J. Fd Hyg. Safety 9(2), 89-94(1994)

수입 과일중 2,4-D의 잔류분석법 및 잔류량 연구

홍 무 기
국립보건원 위생부

Studies on the Analytical Methods and Quantity of Residual 2,4-D in Imported Fruits

Moo-Ki Hong
Department of Hygiene, National Institute of Health, Seoul 122-020, Korea

ABSTRACT—A simple, safe, and sensitive gas chromatographic method using packed column and electron capture detector to analyze 2,4-D herbicide in imported lemon, grapefruit, and orange was described and its usefulness evaluated. In this scheme of analysis the acid herbicide was converted into its alkyl esters by an one-step reaction prior to analysis. The herbicide in the fruits was extracted with ethyl acetate and partitioned against dichloromethane for purification, and the extracts finished partitioning were derivatized with alcohol, using sulfuric acid as a catalyst to form the corresponding alkyl derivatives. The analytical scheme studied was found to be applicable for the herbicide in the fruits without a column clean-up procedure. The mean recoveries of the herbicide for lemon samples fortified at 0.1 mg/kg and 1.0 mg/kg were 93% and 95%, respectively. The detection limit was 0.5 μg/kg for 2.4-D methyl ester.

Keywords □ 2,4-D, Residues, Herbicide, Fruits

우리나라에서는 2,4-D가 벼농사에서 1년생 잡초를 방제하기 위하여 등록, 사용되는데 이는 침투성과 이행성을 가진 호르몬형인 phenoxy계 제초제로 널리 알려져 있다.[1,2] 이러한 제초제로서의 용도 외에도 호르몬성의 작용특성으로 인해 그 사용량의 조절에 따라서 생장조절 효과가 있으며 더욱이 살균효과도 인정되므로 수확한 과일에도 살포하는 수확후 농약(post-harvest pesticide)으로도 사용되고 있다.[3]

2,4-D의 잔류허용기준이 우리나라에서는 레몬 2.0 ppm, 자몽 0.5 ppm, 오렌지는 그 기준이 없으나 감귤류에 0.1 ppm으로 고시[4]되어 있어서 수입 오렌지는 감귤류로 분류하여 규제하고 있다. 2,4-D에 대한 미국이나 Codex의 잔류허용기준은 레몬, 자몽 및 오렌지가 포함된 citrus fruits로서 각각 0.1 ppm과 2 ppm이다.[3,5] 2,4-D의 제제상 사용형태가 우리나라에서는 나트륨염인 수용제, 알킬에스테르형인 수화제및 아민염인 액제로서 단순하나 미국에서는 여러 가지 염인 암모니움, 리튬, 나트륨 및 칼륨 등과 에타놀, 이소프로파놀, C-12~C-14인 알킬계의 각종 아민염, 아밀에스테르 등 각종 에스테르 형태 등 그 종류가 매우 다양하다.[6] 그러나 최종적으로 잔류허용기준은 2,4-D의 acid형, 각종 염 및 에스테르형을 합하여 총 2,4-D의 잔류량으로 환산, 설정되어져 있다.

분석방법은 2,4-D 자체가 화학구조상 두개의 염소를 포함한 카르복실기를 가지고 있으므로 그 유도체를 합성한 후 GC-ECD로 분석하거나 비교적 감도는 낮은 편이지만 유도체를 합성하지 않고 HPLC-UV로 바로 분석할 수 있다. 현재까지 널리 이용되는 유도체 합성법은 BF_3/MeOH나 diazomethane으로 2,4-D를 methyl ester화[7,8] 하거나 pentafluorobenzyl bromide (PFB_{Br})로 PFB ester화[9,10] 하지만 이들 방법은 각각 단점을 가지고 있다. 특히 diazomethane은 극히 위험하고 독성이 강하여 취급이 용이하지 않고 PFB ester화는 분석시료를 철저히 정제하지 않으면 분석이

Received for publication March 30, 1994

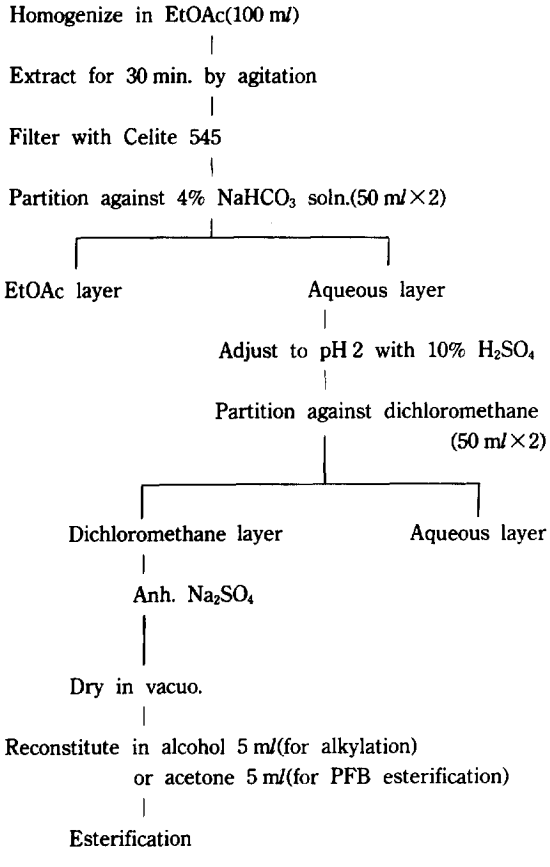

Fig. 1. Extraction and partitioning procedure for residual 2,4-D in fruits.

곤란한 경우가 많다.

따라서 본 연구에서는 주요 수입과일인 레몬, 자몽 및 오렌지에 잔류하는 2,4-D를 추출하여 column chromatography 등 복잡한 정제과정 없이 액액분리만으로 정제하고 이어서 황산을 촉매로 2,4-D alkyl ester를 합성한 후 GC-ECD로 분석하는 신속, 간편한 잔류분석법을 제안하였고 이 분석법으로 시중에 유통중인 주요 수입과일을 구입하여 그 잔류량을 조사하였다.

재료 및 방법

시약

모든 시약은 특급을 사용하였고 2,4-D 표준품 및 용매는 더 이상 정제없이 각각 순품(Sigma, 순도 99.5 %) 및 HPLC용을 사용하였다.

추출 및 정제

시중에서 구입한 레몬, 자몽 및 오렌지는 껍질을 벗겨내지 않고(주 : 농약잔류허용기준은 껍질을 제거하고 난 후 가식부위에 대한 기준임) 8등분으로 자른 후 이중 50 g을 정확히 달아 Fig. 1과 같이 2,4-D를 추출, 정제하였다.

유도체합성

2,4-D의 alkylation은 diazomethane으로 methylation, 14% BF_3/MeOH로 methylation, HCl이나 H_2SO_4를 촉매로 하여 methylation, ethylation, 1-propylation, 2-propylation 및 1-butylation 하였으며 PFB_{Br}로 PFB esterification 하였다. Diazomethane은 Diazald™으로부터 Aldrich Chemical Co.의 technical information bulletin No. AL-113에서 기술한대로 합성하였고 diazomethane을 이용한 2,4-D의 methyl화에는 Khan[11], Cessna 등[12]의 방법을 참고하였다. BF_3/MeOH를 이용한 methylation은 Hargreves 등[13]의 방법, PFB esterification은 정 등[14], Lee 등[10]의 방법을 참고하였다.

강산을 촉매로 사용하여 유도체합성한 경우에는 추출 및 정제가 끝난 시료를 감압하여 용매를 날려버리고 해당알콜(methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 또는 1-butanol) 1 ml로 각각 재용해하고 이 용액을 screw 마개를 단단히 할 수 있는 10 ml capped vial에 약 1 ml의 해당 알콜로 씻으면서 함께 옮겨넣는다. 여기에 0.2 ml의 HCl 또는 H_2SO_4를 함께 넣고 teflon으로 마개를 단단히 하여 흔들어 섞은 후 60℃의 수욕조에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 흐르는 물에서 이를 식힌 다음 10% NaCl용액 5 ml 및 헥산 2 ml를 넣고 흔들어서 추출하고 헥산층을 탈수하여 GC에 주입하였다. 본 실험에 사용한 2,4-D의 각 유도체 합성법의 상세한 합성조건에 대한 특기사항은 Table 1과 같다.

정량 및 기기분석

2,4-D 표준품을 각 농도별로 유도체 합성에 필요한 용매에 녹이고 그 1 ml씩을 취하여 상기의 유도체 합성법으로 4시간 반응시킨 것을 각각의 표준용액으로 하였다. 이 표준용액을 기본으로 하여 시료에서 추출한 용액에 대한 유도체 반응시간의 최적화(100%

Table 1. Characteristics of derivative method used for 2,4-D esterification

No	Derivative method	Final solvent	Reagents	Reaction condition
1	Methylation	Methanol	Diazomethane	Capped, room temp.
2	Methylation	Methanol	14% BF_3/MeOH	Reflux
3	Methylation	Methanol	14% BF_3/MeOH	Open, 60℃
4	Methylation	Methanol	14% BF_3/MeOH	Capped, 60℃
5	Methylation	Methanol	14% BF_3/MeOH	Capped, 100℃
6	PFB esterification	Acetone	K_2CO_3/PFB_{Br}	Capped, room temp.
7	Methylation	Methanol	HCl	Capped, 60℃
8	Methylation	Methanol	H_2SO_4	Capped, 60℃
9	Ehthylation	Ethanol	H_2SO_4	Capped, 60℃
10	1-Propylation	1-Propanol	H_2SO_4	Capped, 60℃
11	2-Propylation	2-Propanol	H_2SO_4	Capped, 60℃
12	1-Butylation	1-Butanol	H_2SO_4	Capped, 60℃

Table 2. Gas chromatographic conditions for residual analysis of 2,4-D

Instrument	Perkin Elmer Sigma 3B
Detector	ECD
Column packing	3% OV-17 on chromosorb W (AW-DMCS)/80-100 mesh 2 mm(I.D)×1.8 m(*L*)
Oven temperature	170℃ (2,4-D alkyl esters) 200℃ (2,4-D PFB ester)
Injector temperature	230℃
Detector temperature	300℃
Flow rate	30 ml/min(N_2)

합성에 소요되는 반응시간)를 위하여 10분~2시간 간격으로 시간대별로 2,4-D의 합성수율을 조사하였다.

시중에 유통되는 수입과일에 대한 2,4-D의 잔류량 조사는 시험한 분석법중 가장 간편하고 우수하다고 판단되는 방법을 선택하였다. 즉, 유도체 합성법으로는 황산을 촉매로하여 2,4-D methyl ester를 합성하고 이를 GC-ECD에 주입, 분석하였다. 정량법은 내부표준물질을 사용하지 않고 2,4-D methyl ester 표준용액을 각 농도별로 GC에 주입하여 검량선을 작성한 후 시료 중의 2,4-D 농도를 구하는 방법인 절대검량선법을 사용하였다. 잔류분석에 사용한 기기 및 그 조건은 Table 2와 같다.

회수율 및 최소검출농도

레몬 50 g 추출물에 각각 0.1 ppm 및 1.0 ppm이 되게 2,4-D를 처리한 다음 상기의 분석법에 따라서 액액분리하여 황산을 촉매로 methylation한 후 이를 분석하여 회수율을 측정하였다. 또한 레몬 50 g을 기준으로하여 2,4-D methyl ester로서 GC-ECD에 대한 최소검출농도(detection limit)를 구하였다.

잔류량조사

보건사회부가 고시하는 농산물중 잔류농약 시험법[15]에서는 과일의 가식부위만을 대상으로 분석하도록 규정되어 있으나 본 연구에서는 과일 전체의 평균잔류량을 구하기 위하여 수입과일별로 각각 20건을 공시하여 과일전체를 분석대상으로 삼았다. 따라서 본 시험법에 따라서 분석한 잔류량 조사결과를 우리나라의 농약잔류허용기준과 비교하여 이 식품의 절대적인 안전성을 평가할 수는 없을 것이다.

결과 및 고찰

추출 및 정제

2,4-D의 화학구조상 비교적 극성이 높은 용매를 추출용매로 선택한 것이 추출효율이 우수하므로 ethyl acetate를 추출용매로 선택하였다. 또 2,4-D를 포함한 MCPA{(4-chloro-*o*-tolyloxy)acetic acid}, MCPP{2-(4-chloro-*o*-tolyloxy)propionic acid}} 2,4,5-T(2,4,5-tri-

Table 3. Yields and impurities of 2,4-D esters using diffrent derivatization from lemon extracts

No	Derivative method	Reaction condition	Yields(%) by reaction time				No. of impurity (by chromatogram)
			10 min	30 min	1 hr	2 hrs	
1	Methylation/diazomethane	Capped, room temp.	88	100	100	100	6~8
2	Methylation/BF_3	Reflux	92	100	100	100	Less then 6
3	Methylation/BF_3	Open, 60℃	76	88	90	92	Less then 6
4	Methylation/BF_3	Capped, 60℃	84	97	100	100	Less then 6
5	Methylation/BF_3	Capped, 100℃	95	100	100	100	Less then 6
6	Estrification/PFB_{Br}	Capped, room temp.	34	52	76	89	More than 12
7	Methylation/HCl	Capped, 60℃	78	90	99	100	5~7
8	Methylation/H_2SO_4	Capped, 60℃	89	99	100	100	5~7
9	Ethylation/H_2SO_4	Capped, 60℃	88	98	100	100	5~7
10	1-Propylation/H_2SO_4	Capped, 60℃	88	98	100	100	5~7
11	2-Propylation/H_2SO_4	Capped, 60℃	88	98	100	100	5~7
12	1-Butylation/H_2SO_4	Capped, 60℃	87	98	100	100	5~7

chlorophenoxyacetic acid) 등 많은 phenoxy계 제초제를 잔류분석할 때 ethyl acetate를 추출용매로 많이 사용했던 점도 고려하였다. 이 실험에서 특이한 점은 추출과정이 끝난 후 column chromatography 등 복잡한 정제과정 없이 액액분리만으로 간단히 정제를 실시하였다는 점이다. 이는 과일 중에는 GC-ECD에 대한 감도가 높은 화합물이 그리 많지 않을 것이라는 점과 추출용액중 중성이나 알카리성 화합물은 액액분리만으로 제거가 용이하다는 점을 고려한 결과이다. 다만 과일중 유기산이나 indoleacetic acid(IAA), abscisic acid(ABA) 등 식물 호르몬, phenol성 화합물 등은 액액분리만으로 제거할 수 없을 것으로 추측되나 시료의 alkylation으로는 GC-ECD에서 이들의 감도가 낮은 편이므로 2,4-D alkyl ester 분석에서는 큰 지장이 없을 것으로 생각되었다. 더욱이 식물성 호르몬인 ABA를 고추씨로부터 추출하여 액액분리만으로 정제하고 이를 PFB ester화 한 후 GC-ECD로 분석하였다는 보고[14]는 이 연구의 분석과정중 정제법을 간단히 액액분리만으로 실시하는 것에 기초가 되었다. 이 보고결과에 의하면 시료중 ABA의 PFB ester화로 인해 유기산 등의 PFB ester화도 가능하나 이들 유기산 등의 PFB ester 물질들에 의한 chromatogram상의 방해가 크지않아 ABA의 미량정량이 가능했음을 증명하였다. ABA는 2,4-D와 화학구조가 달라서 halogen 원소가 ABA분자에 없으므로 GC-ECD에 대한 감도를 높이기 위해서 이를 PFB ester화 하면 추출용액의 액액분리만으로 제거되지 않는 유기산도 동일한 합성반응을 일으켜서 chromatogram상 방해물질로 작용할 수 있지만 2,4-D의 methyl ester 등 alkyl esters의 경우에는 이들 유기산 alkyl esters가 GC-ECD에서 감도가 낮아서 방해물질로 감지되지 않으므로 액액분리만으로도 비교적 깨끗한 chromatogram을 얻을 수 있었다.

유도체합성

2,4-D의 표준용액을 각 농도별로 각각의 유도체 합성법에 따라서 4시간 반응시켜 2,4-D 유도체들의 표준용액으로 삼고 시료추출액의 유도체 합성은 각각 10분~2시간씩 반응시켰다. Table 3은 50 g의 레몬 마쇄액에 1 ppm이 되게 2,4-D를 첨가하여 이를 추출 및 정제한 후 각 유도체 합성법의 최적조건을 알기 위하여 각 반응시간별로 유도체 합성율 및 chromatogram상의 방해피크 수를 조사한 결과이다. 이 Table에서 보는 바와 같이 diazomethane법, BF_3/MeOH로 reflux한 것, BF_3/MeOH로 capped하여 100℃에서 30분 반응한 것 등은 합성을 시작한 후 30분에 반응이 완료되었음을 알 수 있다. 그러나 PFB ester화 및 BF_3/MeOH로 open하여 60℃에서 2시간 반응으로는 유도체합성이 완성되지 않았다. 공통적인 사항은 황산을 촉매로 사용하여 alkyl ester화 한 것은 1시간의 합성반응으로 모두 완료되었음을 알 수 있다. 이 결과는 2,4-D의 methyl화 반응에서 BF_3보다 황산이 우수함을 입증한 결과이다. 그러나 Hargreaves 등에 의하면 BF_3/MeOH법이 황산 촉매법보다 약간 합성수율이 좋았다는 보고[13]와 상반되는 결과이나 이는 methanol 용액에 대한 촉매의 사용비율이 다

르기 때문인 것으로 추측된다. 즉, 본 연구에서는 methanol 용액에 대한 황산의 비율이 Hargreaves 등이 사용한 비율보다 높아서 합성 반응시간이 상당히 단축되었을 것으로 추측할 수 있다. 최근 Hong 등[16]의 연구에 의하면 phenoxy계 제초제인 MCPP의 methyl ester화에서 BF_3/MeOH법 보다 H_2SO_4/MeOH법이 반응시간이 빠르고 유도체 합성이 용이하였다는 주장은 본 연구결과의 신뢰성을 배가 하였다.

레몬 추출물을 각 유도체의 합성법에 따라 합성하여 이를 분석한 결과 Table 3에서 보는바와 같이 PFB법은 레몬 추출물로부터 유래하는 chromatogram상의 방해피크가 12개 이상이었으며 더욱이 이들 방해피크중 일부는 2,4-D PFB ester 피크와 겹치므로 인해 철저한 정제과정 없이 액액분리에 의해서는 정확한 정량이 불가능하였다. 이는 natural water에 잔류하는 10종류의 acid계 제초제를 PFB ester화 한 후 capillary GC- ECD로 분석하기 위하여 철저한 column chromatography로 추출시료를 정제한 후 분석한 결과[10]로 미루어 PFB ester화가 방해피크를 많이 생성하여 간단한 정제과정으로는 분석이 불가능함을 알 수 있다. Diazomethane에 의한 mathyl화는 합성 반응시간이 빠르며 chromatogram상 방해피크가 비교적 적은편이나 diazomethane의 취급에는 위험성이 따르며 촉매역할을 하는 BF_3는 황산에 비해 methylation 속도가 느리며 손쉽게 구입하기에는 황산이 나은 편이므로 2,4-D의 잔류분석에는 alcohol/H_2SO_4법으로 alkylation한 후 GC-ECD로 분석하는 방법이 다른 유도체법에 비해 여러모로 우수하였다. 황산을 촉매로 사용하였을 때 methanol 등 5종류의 알콜로 2,4-D alkyl ester화가 각각 가능하였으며 피크의 retention time이 2,4-D의 methyl, ethyl, 2-propyl, 1-propyl, 1-butyl 순서로 길어졌다. Retention time이 길어짐에 따라 상대적으로 피크의 높이는 낮아졌지만 피크넓이 계산에서는 상호 큰 차이점이 없어서 방해피크 여부 등과 관련하여 시료종류에 따라서 2,4-D alkyl 유도체중 분석자가 자유로이 하나의 alkyl기를 선택할 수 있는 장점이 있다.

회수율 및 최소검출농도

레몬 50 g 추출물에 2,4-D를 각각 0.1 ppm 및 1.0 ppm이 되게 처리한 후 각각 이들을 추출, 액액분리 및 H_2SO_4/MeOH법으로 유도체합성하여 GC-ECD로 분석하였더니 평균 회수율은 각각 93% 및 95%이고 최소검출농도는 2,4-D methyl ester로서 0.5 ppb이었다.

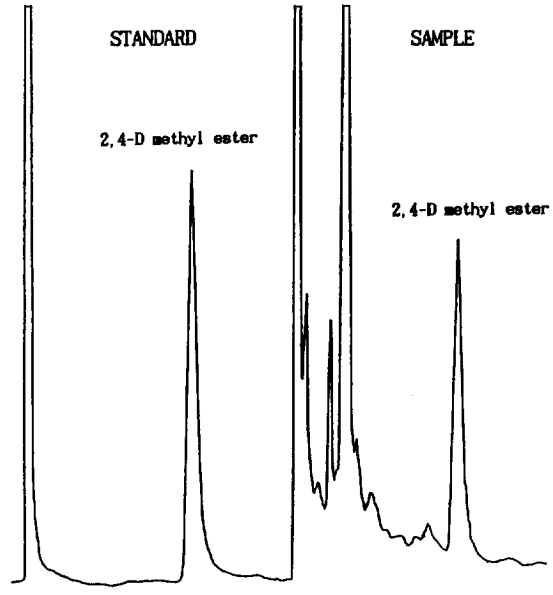

Fig. 2. Typical chromatogram of 2.4-D methylester.

한편 2,4-D methyl ester 표준용액 및 2,4-D가 0.1 ppm 함유한 레몬 추출액을 액액분리로 정제한 후 H_2SO_4/MeOH법으로 유도체합성하여 GC-ECD에 주입하여 얻은 각각의 chromatogram은 Fig. 2와 같으며 이 때 2,4-D methyl ester의 retention time은 4.8분이었다.

잔류량조사

시중에서 구입한 레몬, 자몽, 오렌지 등 수입과일 각 20점에 대해 2,4-D 잔류량을 분석한 결과 레몬 15점에서 0.005~0.490 ppm, 검출된 평균치는 0.095 ppm, 나머지 5점은 불검출이었고 자몽 및 오렌지는 공시한 40점에서 모두 불검출이었다. 레몬의 2,4-D 검출빈도는 75%로서 아주 높은 편이었으나 우리나라의 잔류허용기준이 2.0 ppm인 점을 감안할 때 이에는 크게 못 미치는 수치이므로 이 식품의 안전성에는 문제될 것이 없을 것으로 생각된다. 더욱이 본 실험에서는 레몬껍질을 포함하여 전 부분을 분석한 결과인데 만약 보건사회부 고시인 잔류농약 시험법의 분석지표[15]에 따라 분석하였다면 본 잔류량이나 검출율보다 더욱 낮아졌을 것으로 추측된다.

국문요약

주요 수입과일인 레몬, 자몽, 오렌지에 잔류하는 2,4-D를 간단하고 효과적으로 분석할 수 있는 방법을 제시하였고 그 잔류량을 조사하였다. 수입과일로부터 추출한 시료중 2,4-D는 액액분리로 정제하고 H_2SO_4/alcohol, diazomethane, BF_3/MeOH 등에 의해 2,4-D의 alkyl ester 유도체 및 pentafluorobenzyl bromide(PFB_{Br})로 2,4-D의 PFB ester 유도체를 합성하여 packed column으로 GC-ECD에서 분석하였다. 시료를 ethyl acetate로 추출하고 정제를 위해서는 dichloromethane과 수용액 사이의 액액분리만으로 정제를 간편화 시켰다. 시험한 여러 가지 유도체법중 H_2SO_4/alcohol법이 가장 간편하며 단위시간당 유도체 합성율이 비교적 우수하였으며 이를 GC-ECD에 주입한 결과 chromatogram상 방해피크가 많지 않아서 수입과일의 잔류량 조사시에는 이중에서 H_2SO_4/MeOH법을 사용하였다. 2,4-D를 각각 0.1 ppm 및 1.0 ppm이 되게 첨가한 레몬에서 이를 추출, 분석한 결과 평균 회수율이 각각 93% 및 95%, 최소 검출농도는 2,4-D methyl ester로서 0.5 μg/kg이었다.

참고문헌

1. 농약공업협회: 농약사용지침서. 정화인쇄(주), 서울, 198 (1993).
2. 竹松哲夫: 除草劑研究 總覽. 博友社, 東京, 79-133 (1982).
3. Office of the Federal Register: *Code of federal regulation.* Washington, **40**, 307-309 (1992).
4. 보건사회부: 식품등의 기준 및 규격중 개정(농산물중 농약잔류허용기준). 고시 제91-88호 (1991).
5. Codex Alimentarius Commission: *Codex maximum limits for pesticide residues*(Part 2). CX/PR-2, 21 (1993).
6. Charlotte Sine: *Farm chemicals handbook,* Meister publishing Co., Willoughby, Ohio, C87 and C378 (1990).
7. Gurka, D.F., Shore, F.L., Pan, S. and Amick, E.N.: Single laboratory validation of EPA method 8150 for determination of chlorinated herbicides in hazardous waste. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 970-975 (1986).
8. Cessna, A.J.: The determination of residue of 2,4-D in post-emergence treated triticale. *Pestic. Sci.*, **30**, 141-147 (1990).
9. Chau, A.S.Y. and Terry, K.: Analysis of pesticides by chemical derivatization. III. Gas chromatographic characteristics and conditions for the formation of pentafluorobenzyl derivatives of ten herbicidal acids. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **59**, 633-636 (1976).
10. Lee, H-B., Stokker, Y.D. and Chau, A.S.Y.: Chemical derivatization analysis of pesticide residues. X. Analysis of ten acid herbicides in natural waters. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 557-560 (1986).
11. Khan, S.U.: Electron capture gas-liquid chromatographic method for the simultaneous analysis of 2,4-D, dicamba, and mecoprop residues in soil, water, and barley. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 1027-1031 (1975).
12. Cessna, A.J., Grover, R., Kerr, L.A. and Aldred, M.L.: A multiresidue method for the analysis and verification of several herbicides in water. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 504-507 (1985).
13. Hargreaves, P.A. and Rapkins, S.H.: A simple method for the analysis of picloram and 2,4-D or 2,4,5-T mixtures and commercial formulations. *Pestic. Sci.*, **7**, 515-520 (1976).
14. 정영호, 홍무기, 송병훈: Pentafluorobenzyl ester화에 의한 미량 abscisic acid의 GLC 분석법. 한국 환경농학회지, **4**, 114-117 (1985).
15. 보건사회부: 식품등의 기준 및 규격중 개정(9. 농산물중 잔류 농약 시험법). 고시 제91-82호 (1991).
16. Hong, M.K. and Smith, A.E.: Derivatization and residual determination of MCPP in soil leachate. *Kor. J. Environmental Agriculture,* in press (1994).