

Simultaneous determination of carbaryl & organophosphorous pesticides in water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Keun-Young Park, Jung-Chul Shin, and Dongjin Pyo^{1, *}

Gangwon-do Institute of Health and Environment, Chuncheon 24203, Korea

¹Department of chemistry, Gangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

(Received November 17, 2017; Revised January 19, 2018; Accepted January 19, 2018)

LC/MS/MS를 이용한 수중의 카바릴 · 유기인계 농약 동시분석

박근영 · 신정철 · 표동진^{1, *}

강원도보건환경연구원, ¹강원대학교 자연과학대학 화학과

(2017. 11. 17. 접수, 2018. 1. 19. 수정, 2018. 1. 19. 승인)

Abstract Carbaryl and seven organophosphorous pesticides were analyzed simultaneously using on-line solid phase extraction (on-line SPE) coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The target pesticides are Carbaryl, Methyl demeton, Fenitrothion, Malathion, Parathion, Phenthoate, Diazinon, and EPN. This method includes the direct injection of 500 μ L in the water sample, a 15 min separation period using a rapid resolution liquid chromatography system with on-line SPE, and detection through electrospray ionization (ESI) positive mode. The percentage of recovery of all pesticides ranged from 85.3 % to 100 %. This method showed an accuracy of ≥ 90.0 %, possessing limits of detection and quantification within 0.05 to 0.28 μ g/L and 0.16 to 0.89 μ g/L, respectively. The correlation coefficients (r) for the calibration curves within a range of 0.5 to 8.0 μ g/L were higher than 0.99. The evaluation results showed the efficacy of the method for all contents, and no pesticides were detected in the water quality sample.

요 약: 온라인 고체상 추출을 이용한 LC/MS/MS를 사용하여 carbaryl과 유기인계 농약 7종을 동시에 분석하는 방법을 확립하였다. 분석 대상농약은 carbaryl, diazinon, methyl-demeton, fenitrothion, malathion, parathion, phenthoate, EPN 등 8종이다. 본 연구에서는 온라인 고체상 추출과 LC/MS/MS의 ESI positive mode로 전처리 없이 물 시료 500 μ L를 직접 주입하여 10분안에 분석하였다. 농약 8종의 회수율은 86.8~100% 였고, 정확도는 90.6~98.8%로 90%이상이었으며, 정밀도는 1.3~5.2%로 나타났으며 검출한계 및 정량한계는 각각 0.05~0.28 μ g/L, 0.16~0.89 μ g/L 였다. 0.5 μ g/L에서 8.0 μ g/L까지 다섯 개의 농도로 검량선을 작성한 결과 모든 물질의 상관계수(r^2)가 0.99이상을 나타냈다. 방법의 유효성 평가를 한 결과 모든 내용에서 적합하므로 확립한 분석방법으로 수질 시료에서 농약을 조사한 결과 모두 검출되지 않았다.

Key words: carbaryl, organophosphorous pesticides, liquid chromatography -tandem mass spectrometry, on-line solid phase extraction, method validation

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)33-250-6918

E-mail : pyod@kangwon.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

수질에서 규제하고 있는 농약 항목은 먹는물 수질 기준 중 유기인계인 diazinon, parathion, fenitrothion 등 3종과 카바메이트계인 carbaryl이 있고, 상수원수, 생활용수, 농업용수, 어업용수, 공업용수의 유기인(methyl-demeton, diazinon, parathion, phenthoate, EPN)이 있으며, 해수에는 diazinon, parathion, malathion 등이 있다. 유기인계 농약은 현재 사용하고 있는 농약 중에서 가장 많은 종류를 차지하고 있으며, 주로 곤충의 신경에 작용하는 살충제로 사용하고 있으나 살균제, 제초제로도 개발되어 상용화 되어 있다. 유기염소계에 비해 지속성이 적어 잔류 위험이 적지만 살충력이 강해 적용 해충의 범위가 넓으며 다량 사용되고 있다.¹ 유기인계 및 카바메이트계 농약은 모두 콜린에스테라제 억제제로 인체내 신경전달물질인 아세틸콜린을 분해하는 요소와 강력하게 결합하여 신경전달체계에 아세틸콜린이 분해되지 못하고 활성을 저해하여 살충효과를 나타내고 있다.² 유기인계 농약에 지속적으로 노출되면 기관지 수축으로 인한 가슴압박과 기관지 분비 증대, 구토, 피로 및 경련 등의 증상이 나타날 수 있다.³

물중의 잔류농약 성분을 분석하기 위한 방법으로 유기인계 농약은 기체크로마토그래피/질량분석기(Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS)나 질소인 검출기가 장착된 기체크로마토그래피(Gas Chromatography, GC)를 사용하게 되어 있으며, carbaryl은 고성능액체크로마토그래피(High Performance liquid chromatography, HPLC)를 사용하고 있다. 농약의 수질기준은 매우 낮은 농도로 규제하므로 검출하기 위해서는 농약을 분석하기 전에 추출과 농축을 위한 전처리 과정이 필요하다. 잔류농약 추출 방법으로는 액액 추출법(Liquid Liquid Extraction, LLE)과 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE)을 주로 사용하고 있다. 액액 추출법의 경우 500~1000 mL의 시료를 추출하고 100~1000 배 농축하는 과정에 걸리는 시간과 실험에 사용하는 용매로 인하여 분석자의 건강과 분석실 환경에 영향을 미치므로 이러한 단점들을 개선하기 위한 기술들이 개발되고 있다. 다른 전처리 방법으로 고체상 미량 추출법(Solid Phase Micro Extraction, SPME), 다 성분 동시 신속정제법(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, QuEChERS), On-line SPE 장치와 결합한 Direct injection법, 시료 농축이 없는 Direct injection법 등이 잔류농약 분석에 응용되고 있다. GC/

MS/MS, LC/MS/MS, GC/HRMS(Gas Chromatography/High Resolution Mass Spectrometry), Orbitrap MS 등도 질량분석기의 고감도로 인한 낮은 정량한계값과 높은 정확도 때문에 많이 사용되고 있다.⁴

그동안 LC/MS는 10 µg/L 수준의 농도가 높은 시료의 분석으로 제한되었기 때문에 GC/MS가 잔류농약 분석에 가장 선호하는 방법이었다.⁵ 그러나 새로운 LC/MS/MS의 기술은 LC/MS 시스템의 기기적인 검출한계를 ng에서 pg 이하까지 개선하였고, 수질 환경에서 극성의 오염물질과 그 변환 생성물을 검출하는 데 중요한 기술이 되었다.^{6,7}

본 연구에서는 상수원수, 정수, 먹는물 등의 수질 시료에서 규제하는 carbaryl과 유기인계 농약 7종(methyl-demeton, diazinon, parathion, phenthoate, EPN, fenitrothion, malathion)에 대하여 on-line SPE 장치와 결합한 direct injection LC/MS/MS를 이용하여 전처리 없이 물 시료 500 µL를 직접 주입하여 동시에 분석하는 방법을 확립하였고, 방법의 유효성 평가를 위하여 회수율, 검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도 등을 측정하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 표준물질 및 시약

Methyl demeton, diazinon, parathion, malathion, fenitrothion, phenthoate, EPN 등 유기인계 농약 7종에 대한 표준물질은 AccuStandard (New Haven, CT, USA)의 Custom Pesticide Mix (0.1 mg/mL)를, carbaryl은 Wako (Tokyo, Japan)의 잔류농약시험용(200 mg)을 구입하여 사용하였다. LC/MS/MS에 이동상으로 사용한 formic acid는 SIGMA-ALDRICH (Germany)를 유기용매 methanol과 acetonitrile은 J.T.Baker (USA)의 HPLC grade를 사용하였다.

2.2. 기기 분석 조건

농약 8종에 대한 측정은 고속액체크로마토그래피/질량분석기(LC/MS/MS)를 이용하여 분석을 수행하였으며, 장비는 TSQ QUANTUM ACCESS MAX (Thermo SCIENTIFIC, USA)를 측정에 사용하였다. HPLC 분석 펌프는 DIONEX HPG-3400RS, SPE 로딩 펌프는 DIONEX LPG-3400SD, 분석컬럼은 Thermo SCIENTIFIC™ Hypersil GOLD column (50 × 2.1 mm, 1.9 µm), on-line SPE 컬럼은 Thermo SCIENTIFIC™ Hypersil GOLD Aq. Pre-concentration column (20 ×

Table 1. LC/MS/MS optimized conditions for target pesticides

HPLC conditions		
Column	LC	Hypersil GOLD column 50×2.1 mm, 1.9 μm
	SPE	Hypersil GOLD, 20×2.1 mm, 1.3 μm
Column Temperature	35 °C	
Mobile Phase	A = 0.1 % Formic acid, B = Acetonitrile	
LC Gradient	Min	%B flow rate = 0.25 mL/min
	0	5
	1.5	5
	6.0	95
	9.0	95
	9.1	5
	15.0	5
	Stop time	15 min.
SPE	A : B = 98 : 2	flow rate=1.0 mL/min
Pump	LC HPG-3400RS	
	SPE LPG-3400SD	
Injection Volume	500 μL	
MS/MS conditions		
Mode	Positive ESI	
Capillary Temperature	320 °C	
Vaporizer Temperature	300 °C	
Sheath Gas Pressure	40 arbitrary units	
Ion Sweep Gas Pressure	1.0 arbitrary units	
Aux Gas Pressure	20 arbitrary units	
Spray Voltage	3700 V	
Discharge Current	4.0 μA	
Collision Energy	5~38 V	

2.1 mm, 1.3 μm)을 사용하였다. LC/MS/MS 분석 조건은 Table 1에 요약하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분석능약의 특성

본 연구에서 검토한 수질에서 규제하는 잔류농약 8종의 화학적 구조 및 분자량, 물에 대한 용해도 등의 특성을 Table 2에 나타내었다.

분석은 LC/MS/MS의 Multiple Reaction Monitoring (MRM)의 ElectroSpray Ionization (ESI) positive mode에서 이루어졌고, 본 연구에서 확립한 carbaryl과 유기인계 잔류농약의 동시 분석에 사용한 최종적인 조건들은 Table 3과 같다.

3.2. 회수율

50 μg/L의 혼합표준용액 10 μL를 on-line SPE 컬럼

을 거치지 않고 LC/MS/MS로 직접 주입하여 peak area값을 확인하고, 1 μL/L 혼합표준용액 500 μL를 주입하여 on-line SPE 컬럼을 통과시켜 분석한 peak area값을 비교하여 회수율을 측정하였다. 혼합표준용액 50, 100, 500 μL/L에 대한 각각의 회수율을 검토한 결과는 Table 4와 같고 평균 회수율은 모두 90% 이상이였다. 따라서 on-line SPE 장치와 결합한 LC/MS/MS를 이용하여 수질 시료 500 μL를 직접 주입하는 방법으로 분석이 가능함을 확인하였다. 또한 정량한계에 해당하는 0.5 μL/L에 대한 peak area값이 carbaryl, diazinon, malathion, phenthoate 등 4종은 2×10⁵ 이상으로 ng/L 단위의 양도 검출할 수 있는 감도를 나타냈으므로 주입량은 500 μL로 설정하였다.

3.3 실험방법 비교

유기인계 농약 분석방법은 먹는물수질공정시험기준에서는 기체크로마토그래프-질량분석법과 기체크로마

Table 2. Properties of pesticides⁸


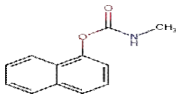
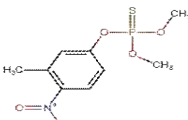
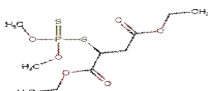
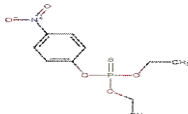
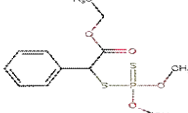
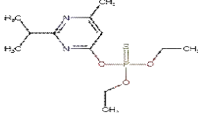
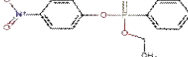
Compound	CAS Number	Molecular weight	Chemical Structure	Molecular Formula	Water Solubility (mg/L)
Methyl-demeton	919-86-8	230.288		C ₆ H ₁₅ O ₃ PS ₂	3,300 (20 °C)
Carbaryl	63-25-2	201.224		C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	110 (22 °C)
Fenitrothion	122-14-5	277.236		C ₉ H ₁₂ NO ₃ PS	38 (25 °C)
Malathion	121-75-5	330.360		C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	143 (20 °C)
Parathion	56-38-2	291.263		C ₁₀ H ₁₄ NO ₃ PS	11 (20 °C)
Phenthoate	2597-03-7	320.368		C ₁₂ H ₁₇ O ₄ PS ₂	11 (20 °C)
Diazinon	333-41-5	304.349		C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	40 (25 °C)
EPN	2104-64-5	323.308		C ₁₄ H ₁₄ NO ₄ PS	3.11 (23 °C)

Table 3. Multiple reaction monitoring conditions for each of the compounds tested

Compound	RT(min.)	Parent ion	Product ion	MRM Collision Energy	ESI mode
Methyl-demeton	5.40	231	61, 89	33, 5	Positive
Carbaryl	5.62	202	117, 127, 145	27, 27, 10	Positive
Fenitrothion	5.75	278	125, 246	20, 18	Positive
Malathion	6.35	331	99, 285	23, 5	Positive
Parathion	6.60	292	110, 156, 236	32, 24, 15	Positive
Phenthoate	6.65	321	79, 135	38, 18	Positive
Diazinon	6.68	305	153, 169	20, 20	Positive
EPN	6.86	324	157, 296	24, 14	Positive

토그래피법이 있고, 수질오염공정시험기준은 기체크로마토그래피법이 있다.^{9,10} 두가지 공정시험기준 모두 수질중에 포함된 유기인계 농약 전처리 방법은 Fig. 1

과 같다.

농약의 전처리 과정에는 용매 추출과 농축 및 정제 과정이 포함되므로 많은 시간이 소요되며, 유기인계

Table 4. Recovery rate of pesticides (unit : %)

Compound	50 µg/L	100 µg/L	500 µg/L	average
Methyl-demeton	99.7	98.5	96.4	98.2
Carbaryl	98.7	99.3	98.8	98.9
Fenitrothion	89.6	90.5	91.2	90.4
Malathion	100	99.6	98.5	99.4
Parathion	87.9	91.4	92.5	90.6
Phenthoate	99.7	96.4	95.1	97.1
Diazinon	98.3	98.2	99.0	98.5
EPN	92.1	91.7	86.8	90.2

☞ 5회 반복, RSD=2~10 %

농약을 기체크로마토그래피(질소인검출기)로 분석할 경우 50 µg/L를 검출하기도 쉽지 않으므로 0.5 µg/L의 정량한계를 맞추려면 시료량과 농축배수로 조절해

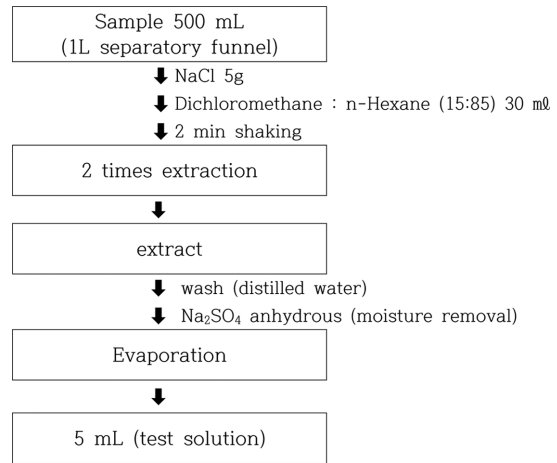


Fig. 1. Flow chart of sample preparation.

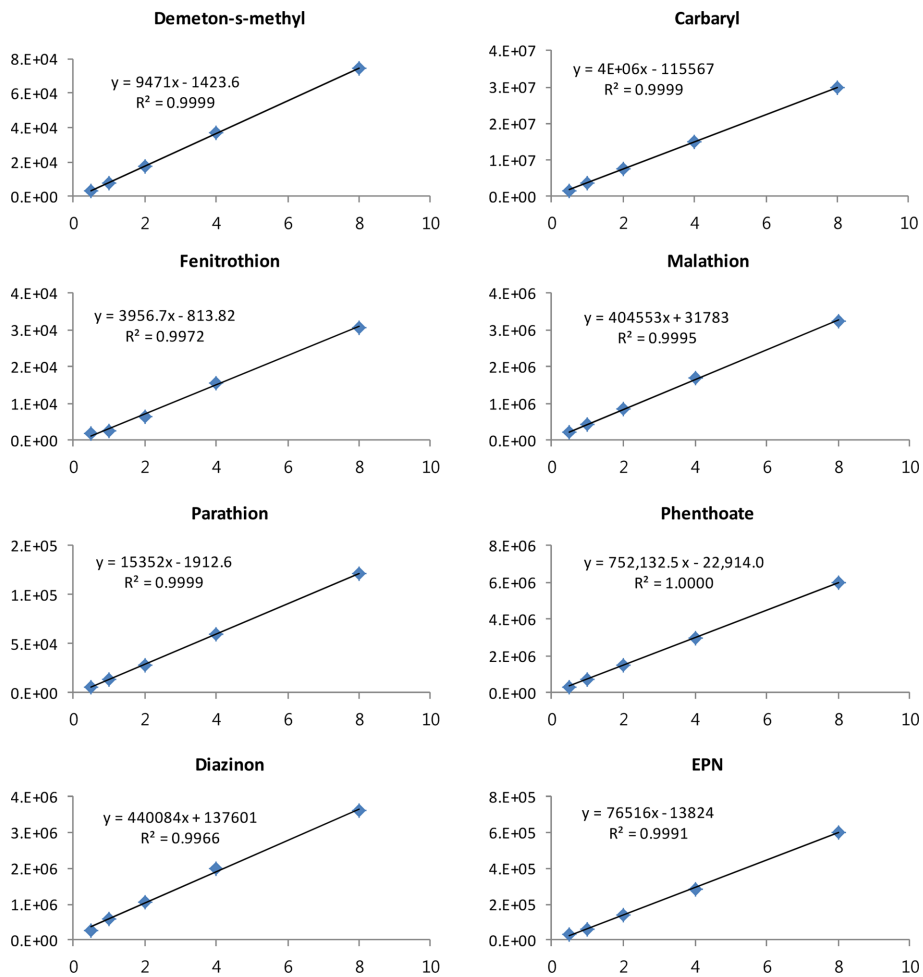


Fig. 2. Calibration curve for target pesticides.

약한다.

또한 카바릴의 경우 먹는물, 샘물 및 염지하수에서 규제하고 있는 항목으로 먹는물 공정시험기준에서는 카바릴-고성능액체크로마토그래피법으로 용매추출후 HPLC로 분리한 다음 자외선검출기로 측정하거나, 용매추출없이 post-column reactor로 유도체화 한 다음 형광검출기로 분석하는 방법이다.

유기인계 농약과 카바릴을 공정시험기준대로 분석하기 위해서는 전처리와 농축을 위한 시간이 많이 걸리고, 다른 분석장비를 사용해야 하며, 사용하는 용매로 인한 분석자의 건강과 실험실 환경에도 영향을 끼치므로 수질시료를 여과만 해서 직접 주입하는 본 연구의 방법은 이러한 단점들을 보완하였다.

3.4. 시험 방법 유효성 평가

3.4.1. 검량선 작성

분석대상 농약 8종에 대하여 외부표준법(External Standard Method)으로 검량선을 작성하였다. 농도가 0.1 mg/mL인 표준원액을 정제수로 희석하여 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 µg/L의 농도를 제조하여 검량선을 작성한 결과 Fig. 2와 같이 상관계수(r^2)가 0.9967~0.9999로 직선성이 좋게 나타났고, 각성분별 크로마토그램은 Fig. 3과 같다.

3.4.2. 검출한계 및 정량한계

분석방법의 검출한계와 정량한계를 측정하기 위하여 표준용액을 희석하여 수질기준에서 잔류농약의 정

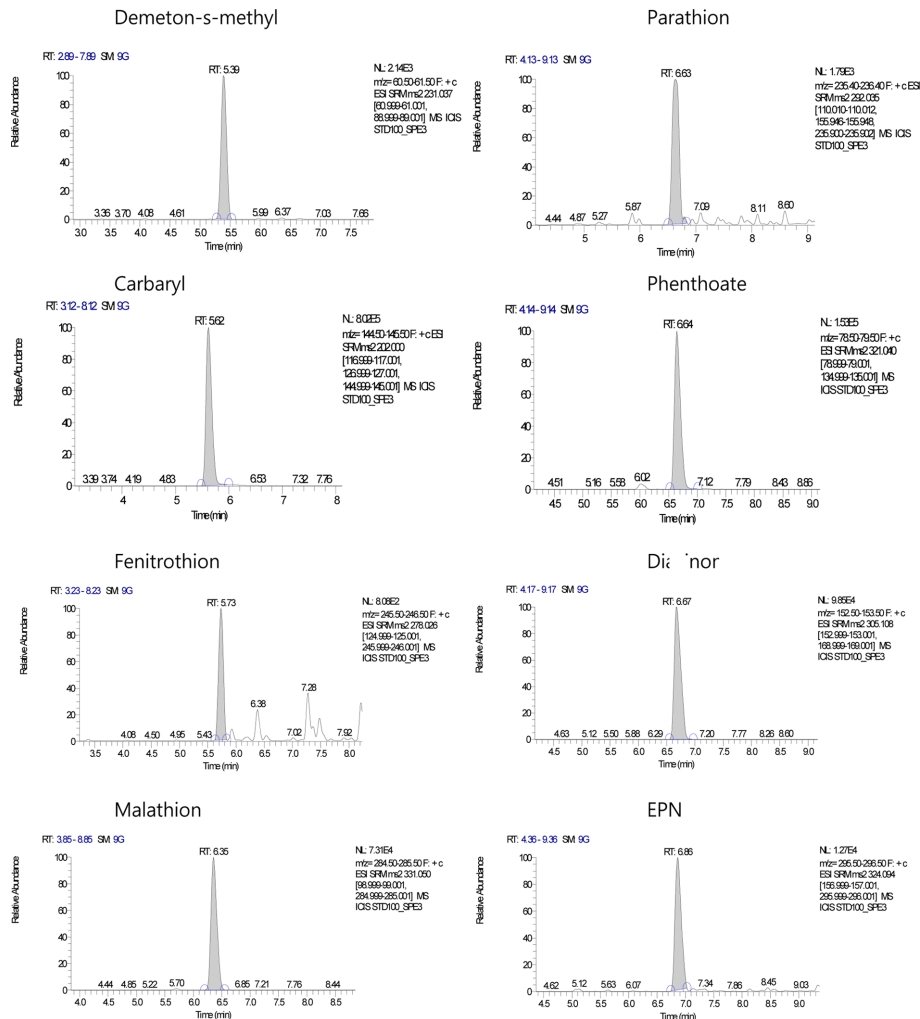


Fig. 3. LC/MS/MS total ion chromatogram.

Table 5. Limits of detection (LODs) and Limits of quantification (LOQs) of pesticides

Compound	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	RSD(%)
Methyl-demeton	0.16	0.51	1.8
Carbaryl	0.08	0.27	1.6
Fenitrothion	0.11	0.34	3.6
Malathion	0.12	0.40	1.5
Parathion	0.28	0.89	1.4
Phenthoate	0.05	0.16	0.4
Diazinon	0.07	0.23	2.5
EPN	0.17	0.54	2.5

☞ 0.5 $\mu\text{g/L}$, 7회 반복, RSD=0.5~10 %

Table 6. Accuracy and precision data obtained in 4 replicates in water

Compound	Accuracy (% recovery)	Precision (% RSD)
Methyl-demeton	95.6	2.5
Carbaryl	98.8	1.5
Fenitrothion	90.6	5.2
Malathion	98.8	1.5
Parathion	94.4	2.5
Phenthoate	98.1	1.3
Diazinon	98.1	1.3
EPN	96.9	2.5

☞ 4.0 $\mu\text{g/L}$, 5회 반복, RSD=1.5~10 %

량한계인 0.5 $\mu\text{g/L}$ 로 제조하여 LC/MS/MS 분석조건으로 7회 반복 분석한 측정값의 표준편차를 이용하여 검출한계와 정량한계를 구하였다. 검출한계는 측정값의 표준편차에 3.14를 곱하여 산출하였고, 정량한계는 표준편차의 10 배에 해당하는 값으로 정하였다⁹ (Table 5).

3.4.3. 정확도와 정밀도

분석방법의 신뢰도를 검증하기 위하여 시료의 정확도와 정밀도를 조사하였다. 정제수에 정량한계의 1~5 배의 농도가 되도록 동일하게 표준물질을 첨가한 시료를 4개 이상 준비하여 분석절차와 동일하게 측정하여 평균값과 표준편차를 구한다. 정확도는 첨가한 표준물질의 농도에 대한 측정 평균값의 상대 백분율로서 나타내며 그 값이 75~120 % 이내이어야 하고 정밀도는 측정값의 % 상대표준편차(RSD)로 계산하며 측정값이 25 % 이내이어야 한다.^{9,10} 4.0 $\mu\text{g/L}$ 가 되도록 농약 표준용액을 정제수에 첨가하여 분석할 시료를 조제하여 확인한 결과 정확도는 90.6~98.8 %, 정밀도는

1.3~5.2 %로 모두 양호한 값을 나타냈다(Table 6).

4. 결 론

상수원수, 정수, 먹는물 등의 수질 시료에서 규제하는 carbaryl과 유기인계 농약 7종 (methyl-demeton, diazinon, parathion, malathion, fenitrothion, phenthoate, EPN)에 대하여 on-line SPE 장치와 결합한 Direct injection LC/MS/MS를 이용하여 전처리 없이 물 시료 500 μL 를 직접 주입하여 동시에 분석하는 방법을 확립하였고, 방법의 유효성 평가를 위하여 표준용액의 검정곡선, 회수율, 검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도 등을 측정하였다.

수질에서 규제하는 잔류농약 8종에 대하여 on-line SPE 장치와 결합한 LC/MS/MS를 이용하여 유기인계 농약과 carbaryl을 추출 및 농축의 전처리 없이 시료 500 μL 를 직접 주입하여 동시에 분석하는 방법을 확립하였다.

2. 잔류농약 8종에 대한 회수율을 검토한 결과, 50 $\mu\text{g/L}$ 에서는 87.9~100 %, 100 $\mu\text{g/L}$ 에서는 91.4~99.6 %, 500 $\mu\text{g/L}$ 에서는 86.8~99.0 %였고 평균 회수율은 모두 90 % 이상이었다.

3. 분석농약에 대해서 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\mu\text{g/L}$ 의 농도를 제조하여 외부표준법으로 검량선을 작성한 결과 상관계수(r^2)가 0.9967~0.9999로 나타났다.

4. 수질기준에서 잔류농약의 정량한계의 농도에 해당하는 0.5 $\mu\text{g/L}$ 의 표준용액을 제조 하여 검출한계와 정량한계를 측정한 결과 각각 0.05~0.28 $\mu\text{g/L}$, 0.16~0.89 $\mu\text{g/L}$ 였고, 4.0 $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 정확도와 정밀도를 측정한 결과 정확도는 90.6~98.8 %, 정밀도는 1.3~5.2 %로 좋은 결과를 나타냈다.

5. 확립한 분석방법으로 상수정수, 원수, 먹는물, 지하수등의 농약을 조사한 결과 모든 시료에서 검출되지 않았다.

References

1. Organophosphate Toxicity, <http://emedicine.medscape.com/article/167726-overview>.
2. H. R. Sim, S. H. Kim, J. Y. Lee, and H. J. Lee, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **20**(6), 571-580 (2009).
3. W. J. Lee, *J. Environ. Health Sci.*, **37**(2), 81-93 (2011).
4. G. A. Kim, M. J. Song, H. S. Yeom, H. J. Son, S. W. Lee, and J. T. Choi, *J. Environ. Sci. Inter.*, **24**(12), 1569-1582

- (2015).
5. D. Barcelo and M. Petrovic, *Trends Anal. Chem.*, **26**(1), 2-11 (2007).
 6. C. Zwiener and F. H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 851-861 (2004).
 7. S. D. Richardson, *Anal. Chem.*, **78**, 4021-4045 (2006).
 8. C. D. S. Tomlin, 'The pesticide manual : a world compendium'. 13th Ed., British Crop Protection Council, 2003.
 9. 환경부, 국립환경과학원, 먹는물수질공정시험기준 (2015. 11. 5).
 10. 환경부, 국립환경과학원, 수질오염공정시험기준 (2016. 4.1).