SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. C220AK

Liquid Chromatography Mass Spectrometry

식품 중 글리포세이트, 글리포시네이트, 아미노메틸포스폰산 정량을 위한 새로운 전략 : 바이알 내 페어링 시약 추가

New Strategy for Glyphosate, Glufosinate, and AMPA quantification in food : In-vial addition of pairing agent

❑ 연구 배경

글리포세이트(Glyphosate)와 글루포시네이트(Glufosinate)는 주로 곡물 및 채소 작물에서 잡초 제거제로 사용되는 농약 성분이다. 글리포세이트는 식물의 광합성 기능에 필수적인 아미노산 전구체의 합성 사슬을 차단하는 역할을 한다. 세계보건기구(WHO)에서는 2015년에 글리포세이트와 주요 대사산물인 아미노메틸포스폰산(AMPA)을 발암 가능성이 있는 물질로 분류하였다.[1)]

글리포세이트, 글루포시네이트 및 아미노메틸포스폰산은 친수성 및 이온성 특징을 가지고 있기 때문에, 환경과 식품 분야에서 모니터링을 위한 다종 잔류물질 분석이 어렵고, 비용이 비싸다는 단점이 있다.

현재, 해당 성분의 분석을 위해 다양한 분석 기술이 사용되고 있다. 이 중, 일부 분석은 FMOC와 같은 활성 시약을 사용하여 유도체화를 하지만, 이 유도체화 단계는 해당 성분의 정량을 복잡하게 만든다. 이와 같은 이유로 음이온 교환, 친수성 상호작용 액체크로마토그래피 (HILIC), 다공성 흑연 탄소 및 혼합 모드 컬럼과 같은 다른 방법을 사용하여 식품 중 유도체화 하지 않은 글리포세이트와 다른 극성 농약을 LC-MS/MS를 이용하여 검출하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 이러한 방법 또한 성공이 제한적이다.[2)]

이 뉴스레터에서는 페어링 시약을 바이알 안에 추가하는 방법을 통해 역상 크로마토그래피를 이용하여 분리 및 정량이 가능한 새로운 분석법을 소개한다. 일반적인 이온 페어링 기술은 이동상에 많은 양의 페어링 시약이 사용되기 때문에 경쟁적인 이온화로 인해 감도가 감소하며, LC-MS/MS 시스템의 오염으로 인해 기기 세척 빈도가 증가하는 문제가 있다. 이 새로운 방법은 이온 페어링 시약을 사용하지만, 125 nmol의 매우 적은 양을 바이알에 추가하는 방식으로 사용하기 때문에 단점없이 이온 페어링 방법의 이점을 유지할 수 있다.

D. Toinon

1) http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Glyphosate_2016_02_10.pdf
2) https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPe_PO_V11(1).pdf

❑ 시험방법

이 응용 분석자료는 식품 중 글리포세이트, 글루포시네이트 및 아미노메틸포스폰산에 대해 페어링 시약을 바이알 내에 추가하는 방법으로 분석한 내용을 정리한 것이다. 이 방법은 역상 조건에서 이온 페어링 시약의 단점 없이 우수한 머무름 시간, 분리도 및 감도를 나타내었다.

이 방법은 과일에서는 50 µg/kg, 다른 매질에서는 100 µg/kg 미만을 하한으로 정하여 정량할 수 있도록 목표를 설정하였다.

액체 크로마토그래피 Nexera™ X2 와 질량 분석기 LCMS™-8060을 이용하여 네거티브 모드에서 다중반응모니터링 (Multiple Reaction Monitoring, MRM)으로 글리포세이트의 경우, 167.9>62.9, 167.9>78.9, 아미노메틸포스폰산은 110.0>62.9, 110.0>78.8, 그리고 글리포시네이트는 179.9>63.0, 179.9>85.0 로 설정하여 진행하였다. 자세한 조건은 <표 1>에 나타내었다.

표 1. 분석 조건

Chromatography liquid	
Column	: Shim-pack Scepter™ Phenyl-120 Metal Free (100 mm × 2.1 mm I.D., 3 µm) (227-31093-02)
Mobile phase A	: Water
Mobile phase B	: Acetonitrile
Flow rate	: 0.4 mL/min
Column temp.	: 50 ℃
Injection volume	: 5 µL
Gradient (min)	: 0 %B (0.0-0.2 min)- 100 %B (3.1-4.0 min)- 0 %B (4.1-7.0 min)
Mass spectrometry	
System	: LCMS-8060
Interface	: Electrospray (ESI)
Nebulizing gas	: 3 L/min
Drying gas	: 5 L/min
Heating gas	: 15 L/min
Desolvation line	: 300 ℃
Heat block temp.	: 500 ℃
Interface	: 350 ℃
CID gas	: 325 kPa
Interface voltage	: -5 kV

검정곡선

검정곡선은 글루포세이트, 글루포시네이트 및 아미노메틸포스폰산 혼합표준용액과 디아밀암모늄아세테이트(Diamylammonium acetate, DAAA) 용액으로 조제하였다.

20 µg/mL 혼합표준용액은 FUJIFILM Wako Pure Chemical(Osaka, Japan)에서 구매하였으며, 0.5 mol/L 농도로 물에 용해되어 있는 디아밀암모늄아세테이트 표준용액은 TCI(Tokyo, Japan)에서 구매하였다. 디아밀암모늄 아세테이트는 최종 농도가 50 mmol/L이 되도록 아세토니트릴로 10 배 희석하여 조제하였다.

3개의 농약성분은 물로 희석하여 1000, 100, 10 ng/mL로 중간 용액을 조제하였으며, 다시 메탄올로 희석하여 0.4, 1, 2, 4, 10, 20, 100, 200 ng/mL의 8 개 농도로 만들었다. 마지막으로 조제된 용액들을 50 mmol/L 디아밀암모늄 아세테이트 용액으로 각각 2 배 희석하였다.

시료의 준비

쌀, 밀가루, 보리, 귤 4 종류의 식품을 아래의 전처리 방법을 이용하여 전처리하고 분석하였다. 액체 추출 및 페어링 시약으로 희석하는 주요 단계를 <그림 1>에 나타내었다. 쌀, 밀가루, 보리는 100 µg/kg, 귤은 50 µg/kg 이 되도록 표준 혼합용액을 첨가하여 3개의 시료를 제조하고, 표준 혼합용액을 첨가하지 않은 1개의 시료를 제조하여 시료를 각각 추출하였다.

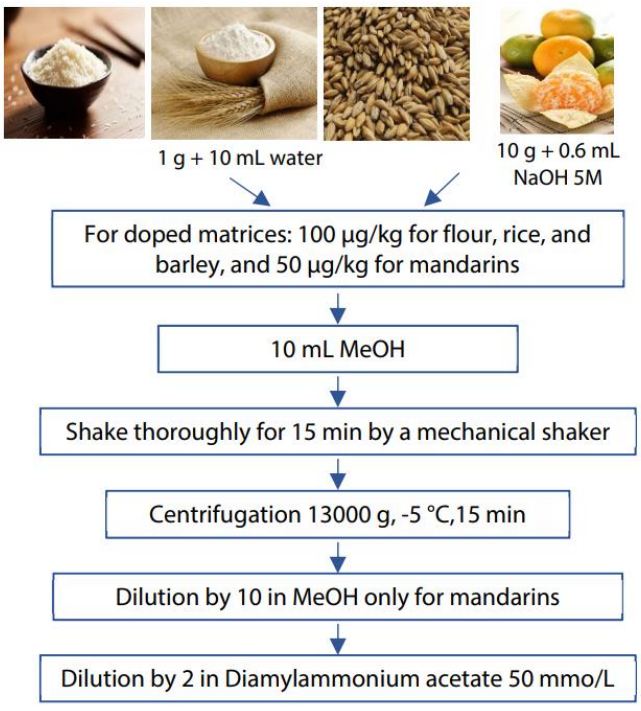


그림 1. 시료의 준비

❑ 결과 및 토의

검정곡선 데이터

페어링 시약을 바이알 내에 추가하는 방법에 따른 해당 농약성분의 분석은 <그림 2>에서 보는 것과 같이 역상 LC 조건인 페닐 컬럼에서도 좋은 분리능을 보였다. 검량선은 <그림 3>과 같이 우수한 직선성을 보였으며, 회귀 인자(r^2)는 0.99 이상, 정확도는 85 % - 115 % 로 나타났다.

정량한계

용액에서의 정량한계는 글루포시네이트, 아미노메틸포스폰산 및 글리포세이트에 대해서 각각 0.1, 0.15, 그리고 0.2 ng/mL로 산출되었다.

식품에 100 µg/kg 및 50 µg/kg을 첨가한 시료의 분석에서도 <그림 4>와 같이 우수한 감도의 피크를 보이는 것으로 나타났다. 따라서, 쌀, 밀가루, 보리 시료의 정량한계는 100 µg/kg 미만, 귤 시료의 정량한계는 50 µg/kg 미만으로 볼 수 있다.

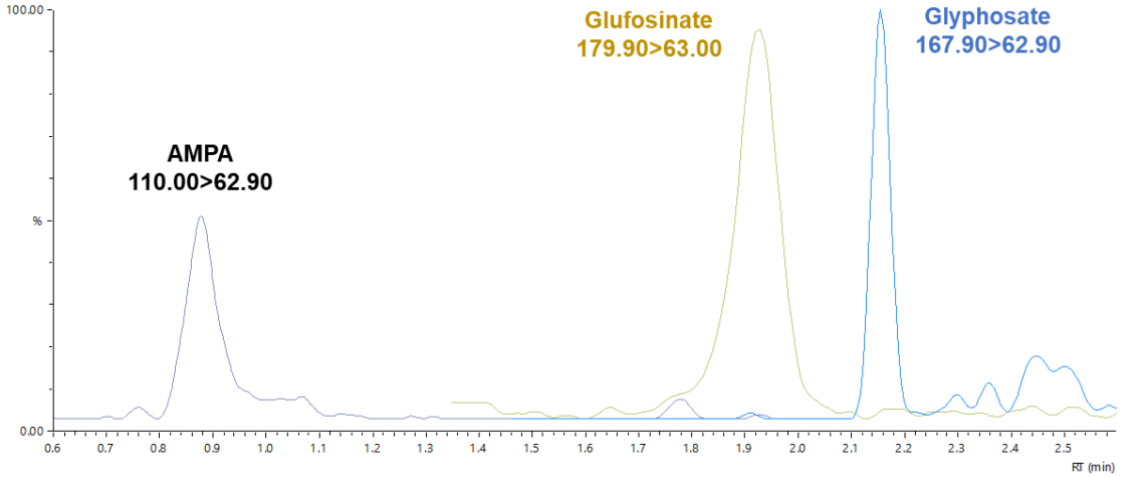
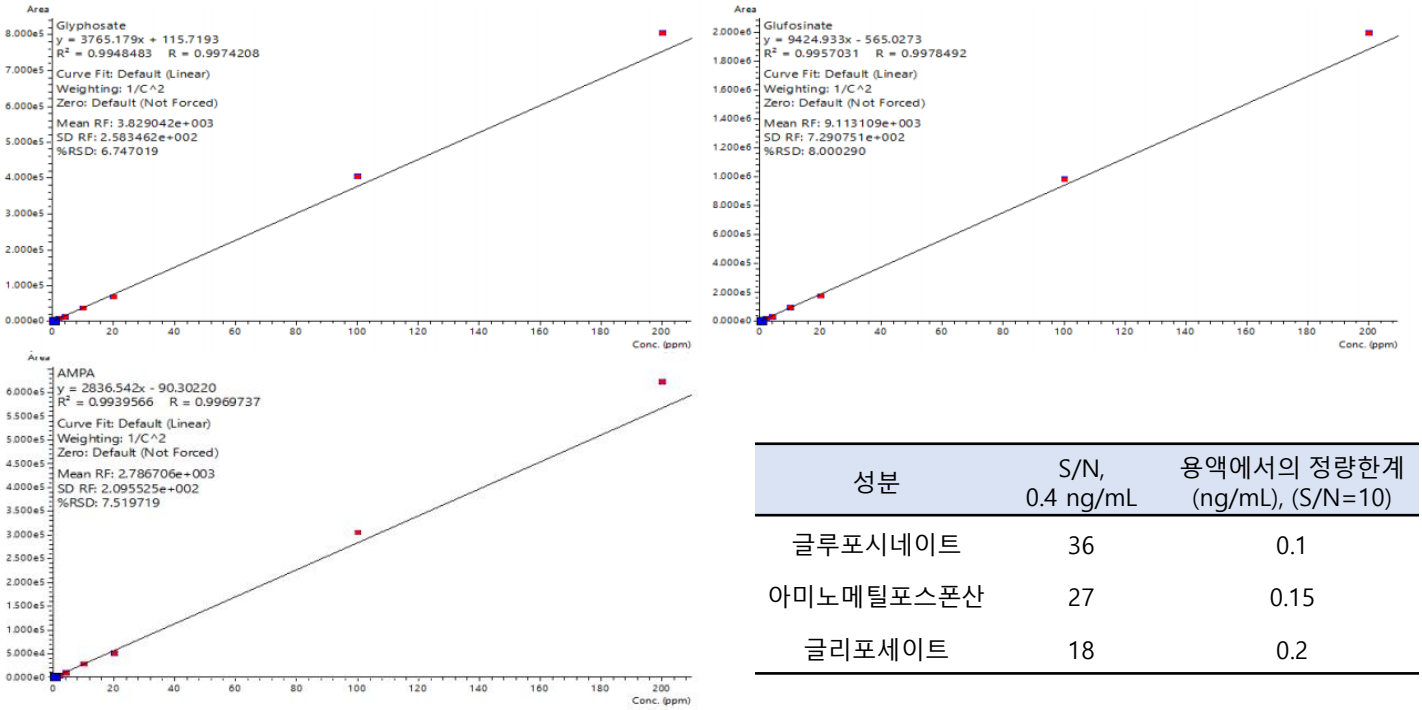


그림 2. MRM 크로마토그램 (Glyphosate, AMPA, Glufosinate의 용액 중 농도: 0.4 ng/mL)



성분	S/N, 0.4 ng/mL	용액에서의 정량한계 (ng/mL), (S/N=10)
글루포시네이트	36	0.1
아미노메틸포스폰산	27	0.15
글리포세이트	18	0.2

그림 3. 검정곡선 및 정량한계

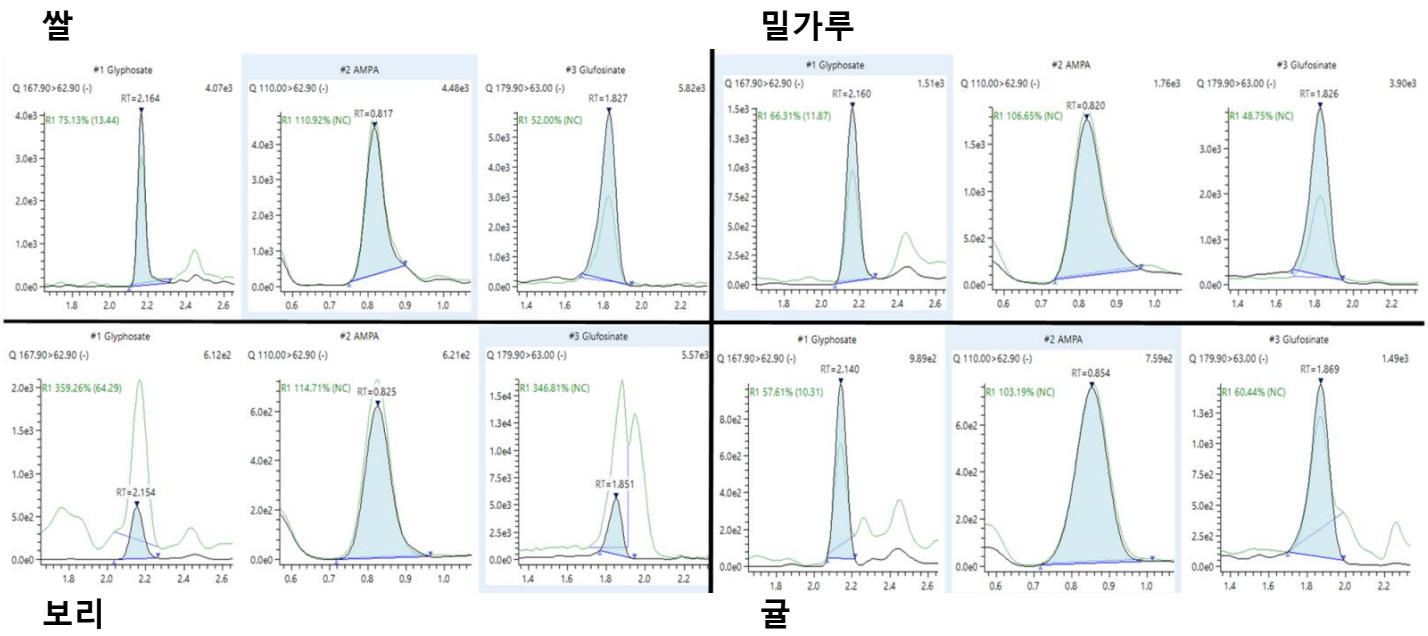


그림 4. 매질에 따른 크로마토그램 (쌀, 밀가루, 보리: 100 µg/kg, 귤 50 µg/kg)

추출 수율

추출 수율을 평가하기 위해서 추출 전에 표준 혼합용액을 첨가한 시료와 추출 후에 표준 혼합용액을 첨가한 시료의 각 성분의 면적을 비교하였다. 그리고 추출 시료 3 개의 평균으로 계산된 추출 수율은 분석 물질과 매질에 관계없이 80 % - 107 %로 나타났다.

반복성 평가

면적 반복성 (RSD)의 경우, 쌀, 밀가루, 보리는 100 µg/mL, 귤은 50 µg/mL의 혼합 표준용액이 첨가된 시료로 평가하였다. 각 시료는 3 개씩 추출하였으며, 매질에 관계없이 글루포세이트, 글루포시네이트 및 아미노메틸포스폰산에 대한 RSD가 <표 2>와 같이 0 % - 11 %로 나타났다.

표 2. 매질에 따른 반복성 평가

성분	쌀 RSD (%)	밀가루 RSD (%)	보리 RSD (%)	귤 RSD (%)
글루포시네이트	5	0	2	3
아미노메틸포스폰산	6	8	11	3
글리포세이트	5	2	7	6

❑ 요약 및 결론

시마즈 LCMS-8060을 이용하여 식품 중 글리포세이트, 글루포시네이트 및 아미노메틸포스폰산을 정량하였다.

바이알 내 페어링 시약 추가 방법을 통해 역상 조건에서도 우수한 머무름 시간, 분리도 및 감도를 얻을 수 있었으며, 이온-페어링 크로마토그래피의 단점도 보완할 수 있었다.

이 분석 방법은 간단한 전처리 방법을 사용하여 7 분 이내에 신속하게 분석할 수 있었으며, 귤에서 50 µg/kg 미만, 쌀, 밀가루, 보리에서 100 µg/kg 미만을 정량 할 수 있는 감도를 나타내었다. 또한, 반복성, 추출 수율 및 견고성에서 우수한 결과를 보여주었다.

SHIMADZU Scientific Korea Corp.
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Not available in the USA, Canada, and China.
This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu.
Company names, products/service names and logos used in this publication are trademarks and trade names of Shimadzu Corporation, its subsidiaries or its affiliates, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".
Third-party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".
Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

Copyright © 2018 SHIMADZU group. All rights reserved.