

HPLC 형광검출법에 의한 Glyphosate의 혈중농도 측정

이상기[#] · 김기욱 · 양자열 · 인상환 · 이수연

국립과학수사연구소

(Received June 4, 2001; Revised June 26, 2001)

Determination of Glyphosate in Whole Blood by HPLC-fluorescence Detection

Sang-Ki Lee[#], Ki-Wook Kim, Ja-Youl Yang, Sang-Whan In and Soo-Yeun Lee

National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-707, Korea

Abstract — A rapid and sensitive method for the determination of glyphosate, a phosphated amino acid herbicide, in whole blood is presented. After removal of protein, the whole blood was purified by using the anion exchange resin (Dowex 1), and derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMCL). Derivatized glyphosate from blood sample was injected onto a Whatman partisol 10SAX column and separated with 0.1M phosphate buffer (pH 2.5) and acetonitrile (ratio=3:1). The high performance liquid chromatography-fluorescence detection gave the detection limit of 86pg and linearity of 0.9999 in the range of 0.25 µg/ml and 25 µg/ml. The recoveries of glyphosate added to the blood samples were ranged from 75.3% to 100.4% compared to the samples prepared in water. The derivatized glyphosate was stable at various acidity and temperature. This method has been successfully applied to the blood samples of lethal intoxication with the herbicide glyphosate.

Keywords □ Glyphosate, HPLC, fluorescence detection, anion exchange, 9-fluorenylmethyl chloroformate

Glyphosate는 합아미노산계 비선택성 제초제로 잡초 및 잡관목의 제거목적으로 국내에서 널리 사용되고 있는 보통독성의 농약이다. Glyphosate의 환경에 대한 경구급성독성(LD₅₀)은 5,600 mg/kg¹⁾으로 실험동물에 대하여 독성이 낮으나, 음독시 농약에 첨가된 계면활성제 등의 첨가물에 의해 치사율이 높은 것으로 보고되어 왔다.²⁾ Glyphosate중독에 의한 사망 사건은 1999년과 2000년도에 국립과학수사연구소에 감정 의뢰된 농약중독사중 약 10%를 차지하고 있으며, 발생 건수도 점점 증가하고 있다. 이는 국내에서 그 동안 비선택성 제초제로 널리 사용되어온 paraquat가 인체에 대한 독성이 매우 강하여 그 대용품으로 glyphosate

가 광범위하게 사용되어온 결과로 보인다.

Glyphosate는 glycine과 유사한 구조를 갖고 있으며, 생체내, 토양 및 물에서 aminomethyl phosphonic acid(이하 AMPA)로 대사된다고 알려져 있다(Fig. 1).^{3,4)}

Glyphosate는 물에 잘 녹고, 휘발성 및 유기용매에 대한 용해도가 낮아 유기용매에 의한 시료의 추출 및 가스크로마토그래프에 의한 분석이 어렵고, 자외선 흡수단을 갖고 있지 않아 고속액체크로마토그래프에 의

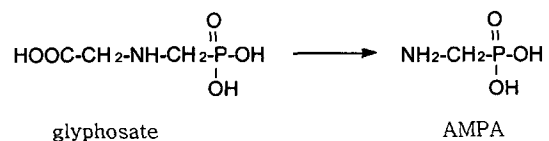


Fig. 1 - Metabolic degradation of glyphosate to aminomethyl phosphonic acid.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-2600-4925 (팩스) 02-2600-4919

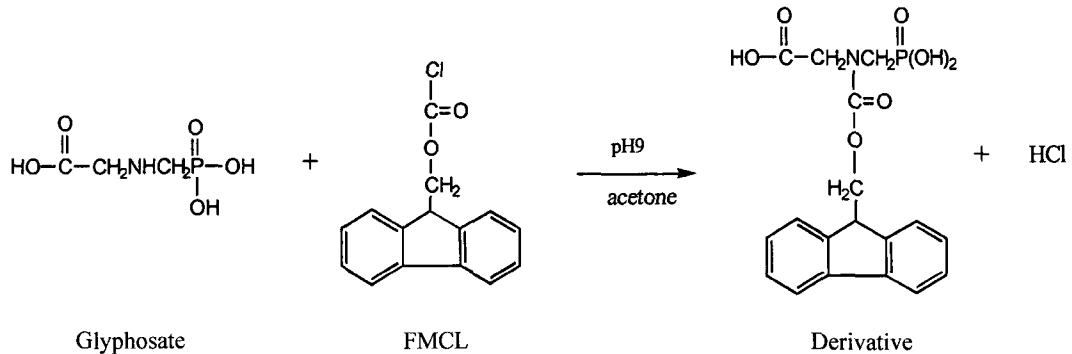


Fig. 2 - Derivatization of glyphosate with 9-fluorenylmethyl chloroformate.

한 분석도 곤란하다. 이 물질의 분석방법으로는 고속 액체크로마토그래프를 이용한 방법,⁵⁾ 아미노산분석기를 이용한 방법,⁶⁾ 모세관전기영동방법,⁷⁾ polarograph법,⁸⁾ 핵자기공명분광광도법²⁾ 등이 있다. 또한 glyphosate를 휘발성유도체로 하여 기체크로마토그래프법으로 분석하거나,⁴⁾ 혈청중 glyphosate를 UV흡수단을 결합시켜 고속액체크로마토그래프법으로 분석한 방법^{9,10)} 및 glyphosate의 형광유도체를 고속액체크로마토그래프법으로 분석한 방법이 보고되어 있다.¹¹⁾

그러나 이러한 방법은 거의 야채, 과일, 물 및 토양 중에 있는 glyphosate의 분석에 적용된 것으로 혈액 등의 생체시료에 대한 분석 사례는 거의 없었다. 따라서 glyphosate 음독에 의한 혈액에서의 치사농도 및 인체 조직내 분포 등에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았으므로, 생체시료에서 glyphosate를 확인 및 정량할 수 있는 방법의 개발이 시급한 실정이다. 저자 등은 혈액중 glyphosate의 신속, 정확한 분석법을 개발하여 감정에 적용하고, glyphosate의 인체 독성에 관한 기초자료를 얻기 위하여 본 연구를 착수하였다. 분석방법은 식품공전¹²⁾ 및 Oppenhuizen 등¹¹⁾의 방법을 개량하여 혈액중 glyphosate를 분리정제하고, 9-fluorenyl-methyl chloroformate 유도체를 만든 후 형광검출기를 이용하여 고속액체크로마토그래프로 분석하였다(Fig. 2).

실험방법

실험재료

Glyphosate는 미국 Monsanto사의 분석용 표준품을 사용하였고, AMPA와 음이온 교환수지(Dowex 1, 50-

100 mesh, chloride form)는 Sigma사, 9-fluorenylmethyl chloroformate는 Aldrich사의 제품을, 기타시약은 시판 특급시약을 사용하였다.

시료의 전처리 및 측정

이온교환수지의 활성화 - 음이온교환수지의 counter ion을 염소형에서 초산형으로 교환하기 위해 음이온교환수지 300 ml를 증류수로 현탁시켜 정치한 다음 증류수를 따라 버린다. 이 조작을 2회 반복한 다음 음이온교환수지를 다시 증류수로 현탁하여 직경 8 cm의 유리 컬럼에 충전하여 1N 수산화나트륨용액 6로 분당 약 30 ml의 유속으로 세척한다. 증류수로 용출액의 액성이 pH 8에 이를 때까지 세척한 후, 10% 초산 600 ml를 가해 초산형으로 활성화시킨다. 활성화된 수지는 4°C에서 냉장보관하고 필요한 양을 취하여 직경 1.5 cm의 유리관에 충전하여 사용한다.

시료의 전처리 - 혈액 0.5 g을 증류수 4 ml로 희석한 후 10% 삼염화초산용액(TCA) 1 ml를 첨가하고, 3000 rpm으로 5분간 원심 분리한다. 상등액을 취하여 diethyl ether 4 ml씩 2회 세척한 후 유기용매층을 버린다. 수용액에 증류수를 가하여 20 ml로 만든 후 이온교환컬럼에 주입한다.

이온교환컬럼의 준비 및 시료의 정제 - 10% 초산용액 10 ml가 채워진 직경 1.5 cm의 유리 컬럼에 활성화된 수지 20 ml를 충전하고, 10% 초산용액을 용출시킨 후, 300 ml의 증류수로 세척한 다음 위 혈액시료를 분당 3 ml의 유속으로 흘려주었다. 증류수 100 ml로 1차 세척한 후 0.3N 염산용액 30 ml로 2차 세척하였다. 다시 1N 염산 30 ml로 glyphosate를 용출시킨 후, 60°C 이하의 온도에서 감압 농축하고 질소가스로 남

아있는 염산을 건조시킨다.

FMCL유도체화 - 건조된 glyphosate를 50 mM borax 완충용액(pH 9.0) 3 ml에 용해하고, 0.01% FMCL아세톤용액 3 ml를 가한 후 상온에서 20분 동안 반응시킨다. 여기에 초산에칠 4 ml씩 3회 가하여 유기용매층을 제거한다. 완충용액에 포화된 초산에칠은 질소가스로 제거한 후 증류수를 가하여 3 ml가 되게 한다.

고속액체크로마토그래프 조건 - Waters사의 Dual pump(Waters 600 Pump)와 형광검출기(Waters 474 Scanning Fluorescence Detector)를 사용하여 분리 및 검출하였고 Waters사의 Millennium32 프로그램을 이용하여 자료를 분석하였다. HPLC 칼럼은 Whatman사의 Partisil 10 SAX(4.6×250 mm)를 사용하였다. 0.1M 인산칼륨완충용액(pH 2.5)과 아세트니트릴이 3:1로 혼합된 이동상으로 컬럼을 유속 0.5 ml/min로 40°C에서 안정화시킨 후, 유도체화된 시료 20 µl를 주입하였으며 형광검출기는 여기파장 255 nm, 발광파장 315 nm에 고정하여 분석하였다.

표준용액의 조제 - Glyphosate와 AMPA를 증류수에 1 mg/ml의 농도로 표준용액을 조제하였으며, 표준원액을 증류수로 단계적으로 희석하여 0.25, 2.5, 12.5 및 25 µg/ml의 표준용액을 조제하였다.

검량선의 작성 - 각각의 표준용액을 0.5 ml씩 취하여

증류수를 가하여 20 ml로 한 후 활성화된 이온교환칼럼을 통과한 후 FMCL로 유도체화 한다. 유도체화된 glyphosate표준액을 HPLC에 주입하여 외부표준법에 따라 검량선을 작성한다.

회수율의 측정 - 대조혈액에 glyphosate를 2.5 µg/ml, 25 µg/ml이 되게 첨가하고 시료와 동일한 방법으로 회수율을 측정하였다.

음독사망한 사람의 혈액 및 뇨에 대한 시험 - Glyphosate를 음독하여 사망한 사람 4명의 혈액에 대하여 위와 같은 방법으로 함량시험을 수행하였으며, 뇨는 0.5 g을 취하여 증류수로 20 ml로 희석한 다음 이온교환칼럼을 통한 정제 단계부터 위 방법에 따랐다. 필요한 경우 유도체화된 시료를 증류수로 희석하여 분석하였다.

실험결과 및 고찰

Glyphosate와 AMPA는 음이온성 물질로 이온교환수지에 결합하였을 때 각각 상이한 농도의 염산용액에서 용출되었다. 실험결과 AMPA와 glyphosate는 각각 0.1N 염산 및 1N 염산에 의해 용출되었으며, 이들의 형광유도체는 고속액체크로마토그래프에서 각각 8.7분 및 10.4분에 검출되었다.

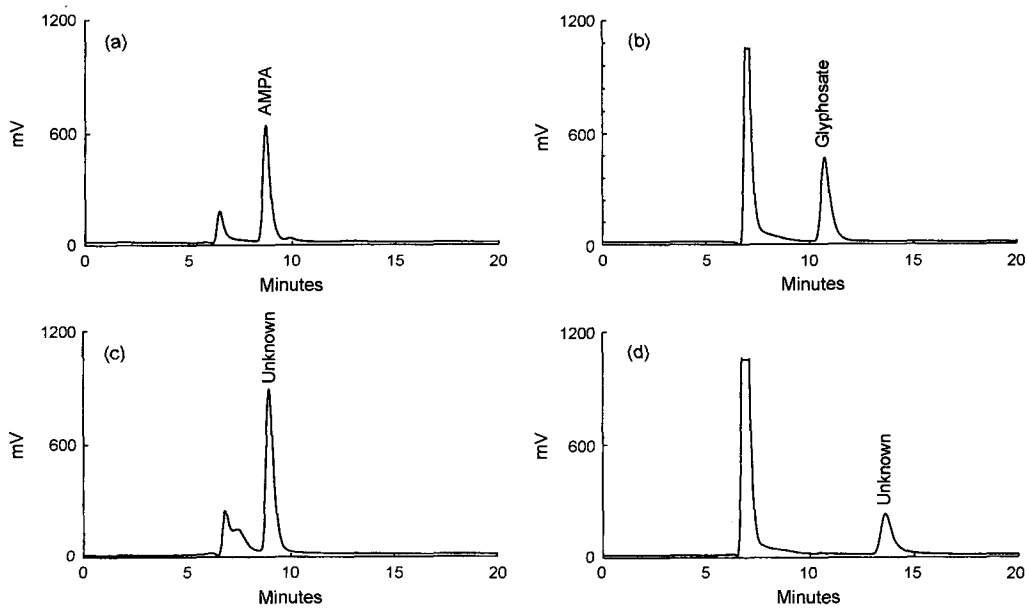


Fig. 3 - Chromatogram of AMPA derivative(a), glyphosate derivative(b), elution fraction of blank blood by 0.1N HCl(c) and 1.0N HCl(d).

Glyphosate 및 AMPA가 함유되어 있지 않은 대조혈액에 대하여 0.1N 및 1N의 염산으로 용출시켰을 때, 0.1N 염산으로 용출되는 혈액성분이 AMPA와 근접한 시간인 8.9분에 검출되어 AMPA의 분석을 방해하였다. 그러나 1N 염산으로 용출되는 혈액 성분에서는 glyphosate의 검출시간인 10.4분에 특정한 물질이 검출되지 않았으며, 13.6분에 미지의 혈액성분이 검출되었다(Fig. 3). 혈액성분으로 0.1N 염산에 용출되는 성분은 과량으로 존재하여 유도체반응시 정량적인 반응을 방해하는 것으로 나타나, 이 혈액성분을 최대한 분리 제거할 필요가 있었다. 따라서 용출용매인 염산의 농도에 따른 glyphosate 및 AMPA의 용출경향을 보기 위해 염산의 농도를 각각 0.1N, 0.3N, 0.5N 및 1N의 농도로 30 ml씩 용출하였다. 그 결과 AMPA는 0.1N 염산에서 완전히 용출되었으나, glyphosate는 0.3N 염산까지는 전혀 용출되지 않았으며 0.5N 염산에서 소량씩 용출되기 시작하여 1N 염산에서는 완전히 용출되었다. 8.9분에 검출되는 혈액성분은 0.1N 염산으로는 완전히 용출되지 않았으나 0.5N 염산에 의해 대부분 용출되었다. 따라서 혈액성분 중 과량 존재하는 불순물을 최대한 glyphosate와 분리하기 위하여, 0.3N 염산으로 용출되는 분획은 버리고 1N 염산으로 용출되는 분획을 glyphosate의 분획으로 하였다. 그러나 이 분석방법으로는 glyphosate의 생체내 대사체인 AMPA는 분리정량할 수 없었으며, 앞으로 이에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다. 단백질을 제거하기 위해 TCA처리를 하였을 때 시료의 조건은 강산성하에 있게 되는데, 액성에 대한 영향을 측정할 결과 산성 및 염기성 모두에서 glyphosate는 산도에 관계없이 이온교환수지에 결합하는 것으로 관찰되었다(데이터 생략).

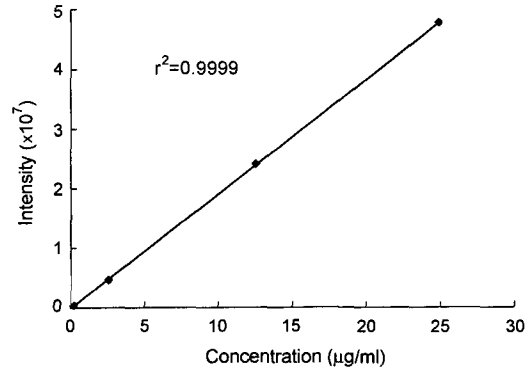


Fig. 4 - Calibration curve of glyphosate derivative ranging from 0.25 µg/ml to 25 µg/ml.

Glyphosate 표준품에 대하여 이 실험방법에 따라 정제 및 유도체를 만들어 0.25~25 µg/ml의 범위에서 검량선을 작성한 결과 r^2 값이 0.9999인 직선성을 얻었다(Fig. 4). 본 방법에 의한 glyphosate의 검출한계는 4.3 ng/ml이었으며, 분석에 소요되는 시간은 2시간 이내였다. 본 시험에서의 검출한계는 Tomita⁹⁾등이 HPLC-UV검출기를 사용하여 측정할 glyphosate의 *p*-toluenesulphonyl유도체 검출한계 300 ng/ml보다 70배 이상 낮아 감도가 매우 좋았다.

회수율을 측정하기 위해 혈액에 glyphosate의 농도가 각각 2.5 µg/ml 및 25 µg/ml이 되게 첨가하였다.

Table I - Recoveries of glyphosate added to blood compared to the samples prepared in water (n=3)

Added amount (µg/ml)	Found amount (µg/ml)	RSD (%)	Recovery(%) M ± D
2.5	1.88 ± 0.10	5.3	75.3 ± 4.08
25	25.1 ± 2.07	8.3	100.4 ± 8.28

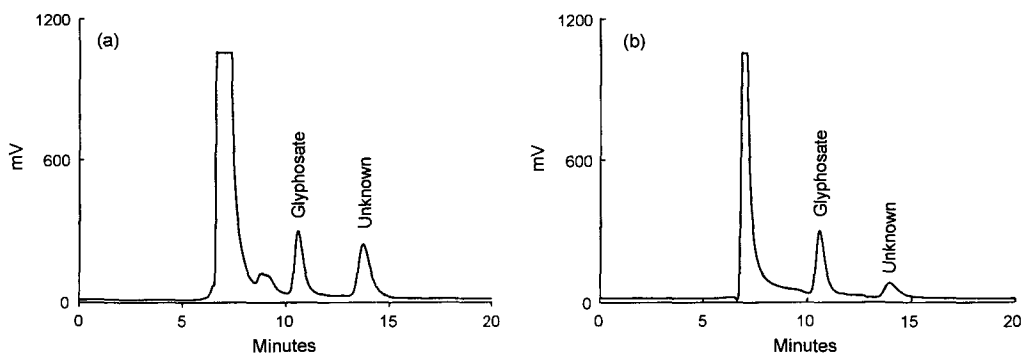


Fig. 5 - Chromatogram of glyphosate-spiked blood(a) and sample blood of glyphosate intoxicated cadaver(b).

각각의 혈액 0.5 g을 취하여 측정된 회수율은 75.3% 및 100.4%이었으며, 상대표준편차(RSD)도 10% 미만으로 나타나 본 방법은 양호한 시험법임을 알 수 있었다(Table I). Fig. 5는 glyphosate 표준품을 첨가한 혈액과 glyphosate를 음독하여 사망한 사람의 혈액을 전처리하여 HPLC 형광분석법에 의해 얻은 chromatogram이다. Chromatogram에서 보는 바와 같이 방해 물질의 영향 없이 혈액에서 glyphosate를 분석할 수 있었다.

Glyphosate를 음독하여 사망한 4명의 혈액중 glyphosate의 함량은 68.8, 104, 200 및 1936 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 범위가 넓게 나타났는데 이는 음독량의 차이에 의한 것으로 사료된다. 혈액에서 glyphosate의 함량이 68.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인 변사자의 뇨에서 glyphosate의 함량은 893.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나 혈액보다 약 13배 높게 검출되어 glyphosate가 신속하게 뇨로 배설되는 것을 알 수 있었다.

결 론

혈액중 glyphosate를 음이온 교환수지인 Dowex 1으로 정제한 후, FMCL형광유도체로 하여 고속액체크로마토그래피법으로 분석하였을 때 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위에서 r^2 값이 0.9999의 양호한 직선성을 나타내었다. 그러나 미지의 혈액성분이 glyphosate의 생체내 대사체인 AMPA와 동일한 유지시간에서 검출되어 혈액에서 AMPA는 검출할 수 없었다. 본 방법에 의한 glyphosate의 검출한계는 4.3 ng/ml이었으며, 회수율은 75.2~100.4%로 나타나, glyphosate 음독사건에 대하여 음독자의 생체시료내의 농도분포를 측정할 수 있는 방법으로 사용할 수 있었다. Glyphosate를 음독하여 사망한 사람의 혈액내 함량을 측정된 결과 glyphosate의 함량은 68.8~1936 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위로 측정되었다. 이 방법은 총 분석시간이 약 2시간 이내가 소요되므로 glyphosate의 중독사건에 신속, 정확하게 적용이 가능하였다.

문 헌

- Tomlin, C. D. S. : *The Pesticide Manual* 12th ed., British Crop Protection Council, Surrey, p. 488 (2000).
- Dickson, S. J. and Meinhold, R. H. : Rapid Determination of Glyphosate in Postmortem Specimens Using ^{31}P NMR. *J. Anal. Toxicol.* **12**, 284 (1988).
- 農藥殘留分析法研究班 : 最新 農藥의 殘留分析法, 中央法規出版, 東京 p.339 (1995).
- Tsunoda, N. : Simultaneous determination of the herbicides glyphosate, glufosinate and bialaphos and their metabolites using capillary gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **637**, 167 (1993).
- Moye, H. A., Miles, C. J. and Scherer, S. J. : A simplified high-performance liquid chromatographic residue procedure for the determination of glyphosate herbicide and (aminomethyl)phosphonic acid in fruits and vegetables employing postcolumn fluorogenic labeling. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 69 (1983).
- Parrot, F., Bedry, R. and Favarel-Garrigues J. C. : Glyphosate herbicide poisoning: use of a routine amino acid analyzer appears to be a rapid method for determining glyphosate and its metabolite in biological fluids. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **33**, 695 (1995).
- Tomita, M., Okuyama, T., Nigo, Y., Uno, B. and Kawai, S. : Determination of glyphosate and its metabolite, (aminomethyl)phosphonic acid, in serum using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **571**, 324(1991).
- Friestad, H. O. and Bronstad, J. O. : Improved polarographic method for determination of glyphosate herbicide in crops, soil, and water. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68**, 76 (1985).
- Tomita, M., Okuyama, T., Watanabe S., Uno, B. and Kawai, S. : High performance liquid chromatographic determination of glyphosate and (aminomethyl) phosphonic acid in human serum after conversion into *p*-toluenesulphonyl derivatives. *J. Chromatogr.* **566**, 239 (1991).
- Mori, H., Sato, T., Nagase, H., Takada, K., Nagasaka, M. and Yamazaki, F. : Analytical method for screening and quantification of phosphated amino acid herbicides in serum of acutely intoxicated patients using HPLC with a diode-array-detector, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* **44**, 245 (1998).
- Oppenhuizen, M. E. and Cowell, J. E. : Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in environmental water: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 317 (1991).
- 식품의약품 안전청, 식품공전, 7판, p. 169 (1999).