

농산물의 잔류농약분석을 위한 가속용매추출 (Accelerated Solvent Extraction) 방법의 이용

이성우¹ · 서혜영 · 한병재 · 정양모 · 김준형 · 노기미 · 김경수*

조선대학교 자연과학대학 식품영양학과, ¹국립농산물품질관리원전남지원

(2003년 10월 25일 접수, 2004년 4월 30일 수리)

농약성분 분석에 있어서 시료 전처리시간을 단축할 수 있는 분석방법을 개발하기 위해 농산물 중에 잔류하고 있는 잔류농약성분을 대상으로 ASE(accelerated solvent extraction) 방법을 활용한 자동화된 전처리 방법을 검토하였다. ASE 추출조건은 preheat 1 min, heat 5 min, static 1 min, solvent flush% 60 vol, nitrogen purge 60 sec, cycle 4, pressure 1500 psi, temperature 100°C를 선택하였다. 이 분석조건과 n-hexane:acetone(4:1, v/v)를 추출용매로 사용하였을 때, ASE의 추출과 정제능력은 solvent extraction 방법과 유의적인 차이를 보이지 않았고, 추출 용매의 감소는 추출산물의 재현성에 큰 영향을 미치지 않았다. ASE 방법은 잔류농약 분석 시 소요되는 유기용매의 양을 감소하고 추출과 정제를 동시에 수행함으로써 동결건조 시간을 제외한 전처리 시간이 단축되어 분석비용 또한 solvent extraction에 비해 감소시킬 수 있었다.

Key words: 가속용매추출, 잔류농약, 농산물

서 론

국제사회는 농산물의 수출입 과정에서 자국 국민과 농업인을 보호하기 위하여 농산물 중 위해 물질 검사를 강화하고 있으며, 국내에서도 국민소득의 향상으로 양보다는 품질 위주의 농산물을 선호함에 따라 안전한 농산물에 대한 관심이 크게 대두되었다. 이런 국내·외적인 상황에서 농산물의 잔류농약이 사회의 주목을 받으면서 분석물량은 점차 증가 추세이며, 분석자가 수행하는 1일 분석량도 증가하고 있다.

잔류농약 분석시 추출시간과 분석자의 건강을 위협하는 유기용매 사용량이 증가하고 있는 상황임에도 현재 농약잔류분석에 쓰이는 전처리 방법은 분석에 많은 시간과 분석비용이 소요되고 오존 발산 및 광화학적 활성을 띠는 화학물질을 증가시키고 있다.²³⁾ 또한 과도한 유기용매 사용으로 인한 환경오염 등의 위해성이 문제점으로 나타나고 있다. 이러한 문제점들을 해결하고자 대학 등 여러 연구기관이나 학자들은 신속, 정확하면서 위해성이 적은 분석방법을 연구하였으며 그 결과, 간이속성법 TARI(Taiwan Agricultural Research Institute), 효소면역학적방법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 고형상미세추출(solid phase microextraction, SPME), 초임계유체추출(supercritical fluid extraction, SFE) 등과 같이 다양한 분석방법들이 개발되었다.^{1,5,23)}

최근에는, 실험과정에서 발생하는 폐수와 유기용매의 양을 줄이고 동시에 분석방법의 검출한계를 증가시키는 방향으로 많은 노력을 하고 있다. 대부분의 재래식 분석방법은 농작물과 유기용매를 혼합시키는 것부터 시작한다. 균질화된 혼합물에서 50~100 g의 시료를 취하고 많은 잔류물 선별방법에서 초기 추출

단계에 200~500 ml의 유기용매를 사용하여 추출하는 동안 추출용매의 일부만이 사용되어 상대적으로 많은 양의 용매를 소비하게 된다. 반면에, 초임계유체추출(SFE)은 농작물로부터 목적 농약성분을 추출하는데 사용되는 유기용매의 사용량 20 ml, 추출 시간 30분으로 단축시킨다.²³⁾ 그러나 SFE 방법 또한 회수율 실험에서는 낮은 회수율을(평균회수율 50%) 나타냈으며, 고전적인 solvent extraction 방법에 비교하여 떨어지는 양상을 보여주고 있다. SPME에 의한 방법은 40 ml의 적은 용매와 짧은 전처리 시간(20분)이 소요되어 빠른 분석이 가능하나, 회수율 시험에서 품목별 회수율 차이가 심하고(1~130%) 변이율(5.8~7.6)은 안정적이나 품목별 회수율 차이가 많아 다성분 동시분석에 어려움이 있으며, ELISA 방법은 단성분 분석은 가능하나 다성분 동시분석이 어려워 사양되는 분석방법이다. 이러한 방법들이 최근 농약잔류분석에 이용하고 있으나, 아직까지는 추출과 정제를 분리하여 전처리를 하는 수준의 방법만이 잔류농약분석법의 주류를 이루어왔고 추출과 정제를 동시에 수행한 SPME 방법 또한 좋은 실험결과를 제공하지 못하였다. 그러나, ASE는 적은 양의 유기용매(35~40 ml)를 사용하지만 온도와 압력을 조절함으로써 훨씬 좋은 추출 효율을 나타낸다. Multiple 시료의 추출은 20~25 min의 시간과(동결건조시간 제외) 35~40 ml의 소량의 용매를 사용하여 추출과 정제를 동시에 수행이 가능하다. 여러 가지 형태의 환경시료인 오수, 슬러지 또는 해양 미립자 물질 중 환경오염물질을 ASE 방법으로 추출하였을 때 회수율은 전통적인 추출 방법보다 뛰어난 것이 보고된 바 있다.¹⁵⁾

따라서, 이번 연구에서는 농약 표준물질을 이용한 총회수율 실험에서 추출과 정제를 동시에 수행하여 수분과 당이 많은 농산물(사과, 귤)의 잔류농약 다성분 분석법을 찾아보고자 하였고, ASE를 이용함으로써 사용되는 유기용매, 초자류 및 분석 시간을 감소시켜 분석비용, 분석 시 분석자의 유기용매 흡입량을 최소화하는데 역점을 두고 실험을 수행하였다.

*연락처

Phone: 82-62-230-7724; Fax: 82-62-224-8880

E-mail: kskim@mail.chosun.ac.kr

재료 및 방법

재료. 본 실험에 시료로 사용된 무농약 재배 사과와 곁은 광주 농산물 유통시장에서 구입하여 고전적인 solvent extraction 방법으로 전처리 분석하여 무농약 시료임을 확인 후, 분쇄하여 -40°C 초저온 냉동고에 보관하며 분석에 이용하였다.

시약. 추출 및 분석에 사용된 유기용매와 시약인 acetonitrile, n-hexane, acetone, diethyl ether, dichloromethane, NaCl, Celite 545, SiO₂, Al₂O₃과 florisil는 Merck사(Germany)의 잔류 농약분석용으로 그리고 florisil cartridge는 Isolute사(EEC)에서 구입하여 사용하였다. Labor Dr. Ehrenstorfer-Schafers(Germany) 사의 공시성분은 총 47종으로서 각 공시성분을 acetone에 용해한 후 1.1~42 ppm 수준이 되도록 조제하였으며, peak의 중복을 피하기 위하여 표준물질을 26종(STD mixture I)과 21종(STD mixture II)으로 2등분하였다.

용매추출법(Solvent extraction)에 의한 회수율 실험. 시료

20 g에 농약 STD mixture I과 II를 각 시료에 2 ml 씩 첨가하고 1시간 동안 방치한 후 acetone 100 ml를 가하여 homogenizer로 5000 rpm에서 5분간 균질화하고 5 g의 celite를 충전한 브흐너 깔대기에 흡입 여과하였다. 잔류물은 acetone 30 ml로 헹구어 흡입 여과하여 500 ml 평저 플라스크로 옮겨 담았다. 40°C 이하에서 감압농축하여 시료액이 50 ml 정도 남으면 500 ml 분액 여두에 옮겨 담고 NaCl 10% 100 ml와 n-hexane 100 ml를 분액여두에 넣고 5 분간 진탕하여 방치한 후 위층의 유기용매층을 수거하였다. Dichloromethane 100 ml를 남은 물층에 부어 5 분간 진탕하여 방치한 후 아래층의 유기용매를 500 ml 평저 플라스크에 옮겨담아 40°C 이하에서 약 3 ml 까지 감압 농축하고 질소로 농축하였다. 농축된 시료를 n-hexane 4 ml에 용해하고 n-hexane 5 ml로 florisil cartridge를 활성화 한 후, 시료가 용해된 n-hexane을 florisil cartridge에 주입하고 n-hexane : acetone(4 : 1, v/v) 10 ml로 10분간 정제하고 농축한 후, acetone 2 ml로 정용하여 GC-ECD로 분석하였다.

Table 1. Detection limit of pesticide standards by GC-ECD analysis

No.	STD mixture I			No.	STD mixture II		
	Pesticide	RT ¹⁾	Detection limit (ppm)		Pesticide	RT	Detection limit (ppm)
1	Ethoprophos	10.452	0.014±0.001 ²⁾	1	Ethalfuralin	10.823	0.003±0.001
2	Trifluralin	11.049	0.003±0.002	2	Phorate	11.403	0.017±0.001
3	Flufenoxuron	13.083	0.014±0.004	3	Chlorothalonil	13.419	0.003±0.001
4	Propanil	14.211	0.008±0.002	4	Metribuzin	14.347	0.003±0.001
5	Vinclozolin	14.580	0.003±0.001	5	Tolclofos-M	14.799	0.007±0.003
6	Alachlor	14.882	0.010±0.002	6	Dichlofluanid	15.988	0.004±0.001
7	Dicofol	16.604	0.010±0.002	7	Triadimefon	16.651	0.005±0.001
8	Penconazole	17.974	0.006±0.001	8	Triflumizole	18.949	0.007±0.002
9	Fipronil	18.394	0.004±0.001	9	α-Endosulfan	19.699	0.003±0.001
10	Procymidone	18.766	0.006±0.001	10	Isoprothiolane	20.707	0.008±0.002
11	Chinomethionet	18.985	0.004±0.001	11	Oxyfluorfen	21.602	0.003±0.001
12	Prothiophos	20.619	0.005±0.001	12	β-Endosulfan	22.746	0.003±0.001
13	Oxadiazon	21.254	0.006±0.001	13	Endosulfan-S	25.599	0.003±0.001
14	Chlorfenapyr	22.508	0.003±0.001	14	Bifenthrin	29.226	0.008±0.001
15	Iprodione	28.551	0.010±0.001	15	Bifenox	29.701	0.003±0.001
16	Bromopropylate	28.912	0.006±0.002	16	Azinphos-M	30.324	0.010±0.002
17	Fenpropathrin	29.425	0.008±0.001	17	Fenarimol	31.253	0.003±0.001
18	Tetradifon	29.967	0.003±0.001	18	Pyrazophos	31.561	0.010±0.001
19	Phosalone	30.340	0.005±0.001	19	Permethrin	32.340	0.021±0.003
20	Cyhalothrin	30.868	0.006±0.002	20	Permethrin	32.340	0.021±0.003
21	Cyhalothrin	31.211	0.006±0.001	21	Cypermethrin	33.653	0.010±0.001
22	Pyridaben	32.483	0.013±0.002	22	Cypermethrin	33.784	0.010±0.001
23	Cyfluthrin	33.221	0.020±0.003	23	Cypermethrin	33.885	0.010±0.001
24	Cyfluthrin	33.352	0.020±0.003	24	Cypermethrin	33.932	0.010±0.002
25	Cyfluthrin	33.460	0.020±0.002	25	Fenvalerate	34.900	0.008±0.001
26	Cyfluthrin	33.511	0.020±0.002	26	Fluvalinate	35.199	0.007±0.001
27	Flucythrinate	33.938	0.007±0.001	27	Fluvalinate	35.286	0.007±0.001
28	Flucythrinate	34.196	0.007±0.001	28	Tralomethrin	36.043	0.010±0.001
29	Esfenvalerate	34.889	0.006±0.001				
30	Esfenvalerate	35.189	0.006±0.001				
31	Difenoconazole	35.496	0.013±0.002				
32	Difenoconazole	35.602	0.013±0.001				
33	Deltamethrin	36.028	0.007±0.001				

¹⁾Retention time

²⁾Mean ± Standard deviation; n=3

원심분리법(Centrifugation extraction)에 의한 회수를 실험. 시료 20 g에 농약 STD mixture I과 II를 시료에 각각 10 ml씩 첨가하고 1시간 동안 방치한 후 acetonitrile 100 ml와 NaCl 15 g를 첨가하여 homogenizer로 5000 rpm에서 2분간 균질화 하였다. 균질화된 시료를 원심분리기에서 2000 rpm으로 5 분간 원심분리 후 상층액 20 ml를 취하여 40°C 이하에서 약 3 ml 까지 감압농축하고 남은 3 ml는 질소 기류 하에서 농축하였다. 질소 농축된 시료를 *n*-hexane 4 ml에 용해하여 *n*-hexane 5 ml로 활성화한 florisil cartridge에 주입하고 *n*-hexane : acetone(4 : 1, v/v) 10 ml로 10분간 정제한 후 농축하고 acetone 2 ml로 정용하여 GC-ECD로 분석하였다.

가속용매추출법(Accelerated solvent extraction)에 의한 회수를 실험. 추출용 cell(33 ml)에 cellulose filter, florisil 4 g, chem tube hydromatrix 2 g를 차례로 넣고 압착한 후 여기에 균질화된 시료인 사과와 귤을 각 10 g씩 넣은 후 농약 STD mixture I과 II를 각각 2 ml씩 첨가하여 1시간 방치한 후 -70°C의 냉동고에 90분간 동결 후 동결건조기에 장착하여 10 microns Hg 이하, -50°C 이하의 기기조건에서 건조 시료를 제조하였다. 동결건조된 사과와 귤 시료를 다음의 추출 조건에서 ASE를 이용하여 추출하였다. 추출용매는 40 ml의 *n*-hexane : acetone (4 : 1, v/v)을 사용하였고 기기조건은 preheat 1 min, heat 5 min, static 1 min, solvent flush% 60 vol, nitrogen purge 60 sec, cycles 4, pressure 1500 psi, temperature 100°C이며 추출이 끝난 후 collection vial에 수집된 용매층을 40°C 수욕상에서 약 3 ml까지 농축하고 남은 추출액은 질소로 천천히 농축하여 acetone 2 ml로 정용한 후 기기분석 하였다.

GC-ECD에 의한 잔류농약분석. 잔류농약성분의 분석을 위해 다음과 같은 조건으로 GC-ECD 분석을 시행하였다. DB-5 (J&W, 30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness, USA) column과 micro-cell electron capture detector(ECD)를 사용하여 분리 및 검출하였으며, temperature program은 130°C에서 2 분간 유지한 다음 10°C/min의 속도로 180°C까지 상승시켜 10 분간 유지시키고 다시 5°C/min의 속도로 280°C까지 상승시켜 5분간 정지시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 250°C, 300°C이며, carrier gas는 N₂를 사용하여 유속은 1.0 ml/min으로 하고 시료는 1 μl을 split ratio 1 : 50으로 주입하였다.

용매추출법(Solvent extraction)에 의한 일부 농산물의 잔류농약 검출. 시료 20 g에 acetone 100 ml를 가하여 homogenizer로 5000 rpm에서 5분간 균질화하고 5 g의 celite를 충전한 브흐너칼대기에 흡입 여과하였다. 잔류물은 acetone 30 ml로 행구어 흡입 여과하여 500 ml 평저 플라스크로 옮겨 담았다. 40°C 이하에서 감압농축하여 시료액이 50 ml 정도 남으면 500 ml 분액 여두에 옮겨 담고 10% NaCl 100 ml와 *n*-hexane 100 ml를 분액여두에 넣고 5분간 진탕하여 방치한 후 위층의 유기용매층을 수거하였다. Dichloromethane 100 ml를 남은 물층에 부어 5분간 진탕하여 방치한 후 아래층의 유기용매를 500 ml 평저 플라스크에 옮겨 담아 40°C 이하에서 약 3 ml 까지 감압농축하고 질소로 농축하였다. Florisil cartridge를 *n*-hexane 5 ml로 활성화한 후, 농축된 시료를 *n*-hexane 4 ml에 용해하여 florisil cartridge에 주입하고 *n*-hexane : acetone(4 : 1, v/v) 10 ml로 10 분간 정제하여 농축한 후, acetone 2 ml로 정용하여 GC-ECD로 분석하였다.

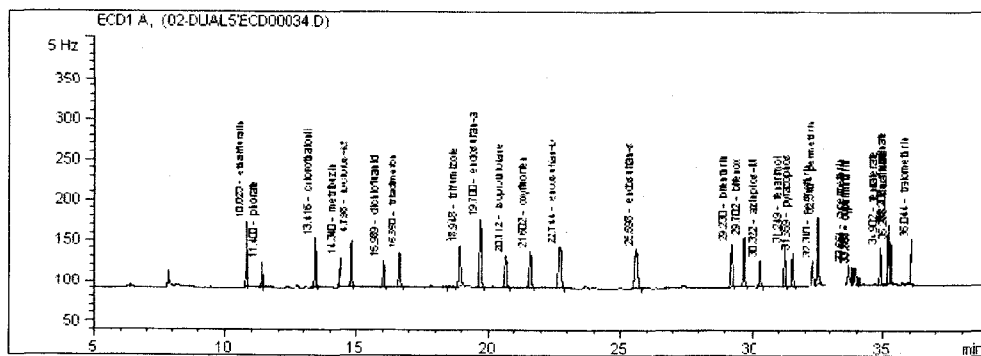


Fig. 1. Chromatogram of 21 pesticides standard mixture I.

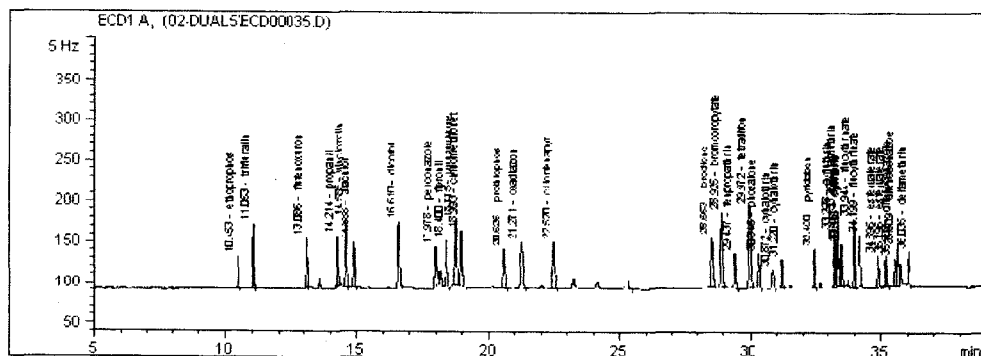


Fig. 2. Chromatogram of 26 pesticides standard mixture II.

원심분리법(Centrifugation extraction)에 의한 일부 농산물의 잔류농약 검출. 시료 20 g에 acetonitrile 100 ml와 NaCl 15 g를 첨가하여 homogenizer로 5000 rpm에서 2분간 균질화 하였다. 균질화된 시료는 회수율 실험과 동일한 방법으로 수행하였다.

고속용매추출법(Accelerated solvent extraction)에 의한 일부 농산물의 잔류농약 검출. 추출용 cell(33 ml)에 cellulose filter, florisil 4 g, chem tube hydromatrix 2 g을 차례로 넣고 압착한 후 여기에 분쇄된 시료인 사과와 귤을 각 10 g씩 넣은 후 -70°C의 냉동고에 90 분간 동결 후 동결건조기에 장착하여 10 microns Hg 이하, -50°C 이하의 기기조건에서 건조 시료를 제조하였다. 수분이 적은 쌀은 동결건조 과정을 생략하였다.

동결건조된 시료를 다음의 추출 조건에서 ASE를 이용하여 추출하였다. 추출용매는 n-hexane:acetone(4:1, v/v) 40 ml를 사용하였고 기기조건은 preheat 1 min, heat 5 min, static 1 min,

solvent flush% 60 vol, nitrogen purge 60 sec, cycles 4, pressure 1500 psi, temperature 100°C이며 추출이 끝난 후 collection vial에 수집된 용매층(40 ml)을 40°C 수욕상에서 약 3 ml까지 농축하고 남은 추출액은 질소로 천천히 농축하여 acetone 2 ml로 정용한 후 기기분석 하였다.

위의 실험방법에 의해 시행된 고전적인 여러 추출방법과 ASE 추출법의 회수율을 비교한 결과의 재현성을 확인하기 위하여 일부 농산물을 대상으로 잔류농약 screening 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 시료는 분석 결과 잔류농약이 검출된 시료를 사용하였다. Solvent extraction 방법으로 추출하여 농약이 검출된 시료(귤, 쌀1과 쌀2)와 원심분리법으로 추출하여 농약이 검출된 시료(키위, 토마토, 귤)를 대상으로 ASE를 이용하여 확립된 최적의 조건에서 추출과 정제를 동시에 수행하여 ASE 방법의 정제능과 회수율을 solvent extraction 및 원심분리법과 비교하였다.

Table 2. Extraction efficiency of various methods treated with standard mixture I for apple sample

Mean recovery (%)

No.	Pesticide	Extraction method		
		ASE ¹⁾	Solvent ²⁾	Centrifugation
1	Ethoprophes	100.9±1.52 ³⁾	95.5±0.26	74.9±0.21
2	Trifluralin	71.1±0.75	97.2±0.38	74.0±0.25
3	Flufenoxuron	76.8±0.34	102.7±0.41	73.5±0.13
4	Propanil	97.3±0.80	91.6±0.26	72.1±0.42
5	Vinclozolin	103.7±1.12	94.8±0.65	76.7±0.16
6	Alachlor	101.6±1.02	94.4±0.18	79.3±0.85
7	Dicofol	93.2±0.51	94.3±0.32	77.2±0.35
8	Penconazole	93.9±0.7	112.4±0.98	70.0±0.42
9	Fipronil	98.6±0.76	96.2±0.39	69.9±0.31
10	Procymidone	93.0±0.25	96.4±0.68	78.7±0.13
11	Chinomethionet	90.6±0.16	87.3±0.75	70.2±0.25
12	Prothiophos	92.7±0.23	93.6±0.68	73.3±0.23
13	Oxadiazon	100.3±0.36	93.7±0.75	77.9±0.15
14	Chlorfenapyr	97.5±0.48	94.1±0.65	75.3±0.24
15	Iprodione	100.3±0.15	88.2±0.32	77.0±0.40
16	Bromopropylate	97.6±0.16	94.2±0.35	72.8±0.20
17	Fenpropathrin	95.1±0.09	93.7±0.42	74.7±0.62
18	Tetradifon	98.2±0.17	94.4±0.51	74.9±0.32
19	Phosalone	109.2±0.41	91.2±0.63	73.8±0.28
20	Cyhalothrin	89.8±0.54	92.9±0.27	72.3±0.12
21	Cyhalothrin	84.5±0.36	91.8±0.28	71.5±0.11
22	Pyridaben	96.6±0.45	82.2±0.62	76.5±0.09
23	Cyfluthrin	96.7±0.25	100.5±0.87	71.0±0.14
24	Cyfluthrin	96.8±0.48	96.9±0.63	70.8±0.32
25	Cyfluthrin	96.1±0.78	99.2±0.25	72.3±0.25
26	Cyfluthrin	90.9±0.19	91.8±0.15	69.3±0.13
27	Flucythrinate	93.3±0.24	91.0±0.28	69.7±0.20
28	Flucythrinate	92.4±0.65	88.3±0.34	69.8±0.13
29	Esfenvalerate	89.2±0.13	86.6±0.62	69.2±0.15
30	Esfenvalerate	93.5±0.19	89.1±0.35	69.7±0.14
31	Difenoconazole	96.0±0.17	79.2±0.42	65.2±0.25
32	Difenoconazole	96.0±0.24	80.7±0.82	65.8±0.15
33	Deltamethrin	94.0±0.51	88.3±0.36	71.8±0.13
Average		91.7	90.19	72.76

¹⁾after lyophilization

²⁾by solvent extraction with florisil cartridge purification continually

³⁾Mean ± Standard deviation: n=3

Table 3. Extraction efficiency of various methods treated with standard mixture II for apple sample

Mean recovery (%)

No.	Pesticide	Extraction method		
		ASE ¹⁾	Solvent ²⁾	Centrifugation
1	Ethalfuralin	95.2±0.15 ³⁾	67.6±0.11	79.4±0.09
2	Phorate	84.6±0.31	83.1±0.21	72.0±0.12
3	Chlorothalonil	102.1±0.25	93.2±0.23	79.4±0.13
4	Metribuzin	105.5±0.41	101.5±0.52	39.8±0.21
5	Tolclofos-M	101.0±1.22	92.3±0.14	81.7±0.26
6	Dichlofluanid	106.7±0.95	95.5±0.21	78.8±0.12
7	Triadimefon	105.5±0.26	91.2±0.35	76.5±0.11
8	Triflumizole	93.7±0.17	91.0±0.14	56.7±0.08
9	α-Endosulfan	95.2±0.12	97.3±0.18	74.9±0.09
10	Isoprothiolane	109.3±0.42	94.1±0.18	79.4±0.19
11	Oxyfluorfen	102.9±0.87	89.8±0.17	89.5±0.16
12	β-Endosulfan	103.7±1.15	100.0±0.46	77.8±0.21
13	Endosulfan-S	105.5±0.29	105.1±0.55	78.3±0.22
14	Bifenthrin	94.1±0.31	93.2±0.23	87.6±0.62
15	Bifenoxy	107.7±0.85	86.2±0.18	84.6±0.35
16	Azinphos-M	109.1±0.32	89.5±0.32	81.7±0.28
17	Fenarimol	101.1±0.14	89.7±0.65	66.7±0.22
18	Pyrazophos	101.2±0.52	91.2±0.28	82.9±0.32
19	Premethrin	94.1±0.34	93.8±0.39	87.6±0.21
20	Permethrin	102.2±0.95	99.3±0.27	88.1±0.52
21	Cypermethrin	105.7±0.53	115.8±0.18	87.5±0.32
22	Cypermethrin	101.3±0.84	106.2±0.15	86.6±0.12
23	Cypermethrin	100.4±0.62	106.2±0.26	86.0±0.23
24	Cypermethrin	100.8±0.35	115.5±0.92	87.3±0.31
25	Fenvalerate	97.8±0.42	89.7±0.36	86.5±0.25
26	Fluvalinate	99.3±0.53	81.3±0.26	84.1±0.28
27	Fuvalinate	97.3±0.78	70.8±0.15	85.7±0.32
28	Tralomethrin	97.5±0.12	96.3±0.33	84.2±0.19
Average		100.73	93.80	79.69

¹⁾after lyophilization²⁾by solvent extraction with florisil cartridge purification continually³⁾Mean±Standard deviation; n=3

결과 및 고찰

추출방법에 의한 잔류농약의 회수율. 잔류농약성분의 정량 분석을 위하여 농약성분 표준물질을 동일한 GC-ECD 기기조건에서 분석하여 각각의 표준검량선을 작성하였으며(도식하지 않음), 각 표준성분 및 검출한계를 Table 1에 제시하였다. STD mixture I, II를 1.1~42 ppm이 되도록 희석, 조제한 후 GC-ECD 분석하여 chromatogram을 Fig. 1과 2에 도식하였다.

Table 2~4와 같이 평균 회수율은 ASE를 이용하여 추출과 정제를 동시에 수행한 실험에서는 사과 97.5%, 귤 86.3%이었으며 고전적인 solvent extraction 분석에서는 사과 93.3%, 귤 93.6%를 나타내어 차이를 보이지 않았으나, 원심분리기를 이용한 screening 분석방법에서는 전자의 방법과 비교하여 76.2%로 낮게 나타났다. 이와 같이 고전적인 방법과 ASE에 의해 추출과 정제를 동시에 수행한 평균 회수율은 차이가 없었으며 유효 회수율 범위인 70~120%에 모두 포함되었고, 변이율(C.V.)은 solvent extraction, 원심분리 분석시 모두 10%미만으로 나타났으나, ASE 추출시에는 trifluralin, flufenoxuron, phorate이 10%

이상 나타났으며, 나머지 대부분의 성분은 10%미만으로 나타났다. 정제효과는 Fig. 3과 4 같이 비슷한 양상을 보이고 있다.

추출 과정의 첫 단계 동안에 가열된 용매에 의해 시료가 적셔지기 때문에 자동화된 solvent extraction은 고전적인 solvent extraction보다 더 빠르고(2~4 hr), 더 적은 양(200~300 ml)의 용매를 사용하게 된다. 추출에 있어서 온도와 압력이 중요한 역할을 수행하기 때문에 먼저 상승된 온도는 van der Waals force, 수소결합 그리고 용매분자와 matrix에서 활성부위의 dipole attraction에 의해 초래된 강한 solute-matrix 상호작용을 분열시킬 수 있다. 또한 열에너지는 desorption process를 위해 필요로 하는 활성화에너지를 감소시킴으로써 시료 내의 결합력과 점착성이 있는 상호작용을 분리할 수 있다. 더불어 수소결합은 온도가 상승하면 약해진다. 또한 더 높은 온도는 액체 용매의 점도를 감소시키고 matrix particle에 침투력을 향상시켜 추출효율을 증가시킨다. 점도 감소와 더불어 상승된 온도는 matrix의 표면장력을 감소시킴으로써 용매는 시료 matrix를 적셔 추출효율을 향상시킨다. 두 가지 변화는 농약성분과 용매의 접촉을 더 쉽게 하고 또한 용매 표면장력의 감소는 용매와 농약성분 사이

Table 4. Extraction efficiency of various methods treated with standard mixture I and II for Chinese mandarin sample Mean recovery (%)

No.	STD mixture I	Extraction method		No.	STD mixture II	Extraction method	
		ASE ¹⁾	Solvent ²⁾			ASE ¹⁾	Solvent ²⁾
1	Ethoprophes	93.2±0.12	93.8±1.10	1	Ethalfuralin	93.2±0.12	88.5±0.14
2	Trifluralin	71.8±0.10	96.9±0.96	2	Phorate	71.8±0.52	95.3±0.80
3	Flufenoxuron	75.1±0.21	82.7±0.63	3	Chlorothalonil	75.1±0.33	95.2±0.23
4	Propanil	98.6±0.12	91.1±0.59	4	Metribuzin	98.6±0.14	59.2±0.32
5	Vinclozolin	88.8±0.32	110.4±0.36	5	Tolclofos-M	88.8±0.18	94.2±0.21
6	Alachlor	86.5±0.62	95.8±0.54	6	Dichlofluanid	86.5±0.32	97.2±0.25
7	Dicofol	88.7±0.25	103.5±0.87	7	Triadimefon	88.7±0.21	99.3±0.12
8	Penconazole	88.3±0.32	115.0±0.32	8	Triflumizole	88.3±0.24	83.7±0.15
9	Fipronil	91.1±0.14	96.4±0.52	9	α-Endosulfan	91.1±0.18	99.9±0.41
10	Procymidone	90.0±0.25	94.8±0.64	10	Isoprothiolane	90.0±0.16	95.6±0.25
11	Chinomethionet	80.0±0.15	86.0±0.38	11	Oxyfluorfen	80.0±0.21	92.4±0.33
12	Prothiophos	87.4±0.35	95.1±0.82	12	β-Endosulfan	87.4±0.32	98.6±0.21
13	Oxadiazon	89.6±0.25	93.2±0.63	13	Endosulfan-S	89.6±0.21	107.3±0.68
14	Chlorfenapyr	90.3±0.25	94.2±0.38	14	Bifenthrin	90.3±0.13	91.0±0.36
15	Iprodione	79.9±0.32	90.4±0.62	15	Bifenox	79.9±0.15	93.0±0.52
16	Bromopropylate	89.3±0.51	95.3±0.37	16	Azinphos-M	89.3±0.21	92.1±0.36
17	Fenpropathrin	90.8±0.15	96.1±0.85	17	Fenarimol	90.8±0.12	89.5±0.32
18	Tetradifon	88.9±0.32	92.1±0.66	18	Pyrazophos	88.9±0.10	93.7±0.25
19	Phosalone	102.5±0.82	95.2±0.75	19	Premethrin	102.5±0.95	100.6±0.18
20	Cyhalothrin	89.8±0.12	95.3±0.54	20	Permethrin	89.8±0.36	94.2±0.19
21	Cyhalothrin	80.5±0.18	94.0±0.48	21	Cypermethrin	80.5±0.15	89.0±0.25
22	Pyridaben	92.5±0.22	87.3±0.98	22	Cypermethrin	92.5±0.52	93.9±0.36
23	Cyfluthrin	99.1±0.51	108.4±0.69	23	Cypermethrin	99.1±0.32	93.2±0.55
24	Cyfluthrin	95.5±0.26	102.9±1.01	24	Cypermethrin	95.5±0.12	114.6±1.32
25	Cyfluthrin	96.1±0.31	102.9±1.30	25	Fenvalerate	96.1±0.15	92.7±0.31
26	Cyfluthrin	98.5±0.25	95.1±0.96	26	Fluvalinate	98.5±0.21	83.2±0.94
27	Flucythrinate	88.9±0.38	93.0±0.63	27	Fuvalinate	88.9±0.40	78.1±0.32
28	Flucythrinate	89.7±0.52	92.1±0.35	28	Tralomethrin	89.7±0.17	101.9±0.81
29	Esfenvalerate	85.5±0.36	86.4±0.13				
30	Esfenvalerate	88.2±0.27	92.2±0.32				
31	Difenoconazole	86.0±0.38	79.2±0.82				
32	Difenoconazole	86.0±0.16	79.9±0.32				
33	Deltamethrin	82.2±0.11	83.5±0.78				
Average		88.7	91.54	Average		88.7	89.97

¹⁾after lyophilization

²⁾by solvent extraction with florisil cartridge purification continually

의 용해도를 증가시킨다. 그러므로 농약성분은 용매에 좀더 빨리 용해하게 된다. 만약 추출되는 동안 용매에 충분한 압력이 가해진다면 비점 이상의 온도가 사용되어 질 수 있다. 압력의 이용은 분석물이 matrix pore에 갇혀져 있는 시료로부터 추출을 용이하게 한다. 압력은 대기 중의 조건에서 용매에 의해 정상적으로 접촉되어지지 않는 matrix의 영역 안으로 용매가 들어가게 한다. ASE는 압력이 일정하게 유지되는 용기의 사용으로 용매를 비점이상으로 가열할 수 있기 때문에 solvent extraction과 비교해서 추출시간이 짧아진다. 이와 관련하여, Richter 등은 PCB, PAH와 같은 환경 오염물질이 일정한 압력이 유지된 유기용매로 100°C 이상의 온도에서 효과적으로 추출되었다고 보고하였다.¹⁵⁻²²⁾

ASE에 의해 추출과 정제를 동시에 수행한 평균 회수율은 원심분리기에 의한 회수율 보다 평균 15~20% 정도의 높은 회수율을 보이면서도 경제적이며, ASE에 의해 잔류농약분석을

screening으로 할 경우 총 소요되는 분석시간은 시료의 동결건조 시간 때문에 길어지나 분석자가 실제 분석에 투입되는 시간은 다른 어느 전처리 방법보다 적은 시간이 소요되며, 분석 시 소요되는 유기용매, 분석비용, 전처리 시 소요되는 노동력 또한 원심분리에 의한 screening 방법보다는 감소시킬 수 있었다.

일부 농산물 내 잔류농약 검출. 위의 실험에 의해 시행된 고전적인 여러 추출방법과 ASE 추출법의 검출율을 비교한 결과의 재현성을 확인하기 위하여 일부 농산물을 대상으로 잔류농약 screening 실험을 수행하였다. Solvent extraction 방법에 의한 분석결과 농약성분이 검출된 시료(귤, 쌀1과 쌀2)와 원심분리법으로 추출하여 농약성분이 검출된 시료(키위, 토마토, 귤)를 대상으로 ASE를 이용하여 확립된 최적의 조건에서 추출과 정제를 동시에 수행하여 ASE 방법의 정제능과 회수율을 solvent extraction 및 원심분리법과 비교하여 회수율을 Table 5와 6에 나타내었다. Fig. 5에서와 같이 solvent extraction과 정

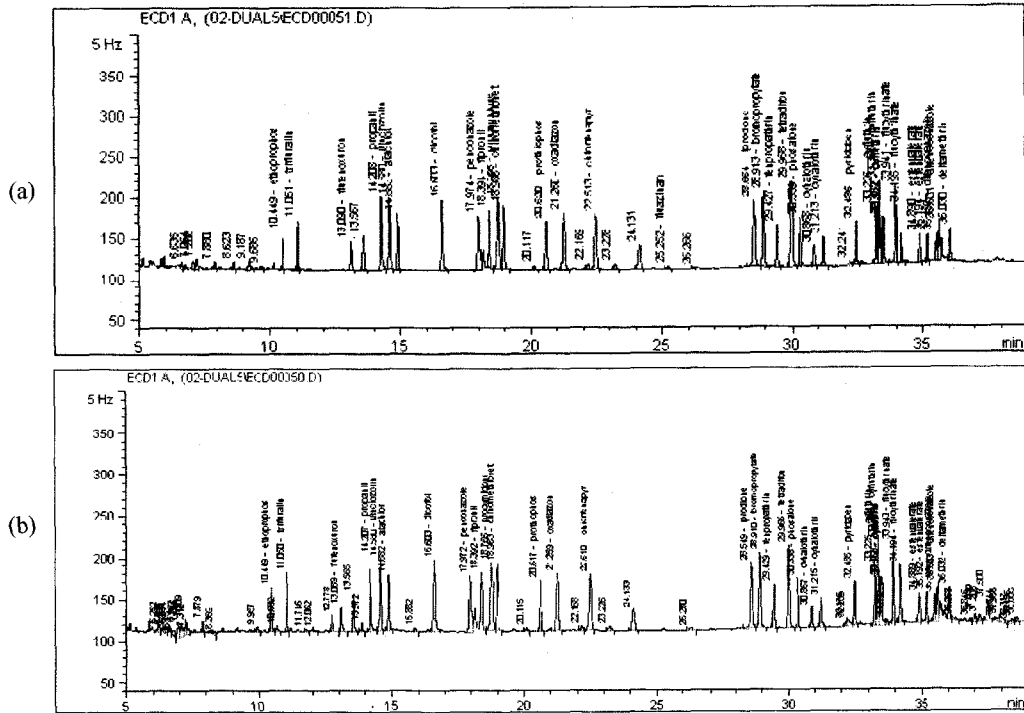


Fig. 3. Chromatogram of pesticides extracted and purified from apple and chinese mandarin sample treated with STD mixture II by ASE after lyophilization.

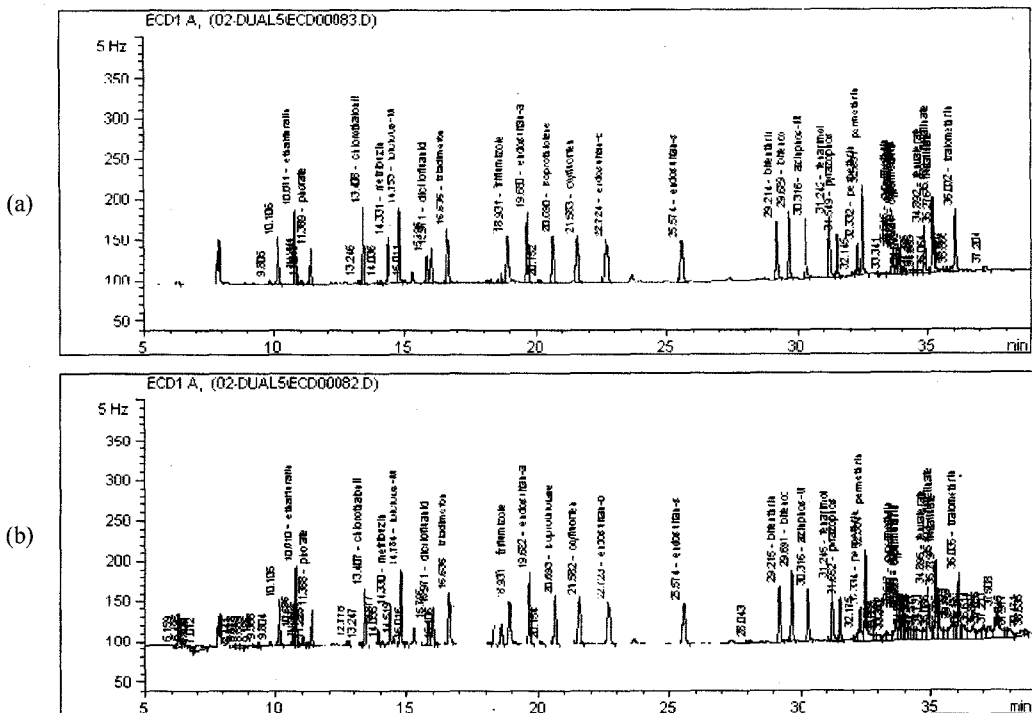


Fig. 4. Chromatogram of pesticides from solvent extraction of apple (a) and chinese mandarin (b) sample treated with STD mixture I.

제를 별도로 시행한 실험결과와 유의적인 차이점을 보이지 않아 ASE를 이용한 동시 추출 정제는 우수한 정제능력을 보여 주었다. ASE와 solvent extraction에 의한 회수량은 꺾에서 잔류농약 propanil에 대하여 각각 0.2358, 0.2291 ppm으로 standard mixture를 이용한 회수율 시험 결과에서와 같이 두 방

법에서는 유사한 회수율을 나타내었다. 한편, ASE와 원심분리에 의한 회수량은 키위에서 잔류농약 vinclozolin에 대하여 각각 0.40000, 0.2487 ppm으로 ASE를 이용한 경우 회수량이 약 1.5배 높았으며, 꺾에서 추출된 잔류농약 procymidone의 경우 원심분리에 의한 회수량은 0.5076 ppm, ASE에 의한 회수량은

Table 5. Comparison of detected amount of pesticide from agriculture produce from solvent extraction and ASE (ppm)

Sample	Pesticides	Solvent extraction	ASE
Chinese mandarin	Propanil	0.2291±0.062	0.2358±0.035
Rice 1	Isoprothiolane	0.9771±0.053	0.9637±0.041
Rice 2	Isoprothiolane	2.0869±0.450	2.0888±0.140

1.4116 ppm으로 ASE방법을 이용한 경우 약 3배정도의 추출효율을 나타내어 ASE가 원심분리보다 월등히 높은 추출결과를 나타내었다. 이러한 결과는 ASE가 보다 적은 농도의 검출에서도 효율이 높음을 알 수 있다.

그러므로, ASE 방법은 원심분리보다 우수한 추출결과를 나타내고, 고전적인 solvent extraction과 비슷한 회수율을 나타내

Table 6. Comparison of detected amount of pesticide from agriculture produce from centrifugation extraction and ASE (ppm)

Sample	Pesticides	Centrifugation extraction	ASE
Kiwi	Vinclozolin	0.2487±0.015 ¹⁾	0.4000±0.030
	Cypermethrin	0.5487±0.053	1.3152±0.35
Tomato	Chlorothalonil	0.1558±0.037	0.2540±0.057
Chinese mandarin	Procymidone	0.5076±0.024	1.4116±0.19
	Iprodione	2.3558±0.47	7.7225±0.38
	Triadimefon	0.0210±0.005	0.0661±0.0002

¹⁾Mean±Standard deviation; n=3

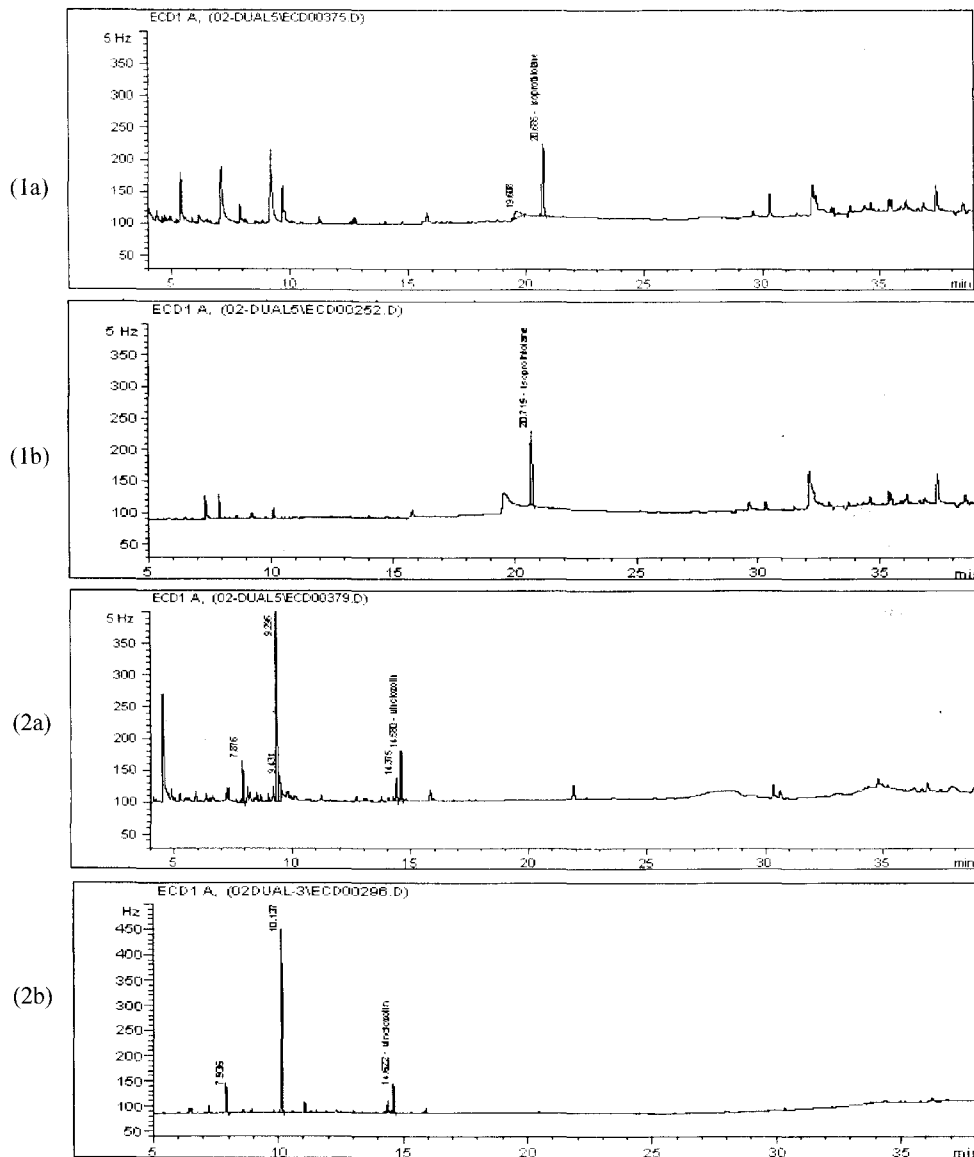


Fig. 5. Chromatogram of pesticides from ASE method (1a and 2a), and from solvent extraction with florisisl cartridge purification (1b and 2b) of agriculture produce.

면서 또한 분석시간을 단축시킬 수 있어 농산물의 잔류농약분석에 유용할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Cairns, T., Luke, M. A., Chiu, K. S., Navarro, D. and Siegmund, E. G. (1993) Multi-residue pesticide analysis by ion-trap technology: A clean-up approach for mass spectral analysis. *Rapid Commun. Mass Sp.* **7**, 1070-1076.
- Hsu, J. P., Schattenberg, H. J. and Garza, M. M. (1991) Fast turnaround multiresidue screen for pesticides in produce. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 886-892.
- Luke, M. A., Froberg, J. E., Doose, G. M. and Masumoto, H. T. (1981) Improved multiresidue gas chromatographic determination of organophosphorus, organonitrogen, and organohalogen pesticides in produce, using flame photometric and electrolytic conductivity detectors. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **64**, 1195-1197.
- Okumura, D., Melnicoe, R., Jackson, T., Drefs, C., Maddy, K. and Wells, J. (1991) Pesticide residues in food crops analyzed by the California department of food and agriculture in 1989. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **118**, 87-151.
- Pylypiw, H. M. (1993) Rapid gas chromatographic method for the multiresidue screening of fruits and vegetables for organochlorine and organophosphate pesticides. *J. AOAC Int.* **76**, 1369-1373.
- Lehotay, S. J. and Eller, K. I. (1995) Development of a method for 46 pesticides in fruits and vegetables by supercritical fluid extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **78**, 821-830.
- Jerry, W. K. (1992) Analytical supercritical fluid extraction: Current trends and future vistas. *J. AOAC Int.* **3**, 75.
- Steven, B. H. (1990) Analytical scale supercritical fluid extraction. *Anal. Chem.* **62**, 633.
- Snyder, J. L., Grob, R. L., McNally, M. E. and Oostdyk, T. S. (1993) The effect of instrumental parameter and soil matrix on the recovery of organochlorine and organochlorine and organophosphate pesticides from soil using supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. Sci.* **31**, 183-191.
- Luque, M. D., de Castro and Jimenez-Carmona, M. M. (2000) Where is supercritical fluid extraction going? *Trends Anal. Chem.* **19**, 223-228.
- Pylypiw, Jr. H. M., Arsenaault, T. L., Thetford, C.M. and Incorvia Mattina, M. J. (1997) Suitability of microwave-assisted extraction for multiresidue pesticide analysis of produce. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3522-3528.
- Fonta, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A. and Zoonenb, P. (1998) van Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography-UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J. Chromatogr. A* **798**, 179-186.
- Fish, J. R. and Revesz, R. (1996) Microwave solvent extraction of chlorinated pesticides from soil. *LC. GC.* **14**, 230-234.
- Lopez-Avila, L., Young, R., Benodicto, K., Ho, P., Kim, R. and Beckert, W. R. (1995) Extraction of organic pollutants from solid samples using microwave energy. *Anal. Chem.* **67**, 2096-2102.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L. and Porter, N. L. (1996) Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* **68**, 6-15.
- Richter, B. E., Ezzele, J. L. and Felix, D. (1995) In ASE 200 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual. Document No. 031149, Revision 01, Sunnyvale: Dionex Corporation.
- Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernandez, L. A. and Madariaga, J. M. (1998) Comparison of accelerated solvent extraction with microwave-assisted extraction and Soxhlet for the extraction of chlorinated biphenyls in soil samples. *Trends Anal. Chem.* **17**, 642-647.
- Ezzell, J. L., Richter, B. E., Felix, W. D., Black, S. R. and Meikle, J. E. (1995) Comparison of accelerated solvent extraction with conventional solvent extraction for organophosphorus pesticides and herbicides. *LC. GC.* **13**, 390-398.
- Richter, B. E., Ezzell, J. L., Felix, W. D., Roberts, K. A. and Later, D. W. (1995) An accelerated solvent extraction system for the rapid preparation of environmental organic compounds in soil. *Am. Lab.* **Feb**, 24-28.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N. and Pohl, C. (1996) Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Anal. Chem.* **68**, 1033-1039.
- Richter, B. E., Ezzele, J. L. and Felix, D. (1994) Single laboratory method validation report: Extraction of organophosphorus pesticides, Chlorinated herbicides, and polychlorinated biphenyls using accelerated solvent extraction with analytical validation by GC/NPD and GC/ECD. Document No. 101124, Sunnyvale: Dionex Corporation.
- Richter, B. E., Ezzele, J. L. and Felix, D. (1994) Single laboratory method validation report: Extraction of TCL/PPL BNAs and pesticides using accelerated solvent extraction with analytical validation by GC/MS and GC/ECD. Document No. 116064 A, Sunnyvale: Dionex Corporation.
- National Agricultural Products Quality Management service, (2003) Society of Agricultural Products Safety, Research Report, Korea.

Use of Accelerated Solvent Extraction Method for Determination of Residual Pesticides in Agricultural Products

Sung-Woo Lee¹, Hye-Young Seo, Byung-Jae Han, Yang-Mo Jeong, Jun-Hyoung Kim, Ki-mi No and Kyong Su Kim*
(*Department of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea, ¹National Agricultural Products Quality Management service, Chonnam Branch office, Kwangju 501-081, Korea*)

Abstracts: ASE (accelerated solvent extraction) was used to develop an analytical method for reducing the sample preparation time in pesticide residues analyses of agricultural produce. The conditions of ASE were as follows: preheat 1 min, heat 5 min, static 1 min, solvent flush% 60 vol., nitrogen purge 60 sec, 4 cycles, 1,500 psi pressure, and 100°C temperature. When *n*-hexane:acetone (4:1, v/v) was used as an extraction solvent, the extraction and purification efficiency of ASE did not show the considerable difference compared with solvent extraction, and the reduction of extraction solvent did not affect the performance of extraction. It was proved that ASE method can reduce, sample preparation time as the extraction and purification steps were combined, and the extraction solvent was significantly reduced.

Key words: accelerated solvent extraction, pesticide residues, agricultural produce

*Corresponding author