SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. 04-AD-0250-K

Polar herbicides / LCMS-8060NX

LC/MS/MS를 이용한 쌀 중 잔류 글루포시네이트, 글리포세이트, AMPA의 정량분석

Quantitative Determination of Residual Glufosinate, Glyphosate and AMPA in Rice Matrix by Direct LC/MS/MS Method

사용자 활용 포인트

- LCMS-8060NX를 이용한 쌀 매질에서 제초제인 글루포시네이트, 글리포세이트 및 아미노메틸포스폰산(대사산물)의 정량분석을 위해 QuPPe 전처리를 사용한 LC-MS/MS 분석법이 확립되었다.
- 이 분석법은 EU의 규정에 따라, 쌀 중 글리포세이트 MRL인 0.1 mg/kg의 LOQ 기준을 충족하였다. 분석법의 성능 평가 결과는 직선성, 정확도, 정밀도, 매질효과 및 회수율에 대해 나타내었다.

■ 서론

글리포세이트와 글루포시네이트는 남아시아와 그 외 많은 나라에서 쌀, 차 그리고 다른 농산물 재배에 널리 사용되는 제초제이다. 다양한 농산물에서 글리포세이트의 농약 잔류 허용기준(MRL)은 유럽연합(EU), 미국, 일본 등의 당국에 의해 설정되었으며, 농산물마다 그 값은 크게 다르다. 예를 들어, EU 규정에 따라 밀, 귀리 및 대두의 글리포세이트 MRL은 각각 30, 30, 20 mg/kg인 반면에 쌀, 포도 및 차의 MRL은 각각 0.1, 0.5, 2 mg/kg 수준으로 낮다. 아미노메틸포스폰산(AMPA)은 토양에서 글리포세이트의 독성 분해 산물이며, 글리포세이트와 함께 LC-MS/MS로 모니터링되는 물질이다[1-5]. 이 뉴스레터에서는 Ion-focus ESI 인터페이스의 탠덤 LC-MS/MS 시스템인 LCMS-8060NX를 이용하여 쌀 매질에서 글리포세이트, 글루포시네이트 및 AMPA의 정량을 위한 고감도의 MRM 분석 방법을 소개하고자 한다.

■ 실험

시약과 표준물질

글리포세이트, 글루포시네이트 및 AMPA는 Sigma-Aldrich에서 고순도 등급으로 구매하였다. LCMS 등급의 포름산 암모늄(Ammonium formate) (>99.0%)과 포름산(formic acid)은 LCMS 등급의 아세토니트릴(Acetonitrile)과 Milli-Q water로 조제한 이동상의 첨가제로 사용하였다.

LC/MS/MS 조건

LCMS-8060NX의 분석 조건은 표 1과 같다. 세 가지 화합물은 극성이 매우 강하며 금속 표면에 흡착될 수 있다. 따라서, LC 오토샘플러와 컬럼 사이의 스테인리스-스틸 튜브를 PEEK 수지 튜브로 교체하였다. 또한 유리로 된 바이알, 튜브, 병 대신 폴리프로필렌 플라스틱 샘플 바이알과 튜브를 표준물질 및 샘플 준비에 사용하였다.

세 가지 화합물의 MRM 조건(정량이온 및 정성이온)과 최적화된 충돌 에너지(CE)는 표 2에 나타내었다. 정량이온과 정성이온 간의 이온 세기 비율은 물질의 확인 기준으로 사용되었다.

샘플 전처리

Basmati 쌀은 시장에서 구매하였고 분석법 개발 및 성능 평가용 매질로 사용했다. 먼저 저온에서 쌀을 분말로 분쇄한 후, EURL

표 1. LCMS-8060NX 분석조건

LC 조건 (Nexera)	
Column	Acclain™ 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, 10 minutes
Oven Temp.	40 °C
Injection Vol.	30 µL
MS 조건 (LCMS-8060NX)	
Interface	HESI Ion-Focus 1.0 kV
Interface Temp.	400 °C
DL Temp.	300 °C
Heat Block Temp.	400 °C
Nebulizing Gas	3 L/min
Heating Gas Flow	20 L/min
Drying Gas Flow	15 L/min
Mode	MRM, negative mode

표 2. MRM 조건 및 최적화된 충돌에너지(CE)

Name	Quantifier	CE (V)	Ref. Ion	CE (V)	Ratio
AMPA	110.0>78.9	27	110.0>63.0	22	100/100
Glufosinate	180.1>63.0	37	180.1>95.0	17	100/87
Glyphosate	168.1>63.0	23	168.1>149.9	37	100/45

에서 권장하는 QuPPe 방법을 채택하였다[2]. 샘플의 전처리 절차는 그림 1과 같으며, 이 방법은 분석법 개발 및 성능 평가를 위해 쌀의 공 매질, 사전 첨가 및 사후 첨가 샘플을 조제할 때 사용하였다.

극성 화합물이 유리 바이알에 흡착되는 것을 방지하기 위해 폴리프로필렌 플라스틱 튜브, 샘플 바이알 및 Eppendorf 튜브를 사용하여 샘플 및 표준물질을 조제하고 보관하였다. 일회용 폴리프로필렌 플라스틱 샘플 바이알(P/N: 228-31600-91)을 LC/MS/MS 분석에 사용하였다.

1) 쌀 샘플(분말) 1 g 을 50 mL 원심분리기 튜브에 넣는다.

2) 물 9mL을 첨가 후 상온에서 15분 간 방치한다.

3) 원하는 농도의 표준혼합용액 100 µL를 추가한다.

4) 메탄올 9.9 mL에 포름산 100 µL을 추가하여 최종적으로 1% 포름산을 함유한 메탄올을 첨가하고 1분 간 섞는다.

5) 10% EDTA 수용액 1mL를 추가한다. 셰이커로 15분 간 튜브를 흔든다.

6) 10분 간 11,000 RPM의 저온 조건(-9 °C)에서 원심분리를 진행한다.

7) 상층액을 0.22 µm 나일론 필터로 여과한다.

8) 튜브에 2 mL 아세토니트릴을 넣은 후, 추출물 2 mL를 옮기고 1분 간 혼합한다.

9) 상층액을 3kDa 컷오프 필터로 여과하고 폴리프로필렌 플라스틱 바이알로 옮긴다.

10) 분석을 위해 LC/MS/MS에 주입한다.

그림 1. QuPPe 방법을 참고한 쌀 매질 내 사전 첨가된 샘플의 전처리과정[2]

■결과 및 토의

LC-MS/MS 최적화

3개의 고극성 화합물을 컬럼에 머무르게 하고 효과적으로 분리하기 위해 HILIC[3], 하이브리드 모드 컬럼[1, 4] 및 바이알 내 이온 쌍 시약[5]을 사용하는 Phenyl 컬럼(metal free)과 같은 적절한 이동상 조건을 갖춘 다양한 LC 컬럼을 사용하였다. 이 뉴스레터에서는 하이브리드 모드 컬럼(Acclaim Trinity Q1)을 사용했으며 쌀 매질의 존재 하에서 적절한 머무름 시간, 피크 모양 및 안정성을 얻기 위해 LC 조건을 최적화하였다. 그림 2에 순수 용매에 첨가된 표준혼합용액과 쌀 매질에 첨가된 표준혼합용액의 MRM 크로마토그램을 나타내었다.

검정곡선 및 감도

검정곡선은 순수 용매에 희석된 0.5 ng/mL-100 ng/mL 농도 범위의 표준혼합용액으로 작성하였다(그림 3). AMPA, 글루포시네이트 및 글리포세이트에 대해 각각 0.9995, 0.9997 및 0.9977의 r^2로 우수한 직선성을 얻었다. 전체 농도 범위에 대한 정확도 결과는 표 3에 나타내었다.

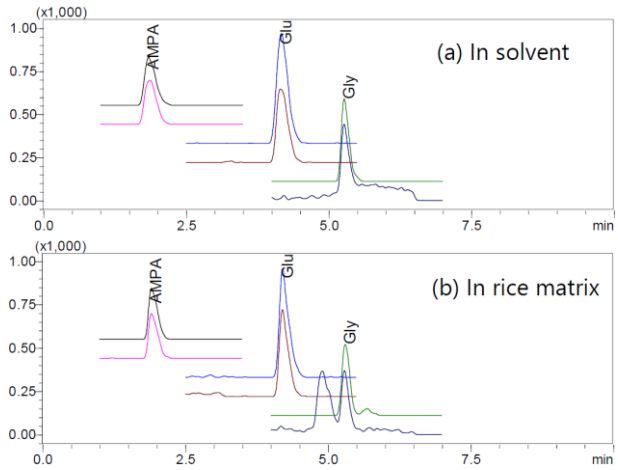

그림 2. 순수한 용매(a)와 쌀 매질(b)에서 혼합표준물질 (각각 2.5 ng/mL)의 MRM 피크

표 3. LCMS-8060NX에서 3개 제초제의 정확도(A) 결과

Calibrant		AMPA (meas.)		Glufosinate (meas.)		Glyphosate (meas.)	
Level	(ng/mL)	(ng/mL)	A [%]	(ng/mL)	A [%]	(ng/mL)	A [%]
1	0.5	0.51	101.5	0.55	109.2	0.55	109.7
	0.5	0.58	115.0	0.58	115.4	0.51	101.9
2	1	1.13	113.1	0.96	96.1	0.97	97.1
	1	1.01	101.0	0.99	98.7	0.98	98.0
3	2.5	2.40	95.8	2.52	100.9	2.50	100.0
	2.5	2.42	96.8	2.45	97.8	2.39	95.6
4	5	4.73	94.7	4.74	94.8	5.30	106.1
5	10	9.38	93.8	9.59	95.9	9.51	95.1
6	25	24.83	99.3	24.93	99.7	25.29	101.2
7	50	49.59	99.2	49.77	99.5	46.53	93.1
8	100	101.45	101.5	100.95	100.9	103.42	103.4

순수 용매 내 표준물질에 대한 분석법의 감도는 MRM 피크를 기준으로 0.5 ng/mL의 LOD 및 1 ng/mL의 LOQ로 확인되었다. 0.5, 1.0 및 2.5 ng/mL 농도의 표준물질 MRM 피크를 그림 4a에 나타내었다. 쌀 매질에서의 감도는 1 ng/mL의 LOD, 2.5 ng/mL의 LOQ로 확인되었다. 이 값은 각각 쌀 샘플에서 0.04 mg/kg 및 0.1 mg/kg에 해당하며, EU에서 규정하는 글리포세이트 MRL 기준을 충족하였다. 순수 용매, 사전 및 사후 첨가 샘플에 첨가된 1 ng/mL 표준물질의 MRM 피크는 그림 4b에 나와있다.

매질효과, 회수율 및 정밀도

내부표준물질을 사용하지 않고 매질효과 및 회수율을 평가하는 것은 중요하다. 이 분석법 평가에 사용된 쌀은 표적 화합물이 검출되지 않은 것을 매질로 사용하였다. 분석법 성능 평가는 1, 2.5 및 5 ng/mL의 세 가지 농도로 수행되었다.

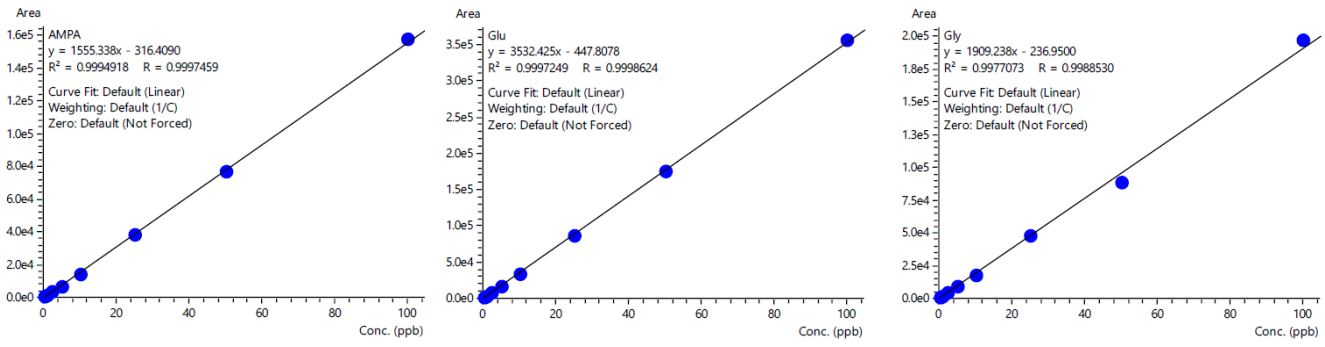

그림 3. (0.5 – 100) ng/mL 범위의 AMPA, 글루포시네이트 및 글리포세이트의 MRM 검정곡선

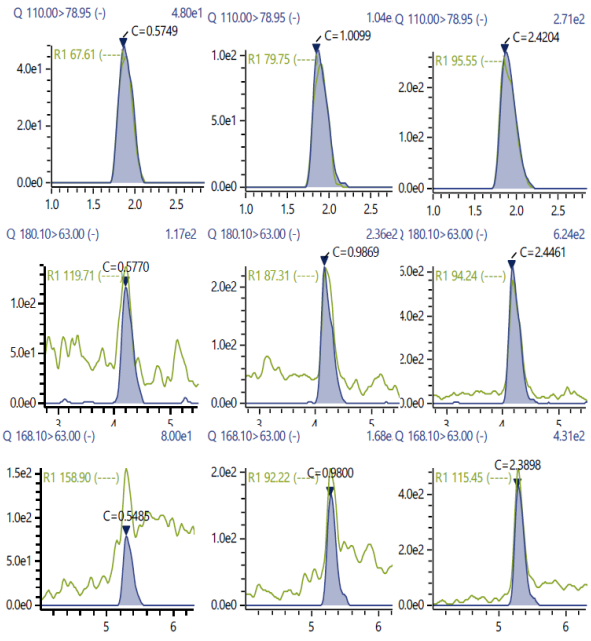

그림 4a. 저농도의 MRM 피크, 좌에서 우로 이동:
0.5, 1.0, 2.5 ng/mL 농도 - AMPA(상단), 글루포시네이트(중간)
및 글리포세이트(하단)

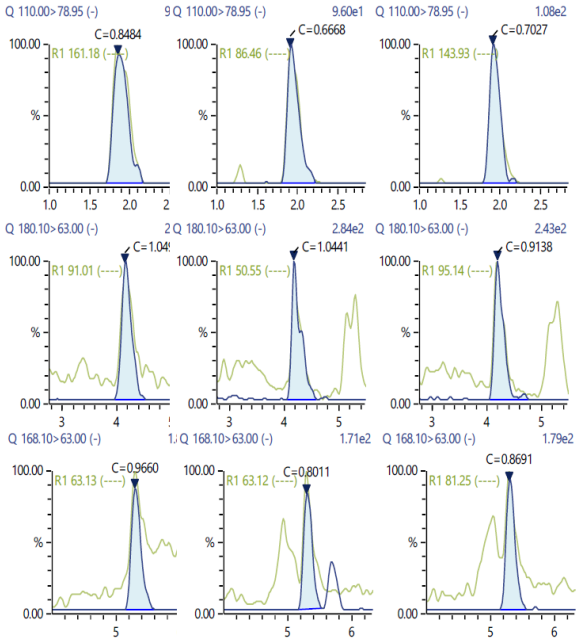

그림 4b. 1 ng/mL 샘플의 MRM 피크, 좌에서 우로 이동:
순수 용매, 사전 첨가 시료, 사후 첨가 시료 - AMPA(상단),
글루포시네이트(중간) 및 글리포세이트(하단)

표 4. 방법 성능 평가 결과: 정밀도(RSD%, n=6), 매질효과(ME), 회수율(Rec) 및 공정 효율성(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.	Conc. (ng/mL)	RSD (%) Conc.	Conc. (ng/mL)	RSD (%) Conc.	ME (%)	Rec (%)	PE (%)
1 ng/mL (0.04 mg/kg)	AMPA	0.90	12.1	0.84	9.6	0.83	10.8	93.3	98.9	92.3
	Glufosinate	1.03	5.0	0.98	6.1	1.01	4.9	95.2	103.2	98.2
	Glyphosate	0.89	11.4	0.93	11.5	0.93	11.0	104.7	100.2	105.0
2.5 ng/mL (0.1 mg/kg)	AMPA	2.43	4.0	2.08	7.2	1.92	9.2	85.9	92.3	79.2
	Glufosinate	2.45	2.8	2.06	5.9	2.04	6.6	83.8	99.2	83.1
	Glyphosate	2.45	2.8	2.38	7.1	2.02	6.3	97.0	85.2	82.6
5 ng/mL (0.2 mg/kg)	AMPA	4.75	2.1	4.43	4.9	4.21	8.1	93.3	94.9	88.6
	Glufosinate	5.07	1.1	4.45	2.7	4.52	4.2	87.8	101.5	89.2
	Glyphosate	5.00	3.2	4.90	6.8	3.79	3.8	98.1	77.4	75.9

1 일차의 결과는 표 4에 요약하였고, 샘플의 전처리부터 LC-MS/MS 분석까지 3일 동안 성능 평가를 수행하였다. 일간 분석법 성능 평가의 결과는 표 4에 나타내었고 결과를 통하여 안정성과 신뢰성이 검증되었다.

■결론

쌀 매질에서 극성 제초제인 글루포시네이트, 글리포세이트 및 AMPA(대사산물)의 정량을 위한 LC/MS/MS 분석법이 확립되었다. EURL에서 권장하는 QuPPE 샘플 전처리법을 분석에 적용하였다. 쌀 매질 내 분석물질에 대한 분석법의 LOQ는 2.5 ng/mL 수준으로 EU 규정에 의해 설정된 글리포세이트에 대한 MRL(0.1 mg/kg) 기준을 충족하였다. 또한, 정밀도, 매질효과 및 회수율 측면에서 분석법의 성능을 평가하였다. 일중 및 일간 정밀도 평가 결과는 이 분석법이 정밀도, 매질효과 및 회수율에서 검증되었다는 것을 보여준다.

■참고문헌

1) N. Chamkasem & T. Harmon, Anal Bioanal Chem (2016) 408: 4995-5004.
2) EURL-SRM, QuPPe PO Method, Version 12, July 2021.
3) M. Kawashima. Shimadzu Appl. News C181 (2018)
4) M. Kawashima; K. Ishioka; M. Kobayashi; J. Masuda, ThP104-ASMS-2020-Poster (2020)
5) D. Toinon, Shimadzu Appl. News C220 (2020)

No. 04-AD-0250-K

SHIMADZU
Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/
Shimadzu Scientific Korea
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 © 2023 SHIMADZU group. All rights reserved.