

HPLC에 의한 殺蟲劑의 同時分離 定量에 관한 研究

—Chlorpyrifos 와 Fluvalinate 에 대하여—

高鍾鳴 · 權文珠 · 李昌根 · 柳德烈 · 許興德

仁川保健環境研究所

A Study on the Simultaneous Determination of Chlorpyrifos and Fluvalinate by HPLC

Ko, J.M. Kwon, M.J. Lee, C.G. Yu, D.Y. Heo, H.D.

Incheon Institute of Health and Environment

ABSTRACT

Rapid determination of chlorpyrifos and fluvalinate in mixed insecticide was established by using high performance liquid chromatography.

Result were as follows :

1. On Lichrosorb® RP-8(10 μm) Column with on eluent of acetonitrile : water = 75 : 25, sufficient separation of Chlorpyrifos and Fluvalinate of base was obtained.
2. A 10 μl portion the diluted solution was injected in to the cdumn, and the effluent was monitored by on UV-Detector at 270 nm.
3. Relative Standard Deviation were 0.97% (chlorpyrifos) and 0.5% (fluvalinate) under analysis conditions.
4. The UV-Detector response at 270 nm were linear ($Y = 421.8 \times - 2090$, $R^2 = 0.9997$: Chlorpyrifos, $Y = 1062.7 \times - 4017.7$, $R^2 = 0.9998$: Fluvalinate) over a range of 30~500 μg/ml.

I. 緒 論

有機磷은 1934年獨日의 Gerhard, Schrader等¹⁾이 自然殺蟲劑의 代替農藥에 對한 研究도중 發見된 여러 磷酸化合物을 中心으로 하여 發展된 殺蟲劑로, 油脂質에 잘 녹는 性質이 있어 쉽게 體內로 侵入된 藥劑는 Acetylcholine의 分解酵素인 「holine esterase」의 作用을 抑制시켜 殺蟲作用을 나타낸다.

合成 Pyrethroid系²⁾인 Fluvalinate는 1985年美國 Zeocon Corp社에서³⁾ 紹介되었고 鱗翅目, 羊翅目 等 昆蟲類에 殺蟲效果가 있으며 日本에서는 昭和 62年⁴⁾, 우리나라는 1987年 品目告示⁵⁾가 되었다.

有機磷劑 殺蟲劑인 Chlorpyrifos와 合成 Pyrethroid系 Fluvalinate는 他 殺蟲劑에 比해 人畜에 對한 毒性이 작고 中毒, 接觸

및 呼吸毒 等 3가지 作用을 가지고 있으며 分解가 용이하여 無毒化되어 殺蟲劑로 널리 使用되고 있다(Table 1).

Chlorpyrifos에 對한 定量法으로는 액체 크로마토그래피法⁶⁾, 가스 크로마토그래피法⁷⁾, 吸光光度法⁸⁾이 있으며 Fluvalinate는 액체 크로마토그래피法,⁹⁾ 質量分析法¹⁰⁾ 등으로 分析하게 되어 있으나 Chlorpyrifos와 Fluvalinate 混合製劑에 對한 두 成分의 同時分離 定量法이 없는 實情이다.

自家基準에서는 가스 크로마토그래피 및 액체 크로마토그래피를 利用하여 各各 별도로 分析하게 되어 있는 方法을 本 研究에서는 액체 크로마토그래피를 利用하여 보다 簡便하고 迅速, 正確하게 同時分離 定量하여 良好한 結果를 얻었기에 報告하고자 한다.

Table 1. Physical and Chemical Characteristics of Chlorpyrifos, Fluvalinate⁸⁾

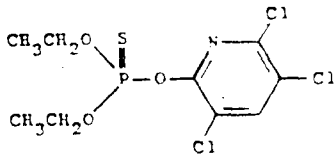
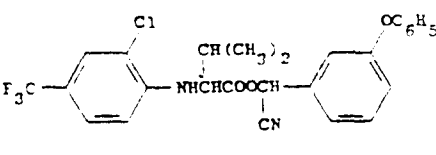
	Chlorpyrifos	Fluvalinate
Chemical Name	0,0-diethyl 0-3, 5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate	N-[2-Chloro-4-(trifluoromethyl)-phenyl]-DL-valine cyano(3-phenoxyphenyl) methyl ester
Molecular Formula	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	C ₂₆ H ₂₂ ClF ₃ N ₂ O ₃
Molecular Weight	350.57	502.93
Structural Formula		
Appearance	White granular crystals	Yellow-amber liquid
Vapor Pressure (at 25°C)	1.87 × 10 ⁻⁵ mm Hg	1 × 10 ⁻⁷ mm Hg

Table 2. Compant of Sample(in 100mℓ)

Spray Type		Smok Type	
Fluvalinate	7.5 g	Fluvalinate	7.5 g
Chlorpyrifos	10 g	Chlorpyrifos	10 g
피페로닐부톡사이드(효력증강제)	0.75 g	피페로닐부톡사이드(효력증강제)	0.75g
하이말-27 DM(유화제)	적량	하이말-AD(안정제)	적량
Xylene KSM-1667(용제)	적량	Xylene KSM-1667(용제)	적량

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

本 研究에 使用된 檢體는 Table 2 와 같은 組成을 가진 製品을 使用하였다.

2. 實驗方法

(1) 標準品 및 試藥

- 1) Chlorpyrifos : 常用標準品(99.0%)
- 2) Fluvalinate : 常用標準品(92.1%)
- 3) Acetonitrile : HPLC 用, Merck 製
- 4) Methanol : HPLC 用, Merck 製
- 5) Water : HPLC 用, Merck 製

(2) 實驗裝置 및 條件

實驗에 使用된 HPLC 는 다음과 같다.

- 1) Solvent Delivery System : Spectra Physics-8700
- 2) Pump : Spectra Physics-8570
- 3) UV/Visible Detector : Spectra Physics-8450
- 4) Integrator : Spectra Physics-4200
- 5) HPLC 實驗條件은 Table 3 과 같다.

(3) 定量法

1) 標準液의 調製

Table 3. Analytical Condition of HPLC

Column	Lichrosorb® RP-8(10μm)
Detector	UV-270 nm
Mobile Phase	Actonitrilei : Wather(75 : 25)
Flow Rate	1.2ml/min
Sensitivity	0.61 AuFs
Chart Speed	0.25 cm/min
Sample Size	10μℓ

Chlorpyrifos 標準品 30.0 mg 과 Fluvalinate 標準品 22.5 mg 을 正確히 取하여 100 ml 容量플라스크에 넣고 Methanol 50 ml 를 加하여 녹인 後 Methanol 로 標線까지 채워 混合한 다음 밀리포아 濾過後 標準液으로 한다. 標準液은 用時 調製한다.

2) 檢液의 調製

各 試料 3.0 ml 를 正確히 取하여 100 ml 容量플라스크에 넣고 Methanol 을 加하여 標線까지 채우고 混合한다. 이 液 5.0 ml 를 正確히 取하여 50 ml 容量플라스크에 넣어 Methanol 을 加하여 標線까지 채우고 混合한 다음 밀리포아 濾過後 檢液으로 한다.

3) 定量操作

標準液 및 檢液을 各各 10 μℓ 씩 取하여

Table 3 의 HPLC 條件으로 Chlorpyrifos 및 Fluvalinate 의 피크 面積의 比(RS, RT)를 各 各 求하여 다음 式에 따라 各 成分의 含量을 計算한다.

Chlorpyrifos ($C_9 H_{11} Cl_3 NO_3 PS$)의 量(mg)=

$$\text{標準品의 量(mg)} \times \frac{RT}{RS}$$

Fluvalinate ($C_{26} H_{22} Cl F_3 N_2 O_3$)의 量(mg)=

$$\text{標準品의 量(mg)} \times \frac{RT}{RS}$$

III. 實驗結果 및 考察

1. 實驗條件檢討

(1) 波長檢討

標準品 一定量을 Methanol 에 녹여 Chlorpyrifos 300 $\mu\text{g/ml}$, Fluvalinate 240 $\mu\text{g/ml}$ 로

만든 後 밀리포아 濾過後 70% Acetonitrile, Column RP-8, flow rate 1.2 ml/min, chart speed 0.25 cm/min 의 條件下에서 250, 260, 270, 280 nm 에서 各 波長을 檢討한 結果 Fig. 1 과 같으며, 250, 260 nm 에서는 Fluvalinate²⁾成分이 定量性이 있었고 Chlorpyrifos 는 定量性이 없었으며, 280 nm 에서는 반대로 Chlorpyrifos 의 感度가 높게 나타나고 Fluvalinate 는 減少하는 現象을 보였다.

270 nm 에서는 두가지 成分 모두가 良好한 Chromatogram 을 보였으며 同時分離定量을 위한 條件으로 270 nm 를 擇하였다.

(2) 移動相檢討

65%, 70%, 75%, 80% Acetonitrile 및 70%, 75%, 80% Methanol 의 移動相을 檢討하였다. 移動相이 Methanol 인 경우에는 分離度가 良好하지 않았으며 Acetonitrile 을

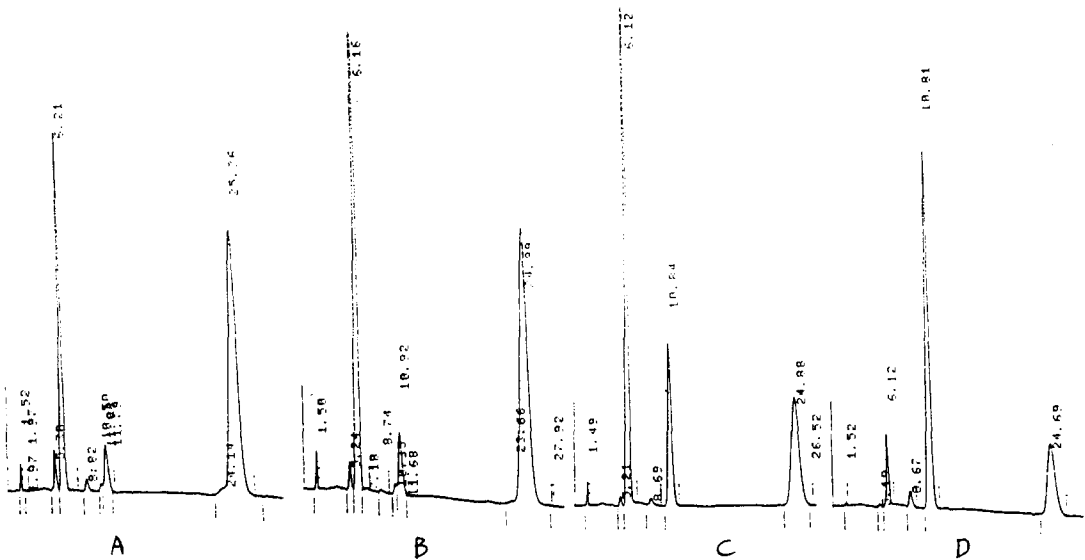


Fig 1. Chromatogram by Variable Detecting Wave Length

(Key) A : 250 nm, B : 260 nm, C : 270 nm, D : 280 nm

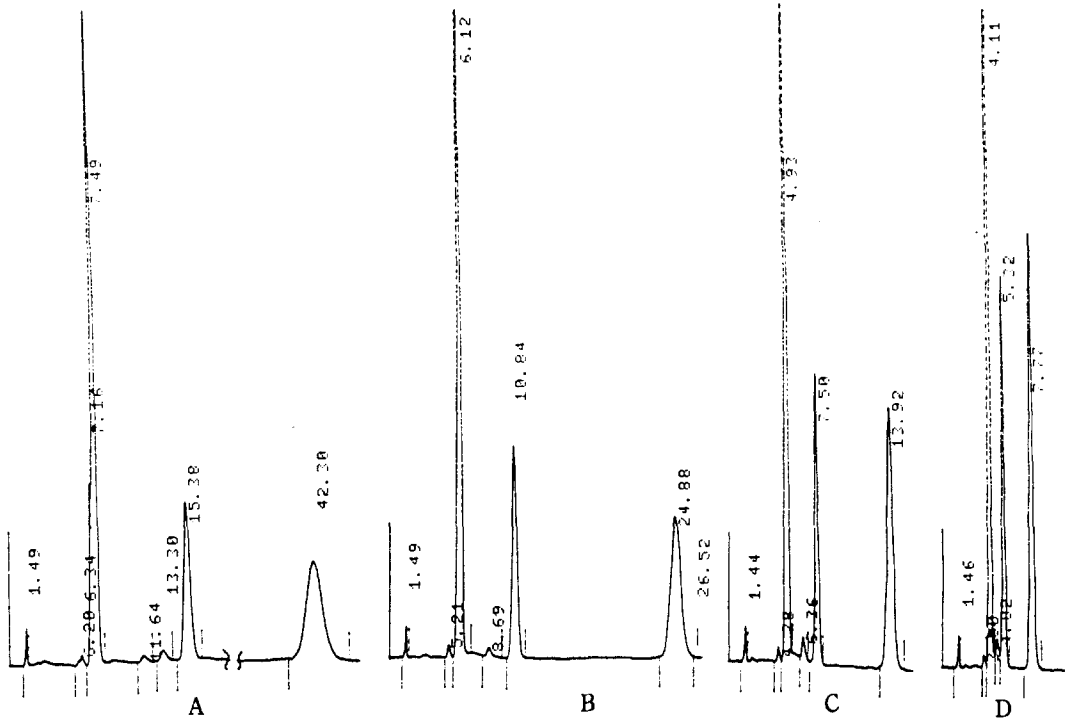


Fig 2. Comparison of chromatogram by Variable mobile phase Concentration
(Key) A : 65%, B : 70%, C : 75%, D : 80%, Acetonitrile

移動相으로 檢討한 結果는 Fig. 2 와 같으며 65% 및 70% Acetonitrile 에서는 維持時間이 Fluvalinate 의 경우 42分, 24分으로 늦고 80%의 경우 약 7.7分이었으나 Chlorpyrifos 의 피크가 겹치고 75%에서는 感度 및 分離度가 매우 良好한 chromatogram 을 보였다.

2. 標準液 및 檢液의 Chromatogram

標準液 및 檢液을 Table 3의 HPLC 條件으로 各 10 μl 씩 注入하여 얻은 chromatogram 은 Fig. 3 과 같으며 維持時間은 Chlorpyrifos 약 8分, Fluvalinate 는 약 15分이었

다.

3. 再現性檢討

標準液을 Table 3의 HPLC 條件으로 10 μl 씩 5回 注入하여 얻은 chromatogram 에서 Chlorpyrifos 와 Fluvalinate 의 面積은 Table 4 와 같으며 相對標準偏差가 0.97% 와 0.56% 로 再現性이 良好하였다.

4. 檢量線檢討

Chlorpyrifos 標準品 50.0 mg, Fluvalinate 標準品 50.0 mg 을 正確히 取하여 100 ml 容量플라스크에 Methanol 을 加하여 녹인後

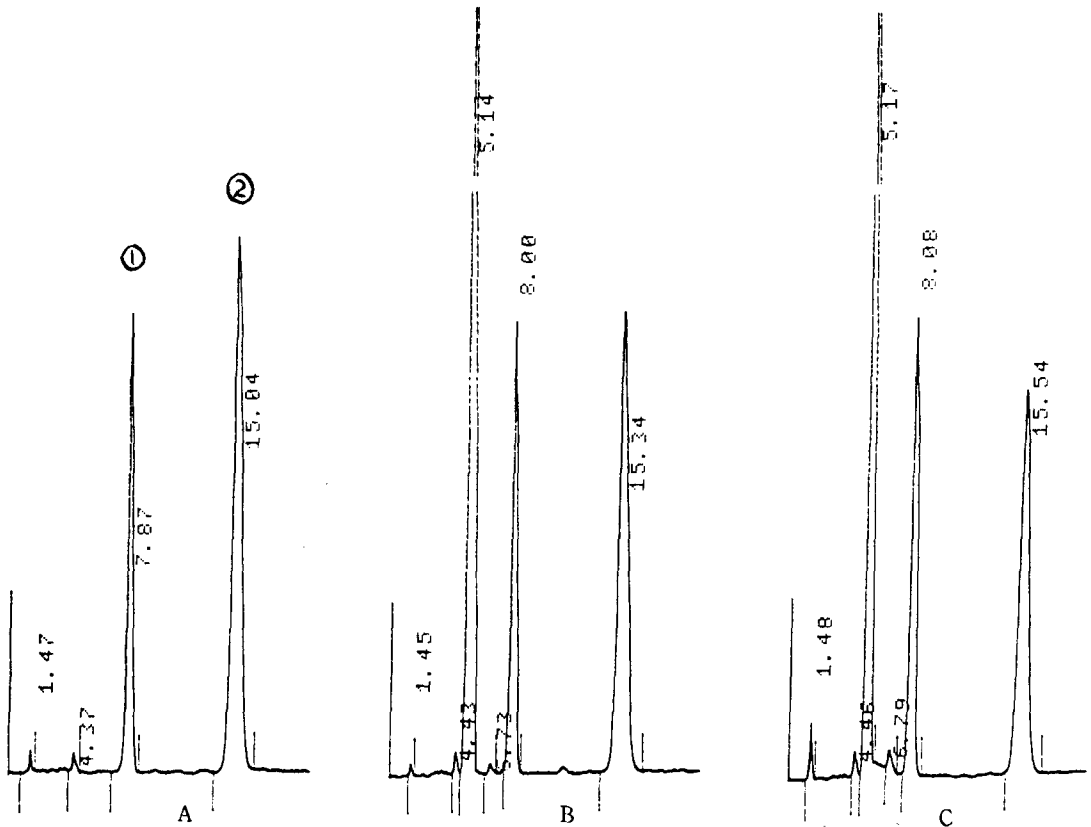


Fig 3. Chromatogram of chlorpyrifos and Fluvalinate(Typical)
 (Key) A : Standard Solution(①Chlorpyrifos ②Fluvalinate)
 B : Sample I (Smoke type)
 C : Sample II (Spray type)

Table 4. Reproducibility of HPLC

	RUN (Area)					Mean±SD	RSD (%)	
	1	2	3	4	5			
Chlorpyrifos	105172	104241	105414	106193	106933	105591	±1023.8	0.97
Fluvalinate	306829	303003	304520	305713	302713	304600	±1698.3	0.56

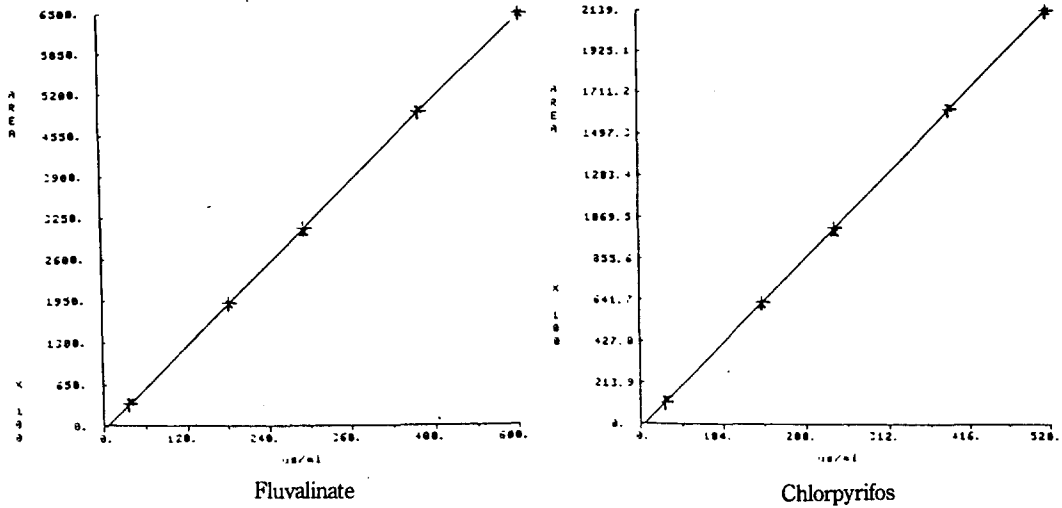


Fig 4. Calibration Curve

標線까지 채운다. 이 액 1.5, 7.5, 12.0, 19.0, 25.0 ml 를 25 ml 容量 플라스크에 取하여 Methanol로 標線까지 채우고 밀리포아 濾過後 Table 3 의 HPLC 分析條件에서 Chlorpyrifos 및 Fluvalinate 標準液의 濃度에 對한 面積을 求한 結果 Fig. 4 와 같으며, $Y = 421.8 \times -2090$, 相關係數 $R^2 = 0.9997$, $Y = 1062.7 \times -4017.7$, 相關係數 $R^2 = 0.9998$ 로서 一直線을 나타냈으며 30 µg/ml 에서 500 µg/ml 범위에서 定量性을 보였다.

5. 可檢物定量

煙幕用 3 Lot, 噴霧用 2 Lot 를 定量法에 따라 試驗한 結果는 Table 5 와 같으며 Chlorpyrifos 平均含量은 表記量의 $95.8 \pm 2.0\%$ 이고 Fluvalinate 의 平均含量은 表記量의 $97.6 \pm 3.6\%$ 로 良好한 結果를 얻었다.

IV. 結 論

1. HPLC 를 利用한 Chlorpyrifos 와 Fluvali-

Table 5. Analysis of preparations

Sample	Chlorpyrifos content(%)	Fluvalinate Content(%)
1	92.0	94.6
2	96.9	95.2
3	97.2	98.4
4	95.7	96.3
5	97.4	103.6
Mean±SD	95.8 ± 2.2	97.6 ± 3.6

- nate 複合製劑의 同時分離定量은 移動相 75% Acetonitrile, 波長 UV-270 nm 에서 良好한 chromatogram 을 보였다.
2. 本 試驗法의 再現性은 Chlorpyrifos 0.97 %, Fluvalinate 0.56% 이었으며 檢量線은 $Y=421.8 \times -2090 (R^2=0.9997)$ 및 $Y=1062.7 \times -4017.7 (R^2=0.9998)$ 로 線形을 나타냈다.
 3. 複合殺蟲劑中 Chlorpyrifos 含量은 平均 95.8%, Fluvalinate 의 含量은 平均 97.6% 의 結果를 얻었다.
 4. 操作이 簡便하고 維持時間은 Chlorpyrifos 約 8分, Fluvalinate 約 15分정도로 同時 分離定量할 수 있어 品質管理에 利用될 수 있을 것으로 思料된다.
- 參考文獻**
1. 日本藥學會編, 衛生試驗法注解, p. 133, 1990.
 2. 윤채혁 : 농약총람, pp. 377~378, 1983.
 3. CMC Co. : 新農藥原本製造トニリ, pp. 353~356, 1989.
 4. 環境廳 : 環境廳告示 第 84-2 号
 5. Dow Chemical Co : Analytical Method No. 26051 C, 1980.
 6. AOAC : Official Method of Analysis, p. 199, pp. 282~283, 15 th, Washington, 1990.
 7. 國立保健院長 : 醫藥品基準 및 試驗方法 第 1 改正, 1985.
 8. Martha Windhdz : The Merck Index, 10 th, 1983.
 9. 公營화학 : 프로킬라 A, B 自家基準 및 試驗方法.
 10. 인천직할시 보건환경 연구소보 : 제 3 권, pp. 51~60, 1989.

1. 日本藥學會編, 衛生試驗法注解, p. 133,