잔류성유기오염물질 공정시험기준 ES 10915.1

어류 시료 중 유기염소계 농약류 동시 시험기준-HRGC/HRMS

2017

Official Method of Organochlorine Pesticide in Fish-HRGC/HRMS

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준의 목적은 어류 시료 중 유기염소계 농약 18종을 동시 분석함에 있어, 시료채취, 추출, 정제 그리고 기기분석 등 제반 절차의 정확과 통일을 기하는데 있다.

1.2 적용범위

1.2.1 어류 시료 중 알드린(aldrin), 디엘드린(dieldrin), 엔드린(endrin), 클로르단(chlordane), 디디티(DDT), 헥사클로로벤젠(hexachlorobenzene), 헵타클로르(heptachlor), 마이렉스(mirex)등 잔류성유기오염물질 중 유기염소계 농약류 8종 및 이성질체 포함하여 총 18종의 물질을 기체크로마토그래프/고분해능 질량분석계(HRGC/HRMS, high resolution gas chromatograph/high resolution mass spectrometer)로 분석하는 방법에 적용한다.

1.2.2 회수율은 50 % ~ 120 %의 범위를 만족하고, 분석방법검출한계는 0.03 ng/g ~ 0.50 ng/g을 만족하여야 한다.

1.3 간섭물질

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 1.3항에” 따른다.

2.0 용어정의

2.1 표준원액

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 2.1항에” 따른다.

2.2 표준용액

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 2.2항에” 따른다.

2.3 검정곡선 표준용액

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 2.3항에” 따른다.

2.4 동위원소 치환 내부표준물질

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 2.4항에” 따른다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 추출장치

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 3.1항에” 따른다.

3.2 농축장치

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 3.2항에” 따른다.

3.3 정제용 컬럼장치

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 3.3항에” 따른다. 단, 알루미나컬럼은 사용하지 않는다.

3.4 분석용 저울

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 3.4항에” 따른다.

3.5 미량주사기

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 3.5항에” 따른다.

3.6 기체크로마토그래프/고분해능 질량분석계

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 3.7항에” 따른다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 4.1항에” 따른다.

4.2 표준용액

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 4.2항에” 따른다.

5.0 시료채취 및 관리

ES 10106 생물시료의 시료채취 및 보존 방법에 따른다.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 방법검출한계 및 정량한계 확인

방법검출한계 및 정량한계는 ES 10001 정도보증/정도관리에 따라 측정한다. 측정한 방법검출한계는 시험기준에 제시한 값 이하이어야 한다.

6.2 정밀도 및 정확도 확인

“어류시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 6.2항에” 따른다.

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 6.3항에” 따른다.

6.4 실험실 내부정도관리

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 6.4항에” 따른다.

7.0 분석절차

7.1 전처리

냉동 보관된 시료를 상온에서 해동시키고 균질기로 균질화하거나 시료를 동결건조한 후 균질화 시킨다. 시료 약 2 g에 무수황산나트륨 약 12 g을 넣고 막자사발에서 균질화한다. 또는 동결건조한 시료는 시료와 동량의 무수황산나트륨을 넣고 균질화한다.

7.1.1 추출(속슬레 추출)

7.1.1.1 유리재 여과조를 본체에 넣는다. 500 mL 플라스크에 200 mL ~ 250 mL 다이클로로메테인:헥세인(1:1/V:V) 혼합 추출용매를 넣고 본체와 플라스크를 연결한 후 냉각장치를 연결하고 6시간 이상 세척한다.

7.1.1.2 세척이 끝난 후 실온으로 될 때까지 방치하고 속슬레 장치를 분해한 후 여과조를 톨루엔으로 씻어준 후 건조시킨다.

7.1.1.3 시료가 여과조의 여과판에 끼이는 것을 방지하기 위해서 먼저 여과조에 약 0.2 cm 높이로 무수황산나트륨을 넣고, 시료를 넣는다.

7.1.1.4 시료에 정제용 내부표준물질 일정량을 주입한 후 세척된 유리섬유를 넣고 여과조를 속슬레 본체에 넣는다. 500 mL 플라스크에 300 mL ~ 350 mL 다이클로로메테인 : 헥세인 (1 : 1) 혼합용매를 넣고 본체와 플라스크를 연결한다. 이때, 시료를 균질화하는데 사용된 막자와 막자사발은 다이클로로메테인 : 헥세인 (1 : 1) 혼합용매로 헹군 뒤 그 용매를 속슬레에 넣어준다.

7.1.1.5 시간당 5회의 순환주기로 18시간 이상 추출한다. 이 때 용매의 종류와 주위 온도 등의 요인에 따라서 순환주기의 변화가 있으므로 1회전에 소요되는 시간을 측정한다.

7.1.1.6 추출을 끝낸 후 실온으로 될 때까지 방치하고 속슬레 장치를 분리한다.

7.1.1.7 추출액을 필요에 따라 분액하여 일부를 취하고 나머지는 추가 분석을 위하여 4 ℃ 이하의 냉암소에 보관한다.

7.1.1.8 분취한 추출액을 회전증발농축기 등을 이용하여 1 mL 미만으로 농축시킨 후, 지방을 정량한다.

7.1.2 지방정량

7.1.2.1 추출 과정에서 넘어 온 시료에 수분이나 염이 포함되어 있을 경우에는 무수황산나트륨을 이용한 여과 과정을 거쳐 방해물질을 제거한다. 깔때기에 거름종이를 깔고 무수황산나트륨을 채운 후 헥세인으로 한 번 헹군 다음, 250 mL 플라스크를 깔때기 아래에 둔다. 농축된 추출시료를 1회용 파스퇴르 피펫을 이용하여 무수황산나트륨을 통과하도록 넣어준다. 시료가 담겨있던 플라스크에 3 mL ~ 4 mL의 헥세인을 넣어 플라스크를 헹군 후 이 헹굼액을 넣는다. 이 과정을 두 차례 더 반복한 후 헥세인으로 무수황산나트륨이나 거름종이에 묻어 있는 노란색의 시료가 완전히 없어질 때까지 씻어 준다. 이때에

무수황산나트륨이 시료에 혼입되지 않도록 주의한다. 여과가 끝난 250 mL 플라스크에 담겨 있는 시료를 다시 회전증발농축기를 이용하여 약 1 mL로 농축시킨 후 지방정량을 시작한다.

7.1.2.2 유리 재질의 원심분리관(15 mL)을 아세톤-톨루엔-헥세인의 순서대로 넣어서 1시간씩 초음파세척기로 세척한다. 완전히 건조시킨 원심분리관의 무게를 측정하여 기록한다.

7.1.2.3 약 1 mL로 농축한 시료를 파스퇴르 피펫을 이용하여 무게(W1)를 미리 잰 원심분리관(15 mL)에 옮긴다. 시료를 옮길 때는 원심분리관 벽에 파스퇴르 피펫이 닿지 않도록 주의한다. 시료를 담았던 플라스크를 헥세인을 이용하여 전체 양이 12 mL 이하가 되도록 2 mL ~ 3 mL씩 3회 이상 헹구어 원심분리관에 합한다.

7.1.2.4 시료를 다 옮긴 후, 원심분리관을 질소농축기에 넣어 시료 위층의 흔들림이 보이지 않도록 약하게 농축한다. 약 2 mL 정도로 농축시킨 후 원심분리관을 옆으로 비스듬히 놓아서 후드 내에서 용매만 증발하도록 자연 건조시킨다. 이때 후드 내에서 다른 작업을 하지 않도록 한다.

7.1.2.5 대략 24시간 이상 방치한 후 1시간 간격으로 더 이상의 무게 변화가 없을 때까지 원심분리관의 무게를 측정한다.(W2)

7.1.2.6 원심분리관 무게(W1)와 측정 무게(W2)를 이용하여 지방의 무게를 결정한다.

$$\text{지방 무게} = \text{측정 무게}(W2) - \text{원심분리관무게}(W1) \qquad \text{(식 1)}$$

$$\text{지방 함량}(\%) = \frac{\text{지방 무게}(g)}{\text{시료 무게}(g)} \times 100 \qquad \text{(식 2)}$$

7.1.2.7 무게를 잰 후, 원심분리관에 있는 시료를 약 2 mL의 헥세인으로 녹여 다음의 정제과정으로 넘어간다. 시료가 잘 녹지 않을 경우, 초음파세척기를 이용하여 초음파 처리를 하면 쉽게 녹일 수 있다.

7.2 정제

7.2.1 겔 침투 크로마토그래프

7.2.1.1 본 컬럼은 시료당 0.5 g의 지질 등 고분자를 제거하는데 적합하도록 제작되어 있으므로 0.5 g 이상의 고분자를 포함하는 시료는 시료를 분할하여 정제한다.

7.2.1.2 추출액에 입자 물질이 존재할 경우 여과하여 고형 물질을 제거한다. 시료양은 약 5 mL를 컬럼에 주입하고 이 때 비즈의 표층이 흔들리지 않도록 주의한다.

7.2.1.3 시료가 있던 용기를 다이클로로메테인 : 헥세인 (1 : 1/V : V) 용매 6-7 mL로 3회에 걸쳐 세척하여 컬럼에 첨가한다.

7.2.1.4 컬럼 코크를 열어 시료와 헹굼액이 비즈를 완전히 통과하면 코크를 닫는다. 컬럼에 용매를 채워 비즈 위로 20 cm 높이를 유지하도록 한 후 컬럼의 코크를 다시 열고 5 mL/min의 일정한 유속으로 용출액을 플라스크로 받는다.

7.2.1.5 용출액이 160 mL가 되면 코크를 닫고 새 플라스크로 바꾸어 받는다. 먼저 받은 160 mL의 용출액 안에 GPC 컬럼을 통해 제거하고자 하는 지방이나 단백질과 같은 고분자 물질이 포함되어 있으므로 먼저 받은 160 mL는 버린다.

7.2.1.6 500 mL 플라스크에 용출액 약 350 mL 받은 후 1 mL 미만으로 농축 시킨다.

7.2.1.7 사용한 컬럼은 다음 시료의 처리를 위해 약 350 mL의 다이클로로메테인 : 헥세인 (1 : 1/V : V)를 이용하여 세척해 준다.

7.2.2 실리카겔/플로리실 복합카트리지 정제

7.2.2.1 SPE 진공장치에 하단에 플로리실 카트리지를 장착하고 상단에 실리카겔 카트리지를 장착하여 복합 카트리지로 조립한다. SPE 진공장치 안에는 유리관을 설치한다.

7.2.2.2 복합 카트리지에 1:1 다이클로로메테인/헥세인, 헥세인 순서로 용매를 흘려 활성화 시킨다.

7.2.2.3 GPC 정제과정을 거쳐 농축된 시료를 카트리지에 넣고 헥세인 16 mL를 최소

의 진공을 사용하여 통과시킨다.

7.2.2.4 1:1 다이클로로메테인/헥세인 12 mL(4 mL × 3회)를 통과시킨다.

7.2.2.5 복합카트리지를 통과한 용출액을 유리관에 합쳐서 모은다.

7.2.3 농축

7.2.3.1 용출액을 담은 유리관을 온도 35 ℃ 이하, 압력 8 psi ~ 10 psi에서 질소농축기를 이용하여 0.5 mL까지 농축시켜 미리 세척한 파스퇴르 피펫으로 농축액을 소량용기에 옮긴다. 다시 혼합용매로 유리관을 헹구고 소량용기에 합한다.

7.2.3.2 농축액이 들어있는 소량용기를 지지대에 고정시키고 상온의 후드 안에서 자연건조 시키고, 시료가 완전히 건조되면 뚜껑을 닫고 분석 전까지 4 ℃ 이하에서 보관한다.

7.2.4 실린지 첨가용 내부표준물질의 첨가

실리카겔/플로리실 복합카트리지 정제 농축액에 실린지 첨가용 내부표준물질을 적당량 첨가한 후, 질소가스를 불어넣어 약 40 µL ~ 100 µL로 농축한 것을 최종 기기분석용 시료로 한다. 분석용 시료는 필요에 따라서 소량의 최종 액량으로 조제한다.

7.3 기기분석방법

분석은 기체크로마토그래프/고분해능 질량분석계의 전자이온화방식을 사용하며, 정성분석은 각 동족체의 2개 이온을 선택이온검출법 (SIM, selected ion monitoring)과 선택이온 머무름 시간으로 하고 정량분석은 그 선택이온의 면적비를 계산한 상대감응계수 (RRF, relative response factors)법 또는 내부표준법으로 한다.

7.3.1 기체크로마토그래프 분석조건

화합물의 분리가 잘되고 감도가 최적화되도록 기체크로마토그래프의 조건을 설정하고, 이 최적의 조건을 모든 시료(표준용액, 바탕시료, 실제시료)에 대해 동일하게 적용한다.

7.3.2 고분해능 질량분석기 분석조건

7.3.2.1 질량설정

고분해능 질량분석기는 분해능 10,000(10 % 계곡(valley) 기준) 이상의 상태를 유지해야 하며 선택이온법으로 각 동족체마다 2개 이상의 선택이온, 즉 분자질량(M^+) 이온 및 감도가 높은 질량($(M+2)^+$ 또는 $(M+4)^+$) 이온을 소수점 넷째 자리까지 이용한다.

7.3.2.2 검정곡선 작성

분석은 동위원소 치환 내부표준물질을 이용한 내부표준분석법으로 상대감응계수(RRF)법에 의해 정량한다. 시료를 분석하기 전에 5단계 이상의 검정곡선 작성용 표준용액(CS1 ~ CS5)을 분석하여 각 선택이온에 대한 크로마토그램을 작성하여 각 표준물질(native standards)의 면적과 이에 대응하는 동위원소 치환 내부표준물질(isotope labelled standards)의 피크 면적으로부터 상대감응계수(RRF)를 구한다. 아래 식에 의해 상대감응계수(RRF)를 얻을 수 있다.

$$RRF = \frac{(A1_n + A2_n)}{(A1_l + A2_l)} \times \frac{(C_l)}{(C_n)} \qquad \text{(식 3)}$$

여기서, $A1_n$, $A2_n$: 표준물질의 1, 2차 선택이온의 피크 면적

$A1_l$, $A2_l$: 정량용 표준물질에 첨가된 내부표준물질의 1, 2차 선택이온의 피크 면적

C_l : 정량용 표준물질에 첨가된 내부표준물질의 농도

C_n : 정량용 표준물질의 농도

위의 식에 의해 농도별 상대감응계수(RRF)값을 구한 다음, 평균 상대감응계수($RRF_{avg.}$)와 상대표준편차(RSD)를 계산한다.

$$RRF_{avg.} = \frac{\sum_{i=1}^{n} RRF_i}{n}, \quad SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(RRF_i - RRF_{avg.})^2}{n-1}}, \quad RSD = \frac{SD}{RRF_{avg.}} \times 100 \qquad \text{(식 4)}$$

농도별 상대감응계수 값에 대한 상대표준편차가 ±15 % 이내인 경우는 평균 상대감응계수를 사용하여 시료를 정량하고, ±15 %를 초과하면 모든 검정곡선 표준용액을 다시 측정하여 새로운 평균 상대감응계수를 구하여야 한다.

7.4 시료분석

7.4.1 7.3.1 항과 7.3.2 항의 방법에 따라 분석기기의 조건을 설정한다.

7.4.2 검정곡선과 시료에 대한 기기분석은 유기염소계 농약류에 대한 해당 CS1 ~ CS5의 표준용액과 시료가 부합되도록 나누어 기체크로마토그래프에 주입한다. 또한, 바탕시료에 대한 분석도 동일한 실험과정을 진행하여 분석한다.

7.5 시료분석결과

7.5.1 정성분석

7.5.1.1 분석하기 위해 질량수 및 질량형태를 구분하고 선택한 각 분석물질별 두 개의 m/z 이온이 정해진 머무름 시간에서 나타나야 한다.

7.5.1.2 시료 추출물에서 각 분석물질들을 검출하기 위하여 기체크로마토그래프의 피크에 대한 신호 대 잡신호 비(S/N)는 2.5보다 커야 한다.

7.5.2 정량분석

7.5.2.1 정량은 검출된 분석물질과 동위원소 치환 내부표준물질의 상대비율로 정량하는 동위원소희석법으로 한다. 농도계산 방법은 다음 식과 같다.

$$C = \frac{(A1_s + A2_s)}{(A1_i + A2_i)} \times \frac{(I_i)}{(RRF)} \times \frac{1}{W} \qquad \text{(식 5)}$$

여기서, C : 시료 중 농도(pg/g 또는 ng/g)

$A1_s$, $A2_s$: 시료에 함유된 이성체의 1, 2차 선택이온의 피크 면적

$A1_i$, $A2_i$: $A1_s$와 $A2_s$에 대응하는 시료에 첨가된 내부표준물질의 1, 2차 선택이온의 피크 면적

I_i : 시료에 첨가된 내부표준물질의 양(pg 또는 ng)

RRF : 상대감응계수

W : 시료량(g)

8.0 결과보고

8.1 분석결과 보고

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 8.1항에” 따른다.

8.2 결과보고 양식

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 8.2항에” 따른다.

9.0 참고문헌

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 9.0항에” 따른다.

10.0 부록

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 10.0항에” 따른다.

주 해

“어류 시료 중 잔류성유기오염물질 동시 시험기준-HRGC/HRMS 주해에” 따른다.