Journal of the Korean Chemical Society
2019, *Vol. 63, No. 5*
Printed in the Republic of Korea
https://doi.org/10.5012/jkcs.2019.63.5.342

LC-MS/MS를 이용한 동물 사료 내 글라이포세이트 및 글루포시네이트 분석

이지수 · 김완서 · 양희득† · 박나연‡ · 정 웅§ · 김정환† · 고영림*
을지대학교 보건환경안전학과
†을지대학교 식품산업외식학과
‡서울아산병원 중독분석실
§경희대학교 의과대학 응급의학과
(접수 2019. 3. 28; 게재확정 2019. 6. 10)

Analysis of Glyphosate and Glufosinate in Animal Feeds using LC-MS/MS

Ji-Su Lee, Wanseo Kim, Heedeuk Yang†, Na-Youn Park‡, Woong Jung§, Junghoan Kim†, and Younglim Kho*
Department of Health, Environment & Safety, Eulji University, Seongnam 13135, Korea.
**E-mail: ylkho@eulji.ac.kr*
†*Department of Food Technology & Service, Eulji University, Seongnam 13135, Korea.*
‡*Department of AMC Toxlab of Asan Medical Center, Seoul 05505, Korea.*
§*Department of Emergency Medicine, School of Medicine, KyungHee University, Seoul 05278, Korea.*
(Received March 28, 2019; Accepted June 10, 2019)

요 약. 식품에서 글라이포세이트와 글루포시네이트의 함량 기준은 구체적이며 분류가 잘 되어있다. 그러나 동물 사료나 먹이에서의 함량 기준은 비교적 구체적이지 못하며 분류가 미흡한 편이다. 또한 인간에게 미치는 위험에 대해서는 지속적인 논의는 이루어지고 있는 반면에, 동물에게 미치는 위험성은 충분한 연구가 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 동물이 글라이포세이트를 섭취하는 경로로 추정되는 사료에서의 분석법을 확립하였다. 25% 메탄올을 이용한 용매추출, 원심분리 후 고체상추출로 정제한 후, 농축하여 LC-MS/MS를 이용하여 정량 분석하였다. 분석법 검증은 검출한계, 정확도 및 정밀도 시험을 통해 진행하였다. 확립된 시험법의 검출한계는 글루포시네이트 1.8 μg/kg, 글라이포세이트 2.4 μg/kg 이었다. 정확도는 94.4~103.4%, 정밀도는 1.5~7.2%의 범위로 나타났다. 동물 사료(n=13)를 분석법을 적용시켜 분석한 결과 글루포시네이트는 한 개의 시료에서 검출되었고(ND~8.8 μg/kg), 글라이포세이트는 한 개의 시료를 제외한 모든 시료에서 검출(ND~337.0 μg/kg)되었다.

주제어: 글라이포세이트, 글루포시네이트, 동물 사료, LC-MS/MS

ABSTRACT. The standards for the contents of glyphosate and glufosinate in foods are specific and well categorized. However, the standard of content in animal feeds is relatively inadequate and the classification is insufficient. There is also constant debate about the risk of glyphosate and glufosinate to human health, but the risk to animals has not been well studied. In this study, we established an analytical method in feeds that is estimated to be the path for animals to ingest glyphosate. The solvent extraction was carried out using 25% methanol. After centrifugation, samples were purified using solid phase extraction (SPE) and quantitatively analysed using LC-MS/MS after concentrated. Assessment of validation was conducted through detection limits, accuracy, and precision tests. The detection limits for the established method were 1.8 of μg/kg of glufosinate and 2.4 μg/kg of glyphosate. Accuracy was ranged from 94.4% to 103.4% and precision was range from 1.5% to 7.2%. Glufosinate was detected in one sample (ND~8.8 μg/kg) and glyphosate was detected in all but one sample (ND~337.0μg/kg) by applying the analytical method to animal feeds (n=13).

Key words: Glyphosate, Glufosinate, Animal feeds, LC-MS/MS

서 론

글라이포세이트와 글루포시네이트는 살포된 지역의 모든 식물을 죽이는 비선택성 제초제이다.[1,17] 글라이포세이트는 1996년 미국에서 개발된 당시에는 총 제초제 함량의 3.7%이었지만, 2009년에는 53.5%로 함량이 10여년 동안 약 50%가 증가하였다.[2] 글라이포세이트의 사용량 증가는 암을 포함한 여러 질병의 발생률 및 사망률의 증가와 관련이 있고, 대표적으로 발생되는 암에는 신장암, 갑상선암, 간암 등이 있다.[3] 실제로 스리랑카에서는 글라이포세

이트가 신장 질병의 원인이라고 생각하여 수입을 금지시켰다.[3] 이는 글라이포세이트가 신장 질환에 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제시했으며, WHO가 글라이포세이트의 발암가능성에 대해 재평가할 수 있도록 하였다.[3] 최근 IARC(국제암연구소)는 글라이포세이트를 Group 2A (probably carcinogenic to humans)로 지정하였다.[4]

글라이포세이트는 특히 유전자변형생명체(GMO) 식물에 널리 쓰이는 제초제이다. 우리나라는 GMO 농산물 수입 2위 국가로 국내에 유통되는 동물 사료의 원재료에 콩류, 알파파, 옥수수 그리고 카놀라유 등 GMO농산물이 함유되어 있는 것을 자주 확인할 수 있다.[5] 또한 우리나라는 배합사료의 70% 이상을 수입에 의존하는데, 수입 사료에 잔류하여 국내에 유입될 가능성이 있다.[6]

현재 국내에 시판되고 있는 동물사료 내 글루포시네이트에 관한 기준은 따로 정해져 있지 않지만 글라이포세이트의 기준은 배합사료 기준 5 μg/g으로 정해져 있다.[7,8] 미국의 한 연구에 따르면, 분석한 사료 내 글라이포세이트의 중앙값이 200 μg/kg이었다.[9] 동물이 인간보다 4배 더 많이 섭취한다고 가정했을 때(6% : 1.5% 체중기준), 12 μg/kg의 글라이포세이트에 노출될 수 있다는 것이다.[9] 이는 CODEX (국제 식품 규격 위원회)의 ADI(일일허용기준)인 1 μg/g의 12배에 달하는 농도이다. 국내의 배합사료 기준치에는 미치지 못하는 결과이지만, 높은 농도로 허용되는 만큼 지속적인 연구가 필요하다.

글라이포세이트와 글루포시네이트가 인간에게 미치는 위험에 대해서 지속적인 논의가 이루어 지고 있는 반면에, 동물에게 미치는 위험성 평가에 관한 연구는 충분히 이루어지지 않았다.[9] 그러나 미국 수의과학회에 따르면 반려동물의 사망 원인의 절반이 암이며, 글라이포세이트를 그 원인으로 추정한다는 연구 결과가 있다.[3] 따라서 본 연구에서는 동물이 글라이포세이트를 섭취하는 경로로 추정되는 사료에서의 글라이포세이트 분석법을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

시료 및 재료

본 연구에서는 개 사료, 고양이 사료 그리고 실험용 쥐 사료를 사용하였다. 분석에 사용된 사료는 총 13종으로 국내 마트 및 애완 용품 판매점에서 구매한 사료 9종, 한국사료협회에서 제공받은 사료 3종, 을지대학교 동물 실험실에서 제공받은 사료 1종으로 구성되어있고, 모든 사료는 배합사료이다. 사료는 곡물 분쇄기를 사용하여 분쇄 후 실온 보관하였다. 분쇄기는 물과 에탄올을 이용하여 세척하여 사용하였다.

분석을 위한 표준물질(glyphosate, glufosinate)과 내부표준물질($^{13}C_2$-glyphosate)은 모두 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich, USA)에서 구입하여 이용하였다. 추출 및 전처리 과정에 사용된 용매는 HPLC 등급으로 순도 95% 이상으로 사용하였다. 폼산과 폼산암모늄은 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich, USA)에서 구입하였고, 메탄올은 대정화금㈜, 물과 아세토니트릴은 J.T Baker에서 구입하여 사용하였다. 정제를 위한 고체상추출(SPE) 카트리지는 strata C18-E 카트리지(50 mg, 1mL, Phenomenex, USA)를 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제 및 검량선 작성

글라이포세이트, 글루포시네이트, 내부표준물질 표준품을 각각 1 mg을 정밀히 달아 1.5 mL 폴리프로필렌 재질의 튜브에 물로 정용하여 1 mg/mL 표준원액을 조제하였다. 검량선 작성을 위한 표준 용액은 60 mM 폼산암모늄, 50% 메탄올을 사용하여 필요에 따라 적정 희석하여 사용하였다. 검량선은 분석대상물질이 검출되지 않는 시료에 표준물질을 10, 20, 50, 100, 200, 500 μg/L가 되도록 첨가하여 시료와 동일하게 전처리하였다. 표준원액과 용액 그리고 검량선은 폴리프로필렌 용기에 담아 냉동보관 하였다.

전처리 방법

추출 전, 15 mL 튜브에 시료 2 g을 칭량하고 내부표준용액(400 μg/L) 4 mL를 넣었다. 실온에서 1 시간 방치 후 60 mM 폼산암모늄, 50% 메탄올 4 mL를 첨가하여 회전 교반기를 이용하여 15분간 혼합 추출하였다. 혼합된 시료를 원심분리하여, 고체상추출 카트리지를 물과 메탄올을 이용하여 활성화 시킨 후 상등액 2 mL을 통과시켜 정제하고 농축하였다. 이후 0.2 μg PTFE 실린지필터로 여과하여 LC-MS/MS에 주입하였다.

기기분석

분석물질의 정량분석은 LC-MS/MS로 수행했으며, Agilent 사의 1100 series와 API 4000 (AB Sciex, Foster City, CA, USA)를 사용하였다. 분석대상물질의 분리에 이용한 컬럼은 HILICpak VT-50-2D (2.0×150 mm, 5 μm)으로 Shodex사(Japan)의 제품을 사용하였다. 이동상은 3% 폼산이 함유된 10 mM 폼산암모늄(A)과 아세토니트릴(B)을 사용하였고, 경사용매 조성법으로 피크를 분리하였다. 유량은 0.3 mL/min 이었다. 이동상은 B 0%로 시작하여 3.5분에 90%로 증가시켰으며 3분 동안 유지시킨 후, 다시 B 0%가 되도록 하였다. 질량분석기(MS/MS)는 ESI negative mode를 사용하였다. 검출기 온도(Source temperature)는 400 °C, 커튼가스(Curtain gas)는 25psi, Gas1은 40psi, Gas2는 60psi, 이온소스 에너지(Ion spray voltage)는 -4.5kV이고, 이온소스의 충돌에너지(CAD)는 8 eV 이었다. 물질별 질량분석(MS/MS) 조건은 *Table* 1에

***Table* 1.** The MS/MS parameters of analyzing glyphosate and glufosinate

Compound	Q1	Q3	DP	EP	CE	CXP
Glyphosate	168.108	62.800	-55.00	-10.00	-34.00	-1.00
Glufosinate	180.104	62.900	-60.00	-10.00	-56.00	-1.00

나타내었다.

분석법 검증

본 연구에서 확립한 분석법의 타당성을 확인하기 위해 직선성, 검출한계, 정확도(accuracy) 및 정밀도(precision) 시험을 수행하였다. 정확도는 회수율(recovery, %)을 이용해 평가하였고, 정밀도는 7번 반복 측정한 결과의 상대표준편차(RSD, %)를 이용하여 평가하였다. 정확도와 정밀도 시험을 위해 분석대상물질이 검출되지 않는 사료에 표준물질을 첨가하여 농도별로(20, 100, 200 μg/L) 7개씩 준비하여 3일 반복 시험하였다. 검출한계(LOD)는 신호 대 잡음비(S/N ratio)가 3배인 농도로 계산하였다. 정확도는 회수율, 정밀도는 상대표준편차를 이용하여 일내(intra-day)와 일간(inter-day)을 구분하여 계산하였다.

본 연구는 LC-MS/MS 시스템을 통한 사료에서의 글라이포세이트 및 글루포시네이트의 분석법을 확립하기 위해 양파, 감자와 같은 작물, 씨리얼 그리고 커피 잎에서의 분석법을 참고하였다.[10,11,12] 또한 기기조건 확립을 위해 Thermo scientific과 EURL-SRM의 Hypercarb 컬럼을 이용한 분석 조건을 참고하였다.[13,14]

결과 및 고찰

분석법 검증결과

분석한 표준물질 2종의 크로마토그램에서(*Fig.* 1) 글루포시네이트는 2.5분, 글라이포세이트는 3.5분의 머무름 시간을 나타내었다. 검출한계는 글루포시네이트 1.8 μg/kg, 글라이포세이트 2.4 μg/kg이었다. 검량선 회귀직선의 결정계수(R^2)는 0.99 이상으로 직선성이 우수하였으며, 일내 정확도는 99.6~102.2%, 일간 정확도는 94.4~103.4%이었다. 일내 정밀도는 1.5~7.2%, 일간 정밀도는 1.5~6.9%의 범위로 나타났다(*Table* 2).

본 연구를 ELISA 키트를 이용해 동물 사료 내의 글라이포세이트를 분석한 연구(n=18)와 비교했을 때, 키트를 이용한 연구의 검출한계 23.3 μg/kg보다 더 낮은 검출한계 값을 얻었음을 알 수 있었다.[9] 본 연구에서 제시한 분석방법은 사료 뿐만 아니라 식품의 분석에도 적합할 것으로 판단된다.

동물 사료 분석 결과

13종의 사료를 모두 분석한 결과 글루포시네이트는 1개의 시료에서 검출되었고, 글라이포세이트는 1개의 시

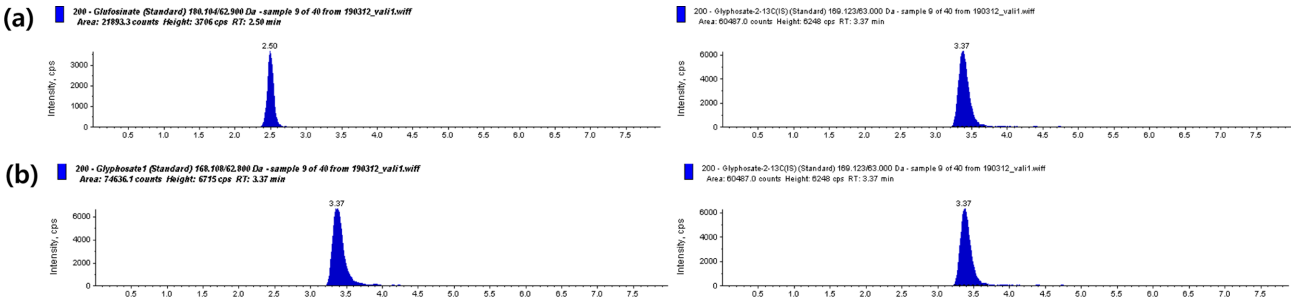


***Figure* 1.** LC-MS/MS chromatograms; (a) glufosinate (200 ng/mL), IS (b) glyphosate (200 ng/mL), IS ($^{13}C_2$-glyphosate).

***Table* 2.** Intra-day and inter-day accuracy and precision for analysis

		Concentration (μg/kg)	20	100	200
Glufosinate	Intra-day (n=7)	Accuracy (%)	99.6	102.0	96.5
		Precision (%)	5.4	3.2	7.2
	Inter-day (3 days)	Accuracy (%)	94.9	100.6	94.4
		Precision (%)	6.9	4.7	5.3
Glyphosate	Intra-day (n=7)	Accuracy (%)	99.9	102.2	100.4
		Precision (%)	3.3	1.5	1.7
	Inter-day (3 days)	Accuracy (%)	100.6	103.4	100.2
		Precision (%)	3.3	1.8	1.5

***Table* 3.** Concentration of glyphosate and glufosinate in animal feeds

Sample Name	Glufosinate (μg/kg)	Glyphosate (μg/kg)
M1	8.8	337.0
D1	ND	43.2
D2	ND	32.4
D3	ND	96.7
D4	ND	27.0
D5	ND	136.4
D6	ND	ND
D7	ND	7.9
D8	ND	5.2
C1	ND	11.6
C2	ND	238.8
C3	ND	178.6
C4	ND	83.6

료를 제외한 모든 시료에서 검출되었다. 검출된 글루포시네이트의 농도는 8.77 μg/kg, 글라이포세이트의 농도 범위는 ND~337.0 μg/kg으로 나타났다(*Table* 3). 중앙값은 43.2 μg/kg 이었고, 평균은 99.9 μg/kg 이었다. 개나 고양이가 아닌 실험용 쥐를 위한 사료에서 가장 높은 농도를 보였다. 키트를 이용한 연구에서 검출된 농도 범위는 78.3~2140 μg/kg 이었고, 중앙값은 200 μg/kg, 평균은 357 μg/kg으로 나타났다. 검출율은 100% 였다.[9] 본 연구와 비교해 보았을 때, 시료의 개수는 비슷하나 검출 농도가 약 3배 이상 높게 나타났고, 두 연구 모두 검출율이 90% 이상으로 나타났다. 이를 통해 대부분의 사료에서 글라이포세이트가 높은 수준으로 검출된다는 사실을 알 수 있다.

결 론

본 연구는 키트를 이용하지 않고 글라이포세이트와 글루포시네이트를 추출할 수 있는 새로운 분석법을 확립하였다. 공 시료를 통해 분석법 검증을 시행한 결과 정확도, 정밀도 그리고 직선성 모두 우수하였다. 또한 검출한계가 동일 물질을 분석한 타 연구보다 낮았으며, 분석 시간 역시 8분으로 짧아 사료가 아닌 식품과 같은 타 시료에서도 효율적이며 효과적인 분석이 가능할 것으로 예측된다.[15,16]

확립된 분석법을 실제 시료에 적용한 결과 검출율이 90% 이상으로 나타나 동물이 글라이포세이트에 노출되는 것은 불가피하다고 판단된다. 국내 배합사료 내의 글라이포세이트 함유 기준에는 미치지 못하는 수준이지만, 거의 모든 시료에서 높은 수준으로 검출되는 만큼 사료 내 글라이포세이트 분석에 관한 연구와 지속적인 모니터링이 필요하다.

Acknowledgments. Publication cost of this paper was supported by the Korean Chemical Society.

REFERENCES

1. Chamkasem, N.; Harmon, T. *Anal. Bioanal. Chem*. **2016**, *408*, 4995.
2. Mesnage, R.; Defarge, N.; Spiroux de Vendomois, J.; Seralini, G. E. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *84*, 133.
3. Samsel, A.; Seneff, S. *J. Biol. Phys. Chem.* **2015**, *15*, 121.
4. World Health Organization; International Agency for Research on Cancer 2016, Q&A for Glyphosate.
5. http://the300.mt.co.kr/newsView.html?no=2016100411207641241.
6. Kim, J. K.; Kim, H. J.; Jeong, M. S.; Kim, C. R.; Jeong, M. H.; Lee, M. J.; Kang, H. M.; Lee, J. W.; Park, H. *Korean J. Pestic. Sci*. **2016**, *20*, 247.
7. Ministry of Agriculture Food and Rural Affairs 2016, Policy data.
8. Lee, H. S.; Choi, E. H.; Lee, H. J.; Kyung, Y. N.; Chang, M. I.; Rhee, G. S. *International Symposium and Annul Meeting of the KSEA* **2016**, *53*, PF06.
9. Zhao, J.; Pacenka, S.; Wu, J.; Richards, B. K.; Steenhuis, T.; Simpson, K.; Hay, A. G. *Environ. Pollut.* **2018**, *243*, 1113.
10. Shimelis, O. *Food and Beverage Analysis* **2016**, *34*, 7.
11. Schrübbers, L. C.; Masís-Mora, M.; Rojas, E. C.; Valverde, B. E.; Christensen, J. H.; Cedergreen, N. *Talanta* **2016**, *146*, 609.
12. Kaczyński, P. *Food Chem.* **2017**, *230*, 524.
13. Phillips, R. Thermo electron corporation; The applications book 2003, LC-MS of Glyphosate and AMPA Using Hypercarb.
14. Anastassiades, M.; Kolberg, D. I.; Eichhorn, E.; Benkenstein, A.; Lukačević, S.; Mack, D.; Wildgrube, C.; Sigalov, I.; Dörk, D.; Barth, A. *EURL-SRM* **2015**, *8.1*, 58.
15. Goncharova, E. N.; Statkus, M. A.; Tsizin, G. I.; Selimov, R. N. *Mosc. Univ. Chem. Bull.* **2018**, *73*, 265
16. Martins-Júnior, H. A.; Lebre, D. T.; Wang, A. Y.; Pires, M. A. F.; Bustillos, O. V. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2009**, *23*, 1029.
17. https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1141423&cid=40942&categoryId=31874.