

콩나물중 benzimidazole계 농약의 추출방법과 잔류성

박준조* · 용금찬 · 정진아

경기도 보건환경연구원

요약 : 콩나물중 잔류농약의 효율적인 분석법을 확립하기 위하여 carbendazim과 thiabendazole을 0.1, 0.3, 0.5 mg/kg 씩 첨가하여 농약성분의 추출방법을 비교하였고, 잔류성을 평가하기 위하여 thiophanate-methyl 1.0, 2.0 g/L 용액에 수침시킨 콩으로 콩나물을 재배하면서 매일 잔류량을 조사하였으며, 또한 시중에 유통되는 콩나물중 benzimidazole계 농약의 잔류실태 조사를 실시하였다. 추출방법에 따라 carbendazim의 회수율은 LLE 69.25~79.16%, SPE 79.99~90.42%, MSPD 92.40~98.48%이었으며, thiabendazole의 회수율은 LLE 64.86~83.26%, SPE 79.12~94.04%, MSPD 65.44~73.92%로 고체상 추출방법이 우수하였다. 또 재배기간별 carbendazim 잔류량은 콩나물 출하적기인 재배 5일째 0.10~0.25 mg/kg이었으며, 출하적기를 넘긴 7일째에도 농약이 잔류되었다. 유통 콩나물 448건을 검사한 결과 6건에서 carbendazim이 검출되었고 검출량은 3건에서 0.1 mg/kg 미만이었으나 3건에서는 0.1 mg/kg을 초과하여 최대 0.37 mg/kg까지 검출되었다.(2000년 1월 17일 접수, 2000년 2월 23일 수리)

Key words : Benzimidazole, liquid-liquid extraction, solid phase extraction, matrix solid phase dispersion.

서 론

콩나물은 재배기간이 짧으며 키우기가 쉽고 단백질, 무기질, 비타민, 섬유소 등 영양가가 풍부하여 옛날부터 우리 국민이 즐겨 먹어온 식품으로서 오랜 재배 역사를 가지고 있음에도 콩나물에 대한 기초연구는 아직 미흡한 상태이다. 특히, 콩나물 재배업체의 대부분이 비닐하우스 움막이나 건물 지하실에서 재배하고 있어 설비의 영세성은 물론 위생적인 관리가 불가능하며 콩나물 재배시 나타나는 미 발아립, 병해립 등의 부패와 성장 중 변질로 인한 피해가 커 이를 방지할 목적으로 농약을 사용하는 경향이 있어 콩나물에 대한 소비자의 불안과 불신이 증폭되고 있는 실정이다.

국내에는 콩나물용 원료콩의 소독용 농약으로 등록된 농약은 없으며 일반 콩종자의 소독용으로 사용되는 Benzimidazole계 농약은 benomyl, thiophanate-methyl, carbendazim 및 thiabendazole을 포함하는 침투성 살균제로서 thiabendazole은 구조적인 변화 없이 살균작용을 나타내며, benomyl과 thiophanate-methyl은 식물체내에서 분해 및 분자 재배열을 거쳐 carbendazim으로 변화될 뿐만 아니라 (박 등, 1994) 산성용액이나 유기용매에서 짧은 시간내에 carbendazim으로 대사되는 특성을 갖고 있어(Clemens와 Sayag, 1969; Baude 등, 1973; Singh와 Brindle, 1990) benomyl과 thiophanate-methyl의 실험방법과 잔류허용기준을 carbendazim에 따라 적용하고 있다(식품공전, 1999).

Carbendazim과 thiabendazole 등의 잔류농약 실험방법은 colorimetry법(Pease와 Gardiner, 1969)이 소개된 이후 UV-spectrophotometry(Chiba, 1977), thin-layer chroma-

tography(TLC)(Monson, 1991), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)(Itak 등, 1993), gas-liquid chromatography(GLC) (Rouchaud와 Decallone, 1974)와 high performance liquid chromatography(HPLC)(Aharonson, 1994) 방법등이 있으며, GLC 방법은 diazomethane, pentafluorobenzyl bromide 등으로 유도체화 시켜야하는 복잡한 과정이 있으나 HPLC 방법은 유도체화 과정이 없어 UV 검출기나 형광검출기를 이용한 실험방법이 널리 이용되고 있다.

Benzimidazole계 잔류농약의 추출방법으로 ethyl acetate 분배에 의한 추출과 산, 알칼리 변화에 의한 dichloromethane 추출 등 액체-액체 추출(LLE)방법(Pesticide analytical manual vol. I)이 있으며 solid-phase extraction(SPE) (Hiemstra 등, 1995), ion-exchanges extraction (Levine 등, 1998), supercritical fluid extraction(SFE) (Aharonson 등, 1994) 등이 보고되어 있다. 특히, 고체상 추출방법은 소량의 용매로 짧은 시간에 추출할 수 있고 충전제도 silica, NH₂, C₁₈, cation exchange 등 다양하여 여러 분야에 응용할 수 있게 되었다.

이에 본 조사는 콩나물 중 benzimidazole계 잔류농약의 추출방법을 다르게 하여 회수율을 비교 실험하였고 원료콩을 종자소독제에 수침시킨 후 재배하면서 24시간마다 carbendazim의 잔류량을 조사하였으며, 콩나물 중 benzimidazole계 잔류농약 동시분석방법을 확립하여 유통되고 있는 콩나물의 benzimidazole계 농약의 잔류실태를 조사하여 콩나물 안전성 확보에 기여하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

*연락처

콩나물 재배에 사용된 원료콩은 전라남도 진도산 준저리를 사용하였으며, 유통 콩나물은 시장, 백화점 등에서 무작위로 500 g씩 채취하여 4°C 이하로 냉장 보관하면서 실험하였다.

시약 및 장치

1) 시약

Carbendazim, thiabendazole 표준품은 Labour Dr. Ehrenstorfer의 제품을 사용하였고, hexane, acetone, ethyl acetate, dichloromethane, silica는 Wako Pure Chemical사의 잔류농약분석용을 사용하였으며, methanol, acetonitrile 등은 LC grade를 사용하였다. 콩 종자 소독제는 지오람수화제로 thiophanate-methyl (50%) 및 thiram(30%) 제제인 시판 제품을 사용하였다. 표준용액은 carbendazim, thiabendazole을 메탄올에 용해하여 0.1, 0.5, 1.0 µg/mL로 하여 사용하였다.

2) 장치

고속액체크로마토그래피는 M410 펌프, 470 scanning fluorescence 검출기(Ex 280nm, Em 315 nm) 490E programable multiwavelength 검출기(λ 280 nm) 그리고 컬럼은 Symmetry C₁₈(3.8×250 mm)를 사용하였으며 이동상은 45% methanol을 유속 0.8 ml/min으로 하면서 30 µL를 717 plus Autosampler로 HPLC에 주입하여 정성 및 정량하였다. 기타 장치로는 진공농축기, 원심분리기, homogenizer, food mixer, dry block bath를 사용하였다.

실험방법

1) 재료의 추출방법에 따른 회수율 실험

준저리로 재배한 콩나물에 carbendazim과 thiabendazole을 0.1, 0.3, 0.5 mg/kg되게 첨가하여 용매-용매추출법(LLE), SPE, MSPD 방법으로 추출하여 회수율을 측정하였다.

가. 용매-용매 추출법

Pesticide analytical manual의 benzimidazole계 잔류농약 추출 및 정제방법에 따라 재료 20 g에 메탄올 100 mL를 가하여 균질화 시켜 3000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 1% NaCl 100 mL와 1 M HCl 10 mL가 들어 있는 분액여두에 옮겨 dichloromethane 100 mL로 2회 세척한 후 1 M NaOH로 pH 7.5~8.0으로 약알칼리화한 다음 dichloromethane 100 mL로 추출하였고, 다시 dichloromethane 100 mL로 추출하여 진공 농축시켜 methanol 5 mL로 용해하여 HPLC에 주입하였다.

나. SPE 추출

재료 50 g에 acetonitrile 100 mL를 가하여 균질화시켜 3000 rpm으로 5분간 원심분리 하고 상층액에 NaCl 10 g을 가하여 용매층을 분리하고 acetonitrile층 20 mL를 취하여 air purge 시키면서 농축하여 dichloromethane 2 mL에 용해한 다음 Regis-Rolle와 Bauville(1993)이 제시한 SPE추출방법을 응용하여 dichloromethane 5 mL로 precondition된 SPE에 옮긴 후 dichloromethane : ethyl acetate(9:1, v/v) 8

mL로 세척하고 dichloromethane : ethyl acetate(4:6, v/v) 15 mL로 용출하였다. 용출액을 air purge하면서 농축시킨 후 methanol 3 mL로 용해하여 HPLC에 주입하였다.

다. MSPD 추출

Silica 3.5 g에 잘게 부순 재료 2 g을 유발에 넣어 균질화 시킨 다음 그림 1과 같이 10 mL syringe에 paper disc, silica 0.5 g, silica와 균질화 된 재료를 차례로 충전하여 dichloromethane : ethyl acetate(8:2, v/v) 8 mL로 세척하고 dichloromethane : ethyl acetate(4:6, v/v) 12 mL로 용출시켜 air purge 하면서 농축한 다음 methanol 1 mL에 용해하여 HPLC에 주입하였다.

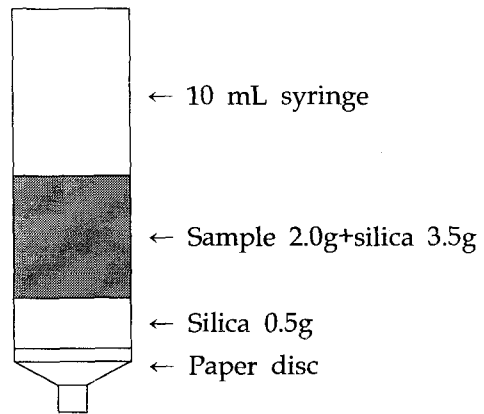


Fig. 1. Structure of MSPD.

재배기간별 carbendazim 잔류량 조사

지오람수화제를 1.0 g/L와 2.0 g/L로 희석하여 농도별로 6 L를 조제하였다. 각 조제액에 콩 종자 3 kg을 2시간 침지한 후 배수시킨 다음 사각형 플라스틱 재배용기에 투입하여 수온 17~22°C, 실내온도 22~27°C를 유지하였고 1일 8회, 1회 15~20분씩 왕복자동살수장치로 물주기를 하면서 경기도 여주군 북내면 소재 콩나물 공장에서 일반적인 콩나물 재배 방법으로 재배하였으며, 대조구에는 농약을 처리하지 않고 같은 조건으로 재배하면서 매 24시간 마다 300 g 썩의 콩나물을 채취하여 carbendazim 농도를 SPE와 MSPD 방법으로 추출하여 잔류량을 측정하였다.

콩나물중 benzimidazole계 농약 잔류실태 조사

유통중인 콩나물과 숙주나물에 benzimidazole계 농약 잔류실태를 조사하기 위하여 시장과 백화점에서 무작위로 448건을 채취하여 LLE방법으로 추출하여 잔류량을 조사하였다.

결과 및 고찰

추출방법에 따른 회수율 실험

농약을 처리하지 않고 재배한 콩나물에 carbendazim과 thiabendazole을 0.1, 0.3, 0.5 mg/kg되게 첨가하여 용매-용매추출법(LLE), SPE, MSPD 방법으로 추출하여 회수율을 측정한 결과 표 1과 2에서 보는 바와 같이 액체-액체

추출방법은 회수율과 재현성에서 가장 낮았고 SPE법과 MSPD법은 비교적 우수하게 나타났다. Carbendazim과 thiabendazole을 동시분석하는데 UV 검출기로 280 nm에서 우수한 흡광치를 나타내었고, 형광검출기에서도 emission 파장 315 nm일 때 thiabendazole의 검출이 가능하여 동시분석하는데 효과적이었다. Hiemstra 등(1995)은 실험실에서 가장 일반적으로 사용되고 있는 액체-액체 추출방법은 회수율이 낮고 재현성에 문제점이 있으며, 많은 노동력과 시간을 소비해야 한다고 하였으며 silica SPE를 이용하여 carbendazim, thiabendazole, benomyl을 정제하였을 때 소량의 용매로 비교적 짧은 시간 내 추출할 수 있으며, 회수율도 98% 이상으로 우수하였다고 보고하였다. Regis-Rolle 등(1993)은 포도 등 6종의 과채류를 methylene chloride로 추출하여 silica SPE 정제한 후 HPLC 형광검출기로 carbendazim의 회수율을 측정된 결과 80~95% 였다고 보고하였다.

Levine 등(1998)은 methylene chloride로 추출하여 strong cation exchange SPE 정제하여 회수율이 60~110%(평균 80%)였다고 하였다. 본 조사에서도 SPE와 MSPD 추출방법은 회수율이 65.44~98.48%로 비슷하게 나타났다. 재현성도 우수하였다. Aharonson 등(1994)은 토마토, 사과, 바나나에 benzimidazole 살균제를 첨가하여

SFE solvent 추출하여 정제하지 않고 HPLC로 회수율을 측정된 결과 90±12% 였다고 보고하여 우수한 회수율과 자동화 및 용매소비량의 감소 등 이익이 있는 반면 추출장치가 고가이며, 용매추출 할 경우 회수율이 matrix에 민감하며 수분을 다량 함유한 콩나물에 분석조건을 확립하여 적용하기에는 한계가 있다고 판단되었다.

본 조사에서는 고체상 추출방법에서 회수율이 높고 간편하며 빠른 시간내 추출 및 정제할 수 있어 경제적인 추출 방법이라고 생각된다. 특히 MSPD법은 SPE법의 용매추출 단계를 생략하여 최소량의 용매로 추출이 가능하며, 실험실 근무자가 용매로부터 해방되기 위하여 다방면으로 연구되고 있는 실정에 비추어 볼 때 MSPD법은 향후 여러 분야에서 연구 개발되어야 할 것으로 사료된다.

재배기간별 carbendazim 잔류량 조사

지오람수화제 1.0 g/L, 2.0 g/L용액에 2시간 침지시킨 콩으로 콩나물을 재배하면서 7일간 carbendazim의 잔류량을 매일 측정된 결과 표 3과 같이 콩나물 출하직기인 5일째에 MSPD로 추출하였을 때 carbendazim이 0.17, 0.25 mg/kg 잔류된 것으로 나타났으며, 콩나물로서 상품성이 떨어지는 7일째에도 농약이 완전히 소실되지 않고 잔류하는

Table 1. Average recovery rates of carbendazim from soybean sprouts by LLE, SPE and MSPD methods

Spiked amount(mg/kg)	Recovery(%)		
	LLE	SPE	MSPD
0.1	79.16±10.78	84.78±4.83	95.74±2.80
0.3	69.25±4.60	79.99±4.02	92.40±3.75
0.5	79.12±4.07	90.42±4.10	98.48±2.29

Table 2. Average recovery rates of thiabendazole from soybean sprouts by LLE, SPE and MSPD methods

Spiked amount(mg/kg)	Recovery(%)		
	LLE	SPE	MSPD
0.1	64.86±3.18	79.12±2.51	73.92±8.74
0.3	83.26±15.30	94.04±1.66	73.22±4.76
0.5	76.27±1.86	93.88±2.78	65.44±3.98

Table 3. Residues of carbendazim in sprout soybean treated with pesticides during cultivated periods

Extraction method	Treated dosage (mg/L)	Cultivated periods(day)						
		1	2	3	4	5	6	7
SPE	500	14.62	5.95	2.00	0.29	0.10	0.03	0.01
	1,000	35.31	12.04	1.96	0.68	0.10	0.05	0.03
MSPD	500	16.88	6.05	1.47	0.52	0.17	0.08	0.04
	1,000	33.21	10.92	1.89	0.83	0.25	0.11	0.07

것으로 나타났다.

Cano 등(1987)은 사과에 benzimidazole 살균제를 처리하여 0°C와 2°C에 저장하는 동안 잔류량이 감소하였으며, 160일 동안 저장하였을 경우 최초 처리한 양에 비하여 thiabendazole과 benomyl, thiophanate-methyl은 30~25%(Starking)와 45~55%(golden Delicious) 그리고 carbendazim은 40~65%가 잔류되어 있었으며, 대부분 껍질에 잔류하였고 pulp는 심부쪽이 미량 잔류된 것으로 보고하였다.

대한두채협회에서 발행하는 "물만 먹고살아요(1998)"에 기고된 콩나물 재배 중 농약 잔류량의 변화 추이에서 지오람수화제를 500, 1000배액을 조제하여 원료콩 50 g에 200 mL씩 가하여 콩을 불린 후 치상하고 매일 50 g씩 재료를 채취하여 잔류량을 조사한 결과 5일째에 500배 액에서 16.56, 1000배액에서 19.72 ppm이 잔류되었으며, 8일째에 500배액에서 6.66, 1000배 액에서 4.27 ppm의 carbendazim이 잔류되었다고 보고하였으며, 본 조사 결과 5일째 0.10~0.25 mg/kg으로 큰 차이를 나타냈다. 이러한 차이는 콩나물 재배과정에서 물주기 회수와 시간 및 콩나물 재배온도가 중요한 요인으로 작용하였으며, 콩나물 재배속도와 성장에 따른 부피의 증가율이 carbendazim의 반감기를 단축시켰을 뿐만 아니라 농약의 대사 및 분해특성도 등이 영향을 미친 것으로 판단된다.

또 그림 2와 3에서 SPE 추출방법은 고농도에서 회수율

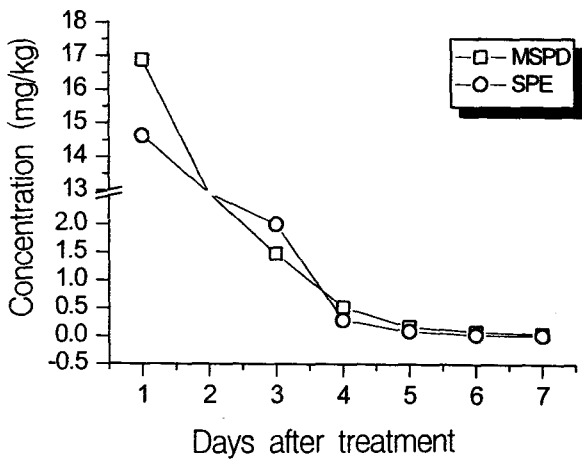


Fig. 2. Residues of carbendazim in sprout soybean treated with thiophanate-methyl(500 mg/L).

이 높았으며, MSPD 추출방법은 저농도에서 회수율 및 재현성이 높게 나타나 콩나물중 benzimidazole계 잔류농약 추출방법으로 MSPD 방법을 제안하고자 한다.

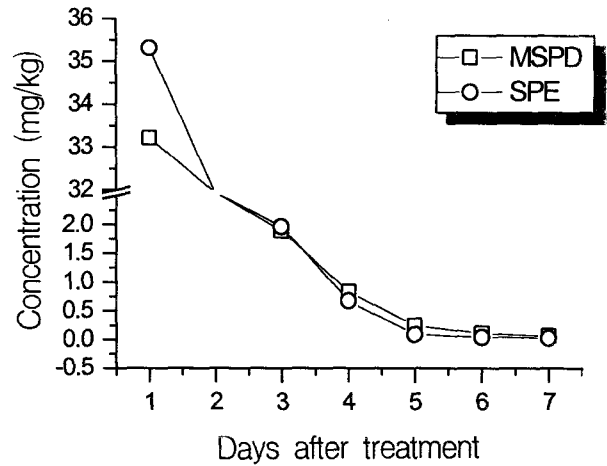


Fig. 3. Residues of carbendazim in sprout soybean treated with thiophanate-methyl(1000 mg/L).

콩나물 중 Benzimidazole계 농약 잔류실태 조사

유통중인 콩나물과 숙주나물의 benzimidazole계 농약 잔류실태를 조사하기 위하여 99년 1월부터 12월까지 시장과 백화점에서 무작위로 총 448건을 수집하고 수집된 재료는 LLE 방법으로 추출하여 분석한 결과 표 4와 같이 콩나물 6건에서 carbendazim이 검출되었으며, 그 중 3건은 0.1 mg/kg 미만이었고 3건은 0.1 mg/kg을 초과하였다.

홍 등(1997)은 콩과 콩나물중 잔류농약에 관한 연구에서 콩나물 콩에 대한 carbendazim의 잔류를 조사한 결과 국내산 45종 및 수입산 20종 모두에서 검출되지 않았다고 하였으며, 원료 콩에 농약이 잔류허용기준 이내로 잔류하고 있다면 농약을 사용하지 않고 콩나물을 재배할 때 농약이 검출되지 않았다고 하여 콩나물에서 검출되는 농약은 원료 콩으로부터 이행될 가능성이 없는 것으로 보고하였다.

Hiemstra 등(1995)은 1992년부터 1994년까지 benzimidazole계 잔류농약을 조사하기 위하여 과일류와 채소류 2,124건을 silica SPE로 cleanup하여 HPLC 형광검출기로 측정한 결과 carbendazim 214건, thiabendazole 161건이 검출되었으며, 과일류 75%에서 carbendazim 또는 thiaben-

Table 4. Benzimidazole fungicide residues in sprout soybeans

No. of samples analyzed	No. of residue findings		Residue levels(mg/kg)	
	Carbendazim	Thiabendazole	Exceed 0.1	Low 0.1
448	6(3)	-	0.15	0.03
			0.20	0.03
			0.37	0.07

dazole이 검출되었고 EC 검출한계치를 초과한 carbendazim은 8건, 독일 검출한계치를 초과한 thiabendazole은 6건으로 총 검사건수의 0.7% 부적합율을 보고하였다. 본 조사에서도 부적합율이 0.54%로 유사하여 benzimidazole계 잔류농약의 지속적인 monitoring이 요구되며, 농약안전사용기준을 준수하도록 사용자에게 홍보를 강화해야할 것을 권고한다.

감사의 글

본 연구를 위해 콩나물 재배에 협조해주신 (주)풀목산 농원에 감사드립니다.

인용문헌

- Aharonson N., S. J. Lehotay and M. A. Ibrahim (1994) Supercritical fluid extraction and HPLC analysis of benzimidazole fungicides in potato, apple, and banana. *J. Agri. Food Chem.* 42:2817~2823.
- Baude, F. J., J. A. Gardiner and J. C. Y. Han (1973) Characterization of residues on plants following foliar spray application of benomyl. *J. Agri. Food Chem.* 21:1084~1090.
- Cano, P., J. L. De la Plaza and L. Munoz-Delgado (1987) Determination and persistence of several fungicides in postharvest-treated apples during their cold storage. *J. Agri. Food Chem.* 35:144~147.
- Chiba, M. (1977) Rapid spectrophotometric method for the simultaneous determination of intact benomyl, and its degradation product, methyl 2-benzimidazolecarbamate(MBC) in organic solvents and water. *J. Agri. Food Chem.* 25:368~373.
- Clemens, G. P., and D. R. Sayag (1969) Formation of a fungitoxic derivative from Benlate. *Phytopathology*, 59:705~706.
- Hiemstra, M., J. A. Joosten and A. de Kok (1995) Fully automated solid-phase extraction cleanup and on-line liquid chromatographic determination of benzimidazole fungicides in fruit and vegetables. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 78:1267~1274.
- Itak, J. A., M. Y. Selisker, S. W. Jourdan, J. R. Fleeker and D. P. Herzog (1993) Determination of benomyl (as carbendazim) and carbendazim in water, soil, and fruit juice by a magnetic particle-based immunoassay. *J. Agri. Food Chem.* 41:2329~2332.
- Levine, R. A., R. G. Luchtefeld, M. L. Hpper and G. D. Salmon (1998) Automated method for clean and determination of benomyl and thiabendazole in table-ready foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 81:1217~1223.
- Monson, K. D. (1991) Release and characterization of bound benomyl and carbendazim metabolites in animal tissues via raney nickel desulfurization and acid dehydration. *J. Agri. Food Chem.* 39:1808~1811.
- Pease, H. L. and J. A. Gardiner (1969) Fluorometric and colorimetric procedures of determining of residues of benomyl. *J. Agri. Food Chem.* 17:267~270.
- Pesticide analytical manual (1987) Foods and feeds, extraction and cleanup, FDA, vol. I. section 242.3.
- Regis-Rolle, S. D. and G. M. Bauville (1993) High performance liquid chromatographic method for the determination of carbendazim residues in crops, grains, and wines with fluorescent detection. *Pestic Sci.* 37:273~282.
- Rouchaud, J. P. and J. R. Decallone (1974) Gas chromatographic method for the analysis of MBC in plants and soil. *J. Agri. Food Chem.* 22:259~260.
- Singh, R. P. and I. D. Brindle (1990) Kinetic study of the decomposition of methyl [1-(butylcarbamoyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate(benomyl) to methyl 1H-benzimidazol-2-ylcarbamate(MBC), *J. Agri. Food Chem.* 38:1758~1762.
- 물만먹고자라요 (1998) 콩나물 잔류농약 시험결과, 대한두채협회 pp.50~53.
- 박창규, 서용택, 이재구, 한대성 (1994) 농약의 생화학과 사용법, 도서출판신일상사 pp.423~435.
- 식품공전 (1999) 농산물의 농약 잔류허용기준, 한국식품공업협회 pp.37~100.
- 홍무기, 최동미, 오창환, 박건상, 황인균, 정지윤, 이정복, 장선영, 최윤주 (1997) 콩과 콩나물중 잔류농약에 관한 연구, 식품의약품안전청연보 pp.38~42.

An extraction method and residues of benzimidazole fungicides in soybean sprouts

Jun-Jo Park, Kum-Chan Yong and Jin-A Jeung(*Division of Food Chemistry Health and Environment Institute of Kyonggi-Do, Suwon 440-290, Korea*)

Abstract : An analytical method was approached to determine the residues of benzimidazole fungicides in soybean sprouts and was compared with traditional solvent-based method of extraction, solid phase extraction(SPE) and matrix solid phase dispersion(MSPD). The recoveries of carbendazim for liquid-liquid extraction (LLE) , SPE and MSPD in soybean sprouts were 69.25~79.16, 79.99~90.42 and 92.40~98.48%, respectively. The recoveries of thiabendazole for LLE , SPE and MSPD in soybean sprouts were 64.86~83.26, 79.12~94.04 and 65.44~73.92%, respectively. The residues of carbendazim by elapsed time under our cultivated soybean sprouts program found 0.10~0.25 mg/kg after 5 days and trace concentration of carbendazim was detected after 7 days. Of the 448 samples analyzed, less than 1.5% had residues of carbendazim ranged from 0.05 to 0.37 mg/kg.

*Corresponding author(Fax : +82-331-250-2610, E-mail : pjj09@netian.com)