

<Note>

경기 및 강원지역 농업용수 중 PAHs의 모니터링 연구

김이선 · 박병준¹ · 이성은*

경북대학교 응용생명과학부, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Agricultural Waterways in Gyeonggi and Gangwon Provinces, Korea

Leesun Kim, Byung-Jun Park¹ and Sung-Eun Lee*

School of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

¹Chemical Safety Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration,
Wanju 55365, Republic of Korea

Abstract - Level and distribution of fourteen polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the agricultural water samples collected in the waterways located in Gyeonggi and Gangwon, Korea were determined for monitoring and risk assessment. A simplified, fast but effective extraction and clean-up methods combined with gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) was employed to measure the concentration of the target compounds. The extraction of the analytes of interest in water sample (10 mL) was performed with acetonitrile (10 mL) and the salt. To purify the target PAHs, the clean-up procedure was employed with 2 mL tubes of dispersive solid phase extraction. The optimized method was validated with recoveries, method detection limit (MDL), accuracy and precision. Good recoveries for each PAHs at 10 and 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ were achieved (60 to 110%, with RSD < 20%) with linearity (>0.99). MDL for all the analytes was achieved with 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$. GC-MS/MS results showed that concentration of phenanthrene in the water samples from Gyeonggi (20 sites) ranged from 0.82 to 2.56 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from Gangwon (15 sites) ranged from 0.83 to 1.62 $\mu\text{g L}^{-1}$. Other PAHs were not found in the water samples but the continuous monitoring for these areas were required.

Key words : monitoring, phenanthrene, polycyclic aromatic hydrocarbons

서 론

다환 방향족 탄화수소류(PAHs, Polycyclic aromatic hydrocarbons)는 열분해 또는 불완전연소 과정에서 발생하는 두 개 이상의 방향족 고리로 이루어진 유기화합물질의 총칭이다. PAHs는 비점과 끓는점이 높고, 증기압이 낮으며, 지용

성으로 토양이나 수계 등의 환경매체에 쉽게 축적된다. 특히 PAHs는 방향족 고리라는 구조상의 특성으로 인해 생물학적으로 쉽게 분해되지 않고, 또한 동물의 지방에 쉽게 흡수되어 생물체 내에 축적되기 쉽고 독성을 일으키며 사람에게 계도 해를 입힌다고 알려져 있다. 이러한 특성들 때문에 국제 암 연구 기관(IARC, International Agency for Research on Cancer) (1973~1983년)에서는 특정 PAHs를 인체발암성, 발암가능성이 높음, 발암가능성으로 분류하였다(IARC 2010). 이에 스톡홀름협약에서는 잔류성유기오염물질(POPs:

* Corresponding author: Sung-Eun Lee, Tel. 053-950-7768,
Fax. 053-953-7233, E-mail. selpest@knu.ac.kr

persistent organic pollutants)에 PAHs를 추가하려는 움직임이 있었으며(Stockholm Convention 2005), UNECE (United Nations Economic Commission for Europe)는 규제대상물질 목록에 PAHs를 이미 포함하였다(UNECE 2016).

PAHs는 특히 강력한 대기오염 물질로 알려져 있으며, 대기 중에서 PAHs는 광분해 될 수 있는 특성을 가지고 있다. 또한 오존, 수산화기, 이산화질소 및 이산화황과 반응하여 diones, nitro-PAHs 및 sulfonic acids 등을 각각 형성할 수 있다(WHO 2010). 한국의 농수로는 주로 농토와 도로 사이에 위치해 있어 자동차 배기 가스나 의도하지 않은 자동차 연료유출 등에 의해 PAHs가 많이 축적될 수 있을 것으로 예측된다. 또한 황사나 미세먼지 등 중국에서 넘어오는 대기 오염물질(Tan *et al.* 2011)로 인해 대기 중 PAHs가 물에 녹아 축적될 수 있는 실정이다. 이에 수계에 PAHs의 농축이 생물 환경에 영향을 미치거나 관개 활동으로 인해 농산물로 이행될 수 있다는 점을 고려해 볼 때 농수로에 대한 PAHs 모니터링이 시급한 실정이다.

PAHs는 환경에 배출될 때 다양한 경로를 통해 2~3종이 함께 배출되며, 여러 가지 작용 기작을 통해 생물에게 독성을 일으키는데, 세포막과 연관된 효소시스템이나 세포막의 정상기능을 방해하고, 면역억제제 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히, 분자량이 큰 PAHs일수록(예 benzo(a)pyrene) 물에 녹지 않고 토양이나 수로 같은 환경매체에 잔류하여 사람과 동물에 독성을 크게 일으킨다고 연구자들이 밝혀왔다(Moorthy *et al.* 2015). 국제 암 연구기관은 benzo(a)pyrene이 암을 일으킨다고 발표한 연구자들의 연구보고를 수집해 보고하고 있다. 한 선행 연구에서는 생체 내 CYP/EH 경로에서, CYP1A1에 의해 benzo(a)pyrene이 BP-7,8-epoxide로 변형된 후 결국 BP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE)로 변형된다고 밝히고 있다(Anandatheerthavarada *et al.* 1999). 이렇게 형성된 BPDE는 DNA와 반응하여 흡연자의 폐 조직에서 발견되는 부가생성물을 생성하고, Tp53 종양 억제 유전자의 돌연변이의 원인이 될 수 있다고 연구자들은 밝히고 있다(Moorthy *et al.* 2015).

PAHs 화합물의 환경 내 모니터링이나 노출평가를 위해서 주로 gas chromatography (GC)를 이용하여 PAHs 화합물질을 분리하고 검출기로는 질량분석기(Mass spectrometer, MS)를 많이 이용해 왔다. 질량분석기 이용 시, 특정 범위의 mass range를 분석하는 full scan mode와 더불어 감도와 선택성을 높이기 위해서 특정 ion만 선택하여 분석하는 selected ion monitoring (SIM) 모드를 많이 사용하는데, 시료 중의 간섭물질로 인한 false positive 혹은 false negative 가 나타날 가능성이 매우 높다(Wong *et al.* 2004). 이에 대한 대안으로 분자량 확인의 과정을 두 번 거쳐서 높은 선택성과 감도를 높일

수 있는 triple quadrupole type의 tandem mass spectrometry (MS/MS)를 활용한 연구들이 많이 보고되고 있다. 또한 GC-MS/M의 활용과 함께 세계적으로 많이 이용되고 있는 신속, 간편한 전처리법인 케처스(QuEChERS, quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)법을 이용하면 비교적 빠른 시간 안에 간단한 전처리 과정만으로 높은 추출 효율을 얻을 수 있으며 노동력, 비용, 시간 등을 절감할 수 있다.

이에 본 연구에서는 케처스법 및 dispersive solid phase extraction (d-SPE) 정제법을 이용하여 PAHs를 추출하고, 최종 시료를 GC-MS/MS (gas chromatography tandem mass spectrometry)로 정성 및 정량 분석하고자 하였다. 분석한 결과를 바탕으로 경기도(20곳) 및 강원도(15곳)에 있는 농수로를 선정하여 수로 내에 존재할 수 있는 14종의 PAHs의 농도와 분포 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 표준품

PAHs 분석을 위한 14종의 PAH 표준품은(순도 >98%) Sigma Aldrich (US) 제품을 구입하여 사용하였으며, 추출용액으로 사용한 Acetonitrile (ACN)은 HPLC급을 사용하였다. 케처스 추출 키트는 4 g anhydrous magnesium sulfate (MgSO₄), 1 g sodium chloride, 1 g trisodium citrate dehydrate와 0.5 g disodium hydrogen citrate sesquihydrate를 포함하고 있는 것을 사용하였다. 정제 단계에서는 PSA (primary secondary amine, 25 mg)와 MgSO₄ (150 mg) 포함하고 있는 2 mL d-SPE tubes (Restek[®])를 사용하였다.

2. GC-MS/MS 분석 장비

전처리 과정으로 준비된 최종 시료는 Bruker CP-8400 autosampler가 장착된 GC-MS/MS (Bruker SCION TQ (triple quadrupole mass spectrometry))를 이용해 SRM (selected reaction monitoring) 모드로 분석하였다. 분석용 컬럼은 ZB-semivolatiles (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness, Phenomenex)을 사용하였으며, splitless pulsed pressure mode (40 psi)로 설정한 후, 시료량을 2 μL로 주입하여 분석하였다. 이동상은 헬륨가스를 사용하였으며 유속은 분당 1 mL로 하였다. GC 주입구 온도는 300°C로 설정하고, 최초 GC 오븐 온도를 90°C에서 3분 동안 유지하고, 170°C까지 분당 25°C의 속도로 승온하고, 다시 300°C까지 분당 5°C의 속도로 승온한 후에 4분 동안 유지하였다. 질량분석기는 EI (electron-impact ionization) mode (70 eV)로 설정하였으며,

transfer line과 ion source 온도는 300°C와 280°C로 각각 설정하였다.

3. 농업용수 시료 전처리 및 회수율 실험 및 검출한계

경기도 20곳과 강원도 지역의 15곳을 선정하여 농업용수 시료를 채취하였다. 채취한 지역의 방위는 Table 1과 2에 각각 표기하였다. 예비실험을 통해 분석 시료의 특성과 농도를 고려한 기존의 케처스 방법을 변형해 시료 전처리를 시행하였으며, 전처리 과정은 Fig. 1에 나타내었다. 농수로에 존재하는 PAHs의 농도를 측정하기 위해 개발한 분석법의 효율

성, 신뢰성 및 정확성을 검증하기 위해 회수율 실험을 수행하고, LOQs (limit of quantifications), LODs (limit of detections)와 MDLs (method detection limits)을 계산하였다. 회수율 실험은 무처리 시료에 분석 대상 PAHs 표준용액 혼합물을 조제하여 10과 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ 수준이 되도록 처리한 후 ($n=3$), 시료 분석 과정과 동일하게 추출 정제 분석하였다. 정량을 위해 시료 매칭 검량선(1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$)을 작성하여 S/N (signal-to-noise) ratio가 3 이상이 되는 농도를 LODs로 S/N ratio가 10 이상이 되는 농도를 LOQs로 결정하였다. MDL은 LOQ ($1 \mu\text{g L}^{-1}$)값을 시료 전처리 과정에서 발생한 농축배수(5)로 나누어 구해주었다.

Table 1. Grid references of locations of agricultural water samples collected from Gyeonggi.

Sample No.	Date collected	Latitude (N)	Longitude (E)
1	27.08.2015	37°07'00.4"	127°38'05.9"
2	27.08.2015	37°07'27.9"	127°37'56.1"
3	27.08.2015	37°09'40"	127°37'42"
4	27.08.2015	37°09'40"	127°38'4"
5	27.08.2015	37°05'44"	127°28'35"
6	27.08.2015	37°06'22.7"	127°27'49.3"
7	27.08.2015	37°00'06"	127°16'13"
8	27.08.2015	37°0'8"	127°16'33"
9	27.08.2015	37°0'14"	127°16'44"
10	27.08.2015	36°58'49.7"	127°19'54.3"
11	27.08.2015	36°58'59.2"	127°19'57.4"
12	27.08.2015	37°0'9"	127°21'8"
13	27.08.2015	37°1'54"	127°21'8"
14	27.08.2015	37°03'24.1"	127°21'48.8"
15	27.08.2015	37°4'15"	127°25'8"
16	09.04.2015	37°16'9"	127°40'3"
17	09.04.2015	36°16'7"	127°40'7"
18	09.04.2015	37°16'9"	127°40'3"
19	09.04.2015	37°15'36"	127°39'28"
20	09.04.2015	37°15'23"	127°38'57"

Table 2. Grid references of locations of agricultural water samples collected from Gangwon.

Sample No.	Date collected	Latitude (N)	Longitude (E)
1	09.04.2015	37°22'59"	127°56'31"
2	09.04.2015	37°22'58"	127°56'58"
3	09.04.2015	37°23'1"	127°57'23"
4	09.04.2015	37°23'1"	127°57'33"
5	09.04.2015	37°23'18"	127°56'32"
6	09.04.2015	37°23'43"	127°56'7"
7	09.04.2015	37°24'56"	127°55'32"
8	09.04.2015	37°24'27"	127°55'34"
9	09.04.2015	37°24'35"	127°55'14"
10	09.04.2015	37°25'44"	127°55'22"
11	09.04.2015	37°24'57"	127°55'58"
12	09.04.2015	37°24'33"	127°56'13"
13	09.04.2015	37°24'38"	127°56'48"
14	09.04.2015	37°24'36"	127°53'32"
15	09.04.2015	37°24'29"	127°53'52"

결과 및 고찰

1. MS/MS 분석 조건 및 전처리 방법 및 회수율

PAHs 14종의 GC-MS/MS 분석은 SRM 모드로 하여 실험하였다. SRM 조건의 확립을 위하여, 우선 분석 대상 물질을 각각 개별 full scan 분석 후 감도와 선택성을 판단하여 pre-

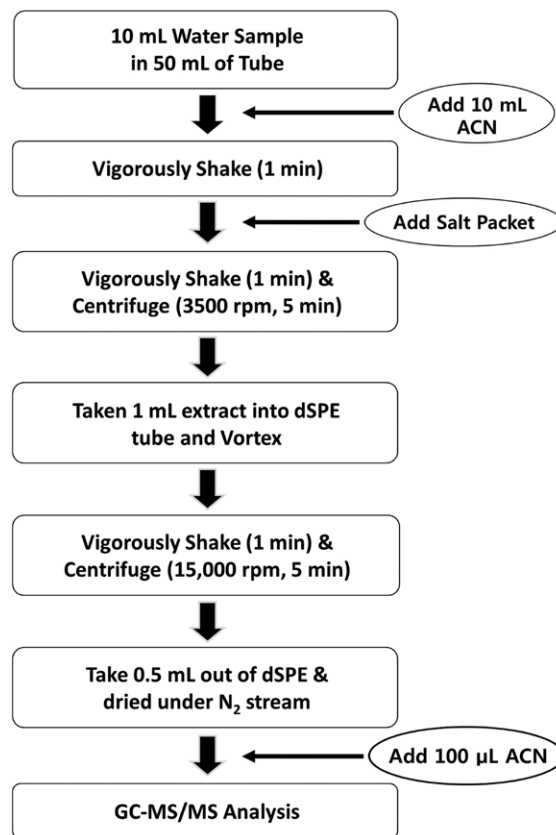


Fig. 1. Sample Preparation Scheme.

cursor ion (또는 parent ion)을 선택하였다. 선택된 precursor ion에 5, 10, 15, 20, 25 및 30 V의 다양한 collision energy를 이용하여 product ion scan 분석 후에, 생성된 fragment ion들 중에서 감도가 뛰어난 2개 이상의 ion을 product ion으로 선정하였다. Product ion 중 가장 감도가 좋은 이온과 collision energy를 정량 조건으로 두 번째로 감도가 좋은 이온을 정성 조건으로 14종의 PAHs를 정량, 정성 분석 방법을 설정하였다.

정량 분석 chromatogram 결과와 GC-MS를 이용한 선행연구와 비교해 본 결과 S/N ratio가 훨씬 높아진 것을 보여주었다(Wong *et al.* 2004). 본 실험에서 경기도 및 강원도 내 모든 농수로에서 채취한 용수 시료에서 phenanthrene이 검출되었으며, 경기도 내 농수로 한 곳에서만 fluoranthene이 검출되었는데, 검출된 두 화합물질의 크로마토그램을 Fig. 2A와 B에 나타내었다. GC-MS/MS 실험 결과 14종의 PAHs의 MDL은 $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ 였다.

케처스(QuEChERS) 추출법은 간섭물질이 많이 존재해 분석이 까다로운 시료에 잔류하는 다성분 농약 분석을 위해 최근에 개발된 간소화된 분석법이다(Anastassiades *et al.* 2003). 잔류농약 분석법으로 개발되었지만 현재 식품 내 PAHs 및 생체 내 의약품 분석(Schmidt and Snow 2016) 등의 다양한 유기화합물질 분석의 추출법으로 응용범위가 확대되고 있다. 다량의 용매가 요구되는 기존의 전처리 법과는 달리 최소한의 추출 용매와 시약을 가지고 추출할 수 있는 방법으로 친환경적인 분석법으로 알려져 있다. 본 연구에서는 용매의 사용을 10배 이상 줄이면서 전처리 시간 역시 대폭 줄일 수 있는 케처스법을 사용 14종의 PAHs를 추출하고 d-SPE 정제법을 사용하였다. 그 결과 14종의 PAHs 모두 상대표준편차가 20%보다 작아 이 분석법의 재현성을 검증해 주었다. 또한 PAHs 14종 혼합표준용액을 10과 $50 \mu\text{g L}^{-1}$ 수준으로

용수시료(PAHs가 없는 검증된 시료)에 첨가하여 얻은 회수율 실험에서 14종 모두 회수율 60~110%를 보여 대부분의 PAHs가 시료에서 추출됨을 검증해 주었다.

2. PAHs 분포 및 모니터링 결과

경기도 및 강원도 내에 있는 농수로 중 20곳과 15곳을 각각 선정 후 시료를 채취하여 개발된 분석법을 이용하여, 수로 내에 존재할 수 있는 PAHs 14종의 농도와 분포 특성을 규명하였다. MS/MS 분석 결과, phenanthrene과 fluoranthene을 제외하고 나머지 12종의 PAHs는 시료채취 지역에서 검출되지 않았다. 경기도 20곳 모두 phenanthrene이 검출되었으며 농도는 0.82에서 $2.56 \mu\text{g L}^{-1}$ 였다(Fig. 3A). 강원도 15곳 역시 phenanthrene이 모두 검출되었으며 농도는 0.83 to $1.62 \mu\text{g L}^{-1}$ 로 나타났다(Fig. 3B). Phenanthrene은 물 시료에서 가장 높은 농도로 검출되고 있는데, benzo(a)pyrene 같은 다른 PAHs류와는 다르게 암이나 돌연변이를 일으키는 오염물질은 아닌 것으로 알려져 있다(IARC 2010). 그러나 주목해야 할 점은 산소가 없는 환경에서 denitrification나 nitrification에 의해 주로 발생하는 반응성이 높은 NO_2^- 와 반응하여 nitro-phenanthrene을 생성한다는 점이다. Nitro-phenanthrene은 역시 불완전연소 과정에서 발생하는데 1970년대에 처음으로 대기오염물질로 검출되어, 암을 유발하거나 돌연변이를 유발할 수 있는 유전자 독성물질로 연구되어 왔다(Talaska *et al.* 1996). 경기도 내에 있는 농수로 한 곳에서 채취한 시료에서만 fluoranthene이 검출되었다($0.26 \mu\text{g L}^{-1}$). Fluoranthene 역시 암을 유발하거나 돌연변이를 유발하는 독성물질은 아니지만, phenanthrene과 마찬가지로 NO_2^- 와 반응하여 독성이 강한 nitro-fluoranthene으로 변형될 수 있다.

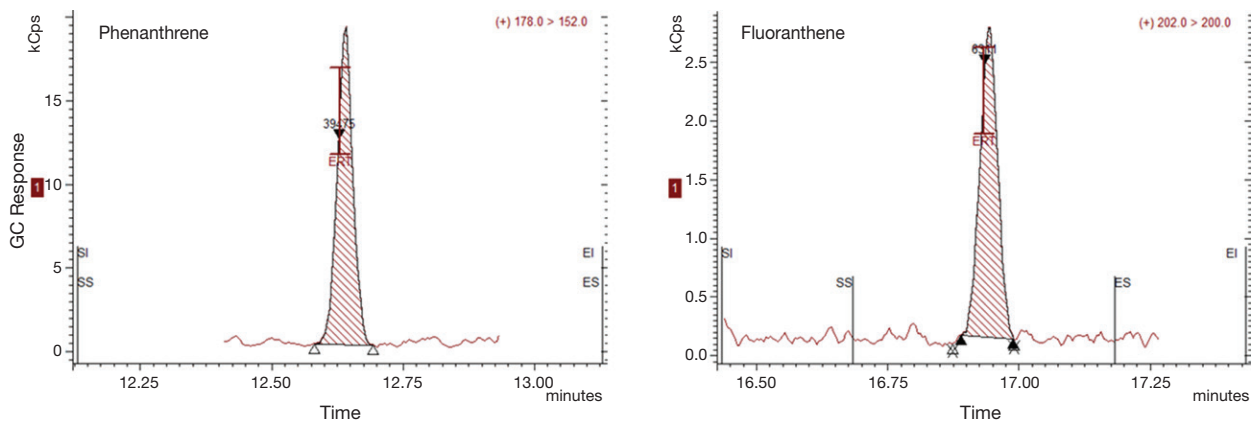


Fig. 2. GC-MS/MS Chromatogram for phenanthrene and fluoranthene detected in the samples from Gyeonggi.

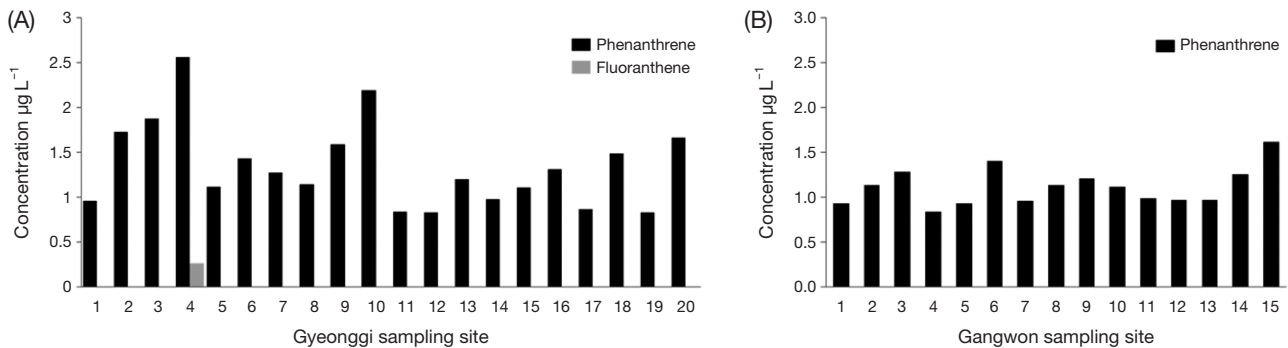


Fig. 3. Levels of PAHs determined in the agricultural water samples taken from Gyeonggi and Gangwon.

두 지역 모두 phenanthrene을 제외하고는 암을 유발할 수 있는 benzo(a)pyrene과 같은 PAHs가 농수로 시료에서 검출되지는 않아 관개용수로 이용하기에 적합한 것으로 나타났다. 그러나 PAHs류는 퇴적물이나 토양에 쉽게 흡착될 수 있다는 선행 연구를 고려해 볼 때 퇴적물이나 토양 중 PAHs 분석이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

적 요

다환방향족탄화수소류 (PAHs, Polycyclic aromatic hydrocarbons)는 열분해 또는 불완전연소 과정에서 발생하는 방향족 고리를 포함하고 있는 유기화합물질로서 생물 및 인간에 해를 입힐 수 있는 독성물질들로 알려져 있다. 이에 본 연구는 경기도 20곳 및 강원도 15곳에서 농업용수를 채취하여, 시료 중 PAHs 농도와 분포 특성을 규명하였다. 쉽고 간단하고 효과적인 케처스 추출법 및 d-SPE 정제법을 이용해 분석 시료를 준비한 후에 GC-MS/MS를 이용해 14종의 PAHs 분석하였다. 경기도 강원도 지역에서 채취한 모든 시료에서 Phenanthrene이 검출되었으며 경기도 지역의 phenanthrene 농도는 $0.82\sim 2.56 \mu\text{g L}^{-1}$ 였고 강원도 지역의 phenanthrene 농도는 $0.83\sim 1.62 \mu\text{g L}^{-1}$ 였다. 경기도 한 곳에서만 fluoranthene ($0.26 \mu\text{g L}^{-1}$)이 검출되었다. 분석법의 효율과 신뢰성을 확인하기 위한 회수율 시험에서 60~110%의 회수율을 얻었다. 상대표준편차는 PAHs 14종 모두 20% 이하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (세부과제명: 비의도성 잔류 유기화합물질의 모니터링 및 노출량 평가, 과제번호: PJ010922032015)의 지원으로 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

호: PJ010922032015)의 지원으로 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

Conflict of Interest

The authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

- Anandatheerthavarada HK, C Vijayasathy, SV Bhagwat, G Biswas, J Mullick and NG Avadhani. 1999. Physiological role of the N-terminal processed P450 1A1 targeted to mitochondria in erythromycin metabolism and reversal of erythromycin-mediated inhibition of mitochondrial protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 274:6617-6625.
- Anastassiades M, SJ Lehotay, D Stajnbaher and FJ Schenck. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86:412-431.
- IARC. 2010. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. https://www.wwf.or.jp/activities/lib/pdf_toxic/chemical/newpopsfinal.pdf. Accessed 20 June 2016.
- Moorthy B, C Chu and DJ Carlin. 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol. Sci.* 145:5-15.
- Schmidt ML and NH Snow. 2016. Making the case for QuEChERS-gas chromatography of drugs. *Trends Anal. Chem.* 75:49-56.
- Stockholm Convention. 2005. “New Pops”; Screening additional POPs candidates. https://www.wwf.or.jp/activities/lib/pdf_toxic/chemical/newpopsfinal.pdf. Accessed 28 June

- 2016.
- Talaska G, P Underwood, A Maier, J Lewtas, N Rothman and M Jaeger. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-PAHs and related environmental compounds: biological markers of exposure and effects. *Environ. Health Persp.* 104:901-906.
- Tan J, S Guo, Y Ma, J Duan, Y Cheng, K He and F Yang. 2011. Characteristics of particulate PAHs during a typical haze episode in Guangzhou, China. *Atmos. Res.* 102:91-98.
- UNECE. 2016. Protocol on persistent organic pollutants (POPs); The 1998 Aarhus Protocol on persistent organic pollutants (POPs). United Nations Economic Commission for Europe. http://www.unece.org/env/lrtap/pops_h1.html. Accessed 3 July 2016.
- WHO. 2010. WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants. WHO regional office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Wong JW, MG Webster, DZ Bezabeh, MJ Hengel, KK Ngim, AJ Krynitsky and SE Ebeler. 2004. Multiresidue determination of pesticides in malt beverages by capillary gas chromatography with mass spectrometry and selected ion monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 52:6361-6372.

Received: 5 August 2016

Revised: 19 August 2016

Revision accepted: 19 August 2016