

보 문

UPLC를 이용한 잔류농약 다성분 동시분석 연구

김기유* · 엄미나 · 강정복 · 도영숙 · 문수경 · 정일형 · 손종성 · 피일선
박은미 · 김영수 · 이성봉 · 조상훈 · 문선애

경기도보건환경연구원 수원농산물검사소

Simultaneous Analysis of Multi-Residual Pesticides Using UPLC

Ki-Yu Kim*, Mi-Na Eom, Jung-Bok Kang, Young-Suk Do, Su-Gyeong Moon, Il-Hyeong Jung,
Jong-Sung Son, Il-Seon Pi, Eun-Mi Park, Young-Su Kim, Seong-Bong Lee, Sang-Hun Cho, Sun-Ae Moon

Research Institute of Public Health & Environment
Suwon Agricultural Products Inspection Team

Abstract 농산물 중 잔류농약을 보다 쉽고 효율적으로 분석할 수 있는 다성분 동시분석 방법에 따라서 UPLC-PDA를 이용하여 기기조건에 따른 검출한계 및 정량한계를 식품별 최저 MRL과 비교하여 유효성을 알아보고 회수율을 통하여 방법의 재현성을 조사한 결과 다음과 같다. 41종의 농약에 대한 검량선은 직선성이 우수하였으며 검출한계 0.005~0.109 mg/kg으로 나타났으며 정량한계는 0.018~0.363 ppm으로 나타났다. Cycloprothrin 등의 경우처럼 검출기의 감응도가 최저 MRL 기준을 초과하는 농약에 대한 보완으로는 검출감도가 보다 우수한 UV검출기 등의 병행 활용이 필요하다. 회수율에 따른 재현성은 쌀의 경우 첨가 농도 0.4 mg/kg 일때 62.09~99.58%로 편차범위는 1.03~13.92% 얻을 수 있었다.

■ Key words: Residual pesticide, UPLC-PDA

서 론

최근 신선한 농산물의 건강 유익성과 식생활 변화로 채소류의 소비가 대중화되고 있으며^{1,2)}, 농산물의 생산 유통 구조 개선으로 원활한 공급 형태가 이루어지고 있지만 농약 살포에 대한 우려가 높고 농산물의 안전성과 관련해 국내외 여건 및 소비자의 소비 의식이 변화함에 따라 안전성을 확보하지 못해서 불신이 따르는 등^{3,4)} 소비자의 호응에는 미치지 못하고 있다.

따라서 소비자가 만족할 수 있는 농산물 안전관리를 위해서 잔류농약 검사가 필요하고 유통농산물에 대해서는 대부분의 채소가 공영도매시장을 통해 거래가 이루어

짐을^{1,2)} 감안하면 경매가 이루어지는 시점에서 신속하고 정확한 잔류농약 검사로 규제관리 하는 것이 바람직하고 이는 생산자의 추적이 비교적 용이하여 적절한 조치가 따를 수 있기 때문이다. 이로써 부적합한 농산물 유통을 근원적으로 차단하여 식품안전성을 확보하고 유통 농산물의 안전성을 평가하며 무엇보다도 농업인으로 하여금 농약의 적절한 사용을 유도하는데 있다.

이처럼 농산물은 잔류농약에 대한 모니터링의 필요성과 함께 효과적인 모니터링 방법으로 규제 관리해야 한다. 우리나라의 잔류농약 검사는 식품공전⁵⁾에 따르고 있으며 보통 GC와 HPLC를 통한 여러 가지 검출기로 조건에 따른 분석을 제시하고^{6,7)} 있다.

잔류농약 검사가 수탁의뢰 받은 농산물이 경매가 이루어지는 시간적 제한이 있지만 단 한번에 가능한 많은 수의 농약을 분리 정량할 수 있는 잔류농약 다성분 동시분석법이 적절하고 식품공전 중 다성분 동시분석법⁵⁾이 비교적 실험조작이 간편하고 효율적인 분석이 가능하며 현실에 부합하는 방법으로써 여타의 분석을 병행하고 있

*Corresponding author: Ki-Yu Kim, Research Institute of Public Health & Environment, 324-1, Pajang-dong, Jangan-gu, Suwon, Gyeonggi-do 440-290, Korea
Tel: +82-31-236-9413
Fax: +82-31-236-9521
E-mail: kimkiyu@gg.go.kr

식품기술
김기유 외

어서 41종의 농약에 대해서도 UPLC를 이용하여 분석하였다. 따라서 기기에 대한 농약별 검출한계와 정량한계를 식품별 최저 MRL조사로 유효성을 알아보고 회수율 조사와 재현성으로 분석방법에 대한 유효성을 알아보고자 하였으며 이로써 보다 철저한 규제모니터링에 따른 안전한 농산물 생산유통에 기여코자한다.

재료 및 방법

실험재료

농약표준품은 Labour Dr. Ehrenstorfer로부터 구입하였고 잔류농약 분석용 methanol, acetonitrile 등은 J.T. Baker사의 LC grade를 사용하였다. H₂O는 Milli-Q 장치를 이용한 증류수를 사용하였다. 정제용 SPE 카트리지는 Strata NH₂(55 µm, 70A)1,000 mg / 6 ml 를 사용하고 공시료로 사용한 쌀은 유기농산물을 시중에서 구입하였다.

기기 및 분석 조건

UPLC분석은 Waters ACQUITY Ultra Performance LC™ Systems을 사용하여 역상칼럼인 Acquity UPLC C18 (100 mm × 2.1 mm)를 이용하여 분석하였다. 각각의 분석 조건은 표 1과 같다.

전처리 방법

공시료인 쌀은 1 kg를 분쇄기로 분쇄하였으며 채로 쳐서 균질화한 쌀 분말 약 50 g을 취하고 회수율 시험을 위해 농약 표준품 혼합제를 첨가하여 충분히 흡수시킨 다음

표 1. Analytical conditions of UPLC

Model		Waters ACQUITY Ultra PerformanceLC™ Systems		
Detector	PDA@ 200-400(254 nm)			
Column	Waters C ₁₈ , 2.1 mm ID × 100 mm, 1.7 µm spherical			
Mobilephase	A : 100%H ₂ O B : 100%ACN			
Flow Rate	0.4 mL/min			
	Time (min)	Profile		Curve
		%A	%B	
Gradient	0.0	80	20	6
	0.1	80	20	6
	2.0	50	50	6
	5.0	35	65	6
	7.0	20	80	6
	8.0	10	90	6
	9.0	10	90	6
	10.0	80	20	6

물 40 ml를 가하여 2시간 정도 방치 한 후 Acetonitrile 100 ml을 넣어 2분간 균질화 하였다. 균질액을 여과한 후 여액을 NaCl 10 g이 들어 있는 용기에 옮긴 후 1분간 진탕하고 용매층이 분리될 수 있도록 30분간 정치하였다. 용매층이 분리되면 acetonitrile층 10 ml을 각 2개의 시험관에 취하여 공기 농축한 후 추출 정제하였다(그림 1).

검량선 작성 및 회수율 시험

표준품 41종을 acetonitrile 에 녹여서 stock solution 으로 한 각 group 별 혼합 표준용액을 10 ppm, 5 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0.5 ppm의 농도로 만들어서 농도에 따른 피크의 면적으로 검정곡선 작성을 단순 선형 회귀곡선으로 작성하였으며, 각 성분에 대한 검출한계와 정량한계는 표준용액의 크로마토그램을 사용하여 Morrison의 방법⁸⁾에 따라 다음의 식을 만족하는 As의 면적을 각 성분의 농도로 환산하여 구하였다.

검출한계 : $As - Ab \geq 3 \times Sb$

정량한계 : $As - Ab \geq 10 \times Sb$

여기서 As는 sample signal의 평균면적, Ab는 blank signal의 평균 면적 그리고 Sb는 blank signal의 표준편차를 나타낸다.

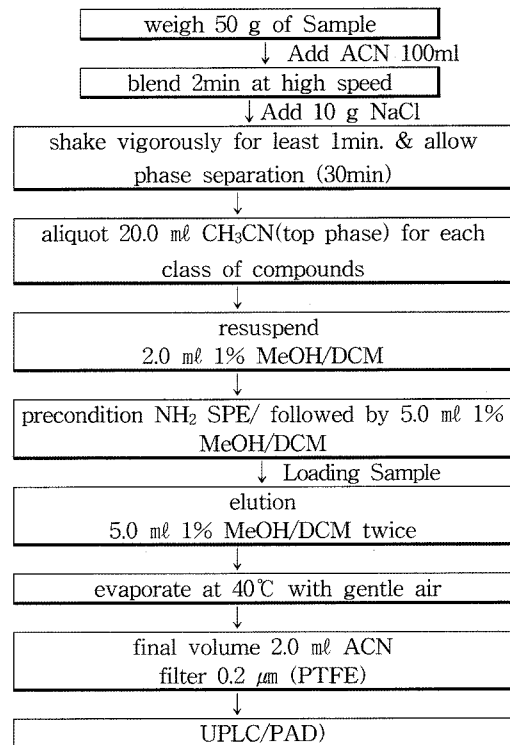


그림 1. Flow chart of treatment in sample

회수율 시험은 농산물 시료에 acetonitrile에 녹인 표준 혼합액을 각 성분이 0.4 mg/kg이 되도록 3반복 처리 혼합하여 분석과정을 통하여 회수율을 산출하였다.

결과 및 고찰

표준물질의 분리

각 표준물질들의 retention time(RT)는 표 2와 같았고 chromatogram은 그림 2와 같이 나타났다.

A 그룹의 경우 thiamethoxam 1.255분부터 fenpyroximate 7.510분의 범위 내에서 그림 2의 첫번째 chromatogram을 보였으며 dimethomorph의 경우는 이성체로서 3.138분과 3.338분의 RT를 보였다.

B 그룹의 경우 pyroquilon 1.897분부터 flufenoxuron

7.355분 범위, C 그룹의 경우 thiacloprid 1.849분부터 cycloprothrin 8.171분의 범위, D 그룹의 경우 cymoxanil 1.765분부터 spiromesifen 8.224분의 범위, E 그룹의 경우 imidacloprid 1.521분부터 spirodiclofen 8.354분의 범위 내에서 그림 2와 같은 순서로 chromatogram을 보였으며 각 개별 group에 속한 표준물질들은 서로 중첩됨이 없이 잘 분리됨을 알 수 있었다.

검정곡선과 결정계수

각 개별 group에 속한 표준물질들은 그림 3에서 보는 바와 같이 표준물질의 농도비와 면적에 따른 검정농도에서 회기방정식에 따라 구했으며 일직선 관계가 있음을 알 수 있었다. 각 그룹별의 표준물질에 대한 결정계수 (R^2) 값들은 표 3에서와 같다.

표 2. Retention times of 41 pesticides

Group	Compound
A	1. Thiamethoxam(1.255) 2. Acetamiprid(1.612) 3. Dimethomorph(3.138, 3.338) 4. Thenychlor(4.785) 5. Tebufenozide(5.222) 6. Pyraclostrobin(5.853) 7. Trifloxystrobin(6.413) 8. Lufenuron(6.823) 9. Fenpyroximate(7.510)
B	1. Pyroquilon(1.897) 2. Methabenzthiazuron(2.423) 3. Azoxystrobin(3.780) 4. Flufenacet(4.808) 5. Hexaflumuron(6.025) 6. Benzoximate(6.263) 7. Imibenconazole(6.413) 8. Flufenoxuron(7.355)
C	1. Thiacloprid(1.849) 2. Pyrimethanil(3.357) 3. Fenhexamid(4.086) 4. Methoxyfenozide(4.357) 5. Pyrazolate(6.054) 6. Pentoxazone(6.835) 7. Pyributicarb(7.355) 8. Cycloprothrin(8.171)
D	1. Cymoxanil(1.765) 2. Flumioxazin(3.465) 3. Boscalid(4.033) 4. Fenoxycarb(4.768) 5. Novaluron(6.333) 6. Cyhalofop-butyl(6.576) 7. Pyriproxyfen(7.077) 8. Spiromesifen(8.224)
E	1. Imidacloprid(1.521) 2. Ferimzone(2.871) 3. Tiadinil(3.813) 4. Mepanipyrim(4.243) 5. Flucrypyrim(4.997) 6. Oxaziclomefone(6.144) 7. Teflubenzuron(6.952) 8. Spirodiclofen(8.354)

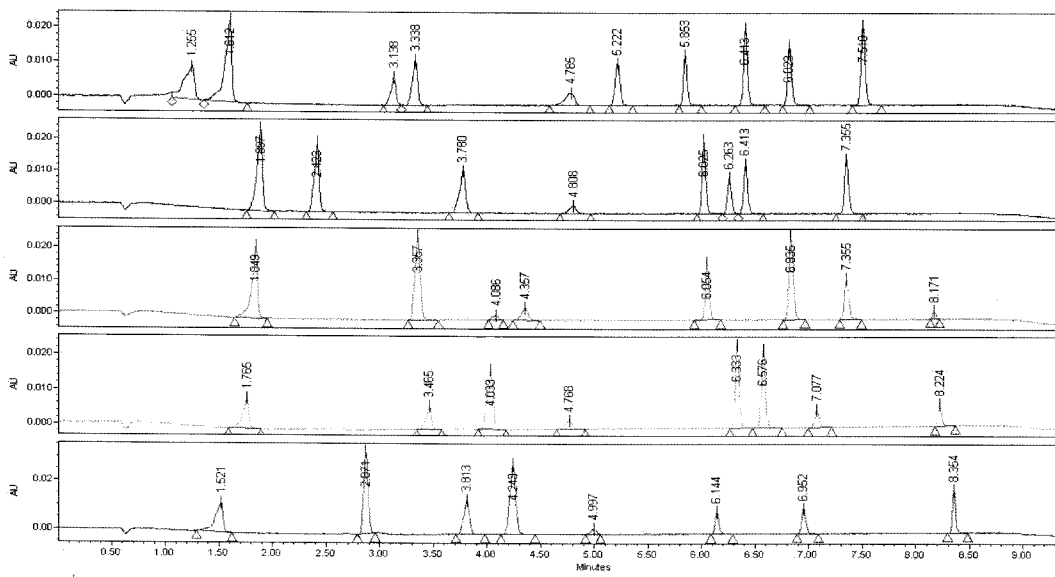


그림 2. Total chromatogram of 41 pesticides

표 3. Coefficient of detremination(R^2) of 41 pesticides

Group	Compound
A	1. Thiamethoxam(0.9990) 2. Acetamiprid(0.9993) 3. Dimethomorph(0.9998) 4. Thenychlor(0.9997) 5. Tebufenozide(0.9999) 6. Pyraclostrobin(0.9996) 7. Trifloxystrobin(0.9997) 8. Lufenuron(0.9999) 9. Fenpyroxymate(0.9999)
B	1. Pyroquilon(0.9997) 2. Methabenzthiazuron(0.9993) 3. Azoxystrobin(0.9998) 4. Flufenacet(0.9999) 5. Hexaflumuron(0.9999) 6. Benzoximate(0.9999) 7. Imibenconazole(0.9999) 8. Flufenoxuron(0.9999)
C	1. Thiocloprid(0.9999) 2. Pyrimethanil(0.9993) 3. Fenhexamid(0.9996) 4. Methoxyfenozide(0.9996) 5. Pyrazolate(0.9995) 6. Pentoxazone(0.9998) 7. Pyributicarb(0.9999) 8. Cycloprothrin(0.9998)
D	1. Cymoxanil(0.9996) 2. Flumioxazin(0.9) 3. Boscalid(0.9993) 4. Fenoxycarb(0.9999) 5. Novaluron(0.9998) 6. Cyhalofop-butyl(0.9999) 7. Pyriproxyfen(0.9999) 8. Spiromesifen(0.9998)
E	1. Imidacloprid(0.9997) 2. Ferimzone(0.9999) 3. Tiadinil(0.9999) 4. Mepanipyrim(0.9997) 5. Fluacrypyrim(0.9999) 6. Oxaziclomefone(0.9999) 7. Teflubenzuron(0.9999) 8. Spirodiclofen(0.9996)

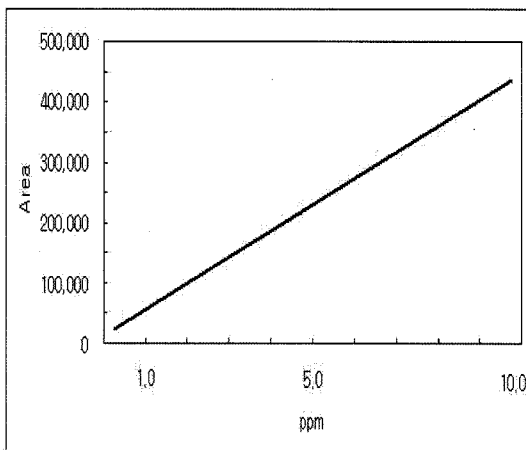


그림 3. Determination coefficient of mepanipyrim

검출 감도 및 회수율 검증

41종의 농약에 대한 농산물의 MRL은 농산물잔류허용 기준 고시⁹⁾에 따른 범위를 조사하여 표 4에 나타냈다.

검출기의 감응도는 Morrison의 방법⁸⁾에 따라 각각의 표준용액의 S/N ratio 에 따른 검출한계(L.O.D)와 정량한계(L.O.Q)를 구하였으며 표 4에 나타냈다.

S/N ratio는 baseline에 대한 noise와 peak의 상대비로 그 값이 높을 수록 표준물질이 주어진 조건에서 잘 검출된다는 의미로 L.O.D와 L.O.Q가 낮아진다.

A 그룹의 경우 Acetamiprid의 LOD 0.007 ppm와 LOQ 0.022 ppm가 낮은 검출한계와 정량한계를 나타내고 Thenylchlor의 LOD 0.025 ppm와 LOQ 0.083 ppm이 높게 나타났다.

B 그룹의 경우 Pyroquilon의 LOD 0.007 ppm와 LOQ 0.022 ppm가 가장 낮은 검출한계와 정량한계를 나타내고 Flufenacet의 LOD 0.059 ppm와 LOQ 0.196 ppm가 높았다. C 그룹의 경우 Pyrimethanil의 LOD 0.007 ppm와

LOQ 0.023 ppm가 낮은 검출한계와 정량한계를 나타내고 cycloprothrin의 LOD 0.109 ppm와 LOQ 0.363 ppm가 높았다. D 그룹의 경우 boscalid의 LOD 0.009 ppm와 LOQ 0.028 ppm가 낮은 검출한계와 정량한계를 나타내고 fenoxycarb의 LOD 0.055 ppm와 LOQ 0.185 ppm가 높았다. E 그룹의 경우 mepanipyrim의 LOD 0.005 ppm와 LOQ 0.018 ppm가 낮은 검출한계와 정량한계를 나타내고 fluacrypyrim의 LOD 0.081 ppm와 LOQ 0.272 ppm가 높게 나타났다.

Cycloprothrin의 경우 시료 전처리에 따른 5배 농축시료를 주입함에도 정량한계가 최저 MRL의 기준 0.05 ppm을 초과함에서 이처럼 PDA 검출기의 감응도에 따른 한계를 보이는 몇몇 농약에 대한 유용성은 보완이 요구된다.

이상에서와 같은 분리조건에서 싼에 첨가된 이들 농약 성분의 회수율도 구하였다. Flumioxazin 62.09%, pyrazolate 62.49%, Teflubenzuron 68.38%의 경우를 제외하고는 대부분의 농약에 대해서는 70% 이상의 회수율을 얻었으며 일반적인 검체의 전처리에 따른 검출방해요소가 따르지만 이는 비교적 검체로부터 기인되는 전처리에 따른 방해요소가 적은 것도 있었다.

결론

본 연구에서는 식품공전 중 동시다성분 분석법에 따라 41종의 농약에 대해서도 UPLC PDA를 이용한 효율적인 검사업무를 하고자 유효성 및 재현성을 알아 본 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분석조건에서 thiamethoxam 1.255분부터 spiromesifen 8.224분의 범위 내에서 각 개별 group에 속한 표준물질들은 각각의 chromatogram에서 서로 중첩됨이 없이 잘 분리됨을 알 수 있었다.

표 4. MRLs, L.O.Ds, L.O.Qs and recovery of 41 pesticides

Compound	MRL range	L.O.D (mg/kg)	L.O.Q (mg/kg)	Recovery in rice	
				mean \pm S.D.	
A_1 Thiamethoxam	0.05~3.5	0.016	0.053	77.59	2.14
A_2 Acetamiprid	0.05~0.7	0.007	0.022	82.22	2.19
A_3 Dimethomorph	0.1	0.008	0.025	91.42	1.70
A_4 Thenylchlor	0.05~5.0	0.025	0.083	87.44	5.66
A_5 Tebufenozide	0.1~3.0	0.014	0.048	79.70	9.26
A_6 Pyraclostrobin	0.1	0.017	0.055	82.85	3.63
A_7 Trifloxystrobin	0.05~2.0	0.010	0.033	81.95	4.80
A_8 Lufenuron	0.2~0.5	0.013	0.044	83.06	6.53
A_9 Fenpyroximate	0.5~10.0	0.009	0.031	85.25	3.57
B_1 Pyroquilon	0.1	0.007	0.022	86.03	3.34
B_2 Methabenzthiazuron	0.1	0.009	0.029	87.07	1.64
B_3 Azoxystrobin	0.05~5.0	0.011	0.038	85.37	9.48
B_4 Flufenacet	0.05	0.059	0.196	82.57	11.53
B_5 Hexaflumuron	0.3~5.0	0.011	0.037	85.84	11.04
B_6 Benzoximate	0.5	0.019	0.065	72.40	4.80
B_7 Imibenconazole	0.2~1.0	0.015	0.051	86.39	12.62
B_8 Flufenoxuron	0.05~10.0	0.013	0.042	83.35	13.92
C_1 Thiacloprid	0.1~1.0	0.007	0.025	90.52	1.81
C_2 Pyrimethanil	0.05~5.0	0.007	0.023	84.17	2.82
C_3 Fenhexamid	0.5~3.0	0.078	0.259	78.20	2.64
C_4 Methoxyfenozide	0.5~5.0	0.036	0.119	90.86	3.93
C_5 Pyrazolate	0.1	0.013	0.042	62.49	7.83
C_6 Pentoxazone	0.05	0.008	0.025	85.20	5.00
C_7 Pyributicarb	0.05	0.015	0.051	91.87	2.14
C_8 Cycloprothrin	0.05	0.109	0.363	85.12	3.01
D_1 Cymoxanil	0.1~3.0	0.016	0.052	75.93	7.59
D_2 Flumioxazin	0.1	0.020	0.068	62.09	10.40
D_3 Boscalid	0.3~3.0	0.009	0.028	72.08	9.92
D_4 Fenoxycarb	0.5	0.055	0.185	99.58	13.84
D_5 Novaluron	0.3~1.0	0.010	0.033	93.01	4.88
D_6 Cyhalofop-butyl	0.1	0.010	0.032	81.70	7.02
D_7 Pyriproxyfen	0.2~2.0	0.039	0.1	94.05	2.15
D_8 Spiromesifen	0.05~6.0	0.041	0.138	90.88	4.15
E_1 Imidacloprid	0.05~3.5	0.012	0.039	94.46	10.38
E_2 Ferimzone	0.05~0.7	0.006	0.019	96.95	1.03
E_3 Tiadinil	0.1	0.011	0.036	85.93	11.40
E_4 Mepanipyrim	0.05~5.0	0.005	0.018	88.39	5.68
E_5 Flucrypyrim	0.1~3.0	0.081	0.272	93.81	4.69
E_6 Oxaziclomefone	0.1	0.025	0.084	97.72	4.01
E_7 Teflubenzuron	0.05~2.0	0.020	0.067	68.38	7.66
E_8 Spirodiclofen	0.5~2.0	0.016	0.054	91.07	2.15

식품기술 김기유 외

2. 각 개별 group에 속한 표준물질들의 농도비와 면적에 따른 회기방정식으로 검량선은 직선성의 결정계수로 thiamethoxam(0.9990)에서 spirodiclen(0.9996)로 나타났다.

3. 검출한계와 정량한계는 mepanipyrim이 0.005 ppm과 0.018 ppm에서 부터 cycloprothrin이 각각 0.109 ppm과 0.363 ppm으로 나타났다. Cycloprothrin 등의 경우처럼 검출기의 감응도가 최저 MRL 기준을 초과 하는 농약에 대한 보완으로는 검출감도가 보다 우수한 UV검출기 등의 병행 활용이 필요하다.

4. 동시다성분 분석에 따른 실패에 대한 회수율 시험으로 Flumioxazin 62.09%, pyrazolate 62.49%, Teflubenzuron 68.38%의 경우를 제외하고는 대부분의 농약에 대해서는 70% 이상의 회수율을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. 농림부, 2007년도 농림업 주요 통계, 농림부, 290-500, 2007
2. 농림부, 2006 채소류 생산 실적, 농림부, 1-102, 2007
3. 농산물유통공사, 2006 주요 채소류 소비패턴, 농산물유통공사, 22-25, 2006
4. 농림부, 친환경농산물 소비자 신뢰도 제고 방안, 미래농정연구원, 5-12, 2007
5. 식품의약품안전청, 식품공전, 한국식품공업협회, 849-855, 2006
6. 박주황, 김택겸, 오창환, 김정환, 이영득, 김장억, Gas-Liquid Chromatography를 이용한 사과 및 배 중의 농약 다성분 잔류분석법, 한국환경농학회, 23(3), 148-157, 2004
7. 식품의약품안전청, 식품중 다중농약 다성분 분석법 개선, 식품의약품안전청, 32-115, 2004
8. Morrison GH, Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry, anal, Chem. 52, 2242-2249, 1980
9. 기준고시 식품의약품안전청, 식품의 기준 및 규격 중 개정(고시 제2007-63호), 2007

2008.11.27. 접수, 2008.12.11. 채택