

ORIGINAL ARTICLE

LC/MS/MS를 이용한 유기인계 농약류의 최적 분석법 정립과 원·정수에서의 모니터링

김경아* · 송미정 · 염훈식 · 손희종 · 이상원 · 최진택
부산광역시 상수도사업본부 수질연구소

Development of Analytical Method and Monitoring of Organophosphorus Pesticides in the Raw Water and Clean Water by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Gyung-A Kim*, Mi-Jeong Song, Hoon-Sik Yeom, Hee-Jong Son, Sang-Won Lee,
Jin-Tack Choi

Water Quality Institute, Busan Water Authority, Gimhae 50804, Korea

Abstract

The analytical method for 16 organophosphorus pesticides was developed in this study. The 16 organophosphorus pesticides were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) using on-line solid phase extraction (on-line SPE) with PLRP- S cartridge. Analysis of all analytes in the MS/MS was processed in the electrospray ionization (ESI) positive mode. They are Azinphos ethyl, Chlorfenvinphos, Ethion, Fampur, Phosmet, Phosphamidon, Terbufos, Aspon, Chlorpyrifos-methyl, Crotoxyphos, Dichlofenthi-on, Dicrotophos, Fonofos, Thionazin, Dimethoate and Iprobenfos. Limits of detection (LODs) and Limits of quantification(LOQs) were obtained as 0.8~2.0 ng/L and 2.6~6.4 ng/L, respectively. All compounds were not detected at the 8 sampling points of the raw water and clean water.

Key words : Organophosphorus pesticides, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, On-line solid phase extraction, Electrospray ionization, Azinphos ethyl

1. 서론

오늘날 농약으로 인식되고 있는 유기합성물질들은 1930년대 후반부터 생산된 것으로 인류가 농약에 본격적으로 노출되기 시작한 것은 불과 수십년 밖에 되지 않는다. 또한 유해환경물질이 만성 건강영향을 유발하는데 일반적으로 수년에서 수십년의 긴 잠복기가 필요한 것을 고려할 때 인류에 대한 농약의 건강영향을 파악하는 것

은 최근에서야 본격적으로 가능해졌다고 할 수 있다. 그리고 농약 노출은 매우 광범위하여 농업이나 임업종사자 혹은 농약 사업장 근로자들과 같이 직업적 노출 뿐 아니라, 일반인들도 가정이나 공공장소에서 병해충 퇴치를 위해 살포되는 경우와 식수나 음식물 오염을 통해 환경적으로 노출되고 있다(Lee, 2011). 농촌진흥청의 2012년 자료에 의하면 국내 등록농약의 독성별 분류에서 맹독성 농약은 없으며, 고독성 12건(0.8%), 보통독성

Received 15 May, 2015; Revised 7 September, 2015;

Accepted 26 November, 2015

*Corresponding author : Gyung-A Kim, Water Quality Institute,
Busan Water Authority, Gimhae 50804, Korea
Phone: +82-51-669-4633
E-mail: rana@korea.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

182건(12.7%), 저독성 1,237건(86.4%)으로 분포되어 있으며, 맹독성 농약은 1992년부터 등록을 허용하지 않고 있다(Rural Development Administration(Nongjajae Management Division), 2012). 또한 국내 농약의 종류별 등록현황을 살펴보면 살균제 558건(34.5%), 살충제 468건(28.9%), 합제 54건(3.3%), 제초제 478건(29.6%), 생장조절제 50건(3.1%), 기타 9건(0.6%)로 분포되어 있다(Rural Development Administration(Pesticide Registration Search Service), 2014). 따라서 이러한 농약노출은 지표수를 원수로 사용하는 경우에도 예외일 수는 없을 것이다. 현재 먹는물 수질기준 중 농약항목으로 유기인계인 다이아지논, 파라티온, 페니트로티온의 3개와 카바메이트계인 카바릴 1개가 지정되어 있다. 원수에서의 농약 항목으로는 유기인이 있으며 이피엔, 파라티온, 메틸디메톤, 다이아지논, 펜토에이트가 포함된다.

현재 사용하고 있는 농약 중에서 가장 많은 종류가 유기인계 농약이며 1930년대 독일의 슈라더 등이 유기인계의 살충효과를 최초로 밝혔다. 유기인계 농약은 일반적으로 곤충의 신경에 작용하는 살충제로 현재 전체 살충제 소비량의 37%를 점유하고 있으며, 잔류성이 적고 체내에서 잘 분해되어 배출되는 반면 급성 농약중독 사고의 50%가 유기인계 농약으로 인한 것인 만큼 포유동물에 대한 급성독성은 매우 크다. 이는 인체 내 신경자극 전달 물질인 아세틸콜린을 분해하는 요소와 강력하게 결합하여 신경전달체계에 아세틸콜린이 분해되지 못하고 계속 쌓여 지속적인 신경흥분을 일으키기 때문이다(Sim et al., 2009). 유기인계 농약에 지속적으로 노출되면 기관지 수축으로 인한 가슴압박, 기관지 분비증대, 구토, 피로, 땀, 무력증, 경련 등의 증상이 나타날 수 있다. 그 밖에 여러 유기인계 농약들(Crotoxyphos, Dichlorvos, Famphur, Diazinon, Fonofos, Malathion, Phorate 등)이 백혈병, 비호즈킨림프종, 전립샘암 발생의 위험을 증가시키는 것으로 보고되었다(Lee, 2011).

한편, 시료의 잔류농약성분을 검출하기 위해서는 기체 크로마토그래피(Gas Chromatography, GC), 고성능액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC), 질량분석법(Mass Spectrometry, MS), GC/MS(Gas Chromatography/Mass Spectrometry), LC/MS(Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) 등의 분석법이 주로 사용되고 있으며 전처리

방법으로 액액 추출법(LLE : Liquid-Liquid Extraction) 과 고체상 추출법(SPE : Solid Phase Extraction) 등이 있다. 따라서 시료를 수백~수천배 농축하여 분석하는 이들 방법들은 증저가의 장비를 사용할 수 있는 장점이 있는 반면 전처리와 농축을 위한 시간이 길며 일정조건들을 유지하기 위한 숙련된 기술을 요하는 등 많은 노력들이 필요하다. 또한 전처리시 사용하는 용매로 인하여 분석자의 건강과 분석실 환경 등에 영향을 끼칠 수 있어 이러한 단점들을 개선하기 위한 방안으로 여러 기술들이 개발되고 있다. 전처리 방법들에는 고체상 미량추출법(SPME : Solid Phase Micro Extraction), 다성분 동시 신속정제법(QuEChERS : Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), On-line SPE 장치와 결합한 Direct injection법, 시료 농축이 없는 Direct injection법 등이 개발되어 분석에 응용되고 있다. GC/MS/MS, LC/MS/MS, GC/HRMS(Gas Chromatography /High Resolution Mass Spectrometry), Orbitrap MS 등의 분석기술들도 고가장비임에도 불구하고 질량분석기의 고감도로 인한 낮은 정량한계값과 높은 정확도 때문에 최근에 많이 사용되고 있다. 따라서 이들 기술들을 응용한 사례들을 살펴보면 다음과 같다. LLE-GC/MS/MS를 이용한 Sinha (2010)와 Sinha et al.(2011a)은 혈액시료에서 triazofos를 분석하여 LOD(Limit of detection) 0.351 ng/mL과 LOQ (Limit of quantification) 1.17 ng/mL의 분석법을 개발하였으며 설탕시료에서 농약류 11종을 분석하여 LOD 0.1 µg/kg의 결과를 얻었다고 보고하였다. Direct injection-LC/MS/MS를 응용한 사례로 Laura et al.(2008)이 물 시료(100 µL)에서 31종의 농약류에 대하여 LOD가 15 ng/L이하인 분석법을 보고하였으며 Thorsten et al. (2013)도 31개 지표수와 지하수의 150종 농약류 분석에서 LOD가 0.01~0.1 µg/L인 결과를 얻었다. Lutz and Kerstin(2008)는 먹는 물에서 Direct injection-LC/MS/MS로 300종의 농약류를 1.0 µL 까지 스크리닝하는데 성공하였다. Choi(2012)는 시료 1 mL에 대하여 On-line SPE 장치와 결합한 Direct injection-UPLC/Orbitrap MS를 적용하여 트리아진계 농약 9종에 대해 0.5~2.4 pg/mL의 LOD와 1.8~7.4 pg/mL의 LOQ를 발표하였다. Sinha et al.(2012)은 과일시료에서 QuEChERS-LC/MS/MS로 18종의 농약을 분석하여 0.002~0.087 ng/g의 LOD를 얻었다고 보고하였다. Anagnostopoulos

and Miliadis(2013)는 올리브 오일과 올리브시료의 32종 농약분석에 QuEChERS를 이용하여 GC/MS/MS와 LC/MS/MS로 분석한 결과 LOQ가 10 µg/kg인 분석법을 보고하였다. Sinha et al.(2011b)은 먹은물 시료를 동결건조시킨 후 LC/MS/MS를 이용하여 8종의 유기인계 농약의 분석법을 개발하였는데 LOD와 LOQ가 각각 4.9~51 ng/L, 16.5~171 ng/L를 얻었다. Choi and Kim (2010, 2011)은 자동화 SPE와 GC/HRMS를 적용하여 1 L의 수질시료에서 유기인계 농약 16종에 대해 2.2~11 ng/L의 LOD를 제시하였으며 수중 피레스로이드계 농약 8종에 대해서는 0.90~7.45 ng/L의 LOD를 보고하였다.

따라서 본 연구는 위 분석방법들 중에서 On-line SPE 장치와 결합한 Direct injection-LC/MS/MS를 적용하여 16종의 유기인계 농약에 대한 최적분석법을 정립하고 원·정수에서 검출현황을 모니터링하여 상수원수 및 정수의 수질관리를 위한 기초자료로 활용함을 목적으로 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 표준물질 및 시약

표준물질 중 14종(Azinphos ethyl, Chlorfenvinphos, Ethion, Famphur, Phosmet, Phosphamidon, Terbufos, Aspon, Chlorpyrifos-methyl, Crotoxyphos, Dichlofen-thion, Dicrotophos, Fonofos, Thionazin)은 Accustandards(New Haven, CT, USA)에서 2그룹으로 분리된 혼합표준원액(0.2 mg/mL in Hexane)을 구입하였고, Dimethoate와 Iprobenfos는 Accustandards(New Haven, CT, USA)에서 각각 100 µg/mL와 1,000 µg/mL (in Methanol)농도를 구입하여 사용하였다. 분석용매는 HPLC급의 Methanol과 Acetonitrile로 Merck 제품(Sigma Aldrich Chemical Co. USA)이었다. 5 M Ammonium formate와 Formic acid는 Supelco사(Bellefonte, PA, USA)에서 구입하였으며 탈이온수(Merck Milli-Q, Integral 5)로 희석하여 사용하였다. 모든 표준물질 원액과 표준용액, spiking 용액, 분석시료들은 4°C로 냉장 보관하여 사용하였다.

2.2. 채수시기 및 채수방법

분석용 원수와 정수 시료들은 2014년 6월, 11월, 12월에 각각 1회씩 총 3회 채수하였으며 각각 1 L씩 갈색 유리병에 담아서 냉장 운반하였다. 모든 분석에 이용된 원수의 시료들은 입자제거를 위하여 0.20 µm 멤브레인 여지(Millipore)를 이용하여 여과시켰다. 모든 정수 시료들은 잔류염소를 제거하기 위해 분석하기 전에 시료 1 L 당 아황산나트륨(Na₂SO₃, Sodium sulfite) 60 mg을 첨가하였다.

2.3. 기기분석방법

UHPLC 분석은 1260 Infinity ALS sampler와 1290 Infinity Bin binary pump가 장착되어 있는 1290 Infinity HPLC system (Agilent)에서 실시하였다. 시료 전처리에서 사용된 On-line SPE Cartridge는 PLRP-S 2.1 mm i.d. × 12.5 mm, 15~20 µm (Agilent)이다. Chromatography는 3개의 LC컬럼 조건에서 물질들의 abundance 값을 비교하여 LC컬럼을 선택하였다. 이동상은 Ammonium formate, Formic acid, Acetonitrile, Methanol을 이용하였으며 4가지 조건하에서 감도, 재현성 등을 비교하였다.

MS/MS 장비는 6490 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Agilent)가 사용되었다. 먼저 multiple reaction monitoring(MRM) 방법을 사용하기 위하여 Precursor ion과 Product ion을 구하였다. 각 물질들을 원활하게 분리하기 위하여 MRM transitions은 충분히 물질특성이 나타나도록 선택하였다. 대부분 물질들의 precursor ion은 표준물질의 분자에 [H]⁺이온이 결합된 [M+H]⁺의 형태로 나타났지만 Crotoxyphos은 이동상의 Ammonium formate(NH₄COOH)에서 기인한 [NH₄⁺] 이온과 Crotoxyphos가 결합된 [M+NH₄]⁺의 분자량 (m/z 332)으로 나타났다. 또한 Product ion의 Collision energy도 최적화되도록 설정하였다. 이때 MRM에서의 dwell time은 20 ms였다. 한편 최적화된 MRM을 기준으로 하여 분석방법을 dynamic multiple reaction monitoring(DMRM) 방법으로 변환시켰다. DMRM은 MRM과 달리 transition에 대한 dwell time을 독립적으로 설정할 수 없지만 감도를 높일 수 있는 장점이 있다. 최적화된 MRM에서 구해진 retention time (RT)을 DMRM 방법에서 똑같이 지정했고 dwell time은 자동

Table 1. Properties of compounds used in this study

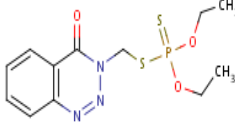
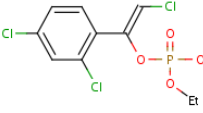
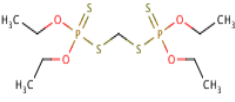
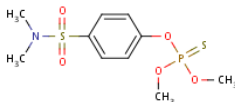
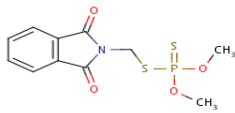
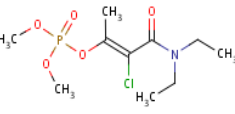
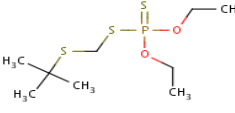
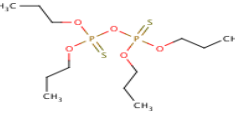
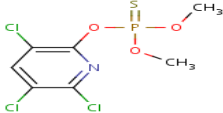
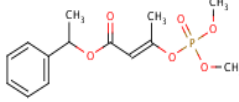
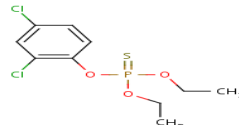
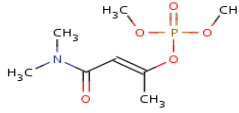
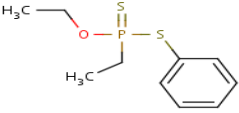
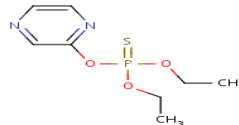
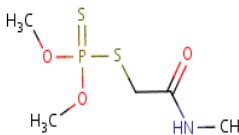
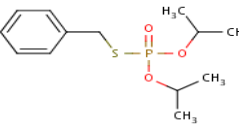
Compound	CAS Num.	Molecular Weight	Chemical Structure	Molecular Formula	Log K_{ow} ^a
Azinphos-ethyl	2642-71-9	345.38		$C_{12}H_{16}N_3O_3PS_2$	3.4
Chlorfenvinphos	470-90-6	359.57		$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	3.81
Ethion	563-12-2	384.48		$C_9H_{22}O_4P_2S_4$	5.07
Famphur	52-85-7	325.34		$C_{10}H_{16}NO_3PS_2$	2.23
Phosmet	732-11-6	317.32		$C_{11}H_{12}NO_4PS_2$	2.78
Phosphamidon	13171-21-6	299.69		$C_{10}H_{19}ClNO_3P$	0.79
Terbufos	13071-79-9	288.43		$C_9H_{21}O_2PS_3$	4.48
Aspon	3244-90-4	378.43		$C_{12}H_{28}O_5P_2S_2$	5.94

Table 1. Continued

Compound	CAS Num.	Molecular Weight	Chemical Structure	Molecular Formula	Log K _{ow} ^a
Chlorpyrifos-methyl	5598-13-0	322.53		C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	4.31
Crotoxyphos	7700-17-6	314.27		C ₁₄ H ₁₉ O ₆ P	3.3
Dichlofenthion	97-17-6	315.16		C ₁₀ H ₁₃ Cl ₂ O ₃ PS	5.14
Dicrotophos	141-66-2	237.19		C ₈ H ₁₆ NO ₅ P	-0.49
Fonofos	944-22-9	246.33		C ₁₀ H ₁₅ OPS ₂	3.94
Thionazin	297-97-2	248.24		C ₈ H ₁₃ N ₂ O ₃ PS	1.86
Dimethoate	60-51-5	229.26		C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	0.78
Iprobenfos	26087-47-8	288.35		C ₁₃ H ₂₁ O ₃ PS	3.34

※ a : <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>

K_{ow} : Hydrophobicity

설정되면서 확장되었다. 결국 MS/MS에서 모든 분석물 질들의 분석은 DMRM의 electrospray ionization (ESI) positive mode에서 행해졌으며 대부분 2개의 transitions 이 사용되었다. 최종적으로 DMRM 조건들을 Table 2에 나타내었다. Nebulizer gas는 Nitrogen이며 Nitrogen generator(GENIUS2 3010, PEAK Scientific)를 이용하였다. Collision gas는 질소분배의 Nitrogen(99.999%)을 사용하였다. LC/MS/MS의 상세한 분석조건은 Table 3에 제시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 기기분석조건 최적화

3.1.1. On-line SPE - Direct injection 방법 검토
먼저 1 $\mu\text{g/mL}$ (1 ppm)의 혼합표준용액 10 μL 을

On-line SPE Cartridge를 거치지 않은 상태로 direct injection 하여 LC/MS/MS의 적용여부를 검토하고 각 물질별 m/z ion값 및 peak area값을 확인하였다. 그리고 나서 On-line SPE Cartridge를 연결시켜 0.001 $\mu\text{g/mL}$ (1 ppb)의 혼합표준용액 900 μL 를 주입시켜 결과값을 살펴보았다. 이때 SPE Cartridge는 PLRP-S였으며 LC 컬럼은 Poroshell 120EC-C18을 사용하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 On-line SPE Cartridge를 통과하지 않은 1 ppm에서의 direct injection한 결과와 On-line SPE 장치와 결합한 direct injection한 1 ppb의 결과를 비교하였다. On-line SPE Cartridge를 통과하지 않은 1 ppm의 abundance값은 $7 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ 의 상당히 높은 값을 보였으며 On-line SPE 장치와 결합한 direct injection한 저농도의 1 ppb에서도 물질별로 차이가 있지만 대체로 $9 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 으로 감도가 높게 나타났다.

Table 2. Dynamic Multiple Reaction Monitoring(DMRM) conditions for each of the compounds tested

Compound	RT (min)	delta RT (min)	Precursor ion	Product ion(P ₁ /P ₂)	Collision energy E ₁ /E ₂ (V)	ESI mode
Azinphos ethyl	7.60	1.0	346.1	77.1 ^b /97.0	48/44	Positive
Chlorfenvinphos	7.68	1.0	358.9	155.0 ^b /99.2	8/28	Positive
Ethion	8.54	1.0	385.0	199.1 ^b /96.9	4/50	Positive
Famphur	7.06	1.16	326.1	217.0 ^b /93.0	16/32	Positive
Phosmet	7.20	1.0	318.0	133.0 ^b /160.0	40/8	Positive
Phosphamidon	5.89	0.9	300.0	127.1 ^b /174.1	20/8	Positive
Terbufos	7.60	1.0	289.1	97.0 ^b /233.0	32/4	Positive
Aspon	8.91	1.0	379.0	115.0 ^b /379.0	36/5	Positive
Chlorpyrifos-methyl	8.09	1.29	321.9	125.0 ^b /290.0	20/12	Positive
Crotoxyphos ^a	7.06	1.12	332.1	105.1 ^b /167.0	12/6	Positive
Dichlofenthion	8.53	1.12	315.1	258.8 ^b /286.9	12/4	Positive
Dicrotophos	4.99	1.09	238.0	112.1 ^b /72.0	8/24	Positive
Fonofos	8.03	1.0	247.0	109.0 ^b /137.0	16/4	Positive
Thionazin	6.96	1.0	249.0	97.0 ^b /193.0	24/8	Positive
Dimethoate	5.55	1.17	230.0	125.0 ^b /198.8	20/4	Positive
Iprobenfos	7.45	1.14	289.1	205.0 ^b /247.1	4/0	Positive

※ a : $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ used as the precursor ion.

b : Quantitative ion.

※ Cycle time : 300 ms.

Table 3. LC/MS/MS optimized conditions for selected compounds

UPLC Conditions		
Column	SPE Cartridge : PLRP-S, 2.1 mm i.d. × 12.5 mm, 15~20 μ m LC Column : Poroshell 120EC-C18, 18.3 mm × 50 mm, 2.7 μ m	
Column temperature	30 °C	
Sample temperature	5 °C	
Mobile phase	A = 5 mM Ammonium formate / 0.1% Formic acid in water B = 5 mM Ammonium formate / 0.1% Formic acid in 95% Acetonitrile / 5% water	
Flow rate	0.4 mL/min	
Gradient	Min	%B
	0	5
	2.6	5
	7.6	95
	9.1	95
	9.2	5
	13.0	5
	Stop time : 16 minutes Post time : off	
Injection volumes	900 μ L	
MS/MS Conditions		
Mode	Positive ESI	
Nebulizer	40 psi	
Sheath gas flow	12 L/min	
Sheath gas temperature	380 °C	
Capillary(V)	4,000 V	
Q1 resolution	Unit	
Q2 resolution	Unit	
Fragmentor voltage	380 V	
Collision energy	0~48 V	
Cell Accelerator voltage	5 V	
DMRM	Optimal conditions for each pesticide are summarized in Table 2	

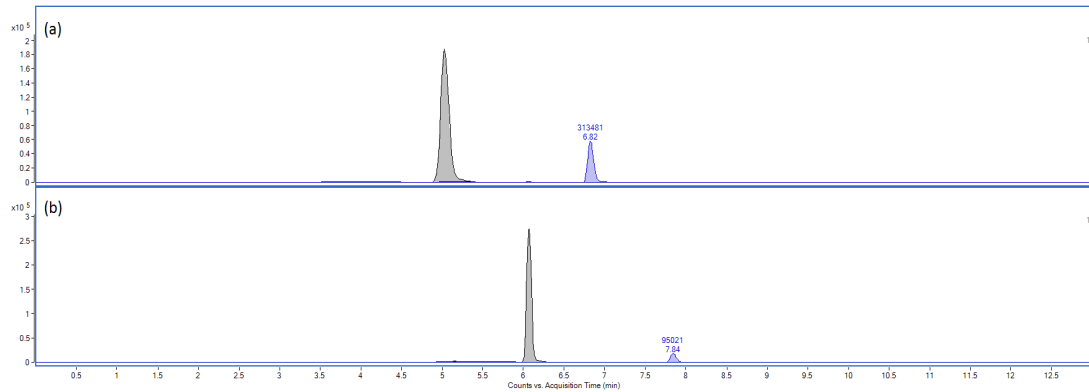


Fig. 1. Injection of 10 μL standard mixture at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for direct injection (black) - 10 ng on column and 900 μL of a standard mixture at 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by On-line SPE - direct injection (blue) - 0.9 ng on column. (a) Famphur, (b) Chlorpyrifos-methyl.

따라서 Fig. 1의 Chromatogram에서 보는 바와 같이 1ppb의 900 μL 주입했을 때 1 ppm의 10 μL 주입(실제 주입량 = 10 ng) 대비 실제 주입량은 약 1/10 정도로 적지만 1 ppm abundance값의 약 8~37%로 양호한 결과값을 보였으며 abundance값도 최저 9×10^4 로 나타났다. 따라서 On-line SPE 장치와 결합한 direct injection-LC/MS/MS 방법으로 분석이 가능함을 확인하였으며 시료의 주입량을 900 μL 로 정하였다.

3.1.2. LC 컬럼 분석비교

최적의 LC용 컬럼을 찾기 위하여 3가지 종류의 컬럼으로 분석물질들의 abundance값을 비교하였다. 컬럼과 flow rate 조건은 다음과 같다. (1) flow rate 0.4 mL/min에서 Poroshell 120EC-C18, 18.3 mm i.d. \times 50 mm, Particle size 2.7 μm (Agilent), (2) flow rate 0.3 mL/min에서 ZOBAX Eclipse C18, 2.1 mm i.d. \times 50 mm, Particle size 1.8 μm (Agilent), (3) flow rate 0.4 mL/min에서 ZOBAX Extend C18, 2.1 mm i.d. \times 100 mm, Particle size 3.5 μm (Agilent)이다. SPE Cartridge는 PLRP-S이다. 이동상의 Solvent A는 Table 3의 조건과 같으며 solvent B는 100% Acetonitrile을 사용하였다. 시료 농도는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1ppm)이며 주입량은 10 μL 이다. 분석시간을 단축시키기 위하여 On-line SPE Cartridge를 거치지 않은 direct injection 방법을 사용하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 Poroshell 120EC-C18의 abundance값이 가장 양호하게 나타났다. ZOBAX

Eclipse C18와 ZOBAX Extend C18는 Fig. 2에서 제시한 물질들로 Poroshell 120EC-C18과 abundance값을 비교했을 때 평균적으로 각각 98%(49~112%)와 81%(54~131%)에 해당하는 값을 확인할 수 있었다. 따라서 컬럼 선택은 Poroshell 120EC-C18로 정하였다.

3.1.3. LC 이동상의 분석조건 최적화

먼저 flow rate은 0.4 mL/min, SPE Cartridge는 PLRP-S이며 Poroshell 120EC-C18 컬럼 조건에서 이동상의 Solvent A(5 mM Ammonium formate + 0.1% Formic acid in water)의 조건을 동일하게 하고 solvent B를 3가지 다른 조건으로 시도하여 감도를 비교하였다. 즉 3가지 조건은 (a) 100% Methanol, (b) 100% Acetonitrile, (c) 50% Methanol + 50% Acetonitrile이다. 이때 시료 농도는 1 ppb이며 주입량은 900 μL 이다. 분석방법은 On-line SPE - direct injection으로 하였다. (a)의 100% Methanol 경우는 (b)와 (c)의 경우에 비해 peak 분리가 원활하게 이루어지지 않았으며 peak 모양이 매우 broad한 형태를 띠었다. 반면 (b)와 (c)의 결과에서는 peak 분리가 매우 양호하였으며 peak 모양도 sharp하게 나타났다. Fig. 3의 결과를 살펴보면 100% Methanol의 경우는 abundance값이 가장 높은 결과를 보였다. 하지만 peak 모양이 broad하게 나타나고 peak 분리가 제대로 이루어지지 않아서 용매조건에서 배제하였다. (b)와 (c)의 경우는 abundance값이 105 정도로서 목적물질 중 상대적으로 감도가 낮은 일부 물질들을 비

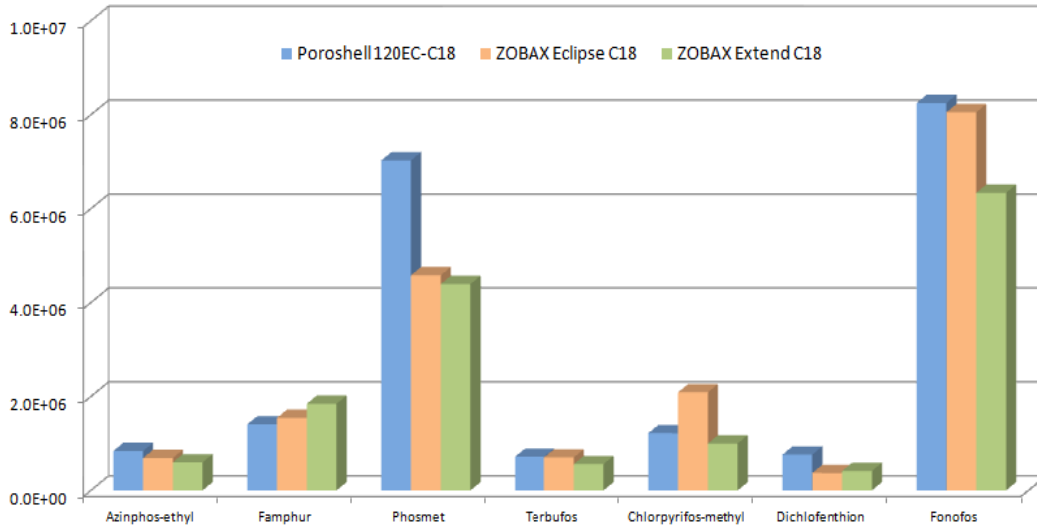


Fig. 2. Sensitivity Comparison of the three LC columns.

교하였는데 (b)의 경우가 (c)에 비해 약 1.6배 높은 abundance값을 확인할 수 있었다. 따라서 Solvent A는 5 mM Ammonium formate, 0.1% Formic acid, water 이며 solvent B는 100% Acetonitrile로 이동상의 조건을 정했다. 하지만 이러한 용매조건이 재현성 테스트를 한 결과 RT가 낮은 일부 물질들에서 재현성이 양호하지

못한 결과로 나타났다.(10 ng/L, 5회 반복, rsd=1.9~40.0%). 아마도 solvent gradient 과정 중 solvent B (100% Acetonitrile)가 95%로 바뀌는 단계에서 pH 조절 등이 적절하지 못하여 나타난 결과인 것으로 추정된다. 그러므로 solvent B의 조건을 5 mM Ammonium formate + 0.1% Formic acid in 95% Acetonitrile/5%

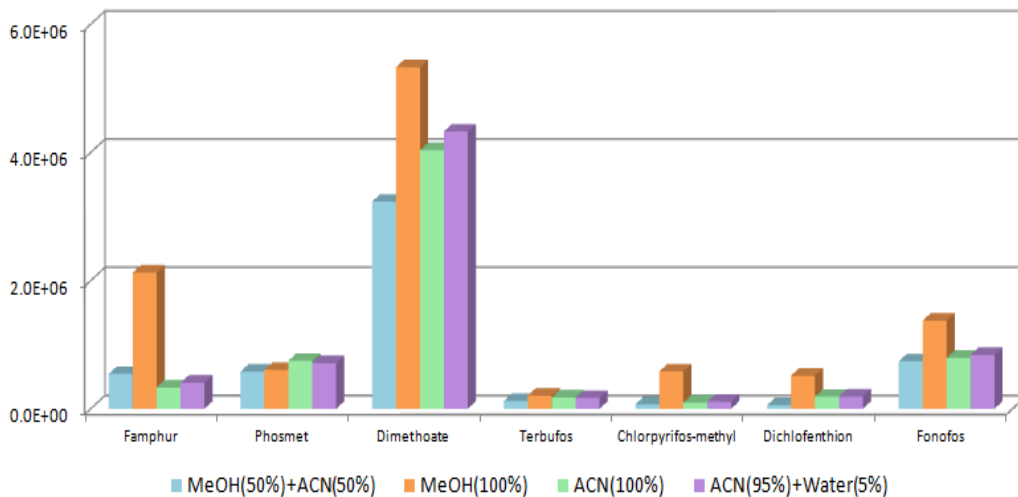


Fig. 3. Sensitivity Comparison of the (a) 100% Methanol, (b) 100% Acetonitrile, (c) 50% Methanol + 50% Acetonitrile and (d) 5 mM Ammonium formate + 0.1% Formic acid in 95% Acetonitrile/5% water.

water로 다시 변경하여 재현성 검사를 한 결과 개선된 결과값을 확인할 수 있었다(10 ng/L, 5회 반복, rsd=0.9~9.3%). 또한 Fig. 3에서 보는 바와 같이 100% Acetonitrile과 완충용액을 추가한 (d) 이동상 조건의 분석감도는 거의 비슷하였다. 따라서 최종 solvent B의 조건은 완충용액이 추가된 (d) 이동상 조건으로 확정하였고 Table 3에 Solvent gradient 조건을 상세하게 나타내었다. 이때 flow rate 0.4 mL/min, column temperature 30 °C, sample temperature 5 °C를 유지하였고 injection volume은 900 µL이다. 분석시간은 16분이었다.

3.2. 시험방법에 대한 유효성 평가

3.2.1. 검량선 작성

조사물질 16종에 대하여 외부표준법 (external standard method)으로 검량선을 작성하였다. 농도가 2.0 mg/mL인 표준원액을 탈이온수로 희석하여 검정곡선 작성용 표준액을 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0, 200.0, 500.0 ng/L의 농도로 제조하였다. 탈이온수에서 목적물질들이 검출되지 않는 것을 확인하였다. 7개 point의 검량선은 상관계수(r²)가 0.9973~0.9999로 직선성이 좋게 나타났다. 자세한 내용은 Table 4에 제시하였다. 또한 목적성분 16종의 TIC(total ion chromatogram)를 Fig. 4에 나타내었다.

3.2.2. 검출한계와 정량한계

분석방법의 검출한계와 정량한계를 평가하기 위하여 표준용액을 탈이온수에 희석하여 극미량 농도(10 ng/L)의 표준시료를 제조하였다. 제조된 표준시료를 LC/MS

/MS 분석조건을 이용하여 7회 반복 분석하여 7개의 측정값을 얻었고 이들 측정값의 표준편차를 이용하여 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 구하였다. 검출한계(LOD)는 측정값의 표준편차에 3.14를 곱하여 산출하였으며 정량한계(LOQ)는 표준편차의 10배에 해당하는 값으로 정하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 신뢰구간 99% 범위에서 검출한계(LOD)는 0.8~2.0 ng/L였으며, 정량한계(LOQ)는 2.6~6.4 ng/L였다. 정밀도는 상대표준편차(Relative Standard Deviation : RSD)로 2.2~6.2% 범위를 보였다. 앞서 언급했듯이 Choi(2012)는 시료 1 mL에 대하여 On-line SPE 장치와 결합한 Direct injection-UPLC-Orbitrap MS를 적용하여 트리아진계 농약 9종에 대해 0.5~2.4 pg/mL의 LOD와 1.8~7.4 pg/mL의 LOQ를 발표하였는데 본 연구에서는 유기인계 농약류 16종에 대해 분석했지만 LOD와 LOQ의 결과는 비슷하게 나타났다. 또한 Choi and Kim(2010)은 자동화 SPE와 GC/HRMS를 적용하여 1 L의 수질시료에서 유기인계 농약 16종에 대해 2.2~11 ng/L의 LOD를 제시하였는데 Terbufos와 Iprobenfos의 경우 Choi and Kim(2010)은 LOD가 각각 6.5 ng/L와 7.0 ng/L이었으나 본 연구에서는 시료량 900 µL에 대해 Table 4와 같이 각각 5.9 ng/L와 2.6 ng/L의 결과를 보여 적은 시료량을 사용하면서도 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구 방법은 적은 시료량을 사용하면서도 LC에서 시료 loop에 의한 일정한 부피 조절과 Flexible cube에 의한 On-line SPE Cartridge 사용으로 전처리 시간 단축 및 시료의 일정한 농축량을 유지함으로써 컬럼에 흡착되는

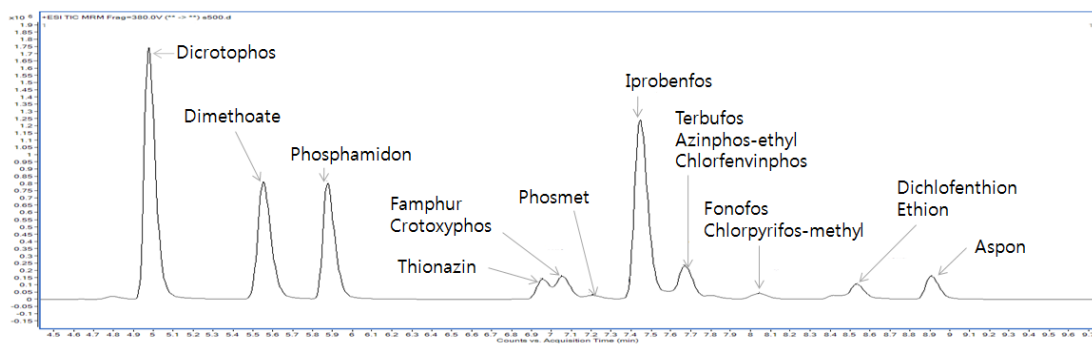


Fig. 4. LC/MS/MS total ion chromatogram of 16 pesticides at highest standard level 500 ng/L and retention times are shown in Table 3.

Table 4. Analytical parameters of 16 pesticide compounds in the study

Compound	LOD(ng/L)	LOQ(ng/L)	RSD(%)	Linear range(ng/L)	Correction coefficient (r ²)
Azinphos-ethyl	1.0	3.1	3.3	1-500	0.9998
Chlorfenvinphos	1.3	4.1	3.6	1-500	0.9998
Ethion	1.4	4.6	3.0	1-500	0.9995
Famphur	1.7	5.4	4.1	1-500	0.9996
Phosmet	2.0	6.4	6.2	1-500	0.9994
Phosphamidon	0.9	2.9	2.3	1-500	0.9993
Terbufos	1.8	5.9	4.4	1-500	0.9999
Aspon	1.2	3.7	3.7	1-500	0.9987
Chlorpyrifos-methyl	1.2	3.7	2.3	1-500	0.9973
Crotoxyphos ^a	1.7	5.6	4.8	1-500	0.9999
Dichlofenthion	1.6	5.1	4.0	1-500	0.9995
Dicrotophos	1.1	3.6	3.7	1-500	0.9997
Fonofos	1.6	5.2	3.9	1-500	0.9975
Thionazin	1.8	5.6	5.6	1-500	0.9996
Dimethoate	1.7	5.4	4.8	1-500	0.9986
Irobenfos	0.8	2.6	2.2	1-500	0.9999

양이 일정하게 되어 반복 측정에도 높은 재현성을 보임으로써 낮은 검출한계값과 정량한계값을 구할 수 있었던 것으로 판단된다.

3.2.3. 정확도와 정밀도

본 연구에서 확립된 분석방법의 신뢰도 검증을 위하여 극미량의 유기인계 농약류를 주입한 시료의 정확도(accuracy, % 회수율)와 정밀도(precision, RSD)를 조사하고 그 결과를 Table 5에 요약하였다. 이때 사용된 시료는 덕산정수와 매리원수이며 농도가 각각 50 ng/L과 200 ng/L이 되도록 유기인계 농약류 표준용액을 spiking하여 분석할 시료를 조제하였다. 또한 신뢰도 검증에 사용된 시료들의 blank값(background concentration)을 확인한 결과 분석 대상물질들은 모두 불검출이었다. 따라서 Table 5에서 보듯이 덕산정수의 경우, 정확도는 50 ng/L에서는 77.8~95.5%, 200 ng/L에서는 78.4~96.3%였으며 매리원수는 각각 76.4~109.4%(50 ng/L),

78.2~97.1%(200 ng/L)로 나타나 모두 양호한 결과값을 보였다. 정밀도를 나타내는 상대표준편차는 0.5~15.7%로 본 분석법과 유사한 USEPA Method 535(2005) 기준을 모두 만족하였다. 참고로 USEPA Method 535(2005)에서 정확도는 참값의 $\pm 30\%$ 이내, 정밀도는 $\pm 20\%$ 이내로 지정되어 있다. 정확도는 해당 표준물질을 첨가한 시료를 분석한 농도와 첨가하지 않은 시료의 분석농도와의 차이를 첨가 농도의 상대백분율로 구했다. 정밀도는 반복 시험하여 얻은 결과를 상대표준편차로 나타낸 것으로 본 연구에서는 연속 4회 측정된 결과의 평균값을 표준편차의 상대백분율로 구하였다(Ministry of Environment Notice, 2013). 또한 Matrix effects 측면에서도 Table 5에서 보듯이 정수와 원수에서의 % 회수율과 재현성(RSD)을 고려해 볼 때 Matrix로 인한 영향은 적은 것으로 사료되었다.

Table 5. Accuracy and precision data obtained in 4 replicates in mineral water (50~200 ng/L)

Compound	Spiked conc. of tap water ^a				Spiked conc. of river water ^b			
	50 ng/L		200 ng/L		50 ng/L		200 ng/L	
	Accuracy (%recovery)	Precision (RSD)	Accuracy (%recovery)	Precision (RSD)	Accuracy (%recovery)	Precision (RSD)	Accuracy (%recovery)	Precision (RSD)
Azinphos-ethyl	88.2	1.5	92.6	1.5	87.7	4.3	82.9	5.2
Chlorfenvinphos	87.8	2.5	90.7	1.6	83.1	2.5	82.8	2.7
Ethion	89.8	9.0	93.6	6.1	81.9	10.4	81.7	15.7
Famphur	95.5	0.9	96.3	2.7	105.1	3.1	97.1	2.1
Phosmet	91.1	1.9	87.1	1.0	76.4	3.8	79.7	2.0
Phosphamidon	86.1	1.2	81.8	2.3	76.9	4.1	78.6	4.3
Terbufos	87.7	1.0	91.1	4.1	90.7	3.4	89.0	2.7
Aspon	85.0	10.5	83.9	4.6	91.8	5.3	85.3	3.4
Chlorpyrifos-methyl	81.4	7.6	80.2	4.7	82.0	3.6	93.0	6.9
Crotoxyphos	88.0	1.4	87.4	1.6	90.5	3.1	87.0	2.2
Dichlofenthion	90.2	13.1	87.6	11.7	109.4	12.2	86.6	12.5
Dicrotophos	81.9	3.8	80.8	12.0	78.0	4.0	88.1	10.7
Fonofos	77.8	1.6	78.4	5.3	86.3	5.9	81.8	7.9
Thionazin	93.7	0.5	91.8	3.6	93.6	3.2	83.5	3.8
Dimethoate	77.9	1.8	78.8	8.1	79.3	6.9	78.2	7.6
Iprobenfos	91.4	1.3	93.3	1.3	101.9	3.7	82.9	3.2

※ a : Chlorinated drinking water from a river water source. TOC=1.31 mg/L

b : River water. TOC=4.26 mg/L

3.3. 원정수의 유기인계 농약류 검출현황 조사

본 연구에서 유기인계 농약류의 조사지점은 부산시 4개 정수장의 원·정수로 각각 4개 지점에서 채수하였다. 원수 채수지점은 낙동강수계 중 본류인 물금과 매리의 각각 1개 지점과 회동과 범기수원지의 각각 1개 지점이다. 정수는 화명, 덕산, 명장, 범어사정수이다. 원·정수 8개 지점에 대해 2014년 6월, 11월, 12월에 각각 1회씩 총 3회에 걸쳐 유기인계 농약류 16종에 대해 조사한 결과 Table 6에 나타난 바와 같이 조사기간의 모든 지점에서 불검출로 나타났다.

4. 결론

현재 사용하고 있는 농약 중에서 가장 많은 종류를 가

진 유기인계 농약(organophosphorus pesticides, OPPs)에 대하여 기존의 원·정수에서의 모니터링 외에 추가항목의 모니터링이 필요함에 따라 전처리 시간을 단축하면서도 고감도의 새로운 분석법을 개발하고자 본 연구를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 16종의 유기인계 농약류에 대해 On-line SPE 전처리장치와 결합한 Direct injection-LC/MS/MS를 적용하여 유기인계 농약류 16종의 최적분석법을 정립하였다.

2) 검량선은 상관계수(r^2)가 0.9973~0.9999로 직선성이 좋게 나타났으며 외부표준법(external standard method)으로 작성하였다. 신뢰구간 99% 범위에서 검출한계(LOD)는 0.8~2.0 ng/L였으며, 정량한계(LOQ)는 2.6~

Table 6. Monitoring results of 16 pesticide compounds (unit: ng/L)

Sampling points	Compounds	1st (June)	2nd (November)	3rd (December)
clean water	MJ	ND	ND	ND
	HM	ND	ND	ND
	DS	ND	ND	ND
raw water	BS	ND	ND	ND
	HD	ND	ND	ND
	MG	ND	ND	ND
	MR	ND	ND	ND
	BG	ND	ND	ND

※ ND, Not Detected

※ MJ, Myeongiang; HM, Hwamyeong; DS, Deoksan; BS, beomeosa
HD, Hoedong; MG, Mulgeum; MR, Maeri; BG, Beopgi

※ MJ : pH=6.7~7.1, TOC=1.37~1.71 mg/L, NO₃-N=1.1~1.6 mg/L

HM : pH=6.8~7.1, TOC=1.22~1.51 mg/L, NO₃-N=1.2~1.7 mg/L

DS : pH=6.7~7.1, TOC=1.17~1.23 mg/L, NO₃-N=1.2~1.7 mg/L

BJ : pH=6.5~6.7, TOC=0.65~0.91 mg/L, NO₃-N=0.2~0.4 mg/L

HD : pH=7.0~7.2, TOC=2.40~3.52 mg/L, NO₃-N=1.3~1.4 mg/L

MG : pH=7.7~8.8, TOC=3.21~3.93 mg/L, NO₃-N=0.9~2.3 mg/L

MR : pH=7.6~8.8, TOC=3.14~2.73 mg/L, NO₃-N=0.9~2.2 mg/L

BG : pH=6.7~7.1, TOC=0.65~0.91 mg/L, NO₃-N=0.2~0.3 mg/L

6.4 ng/L였다.

3) 분석법의 신뢰도 검증을 위하여 정확도와 정밀도를 조사하였다. 덕산정수의 경우, 정확도는 50 ng/L에서는 77.8~95.5%, 200 ng/L에서는 78.4~96.3%였으며 매리 원수는 각각 76.4~109.4%(50 ng/L), 78.2~97.1%(200 ng/L)로 나타나 모두 양호한 결과값을 보였다. 정밀도는 상대표준편차로 0.5~15.7%로 본 분석법과 유사한 EPA Method 535 기준(정확도 = 70~130%, 정밀도 \leq 20%)을 모두 만족하였다.

4) Matrix effects 측면에서도 정수와 원수에서의 % 회수율과 재현성(RSD)을 고려해 볼 때 Matrix로 인한 영향은 적은 것으로 사료되었다.

5) 본 분석법은 적은 시료량을 사용하면서도 시료 loop에서의 일정량 조절 및 Flexible cube에 의한 On-line SPE Cartridge 사용으로 전처리 시간 단축과 일정한 시료 농축방법을 사용함으로써 컬럼에 흡착되는 양이 일정하게 유지되어 반복 측정에도 높은 재현성을 보임으로써 낮은 검출한계값과 정량한계값을 구할 수 있었던 것으로

판단된다.

6) 부산시 4개 정수장의 원·정수를 3회 조사한 결과 모든 지점에서 농약류 16종이 검출되지 않았다.

따라서 상기 결과를 종합해 보면 On-line SPE 전처리 장치와 결합한 Direct injection-LC/MS/MS법으로 극미량의 유기인계 농약류 분석이 가능함을 확인하였다. 또한 강우량 및 계절적인 영향에 의해 낙동강 수계에서의 검출가능성을 고려하여 원·정수의 지속적인 모니터링이 실시되어야 할 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Anagnostopoulos, C., Miliadis, G. E., 2013, Development and validation of an easy multiresidue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC-MS/MS and LC-MS/MS in olive oil and olives. *Talanta*, 112, 1-10.
- Sim, H. R., Kim, S. H., Lee, J. Y., Lee, H. J., 2009, Creating highly sensitive and selective bio-chip

- sensors for the detection of organophosphorus/carbamate pesticides, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, 20(6), 571-580.
- Choi, J. W., Kim, Y. S., 2010, Applications of high resolution mass spectrometer for simultaneous measurement of residual organophosphorous pesticides, *J. of the Korean Society for Environmental Analysis*, 13(4), 195-203.
- Choi, J. W., Kim, Y. S., 2011, Applications of high resolution mass spectrometer for simultaneous quantitation of pyrethroid pesticides in water, *J. of the Korean Society for Environmental Analysis*, 14(1), 55-62.
- Choi, J. W., 2012, Analysis of triazines in water using orbitrap high resolution and accurate mass spectrometer, *J. of the Korean Society for Environmental Analysis*, 15(4), 282-291.
- Laura, D., Julio, L. P., Ignacio, V., 2008, Ultra trace determination of 31 pesticides in water samples by direct injection -rapid resolution liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *analytica chimica acta*, 624, 90-96.
- Lee, W. J., 2011, Pesticide exposure and health, *J. of Environ health sci.*, 37(2), 81-93.
- Lutz, A., Kerstin, G., 2008, Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC/MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 183-197.
- Ministry of Environment Notice, 2013, Official test methods of Drinking water quality, 2013(136).
- Rural Development Administration(Nongjajae Management Division), 2012, Safe use of pesticides for agricultural production safety(educational resources).
- Rural Development Administration(Pesticide Registration Search Service), 2014, <http://npms.rda.go.kr/epmso>.
- Sinha, S. N., 2010, Effect of dissociation energy: signal to noise ratio on ion formation and sensitivity of analytical method for quantification and confirmation of triazofos in blood samples using gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS/MS), *International Journal of Mass Spectrometry*, 296, 47-52.
- Sinha, S. N., Bhatnagar V. K., Doctor, P., Toteja, G. S., Agnihotri, N. P., Kalra, R. L., 2011a, A novel method for pesticides analysis in refined sugar samples using GC-MS/MS and solvent extraction method, *Food Chemistry*, 126, 379-386.
- Sinha, S. N., Vasudev, K., Vishnu Vardhana Rao M., Odetokun, M., 2011b, Quantification of organophosphate insecticides in drinking water in urban areas using lyophilization and high-performance liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry technique. *International Journal of Mass Spectrometry*, 300, 12-20.
- Sinha S. N., Vishnu Vardhana Rao M., Vasudev K., Odetokun M., 2012, A liquid chromatography mass spectrometry-based method to measure organophosphorous insecticide, herbicide and non-organophosphorous pesticide in grape and apple samples, *Food Control*, 25, 636-646.
- Thorsten R., Lutz A., Ursula B., 2013, A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography mass spectrometry, *J. Chromatography A*, 1271, 95-104.
- USEPA Method 535, 2005, Measurement of chloroacetanilide and other Acetamide herbicide degradates in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry(LC/MS/MS).