

LC-ICP-QQQ를 이용한 와인 내 비소 화학종 함량의 빠른 분석

응용 자료
식품 및 음료

저자

Courtney Tanabe¹⁻², Susan E. Ebeler¹⁻², Jenny Nelson¹⁻³

¹Food Safety and Measurement Facility, University of California, Davis, USA

²Department of Viticulture and Enology, University of California, Davis, USA

³Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA



소개

비소(As)는 환경에서 자발적으로 발생하지만, 일부 지역에서 검출되는 비소 농도는 인간의 활동과 연관됩니다. 광업과 제련 및 발전 등 산업 활동과 농업용 농약 및 목재 방부제 사용으로 비소가 환경으로 배출됩니다[1]. 일단 오염이 발생하면, 수십 년 동안 환경에 잔류합니다. 예를 들어, 농약으로 광범위하게 사용되었던 비소 화합물은 1970년대 사용이 중지되었으나, 일부 지역 토양에서는 낱과 칼슘 비소가 아직도 높은 농도로 검출됩니다. 용수나 토양 내 비소는 농작물에 흡수될 수 있습니다. 와인 내 비소 함량은 와인 제조 공정에 따라 달라집니다.

비소는 다양한 형태로 식품과 음료에 함유되며, 화학적 형태에 따라 독성을 다르게 보입니다. As(III)(arsenite)과 As(V)(arsenate)로 형성되는 무기 비소가 가장 독성이 높으며, 1급 발암 물질로 분류됩니다. 대조적으로, 신선한 해산물에서 가장 많이 발견되는 arsenobetaine(AB)는 인체에 무해합니다. 화학종마다 크게 다른 독성과 무기 비소가 인체에 미치는 잠재적인 유해성을

8900 ICP-QQQ로
검증됨



Agilent Technologies

고려하면, 식음료에 함유된 비소의 총 함량보다는 개별 비소 화학종의 농도를 결정하는 접근법이 바람직합니다. 미국 식품의약국(US Food and Drug Administration, FDA)은 사과 주스에 함유된 비소 농도를 10µg/kg(ppb)으로 제한하는 규정을 마련하였으나[2], 와인에 포함된 비소 함량은 규제되지 않고 있습니다. 캐나다 브이큐에이(Vintners Quality Alliance VQA, Ontario)과 유럽 국제포도과와인기구(International Organisation of Vine and Wine, OIV)는 와인 내 총 비소 함량을 100과 200µg/L(ppb)으로 제한하고 있습니다[3, 4].

비소에 의한 식품 불순물은 중대한 공공 관심사입니다. 기존 및 향후 규정에 부합하며, 식품 및 음료에 포함된 무기 비소 함량을 정확하게 결정할 수 있는 빠르고 신뢰성 높은 스크리닝 방법이 요구되고 있습니다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 비소 화학종을 분리하고, 분리된 화학종을 유도 결합 플라즈마 질량 분석기(ICP-MS)로 정량하는 방법은 가장 유용하며 신뢰할 수 있는 분석법 중 하나입니다[5].

이 응용 자료는 사용한 방법은 HPLC를 삼중 사중극자 ICP-MS(ICP-QQQ)와 연결하여 Jackson이 개발한 이전 비소 종분리 분석법을 토대로 작성되었습니다[6]. 이 연구에서도 HPLC-ICP-QQQ를 사용하였습니다. 그러나 개별 무기 비소종을 분석하는 대신, 분석 전에 hydrogen peroxide로 As(III)를 As(V)로 산화하였습니다[7, 8]. As(III)를 산화하고 모든 무기 비소종을 As(V) 형태로 분석하여, As(V) 형태의 무기 비소에서 monomethylarsonic acid(MMA)와 dimethylarsinic acid(DMA)를 2분 이내에 분리할 수 있었습니다. 현재 FDA 분석법과 비교하여 비소 종분리 분석 시간을 10배 단축할 수 있었습니다[9].

이 연구에서는 ICP-QQQ 충돌/반응 셀(CRC) 반응 가스로 산소를 사용하여 ⁷⁵As에 미치는 스펙트럼 간섭을 분리하고, 동시에 높은 감도를 유지하였습니다. 새 분석법의 정확성과 재현성을 보여주는 결과를 요약하였습니다. 이 연구에 참여한 다른 두 실험실에서 와인 매트릭스로 분석하여 새로운 분석법을 추가 검증하였습니다.

실험

표준품

As(III)와 As(V) 표준품은 Spex Certiprep(Christiansburg, VA; Metuchen, NJ, USA) 제품을 사용하였습니다. MMA와 DMA 표준품은 Chem Service(West Chester, PA, USA)에서 구입하였습니다. AB 표준품은 Chem Service사에서 구입하여 flow injection 마커(내부 표준물질)로 사용하고 컬럼 말단에(post-column) 주입하였습니다. DMA와 MMA, 무기 비소 총량(As(III)와 As(V)의 총량) 결정을 위한 검량 표준물질은 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 및 20µg/L(ppb) 농도를 사용하였습니다.

시료

캘리포니아 와인 5종을 선정하여 밸리데이션(V) 연구를

수행하였습니다. 다섯 종류의 주요 와인(레드, 화이트, 로제(rosé), 스파클링, 디저트용)을 대표하는 각각의 와인을 선정하여 시험에 사용하였습니다. 상업적인 마켓 바스켓(commercial market, MB) 연구를 위해 캘리포니아산 와인 5종을 추가 분석하였습니다. 표 1에 시료로 사용된 모든 와인의 유형, 품종, 재배 지역, 생산 연도 및 알코올 함량을 자세히 요약하였습니다.

표 1. 밸리데이션과 상업적인 마켓 바스켓에 사용된 와인 시료의 종류, 품종, 원산지, 생산 연도 및 알코올 함량

시료	유형	품종	원산지	생산 연도	알코올(%v/v)
V-1	로제(Rosé)	Zinfandel	Napa와 Lodi	NA	9.5
V-2	화이트	Sauvignon blanc	Oakville/Napa 카운티	2013	13.0
V-3	스파클링	스파클링 화이트 블렌드	Sonoma 카운티	NA	12.0
V-4	디저트	Petite Sirah Port-style	Clarksburg/Yolo 카운티	2012	20.0
V-5	레드	Cabernet Sauvignon	Monterey 카운티	2013	14.5
MB-1	레드	Cabernet Sauvignon	북부 연안	2009	13.5
MB-2	레드	Pinot noir	Appellation 중부 연안	2004	13.8
MB-3	화이트	Chardonnay	Santa Barbara County	2013	13.5
MB-4	로제(Rosé)	Zinfandel	Napa와 Sonoma	2013	10.5
MB-5	화이트	Chardonnay	중부 연안	2013	13.5

시료 전처리

As(III)를 As(V)로 산화하기 위해 모든 시료에 H₂O₂를 1:1로 첨가하였습니다. 탈이온수로 각 시료를 최종 총 희석 배율 5 또는 6으로 희석하였으며, 두 희석 배율에 따른 차이는 발견되지 않았습니다. 각 시료를 0.45µm 시린지 필터로 여과하여 입자상 물질을 제거하였습니다. 시료 V-1, V-4, V-5는 모든 비소 화학종을 5, 10 및 30µg/kg 농도 수준으로 중복하게 스파이크하였습니다 (N=2).

기기

Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS(ICP-QQQ)와 연결된 Agilent 1260 HPLC에 Hamilton PRP-X100 5µm 50 x 2.1mm 컬럼을 사용하여 분석을 수행하였습니다. 이동상으로는 3% v/v methanol을 함유한 40mM ammonium carbonate((NH₄)₂CO₃, 극미량 금속 등급 99.999%, Sigma Aldrich)을 사용하고, ammonium hydroxide(Optima LC/MS 등급, Fisher Chemical)로 pH를 9.0로 조정하였습니다. 시료 주입에는 ICP-QQQ는 석영 토치(내경 2.5mm 주입기), 석영 스프레이 챔버, glass concentric nebulizer 및 nickel-tipped interface cone 으로 구성된 표준 시료 주입 시스템을 사용하였습니다. 피크

적분은 FDA EAM §4.10 및 4.11.15에 따라 수행하였습니다[9]. 표 2에 기기 운용 조건을 요약하였습니다.

표 2. HPLC-ICP-QQQ 운용 조건

ICP-QQQ	
Forward power	1550W
Sampling depth	8.0mm
스프레이 챔버 온도	2°C
운반 가스	0.95L/min
Makeup 가스	0.20L/min
Extract 1	0V
팔중극자 바이어스	-5.0 V
에너지 분별성(V)	-7 V
셀 가스(O ₂) 유속	0.31mL/min
스캔 모드	MS/MS
Q1/Q2 질량	75/91u
HPLC	
이동상 유속	0.5mL/min
주입량	5µL
시료 주입 온도	4°C
ISTD 주입량	5µL

결과 및 토의

빠른 시험법 개발

이 연구에서는 시료당 소요되는 분석 시간 단축에 중점을 두고 분석법을 개발하였습니다. Jackson의 제안대로, 작은 주입 용량과 짧은 이온 교환 컬럼을 사용하고 셀 가스로 산소를 사용하였으며, 이동상 선속도를 높게 설정하였습니다[6].

검량을 위해 0.5, 1.0, 5.0 및 20µg/kg에서 측정된 표준품의 대표적인 오버레이한 크로마토그램을 그림 1에 나타내었습니다. 모든 비소 화학종을 2분 이내 명확하게 분리할 수 있었습니다. As(III)를 As(V)로 산화하고 모든 무기 비소를 As(V) 형태로 분석하여, 기존 FDA 규제 방법보다 분석 시간을 크게 단축할 수 있었습니다[9].

선형 검량

DMA, MMA 및 무기 비소의 검량선은 높은 직선성을 보였습니다.(그림 2). 무기 비소를 제외하고 시료 내 모든 비소 화학종 농도는 직선 범위(linear range) 내에 있었으며, 무기 비소 최고 농도는 검량 표준물질 상한 농도의 150%였습니다.

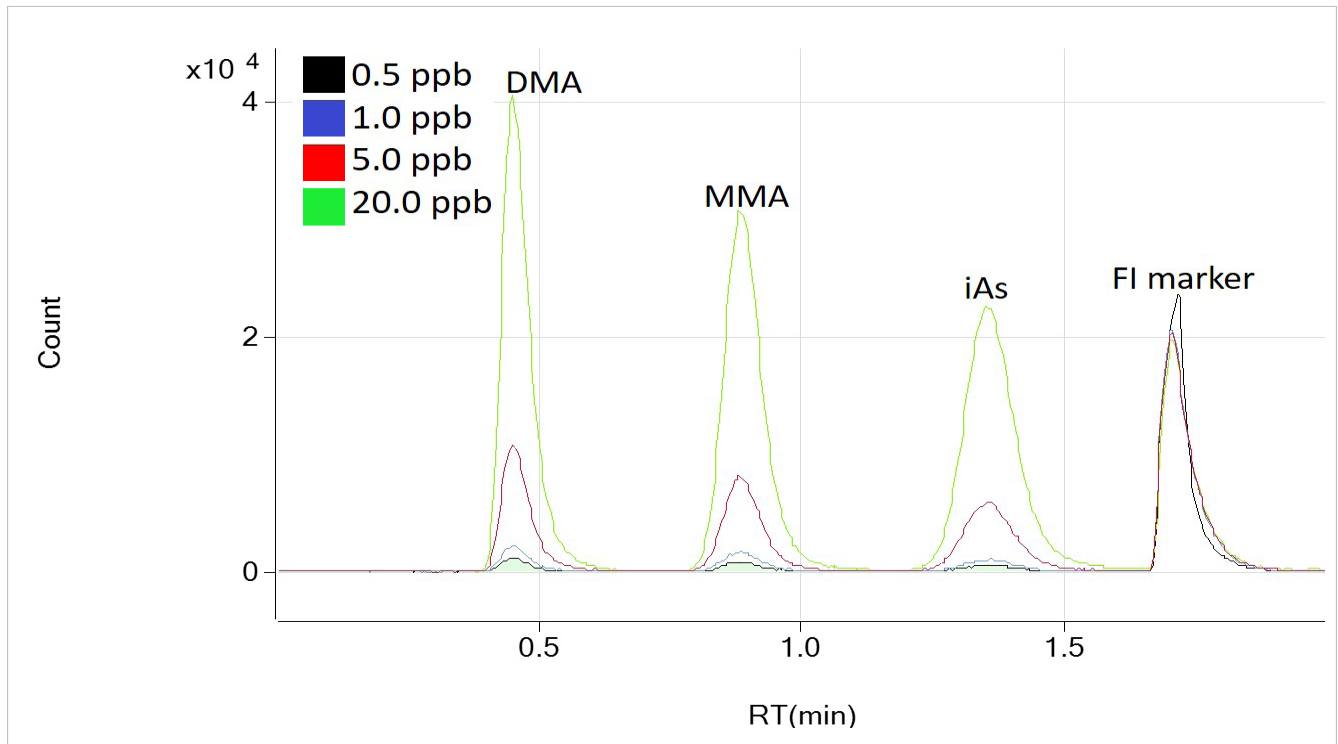


그림 1. 표준품 농도 0.5, 1.0, 5.0 및 20.0µg/kg에서 측정된 검량선 오버레이. AB 내부 표준물질(flow injection 마커, 네 번째 피크)은 외부 스위칭 밸브를 사용하여 컬럼 말단(post-column)에 주입하였습니다.

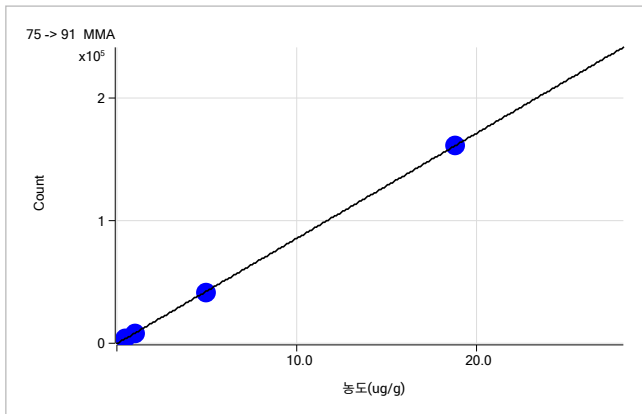
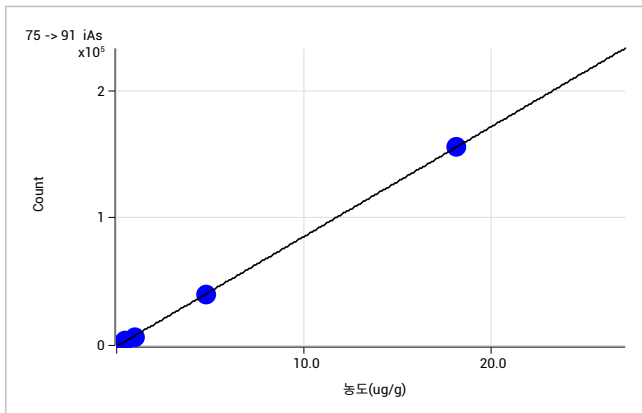
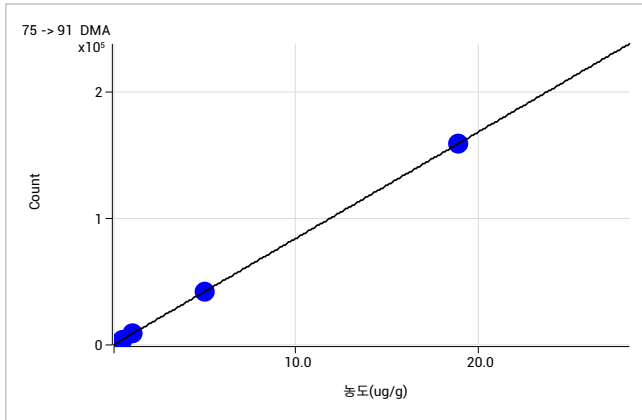


그림 2. DMA, MMA 및 총 무기 비소(산화된 As(III)와 As(V)의 총량) 검량선

검출 한계

표 3에 요약한 검출 한계(LOD)와 정량 한계(LOQ)는 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) 표준품 혼합물을 사용하여 결정하였습니다($n=15$).

표 3. LOD(3 시그마), LOQ(30 시그마) 및 추정된 와인 LOQ.

	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	추정된 와인 LOQ(6배 희석) $\mu\text{g}/\text{kg}$
DMA	0.018	0.175	1.1
MMA	0.026	0,258	1,5
iAs	0.022	0,221	1,3

영국왕립화학회(The Royal Society of Chemistry)의 허가를 받아 게재

스파이크 회수율(%)

시료 V-1, V-4, V-5는 각 비소 화학종(DMA, MMA 및 As(V)로 총 iAs)을 5, 10 및 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 중복하게 스파이크하였습니다. 세가지 다른 농도 레벨에서 모든 비소 화학종의 평균 회수율은 $100 \pm 3\%$ 였습니다(표 4).

표 4 DMA, MMA 및 무기 비소를 세 스파이킹 농도로 V-1, V-4 및 V-5 시료에서 회수율(평균과 범위).

	DMA	MMA	iAs
평균, %	102	97	99
범위, %	97~107	91~102	95~103

정량 결과

새 HPLC-ICP-QQQ 분석법으로 와인 시료 10종을 분석하였습니다. 측정된 DMA와 무기 비소 농도를 표5에 요약하였습니다. 모든 MMA 측정값은 LOD 추정값(0.026 $\mu\text{g}/\text{kg}$)보다 낮아 정량이 불가능하였습니다. 이 연구에서 개발한 새로운 측정법을 사용하여 측정된 농도는 FDA EAM §4.10 확장 분석법을 사용하여 얻은 값과 비교하였습니다[10]. 두 방법으로 측정한 함량은 대부분 $\pm 10\%$ 내에서 일치하였으며, 모든 와인 시료에서 무기 비소가 총 비소 함량의 대부분을 차지하였습니다. 유일하게 MB-3 와인 시료에서는 DMA 함량이 LOQ(1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)보다 월등히 높았습니다. V-1 시료의 크로마토그램을 그림 3에 나타내었습니다.

전체적으로 무기 비소의 농도는 1.7 ± 0.3 에서 $32.9 \pm 0.8\mu\text{g}/\text{kg}$ 사이로 나타났습니다(상한 값은 FDA가 정한 사과 주스 내 무기 비소 허용 한도인 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 초과). 총 비소 함량(표 5)은 2.2 ± 0.3 에서 $32.9 \pm 0.8\mu\text{g}/\text{kg}$ 사이로, 캐나다가 정한 허용 한계 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 과 OIV가 정한 허용 한계 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ (ppb)보다 낮았습니다.

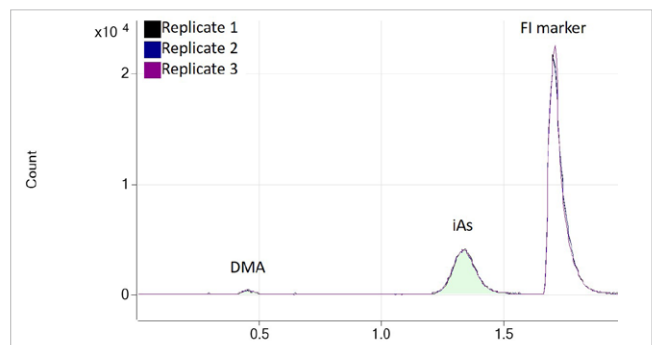


그림 3. 3회 반복 측정된 와인 시료 V-1의 오버레이를 보여주는 크로마토그램.

표 5. 새로 개발한 분석 시간이 짧으며 용도에 적합한 분석법(다른 두 실험실에서 측정)과 FDA EAM §4.10 확장 분석법을 이용하여 밸리데이션(V) 시료 5종과 마켓 바스켓(MB) 와인 시료 5종을 분석한 결과. % 회수율(괄호 안에 표시)은 “측정값/EAM §4.10” 또는 “화학종 총합/총 비소 함량”으로 계산하였습니다.

시료	DMA (µg/kg)		iAs(µg/kg)		총 비소(µg/kg)	
	EAM §4.10	측정값	EAM §4.10	측정값	합계	화학종 총량
V-1	0.81 ± 0.1*	0.72 ± 0.04(89%)	14.4 ± 1.0	16.0 ± 0.5(111%)	16.5 ± 0.02	16.7 ± 0.5(101%)
V-2	0.74 ± 0.04*	0.72 ± 0.06(98%)	10.7 ± 0.2	11.4 ± 0.4(107%)	12.6 ± 0.16	12.1 ± 0.3(96%)
V-3	0.75 ± 0.1*	0.83 ± 0.04(111%)	9.2 ± 0.4	9.5 ± 0.6(103%)	10.4 ± 0.11	10.3 ± 0.5(99%)
V-4	1.70 ± 0.1	1.86 ± 0.06(109%)	2.1 ± 0.3	2.3 ± 0.4(109%)	4.5 ± 0.01	4.1 ± 0.4(92%)
V-5	0.45 ± 0.01*	0.47 ± 0.04(105%)	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.3(113%)	2.4 ± 0.03	2.2 ± 0.3(90%)
MB-1	<LOD	<LOD	30.2 ± 1.3	32.9 ± 0.8(109%)	34.4 ± 0.4	32.9 ± 0.8(96%)
MB-2	0.33 ± 0.04*	<LOD	7.57 ± 0.49	9.1 ± 0.4(120%)	9.1 ± 0.3	9.1 ± 0.4(100%)
MB-3	0.71 ± 0.08*	1.1 ± 0.0(155%)	24.64 ± 0.40	27.6 ± 0.7(112%)	28.9 ± 0.9	28.6 ± 0.7(99%)
MB-4	1.16 ± 0.09*	1.0 ± 0.1(86%)	26.3 ± 0.89	27.5 ± 0.9(105%)	27.9 ± 0.9	28.5 ± 0.9(102%)
MB-5	<LOD	<LOD	3.5 ± 0.25	4.5 ± 0.1(129%)	4.7 ± 0.1	4.5 ± 0.1(96%)

평균 ± 1σ, n=3. *로 표시한 값은 EAM §4.10 분석법에서 LOD(0.17µg/kg)와 LOQ(1.3µg/kg) 사이에 위치한 값을 나타냅니다. 측정 LOD와 LOQ는 표 3을 참조하시기 바랍니다.

결론

이 응용 자료에서는 간단하고 견고하며 2분 이내 짧은 분석 시간으로 독성이 가장 높은 비소 화학종(As(III)과 As(V))과 유기 비소 2종의 총 함량을 측정할 수 있는 빠른 HPLC-ICP-QQQ 분석법을 소개하였습니다. 시료 전처리 과정에서 H₂O₂로 As(III)를 As(V)로 산화한 후, As(V)로 무기 비소 총 함량을 측정하여, 와인 시료에서 분석하고자 하는 화학종을 더 빠르게 분리할 수 있었습니다. 내경이 좁은 컬럼과 0.5mL/min 유속을 사용하여 감도를 높였으며, 그 결과 적은 시료 주입량으로도 분석이 가능하였습니다. 와인 내 비소 함량 측정에 사용되는 기존 FDA 방법과 비교하여 시료 분석 시간이 10배 단축되었으며, 동시에 검출 및 정량 한계도 향상되었습니다.

이 연구 결과에 따르면, 총 비소 농도는 2.2에서 32.9µg/kg 사이로 캐나다 VQA와 유럽 국제포도와인기구 OIV가 정한 100과 200µg/L(ppb) 허용 한도보다 낮았습니다. 그러나 무기 비소가 비소 함량의 대부분을 차지했으며, 와인 시료 다섯 개에서 검출된 무기 비소 농도는 FDA가 사과주스 내 무기 비소 함유량 한계로 정한 10µg/kg을 초과하였습니다.

이 연구에서 개발한 분석법은 짧은 분석 시간과 용도 적합성이 특징이며, 새로운 분석법으로 측정한 결과는 FDA의 EAM §4.10 방법으로 측정한 결과와 잘 일치하였습니다.

참고문헌

1. H. Garelick, H. Jones, A. Dybowska, E. Valsami-Jones, Arsenic pollution sources, *Rev Environ Contam Toxicol.* **2008**, 197, 17–60
2. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition, Guidance for Industry Arsenic in Apple Juice: Action Level (draft), 2013, accessed August 2017: <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm360020.htm>
3. Canada Ontario, V. Q. A., Wine Standards. 1999, accessed August 2017: <http://www.vqaontario.ca/Regulations/Standards>
4. OIV–Compendium of International Methods of Analysis. Maximum acceptable limits of various substances contained in wine, 2011 issue. Europe
5. B. Sadee, M. E. Foulkes, S. J. Hill, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, 30, 102–118
6. B. P. Jackson, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2015**, 30, 1405–1407
7. S. Musil, Á. H. Pétursdóttir, A. Raab, H. Gunnlaugsdóttir, E. Krupp, J. Feldmann, *Anal. Chem.*, **2014**, 86 (2), 993–999
8. H. R. Hansen, A. Raab, A. H. Price, G. Duan, Y. Zhu, G. J. Norton, J. Feldmann, A. A. Meharg, *J. Environ. Monit.*, **2011**, 13, 32–34
9. K. M. Kubachka, N. V. Shockey, T. A. Hanley, S. D. Conklin and D. T. Heitkemper, Arsenic Speciation in Rice and Rice Products Using High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Determination version 1.1, accessed August 2017, <https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM479987.pdf>
10. C. K. Tanabe, H. Hopfer, S. E. Ebeler, J. Nelson, S. D. Conklin, K. M. Kubachka, and R. A. Wilson, Matrix Extension and Multilaboratory Validation of Arsenic Speciation Method EAM §4.10 to Include Wine, *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65 (20), 4193–4199

더 자세한 정보

이 응용 자료에서 기술한 방법에 관한 더 자세한 정보는 아래 문헌을 참조하십시오.

Patrick J. Gray, Courtney K. Tanabe, Susan E. Ebeler, and Jenny Nelson, A fast and fit-for-purpose arsenic speciation method for wine and rice, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2017**, 32, 1031–1034; DOI: 10.1039/C7JA00041C

감사의 글

이 연구는 Agilent Technologies, Gerstel US 및 Constellation Brands의 지원으로 University of California, Davis 내, Food Safety 및 Measurement Facility에서 수행하였습니다.

8900 ICP-QQQ로

검증됨



본 문서에 제시된 결과는 8800 ICP-QQQ를 사용하여 얻은 것지만 8900 ICP-QQQ로도 검증됩니다.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 자료의 오류 또는 장비의 설치, 성능, 이 자료의 사용 등과 관련된 사고나 결과적 손상에 대해 법적 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명, 사양은 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2017

2017년 10월 11일 발행

발행물 번호: 5991-8454KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418

한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부

고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies