

잔류성유기오염물질 공정시험기준

ES 10915.2

어류 시료 중 유기염소계 농약류 동시
시험기준-HRGC/LRMS

2017

Official Method of OCPs in Fish-HRGC/LRMS

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/질량분석계 (HRGC/LRMS, high resolution gas chromatograph/low resolution mass spectrometer)로 분석하는 방법에 적용한다.

1.2.2 회수율은 70 % ~ 120 %의 범위를 만족하고, 분석방법검출한계는 0.5 ng/g ~ 1.5 ng/g을 만족하여야 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 시료분석 과정에 영향을 줄 수 있으며, 분석자료의 질을 저하시킬 수 있다. 따라서 모든 시약은 순도 및 불순물의 종류와 함량을 고려하여 엄선하고 필요한 경

용매나 시약은 증류 및 정제하여 사용한다. 각 실험실에서는 오염원으로 인한 영향 유무와 수준에 대해 실험실 바탕시료(laboratory reagent blank)의 측정을 통한 평가가 필요하다.

1.3.2 유리 기구류는 적절한 세척이 매우 중요하다. 잘못 세척된 유리 기구류는 분석과정 중 시료를 오염시킬 수 있으며 유리표면에 분석물질이 흡착될 경우 목적성분의 손실 우려가 있으므로 유리 기구류의 적합한 세척방법은 매우 중요하다.

1.3.2.1 유리 기구류는 마지막 사용 용매로 한번 행구어 준 후, 바로 세제로 씻는다. 세제용액과 용매를 이용하여 30분간 초음파 세척한다.

1.3.2.2 세제로 세척한 후, 수돗물, 정제수 순으로 행군다. 열에 안정한 물질의 경우 증류수 세척만으로는 잘 제거되지 않기 때문에 다시 아세톤, 헥세인의 용매 순으로 행군 후, 105 °C 오븐에서 1시간 이상 건조하여 사용한다.

1.3.3 분석에 사용되는 모든 물질은 처음과 각 시료군에 대해 실험실 바탕시료의 측정을 통해 오염원으로 인한 간섭이 없음을 최대 20개의 시료마다 확인한다.

1.3.4 실험실 바탕시료(laboratory reagent blank)는 실제시료의 매질과 가능하면 같아야 하고 이 기준매질에는 검출하고자 하는 물질이 검출한계 값보다 낮게 함유되어야 한다.

1.3.5 고농도시료 측정 후, 바로 다음 시료 측정 시 고농도시료의 영향(cross-contamination)으로 다음의 시료에서 잘못된 결과를 얻을 수 있다. 따라서 고농도의 시료 측정 후에는 마지막에 사용되는 유기용매를 2 번 ~ 3 번 측정한 후, 다음 시료 분석한다.

1.3.6 시약이나 용매는 잔류농약분석급 또는 특급 이상을 사용하고, 필요한 경우 증류나 정제 과정을 통해 불순물의 방해로 인한 문제를 최소화 하도록 한다.

1.3.7 시료와 작업용 표준용액(working solution)은 전 처리 시 동일한 용매를 사용하고 같은 과정을 거친다.

1.3.8 기체크로마토그래프 주입구의 라이너는 20개 이상의 시료를 분석한 후 바꿔주어야 한다. 또한 라이너의 극성을 비활성화 시키기 위하여 MSTFA(*N*-methyl-*N*-(trimethyl silyl)trifluoroacetamide)를 15 μ L 정도 넣어준 후 주입구, 오븐, 인터페이스를 300 $^{\circ}$ C에서 약 30분간 유지하여 잔량의 MSTFA를 빼낸다. 분석항목인 엔드린(endrin)의 경우 라이너의 유리와 강하게 흡착되어 분석의 재현성이 떨어지므로 비활성화 과정을 시행하는 것이 좋다.

2.0 용어정의

2.1 표준원액

표준원액(stock standard solution)은 순수 표준시약(pure reference materials)으로서 단일 또는 몇 가지 물질을 일정 용매에 용해시킨 고농도의 표준물질을 의미한다.

2.2 표준용액

표준용액(standard solution)은 검정곡선 표준용액과 내부표준용액을 만들기 위한 혼합용액을 말하며 분석대상 물질과 내부표준 물질을 혼합, 희석하여 조제한다.

2.3 검정곡선 표준용액

동위원소 희석법에 의한 검정곡선 표준용액(calibration standard solution)은 분석대상 물질을 농도별로 조제한 용액에 동위원소 치환 내부표준물질이 일정농도가 되도록 혼합 조제한 것(CS1 ~ CS5)이며, 절대검량선법에 의한 검정곡선 표준용액은 표준원액을 가지고 필요한 농도 범위로 희석하여 조제한 것으로, 2가지 모두 분석대상물질에 대한 기기의 감응도 평가를 위한 검정곡선 작성에 이용한다.

2.4 동위원소 치환 내부표준물질

동위원소 치환 내부표준물질(^2H -, ^{13}C - 또는 ^{37}Cl -labelled internal standard)은 동위원소로 치환된 물질로 만들어진 표준물질로 내부표준법에 의한 분석방법에 사용된다.

2.4.1 정제용 내부표준물질

정제용 내부표준물질은 분석하고자 하는 물질과 유사한 화학적 구조나 화학적 성질을 가지며 시료 매질 중에서는 발견되지 않는 유기화합물로 분석방법의 신뢰성을 알아보기 위해 시료처리나 추출 이전에 첨가하여 사용한다.

2.4.2 실린지 첨가용 내부표준물질

실린지 첨가용 내부표준물질(syringe internal standard)은 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 추출 장치

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

3.2 농축장치

3.2.1 회전증발 농축기

회전증발 농축기는 증류플라스크, 농축수기, 물중탕기(± 2 °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 3회 이상 세척하여 교

차오염 등을 예방한다.

3.2.2 질소 농축기

질소 농축기는 질소가스가 연결될 수 있는 미세관과 테플론으로 코팅된 바늘, 기체의 유량조절이 가능한 유량계, 시료용기를 고정할 수 있는 장치로 구성되어야 한다. 시료의 농축에 앞서 농축기의 바늘부분은 아세톤 및 노말-헥세인으로 3회 이상 세척하여 교차오염 등을 예방하고, 농축 시 질소가스의 세기에 의해 시료가 시료용기의 외부로 유출되지 않게 항상 주의한다.

3.3 정제용 컬럼장치

3.3.1 겔 침투 크로마토그래프

겔 침투 크로마토그래프 (GPC, gel permeation chromatograph)는 Bio Beads S-X3 (200 mesh ~ 400 mesh) 또는 동등 이상의 성능을 가지고 있는 것을 사용한다. 사용에 앞서 500 mL 비이커에 비즈(beads) 70 g을 넣은 후 다이클로로메테인 : 헥세인 (1 : 1/V : V) 비율로 혼합된 용매를 비즈가 잠길 정도를 붓고 12시간 이상 방치하여 용매가 비즈의 공극사이로 스며들도록 하고 길이 55 cm, 직경 3.5 cm의 유리컬럼에 비즈를 충전하여 사용한다.

3.3.2 카트리지 정제

3.3.2.1 실리카겔 카트리지 실리카겔이 500 mg ~ 1,000 mg 충전된 6 mL 용량의 카트리지를 사용한다.

3.3.2.2 플로리실 카트리지 플로리실이 500 mg ~ 1,000 mg 충전된 카트리지로 다른 카트리지와 연결할 수 있는 것을 사용한다.

3.3.2.3 황산나트륨 카트리지 황산나트륨이 2 g 충전된 카트리지로 다른 카트리지와 연결할 수 있는 것을 사용한다.

3.4 분석용 저울

0.0001 g까지 정확하게 무게를 측정할 수 있는 저울을 사용한다.

3.5 미량주사기

1 μ L ~ 500 μ L 용량의 미량주사기(micro syringe)를 사용한다.

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.

3.6.2 모세관 컬럼

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

3.6.3 질량분석기

70 eV의 전자에너지를 이용하여 1초 미만의 스캔 싸이클 타임(scan cycle time)으로 35 amu ~ 500 amu까지 메스 스캐닝(mass scanning)이 가능한 전자이온화방식 (EI)의 것을 사용한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 증류수 : 노말-헥세인으로 세정한 증류수를 사용한다.

4.1.2 노말-헥세인($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.3 아세톤($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.4 다이클로로메테인(CH_2Cl_2) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.5 톨루엔(C_7H_8) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.6 황산(H_2SO_4) : 유해중금속 분석급 이상을 사용한다.

4.1.7 수산화나트륨(NaOH) : 특급 이상을 사용한다.

4.1.8 무수황산나트륨(Na_2SO_4) : 잔류농약 분석급 이상을 사용한다.

4.1.9 노난(C_9H_{20}) : GC 분석용의 것을 사용한다.

4.1.10 옥살산나트륨($\text{C}_2\text{Na}_2\text{O}_4$) : 특급 이상을 사용한다.

4.1.11 포름산(CH_2O_2) : 특급 이상을 사용한다.

4.2 표준용액

4.2.1 표준물질

유기염소계 농약류 8종(총 18종)의 표준물질은 Accustandard, Supelco, Chem. service사의 제품 혹은 이와 동등 이상의 제품을 사용하며, 정제용 내부표준물질은 pyrene- d_{10} 을, 실린지 첨가용 내부표준물질로는 phenanthrene- d_{10} 을 사용한다. 실험에 사용된 모든 혼합표준용액은 적합한 작업 농도범위(working range)로 희석하여 사용한다.

4.2.2 표준용액 및 정제용 내부표준용액

순수한 물질로 구입한 표준물질은 노말-헥세인을 이용하여 1,000 mg/L의 표준용액으

로 만든 후 -20 ℃에 보관한다. 순수한 물질이 없는 표준물질은 가급적 가장 높은 농도의 표준용액을 구입한다.

정제용 내부표준물질 pyrene- d_{10} 과 실린지 첨가용 내부표준물질 phenanthrene- d_{10} 은 순수물질로 구입하며 표준물질과 동일한 방법으로 만든 후 -20 ℃에 보관한다.

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

6.2.1 정밀도 및 정확도는 ES 10001 정도보증/정도관리에 따라 측정한다.

6.2.2 정확도는 정제용 내부표준물질의 회수율로 확인한다. 정제용 내부표준물질로 pyrene- d_{10} 을 이용하고 실린지 첨가용 내부표준물질 phenanthrene- d_{10} 으로 보정한다. 회수율이 70 % ~ 120 %의 벗어나면 재 정제해야한다. 정제용 표준물질의 회수율은 시료 분석결과에 대한 신뢰성 검토를 위해 시료분석결과와 함께 제시한다.

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

검정곡선은 정량범위 내 5개의 농도(CS1 ~ CS5)로 시료군 마다 작성하고, 직선성 결정계수(R^2 , 상관계수의 제곱값)는 0.99 이상이어야 하고, CS1 ~ CS5의 상대감응계수(RRF)의 상대표준편차(RSD)는 ± 15 % 이내로 하며 그 허용범위를 벗어나면 재 작성

한다. 분석 종료 후, 검정곡선의 중간농도(CS3)에 해당하는 표준용액을 비교 측정하여 당초 중간농도 검정곡선의 상대감응계수와 상대표준편차가 $\pm 20\%$ 를 벗어나면 재시험한다.

6.4 방법바탕시료의 측정

방법바탕시료(method blank)는 실제시료와 동일한 방법으로 전처리·분석되어야 하며 측정값은 방법검출한계 이하이어야 한다. 시료군마다 1 개의 방법바탕시료를 측정한다.

6.5 실험실 내부정도관리

잔류성유기오염물질을 측정분석하는 실험실에서는 분석방법검출한계와 정밀도/정확도를 연 1회 이상 실시하는 것을 원칙으로 하며, 분석장비의 주요부품 수리·교체, 분석자 변경 등 내부정도관리가 필요한 경우 수시로 실시하고 그 결과를 정도관리기록부에 보관하여야 한다.

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 ~ 500 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 여과조

를 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 °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 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 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 헥스메인액이 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 헹구고 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 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 적용한다.

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

유기염소계 농약류 혼합표준용액(1 mg/L) 5 μ L ~ 100 μ L를 첨가하여 각 시료 매질에서의 검정곡선 농도를 0.5 μ g/kg ~ 10 μ g/kg가 되도록 하며 추출과 정제과정을 통해 전처리 한 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 표준물질의 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.

$$y = ax + b \quad (\text{식 3})$$

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

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

$$\frac{A_s C_{is}}{A_{is}} = a C_s + b \quad (\text{식 4})$$

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.

$$C_s = \frac{\left[\frac{A_s C_{is}}{A_{is}} - b \right]}{a} \quad (\text{식 5})$$

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

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

7.5.2.3 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

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

8.1.1 시료채취관련자료

시료번호, 시료채취 일자, 연령, 성별, 건강상태 점검 및 병력 설문조사, 시료채취 양, 시료의 운반과 보관 방법 등을 보고한다.

8.1.2 분석방법자료

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

8.1.3 분석결과자료

8.1.3.1 검정곡선 작성, 질량 검정, 표준물질 및 바탕시료의 크로마토그램을 분석시료의 크로마토그램과 함께 보고한다.

8.1.3.2 방법검출한계 및 산출근거 등을 보고한다.

8.1.3.3 분석결과 농도 및 회수율을 보고한다.

8.2 결과보고 양식

8.2.1 시료 분석결과 실측농도는 ng/g 으로 표시한다. 또는 필요시 지질량을 표시하고 ng/g lipid로 나타낼 수 있다.

8.2.2 각 동질체의 분석결과는 총 합으로 제시하되, 모든 결과에 대한 수치의 표시자릿수는 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 ND로 표시하고 방법검출한계값을 같이 제시한다.

8.2.4 결과보고 양식은 부록에 제시한 양식에 따른다.

9.0 참고문헌

9.1 US. CDC, Laboratory Procedure Manual Method No. 28.

9.2 Third round of WHO-coordinated exposure studies (van Leeuwen and Malisch, 2002; Schechter et al., 2003).

9.3 9.3 US EPA, "EPA's Agency-wide Multimedia Persistent, Bioaccumulative, and Toxic Pollutants Initiative"(EPA 743-R-00-003), 2000.

9.4 Food and Drugs Administration, Pesticide Analytical Mannual 1, 1997.

9.5 UNEP, Guidance for a Global Monitoring Programme for Persistent Organic Pollutants, 1st edition, June 2004.

9.6 국립환경연구원, 내분비계 장애물질 측정분석방법, 2002.

10.0 부록

표 1. 유기염소계 농약류 대상물질

표준물질종류		항 목
대상 유기염소계 농약 (총 18종)		Hexachlorobenzene, heptachlor, aldrin, heptachlor epoxide, oxychlordan, trans-chlordane, o,p'-DDE, cis-chlordane, trans-nonachlor, p,p'-DDE, dieldrin, o,p'-DDD, endrin, p,p'-DDD, o,p'-DDT, cis-nonachlor, p,p'-DDT, mirex
내부표준물질	정제용 내부표준물질	Pyrene- <i>d</i> ₁₀
	실린지 침	
	가용 내부표 준물질	Phenanthrene- <i>d</i> ₁₀

표 2. 분석대상물질과 내부표준물질의 분자량 및 선택 질량이온과 머무름 시간

No.	대상물질	분자량	선택 질량이온 (m/z)	머무름 시간 (min)
1	Hexachlorobenzene	284.8	282, 284	13.17
ISTD-1	Phenanthrene- <i>d</i> ₁₀	188.3	188, 94	14.46
2	Heptachlor	373.3	272, 274	17.33
3	Aldrin	364.9	263, 265	19.16
4	Heptachlor epoxide	389.3	353, 355	21.24
5	Oxychlordan	423.8	387, 389	21.29
6	trans-Chlordane(gamma)	409.8	373, 375	22.62
7	o,p'-DDE	318.0	246, 248	22.65
ISTD-2	Pyrene- <i>d</i> ₁₀	212.3	212, 106	22.94
8	cis-Chlordane(alpha)	409.8	373, 375	23.44
9	trans-Nonachlor	444.2	407, 409	23.71
10	p,p'-DDE	318.0	246, 248	24.43
11	Dieldrin	380.9	263, 265	24.87
12	o,p'-DDD	320.0	235, 237	24.98
13	Endrin	380.9	263, 265	26.26
14	p,p'-DDD	320.0	235, 237	27.04
15	o,p'-DDT	354.5	235, 237	27.31
16	cis-Nonachlor	444.2	407, 409	27.53
17	p,p'-DDT	354.5	235, 237	29.41
18	Mirex	545.5	272, 274	33.73

표 3. 염소원자수에 의한 동위치 피이크의 자연존재비

염 소 원자수	질 량 수							
	M	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10	M+12	M+14
4	76.5	100	48.7	10.5	0.9			
5	61.5	100	65.0	21.1	3.5	0.2		
6	51.2	100	81.2	35.2	8.5	1.1	0.06	
7	43.2	100	97.5	52.8	17.1	3.3	0.36	0.02
8	33.8	87.9	100.0	65.0	26.4	6.8	1.1	0.10
9	27.1	78.1	100.0	74.7	35.8	11.5	2.4	0.3
10	21.7	69.5	100.0	85.3	47.8	18.3	4.9	0.9
	M	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10	M+12	M+14

표 4. 분석대상물질의 검정곡선 직선성 및 검출한계

No.	대상물질	범위($\mu\text{g/kg}$)	검정곡선	R^2	검출한계 ($\mu\text{g/kg}$) ¹
1	Hexachlorobenzene	0.5 ~ 50	$y=0.0002x-0.0065$	0.9998	1.37
2	Heptachlor	0.5 ~ 50	$y=0.0006x-0.0056$	0.9958	1.50
3	Aldrin	0.5 ~ 50	$y=0.0007x-0.0079$	0.9987	1.58
4	Heptachlor epoxide	0.5 ~ 50	$y=0.0019x-0.0337$	0.9983	1.46
5	Oxychlordane	0.5 ~ 50	$y=0.0004x-0.0055$	0.9996	1.09
6	trans-Chlordane(gamma)	0.5 ~ 50	$y=0.0025x-0.0457$	0.9980	0.79
7	o,p'-DDE	0.5 ~ 50	$y=0.0076x-0.1398$	0.9968	0.48
8	cis-Chlordane(alpha)	0.5 ~ 50	$y=0.0023x-0.0353$	0.9987	0.68
9	trans-Nonachlor	0.5 ~ 50	$y=0.0015x-0.0214$	0.9982	0.52
10	p,p'-DDE	0.5 ~ 50	$y=0.0049x-0.1585$	0.9985	0.61
11	Dieldrin	0.5 ~ 50	$y=0.0008x-0.0137$	0.9955	1.62
12	o,p'-DDD	0.5 ~ 50	$y=0.0111x-0.1646$	0.9989	0.50
13	Endrin	0.5 ~ 50	$y=0.0008x-0.0158$	0.9973	1.68
14	p,p'-DDD	0.5 ~ 50	$y=0.0084x-0.077$	0.9974	0.67
15	o,p'-DDT	0.5 ~ 50	$y=0.0068x-0.166$	0.9964	0.62
16	cis-Nonachlor	0.5 ~ 50	$y=0.0029x-0.0491$	0.9983	0.47
17	p,p'-DDT	0.5 ~ 50	$y=0.0044x-0.1227$	0.9940	0.50
18	Mirex	0.5 ~ 50	$y=0.0046x-0.0777$	0.9985	0.50

¹검출한계($\mu\text{g/kg}$)는 7회 반복실험 후 시그마법을 이용하여 계산된 값임.

표 5. 유기염소계 농약류 분석을 위한 기체크로마토그래프/질량분석계의 기기조건

		기기분석조건	
기 체 크 로 마 토 그 래 프	• 컬럼	Ultra-2 (Cross-linked 5 % Phenylmethylsilicon, 30 m x 0.2 mm I.D x 0.33 µm, film thickness)	
	• 운반기체	He (99.9999 %) at 1.0 mL/min	
	• 주입부 온도	260°C	
	• 주입방식	Splitless (purge on at 0.5 min)	
		50 °C (0.3min) → (20 °C/min) → 200 °C → (2.5 °C/min) → 280 °C (1 min)	
질 량 분 석 기	• 연결부 온도	280 °C	
	• 이온화 방식	Electron impact (EI)	
	• 이온화 전압	70 eV	
	• 이온원 온도	230 °C	
	• 검출기 형식	Quadrupole	
	• 검출방식	SIM mode	
	• 선택이온모니터링 (SIM)	시간(min)	선택이온, m/z
		5.0	(284, 286, 249, 188, 160)
		18.0	(272, 274, 100, 263, 293, 91)
		22.0	(353, 355, 263, 115, 185, 387)
		23.8	(373, 375, 272, 246, 76, 318)
		24.7	(373, 375, 272, 409, 407, 272, 212, 106)
		25.9	(79, 318, 176, 263, 265, 277, 235, 237, 165)
		27.4	(263, 317, 345, 235, 237, 165, 409, 407, 272)
		30.3	(235, 237, 165)
		35.0	(272, 274, 237)

표 6. 시료채취 결과보고 양식

시료정보	
시료채취일자	
시료번호(코드)	
시료채취위치코드	
정확한 시료채취 위치	지도에 위도 경도 표시
학명(영문명)	
무게	
크기	
포획량	
포획장비	

표 7. 시료 분석결과보고 양식

항목		형식 및 단위
시료번호		# 000
시료분석일자		년 월 일
시료조제방법		000
시료추출방법		
시료추출량		g
정제방법		
내부표준물질 사용량	채취용	ng
	정제용	ng
	실린지 첨가용	ng
분석기기조건	GC	
	MS	
분석결과	회수율	%
	농도	실측농도 및 환산농도

<첨부사항>

1. 분석크로마토그램
2. 각 이성체별 농도 및 회수율 결과 표

주 해

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