

증발법과 GC/MS를 이용한 수질 시료 중의 Amitrole의 분석법 연구

윤소희 · 홍지은 · 표희수* · 박송자
한국과학기술연구원 생체대사연구센터
(2003. 9. 25 접수, 2003. 10. 16 승인)

Determination of Amitrole in Water Samples by Evaporation and GC/MS

So Hee Yoon, Ji Eun Hong, Hee soo Pyo* and Song Ja Park
Bioanalysis & Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science & Technology
P.O. Box 131, Chengryang, Seoul, Korea
(Received Sep. 25, 2003, Accepted Oct. 16, 2003)

요 약 : Triazole 계의 대표적인 농약 중 하나인 amitrole (3-amino-1,2,4-triazole)은 널리 사용되고 있는 제초제로, 환경 중에 유입될 경우 지하수 및 지표수를 오염시킴으로써 궁극적으로 음용수의 오염까지 일으킬 수 있다. 이 물질은 물에 대한 용해도가 높은 반면, 유기 용매에 대한 용해도가 낮고 극성이 강하기 때문에 수질 시료로부터 추출하기 매우 어렵다. 본 연구에서는 수질 시료 중의 amitrole을 GC/MS를 이용하여 ppb 수준 이하의 극미량까지 분석하기 위한 방법을 조사하였다. 10 mL의 수질 시료를 진공회전증발기로 완전히 증발시킨 후, isobutyl chloroformate (iso-BCF)를 사용하여 실온에서 15~20분간 반응시켜 유도체화 하였다. 그 결과, N-isobutoxycarbonyl amitrole derivative를 생성함으로써 GC/MS에서의 감도가 향상됨을 확인할 수 있었다. 1.0 µg/L, 10.0 µg/L 및 100.0 µg/L 농도의 수질에서 본 분석방법의 회수율은 각각 98.0%, 94.9% 및 105.3%였고, RSD는 2.4%, 2.8% 및 1.5%였다. 10 mL의 수질 시료로부터 얻어진 검량선의 상관계수는 0.1~100.0 µg/L의 농도 범위에서 0.997로 나타나 직선성이 우수하였으며, 검출한계는 0.1 µg/L로 나타났다.

Abstract : Amitrole is well-known as a non-selective herbicide and it is able to cause contamination of drinking water as well as pollution of ground water and surface water. However, it is difficult to extract from water because it has a high solubility for water whereas a low solubility for general organic solvents. This method is described for the determination of amitrole in water samples by GC/MS. After evaporation of 10 mL water sample by a vacuum evaporator, amitrole was derivatized with isobutyl chloroformate (iso-BCF) on room temperature for 15~20 min. As a result, the sensitivity for GC/MS was improved as N-isobutoxycarbonyl amitrole derivative was formed. The linearity of the

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)2-958-5181 Fax : +82+(0)2-958-5059
E-mail : phs3692@kist.re.kr

calibration curve showed good as 0.997. The recoveries were obtained more than 94.9% and relative standard deviations were less than 2.8% at 1.0 $\mu\text{g/L}$, 10.0 $\mu\text{g/L}$ and 100.0 $\mu\text{g/L}$. The limit of detection showed 0.1 $\mu\text{g/L}$ with a signal-to-noise ratio (S/N) of 3.

Key words : amitrole, isobutyl chloroformate, GC/MS

1. 서 론

인구의 증가와 더불어 발생하는 식량난을 해결하기 위하여 농약 개발은 꾸준히 진행되고 있고 그 종류와 사용 빈도가 증가하는 추세이다. 따라서 농약의 사용으로 야기되는 환경오염에 대한 분석의 필요성 또한 높아지고 있다. 특히 이러한 농약류 중에서 내분비계 장애 물질로 분류되어 엄격한 규제가 필요한 물질 중 하나가 amitrole이다. 미국환경보호청 (US EPA)에 따르면, 내분비계 장애물질 (endocrine disruptors)이란 “체내의 항상성 (homeostasis) 유지와 발달 과정을 조절하는 생체 내 호르몬의 생산, 분비, 이동, 대사, 결합작용 및 배설을 간섭하는 체외물질” 이라고 정의하고 있다.

Amitrole (3-amino-1,2,4-triazole)은 1952년 미국 Amchem Product 사가 처음으로 개발한 제초제로 초기에는 인축에 대한 독성이 없는 반면, 식물 체내의 이형성이 커서¹ 광역 잡초의 제거에 널리 사용되어 왔다.^{2,3} 물에 대한 용해도가 280 g/l 로 매우 커서 수질 환경에 유입될 경우 200일 이상 잔류함으로써 궁극적으로 수용수의 오염을 일으킬 가능성이 있다.⁴ US EPA에서는 amitrole을 인간에게 발암 가능성이 있는 물질로 분류하고 있고,⁵ 일본 국립 의약품 식품 위생 연구소에서도 amitrole을 내분비계 장애물질로 분류해 규제를 강화하고 있다. 미국에서는 1971년 이후에 생산 및 사용을 완전 중단하였고,⁶ 일본의 경우에도 1975년 생산과 판매를 중지하였다.¹ 우리나라에서는 1984년 영일화학에서 우스터넥수 수화제 (아미트롤 40% + MCPA 20% + 메타벤 20%) 등의 제품으로 생산되었으며 현재는 생산이 중지되었으나,⁷ 1999년 환경부 국립환경연구원에서 조사한 바에 따르면 수질 및 토양, 그리고 저질의 환경시료에서 0.16-13.94 $\mu\text{g/L}$ 의 농도 범위로 검출된 사례가 있다.⁸

기존의 amitrole의 분석방법은 일본의 내분비계장애물질 분석법인 SPEED '98에 나타나있는 방법으로, 초산 완충액을 이용하여 pH를 4.0으로 조절한 후 플루오레스카민과 반응시켜 ODS계 고상 컬럼을 사용하여 농축한

다음, HPLC/FLD로 정량하는 방법이다.⁹ 그러나 이 방법은 복잡한 시료 전처리 단계를 거쳐야 하고 분석시간이 오래 걸리는 등의 여러 단점이 있어 amitrole을 분석하는데 많은 어려움이 따르며 LC/MS 등을 사용하여 질량 분석에 의한 amitrole 확인이 요구된다.

본 연구에서는 기체크로마토그래프-질량분석계 (GC/MS)를 이용하여 amitrole을 신속, 정확하게 분석할 수 있는 유도체화 방법을 확립하고, 이를 이용하여 수질시료에서 잔류하는 amitrole을 정량 분석하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 amitrole은 Dr.Ehrenstofer 사 (Augsburg, Germany)에서 구입하여 0.01 g을 정확히 무게 달아 메탄올 10 mL에 녹여 1000 $\mu\text{g/mL}$ 의 표준용액을 만들어 희석하여 사용하였고, 내부표준물질로 pyrene-d₁₀을 Aldrich 사 (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하여 0.01 g을 정확히 무게 달아 아세트산에틸 10 mL에 녹여 1000 $\mu\text{g/mL}$ 로 만든 다음 희석하여 사용하였다. 유도체화 시약으로 사용한 isobutyl chloroformate (iso-BCF) 98% 용액은 Acros Organics 사 (Geel, Belgium)에서 구입하여 원액을 그대로 사용하였고, 반응용매로 사용한 디클로로메탄은 Baker 사 (Philipsburg, NJ, USA)의 잔류농약급 시약을 사용하였으며, 증류수는 Mili-Q 및 Mili-RO system을 통과한 3차 증류수를 사용하였다.

2.2. 분석기기 및 장치

실험에 사용한 시험관 등 모든 유리 기구는 세척액과 3차 증류수로 세척 후 건조하여 사용하였고, 시료의 농축을 위해 사용한 진공회전증발기는 Buchi 사 (Flawil, Switzerland)의 제품을 사용하였다. 질소농축기는 Zymark 사 (Hopkinton, MA, USA)의 TurboVap LV evaporator를 사용하였다.

본 연구에서 사용한 GC/MS는 Agilent 사 (Palo Alto,

CA, USA)의 6890 GC와 5973N mass selective detector를 direct inlet으로 연결한 것으로서 시료는 7683 autoinjector 및 controller를 사용하여 주입하였다. 헬륨 가스는 99.9999% 순도를 사용하였다. 기기 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. GC/MS operating conditions for amitrole-isobutoxycarbonyl derivative

• GC/MS : Agilent 6890 Gas Chromatography/5973N Mass Selective Detector				
• Column : Ultra-2(Cross-linked 5% phenylmethylsilicon, 25 m × 0.2 mm I.D × 0.33 μm film thickness)				
• Carrier gas : He at 1.0 mL/min				
• Splitless				
• Injection port temp. : 250 °C				
• Transfer line temp. : 280 °C				
• Oven temp. program				
initial temp. (°C)	initial time (min)	rate (°C/min)	final temp. (°C)	final time (min)
100	0	10	260	0
• Run Time : 16 min				
• SIM mode (solvent delay : 4.0 min)				
Group	Start time(min)	Selected Ions, m/z		
1	4.0	57, 84, 106, 127, 184, 212		

2.3. 실험 방법

2.3.1. 시료 전처리

물시료 10 mL을 취하여 20 mL 시험관에 넣은 다음, 10 μg/mL의 내부표준물질 100 μl를 넣는다. 진공회전증발기를 이용하여 시료를 완전히 증발시킨 후, 잔류물에 디클로로메탄 200 μl을 넣어 녹인 다음 유도체화시약 iso-BCF 50 μl를 넣는다. 실온에서 20분간 반응시킨 후 질소농축기를 이용하여 건조시킨 다음 잔류물을 아세트산에틸 100 μl로 다시 녹인 후 자동시료 주입기용 바이알에 옮겨 담아 2 μl를 GC/MS에 주입하여 분석하였다.

2.3.2. GC/MS 분석

시료 전처리를 통해 얻은 용액을 Table 1에 나타난 기기조건에 따라 amitrole을 분석하였다. 먼저 isobutoxy carbonyl 유도체화된 amitrole과 내부표준물질을 질량 주사범위 40-700amu의 scan mode로 질량스펙트럼을 확인한 다음, 3개의 특성이온을 선택하여 SIM mode로 분석하였다.

2.3.3. 검량선 및 검출한계

물시료 10 mL에 10 μg/mL의 내부표준물질을 100 μl 넣은 후, amitrole 표준용액을 농도별로 0.1-100.0 μg/L 까지 되도록 첨가하고 앞에서 설명한 방법으로 시료를 전처리 한 다음, GC/MS에 주입하여 분석하였다. 용액 중의 각 성분의 농도에 따른 피크 면적비에 따라 검량선을 작성하고 S/N ratio가 3이상 되는 최저농도를 검출한계로 정하였다.

2.3.4. 정밀도 및 정확도

물시료 10 mL에 내부표준물질용액 (10 μg/mL) 100 μl를 넣은 후, amitrole 표준용액을 각각 1.0 μg/L, 10.0 μg/L, 100.0 μg/L이 되도록 첨가하고 앞의 실험방법과 동일하게 전처리 한 후, GC/MS로 분석 정량하여 실제값과 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. GC/MS 분석 결과

본 연구의 목적은 GC/MS를 이용하여 amitrole을 신속, 정확하게 분석할 수 있는 유도체화 방법을 확립하고, 이를 이용하여 수질시료에서 잔류하는 amitrole을 정량 분석하는데 있다. 본 연구에서는 수질 시료로부터 추출이 잘 되지 않는 amitrole을 진공회전증발기로 시료를 완전히 증발시킨 후, iso-BCF 50 μl를 사용하여 실온에서 20분 동안 유도체화 하여 GC/MS로 분석하는 방법을 사용하였다. 유도체화 반응은 Fig. 1에 나타내었다.

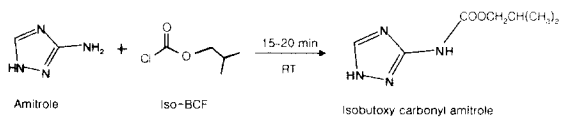


Fig. 1. Chemical reaction of the derivatization of amitrole with iso-BCF.

표준용액의 GC/MS의 분석결과는 Fig. 2의 크로마토그램으로 나타내었으며, Fig. 3에는 각각의 성분별 mass spectrum도 나타내었다. Mass spectrum에서 보는 바와 같이, amitrole의 분자량은 84이나 amitrole의 -NH2 group에서 H⁺가 isobutoxy carbonyl group으로 치환되어 분자이온 [M⁺]의 m/z 184로 나타난다. 여기에서 다시

isobutoxy carbonyl group이 떨어져 나가면서 H⁺가 치환되어 나타나는 m/z 84가 주피이크로 나타남을 볼 수 있다. 그리고 유도체화 시약으로 formate 계의 시약을 사용하여 mass spectrometry로 분석하였을 때 보편적으로 carbonyl group과 alkyl group의 결합이 끊어져 alkyl group의 m/z가 나타나는 특징이 있는데, 이 경우에는 -CH₂CH(CH₃)₂의 m/z 57이 나타나는 것을 확인할 수 있다. 본 연구에서는 amitrole의 정량을 위해 주피이크로 나타난 m/z 84를 정량이온으로 이용하였고, 정성을 위해 m/z 57, 84, 184를 정성이온으로 이용하여 보다 정확히 amitrole의 검출 여부를 확인할 수 있도록 하였다.

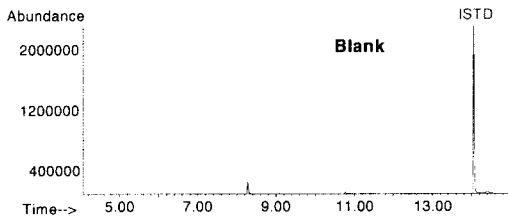
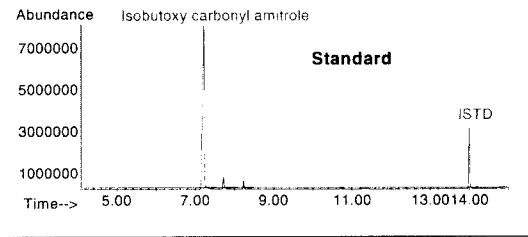


Fig. 2. Total ion chromatograms of the isobutoxycarbonyl amitrole and its blank.

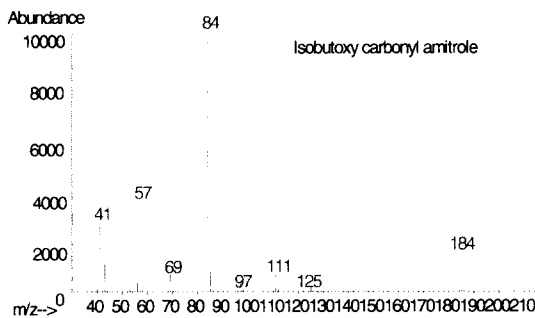


Fig. 3. Mass spectrum of amitrole-isobutoxycarbonyl derivative.

3.2. 검량선 및 검출한계

Amitrole의 검량선과 검출한계를 구하기 위하여 0.1 - 100.0 µg/L의 농도 범위에서 10개의 농도를 선택하여 실험하였으며, Table 2에 검량선의 상관관계수 및 검출한계를 나타내었다. 10 mL의 수질 시료로부터 얻어진 검량선의 상관관계수는 0.1 - 100.0 µg/L의 범위에서 0.997로 직선성이 우수하였으며, 검출한계는 S/N 비를 3 이상으로 하였을 경우 0.1 µg/L로 나타났다.

Table 2. Calibraton table and detection limits of amitrole in 10 mL of water samples

Calibration range (µg/L)	y = ax + b			MDL* (µg/L)
	a	b	r ²	
0.1 - 100.0	0.156	-0.00174	0.997	0.1

* MDL : method detection limit

일본의 내분비계 장애물질의 분석방법인 SPEED '98의 amitrole 분석법에 따르면, 시료 20 mL를 사용하여 아세트산완충액으로 pH 4.0으로 조절한 후 fluorescamine과 반응시켜 ODS계 고체상 컬럼을 사용하여 농축한 다음 HPLC/FLD로 정량하는 방법을 사용하고 있다. 그러나 이 방법은 복잡한 시료 전처리 단계를 거쳐야 하고 분석시간이 오래 걸리는 등의 여러 단점들이 있으며 검출한계가 1.0 µg/L으로, 본 연구 방법의 결과와 비교하여 볼 때 훨씬 높은 검출한계를 보여주고 있다. 또한 본 연구에서는 물시료를 10 mL만 사용하였고 진공회전증발기를 사용하여 완전 증발한 다음 짧은 반응 시간만이 소요되므로 시료의 전처리의 시간을 단축할 수 있었다.

3.3. 정밀도 및 정확도

본 실험방법의 정확도 및 신뢰성을 검증하기 위해 정도 관리를 수행하였다. 10 mL의 3차 증류수에 표준 용액을 1.0 µg/L, 10.0 µg/L 및 100.0 µg/L가 되도록 첨가하고 위와 동일한 실험방법으로 각 농도별로 3회 실시하였다. 실험 결과, 각 농도에서 회수율이 각각 98.0%, 94.9%, 및 105.3%로 나타났고, 정밀도는 1.46 ~ 2.84%, 정확도는 ± 2.00 ~ 5.26%로 나타나 본 실험방법으로 amitrole의 정확한 정량분석이 가능함을 확인하였다. 이 결과를 Table 3에 나타내었다.

Table 3. Quality controle data of amitrole (n=3)

Target value ($\mu\text{g/L}$)	Measured value ($\mu\text{g/L}$)				Precision (% C.V.)	Accuracy (% Bias)
	1	2	3	Average		
1.00	1.01	0.97	0.97	0.98	2.35	-2.00
10.00	9.25	9.78	9.43	9.49	2.84	-5.10
100.00	104.46	104.29	107.03	105.26	1.46	+5.26

4. 결 론

본 연구에서는 수질시료에 잔류하는 제초제인 amitrole을 GC/MS를 통해 분석하는 방법을 연구하였다. Amitrole은 수질시료에서 추출이 잘 되지 않기 때문에 본 연구에서는 시료를 진공회전증발기로 완전히 증발시켜 농축하는 방법을 선택하였다. 또한 GC/MS를 이용하여 분석하기 위해 iso-BCF로 유도체화 한 결과 기존의 방법보다 향상된 검출한계를 얻을 수 있었다. 기존의 분석방법인 일본의 SPEED '98 실험방법의 검출한계가 1.0 $\mu\text{g/L}$ 인데 비하여, 본 연구 방법을 통하여 얻은 검출한계는 0.1 $\mu\text{g/L}$ 로 나타났다. 회수율을 조사한 결과, 3개의 농도에서 모두 94.9% 이상으로 나타났으며, 상대표준편차도 모두 2.84% 이하로 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 그리고 10 mL의 수질시료 중 amitrole을 분석한 결과, 0.1 $\mu\text{g/L}$ - 10.0 $\mu\text{g/L}$ 의 범위에서 상관계수가 0.997로 직선성이 양호하였다.

감사의 글

본 연구는 과기부의 국가지정연구실사업 지원(과제번호 : 2000-N-NL-01-C-045)으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. 박찬구, 어수미, 김민영, 신재영, 황지만, 모세영, 한국환경분석학회지, 2(4), 275-279 (1999).
2. "Farm chemicals handbook", 76th Ed., C16, Meister Pub. Co., Ohio, USA, 1982.
3. T. Oesterreich, U. Klaus, M. Volk, B. Neidhart, and M. Spitteller, *Chemosphere*, 38, 379-392(1999).
4. I. Bobeldijk, K. Broess, P. Speksnijder, and

- T. van Leerdam, *J. Chromatogr. A*, 938, 15-21(2001).
5. USEPA; Methodology for Evaluating Potential Carcinogenicity in Support of Reportable Quantity Adjustments Pursuant to Cercla Section, 102 (Final), 37(1988) EPA/600/8-89/053.
6. P. C. Kearney, "Herbicides : chemistry, degradation and mode of action", 2nd Ed., Vol. 1, pp.378, D. D. Kaufman, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, U.S.A., 1975.
7. 박창규, 홍종우, "농약총람", 동신출판사, 1996.
8. 환경부 국립환경연구원, "'99년 내분비계 장애물질 조사·연구사업 결과보고서", 15-39, 2000.
9. 일본 내분비계 장애물질 분석법, "SPEED '98", 77-83, 1998.