Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(1):63-66. Korean
Published online 2017 March 29. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.1.10

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

액-액 추출과 아세틸화 후 GC-MS를 이용한 물 중 phenol의 분석

박선영[1], 김윤정[1], 정성진[1], 김희갑[2*]

[1]강원대학교 자연과학대학 환경학과, [2]강원대학교 농업생명과학대학 환경융합학부

Quantitative Determination of Phenol in Water Using GC-MS after Liquid-Liquid Extraction and Acetylation

Sunyoung Park[1], Yunjeong Kim[1], Sungjin Jung[1] and Hekap Kim[2*] ([1]Department of Environmental Science, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea, [2]School of Natural Resources and Environmental Science, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea)

Received: 9 March 2017 / Revised: 14 March 2017 / Accepted: 25 March 2017

ORCID
Sunyoung Park
http://orcid.org/0000-0002-1774-7413

Hekap Kim
http://orcid.org/0000-0001-7709-3071

Abstract

BACKGROUND: The phenol concentrations in water samples were determined using gas chromatography after derivatization of the analyte to phenyl acetate followed by extraction using a large volume of solvent. However, this procedure requires an additional purification step and is not analytically efficient.

METHODS AND RESULTS: In this study, phenol was first extracted from an acidified water sample using ethyl acetate and then acetylated using acetic anhydride in the presence of a small amount of water and K_2CO_3. The derivative was extracted using 1 mL of *n*-butyl acetate. One microliter of the extract was analyzed by GC-MS without further purification. The calibration curve showed good linearity with the r^2 value of 0.9968. The method detection limit and the limit of quantitation were estimated to be 0.18 µg/L and 0.56 µg/L, respectively. Repeatability (RSD, n=3) and recovery (n=3) were 9.1%-4.3% and 90.6%-110.5%, respectively. The concentrations of phenol in a few samples of stream water were distributed in the range of 2.51-7.51 µg/L.

CONCLUSION: This method is simpler and faster to implement than those currently utilized and shows high analytical reliability. It can be applied to the quantitative determination of phenol concentrations in surface water and groundwater samples.

Key words: Acetylation, GC-MS, Liquid-liquid extraction, Phenol, Water

*Corresponding author: Hekap Kim
Phone: +82-33-250-8577; Fax: +82-33-259-5563;
E-mail: kimh@kangwon.ac.kr

서 론

Phenol(페놀)은 합성섬유, 플라스틱, 의약품, 화장품, 세정제 등의 생산 등 다양한 목적으로 사용되고 있다. 그렇지만, 저장 중인 phenol은 물이나 토양으로 유출되어 수생태계에 영향을 주거나 지하수를 오염시키기도 한다(ATSDR, 2008; IRIS, 2002; Saha *et al.*, 1999). 이렇게 phenol에 오염된 지표수나 지하수가 농업용수로 사용되면 토마토, 피망 등에 흡착되어 농작물에도 잔류할 수 있다(CCME, 1999). 따라서 미국환경보호청(US EPA)은 phenol을 우선오염물질(priority pollutant) 중의 하나로 지정하였으며(EPA, 2014), 환경부는 먹는 물 및 농업용수에서 phenol의 농도를 5 µg/L 이하로 정해 규제하고 있다(법제처 수질오염기준, 2016).

일반적으로 물 중 phenol의 분석은 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)를 사용하여 분석하며, 유도체를 만들지 않고 극성 칼럼을 사용하기도 하지만(Farhadi *et*

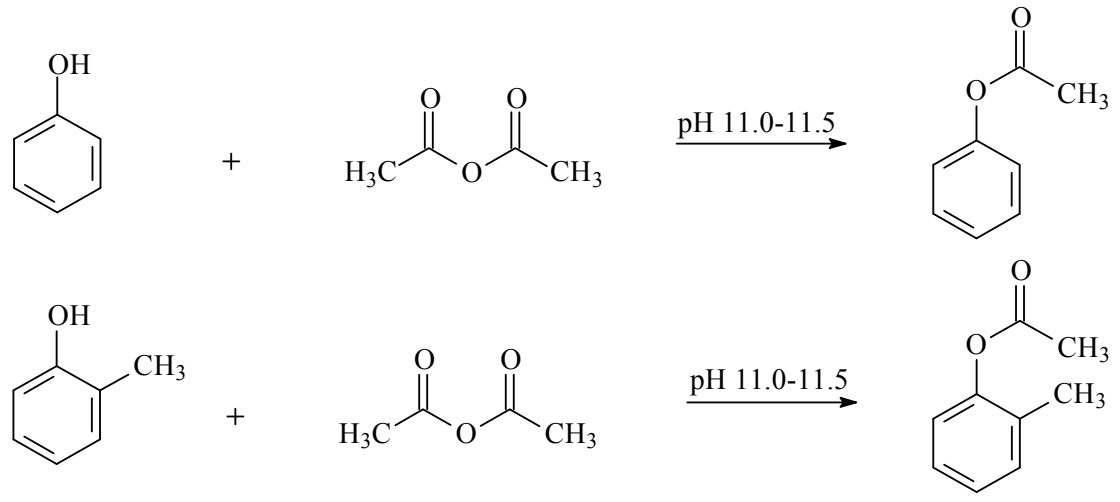

Fig. 1. Acetylation reactions of phenol and o-cresol (surrogate standard) with acetic anhydride at pH 11.0-11.5.

al., 2014), 유도체를 만든 후 비극성 칼럼으로 분리하여 분석하는 방법이 더 널리 사용되고 있다(Bagheri *et al.*, 2004). 가장 널리 사용되는 유도체는 phenyl acetate인데(Fig. 1), 이는 상온에서 phenol이 phenyl acetate로 빠르게 acetyl화되는 반응이 일어나기 때문이다(Rodrígez *et al.*, 2000).

일반적으로 사용되는 phenol의 분석 방법은 염기성화한 물 중의 phenol을 먼저 phenyl acetate 유도체로 만든 후에 *n*-hexane으로 추출하고 농축한 후 분석하는 것이다(환경부 수질오염공정시험기준, 2017; NCASI, 2007). 그러나 이 방법은 크로마토그램이 깨끗하지 않을 뿐만 아니라 많은 양의 용매를 사용하기 때문에 경제적이지 않다(Faraji, 2005; Llompart *et al.*, 2002). 따라서 본 연구에서는 산성화한 물로부터 phenol을 추출하고 phenyl acetate 유도체를 만든 후 소량의 용매로 추출하여 GC-MS로 분석하는 새로운 방법을 개발하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Phenol, phenyl acetate, *o*-cresol, potassium carbonate 및 acetic anhydride는 Sigma-Aldrich사(Missouri, USA)의 제품을 사용하였다. HPLC 등급의 methanol, ethyl acetate 및 dichloromethane(DCM)은 Tedia(Ohio, USA), sodium chloride는 Junsei Chemical Co. Ltd(Tokyo, Japan), 그리고 *n*-butyl acetate, sodium sulfate 및 hydrochloric acid(35%)는 Daejung(Busan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그리고 sodium thiosulfate는 Fluka(Bunch, Switzerland)사의 제품을 사용하였다.

표준용액의 제조

Phenol의 표준용액은 5000 mg/L의 phenol 표준물질을 methanol에 녹여 1000, 100 및 10 mg/L의 농도로 제조하였으며, 사용하기 전까지 냉동(-24℃) 보관하였다. 대체표준물질(surrogate standard, SS)로 사용된 *o*-cresol은 methanol에 녹여 207 mg/L 농도로 제조하였다.

추출

50 mL의 물 시료에 *o*-cresol(SS) 용액 2 μL를 주입한 후 35% HCl 수용액을 가하여 pH를 2 이하로 조절하였다. 여기에 50 mL의 ethyl acetate를 첨가한 후 분별 깔때기에 옮겨 shaker(SR-2DS, Taitec, Koshigaya, Japan)로 15분 동안 진탕하여 추출하였다. 이 과정을 한 번 더 반복하여 ethyl acetate 층을 취하였다. Ethyl acetate 추출액(100 mL)에 1 g의 sodium sulfate를 첨가하여 건조한 후, 회전감압농축기(Model HS 2000, Hahn-Shin Science Co., Bucheon, Korea)와 질소 가스를 사용하여 소량이 될 때까지 농축하였다. 농축액을 원심분리관으로 옮기고 1 mL의 초순수, 0.5 mL의 5% K_2CO_3 및 0.1 mL의 acetic anhydride를 가한 후, vortex mixer로 20초 동안 진탕하여 10분 동안 정치하였다. 여기에 0.1 mg의 NaCl을 첨가한 후 1 mL의 *n*-butyl acetate를 넣고 vortex mixer로 1분 동안 진탕하였다. *n*-Butyl acetate 층을 취하여 vial에 옮긴 후 1 μL를 GC- MS에 주입하여 분석하였다.

기기 분석

기기 분석에 사용된 GC-MS는 7890A GC와 5975C inert MSD(Agilent Technology Inc., Santa Clara, USA)이었으며 분석 조건은 Table 1과 같았다. 칼럼으로는 DB-WAX를 사용하였고, 주입구의 온도는 240℃, 그리고 주입 방식은 비분할 주입이었다. 질량분석기는 EI 방식으로 사용하였으며, phenyl acetate의 정성 및 정량에 사용된 이온값(m/z)은 66, 94 및 136이었다.

유효성 검증

검량선은 1-10 μg/L의 범위에서 작성하였으며, 반복성 및 회수율은 4 μg/L 및 10 μg/L의 두 농도에 대해 각각 3번

Table 1. Operating conditions of GC-MS for quantitative determination of phenol in water as phenyl acetate form

GC	Carrier gas, flow rate	99.999% He gas, 1 mL/min
	Column	Agilent DB-WAX (30 m×0.25 mm×0.25 μm)
	Oven temperature program	40℃ (3 min)→150℃ at a rate of 10℃/min→230℃ at a rate of 25 ℃/min→230℃ (20 min)
	Inlet port temperature	240℃
	Injection mode, volume	Splitless mode, 1 μL
MS	Transfer line temperature	240℃
	Mode	Electron impact (EI), 70 eV
	Ion source temp.	230℃
	Quadrupole temp.	150℃
	Selected ions (m/z)	Phenyl acetate: 66, 94, 136 *o*-Cresyl acetate: 107, 108, 150

씩 분석하여 평가하였다. 검출한계(method detection limit, MDL)와 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 S/N 비 3으로 추정된 농도의 2배에 해당하는 수준의 시료를 7개 제조하여 분석한 후, 표준편차를 구해 각각 3.14와 10을 곱하여 구하였다.

하천수 중 phenol 분석

2015년 8월부터 11월 사이에 강원도 강릉 및 동해의 하천에서 1 L의 갈색 유리병에 다섯 개의 물 시료를 채취하였으며, 잔류 염소를 제거하기 위하여 40-50 mg의 sodium thiosulfate를 첨가하였다. 또한, 6 N HCl 수용액을 첨가하여 시료의 pH를 2 이하로 조절하였다. 시료는 분석 전까지 4℃에서 보관하였으며, 분석 전에 0.2 μm 멤브레인 필터(Whatman, Little Chalfont, UK)로 여과하였다(US EPA, 2000).

결과 및 고찰

전처리 조건 확립

소량의 용매로도 phenol 유도체(phenyl acetate)의 추출이 가능한 용매를 탐색하기 위하여 ester 계열의 용매인 *n*-butyl acetate, ethyl acetate 및 DCM에 대한 추출 효율을 평가하였다(Fig. 2). *n*-butyl acetate가 다른 두 용매보다 약 1.5배 높은 결과를 나타내, *n*-butyl acetate를 phenyl acetate의 추출에 적합한 용매로 선정하였다.

기존 phenol 분석 방법은 50 mL의 물 시료를 유도체화한 후에 phenyl acetate를 *n*-hexane 20 mL로 추출한 후 농축하였다(NCASI, 2007). 본 연구에서는 이와 같은 방법으로 *n*-hexane 대신 추출 효율이 더 좋은 *n*-butyl acetate를 시도하였다. 그런데 *n*-butyl acetate는 냄새가 자극적일 뿐만 아니라 만성 노출 시 중추신경계에 독성을 일으킬 수 있는 물질이므로(Copestake and Malcolm, 2005) 호흡기를 통해 노출되지 않도록 유의하여야 한다.

따라서 물에서 많은 양의 *n*-butyl acetate를 사용하여 유도체를 추출하는 phenol을 유도체화를 하지 않은 상태에서

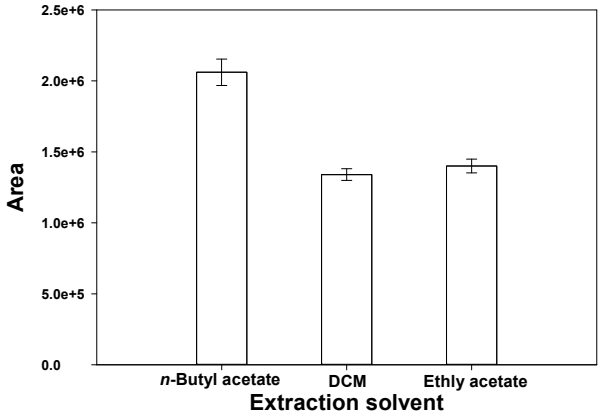

Fig. 2. Comparison of solvent extraction of phenyl acetate from the acetylation reaction mixture. *n*-Butyl acetate showed the highest extraction efficiency.

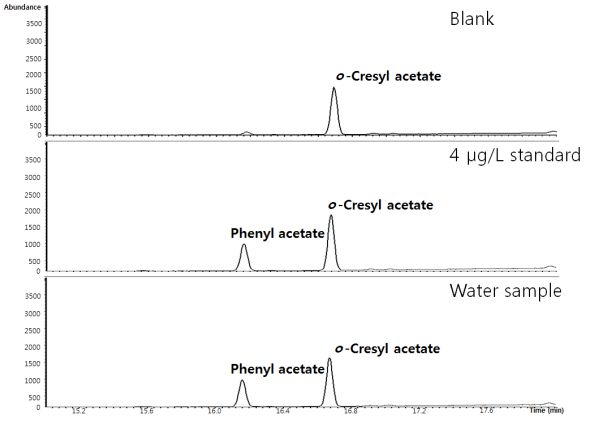

Fig. 3. Chromatograms of a blank, a standard, and a water sample.

ethyl acetate로 추출한 후 유도체화하는 방법으로 전환하였다. 이 방법으로 단지 1 mL의 매우 적은 양의 *n*-butyl acetate를 사용하여 추출할 수 있었고, 추출액을 바로 GC-MS에 주입함으로써 분석의 효율성이 증대되었다.

선택성 및 직선성

Fig. 3은 phenol과 SS로 사용된 *o*-cresol의 ester 유도체 화합물에 대한 크로마토그램이다. 바탕 시료, 표준 시료 및 물 시료에서 두 화합물의 머무름 시간에서 분리에 방해가 되는 피크들이 검출되지 않아 좋은 분리능과 선택성을 나타냈다.

초순수에 각 표준용액을 첨가하여 작성한 검량선의 직선성은 결정계수(r^2)가 0.9968로 매우 높았다. 검량선에서 세로축의 값은 표준물질에 대한 피크의 면적을 SS에 대한 피크의 면적으로 나눈 값을 사용함으로써, 각 시료마다 나타낼 수 있는 추출 효율의 차이를 보정할 수 있었다.

반복성과 회수율

4 μg/L 및 10 μg/L 두 농도에 대한 3 반복 시험값의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 각각 9.1% 및 4.3%이었고, 회수율은 평균 90.6% 및 110.5%를 보여 만족할 만한 결과를 얻었다. 이 결과는 먼저 acetate 유도체를 만든 후 *n*-hexane으로 추출하여 분석한 방법에서의 페놀류 화합물의 RSD(4.1-12.4%) 및 회수율(102-105%)과 유사한 수준이었다(NCASI, 2007).

방법검출한계 및 정량한계

확립된 분석 방법에 대한 MDL과 LOQ는 각각 0.18 μg/L 및 0.56 μg/L이었다. 이 LOQ는 우리나라 수질환경기준인 5 μg/L의 약 10분의 1 수준으로, 확립한 방법이 물 중 phenol의 분석에 적합함을 알 수 있었다. 이 연구에서 얻은 MDL은 기존의 페놀류 화합물에 대한 MDL(0.16-0.32 μg/L)과 유사한 수준이었다(NCASI, 2007).

하천수 시료 분석

상기방법으로 하천수 시료를 분석한 결과, 하천수 페놀의 평균 농도는 4.84 μg/L이었고 검출 범위는 2.51-7.51 μg/L이었다(Table 2). 이 농도는 미국에서 기존에 보고된 비오염 지역 하천수 농도(0.1-1.5 μg/L)보다 높은 수준이었으며(ATSDR, 2008) 다섯 개의 시료 중 세 개(60%)의 시료에서의 농도는 우리나라 수질환경기준(5 μg/L)을 초과하였다.

Table 2. Concentrations of phenol in stream water samples

Site	Concentration (μg/L)
1	5.07
2	6.03
3	3.07
4	2.51
5	7.51
Mean	4.84
Standard deviation	2.07
Range	2.51-7.51

요 약

이 연구에서 개발한 방법은 phenyl acetate 유도체를 만든 후 추출-정제-농축 단계로 분석하는 기존 phenol 분석 방법의 '추가적인 정제 과정 필요' 및 '많은 양의 유해 용매 사용'이라는 단점을 보완할 수 있는 분석 방법이다.

이 방법은 phenol을 물로부터 액-액 추출한 후 생성한 phenyl acetate 유도체를 소량의 용매로 추출한 후 바로 GC-MS에 주입하여 분석할 수 있는 장점을 갖고 있다. 이 방법은 기존 방법과 유사한 수준의 반복성, 회수율, 직선성 및 방법검출한계를 나타내었고, 분석 과정이 기존에 비해 더 간단하여 물 중의 phenol 및 페놀류 화합물를 분석하는 데에 적합할 것으로 생각한다.

References

Bagheri, H., Saber, A. & Reza Mousavi, S. (2004). Immersed solvent microextraction of phenol and chlorophenols from water samples followed by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1046(1), 27-33.

Ballesteros, E., Gallego, M., & Valcarcel, M. (1990). Gas chromatographic determination of phenol compounds with automatic continuous extraction and derivatization. Journal of Chromatography, 518, 59-67.

Faraji, H. (2005). β-Cyclodextrin-bonded silica particles as the solid-phase extraction medium for the determination of phenol compounds in water samples followed by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometry detection. Journal of Chromatography A, 1087(1), 283-288.

Farhadi, K., Matin, A. A., Amanzadeh, H., Biparva, P., Tajik, H., Farshid, A., & Pirkharrati, H. (2014). A novel dispersive micro solid phase extraction using zein nanoparticles as the sorbent combined with headspace solid phase micro-extraction to determine chlorophenols in water and honey samples by GC–ECD. Talanta, 128, 493-499.

Llompart, M., Lourido, M., Landín, P., García-Jares, C., & Cela, R. (2002). Optimization of a derivatization–solid-phase microextraction method for the analysis of thirty phenolic pollutants in water samples. Journal of Chromatography A, 963(1), 137-148.

Rodríguez, I., Llompart, M., & Cela, R. (2000). Solid-phase extraction of phenols. Journal of Chromatography A, 885(1), 291-304.

Saha, N., Bhunia, F., & Kaviraj, A., (1999). Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 63(2), 195-202.