

GC-MS에 의한 나뭇잎에 침착된 다환방향족 탄화수소의 분석

천만영·임철수¹⁾·김태욱
한경대학교 환경공학과, ¹⁾국립환경연구원 자동차공해연구소

Development of Analytical Method of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Deposited on Tree Leaves by GC/MS

Man-Young Chun, Ceel-Soo Lim¹⁾ and Tae-Wook Kim (Dept. of Environmental Engineering, Hankyong National University, Ansong, 456-749, Korea, 1)Motor Vehicle Emission Research Lab., National Institute of Environmental Research, Seoul, 122-040, Korea)

ABSTRACT : A new effective and economic method was developed, removing interferences such as chlorophyll and lipid from leaves with small amounts of reagents and solvents in order to analyse PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons). The extract from a soxhlet containing 4~5 g of leaves and 100 ml of dichloromethane and refluxed for 20 hrs was concentrated and eluted with 60 ml of a hexane:dichloromethane (1:1) mixture through a column of 9 mm wide inner diameter and 130 mm long, packed from the bottom with 2.5 g of Al₂O₃, 1.5 g of SiO₂ and 2 g of anhydrous Na₂SO₄. The eluent was concentrated and loaded on a GPC column of 20 mm wide inner diameter and 280 mm long, packed with 12 g of Bio-beads. The column was washed with 37 ml of the hexane:dichloromethane (1:1) mixture. Another 43 ml of the mixture was eluted as a PAH fraction and collected. This eluent was concentrated under gentle nitrogen to 50 μl and analysed using GC-MS. The recoveries obtained by comparing with the amounts of the internal standards of deuterated PAHs were 43.3~107.5 % (RSD 2.2~9.5 %).

Key Words : PAHs, Al₂O₃-SiO₂ Column, GPC, GC-MS

서론

다환방향족 탄화수소(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)는 주로 화석연료의 불완전 연소에 의하여 생성되는 것으로 그 중의 많은 화합물은 암, 돌연변이를 일으키는 내분비계 장애물질 (endocrine disruptors)로 알려져 있다. 최근 우리나라는 산업의 발달, 인구와 자동차수의 증가로 화석연료의 사용은 매년 빠른 속도로 증가하고 있다¹⁾. 특히 우리나라는 가솔린 자동차보다 PAHs의 배출량이 훨씬 더 많은 디젤 자동차가 전체 자동차 수의 거의 절반 정도를 차지하기 때문에 선진국보다 대기 중의 PAHs 농도는 훨씬 높은 실정이다²⁾.

대기 중의 PAHs는 친지질성 (lipophilic)으로 식물잎에 존재하는 지질(lipid)에 건식침착(dry deposition)되기 때문에 있는 대기 중의 PAHs 농도를 측정하는 passive sampler로 사용이 가능하다^{3,4,5,6)}. 식물은 지구 어디서나 자생하고 있으며 사용할 수 있는 양이 충분하기 때문에 잎을 채취하여 분석

하면 값비싼 sampler를 사용하여 힘들어 시료를 채취하지 않아도 쉽게 여러지역의 대기중 PAHs 농도를 측정·비교해 볼 수 있는 장점이 있다. 특히 전기 설치가 어려운 먼 지역이나 많은 지역에서 농도를 측정하여야 할 경우 시간과 경제적인 면에서 대단히 유리하며 편리한 방법이다. 그리하여 많은 연구자들이 잎을 이용하여 각 지역의 대기중 PAHs 농도를 측정, 비교하고 있다^{7,8,9,10)}.

그러나 나뭇잎에 포함되어 있는 지질과 엽록소도 시료와 함께 추출되어 PAHs 분석을 방해하므로 분석 전에 전처리를 통하여 이러한 물질들을 제거해 주어야 한다. 현재 표준화된 전처리 방법은 없으며, 같은 실험실에서도 연구자마다 다른 방법을 사용할 정도로 다양한 방법이 사용되고 있지만 일반적으로 속슬렛이나 초음파로 시료중 PAHs를 추출하고 silica(SiO₂), alumina(Al₂O₃), florisil(magnesium silicate) 등을 충전한 chromatography column으로 PAHs와 엽록소, 지질을 분리해 내는 방법이 사용되고 있다^{3,4,5,6,7,8,9,10)}. 그런데 silica, alumina, florisil은 진폐증과 폐암을 일으키며 추출과

Table 1. Nomenclatures, abbreviations and physico-chemical properties of 16 PAHs analysed in this study.

Nomenclature(IUPAC)	Abbreviation	Formular	Molecular weight	Ring No.
Naphthalene	NPThL	C ₁₀ H ₈	128.16	2
Acenaphthylene	ACNPL	C ₁₂ H ₈	152.20	"
Acenaphthene	ACNPN	C ₁₂ H ₁₀	154.21	"
Fluorene	FL	C ₁₃ H ₁₀	166.22	"
Phenanthrene	PHEN	C ₁₄ H ₁₀	178.22	3
Anthracene	ANTHN	C ₁₄ H ₁₀	178.22	"
Fluoranthene	FLRTH	C ₁₆ H ₁₀	202.26	"
Pyrene	PY	C ₁₆ H ₁₀	202.26	4
Benzo(a)anthracene	BaA	C ₁₈ H ₁₂	228.29	"
Chrysene	CHRY	C ₁₈ H ₁₂	228.29	"
Benzo(b)fluoranthene	BbF	C ₂₀ H ₁₂	252.32	"
Benzo(k)fluoranthene	BkF	C ₂₀ H ₁₂	252.32	"
Benzo(a)pyrene	BaP	C ₂₀ H ₁₂	252.32	5
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	I123P	C ₂₂ H ₁₂	276.34	6
Dibenz(a,h)anthracene	DahA	C ₂₂ H ₁₄	278.35	5
Benzo(g,h,i)perylene	BghiP	C ₂₂ H ₁₂	276.34	6

용출에 사용되고 있는 dichloromethane(DCM, CH₂Cl₂) 역시 발암물질로 분류되어 있다. 그러므로 우리나라처럼 폐기물의 처리 및 관리가 허술한 나라에서는 가능하면 인체에 유해한 물질의 발생량을 줄이는 것이 중요하다. 또한 전처리에 사용되고 있는 모든 물질과 용매는 고순도 시약이므로 전량 수입에 의존하고 있어서 가격이 상당히 비싸다. 그러므로 오염방지과 경제적인 면에서 가능한한 적은 양의 시약과 용매를 사용하여 방해물질을 제거할 수 있는 전처리 방법의 개발이 필요한 실정이다.

이 연구는 앞에 침착된 PAHs를 GC-MS로 분석할 때 지금까지 알려진 전처리 방법보다 더 적은 양의 시약과 용매를 사용하여 방해물질인 염류소와 지질을 효율적이고 경제적으로 분리하는 전처리법을 개발하는데 목적이 있다.

실 험

시료는 다른 수종에 비하여 지질양이 비교적 많은 소나무잎을 선택하였으며¹¹⁾, 시료 약 4~5g에 내부표준물질(Naphthalene-D8, Acenaphthene-D10, Phenanthrene-D10, Chrysene-D12, Perylene-D12, Supelco사)을 spike하고 dichloromethane(DCM, CH₂Cl₂) 약 100ml로 속슬렛에서 20시간 추출한 다음 회전증발 농축기에서 약 3ml까지 농축하였다. 농축액 속에는 염류소, 지질등 분석을 방해하는 여러가지 오염물질들이 공존하고 있으므로 이러한 물질들을 분리하기 위하여 시료를 내경 9mm, 길이 130mm인 glass column에 위로부터 Na₂SO₄, SiO₂, Al₂O₃를 차례로 넣고 시료를 hexane : DCM (1 : 1) 혼합액으로 용출한 후 다시 회전증발 농축기에서 약 1ml까지 농축시켰다. 1차 silica-alumina(SiO₂-Al₂O₃) column으로 완전히 제거되지 않은 염류소와 지질은 Bio-beads(S-X3, 40~80µm, Bio Rad사) 12g을

충전시킨 내경 200mm, 길이 250mm GPC(Gel Permeation Chromatography) column을 사용하여 다시 정제시켰다. 이 용

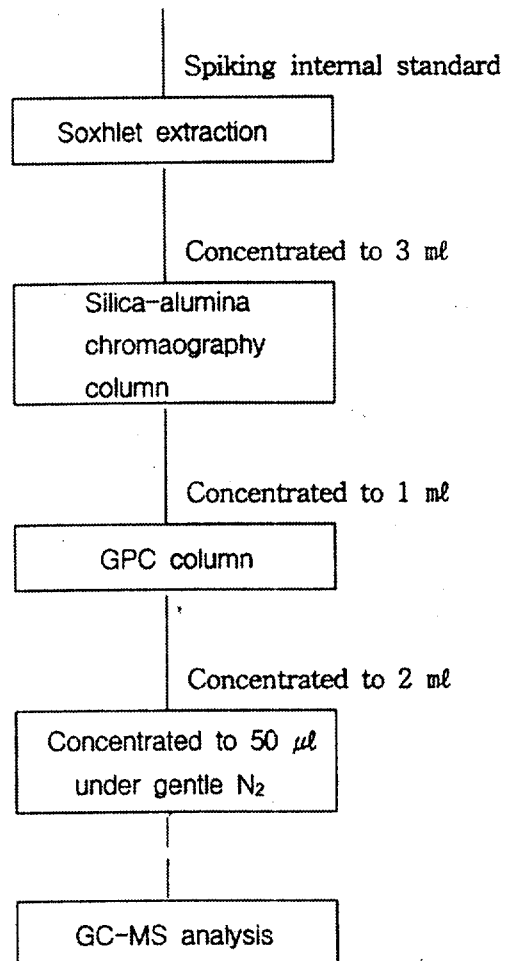


Fig. 1. Analytical procedure for the determinatiuon of PAHs deposited on tree leaves.

출액을 회전증발 농축기에서 약 2ml까지 농축한 후 5ml vial에 정량적으로 옮기고 keeper로서 toluene 100 μ 를 가한 후 hot plate 위에서 질소로 약 50 μ 까지 서서히 농축시켜 GC-MS로 분석하였다. 시료 추출 및 전처리에 사용된 모든 용매는 HPLC grade(J.T.Baker사)를 사용하였으며, Na₂SO₄(anhydrous, Shinyo pure chemical사), SiO₂(70~230 mesh ASTM, Merck사)와 Al₂O₃(Neutral grade 1, BDH)는 450 $^{\circ}$ C의 전기로에서 약 12시간 구운 후 활성을 유지하기 위하여 140 $^{\circ}$ C의 오븐에 넣어 두고 사용하였다. 분석에 사용된 PAHs standard는 Supelco사로 부터에서 16가지 PAHs가 혼합된 것을 구매하여 사용하였으며, standard에 포함된 PAHs의 종류 및 약어는 표 1에 나타내었고 그림 1은 분석법의 전체 흐름도를 나타낸 것이다.

결과 및 고찰

추출방법 비교

일중 PAHs의 추출을 위해서는 전통적으로 속슬렛(soxhlet) 추출법이 이용되고 있으나 최근에는 초음파 추출법도 많이 이용되고 있다. DCM으로 PAHs를 추출할 때 속슬렛의 경우 16시간 이상, 초음파의 경우 1시간 추출한 다음 추출액을 round bottom flask로 옮기고 다시 DCM으로 3시간 더 추출할 경우 거의 대부분이 추출되었으며 두 방법간의 추출율에는 별 차이가 없었다. 그리하여 이 번 연구에서는 나뭇잎 4~5g을 DCM 100ml로 속슬렛에서 20시간 추출하는 방법을 사용하였다.

기존의 방법처럼 추출에 사용된 시료의 양을 약 20g으로 할 경우 추출용매로 속슬렛에서는 약 250ml, 초음파 추출법에서는 약 500ml가 필요하다.

시료의 전처리

Silica-Alumina Column

추출액을 회전증발 농축기에서 약 3ml까지 농축한 다음 테프론 코크가 달린 내경 9mm, 길이 130mm인 glass column에 밑에서 부터 Al₂O₃ 2.5g, SiO₂ 1.5g, Na₂SO₄ 약 2g을 차례로 넣고 hexane:DCM(1:1) 혼합용매로 용출하여 시료중 엽록소와 지질을 제거하였다. 그림 2는 silica-alumina column으로 clean-up한 시료의 용출양별 몇 가지 PAHs의 용출된 총농도에 대한 백분율을 나타낸 것으로 분자량이 작을수록(링의 수가 적을수록) 용출속도가 빠르다는 것을 알 수 있었다. 그림에서 보듯이 hexane:DCM(1:1) 혼합용매 60ml로 PAHs의 완전 용출이 가능하였다.

추출 시료의 양이 많을 경우 칼럼의 직경이 작으면 지질과 엽록소가 칼럼에 충전한 Na₂SO₄ 표면 위를 두껍게 덮으므로 용매의 통과가 어려워 용출이 힘들기 때문에 직경이 큰 칼럼을 사용할 수밖에 없고 따라서 용출에 사용되는 용

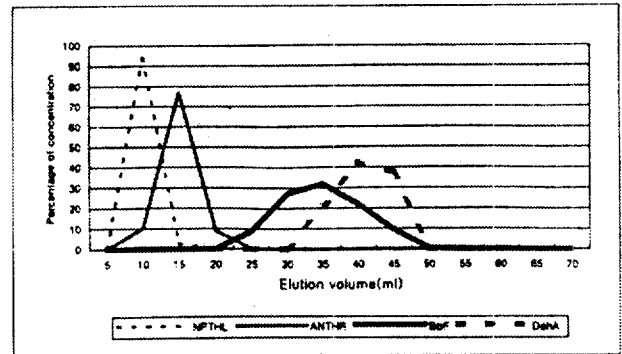


Fig. 2. Elution diagram of selected PAHs for the silica-alumina column.

매의 양도 많아질 수밖에 없다. 추출 시료 20g, 내경 25mm 칼럼을 사용할 경우 약 300~350ml의 용출 용매가 필요한데 이 번 연구에서는 추출에 사용된 시료의 양을 4~5g으로 줄임으로서 용출에 사용된 용매의 양을 60ml로 대폭 줄일 수 있었다.

그러나 silica-alumina column만으로는 엽록소와 지질이 충분히 제거되지 않았다.

Gel Permeation Chromatography Column

Silica-alumina column만으로는 엽록소와 지질등 방해물질이 충분히 제거되지 않았으므로 내경 20mm, 길이 280mm 유리관에 Bio-beads(S-X3, 40~80 μ m, Bio Rad사) 12g을 충전시킨 GPC(Gel Permeation Chromatography) column으로 다시 clean-up을 하였다. Silica-alumina column으로 clean-up한 용출액을 회전증발 농축기에서 약 1ml까지 농축한 다음 GPC column에 넣고 hexane:DCM(1:1) 혼합용매로 용출시켰다. 그림 3은 GPC column으로 clean-up한 시료의 용출양별 몇 가지 PAHs의 용출된 총농도에 대한 백분율을 나타낸 것으로 분자량이 적을수록 용출속도가 빨랐다. 용출액의 처음 37ml에는 엽록소와 지질이 포함되어 있으므로 버리고 나중 43ml는 PAHs fraction이므로 분석을 위하여 포집하였다.

Silica-alumina column과는 달리 GPC column은 추출에 사용된 시료양이 적을지라도 직경의 크기를 줄일 수가 없었다. GPC column으로 PAHs와 지질 및 엽록소를 분리시킬

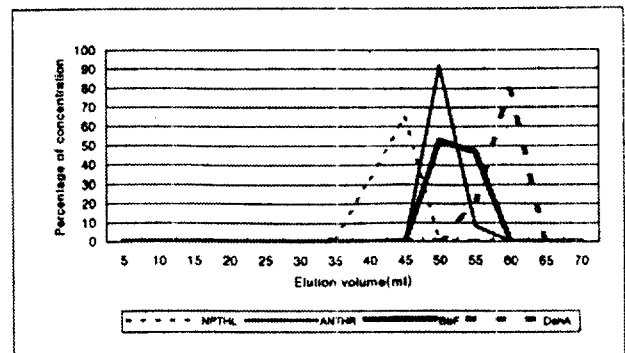


Fig. 3. Elution diagram of selected PAHs for the GPC column.

Table 2. Analytical conditions of GC-MS for PAHs determination.

GC	HP 6890
Detector	HP Mass Selective Detector 5973
Mode	Selected ion monitoring (SIM)
Electron energy	70 eV
Injector	Splitless
Sample injection volume	1 μ l
Carrier Gas	He 1 ml/min
Column	HP Crosslinked HP ME Sioxane 30m \times 0.25mm \times 0.25 μ m Film thickness
Temperature Programme	60 $^{\circ}$ C for 1 min 20 $^{\circ}$ C/min to 130 $^{\circ}$ C 4 $^{\circ}$ C/min to 300 $^{\circ}$ C with a final hold of 15 min
Total Run Time	62 min
Injector Temperature	300 $^{\circ}$ C

때 엽록소와 지질이 칼럼을 먼저 통과하고 PAHs는 나중에 통과하는데 엽록소는 칼럼을 빨리 통과하므로 별 문제가 없으나 분자량이 적은 PAHs는 지질과 아주 근접해서 통과한다. 이 때 칼럼의 직경이 작으면 처음 주입한 시료의 높이가 높아서 PAHs와 지질의 분리가 잘되지 않은 문제가 발생하므로 칼럼의 직경을 줄일 수가 없었고 용출에 사용된 용매의 양도 줄일 수가 없었다.

분석

PAHs fraction을 회전증발 농축기에서 약 2ml까지 농축한 다음 5ml vial에 정량적으로 옮기고 keeper로서 toluene 100 μ l를 가한 후 hot plate 위에서 질소로 천천히 약 50 μ l까지

농축하여 GC-MS로 분석하였다.

표 2는 PAHs 분석을 위한 GC-MS의 분석조건을 나타낸 것이며 그림 4는 16 PAHs standard의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

회수율

내부표준물질로 사용된 deuterated PAHs를 이용하여 회수율을 알아본 결과는 표 4와 같다. 분자량이 작아서 휘발성이 큰 PAHs는 회수율이 낮았고 분자량이 커서 휘발성이 낮은 PAHs는 회수율이 높은 경향을 보였다.

기존의 방법에서는 추출시 시료를 10~100g을 사용하였기 때문에 추출에 사용되는 용매의 양을 250~500ml 정도로 많이 사용해야만 했다. 따라서 clean-up에 사용되는 칼럼의 직경도 커지고 용출에 사용되는 용매의 양도 많아질 수밖에 없었다^{47,9)}. 그러나 이 번 연구에서는 사용되는 시료의 final volume을 기존의 250~1,000 μ l보다 더 적은 50 μ l로 농축함으로써 적은 양의 시료를 사용하였지만 검출한계 이상의 농도를 얻을 수 있었고 따라서 추출과 용출에 사용되는 시약과 용매의 양을 기존의 방법보다 대폭 줄일 수 있었다^{47,9)}.

요 약

나뭇잎에 침착된 PAHs를 분석할 때 기존의 방법들 보다 더 적은 양의 시약과 용매를 사용하여 효율적이고 경제적으로 방해물질을 제거하는 방법을 개발하였으며, 방법은

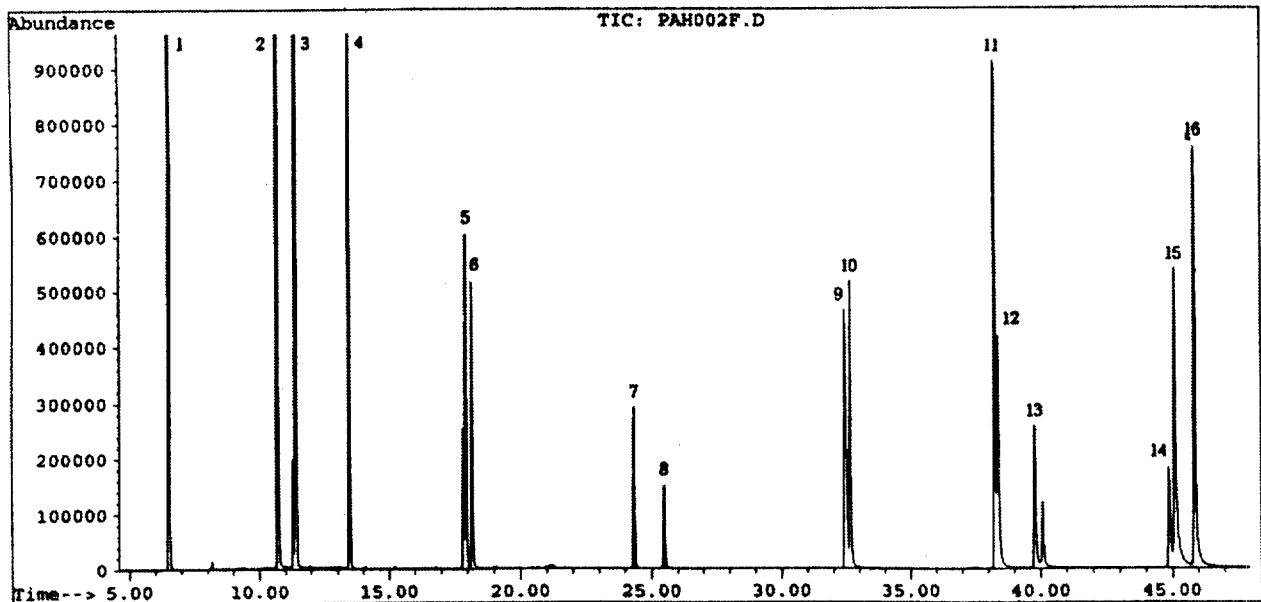


Fig. 4. GC-MS chromatograms of 16 PAHs standards.

1:NPTHL, 2:ACNPL, 3:ACNPN, 4:FL, 5:PHEN, 6:ANTHN, 7:FLRTH, 8:PY 9:BaA, 10:CHRY, 11:BbF, 12:BkF, 13:BaP, 14:I123P, 15:DahA, 16:BghiP.

Table 4. Recovery efficiencies for 5 deuterated PAHs for clean-up procedure.

PAH	1	2	3	Average (%)	Standard deviation(%)
Naphthalene-D8	34.7	48.1	47.2	43.3	7.5
Acenaphthene-D10	60.8	65.3	68.9	65.0	4.1
Phenanthrene-D10	80.9	79.8	76.6	79.1	2.2
Chrysene-D12	101.6	118.5	102.5	107.5	9.5
Perylene-D12	89.1	101.2	91.7	94.0	6.3

아래와 같다.

1) 시료 4~5g을 DCM 100ml로 속슬렛에서 20시간 추출하고 약 3ml까지 농축한다.

2) 내경 9mm, 길이 130mm column에 아래로 부터 Al₂O₃ 2.5g, SiO₂ 1.5g, 무수 Na₂SO₄ 2g을 충전시키고 hexane : DCM(1 : 1) 60ml로 용출한 후 1ml까지 농축한다.

3) 내경 20mm, 길이 200mm column에 Bio-beads 12g을 충전시킨 GPC(Gel Permeation Chromatography) column을 사용하여 hexane:DCM(1:1) 80ml로 다시 clean-up 한다.

용출액중 처음 37ml는 방해물질이 포함되어 있으므로 버리고 나머지 43ml는 PAHs fraction이므로 포집하여 약 2ml까지 농축한다.

4) Hot plate위에서 질소로 천천히 final volume 50μl까지 농축하여 GC-MS로 분석한다.

5) Deuterated PAHs로 계산한 회수율은 43.3~107.5%(RSD 2.2~9.5%)였다.

참 고 문 헌

- 환경부, (1997), 환경통계연감, 10, 33~40.
- 조강래, (1992), 자동차와 환경오염, 화학세계, 32(8), 11~22.
- Lodovici, M., Akpan, V., Casalini, C., Zappa, C. and Dolara, P., (1998), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Laurus Nobilis Leaves as a Measure of Air Pollution in Urban and rural Sites of Tuscany, *Chemosphere*, 36(8), 1703~1712.
- Nakajima, D., Yoshida, Y., Suzuki, J. and Suzuki, S., (1995), Seasonal Changes in the Concentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Azalea Leaves and Relationship to Atmospheric Concentration, *Chemosphere*, 30(3), 409~418.
- Simonich, S.L. and Hites, R.A., (1994), Vegetation-Atmosphere Partitioning Aromatic Hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.*, 28(5), 939~943.
- Tremolada, P., Burnett, V., Calamari, D. and Jones, C.K., (1996), Spatial Distribution of PAHs in the U.K. Atmosphere Using Pine needles, *Environ. Sci. Technol.*, 30(12), 3570~3577.
- Kaupp, H. and Sklorz, M., (1996), A Method for Analysing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs) in Plant Samples, *Chemosphere*, 32(5), 849~854.
- Yang, S.Y.N., Connell, D.W., Hawker, D.W. and Kayal, S.I., (1991), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air, Soil and Vegetation in the Vicinity of an Urban Roadway, *The Science of the Total Environment*, 102, 229~240.
- Franzaring, J., Bierl, R. and Ruthsatz, B., (1992), Active Biological Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using Kale(*Brassica oleracea*) as a Monitor-Species, *Chemosphere*, 25(6), 827~834.
- Wagrowski, D.M. and Hites, R.A., (1997), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Urban, Suburban, and Rural Vegetation", *Environ. Sci. Technol.*, 31(1), 279~282.
- Yoo, Shi-Gyun, Kim, Taewook and Chun, Man-Young, (1999), Deposition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Tree Leaves, *Korean Journal of Environmental Agriculture*, Submitted.