

초임계이산화탄소에 의한 유기염소계 잔류농약의 포집효율

임 상 빈*, 좌 미 경**, 김 수 현*

Collection Efficiencies of Organochlorine Pesticides by Supercritical Carbon Dioxide

Sang-Bin Lim*, Mi-Kyung Jwa** and Soo-Hyun Kim*

ABSTRACT

Collection efficiencies of organochlorine pesticides by supercritical fluid extraction(SFE) was investigated to develop a simple, fast and inexpensive extraction method. Standard organochlorine pesticides mixture(SOPM, no water) showed no evidence of metering valve plugging in contrast to the plugging associated with SFE of fish tissues(wet sample). Maximum percent recovery of SOPM was obtained at 40°C/172 bar by collecting the extract within 3 min through the metering valve without heating into a capped screw-top tube half filled with solid CO₂. Recovery of SOPM itself showed 98.3% while recovery of that spiked in fish tissue 85.6%.

Key words : Supercritical carbon dioxide extraction, Organochlorine pesticide residues

1. 서 론

유기용매에 의하여 식품 중의 잔류농약을 분석하는 기존의 방법은 유기용매의 화염성, 독성, 가격의 고가, 폐유기용매에 의한 환경오염 뿐만 아니라 16~24시간의 추출 시간이 소요되는 등 많은 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위하여 새로운 추출방법의 개발이 시급한 실정이다⁽¹⁾.

초임계유체 추출법은 추출시간이 적게 소요되

며, 유기용매 사용량이 적기 때문에 시료로부터 분석대상이 되는 물질을 추출시 유기용매 추출법의 대용으로 이용될 수 있다^(2,3). 그런데 정량적인 결과를 얻기 위해서는 높은 추출수율과 포집효율이 요구되어 진다. 추출물을 포집하는 방법으로는 내경이 작은 크기의 exit tube(일명 restrictor)를 사용하는데 수분함량이 많은 시료를 추출할 경우 추출 후 시료를 포집할 때 높은 압력에서 낮은 압력으로의 급격한 압력강하에 의한 냉각효과에 의하여 tube가 막히는 문제를 초래하게 된다. 이를 방지하기 위하여 tube를 가열하면^(4,5) 휘발성 성분의 손실을 초래하게 되므로, Hopper과 King⁽⁵⁾은 pelletized diatomaceous

* 제주대학교 식품공학과
Dept. of Food Sci. and Technol., Cheju Nat'l Univ.
** 제주대학교 대학원
Graduate School, Cheju Nat'l Univ.

earth를 시료에 흡습제로 첨가하여 수분이 많이 함유되어 있는 시료를 추출하였다. 이렇게 함으로서 냉각현상에 의한 tube의 막힘을 방지할 수 있고 시료를 추출조에 분산시킬 수 있고, 시료중의 수분을 흡수하므로써 시료의 유동특성을 증가시켜 추출조에 충전이 용이하며, homogeneous permeable extraction bed를 만들어 줌으로서 bed내의 channeling을 최소화하여 추출 및 포집 효율을 증대시켰다. 이와 같은 시료 처리방법은 휘발성 물질의 손실을 최소화할 수 있었으며 실험이 신속하고 용이하였다.

따라서 본 연구에서는 추출한 후 감압할 때 시료 중의 수분에 의한 exit tube의 막힘을 방지하고, 칼람에 충전할 때 시료에 유동특성을 부여하기 위하여 시료를 무수황산나트륨과 혼합하여 사용하였다. 이와 같은 방법을 수산물로부터 유기염계 농약 추출에의 적용 가능성을 검토하기 위하여 농약 표준용액 자체와 농약 표준용액을 첨가한 어류 조직을 초임계 이산화탄소로 추출하여 포집용기의 뚜껑유무, metering valve의 가열온도별, 포집방법 및 포집시간에 따른 포집효율을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

2.1 재료

대구(*Gadus macrocephalus*)는 제주시내 시장에서 구입하여 가식부만 분리한 후 waring blender로 갈아서 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 어류조직에 첨가한 유기염소계 농약 표준품으로서 α , β , γ , δ -BHC, p,p'-DDD, DDE, DDT, aldrin, dieldrin은 Dr. Ehrenstorfer GmbH 제품을, endrin은 WAKO PURE Chemical Ind., Ltd 제품을 구입하여 사용하였다. 그 외 hexane, anhydrous sodium sulfate(입자분포: >355 μ m가 15%, 150~355 μ m가 65%, <150 μ m가 20%인 입자형) 등은 WAKO PURE Chemical Ind., Ltd 제품을 구입하여 사용하였다.

2.2 초임계유체 추출

본 실험에 사용한 초임계유체 추출장치는 본 실험실에서 제작하였으며, 최대 압력이 414 bar 까지 사용 가능한 연속 유통형이다(Fig. 1). 먼저 60 mL의 추출칼람에 일정량의 시료를 주입하였다. 탄산가스는 실린더(TK)로부터 check valve(CV)를 거쳐 고압 피스톤펌프(HPP)에 의하여 가압되었다. 이 때 탄산가스 주입부의 공동화 현상을 방지하기 위하여 냉각조(HE)를 설치하여 초임계 이산화탄소의 기화를 방지하였다. 가압된 초임계 이산화탄소는 압력계(P)에

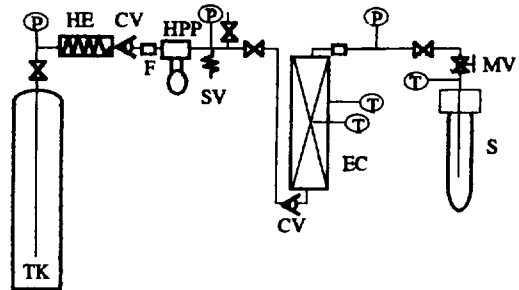


Fig. 1 Schematic diagram of supercritical fluid extraction system(CV : check valve, EC : extraction column, F: filter, HE : heat exchanger, HPP: high pressure pump, MV : metering valve, P: pressure gauge, S : separator, SV : safety valve, T : temperature indicator, TK : carbon dioxide tank).

의해 압력이 측정된 후 추출칼람(EC)으로 이송되었다. 추출칼람의 온도는 비례형 온도조절기로 조절되었으며, 추출칼람 중앙에 설치된 열전대 온도계(T)에 의하여 측정되었다. 추출공정을 단순화시키기 위하여 일단 추출칼람에 초임계 이산화탄소를 주입하여 일정압력에 이르면 펌프의 작동을 중단시켜 정적 추출(초임계 이산화탄소의 흐름이 없음)을 하였으며, 추출공정은 이산화탄소의 임계점보다 높은 온도와 압력에서 행하였다. 추출시간을 한시간으로 고정시키고

추출온도와 추출압력을 달리하여 추출한 후 초입계유체 추출물을 0.79 mm의 내경을 갖는 metering valve(MV)를 통하여 고체 이산화탄소가 들어 있는 한개의 구멍(내경: 7.5 mm)이 뚫린 뚜껑을 가진 시험관(S)(2 x 19.5 cm)속에서 3분이내로 신속히 감압한 후 10 mL의 핵산을 즉시 가하여 용해한 후 GC로 분석하였다. 이때 exit tube는 시험관의 16 cm 깊이에 위치하였다.

2.3 첨가회수율

먼저 유기염소계 표준용액 자체의 추출회수율을 측정하였다. 즉 잔류농약 표준용액(α -BHC 20.7 ppm, β -BHC 24.3 ppm, δ -BHC 25.5 ppm, γ -BHC 21.8 ppm, aldrin 25.4 ppm, dieldrin 23.0 ppm, endrin 26.6 ppm, p,p'-DDD 22.5 ppm, p,p'-DDE 22.9 ppm, p,p'-DDT 23.7 ppm) 1 mL을 무수황산나트륨 12g과 100 mL의 비이커에서 혼합한 후 추출칼람에 충전시키고, 다시 무수황산나트륨 3g으로 비이커를 씻어 추출칼람에 충전한 후 일정온도, 압력에서 초입계 이산화탄소로 추출하여 GC 분석을 한 후 회수율을 측정하였다.

다음으로 유기염소계 표준용액을 수분함량이 79.2%인 대구에 첨가하여 첨가회수율을 측정하였다. 즉 위 표준용액 1 mL을 생체시료 2g에 가하여 혼합한 후 무수황산나트륨 30g을 가하여 100 mL의 비이커에서 혼합하여 추출칼람에 충전시키고, 다시 무수황산나트륨 10g으로 비이커를 씻어 추출칼람에 충전한 후 일정온도, 압력에서 초입계 이산화탄소로 추출하여 GC 분석을 한 후 생체시료에 대한 첨가회수율을 측정하였다. 모든 실험은 2~3회 반복시행하였는데, 이때 상대표준편차는 p,p'-DDD가 3.87%로 가장 낮았고 p,p'-DDT가 14.7%로 가장 높았으며 10개 성분에 대한 평균상대표준편차는 6.21%였다.

2.4 잔류농약 분석

추출물 중의 잔류농약 분석은 GC(Hewlett-Packard 5890 series II)에 의하였으며, column

은 SPB-608 capillary(30 m x 0.25 mm i.d., Supelco)를 사용하였고, column 온도는 150°C에서 4분간 유지한 다음 8°C/min 속도로 290°C까지 온도를 높여 10분간 유지하였다. 검출기는 ECD를 사용하였고, 검출기 및 주입구의 온도는 300°C, 220°C로 유지하였다. 운반기체로서 질소가스는 split ratio를 1 : 100으로 주입하였다. 모든 분석은 2~3회 반복 시행하였다.

III. 결과 및 고찰

3.1 추출온도에 따른 농약 표준용액의 추출수율

유기염소계농약 표준용액을 추출압력 172 bar에서 추출온도를 40, 50, 60°C로 달리하여 추출한 후 급격한 압력강하에 의한 metering valve의 빙결현상을 방지하기 위하여 metering valve를 가열하면서 10 mL의 핵산이 들어 있는 수기에 추출물을 유출시킨 후 회수율을 측정할 결과는 Table 1과 같다. 추출온도 40, 50, 60°C에서 평균 회수율은 각각 23.9, 19.3, 9.3%였는데, 이와 같이 낮은 이유는 metering valve의 가열로 인한 휘발손실과 핵산에 의한 비발동반으로 추정된다. 또한 추출온도가 높을 수록 회수율이 감소하였는데, 이는 높은 온도에서 초입계 이산화탄소의 밀도 감소에 의한 용해도 감소 효과와 높은 추출온도에 의한 수기에서의 추출물의 휘발손실 촉진 등을 들 수 있다. 따라서 회수율을 높이기 위해서는 metering valve를 가열하지 않고 수기의 온도를 가능한 낮게 유지하는 것이 바람직하였다.

한편 잔류농약 분석을 다량의 시료에 대하여 행하려면 시간적인 제한성이 있으므로 최근 enzyme assay을 통하여 간편하게 분석하는 screening method가 많이 이용되고 있다⁽¹⁾. 그런데 유기용매 추출법에 의하여 추출한 후 잔류농약을 분석하기 위하여 enzyme assay을 이용하려면 추출물에 함유되어 있는 유기용매가 antigen-antibody 반응을 파괴하여 효소를 변성시키므로 잔존하는 유기용매를 제거한 후 추출

물을 수용성 용매에 다시 용해시켜야 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 추출물을 유기용매가 들어 있지 않은 수기에 포집한 후 분석방법에 맞는 용매에 용해시켜야 한다. 따라서 다음 실험에서는 추출물을 포집할 때 metering valve를 가열하지 않은 상태에서 수기에 핵산을 가하지 않았으며, 또한 수기의 온도를 낮게 유지하기 위하여 수기에 고체 이산화탄소를 가한 후 시료를 취하였다.

Table 1 Extraction efficiencies of organochlorine pesticides mixture with different extraction temperature at 172 bar.

Analyte	Percent recovery		
	40℃	50℃	60℃
α -BHC	37.8	42.0	28.7
γ -BHC	32.3	34.7	20.4
β -BHC	19.9	14.6	4.9
δ -BHC	22.9	17.7	7.2
Aldrin	31.0	31.8	18.5
p,p'-DDD	21.9	12.9	4.5
Dieldrin	20.2	14.8	5.7
Endrin	19.2	12.5	3.7
p,p'-DDE	16.6	6.7	-
p,p'-DDT	17.2	5.4	-
Average	23.9	19.3	9.3

3.2 포집시간에 따른 농약 표준용액의 포집 효율

추출물의 포집(유출)시간이 회수율에 미치는 영향을 측정하기 위하여 농약 표준용액을 40℃/103 bar에서 초임계 이산화탄소로 추출하여 포집효율을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 급격한 감압에 의하여 metering valve가 동결되는 것을 방지하고 추출물을 유출시키는 동안 수기에서 튀어나가는 것을 방지하기 위하여 40℃/103 bar에서 1시간 40분에 걸쳐 서서히 추출물을 유출시켰는데 이때 회수율은 평균 26.3%로

매우 저조한 반면 포집(유출)시간이 3분 이내인 경우는 회수율이 82.5%로 높았다. 40℃/172 bar에서 추출한 후 추출물을 3분이내에 유출시킨 경우 평균회수율은 98.3%로 매우 높았다. 이는 유출시 고체 이산화탄소의 형성에 의하여 수기의 온도가 저하되어 추출된 잔류농약의 포집에 도움을 주기 때문인 것으로 추정된다. Miller 등⁽⁶⁾도 포집시간을 3, 10, 30초로 달리하여 포집하였을 때 회수율은 포집시간이 짧을수록 높았으며 포집시간이 길수록 저조하였는데, 이는 포집시간이 길수록 초기에 포집되었던 성분들이 재 휘발되어 손실이 일어나는 것으로 추정하였다. Nam과 King⁽⁴⁾도 초임계 이산화탄소로 alachlor을 추출하여 높은 회수율을 얻기 위해서는 감압 시간 즉 유출시간을 가능한 짧게 해야 한다고 보고하고 있다. McNally 등⁽⁷⁾도 다중 추출조를 이용하여 정적 추출을 한 후 추출물을 급히 감압하여 포집하는 방법으로 토양 중에 첨가한 phenylmethylurea pesticide의 회수율 97.3%를 얻었다.

Table 2 Collection efficiencies of organochlorine pesticides mixture with different collection time at 40℃/103 bar

Analyte	Percent recovery		
	40℃/ 103 bar/ 1hr 40 min	40℃/ 103 bar/ 3 min	40℃/ 172 bar/ 3 min
α -BHC	38.3	82.3	101.3
γ -BHC	32.5	82.2	98.5
β -BHC	14.6	79.1	88.8
δ -BHC	18.5	84.1	94.4
Aldrin	41.0	82.8	104.1
p,p'-DDD	34.2	62.0	104.2
Dieldrin	30.2	82.0	105.2
Endrin	25.4	88.2	103.1
p,p'-DDE	16.2	83.3	100.9
p,p'-DDT	12.3	99.6	83.4
Average	26.3	82.5	98.3

따라서 초임계 이산화탄소에 의하여 유기염소계 잔류농약 표준용액의 최대 추출회수율을 얻기 위해서는 추출온도 40℃와 압력 172 bar에서 metering valve를 가열하지 않고, 수기에 고체 이산화탄소를 반쯤 채운 상태에서 뚜껑이 있는 시험관을 수기로 사용하여 3분 이내에 추출물을 유출시키는 것이 바람직하였다.

3.3 시료량에 따른 첨가회수율

유기염소계 잔류농약 표준용액의 최적 추출 및 포집조건을 실제 시료인 수산물로부터 유기염소계 잔류농약 추출에의 적용 가능성을 검토하였다. 시료량이 잔류농약의 회수율에 미치는 영향을 검토하기 위하여 농약표준용액 1 mL을 1,

Table 3 Percent recovery of organochlorine pesticides mixture spiked in Pacific Cod with different size of sample at 40℃/172 bar

Analyte	Percent recovery		
	Sample weight(g)		
	1	2	5
α -BHC	65.8	63.8	66.6
γ -BHC	68.4	74.3	67.6
β -BHC	68.7	75.9	71.1
δ -BHC	69.4	76.3	75.6
Aldrin	65.5	67.2	61.1
p,p'-DDD	63.8	70.3	63.9
Dieldrin	67.3	69.8	63.5
Endrin	64.5	69.0	64.4
p,p'-DDE	69.3	72.0	69.9
p,p'-DDT	71.1	77.9	67.1
Average	67.3	71.6	67.0

2, 5g의 대구 시료에 첨가하여 40℃/172 bar에서 추출한 후 첨가회수율을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 시료량을 1, 2, 5g으로 달리함에 따라 평균회수율이 67.0, 71.6, 67.3%로 거의 유사하였으나, 잔류농약 표준용액의 최대 추출수율인 98.3%로 보다는 극히 저조하였다. 그 이유는 수분을 함유하지 않는 잔류농약 표준용액

과는 달리 수분을 함유하고 있는 어류조직을 추출한 후 추출물을 빠르게 유출시킬 경우 시료중에 함유되어 있는 수분의 추출로 말미암아 급격한 압력강하에 의한 metering valve의 냉각효과에 의하여 metering valve가 빙결되어 유출시간이 증가로 인한 휘발손실이 발생하였기 때문인 것으로 추정된다.

3.4 Metering valve의 가열온도에 따른 첨가회수율

수분이 함유되어 있는 시료를 추출할 경우 내경이 작은 tube(일명 restrictor)를 통하여 감압시 이산화탄소의 감압 팽창에 의한 냉각효과 때문에 metering valve의 orifice에 얼음이 형성되어 막히게 되는 문제점을 방지하기 위하여 metering valve를 가열하는 방법이 이용된다⁽⁵⁾. Metering valve의 가열방법이 회수율에 미치는 영향을 검토하기 위하여 잔류농약 표준용액을 첨가한 대구 시료를 40℃/172 bar에서 추출한

Table 4 Collection efficiencies of organochlorine pesticides mixture spiked in Pacific Cod with different heating temperature of metering valve at 40℃/172 bar

Analyte	Percent recovery		
	A	B	C
α -BHC	21.2	41.3	67.7
γ -BHC	18.2	45.5	75.1
β -BHC	18.8	56.6	79.4
δ -BHC	22.9	55.6	84.2
Aldrin	19.8	36.2	64.5
p,p'-DDD	21.7	46.3	66.4
Dieldrin	22.4	45.2	67.4
Endrin	17.9	42.6	70.0
p,p'-DDE	17.1	54.7	72.2
p,p'-DDT	18.8	41.5	74.6
Average	19.8	46.5	72.1

· Metering valve was heated at 122℃(A), 50℃(B), and 70~166℃ after freezing(C)

후 metering valve를 122℃(A), 55℃(B)에서 계

속 가열하면서, 또는 metering valve가 빙결된 후 70~166°C에서 가열하면서 추출물을 유출시켜 회수율을 측정 한 결과는 Table 4와 같다. 122, 50°C에서 metering valve를 계속 가열하는 경우는 회수율이 19.8, 46.5로 극히 저조하였으며, metering valve가 빙결된 후 가열한 경우도 회수율이 72.1%로서 낮았다. 따라서 metering valve의 빙결을 방지하면서 추출물의 유출속도를 증가시키기 위하여 metering valve를 가열하지 않고 추출물을 신속히 유출시킬 수 있는 다른 방법의 모색이 필요하다.

3.5 유출방법에 따른 첨가회수율

추출칼럼 후반부에 위치하여 있는 metering valve의 조절에 의하여 추출물의 유출속도를 조절할 수 있으므로 대구에 유기염소계농약 표준용액을 첨가하여 40°C/172bar에서 추출한 후 metering valve를 가열하지 않고 닫힌 상태, 열린 상태, 제거한 상태에서 추출물을 유출시킨 후 포집효율을 측정 한 결과는 Table 5과 같다. Metering valve가 닫힌 상태에서 추출물을 유출시켰을 때 평균회수율이 72.5%로 낮았는데, 이는 오랜 유출시간으로 수기 온도가 상승하여 휘발손실이 생겼기 때문인 것으로 추정되며, metering valve가 제거된 경우에는 평균회수율이 74.6%였는데, 이는 너무 빠른 유속으로 인하여 포집된 추출물이 수기에서 튀겨나가기 때문인 것으로 추정된다. 반면 metering valve를 완전히 연 상태에서 유출시켰을 때 회수율이 85.6%로 가장 높았는데, 이는 유출속도를 적당히 빠르게 유지해주므로써 수기온도가 낮게 유지되기 때문인 것으로 추정된다. 따라서 metering valve를 가열하지 않고 열린 상태에서 유출시키는 것이 바람직하였다. Miller 등⁽⁶⁾도 0.254 mm의 내경을 갖는 exit tube 보다는 0.178 mm의 내경을 갖는 exit tube를 사용시 회수율이 약 20% 증가하였다고 보고하였다. 따라서 수분이 함유되어 있는 시료 중의 유기염소계 잔류농약을 초임계 이산화탄소로 추출하여 추출물을 유출시킬 때에는 적당한 크기의 orifice 내경을 가

진 metering valve를 사용하여야 하며 가열하지 않고 빙결되지 않은 상태에서 신속히 유출시키는 것이 바람직하였다.

Table 5 Collection efficiencies of organochlorine pesticides mixture spiked in Pacific Cod with different venting method at 40°C /172 bar

Analyte	Percent recovery		
	A	B	C
α -BHC	68.1	82.9	65.7
γ -BHC	76.3	85.7	73.1
β -BHC	84.8	87.0	91.6
δ -BHC	92.6	87.2	85.9
Aldrin	61.1	82.0	61.4
p,p'-DDD	69.0	84.0	69.2
Dieldrin	68.4	85.4	70.8
Endrin	64.2	86.2	69.2
p,p'-DDE	78.6	87.9	84.4
p,p'-DDT	62.4	87.6	75.2
Average	72.5	85.6	74.6

A : vent through a closed-metering valve
 B : vent through a opened-metering valve
 C : vent without a metering valve

IV 결 론

초임계유체를 이용하여 간단하고, 신속하게 식품 중의 잔류농약을 추출하는 방법을 개발하기 위한 사업의 일환으로 10종의 유기염소계 농약에 대하여 ppm 수준의 농도에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 유출방법을 달리하여 포집효율을 측정하였다. 초임계 이산화탄소에 의하여 유기염소계 잔류농약 표준용액의 최대 회수율을 얻기 위해서는 추출온도 40°C와 압력 172bar에서 metering valve를 가열하지 않고, 수기에 고체 이산화탄소를 반쯤 채운 상태에서 뚜껑이 있는 시험관을 수기로 사용하여 3분 이내에 추출

물을 유출시키는 것이 바람직하다. 수분이 함유되어 있는 시료 중의 유기염소계 잔류농약을 초임계 이산화탄소를 이용하여 추출한 후 추출물을 유출시킬 때에도 적당한 크기의 orifice 내경을 가진 metering valve를 가열하지 않고 병결되지 않은 상태에서 신속히 유출시키는 것이 바람직하다. 위와 같은 조건에서 유기염소계 농약 표준용액의 평균 추출회수율은 98.3%였으며, 대구에 첨가한 표준용액의 평균 첨가회수율은 85.6%였다.

감사의 글

본연구는 '95년도 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것의 일부이며, 이에 감사드린다.

참고 문헌

1. France, J.E., King, J.W., Snyder, J.M., 199. Supercritical fluid-based cleanup technique for the separation of organochlorine pesticides from fats, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 39, p. 1871.
2. King, J.W., 1989, Fundamentals and applications of supercritical fluid extraction in chromatographic science, *J. Chromatogr. Sci.*, Vol. 27, p. 335.
3. Hawthorne, S.B., 1990, Analytical-scale supercritical fluid extraction, *Anal. Chem.*, Vol. 63, p. 633A.
4. Nam, K.S. and King, J.W., 1994, Supercritical fluid extraction and enzyme immunoassay for pesticide detection in meat products, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 42, p. 1469.
5. Hopper, M.L., King, J.W., 1991, Enhanced supercritical fluid carbon dioxide extraction of pesticides from foods using pelletized diatomaceous earth, *JAOAC*, Vol. 74, No. 4, p. 661.
6. Miller, D.J., Hawthorne, S.B., McNally, M.E.P., 1993, Solventless collection of analyte by rapid depressurization after static supercritical fluid extraction, *Anal. Chem.*, Vol. 65, p. 1038.
7. McNally, M.E.P., Deardorff, C.M., Fahmy, T.M., 1992, In *Supercritical Fluid Technology: Theoretical and Applied Approaches in Analytical Chemistry*, Bright, F.V., and McNally, M.E.P.(ed.), ACS Symp. Series 488, American Chemical Society, Washington, DC, Chap. 12.