

잔류성유기오염물질 공정시험기준

ES 10540.1

모유 시료 중 독사펜류

2017

시험기준-HRGC/LRMS-NCI

Official Method of Toxaphene in Milk-HRGC/LRMS-NCI

1.0 개요

1.1 목적

이 시험기준의 목적은 모유 시료 중 독사펜을 분석함에 있어, 시료채취, 추출, 정제 그리고 기기분석 등 제반 절차의 정확과 통일을 기하는데 있다.

1.2 적용범위

1.2.1 모유 시료 중 독사펜 3종(Parlar #26, #50, #62)을 기체크로마토그래프/음이온 화학이온화 질량분석계 (HRGC/LRMS-NCI, high resolution gas chromatograph/low resolution mass spectrometer-negative chemical ionization)로 분석하는 방법에 적용한다.

1.2.2 회수율은 70 % ~ 120 %의 범위를 만족하고, 분석방법검출한계는 Parlar #26과 #50은 0.5 ng/g 그리고 Parlar #62는 2.0 ng/g을 만족해야 한다.

1.3 간섭물질

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 1.3항에” 따른다.

2.0 용어정의

2.1 표준원액

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 2.1항에” 따른다.

2.2 표준용액

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 2.2항에” 따른다.

2.3 검정곡선 표준용액

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 2.3항에” 따른다.

2.4 내부표준물질

“모유 시료 중 유기염소계 농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 2.4항에” 따른다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 추출장치

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 3.1항에” 따른다.

3.2 농축장치

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 3.2항에” 따른다.

3.3 정제용 컬럼장치

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 3.3항에” 따른다.

3.4 분석용 저울

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 3.4항에” 따른다.

3.5 미량주사기

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 3.5항에” 따른다.

3.6 기체크로마토그래프/질량분석계

3.6.1 기체크로마토그래프

기체크로마토그래프 (GC, gas chromatograph)는 모세관 컬럼(capillary column)이 장착된 분할(split) 또는 비분할(splitless)과 컬럼 내(on-column) 주입 그리고 일정온도의 유지 및 설정 기능이 내재된 것을 사용하여야 한다.

3.7.2 모세관 컬럼

모든 대상물질이 적절하게 분리 가능한 모세관 컬럼 (capillary column)을 분석목적에 따라 선정하여 사용한다.

3.7.3 질량분석기

38 eV의 전자에너지를 이용하여 1초 미만의 스캔 싸이클 타임(scan cycle time)으로 35 amu ~ 500 amu까지 메스 스캐닝(mass scanning)이 가능한 음이온 화학이온화(negative chemical ionization)가 장착된 질량분석기를 사용한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 4.1항에” 따른다.

4.2 표준용액

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 4.2항에” 따른다.

5.0 시료채취 및 관리

ES 10105 생체시료의 시료채취 및 보존 방법에 따른다.

6.0 정정보증/정도관리(QA/QC)

6.1 방법검출한계 및 정량한계 확인

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

6.2 정밀도 및 정확도 확인

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 6.2항에” 따른다.

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 6.3항에” 따른다.

6.4 실험실 내부정도관리

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 6.5항에” 따른다.

7.0 분석절차

7.1 전처리

7.1.1 추출

7.1.2 시료준비

7.1.2.1 냉동 보관된 모유시료를 12시간 정도 냉장고에서 해동시키고 상온에서 모유시료를 교반시켜 균질화 시킨다.

7.1.2.2 저울에 미리 세척한 유리관을 놓고 무게를 측정하고, 피펫을 이용하여 모유 2 mL를 유리관에 옮겨 무게를 측정한다.

7.1.2.3 정제용 표준물질을 모유에 첨가하고, 유리관의 마개를 막아 15초 ~ 20초간 교반한 후, 15분간 방치하여 균일하게 한다. 다시 증류수 1 mL를 넣고 교반한다.

7.1.2.4 포름산 2 mL를 첨가하고, 교반하여 기체가 빠지도록 30분간 방치하는데, 포름산과 모유가 30분 이상 반응하게 되면 젤라틴과 같은 물질이 생성하여 C₁₈ 고체상 카트리지를 추출을 어렵게 만든다. 다시 증류수 1 mL를 넣고 교반하여 기체를 제거한다.

7.1.3 C₁₈, NH₂ 카트리지를 활성화

7.1.3.1 500 mg C₁₈ SPE 카트리지를 SPE 진공장치에 장착하고, SPE 진공장치 안에는 유리관을 설치한다.

7.1.3.2 메탄올 6 mL를 2회 처리한 다음, 증류수 6 mL를 2회 반복 처리하여 카트리지를 활성화시킨다. 이 과정에서 카트리지가 마르지 않도록 용매가 충전제 표면에 도달하기 전에 용매를 넣고, 증류수가 충전제 표면 위에 도달하면 카트리지를 밸브를 잠그고 진공을 끈다.

7.1.3.3 500 mg NH_2 SPE 카트리지를 SPE 진공장치에 장착 후 헥세인 6 mL를 2회 반복 처리하여 활성화 시킨다. 이 과정에서 카트리가 마르지 않도록 용매가 충전제 표면에 도달하기 전에 용매를 넣고, 헥세인이 충전제 표면 위에 도달하면 카트리지를 밸브를 잠그고 진공을 끈다.

7.1.4 C_{18} , NH_2 카트리지 추출

7.1.4.1 위 모유시료를 C_{18} 트리지에 옮기고, 증류수 1 mL로 모유를 담았던 유리관을 세척하여 카트리지에 옮긴다.

7.1.4.2 모유시료가 카트리를 완전히 통과하도록 하며, 이때 진공을 사용해서는 안 되고, 중력으로 통과하도록 한다.

7.1.4.3 증류수 1 mL로 다시 카트리를 세척한 후, 진공 (10 psi ~ 15 psi)을 켜고 60 분 정도 C_{18} 카트리를 건조시킨다.

7.1.4.4 SPE 진공장치에 아래부터 NH_2 SPE 카트리지, 무수황산나트륨 카트리지, C_{18} 카트리지 순서로 장착하여 진공장치에 설치하고 헥세인 16 mL(4 mL $\times$ 4회)를 카트리지에 흘려서 분석물질을 용출시킨다. 이때 진공은 5 psi 이하로 유지한다.

7.2 정제

7.2.1 실리카겔/플로리실 복합카트리지 정제

7.2.1.1 SPE 진공장치에 하단에 플로리실 카트리를 장착하고 상단에 실리카겔 카트리를 장착하여 복합 카트리지로 제작한다. SPE 진공장치 안에는 유리관을 설치한다.

7.2.1.2 복합 카트리지에 다이클로로메테인(1) : 헥세인(1) 혼합용매, 헥세인 순서로 용매를 흘려 활성화 시킨 후, C_{18} 카트리를 통과한 용출액 16 mL를 복합 카트리지에 넣

고, 최소의 진공을 사용하여 통과시킨다.

7.2.1.3 다이클로로메테인(1) : 헥세인(1) 혼합용매 12 mL(4 mL × 3회)를 통과시킨 용출액을 유리관에 합쳐서 모은다.

7.2.2 농축

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

7.2.2.2 농축액이 들어있는 소량용기를 지지대에 고정시키고 상온의 후드 안에서 자연 건조시키고, 시료가 완전히 건조되면 뚜껑을 닫고 분석 전까지 4 °C 이하에서 보관한다.

7.2.3 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/질량분석계의 전자이온화방식을 사용하며, 정성분석은 각 동족체의 2개 이온을 선택이온검출법 (SIM, selected ion monitoring)과 선택이온 머무름 시간으로 하고 정량분석은 그 선택이온의 면적비를 계산하여 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 적용한

다.

7.3.2 질량분석기 분석조건

7.3.2.1 질량설정

질량분석기는 선택이온검출법 (SIM, selected ion monitoring)으로 각 물질마다 2개의 이온(selected ion), 즉 분자질량(M^+) 이온 및 감도가 높은 질량($(M+2)^+$ 또는 $(M+4)^+$) 이온의 질량을 선택하여 모니터한다.

7.3.2.2 머무름 시간 확인 및 선택이온검출 그룹 조건 확립

분석하고자 하는 목적에 따라 검정곡선을 작성하며, 표준물질이나 시료를 분석하여 각 대상물질의 머무름 시간을 확인한 다음 이를 토대로 선택이온검출법에 사용할 그룹의 수와 각 선택한 이온의 검출시간 등을 설정한다.

7.3.2.3 질량 검정

질량분석기의 질량 검정은 주로 PFTBA(perfluorotributylamine)를 사용하며 사용하는 기종에 따라 기준되는 값을 만족하여야한다.(예, m/z 69 (100 %), m/z 219 (>50 %), m/z 502 (>3 %) 등)

7.3.2.4 검정곡선 작성

특사펜 혼합표준용액(1 mg/L) 5 μ L ~ 100 μ L를 첨가하여 각 시료 매질에서의 검정 곡선 농도를 0.5 μ g/kg ~ 10 μ g/kg가 되도록 하며 추출과 정제과정을 통해 전처리한 후 기체크로마토그래피/질량분석기로 분석하여 검정곡선을 작성한다(검정곡선은 최소 5점 이상의 농도를 선택하도록 한다).

정제용 내부표준물질과 미량주사기 내부표준물질은 각 시료 매질에서의 농도가 2.5 μ g/kg이 되도록 모두 1 mg/L 표준용액 10 μ L를 첨가한다.

시료 분석시 매번 검량작성용 표준액을 사용하여 검정곡선을 작성해야 한다. 각 성분과 내부표준물질과의 피크 면적의 비로부터 표준물질의 검정곡선을 작성하고 시료를

정량한다. 검정곡선을 이용하는 경우에는 표준물의 농도에 대한 기기의 감도정도의 선형회귀 분석으로 얻어질 수 있다. 이때 기기감도 정도는 의존변수인 y 를 사용하고 독립변수 x 로는 농도를 사용한다. 이 회귀 분석은 기울기와 절편으로 된 선형식을 사용한다.

$$y = ax + b \quad (\text{식 1})$$

여기서, y = 기기감도(피크의 면적이나 높이)

a = 기울기

x = 교정용 표준물질의 농도

b = 절편

이 선형회귀방법을 사용할 때 교정용 표준물질의 농도보다 낮은 농도로 검출된 시료에서는 사용할 수 없다. 회귀 계산은 검량 결과가 선형에 얼마나 적합한지를 판단하는 결정계수(R^2)를 구해야 한다. 이 값이 1이라면 선형과 결과가 완벽하게 일치하는 것이고, 정량의 목적이라면 R^2 값이 0.99보다 커야 한다.

7.4 시료분석

7.4.1 7.3.1 항과 7.3.2 항의 방법에 따라 분석기기의 조건을 설정한다.

7.4.2 바탕시료에 표준물질을 첨가하여 7.1 항과 7.2 항에 따라 수행한 추출 효율성 실험을 통해 얻어진 각 시료 매질별 최적 전처리 조건에 따라 실제시료를 처리한다. 이때 각 시료에 내부표준물질을 일정 농도로 첨가하여 바탕시료와 동일한 실험과정을 통해 처리된 시료를 기체크로마토그래프에 주입한다.

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

7.5.1.3 검정곡선 방법을 사용해서 내부표준물질에 대한 추출물의 농도를 정량한다. 아래와 같이 앞 절에서 작성한 검정곡선식을 재배열할 수 있다.

$$\frac{A_s C_{is}}{A_{is}} = a C_s + b \quad (\text{식 2})$$

여기서, A_s = 교정용 표준물질로 사용한 분석물질의 피크 면적

A_{is} = 내부표준물질의 피크 면적

C_s = 교정용 표준물질로 사용한 분석물질의 농도

C_{is} = 내부표준물질의 농도

a = 직선의 기울기

b = 절편

내부표준물질을 사용하여 시료농도를 계산할 때, 유기염소계 농약들의 농도를 계산하기 위해 아래와 같이 회귀식을 다시 재배열해서 농도를 계산한다.

$$C_s = \frac{\left[\frac{A_s C_{is}}{A_{is}} - b \right]}{a} \quad (\text{식 3})$$

7.5.1.4 위에서 계산된 농도를 사용하여 다음 식으로부터 표지된 정제용 내부표준물질의 회수율을 계산한다.

$$\text{회수율 (\%)} = \frac{\text{계산된표준용액농도}}{\text{첨가한표준용액농도}} \times 100 \quad (\text{식 4})$$

7.5.1.5 만약 시료 중 대상물질의 농도가 검정곡선의 정량범위를 넘어갈 경우, 시료를 묽혀서 정량 범위 내에 들어오도록 농도를 조절해야한다. 이때 내부표준물질은 희석하여 농도를 조절한 시료에 첨가하여야 하며, 희석에 의한 대상물질의 농도와 검출한계 등은

조절되어야 한다.

8.0 결과보고

8.1 분석결과 보고

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 8.1항에” 따른다.

8.2 결과보고 양식

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 8.2항에” 따른다.

9.0 참고문헌

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 9.0항에” 따른다.

10.0 부록

표 1. 특사펜 표준물질

화합물명	농도(μg/mL)
B7-1450	5
Parlar #26	5
Parlar #50	5
Parlar #62	5

표 2. 특사펜 분석을 위한 기체크로마토그래프/질량분석계(NCI)의 기기조건(예)

기기분석 조건		
기체크로 마토그래 프	• 컬럼 • 운반기체 • 주입부 온도 • 주입 방식	Ultra-2 (Cross-linked 5 % Phenylmethylsilicon, 50 m x 0.2 mm I.D x 0.33 μ m, film thickness) He(99.9999 %) at 1.0mL/min 260 °C splitless(purge on at 0.5min)
	• 승온 조건	100 °C $\rightarrow$ (20 °C/min) $\rightarrow$ 300 °C (10min)
질량분석 기	• 이온원 온도 • 연결부 온도 • 이온화 방식 • 검출기 형식 • 검출 방식 • 반응 기체	150 °C 250 °C Negative Chemical ionization (NCI) Ion trap segment scan mode : 69 - 71, 340 - 348, 375 - 385, 408 - 415, 440 - 450 methane at 1.5 mL/min

표 3. 특사펜 분석을 위한 SIM 조건 (예)

특사펜 종류	선택이온 (m/z)
B7-1450	376.9 , 378.9 [M] ⁻
Parlar #26	342.9 , 344.9 [M-HCl-Cl] ⁻
Parlar #50	410.8 , 412.8 [M-Cl] ⁻
Parlar #62	376.8 , 378.8 [M-HCl-Cl] ⁻

주 해

“모유 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 주해에” 따른다.