

수포작용제(HD) 분석을 위한 단일방울 미세농축법 연구

Single Drop Microextraction for Analysis of Mustard Gas(HD)

박 양 기* **김 성 기*** **손 병 훈*** **박 명 주***
 Park, Yang-Ki Kim, Sung-Ki Son, Byung-Hoon Park, Myeong-Ju

ABSTRACT

A fast, simple, inexpensive, and reproducible sample preparation for extraction and analysis of HD in water was studied using single-drop microextraction(SDME) and GC-MS. Operation parameters, such as extraction solvent, extraction time were optimized. The optimized conditions were 1 μ L trichloroethylene and 10 min extraction time. In these conditions, about 42 times higher enrichment factor(EF) was obtained. The detection limit of HD was 1 μ g/L, and the precision expressed as relative standard deviation was about 9.0%.

주요기술용어(주제어) : Single drop microextraction(단일방울미세농축법), Chemical Weapon Convention(화학무기금지협약)

1. 머리말

화학무기 금지협약(CWC : Chemical Weapon Convention)에서는 신경, 수포, 질식, 혈액등과 같은 화학작용제와 이와 유사한 물질들이 협약관련물질(CRCs : Convention Related Compounds)로 분류되어 있는데, 이러한 물질들의 분석을 위하여 이용되는 전처리 방법에는 액체-액체 추출(LLE : Liquid-Liquid Extraction)^[1,2]과 고체상 추출(SPE : Solid-Phase Extraction)^[3,4]이 있다. 액체-액체 추출은 액체 샘플에 대해 가장 널리 사용되는 샘플 전처리 방법인데, 시간이 많이 소비되고, 절차가 복잡하며, 독성의 유기용매를 많이 사용해야하는 단점이 있다. 또

한 이러한 단점들 때문에 농축과정간에 분석물질이 누출될 수 있고, 자동화하는데 어려움이 많다. 고체상 추출은 액체-액체 추출보다는 시간이 적게 걸리지만 독성의 유기용매를 포함하는 용리액과 전처리 컬럼을 필요로 한다. 최근에 이러한 방법들의 대안이 되는 추출방법으로 고체상 미세추출(SPME : Solid-Phase Micro-Extraction)^[5]과 액체상 미세추출(LPME : Liquid-Phase Micro-Extraction)^[6,7]이 개발되었다. SPME는 1990년에 처음으로 도입된 방법으로 용매가 필요 없고, 절차가 간단하며, 과거방법들의 단점으로 부터 자유로운 추출기술이다. 현재는 환경물질, 음식, 독극물등의 분석에 많이 이용되고 있다. 1996년에 처음 도입된 LPME는 2000년대에 이르러 그 응용이 증대되고 있고, 빠르고 간단하며 값이 싸고, 용매가 거의 필요하지 않은 가장 최신의 추출방법이다. LPME의 일종인 Single Drop Micro-Extraction(SDME)은 유기용매의 방울을 받게(acceptor)로 사용하여 한 번

† 2008년 1월 24일 접수~2008년 3월 7일 게재승인

* 국군화생방방호사령부 화학방어연구소(CDRI)

주저자 이메일 : c13702@hanmail.net

의 단계로 추출, 농축을 수행하는 추출방법이다. 이 기술은 수용액과 마이크로실린지 바늘 끝의 유기용매 방울사이에서 분석물질의 분배(distribution)에 기초를 두고 있으며, nitroaromatic^[8]이나, selenium^[9], linalool^[10]등의 추출에 사용되었다.

이 논문에서 우리는 LPME의 한 종류인 SDME를 이용하여 수포작용제인 HD를 추출, GC-MS로 분석하였다.

또한 추출에 영향을 미치는 파라미터로서 용매의 종류, 추출 시간, 시간 경과에 대해 연구하였다. 이 연구의 목적은 물에 녹아있는 화학작용제를 빠르고, 간단하며, 정확하게 추출하여 분석하는 것이라고 할 수 있다.

2. 실험

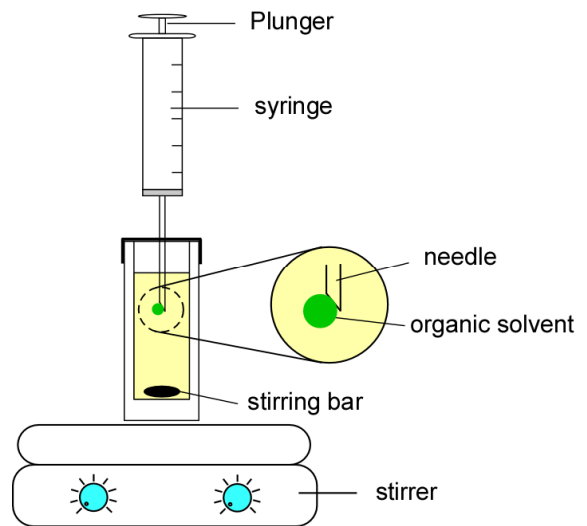
가. 화학물질

화학작용제인 HD(Bis(2-chloroethyl) sulfide)는 화학방어연구소(서울, 한국)에서 합성되었다. 사용된 유기용매로서 toluene, acetonitrile은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), carbon tetrachloride, trichloroethylene, decane은 Duksan(서울, 한국), dichloromathane은 J. T. Baker(Philipsberg, NJ, USA)에서 구입하였으며, 증류수는 NANO PureII purification system(Barnstead, Dubuque, IA, USA)를 이용하여 준비하였다. HD 수포작용제의 stock solutions(3000mg/L)은 acetonitrile에 녹여 만들었으며, 이 stock solutions을 이용하여 50mg/L의 HD를 증류수에 녹여 만들었고, 모든 추출간에는 새로 만들어진 50mg/L의 HD를 이용하였다. 내부표준물질로 사용된 decane의 농도는 50mg/L였다.

나. SDME 절차

SDME 실험은 관련문서에서 명시된 주의사항에 따라 수행되었다^[11]. 주사기는 10 μ L 마이크로 시린지(Hamilton #701, Reno, NV, USA)를 사용하였고, 주사기안의 공기방울을 제거하고, 오염을 방지하기 위해 유기용매로 10회 이상 씻는 작업을 반복하였다. 3mm의 교반자석이 담겨 있는 4mL의 vial은 자석 교반기

위에 놓여지고, 3mL의 분석물질을 포함한 샘플이 vial에 채워졌다. 그리고 PTEE-coated silicon septum으로 vial을 밀봉하였다. 1 μ L의 추출용매를 포함하는 주사기는 septum을 통과하여 vial로 들어가고, 주사기의 바늘은 샘플에 담겨지게 되는데, 이때, 표면에서 약 1cm 아래에 주사기 끝이 위치하게 된다. 분석의 정밀성을 위하여 항상 수용액 샘플의 고정된 위치에 주사기 바늘이 위치하게 된다. 그 다음에는 주사기의 플랜지를 눌러 유기용매 방울을 주사기바늘 끝에 만들고, 10분 동안 300rpm으로 교반 하였다. 추출이 완료된 후, 방울을 다시 주사기 안으로 흡입하고, 물로부터의 오염을 방지하기 위하여 바늘을 티슈로 닦아 주었다. 이렇게 HD가 추출된 유기용매는 분석을 위해 GC-MS에 주입되었다.



[그림 1] SDME의 개략도

다. GC-MS분석

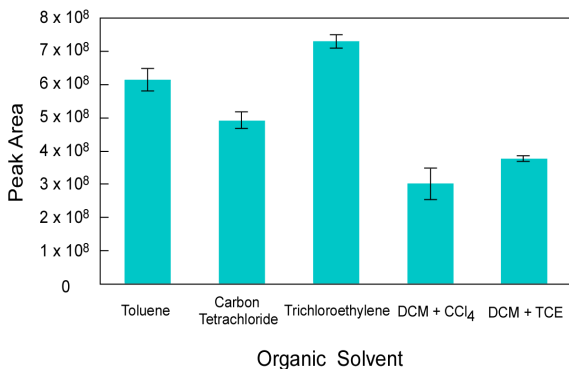
GC-MS분석은 Agilent 6890 GC와 연결된 5793 mass selective detector(Agilent Technologies, U.S.A)의 EI mode에서 수행하였다. 컬럼은 J&W Scientific에서 만들어진 길이 30m × 내경 0.25mm × 필름두께 0.25 μ m의 HP-5MS를 이용하였고, 오븐의 온도프로그램은 50 $^{\circ}$ C(2min) - 15 $^{\circ}$ C/min - 250 $^{\circ}$ C이었다. carrier gas로서 헬륨을 이용하였고, 이 가스는 constant flow에서 0.7mL/min였다, 샘플은 injection

온도 250°C, EI source 온도 250°C, quadrupole 분석기 200°C의 조건에서 splitless mode로 분석되었다. 정량을 위해 selected ion monitoring(SIM) mode를 사용하였고, GC-MS(SIM)을 위해 선택된 이온은 HD에 대해서 m/z 109와 158이고, decane에 대해서는 85와 142였다.

3. 결과 및 토의

가. 추출용매의 선택

SDME의 추출효율을 향상시키기 위해 적절한 유기용매를 선택하는 것은 매우 중요한 문제이다. 이러한 유기용매의 선택에 있어, 최대의 추출효율이 가능한 유기용매의 선택과 더불어, 물에 대한 용해도와 유기용매방울의 크기감소와 같은 요소가 고려되어야 한다. 또한 retention time이 비교적 빠른 용매의 피크에 의해 분석물질의 확인이 불가능할 수 있다는 점도 유기용매 선택 시 고려사항이 될 수 있을 것이다. 이 논문에서는 toluene(점성도 0.62mPa·s), carbon tetrachloride(점성도 0.793mPa·s), trichloroethylene(점성도 0.53mPa·s)과 혼합추출용매의 효율을 확인하기 위해 dichloromethane을 trichloroethylene과 carbon tetrachloride에 각각 1:1로 혼합한 유기용매를 각 1μL를 이용, 3mL에 녹아있는 50mg/L의 HD를 추출함으로써 유기용매의 효율을 확인할 수 있었다. 각각의 유기용매는 25°C, 30분, 교반속도 300rpm에서 각 3회씩 추출 및 분석이 이루어졌다. 또한 위

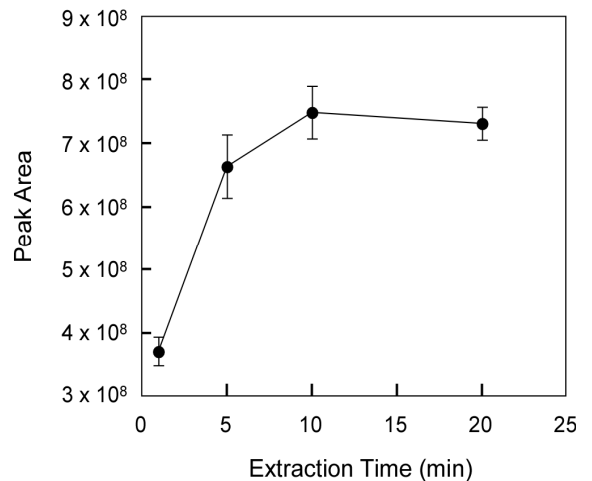


[그림 2] HD에 대한 유기용매의 추출효율

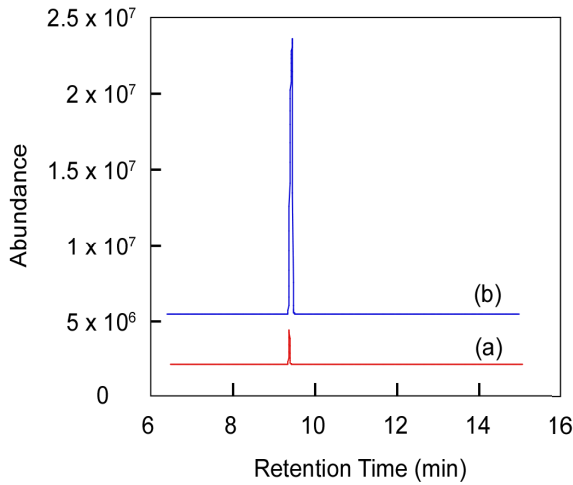
에 언급된 유기용매를 제외하고, hexane, chloroform, dichloromethane를 확인해 보았는데, 이 세 가지 유기용매는 추출 과정동안 양이 줄어들거나, 원하는 시간만큼 주사기 바늘 끝에 매달려 있지 못했기 때문에, SDME에 적합하지 않는 유기용매라고 판단할 수 있었다. 그림 2는 각 용매들의 추출효율을 보여주고 있다. 유기용매들 중에서 가장 높은 효율을 보이는 유기용매는 trichloroethylene였다. 두 혼합유기용매의 경우도 trichloroethylene보다 높은 효율을 보이지는 못하였다. 이러한 결과에 따라서, trichloroethylene이 앞으로의 실험에서 추출용매로서 사용되었다.

나. 추출시간의 최적화

두 섞이지 않는 상(phase)사이의 평형이 이루어질 때, 유기용매방울로 이동한 분석물질의 양은 최대가 될 것이다. 수용액과 유기용매 사이에서 분석물질이 평형을 이루기 위해서는 충분한 추출시간이 보장되어야 한다. 일반적으로 추출 시간이 증가할수록 추출효율이 증가하나, 일정시간 경과 후에 방울이 수용액에 녹을 수 있기 때문에 추출효율에 영향을 미칠 수도 있다. 추출시간의 변화에 따른 추출효율의 증가양상을 그림 3에서 확인할 수 있다. 유기용매로서 trichloroethylene를 이용, 50mg/L의 HD를 300rpm, 25°C의 조건에서 1분부터 20분까지 추출시간을 변화시켰다. 1분의 짧은 추출시간에도 추출이 이루어지



[그림 3] 시간 대 추출량의 관계



[그림 4] SDME 전(a)과 후(b)의 크로마토그램

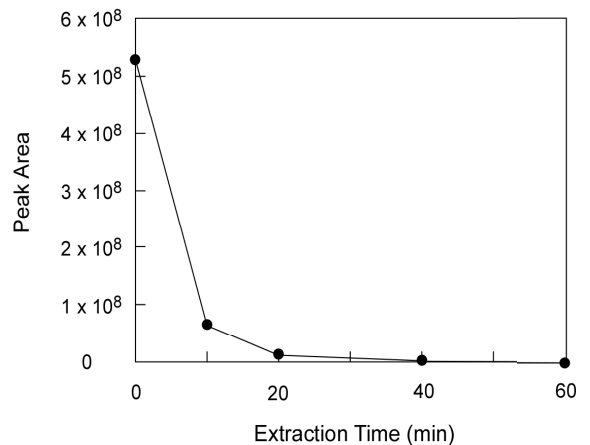
며, 10분후에는 거의 변화가 없음을 알 수 있었다. 그리고 10분 추출한 경우의 크로마토그램(추출 후(b))과 추출을 하지 않고 분석한 경우의 크로마토그램(추출 전(a))을 비교한 결과가 그림 4에 나타나 있다. Enrichment Factor(EF)를 추출 전과 후의 피크의 넓이비라고 하면, 추출시간 10분에 42의 EF가 얻어지는 것을 알 수 있었다. 이 EF는 SDME의 농축효과를 단적으로 보여준다고 할 수 있다.

다. 일정시간 경과 후 추출량의 변화

샘플을 준비하고, 일정시간이 경과한 후, 10분 동안 추출된 HD의 양을 확인해 보았다. 그림 5에서 10분이 경과한 샘플에서 추출된 양은 시간이 경과하지 않은 샘플에서 추출된 양의 약 11.9%였다. 20분이 경과한 후의 샘플에서 추출된 양은 약 2.1%, 60분이 경과한 후의 샘플에서는 약 0.03%였다. 이와 같이 시간에 따라 추출된 양이 줄어드는 이유는, 샘플에 존재하는 HD의 양이 시간이 경과함에 따라 줄어들기 때문인 것으로 판단된다. 물에 완전히 녹아있는 HD는 수 분의 반감기를 가지고 가수분해 되는 것으로 알려져 있는데, 25°C의 증류수에서 반감기가 8.5분이며,^[12] 가수분해동안에는 intermediate cyclic sulphonium ion과 bis-(2-hydroxyethyl)-thioether가 생성된다고 한다^[13].

이렇게 시간에 따라 물속에서의 HD 존재량이 변

하기 때문에, 추출되는 HD의 양도 같은 경향성을 보이는 것으로 판단된다. 하지만 일반적인 물(강물, 야전에 고여 있는 물)에서 HD는 물에 완전히 녹지 않기 때문에 가수분해 속도가 실험실적인 경향을 따르지 않을 것으로 판단된다. 따라서 수시간에 지난후에도 HD가 추출될 수 있을 것이며, 유도체화 과정을 거친다면 분해물도 함께 추출해 낼 수 있을 것이다.



[그림 5] 시간 경과에 따른 추출량 변화

라. 직선성(linearity), 최저검출한계(limit of detection) 그리고 재현성(reproducibility)

유기용매 trichloroethylene, 추출시간 10분, stirring 속도 300rpm, 25°C의 조건하에서 직선성, 최저검출한계 그리고 재현성을 평가하였다. 직선성의 확인을 위해서 내부표준물질인 decane을 이용하였고, 직선성은 10mg/L~50mg/L의 범위에서 획득되었다. 상관계수(correlation coefficient, r^2)는 0.9904였고, 최저검출한계는 SDME 후, GC-MS(scan mode)에서 S/N ratio가 3 : 1일 때, 1 μ g/L였다. 5회의 실험으로 SDME의 재현성을 평가하였는데, 실험에 따른 상대표준편차(RSD)는 9.0%였다. 화학무기금지기구(OPCW : Organization for Prohibition of Chemical Weapons)는 S/N ratio가 5 : 1일 때, scan mode에서 1~10 mg/L의 최저검출한계를 요구하고 있으므로,^[14] 이 방법의 재현성과 최저검출한계를 고려한다면, 화학무기검증을 위해 SDME가 적용될 수 있는 가능성을 가진다고 할 수 있겠다.

4. 맺음말

본 연구는 물에 녹아있는 수포작용제 HD를 SDME를 이용하여 빠르고, 간단하며, 재현성 있게 추출한 결과를 보여주고 있다. 물로부터 유기용매방울로의 추출간 영향을 미치는 용매나 추출시간과 같은 파라미터가 최적화 되었는데, 최적화된 조건은 trichloroethylene 1 μ L, 추출시간 10분이었다. 또한 GC-MS scan mode에서 최저검출한계는 S/N ratio가 3 : 1일 때, 1 μ g/L였고, 상대표준편차(RSD)는 9.0%였다. 위에 언급된 결과에 비추어 볼 때, SDME는 비용, 속도, 안전, 작업의 간편성의 관점에서 매우 효율적인 샘플 전처리 기술이라고 생각된다. 따라서, 화학무기 저장시설이나 화학작용제사용이 의심되는 지점에서 수집된 물샘플을 검증하기 위해서 이 기술은 충분한 가능성을 가진다고 할 수 있겠다.

참 고 문 헌

- [1] Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., Halvorsen, T. G., "Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis", J. chromatogr. A. Vol. 902, pp. 91~105, 1994.
- [2] Harrison, I., Leader, R. U., Higgs, J. J. W., Teill, J. C., "Determination of organic pollutants in small samples of groundwaters by liquid-liquid extraction and capillary gas chromatography", J. Chromatogr. A. Vol. 688, pp. 181~188, 1994.
- [3] Lanza, F., Sellergren, B., "The Application of Molecular Imprinting Technology to Solid Phase Extraction", Chromatographia. Vol. 53, No. 11, pp. 599~611, 2001.
- [4] Hennion, M. C., "Solid-phase extraction : method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography", J. Chromatogr., A. Vol. 856, pp. 3~54, 1999.
- [5] Lord, H., Pawliszyn, J., "Evolution of solid-phase microextraction technology", J. Chromatogr., A. Vol. 885, pp. 153~193, 2000.
- [6] He, Y., Lee, H. K., "Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe", Anal. Chem. Vol. 69, No. 22, pp. 4634~4640, 1997.
- [7] Jeannot, M. A., Cantwell, F. F., "Solvent Micro-extraction as a Speciation Tool : Determination of Free Progesterone in a Protein Solution", Anal. Chem. Vol. 69, No. 15, pp. 2935~2940, 1997.
- [8] Psillakis, E., Kalogerakis, N., "Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples", J. Chromatogr., A. Vol. 938, pp. 113~120, 2001.
- [9] Fragueiro, S., Lavilla, I., Bendicho, C., "Hydride generation-headspace single-drop microextraction-electrothermal atomic absorption spectrometry method for determination of selenium in waters after photoassisted prereluction", Talanta. Vol. 68, pp. 1096~1101, 2006.
- [10] Kim, N. S., Jung, M. J., Yoo, Z. W., Lee, S. N., "Headspace Hanging Drop Liquid Phase Microextraction and GC-MS for the Determination of Linalool from Evening Primrose Flowers", Bull. Korean Chem. Soc. Vol. 26, No. 12, pp. 1996~2000, 2005.
- [11] Pait, M., Paedasani, D., Gupta, A. K., Dubey, D. K., "Application of Single Drop Microextraction for Analysis of Chemical Warfare Agents and Related Compounds in Water by Gas Chromatography/Mass Spectrometry", Anal. Chem. Vol. 77, No. 2, pp. 771~717, 2005.
- [12] Bartelt-hunt, S. U., Barlaz, M. A., Knappe, D. R. U., Kjeldsen, P., "Fate of Chemical Warfare Agents and Toxic Industrial Chemicals in Landfills", Environ. Sci. Technol. Vol. 40, No.

- 13, pp. 4219~4225, 2006.
- [13] Khordagui, H., "Potential fate of blistering chemical warfare agents on Kuwait's arid soil and related research needs", *Journal of Arid Environments*. Vol. 32, pp. 93~102, 1996.
- [14] Hooijshuur, E. W. J., Hulst, A. G., De Jong, Ad L., De Reuver, L. P., Van Krimpen, S. H., Van Baar, B. L. M., Wils, E. R. J., Kientz, C. E., Brinkman, U. A. Th., "Identification of chemicals related to the chemical weapons convention during an inter laboratory proficiency test", *Trens Anal Chem*. Vol. 21, No. 2, pp. 116~130, 2002.