J. Fd Hyg. Safety 12(4), 288 - 293(1997)

식육중 Chlorfluazuron의 잔류분석법 및 잔류량에 관한 연구

박건상† · 홍무기 · 백선영 · 정병곤* · 박종세
*식품의약품안전본부 식품안전평가실, *국립동물검역소*

Studies on the Analytical Methods and Quantity of Residual Chlorfluazuron in Meat

K. S. Park†, M. K. Hong, S. Y. Baik, B. G. Jeong* and J. S. Park
**Dept. of Food, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-020, Korea*
National Animal Quarantine Service, Seoul 157-030, Korea

ABSTRACT — Analytical method using capillary GC/ECD was developed to determine trace residues of chlorfluazuron, *1-[3, 5-dichloro-5-trifluoromethyl-2-pyridyloxy)phenyl]-3-(2, 6-difluorobenzoyl)*, in meat, and applied to analyze the residues in domestic and imported meats. The analytical scheme developed does not require column chromatographic cleanup; chlorfluazuron was extracted with diethyl ether and petroleum ether (50: 50), partitioned against acetonitrile, cleaned up with silica Sep-Pak cartridge, identified GC/ECD, and comfirmed by GC/MS. The mean recoveries of the pesticide in meat fortified with standard solution 0.1, 0.5, 1.0 mg/kg were ranged from 82 to 95%. The limit of detection and limit of quantitation were 0.001 and 0.005 mg/kg, respectively. Chlorfluazuron residues were not found in domestic samples, but found in imported Australian beef ranging from 0.02 to 0.17 mg/kg, detected by 18% among the samples.

Key words □ Chlorfluazuron, Meat, Silica Sep-Pak

동물성 식품은 값이나 영양가적 측면에서 고급식품인 반면, 생산에서부터 식탁에 오르기까지 철저한 위생관리가 요구되며 인체에 위해 가능성이 큰 식품이기도 하다. 동물성 식품에 대한 위생관리는 원래 인수공통전염병과 식중독 예방의 목적에서 출발하였으나 효과적인 동물의 질병과 치료 그리고 성장촉진 등의 목적으로 다양한 약제가 소개되었고 또 그 사용량이 급격히 증가하였을 뿐만 아니라 산업의 발달과 더불어 각종 공해물질이 이들 동물성식품에 잔류 혹은 오염될 가능성이 높아짐에 따라 잔류화학물질에 의한 인체에 대한 위해 가능성이 점차 높아지고 있다.[1] 유해물질에 대한 잔류규제는 동물성 식품 전반과 그 부산물에 대하여 모두 적용되어야 할 것이고 규제대상약제의 범위는 우선 배합사료 첨가사용기준에 명시된 것 중 중요한 것과 질병의 치료, 예방 혹은 성장촉진의 목적으로 사용되는 약제 중 위해성이 큰 것 그리고 국내에서 사용빈도가 높은 것을 대상으로 하는 것이 세계적인 추세이다. 미국의 FDA에서는 동물용 의약품, 농약, 공해물질과 그 대사물을 포함하여 약 230여종의 화학물질에 대하여 소, 양, 돼지, 가금류, 말 등에 잔류허용기준을 장기 조직별로 설정하고 있다.[2] 국제기구(FAO/WHO: Codex)에서도 현재 68종의 농약에 대하여 식육중 농약잔류허용기준이 설정되어 있으며 14종의 농약에 대하여 잔류허용기준 설정을 심의하고 있다.[3] 따라서 보건복지부에서는 소비자의 입장에서, 농림수산부에서는 생산자의 입장에서 각각 각종 잔류물질에 잔류허용기준을 설정하여 국내 및 수입 동물성식품중 잔류유해물질에 의한 국민보건상 위해방지에 노력을 기울이고 있다. 보건복지부에서는 1989년 12월에 항생물질 17종, 합성항균제 18종과 홀몬제 5종에 대하여 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기중에 잔류허용기준을 설정하여 운영하고 있으며 현재는 식육(소, 돼지, 닭, 말, 염소, 양, 가금류 등)중에 17종의 농약잔류허용기준이 고시[4]되어 1995년 3월 1일부터 시행되고 있으며 최근에는 아세페이트 등 52종 농약에 대하여 잔류허용기준이 1996년 2월에 고시되어 1996년 7월부터 시행되고 있다.[5] 이와 같이 동물성 식품의 잔류허용기준이 설정된 유해물질은 유통중 또는 수입통관시 공인된 검사방법에 의하여 모니터링하므로서 규제할 수 있으나 다량의 농약으로 오염된

† Author to whom correspondence should be addressed.

농작물을 동물이 사료로서 먹고 이 고기를 사람이 섭취할 경우 먹이사슬의 법칙에 따라서 인체에 위해를 줄 수 있다. 1994년 말에 위와 같은 경우가 전세계적으로 발생하였으며 우리나라에서도 호주산 쇠고기 파동사건으로 문제가 되었던 경우이다. 호주에서 면화에 주로 사용되는 농약인 chlorfluazuron이 다량 잔류된 면화를 먹은 쇠고기에서 이 농약이 검출된 사건으로 이 농약의 잔류허용기준은 쇠고기의 주요 수출국인 호주에서 설정 운영되고 있으나 호주 자체에서도 이 농약에 대한 정확한 검사방법이 확립되지 않은 상태였으며 우리나라에서는 잔류허용기준은 물론 검사방법 조차 전무한 무방비 상태에 있었다. 이에 호주산 쇠고기중 chlorfluazuron의 잔류검사를 시행하면서 확립된 간편하고 회수율면에서 우수한 방법을 개발하였으며 이 방법에 따라 국내산과 호주산 쇠고기중 chlorfluazuron의 잔류량 검사결과를 보고하고자 한다.

재료와 방법

시약

표준품은 chlorfluazuron(wako, 일본)을 사용하였다. 유기용매중 헥산, 에텔, 석유에텔, 아세토니트릴은 잔류농약용 시약(wako, 일본)을 사용하였고 메타놀은 HPLC용 시약(merck, 독일)을 사용하였으며 무수황산나트륨 등 기타 시약은 특급을 사용하였다. 표준용액은 표준원액으로 chlorfluazuron을 헥산에 녹여 1000 mg/kg 만들어 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 표준용액 A는 0.1 mg/kg, 표준용액 B는 0.5 mg/kg, 표준용액 C는 1.0 mg/kg되게 표준원액을 헥산에 희석하여 사용하였다. 정제용 카드리지는 silica가 충진된 Sep-Pak(Waters제)을 사용전에 헥산 10 m*l*로 씻은 후에 사용하였다.

실험방법

농약을 첨가한 시료는 한우고기를 사용하였으며 무첨가 시료로는 호주산 쇠고기와 국내산 쇠고기를 사용하였다. 쇠고기중 지방덩어리는 지방을 분리하여 취한 후 hot plate에서 가온하여(약 50°C 정도) 녹여 그 중 약 3 g을 정밀히 달아 여기에 chlorfluazuron 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1.0 ppm의 표준용액(헥산) 각각 1 m*l*씩을 넣었고, 지방이 붙어있지 않은 고기는 50 g을 정확히 달아 호모게나이저 용기에 넣고 여기에 chlorfluazuron 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1.0 ppm의 표준용액(헥산)을 각각 1 m*l*씩 넣고 에텔 50 m*l*와 석유에텔 50 m*l* 그리고 무수황산나트륨 80 g을 넣고 약 10분간 고속으로 균질화한 후 흡인여과하였다. 잔사는 다시 에텔 25 m*l*와 석유에텔 25 m*l*를 넣고 약 5분간 고속으로 균질화한 후 흡인여과하여 앞의 여액과 합쳐 40°C 이하의 수욕상에서 회전농축기로 용매를 제거하고 다시 질소가스를 통과하면서 용매를 완전히 제거한 후 지방을 취하였다. 각각의 지방을 n-hexane 15 m*l*에 녹여 125 m*l*의 분액깔대기에 옮겨 미국 PAM(Pesticide Analytical Manual)[6] 방법에 따라 아세토니트릴 분배를 한후 이를 보건복지부의 식품공전에 따라 추출한후 40°C 이하의 수욕상에서 회전농축기로 농축하고 잔류물을 n-hexane 2 m*l*에 녹이고 이를 활성화시킨 silica Sep-Pak(헥산 10 m*l*로 유출)에 넣고 위의 농축액을 넣어 카트리지에 흡착시킨 후 에텔과 헥산(15:85)의 혼합액 10 m*l*로 유출하여 버리고 이어서 에텔과 헥산(3:7)의 혼합액 10 m*l*로 용출하였다. 용출액은 40°C 이하의 수욕상에서 감압하에 용매를 날려버리고 헥산 1 m*l*에 녹여 가스크로마토그라프에 사용하였으며 고속액체크로마토그라프에는 메탄올 1 m*l*로 녹여 사용하였다. 실험과정의 요약은 Fig. 1과 같다.

기기측정

GC는 Hewlett-Packard II를 사용하였고 검출기는 전자포획형검출기(ECD)를 사용하였으며 칼럼은 HP-608(Hewlett-Packard) 캐필러리칼럼(25 m × 0.53 mm i.d, fused silica)을 사용하였고 주입부와 검출기의 온도는 280°C로 하였다. 오븐온도는 항온과 승온조건으로 하였다. 항온조건은 160°C였고 승온조건은 처음온도 150°C에서 4분간 유지하였고 20°C/분의 속도로 190°C까지 승온하여 7분간 유지하였다. Carrier가스는 질소를 사용하여 13~15 m*l*/분의 속도를 유지하였다. Make-up가스도 질소를 사용하였으며 주입량은 1 μ*l*를 주입하여 1/50(split ratio)의 비율로 칼럼을 통과하게 하였다. GC/MSD는 Hewlett-Packard 5890 모델에 5970 MSD와 HP 7959B MS Chemstation을 사용하였으며 칼럼

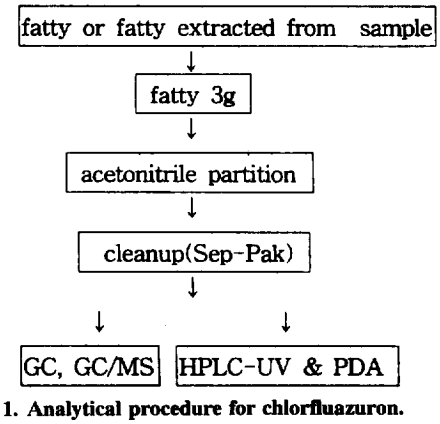

Fig. 1. Analytical procedure for chlorfluazuron.

은 HP-5 fused-silica 캐필러리 칼럼(30 m×0.22 mm i.d)으로 splitless로 하여 사용하였다. 주입부 온도와 interface 온도는 각각 250°C, 280°C로 하였고 오븐온도는 승온조건으로 처음온도 150°C에서 4분간 유지하였고 20°C/분의 속도로 190°C까지 승온하여 7분간 유지하였다. Carrier가스는 헬륨을 1 ml/분의 속도로 하였고 solvent delay time(시료 주입 후 일정 시간동안 vent시키고 그 이후 부터 MSD로 흐르게 하는 기능)은 3분으로 하였다.

HPLC는 Water사의 486 tunable absorbance detector(UV 검출기)와 996 photodiode array detector를, 칼럼은 μ Bondapak C_{18} (3.9 mm×30 mm)를 각각 사용하였고 이동상은 MeOH/water(3:7)을 1.0 ml/min. 속도로 하여 UV-257 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

회수율

쇠고기중 지방과 고기(근육)추출물에 chlorfluazuron 0.1 ppm, 0.5 ppm 및 1.0 ppm의 표준용액 각각 1 ml씩을 넣고 이 연구의 실험방법에 따라 실험하였으며 또한 대조군으로서 위의 3가지 표준용액을 3 ml씩 취하여 동일하게 실험하였을때 각각의 시료와 농도별 회수율은 Table 1과 같았고 표준용액의 chromatogram은 Fig. 2와 같았다. 회수율은 높은 농도를 첨가한 시료가 높이 나타났으며 시료별로는 표준용액만으로 실험했을 때 가장 높았고 HPLC(peak 높이법으로 계산)보다는 GC에서 다소 높은 경향을 나타냈다. 쇠고기중에서는 근육보다는 지방자체에 첨가하였을때가 높았는데 이는 근육에서의 실험과정이 한단계 많은 것이 아닌가 추정되었다.

Table 1. Recovery[a] of the chlorfluazuron in fatty, meat and water

GC & HPLC / Samples	GC spike (ppm)	GC recover yield (%)	HPLC[b] spike (ppm)	HPLC[b] recover yield (%)
Fatty	0.1	88	0.1	86
	0.5	92	0.5	91
	1.0	95	1.0	94
Meat	0.1	82	0.1	80
	0.5	86	0.5	84
	1.0	90	1.0	88
Blank (Water)	0.1	96	0.1	96
	0.5	97	0.5	97
	1.0	99	1.0	99

[a]Each value is the average of 4 measurements.
[b]Calculated with peak height by manual.

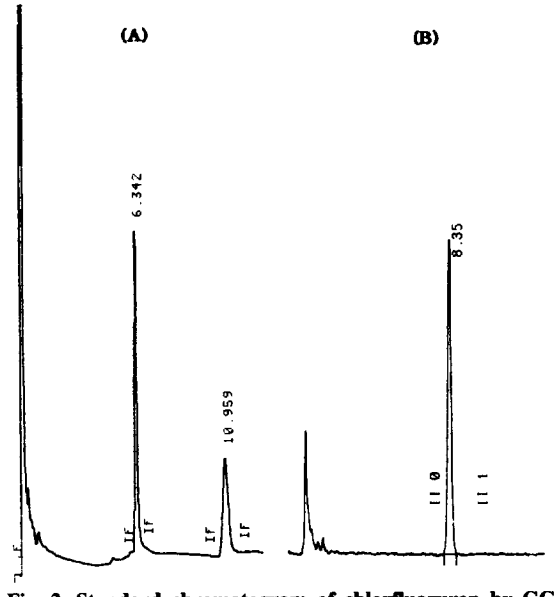

Fig. 2. Standard chromatogram of chlorfluazuron by GC (A) and HPLC (B) (0.2 ppm, 1 μl injection in GC and 20 μl injection in HPLC).

검출한계와 정량한계[7,8]

이 연구의 실험방법에서 검출한계와 정량한계는 Table 2와 같았다. GC분석에 있어서 쇠고기중의 지방 또는 고기(근육)중 지방 3 g에 대하여 검출한계(LOD)는 1 ppb이었고 정량한계(LOQ)는 5 ppb이었다. 그러나 시료인 지방 3 g에 대하여 최종용액을 1 ml로 하였을때 GC 크로마토그람상 안정되었던 점으로 미루어 시료를 좀더 많이 취할 경우는 검출한계와 정량한계를 더욱 낮출 수 있을 것으로 생각되었다. HPLC분석에 있어서 시료중에서는 시료의 방해성분 때문에 검출한계와 정량한계를 구하는 것이 무의미 하였으며, 표준용액을 사용한 실험에서는 GC분석시와 같았다.

GC 측정법과 HPLC 측정법의 비교

GC에서 chlorfluazuron의 peak를 살펴보면 캐필러리 칼

Table 2. Limit of Detection(LOD) and Limit of quantitation (LOQ) for chlorfluazuron at GC and LC chromatogram (ppm)

Method	LOD	LOQ
GC	0.001	0.005
HPLC	0.001	0.005

럼에서는 GC injector내에서 열분해에 의하여 3개의 분해물 생성되고 chromatogram상 3개의 peak로 분리되었으나, wide bore 칼럼에서는 2개의 peak만이 분리되었다. Injector내에서의 열분해 메카니즘[9]은 Fig. 3과 같고, 이에 대한 GC-Mass의 total ion chromatogram(TIC)과 각 peak별 spectrum은 Fig. 4와 같았다. 이 농약의 분석법은 호주,[10] 일본[11]의 시험법 등이 있으나 정량에 있어서 명확한 설명이 없는 실정이다. 그러므로 이 연구에서는 표준용액에서 얻은 분해물 peak를 농도별로 calibration하였을 때는 그 비율이 맞게 나타났다. 그러나 시료의 경우에는 쇠고기중 chlorfluazuron의 잔류량이 높을때에는 분해물 peak의 비율이 거의 유사하였으나 잔류량에 낮을 때에는 분해물 peak의 비율은 의미가 없었다. Chromatogram도 캐필러리 칼럼에서는 3가지 분해물중 chlorfluazuron의 urea type (2번째 peak)의 peak만 형성되었고 wide bore 칼럼에서도 chlorfluazuron의 urea type(1번째 peak)의 peak만 형성되었다. 즉 어느 정도의 농도에서는 열분해물의 peak가 모두 형성되나 미량 존재시에는 chlorfluazuron의 urea type의 peak(캐필러리 칼럼에서는 2번째, wide bore 칼럼에서는 1번째 peak)만이 나타났으나 이 peak 하나만으로 calibration하여도 일반적인 잔류분석 범위의 농도에서 직선

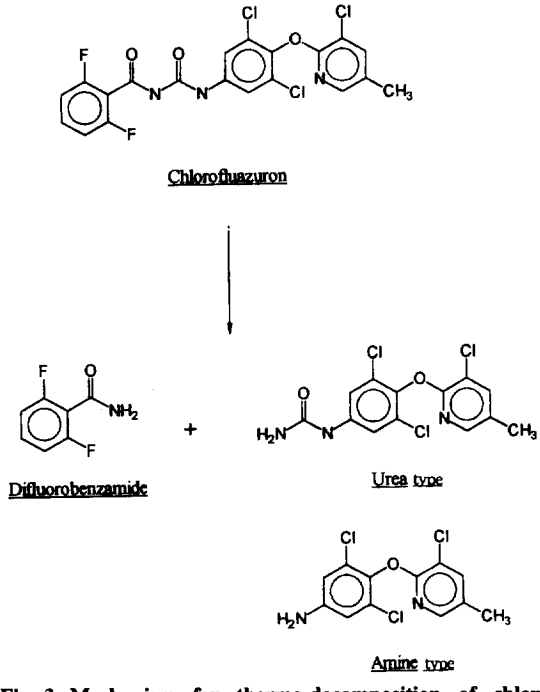

Fig. 3. Mechanism for thermo-decomposition of chlorfluazuron in GC injector.

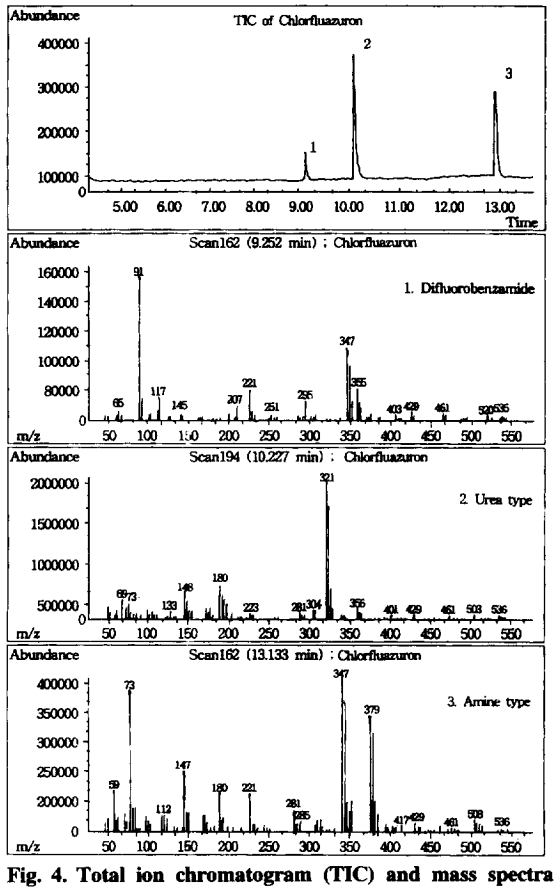

Fig. 4. Total ion chromatogram (TIC) and mass spectra of chlorfluazuron.

성을 나타내어 정량에는 아무 문제가 없었다. 그러므로 이 연구에서는 표준용액과 시료의 비교 정량에서 각각의 chlorfluazuron의 urea type peak로 정량하여 좋은 결과를 얻었다.

HPLC에서는 UV와 PDA 검출기로 chlorfluazuron의 메탄올 표준용액을 scan한 결과 Fig. 5과 같이 UV 257 nm에서 최대 흡수를 나타내어 UV 257 nm에서 분석하였다. 표준용액의 peak는 HPLC의 장점인 온도와 관계가 없는 이유로 열분해물은 생성되지 않고 농약성분의 peak만 나타나며 표준용액이나 blank 시료의 경우에는 GC에서 보다도 좋은 결과 즉 한개의 peak로 정성과 정량이 가능하였다. 그러나 쇠고기중 지방과 고기(근육) 시료에서는 이 농약의 성분과 시료중의 성분이 분리되지 않았으며 용매의 조성을 바꾸어 물의 함량을 아주 높게하면 분리는 되나 이때 분석시간이 아주 길어지므로 바람직하지 않았다. 이 연구의 실험방법중 정제과정에서도 시료중의 방해성분이 제거

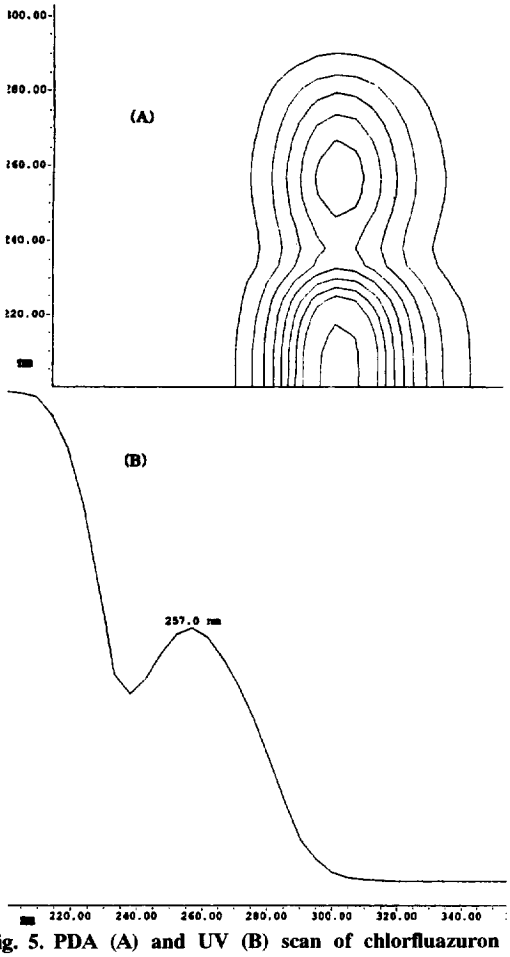

Fig. 5. PDA (A) and UV (B) scan of chlorfluazuron in methanol.

Table 3. Chlorfluazuron residues in domestic and imported beef (ppm)

Samples	No. of samples	Detected	Detection range	Average
Domestic	10	0	–	–
Imported	50	9	0.020~0.170	0.084

되지 않아서 정량에는 문제점을 내포하고 있었으나 시료 중 방해성분을 효과적으로 제거할 수 있는 방법을 개발할 경우 HPLC가 GC 분석보다 좋은 결과를 나타낼 수 있다고 생각되었다.

국내산과 수입산 쇠고기중의 잔류량 조사

시중에서 구입한 호주산 쇠고기 50건과 국내산 쇠고기 10건에 대하여 chlorfluazuron의 잔류량을 분석한 결과는 Table 3과 같았다. 국내산 쇠고기에서는 검출되지 않았으나 호주산 쇠고기에서는 9건에서 0.02~0.170 ppm이 검출되었으며 검출된 평균치는 0.084 ppm이었고 나머지 41건에서는 검출되지 않았다.

Chlorfluazuron의 잔류허용기준은 Codex, 미국, 일본 등에서는 설정되어 있지 않으며 호주[11]에서 쇠고기에 1.0 ppm으로 설정되어 있고 호주산 쇠고기중 검출된 농약의 최고잔류량도 이 기준에는 미치지 않았다. 이 농약은 비교적 독성이 낮으며(급성경구독성 LD_{50}은 8500 mg/kg임) 곤충의 chitin 합성을 저해하는 살충제로 chitin이 없는 포유동물 즉 인축에는 독성이 문제가 되지 않는 것으로 알려져 있다.[12] 따라서 Codex, 미국 등 선진외국에서도 잔류허용기준을 설정하지 않고 있으므로 우리나라에서 이 농약의 잔류허용기준을 설정할 필요는 없을 것으로 생각된다.

국문요약

Capillary GC/ECD를 사용하여 쇠고기중 미량 잔류하는 chlorfluazuron의 분석방법을 개발하였다. 수입산과 국내산 쇠고기중 chlorfluazuron 잔류량 분석은 diethyl ether 및 석유에텔(50:50)의 혼합액으로 추출하고, 아세토니트릴 분배에 의해서 지방을 제거한 후 실리카 Sep-Pak 카트리지로 정제하였다. 이 분석방법은 칼럼정제를 생략하고 capillary GC/ECD를 사용한 것으로서 쇠고기중 chlorfluazuron분석에 적용이 가능하였다. 이 실험방법의 회수율은 쇠고기중 chlorfluazuron 표준용액을 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg/kg 첨가하여 분석한 결과 82~95%를 나타냈으며 검출한계와 정량한계는 각각 0.001 mg/kg과 0.005 mg/kg이었다. 쇠고기중 chlorfluazuron의 잔류량검사 결과는 국내산 쇠고기에서는 검출되지 않았으나 호주에서 수입된 쇠고기에서는 50건중 9건이 검출되어 18%의 검출율을 보였고 그 잔류량은 0.02~0.17 mg/kg이었다.

참고문헌

1. 이문한, 신광순: 동물성 식품에 대한 안전성 확보 및 문제점과 대책, 한국식품위생학잡지, 5(3), 139-158 (1989).
2. The Office of the Federal Register Nation Archives and Records Administration: 40 Code of Federal Regulation Part 150 to 189, 1992, USA (1994).
3. FAO/WHO: Codex Alimentarius Commission (1995).
4. 보건사회부: 식품공전, pp. 85-86, 746 (1995).
5. 보건사회부: 보건사회부 고시 제 1996-10호 (1996).
6. U. S. Department of Health and Services, Food and Drug Admini- stration : Pesticide Analytical Manual, Volume I (1995).
7. 後勝眞康, 加勝誠哉: 殘留農藥分析法, pp. 7-9, 1980.
8. Michael D. Smedley and John D. Weber: Liquid Chromatographic Determination of Multiple Sulfonamide Residues in Bovine Milk, *J. of A.O.A.C.*, 73(6), 875-879 (1990).
9. Department of Administration Services: Australian Government Analytical Laboratories, Pesticides and Organic Resdiue Method Manual (1994).
10. 厚生省 生活衛生局 牛肉衛生課: 牛肉のChlorfluazuron의 暫定的な 分析法, 社務連絡ね, 日本(1994).
11. D. West, Goverment Printer: Pure Food ACT, 1908 and Pure Food Regulations, 1937, Australia, 1983.
12. The British Crop Protection Council: The Pesticide Manual, 10th pp. 176-177 (1994).