

LC/ESI-MS를 이용한 아미트롤의 정성확인 및 정량분석

박찬구[★] · 어수미 · 김민영 · 손종열^{*} · 모세영^{**}

서울시보건환경연구원

^{*}고려대학교 보건대학 환경위생과

^{**}충북대학교 환경공학과

(2003. 4. 7 접수, 2004. 1. 19 승인)

Quantitative Analysis and Qualification of Amitrole Using LC/ESI-MS

Chan-Koo Park[★], Soo-Mi Eo, Min-Young Kim, Jong-Ryeul Sohn^{*} and Sae-Young Mo^{**}

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Seoul 137-130, Korea

^{*}Department of Environmental Sanitation College of Health Science Korea University, Seoul 136-703, Korea

^{**}Department of Environmental Engineering, Chungbuk University, Chengu 361-763, Korea

(Received Apr. 7, 2003, Accepted Jan. 19, 2004)

요약 : 본 연구에서는 극성이 높고, 휘발성이 낮아 GC나 GC/MS로 분석이 곤란한 환경매체 중의 아미트롤을 LC/ESI/MS를 사용하여 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 분자량이 84인 아미트롤은 LC/ESI/MS 방식에서는 m/z 85 인(M+H)⁺ 형태로 나타났으며, 피크강도는 30V에서 (SIR mode) 최대를 나타내었다. 질량 스펙트럼 비를 정성확인에 적용하기 위하여 실험한 결과 아미트롤은 m/z 85 와 m/z 58 이온으로 나타났으며, 50V에서 이 비는 1 : 7.03 ~7.58 로 나타났다. 동위원소 비를 이용한 정성확인은 isotope MS나 HR/MS가 주로 사용되나, 본 연구에서는 정성확인을 위한 보조수단으로 이용하고자 실험한 결과 아미트롤의 동위원소는 86([M+H])⁺ 형태로 나타났으며, 시료에서(30V) m/z 85와 m/z 86의 질량 스펙트럼 비는 27.1 ~28.6 : 1(이론적 비 26.6 : 1)로 나타났다. 단계별 표준액을 시료의 전 처리 방법과 동일하게 처리하여 분석한 검량선의 직선성은 $y = 1.09354e^6X + 26947.2$ 이었으며, $r^2 = 0.99$ 로 나타났다. 분석의 정도관리를 위한 회수율검정과 반복 재현성을 알아보기 위한 실험에서 수질시료의 회수율은 77.64 ~ 83.44%, 토양시료에서는 71.11 ~79.44%로 나타났으며, 각 농도 단계별 반복(5회)실험결과 상대표준편차 값은 10%이하를 나타내었다.

Abstract : Amitrole in environment, difficult to be analyzed by GC or GC/MS due to high polarity and low volatility, was analyzed by LC/ESI/MS in the study. Maximum peak intensity of amitrole in LC/MS/ESI mass spectrum is m/z 85 of protonated molecular ion (M+H)⁺ with 30V of cone voltage at SIR mode. It was confirmed that ratios between main ion of amitrole, 85 of protonated molecular

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-570-3356 Fax : +82+(0)2-2570-3354

E-mail : pegksy@yahoo.co.kr

ion, and m/z 58 fragmented ion of amitrole, had increased corresponding with the increment of cone voltage from 20V to 70V. The isotope molecular weight of amitrole was $86([M+H])^+$ at LC/MS analysis and the mass spectrum ratio between 85 mass and 86 mass was not different by the change of concentration but similar to theoretical ratio (less than 10% standard deviation). The linearity of standard calibration curve under same condition with sample treatment method had $y=1.09354E^6 X + 26947.2$ and $r^2 = 0.99$. Recovery rates in water and soil samples were 77.64 ~83.44% and 71.11 ~79.44%, respectively. Reliability of the analysis was performed with 5 repeated measurements at each level of standard concentration and the result showed that relative standard deviation was less than 10%; therefore, the extraction and analysis method in the study suggested that it would be reliable to measure amitrole in water and soil media.

Key words : Amitrole, EDCs, LC/ESI/MS, Quantification, Qualification

1. 서 론

현재 인간의 활동에 기인해 발생하는 문제 중에서 가장 주목 받고 있는 문제 중의 하나는 내분비계 장애 물질(endocrine disruptor chemicals, EDCs), 내분비계 교란물질, 환경호르몬 등 여러 용어로 표현되고 있는 물질이다. 내분비계 장애물질에 대해 미국 환경청(EPA)에서는 “항상성(homeostatics)의 유지와 발달과정을 조절하고 생체 내 호르몬의 생산, 분비, 이동, 대사, 결합 작용 및 배설을 간섭하는 외인성 물질”이라고 정의하고 있다. 이러한 물질들 중 아미트롤(3-amino-1,2,4-triazole)은 생태계 내에 잔류성이 크며, 인체에 발암 및 돌연변이를 일으킨다고 알려져 있어^{12,34} EPA, IARC (International Agency for Research on Cancer), NTP (National Toxicology Program), WWF (World Wildlife Fund), EU 등의 국가나 기관 등에서 이 물질에 대한 제조 및 사용에 대한 규제를 강화하고 있다. 그러나 분석의 까다로움으로 인하여 '90년대 초까지 연구된 아미트롤에 대한 자료는 그렇게 많지 않은 실정이다. 또한 이러한 자료들조차도 분광광도계나 HPLC의 UV 검출기를 이용한 결과로 그 정확확인에 많은 문제를 내포하고 있으며, 또한 검출할 수 있는 농도(검출한계 50 ng 이상)가 높아 생태계 내에 미량으로 존재하는 아미트롤을 다루기에는 많은 어려움이 있었다.^{5,6} 최근에 들어와서야 일본 후생성과 환경청 공동으로 외인성 내분비계 장애물질을 제어하기 위한 내분비계 장애물질 전략계획 '98(Strategic Programs Environmental Endocrine Disruptors '98)이 수립되었으며, 이러한 대상물질 중의 하나인 아미트롤을 분석하기 위하여, 자체로는 형광을 띄

지 않는 아미트롤을 플루오레스카민(fluorescamine)과 유도체화 반응을 시켜 HPLC 검출기 중 감도가 가장 우수한 형광검출기를 사용한 분석 방법을 개발하여 사용하고 있다.^{7,8,9} 그러나 이 방법은 비록 검출한계를 낮출 수는 있었지만, 여러 문제점을 내포하고 있는데 이중에서 특히 유도체화 반응을 거친 아미트롤+플루오레스카민 복합체는 박¹⁰ 등의 연구결과에 의하면 안정화 지속 시간이 극히 짧아 분석에 많은 어려움이 있다고 보고 된바 있다. 이외에도 아미트롤은 비 극성용매인 물 메탄올등에 잘 용해되기 때문에 시료 추출시 분석에 방해가 되는 유기물 제거가 어려워 분석 시 방해물질에 의한 어려움이 가중된다. 이러한 이유들로 인하여 현재까지 아미트롤의 분석은 극히 제한적인 연구자들에 의해서 연구되고 있는 실정이다.

최근까지 LC/MS는 주로 고분자 유기화합물(분자량 500 이상)의 분석에 주로 사용되어왔다. 그러나 최근에 개발된 기중에서는 저 분자량 영역에서의 분리능과 감도가 크게 향상되어, 환경매체에 미량으로 잔류하는 저 분자 영역의 유기화합물에 대한 분석도 가능하다고 판단되었다. 본 연구에서는 극성이 높고 휘발성이 낮아 GC나 GC/MS로 분석이 곤란한 환경매체 중 미량으로 잔류하는 저 분자 영역의 아미트롤을 국내에서 시도 사례가 없는 LC/ESI-MS 방식을 사용하여 분석방법을 개발하고자 하였다. 이러한 LC/MS를 사용한 아미트롤의 정확한 정성확인 및 정량평가를 할 수 있는 분석방법이 확립되면, GC 또는 GC/MS로 분석이 어려운 환경 매체 내에 잔존하는 저 분자량 영역의 물질들의 연구에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

2. 실험 및 방법

2.1. 분석기기 및 시약

아미트롤을 분석하기 위하여 사용한 분석 기기는 Waters사의 2690 HPLC와 Micromass사의 Mass Selective ZQ 2000을 연결시킨 LC/MSD 에 Waters 2690 HPLC auto injector 및 controller를 연결하여 사용하였다. 아미트롤의 추출을 위하여 Sonics & Materials 사의 초음파 추출기와 JEIO TECH사의 SI-2000R 진탕기를 사용하였다. 시료의 농축을 위하여 사용된 질소농축기는 Organomation Association 사의 N-EVAPRTM 112를 사용하였으며, 사용된 질소가스의 순도는 99.99% 이상이었다. 아미트롤 표준시약 (Ultra Scientific Inc, USA)은 분말제제로 순도가 99% 이상을 사용하였으며, 시료의 농축과 정제에는 Waters 사의 MCX (Mixed mode Cation eXchanger, 6 cc 500 mg) 카트리지와 HLB (Hypophilic Lipophilic Balance, 6 cc 500 mg) 카트리지를 사용하였다. 또한 실험에 사용된 초자는 초자세척기 (NEWMACTIC LA2)를 이용하여 2회 이상 세척하여 건조 시킨 후, 알루미늄 호일로 밀봉 후 보관하였으며 사용하기 전에 사용용매 (메탄올)로 다시 한번 세정 후 사용하였다. 기타 실험에 사용된 모든 시약과 추출용매는 잔류농약급 이상을 사용하여, 불순물이나 오염에 의한 측정오차를 최대한 감소시켰다.

2.2. 표준시료 분석을 위한 기기조건 설정

2.2.1. 표준액의 조제

아미트롤 100 mg에 메탄올을 넣어 100 mL로 만든 후 이것을 표준원액(1,000 µg/mL)으로 사용하였다. 표준원액을 단계적으로 희석하여 0.01 ppb ~ 100 ppb 범위의 7단계의 표준용액을 조제하였다. 이 실험과정에서 사용되는 표준액 (표준원액, 표준용액)은 조제 직후 가능한 바로 사용하였으며, 만일 분석이 지연될 시 밀봉하여 냉암소에 보관하여 사용하였다.

2.2.2. 기기조건 설정

LC/MS는 이온화 방식에 따라 대기압 화학적 이온화 방식 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) 과 전기분무 이온화 (electrospray ionization, ESI) 방식으로 나눌 수 있다. ESI 방식은 분석할 수 있는 분자량 범위가 넓으며, 전하를 띤 물질의 분석에 주로 이용되며, APCI 방식은 분자량이 작고 비극성을 갖는 환경물질 분석에 주로 사용되고 있다. 본 연구에서는 그 대상물질을

알고 있으며, 분자량이 84로 작으며 극성을 띄고 있는 아미트롤을 분석하고자 하므로 ESI 방식을 적용하였다. 또한 아미트롤은 양 전하를 띄고 있어 LC/ESI/MS 중 positive ion mode 방식을 사용하였다. 이 방식을 적용하여 대상물질(M)을 분석하게 되면 대상물질에 H, NH₄⁺, Na, K가 첨가되어 (M+H)⁺, (M+NH₄)⁺, (M+Na)⁺, (M+K)⁺의 형태의 질량을 나타내게 된다. ESI 방식에서 나타나는 아미트롤의 질량을 확인하기 위하여 아미트롤 표준용액 (0.1 µg/mL)을 10 µL/min 속도로 질량검출기에 직접 주입한 결과 m/z가 85인 (M+H)⁺형태로 나타났다. 이 상태에서 (tune page) 아미트롤의 피크가 최대가 되도록 기기조건을 설정하였다. 아미트롤 분리에 사용한 칼럼은 극성물질이며, 질량이 작은 유기화합물의 분석에 적합하도록 고안된 C-8 계통의 Waters사의 Spherisorb S5 CN column (2.0×150 mm, microbore column)을 사용하였다. 이동상 비는 메탄올 아세트나이트릴 0.5% 포름산을 76 : 10 : 14로 하였다. 분석에 사용된 기기조건은 Table 1에 제시하였다.

Table 1. Operating conditions for LC/MS

	Item	Analytical Conditions
MS	Cone Voltage	30(V)
	Ionization Mode	ES+
	Ion Energy	0.3
	Multiplier	640
	Source Temp.	120 (°C)
	Desolvation Temp.	250 (°C)
	LM Resolution	14.5
	HM Resolution	15.5
	Cone Gas Flow	50 (L/Hr)
	Desolvation Temp.	270 (L/Hr)
HPLC	Column	Water Spherisorb S5 CN Column
	Mobile Phase	MeOH : CH ₃ CN : 0.5%Formic Acid (76 : 10 : 14)
	Flow Rate	0.2 mL/min
	Run Time	20 min
	Injection Volum	0.2 µL

2.3. 시료추출

환경매체에 잔류하고 있는 아미트롤은 토양이나 저질등의 입자상물질에 흡착된 상태로 잔류하거나, 하천수, 호소수, 방류수등과 같은 수중에 용해되어 존재하고 있다.

2.3.1. 액상시료(aqueous sample) 추출방법

시료 (하천수, 호수수)를 충분히 혼합하여 균일화 시킨 다음 50 mL 정도를 취하여 5C여과지로 여과한 다음 분액여두에 옮겨 에멸전이 생기지 않을 정도의 디클로로메탄을 가하여 진탕한다. 이 혼합액을 층 분리를 시킨 후 디클로로메탄층을 제거하였다. 이 여액중에 함유되어 있는지 모르는 디클로로메탄을 제거하기 위하여 40 ℃이하의 수욕조에서 가열하여 제거하였다. 디클로로메탄이 제거된 여액은 방냉후 HLB와 MCX카트리지를 사용하여 정제와 농축을 하였다. 이러한 과정을 거친 여액을 수욕조가 장착된 질소농축기를 사용하여 완전 건조시킨 후 메탄올을 가하여 정확히 1 mL로 하여 측정용 시료액으로 하였다. 이 추출과정과 LC/MS 에 주입하는 단계까지의 과정을 아래 Fig. 1에 도시하였다.

2.3.2. 저질 및 토양시료(soil/sediment sample) 추출 방법

균질화 시킨 토양 적당량 (30 g 전·후)을 취하여, 초 순수 30 mL를 가한 후 이 시료를 진탕기와 초음파추출기를 사용하여 각 10 분간씩 추출한다. 이 과정을 3-4 회 반복한 후 이 여액을 합한다. 여액 중에 함유된 입자상 물질

(가능한 콜로이드 상태의 입자까지)을 제거하기 위하여 고속원심분리기 (12000 rpm)를 사용하여 10분간 원심분리 한 후 상층의 액층을 취하여 5C 여과지로 여과한다. 이하 수질시료의 처리과정과 동일하다.

2.4. 정제 및 농축

토양과 방류수 등에 함유된 다양한 방해물질들은 추출 과정에서 디클로로메탄에 의하여 일부 제거되나, LC/MS 에 주입하여 분석하기에는 아직 많은 방해물질을 함유하고 있어 또 다른 정제과정이 필요하다. 또한 생태계내에 존재하는 아미트롤은 미량으로 잔류하기 때문에 시료의 농축과정이 필요하다.

2.4.1. 시료의 정제

시료추출과정에서 디클로로메탄에 의해 시료중의 비 극성유기물이 일부 제거되지만, 여액중에는 분석에 영향을 미치는 다량의 유기물질이 잔류할 가능성이 있으므로 정제과정이 필요하게 된다. 아미트롤과 유사한 구조를 갖고 있어 분석에 직접적인 영향을 미치는 아민류와 기타 디클로로메탄에 의해 제거되지 않은 비 극성유기물질을 제거하기 위하여 시판되고 있는 카트리지에서 아민류 제거에 가장 효율적인 HLB 카트리지를 사용하였다.

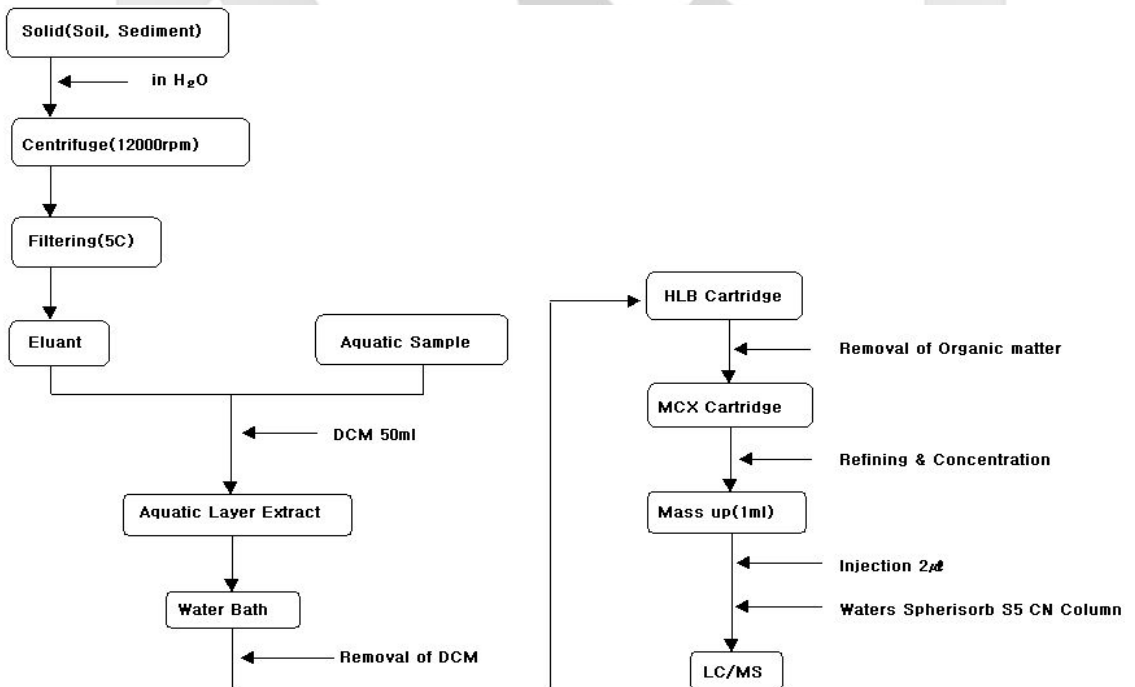


Fig. 1. Experimental procedure for the determination of amitrole.

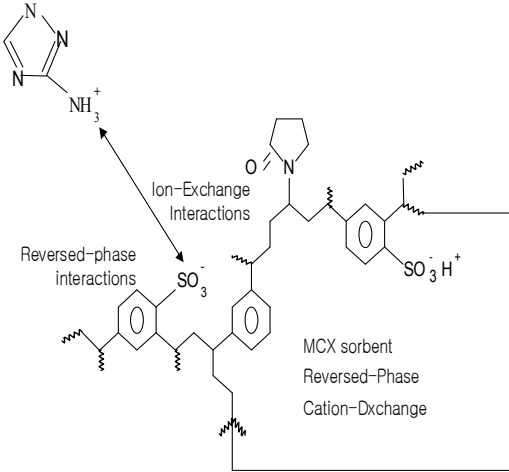


Fig. 2. Structure of Oasis MCX sorbent.

HLB 카트리지를 통과한 여액에 함유된 아미트롤은 그 구조식에서도 알 수 있듯이 양전하를 띠고 있어 이의 흡착에 가장 효율적인음 전하의 흡수기를 갖고 있는 MCX 카트리지를 사용하여 정제 및 농축을 하였다 이 MCX 카트리지와 아미트롤의 흡착 과정을 다음 Fig. 2에 나타내었다.

MCX 카트리지에 흡착된 아미트롤을 탈착하기 위하여 4% 암모니아수 (메탄올에 용해)를 사용하였으며, 효율적인 탈착량을 결정하기 위하여 fractional extraction test (FET)를 수행하였다. 추출액을 0.5 mL 단위로 분취하여 5 mL까지 추출액을 측정 한 결과 0-0.5 mL에서 25%, 0.5-1 mL에서 64%, 1-1.5 mL에서 7%, 1.5-2 mL에서 2.4%로 주입량의 98.4%의 회수율을 얻을 수 있었다. 그 이상의 메탄올을 주입시킨 경우에는 추출되는 양이 극히 적어 정성적인 확인이 어려웠다. 이 FET 실험결과에 따라 본 실험에서는 추출량을 0~2 mL로 하였으며, 이를 정리하여 Fig. 3에 도시하였다.

2.4.2 시료의 농축

MCX 카트리지를 통과한 시료 (액상시료: 50 mL→2 mL)는 25배정도 농축된 상태이며 또한 4% 암모니아수가 함유되어 있다. 이 시료액을 수욕조가 장착된 질소농축기를 사용하여 완전 건조시켜 암모니아수를 제거하였다. 최종적으로 메탄올을 가하여 정확히 1 mL로 하였다. 이 건조 과정에서 수욕조의 온도가 50 °C이상에서는 온도의 증가에 따라 농도가 감소됨을 확인할 수 있었으며, 그 이하 온도에서는 온도에 따른 농도 변화가 관찰되지 않아 수욕조의 온도는 50 °C로 결정하였다.

Fraction Test for MCX cartridge

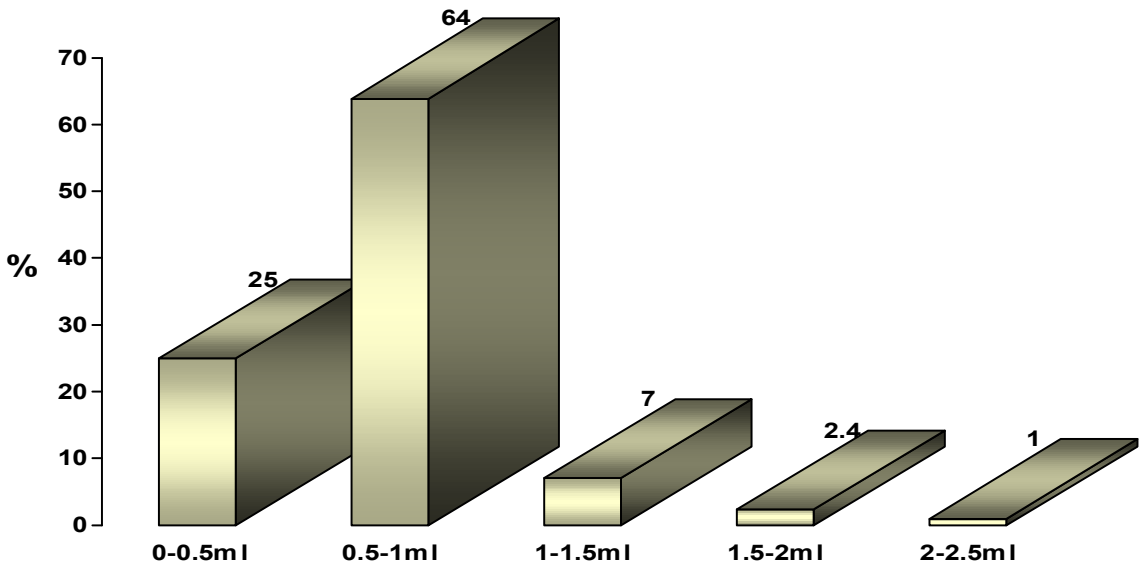


Fig. 3. Elution patterns of amphetamine on the MCX cartridge.

3. 결과 및 고찰

3.1. 정성확인

3.1.1. 정량 확인용 Cone Voltage 선정

분자량이 84인 아미트를 표준용액 (0.1 $\mu\text{g/mL}$)을 10 $\mu\text{L/min}$ 속도로 질량검출기에 직접 주입한 결과 m/z 85인 (M+H)⁺ 형태로 나타났으며, m/z 85가 최적화되도록 튜닝 (tuning)을 통하여 기기 조건을 설정하였다. 이 조건에서 TIC 방식을 통하여 머무름 시간이 15.25 분임을 확인하였다. 정량 확인을 위한 cone voltage를 결정하기 위하여 LC/MS에 주입하는 아미트를 표준물질 양을 2 ng으로 고정 후 cone voltage만 변화 (20~70 V)를 주어 실험한 결과 피크 강도는 30 V에서 최대로 나타났으며, 30 V 전·후에서는 감소하다가 70 V 이상에서는 trace 정도로 나타났다. 또한 이러한 차이를 질량 스펙트럼에서 확인하고자 동일한 조건하에서 TIC 모드로 확인한 결과 SIR 모드 결과와 동일하게 나타나 아미트를 정량 분석 시 최적의 cone voltage는 30 V임을 확인할 수 있었다. 이러한

결과를 Fig. 4에 도시하였다.

3.1.2. Precursor 와 products 이온 비를 이용한 정성확인

대상물질의 정성확인을 위한 가장 보편적인 방법은 스펙트럼 비를 이용하는 것이다. GC/EI-MS 방식에서는 70 eV에서 설정된 library가 사용되기도 하지만, LC/MS에서 사용하는 API 방식에서는 분석방법의 차이 (이동상등) 때문에 이러한 library가 설정되기는 사실상 어렵다. 따라서 대상물질의 정성확인을 하기 위하여 사용자가 library를 설정하여야 한다. 사용자 library를 만들고자 TIC 모드에서 cone voltage를 20 V부터 70 V까지 10 V 간격으로 단계별 변화를 주어 아미트 이온의 ion spectrum의 변화를 알아보았다. 이 결과 아미트 이온의 precursor ion인 m/z 85[M+H]⁺는 30 V에서 최대 강도를 나타낸 후 cone voltage 증가에 따라 점진적으로 감소되었다. 반면 cone voltage가 증가함에 따라 아미트 이온의 products ion인 m/z 58 ion은 30 V 이하에서는 trace 정도의 강도를 나타내다가 이후 50 V까지는 비례적으로 증가하였다.

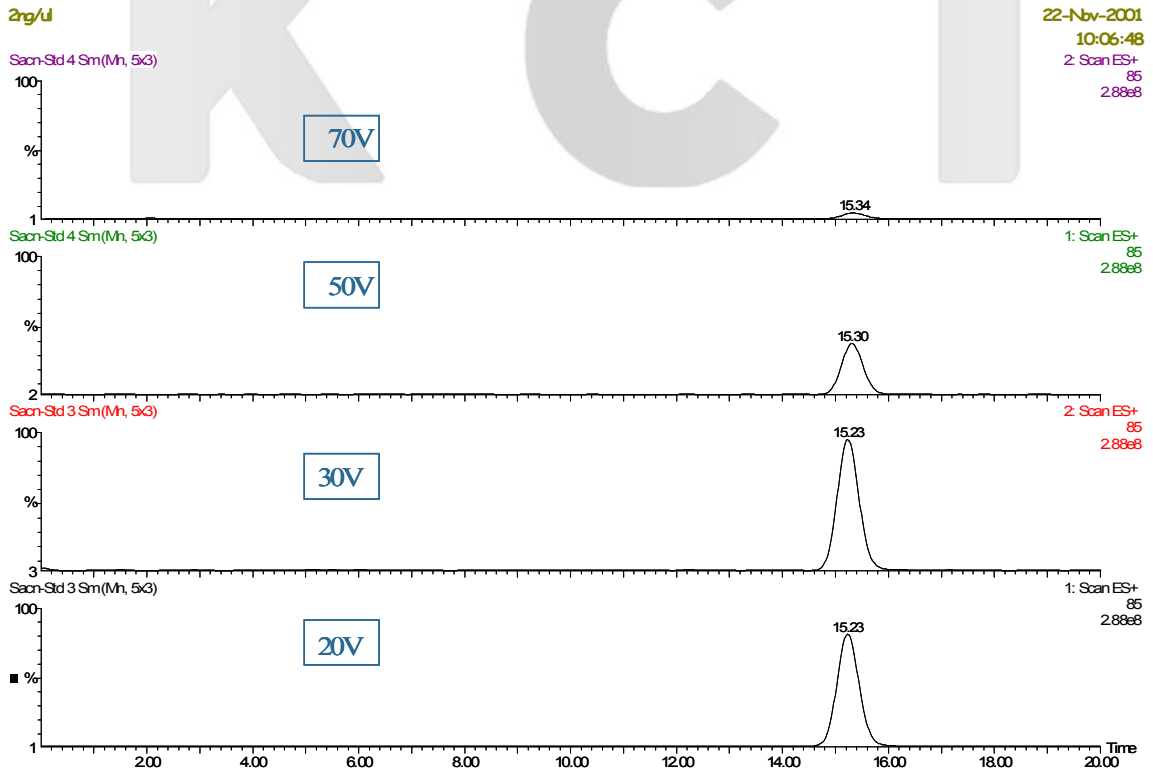


Fig. 4. Ion chromatograms at m/z 85 [M+H]⁺ according to cone voltage (20,30,50 and 70 V).

그러나 60 V 이상의 cone voltage 에서는 급격히 감소하는 추세를 나타내었으며, 70 V 이상에서는 precursor 와 products ion 모두 trace 정도의 강도를 나타내었다. Voltage 변화에 따른 아미트롤의 precursor 와 products

ion의 이러한 변화를 정량적 비로 확인하기 위하여 cone voltage를 가장 큰 products ion이 생성되는 50 V로 고정시킨 후 농도를 단계적인 변화 (0.5 ~ 10 ng)를 주어 분석한 결과 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다.

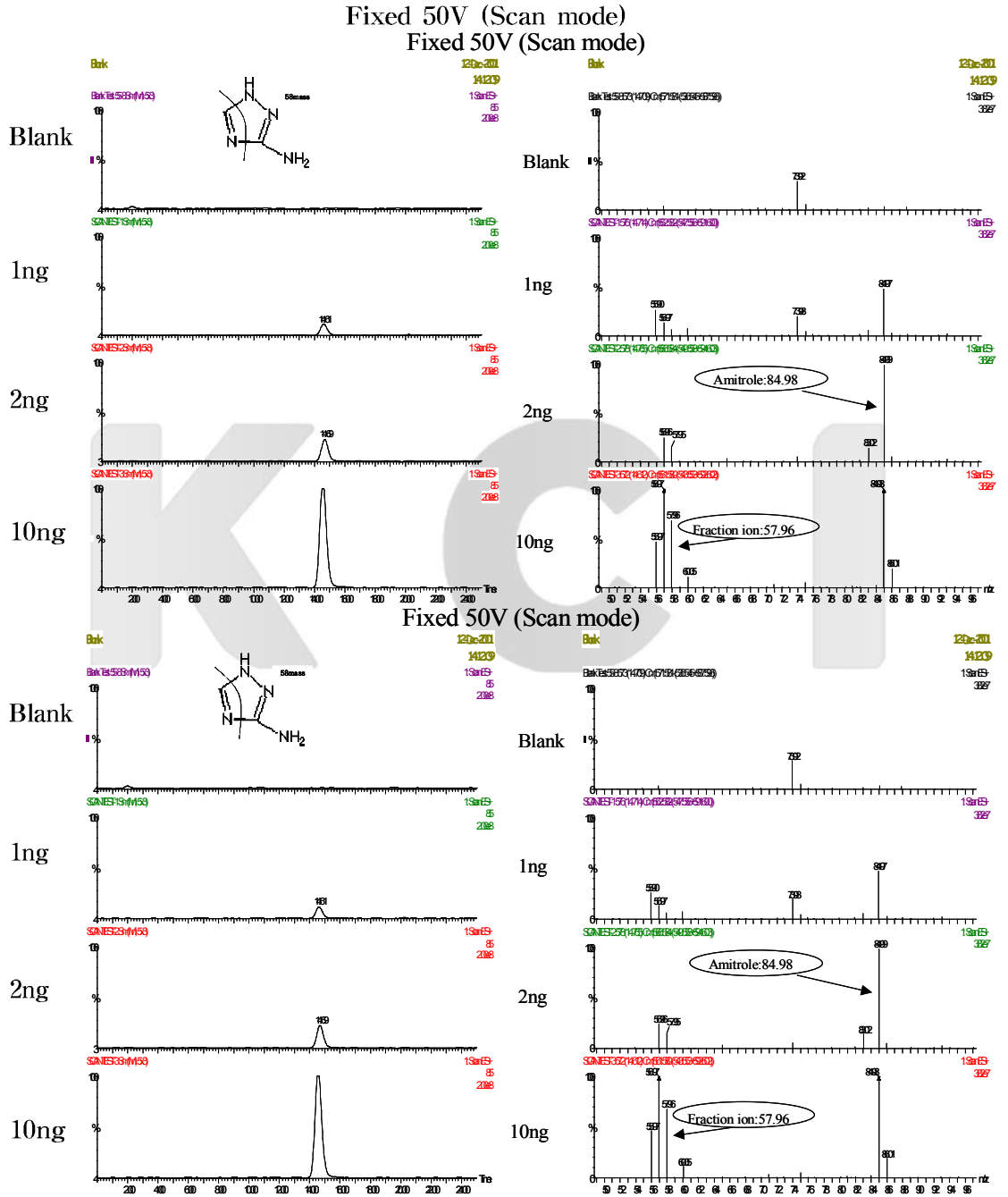


Fig. 5. Amitrole spectrum intensity of each standard concentration.



Fig. 6. Amitrole spectrum intensity of each standard concentration.

Fig. 5에서는 아미트롤의 precursor ion m/z 85 와 products ion m/z 58 은 농도 증가에 따라 비례적으로 증가하며, 또한 그 비율이 일정하게 나타나고 있음을 확인할 수 있었다. 즉 cone voltage가 일정한 범위 (50 V이하)에서는 농도 변화에 따라 precursor ion 과 products ion의 비는 변하지 않았다. 이러한 full scan mode에서 나타나는 precursor ion 과 products ion의 비만으로도 분석하고자 하는 물질의 정성확인이 가능하다. 그러나 환경매체중의 아미트롤을 비롯한 대부분의 내분비계장애물질들은 ppb 이하의 농도로 잔류하고 있어, 감도가 낮은 full scan mode에서는 검출이 어렵다. 이러한 점을 고려하여 full scan mode에서 나타난 precursor 와 products ion을 선정하여 SIR mode에서 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6은 cone voltage를 50 V로 고정 한 후 아미트롤 표준액 농도를 단계적 (7단계)으로 증가시켜 precursor와 products ion의 비 변화를 5회 반복하여 측정 한 결과로 그 비는 1 : 7.03 ~7.58 범위였으며, 상대표준편차는 10%이하를 나타내었다. 이러한 결과는 아미트롤의 정성 확인에 이 방법을 적용하여도 큰 무리가 따르지 않음을 확인할 수 있었다.

3.1.3. 동위원소를 이용한 정성확인

모든 물질은 물리·화학적 성질은 같으나 질량이 다른 동위원소를 갖고 있다. 분자량이 같더라도 구조식이 다르 면 다른 동위원소를 갖게 된다. isotope MS나 HR/MS에서 는 동위원소의 이러한 특성을 이용하여 대상물질의 정성확인에 많이 사용하고 있다. 본 실험에서는 아미트 롤 정성확인의 보조수단으로 이용하고자 분리능이 HR/MS 에 비해 떨어지는 LC/ESI/MS에 이 방법을 적용하여 보았다. 아미트롤 ($C_7H_{14}N_4$)은 탄소, 수소, 질소로 구성되어 있다. 탄소는 자연계 내에서 ^{12}C 와 ^{13}C 로 존재하며 그 비는 98.89%와 1.11%이며, 수소는 1H 와 2H 로 99.985%와 0.015%, 질소는 ^{14}N 과 ^{15}N 이 99.64%와 0.86%의 비로 자연 계에 존재한다고 알려지고 있다. 아미트롤의 질량은 84이며, 아미트롤의 동위원소는 질량이 85의 형태를 대부분 취 하는 것으로 계산되어진다. 이 아미트롤의 동위원소는 LC/ESI/MS에서는 m/z 86($[M+H]^+$) 형태로 나타났으며 아미트롤 m/z 85($[M+H]^+$)와의 비는 85 : 86 = 26.6 : 1로 확인 되었다. 아미트롤 농도변화에 따라서 이 비가 어떻게 나타 나는지를 확인하기 위하여 scan mode에서 voltage를 30 V 로 고정시킨 후 단계적으로 농도 변화 (0.1 ng ~ 10 ng)를 주어 분석한 결과 농도변화에 따라 아미트롤의 m/z 85($[M+H]^+$) 와 Isotope m/z 86($[M+H]^+$)의 이온 스펙트럼 비는

농도변화에 따라 달라지지 않고 그 비 [28.6 : 1(1 ng), 27.1 : 1(2 ng), 27.8 : 1(10 ng)]가 일정 (SD 10%이하)하게 나타났 으며, 또한 농도가 비교적 높게 나타난 실제 시료들에서 24.94 : 1로 나타났다. 현재 일반적으로 통용되는 이론적인 비와 실제시료의 편차를 30% 정도 (EPA등)인 점을 감안 한다면 본 실험이 큰 무리가 따르지 않은 실험임을 확인할 수 있었다. 그러나 저 농도 (0.1 ng 이하)영역에서의 편차가 30%를 자주 상회하며, 또한 이 기종을 사용한 이러한 정성 확인 방법의 예가 적어 이에 대한 명확한 설정을 하려면 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

3.2. 검출 및 정량한계

위에서 정한 실험방법에 따라 LC/MS/SIR 방법의 아미 트롤에 대한 검량선을 작성하고자 주입되는 아미트롤 표 준용액의 양이 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.2, 0.4 ng이 되도록 7단계의 시료를 만들었다. 먼저 분석기기의 검출 한계 (instrumental detection limit : IDL)를 확인하고자 한 실험결과 아미트롤의 직선성을 나타내는 식은 $y=1.74688e^6X + 2672.70$ 이었으며 r^2 는 0.99 이상을 유지하 는 것으로 나타났다. 검량선의 가장 하한 값 (검출한계)인 10 pg (LC/MS 주입량)에서 S/N (signal to noise) 비는 8 이상을 나타내어 이를 이 실험의 기기 검출한계로 하였다. 매트릭스에 따른 회수율 차이를 보완하기 위하여 최 근에는 대부분 치환된 정량용 내부표준물질을 사용한 내 부표준법[상대반응계수 (relative response factor)이용]에 의한 정량이 일반적이다. 그러나 본 실험에서는 아미트롤 의 치환된 정량용 내부 표준물질을 국내에서는 구할 수 없어 위에서 만든 표준용액을 시료의 전 처리 방법과 동 일하게 처리한 후 검량선을 작성하였으며, 이 검량선의 직선성은 $y = 1.09354e^6X + 26947.2$ 이었으며, $r^2 = 0.99$ 로 나타났다. 일반적인 정량한계 (method detection limit : MDL)는 S/N 비 10 이상으로 간주되고 있으며, 본 실험에 서 검량선의 가장 하한 값(정량한계)인 20 pg (LC/MS 주 입량) 분석 시 S/N 비는 20 ~30 정도를 나타내어 이를 본 실험의 정량한계로 설정하였다. 이는 수질시료 50 mL(토 양시료 50 g)를 취하여 추출한 최종액의 양이 1 mL 정도 일 때 이 용액 중에 아미트롤이 20 ng이 포함되어 있는 양으로 수질 (토양) 중의 아미트롤 농도가 0.5 ppb 이상의 농도로 존재할 때 분석할 수 있는 수준이다. 이러한 방법 으로 작성된 검량선을 Fig. 7에, 각 농도 단계별 크로마토 그램을 Fig. 8에 나타내었다.

S.I.H.E.

03-Dec-2001
09:27:31

Compound 1 name: Amitrole 4 Method File: Amitrole 4
Correlation coefficient: $r = 0.999651$, $r^2 = 0.999303$
Calibration curve: $1.74688e6 * x + 2672.70$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

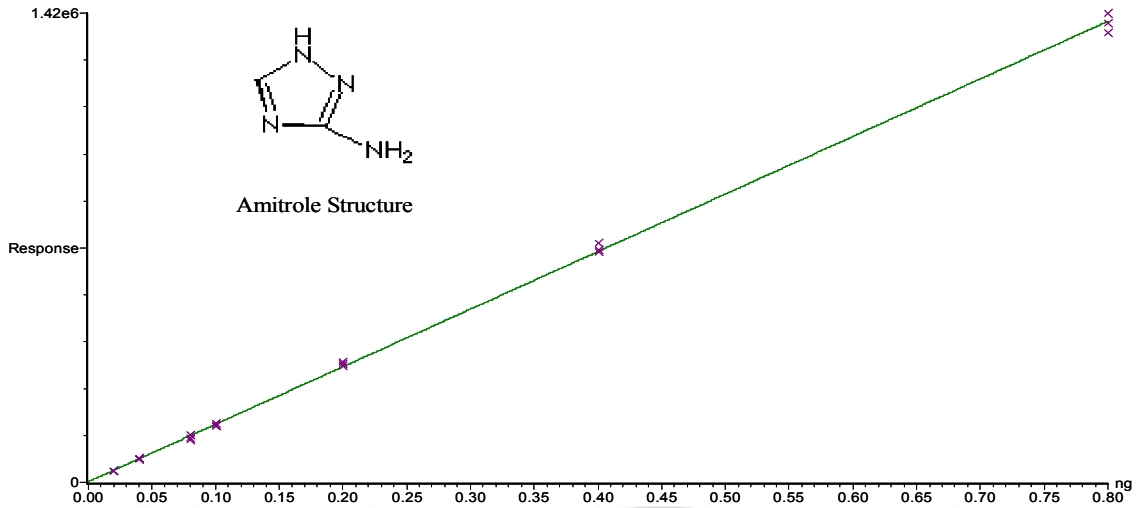
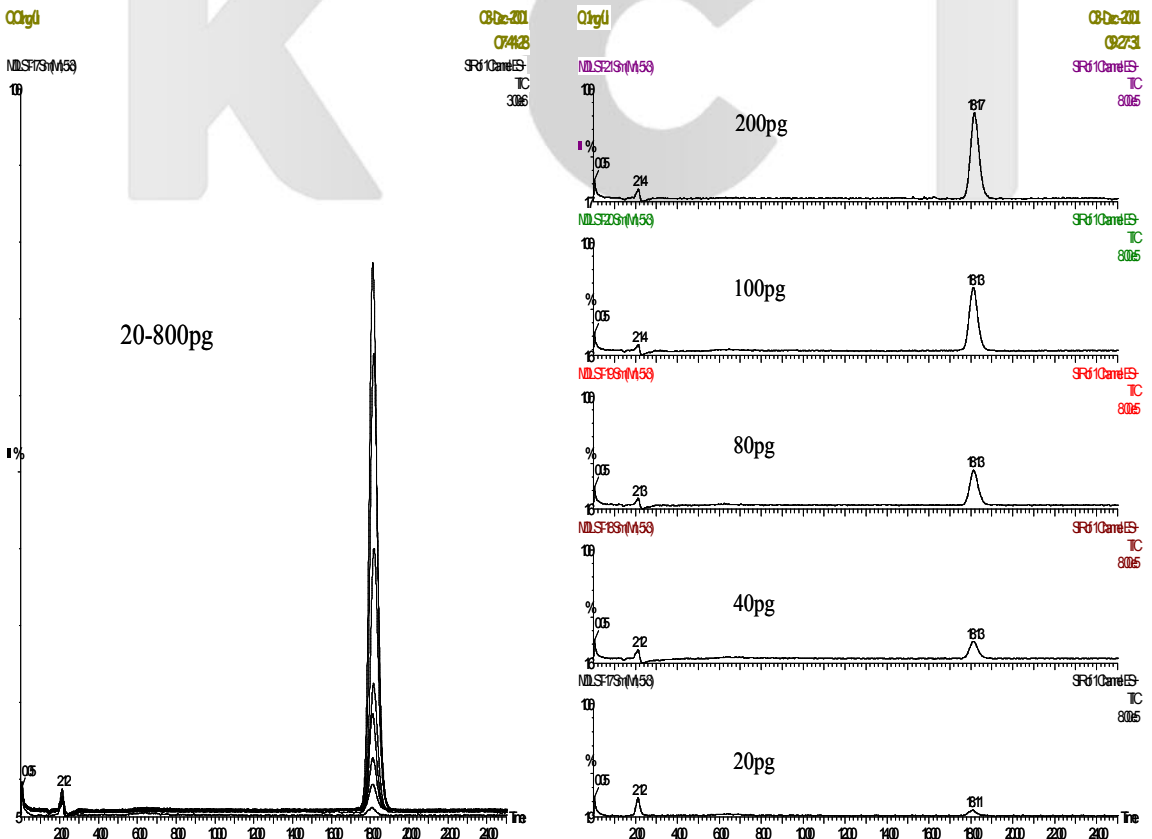


Fig. 7. Amitrole calibration curve with pretreatment.



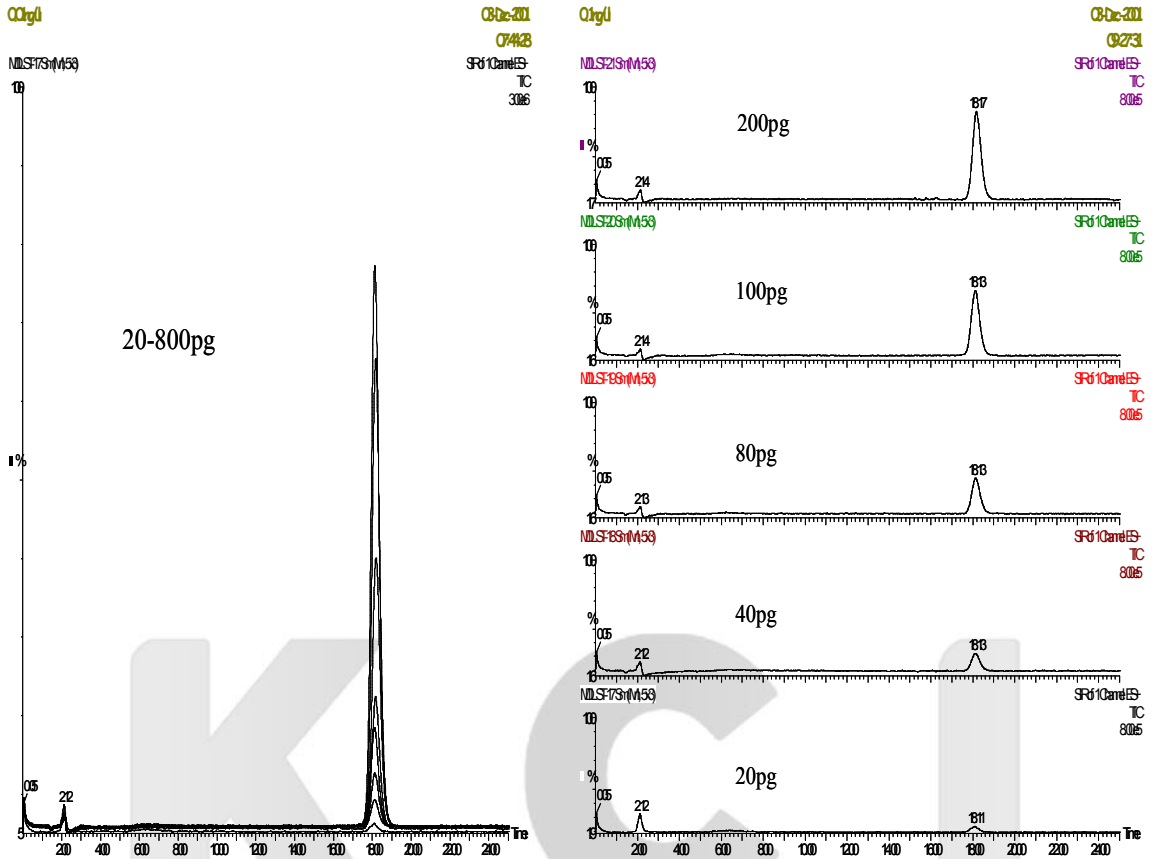


Fig. 8. Amitrole spectrum intensity of each standard concentration.

3.3. 분석방법에 대한 정도관리

실험의 정확성을 기하고자 앞서 설정된 조건 하에서 표준시료의 회수율검정과 반복재현성 등을 확인함으로써 아미트롤 분석에 대한 정도관리를 수행하였다. 수질시료와 토양시료를 전 처리를 한 군과 전 처리를 하지 않은 군으로 나누어 각 방법별로 5회에 걸쳐 회수율을 실험하고, 이를 외부표준법으로 정량한 결과들을 Table 2에 제시하였다. Table 2에서 보듯이 수질시료의 회수율은 77.64~83.44%, 토양시료에서는 71.11~79.44%로 나타나 수질시료가 토양시료에 비하여 5% 이상의 높은 회수율을 나타내었다. 이 차이는 토양시료의 전 처리 과정이 Fig. 3에서 보듯이 수 시료에 비해 원심분리 등 여러 단계를 더 거치기 때문이라 생각된다. 수 시료 0.02 ng을 제외한 모든 농도 단계에서의 상대표준편차 값은 10% 이하로 나타나 일반적으로 허용하는 최대상

대표준편차가 30% (EPA, JIS 등)인 점을 감안한다면 본 실험실에서 수행하는 추출방법은 상당히 양호한 것임이 확인되었다. 병행하여 나타낸 머프름 시간에 대한 상대표준편차는 1% 이하로 나타나 선정된 컬럼의 분리능은 우수한 것으로 확인되었다.

4. 결 론

본 연구에서는 극성이 크고, 휘발성이 낮아 GC 나 GC/MS 로 분석이 곤란한 환경매체 중의 아미트롤을 LC/ESI/MS 방식을 사용하여 분석조건을 설정하고자 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 아미트롤을 분석하기 위하여 사용하기는 LC/ESI/MS (positive ion mode)를 사용하였으며, 분리에 사용된 컬럼은 C-8 계통의 Spherisorb S5 CN column을, 이동상은

Table 2. Result of amitrole QA, QC test

Std Cone (ng)	Without treatment (A)				Without treatment (A)				Rec(%) (B)/(A)
	Area	R.T	RSD		Area	R.T	RSD		
			Area	R.T			Area	R.T	
0.02	14714±0333	15.28	9.06	0.27	11424±1590	15.25	13.92	0.31	77.64
0.04	28702±1492	15.24	5.20	0.35	22444±1894	15.28	8.44	0.20	78.20
0.08	60343±3660	15.28	6.07	0.32	47540±1004	15.28	2.11	0.22	78.78
0.16	12806±6033	15.25	4.99	0.54	96281±4591	15.29	4.77	0.25	79.70
0.2	152364±10247	15.32	6.73	0.37	122129±5605	15.31	4.59	0.18	80.16
0.4	298485±17799	15.28	5.96	0.62	249041±6738	15.29	2.71	0.37	83.44

Soil n=5

Std Cone (ng)	Without treatment (A)				Without treatment (A)				Rec(%) (B)/(A)
	Area	R.T	RSD		Area	R.T	RSD		
			Area	R.T			Area	R.T	
0.02	14714±0333	15.28	9.06	0.27	10463±717	15.38	6.85	0.54	71.11
0.04	28702±1492	15.24	5.20	0.35	20841±715	15.38	3.43	0.23	72.61
0.08	60343±3660	15.28	6.07	0.32	45335±1126	15.37	2.48	0.50	75.13
0.16	12806±6033	15.25	4.99	0.54	94537±5664	15.44	5.99	0.48	78.26
0.2	152364±10247	15.32	6.73	0.37	119012±5366	15.42	4.51	0.51	78.11
0.4	298485±17799	15.28	5.96	0.62	237117±2366	15.47	1.00	0.58	79.44

- 메탄올, 아세토나이트릴, 0.5% 포름산을 76 : 10 : 14 비로 사용하였다. 시료에서 추출된 여액의 정제와 농축을 위하여 HLB와 MCX 카트리지를 사용하였다. 최적의 회수율을 얻기 위하여 수행된 Fractional Extraction Test 에서 0~2 mL 범위에서 98.4%의 회수율을 얻을 수 있었다.
2. 질량이 84인 아미트롤은 LC/MS/ESI 방식에서는 m/z 85 인 (M+H)⁺ 형태로 나타났으며, m/z 85가 최적화되도록 tuning 작업을 한 결과 30 V에서 (SIR mode) 최대의 peak 를 얻을 수 있었다.
 3. Precursor 와 products ion 의 비를 이용한 정성확인용 library를 설정하고자, voltage와 아미트롤 표준용액을 단계적 변화를 주어 5회 반복 실험한 결과 50V 에서 아미트롤의 precursor ion m/z 85 와 products ion m/z

- 58 은 농도 변화에 관계없이 1 : 7.03~7.58 범위로 나타났으며, 상대표준편차는 10%이하를 나타내었다. 동위원소 비를 이용한 정성확인에서는 아미트롤의 동위원소는 m/z 86 ([M+H]⁺) 형태로 나타났으며, m/z 85 ([M+H]⁺)와의 이론적인 비는 85 : 86 = 26.6 : 1로 확인되었다. 시료에 이를 적용 시 비교적 고농도 영역에서는 이러한 비가 상당히 일치하는 결과를 나타내었으나, 저 농도 (0.1 ng 이하)영역에서는 표준편차가 30%를 상회하는 결과가 자주 나타나며, 또한 이러한 기종을 사용한 정성확인 방법의 예가 적어 이에 대한 명확한 설정을 하려면 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료되었다.
4. 정량확인을 위하여 아미트롤 표준용액을 7단계로 만들

어 검량선을 작성한 결과 $y=1.74688e^6X + 2672.70$ 이었으며 r^2 는 0.99 이상을 유지하는 것으로 나타났다. 검량선의 가장 하한 값(검출한계)인 10pg (LC/MS 주입량)에서 S/N 비는 8 이상이였다. 또한 표준액을 시료의 전처리 방법과 동일하게 처리한 검량선의 직선성은 $y = 1.09354e^6X + 26947.2$, $r^2 = 0.99$ 로 나타났으며, 검량선의 가장 하한 값(정량한계)인 20 pg (LC/MS 주입량)에서 S/N 비는 20~30 정도로 나타났다.

- 본 실험의 정확성을 기하고자 회수율검정과 반복 재현성등에 대한 실험 결과 수질시료의 회수율은 77.64~83.44%, 토양시료에서는 71.11~79.44%로 나타났으며, 각 농도 단계별 반복 (5회)실험결과 상대 표준편차 값이 10%이하로 나타나 본 실험실에서 수행한 실험방법이 큰 무리가 따르지 않음을 확인할 수 있었다.

- 日本 環境廳, 外因域内分泌攪亂化學物質調査鑑定, マニュアル(1998).
- 박찬구, 어수미, 김민영, 신재영, 황지만, 모세영, 한국환경분석학회지, 2(4) 275-279(1999).

감사의 글

본 연구는 환경부의 내분비계장애물질 중·장기 연구 사업계획의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- F. Mattioli, L. Robbiano, L. Fazzioli, and P. Baracchini, Studies the Mechanism of the Carcinogenic Activity of Amitrole(1993).
- ACGIH, Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices, 6th, American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, Ohio(1991).
- D. Seinhoff et al., *Toxicol Appl Pharmacol*, **69**, 161-169(1983).
- U.S. EPA, Prevention pesticides and toxic substances, EPA-738-F-96-002 August(1996).
- A. Pachinger, E. Eisner, H. Begutter, and H. Klus, *Frescrius J. Anal. Chem*, **342**, 413-415(1992).
- B. D Mcgarvey, *J. Chromatography B.*, **659**, 243-257. (1994).
- T. Oesterrich and U. Klaus, *Chemosphere*, **38**, 379-392, (1999).
- B. D. McGarvey, *J. Chromatography B.*, **659**, 243-257 (1994).