

아크릴아미드-액체크로마토그래피-

2015

텐덤질량분석법

(Acrylamide-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 물 속에 존재하는 아크릴아미드를 0.2 μm 공극의 여지를 사용하여 여과한 후 여액을 직접 액체크로마토그래피-텐덤질량분석기에 주입하여 분석한다.

1.2 적용범위

이 시험기준 폐수 또는 아크릴아미드의 농도가 비교적 높은 지표수, 지하수 등에 적용하며, 정량한계는 0.006 mg/L 이다.

1.3 간섭물질

시료 중에 존재하는 입자상 물질은 컬럼의 공극을 막히게 하여 분리효율을 저하시키거나 컬럼수명에 영향을 끼치므로, 분석 전에 시료 중의 입자상물질은 0.2 μm 의 여지를 사용하여 여과하여 사용한다.

2.0 용어정의

2.1 동위원소 치환 내부표준물질

동위원소 치환 내부표준물질은 분석물질에 동위원소로 치환한 물질로 물리적 및 화학적 성질이 유사하여 정량분석에서 내부표준물질로 사용하면 좋다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 고성능 액체크로마토그래프 (high performance liquid chromatograph)

3.1.1 분석용 컬럼은 비극성 흡착제가 코팅된 역상 컬럼 (ODS계통)을 사용하고, 길이 2 cm ~ 30 cm, 내경 4.6 mm, 충전제 크기 10 μm 인 것을 선택한다. 컬럼을 보호하기 위해 가드필터 (일반적으로 0.3 μm 인 것을 사용함)를 사용하거나 precolumn (1 - 3 cm의 분석용 컬럼과 같은 재질)을 사용한다.

3.1.2 이동상은 기기 제조사와 분석 조건에 따라 적절히 제조한다.

3.2 텐덤질량분석기 (tandem mass spectrometer)

3.2.1 질량분석기는 사중극자형 (quadrupole) 또는 이와 동등 이상의 성능을 가진 것을 사용한다.

3.2.2 이온화방식은 전기분무 이온화 (ESI, electrospray ionization)을 사용한다.

3.2.3 검출방법은 다중반응검출법 (MRM, multiple reaction monitoring)을 사용하고 이온 질량수 (m/z)는 표 3을 참고한다.

3.3 초자류

3.3.1 여과용 주사기

10 mL 용량의 PE재질로 된 것 또는 동등 이상의 것으로 한다.

3.3.2 실린지 필터

주사기에 연결하여 사용하는 필터로서, 공극 0.2 μm PVDF 재질로 된 것 또는 동등 이상의 것으로 한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 정제수

시약용 정제수나 당일 정제된 유기물질이 없는 3차 증류수를 사용한다. 바탕시험시 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 것을 사용한다.

4.1.2 아세트산

아세트산 (acetic acid, CH_3COOH , 분자량 : 60.05)은 바탕시험시 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 것을 사용한다.

4.1.3 메탄올

메탄올 (methanol, CH_3OH , 분자량 : 32.04)은 바탕시험시 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 것을 사용한다.

4.2 표준용액

4.2.1 아크릴아미드 표준원액 (1,000 mg/L)

시판되는 고순도의 아크릴아미드 (acrylamide, $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$, 분자량 : 71.08) 0.100 g을 취하여 증류수에 녹여 100 mL로 한다. 이 용액은 바이알에 넣은 다음 밀봉하여 냉장 보관하고 4주일 이내에 사용한다. 또는 소급성이 있는 제조된 용액을 사용한다.

4.2.2 아크릴아미드 표준용액 (1.0 mg/L)

10 mL 부피플라스크에 표준원액 100 μL 를 넣고 증류수로 표선까지 채운다. 마개를

하고 플라스크를 조심히 흔들어서 혼합한다. 이 표준용액의 농도는 10 mg/L이다. 10 mL 부피플라스크에 표준용액 (10.0 mg/L) 1.0 mL를 넣고 증류수로 표선까지 채운 후 위와 동일하게 혼합한다. 용액을 바이알에 옮기고 밀봉하여 냉장 보관하고, 3개월 간격으로 농도를 확인한다.

4.2.3 내부표준원액 (1,000 mg/L)

내부표준물질은 아크릴아미드- $^{13}\text{C}_3$ (acrylamide- $^{13}\text{C}_3$, 분자량 : 74.08, 순도 99 %) 0.01 g을 취하여 정제수에 녹여 10 mL로 한다. 이 용액은 냉장 보관하고, 6개월 이내에 사용한다. ^{13}C 의 함량이 시약 (제조사)에 따라 다를 수 있다.

4.2.4 내부표준용액 (10.0 mg/L)

내부표준원액 1.0 mL를 정확히 취하여 정제수에 녹여 100 mL로 한다. 이 용액 1.0 mL는 아크릴아미드 내부표준물질 10 μg 을 함유한다. 용액을 바이알에 옮기고 밀봉하여 냉장 보관한다.

4.2.5 내부표준용액 (1.0 mg/L)

4.2.4. 내부표준용액 1.0 mL를 정확히 취하여 정제수에 녹여 10 mL로 한다. 이 용액 1.0 mL는 아크릴아미드 내부표준물질 1.0 μg 을 함유한다. 용액을 바이알에 옮기고 밀봉하여 냉장 보관한다.

5.0 시료채취 및 관리

수질오염공정시험기준 ES 04130.1c 시료의 채취 및 보존 방법에 따른다.

6.0 정도보증/정도관리 (QA/QC)

6.1 방법검출한계 및 정량한계

6.1.1 방법검출한계 및 정량한계는 ES 04001b 정도보증/정도관리에 따라 측정한다. 정제수에 정량한계 부근의 농도가 되도록 분석물질을 첨가한 7개의 시료를 준

비하고 각 시료를 7.0항의 실험절차와 동일하게 측정하여 표준편차를 구한다.

6.1.2 표준편차에 3.14를 곱한 값을 방법검출한계로, 표준편차에 10을 곱한 값을 정량한계로 나타낸다. 측정한 방법검출한계는 시험방법에서 제시한 정량한계 이하의 값이어야 한다.

6.2 방법바탕시료의 측정

ES 04001b 정도보증/정도관리에 따라 시료군마다 1개의 방법바탕시료를 측정한다. 방법바탕시료는 정제수를 사용하여 7.0 분석절차와 동일하게 전처리·분석하며 측정값은 방법검출한계 이하이어야 한다.

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

6.3.1 검정곡선의 작성 및 검증은 정량범위 내의 3개 이상 농도에 대해 검정곡선을 작성하고 얻어진 검정곡선의 결정계수 (R²)가 0.98 이상 또는 감응계수 (RF, response factor)의 상대표준편차가 25 % 이내이어야 하며 결정계수나 상대표준편차가 허용범위를 벗어나면 재작성하도록 한다.

6.3.2 검정곡선의 직선성을 검증하기 위하여 각 시료군마다 1회의 검정곡선 검증을 실시하는 것이 바람직하다. 방법검출한계의 5배 ~ 50배 또는 검정곡선의 중간 농도에 해당하는 표준용액을 측정한다. 선택한 표준용액의 측정값은 검정곡선 작성시 해당값과 25 % 이내에서 일치하여야 한다. 만약 이 범위를 넘는 경우, 검정곡선의 재작성이 요구된다.

$$RF = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times C_s} \quad (\text{식 1})$$

여기서, A_s : 측정할 분석물질의 면적

A_{is} : 내부표준물질의 면적

C_{is} : 내부표준물질의 농도

C_s : 측정할 분석물질의 농도

6.4 정확도 및 정밀도

6.4.1 정확도 및 정밀도의 측정은 ES 04001b에 따라 측정한다. 정제수에 정량한계 농도의 1배 ~ 5배의 농도가 되도록 동일하게 표준물질을 첨가한 시료를 4개 이상 준비하고, 7.0 항의 절차와 동일하게 측정하여 평균값과 표준편차를 구한다.

6.4.2 정확도는 인증시료를 확보할 수 있는 경우 인증표준물질을 분석한 결과값 (CM)과 인증값 (CC)과의 상대백분율로 나타내고, 인증시료를 확보할 수 없는 경우 인증시료를 정확히 첨가한 시료로 대체한다. 이때 정확도는 첨가시료를 분석한 농도 (CAM)와 첨가하지 않은 시료를 분석한 농도 (CS)와의 차이에 대한 첨가농도 (CA)의 상대 백분율로서 나타내며 그 값이 75 % ~ 125 % 이내이어야 한다.

$$\text{정확도} = \frac{C_M}{C_C} \times 100 \% = \frac{C_{AM} - C_S}{C_A} \times 100 \% \quad (\text{식 2})$$

여기서, CM : 인증표준물질을 분석한 농도

CC : 인증 농도

CAM : 첨가시료를 분석한 농도

CS : 첨가하지 않은 시료를 분석한 농도

CA : 첨가농도

6.4.3 정밀도는 측정값의 상대표준편차 (RSD)로 계산하며 측정값이 25 % 이내이어야 한다.

6.5 내부정도관리 주기 및 목표

6.5.1 방법검출한계, 정량한계, 정밀도 및 정확도는 연 1회 이상 산정하는 것을 원칙으로 하며, 분석자의 교체, 분석 장비의 수리 및 이동 등의 주요 변동사항이 생길 경우에는 다시 실시한다. 단, 장비의 청소, 컬럼 교체 시와 측정 장비의 감도가 의심될 때에는 언제든지 측정하여 확인하여야 한다.

6.5.2 검정곡선 검증 및 시약바탕시료의 분석은 각 시료군마다 실시하며, 고농도의 시료 다음에는 시약바탕시료를 측정하여 오염여부를 점검한다.

6.5.3 각 정도관리 항목에 대한 정도관리 목표 값은 표 1과 같다.

7.0 분석절차

7.1 전처리

7.1.1 주사기 또는 자동 주입장치로 시료 950 μL 를 정확히 취해 바이알에 옮긴 후, 내부표준용액 (1.0 mg/L) 50 μL 를 시료에 첨가한다.

7.1.2 7.1.1의 시료를 일부분 취해 0.2 μm syringe filter로 여과 시킨 후 HPLC용 바이알에 옮겨 액체크로마토그래프-질량분석기에 20 μL 주입한다.

7.1.3 크로마토그램과 질량스펙트럼으로부터 분석성분의 피크면적 (A_x)과 내부표준물질의 피크면적 (A_i)을 측정하고 피크면적 비 (A_x/A_i)를 구한다.

7.1.4 시료의 피크면적 비가 검정곡선의 범위를 벗어날 경우에는 시료를 희석하여 다시 측정한다.

7.3 검정곡선의 작성

7.3.1 10 mL 부피플라스크에 표준용액 (1.0 mg/L)을 10 μL , 50 μL , 100 μL , 250 μL , 500 μL , 1000 μL 를 각각 취한 다음 내부표준용액 (1.0 mg/L) 500 μL 를 각 플라스크에 함께 넣은 다음 정제수를 넣어 부피플라스크의 표선을 채운다. 일정량을 미량주사기를 사용하여 액체크로마토그래프-탠덤질량분석기에 주입하고 크로마토그램을 작성하여 각 성분의 양과 피크의 높이 또는 면적과의 관계식을 작성한다. 이때 주입한 표준용액의 농도는 1.0 $\mu\text{g/L}$, 5.0 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 25 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$ 이며 내부표준용액의 농도는 50 $\mu\text{g/L}$ 이다.

7.3.2 표준용액의 농도 (C_x)를 가로축 (x 축)에, 각 표준용액에 해당하는 피크 면적 (A_x)과 내부표준물질의 피크면적 (A_i)과의 비 (A_x/A_i)를 세로축 (y 축)에 취하여 검정곡선을 작성한다.

8.0 결과보고

분석물질과 내부표준물질에 대한 면적 비 (A_x/A_i)를 구할 경우 검정곡선식의 $y(i)$ 값에 대입하여 $x(i)$ 값을 계산하면 분석물질의 농도 (mg/L)를 구할 수 있다.

$$\text{농도}(mg/L) = \frac{\frac{A_x}{A_i} - b}{a} \quad (\text{식 } 3)$$

여기서, A_x/A_i : 분석물질과 내부표준물질의 피크 면적 비

a : 검정곡선의 기울기

b : 검정곡선의 절편 값

9.0 참고자료

9.1 US EPA, Method 8316, “Acrylamide, Acrylonitrile, and Acrolein by HPLC”, (1996).

9.2 Patrick D. DeArmond & Amanda L. DiGoregorio, Characterization of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Acrylamide in Complex Environmental Samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry, May; 405(12): 4159-4166 (2013).

9.3 식품의약품안전청, 고시 제 2009-171호, “식품등 중 기준규격미설정 물질의 시험방법”, (2009).

10.0 부록

표 1. 정도관리 목표 값

정도관리 항목	정도관리 목표
정량한계	0.006 mg/L
검정곡선	결정계수(R2) ≥ 0.98 또는 감응계수(RF)의 상대표준편차 ≤ 25 %
정밀도	상대편차가 25 % 이내
정확도	75 % ~ 125 %

표 2. 아크릴아미드의 액체크로마토그래프 기기분석 조건 (예)

항목	조 건
컬럼	비극성 흡착제가 코팅된 역상 칼럼 (2.1 x 100 mm, 0.17 μm)
이동상(유속)	0.1% 아세트산, 0.5% 메탄올을 포함한 수용액 (0.2 mL/분)
컬럼 온도	35 $^{\circ}\text{C}$
시료 주입량	20 μl

표 3. 아크릴아미드 및 내부표준물질의 질량스펙트럼 이온

물질명	분자량	이온화 방식	MRM mode (MS/MS mode)		Cone Voltage (V)	Collision energy (V)
			Precursor ion (= parent ion) (m/z)	Production ion (= daughter ion) (m/z)		
아크릴아미드	71.08	ESI (Positive)	72	55	20	11
아크릴아미드- $^{13}\text{C}_3$	74.08	ESI (Positive)	75	58	20	11

[주 1] 기기 조건에 따라 분석조건은 바뀔 수 있다.

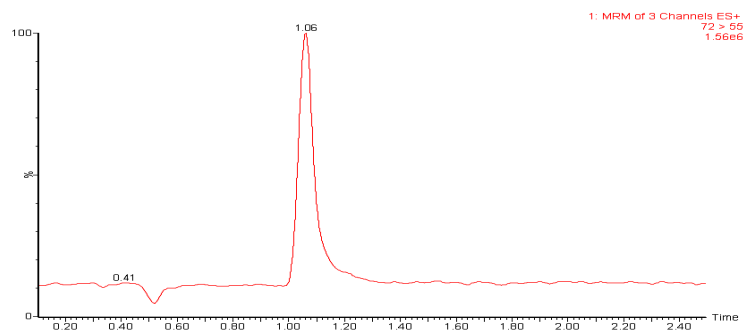


그림 1. 아크릴아미드의 크로마토그램 (예)

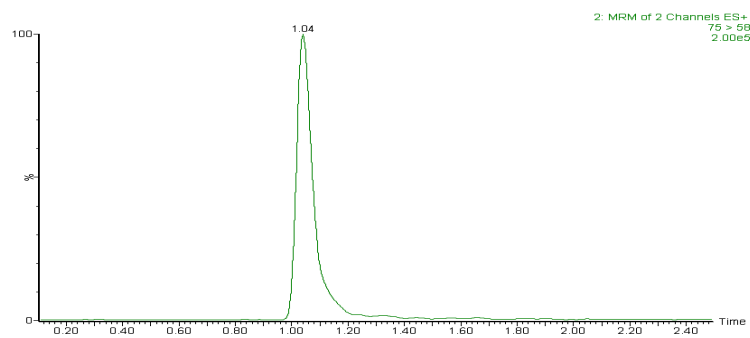


그림 2. 내부표준물질 아크릴아미드-13C3 크로마토그램 (예)