

Application News

No. 04-AD-0257-K

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8060NX

LC-MS/MS와 QuPPE 전처리를 이용한 홍차 내 유기인산염 및 페녹시계 제초제의 동시분석

Simultaneous Determination of Organophosphate and Phenoxy-based Herbicides in Black Tea using LC-MS/MS and QuPPE Pretreatment

■ 서론

유기인산염과 페녹시 제초제는 농업과 차를 재배하는 경우 일반적으로 사용되고 있다^[1]. 제초제는 잠재적으로 인체에 해를 가할 수 있는 위험이 있기 때문에 전세계적으로 다양한 식품에 포함된 제초제의 최대잔류허용기준 (Maximum residue limits, MRLs)이 설정되어 있다.

다양한 제초제에 대한 동시 스크리닝이 바람직하지만 물질에 따른 화학적 특성 및 머무름 시간의 상당한 차이로 인해 각 제초제 그룹의 분석에 대해 서로 다른 LC-MS/MS 분석법 및 컬럼이 종종 사용된다. 예를 들어, glyphosate와 glufosinate(유기인산염)는 극성이 높기 때문에 C18 또는 Phenyl LC 컬럼으로는 머무름 시간이 길지 않고 분리 또한 되지 않는다.

EUROL-SRM은 식품 중 극성이 높은 제초제와 살충제를 분석하기 위해 특정 LC-MS/MS 분석법과 QuPPE 전처리법의 이용을 권장하고 있다. 이 뉴스레터에서는 남아시아 국가의 차 농장에서 일반적으로 사용되고 있는 5 종의 제초제(및 독성대사물)를 동시분석하기 위한 고감도의 LC-MS/MS 분석법을 소개하고자 한다. Ion-focus ESI 인터페이스가 장착된 LCMS-8060NX 에는 홍차 내 Glyphosate, glufosinate, AMPA(대사산물), MCPA, 2,4-D 및 4-CPA 분석을 위해 혼합모드 LC 컬럼을 사용하였다.

■ 실험

시약과 표준품

고순도의 glyphosate, glufosinate, AMPA, MCPA, 2,4-D 및 4-CPA는 Sigma-Aldrich에서 구매하였다. 이동상 용매는 LC/MS 급의 acetonitrile과 Milli-Q water로 준비하였다. LC/MS 급의 formic acid와 ammonium formate (>99.0%)를 첨가제로 Milli-Q water에 첨가하였다.

LC-MS/MS 조건

LCMS-8060NX의 분석조건은 표 1에 나타내었으며, 유기인계 제초제의 킬레이트 특성으로 인해 LC 오토샘플러와 컬럼 사이의 스테인리스 튜브를 PEEK 수지 튜브로 교체하여 분석하였다.

6가지 화합물에 대한 MRM transition(정량이온과 정성 이온)과 최적화된 충돌에너지(CE)는 표 2에 나타내었으며, 정량이온과 정성이온 간의 감도 비율을 물질의 확인 기준으로 사용하였다.

표 1. LCMS-8060NX 분석조건

LC 분석조건 (Nexera)	
Column	Acclaim™ Trinity Q1 column (3 x 100 mm, 3 μm)
Flow rate	0.5 mL/min
Mobile phase	(A) Water with 50 mM ammonium formate and 1% formic acid (pH 2.8) (B) Acetonitrile
LC program	Gradient elution, 20 minutes
Oven Temp.	40 ° C
Injection Vol.	30 μL
MS 분석조건 (LCMS-8060NX)	
Interface	HESI IonFocus 1.0 kV
Interface Temp.	400 ° C
DL Temp.	300 ° C
Heat block Temp.	400 ° C
Nebulizing gas flow	3 L/min
Heating gas flow	20 L/min
Drying gas flow	15 L/min
MS mode	MRM, negative mode

표 2. MRM transitions (negative mode)와 최적화된 충돌에너지(CE)

Name	Quantifier	CE (V)	Ref. Ion	CE (V)	Ratio
AMPA	110.0>63.0	22	110.0>79.0	27	100:80
Glufosinate	180.1>95.0	17	180.1>85.1	19	100:56
Glyphosate	168.1>63.0	23	168.1>79.0	37	100:56
MCPA	199.1>141.0	15	201.0>143.0	16	100:36
2,4-D	219.0>161.0	15	221.0>163.0	11	100:55
4-CPA	185.1>127.0	15	187.0>129.0	15	100:47

샘플 전처리

홍차 샘플은 시장에서 구매하였으며, 추출방법으로는 변형된 QuPPE법을 이용하여 차에서 제초제를 추출하였다^[2]. 그림 1은 분석법 개발 및 유효성 평가를 위한 홍차 블랭크 매질, 스파이크 전과 후 샘플의 준비에 사용된 샘플 전처리 절차의 개요를 나타내고 있다. 추출시간(3분)은 홍차에 대한 권장 추출 시간을 기준으로 하였다.

- 1) 15 mL 튜브에 찻잎 500 mg을 측정하여 담는다.
- 2) 2.5 mL 물을 첨가하여 혼합 후 3분 동안 실온에 보관하여 찻잎을 수화시킨다.
- 3) 목표 농도의 혼합 표준용액 100 µL를 추가한다.
- 4) 1% formic acid를 포함한 MeOH 2.5 mL를 추가하고 3분 간 혼합한다.
- 5) -10 ° C의 냉동 조건에서 11,000 RPM으로 10분 간 원심분리한다.
- 6) 0.22 µm PTFE 필터를 사용해 상층액 3.0 mL를 여과한다.
- 7) 3.0 mL acetonitrile을 추가하고 2 시간동안 -20 ° C에 보관한다.
- 8) 이동상용매 A 1.0 mL가 들어있는 튜브에 추출물 1.0 mL를 옮겨 담는다.
- 9) 3 kDa cut-off 필터를 통한 여과 상층액 및 폴리프로필렌 플라스틱 바이알로 옮겨 담는다.
- 10) LC-MS/MS로 분석한다.

그림 1. QuPpe 전처리법을 이용한 홍차 매질에 스파이크된 샘플의 전처리 방법^[2]

■ 결과 및 토의

LC-MS/MS 분석법의 최적화

이전 연구에서 쌀에서의 유기인산염 제초제의 정량분석은 tri-mode 컬럼을 사용하여 진행되었다^[3]. 본 연구에서는 동일한 컬럼을 채택하고, LC 조건을 다시 최적화하여 그림 2와 같이 고극성의 유기인산염 제초제와 저극성인 페녹시계 제초제를 20분 이내에 모두 분석하였다. 전통적으로 이 두 종류의 제초제는 항상 다른 방법으로 분석된다.^[4]

검정곡선

검정곡선은 순수한 용매로 유기인산염 제초제는 0.5 ng/mL ~ 100 ng/mL, 페녹시계 제초제는 0.05 ng/mL ~ 10 ng/mL 농도 범위로 혼합하여 작성하였다.

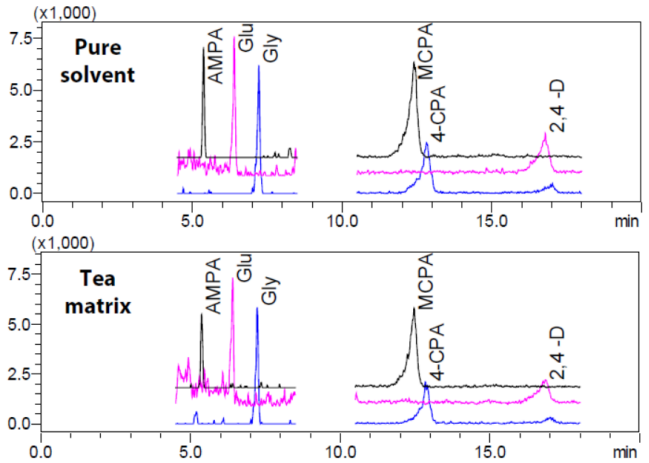


그림 2. 혼합 표준용액의 MRM 피크. 순수용매와 차 매질 내 유기인산염 제초제 (2.5 ng/mL)와 페녹시계 제초제 (0.25 ng/mL)의 피크

표 3. LCMS-8060NX를 이용한 6개 제초제의 정량결과 요약

Name	Range (ng/mL)	Accuracy (%)	R ²	LOQ (ng/mL)
AMPA	0.5 - 100	92.2 -114.9	0.9991	0.42
Glu*	0.5 - 100	81.6 -113.5	0.9987	1.61
Gly*	0.5 - 100	90.0 -102.3	0.9991	0.30
MCPA	0.05 - 10	79.7 -114.2	0.9989	0.04
2,4-D	0.05 - 10	79.7 -103.9	0.9991	0.12
4-CPA	0.05 - 10	84.9 -107.6	0.9994	0.10

*Glufosinate (Glu)와 Glyphosate (Gly)의 약어

그림 3과 같이 6 종의 대상 화합물 모두에서 R² 0.998 - 0.999사이의 우수한 직선성을 얻었으며, 검량범위, 정확성, 직선성 및 정량한계는 표 3에 나타내었다. 이 분석법을 이용한 순수용매 중 AMPA, glufosinate, glyphosate, MCPA, 2,4-D 및 4-CPA의 LOQ는 각각 0.42 ng/mL, 1.61 ng/mL, 0.30 ng/mL, 0.04 ng/mL, 0.12 ng/mL 및 0.10 ng/mL로 나타났다. 홍차 내 각 제초제들의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 다음 섹션에 나타내었다.

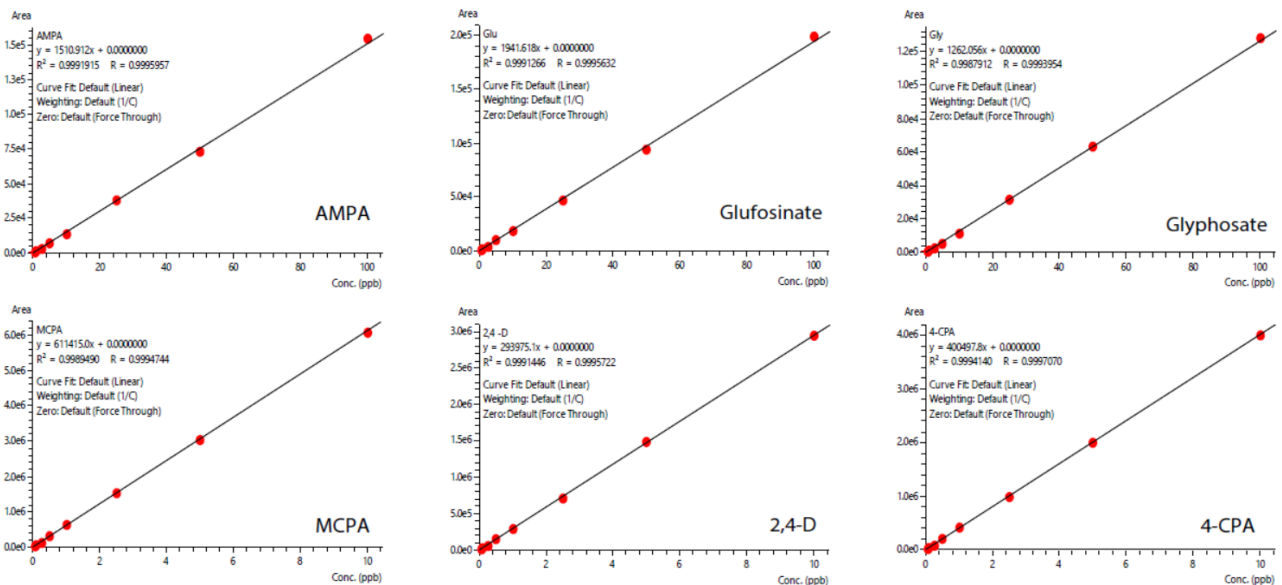


그림 3. 0.5 ng/mL ~ 100 ng/mL 범위에서 AMPA, glufosinate와 glyphosate의 MRM 검정곡선과 0.05 ng/mL ~ 10 ng/mL 범위에서 MCPA, 2,4-D, 4-CPA의 검정곡선

정밀성, 매질효과 및 회수율

내부표준물질을 사용하지 않는다면, 매질효과와 회수율을 평가하는 것은 중요하다. 따라서 블랭크 매질로 사용할 수 있는 차 샘플을 선별하는 것이 중요하다. 네 개 브랜드의 실론(스리랑카) 홍차 시료를 대상으로 제초제 함량을 선별하였다(표 4). 모든 차 시료에서 미량의 제초제가 검출되었지만 EU 및 JP 규정에서 설정한 MRL보다 훨씬 낮았다. 제초제 농도가 가장 낮은 차 브랜드인 E를 선정하여 분석법 유효성 평가를 위한 차 블랭크로 사용하였다. 홍차 매질은 LC-MS/MS분석에서 특정 제초제에 대해 상당한 이온 억제제를 보이는 것으로 보고되었다^[5]. 이 연구에서는 QuPpe 절차에 따른 이온 억제 또한 관찰하였다. 따라서 이온 억제 효과를 줄이기 위해 분석 전에 이동상용매로 차 추출물의 희석(50%)을 진행하였다^[6]. 일중 및 일간 평가는 3일에 걸쳐 3 개의 첨가 농도 수준에서 수행되었다.

표 4. 홍차 4 개 브랜드에 대한 제초제 함량

Compound	Brand D (ng/mL)	Brand E (ng/mL)	Brand M (ng/mL)	Brand T (ng/mL)
AMPA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Glu*	5.2	N.D.	3.93	1.76
Gly*	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MCPA	0.061	0.02	0.03	0.01
2,4-D	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
4-CPA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

*Glufosinate (Glu)와 Glyphosate (Gly)의 약어

1일 차 (n=6)의 결과는 표 5에 나타내었다. AMPA의 경우 52.7~58.0 %의 매질효과를 제외하고, 일중 및 일간 평가 (표시되지 않음)의 결과에서 분석법의 정밀성과 안정성이 허용범위 내에 있는 것으로 나타났다.

표 5. 유효성 평가 결과: 정밀성 (RSD%), 매질효과 (ME), 회수율 (Rec) 및 전처리 효율 (PE)

Level	Compound	Mix std in solvent (n=6)		Mix std post-spk (n=6)		Mix std pre-spk (n=6)		Performance (n=6)		
		Conc. (ng/mL)	RSD (%)	Conc. (ng/mL)	RSD (%)	Conc. (ng/mL)	RSD (%)	ME (%)	Rec (%)	PE (%)
2.5 ng/mL (0.1 mg/kg)	AMPA	2.31	16.7	1.22	8.5	1.23	9.8	52.7	100.7	53.1
	Glufosinate	2.50	7.7	2.71	15.2	3.27	16.8	108.6	120.4	130.9
	Glyphosate	2.75	9.5	2.67	8.9	2.82	11.5	97.1	105.8	102.7
0.25 ng/mL (0.01 mg/kg)	MCPA*	0.27	4.5	0.219	3.1	0.215	1.2	74.0	98.2	72.6
	2,4-D	0.27	4.3	0.215	8.0	2.07	4.1	80.5	96.3	77.5
	4-CPA	0.27	3.3	0.217	1.9	0.213	3.5	81.9	98.2	80.4
	AMPA	4.56	14.7	2.64	7.45	2.20	10.9	58.0	83.1	48.2
5.0 ng/mL (0.2 mg/kg)	Glufosinate	4.99	4.1	4.87	9.34	5.28	8.5	97.4	108.4	105.6
	Glyphosate	4.93	4.5	4.59	4.76	4.60	5.7	93.1	100.2	93.3
	MCPA*	0.55	2.3	0.453	1.78	0.469	6.0	77.0	103.5	79.7
0.5 ng/mL (0.02 mg/kg)	2,4-D	0.47	2.6	0.375	2.96	0.353	5.8	79.8	94.1	75.1
	4-CPA	0.56	4.4	0.447	3.15	0.467	4.1	80.5	104.5	84.1
	AMPA	9.25	7.6	5.07	8.4	3.72	9.0	54.8	73.4	40.2
	Glufosinate	10.21	3.1	9.11	5.7	10.42	3.4	89.2	114.4	102.1
10.0 ng/mL (0.4 mg/kg)	Glyphosate	9.23	5.6	9.04	5.2	10.81	6.7	97.9	119.7	117.2
	MCPA*	0.95	3.8	0.719	1.8	0.827	1.6	75.0	115.0	86.3
	2,4-D	1.03	4.5	0.881	2.3	1.01	2.47	85.9	115.3	99.0
1 ng/mL (0.04 mg/kg)	4-CPA	0.93	2.3	0.726	2.9	0.830	3.0	78.4	114.3	89.6

*MCPA는 홍차 블랭크에서 약 0.02 ng/mL로 검출되었다.

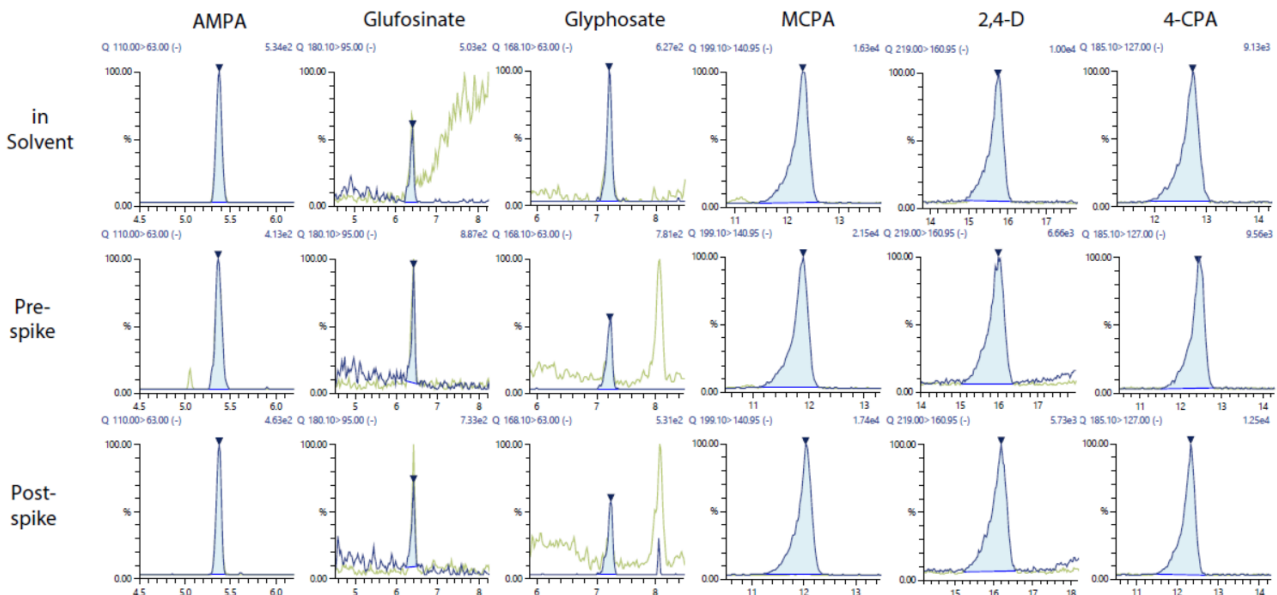


그림 4 AMPA, glufosinate 및 glyphosate (2.5 ng/mL 또는 0.1 mg/kg) 와 MCPA, 2,4-D 및 4-CPA (1.0 ng/mL 또는 0.04 mg/kg)의 대표적인 MRM 피크

감도 (홍차 매질의 LOD 및 LOQ)

분석법의 감도 평가는 그림 4와 같이 스파이크 샘플을 기반으로 하였다. 홍차 매질에 포함된 제초제의 LOD 및 LOQ 값은 JP 및 EU에서 규정한 MRL과 함께 표 6에 표로 나타내었다. AMPA (대사체) 및 5 가지 제초제에 대한 LOQ 추정값은 0.06~2.62 ng/mL이며, 이를 0.0024~0.1048 mg/kg으로 환산하였다. LOQ는 EU 및 JP 에서 설정한 MRL을 충족하거나 훨씬 낮은 결과를 보였다.

표 6. LC-MS/MS를 이용한 홍차 매질 내 5종 제초제 및 AMPA의 감도(LOD 및 LOQ)와 MRLs 값

Compd.	LOD in tea		LOQ in tea		MRLs for tea	
	ng/mL	mg/kg	ng/mL	mg/kg	JP mg/kg	EU mg/kg
AMPA*	0.17	0.0068	0.48	0.019	N.A.	N.A.
Glu	0.97	0.0388	2.62	0.105	0.3	0.1
Gly	0.34	0.0136	1.06	0.042	1.0	2.0
MCPA	0.02	0.0008	0.06	0.002	N.A.	0.1
2,4-D	0.09	0.0036	0.28	0.011	N.A.	0.1
4-CPA	0.04	0.0016	0.11	0.004	0.02	N.A.

■ 결론

LCMS-8060NX를 이용하여 홍차 내 고극성의 유기인산계 제초제 (glyphosate, glufosinate, AMPA) 와 저극성 페녹시계 제초제(MCPA, 2,4-D, 4-CPA)를 동시에 정량분석할 수 있는 LC-MS/MS 분석법을 개발하였다. 일중 및 일간의 정밀도, 매질효과 및 회수율에 대한 유효성을 평가하였다. AMPA (대사체) 및 5 종의 제초제에 대한 LOQ 추정값은 0.06 ~ 2.62 ng/mL로 0.0024 ~ 0.1048 mg/kg으로 환산된다. LOQ는 EU 및 JP 에서 설정한 MRL을 충족하거나 훨씬 낮은 것으로 확인되었다.

■ 참고문헌

1. N.Chamkasem&T.Harmon,AnalBioanalChem(2016)408:4995-5004.
2. EURL-SRM,QuPPePOMethod,Version12,July2021.
3. Z.Sun;Z.Zhan,ShimadzuAppl.NewsC250(2021)
4. N.Chamkasem&C.Morris,JournalofRegulatoryScience(2016)4:9-18.
5. J.Wang;W.Chow,D.Leung,J.AOACInt.(2011)94:1685-1714.
6. H.Stahnke;S.Kittlaus;G.Kempe;L.Alder,Anal.Chem.(2012)84:1474-1482.