

Application News

No. 04-AD-0299-ENK

GCMS-TQ™8050 NX HS-20 NX Trap

Dynamic HS-GC-MS/MS를 이용한 라면 중 Ethylene Oxide 및 2-Chloroethanol 분석

Ethylene Oxide and 2-Chloroethanol Analysis in Instant Noodles by Dynamic Headspace and GC-MS/MS

사용자 활용 포인트

- ◆ 간단한 시료 준비 절차, 직접 시료 분석
- ◆ Matrix-matched 검정곡선을 적용하지 않은 시료의 회수율이 70 - 130 % 이내로 검출

■ 서론

에틸렌옥사이드(Ethylene Oxide, EO)는 훈증 살충제로 해충 방제에 주로 사용되어져 왔으나 흡입할 경우, 암을 유발할 수 있고 단기간 노출로도 눈과 피부에 자극을 유발할 수 있는 물질이다. 최근 몇 년 동안에는 식품인 라면에서 EO가 검출되어 큰 이슈가 되었던 사례도 있었다. 이와 관련해 유럽연합 위원회(European Commission, EU)에서는 식품 중 라면과 같은 합성 제품의 최대잔류허용기준(Maximum residual level, MRL)을 0.02 mg/kg^[2]로 지정해 관리하고 있다. 또한 EO의 대사물인 2-클로로에탄올(2-Chloroethanol, 2-CE)도 EO^[1]와 유사한 독성 효과를 나타낼 수 있어 관리 대상에 포함 된다.

본 뉴스레터에서는 Application Databook^[3]을 참조하여 동적 헤드스페이스(Dynamic headspace)와 결합된 GC-MS/MS를 사용한 라면 중 EO 및 2-CE를 정량하는 시험법을 최적화하였다. 시료는 헤드스페이스 자동주입장치에 의해 직접 주입하여 분석하였고 Matrix-matched 검정곡선을 제외한 내부표준법을 사용하였다. 분석 결과, 라면 중 EO와 2-CE은 10 ng/g 농도에서 양호한 회수율을 확인 할 수 있었다(70 ~ 130 % 범위).

■ 실험

분석 조건

본 연구에서는 HS-20 NX Trap(Shimadzu Corporation, Japan)을 적용한 GCMS-TQ8050 NX를 사용하였다(그림 1). GCMS-TQ8050 NX는 초미량 분석을 위한 고효율 검출기 및 특허 소스 기술을 탑재하여 최적의 감도를 제공한다. HS-20 NX Trap은 정적(Static) 및 동적(Dynamic) 헤드스페이스 모드를 실행할 수 있으며, 본 뉴스레터에서는 감도를 향상시키기 위해 동적 헤드스페이스(흡착관 사용)를 사용하였다(그림 2).

분석에 사용된 조건은 표 1에 나타내었다.



그림 1. HS-20 NX Trap 자동주입장치와 GCMS-TQ™8050 NX.

표 1. 라면 중 EO 및 2-CE를 분석하기 위한 동적 헤드스페이스와 GC-MS/MS의 분석조건

Headspace Autosampler Parameter (HS-20 NX, Trap Model)	
Oven Temp.	70 °C
Sample Line Temp.	110 °C
Transfer Line Temp.	130 °C
Trap Cooling Temp.	-20 °C
Trap Desorb. Temp.	200 °C
Trap Equilib. Temp.	-20 °C
Shaking Level	5
Multi Injection Count	3
Pressurizing Gas Pressure	105 kPa (Helium)
Equilibrating Time	5.0 min
Pressurizing Time	0.3 min
Pressure Equilib. Time	0.0 min
Load Time	0.3 min
Load Equilib. Time	0.0 min
Dry Purge Time	0.0 min
Injection time	10.0 min
Needle Flush Time	10.0 min
GC Cycle Time	25.0 min
GC Parameter	
Carrier Gas	Helium
Injection Mode	Split mode, split ratio 15
Flow Control Mode	Linear Velocity, 40.2 cm/s
Purge Flow	3 mL/min
Column	SH-I-624 Sil MS (60 m x 0.25 mm ID x 1.4 µm df) [P/N: 227-36076-01]
Column Oven Temperature Program	35 °C (hold time: 4 min) → rate: 50 °C/min to 240 °C → rate: 20 °C/min to 300 °C (hold time: 3.9 min)
MS/MS Parameter	
Ion Source Temp.	250 °C
Interface Temp.	235 °C
Solvent Cut Time	3 min
MRM transition* (Collision Energy)	
EO	44>29 (6), 44>28 (6), 44>14 (18)
EO-d4	48>20 (6), 48>30 (5), 48>16 (20)
2-CE	80>31 (6), 80>44 (5), 82>31 (6)
2-CE-d4	84>33 (5), 86>33 (5)

* 일부 MRM 조건은 특정 matrix에서 식별이 어려울 수 있기 때문에, 최적의 MRM 조건이 필요할 수 있음.

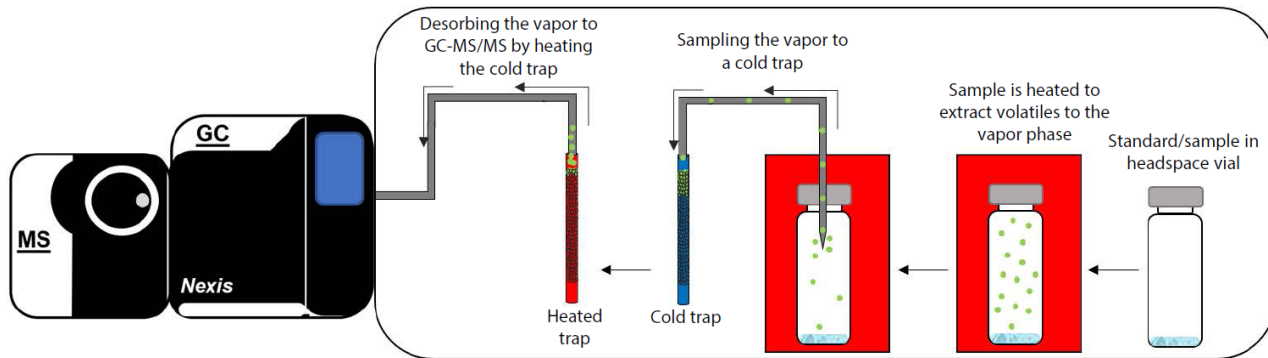


그림 2. 동적 헤드스페이스의 모식도, GC-MS/MS로 주입되기 전 콜드 트랩에 휘발성 물질의 농축

표준물질과 시료 준비

내부표준물질인 EO-d4 및 2-CE-d4는 Cambridge Isotope Laboratories, EO 및 2-CE, 황산 마그네슘(MgSO₄)은 Merck, 아세토니트릴은 Kanto Chemical에서 구매하였다.

표준용액의 제조를 위해 EO와 2-CE를 아세토니트릴로 희석하여 최종 농도가 100, 200, 500, 1000 및 2000 pg/μL가 되도록 하였다. EO-d4와 2-CE-d4의 내부표준용액은 500 pg/μL가 되도록 아세토니트릴에 희석하여 준비한 뒤 각 표준용액과 시료에 동량으로 첨가하여 이용하였다.

Matrix matched 검정곡선을 위해 20 mL의 헤드스페이스 바이알에 5개의 표준 용액 5 μL를 각각 넣고 캡으로 즉시 밀봉하여 헤드스페이스 자동주입 장치에 장착했다. 이때, 시료 중 EO 및 2-CE의 최종 농도는 5, 10, 25, 50 및 100 ng/g이며, 내부표준물질 EO-d4와 2-CE-d4는 25 ng/g이 된다.

시료 분석을 위해 시료 0.1 g을 20 mL 헤드스페이스 바이알에 넣고 5 μL의 내부표준용액(500 pg/μL)을 시료에 주입한 후 캡으로 즉시 밀봉하여 헤드스페이스 자동주입장치에 넣어 분석하였다.

회수를 측정을 위해 헤드스페이스 바이알에 시료 0.1 g을 넣고 표준용액 EO 및 2-CE 200 pg/μL를 5 μL, 내부표준용액 EO-d4 및 2-CE-d4 500 pg/μL를 5 μL 씩 취하여 각 시료에 첨가하였다. 이 때 시료 중 EO 및 2-CE의 최종 농도는 10 ng/g이 되며, 헤드스페이스 바이알은 즉시 밀봉하여 분석에 이용하였다. 시료 중 물을 포함하는 시료의 경우에는 바이알을 밀봉하기 전 50 mg의 황산 마그네슘을 첨가하였다.

■ 결과

감도, 재현성 및 직선성

그림 3은 내부표준검정곡선(5, 10, 25, 50 및 100 ng/g)과 EO, 2-CE 및 내부표준물질의 MRM 크로마토그램이다. 검정곡선의 R²값은 두 성분이 0.999 이상으로 모두 우수한 직선성을 보였다. 또한 두 성분 모두 5 ng/g 농도에서 피크의 신호 대 잡음비(S/N)가 10 이상으로 정량한계(LOQ) 기준의 한계를 충족했으며, 해당 농도에서 EO 및 2-CE 모두 피크 면적에 대한 % RSD(n=5)는 10 % 미만으로 나타났다(표 2).

표 2. EO 및 2-CE (5 ng/g)의 면적 재현성 (n=5)과 S/N

No.	Compound Name		Injection 1	Injection 2	Injection 3	Injection 4	Injection 5	% RSD
1	EO	Area count	12773	11961	11473	12045	11328	4.8
		S/N	65	60	68	107	79	
2	2-CE	Area count	5109	5306	5251	5652	4568	7.6
		S/N	30	102	22	46	44	

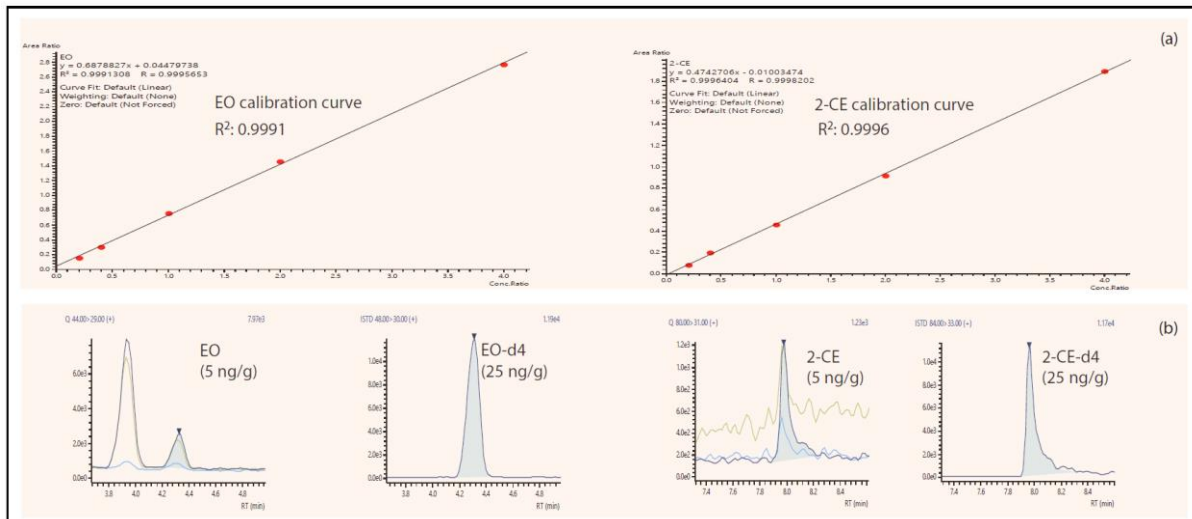


그림 3. (a) EO 와 2-CE의 5 포인트 검정곡선; (b) EO, EO-d4, 2-CE, 2-CE-d4의 MRM 크로마토그램

표 3a. 라면 A의 EO와 2-CE의 농도 및 회수율 결과

Sample In Instant Noodle A		Conc Result (ng/g)		% Recovery	
		EO	2-CE	EO	2-CE
Noodle A	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	9.737	11.454	97	115
Seasoning Powder A	Unspiked	N.D.*	3.142 (<LOQ)		
	10 ng/g Spiked	10.602	12.969	106	98**
Seasoning Oil A	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	9.003	11.662	90	117

표 3b. 라면 B의 EO와 2-CE의 농도 및 회수율 결과

Sample In Instant Noodle B		Conc Result (ng/g)		% Recovery	
		EO	2-CE	EO	2-CE
Noodle B	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	9.044	10.092	90	101
Seasoning Powder B	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	7.905	12.009	79	120
Dried Vegetable B	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	8.159	10.946	82	109
Seasoning Oil B	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	8.595	9.923	86	99
Sauce B1	Unspiked	N.D.*	5.668		
	10 ng/g Spiked	9.834	13.984	98	83**
Source B2	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	7.185	10.850	72	109

* 불검출 (Not Detected)

** 첨가된 농도에서 무첨가 시료 결과를 제외하고 계산된 회수율

정량 및 회수율 결과

지역 마켓에서 4종류의 라면을 구입하여 라면의 재료인 면, 소스, 조미가루 및 조미유를 별도로 분석하고 각 시료에 10 ng/g 농도가 되도록 표준용액을 첨가하여 회수율을 확인하였다. 표 3a-3d에서 첨가된 시료의 평균 농도(n=2)와 회수율을 보여주고 있다. 양성 결과를 얻은 시료의 경우, 회수율을 계산하기 전 무첨가 시료의 농도를 제외한 후 첨가된 농도의 회수율이 결정되었다.

모든 시료에 대한 회수율 결과가 70 - 130 % 범위 내로 나타났으며, 이는 EO 및 2-CE를 분석하는데 있어 동적 헤드스페이스와 GC-MS/MS를 이용한 분석이 적합하다는 것을 알 수 있었다. 또한 해당 분석 시 matrix matched 검량곡선을 사용하지 않아도 분석이 가능함을 확인하였다.

다만, Matrix의 간섭으로 인해 회수율이 70 - 130 % 범위를 벗어나는 경우에는 matrix matched 검량곡선을 사용하는 것이 결과를 개선할 수 있을 것으로 여겨진다. Matrix 간섭이 심한 시료의 경우, 수동 추출 및 정제과정 추가와 같은 다른 시료 준비 과정이 필요할 수 있으며, 동적 헤드스페이스 대신 액체 주입 모드를 이용하는 GC-MS/MS 분석이 필요할 수 있다.

표 3c. 라면 C의 EO와 2-CE의 농도 및 회수율 결과

Sample In Instant Noodle C		Conc Result (ng/g)		% Recovery	
		EO	2-CE	EO	2-CE
Noodle C	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	9.246	12.170	92	122
Seasoning Powder C	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	8.051	11.360	81	114
Dried Vegetable C	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	8.206	11.816	82	118

표 3d. 라면 D의 EO와 2-CE의 농도 및 회수율 결과

Sample In Instant Noodle D		Conc Result (ng/g)		% Recovery	
		EO	2-CE	EO	2-CE
Noodle D	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	8.832	10.952	88	110
Seasoning Powder D	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	7.926	11.078	79	111
Dried Vegetable D	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	9.085	11.089	91	111
Seasoning Oil D	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	8.888	10.931	89	109
Sauce D1	Unspiked	N.D.*	4.340 (<LOQ)		
	10 ng/g Spiked	11.210	12.818	112	85**
Source D2	Unspiked	N.D.*	N.D.*		
	10 ng/g Spiked	8.588	9.665	86	97

또한, 수분함량이 높은 시료의 경우, 별도의 처리가 없이 해당 분석을 진행하면 2-CE의 피크 모양이 넓어지거나 감도가 낮아지는 현상이 나타났다. 이 때 시료에 황산 마그네슘을 첨가함으로써 이 문제점을 개선할 수 있었다(그림 4). 따라서 물이 포함된 시료의 경우 시료 전처리의 마지막 단계에서 황산 마그네슘을 첨가하는 것이 권장된다. 또한 표 4에 나타난 바와 같이, 황산 마그네슘의 첨가는 EO와 2-CE의 회수율에는 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

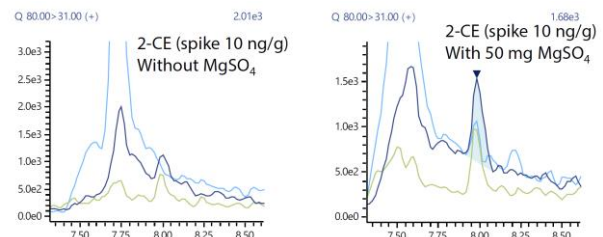


표 4. 황산 마그네슘이 첨가되지 않은 것과 50 mg의 황산 마그네슘이 첨가된 동일한 시료 (소스)의 MRM 크로마토그램 (10 ng/g)

표 4. 황산 마그네슘을 첨가한 EO 및 2-CE 농도 결과 (10 ng/g)

Magnesium sulphate	Conc Result (ng/g)		% Recovery	
	EO	2-CE	EO	2-CE
50 mg MgSO ₄ (10 ng/g spiked)	9.021	9.958	90	100

■ 결론

HS-20 NX Trap과 GCMS-TQ8050 NX를 이용하여 라면의 EO 및 2-CE 분석을 위한 내부표준법을 성공적으로 개발하였으며, 이를 위해 시료 준비의 번거로움을 줄일 수 있는 동적 헤드스페이스 기법을 사용하였다. 비록 matrix-matched 검정곡선을 적용하지 않았으나, 본 실험에서 분석된 모든 시료에 대해 우수한 직선성($R^2 > 0.999$)과 회수율 결과(70 ~ 130 % 이내)를 보여주었다.

■ 참고문헌

1. United States Environmental Protection Agency, *Ethylene Oxide*, accessed 18 December 2023 <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/ethylene-oxide.pdf>
2. European Commission, *Summary of the Meeting on Ethylene Oxide (ETO): Regulatory and Technical Aspects*, accessed 18 December 2023 https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-12/rasff_ethylene-oxide-incident_e410_crisis-coord_20211004_sum.pdf
3. Shimadzu Application Databook SAIP-GC001-APDB001, *Analysis of Ethylene Oxide (EO) & 2-Chloro Ethanol (2-CE) Application Databook*, accessed 18 December 2023 <https://www.an.shimadzu.com/rs/119-VAD-470/images/EtO%20Analysis.pdf>

