

HPLC를 이용한 내분비계 장애물질 중 Amitrole 분석방법에 관한 연구

박찬구 · 어수미 · 김민영 · 신재영 · 황지만* · 모세영**

서울시 보건환경연구원, *워터스 한국지사, **충북대학교 환경공학과

A study on the analysis method of amitrole by HPLC

Chan Koo Park, Soo Mi Eo, Min Young Kim, Jai Young Shin,
Ji Man Hwang* and Sae Young Mo**

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment,
Seocho-gu Yangjae-dong 202-3, Seoul 137-130, Korea

*Waters Korea, **Department of Environment Engineering, Chungbuk University

Amitrole, one of the endocrine disruptors, exists trace in the environment, was analyzed by HPLC with a fluorescence detector which shows highest sensitivity to it. The optimum derivatization time after amitrole responded with fluorescamine was 2 hour. The peak intensity of eluent passed by C-18 sep-pak cartridge after completion of derivatization response was decreased 5% per 10 minutes and 30% in one hour.

Key words : Endocrine disruptors, Amitrole, Fluorescamine, HPLC, Fluorescence detector, Speed '98

1. 서 론

현재 인간의 활동에 의한 환경오염에 기인해 발생하는 문제 중에서 가장 주목되고 있는 것 중의 하나는 Endocrine disruptors, 내분비계 장애물질, 환경호르몬 등 여러 용어로 표현되는 물질이다(이하 내분비계 장애물질이라 칭함). 내분비계 장애물질의 정의를 미국 EPA는 "항상성(homeostasis)의 유지와 발달과정의 조절을 담당하는 체내의 자연 호르몬의 생산, 방출, 이동, 대사, 결합, 작용 혹은 배설을 간섭하는 체외물질"이라고 정의하고있다.

이중 아미트롤(3-Amino-1,2,4-triazole)은 1952년 미국 Amchem Product사에서 개발한 제초제로 초기에는 인축에 대한 독성이 없는 반면 식물 체내의 이행성이 매우 커서 광역 잡초 제거에 주로 사용되었다.¹⁾ 우리 나라에서는 1984년에 영일화학에서 우스티넥스 수화제(아미트롤40% + MCPA20% + 페타벤20%)등의 제품으로 생산되어 제초제로 사용되어오다가 1990년 1월에 잔류성이 큰 발암성물질로 분류되어 생산이 중단되었으며²⁾ 일본에서는 이미

1975년에 이 물질의 생산과 판매를 중지시켰다.³⁾

잔류성이 크며 발암성을 가진 아미트롤은 생태계 내에 미량으로 존재하더라도 먹이 연쇄적 축적(Bioaccumulation of foodchain) 현상이 일어나 인체에 미치는 영향이 크기 때문에 WWF(World Wildlife Fund)에서는 내분비계 장애물질 67종에, IARC(International Agency for research on cancer)는 IIB급, NTP(National Toxicology Program)에서도 R급으로 모두 인간에게 발암성이 있는 물질로 분류하여 규제를 강화하고 있다.

'90년대 초반까지 아미트롤에 대한 분석 연구들은 대부분 검출한계가 낮은 분광광도계와 HPLC의 UV 검출기를 사용하였으나 검출한계가 50 ng 이상이었다.^{4,5)} 최근에는 생태계 내에 미량(1 ppb 이하)으로 존재하는 것을 검출하기 위하여 그 자체는 형광을 띄지 않는 아미트롤을 플루오레스카민과 반응시켜 유도체화 반응을 일으켜 형광을 띄게 하여 HPLC 검출기 중 가장 감도가 우수한 형광 검출기로 측정하는 연구가 진행되고있다.^{6,7)}

현재 국내에서도 이 물질에 대한 생태계 내의 잔

류상태 파악의 필요성이 대두되고 있으나 아직 조사 보고된 문헌을 찾아볼 수 없었다. 우리나라보다 사용이 15년 전(1975년)에 종료된 일본에서 1984년에 수질과 저질에서 조사된 자료에서는 모두 불검출(ND)로 처리되었으나, 이는 당시 분석기기의 감도와 분리능력의 한계로 수질 4 ppb, 저질 5~20 ppb 정도로 검출된 농도를 모두 불검출 처리한 결과이며³⁾ 1998년에 조사된 SPEED '98 에서는 하천수에서 검출되고있다고 보고되고 있다.

이러한 시점에서 CAS NUMBER 61-82-5로 분류된 아미트롤을 분석하기 위한 효율적인 추출방법과 최적의 분석조건을 설정하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 시약 및 기구

표준시약은 AUGS BURG Inc. 및 Fluka 제품을 사용하였고 시료의 추출 및 정제에 필요한 시약 및 기구는 분석에 영향을 미치지 않는 잔농급(300)을 사용하였다.

2.2. 실험방법

아미트롤의 물리·화학적 특성은 분자량: 84.08, 구조식: $C_2H_4N_4$, mp 157~159°C, vp 55 nPa, 용해도는 물에 280 g/L로 가장 용해성이 좋으며 에탄올 등에도 잘 용해된다. 에테르같은 비극성 용매에는 불용성이다.⁸⁾ 이러한 성질을 가지고 있는 생태계내의 아미트롤을 분석하고자, 고체시료(토양, 저질)인 경우 2% 암모니아수를 가하여 초음파 추출을 한 후 원심분리 후 상등액을 취하여 시료용액으로 하였다. 이렇게 추출된 아미트롤을 플루오레스카민과 유도체화 반응을 거쳐 형광물질로 전환시켰다. 이의 유도체화 과정은 다음 Fig. 1과 같다.

유도체화 반응이 종료된 여액은 C-18 카트리지를 통과시킨 후 HPLC-형광검출기로 정성 및 정량 분석을 하였다. 자세한 시료의 전처리 과정은 Fig. 2와 같으며, 분석 조건은 Table 1과 같다.

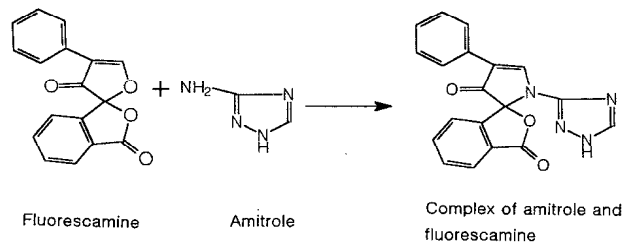


Fig. 1. Reaction complex of amitrole and fluorescamine.

Table 1. Analytical conditions of HPLC for the amitrole.

Item	Analytical conditions
○ HPLC	Waters Alliance 474 scanning fluorescent detector
○ Column	C-18 (25cm×4.6mm ID 5μm)
○ Mobile Phase	9%CH ₃ COOH:MEOH:DW(1:10:10)
○ Flow rate	0.9ml/ min
○ Ex & Em Wave length	395nm & 480nm
○ Injection volume	20μl automatically

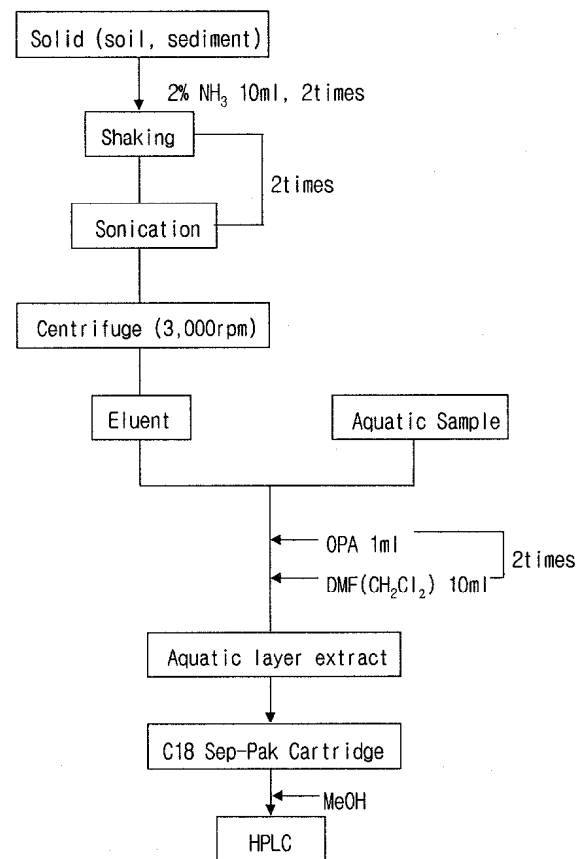


Fig. 2. Flow chart of the amitrole analysis.

3. 결과 및 고찰

생태계 내에 미량으로 존재하는 아미트롤을 분석하기 위하여 위의 처리과정을 거친 시료에서 최대피크를 얻을 수 있는 최적 유도체화 시간 설정과 또한 이렇게 형성된 유도체화 물질의 안정한 지속 시간 파악이 필요하다.

최적의 회수율을 얻기 위해서는 이 유도체화 물질의 결합상태를 파괴하지 않는 카트리지 선정과 또한 Fraction test를 통한 유출량의 선정이 필요하다.

3.1. 최적 유도체화 형성에 필요한 시간설정

형광을 띠지 않는 플루오레스카민(Fluorescamine) 과 1차 아민(primary amine)을 반응시켜 최대의 형광을 나타내는 유도체화 형성 시간을 알아보기 위해 5회에 걸쳐 아미트롤 표준액에 플루오레스카민을 주입한 후 시간에 따른 농도 변화를 알아보았다. 반응 후 2시간에서 최대 피크를 볼 수 있었고 1시간에서는 2시간에 비해 92%, 3시간 경과 후에는 83% 정도였다. 이의 결과는 Table 2와 Fig. 3에 나타내었다.

Table 2. Comparison of peak area of amitrole depending on derivatization time.

	1hr	1hr 30min	1hr 50min	2hr	2hr 10min	2hr 30min	3hr
1	1860	1876	1991	2018	1946	1781	1667
2	1875	1894	2005	2031	1970	1790	1665
3	1859	1890	2001	2025	1952	1785	1669
4	1863	1885	1998	2019	1947	1777	1672
5	1859	1874	1992	2015	1944	1790	1670
mean±SD	1863±7	1884±8	1997±5	2022±6	1952±10	1785±5	1669±3

3.2. 유도체화 반응 종료 후 시간경과에 따른 피크 세기 감소율 측정

유도체화 반응이 종료된 표준용액을 C-18 카트리지에 통과시킨 다음 10분 간격으로 측정된 결과는 추출 직후에 측정된 값을 100%로 하였을 때 10분 간격 마다 5% 정도 비율로 감소되어 1시간 후에는 약 30% 정도의 피크 세기 감소율을 볼 수 있었다. 이의 결과는 다음 Table 3 및 Fig. 4에 나타

내었다.

Table 3. Comparison of peak area of Amitrole depending on the time after extraction.

	2hr	2hr 10min	2hr 20min	2hr 30min	2hr 40min	2hr 50min	3hr
1	2018	1921	1838	1763	1682	1611	1515
2	2016	1923	1835	1765	1684	1613	1519
3	2010	1919	1841	1759	1688	1608	1510
4	2019	1920	1844	1764	1680	1619	1514
5	2021	1917	1835	1770	1681	1619	1513
mean±SD	2013±4	1920±2	1838±4	1764±4	1683±3	1614±5	1514±3

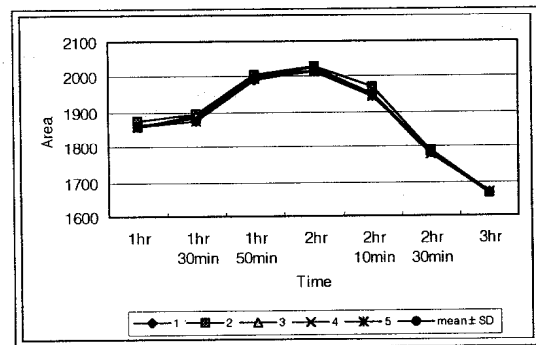


Fig. 3. The peak area of amitrole depending on derivatization times.

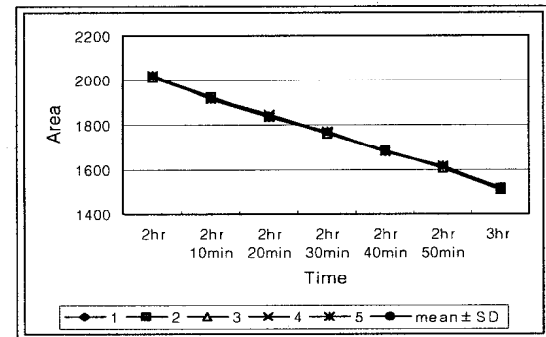


Fig. 4. The peak area of amitrole depending on with time after extraction.

3.3. Fraction Test

유도체화 반응이 종료된 추출액의 정제 및 농축은 옥타데실시릴화 실리카겔(ODS)계 고상 칼럼을 사용한다. C-18계 중에서 Resin base인 HLB (Hydrophilic Lipophilic balance) Cartridge 사용 시 가장 깨끗한 피크를 얻을 수 있었다. HLB Cartridge의 Fraction Test에서 메탄올을 1 ml 단위로 분취하여 그 각각의 회수율을 측정된 결과 최초 1 ml

에서는 검출되지 않았으며, 1~2 ml에서 36.9%, 2~3 ml에서 30.6%, 3~4 ml에서 24.5%, 4~5 ml에서 5.5% 검출되어 총 97.7%의 회수율을 얻을 수 있었다. 그 이상의 메탄올을 주입시킨 경우에는 추출되는 양이 적어 정량적인 확인이 어려웠다. 이의 결과는 Fig. 5에 나타내었다.

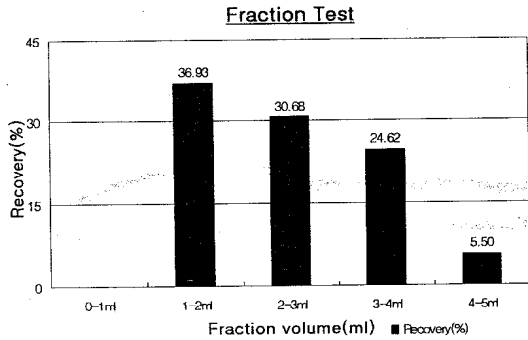


Fig. 5. Fraction test for C-18 HLB cartridge.

3.4. 검량선 작성 및 이를 이용한 검출한계 산정

위의 분석 결과를 통해 아미트롤의 최대 피크 세기를 얻을 수 있는 조건이 설정되었다. 이러한 조건에서 표준액을 0.1, 0.2, 1, 2, 4(ng)을 HPLC에 주입하여 작성된 검량선은 $Y = 7.824266X + 0.05$ 이었으며 $R^2 = 0.999899$ 이었다. 이는 Fig. 6과 같으며 Fig. 7은 0.02 ng의 피크로 이는 시료 20 g(20 ml)을 취하여 최종 추출액을 2(3) ml로 하고, HPLC에 20(30) μ l 주입 시 다음 계산식에 따르면

$$C(\mu\text{g}/\text{kg}) = S_{\text{sabs}}(\text{ng}) \times V_{\text{conc}}(\text{ml}) \times 1,000 / V_{\text{inj}}(\mu\text{l}) \times V_{\text{spl}}(\text{ml})$$

여기서 C : 시료 중 아미트롤 농도($\mu\text{g}/\text{kg}$)

S_{sabs} : 검량선에서 구한 시료액 중 아미트롤의 양 (ng)

V_{inj} : HPLC 주입량(μl)

V_{spl} : 시료의 양(ml)

농도는 0.1 ppb로 이는 일반적인 검출한계($3 > S/N$)와 정량한계($10 > S/N$)를 모두 만족하였다.

4. 결 론

환경 생태계 내에 극미량으로 존재하는 내분비

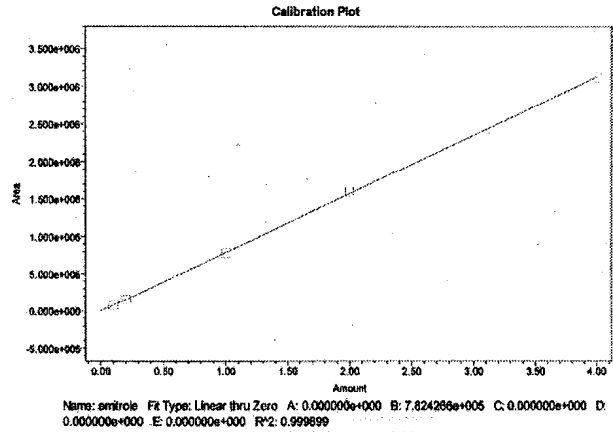


Fig. 6. Standard calibration curve.

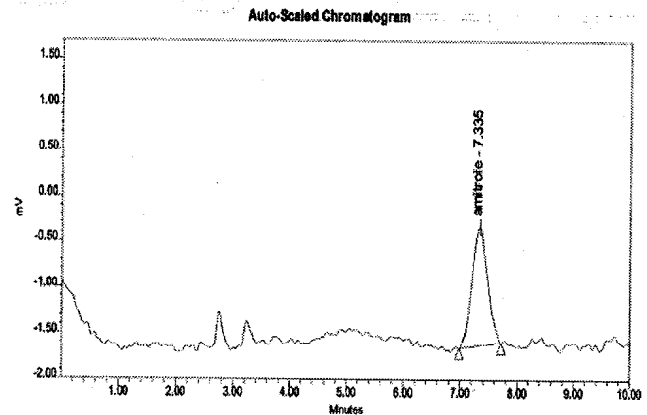


Fig. 7. Typical HPLC chromatogram of standard amitrole solution(0.02ng) for amitrole.

계 장애물질 중의 하나인 아미트롤을 HPLC 검출기 중 가장 감도가 뛰어난 형광 검출기로 분석하기 위하여 그 자체는 형광을 띠지 않는 아미트롤을 플루오레스 카민과 반응시켜 유도체화 반응을 시킨 결과 최적 유도체화 반응시간은 2시간이었으며, 1시간에서는 2시간에 비해 92%, 3시간 경과 후에는 83%정도로 나타났다. 유도체화 반응이 종료된 후 C-18 Sep-Pak Cartridge를 통과한 추출액은 시 경과에 따라 10분당 5% 정도 비율로 피크 세기가 감소되어 1시간 후에는 약 30%정도의 감소율을 나타내었다. 옥타데실시릴화 실리카겔(ODS)계 고상 칼럼을 사용한 Fraction Test시 최초 1 ml에서는 검출되지 않았으며, 1~2 ml에서 36.9%, 2~3 ml에서 30.6%, 3~4 ml에서 24.5%, 그리고 4~5 ml에서 5.5% 검출되어 총 97.7%의 회수율을 얻을 수 있었다.

검량선 작성 및 이를 이용한 검출한계 산정 후 이를 이용하여 실제 시료를 분석하기 위하여는 추

출 회수율 파악이 필요하다. 이를 위하여 SRM (Standard Reference Material)을 이용한 방법이 일반적이거나 현재 이 물질의 SRM을 구할 수 없었다. 실제 시료에서 아미트롤을 제거한 후 HPLC에서 피크 확인 후 표준액을 첨가하여 이를 위의 실험방법에 따라 표준물질의 농도에 대한 면적비를 계산한 결과 수 시료에서 85.5%, 토양 및 저질 시료에서 68.5%의 회수율을 얻을 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) 최승윤, 1992, 신농약, 향문사.
- 2) 박창규, 홍종우, 1996, 농약총람, 동신출판사.
- 3) 浦野 雄平, 1998, ホルモンの使用と排出の現況, 講演要旨集 pp 7-13, 九州大學藥學部.
- 4) A. Pachinger, E. Eisner, H. Begutter, and H. Klus, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1992, 342, 413-415.
- 5) B. D. Mcgarvay, *J. Chromatography B.*, 1994, 659, 243-257.
- 6) 外因性内分泌攪亂化學物質調査鑑定マニュアル, 1998, 日本 環境廳.
- 7) T. Oesterrich and U. Klaus, *Chemosphere* 1999, 38, 379-392.
- 8) The Merck Index, 1995.