

## 기체크로마토그래피/질량분석기에 의한 수질시료 중 4-니트로톨루엔의 분석법 연구

이 회 경, 권 오 승, 류 재 천\*

한국과학기술연구원 독성연구실

### Analysis of 4-Nitrotoluene in Water by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Hee-Kyung Rhee, Oh-Seung Kwon and Jae-Chun Ryu

Toxicology Lab., Korea Institute of Science and Technology, P.O.Box 131,  
Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

#### ABSTRACT

Analytical method of 4-nitrotoluene (4-NT) in water was developed by gas chromatography/mass selective detector/selected ion monitoring (GC/MSD/SIM). 4-NT was extracted with diethyl ether. Organic layer was washed with 5 % sodium chloride solution. The influence of solvent and evaporation condition on extraction of 4-NT were examined. The retention time of 4-NT peak was 7.72 min. Coefficient of variation (CV) of 4-NT (ng) within day and day-to-day was ranged from 7.0 to 14.6% and from 7.7 to 20.8%, respectively. Recovery of 4-NT was ranged from 84 to 109%, and detection limit of 4-NT was less than 1 ng/ml.

#### 서 론

Nitroaromatic류에 대한 독성 연구는 지속적으로 이어져 오고 있으나<sup>1),2)</sup> 공기 중에 혼합되어 있는 nitroaromatic류를 건강에 대한 위험인자로 평가하는 방법은, 이 물질의 증발성으로 인해 난점이 있는 것으로 알려져 왔다. Nitrotoluene류는 피부를 통해 쉽게 흡수되기 때문에 흡입 경로에 의한 흡수보다 더 높은 흡수율을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup>

1세기 전부터 전쟁시 폭발에 가장 널리 사용되어 왔으며 가장 잘 알려져 있는 nitroaromatic 화합물인 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) 자체 및 그의 nitro기의 환원에 의해 생성된 대사체인 4-amino

-2,6-dinitrotoluene (4-ADNT) 및 2-amino-2,6-dinitrotoluene (2-ADNT)의 분석 방법에 대한 연구가 이루어져 왔다.<sup>4),5)</sup> 이 nitrotoluene류는 증발성 염화물 및 다른 nitro 화합물과 함께 수질 중에서 발견되는 것으로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 본 연구는 nitroaromatic 화합물 중 치환기가 하나인 간단하며 환원되기 쉬운 4-nitrotoluene (4-NT)의 특성을 고려한 분석법 확립을 목적으로 GC/MSD를 사용하여 수질 중 4-NT의 검출 및 정량을 위한 추출 및 분석 방법을 연구하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 1. 시약 및 기구

수질시료 중의 4-NT 분석에 사용된 시약은 diethyl ether and *n*-hexane (분석용, J. T. Baker), 염

\* Corresponding Author

화나트륨(분석용, Mallinckrodt), 무수황산나트륨(분석용, J.T. Baker), 4-nitrotoluene (Aldrich), nitrobenzene-d<sub>5</sub> (Supelco) 등을 구입하여 사용하였다. 염화나트륨은 사용 전 *n*-hexane으로 세정하고 100°C의 oven에서 하룻밤 방치한 후 사용하였고 염화나트륨은 5% (w/v) 수용액으로 만든 후 *n*-hexane으로 세정하여 분석에 사용하였다. Helium gas (99.9999%)는 신양산소로부터 구입하였으며 그 외 모든 시약은 분석용으로 사용하였다.

사용된 기구 및 장치는 원심분리용 초자 시험관(15 ml), 초자 메스실린더 등이었으며 이들은 사용하기 전 아세톤 및 *n*-헥산으로 세정하고 건조하였다. 그 외 감압 농축기 (Rotavapor RE 111, BüCHI, Germany) 등이 사용되었다.

## 2. 분석기기 및 분석기기 조건

GC/MSD (HP5890 GC/HP5970 MSD), autosampler (HP7673) 및 MS Chemstation (HP)을 사용하였고 selected ion monitoring (SIM) 방법으로 4-NT를 분석하였다. GC 주입구의 온도는 250°C, 주입 방법은 splitless (0.5분 퍼지)이었고, 사용된 칼럼은 50% phenylmethylsiloxane 화학결합형 (0.2 mm, I.D. × 25 m, L. × 0.31 μm, F.T.)이었으며 GC oven의 온도는 처음 50°C에서 1분간 머무르고, 분당 20°C씩 증가시켜 최종온도 300°C에 도달한 후 7분간 머무르게 하였다. 캐리어가스의 유속은 0.8 ml/min (linear velocity 40 cm/sec) 이었다. MSD (mass selective detector)의 이온화법은 electron impact (EI) mode를 사용하였고, 이온화 에너지는 70 eV로 고정하였으며, transfer line의 온도는 300°C로 하였다. 4-NT의 정량에 사용된 이온은 m/z 91 및 m/z 137을 선택하였고 내부표준물질인 nitrobenzene-d<sub>5</sub>는 m/z 128을 사용하여 정량하였다.

## 3. 표준용액의 조제

4-NT의 표준원액은 표준물질 100 mg을 정확히 취하여 별도의 100 ml의 메스플라스크에 넣고 *n*-hexane에 녹인 후 정확히 100 ml로 하여 1000 μg/ml로 하였다. 이 표준원액 10 ml를 100 ml의 메스플라스크에 정확히 취하여, *n*-hexane을 넣어 100 ml로 하고 이 용액을 단계적으로 희석하여 10, 1 및 0.1 μg/ml의 용액으로 제조하였다. 또한 내부표준물질인 nitrobenzene-d<sub>5</sub> 용액 (2 mg/ml in

methylene chloride)은 10 μg/ml으로 희석하여 사용하였다.

## 4. 수질 중 4-nitrotoluene의 전처리 방법

3차 증류수 10 ml씩을 정확히 취하여 15 ml의 원심분리용 초자 시험관에 넣고 각 농도별 4-NT 표준액 및 내부표준물질로 nitrobenzene-d<sub>5</sub> 500 ng씩을 가한 후, 각 시험관에 염화나트륨 0.5 g을 넣어 충분히 혼합하여 녹인 후 diethyl ether 4 ml를 넣고 20분간 진탕 추출한 후 정지하고 물층을 덜러 diethyl ether 층을 취하였다. diethyl ether 층을 무수황산나트륨으로 탈수한 후 회전식 감압농축기를 사용하여 (수욕온도: 실온) 농축하였다. 각 시료에 *n*-hexane 300 μl를 가하여 이 용액 2 μl씩을 GC/MSD에 주입하였다.

## 5. 검량선 작성용 표준액의 조제

4-NT의 검량선을 작성하기 위하여 0, 5, 10, 25, 50, 100 및 250 ng을 3차 증류수 10 ml에 가하고 내부표준물질로 nitrobenzene-d<sub>5</sub> 500 ng을 넣은 다음 위의 전처리 방법에 의해 추출한 후 이 용액 2 μl씩을 취하여 GC/MSD에 주입하고 얻어진 4-NT (m/z 137)와 nitrobenzene-d<sub>5</sub> (m/z 128)의 크로마토그램의 피크 강도(면적)의 비로부터 검량선을 작성하였다.

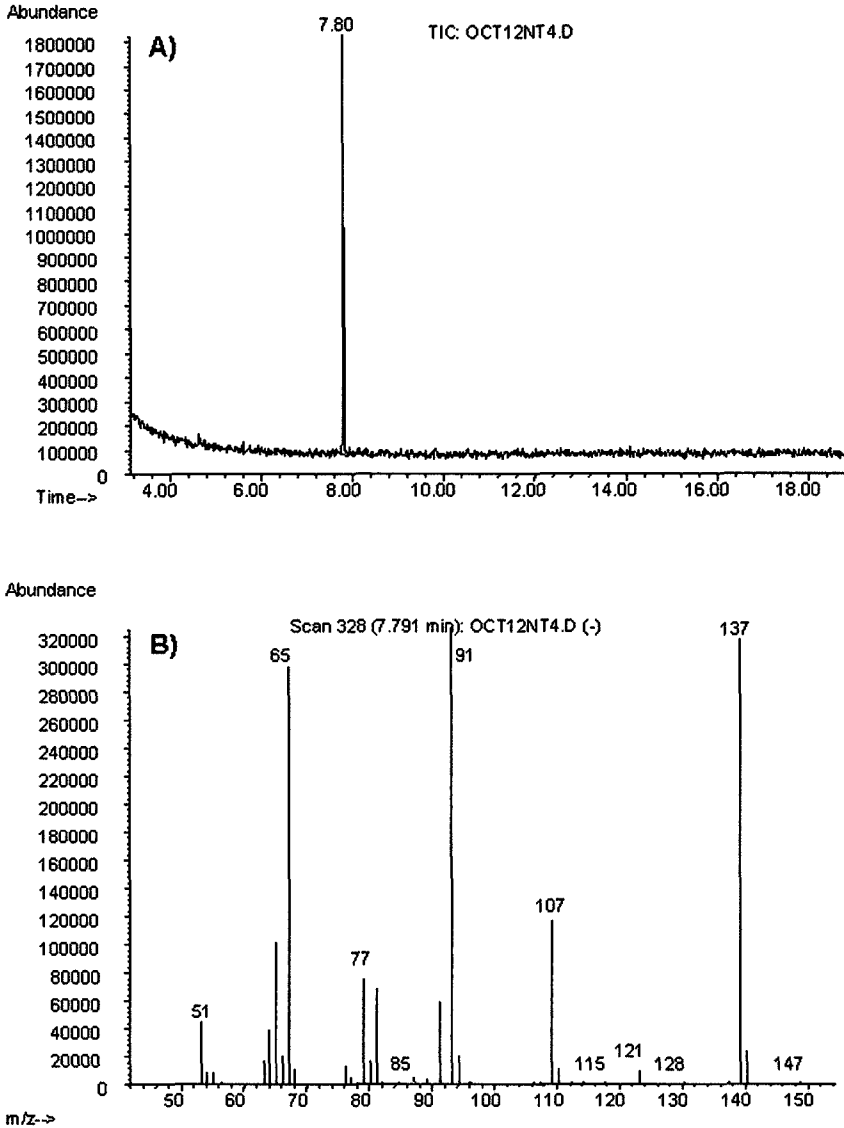
## 결과 및 고찰

### 1. GC/MSD/SIM 방법에 의한 4-nitrotoluene 분석방법의 확립

4-Nitrotoluene (4-NT)의 scan spectrum은 Fig. 1에 나타내었다. 분자이온은 m/z 137이었으며 4-NT의 base peak는 m/z 91로 관찰되었다. SIM 방법으로 4-NT의 정량분석에 사용된 이온은 m/z 137과 내부표준물질인 nitrobenzene-d<sub>5</sub>의 m/z 128을 선택하였다 (Fig. 2). 이 두 개의 이온은 모두 4-NT와 nitrobenzene-d<sub>5</sub>의 분자이온에 해당하는 것으로 다른 방해물질로부터 쉽게 확인할 수 있었다.

### 2. 4-Nitrotoluene 분석법의 검출한계

4-NT 분석법의 기기상의 검출한계를 나타내는 SIM ion chromatogram은 Fig. 3에 제시하였다. 4-NT의 baseline에 대한 signal to noise의 비율은 3.6



**Fig. 1.** Total ion chromatogram (A) and scan mass spectrum of 4-nitrotoluene (B).

으로 비교적 양호하였고 이 때의 시료 주입량은 5 pg이었다.

**3. 4-Nitrotoluene의 재현성**

4-NT 표준품의 GC/MSD에 의한 within-day (4 회) 및 day-to-day 분석(3일)의 농도별 재현성을 Table 1에 나타내었다. 위에서 제조한 4-NT 표준 용액을 n-hexane으로 10, 25, 50, 100 및 250 ng/0.3 ml 농도로 희석한 용액을 각각 4개씩 만들

어 GC/MSD에 주입하고 이를 3일간 반복하여 분석한 결과 C.V. %는 7.0~14.6% (within-day) 및 7.7~20.8% (day-to-day)로 비교적 양호한 재현성을 나타내었다.

**4. 4-Nitrotoluene의 검량선 및 분석**

시료의 농도 0~250 ng/10 ml에서 얻어진 검량선을 Fig. 4에 나타내었다. 3차 증류수 10 ml 중에 4-NT 표준물질을 각각 0, 5, 10, 25, 50, 100 및 250

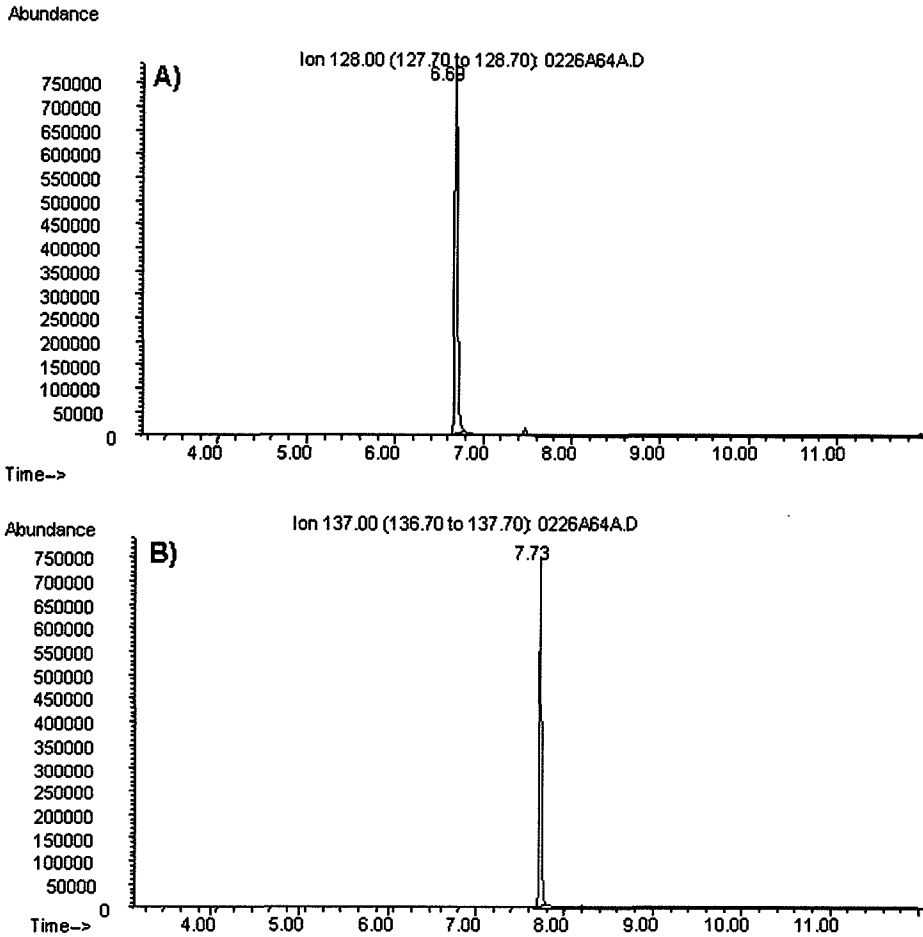


Fig. 2. SIM ion chromatograms of nitrobenzene-d<sub>5</sub> (A) and 4-nitrotoluene (B).

Table 1. Within-day (n=4) and day-to-day (n=3) precision of for 4-nitrotoluene (4-NT)

Amount added conc. (ng)	Within-day		Day-to-day (within three days)	
	Amount found (ng) (mean ± S.D., n=4)	C.V. (%)	Amount found (ng) (mean ± S.D., n=3)	C.V. (%)
10	9.8 ± 0.7	7.2	10.5 ± 1.6	15.6
25	21.4 ± 0.9	4.2	20.8 ± 3.2	15.4
50	40.5 ± 3.4	14.6	43.7 ± 9.1	20.8
100	90.4 ± 6.3	7.0	84.4 ± 6.5	7.7
250	240.6 ± 31.0	12.9	250.3 ± 19.9	7.9

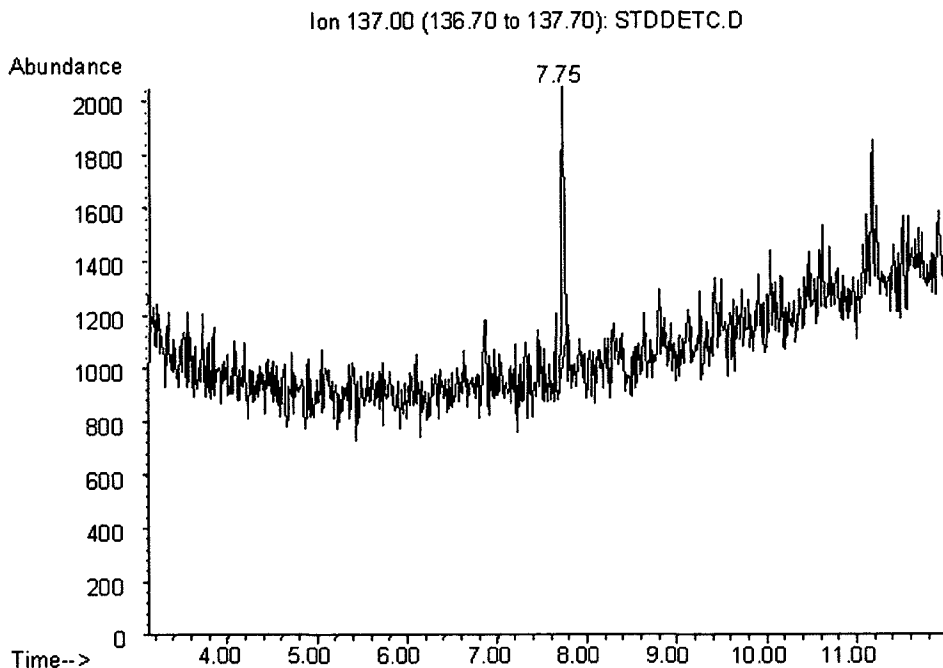
ng씩 가하고 이를 위의 추출방법에 따라 추출한 후, n-hexane 0.3 ml씩을 가하여 제조한 시료를 4

개씩 만들어 이를 GC/MSD에 주입한 결과에 의해 얻어진 검량선에 따른 상관계수는 0.990이었고, 직선의 y절편 및 기울기는 각각 -0.00120 및 0.00236으로 이 농도 범위 안에서 양호한 직선성을 보여주었다.

Fig. 5는 위의 검량선 작성용 시료 중 0.5 및 50 ng/10 ml 시료의 분석 결과를 ion chromatography로 나타낸 것이다. 4-NT의 유지시간은 7.72분이었으며 이 위치에서 어떠한 방해 peak도 존재하지 않았다.

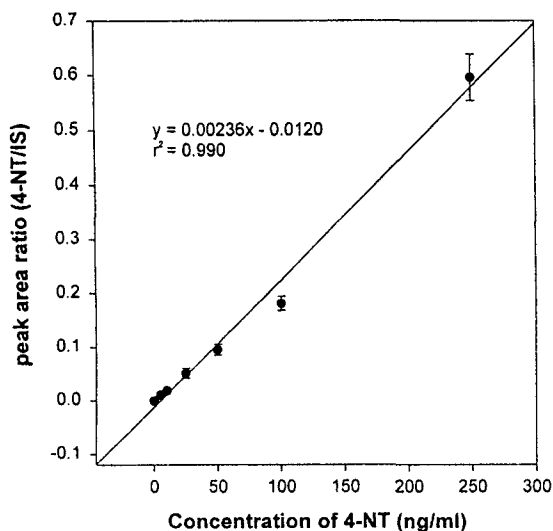
### 5. 4-Nitrotoluene의 회수율

3차 증류수 10 ml 중 4-NT의 추출 후 GC/MSD 분석에 의한 농도별 회수율은 Table 2에 나타내었



**Fig. 3.** Ion chromatogram showing detection limits of 4-NT (S/N ratio=3.6) in GC/MSD.

2  $\mu$ l of authentic standards of 4-NT (2.5 ng/ml) was injected to a GC/MSD. The detection limits for S/N ratio = 3.6 were corresponded to 5 pg of 4-NT as injected amount to the instrument.



**Fig. 4.** Calibration curve of 4-nitrotoluene obtained from extraction in 10 ml of distilled water spiked 4-nitrotoluene.

**Table 2.** Recovery of 4-Nitrotoluene (4-NT) extracted from 10 ml of distilled water

Amount added (ng)	Amount found* (ng)	Recovery (%)
10	10.9 $\pm$ 0.1	109
25	25.8 $\pm$ 4.3	103
50	45.6 $\pm$ 4.6	91
100	84.2 $\pm$ 6.0	84
250	271.9 $\pm$ 19.3	109

\* Each value represents mean  $\pm$  S.D. of n=4

다. 시료를 diethyl ether로 추출한 후 GC/MSD를 이용한 분석 결과, 농도에 따라 표준물질 함량의 84~109%에 해당하는 비교적 양호한 회수율을 나타내었으며 이는 추출 용매로 n-hexane을 사용하는 경우 18~61%였던 것에 비해 향상된 결과였다.

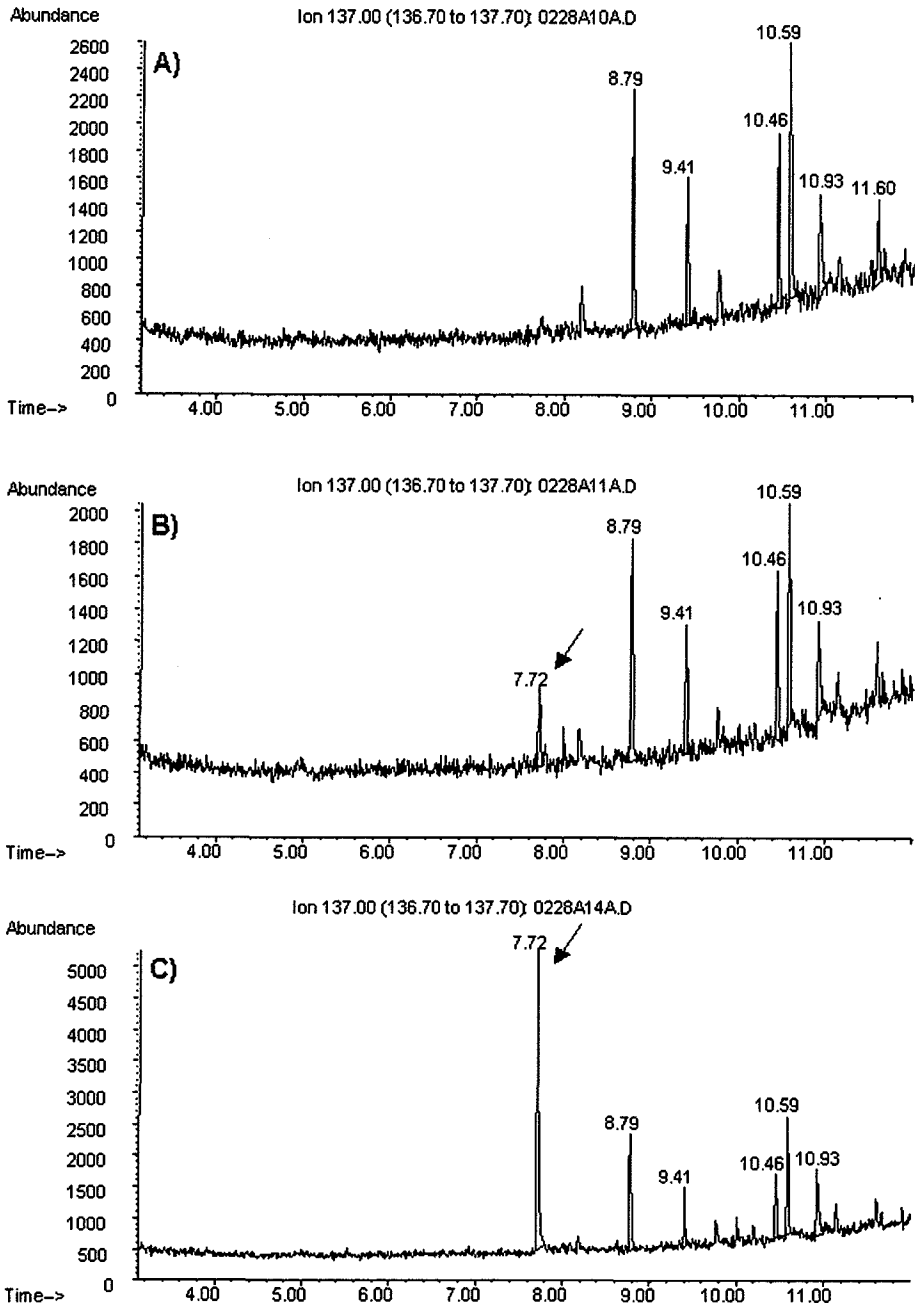


Fig. 5. SIM chromatograms of water blank (A) and authentic standards (B, 5 ng; C, 50 ng) of 4-nitrotoluene spiked to 10 ml of distilled water.

## 결론

수질 중 4-nitrotoluene (4-NT)의 분석은 수질

시료 10 ml를 diethyl ether를 이용하여 추출하고 이를 실온에서 증발 농축시켜 *n*-hexane으로 최종 용량을 0.3 ml로 하여 GC/MSD를 사용하여 분석

하는 방법을 개발하였다. 이 방법에 의한 4-NT의 within-day와 day-to-day의 coefficient variation은 각각 7.0~14.6% 및 7.7~20.8%의 범위에 들었으며 4-NT의 회수율은 84% 이상이었다. 이 방법에 의한 4-NT의 검출한계는 1 ng/ml이었다.

### 참 고 문 헌

1. Ciss, M., Dutertre, H., Phu-Lich, N. and Truhaut, R. Toxicologic study of nitrotoluenes. Determination of the irritant action on the skin and mucous membrane. *Dakar Med.* 1981; 26(4): 443-451.
2. Dunnick, J.K., Elwell, M.R. and Bucher, J.R., Comparative toxicities of o-, m-, and p-nitrotoluene in 13-week feed studies in F344 rats and B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1994; 22(3): 411-421.
3. Woollen, B.H., Hall, M.G., Craig, R. and Steel, G.T. Tri-nitrotoluene: assessment of occupational absorption during manufacture of explosives. *Br. J. Ind. Med.* 1986; 43(7): 465-473.
4. Yinon, J. and Hwang, D.G. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolic studies of explosives. *J. Chromatogr.* 1987; 394(1): 253-257.
5. Bader, M., Goen, T., Muller, J. and Angerer, J. Analysis of nitroaromatic compounds in urine by gas chromatography-mass spectrometry for the biological monitoring of explosives. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1998; 710(1-2): 91-99.
6. Gotz, R., Bauer, O.H., Friesel, P. and Roch, K. Organic trace compounds in the water of the River Elbe near Hamburg. Part I. *Chemosphere.* 1998; 36(9): 2085-2101.