

내부표준법과 외부표준법에 따른 검량선 방법의 비교분석

김창규[†] · 엄석원 · 길혜경 · 이만호

서울특별시보건환경연구원 수질부

Comparison of Calibration Methods using External Standards and Internal Standards

Chang-Kyu Kim[†], Seog-Won Eom, Hae-Kyoung Kil, and Man-Ho Lee

Water Quality Division, Seoul Metropolitan Government Institute Health and Environment, Gwacheon 427-070, Korea

Received October 15, 2009/Accepted December 23, 2009

In this study, the internal standard method was compared with the external standard method in the determination of organic phosphorus pesticides. Also, We compared the internal standard methods of volume(w/v) with weight(w/w). Analyte was parathion and internal standard was malathion. Calibration curve was drawn with parathion at the final concentration of 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL, 2.5 µg/mL in the external standard method. The internal standard method of volume was in the same way. However, it was fortified with 10 µg internal standard (malathion), respectively, and was dissolved in hexane. After dissolving, total volume of the sample was 10 mL. In the case of the internal standard method of weight, calibration curve was completed with parathion at the final weight of 5 µg, 10 µg, 25 µg. It was fortified with 10 µg internal standard (malathion) respectively, and dissolved in about 10 mL hexane. But it was not important to set the volume exactly. 10 µg of parathion and malathion were spiked into 500 mL deionized water and analyzed with a GC-NPD (Gas Chromatograph-Nitrogen Phosphorus Detector). Result obtained with the external standard method was 0.0134 µg/mL (RSD 1.437), the internal standard method with volume basis was 0.0143 µg/mL (RSD 1.376) and the internal standard method with weight basis was 0.0146 µg/mL (RSD 1.316). Accuracies of the external standard method, of the internal standard method with volume basis and with weight basis were 67%, 72% and 73%, respectively. Thus the internal standard method with weight basis can determine pesticides more accurately and precisely than the external standard method and is more convenient than the internal standard method with volume basis.

Key words: Internal standard method, External standard method, Organic phosphorus pesticides

1. 서 론

대부분의 분석방법은 농도를 알 수 있게 분석물질을 포함한 일련의 표준시료에 대하여 시험하고 얻은 검정 데이터에 바탕을 두고 있다.¹⁾ 특히 현대에는 컴퓨터의 응용프로그램과 접목한 정밀분석기기의 발달로 정확도가 높아지고 또한 검출한계도 낮아지게 되었으며, 가장 일반적인 분석방법은 기체크로마토그래피로, 이것은 기체 상태의 혼합물을 길고 가는 관내에 있는 다공질 흡

수체에 통과시켜 각각 다른 성분으로 분리하는 것이다. 정량적으로 크로마토그래피 분석을 하는 가장 직접적인 방법은 미지 시료의 조성구와 비슷한 일련의 표준용액을 준비하는 것과 관련이 있다. 표준물질에 대한 크로마토그램을 얻고 피크 높이나 면적을 함수로 도시한다. 데이터들의 도시는 원점을 지나는 직선을 얻고, 분석은 이 도시에 의거한다.²⁾

측정된 넓이(또는 높이)와 성분량과의 관계를 구하는 다양한 정량법 중에 외부표준법은 정량하려는 성분으

[†]To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-(0)2-570-3218, Fax: +82-(0)2-570-3214, E-mail: cckim0707@seoul.go.kr

로 된 순물질을 단계적으로 취하여 크로마토그램을 기록하고 피크의 면적(또는 높이)을 구한다. 이것으로부터 성분량을 X축에, 피크의 넓이(또는 높이)를 Y축에 취하여 검량선을 작성한다. 방법은 간단하나 주입된 시료의 양을 정확히 알아야 하고, 검출기의 감도가 분석할 때 마다 다르므로 항상 새로 검량선을 만들 필요가 있다. 반면 내부표준법은 정량하려는 성분의 순물질 일정량에 내부표준물질의 일정량을 가한 혼합시료의 크로마토그램을 기록하여 피크의 넓이를 측정한다. X축에 정량하려는 성분량과 내부표준물질의 비를 취하고 분석 시료의 크로마토그램에서 측정된 정량할 성분의 피크 넓이와 표준물질의 피크넓이의 비를 Y축에 취하여 검량선을 작성한다. 이 방법은 주입된 양을 정확히 측정할 필요가 없고 검출기의 반응이 변하더라도 넓이의 비에는 영향을 미치지 않는다.³⁾

검정곡선 정량법에 의한 분석방법에서 오차가 생기는 가장 중요한 원인은 시료 부피의 불확정성이다. 가끔은 주입속도도 한 가지 인자로 작용한다. 시료는 보통 소량이며, 마이크로 주사기로 소량 크기의 부피를 재현성 있게 주입하는데 나타나는 불확도는 상대적으로 몇 %가 될 수 있다. 이런 사정은 시료가 가열된 시료통에 주입해야 하는 기체-액체 크로마토그래피에서는 더 나쁘다. 이런 상황에서 바늘 끝으로부터의 증발은 주입된 부피에 큰 변화를 유발시킨다.²⁾

정량분석에서 수반되는 측정결과와 불확도는 측정량의 값을 정확하게 알 수 없다는 사실을 반영하고 있다.⁴⁾ 측정의 불확도란 충분히 타당성 있는 이유에 의해 측정량에 영향을 미칠 수 있는 값들의 분포를 특성화한 파라미터이다.⁵⁾ 따라서 측정결과는 이미 알고 있는 계통효과를 적절하게 보정하여도 역시 추정값에 불과하다. 왜냐하면, 계통효과에 대한 완전한 보정이 불가능하고 또 우연효과가 있기 때문에 측정결과에는 항상 불확도가 존재하기 때문이다.⁴⁾

크로마토그래피 정량에서 내부표준법은 시료 주입 때 생기는 불확정성을 피할 수 있기 때문에 이 방법으로 높은 정밀도를 얻을 수 있다. 이 방법이 성공하기 위해서는 내부표준물질 피크가 시료 중 모든 다른 성분들의 피크로부터 잘 분리되어 있어야 한다. 그러나 또 그것은 분석 성분 피크에 가까이 나타나야 한다.²⁾

분석기기의 발달로 GC(Gas Chromatograph)와 HPLC에도 검출기로 질량분석기를 널리 이용하여 내부표준물질을 분석대상물질의 동위원소로 이용하여 보다 쉽게 이용할 수 있게 됨으로, 지금까지 널리 사용

하여 오던 외부표준법의 단점을 보완할 수 있는 내부표준법의 사용이 증가하고 있는 실정이다. 그러나 EPA Method 1613⁶⁾ 및 EPA Method 1668a⁷⁾ 등은 전처리 후 최종부피를 알아야 하는 부피개념의 내부표준법을 사용하고, EPA Method 23,⁸⁾ EPA Method 8290,⁹⁾ TO-9a¹⁰⁾ 등은 전처리 후의 최종부피와 검량선 작성용 표준용액의 부피를 알 필요가 없는 중량개념의 내부표준법을 사용하고 있어, 일부 분석자들에게 전처리한 시료의 최종부피와 표준용액의 농도(W/V)를 알기 위하여 일정 부피를 정확히 맞추어야 하는지에 대한 논란이 있다. 이에 본 연구에서는 외부표준법과 부피개념의 내부표준법 및 중량개념의 내부표준법을 비교분석하여 이러한 문제점을 해결하고자 하였다. 또한 내부표준법을 이용하여 정확도와 정밀성을 향상시키고, 특히 중량개념의 내부표준법을 적용하여 시험의 불확도 감소와 분석방법 개선을 목적으로 하였다.

2. 실험재료 및 방법

일반실험실에 사용하는 증류수를 시료로 하여 분석하였으며, 시험에 사용된 시약, 분석조건, 표준용액조제 등 시험방법을 다음과 같이 수행하였다.

2.1. 시약

표준물질은 parathion을 포함한 mixture standard 1,000 µg/mL(AccuStandard)와 malathion 1,000 µg/mL(AccuStandard) 제품을 사용하였다. 시약으로 acetone(Acetone 5,000 for Pesticide Residue, Wako), hexane(Hexane300, Wako), NaCl(JUNSEI, 특급), HCl(Wako, 특급)을 사용하였다.

2.2. 기기 및 분석조건

분석장비는 GC Agilent7890으로 NPD(Nitrogen Phosphorus Detector)를, 농축장비는 Rotavapor R-215(BUCHI)를 사용하였다. Column은 HP-5(5%-Phenyl-methylpolysiloxane nonpolar : 30 m×0.25×25 : Agilent)를 사용하였다. 여지는 1PS(110 mmØ Whatman)를 사용하였다.

오븐 조건은 처음 50°C에서 분당 25°C씩 100°C까지 승온하고, 다시 분당 5°C씩 승온하여 300°C까지 승온한 후 5분간 머무름 시간을 갖는다. 주입구 온도는 250°C, 검출기 온도는 300°C, 기체흐름속도는 1.0 mL N₂/min, 분리비는 10 : 1로 하였다.

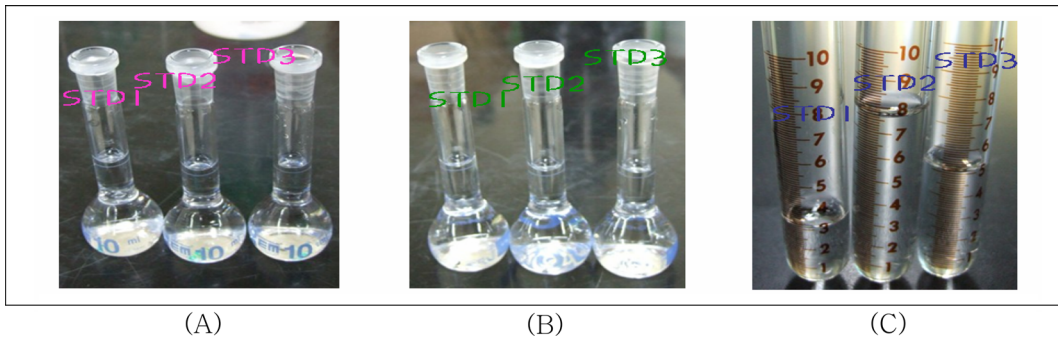


Fig. 1. Making calibration solutions(A: the external standard method, B: the internal standard method of volume, C: the internal standard method of weight).

2.3. 표준용액 조제

분석대상물질은 parathion이고, 내부표준물질(Internal standard)은 malathion이며, 용매는 acetone을 사용하였다. 외부표준법은 표준액 0.5 µg/mL, 1.0 µg/mL, 2.5 µg/mL로 절대검량선을 작성하였다. 부피개념의 내부표준법은 외부표준법과 같은 방법으로 하되 표준액에 내부표준물질인 malathion을 10 µg씩 첨가하여 정확히 10 mL로 하였다. 중량개념의 내부표준법은 parathion 5 µg, 10 µg, 25 µg과 내부표준물질인 malathion을 10 µg씩 각각 시험관에 첨가 후 3 mL, 8 mL, 5 mL로 하여 상대검량선을 작성하였다(Fig. 1).

2.4. 전처리 및 분석

먹는물 수질공정 시험방법을 참고하여, 시료 500 mL를 1 L 분액깔때기에 취하고 NaCl 약 5 g을 넣어 녹인 다음 염산(1+1)을 넣어 산성으로 하였다. 추출용매인 hexane 40 mL를 넣어 3분간 강하게 흔들어 섞은 다음 물 층을 버리고, 증류수 10 mL씩 넣어 세척하였다. 물로 세척한 추출액을 여지에 여과하여 농축하였다. 외부표준법은 최종농축액을 5 mL로 정확히 맞추고, 부피개념과 중량개념의 내부표준법은 대략 5 mL로 하였으며, 1 µL를 주입하여 GC-NPD로 분석하였다.¹¹⁾

3. 결과 및 고찰

증류수에 분석대상 표준물질인 parathion과 내부표준물질인 malathion을 적용하여 GC-NPD로 분석하였고, 외부표준법과 부피개념 및 중량개념 내부표준법의 결과 값을 다음과 같이 비교하였다.

3.1. 외부표준법에 의한 분석

시료(증류수) 500 mL에 parathion 표준물질을 첨가하여 0.02 µg/mL가 되도록 하고, 전처리 후 분석하였다. Fig. 2와 같이 parathion은 25.5분대에 peak가 나타났고, Table 1과 같이 0.013404 µg/mL의 결과값을 나타내었다.

3.2. 부피개념을 적용한 내부표준법 분석

시료 500 mL에 parathion과 내부표준물질인 malathion을 첨가하여 각각 0.02 µg/mL가 되도록 하고, 전처리 후 분석하였다. Fig. 3와 같이 parathion은 25.5분대에, malathion은 25.1분대에 peak가 분석되었고, Table 1과 같이 0.014360 µg/mL의 결과값을 나타내었다.

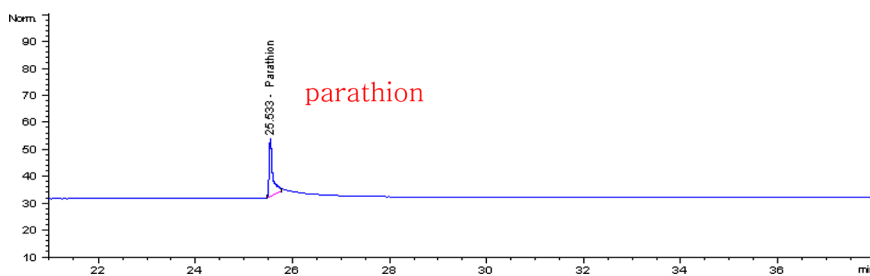


Fig. 2. Chromatogram of the external standard method.

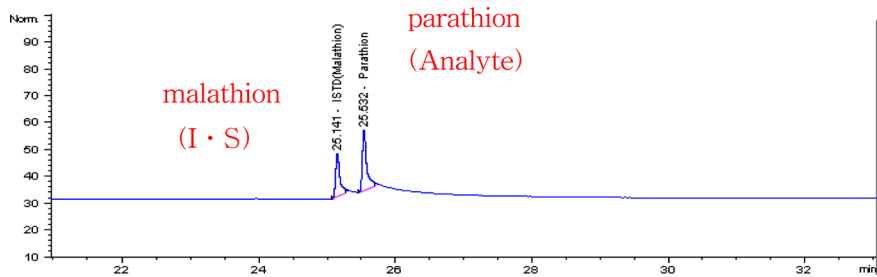


Fig. 3. Chromatogram of the internal standard method of volume.

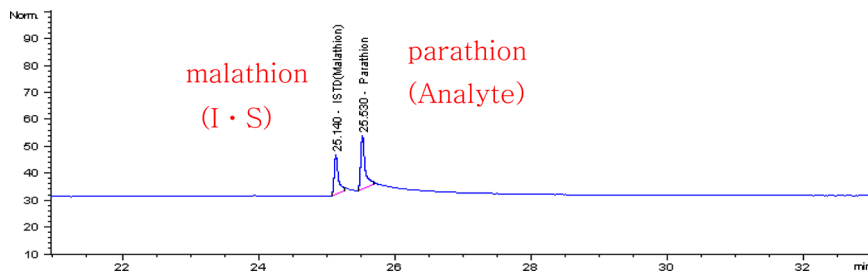


Fig. 4. Chromatogram of the internal standard method of weight.

3.3. 중량개념을 적용한 내부표준법 분석

시료의 표준물질, 전처리 및 분석방법은 부피개념의 내부표준법과 동일하게 실시하였다. 피크의 머무름 시간은 역시 동일하며(Fig. 4), Table 1과 같이 0.014638 $\mu\text{g/mL}$ 의 결과값을 나타내었다.

3.4. 각 표준방법에 따른 비교 분석

표준방법별 평균 결과값은 내부표준법이 외부표준법보다 참값 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 에 근접하였다. 이것은 내부표준물질이 전처리 과정 중에서 분석대상물질과 함께 손실이 생긴 현상을 결과값에서 분석대상물질의 감응값(피크의 면적값)에 보정을 해주었기 때문이라고 할 수 있다. 검량선의 R^2 값은 모두 비슷한 수준을 나타내었고, RSD는 내부표준법이 낮게 나타났다(Table 1). 따라서 내부표준법에 의해 시료를 전처리해서 나온 결과값은 단순히 전처리만의 영향뿐만 아니라 내부표준물질의 영향도 포함되어 있다고 할 수 있다. Table 2는 동일한

시료에 대상물질을 첨가하고 외부표준법과 내부표준법을 동시에 적용했을 때 결과값을 비교한 것이다. 내부표준법이 참값 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 에 더 근접하였고, RSD 역시 낮게 나타났다. 서론에서 언급한 바와 같이 주입된 시료의 부피 변화에 내부표준법이 불확정성을 피할 수 있다고 했는데, 본 연구에서는 그 뿐만 아니라 시료의 전처리 과정에도 내부표준물질의 보정값이 정확도 향상에도 기여한다는 사실을 확인하였다.

따라서 내부표준물질을 최종 검액에 첨가하는 경우보다는 전처리 전에 첨가하여 전처리에서 발생할 수 있는 손실까지 보정하는 방법이 바람직하다고 사료된다. 반면, 외부표준법은 전처리과정에서 생기는 분석대상물질의 손실을 내부표준물질로써 보정을 해주지 않았기 때문에 내부표준법 보다는 정확성에서 떨어지는 것으로 나타났다. 김 등⁸⁾의 잔류농약 파라티온 시험결과를 보면 GC-NPD를 이용하여 외부표준법으로 분석하여 RSD가 1.778을 나타내었다. GC/NPD시료의 전처리 조

Table 1. Result of the external standard, the internal standard of volume and weight

Methods	Number of samples	Value ($\mu\text{g/mL}$)			Correlation (R^2)	RSD
		True	Mean	Accuracy		
External standard	7	0.02	0.013404	67%	0.99774	1.437
Internal standard (volume)	7	0.02	0.014360	72%	0.99898	1.376
Internal standard (weight)	7	0.02	0.014638	73%	0.99777	1.316

Table 2. Comparison of the external standard method and the internal standard method in the same sample

Methods	Number of samples	Value (µg/mL)			Correlation (R ²)	RSD
		True	Mean	Accuracy		
External standard	7	0.02	0.012575	63%	0.99788	6.562
Internal standard	7	0.02	0.014360	72%	0.99898	1.376

건이 본 시험과는 다른 점이 있어 정확성 비교는 어려우나, RSD면에서는 본 연구의 내부표준법(RSD 1.316~1.376)이 낮게 나타냄을 확인할 수 있었다.

시료 전처리 및 분석은 3가지 방법 동일하게 실시하였으나, 결과 산출방법은 Fig. 5와 같이 외부표준법과 내부표준법이 서로 상이하였다. 외부표준법에서 농도는 각 피크의 검량선 작성 즉, 피크면적을 목적성분의 무게로 나누어 절대감응인자를 산출하고, 시료의 피크면적을 감응인자(CF)로 나누어 주입된 시료내의 목적성분의 절대량을 구한 후, 사용된 시료량으로 나누어 시료의 농도를 산출하였다. 내부표준법에서 농도는 내부

표준물질과 분석대상물질의 무게비를 X축에 감응비를 Y축으로 하여 기울기인 상대감응계수(RRF)를 산출한 후, 시료의 상대감응비에 내부표준물질의 첨가량을 곱하고, 평균 상대감응인자(RRF)로 나누어 시료에 함유된 목적성분의 무게를 산출하였다. 마지막으로 검량식으로부터 산출한 목적성분의 무게를 시료량(부피 혹은 무게)으로 나누어 시료의 농도를 산출하였다.¹⁰⁾

먹는 물 기준 유기인계 농약류의 효율적인 분석조건을 찾기 위해 내부표준법을 적용하였다. 내부표준법은 외부표준법보다 실험의 정확성과 정밀도면에서 우수하였다. 또한 외부표준법과 부피개념의 내부표준법은 대

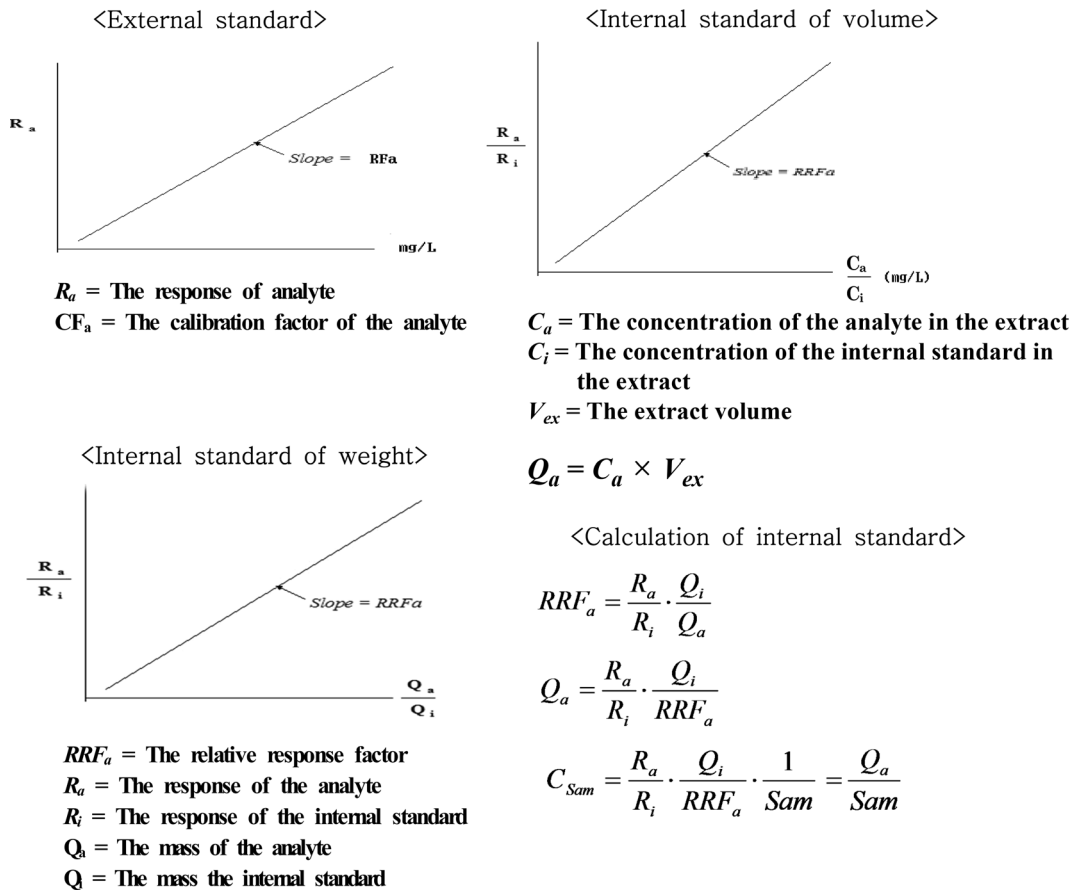


Fig. 5. Calibration curve of the external standard method versus the internal standard methods.

Table 3. Uncertainty comparison of the external standard method with the internal standard method of weight related to 10 mL volume of the flask (95% confidence level, $k = 2.87$)

Uncertainty	External Standard	Internal standard of weight	Remarks
Calibration	0.03 mL ^a	-	Type B uncertainty
Repeatability	0.00028 g	-	Type A uncertainty
Expanded uncertainty	0.00415	0.00414	-

^aThis result was measured ten times on the basis of measurement uncertainty of EURACHEM/CITAC Guide.

상표준물질을 용매에 녹일 때 플라스크의 눈금을 목측으로 정확히 맞추는데 고도의 집중력이 필요하였다. 그러나 중량개념의 내부표준법은 대상표준물질의 무게를 내부표준물질의 무게로 나누어 보정해주기 때문에 전체 용매의 부피는 고려하지 않았다. 따라서 용매의 양은 중요하지 않고 단순히 대상표준물질과 내부표준물질만을 녹일 수 있을 정도만 필요하였다. 부피를 정량하기 위해 플라스크의 눈금을 정확히 맞추는 과정을 생략하고 실험자에 따라 다른 시각기준을 고려하지 않아도 되기 때문에 불확도 감소 및 시간단축과 실험자 오류를 줄일 수 있었다. Table 3는 외부표준법과 중량개념의 내부표준법의 불확도를 비교한 결과이다. 부피를 정확히 맞춰야 하는 외부표준법의 경우, 교정(Calibration) 및 반복측정(Repeatability) 불확도를 고려해야 하기 때문에 전체 확장불확도값이 0.00415를 나타내었고, 중량개념의 내부표준법에서는 교정 및 반복측정 불확도에 상관없이 0.00414를 나타내어 0.24%의 차이를 보였다. 이 차이값은 비록 작지만, 복잡한 회색 단계 및 부정확한 초차기구가 원인일 때 중대한 차이값을 나타낼 수 있다.

EPA Method 내에서도 최종부피를 알아야 하는지에 대해 다양한 의견이 있는데, 본 연구를 수행함으로써 부피와는 상관없이 중량개념의 내부표준법을 적용하여 정확한 결과값을 얻을 수 있었다.

4. 결 론

수중 유기인계 잔류농약을 외부표준법과 내부표준법으로 구분하여 상호 비교를 위해 대상물질에 대한 정량분석을 하였다. 내부표준법은 부피개념과 중량개념으로 구분하여 시험하였다. 외부표준법 결과는 0.013404 µg/mL(RSD : 1.437)이고, 부피개념의 내부표준법은 0.014360 µg/mL(RSD : 1.376)이었으며, 중량개념의 내부표준법은 0.014638 µg/mL(RSD : 1.316)을 나타내었다. 정확도 면에서 외부표준법 결과는 참값에 대하

여 67%이고, 부피개념의 내부표준법은 72%이었으며, 중량개념의 내부표준법은 73%였다. 외부표준법보다는 내부표준법이 정확성과 정밀성에서 우수함을 나타내었다. 시험결과에서 정확도와 정밀도가 가장 좋은 중량개념의 내부표준법은 표준물질을 용매에 녹일 때 용매의 부피에 상관없이 무게의 양만으로 검량선을 작성하기 때문에, 플라스크 자체에 발생되는 불확도 요인을 차단할 수 있고 시간을 단축할 수 있었다.

참고문헌

1. Douglas A. Skoog, 박기채, “기기분석의 원리”, 2개정판, 1991, 15, 탐구당.
2. 박기채, “분석화학”, 1996, 517-518, 연구당.
3. 최규철, 권오역, 김용대, 김용환, 이우식, 이정연, 전세진, 정수경, “수질오염공정시험방법주해”, 2000, 134-135, 동화기술.
4. 한국화학시험연구원, “측정불확도”, 2007, 11, 한국화학시험연구원.
5. SLR Ellison, M Rosslei and A Willams, “Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement” 2nd Ed., 2000, 4, EURACHEM / CITAC Guide.
6. Method 1613, Revision B, EPA Document number : EPA821/B-94-005, 1994, “Tetra-through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS” U.S Environmental Protection Agency.
7. Method 1668, Revision A, EPA Document number : EPA/821/R-00-002, 1999, “Chlorinated Biphenyl Congeners in Water, Soil, Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS” U.S Environmental Protection Agency.
8. Method 23, Revision 1, 1996, “Sampling Method for Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Polychlorinated Dibenzofuran Emissions from Stationary Sources” U.S Environmental Protection Agency.
9. Method 8290, Revision 0, 1994, “Polychlorinated Dibenzodioxins (PCDDs) and Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) by High-Resolution Gas Chromatography/High-Resolution Mass Spectrometry(HRGC/HRMS).

10. Method TO-9A, EPA Document number : EPA/625/R-96/010b, **1997**, “Compendium of Method for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air” 2nd Ed., U.S Evironmental Protection Agency.
11. 환경부, **2007**, 먹는물수질공정시험방법.
12. 김우성, 이선화, 김상엽, 정동윤, 김재이, 이영자, 이홍재, 정성욱, 박홍재, “GC/NPD를 이용한 다성분 잔류 농약의 동시분석”, *J. of the Environmental Sciences* 한국환경과학회지 제12권(제10호), 41, **2003**, 1117-1120.