pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 38, No. 3, pp. 89~98 (2023)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2023.38.3.89

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

가열증류법에 의한 식용유지의 잔류농약 분석법 개발

손미희* · **김재관** · **조영선** · **한나은** · **김병태** · **박명기** · **박용배**
경기도보건환경연구원 안산농수산물검사소

Residual Pesticide Analysis Method of Edible Oil via Heat Distillation Methods

Mi-Hui Son*, Jae-Kwan Kim, Young-Seon Cho, Na-Eun Han, Byeong-Tae Kim, Myoung-Ki Park, Yong-Bae Park
Ansan Agricultural and Fishery Products Inspection Center, Ansan, Korea

(Received February 13, 2023/Revised June 5, 2023/Accepted June 10, 2023)

ABSTRACT - Currently, no guidelines exist regarding the maximum residues of pesticides in edible oil which is a processed food commonly consumed in Korea. This lack of guidelines hinders the evaluation of the safety of edible oil in terms of pesticide contamination. In this study, an analysis method based on heat distillation and GC-MS/MS was established by optimizing the extraction and purification procedure for 68 pesticides. Important variables in the thermal distillation procedure included heating temperature and time, and we found the nitrogen flow rate as a mobile phase and the type of dissolving solvent were not considerably affected. The determination coefficient (R^2) of the residual pesticide was 0.99 or higher, and the quantitative limit (LOQ) was 0.01-0.02 mg/L. The average recovery rate (n=5) was 66.1-120.0% and the relative standard deviation was lower than ±10% when 68 pesticides were spiked at concentrations of 0.01-0.02, 0.1, and 0.5 mg/L. In addition, the within-laboratory precision was less than ±11%, meeting the Korea Food and Drug Safety Evaluation Institute's Guidelines on Standard Procedures for Preparing Food Testing Methods (2016). Therefore, the test method developed in this study can be used as a test method for managing the safety of the residual pesticide concentration in edible oil.

Key words: Edible oil, Residual pesticides, Heat distillation methods

튀김이나 부침 등 각종 음식에 다양한 맛과 향미를 부여하는 식용유는 3대 영양소 중 하나인 지방의 주요 공급원으로 필수 지방산과 지용성 비타민 등을 함유하여 영양학적 가치가 매우 높다.[1] 또한 각종 식품에 다양한 맛과 향미를 부여하여 식욕을 증진시키기 때문에 식품가공 현장이나 가정에서 매우 중요한 식품으로 이용하고 있다. 그러나 보관이나 용도에 맞지 않는 사용상의 부주의 등으로 인해 산패되거나 과산화물, 벤조피렌과 같은 물질이 생성될 경우 오히려 건강에 역효과를 끼칠 수 있어 주의를 기울여야 하는 식품이기도 하다[2-4].

식용유지는 유지를 함유한 원료로부터 얻은 원료 유지를 식용에 적합하도록 제조·가공한 것으로 식물성 유지류(vegetable oils and fats), 동물성 유지류(animal fats and oils), 식용유지 가공품(edible oil and fat processed goods)으로 분류한다. 이 중 식물성 유지류는 유지를 함유한 식물로부터 얻은 원료유지를 식용에 적합하게 처리한 것으로 품질관리를 위해 산가, 요오드가, 산화방지제, 벤조피렌 등의 기준을 설정하여 관리하고 있다[5]. 식용유지 품질에 관한 연구활동은 주로 산화방지제[6], 벤조피렌[7,8], 지방산[9]에 관한 내용이 주를 이루고 있으며 잔류농약[10,11]에 관한 국내외 연구보고는 아직 미진한 편이다.

식용유지는 조제방법에 따라 조제기름(crude oil) 및 정제기름(refined oil)으로 나뉘는데 조제기름의 경우 식용유 제조 중 탈검(degumming), 탈산(deacidification), 탈색(bleaching), 탈취(deodorization) 등의 과정을 거치면서 상당량의 잔류농약이 감소 및 제거된다[10,11]. 그러나 상품화된 완제품에 농약이 일부 잔류될 가능성이 있으며, 단순 압착공정으로 제조하는 조제기름의 경우 별도의 가공과정이 없어 기름 중 잔류농약이 높게 나타날 수 있어 유지 중 잔류농약 분석법 개발 및 모니터링이 필요할 것으로 사료되었다.

유지류에서 잔류농약 및 산화방지제 등의 특정 성분 분

*Correspondence to: Mi-Hui Son, Ansan Agricultural and Fishery Products Inspection Center, Gyeinggi-Do Institute of Health and Environment, Ansan 15507, Korea
Tel: +82-31-8008-9771, Fax: +82-31-438-5871
E-mail: amas82@gg.go.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

석시 유지를 효과적으로 제거하기 위한 실험법이 보고 되었으나 목적 성분을 흡착할 때 사용하는 florisil trap이 실험자의 건강에 위해요소가 될 수 있는 유리섬유(Glass fiber)를 사용해야 하는 점과 시료를 소량 밖에 취할 수 없고, 균일하게 제작하기 어려운 점 등으로 인해 꾸준한 후속 연구가 이루어지지 않았다[12-17].

유지의 잔류농약을 분석 및 정제하는 방법으로 여러 방법[12-15,18-24]이 보고되고 있으나 본 연구에서는 다량의 시료와 유리 초자를 이용한 새로운 잔류농약 분석을 시도하였다. 유리 초자에서 비활성 기체인 질소를 시료에 직접 주입하면 휘발성 물질은 기체를 따라 유리관을 이동하고 비휘발성인 색소나 유지 등은 검체 내 남아있게 되는 원리를 이용한 방법으로 휘발된 분석 성분을 카트리지에 통과시켜 흡착시킨 후 최종 정제하여 실험하였다. 그러나 다량의 시료를 취해야 하는 잔류농약 분석 특성상 농산물 시료에서 지방성분을 완벽하게 제거하기는 굉장히 어려우며 특히 가공식품인 식용유지에서 잔류농약 분석시 지방성분을 선택적으로 제거하지 못할 경우 matrix interference가 발생하고, 지방성분 제거시 잔류농약도 동시에 제거되어 낮은 회수율의 문제점이 있다. 이에 본 연구에서는 이러한 문제점을 보완할 수 있는 증류장치를 제작하고 편의성, 안전성, 정밀성이 인정된 상용화된 florisil cartridge를 이용하여 식용유지에서 다양한 종류의 농약을 분석할 수 있는 최적의 전처리 분석 조건을 제시하고자 하였다. 본 연구는 식용유지에 대한 잔류농약 검사법을 설정하는데 기여 할 수 있을 것으로 기대된다.

Materials and Methods

시약 및 재료

분석대상 농약은 분석법의 적용이 가능한 68종을 대상으로 하였다. 농약 표준물질은 kemidas (Suwon, Korea)사에서 1,000 mg/L로 제조된 제품을 구입하여 표준원액으로 사용하였다. Acetonitrile (Honeywell Burdick & Jacson, Muskegon, MI, USA)은 HPLC급을 사용하였고 acetone과 n-hexane (Wako, Osaka, Japan)은 잔류농약용을 사용하였다. Florisil cartridge는 Biotage (2 g, 15 mL, Uppsala, Sweden)에서 구입하였고, 분석법 개발용 시료는 대두유를 구입하여 암소에 보관하며 사용하였다.

혼합 표준용액 조제

각 표준원액 1,000 mg/L를 100 mg/L이 되도록 acetonitrile로 희석하여 혼합 표준용액으로 하였다. 혼합 표준용액을 희석하여 1.0 mg/L이 되도록 조제한 뒤 다시 단계적으로 희석하여 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/L의 농도가 되도록 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 사용하였다. 혼합 표준용액은 갈색병에 담아 냉동 보관하며 사용하였다.

분석방법

시료에서 잔류농약을 추출을 위한 가열증류 장치는 Fig. 1과 같이 자체적으로 제작하여 사용하였다. 시료 약 50 g을 2구 환저플라스크에 넣고 연결관을 결합하였다. 가스 유도관 끝에 florisil cartridge를 부착한 후 연결관에 결합하고 heating mantle에서 질소가스를 1,000 mL/min 흘려주면서 230°C에서 90분간 가열증류하였다. Florisil cartridge를 분리한 후 카트리지에 흡착된 농약성분을 용출하기 위해 hexane:acetone (80:20) 20 mL로 용출하였다. 이어서 40°C에서 감압농축하고 acetonitrile 5 mL에 용해시킨 후 멤브레인필터(PTFE, 0.2 μm × 13 mm, Whatman™, Cytiva, Little Chalfont, UK)로 여과하였다. –20°C에서 냉동보관하여 증류과정 중 유증기로 인해 발생한 소량의 지방성분을 냉동시킨 후 상등액을 취하여 GC-MS/MS 분석하였다. 본 시험법은 질소가스를 이용한 시험법으로 질소 누출시 회수율이 저하되는 것을 방지하기 위해 초자의 연결부위를 screw cap 방식으로 제작하여 사용하였다.

분석기기 및 조건

Heating mantle은 MS-EAMD 9401-06 (Misung Scientific, Suwon, Korea)을 사용하였고, 질소가스 발생장치는 Nitrostation (Labsolutions, Gwangmyeong, Korea)를 사용하였다. 시료의 농축은 TurboVap LV (Biotage, Uppsala, Sweden)를 사용하였으며, 분석기기는 GC-MS/MS (TSQ9000, Themofisher scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하였고 분석조건은 Table 1과 같다.

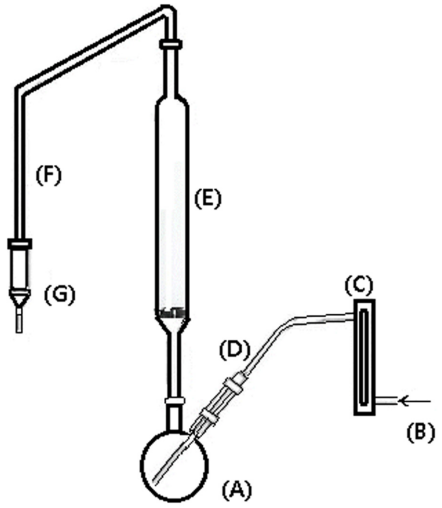

Fig. 1. Heating distillation apparatus
(A) 2 Neck Round Bottom Flask, (B) Nitrogen, (C) Gas flow meter, (D) Gas adapter, (E) Connector, (F) Gas induction tube, (G) florisil cartridge

Table 1. Analytical condition of GC-MS/MS

Parameters	Condition	
Injection temp.	280°C	
Injection vol.	1 μL	
Injection mode	splitless,	
Column	TG-5 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)	
Flow rate	1.0 mL/min	
Oven temp.	°C/min	next
	initial	70
	15	160
	5	300
Detector temp.	Transfer line: 280°C	
	Source temp.: 280°C	

시험법 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대한 유효성은 국제식품규격위원회 가이드라인(Codex Alimen tarius Commission, CAC/GL 40-1993, 2003)[25]의 잔류농약 분석 기준 및 식품의약품안전평가원의 '식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'에[26] 따라 선택성(selectivity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ), 회수율(recovery), 정밀도(precision) 등을 통하여 확인하였다. 선택성은 대두유 무처리 시료와 표준용액을 첨가한 시료의 크로마토그램을 비교하여 확인하였고, 직선성은 대두유 무처리 시료 시험용액을 이용하여 0.005-0.2 mg/L 농도로 제조한 혼합 표준용액으로 작성한 검량선과 결정계수(coefficient of determination, R^2)를 통하여 확인하였다. 검출한계와 정량한계는 국제의약품규제조화위원회(International council for harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, ICH)[27]에서 제시한 방법에 따라 3.3×σ/S (σ: The standard deviation of the response, S: The slope of the calibration curve)로 산출한 값을 검출한계로 하고 10×σ/S의 수식으로 산출한 값을 정량한계로 하였다. 회수율은 시료에 혼합표준용액을 0.01, 0.1, 0.5 mg/L 수준으로 처리 후 각 5회 반복 시험하여 측정하였고 실험실내 검증을 위해 3일간 반복 시험하여 일간 정밀도를 산출하였다.

Results and Discussion

분석조건의 설정

본 시험법은 휘발성이 있으며 고온에서 분해되지 않아야 하고 florisil cartridge에 흡착 및 용출되어야 분석이 가능한 방법으로 가열증류시간, 가열온도, 질소가스 유량, 용출용매의 조성 등에 영향을 받을 것으로 예측되었다. 이에 본 연구에서는 시료 약 50 g을 취한 후 각 분석조건을 조절하여 0.1 mg/L의 농도에서 5회씩 회수율 시험을 진행하였으며 다수의 농약 평균 회수율이 70-120%가 되는 최적 분석조건을 확립하였다. 가열시간에 따른 회수율을 알아보기 위해 대두유의 온도를 230°C가 되도록 heating mantle의 온도를 조절 후 실온에서 가열하기 시작하여 설정온도가 된 후부터 40분, 60분, 90분 가열 후 잔류농약이 기화하여 흡착된 florisil cartridge에 hexane:acetone (80:20)을 용출용매로 하여 회수율을 비교하였다. Table 2에서와 같이 40분 가열했을 때 10종의 농약이 70-120%의 회수율 범위에 들었으나 60분 가열했을 때는 45종으로 크게 증가하였고 90분간 가열했을 때 70-120%의 회수율 범위에 충족되는 농약이 68종으로 나타났으며 90분 이상 가열했을 때는 회수율의 변화가 미미한 것으로 나타났다.

가열온도에 따른 회수율은 대두유의 온도가 220°C, 230°C, 240°C가 되도록 heating mantle의 온도를 조절하고 설정온도에 도달한 뒤 각 온도 조건에서 90 분간 증류한 후 회수율을 비교한 결과 Table 3에서와 같이 220°C에서 58종 230°C 및 240°C에서 68종이 70-120%의 범위에 들어간 것으로 나타났다.

질소 가스유량이 회수율에 영향을 주는지 알아보기 위해 1,000 mL/min부터 1,400 mL/min까지 100 mL/min씩 증가시키면서 회수율을 측정하였다. 그 결과 1,000-1400 mL/min일 때 모두 68종의 농약의 70-120%의 범위에 들어 질소 가스 유량은 회수율에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타나(data not shown) 시간은 90분, 실험 온도는 230°C, 질소 유량은 1,000 mL/min의 조건에서 가열 증류하고 용출용매에 따른 회수율을 측정하였다. Florisil cartridge에 흡착된 농약성분을 용출하기 위해 hexane:acetone (80:20), hexane: ether (90:10), dichloromethane:methanol (99:1) 3개의 용출 용매 각 20 mL를 이용하여 회수율을 비교하였다.

Table 2. Number of residual pesticides in the range of 70-120% recovery rate depending on heating time

Heating time (min)	40	60	90
No. of pesticides	10	45	68

Table 3. Number of residual pesticides in the range of 70-120% recovery rate depending on heating temperature

Heating temperature (°C)	220	230	240
No. of pesticides	58	68	68

Table 4. Results of the method validation by heat distillation method unit: (mg/L)

Pesticides	R^2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Fortification	Recovery±RSD[1)] (%)	Intraday precision RSD (%)
Alachlor	0.9994	0.005	0.014	0.01	78.0±3.7	7.5
				0.1	80.9±4.2	6.9
				0.5	81.7±4.0	3.7
Benfuresate	0.9991	0.003	0.009	0.01	77.7±6.9	6.9
				0.1	80.3±3.6	7.2
				0.5	81.5±4.1	3.9
α-Hexachloro cyclohexane (α-BHC)	0.9992	0.003	0.008	0.01	86.6±5.2	7.3
				0.1	88.9±3.2	6.1
				0.5	89.1±5.4	6.8
β-Hexachloro cyclohexane (β-BHC)	0.9974	0.002	0.007	0.01	78.8±5.4	6.0
				0.1	79.1±4.7	5.6
				0.5	80.3±5.6	6.2
δ-Hexachloro cyclohexane (δ-BHC)	0.9998	0.005	0.015	0.02	79.8±5.7	6.3
				0.1	82.7±5.4	5.8
				0.5	83.3±5.8	5.9
Lindane (γ-BHC)	0.9995	0.006	0.018	0.02	73.1±6.2	6.5
				0.1	74.2±5.4	7.2
				0.5	75.3±6.1	6.8
Bifenthrin	0.9998	0.005	0.014	0.01	70.9±5.2	3.7
				0.1	71.2±5.7	3.9
				0.5	76.9±5.3	4.5
Butachlor	0.9996	0.004	0.014	0.01	87.7±7.1	3.7
				0.1	92.3±6.8	2.1
				0.5	92.8±6.6	6.0
Cadusafos	0.9998	0.007	0.020	0.02	85.7±3.1	7.4
				0.1	87.9±3.7	5.1
				0.5	88.4±4.5	4.5
Chlorobenzilate	0.9996	0.004	0.012	0.01	75.5±6.3	4.1
				0.1	74.0±6.1	3.5
				0.5	75.1±5.8	6.3
Chlorpropham	0.9999	0.004	0.013	0.01	90.8±4.8	5.9
				0.1	97.9±2.6	6.1
				0.5	99.7±4.9	4.2
Chlorpyrifos	0.9998	0.004	0.014	0.01	69.7±4.9	6.4
				0.1	70.5±3.5	6.3
				0.5	74.8±4.5	5.3
Chlorpyrifos-methyl	0.9997	0.003	0.010	0.01	79.6±4.9	7.6
				0.1	81.0±3.5	6.2
				0.5	81.9±4.3	5.8
Clomazone	0.9999	0.005	0.015	0.02	72.3±4.9	7.2
				0.1	81.8±3.2	9.3
				0.5	83.2±5.8	5.6

Table 4. (Continued) Results of the method validation by heat distillation method unit: (mg/L)

Pesticides	R^2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Fortification	Recovery±RSD[1)] (%)	Intraday precision RSD (%)
Cyflufenamid	0.9995	0.003	0.010	0.01	85.9±7.7	5.9
				0.1	90.2±5.2	2.9
				0.5	90.6±7.0	5.6
Cyprodinil	0.9998	0.005	0.014	0.01	76.9±4.2	6.7
				0.1	80.4±4.3	2.6
				0.5	83.9±4.7	4.5
Diazinon	0.9999	0.004	0.012	0.01	79.3±6.7	7.1
				0.1	83.7±3.1	9.6
				0.5	83.3±4.3	4.2
Dicofol	0.9999	0.004	0.012	0.01	74.0±3.5	5.2
				0.1	77.9±4.1	3.5
				0.5	78.5±5.8	4.9
Dimethenamid	0.9992	0.005	0.014	0.01	84.0±4.0	7.2
				0.1	89.3±3.1	6.6
				0.5	90.9±4.1	5.7
Dimethylvinphos	0.9994	0.006	0.017	0.02	92.4±5.2	7.6
				0.1	98.6±4.6	6.7
				0.5	99.2± 6.6	7.6
Diphenamid	0.9999	0.003	0.008	0.01	83.6±5.7	8.3
				0.1	80.8±4.6	2.9
				0.5	82.9±4.9	5.3
Dithiopyr	0.9999	0.004	0.012	0.01	80.2±5.7	4.1
				0.1	85.5±3.7	7.9
				0.5	87.1±3.7	4.3
Ethion	0.9988	0.006	0.020	0.02	79.1±2.3	7.5
				0.1	84.0±5.2	4.8
				0.5	85.2±4.6	4.8
Ethoprophos	0.9999	0.008	0.023	0.02	91.7±6.2	7.6
				0.1	98.6±3.4	10.4
				0.5	99.2±4.2	5.4
Etridiazole	0.9998	0.007	0.021	0.02	89.7±2.4	6.6
				0.1	93.5±3.4	2.3
				0.5	98.7±6.1	6.2
Fenclorim	0.9994	0.004	0.012	0.01	77.7±6.7	7.2
				0.1	73.2±3.2	9.4
				0.5	79.5±4.7	4.8
Fenothiocarb	0.9999	0.004	0.011	0.01	85.1±3.3	6.6
				0.1	88.9±4.6	3.7
				0.5	89.5±5.4	5.5
Fenpropimorph	0.9999	0.004	0.011	0.01	91.3±3.9	7.4
				0.1	95.2±2.3	3.9
				0.5	104.8±3.6	3.8

Table 4. (Continued) Results of the method validation by heat distillation method unit: (mg/L)

Pesticides	R^2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Fortification	Recovery±RSD[1)] (%)	Intraday precision RSD (%)
Fluacrypyrim	0.9996	0.004	0.011	0.01	102.7±9.2	3.9
				0.1	114.6±9.6	4.3
				0.5	113.6±3.2	4.3
Fluazifop-butyl	0.9996	0.004	0.013	0.01	95.1±5.9	5.2
				0.1	102.7±6.1	4.2
				0.5	104.3±6.2	6.4
Formothion	0.9999	0.003	0.009	0.01	93.1±2.9	8.2
				0.1	108.4±3.9	7.3
				0.5	102.7±3.8	4.1
Fthalide	0.9999	0.006	0.018	0.02	77.6±9.2	7.5
				0.1	77.8±4.4	4.0
				0.5	80.4±7.6	7.8
Heptachlor	0.9995	0.005	0.014	0.01	75.9±6.3	7.6
				0.1	77.1±2.5	8.4
				0.5	76.5±4.5	5.3
Hexythiazox	0.9994	0.008	0.023	0.02	100.3±3.8	4.4
				0.1	112.9±6.0	4.2
				0.5	115.8±6.4	6.5
Isazofos	0.9994	0.005	0.014	0.01	99.8±6.2	5.3
				0.1	108.4±5.7	8.5
				0.5	101.6±4.4	4.8
Isofenphos	0.9995	0.003	0.010	0.01	85.9±4.1	6.8
				0.1	88.7±2.9	4.0
				0.5	90.4±4.5	4.5
Isoprocarb	0.9994	0.005	0.014	0.01	90.1±4.3	3.6
				0.1	110.7±3.2	5.7
				0.5	109.8±3.8	5.2
Kresoxim-methyl	0.9999	0.006	0.020	0.02	76.2±3.8	7.2
				0.1	71.8±4.3	4.0
				0.5	78.4±2.6	2.9
Mepanipyrim	0.9998	0.003	0.009	0.01	73.4±4.8	6.4
				0.1	79.6±4.8	3.5
				0.5	78.3±2.5	3.2
Methidathion	0.9992	0.008	0.023	0.02	86.2±3.2	4.6
				0.1	93.3±4.2	3.6
				0.5	92.6±5.2	6.4
Metolachlor	0.9995	0.004	0.012	0.01	85.1±4.7	6.3
				0.1	87.2±4.1	5.3
				0.5	91.3±5.0	5.1
Nitrapyrin	0.9992	0.005	0.015	0.02	88.8±3.9	3.3
				0.1	88.1±4.8	2.9
				0.5	87.7±3.4	3.7

Table 4. (Continued) Results of the method validation by heat distillation method unit: (mg/L)

Pesticides	R^2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Fortification	Recovery±RSD[1)] (%)	Intraday precision RSD (%)
Oxyfluorfen	0.9984	0.005	0.015	0.02	113.2±4.8	5.6
				0.1	120.0±5.5	2.1
				0.5	117.2±3.2	3.7
Paclobutrazol	0.9989	0.006	0.018	0.02	103.9±6.1	7.1
				0.1	114.3±5.3	4.2
				0.5	114.9±5.8	6.1
Penconazole	0.9994	0.003	0.010	0.01	88.2±4.2	2.5
				0.1	91.4±4.0	3.0
				0.5	93.6±5.8	6.8
Penflufen	0.9996	0.003	0.009	0.01	76.6±5.7	6.8
				0.1	78.6±5.4	4.0
				0.5	81.2±7.2	7.8
Penthiopyrad	0.9994	0.003	0.010	0.01	82.0±5.3	5.8
				0.1	88.8±5.3	3.7
				0.5	86.7±5.7	6.1
Picoxystrobin	1.0000	0.007	0.021	0.02	77.1±2.1	2.5
				0.1	80.2±3.7	3.2
				0.5	82.8±4.7	4.8
Piperonyl butoxide	0.9993	0.006	0.017	0.02	81.8±6.7	7.3
				0.1	85.7±6.6	4.7
				0.5	97.3±7.3	7.5
Pirimicarb	0.9998	0.005	0.015	0.02	81.1±4.2	4.3
				0.1	84.9±3.7	9.2
				0.5	78.5±6.0	7.6
Pyriminobac-methyl	0.9993	0.008	0.023	0.01	73.6±5.1	6.3
				0.1	86.4±5.6	3.9
				0.5	88.4±4.4	4.8
Pirimiphos-ethyl	0.9997	0.004	0.012	0.01	99.2±3.6	7.6
				0.1	100.6±2.3	5.4
				0.5	101.3±4.1	4.4
Pirimiphos-methyl	0.9998	0.005	0.016	0.02	95.8±3.8	4.1
				0.1	100.1±2.3	6.4
				0.5	98.6±4.2	5.0
Propanil	0.9990	0.006	0.017	0.02	111.3±4.1	4.7
				0.1	119.2±3.3	7.3
				0.5	115.8±5.1	6.5
Pyrimethanil	0.9997	0.004	0.013	0.01	92.0±3.7	4.5
				0.1	95.4±2.6	5.5
				0.5	95.3±4.2	4.9
Quinalphos	0.9996	0.003	0.010	0.01	81.3±5.5	6.7
				0.1	82.0±5.1	6.0
				0.5	87.1±3.8	4.4

Table 4. (Continued) Results of the method validation by heat distillation method unit: (mg/L)

Pesticides	R^2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Fortification	Recovery±RSD[1)] (%)	Intraday precision RSD (%)
Quintozene	0.9993	0.008	0.023	0.02	78.9±5.2	5.5
				0.1	79.2±4.0	7.6
				0.5	82.3±4.7	5.4
Simeconazole	0.9988	0.003	0.010	0.01	103.2±4.6	5.5
				0.1	110.5±3.5	3.9
				0.5	110.8±3.8	4.2
Tebuconazole	0.9992	0.005	0.015	0.02	73.6±5.8	5.5
				0.1	79.9±5.7	5.2
				0.5	80.6±3.8	3.9
Tecnazene	1.0000	0.008	0.023	0.02	74.1±4.7	4.9
				0.1	81.9±3.0	9.5
				0.5	82.2±4.8	4.8
Tefluthrin	0.9999	0.005	0.014	0.01	77.1±3.7	7.6
				0.1	87.1±2.4	9.8
				0.5	89.1±6.9	7.0
Tetraconazole	0.9986	0.003	0.010	0.01	88.6±4.7	5.5
				0.1	98.7±4.5	2.9
				0.5	103.9±5.2	5.4
Thifluzamide	0.9995	0.008	0.023	0.02	88.9±4.6	4.4
				0.1	90.1±5.0	3.7
				0.5	91.9±3.8	5.8
Tolclofos-methyl	0.9999	0.005	0.014	0.01	73.9±5.7	6.2
				0.1	78.1±4.6	6.7
				0.5	79.9±4.5	4.6
Triadimefon	0.9994	0.004	0.012	0.01	76.3±4.8	5.1
				0.1	89.8±4.5	4.2
				0.5	90.9±4.4	4.4
Trifloxystrobin	0.9996	0.007	0.020	0.02	73.6±4.5	4.7
				0.1	77.3±4.3	3.6
				0.5	79.4±5.1	5.4
Trifluralin	0.9989	0.005	0.014	0.01	66.1±4.7	5.1
				0.1	70.0±4.8	5.5
				0.5	69.8±3.4	3.6
Vinclozolin	0.9998	0.004	0.014	0.01	71.0±3.8	6.9
				0.1	75.8±3.4	7.2
				0.5	76.2±3.4	3.6

3개의 용출 용매 모두 같은 종류의 농약 68종이 70-120%의 범위에 들어 florisil cartridge에 흡착된 농약성분을 용출하는데 용매의 종류는 크게 영향이 없는 것으로 나타났으며(data not shown) 식품공전에서 GC분석에 많이 사용하는 hexane:acetone (80:20)을 용출용매로 최종 결정하였다.

분석법 검증

혼합 표준용액과 무처리 시료, 회수율 시료의 크로마토그램과 RT (Retention time) 및 질량 대 전하비(m/z) 등을 확인하여 선택성을 비교한 결과 분석에 방해가 되는 간섭물질이 검출되지 않은 68종을 중심으로 혼합 표준용액을

조제하고 무처리 시료 용출액으로 희석하여 0.005-0.2 mg/L의 범위에서 6개 농도에 대해 검량선을 작성하였다. 5회 반복 실험하여 확인한 분석대상 잔류농약의 결정계수(Coefficient of determination, R^2)는 모두 0.99 이상으로 나타나 직선성을 확인하였다. 분석 가능한 것으로 나타난 68종의 검출한계는 0.003-0.008 mg/L, 정량한계는 0.007-0.023 mg/L로 산출되었다.

시험법의 정확성 및 정밀성을 확인하기 위하여 0.01-0.02, 0.1, 0.5 mg/L 농도가 되도록 대두유에 혼합 표준용액을 첨가한 후 회수율 실험을 5반복 수행하였다. 그 결과 Table 4에서와 같이 0.01-0.02 mg/L 농도에서 66.1-113.2%, 0.1 mg/L 농도에서는 70.1-120.0% 그리고 0.5 mg/L 농도에서는 69.8-115.8%로 나타났으며 상대표준편차는 모두 ±10% 이하로 나타났다.

실험실내 검증

균질한 검체를 여러 번 채취하여 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접한 정도(분산정도)를 의미하는 정밀도[28]를 확인하기 위해 혼합표준용액을 0.01-0.02 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L의 3가지 농도로 첨가하여 5반복 수행하였고 일간 분석 결과를 상대표준편차(RelativeStandard Deviation, RSD)로 나타내었다. 3일간 반복 시험하여 구한 일간 정밀도는 0.01 mg/L 일 때 2.5-8.3%, 0.1 mg/L 에서 2.1-10.4%, 0.5 mg/L 에서 2.9-7.8%로 일간 정밀성의 상대표준편차는 모두 11% 이하로 나타나 '식품 등 시험법마련 표준절차에 관한 가이드라인'에 적합함을 확인하였다.[25]

잔류농약 분석시 시료에서 지방 성분이 완전히 제거되지 않으면 분석기기에 무리가 갈 수 있고 분석과정에서 심각한 간섭현상을 유발할 수도 있다. 특히 유지처럼 기름이 100%일 경우 전처리과정에서 완벽하게 지방을 제거하기가 매우 어렵기 때문에 이를 효과적으로 제거할 수 있는 기술개발이 요구되어 왔다. 본 연구의 시험방법은 고가의 특정 기기를 사용하지 않고 간단한 초자를 이용하여 식용유지에서 유지성분을 제거하고 목적으로 하는 잔류농약 성분만 쉽게 추출하기 위해 고안한 방법으로, 본 연구팀은 다량의 시료를 취해도 유지성분에 방해받지 않는 방법을 찾고자 하였다.

Conclusion

현재 유지류에서 잔존하는 농약 성분만을 선택적으로 추출하는 것은 어려운 실정이다. 또한 가공식품인 식용유지에 대한 잔류농약 허용기준이 설정되어 있지 않아 식용유지의 잔류농약은 식용유 품질평가의 사각지대로 안전관리가 요구되고 있다.

이에 본 연구에서는 유지속에 잔존하는 농약성분을 최적 온도에서 가열하여 포집하는 가열증류법을 이용하여 68종의 농약을 대상으로 시험법을 개발하였으며 추출 및 정제법을 최적화하여 GC-MS/MS에 의한 분석법을 확립하였다.

가열증류법은 가열온도 및 시간의 영향을 많이 받았으며 이동상의 역할을 하는 질소의 유량과 용출용매의 종류에는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

본 시험법에서 잔류농약의 결정계수(R^2)는 0.99 이상으로 나타났고, 정량한계(LOQ)는 0.01-0.02 mg/L이었으며, 대두유를 이용한 회수율 실험 결과 평균 회수율(n=5)은 66.1-120.0%이었고 상대표준편차는 ±10%이하로 나타났다. 또한 실험실내 일간정밀도는 11% 이하로 조사되어, 식품의약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'에 적합한 수준임을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 식용유지의 잔류농약 안전 관리를 위한 시험법을 설정하는 데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

국문요약

현재, 국내에서는 가공식품인 식용유지에 대한 잔류농약 허용기준이 설정되어 있지 않아 잔류농약은 식용유 품질평가의 사각지대라 할 수 있다. 본 연구에서는 식용유지에서 가열증류법을 이용하여 68종의 농약을 대상으로 추출 및 정제법을 최적화하여 GC-MS/MS 분석법을 확립하였다. 가열증류법은 가열온도 및 시간의 영향을 받았으며 이동상의 역할을 하는 질소의 유량과 용출용매의 종류에는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 본 연구에서 잔류농약의 결정계수(R^2)는 0.99 이상으로 나타났고, 정량한계(LOQ)는 0.01-0.02 mg/L이었으며, 대두유를 이용하여 0.01, 0.02, 0.1, 0.5 mg/L 수준으로 회수율 실험 결과 평균 회수율(n=5)은 66.1-120.0%이었고 상대표준편차는 ±10%이하로 나타났다. 또한 실험실내 일간정밀도는 11%이하로 조사되어, 식품의약품안전평가원의 '식품등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인(2016)'에 적합한 수준임을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 시험법은 식용유지의 잔류농약 안전관리를 위한 시험법으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Mi-Hui Son https://orcid.org/0000-0002-3841-4861
Jae-Kwan Kim https://orcid.org/0000-0002-7844-8062
Young-Seon Cho https://orcid.org/0000-0003-4192-1335
Na-Eun Han https://orcid.org/0000-0001-7693-2769
Byeong-Tae Kim https://orcid.org/0000-0002-2812-2240
Myoung-Ki Park https://orcid.org/0000-0002-9056-5499
Yong-Bae Park https://orcid.org/0000-0003-2596-8520

References

1. Lim, J.K., Edible oil industry, *Food Ind.,* **181**, 10-37 (2004).
2. Lee, J.H., Park, J.M., Kim, H.J., Koh, J.H., Kim, J.M., Physicochemical changes in edible oils (soybean, canola, palm, and lard) and fried foods (pork cutlet and potato) depending on fry number. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **49**, 50-55 (2017).
3. Lee, J.W., Park, J.W., Changes of fatty acid composition and oxidation stability of edible oils with frying number of french fried potatoes. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nut.,* **39***,* 1011-1017 (2010).
4. Kim, S., Policy of Reducing Benzopyrene in Foods, *Food Ind. Nut.,* **19**, 13-14 (2014).
5. Ministry of Food and Drug Safety, (2023, May 30). Korea Food Code. Retrieved from http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/safefoodlife/food/foodRvlv/foodRvlv.do
6. Kim, J.M., Method validation and measurement uncertainty for the simultaneous determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils. Master's thesis, Kangwon National University, Chuncheon, Korea (2017).
7. Nam, H.J., Seo, I.W., Lee, K.E., Lee, S.Y., Shin, H.S., Analysis of benzo[a]pyrene content in edible oils from Korean market. *Food Eng. Prog*., **13**, 211-215 (2009).
8. Jang, M.R., Hong, M.S., Jung, S.Y., Choi, B.C., Lee, K.A., Kum, J.Y., Kim, I.Y., Kim, J.H., Chae, Y.Z., Analysis and risk assessment of benzo(a)pyrene in edible oils. *J. Fd Hyg. Safety*, **29**, 141-145 (2014).
9. Lee, M.J., Cho, M.K., Oh, S.H., Oh, C.H., Choi, D.S., Woo, J.W., Park, K.H., Jung, M.Y., Fatty acid composition, contents of tocopherols and phytosterols, and oxidative stability of mixed edible oil of perilla seed and rice bran oil. *Korean J. Food & Nutr*., **27**, 59-65 (2014).
10. Lee, M.G., Kim, J.S., Pesticide residues in chili pepper seeds and their transfer into the seed oil. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **48**, 317-322 (2016).
11. Lee, C.W., Shin, H.S., Removal of pesticide residues in rice bran oil by refining process. *J. Food Hyg. Safety,* **11**, 89-97 (1996).
12. Muhamad, H., Abdullah, M.P., Ai, T.Y., Chian, S.S., Optimization of the sweep co-distillation clean-up method for the determination of organochlorine pesticide residues in palm oil. *J. Oil palm res*., **16**, 3036 (2004).
13. Armishaw, P., Millar, R.G., Roderick G., Comparison of gel permeation hromatography, sweep codistillation, and florisil column adsorption chromatography as sample cleanup techniques for the determination of organochlorine pesticide residues in animal fats. *J. AOAC Int*., **76**, 1317-1322 (1993).
14. Luke, B.G., Richards, J.C., Recent advances in cleanup of fats by sweep co-distillation. Part 2. Organophosphorus residues, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* **67**, 902-904 (1984).
15. Ministry of Food and Drug Safety, Analytical practices manual for pesticide residues in foods, 5th ed, MFDS, Cheongju, Koear, pp. 78-82 (2017).
16. Mum, S.K., Park, J.J., Kim, C.E., Kim, J.K., Kim, Y.H., Lee, K. C., Studies on the extraction methods and residual contents of pesticides in meats II. Organophosphorous pesticides. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth*., **20**, 241-248 (1996).
17. Kim, J.K., Whang, H.J., Oh, M.H., Do, Y.S., Yoon, M.H., Extraction method of antioxidants in soybean oil. (1999), *Korean J. Food & Nutr.*, **12**, 358-363 (1999).
18. Li, L., Zhang, H., Pan, C., Zhou, Z., Jiang, S., Liu, F., Multiresidue analytical method of pesticides in peanut oil using low-temperature cleanup and dispersive solid phase extraction by GC-MS. *J. Sep. Sci*., **30**, 2097-2104 (2007).
19. Li, L., Zhou, Z., Pan, C., Qian, C., Jiang, S., Liu, F., Determination of Organophosphorus pesticides in soybean oil, peanut oil and sesame oil by low-temperature extraction and GC-FPD. *Chromatographia*, **66**, 625-629 (2007).
20. Liu, Y., Shen, D., Mo, R., Zhong, D., Tang, F., Simultaneous determination of 15 multiresidue organophosphorous pesticides in camellia oil by MSPD-GC-MS. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*., **90**, 274 -279, (2013).
21. Fuentes, E. Baez, M.E. Diaz, J., Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different cleanup methods for the determination of organophosphorus pesticides in olive and avocado oil. *J. Chrom. A*, **1216**, 8859-8866 (2009).
22. He, Z., Wang Y., Wang, L., Peng, Y., Wang, W., Liu, X., Determination of 255 pesticides in edible vegetable oils using QuEChERS method and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bio. Chem.*, **409**, 1017- 1030, (2017).
23. Nguyen, T.D., Lee, M.H., Lee, G.H., Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical J.*, **95**, 113-119 (2010).
24. Sánchez, A.G., Martos, N.R., Ballesteros, E., Multiresidue analysis of pesticides in olive oil by gel permeation chromatography followed by gas chromatography-tandem mass-spectrometric determination. *Anal. Chim. Acta.*, **558**, 53-61 (2006).
25. CAC (CODEX Alimentarius Commission), (2023, May 30). Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis CAC/GL 40-1993. Retrieved from https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/
26. Ministry of Food and Drug Safety, (2023, May 30). Guidelines on standard procedures for preparing analysis method. Retrieved from http://www.nifds.go.kr/brd/m_15/view.do?seq=8215
27. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), (2023, May 30). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). Retrieved from https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1__Guideline.pdf
28. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, (2023, May 30). Guidelines for validation of analytical procedure for pharmaceuticals, etc. Retrieved from https://www.mfds.go.kr/docviewer/skin/doc.html?fn=ba6253f045c544ba75922c4dc9affaa7&rs=/docviewer/result/data0011/12697/1/202306