

영아용 조제분유, 우유 및 달걀 내 30종 과불화화합물(PFAS)의 측정

Agilent Captiva EMR PFAS Food II 패스스루 클린업 및
LC/MS/MS 사용

저자

Limian Zhao,
Matthew Giardina, Emily Parry
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 영아용 조제분유, 우유 및 달걀 내 과불화화합물(PFAS)을 분석하기 위한 다중 잔류물 분석법의 개발 및 검증에 대해 설명합니다. 이 분석법은 QuEChERS 추출과 Agilent Captiva EMR PFAS Food II 카트리지를 사용한 EMR 혼합 모드 패스스루 클린업 및 LC/MS/MS 검출을 사용합니다. 이 분석법은 간소화되고 효율적인 시료 전처리, 고감도 LC/MS/MS 검출, 신뢰할 수 있는 표준 검량선을 사용한 안정적인 정량 분석이 특징입니다. 새로운 Captiva EMR PFAS Food II 카트리는 동물성 식품과 식물성 씨앗 건조 식품의 PFAS 분석을 위해 특별히 개발되고 최적화되었습니다. 이 분석법은 분석법 적합성, 감도, 정확도 및 정밀도를 포함하여 AOAC 표준 분석법 성능 요건(SMPR) 2023.003을 기반으로 검증되었습니다. 이 분석법은 영아용 조제분유, 우유 및 달걀에서 perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluoronanoic acid (PFNA), perfluorohexane sulfonic acid (PFHxS) 등 4종 주요 PFAS 표적물질 및 나머지 26종 PFAS 표적물질에 대해 요구되는 정량 한계(LOQ), 회수 및 재현성(RSD)을 충족하는 것으로 입증되었습니다.

소개

식품에 잔류하는 PFAS의 측정은 지난 몇 년 동안 더 많은 관심을 끌면서 오늘날의 뜨거운 화제가 되었습니다. 2023년 4월, 유럽위원회는 달걀, 생선, 해산물, 육류 및 내장에서 PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS 등 4종 PFAS 화합물에 대한 규제를 시행했습니다.¹ 2023년 11월, AOAC는 농산물, 음료, 유제품, 달걀, 해산물, 육류제품 및 사료에 포함된 30종 PFAS 분석을 위한 SMPR 2023.003을 발표했습니다.²

PFAS 분석을 위한 LC/MS/MS 기반 분석법은 환경 수질 및 토양 분석에 널리 적용되어 왔습니다.^{3,4} PFAS 화합물에 포함된 산성기는 음이온 모드에서 쉽고 효율적으로 이온화할 수 있어 분석법 감도와 선택성에 이점을 제공합니다.

식품 분석에서 시료 전처리 방법은 필요 시 PFAS의 효율적인 추출, 매트릭스 동시 추출물 제거, 시료 농축 또는 희석에 중요한 역할을 합니다. 식품 매트릭스의 다양성과 복잡성은 시료 전처리법에 있어 시료 추출 및 매트릭스 정제 효율성 뿐만 아니라 전반적인 분석법의 단순성, 시료 처리 효율성, 그리고 다양한 매트릭스를 수용하는 데에도 도전을 제기합니다. 약 음이온 교환(WAX) 흡착제 기반 고체상 추출(SPE) 분석법은 물, 토양과 같은 환경 시료와 기타 매트릭스의 PFAS 분석에 널리 사용되어 왔습니다. 그러나 SPE 분석법은 카트리지에 로드하기 전에 식품 시료를 추출해야 하므로 복잡한 고체 식품의 시료 전처리에는 까다로운 일입니다. 또한 컨디셔닝, 평형, 로드, 세척 및 용출을 포함하는 일반적인 SPE 절차에는 많은 시간과 용매가 필요합니다.

PFAS 분석을 위한 식품 시료 전처리에서 QuEChERS 추출 후 일반적인 분산형 SPE (dSPE) 클린업이 보고되어 왔습니다.^{5,6} 그러나 dSPE 클린업은 많은 식품 매트릭스에 대해 효율적인 매트릭스 제거를 제공하지 못하므로 식품의 낮은 LOQ 요구 사항을 지원할 수 없습니다. 따라서 dSPE 클린업 후 WAX SPE를 사용한 또 다른 클린업 단계가 추가됩니다.⁵ 이 분석법은 시간과 노동 집약적이어서 시료 프로세스 생산성에 큰 영향을 미칩니다. 이러한 유형의 시료 클린업으로 인해 PFAS 표적물질이 손실될 수도 있습니다.

Agilent Captiva EMR PFAS Food 카트리지는 식품의 PFAS 분석을 위해 특별히 개발되고 최적화되어 포괄적인 혼합 모드 패스스루 클린업을 제공합니다. 다양한 식품 매트릭스를 포괄하기 위해 두 가지 유형의 카트리지(I 및 II)가 설계되었습니다. 이 연구의 목적은 영아용 조제분유, 우유 및 달걀에서 30종 PFAS 측정을 위한 완전한 워크플로를 개발하고 검증하는 것입니다. 이 분석법에서는 QuEChERS 추출 후 Captiva EMR PFAS Food II 카트리지를 사용한 패스스루 클린업과 Agilent 6495D TQ LC/MS로 검출합니다.

실험

화학물질 및 시약

Native PFAS 및 동위원소 표지 내부 표준물질(ISTD) 용액은 Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada)에서 구입했습니다. Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) 및 isopropyl alcohol (IPA)은 VWR (Radnor, PA, USA) 제품입니다. Acetic acid (AA) 및 ammonium acetate은 MilliporeSigma (Burlington, MA, USA)로부터 구입했습니다.

용액 및 표준물질

28종 PFAS 표적물질에 대해 각각 200, 20, 2ng/mL의 농도로 native PFAS 용액을 MeOH로 희석하여 세 가지 native PFAS 스파이킹 용액(I, II, III)을 준비했습니다. 예외적으로 PFBA 및 PFPeA는 농도가 각각 다른 28종 표적물질의 농도보다 10배, 2배 높았습니다.

ISTD 스파이킹 용액은 ISTD 1차 용액을 MeOH로 100ng/mL 농도로 희석하여 준비했습니다.

Native PFAS 및 동위원소 ISTD 스파이킹 용액은 native PFAS 표적물질에 대해 20, 50, 100, 200, 500, 1,000, 2,000, 5,000 및 10,000ng/L의 순수한 검량 표준물질을 준비하는 데 사용되었고 MeOH의 ISTD 농도는 1,000ng/L였습니다. 이들은 또한 매트릭스 사전 스파이크 품질 관리(QC) 시료에도 사용되었습니다. 모든 표준물질은 4°C에서 보관했으며 2주 이내에 사용했습니다.

1% AA 추출 용매가 포함된 ACN은 990mL의 ACN에 10mL의 빙초산을 첨가하여 제조하였고 실온에서 보관했습니다. LC 이동상 A는 5mM NH₄OAc가 함유된 물을, 이동상 B는 MeOH를 사용했습니다.

장비 및 재료

1290 Infinity II 고속 펌프(G7120A), 1290 Infinity II multisampler(G7167B), 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A)로 구성된 Agilent 1290 Infinity II LC 시스템을 사용하여 연구를 수행하였습니다. LC 시스템은 Agilent Jet Stream iFunnel 전기분무 이온화원(ESI)이 장착된 Agilent 6495D LC/TQ와 함께 사용하였습니다. 데이터 수집 및 분석에는 Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어를 사용했습니다.

시료 전처리에 사용된 기타 장비는 다음과 같습니다.

- Centra CL3R 원심분리기(Thermo IEC, MA, USA)
- Geno/Grinder (Metuchen, NJ, USA)
- Multi Reax 시험관 진탕기(Heidolph, Schwabach, Germany)
- 피펫 및 리피터(Eppendorf, NY, USA)
- 애질런트 양압 매니폴드 48 프로세서(PPM-48; 제품 번호 5191-4101)
- CentriVap 및 CentriVap 콜드 트랩(Labconco, MO, USA)
- 초음파 세척 수조(VWR, PA, USA)

1290 Infinity II LC 시스템은 Agilent InfinityLab PFC 지연 컬럼, 4.6 x 30mm(제품 번호 5062-8100)를 포함한 Agilent InfinityLab PFC-free HPLC 변환 키트(제품 번호 5004-0006)를 사용하여 변형되었습니다. Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 x 100mm, 1.8µm(제품 번호 959758-902) 및 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 컬럼, 2.1mm, 1.8µm, 최대 압력: 1,200bar, UHPLC 가드(제품 번호 821725-901)를 사용하여 크로마토그래피 분리를 수행했습니다.

사용된 기타 애질런트 소모품은 다음과 같습니다.

- Agilent Bond Elut QuEChERS EN 추출 키트, EN 15662 분석법, 완충염, 세라믹 균질기(제품 번호 5982-5650CH)
- Captiva EMR PFAS Food II 카트리지, 6mL, 750mg(제품 번호 5610-2232)
- 폴리프로필렌(PP) 스냅 캡 및 바이알, 1mL(제품 번호 5182-0567 및 5182-0542)
- PP 스크류 캡 스타일 바이알 및 캡, 2mL(제품 번호 5191-8150 및 5191-8151)
- 튜브 및 캡, 50mL, 50/pk(제품 번호 5610-2049)
- 튜브 및 캡, 15mL, 100/pk(제품 번호 5610-2039)

연구에 사용된 모든 소모품은 PFAS 함유량이 기준치 미만인지 테스트 및 검증되었습니다.

LC/MS/MS 기기 조건

LC Binary 펌프 조건은 표 1에, multisampler 프로그램은 표 2에 나열되어 있습니다. 컬럼 온도는 55 ± 0.8°C로 설정되었습니다. MS 데이터는 음이온 모드에서 166V의 일정한 fragmentor 설정으로 수집했습니다. ESI 소스 설정은 건조 가스 150°C, 18L/분, sheath 가스 390°C, 12L/분, nebulizer 가스 15psi, 캐필러리 전압 2,500V, 노즐 전압 0V였습니다.

표 1. LC/MS/MS용 LC 펌프 조건.

파라미터	설정			
이동상 A	5mM NH ₄ OAc가 포함된 물			
이동상 B	MeOH			
그라디언트	시간(분)	%A	%B	유속(mL/분)
	0.00	98.00	2.00	0.400
	2.00	98.00	2.00	0.400
	2.50	45.00	55.00	0.400
	6.50	30.00	70.00	0.400
	8.00	20.00	80.00	0.460
	14.20	0.00	100.00	0.460
	17.00	0.00	100.00	0.400
	17.10	98.00	2.00	-
Post Time	3.0분			

표 2. LC/MS/MS용 LC multisampler 프로그램.

파라미터	설정					
주입 프로그램	10µL 물 추출(draw)					
	10µL 추출(draw)					
	니틀 세척					
	50µL 물 추출(draw)					
	공기 중 10µL을 5회 혼합					
	주입					
Multiwash	단계	용매	시간(초)	시트 백플러시	니틀 세척	
	1	IPA	10	가능	가능	
	2	ACN	10	가능	가능	
	3	물	10	가능	가능	
	시작 조건	물	NA	가능	가능	

시료 전처리

영아용 조제분유, 우유, 달걀 시료는 현지 식료품점에서 구입했습니다. 신선한 우유와 영아용 조제분유 시료는 직접 추출에 사용했습니다. 신선한 달걀을 깨서 폴리프로필렌 병에 넣고 잘 섞은 후 추출했습니다.

영아용 조제분유 시료 전처리의 경우 5g 시료를 추출에 사용했고, 우유 및 달걀 시료의 경우 10g 시료를 추출에 사용했습니다. Native PFAS 및 ISTD 스파이킹 용액을 QC 시료에 적절하게 첨가하고, 매트릭스 바탕시료에는 ISTD만 첨가했습니다. 스파이킹 후 시료를 10-15초 동안 볼텍싱했습니다. 그런 다음 시료는 그림 1에 설명된 전처리 절차를 위해 준비되었습니다.

표 3. PFAS 표적물질, ISTD 및 cholic acid 간섭 모니터링을 위한 MS 수집 조건(Agilent 6495D LC/MS 시스템).

화합물	RT (분)	전구 이온 (m/z)	생성 이온 (m/z)	충돌 에너지 (V)	충돌 셀 가속기(V)	iFunnel 모드
PFBA	4.78	213	169	8	2	표준물질
PFPeA	5.29	263	219	4	2	표준물질
PFHxA	5.93	313	269 119	8 24	2	표준물질
PFHpA	6.72	363	319 169	8 16	2	표준물질
PFOA	7.6	413	369 219	8 16	2	표준물질
PFNA	8.51	463	419 219 169	8 16 20	2	표준물질
PFDA	9.3	513	469 269 219	12 16 20	2	표준물질
PFUnDA	9.88	563	519 319 269	12 20 20	2	표준물질
PFDoA	10.35	613	569 319 269	8 20 24	2	표준물질
PFTTrDA	10.77	663	619 319 169	12 20 32	2	표준물질
PFTeDA	11.17	712.9	669 219 169	12 28 32	2	표준물질
PFBS	5.39	298.9	99 80	34 36	2	표준물질
PFPeS	5.99	348.9	99 80	40 44	2	표준물질
PFHxS	6.76	398.9	99 80	40 56	2	표준물질
PFHpS	7.63	448.9	99 80	42 50	2	표준물질
PFOS	8.50	498.9	99 79.9	50 54	2	표준물질
PFNS	9.29	548.9	99 80	52 56	2	표준물질
PFDS	9.86	598.9	99 80	56 60	2	표준물질
PFUnDS	10.31	648.9	99 79.8	56 76	2	표준물질
PFDoS	10.73	698.9	99 80	62 67	2	표준물질
PFTTrDS	11.13	748.9	98.9 79.6	64 80	4	표준물질
PFOSA	10.0	497.9	169 78 48	36 36 110	3	표준물질
9Cl-PF3ONS	9.03	530.9	350.9 83	28 32	3	표준물질

화합물	RT (분)	전구 이온 (m/z)	생성 이온 (m/z)	충돌 에너지 (V)	충돌 셀 가속기(V)	iFunnel 모드
11Cl-PF3OUdS	10.14	630.9	450.9 83	36 32	2	표준물질
HFPO-DA	6.15	285	185 169 119	20 4 32	5	Fragile
DONA	6.83	377	251 85	8 32	5	표준물질
4:2 FTS	5.87	327	307 81 80	20 36 42	2	표준물질
6:2 FTS	7.55	427	407 81 80	30 32 58	2	표준물질
8:2 FTS	9.29	527	507 81 80	30 46 50	4	표준물질
10:2 FTS	10.35	627	606.9 81 80	34 42 54	4	표준물질
¹³ C ₂ -4:2 FTS	5.87	329	309	24	2	표준물질
¹³ C ₂ -6:2 FTS	7.55	429	409	28	2	표준물질
¹³ C ₂ -8:2 FTS	9.29	529	509	28	4	표준물질
¹³ C ₂ -PFDoA	10.35	615	570	12	2	표준물질
¹³ C ₂ -PFTeDA	11.17	715	670	12	2	표준물질
¹³ C ₃ -HFPO-DA	6.15	287	169	4	5	표준물질
¹³ C ₃ -PFBS	5.39	302	80	44	2	표준물질
¹³ C ₃ -PFHxS	6.76	402	80	48	2	표준물질
¹³ C ₄ -PFBA	4.78	217	172	8	2	표준물질
¹³ C ₄ -PFHpA	6.72	367	322	8	2	표준물질
¹³ C ₅ -PFHxA	5.93	318	273	8	2	표준물질
¹³ C ₅ -PFPeA	5.29	268	223	4	2	표준물질
¹³ C ₆ -PFDA	9.3	519	474	8	2	표준물질
¹³ C ₇ -PFUnDA	9.88	570	525	8	2	표준물질
¹³ C ₈ -PFOA	7.6	421	376	8	2	표준물질
¹³ C ₈ -PFOS	8.52	507	80	54	2	표준물질
¹³ C ₈ -PFOSA	10	506	78	36	3	표준물질
¹³ C ₉ -PFNA	8.51	472	427	8	2	표준물질
TUDCA	6.8	498	124 80	53 80	4	표준물질
TCDCa	8.6	498	124 80	65 80	4	표준물질
TDCA	9.0	498	124 80	69 80	4	표준물질

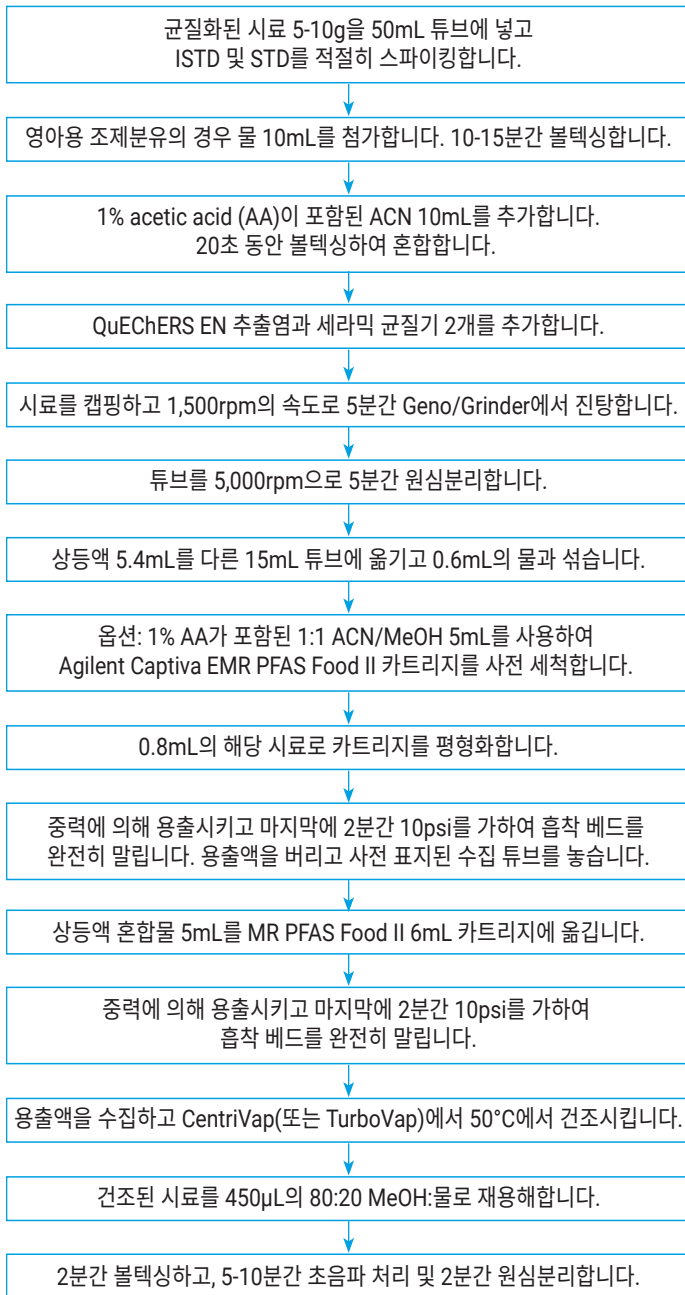


그림 1. 영아용 조제분유, 우유, 달걀의 PFAS 분석을 위한 시료 전처리 절차.

분석법 성능 평가

Captiva EMR PFAS Food II 카트리지를 사용한 새로운 패스스루 클린업은 카트리지로 시료를 클린업하는 동안 매트릭스 제거, 표적물질 회수율 및 재현성 측면에서 평가되었습니다. 그런 다음 검량 연구, 분석법 LOQ 측정, 회수율 정확도 및 정밀도를 포함하여 전체 분석법이 검증되었습니다. 표적물질 LOQ의 요구 사항이 서로 다르기 때문에 5개의 사전 스파이크된 QC 농도 시료를 각 농도에서 4-5개를 반복하여 준비했습니다. 또한 매트릭스 대조 시료의 표적 정량화를 위해 매트릭스 바탕시료를 5-7개 반복하여 준비했습니다. 이는 일부 PFAS의 경우 매트릭스의 기여가 불가피하기 때문에 정확도 평가에 중요합니다. 표 4는 매트릭스 제로 바탕시료와 PFAS 표준물질 및 ISTD 스파이킹을 통해 사전 스파이크된 QC를 보여줍니다. 시료 전처리를 통해 도입된 다양한 농도 요인에 따라 매트릭스의 실제 스파이킹 농도는 다양했습니다.

표 4. 그룹 II 식품 매트릭스의 매트릭스 일치 QC 및 매트릭스 제로 시료.

	영아용 조제분유	우유	달걀			
시료량(g)	5	10	10			
농도 계수	5x	10x	10x			
매트릭스 스파이킹 시료	스파이킹 농도(µg/kg)					
	STD*	ISTD	STD*	ISTD	STD*	ISTD
제로	-	0.2	-	0.1	-	0.1
PR-QC 1	0.01	0.2	0.01	0.1	0.01	0.1
PR-QC 2	0.02	0.2	0.02	0.1	0.02	0.1
PR-QC 3	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
PR-QC 4	0.4	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1
PR-QC 5	1.0	0.2	0.5	0.1	0.5	0.1

* 농도는 28종 PFAS 표적물질의 일반적인 농도만을 나타냅니다. PFBA 및 PFPeA의 농도는 각각 일반 농도의 10x 및 2x였습니다.

결과 및 토의

EMR 혼합 모드 패스스루 클린업

Captiva EMR PFAS Food 카트리지는 혼합 모드 패스스루 클린업을 통해 기존 QuEChERS 추출 후 포괄적인 매트릭스 제거를 제공합니다. 탄수화물, 유기산, 색소, 지방 및 지질, 기타 소수성 및 친수성 매트릭스 공동 추출물을 포함한 매트릭스 간섭 물질을 제거하는 간단하고 효율적인 절차입니다. Captiva EMR PFAS Food I 카트리는 더 간단한 제형으로 흡착제가 적게 포함되어 있으며 과일과 채소, 이유식, 주스 등 식물성 신선 가공 식품에 권장됩니다. EMR PFAS Food II 카트리지에는 더 복잡한 제형의 흡착제가 많이 포함되어 있으며 우유, 달걀, 육류, 생선, 영아용 조제분유와 같은 동물성 신선 및 가공 식품과 건조 씨앗 사료 및 식품, 오일과 같은 일부 식물성 식품에 권장됩니다.

QuEChERS 추출 후 사용되는 기존의 dSPE 클린업과 비교하여 EMR 혼합 모드 패스스루 클린업은 PFAS 회수율 및 재현성을 크게 향상시켰습니다. 포도, 이유식, 영아용 조제분유, 참치, 달걀, 대두 조 추출물 등 대표적인 식품 시료 추출물을 대상으로 QuEChERS 추출 후 EMR 패스스루 클린업을 사용한 PFAS 회수율을 평가하고 일반적인 dSPE 클린업과 비교했습니다. 이유식 및 포도 추출물 클린업에는 Captiva EMR PFAS Food I 카트리지를, 대두, 영아용 조제분유, 참치 및 달걀 추출물 클린업에는 Captiva EMR PFAS Food II 카트리지를 사용했습니다. 그림 2는 각 식품 매트릭스에서 각 표적물질의 평균 회수율을 기준으로 한 비교 결과를 보여 주며, EMR 혼합 모드 패스스루 클린업을 사용하면 dSPE 클린업에 비해 회수율이 크게 향상됨을 보여줍니다.

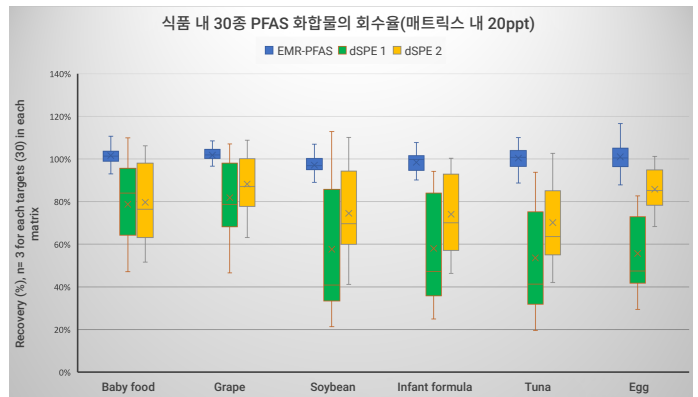


그림 2. EMR 혼합 모드 패스스루 클린업 또는 기존 dSPE 클린업을 사용하는 식품 추출물 클린업 분석법에 대한 PFAS 회수율 비교.

그림 3과 4의 크로마토그램 비교에서 볼 수 있듯이 시료 클린업 중 매트릭스 제거는 각각 GC/MS full scan과 LC/Q-TOF 총 이온 크로마토그램(TIC) scan을 사용하여 평가했습니다. 그 결과 EMR 혼합 모드 패스스루 클린업을 사용하여 매트릭스 제거가 크게 개선된 것으로 나타났습니다.

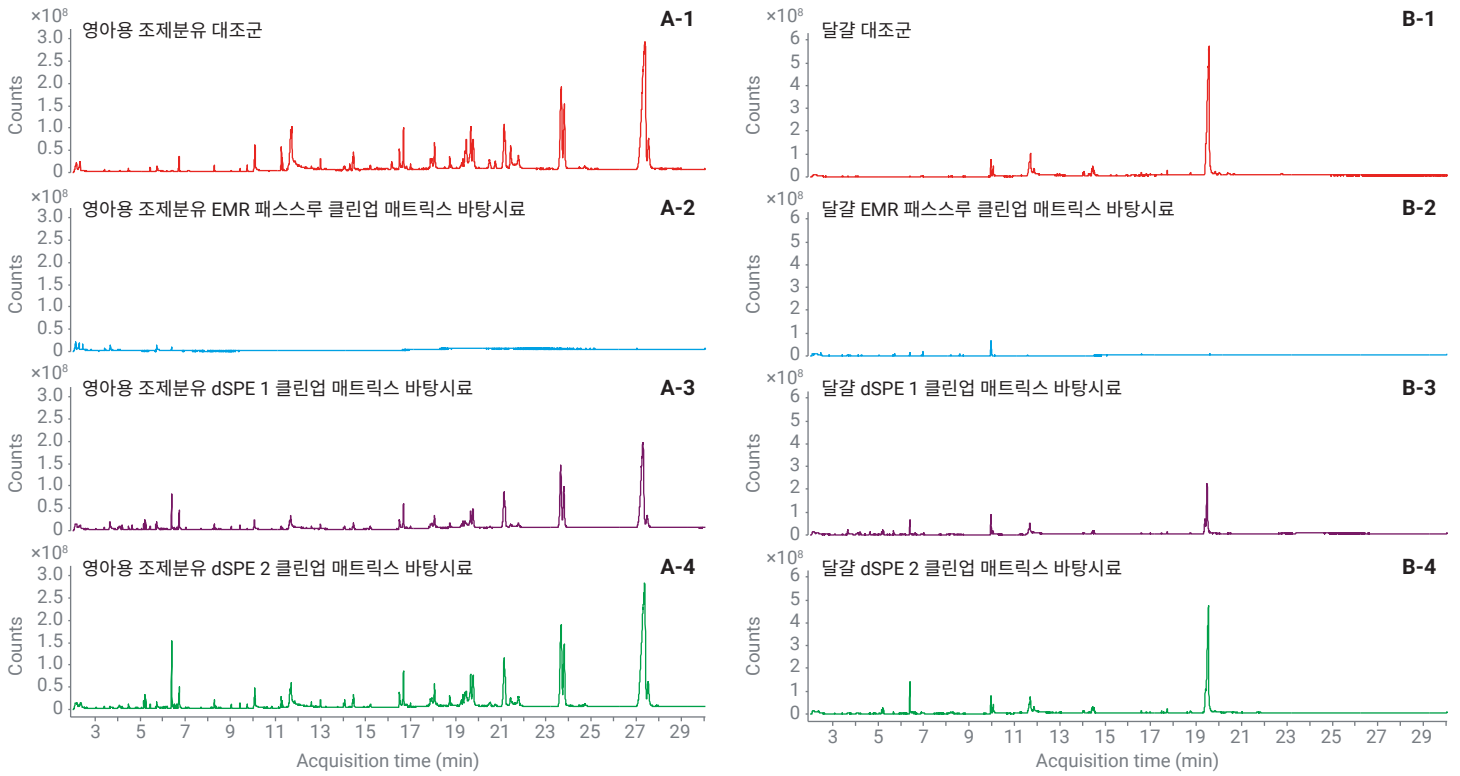


그림 3. GC/MS full scan을 이용하여 (A) 영아용 조제분유 시료 및 (B) 달걀 시료의 매트릭스 바탕시료에 대해 EMR 혼합 모드 패스스루 클린업과 기존 dSPE 클린업의 식품 매트릭스 제거 비교. (1) 클린업 하지 않음, (2) EMR 패스스루 클린업, (3) dSPE 1 클린업, (4) dSPE 2 클린업

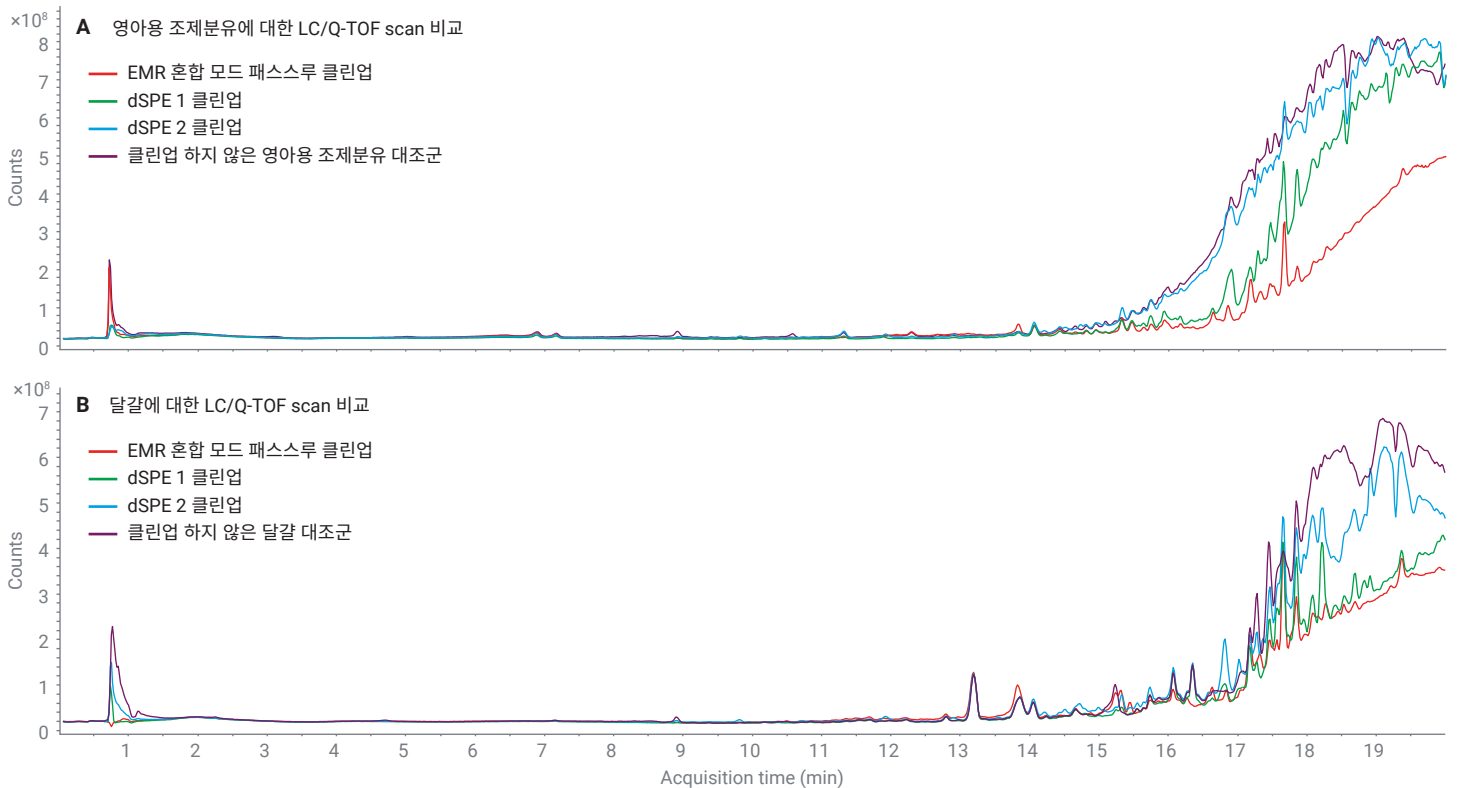


그림 4. LC/Q-TOF TIC(+) scan을 이용하여 영아용 조제분유 시료(A) 및 달걀 시료(B)에서 EMR 혼합 모드 패스스루 클린업과 기존 dSPE 클린업의 식품 매트릭스 제거 비교.

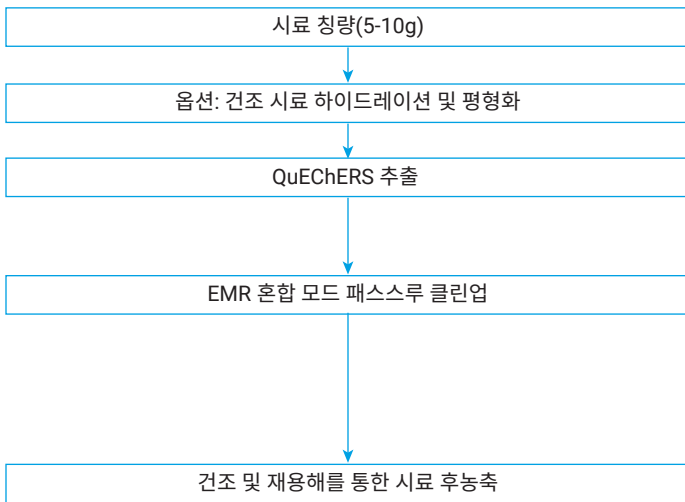
PFAS 표적물질 회수율 및 매트릭스 제거 개선 외에도 EMR 혼합 모드 패스스루 클린업의 또 다른 중요한 특징은 시료 부피 회수율이 향상된다는 것입니다. 농약 및 동물용 의약품 분석과 같은 기타 일반적인 식품 안전 분석에서는 일반적으로 시료 부피 회수율이 문제가 되지 않지만, 식품의 PFAS 분석에서는 요구되는 LOQ가 낮은 범위부터 중간 범위의 농도이기 때문에 시료 부피 회수율이 중요할 수 있습니다. 초저 LOQ는 분석법 감도를 높이기 위해 농축 후 단계를 거쳐야 합니다. 일반적으로 시료 클린업 후 건조 및 재용해 단계를 사용하여 5-10배의 농축 후 계수를 적용합니다. 결과적으로 높은 농도 계수와 일관된 재용해를 달성하기 위해서는 시료의 부피가 중요해집니다. 일반적으로 dSPE 클린업은 약 50%의 시료 부피 회수율만 제공하므로 5mL 시료 추출물의 정제는 약 2.5mL의 정제된 시료 부피만 생성할 수 있습니다. 그러나 EMR 혼합 모드 클린업 부피 회수율은 90% 이상으로, 5mL 시료 추출물의 정제는 최대 4.5mL의 시료를 얻을 수 있습니다. 이러한 큰 부피는 쉬운 후농축 및 일관된 시료 재용해를 제공합니다.

시료 전처리 절차

EMR 혼합 모드 패스스루 클린업을 사용하면 전체 시료 전처리 절차가 더 적은 단계로 간소화되어 시간, 노력 및 소모품이 절약됩니다. 새로 개발된 분석법에는 크게 두 가지 절차가 포함됩니다. QuEChERS 추출 및 EMR 패스스루 클린업이 포함되며, 이와 달리 기존 분석법은 QuEChERS 추출, dSPE 클린업, WAX SPE 추출의 세 가지 주요 절차를 포함합니다.⁵

그림 5는 두 가지 시료 전처리 방법의 절차의 비교를 보여줍니다. dSPE 클린업 후 기존 분석법에서 사용하던 WAX SPE 단계를 추가하여 시료 추출물을 추가로 정제했습니다. 그러나 SPE 분석법은 이전의 시료 추출 및 dSPE 클린업 단계와 함께 구현하기가 어렵습니다. 원 유기(ACN) 추출물은 카트리지에 로드하기 전에 최소 90%의 물이 포함된 용액으로 전환해야 합니다. 이는 매우 높은 수용성의 용액에서 건조 및 재용해하거나 물로 직접 희석하여 수행할 수 있는데, 이는 시료 로딩 시간 또는 WAX 카트리지를 로딩을 위한 전처리 시간을 크게 증가시킵니다. 컨디션닝, 평형, 로드, 세척 및 용출을 포함하는 일반적인 SPE 절차에는 더 많은 시간이 필요하고 더 많은 용매가 사용됩니다. 동일한 양의 시료를 전처리한다고 가정할 때, 기존 분석법은 새로운 분석법보다 최대 3배의 시간이 소요될 수 있습니다. 또한 새로운 분석법에서는 기존 분석법에 비해 용매와 소모품 사용량이 적습니다. 이러한 새로운 분석법의 이점을 종합적으로 고려하면 전반적인 실험실 생산성을 향상시킬 수 있습니다.

A QuEChERS 추출 + EMR 혼합 모드 패스스루 클린업



B QuEChERS 추출 + dSPE 클린업 + WAX SPE 추출

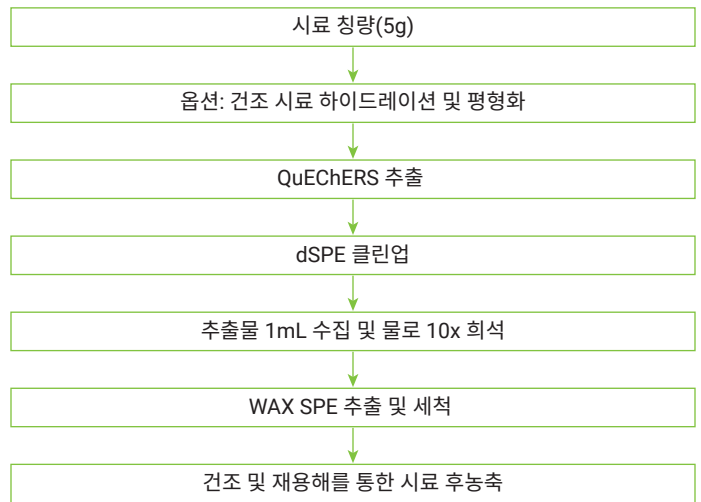


그림 5. 새로 개발된 분석법(A)과 기존 분석법(B)을 사용한 식품 내 PFAS 분석에서 시료 전처리 절차 비교.

완전한 분석법 검증

AOAC SMPR 가이드라인에 따라 영아용 조제분유, 우유 및 달걀에서 30종 PFAS 표적물질을 측정하기 위한 새로운 분석법을 검증했습니다. 테스트된 식품 매트릭스에 대한 PFAS 표적물질 LOQ에 대한 요구 사항은 표 5에 나와 있습니다.

표 5. 영아용 조제분유, 우유 및 달걀의 LOQ에 대한 AOAC SMPR 요구 사항.

식품 매트릭스	LOQ (µg/kg)		
	PFHxS, PFOA, PFNA 및 PFOS	PFBA 및 PFPeA	기타 PFAS
영아용 조제분유	≤ 0.01	≤ 1	≤ 0.1
달걀	≤ 0.3	≤ 3	≤ 3
우유	≤ 0.01	≤ 1	≤ 0.1

분석법 LOQ

연구에서 평가한 세 가지 식품 매트릭스는 모두 매트릭스 바탕시료에서 양성 검출을 보였습니다. 그 결과, 매트릭스 백그라운드 보정이 필요했고 표적물질 회수율 계산을 위한 분석법 검증에 사용되었습니다. 매트릭스 바탕시료를 5-7회 반복하여 준비한 다음, 다음 공식에 따라 보고 가능한 가장 낮은 LOQ를 계산했습니다.

$$LOQ_{cal} = 10 \times SD_{MBS}$$

여기에서:

- LOQ_{cal} 은 분석법의 보고 가능한 가장 낮은 정량 한계(LOQ)
- SD_{MBS} 는 매트릭스 바탕시료 5-7개 반복 실행에서 검출된 표적물질의 표준 편차(SD)입니다

그런 다음 보고 가능한 최저 LOQ와 같거나 그 이상의 검증된 최저 QC 스파이킹 농도를 기준으로 분석법 LOQ를 결정했습니다. 표 6은 각 매트릭스의 각 표적물질에 대해 계산된 보고 가능한 최저 LOQ_{cal} 및 검증된 분석법 LOQ_{val} 을 보여줍니다.

주요 PFAS 표적물질인 PFHxS, PFNA 및 PFOS의 경우 검증된 분석법 LOQ는 테스트된 세 가지 매트릭스 모두에서 요구되는 LOQ보다 낮거나 같은 것으로 입증되었습니다. PFOA에 대해 검증된 분석법의 LOQ는 우유와 달걀의 나열된 요구되는 LOQ보다 낮거나 같았습니다. 영아용 조제분유에서는 매트릭스 양성 발생으로 인해 요구되는 LOQ보다 높게 나타났습니다. 기타 PFAS 표적물질의 경우 검증된 분석법 LOQ는 양성 발생으로 인해 우유의 6:2 FTS에 대한 더 높은 LOQ를 제외하고 세 가지 매트릭스 모두에서 요구되는 LOQ보다 낮거나 같은 것으로 나타났습니다. 달걀의 PFOS는 498.9에서 79.9로의 qualifier

transition에서 TCDCA의 상당히 높은 간섭으로 인해 기타 주요 PFAS 표적물질보다 LOQ가 높았으며, 이로 인해 낮은 농도에서 qualifier 비율 식별에 실패했습니다. 그러나 검증된 분석법의 LOQ(0.1µg/kg)는 달걀의 0.3µg/kg LOQ보다 여전히 낮았습니다. 그림 6은 영아용 조제분유, 우유 및 달걀의 주요 PFAS 표적물질에 대한 매트릭스 바탕시료 및 검증된 분석법 LOQ의 크로마토그램을 보여줍니다.

표 6. 영아용 조제분유, 우유 및 달걀의 30종 PFAS 표적물질에 대한 보고 가능한 분석법의 계산된 LOQ(LOQ_{cal}) 및 검증된 LOQ(LOQ_{val}).

표적물질	영아용 조제분유		우유		달걀	
	LOQ_{cal}	LOQ_{val}	LOQ_{cal}	LOQ_{val}	LOQ_{cal}	LOQ_{val}
PFBA	NA	0.1	NA	0.1	0.147	0.2
PFPeA	0.005	0.02	0.003	0.02	0.011	0.02
PFBS	0.002	0.01	0.001	0.01	NA	0.01
4:2 FTS	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFPeS	NA	0.02	NA	0.02	0.005	0.01
PFHxA	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
HFPO-DA	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFHpA	0.001	0.01	0.002	0.01	0.001	0.01
PFHxS*	0.004	0.01	0.002	0.01	0.001	0.01
DONA	0.001	0.01	0.045	0.1	NA	0.01
6:2 FTS	0.007	0.01	0.322	0.5	0.006	0.01
PFOA*	0.016	0.02	0.004	0.01	0.006	0.01
PFHpS	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFNA*	0.005	0.01	0.002	0.01	0.003	0.01
PFOS*	0.002	0.01	0.001	0.01	0.003	0.1
9Cl-PF3ONS	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
8:2 FTS	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFNS	0.006	0.01	0.002	0.01	0.001	0.01
PFDA	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFDS	0.002	0.01	0.002	0.01	0.001	0.01
PFUnDA	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFOSA	0.001	0.01	0.001	0.01	NA	0.01
11Cl-PF3OUds	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFUnDS	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFDoA	0.005	0.01	0.001	0.01	NA	0.01
10:2 FTS	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFDoS	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFTTrDA	0.002	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFTTrDS	0.004	0.01	NA	0.01	NA	0.01
PFTTeDA	NA	0.01	NA	0.01	NA	0.01

* 주요 PFAS 표적물질

빨간색 글자는 매트릭스의 영향으로 인해 LOQ_{val} 농도가 요구되는 LOQ 농도보다 높음을 나타냅니다.

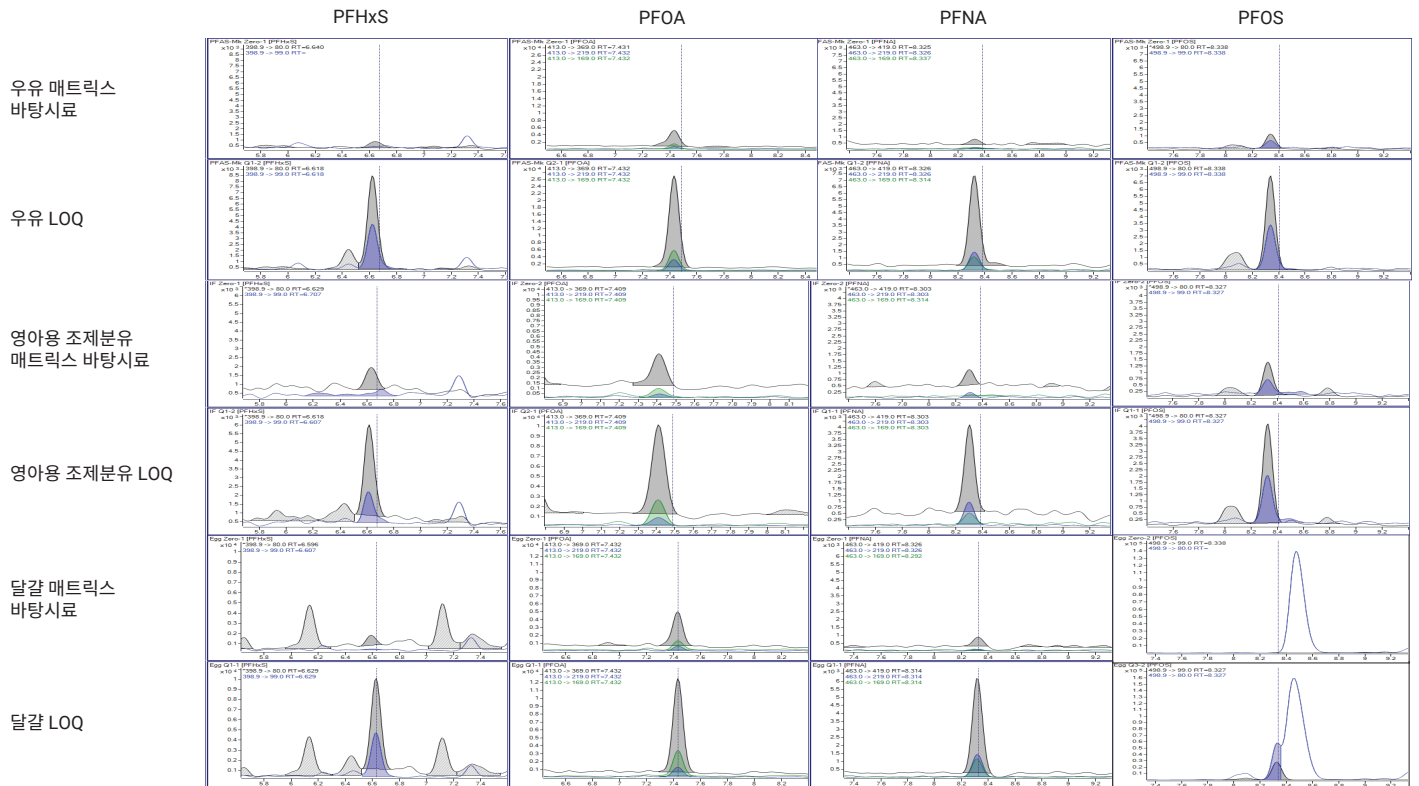


그림 6. 주요 PFAS 표적물질에 대한 우유(상단), 영아용 조제분유(중간), 달걀(하단) 매트릭스 바탕시료 및 LOQ 농도 크로마토그램: PFHxS, PFOA, PFNA 및 PFOS. 각 매트릭스의 LOQ 농도는 표 6에 정리되어 있습니다.

분석법 검량

18종 PFAS 동위원소 표지 ISTD를 사용하면 동일한 표준물질 검량선을 다양한 식품 매트릭스 시료의 PFAS 정량화에 사용할 수 있습니다. 따라서 각 식품 매트릭스에 대해 매트릭스 일치 검량선이 필요하지 않습니다. 이를 통해 시료 테스트 생산성이 크게 향상되고 시간과 노동력 및 재료의 비용이 절약되며 시료 분석 일관성이 향상됩니다.

검량선 범위는 식품 매트릭스의 요구되는 LOQ, 시료 전처리를 통해 도입된 농도 계수 및 기기 분석법 감도를 기반으로 결정되었습니다. 영아용 조제분유, 우유 및 달걀에 요구되는 더 높은 검출 농도로 인해 20-10,000ng/L의 검량 세트 범위가 사용되었습니다. 그 결과 30종 모든 PFAS 표적물질에 대해 상관 계수 R²가 0.99를 초과하는 500x의 검량선 측정 범위를 확인했습니다.

분석법 정확도 및 정밀도

영아용 조제분유, 우유 및 달걀에서 분석법 회수율과 재현성을 검증했습니다. 달걀의 허용 기준은 80-120% 회수율이고 영아용 조제분유와 우유의 경우 PFOS, PFOA, PFHxS 및 PFNA의 경우 65-135% 회수율입니다.⁵ 세 가지 매트릭스에 있는 기타 PFAS 표적물질의 경우 허용 회수율 기준 또한 해당 동위원소 ISTD가 포함된 표적물질의 경우 65-135%이고, 해당 ISTD가 없는 표적물질의 경우 40-140%입니다. 재현성(RSD%) 허용 범위는 달걀의 주요 PFAS의 경우 20% 이하, 우유 및 영아용 조제분유의 주요 PFAS의 경우 25% 이하, 해당 동위원소 ISTD가 포함된 기타 모든 PFAS 표적물질의 경우 25% 이하, 세 가지 매트릭스 모두에서 해당 동위원소 ISTD가 없는 기타 PFAS 표적물질의 경우 30% 이하입니다.

최종 분석법 검증 결과에는 LOQ, 중간 및 고농도 QC를 포함하여 각 매트릭스에 세 가지 QC 농도가 포함되었습니다. 검증된 분석법 LOQ는 표 6에 정리했습니다. 중간 농도 QC는 LOQ의 5-10배로 보고되고, 고농도 QC는 LOQ의 20-50배로 보고됩니다. 우유의 6:2 FTS에 대한 한 가지 예외가 있는데, 시료 매트릭스 대조군에서 상당한 높은 양성 검출로 인해 0.5µg/kg의 한 가지 농도만 보고 가능했습니다.

그림 7은 영아용 조제분유, 우유 및 달걀의 PFAS 분석에 대한 분석법 검증 회수 및 재현성(RSD) 요약을 보여줍니다. 전반적으로, 이 분석법은 허용 요건을 충족하는 테스트된 식품 매트릭스의 30종 표적물질 모두에 대해 허용 가능한 회수율 및 재현성 결과를 제공했습니다. 주요 PFAS 표적물질은 모든 매트릭스의 모든 스파이킹 농도에 대해 허용 가능한 회수율(80-120%)과 RSD (20% 미만)를 모두 얻었습니다. 해당 동위원소 표지 ISTD가 포함된 표적물질은 해당 동위원소 표지 ISTD가 없는 표적물질보다 더 우수한 정량 결과를 생성했습니다.

분석법 검증 회수율 및 재현성(RSD%) 요약

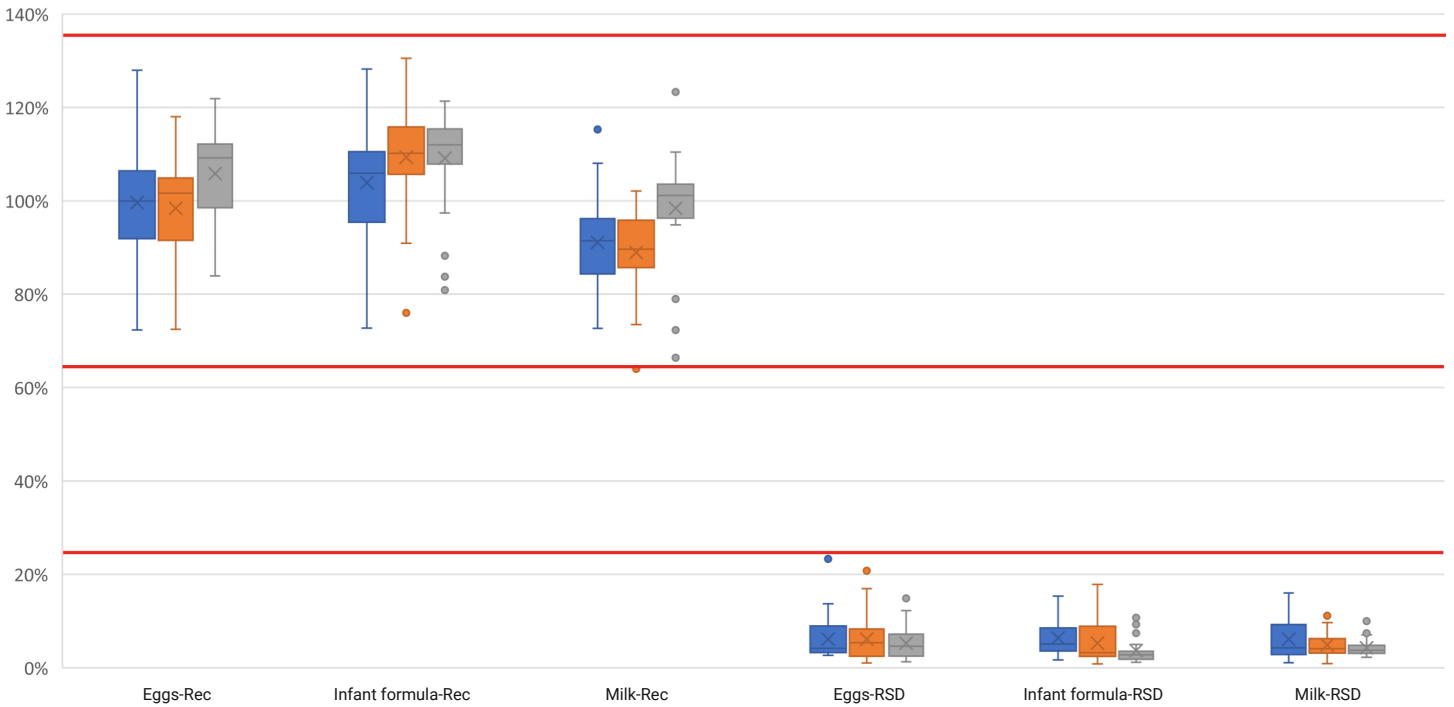


그림 7. 영아용 조제분유, 우유 및 달걀의 PFAS 분석에 대한 분석법 검증 회수율(Rec) 및 재현성(RSD%) 요약.

결론

QuEChERS 추출에 이어 Agilent Captiva EMR PFAS Food II 카트리지를 사용하여 혼합 모드 패스스루 클린업하고 LC/MS/MS 검출하는 간단하고 신속하며 신뢰할 수 있는 분석법이 영아용 조제분유, 우유 및 달걀의 30종 PFAS 표적물질에 대해 개발되고 검증되었습니다. 새로운 클린업 분석법은 매트릭스 제거, PFAS 회수율 및 시료 부피 회수율 측면에서 기존 dSPE 클린업에 비해 상당한 개선이 이루어졌음을 입증했습니다. 이 분석법은 또한 더 간단하여 시간과 노력을 절약하므로 전반적인 실험실 생산성이 향상됩니다. 전체 분석법은 허용 기준에 따라 검증되었으며 분석법 성능은 AOAC SMPR 2023.003에 명시된 요구 사항을 충족하는 것으로 나타났습니다.

참고 문헌

1. EUR-Lex (2023) Consolidated text: Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on Maximum Levels for Certain Contaminants on Food and Repealing Regulation (EC) No 1881/2006.
2. AOAC (2023) Standard Method Performance Requirements (SMPRs) for Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Produce, Beverages, Dairy Products, Eggs, Seafood, Meat Products, and Feed (AOAC SMPR 2023.003)
3. EPA method 533 Determination of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Drinking Water by Isotope Dilution Anion Exchange Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (EPA 533:2019).
4. EPA method 1633 Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Aqueous, Solid, Biosolids, and Tissue Samples by LC-MS/MS (EPA 1633:2024).
5. Genualdi, S.; Young, W.; Peprah, E.; et al. Analyte and Matrix Method Extension of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Food and Feed, *Anal. and Bioanal. Chem.* **2024**, 416, 627-633. doi: 10.1007/s00216-023-04833-1.
6. Hwang, S. H.; Ryu, S. Y.; Seo, D.; et al. Development of a Method Using QuEChERS and LC-MS/MS for Analysis of Per- and Polyfluoroalkyl Substances in Rice Matrix, *Food Chem.* **2024**, 445, 138687. doi: 10.1016/j.foodchem.2024.138687.

www.agilent.com

DE90981738

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 7월 2일 한국에서 발행
5994-7366KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com