Journal of the Korean Chemical Society
2001, *Vol. 45, No. 1*
Printed in the Republic of Korea

LC/MS법 및 LC/UVD(EPA-631)를 이용한 수계 중 Benomyl의 분석법 평가

金基棟* · 崔元圭[†] · 徐容燦[‡] · 朴炳晃[‡] · 崔慧璟[‡]
상지대학교 이학부 화학과
[†]상지대학교 공학부 자원공학과
[‡]상지대학교 공학부 환경공학과
(2000. 9. 22 접수)

Evaluation of LC/MS and LC/UVD(EPA-631) Methods in Determination of Benomyl Concentration in Water Samples

Kee D. Kim*, Won Gyu Choi[†], Yong Chan Seo[‡], Byung Hwang Park[‡], and Hye Kyung Choi[‡]
Department of Chemistry, Sangji University, Wonju 220-702, Korea
[†]Department of Mining and Minerals Engineering, Sangji University, Wonju 220-702, Korea
[‡]Department of Environmental Engineering, Sangji University, Wonju 220-702, Korea
(Received September 22, 2000)

요 약. 내분비계 장애물질 중의 하나인 농약 benomyl의 환경잔류실태를 조사하기 위해 수질중의 benomyl 농도를 정량 하였다. 일반적으로 benomyl은 가수분해하여 carbendazim으로 변하며 본 분석법은 carbendazim을 정량 하는 간접법이다. 수질중의 잔여 benomyl은 가수분해 후 적절한 용매로 추출하여 농축, 정제되었다. 농축된 시료의 carbendazim 농도를 LC-MS (TOF)로 분석하였으며 그 결과 방해물질에 의해 발생할 수 있는 오차를 제거할 수 있었다. 검출한계는 LC/UVD법(EPA-631)에 비하여 약 1,600배 낮았으며 spike의 회수율도 약 80-118%로 양호하였다.

ABSTRACT. Benomyl, one of the known endocrine disrupting chemicals, was analyzed to understand the its fate in water. Benomyl analysis process in water sample include the following sequential steps. Hydrolysis of benomyl into carbendazim, solvent extraction, concentration, and the concentration of final carbendazim solution was determined by LC/MS (TOF). Recoveries of the spiked samples were good with the range of 80.6 to 118.6% and the MDL was 1,600 times lower than that of LC-UVD method. The use of LC/MS (TOF) successfully eliminated the positive error incurred by interferencing materials in the matrix.

서 론

Methyl (1-butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate (benomyl)은 신경전달계 효소인 acetylcholine esterase의 reversible inhibitor로서 균류발생 억제작용이 있는 carbamate 계열의 농약이며 작물의 수확 후 저장, 수송, 유통 중 보조제로 널리 사용되고 있다.[1] 국내에서는 연간 약 50톤 정도가 사용되고 있으며(환경부, 1999) 미국 내에서는 1979년부터 1986년까지 연간 750톤 이상 사용되었다. Benomyl은 비교적 독성이 낮은 것으로 알려졌었으나 1987년 미국 환경보호국에 의해 종양유발 가능성이 있는 농약 53종 중의 하나로 확인되어 각 농작물에 대한 허용잔류량이 정하여져 있다.[2] 국내의 경우 환경부에서 지정하는 내분비계장애추정물질(총 67종)중의 하나로 규정되어 있으며 화학물질의 배출조사대상 물질로 규정되었을 뿐만 아니라(환경부, 1999) 식품의약품안정청에서 제시하는 농작물에서의 허용잔류량도 정해져 있다.

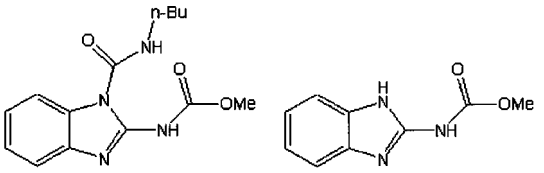

Fig. 1. Structure of benomyl and carbendazim.

Benomyl의 경우 rat LD50는 약 10 g/Kg(WHO, 1993)으로 매우 낮은 독성을 보이고 있으나 고환에는 단 한번의 100 mg/Kg의 주입으로도 심각한 손상을 비치고 있다. 특히 benomyl의 대사산물 중 하나인 methyl 2-benzimidazole carbamate(carbendazim)의 독성은 benomyl에 비해 상당히 높으며 benomyl에 의해 나타나는 독성은 benomyl의 생체내 대사화에 의해 생성된 carbendazim에 의한 효과로 예측되어지고 있다.[3]

Benomyl은 물에 대한 용해도가 낮고 매우 불안정하여 자연상태에서도 상대적으로 안정한 carbendazim으로 쉽게 분해되는 것으로 알려져 있다(*Fig.* 1). 분해속도는 온도, 수분, 산, 열 등이 주 요인으로 알려져 있다. 즉, 저온에서보다 고온에서, 산성상태 보다는 염기성에서 분해가 빠르게 이루어진다. pH에 따른 benomyl의 반감기는 pH 3, 7, 9의 경우 각 470, 180, 30 분으로 알려져 있다. 그러나 분해에 따른 생성물은 산성의 경우 carbendazim이, 염기성의 경우에는 3-butyl-2,4-dioxo-s-triazino[1,2-a]benzimidazole(STB)가 주로 생성되는 것으로 알려져 있으며 pH 3에서 8까지에서의 주 분해산물은 carbendazim이다. Carbendazim은 매우 안정한 물질로서 pH 8 수용액에서 최소 8일 이상 안정함을 보이고 있다.[3,4] 이러한 이유로 benomyl은 그 자체로 존재하기보다는 carbendazim등의 다른 물질로 전환되어 존재하기 때문에 benomyl 자체에 대해 분석하기보다는 carbendazim으로 가수분해시켜 추출, 정제과정을 거쳐 정량분석을 한 후 역으로 분자량을 환산하여 잔류도를 측정하고 있다.[1,5]

현재 benomyl에 대한 분석법은 외국의 경우 미국 환경청의 EPA Method-631,[6] 일본의 내분비계장애물질 분석법[7] 등이 확립되어 있다. 미국 환경청의 분석법은 액-액 추출법을 이용하여 추출을 한 후 산성하에서 약 16-24시간에 걸쳐 carbendazim으로 가수분해를 하여 HPLC UVD로 분석을 하게 되어 있다. 일본에서도 전처리는 액-액 추출법을 이용하나 carbendazim으로 가수분해시 미국 환경청과는 달리 짧은 시간을 필요로 하며 최종적으로 얻어진 carbendazim을 diazomethane으로 methylation을 하여 유도체화한 후에 GC/MS로 분석을 한다.[7]

Benomyl을 carbendazim으로 분해하여 정량함에 있어 좀더 명확한 전처리법의 확립이 필요하며, 미국 환경청의 HPLC UVD를 이용한 분석법의 경우 방해물질의 존재 시 정량함에 있어 오류를 발생시킬 여지가 있다. 일본의 유도체화를 통한 GC/MS법의 경우 carbendazim의 diazomethane에 의한 *N*-methylation은 화학적인 견지에서 볼 때 진행되기 매우 어려운 반응이므로 그 방법에 신뢰성을 갖기가 어려운 것이 사실이다. 이에 benomyl을 carbendazim으로 가수분해하여 분석함에 있어 방해물질의 존재에 의한 영향을 최소화하며 LL 검출한계를 낮출 수 있는 분석법의 개발이 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 LC/MS(TOF)를 이용하여 방해물질의 영향을 제거하며 동시에 검출한계를 낮추도록 하였고 이 방법을 이용하여 전국 각지 하천에서의 benomyl 농도를 조사하였다.

실험방법

기기 및 시약. Benomyl 분석에 사용된 기기는 HPLC(Varian 9012Q), 질량분석기(Micromass LCT)와 UV 검출기(Varian 9050 UVD)를 사용하였다. 이염화메탄, 메탄올은 잔류농약분석용을 사용하였으며 표준시약은 순도 99%의 benomyl과 carbendazim을 Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. LL 외 시약들은 특급시약을 사용하였고 질소 가스는 순도 99.999% 이상의 고순도 1급 질소를 사용하였다.

시료의 전처리 및 분석. 1 L의 삼각 플라스크에 500 mL의 시료를 넣은 후 7 mL의 1+1 황산과 magnetic stirrer를 넣고 약 20시간을 실온에서 교반시킨다. 10 N NaOH를 적가하여 시료의 pH를 7-8 정도로 조정한 후 1 L의 분액 깔때기에 넣고 80 mL의 methylene chloride를 가한다. 이 혼합물을 약 2분간 진탕하여 10분간에 걸쳐 두 층이 분리되도록 정치한 후 하층을 분리한다. 위의 추출을 4회 반복하고, 분리된 유기층은 모두 합한 뒤 무수 sodium sulfate로 충진된 drying column을 통과시킨 후 Kunderna-Danish(K-D) 농축기로 1 mL까지 농축시킨다. Column 및 플라스크를 여분의 메탄올로 닦은 후 질소를 불어넣어 최종 부피가

1 mL가 되도록 농축시킨다. 최종 농축된 시료는 30 cm×3.9 mm ID μ bondapak(10 μ) column을 사용하여 이동상(메탄올 : 물=1:1)을 0.8 mL/min의 유속으로 진행시키며 LC/MS(TOF)로 분리, 분석하였다. 여기서 MS에의 주입량은 splitter를 사용하여 1/12의 시료만이 들어가도록 조절하였다. 분석물질의 이온화는 electrospray법을 사용하였으며 검출이온(m/z)은 192.19(M+H)$^+$ 이온을 SIM(selected ion monitoring)로 정량분석하였으며 질량측정은 TOF(time of flight)법으로 하였다. UVD로 분석을 할 경우에는 EPA-631법에서 명시한 흡수파장인 254 nm 대신 최대 흡수파장인 286 nm에서 분석을 하여 MDL(method detection limit)을 낮추었다. GC/MS를 사용할 경우는 일본법에 나타난 조건을 그대로 사용하였으나 methylation을 위한 diazomethane의 합성시 Aldrich사의 Diazald kit를 사용하여 합성하였다.

결과 및 고찰

미국 환경청의 EPA-631에 의하면 수계 중 benomyl의 분석은 시료 150 mL를 취하여 최종 10 mL로 농축시키며 그때의 MDL은 8.7 μg/L 정도로 알려져 있다. 반면 일본법에 의하면 1 L의 시료를 취하여 건고시킨 후 최종 0.2 mL의 용매를 넣어 최종 부피를 결정하며 그때의 MDL은 약 0.1 μg/L으로 알려져 있다. 본 실험에서는 추출용매를 농축시켜야 하므로 편리를 위하여 최종부피를 1 mL로 하였고 MDL의 향상과 전처리 과정의 편리성 및 경제성을 모두 고려하여 시료는 500 mL를 사용하였다. 실제로 LC/UVD로 측정할 경우 MDL을 0.1 μg/L까지 낮출 수 있었다.

전처리 후 농축된 시료의 carbendazim 농도는 LC/MS(TOF)를 사용하여 m/z가 192.19(M+H)$^+$이온의 SIM chromatogram을 사용하여 분석하였다. Carbendazim 농도에 1.52(benomyl 분자량/carbendazim 분자량)를 곱한 값이 benomyl의 농도에 상당한다.[1,5]

검량선 작성 후 50 μg/L carbendazim 표준용액을 자체 제작하여 검량확인(calibration check)을 하였고 매 10개 시료를 측정한 후에 carbendazim 표준용액을 측정하여 기기의 안정성을 주기적으로 검토하였다. Warning level로는 2δ(표준편차), control level로는 3δ를 사용하였고 warning level을 연속 2회 초과하거나 control level을 초과할 경우 검량선을 재 작성하여 시료를 분석하였다.

Table 1. MDL Study for the Determination of Benomyl by LC/MS (TOF) Method

Sample Number	Area Count	Carbendazim Concentration (g/L)	Benomyl Concentration (g/L)
MDL1	72.8	0.026	0.039
MDL2	68.0	0.024	0.036
MDL3	65.2	0.022	0.034
MDL4	67.8	0.023	0.036
MDL5	69.2	0.024	0.036
MDL6	68.2	0.024	0.036
MDL7	68.6	0.024	0.036
Standard Deviation	2.262	0.0011	0.0017
MDL		0.0035	**0.0053**

*0.0304 μg/L of standard carbendazim solution was used for MDL study.

MDL 측정은 carbendazim을 0.0304 μg/L의 농도가 되도록 spike 한 7개의 시료를 측정하여 표준편차를 구하고 98% 신뢰도의 Student t 값인 3.14를 표준편차에 곱하여 계산하였다. *Table* 1에서 보는 바와 같이 LC/MS(TOF)로 측정한 benomyl의 MDL은 0.0053 μg/L으로 일본법에 비해 20배, 미국 EPA 법에 비하여는 약 1,600배의 낮은 값을 보이고 있다.

Spike 회수율을 측정하기 위하여 시료(500 mL)에 0.1, 0.2, 0.3 μg의 carbendazim을 각각 첨가한 후 동일한 전처리 과정을 거쳐 회수율을 측정하였다. 그 결과 각각 118, 80, 81%의 양호한 회수율을 보이고 있다(*Table* 2).

일본법에 따른 benomyl의 가수분해물인 carbendazim의 diazomethane에 의한 메틸화반응은 유기화학적 견지에서 볼 때 진행되기 어려운 반응으로 예측된다. 실제로 carbendazim 10 mg/L 표준용액을 diazomethane으로 처리하여 GC/MS로 확인한 결과 methyl carbendazim의 생성을 SIM으로는 확인할 수 있었으나 total ion 크로마토그램상으로는 그 peak을 확인할 수 없을 정도의 소량만이 생성됨을 알 수 있었다. 아마도 구조분석이 불가능한 여러 peak이 검출되는 것으로 보아 대부분의 carbendazim은 반응 중 혹은 GC column상에서 분해되며 methyl carbendazim은 약 1% 이하로 형성되는 것으로 예측된다.

미국 EPA-631법에 따라 LC/UVD로 측정할 경우 상당량의 시료에서 carbendazim과 같은 retention time을 보이는 peak이 검출되었으나 기타 방해 유기물질이

Table 2. The benomyl concentration in water samples

수계	Sample Number	Carbendazim Concentration (μg/L)	Benomyl Concentration (μg/L)	Recovery (%)		Sample Number	Carbendazim Concentration (μg/L)	Benomyl Concentration (μg/L)	Recovery (%)
한강	w-1	0.506	0.768		금강	w-23	0.078	0.117	
	w-2	1.861	2.829			w-24	0.019	0.028	
	w-3	0.466	0.707			w-25	0.066	0.100	
	w-4	ND	ND			w-26	0.101	0.153	
	w-5	0.029	0.044		영산강	w-27	0.024	0.035	
	w-5-s[1]	0.516	0.783	81.2		w-27-s[2]	0.346	0.526	80.5
	w-6	0.143	0.217			w-28	0.018	0.026	
	w-7	ND	ND			w-29	0.079	0.119	
	w-8	0.584	0.888			w-30	0.634	0.962	
	w-9	0.265	0.402			w-31	0.018	0.026	
	w-10	ND	ND			w-32	ND	ND	
낙동강	w-11	ND	ND		만경강	w-33	0.096	0.146	
	w-12	ND	ND			w-34	ND	ND	
	w-13	0.290	0.440		삽교천	w-35	0.076	0.115	
	w-14	ND	ND		태화강	w-36	0.212	0.323	
	w-15	0.153	0.232		양양남대천	w-37	0.089	0.135	
	w-16	0.157	0.238		섬진강	w-38	ND	ND	
	w-17	0.039	0.059			w-39	0.076	0.115	
	w-18	ND	ND		삼척	w-40	0.046	0.070	
	w-19	0.094	0.143		오십천	w-40-s[3]	0.283	0.430	118.5
	w-20	ND	ND		강릉남대천	w-41	ND	ND	
금강	w-21	ND	ND		안성천	w-42	0.678	1.030	
	w-22	0.054	0.082		경안천	w-43	0.042	0.064	

*1, 2, 3; 0.3, 0.2, 0.1 g of carbendazim was spiked to the 500 mL of samples for recovery test, respectively.

많은 관계로 다른 유기물에 의한 현상임을 배제할 수 없다. *Fig.* 2의 그림 A에서 보는 바와 같이 실제 수질 환경 시료의 경우 LC/UVD로 측정한 chromatogram은 peak의 형태가 넓은 시간대에 걸쳐 나타나는 특성을 보이고 있어 다른 방해물질에 의한 positive error의 가능성을 가지고 있을 뿐만 아니라 기타 불순물로 인한 base line의 불안정성도 보이고 있다. 반면 *Fig.* 2의 그림 B에서 보이는 LC/MS(TOF)의 SIM으로 측정한 결과는 모든 방해 물질 및 불순물에 의한 영향을 모두 제거하여 안정된 base line 및 높은 감도를 보이고 있다.

이에 따라 LC/MS(TOF)로 전국 13개 하천 43개 지점에서 수계중의 benomyl농도를 측정하였으며 0.02 μg/L 이하는 불검출(N.D.)로 처리한 결과 대략 70% 정도(30개 지역)가 benomyl에 의해 오염되었음을 알

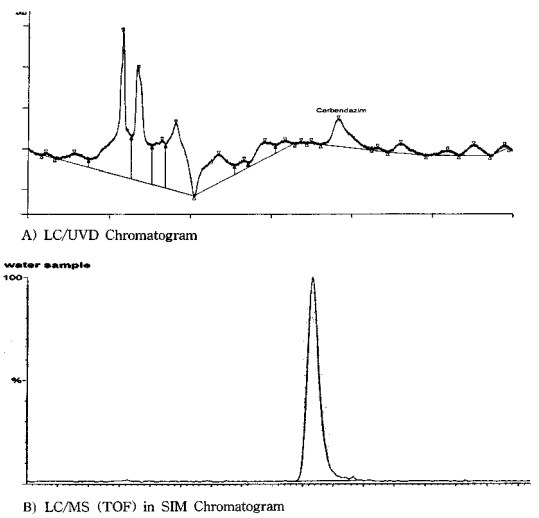

Fig. 2. Carbendazim chromatograms of w-29 sample taken by LC/UVD (A) and LC/MS (TOF) in SIM (B).

Table 3. The benomyl concentration in water samples determined by LC/MS (TOF) and LC/UVD

Sample Number	Determined by LC/MS (TOF)		Determined by LC/UVD		Differences between LC/MS (TOF) & LC/UVD (%)
	Carbendazim Concentration (μg/L)	Benomyl Concentration (μg/L)	Carbendazim Concentration (μg/L)	Benomyl Concentration (μg/L)	
w-15	0.153	0.232	0.244	0.371	59.3
w-17	0.039	0.059	0.102	0.156	160.4
w-19	0.094	0.143	0.113	0.172	20.3
w-22	0.054	0.083	0.187	0.284	242.9
w-23	0.078	0.117	0.208	0.316	168.2
w-24	0.019	0.028	0.097	0.148	423.3
w-26	0.101	0.153	0.121	0.184	19.7
w-29	0079	0.119	0.353	0.536	350.3

수가 있다(*Table* 2). 일반적인 식품에서의 허용치인 1 mg/L을 초과하는 시료는 없었으나 시료채취 시기는 9, 10월로서 농약의 주 살포기간이 아님을 고려할 때 국내 하천이 benomyl에 의해 상당히 지속적으로 오염이 되어 왔다고 생각할 수 있다.

위의 43개의 시료 중 benomyl이 포함된 것으로 확인된 시료 중 8개의 시료를 무작위로 추출하여 전처리 후 LC/UVD와 LC/MS(TOF)로 carbendazim을 정량 후 benomyl로 환산하였다(*Table* 3). 그 결과 LC/UVD에 의해 결정된 농도는 동일시료를 LC/MS(TOF)로 정량한 결과에 비해 최대 420%정도의 오차를 보이는 것으로 보아 LC/UVD에서는 방해물질에 의한 상당량의 error가 발생할 수 있음을 알 수 있다. 이 오차는 약 0.03에서 0.3 μg/L 정도로서 carbendazim의 농도에 무관하게 변화하고있다. 이것으로 보아 이 오차는 유기 방해물질에 의한 것임을 유추할 수 있다.

결 론

LC/MS(TOF)에 의한 benomyl 분석법은 일본 분석법이나 미국 EPA-631에 비해 월등히 낮은 MDL을 보여줄 뿐만 아니라 전처리법도 간단하다는 장점이 있다. 특히 미국 EPA-631의 LC/UVD에 의한 정량분석에는 방해물질에 의한 positive error가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과로 비추어 볼 때 정확한 분석을 위하여는 LC/MS를 이용한 정성, 정량 분석이 필수임을 알 수 있다. 더욱이 분리능과 용매절감효과가 큰 micro-HPLC를 결합하여 사용할 경우 더욱 경제적이고 향상된 분석결과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

본 연구는 2000년도 상지대학교 교내연구비와 한국과학재단 특정기초 연구(1999-2-309-005-5)의 일부 지원으로 수행되었으며 이에 감사한다.

인 용 문 헌

1. Liu, C. H.; Maltem, G.; Yu, X.; Rosenu, J. L. *Agri. Food. Chem.* **1990**, *38*, 167.
2. National Research Council. *Regulating Pesticides in Food, The Delaney Paradox*; National Academy Press: Washington, D.C., U.S.A., 1987; p 89.
3. Lim, J.; Miller, M. G. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1997**, *142*, 401.
4. Mallat, E.; Barelo, D.; Tauler, R. *Chromatographia* **1997**, *46*, 342.
5. Cano, P.; Plaza, J.; Munoz-Delgado, L. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 144.
6. U.S. EPA Analysis of Water, Method-631, 1998.
7. 국립환경연구원, *내분비계 장애물질의 측정방법* (Speed 98), 1999.
8. Choi, K.; Lee, H.; Lee, D.; Byun, W. *Anal. Sci. and Tech.* **1994**, *7*, 421.
9. Han, I.; Chai, J.; Lee, J.; Yeo, I. *Anal. Sci. and Tech.* **1994**, *7*, 395.