Journal of the Korean Chemical Society
2001, *Vol. 45, No. 2*
Printed in the Republic of Korea

단 신

LC/MS(TOF)를 이용한 토양 중 Benomyl의 농도 분석

金基棟*・徐容燦†・崔元圭‡
상지대학교 이학부 화학과
†상지대학교 공학부 환경공학과
‡상지대학교 공학부 자원공학과
(2001. 2. 5 접수)

Determination of Benomyl in Soil by LC/MS(TOF)

Kee D. Kim*, Yong Chan Seo†, and Won Gyu Choi‡
Department of Chemistry, Sangji University, Wonju 220-702, Korea
†*Department of Environmental Engineering, Sangji University, Wonju 220-702, Korea*
‡*Department of Mining and Minerals Engineering, Sangji University, Wonju 220-702, Korea*
(Received February 5, 2001)

서 론

Methyl(1-butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate (benomyl)은 carbamate 계열의 농약으로서 그 동안 비교적 독성이 낮은 것으로 알려졌었으나 종양유발 가능성이 있는 농약 및 내분비계장애 추정물질 중의 하나로 확인되어 각 농작물에 대한 허용 잔류량이 정해져있다.[1] Benomyl은 주로 고환에 심각한 손상을 미치고 있으며, 특히 benomyl의 대사산물 중 하나인 methyl 2-benzimidazole carbamate(carbendazim)의 독성은 benomyl에 비해 상당히 높다. benomyl에 의해 나타나는 독성은 benomyl의 생체내 분해에 의해 생성된 대사산물인 carbendazim에 의한 효과로 추정되고 있다.[2] Benomyl은 물에 대한 용해도가 낮고 매우 불안정하여 자연상태에서도 상대적으로 안정한 carbendazim으로 쉽게 분해되는 것으로 알려져 있다(*Fig.* 1). Carbendazim은 매우 안정한 물질로 pH 8 수용액에서 최소 8일 이상 안정함을 보이고 있다.[2,3] 이러한 이유로 benomyl은 그 자체로 존재하기보다는 carbendazim 등의 다른 물질로 전환되어 존재하기 때문에 benomyl 자체에 대해 분석하기보다는 carbendazim으로 가수분해시켜 추출, 정제과정을 거쳐 정량분석을 한 후 역으로 분자량을 환산하여 잔류량을 측정하고 있다.[4,5]

농약의 잔류 농도 분석에서 carbamate 계열의 농약은 분석방법에 상당한 제한요소를 갖는다. 일반적으로 carbamate 계열의 물질은 열에 상당히 민감하여 쉽게 분해되므로 분석상에 열을 가하는 GC등의 분석장비로는 측정이 용이하지 않다. 그 단점을 보완하기 위하여 사용되는 LC/UVD는 감도가 GC에 비하여 상당히 떨어지므로 수질 혹은 음식물등에 포함되어 있는 낮은 농도의 carbamate 계열의 농약을 분석하기에는 비능률적이다.

현재 benomyl에 대한 분석법은 미국 환경청의 EPA Method-631, EPA Method-8321-B,[6] 일본의 내분비계장애물 분석법[7] 등이 확립되어 있다. 토양시료는 미국의 경우 benomyl을 위한 명확한 전처리방법은 아직 마련되어있지 않으나 EPA Method 8321-B에 준하여 시행하도록 되어있다. 전처리법에 있어 미국법은 산성

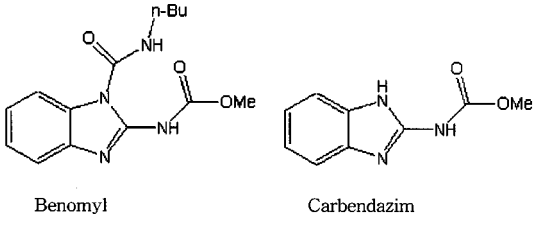

Fig. 1. Structure of benomyl and carbendazim.

하에서 시료를 ether로 추출하도록 되어있는 반면 일본법은 메탄올로 추출 후 산으로 가수분해를 한다. 미국법의 경우 carbendazim이 잘 녹지 않는 ether로 추출을 하는 단점이 있고 일본법의 경우 추출과정상 화학적으로 명확하지 않은 과정이 있다.

Benomyl을 carbendazim으로 분해하여 정량함에 있어서도 미국 환경청의 HPLC/UVD를 이용한 분석법의 경우 방해물질의 존재에 의해 상당한 오차가 발생하고 있다.[8] 일본의 유도체화를 이용한 GC/MS법의 경우 carbendazim의 diazomethane에 의한 N-methylation은 진행되기 매우 어려운 화학반응이며 실제적으로 상당히 낮은 수득율을 보이고 있어 신뢰성을 갖기가 어렵다. 이에 방해물질에 의한 영향을 최소화하며 검출한계를 낮추기 위해 수질에서와[8] 같이 LC/MS(TOF)를 이용하여 전국 각지 토양에서의 benomyl 농도를 조사하였다.

실험방법

기기 및 시약. Benomyl 분석에는 HPLC(Varian 9012Q), 질량분석기(Micromass LCT)와 UV 검출기(Varian 9050 UVD)를 사용하였다. Dichloromethane과 메탄올은 잔류농약분석용을 사용하였으며 표준시약은 순도 99%의 benomyl과 carbendazim을 Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. 그 외 시약들은 특급시약을 사용하였고 질소 가스는 순도 99.999%이상의 고순도 1급 질소를 사용하였다.

토양시료의 전처리 및 분석. 균질화한 시료 20 g에 메탄올 50 mL를 넣고 15분간의 진탕, 15분간의 초음파처리 과정을 거친 후 3000 rpm에서 원심분리 한다. 상등의 메탄올 층을 분취한 후 잔유물에 메탄올 50 mL를 넣어 추출조작을 반복하여 먼저의 메탄올 추출액에 합한다. 합하여진 메탄올 추출액을 회전식 감압 농축기 혹은 K-D 농축기를 사용하여 1 mL로 농축시킨 후 이 농축액을 0.3 N 황산액 20 mL가 들어있는 50 mL 삼각 플라스크에 넣고 2시간 실온에서 교반하여 잔여 benomyl을 가수분해시킨다. 10 N NaOH 용액를 적가하여 pH 7-8로 조정하고 10 mL의 dichloromethane을 사용하여 수질시료와 같은 방법으로 분석물질을 추출한다. 이러한 추출을 2회 반복 후 모두 합한 dichloromethane 용액을 무수 황산나트륨으로 충진된 drying column을 통과시키고 여과액은 K-D 농축기로 농축한 후 수질시료와 같은 방법으로 LC/MS(TOF)로 분석하였다. 단, 이동상은 100% 메탄올을 사용하였다.

결과 및 고찰

미국 환경청의 수계 중 benomyl의 분석방법은 EPA-631에 의해 규정되어 있으나 토양 및 저질시료 등의 분석방법은 명확히 규정되어 있지 않다. 일본법에 의하면 토양 및 저질시료는 메탄올로 추출하여 산처리와 추출과정을 거쳐 얻어진 carbendazim을 최종적으로 diazomethane을 이용하여 Me-carbendazim으로 전환시킨 후 GC/MS로 분석을 하도록 규정되어 있으며 그 때의 MDL(Method Detection Limit)은 2 μg/kg으로 알려져 있다. 본 실험에서 전처리는 일본법을 기본으로 하였으나 추출과정 중 산처리 후 유기층을 제거하는 등의 수득율을 감소시킬 수 있는 과정이 포함되어 있어 그 과정을 변형하였다. 실제 spike한 시료의 경우 일본법을 따라 했을 경우는 수득율이 10% 미만이었으나 본 실험방법으로 했을 경우는 약 70%의 양호한 수득율을 얻을 수 있었다.

전처리 후 농축된 시료의 carbendazim 농도는 LC/MS(TOF)를 사용하여 m/z가 192.19(MH^+)인 SIM (Selected Ion Monitoring)을 사용하여 분석하였다. Carbendazim농도에 1.52(benomyl 분자량/carbendazim 분자량)를 곱한 값이 benomyl의 농도에 해당한다.

검량선 작성 후 50 μg/L carbendazim 표준용액을 자체 제작하여 검량확인(calibration check)을 하였고 매 10개 시료를 측정한 후에 carbendazim 표준용액을 측정하여 기기의 안정성을 주기적으로 조사하였다. Warning level로는 ±2δ(표준편차), control level로는 ±3δ를 사용하였고 warning level을 연속 2회 초과하거나 control level을 초과할 경우 검량선을 재 작성하여 시료를 분석하였다.

MDL 측정은 carbendazim을 0.530 μg/kg의 농도가 되도록 spike 한 7개의 시료를 측정하여 표준편차를 구하고 98% 신뢰도의 Student t 값인 3.14를 표준편차에 곱하여 계산하였다(*Table* 1). LC/MS(TOF)로 측정한 benomyl의 MDL은 0.184 μg/kg으로 일본법에 비해 10배 이상 낮은 값을 보이고 있다.

일본법에 따른 benomyl의 가수분해물인 carbendazim의 diazomethane에 의한 메틸화반응은 진행되기 어려운 화학반응으로 예측된다. 실제로 일본법에 따라 GC/

Table 1. MDL study for the determination of benomyl in soil by LC/MS(TOF) method

Sample number	Area count	Carbendazim concentration in soil (μg/kg)	Benomyl concentration in soil (μg/kg)
MDL1	143	0.325	0.494
MDL2	156	0.380	0.577
MDL3	167	0.426	0.648
MDL4	169	0.435	0.661
MDL5	157	0.384	0.584
MDL6	151	0.359	0.545
MDL7	152	0.363	0.552
Standard Deviation	9.126	0.0385	0.0586
MDL		0.1210	0.184

*0.530 μg/kg of Carbendazim Sample was used for MDL Study

Table 2. The benomyl concentration in soil determined by LC/MS(TOF) and LC/UVD

Sample number	Determined by LC/MS (TOF)		Determined by LC/UVD		Differences (%)
	Carbendazim Concentration (μg/kg)	Benomyl Concentration (μg/kg)	Carbendazim Concentration (μg/kg)	Benomyl Concentration (μg/kg)	
s-5	2.484	3.776	4.154	6.314	67.2
s-9	1.134	1.724	2.513	3.819	122
s-15	0.782	1.188	7.163	10.887	816
s-21	3.240	4.925	35.957	54.654	1010
s-27	1.613	2.452	6.566	9.980	307

Table 3. The benomyl concentration in soil

Sample number	Site	Benomyl concentration (μg/kg)	Sample number	Site	Benomyl concentration (μg/kg)
s-1	Seoul Songpagu Jamsil	2.216	s-19	Kyungbook Sangjoo	N.D
s-2	Seoul Kurogu Kuro	N.D	s-20	Kyungbook Youngchun	N.D
s-3	Kyunggi Yangju	N.D	s-21	Kyungbook Moonkyung	4.925
s-4	Kyungg Kwangju	N.D	s-22	Busan Kangsugu Karak	N.D
s-5	Kyungg Sungnam	3.776	s-23	Ulsan Uljoo Onsan	N.D
s-6	Kyungg Hwansung	N.D	s-24	Kyungnam Sanchung	N.D
s-7	Inchun Namgu Hakik	1.078	s-25	Kyungnam Milyang	N.D
s-8	Kangwon Jungsun	N.D	s-26	Kyungnam Changyoung	N.D
s-9	Kangwon Pyungchang	1.724	s-27	Junbook Junjoo Youe	2.555
s-10	Kangwon Hoeingsung	N.D	s-28	Junbook Kimje Keumsan	N.D
s-11	Daejun Seogu Tanbang	1.748	s-29	Junbook Wanjoo Esu	N.D
s-12	Chungnam nonsan sun	N.D	s-30	Kwangjoo Seoboo	N.D
s-13	Chungnam Suchun Masu	N.D	s-31	Junnam Yuchun Wolrae	N.D
s-14	Chungnam Chunan	6.605	s-32	Junnam Jangsung Nam	2.606
s-15	Chungbook Chungwon	1.188	s-33	Junnam Kogsung Okog	3.085
s-16	Chungbook Chungju	1.112	s-34	Junnam Youngkwang	N.D
s-17	Kyungbook Kimchun	N.D	s-35	Jejoo Namjejoo Pyosun	N.D
s-18	Kyungbook Youngduck	N.D			

MS로 분석한 결과수득율이 1% 이하로 나타났다. 미국법에 따라 LC/UVD로 측정할 경우 수질에서와 마찬가지로 다른 방해물질에 의해 상당한 오차를 나타내고 있다(*Table* 2).[8]

이에 따라 LC/MS(TOF)의 SIM으로 제주도를 포함한 전국 35개 지점에서 토양중의 benomyl 농도를 측

정하였으며 1 μg/kg 이하는 불검출(N.D.)로 처리한 결과 대략 34% 정도(12개 지역)가 benomyl에 의해 오염됐음을 알 수가 있다(*Table* 3). 오염된 지역의 경우 수질시료에[8] 비해 benomyl의 농도가 수십배에서 수백배 정도로 높게 나온 결과로 유추해 볼 때 benomy의 토양에서의 분해속도가 수질에서의 경우에 비해 상대적으로 늦으며 그에 따라 benomyl의 축적이 진행되고 있음을 알 수 있다. 특히 시료의 채취 시기가 9, 10월로서 농약의 주 살포기간이 아님을 고려할 때 국내 토양이 benomyl에 의해 상당히 지속적으로 오염이 되어 왔다고 생각할 수 있다.

결 론

본 실험방법인 LC/MS(TOF)에 의한 토양의 benomyl 분석법은 일본 분석법에 비해 월등히 낮은 MDL을 보여줄 뿐만 아니라 전처리법도 간단, 명확하다는 장점이 있다. 특히 LC/UVD에 의한 정량분석에는 방해물질에 의한 positive error가 발생할 수 있기 때문에 일반 환경시료에의 응용은 상당히 제한적일 수밖에 없다. 이러한 이유로 LC/MS(TOF)로 수행되어진 국내 토양의 benomyl 분석 결과 전국의 토양이 상당히 오염이 되었음을 확인 할 수 있었다. 더욱이 토양의 오염은 궁극적으로 하천의 오염 및 지하수의 오염을 야기 시키게된다. 수질의 오염은 동식물뿐만 아니라 인체에도 직접적인 영향을 미치게 되므로 수질에의 간접적인 오염을 방지하기 위해서는 토양의 오염에 대한 1차적인 규제가 필요할 것이다.

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(1999-2-309-005-5)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사한다.

인 용 문 헌

1. National Research Council *Regulating Pesticides in Food, The Delaney Paradox*, National Academy Press: Washington, DC., U.S.A., **1987**; p 89.
2. Lim, J.; Miller, M. G. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1997**, *142*, 401.
3. Mallat,E.; Barelo, D.; Tauler, R. *Chromatographia*, **1997**, *46*, 342.
4. Liu, C. H.; Maltern, G.; Yu, X.; Rosenu, J. *J. Agri. Food. Chem.* **1990**, *38*, 167.
5. Cano, P.; Plaza, J.; Munoz-Delgado, L. *J. Agri. Food Chem.*, **1987**, *35*, 144.
6. U.S. EPA Analysis of Water, Method-631, Method-8321-B, 1998.
7. 국립환경연구원, 내분비계 장애물질의 측정방법(Speed 98 번역본), 1999.
8. Kim, K. D.; Choi, W. G.; Seo, Y. C.; Park, B. H.; Choi, H. K. *J. Kor. Chem. Soc.* **2001**, *45*, 40.