

잔류성유기오염물질 공정시험기준

ES 10304.1

환경대기 시료 중

헥사브로모사이클로도데칸(HBCDs) 시험기준

2020

- LC-MS/MS

(Official Method of Hexabromocyclododecanes in Ambient Air
by LC-MS/MS)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준은 환경대기 중 헥사브로모사이클로도데칸 (HBCDs, hexabromocyclododecanes)을 시험·검사함에 있어, 시료채취·추출·정제, 기기분석 등 제반 절차의 정확과 통일을 기하는 데 있다.

1.2 적용범위

1.2.1 환경대기 시료 중 헥사브로모사이클로도데칸 이성질체 3종 α -HBCD, β -HBCD, γ -HBCD을 액체크로마토그래프/탠덤 질량분석기 (LC-MS/MS, liquid chromatograph/tandem mass spectrometer)로 분석하는 방법에 적용한다.

1.2.2 헥사브로모사이클로도데칸의 이성질체별 회수율은 50 % ~ 130 % 범위를 만족하고, 이성질체별 방법검출한계 (MDL, method detection limit)는 표준상태 (0 °C, 1 기압)에서 각각 1.0 pg/m³을 만족해야 한다.

1.3 간섭물질

1.3.1 분석결과에 오류를 가져올 수 있는 주요 오염원으로는 용매, 시약, 유리 기구 및 그 외 분석과정 중에 사용하는 모든 기구 등 이다. 이들은 크로마토그램상의 바탕선을 상승시키는 등 시료분석과정에 영향을 줄 수 있으며, 분석 자료의 질을 저하시킬 수 있다.

1.3.2 잘못 세척된 유리 기구류는 분석과정 중 시료를 오염시킬 수 있으며 유리표면에 분석물질이 흡착될 경우 손실의 우려가 있으므로 유리 기구류는 적절한 세척이 매우 중요하다. 유리 기구류는 마지막 사용 용매로 한번 행구어 준 후 바로 세제로 씻는다. 세제 용액에 유리 기구를 넣고 30 분간 초음파 세척한다. 세제로 세척한 후, 뜨거운 물, 수돗물, 정제수 순으로 행군다. 열에 안정한 물질의 경우 증류수 세척만으로는 잘 제거되지 않기 때문에 다시 아세톤, 노말-헥세인, 다이클로로메테인의 용매 순으로 각각 3 회 행군 후 105 °C 오븐에서 1 시간 이상 건조하여 사용한다.

1.3.3 모든 시약은 순도 및 불순물의 종류와 함량을 고려하여 엄선하고, 일반적으로 잔류농약분석급 이상의 시약이나 용매를 사용한다. 필요한 경우 용매나 시약은 증류 및 정제하여 불순물들의 방해로 인한 문제를 최소화하도록 한다.

1.3.4 실험실에서는 실험실 정제수 바탕시료 (laboratory reagent blank)의 측정을 통해 정제수, 시약 또는 용매 등의 오염 영향 유무와 수준을 평가해야 한다.

1.3.5 분석에 사용되는 모든 물질은 오염원으로 인한 간섭이 없음을 시료 분석 이전과 시료군마다 (최대 20 개) 확인하여야 한다.

1.3.6 방법바탕시료 (method blank sample)는 실제시료의 매질과 가능하면 같아야 하고, 검출하고자 하는 물질의 농도는 방법검출한계 값 이하로 검출되어야 한다.

1.3.7 고농도의 시료 측정 후, 바로 다음 시료 측정 시 고농도의 시료에 의한 오염 영향 (carryover)으로 잘못된 결과를 얻을 수 있다. 따라서 고농도의 시료 측정 후, 마지막에 사용된 유기용매를 2 번 ~ 3 번 측정한 후 다음 시료를 분석한다.

2.0 용어정의

2.1 표준원액 (stock standard solution) 및 혼합표준원액

표준원액은 분석대상물질, 대체표준물질 및 대체표준물질의 고농도 용액으로, 고상 또는 액상의 순수 표준물질 (pure reference materials)을 일정 용매에 용해시켜 제조하

거나 시판되는 표준원액을 구입하여 사용가능하다. 혼합표준원액은 여러 분석대상물질의 표준물질들을 일정 용매에 용해시키거나, 시판되는 혼합표준원액을 구입하여 사용가능하다.

2.2 표준용액 (primary dilution standard solution) 및 혼합표준용액

표준용액은 표준원액을 일정 용매로 희석하여 제조하며, 혼합표준용액은 분석대상물질들의 표준원액을 혼합하여 희석·제조하거나 또는 혼합표준원액을 희석하여 사용한다.

2.3 내부표준용액 (internal standard solution) 및 혼합내부표준용액

내부표준용액은 내부표준물질 표준원액을 일정 용매로 희석하여 제조한다. 혼합내부표준용액은 분석 시 사용되는 내부표준물질의 표준원액을 혼합하여 희석·제조하거나 또는 내부표준물질의 혼합표준원액을 희석하여 사용한다.

2.4 동위원소 치환 내부표준물질

D, ^{13}C -, ^{37}Cl - 등의 동위원소로 치환된 물질로 만들어진 표준물질로, 상대검정곡선법 또는 동위원소희석법에 의한 분석방법의 내부표준물질로 주로 사용된다.

2.4.1 시료채취용 내부표준물질

시료채취용 내부표준물질은 분석하고자 하는 물질과 유사한 화학적 구조나 화학적 성질을 가지며 시료 매질 중에서는 발견되지 않는 유기화합물로 시료채취방법의 신뢰성을 알기 위해 시료채취 직전에 첨가하여 사용한다.

2.4.2 정제용 내부표준물질

정제용 내부표준물질은 분석하고자 하는 물질과 유사한 화학적 구조나 화학적 성질을 가지며 시료 매질 중에서는 발견되지 않는 유기화합물로, 분석방법의 신뢰성을 알아보기 위해 시료 처리 시 추출이나 정제단계에 첨가하여 사용한다.

2.4.3 실린지 첨가용 내부표준물질

실린지 첨가용 내부표준물질은 분석하고자 하는 물질과 유사한 화학적 구조나 화학적 성질을 가지며 시료 매질 중에서는 발견되지 않는 유기화합물로, 분석방법의 재현성 및 정확성을 알아보기 위해 시료전처리 후 기기분석 이전에 첨가하여 사용한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 추출장치

3.1.1 속슬레 추출장치

속슬레 추출장치 (soxhlet extraction device)는 유리재 여과조 (thimble), 냉각장치, 추출 플라스크 및 가열장치 등으로 구성되어야 한다.

3.1.2 액체-액체 추출장치

액체-액체 추출장치 (liquid-liquid extraction device)는 수직 진탕기와 분별깔때기로 이루어져 있으며, 수직 진탕기는 여러 개의 분별깔때기를 한꺼번에 수직으로 진탕할 수 있는 것으로 진탕속도 및 시간 조절이 가능한 것을 사용한다.

3.1.3 고체상 추출장치

고체상 추출장치 (SPE, solid phase extraction)는 진공장치, 진공펌프, 시험관 등으로 구성되어야 한다. 진공장치는 진공과 유속을 조절할 수 있는 것을 사용하며, 진공펌프는 진공을 조정 및 확인할 수 있는 것을 사용한다. 고정상으로 사용되는 고체상 흡착제는 분자 간 상호작용에 따라 극성, 비극성, 이온성 등으로 구분되며 주로 주사기형 카트리지 또는 평면형 디스크로 실용화되어 있으며, 각 시험기준에 명시되어 있는 것을 사용한다.

3.2 농축장치

3.2.1 회전증발 농축기

회전증발 농축기는 증류플라스크, 농축수기, 물중탕기 ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이내로 조절 가능한 것), 냉각장치 등으로 구성되어야 한다. 농축하고자 하는 용매의 특성 (끓는점)을 고려하여 물중탕기의 온도를 설정한다. 농축하는 동안 냉각수 순환장치를 이용하여 냉각수를 흘려주며, 냉각수 순환장치가 없는 경우 수돗물을 계속해서 흘려보내준다. 시료의 농축에 앞서 농축기와 수기 연결부분은 아세톤 및 노말-헥세인으로 3 회 이상 세척하여 교차오염 등을 방지한다.

3.2.2 질소 농축기

질소 농축기는 질소가스가 연결될 수 있는 미세관과 폴리테트라플루오로에틸렌 (PTFE, polytetrafluoro ethylene)으로 코팅된 바늘, 기체의 유량조절이 가능한 유량계, 시료용기를 고정할 수 있는 장치로 구성되어야 한다. 시료의 농축에 앞서 농축기의 바늘부분은 아세톤 및 노말-헥세인으로 3 회 이상 세척하여 교차오염 등을 방지하고, 농축 시 질소가스의 빠른 유속에 의해 시료가 시료용기 외부로 유출되지 않게 항상 주의한다.

3.3 정제용 컬럼

3.3.1 활성 실리카겔 컬럼

0.063 mm ~ 0.200 mm (70 mesh ~ 230 mesh)의 실리카겔을 130 $^{\circ}\text{C}$ 에서 18 시간 이상 건조 후, 데시케이터 안에서 약 30 분간 방치하여 냉각한 후 바로 사용한다. 안지름 15 mm, 길이 300 mm의 정제용 컬럼의 하단에 유리섬유를 채운 후, 무수황산나트륨 2 g, 활성화된 실리카겔 5 g, 무수황산나트륨 2 g을 순차적으로 노말-헥세인과 함께 습식으로 충전하여 사용한다.

3.3.2 산성 실리카겔 (44 % H_2SO_4) 컬럼

활성 실리카겔 사용량의 무게비로 44 %가 되도록 황산을 첨가하여 혼합한 후, 바로 사용한다. 단, 바로 사용하지 않는 경우에는 밀폐 후 데시케이터에 보관하여 사용한다. 안지름 15 mm, 길이 300 mm의 정제용 컬럼의 하단에 유리섬유를 채운 후 무수황산나트륨 1 g, 산성 실리카겔 2 g, 무수황산나트륨 1 g을 순차적으로 노말-헥세인과 함

깨 습식으로 충전하여 사용한다.

3.3.3 염기성 실리카겔 (2 % KOH) 컬럼

활성 실리카겔 100 g에 대하여 50 g/L 수산화칼륨 용액 40 mL를 넣어 혼합 후, 50 °C에서 감압 농축, 건조 후, 바로 사용한다. 단, 바로 사용하지 않는 경우에는 밀폐 후 데시케이터에 보관하여 사용한다. 안지름 15 mm, 길이 300 mm의 정제용 컬럼의 하단에 유리섬유를 채운 후 무수황산나트륨 1 g, 염기성 실리카겔 2 g, 무수황산나트륨 1 g을 순차적으로 노말-헥세인과 함께 습식으로 충전하여 사용한다.

3.3.4 다층 실리카겔 컬럼

안지름 15 mm, 길이 300 mm의 정제용 컬럼의 하단에 유리섬유를 채운 후, 무수황산나트륨 2 g, 염기성 실리카겔 (2 % KOH) 1 g, 활성 실리카겔 3 g, 산성 실리카겔 (44 % H₂SO₄) 3 g, 활성 실리카겔 3 g, 무수황산나트륨 2 g을 순차적으로 노말-헥세인과 함께 습식으로 충전하여 사용한다.

3.4 카트리지

3.4.1 고체상 추출 카트리지

고체상 추출 카트리지는 폴리머 또는 코폴리머 재질의 카트리지 (Waters Oasis HLB, 200 mg/6 cc) 또는 이와 동등한 성능을 가진 카트리지[주 1]를 사용한다. 카트리지는 5 mL 다이클로로메테인, 5 mL 메탄올을 순차적으로 통과시켜 활성화시킨다.

[주 1] 고체상 추출 카트리지의 종류 및 규격, 활성 조건, 용출조건 등은 표준물질 등으로 분획 실험하여 정도관리 목표를 만족하는 경우 변경하여 사용할 수 있다.

3.5 분석용 저울

0.0001 g까지 정확하게 칭량할 수 있는 저울을 사용한다.

3.6 미량주사기

1 μL ~ 500 μL 용량의 미량주사기 (microsyringe)를 사용한다.

3.7 액체크로마토그래프/탠덤 질량분석기

3.7.1 액체크로마토그래프

일반적으로 5 μL ~ 10 μL 용량의 시료를 반복적으로 주입할 수 있어야 하며, 농도 기울기 조절이 가능하고 분석 유량 (0.4 mL/min)을 일정하게 유지할 수 있는 이성분 (binary) 펌프가 있는 시스템이 요구된다. 액체크로마토그래프 시스템은 오염의 원인이 될 수 있는 기포 제거장치 (degasser)가 없어도 용매를 일정하게 조절할 수 있어야 한다.

3.7.2 권장 컬럼

적절한 분해능, 피크 모양, 정확도 및 정밀도를 가지는 역상 C_{18} 액체크로마토그래프 컬럼 (2.1 mm, $\times$ 100 mm, 1.7 μm 또는 동급 이상)을 사용한다.

3.7.3 탠덤 질량분석기

탠덤 질량분석기 (MS/MS, tandem mass spectrometer)는 액체크로마토그래프(LC)에서 사용하는 유량에서 음이온 전자 분무 이온화 (ESI, electrospray ionization)가 가능한 장비이어야 한다. 적절한 정밀도를 유지하기 위해서 크로마토그램 상의 피크당 10 번 이상의 스캔을 할 수 있어야 한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 정제수 : 노말-헥세인으로 세정한 증류수를 사용한다.

4.1.2 아세톤 (acetone, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, 분자량 : 58.08) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.3 노말-헥세인 (n-hexane, C_6H_{14} , 분자량 : 86.17) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.4 다이클로로메테인 (dichloromethane, CH_2Cl_2 , 분자량 : 84.9) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.5 에틸아세테이트 (ethyl acetate, $C_4H_8O_2$, 분자량 : 88.11) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.6 메탄올 (methanol, CH_3OH , 분자량 : 32.04) : 고순도를 사용하여야 하며, 사용하기 전에 방해물질이 없음을 확인하여야 한다.

4.1.7 아세토니트릴 (acetonitrile, C_2H_3N , 분자량 : 41.05) : 고순도를 사용하여야 하며, 사용하기 전에 방해물질이 없음을 확인하여야 한다.

4.1.8 암모늄아세테이트 (Ammonium acetate, $C_2H_7NO_2$, 분자량 : 77.08) : 고순도를 사용하여야 하며, 사용하기 전에 방해물질이 없음을 확인하여야 한다.

4.1.9 황산 (sulfuric acid, H_2SO_4 , 분자량 : 98.1) : 유해중금속 분석급 이상을 사용한다.

4.1.10 무수황산나트륨 (sodium sulfate anhydrous, Na_2SO_4 , 분자량 : 142.04) : 유해중금속 분석급 이상을 사용한다.

4.2 표준용액

4.2.1 표준용액 및 혼합표준용액

표준물질은 분석물질이 함유된 순수한 물질로써, 표준원액 또는 표준용액은 용매에 녹아 고농도로 제조된 것을 구입하여 사용한다. 분석대상물질이 모두 혼합되어 있는 혼합표준용액을 구입하여 사용하거나, 개별항목의 표준용액을 혼합하여 사용한다.

4.2.2 내부표준용액 및 혼합내부표준용액

정제용 내부표준물질은 ^{13}C 로 치환된 HBCD ($^{13}\text{C}_{12}$ - α -HBCD, $^{13}\text{C}_{12}$ - β -HBCD, $^{13}\text{C}_{12}$ - γ -HBCD) 내부표준용액을 사용한다. 주로 50 mg/mL의 개별항목의 용액상태 앰플로 구입되어 냉동보관하며, 사용 직전 개봉한다.

실린지 첨가용 내부표준물질은 중수소 D로 치환된 HBCD (D_{18} - α -HBCD, D_{18} - β -HBCD, D_{18} - γ -HBCD) 내부표준용액을 사용한다. 주로 50 mg/mL의 개별항목의 용액상태 앰플로 구입되어 냉동보관하며, 사용 직전 개봉한다.

정제용 및 실린지 첨가용 내부표준물질은 실험 직전에 작업 농도범위에 맞게 용매로 혼합·희석하여 필요한 양의 혼합내부표준용액을 만들어 사용한다.

4.2.3 검정곡선 표준용액

검정곡선 표준용액은 분석물질에 대한 기기의 감응도 평가를 위하여 변질과 오염이 없는 표준용액 및 내부표준용액을 혼합 및 희석하여 농도별로 제조하며, 분석대상물질에 대한 기기의 감응도 평가를 위한 검정곡선 작성에 이용한다.

상대검정곡선법 (또는 내부표준법, internal standard method)에 의한 검정곡선 표준용액 (calibration standard solution)은 농도별로 조제한 혼합표준용액에 혼합내부표준용액이 일정 농도가 되도록 혼합한 용액으로 5 개 이상의 농도 (CS1 ~ CS5)로 조제한 다.

5.0 시료채취 및 관리

ES 10100.a 환경대기의 시료채취 및 보존 방법에 따른다.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 방법검출한계 및 정량한계 확인

방법검출한계 및 정량한계는 ES 10001.a 정도보증/정도관리에 따라 측정한다. 측정된 방법검출한계는 시험기준에서 제시한 값 이하이어야 한다.

6.2 방법바탕시료의 측정

대기시료채취 재료인 석영섬유여과지, 폴리우레탄폼, 활성탄 수지펠트를 세정하여 대기시료 분석용 바탕시료로 사용한다. 방법바탕시료는 실제시료와 동일한 방법으로 전처리·분석되어야 하며 측정값은 방법검출한계 이하이어야 한다. 시료군마다 1 개의 방법바탕시료를 측정한다.

6.3 정확도 및 정밀도 확인

6.3.1 정확도 및 정밀도는 ES 10001.a 정도보증/정도관리에 따라 측정한다. 정확도는 인증표준물질을 4 회 이상 분석하거나 또는 바탕시료에 표준물질을 첨가한 4 개 이상의 첨가시료를 분석하여 첨가된 양에 대한 측정값들의 평균 %회수율로부터 도출하며, 정밀도는 그 측정평균값과 표준편차로부터 계산된 상대표준편차로부터 산출한다.

6.4 검정곡선의 검증

6.4.1 검정곡선은 정량범위 내 5 개의 농도 (CS1 ~ CS5)로 시료군마다 작성하고, 결정계수 또는 식 (1)에 따라 상대감응계수 (RRF, relative response factor)를 구한다.

$$\text{상대감응계수 (RRF)} = \frac{A_n \times C_{IS}}{A_{IS} \times C_n} \quad (\text{식 1})$$

여기서, A_n : 표준물질의 피크 면적[주 2]

A_{IS} : 표준물질에 첨가된 정제용 내부표준물질[주 3]의 피크 면적

C_{IS} : 표준물질에 첨가된 정제용 내부표준물질의 농도

C_n : 표준물질의 농도

[주 2] 크로마토그램의 피크 높이 등을 사용할 수도 있다.

[주 3] 정제용 내부표준물질을 사용하지 않을 경우 실린지 첨가용 내부표준물질 혹은 시료채취용 내부표준물질을 적용하여 계산한다.

6.4.2 얻어진 검정곡선의 결정계수 (R^2)가 0.99 이상 또는 상대감응계수의 표준편차가 20 % 이하이어야 하며, 검정곡선 각 농도의 정확도는 ± 20 (80 ~ 120 %) 이내에 있어야 한다. 허용범위를 벗어나면 재작성 하도록 한다.

6.4.3 검정곡선의 직선성을 검증하기 위하여 분석 종료 후, 검정곡선의 중간농도 (CS3)에 해당하는 표준용액을 비교 측정한다. 선택한 표준용액의 측정값은 검정곡선 작성 시 해당 값과 20 % 이내에서 일치하여야 한다. 만약 이 범위를 넘는 경우, 검정곡선을 재작성하여 분석해야 한다.

6.5 실험실 내부정도관리

잔류성유기오염물질을 시험·검사하는 실험실에서는 방법검출한계, 정밀도 및 정확도를 연 1 회 이상 실시하는 것을 원칙으로 하며, 분석 장비의 주요부품 수리·교체, 분석자 변경 등 내부정도관리가 필요한 경우 수시로 실시하고 그 결과를 정도관리기록부에 보관하여야 한다.

7.0 분석절차

7.1 추출

7.1.1 흡착제 (PUF, 흡착 수지 또는 ACF)와 석영섬유 여과지를 함께 유리재 여과조에 삽입하고 회수율을 확인하기 위하여 정제용 내부표준물질[주 4] 일정량을 주입 후 다이클로로메테인[주 5] 500 mL로 24 시간 속슬레 추출한다. 이때 내부표준물질의 첨가조작은 실험자의 안전을 위하여 글러브박스 (glove box) 안에서 하는 것을 원칙으로 한다.

[주 4] 시험과정의 단계별 회수율을 확인하기 위해 정제용 내부표준물질은 추출단계 또는 정제단계에서 추가할 수 있다.

[주 5] 추출 용매로 노말-헥세인을 사용할 수 있다.

7.1.2 시료로부터 추출된 용액은 무수황산나트륨으로 탈수하고 회전증발 농축기를 이용하여 1 mL 정도로 농축한다.

7.1.3 추출된 시료는 노말-헥세인 2 mL로 용매를 전환하여 5 mL ~ 15 mL 시험관에 옮기고, 질소 농축기로 약 1 mL가 되게 농축한다.

7.2 정제

정제방법은 7.2.1 또는 7.2.2 중 적당한 방법을 사용한다.

7.2.1 다층실리카겔 컬럼 정제

7.2.1.1 용매로 세정한 안지름 15 mm, 길이 300 mm의 정제용 컬럼에 무수황산나트륨 2 g, 염기성 실리카겔 1 g, 활성 실리카겔 3 g, 산성 실리카겔 3 g, 활성 실리카겔 3 g, 무수황산나트륨 2 g을 순차적으로 충전한다. 이때 충전 부분이 다소 변색된 경우는 사용하지 않는다.

7.2.1.2 농축된 시료를 컬럼 기벽에 묻지 않고, 상단의 무수황산나트륨이 흩어지지 않도록 조심스럽게 주입한 후, 50 % 다이클로로메테인 함유 노말-헥세인 200 mL[주 6]로 매초 1방울 속도로 용출시킨다. 이때 충전 부분이 많이 착색되었을 경우는 다시 정제한다.

[주 6] 정제과정에서 사용하는 용매의 종류 및 양은 표준물질 등으로 분획 실험하여 미리 정한 것으로 한다.

7.2.1.3 용출액을 회전증발 농축기로 약 1 mL까지 농축한 다음 질소농축기를 이용하여 100 μ L 이하로 농축한다. 메탄올을 넣어 용매를 전환시킨 후, 실린지 첨가용 내부표준물질을 첨가하여 최종부피가 1 mL가 되도록 한 뒤 0.2 μ m 필터로 여과하여 기기분석을 위한 시험용액으로 사용한다.

7.2.2 고체상 추출 카트리지 정제

7.2.2.1 카트리지의 정제 및 활성화를 위해 카트리지를 다이클로로메탄 5 mL, 메탄올 5 mL, 정제수 10 mL를 차례로 통과시켜 컨디셔닝을 한다.

7.2.2.2 고체상 추출 카트리지를 사용할 경우, 7.1.1.1 ~ 7.1.1.2의 추출 과정을 거친 시료를 메탄올을 넣어 용매를 전환하고, 정제수를 첨가하여 10 % 메탄올 함유 용액으로 만든다. 이 용액을 활성화된 카트리지 벽면에 묻지 않도록 주의하여 부하 (loading)하여 분당 3 mL ~ 10 mL의 속도로 카트리지에 포집한다.

7.2.2.3 시료가 부하된 카트리지 내의 불순물 제거를 위하여 5 mL의 정제수를 통과시킨 후 40 % 메탄올 용액 10 mL를 추가적으로 통과시킨다.

7.2.2.4 카트리지 내의 수분을 완전히 제거하기 위해 10분간 진공상태를 유지시킨다.

7.2.2.5 카트리지 아래 추출용액을 담은 15 mL 원심분리관을 넣고 카트리지에 에틸아세테이트 10 mL를 부하하여 분석대상물질을 용출시킨다.

7.2.2.6 용출액은 실온에서 질소농축기를 이용하여 농축한 후 메탄올을 넣어 용매를 전환시킨다. 실린지 첨가용 내부표준물질을 첨가하고 최종 부피가 1 mL가 되도록 농축한 후, 0.2 μ m 필터로 여과하여 기기분석을 위한 시험용액으로 사용한다.

7.3 기기분석

기기분석은 액체크로마토그래프/탠덤 질량분석기의 전자 분무 이온화 방식 (ESI)을 사용하며, 각 분석대상물질별로 모분자 이온 (Q1, precursor ion)과 생성 이온 (Q3, product ion)을 결정하고 적절한 질량분석조건을 확립한 후 다중반응 모니터링 (MRM, multiple reaction monitoring) 방법으로 분석한다. 정량 이온의 머무름 시간과 면적 비를 검사하여 각 물질들을 확인한 후 상대검정곡선법으로 정량한다.

7.3.1 액체크로마토그래프 분석조건

7.3.1.1 화합물의 분리가 잘되고 감도가 최적화되도록 액체크로마토그래프 분석조건을 결정하고, 최적의 조건을 사용하여 분석에 사용하는 모든 시료 (표준용액, 바탕시료, 실

제시료)에 대해 동일하게 적용해서 사용한다.

7.3.1.2 이동상[주 7]은 개별 HBCD 이성질체의 분리에 적절하도록 선택한다. 이동상 A는 10 mM 암모늄아세테이트가 포함된 증류수, 이동상 B는 아세토니트릴과 메탄올이 부피비로 3 : 7로 혼합된 용매를 이용하여 분리하고 방해물질과 분석대상물질의 피크가 최대한 겹치지 않는 기울기 용리법 (gradient elution method)을 이용한다. 또한 이동상의 유량은 컬럼의 분리효율이 최대가 되는 0.4 mL/min으로 하고 시료 주입량은 5 μ L로 한다.

[주 7] 이동상 조건은 기기 제조사와 분석 조건에 따라 이성질체의 분리에 적절하도록 변경하여 사용할 수 있다.

7.3.2 질량분석기 분석조건

각 물질의 질량분석기 조건을 최적화하기 위하여 미량주사기를 이용하여 메탄올에 표준물질이 1 μ g/mL로 들어 있는 용액을 5 μ L/min의 유속으로 주입 (infusion)하는 방법을 이용한다. Manual tuning mode에서 분석대상물질의 m/z [M-H]에 해당하는 피크를 확인한 후, 정량분석을 위한 최적화 과정을 수행하여 모분자 이온 (Q1, precursor ion) 및 생성 이온 (Q3, product ion)을 확인하고 분석대상 물질별 DP (declustering potential, V), EP (entrance potential, V), CE (collision energy, eV), CXP (collision cell exit potential) 등을 확정한다.

7.3.3 검정곡선 작성

7.3.3.1 상대검정곡선법을 이용한 검정곡선의 작성을 위해 시료와 동일한 양의 내부표준물질이 첨가된 검정곡선 작성용 표준용액을 제조한다. 내부표준물질의 농도는 분석대상 성분의 피크 면적 (또는 피크 높이)과 비슷한 수준이 되도록 한다.

7.3.3.2 시료와 검정곡선 작성용 표준용액에 대해 분석대상물질과 내부표준물질의 피크 면적 (또는 피크 높이)을 각각 구한다.

7.3.3.3 표준용액의 분석대상물질 농도 (C_n)와 내부표준물질 농도 (C_{IS})의 비를 가로축 (x 축)에, 표준용액의 분석대상물질 피크 면적 (A_n)과 내부표준물질 피크면적 (A_{IS})의 비

(A_n/A_{IS})를 세로축 (y 축)에 취하여 그림 1과 같이 검정곡선을 작성한다.

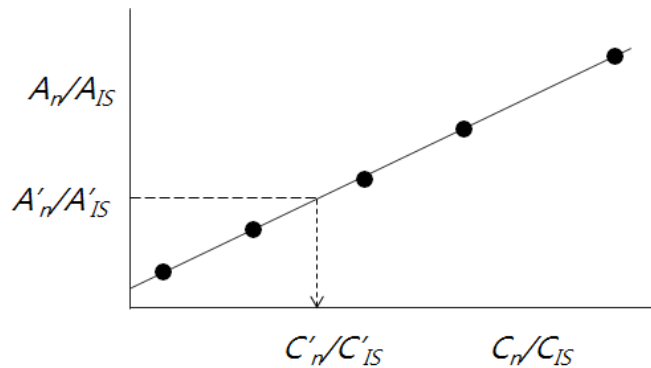


그림 1. 상대검정곡선법에 의한 검정곡선 작성

7.4 시료분석

7.4.1 7.2.1과 7.2.2의 방법에 따라 분석기기의 조건을 설정한다.

7.4.2 바탕시료에 표준물질을 첨가하여 7.1과 7.2에 따라 수행한 추출 및 정제 효율성 실험을 통해 얻어진 각 시료 매질별 최적 전처리 조건에 따라 실제시료를 처리한다. 이때 각 시료에 내부표준물질을 일정 농도로 첨가하고, 바탕시료와 동일한 실험과정을 통해 처리된 시료를 액체크로마토그래프에 주입한다.

7.5 시료 분석결과

7.5.1 정성분석

7.5.1.1 정성분석을 위해 각 분석대상물질별로 결정된 정량 이온 ($Q1 \rightarrow Q3$)이 표준용액의 피크 머무름 시간에서 나타나야 한다. 다중으로 선정된 생성 이온 ($Q3$) 중 분석대상 물질에 대한 방해물질이 적고, 감도가 큰 이온을 정량 이온으로 선정하고 다른 이온을 확인 이온으로 선정하여 두 이온의 피크 면적비가 표준물질에서 나타난 값과 유사할 경우 분석대상물질로 확정할 수 있다. 방해물질이 적은 일반적인 시료 분석에서는 문제가 되지 않으나 생체시료와 같이 다양한 방해물질이 존재할 경우에는 개별 크로마토그램을 확인한 후 정량하여야 한다.

7.5.1.2 시료 추출물에서 각 분석물질들을 검출하기 위해서 크로마토그램 피크에 대한 신호 대 잡음 비 (S/N, signal/noise ratio)는 2.5 보다 커야한다.

7.5.2 정량분석

7.5.2.1 상대검정곡선법에 의한 정량은 시료를 분석하여 얻은 분석대상물질 피크면적 (A'_n)과 내부표준물질 피크면적 (A'_{IS})의 비 (A'_n/A'_{IS})를 구한 후, 검정곡선에 대입하여 분석대상물질 농도 (C'_n)와 내부표준물질 농도 (C'_{IS})와의 비 (C'_n/C'_{IS})를 구한다.

7.5.2.2 분석대상물질 농도 (C'_n)와 내부표준물질 농도 (C'_{IS})와의 비 (C'_n/C'_{IS})에 첨가한 내부표준물질 농도 (C'_{IS})를 곱하여 상대검정곡선법에 의한 시료 중의 분석대상물질 농도 (C'_n)을 구한다.

7.5.2.3 상대검정곡선법에 의한 시료 중의 분석대상물질 농도 (C'_n), 최종 시료의 부피 및 시료량 등으로부터 시료 중의 분석대상물질의 농도 (C)를 산출한다.

$$C = \frac{C'_n \times V_F}{1000 \times V} \quad (\text{식 2})$$

여기서, C : 시료 중 분석대상물질의 농도 (pg/Sm³)

C'_n : 내부표준법에 의한 분석대상물질의 농도 (ng/mL)

V_F : 최종 시료의 부피 (mL)

V : 시료량 (Sm³)

7.5.2.4 만약 시료 중 분석대상물질의 농도가 검정곡선의 정량 범위를 넘어갈 경우, 시료를 희석하여 정량 범위 내에 들어오도록 다시 분석해야 한다. 또한 내부표준물질의 피크 면적이 시료군 평균보다 50 % 이상 차이를 보이면 다시 분석해야 한다.

7.5.2.5 검출된 모든 피크의 적분은 모분자 이온 (precursor ion)과 생성 이온 (product ion), 머무름 시간 (RT) 및 다양한 적분을 위한 변수를 포함하는 하나의 정량방법에 의해 정량하는 것이 이상적이다. 하지만, 방해물질의 존재로 피크 모양에서 뒤틀림 등이 나타나면 정해진 변수에 의해 제대로 적분되지 않을 수 있다. 피크 모양 자체가 방해물질과 섞여서 구별할 수 없을 때에는 재분석 하고 정성분석에서 명확한 피크가 적분되지 않

왔을 때에는 수동으로 적분한다.

7.5.3 내부표준물질의 회수율

7.5.3.1 내부표준물질의 회수율은 정제용 내부표준물질의 정량 이온과 실린지 첨가용 내부표준물질의 정량 이온의 비로부터 구한다.

7.5.3.2 검정곡선 자료를 이용하여 정제용 내부표준물질의 평균 상대감응계수 ($RRF_{IS-avg.}$)를 식 (3)과 같이 계산한다.

$$RRF_{IS} = \frac{A_{IS}}{A_{RS}} \times \frac{C_{RS}}{C_{IS}}, \quad RRF_{IS-avg} = \frac{\sum_{i=1}^n}{n} \quad (\text{식 3})$$

여기서, A_{IS} : 검정곡선 표준용액에 첨가된 정제용 내부표준물질의
정량 이온 피크 면적

A_{RS} : 검정곡선 표준용액에 첨가된 실린지 첨가용 내부표준물질의
정량 이온 피크 면적

C_{IS} : 검정곡선 표준용액에 첨가된 정제용 내부표준물질의 농도

C_{RS} : 검정곡선 표준용액에 첨가된 실린지 첨가용 내부표준물질의 농도

7.5.3.3 계산된 $RRF_{IS-avg.}$ 값과 시료분석 자료를 이용하여 식 (4)과 같이 내부표준물질의 회수율을 계산한다.

$$\text{회수율}(\%) = \frac{A'_{IS}}{A'_{RS}} \times \frac{1}{RRF_{IS-ave.}} \times \frac{C'_{RS}}{C'_{IS}} \times 100 \quad (\text{식 4})$$

여기서, A'_{IS} : 시료에 첨가된 정제용 내부표준물질의 정량 이온 피크 면적

A'_{RS} : 시료에 첨가된 실린지 첨가용 내부표준물질의 정량 이온 피크 면적

C'_{IS} : 시료에 첨가된 정제용 내부표준물질의 농도

C'_{RS} : 시료에 첨가된 실린지 첨가용 내부표준물질의 농도

$RRF_{IS-avg.}$: 검정곡선의 정제용 내부표준물질 평균 상대감응계수

7.5.3.4 내부표준물질에 대한 회수율은 50 % ~ 130 %의 범위를 만족하여야 하며,

시료 분석결과에 대한 신뢰성 검토를 위해 시료 분석결과와 함께 제시한다.

8.0 결과보고

8.1 분석결과 보고

시료의 측정·분석 후, 결과 보고 시에는 다음과 같은 목록을 보고하여야 한다.

8.1.1 시료채취 관련자료

시료목록, 시료번호, 시료채취 일자 및 기상사항, 시료채취 장소, 시료채취 유량, 시료 채취 방법, 시료채취량, 시료채취 과정, 시료보관 방법 등을 보고한다.

8.1.2 분석방법 자료

분석일자, 시료량, 추출과정, 정제과정, 농축과정, 농축량, 분석기기 및 조건, 사용한 표준물질 등에 대한 자료를 보고한다.

8.1.3 분석결과 자료

8.1.3.1 검정곡선 작성, 표준물질 및 방법바탕시료의 크로마토그램을 분석시료의 크로마토그램과 함께 보고한다.

8.1.3.2 방법검출한계, 정량한계 및 산출근거를 보고한다.

8.1.3.3 분석결과 농도 및 내부표준물질의 회수율을 보고한다.

8.2 결과보고 양식

8.2.1 시료 분석결과는 표준상태 (0 °C, 1 기압)에서의 pg/Sm³으로 표기한다.

8.2.2 분석결과는 각 이성질체별 결과와 총합을 함께 제시하되, 모든 결과에 대한 수치

의 표시 자릿수는 소수 셋째자리로 한다. 단, 표시자릿수 이하 다음 자리의 수치가 5 이상이면 끊어 올리고, 5 미만이면 끊어버린다.

8.2.3 모든 농도결과는 방법검출한계를 적용하여 나타내고 방법검출한계 미만은 N.D.로 표시하고 방법검출한계 값을 같이 제시한다.

8.2.4 결과보고 양식은 부록에 제시한 양식에 따른다.

9.0 참고문헌

9.1 KS M 1072, 2016, 『고분자 물질 중의 브롬계 난연제 정량 방법』

9.2 KS M 1084, 2019, 『고분자 중의 특정 유해물질 (HBCD, PBBs/PBDEs, Phthalates) 동시분석방법』

9.3 US EPA Method 537.1, 2018, 『Determination of selected Per- and Polyfluorinated alkyl substances in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS)』,

10.0 부록

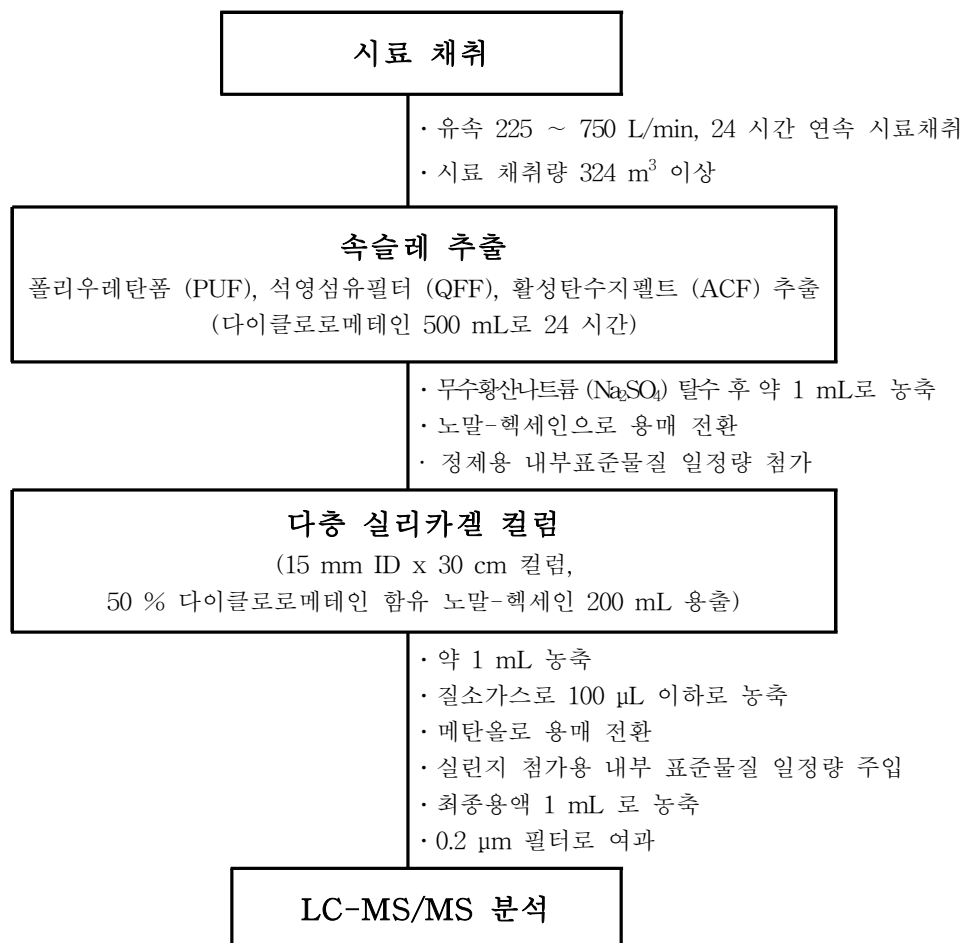


그림 2. 환경대기 시료 중 헥사브로모사이클로도데칸 전처리 흐름도
(다층 실리카겔 컬럼 정제방법)

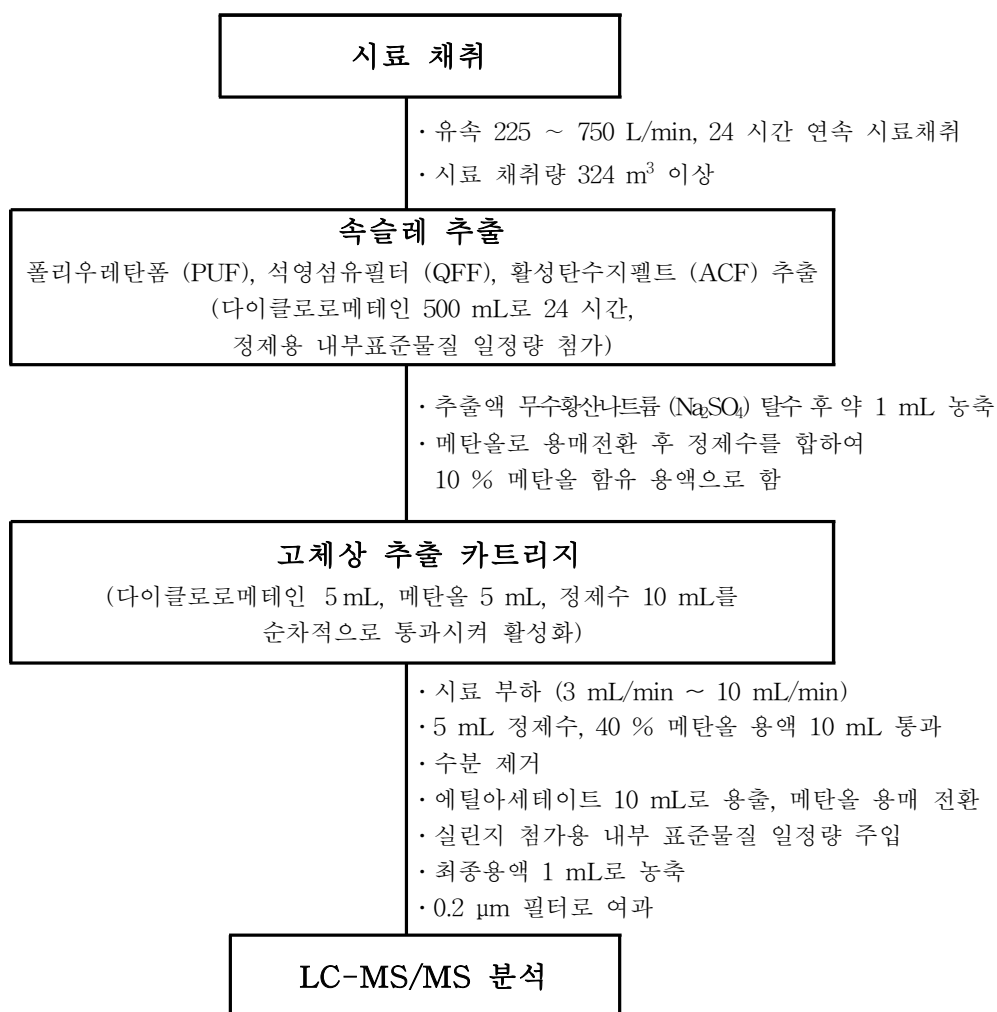


그림 3. 환경대기 시료 중 헥사브로모사이클로도데칸 전처리 흐름도
(고체상 추출 카트리지 정제방법)

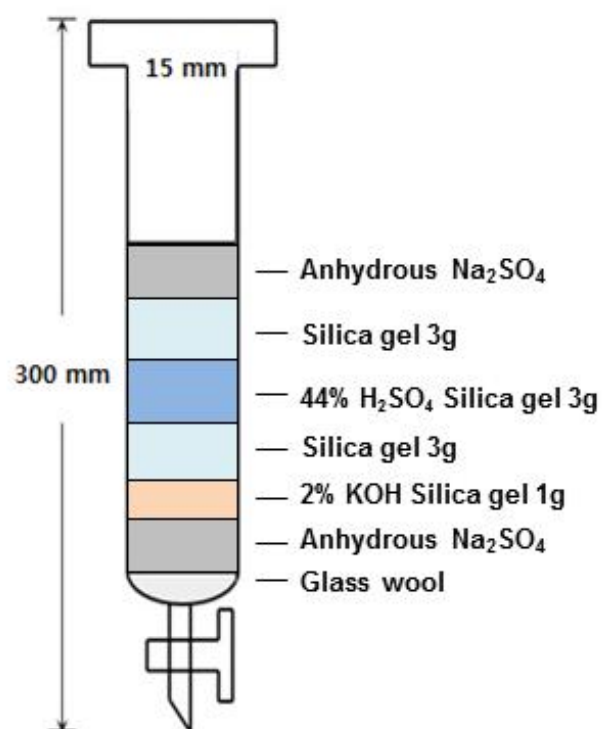


그림 4. 다층 실리카겔 정제용 컬럼 장치

표 1. 헥사브로모사이클로도데칸 (HBCDs) 분석을 위한 표준물질

분 류	분석물질	보정용 내부표준물질 (IS#)
표준물질	α -HBCD	IS#1
	β -HBCD	IS#2
	γ -HBCD	IS#3
정제용 내부표준물질	$^{13}\text{C}_{12}$ - α -HBCD - IS#1	IS#4
	$^{13}\text{C}_{12}$ - β -HBCD - IS#2	IS#5
	$^{13}\text{C}_{12}$ - γ -HBCD - IS#3	IS#6
실린지 첨가용 내부표준물질	d_{18} - α -HBCD - IS#4	-
	d_{18} - β -HBCD - IS#5	-
	d_{18} - γ -HBCD - IS#6	-

표 2. 헥사브로모사이클로도데칸 분석을 위한 검정곡선 표준용액 (예)

	(Unit : ng/mL)				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
α -HBCD	1	5	10	50	100
β -HBCD	1	5	10	50	100
γ -HBCD	1	5	10	50	100
$^{13}\text{C}_{12}$ - α -HBCD	10	10	10	10	10
$^{13}\text{C}_{12}$ - β -HBCD	10	10	10	10	10
$^{13}\text{C}_{12}$ - γ -HBCD	10	10	10	10	10
d_{18} - α -HBCD	10	10	10	10	10
d_{18} - β -HBCD	10	10	10	10	10
d_{18} - γ -HBCD	10	10	10	10	10

표 3. 헥사브로모사이클로도데칸 분석을 위한 액체크로마토그래프/탠덤 질량분석기의 기기분석조건 (예)

기기분석조건			
컬럼	Waters Acquity BEH C ₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)		
컬럼 오븐 온도	40 °C		
시료 주입량	5 μL		
이동상	(A) MeOH/ACN (7:3, v/v) (B) 10 mM ammonium acetate		
이동상 유속	0.4 mL/min		
이동상 기울기 비율	Time (min)	A (%)	B (%)
	Initial	5	95
	6	80	20
	13	100	0
	15	100	0
	17	5	95
	20	5	95
이온화 방식	전자 분무 이온화 방식 (ESI-)		
검출 방식	다중반응 모니터링 방식 (MRM)		
Spray gas	N ₂ (7 bar)		
가스 유속	800 L/hr		
가스 온도	350 °C		

표 4. 헥사브로모사이클로도데칸 분석을 위한 탠덤 질량분석기 조건

Compound	Q1 Precursor ion (m/z)	Q3 Product ion ¹ (m/z)	Cone voltage (V)	Collision Energy (eV)
α -HBCD	640.7	<u>79</u> , 81	25	15
β -HBCD	640.7	<u>79</u> , 81		
γ -HBCD	640.7	<u>79</u> , 81		
¹³ C ₁₂ - α -HBCD	652.8	<u>79</u> , 81		
¹³ C ₁₂ - β -HBCD	652.8	<u>79</u> , 81		
¹³ C ₁₂ - γ -HBCD	652.8	<u>79</u> , 81		
d ₁₈ - α -HBCD	657.8	<u>79</u> , 81		
d ₁₈ - β -HBCD	657.8	<u>79</u> , 81		
d ₁₈ - γ -HBCD	657.8	<u>79</u> , 81		

1: 밑줄 표시되어 있는 이온은 정량 이온이며, 그 외는 정성 이온으로 사용된다. 각 생성 이온 (product ion)에 대한 탠덤 질량분석기의 기기분석조건은 사용기기의 최적 값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이온 외의 생성 이온도 정량 이온 또는 정성 이온으로 적용이 가능하다.

표 5. 시료 채취결과보고 양식

항목	형식 및 단위
시료번호	
시료채취일자	년 월 일
기상사항	온도, 풍향 등
시료채취장소	000
시료채취방법	
시료채취유량	L/min
시료채취시간	h
시료채취량	m ³
시료보관방법	
기타 특이사항	

표 6. 시료 분석결과보고 양식

항목		형식 및 단위
시료 번호		
시료 분석일자		년 월 일
시료 조제방법		
시료 추출방법		
시료 채집		m ³
정제방법		
내부표준물질 사용량	시료채취용	ng
	정제용	ng
	실린지 첨가용	ng
기기분석조건	LC	
	MS/MS	
분석결과	회수율	%
	농도	실측농도 및 환산농도

< 붙임 >

1. 분석크로마토그램
2. 각 이성질체별 농도 및 회수율 결과 표(방법검출한계 등 산출근거 함께 제시)