

HPLC-ICP-QQQ를 이용한 비소의 종분리 시험

확장된 FDA 원소 분석법 밸리데이션 수동 분석법



저자

C. K. Tanabe,¹ H. Hopfer,^{1,2,3}
S. E. Ebeler^{1,2}, J. Nelson^{1,2,4}

1. Dept. Viticulture & Enology,
University of California (Davis),
USA

2. Food Safety & Measurement
Facility, University of California,
(Davis), USA

3. Depart. of Food Science, The
Pennsylvania State University,
Pennsylvania, USA

4. Agilent Technologies, USA

미국 식품의약품청(FDA)은 2013년 EAM(Elemental Analysis Manual) 분석법 §4.10을 발표하였습니다. 이 분석법에서 고성능 액체 크로마토그래피와 유도결합플라즈마-질량 분석법을 함께 사용하여 과일 주스 내 함유된 네가지 비소 종의 함량을 결정하는 방법을 기술하였습니다[1]. 이 분석법을 와인에 확대 적용하기 위해, 미국에 있는 세 개의 실험실에서 이 분석법에 대한 여러 실험실 검증(MVL)을 수행하고 데이터를 공유하였습니다[2]. 이 응용 자료에 포함된 데이터는 출판된 데이터를 보완합니다. 논문에 발표된 결과에 더하여, 이 자료에 분석법의 장기간 안정성과 시판 와인 5종을 사용하여 확장된 정량 분석법 결과를 포함하였습니다. 이 분석법에서는 모든 목적된 화학종의 분리 및 분석이 필요했습니다. 이 접근법은 분석 기간 단축에 초점을 두고 무기 비소 분석법을 소개한 다른 애질런트 응용 자료와 구분됩니다[3].

EPA(Environmental Protection Agency)는 음용수 내 총 비소 함량 최대 임계값은 10µg/kg으로 정하였습니다[4]. 그러나 와인에 적용되는 비소에 관한 적절한 미국 기준은 마련되지 않습니다. 연구에 따르면, 와인 내 비소는 환경으로부터 포도에 축적되거나[5] 와인 제조 공정에서 유입된[6] 비소에 기인합니다.

Verified for Agilent
8900 ICP-QQQ



캐나다의 규제기관(Vintners Quality Alliance VQA, Ontario)과 유럽 국제포도과와인기구 OIV(International Organisation of Vine and Wine, OIV)는 와인 내 총 비소 함량을 100과 200 µg/L(ppb)으로 제한하고 있습니다[7, 8]. 그러나 비소 중의 독성은 화학적 형태에 따라 다릅니다. FDA는 2013년 무기 비소(iAs)의 발암성이 가장 높다는 점을 고려하여, 사과 주스 내 무기 비소 함량 허용 기준을 10µg/kg으로 정하였습니다[9]. FDA EAM 분석법 §4.10에서는 HPLC-ICP-MS를 이용한 과일 주스에서 비교적 간단하며 신뢰성 높은 비소 중 분석법을 기술하고 있습니다[1]. 위 분석법을 사용하여 무기 비소(arsenite, As(III)와 arsenate, As(V)의 총량)와 dimethylarsinic acid(DMA) 및 monomethylarsonic acid(MMA) 함량을 결정할 수 있습니다. 또한, arsenobetaine(AB)과 As(III) 혼합용액에서 흘러간 비소 화학종과 As(III)를 적절히 분리하는 방법이 제시되어 있습니다.

최근 와인에 함유된 비소 농도에 관한 언론의 관심과 와인에 함유된 비소 중 분리에 관한 미미한 연구 실태를 고려하면, EAM §4.10을 와인에 확장 적용하기 위한 연구는 가장 합리적인 접근법일 수 있습니다.

이 연구에서는 HPLC를 삼중 사중극자 ICP-MS(ICP-QQQ)와 연결하여 EAM §4.10에 따라 와인 시료를 분석하고 주요 유기 비소 중(DMA와 MMA) 및 독성이 높은 무기 비소(As(V)와 As(III)) 함량을 결정하였습니다. ICP-QQQ는 UC Davis 실험실이 보유한 모든 실험실 기기 중 가장 높은 감도를 제공합니다. ICP-QQQ를 이용하면 잠재적인 스펙트럼 간섭을 효과적으로 분리할 수 있으며, CI에 의한 ⁷⁵As 간섭은 크로마토그래프 기법으로 분리할 수 있으므로, QQQ를 반드시 MS/MS와 연결하여 사용할 필요는 없습니다. 이 응용 분석은 Agilent 7800나 7900과 같은 단일사중극자 ICP-MS에서도 사용할 수 있습니다.

실험

시약

Arsenite(As(III))와 arsenate(As(V))는 Spex Certiprep (Metuchen, NJ, USA)사가 공급하는 1000mg/L 표준 용액을 구입하였습니다. Monomethylarsonic acid(MMA, 순도 98.5%)와 dimethylarsinic acid(DMA, 순도 98.9%)는 Chem Service(West Chester, PA, USA)에서 구입하였습니다. Arsenobetaine(AB, purum p.a., ≥95.0%)은 Fluka Analytical(Morris Plains, NJ, USA)에서 구입하였습니다.

시료 및 시료 전처리

시판 와인 시료 5개는 California주 Davis 지역 상점에서 구입하였습니다. 대표적인 와인 유형(또는 스타일)인 레드(Cabernet Sauvignon), 화이트(Sauvignon blanc), 로제(Zinfandel), 스파클링(sparkling white), 주정 강화 와인(Port-style)을 1종씩 선택하여 구입하였습니다. 이 분석법으로 분석 가능한 에탄올 함량을 결정하기 위해 알코올 농도가 9.5~20%(v/v)인 와인을 선정하였습니다.

EAM §4.10 분석법에 따라 시료 전처리 및 분석을 수행하였습니다. 각 와인 시료는 탈이온수로 5배 희석한 뒤 시린지 필터를 사용하여 별도로 여과하였습니다 (0.45µm PVDF 멤브레인).

EAM §4.10에 따라, 0.4, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40µg/kg 농도로 네 비소 중 용액을 준비하고 검량선을 생성하였습니다. (As(III), DMA, MMA, As(V)) 그러나 이 분석법의 경우 0.1µg/kg에서 다섯 번째 낮은 수준의 검량 포인트도 준비했습니다. NIST 1643e Trace Elements in Water standard reference material(SRM)을 15 배 희석하여 회수율과 안정성 평가에 사용하였습니다. 모든 검량 표준물질과 SRM은 알코올(탄소 매트릭스) 희석 와인 시료 수준과 거의 비슷하도록 3% 에탄올 용액으로 준비하였습니다. 시료 점도 변화는 시료 이송과 분무술에 영향을 주며, 탄소 함량은 ICP에서 비소를 포함한 일부 원소의 이온화 정도에 영향(증가)을 미칩니다. 따라서, 시료 용액 내 탄소 함량 차이에 따른 오차를 제거하기 위해 모든 시료와 표준물질 내 탄소 함량이 합리적인 범위에서 일정하도록 탄소를 함유한 매트릭스를 시료 전처리 하였습니다.

기기

Binary 펌프와 자동 시료 주입기 및 진공 탈기 장치로 구성된 Agilent 1260 Infinity LC를 Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS(ICP-QQQ)와 연결하여 분석에 사용하였습니다. HPLC와 ICP-QQQ 파라미터를 표 1에 요약하였습니다.

표 1. HPLC-ICP-QQQ 하드웨어 시스템과 운용 조건.

| LC 조건 | 값 |
|-----------------------|--|
| 컬럼 | Hamilton PRP-X100 음이온 교환(4.1 x 250mm) 컬럼과 매칭 Hamilton PRP-X100 가드 컬럼 |
| 이동상 | 이동상, 10mM ammonium phosphate dibasic 수용액, 1% ethanol, pH 8.25(±0.05) |
| 유속(mL/분) | 1.0 |
| 온도 | 실온 |
| 주입 부피(µL) | 100 |
| ISTD 주입을 위한 컬럼 장치 시간표 | 0.1분, 컬럼 위치 1, 1.0분, 컬럼 위치 2로 전환, 2.0분, 다시 컬럼 위치 1로 전환 |
| ICP-QQQ 파라미터 | 값 |
| RF 출력(W) | 1550 |
| 운반 가스 유속(L/분) | 1.0 |
| 스프레이 챔버 온도(°C) | 2 |
| 시료 깊이(mm) | 8.5 |
| 연동펌프 속도(rps) | 0.3(~1.2mL/분) |
| 스캔 모드 | MS/MS |
| Helium 셀 가스 유속(mL/분) | ~2.0 |

결과 및 토의

검출 한계를 결정하기 위해 분석법 바탕(3% 에탄올)을 낮은 농도의 As(III), DMA, MMA, As(V)로 스파이크하고 준비하며 분석하였습니다.

그림 1에 비소 종을 혼합한 표준물질의 오버레이한 크로마토그램을 나타내었으며, 명확히 분리된 비소 종의 피크를 확인할 수 있습니다. 그림 2의 검량선은 0.1~40µg/kg 농도 범위에서 각 비소 종에 대한 감도도 직선성을 보였습니다.

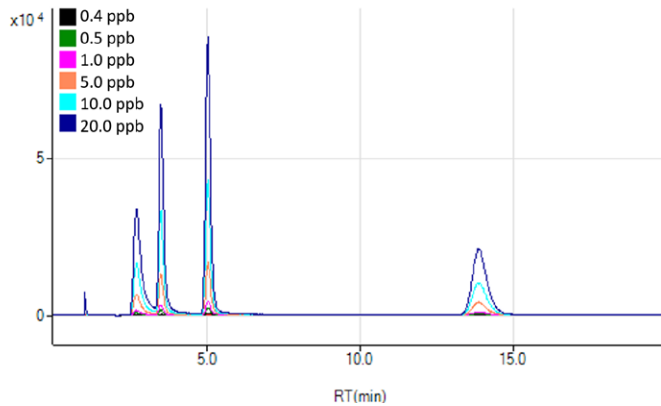


그림 1. 0.4, 0.5, 1, 5, 10, 20µg/kg의 공칭 농도에서 측정된 비소 종 표준물질의 오버레이한 크로마토그램은 피크 분리를 나타냅니다. 낮은 농도 수준의 결과를 보여주기 위해 40µg/kg 표준물질이 나타나지 않습니다.

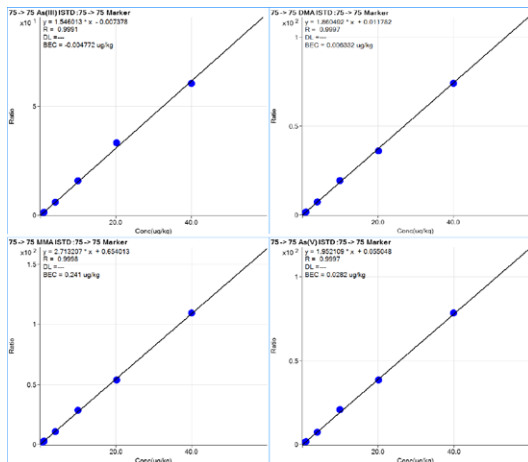


그림 2. As(III)와 DMA, MMA, As(V)의 검량 그래프.

와인에 함유된 비소 화학종의 검출 한계(LOD)는 FDA의 원소 분석 매뉴얼 섹션 3.2 [1]에 설명된 대로 계산하였습니다. 화학종별 정량 한계(LOQ)는 $LOQ = \text{희석 배율 (DF)} \times 30 \times \sigma$ 로 계산하였습니다. As(III)와 As(V)의 LOQ는 각각 1.18과 1.35µg/kg이었습니다. 하한 농도 표준 용액을 반복 측정하여 As(III)와 As(V) 통합형 피크 면적의 합을 구하고, 총 면적의 표준편차(SD)를 이용하여 계산된 총 무기 비소의 LOQ는 2.53µg/kg이었습니다. 최적화된 분석법으로 추정된 DMA와 MMA, 총 무기 비소(As(III)와 As(V)의 총량)의 LOD와 LOQ를 표 2에 정리하였습니다. 현재 규정에서는 As(III)와 As(V) 등 개별 종이 아닌 총 무기 비소 함량을 규제하므로, 결과는 총 무기 비소를 기준으로 나타내었습니다.

표 2. DMA와 MMA, 무기 비소의 LOD와 LOQ.

| | LOD, µg/kg | LOQ, µg/kg |
|-----|------------|------------|
| DMA | 0.17 | 1.3 |
| MMA | 0.15 | 1.2 |
| iAs | 0.17 | 1.4 |

무기 비소의 LOQ는 FDA에 정한 주스 시료 내 함량 기준인 10µg/L보다 훨씬 낮았습니다. 이 분석법의 감도가 5배 희석한 시료에 함유된 무기 비소를 용액에 정량하는 데 충분하다는 것을 의미합니다.

정량 결과

MLV에 사용된 와인 5종을 UC Davis 실험실에서 LC-ICP-QQQ를 이용하여 분석한 결과를 표 3에 요약하였습니다. 시료 내 존재하는 총 비소 함량(HPLC 분리 없이 직접 분석으로 결정) 대비 총 화학종 함량의 평균 회수율은 질량 균형 접근법을 사용하여 계산되었습니다. 모든 시료에서 회수율은 91~107% 사이였습니다. 이 결과는 MLV 연구에 참여한 다른 실험실 분석 결과와 잘 일치하였습니다[2].

표 3. MLV 연구의 일부로 UC Davis에서 분석한 와인 5종의 정량 분석 결과. 개별 화학종별 평균(n=3, ± 1σ)

| 와인 시료 | % 에탄올(v/v) | DMA µg/kg | MMA µg/kg | iAs µg/kg | 화학종 총량 µg/kg | 총 비소 함량 µg/kg | 질량 균형 % |
|-----------------|------------|--------------|-----------|------------|--------------|---------------|---------|
| 레드(Cabernet) | 9.5 | 0.81 ± 0.1* | <LOD | 14.4 ± 1.0 | 15.2 ± 1.1 | 15.3 ± 1.2 | 99 |
| 화이트(Chardonnay) | 13 | 0.74 ± 0.04* | <LOD | 10.7 ± 0.2 | 11.4 ± 0.2 | 11.1 ± 0.8 | 103 |
| 로제(Zinfandel) | 12 | 0.75 ± 0.1* | <LOD | 9.2 ± 0.4 | 9.9 ± 0.4 | 9.3 ± 1.1 | 107 |
| 스파클링 와인 | 20 | 1.7 ± 0.1 | <LOD | 2.1 ± 0.3 | 3.8 ± 0.3 | 3.6 ± 0.3 | 105 |
| Port-style 와인 | 14.5 | 0.45 ± 0.01* | <LOD | 1.5 ± 0.3 | 2.0 ± 0.3 | 2.2 ± 0.1 | 91 |

* LOD와 LOQ 사이의 값

장기 안정성

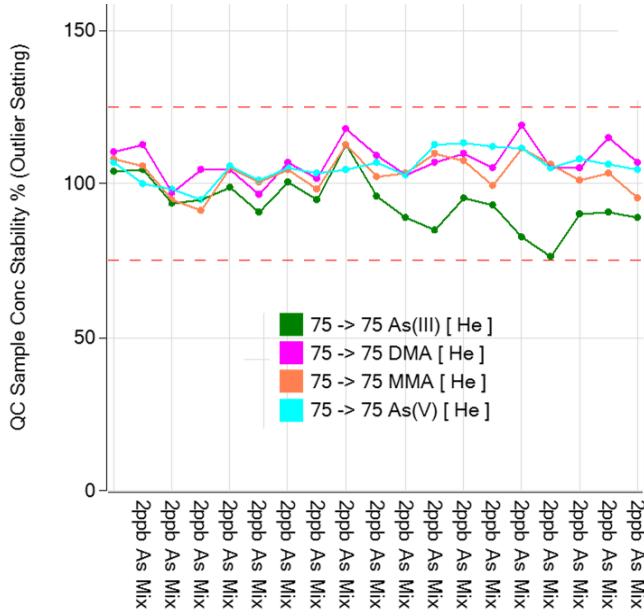


그림 3. 비소 혼합 표준 용액(2ppb)을 96시간(4일)에 걸쳐 분석된 안정성 곡선.

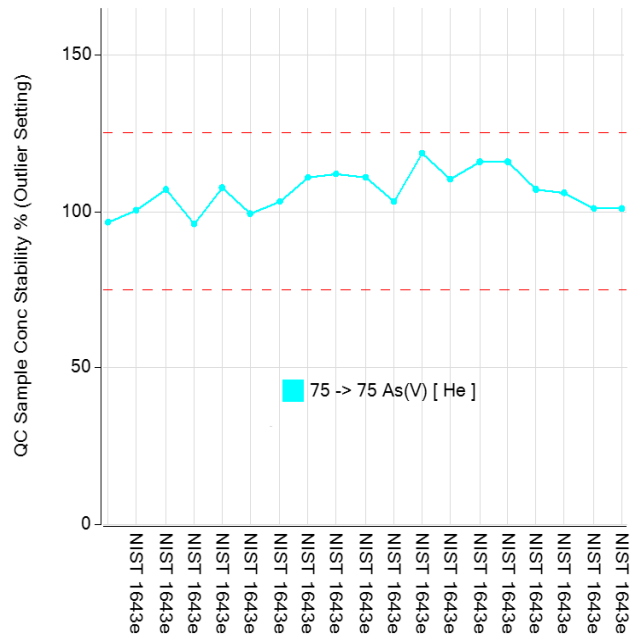


그림 4. NIST 1643e를 에탄올로 스파이크하고 4일에 걸쳐 분석된 비소의 안정성 곡선.

ICP-QQQ의 안정성을 테스트하기 위해 96시간(4일)에 걸쳐 와인 시료를 준비하고 연속해서 반복 측정하였습니다. 와인 시료 10개마다 두 개의 품질 관리(QC)용 시료(2ppb 농도 비소 중 혼합 표준 용액과 3% 에탄올로 스파이크한 NIST 1643e)를 분석하였습니다. 기기는 연속된 반복 분석 도중 검량선의 재측정은 수행하지 않았습니다. 그림 3과 4에서 볼 수 있듯이 밸리데이션 안정성 테스트 기간에 걸쳐 탁월한 안정성이 확인되었습니다.

추가적인 마켓 바스켓 와인 분석의 결과

MLV 연구에 사용된 와인 5종 외에도, 추가로 와인 60종을 분석법 검증의 일부로 분석하였습니다[2]. 이 연구에서는 이전 시험하지 않은 와인을 선정하였습니다(S1과 S5). 표 4에 요약한 결과는 선행 문헌에 보고된 데이터와 일치하였습니다[2]. 대부분 비소는 가장 독성이 높은 무기 비소 형태로 존재하였습니다. 와인 시료 5개 중 4개에서 총 비소 함량은 EPA 음용수 한계 10µg/L보다 높았으나, 시료 5개 모두 캐나다와 유럽에서 정한 와인 내 허용 함량 100과 200µg/L보다 총 비소 함량이 낮았습니다. 그러나 와인 시료 다섯 개 중 네 개에서 무기 비소 측정 농도는 FDA가 사과 주스 내 무기 비소 농도 한계로 정한 10µg/kg을 초과하였습니다.

표 4. 시판 와인 5종에 함유된 비소 종에 대한 LC-ICP-QQQ로 측정된 정량 분석 결과 (µg/kg).

| 와인 시료 | iAs | DMA | MMA | 화합물 총량 |
|-------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| S1 | 17.13 ± 0.22 | 0.83 ± 0.03 | <LOD | 17.96 ± 0.13 |
| S2 | 7.49 ± 0.15 | 0.30 ± 0.06 | 0.77 ± 0.32 | 8.56 ± 0.17 |
| S3 | 14.63 ± 0.40 | 0.80 ± 0.08 | <LOD | 15.43 ± 0.24 |
| S4 | 25.03 ± 0.89 | 0.69 ± 0.26 | 0.47 ± 0.12 | 26.19 ± 0.42 |
| S5 | 23.45 ± 1.12 | 0.32 ± 0.05 | <LOD | 23.77 ± 0.59 |

스파이크 회수율 테스트

표 5에 DMA와 MMA, 무기 비소를 약 5, 10 및 30µg/kg 농도로 스파이크한 시료에서 회수율을 측정된 결과를 요약하였습니다 (무기 비소 스파이크 농도는 표시된 수준의 50%에서 각각 스파이크된 As(III)와 As(V)의 총량). LC-ICP-QQQ로 측정된 DMA, MMA 및 무기 비소의 평균 회수율은 각각 99, 92 및 104%였습니다. 모든 회수율은 FDA가 EAM에 명시한 무기 비소, DMA 및 MMA의 허용 기준 100 ± 20%를 충족하였습니다[1].

표 5. DMA와 MMA, 무기 비소를 5, 10, 30µg/kg 농도로 스파이크한 시료 5개를 2회 반복 분석한 테스트에서 평균 스파이크 회수율(n=30).

| | DMA | MMA | iAs |
|----------------|--------|--------|--------|
| 평균 스파이크 회수율, % | 99 | 92 | 104 |
| 회수율 범위 | 93~107 | 72~119 | 97~114 |

K. Tanabe et al.(J. Agric.)의 허가를 받아 증쇄됨. Food Chem., 2017, 65 (20), 4193-4199. Copyright 2017. American Chemical Society.

결론

Agilent 8800 ICP-QQQ와 Agilent 1260 Infinity LC를 조합한 비소 종 분리 결과는 수동 원소 분석법 §4.10를 와인에 확장 적용하기 위한 MLV 밸리데이션 연구의 일부로 사용되었습니다. 이 분석법을 독성이 높은 무기 비소인 As(III)와 As(V)를 포함한 네 개의 비소 화학종을 분석할 수 있도록 최적화하였습니다.

MLV 연구의 일부로 출판된 데이터 외에도, 와인 5종을 추가로 분석하였습니다. 5종 와인 시료에서 총 비소 함량은 8.56에서 26.19µg/L 사이였습니다. 이 함량은 캐나다와 유럽에서 정한 와인 내 총 비소 허용 함량 100과 200µg/L(ppb)보다 낮은 수치입니다. 5종 와인 시료에서 검출된 비소는 평균적으로 95%가 무기 비소 종으로 확인되었습니다.

참고문헌

1. S. D. Conklin, K. Kubachka, N. Shockey, Elemental Analysis Manual for Food and Related Products, 4.10 HPLC-ICP-MS As Species in Fruit Juice (Ver. 1; 2013), <http://www.fda.gov/EAM> (accessed September 2017)
2. C. K. Tanabe, H. Hopfer, S. E. Ebeler, J. Nelson, S. D. Conklin, K. M. Kubachka, and R. A. Wilson, *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65 (20), pp 4193–4199
3. C. K. Tanabe, S. E. Ebeler, J. Nelson, Fast Analysis of Arsenic Species in Wines using LC-ICP-QQQ, Agilent publication, 2017, 5991-8454EN
4. *National Primary Drinking Water Regulations*. US E.P.A, In Title 40, EPA, Ed. 2014; Vol. AE 2. 106/3:40/
5. D. Bertoldi, R. Larcher, M. Bertamini, S. Otto, G. Concheri, G. Nicolini, *J. of Agri and Food Chem.*, **2011**, 59, 7224–7236.

6. M. V. Aguilar, M.C. Martinez, T.A. Masoud, Z. *Lebensm-Unters-Forsch.*, **1987**, 185, 185–187.

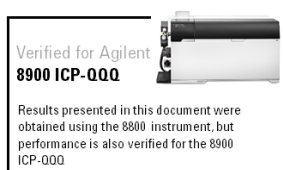
7. Canada Ontario, V. Q. A., Wine Standards. 1999 <http://www.vqaontario.ca/Regulations/Standards> (accessed August 2017)

8. OIV–Compendium of International Methods of Analysis. Maximum acceptable limits of various substances contained in wine, 2011 issue. 유럽

9. US 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. <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm360020.htm> (accessed September 2017)

더 자세한 정보

이 연구와 관련된 자세한 정보는 아래 문헌을 참조하십시오. Courtney K. Tanabe, Helene Hopfer, Susan E. Ebeler, Jenny Nelson, Sean D. Conklin, Kevin M. Kubachka, and Robert A. Wilson, Matrix Extension and Multilaboratory Validation of Arsenic Speciation Method EAM §4.10 to Include Wine, *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, 65 (20), pp 4193–4199, DOI: 10.1021/acs.jafc.7b00855



www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 2월 26일, 한국에서 인쇄
5991-8833KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국에질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr