

GC-MS/MS를 이용한 다환방향족탄화수소 (PAHs) 대사체 분석

Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) using GC-MS/MS

■ 서론

다환방향족탄화수소 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons :PAHs)는 탄소와 수소만으로 이루어진 2개이상의 방향족 고리의 탄화수소이다. PAHs는 차량 배기가스, 석탄, 유해 폐기물, 흡연과 같이 불완전 연소할 때 생성되며 공기, 물, 음식, 토양 등에서 흔히 발견된다. 인간의 내분비계를 교란시키는 독성, 발암성, 돌연변이 유발 화합물로서, 이것은 오랜 시간 환경에 머무를 수 있기 때문에 문제가 되고 있다.¹⁾²⁾ PAHs는 일반적으로 근로 현장이나 일상 생활에서 호흡, 피부의 노출, 음식물 섭취를 통해 인체에 유입 될 수 있다.

국내에서는 한국산업표준법 (KS C IEC 62321-10)에 따라 전기전자 제품에 함유된 플라스틱이나 고무 등 고분자 내의 PAHs 정량법을 제공하고 있다. 또한, 대기오염공정시험기준 (ES 01802.1)에서는 '환경대기 중 다환방향족탄화수소류 (PAHs)-기체크로마토그래피/질량분석법'을 제시하고 있지만 사람의 PAHs 노출평가에 관련된 가이드라인은 제시되고 있지 않다.

이 뉴스레터에서는 생체시료 중 PAHs의 정량법을 소개하기 위해 국립환경과학원에서 발간한 제3기 국민환경보건기초조사 중 '생체시료 중 환경유해물질 분석매뉴얼-유기화합물 - I. 요 중 다환방향족탄화수소류 대사체-기체크로마토그래피 질량분석법 (GC-MS)'을 바탕으로 PAHs의 대사체 분석을 시행하였다.

PAHs는 낮은 휘발성을 가지고 분자량이 증가함에 따라 휘발성이 감소하는 경향이 있으며 유기용매에 대한 용해도가 높은 특징이 있다. 그래서 분석매뉴얼에 따르면 PAHs 대사체 물질 분석 시 BSTFA (N,O-Bis(Trimethylsilyl) trifluoroacetamide) 로 유도체화하여 가스크로마토그래피 질량분석법을 이용한다. 그러나 이 뉴스레터에서는 매트릭스의 간섭을 최소화 하기 위해 GC-MS/MS를 사용하여 분석하였다.

분석 대상물질은 그림 1 에서 보는것과 같이 4 종류로 2-Hydroxynaphthalene, 1-Hydroxyphenanthrene, 2-Hydroxyfluorene, 1-Hydroxypyrene 과 내부표준물질 1-Hydroxypyrene-d₉ 를 사용하여 인공뇨에서 PAHs 대사체 분석법을 확인하였다. Hydroxyl group (-OH)이 결합되어 있는 표준용액을 사용하였기 때문에, β-Glucuronidase/aryl sulfatase 를 사용한 가수분해 과정은 생략하고 SPE 정제와 BSTFA 유도체화만 진행하였다. 1-Hydroxypyrene의 TMS 유도체화 반응식은 그림 2 와 같다.

표준물질은 0.05 ~ 2 µg/L의 농도 범위에서 검정곡선의 결정계수 (r²) 를 확인하였으며, 분석방법의 신뢰성을 확보하기 위해 회수율, 재현성, 검출한계 및 정량한계를 확인하였다.



GCMS-TQ8050 NX

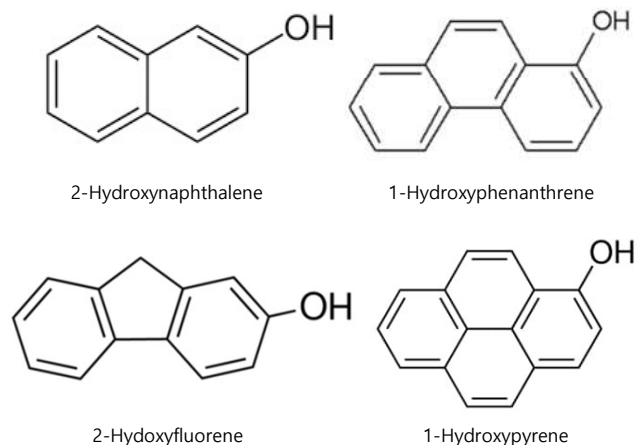


그림 1. PAHs 분석 대상 물질 4종

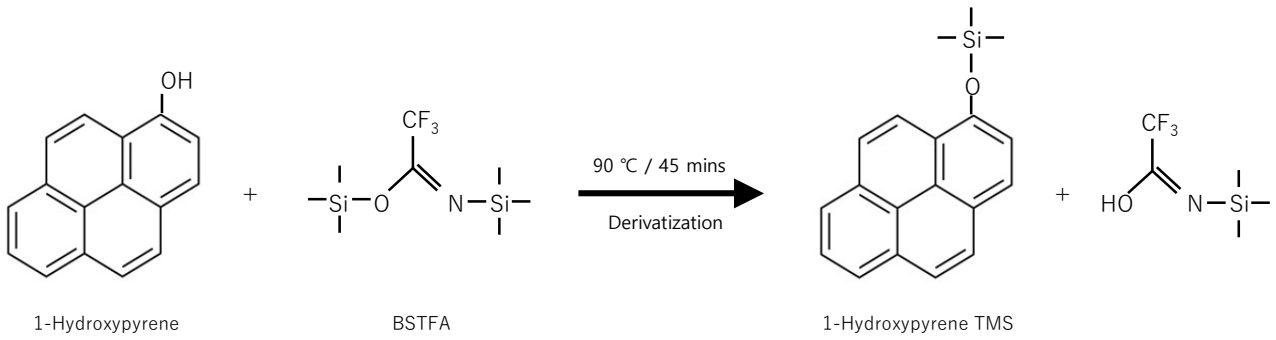


그림 2. 1-Hydroxypyrene의 BSTFA 유도체화 반응

■ 실험

시약과 표준품

고순도의 2-Hydroxynaphthalene, 1-Hydroxyphenanthrene, 2-Hydroxyfluorene, 1-Hydroxypyrene 1-Hydroxypyrene-d₉, N,O-Bis-(Trimethylsilyl)trifluoroacetamide 는 Sigma-Aldrich 에서 구매하였다. 인공뇨는 Biozoa 사의 Simulated Urine (Normal PH)을 사용했으며, 용매는 HPLC grade (99.9%)의 Methanol, Dichloromethane, Milli-Q Water를 사용하였다.

시료 전처리

바탕시료, QC 시료, 표준용액 0.05 ~ 2 µg/L 범위로 준비하고 각각 1 mL 씩 서로 다른 시험관에 분취한 후, 내부표준용액 100 µL (5 µg/L)를 넣어 준비한다. SPE 는 MCX 카트리지를 사용하여 메탄올 1 mL 와 정제수 1 mL 로 Conditioning 후 준비한 샘플을 Loading 한다. Elution 은 Dichloromethane 8 mL로 한 후, 질소 농축기에서 건조시킨다. 모든 용매가 건조된 후 BSTFA 유도체화 시약 100 µL를 첨가하여 Vortex mixer 로 혼합한 뒤, 배양기에서 90 °C, 45분간 반응시킨다.

GC-MS/MS 분석 조건

PAHs에 대한 기기 분석 조건 및 MRM 조건은 표 1에 나타났다.

표 1. GC-MS/MS 분석 조건

Gas Chromatography

System	: GCMS-TQ8050 NX
Column	: SH-I-5Sil MS (30 m, 0.25 mm I.D, 0.25 µm)
Injection volume	: 1 µL
Injector Temp.	: 300 °C
Injection mode	: Splitless
Column flow	: 1 mL/min (He)
Column Temp.	: 80 °C (2 min) → 20 °C/min → 170 °C (2 min) → 10 °C/min → 280 °C (5 min)

Mass spectrometry

Detector Temp.	: 250 °C
Interface Temp.	: 280 °C

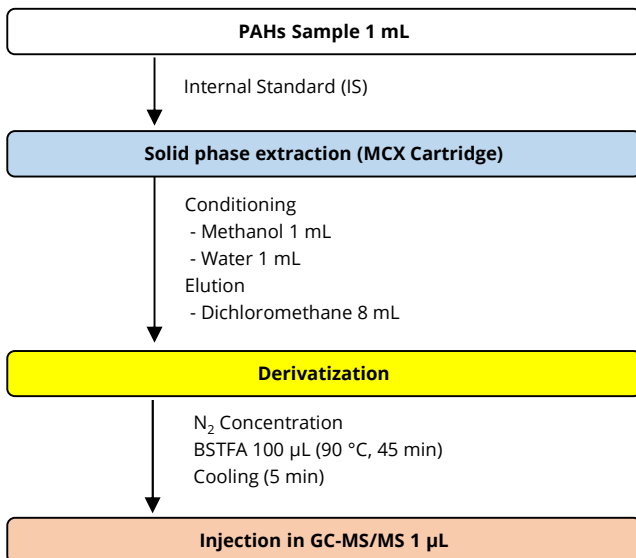
MRM

2-Hydroxynaphthalene	216>201 (9)	201>127 (27)
2-Hydroxyfluorene	254>239 (12)	254>165 (30)
1-Hydroxyphenanthrene	266>251 (15)	266>235 (21)
1-Hydroxypyrene	290>73 (27)	290>275 (15)
1-Hydroxypyrene-d ₉ (IS)	299>73 (18)	299>284 (9)

■ 결과 및 토의

검정곡선

표준물질의 검정곡선은 1-Hydroxypyrene-d₉ 를 내부표준물질 (IS) 로 이용한 내부 표준법을 활용하였으며, PAHs 4종 모두에 대해 0.05 ~ 2 µg/L 농도 범위에서 선형 검량선을 얻었다. 검량선의 결정계수 (r²)는 그림 3에서 처럼 0.999 이상으로 우수한 직선성을 보였다.



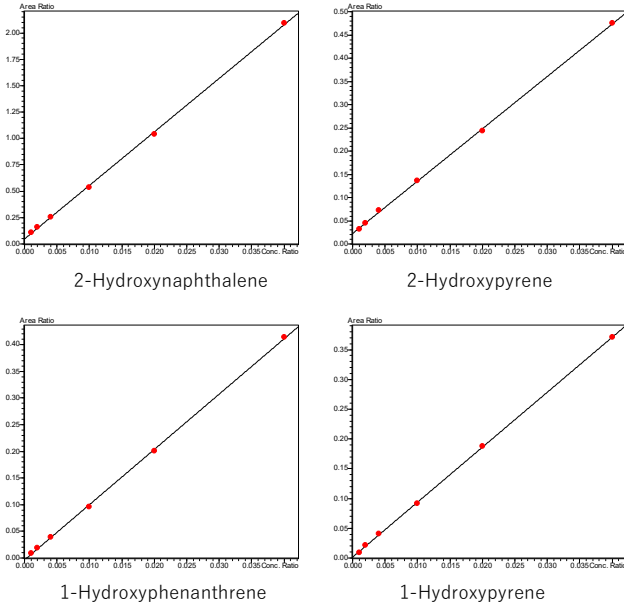


그림 3. PAHs 4종의 검정 곡선 (0.05 ~ 2 µg/L)

회수율 및 재현성

회수율 및 재현성 확인을 위해 인공노에 PAHs 농도 0.5 µg/L 가 되도록 표준용액을 첨가하여 3회 반복 분석하였다. 3회 반복 측정 결과 표 2에서 처럼 2-Hydroxynaphthalene, 2-Hydroxyfluorene, 1-Hydroxyphenanthrene, 1-Hydroxypyrene 은 각각 1.7, 3.4, 1.7 그리고 1.2 %RSD를 나타냈다. 회수율 측정 결과는 80.3 ~ 90.2 % 수준으로 양호한 결과를 보여주었다.

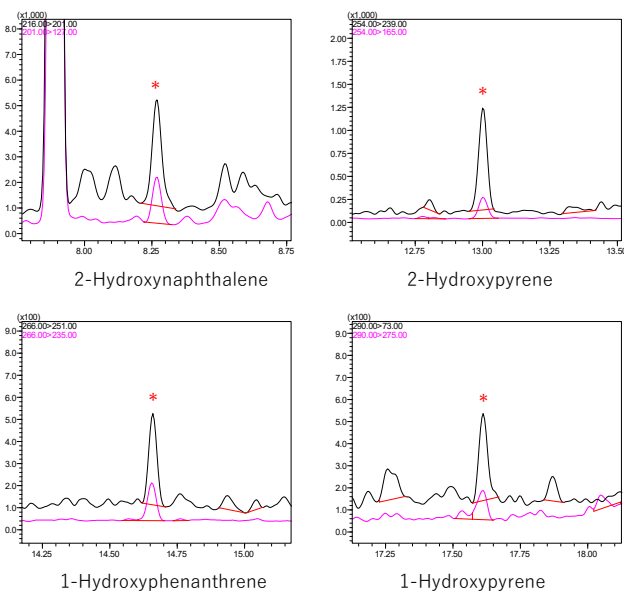


그림 4. PAHs 4종의 크로마토그램 (0.05 µg/L)

표 2. PAHs 대사체 재현성 및 회수율 결과 (0.5 µg/L, n=3)

No.	Concentration (µg/L)			
	2-Hydroxy naphthalene	2-Hydroxy fluorene	1-Hydroxy phenanthrene	1-Hydroxy pyrene
1	0.43	0.41	0.42	0.45
2	0.41	0.39	0.43	0.45
3	0.43	0.41	0.42	0.46
Average	0.42	0.40	0.42	0.45
%RSD	1.7	3.4	1.7	1.2
Recovery (%)	84.5	80.3	84.5	90.2

검출한계 및 정량한계

검출한계 및 정량한계를 측정하기 위해서 인공노에 검량곡선의 가장 낮은 농도인 0.05 µg/L 의 농도를 제조하여 7회 반복 측정하였으며, 검출한계는 표준편차의 3.14, 정량한계는 표준편차의 10 의 곱으로 계산하였다.

표준용액 0.05 µg/L 의 크로마토그램은 그림 4에 나타냈다. 검출한계 및 정량한계는 표 3에서 보는것과 같이 0.003 ~ 0.006 µg/L 와 0.01 ~ 0.019 µg/L 수준으로 측정되었다.

표 3. PAHs 대사체 검출한계 및 정량한계 결과 (0.05 µg/L, n=7)

No.	Concentration (µg/L)			
	2-Hydroxy naphthalene	2-Hydroxy fluorene	1-Hydroxy phenanthrene	1-Hydroxy pyrene
1	0.057	0.035	0.059	0.052
2	0.055	0.032	0.062	0.049
3	0.055	0.034	0.061	0.047
4	0.057	0.035	0.061	0.050
5	0.055	0.035	0.061	0.048
6	0.055	0.030	0.062	0.050
7	0.055	0.034	0.058	0.050
Average	0.056	0.034	0.061	0.049
%RSD	1.76	5.67	2.50	3.27
STDEV	0.0010	0.0019	0.0015	0.0016
LOD (µg/L)	0.003	0.006	0.005	0.005
LOQ (µg/L)	0.010	0.019	0.015	0.016

■ 결론

본 뉴스 레터는 국립 환경 과학 원에서 국민환경보건기초조사를 통해 발간한 '생체시료 중 환경유해물질 분석매뉴얼-유기화합물'에 근거하여, Shimadzu GCMS-TQ8050 NX를 이용하여 PAHs 대사체 물질에 대해 재현성, 회수율, 검출한계 및 정량한계를 살펴보았다.

생체 시료를 사용하여 유도체화 과정을 거친 샘플의 경우 매트릭스의 간섭 영향이 크에도 불구하고, GC-MS/MS를 사용하여 0.003 ~ 0.006 µg/L 와 0.01 ~ 0.019 µg/L 수준의 검출한계 및 정량한계를 구할 수 있었으며, 1.2 ~ 3.4 %RSD 와 회수율 80.3 ~ 90.2 % 수준으로 PAHs 대사체 분석에 적합함을 확인 할 수 있었다.

■ 참고문헌

- 1) <https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/pahs.pdf>
- 2) Narges Shamsedini, Health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in individuals living near restaurants: a cross-sectional study in Shiraz, Iran, *Scientific Reports*,12:8254 (2022)
- 3) 제 3 기 국민 환경 보건 기초 조사 '생체 시료 중 환경유해물질 분석 매뉴얼 - 유기화합물', 국립환경과학원 2018