Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(4):269-278. Korean
Published online 2017 November 27. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.4.33

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

# 오비트랩 고분해능 질량분석기를 이용한 폐사 조류 중 다성분 잔류 농약 스크리닝 기법

이두희[1], 김보경[1], 왕승준[2], 손기동[2], 정현미[3], 최종우[1*]

[1]국립환경과학원 환경기반연구부 환경측정분석센터, [2]국립환경과학원 환경건강연구부 환경보건연구과, [3]국립환경과학원 환경기반연구부

## Residual Multi Pesticides Screening of Dead Birds by Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry

Doo-Hee Lee[1], Bo-Kyong Kim[2], Seung-Jun Wang[2], Ki-Dong Son[2], Hyen-Mi Jung[3] and Jong-Woo Choi[1*] ([1]Environmental Measurement & Analysis Center, Environmental Infrastructure Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea, [2]Environmental Health Research Division, Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea, [3]Environmental Infrastructure Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Korea)

Received: 27 September 2017/ Revised: 30 October 2017/ Accepted: 8 November 2017


**ORCID**
Doo-Hee Lee
http://orcid.org/0000-0002-3336-2222

Jong-Woo Choi
http://orcid.org/0000-0003-2331-3213

## Abstract

**BACKGROUND:** The objective of this study was to evaluate screening method of residual multi pesticides in dead birds by Orbitrap high resolution mass spectrometry (HRMS) to identify the cause of death for birds .
**METHODS AND RESULTS:** Extraction and clean-up method of residual pesticides in liver of dead birds was used QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe) and method validations was conducted using liquid chromatography and gas chroamtography with triple-quadrupole mass spectrometer (LC/MS/MS and GC/MS/MS) Also, we were evaluated screening method for the determination of residual pesticides in liver of dead birds by LC and GC Orbitrap Mass Spectrometry. Results of method validations, Correlation coefficients of the matrix matched calibration curves were >0.978, and the method detection limits (MDLs) and limits of quantitation (LOQ) were 2.8~72.1 ng/g (18.4 ng/g on average) and 9.0~230 ng/g (58.5 ng/g on average). The accuracy ranged from 69.1% to 130% (103% on average), and the precision values were less than 14.8%(3.8% on average). The screening of residual pesticides in liver of dead birds by LC and GC Orbitrap HRMS was detected monocrotophos, carbofuran, carbosulfan, deltametrin, benfuracarb, carbofuran, phosphamidon, prochloraz in investigated samples.
**CONCLUSION:** This results showed that accurate mass were extraction of residual pesticides in dead birds by Orbitrap HRMS. It suggested that this screening method is applicable to the residual pesticide analysis for the cause of death as a main tool.

**Key words:** Dead Birds, Orbitrap high resolution mass spectrometry, Residual pesticides, QuEChERS

*Corresponding author: Jong-Woo Choi
Phone: +82-32-560-8383; Fax: +82-32-568-7905;
E-mail: cjw111@korea.kr

## 서 론

조류 폐사사고는 바이러스나 세균 등 생물적 요인, 농약, 독극물 등 화학적 요인 등에 의하여 매년 반복적으로 발생되고 있다. 일단 조류 폐사사고가 발생하면 폐사 원인 규명을 위하여 조직병리검사, 바이러스 검사 및 중독증 검사 등을 실시한다(Jang *et al.*, 2010). 이중 중독증은 대다수 농약중독에 의해 발생되고 있으며, 일부 농약은 효소분해, 가수분해 등에 의하여 쉽게 분해(Park *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2003)되

기 때문에 조류폐사 원인 물질을 규명하기 위해서는 신속한 폐사시료 수거 및 잔류농약 분석 시스템 구축이 요구된다.

잔류 농약 분석 방법은 식품안전의약처와 농림축산식품부에서 각각 397종 및 320종으로 관리되고 있으며, 환경부에는 먹는물수질공정시험기준과 잔류성유기오염물질공정시험기준에서 몇몇 항목만 관리되고 있다. 현재 제시된 전처리 방법은 액상미량추출법(liquid phase micro-extraction, LPME), 고상미량추출법(solid phase micro-extraction, SPME), 교반막대 수착 추출법(Stir bar sorptive extraction, SBSE), QuEChERS법(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) 등이 있다(Ock, 2009). 이중 공인된 분석법은 액상미량추출법과 QuEChERS법이 있으며 액상미량추출법은 시료와 항목에 따라 전처리 과정이 다르고 그 과정이 복잡하고 오랜 시간이 소모되는 단점을 가지기 때문에 현재 전처리 시간이 빠르고 간단한 QuEChERS 법으로 전환되고 있다.

과거 농약 분석을 위한 측정기기는 GC-ECD (electron capture detector), GC-NPD (nitrogen phosphorous detector), GC-FPD (flame photometric detector), LC-FLD (fluorescence detector) 및 LC-UVD (UV photometric detecto) 등으로 나눠서 분석하였다(Park *et al.*, 2014). 이러한 분석방법은 잔류 농약의 화학적 특성에 따라 분리하여 분석하기 때문에 최적화된 분석방법이지만 검출기 특성상 낮은 감도를 가지고 있으며 농약류 항목을 모니터링을 하기 위해서는 모든 장비를 보유해하며 최종 결과를 얻기까지 많은 시간이 필요하다는 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위하여 LC/MS/MS 및 GC/MS/MS 등 질량분석기를 이용하여 다양한 화학적 특성을 가진 잔류 농약을 동시 분석하는 공인분석법으로 추가되었으며, 이를 통해 신속한 잔류 농약의 모니터닝이 가능해졌다. 하지만 이 분석법들은 기지물질을 분석하기 위한 시험방법으로 시험전 기기분석 조건 설정이 필수적이며 분석항목 이외에 항목을 측정할 수 없다. 따라서 분석 항목 이외의 화학물질을 분석하기 위해서는 스크니링 분석에 대한 필요성이 대두된다.

현재 기지물질 분석의 한계점을 극복하기 위하여 스크리닝 분석 기법은 몇몇 연구자들에 의해 제안되어 왔다. 기존 스크리닝 분석 기법은 GC/MS의 full scan 모드를 이용하여 측정 후 해당 이온을 추출하는 이온추출(deconvolution) 프로그램를 이용하여 비표적(non-target) 분석을 실시하였다(Meng *et al.*, 2010; Shaikh *et al.*, 2014). 하지만 이 방법은 매질 영향 및 방해 물질로 저농도의 경우 측정하기 어려운 경우가 많으며 크로마토그램상 겹치는 화학물질로 인하여 해석하기 어려운 단점을 가진다. 따라서 최근 들어 Orbitrap-HRMS 및 TOF-HRMS 등 고분해능 질량분석기를 이용하여 환경 및 식품 등의 분야에서 스크니링 기법 연구를 진행하고 있다(Garcia-Reyes *et al.*, 2007; Alder *et al.*, 2011; Cervera *et al.*, 2012; Huerta *et al.*, 2013; Farre *et al.*, 2014). 고분해능 질량분석기의 장점은 소수점 4자리에서 3~10 ppm의 높은 질량정확도(Bletsou *et al.*, 2015)로 인하여 매질에 의한 간섭을 최소화 할 수 있으며 감도가 우수하기 때문에 낮은 농도에서도 충분히 검출이 가능하다. 또한, 소프크웨어(Trace Finder, MassHunter Workstation 등)의 발달로 크로마토그램상 겹치는 피크를 쉽게 추출할 수 있으며, 인터넷을 통하여 제공되는 다양한 데이터베이스(MZ Cloud, Chemspider, PubChem, Metlin 등)가 증가함에 따라 추출된 피크를 어떤 화학물질인지 확인이 가능하다(Zedda and Zwiener, 2012; Jeon *et al.*, 2016). 따라서 기존에 제시된 잔류 농약분석법 대신 고분해능질량분석기를 이용한 스크니링 기법을 이용하면 보다 정확하고 신속한 결과 도출이 가능하다 판단되며 이를 위해 적용성 평가가 요구된다.

이에 본 연구에서는 폐사조류의 원인 잔류농약을 신속히 규명하기 위한 고분해능질량분석기의 적용성 평가를 실시하였으며 이를 위하여 폐사조류에 대한 QuEChERS 전처리 방법 제시 및 실제 시료를 대상으로 폐사 원인 잔류농약을 도출였다.

## 재료 및 방법

### 폐사 조류 시료

연구에 사용된 시료는 2017년 1월에서 5월까지 전국에서 폐사한 조류를 대상으로 실시하였다. 폐사 조류의 종은 떼까마귀(*Corvus fugilegus*), 직박구리(*Hypsipetes amaurotis*), 청둥오리(*Anas platyrhynchos*), 비둘기(*Columba livia var. domestica*) 및 쇠기러기(*Anser albifrons*) 등으로써 총 7지역에서 폐사체를 수거한 후 바로 실험실에서 간을 분리하여 분석에 사용하였다.

### 표준물질 및 시약

연구에 사용된 농약표준물질은 전처리 방법을 보증하기 위하여 미국 PAN (Pesticide Action Network)를 참고하여 유기인제, 유기염소제, 카바메이트제 등의 잔류 농약 238항목을 화학적 특성(Table 1)에 따라 선정하여 Accustandard사(USA), Sigma-Aldrich사(USA), Dr. Ehrenstorfer GmBH사(Germany)에서 단일 표준품으로 구매하였다(Table 1). 시료 추출을 위해 사용한 QuEChERS 튜브는 AOAC (Na-acetate 1.5 g, $MgSO_4$ 6 g) 추출 튜브, EMR-Lipid dSPE (Enhanced Matrix Removal-Lipid dispersive Solid-phase Extraction) 및 EMR-Lipid Final Polish ($MgSO_4$ 1.6 g, NaCl 0.4 g) 정제튜브를 Agilent 사(USA)에서 구매하였다. 시료의 전처리 과정 및 기기분석에 사용된 용매는 메탄올(methanol), 아세토나이트릴(acetonitrile) 및 3차 증류수 등으로써 모두 Honeywell B&J 사(USA)에서 HPLC 급 이상으로 구매하여 사용하였다. 또한, QuEChERS 추출시 사용된 아세트산(acetic acid)과 LC-MS/MS 및 LC-Orbitrap의 이동상에 사용된 개미산(formic acid) 및 포름산 암모늄(ammonium formate)은 모두 Sigma-Aldrich사(USA)에서 구매하여 사용하였다.

### QuECHERS 전처리 방법

시료의 전처리는 QuEChERS 중 AOAC 2007.01 방법

**Table 1. Classification of residual pesticides for QA/QC**

| Classification | Residual Pesticides |
|---|---|
| Amide (18) | alachlor, bromobutide, butachlor, cyflufenamid, dichlofluanid, dimethenamid, diphenamid, fenoxanil, fentrazamide, flubendiamide, fluopicolide, fluopyram, mandipropamid, naprophamid, penthiopyrad, prochloraz, tolyfluanid, zoxamide |
| Anilide (9) | boscalid, flutolanil, mefenacet, mepronil, ofurace, propanil, pyrimisulfan, thifluzamide, tiadinil |
| Azine (9) | clofentezine, dimethametryn, metribuzine, prometryn, simazine, simetryn, tebufenozide, terbutryn, terbutylazine |
| Azole (27) | bitertanol, carbendazim, cyazofamid, cyproconazole, difenoconazole, diniconazole, etoxazole, fenbuconazole, fipronil, flusilazole, hexaconazole, imazalil, isopyrazam, metconazole, myclobutanil, paclobutrazol, penconazole, probenazole, propiconazole (2 isomers), tebuconazole, tebufenpyrad, tetraconazole, thiabendazole, triadimefon, tricyclazole, triflumizole, uniconazole |
| Benzoate (2) | pyriminobac-methyl (E), pyriminobac-methyl (Z) |
| Carbamate (22) | aldicarb, bendiocarb, benthiavalicarb-isopropyl, carbaryl, carbofuran, chlorpropham, esprocarb, ethiofencarb, fenobucarb, fenothiocarb, furathiocarb, iprovalicarb, isoprocarb, methiocarb, methomyl, metolcarb, molinate, oxamyl, pirimicarb, propoxur, pyributicarb, thiobencarb, |
| Dicarboximide (2) | fenamidone, iprodione |
| Dinitroaniline (2) | ethalfluralin, pendimethalin |
| Diphenyl ether (2) | bifenox, oxyfluorfen |
| Keto-enol (1) | spiromesifen |
| Morpholine (1) | dimethomorph |
| Neonicotinoid (6) | acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, thiacloprid, thiamethoxam |
| Organochlorine (22) | aldrin, α-BHC, β-BHC,γ-BHC, δ-BHC, chlordane-cis, chlordane-trans, 2,4`-DDD, 4,4`-DDD, 2,4`-DDE, 4,4`-DDE, 2,4`-DDT, 4,4`-DDT, dieldrin, endosulfan sulfate, α-endosulfan, β-endosulfan, endrin, heptachlor, heptachlor epoxide, methoxychlor, methyl-pentachlorophenyl sulfide |
| Organophosphorus (44) | anilofos, azinphos-methyl, cadusafos, carbophenothion, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, diazinon, dimethoate, dimethylvinphos, edifenphos, EPN, ethion, ethoprophos, etrimfos, fenamiphos, fenitrothion, fenthion, fosthiazate, imicyafos, iprobenfos, isofenphos, malathion, mecarbam, methidathion, mevinphos, monocrotophos, parathion, parathion-methyl, phenthoate, phorate, phosalone, piperophos, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, profenofos, prothiofos, pyraclofos, pyrazophos, pyridaphenthione, tebupirimfos, terbufos, tolclofos-methyl, tralomethrin |
| Phenoxy (4) | cyhalofop-butyl, diclofop methyl, fenoxaprop-p-ethyl, metamifop |
| phthalimide (1) | folpet |
| Pyrethroid (12) | acrinathrin, bifenthrin, cyfluthrin (4 isomers), cyhalothrin-L, cypermethrin , deltamethrin, fenpropathrin, fenvalerate (2 isomers), flucythrinate (2 isomers), permethrin (2 isomers), silafluofen, tefluthrin |
| Pyridine (2) | dithiopyr, thiazopyr |
| Pyrimidine (6) | cyprodinil, fenarimol, ferimzone, nuarimol, pyrimethanil, pyrimidifen |
| Pyrrole (2) | chlorfenapyr, fludioxonil |
| Quinoline (1) | pyriproxyfen |
| strobin (6) | azoxystrobin, fluacrypyrim, kresoxim-methyl, picoxystrobin, pyraclostrobin, trifloxystrobin, |
| Substituted Benzene (4) | chlorothalonil, dicloran, pentachloroaniline, quintozen |
| Urea (9) | chlorfluazuron, diuron, dymron, forchlorfenuron, metazosulfuron, methabenzthiazuron, metobromuron, pencycuron, triflumuron, |
| Xylyalanine (1) | metalaxyl |
| Unclassified (23) | bentazone, benzobicyclon, benzoximate, buprofezin, chinomethionat, chlorobenzilate, clomazone, dicofol, dimepiperate, diphenylamine, fenazaquin, fthalide, hexythiazox, indanofan, mepanipyrim, oxadiazon, oxaziclomefon, pyribenzoxim, pyridaben, pyroquilon, quinoclamine, sulfoxaflor, tetradifon |

(Association of Analytical Communities Official Method 2007.01, Lehotay *et al.*, 2007)을 이용하여 추출하였으며, 정제는 지질제거를 위해 개발된 EMR 방법(Han *et al.*, 2016)으로 실시하였다. 시료의 추출은 균질화된 시료 5 g와 1% 아세트산이 첨가된 아세토나이트릴 15 mL을 50 mL 튜브에 넣은 후 1분간 혼합하였으며, 이후 Na-acetate 1.5 g과 $MgSO_4$ 6 g로 구성된 추출 튜브를 첨가하여 250 rpm에서 10분 동안 혼합한 후 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하

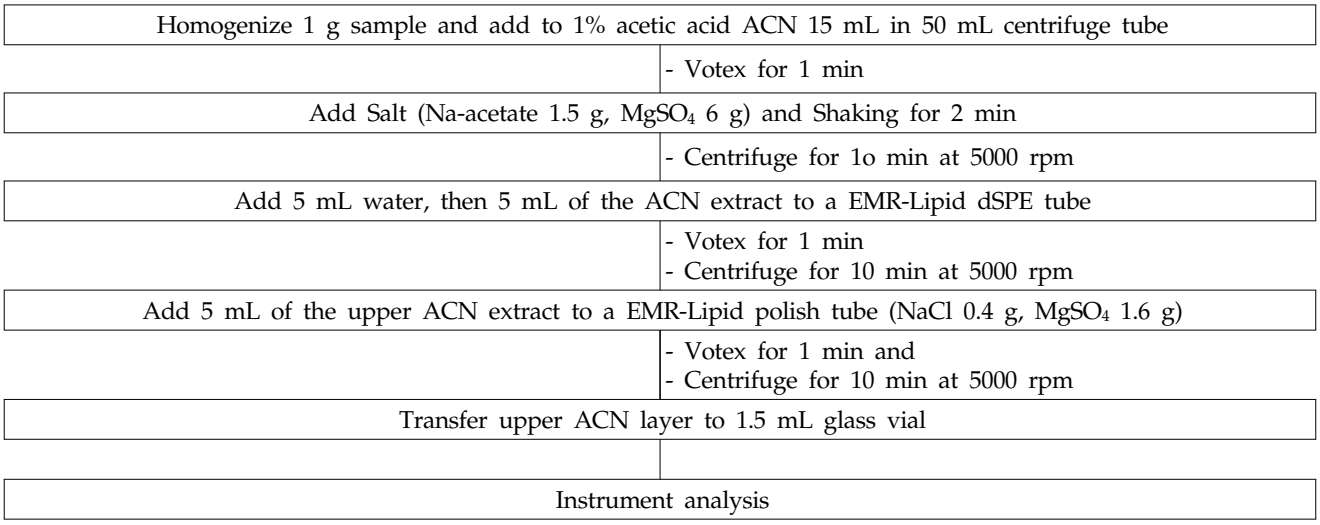


**Fig. 1. Flow chart for residual pesticides in liver of dead birds.**

**Table 2. Analytical condition of LC/MS/MS for residual pesticides**

| LC parameters | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Instrument | Shimadzu 8030 with Nexera UHPLC | | | |
| Column | Phenomenex Kinetix, C18, 100 × 2.1 mm, 2.6 μm | | | |
| Run Time | 20 min | | | |
| Injection volume | 5 μL | | | |
| Oven temp. | 40℃ | | | |
| Mobile phase | A: 0.1% formic acid, 5 mM ammonium formate in water<br>B: 0.1% formic acid, 5 mM ammonium formate in methanol | | | |
| Gradient condition | Time (min) | A (%) | B (%) | Flow (mL/min) |
| | 0 | 95 | 5 | 0.2 |
| | 2 | 95 | 5 | 0.2 |
| | 7 | 5 | 95 | 0.2 |
| | 11.5 | 5 | 95 | 0.2 |
| | 12.5 | 95 | 5 | 0.2 |
| | 15 | 95 | 5 | 0.2 |
| MS/MS parameters | | | | |
| Ionization mode | Electrospray ionization (ESI) | | | |
| Nebulizing gas flow | 3 L/min | | | |
| DL temp. | 250℃ | | | |
| Heat block temp. | 400℃ | | | |
| Drying gas flow | 15 L/min | | | |

였다. 시료의 정제는 1 g의 EMR-Lipid dSPE 튜브에 증류수 5 mL을 첨가하여 vortex 혼합 후 2 g의 EMR dSPE-lipid kit (NaCl:$MgSO_4$=2:8)에 넣고 1분간 vortex 혼합 한 뒤, 원심분리하였다. 이후 상등액 5 mL을 EMR-lipid polish kit에 첨가하여 vortex 혼합 및 원심분리를 한 후 용매층을 분리하여 기기분석을 실시하였다(Fig. 1).

### 전처리 방법의 유효성 검증

폐사 조류 중 잔류 농약 전처리 방법의 유효성 검증은 농약성분이 없는 조류의 간을 잔류 농약 238항목을 대상으로 직선성, 방법검출한계(method detection limit, MDL), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정확도 및 정밀도 등을 LC/MS/MS 및 GC/MS/MS를 이용(Table 2, 3)하여 평가하였다. 각 항목별 직선성 평가는 0.1~100 ng/mL 범위에서 매질보정검량선법(matrix matched standard method)

**Table 3. Analytical condition of GC/MS/MS for residual pesticides**

| | |
|---|---|
| GC parameters | |
| Instrument | TSQ8300 EVO with Trace 1310 |
| Carrier gas flow | He, 1.0 mL/min |
| Column | DB-5MS (30 m×250 μm×0.25 μm) |
| Injection temp. | 280℃ |
| Injection mode | Splitless |
| Injection volume | 1 μL |
| Oven temp. | 50℃ (2 min)→ 15℃/min → 140℃ (15 min) → 5℃/min → 300℃ (10 min) |
| MS/MS parameters | |
| Ionization mode | Electron ionization (EI) |
| Multiplier voltage | 1,000 V |
| Source temperature | 280℃ |
| Scan time | 1 sec |
| Interface temp. | 280℃ |
| Q2 collision gas | Argon |

을 이용하여 실시하였다. 방법검출한계 및 정량한계는 전처리 시작과정에서 500 ng/mL의 농도 150 μL를 첨가하여 시료와 동일하게 전처리를 실시한 후 기기분석을 하였으며, 이를 7반복한 후 도출된 농도의 표준편차에 3.14 및 10을 곱하여 산출하였다. 정확도 및 정밀도는 2000 ng/mL의 농도 150 μL를 앞선 전처리 시작과정에 첨가하여 5반복하여 도출하였다. 정확도의 계산은 5반복된 농도의 평균값과 원농도의 비율에 100을 곱하여 산출하였으며 정밀도는 5반복된 농도의 표준편차와 평균값의 비율에 100을 곱하여 산출하였다.

### 고분해능 질량분석기 기기조건

폐사조류 내에 잔류 농약 탐색을 위하여 LC-Orbitrap 및 GC-Orbitrap 고분해능질량분석기를 사용하였다. LC-Orbitrap의 LC와 질량검출기는 Dionex Ultimate 3000-Q와 Q Exactive Plus로써 모두 Thermo Scientific 사(USA)의 제품을 사용하였다. 분석시 분리 컬럼은 Phenomenex 사의 Kinetex C18 컬럼(100×2.1 mm, 2.6 μm)을 사용하였으며, 컬럼 오븐의 온도는 40℃로 고정하였다. 이동상은 0.1% 개미산과 5 mM 포름산 암모늄이 첨가된 물과 메탄올을 이용하여 200 μL/min 유속으로 시간에 따라 비율을 변화시켜 사용하였다. 메탄올의 비율이 2분까지 0% 이었으며 25분까지 100%로 올린 후 30분까지 유지시켰으며 35분까지 0%로 낮추어 최종 40분까지 유지시켰다. LC-Orbitrap 질량분석기 조건은 이온화 방식(ionization mode)을 ESI (electospray ionization) 방식으로 설정하고 이온소스 온도를 300℃로 설정한 후 질량분해능(mass resolution) 70,000에서 50~1000 m/z 범위에서의 양이온 및 음이온 full scan 방식과 ddMS2 (data dependent MS/MS) 방식을 동시에 측정하였다. GC-Orbitrap의 GC와 질량검출기는 TRACE 1300과 Q Exactive GC로써 모두 Thermo Scientific 사(USA)의 제품을 사용하였다. 분석시 분리 컬럼은 DB-5MS (30 m×250 μm ×0.25 μm, J&W Scientific, USA)를 사용하였다. GC 분석 조건은 주입 방식(injection mode)을 비분할(splitless) 방식으로 이동가스는 He, 이동속도는 1.0 mL/min으로 설정하였으며 시료 주입량을 1 μL로 하였다. 주입구 및 전달라인(transfer line) 온도는 280℃로 설정하였으며 오븐(oven) 온도는 초기 60℃에서 10분간 머무른 후 160℃까지 분당 20℃로 올리고 300℃까지 분당 5℃로 올린 뒤 4분 동안 유지하였다. GC-Orbitrap 질량분석기 조건은 이온화 방식(ionization mode)을 EI (Electron ionization) 방식으로 이온소스 온도를 280℃로 설정한 후 질량분해능(mass resolution) 60,000에서 45~650 m/z 범위에서의 full scan 방식으로 측정하였다.

## 결과 해석

고분해능 질량분석기의 측정된 결과는 기기프로그램 및 라이브러리를 이용하여 해석하였다. LC-Orbitrap에 사용된 accurate mass 프로그램은 Thermo Scientific 사(USA)의 TraceFinder 3.3을 이용하여 실시하였으며, 이때 장비에 보유하고 있는 NiST 라이브러리와 MZ Cloud 웹사이트에서 자체적으로 작성한 라이브러리를 이용하여 MS 라이브러리 패턴 비교, 동위원소 패턴, ddMS2 쪼개짐 패턴을 비교하여 대상농약을 확인하였다. GC-Obritrap은 NIST 라이브러리의 일종인 gc-orbitrap contaminants library와 이온추출 프로그램인 TraceFinder 4.1 이용하여 대상농약을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 전처리 방법 유효성 검증

본 연구에서는 폐사 조류 중 농약류 분석을 위한 QuEChERS 전처리 방법의 유효성을 확인하기 위하여 정확도, 정밀도, 방법검출한계 및 정량한계 등의 정도관리를 실시하였다. 정도관

**Table 4. Method detection limit (MDL), limit of quantitation (LOQ), accuracy and precision for residual pesticides by AOAC QuChERS method for liver of dead birds**

| Classification | MDL (ng/g) | LOQ (ng/g) | Accuracy (%) | Precision (%) |
|---|---|---|---|---|
| Amide (18) | 19.4 (8.57~33.6) | 62.1 (27.3~107) | 106 (69.1~128) | 3.9 (0.2~10.2) |
| Anilide (9) | 14.8 (6.00~23.2) | 47.1 (19.1~73.9) | 106 (7700~122) | 3.6 (1.1~7.9) |
| Azine (9) | 11.1 (2.83~18.5) | 35.2 (9.00~58.9) | 114 (106~122) | 3.7 (1.9~5.3) |
| Azole (27) | 19.3 (7.16~55.3) | 61.5 (22.8~176) | 98.4 (77.4~122) | 3.4 (0.6~14.2) |
| Benzoate (2) | 19.4 (17.9~20.9) | 61.8 (57.0~66.6) | 92.9 (90.0~95.9) | 6.4 (4.3~8.4) |
| Carbamate (22) | 12.5 (4.55~40.3) | 39.7 (14.5~129) | 112 (91.1~125) | 3.1 (0.3~6.8) |
| Dicarboximide (2) | 14.8 (8.20~21.4) | 47.1 (26.1~68.1) | 118 (108~127) | 4.9 (1.0~8.8) |
| Dinitroaniline (2) | 12.9 (2.86~23.0) | 41.2 (9.10~73.2) | 97.6 (97.4~97.8) | 2.7 (0.8~4.5) |
| Diphenyl ether (2) | 52.0 (32.0~72.1) | 165.8 (102~230) | 90.4 (85.2~95.5) | 10.6 (9.2~12.0) |
| Keto-enol (1) | 12.1 | 38.5 | 114 | 2.2 |
| Morpholine (1) | 6.19 | 19.7 | 96.3 | 3.5 |
| Neonicotinoid (6) | 21.5 (15.4~27.2) | 68.4 (49.0~86.6) | 106 (102~118) | 4.9 (1.8~14.8) |
| Organochlorine (22) | 24.5 (7.38~71.0) | 77.9 (23.5~226) | 96.1 (81.0~112) | 3.7 (0.4~14.8) |
| Organophosphorus (44) | 18.4 (7.13~40.4) | 58.5 (22.7~129) | 105 (82.1~125) | 3.7 (0.1~9.2) |
| Phenoxy (4) | 8.99 (5.28~16.8) | 28.6 (16.8~53.5) | 101 (86.5~114) | 2.8 (0.8~5.3) |
| phthalimide (1) | 33.0 | 105.1 | 110 | 5.0 |
| Pyrethroid (12) | 21.2 (5.02~37.8) | 67.6 (16.0~120) | 88.7 (74.4~105) | 4.4 (1.3~9.4) |
| Pyridine (2) | 23.3 (21.9~24.7) | 74.3 (69.7~77.4) | 104 (103~106) | 2.0 (1.0~3.0) |
| Pyrimidine (6) | 15.7 (10.1~24.3) | 50.0 (32.3~77.4) | 97.8 (83.5~114) | 4.2 (1.2~6.8) |
| Pyrrole (2) | 38.5 (26.0~51.0) | 122.6 (82.9~162) | 93.6 (91.2~96.0) | 3.3 (1.6~5.1) |
| Quinoline (1) | 7.38 | 23.5 | 116 | 2.0 |
| Strobin (6) | 17.3 (12.4~25.9) | 55.0 (39.6~82.5) | 113 (107~120) | 3.1 (0.9~5.0) |
| Substituted Benzene(4) | 25.9 (17.6~30.3) | 82.6 (56.1~96.5) | 88.5 (78.6~105) | 4.8 (1.2~7.0) |
| Urea (9) | 12.8 (6.59~34.5) | 40.8 (21.0~110) | 113.3 (101~130) | 4.7 (1.6~8.7) |
| Xylyalanine (1) | 9.23 | 29.4 | 108 | 3.1 |
| Unclassified (23) | 17.3 (2.92~49.6) | 54.9 (9.3~158) | 104 (75.5~126.3) | 3.3 (0.5~8.9) |
| Total | 18.4 (2.8~72.1) | 58.5 (9.0~230) | 103 (69.1~130) | 3.8 (0.1~14.8) |

리 실시전 해당농약류(238종)에 대한 LC/MS/MS (139종) 및 GC/MS/MS (99종)에 대한 기기분석을 MRM 조건에서 1개의 정량이온과 2개의 확인이온을 선정하였으며 이를 컬럼 분리를 통하여 적절한 크로마토그램을 확인하였다(Fig. 1). 또한, 이를 바탕으로 0.1~100 g/mL의 농도범위의 매질보정 검정곡선을 작성하여 직선성을 확인하였으며 그 결과 결정계수($r^2$)는 0.978~0.999의 범위를 보였으며 직선성 편차는 ± 15% 이하의 정밀도를 보였다. Table 4는 폐사 조류 간의 농약류 전처리 방법에 대하여 방법검출한계 및 정량한계, 정확도 및 정밀도를 화학적 특성별로 분리하여 나타낸 것이다. 분석 결과, 방법검출한계 및 정량한계는 각각 2.8~72.1 ng/g 및 9.0~230 ng/g의 범위(평균 18.4 ng/g 및 58.5 ng/g)로써 잔류 농약 특성에 따라 최소값과 최대값 차이가 약 26배를 보였다. 정확도 및 정밀도는 69.1~130% 및 0.1~14.8%의 범위에서 평균 103% 및 3.8%로 나타났다. 이는 식품의약품안전평가원" 식품공전 잔류농약 분석법 실무 해설서 제5판 " 보고서(2017)에 제시된 값(회수율: 70~130%, 정밀도: 30% 이하)과 비교하였을 경우 zoxamide (69.1%)을 제외한 모든 항목에서 적합한 범위를 보였다. 또한, EU 가이드라인(SANCO/825/00 rev.8.1, 2010)에 제시된 기준(회수율: 70~120%, 정밀도: 20% 이하)과 비교하였을 때는 Cadusafos 등 17항목이 회수율 범위에서 벗어났지만 USDA method validation guideline (2000)에서 제시된 기준(회수율 50%~150%, 정밀도 20%)과 비교하였을 경우 모든 항목이 적합한 범위를 보였다. 이는 본 연구에서 실시한 QuEChERS AOAC 추출 및 EMR 정제 방법이 조류폐사 시료에 적합한 전처리 방법임을 제시한다. 국립환경과학원 "환경오염 사고대응 미지오염물질 신속탐색기법 정립(I)"보고서(2015) 및 Han 등(2016)도 본 연구와 동일한 방법으로 어류 장기 및 돼지고기 등에 대하여 잔류농약 정도관리를 실시하였으며 대다수의 항목에서 적합한 범위를 보임을 제시하였다. 하지만 Log Kow가 1이하인 PPCPs에 대하여 낮은 회수율을 보였으며, 따라서 분석방법

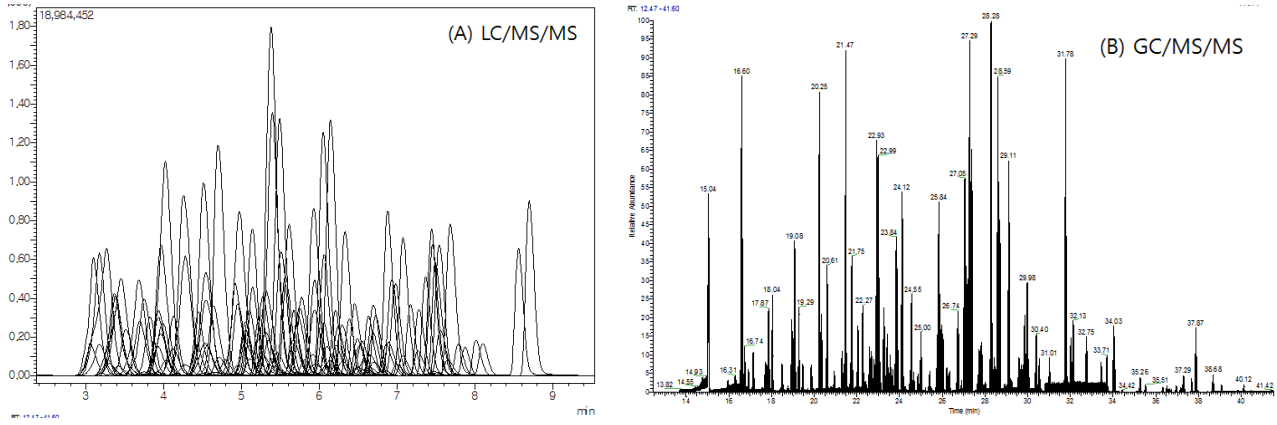


Fig. 2. Chromatograms for residual pesticides by (A) LC/ MS/MS and (B) GC/MS/MS

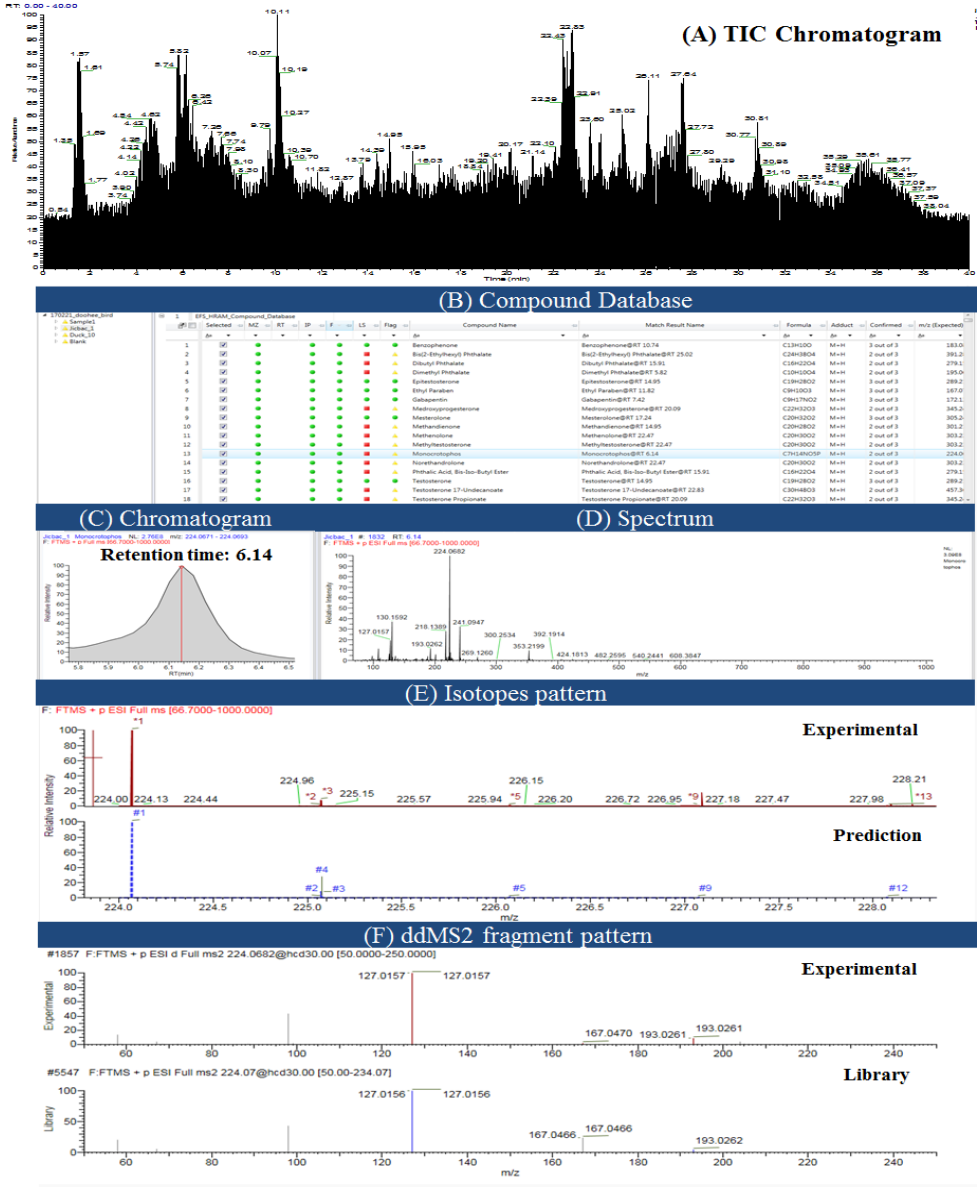


Fig. 3. (A) Total ion chromatogram of residual pesticides in liver of dead birds and Tracefinder3.3 browser by LC-Orbitrap. (B) Candidate list with a library matching compound, (C) its chromatogram, (D) mass spectrum, (D) isotopes pattern of the compared with experimental and prediction, (E) datadependent MS/MS of the compared with experimental and library.

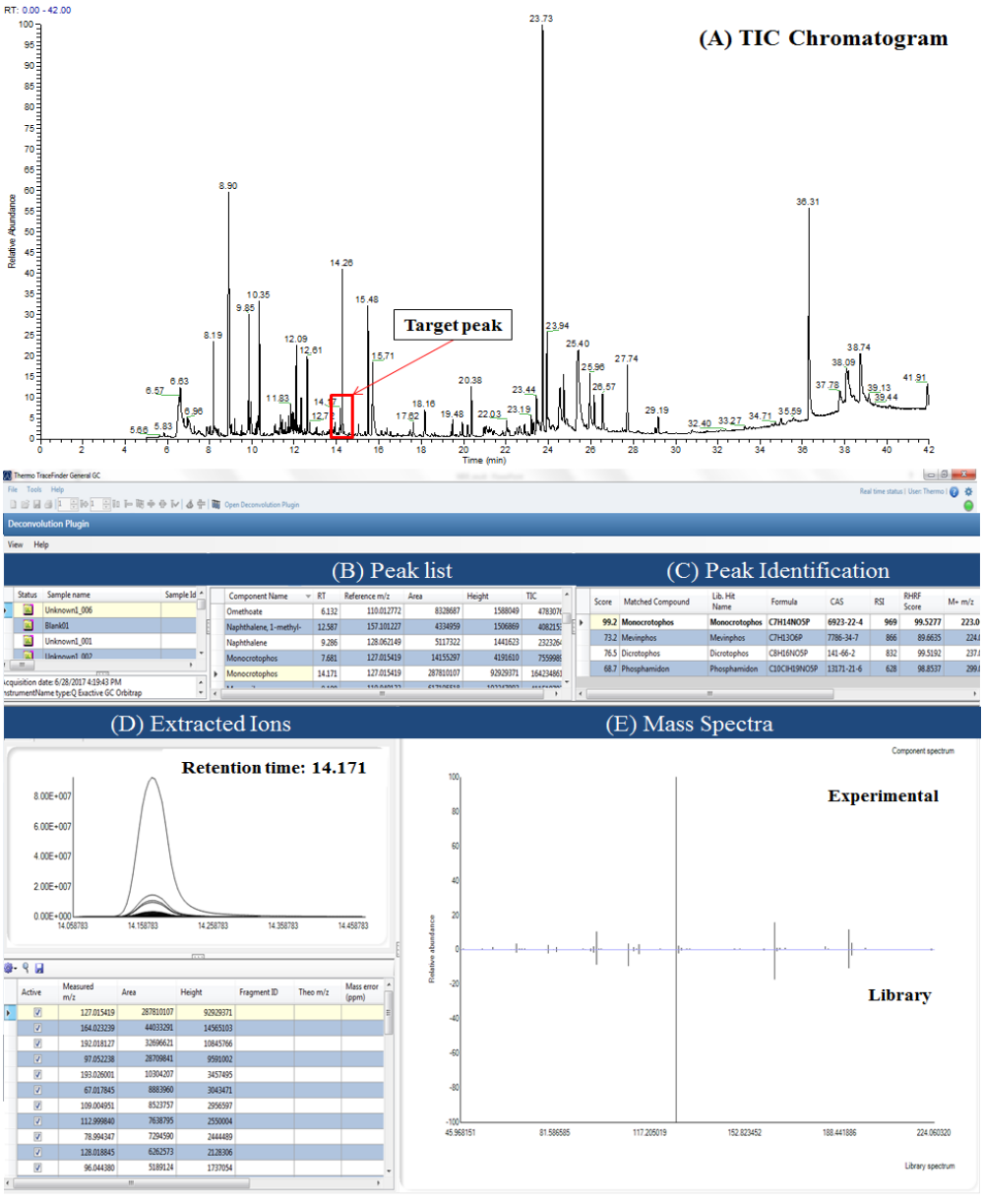


**Fig. 4. (A) Total ion chromatogram of residual pesticides in liver of dead birds and Tracefinder4.1 browser by GC-Orbitrap. (B) Candidate list with a library matching compound, (C) peak identification, (D) its chromatogram and extracted ions, (E) mass spectrum of the compared with experimental and library.**

에 대하여 보다 정확한 신뢰성을 제시하기 위해서는 Log Kow가 1이하인 acephate (-0.85)나 dicrotophos (-0.50) 등과 같은 항목에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

### 고분해능 질량분석기 스크니링 결과

LC 및 GC는 이용한 화학물질 분석방법은 크게 표적(target)/추정(suspect)/비표적(non-target) 분석기법이 있다(Krauss *et al.*, 2010). 이중 표적분석기법 기존에 제시된 대다수의 분석법으로써 표준물질이 확보 후 정성 및 정량을 하는 방법이기 때문에 분석물질에 대한 기기분석 조건을 확립 후 진행해야 하며 특정물질에 한정되어 분석해야 한다는 단점을 가지고 있다. 추정 및 비표적 분석기법은 기기의 full scan 모드로 측정하여 나오는 피크의 m/z 값 및 쪼개짐 패턴을 비교하여 분석시료에 함유하고 있는 화학물질은 찾아내는 기법이다. 이 방법은 화학물질이 고농도일 경우 상용화된 LC/MS나 GC/MS로 측정 후 보유하고 있는 라이브러리를 이용하면 쉽게 찾을 수 있지만 저농도의 경우 시료의 매질, 피크 겹침 등으로 인하여 화학물질을 찾는데 어려움이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근들어 고분해능 질량분석기를 이용한 추정 및 비표적 분석기법이 진행되고 있다. 특히 고분해능 질량분석기는 m/z 값이 정수로 표현되는 저분해능 질량분석기와 달리 높은 질량정확도를 보이기 때문에 정수단위에서 동일한 m/z값을 보이는 화학물질의 분리가 용이하며, 동시에 수많은 화학물질에 대하여 정확한 질량을 추출이 가능하다(Hernández *et al.*, 2015). 따라서 본 연구에서는 전처리가 완료된 폐사된 조류를 대상으로 고분해능 질량분석기

**Table 5. Detection of residual pesticides in liver of dead birds**

| | Sample | Residual Pesticides |
|---|---|---|
| 1 | *Corvus fugilegus* | not detecting |
| 2 | *Hypsipetes amaurotis1* | monocrotophos |
| 3 | *Anas platyrhynchos* | carbofuran, carbosulfan, deltamethrin |
| 4 | *Columba livia var. domestica* | benfuracarb, carbofuran |
| 5 | *Hypsipetes amaurotis2* | carbofuran |
| 6 | *Hypsipetes amaurotis3* | phosphamidon |
| 7 | *Anser albifrons* | monocrotophos, prochloraz, fenitrothion |

의 일종인 Orbitrap 질량분석기를 이용하여 시료에 함유하고 있는 잔류 농약을 스크리닝하였다. Fig. 3-A은 LC-Orbitrap 질량분석기의 크로마토그램을 나타낸 것으로써 양이온 및 음이온 조건에서의 full scan과 ddMS2의 결과가 함께 존재하기 때문에 실제 육안으로는 폐사원인 물질을 찾기 어려웠다. 이 크로마토그램에서 잔류 농약에 대한 피크를 추출하기 위해서는 예측된 m/z을 입력하여 추출해야 한다. 하지만 고분해능 질량분석기 특성상 소수점 4째 자리까지의 정확한 값을 입력해야 하기 때문에 실제로 해석하기에 어려움이 있다. 따라서 이를 해석하기 위하여 accurate mass 추출 프로그램인 TraceFinder3.3 프로그램을 사용하였으며 그에 대한 해석 과정 Fig. 3-B~F에 제시하였다. Fig. 3-B는 MZ Cloud을 이용해서 작성된 리스트로써 동위원소패턴, ddMS2 쪼개짐 패턴, NIST 라이브러리의 일치여부를 판단할 수 있다. 이를 바탕으로 해석한 결과 epitestosterone, testosterone 등 생체기원의 물질들을 확인할 수 있었으며 잔류 농약은 6.14분의 머무름 시간에서 monoctophos를 확인하였다. 특히 monocrotophos는 기기조건과 동일한 NIST 라이브러리가 존재하지 않았지만 동위원소패턴(Fig. 3-E), MZ Cloud에서 입력된 MS 쪼개짐 패턴과 ddMS2 쪼개짐 패턴(Fig. 3-F)이 실험값과 일치하는 결과는 보였다. 특히 ddMS2 쪼개짐 패턴에서 주요 피크의 분자량이 실험값과 라이브러리값이 각각 127.0157 m/z 및 127.0156 m/z로 질량오차(exact mass – accurate mass)가 −0.0001로 나타났으며 0.79 ppm의 우수한 질량정확도를 보였다. Fig. 4는 GC-Orbitrap 질량분석기를 이용한 폐사 조류 중 잔류농약의 해석과정을 나타낸 것이다. 이 크로마토그램도 LC-Orbitrap 질량분석기 결과 해석과 동일하기 잔류 농약에 대한 피크를 추출하기 위해서는 예측된 m/z을 입력하여 추출해야 한다. 하지만 수많은 피크를 동정하는데 많은 시간이 소모될 뿐만 아니라 저농도에서 다른 화학물질과 피크가 겹칠 경우 동정하기 어려움이 있다. 따라서 분석 결과의 정확한 해석을 위해 TraceFinder 4.1 프로그램을 약 700여종의 잔류 농약을 보유하고 있는 gc-orbitrap contaminants library 입력하여 사용하였다. 크로마토그램 해석 결과 Fig. 4-B에서 다양한 후보물질을 확인할 수 있었으며 이를 수작업으로 확인한 결과 잔류 농약은 앞선 결과와 동일하게 monocrotophos임을 확인하였다. 이를 피크동정(Fig. 4-C)을 통하여 후보물질의 우선순위의 score로 확인하고 추출이온(Fig. 4-D) 및 질량스펙트럼(Fig. 4-E)의 비교를 통해서 최종적으로 monocrotophos임을 확인하였다.

이와 동일한 방법으로 폐사조류에서의 폐사 원인 물질을 확인한 결과 떼까마귀에서는 잔류농약이 불검출됨을 확인하였으며 직박구리1에서는 monocrotophos, 청둥오리에서는 carbofuran, carbosulfan, deltamettrin, 비둘기에서는 benfuracarb, carbofuran, 직박구리2에서는 carbofuran, 직박구리3에서는 phosphamidon, 쇠기러기에서는 monocrotophos, prochloraz, fenitrothion임을 확인하였다(Table 5). Kim 등(2008)과 Jang 등(2010)은 1998년부터 2009년에서 폐사된 야생조류를 대상으로 잔류농약 분석 결과 monocrotophos, phosphamidon, carbofuran, fenitrothion 등이 국내 조류 폐사의 주요 원인 물질임을 제시하였으며 이는 본 연구 결과와 일치한다. 또한, 본 연구 결과를 통해 LC-Orbitrap 및 GC-Orbitrap 질량분석기를 이용하여 복잡한 매질을 가진 생체시료에 경우에서 잔류농약에 대한 정확한 질량을 추출 가능하며 이를 통하여 조류 폐사 원인 잔류농약을 신속하게 규명이 가능함을 제시한다.

## Notes

The author declare no conflict of interest.

## Acknowledgement

This work was supported by the National Institute of Environmental Research R&D (1900-1946-303-210-13) of Korea Government (NIER).

## References

Alder, L., Steinborn, A., & Bergelt, S. (2011). Suitability of an orbitrap mass spectrometer for the screening of pesticide residues in extracts of fruits and vegetables. Journal of AOAC International, 94(6), 1661-1673.

Bletsou, A. A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., & Thomaidis, N. S. (2015). Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows

for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 66, 32-44.

Cervera, M. I., Portoles, T., Pitarch, E., Beltran, J., & Hernandez, F. (2012). Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. Journal of Chromatography A, 1244, 168-177.

Farre, M., Pico, Y., & Barcelo, D. (2014). Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues. Journal of Chromatography A, 1328, 66-79.

Garcia-Reyes, J. F., Hernando, M. D., Molina-Diaz, A., & Fernandez-Alba, A. R. (2007). Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 26(8), 828-841.

Han, L., Matarrita, J., Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. (2016). Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. Journal of Chromatography A, 1449, 17-29.

Hernández, F., Ibánez, M., Portolés, T., Cervera, M., Sancho , J. & López, F. (2015). Advancing towards universal screening for organic pollutants in waters, Journal of Hazardous Materials, 282, 86-95.

Huerta, B., Jakimska, A., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló D. (2013). Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1288, 63-72.

Jang, J. H., Bong, Y. H., Kim, D. G., Kim, M., Chung, G. S., & Son, S. W. (2010). Analysis of residual pesticides in dead wild birds and other animals during 2008-2009 in Korea. Korean Journal of Veterinary Research, 50(3), 197-203.

Jeon J. H., Park, N. R., & Lee, S. H. (2016). Application of target, suspect, nontarget screening metholds based on high resolution mass spectrometry for the identification of micropollutants and their transformation products in aquatic evironments: A review. Journal of Korean Society for Environmental Analysis. 19(4), 225-245.

Kim, M., Yun, S. J., Kim, D. G., Bong, Y. H., Kim, H. J., Jang, J. H., & Chung, G. S. (2008). Determination of pesticides in dead wild birds in Korea. Korean Journal of Veterinary Research, 48(2), 131-137.

Krauss, M., Singer, H., & Hollender, J. (2010). LC high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397(3), 943-951.

Kwon, Y. K., Yun, S. J., & Kim, K. S. (2003). Parathion Poisoning in the White-napped Cranes. Korean Journal of Veterinary Public Health, 27(2), 83-88.

Lehotay, S. J., Tully, J., Garca, A. V., Contreras, M., Mol, H., Heinke, V., Anspach, T., Lach, G., Fusseli, R., Mastovska, K., & Poulsen, M. E. (2007). Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study, Journal of AOAC International, 90(2), 485-520.

Meng, C. K., Zweigenbaum, J., Frst, P., & Blanke, E. (2010). Finding and confirming nontargeted pesticides using GC/MS, LC/quadrupole-time-of-flight MS, and databases. Journal of AOAC International, 93(2), 703-711.

Ock, H. S. (2009). Developmental trend of analytical methods for pesticide residues. The Korean Journal of Pesticide Science, 13(4), 336-348.

Park, B. J, Choi, J. H., Lee, B. M., Im, G. J., Kim, C. S., & Park, K. H. (1998). Decomposition rate of iprobenfos, isoprothiolane, and diazinon by some environmental factors in aqueous. The Korean Journal of Pesticide Science, 2(2), 39-44.

Park, J. W., Kim, A. K., Kim, J. P., Lee, H. H., Park, D. W., Moon, S. J., Jang, T. K., Ha, D. R., & Seo, K. W. (2014). Multi-residue analysis of pesticides using GC-TOF/MS, ECD, NPD with QuECHERS sample preparation. The Korean Journal of Pesticide Science, 18(4), 278-295.

Shaikh, H., Memon, N., Bhanger, M. I., & Nizamani, S. M. (2014). GC/MS based non-target screening of organic contaminants in river Indus and its tributaries in Sindh (Pakistan). Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry, 15(1), 42-65.

Zedda, M., & Zwiener, C. (2012). Is nontarget screening of emerging contaminants by LC-HRMS successful? A plea for comound libraries and computer tools. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 403(9), 2493-2502.