

Simultaneous and quantitative determination of anion biocides in soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Eun-Young Yang and Ho-Sang Shin¹, ★

Environmental Science, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

¹*Department of Environmental Education, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea*

(Received March 19, 2015; Revised September 6, 2015; Accepted October 5, 2015)

토양 중 음이온 바이오사이드의 HPLC-MS/MS 동시 정량분석법

양은영 · 신호상¹, ★

충남공주시 신관동 공주대학교 환경과학과, ¹충남공주시 신관동 공주대학교 환경교육과
(2015. 3. 19. 접수, 2015. 9. 6. 수정, 2015. 10. 5. 승인)

Abstract: Simultaneous analytical method has developed for the determination of anion biocides in soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Chlorite and chlorate in soil were extracted with pure water, and cyanuric acid and sodium dodecylbenzenesulfonate (Na-DBS) were extracted with mobile phase (0.25 mM ammonium formate in 20 mM formic acid : acetonitrile (1:1)). The extract was injected into the LC-MS/MS system after filtration. The method detection limits in this study were 0.04 mg/kg for chlorite, 0.04 mg/kg for chlorate, 0.27 mg/kg for cyanuric acid, and 0.05 mg/kg for Na-DBS, respectively. The method was applied to the analysis of 50 soil samples collected from 40 sites sprayed with biocides and 10 background sites. As a result, anion biocides were not detected in all sites.

요 약: 토양 중 음이온 바이오사이드인 chlorite, chlorate, cyanuric acid와 sodium dodecylbenzenesulfonate (Na-DBS)의 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) 동시 분석방법을 개발하였다. Chlorite와 chlorate는 물로 추출하였으며, cyanuric acid와 Na-DBS는 0.25 mM ammonium formate를 함유한 20 mM formic acid와 acetonitrile (1:1) 이동상을 이용하여 추출하였다. 추출물은 필터 후 직접 LC-MS/MS로 주입하였다. 분석물질이 검출되지 않는 토양에 각 성분들을 첨가한 후 정도관리를 실시한 결과 검출한계는 chlorite 0.04 mg/kg, chlorate 0.04 mg/kg, cyanuric acid 0.27 mg/kg 그리고 Na-DBS의 경우는 0.05 mg/kg 이었다. 이 방법을 사용하여 우리나라 AI로 소독제를 많이 사용한 장소 40개 지역과 사용하지 않은 지역 10개 대조 지역의 토양을 분석한 결과 대조지역을 포함한 모든 조사지역에서 네 가지 음이온 모두 검출되지 않았다.

Key words: chlorite, chlorate, cyanuric acid, Na-DBS, soil, LC-MS/MS

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)41-850-8811 Fax : +82-(0)41-850-8810

E-mail : hshin@kongju.ac.kr

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.

1. 서 론

최근 가금류와 조류에서 조류 인플루엔자(avian influenza, AI)가 확산되어 축산농가에 큰 피해를 주었다. AI 뿐만 아니라 사람도 감염될 수 있어 AI의 발생 시마다 여러 가지 소독제를 사용하여 방역을 실시해오고 있다. 그러나 이들 소독제를 반복하여 사용하면서 생태계에 영향을 줄 수 있다는 논란이 있어왔고 살포한 소독제의 생태계 영향을 파악하기 위해 소독제의 잔류량 파악이 우선적으로 필요하다. 이산화염소는 물 중에서 소독과정 중에 트리할로메탄과 같은 염소 소독부산물인 직접 생성되지 않아 염소 대체 소독제로서 많은 관심을 받고 있다.¹ 그러나 이산화염소는 불안정하여 쉽게 분해되어² chlorite와 chlorate를 생성한다.³⁻⁵ 한편 sodium dichloroisocyanurate (Na-DCC)는 cyanuric acid와 염소 (HOCl)를 생성시켜 실제적으로는 염소가 작용하여 소독하는 성분으로, 사람과 환자들에게 심각한 잠재적 위험성이 있을 수 있는 체액 유출시 주로 사용하는 소독제이다. Na-DCC는 물속에서 가수분해 반응에 의해 쉽게 cyanuric acid를 생성하기 때문에 Na-DCC보다는 cyanuric acid를 측정하는 것이 독성과 환경측면에서 필요하다.⁶ Sodium dodecylbenzenesulfonate (Na-DBS)는 세제의 주성분으로 세정 작용뿐만 아니라 미생물의 발육저해 및 살균작용을 지니고 있어 낙농농가에서 착유기나 우유 등의 세척에 많이 사용하고 있다. 따라서 본 연구에서는 토양 중 이산화염소, Na-DCC와 Na-DBS의 잔류량을 조사하기 위해서 음이온인 chlorite, chlorate, cyanuric acid와 Na-DBS를 분석하는 것이 바람직하다.

Chlorite와 chlorate를 분석하는 일반적인 방법으로는 물에서 amperometric 적정법,⁷ ion chromatography,⁸⁻¹² spectrophotometry¹³와 flow injection system¹⁴ 등이 있다. Cyanuric acid 분석방법으로는 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),¹⁵ gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS),¹⁶⁻¹⁷ GC-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS),¹⁸ high performance liquid chromatography (HPLC),¹⁹⁻²¹ LC-MS/MS²²⁻²⁴ 등을 주로 이용하여 왔다. Na-DBS의 분석방법은 spectrophotometry²⁵⁻²⁶와 HPLC/DAD²⁷ 등이 있다.

그러나 위 분석법들은 각 성분별 개별 분석에서는 아주 고감도이고 선택적이지만, 이들 성분들을 함께 분석할 수 있는 동시분석법은 아직까지 제시되지 않았다. 특히 토양 중에서 이들을 분석하는 방법은 지금까지 발표된 바가 없다.

본 연구에서는 토양 중의 chlorite, chlorate, cyanuric acid와 Na-DBS의 추출법과 LC-MS/MS를 이용한 동시 분석하는 방법을 개발하고 개발한 시험법을 이용해 실태조사를 하는데 그 목적이 있다.

2. 실험방법

2.1. 시료준비

본 연구에서는 우리나라 전국에서 방역을 실시한 철새도래지, 집중 방역지역, 축산농가, 고속도로 출구 방역지역 등 방역 대표지점 40개소를 선정하고 소독제를 사용하지 않은 대조지점 10개소를 선정하여 시료를 채취하였으며 시료 20개당 동일한 채취지점에서 현장이증시료를 채취하여 냉장보관 후 실험하였다.

2.2. 시약 및 기기조건

본 연구의 조사대상물질인 sodium chlorite, sodium chlorate, cyanuric acid, Na-DBS와 내부표준물질인 bisphenol A-d16, 이동상 용매에 사용된 ammonium formate와 formic acid는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였다. 시약 제조 및 추출용매로 사용한 증류수는 Milli-Q system을 통과한 초순수를 이용하였다. LC-MS/MS는 시료 자동주입기 (Agilent 1290 series G4226A Autosampler)가 장착된 Agilent 사 (Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1290 series HPLC를 사용하였고, 분리용 칼럼은 Eclipse Plus C₈ column (2.1 mm i.d., 50 mm length, 1.8 µm particle size)을 사용하였다. 이동상 용매는 0.25 mM ammonium

Table 1. Instrument conditions of LC-MS/MS system for the analysis of anion biocides

Parameters	Conditions
Column	Eclipse Plus C ₈ column, 2.1 mm i.d., 50 mm length, 1.8 µm particle size
Mobile phase	A: 0.25 mM ammonium formate in 20 mM formic acid B: Acetonitrile
Gradient	Time (min) 0 2 6 12 12.5 15 Solvent B (%) 50 85 100 100 50 50
Column flow rate	0.2 mL/min
Injection volume	10 µL
Column temperature	40 °C
Ionization mode	Negative ion electrospray
Capillary voltage	4.00 kV
Gas temperature	350 °C
Gas flow	8 L/min (N ₂)
Nebulizer	35 psi

Table 2. Parameters for the determination of anion biocides by LC-MS/MS

Compounds	Fragmentor voltage (V)	Precursor ion (m/z)	Quantitation ion (m/z) (Collision energy, eV)	Confirm ion (m/z) (Collision energy, eV)
Chlorite	40	67	67 (1)	51(13) 35(19)
Chlorate	50	83	83 (1)	67(21) 51(31)
Cyanuric acid	80	128	128 (1)	84.8(1) 42(7)
Na-DBS	160	325	325 (1)	197(39) 183(33) 119(59)
ISTD (Bisphenol A-d16)	150	241.2	241.2 (1)	223.3(13) 142.2(25)

formate의 20 mM formic acid와 acetonitrile을 사용하였고 기율기 용리법을 적용한 결과 분석시간은 15분이었다. 분리한 각 물질의 분자량 확인을 위해 Agilent G6460A Triple-quadrupole 텐덤질량 분석기 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였고 negative ion electrospray 모드에서 분석하였다.

2.3. 분석방법

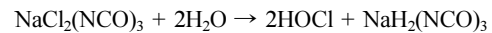
Chlorite와 chlorate의 경우 균질시료 2.0 g을 사용하여 정제수 10 mL로 초음파 추출 후 내부표준물질 bisphenol A-d16을 50 µL를 첨가하고 시료를 여과하여 LC-MS/MS를 사용하여 분석하였다.

Na-DBS와 cyanuric acid는 시료 2.0 g을 취하여 0.25 mM ammonium formate가 포함된 20 mM formic acid와 acetonitrile (1:1)를 10 mL 첨가하고 초음파 추출 15분, 진탕 15분, 원심분리 5분 (4 °C, 12,000 RPM)을 차례로 실시한 다음 상층액 5 mL를 취해 1000 mg/L 내부표준물질 bisphenol A-d16 50 µL를 첨가하였다. 시료를 여과하여 LC-MS/MS에 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

이산화염소는 강한 산화제이면서 적용환경에 따라서 염소와 같거나 더 우수한 살균효과를 가지는 친환경적인 소독제이다. 그러나 압축하여 사용할 수 없어 현장에서 발생시켜 사용해야만 하는 불안정한 가스로 환경 중 태양광선에 의해 쉽게 분해되며 소독제로 사용할 때 여러 적용조건에 의해 부산물로서 chlorite와 chlorate를 생성한다. 따라서 chlorite와 chlorate는 토양 중에 잔류 가능성이 있으며, 이를 확인하기 위하여 두 성분을 분석하였다. 또한 cyanuric acid는 표백, 위생, 소독처리에서 chloroisocyanurates의 최종산물로서 토양 중에서 아래의 가수분해 반응에 의해 sodium cyanurate와 hypochlorous acid로 빠르게 바뀌므로 Na-

DCC의 marker로서 cyanuric acid를 분석하였다.



물리화학적 특성이 각각 다른 chlorite, chlorate, cyanuric acid와 Na-DBS를 동시분석하기 위한 이동상 용매 선택을 위해 ammonium formate, formic acid, ammonium acetate, acetic acid를 비교하였다. Ammonium formate를 이동상으로 사용했을 때 cyanuric acid는 검출할 수 없었고 나머지 분석항목들은 감도가 낮았다. Formic acid를 이동상으로 사용하였을 때 chlorite와 chlorate의 경우 피크모양이 좋고 감도가 좋았으나 cyanuric acid와 Na-DBS는 검출할 수 없었다. Acetic acid와 ammonium acetate를 개별적으로 사용할 때에는 피크 모양이 좋지 않았기 때문에 chlorite와 chlorate의 감도가 좋은 formic acid 그리고 Na-DBS와 cyanuric acid의 피크 모양이 좋은 ammonium formate를 일정 농도비로 사용하여 비교한 결과 20 mM formic acid에 0.25 mM ammonium formate를 혼합하여 사용할 때 가장 좋은 결과를 보였다. 그러나 chlorite, chlorate와 cyanuric acid는 분리할 수 없었으며 Na-DBS는 잘 분리되었다. 네 가지 화합물의 MRM chromatogram을 Fig. 1에 나타내었다.

분석성분이 검출되지 않은 토양시료에 표준용액을 첨가하여 검정곡선을 작성한 결과 모든 화합물에서 0.991 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. 또 동일한 방법의 첨가시료 7개를 준비하여 실험절차에 따라 반복 분석한 후 구한 표준편차에 3.14를 곱한 방법검출 한계(MDL)는 0.04 mg/kg~0.27 mg/kg의 범위를 보였고, 표준편차에 10배를 곱한 정량한계는 0.12 mg/kg~0.87 mg/kg의 범위를 나타내었다(Table 3).

또한 정밀도와 정확도는 상대표준편차와 회수율을 구하여 측정하였다. 분석성분이 검출되지 않은 토양에 분석물질 일정량을 첨가한 시료 5개를 준비하여 위와 동일한 방법으로 정량한 결과로부터 상대표준편차를

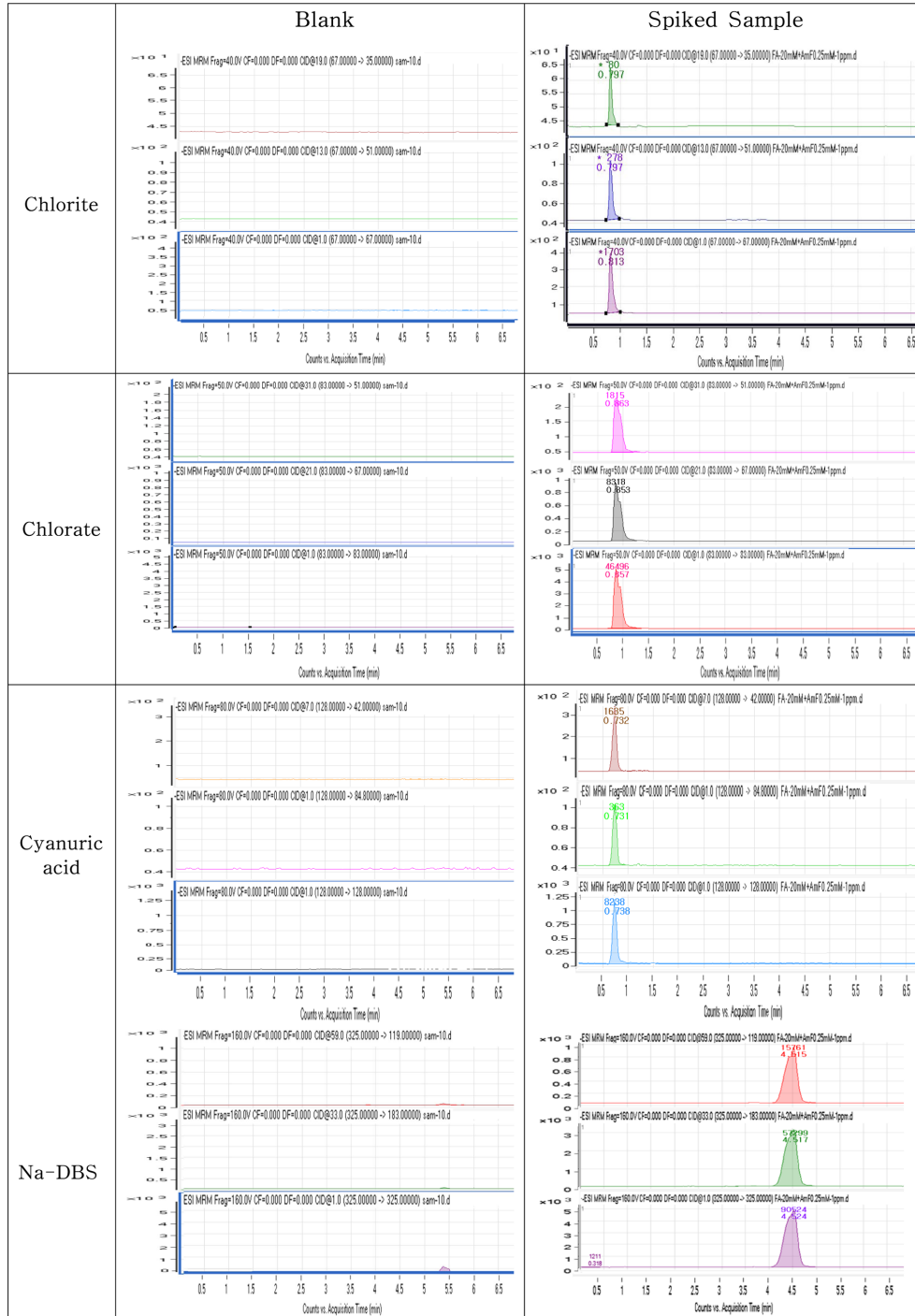


Fig. 1. MRM chromatogram of anion biocides from blank soil sample and the spiked samples at 1.0 mg/kg

구하여 정밀도를 측정하였고, 참값에 대한 백분율로 회수율을 구하여 정확도를 확인하였다(Table 4).

분석성분이 검출되지 않은 토양에 일정 농도로 5개의 동일한 방법의 첨가시료를 준비하여 실험절차에

Table 3. The limit of detection and limit of quantification, linearities (r^2) and calibration curves in the matched matrix of the anion biocides

Compounds	Conc. range (mg/kg)	Calibration curves	r^2	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Chlorite	2.5 ~ 20.0	$y=0.3792x+0.0656$	0.9979	0.04	0.14
Chlorate	0.1 ~ 10.0	$y=1.647x+0.2293$	0.9914	0.04	0.12
Cyanuric acid	0.5 ~ 10.0	$y=0.0885x+0.0239$	0.9971	0.27	0.87
Na-DBS	0.1 ~ 10.0	$y=5.886x+0.1886$	0.9958	0.05	0.15

LOD (limit of detection)=SD×3.14, LOQ (limit of quantification)=SD×10

Table 4. Precision and accuracy from samples spiked at two concentrations

Compounds	Spiked Conc.	Measured Conc. (mg/kg)	Mean ± SD	Precision (%)	Accuracy (%)
Chlorite	5.0	6.0, 5.1, 5.3, 5.6, 5.7	5.5±0.34	6.1	111
	20.0	19.9, 18.8, 19.3, 19.8, 19.9	19.5±0.48	2.4	98
Chlorate	1.0	1.0, 1.0, 1.1, 1.0, 1.0	1.0±0.04	3.6	102
	5.0	4.1, 4.6, 4.5, 5.0, 5.3	4.7±0.44	9.4	94
Cyanuric acid	1.0	1.2, 1.5, 1.3, 1.5, 1.6	1.4±0.15	10.3	141
	5.0	4.9, 5.0, 5.0, 5.4, 5.3	5.1±0.25	4.8	102
Na-DBS	1.0	1.0, 1.1, 1.1, 1.0, 1.1	5.5±0.06	5.5	107
	5.0	4.7, 5.2, 5.1, 5.7, 5.8	5.3±0.44	8.4	106

따라 분석하여 회수율을 조사하였을 때 90~126% 범위의 값을 보였다.

토양시료 중 음이온 소독제인 chlorate, chlorite, cyanuric acid와 Na-DBS는 국내 토양에서의 검출사례가 없으며 이번 실태조사 결과에서도 모든 조사지점 및 대조지역에서 검출되지 않았다. 토양 중에 음이온 소독제들이 검출되지 않은 이유는 중성상태의 토양은 주로 음이온을 띠므로서 이온반발로 인한 흡착력이 줄어들고 물에 대한 용해도가 높아서 강우에 의해 쉽게 제거되었을 것으로 보이며,²⁸ cyanuric acid의 경우 토양층이나 용존산소가 낮은 환경에서 박테리아에 의해 빠르게 이산화탄소와 암모니아로 분해되고 Na-DBS 역시 토양 중 미생물의 탄소원으로 사용되거나 분해되어 검출되지 않은 것으로 보인다.

4. 결 론

본 연구는 최근 AI 발생으로 인한 잦은 방역으로 환경 중 소독제가 토양에 잔류하는지 알아보기 위해 토양 중 음이온 소독제의 동시분석방법을 개발하고 이 방법을 사용하여 실태조사를 수행하였다. 이산화염소와 Na-DCC는 토양 중에서 분해하여 존재하는

chlorite, chlorate와 cyanuric acid로 분석하고 Na-DBS는 그 자체로 분석하였다. 물리화학적 특성이 다른 분석물질들을 동시 분석하기 위한 최적의 이동상용매는 20 mM formic acid의 0.25 mM ammonium formate와 acetonitrile (1:1)이었으며 정도관리결과 검출한계가 0.04~0.27 mg/kg 이었다.

실제 토양 중 잔류실태를 조사한 결과 토양 중 음이온 소독제는 검출되지 않았고 이것은 수용해성이 높은 분석물질들이 토양에 잔류하지 않고 우수에 의해 제거되거나 토양 중 박테리아에 의해 분해되었기 때문인 것으로 보인다. 하지만 앞으로 방역이 계속된다면 이에 따른 음이온 소독제의 환경 중 잔류 가능성이나 환경 중 미치는 영향에 대해서도 꾸준히 관심을 가지고 모니터링을 하여야 그 잔류성을 확인할 수 있으며 이 때 본 연구에서 개발한 분석방법을 유용하게 활용할 수 있기를 기대한다.

References

1. H. H. Shin and Y. S. Oh, *J. Korean Anal. Sci. Technol.*, **12**(5), 403-407 (1999).
2. US Environmental Protection Agency, *Alternative dis-*

- infectants and oxidants guidance manual, EPA 815-R-99-014, Washington, DC, USA, 1999.
3. US Environmental Protection Agency, In Support of Summary Information on the EPA-635-R-00-007, Washington, DC, USA, 2000.
 4. L. McIntyre and L. Noton, Chlorates; A literature review of aspect relevant to the aquatic environment, Environmental Quality Monitoring Branch, Environmental Assessment Division, Environmental Protection Services, Alberta Environment, 1990.
 5. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality - Guideline Technical Document Ottawa : Health Canada, 2008.
 6. K. Patel and K. Jones, *J. Chromatogr. B*, **853**, 360-363 (2007).
 7. American Public Health Association, Standard methods for the examination of water and wastewater, Method 4500-ClO₂ E, 1995.
 8. US Environmental Protection Agency, Method 1999a.
 9. US Environmental Protection Agency, Method 300.0, 2.2. 1999b.
 10. US Environmental Protection Agency, Method 300.1. 1998.
 11. US Environmental Protection Agency, Method 317.0. 2001a.
 12. US Environmental Protection Agency, Method 326.0. 2002.
 13. US Environmental Protection Agency, Method 327.0. 2003b.
 14. D. G., D. W. Wood and G. Gorden., *Anal. Chim. Acta*, **225**, 437-441 (1989).
 15. P. Lutter, M. Savoy-Perroud, E. Campos-Gimenez, L. Meye, Goldmann, M. Bertholet, P. Mottier, A. Desmarchelier, F. Monard, C. Perrin, F. Robert and T. Delatour, *Food Control*, **22**, 903-913 (2011).
 16. S. H. Tzing and W. H. Ding, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 6267-6273 (2010).
 17. X. D. Pan, P. G. Wu, D. J. Yang, L. T. Wang, X. H. Shen and C. Y. Zhu, *Food Control*, **30**, 545-548 (2013).
 18. H. Miao, S. Fan, Y. N. Wu, L. Zhang, P. P. Zhou, J. G. Li, H. J. Chen and Y. F. Zhao, *Biomed. Environ. Sci.*, **22**, 87-94 (2009).
 19. Method Validation for Determination of Cyanuric acid by High Performance Liquid Chromatography, OOI YEN HAN, Universiti Tunku Abdul Rahman, 2014.
 20. H. Sun, L. Wang, L. Ai, S. Liang and H. Wu, *Food Control*, **21**, 686-691 (2010).
 21. B. S. P. Kumar, M. M. Annapurna and S. Pavani, *J. Pharma.ceut. Anal.*, **3**(1), 66-70 (2012).
 22. P. Panuwet, E. L. Wade, J. V. Nguyen, M. A. Montesano, L. L. Needham and B. D. Barr, *J. Chromatogr. B*, **878**, 2916-2922 (2010).
 23. P. Varelis and R. Jeskelis, *Food Addit. Contam.*, **25**(10), 1208-1215 (2008).
 24. J. V. Sancho, M. Ibáñez, S. Grimalt, Pozo, O. J. and Hernández, F., *Anal. Chim. Acta*, **530**(2), 237-243 (2005).
 25. E. Jurado, M. Fernández-Serrano, J. Núñez-Olea, G. Luzón and M. Lechuga, *Chemosphere*, **65**(2), 278-285 (2006).
 26. X. H. Liu, J.-J. R. Ren, H. P. Zhao and H. W. Gao, *Indian J. Chem. Technol.*, **1**, 488-492 (2008).
 27. M. Hida, S. Okuyama, T. Mitsui, Y. Minami and Y. Fujimura, *Chromatographia*, **35**, 643-648 (1993).
 28. National Institute of Environment Research, Incheon, Republic Korea, http://ncis.nier.go.kr/download/download2.jsp?file_name=7778-54-3.pdf.