

Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC/MS를 이용한 식품 시료 중 mycotoxin 분석



그림 1. LC 위에 쌓아올릴 수 있는 애질런트 Ultivo

저자

Theresa Sosienski¹,
Dan-Hui Dorothy Yang¹,
Mark Sartain¹,
Christian Hegmanns², Joni
Stevens

¹ Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

² Agilent Technologies, Inc.
Waldbonn, Germany

개요

이 응용 자료는 Agilent Ultivo Triple Quadrupole 질량 분석기를 이용해 옥수수와 땅콩 시료의 12종 mycotoxin 및 검은 후추의 5종 mycotoxin을 분석하기 위한 감도 높고 정밀한 분석법을 설명합니다. Ultivo LC/MS는 고처리량 분석에 필요한 성능을 유지하면서 실험실 공간을 절약하도록 설계되었습니다. 식품 시료 내 모든 mycotoxin은 European Union Commission Regulations (EC) No. 1881/2006 및 No. 105/2010에 의해 규정된 최대 농도 이하에서 정량 분석될 수 있습니다. Ultivo 시스템을 통해 최저 정량 농도에서 <10%의 상대 표준 편차(%RSD)로 우수한 분석법 정밀도를 얻을 수 있었습니다. 시료 간섭물 cleanup, 크로마토그래피 및 새로 개발된 Triple Quadrupole의 조합을 통해 높은 감도와 정밀도로 mycotoxin을 검출할 수 있었습니다.

소개

mycotoxin은 다양한 곡물에서 생장할 수 있는 균류에 의해 생성됩니다. 특정 농도와 조합에서 mycotoxin은 오염된 곡물을 섭취하는 인간과 가축에게 해로울 수 있습니다. 따라서, 오염된 곡물 섭취로 인한 위험을 최소화하기 위해 곡물에 존재하는 mycotoxin은 일정한 농도로 규제되고 있습니다¹. 규제 기관은 위험한 농도의 mycotoxin이 식품 체인에 유입되지 않도록 하기 위해, mycotoxin의 최대 농도 (ML)를 일부 유아용 식품의 경우 0.1ppb 수준, 일부 동물 사료의 경우 ppm 수준으로 규정하고 있습니다. 식품 시료 조성은 매우 복잡하기 때문에 다양한 식품 사료 내 ML 수준 이하의 mycotoxin 함량을 정확히 정량 분석하는 것이 중요합니다.

Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC/MS는 환경 및 식품 분석을 수행하는 실험실에서 직면한 많은 과제를 해결하기 위해 고안되었습니다. Ultivo는 혁신 기술로 전체 설치 공간이 대폭 줄어들면서도 기존 시스템의 성능을 유지할 수 있습니다 (그림 1). Cyclone Ion Guide, Vortex Collision Cell 및 Hyperbolic Quads와 같은 혁신 기술은 작은 패키지에서 정량 분석 성능을 극대화합니다. 이러한 혁신 기술은 기기 안정성 및 견고성을 높여 가동 시간(uptime)을 높혀드립니다. VacShield 및 검출기 어셈블리의 간편한 교체로 시스템 유지보수를 위한 시간과 전문성 투자를 줄일 수 있으며, MS 사용자는 전문가가 아니더라도 쉽게 기기를 작동하고 유지보수할 수 있습니다. 애질런트 MassHunter 소프트웨어 제품군은 데이터 수집, 분석법 설정, 데이터 분석 및 보고 과정을 간소화합니다. 이 소프트웨어는 수집부터 보고까지 시간을 단축하고 실험실 생산성과 결과에 대한 확신을 높입니다. 이 응용 자료는 새로운 Ultivo Triple Quad LC/MS를 이용해 세 가지 널리 규제되는 식품에서 최대 12종 규제 대상 mycotoxin 화합물을 높은 감도와 정밀도로 정량 분석하는 방법에 대해 설명합니다.

실험

시약 및 화학물질

이 연구에서 사용된 모든 시약은 HPLC 또는 LC/MS 등급입니다. 아세토니트릴은 Honeywell(Morristown, NJ, USA)에서 구매했으며, 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22-μm point-of-use membrane filter cartridge(EMD Millipore, Billerica, MA, USA)를 장착한 Milli-Q Integral 시스템에서 얻었습니다. 포름산(FA) 및 포름산 암모늄은 Fluka(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)에서, 불화 암모늄은 Aldrich(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)에서 구매했습니다. 화학 표준물질은 Sigma-Aldrich 또는 Cayman Chemical에서 구매했습니다.

시료 전처리

옥수수 가루, 땅콩 및 검은 후추 가루는 현지 식료품점에서 구입했습니다. 옥수수 가루 5g, 뽕은 땅콩(혼합기로 갈아 분석 전까지 냉동) 5g 또는 검은 후추 가루 2g을 50mL 폴리프로필렌 튜브에 넣고 아세토니트릴 10mL 및 0.2% FA 초순수 용액 10mL를 추가한 후 회전식 혼합기(Heidolph Hei-MIX Multi reax, 545-10000-00)에 넣고 30분 동안 훈들어 추출합니다. Agilent QuEChERS EN Extraction Salts(p/n 5982-5650)를 추출물에 첨가하고 튜브를 추가로 2분 동안 훈든 다음, 4,500rpm(Sorvall Heraeus, Labofuge 400K)에서 5분 동안 원심 분리합니다. 검은 후추 추출물은 애질런트 범용 Dispersive

SPE Kit(p/n 5982-0029)를 이용해 추가적인 cleanup 단계를 거칩니다.

그런 다음, 모든 추출물 1.6mL를 0.4mL의 초순수로 희석하고, Agilent Captiva EMR—Lipid 카트리지(p/n 5190-1003)를 이용해 정제합니다. 첨가된 후추 추출물은 30:70 추출물/초순수로 희석한 후 분석합니다. 그림 2는 시료 전처리 플로우차트를 나타냅니다.

기기

Agilent 1290 Infinity II UHPLC

- Agilent 1290 Infinity speed pump(G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler, 쿨러 장착(G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II Multicolumn Thermostat(G7116B)

Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC/MS 시스템

- Agilent Jet Stream 전자분무 이온화원

분석법

표 1은 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 조건을 요약하고, 표 2는 Ultivo Triple Quadrupole 파라미터와 Agilent Jet Stream ESI 이온화원 파라미터를 요약합니다. 분석은 양이온 모드와 dMRM(dynamic multiple reaction monitoring)을 통해 수행되며, 데이터는 Quant-My-Way 기능을 가진 Agilent MassHunter Quantitative Analysis Software B.09를 이용해 평가됩니다.

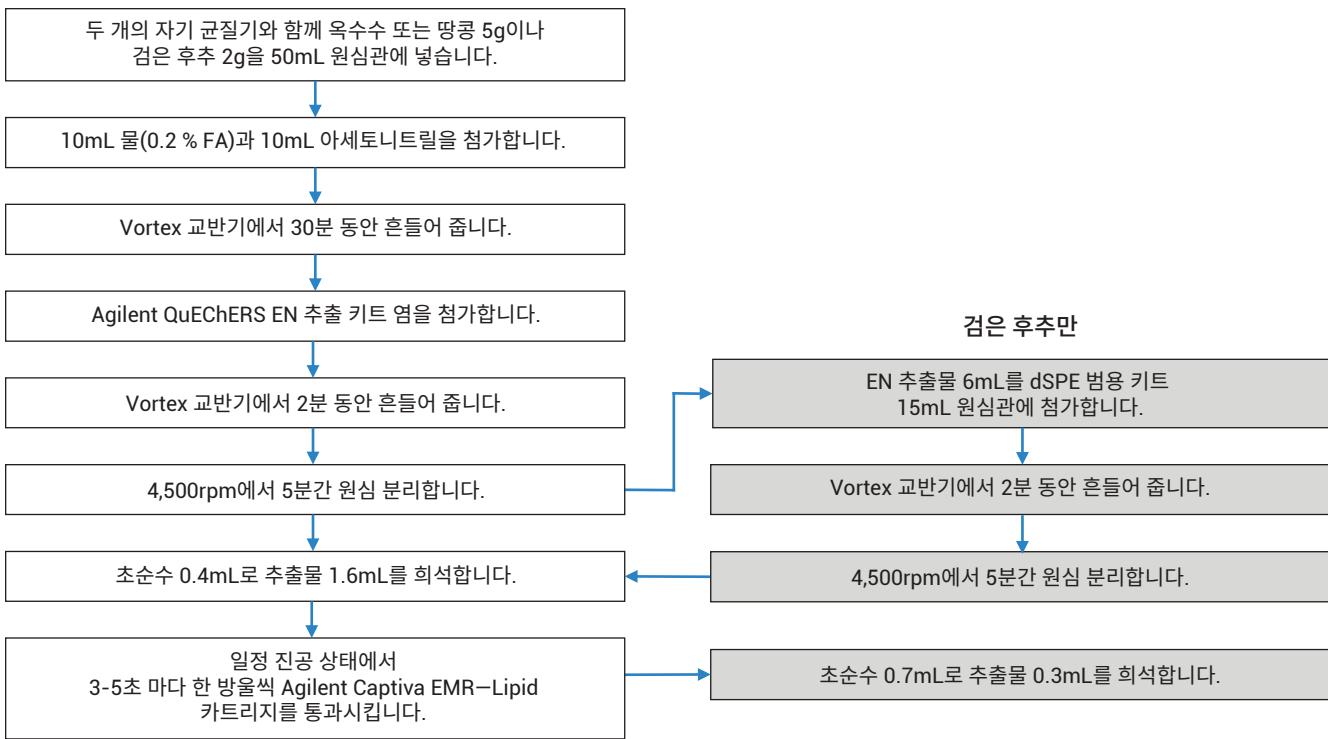


그림 2. 옥수수, 땅콩 및 검은 후추 내 mycotoxin 분석을 위해 Agilent Captiva EMR—Lipid를 사용한 시료 전처리 절차

표 1. Agilent 1290 Infinity II UHPLC 파라미터

파라미터	값
컬럼	Agilent Eclipse Plus C18 3.0 × 150mm, 1.8µm(p/n 959759-302)
컬럼 온도	45°C
주입량	2µL 옥수수, 땅콩; 10µL 검은 후추
이동상	A) 0.5mM Ammonium fluoride + 5mM ammonium formate + 0.1% formic acid in water B) 0.5mM Ammonium fluoride + 5mM ammonium formate + 0.1% formic acid in methanol
유속	0.45mL/분
Gradient	Time %B 0 30 0.5 30 7.5 100 9.0 100 9.1 30
정지 시간	9.1분
Post time	1.9분

표 2. Agilent Ultivo Triple Quadrupole 및 Agilent Jet Stream 이온화원 파라미터

파라미터	값
건조 가스 온도	250°C
건조 가스 유량	8L/분
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유량	12L/분
분무기 압력	30psi
캐뉼러리 전압	3,300V(+)
노즐 전압	0V(+)
주기 시간	500ms

결과 및 토의

mycotoxin 최대 규제 농도

mycotoxin은 특정 mycotoxin, 분석되는 시료, 규제 기관 및 대상 소비자에 따라 매우 다양한 농도로 규제됩니다. 이 연구는 European Union regulations No. 1881/2006 및 No. 105/2010의 규정을 적용했습니다. EU는 다른 지역의 규제 기관에 비해 mycotoxin에 대한 최대 규제 농도(ML)가 가장 낮기 때문에 이 절차가 실시되었습니다. 비규제 화합물은 시료에 포함되지 않았거나 표 4에 규정된 현재 우려 수준에 기초해 평가되지 않았습니다.

표 3. dMRM 모드에서 mycotoxin 검출을 위한 전이

화합물	전구이온 (m/z)	생성이온 (m/z)	RT (분)	RT Window (분)	Fragmentor (V)	CE(V)	극성
Aflatoxin B1(AB1)	313.3	285.1	5.9	1	190	20	Positive
Aflatoxin B1(AB1)	313.3	241.1	5.9	1	190	40	Positive
Aflatoxin B2(AB2)	315.1	287.1	5.7	1	190	24	Positive
Aflatoxin B2(AB2)	315.1	259.1	5.7	1	190	28	Positive
Aflatoxin G1(AG1)	329.1	311.1	5.3	1	180	20	Positive
Aflatoxin G1(AG1)	329.1	243.1	5.3	1	180	28	Positive
Aflatoxin G2(AG2)	331.1	313.1	5.1	1	190	24	Positive
Aflatoxin G2(AG2)	331.1	115	5.1	1	190	80	Positive
Deoxynivalenol(DON)	297.1	249.2	3.0	1	120	4	Positive
Deoxynivalenol(DON)	297.1	77	3.0	1	120	80	Positive
Fumonisin B1(FB1)	722.4	352.3	6.6	1	240	36	Positive
Fumonisin B1(FB1)	722.4	334.3	6.6	1	240	40	Positive
Fumonisin B2(FB2)	706.4	336.3	7.4	1	240	36	Positive
Fumonisin B2(FB2)	706.4	318.4	7.4	1	240	40	Positive
Fumonisin B3(FB3)	706.4	336.3	7.0	1	240	36	Positive
Fumonisin B3(FB3)	706.4	318.4	7.0	1	240	36	Positive
HT-2 Toxin(HT-2)	442.2	263.2	6.8	1	120	4	Positive
HT-2 Toxin(HT-2)	442.2	215.1	6.8	1	120	4	Positive
Ochratoxin A(OTA)	404.1	239	7.6	1	140	20	Positive
Ochratoxin A(OTA)	404.1	221	7.6	1	140	36	Positive
T-2 Toxin(T-2)	484.2	215.2	7.3	1	140	12	Positive
T-2 Toxin(T-2)	484.2	185.1	7.3	1	140	4	Positive
Zearalenone(ZEA)	319.2	301.2	7.7	1	120	4	Positive
Zearalenone(ZEA)	319.2	185.1	7.7	1	120	24	Positive

표 4. 이 연구에서 mycotoxin의 ML 농도 EU reg No. 1881/2006 및 No. 105/2010은 참조용으로 사용됩니다. 이 연구에서 설정된 모든 ML은 EU에서 규정한 ML보다 낮거나 같습니다.

mycotoxin	European Union에서 규정한 mycotoxin ML ^{2,3}			이 연구에서 설정된 ML	
	옥수수(ppb)	땅콩(ppb)	검은 후추(ppb)	옥수수와 땅콩(ppb)	검은 후추(ppb)
Aflatoxin B1	2	2	5	2	5
Aflatoxin B2				2	5
Aflatoxin G1	Aflatoxin의 합: 4ppb	Aflatoxin의 합: 4ppb	Aflatoxin의 합: 10ppb	2	5
Aflatoxin G2				2	5
Ochratoxin A	3	n/a	15	3	15
Fumonisin B1	B1 및 B2의 합: 1,000ppb	n/a	n/a	500	포함되지 않음
Fumonisin B2			n/a	500	포함되지 않음
Fumonisin B3	n/a	n/a	n/a	500	포함되지 않음
Deoxynivalenol	750	n/a	n/a	75	포함되지 않음
Zearalenone	100	n/a	n/a	100	포함되지 않음
T-2 Toxin	n/a	n/a	n/a	100	포함되지 않음
HT-2 Toxin	n/a	n/a	n/a	500	포함되지 않음

분석법 회수율

이 분석법의 추출 절차는 간단하고 효과적이었습니다. Agilent Captiva EMR—Lipid Kit는 분석 대상 화합물에서 시료 성분을 적절히 분리할 수 있는 빠른 방법입니다. 이 분석법은 식품 시료 내 모든 화합물에 대해 양호한 회수율을 보였으며, 각 화합물의 회수율(ML)은 60-110%였습니다 (표 5).

분석법 감도

그림 3은 ML 농도 옥수수 시료의 크로마토그램을 보여주며 이 분석법으로 분석된 12종 mycotoxin은 우수한 반응을 나타냈습니다. 설정된 ML 농도의 1/20에서 설정된 ML 농도의 10배까지 수준에서 mycotoxin 표준물질을 평가하였습니다. 정량 한계(LOQ) 및 %RSD 분석을 위해 8개 농도의 표준물질이 시료 추출물에

첨가되었습니다. 개선된 신호 반응으로 각 시료 내 대부분 mycotoxin이 설정된 ML의 1/20 농도에서 정량 한계를 가질 수 있었습니다. 그림 4는 모든 mycotoxin이 설정된 ML의 1/5 농도에서 LOQ를 가졌음을 보여줍니다. LOQ는 6회 반복 주입 중 4회에 80-120%의 정확도를 가지는 것으로 확인되었으며 신호대 잡음비(S/N)는 10보다 컸습니다.

표 5. 옥수수, 땅콩 및 검은 후추 시료에서 분석된 각 mycotoxin의 ML 회수율(%). Fumonisin 화합물은 $\frac{1}{2}$ ML에서 정량 분석되었습니다.

mycotoxin	mycotoxin 회수율(%)		
	옥수수	땅콩	검은 후추
Aflatoxin B1	107	105	90
Aflatoxin B2	110	109	97
Aflatoxin G1	109	108	102
Aflatoxin G2	110	96	104
Ochratoxin A	83	83	109
Fumonisin B1	60	65	—
Fumonisin B2	67	77	—
Fumonisin B3	90	61	—
Deoxynivalenol	111	72	—
Zearalenone	98	90	—
T-2 Toxin	105	104	—
HT-2 Toxin	108	102	—

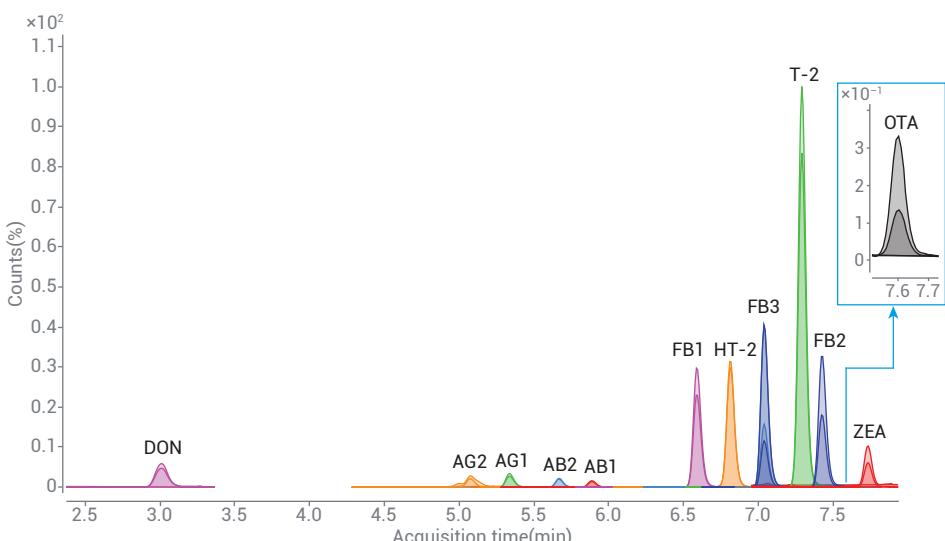


그림 3. 설정된 ML에서 옥수수 시료 내 mycotoxin의 합성 dMRM 크로마토그램

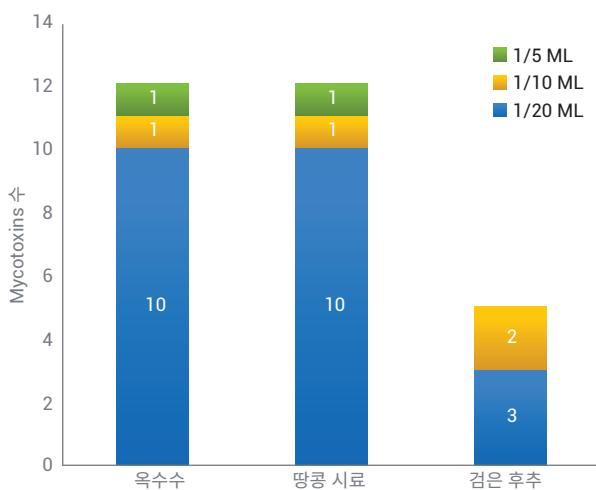


그림 4. 각 시료 내 mycotoxin에 대한 LOQ. 설정된 ML의 분수 수준에서 정확하게 정량 분석될 수 있습니다.

분석법 정밀도 및 직전성

각 시료에서 분석된 화합물은 모두 우수한 정밀도를 보였습니다. 그림 5는 LOQ에서 각 시료 내 mycotoxin을 6회 반복 주입한 %RSD를 보여줍니다. 각 시료 내 모든 화합물의 %RSD는 10% 미만이었으며, 대부분 화합물의 %RSD는 5% 미만이었습니다. 옥수수와 땅콩 시료에서 200ppt로, 그리고 검은 후추 시료에서 500ppt로 Aflatoxin B1의 6회 반복 주입을 자세히 분석한 그림에서 이 분석법의 우수한 정밀도를 확인할 수 있습니다. 이는 ML보다 10배 낮은 농도입니다(그림 6).

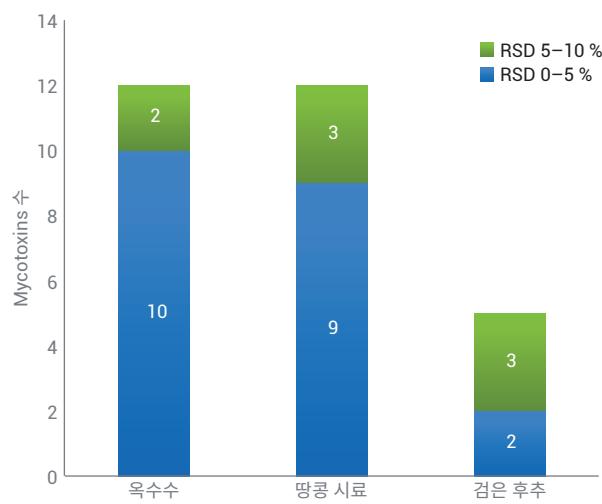


그림 5. 3가지 시료 내 mycotoxin을 LOQ에서 정량 분석한 결과 %RSD <10%로 우수한 정밀도를 보여줍니다.

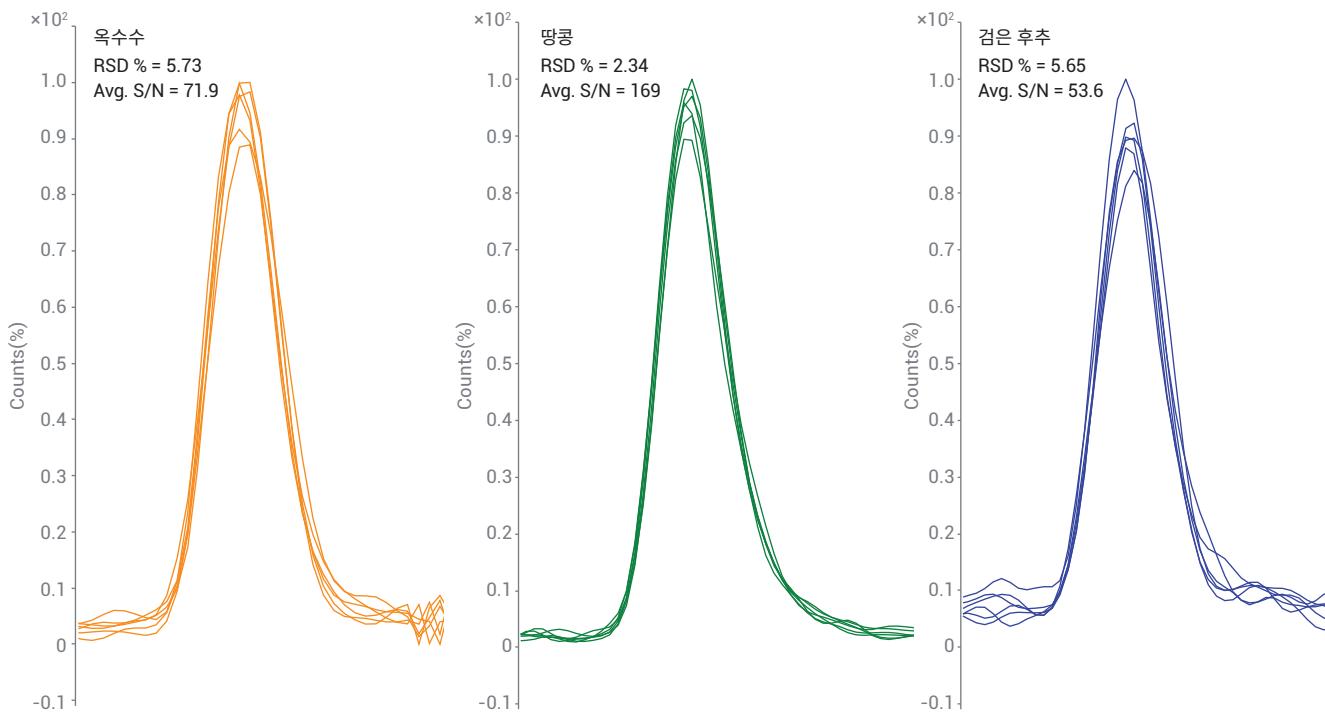


그림 6. 모든 시료에서 1/10 ML(200ppt 또는 500ppt)의 Aflatoxin B1을 6회 반복 주입하여 증명된 우수한 정밀도

모든 화합물은 우수한 직선성을 보였습니다.
각 화합물에 대해 ML의 1/20부터 10배
까지 6 ~ 8개 검량 농도를 적용한 결과, 모든
시료의 모든 화합물에 대해 $R^2 \geq 0.99$ 값을
나타냈습니다. 그림 7은 땅콩 시료 내 6가지
선택된 화합물에 대해 우수한 직선성을
나타낸 예를 보여줍니다.

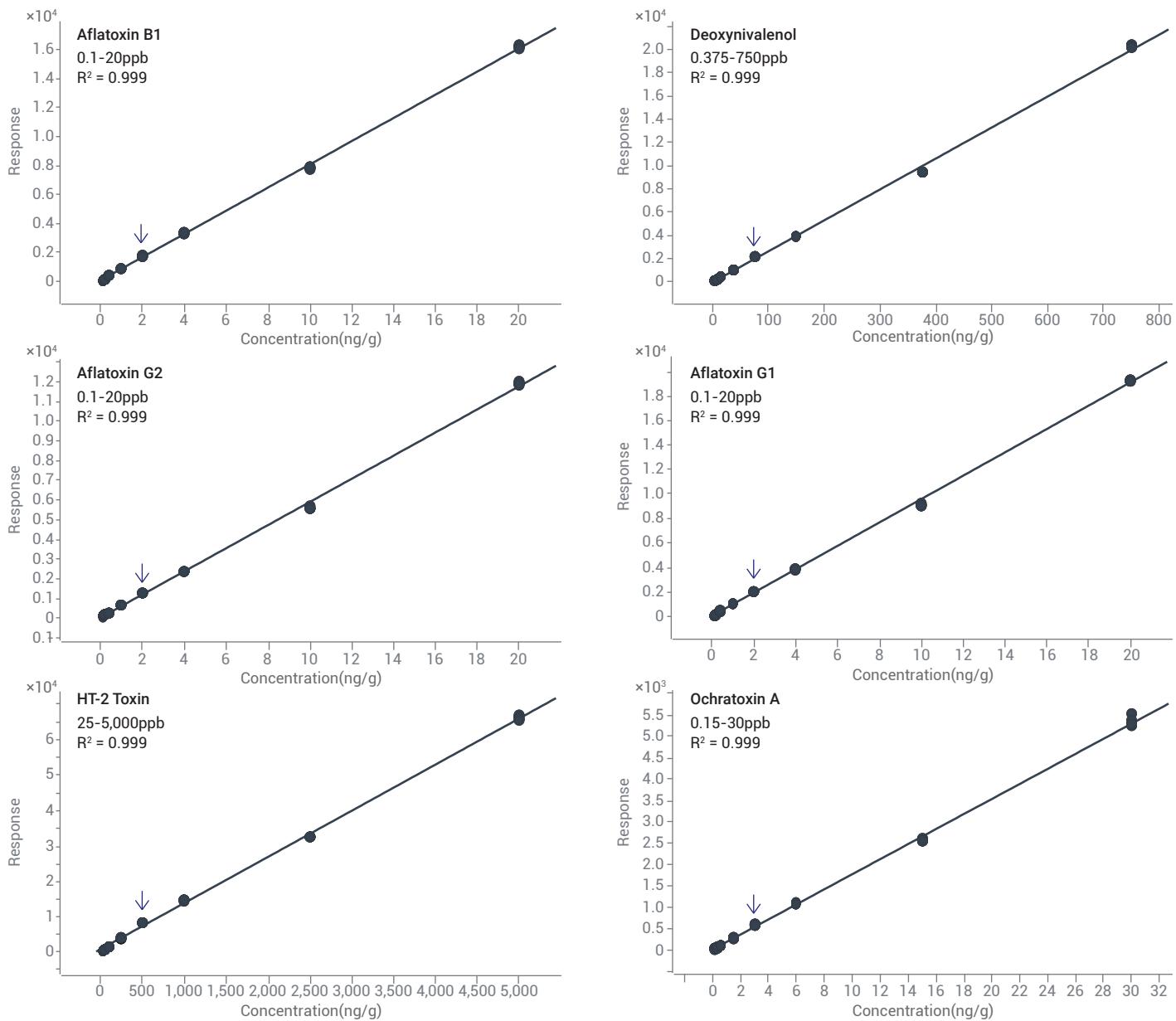


그림 7. 땅콩 시료에서 선택된 화합물에 대한 검량선. 직선성을 나타내며 가중치를 사용하지 않았습니다. 화살표는 ML을 나타냅니다.

결론

Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC/MS는 기기 설치 공간을 최소화하는 매우 혁신적인 질량 분석기입니다. 또한 유지보수 문제를 줄이고, 실험실 처리량 증대로 생산성 높은 작업 환경을 구현합니다. Ultivo는 작지만 강력한 기기로 다양한 식품 시료에서 일반적으로 규제되는 mycotoxin을 규정된 ML 농도 이하에서 높은 감도와 정밀도로 검출할 수 있습니다. 애질런트 MassHunter 소프트웨어는 LC/MS 데이터의 수집과 보고를 위한 사용이 편리하고 종합적인 도구를 제공합니다.

참고문헌

1. Bennett, J. W.; Klich, M. mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, 16(3), 497-516. 2003.
2. Commission Regulation (EC) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 19 December **2006**, L 364/5-24.
3. Commission Regulation (EU) No 105/2010. Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*, 5 February **2010**, L 35/7-8.
4. Determination of mycotoxins in Peanuts with Enhanced Matrix Removal—Lipid by LC/MS/MS. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-7381.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 2월 14일, 한국에서 인쇄
5991-8962KO

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

