

# GC/MS/MS를 사용한 올리브 시료의 농약 다성분 잔류물 분석

## 응용 자료

식품 검사 및 농업

## 저자

A. Moreno López, L. Moreno  
López, 및 J.L. Pineda Lucas  
Laboratorio Químico  
Microbiológico S.A.  
Sevilla, Spain

Joan Stevens  
Agilent Technologies, Inc.

## 개요

본 응용 자료는 올리브의 27 종 농약 잔류물 확인을 위한 분석법을 설명합니다. 올리브는 지질 함량이 약 80~85%로 높아 농약 회수율 및 크로마토그래피 시스템에 악영향을 미칠 수 있습니다. 따라서, 가스 크로마토그래피/QQQ (GC/MS/MS) 다중 반응 모니터링 분석법에 의한 추출 및 분석을 위해 수정된 QuEChERS 분석법을 사용했습니다. 이 분석법은 올리브의 회수율, 반복성 및 재현성을 검증하였습니다. 그 결과, 이 분석법은 SANCO/12571에서 권장한 RSD <20%를 사용하여 허용 가능한 정량 회수율 70~120%를 달성했습니다[1]. 농약 잔류 허용 기준 규제 이하의 정량 한계를 달성했습니다.

## 서론

잔류 농약 분석은 사람과 동물의 건강을 위해 그리고 수출입 무역 및 규제 관리 목적에 필수입니다. 많은 농약류가 농업에 사용되며, 대부분의 농약은 예로써 GC/MS 또는 LC/MS/MS에 근거한 분석 확인으로 식품의 잔류 허용 기준 (MRLs)과 같은 규제 지침이 적용됩니다[2].

질량분석(GC/MS)과 결합한 가스 크로마토그래피를 사용하는 분석법은 고감도 이지만 식별 가능성 및 비표적/소급적 분석 기능은 없는 선택 이온 모니터링 (SIM)을 기반으로 합니다. GC/MS/MS를 사용한 식품 시료의 GC 분석 가능 농약 확인은 지난 10년 동안 높은 선택성과 감도를 가지면서 대부분의 크로마토그래피 간섭을 최소화하거나 제거하는 가치 있는 접근법으로 등장했습니다[3]. GC/MS/MS 동시 추출 매질 성분의 감도 및 선택성 향상에도 결과에 부정적인 영향을 줄 수 있는 매질 효과를 야기할 수 있습니다. 최적화된 시료 전처리법은 이러한 효과를 최소화할 수 있습니다.



**Agilent Technologies**

## 재료 및 분석법

올리브의 27종 농약 추출을 위해 수정된 EN 추출법을 사용했습니다. EN 15662에 기술된 비극성 및 극성 비양성자성 용매(ethyl acetate:cyclohexane:acetone) 대 극성 양성자성 용매(acetonitrile)의 혼합물을 포함한 용매 수정 분석법[4]을 사용하여 올리브와 관련된 고지질 매질에서 농약을 추출했습니다. 비극성 및 극성 비양성자성 용매 혼합물은 극성 양성자성 용매인 ACN의 단독 사용에 비해 추출 가능한 화합물에 대한 더욱 광범위한 극성 범위를 제공할 수 있습니다. 농약에는 organochlorine, organophosphate 및 pyrethroid계가 포함됩니다.

## 소모품 및 기기

- Agilent Bond Elut QuEChERS EN Extraction 키트 (p/n 5982-5650)
- Agilent Bond Elut QuEChERS Dispersive 키트, EN Method, 15 mL(p/n 5982-5156)
- Agilent SPE Bulk Sorbent, C18 Endcapped (p/n 5982-8082)
- Agilent J&W HP-5ms Ultra Inert GC 컬럼, 30m × 0.25mm(p/n 19091S-433UI)
- Agilent 7890A GC
- Agilent 7000A QQQ GC/MS System
- Agilent 7693 ALS Injector

## 용매 및 농약 표준물질

- Ethyl acetate, 잔류 분석 순도, Baker
- Cyclohexane, 잔류 분석 순도, Sharlau
- Acetone, 잔류 분석 순도, Baker
- 용매 혼합물: ethyl acetate:cyclohexane:acetone(1:1:4)
- 농약 표준물질, Dr. Ehrenstorfer

## GC 조건

운반 가스: 일정 압력, 22.0psi  
 오븐 온도: 초기 70°C(2분 유지), 25°C/분으로 150°C까지 (0분), 3 °C/분으로 200°C까지(0분), 8°C/분으로 280°C까지(10 분 유지)  
 주입구 온도: 250°C  
 샘플 퍼지: 컵, 3mL/분  
 퍼지 유속 분할 버림: 0.75분에서 100mL/분  
 주입: 비분할, 1.0µL  
 RTL 화합물: Chlorpyrifos methyl

## MS 조건

이온화원: EPC  
 소스 온도: 280°C  
 충돌 가스: He quench 가스 컵, 2.35mL/분  
 N<sub>2</sub> 충돌 가스 컵, 1.5mL/분  
 이송 라인 온도: 280°C  
 MS 사중극자 1,2 온도: 모두 150°C  
 MS1/MS2 분리능: Wide/wide  
 MRM 설정: 표 1 참조

표 1. 27 종 농약의 머무름 시간 및 MRM 파라미터

농약	RT(chlorpyrifos methyl에 고정)
Chlorpropham	11.05
Heptenophos	9.737
Pirimiphos methyl	18.307
Hexachlorobenzene	12.377
Fonofos	13.889
Simazine	12.909
Terbufos	13.796
Terbutylazine	13.810
Diazinon	14.466
Pirimicarb	15.677
Chlorpyrifos methyl	16.59
Chloropropylate	25.419
Parathion-methyl	16.594
Bifenthrin	28.839
Fenitrothion	18.072
Parathion	19.275
Chlorthal dimethyl	19.433
Chlorfenvinphos	21.557
Pendimethalin	20.991
Alpha-endosulfan	22.637
Procymidone	21.962
Beta-endosulfan	25.3158
Endosulfan sulfate	26.76
Acrinathrin	30.724
Aldrin	18.528
Chlorpyrifos	19.234
4,4'-Dichlorobenzophenone(dicofol)	19.201

표 2는 시간 세그먼트입니다. MS1 및 MS2 분리능은 wide/wide 처리량이었습니다. 머무름 시간은 10ms였습니다.

표 2. 시간 세그먼트

화합물	전구이온	생성이온	총돌 에너지
<b>시간 세그먼트 2</b>			
Chlorpropham	213	171	5
Chlorpropham	213	127	5
Heptenophos	124	89	20
Heptenophos	124	63	35
<b>시간 세그먼트 3</b>			
Hexachlorobenzene	284	249	20
Hexachlorobenzene	284	214	35
<b>시간 세그먼트 4</b>			
Fonofos	246	109	15
Fonofos	246	81	30
Simazine	201	186	5
Simazine	201	173	5
Terbufos	231	175	10
Terbufos	231	129	25
Terbuthylazine	214	132	10
Terbuthylazine	214	104	20
<b>시간 세그먼트 5</b>			
Diazinon	179	137	20
Diazinon	179	121	40
Fonofos	246	109	15
Fonofos	246	81	30
Terbufos	231	175	10
Terbufos	231	129	25
Terbuthylazine	214	132	10
Terbuthylazine	214	104	20
<b>시간 세그먼트 6</b>			
Pirimicarb	238	166	10
Pirimicarb	166	96	15
Terbacil	161	144	10
Terbacil	161	88	20
<b>시간 세그먼트 7</b>			
Chlorpyrifos methyl	286	271	20
Chlorpyrifos methyl	286	93	25
Methyl parathion	263	109	15
Methyl parathion	263	79	30

화합물	전구이온	생성이온	총돌 에너지
<b>시간 세그먼트 8</b>			
4,4'-Dichlorobenzophenone	139	111	15
4,4'-Dichlorobenzophenone	139	75	35
Aldrin	263	193	30
Aldrin	263	191	30
Chlorpyrifos	197	169	15
Chlorpyrifos	197	107	40
Fenitrothion	277	125	15
Fenitrothion	277	109	20
Parathion	291	109	10
Parathion	291	81	25
Pirimiphos methyl	305	290	10
Pirimiphos methyl	305	180	5
<b>시간 세그먼트 9</b>			
Chlorthal dimethyl	301	223	25
Chlorthal dimethyl	299	221	25
<b>시간 세그먼트 10</b>			
Chlorfenvinphos	267	159	15
Chlorfenvinphos	267	81	30
Pendimethalin	252	162	10
Pendimethalin	252	161	20
<b>시간 세그먼트 11</b>			
Endosulfan(alpha isomer)	241	206	10
Endosulfan(alpha isomer)	241	170	20
Procymidone	283	255	10
Procymidone	283	96	10
<b>시간 세그먼트 13</b>			
Endosulfan(beta isomer)	241	206	15
Endosulfan(beta isomer)	195	159	5
<b>시간 세그먼트 14</b>			
Endosulfan(beta isomer)	241	206	15
Endosulfan(beta isomer)	195	159	5
Chloropropylate	251	139	15
Chloropropylate	251	111	35
<b>시간 세그먼트 15</b>			
Endosulfan sulfate	272	237	20
Endosulfan sulfate	272	117	40
<b>시간 세그먼트 16</b>			
Bifenthrin	181	166	20
Bifenthrin	181	165	25
<b>시간 세그먼트 17</b>			
Acrinathrin	289	93	5
Acrinathrin	208	181	5

## 시료 전처리

올리브는 현지의 나무에서 채취하여 얇게 편으로 썰었으며 시료 1회 분량(약 1g)을 분석에 사용하고 나머지는 냉동 보관했습니다. 올리브에 돌이 섞여 있으면 제거하고, 최종 시료에 존재하는 돌이 기여율을 추정치를 계산했습니다. 이는 LMR 계산을 위한 입법 요건입니다. 다음과 같이 돌의 백분율 평가를 위해 대표 시료 일부(온전한 두 조각 또는 세 조각)를 취했습니다. 먼저 돌을 포함한 대표 시료를 칭량합니다. 다음으로 시료에서 돌을 제거하고 칭량합니다. 마지막으로 등식 1을 사용해 돌의 백분율을 계산합니다.

$$\% H = \frac{\text{Weight of stone}}{\text{Weight of sample}} \times 100 \quad \text{등식 1}$$

여기서:

% H = 돌의 백분율

## 절차

1. 50mL 원심분리 튜브에 잘게 썬 시료를 담아 10.0g±0.1g로 칭량합니다.
2. 용매 혼합물 ethyl acetate:cyclohexane:acetone (1:1:4) 10mL를 첨가하고 튜브 뚜껑을 닫아 1분 이상 흔듭니다.
3. Bond Elut QuEChERS 추출염 키트(p/n 5982-5650)를 시료 튜브에 첨가하고 1분 동안 흔듭니다.
4. 시료 튜브를 4,000rpm으로 5분간 원심분리합니다.
5. 유기물 상층액 6mL를 15mL Bond Elut dispersive 튜브(p/n 5982-5156)에 옮기고 여기에 C18EC (p/n 5982-8082) 300mg을 첨가합니다.
6. 1분 이상 흔든 다음 5분 동안 4,000rpm으로 원심분리합니다.
7. 유기물 상층액 추출물 1~2mL를 크로마토그래피 바이알에 옮기고 단단히 밀봉합니다.

## 결과 및 토론

모든 표적 농약은 HP-5ms Ultra Inert GC 컬럼으로 분리되어 잘 검출되었습니다. GC/MS/MS의 강력한 선택성으로 매질 바탕의 MRM 크로마토그램에 표적 분석물질의 간섭 피크는 없었습니다. 그림 1은 수정한 EN QuEChERS 추출 방법으로 처리한 20µg/kg 강화 올리브 추출물의 GC/MS/MS 크로마토그램입니다. 그림 2는 terbutylazine 및 chlorpyrifos와 같은 올리브 및 올리브유 분석에서 더 문제인 것으로 여겨지는 농약의 탁월한 정량 분석을 보여줍니다.

## 계산

검량선으로 바이알의 농약 농도를 얻고 등식 2로 mg/kg 단위의 시료 농도를 산출했습니다.

$$C_{\text{Pesticide}}(\text{mg/kg}) = C_{\text{Pesticide}}(\mu\text{g/L}) \times \frac{10}{W} \times 1e-3 \times [1 - (\frac{\% H}{100})] \quad \text{등식 2}$$

여기서:

$C_{\text{농약}}$  = 검량선으로 얻은 농도(µg/L)

$W$  = 시험을 위해 채취한 시료의 초기 중량, g 단위(10.0 g)

% H = 돌의 기여율(필요한 경우)

최종 결과는 I.S. 단위로 표현하며 결과는 µg/kg 단위로 표시됩니다.

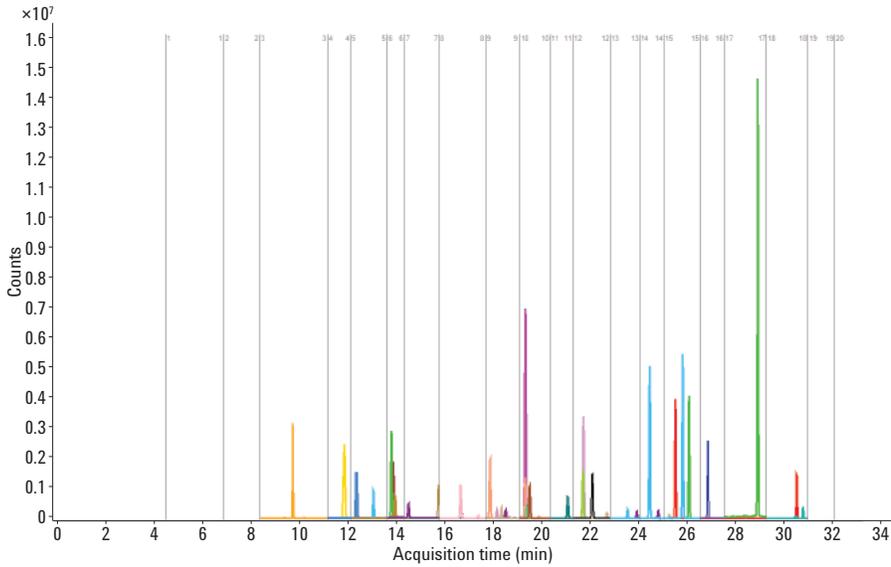


그림 1. GC/MS/MS로 얻은 올리브 20µg/kg에 스파이킹한 농약 27종의 MRM 전이 오버레이

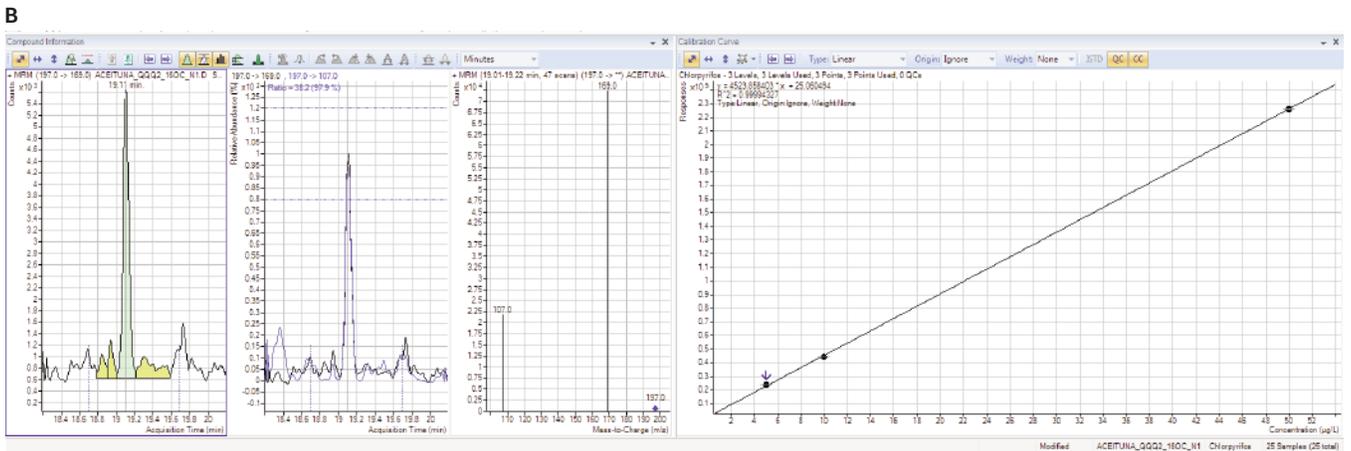
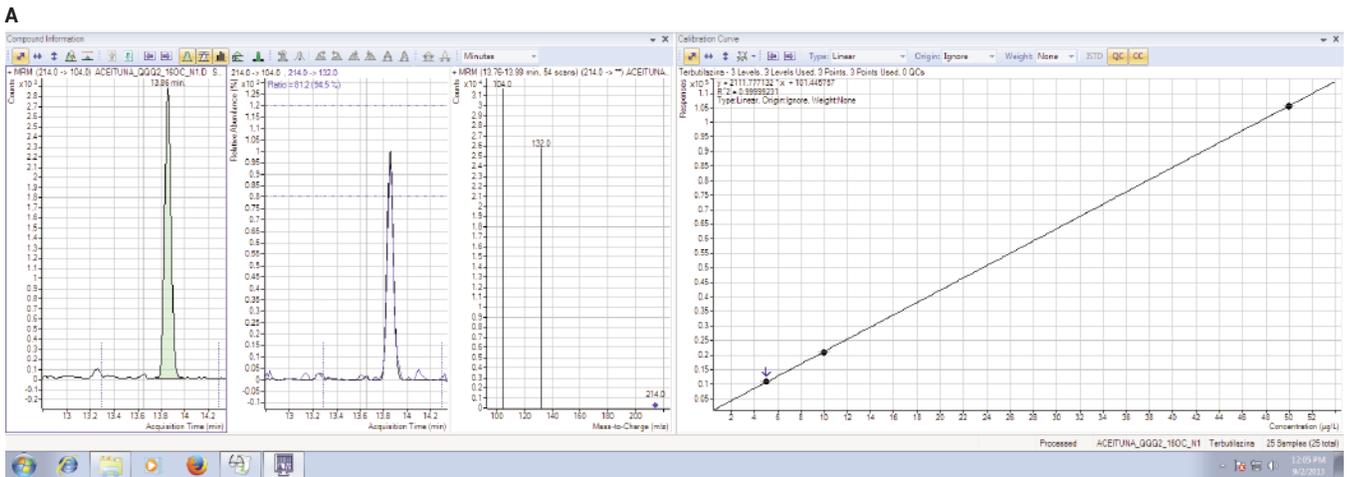


그림 2. A) 5µg/kg g/kg Terbutylazine,  $R^2 = 0.9999$ . B) 5µg/kg Chlorpyrifos,  $R^2 = 0.9999$

## 직선성 및 정량 한계(LOQ)

시험한 모든 농약의 직선성 검교정 범위는 5~60µg/kg이었습니다. 스파이킹한 매질 바탕을 사용한 검량선은 5, 10, 20, 60µg/kg으로 생성하였으며, 60µg/kg은 상한의 120%이상이었습니다. 검량선은 분석물질의 상대적 감응을 플롯으로 나타내 생성하였습니다. 모든 농약에 대해 수립한 10µg/kg 정량 한계는 과일과 채소의 농약 MRL 이하였습니다. 모든 화합물의 상관 계수(R<sup>2</sup>)는 >0.99999이었습니다.

## 회수율 및 재현성

회수율 및 재현성은 EN QuEChERS 추출법 및 용매 수정 cleanup 방법으로 준비하고 5, 10, 20µg/kg 수준으로 분쇄한 올리브 시료에 농약 표준 물질을 스파이킹하여 평가했습니다. 이들 QC 시료는 매질 스파이킹 검량선에 대해 정량했습니다. 본 분석은 각 수준에서 5회 반복 분석했습니다. 회수율 및 재현성(RSD) 데이터는 표 3과 같습니다. 27종 농약은 탁월한 회수율 및 정밀도를 가지고 있음을 알 수 있습니다.

표 3. 지방과 왁스를 함유한 과일 및 채소용 Agilent Bond Elut QuEChERS EN extraction 방법과 용매 수정 dispersive SPE 키트를 사용한 올리브 농약 회수율 %, (RSD%) 및 재현성

화합물	L1	L2	L3
4,4'-Dichlorobenzophenone	93.94(7.32)	92.95(7.62)	106.43(6.28)
Acrinathrin	101.92(6.66)	95.13(14.01)	105.25(2.00)
Aldrin	90.46(12.86)	90.36(9.60)	100.00(10.52)
Bifenthrin	96.50(9.12)	95.88(7.87)	104.29(8.01)
Chlorpyrifos	93.15(4.43)	86.07(14.21)	108.10(5.53)
Chlorthal dimethyl	98.78(5.78)	96.05(7.47)	99.96(16.41)
Chlorfenvinphos	93.10(6.04)	89.01(11.80)	106.86(6.38)
Chloropropylate	91.24(7.46)	86.68(7.88)	108.70(5.41)
Chlorpyrifos methyl	100.40(11.72)	92.70(8.63)	110.22(3.23)
Chlorpropham	98.38(7.30)	91.00(15.89)	105.07(6.86)
Diazinon	94.11(10.24)	94.68(14.24)	108.81(5.98)
Endosulfan(alpha isomer)	89.13(16.31)	93.97(11.88)	105.55(5.64)
Endosulfan beta	83.90(21.05)	93.06(10.03)	98.25(4.41)
Endosulfan sulfate	94.67(4.76)	93.48(7.74)	109.58(4.75)
Fenitrothion	91.48(8.74)	86.33(17.91)	109.38(10.91)
Fonofos	89.55(5.21)	91.06(9.75)	104.63(7.52)
Heptenophos	97.24(4.02)	93.55(17.02)	101.78(12.40)
Hexachlorobenzene	95.25(3.52)	87.10(8.51)	105.62(7.34)
Parathion-methyl	94.00(15.54)	85.27(10.50)	104.57(7.81)
Parathion	86.26(11.20)	81.57(10.98)	94.98(10.91)
Pendimethalin	90.25(12.40)	81.78(7.91)	96.00(4.64)
Pirimicarb	84.52(5.09)	76.15(5.43)	89.66(10.16)
Pirimiphos methyl	93.02(7.29)	85.34(13.69)	106.92(5.54)
Procymidone	90.75(7.97)	85.04(3.41)	98.88(7.29)
Simazine	94.12(4.59)	90.17(11.80)	105.81(8.75)
Terbufos	105.06(8.45)	98.92(9.06)	112.62(6.92)
Terbutylazine	97.31(9.04)	91.66(7.59)	105.34(9.99)

수준	검량 포인트(µg/L)	정량 한계(µg/kg)
L1	5.0(70% LQ 이상)	10.0
L2	10	
L3	20	
L4	60(상한의 120% 이상)	

## 결론

지방과 왁스를 함유한 과일 및 채소용 Agilent Bond Elut QuEChERS EN buffered extraction 키트와 dispersive - SPE 키트 및 수정 용매 혼합물은 올리브의 대표적인 농약 정제를 위한 간단하고 신속하며 효과적인 분석법을 제공했습니다. 매질에 스파이킹한 표준물질 기반, 회수율과 재현성은 올리브의 여러 종류의 농약 확인에 적용할 수 있으며 올리브 매질 영향 최소화로 표적 성분 정량 분석에 방해되지 않았습니다. 농약의 LOQ는 식품의 규제 MRL 이하였습니다. 선택한 농약은 다양한 종류 및 특성을 나타내므로, 수정한 용매 혼합물을 사용한 Bond Elut QuEChERS EN extraction 및 dispersive-SPE는 유사한 식품 매질의 다른 농약 분석에 대해서도 탁월한 선택일 것입니다.

## 참고문헌

1. Anon. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571\_2013. European Commission (2013).
2. L. Alder, et al. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 838 (2006).
3. F. Hernández, et al. *Anal. Methods* **5**, 5875 (2003).
4. Anon. Foods of plant origin. Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. QuEChERS-method. EN 15662. European Standard.

## 자세한 정보

본 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품과 서비스에 대한 보다 자세한 정보는 [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)을 방문하십시오.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2014

한국에서 인쇄  
2014년 6월 18일  
5991-4800KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418  
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부  
고객지원센터 080-004-5090 [www.agilent.co.kr](http://www.agilent.co.kr)



**Agilent Technologies**