

LC/MS를 이용한 카바메이트계 잔류농약 확인방법

박준조¹, 금모래, 고광춘, 박병옥, 이성식

경기도축산위생연구소
(접수 2002. 2. 4, 게재승인 2002. 3. 23)

Confirmation of carbamate pesticides by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry

Jun-Jo Bark¹, Mo-Rae Keum, Kwahng-Choon Koh,
Byoung-Ok Park, Sung-Sik Lee

Gyeonggi Livestock and Veterinary Research Institute, Suwon, 441-460, Korea
(Received 4 February 2002, accepted in revised form 23 March 2002)

Abstract

A method was developed to separate, detect and qualify aldicarb, bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, methomyl, methiocarb, propoxur in meats and fruits. Experimental beef and fork samples were fortified with 0.05mg/kg of carbamate pesticides for analysis. Carbamate-detected pear by HPLC fluorescence detector(HPLC/FLS) are extracted with acetonitril and refined by solid phase extraction(SPE) filled with aminopropyl-bonded silica. In the following step, the injected materials into LC/MS are analyzed to result in the fact that bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, methomyl, methiocarb, propoxur presents several sorts of fraction ions following with; $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M-CONHCH_3]^+$, $[M-OCONHCH_3]^+$.

In addition, ethiofencarb presents $[M-SCH_2CH_3]^+$ ion distinctive and aldicarb presents $[M+Na]^+$ and $[M-OCONHCH_3]^+$ ion which is the most decisive fraction ion for pesticides such as bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, methiocarb, methomyl, propoxur excluding $[M+H]^+$ ion. However, $[M-OCONHCH_3]^+$ and $[M-OCONHCH_3]^+$ fraction ion charactering carbamate pesticides are detected most efficiently with fragment voltage 50eV.

As a result, for quantitative analysis, $[M+Na]^+$ ion is the most decisive ion for detection of

¹Corresponding author

Phone : 031-294-6763, Fax : 031-293-6392

E-mail : junjo01@kg21.net

aldicarb and $[M+H]^+$ ion is the most decisive fraction ion for pesticides such as bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, methiocarb, methomyl, propoxur. Carbaryl-detected pear by HPLC/FLS are analyzed by LC/MS and the result shows that $[M+H]^+$ and $[M-CONHCH_3]^+$ ions charactering carbaryl are detected.

Key words : Carbamate pesticides, Electrospray ionization mass spectrometry, Fraction ion

서 론

국민의 생활수준 향상으로 식품에 대한 안전성 확보와 환경오염 문제 그리고 농약의 유해성이 사회문제로 대두되고 있다. 농약은 생태학적인 측면에서 식품 또는 작물에 잔류되어 섭취하는 사람들에게 공포의 대상이 되기도 하지만 해충, 균류 및 잡초 등의 방제방법으로 가장 많이 사용하고 있다. 특히 카바메이트계 농약은 *N*-methylcarbamate를 잔존시킴으로서 acetylcholinesterase의 활성을 저해하여 살충 효과를 나타내고 다른 농약을 사용하여 쉽게 방제되지 않는 해충의 방제에 자주 이용되고 있으며¹⁾, 그 사용 범위가 넓어 생산이 꾸준히 증가하는 추세에 있다.

카바메이트계 농약을 분석하기 위하여 극성의 차이를 이용한 액체-액체 추출방법²⁾과 aminopropyl-bonded silica를 이용하여 추출·정제하는 solid phase extraction(SPE) 방법³⁾이 있으며, CO₂ 가스를 임계온도로 하여 시료를 추출하는 supercritical fluid extraction(SFE)법 등⁴⁾이 보고되어 있으며, 분석방법으로는 추출 용액을 유도체화하여 gas chromatography(GC)로 분석하는 방법⁵⁾이 있으며 카바메이트계 농약의 분자구조는 UV/VIS 흡광치가 낮아 저농도를 분석하기 어려워 methylamine으로 가수분해하고 o-phthaldehyde(OPA)로 유도체화하여 liquid chromatography(LC)의 형광검출기로 분석방법⁶⁾이 보고되어 있다.

그러나 GC 분석법은 추출과정과 유도체화하는 과정이 복잡한 단점이 있고 LC의 형광검출기 분석법은 두 개의 고압펌프로 가수분해 시약과 유도체시약을 송출하여 분석하므로 비교

적 간단한 유도체화 과정을 거치며 낮은 농도를 검출할 수 있는 장점은 있으나 methylamine으로 가수분해하는 과정에서 카바메이트계 농약이 분해되어 정성 및 분자구조를 확인하는데 어려움이 있다.

최근 liquid chromatography/mass selective detector(LC/MSD)의 급속한 발전으로 분석시료의 적용범위가 확대되고 다양한 물질을 검출할 수 있게 되었으며, 특히 미량의 카바메이트계 농약을 유도체화하지 않으면서 보다 선택적이고 고감도로 정성과 정량분석^{7,8)}이 가능하게 되었다. 그러나 LC/MS를 이용한 분석방법에 대한 국내의 보고자료가 거의 없는 실정에 있다.

따라서 본 연구는 카바메이트계 농약을 정성 분석 및 정량분석 할 수 있도록 LC/MS의 분석조건을 개발하고 식육중 카바메이트계 농약 잔류허용기준이 설정되어 있는 8종에 대한 분석방법을 확립하여 축산물 안전성 확보 및 국민보건향상에 기여하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 재료는 카바메이트계 농약이 잔류되어 있지 않은 쇠고기와 돼지고기를 채취하여 냉장보관하면서 실험할 때마다 표준용액을 첨가하여 실험하였으며, 액체크로마토그래피 형광검출기(HPLC/FLS)로 carbaryl이 검출된 배를 공시재료로 사용하였다.

추출 및 이동상으로 사용되는 시약중 methanol, acetonitril, deionized water는 HPLC grade(J T Baker, USA)를 사용하였으며, NaCl은 시약 특급을 사용하였다.

농약표준용액은 aldicarb, bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, methomyl, methiocarb, propoxur(Dr. Ehrenstorfer GmbH) 10mg을 100ml methanol에 용해하여 -20℃에 보관하고 실험할 때 마다 0.01~0.5µg/ml되게 methanol에 용해하여 사용하였다.

LC/MS 조건

카바메이트계 농약을 정성분석하기 위하여 LC펌프, 시료자동주입기, 질량분석기는 HP 1100 series(Hewlett Packard, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Hypersil BDS C₁₈(3.0µm, 125×2.0 mm)를 사용하였다. Data system은 Chemstation (Hewlett Packard, USA)을 사용하였으며 이동상은 초기에 물100%, 35분에 70% methanol을 0.3ml/min으로 gradient를 작성하였다.

Mass spectrophotometer의 분석조건은 mass range : 100~300amu, fragment voltage : 50V, polarity : positive, ionization mode : API-ES, nebulizer pressure : 30psi, dry gas flow 13 l /min, capillary voltage : 4,000V로 측정하였다.

재료의 추출

재료 20g을 취하여 acetonitril 100ml를 가하여 균질화 시킨 다음 여과하였고 여액에 NaCl 10g을 첨가하여 흔든 다음 acetonitril을 분리하기 위하여 정지하였다. 분리된 acetonitril 50ml를 취하여 hexane 20ml로 지방을 제거하고 air purge하면서 농축하여 1% methanol dichloromethan 2ml에 용해하였다. 미리 1% methanol dichloromethan 1ml로 활성화된 SPE-NH₂ 컬럼에 앞의 용액을 옮겨 1% methanol dichloromethane 4ml로 2회 용출하여 용출용액을 40℃에서 air purge하면서 농축하였다. 잔류물을 1 ml methanol로 용해하여 0.2µm filter로 여과하여 50µl를 LC/MS에 주입하였다.

결과 및 고찰

카바메이트 농약은 Fig 1의 구조와 같이 UV

흡광도를 나타내는 단말기가 없어 LC/MS로 동시분석하기 위하여 fragmentation voltage를 50eV로 하여 fragment ion을 측정한 결과 Fig 2와 같이 bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, methomyl, methiocarb, propoxur는 [M+H]⁺이온과 [M+Na]⁺ 이온이 존재하였으며 [M-R]⁺ 조각이온을 형성하였다. ethiofencarb는 [M-SCH₂CH₃]⁺ 이온이 특징적으로 나타났으며, aldicarb는 [M+Na]⁺ 이온과 [M-OCONHCH₃]⁺ 이온이 형성되었으나 [M+H]⁺ 이온은 형성되지 않은 것으로 나타났다. fragment voltage를 40V, 60V로 하였을 때도 [M+H]⁺ 이온은 형성되지 않았다.

따라서 aldicarb를 SIM mode로 정량할 때 [M+Na]⁺과 [M-OCONHCH₃]⁺ 이온으로 정량하는 것이 타당할 것으로 사료된다. 또 분자량과 1차 조각 이온의 질량대 전하비가 169로 같은 ethiofencarb와 methiocarb의 구별은 피크의 머무름시간과 ethiofencarb에서 [M-SCH₂CH₃]⁺와 [M-SCH₂CH₃-CONHCH₃]⁺ 이온이 형성되었으나 methiocarb는 [M+H]⁺와 [M-CONHCH₃]⁺ 이온의 차이로 구별할 수 있었다. 그리고 질량대전하비(m/z) 관계를 살펴보면 Table 1에서와 같이 [M+Na]⁺ 이온이 모든 carbamate 농약에서 나타나 Na와 쉽게 결합된 상태로 존재하고 있음을 알 수 있었으며 질량대전하비도 70~100%로 비교적 높게 나타나 실험실에서 Na나 K 이온으로부터 자유롭지 못하였다.

또 카바메이트계 농약의 특성을 나타낼 수 있는 [M-CONHCH₃]⁺ 또는 [M-OCONHCH₃]⁺ 이온은 fragmentation voltage를 40eV로 하였을 때 나타나지 않은 농약이 있었고 70eV로 높이면 [M+H]⁺ 이온이 너무 낮았으며 fragmentation voltage를 50eV로 하였을 때 [M-CONHCH₃]⁺ 또는 [M-OCONHCH₃]⁺ 이온이 5~100% 가지고 있어 가장 적당한 것으로 나타났다.

우리나라는 카바메이트 농약에 대한 잔류허용기준이 0.01~0.5mg/kg으로 설정되어 있어 소고기와 돼지고기에 카바메이트 농약 8종을 0.05mg/kg되게 첨가하여 재료의 추출방법에 따라 추출하여 LC/MS로 TIC와 aldicarb는

[M+Na]⁺ 이온으로, 다른 농약은 [M+H]⁺ 이온 EIC를 측정된 결과 Fig 3과 같이 methomyl을 제외하고 우수한 크로마토그램을 보여주고 있다.

LC/MSD의 mass range를 100~300amu로 하여 측정된 결과 Fig 4와 같이 [M+H]⁺와 [M+Na]⁺ 그리고 [M-CONHCH₃]⁺ 이온이 나타나 carbaryl을 확인할 수 있어 이 분석방법이 methomyl은 [M+Na]⁺ 이온의 질량대 전하비가

가장 크게 나타나 [M+H]⁺ 이온값이 낮게 나타난 것으로 사료된다. 또 carbaryl과 bendiocarb의 TIC가 겹쳐서 검출되어 먼저 정성분석으로 농약의 종류를 확인한 다음 EIC로 정량 분석하여야 할 것으로 판단된다.

또 HPLC/FLS로 분석하여 carbaryl이 0.213mg/kg 검출된 배를 확인 검사하기 위하여 카바메이트계 농약의 최종확인분석에 적합한 것으로 나타났다.

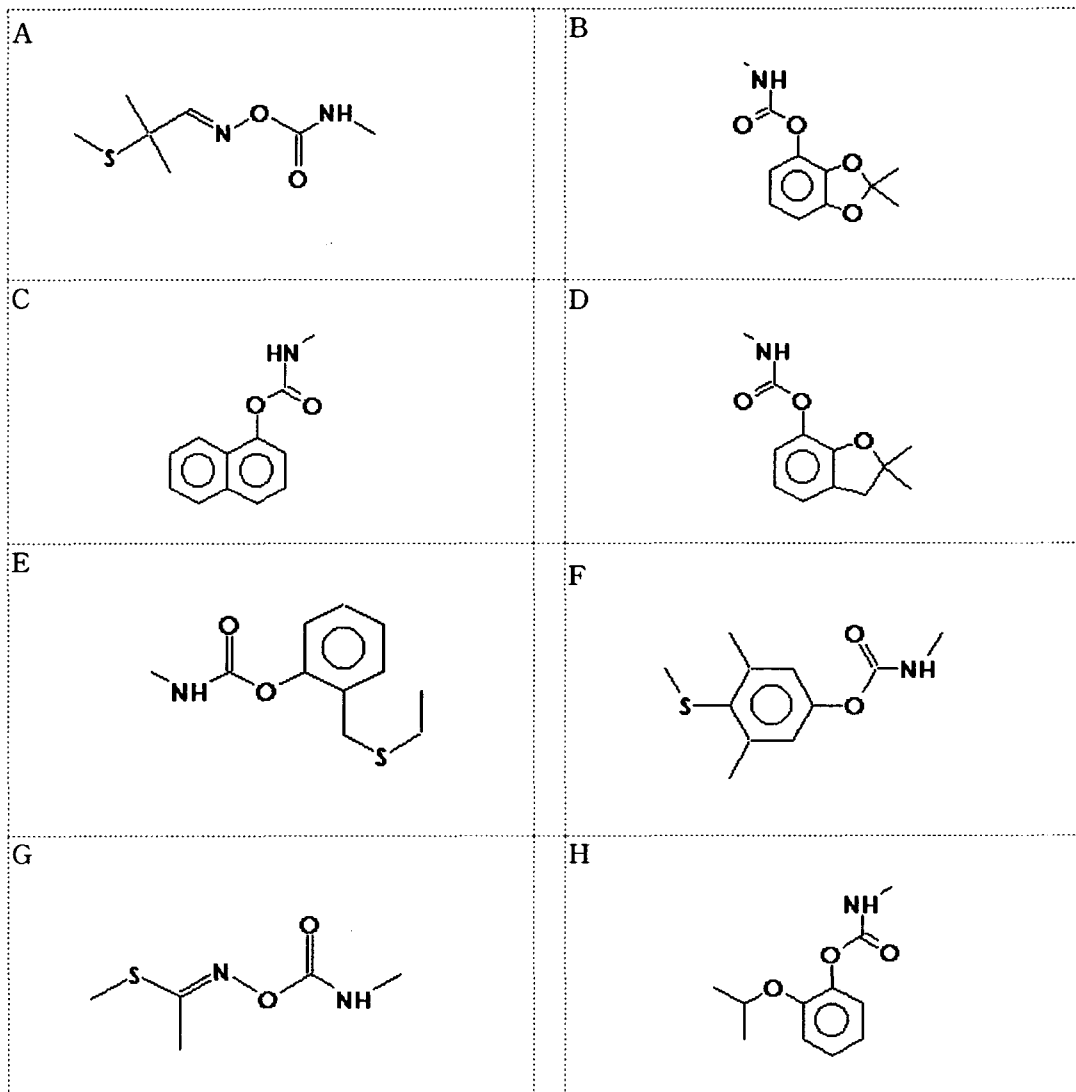


Fig 1. Molecular structure of aldicarb(A), bendiocarb(B), carbaryl(C), carbofuran(D), ethiofencarb(E), methiocarb(F), methomyl(G), propoxur(H).

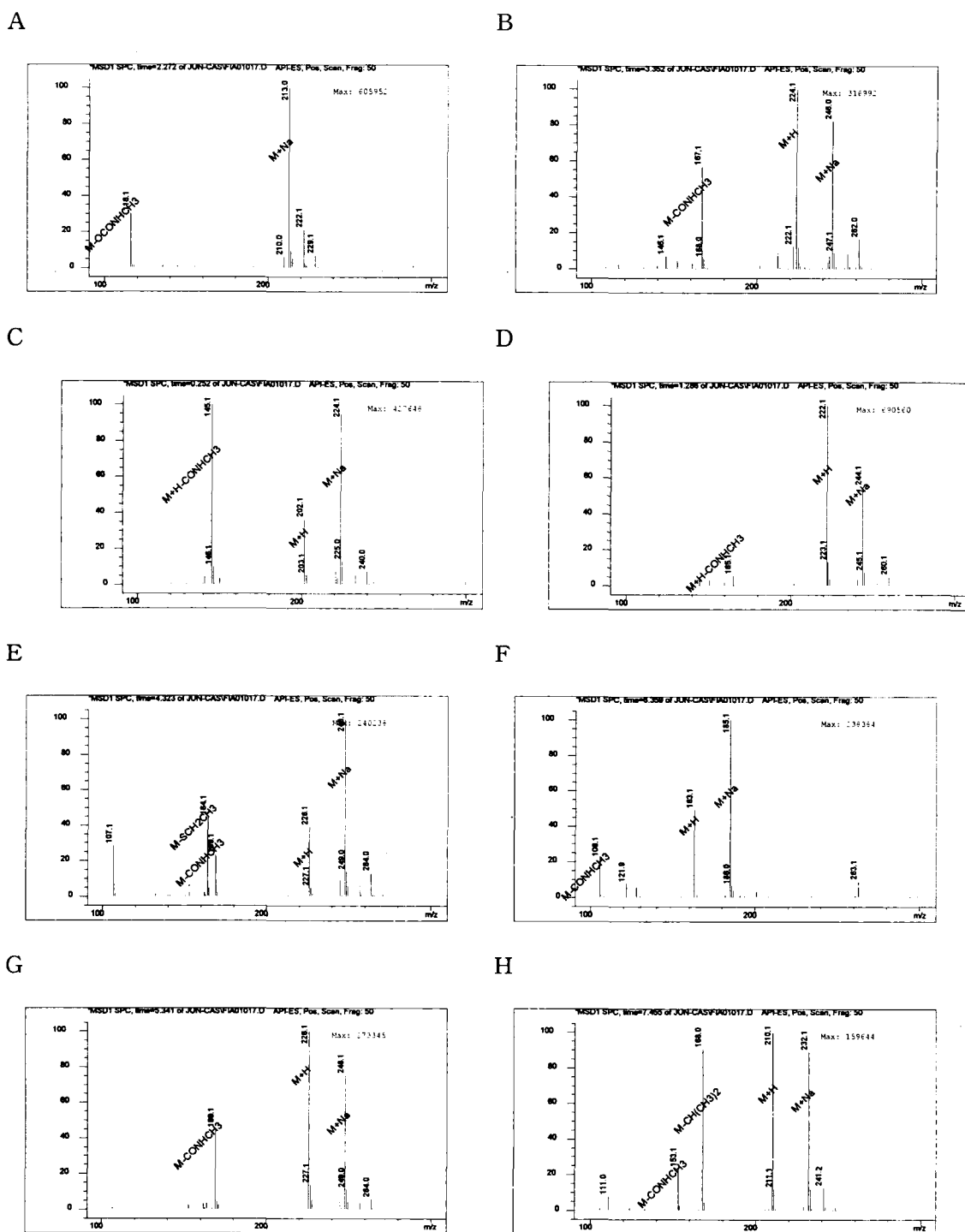


Fig 2. Ion monitoring mass spectra of aldicarb(A), bendiocarb(B), carbaryl(C), carbofuran(D), ethiofencarb(E), methiocarb(F), methomyl(G), and propoxur(H).

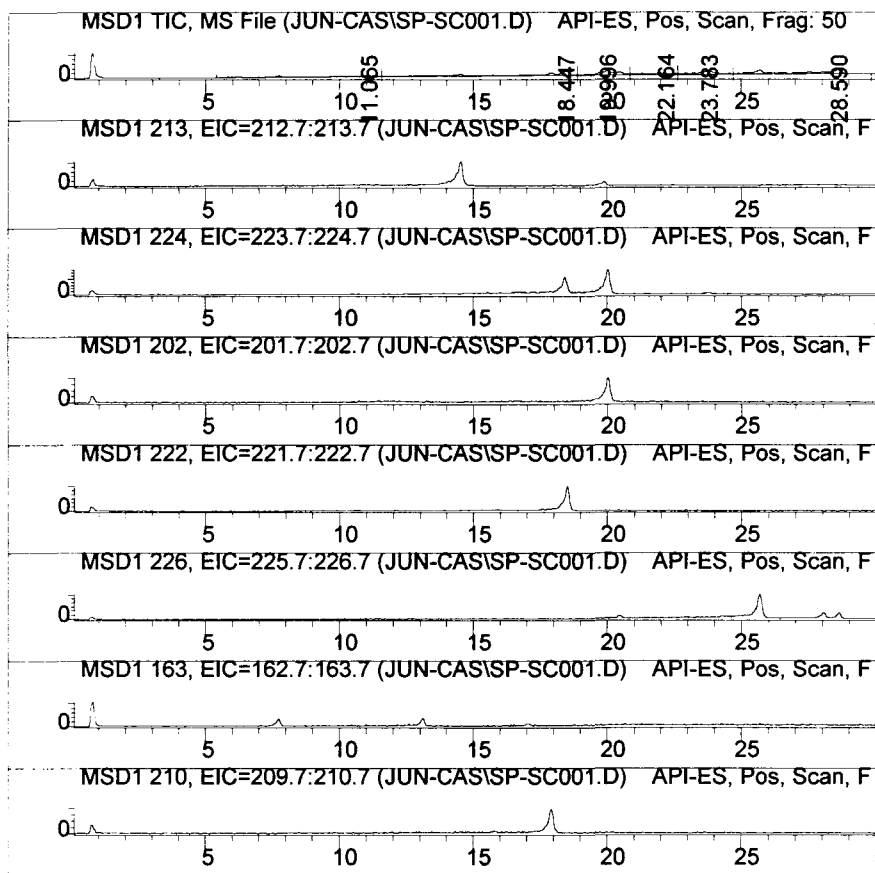


Fig 3. Total ion current(TIC) and each ion current(EIC) profiles relative to product ions of each cabamate pesticides resulting from analysis of muscle spiked with 0.05mg/kg.

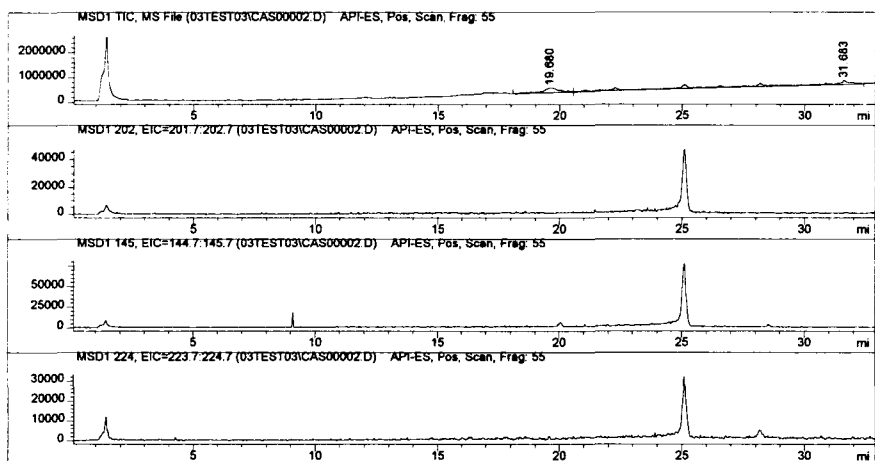


Fig 4. Total and fraction ion current profiles relative to product ions of pear containing 0.213mg/kg of the carbaryl.

Table 1. Mass spectra ion ratios of carbamate pesticides

| Name | m/z(%) | | |
|--------------|---|--------------------|---------------------|
| | [M-CONHCH ₃] ⁺ or [M-OCONHCH ₃] ⁺ | [M+H] ⁺ | [M+Na] ⁺ |
| aldicarb | 116 (30) | - | 213(100) |
| bendiocarb | 167 (60) | 224(100) | 246 (90) |
| carbaryl | 145(100) | 202 (40) | 224 (95) |
| carbofuran | 165 (5) | 222(100) | 244 (60) |
| ethiofencarb | 169 (20) | 226 (40) | 248(100) |
| methomyl | 106 (20) | 163 (40) | 185(100) |
| methiocarb | 169 (40) | 226(100) | 248 (70) |
| propoxur | 153 (20) | 210(100) | 232 (90) |

결 론

식육중 잔류허용기준이 설정되어 있는 카바메이트계 농약 8종을 소고기와 돼지고기에 첨가하여 acetonitril로 추출한 후 aminopropyl-bonded silica가 충전된 solid phase extraction (SPE)으로 정제, LC/MS에 주입하여 분석한 결과 bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, methomyl, methiocarb, propoxur는 [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [M-CONHCH₃]⁺과 [M-OCONHCH₃]⁺ 조각이온을 형성하였다. Ethiofencarb는 [M-SCH₂CH₃]⁺ 이온이 특징적으로 나타났으며 aldicarb는 [M+Na]⁺ 이온과 [M-OCONHCH₃]⁺ 이온이 형성되었으나 [M+H]⁺ 이온은 형성되지 않은 것으로 나타나 aldicarb는 [M+Na]⁺ 이온을, bendiocarb, carbaryl, carbofuran, ethiofencarb, methiocarb, methomyl, propoxur는 [M+H]⁺ 이온으로 정량분석하는 것이 가장 적당하였다. 카바메이트계 농약의 특성을 나타내는 조각이온으로 [M-CONHCH₃]⁺과 [M-OCONHCH₃]⁺ 조각이온은 5~100%로 fragmentation voltage를 50eV로 하였을 때 가장 좋은 결과를 얻었다. 또 HPLC/FLS로 monitoring 검사에서 carbaryl이 검출된 배를 LC/MS로 분석한 결과 [M+H]⁺와 [M-CONHCH₃]⁺ 이온이 확인되어 카바메이트 농약을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 박창규, 서용택, 이재구 등. 1994. 농약의 생화학과 사용법. 신일상사 제2권 : 164~190.
2. 한국식품공업협회. 2000. 식품공전 : 109~114.
3. de Kok A, Hiemstra M. 1992. Optimization, automation and validation of the solid-phase extraction cleanup and on-line liquid chromatographic determination of *N*-methylcarbamate pesticides in fruits and vegetables. *JAOAC* 75 : 1063~1072.
4. Terry AB, William HW, Jerome FD. 1994. Analysis of carbamate pesticides by packed column supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr Sci* 32 : 179~184.
5. Anunciacion EM, Francisco S, Angel Z. 1995. Simultaneous determination of carbaryl, chlorpyrifos, and its metabolite 3,5,6-trichloro-2-piridol(TCP) by derivative spectrophotometry. Direct determination of the degradation grade of a pesticide formulation by measurement of TCP. *J Agri Food Chem* 43 : 146~150.
6. Robert JA, Konstantin IE, Medina AI, et al. 1995. Determining propoxur and other carbamates in meat using HPLC fluorescence and gas chromatography/ion trap mass spectrometry after supercritical fluid extraction. *J Agri Food Chem* 43 : 2774~2778.
7. Bernard D, Dominique HP, Pascal S. 1996. Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. *JAOAC* 79 : 397~404.
8. Federica B, Roberta C, Antonio DC, et al. 2001. Solid phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of β -lactam antibiotics in bovine milk. *J Agri Food Chem* 49 : 3463~3470.