

Agilent Captiva EMR-Lipid와 GC/MS/MS를 이용한 연어 내 다성분 잔류 농약 분석

저자

Pimperlilli J. dos Santos,
Sônia M. V. S. Cardoso,
Osmar D. Prestes,
Martha B. Adaime,
and Renato Zanella
Universidade Federal de
Santa Maria, Departamento
de Química, Laboratório de
Análises de Resíduos de
Pesticidas (LARP), Santa
Maria-RS, Brasil, 97105-900

Mariana Baptista
Agilent Technologies do Brasil,
Barueri-SP, Brasil, 06455-000

개요

이 응용 자료에서는 연어 내 다성분 잔류 농약 측정을 위한 분석법을 소개합니다. 시료 전처리 분석법은 액체 추출을 기반으로 하며 Agilent Captiva EMR—Lipid cleanup 및 Agilent Intuvo 9000 GC 및 7010B QQQ 질량 분석법(GC/MS/MS)을 이용한 분석을 수행합니다. Captiva EMR—Lipid cleanup을 이용하면 연어의 지질과 같은 주요 간섭물질이 효율적으로 제거됩니다. Agilent HP-5ms Ultra Inert 컬럼을 사용하여 20분 동안 총 38가지 농약을 측정된 결과 연어에 함유된 모든 화합물에 대해 0.5~25µg/kg의 농도 범위에서 우수한 직선성($R^2 \geq 0.990$)을 보였습니다. 전체 회수율은 RSD <25%에서 83%~125% 범위였습니다.

서론

양식 제품에 대한 수요가 크게 증가함에 따라 안전한 식품 공급을 위해 잔류 농약을 모니터링해야 할 필요성이 제기되고 있습니다. 어류 시료(단백질과 지방 함량이 높음)의 복잡한 조성으로 인해 양질의 분석 결과를 얻기 위한 시료 전처리에 어려움이 따릅니다. 적절한 시료 전처리를 위해서는 표적 분석물질을 만족스럽고 일관되게 추출하고 매트릭스를 효과적으로 제거해야 합니다.

이러한 잔류 농약 수준을 규제하는 최대 잔류 허용기준(MRL)을 준수하는지 여부를 평가하기 위해서는 농약을 광범위하게 추적하는 작업이 필요합니다. 연어는 약 20%의 단백질과 10%의 지질로 구성된 오메가-3를 함유하고 있습니다. 유엔 식량농업기구(FAO)에 따르면 연어는 전 세계에서 9번째로 많이 양식되는 어류이며, 양식 과정에서 기생충 존재 가능성으로 일부 농약 사용이 허용됩니다.¹ 공급 식품에 이러한 화합물이 극미량으로 존재하지만, 이조차도 환경에 영향을 미칠 수 있습니다.

이 연구의 목적은 연어 시료에서 38가지 잔류 농약을 검출하고 정량하기 위한 효율적이고 간단한 GC/MS/MS 분석법을 개발하는 것입니다. 이 분석법에는 고체-액체 추출을 기반으로 하며 Captiva EMR—Lipid cleanup 및 수중 잔류물 제거가 적용되었습니다. GC/MS/MS 분석법은 고효율 이온화원(HES) 및 30m HP-5ms Ultra Inert 컬럼을 이용한 Dynamic Multiple Reaction Monitoring(dMRM) 기법을 기반으로 합니다.

실험

화학물질 및 시약

- 농약 표준물질(고순도 $\geq 95\%$), Dr. Ehrenstorfer(독일) 및 Sigma-Aldrich(미국)
- Acetonitrile (ACN), methanol(MeOH) 및 ethyl acetate(EtOAc), HPLC 등급, J.T. Baker(미국)
- 시약 등급 isooctane, Mallinckrodt(아일랜드)
- 폴리프로필렌 튜브(15mL 및 50mL), Sarstedt(독일)
- Eppendorf 마이크로튜브(2mL), Axygen Scientific(미국)

용액 및 표준물질

개별 농약 원액(1000mg/L)은 적절한 용매(ACN, MeOH 또는 toluene)로 제조하고 $\leq -5^\circ\text{C}$ 에서 보관했습니다. 혼합 용액(10mg/L)은 ACN으로 제조하고 $\leq -5^\circ\text{C}$ 에서 보관했습니다.

80:20 ACN/EtOAc 추출 용매 및 16:64:20 ACN/EtOAc/물 용리 용액을 제조하고 실온에서 보관했습니다.

장비 및 재료

- 원심분리기 NT 825(Novatecnica, São Paulo, Brazil) 및 SL 703(Solab, São Paulo, Brazil)
- Vortex 진탕기 QL-901(Microtechnology, São Paulo, Brazil)
- 분석용 정밀 저울 UX-420H 및 AUW 220D(Shimadzu, Kyoto, Japan)
- 초순수(18M Ω cm), Milli-Q system(France)
- Captiva EMR—Lipid 카트리지, 3mL, 300mg(p/n 5190-1003)

- 매니폴드 Vac Elut 12 position(p/n 5982-9115)
- 세라믹 균질기(p/n 5982-9313)
- 시린지 필터, 13mm, 0.22 μm , 나일론(p/n 5190-5269)
- 주입구 셉타, bleed and temperature optimied(BTO), 비접착성 11mm(p/n 5183-4757)
- 바이알 2mL, 투명, 스크루, 인증 제품(p/n 5182-0714)
- 스크루 캡, 셉타 PTFE/red 실리콘, 인증 제품(p/n 5182-0717)
- ALS 시린지, 고정 니들, 10 μL , PTFE-팁 플런저(p/n 5183-4730)
- Ultra Inert liner, 비분할, 단일 테이퍼, 유리솜(p/n 5190-3167)
- 평면형 캐필러리 컬럼 HP-5ms UI, 30m \times 0.25mm, 0.25 μm (p/n 19091S-433UI-INT)
- Intuvo SSL Guard Chip(p/n G4587-60565)
- Gas Clean 필터 키트 - 물, 산소 및 유기물 제거용 브래킷, 연결 장치 및 운반 가스 필터 포함(p/n CP17975)
- 다양한 부피의 피펫, Eppendorf(미국)

7010B QQQ GC/MS 및 Agilent Intuvo 9000 GC를 사용하여 분석을 수행했습니다. GC 시스템에는 전자식 기체역학 제어 장치(EPC) 및 7693 자동 시료 주입기가 장착되었습니다. 데이터 수집 및 분석에는 Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어를 사용하였습니다.

기기 조건

평가된 화합물을 기반으로 GC/MS/MS 기기 조건을 확립했습니다. 표 1에 GC/MS/MS 작동을 위한 최종 조건을 나타냈습니다.

표 1. Intuvo 9000C 및 7010B GC/MS/MS 조건.

파라미터	값
운반 가스	Helium 1.2 mL/분
주입 부피	2μL(펄스 비분할 모드)
주입 펄스 압력	50psi
오븐 프로그램	60°C(1분), 40°C/min로 170°C까지 승온, 10°C/min로 310°C까지 승온, 3분 유지
주입구 온도	280°C
Guard Chip 온도	초기 85°C 트랙 오븐 모드
버스 온도	280°C
이송 라인	290°C
이온화원	전자 충격(EI)
이온화원 온도	300°C
MS1/MS2 온도	150°C
수집 모드	Dynamic MRM(dMRM)
충돌 가스	질소, 1.5mL/분

표 2. 농약 목록, MRM 및 충돌 에너지에 대한 질량 전이.

화합물	MRM 전이				RT(분)
	정량자 (m/z)	CE (V)	정성자 (m/z)	CE (V)	
Acrinathrin	228.9 및 92.8	10	207.8 및 181.1	10	14.762
Alachlor	188.1 및 160.1	10	188.1 및 132.1	20	9.224
Atrazine	214.9 및 200.2	5	214.9 및 58.1	10	8.069
Cadusafos	158.8 및 131.0	5	158.8 및 97.0	15	7.183
Chlordane-cis	372.8 및 300.9	10	372.8 및 265.9	25	11.099
Chlorfenapyr	328.0 및 247.0	20	247.1 및 227.1	20	11.914
Chlorfenvinphos	294.9 및 266.9	5	266.9 및 159.0	20	10.438
Chlorpyrifos	313.8 및 257.8	15	198.9 및 171.0	15	9.881
Chlorpyrifos-methyl	285.9 및 93.0	25	124.9 및 47.0	15	9.120
Cyhalothrin (Lambda)	208.1 및 181.1	10	181.1 및 152.1	30	14.657
Epoxiconazole	192.0 및 138.1	10	192.0 및 111.0	25	12.919
Ethoprophos	157.9 및 114.0	5	157.9 및 97.0	15	7.183
Etrimfos	292.1 및 181.1	5	181.1 및 153.1	10	8.560
Fenitrothion	277.0 및 260.1	5	125.1 및 79.0	5	9.118
Fenpropimorph	128.1 및 110.1	5	128.1 및 86.1	10	9.990
Fenthion	278.0 및 109.0	15	124.9 및 79.0	5	9.974
Fipronil	366.8 및 212.8	25	350.8 및 254.8	15	10.488
Fluazifop- <i>p</i> -butyl	382.9 및 282.0	10	281.9 및 238.0	15	12.049
Fluquinconazole	340.0 및 298.0	15	340.0 및 107.8	40	15.798
HCH-alpha	218.9 및 183.0	5	216.9 및 181.0	5	7.766
HCH-beta	218.9 및 183.1	5	216.9 및 181.1	5	7.866
Hexachlorobenzene	283.9 및 248.8	15	283.8 및 213.9	30	7.834
Indoxacarb	202.9 및 134.0	15	202.9 및 106.0	25	17.900
Malathion	172.9 및 99.0	15	157.8 및 125.0	5	9.734
Methidathion	144.9 및 85.0	5	144.9 및 58.1	15	11.033
Metolachlor	240.0 및 162.2	10	238.0 및 162.2	10	9.866
Pendimethalin	251.8 및 162.2	10	251.8 및 161.1	15	10.449
Pirimicarb	238.0 및 166.2	10	166.0 및 96.0	15	8.699
Pirimiphos-methyl	290.0 및 125.0	20	232.9 및 151.0	5	9.533
Pyrazophos	232.0 및 204.1	10	221.0 및 193.1	10	15.031
Pyrimethanil	198.0 및 183.1	15	198.0 및 158.1	20	8.451
Quinalphos	157.0 및 129.1	15	146.0 및 118.0	10	10.757
Spiromesifen	273.0 및 255.1	5	272.0 및 254.2	5	13.611
Terbufos	230.9 및 175.0	10	230.9 및 129.0	20	8.256
Tetraconazole	336.0 및 217.9	20	336.0 및 203.8	30	10.049
Trifloxystrobin	172.0 및 145.1	15	116.0 및 89.0	15	12.830
Trifluralin	306.1 및 264.0	5	264.0 및 206.0	5	7.269
Vinclozolin	212.0 및 172.1	15	197.9 및 145.0	15	9.158

시료 전처리

연어 내 다환 방향족 탄화수소(PAH)를 측정하기 위해 이전의 보고된 분석법을 바탕으로 시료 전처리 분석법을 확립했습니다.² 연어 시료는 브라질 히우그란지두술 주에 위치한 산타 마리아 현지 식품점에서 구입했습니다. 시료를 잘게 잘라 균질화하여 $\leq -10^{\circ}\text{C}$ 의 냉동고에 보관했습니다. 이 분석법은 크게 세 부분으로 나뉘어 수행되었습니다.

1. 고체-액체 추출
2. Captiva EMR—Lipid cleanup
3. 수분 제거

균질화된 시료를 2.5g 칭량하여 50mL 원심분리기(폴리프로필렌) 튜브에 넣고 필요에 따라 스파이킹한 다음, 1분 동안 vortex 처리한 후 평형 상태에서 15~20분 동안 그대로 유지했습니다. 전체 시료 전처리 절차를 그림 1에 설명했습니다.

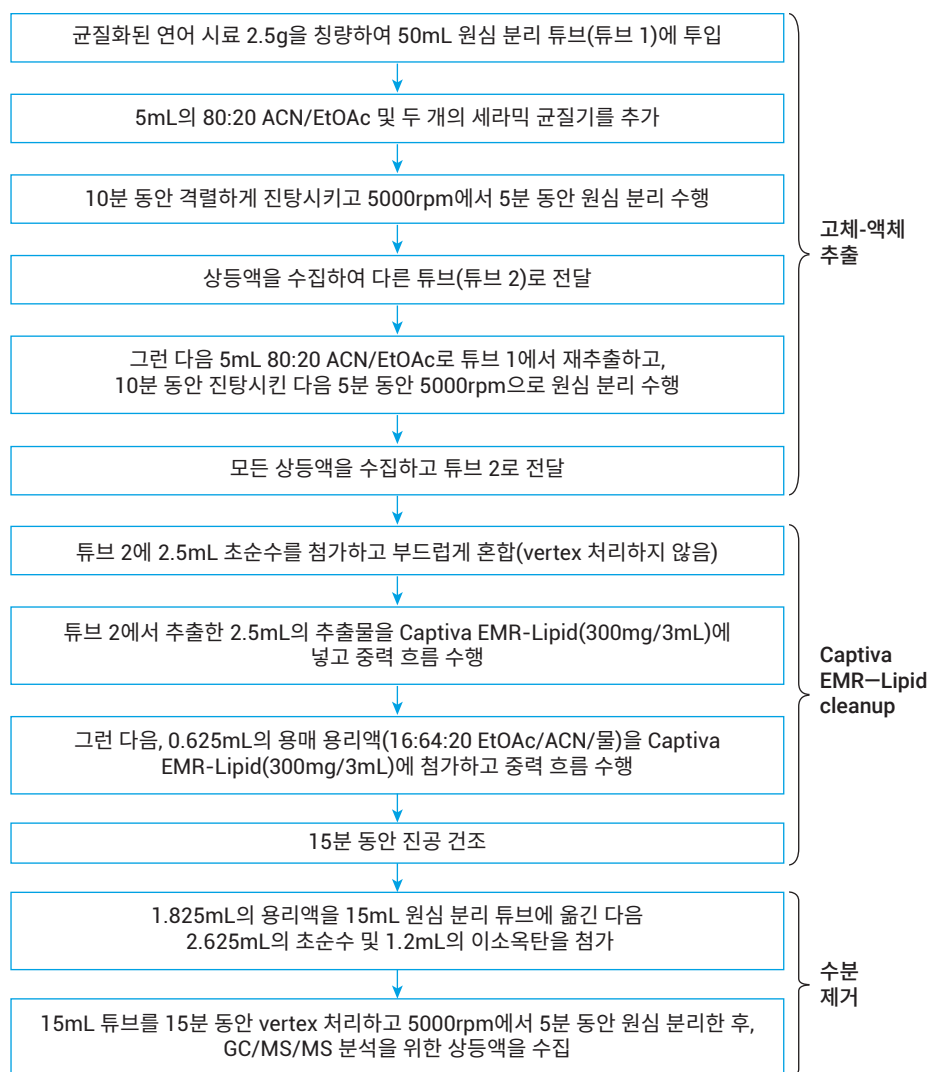


그림 1. 고체-액체 추출 기반으로 Captiva EMR—Lipid cleanup을 수행하는 방법을 이용해 연어 시료를 전처리하는 절차.

분석법 밸리데이션

정량 한계(LOQ), 직선성, 정밀도 및 정확도와 같은 파라미터를 평가했습니다. 검량선 표준물질에는 5개의 다른 수준(2, 4, 25, 50 및 100µg/kg)이 포함되었습니다. 회수율과 RSD%(n = 3) 측면에서 3개의 스파이크 수준(25, 50 및 100µg/kg)을 평가했습니다. 머무름 시간 및 MRM 전이로부터 분석물질 식별과 정량을 진행했습니다.

결과 및 토의

GC 분석법

Dynamic MRM은 다중 잔류물 분석을 위한 유용한 도구입니다. 분석물질의 검출 가능한 머무름 시간 범위(델타 RT)에서 머무름 시간(RT)에 기초하여 MRM의 자동 테이블을 구성하는 식으로 화합물을 보다 정밀하게 식별하고 정량했습니다. 또한, Ultra Inert(UI) 라이너와 컬럼을 사용하여 유기인계 및 유기염소계와 같은 불안정한 농약이 GC 유동 경로의 표면 활성 부위와 반응하여 결과의 정확도를 떨어트리는 것을 방지했습니다. 기기 유동 경로의 활성 부위에서 매우 민감한 화합물이 반응하게 되면 피크 모양과 재현성 불량으로 이어지고 감도 손실을 초래할 수 있습니다.^{3,4} 그림 2에 25µg/kg 수준에서 스파이크한 연어 바탕 시료의 38가지 화합물 모두에 대한 MRM 크로마토그램을 나타내었습니다.

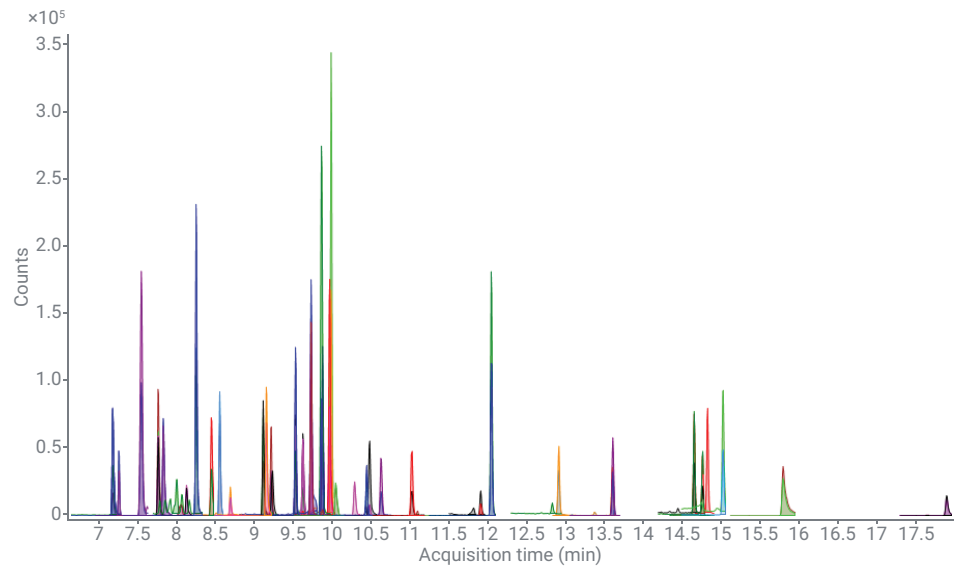


그림 2. 20분 내에 38가지 농약을 분리한 GC/MS/MS의 MRM 크로마토그램 결과.

38가지 농약 모두에 대한 밸리데이션 결과를 표 3에 나열했습니다. 모든 화합물에서 검량선 직선성 계수 R^2 이 0.9900보다 높았습니다. 분석법 정량 한계(LOQ)는 50µg/kg인 cyhalothrin lambda 및 fenpropimorph의 두 예외를 제외하고 25µg/kg였습니다. 분석물질 회수율은 25µg/kg 수준에서 80~125%, 50µg/kg 수준에서 93~119%, 그리고 100µg/kg 수준에서 83~107% 범위였습니다. 상대 표준 편차(RSD)의 정밀도는 세 가지 스파이크 수준 모두에서 25%보다 낮은 것으로 나타났습니다.

표 3. 모든 농약에 대한 분석법 검량선의 직선성, RSD(n = 3)에서 회수율 및 정량 한계(LOQ).

화합물	R^2	Rec %(RSD %, n = 3)			LOQ (µg/kg)
		25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	
Acrinathrin	0.9922	92 (7)	101 (9)	101 (2)	25
Alachlor	0.9966	100 (5)	111 (8)	101 (9)	25
Atrazine	0.9959	113 (2)	106 (1)	92 (9)	25
Cadusafos	0.9938	107 (9)	119 (8)	105 (13)	25
Chlordane- <i>cis</i>	0.9900	95 (5)	104 (3)	83 10	25
Chlorfenapyr	0.9941	88 (1)	101 (7)	97 1	25
Chlorfenvinphos	0.9918	109 (14)	114 (2)	95 14	25
Chlorpyrifos	0.9951	83 (9)	105 (14)	96 3	25
Chlorpyrifos-methyl	0.9973	93 (2)	107 (9)	96 14	25
Cyhalothrin (Lambda)	0.9986	125 (25)	104 (6)	94 (8)	50
Epoxiconazole	0.9919	105 (1)	103 (5)	95 (9)	25
Ethoprophos	0.9934	108 (9)	119 (9)	106 (13)	25
Etrinfos	0.9967	99 (3)	110 (9)	100 (8)	25
Fenitrothion	0.9985	88 (4)	102 (12)	93 (13)	25
Fenpropimorph	0.9926	80 (25)	100 (8)	103 (15)	50
Fenthion	0.9955	95 (3)	106 (4)	95 (5)	25
Fipronil	0.9907	99 (7)	110 (5)	93 (15)	25
Fluazifop- <i>p</i> -butyl	0.9939	92 (5)	103 (7)	98 (1)	25
Fluquinconazole	0.9917	108 (12)	113 (3)	97 (14)	25
HCH- α	0.9901	100 (3)	116 (4)	100 (16)	25
HCH- β	0.9930	100 (3)	116 (4)	100 (16)	25
Hexachlorobenzene	0.9917	84 (13)	93 (5)	98 (7)	25
Indoxacarb	0.9999	93 (5)	114 (4)	99 (12)	25
Malathion	0.9981	97 (7)	106 (7)	88 (3)	25
Methidathion	0.9968	97 (13)	107 (5)	92 (21)	25
Metolachlor	0.9909	98 (5)	109 (4)	96 (7)	25
Pendimethalin	0.9946	94 (0)	109 (8)	100 (3)	25
Pirimicarb	0.9937	114 (6)	112 (9)	103 (20)	25
Pirimiphos-methyl	0.9985	92 (2)	105 (4)	96 (5)	25
Pyrazophos	0.9954	91 (6)	114 (8)	97 (13)	25
Pyrimethanil	0.9924	96 (3)	104 (9)	94 (9)	25
Quinalphos	0.9909	92 (1)	106 (7)	95 (6)	25
Spiromesifen	0.9970	92 (2)	108 (6)	97 (8)	25
Terbufos	0.9960	93 (3)	108 (10)	99 (2)	25
Tetraconazole	0.9915	110 (12)	113 (2)	95 (14)	25
Trifloxystrobin	0.9978	108 (9)	109 (8)	100 (11)	25
Trifluralin	0.9920	96 (1)	113 (9)	107 (6)	25
Vinclozolin	0.9988	91 (3)	107 (7)	98 (5)	25

시료 전처리 분석법

매트릭스 간섭은 일반적으로 데이터 품질 저하, 소모품 수명 단축, 시스템 유지보수 빈도 증가 등의 문제를 일으키기 때문에 복합 식품 매트릭스에서 다성분 잔류 농약 분석을 성공적으로 수행하려면 효율적인 매트릭스 제거가 중요합니다. Captiva EMR—Lipid cleanup은 쉽고 간편하게 간섭물질만 선택적으로 제거할 수 있는 솔루션입니다. 분석법 개발 과정에서 연어에서 PAH를 추출하는 데 사용된 이전 방법은 연어 내 농약 분석에도 적합한 것으로 발견되었습니다.

분석법에서 분석물질 회수율을 높이기 위한 두 가지 중요한 방법은 다음과 같습니다.

1. 중복 액체 추출은 지방 매트릭스로부터 분석물질을 보다 효율적으로 추출합니다.
2. 시료가 카트리지를 통과한 후 추가로 용리시키면 분석물질 용리가 보다 완벽해집니다.

용리 용액은 다양할 수 있지만, 포획된 지질이 재처리되는 것을 방지하기 위해 10 ~ 20%의 물을 함유해야 합니다. 이 분석법에서 추가 용리를 위해 16:64:20 EtOAc/ACN/물의 혼합물을 사용했습니다.²

Captiva EMR-Lipid 카트리지에 시료를 로딩하기 전에 적당한 물을 조추출액에 첨가했습니다. 이 과정은 EMR-Lipid 흡착제에서 지질이 원활하게 머무르도록 하는 데 중요합니다. 일반적으로, 시료

혼합물에 20% 물을 첨가하는 것이 좋습니다. GC/MS/MS 검출의 경우, 우수한 크로마토그래피와 GC/MS/MS의 일관된 분석물질 감응을 보장하기 위해 물을 완전히 제거하는 것이 매우 중요합니다. 본 연구에서는 isooctane 용매 역추출을 물 제거 목적 뿐만 아니라 부분적인 시료 재농축에 이용했습니다. 그러나 LC/MS/MS 검출의 경우 물을 제거할 필요가 없습니다. EMR-Lipid cleanup 후, 시료를 곧바로 분석하거나 LC/MS/MS로 희석한 후에 분석할 수 있습니다. 검출 감도가 요구 사항을 충족하지 못하는 경우에 한해서 LC/MS/MS 분석 전에 시료를 농축시키기 위한 건조 및 재구성 단계가 필요합니다.

그림 3은 세 가지 스파이크 수준(25, 50, 100µg/kg)에서 연어 내 38가지 농약 회수율을 보여줍니다.

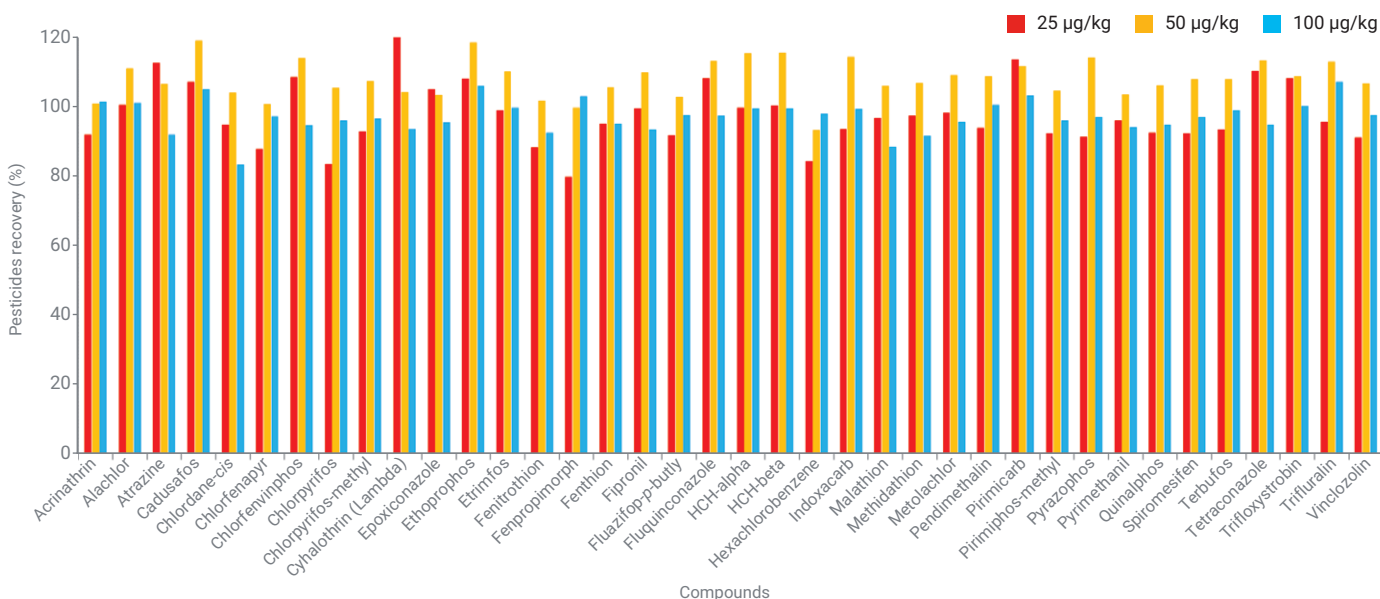


그림 3. 25, 50 및 100µg/kg의 스파이크 수준에서 모든 농약의 회수율.

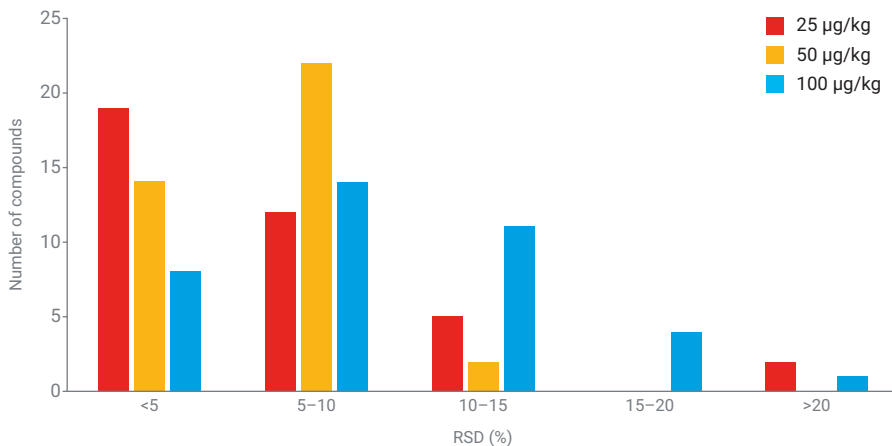


그림 4. 각 스파이크 수준에서 연어 내 농약 분석을 위한 % RSD의 분석법 재현성(n = 3).

결론

연어에 함유된 38가지 농약 분석을 위해 Agilent Captiva EMR—Lipid cleanup 및 Agilent Intuvo GC/MS/MS를 이용한 분석법을 개발하고 검증했습니다. 시료 전처리 분석법은 GC의 농약 분석에 적합하고 적용 가능한 것으로 입증되었습니다. 따라서 이 분석법은 효율적인 시료 매트릭스 cleanup을 통해 지방이 많은 식품 매트릭스에서 다종 화합물을 추출하기 위한 고유한 방법으로, 식품 검사 실험실에서 간단한 일상적 분석법으로 이용할 수 있습니다. Agilent Captiva EMR—Lipid cleanup은 LC/MS/MS 기술과 호환된다는 점에 유의하십시오.

참고문헌

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), The state of world fisheries and aquaculture, **2018**. <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
2. Determination of 19 Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds in Salmon and Beef, *Agilent Application Note*, publication number 5994-0553EN, **2019**.
3. Challenging Pesticide Analysis Using an Agilent J&W DB-35ms Ultra Inert GC Column, *Agilent Application Note*, publication number 5990-6595EN, **2010**.
4. Better Pesticide Analysis with Agilent J&W Ultimate Plus Tubing in an Inert Flow, *Agilent Application Note*, publication number 5991-5404EN, **2014**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2020
2020년 2월 10일, 한국에서 인쇄
5994-1717KO
DE.5752546296

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