

劉銀娥 教授指導
碩士學位 請求論文

인삼 중 잔류농약(Azoxystrobin, Fenhexamid)
최적 분석 방법에 관한 연구

2005

誠信女子大學校 大學院

化學科

李京珍

인삼 중 잔류농약(Azoxystrobin,
Fenhexamid) 최적 분석 방법에 관한 연구

劉銀娥 教授指導

이 論文을 碩士學位 論文으로 提出함

2004년 11월

誠信女子大學校 大學院

化學科

李京珍

認 准 書

李京珍의 碩士學位 論文으로 認准함

審査委員 _____ 印

審査委員 _____ 印

審査委員 _____ 印

誠信女子大學校 大學院

논문개요

본 연구는 인삼 중 잔류농약(Azoxystrobin, Fenhexamid)의 최적 분석조건을 확립하고자 기존의 GC(Gas Chromatography)와 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)분석법 이외에 HPLC분석법의 한 종류로 의약, 제약 및 비타민 분석에 많이 사용되어지고 있는 HPLC Column switching법을 도입하여 상호 비교해보았다. 인삼 시료는 충주주덕시에 있는 인삼포에서 포장실험을 하여 농약을 살포한 인삼과 살포하지 않은 인삼으로 나누어 수삼, 건삼, 및 홍삼으로 제조한 시료로 잔류농약분석을 실시하였다.

그 결과 Azoxystrobin과 Fenhexamid의 표준용액의 상관계수 값이 모든 분석방법에 대하여 0.9951 이상으로 좋은 값을 나타내었으며, 검출한계는 Azoxystrobin의 경우 GC 0.1ppm, HPLC 0.01ppm, HPLC Column switching 0.006ppm으로 HPLC Column switching의 감도가 좋았고, Fenhexamid의 경우 GC 0.5ppm, HPLC 0.05ppm, Column switching 0.03ppm으로 Fenhexamid의 경우에도 HPLC Column switching의 감도가 다른 분석방법과 비교하여 보다 우수한 결과를 나타내었다.

제품(수삼, 건삼 및 홍삼)에 따른 분석방법별 잔류농약의 회수율을 비교하기 위하여 농약을 살포하지 않은 분석시료에 Spiking 처리하여 얻은 결과 제품에 따른 회수율의 차이는 거의 나타나지 않았으며, 분석방법별 회수율은 Azoxystrobin이 HPLC Column switching법에서 100%정도의 회수율을 보여 70% 정도의 회수율을 보인 GC와 HPLC분석법보다 훨씬 좋고, Fenhexamid도 HPLC column switching법이 79% 정도로 65% 정도의 회수율을 보인 GC와 HPLC분석법보다 우수한 결과를 나타내었다. 그리고 농약을 살포하여 얻은 분석시료를 농약을 살포하지 않은 분석시료와 동일한 방

법으로 농약의 잔류량을 실험한 결과, 회수율 결과와 유사하게 HPLC Column switching법으로 분석하여 얻은 실험 결과 값이 GC와 HPLC 결과 값보다 2배 정도의 좋은 감도를 나타내었다.

본 연구결과 HPLC Column switching의 경우 분석에 있어서, 분석대상 농약인 Azoxystrobin과 Fenhexamid의 머무름 시간에 차이가 있어 switching의 방법에 의하여 동시에 분석이 안되는 단점이 있지만 다른 분석 방법과 비교하여 간단한 전처리 방법으로 높은 감도를 얻을 수 있었고 일반적인 방법으로는 미량분석인 잔류농약 분석시 방해물질이 많아 방해물질과 분석물질의 분리가 어려워 결과 해석에 어려움이 많았으나 HPLC Column switching법은 방해물질과 분석물질의 분리가 용이하여 결과해석에 있어서 정확성이 높았다. 그러므로 인삼에서 잔류농약 분석시 HPLC Column switching법을 이용하여 분석을 할 경우 기존의 GC와 HPLC분석법보다 좀더 정확하고 정밀한 결과를 얻을 수 있다.

목 차

논문개요

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 약제처리와 시료 채취 및 보관	6
2. 시약 및 분석 기기	
1) 시약	6
2) 분석기기 및 장치	
① GC 분석	9
② HPLC 분석	11
③ HPLC Column switching 분석	13
3. 실험과정	
1) 검량선 작성 및 검출한계 실험	17
2) 시료 전처리	
① GC, HPLC 분석	18
② HPLC Column switching 분석	19
III. 결과 및 고찰	
1. 표준검량곡선 및 검출한계	
1) 표준농약의 검량곡선	22
2) 표준농약의 크로마토그램	
① GC	26
② HPLC	27
③ HPLC column switching	28
3) 표준농약의 검출한계	30
2. 기기 분석의 최적화	
1) GC	31
2) HPLC	33

3) HPLC Column switching	35
3. 인삼제품에 따른 회수율	
1) 수삼에서의 회수율	37
2) 건삼에서의 회수율	39
3) 홍삼에서의 회수율	41
4. 포장실험시료의 잔류농약분석	
1) 수삼에서의 잔류농약 분석	44
2) 건삼에서의 잔류농약 분석	46
3) 홍삼에서의 잔류농약 분석	48
IV. 결 론	50

참고문헌

Abstract in English

List of Figures

Fig. 1. Schematic diagram of a HPLC Column switching system	14
Fig. 2. Preparation procedure of GC and HPLC analysis	20
Fig. 3. Preparation procedure of HPLC Column switching	21
Fig. 4. Calibration curve of pesticides in GC	23
Fig. 5. Calibration curve of pesticides in HPLC	24
Fig. 6. Calibration curve of pesticides in HPLC Column switching	25
Fig. 7. Typical GC Chromatogram of pesticides by GC	26
Fig. 8. Typical HPLC Chromatogram of pesticides by HPLC	27
Fig. 9. Typical HPLC Column switching Chromatogram of pesticides by HPLC Column switching	29
Fig. 10. Overlay GC Chromatogram of Standard and Sample	32
Fig. 11. Overlay HPLC Chromatogram of Standard and Sample	34
Fig. 12. Sample Chromatogram and PDA Spectrum of Pesticide by HPLC Column switching Method	36
Fig. 13. Recovery in fresh ginseng	38
Fig. 14. Recovery in dried ginseng	40
Fig. 15. Recovery in red ginseng	43
Fig. 16. Residual amount in fresh ginseng	45
Fig. 17. Residual amount in dried ginseng	47
Fig. 18. Residual amount in red ginseng	49

List of Tables

Table 1. Physicochemical properties of pesticides used in this study	8
Table 2. Analysis conditions for GC	10
Table 3. Analysis conditions for HPLC	12
Table 4. Analysis conditions for HPLC Column switching of Azoxystrobin	15
Table 5. Analysis conditions for HPLC Column switching of Fenhexamid	16
Table 6. Correlation coefficient of standard pesticides	22
Table 7. Detection limit of the analytical methods of pesticide	30
Table 8. Recovery in fresh ginseng	37
Table 9. Recovery in dried ginseng	39
Table 10. Recovery in red ginseng	42

I. 서 론

인삼(人蔘 : Panax ginseng C.A.Meyer)은 오가피나무과(Araliaceae) 인삼속(Panax)에 속하는 다년생 초본류로서, 한방에서 그 뿌리를 보혈강장제로 널리 이용하고 있는 약용식물이다. 인삼이 약용으로 사용되기 시작한 시기는 정확히 알려져 있지 않으나, 약 2000년 전 고대중국의 전한시대에 사유(史遊)가 저술한 급취장(急就章)에 인삼에 대한 기록이 있고, 중국의 초고본초서인 신농본초경(神農本草經, A.D 456~536)에 인삼의 효능에 대해 기술되어있다.^{1,2)} 최근 인삼의 효능에 대한 연구에서 조 등³⁻⁶⁾은 인삼이 콜다공증과 당뇨병의 예방에 좋고, 동맥경화성 질환과 심부전증 그리고 고혈압에도 좋은 효능을 가지고 있으며, 악성종양(암)의 억제와 체력증강, 피로회복, 소화기계, 신경계, 대사계, 순환기계에 좋다고 하였다. 이런 효능들로 인하여 인삼은 우리나라에서 뿐만아니라 전세계적으로 건강식품의 하나로써 다양한 용도로 많은 사람들에게 애용되고 있다.

인삼은 일반작물과는 달리 그 생육이 비교적 낮은 광도의 빛만을 필요로 하는 반음지성 식물로서 일광을 차단하는 해가림시설 하에서 생육하기 때문에 내비·내병성에 약할 뿐만 아니라 오랜기간(3~6년) 같은 곳에서 재배되므로 인삼 뿌리썩음병, 균핵병, 심하면 뿌리 전체가 썩어 없어지는 인삼 썩이선충병과 같은 토양전염성 병해가 발생할 가능성이 많고 성장속도 또한 느리다.^{7,8)} 그래서 인삼은 각종 병해충과 생리장해에 의해 생산량 및 품질의 편차가 커 재배하기 어려운 약용작물 중의 하나이다. 이런 단점을 최소화시키고 인삼의 생산량과 품질을 높여 소비자들의 수요충족을 위하여 병해충 방지와 제초제 역할을 할 수 있는 농약이 필수불가결하게 사용되고 있다. 그러나 그 역할을 수행하기 위해서 농약은 어느 정도의 잔류성과 독성을 겸

비해야하므로 살포된 작물이나 토양 중에 잔류 될 수 있다.

이렇게 잔류된 농약을 매일 연속적으로 섭취하게 되면 농약 중독 현상이 나타날 수 있다. 이 등⁹⁻¹¹⁾은 이런 농약 중독현상으로 두통·현기증·구역질 등을 시작으로 하여 심하면 제반중독증상·호흡근 마비·중추신경계 작용으로 끝내는 사망에 이를 수 있다고 하였다. 그러나 현재 사용되고 있는 대부분의 농약 중에서 작물이나 토양에 잔류하여 중독증상을 일으킬 우려가 있는 농약들은 대부분 도태되었으며, 잔류되어 섭취된 농약이라도 인체 내에서 여러 가지 대사경로를 통하여 분해되므로 지금까지 농산물 중 개개 농약의 잔류에 의한 만성중독의 예는 보도된 바가 없다.¹²⁾ 그러나 농약은 인삼뿐만 아니라 각종 작물에 사용되고 있으며, 각종 식품을 통해서 섭취되므로 개개 농산물에 잔류하는 농약 잔류량 뿐만 아니라 식품 전체를 통하여 매일 섭취하는 양에 대하여 검토해야 한다. 그래서 FAO/WHO를 비롯한 세계 여러 나라에서는 과도한 그리고 무분별한 농약 사용을 줄이고 국민건강에 기여하고자 농약잔류허용기준(MRL, maximum residue limit)을 설정함으로써 그에 대한 대책을 세우고 있다. 국내에서도 1971년부터 잔류독성 농약의 작물별 안전사용기준에 따라 농약사용을 규제하고 있으며, 현재 식품공전에 농산물 347종, 식육 87종, 인삼 26종, 차(茶) 23종에 대하여 잔류농약 허용기준이 설정되어 시행되고 있다.¹³⁾

위와 같이 잔류농약에 대한 규제는 전세계적으로 점점 엄격해지고 있지만 몇몇 생산자들은 좀더 많은 생산량을 얻기 위해 기준치를 초과하는 농약을 살포하고 있다. 그래서 최근 식품에서 농약이 검출되었다는 보도가 종종 나오고 있는데 이는 인삼의 경우에도 마찬가지이다. 시중에 유통되고 있는 인삼들에서 잔류허용기준을 초과하는 농약이 검출되었다는 내용이 보도됨으로 인하여, 잔류된 농약을 섭취하게 되어 얻게 되는 불이익에 대한 인식이 높

아진 소비자들로부터 불신을 받아 그 상품은 소비자들의 외면을 당함으로 가치가 떨어지게 된다. 이와 관련하여 한 일간지의 기사는 위에서 말한 것과 같이 인삼 중의 잔류농약 함유 문제로 인하여 국내 유통 및 해외 시장에서 어려움을 겪고 있으며 한국 인삼 산업 전체가 침체되어 가고 있다고 하였다.

인삼 산업이 침체되는 것을 방지하기 위하여 농림부에서는 인삼 및 인삼류의 경작·제조·검사 등에 관하여 필요한 사항을 규정함으로써 인삼을 특산물로 보호·육성하고 인삼산업의 건전한 발전에 이바지하기 위하여 법률 제 06998호 인삼 산업법을 개정하였고 2004년 7월 1일부터 시행하기로 하여 인삼 중 잔류농약 검사의 중요성이 커지게 되었다.¹⁴⁾

이에 본 연구에서는 인삼 중 잔류농약 분석시 보다 정확한 결과를 얻기 위하여 현재 식품공전 상 잔류허용기준이 설정되어있고 HPLC 분석으로 적용되어있는 농약 중 GC로도 분석이 가능한 농약을 찾아 상호 비교를 하여 최적의 분석 조건을 확립하고자 하였다. 결과 IV급(저독성)·어독성II급 농약으로 인삼의 탄저병과 점무늬병 방제에 사용되는 Azoxystrobin과 IV급(저독성) 농약으로 인삼의 잣빛곰팡이병 방제에 사용되는 Fenhexamid의 두 살균제¹⁵⁾를 선정하여 분석대상 성분으로 하였다.

농약분석은 높은 감도와 선택성이 요구되므로 분석기기로 GC와 HPLC를 많이 사용하고 있다. 이는 농약이 heteroatom인 Cl, Br, I, S, P 중 하나 이상의 원소를 가지고 있는 지용성 화합물이기 때문이다.¹⁶⁾ 그래서 이들 heteroatom에 선택적으로 반응하는 검출기가 농약분석에 사용되어지고 있으며, 분석시 많이 요구되어지는 검출기로는 인 또는 황을 포함하는 농약일 경우 선택성이 매우 뛰어난 검출기인 불꽃광도검출기(flame photometric

detector; FPD)의 P mode, 질소 함유 농약은 질소 인검출기(nitrogen phosphorus detector; NPD), 할로젠 화합물이 주류인 유기염소계 농약의 분석에는 사용법이 간편하고 감도도 뛰어난 전자포획검출기(electron capture detector; ECD)가 있다. 그리고 Carbamate계 농약이나 비휘발성이거나 열에 약한 농약의 경우에는 GC보다는 HPLC로 분석하는데 이때 농약이 흡광성질을 가지고 있으면 UV 검출기로 분석을 한다. 그래서 오 등¹⁷⁻¹⁹⁾은 채소류, 쌀 등과 같은 농산물에서 유기인계 농약 분석에 NPD 검출기를 사용하였고, 김²⁰⁾은 대두에서 유기염소계 및 Pyrethroid계 농약분석시에 ECD 검출기를 사용하였으며, 박²¹⁾은 유기인계, 유기염소계 및 카바메이트계 농약을 분석하기 위하여 ECD와 NPD검출기를 사용하였다.

본 연구에서는 이를 바탕으로 Azoxystrobin과 Fenhexamid의 검출 및 정량을 위한 최적 분석기기 조건에 대해 알아보았다. Azoxystrobin과 Fenhexamid의 특성을 보면(Table 1) Azoxystrobin은 전자를 줄 수 있는 CO⁻기가 있으므로 GC 분석 중에서 할로젠원소와 같이 전자를 줄 수 있는 원자들을 선택적으로 감응하는 ECD 검출기를, -N기가 있으므로 GC 검출기 중 질소와 인기를 선택적으로 감응하는 NPD 검출기를 사용함으로써 선택적으로 분석을 할 수가 있고, Fenhexamid의 경우 -Cl기와 CO⁻기가 있어서 ECD 검출기로 선택적으로 검출할 수 있다. 또한 두 농약은 벤젠고리에 이중결합을 가지고 있으므로 HPLC분석에서 UV 검출기를 이용하여 검출이 가능하다. 그래서 한 등^{22,23)}은 오이, 딸기, 포도에서 Fenhexamid의 잔류정도를 알기 위하여 ECD 검출기를 선택하여 분석을 하였고, 과일 중에서 Fenhexamid의 분석을 위하여 HPLC-MS-MS 검출기를 사용하였다. Garau 등^{24,25)}은 토마토에서 Azoxystrobin의 감소량을 보기 위하여 NPD 검출기를 선택하여 분석을 하였고, 과일과 채소류에서 Azoxystrobin의 분석을 위하여 HPLC-MS-MS 검출기를 사용하였다.

이에 본 연구에서는 인삼 중에 잔류하는 Azoxystrobin과 Fenhexamid의 분석을 위하여 GC-ECD 검출기와 HPLC-UV 검출기를 사용하여 최적분석 조건을 얻고자 하였다. 그러나 일반 식품에서의 잔류농약 검사와 인삼에서의 잔류농약 검사는 차이가 있다. 박 등²⁶⁻²⁸⁾의 실험결과에서도 볼 수 있듯이 인삼은 일반식품보다 굉장히 많은 성분들로 구성되어 있는 화학적으로 매우 복잡한 matrix를 가지고 있으므로 매우 복잡한 matrix속에서 농약을 분석해야 하기 때문에 시료의 전처리 방법 및 결과의 해석까지 매우 세심한 주의가 요구된다. 그래서 본 연구에서는 기존의 GC와 HPLC방법이외에 HPLC의 한 방법인 HPLC Column switching방법을 도입하여 비교해 보고자 한다.

HPLC Column switching법은 off-line의 흡착컬럼 대신에 분석컬럼과 전처리컬럼을 six port 또는 ten port의 Switching valve로 연결하여 on-line 상에서 시료를 정제 및 농축하는 전처리 과정을 거쳐 HPLC로 분석하는 기술이다. 따라서 시료손실이 적을 뿐 아니라 오염의 우려가 없으며 분석목적 성분의 정제 농축효과가 우수하고 극미량의 시료로도 단시간내에 효율적인 분석을 완료할 수 있고^{29,30)}, 이런 장점으로 인하여 의학 및 제약의 분석³¹⁻³⁵⁾에서는 HPLC Column switching 분석법이 활발히 이용되어지고 있지만 식품에서는 비타민 분석 등³⁶⁻³⁸⁾의 제한된 분야에서만 이용되고 있는 실정이다.

그래서 본 연구에서는 Azoxystrobin과 Fenhexmid 두 농약을 선정하고 농약분석에 사용되지 않았던 HPLC Column switching방법을 최초로 도입하여 기존의 GC, HPLC 방법과 비교하여 최적의 분석 방법을 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 약제처리와 시료 채취 및 보관

인삼 시험에 사용된 인삼포는 충청북도 충주시 주덕에 소재하고 있는 인삼포를 임차하여 사용하였으며 면적은 가로 6m×세로 1.5m 이었다. 인삼에 살포한 약제 살포농도는 안전사용기준에 따라 표준희석배수의 2배가 되도록 조절하여 배부식 분무기를 사용하여 인삼 전면에 균일하게 약액이 충분히 흐르도록 살포하였다. 약제 살포는 안전사용기준에 의하여 수확 전 10일까지 이나 본 연구에서는 잔류되어있는 농약을 분석해야 하므로 3일 간격으로 3회 살포하여 3일 후에 수확을 하였다. 인삼을 채취할 때 농약을 살포하지 않은 인삼과 농약을 살포한 인삼을 구분하여 채취하고, 채취된 수삼은 흐르는 물로 흙을 제거하고, 그늘에서 표면의 수분을 건조시킨 후, 믹서기로 갈아서 균질화 하였다. 홍삼과 건삼은 금산 소재 W사의 방법을 벤치마킹하여 홍삼은 찌서, 건삼은 그대로 45℃오븐에서 18시간 통풍건조 시킨 후 6시간 일광건조 시켰다. 이 과정을 4일간 반복하는 것을 실험실에서 직접 제조하였으며 제조한 농약분석용 시료는 믹서기로 갈아 균질화 시켜 -20℃이하 냉동고에 보관하며 사용하였다.

2. 시약 및 분석기기

1) 시약

분석 대상성분은 인삼식품에 대하여 현재 식품공전에 농약잔류허용 기준이 설정되어있는 성분 중 GC와 HPLC분석이 가능한 Azoxystrobin,

Fenhexamid를 선정하였다. 농약 표준물질은 Dr. Ehrenstorfer(Germany)사에서 구입하여 사용하였다.

인삼에 처리한 농약은 시중 농약상에서 구입한 제품으로서, 액상수화제인 오티바(20% Azoxystrobin, 신젠타)와 텔도(42% Fenhexamid, 바이엘)를 사용하였으며 본 실험에서 사용된 농약성분의 특성 및 안전사용기준은 Table 1에 나타내었다.

농약 표준물질은 Methanol 또는 Acetone을 이용하여 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 조제한 후, 다시 용매로 희석하여 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 조제해서 Stock solution으로 사용하였고, Working solution은 분석 전에 용매를 가해 적당농도로 조제하여 -4°C 에서 보관하면서 사용하였다.

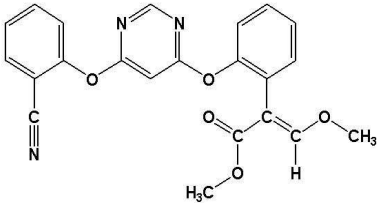
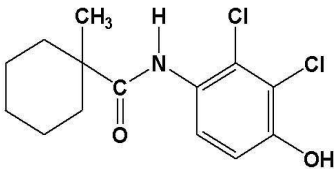
농약의 추출 및 정제과정의 용매로 Acetonitrile, Acetone, Hexane 등은 pesticide grade(Fisher, Pittsburgh, USA)를 사용하였고, 기기분석 이동상 용매로 사용한 Methanol은 HPLC Grade(J.T Baker, Phillipsburg, USA)를 사용하였다. 추출 시에는 1차 증류수를 기기 분석에는 3차 증류수를 사용하였다.

Sodium chloride와 Sodium sulfate, Anhydrous는 Wako(Osaka, Japan)를 사용하였다.

정제를 위하여 Florisil(Varian, 500mg), Amino-propyl(Waters, 1g) Cartridge를 구입하여 사용하였다.

또한 실험 과정중의 오염을 방지하기 위한 초자 세척을 위해 Methanol, Acetone, Dichloromethane, Hexane은 Pesticide grade(Fisher, Pittsburgh, USA)를 사용하였다.

Table 1. Physicochemical properties of pesticides used in this study

Common name		Azoxystrobin	Fenhexamid
Structural formula & Chemical name		 <p>methy- (E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl]-3-methoxyacrylate</p>	 <p>2,3-dichloro-4-hydroxy-1-methylcyclohexanecarboxanilide</p>
	Properties		
	Molecular formula	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	$C_{14}H_{17}Cl_2NO_2$
	Molecular weight	403.39	302.20
	M.P	116°C	153°C
	MRL	0.5ppm	0.5ppm
Purity(%)		99.5	99.5
Purchase supplie		Dr, Ehrenstorfer	Dr, Ehrenstorfer
ADI* for man(mg/kg)		(EU) 0.1 mg/kg b.w. (USA) 0.18 mg/kg b.w.	0.183 mg/kg b.w.

ADI* : Acceptable daily intake

2) 분석기기 및 장치

① GC 분석

GC(Gas Chromatography)는 GC-Ni⁶³ECD(Electron Capture Detector)가 장착된 Hewlett Packard사의 HP 6890 Gas Chromatography로 HP 6890 Autosampler를 사용하여 시료를 주입하였고 자료 분석을 위하여 Hewlett Packard사의 Chemstation을 사용하였다.

분석을 위한 컬럼은 Ultra-2(50m × 0.2mm × 0.33 μ m, film thickness)를, 이동상은 유속 1.0 mL/min로 질소기체를, 주입 방식은 분할 주입 방법(Split mode)으로 50:1의 비율을 사용하였다.

온도프로그램은 인삼 고유의 peak들과 겹치는 것을 피하기 위하여 215 $^{\circ}$ C에서 시작하여 20분간 유지시킨 후 5 $^{\circ}$ C/min의 속도로 225 $^{\circ}$ C까지 올려 15분간 머물게 하고 300 $^{\circ}$ C까지는 30 $^{\circ}$ C/min 으로 올려준 후 300 $^{\circ}$ C에서 20분간 머물게 하였다.

주입구 온도는 250 $^{\circ}$ C, Detector의 온도는 300 $^{\circ}$ C로 하였다. 이러한 기기 조건을 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Analysis conditions for GC

Model	Agilent 6890
Column	Ultra-2 J&W (50m × 0.2mm × 0.33 μ m film thickness)
Flow rate	1 ml/min, N ₂ carrier gas
Detector	Ni ⁶³ ECD
Split ration	50:1
Injection Volumn	1 μ l
Inj. Temp	250 $^{\circ}$ C
Det. Temp	300 $^{\circ}$ C
Oven Temp (Program)	215 $^{\circ}$ C(20min) \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 225 $^{\circ}$ C(15min) \rightarrow 30 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C(20min)

② HPLC 분석

HPLC(High Performance Liquid Chromatography)는 Pump, Autosampler, Oven, Degasser 및 PDA(Photo Diode Array) 검출기가 장착된 Shiseido Nanospace(Yokohama, Japan)를 사용하였으며, 동회사의 Ezchrom을 사용하여 자료를 분석하였다.

분석을 위한 컬럼은 C₁₈(4.6mmI.D × 250mm)으로 이동상의 유속은 1.0 mL/min로 하였고 오븐 온도는 40℃로 일정하게 유지시켰다.

이동상 용매로 Methanol과 3차 증류수를 사용하여 인삼 고유성분들의 peak와 겹치지 않게 gradient 조건을 잡아 시료 10 μ l를 주입하여 분석하였다. 이러한 기기 조건을 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Analysis conditions for HPLC

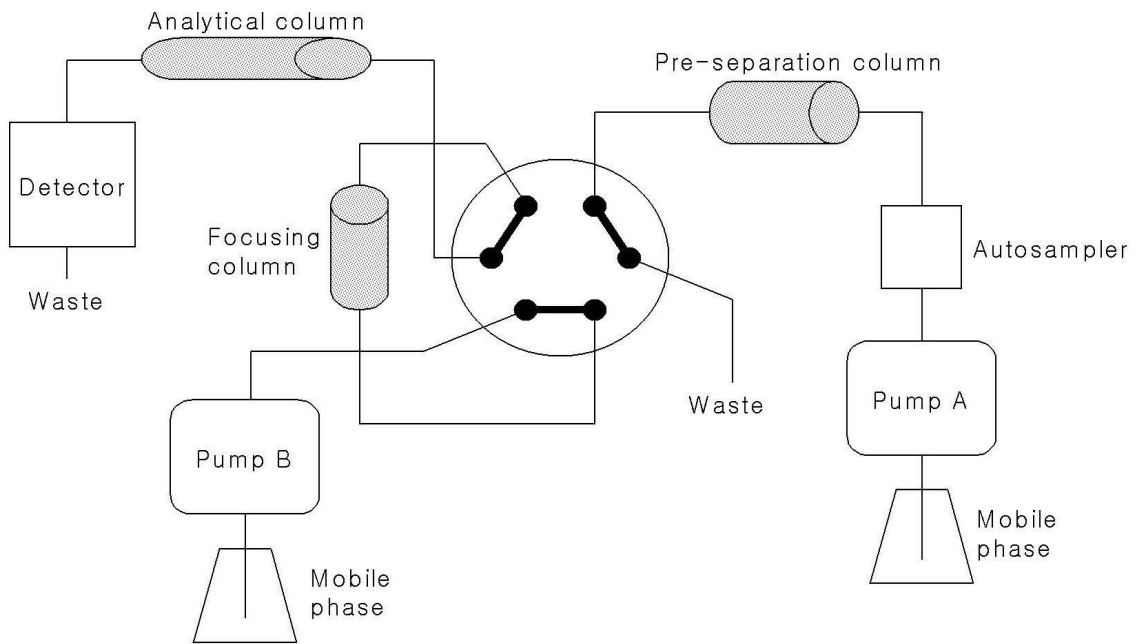
Model	Shiseido Nanospace		
Column	C ₁₈ (5 μ m, 4.6mmI.D \times 250mm,)		
Detector	UV detector (254nm)		
Mobile Phase	A : Methanol B : H ₂ O		
Injection volume	10 μ l		
Gradient	Time	%A	Flow
	0min	20	1.0mL
	3min	20	1.0mL
	20min	70	1.0mL
	35min	70	1.0mL
	45min	95	1.0mL
	60min	95	1.0mL
	63min	50	1.0mL
	68min	20	1.0mL
73min	20	1.0mL	

③ HPLC Column switching 분석

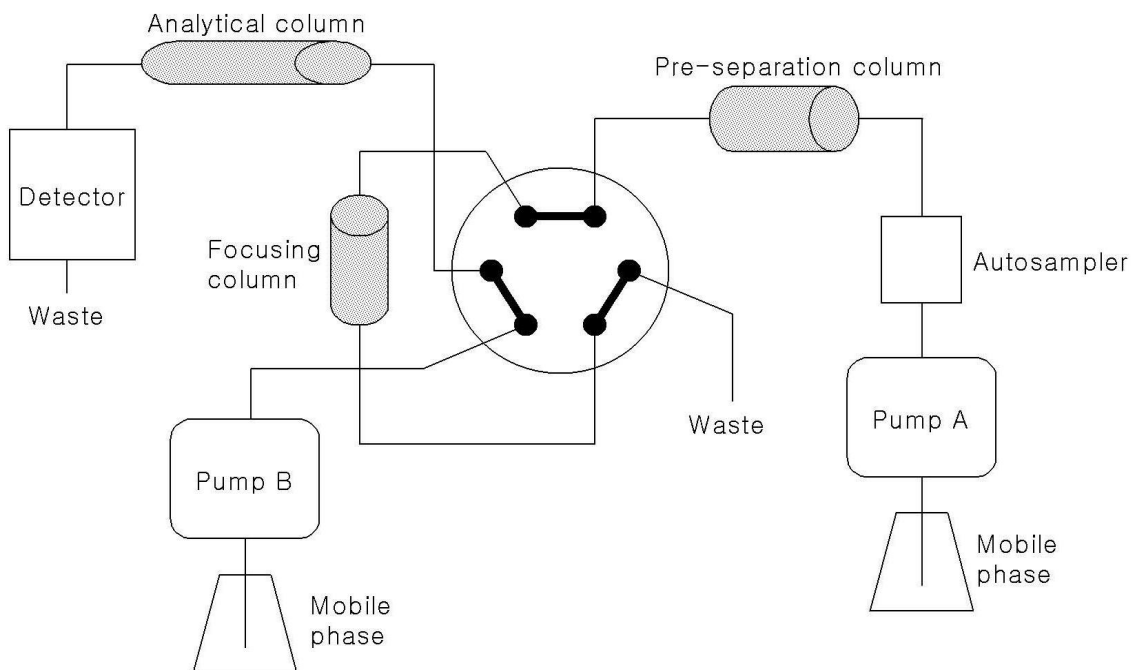
HPLC Column switching을 하기 위하여 PDA Detector, Pump, Autosampler, Oven, Degasser, switching valve가 있는 Shiseido Nanospace 시스템을 사용하였다. 이때 사용된 컬럼은 시료 전처리용으로 MF ph-1 precolumn($5\mu\text{m}$, $4.6\text{mmI.D} \times 50\text{mm}$, Shiseido, Tokyo, Japan), 농축용으로 Capcellpak C_{18} ($5\mu\text{m}$, $2.0\text{mmI.D} \times 35\text{mm}$, Shiseido, Tokyo, Japan), 분석컬럼으로는 Capcellpak C_{18} ($5\mu\text{m}$, $1.5\text{mmI.D} \times 150\text{mm}$, Shiseido, Tokyo, Japan) column을 사용하였다. 오븐 온도는 40°C 로 일정하게 유지시켰다.

이동상 용매로 A pump에는 40% Methanol을 0.5 mL/min 의 유속으로 B pump에는 60% Methanol을 0.2 mL/min 의 유속으로 흘려주었다.

HPLC Column switching system은 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 A position과 B position으로 나누었으며 시료를 주입시켜 pump A를 통하여 시료가 0.5 mL/min 흐름속도로 Pre-separation column으로 흐르도록 한다. 그 사이에 pump B에서는 이동상을 0.2 mL/min 의 흐름속도로 Focusing column에서 analytical column 방향으로 흘러 Focusing column과 analytical column이 이동상과 평형을 이루도록 하였다(A position). 시료주입 후 분석물질이 Pre-separation column에서 나오려고 할 때 Switching valve position을 B로 바꾸어주어 Pump A을 통해 이동상이 Pre-separation column에서 Focusing column으로 흐르게 하여 분석물질을 Focusing column에 모으고 있다가 분석물질이 다 모아지면 valve position을 A로 바꾸어주어 Pump B를 통하여 Focusing column에 농축되어 있던 분석물질을 analytical column으로 흐르게 한 후 분석하였다. 기기 조건은 Table 4와 Table 5에 나타내었다.



A position



B position

Fig. 1. Schematic diagram of a HPLC Column switching system.

Table 4. Analysis conditions for HPLC Column switching of Azoxystrobin

Model	Shiseido Nanospace
Pre-Separation column	MF ph-1 (5 μ m, 4.6mmI.D \times 50mm)
Focusing column	C ₁₈ (5 μ m, 2.0mmI.D \times 35mm)
Analytical column	C ₁₈ (5 μ m, 1.5mmI.D \times 150mm)
Detector	UV detector (254nm)
Mobile Phase	A : 40% Methanol B : 60% Methanol
Flow	A : 0.5mL/min B : 0.2mL/min
Switching valve	7.5min Valve - B position
Time events	8.7min Valve - A position
Injection volume	10 μ l

Table 5. Analysis conditions for HPLC Column switching of Fenhexamid

Model	Shiseido Nanospace
Pre-Separation column	MF ph-1 (5 μ m, 4.6mmI.D \times 50mm)
Focusing column	C ₁₈ (5 μ m, 2.0mmI.D \times 35mm)
Analytical column	C ₁₈ (5 μ m, 1.5mmI.D \times 150mm)
Detector	UV detector (254nm)
Mobile Phase	A : 40% Methanol B : 60% Methanol
Flow	A : 0.5mL/min B : 0.2mL/min
Switching valve	10.0min Valve - B position
Time events	11.2min Valve - A position
Injection volume	10 μ l

3. 실험과정

1) 검량곡선 작성 및 검출한계 실험

GC 분석에서 분석 성분의 표준 검량선을 작성하기 위해 Azoxystrobin과 Fenhexamid를 Acetone으로 희석하여 Azoxystrobin은 0.2, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/L의 표준용액을 만들고, Fenhexamid는 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/L의 표준용액을 만들었다. 각각 1 μ l씩을 주입하여 얻어진 크로마토그램의 peak height를 측정 후, 표준검량선을 작성하였다.

HPLC 분석에서는 분석 성분의 표준 검량선을 작성하기 위해 Azoxystrobin과 Fenhexamid를 Methanol로 희석하여 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/L의 표준용액을, HPLC Column switching 분석시에는 0.05, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L의 표준용액을 만들어 각각 10 μ l씩을 주입하여 얻어진 크로마토그램의 peak area를 측정 후, 표준검량선을 작성하였다. 또한 검출한계는 표준용액을 계속 희석하여 chromatogram상의 표준품의 S/N의 비가 3이 되는 때로 하였다.

2) 시료 전처리

① 공전시험법에 따른 GC, HPLC 분석

-20℃ 이하 냉동고에 보관되어있는 시료(수삼, 건삼, 홍삼)를 상온에 방치한 후 식품공전 실험법¹³⁾을 바탕으로 10g을 브렌더에 취하여 농약을 살포하지 않은 인삼에는 표준 농약 혼합 용액 3mL를 Spike 처리하고, 농약을 살포한 인삼은 그대로 하여 증류수 50mL를 가하여 1시간 방치 하였다. 추출 용매로 Acetonitrile 100mL을 가한 후 Homogenizer로 10분간 균질화하고, 감압 여과하여 250mL 분액깔때기에 옮겼다. 여기에 물층을 분리하기 위하여 Sodium chloride 5g을 넣고 10분간 심하게 흔들여 섞은 후, 확실한 분리를 위하여 1시간 동안 4℃ 냉장고 안에서 방치 하였다. 물 층을 제거하고 유기용매층을 삼각플라스크에 받아서 무수황산나트륨을 가하여 탈수 시킨 후, 둥근바닥플라스크에 담아 40℃ 이하 수욕조상에서 감압 농축하였다. 감압 농축된 잔류물을 GC 분석시 사용하는 것은 Hexane 1mL로 녹인 후 Florisil 카트리지에 loading 한 후, 용출 용매로 20% Acetone/Hexane 10mL를 사용하여 1초에 2방울씩 떨어지도록 용출 시켰다. 용출액은 40℃ 이하 수조상에서 Turbo vap 농축기를 이용하여 완전 농축한 후 20% Acetone/Hexane 2mL에 녹여 0.45 μ m Syringe filter로 여과한 후 분석을 하였고, HPLC 분석시 사용할 시료는 Methanol 1mL에 녹여 NH₂ 카트리지에 loading 한 후, 용출 용매로 1% Methanol/Dichloromethane을 사용하여 1초에 2방울씩 떨어지도록 용출 시켰다. 용출액은 40℃ 이하 수조상에서 Turbo vap 농축기를 이용하여 완전 농축한 후 Methanol 2mL에 녹여 0.45 μ m Syringe filter로 여과한 후 분석을 하였고 이 과정은 Fig. 2에 나타내었다.

② HPLC column switching 분석

-20℃ 이하 냉동고에 보관되어있는 시료(수삼, 건삼, 홍삼)를 상온에 방치한 후 3g을 Talcon tube에 취해서 농약을 살포하지 않은 인삼에는 표준 농약 혼합 용액 3mL를 Spike 처리하고 농약을 살포한 인삼은 그대로 하여 증류수 15mL를 가하여 1시간 방치 하였다. 추출용매로 Acetonitrile 30mL을 가한 후 균질화 되도록 한 후, Sodium Chloride 2g을 넣고 10분간 심하게 흔들어서 섞은 후, 원심분리기에서 300rpm으로 5분간 원심분리 후, 상층액 2mL를 취하여 0.45 μ m Syringe filter로 filtering 한 후 HPLC Column switching으로 분석을 하였고 이 과정을 Fig. 3에 나타내었다.

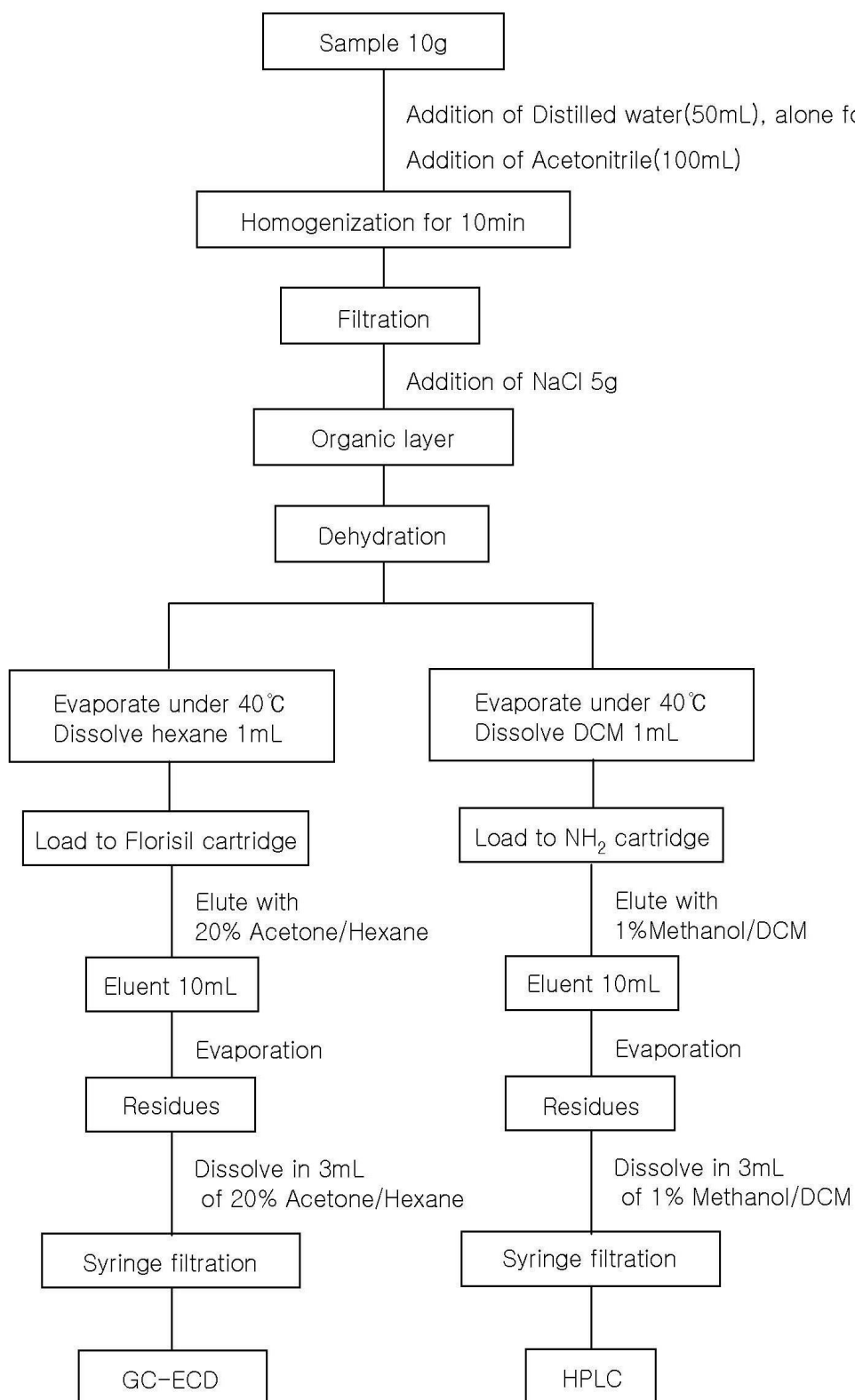


Fig. 2. Preparation procedure of GC and HPLC analysis.

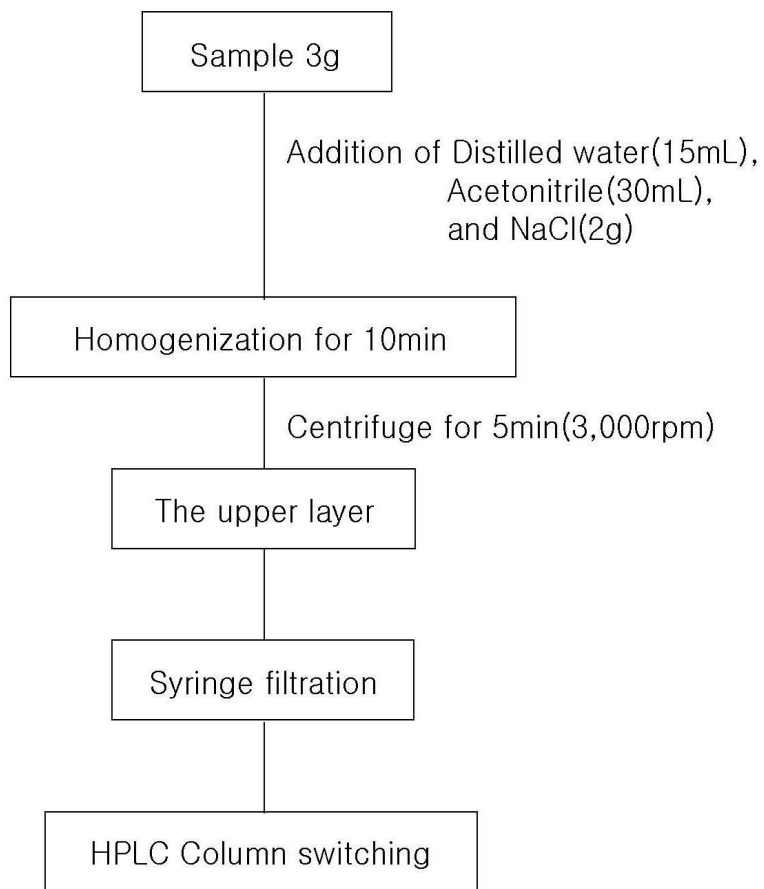


Fig. 3. Preparation procedure of HPLC Column switching

III. 결과 및 고찰

1. 표준검량곡선 및 검출한계

1) 표준 농약의 검량곡선

본 연구에서는 GC, HPLC 및 HPLC Column switching법을 이용하여 인삼 중의 잔류농약 분석시 최적 분석조건을 확립하기 위하여 표준 농약의 검량선을 작성하였다. 4개 이상의 점을 잡아 검량선을 작성한 결과 Table 6에서 보여주듯이 GC, HPLC 및 HPLC Column switching 분석법에서 0.9951~0.9990의 좋은 상관계수 값을 보여주었으며 Fig. 4-6에 검량선을 나타내었다.

Table 6. Correlation coefficient of standard pesticides

	Azoxystrobin	Fenhexamid
GC-ECD	0.9975	0.9951
HPLC	0.9990	0.9984
HPLC column switching	0.9956	0.9965

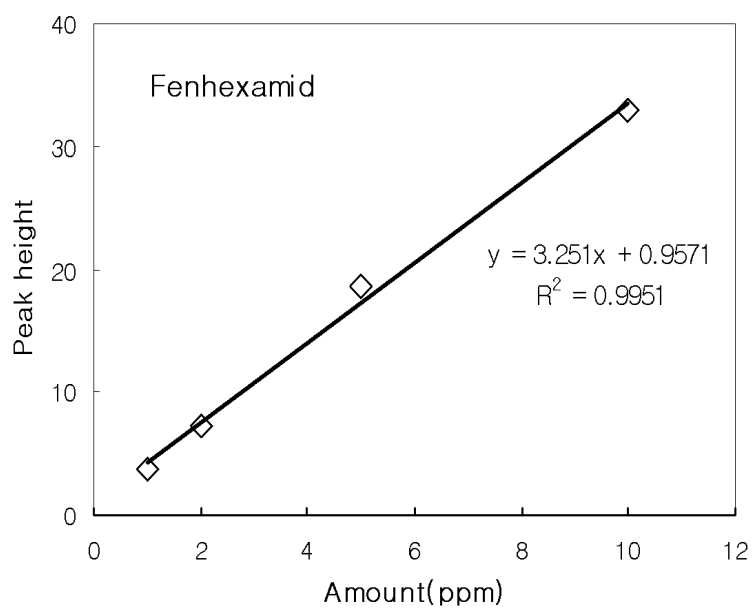
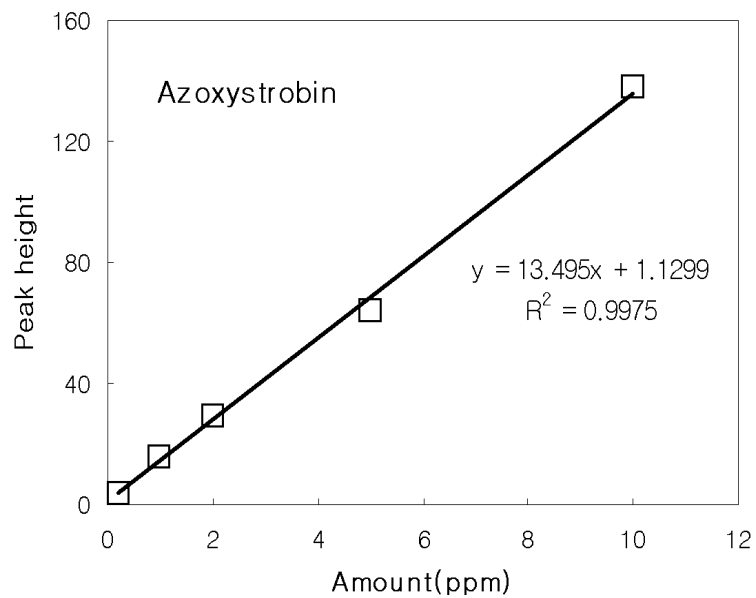


Fig. 4. Calibration curve of pesticides in GC.

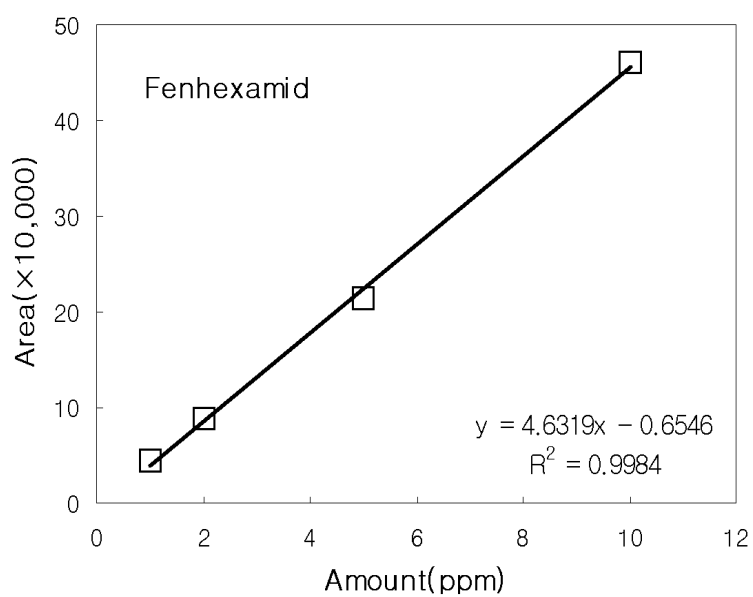
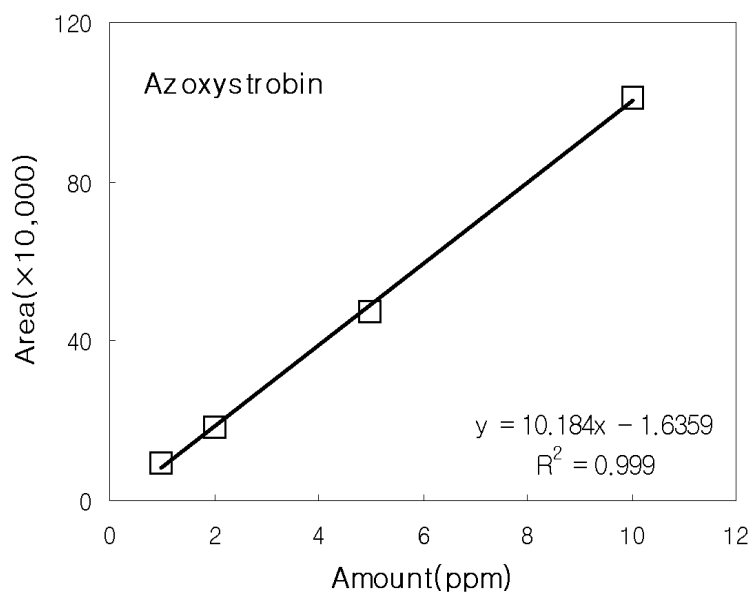


Fig. 5. Calibration curve of pesticides in HPLC.

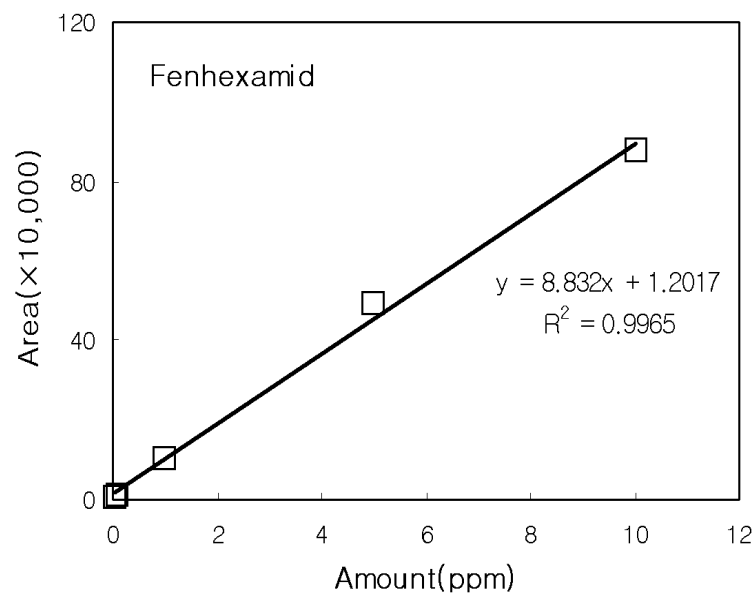
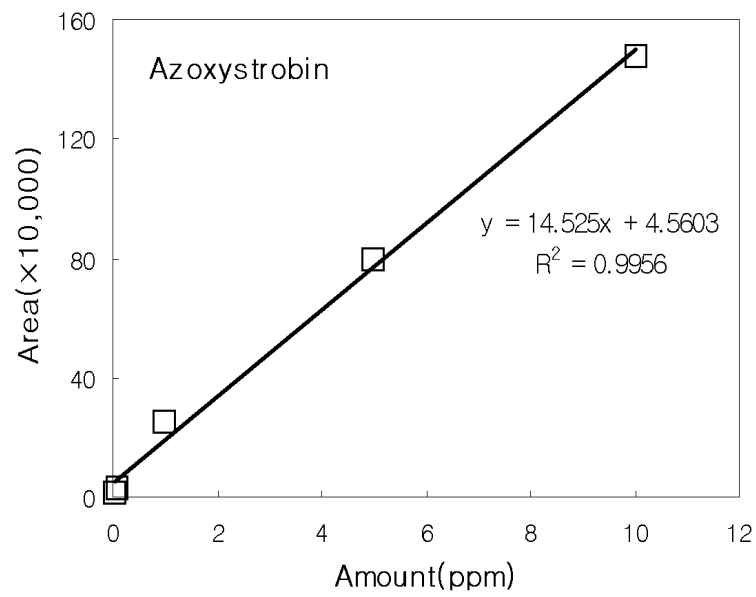


Fig. 6. Calibration curve of pesticides in HPLC Column Switching

2) 표준농약의 크로마토그램

① GC

분석 농약성분인 Azoxystrobin은 ECD검출기와 NPD검출기에 감도가 좋았고, Fenhexamid는 ECD검출기에 감도가 좋았다. 두 농약성분을 동시에 분석을 하기 위하여 ECD 검출기를 선택하여 분석을 실시하였다. 총 분석시간은 60분으로 표준농약용액을 Acetone으로 희석하였고 Azoxystrobin은 2ppm, Fenhexamid는 10ppm으로 하여 분석한 결과 Azoxystrobin의 머무른 시간은 52분, Fenhexamid의 머무른 시간은 33분으로 표준농약의 크로마토그램은 Fig. 7과 같았다.

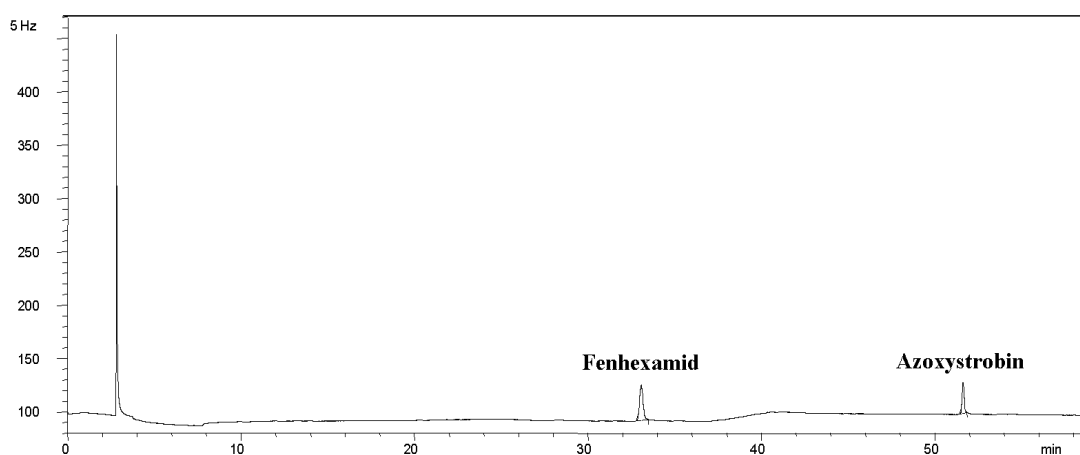


Fig. 7. Typical GC Chromatogram of pesticides by GC.

② HPLC

HPLC는 GC 분석시보다 방해 성분과 불순물들이 많아 컬럼세척 시간을 길게하여 총 분석시간을 73분으로 하였고, 표준농약용액을 Methanol로 희석하여 각각 10ppm 으로 하여 분석을 한 결과 분리된 표준농약의 크로마토그램은 Fig. 8과 같았다. Azoxystrobin은 22.5분, Fenhexamid는 25.2분의 머무름 시간을 나타내었고, Azoxystrobin의 감도가 더 우수하여 같은 농도로 분석하였더라도 Fenhexamid 보다 더 높은 peak를 나타내었다.

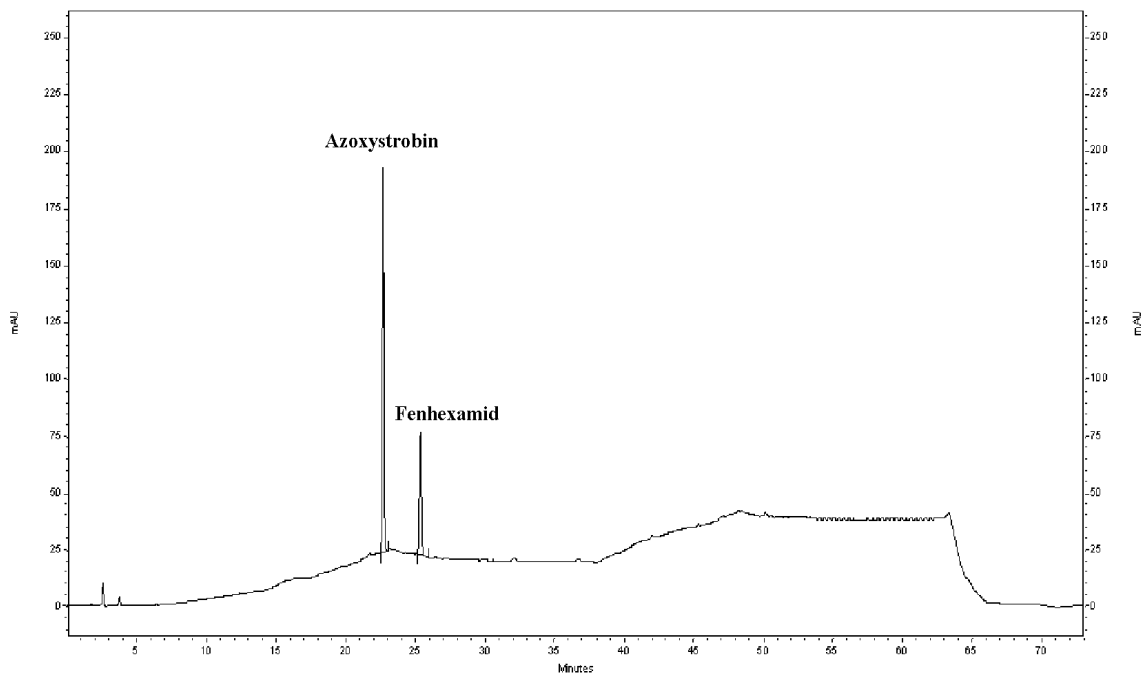


Fig. 8. Typical HPLC Chromatogram of pesticides by HPLC.

③ HPLC column switching

HPLC Column switching은 전처리 컬럼에서의 머무름 시간에 따라 분석 시간에 다소 차이가 있는데 Azoxystrobin은 7.5분, Fenhexamid는 10.0분의 머무름 시간을 지니고 있었다. HPLC Column switching의 경우 전처리 컬럼을 같은 시간대에 지나가는 물질들을 분리시키는 것이 용이하나 다른 시간대에 나오는 물질을 분리시키기에는 어려움이 있으므로 본 실험에서도 각각 분석을 하였다. 총 분석시간은 Azoxystrobin이 35분, Fenhexamid는 45분이었으며, 전처리컬럼을 지나가는 머무름시간은 Azoxystrobin의 경우 7.5분 정도였고, Fenhexamid는 10분 정도였으며, 분석컬럼까지의 머무름 시간은 Fig. 9에서와 같이 Azoxystrobin이 16.2분, Fenhexamid가 24.5분이었다.

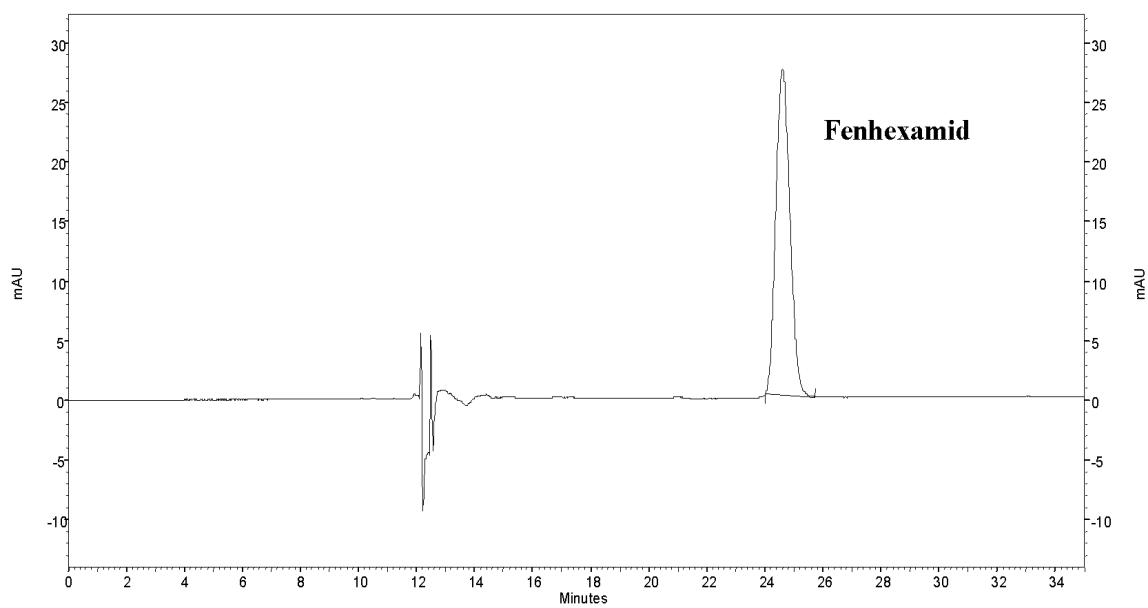
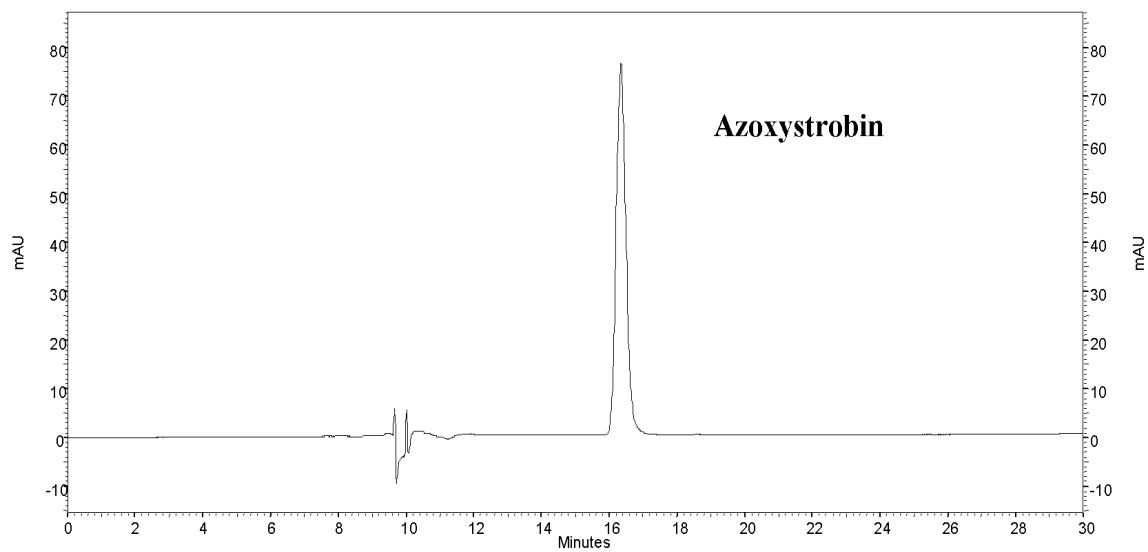


Fig. 9. Typical HPLC column switching Chromatogram of pesticides by HPLC column switching.

3) 표준 농약의 검출한계

표준용액을 점차 희석하여 표준물질의 검출한계(S/N=3)을 비교해 본 결과 GC 분석에서 Azoxystrobin 0.1, Fenhexamid 0.5, HPLC 분석에서 Azoxystrobin 0.01, Fenhexamid 0.05, HPLC column switching 분석에서 Azoxystrobin 0.006, Fenhexamid 0.03으로 HPLC Column switching의 검출한계가 다른 분석방법과 비교하였을 때 더 우수한 결과를 나타내었으며 이를 Table 7에 나타내었다.

Table 7. Detection limit of the analytical methods of pesticide

	Limit of Detection (ppm)		
	GC	HPLC	switching
Azoxystrobin	0.1	0.01	0.006
Fenhexamid	0.5	0.05	0.03

2. 기기 분석의 최적화

1) GC

Fig. 2에 의하여 전처리를 한 시료를 $80^{\circ}\text{C}(5\text{min}) \rightarrow 10^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 280^{\circ}\text{C}(30\text{min})$ 의 온도프로그래밍으로 Gas Chromatography로 분석한 결과 Azoxystrobin의 경우에는 50분 이후에서 머무른 시간을 나타내어 인삼 고유의 Peak들과 겹치는 현상이 일어나지 않았으나 Fenhexamid의 경우에는 인삼 고유의 Peak들과 비슷한 머무른 시간인 33분을 가지고 있어 Fenhexamid 표준용액 크로마토그램과 농약을 뿌리지 않은 분석시료의 크로마토그램을 겹쳐서본 Fig. 10의 첫 번째 크로마토그램과 같이 인삼 고유의 Peak들과 겹쳐서 나왔다.

겹쳐진 Peak로는 정확한 데이터를 얻을 수 없으므로 Fenhexamid를 인삼 고유의 Peak들과 분리시키고자 하였다. 온도프로그래밍에서 초기온도를 낮은 온도로 시작하여 승온 조건에서 천천히 온도를 올려서 분석한 결과 초기 분석시의 그래프와 변화가 없었다. 그래서 Fenhexamid가 분석되는 온도보다 약간 낮은 온도에서 장시간 머무른 후 승온 조건으로 온도를 올려주기로 하였다. 그 결과 $215^{\circ}\text{C}(20\text{min}) \rightarrow 5^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 225^{\circ}\text{C}(15\text{min}) \rightarrow 30^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 300^{\circ}\text{C}(20\text{min})$ 조건하에서 Fig. 10의 두 번째 크로마토그램과 같이 표준용액의 Peak와 분석시료의 고유의 Peak가 분리가 되었다.

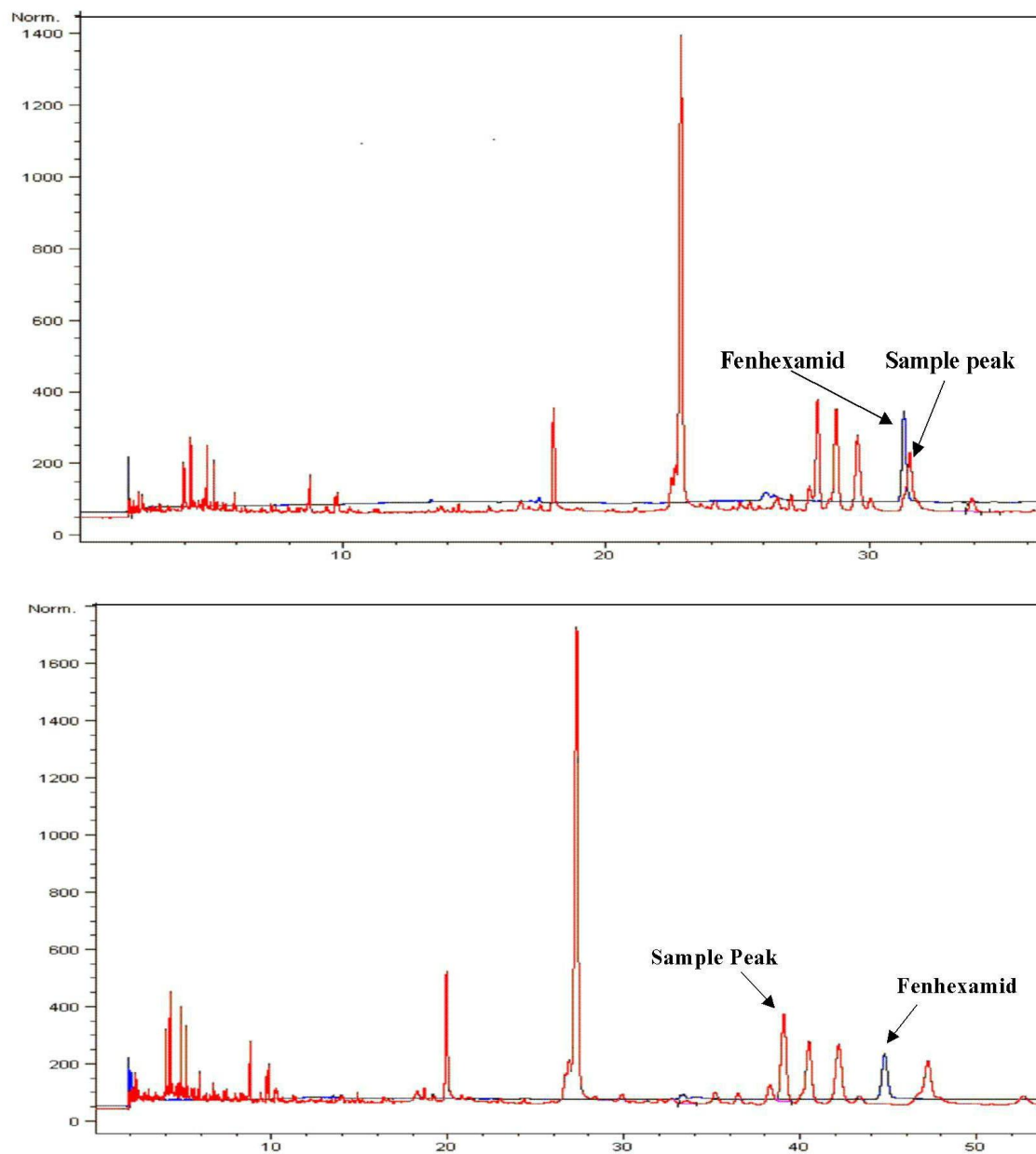


Fig. 10. Overlay GC Chromatogram of Standard and Sample

2) HPLC

식품공전¹³⁾ 중의 분석법에 따라서 이동상 용매를 여러 조건에서 검색하여 적절히 조절한 결과, Azoxystrobin과 Fenhexamid가 254 nm이상의 높은 파장에서도 높은 감도를 보였다. 그리고 인삼의 잔류농약 분석시 복잡한 matrix로 인해 많은 방해 Peak들이 검출되므로 column의 오염으로 다음 분석에 영향을 미치므로 분석에 정확도와 정밀성이 감소된다. 그래서 현재 식품공전상¹³⁾에서는 Acetonitrile을 이동상으로 사용하나 본 실험에서는 분석의 정확도와 정밀성을 높이기 위해 세척력이 우수한 Methanol을 이동상 용매로 사용하였다. 그리고 검출기 측정파장은 이동상의 측정파장에 영향을 받지 않도록 고려하여 254 nm 파장을 선택하여 분석을 실시하였다.

HPLC 분석의 결과 GC와는 달리 Azoxystrobin, Fenhexamid 두 농약 모두 인삼고유 Peak의 머무른 시간때와 비슷한 시간에서 나오므로 GC보다 분리가 더 어려웠다.

Methanol : H₂O의 비율을 2 : 8의 비율로 시작하여 Methanol : H₂O의 비율을 8 : 2의 비율로 바꾸면서 분석한 결과 Fig. 11의 첫 번째 크로마토그램과 같이 표준용액의 peak들과 인삼고유의 성분 peak들과 겹쳐서 나오므로 이를 기준으로 이동상 흐름을 바꾸어 최적의 분석조건을 잡은 결과 Flow를 1 mL/min 의 유속으로 3분까지 Methanol을 0.2 mL/min 의 유속으로 흘려주다가 20분에서 0.7 mL/min의 유속으로 흘려주어 15분간 Holding 시켰으며, 45분까지 0.95 mL/min 의 유속으로 흘려주어 15분간 Holding 후 68분에는 초기 상태로 돌아가 Fig.11의 두 번째 크로마토그램과 같은 결과를 얻었으나 첫 번째 크로마토그램과 비교할 때 분리는 더 잘 되었지만 GC 크로마토그램과 같이 확연한 분리는 나타나지 않아 정확한 분석에 어려움이 있었다.

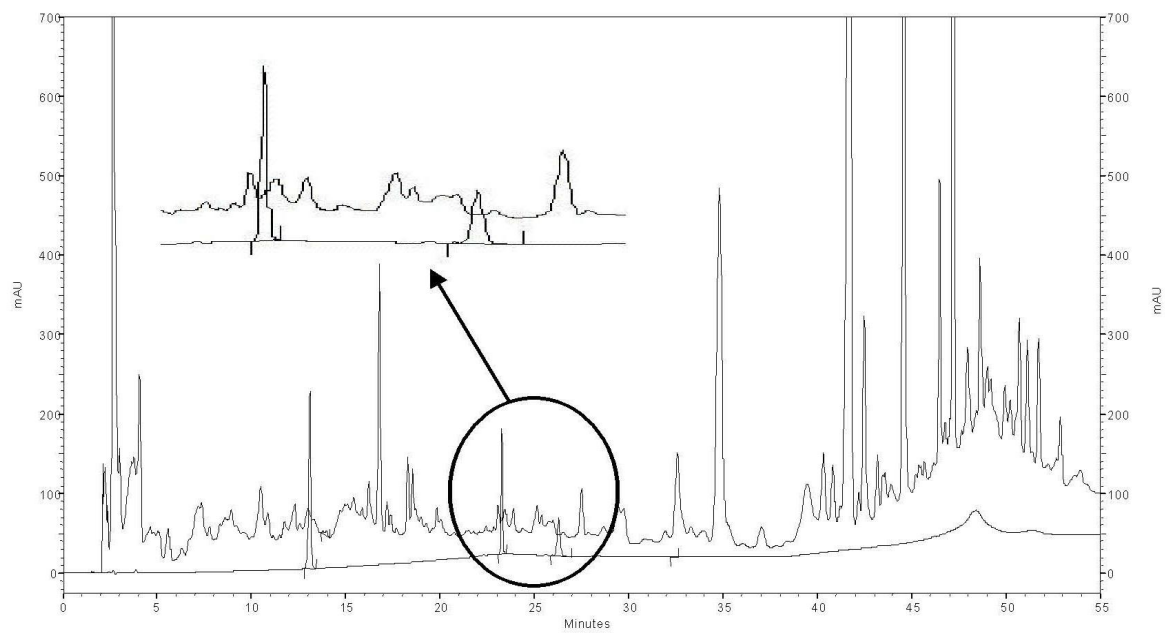
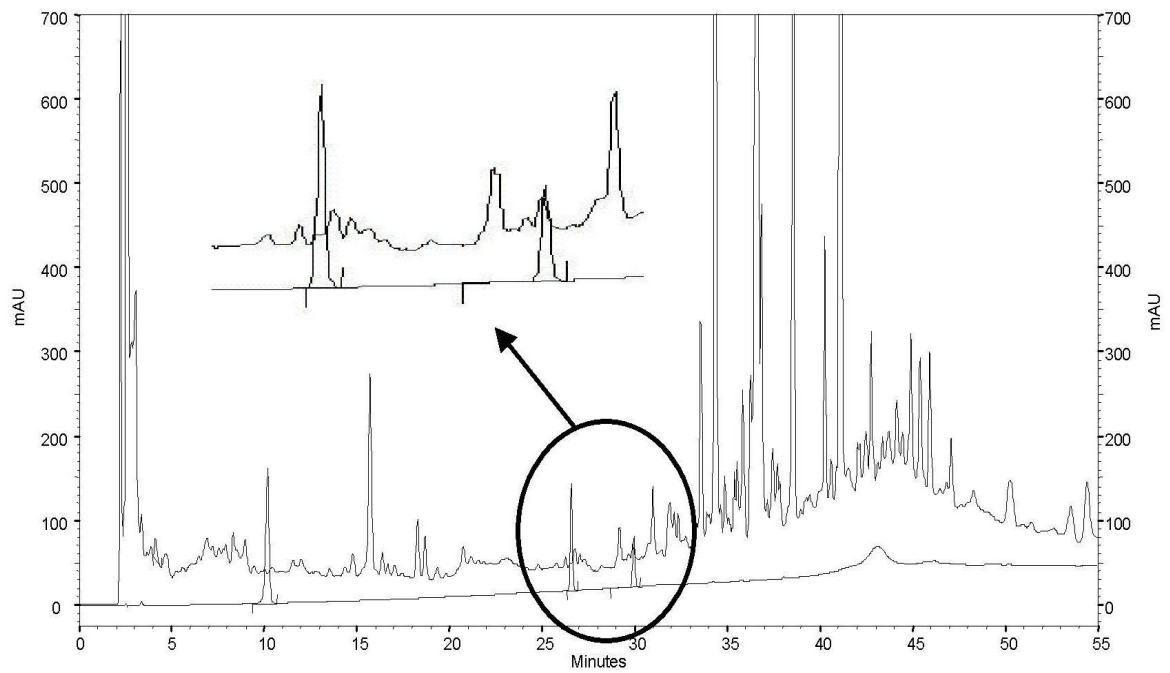


Fig. 11. Overlay HPLC Chromatogram of Standard and Sample.

3) HPLC Column switching

검출기 측정과장과 이동상 용매는 HPLC분석에서와 동일한 과장과 이동상 용매를 사용하였으며 본 실험에서 사용한 전처리 컬럼의 길이가 짧고 분석하고자 하는 물질이 유기용매에 잘 용해되므로 이동상의 유기용매양이 많아질수록 용매 Peak와 같은 시간 때에 나올 가능성이 있으므로 10% Methanol을 시작으로 조금씩 Methanol의 양을 늘려가면서 분석을 하였다. 그리고 농축컬럼과 분석컬럼은 내경이 얇고 길이가 길어 전처리 컬럼의 이동상과 같은 농도의 용매를 사용하게 되면 분석시간이 길어지므로 전처리 컬럼을 통과하는 이동상보다 유기용매의 양을 증가 시켜 분석을 실시하였다.

그 결과 전처리 컬럼을 통과하는 이동상은 40% Methanol로, 농축컬럼과 분석컬럼을 통과하는 이동상은 60% Methanol로 하여 분석한 결과가 GC 및 HPLC로 분석한 결과 보다 Fig. 12에서 보여주듯이 더 높은 분리능을 얻었다. Fig. 12의 첫 번째 크로마토그램은 Azoxystrobin의 크로마토그램이고, 두 번째 크로마토그램은 Fenhexamid의 크로마토그램으로, 확인 결과 HPLC Column switching에 의한 분석방법이 GC와 HPLC분석방법 보다 더 정밀하고 정확한 것으로 판단되었다.

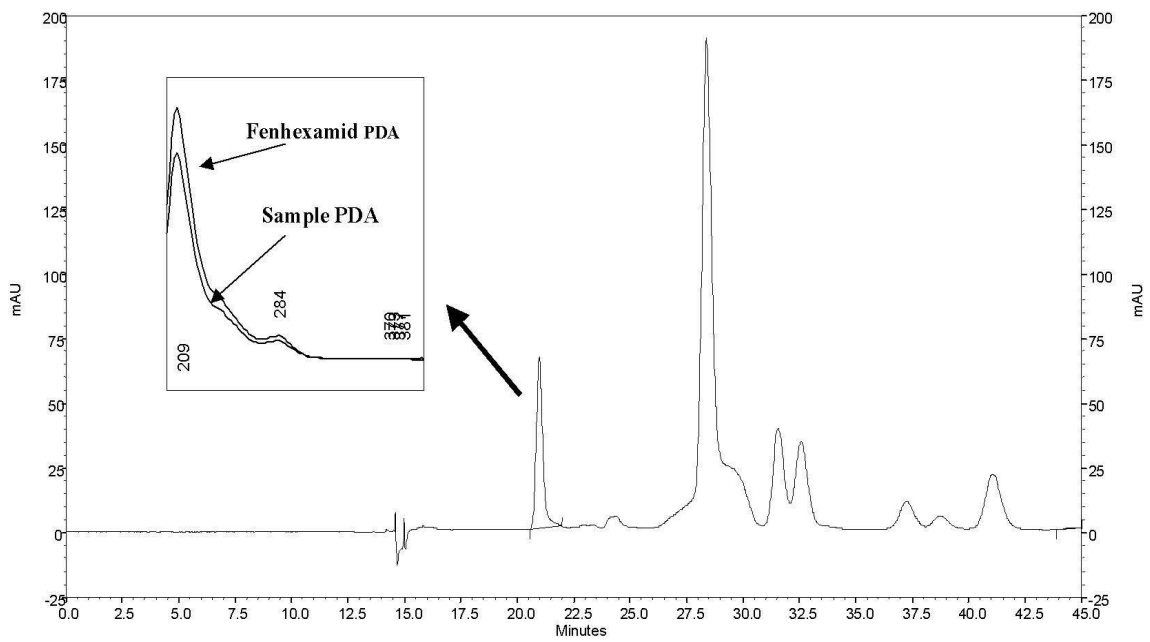
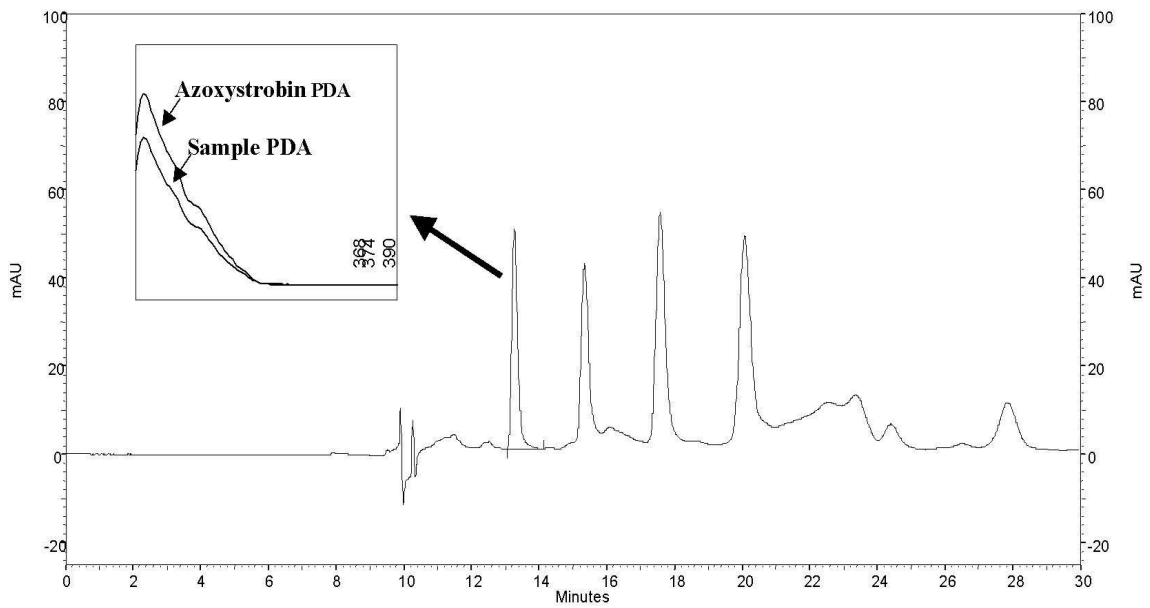


Fig. 12. Sample Chromatogram and PDA Spectrum of Pesticides by Column switching Method.

3. 인삼제품에 따른 회수율

1) 수삼에서의 회수율

인삼제품은 원료 수삼에서 건삼, 홍삼, 엑기스로 가공시 성분 변화가 동반되어 각각의 제품마다 서로 다른 물성을 가지게 되어 분석할 때 고유의 성분들로 인한 분석실험의 회수율차가 있을 수 있으므로 본 실험에서는 수삼, 건삼, 홍삼 제품에 분석방법에 따라 농약표준용액을 Spiking 처리하여 회수율을 비교하고자 하였다. 수삼에 농약표준용액을 Spiking 처리하여 회수율을 비교한 결과 Table 8과 Fig. 13과 같았다. 본 연구에서 분석하고자 하는 농약 성분 중 Azoxystrobin의 경우 HPLC, GC, HPLC Column switching의 순서로 우수한 회수율을 보였다. HPLC는 70.20±3.09%, GC는 71.27±1.72%의 회수율을 보여주었고, HPLC Column switching에 의한 회수율은 두 분석방법에 비하여 101.78±2.65%로 매우 우수한 결과를 보였다. 그리고 Fenhexamid의 경우 Azoxystrobin과 마찬가지로 HPLC Column switching법의 회수율이 79.40±1.4%로 높게 나타났다.

Table 8. Recovery in fresh ginseng

(Unit : %)

	Switching	GC	HPLC
Azoxystrobin	101.78±2.65	71.27±1.72	70.20±3.09
Fenhexamid	79.40±1.4	74.01±1.23	70.15±1.65

(n=3)

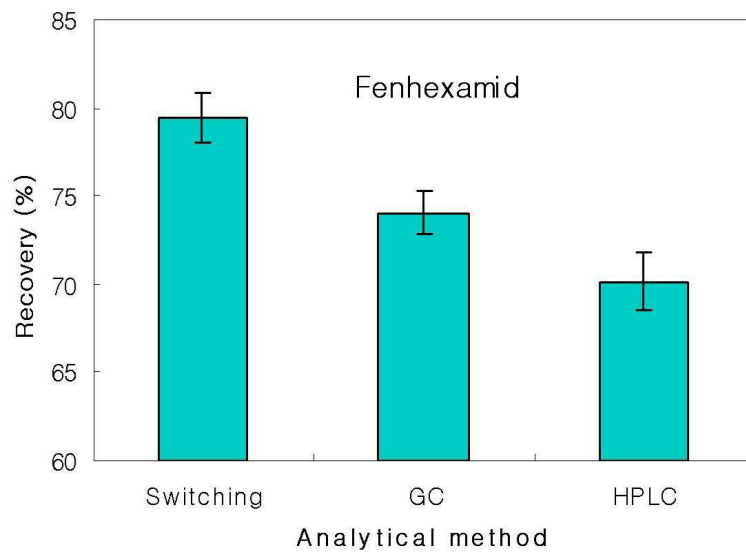
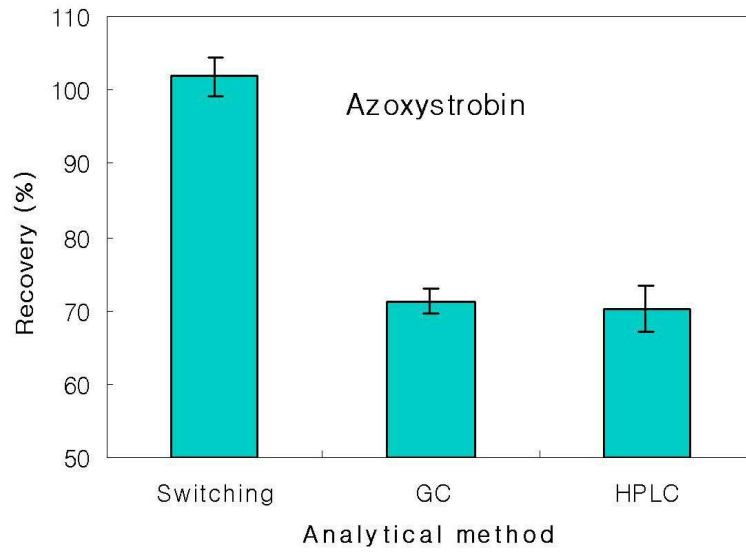


Fig. 13. Recovery in fresh ginseng(n=3).

2) 건삼에서의 회수율

건삼에 농약표준용액을 Spiking처리하여 회수율을 비교한 결과 수삼에서의 회수율과 유사한 경향을 보여주었다. Azoxystrobin, Fenhexamid 두 농약성분의 회수율은 Table 9와 Fig. 14에서 보는바와 같이 Azoxystrobin은 HPLC 71.7±6.75%, GC 75.17±3.45%, HPLC Column switching 101.65±3.06%, Fenhexamid에서는 HPLC 60.72±2.04%, GC 63.37±1.98%, HPLC Column switching 72.8±2.20%의 회수율을 나타내었다. GC와 HPLC에서의 결과보다 HPLC Column switching법을 이용한 회수율 시험 결과에서 Azoxystrobin은 약 30%, Fenhexmid의 경우는 10% 정도 우수한 회수율을 보여주었다.

Table 9. Recovery in dried ginseng

(Unit : %)

	Switching	GC	HPLC
Azoxystrobin	101.65±3.06	75.17±3.45	71.7±6.75
Fenhexamid	72.8±2.20	63.37±1.98	60.72±2.04

(n=3)

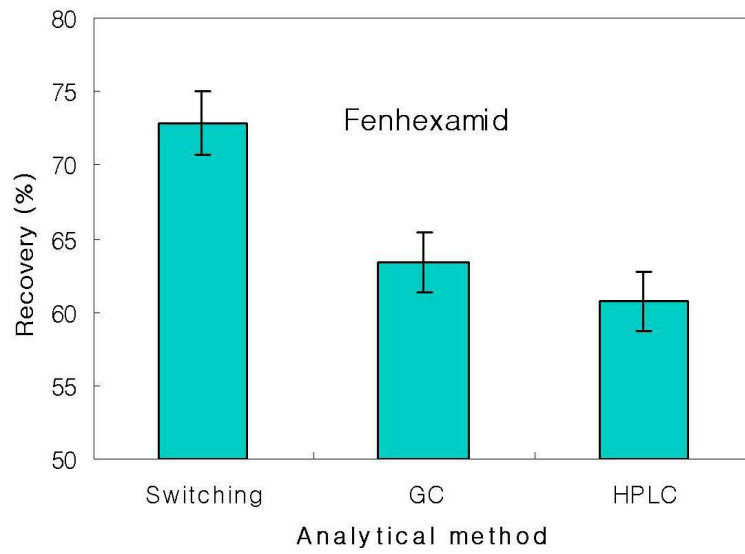
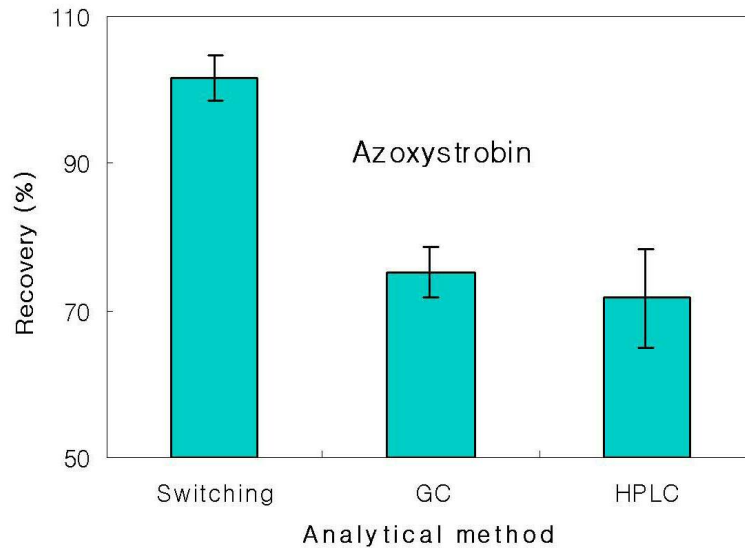


Fig. 14. Recovery in dried ginseng(n=3).

3) 홍삼에서의 회수율

홍삼도 Table 10과 Fig. 15에 보여주듯이 수삼, 건삼과 비슷한 회수율을 보였다. Azoxystrobin은 HPLC가 $69.55 \pm 1.92\%$, GC가 $73.54 \pm 2.61\%$, HPLC Column switching이 $100.81 \pm 2.52\%$ 의 순서로 우수한 회수율을 보였고 Fenhexamid는 분석방법별 회수율의 차이가 확연히 나타나지는 않았지만, HPLC Column switching 분석법이 $79.93 \pm 1.90\%$ 로 다른 분석법에 비하여 다소 높은 회수율을 보여주었다.

수삼, 건삼 및 홍삼에 대하여 GC, HPLC 및 HPLC Column switching을 이용한 최적의 분석조건을 확립하고자 실험을 실시한 결과 HPLC Column switching의 분석방법이 GC나 HPLC분석방법보다 높은 감도를 지니고 있었으며 Spiking 처리를 하여 회수율을 본 결과 다른 분석방법과 비교하여 우수한 회수율을 나타내었고, 수삼, 건삼 및 홍삼 간의 제품에 따른 회수율의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

본 연구의 결과와 같이 HPLC Column switching을 이용하여 분석을 한 연구들을 살펴보면 비타민 분석의 경우³⁶⁻³⁸⁾, 미생물학적 정량법과 비교하였을 때 HPLC Column switching방법은 단시간에 정확한 분석을 하였으며, 100%에 가까운 회수율을 얻었고, HPLC Column switching과 고체상 추출을 이용한 요중 H₂ 수용체 길항제의 분석을 한 연구에서도²⁹⁾ HPLC Column switching방법이 추출과정은 거치지 않아 84% 이상의 높은 회수율로 Solid phase extraction에 비교하여 분석성분의 정확한 분리와 높은 회수율을 나타내었다. 또한 혈장중의 플루코나졸의 분석과 뇨중의 플루비프로펜의 분석에 관한 연구를³¹⁻³²⁾ 보면 HPLC Column switching방법을 이용하여 생체시료 중 약물의 함량을 측정하기 위하여 시료 중에 존재하는 단백질을

제거한 다음 유기용매를 사용하여 약물을 추출하는 일련의 과정을 생략할 수 있으며, 또한 내부표준물질을 사용하지 않고 분석을 할 수 있는 장점을 가지고 있다고 하였다. HPLC Column switching 방법을 이용한 연구 결과를 살펴본 결과 본 연구결과와 같이 복잡한 전처리 과정을 간소화하여 분석시간을 단축시킬 수 있었으며, 우수한 회수율과 정확성을 가지고 있었다.

Table 10. Recovery in red ginseng

(Unit : %)

	Switching	GC	HPLC
Azoxystrobin	100.81±2.52	73.54±2.61	69.55±1.92
Fenhexamid	79.93±1.90	78.73±0.62	68.47±2.94

(n=3)

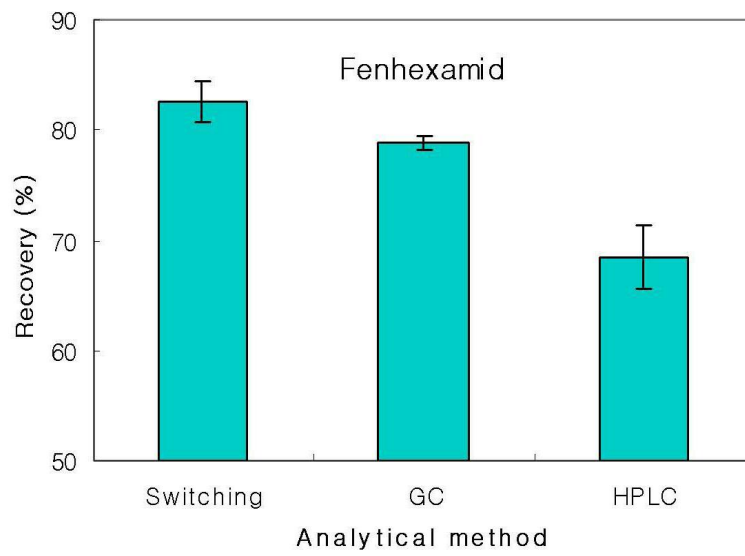
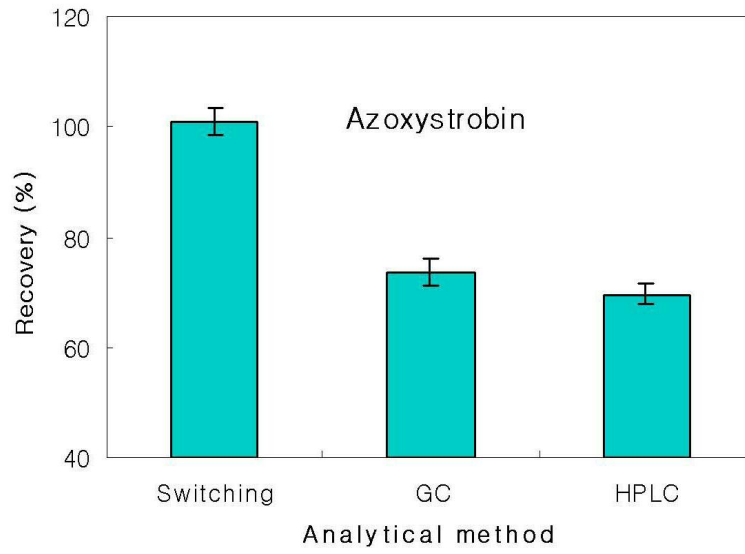


Fig. 15. Recovery in red ginseng.(n=3)

4. 포장실험시료의 잔류농약분석

1) 수삼에서의 잔류농약 분석

인삼은 많은 성분들을 포함하고 있어 복잡한 matrix를 가지고 있어 미량 분석인 잔류농약 분석시 인삼의 방해물질들로 인한 분석의 어려움이 많다. 본 연구에서는 방해물질에 의한 분석오차를 최소화 하여 최적의 분석방법을 확립하고, Spiking 처리 한 인삼과 생산단계에서 직접 농약을 살포하여 잔류된 인삼의 농약분석에는 차이가 있을 것으로 사료되어 위와 같이 두개의 조건으로 분석을 하고 그 결과를 비교하고자 하였다. Spiking 처리를 한 인삼은 곁에 묻은 농약을 추출하여 분석하는 것이지만 직접 농약을 살포하여 잔류된 인삼은 조직 속에서 농약을 추출해 내야하므로 차이가 있을 것이다. 그래서 충주 주덕의 인삼포를 임대하여 6년근 인삼에 직접 살포하여 잔류시켰으며 인삼에 농약이 잔류되도록 약제 살포농도는 안전사용기준농도의 2배가 되도록 조절하여 배부식 분무기를 사용하여 인삼엽부에 균일하게 약액이 충분히 흐르도록 살포하였다. 약제 살포 시기는 안전사용기준의 최종 살포일이 수확 전 10일까지 이나 본 연구에서는 잔류되어있는 농약을 분석해야하므로 3일 간격으로 3회 살포한 후 3일 후에 수확하여 분석용 시료로 사용하였다. 수확한 수삼을 원료로 하여 시판되는 건삼과 홍삼을 제조하는 동일한 방법으로 실험실에서 제조하여 분석실험을 실시하였다. 수삼의 경우 회수율 실험에서와 유사한 경향으로 Fig. 16에서 나타난 것과 같이 HPLC Column switching법에 의해 분석한 결과가 GC와 HPLC 분석법의 결과보다 더 우수하였다. GC의 회수율은 HPLC 분석법과 차이는 없으나 다소 낮은 회수율을 보여주었다. 또한 Switching 분석법으로 얻은 결과가 회수율 결과와 유사한 경향을 보였으나 GC와 HPLC분석법에서 얻은 실험결과는 예상보다 낮은 값을 얻었다.

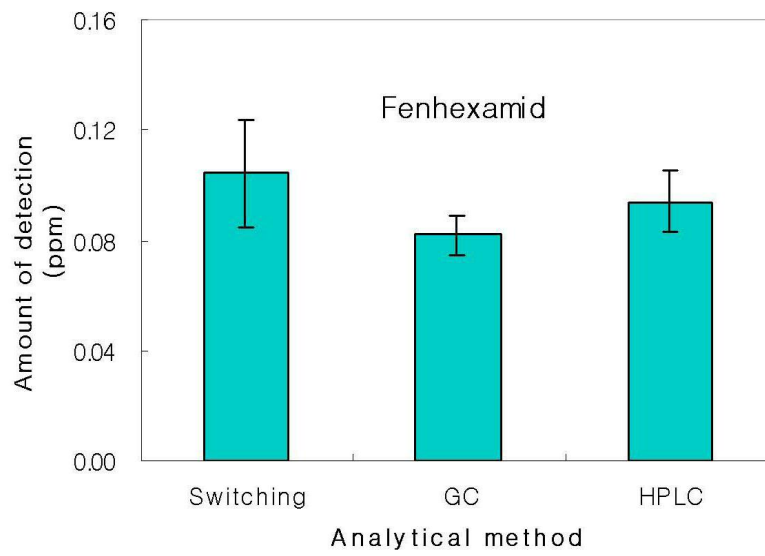
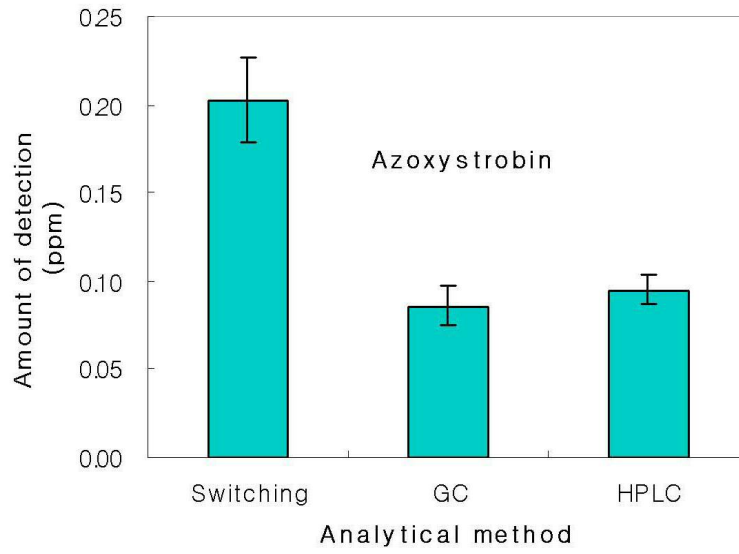


Fig. 16. Residual amount in fresh ginseng(n=3).

2) 건삼에서의 잔류농약 분석

건삼은 수삼에서 나온 실험결과와 유사한 경향을 보였으며, Spiking 회수율에서의 결과와 같았다. 농약을 직접 살포하여 채취한 인삼을 건삼으로 제조하여 잔류농약의 양을 분석한 결과 Azoxystrobin은 HPLC Column switching법이 0.43 ± 0.017 ppm, GC분석방법이 0.19 ± 0.019 ppm, HPLC분석방법이 0.15 ± 0.018 ppm으로 HPLC Column switching법이 GC, HPLC분석방법보다 더 우수한 결과를 얻었다. Fenhexamid는 HPLC Column switching법이 0.42 ± 0.027 ppm, GC분석방법이 0.21 ± 0.035 ppm, HPLC분석방법이 0.18 ± 0.011 ppm으로 Azoxystrobin과 같은 결과를 나타내었다.

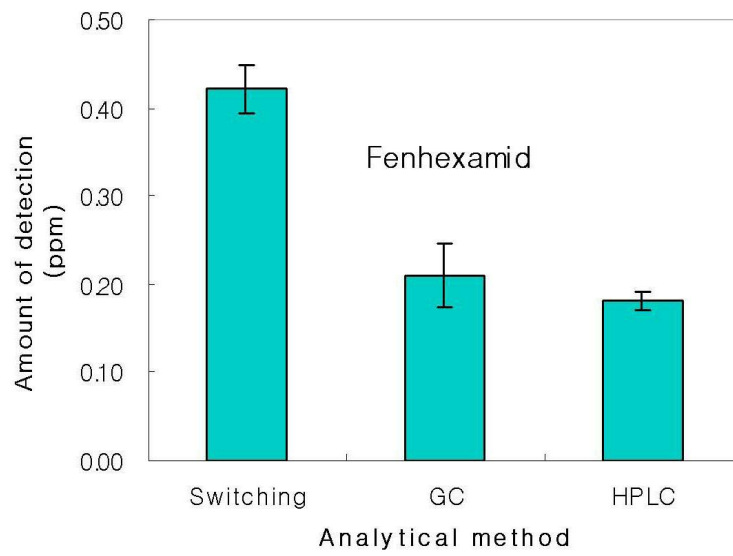
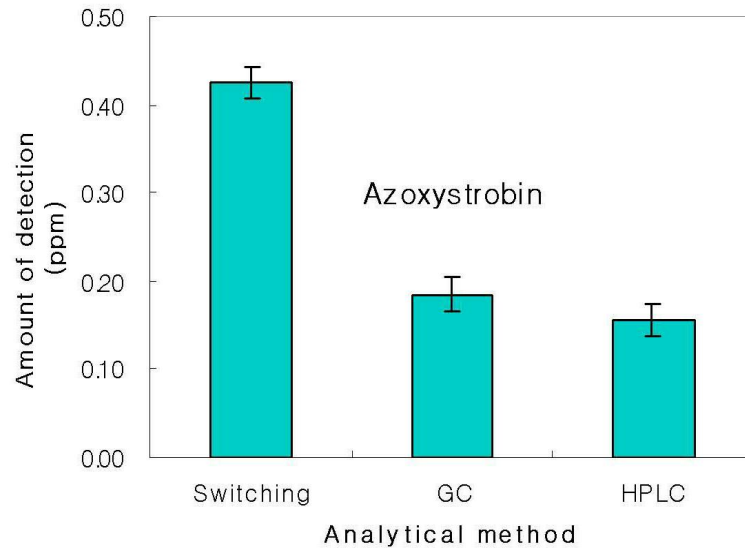


Fig. 17. Residual amount in dried ginseng(n=3).

3) 홍삼에서의 잔류농약 분석

홍삼도 수삼과 건삼의 결과와 같이 HPLC Column switching법이 GC와 HPLC분석결과보다 더 우수한 결과를 보여주었다. Azoxystrobin과 Fenhexamid에 대한 분석법들의 감도는 HPLC Column switching법이 GC와 HPLC분석방법과 비교하였을때 2배 이상의 감도를 보였으며, 홍삼에서 분석한 결과는 Fig. 18과 같았다. 인삼에서의 잔류농약 분석은 Spiking 처리를 하여 회수율을 본 결과와 동일하게 수삼, 건삼, 홍삼 간의 제품에 따른 차이가 거의 없는 것으로 나타났다. 그러므로 시중에 유통되고 있는 인삼을 잔류농약 검사를 할 때 HPLC Column switching법을 이용할 수 있으며, 이를 이용하여 분석을 하였을 경우 보다 정확한 분석이 가능함을 알 수 있다.

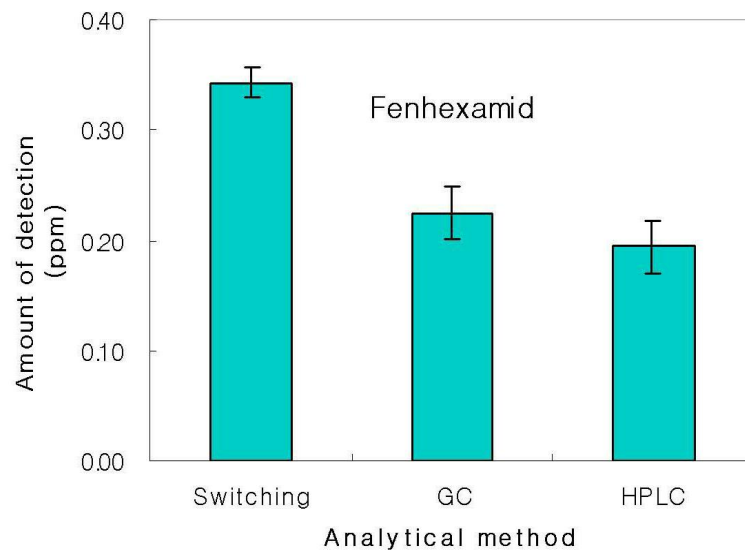
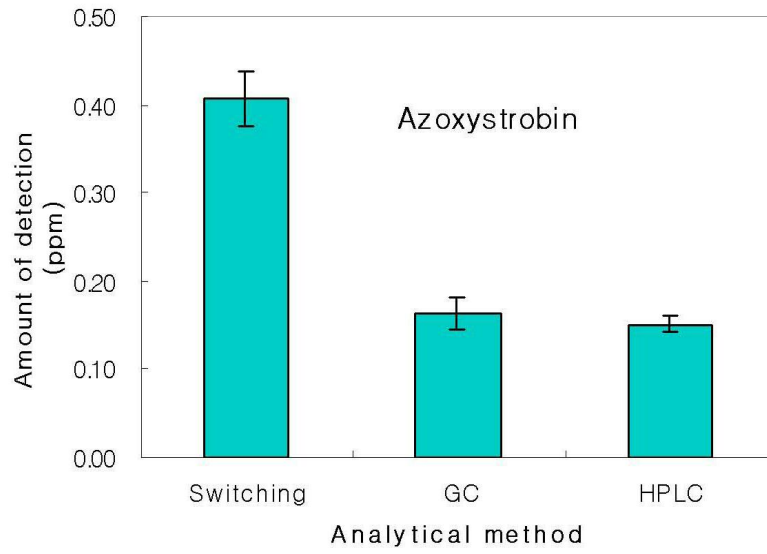


Fig. 18. Residual amount in red ginseng(n=3).

IV. 결 론

본 연구에서는 인삼 중 잔류농약(Azoxystrobin, Fenhexamid)의 최적분석조건을 확립하고자 기존의 GC와 HPLC에 의한 잔류농약분석법 이외에 HPLC의 한 종류인 HPLC Column switching법을 도입하여 잔류농약분석에 적용시켜 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 농약표준용액을 사용한 검정곡선에서 상관계수 값은 0.9951 이상의 양호한 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 Azoxystrobin의 경우 GC 0.1, HPLC 0.01, HPLC Column switching 0.006, Fenhexamid의 경우 GC 0.5, HPLC 0.05, HPLC Column switching 0.03으로 두 농약성분에 대한 분석법의 감도는 HPLC Column switching이 다른 분석방법에 비하여 우수하였다.
2. 분석방법별 최적분석조건을 잡고자 실시한 결과 HPLC분석법에 의한 인삼의 방해성분과 분석성분의 분리가 확실히 이루어지지 않았고, GC와 HPLC Column switching의 경우 분리가 확실히 이루어졌다. 그러나 GC의 경우 검출한계가 낮아 미량분석인 잔류농약 분석시 HPLC Column switching에 의한 분석방법이 GC와 HPLC분석방법보다 더 정밀하고 정확하였다.
3. 농약을 처리하지 않은 인삼으로 제조한 수삼, 건삼, 홍삼에서의 회수율을 비교한 결과 수삼에서 Azoxystrobin은 HPLC Column switching법이 101.78%의 회수율로 70%정도의 회수율을 가진 GC와 HPLC분석법과 비교하여 우수하였고, Fenhexamid의 경우 HPLC Column switching법이 79.40%의 회수율로 74%정도의 회수율을 가진 GC와 HPLC분석법과 비교하여 우수하였으며, 건삼과 홍삼에서도 유사한 경향을 보여주었다.

4. 농약을 살포한 인삼제품에서 분석방법에 따른 잔류농약의 양을 비교한 결과 수삼에서 Azoxystrobin은 HPLC Column switching법이 0.2ppm으로 0.09ppm, 0.08ppm을 얻은 GC와 HPLC분석방법에 비교하여 2배 이상의 감도를 보여주었으며, 건삼과 홍삼에서도 유사한 경향을 보여주었다. Fenhexamid는 HPLC Column switching법이 0.1ppm으로 0.08ppm, 0.09ppm을 얻은 GC와 HPLC분석방법에 비교해 다소 높은 결과를 얻었고, 건삼과 홍삼에서는 2배 이상의 감도를 보였다.

본 연구 결과를 바탕으로 인삼분석시 기존의 의약품과 비타민 분석에서만 많이 사용되었던 HPLC의 한 종류인 HPLC Column switching법을 도입함으로써 높은 감도와 방해성분들과의 확실한 분리로 분석결과의 정밀성과 정확성을 높였으며, 전처리 시간의 단축과 유기용매 사용량의 감소로 인한 경제적인 측면에서도 효과를 보았다.

참 고 문 헌

1. 한국인삼연초연구원 : 고려인삼. 288 (1993)
2. 한국인삼연초연구원 : 최신고려인삼(성분 및 효능편) (1996)
3. 조영동: 인삼성분의 임상적 효능과 생화학적 작용기전. J.Ginseng Res., 25, 1, 19-25 (2001)
4. Yi-Seong Kwak, Jong-Dae Park and Jai-Won Yang : Present and Its Prospect of Red Ginseng Efficacy Research. Food industry and Nutrition, 30-37 (2003)
5. 한덕용 : 인삼의 효능과 성분에 대한 연구의 최근 경향. Korean J, Ginseng Sci., 14, 1, 74-80 (1990)
6. Ki Yeul. Nam : Clinical Applications and Efficacy of Korean ginseng. J. Ginseng Res. Bol., 26, 3, 111-131 (2002)
7. Sug Won Roh, Hyun Ho Kim, Yeun Chung Ku, Jae sung Jo and Jong Yeong Pyon : Occurrence and Distribution of Weeds in Ginseng Gardens in Korea. Kor. J. Weed Sci., 22(4), 350-358 (2002)
8. Hyo-Kun Kim and Kyu-Seng Lee : Effect of Coverings on the Growth of Ginseng and the persistency of Procymidone in Growing Soils. Korean Journal of Environmental Agriculture, 21, 1, 24-30 (2002)
9. Seung-Hoon Lee, Dong-Yun Kim, Yong-Moon : Clinical observation of Acute Carbamat Intoxication, The Korean Society of Emergency Medicine, 9, 4 (1998)
10. Bum-Jin OH, Sung-Oh Hwang, Kang-Hyun Lee, Eun-Seog Hong, Jong-Chun Lim, Hyun Kim, Jun-Hwi Cho, Jun-Sub Shin, Ki-Chul

- Yoo : Different Clinical Features of Organophosphate Insecticides Intoxication according to The route of administration: Disparity between Clinical severity and Plasma Cholinesterase level. The Korean Society of Emergency Medicine, 9, 1 (1998)
11. Dong-Ik Lee, Young-Ho Jin, Jae-Baek Lee : Acute Pancreatitis Following Organophosphate Intoxication-Analysis of 6 Cases. The Korean Society of Emergency Medicine. 12, 12 (2001)
 12. 향문사 : 삼정 신농약. (1998)
 13. 식품의약품안전청 : 식품공전. (2004)
 14. 인삼 산업법 ; 법률 제 06998호
 15. 농약사용지침서, 농약공업협회 (2004)
 16. Yoon Hye Ran : Analytical Method fo Residual Pesticides in Herbal Drugs, Seoul national university (1994)
 17. Bok-Soon Kim, Sung-Ja Cho, Sung-Ae Cho, Hee-Gon Kang, Jung-Hun Kim : Simultaneous determination of 13 organophosphorus pesticides in agricultural products by Gas Chromatograph. Agrochemical Analysis Division (1998)
 18. Woo-Seong Kim, Seon-Hwa Lee, Sang-yub Kim, Dong-Youn Jeong, Jae-I Kim, Yeong-Ja Lee, Hong-Jae Lee, Seong-Ug Jeong and Heung-Jai Park : Simultaneous Analysis of Multi-residual Pesticides using GC/NPD. J. of the Environmental Sciences, 1117-1120 (2003)
 19. Dong-Jin Oh, Young-Bok Kim, Ji-Young Lee, Ji-Young Moon and Gi-Ho Jeong : Accumulation of Organonitrogen Pesticides in Fishes and Amphibians from the Basin of Major Rivers of S.Korea. Analytical science & Technology, 15, 6, 489-495 (2002)

20. Woo-seong kim, Sun-Hwa Lee, Jae-I Kim, Ji-Yoon Jeong, Myeong-Ja Lee, Yeong-Chai Park, Yeong-Ja Lee, Seong-Ug Jeong, Bong-Hun Lee and Heung-Jai Park : Simultaneous Analytical Method of Organochlorine and Pyrethroid Pesticides using GC(ECD). *J.of the Environmental Sciences.*, 477-480 (2003)
21. Hye-Jin Park : A Study on the multiresidue analytical methods for Organophosphorus, Organochlorine, and N-Methyl carbamate pesticides in Food, Chung-Nam national university (2003)
22. Seong-Soo Han, Seog-Cho Lo, Won-Ju Kim, Pii-Jae Park and Il-Kwang Kim : Gas Chromatographic Analysis on the Residual fo Fungicide Fenhesamid in Crops(Cucumber, Strawberry and Grape). *Analytical science&Technology*, 16, 1, 70-71 (2003)
23. Matt hengel, B.hung, Jo engebretson and Takayuki shibamoto : Analysis of Fenhexamid in caneberry, Blueberry, and Pomegranate by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J.Agric, Food Chem*, 6635-6639 (2003)
24. Vincenzo L. Garau, Alberto angioni, Ana Aguilera Del real, Mariateresa russo, And Paolo cabras : Disappearance of Azoxystrobin, Pyrimethanil, Cyprodinil, and Fludioxonil on Tomatoes in a Greenhouse. *J.Agric. Food Chem*, 1929-1932 (2002)
25. Anna sanino, Luciana bolzoni, Mirella bandini : Application of liquid chromatography with eletrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *Journal of chromatography A*.1036 161-189 (2004)
26. Chae-kyu Park, Byeong-Seon Jeon and Jai-Won Yang : The

- Chemical Components of Korean Ginseng. Food industry and Nutrition. 8(2), 10-23 (2003)
27. Bogim Gil : A Survey on the Quality Characteristics of Dried Ginseng Products. Korean J. Food Sci. Technol, 35, 5, 1003-1006 (2003)
 28. Jung-Won Lee : Studies on the organic chlorinated pesticide residues in ginseng and ginseng cultivating soil. Hanbat national university (2003)
 29. Kyung-Hee Kwon : High Performance liquid Chromatographic Determination of H₂-receptor Antagonist in Urine with Solid Phase Extraction and Column-Switching Technique. The Graduate School of Seoul Woman's University (1993)
 30. Nyun-Jung Kim : Development of column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of trace compounds. Konkuk national university (2003)
 31. Hyun-Cheol Choi, Sin-Jung Kang, Mi-Ok Youn, Su-Jung Lee, Ho-Jung Kim, Chang-Hun Park and Ki-Won Cha : Trace Analysis of Racemic Isomers of Flurbiprofen in Human Urine using Column Switching-HPLC. Analytical Science & Technology, 15, 6, 529-533 (2002)
 32. Jun-Pin Jee, Sook Jin, Mi-Kyung Lee, Yang-Bae Kim and Chong-Kook Kim : Column-switching High Performance Liquid Chromatographic Determination of Fluconazole in Human Plasma. J. Kor, Pharm, Sci., 30, 1, 51-54 (2000)
 33. Minsun baek, Young-Soo rho, Dong-Hyun Kim :

Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for determination of asiaticoside in rat plasma and bile with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B* 732, 357-363 (1999)

34. Sung Jin Choi, Sang Beom kim, Hee-Yong Lee, Dong Hee Na, Yoo Seok Yoon, Seung Seok Lee, Jeong Han Kim, kang Choon Lee, Hye Suk Lee : Column-switching high-performance liquid chromatographic determination of clarithromycin in human plasma with electrochemical detection. *Talanta* 54, 377-382 (2001)
35. Misun Baek, jin Hyun Jeong, Dong-Hyun Kim : Determination of aloesin in rat plasma using a column-switching high-performance liquid chromatographic assay. *Journal of Chromatography B*. 754, 121-126 (2001)
36. Sung-Jin Park, Tae-Shik Hahm : New Column Switching Technique For Determination of The Vitamin D₃ in dried Milk. *J.of the Korea society for Environmental Analysis*, 197-200 (2001)
37. Sung-Jin Park, Hye-Kyung Kim, Tae-Shik Hahm and Byung-Yong Kim : Determination of Vitamin B₁₂ in Foods Using Column-Switching Technique in μ -HPLC. *J. Korean Soc. Food Sci.* 1208-1211 (1999)
38. Dai Byung Kim, Hye Kyung Park, Kun Sang Park, Jae Hee Jang, Yong Eui Koo, Youn Ju Choi, Sang Wook Park, Se Jung Um, Bo Young Kim : Development of liquid chromatographic method for determining vitamin B₁₂ and pantothenic acid in foods. *The Annual Report of KFDA*, 104-110 (2002)

A study on the optimal analysis method of Residual Pesticides(Azoxystrobin, Fenhexamid) in Ginseng

KyungJin Lee

Department of Chemistry

Graduate school of

Sungshin Women's University

This study was Performed by Gas chromatography(GC), High performance liquid chromatography(HPLC) and HPLC Column switching method to establish optimum condition for analyzing the residual pesticides in ginseng. The samples of fresh ginseng, dried ginseng and red ginseng were prepared from the ginseng field in ChungJu.

Correlation coefficient was 0.9951, a relatively better value. In LOD(Limit of Detection), GC is 0.1ppm, HPLC is 0.01ppm, and HPLC Column switching is 0.006ppm in the case of Azoxystrobin. In the case of Fenhexamid, GC is 0.5ppm, HPLC is 0.05ppm and HPLC Column switching is 0.03ppm. As the result shows the sensitivity gets much better when using HPLC Column switching method.

The recovery rate of Azoxystrobin by Spiking processing on ginseng is 100% with HPLC Column switching and approximately 70% with GC and HPLC. Also, The recovery rate of Fenhexamid was

75% with HPLC Column switching and 65% with GC and HPLC.

The recovery result, however, shows that using HPLC Column switching inspecting residual pesticide is twice sensitive than GC and HPLC.

감사의 글

대학원생활에 발을 들여놓은지가 어제 같은데 벌써 2년의 세월이 지나 석사학위논문을 내게 되었습니다. 이 논문을 쓰기까지 많은 도움을 주신 분들께 작으나마 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

우선 부족한 저를 위해 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 깊은 관심으로 이끌어 주신 지도 교수 유은아 교수님께 깊은 감사드립니다. 그리고 각 분야에서 많은 지도를 해주신 이종만 교수님, 김순옥 교수님, 정미원 교수님, 정선호 교수님, 정택동 교수님과 이향기 선생님, 홍사미 선생님, 이은경 선생님, 이향해 선생님에게도 감사드립니다. 또한 저의 논문심사를 위해 어렵게 시간을 내주셨던 홍무기 박사님, 채영주 박사님께도 감사의 마음을 전합니다.

일과 학업을 병행하느라 정신이 없었던 제가 이 논문을 마칠 수 있도록 배려해주신 식품의약품안전청 잔류화학물질과 홍무기 과장님, 최동미 연구관님, 박건상 연구관님 그리고 조언과 충고를 아끼지 않으셨던 임무혁 박사님, 장문익 선생님, 정지윤 선생님, 윤희경 선생님께 감사드립니다. 그리고 지금은 다른 과에 계시지만 항상 신경써주시고 걱정해주셨던 황인균 연구관님, 이강봉 박사님, 오금순 박사님, 서정혁 선생님, 이은주 선생님과 정말 너무나도 고마웠던 허수정 선생님께 깊은 감사의 마음을 전합니다. 또한 논문을 쓰는데 있어서 많은 도움과 실질적인 조언을 해주신 권광일 박사님께 감사드리며, 논문실험을 편안하게 할 수 있게 물질적으로나 정신적으로 도와준 잔류화학물질과 연구생들 민정언니, 원갑씨, 성수

씨, 병현씨, 재욱씨에게도 감사드립니다. 그리고 밖에 나가서도 많은 격려와 도움을 주시고 오빠라고 안부른다고 뭐라고 했던 경구 오빠, 상수 오빠와 힘내라고 말해주었던 정미언니에게도 감사의 마음을 전합니다.

기쁠때나 힘들때나 늘 곁에서 큰 위로와 힘이 되어준 친구들 수진언니, 민선언니, 혜경, 선민, 민정, 수희, 숙경, 윤정, 미진, 영실에게도 깊은 우정과 고마움을 전하며, 대학교 생활 내내 항상 곁에 있어준 성불회 식구들에게도 고마운 마음을 전합니다. 그리고 항상 옆에서 힘이 되어주고 아낌없이 도와준 효원 오빠 감사합니다.

가까이 있지 못해서 항상 전화로 안부를 물어보고 신경을 써준 오빠와 할머니, 그리고 일가친척들에게 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 지난 2년 동안 저보다도 마음줄이며 딸이 잘되기를 기도하며 항상 걱정과 사랑으로 저를 아끼고 사랑해주신 부모님께 무한한 감사와 존경을 표하며 부족하나마 이 논문을 바칩니다.

이제 졸업과 더불어 새로운 세계에 한발을 내딛으면서 항상 노력하고 최선을 다하는 모습으로 열심히 생활하겠습니다.

2004년 12월

이 경 진