

Application News

No. SSK-LCMS-2306

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-8060NX

LC-MS/MS를 이용한 소변 시료 중 유기인계난연제 대사체 분석

LC-MS/MS Method for Determination of Metabolites of Organophosphate Flame Retardants (OPFRs) in Human Urine

■ 서론

난연제는 가연성 감소 및 연소 지연에 사용되는 물질로 발화원에 의해 활성화되며, 플라스틱, 직물, 표면 마감 및 코팅과 같은 제조된 재료에 첨가되는 다양한 화학 물질 그룹을 포함한다. 이 중 유기인계난연제(OPFRs)는 일부 성분이 발암성 및 신경독성을 가지는 것으로 알려져 있어 물, 공기와 같은 환경 시료에 대한 연구가 여러 차례 보고되었으며, 최근에는 실내 환경에 초점을 맞춘 연구도 이루어지고 있다^[1].

또, 미국 소비자 제품 안전위원회 (Consumer Product Safety Commission)가 실시한 노출평가에서 TDCPP (Tris(1,3-dichloroisopropyl)phosphate)가 의심되는 발암물질로 언급되기도 하였다^[2].

그러나, 현재 유기인계난연제의 인체 노출에 대한 역학 연구가 부족한 실정이기 때문에 잠재적으로 건강에 영향을 줄 수 있는 유기인계난연제에 대한 바이오 모니터링이 필요하다.

이에, 이 뉴스레터에서는 생체시료 중 사람의 소변에서 9 종의 유기인계난연제 대사체 검출을 위한 분석법을 소개하고자 하며, 일부 대상 성분을 그림 1에 나타내었다.

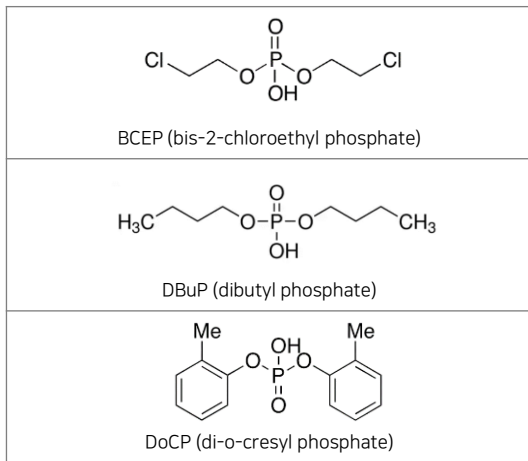


그림 1. 유기인계난연제 대사체 일부 성분

■ 분석 방법

시마즈 액체크로마토그래피 질량분석기 LCMS-8060NX와 ACE Excel 2 C18-AR (3.0 x 150 mm, 2 μm) 컬럼을 사용하여 9 종의 유기인계난연제 대사체 분석법을 최적화하였다^[1]. 세부 분석 조건 및 MRM 조건은 표 1과 표 2에 각각 나타내었으며, 합성 소변을 전처리하여 조제한 검량선의 크로마토그램은 그림 2와 같다.

표 1. LC-MS/MS 분석 조건

Liquid chromatograph Nexera™ X3	
Column	: Excel 2 C18-AR (3.0 x 150 mm, 2 μm)
Flow rate	: 0.4 mL/min
Mobile phase	: (A) 1mM Acetic acid in water/MeOH = 80/20 (v/v) : (B) 1 mM Tributylamine, 1mM Acetic acid in MeOH/water = 95/5 (v/v)
Gradient	: 20 % B (0.0-1.0 min) – 40 % B (2.0 min) – 80 % B (8.0 min) – 100 % B (8.5-10.5 min) – 20 % B (10.51-14.0 min)
Oven temp.	: 45 °C
Injection volume	: 20 μL
Mass spectrometer LCMS-8060NX	
Interface	: ESI, Negative mode
Data acquisition	: MRM mode
Nebulizing Gas Flow	: Nitrogen, 3 L/min
Heating Gas Flow	: Zero Air, 10 L/min
Drying Gas Flow	: Nitrogen, 10 L/min
Interface temp.	: 300 °C
DL Temp.	: 150 °C
Heat block Temp.	: 400 °C

표 2. MRM 조건

Name	Type	Quantifier ion (m/z)	Qualifier ion (m/z)
BCEP		221 >35	223 >35
BCPP		249 >35	251 >35
BDCPP		317 >35	319 >35
DBuP		209 >79	209 >153
DBzP	Target	277 >79	277 >63
DoCP		277 >107	277 >169
DpCP		277 >107	277 >169
DPhP		249 >93	249 >155
TBBA		437 >393	437 >79
BCEP-d8		229 >35	231 >35
BCPP-d12		261 >35	263 >35
BDCPP-d10		329 >35	327 >35
DBuP-d18		227 >79	227 >163
DBzP-d10	ISTD	287 >79	287 >63
DoCP-d14		291 >114	291 >175
DpCP-d14		291 >114	291 >112
DPhP-d10		259 >98	259 >159
TBBA-13C6		443 >399	443 >81

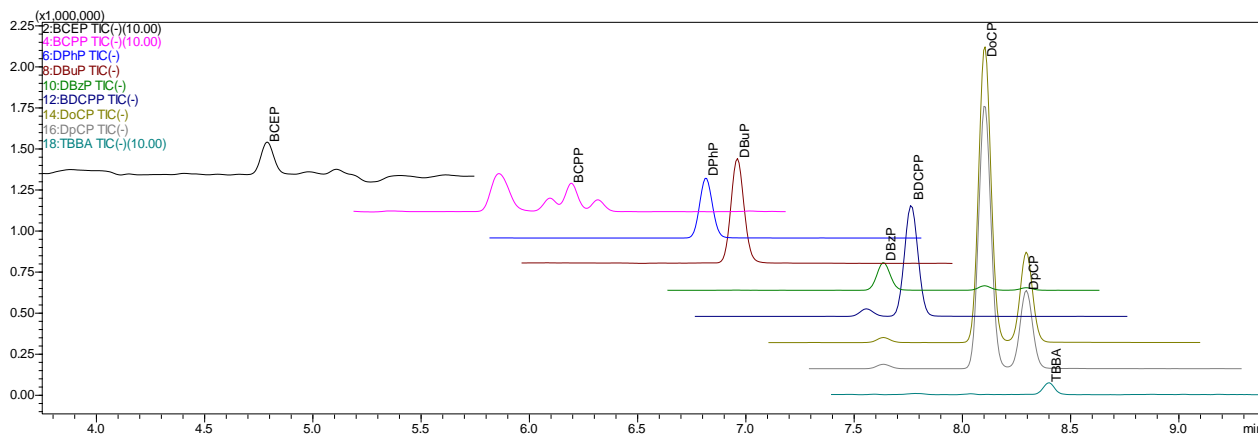


그림 2. 유기인계난연제 대사체 9종의 MS 크로마토그램 (소변 시료 중 농도: 10 ng/mL)

■ 전처리 방법

세부 전처리 과정은 그림 3과 같으며, 소변 시료를 효소 반응 시킨 후, SPE 정제 및 농축을 통해 분석하였다.

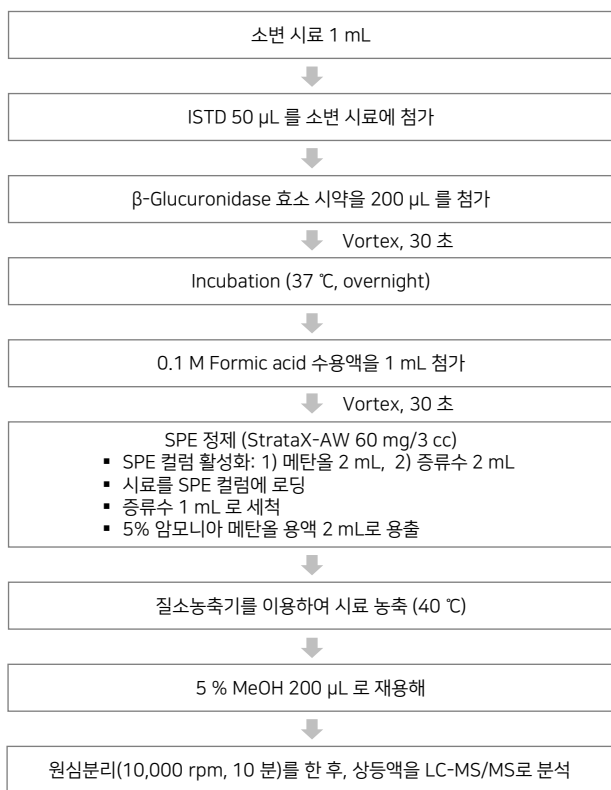


그림 3. 소변 시료 전처리 방법

■ 결과 및 토의

유기인계난연제 대사체의 검량선

합성 소변에 혼합표준용액을 첨가하여 그림 3과 같이 전처리 한 후, 검량선을 작성하였다. 검량선 범위는 약 (0.4 - 20) ng/mL 수준으로 설정하였으며, 유기인계난연제 대사체 9종에 대한 검량선의 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 우수하였다(표 3).

회수율 시험 및 방법검출한계(MDL)

합성 소변에 혼합표준용액을 검량선 중간 농도인 2.5 ng/mL 수준으로 첨가하여 전처리를 한 후, 5 번 반복 분석하여 회수율을 평가하였다. 성분별 회수율은 (85-110) % 수준으로 나타났으며, 상대표준편차(%RSD)는 (3-12) % 로 나타났다. 방법검출한계는 검량선 혼합표준용액 중 가장 낮은 농도를 7 회 반복 분석한 표준편차에 3.14 배 한 값으로 산출하였다(표 3).

표 3. 유기인계난연제 대사체 분석법의 밸리데이션 결과

성분명	r^2	회수율 (%) \pm %RSD, $n=5$	방법검출한계 (ng/mL) $n=7$
BCEP	0.998	101 \pm 8	0.2
BCPP	0.997	110 \pm 4	0.2
BDCPP	0.995	109 \pm 12	0.2
DBuP	0.997	99 \pm 12	0.4
DBzP	0.995	96 \pm 3	0.1
DoCP	0.996	101 \pm 8	0.1
DpCP	0.996	95 \pm 3	0.1
DPhP	0.998	85 \pm 8	0.1
TBBA	0.999	94 \pm 10	0.2

■ 결론

시마즈 액체크로마토그래피 질량분석기 LCMS-8060NX를 이용하여 소변 중 유기인계난연제 대사체 9종에 대한 동시분석법을 확립하였다. 검량선은 합성 소변을 사용하여 작성하였으며, 전 성분이 결정계수(r^2) 0.99 이상으로 우수한 직선성을 보였다. 또, 성분별 회수율 결과는 (85-110) %, 방법검출한계는 (0.1-0.4) ng/mL 으로 나타났다.

■ 참고문헌

- Syrago-Styliani E. Petropoulou, Myrto Petreas, June-Soo Park, Analytical methodology using ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of four di-ester metabolites of organophosphate flame retardants in California human urine, Journal of Chromatography A, 1434 (2016) 70-80
- Kate Hoffman, Julie L. Daniels, Heather M. Stapleton, Urinary Metabolites of Organophosphate Flame Retardants and Their Variability in Pregnant Women, Environ Int. 2014 Feb; 63: 169-172.