

# Application News

No. M287-ENK

Gas Chromatograph Mass Spectrometer, GCMS-TQ™8050

## BEIS(Boost Efficiency Ion Source)-GC-MS/MS를 이용한 식품과 사료 중 다이옥신 분석

Analysis of Dioxins in Foods and Feeds Using GC-MS/MS with BEIS (Boost Efficiency Ion Source)

### ■ 서론

식품과 동물 사료 제품 중 잔류성 유기 오염물질(POPs)은 다양한 방법으로 분석되고 있다. 특히 POPs 중에서도 다이옥신은 독성이 높기때문에 저농도에서의 다이옥신 정량 분석이 필요하다. 지금까지 다이옥신 분석에는 높은 정확도를 제공하는 자기색터형(double focusing) GC-MS (GCHRMS)가 사용되었다.

그러나 최근 몇 년간 삼중-사중극자 GC-MS(이하, GC-MS/MS)의 정량적 성능이 현저하게 향상됨에 따라 EU는 GC-HRMS 분석법과 함께 GC-MS/MS 분석법을 공식시험법으로 하는 Commission Regulations(EU) 589/2014 및 644/2017을 발표하였다. 이러한 이유로 GC-MS/MS에 의한 다이옥신 분석이 관심을 끌고 있다. EI법에 의해 이온화를 시키는 BEIS(Boost Efficiency Ion Source, 이하 BEIS)는 전자빔의 초점 최적화를 통해 이온 효율을 극대화 하는 이온원이다. BEIS는 기존 이온원보다 약 4배의 높은 감도를 실현한다.

이 뉴스레터에서는 BEIS가 장착된 GC-MS/MS를 사용하여 40여종의 식품과 동물 사료 제품 약 250 개 샘플에서 다이옥신을 분석하였다. (단, 다이옥신은 Polychlorinated dibenzo-p-dioxin(PCDD)과 polychlorinated dibenzofuran(PCDF)으로 제한함) 정량 성능은 GC-HRMS와 GC-MS/MS로 얻은 분석 결과를 비교하여 평가하였다. 또, GC-MS/MS의 내구성을 검증하기 위해 저농도에서 감도를 유지하면서 분석이 가능한 분석 횟수를 평가하였다.

### ■ 시료 및 분석 조건

모든 식품 및 사료 샘플은 자동 전처리 장치를 사용하여 준비하였다.(추출 : Speed Extractor(BÜCHI Labortechnik AG), 정제: GO-xHT(Miura Co., Ltd.))

시료의 최종 용매로 Nonane을 사용하였으며, 최종 용매량은 10 µL 로 하였다. 표준물질은 DF-ST와 DF-LCS(Wellington Laboratories Inc.)를 혼합하여 준비하였으며, GC-MS/MS 분석 조건은 "EU Regulations Compliant GC-MS/MS Method Package for Dioxins in Foods"에 등록된 GC-MS/MS 분석 조건을 사용하였다. 세부 조건은 표 1에 나타내었다.

### ■ 표준용액 분석 결과

검정곡선의 농도 범위는 0.025 pg/µL에서 1 pg/µL(Octa-PCDD/PCDF는 2배 농도)의 농도로 표준용액을 제조하였다. EU 규정에서 모든 화합물은 LOQ(정량한계)농도에서 아래에 표시된 두 가지 기준(EU 589/2014 및 644/2017에서 부분적으로 발체)을 충족해야 한다. 이 연구에서는 검량선의 가장 낮은 농도에서 두 기준을 모두 만족할 수 있음을 확인하였으며, 결과는 표 2에 나타내었다.

#### 1. S/N 비

저농도 분석 데이터에 대해 3:1의 S/N(신호/잡음)비로 모니터링되는 두 개의 다른 이온에서 기기 감응을 나타내는 샘플 추출물 내 분석물의 농도.

또는 기술적 이유로 S/N비 계산이 신뢰 할 수 있는 결과를 제공하지 않는 경우에는 아래의 조건을 만족해야 한다.

#### 2.검정곡선의 최저농도

각 시료의 검량선 상의 모든 점에 대해 계산된 평균 상대 감응 계수에 대해 허용 가능(≤30 %)하고 일관된(최소한 시료 분석의 시작과 종료 시점에 측정함) 편차를 제공하는 검정곡선의 가장 낮은 농도 지점이다.

표.1 GC-MS/MS 분석 조건

Instrument composition		Detailed analysis conditions (GC)	
Sample preparation (extraction)	SpeedExtractor (BÜCHI Labortechnik AG)	Inlet liner	Topaz Single Gooseneck Inlet Liner, w/ Wool (Restek Corp., P/N: 23336)
Sample preparation (clean-up)	GO-xHT (Miura Co., Ltd.)	Column	SH-Rxi™ -5Sil MS (60 m, 0.25 mm I.D., 0.25 µm), (SHIMADZU, P/N: 227-36036-02)
Auto sampler	AOC-20i/s	Injection Mode	Splitless
GC-MS/MS	GCMS-TQ™ 8050	Sampling Time	1.00 min
Software	GCMSsolution™ Ver. 4.50SP1 LabSolutions Insight™ Ver. 3.6 EU Regulation Compliant GC-MS/MS Method Package for Dioxins in Foods	Injection Temp.	280 °C
		Column Oven Temp.	150 °C (1 min)→(20 °C/min)→220 °C→(2 °C/min) →260 °C (3 min)→(5 °C/min)→320 °C (3.5 min)
Detailed analysis conditions (AOC-20i/s)		High Pressure Injection	450 kPa (1.5 min)
# of Rinses with Solvent (Pre-run)	3	Flow Control Mode	Linear Velocity (45.6 cm/sec.)
# of Rinses with Solvent (Post-run)	3	Purge Flow	20 mL/min
# of Rinses with Sample	0	Carrier Gas	Helium
Plunger Speed (Suction)	Low	Analysis conditions (MS)	
Viscosity Comp. Time	0.2 sec.	Ion Source Temp.	230 °C
Plunger Speed (Injection)	High	Interface Temp.	300 °C
Syringe Insertion Speed	High	Detector Voltage	1.8 kV (Absolute)
Pumping Times	5	Loop time	0.8 sec. (for native compounds) 0.2 sec. (for labeled compounds)
Inj. Port Dwell Time	0.3 sec.	Transition	Conditions of Method Package
Terminal Air Gap	No	Ion source	BEIS
Plunger Washing Speed	High	Emission current	150 µA
Washing Volume	6 µL		
Injection Volume	2 µL		

\* 감도의 변화는 물질에 따라 차이 발생

표. 2 표준 물질 분석 결과 및 정량한계

ID.	Compound name	Average RRF	RRF (Level 1)	RRFDev (%) (Level 1)	S/N ratio (Level 1)	LOQ
1	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	1.07	1.15	8.10	552	0.025 pg/μL
2	1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin	1.09	0.97	10.56	411	0.025 pg/μL
3	1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	1.14	1.39	22.26	269	0.025 pg/μL
4	1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	0.95	0.92	2.72	254	0.025 pg/μL
5	1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	1.03	1.25	21.44	260	0.025 pg/μL
6	1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin	0.92	0.82	11.46	421	0.025 pg/μL
7	Octachlorodibenzo-p-dioxin	1.19	1.04	12.21	915	0.050 pg/μL
8	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran	1.10	1.05	4.66	793	0.025 pg/μL
9	1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran	1.04	1.00	3.23	483	0.025 pg/μL
10	2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran	0.97	0.89	7.59	474	0.025 pg/μL
11	1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran	1.03	0.82	20.72	447	0.025 pg/μL
12	1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran	1.09	1.36	24.62	446	0.025 pg/μL
13	2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran	1.09	1.39	27.83	286	0.025 pg/μL
14	1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran	1.06	1.23	16.10	315	0.025 pg/μL
15	1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran	1.17	1.05	10.37	705	0.025 pg/μL
16	1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran	1.02	0.97	4.97	650	0.025 pg/μL
17	Octachlorodibenzofuran	1.00	0.84	15.80	689	0.050 pg/μL

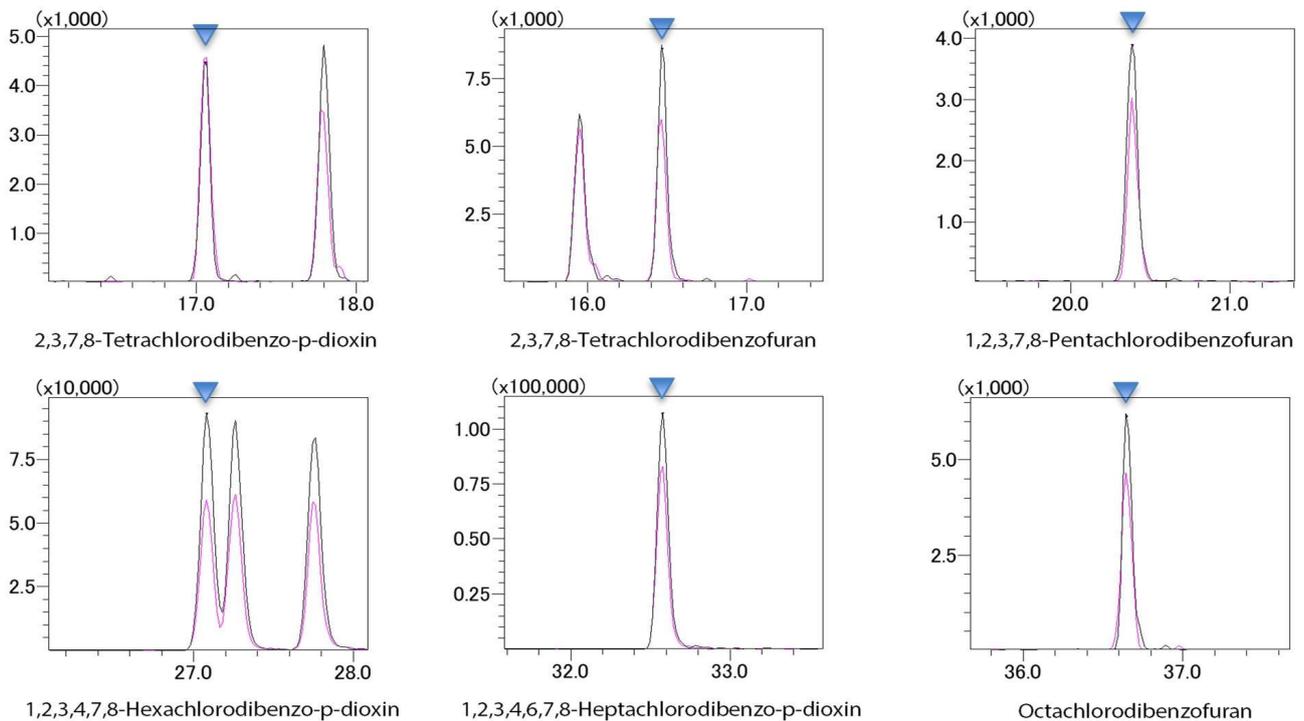


그림. 1 표준 물질의 크로마토그램 (농도: 0.025 pg/μL)

### ■ 시료의 감도 평가

실제 시료를 분석하여 저농도 수준에서의 감도를 확인하였다. 그림 2는 대표적인 화합물의 크로마토그램을 나타낸 것으로, 실제 시료 분석에서도 정량한계(LOQ)에 가까운 만족스러운 감도를 얻었다.

### ■ 시료의 정확성 평가

GC-MS/MS를 이용하여 약 40 여종의 식품 및 동물사료 제품 250 개 이상의 시료를 분석하였으며, 동일한 샘플을 GC-HRMS로 분석한 결과를 비교하여 정량 분석값의 정확도를 평가하였다. 각 시료의 정량값을 TEQ(Toxicity Equivalent Quantity)로 환산하여 비교하였으며, 결과는 그림 3에 나타내었다.

그림 3의 왼쪽 그래프는 X축과 Y축 선형 스케일로 나타내었으며, 오른쪽 그래프는 X축 Y축의 값을 로그 스케일로 하여 정량값이 작은 시료의 결과를 자세히 확인할 수 있도록 나타내었다. 두 그래프 모두 가로축은 GC-HRMS로 분석한 정량값을 나타내고, 세로축은 GC-MS/MS로 분석한 정량값을 나타낸다.

두 그래프에서 GC-HRMS와 GC-MS/MS 값 사이에 상관 관계가 있는 경우, 값은 기울기가 1인 선(파란색 점선)에 가깝다.

그림 3의 왼쪽 그래프를 보면 검출된 정량값이 1 ng/kg TEQ 이상인 모든 시료에서 GC-MS/MS와 GC-HRMS에 의한 정량값이 비슷한 수준으로 나타났다.

오른쪽 그림은 두가지 방법에 의해 얻어진 정량값 사이의 차에 대한 기준으로써 GC-MS/MS와 GC-HRMS에 의한 정량값의 비율이 50 % 또는 200 %인 선(주황색 점선)을 나타낸다. GC-HRMS법으로 분석한 값이 0.1 ng/kg TEQ 이하인 시료에서는 정량값의 비율이 50 % 또는 200 %의 범위를 벗어나는 산란 결과가 일부 나타났다.

최대 허용 수준(이하, ML)이 가장 작은 시료는 돼지고기 지방이었으며, ML은 1.0 ng/kg TEQ였다. 이와 같은 이유로, ML보다 10 배 이상 낮은 농도 수준에서는 정량값의 큰 차이(즉, 50 % - 200 % 범위를 벗어나는 정량값 비율)가 발생할 수 있다. 그러나 분석에서 요구하는 농도 수준에서 GC-MS/MS와 GC-HRMS의 정량성능은 큰 차이를 보이지 않았다.

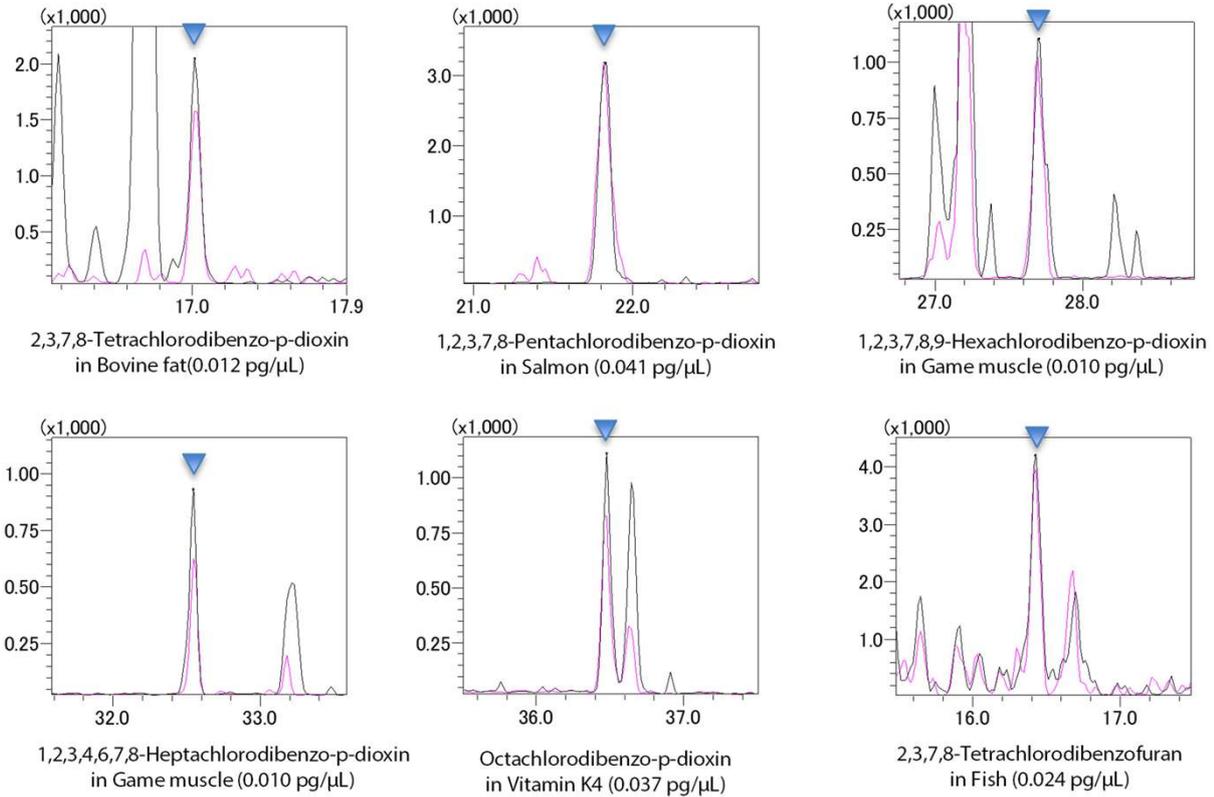
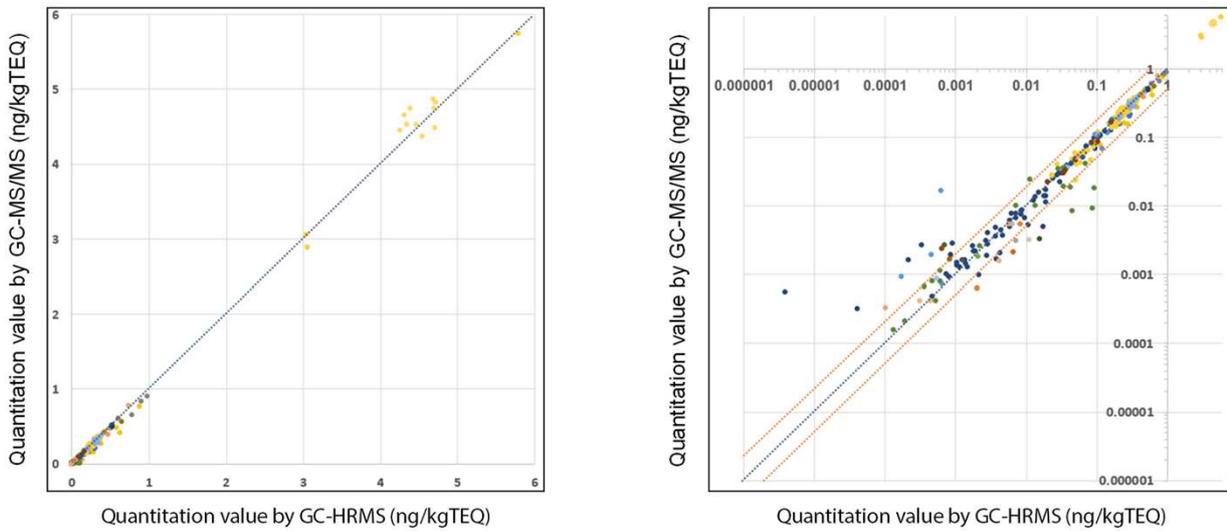


그림. 2 실제 시료에서의 대표적인 물질의 크로마토그램



- Animal feed product
- Bétaïne anhydre
- BétaïneHCL 95%
- Bovine fat
- Bovine milk
- Bovine muscle
- Compound fish food
- Dairy product
- Diverse nature
- Eels
- Fish
- Fresh product
- Game liver
- Goat fat
- Goat liver
- Grasses
- Milk
- Molluscs
- Mussels
- Oilcake
- Ovine fat
- Ovine liver
- Oysters
- Pork fat
- Poultry eggs
- Poultry muscle
- Powder
- QC
- Salmon
- Sardine
- Scallops
- Shellfish
- Shrimp
- Thréronine
- Veal fat
- Vitamine K4
- Yellow Pigment
- other

그림. 3 GC-MS/MS와 GC-HRMS의 정량값 비교 (왼쪽: 선형척도, 오른쪽: 로그척도)

### ■ 실제 시료 분석에서의 내구성 평가

식품 중 다이옥신 분석의 내구성 평가로서 실제 시료와 표준 시료(0.05 pg/μL)를 교대로 분석하였으며, 저농도 표준 시료에 대한 감도 변화를 기준으로 감도를 유지하면서 분석이 가능한 횟수를 평가하였다. 표준 시료와 실제 시료에 대해 총 500 개 이상의 분석이 수행되었으며, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

그림 4에서 가로축은 분석횟수, 세로축은 분석횟수별 피크면적을 나타낸다. 500 회 이상의 분석 후에도 감도는 크게 저하되지 않았다. 다음으로 표 3은 첫번째 분석부터 530번째 분석까지의 평균 피크면적과 재현성을 나타내고 있다. 재현성은 모든 물질에 대해 20 %RSD 미만이었으며, 이는 전체 테스트 동안 감도가 잘 유지될 수 있음을 보여준다.

### ■ 결론

이 실험에서는 BEIS가 장착된 GC-MS/MS를 이용하여 약 40종의 식품 및 동물사료 제품 250 개 이상의 시료 중 다이옥신을 분석하였으며, GC-MS/MS와 GC-HRMS로 분석한 결과를 비교하여 GC-MS/MS의 정량성능을 평가하였다. 평가결과 분석에 필요한 농도 수준에서 GC-MS/MS와 GC-HRMS의 정량 성능 차이가 발견되지 않았다.

실제 시료에서 다이옥신 분석 내구성도 평가하였으며, 500회 이상 분석 후에도 저농도 수준에서의 감도 변화는 발생하지 않았다.

이러한 결과를 바탕으로 BEIS는 다이옥신 분석에 대해 고감도 및 내구성 있는 분석이 가능하다는 것을 알 수 있다.

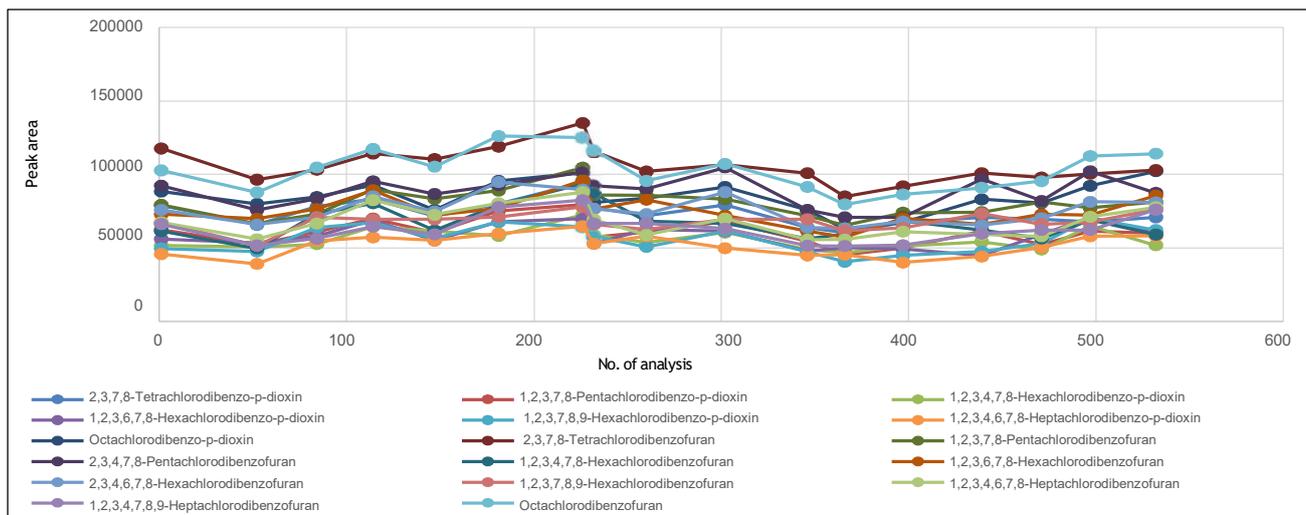


그림. 4 반복분석 시 피크면적의 변화 그래프

표. 3 내구성 시험에서의 표준 물질의 평균 피크면적 및 반복성 (농도: 0.05 pg/μL)

ID.	Compound name	Average peak area	SD	%RSD(n = 17)
1	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	73596	8321	11.31
2	1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzo-p-dioxin	60713	8803	14.50
3	1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	55956	7025	12.55
4	1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	58167	8034	13.81
5	1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	56035	9095	16.23
6	1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzo-p-dioxin	51663	7452	14.43
7	Octachlorodibenzo-p-dioxin	84614	10814	12.78
8	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran	105930	11847	11.18
9	1,2,3,7,8-Pentachlorodibenzofuran	80339	9592	11.94
10	2,3,4,7,8-Pentachlorodibenzofuran	88317	10631	12.04
11	1,2,3,4,7,8-Hexachlorodibenzofuran	67814	11761	17.34
12	1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran	74759	9636	12.89
13	2,3,4,6,7,8-Hexachlorodibenzofuran	75794	9605	12.67
14	1,2,3,7,8,9-Hexachlorodibenzofuran	67878	6056	8.92
15	1,2,3,4,6,7,8-Heptachlorodibenzofuran	67665	10199	15.07
16	1,2,3,4,7,8,9-Heptachlorodibenzofuran	62914	9356	14.87
17	Octachlorodibenzofuran	103483	13911	13.44

