

GC/MS를 이용한 혈액 중 유기인제류 농약의 동시 분석에 관한 방법의 유효화

박미정, 양자열, 김기욱, 박유신, 정희선, 이상기*

국립과학수사연구소 법과학부

Method Validation for the Simultaneous Analysis of Organophosphorous Pesticides in Blood by GC/MS

Mee Jung Park, Ja Youl Yang, Ki Wook Kim, Yoo Shin Park,
Hee Sun Chung and Sang Ki Lee*

Forensic Science Department, National Institute of Scientific
Investigation, 331-1 Shinwol 7-dong, Yangchon-ku, Seoul, Korea 158-097

ABSTRACT

The purpose of this study was to provide the standard method for the analysis of organophosphorous pesticides such as chlorpyrifos, diazinon, malathion and parathion in blood. We performed method validation for these pesticides in blood according to EURACHEM (A focus For Analytical Chemistry in Europe) guide. For the analysis of the pesticides, we used solid-phase extraction column (Waters Oasis HLB®). After the extraction, the supernatants were evaporated to dryness under the nitrogen stream. They were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) after reconstituting with ethanol. Terbufos was used as an internal standard. To validate this method, we performed verification procedures with the following parameters : selectivity, linearity of calibration, accuracy, precision, limit of detection and quantification. Validation data according to Eurachem guide were adequate for our purpose for the analysis of chlorpyrifos, diazinon, malathion and parathion in blood.

Key words : organophosphorous pesticides, method validation, solid-phase extraction, GC/MS

서 론

유기인계 살충제는 농작물의 해충구제에 사용될 뿐만 아니라 인체에 대한 독성이 강하여 자·타살 및 사고사에 이용되는 빈도가 높다. 그 이유 중 하나로 이들 물질은 구입이 용이하며 취급에 대한

기준이 불명확하고 규제가 엄격하게 지켜지지 않기 때문이다. 살충제를 음독하여 사망하거나 치료 중인 환자에 대하여 음독한 살충제의 종류를 밝히는 것은 법과학적인 측면과 신속한 응급치료 면에서 중요한 문제이다.

혈액에서 유기인계 살충제의 확인 및 정량을 위해서는 액상추출 또는 고상추출이 일반적이다. 액상추출은 유기용매를 사용하므로 시험자에게 유해하며 혈액의 단백질들이 응고되어 추출 효율이 감소하는 단점이 있다. 고상추출은 유기용매가 적게

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: +82-2-2600-4925, Fax : +82-2-2600-4919
E-mail: skleedoc@nisi.go.kr

들며, 혈액에 존재하는 분석방해물질들을 쉽게 제거하는 장점이 있으며 (Frank *et al.*, 2000), 현재 여러 가지 제조사에서 만든 제품들이 있으므로, 화학물질의 특성에 따라 추출효율이 높은 것을 선택해야 한다.

유기인계 농약은 휘발성이 있으므로, solid-phase microextraction (SPME) 방법을 사용하여 확인하는 방법도 보고되어 왔다 (Goncalves G and Alpendurada, 2002; Kim *et al.*, 2003). 현재까지 고상추출 컬럼을 이용하여 유기인계 살충제의 확인 및 정량을 한 연구결과는 많이 보고되어 있지만, 대부분 토양, 물, 과일 또는 채소 등에 관한 것이며 (Hercegoва *et al.*, 2005; Mutavdzic *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005), 생체시료에서 이를 분석한 연구결과에 대한 보고는 전혀 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유기인계 살충제 중 사용이 많고 검출빈도가 높은 성분 즉, chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion을 선택하여 고상추출법을 이용하여 혈액 중 이들의 확인 및 정량방법에 대한 유효화를 시행하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

Chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion은 Chemservice사, 고상추출 컬럼은 Waters사의 Oasis HLB[®] 컬럼을 사용하였으며, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 표준용액의 조제

Chlorpyrifos, diazinon, malathion, parathion 및 terbufos는 100 µg/mL 메탄올 용액을 표준원액으로 하였으며 이를 희석한 10 µg/mL 메탄올 용액을 표준액으로 사용하였고, 사용하지 않을 때에는 -20°C에서 보관하였다.

3. 시료의 추출

약물이나 농약성분이 검출되지 않음을 GC/MS로 확인한 공시료 혈액 1 mL를 취하여 내부표준물질로 terbufos 250 ng/mL를 첨가한 후, 0.1 M phosphate buffered saline (pH = 7.0) 3 mL를 넣고 3,000 rpm에

서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 고상추출용 시료로 하였다. 고상추출용 컬럼을 메탄올 1 mL 및 증류수 1 mL로 활성화시킨 후 상압에서 시료를 증진하였다. 5% 메탄올 2 mL로 컬럼을 세척한 후 용출액은 2 mL 메탄올을 사용하였다. 용출된 액을 35°C 이하에서 질소농축한 후 잔사에 에탄올 100 µL를 가하고 이를 GC/MS 분석용 시료로 사용하였다.

4. 기기 및 분석조건

GC/MS는 HP 5973 MSD를 사용하였고 컬럼은 HP-5 MS (30 m × 0.25 mm I. D.)를 사용하였으며, 오븐 온도는 100°C에서 1분간 머무르고 290°C까지 분당 20°C씩 올린 후 10분간 유지하였다. Injector의 온도는 250°C이었으며 시료 1 µL를 주입하였다. Transfer line의 온도는 270°C이었으며 이온화 에너지는 70 eV이었다. 검출기는 Full scan mode를 이용하였다.

5. 시험방법의 유효화

1) 특수성 (Specificity, Selectivity)

혈액 자체의 성분, 색깔이나 산도 (pH) 등이 유기인계 농약 (chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion)의 분석 방법에 영향을 줄 수 있는지와 목적성분과 구조적인 유사성을 가지고 있어 추출 및 분석방법에서 방해물질로 작용할 수 있는 약물에 대한 간섭작용을 알기 위하여 공시료 혈액 1 mL를 취하여 동일한 시험방법에 의해 분석한 후 Bias (%)를 측정하였다. 간섭물질로는 EPN, phosphamidon, dichlorvos, fenitrothion, monocrotophos 등을 고농도인 1,500 ng/mL씩 첨가하였다.

2) 직선성 (Linearity)

공시료 혈액 1 mL에 각각 5~6개의 농도 (135~1,500 ng)를 첨가하여 시험을 실시한 후 대상약물의 면적비와 내부표준물질의 면적비의 비율을 이용하여 x축은 농도, y축은 면적비로 5개의 검량곡선을 작성하였다. 이들의 상관계수 R²이 1에서 벗어나는 정도, y절편 및 기울기가 95% 신뢰구간 (confidence intervals)에 적합함을 확인하였다.

3) 정확도 (Accuracy) 및 정밀도 (Precision)

시험에서 얻은 측정값과 참값의 근접성인 정확

도를 알아보기 위하여 공시료 혈액 1 mL에 chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion을 각각 250 ng/mL씩 첨가한 후 5회 시험하여 얻은 결과를 검량선에 적용하여 얻은 결과로 Bias (%)를 측정하였다. 정밀도를 확인하기 위하여 동일한 방법으로 실험한 후 CV (%)를 측정하였다.

4) 회수율 (Recovery)

250 ng/mL를 공시료 혈액에 첨가하여 5회 시험하여 얻은 결과로 측정값과 실제 함량에 대한 백분율을 구하여 회수율을 측정하였다.

5) 검출한계 및 정량한계 (LOD: Limit of Detection, LOQ: Limit of Quantification)

합리적인 통계적 확실성으로서 측정할 수 있는 최소한의 양 (LOD)과 검량선 상에서 최소한의 농도점보다 작거나 동일한 양으로서 정량치를 낼 수 있는 최소량 (LOQ)을 알기 위하여 시험을 실시하였다. 즉, chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion을 각각 0~110 ng/mL씩 공시료 혈액 5개에 첨가한 후 시험을 실시하여 5개 모두 양성인 나온 농도를 LOD로 설정하였다. LOQ로 추정되는 최저 농도를 공시료 혈액에 첨가한 후 실험하여 검량선에서 추정되는 최저농도와 일치하고 정밀도 (CV (%))와 정확도 (bias (%))가 각각 10% 이내 이었을 때 LOQ로 결정하였다.

결과 및 고찰

혈액에서 약물이나 농약성분의 추출을 위해서는

고상추출법이 보편적으로 이용되고 있다 (Walles *et al.*, 2004; Barroso *et al.*, 2005; Margalho *et al.*, 2005). 그 이유 중 하나로 혈액속의 단백질이나 지질 성분들이 액상 추출시에 방해물질로 작용하기 때문이다. 유기인계 농약은 대부분 산성에서 추출되며, 적합한 컬럼을 선정하기 위하여 여러 가지 제조사의 컬럼으로 회수율을 비교한 결과 Waters사에서 제조하는 Oasis HLB column이 가장 적합한 것을 확인할 수 있었다. 생체시료에서 살충제 성분의 확인 및 정량에 사용하는 기기로는 GC, HPLC, GC/MS 등이 일반적이다 (Sharma *et al.*, 1990; Luca *et al.*, 2002).

혈액 중 유기인계 살충제 분석방법의 유효화를 위한 시험 항목 및 방법으로는 Eurachem (A focus For Analytical Chemistry in Europe)에서 제공하는 가이드라인을 참조하여 실시하였다.

1. 유효화 결과

1) 특수성 (Specificity, Selectivity)

공시료 혈액에 chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion을 각각 250 또는 500 ng/mL씩 첨가하여 함량을 계산하였을 때 Bias (%)가 5개의 혈액에서 각각 12% 미만이었다 (Table 1). 공시료 혈액 자체의 chromatogram을 보면 혈액자체의 성분들은 분석에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 간섭물질에 대한 분석적인 방해작용을 확인하기 위하여 대상물질과 구조가 유사한 물질인 EPN, phosphamidon, dichlorvos, fenitrothion, methidathion

Table 1. Selectivity and interference of chlorpyrifos, diazinon, malathion and parathion

Item	Sample	Bias (%)			
		Chlorpyrifos	Diazinon	Malathion	Parathion
Selectivity	Blood 1	5.28	12.71	0.62	4.41
	Blood 2	6.61	10.41	3.66	4.41
	Blood 3	5.55	1.71	5.09	3.36
	Blood 4	1.89	9.92	6.70	6.38
	Blood 5	0.02	11.01	1.89	6.02
Interference	EPN	11.20	9.38	4.66	6.43
	Phosphamidon	3.21	8.91	1.52	2.40
	Dichlorvos	7.24	8.01	3.61	6.95
	Fenitrothion	0.02	1.09	6.45	5.88
	Monocroptophos	1.26	4.00	1.95	3.07

$$\text{Bias (\%)} = (\text{MV} - \text{NV}) / \text{NV} \times 100, \text{ MV} = \text{Mean value}, \text{ NV} = \text{Nominated value}$$

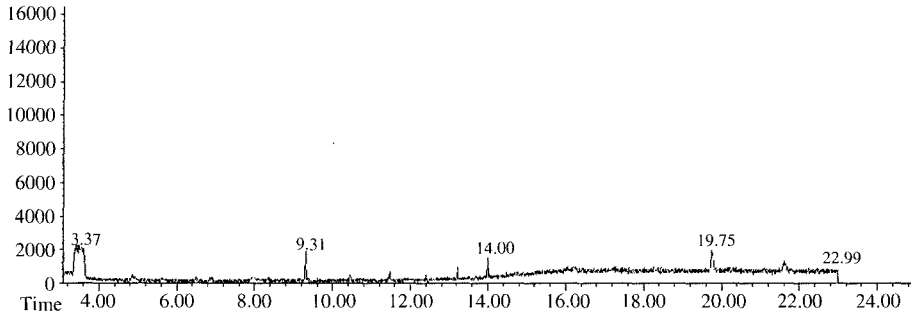


Fig. 1. Total ion chromatogram of blank blood in GC/MS.

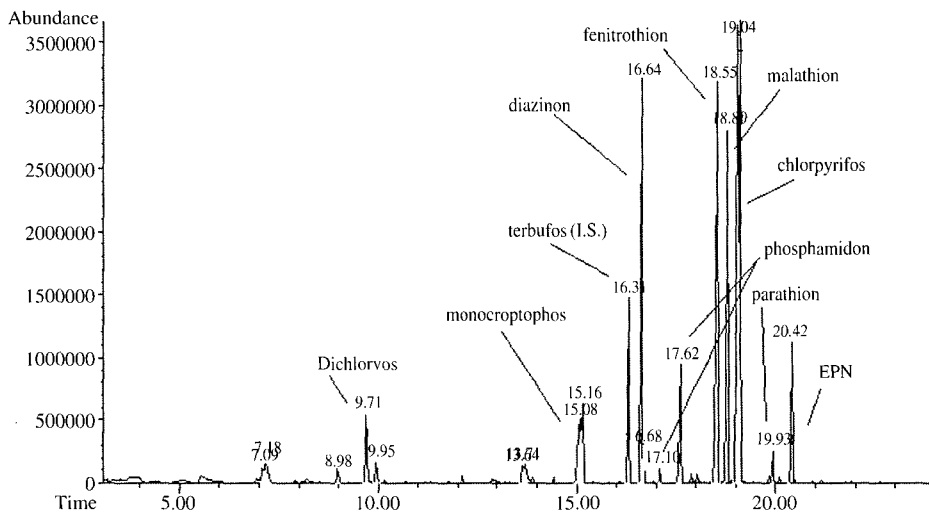


Fig. 2. Total ion chromatogram of target materials and interfering compound in GC/MS.

및 monocrotophos를 고농도로 첨가한 결과 이들 대상물질과 간섭물질은 머무름 시간과 mass spectrum이 구별되었으며 기지농도에 대한 Bias (%)가 12% 미만으로 시험에 영향을 미치지 않았다(Table 1, Fig. 2).

2) 직선성 (Linearity)

Chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion의 상관계수 R^2 은 0.99 이상이고, 95% 신뢰구간에서 각각의 기울기와 절편은 Table 2와 같았다. 즉, 135 ~ 1500 ng/mL까지 R^2 이 0.99 이상으로 직선성을 나타내었으며, 95% 신뢰구간에서, t -분포도를 계산하면 기울기 및 y 절편 평균값이 본 신뢰구간에 들어가므로 이상치가 없었다.

3) 정확도 (Accuracy) 및 정밀도 (Precision)

Chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion 모두에서 within run accuracy가 4.55 ~ 7.15%이었으며, between run accuracy에서는 0.07 ~ 6.37%이었다(Table 3). 같은 방법으로 측정된 결과 within run precision은 0.90 ~ 3.67%이었으며, between run precision은 1.87 ~ 11.0%이었다(Table 3).

4) 회수율 (Recovery)

Chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion을 5회 반복실험한 후의 회수율은 각각 92.9 ± 3.0 , 104.0 ± 2.9 , 99.3 ± 3.6 및 $91.4 \pm 0.8\%$ 이었다.

5) 검출한계 및 정량한계

4가지 농약성분을 각각 0 ~ 110 ng/mL씩 공시험

Table 2. Slope and y intercept of calibration curves of chlorpyrifos, diazinon, malathion and parathion (135 ~ 1,500 ng/mL)

Analytes	Slope (a)		y intercept (b)		R ²
	Best-fit value	95% CI	Best-fit value	95% CI	
Chlorpyrifos	-0.0686	-0.1855 ~ 0.04827	0.0009	0.00079 ~ 0.00093	0.9965
Diazinon	-0.0035	-0.0163 ~ 0.00927	0.0011	0.0011 ~ 0.00118	0.9981
Malathion	0.0081	-0.05829 ~ 0.074486	0.0018	0.001724 ~ 0.001836	0.9936
Parathion	-0.0435	-0.0544 ~ -0.03257	0.0009	0.0009 ~ 0.0009	0.9951

Confidence interval (CI) : mean \pm [t (df, $\alpha = 0.025$) \times SEM], df : degree of freedom (n-1), SEM : standard error

Table 3. Accuracy and precision of chlorpyrifos, diazinon, malathion and parathion

Analytes		Chlorpyrifos	Diazinon	Malathion	Parathion
Accuracy bias (%)	Within run (n=5)	7.15	5.51	4.55	6.93
	Between run (n=3)	6.37	0.07	6.04	5.93
Precision CV (%)	Within run (n=5)	3.26	2.80	3.67	0.90
	Between run (n=3)	11.0	2.32	1.87	4.66

Bias (%) = (MV - NV)/NV \times 100, MV = Mean value, NV = Nominated value, CV (%) = S.D/M \times 100, S.D : standard deviation, M: Mean

Table 4. Limit of detection (LOD) of chlorpyrifos, diazinon, malathion and parathion

Conc. (ng/mL)	No. of replicates	No. of positives/negatives			
		Chlorpyrifos	Diazinon	Malathion	Parathion
110	5	5/5	5/5	5/5	5/5
100	5	5/5	5/5	5/5	5/5
90	5	5/5	5/5	5/5	5/5
80	5	5/5	5/5	0/5	0/5
70	5	2/5	5/5	0/5	0/5
60	5	0/5	5/5	0/5	0/5
50	5	0/5	5/5	0/5	0/5
40	5	0/5	5/5	0/5	0/5
30	5	0/5	0/5	0/5	0/5
20	5	0/5	0/5	0/5	0/5

혈액 5개에 첨가한 후 시험을 실시하여 5개 모두 양성인 농도를 LOD로 설정하였다 (Table 4). LOQ로 추정되는 최저농도를 공시료 혈액에 첨가한 후 실험하여 검량선에서 추정되는 최저농도와 일치하고 정밀도 (precision, CV (%))와 정확도 (accuracy, bias (%))가 각각 10% 이내이었을 때 LOQ로 결정하였으며, 그 결과 chlorpyrifos는 150 ng/mL, diazinon은 150 ng/mL, malathion은 175 ng/mL, parathion은 130 ng/mL이었다.

결론

Chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion 0 ~ 110 ng/mL을 공시료 혈액 5개에 각각 첨가한 후 시험을 실시하여 5개 모두 양성인 농도를 LOD로 결정하였다. 시험 결과 40 ~ 90 ng/mL이었으며 LOQ는 130 ~ 175 ng/mL이었다. 대상물질과 유사한 구조를 가지는 유기인계 화합물 (phosphamidon, EPN, dichlorvos, fenitrothion, methidathion) 및 혈액의 성분이 대상화합물의 검출에 미치는 영향을 검토한 결과 특수성 및 선택성이 우수하였다. 직선성에 대한 시험 결과는 $R^2 > 0.99$ 이었고 기울기 및 y 절편은 95% 신뢰구간에서 벗어나지 않았다. 정밀도 및 정확도에 대한 실험결과 Bias (%) 및 CV (%)는 10% 미만이었으며 회수율도 90% 이상이었다. 이상과 같은 시험결과 혈액 중 chlorpyrifos, diazinon, malathion 및 parathion의 확인 및 정량에서 고상추출법에 따라 추출하고 GC/MS에 의하여 분석하는 상기 방법이 우수함을 알 수 있었다.

참고 문헌

김기욱, 양자열, 이수연, 이상기. HS-SPME를 이용한 생체 시료 중 유기인계류 농약의 동시분석, 국립과학수사연

- 구소 연보 2003; 35: 259–264.
- Barroso M, Gallardo E, Margalho C, Marques E, Vieira DN and Lopez-Rivadulla M. Determination of strychnine in human blood using solid-phase extraction and GC-EI-MS, *J Anal Toxicol* 2005; 29(5): 383–386.
- Frank M, Heike H and Burhard M. Simple determination of 22 organophosphorous pesticides in human blood using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric determination, *J Chromatogr Sci* 2002; 40: 29–34.
- Goncalves G and Alpendurada MF. Multiresidue method for the simultaneous determination of four groups of pesticides in ground and drinking waters, using solid-phase microextraction-gas chromatography with electron-capture and thermionic specific detection, *J Chromatogr A* 2002; 968: 177–190.
- Guide to Quality in Analytical Chemistry, An Aid to Accreditation. Eurachem (A focus For Analytical Chemistry in Europe), 2002.
- Hercegova A, Domotorova M, Matisova E, Kirchner M, Otrekala R and Stefuca V. Fast gas chromatography with solid phase extraction clean-up for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food, *J Chromatogr A* 2005; 1084(1–2): 46–53.
- Luca A, Francesco B, Anna S, Carollo DL and Lelio Z. Analysis of organophosphorus pesticides by gas chromatography-mass spectrometry with negative chemical ionization: a study on the ionization conditions, *Analytica Chimica Acta* 2002; 461: 97–108.
- Margalho C, de Boer D, Gallardo E, Barroso M and Vieira DN. Determination of furosemide in whole blood using SPE and GC-EI-MS, *J Anal Toxicol* 2005; 29(5): 309–313.
- Mutavdzic D, Horvat AJ, Babic S and Kastelan-Macan M. SPE-microwave-assisted extraction coupled system for the extraction of pesticides from water samples, *J Sep Sci* 2005; 28(13): 1485–1492.
- Sharma VK, Jadhav RK, Rao GJ, Saraf AK and Chandra H. High performance liquid chromatographic method for the analysis of organophosphorus and carbamate pesticides, *Forensic Sci Int* 1990; 48(1): 21–25.
- Walles M, Mullett WM and Pawliszyn J. Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A* 2004; 30: 85–92.
- Zhu X, Yang J, Su Q, Cai J and Gao Y. Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil samples, *J Chromatogr A* 2005; 1092(2): 161–169.