

## Application News

No. GCMS-2005K

Gas Chromatograph Mass Spectrometer

### 자동 전처리 샘플러를 이용한 혈중 알코올(BAC)의 GC-MS 및 FID의 동시분석

Simultaneous GC-MS and FID Analysis of Blood Alcohol Content utilizing Robotic Autosampler for Automated Sample Preparation

#### ■ 초록

혈중 알코올(Blood Alcohol Components, BAC) 분석은 수년 동안 법의학 분야에서 주요 응용 분야였으며, 일반적으로 듀얼 FID를 사용한 GC와 루프타입의 헤드스페이스 샘플러를 사용하여 분석되었다. 그러나 최근 많은 실험실에서 GC-FID와 GC-MS를 결합하는 방법으로 전환하고 있는 실정이다. 본 뉴스레터에서는 혈중 알코올을 분석하기 위해 FID를 함께 결합한 GC-MS를 사용하였다. 이 연구의 목적은 AOC-6000이 시작단계인 샘플 준비부터 끝나는 샘플 주입까지 반복 수행을 할 수 있는지 확인하는 것이었다. 총 6개의 표준용액을 준비하고 분석한 결과  $r^2$ 은 0.999 이상의 직선성을 나타냈으며, 0.08 g/dL BAC 표준용액을 30회 주입 후 반복성을 측정했을 때 에탄올의 표준편차가 0.003 미만으로 나타났다.

#### ■ 서론

많은 법의독물학 실험실에서 FID 데이터 분석과 함께 GC-MS의 결합으로 분석법이 바뀔에 따라, 동시분석은 필수적이게 되었다. 또한 BAC 분석 중 직면해 있는 근본적인 문제 중 하나인 샘플 준비과정도 본 뉴스레터에서 다루고 있다. 국가규정에 따라 검량선과 확인용 표준용액은 여러 번 반복하여 준비해야 하며, 미지 시료의 경우도 준비되어야 하기 때문에 결국 분석자가 분석을 위해 많은 시간을 소비하게 된다. 본 뉴스레터의 목적은 분석자가 다른 프로젝트나 데이터 분석에 필요한 시간을 활용할 수 있도록 샘플을 준비하는데 소요되는 시간을 없애는 것이다. 또한, 자동 전처리 샘플러를 사용함으로써 사람이 샘플을 준비하면서 범할 수 있는 오류를 제거할 수 있다. 자동 샘플러인 AOC-6000 RTC 120 cm를 사용하면, 모든 표준물질과 미지 시료를 준비한 후 BAC에 대한 높은 수준의 반복성 및 정확도를 얻을 수 있다.

#### ■ 샘플 및 분석, 실험 조건

##### 기기 설정

Shimadzu GCMS-QP2020 NX는 BAC 데이터를 동시에 얻기 위해 FID-2030과 함께 사용되었다. AFT (Advanced Flow Technologies)는 낮은 농도의 BAC 분석 시간 동안 질량분석기의 감도 저하가 없고, 두 검출기 사이에서 유량 조절을 통해 샘플이 분할될 수 있도록 구성되었다. 또한, 샘플 도입 장치로 AOC-6000 RTC 120 cm 레일이 장착되어 헤드스페이스 주입에 사용될 뿐만 아니라 샘플 준비에도 사용되었다. 샘플 준비에 필요한 많은 양의 표준용액 및 희석 용매를 준비하기 위해 Large Wash Station이 설치되었다. AOC-6000은 3개의 액상 시린지와 2.5 mL HS 시린지를 자동으로 전환하기 위해 2개의 Tool Parking Station을 갖추었다.



샘플 준비

AOC-6000은 앞서 언급한 헤드스페이스 주입을 포함하여 처음부터 끝까지 BAC 표준용액 준비를 수행하는데 사용되었다. 메탄올, 에탄올, 이소프로판올 및 아세톤으로 이루어진 1.0 g/dL BAC 표준원액을 20 mL HS 바이알에 넣은 후 첫 번째 Vial Headspace Rack의 1번 위치에 두었다. Large Wash Station 모듈 1은 탈이온수를 넣고 표준용액 희석 및 시린지 세척에 사용하였으며, 모듈 2의 첫번째 위치에는 내부 표준용액인 노말 프로판올(0.03 g/dL, 100 mL)을 넣고 두번째 바이알에는 시린지 세척을 위한 탈이온수를 넣었다. 두 번째 Vial Headspace Rack의 1-34번에는 스크류 캡이 씌어진 비어 있는 20 mL HS 바이알을 넣었다.

AOC-6000을 사용하여 최종 부피 100 µL인 5개 농도의 (0.01, 0.04, 0.1, 0.2, 0.5 g/dL) 표준용액을 만들었다.

표준용액은 3 세트의 반복실험으로 진행하였고, 세트당 바이알 한 개씩 건너뛰고 위치하였다. 바이알 1-5, 7-11 및 13-17번에는 BAC 표준용액 100 µL가 들어있고, 바이알 6번과 12번은 비워 두었다. 이러한 프로세스를 반복하여 자동 전처리 샘플러가 적절히 작동하는지 확인하기 위해 표준용액을 동일하게 준비하였다. 바이알 18-22, 24-28 및 30-34 번에는 BAC 표준용액이 100 µL 들어있고, 바이알 23번과 29번은 비워 두었다.

AOC-6000을 사용하여 바이알 1-34번까지 내부표준용액 1 mL를 넣어주었고, 샘플의 균질성을 위해 Vortex module로 옮겨졌다. 바이알 6, 12, 23, 29번에 있는 블랭크 바이알들도 내부표준용액 1 mL를 넣고, 표준용액 분석 후 캐리 오버 (carry over)를 확인하는데 사용되었다. 내부표준용액을 추가한 후, 각각 샘플은 HS 시린지를 사용하여 HS에 주입되었다. 자세한 분석조건은 표 1에 나타났다.

표 1. GC-MS/FID 분석조건

AOC-6000	HS Method Parameters
Sample	1 mL Sample Injection Volume
	20 mL HS Vial
Equilibration	15 minutes at 60 °C
	Syringe Temp 70 °C
	Agitator 500 RPM
GC	GC-2030
Injection	Split 30:1
	Column Flow 4 mL/min
Column	SH-BAC1, 30.0 m x 0.32 mm ID x 1.80 µm
	Helium Carrier Gas
	Constant Pressure 86.3 kPa
	Linear Velocity 72.1 cm/s
Oven Program	Isothermal 40 °C
	Total GC Run Time 5.25 min
	Total Cycle Time 10 min
APC	25 kPa for Detector Splitter
Detector 1	MS
Operating Mode	Scan Mode 29 m/z - 200 m/z, 2.00 min - 5.25 min
Ion Source	200 °C
MS Interface	250 °C
Detector 2	FID
FID Temperature	250 °C
FID Flow Rates	H <sub>2</sub> = 32.0 mL/min
	Air = 200 mL/min
	Makeup = 24.0 mL/min

## ■ 결과 및 토의

### Chromatography

헤드스페이스 샘플은 스플리터에서 25 kPa 의 일정한 압력을 유지하며, AFT Detector splitting kit를 사용한 GC-MS와 FID 사이에 자동으로 분할되었다. 그 결과 그림 1에서 보는 것과 같이 두 검출기의 크로마토그램에서 모든 피크에 대해 거의 유사한 머무름 시간을 보여주었다.

모든 5개의 화합물들은 선속도를 72 cm/s 로 설정하여 5 분 내에 분리할 수 있었다.

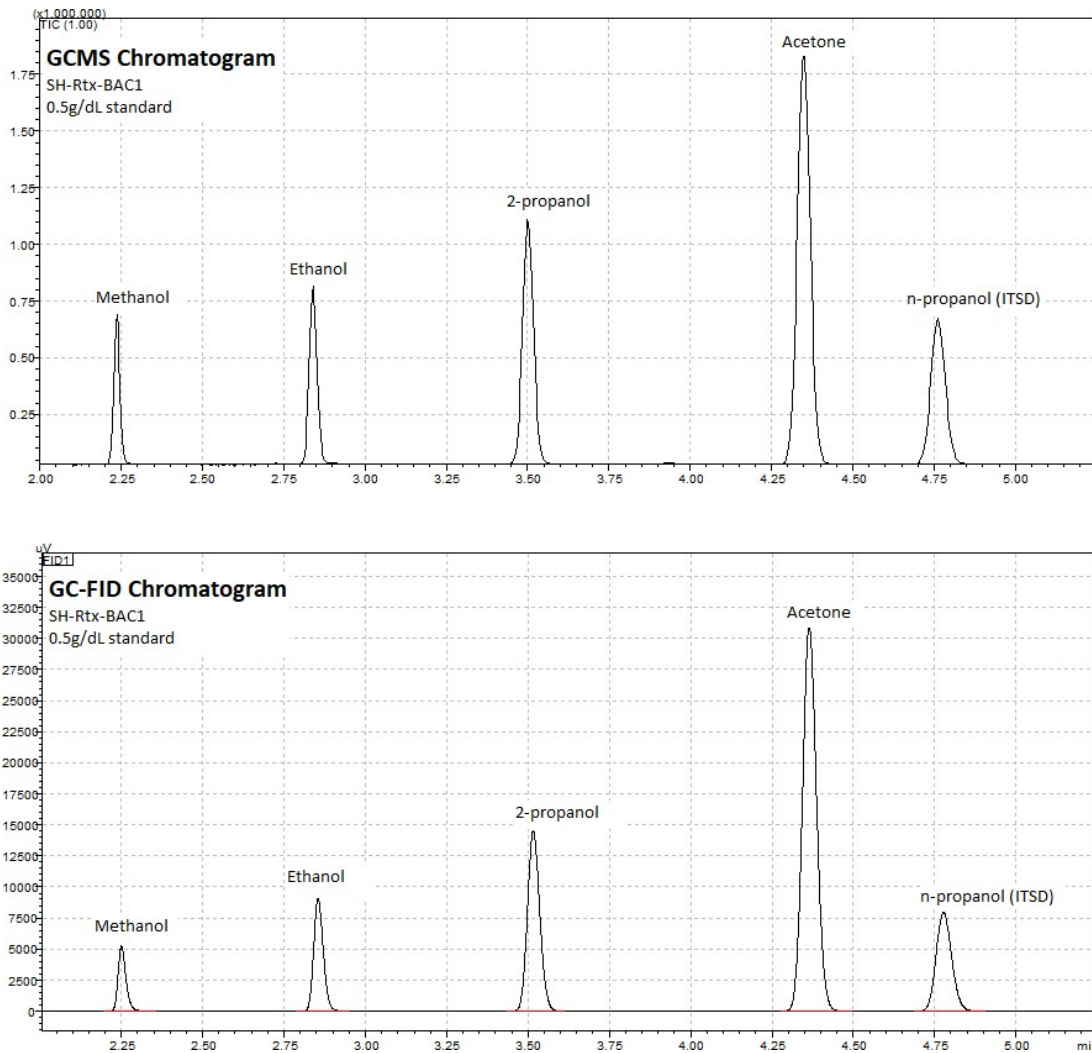


그림 1. 0.5 g/dL BAC 표준용액의 GC-MS 크로마토그램 (위) 과 GC-FID 크로마토그램 (아래)

질량 스펙트럼 확인

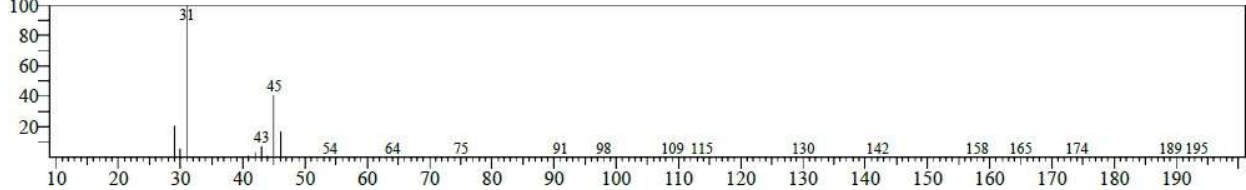
질량 스펙트럼 확인을 위해 MS를 사용하는 것은 BAC 분석을 수행할 때 유리하다. 크로마토그램에서 스펙트럼을 확인하면 이전에 GC-FID에서 용출 순서를 확인하기 위해 사용했던 듀얼 컬럼 분석이 필요하지 않기 때문이다.

모든 피크에 대한 질량 스펙트럼 정보는 가장 정확한 결과를 위해 최신의 Wiley/NIST 라이브러리를 참조하였고, 가장 낮은 0.01 g/dL 농도에서도 유사도 지수가 96으로 나타났다 (그림 2).

Library Search

<< Target >>

Line#: 1 R Time: 2.840 (Scan#: 253) MassPeaks: 94  
Raw Mode: Averaged 2.837-2.843 (252-254) BasePeak: 31.00 (10000)  
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan



Hit#: 1 Entry: 57 Library: W12N20M1.lib

SI: 96 Formula: C2H6O CAS: 64-17-5 MolWeight: 46 RetIndex: 463

CompName: Ethanol \$\$ Ethyl alcohol \$\$ Alcohol \$\$ Alcohol anhydrous \$\$ Algrain \$\$ Anhydrol \$\$ Denatured ethanol \$\$ Ethyl hydrate \$\$ Ethyl hydroxide

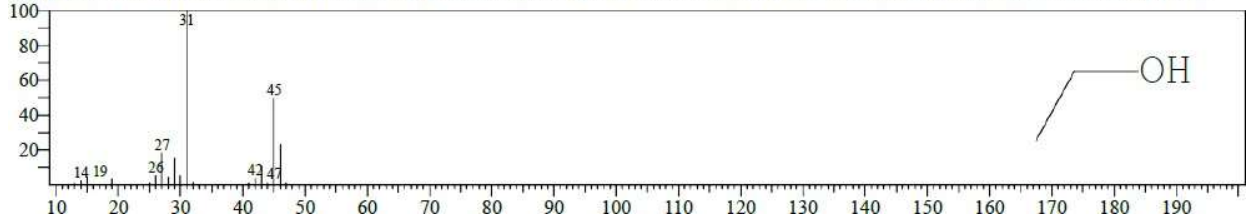


그림 2. Wiley/NIST 라이브러리를 사용하여 0.01 g/dL 농도의 에탄올을 검색한 결과

검량선

5개 농도의 표준용액 (0.01, 0.04, 0.1, 0.2, 0.5 g/dL)은 내부표준용액 첨가를 포함해 AOC-6000에 의해 모두 준비되었다.

각 표준물질 세트는 3반복으로 측정했고 내부표준물질만 포함하고 있는 바탕시료를 분석하여 캐리 오버가 없음을 확인하였다 (그림 3).

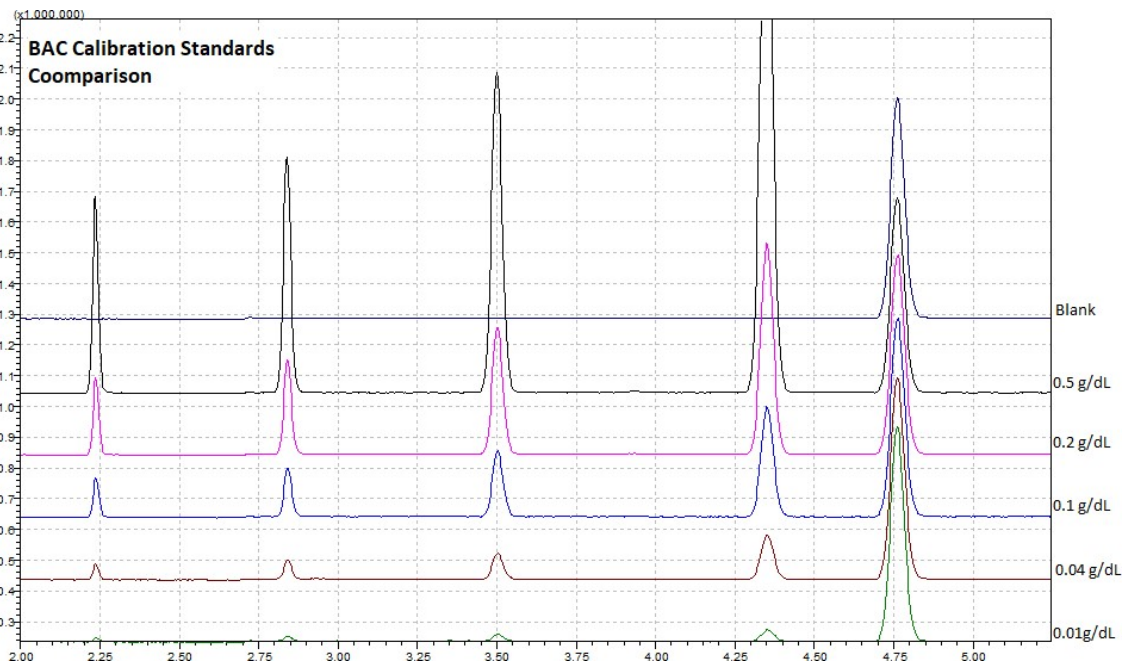


그림 3. AOC-6000에서 준비하고 샘플링한 BAC 검량선의 데이터 비교. 내부표준물질만 포함된 바탕시료는 상위의 크로마토그램

GC-MS와 GC-FID 모두에 대한 검정곡선은 각 레벨별로 총 6번 (3번의 검정곡선과 3번의 확인시험)의 반복실험을 진행하였다. 모든 분석 물질에 대하여 FID와 MS 검출기에서  $r^2=0.999$  이상의 직선성을 나타냈다.

두 검출기에서 측정된 에탄올의 검정곡선은 그림 4와 같으며, 추가적으로 3가지 물질에 대한 직선성은 표 2에 나타났다.

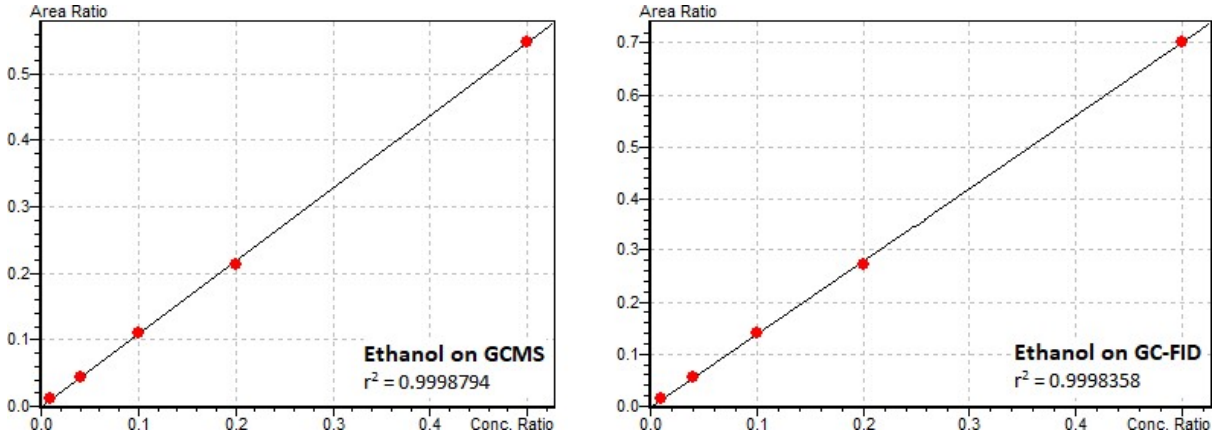


그림 4. GC-MS 및 GC-FID에서 에탄올에 대한 검정곡선과 직선성 비교.

표 2. GC-FID와 GC-MS에서 4가지 물질에 대한 직선성

	GC-MS	FID
Methanol	0.9998657	0.9998063
Ethanol	0.9998794	0.9998358
2-Propanol	0.9999022	0.9998546
Acetone	0.9998253	0.9997563

반복성

표준용액을 분석한 후, 0.08 g/dL에서 30개의 샘플을 내부표준물질을 첨가하여 에탄올 농도를 정량한 결과 표 3에서 보는 바와 같이, 에탄올의 평균 농도는 GC-MS와 GC-FID의 경우 각각 0.0779 g/dL, 0.0768 g/dL 이었다.

또한, 에탄올 농도의 표준편차는 0.005 미만으로 계산되었다.

표 3. 에탄올에 대한 반복측정 (샘플 n=30)

	GC-MS	FID
Average RT (min)	2.838	2.853
% RSD for RT	0.033	0.017
Average EtOH conc. (g/dL)	0.0779	0.0768
Standard Deviation of EtOH conc.	0.0022	0.0021

## ■ 결론

BAC 분석을 위해 FID와 함께 GC-MS를 사용하여 데이터를 동시에 획득하면 높은 정확성의 화합물 식별 및 에탄올 정량이 가능하다. 샘플 준비를 위해 자동 전처리 샘플러를 사용하면 넓은 선형 범위에서 높은 수준의 정확도와 반복성을 유지하면서 분석자가 샘플을 준비할 필요가 없다.

질량 스펙트럼을 확인하면 다른 BAC 성분과 함께 에탄올을 더 낮은 농도 수준에서 정확하게 식별할 수 있으며, 본 뉴스레터에서 소개한 자동 전처리 샘플러 사용은 효율성 뿐만 아니라 자동화된 BAC 분석에 신뢰할 수 있음을 나타낸다.

## ■ 소모품

REST-18003	Rtx-BAC1 Cap. Column 30m, 0.32mm ID, 1.80µm
225-19744-03	SYRINGE, 10 µL GT 0.47 [AOC-6000]
225-19744-08	SYRINGE, 250 µL GT 0.47 [AOC-6000]
225-19744-10	SYRINGE, 1 mL GT 0.47 [AOC-6000]
225-19744-11	SYRINGE, 2.5 mL GT 0.47 [AOC-6000] HS
220-97331-16	Vials, 20 mL Headspace vial w/ 18 mm Magn Screw Cap & Silicone/PTFE Septa, Kit, round bottom, 100/pk