

GC/MS를 이용한 수질시료 중 2, 4-D와 2, 4, 5-T의 분석에 관한 연구

표 희 수, 신 혜 승, 박 송 자

한국과학기술연구원 생체대사연구센터

Determination of 2, 4-D and 2, 4, 5-T in River Water and Drinking Water by Gas Chromatograph/Mass Spectrometer

Heesoo Pyo, Hye Seung Shin and Song-Ja Park

Bioanalysis and Biotransformation Research Center,
Korea Institute of Science and Technology Seoul 136-791, Korea

ABSTRACT

Chlorophenoxy acids are one of the most useful classes of chlorinated herbicides. Specially 2,4-D and 2,4,5-T were known to endocrine disruptors. In this study, these pesticides in water samples were extracted by liquid-liquid extraction at acidic conditions and then derivatization of acidic group was carried out various esterifications using by $\text{CH}_3\text{I}/\text{Acetone}-\text{K}_2\text{CO}_3$, $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ or TFAA/TFE . That result, Sensitivities of TFE derivatized 2,4-D and 2,4,5-T are prior to the others. The recoveries of 2,4-D and 2,4,5-T were 98% and 82% respectively using diethyl ether as an extracting solvent.

Key words : 2,4-D, 2,4,5-T, 유도체화 반응, GC/MS, 수질시료

서 론

근래에 와서 수질오염문제 뿐만 아니라, 환경에 대한 관심이 높아짐에 따라서 대기 및 토양이나 저질의 오염문제도 심각하게 대두되고 있다. 특히 최근 몇 년 사이에는 흔히 환경호르몬이라고 지칭되는 내분비계 장애 물질에 대한 관심이 높아지고 있다. 2,4-D와 2,4,5-T는 이러한 내분비계 장애 물질 중의 하나로 알려져 있으며, 2,4-D는 생분해 (biodegradation)에 의해 2,4-dichlorophenol로 변하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 이들 chlorophenoxy acid 류는 제초제로 폭넓게 사용되었으며,²⁾ 지금도 세계 여러 나라에서 사용되고 있는 농약이다.

이들 농약들의 사용은 인구의 빠른 증가와 더불어 식량 부족 현상이 문제화되면서 급속히 증가하여왔다. 그러나, 이러한 사용으로 인하여 여러 가지 농약들은 사용 후에 수질 및 토양의 오염물질로 심각한 환경오염의 주범이 되고 있다. 이와 같은 chlorophenoxy acid류는 주로 호흡이나 피부 접촉, 그리고 음식물로 인하여 섭취하는 사이에 체내로 유입되는 것으로 알려져 있다.

우리 나라에서는 현재 이러한 chlorophenoxy acid 류의 농약의 사용을 규제하고 있다. 그러나, 이제까지 사용되어 온 많은 양이 아직도 수질 및 토양에 오염이 되었을 것으로 사료된다. 그리고 음용수 중 WHO 가이드 라인은 2,4-D가 30 ppb 그리고 2,4,5-T가 9 ppb로 규제되어 있으며, chlo-

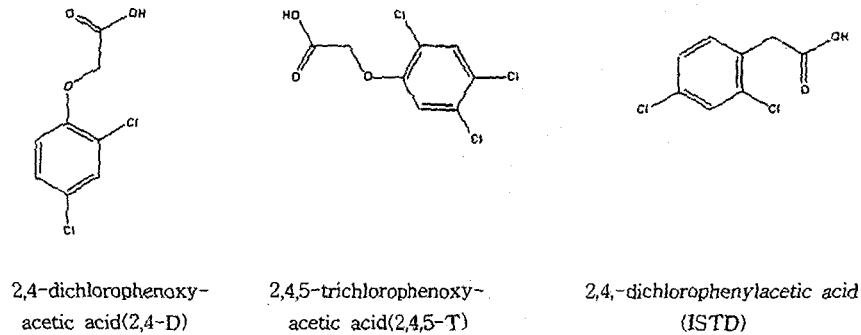


Fig. 1. Chemical structures of 2,4-D, 2,4,5-T and 2,4-dichlorophenylacetic acid (ISTD).

rophenoxy acid 류는 현재 IARC에서 2B군으로 분류되어 있다.³⁾ 그 중 2,4-D는 1970년대 초반부터 1980년대 중반까지 캐나다에서 음용수를 분석한 결과 총 805개의 시료 중 52개의 시료에서 최고 29 µg/l로 검출된 바 있다.⁴⁾

Rat을 사용한 동물 실험결과 2,4-D의 LD50 값이 각각 420에서 840 mg/kg,⁵⁾ 2,4,5-T가 300 mg/kg⁶⁾ 정도이다. 또한 경구 투여한 후 체내 분포를 검사한 결과 투여 후 3시간 후에 혈중 최고 농도를 나타냈으며, 신장과 간장, 비장, 폐 등 신체 장기내에 골고루 분포함을 보였다.^{7),8)} 이러한 chlorophenoxy acid 류의 분석법이 여러 가지 알려져 있다. 특히 HPLC (high-performance liquid chromatography)^{9),10)}와 GC/ECD (electron-capture detector)¹¹⁾을 이용한 방법 등이 있다. 본 실험에서는 수질 중에 포함되어 있는 2,4-D와 2,4,5-T를 효율적으로 분석하기 위하여 액체-액체추출법으로 전처리한 후 GC/MSD를 이용하여 분석하였으며, 유도체화방법을 여러 가지로 사용하여 그 감도를 비교하였다. 특히 일반적으로 사용되고 있는 황산/메탄올을 사용한 methylation과 TFAA/TFE를 이용하여 유도체화 시켰을 때의 감도를 비교하였다. 2,4-D와 2,4,5-T와 내부 표준 물질로 사용한 2,4-dichloro-phenylacetic acid의 구조를 Fig. 1에 나타내었다.

실 험

1. 기기 및 시약

1) 기기

본 연구에서 사용된 GC/MSD는 Hewlett-Packard사의 HP5890 series II plus GC와 5972 series mass selective detector를 direct inlet으로 연결하여 사용하였다. 또한 시료는 HP7673 autoinjector 및 controller를 사용하여 주입하였다.

시료의 농측은 Buchi사의 회전진공증발기를 사용하였고, 유도체화반응은 Thermolyne사의 dry bath를 사용하였다.

2) 시약

실험에서 사용된 2,4-D, 2,4,5-T와 내부 표준 물질로 쓰인 2,4-dichlorophenylacetic acid는 Aldrich사에서 구입하여 표준 용액을 만들어 사용하였다. 표준 용액은 10 mg을 10 ml MeOH에 녹여 1,000 ppm stock solution을 만들었다. 실험에 사용된 methylene chloride와 diethyl ether 그리고 methanol은 Merck사의 잔류농약 분석용을 구입하여 사용하였다. 증류수는 Milli-Q 및 Milli-RO system을 통과한 3차 증류수를 사용하였다. 무수황산 나트륨과 수산화나트륨은 Baker사의 특급시약을 구입하여 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 유도체화 시약의 비교 실험

2,4-D와 2,4,5-T의 염기성 조건하에서 methylation을 위하여 표준 혼합용액을 일정한 양으로 취하여 (100 µl of 10 ppm) 질소하에서 건조 시킨 후 CH₃I 50 µl와 acetone을 150 µl를 넣고 K₂CO₃ 약 2~3 mg 첨가하여 80°C의 dry bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 가열판에서 꺼내어 건조시킨 후 ethylacetate 100 µl로 녹여 GC/MSD로 분석하였다.

산성조건하에서의 methylation을 위하여 10%의 황산/메탄올 용액을 사용하여 반응 온도와 시간은 동일하게 실험하였고, Trifluoroethylation은 100 µl TFAA와 50 µl TFE를 넣어 후 실험하였다.

2) 추출을 조사

중류수 200 ml를 취하여 5 g NaOH를 넣고 60°C에서 약 15분간 중탕한다. 실온에서 냉각시킨 후 에 진한 황산 5 ml를 넣어 pH를 1 이하로 조절한 후 무수황산나트륨을 60 g 첨가한다. 위의 시료를 진탕하여 모두 녹인 후 추출용매 (diethyl ether 혹은 methylene chlorid) 25 ml를 넣어 추출한다. 추출된 유기층을 질소로 건조시키고 TFAA (trifluoroacetic anhydride) 100 µl와 TFE (trifluoroethanol) 50 µl를 각각 넣고 80°C에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 상온에서 식힌 후 진공회전 증발기를 이용하여 건조시키고 남은 잔사에 phenanthrene-d10 (10 ng/µl)을 함유한 100 µl의 ethyl acetate를 넣어 GC/MSD로 분석하여 추출율을 비교하였다.

3) 검량선 작성

중류수 200 ml를 취하여 농도가 1~1,000 ng/l가 되도록 표준 혼합용액을 가하고 내부표준 물질 (2,4-dichlorophenylacetic acid 10 ng/µl 용액 20 µl)을 넣은 후 전처리하여 GC/MS로 측정하여 그 결과로 검출한계를 구하고 검량 곡선을 구하였다.

Table 1. GC/MS operation conditions for 2,4-D and 2,4,5-T

-Column : Ultra-2, 25 m × 0.2 mm I.D. × 0.33 µm				
-Carrier gas : He at 0.7 ml/min				
-Splitless				
-Injection port temp. : 280°C				
-Transfer line temp : 280°C				
-Oven program				
initial temp (°C)	initial time (min)	rate (°C/min)	final temp (°C)	final time (min)
100	0	10	300	1
-Solvent delay : 5 min				
-SIM mode				
Compds	retention time (min)	selected fragment ion (m/z)		
I.S.	7.80	159, 289		
2,4-D	9.33	302, 163, 161, 175, 267		
2,4,5-T	11.0	336, 338, 301, 209, 195		

4) GC/MS 분석

표준 혼합용액을 mass range 50~600 amu로 Table 1에 나타난 oven temperature program에 따라서 각 물질의 질량 스펙트럼을 확인하여 특성 이온을 선택하였다. 선택된 이온과 각 물질의 머무른 시간에 따른 이온 선택 분석법 (selected ion monitoring mode)을 작성하고 macro를 사용하여 2,4-D와 2,4,5-T의 분석 조건을 확립하였다.

5) 실제 시료의 분석

실제 시료로 정수, 원수 및 하천수에 대하여 diethyl ether를 사용하여 추출하고 TFAA/TFE를 사용하여 유도체화 반응을 시킨 후 GC/MSD로 사용하여 SIM mode로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 유도체화 반응

CH₃I/Acetone을 사용한 basic methylation과 황산과 메탄올을 사용한 acidic methylation의 반응성을 비교한 결과 basic methylation는 반응이 일어나지 않았으며, acidic methylation 경우 카르복실기에 반응이 진행됨을 확인할 수 있었다. 염기성 조건에서의 반응은 methyl기와 carboxyl기의 수소 원자의 치환반응으로서 본 연구에서는 보다 더 강한 조건이 필요한 것으로 사료된다. 반면에 산성 조건에서는 acid의 hydroxy 기에 수소원자가 배위되어 쉽게 떨어질 수 있으며 여기에 반응에 사용된 알코올 기가 치환되는 반응으로서 mild한 조건에서도 쉽게 반응이 진행되는 것을 알 수 있다.

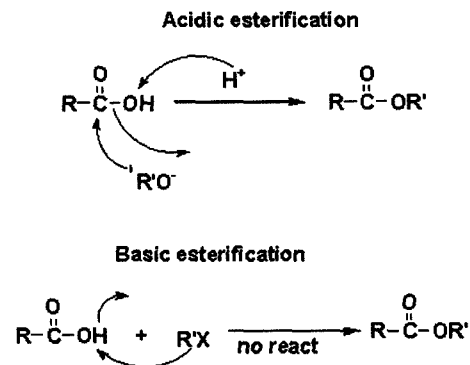


Table 2. Relative abundance of derivatized 2,4-D and 2,4,5-T according to various reagents

Derivatizing reagents	Relative abundance (%)	
	2,4-D	2,4,5-T
CH ₃ I/K ₂ CO ₃ (basic methylation)	not react	not react
MeOH/H ₂ SO ₄ (acidic methylation)	3.59	20.3
TFAA + TFE (trifluoroethylation)	100%	100%

산성 조건에서 반응이 진행된 황산/Methanol과 TFAA/TFE에 의한 생성물들의 GC/MSD 감도를 비교한 결과 TFE-에 의한 ester 화합물들의 감도가 뛰어난 것으로 나타났다. 이는 trifluoroethyl 기가 질량분석기에서 훨씬 분자개열이 잘 일어나고 또한 개열이 진행된 상태의 양이온이 안정함에 따라 감도가 높은 것을 알 수 있다. 이 결과를 Table 2에 나타내었다.

2. GC/MS 분석

2,4-D, 2,4,5-T 및 내부표준물질의 GC/MSD

크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 내부 표준 물질로 사용한 2,4-dichlorophenylacetic acid-TFE는 약 7.8 min에서 피크가 나타났으며, 2,4-D-TFE와 2,4,5-T-TFE는 각각 9.3 min과 11.0 min에서 나타났다. 또한 반응 후의 mass spectra를 Fig 3에 나타내었다. 두 가지 물질 모두 분자이온이 검출되었으며, 2,4-D-TFE의 경우에는 분자이온인 m/z 302에서 염소이온이 한 개 떨어진 [M-Cl]⁺ 토막이온이 나타났고, base peak는 [M-CH₂COOCH₂CF₃]⁺인 m/z 161이온이며, 이때 염소가 2개 포함된 경우의 등위원소 효과에 의해 161:163:165=9:6:1의 비율로 나타났다. 그 이외에 [M-COOCH₂CF₃]⁺ 토막이온인 m/z 175도 선택이온으로 정하였다.

2,4,5-T의 경우에는 분자이온인 m/z 336이온이 base peak로 나타났으며 염소가 3개 포함되어있으므로 336:338=1:1의 비율로 나타났으며, [M-COOCH₂CF₃]⁺ 토막이온인 m/z 209이온도 선택이온으로 정하였다.

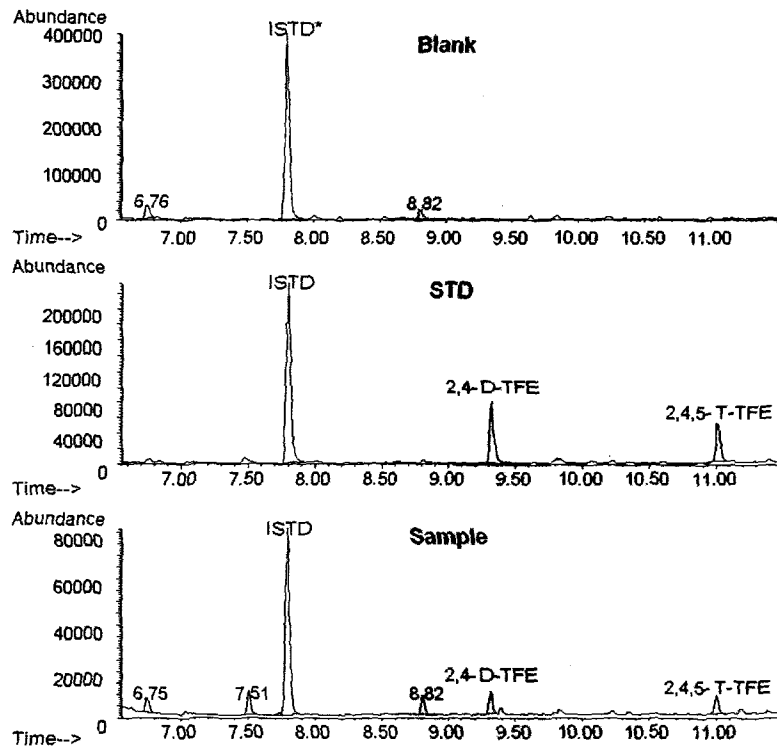
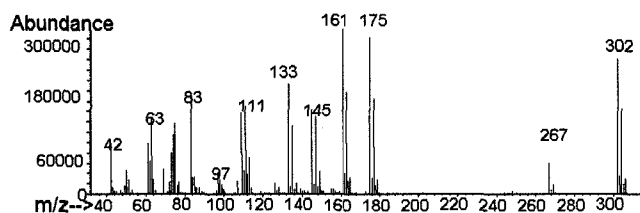
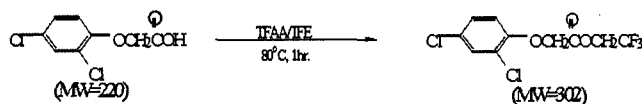


Fig. 2. GC/MSD total ion chromatograms of 2,4-D and 2,4,5-T of Blank, Standard and Sample.

2,4-D



2,4,5-T

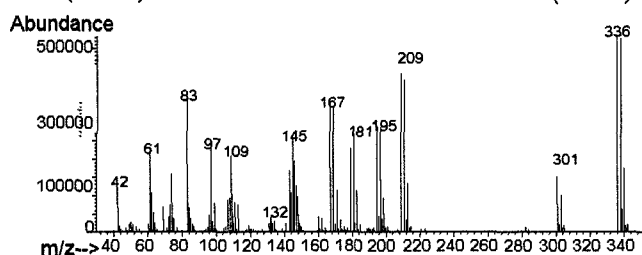
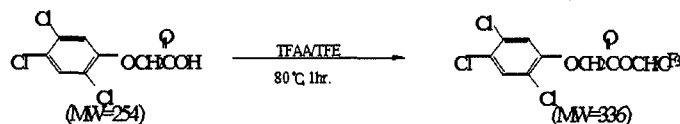


Fig. 3. Mass spectra for derivatized 2,4-D and 2,4,5-T.

3. 추출율 조사

Methylene chloride와 diethyl ether를 사용하여 각각 추출 한 결과 diethyl ether를 이용한 추출회수율이 98.4%와 82.1%로 나타났다. 반면에 methylene chloride를 이용한 추출회수율에서는 각각 41.3%와 37.3%로 낮게 나타났다. Table 3에서는

Table 3. Extraction recoveries of 2,4-D and 2,4,5-T with methylene chloride and diethyl ether

Solvents	Compds	Conc. (µg/L)	Avg (%)	S.D.	R.S.D (%)
Methylene chloride	2,4-D	1.0	41.3	6.04	14.6
	2,4,5-T	1.0	37.3	6.21	17.5
Diethyl ether	2,4-D	1.0	98.4	4.86	4.94
		10.0	90.2	7.88	8.74
	2,4,5-T	1.0	82.1	11.1	13.5
		10.0	78.8	11.9	14.8

수질 중의 diethyl ether methylene chloride의 각각 회수율을 나타내었다.

4. 검량선 작성

중류수 200 ml에 표준 혼합용액을 1~1,000 ng/l 범위로 첨가하고 diethyl ether로 추출한 후 TFAA/

Table 4. Calibration table and detection limits of 2,4-D and 2,4,5-T

Compds	2,4-D	2,4,5-T
t_R (min)	9.33	11.0
Ion	302	336
Conc., range (ng/L)	1.0~1000	1.0~1000
$y = ax + b$	a	1.1011
	b	0.0016
	r^2	0.9971
DL (ng/L)	MDL	1.0
	PQL	5.0

Table 5. Analytical results of 2,4-D and 2,4,5-T

	2,4-D			2,4,5-T		
	Concentration range (ng/l)	Mean (ng/l)	No. of detected samples	Concentration range (ng/l)	mean (ng/l)	No. of detected samples
Treated water	N.D.	N.D.	0/35	N.D.	N.D.	0/35
Raw water	N.D.	N.D.	0/8	N.D.	N.D.	0/8
River water	7~33	15.7	3/43	6~29	17.5	2/43

TFE로 반응시키고 GC/MS로 분석하여 얻은 검량선은 Table 4와 같다. 2,4-D와 2,4,5-T 모두 r^2 이 0.98과 0.99의 높은 직선성을 얻을 수 있었으며 정량한계는 각각 5.0 ng/l로 나타났다.

5. 실제 시료의 분석 결과

정수 및 원수 43종과 하천수 43종을 실험한 결과 정수 및 원수에서는 모든 시료에서 검출한계 이하로 나타났으며, 하천수에서는 시료 중 3개에서 2,4-D가 최저 7 ng/l에서 최고 33 ng/l로 검출되었고, 2,4,5-T는 2개의 시료에서 각각 6 ng/l와 29 ng/l로 검출되었다. Table 5에 각각의 값을 나타내었다.

결 론

수질시료중의 2,4-D 및 2,4,5-T를 GC/MSD로 분석하기 위하여 유도체화 조건을 조사하고 정수장에서 채취한 정수 및 원수 시료와 하천수를 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 염기성 및 산성 조건에서의 methanolysis과 trifluoroethanolysis에 의한 반응을 비교한 결과 염기성 조건에서는 반응이 진행되지 않았으며, 산성 조건에서의 methanolysis에 비해 trifluoroethanolysis의 반응성이 더 높은 것으로 나타났다.

2. GC/MS를 이용하여 trifluoroethanolysis한 2,4-D와 2,4,5-T의 질량 스펙트럼을 비교한 결과 두 물질 모두 분자이온이 검출되었으며 염소이온의 동위원소 효과에 의해 분자구조의 확인이 용이하였다.

3. Diethylether와 dichloromethane을 이용하여 수질시료중의 추출 회수율을 조사한 결과 diethyl ether를 사용한 경우의 추출율이 98.4%와 82.1%로 높게 나타났다.

4. 시료 200 ml에서의 검량선을 작성하고 검출

한계를 조사한 결과 각각 1.0 ng/l로 나타났으며 각각의 정량 한계는 5 ng/l로 나타났다.

5. 전국 정수장에서 채취한 정수 및 원수 시료 43개를 분석한 결과 두 물질 모두 검출되지 않았으며, 하천수 시료 43개의 분석 결과 2,4-D는 3개 시료에서 7~33 ng/l의 농도로 검출되었고, 2,4,5-T는 2개 시료에서 6~29 ng/l의 농도로 검출되었다.

적 요

Chlorophenoxy acid류는 제초제로 폭넓게 사용되고 있는 농약 중의 하나이다. 특히 2,4-D와 2,4,5-T는 내분비계 장애 물질 중의 하나로 알려져 있다. 본 연구에서는 이 두 가지 물질을 산성하에서 액체-액체 추출법으로 추출한 후 유도체화하여 GC/MS로 분석하였다. 추출용매로 methylene chloride와 diethyl ether를 사용하여 추출율을 비교한 결과 ether를 사용한 경우 2,4-D는 약 98% 2,4,5-T는 약 82%의 좋은 회수율을 보였다. 또한 산성기를 유도체화하기 위하여 $\text{CH}_3\text{I}/\text{Acetone}-\text{K}_2\text{CO}_3$ 와 황산/메탄올로 각각 methylation실험을 행하였고, 산성조건에서 trifluoroethanol (TFAA/TFE)과 반응시켜 각각의 검출검도를 비교하였다. 그 결과 TFAA/TFE를 사용하여 반응시킨 결과검도가 좋은 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Loos, MA. Phenoxyalkanoic acids In: Kearney Kaufman DD, eds. *Herbicides chemistry, degradation, and mode of action*. New York, NY, Macel dekker, 1975: 1-128.
- Royal Society of Chemistry. *The agrochemicals handbook*, 3rd ed. Cambridge, 1991.
- International Agency for Research on Cancer. Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of Mono-

- graphs volumes 1-42. Lyon, 1987:156-160.
4. Hiebsch SC. The occurrence of thirty-five pesticides in Canadian drinking water and surface water. Ottawa, Canada, Department of National Health and Welfare, Environmental Health Directorate, 1988.
 5. Gorzinski SJ, et al., Acute, pharmacokinetic, and subchronic toxicological studies of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Fundamental and applied toxicology*, 1987, 9:423-435.
 6. National Institute of Occupational Safety and Health. Registry of Toxic Effects of Chemical substances (RTECS). 1978.
 7. Geneva, World Health Organization. 1971 (WHO Technical Report Series, No.5) Pesticide residues in food : report of 1970 Joint FAO/WHO meeting.
 8. Geneva, World Health Organization. 1975 Geneva World Health Organization, 1976 (WHO Pesticide residues Series, No. 5).
 9. Duncan AR, Paul DJ and Richard HB. *J. Chromatography A*, 755(1996), 245-250.
 10. R. Wintersteiger, B. Goger and H. Krautgarther. *J. Chromatography A*, 846(1999), 249-357.
 11. M. Vink, J.M. etc. *J. Chromatography A*, 733(1996) 361-366.