

기체크로마토그래피/질량분석법을 이용한 생체시료 중 프탈산 에스테르류의 분석법

서정주, 나윤철, 홍종기*
한국기초과학지원연구원, 유해물질분석팀
(2001. 9. 12. 접수)

Determination of Phthalates in Biota Samples Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Jung-Ju Seo, Yuncheol Na, Jongki Hong*
Hazardous Substance Research Team, Korea Basic Science Institute, Seoul, 136-701, Korea
(Received Sep. 12, 2001)

요 약 : 본 연구는 프탈산 에스테르류에 대하여 생물시료 중에 존재하는 가장 일반적인 9종의 분석을 기체크로마토그래피-질량분석기-선택이온검색법에 의해 수행하였다. 생물시료는 유기용매로 추출하고 Florisil 컬럼을 사용하여 정제하였다. 프탈산 에스테르류는 전처리 과정 중 가장 쉽게 오염되는 물질로 생물시료의 경우 전처리 단계가 수질이나 저질시료보다 복잡해지므로 각 전처리 단계의 오염정도를 비교 분석하였다. 표준물질이 첨가된 생물시료에 본 연구에서 개발된 분석법을 적용하여 구한 회수율은 79 - 117%정도로 나타났다. 또한 프탈산 에스테르류의 정량의 정확도, Florisil 컬럼 용리패턴, 검출한계 등을 조사하였다.

Abstract : A method for the analysis of most common phthalate acid esters (9 species) in biota samples by gas chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring mode is described. Phthalates in biota samples are extracted by organic solvent and purified by Florisil column. Phthalates are easily contaminated during extraction procedure. Since the extraction and cleanup steps for biota samples generally are more complicate than those for water or sediment samples, we compared with contamination state of each sample work-up step. By applying this developed method, the overall recoveries ranged between 79 - 117% in biota sample which was spiked with standards. For phthalates used in this study, the quantitative accuracy, elution pattern on Florisil column, and detection limits were also investigated.

Key words : phthalates, GC/MS-SIM, biota sample

1. 서 론

프탈산 에스테르류는 polyvinyl chloride, polyvinyl

acetate, polystyrene, cellulose nitrate, polyamides 그리고 polyesters 등 여러 가지 물질의 가소제로 매우 널리 쓰이나 이들 중 일부는 내분비계활동에 장애를 줄 수 있다¹. 이런 플라스틱에서 프탈산 에스테르류는 어떤 화학적 결합을 하지 않고 분자간의 윤활제 역할로 플라

★ Corresponding author
Phone : +82+(0)2-920-0790, Fax : +82+(0)2-920-0789
E-mail : jongki@kbsi.re.kr

스티의 고분자 구조 안에 포함되어 플라스틱에 유연성을 주는 역할을 한다. 산업에서는 주로 프탈산 디부틸(DBP)과 프탈산 디(2-에틸헥실)(DEHP)이 가장 널리 사용되고 있다. 또한 일상 생활에서 많이 사용되고 있는 PVC의 경우 상당 양의 가소제가 첨가되어 지고 있으며, 플라스틱 물질의 무게 당 60% 정도의 비율에 이르고 있다.

년 간 매우 많은 양의 가소제가 PVC resins, 접착제, 셀룰로스 필름 코팅, 화장품, 곤충 퇴치제, 살충제 운반제 등으로 사용되고 있다². 우리 나라의 경우 1998년에 DBP 사용량이 1400M/T로 전년도에 비해 30%의 증가를 보이고 있으며³ 연간 76만 톤의 가소제를 생산하여 국내에서 25만 톤 정도를 소모하는 것으로 알려져 있다⁴. 이러한 가소제는 고분자물질과 화학적으로 결합되어 있지 않은 상태이므로 환경에 전이될 수 있는 가능성이 매우 크며 이러한 대량 생산과 사용으로 환경에 매우 널리 확산되어 있다. 플라스틱은 보통 일반 쓰레기의 10%를 차지하기 때문에 쓰레기 매립지, 도시와 공장 폐수처리 시설, 그리고 도시 소각로가 주요 오염원으로 알려져 있다⁵. 따라서 이러한 프탈산 에스테르류는 플라스틱과 플라스틱 물질 혹은 사용 후 폐기과정에서 환경에 직접적으로 유입될 가능성이 매우 높다. 프탈산 에스테르류는 미국 EPA와 여러 다른 나라에 의해 주요 오염물질로서 등록되어있고, 환경중 주요 관찰대상 물질로 규정되어 있다^{6,8}.

일반적으로 프탈산 에스테르류는 지용성이므로 버터, 마가린, 치즈 같은 물질에 축적되는 경향이 있으므로 인체 내 지방조직에 축적된다. 사람에게 미치는 영향이 아직 증명되지 않았지만 특히 DEHP의 경우 정소성 독성물질이고 DBP도 에스트로겐에 영향을 준다고 알려져 있다^{9,10}. 수질환경에서 프탈산 에스테르류의 잔류와 지속성은 그들의 화학적-물리적 성질과 분해과정에 직접적으로 의존한다. 화학적-물리적 성질로 보면 프탈산 에스테르류는 실질적으로 순수한 물에는 불용성이지만¹¹, 수용액에서 fuming acid나 fulvic acid에 의해 용해되어 착물을 이루거나 혹은 입자에 흡착되어 가라앉게 된다. 따라서 광분해, 가수분해에 의한 프탈산 에스테르류의 환경자동정화과정은 그리 효과적인 방법으로 사용될 수 없다⁵. 또한, 프탈산 에스테르류의 반감기($t_{1/2}$)는 수년단위이므로 환경에서 완전분해는 시일이 걸리지만 박테리아 및 어류 등은

프탈산 에스테르류를 완전히 혹은 부분적으로 대사한다고 알려져 있다¹¹.

가소제 중 가장 일반적으로 환경에서 발견되는 물질로는 di-2-ethylhexylphthalate (DEHP), di-iso-octylphthalate (DiOP), 및 di-iso-decylphthalate(DiDP)로 알려져 있지만, 간혹 diethylphthalate (DEP), di-n-butylphthalate (DBP), di-iso-butylphthalate (DiBP), 및 혼합물로 존재하는 n-octylphthalate, n-decylphthalate등이 환경매체 중에 발견되었다⁷.

환경시료에서 프탈산 에스테르류의 추출, 정제 및 분석을 위한 다양한 분석법이 개발되었다. 우선 추출방법으로 수용액 시료의 경우 디클로로메탄 또는 헥산으로 추출하는 액-액 추출방법 (liquid-liquid extraction, LLE)이 주로 사용되어지며^{12,13}, 토양이나 저니토의 경우 초음파추출¹⁴, Soxhlet 추출^{15,16} 혹은 용매 진탕 추출방식이 많이 사용되었고¹³ 근래에 있어 추출의 경제성, 실험의 간편성 그리고 실험 단계의 간소화에서 오는 불순물의 영향을 감소시키는 등의 다양한 장점으로 인한 SPME (solid-phase microextraction)방법을 이용한 결과들이 많이 발표되고 있다¹⁷⁻¹⁹. EPA 방법²⁰에 있어서도 액-액 추출, 고체상 추출, 초음파추출 그리고 연속 액-액 추출 등의 방법을 제시하고 있다. 또한 시료의 정제방법²⁰에 있어 분석물질과 매트릭스에서 오는 여러 가지 방해물질을 제거하기 위해 알루미나 (alumina), 플로리실 (florisil) 그리고 왁스나 지질 (lipid)등을 제거하기 위해 GPC (gel-permeation chromatograph cleanup)¹⁴ 등을 사용할 수 있다.

프탈산 에스테르류의 검출을 위한 분석기기로는 gas chromatograph (GC)¹³, high performance liquid chromatograph (HPLC)²¹등이 사용되며 가장 일반적으로는 정확한 정성 및 정량을 위해 분리와 확인이 동시에 가능한 GC-mass spectrometer(GC-MS)가 널리 사용되어지고 있다^{14,19,22}. 또한 최근 HPLC-APCI (atmospheric pressure chemical ionization) - MS/MS²³ 등이 구조분석 등에 이용되기도 하였다.

본 연구의 목적은 비교적 지방성분이 많고 매트릭스가 복잡한 생체시료에서 초음파추출 방법과 Florisil 컬럼 정제법을 이용하여 가능한 시료전처리 과정에서 오는 오염을 줄이고 내분비계 장애물질로 규정되어 있는 9종류의 프탈산 에스테르류를 신속하고 정확하게 정성 및 정량할 수 있는 분석법을 개발하는데 있다.

2. 실험 및 방법

2.1 시약

모든 유기용매는 가능한 사용직전까지 개봉하지 않은 잔류농약용 (J. T. Baker, NJ, USA)을 사용하였으며 분석대상물질 8종의 표준물질은 Supelco (Bellefonte, PA, USA) 제품과 di-n-hexyl phthalate (DHP)의 경우 Chemservice (West Chester, U.S.A) 제품을 사용하였고 내부표준물질인 penanthrene-d₁₀은 Aldrich (Milwaukee, WI, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다. 이 표준물질은 헥산에 녹여 적당한 농도로 혼합용액을 만들었으며 표준원액을 n-헥산으로 희석 혼합하여 소정농도(20 ~ 6000 ng/ml)의 혼합표준액을 5단계 이상 조제하였다. 무수 황산나트륨 (Aldrich, Milwaukee, WI, USA)은 수분과 유기물제거를 위해 700°C에서 24시간 가열한 후 오염되지 않은 곳에서 방냉한 것을 사용하였으며, 염화나트륨(Sigma, St. Louis USA) 역시 700°C에서 24시간 가열한 후 오염되지 않은 곳에서 방냉한 것을 역삼투와 밀리Q로 정제한 정제수로 5%의 염화나트륨 용액을 만들어 헥산으로 세척하여 사용하였다. 프로리실은 잔류농약시험용 플로리실 (Supelco, Bellefonte, PA, U.S.A, PR60~100 메쉬)을 헥산으로 세척 후 130°C에서 16시간 가열하여 데시케이터 안에서 방냉하여 안지름 1cm, 길이 20cm의 유리칼럼에 플로리실 2g을 n-헥산으로 습식충진하고 칼럼상부에 무수황산나트륨을 1cm의 두께로 적층하고 다시 헥산 50ml로 세척한 것을 사용하였다. 본 실험에서 사용된 모든 유리기구는 세척 후 아세톤, 헥산으로 유기물을 제거하고 200°C이상에서 10시간 이상 가열하였고 vial insert 역시 500°C에서 8시간이상 가열하여 오염이 없는 곳에서 방냉한 것을 사용하였다. 사용한 생물시료는 냉동참치와 국내산 소고기를 사용하였다.

2.2 추출과 정제

균질화한 생물 시료 10g을 50ml의 원심관에 취하고 아세토니트릴 15ml를 넣어, 10분간 초음파추출기 (ultra-sonicator 5510, Branson, USA)로 추출한 후 3000 rpm으로 10분간 원심분리(Sorvall RT6000B, DUPONT, Wilmington, U.S.A)하고 상등액을 분취한다. 추출조작을 2회 반복하고 아세토니트릴 추출액을 합한다.

상등의 아세토니트릴 추출액의 1/2에 해당하는 15ml에 n-헥산을 적하하여 포화시킨다. 여기에 n-헥산 5

ml를 넣어 5분간 진탕하고 아세토니트릴을 분취한다. 남은 n-헥산층에 5% 함수 아세토니트릴 20ml를 넣어 추출하고 아세토니트릴층과 먼저의 아세토니트릴 추출액을 합한다. 아세토니트릴 추출액을 미리 헥산으로 세척한 5% 염화나트륨 수용액 100ml를 넣어둔 250ml의 분액깔때기에 옮기고 n-헥산 25ml를 넣어 5분간 진탕 추출한다. 추출조작을 2회 반복하고 n-헥산층을 합하고 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40°C 이하의 수욕에서 회전식 감압농축기(Heidolph WB2000, Heidolph Elektro GmbH, Deutschland)를 사용하여 10ml까지 농축한다. 농축액을 함수 프로리실컬럼(안지름 10mm, 길이 200mm의 컬럼에 2g의 함수 프로리실을 n-헥산으로 습식충진하고 상부에 무수황산나트륨을 1cm의 두께로 층적한다)에 부하한다. 수기를 설치하고 매분 1~2ml의 유속으로 액면을 컬럼베드까지 내린 후, n-헥산 50ml를 같은 유속으로 흘려보내고 n-헥산 용출액은 버린다. 다시 수기를 바꾸어 아세토니트릴:n-헥산(0.5:100) 100ml를 매분 1ml의 유속으로 흘려보내 용출시킨다. 용출액을 무수황산나트륨으로 탈수한 후 40°C 이하의 수욕에서 회전식 감압농축기를 사용하여 약 10ml까지 농축하고 다시 질소가스를 조용히 불어넣어 0.2ml로 농축하여 측정용 시료액에 내부표준액을 소정량 첨가한 후 GC/MS의 측정용 시료액으로 하였다.

2.3 기체크로마토그래피/질량분석기

기체크로마토그래피-질량분석기는 Hewlett-Packard 6890 plus 기체 크로마토그래프와 HP5973 사중극자형 질량분석기 (Hewlett-Packard, USA)를 사용하였다. 칼럼은 DB-5MS 용융 실리카 캐피러리 컬럼 (5% phenylmethylsilicone, 30m x 0.25mm, 0.25 μ m film thickness)을 이온원과 직접 연결되는 직접연결방식 (direct interface)을 사용하였다. 오븐 온도는 초기 60°C에서 2분간 머무른 후 분당 10°C/min의 승온 속도로 270°C까지 올린 후 10분 동안 머물게 하였다.

시료주입방식은 비분할주입법 (splitless, 1분 후 퍼지)으로 1 μ l 주입하였으며 주입구 온도는 250°C, 인터페이스온도는 270°C, 그리고 운반기체로 헬륨 (99.999%)을 사용하였고 유속은 1ml/min, 평균 선속도 39cm/sec이었다.

질량분석기에 사용된 이온화 법은 전자 충격법 (electron impact ionization)으로 이온화 에너지 70 eV에서 사용하였으며, 이온원 온도 230°C를 유지하였다.

Table 1. Retention times(RT) and mass spectral characteristic ion of phthalates

Compound	RT(min)	Characteristic ion(m/z, %)
Diethyl(DEP)	14.14	29(11), 149(100), 177(M-OC ₂ H ₅ , 35), 222(M ⁺ , 3)
Dipropyl (DPP)	16.17	43(7), 149(100), 209(M-C ₃ H ₅ , 9), 250(M ⁺ , 0.3)
Di-iso-butyl (DiBP)	17.14	57(66), 149(100), 167(7), 223(M-C ₄ H ₇ , 9)
Di-n-butyl (DBP)	18.08	57(9), 149(100), 167(1), 223(M-C ₄ H ₇ , 10)
Di-n-pentyl (DPnP)	19.87	71(4), 149(100), 167(1), 237(M-C ₅ H ₉ , 6)
Di-n-hexyl (DHP)	21.53	85(17), 104(100), 149(96), 251(M-C ₆ H ₁₁ , 11), 334(M ⁺ , 1)
n-Butylbenzyl (BBP)	21.64	91(C ₇ H ₇ , 71), 149(100), 206(M-C ₇ H ₆ O, 24), 312(M ⁺ , 1)
Di-cyclohexyl (DCHP)	23.16	149(100), 167(28), 249(M-C ₆ H ₉ , 3)
Di-2-ethylhexyl (DEHP)	23.27	149(100), 167(44), 279(M-C ₈ H ₁₅ , 22), 390(M ⁺ , 0.5)
Phenanthrene-d ¹⁰	16.39	188(M ⁺ , 100), 186(M ⁺ -2, 6)

검출모드로 정량분석을 위하여 선택이온검색(selected ion monitoring, SIM)에서 각각의 정량이온과 확인이온을 선택하였다. 본 실험에서 선택한 정량 및 확인이온을 Table 1에 실었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 GC/MS 분석에 의한 확인

프탈산 에스테르류의 표준용액에 대한 total ion chromatogram을 Fig. 1에 나타내었고, 이들에 대한 비극성 칼럼인 DB-5에서의 머무름 시간 (retention time, min) 및 특성이온 (characteristic ion, m/z)을 Table 1에 나타내었다. Fig. 1에서 보듯이, 이들 9개 화합물들은 본 chromatographic 분리조건에서 매우 잘 분리되었으며, 용리 순서는 ester기의 탄소 수가 증가할수록 늦은 머무름 시간을 나타내었다. 또한 같은 탄소수를 가진 경우, iso-로 치환된 것이 n-치환기를 가진 프탈산 에

스테르류 보다 먼저 용리되었다.

Table 1에서 보듯이, 프탈산 에스테르류의 EI 질량 스펙트럼은 분자 이온(molecular ion)의 세기가 매우 약하다. 그러나 이들 스펙트럼들은 공통적으로 나타나는 이온인 m/z 149 기준피크 (base peak)가 생성되었고, 이 이온에 의해 프탈산 에스테르류를 확인할 수 있다²⁴. 이들의 질량 스펙트럼상에서 가지 달린 프탈산 에스테르류의 질량 스펙트럼은 곧은 사슬 프탈산 에스테르류의 스펙트럼과 전체적으로 매우 유사하다. 따라서 이들 이성질체의 구분은 질량분석 스펙트럼에 의해서만 어렵기 때문에 머무름 시간에 의해서 구분할 수 있었다. 이러한 확인 방법은 미국 EPA method 525도 같은 방식을 취하고 있으며²⁵, 프탈산 에스테르류의 존재를 확인하기 위하여 머무름 시간과 함께 사용되는 특징적인 질량 분석 이온으로는 m/z 149를 정하고 있다. 그러나 프탈산 에스테르류의 정량분석에 있어서 다른 확인이온을 선택하지 않고, 정량이온인 m/z 149만 사용하면 잘

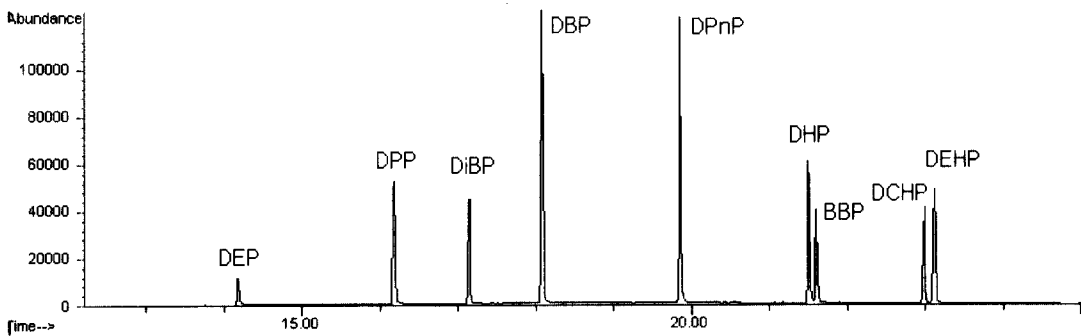


Fig. 1. Total ion chromatogram of standard phthalates mixture.

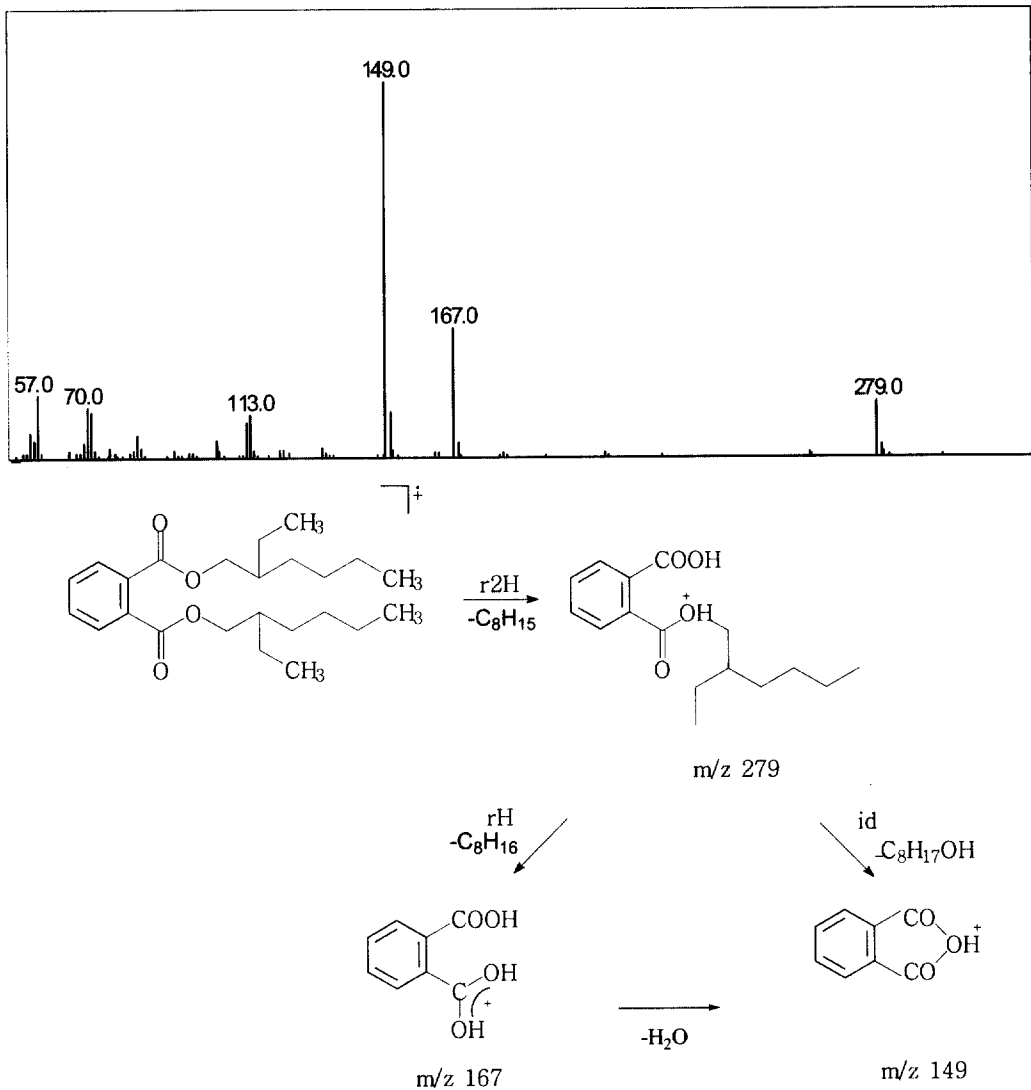


Fig. 2. Mass spectrum of di-2-ethylhexyl phthalate and formation of diagnostic ions.

못된 실험결과를 유발할 수 있다. 예를 들어 분석하고자 하는 시료의 매트릭스가 프탈산 에스테르나 nonylphenol 이성체 또는 이 둘을 모두 포함하고 있다면 이 두 화합물은 질량스펙트럼에서 강한 세기의 m/z 149 이온을 나타내므로 잘못된 정량 값을 나타낼 수 있다. 이러한 경우에는 머무름 시간과 2개 이상의 선택이온을 사용하여 정확한 정량분석을 수행할 수 있다. 프탈산 에스테르의 정량이온으로 사용되는 기준이온인 m/z 149는 프탈산 에스테르의 종류와 관계없이 Fig. 2와 같이 rearrangement에 의해 생성되고 m/z149와

m/z167의 상대적 비는 alkyl chain의 길이에 따라 달라진다. Fig. 2에서 보듯이, 프탈산 에스테르는 우선 한쪽에 치환된 탄소줄기가 2개의 수소원자가 이전 (migration)되는 동시에 떨어져 나가면서 특성이온 (m/z 279)이 형성되고 난 후 rearrangement에 의해 기준피크인 m/z 149 이온이 형성된다²⁶. 또 다른 특성이온은 한개의 수소이온이 이전됨과 동시에 탄소줄기가 떨어져서 생성되는 이온 (m/z 167)이다. 그 외의 다른 질량토막이온들은 매우 약하게 나타난다.

실제 환경시료에서는 프탈산 에스테르가 ppb (parts

per billion) 및 ppt (parts per trillion)으로 존재하므로 이들의 검출을 위해서는 GC/flame ionization detector(FID)로는 어려움이 많다. 우선 FID의 감도가 수 ppt수준까지 검출하기 어렵고 방해물질에서 오는 피크와 구분할 수 없는 단점을 가지고 있다. 따라서 극 미량물질의 정량과 정성분석을 함께 수행할 수 있는 GC/MS-selected ion monitoring (SIM)기법이 매우 유용하다. SIM법은 이온의 선택성으로 프탈산 에스테르류와 함께 추출된 방해물질의 피크는 감소시키고 반면 프탈산 에스테르류의 선택이온을 연속적으로 조사하여 감도를 크게 증가시킬 수 있다. 또한 머무름 시간과 더불어 선택한 2개의 이온의 비를 조사하면 정성분석도 함께 수행되는 장점이 있다. 따라서 본 실험에서 선택이온 검색에 의해 얻어진 각 프탈산 에스테르류의 검출한계(detection limit)²⁷와 상대감응비 (relative response factor, RRF)를 Table 2에 실었다. Table 2에서 보듯이, GC/MS상의 상대감응비는 치환된 ester기의 종류에 따라서 약간의 차이를 나타내고 있으며 n-dibutylphthalate와 n-dipentyl phthalate가 가장 높은 상대감응비를 나타낸다. 비교적 상대감응비가 높은 물질들이 높은 검출한계를 보이나 n-dibutylphthalate와 di-2-ethylhexylphthalate의 경우 전처리 과정에서 불순물로 유입되어 바탕시험에서 분석대상물질이 검출되므로 이 두 물질이 가장 낮은 감도를 나타내었고 내분비계장애물질의 측정분석 방법에서의 경우도 이 두 물질의 경우 목표검출한계가 25 μ g/kg이다²⁷.

Table 2. Method detection limits(MDL) and relative response factors of phthalates

Compound	Detection limit (μ g/kg)	RRF
Diethyl(DEP)	4	0.22
Dipropyl (DPP)	2	0.71
Di-iso-butyl (DiBP)	2	0.67
Di-n-butyl (DBP)	12	1.18
Di-n-pentyl (DPnP)	2	1.12
Di-n-hexyl (DHP)	2	0.81
n-Butylbenzyl (BBP)	2	0.43
Di-cyclohexyl (DCHP)	11	0.50
Di-2-ethylhexyl (DEHP)	22	0.63

Method detection limits(MDL)

Relative response factors(RRF) = (area of each phthalates x concentration of phenanthrene-d₁₀:500ng/ml) / (area of phenanthrene-d₁₀ x concentration of phthalates).

3.2 생물시료 중 프탈산 에스테르류의 추출 및 정제

일반적으로 생물시료 (어류 및 양서류)에서 프탈산 에스테르류를 추출할 때는 Soxhlet 추출방식을 주로 사용하나, 이 과정은 많은 용매의 사용과 추출시간이 긴 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 초음파 추출법을 사용하였고, 추출용매로는 아세토니트릴을 사용하였다. 생물시료는 초음파추출 과정에서 프탈산 에스테르류와 함께 과량의 지질성분들이 함께 추출되어 나온다. 이때 어류나 양서류 시료에서 추출되는 대부분의 지질은 mono-, di-, triglyceride 및 phospholipid로 구성되어 있다. 이러한 지질류는 헥산에 매우 잘 녹으므로 아세토니트릴과 n-헥산으로 액-액분배를 하면 헥산층에 많은 양의 지질이 녹아 들어간다. 따라서 헥산층을 버리고 나면 추출 아세토니트릴층에는 많은 양의 지질성분이 제거된다. 그러나 이렇게 처리된 용액 내에는 지질이 외에 극성의 방해물질이 남아 있으므로 이들을 효율적으로 제거하기 위해서는 칼럼정제 방식이 필수적이다. 칼럼 크로마토그래피를 이용한 추출액의 정제는 고체 흡착제에 시료를 통과시킨 후 적당한 유기용매로 탈착 시킴으로써 시료 속에 공존하는 여러 물질들을 분취하여 방해효과를 최소화하도록 한다. 일반적으로 프탈산 에스테르류를 정제할 때에는 알루미나 및 Florisil 등의 흡착제를 사용하거나 GPC등을 이용할 수 있는데 컬럼 정제방법의 경우 충전물질의 정제, 보관상태 및 충전과정 등이 실험편차를 크게 하는 원인이 되므로 흡착제의 활성정도를 검사하여야한다. 본 실험에서는 Florisil을 사용하였는데, 이는 충전물질의 팽윤과정 및 충전과정이 비교적 용이하기 때문이다. Florisil은 극성을 띠는 방해물질을 강하게 흡착시키므로 프탈산 에스테르류와 같은 물질을 추출액으로부터 분리하기가 용이하였다. 본 실험에서도 효율적인 정제를 위하여 Florisil 컬럼에 대한 프탈산 에스테르류의 용출실험 결과를 Fig. 3에 실었다. Fig. 3에서 보듯이, 대부분의 프탈산 에스테르류는 기본 벤젠고리구조에 달려있는 에스테르기에 치환된 알킬 그룹의 길이에만 차이가 있어 실제 실험에 사용된 모든 프탈산 에스테르류의 극성정도가 매우 비슷하고 또한 사용된 플로리실의 양이 2g이므로 0 - 40 ml 용리액에서 약 90%이상이 용출되었음을 볼 수 있다. 따라서 이러한 특성들을 이용하여 머무름 시간이 늦은 극성 물질들로부터 프탈산 에스테르류의 정제가 충분히 가능하였으며, 플로리실의 양을 더욱 늘렸을 경우 각 프탈산 에스테르류간의 미세한 차이가 보였다.

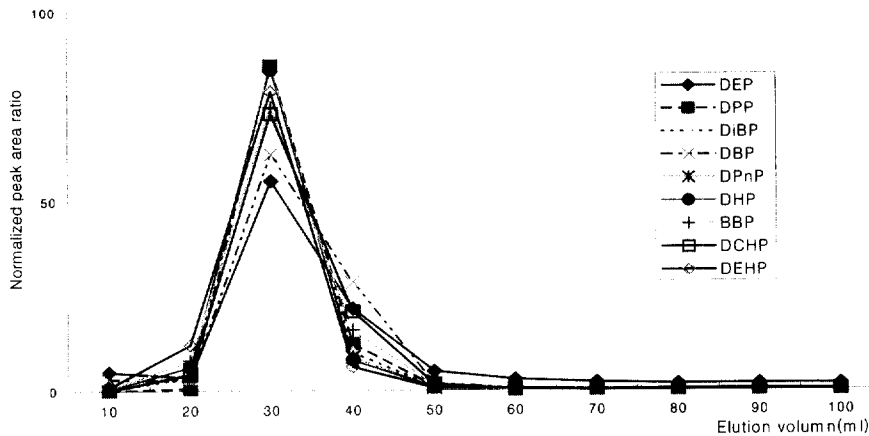


Fig. 3. Elution behavior of phthalates on Florisil column eluted with hexane/acetonitrile (v/v, 100/0.5).

3.3 프탈산 에스테르류의 회수율 및 정량

회수율 실험을 위하여 어류 시료에 각 300ng을 함유하는 프탈산 에스테르류 혼합액을 첨가한 후 아세토니트릴을 추출용매로 사용하여 초음파 추출기로 추출하고 Florisil 컬럼을 통해 정제하였을 때, Table 3에서 보듯이 79 - 119% 범위의 회수율을 보여 주었다. 여기서 DEP의 경우 용매를 날려보내는 과정을 통하여 약간의 손실이 오히려 가장 낮은 회수율을 보인다. 본 실험 방법을 통하여 GC/MS-SIM 방식에 의해 얻어진 SIM chromatogram을 Fig. 4에 실었다. Fig. 4에서 보듯이, 각각의 프탈산 에스테르류는 방해물질 피크에 간섭받지 않고 잘 검출되었다. 내부표준물질인 phenanthrene-d₁₀은 이온 크로마토그램 m/z 188에서 다른 피크의 겹침 없이 검출되었다. 이들 두 피크의 면적비를 계산하면 추출 및 정제과정의 전반적인 회수율을 측정할 수 있다.

실제 환경상태 시료 내에 존재하는 미량의 프탈산 에스테르류의 정량분석은 GC/MS-SIM 방식으로 검출된 각 이온 크로마토그램상에서 검출된 프탈산 에스테르류의 피크 면적과 내부표준물질 피크의 면적비를 계산함으로써 정확한 정량값을 얻을 수 있다. 각 프탈산 에스테르류가 함유된 시료에 500ng의 내부표준물질인 phenanthrene-d₁₀를 넣고 10ng/g - 6000ng/g 범위에서 검량선을 최소자승법 (least square method)으로 얻었다. 이들의 직선식은 Table 4에 실었다. Table 4에서 보듯이 각각의 검량선의 직선성은 0.9925 - 0.9982로 나타났다. 또한 실험의 회수율을 측정하며, 검정하는 목적으로 회수율 내부표준물질 (syringe internal standard)의 피크와 내부표준물질의 피크 면적을 계산하면 실험의

정확성을 보완할 수 있다. 일반적으로 각 프탈산 에스테르/phenanthrene-d₁₀의 면적비로서 계산되는 회수율이 70% 미만이거나 120% 이상일 경우 재실험을 해서 정량을 확인해야한다.

Table 3. Recoveries of phthalates for biota sample using GC/MS-SIM mode

Compound	Mean recovery(%)	RSD(%)
Diethyl(DEP)	79	6.1
Dipropyl(DPP)	104	8.9
Di-iso-butyl (DiBP)	108	8.8
Di-n-butyl (DBP)	111	12.9
Di-n-pentyl (DPnP)	110	8.9
Di-n-hexyl (DHP)	93	9.0
n-Butylbenzyl (BBP)	110	9.0
Di-cyclohexyl (DCHP)	117	6.6
Di-2-ethylhexyl (DEHP)	100	9.1

Table 4. Equations of calibration curves for phthalates

Compound	Equation	Linear coefficient(R ²)
Diethyl(DEP)	y=0.6566x - 0.1959	0.9926
Dipropyl(DPP)	y=2.0829x - 1.1281	0.9925
Di-iso-butyl(DiBP)	y=1.8515x - 0.8758	0.9940
Di-n-butyl(DBP)	y=2.9118x - 1.1200	0.9982
Di-n-pentyl(DPnP)	y=2.8245x - 1.1523	0.9981
Di-n-hexyl(DHP)	y=2.2592x - 1.1516	0.9946
n-Butylbenzyl(BBP)	y=1.1439x - 0.5431	0.9960
Di-cyclohexyl(DCHP)	y=1.4636x - 0.7847	0.9930
Di-2-ethylhexyl(DEHP)	y=1.6683x - 0.7916	0.9962

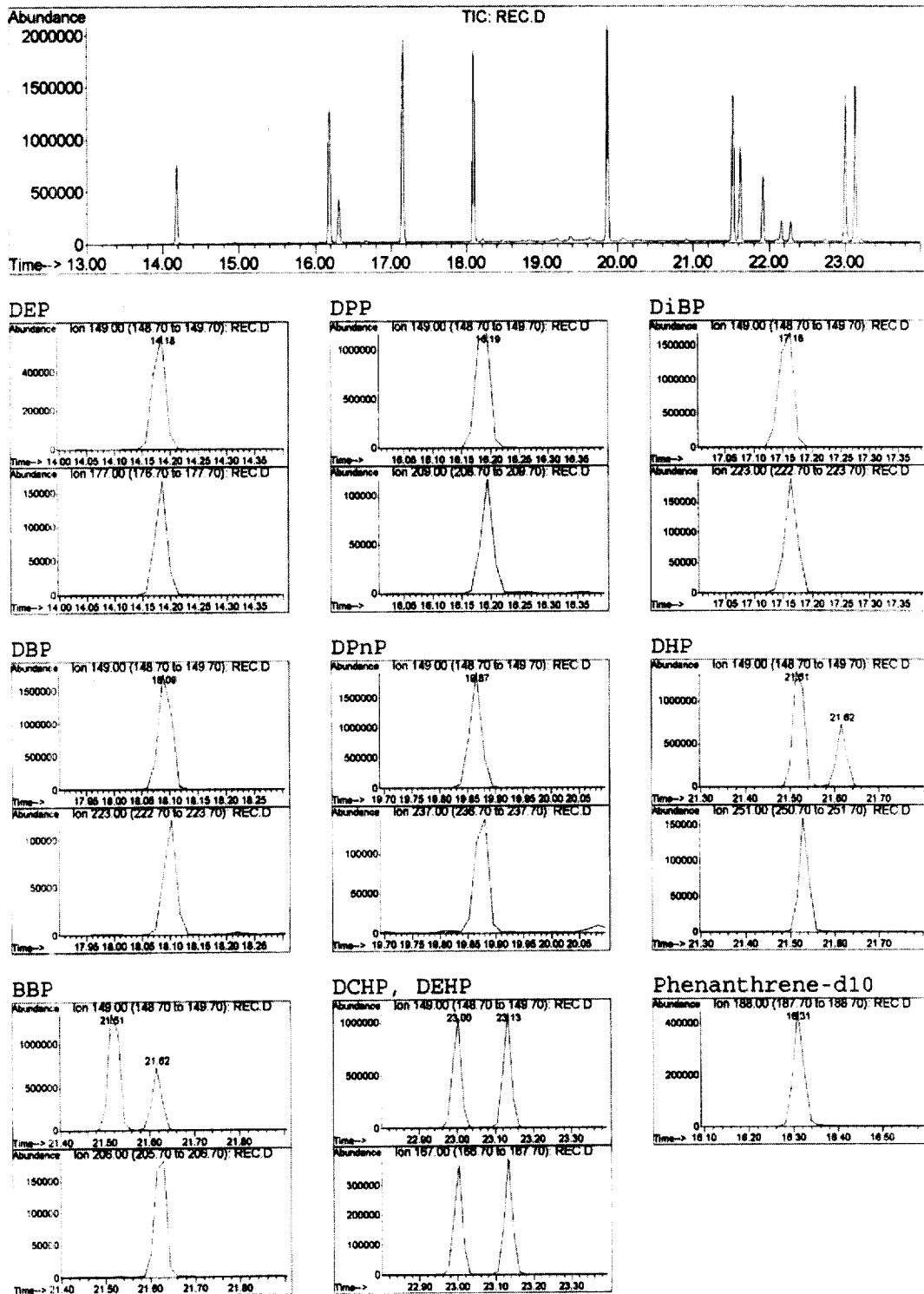


Fig. 4. Typical SIM chromatograms of phthalates for spiked fish samples.

3.4 실험과정에서 프탈산에스테르류의 오염 최소화

프탈산 에스테르류는 전처리 과정 중 매우 쉽게 오염이 된다. 심지어 유기용매는 개봉 후 하루만 지나도 프탈산 에스테르류에 의해 오염된다고 알려져 있다²⁰. 프탈산 에스테르류의 분석에 있어서 정량분석은 많은 어려움이 있다. 일단 바탕 시험에서도 과량의 프탈산 에스테르류가 검출되고 이들의 source를 찾는 데 어려움이 있다. 실제 분석에서 아무리 조심하여도 실험 전처리하는 과정에서 프탈산 에스테르류가 검출되며 이들의 양은 균일하게 나타나지 않는다는 점이다. 본 실험에서 실제 생물시료를 아세트나이트릴 용매를 사용하여 초음파 추출법으로 추출했을 경우 과량의 지질성분이 같이 추출되어 나오는데 이를 없애주기 위해 과량의 헥산으로 지질성분을 추출하게 된다. 그러나 이 방법으로 완벽히 지질성분을 없앨 수 없으므로 반드시 칼럼 정제 과정이 필요하다. 본 실험의 전처리 단계를 모두 여섯 단계로 나누어 각각의 단계에서 오는 오염 정도를 측정 한 결과 칼럼 정제 과정에서 가장 많이 오염이 되는 것으로 나타났다. 따라서 잔류농약시험용 및 PCB 시험용의 용매를 반드시 사용하여야 하고 Florisil도 반드시 유리병에 있는 잔류농약용 제품을 사용하고 사용 전 용리액으로 충분히 씻어내어야 한다. 다른 처리 없이 순수한 용액만 농축하여 GC/MS-SIM을 측정하여 보면 잔류농약시험용 및 PCB 시험용의 용매에 비해 HPLC용이 오염이 많다. 유리 솥도 특별히 처리된 잔류농약용 pyrex 제품을 사용하고 역시 400°C에서 4시간 구워준다. 프탈산 에스테르류의 florisil 칼럼에 대한 용출패턴은 Fig.3에서 보듯이 비교적 용출이 40ml이내에서 모두 이루어지므로 흘려주는 용리액 양을 조절하여 선택적으로 프탈산 에스테르류만 정제할 수 있다.

4. 결 론

지질성분이 많은 생물시료 중 프탈산 에스테르류의 추출과 정제는 초음파추출법과 프로리실 칼럼 정제방법으로 효과적으로 수행할 수 있었으며 대체로 79-119%의 회수율을 얻을 수 있었다. 프탈산 에스테르류는 전처리 과정 중에 쉽게 오염될 수 있으므로 사용하는 시약 및 용기 세정에 매우 세심한 주의를 요한다. EPA 방법²⁰에도 칼럼 정제방법을 사용하는 한 바탕시험에서 완전히 프탈산 에스테르류를 없애는 것은 불가능하다고 되어있으며 따라서 가능한 실험 전처리

과정을 최소화하고 사용하는 용매의 양을 최소한으로 줄이는 것이 한 방법이 될 수 있다. 본 조건에서 9종의 프탈산 에스테르류가 효과적으로 분리되었으며 GC/MS-SIM 방법으로 극미량의 프탈산 에스테르류 검출이 가능하였다. 위의 방법은 어류, 쇠고기 시료 외에 지방성분을 함유하고있는 돼지고기, 식품 등에 존재하는 다른 프탈산 에스테르류의 분석에도 적용될 수 있을 것이다.

5. 감사의 글

본 연구는 환경부 "차세대 환경 핵심 기술 개발 사업"의 환경 측정 자료의 품질 관리 시스템 개발로 수행된 연구 결과의 일부이며, 지원하여 주신 환경부에 감사드립니다.

6. 참고문헌

1. M. Burk, *Environ. Sci. Tech. News* Oct. 398A-399A (1999).
2. USEPA EPA-560/3-75-002 Washington D.C. (1975).
3. Koplax "정밀화학관련제품동향" <http://www.koplas.net/information/data-a01-36-1/h.htm>
4. 화학경제연구원, *화학저널* 2000/11/13
5. M.J. Bauer, R. Herrmann, A. Martin and H. Zellmann, *Proceedings of the Water Quality International 1998 IAWQ 19th Biennial International Conference* 6 348-355 (1998).
6. X. Bosch, *Lancet*, 354(9195) 2060-2061(1996).
7. Europa Health and Consumer Protection 6th CSTEEN plenary meeting, Brussel, 26/27 Nov. (1998)
8. K. Christen, , *Environ. Sci. Techn. News* Jan. 11A (2000).
9. M. Castillo and D. Barcelo, *TRAC-trend in analytical chemistry*, 16(10), 574-582 (1997).
10. "Health and Consumer Protection Opinion on phthalates migration from soft PVC toys and child care article"-6th CSTEEN plenary meeting, Brussels (1998)
11. C. Staples, D. R. Peterson, T. F. Parkerton, and W. J. Adams *Chemosphere*, 35(4), 667-749 (1997).
12. M. Vitali, M. Guidotti, G. Macilenti and C. Cremisini,

- Environ. Inter.*, 23(3), 337-347 (1997).
13. A. Yasuhara, H. Shiraishi, M. Nishikawa, T. Yamamoto, T. Uehiro, O. Nakasugi, T. Okumura, K. Kenmotsu, H. Fukui, M. Nagase, Y. Ono, Y. Kawagoshi, K. Baba, Y. Noma, *J. Chromatogr. A*, 774, 321-332 (1997).
 14. R. Lega, G. Ladwig, O. Meresz, R. E. Clement, G. Crawford, R. Salemi and Y. Jones, *Chemosphere*, 34(8), 1705-1712 (1997).
 15. N. Nakada, T. Isobe, H. Nishiyama, K. Okuda, S. Tsutsumi, J. Yamada, H. Kumata and H. Takada, *Bunseki Kagaku*, 48(6), 535-547 (1999).
 16. S. C. Rastogi, *Chromatographia*, 47(784), 724-726 (1998).
 17. A. Penalver, E. Pocerull, R. M. Marce, *Trend in Analytical Chemistry*, 18(8), 557-568 (1999).
 18. A. Penalver, E. Pocerull, F. Borrull, R. M. Marce, *J. Chromatogr. A*, 872 191-201 (2000).
 19. A. Penalver, E. Pocerull, F. Borrull, R. M. Marce, *J. Chromatogr. A*, 922, 377-384 (2001).
 20. USEPA Method 8061A Washington D.C EPA (1996).
 21. M. T. Kelly, M. Larroque, *J. Chromatogr. A*, 841 177-185 (1999).
 22. G. D. Bella, M. Saitta, M. Pellegrino, F. Salvo and G. Dogo, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1009-1012 (1999).
 23. B. C. Blount, K. E. Milgram, M. J. Silva, N. A. Malek, J. A. Reidy, L. L. Needham and J. W. Brock, *Anal. Chem.* 72, 4127-4134 (2000).
 24. R. Kumar, *American Laboratory*, 32, 33-35 (1999).
 25. USEPA Method 525.2 Washington D.C EPA (1994).
 26. F. W. McLafferty and F. Tureck "Interpretation of mass spectra" 4th Ed., p. 258 University Science Book, California, U.S.A., 1993.
 27. 국립환경연구원 "내분비계장애물질의 측정분석 방법" p. 16, 1999