

소지방 중 잔류농약분석을 위한 액-액분배법과 modified QuEChERS법 비교

김연주* · 최윤화 · 신방우 · 이정학

서울특별시 보건환경연구원

(접수 2011. 9. 23; 수정 2011. 12. 16; 계재승인 2011. 12. 21)

Comparison between the liquid-liquid partition method and modified QuEChERS method for the analysis of pesticide residues in beef fat

Yoen-Joo Kim*, Yoon-Hwa Choi, Bang-Woo Shin, Jung-Hark Lee

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Gwacheon 427-070, Korea

(Received 23 September 2011; revised 16 December 2011; accepted 21 December 2011)

Abstract

This article described the comparison of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) sample preparation and the classical method established by National Veterinary Research and Quarantine Service (NVRQS) for the determination of pesticide residues in livestock products using GC-tandem mass spectrometry. The classical method by NVRQS used liquid-liquid partitioning followed by evaporizing. The modified QuEChERS entailed extraction of 2 g sample with 15 ml acetonitrile containing 1% acetic acid followed by addition of 6 g anhydrous magnesium sulfate and 1.5 g sodium acetate. After centrifugation, 6 ml of the extract underwent a cleanup step (in a technique known as column-based solid phase extraction) using 400 mg each of C₁₈ and primary secondary amine sorbents plus 1,200 mg magnesium sulfate. The quantitation of individual pesticides by both methods was based on tissue standard calibration curves with a correlation coefficient in excess of 0.98 for the 24 pesticides. The detection limits by the classical method were ranged 1.3~5.0 µg/kg, with mean recoveries between 76.2% and 114.3% except aldrin (59.3%) and deltamethrin (63.6%). The detection limits by modified QuEChERS were ranged 0.3~6.2 µg/kg, with mean recoveries between 68.0% and 114.3% except dimethipin (152.6%), chlorgenvinphos (138.1%), 4,4-DDT (61.5%), aldrin (60.4%) and chinomethionate (30.3%).

Key words : Pesticide residue, QuEChERS, GC-tandem mass spectrometry

서 론

인구 증가와 경제성장에 따른 참살이문화의 확산으로 안전한 농산물에 대한 요구가 커졌으며, 안정적인 식량생산을 위한 농약의 사용은 생산량 증대, 상

품성 향상 및 시간과 노동력 절감차원에서 큰 공헌을 하고 있다(김 등, 2011; 정 등, 2004).

그러나 농약은 먹이사슬을 통해 식물에서 동물로 전이될 수 있고(LeDoux, 2011; Jones와 Voogt, 1999), 해충감염 방지를 목적으로 사육하는 동물과 축사에 살포될 수도 있다(LeDoux, 2011; Stefanelli 등, 2009). 결과적으로 이 두 가지 오염 경로는 식육, 어류, 지

*Corresponding author: Yoen-Joo Kim, Tel. +82-2-570-3446,
Fax. +82-2-570-3043, E-mail. lunar725@seoul.go.kr

방, 식용란, 우유와 같은 동물유래 식품을 통하여 잔류성 농약의 생물축적을 발생시킬 수 있다(LeDoux, 2011). 이렇게 식품에 잔류되는 농약은 단기 질병부터 만성질환까지 건강에 문제를 일으킬 수 있음을 보여준다. 그래서 식품 중 잔류되는 농약은 철저히 감시해야 한다. 지금까지 식품 중 다성분을 분석하기 위해 개발된 분석방법들에는 액-액 추출법, 고상추출법, 가속용매추출법, 겔침투크로마토그래피, 마이크로웨이브추출법, 시료고체상분산처리법, 초임계유체추출법 등이 있다(Park 등, 2011).

이 연구에서 사용한 액-액 분배법은 대상 성분의 서로 섞이지 않는 두 용매 간 분배계수의 차이를 이용하여 불순물을 제거하는 방법으로 hexane-acetonitrile partition법은 비극성 유지성분을 제거하기 위하여 사용하였다. 유지성분은 농약 성분에 비하여 더 비극성이므로 비극성 용매인 hexane과 극성 용매인 acetonitrile 간에 분배할 경우 hexane층에 주로 분포하게 된다. 이에 반하여 농약 성분은 극성이 다소 높으므로 상대적으로 acetonitrile층에 보다 많이 분포한다. 이러한 원리를 이용하면 간단한 분배조작에 의하여 잔류농약 분석에서 가장 제거하기 어려운 간접성분을 상당히 제거할 수 있으나, 분리효율이 그다지 높지 않아 분배 후 직접 기기분석에 공시하는 경우는 드물며, 주로 추출액 중 간접물질의 일차적 정제에 많이 사용되고(식품의약품안전평가원, 2009), 그 후에 다시 정제과정을 거쳐서 기기분석을 하게 된다. 이처럼 전통적인 농약분석방법은 시간이 오래 걸리고, 노동집약적이며, 복잡하고, 비용이 많이 드는데다가 상당한 양의 폐용매를 만들어내고, 충분한 검출한계도 얻지 못하는 경우가 있었다(Wilkowska and Biziuk, 2011; Beyer, Biziuk, 2008).

이에 Anastassiades 등(2003)이 식품에서 농약의 추출, 분리 및 정제를 결합하는 분석법을 개발하여 Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, safe의 머리글자를 따서 QuEChERS라 명명하였으며(Wilkowska and Biziuk, 2011), 이때 개발된 QuEChERS법은 2007년 AOAC의 공정법으로 채택되었다(Lehotay, 2007). 이 분석법은 처음에 염을 추가하고 acetonitrile로 농약을 추출하여 그 추출물의 일부를 dispersive-SPE로 정제한 후, acetonitrile의 최종 추출물을 직접적으로 기기분석에 사용하는 것으로, 극성 농약뿐 아니라 산성, 염기성 농약을 포함한 넓은 범위의 농약에 대하여 효과적으로 적용할 수 있고, 높은 시료처리능력과 소량의 용매를 사용하는 장점이 있다(Payá 등, 2007). 또

한, 일반적으로 이 분석법은 8개의 시료를 30분 안에 처리할 수 있다고 알려져 있으나, 이 연구에서는 농축과정 등이 추가됨으로써 시간이 연장되었다(국립농업과학원, 2011). 우리나라에서도 농촌진흥청에서 QuEChERS 전처리법 및 LC/MS/MS와 GC-TOF/MS를 이용하여 개발된 분석법을 농산물품질관리원과 식품의약품안전청에 정책제안하고 민간 잔류농약 분석 연구소 분석자를 대상으로 워크숍을 개최하여 분석법을 보급하고 있다(국립농업과학원, 2011).

우리나라의 축산물에 대한 농약의 잔류허용기준은 1995년부터 유기염소계, 유기인계, 카바메이트계 총 16종에 대하여 설정한 이후 2011년 현재 총 83종의 농약에 대한 잔류허용기준이 설정되어 있다(홍 등, 2005). 농약성분에 따라 주로 GC-ECD나 GC-NPD로 분석해왔던 잔류농약을 선택성과 감도가 좋을 뿐 아니라 계열별로 분리하지 않고 동시에 분석할 수 있는 GC-MS/MS를 이용하여 QuEChERS법을 응용한 전처리법과 기존의 잔류농약분석 전처리법을 비교하고자 이 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

서울시 소재 도축장에서 2010년 11월에 도축한 소의 지방을 200 g씩 채취하여 냉동보관하며 분석시료로 사용하였다.

시약 및 기구

4,4-DDD, 4,4-DDT, chinomethionate, chlorfenvinphos, chlorpyriphos, chlorpyrifos-methyl, cypermethrin, endosulfan sulfate, γ -BHC, permethrin, endosulfan-alpha, endosulfan-beta, deltamethrin은 Sigma-aldrich (USA)사로부터, aldrin, chlordane, dimethipin, endrin, ethion, fenitrothion, fenvalerate, heptachlor, triadimefon, dieldrin은 Chem service (USA)사로부터 4,4-DDE는 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany)사로부터 구매한 것을 각각 사용하였으며, 순도는 95.1~99.9%였다.

추출과 정제에 사용된 acetone, acetonitrile, n-hexane 등은 잔류농약분석용(Wako Pure Chemical, Japan)을, isoctane은 HPLC용(Merck, Germany)을 사용하였으며, 그 외 glacial acetic acid 등의 기타 시약들은 모두

특급을 사용하였다. QuEChERS extract tubes (6 g MgSO₄, 1.5 g sodium acetate)와 dispersive SPE (400 mg PSA, 400 mg C₁₈EC, 1,200 mg MgSO₄)는 Agilent simpliQ를 사용하였다.

분석기기로는 기체크로마토그래프/질량분석기(Waters

Table 1. Analytical conditions of GC-MS/MS for pesticides

Parameters	Analytical conditions
Instrument	GC-MS/MS (Waters Quattro micro GC, USA)
Column	DB-5 MS column (30 m×250 μm ID×0.25 μm, J & W Co, USA)
Injector temp	280°C
Oven temp	70°C (3 mins)-20°C/min-180°C-5°C/min-300°C (7.5 mins)
Gas flow	He (0.8 ml/min)
Ion source temp	200°C
Interface temp	260°C
Ion mode	Positive EI
Multiplier	650
Injection mode	Splitless

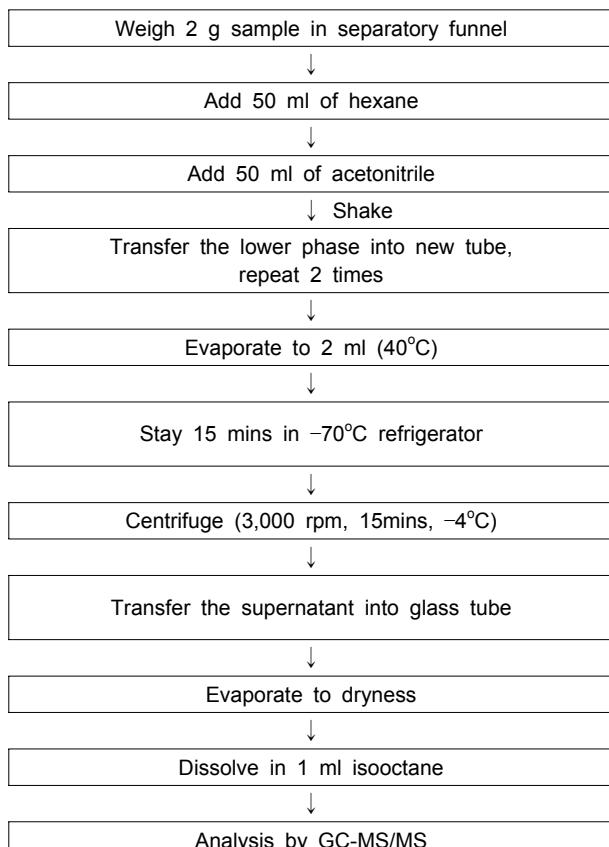


Fig. 1. Flow diagram of liquid-liquid partition method for analysis of pesticides.

Quattro micro GC, HP7890N), 질소농축기(Turbo vap II), EZ-2 plus (Genevac, UK), MMV-1,000W (Eyela, Japan), SPE vacuum manifold (Supelco, USA) 등을 사용하였으며 잔류농약의 분석 및 정성확인을 위한 분석기기의 조건은 Table 1과 같다.

표준용액 및 첨가시료 제조

각각의 표준품을 10 mg씩 취하여 10 ml 용량 플라스틱에 넣고 acetone에 완전히 녹여 표준원액(1,000 ug/ml)으로 하였다. 또 표준원액을 각 실험방법에 따라 isoctane과 acetone으로 희석하여 10 μg/ml로 만들어 표준용액으로 사용하였다. 첨가시료(spiked sample)는 액상지방시료에 농도가 10, 20, 50, 100 μg/kg 이 되도록 24종의 표준용액혼합액을 첨가하여 제조하였다.

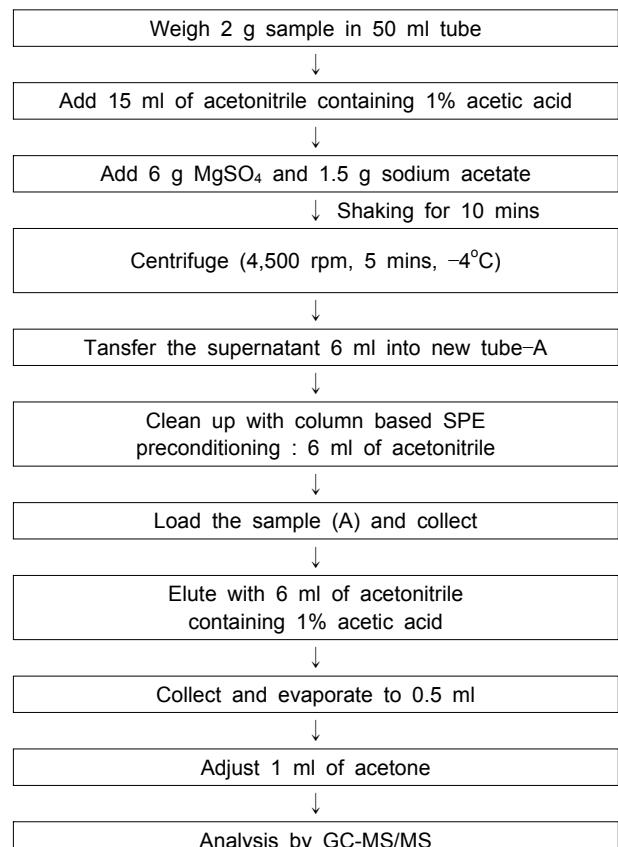


Fig. 2. Flow diagram of modified QuEChERS method for analysis of pesticides.

실험방법

소의 지방을 비이커에 담아 $80.0 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 오븐에 12시간 동안 두어 액상지방을 추출한 후 50°C 수욕 상에 정치하여 지방을 추출, 정제하여 비교 및 회수율 실험에 사용하였다.

액-액 분배법: 국립수의과학검역원의 유기염소계, 유기인계, 피レス로이드계 농약분석법에 따라 지방시료 2.0 ± 0.1 g을 50 ml Hexane으로 용해하고, 50 ml acetonitrile로 2회 추출하여 농축(2 ml)한다. -70°C 냉동고에서 15분간 지방을 얼린 후, 4°C , 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 지방분을 제거하였다. 상층의 acetonitrile액을 농축한 뒤, isoctane 1 ml로 용해하여 GC-MS/MS로 분석하였다(농림수산식품부 농업연수원, 2010).

QuEChERS법을 응용한 전처리법(modified QuEChERS법): 지방시료 2.0 ± 0.1 g에 1% acetic acid를 포함한 acetonitrile 15 ml를 넣고 6 g MgSO₄과 1.5 g sodium acetate을 넣어 10분간 진탕한 후, 4,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액 6 ml를 acetonitrile 6 ml로 conditioning한 column based SPE (400 mg PSA, 400 mg C₁₈EC, 1,200 mg MgSO₄)에 넣고 정제된 용액을 받은 후 1% acetic acid를 포함한 acetonitrile 6 ml로 통과시켜 합친 용액을 500 μl 로 농축한 뒤, acetone으로 1 ml로 맞춘 후 GC-MS/MS로 분석하였다.

SPE 정제를 위한 충진제는 QuEChERS에서 지질이 많은 성분을 분석할 때 사용되는 성분으로 선택하였고, dispersive SPE 방법이 회수율이 저조하여 그 충진제를 그대로 column based SPE로 적용하여 실험하였다.

각 실험법에 대한 흐름도는 Fig. 1과 Fig. 2로 정리하였다.

결과 및 고찰

표준검량곡선

소의 지방시료를 각 실험방법에 따라 추출한 용액으로 24종의 농약혼합표준용액($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 희석하여 $5 \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도에서 표준곡선을 작성한 결과, 24종 모두 0.98 이상의 정의 상관관계(r^2)를 보였다.

농약별 MS/MS 분석대상 ion 설정

농림수산식품부의 식육증잔류물질검사요령에 의거 시행하고 있는 식육의 잔류물질 검사계획의 검사항목인 28종의 농약 중 GC로 분석 가능한 20종과 일부 이성질체를 포함하여 총 24종의 농약을 분석하였다.

농약 24종에 대하여 각각 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 수준의 표준용액을 조제하여 full scan mode로 분석하여 각각 머무름 시간(retention time)과 질량스펙트럼을 확인하였다. 그 결과를 바탕으로 precursor ion (m/z)을 설정하여 collision energy (V)를 $3 \sim 39$ V 범위에서 3 V간격으로 달리하여 product ion 스펙트럼을 다시 확인하였다. 그 스펙트럼에서 precursor와 적합한 collision energy, product ion을 설정하여 Table 2와 같이 농약 별 분석 조건을 작성하였다.

24종의 혼합 표준품에 대한 GC-MS/MS의 TIC chromatogram은 Fig. 3과 같은데 이중 chlordane이나 피レス로이드계의 농약은 이성질체로 인해 peak가 여러 개이므로 peak 중 다른 peak와 머무름 시간이 겹치지 않고 감도가 양호한 한 개의 peak를 선택하여 정량비교에 사용하였다.

시료전처리법

AOAC 2007 QuEChERS법을 이용한 실험으로는 회수율이 측정되지 않아, AOAC법과 국립수의과학검역원의 GC-MS/MS를 이용한 농약동시분석법을 응용하여(농림수산식품부 농업연수원, 2010) 다음과 같은 과정의 dispersive SPE를 이용한 전처리법을 단계적으로 적용하였으나, 각 전처리법의 회수율이 Table 3과 같이 제조하였다.

진탕시간을 연장한 방법과 hexane을 첨가한 방법은 시료에 첨가한 표준용액의 농도가 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 이하인 경우, 검량선의 범위 이하로 회수되어 정량이 되지 않았고, 농축과정을 추가한 방법은 aldrin, chlordane, chinomethionate를 제외하고는 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 부터 정량이 되었다. 액-액 분배법을 응용하여 지방 제거 목적으로 hexane을 첨가하였는데 진탕시간을 연장한 방법보다 회수율이 더 낮게 측정이 되어, hexane 첨가단계는 제외하고 농축과정을 추가한 방법을 적용하였다. 이 방법은 두 번의 농축과정으로 인하여 전처리시간이 연장되었으나, dimethipin과 chlorgenvinphos만 회수율이 50% 이상이었고 그 외의 물질은 10.5~45.2%였다. 이렇게 dispersive SPE를 이용한 전처리법

Table 2. GC-MS/MS parameters for pesticides

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (v)	Dwell time (sec)
Dimethipin	118	90	3	0.05
	124	76*	5	0.05
γ -BHC	183	147	12	0.05
	219	183	9	0.05
Chlorpyrifos-methyl	286	93	21	0.05
	286	241	20	0.05
Heptachlor	272	237	12	0.05
	274	239	15	0.05
Fenitrothion	277	109	15	0.05
	277	260	6	0.05
Chlorpyrifos	197	169	12	0.04
	314	258	12	0.04
Aldrin	263	191	27	0.04
	263	193	27	0.04
Triadimefon	181	127	6	0.04
	208	181	9	0.04
Chlorfenvinphos	267	159	12	0.1
	323	267	12	0.1
Chlordane	373	266	24	0.03
	375	266	12	0.03
Chinomethionate	206	148	12	0.03
	234	206	9	0.03
Endosulfan-alpha	195	159	6	0.03
	195	160	6	0.03
4,4-DDE	246	176	30	0.05
	318	248	21	0.05
Dieldrin	263	191	27	0.05
	263	193	27	0.05
Endrin	263	191	30	0.08
	263	193	30	0.08
Endosulfan-beta	195	159	6	0.02
	195	160	9	0.02
Ethion	231	175	12	0.02
	231	203	6	0.02
4,4-DDD	235	165	20	0.02
	235	199	20	0.02
Endosulfan sulfate	272	235	15	0.03
	272	237	12	0.03
4,4-DDT	235	165	30	0.03
	235	199	12	0.03
Permethrin	183	153	20	0.1
	183	168	9	0.1
Cypermethrin	163	127	5	0.1
	181	152	20	0.1
Fenvalerate	125	89	15	0.1
	167	125	10	0.1
Deltamethrin	181	152	20	0.1
	253	93	15	0.1

*The bold texts are quantification ions.

의 회수율이 50% 이하로 제조하여 충진제를 그대로 column based SPE로 적용하여 활성화 과정을 갖는 최종 modified QuEChERS법을 확립하였다.

기존의 액-액분배법은 두 번의 농축과정이 있어 6건의 시료처리에 6시간 정도 소요되었고, 경우에 따라서는 연장되기도 하였으며, modified QuEChERS법

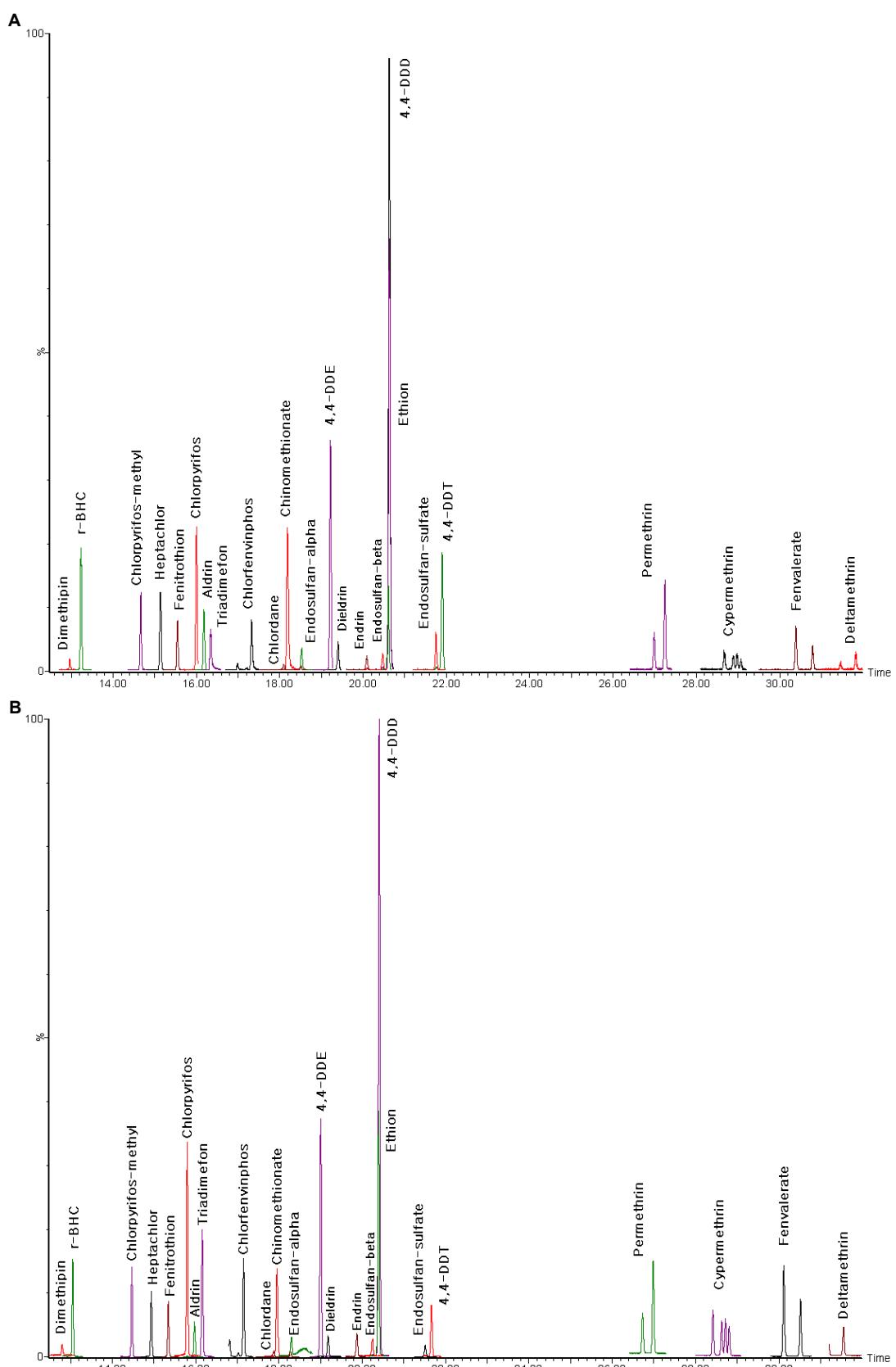


Fig. 3. Total ion chromatograms of sample extract of beef fat fortified at 100 µg/kg with various methods. (A) Liquid-liquid partitioning, (B) Modified QuEChERS.

Table 3. Recovery (n=3) of pesticides by comparison of sample preparations (spiked at 100 µg/kg)

Pesticide	Increasing shaking time		Adding hexane		Adding concentraturation procedure	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Dimethipin	16.2	4.0	13.4	1.6	50.1	1.4
γ-BHC	16.8	3.3	12.6	0.2	32.0	0.6
Chlorpyrifos-methyl	17.3	3.5	12.9	0.4	35.9	0.8
Heptachlor	12.7	2.4	7.4	0.1	25.2	1.4
Fenitrothion	21.4	4.1	15.4	0.2	42.1	1.1
Chlorpyrifos	17.9	4.0	11.2	0.3	34.1	1.5
Aldrin	11.9	2.6	4.9	0.3	18.8	0.7
Triadimefon	18.1	4.0	14.4	0.6	38.1	1.5
Chlorfenvinphos	17.2	3.9	14.4	0.2	57.1	2.2
Chlordane	14.4	3.7	8.4	0.5	25.6	2.8
Chinomethionate	8.9	2.1	7.2	0.1	10.5	0.1
Endosulfan-alpha	16.5	3.7	9.2	0.3	32.7	2.8
4,4-DDE	14.6	3.6	7.0	0.2	24.9	0.4
Dieldrin	17.7	3.4	9.3	0.4	27.9	0.7
Endrin	19.8	4.2	8.3	0.2	33.5	0.4
Endosulfan-beta	17.5	3.5	11.4	0.4	32.0	2.2
Ethion	18.9	4.0	12.9	0.2	39.4	1.0
4,4-DDD	16.9	3.9	11.2	0.1	31.9	0.3
Endosulfan sulfate	15.7	2.8	12.0	0.5	45.2	3.2
4,4-DDT	19.6	4.4	9.9	0.2	33.7	1.0
Permethrin	16.0	3.8	9.6	0.3	28.6	1.0
Cypermethrin	14.8	3.6	12.5	0.1	35.2	1.2
Fenvalerate	14.2	3.3	12.3	0.2	36.8	1.1
Deltamethrin	13.6	2.9	12.3	0.5	36.8	2.6

은 column based SPE 정제와 농축과정으로 인하여 6 건의 시료처리에 3~4시간 정도 소요되었다.

진탕시간 연장

지방시료 2.0±0.1 g에 1% acetic acid를 포함한 acetonitrile 15 ml를 넣고 10분간 진탕한 후, 6 g MgSO₄과 1.5 g sodium acetate을 넣어 10분간 진탕하고 4,000 rpm으로 5분간 원심분리한다. 상층액 8 ml를 dispersive SPE (400 mg PSA, 400 mg C₁₈EC, 1,200 mg MgSO₄)로 옮겨 10분간 진탕한 후, 4,000 rpm으로 5분간 원심분리한 뒤, 1 ml을 GC-MS/MS로 분석하였다.

Hexane 첨가

지방시료 2.0±0.1 g에 hexane 15 ml를 첨가하여 진탕하고, 1% acetic acid를 포함한 acetonitrile 15 ml를 넣어 진탕한 후, 하층액을 옮겨서 6 g MgSO₄과 1.5 g sodium acetate을 넣고 10분간 진탕한다. 4,500 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 상층액 8 ml를 dispersive SPE (400 mg PSA, 400 mg C₁₈EC, 1,200 mg MgSO₄)

로 옮겨 10분간 진탕하고 4,000 rpm으로 5분간 원심분리한 뒤, 1 ml을 GC-MS/MS로 분석하였다.

농축과정 추가

지방시료 2.0±0.1 g에 1% acetic acid를 포함한 acetonitrile 15 ml를 넣고 10분간 진탕한 후, 6 g MgSO₄과 1.5 g sodium acetate을 넣어 10분간 진탕하고 4,500 rpm으로 5분간 원심분리한다. 상층액 8 ml를 4 ml로 농축한 후, dispersive SPE (400 mg PSA, 400 mg C₁₈EC, 1,200 mg MgSO₄)로 옮겨 10분간 진탕하여 4,500 rpm으로 5분간 원심분리한 뒤, 농축하여 acetone 1 ml로 용해하여 GC-MS/MS로 분석하였다.

정확도 및 정밀도

소의 지방에 농도가 20, 50, 100 µg/kg이 되도록 24 종의 표준용액 혼합액을 첨가하여 액-액 분배법과 modified QuEChERS법으로 전처리한 후 GC-MS/MS로 분석하여 정확도(평균 회수율)와 정밀도(변이계수)를 조사한 결과는 Table 4과 같다.

Table 4. Pesticide recovery results in GC-MS/MS for the 2 methods spiked at 20 µg/kg, 50 µg/kg, 100 µg/kg in beef fat

Pesticide	Mean recovery (%)		RSD* (%)		Coefficient of variation (%)	
	Liquid -liquid	Modified QuEChERS	Liquid -liquid	Modified QuEChERS	Liquid -liquid	Modified QuEChERS
Dimethipin	102.0	152.6	1.7	2.1	2.3	5.4
γ-BHC	102.3	81.8	1.8	0.5	2.3	1.9
Chlorpyrifos-methyl	99.3	101.0	1.8	0.6	2.2	1.1
Heptachlor	76.2	72.7	1.5	0.4	3.3	1.5
Fenitrothion	114.1	102.3	2.7	1.7	3.2	4.4
Chlorpyrifos	99.4	97.1	1.5	0.3	2.1	0.6
Aldrin	59.3	60.4	1.0	0.3	2.6	2.1
Triadimefon	111.4	103.5	2.9	0.2	3.7	0.6
Chlorgenvinphos	104.8	138.1	2.3	1.6	3.3	2.7
Chlordane	96.8	75.4	2.3	0.9	3.3	3.7
Chinomethionate	91.7	30.3	2.0	0.3	3.0	2.0
Endosulfan-alpha	81.2	79.7	0.8	1.8	2.4	5.6
4,4-DDE	80.3	68.0	1.5	0.3	3.8	1.2
Dieldrin	104.5	78.0	1.4	0.5	2.1	2.1
Endrin	104.4	72.6	1.8	0.4	2.7	1.2
Endosulfan-beta	104.8	81.5	2.0	1.2	2.5	2.9
Ethion	110.9	96.9	2.8	0.2	3.7	1.1
4,4-DDD	107.6	82.5	2.4	0.2	2.8	0.8
Endosulfan sulfate	90.2	92.5	2.0	2.3	4.3	5.3
4,4-DDT	82.1	61.5	1.9	1.3	3.7	5.7
Permethrin	86.0	78.8	2.5	0.4	4.8	1.6
Cypermethrin	94.9	114.3	2.9	0.6	5.6	1.4
Fenvalerate	88.2	112.3	2.2	0.8	4.3	1.4
Deltamethrin	63.6	99.5	1.8	1.9	3.9	4.7

Mean of 9 replicates. *Relative standard deviation.

기존의 액-액 분배법을 사용한 실험의 회수율은 fenitrothion이 114.1%로 가장 높게 나타났고, aldrin은 59.3%, deltamethrin은 63.6%로 저조하였으며, 그 밖의 농약성분은 76.2~111.4%로 비교적 양호한 회수율을 보였고, 정밀도는 2.1~5.6였다.

Modified QuEChERS법을 사용한 실험에서는 dimethipin이 152.6%, chlorgenvinphos가 138.1%로 너무 높게 나타났지만, 4,4-DDT가 61.5%, aldrin이 60.4%, chinomethionate는 30.3%로 회수율이 매우 저조하였다. 그 외의 농약은 68.0~114.3%로 양호한 회수율을 나타내었고, 정밀도는 0.6~5.7이었다. 이는 분석법 validation에 관한 Codex 권장범위가 10~100 µg/kg에서 회수율이 70~120%이므로 대부분 분석물질이 적합하였으나, 몇 가지 물질은 범위를 벗어났다.

우유와 식용란을 가지고 QuEChERS법에서 cleanup 과정에 dispersive SPE와 column SPE를 비교한 Lehotay 등(2005)이 연구한 결과를 보면, dispersive SPE와 column SPE에서 크게 차이를 보이진 않으나, 식용란에서 chlordane, DDE, dieldrin은 column SPE에

서 회수율이 다소 떨어졌다. 또한, chlordane, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, dieldrin, endosulfan sulfate, permethrin의 회수율은 이번 연구결과와 유사한 수치를 보이고 있다. 액-액 분배법에서는 retention time window가 ±0.09분이었으나, propiconazole의 경우에는 머무름 시간이 0.14분 이상 차이가 나서 정량이 불가하여 동시분석에서 제외할 수밖에 없었다. Modified QuEChERS법을 이용한 실험에서는 retention time window가 ±0.05분으로 액-액 분배법보다 안정되었고, propiconazole의 경우도 정량이 가능하였다.

범위를 벗어난 물질은 동시분석에서 제외하고, 이를 물질에 대해서는 기존의 검사법을 적용하거나, matrix의 영향을 제거할 수 있도록 gas permeation chromatography (GPC)를 이용한 전처리법(Castillo 등, 2011)이나 programmed temperature vaporisation (PTV) injector, pulsed splitless injector 등(LeDoux, 2011)을 GC inlet 부분에 장착하여 분석하는 방법이 적합할 것으로 생각하며, matrix effect를 보완하기 위해 처음부터 시료에 표준용액을 첨가하는 matrix matched

standard로 검량선을 작성하는 방법이 있는데(LeDoux, 2011), 일상적으로 수행하기에는 어려움이 있어 이 연구에서는 시료를 각 실험법으로 추출한 후 표준용 액을 희석하는 tissue standard curve를 사용하였다.

Anastassiades 등(2003)의 연구를 따르면, 구조적으로 수소결합을 형성할 수 있는 -NH-, =N-, -OH, P=O와 같은 작용기를 가진 농약들은 matrix-induced enhancement effect에 영향을 많이 받는 것으로 알려졌는데, 이 연구에서는 chlorfenvinphos가 구조상 P=O를 가지고 있어서 회수율이 높게 나온 것으로 보인다. 또한, Schenck와 Lehotay (2000)는 P=O 결합과 =O 결합, amide를 많이 가지고 있는 물질들이 matrix enhancement의 영향이 많이 나타나는 것으로 추정하고 있으며, dimethipin의 경우 구조상 4개의 =O결합이 있어서 회수율이 높은 것으로 생각된다. 유기염소계 농약은 비극성이고, 지질 친화적인, 매우 안정적인 물질들로 Rosenblum 등(2001)의 연구에 따르면, 그 중 4,4-DDT는 GC에서 DDD로 분해되어 회수율이 낮아-

지는 현상을 나타내며, Castillo 등(2011)은 internal standard인 4,4-DDT-D₈을 사용하여 그 물질을 분석하였다. 그리고 Castillo 등(2011)의 연구에서 보다 지질 친화적인 DDD, endrin, dieldrin, β-endosulfan이 지질과 acetonitrile상에서의 물리화학적 분배인자와 흡착제인 C₁₈에의 정체로 회수율이 <70%가 된 것으로 분석하고 있는데, aldrin도 같은 원인으로 회수율이 낮은 것으로 본다. 다만, chinomethionate는 회수율이 낮은 정확한 원인을 찾지 못했지만, peak가 넓고 tailing이 있는 것으로 보아 SPE의 흡착제 중 PSA에 의한 극성 matrix의 제거로 peak이 넓어지고, 주입하는 동안 분해가 일어난 것으로 추정된다(Anastassiades 등, 2003). 따라서 이 연구에서 유기인계, 유기염소계, 피レス로이드계 등의 농약을 동시분석하고자 하였으나, 범위를 벗어난 물질에 대해서는 analyte protectant나 internal standard를 적용하는 방법 등의 추가적인 연구가 필요하다 하겠다.

Table 5. Calibration equations, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for the investigated pesticides in beef fat

Pesticide	Liquid-liquid					Modified QuEChERS			
	Correlation coefficient	Regression equation	LOD*	LOQ†	(μg/kg)	Correlation coefficient	Regression equation	LOD*	LOQ†
Dimethipin	0.9988	y=33.399x+4.3656	2.8	8.6		0.9946	y=11.855x+3.6889	3.4	10.3
γ-BHC	0.9996	y=162.04x-47.669	2.7	8.2		0.9951	y=93.985x-11.157	1.2	3.6
Chlorpyrifos-methyl	0.9994	y=186.82x-213.5	3.4	10.3		0.9961	y=97.107x-19.081	0.4	1.2
Heptachlor	0.9946	y=110.13x+184.35	4.0	12.0		0.9945	y=70.133x+29.406	1.5	4.4
Fenitrothion	0.9987	y=213.37x-323.16	4.2	12.6		0.9889	y=66.621x-27.354	3.2	9.6
Chlorpyrifos	0.9973	y=300.8x-707.97	1.3	3.9		0.9936	y=200.16x+58.249	0.5	1.5
Aldrin	0.9996	y=42.215x-34.067	3.8	11.4		0.9974	y=40.397x+8.6522	2.2	6.7
Triadimefon	0.9996	y=202.05x-70.591	4.3	13.0		0.9951	y=159.04x+2.4831	0.4	1.1
Chlorfenvinphos	0.9996	y=261.13x-202.56	3.6	10.9		0.9935	y=90.156x-27.563	0.9	2.9
Chlordane	0.9983	y=9.3739x+0.8939	4.1	12.4		0.9972	y=6.9078x+6.8465	1.7	5.0
Chinomethionate	0.9997	y=388.05x-332.65	3.7	11.3		0.9813	y=94.392x-261.89	2.5	7.5
Endosulfan-alpha	0.9993	y=30.078x-34.463	2.1	6.5		0.9955	y=20.219x-8.6223	6.2	18.9
4,4-DDE	0.9984	y=419.06x-765.75	3.0	9.0		0.9968	y=320.89x-156.56	0.5	1.5
Dieldrin	0.9995	y=36.491x-35.578	2.6	7.9		0.9979	y=26.633x+19.839	4.2	12.6
Endrin	0.9996	y=41.821x-41.32	2.9	8.9		0.9967	y=28.173x+4.6501	1.0	3.1
Endosulfan-beta	0.9998	y=29.671x-10.806	3.2	9.7		0.9974	y=19.055x-7.1523	4.8	14.5
Ethion	0.9991	y=396.57x-613.57	4.0	12.0		0.9946	y=257.06x-134.15	0.3	0.8
4,4-DDD	0.9991	y=1625.8x-2516	3.7	11.1		0.9964	y=1091.1x-332.89	1.1	3.5
Endosulfan sulfate	0.9932	y=108.37x+206.69	4.3	13.1		0.9955	y=21.687x+18.749	2.1	6.5
4,4-DDT	0.9980	y=393.4x-761.27	2.9	8.6		0.9967	y=81.362x-79.301	4.1	12.4
Permethrin	0.9986	y=172.95x-378.43	3.9	11.7		0.9957	y=119.22x-28.134	1.5	4.5
Cypermethrin	0.9995	y=114.11x-36.147	5.0	15.1		0.9928	y=58.752x-13.57	2.1	6.4
Fenvalerate	0.9995	y=391.29x-443.22	3.5	10.6		0.9937	y=155.96x-41.452	0.5	1.5
Deltamethrin	0.9986	y=114.13x-230.25	1.5	4.4		0.9953	y=35.764x-40.733	1.7	5.3

*3.3 (σ/S), †10 (σ/S). σ: standard deviation of the response, S: slope of the calibration curve.

검출한계 및 정량한계

24종의 농약 표준물질을 첨가한 소지방 시료를 가지고 ICH (1996)에 따라 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 구한 결과를 Table 5에 정리하였다. 액-액 분배법에서는 검출한계가 1.3~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이고, 정량한계가 4.0~15.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 범위로 나타났으며, modified QuEChERS법은 검출한계가 0.3~6.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이고, 정량한계가 0.8~18.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 범위로 나타났다.

기존의 전처리법에 비하여 modified QuEChERS법이 더 간단하고, 사용하는 유기용매의 양도 적어서 안전하지만, 시료의 특성상 회수율을 높이기 위해 dispersive SPE로 적용하지 못하고, column based SPE로 수행하게 되어 본래의 QuEChERS법과 기존 SPE 법을 결합한 형태가 되었다. 전반적으로 기존의 액-액 분배법이 회수율이 좀 더 우수하나, 검출한계와 정량한계는 modified QuEChERS법이 더 우수하였고, 분석농약 중 피레스로이드계는 기존의 전처리법으로도 잘 되지만 modified QuEChERS법이 더 효과적이라 생각한다.

결 론

이 연구의 목적은 축산물에서 규제대상으로 설정된 농약 중 24종을 대상으로 기존의 액-액 분배법과 QuEChERS법을 비교하는 것으로, 두 가지 전처리법으로 소지방을 추출, 정제하여 GC-MS/MS로 동시분석하였다.

측정한 24종의 농약표준품 표준곡선식에서 두 가지 방법 모두 상관계수 0.98 이상의 양호한 직선성을 보였으며, 20~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 첨가한 시료에서 평균 회수율은 액-액 분배법에서 aldrin (59.3%)과 delta-methrin (63.6%)를 제외하고 76.2~114.1%가 나왔다.

Modified QuEChERS법에서는 19종에서 68.0~114.3%의 결과가 나왔으나, dimethipin (152.6%)과 chlorgenvinphos (138.1%)는 높은 회수율을 보이고, 4,4-DDT (61.5%), aldrin (60.4%)과 chinomethionate (30.3%)에서는 저조한 회수율을 나타내어 추가적인 연구가 필요하다 하겠다. 액-액 분배법의 검출한계 및 정량한계는 각각 1.3~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 4.0~15.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이고, modified QuEChERS법의 검출한계 및 정량한계는 각각 0.3~6.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.8~18.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 수준이었다.

참 고 문 헌

- 국립농업과학원. 2011. 유기오염물질의 신속 분석체계 확립. 2010년도 국립농업과학원 시험연구사업보고서-농산물안전성연구. 34-45.
- 김옥희, 박성규, 최영희, 승현정, 한성희, 이영주, 장정임, 김윤희, 조한빈, 박건용, 유인실, 한기영. 2011. 서울지역 유통 농산물 중 내분비계 장애 추정농약의 잔류실태 조사. 농약과학회지 15: 36-47.
- 농림수산식품부 농업연수원. 2010. 제2기 축산물잔류물질검사과정. pp. 285-296.
- 식품의약품안전평가원. 2009. 식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서. pp. 22-24.
- 정영호, 김장억, 김정한, 이영득, 임치환, 혀장현. 2004. 최신농약학. 시그마프레스, 서울.
- 홍인석, 최윤화, 권택부, 이정학. 2005. Gas chromatograph-mass selective detector를 이용한 식육 중 잔류농약의 동시 분석. 한국가축위생학회지 28: 285-294.
- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. J AOAC Int 86: 412-431.
- Beyer A, Biziuk M. 2008. Methods for determining pesticides and polychlorinated biphenyls in food samples-Problems and challenges. Crit Rev Food Sci Nutr 48: 888-904.
- Castillo M, Gonzalez C, Miralles A. 2011. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. Anal Bioanal Chem 400: 1315-1328.
- Jones KC, Voogt P. 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. Environ Pollut 100: 209-221.
- ICH. 1996. Q2B validation of analytical procedures: Methodology <http://www.fda.gov/downloads/Regulatory%20y-Information/Guidances/UCM128049.pdf>
- LeDoux M. 2011. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. J Chromatogr A 1218: 1021-1036.
- Lehotay SJ, Mastovská K, Yun SJ. 2005. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices. J AOAC Int 88: 630-638.
- Lehotay SJ. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. J AOAC Int 90: 485-520.
- Park JY, Choi JH, Abd El-Aty AM, Kim BM, Oh JH, Do JA, Kwon KS, Shim KH, Choi OJ, Shin SC, Shim JH. 2011. Simultaneous multiresidue analysis of 41 pesticide residues in cooked foodstuff using QuEChERS: comparison with classical method. Food Chem 128: 241-253.
- Payá P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tasdelen B, Oliva J, Barba A. 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe

- (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Anal Bioanal Chem* 389: 1697-1714.
- Rosenblum L, Hieber T, Morgan J. 2001. Determination of pesticides in composite dietary samples by gas chromatography/mass spectrometry in the selected ion monitoring mode by using a temperature-programmable large volume injector with preseparation column. *J AOAC Int* 84: 891-900.
- Stefanelli P, Santilio A, Cataldi L, Dommarco R. 2009. Multiresidue analysis of organochlorine and pyrethroid pesticides in ground beef meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J Environ Sci Health B* 44: 350-356.
- Schenck FJ, Lehotay SJ. 2000. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? *J Chromatogr A* 868: 51-61.
- Wilkowska A, Biziuk M. 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem* 125: 803-812.