Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 21, No. 4, 259-271, 2008

HS SPME-GC/MS를 이용한 혈액 중 유기염소계 농약의 분석법 개발

강태우[1, 2] · 표희수[1] · 홍종기[2, ★]
[1]한국과학기술연구원 생체대사연구센터
[2]경희대학교 약학대학 약학과
(2008. 5. 20. 접수. 2008. 6. 23. 승인)

Development of an analytical method of organochlorine pesticides in human bloods using head space-solid phase microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry

Tae-woo Kang[1, 2], Hee-soo Pyo[1] and Jongki Hong[2, ★]
[1]Bioanalysis and Biotransformation Research Center, Korea Institute of Science and Technology P.O. Box 131,130-650 Cheongryang, Seoul, Korea
[2]College of Pharmacy, Kyung Hee University 130-701 Hoegi-Dong, Dongdaemun-gu, Seoul, Korea
(Received May 20, 2008; Accepted June 23, 2008)

요 약: 혈액 내에 축적되어 있는 유기염소계 농약을 분석하기 위한 방법으로 기존에는 액체-액체 추출법과 고체상 추출법을 많이 사용하였으나 정제 및 많은 양의 시료 처리에 한계가 있다. 이를 극복하기 위한 방법으로 시료양이 적으며 간편한 고체상미량추출법을 사용하여 혈액 중 18종의 유기염소계 농약의 최적 추출법을 연구하였다. 흡착조건(fiber type, 흡착시간, 흡착온도, 염석효과)과 탈착조건(탈착시간, 탈착온도) 등 최적의 추출을 위해 여러 가지의 실험조건 등을 검토한 결과, fiber는 polyacrylate 85 μm, 흡착시간은 50분, 흡착온도는 80°C, 염석효과는 NaCl 0.1 g, 탈착시간은 5분, 탈착온도는 280°C에서 최적임을 확인하였다. 정확도, 정밀도 및 검출한계에 대한 타당성을 최적 실험조건에서 조사한 결과, 검출한계는 0.05~0.20 ng/mL, 정밀도는 5.59~13.39%, 정확도는 -0.5%~24.5%의 범위인 것으로 확인되었다.

Abstract: The analytical method of extracting compounds from human blood to examine accumulated organochlorine pesticides (OCPs) has been widely used the traditional liquid-liquid extraction (LLE) method and solid-phase extraction (SPE) method, yet these methods have certain limitations in purification and usafe of a large amount of sample. In order to overcome the se problems reside in these, solid-phase microextraction (SPME), known as a highly efficient extration method with less samples and relatively simple, was employed to collect 18 different kinds of OCPs in blood as extraction method in this study. To optimize extraction method, we examine various experimental SPME-parameters such as adsorption (fiber type, adsorption time, adsorption temperature, salting out effect), and desorption (desorption time, desorption temperature etc.). From the

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)2-961-9255 Fax : +82-(0)2-961-0357
E-mail : jhong@khu.ac.kr

experimental results, the optimal conditions are as follows: fiber was polyacrylate with 85 μm, adsorption time was for 5 min, adsorption optimum temperature was at 280°C, and salting out effect was NaCl with 0.1 g. MDL, precision and accuracy was in the ranges of 0.05~0.20 ng/mL, 5.59~13.39%, respedively, and accuracy was -0.5% ~24.5% for all OCPs.

Key words : organochlorine pesticides, blood, GC/MS, SPME

1. 서 론

유기염소계 농약(organochlorine pesticides, OCPs)은 20세기 들어 산업 발전의 가속화 및 합성 농약의 대량 사용 등에 의하여 이미 지구 전역에 확산되어 있으며, DDT와 같은 농약은 국내에서 사용 금지된 지 30년이 되었지만 아직도 토양 등의 환경 시료에서 검출되고 있을 정도로 환경매체에 잔류성이 높은 것으로 알려졌다.[1-5] 일부 독성 및 잔류성이 큰 유해화학물질들은 환경에 배출된 후 분해되지 않고 대기 및 해류 등을 통해 전 세계를 돌아다니며 적당한 환경매체에 잔류하는 것으로 알려져 있다. 이로 인해 북극 지역 생물 및 주민들에게까지 사용사례가 없는 잔류성 유기오염물질(persistent organic pollutants, POPs)이 검출되고 있는 것으로 보고되고 있다.[6-8]

POPs가 인간에게 노출되는 주된 경로는 음식물을 통한 인체 내 축적과 그 이외의 환경적 요인에 의한 노출로 보고되었다.[9-11] 특히, 영아의 경우 모유를 통해서 노출되는 것으로 보고되고 있으며,[12] 이러한 노출로 인해 인체 내 암을 유발시키고, 신경계 장애, 호르몬의 불균형, 내분비계 장애, 면역계 장애 및 심장혈관에도 영향을 주는 것으로 보고되고 있다.[13-15]

OCPs는 인체 내에서의 작용 기전 또한 복잡하여 과학자들 사이에 작용기전을 규명하기 위해 현재까지 많은 연구가 진행되어 왔고, 그 결과 다양한 경로에 의해 내분비계 장애등의 영향을 주는 것으로 밝혀지고 있다.[16] 예를 들어 *o,p'*-DDT는 에스트로겐 수용체와 결합하여 정상적인 호르몬과 수용체의 결합을 방해하여 정상적인 반응을 억제하거나 비정상적인 반응을 야기 시키는 것으로 알려져 있으며, *p,p'*-DDT는 에스트로겐 수용체와 결합하지 않고 세포 신호 전달 단백질 혼합체를 자극하여 세포 분열 과정을 진행시킨다고 보고되는 한편, 이와 달리 반대적 연구결과로서 *p,p'*-DDT는 안드로겐 수용체와 결합하여 안드로겐의 결합을 방해할 수도 있다고 보고되고 있다.[17-18]

이러한 잔류성이 큰 OCPs들은 그 자체 혹은 환경 중 분해산물이나 생체 내 대사체의 강력한 독성 때문에 이미 30여년 전 많은 선진국에서 이들의 생산과 사용을 법적으로 규제하였다. 국내에서도 1970년대 들어서 OCPs의 사용을 규제하였지만, 과거에 사용된 DDT와 그의 분해산물인 DDD 및 DDE 등은 환경에서의 잔류성이 높아 최근까지도 토양 중에서의 검출 사례가 보고되고 있다. 또한, 이들 화합물의 환경 잔류성과 생체 축적성 때문에 어류나 야생생물에서 종종 검출이 되고 있으며, 먹이사슬의 최상에 위치한 인간의 지방조직, 혈액 및 모유에서 검출되고 있다.[19]

액체시료에서 OCPs를 검출하기 위한 장치로는 가스 크로마토그래프(gas chromatograph, GC)가 일반적으로 널리 사용되고 있다. 이 때 분석대상물질에 따라 분리관, 검출기, 시료주입방법 등을 결정해야한다. OCPs는 비극성의 분리컬럼을 주로 사용하며, 검출기로는 유기염소계 화합물에 선택적이고 감도가 높은 전자포획검출기(electron capture detector, ECD)와 정성, 정량분석이 동시에 가능한 질량분석기(mass spectrometer, MS)가 많이 사용되고 있다. 현재까지 OCPs의 추출법으로는 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)과 고체상 추출법(solid-phase extraction, SPE)이 널리 사용되고 있다. LLE는 특별한 추출장비가 없이 간단한 방법으로 추출할 수 있지만, 전처리 시간이 비교적 길고, 유기용매의 사용으로 인체에 유해하며, 유기용매의 처리비용이 많이 드는 단점이 있다. SPE는 LLE보다 용매의 사용이 더 적고 시료를 동시에 20개 정도 까지 추출할 수 있는 장점이 있는 반면 사용되는 장비나 카트리지가 비싸다는 단점이 있다.[20-21] 고체상 미량추출법(solid-phase microextraction, SPME)은 빠르고 간편하며,[22-25] 노동력을 최소화할 수 있고, 적은 양의 시료를 사용하며 유기용매를 사용하지 않는 친환경적인 장점으로 인해 환경시료부터 생체시료에 이르기까지 다양한 시료의 분석에 적용하고 있는 실정이다. 또한, SPME 방법은 LLE와 SPE보다 농축률이 더 높기 때문에 낮은 검출한계까지 추출할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 장치가 복잡하지 않고 시료 매질에 따라

직접담금법(immersion)과 헤드스페이스(Headspace, HS)법을 모두 사용할 수 있는 장점이 있다.

본 연구는 혈액 중 18종의 OCPs에 대하여 간편하고, 감도 높은 HS-SPME 분석법 개발에 대하여 조사하였다. 혈액 중 18종의 OCPs를 추출하기 위해 SPME법의 다양한 파라미터에 대한 최적 조건을 확립하였으며, 고감도 정성, 정량 분석을 위하여 GC/MS-SIM 방법을 수행하였다. 본 개발된 분석법에 대한 정밀도, 정확도 및 검량선에 대하여 타당성을 조사하였으며, 실제 혈액 시료의 분석에 적용하였다.

2. 실 험

2.1. 시약 및 기기

2.1.1. 시약

본 연구의 분석대상물질인 OCPs 18종인 hexachlorobenzene, aldrin, oxychlordane, *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, mirex의 표준시약은 Supelco (Bellefonte, PA, USA)에서 구입하였고, heptachlor, heptachlor epoxide의 표준시약은 Chem Service (West Chester, PA, USA)에서 구입하였다. 본 연구에서 사용한 18종의 OCPs의 화학구조는 *Fig.* 1에 나타내었다. 2종의 내부표준물질은 Aldrich (Milwaukee, WI, USA) 특급시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였고, 증류수는 Mill-Q 및 Mill-RO system을 통과한 3차 증류수를 사용하였다. 유기용매인 *n*-헥산은 잔류농약 분석급으로 Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)사의 제품을 사용하였다. Artifical cerebrospinal fluid (ACSF)제조를 위한 시약인 KCl, NaCl, dextrose andhydrous, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, urea, $MgSO_4$ 및 NaH_2PO_4을 사용하였으며, 이들은 SHOWA (Tokyo, Janpan), JUNSEI (Tokyo, Janpan), KANTO chemical (Tokyo, Japan) 및 DAEJUNG (Kyonggi, Korea)사로부터 각각 구입하였다.

2.1.2. 기기 및 장치

본 연구에서 사용한 GC/MS는 Agilent 6890 Series GC에 직접 연결된 Agilent 5973N MSD를 사용하였고 HS-SPME autosampler는 CTC Analytics AG (Zwingen, Switzerland)의 Combi PAL을 사용하였다. SPME 추출을 위한 fiber는 Supelco (Bellefonte, PA, USA)사로부터 구입하였다. 이외에도 본 실험에서 사용한 SPME fiber는 다음과 같다.

Stableflex/SS : Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) 85 μm (Light Blue)

Stableflex/SS : Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB) 65 μm (Blue)

Fused silica/SS : Polydimethylsiloxane (PDMS) 100 μm (Red)

Fused silica/SS : Polydimethylsiloxane (PDMS) 30 μm (Yellow)

Fused silica/SS : Polydimethylsiloxane (PDMS) 7 μm (Green)

Fused silica/SS : Polyacrylate(PA) 85 μm (White)

2.2. 표준용액의 제조

18종의 표준시약을 정확히 0.010 g으로 무게 달아 *n*-헥산 10 mL에 녹여 1000 μg/mL의 표준원액을 만들고, 이들을 혼합하여 10 μg/mL OCPs 18종 표준 용액을 만든다. 다시 희석하여 1 μg/mL 혼합표준용액을 제조하였다. 검량선 작성을 위하여 1 μg/mL 혼합표준용액을 단계적으로 희석하여 사용하였다. 내부표준물질인 pyrene-d_{10}과 phenanthrene-d_{10}은 각각 1000 μg/mL 용액을 만들고 이들을 1:1로 섞은 후 희석하여 1 μg/mL 내부표준물질혼합용액을 만들어 보관한다.

2.3. Artificial cerebrospinal fluid (ACSF) 제조[26]

혈액 시료 분석에 앞서 바탕시료를 얻기 위하여 인공 뇌척수액을 만들어 사용하였다. 사람의 체강에 있는 모든 체액과 마찬가지로 뇌척수액은 혈액이 여과되어 나온 액체로 그 성분은 혈장과 비슷하다고 알려져 있다. 인공 뇌척수액은 NaCl 126.0 mM, KCl 5.3 mM, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 1.0 mM, $NaHCO_3$ 26.2 mM, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.8 mM, Urea 13.3 mM, d-Glucose 24.6 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM을 증류수 1 L에 녹여 사용하였고, 이 조건에서 pH는 8.0로 측정되었다.

2.4. HS SPME를 이용한 혈액시료 추출방법

SPME법에 있어서 최적의 OCP 추출조건을 확립하기 위해서 ACSF에 다음과 같은 조건을 변화시켜가며 실험하였다. OCP 추출법으로는 혈액시료에 직접담금(immersion)법을 사용하면 fiber의 수명이 짧아지고, 쉽게 오염되기에 헤드스페이스 법으로 추출하는 방식을 택하였다.

2.4.1. 고정상(fiber)에 따른 추출효율

염화나트륨 0.2 g을 첨가하고 90°C에서 50분간 추

출하되 fiber를 PDMS 100 μm, CAR/PDMS 85 μm, PDMS/DVB 65 μm, PA 85 μm, PDMS 30 μm, PDMS 7 μm로 변화시키면서 흡착시킨 후 280°C에서 1분간 탈착하여 추출효율을 비교하였다.

2.4.2. 추출온도에 따른 추출효율

추출시간 50분, 염화나트륨 첨가량 0.2 g, 탈착온도 280°C에서 1분으로 고정한 상태에서 시료 온도를 50°C, 70, 80°C, 90°C까지 변화시키면서 추출효율을 비교하였다.

2.4.3. 추출시간에 따른 추출효율

추출온도 80°C, 염화나트륨 첨가량 0.2 g, 탈착온도 280°C, 탈착시간 1분으로 고정한 상태에서 추출시간을 50분에서 90분까지 변화시키면서 추출효율을 비교하였다.

2.4.4. 탈착시간에 따른 추출효율

염화나트륨 첨가량 0.2 g, 추출온도 80°C에서 50분간 추출한 후 280°C에서 탈착시간을 0.5분부터 10분까지 변화시키며 비교하였다.

2.4.5. 탈착 온도에 따른 추출효율

추출온도 80°C, 염화나트륨 첨가량 0.2 g, 추출시간 50분으로 고정한 상태에서 주입구 온도를 200°C에서 310°C까지 변화시키며 5분간 탈착하였다.

Table 1. Optimum parameters of HS SPME for OCPs

Parameter	Biological Samples
	Whole blood
Fiber Type	PA 85 μm
Sample Amount	1 mL
Added Water	1 mL
Added NaCl	0.1g
Adsorption Temp (°C)	80
Adsorption Time (min)	50
Desorption Temp (°C)	280
Desorption Time (min)	5.0

2.4.6. 염석효과(salting out)에 따른 추출효율

염화나트륨 첨가량을 0M~8.55M까지 변화시키면서 80°C에서 50분간 추출한 후 280°C에서 5분간 탈착하여 추출효율을 비교하였다.

2.4.7. 최적 추출조건에 따른 추출방법

ACSF 2 mL에 NaCl 0.1 g (0.855M)을 첨가한다. 이를 교반시키면서 80°C에서 50분간 PA 85 μm fiber에 흡착을 시킨 후 GC의 주입구에서 280°C, 5분간 탈착시킴으로써 컬럼 안으로 주입시킨다. 최적의 추출조건은 *Table* 1에 정리하였다.

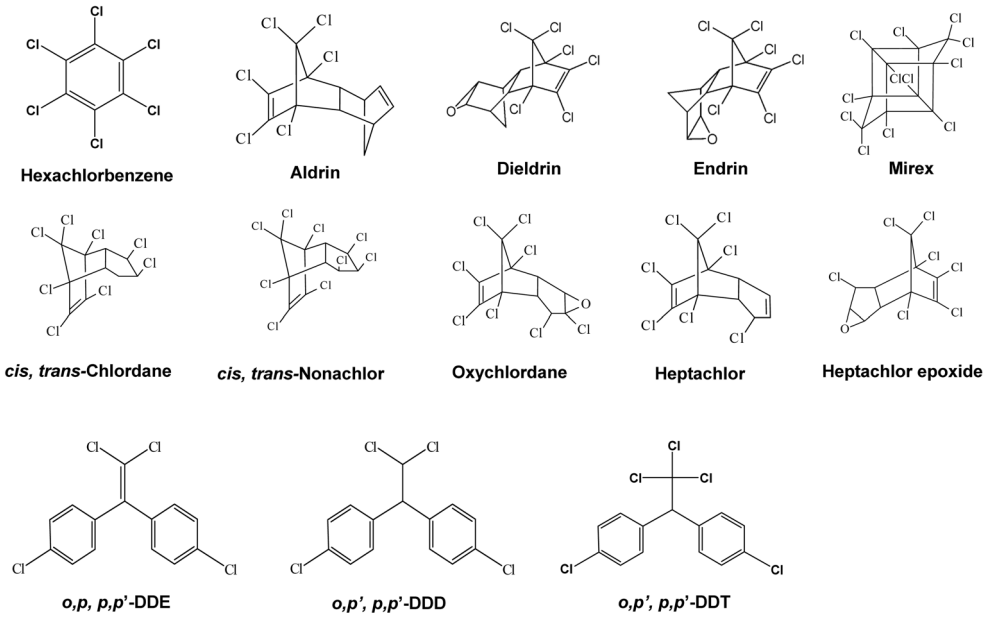

Fig. 1. Chemical structures of organochlorine pesticides.

Table 2. GC/MS operating conditions for OCPs

GC				
Column : Ultra-2 (Cross-linked 5% Phenylmethylsilicon, 25 m × 0.2 mm I.D × 0.33 μm film thickness)				
Carrier Gas : He at 1 mL/min (12 min)				
Split ratio : 1/10				
Injection port temp. : 280°C				
MS				
Transferline temp. : 280°C				
Ion source temp. : 230°C				
Ionization mode : Electron impact (EI)				
Electron energy : 70 eV				
Scan mode : 40~550 amu (solvent delay : 4 min)				
Oven temp. program :				
initial temp.(°C)	initial time(min)	rate (°C/min)	final temp.(°C)	final time(min)
80	0	15	230	2
		5	245	6
		10	310	0

GC/MS/SIM Condition

Run Time : 24.25 min
SIM mode (solvent delay : 4 min)

Group	Start time(min)	Selected Ions, m/z
1	4.0	94, 249, 188, 237, 272, 274, 284, 286,
2	10.9	66, 263, 265, 353, 355, 387, 389
3	12.3	106, 212, 246, 248, 373, 375, 407, 409
4	13.2	79, 235, 237, 246, 248, 263, 265
5	13.8	81, 235, 237, 263, 265, 407, 409
6	15.0	235, 237, 272, 274

2.5. 기기분석방법

SPME fiber에 흡착된 분석대상물질은 GC 주입구에서 탈착되어 GC 캐필러리 컬럼 내로 주입되며 *Table* 2의 기기분석 조건에 따라 분석하였다. GC/MS 전자충격이온화방식의 분석법을 이용하였으며, 대상물질 및 내부표준물질을 질량 주사범위 40-550 amu의 scan mode로 질량스펙트럼을 확인한 후, 각 물질별로 2~3개의 특성이온을 선택하여 선택이온검출법(SIM)으로 검출하였다.

2.6. 검량선 및 검출한계

ACSF 2 mL에 각각 일정량의 내부표준물질과 혼합표준용액을 단계적으로 0.05~10.0 ng/mL 의 범위로 첨가하고 2.4와 2.5에서 설명한 방법에 따라 전처리한 후 GC/MS에 의해 분석하여 각 물질과 내부표준물질의 농도비와 검출된 양에 따라 검량선을 작성하였다. 검출한계는 S/N 비가 3이상이 되는 최저의 농도로 정하였다.

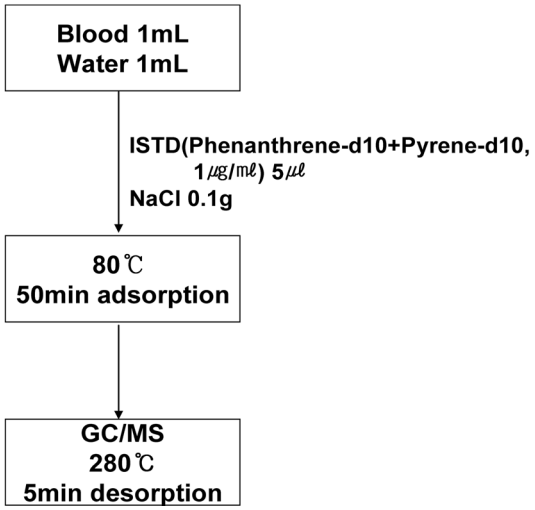

Fig. 2. Sample preparation procedure for the analysis of OCPs in whole blood samples.

3. 결과 및 고찰

3.1. HS SPME의 최적 추출조건 선택

3.1.1. 고정상(fiber)에 따른 추출효율 결과

ACSF 2 mL에 염화나트륨 0.2 g을 첨가하고 80°C에서 50분간 추출하되 fiber를 PDMS 100 μm, PDMS/DVB 65 μm, PA 85 μm, PDMS 30 μm, PDMS 7 μm, CAR/PDMS 85 μm로 변화시키면서 흡착시킨 후 280°C에서 1분간 탈착하였다(*Fig.* 3). SPME법에 있어서 분석물질을 흡착시키는 fiber의 선택 기준은 fiber에 코팅되어 있는 화합물의 극성도에 의해 좌우된다. 고정상은 용융된 실리카에 다양한 화합물을 결합시킨 형태를 갖는다. 본 실험에서 사용한 fiber는 비결합형태의 비극성 PDMS, 비교적 극성이 높은 carboxen, divinylbenzene을 가교 결합시킨 fiber 및 중간극성을 띄는 PA였으며, 코팅된 필름두께에 따라 oCPs의 흡착능의 변화를 확인하였다. PDMS의 경우, 30 μm 보다 100 μm를 사용하였을 때 높게 나타나 코팅된 필름의 두께가 증가할수록 OCPs의 흡착율이 증가하는 것을 확인하였다. CAR-PDMS의 경우에서는 흡착율이 비교적 낮은 결과를 확인하였다. PDMS-DVB는 비교적 높은 흡착율이 나타났으나, heptachlor에 대하여 낮은 흡착율을 확인하였다. PA의 경우 OCPs에 대하여 *p,p'*-DDT의 흡착율이 PDMS 100 μm에 비해 약간 낮아지는 경향이 있었지만 다른 OCPs에 대하여 대체적으로

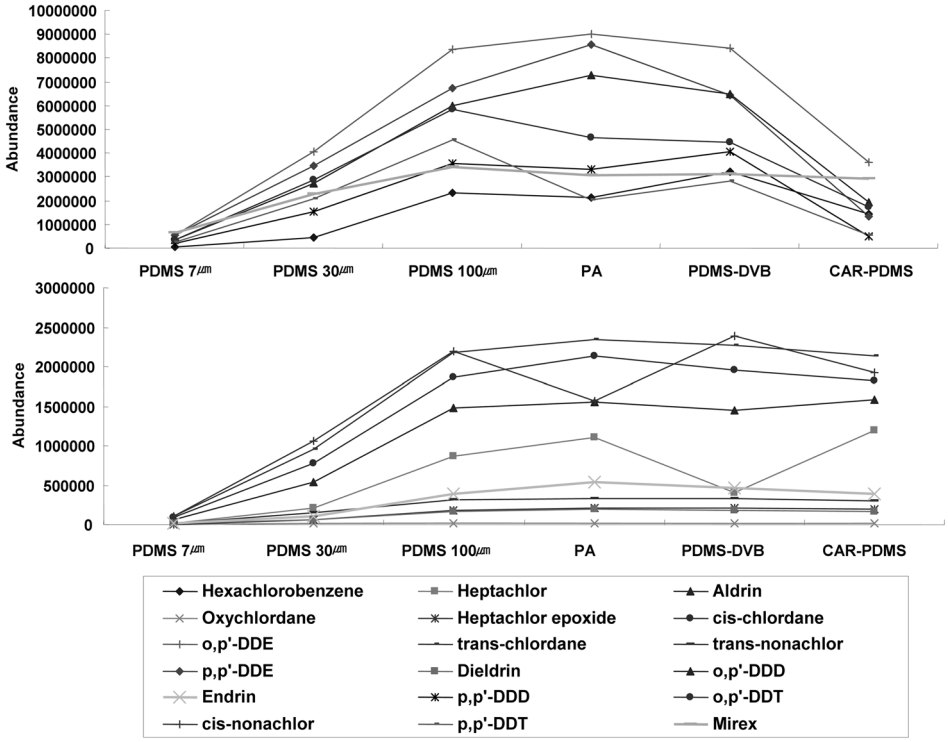

Fig. 3. Comparison of extraction efficiency of analytes obtained by six SPME fibers.

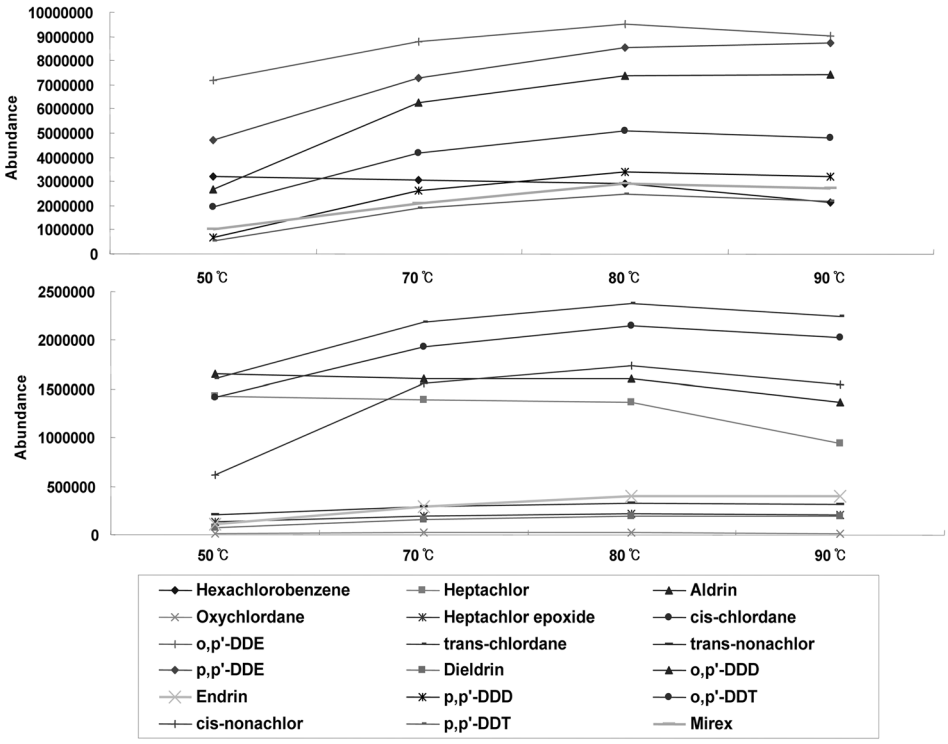

Fig. 4. Effect of the exposure temperature of the fiber in extraction of the analytes.

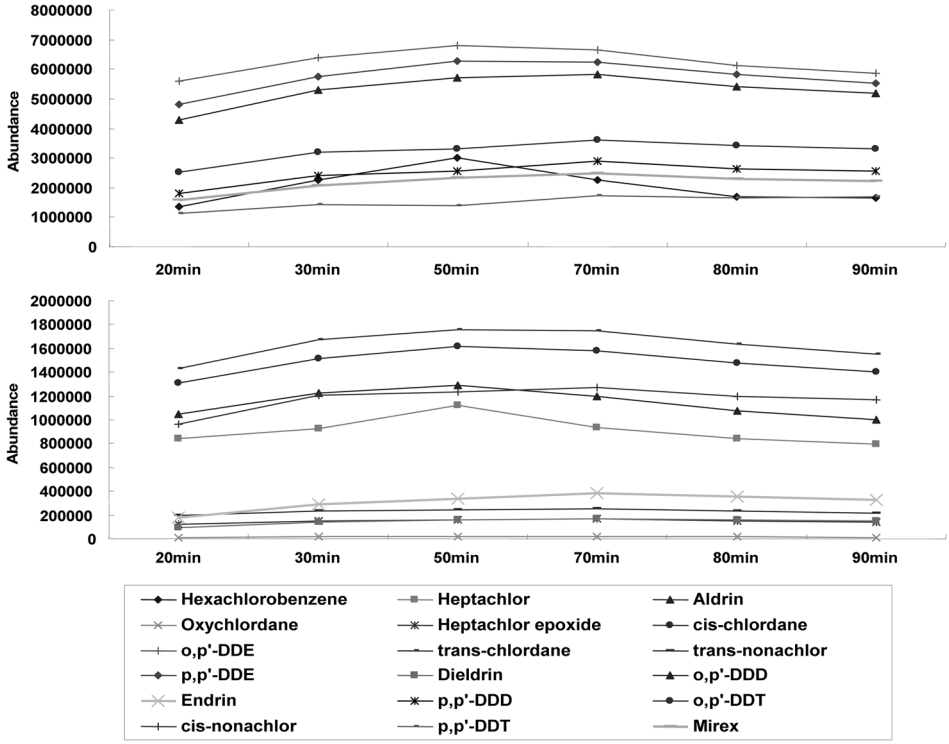

Fig. 5. Effect of the exposure time of the fiber in extraction of the analytes.

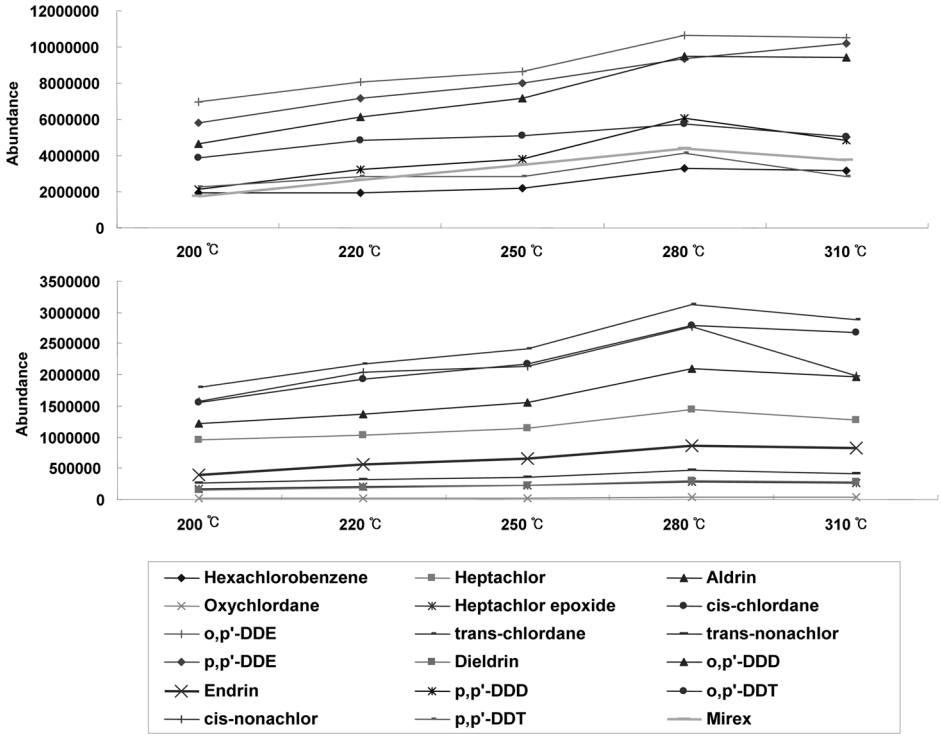

Fig. 6. Effect of the desorption temperature in extraction of the analytes.

높은 추출효율을 나타내었다. 이러한 현상은 분석대상 물질이 비휘발성 물질이며 극성도가 중간정도인 화합물이기 때문에 PA가 코팅되어 있는 고정상에서 가장 큰 흡착성능을 나타내는 것으로 사료된다.

3.1.2. 추출온도에 따른 추출효율 결과

추출시간 50분, 염화나트륨 첨가량 0.2 g, 탈착온도 280°C에서 탈착시간 1분으로 고정한 상태에서 시료온도를 50°C에서 90°C까지 변화시키면서 HS SPME로 추출하여 효율을 비교하였다(*Fig.* 4). 온도가 증가하면 액체 시료로부터 OCPs가 헤드스페이스로 올라오는 양은 증가하지만 일부 화합물이 fiber에서 탈착도 유발될 수 있는 점도 고려해야 할 사항이다. 즉, HS-SPME의 경우 기체상에 존재하는 분석물질의 농도는 추출온도에 비례하며 분석물질이 갖는 물리적 특성에 따라 최적의 추출온도가 결정된다. 특히 시료와 헤드스페이스간 분배계수와 헤드스페이스와 fiber간 분배계수에 비례하여 추출효율이 좋아지는데 시료와 헤드스페이스간 분배계수는 화학종의 증기압에 따르며 증기압은 온도에 따라 증가하는 경향이 있다.[27]

OCPs에 대한 각 온도에서의 상대적인 추출효율을 관찰한 결과 추출효율은 분석종의 끓는점에 따른 휘발성의 차이에 의한 영향을 받는 것으로 관찰된다. 즉, 비교적 끓는점이 높은 비휘발성 물질은 추출온도가 높을수록 추출효율이 크게 나타났다. *Fig.* 4에서 보듯이, OCPs의 흡착율이 전반적으로 증가하는 경향을 보였으며 80°C와 90°C에서 높은 추출율을 보였다. 그러나 90°C에서는 헤드스페이스상에 상대적으로 많은 수분이 존재하게 되어 OCP의 흡착을 방해할 수 있으며, fiber에 흡착된 OCP가 일부 다시 탈착되는 경향이 높아진다. 따라서 본 실험의 최적 추출온도는 80°C로 선정하였다.

3.1.3. 추출시간에 따른 추출효율 결과

추출온도 80°C, 염화나트륨 첨가량 0.1 g, 탈착온도 280°C, 탈착시간 1분으로 고정한 상태에서 추출시간을 20분에서 90분까지 변화시키면서 추출효율을 비교하였다(*Fig.* 5). 추출시간은 분석물질이 시료와 고정상 사이에서 평형을 이루는데 필요한 시간을 결정하는 것으로 최적화된다. 20분부터 50분까지 추출효율이

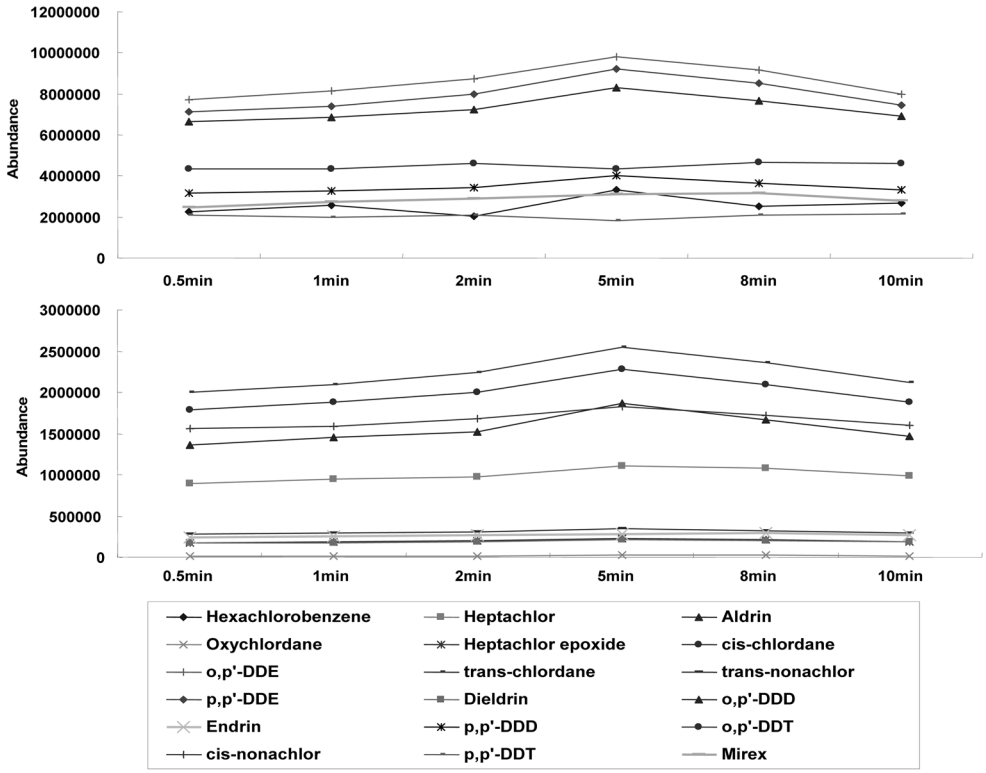

Fig. 7. Effect of the desorption time in extraction of the analytes.

증가하다가 50분 이후부터는 감소하는 것을 볼 수 있다. HS-SPME의 경우 흡착과정에서 수분이 fiber에 흡착되어 일정시간 이후로는 효율이 감소되는 것으로 사료된다. 따라서 가장 추출효율이 좋은 50분으로 추출시간을 사용하였다.

3.1.4. 탈착온도에 따른 추출효율 결과

추출온도 80°C, 염화나트륨 첨가량 0.1 g, 추출시간 50분으로 고정한 상태에서 주입구 온도를 200°C에서 280°C까지 변화시켜 가면 1분간 탈착하여 HS-SPME로 추출하였다(*Fig.* 6). 대체적으로 250°C이상에서 급격한 추출효율의 증가를 보였으며 대체적으로 온도가 증가하면서 추출효율이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 비휘발성물질이 고정상에서 탈착되는 온도는 높을수록 효율이 더 좋아지는 것으로 나타난다. 그러나 높은 온도는 fiber의 수명을 단축시키는 단점이 있으므로 본 실험에서는 280°C를 선택하였다.

3.1.5. 탈착시간에 따른 추출효율 결과

염화나트륨 첨가량 0.1 g, 추출온도 80°C에서 50분

Table 3. Precision and accuracy of OCPs in blood (n=5)

Compounds	Precision, CV(%)	Accuracy, bias(%)
Hexachlorobenzene	13.39	-10.6
Heptachlor	9.38	-0.5
Aldrin	9.50	7.9
Oxychlordane	5.59	6.8
Heptachloro epoxide	7.63	8.3
cis-Chlordane	7.22	8.6
o,p'-DDE	7.35	7.6
trans-Chlordane	6.25	7.1
trans-Nonachlor	6.15	7.9
p,p'-DDE	7.26	9.0
Dieldrin	6.50	7.2
o,p'-DDD	7.43	9.6
Endrin	6.31	10.0
p,p'-DDD	8.45	14.7
o,p'-DDT	8.80	18.4
cis-Nonachlor	8.75	11.3
p,p'-DDT	12.01	24.5
Mirex	7.84	13.2

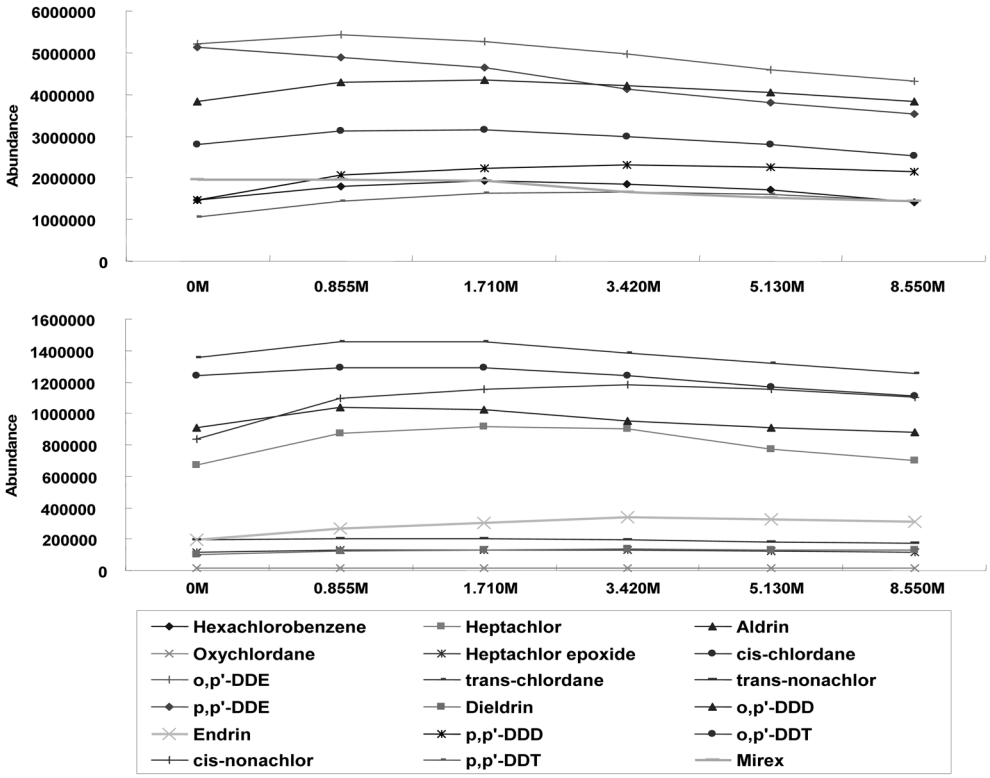

Fig. 8. Effect in extraction of the analytes on the NaCl addition.

간 추출한 후 280°C에서 탈착시간을 0.5분부터 10분까지 변화시키며 HS-SPME로 추출하였다(*Fig.* 7). 탈착시간이 증가하면서 대체적으로 추출효율이 좋아지는 것을 확인할 수 있었는데 5분 이상 탈착시킬 경우 변화는 거의 없었다. 또한 탈착시간이 길어짐에 따라 탈착된 화합물의 컬럼 내로 주입시간이 길어지게 되고 따라서 컬럼에서의 머무른 시간이 길어져 피크의 모양이 넓게 퍼지는 현상이 나타날 수 있다. 따라서 OCPs가 비휘발성물질임을 감안해 5분 동안 탈착을 시켜 가장 좋은 추출효과와 분리능을 가질 수 있도록 하였다.

3.1.6. 염석효과에 따른 추출효율 결과

염화나트륨 첨가량을 0M~8.55M까지 변화시키면서 80°C에서 50분간 추출한 후 280°C에서 1분간 탈착하여 HS-SPME로 추출하였다(*Fig.* 8). 염화나트륨과 같은 염의 첨가는 이온강도를 증가시킴으로써 유기화합

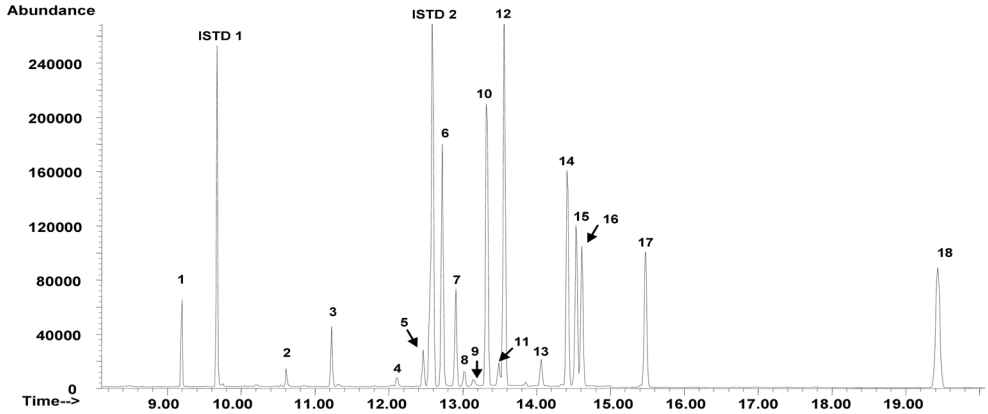

Fig. 9. Total ion chromatogram of organochlorine pesticides obtained by HS-SPME.

Table 4. Calibration data and detection limits of OCPs

No.	Compounds	MW	Ions	Range (ng/mL)	Correlation	R^2	MDL (ng/mL)
1	Hexachlorobenzene	284	**284**,286,249	0.05-10.0	Y = 0.196X+0.00556	0.998	0.05
2	Heptachlor	373	**272**,274,237	0.05-10.0	Y = 0.0902X-0.00231	0.998	0.05
3	Aldrin	364	**263**,265,66	0.05-10.0	Y = 0.0119X-0.000789	0.999	0.05
4	Oxychlordane	423	**387**,389	0.20-10.0	Y = 0.00157X-0.0000517	0.997	0.20
5	Heptachlor epoxide	389	**353**,355	0.05-10.0	Y = 0.0153X-0.000117	0.999	0.05
6	*cis*-Chlordane	409	**373**,375	0.05-10.0	Y = 0.153X-0.00178	0.999	0.05
7	*o,p*'-DDE	318	**246**,248	0.05-10.0	Y = 0.692X-0.00496	0.998	0.05
8	*trans*-Chlordane	409	**373**,375	0.05-10.0	Y = 0.174X-0.00275	0.998	0.05
9	*trans*-Nonachlor	444	**407**,409	0.05-10.0	Y = 0.0237X-0.0000624	0.998	0.05
10	*p,p*'-DDE	409	**246**,248	0.05-10.0	Y = 0.0595X-0.00161	0.999	0.05
11	Dieldrin	380	**263**,265,79	0.05-10.0	Y = 0.0154X+0.0000242	0.999	0.05
12	*o,p*'-DDD	320	**235**,237	0.05-10.0	Y = 0.0532X-0.00605	0.999	0.05
13	Endrin	380	**263**,265,81	0.05-10.0	Y = 0.0428X-0.000376	0.999	0.05
14	*p,p*'-DDD	320	**235**,237	0.05-10.0	Y = 0.0217X-0.00212	0.998	0.05
15	*o,p*-'DDT	354	**235**,237	0.05-10.0	Y = 0.413X-0.0162	0.997	0.05
16	*cis*-Nonachlor	444	**407**,409	0.05-10.0	Y = 0.119X-0.00198	0.998	0.05
17	*p,p*'-DDT	354	**235**,237	0.05-10.0	Y = 0.209X-0.00842	0.997	0.05
18	mirex	545	**272**,274	0.05-10.0	Y = 0.238X-0.00405	0.998	0.05

MDL : method detection limit (S/N > 3)
ISTD1 : phenanthrene-d_{10} (RT: 9.77min, 5ng/mL)
ISTD2 : pyrene-d_{10} (RT: 12.88min, 5ng/mL)
Bold : quantitative ion

물의 물과 혈액에서의 용해도를 감소시키는 효과를 가져온다. 이러한 염석효과는 0.1 g(0.855M)의 NaCl을 넣을 때 가장 효율이 좋았으며, 염의 첨가량이 많아질수록 혈액의 응고가 빨라지면서 효율이 오히려 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

3.3. 정밀도(precision)와 정확도(accuracy)

혈액시료 1 mL에 물 1 mL를 첨가한 후 OCPs 혼합용액을 10 ng/mL 되게 첨가한 후 HS SPME-GC/MS로 분석한 결과 *Table* 3에서 보는 바와 같이 정확도와 정밀도를 측정하였다. 측정을 위해 5회 실험을 수행하여 정량한 결과 변동계수(coefficient of variance)가 5.59~13.39%의 범위로 측정 되었으며 hexachlorobenzene와 *p,p'*-DDT를 제외하고 모두 10% 이내의 정밀도를 나타내었다. 본 실험 방법으로 측정한 결과, 정확도는 18종의 OCPs에서 *p,p'*-DDD, *cis*-Nonachlor, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, Mirex 등의 5종에서 10%이상으로 나타났으며, 그 이외의 13종에서는 10%이내로 나타났다.

3.4. 검량선 및 검출한계

혈액 1 mL에 물 1 mL를 첨가한 후 OCPs 혼합용액

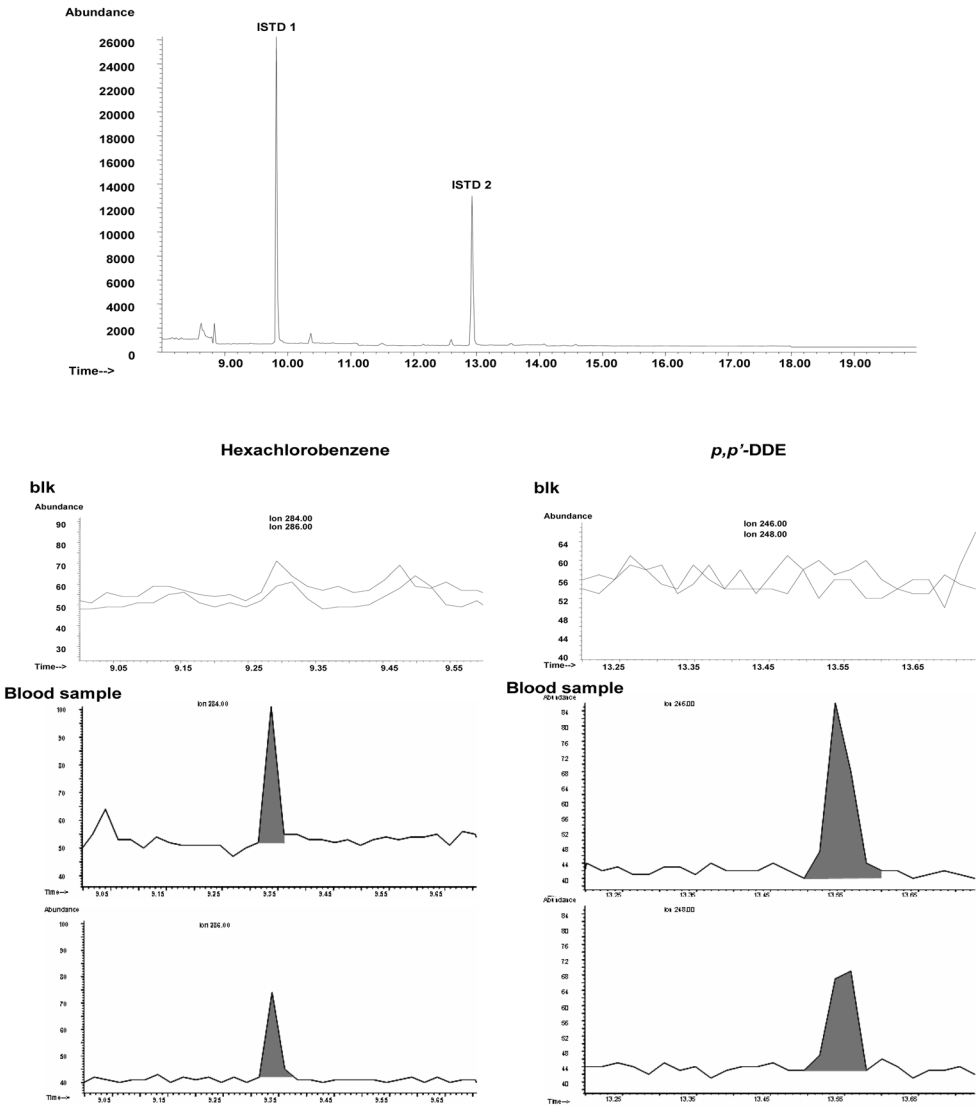

Fig. 10. Total ion chromatogram and extract ion chromatograms of extract of blood sample.

을 0.05~10.0 ng/mL 되게 첨가한 후 HS SPME-GC/MS로 분석한 결과 *Table* 3과 같은 검량선을 얻을 수 있었다. 대부분의 물질들은 직선 상관계수가 0.99 이상으로 좋은 직선성을 얻을 수 있었다. 혈액 시료 1 mL를 사용할 경우 검출한계는 S/N > 3을 기준으로 하였을 때 0.05~0.20 ng/mL로 측정되었다. 본 실험 방법으로 혈액 시료에 10 ppb 수준으로 OCPs를 첨가한 시료를 분석한 결과는 *Fig.* 9에 나타내었다(피이크 순서는 *Table* 4와 동일). 또한, 실제시료에서 분석한 크로마토그램을 *Fig.* 10에 TIC와 EIC로 나타내었다.

4. 결 론

혈액에 미량으로 잔류하는 OCPs를 HS-SPME와 GC/MS를 이용하여 분석 및 실험조건을 최적화하여 분석방법을 연구하고 분석결과를 비교하여 나타내었다.

첫째, 18종의 OCPs를 검출하기 위해 GC/MS를 이용하였으며 각 물질별로 확인된 질량스펙트럼에 따라 2-3개의 이온을 정하고 선택 이온검출법(SIM)으로 분석하였다.

둘째, 혈액시료는 HS-SPME를 이용하여 추출하였으며 혈액 1 mL에 증류수 1 mL를 첨가하여 혈액응고가 되는 시간을 단축시켰다. 이 때 사용한 fiber는 PA 85 μm를 선택하였고, 염석효과를 위해 NaCl 0.1g을 첨가하였다. 헤드스페이스에서 80°C에서 50분간 흡착시킨 후 GC 주입구에서 280°C, 5분간 탈착시켰다. OCPs의 검량선은 0.05~10.0 ng/mL의 범위에서 r^2=0.99이상의 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 0.05~0.20 ng/mL의 범위로 검출되었다.

본 연구에서 사용한 분석법은 정제과정이 어려운 혈액시료에서의 효율적인 추출이 가능하였으며 GC/MS를 이용한 동시분석이 가능하였다. 검출한계 또한 우수하여 혈액 내의 OCPs의 정량이 가능하여 혈액시료의 빠르고 간편한 분석을 위한 적절한 방법으로 사료되며, 특히 필요한 전혈의 양이 1 mL로, 매우 적은 양으로도 분석이 가능하기 때문에 국민 혈 중 모니터링에 이용하기에 적합할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. N. Garcia-Reyero, D. S. Barber, T. S. Gross, K. G. Johnson, M. S. Sepulveda and N. J. Szabo, N. D. Denslow, *Aquat. Toxicol.*, **78**, 358-369(2006).
2. Y. Wang, R. Yang and G. Jiang, *Environ. Pollut.*, **146**, 100-106(2007).
3. L. Guo, Y. Qiu, G. Zhang, G. J. Zheng, P. K. S. Lam and X. Li, *Environ. Pollut.*, **152**, 604-611(2008).
4. J. L. Raposo Jr and N. Re-Poppi, *Talanta*, **72**, 1833-1841(2007).
5. J. Font and A. Marsal, *J. Chromatogr. A*, **811**, 256-260 (1998).
6. J. C. Hansen, *Toxicol. Lett.*, **112-113**, 119-125(2000).
7. J. Klanova, N. Matykiewiczova, Z. Macka, P. Prosek, K. Laska and P. Klan, *Environ Pollut.*, **152**, 416-423 (2008).
8. J. Li, T. Zhu, F. Wang, X.H. Qiu and W. L. Lin, *Ecotoxico. Environ. Saf.*, **63**, 33-41(2006).
9. A. C. Dirtu, R. Cernat, D. Dragan, R. Mocanu, R. Van Grieken, H. Neels and A. Covaci, *Environ. Int.*, **32**, 797-803(2006).
10. Y. Yang, D. Li and D. Mu. *Atmos. Environ.*, 42, 677-687(2008).
11. R. Zhou, L. Zhu and Q. Kong, *J. Hazard. Mat.*, **152**, 1192-1200(2008).
12. S. Tanabe and T. Kunisue, *Environ. Pollut.*, **146**, 400-413 (2007).
13. P. Bohlin, K. C. Jones and B. Strandberg, *J. Environ. Monit.*, **9**, 501-509(2007)
14. M.-H. Ha, D.-H. Lee and D. R. Jacobs Jr. *Environ. Health Perspect.*, **115,** 1204- 1209(2007).
15. C. Sonne, H. Wolkers, P. S. Leifsson, B. M. Jenssen, E. Fuglei, ϕ. Ahlstrϕm, R. Dietz, M. Kirkegaard, D. C. G. Muir and E. Jϕrgensen, *Chemosphere*, **71**, 1214-1224 (2008).
16. C. Basheer, K. Narasimhan, M. Yin, C. Zhao, M. Choolani and H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **1186**, 358-364 (2008).
17. K. Shen and R. F. Novak, *Biochem. Biophys. Res.*, **231**, 17-21(1997).
18. W. R. Kelce, C. R. Stone, S. C. Laws, L. E. Gray, J. A. Kemppainen and E. M. Wilson, *Nature*, **375**, 15(1995).
19. C. Basheer, J. P. Obbard and H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **1068**, 221-228(2005).
20. H.-P. Li, G.-C. Li and J.-F. Jen, *J. Chromatogr. A*, **1012**, 129-137(2003).
21. C. Dong, Z. Zeng and M. Yang, *Water Res.*, **39**, 4204-4210(2005).
22. C. G. Zambonin, M. Quinto, N. De Vietro and F. Palm-

isano, *Food Chem.*, **86**, 269-274(2004).
23. D. A. Lambropoulou, I. K. Konstantinou and T. A. Albanis, *J. Chromatogr. A*, **1152**, 70-96(2007).
24. X. Li, M. Zhong, S. Xu and C. Sun, *J. chromatogr. A*, **1135**, 101-108(2006).
25. N. Fidalgo-Used, G.e Centineo, E. Blanco-Gonzalez and A. Sanz-Medel, *J. Chromatogr. A*, **1017**, 35-44(2003).
26. S. D. Salamoni, J. C. da Costa, M. S. Palma, K. Konno, K. Nihei, A. A. Tavares, D. S. de Abreu, G. T. Venturin, F. de B. Cunha, R. M. de Oliveira and R. V. Breda, *Brain Res.*, **1048**, 170-176(2005).
27. L. J. Krutz, S. A. Senseman and A. S. Sciumbato, *J. Chromatogr. A*, **999**, 103-121(2003).