

Application News

No. GCMS-2202-K

Gas Chromatography Mass Spectrometry

Py-GCMS를 이용한 환경시료 중 미세 플라스틱의 정량 분석

An Automated Workflow for Quantitative Analysis of Microplastics in Environmental Samples via Pyrolysis-GC/MS

■ 초 록

플라스틱 사용이 증가함에 따라, 미세 플라스틱 (MPs) 에 대한 선별이 시급한 문제가 되었다. 이에 대응하여 세계는 오염 물질을 식별하고 측정하기 위한 분석 방법을 개발할 것을 과학계에 요청했다. 이러한 방법 중 다수는 미세 플라스틱의 식별에 성공했지만 일부는 복잡한 매트릭스에서 정량하기 위한 빠르고 자동화된 Workflow가 부족하다.

본 뉴스레터에서는 수질 중에서 미세 플라스틱을 식별하고, 정량 분석을 수행하였다. Frontier Py-3030D Pyrolyzer에 결합된 Shimadzu GCMS-QP2020 NX를 사용하여 환경에서 많이 검출되는 물질 중 12개의 미세 플라스틱 고분자를 선택하여 정량 분석을 입증했다^[1]. 모든 화합물에 대해 5개 포인트의 검정 곡선은 결정 계수 (R^2) > 0.9959의 직선성을 보여주었다. 0.2 및 3 mg ($n=7$) 표준물질을 사용하여 검정 범위의 저농도 및 고농도 모두에서 반복성 테스트를 수행했다. 0.2 mg에서 백분율 상대 표준 편차 (% RSD)는 3.6 - 23.6 범위인 반면, 3 mg에서 % RSD는 2.3 - 12.1 이었다. 정확도 평가도 수행되었으며 결과는 0.2 mg이 66.4 % - 145.1 % 범위의 회수율을 보이고 3 mg 회수율 범위가 92.2 % - 102.8 % 인 것으로 나타났다.

정량한계 (LLOQ) 실험을 통해 여러 고분자의 측정할 수 있는 최저 농도를 결정했다. 이 연구에서 LLOQ는 각 고분자에 대한 검정 곡선의 가장 낮은 농도였으며 범위는 0.1 μg - 7.29 μg (0.2 mg 표준 물질)이다. 또한 실험 중 검정 곡선 Drift가 없는지 확인하기 위해 CCC (Continuous Calibration Check) 테스트를 수행했다. 결과는 모든 화합물에 대한 % Drift가 20% 미만임을 보여주었다.

이러한 결과는 새로운 분석 방법을 개발하는 동안 전통적으로 평가된 기기 품질관리 (QC) 매개변수가 허용 가능한 수준 내에 있음을 보여주었다. 이 뉴스레터의 분석법 검증 결과는 ASTM 위원회 D19^[2] 및 ISO TC147 SC2 JWG 1^[3]에서 진행 중인 수질 중 미세플라스틱 연구에 대한 Py-GC/MS 분석법 조건 지침 역할을 할 수 있다. 또한 결과는 환경 샘플에서 미세플라스틱을 분석하는 환경 과학자를 위한 참고 자료로 사용될 수 있다.

■ 서 론

플라스틱의 생산과 분해되지 않는 특성은 환경에서 아직 입증되지 않은 잠재적인 부작용을 나타낼 수 있다. 큰 플라스틱 파편은 빗물 파이프를 막을 뿐 아니라 살충제 및 미생물과 같은 화학물질을 포함한 다른 오염 물질의 흡착 장소가 될 수 있는 마이크로 및 나노 입자로 분해될 수 있다^[4]. 이러한 마이크로 플라스틱 및 나노 플라스틱은 수중 유기체에 의해 섭취될 수 있으며 먹이 사슬을 통해 인간에게 축적될 수 있다. 플라스틱 오염을 완화해야 할 필요성 때문에 연구자들은 플라스틱이 환경에 미치는 영향을 이해하고 모니터링 및 완화 프로그램을 개발하기 위해 노력하고 있다.

Pyrolysis-GCMS (Py-GC/MS)는 미세 플라스틱의 식별 및 정량을 위한 정확하고 정밀한 대안인 혁신적 기술이며 샘플 준비 단계를 단축하여 빠른 Workflow를 제공한다. 일부 기존 미세 플라스틱 분석법에서는 시료 준비, 매트릭스 분리 및 용매 추출이 필요하다^[4]. Polyethylene (PE), Polypropylene (PP) 등의 고분자는 용매에 쉽게 용해되지 않으며 초기 재료로부터의 회수율이 낮을 수 있다. 따라서 기존 분석법을 이용한 미세 플라스틱 분석은 문제가 발생할 수 있다.

Py-GC/MS는 고체 샘플을 직접 분석하기 때문에 기존의 미세 플라스틱 분석법보다 샘플 준비가 더 용이하다^[4]. 또한 고체 자체를 그대로 샘플 컵에 넣기 때문에 Workflow에서 용매 추출 단계를 제거할 수 있다. 따라서 Py-GC/MS를 사용하면 용매 사용량과 분석 시간을 감소시킬 수 있고, 다양한 플라스틱의 정성 분석의 불일치성을 최소화할 수 있다. 입자의 개수를 세고 질량 농도를 추정해야 하는 분광법과 달리 준비된 샘플을 샘플 예코 컵에 넣고 분석한 후 $\mu\text{g/L}$ 와 같은 부피당 질량으로 나타낸다. Retention Index (머무름 지수)를 사용하여 대상 화합물의 특정 열분해물을 쉽게 식별하는 전문 소프트웨어인 Frontier MP-Search를 사용하여 Py-GC/MS의 효율이 더욱 향상되었다.

이 뉴스레터는 Frontier Py-3030D Pyrolyzer 결합된 Shimadzu GCMS-QP2020NX를 사용하여 12가지 미세 플라스틱의 빠르고 정확하고 정밀한 분석을 보여준다.

■ 실험적 접근

Frontier Lab multi-shot Pyrolyzer (Py)는 Shimadzu GCMS와 결합될 수 있다 (그림 1). 이 뉴스레터의 시스템 구성은 Shimadzu GCMS (QP2020 NX), Frontier Multi-Shot Pyrolyzer (EGA/PY-3030D), Auto-shot sampler (AS-1020E), Frontier lab Ultra-alloy microplastics column (UAMP)으로 구성되었다. 또한 Vent-free GC/MS 어댑터 및 F-Search MP Library, 12가지 고분자의 Calibration Standard mixture, Eco-cup LF 및 Packed Inlet liner로 구성되어 있다.

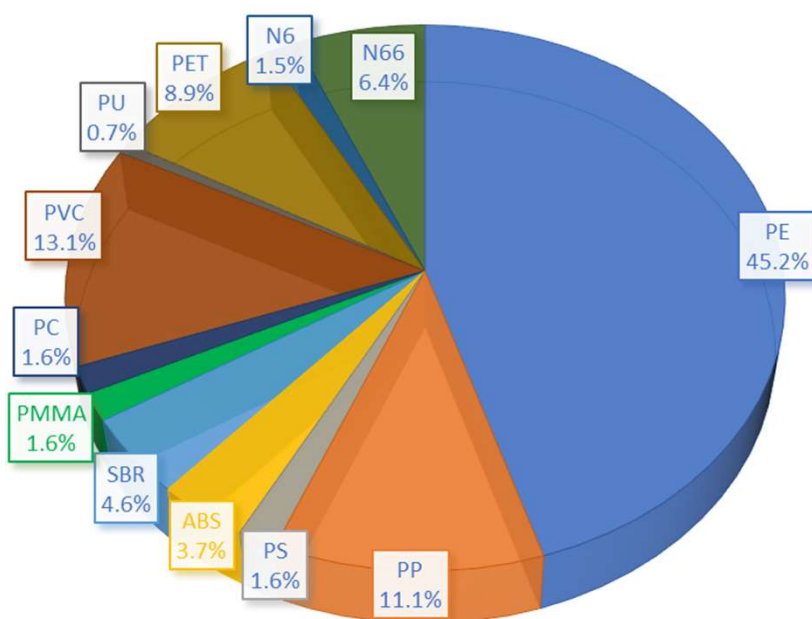
본 뉴스레터에서 분석된 고분자는 Polyethylene (PE), Polypropylene (PP), Polyvinylchloride (PVC), Polycarbonate (PC), Polyethylene terephthalate (PET), Poly (methyl methacrylate) (PMMA), Nylon-6 (N-6), Polystyrene (PS), Acrylonitrile-butadiene-styrene copolymer (ABS), Styrene-butadiene rubber (SBR), Nylon-6,6 (N-66) 및 MDI-Polyurethane (PU) 이다. 상기 고분자 중 7가지에 대한 특정 열분해물을 결정하기 위한 Workflow는 Shimadzu 뉴스레터 GCMS-2201^[5]에 설명되어 있다.

Frontier MPs-CaCO₃ 표준 물질을 사용하여 5개 포인트의 검정 곡선을 작성했다^[1]. MPs-CaCO₃ 표준 물질의 고분자 백분율 분포와 표준 물질 4 mg에 들어있는 분석 물질의 질량은 그림 2에 나타났다.

전자 세미-마이크로 저울을 사용하여 0.2, 0.4, 0.8, 2.0 및 4.0 mg의 표준 물질을 예코 샘플 컵에 반복하여 칭량했다 (n=4). 그 후, 1 - 2 mg의 유리 솜을 각 샘플 컵에 넣은 후 자동 주입 장치에 놓았다. Blank 예코 샘플 컵에 이어 가장 낮은 농도의 샘플부터 높은 순으로 분석했다. 각 샘플 컵은 Pyrolyzer furnace로 주입되어 표준 물질의 열화학적 분해가 발생한다. 그림 3은 4 mg 표준 물질의 Pyrogram을 보여준다.



그림 1. Shimadzu GCMS-QP2020NX와 Frontier Multi-Shot Pyrolyzer EGA/PY-3030D.



Polymer	Mass (μg) in 4 mg standard
PE	145.8
PP	35.7
PS	5.2
ABS	12.1
SBR	15.0
PMMA	5.3
PC	5.1
PVC	42.4
PU	2.1
PET	28.6
N6	4.9
N66	20.7

그림 2. CaCO₃ 희석제를 포함한 4 mg MPs-CaCO₃ 표준 물질에서 각 분석 물질의 질량 및 고분자 조성 백분율

Frontier MP Search 소프트웨어를 사용하여 데이터 처리를 수행했다. 이 과정에서 특정 열분해물을 기반으로 대상 고분자를 식별했다 (그림 3). 열분해물의 Quantitative ion은 정량 분석에 사용하였고, Reference ion은 각 고분자의 성분 확인에 사용하였다. 검정 곡선은 측정된 각각의 평균 질량을 반복 분석하여 얻은 평균 피크 면적을 기준으로 MP Search 소프트웨어에 의해 자동으로 생성되었다.

교정 범위의 저농도 (0.2 mg)에서 7회 반복 분석과 고농도 (3 mg)에서 7회 반복 분석하여 반복성 테스트를 진행하여, 각각의 백분율 상대 표준편차 (% RSD)를 계산했다.

각 표준 물질의 정확도 또는 회수율은 0.2 mg 및 3 mg 수준 내에서 각 구성 요소에 대한 이론적 농도를 사용하여 계산되었다. LLOQ 측정은 표준 물질 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 및 1 mg을 주입하여 얻었다. LLOQ는 가장 민감도가 낮은 화합물에 대해 신호 대 잡음 비 (S/N)가 10 이상인 0.2 mg 표준 물질 수준에서 설정되었다. 분석에서 검정 곡선의 유효성을 평가하기 위해 검정 곡선의 중간 농도 표준 물질을 분석했다. 싱글 샷 모드일 때 GC-MS 및 Py 시스템 대한 실험 조건은 표 1에 나열되어 있다.

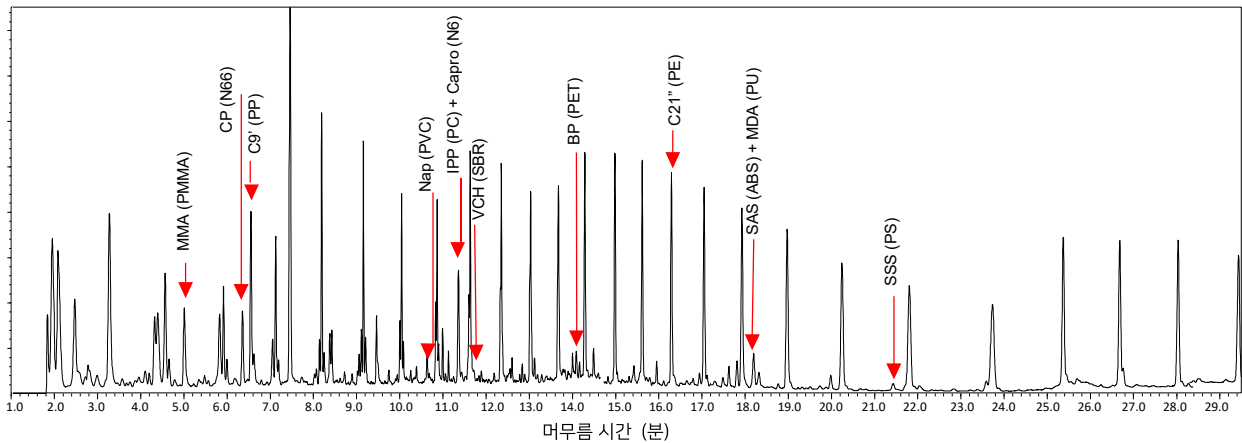


그림 3. 12가지 특정 열분해물 검출 순서를 보여주는 4 mg 표준 물질 Pyrogram

표 1. GCMS와 Pyrolyzer 분석 조건

Gas Chromatography		Nexis GC-2030
Injection Port Mode	Split mode; 50:1 split ratio	
Injector Pressure	150 kPA	
Carrier Gas	Helium	
Injection Port Temperature	300 °C	
Column: Frontier Lab UAMP	UA precolumn 50: Ultra Alloy-50 (2 m x 0.25 Column mmID x 1.0 µm), Separation column: Ultra Alloy-5(30 m x 0.25 mmID x 0.5 µm)	
Flow Control Mode	Constant pressure	
Oven Temperature	40 °C (2 min) → 20 °C /min → 280 °C (10 min) 40 °C/min to 320 °C (60 mins. hold)	
Mass Spectrometer		QP2020 NX
Interface Temperature	300 °C	
Ion Source Temperature	230 °C	
Detector Voltage	Relative to Tune 0 kV	
Threshold	0	
Scan Range	m/z 29 to 350; Event time 0.2 s	
Pyrolyzer		EGA/PY-3030D
Single Shot Furnace Temp	600 °C	
Interface Temp	300 °C	
Auto Sampler Flushing Gas	Helium	
Auto Sampler Purge Time	10 sec	

■ 결과 및 토의

System Background에 대한 확인

검정 곡선을 측정하기 전, 품질관리 방법으로 System Background 를 확인하기 위해 빈 샘플 컵을 분석하여 시스템에 오염이 없는 것을 확인하였다.

검정 곡선

혼합 고분자 분석을 위해 직선 범위에 걸쳐 5개 포인트 외부 표준 물질 검정 곡선을 생성하였다 (그림 4).

각 농도 수준에서 4번 반복 분석하고 분석값의 평균을 계산하여 검정 곡선을 만들고 결정 계수를 결정했다. 검정 결과는 모든 화합물에 대해 우수한 직선성을 보여주었다. 그림 5는 감도가 낮은 고분자의 검정 곡선으로, 각 고분자의 S/N비는 10보다 크다. 감도가 낮음에도 불구하고 모든 12개 고분자에 대한 결정 계수 (R^2)는 0.9959 보다 높다 (표 2).

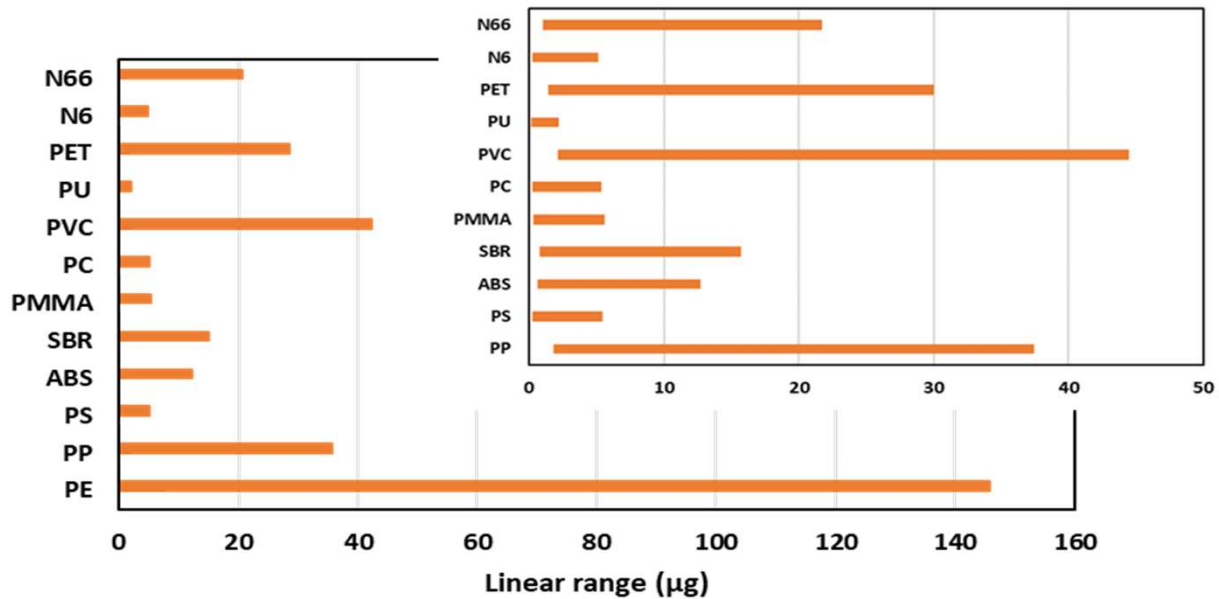


그림 4. 각 미세 플라스틱 화합물의 검정 곡선 직선 범위

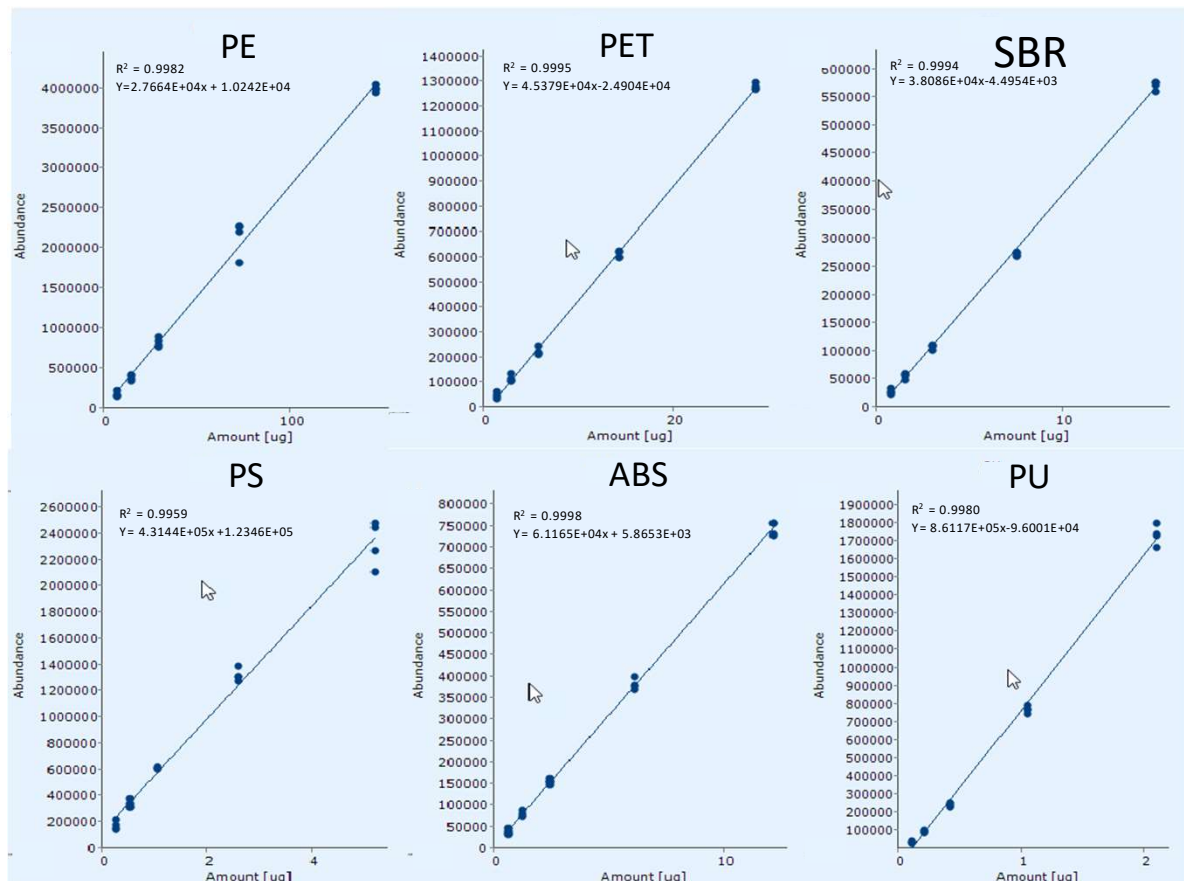


그림 5. 감도가 가장 낮은 고분자에 대한 검정 곡선

표 2. 검정 곡선의 통계적 분석

Polymer	Characteristic pyrolyzates	Quant ion (m/z)	Reference ions (m/z)	Linearity (R ²)
PE	1,20-Heneicosadiene	82	41,55,97	0.9982
PP	2,4-Dimethyl-1-heptene	126	43,55,70	0.9997
PS	Styrene trimer	91	117,207,312	0.9959
ABS	2-Phenethyl-4-phenylpent-enenitrile	170	91,115,118	0.9998
SBR	4-Phenylcyclohexene	104	158	0.9994
PMMA	Methyl methacrylate	100	69,41,99	0.9988
PC	4-Isopropenylphenol	134	91,119	0.9999
PVC	Naphthalene	128	102	0.9999
PU	4,4'-Methylenediabiline	198	106,182,197	0.998
PET	Benzophenone	182	51,77,105	0.9995
N6	ϵ -Caprolactam	113	30,55,85	0.9999
N66	Cyclopentanone	84	39,55,56	> 0.9999

정밀도 확인

검정 곡선의 저농도와 고농도에서 반복성 테스트를 수행하였다. 0.2 mg 및 3 mg의 MPs-CaCO₃ 표준 물질을 모두 7개의 각 에코 샘플 컵에 넣고 순서대로 분석했다 (즉, 주입 1 - 7). 각 반복 샘플 분석 물질의 농도는 검정 곡선을 사용하여 계산되었다.

0.2 mg 및 3 mg 표준 물질에서 고분자 반복성에 대한 % RSD는 각각 3.6 - 23.6 및 2.3 - 12.1 범위였다 (그림 6). 대부분의 화합물은 RSD가 10 % 이내였다.

낮은 정량 한계

혼합 표준 물질의 다양한 질량을 세미-마이크로 저울에서 칭량하였다. 그리고 S/N >10이 되는 최저 농도까지 분석하였다. LLOQ는 최저 보정점으로 임의로 정의되며, 본 뉴스레터에서는 혼합 고분자의 0.2 mg 표준 물질로 결정하였다. 모든 고분자에 대한 LLOQ 범위는 0.1 - 7.3 μ g 이다 (그림 7).

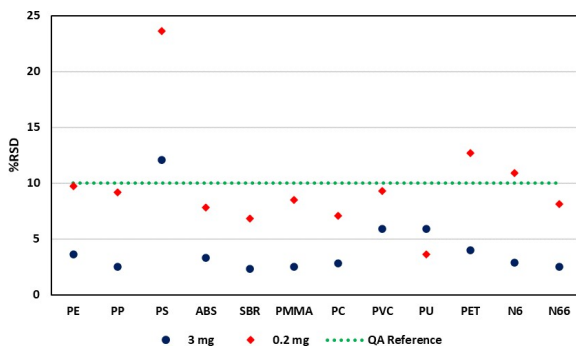


그림 6. 정밀도 테스트 % RSD (n=7).

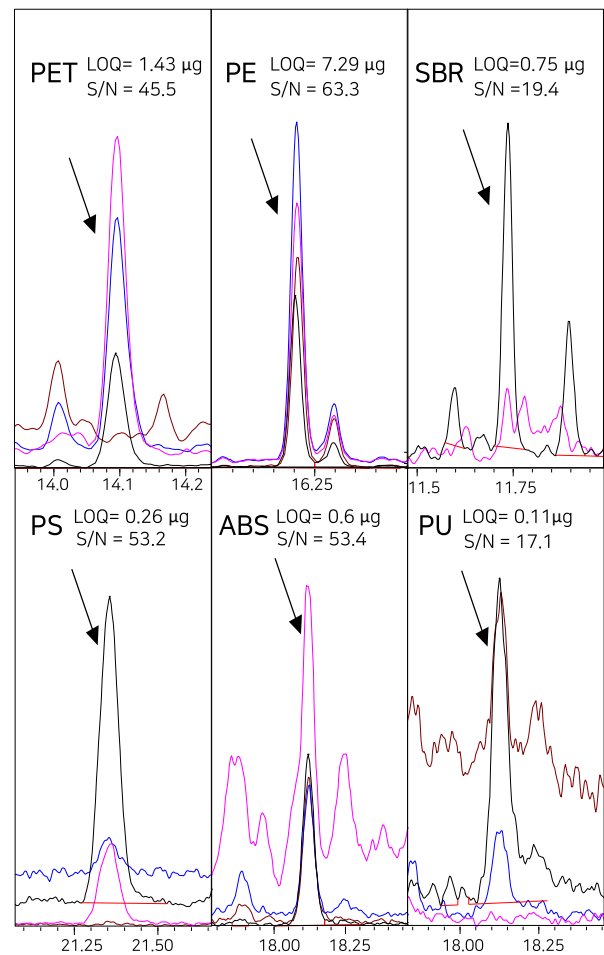


그림 7. 가장 감도가 낮은 고분자에 대한 정량 한계

정확도 확인

반복성 테스트의 모든 반복 샘플에서 각 분석 물질의 평균 농도를 결정했다. 이 평균 농도와 이론적 농도를 사용하여 0.2 및 3 mg 표준 물질의 회수율을 계산했다 (표 3). 0.2 mg 표준 물질은 66.4 % - 145.1 % 범위의 회수율을 보였으며 3 mg 표준 물질의 회수율은 92.2 % - 102.8 % 범위였다.

Continuing Calibration Check (지속적인 검정 곡선 확인)

CCC는 연구 중에 사용된 검정 곡선을 검증하기 위해 Batch (42회 주입) 마지막에 분석하였다. 전체 배치에 대한 이 검정 곡선의 적합성을 평가하기 위해 CCC 표준 물질의 % Drift를 사용했으며, % Drift를 계산하는데 아래 방정식이 사용되었다.

$$\% \text{ Drift} = \frac{\text{계산된 농도} - \text{이론적 농도}}{\text{이론적 농도}} \times 100$$

Drift 비율을 평가하기 위해 검정 곡선의 중간 농도 (0.8 mg)를 이용하여 CCC의 정량 이온의 피크 면적을 확인했다. 검정 곡선의 유효성을 확인하기 위해 최대 20 %의 Drift를 설정하였고, 그 결과 CCC의 모든 화합물에 대한 % Drift가 20 % 미만으로 테스트 기준을 충족함을 보여주었다 (표 3). 이 결과는 전체 Batch 분석 중에 검정 곡선이 유효했음을 나타낸다.

■ 결론

본 연구에서 선택된 12가지 미세 플라스틱의 정량을 위해 Frontier Py-3030D Pyrolyzer와 결합된 Shimadzu GCMS-QP2020NX의 만족스러운 성능을 확인했다. 분석법 유효성 검증 결과는 앞으로 진행될 MPs 연구에서 Py-GC/MS 분석 조건 지침 역할을 할 수 있음을 보여준다.

이 뉴스레터에서는 12가지 고분자의 정량을 위해 빠르고 정확한 분석법이 개발되었다. 검정 곡선은 모든 화합물에 대해 결정 계수 (R²)>0.9959 이상의 직선성을 보여주었다. 0.2 mg 및 3 mg 표준 물질을 7번 반복 분석하여 정밀도 및 정확도 평가를 수행 한 결과, % RSD는 3.6 - 23.6 및 2.3 - 12.1, 정확도는 0.2 mg 표준 물질이 66.4 % - 145.1 %, 3 mg 의 표준 물질이 92.2 % - 102.8 %의 회수율을 보였다. 모든 고분자에 대한 LLOQ는 0.1 - 7.3 (0.2 mg) 범위였다.

그 밖에도, CCC 테스트를 진행하였으며, 42회 주입 후 모든 화합물에 대해 Drift 비율은 20 % 미만으로 나타났다.

표 3. 분석법 유효성 검증 요약

Polymer	Recovery %(n=7)		Retention time (min)	LLOQ (µg)	% Drift (at 0.8 mg)
	3 mg	0.2 mg			
PE	99.0	99.9	16.2	7.3	-16.9
PP	99.6	111.2	6.6	1.8	-11.4
PS	92.2	66.4	21.3	0.3	-9.3
ABS	92.9	107.3	18.1	0.6	-18.1
SBR	96.0	121.8	11.7	0.8	-8.7
PMMA	102.8	103.6	5.0	0.3	-6.5
PC	97.2	123.0	11.4	0.3	-10.8
PVC	97.5	114.1	10.6	2.1	-9.6
PU	94.9	145.1	18.1	0.1	-19.8
PET	95.0	126.7	14.1	1.4	-18.2
N6	100.1	112.0	11.4	0.3	-11
N66	100.8	121.5	6.4	1.0	-7.2

■ 참고 문헌

1. Ishimura, T.; Iwai, I.; Matsui, K.; Mattonai, M.; Watanabe, A.; Robberson, W.; Cook, A.; Allen, H.L.; Pipkin, W.; Teramae, N.; Ohtani, H.; Watanabe, C. Qualitative and quantitative analysis of mixture of microplastics in the presence of calcium carbonate by Pyrolysis-GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2021 (157): 105188.
2. WK67788 - New Test Method for Identification of Polymer Type and Quantity (Mass) Measurement of Microplastic Particles and Fibers in Waters with High-to-Low Suspended Solids Using Pyrolysis-Gas Chromatography/Mass Spectrometry: Py-GC/MS.
3. Joint ISO/TC 147/SC 2 - ISO/TC 61/SC 14 WG: Plastics (including microplastics) in waters and related matrices.
4. Pipkin, W.; Belganeh, R.; Robberson, W.; Allen, H.L.; Cook, A.; Watanabe, A. Identification of Microplastics in Environmental Monitoring Using Pyrolysis-GC-MS Analysis. *LCGC North America*, 2021 April 01; 39(4):179-186.
5. How to Kickstart Your Micro- and Nanoplastic Py-GC/MS Analysis. Shimadzu Application News. GCMS-2201.

■ 소모품

Part Number	Item Name	Item Description
UAMP-K01	UAMP Column Bracket	UA Precolumn 50: Ultra Alloy-50 (2 m x 0.25 mm ID x 1.0 μm) and separation column: Ultra Alloy-5 (30 m x 0.25 mm ID x 0.5 μm)
PY1-3346	Packed GC glass insert	Packed GC glass insert for Shimadzu
220-90906-00	Eco-Cup LF	PY-2020 Eco-Cup LF
220-94824-18	Quartz Pyrolysis Tube	Pyrolysis tube, 120MM PY
220-90917-00	Graphite Vespel ferrule	Graphite Vespel Ferrule for Py-2020 (pk of 5)
220-94824-14	Needle Set	Syringe, deactivated needle (PY) (3/pk)
PY1-4940	MP calibration standard set	MP calibration standard consisting of 12 polymers
MS402280	Vent-free GC/MS Adapter	Vent-free GC/MS Adapter N-50
220-94792-03	Quartz wool	Phthalate-free quartz wool
220-94792-00	Septa	Septa for Pyrolysis
221-49662-91	O-ring	O-ring for sealing glass liners when using a Pyrolyzer

No. GCMS-2202-K



Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/
 Shimadzu Scientific Korea
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not available in the USA, Canada, and China.
 This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Third-party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®". Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

Copyright © 2023 SHIMADZU group. All rights reserved.