

잔류성유기오염물질 공정시험기준

ES 10570.1

어류 시료 중 독사펜류

2017

시험기준-HRGC/LRMS-NCI

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

1.0 개요

1.1 목적

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

1.2 적용범위

1.1.1 어류 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.

1.1.2 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

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

2.0 용어정의

2.1 표준원액

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

2.2 표준용액

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

2.3 검정곡선 표준용액

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

2.4 내부표준물질

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

3.0 분석기기 및 기구

3.1 추출장치

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

3.2 농축장치

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

3.3 정제용 컬럼장치

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

3.4 분석용 저울

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

3.5 미량주사기

“어류 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 내제된 것을 사용하여야 한다.

3.6.2 모세관 컬럼

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

3.6.3 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

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

4.2 표준용액

“어류 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 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. 측정된 방법검출한계는 시험기준에 제시한 값 이하이어야 한다.

6.2 정밀도 및 정확도 확인

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

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

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

6.4 실험실 내부정도관리

“어류 시료 중 유기염소계농약류(OCPs) 동시 시험기준-HRGC/LRMS 6.5항에” 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 냉각 장치를 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 시료채취용 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 °C 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 행군 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 행군 후 이 행굼액을 넣는다. 이 과정을 두 차례 더 반복한 후 헥세인으로 무수황산나트륨이나 거름종이에 묻어 있는 노란색의 시료가 완전히 없어질 때까지 씻어 준다. 이때 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 행구어 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.

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

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

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. 시료량은 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 mL ~ 7 mL로 3회에 걸쳐 세척하여 컬럼에 첨가한다.

7.2.1.4 컬럼 코크를 열어 시료와 헥세인이 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 최소의 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 °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.

7.2.3.2 농축액이 들어있는 소량용기를 지지대에 고정시키고 상온의 후드 안에서 자연 건조 시키고, 시료가 완전히 건조되면 뚜껑을 닫고 분석 전까지 4 °C 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 μL 로 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 결정하고 이 최적의 조건을 사용하여 분석에 사용되는 모든 시료(표준용액, 바탕시료, 실제시료)에 대해 동일하게 사용한다.

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

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 만족하여야 한다.(예, m/z 69 (100 %), m/z 219 (>50 %), m/z 502 (>3 %) 등)

7.3.2.4 검정곡선 작성

유기염소계 농약류 혼합표준용액(1 mg/L) 5 µL ~ 100 µL를 첨가하여 각 시료 매질에서의 검정곡선 농도를 0.5 µg/kg ~ 10 µg/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 µg/kg이 되도록 모두 1 mg/L 표준용액 10 µL를 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 y를 사용하고 독립변수 x로는 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 7.3.1과 7.3.2절의 방법에 따라 기체크로마토그래프/질량분석계(NCI) 분석조건을 만든다.

7.4.2 바탕시료에 표준물질을 첨가하여 시행한 추출 효율성 실험을 통해 얻어진 최적 전처리 조건에 따라 실제시료를 처리한다. 이때 각 시료에 내부 표준물질을 일정 농도로 첨가 한 후 앞과 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

7.5.2.1 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, 독사펜(toxaphene)의 농도를 계산하기 위해 아래와 같이 회귀식을 다시 재배열해서 농도를 계산한다.

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

7.5.2.2 위에서 계산된 농도를 사용하여 다음 식으로부터 표시된 정제용 내부표준물질의 회수율을 계산한다.

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

7.5.2.3 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

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

8.2 결과보고 양식

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

9.0 참고문헌

“어류 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

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