카바릴-고성능액체크로마토그래피

2024

(Carbaryl-High Performance Liquid Chromatography)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 먹는물, 샘물 및 염지하수 중에 카바릴의 측정방법으로서, 시료 중의 카바릴을 디클로로메탄으로 추출 후 농축하여 역상 고성능액체크로마토그래프 컬럼을 통과시켜 분리한 다음 자외선 검출기로 검출하거나 모노클로로아세트산 완충용액으로 pH를 조정한 다음 유도체화하여 다음 형광 검출기로 분석하는 방법이다.

1.2 적용범위

1.2.1 이 시험기준은 먹는물, 샘물 및 염지하수 중에 카바릴의 분석에 적용한다.

1.2.2 이 시험기준은 용매추출 후 고성능액체크로마토그래프로 분리한 다음 자외선 검출기로 측정하거나 용매추출 없이 포스트 분리관 유도체화 한 다음 형광 검출기로 분석하는 방법이다.

1.2.3 이 시험기준에 의한 먹는물, 샘물 및 염지하수 중에 카바릴의 정량한계는 0.005 mg/L이다.

1.3 간섭물질

1.3.1 추출 용매 안에 함유하고 있는 불순물이 분석을 방해할 수 있다. 이 경우 바탕시료나 시약바탕시료를 분석하여 확인할 수 있다. 방해물질이 존재하면 용매를 증류하거나 컬럼 크로마토그래프를 이용하여 제거한다. 고순도의 시약이나 용매를 사용하면 방해물질을 최소화할 수 있다.

1.3.2 유리기구류는 세정제, 수돗물, 정제수 그리고 아세톤으로 차례로 닦아준 후 400 ℃에서 15분 ~ 30분 동안 가열한 후 식혀 알루미늄박(箔)으로 덮어 깨끗한 곳에 보관하여 사용한다.

2.0 용어정의

“내용 없음”

3.0 분석기기 및 기구

3.1 고성능액체크로마토그래프

3.1.1 고성능액체크로마토그래프는 아래 그림과 같이 이동상보관부, 용매전달부, 시료주입기, 분리관 및 검출부로 구성되고 검출부에서 나온 신호는 기록부에서 측정목적에 따라 여러 가지 형식으로 보고한다.

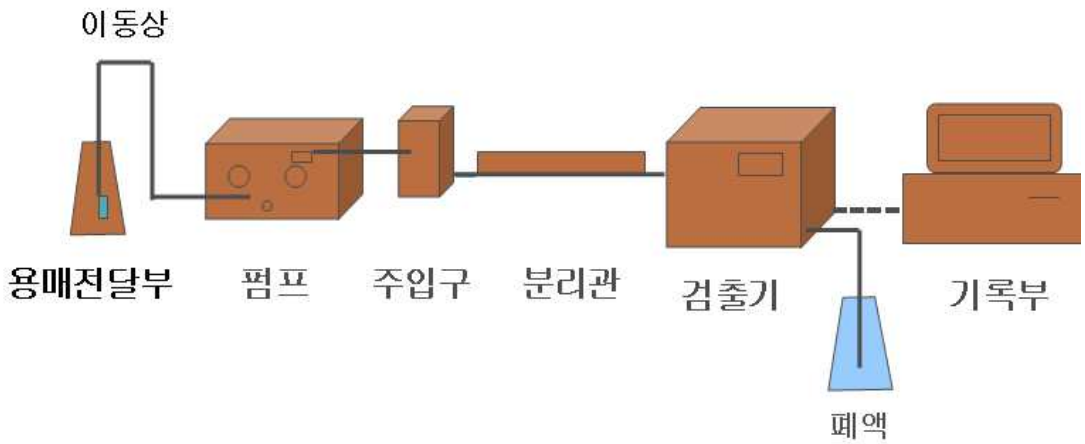


그림 1. 고성능액체크로마토그래프의 구조

3.1.2 컬럼은 안지름 3 mm ~ 5 mm, 길이 15 cm ~ 25 cm의 스테인리스 강관에 옥타데실실릴기(ODS)를 화학결합시킨 실리카겔(입경 5 μm ~ 10 μm)을 충전한 것 또는 이와 동등의 분리능을 갖는 것 (Novapak C18, Beckman Ultrasphere ODS, Supelco LC-1 등)을 택하여 시험한다.

3.1.3 이동상은 다음과 같다.

3.1.3.1 자외선검출기를 사용할 때에는 아세토니트릴 : 정제수(10 : 90)의 혼합비로 시작하여 30분 안에 아세토니트릴(100 %)로 선형 구배하여 사용하고 유속은 1.0 mL/min으로 사용한다.

3.1.3.2 형광검출기를 사용할 때에는 메탄올 : 정제수(80 : 20)의 혼합비로 사용하고 유속은 1.0 mL/min으로 사용한다.

3.1.4 자외선 검출기

자외선 검출기 (UV detector)는 220 nm에서 검출할 수 있는 것으로 사용한다.

3.1.5 형광 검출기

형광 검출기의 들뜸파장은 230 nm로 방출파장은 418 nm를 택하여 사용한다.

3.1.6 포스트 분리관 반응기

3.1.6.1 이동상에 반응시약을 혼합할 수 있는 장치로서 반응시약을 0.1 mL/min ~ 1.0 mL/min의 유속으로 주입할 수 있는 펌프가 설치된 것을 사용한다.

3.1.6.2 포스트분리관 반응기에서 가수분해는 95 ℃에서 1.0 mL 반응코일에 수산화나트륨용액(0.05 M)을 유속 0.5 mL/min으로 주입하고 유도체를 위해 실온에서 1.0 mL 반응코일에 OPA 반응용액을 유속 0.5 mL/min으로 주입한다.

3.1.7 여과지

이동상 또는 반응시약용은 47 mm 여과지를 사용하고, 시료는 직경 13 mm 여과지(직경 0.2 μm 폴리에스터)를 사용한다.
[주 1] 여과지는 Millipore의 HA type(수용액) 또는 FA type(용매)을 사용하거나 동등 이상의 것을 사용한다.

3.1.8 고성능액체크로마토그래프의 조건은 표 2 또는 표 3과 같이 수행할 수 있다.

3.2 농축기

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 디클로로메탄

디클로로메탄 (methylene chloride, CH_2Cl_2, 분자량 : 84.93) 100 mL를 약 1 mL ~ 5 mL로 농축한 것을 5 μL 취하여 기체크로마토그래프에 주입할 때 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 것을 사용한다.

4.1.2 무수황산나트륨 (anhydrous sodium sulfate, Na_2SO_4, 분자량 : 142.04)

유기인계농약의 검사에 쓰는 무수황산나트륨과 같다.

4.1.3 황산 (sulfuric acid, H_2SO_4, 분자량 : 98.08)(50 %)

4.1.4 메탄올

액체크로마토그래프용 시약을 사용하며, 바탕시험 할 때 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 것을 사용한다.

4.1.5 정제수

액체크로마토그래프용 시약을 사용하며, 바탕시험 할 때 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 것을 사용한다.

4.1.6 수산화나트륨용액(0.05 M)

수산화나트륨 2 g을 물에 녹여 1 L로 한다. 사용하기 전에 여과하고 헬륨으로 기체제거 한다.

4.1.7 2-머캅토에탄올용액

2-머캅토에탄올 10 mL와 아세토니트릴 10 mL를 혼합한다. 이 용액은 차고 어두운 곳에 보관한다.

4.1.8 붕산나트륨용액(0.05 M)

붕산나트륨·10수화물 19.1 g을 물에 녹여 1 L로 한다. 완전히 용해되도록 하루 지난 후에 사용한다.

4.1.9 OPA 반응용액

o-프탈알데하이드 0.1 g을 메탄올 10 mL에 녹이고, 붕산나트륨용액(0.05 M) 1 L에 넣고 혼합하여 여과한 후 헬륨기체로 탈기한다. 이 용액에 2-머캅토에탄올용액 100 µL를 넣어 혼합한다. 이 용액은 산소와 접촉하지 않으면 3일이상 안정하다. 필요시 조제하여 즉시 사용한다.

4.1.10 모노클로로아세트산용액(2.5 M)

모노클로로아세트산 236 g을 정제수에 녹여 1 L로 한다.

4.1.11 아세트산칼륨용액(2.5 M)

아세트산칼륨 245 g을 정제수에 녹여 1 L로 한다.

4.1.12 모노클로로아세트산 완충용액(pH 3)

모노클로로아세트산용액(2.5 M) 156 mL와 아세트산칼륨용액(2.5 M) 100 mL를 혼합한다.

4.1.13 티오황산나트륨

4.2 표준용액

4.2.1 카바릴 표준원액(1 000 mg/L)

25 mL 부피플라스크에 카바릴(순도 96 % 이상) 25.0 mg을 정확히 취하여 넣고 아세톤을 넣어 25 mL로 한다. 이 용액은 갈색병에 넣어 냉암소에 보존한다. 이 용액 1 mL는 카바릴 1 mg을 함유한다.

4.2.2 카바릴 표준용액(10 mg/L)

카바릴 표준원액 250 µL를 정확히 취하여 25 mL 부피플라스크에 넣고 아세톤을 넣어 전량 25 mL로 한다. 이 용액 1 mL는 카바릴 0.010 mg을 함유한다.

4.3 내부표준용액

4.3.1 내부표준물질원액(1 000 mg/L)

4-브로모-3,5-디메틸페닐N-메틸카바메이트 (4-bromo-3,5-dimethylphenyl N-methylcarbamate, BDMC) 25.0 mg을 정확히 취하여 25 mL 부피플라스크에 넣고 아세톤을 넣어 25 mL로 한다. 이 용액 1 mL는 BDMC 1 mg을 함유한다.

4.3.2 내부표준물질용액(10 mg/L)

내부표준물질원액 250 µL를 정확히 취하여 25 mL 부피플라스크에 넣고 아세톤을 넣어 전량 25 mL로 한다. 이 용액 1 mL는 BDMC 0.010 mg을 함유한다.

5.0 시료채취 및 관리

5.1 시료채취는 유리병을 사용하며 채취 전에 시료로서 세척하지 말아야 한다.

5.2 모든 시료는 시료채취 후 추출하기 전까지 1 ℃ ~ 5 ℃ 냉암소에서 보관하고 40일 이내에 분석한다.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 방법검출한계 및 정량한계

6.1.1 방법검출한계 (MDL, method detection limit) 및 정량한계 (LOQ, limit of quantitation)는 ES 05001 정도보증/정도관리에 따라 계산한다. 정제수에 표준용액을 정량한계 부근의 농도가 되도록 첨가한 7개의 첨가시료를 준비하고 7.0항의 분석절차와 동일하게 분석하여, 표준편차를 구한다.

6.1.2 표준편차에 3.14를 곱한 값을 방법검출한계로, 10을 곱한 값을 정량한계로 나타낸다. 측정한 방법검출한계는 표 1에서 제시한 정량한계 이하이어야 한다.

6.2 방법바탕시료의 측정

ES 05001 정도보증/정도관리에 따라 시료군마다 1개의 방법바탕시료 (method blank)를 측정한다. 방법바탕시료는 정제수를 사용하여 7.0항의 분석절차와 동일하게 전처리·측정하며 측정값은 방법검출한계 이하이어야 한다.

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

6.3.1 검정곡선의 작성 및 검증은 ES 05001 정도보증/정도관리에 따른다. 정량범위 내의 5개의 농도에 대해 검정곡선을 작성하고 얻어진 검정곡선의 결정계수 (R^2)가 0.98 이상 또는 감응계수 (RF)의 상대표준편차가 20 % 이내이어야 하며 결정계수나 감응계수의 상대표준편차가 허용범위를 벗어나면 재작성한다.

6.3.2 검정곡선의 직선성을 검증하기 위하여 검정곡선을 작성할 때에는 정량범위를 0.005 mg/L ~ 0.050 mg/L로 한다. 그러나 측정값이 이 농도범위를 벗어날 경우에는 시료를 묽혀서 다시 분석한다.

6.3.3 검정곡선을 검증하기 위하여 감응계수를 비교할 때에는 검정곡선의 중간 농도에서 한 농도를 선택하여 감응계수 (RF)를 구하여 그 값의 변화가 20 % 이내에서 일치하여야 한다. 만약 이 범위를 넘는 경우, 검정곡선을 재작성한다.

6.4 정밀도 및 정확도

6.4.1 정밀도 (precision) 및 정확도 (accuracy)의 측정은 ES 05001 정도보증/정도관리에 따른다. 정제수에 정량한계 농도의 10배가 되도록 동일하게 표준물질을 첨가한 시료를 4개 이상 준비하고, 7.0항의 절차와 동일하게 측정하여 평균값과 표준편차를 구한다.

6.4.2 정확도는 인증시료를 확보할 수 있는 경우 인증표준물질을 분석한 결과 값과 인증값과의 상대백분율로 나타내고, 인증시료를 확보할 수 없는 경우 이를 정확한 농도로 첨가한 시료로 대체한다. 이 때 정확도는 첨가시료를 분석한 농도와 첨가하지 않은 시료를 분석한 농도와의 차이에 대한 첨가농도의 상대백분율로서 나타내며 그 값이 75 % ~ 125 % 이내이어야 한다.

6.4.3 정밀도는 측정값의 상대표준편차 (RSD)로 계산하며 측정값이 25 % 이내이어야 한다.

6.5 현장 이중시료의 측정

현장 이중시료 (field duplicate sample)는 동일한 시료채취 장소에서 동일한 조건으로 중복 채취한 시료로서 한 조사팀이 하루에 20개 이하를 채취할 경우에는 1개를 그리고 그 이상을 채취할 때에는 시료 20개당 1개를 추가로 취한다. 동일한 조건의 두 시료간의 측정값의 편차는 25 % 이하이어야 한다.

6.6 내부정도관리 주기 및 목표

6.6.1 방법검출한계, 정량한계, 정밀도 및 정확도는 연 1회 이상 산정하는 것을 원칙으로 하며, 분석자의 교체, 분석 장비의 수리 및 이동 등의 주요 변동사항이 생길 경우에는 다시 실시한다. 단, 장비의 청소, 컬럼 교체 시와 측정 장비의 감도가 의심될 때에는 언제든지 측정하여 확인하여야 한다.

6.6.2 검정곡선 검증 및 시약바탕시료의 분석은 각 시료군마다 실시하며, 고농도의 시료 다음에는 시약바탕시료를 측정하여 오염여부를 점검한다.

6.6.3 각 정도관리 항목에 대한 정도관리 목표 값은 표 1과 같다.

7.0 분석절차

7.1 전처리

7.1.1 자외선 검출기를 사용할 때

7.1.1.1 시료 500 mL를 1 L 분별깔때기에 취하고, 황산(50 %)을 넣어 pH 3 ~ 4로 한 다음 무수황산나트륨 5 g을 넣어 잘 녹인다.

7.1.1.2 시료에 디클로로메탄 50 mL를 넣고 내부표준용액(10.0 mg/L)을 정확히 100 µL를 취하여 시료에 첨가한 후 2분간 강하게 흔들어 섞은 다음 가만히 두었다가 추출액을 300 mL 분별깔때기에 취한다.

7.1.1.3 다시 한 번 시료에 디클로로메탄 50 mL를 넣어 같은 방법으로 추출하고, 추출액을 합한 다음 무수황산나트륨을 이용하여 수분을 제거한다.

7.1.1.4 농축기로 1 mL까지 농축하여 시험용액으로 한다.

7.1.2 형광 검출기를 사용할 때

7.1.2.1 시료를 냉장고에서 꺼내 상온으로 한다.

7.1.2.2 50 mL 부피플라스크에 모노클로로아세트산 완충용액 1.5 mL와 내부표준용액 20 µL를 넣고 시료로 채워 50 mL로 한다.

7.1.2.3 주사기와 여과지에 물 5 mL를 통과시켜 세척한 다음 위의 용액 5 mL를 취하여 여과지를 통과시킨다. 거른 용액은 버린다. 다시 위의 용액 5 mL ~ 10 mL를 취하여

여과지를 통과시켜 얻은 용액을 시험용액으로 한다.

7.2 검정곡선의 작성

7.2.1 자외선 검출기를 사용할 때

7.2.1.1 정제수 500 mL를 취하여 1 L 분별깔때기에 넣은 후 카바릴 표준용액(10.0 mg/L) 0, 250, 500, 1 000, 2 000, 2 500 µL를 단계적으로 취하여 넣고 내부표준용액(10.0 mg/L)을 정확히 100 µL를 취하여 시료에 첨가한다. 제조한 검정곡선용 표준용액의 농도는 0, 0.005, 0.010, 0.020, 0.040, 0.050 mg/L에 해당되며 필요에 따라 사용하는 표준용액의 농도와 개수를 달리 할 수 있다.
[주 2] 시료분석결과 이 검정곡선 농도범위를 벗어나면 시료를 희석해서 재분석하여야 한다.

7.2.1.2 이하 추출방법은 7.1.1.1 ~ 7.1.1.4에 따른다.

7.2.1.3 카바릴의 농도 (Cx)를 취하여 가로축 (x 축)에, 카바릴의 피크 면적 (Ax)과 내부표준물질의 피크 면적 (Ai)과의 비 (Ax/Ai)를 세로축 (y 축)에 취하여 검정곡선을 작성한다.

7.2.2 형광 검출기를 사용할 때

7.2.2.1 카바릴 표준용액 0 mL ~ 5 mL를 단계적으로 50 mL 부피플라스크에 넣고 각각에 내부표준용액 20 µL를 넣은 다음 모노클로로아세트산 완충용액(pH 3)으로 전량을 50 mL로 한다.

7.2.2.2 이하 전처리방법은 7.1.2.2 ~ 7.1.2.3에 따른다.

7.2.2.3 카바릴의 농도 (Cx)를 취하여 가로축 (x 축)에, 카바릴의 피크 면적 (Ax)과 내부표준물질의 피크 면적 (Ai)과의 비 (Ax/Ai)를 세로축 (y 축)에 취하여 검정곡선을 작성한다.

7.3 측정법

7.3.1 자외선 검출기를 사용할 때

7.3.1.1 추출액 10 µL를 취하여 고성능액체크로마토그래프에 주입하여 분석한다.

7.3.1.2 크로마토그램으로부터 카바릴 및 내부표준물질의 피크 면적을 측정하여 카바릴의 피크 면적 (Ax)과 내부표준물질의 피크 면적 (Ai)과의 비 (Ax/Ai)를 구한다.

7.3.2 형광 검출기를 사용할 때

7.3.2.1 전처리에서 얻은 시험용액 500 µL를 액체크로마토그래프에 주입하여 생성된 크로마토그램을 얻는다.

7.3.2.2 크로마토그램으로부터 카바릴 및 내부표준물질의 피크 면적을 측정하여 카바릴의 피크 면적 (Ax)과 내부표준물질의 피크 면적 (Ai)과의 비 (Ax/Ai)를 구한다.
[주 3] 피크 면적이 검정곡선의 최고농도 범위를 초과하면 시험용액을 모노클로로아세트산 완충용액(pH 3)으로 희석하여 다시 주입한다.

8.0 결과보고

8.1 계산

카바릴과 내부표준물질에 대한 면적 비 (Ax/Ai)를 구한 다음 검정곡선식의 y(i)값에 대입하여 x(i)값을 계산하면 분석물질의 농도(C_s, mg/L)를 구할 수 있다.

$$C_s\ (mg/L) = \frac{\frac{A_X}{A_i} - b}{a} \qquad \text{(식 1)}$$

여기서, Ax/Ai : 분석물질과 내부표준물질의 피크 면적 비
a : 검정곡선의 기울기
b : 검정곡선의 절편 값
C_s : 분석물질의 농도(mg/L)

8.2 결과보고

행정사항과 관련된 항목별 시험결과의 표시는 ES 05003의 먹는물 수질기준의 표시한계 및 결과표시에 따른다.

9.0 참고자료

9.1 US EPA Method 632, 1982, Determ The Determination Of Carbamate And Urea Pesticides In Industrial And Municipal Wastewater

9.2 US EPA Method 531.2, 2001, Measurement Of N-Methylcarbamoyloximes And N-Methylcarbamates In Water By Direct Aqueous Injection HPLC With Post Column Derivatization

9.3 US EPA Method 553, 1992, Determination Of Benzidines And Nitrogen-Containing Pesticides In Water By Liquid-Liquid Extraction Or Liquid-Solid Extraction And Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography/Particle Beam/Mass Spectrometry

9.4 Standard Method 6610, 2005, Carbamate Pesticides

10.0 부록

표 1. 정도관리 목표 값

정도관리 항목	정도관리 목표
정량한계	0.005 mg/L
검정곡선	결정계수 (R^2) ≥ 0.98 또는 감응계수 (RF)의 상대표준편차 ≤ 20 %
정밀도	상대표준편차 ± 25 % 이내
정확도	75 % ~ 125 %
현장이중시료	상대편차백분율 ± 25 % 이내

표 2. 카바릴의 액체크로마토그래피 실험조건 (예)(자외선 검출기용)

항 목	조 건
컬럼	Novapak C18(300 x 4.0 mm, 10 µm) 또는 이와 동등한 컬럼
이동상	초기 : 아세토니트릴 : 정제수(10 : 90) 30분 후 : 아세토니트릴(100)
유속	1.0 mL/min
파장	220 nm
주입구 부피	10 µL
컬럼 온도	40 ℃

표 3. 카바릴의 액체크로마토그래피 실험조건 (예)(형광 검출기용)

항 목	조 건
컬럼	Novapak C18 300 x 4.0 mm, 10 µm
이동상	메탄올 : 정제수 (80 : 20)
유속	1.0 mL/min
파장	들뜸파장 230 nm; 방출파장 418 nm
주입구 부피	500 µL
컬럼 온도	상온

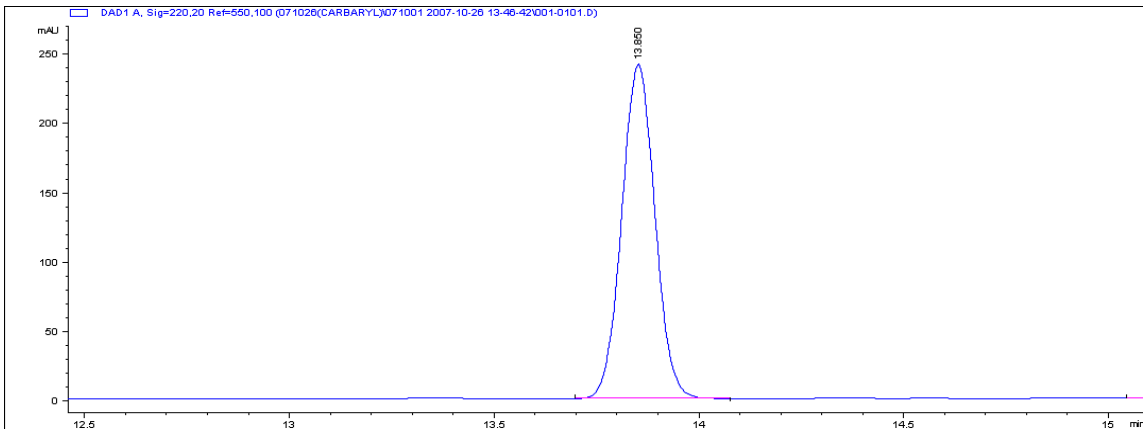


그림 2 .카바릴 표준물질의 액체크로마토그램(자외선 검출기법)