

애질런트 Ultivo Triple Quadrupole LC/MS를 이용해 복잡한 식품 시료의 다성분 잔류 농약 스크리닝 및 정량

저자

Dan-Hui Dorothy Yang,
Mark Sartain,
Theresa Sosienski 및
Patrick Batoon
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

개요

본 응용 자료는 식품 시료에서 250가지 이상의 농약과 그 대사물질의 측정을 위한 UHPLC/MS/MS 기반 다중 잔류물 분석법을 소개합니다. 이 분석법은 다음과 같은 장점을 가집니다:

- Agilent 1290 Infinity II UHPLC 시스템의 높은 크로마토그래피 분리능
- Agilent Jet Stream 이온화원의 다양한 이온화 기능
- 애질런트 Ultivo Triple Quadrupole LC/MS 시스템에 구현된 혁신 기술, 기기 설치 공간을 줄이면서도 분석 감도 유지

분석법은 아보카도와 홍차 같은 복잡한 시료의 농약 잔류물 분석에 적용되었습니다.

결과는 대부분의 화합물이 우수한 정밀도로 매트릭스의 최대 잔류 수준(MRL) 아래로 정확하게 정량될 수 있음을 보여줍니다. Ultivo LC/TQ는 훨씬 작은 설치 공간과 간단한 유지보수로 인해 일상적인 농약 잔류물 테스트에 가장 적합한 선택입니다.

소개

식품에서 잔류 농약의 스크리닝과 정량은 식품 안전에 가장 중요하고 까다로운 응용 작업 중 하나입니다. 규제 기관은 식품에서 수백 가지의 농약과 그 대사물질에 대해 최대 잔류 수준(MRL)을 규정해 놓았습니다¹. 대부분의 MRL은 낮은 ppb(part-per-billion) (ng/g) 수준으로 설정되어, 복잡한 매트릭스에서 수백 가지의 분석물질을 스크리닝하고 정량해야 하는 큰 과제를 안고 있습니다. 그러므로, 농약 잔류물을 확실하게 정량하려면 신뢰할 수 있는 분석 기기와 분석법이 필요합니다. 일반적으로, LC/MS/MS 또는 GC/MS/MS에 기반한 다성분 잔류물 분석법이 사용됩니다. 농약 잔류물의 식별을 위한 기준, 분석법 확인을 위한 요구사항, 그리고 정량을 위한 품질 관리 절차는 SANTE/11813/2017²과 같은 지침 문서에 규정되어 있습니다.

애질런트 Ultivo Triple Quadrupole LC/MS는 특히 환경 및 식품 안전 분야에서 일상적인 생산 실험실이 직면하는 많은 과제를 해결하기 위해 고안되었습니다. Ultivo LC/TQ에 구현된 혁신적인 기술을 이용해 훨씬 더 큰 MS 시스템과 동등한 성능을 유지하면서도 전반적으로 설치 공간을 줄일 수 있습니다. 작은 기기에 Cyclone Ion Guide, Vortex Collision Cell 및 Hyperbolic Quad와 같은 혁신 기술이 탑재되어 정량 성능을 극대화할뿐 아니라 더 긴 가동 시간을 촉진하면서 기기 신뢰성과 견고성을 높여 줍니다. VacShield를 이용한 Ultivo는 시스템 유지보수를 위한 사용자 작업 필요성을 줄이면서, 전문가 외 분석자도 시스템 작동과 유지보수를 할 수 있습니다. 애질런트 MassHunter 소프트웨어는 데이터 수집, 분석법 설정, 데이터 분석 및

보고 과정을 단순화하여, 수집부터 보고까지 시간을 최대한 단축하고 실험실 생산성을 높여 줍니다.

이 응용 자료는 식품 시료 내 251가지 농약의 스크리닝과 정량을 소개합니다. Agilent 1290 Infinity II UHPLC 시스템은 빠른 극성 전환이 가능한 dynamic MRM 모드로 작동하는 Ultivo LC/TQ 시스템과 결합되었습니다.

실험

시약 및 화학물질

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 LC/MS 등급이었습니다. 아세트오닐트릴과 메탄올은 Honeywell(Morristown, NJ, USA)에서 구매했습니다. 초순수는 LC-Pak Polisher 및 0.22µm POU(point-of-use) 멤브레인 필터 카트리지(EMD Millipore, Billerica, MA, USA) 및 Milli-Q Integral 시스템을 이용해 생성되었습니다. 포름산은 Fluka(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)에서 구매했으며 포름산 암모늄 용액(5M)은 애질런트(p/n G1946-85021)에서 입수되었습니다. 농약성분은 애질런트 종합 농약 혼합물(p/n 5190-0551)에 포함되었습니다. 종합 농약 혼합물의 8가지 하위 혼합물을 조합하고 추가로 아세트오닐트릴을 이용해 희석하여 10µg/mL의 농도로 251가지 농약을 포함하고 있는 최종 농약 작업 용액을 만들었습니다. 이 용액은 QuEChERS 추출물에 스파이킹하기 위해 사용되었습니다. 1ng/g ~ 100ng/g의 농도 범위에서 6가지 검량 시료가 준비되었습니다(1, 5, 10, 20, 50 및 100ng/g).

시료 전처리

유기 홍차, 아보카도, 브로콜리 및 오렌지는 현지 식품점에서 구입했습니다. 시료는 구연산염 버퍼화 QuEChERS 프로토콜에 따라 애질런트 BondElut QuEChERS 키트(p/n 5982-5650)를 이용해 추출되었습니다. 10g의 균질화된 과일과 야채 또는 2g의 차를 50mL 폴리프로필렌 튜브에 넣고, 10mL의 아세트오닐트릴을 추가해 강하게 흔들어서 추출했습니다. 추출 전에, 차 시료를 8mL의 초순수에 담갔습니다. 오렌지 원액은 1기 2기 아민(p/n 5982-5058)을 포함하는 Dispersive SPE(dSPE)에 의해 정제되었습니다. 브로콜리 추출물은 색소 제거를 위해 graphitized carbon(p/n 5982-5256)을 사용하는 dSPE 키트를 이용해 정제되었습니다. 홍차 추출물은 높은 색소 시료 때문에 graphitized carbon을 포함하는 Dispersive Kit를 이용해 정제되었습니다(p/n 5982-5356CH). 아보카도 추출물은 애질런트 EMR-Lipid(p/n 5982-1010)를 이용한 다음 Polish 단계(p/n 5982-0101)를 거쳐 정제되었습니다. 비유기농 브로콜리, 오렌지 및 아보카도 추출물은 해당 유기농 시료와 동일한 방법으로 전처리되었습니다.

실험 기기

분리 과정은 다음으로 이루어진 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 시스템을 이용해 수행되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity 고속 펌프 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler, 시료 냉각기 포함(G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat(G7116B)

UHPLC 시스템은 애질런트 Jet Stream 전기분무 이온화원이 장착된 애질런트 Ultivo Triple Quadrupole LC/MS 시스템과 결합되었습니다.

분석법

표 1에서 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 조건이 나타납니다. 표 2는 Ultivo Triple Quadrupole 파라미터와 Agilent Jet Stream(AJS) 전기분무 이온화원 파라미터를 나열합니다. 분석은 양이온 및 음이온 전기분무 이온화와 Dynamic Multiple Reaction Monitoring(dMRM)을 이용해 수행되었습니다.

데이터는 Quant-My-Way 기능을 가진 애질런트 MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 B.09를 이용해 평가되었습니다. 1/x 가중을 이용해 직선 검량선이 생성되었습니다.

표 1. Agilent 1290 Infinity II UHPLC 파라미터

파라미터	값																
컬럼	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 3.0 × 150 mm, 1.8 μm (p/n 959759-302)																
컬럼 온도	45 °C																
주입 부피	2 μL																
Autosampler 온도	6 °C																
이동상	A) 4.5 mM ammonium formate + 0.5 mM ammonium fluoride + 0.1 % formic acid in water B) 4.5 mM ammonium formate + 0.5 mM ammonium fluoride + 0.1 % formic acid in methanol																
유속	0.45 mL/min																
그라디언트 프로그램	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>B %</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>65</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	B %	0	2	0.5	2	1	50	4	65	16	100	18	100	18	12
Time (min)	B %																
0	2																
0.5	2																
1	50																
4	65																
16	100																
18	100																
18	12																
정지 시간	20																
사후 시간	1.5																

표 2. 애질런트 Ultivo Triple Quadrupole 및 애질런트 Jet Stream 이온화원 파라미터

파라미터	값
이온 모드	Agilent Jet Stream을 이용한 양이온 및 음이온 ESI
스캔 유형	Dynamic MRM
건조 가스 온도	250 °C
건조 가스 유량	11 L/min
Sheath 가스 온도	350 °C
Sheath 가스 유량	12 L/min
Nebulizer 압력	40 psi
캐필러리 전압	3,500(양/음)
노즐 전압	300 V(양); 1,000 V(음)
주기 시간	650 ms
총 MRM	883
최소 머무름 시간	5.45 ms
최대 머무름 시간	215.84 ms
MS1 및 MS2 분리능	Unit

결과 및 토의

분석법 감도

AJS 이온화원 파라미터는 대부분 대상 화합물이 더 많이 존재하도록 애질런트 MassHunter Source Optimizer 소프트웨어를 이용해 최적화되었습니다. 이 연구에서 Fragmentor 전압과 충돌 에너지와 같은 화합물 관련 파라미터는 추가적인 최적화 없이 Agilent 6460 LC/TQ의 기존 분석법으로부터 Ultivo LC/TQ로 이전되었습니다.

그림 1은 5ng/g에서 홍차 추출물 내 251 가지 농약에 대한 신호 반응이 상당히 잘 나타나 있습니다. 대부분의 화합물은 이 농도에서 검출되었으며 이는 1/2 MRL 또는 1ng/mL에 해당합니다. Ultivo에 적용된 혁신 기술은 감도 높은 검출을 위해 중요한 요소입니다.

양호한 신호 반응 때문에, 대부분의 화합물은 매트릭스에서 1ng/g으로 검출되었으며 (1/10 MRL에 해당), 최소 4회 반복 주입의 정확도가 80-120%였습니다. 더 높은 농도에서 추가적인 분석물질을 검출할 수 있었습니다(그림 2). 하나의 화합물이 양 및 음 이온화 모드에서 검출되었으며, 2개의 개별 측정으로 계산되었습니다.

분석법 정밀도

Cyclone Ion Guide, Vortex Collision Cell 및 Hyperbolic Quad를 이용해 폭 넓은 m/z 범위 사이에 일관된 이온 전송을 가능하게 합니다. 이 일관성은 우수한 분석 정밀도를 구현합니다. 각 농도 수준에서 6회 주입이 실시되었습니다. 최저 농도에서 각 화합물에 대해 %RSD가 계산되었으며, 6회 반복 주입 중 최소 4회에 대해 80-120%의 정확도로 정량할 수 있었습니다. 대부분의 화합물은 10% 이하의 %RSD를 가졌습니다(그림 3).

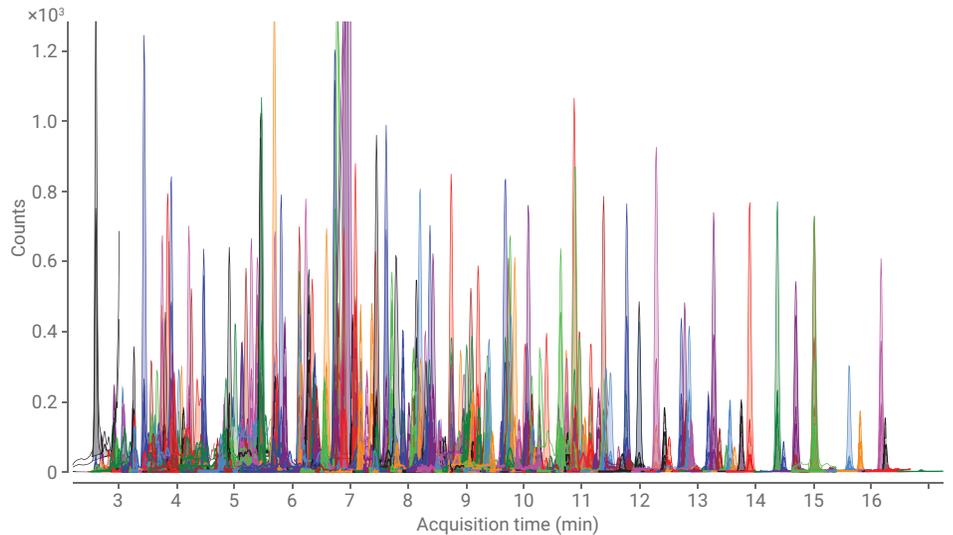


그림 1. 5ng/g로 홍차에 첨가된 251가지 농약의 크로마토그램(1ng/mL의 농도에 해당)

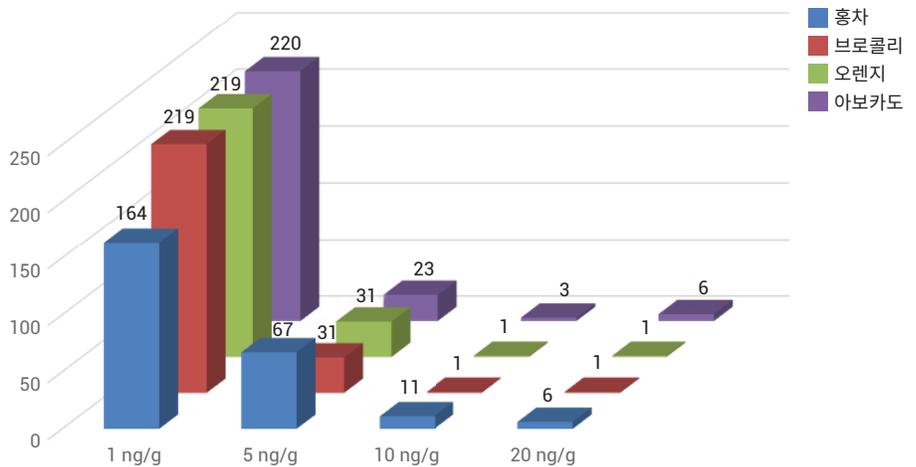


그림 2. 1ng/g에서 정확하게 정량될 수 있는 화합물 수. 더 높은 농도에서 추가적인 화합물을 정량 가능

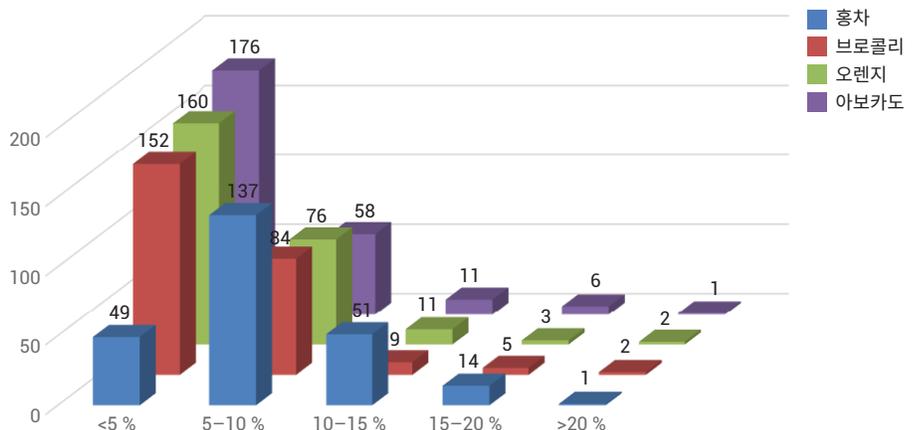


그림 3. 서로 다른 시료에서 %RSD 분포. 분석물질을 정확히 정량할 수 있는 최저 농도에서 %RSD가 계산되었습니다

실제 시료

비유기농 아보카도, 브로콜리 및 오렌지 시료는 해당 유기농 시료와 동일한 방법으로 전처리되었습니다. 대부분의 검량 곡선은 R^2 가 0.99이상이므로 정확한 시료 정량을 가능케 합니다. 아보카도에서 농약을 검출할 수 없었지만, 오렌지와 브로콜리에서는 MRL 수준에서 혹은 그 이상에서 각각 3개와 7개의 농약이 검출되었습니다(그림 4 및 5). 브로콜리에서는 검량선의 범위를 초과하는 농도에서 dimethomorph,

azoxystrobin 및 mandipropamid가 검출되었으며, 각각 592ng/g, 493ng/g 및 154ng/g의 농도였습니다. 점선은 그림 4와 그림 5의 그래프에서 검량 표준물질에 따라 예상된 Qualifier 범위를 나타냅니다. 시료 내 모든 농약은 높은 신뢰성으로 검출되었습니다. 일부 오염된 식품이 소비자에게 판매되었음이 증명되었습니다. 산업 및 식품 테스트 실험실에서 기술 혁신을 통해 식품을 안전하게 지키기 위해 함께 노력하는 일은 어려운 과제입니다.

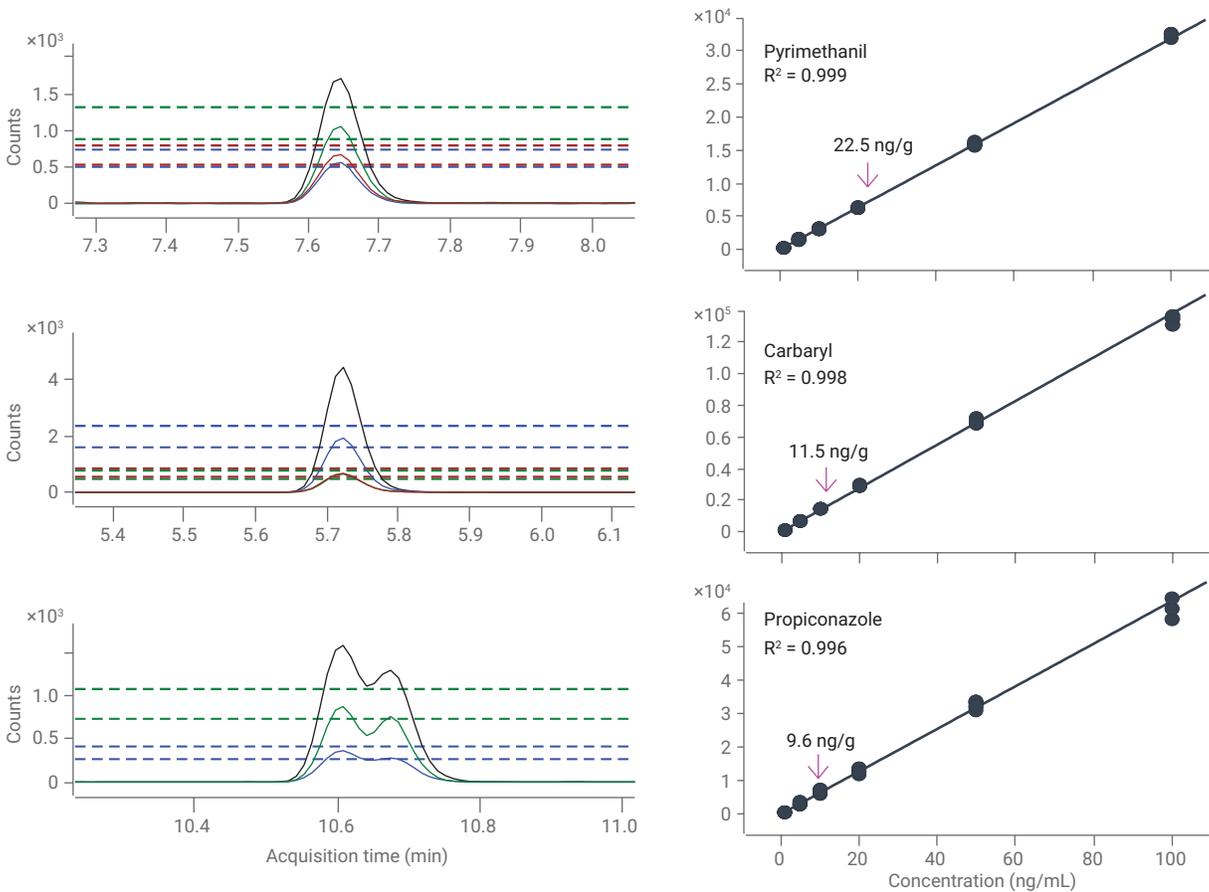


그림 4. 비유기농 오렌지 내 MRL로 또는 그 이상으로 검출된 농약성분

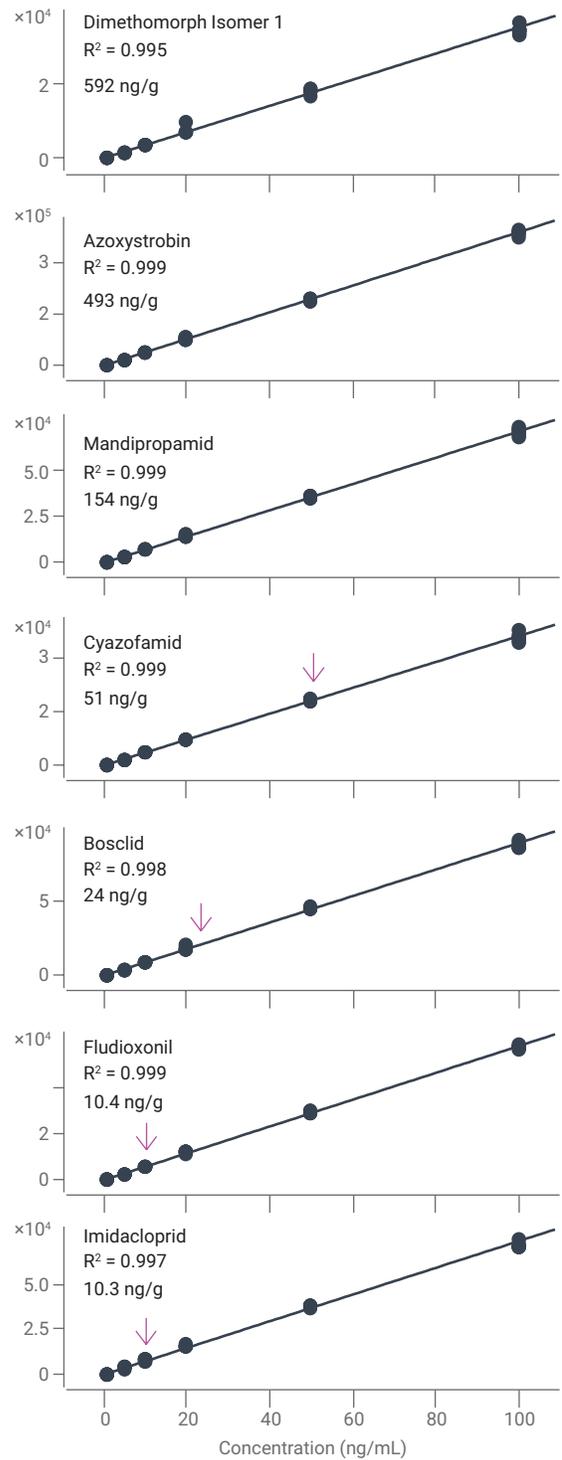
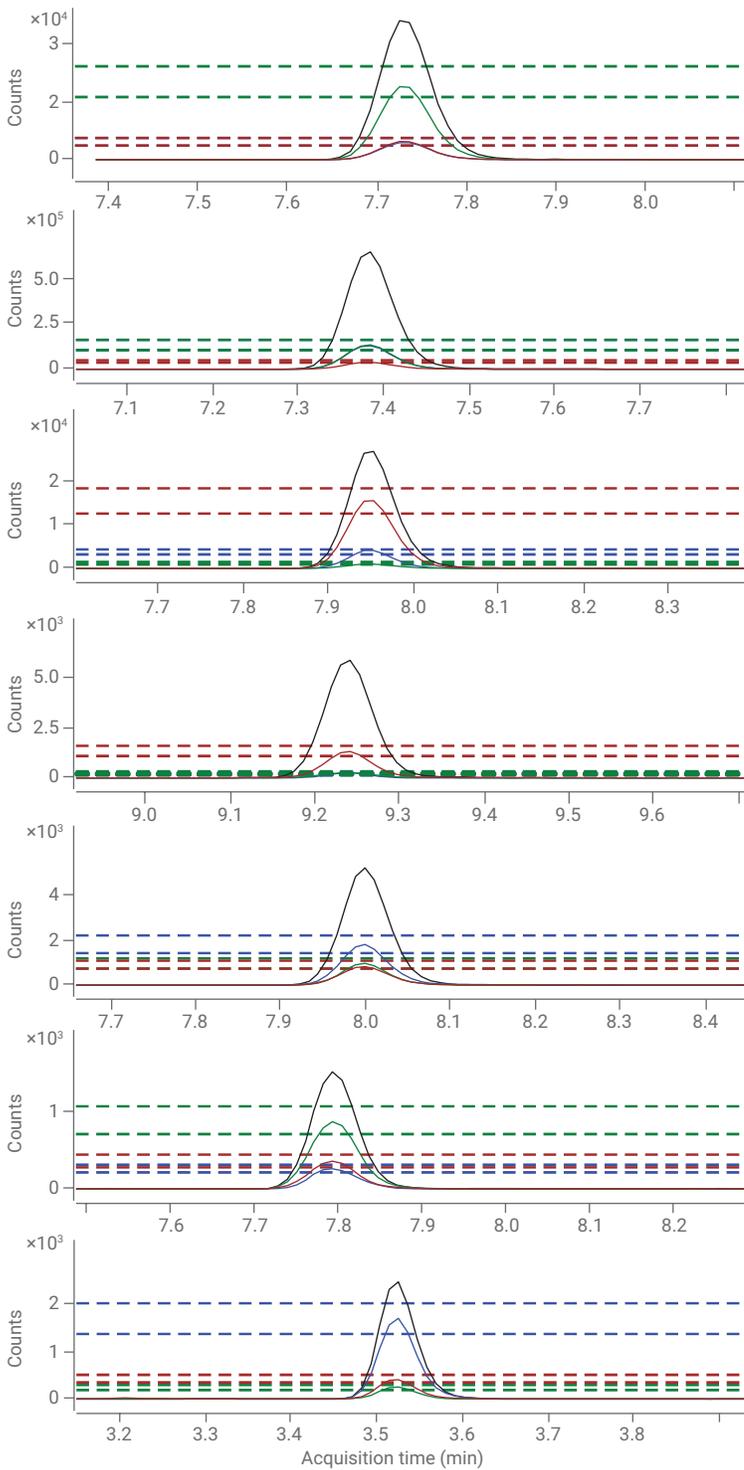


그림 5. 비유기농 브로콜리 내 MRL로 또는 그 이상으로 검출된 농약성분

결론

애질런트 Ultivo Triple Quadrupole LC/MS 시스템은 복잡한 식품 매트릭스 내 다중 농약 잔류물의 분석에 적합합니다. Ultivo Triple Quadrupole LC/MS 시스템에 구현된 기술 혁신은 비전문 LC/MS 사용자를 위한 고급 기능을 갖춘 일상적인 생산성 실험실에 적합한 안정적 검출과 간편한 유지보수를 제공합니다. Quant-My-Way는 사용자 요구에 기초한 데이터 분석을 효율화하여 시료부터 분석까지 시간을 단축합니다. 더불어, 시료 전처리, 데이터베이스 및 보고를 포함한 애질런트 종합 워크플로 솔루션으로 식품 안전 분석에서 빠른 분석법 개발과 확인이 용이합니다.

참고문헌

1. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin (including amendments as of 18 March 2008) and complying with regulation (EC) 1107/2009.
2. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues and analysis in food and feed, SANTE/11813/2017, 21-22 November 2017. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2017
2017년 12월 19일, 한국에서 인쇄
5991-8820KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

