

노중 Triazine류의 동시분석

황선혜^{1,2} · 김승기¹ · 최종호² · 표희수^{1,†}

¹한국과학기술연구원 융합오믹스센터, ²고려대학교 화학과

Simultaneous Analysis of Triazines in Human Urine

Sunhye Hwang^{1,2}, Seungki Kim¹, Jong-Ho Choi², and Heesoo Pyo^{1,†}

¹Integrated Omics Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

²Department of Chemistry, Korea University

Received August 13, 2010/Accepted December 6, 2010

Triazines are the widely used herbicides and they can be introduced into rivers or lakes. When a human body is exposed to triazines, nausea, vomiting, dyspnea and nephritis can be induced. Therefore, the ability to detect triazine by qualitative analysis is required. In this study, an analytical method for 10 triazines including simazine, prometon, atrazine, propazine, terbuthylazine, simetryn, ametryn, prometryn, terbutryn and cyanazine was investigated. Liquid-liquid extraction of the triazines from human urine and analysis of the compounds using gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatograph-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) were conducted. In the case of urine samples, extraction recoveries of triazines were within the range of 71.99-111.91%. The calibration curves showed a good linearity (R^2 of 0.998-0.999) and method detection limits of all the analytes were obtained in the range of 0.10-0.95 ng/mL by the signal to noise method ($S/N > 3$). Instrument detection limits of the LC-MS/MS were within the range of 0.01-0.25 pg.

Key words: Triazines, Liquid-liquid extraction, GC-MS, LC-MS/MS, Urine

1. 서 론

농약은 농작물에 해를 주는 병해충을 방제함으로써 생산량을 높이고 잡초방제에 필요한 노력을 줄여 생산비를 절감하는 등 안정적인 농업생산을 이끌어 가는데 없어서는 안 될 농업자재로서의 역할을 맡고 있다.^{1,2} 트리아진류는 광범위하게 사용되는 제초제로서 이들이 살포된 후 강이나 호수 등으로 유입되어 인체 내에 여러 가지 질병을 일으킬 가능성이 제기되고 있다.^{3,4} 따라서 WHO와 선진국에서는 수질, 토양 등에서의 트리아진류의 허용 기준치를 정하여 관리하고 있지만 아직 우리나라에서는 수질이나 토양 등에서의 트리아진류에 대한 기준치 및 분석방법 등이 설정되어 있지 않은 상황이다.⁵

트리아진류는 heterocyclic ring 구조로서 벤젠링과

비슷해 보이지만 탄소 3개가 질소로 치환되어 있는 구조를 나타낸다. 트리아진류가 인간에게 노출되는 경로는 식물체를 통한 인체 내 축적과 그 이외의 환경적 요인에 의한 노출로 보고되었다. 특히, 제초제를 직접적으로 사용하고 있는 임농업 종사자나 제초제를 생산하고 있는 공장의 노동자들에게 크게 노출이 되고 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 노출은 메스꺼움과 구토를 유발하고, 점막에 자극을 주며, 접촉성 피부염, 쇼크, 호흡곤란과 신장염을 야기한다.^{6,7}

본 연구에서 다루게 될 트리아진은 simazine, prometon, atrazine, propazine, terbuthylazine, simetryn, ametryn, prometryn, terbutryn, cyanazine 등 총 10가지이다. 제초제로서 널리 쓰이고 낮은 농도로도 인체에 피해를 미치는 트리아진에 대한 정성 및 정량 분석은 매우 중요하며 특히 생체 내에 포함되어 있는 트리

[†]To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-2-958-5181, Fax: 82-2-958-5059, E-mail: pbs3692@kist.re.kr

아진의 검출한계를 낮출 수 있는 방법이 필요하다.⁸⁻¹⁰⁾

따라서 복잡한 뇨시료로부터 트리아진만을 효과적으로 추출하는 전처리 과정이 필요하다.

현재까지의 추출법으로는 고체상 추출법(solid-phase extraction, SPE)이¹¹⁻¹⁴⁾ 널리 사용되며 LLE보다는 용매의 사용이 적고 시료를 동시에 20개 정도까지 추출할 수 있는 장점이 있는 반면 사용되는 장비나 카트리지가 비싸고 회수율이 떨어진다는 단점이 있다. 또한 근래 들어 많이 사용하고 있는 고체상 미량추출법(solid-phase microextraction, SPME)은 빠르고 간편하며, 노동력을 최소화할 수 있지만 회수율이 20%도 못 미친다는 단점이 있다.¹⁵⁾

반면, 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)은 특별한 추출장비가 없어 간단하고 pH 조절이 용이하며 회수율이 좋다는 장점이 있다.^{16,17)}

생체 시료에서 트리아진을 검출하기 위한 분석기기로는 가스 크로마토그래프가 일반적으로 널리 사용되고 있다.¹⁸⁾ 이 때 분석대상물질에 따라 분리관, 검출기, 시료주입방법 등을 결정해야한다. 트리아진은 비극성의 분리관을 주로 사용하며, 검출기로는 감도가 높은 전자포획검출기(electron capture detector, ECD)와 열전도검출기(thermionic-sensitive detector, TSD), 불꽃이온화 검출기(flame ionization detector, FID)¹⁹⁾ 등이 많이 사용되고 있으며, 최근에는 정성, 정량분석이 동시에 가능한 질량분석기(mass spectrometer, MS)가 많이 사용되고 있다. GC에 의한 분석방법은 감도, 특이성, 신속성 등의 장점을 가지고 있으나, 트리아진의 증기압이 낮기 때문에 GC를 이용하여 분석 시에는 아주 낮은 검출한계를 기대하기 힘들다.²⁰⁾

HPLC의 경우 검출기로서 diode array detector (DAD)를 사용할 수 있으나 DAD는 선택과정에 의한 peak의 머무른 시간 및 그 넓이에 의해서만 정성 및 정량이 가능하므로 정확한 분자량 및 분자의 구조를 알 수 없다는 단점이 있다.²¹⁻²³⁾ 이에 반해 LC/MS를 이용하면 DAD를 통해 알 수 없었던 각 물질의 분자량 및 분자의 구조를 알 수 있고 여러 가지 방해 물질로 인한 바탕선 들뜸의 문제를 LC-MS/MS의 (Single Reaction Monitoring, SRM) mode를 이용하여 해결할 수 있다는 장점이 있다.²⁴⁻³⁰⁾

문헌조사에 의하면 뇨와 물에서 2-7종의 트리아진류를 고체상 미량추출법, 고체상 추출법으로 추출하고 GC-MS, GC-TSD, HPLC-DAD를 이용하여 분석한 결과 검출한계는 0.001-20 ng/mL으로 나타났다.

본 실험에서는 인체에 유해한 영향을 끼치는 트리아진 10종을 GC-MS와 LC-MS를 이용하여 동시분석하고 검출한계의 향상을 이루었고, 인체 뇨내의 트리아진의 효과적인 검출이 가능하게 되어 정량 분석 뿐만 아니라 정성 분석을 통해 효과적인 대사체 검출도 가능할 것이라고 기대된다.³¹⁾

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

2.1.1. 시약

사용된 simazine, prometon, atrazine, propazine, terbuthylazine, ametryn, prometryne, cyanazine은 Chem Service Inc.(Pennsylvania, USA)에서 구입하였고, simetryn은 Fluka Inc.(Buchs, Switzerland)에서, terbutryn은 Dr. Ehrenstorfer GmbH Inc.(Augsburg, Germany)에서 구입하였다. 내부 표준물질인 phenanthrene-d₁₀은 Sigma-Aldrich Inc.(Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였다.

Ethyl ether, ethylene acetate(EA), methylenechloride(MC), methyl-tert-butyl ether(MTBE), acetonitrile(ACN), methanol(MeOH)은 J.T. Baker Inc.(Philipsburg, USA)의 잔류농약급과 HPLC급을 사용하였다. Sodium sulfate anhydrous(Na₂SO₄)와 citric acid anhydrous는 Junsei Inc.(Tokyo, Japan)의 특급 시약과 guaranteed reagent를, potassium hydroxide는 J.T. Baker Inc.의 A.C.S. reagent를 구입하여 사용하였다. 또한 ammonium acetate는 Sigma-Aldrich Inc.(Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였다.

증류수는 Milli-Q 및 Milli-RO system을 통과한 3차 증류수를 Whatman사의 membrane filter(pore size 0.2 μm)로 여과한 것을 사용하였다. 고체상 추출에 사용한 카트리는 Water사에서 구입하여 사용하였다.

2.1.2. 기기 및 장치

Triazines의 분석은 Agilent사의 5975 mass selective detector(Santa Clara, CA, USA)를 직접 연결한 Agilent사의 6890N gas chromatograph(Santa Clara, CA, USA)와 autosampler는 CTC Analytics AG사의 Combi PAL(Zwingen Switzerland)을 사용하였다. LC-MS는 Agilent사의 HPLC 1200 Series(Palo Alto, CA, USA)와 Applied Bio System사의 QqQ triple

quadruple mass spectrometer API 4000(Foster City, CA, USA)가 직접 연결된 것을 사용했다. MS의 이온화 방식은 전자분무이온화(electrospray ionization, ESI)법을 이용하고, 역상 HPLC에 의하여 분석하였다.

액체-액체 추출은 Edmund Buhler사의 7400 Tuiingen shaker(Hechingen, Germany)를 이용하였고, 층 분리를 위해 BD사의 centrifuge(Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하였다. 고체상 추출은 Waters사의 vacuum folder(Massachusetts, USA)를 이용하였고, 시료농축을 위해 Zymark사의 Turbo Vap LV 질소증발기(Allschwil, Switzerland)를 사용하였다. 또한 정확한 pH를 측정하기 위해서 Orion. Research사의 pH meter(Michigan, USA)를 사용하였다.

2.1.3. 표준시료 제조

Triazines는 10종의 1,000 µg/mL 용액을 10 µg/mL 혼합용액으로 만들어서 사용하였다. 표준용액은 -20°C 암소에서 보관 후, 필요 농도에 맞춰 희석하여 실험에 사용하였다.

내부표준물질은 triazines를 정량하기 위하여 2,000 µg/mL의 phenanthrene-d₁₀ 표준용액을 10 µg/mL으로 희석하여 실험에 사용하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 액체-액체 추출법

노 시료 5 mL을 20 mL 시험관에 취하고 염색효과를 위해 무수황산나트륨을 0.7 g을 넣고, 혼합표준물질과 내부표준물질 phenanthrene-d₁₀ 10 µg/mL을 10 µL 넣은 후, 1분간 vortexing 하여 무수황산나트륨을 녹인 후 5 mL의 MTBE를 넣어 15분간 shaker를 작동시켜 추출한 후 층 분리를 위해서 5분간 centrifuge를 돌린다. 노층을 얼리기 위해 -25°C의 freezer에 15분간 방치해 둔다. 유기용매층을 10 mL 시험관에 옮겨 담아 질소증발기를 이용하여 모두 증발시킨 후 에틸아세테이트 100 µL를 시험관에 넣어 잔사를 녹이고 auto-sampler용 바이알에 옮겨 담는다(Fig. 1).

2.2.2. 고체상 추출법

노 시료 5 mL을 10 mL 시험관에 취하고 혼합표준물질과 내부표준물질 phenanthrene-d₁₀ 10 µg/mL을 10 µL 넣는다. 고체상 카트리지 tC2를 vacuum folder에 장착한 다음 MeOH 10 mL과 증류수 10 mL을 두 번씩 반복하여 흘려주어 활성화 시킨 다음 시료를

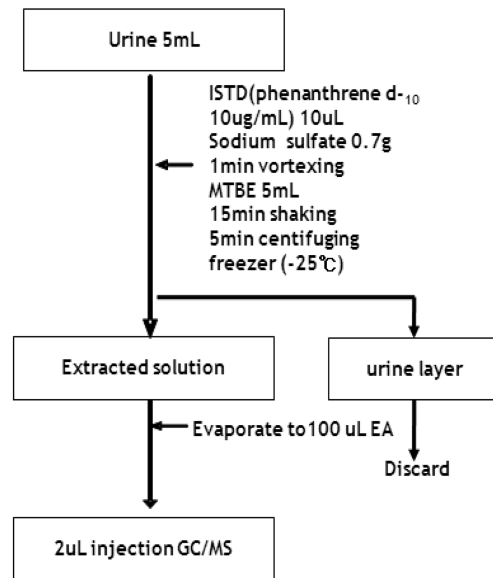


Fig. 1. Sample preparation procedure for triazines analysis in urine using liquid-liquid extraction (LLE).

적재하여 고체상에 흡착시켰다. 증류수 20 mL을 사용하여 불순물을 씻어낸 후 10분간 진공펌프로 고체상의 수분을 제거하고 5 mL의 에틸아세테이트를 이용하여 용출하였다. 용액을 무수황산나트륨을 이용하여 수분을 제거한 후에 질소증발기를 이용하여 모두 증발시킨후

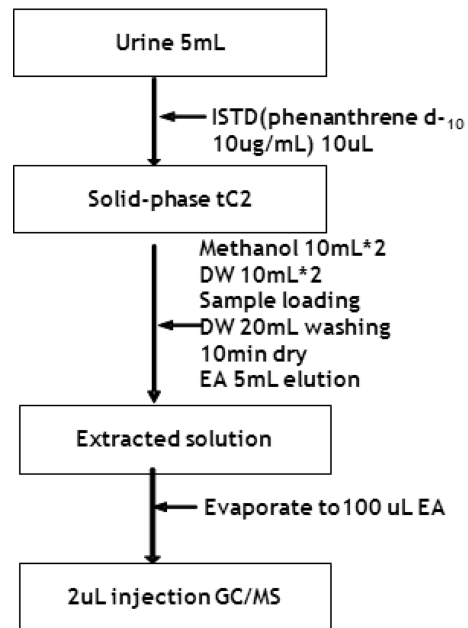


Fig. 2. Sample preparation procedure for triazines in urine using solid phase extraction (SPE).

에틸아세테이트 100 μ L를 시험관에 넣어 잔사를 녹인 후 auto-sampler 용 바이알에 옮겨 담는다(Fig. 2).

2.2.4. 기기분석방법

2.2.4.1. GC-MS 분석방법

2.2.1.과 2.2.2.의 전처리에서 얻은 시료용액 2 μ L를 GC-MS에 주입하고 Table 1에 제시한 조건을 이용하여 mass range 40-550 amu의 scan mode(Fig. 3)로 질량스펙트럼을 확인한 후 물질별로 3개의 특성이온을 선

택하여 SIM(Selected Ion Monitoring) mode로 분석하였다.

2.2.4.2. LC-MS/MS 분석방법

시료용액 5 μ L를 LC-MS/MS에 주입하고 Table 2에 제시한 조건을 이용하여 mass range 100-500 amu의 scan mode(Fig. 4)로 질량스펙트럼을 확인한 후 $[M+H]^+$ 을 선구이온(precursor ion)으로 지정 후, 물질별로 생성이온(product ion)을 특성이온으로 선택하여 확인한 후 SRM mode로 분석하였다.

Table 1. GC-MS operating conditions for triazines

GC				
• Column : Ultra-2 (Cross-linked 5% Phenylmethylsilicon, 25 m \times 0.2 mm I.D x 0.33 μ m film thickness)				
• Carrier Gas : He at 0.5 mL/min				
• Split ratio : 1/20				
• Injection port temp. : 280°C				
MS				
• Transferline temp. : 300°C				
• Ion source temp. : 230°C				
• Ionization mode : Electron impact (EI)				
• Electron energy : 70 eV				
• Scan mode : 40-550 amu (solvent delay : 4 min)				
• Oven temp. program :				
initial temp.(°C)	initial time(min)	rate (°C/min)	final temp.(°C)	final time(min)
170	10	5	200	0.0
		20	300	1.0
GC/MS/SIM Condition				
• Run Time : 22.0 min				
• SIM mode (solvent delay : 10 min)				
Group	Start time(min)	Selected Ions, m/z		
1	10.0	94, 132, 173, 183, 186, 187, 188, 200, 201, 210, 214, 215, 216, 225, 229		
2	16.5	155, 170, 172, 212, 213, 225, 226, 227, 241		

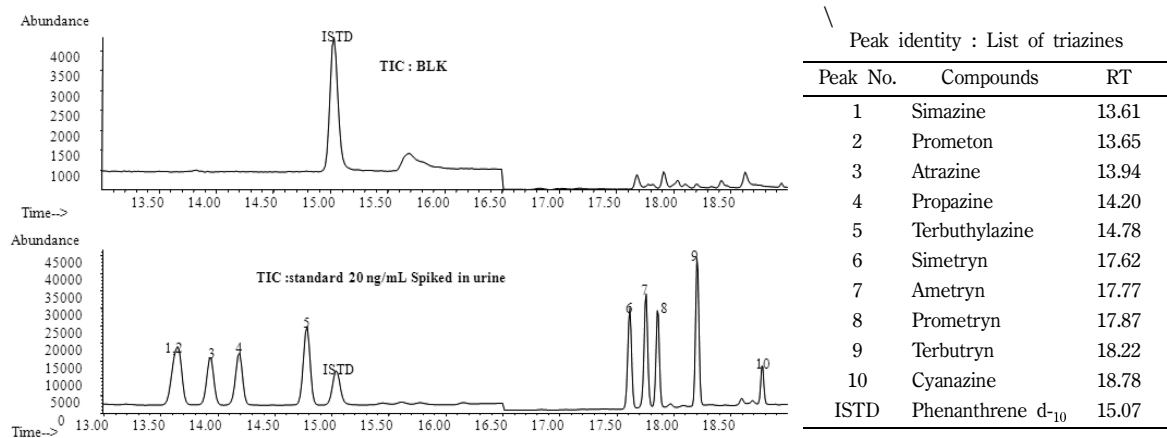


Fig. 3. GC-MS chromatogram for triazines.

Table 2. LC-MS/MS operating conditions for triazines

HPLC		
• Instrument : Agilent 1200 series AB (Applied Bio systems API4000)		
• Column : Shiseido C18 150P1.5 mm, 5 um		
• Column oven temperature : 20°C		
• Injection volume : 5 µL		
• Flow rate : 300 µL/min		
• Eluant A : 5mM Ammonium acetate in D.W, Eluant B : MeOH		
• Gradient programs :		
Time	%A	%B
0	70.0	30.0
2	70.0	30.0
10	15.0	85.0
12	15.0	85.0
13	70.0	30.0
15	70.0	30.0

Table 2. Continued

Mass
• Ionization : Electrospray in positive mode
• Ion spray voltage : 4.5 kV
• collision Gas (CAD) : 4
• curtain Gas (CUR) : 20 psi
• Ion Transfer Tube Temperature : 300°C
• Acquisition mode : Single Reaction Monitoring (SRM)

2.2.5. 검정곡선, 정밀도, 정확도, 회수율, 검출한계 작성

노시료에 triazines의 표준물질 혼합용액을 0.1-20.0 ng/mL이 되도록 첨가하고 내부표준물질을 각각 첨가하여, Fig. 1의 시료 전처리 방법에 따라 추출한 후 분석하였고, 내부표준물질에 대한 각 성분의 농도비에 따른 피크 면적비를 사용하여 검정곡선을 작성하였다. 정

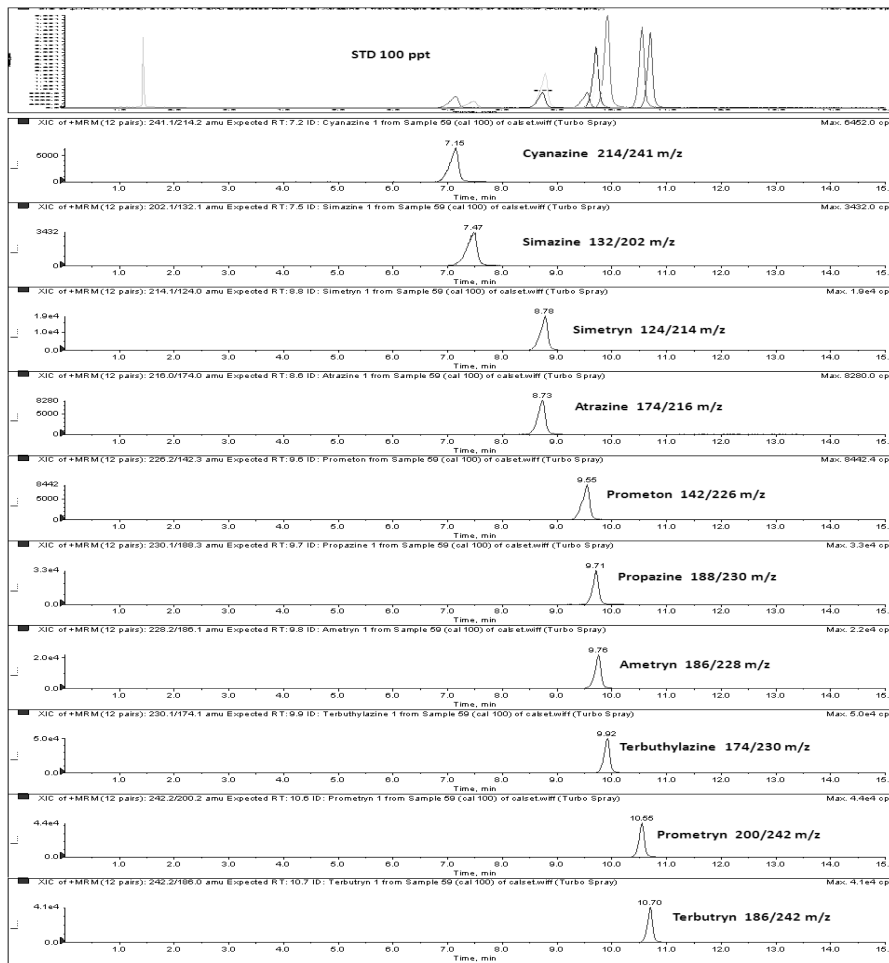


Fig. 4. Chromatograms of triazines by LC-MS/MS.

밀도와 정확도 측정실험은 각 물질의 예상되는 검출한계의 5, 10, 15배의 농도를 선택하여 같은 시료전처리 방법을 이용하여 추출한 후 그들의 오차를 측정하여 정밀도와 정확도 측정을 수행하여 정량 결과 간의 표준편차를 비교하였다. 추출 회수율 역시 각 물질의 예상되는 검출한계의 5, 10, 15배의 농도를 선택하여 실험을 수행하였다.

본 연구의 검출한계 측정은 신호 대 잡음비(S/N: signal to noise)방법과 σ 법($n=7$)을 이용하여 실험하였다. 신호 대 잡음비 방법은 signal to noise가 3인 값을 검출한계로 정하였고, σ 법은 예상되는 검출한계의 5배농도의 값을 7번 실험하여 표준편차를 구한 후 3.143를 곱하여 검출한계를 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. GC-MS 질량 스펙트럼

GC-MS로 화합물을 분석하기 위해서 scan mode를 사용하여 전체 질량스펙트럼을 측정하고 각 화합물의

특징적인 질량스펙트럼을 얻어 이들 중 상대적 크기가 큰 이온과 화합물 고유의 특성이온 등 2-3개의 이온만을 선택하여 SIM으로 분석하였다(Table 3). 이때 전체를 몇 개의 그룹으로 나누는데 각 화합물의 머무름 시간과 선택된 특성 질량스펙트럼에 근거한다.

Simazine은 분자이온[M]⁺인 m/z 201과 [M-NH]⁺인 m/z 186, [M-C₂H₃]⁺인 m/z 173이 100:61:38의 비율로 검출되었고, 이를 바탕으로 선택이온을 m/z 201, 186, 173으로 정하였다. Prometon은 m/z 210, 225, 183, atrazine은 m/z 200, 215, 173, propazine은 m/z 214, 229, 187, terbuthylazine은 m/z 214, 173, 216으로 simetryn은 m/z 213, 170, 155, ametryn은 m/z 227, 212, 185, prometryn은 m/z 241, 226, 199, terbutryn은 m/z 226, 241, 185, cyanazine은 m/z 212, 225, 172으로 선택하였다. 전체적으로 triazine들이 [M]⁺, [M-15]⁺, [M-27]⁺, [M-43]⁺, [M-57]⁺의 토막이온들을 공통적으로 가지고 있다.

분석에 사용된 내부표준물질은 phenanthrene-d₁₀으로서 이 물질의 분자이온[M]⁺인 m/z 188을 정량이온으

Table 3. GC-MS characteristic ions of triazines

Compounds	MW	[M-CH ₃] ⁺	[M-C ₂ H ₃] ⁺	[M-C ₂ H ₅ N] ⁺	[M-C ₃ H ₇ N] ⁺
Simazine	201	186	-	158	-
Prometon	225	210	-	-	168
Atrazine	215	200	-	-	158
Propazine	229	214	-	-	172
Terbuthylazine	229	214	-	-	-
Simetryn	213	-	-	170	156
Ametryn	227	212	-	-	170
Prometryn	241	226	-	-	184
Terbutryn	241	226	-	-	-
Cyanazine	240	225	213	-	-

Table 4. LC-MS/MS characteristic ions of triazines

Compounds	MW	[M+H] ⁺	[M+H-C ₂ H ₃] ⁺	[M+H-C ₃ H ₆] ⁺	[M+H-C ₄ H ₈] ⁺	[M+H-C ₂ H ₅ N-CN] ⁺	[M+H-C ₃ H ₈ N-CN] ⁺	[M+H-C ₂ H ₅ N-SCH ₃] ⁺
Cyanazine	240	241	214	-	-	-	-	-
Simazine	201	202	-	-	-	132	-	-
Atrazine	215	216	-	174	-	-	-	-
Simetryn	213	214	-	-	-	-	-	124
Prometon	225	226	-	-	-	-	142	-
Propazine	229	230	-	188	-	-	-	-
Ametryn	227	228	-	186	-	-	-	-
Terbuthylazine	229	230	-	-	174	-	-	-
Prometryn	241	242	-	200	-	-	-	-
Terbutryn	241	242	-	-	186	-	-	-

로 선택하였다.

3.2. LC-MS/MS 질량스펙트럼

질량분석기를 이용하여 triazine을 분석할 경우 HPLC/DAD에 의한 분석만으로는 확인하기 어려운 각 물질의 분자량 및 분자구조에 대한 정보를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 선택이온 크로마토그램을 이용하여 바탕선 상승 및 정량에 대한 방해 효과를 해결할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 인체 노중에서 triazine을 확인하는 방법으로 LC-MS/MS에 의한 질량스펙트럼을 조사하여 분석의 선택성과 정밀성을 높이고자 하였다.

대상물질인 triazine을 질량분석기를 이용하여 100-500 m/z의 질량 범위로 positive scan 모드를 이용하여 질량스펙트럼을 확인하였다. 또한 효과적이고 보다 정확한 정량 분석을 위하여 MS/MS 과정을 수행하였다. MS/MS과정은 [M+H]⁺를 선구이온으로 (precursor ion) 선정하였다. 또한 각 화합물에 대한 충돌 에너지 (collision energy)를 순차적으로 일으켜 최적화된 충돌에너지 및 생성이온을 확인하였다(Table 4).

3.3. 노 시료 중에서의 추출 회수율 조사

생체시료의 전처리에서는 분석대상물질의 손실을 방지하면서 matrix로부터 분석대상물질을 분리하고 농축하는 과정 등이 포함된다. 본 연구에서는 액체-액체 추출법과 고체상 추출법을 사용하여 대상 matrix인 뇨에서 triazines를 동시분석 하기위한 최적 조건을 조사하였다.

3.3.1. 액체-액체 추출법

3.3.1.1. 염의 양에 따른 추출 회수율

무수황산나트륨을 0 g, 0.2 g, 0.4 g, 0.7 g, 1.1 g으로 변화 시켜가면서 회수율을 비교한 결과 0.7 g과 1.1 g에서 비슷한 회수율을 보였으나 실험의 효율성을 고려하여 포화상태인 0.7 g을 선택 하였고, 10종의 대상 물질에 대한 추출율은 78.56-103.84% 범위로 나타났고, RSD는 2.04-9.86% 범위로 우수한 재현성을 보였다.

액체-액체 추출법에서 염석효과를 위해 염화나트륨과 무수황산나트륨을 사용할 수 있는데 본 실험에서는 분자량이 큰 무수황산나트륨을 사용하였다. 염화나트륨은 분자량이 58.443 g/mol이고 물에 대한 용해도는 35.6 g/100 mL(0°C), 35.9 g/100 mL(25°C), 39.1 g/100

mL(100°C)이다.

무수황산나트륨은 분자량이 142.04 g/mol(anhydrous)이고, 물에 대한 용해도는 4.76 g/100 mL(0°C), 42.7 g/100 mL(100°C)이다. 염화나트륨과 무수황산나트륨 모두 염석효과를 줄 수 있지만 상온에서 실험시 포화 상태를 만들기 위해서는 용해도를 고려 했을때 무수황산나트륨이 더 적은 양으로도 포화가 가능하다. 따라서 무수황산나트륨을 염석 효과를 위해 사용했다(Fig. 5).

3.3.1.2. 용매종류에 따른 추출 회수율

용매를 Ethyl ether, EA, MC, MTBE로 변화 시켜가면서 회수율을 비교한 결과 MTBE에서 10종의 대상 물질에 대한 추출율이 71.99-111.91%범위로 나타났고, RSD는 8.26-10.14% 범위로 우수한 재현성을 보였다.

Snyder에 의하면, 용매의 극성도를 나타내는 척도인 solvent polarity parameter(p')의 값이 EA(4.4) > MC(3.1) > Ethyl ether(2.8) > MTBE(2.5)의 순서로 나타나 있다¹⁷⁾. 4개의 solvent를 실험을 통해 비교하였을때 MTBE > MC > EA > Ethyl ether의 순서로 회수율이 좋게 나타났다. Ethyl ether를 제외한 solvent들은 극성이 작은 순서로 회수율이 좋게 나타났다. Ethyl ether의 경우 물에 대한 용해도가 6.89으로 높은 편이라서 물에 가까운 뇨를 액체-액체 추출법을 이용하여 실험할 때 뇨에 많이 녹아 shaking후 손실이 많을 것으로 판단된다. 또한 끓는점이 35°C로써 매우 낮기 때문에 실험 시 손실이 될 가능성이 많아 4가지의 solvent중 가장 낮은 회수율이 나온 것으로 판단된다. MC의 경우 물에 대한 용해도가 낮지만 ethyl ether와 마찬가지로 끓는점이 낮아 회수율이 낮은 것으로 판단되고, 물보다 밀도가 높아 20 mL 시험관에 액체-액체 추출법 실험을 할때 뇨보다 아래 층에 머물러 shaking 후 solvent를 따라내기가 어렵다.

따라서 회수율과 실험의 편의성을 고려 할때 MTBE를 추출 용매로 사용하는 것이 적합하다고 판단된다(Fig. 5).

3.3.1.3. pH에 따른 추출 회수율

pH를 2, 6.5(blank urine), 8.5, 14로 변화 시켜가면서 회수율을 비교한 결과 pH 6.5(바탕소변)에서 10종의 대상 물질에 대한 추출율이 63.53-111.82%범위로 나타났고, RSD는 5.85-11.60% 범위로 우수한 재현성을 보였다.

노시료에 citric acid 1g을 넣어 pH 2로 조절한 후 실험을 하였을 크로마토그램의 바탕이 지지분하고 바탕선이 다른 pH조건 보다 높은 것을 알 수 있었다.

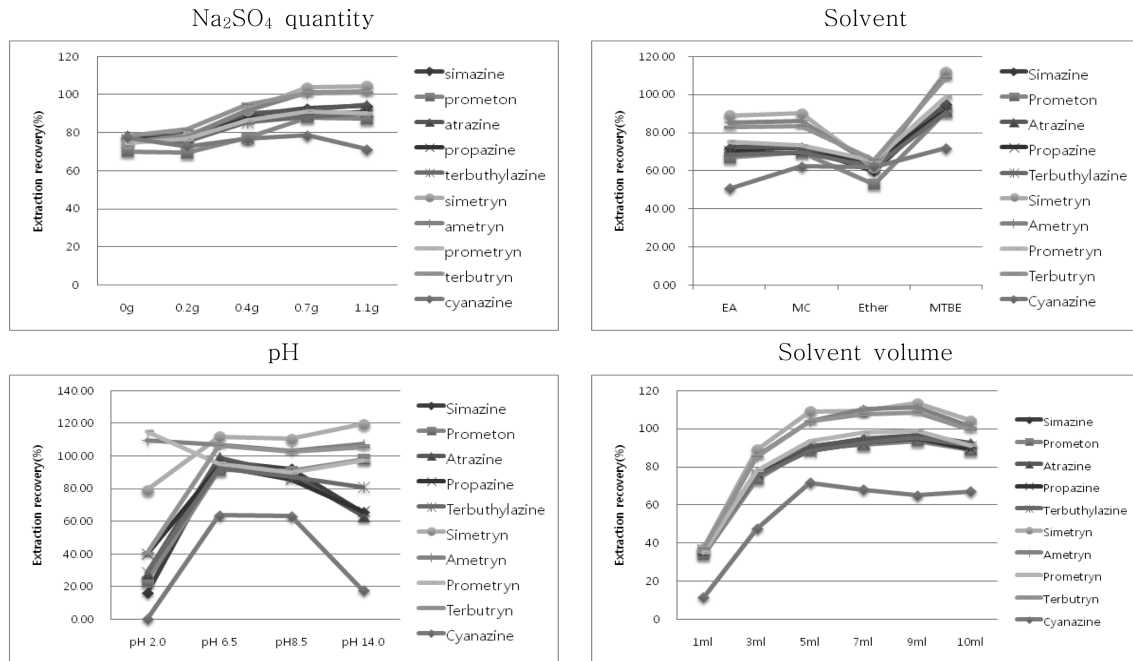


Fig. 5. Effects of Na_2SO_4 quantity, solvent, pH and solvent volume on the extraction recoveries of triazines in urine with LLE.

이는 시료를 산성으로 맞추어 주었을 때 트리아진 뿐만 아니라 산성 조건에서 추출이 잘되는 물질이 모두 나와 바탕이 지저분해지는 것으로 판단된다.

노시료에 KOH 0.5g을 넣어 pH 14인 강염기로 조절 한 후 chromatogram의 back ground가 깨끗하지만 10개의 트리아진 중 일부의 회수율만 좋을 뿐 10개를 동시에 분석하기에 적합하지 않았다.

트리아진은 약산이나 약염기에서는 안정한 상태를 유지할 수 있으나 강산이나 강염기에서는 가수분해가 빠르게 진행되기 때문에 회수율이 떨어지는 것으로 판단된다. 따라서 가장 회수율이 좋은 pH 6.5 (바탕소변)에서 실험을 진행하였다(Fig. 5).

3.3.1.4. 용매양에 따른 추출 회수율

MTBE를 1, 3, 5, 7, 9, 10 mL로 변화 시켜가면서 회수율을 비교한 결과 MTBE 1 mL의 경우 회수율이 40%가 되지 않아 5 mL의 sample을 추출하기에 양이 적절하지 않음을 알수 있었다.

Solvent 5 mL과 10 mL의 회수율을 비교하였을 시 비슷한 양상을 보여 실험 효율을 고려하여 MTBE 5 mL을 추출 solvent 양으로 정하였다(Fig. 5).

3.3.2. 고체상 추출법

3.3.2.1. 고체상에 따른 추출 회수율

C18, tC2 두가지의 고체상을 사용하여 회수율을 비교한 결과 tC2에서 10종의 대상 물질에 대한 추출율이 79.70-103.67% 범위로 C18보다 더 좋은 회수율을 나타냈고, RSD는 8.01-12.63% 범위의 재현성을 보였다.

트리아진은 비교적 극성이 큰 물질들로 고체상 추출법을 사용할 때 주로 역상에 의한 고체상 추출법을 사용한다. C18과 tC2는 모두 대표적인 비극성 고체상으로서 C18은 표면특성으로는 강 소수성을 띠고 tC2는 낮은 소수성을 띤다. 이러한 고체상 특징의 영향으로 tC2가 더 좋은 회수율을 보인 것으로 판단한다(Fig. 6).

3.3.2.2. 용리액 종류에 따른 추출 회수율

EA, MTBE, Ethyl ether, MC, ACN 으로 용리액의 종류를 바꾸어서 회수율을 비교한 결과 EA를 사용하였을 때 10종의 대상 물질에 대한 추출율이 58.76-121.38%범위로 나타났고, RSD는 4.47-10.58% 범위의 재현성을 보였다.

용리액은 트리아진 보다 덜 극성을 띠는 solvent를 사용하는 것이 보편적이고 EA > MC > MTBE > Ethyl ether > ACN의 순서로 추출율이 좋게 나타났다.

Snyder에 의하면, 용매의 극성도를 나타내는 척도인

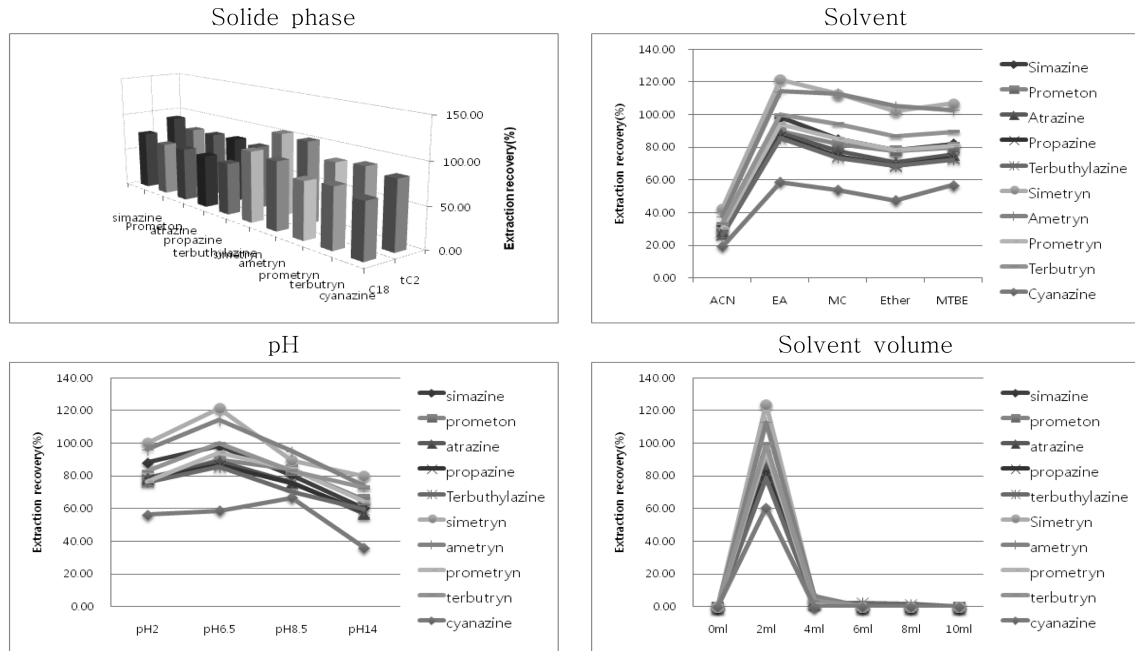


Fig. 6. Effects of solide phase, solvent, pH and solvent volume on the extraction recoveries of triazines in urine with SPE.

solvent polarity parameter(p')의 값이 ACN(5.8) > EA (4.4) > MC(3.1) > Ethyl ether(2.8) > MTBE(2.5)의 순서로 ACN을 제외하고 극성이 높은 순서대로 추출율이 높게 나타났다(Fig. 6).

3.3.2.3. pH에 따른 추출 회수율

pH를 2, 6.5(blk urine), 8.5, 14로 변화 시켜가면서 회수율을 비교한 결과 pH 6.5(blk urine)에서 10종의 대상 물질에 대한 추출율이 58.76-121.38% 범위로 나타났고, RSD는 4.47-10.58% 범위로 우수한 재현성을 보였다.

액체-액체 추출법에서의 실험과 마찬가지로 산성의 조건에서는 크로마토그램이 지저분하고 추출이 잘 안 되는 것을 확인할 수 있었다. 트리아진은 약산이나 약 염기에서는 안정한 상태를 유지할 수 있으나 강산이나 강염기에서는 가수분해가 빠르게 진행되기 때문에 회수율이 떨어지는 것으로 판단된다(Fig. 6).

3.3.2.4. Solvent양에 따른 추출 회수율

EA를 2, 4, 6, 8, 10 mL로 변화 시켜가면서 회수율을 비교한 결과 EA 2 mL만으로도 80% 이상의 회수율을 나타냈고 4 mL 이상부터는 더 이상의 회수율 증가가 보이지 않고 실험의 효율성을 판단하여 추출 용 리액을 5 mL로 결정하였다(Fig. 6).

3.3.3 액체-액체 추출법 & 고체상 추출법 회수율 비교
 액체-액체 추출법과 고체상 추출법의 회수율을 비교 하기 위하여 각 각의 최적의 추출법을 이용하여 20 ng/mL의 농도를 선택하여 실험을 수행하였다. 액체-액체 추출법은 71.99-111.91%의 회수율을 고체상 추출법은 79.70-103.67%의 결과로 나타났다. 액체-액체 추출법을 이용하여 실험하였을 때 대부분의 물질들이 우수한 회수율을 나타냈고 고체상 추출법에 비해 깨끗한

Table 5. Recoveries of triazines in urine by GC-MS

Compounds	LLE		SPE	
	Mean (%)	RSD (%)	Mean (%)	RSD (%)
Simazine	94.87	8.26	91.28	9.45
Prometon	90.95	9.64	81.22	8.01
Atrazine	95.11	9.21	81.28	12.63
Propazine	91.73	8.87	82.26	11.10
Terbutylazine	90.76	9.05	79.70	10.63
Simetryn	111.91	9.16	103.67	8.87
Ametryn	110.63	9.23	101.39	10.06
Prometryn	98.81	9.11	84.63	10.61
Terbutryn	108.89	9.51	88.35	11.45
Cyanazine	71.99	10.14	83.16	8.38

*RSD : relative standard deviation with n=5

*Target concentration = 20ng/mL

Table 6. Calibration data and detection limits of triazines by GC-MS

Compounds	MW	Selected Ion, m/z	RRT	concentration range, ng/mL	y = ax + b			MDL (ng/mL)
					a	b	r ²	
Simazine	201	201	0.909	0.5-20.0	0.2412	0.0037	0.999	0.40
Prometon	225	210	0.907	1.0-20.0	0.2556	0.0023	0.999	0.79
Atrazine	215	200	0.927	0.2-20.0	0.3076	0.0034	0.999	0.19
Propazine	229	214	0.943	0.2-20.0	0.2790	0.0027	0.999	0.20
Terbutylazine	229	214	0.982	0.1-20.0	0.4965	0.0048	0.999	0.10
Simetryn	213	213	1.159	0.5-20.0	0.4212	0.0025	0.999	0.49
Ametryn	227	227	1.168	0.5-20.0	0.3546	0.0025	0.999	0.39
Prometryn	241	241	1.175	0.5-20.0	0.3344	0.0022	0.999	0.49
Terbutryn	241	226	1.197	0.5-20.0	0.3255	0.0041	0.998	0.51
Cyanazine	240	212	1.233	1.0-20.0	0.1586	0.0036	0.998	0.95

*ISTD : Phenanthrene -d₁₀ (t_R = 15.071)

*MDL : Method Detection Limits

*σ=3.143PSD (T-통계이용)

back ground를 나타내서 최적의 추출법은 액체-액체 추출법이라고 판단하였다(Table 5).

3.4. 검정곡선, 정밀도, 정확도, 회수율, 검출한계작성

Triazines 10종의 혼합표준용액을 0.1-20 ng/mL 농도 범위로 첨가하여 GC-MS를 이용하여 검정곡선 실험을 시행한 결과 모두 r²=0.99이상의 좋은 직선성을 나타내었다(Table 7). GC-MS를 이용한 σ범(n=7) 검출한계 측정실험을 한 결과 0.10-0.95 ng/mL으로 나타났고 신호 대 잡음비 방법을 이용한 검출한계 측정실험에서 LC-MS/MS를 이용한 방법이 GC-MS의 방법보다 80-4000배 감도가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(Table 6, 7).

각 물질의 예상되는 검출한계의 5, 10, 15배의 농도

Table 7. Detection limits of triazines by LC-MS/MS

Compounds	IDL (pg)	
	GC-MS 2 ul injection	LC-MS/MS 5 ul injection
Simazine	50	0.25
Prometon	100	0.25
Atrazine	20	0.25
Propazine	20	0.01
Terbutylazine	10	0.01
Simetryn	50	0.01
Ametryn	50	0.25
Prometryn	50	0.01
Terbutryn	50	0.03
Cyanazine	100	0.25

*IDL : Instrument Detection Limit (S/N > 3)

Table 8. Precision and accuracy of triazines in urine by GC-MS

Compounds	Target value (ng/mL)	Precision (%C.V.)	Accuracy (%Bias)
Simazine	5	7.69	-7.64
	10	4.35	9.44
	15	3.36	-0.83
Prometon	10	1.05	11.86
	15	4.47	-7.48
	30	2.61	-0.79
Atrazine	5	6.71	-6.96
	10	3.55	14.18
	15	4.17	-0.16
Propazine	2	7.71	-7.80
	5	7.78	-5.40
	10	4.28	13.80
Terbutylazine	2	10.69	-3.30
	5	8.91	-9.92
	10	6.95	9.92
Simetryn	5	8.99	-9.40
	10	5.44	12.22
	15	3.20	-5.97
Ametryn	5	8.79	-9.20
	10	2.05	13.60
	15	3.32	-4.43
Prometryn	5	8.04	-7.92
	10	5.27	9.52
	15	4.01	-4.71
Terbutryn	5	8.26	-8.60
	10	6.05	16.00
	15	3.71	-5.72
Cyanazine	10	4.55	14.68
	15	5.85	8.44
	30	5.14	2.98

를 선택하여 정밀도와 정확도측정 실험을 한 결과 정밀도는 1.05-10.69%로, 정확도는 -9.92-16.00%로 나타났다(Table 8). 따라서 MTBE 5 mL을 이용하여 액체-액체 추출법으로 추출한 방법은 노 중에서 트리아진을 동시분석하기에 적합한 분석방법이라고 판단되며, LC-MS/MS 방법을 이용한 분석방법은 GC-MS보다 우수한 검출한계를 얻을 수 있어 background가 지저분한 생체 시료에서의 검출기로서 적합하다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 triazines에 대하여 인체 노 시료를 대상으로 GC-MS와 LC-MS/MS를 이용하여 실험 조건을 최적화하여 분석하는 방법을 연구하였다.

GC-MS를 이용하여 고체상 추출법과 액체-액체 추출법을 통해 효과적인 전처리 방법을 선택하고 회수율을 구하였다. 노 시료를 액체-액체 추출법을 이용하여 전처리한 결과 pH6.5에서 Na₂SO₄ 0.7 g을 이용하여 염석효과를 하고 MTBE 5 mL을 이용하여 추출한 결과 고체상 추출보다 회수율이 높게 나타나고 chromatogram의 back ground도 더 깨끗한 것을 확인할 수 있었다. 최적의 액체-액체 추출법에 의한 회수율이 71.99-111.91%로 나타났고, 0.1-20.0 ng/mL범위에서 검량선을 작성한 결과 r²값은 0.998-0.999로 나타났다. GC-MS에서 시그마법을 이용하여 검출한계를 계산 한 결과 0.10-0.95 ng/mL으로 나타났다.

LC-MS/MS에서 신호 대 잡음비 방법을 이용하여 계산한 결과 기기검출한계는 0.01-0.25 pg으로 GC-MS를 이용하여 검출한계를 구하였을 때 보다 80-4000배 정도 좋은 감도를 얻을 수 있었다. LC-MS/MS를 이용하게 되면 SRM방식을 이용하여 더욱 선택적인 분석이 가능하게 되어 back ground가 지저분한 생체 시료의 경우 GC-MS를 이용하였을 때 보다 낮은 검출한계를 기대할 수 있다.

본 논문에서 개발한 분석법은 기존의 방법과는 달리 LC-MS/MS를 이용해 인체 노중에서 10종의 트리아진의 검출한계를 향상시켜서 체내에 존재하는 트리아진의 효과적인 발견을 가능하게 되었고 후에 대사체 실험에도 응용이 가능 할 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학기술연구원의 Metabolomics 응용

기술연구 지원을 받아 수행되었으며, 도움을 주신 웅진 R&D센터의 관계자 분께 감사드립니다.

참고문헌

1. Stevens, J. T. and Sumner, D. D. Herbicides. In Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., Eds. Academic Press New York, NY. **1991**, 8, 4.
2. Rider, J.A., Moeller, H.C., Puletti, E.J. and Swader, J.I. Toxicity of parathion, Systox, octamethyl pyrophosphoramidate and methyl parathion in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1969**, 14, 603.
3. Suntio, L.R., Shiu, W.Y., Mackay, D., Seiber, J.N. and Glotfelty, D. Critical review of Henry's law constants for pesticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **1988**, 103, 1.
4. Thomas H. Corbett, Wilbur R. Leopold, Donald J. Dykes, Billy J. Roberts, Daniel P. Griswold, Jr., and Frank M. Schabel, Jr. *Cancer Research.* **1982**, 42, 1707-1715.
5. Qingxiang ZHOU, Long PANG, Guohong XIE, Junping XIAO, and Huahua BAI, *ANALYTICAL SCIENCES JANUARY.* **2009**, 25, 73.
6. P.B. Tchounwou, B. Wilson, A. Ishaque, R. Ransome, Ming-Ju Huang and Jerzy Leszczynski, *Int. J. Mol. Sci.* **2000**, 1(4), 63-74.
7. Schuler LJ, Trimble AJ, Belden JB, Lydy MJ. *Arch Environ Contam Toxicol.* **2005**, 49, 173-177.
8. Rita Frassanito, Giacomo De Socio, Danilo Laura, and Domenico Rotilio, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 2282-2286.
9. G. MendaB. Tkalčević, V. Drevenkar, *Analytica Chimica Acta.* **2000**, 424, 7-8.
10. Anne D. Lucas, A. Daniel Jones, Narvin H. Goodrow, Steven G. Saiz, Craig Blewett, James N. Seiber,t and Bruce D. Hammock, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 6, 107-116.
11. Sergio Frás-García M. J. Sánchez Miguel. Rodríguez-Delgado, *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 660-666.
12. Joseane M. Pozzebon, Sonia C. N. Queiroz, and Isabel C. S. F. Jardim, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* **2003**, 26, 781-790.
13. J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, *Journal of Chromatography A.* **2000**, 885, 389-04.
14. G. Mendasá, V. Drevenkara, L. Zupančič-Kraljč, *Journal of Chromatography A.* **2001**, 918, 351-59.
15. T. Kumazawa, X.-P. Lee, K. Kondo, K. Sato, H. Seno, K. Watanabe-Suzuk, A. Ishii, O. Suzuk, *Journal of*

- Chromatography A.* **2000**, 52, 195-199.
16. 박송자, 김연제, 표희수, 박경수, 박종세, *Analytical Science & Technology.* **1994**, 7, 1.
 17. Johansson G, Joelsson M. *Appl Biochem Biotechnol.* **1986**, 1, 15-27.
 18. Barbara Hausera, Peter Poppa, Eike Kleine-Benneb, *Journal of Chromatography A.* **2002**, 963, 27-36.
 19. E. Matisova, J. Krupka and O. Likaa. *Journal of Chromatography A.* **1979**, 173, 139-146.
 20. 김택제, 명승윤, 조현우, 김명수: *실용적인 기체액체 크로마토그래피와 질량분석법, 자유아카데미* **2002**.
 21. Paulo C. do Nascimento, Ana L.B. Rohlfs, Denise Bohrer, Leandro M. de Carvalho, Eduardo J. Pilau, *Talanta.* **2005**, 65, 211-216.
 22. M.S. Dopico G, M.V. González R1, J.M. Castro R, E. González S, J. Pérez I, M. Rodríguez T, A. Calleja, J.M.L. Vilariñ, *Talanta.* **2003**, 59, 561-569.
 23. Nobumitsu Hanioka, Hideto Jinno, Toshiko Tanaka-Kagawa, Tetsuji Nishimura, and Masanori Ando, *Toxicology and Applied Pharmacology.* **1999**, 156, 195-05.
 24. Bichon E, Dupuis M, Le Bizec B, Andre F. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2006**, 2, 96-106.
 25. Joseane M. Pozzebona, Wagner Vilegasb, Isabel C.S.F. Jardim, *Journal of Chromatography A.* **2003**, 987, 375-380.
 26. Matthew K. Ross, Nikolay M. Filipov, *Analytical Biochemistry.* **2006**, 351, 161-73.
 27. Bjarni Bjarnason, Luke Chimuka, and Olof Ramstrom, *Anal. Chem.* **1999**, 71, 2152-2156.
 28. Zhiquan Zhoua, Ming Jina, Jianhua Dingb, Yueming Zhoub, Jian Zhengc,d and Huanwen Chenab, *Metabolomics.* **2007**, 3, 2.
 29. Feng Ji1 Lixia Zhao1 Wei Yan1 Qinzhong Feng1 Jin-Ming Lin1, *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 961-968.
 30. Joseane M. Pozzebona, Wagner Vilegasb, Isabel C.S.F. Jardim, *Journal of Chromatography A.* **2003**, 987, 375-380.
 31. William R. Lusby, Philip C. Kearney. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, 26, 635-638.