

Agilent Ultivo QQQ LC/MS를 이용한 EPA 537.1 및 EPA 533에 따른 먹는물 중 PFAS(Per/Polyfluoroalkyl Substances) 분석

저자

Agustin Pierri
Weck Laboratories Inc.,
Industry, CA, USA

Tarun Anumol and Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.
Wilmington, DE, USA

개요

이 응용 자료는 민간 실험실 환경에서 EPA 분석법 537.1 및 533에 따른 먹는물 중 PFAS(per/polyfluoroalkyl substances) 분석법을 검증하는 절차를 집중적으로 소개합니다. 두 가지 분석법에서 Agilent Poroshell EC-120 컬럼을 사용해 분석물질을 모두 분리했습니다. 피크 비대칭 인자가 EPA 가이드라인을 충족했을 뿐만 아니라 분석 시간을 10분 미만으로 줄여 EPA 분석법의 분석 시간 대비 처리량을 크게 향상시켰습니다. 250mL 시료의 고체상 추출 후 모든 분석물질의 회수율은 70 ~ 130%로, EPA 분석법 537.1 및 533에 명시된 프로토콜을 준수했습니다. 분석법 보고 수준(Method Reporting Level)은 EPA 가이드라인에 따라 산출했습니다. EPA 가이드라인에 명시된 것보다 낮은 주입 부피를 사용했음에도 불구하고 보고 수준은 2ng/L 이하로 EPA 분석법 단일 실험실 검증에 열거된 수준보다 낮았습니다.

서론

PFAS는 매우 특별한 화학적 특성을 지녀 일상생활용품에 이러한 PFAS를 사용하는 것이 편리해지고 필수적이 되었습니다. PFAS는 1940년부터 상업용 및 산업용 제품과 개인위생용품에 사용되어왔기 때문에, 환경 곳곳에 존재합니다.¹ 이 물질은 지속성, 생물농축성 및 독성이 있습니다.² 따라서 미국 환경보호국(EPA), 유럽 화학물질청(ECHA) 등과 같은 규제 및 정부 기관은 환경 내 PFAS의 존재를 제한하기 위해 노력하고 있습니다.

미국의 경우, 현재 먹는물 중 PFAS를 모니터링하고 정량하기 위한 표준 분석법 2가지가 있습니다. EPA 537.1 분석법은 고체상 추출(SPE) 후 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석기(LC/MS/MS)를 사용해 먹는물 중 18종의 PFAS 화합물을 낮은 ng/L 검출 수준으로 분석합니다. 2019년에 미국 EPA는 25가지 PFAS 화합물을 분석할 수 있는 최신 분석법, EPA 533을 발표한 바 있습니다. 이 분석법은 먹는물 중 짧은 사슬(6개 미만의 C-사슬) PFAS와 신종 PFAS를 분석 방법을 포함하고 있으며, SPE 및 LC/MS/MS를 사용합니다. 이 응용 자료는 EPA 분석법 요구사항을 만족함과 동시에 이를 뛰어넘기 위해 SPE 및 Agilent Ultivo tandem quadrupole MS 시스템과 Agilent 1290 Infinity II LC를 함께 사용하여 이러한 두 가지 분석법에 대한 이차 실험실 검증 데이터를 제공합니다.

실험

시료 전처리

250mL의 먹는물 시료 세트를 EPA 분석법 537.1 및 EPA 533의 설명에 따라 항균제와 염소 퀘칭 시제를 사용해 처리했습니다. 동위원소로 표지된 대체 표준물질을 스파이킹 했습니다. 그다음, 각 EPA 분석법에 설명된 프로토콜에 따라 SPE로 추출했습니다. 추출물은 증발시켜 최종 부피 1mL로 만들었으며, 내부 표준물질 스파이킹 하였고, LC/MS 분석을 위해 보관했습니다. EPA 분석법 537.1의 경우 최종 1mL 추출물은 메탄올/물 비율 96/4 용액인 반면, EPA 533 분석법의 추출물은 메탄올/물 비율 80/20으로 보다 짧은 사슬의 PFAS에 대한 회수율을 더 높였습니다. 시료 전처리 프로토콜에 대한 상세 정보, 최적화된 회수율 및 재현성과 정확도에 대한 기대값 정보 등은 다른 애질런트 응용 자료에서 확인하실 수 있습니다.^{3,4}

표준물질 제조

표준물질 원액을 희석하여 30, 20, 10, 5, 1 및 0.5ng/mL 농도의 검량 용액을 얻었습니다. 각 농도의 검량 용액은 EPA 분석법 537.1 또는 EPA 533에 따른 메탄올/물 혼합물로 제조했습니다.

기기

고속 펌프가 장착된 1290 Infinity II LC와 Agilent Ultivo QQQ LC/MS를 사용해 분석을 수행했습니다. LC는 20μL 주입 루프와 Multisampler로 구성했습니다. 용매 및 LC 시스템으로부터의 PFAS 오염과 백그라운드 간섭을 피하기 위해 표 1에 나타난 지연 컬럼(delay column)을 사용했습니다. 구체적인 설치 정보는 다른 애질런트 응용 자료에서 확인할 수 있습니다.⁵

표 1 및 2는 LC 및 MS 파라미터를 보여줍니다.

표 1. LC 파라미터

파라미터	EPA 537.1	EPA 533
액체 크로마토그래프	Agilent 1290 Infinity II	Agilent 1290 Infinity II
지연 컬럼	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 4μm(p/n 699770-902T)	Agilent Poroshell 120 EB-C18, 2.1 × 50mm, 4μm(p/n 699770-902T)
분석 컬럼	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 50mm, 1.9μm(p/n 699675-902)	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 × 50mm, 1.9μm(p/n 689675-902)
컬럼 온도	55°C	55°C
이동상	A) 0.1% Acetic acid in H ₂ O B) Methanol	A) 20mM Ammonium acetate in H ₂ O B) Methanol
총 분석 시간	9분	9분
사후 시간	2.5분	2.5분
주입 부피	4μL	7μL
유속	0.7mL/분	0.7mL/분

표 2. MS 파라미터

파라미터	EPA 537.1	EPA 533
질량 분석기	Agilent Ultivo QQQ LC/MS	Agilent Ultivo QQQ LC/MS
이온화 모드	Negative ESI	Negative ESI
캐필러리 전압	3,500V	3,500V
노즐 전압	500V	500V
Nebulizer 압력	45psi	45psi
건조 가스 온도	300°C	300°C
건조 가스 유속	9.0L/분	9.0L/분
Sheath 가스 온도	260°C	260°C
Sheath 가스 유속	11.0L/분	11.0L/분

MS 수집 방법

Agilent MassHunter(버전 1.1)를 사용해 다이내믹 MRM(dMRM) 수집을 수행했습니다. MassHunter 정량 분석 소프트웨어에서 Quant-My-Way 템플릿을 사용해 모든 데이터를 처리했습니다. 표 3은 Ultivo QQQ LC/MS에서 EPA 537.1 및 533에 따른 PFAS 분석 시 최적화된 전이 및 화합물 파라미터를 나타냅니다.

표 3. 화합물별 파라미터

분석법	화합물 명	ISTD	전구 이온 (m/z)	생성 이온 (m/z)	Fragmentor (V)	충돌 에너지 (V)
537.1	PFTeDA	아니요	712.9	668.5	100	12
537.1	PFTeDA	아니요	712.9	169	60	0
537.1	PFTTrDA	아니요	663	618.7	101	8
537.1	PFTTrDA	아니요	663	169	101	15
모두	11Cl-PF3OUdS	아니요	631	451	70	38
모두	11Cl-PF3OUdS	아니요	631	85	70	30
533	PFDaA-13C2	예	614.9	570	104	5
모두	PFDaA	아니요	613	268.7	100	7
모두	PFDaA	아니요	613	568.9	79	12
537.1	Et-FOSAA-D5	아니요	589	419	115	15
537.1	Et-FOSAA	아니요	584	525.9	115	15
537.1	Et-FOSAA	아니요	584	419	115	15
537.1	Me-FOSAA-D3	예	573	418.9	115	19
537.1	Me-FOSAA	아니요	570	482.9	115	15
537.1	Me-FOSAA	아니요	570	418.9	115	12
533	PFAUnA-13C7	아니요	570	525	98	8
모두	PFAUnA	아니요	563	519	83	8
모두	PFAUnA	아니요	563	218.7	100	15
모두	9Cl-PF3OUdS	아니요	531	351	100	28
모두	9Cl-PF3OUdS	아니요	531	351	98	20
모두	9Cl-PF3OUdS	아니요	531	83	98	30
533	8-2 FTS-13C2	예	529	80.9	173	56
533	8-2 FTS	아니요	527	506.8	173	28
533	8-2 FTS	아니요	527	81	173	56
533	PFDA-13C6	예	519	474	102	5
537.1	PFDA-13C2	아니요	514.9	469.9	91	8
모두	PFDA	아니요	513	468.6	91	8
모두	PFDA	아니요	513	218.7	100	8
533	PFOS-13C8	예	507	80	210	50
모두	PFOS-13C4	예	502.9	80	110	46
모두	PFOS	아니요	498.9	99	100	46
모두	PFOS	아니요	498.9	80	100	46
533	PFNA-13C9	예	472	427	66	5
모두	PFNA	아니요	462.9	418.9	76	8
모두	PFNA	아니요	462.9	169	76	17
533	PFHpS	아니요	448.9	98.7	170	44
533	PFHpS	아니요	448.9	79.7	170	52
533	6-2 FTS-13C2	예	429	81	161	48
533	6-2 FTS	아니요	427	407	116	24
533	6-2 FTS	아니요	427	81	116	48
533	PFOA-13C8	예	421	376	79	8
모두	PFOA-13C2	예	415	370	79	8
모두	PFOA	아니요	412.9	368.9	79	8
모두	PFOA	아니요	412.9	169	79	17
533	PFHxS-13C3	예	401.9	99	164	45
모두	PFHxS	아니요	398.9	99	80	42
모두	PFHxS	아니요	398.9	80	110	45

결과 및 토의

화합물은 크로마토그래피에서 충분히 분리되었으며, 표적 피크도 EPA 분석법 기준을 충족할 뿐만 아니라 이를 능가하는 피크 비대칭 인자를 나타내며 잘 분리되었습니다. 두 가지 EPA 분석법 모두에서 Agilent Poroshell EC-120 컬럼을 사용해 분리했습니다. 이 컬럼은 내경이 sub-2 μ m인 표면 다공성 컬럼으로, 역압이 많이 걸리지 않으면서도 높은 유속에서 날카로운 피크를 분리할 수 있도록 해줍니다. 그 결과, 크로마토그래피가 EPA 요구사항을 충족할 뿐만 아니라 EPA 533 및 537.1 모두에서 분석 시간을 10분 이하로 단축하였고, 사후 시간이 2.5분에 불과했습니다. 높은 유속을 사용할 수 있기 때문에 분석 시간이 20분 이상인 EPA 분석법과 비교해 처리량을 크게 향상시킬 수 있었습니다. 실험실 검증에서 EPA 537.1 및 EPA 533으로 분석한 PFAS의 대표 크로마토그램을 그림 1 및 2에 나타냈습니다.

가중치 1/x로 선형 맞춤을 사용해 검량 포인트를 생성하였으며 검량선은 두 가지 EPA 분석법에서 요구된 바와 같이 강제로 0점을 통과하도록 했습니다. EPA 533 및 537.1의 모든 분석물질에 대한 본 연구에서는 각 화합물에 대해 최소 5개의 검량 포인트를 적용하여 $R^2 > 0.99$ 의 우수한 직선성을 확인하였습니다.

분석법	화합물 명	ISTD	전구 이온 (m/z)	생성 이온 (m/z)	Fragmentor (V)	충돌 에너지 (V)
모두	ADONA	아니요	377	251	95	1
모두	ADONA	아니요	377	84.9	95	38
533	PFHpA-13C4	예	367	322	66	5
모두	PFHpA	아니요	362.9	319	82	1
모두	PFHpA	아니요	362.9	169	82	17
533	PFPeS	아니요	349	99	110	45
533	PFPeS	아니요	349	80	110	45
533	4-2FTS-13C2	아니요	329	309	113	20
533	4-2FTS	아니요	327	307	113	20
533	4-2FTS	아니요	327	80.9	113	28
533	PFHxA 13C5	예	318	272.9	66	5
537.1	PFHxA 13C2	아니요	314.9	269.9	70	4
533	PFEESA	아니요	315	135	103	20
533	PFEESA	아니요	315	69.1	103	56
모두	PFHxA	아니요	313	268.6	70	4
모두	PFHxA	아니요	313	119	70	22
533	PFBS-13C3	예	302	98.9	133	29
모두	PFBS	아니요	298.9	98.9	110	30
모두	PFBS	아니요	298.9	80	110	42
533	NFDHA	아니요	295	201	83	0
533	NFDHA	아니요	295	85	83	24
모두	HFPO-DA-13C3	예	287	169	100	1
모두	HFPO-DA	아니요	285	185	100	12
모두	HFPO-DA	아니요	285	169	100	1
533	PFMBA	아니요	279	235	68	0
533	PFMBA	아니요	279	85	68	4
533	PFPeA-13C5	예	268	223	59	4
533	PFPeA	아니요	263	219	59	0
533	PFMPA	아니요	229	185	89	8
533	PFMPA	아니요	229	85	89	8
533	PFBA-13C4	예	217	171.7	62	4
533	PFBA-13C3	예	216	171.7	62	4
533	PFBA	아니요	213	168.7	62	4

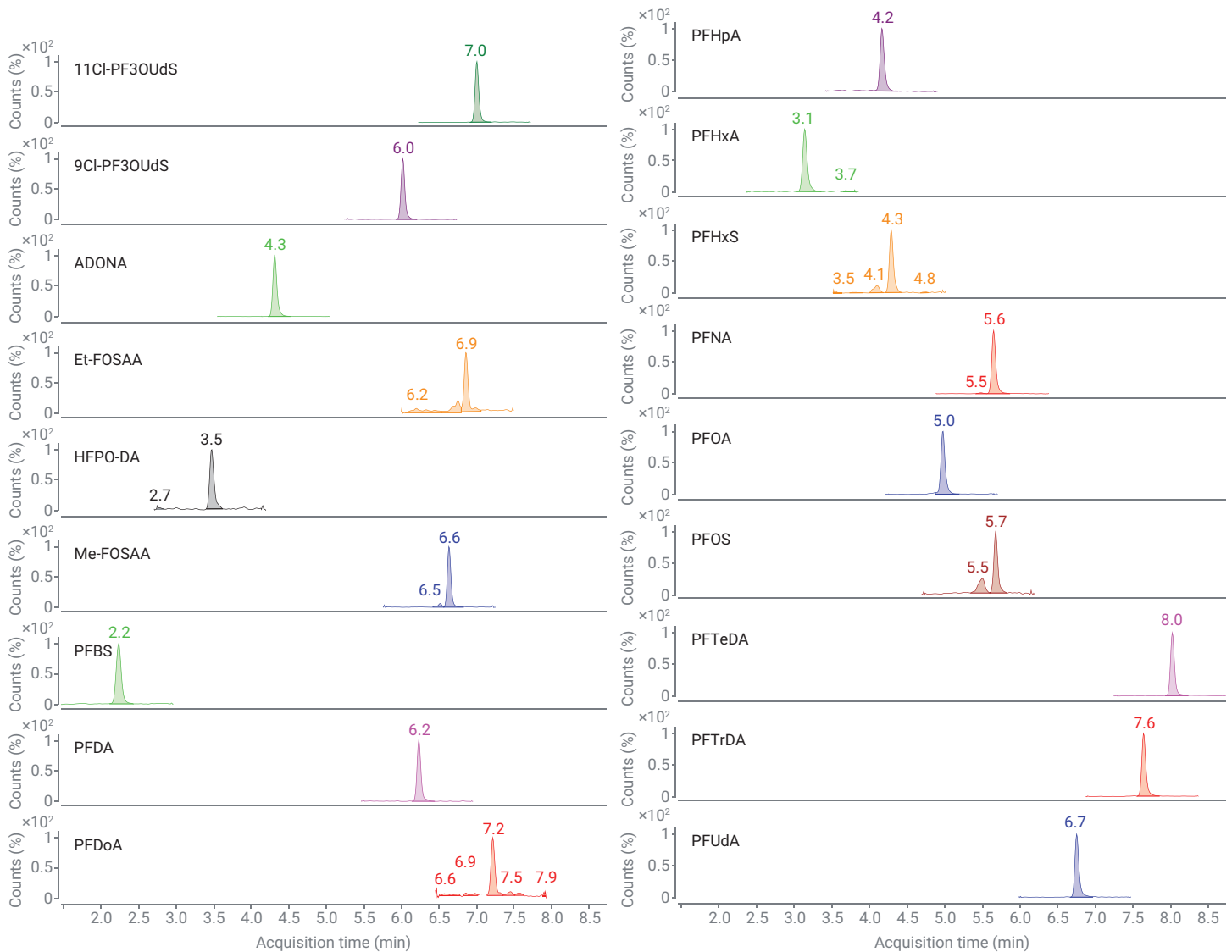


그림 1. EPA 537.1에 따라 2ng/L(먹는물에 스파이킹)에서 분석한 18종 PFAS의 MRM 크로마토그램

바탕 오염

이 연구에 따르면, 두 가지 EPA 분석법 모두에서 지연 컬럼의 사용이 백그라운드 PFAS 오염을 분석법 보고 수준 이하로 충분히 감소시키는 것으로 확인되었습니다. 또한, 바탕 표준물질에서의 PFAS 오염이 관찰되는지 확인하기 위해 가장 높은 농도의

검량 표준물질 분석 후 캐리오버 연구를 수행했습니다. 대부분의 경우 캐리오버가 관찰되지 않았고, 소수의 화합물에서만 미량의 캐리오버가 확인되었습니다. 미량의 캐리오버는 가장 낮은 농도의 검량 표준물질보다도 5배 이상 낮았습니다. 이렇게 낮은 농도(시료의 2ng/L보다 5배

낮은)에서의 LC/MS/MS 감도는 QQQ LC/MS의 높은 감도를 입증하며, EPA 537.1 및 EPA 533 분석을 수행하는 실험실에 일반적으로 요구되는 감도를 뛰어넘는 것입니다.

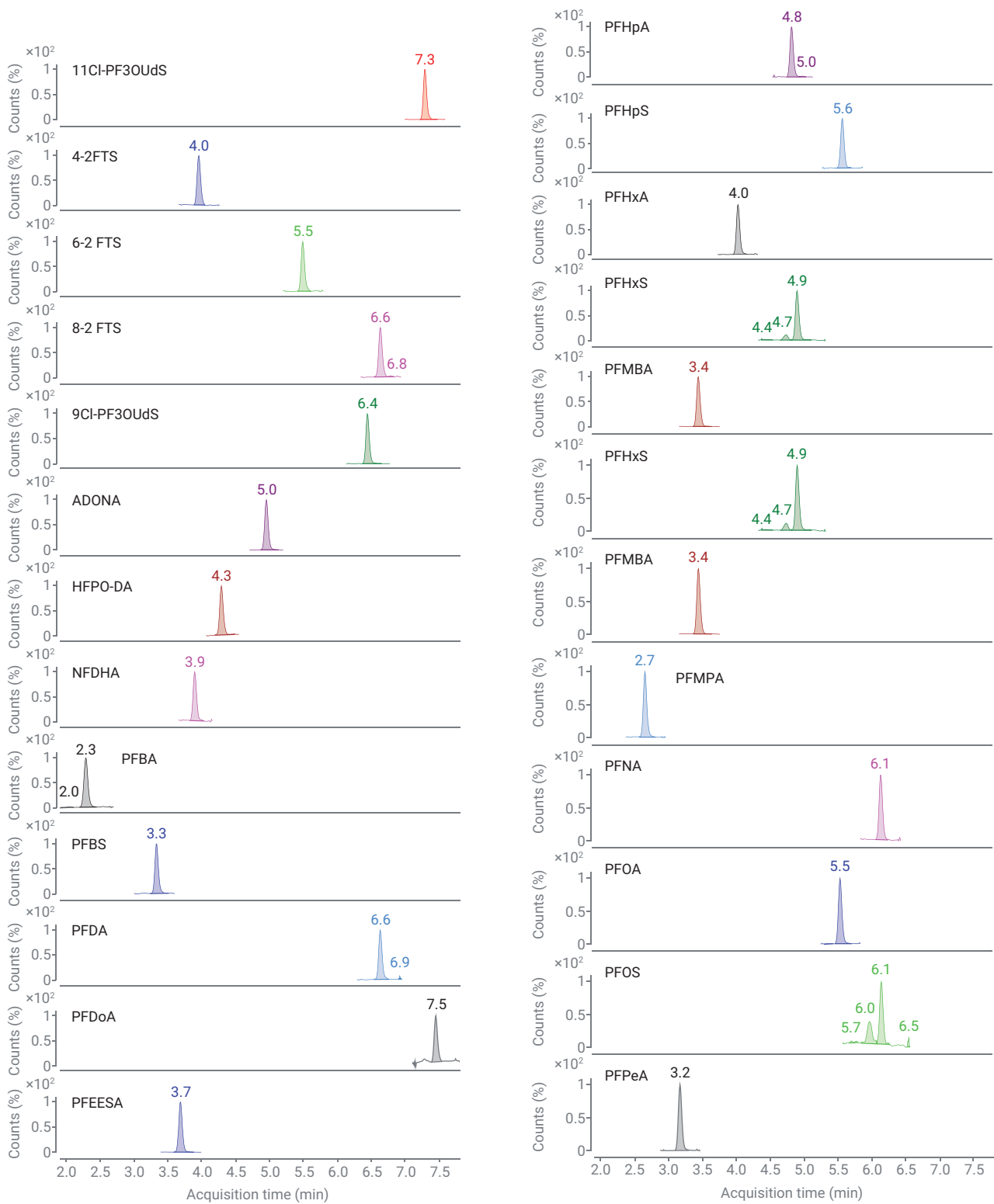


그림 2. EPA 533에 따른 1ng/L의 실험실 바탕 첨가시료(LFB) 내 25종 PFAS에 대한 추출 MRM 크로마토그램(quant transition)

회수율 및 재현성

250mL의 먹는물 시료에 이미 알고 있는 농도의 분석물질을 스파이킹 하여 전체 분석법의 회수율 및 재현성을 평가했습니다. 시료는 적절한 방법으로 보존하고 EPA 537.1 또는 533에 해당하는 내부 표준물질을 첨가했습니다. 5개의 초순수(reagent water) 및 먹는물 시료에 EPA 537.1 및 533의 모든 분석물질을 4ng/L로

스파이킹 했습니다. 이들 시료는 SPE한 뒤 Ultivo QQQ LC/MS에서 분석했습니다. 평균 회수율 및 상대 표준 편차(RSD)는 표 4에 정리되어 있습니다. 회수율은 EPA 분석법에서 요구하는 70 ~ 130% 범위 내로 잘 나타났습니다. EPA 533 및 537.1에 따라 테스트한 모든 분석물질에 대하여 초순수(reagent water) 및 정수 처리된 먹는물에서의 RSD는 20% 미만이었습니

분석법 보고 수준(Method Reporting Level)

분석법 검출 수준(MDL)은 EPA 분석법에서 측정한 것과 동일하게 EPA 533 및 537.1의 모든 분석물질에 대하여 회수율이 50 ~ 150%가 될 때까지 점진적으로 농도를 낮춰 스파이킹 하고, 8개 반복 시료를 사용하여 산출했습니다. 스파이킹 시료는 SPE 추출, 증발시킨 다음 QQQ LC/MS에서

표 4. EPA 533 및 537.1에 따라 초순수(reagent water) 및 정수 처리된 먹는물에서 테스트한 PFAS의 회수율 및 RSD(%)

분석물질	초순수				정수 처리된 먹는물			
	EPA 533		EPA 537.1		EPA 533		EPA 537.1	
	회수율(%)	RSD(%)	회수율(%)	RSD(%)	회수율(%)	RSD(%)	회수율(%)	RSD(%)
PFBA	97%	2%	—	—	92%	3%	—	—
PFMPA	79%	5%	—	—	77%	3%	—	—
PFPeA	91%	3%	—	—	92%	5%	—	—
PFBS	96%	4%	109%	5%	95%	5%	106%	8%
PFMBA	94%	3%	—	—	92%	6%	—	—
PFEESA	93%	6%	—	—	91%	5%	—	—
NFDHA	93%	8%	—	—	98%	7%	—	—
4:2 FTS	96%	6%	—	—	91%	10%	—	—
PFHxA	93%	5%	119%	9%	90%	3%	116%	8%
PFPeS	95%	5%	—	—	96%	7%	—	—
HFPO-DA	92%	12%	116%	11%	93%	6%	111%	10%
PFHpA	81%	9%	—	—	85%	4%	—	—
PFHxS	92%	8%	102%	7%	100%	8%	114%	5%
ADONA	90%	2%	112%	8%	87%	1%	109%	8%
6:2 FTS	101%	15%	—	—	104%	3%	—	—
PFOA	89%	7%	101%	5%	89%	5%	117%	7%
PFHpS	92%	5%	—	—	85%	10%	—	—
PFNA	95%	6%	115%	6%	95%	6%	113%	8%
PFOS	94%	9%	98%	6%	100%	6%	103%	7%
8:2 FTS	109%	3%	—	—	97%	8%	—	—
9Cl-PF3OUdS	110%	17%	110%	6%	122%	10%	109%	9%
PFDA	93%	6%	112%	6%	93%	6%	110%	8%
PFUnA	94%	4%	—	—	89%	3%	—	—
11Cl-PF3OUdS	81%	7%	106%	7%	77%	8%	109%	10%
PFDoA	96%	12%	101%	14%	100%	14%	96%	17%
Me-FOSAA	—	—	126%	8%	—	—	122%	9%
Et-FOSAA	—	—	120%	6%	—	—	118%	8%
PFHpA	—	—	122%	6%	—	—	126%	7%
PFTeDA	—	—	97%	9%	—	—	102%	9%
PFTTrDA	—	—	103%	5%	—	—	110%	9%
PFUnA	—	—	98%	4%	—	—	104%	9%

분석했습니다. 모든 분석물질에 대한 MDL은 EPA 533 및 537.1 모두에서 1ng/L 미만으로, Ultivo QQQ LC/MS의 뛰어난 감도를 보여줍니다. 이러한 검출 수준은 EPA 분석법에서 보고된 검출 수준보다 훨씬 낮은 것이었습니다. 이 감도는 두 가지 EPA 분석법에 명시된 것보다 더 적은 양의 추출물을 주입만으로 얻을 수 있었습니다. 주입량을 줄이면 피크 모양이 더욱 날카로워지고 분석용 LC 컬럼 및 MS/MS에 로드되는 매트릭스 화합물의 양도 감소하기 때문에 오염이 감소하여 MS 이온화원 세척 빈도를 줄일 수 있습니다.

결론

Agilent Ultivo QQQ LC/MS 시스템은 EPA 분석법 533 및 537.1에서 요구하는 수준의 PFAS를 정량할 수 있는 탁월한 감도를 입증했습니다. 민간 실험실 환경에서의 성능평가를 통해 이 분석법의 보고 수준이 EPA 분석법에서 요구하는 것보다 더욱 낮은 농도임을 보여주었습니다. 지연 컬럼과 Agilent Poroshell EC-120 컬럼을 함께 사용하여 충분한 분리를 이루었습니다. 이 분석법은 요구된 값보다 뛰어난 피크 비대칭 인자를 제공하여 분석을 방해하는 수준의 백그라운드 없이 모든 PFAS를 분리 및 정량할 수 있었습니다. 또한 EPA 분석법보다 훨씬 짧은 시간 내에 분리할 수 있습니다. SPE를 사용해 250mL 시료를 추출한 경우, 두 EPA 분석법 모두에서 초순수 (reagent water)와 정수 처리된 먹는물의 회수율은 EPA 분석법 가이드라인을 초과 충족하였습니다. Ultivo QQQ LC/MS와 1290 Infinity II LC의 구성은 먹는물 중 PFAS의 분석 및 정량에 이상적입니다.

표 5. EPA 533 및 EPA 537.1로 분석한 모든 PFAS의 분석법 검출 수준.

화합물	EPA 533	EPA 537.1
	MDL(ng/L)	MDL(ng/L)
PFBA	0.44	–
PFMPA	0.28	–
PFPeA	0.24	–
PFBS	0.26	0.67
PFMBA	0.33	–
PFEEESA	0.13	–
NFDHA	0.42	–
4:2FTS	0.36	–
PFHxA	0.39	0.67
PFPeS	0.41	–
HFPO-DA	0.44	0.81
PFHpA	0.27	–
PFHxS	0.4	0.79
ADONA	0.27	–
6:2FTS	0.67	–
PFOA	0.29	0.39
PFHpS	0.44	–
PFNA	0.41	0.62
PFOS	0.44	0.55
9Cl-PF3ONS	0.48	0.82
8:2FTS	0.49	–
PFDA	0.27	0.68
PFUnA	0.41	–
11Cl-PF3OUdS	0.16	0.63
PFDoA	0.59	0.45
Me-FOSAA	–	0.82
Et-FOSAA	–	0.91
PFHpA	–	0.54
PFTeDA	–	0.62
PFTTrDA	–	0.41
PFUnA	–	0.56
ADONA	–	0.46

참고 문헌

1. Zhanyun, W. *et al.* A Never-Ending Story of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)? *Environ. Sci. Technol.* **2017**, 51, 5, 2508–2518.
2. ATSTR, PFAs Toxicological Profile Key Messages, **2018**.
3. Hunt, K. *et al.* Extraction of Per/Polyfluoroalkyl Substances in Water Using Agilent Offline Solid Phase Extraction, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-0250EN, **2018**.
4. Hindle, R. *et al.* EPA Method 533 for Analysis of Per/Polyfluoroalkyl Substances in Drinking Water Using Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS, *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-1628EN, **2020**.
5. Anumol, T. *et al.* Recommended Plumbing Configurations for Reduction in Per/Polyfluoroalkyl Substance Background with Agilent 1260/1290 Infinity (II) LC Systems, *Agilent Technologies application note*, publication number 5991-7863EN, **2017**.

www.agilent.com/chem

DE.6292361111

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 5월 12일 한국에서 인쇄
5994-1920KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com