

Research Article



CrossMark

Open Access

농산물 및 경작지 토양 시료 중 Benzo(a)pyrene 신속잔류분석법 개선 연구

김희곤¹, 함헌주¹, 홍경숙³, 신희창³, 허장현^{1,2*}

¹강원대학교 친환경농산물안전성센터, ²강원대학교 농업생명과학대학 환경융합학부,
³국립농산물품질관리원 시험연구소 안전성분석과

A Study on Rapid Residual Analysis of Benzo(a)pyrene in Agricultural Products and Soils

Hee-Gon Kim¹, Hun-Ju Ham¹, Kyong-Suk Hong³, Hee-Chang Shin³, and Jang Hyun Hur^{1,2*} (¹Environment Friendly Agricultural Products Safety Center, Chuncheon 24341, Korea, ²School of Natural Resources and Environmental Science, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea, ³Division of Safety Analysis, Experiment & Research Institute, National Agriculture Products Quality Management Service, Gimcheon 39660, Korea)

Received: 13 January 2020/ Revised: 14 February 2020/ Accepted: 19 March 2020

Copyright © 2019 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Hee-Gon Kim

<https://orcid.org/0000-0002-2636-8802>

Jang Hyun Hur

<https://orcid.org/0000-0003-2592-7147>

Abstract

BACKGROUND: Benzo(a)pyrene is a highly toxic substance which has been listed as a Group I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer. There have been numerous studies by researchers worldwide on benzo(a)pyrene. Soxhlet, ultrasound-assisted, and liquid-liquid extractions have been widely used for the analysis of benzo(a)pyrene. However these extraction methods have significant drawbacks, such as long extraction time and large amount of solvent usage. To overcome these disadvantages, we aimed to establish a rapid residual analysis of benzo(a)pyrene content in agricultural products and soil samples.

METHODS AND RESULTS: A Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) method was used as the pretreatment procedure. For rapid residual analysis of benzo(a)pyrene, a modified QuEChERS method were used, and the best condition was demonstrated after

various performing instrument analysis. The extraction efficiency of this method was also compared with Soxhlet extraction, the current benzo(a)pyrene extracting method. Although both methods showed high recovery rates, the rapid residual analysis method markedly reduced both the measurement time and solvent usage by approximately 97% and 96%, respectively.

CONCLUSION: Based on these results, we suggest the rapid residual analysis method established through this study, faster and more efficient analysis of residual benzo(a)pyrene in major agricultural products such as rice, green and red chili peppers and also soil samples.

Key words: Agricultural products, Benzo(a)pyrene, QuEChERS, Rapid residual analysis, Soil

서론

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)는 유기물의 불완전연소 시 부산물로 발생하는 2개 이상의 방향족 고리로 축합 구성된 유도체 화합물로, Codex 및 JECFA(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)의 발암가능물질로 우선순위목록에 포함하는 등 세계적으로 관

*Corresponding author: Jang Hyun Hur
Phone: +82-33-257-6441; Fax: +82-33-259-5563;
E-mail: jhhur@kangwon.ac.kr

심의 대상으로 분류되고 있다[1-3]. 그 중 benzo(a)pyrene은 대표적인 PAHs로 국내에서는 benzo(a)pyrene의 안전성 문제를 해결하기 위해 유통식품 중 benzo(a)pyrene을 포함한 PAHs의 함량에 대한 증장기 모니터링을 지속적으로 수행하고 있다[3, 4]. 현재 benzo(a)pyrene에 대한 잔류허용기준 설정 및 모니터링 연구는 식용유지 및 어패류 혹은 가공식품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만 농산물 중 benzo(a)pyrene에 대한 잔류허용기준 설정 및 모니터링 연구는 상대적으로 미비한 실정이다[5, 6]. 현재 benzo(a)pyrene에 대한 분석법으로는 환경부에서 고시한 토양오염공정시험기준"에서 제시하고 있는 속슬렛 분석법과, 식품의약품안전평가원에서 발행한 "벤조피렌 시험법 실무해설서"에서 제시하고 있는 초음파 추출법, 액-액 추출법 등이 많이 사용되고 있으나, 이와 같은 분석법은 분석 시 많은 시간이 소요되며, 과량의 용매가 사용되기 때문에 식품 또는 환경시료 중 benzo(a)pyrene에 대한 분석 시 효율적인 신속분석법이 필요한 실정이다[7, 8]. 따라서 본 연구에서는 현재 전 세계적으로 식품 및 농산물 시료 중 잔류농약 분석 시 신속분석법으로 널리 사용되어지고 있는 QuEChERS분석법 개선을 통해 식품, 농산물, 토양 등 다양한 시료에 대한 benzo(a)pyrene 분석에 사용될 수 있는 신속잔류분석법을 확립하여 benzo(a)pyrene에 대한 분석능력 개선 및 안전관리에 일조하고자 하였다.

재료 및 방법

시험물질

Benzo(a)pyrene은 PAHs 중 인체발암물질로 가장 잘 알려진 물질로서 안전성에 대한 문제가 확대 되고 있다. 본 연구에서 회수를 시험을 위해 사용된 benzo(a)pyrene은 Sigma-aldrich (Saint Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 화학구조는 Fig. 1과 같다.

시험시약 및 기구

본 연구에서는 acetonitrile, acetone, n-hexane (Merk, Darmstadt, Germany), sodium sulfate anhydrous, sodium chloride (Daejung, Siheung, Korea) QuEChERS kit (Phenomenex, Torrance, USA), PSA dSPE (BEKOLut, Bruchmühlbach-Miesau, Germany)를 이용하여 시료를 추출하였다. 분석 시 homogenizer (Kinematica, Luzern, Switzerland), Centrifugal separator (Beckman coulter life science, Brea, USA), Centrifugal separator (Hanil science, Gimpo, Korea)를 이용하여 benzo(a)pyrene을 분석하였다.

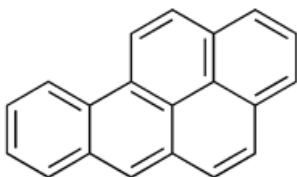


Fig. 1. Chemical structure of benzo(a)pyrene.

대표시료 선정 및 시료 준비

대표시료는 우리나라 국민들의 주식인 쌀과 양념 농산물 중 다소비 되는 풋고추와 홍고추, 작물을 재배하는 토양을 시료로 선정하여 이를 이용한 QuEChERS를 이용한 신속분석법 확립을 수행하였다. 농산물시료 쌀, 풋고추, 홍고추는 시중에서 구입하여 마쇄 후 쌀은 10 g, 풋고추, 홍고추는 5 g 을 사용하였으며, 토양시료는 친환경 논농지의 토양을 자연건조시킨 후 2 mm 체에 통과한 토양시료 10 g을 측정하여 conical tube에 넣어 분석 시 사용하였다.

전처리 분석법

Benzo(a)pyrene에 대한 신속 전처리 분석법 확립을 위해 여러 문헌에서 신속분석법으로 많이 시도되고 있는 QuEChERS 분석법을 전처리 방법 및 추출용매에 따른 추출효율을 비교·분석하였다. 분석은 쌀, 풋고추, 홍고추, 토양 각각의 시료를 습윤화 과정 없이 conical tube에 옮겨 증류수, acetonitrile 10 mL를 첨가 후, 고추시료는 작물체내 침투해 있는 benzo(a)pyrene 추출을 위해 마쇄추출(3 min, 20,000 rpm)을 진행하였다. 그 후 각 시료가 담겨있는 conical tube에 MgSO₄, NaCl이 함유된 QuEChERS 분석 kit (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g sodium citrate, 0.5 g disodium citrate sesquihydrate)를 넣고 진탕(1,500 rpm, 1 min) 및 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 상정액을 0.2 μm membrane filter에 통과시켜 여과 후 기기분석을 진행하였다. 동일한 분석법에 PSA dSPE 과정을 추가한 전처리 분석법과 QuEChERS 분석 kit를 대신하여 sodium sulfate anhydrous, sodium chloride를 첨가한 전처리 분석법에 대한 추출효율을 평가한 후 적합한 전처리 분석법을 선정하였다. 선정된 전처리 분석법에 acetonitrile, n-hexane, acetonitrile:n-hexane (9:1, v/v), acetone을 추출용매로 하여 용매조건별 추출효율을 비교 분석하여 농산물(쌀, 풋고추, 홍고추) 및 토양 시료 중 benzo(a)pyrene 분석 시 적합한 전처리 분석법을 확인하고자 하였다.

기기 분석 및 조건

본 연구에서는 HPLC-FLD (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), GC-MS/MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), LC-MS/MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)를 이용하여 각 기기별 최적의 기기분석조건을 확립하여 분석을 진행하였다. HPLC-FLD는 최신문헌을 통해 benzo(a)pyrene의 여기파장과 방출파장을 조사한 후[9], 기기분석하여 최적의 감도를 보이는 파장을 확인하였다. 분석 컬럼은 Venusil PAH (Agela Technologies, Wilmington, USA)를 사용하였으며, 여기파장 260 nm, 방출파장 420 nm에서 가장 높은 감도를 보였다. GC-MS/MS 및 LC-MS/MS는 scan 분석하여 최적의 Multiple-Reaction Monitoring (MRM) 조건을 확인하였다.

회수율 시험

농산물 시료 쌀, 고추(풋고추, 홍고추)를 시중에서 구입하여 마쇄한 후 쌀 10 g, 고추(풋고추, 홍고추) 5 g을 칭량하였

으며, 토양시료는 자연건조 시켜 2 mm 체에 통과시킨 후 10 g을 칭량하여 회수율 시험에 사용하였다. 회수율 시험은 수준 1 (10 µg/kg), 수준 2 (50 µg/kg), 수준 3 (100 µg/kg)의 3농도를 7반복으로 각각의 시료에 가하였으며, 30분 동안 방치하여 표준물질을 시료에 완전히 흡수시킨 후 수행하였다.

유효성 검증

본 연구의 QuEChERS 분석을 활용한 신속분석법의 신뢰성 확보를 위해 분석법에 대한 유효성 검증을 수행하였으며, 유효성 검증 시험은 '시험법 마련 표준 절차 AOAC 가이드 라인'에 준하여 수행하였다[10].

결과 및 고찰

전처리 분석법에 따른 추출효율 결과

농산물 및 토양 시료 중 benzo(a)pyrene 분석 시 적합한 전처리 분석법을 선정하기 위해 전처리 방법에 따른 회수율

을 3반복 분석하였으며, δ SPE 과정을 거치지 않고 MgSO₄, NaCl이 함유된 QuEChERS 분석 kit를 넣고 진탕 및 원심 분리 후 여과하여 분석한 방법에서 가장 높은 수준의 추출효율을 보였다(Table 1).

선정한 추출방법 중 추출용매에 따른 회수율을 3반복 분석한 결과, 4종의 추출용매 중 acetonitrile을 이용하여 분석하였을 때 가장 높은 수준의 추출효율을 보였다(Table 2).

본 연구에서 확인된 QuEChERS 분석을 활용한 신속분석법과 현행 benzo(a)pyrene 분석 시 추출효율이 우수하여 다양한 분야에서 사용되어 지고 있는 속슬렛 추출법과의 추출효율을 비교·분석하였다. 두 분석법에 대한 3반복 회수율 분석결과, 두 분석법 모두 80% 이상의 높은 회수율을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Table 3).

유효성 검증 결과

분석법의 신뢰성 확보를 위해 분석법에 대한 유효성 검증을 수행하였다. HPLC-FLD는 5수준의 표준물질을 분석하여

Table 1. Extraction efficiency of benzo(a)pyrene by different cleanup procedures

Sample	Recovery ± RSD ^a (%)		
	QuEChERS (kit)	QuEChERS (kit+PSA)	QuEChERS (NaSO ₄ +NaCl)
Rice	106.1±4.4	85.5±4.4	97.6±5.6
Green pepper	93.7±2.6	82.5±7.0	95.7±3.5
Red pepper	86.7±5.3	69.3±6.6	76.0±6.7
Soil	88.4±4.5	73.3±4.5	74.9±8.0

^aMeans of triplicate ± RSD. RSD values were calculated as standard deviation/mean × 100%

Table 2. Extraction efficiency of benzo(a)pyrene by various solvents

Sample	Recovery ± RSD ^a (%)			
	Acetonitrile	<i>n</i> -Hexane	Acetonitrile: <i>n</i> -Hexane (9:1, v/v)	Acetone
Rice	106.1±4.4	70.8±3.2	100.2±3.1	-
Green pepper	93.7±2.6	60.6±2.2	64.5±5.6	-
Red pepper	86.7±5.3	37.2±7.3	58.8±2.0	-
Soil	88.4±4.5	55.8±5.6	40.7±4.1	-

^aMeans of triplicate ± RSD. RSD values were calculated as standard deviation/mean × 100%

Table 3. Comparison of extraction efficiency between conventional soxhlet and new rapid extraction methods for residue analysis of benzo(a)pyrene

Sample	Recovery ± RSD ^a (%)	
	Rapid extraction method	Soxhlet method
Rice	106.1±4.4	101.9±3.0
Green pepper	93.7±2.6	87.8±2.8
Red pepper	86.7±5.3	90.5±2.8
Soil	88.4±4.5	86.2±5.6

^aMeans of triplicate ± RSD. RSD values were calculated as standard deviation/mean × 100%

Table 4. The coefficient of determination (R-squared) for benzo(a)pyrene in HPLC-FLD, GC-MS/MS and LC-MS/MS analysis

Samples	Instrumental methods		
	HPLC-FLD	GC-MS/MS	LC-MS/MS
Rice	0.9999	1.0000	0.9998
Green pepper		0.9993	1.0000
Red pepper		0.9998	0.9995
Soil		0.9997	0.9992

기울기로 작성하였으며, 0.9999이상의 직선성을 확인할 수 있었다. GC-MS/MS, LC-MS/MS는 matrix matched하여 5 수준으로 기울기를 작성하였으며, 4개의 시료에서 모두 0.999 이상의 직선성을 보였다.

검출한계 및 정량한계 산출을 위해 본 연구의 신속분석법을 이용하여 추출한 10 µg/kg 수준의 시료 7반복에 대한 편차를 산출하였다. 편차값에 3배를 곱하여 검출한계(Limit of Detection, LOD)를 산출하였으며, 검출한계에 3배를 곱하여 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)를 산출하였다. 산출된 정량한계를 고려하여 4개 시료에 대한 Low(10 µg/kg), Mid(50 µg/kg), High(100 µg/kg) 3농도를 설정하였으며, 각 농도에 대한 회수율 시험을 수행하였다. 회수율 시험은 쌀, 고추(풋고추, 홍고추), 토양에 대해 7반복으로 수행하였으며, HPLC-FLD의 검출한계는 1.8~3.1 µg/kg, 정량한계는 5.4~9.4 µg/kg이었으며, 회수율 및 반복·재현성은 86.1~98.2%, 0.6~8.7%로 산출되었다. GC-MS/MS 및 LC-MS/MS의 검출한계는 1.8~3.0 µg/kg, 2.3~3.3 µg/kg 이었으며, 정량한계는 5.5~9.1 µg/kg, 7.0~9.8 µg/kg이었다. GC-MS/MS의 회수율 및 반복·재현성은 85.8~100.8%, 0.6~5.3%였으며, LC-MS/MS는 86.3~111.9%, 1.1~7.1%로 산출되었다.

시험결과 HPLC-FLD, GC-MS/MS, LC-MS/MS 모두 4개의 시료에서 유효회수율 범위인 70~120%를 만족하였고, 변이계수 또한 10%이하의 값으로 산출되었다.

기존 분석법과의 비교

본 연구의 QuEChERS 분석을 활용한 신속분석법과 속슬렛 분석법과의 추출효율 비교 시 두 분석방법 모두 높은 수준의 회수율을 확인할 수 있었다. 전처리 분석시간은 QuEChERS 분석을 활용한 신속분석법의 경우 20분 내외로 속슬렛 추출법 960분(16시간) 대비 97% 이상 분석시간이 확실하게 개선되었으며, 사용되는 유기용매의 양을 비교한 결과 QuEChERS 분석을 활용한 신속분석법은 10 mL 내외인 반면 속슬렛 추출법은 300 mL로 96%이상 유기용매 사용량을 절감할 수 있었다. 이러한 결과를 [11, 12]의 선행연구결과를 토대로 분석해보았을 때 QuEChERS 분석법이 농약의 잔류분석 등 다양한 분야에서 분석시간 단축과 유기용매 사용을 줄일 수 있는 분석법으로 널리 사용되고 있어 농산물(쌀, 풋고추, 홍고추) 및 토양 시료 중 benzo(a)pyrene 분석시험에서도 동일한 결과를 얻을 수 있는 것으로 사료된다. 따라서 농산물(쌀, 풋고추, 홍고추) 및 토양 시료 중 benzo(a)pyrene 분석 시 본 연구의

Table 5. Validation of analytical method for benzo(a)pyrene in HPLC-FLD

Sample	Concentration	Recovery (%)	RSD ^a (%)	LOD ^b (µg/kg)	LOQ ^c (µg/kg)
Rice	LOW	98.2	8.2	2.9	8.9
	MID	93.9	3.0		
	HIGH	97.5	1.0		
Green pepper	LOW	88.1	6.7	2.9	8.7
	MID	96.6	6.3		
	HIGH	86.1	1.1		
Red pepper	LOW	93.9	1.2	3.1	9.4
	MID	94.7	2.6		
	HIGH	90.6	1.2		
Soil	LOW	90.2	8.7	1.8	5.4
	MID	98.1	7.8		
	HIGH	97.7	0.6		

^aRSD: Relative Standard Deviation

^bLOD: Limit of Detection

^cLOQ: Limit of Quantitation

Table 6. Validation of analytical method for benzo(a)pyrene in GC-MS/MS

Sample	Concentration	Recovery (%)	RSD ^a (%)	LOD ^b (µg/kg)	LOQ ^c (µg/kg)
Rice	LOW	100.8	3.3	2.1	6.4
	MID	96.9	4.4		
	HIGH	95.0	0.7		
Green pepper	LOW	98.7	1.9	1.8	5.5
	MID	95.1	5.3		
	HIGH	97.6	0.6		
Red pepper	LOW	93.2	3.3	2.4	7.1
	MID	91.3	4.8		
	HIGH	85.8	0.9		
Soil	LOW	94.5	4.3	3.0	9.1
	MID	96.1	4.9		
	HIGH	94.2	1.1		

^aRSD: Relative Standard Deviation^bLOD: Limit of Detection^cLOQ: Limit of Quantitation**Table 7. Validation of analytical method for benzo(a)pyrene in LC-MS/MS**

Sample	Concentration	Recovery (%)	RSD ^a (%)	LOD ^b (µg/kg)	LOQ ^c (µg/kg)
Rice	LOW	105.6	7.1	2.4	7.2
	MID	104.7	1.7		
	HIGH	101.4	3.1		
Green pepper	LOW	91.9	2.6	3.3	9.8
	MID	105.2	3.4		
	HIGH	111.9	1.1		
Red pepper	LOW	110.7	3.3	3.2	9.7
	MID	99.2	4.8		
	HIGH	102.0	0.9		
Soil	LOW	86.3	6.1	2.3	7.0
	MID	100.3	2.0		
	HIGH	98.1	3.5		

^aRSD: Relative Standard Deviation^bLOD: Limit of Detection^cLOQ: Limit of Quantitation

신속분석법을 활용한다면 효율적인 분석이 가능할 것이며, 본 연구에서 수행한 농산물(쌀, 풋고추, 홍고추) 이외 다른 농산물에 대해서도 QuEChERS 분석법을 개선한 분석법에 대한 연구가 이루어진다면 농산물 및 토양 중 benzo(a)pyrene 안전 관리체계 구축에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study is supported by 2017 Research Grant from Kangwon National University(No. 520170219), also this research was supported by a grant from NAQS in 2017.

References

1. Kim S (2014) Policy of reducing benzopyrene in foods. Korea Journal of The Korean Society of Food Science

- and Nutrition, 19(1), 13-14.
2. Lee MY, Jung SM, Lee GW (2012) Monitoring on benzo(a)pyrene content in oriental medicine. *Korea Journal of Digital Convergence*, 10(7), 201-206.
 3. Shin HS, Kim MJ (2014) Factors that Affect the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods. *Korea Journal of Food Industry and Nutrition*, 19(1), 1-4.
 4. Hu SJ, Lee HM, Chae YZ, Yoo EA (2005) Pretreatment of Fish for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using alkali digestion. *Korea Journal of Analytical Science and Technology*, 18(5), 403-409.
 5. Lim JS, Kim SS, Park DS, Joo JH, Kim CK, Hur JH (2007) Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues in Environmental Samples in Korea. *Korean Journal of Pesticide Science*, 11(2), 95-105.
 6. Song MH, Cho YD, Choe EK (2014) Study on analysis of PAHs in consumer products. *Korea Journal of Analytical Science and Technology*, 27(4), 201-212.
 7. Jung SY, Park JS, Son YJ, Choi SJ, Lee YJ, Kim MS, Park SH, Lee SM, Chae YZ (2011) Analysis of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in Ground Coffee Using GC-tandem Mass Spectrometry and Estimation of Daily Dose. *Korea Journal of Food Science Technol*, 43(5), 544-552.
 8. Kim JO, Park SH, Lee WB (2019) Distribution Characteristics of Heavy Metals and PAHs in the Jellanamdo Soils using Statistical Analyses. *Journal of Korea Society of Waste Management*, 36(1), 33-40.
 9. Mo RH, Zhang YP, Ni ZL, Tang FB (2017) Determination of benzo[a]pyrene in camellia oil via vortexassisted extraction using the UPLC-FLD method. *Korea Journal of Society of Food Science and Technology*, 26(1), 15-19.
 10. Oh MH, Lee JH, Kim SA, Kim MH (2018) Analytical Method Development for Determination of Silymarin by LC-MS/MS for Related Health Functional Foods. *Korea Journal of Food Hygiene and Safety*, 33(2), 124-130.
 11. Kim JH, Kim YJ, Kwon YS, Seo JS (2016) Development of multi-residue analysis of 320 pesticides in apple and rice using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Korean Journal of Pesticide Science*, 20(2), 104-127.
 12. Noh HH, Kwon HY, Kim DB, Kim CJ, Lee HS, Kyung KS (2019) Application of QuEChERS Sample Preparation Method for the Residual Analysis of Newly Registered Pesticide Pydiflumetofen in Agricultural Products. *Korea Journal of Society of Pesticide Science*, 23(2), 86-95.