

감귤류 과일의 피메트로진 정량을 위한 분석법 개선

전준호^{1,2,3,†} · 전수현^{4,†} · 김민혁⁴ · 김미옥² · 이광원^{4,*}

¹고려대학교 생명환경과학대학원 식품공학과, ²경인지방식품의약품안전청 시험분석센터 유해물질분석과, ³한국식품산업협회 부설 한국식품과학연구원, ⁴고려대학교 일반대학원 생명공학과

Improvement of analytical method for pymetrozine in citrus fruits

Jun-Ho Jeon^{1,2,3,†}, Su-Hyun Chun^{4,†}, Min-Hyuk Kim⁴, Mi-Ok Kim², and Kwang-Won Lee^{4,*}

¹Department of Food Bioscience and Technology, Graduate School of Life and Environmental Science, Korea University

²Division of Hazardous Substances Analysis, Gyeongin Regional Office of Food and Drug Safety

³Korea Advanced Food Research Institute, Korea Food Industry Association

⁴Department of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

Abstract It is difficult to analyze pymetrozine in citrus fruits using the hydromatrix method because of its low efficiency of purification and overlap of matrix and pymetrozine peaks. Liquid-liquid extraction can analyze pymetrozine in citrus fruits using dichloromethane. Since low pH interferes with the extraction of pymetrozine, the extracts of citrus fruits were maintained over pH 7.0 by adding borax buffer and 1 N NaOH in the improved method. According to the improved method, citrus fruits (such as lemon, lime, orange, tangerine, and grapefruit) were extracted and purified for HPLC-photo diode array analysis. The results of validation were as follows: 4.360 µg/kg of limit of detection, 14.533 µg/kg of limit of quantitation, and 0.007 mg/kg of method quantitative limit. Citrus fruits spiked with pymetrozine showed a recovery range from 71.8 to 83.7% and a coefficient of variation below 6%. Thus, the improved method can efficiently analyze pymetrozine in citrus fruits.

Keywords: pymetrozine, analytical method, HPLC-PDA, citrus fruits, liquid-liquid extraction

서 론

현대 농업 활동에 있어 농약은 농산물의 생산성과 품질향상에 크게 기여하는 필수적인 자재이며, 풍족한 식량 공급과 재배 과정의 노동력 감소 및 생산비 절감 등 중요한 역할을 한다. 그러나 농약은 작물의 생장을 방해하는 생물을 죽이기 위한 화합물이기 때문에 노출 정도에 따라 독성을 가지고 있다는 단점이 있다. 따라서 농약을 사용하는 농업인 또는 제조 공정에 관여하는 종사자의 건강을 해칠 우려가 있으며, 농약이 농산물에 일정 이상 잔류 될 경우 그것을 섭취하는 인간의 건강에 심각한 이상을 초래할 수 있다(Jang 등, 2010). 이러한 이유로 식품 내 잔류 농약에 대한 식품 안전 문제는 사회적으로 중요한 이슈가 되어왔다. 정부와 국제 기관들은 과일과 채소에 대해 최대 잔류 허용량(maximum residue limits, MRLs)을 지정하였고, chlordane, dichlorodiphenyl-trichloroethane, toxaphene 등의 화학물질 사용을 배제해왔다(Zhang 등, 2007).

피메트로진(4,5-dihydro-6-methyl-4-[3(3-pyridylmethylene)-amino]-1,2,4-triazin-3(2H)-one)은 pyridine azomethine계열의 화합물로 진딧물, 가루이, 벼멸구와 같이 식물의 즙을 빨아먹는 해충에 대한 선택성을 가진 살충제이며, 섭식 행동에 관여하는 신경 조절의 특수 경로를 방해하는 강력한 항섭식제이다(Fuog 등, 1998; Li 등, 2011). 이러한 피메트로진은 랫트와 마우스를 이용한 연구결과에서 간과 심혈관에 중양을 발생시키는 것으로 보고되어 미국환경보호국(Environmental Protection Agency)에서는 발암 가능성 물질로 분류되어 있다(Zhang 등, 2007). 미국 및 유럽 연합 국가들과 일본을 포함한 많은 나라들에서 채소에 이용되는 피메트로진에 대해 MRLs이 0.02-2.0 mg/kg 사이로 지정되어있고, 우리나라의 경우에는 0.03-3.0 mg/kg의 범위로 설정되어있다(MFDS, 2017a; Shen 등, 2009).

피메트로진은 -0.18의 n-옥탄올/물 분배계수(log P_{ow})와 0.29 g/L의 용해도를 갖는 극성화합물이기 때문에 잔류 농약 분석시 회수율을 높이는 것은 매우 어렵다(Yoon 등, 2013). 식품공전법 상 피메트로진의 분석법은 다공성 구조체를 이용한 하이드로메트릭스법으로 친수성 물질의 정제와 소수성물질의 추출을 위해 액-액 분배과정 대신 이용된다(MFDS, 2017b). 액-액 분배법에서는 발암 가능 물질로 알려진 다이클로로메테인(dichloromethane, DCM)을 많이 이용하기 때문에 분석자의 안전과 환경 오염 문제가 있어 이를 해결한 하이드로메트릭스법을 적용하였다(Hwang 등, 2011; Yoon 등, 2013). 그러나 이는 오렌지나 레몬 같은 감귤류 과일(citrus fruits)에서 정제 능력이 떨어진다. 또한, Hong 등(2011)에 따르면 액-액 분배법이 추출 효율이나 회수율 및 변이

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Kwang-Won Lee, Department of Biotechnology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea
Tel: +82-2-3290-3027
Fax: +82-2-927-1970
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr
Received May 23, 2019; revised June 17, 2019;
accepted June 24, 2019

계수(coefficient of variation, CV) 측면에서 더 적합한 분석법이라고 보고하고 있다.

따라서 이 연구에서는 레몬이나 오렌지와 같은 감귤류 과일에서 잔류 농약인 피메트로진을 분석함에 있어 기존 분석법의 한계점을 파악하고 효율적인 분석을 위해 액-액 분배법을 이용하여 감귤류 과일 내 잔류 농약인 피메트로진의 분석법을 개선하여 회수율을 향상시키고 다양한 감귤류 과일에 대한 적용성을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

감귤류 과일 중 레몬, 라임, 오렌지, 감귤 그리고 자몽을 시료로 사용하였다. 2016년 1월부터 2017년 5월까지 서울과 인천의 지역 시장에서 판매되고 있는 것을 각각 약 2 kg씩 구입하였다. 감귤은 국내산을 사용하였고, 나머지 과일은 수입산을 사용하였다. 모든 시료는 식품공전 일반시험법 4. 식품 중 잔류농약 분석법 4.1.1. 검체 채취 기준표에 따라 과실 전체를 분쇄하여 사용하였다(MFDS, 2017b).

표준품의 제조

피메트로진 표준품은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)에서 구입하였고, 10 mg을 정밀히 칭량한 후 순도(99%)를 고려하여 유기 용매인 메탄올(methanol, MeOH; Burdick & Jackson, Muskegon, MI, USA)에 녹여 500 mg/L 농도가 되도록 표준 원액을 제조하였다.

하이드로매트릭스법의 적용성 검토

식품공전 4.1.4.56에 따라 하이드로매트릭스법을 이용하여 레몬과 오렌지를 전처리 하였으며, 자외선 검출기를 장착한 HPLC를 이용하여 300 nm에서 피메트로진을 분석하였다(MFDS, 2017b).

액-액 분배법의 적용성 검토

분쇄된 각 시료 20 g을 취하여 전처리에 사용하였으며, Yoon 등(2013)이 보고한 액-액 분배법을 토대로 일부 변형하여 기본적인 방법을 구축하였고(Fig. 1A), 방법의 최적화를 위해 다음과 같이 변경하여 결과를 비교하였다. 우선 용매량에 따른 분배 효율을 검증하기 위해 DCM (Burdick & Jackson, Muskegon, MI, USA)을 이용한 분액 단계에서 DCM의 사용량을 변경하였다. 첫 번째 분액 시 DCM의 용량을 100 mL과 80 mL로 달리하였으며, 두 번째와 세 번째 분액 시에는 100, 80, 70, 그리고 50 mL로 달리하여 각 단계별로 피메트로진의 회수율을 비교하였다. 또한 피메트로진 분석이 용이하도록 산성 과일인 시료의 pH를 7.0 이상으로 하는 최적의 용매 조건을 선정하였다.

개선된 시료 전처리 방법

분쇄된 각 시료 20 g을 취하여 전처리에 사용하였으며, 최종적으로 선정된 각 시료의 전처리 방법은 Fig. 1B와 같다. 레몬과 라임의 경우 25 mL의 붕사 완충 용액(borax buffer)과 100 mL의 MeOH을 넣고 1 N NaOH 5 mL을 추가한 뒤 1시간 동안 진탕하여 추출하였다. 오렌지, 감귤 그리고 자몽의 경우, 15 mL의 붕사 완충 용액과 100 mL의 MeOH를 넣고 1 N NaOH 1 mL을 추가한 뒤 1시간 동안 진탕하여 추출하였다. 각각의 추출물은 MeOH을 이용하여 200 mL로 정용한 뒤 이 중 100 mL를 취하여 40°C 수욕상에서 감압 농축하였다. 농축물을 50 mL의 포화 염화나트륨

수용액에 녹인 뒤, 1 N NaOH 1 mL과 80 mL의 DCM을 첨가하여 흔들어 섞은 후 정치 시켰다. DCM 층을 무수황산나트륨에 통과시켜 취하였다. 다시 70 mL의 DCM과 흔들어 섞은 후 DCM 층을 얻는 과정을 반복한 뒤 먼지의 DCM 층과 합쳤으며, 40°C 수욕상에서 감압 농축하여 용매를 완전히 날린 후 DCM 5 mL에 녹였다.

분석 전 시료 전처리 액의 정제를 위해 미리 DCM으로 활성화 시킨 실리카 고체상 추출(SPE) 카트리지(1 g, 6 cc; Waters, Milford, MA, USA)에 전처리 액을 넣고 아세트산에틸(ethyl acetate; Merck, Darmstadt, Germany) 10 mL로 세척한 다음 MeOH와 아세트산에틸 혼합액(5:95, v/v) 20 mL로 용출시켰다. 이를 40°C 수욕상에서 감압 농축하여 용매를 완전히 날린 후 30% MeOH 5 mL에 녹였다. 0.2 µm PTFE syringe filter를 이용해 여과한 후 시험용액으로 사용하였다.

분석 기기 조건

피메트로진 분석에 사용한 HPLC는 nanospace SI-2 (Shiseido, Tokyo, Japan)이며, detector는 광 다이오드 검출기(photo diode array, PDA)를 이용하였다. 컬럼은 capcell pak C8 (4.6×250 mm, 5 µm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 컬럼의 온도는 40°C로 유지하였다. 시료 주입량은 20 µL이며, 분석 시간은 15분이었다. 30% MeOH을 이동상으로 하여 분당 0.8 mL의 속도로 분석하였으며, 300 nm의 파장에서 분석하였다.

유효성 검증

검량선 작성을 위해 표준 원액을 30% MeOH으로 희석하여 20, 50, 100, 200, 500, 1000 µg/L의 농도로 제조하여 분석하였다. 피메트로진 표준 용액 0.1과 1.0 mg/L을 HPLC에 20 µL씩 주입하여 크로마토그램 상의 signal (S)과 noise (N)의 비(S/N ratio)를 구하여 검출 한계(limit of detection, LOD) 및 정량 한계(limit of quantitation, LOQ)를 설정하였다. 또한 분석정량한계(method quantitative limit, MQL)는 Yoon 등(2013)이 보고한 바와 같이 분석 기기의 LOQ와 시료량 및 분석 과정 중의 희석 배수를 고려하여 산출하였다.

재현성 검정을 위해 피메트로진 표준 용액 2 mg/L를 1.5 mL씩 각 시료에 주입하여 최종적으로 0.3 mg/kg이 되도록 하였으며, 추출 및 정제과정을 거쳐 크로마토그램 상의 머무름 시간과 peak 면적 및 높이의 변화, 회수율을 측정하였다. 반복 실험을 통해 얻은 결과를 토대로 CV를 계산하여 실험의 재현성을 확인하였다.

결과 및 고찰

감귤류 과일에서 하이드로매트릭스법의 적용성 검토

순수한 레몬과 오렌지를 대상으로 하여 피메트로진을 분석해 본 결과, 피메트로진의 머무름 시간인 6.5분에서 매트릭스의 peak가 있어 정확한 피메트로진의 분석에 어려움이 있었다(Fig. 2B-C). 또한 레몬과 오렌지에 각각 피메트로진 표준 용액을 주입하여 최종 농도가 1 mg/kg이 되도록 한 후 분석한 결과 역시 피메트로진의 정량이 불가능 하였다(Fig. 2D-E).

식품공전에서는 극성을 띠는 농약에 대해 대부분 액-액 분배법을 이용하도록 되어있으나 피메트로진 분석법만이 하이드로매트릭스법을 이용하도록 되어있다(MFDS, 2017b). 비록 하이드로매트릭스법이 액-액 분배법에 사용되는 유기 용매의 위험성으로부터 작업자의 안전을 확보하고, 액-액 분배 시 층 분리의 어려움을 해결할 수는 있다(Yoon 등, 2013). 그러나 추출단계에서 다

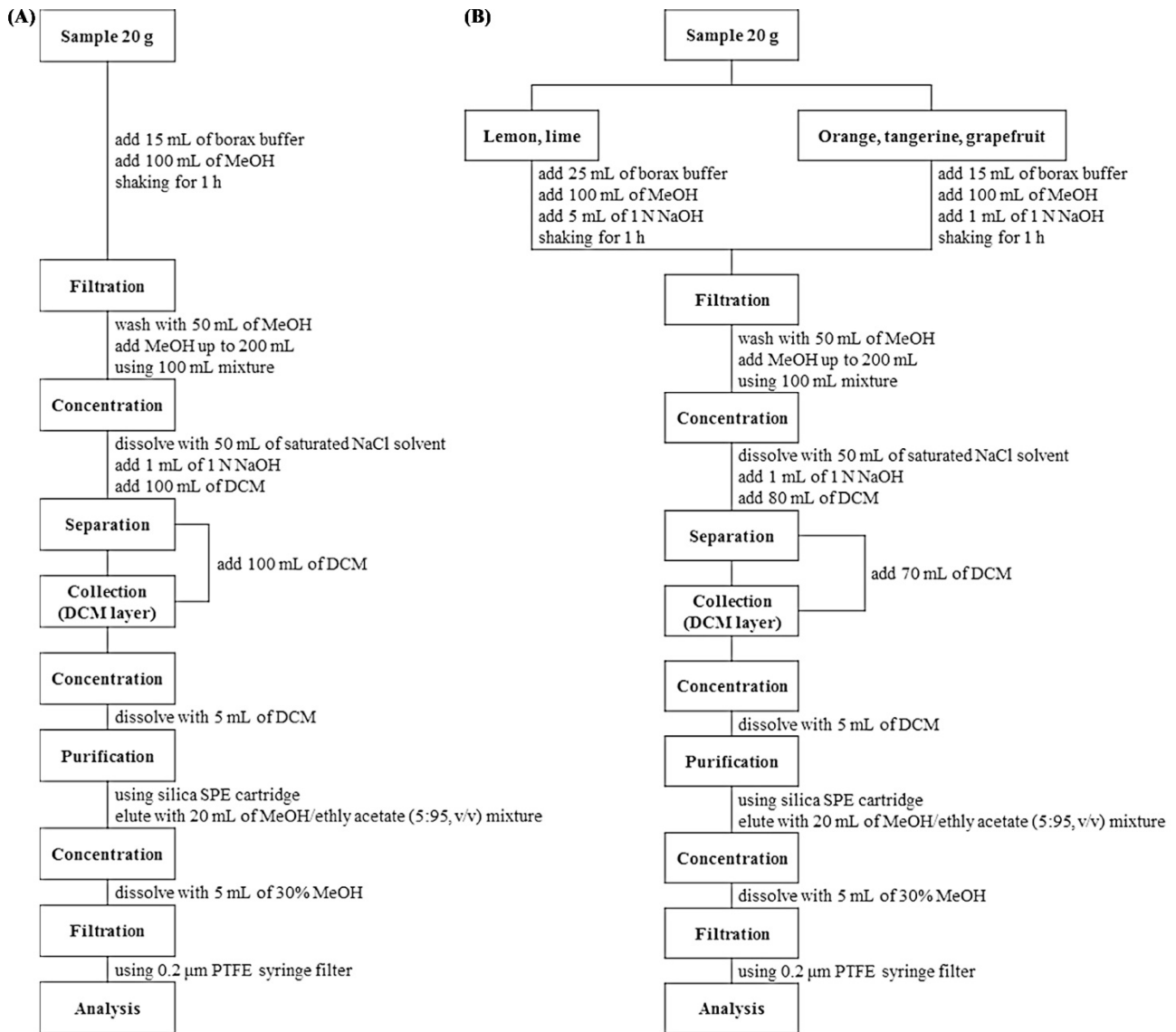


Fig. 1. Scheme of standard and improved method for pymetrozine analysis using the liquid-liquid extraction. (A) Standard method for pymetrozine analysis was modified liquid-liquid extraction method from Yoon et al. (2013). (B) An improved method for pymetrozine analysis was changed the two steps. The first step, sample preparation was changed to separate according to pH of citrus fruits and adjust pH by adding 1 N NaOH. The second step, separation of the dichloromethane (DCM) layer was changed to decrease the added volume of DCM.

공성 구조토를 이용한 방법은 감귤류 과일에 대해서 그 정제 효율이 좋지 않아 정확한 정량을 할 수 없다는 한계점을 파악할 수 있었다. 선행 연구들에 의해 보고된 바에 따르면, 피메트로진을 분석할 때 하이드로매트릭스법에 비해 DCM을 이용한 액-액 분배법의 분석 효율이 더 높았으며, 또한 정제과정에서 카트리지의 이용은 피메트로진의 분석 효율을 높였다(Hong 등, 2011; Yoon 등, 2013). 따라서 감귤류 과일 내 피메트로진의 분석법으로 DCM을 이용한 액-액 분배법을 적용해보았다.

용매량에 따른 액-액 분배 효율 검증

액-액 분배 단계에서 추출 용매로 이용되는 DCM은 발암 가능성 물질로 알려져 있어, 이를 과량으로 사용하는 것은 분석자의 안전에 위해를 가할 수 있을 뿐 아니라 분석 시 발생하는 폐액의 처리과정에서도 환경오염을 야기할 수 있다(Hwang 등, 2011; IARC, 1987). 따라서 DCM의 사용량을 줄이면서 분배 효율은 증

가시키는 최적 용량의 선정이 필요하다.

선행 연구 방법 중 액-액 분배 첫번째 단계에서 DCM의 첨가량을 각각 100과 80 mL로 변경하였으며, 피메트로진의 회수율 측정 결과 100 mL을 첨가하여 분배 시 약 56.2%의 회수율을 보인 데 비해, 80 mL로 낮추었을 때 약 59.4%의 회수율을 보였다(Table 2). 두번째 분배 시 DCM의 첨가량을 100, 80, 70, 그리고 50 mL로 변경하였으며, 각각의 피메트로진 회수율은 13.7, 15.9, 16.1, 그리고 11.7%로 나타났다(Table 2). 반면, 세번째 분배 단계에서는 DCM의 첨가량을 두번째 단계와 동일하게 변경하여 각 회수율을 측정하였으나, 피메트로진이 검출되지 않았다(Table 2). 따라서 액-액 분배 시 두번째 단계까지만 진행하여도 피메트로진이 모두 추출됨을 확인할 수 있었으며, 각 단계별로 DCM의 첨가량은 기존 100 mL보다 낮은 용량인 80과 70 mL를 첨가하여 추출하는 것으로 변경하였다.

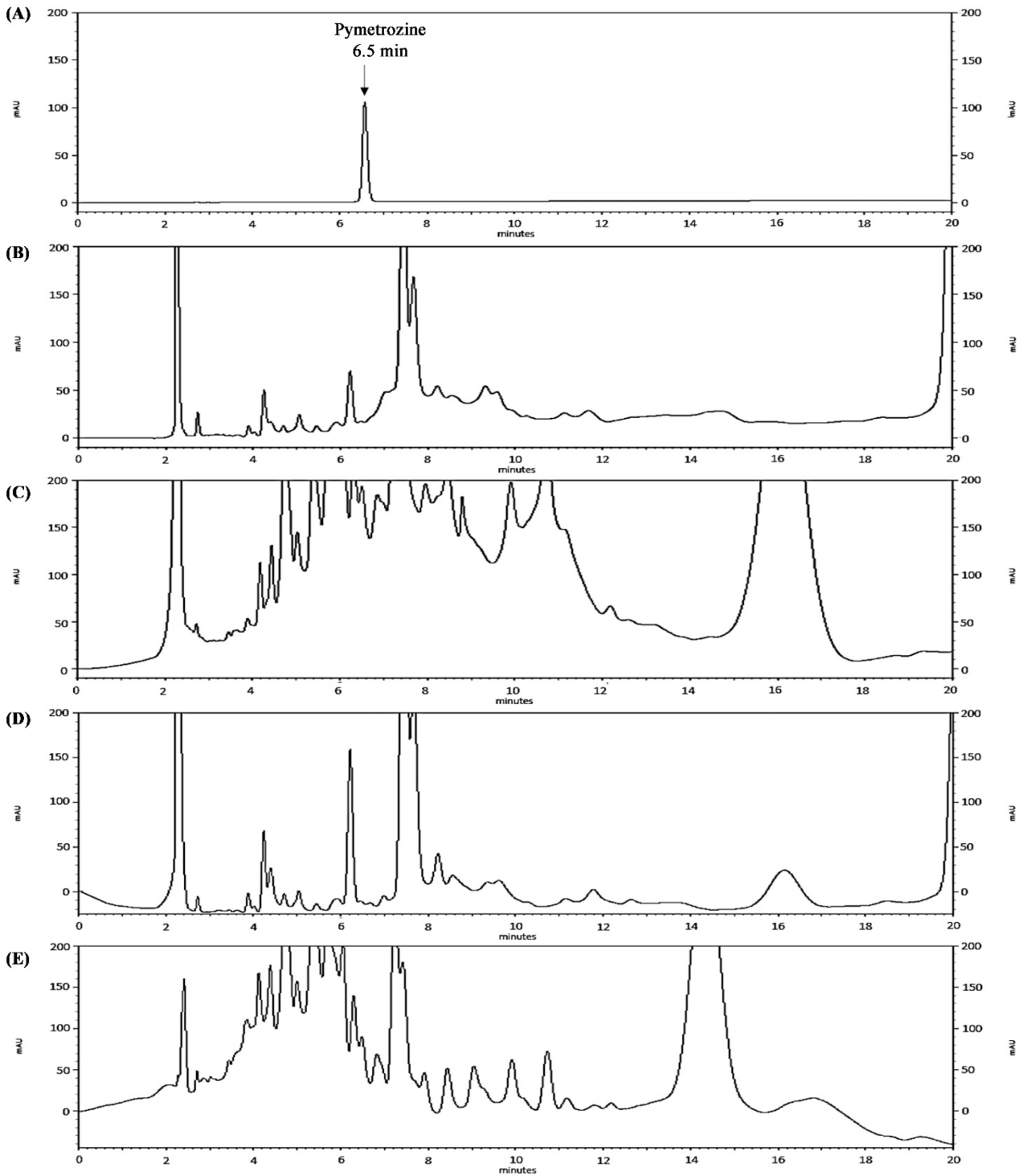


Fig. 2. Chromatography of pymetrozine in lemon or orange using hydromatrix method. Chromatography of pymetrozine standard (1 mg/kg) (A), lemon (B), orange (C), and spiked pymetrozine (1 mg/kg) in lemon (D) or orange (E). Retention time of pymetrozine is 6.5 min.

양자 부가 반응의 억제

오렌지를 대상으로 Fig. 1A의 전처리 방법에 따른 분석방법의 재현성을 평가한 결과, 0.03과 0.3 mg/kg에 대한 평균 회수율이 각각 74.7과 79.5%이었으며, CV는 두 농도 모두 6.6%로 나타났다(Table 1). 이는 잔류농약 분석 기준인 70-120% 이내의 회수율과 10% 미만의 CV를 만족하였으나, 오렌지보다 강한 산성을 띄는 레몬이나 라임에 대해서는 pH를 조절할 필요가 있다. 특히 피

메트로진은 짝산의 pKa가 4.06인 약염기성 화합물로서 약염기성 원충 용액을 가해 pH를 조절함으로써 이온화를 억제해 유기용매에 녹을 수 있도록 해야한다. 감귤류 과일인 레몬, 라임, 오렌지, 감귤, 그리고 자몽은 Fig. 1A의 전처리 방법에 따라 진탕 추출 후 200 mL의 MeOH로 정용 시 25°C에서 pH가 각각 4.46, 4.27, 5.65, 5.31, 그리고 5.12로 나타났다(Table 3). 따라서 추출 과정 중 추가적으로 1 N NaOH를 시료에 첨가하여 pH를 7.0 이상으로 만

Table 1. Reproducibility of the standard method¹⁾ for pymetrozine analysis in orange

Fortification level (mg/kg)	Recovery (%)			Mean ²⁾ (%)	CV ³⁾ (%)
	1	2	3		
0.03	80.0	70.3	73.8	74.7	6.6
0.3	85.4	77.6	75.4	79.5	6.6

¹⁾Modified method (liquid-liquid extraction) of Yoon et al.(2013)²⁾Average of recovery rate=sum of recovery rate/n⁴⁾³⁾Coefficient of variation=standard deviation/average×100⁴⁾n=3**Table 2. Efficiency in each separation step of standard method¹⁾ according to the added volume of dichloromethane (DCM)**

Separation step	DCM volume (mL)	Recovery (Mean ²⁾ ±CV ³⁾ , %)
First	100	56.2±4.5
	80	59.4±7.5
Second	100	13.7±4.2
	80	15.9±2.8
	70	16.1±3.5
	50	11.7±11.6
Third	100	N.D. ⁴⁾
	80	N.D.
	70	N.D.
	50	N.D.

¹⁾Modified method (liquid-liquid extraction) of Yoon et al. (2013)²⁾Average of recovery rate=sum of recovery rate/n³⁾³⁾Coefficient of variation=standard deviation/average×100⁴⁾Not detected⁵⁾n=3

들어 양자 부가 반응을 억제하였다. 오렌지, 감귤, 그리고 자몽의 경우, 15 mL의 붓사 완충 용액에 1 mL의 1 N NaOH를 추가하였을 때 pH가 7.0 이상을 유지함을 확인하였다(Table 3). 하지만 레몬과 라임의 경우, 크로마토그램상 피메트로진의 머무름 시간인 5.7분에서 매트릭스 peak에 의한 간섭이 발견되어(Fig. 3B-C), 붓사 완충 용액의 첨가량을 25 mL로 늘려서 매트릭스의 간섭을 줄였으며(Fig. 3D-E), 5 mL의 1 N NaOH를 추가함으로써 pH는 각각 7.06과 7.51로 7.0 이상을 유지함을 확인하였다(Table 3).

Table 3. pH of citrus fruits extracts depending on the added volume of borax buffer and 1 N NaOH

Sample	pH				
	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾	D ⁴⁾	E ⁵⁾
Lemon	4.27	4.49	5.12	7.33	7.06
Lime	4.46	4.54	5.14	7.20	7.51
Orange	5.65	6.20	7.64	-	-
Tangerine	5.31	5.62	7.38	-	-
Grapefruit	5.12	5.59	7.21	-	-

¹⁾Sample only²⁾added 15 mL of borax buffer³⁾added 15 mL of borax buffer with 1 mL of 1 N NaOH⁴⁾added 15 mL of borax buffer with 5 mL of 1 N NaOH⁵⁾added 25 mL of borax buffer with 5 mL of 1 N NaOH

개선된 분석법의 유효성 검증

최종 확립된 감귤류 과일의 피메트로진 분석방법(Fig. 1B)의 신뢰성을 검증하기 위해 피메트로진 표준품을 이용하여 검량선을 작성하고 직선성(r^2)을 확인한 결과, 0.9999의 직선성을 나타내었으며, LOD와 LOQ는 각각 4.360과 14.533 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타났다(Table 4). 또한 연구에 사용된 분석방법을 통해 신뢰성 있게 정량 할 수 있는 한계를 의미하는 MQL은 LOQ (ng), 주입전 시료 용액량(mL), 희석배수, 주입량(μL), 및 시료량을 토대로 산출할 수 있다. 개선된 분석방법을 통해 얻어진 각 수치는 0.29 ng (LOQ), 주입전 시료 용액량 5 mL, 2배 희석, 20 μL 주입, 시료량 20 g이었으며, 이를 토대로 계산된 MQL은 0.007 mg/kg이었다(Table 4). 식품공전 잔류 농약 분석법 실무해설서에서는 MQL이 잔류 농약 분석법 기준인 0.05 mg/kg 이하 또는 MRLs의 1/2 이하까지 검출 가능하도록 추천하고 있다(MFDS, 2017c; Yoon 등, 2013). 따라서 얻어진 MQL은 0.007 mg/kg 이었으므로 잔류 농약 분석법 기준에 적합 하였고, 피메트로진에 대하여 설정된 MRLs (0.03-3.0 mg/kg)의 1/2 이하까지 검출이 가능함을 확인하였다.

개선된 분석법의 재현성 검정을 위해 각 시료에서 피메트로진의 크로마토그램 상 머무름 시간과 매트릭스 peak와의 겹침을 확인한 결과, 피메트로진의 머무름 시간인 5.7분에서 매트릭스 peak와의 겹침은 발견되지 않았다(Fig. 4). 또한 레몬, 라임, 오렌지, 감귤, 그리고 자몽에서 0.3 mg/kg에 대한 평균 회수율을 확인한 결과, 각각 71.8, 72.0, 79.9, 79.7, 그리고 83.7%으로 나타났으며,

Table 4. Validation and reproducibility of the improved method for pymetrozine analysis in citrus fruits

Sample ¹⁾	Reproducibility					Validation			
	Recovery (%)			Mean ²⁾ (%)	CV ³⁾ (%)	r^2	LOD ⁴⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ⁵⁾ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	MQL ⁶⁾ (mg/kg)
	1	2	3						
Lemon	73.6	70.2	71.5	71.8	2.4	0.9999	4.360	14.533	0.007
Lime	70.9	73.6	71.4	72.0	2.0				
Orange	75.5	83.1	81.2	79.9	4.9				
Tangerine	79.7	80.5	78.8	79.7	1.1				
Grapefruit	78.1	85.6	87.3	83.7	5.9				

¹⁾Spiked pymetrozine until 0.3 mg/kg²⁾Average of recovery rate=sum of recovery rate/n⁷⁾³⁾Coefficient of variation=standard deviation/average×100⁴⁾Limit of detection⁵⁾Limit of quantitation⁶⁾Method quantitative limit=[LOQ (ng)×sample volume before injection (mL)×dilution factor]/[injection volume (μL)×total sample (g)]⁷⁾n=3

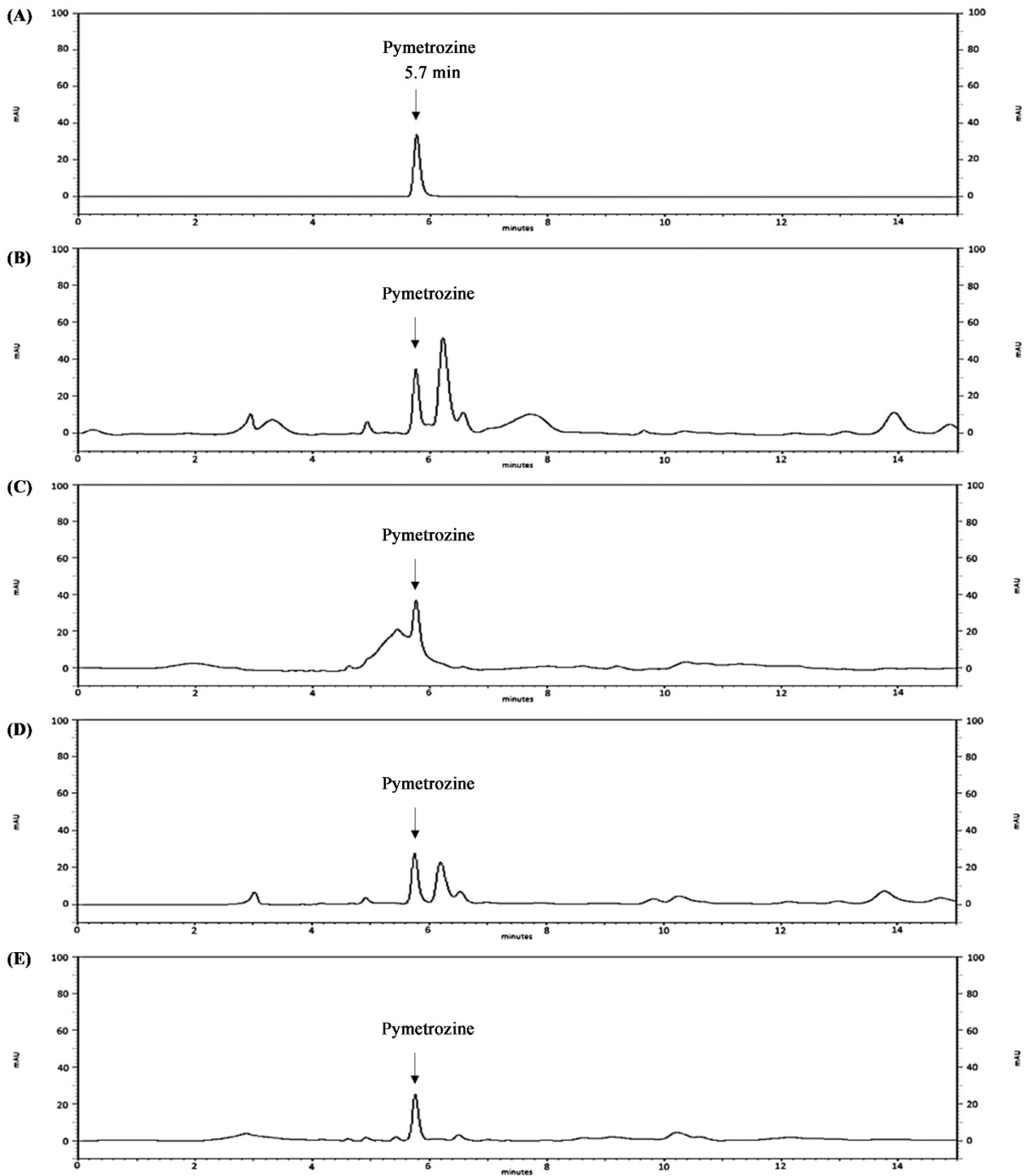


Fig. 3. Chromatography of pymetrozine in lemon or lime using liquid-liquid extraction method. Chromatography of pymetrozine standard (0.3 mg/kg) (A), spiked pymetrozine (0.3 mg/kg) in lemon (B) or lime (C) added 15 mL of borax buffer with 5 mL of 1 N NaOH, and spiked pymetrozine (0.3 mg/kg) in lemon (D) or lime (E) added 25 mL of borax buffer with 5 mL of 1 N NaOH. Retention time of pymetrozine is 5.7 min.

각 시료의 CV는 2.4, 2.0, 4.9, 1.1, 그리고 5.9%로 나타났다(Table 4). 이는 잔류농약 분석 기준인 70-120%의 회수율을 만족하였고, 10% 미만의 CV값을 만족하였다. 따라서 개선된 분석방법은 감귤류 과일에서 피메트로진의 분석에 유효하다고 판단된다.

요 약

이 연구에서는 레몬이나 오렌지와 같은 감귤류 과일에서 잔류농약인 피메트로진을 분석함에 있어 기존 분석법의 한계점을 파

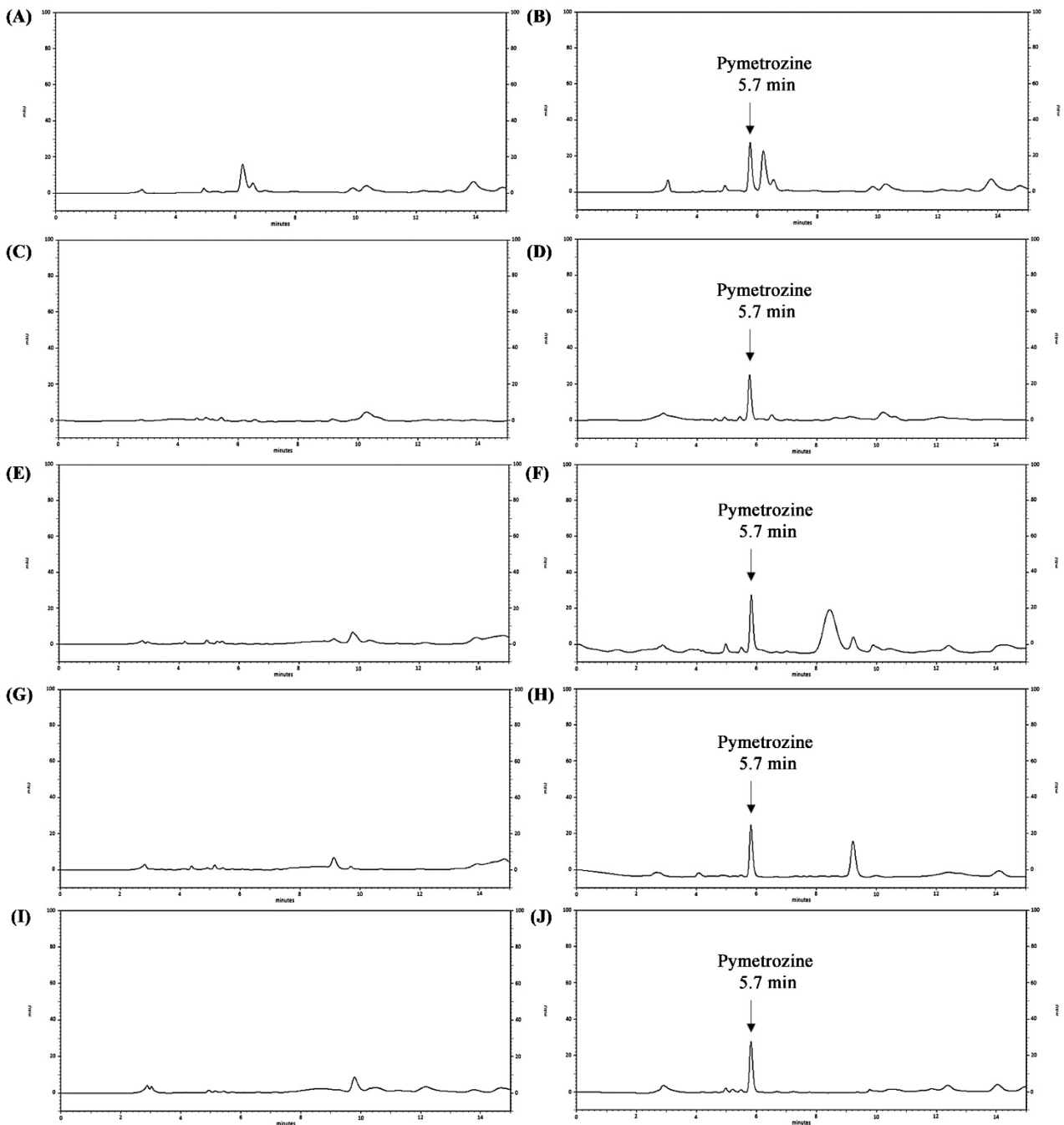


Fig. 4. Chromatography of pymetrozine in citrus fruits using improved liquid-liquid extraction method. Chromatography of lemon (A and B), lime (C and D), orange (E and F), tangerine (G and H), and grapefruit (I and J). Chromatography of naïve citrus fruits (A, C, E, G, and I) and spiked pymetrozine (0.3 mg/kg) in citrus fruits (B, D, F, H, and J). Retention time of pymetrozine is 5.7 min.

악하고 효율적인 분석을 위해 이를 개선하고자 하였다. 감귤류 과일의 경우 산성을 띄고 있어 기존의 하이드로매트릭스법을 이용하여 피메트로진을 분석 시 효율적인 정제 능력이 부족하여 피메트로진의 머무름 시간에 많은 매트릭스 peak가 나타나 검출에 어려움이 발견되었다(Fig. 2). 이에 액-액 분배법을 이용하여 감귤류 과일의 피메트로진을 분석하였으나 액-액 분배 단계에서 추출 용매로 이용되는 DCM은 발암 가능성 물질로 알려져 있어, DCM의 사용량을 낮추면서 분배 효율에 영향을 미치지 않는 용량(첫번째 분배 시 80 mL과 두번째 분배 시 70 mL 첨가)을 설정하였다(Table 2). 또한 액-액 분배법에 따라 감귤류 과일을 추출

할 경우 pH가 6.0 이하로 나타났으며, 이는 피메트로진의 추출 효율에 영향을 미치게 되므로 붕사 완충 용액과 1 N NaOH를 레몬과 라임의 경우에는 각각 25와 5 mL, 오렌지, 감귤 및 자몽의 경우에는 각각 15와 1 mL을 첨가하여 감귤류 과일 추출물의 pH를 7.0 이상으로 유지하였다(Table 3). 최종적으로 개선된 액-액 분배법(Fig. 1B)에 따라 5 종류의 감귤류 과일인 레몬, 라임, 오렌지, 감귤, 그리고 자몽을 추출 및 정제 후 HPLC-PDA를 이용하여 분석하였다. 분석법의 유효성 검증 결과, 검량선을 통해 얻은 직선성(r^2)은 0.9999로 나타났고, LOD와 LOQ는 각각 4.360과 14.533 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. MQL은 0.007 mg/kg 으로 현재 공전 상 폐배

트로진에 대하여 설정된 MRLs인 0.03-3.0 mg/kg의 1/2 이하까지 검출 가능하였다(Table 4). 또한 레몬, 라임, 오렌지, 감귤 및 자몽에 각각 피메트로진을 첨가하여 최종적으로 분석 값이 0.3 mg/kg이 되도록 실험한 결과, 각각의 평균 회수율은 71.8, 72.0, 79.9, 79.7, 및 83.7%이었고, CV는 각각 2.4, 2.0, 4.9, 1.1, 및 5.9%로 나타나 잔류 농약 분석 기준인 70-120%의 회수율과 10% 이내의 CV값을 만족하였다(Table 4). 따라서 본 연구를 통해 개선된 분석법은 산성을 띄는 감귤류 과일에서 피메트로진의 분석법으로 사용 가능함을 확인하였으며, 또한 향후 수입되는 산성도가 높은 과일의 피메트로진 분석 시에도 적용 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 고려대학교 BK21 플러스 생명공학원 사업단의 지원을 받아 수행되었다(This study was supported by a Korea University Grant and partially supported by School of Life Sciences and Biotechnology of Korea University for BK21 PLUS).

References

- Fuog D, Fergusson SJ, Flückiger C. Pymetrozine: a novel insecticide affecting aphids and whiteflies. pp. 40-49. In: Insecticides with novel modes of action: mechanisms and application. Ishaaya, I, Degheele, D (ed). Springer Berlin Heidelberg, Berlin Heidelberg (1998)
- Hong JH, Lee CR, Lim JS, Lee KS. Comparison of analytical methods and residue patterns of pymetrozine in *Aster scaber*. B. Environ. Contam. Tox. 87: 649-652 (2011)
- Hwang JI, Jeon YH, Kim HY, Kim JH, Lee YJ, Park JY, Kim DH, Kim JE. Application of macroporous diatomaceous earth column for residue analysis of insecticide endosulfan in herbal medicines. Korean J. Environ. Agr. 30: 60-67 (2011)
- IARC. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs. Vol. 1-42. Lyon, France. pp. 194-195 (1987)
- Jang M, Moon H, Kim T, Yuk D, Kim J, Park S. Dietary risk assessment for pesticide residues of vegetables in Seoul, Korea. Korean J. Nutr. 43: 404-412 (2010)
- Li C, Yang T, Huangfu W, Wu Y. Residues and dynamics of pymetrozine in rice field ecosystem. Chemosphere 82: 901-904 (2011)
- MFDS. Pymetrozine. Pesticide MRLs in food. Notification No. 2017-57. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2017a)
- MFDS. Food code. Notification No. 2017-57. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2017b)
- MFDS. Practical guide to analytical methods for residual pesticide in food. 5th ed. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2017c)
- Shen G, Hu X, Hu Y. Kinetic study of the degradation of the insecticide pymetrozine in a vegetable-field ecosystem. J. Hazard. Mater. 164: 497-501 (2009)
- Yoon JY, Moon HR, Park JH, Han YH, Lee KS. Establishment of analytical method for pymetrozine residues in crops using liquid-liquid extraction (LLE). Korean J. Pestic. Sci. 17: 107-116 (2013)
- Zhang X, Cheng X, Wang C, Xi Z, Li Q. Efficient high-performance liquid chromatography with liquid-liquid partition cleanup method for the determination of pymetrozine in tobacco. Ann. Chim. Rome. 97: 295-301 (2007)