

LC-MS/MS에 의한 동물 혈청 내 피프로닐 및 피프로닐 설편 분석법 개발

이정선 · 박나연[†] · 정 웅[‡] · 고영림*

을지대학교 보건환경안전학과

[†]서울아산병원 중독분석실

[‡]경희대학교 의과대학 응급의학과

(접수 2019. 6. 10; 게재확정 2019. 8. 12)

Development of Analytical Method for Fipronil and Fipronil-Sulfone in Animal Serum by LC-MS/MS

Jeongsun Lee, Na-Youn Park[†], Woong Jung[‡], and Younglim Kho*

Department of Health, Environment & Safety, Eulji University, Seongnam 13135, Korea. *E-mail: ylkho@eulji.ac.kr

[†]Department of AMC Toxlab of Asan Medical Center, Seoul 05505, Korea.

[‡]Department of Emergency Medicine, School of Medicine, KyungHee University, Seoul 05278, Korea.

(Received June 10, 2019; Accepted August 12, 2019)

요 약. 피프로닐은 N-페닐피라졸계의 살충제로 해충 방지제로 사용되고 있으며, WHO에서는 피프로닐을 발암물질 2급으로 분류 및 규제하고 있다. 피프로닐은 급성중독 시에 현기증, 근육약화, 호흡곤란, 피부자극, 심박수 증가 등의 다양한 증상이 나타나 는 것으로 알려져 있고 피프로닐 설편 또한 이와 비슷한 증상을 유발하는 것으로 알려져 있다. 최근 피프로닐이 함유된 계란이 유통되면서 전 세계적으로 독성 문제가 확산되고 있는 상황이다. 본 연구에서는 동물 혈청 시료 중 피프로닐 및 피프로닐 설편의 노출량 분석법 개발을 시도하였다. 이동상에 따른 차이 및 액체-액체 추출과 고체상추출 전처리 방법에 따른 결과를 비교하였다. 이동상은 증류수(A)와 아세토니트릴(B)을 선정하였고, 전처리 방법은 고체상추출로 진행하였다. 분석법검증을 수행한 결과, 일 내/일간 정확도는 82.2~114.1% 이었고, 정밀도는 20% 이하로 나타났다. 검출한계는 피프로닐 0.027 ng/ml, 피프로닐 설편은 0.087 ng/mL 이었고, 검량선 회귀식의 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 우수한 직선성을 보여주었다. 본 연구에서 개발된 동물 혈청 중 피프로닐 및 피프로닐 설편 분석방법을 이용하여 일부 동물 혈청에서의 농도를 확인하였다. 본 연구에서 개발한 분석법을 이 용하여 동물 혈청뿐만 아니라 피프로닐 및 피프로닐 설편의 인체 모니터링을 위한 분석법으로도 사용 할 수 있을 것으로 판단된다.

주제어: 피프로닐, 피프로닐 설편, 동물 혈청, 고체상추출, LC-MS/MS

ABSTRACT. Fipronil is an insecticide that belongs to the N-phenylpyrazole and has been used mainly for an insect pest control. However, it is known that acute poisoning of the human body causes various symptoms such as dizziness, muscle weakness, dyspnea, skin irritation, and increased heart rate. Lately, eggs containing fipronil have been distributed and toxic problems are spreading around the world. In this study, we tried to develop analytical methods to evaluate the exposure of fipronil and fipronil sulfone in animal serum samples. The differences according to mobile phase and the results of liquid - liquid extraction and solid phase extraction pretreatment method were compared. Distilled water (A) and acetonitrile (B) were selected for the mobile phase, and the pretreatment method was determined by solid phase extraction. As a result of the method validation, the intra-day / inter-day accuracies were 82.2~114.1% and the precisions were less than 20%. The detection limit was 0.027 ng/ml for fipronil and 0.087 ng/ml for fipronil sulfone. The linearity obtained was satisfying, with a coefficient of determination (r^2) higher than 0.99. The concentrations in some animal sera were determined using the methods of analysis for fipronil and fipronil sulfone in animal sera developed in this study. Using the method developed in this study, it could be used as an analytical method for human bio-monitoring of fipronil and fipronil sulfone as well as animal serum.

Key words: Fipronil, Fipronil sulfone, Animal Serum, SPE, LC-MS/MS

서 론

피프로닐(Fipronil, C₁₂H₄C₁₂F₆N₄OS)은 N-페닐피라졸계의 살충제로 1987년 Rhoeil Poilenc에 의해 처음 만들어졌다.

이후 상업적으로 개발되어 1993년부터 농업용으로 사용 되었으며, 1994년에 동물에 기생하는 절지동물을 관리하 는데 유효하다는 사실이 알려진 이래 프론트라인(Frontline) 이라는 이름으로 1996년에 미국, 2000년에는 한국에 소개

되어 현재 100여개 국가에서 사용되고 있다.¹ 현재 피프로닐은 작물의 해충, 개미, 바퀴벌레, 개와 고양이의 벼룩 등 다양한 해충 방제를 위해 다양한 농산물 및 수의약품에서 사용된다.²

피프로닐의 인체 노출은 흡입, 섭취 및 피부접촉을 통해 발생한다.⁴ 스리랑카의 한 연구에 따르면 혈장에서 고농도의 피프로닐이 검출된 두 명의 환자가 수 분간 간질 발작을 일으킨 사례가 있었고,³ 2001~2007년에 미국에서 피프로닐 함유 제품에 대한 노출과 관련된 데이터를 조사한 결과 사람에게 대한 급성 중독 시 현기증, 감각 이상, 근육약화, 호흡곤란, 기침, 천식, 피부 자극, 홍반, 가려움, 심박수 증가, 피로함 등의 다양한 증상이 나타나는 것으로 보고되었다.⁵ 피프로닐의 대사산물인 피프로닐 설펜(Fig. 1)도 피프로닐과 독성이 비슷하다고 알려져 있다.⁶

유럽 식품 안전청(European Food Safety Authority)은 피프로닐을 함유한 식물 보호 제품의 사용을 금지하였으며,⁷ 미국환경보호청(Environment Protection Agency, EPA)은 피프로닐을 발암물질 C군(인간 발암 가능성 물질)으로 분류하였다.⁸

2017년 7월 유럽에서 피프로닐에 오염된 계란이 유통된 후 그해 8월 한국에서 유통된 계란에서 피프로닐이 검출되어 큰 논란이 있었다.⁹ 농림축산식품부는 2017년 8월 산란계 농장의 계란을 대상으로 잔류 농약 검사를 진행하였다. 식품으로서 동물에 축적된 양도 확인해야 하지만, 동물 혈청 분석을 통해 피프로닐에 노출된 양을 파악하는 것이 필요하며, 나아가 인체노출량을 확인하기 위해 혈청에서의 피프로닐 및 대사체의 분석법 마련이 필요하다.

피프로닐은 주로 가스나 액체 크로마토그래피에 의한 질량분석법이나 전자 포획검출 등으로 꽃가루, 꿀, 토양, 물 등의 환경시료에서의 분석이 주로 이루어졌다.^{10,11} 인체시료에서의 피프로닐 분석은 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry) 및 LC-MS/MS (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry)를 이용하여 혈장 내 피프로닐을 정량하고 환자의 중독 진단을 확인하는 것으로 알려져 있다.^{3,12}

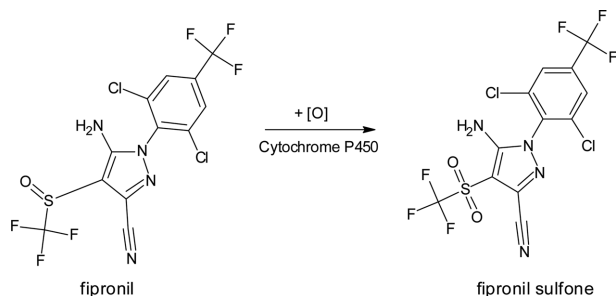


Figure 1. The transformation mechanism from fipronil to fipronil sulfone.

하지만 현재까지 피프로닐이 잔류하는 계란과 같은 식품 섭취에 의한 노출과 같이 의도적이지 않은 노출을 확인하기 위한 인체시료에서 저농도의 피프로닐을 분석하는 방법이 다양하게 개발되지 않은 상황이다. 따라서 본 연구는 LC-MS/MS를 사용하여 혈청 시료 내에서 피프로닐 및 피프로닐 설펜의 분석을 위한 빠르고 효율적인 전처리 방법을 개발 및 검증하고자 하였다.

실 험

시료 및 시약

본 연구의 시료는 연구용으로 판매중인 소 혈청을 이용하였다. 표준 물질인 피프로닐 및 피프로닐 설펜과 내부표준물질인 에티프롤은 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich, USA)에서 구입하여 사용하였다. 아세트니트릴과 메탄올은 Burdick&Jackson (Muskegon, MI, USA)사에서 구입하였고, 아세트산 암모늄, 폼산암모늄, 아세트산, 폼산은 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich, USA)에서 구입하여 사용하였다.

전처리 방법

고체상 추출은 혈청 시료 200 μ L에 내부표준용액(2,000 ng/mL) 20 μ L와 0.1% 폼산 500 μ L를 첨가하여 잘 혼합하고, Strata-X (30 mg/1cc, Phenomenex, UK)를 이용하여 고체상 추출하였다. 고체상추출 카트리지에 메탄올 2 mL와 증류수 2 mL를 통과시킨 후, 준비된 혈청 시료를 주입하였다. 시료 주입 후 방해물질 제거를 위해 증류수 2 mL와 30% 메탄올 수용액 2 mL로 카트리지를 세척하고 3 mL의 메탄올로 분석대상물질을 용출시킨다. 용출액을 진공농축기를 이용하여 농축하고, 메탄올 200 μ L를 사용하여 재조성하였다.

액체-액체 추출은 혈청 시료 200 μ L에 내부표준용액(2,000 ng/mL) 20 μ L를 첨가하여 잘 혼합하고 아세트니트릴 500 μ L를 넣어 추출하였다. 이후, 층분리를 위해 10 M의 염화나트륨 수용액을 첨가한 후, 2분간 잘 섞어주고 2,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 건조하여 200 μ L의 메탄올로 재조성하였다.

피프로닐과 피프로닐 설펜의 분석을 위한 이동상 비교를 위해, A용매는 증류수, 5 mM 아세트산 암모늄, 5 mM 폼산암모늄, 0.1% 아세트산, 0.1% 폼산을 비교하고 B용매는 메탄올과 아세트니트릴을 비교하였다.

기기분석

피프로닐과 피프로닐 설펜분리 및 검출을 위해 고성능 액체크로마토그래피(Shimadzu Nexera-x2, Japan)와 텐덤 질량분석기(TQ 4500, AB Siex, USA)를 이용하였다. 분석대상물질의 분리에 이용된 컬럼은 YMC-Pack ODS-AQ (50

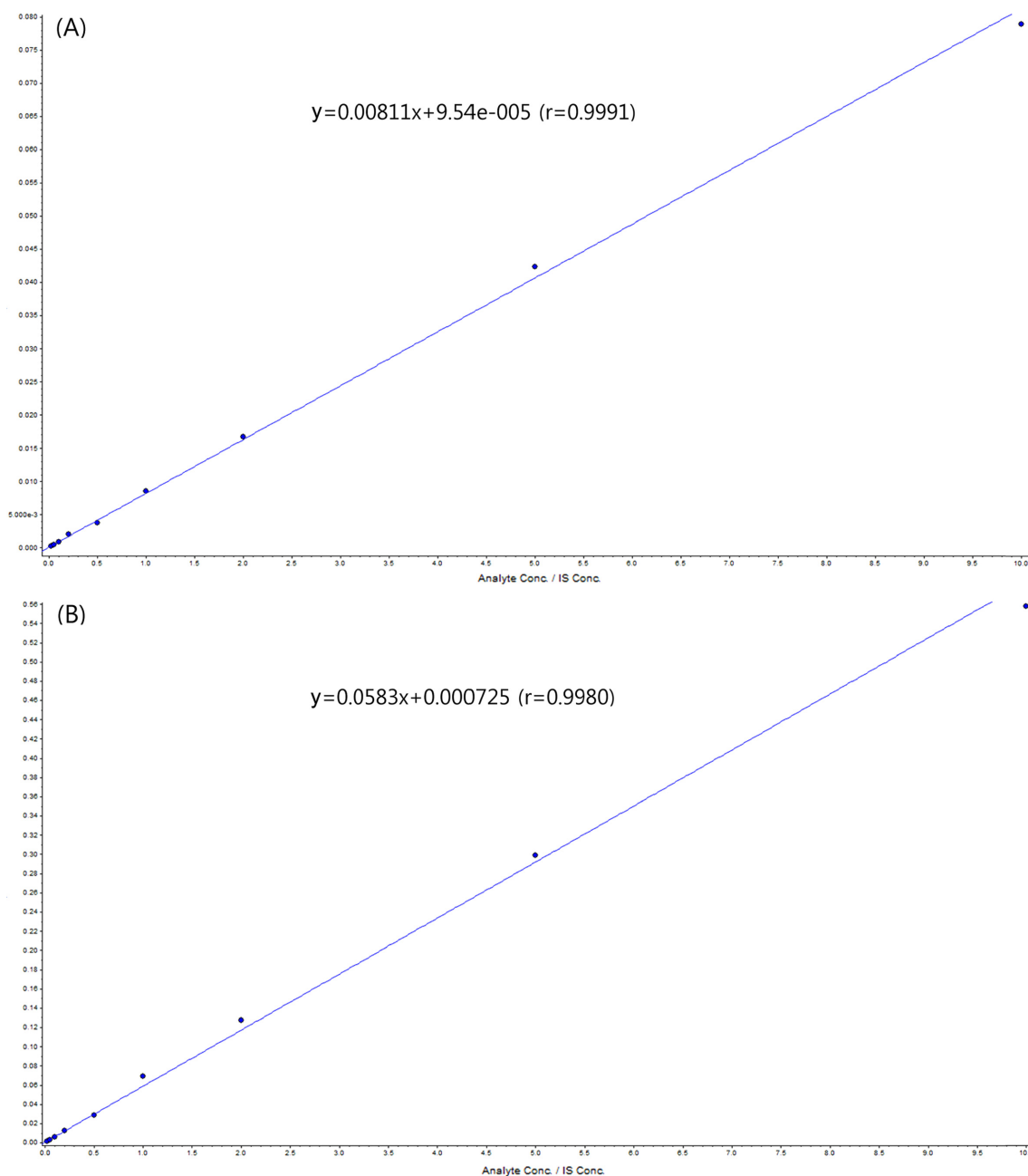


Figure 2. Calibration curve of Fipronil (A) and Fipronil Sulfone (B).

mm × 2.0 mm, 3 μm)이며, HPLC의 유량은 500 μL/min 이며, MS/MS는 ESI negative mode로 진행하였다. 구체적인 LC-MS/MS 조건은 Table 1과 2에 제시하였다.

분석법 검증

이 실험의 정확도(accuracy) 및 정밀도(precision) 평가를 위한 시험시료는 동물 혈청 중 농도가 0.5, 1, 5ng/mL가 되도록 표준물질을 첨가하고, 농도별로 각각 5개씩 준비하였다. 준비된 시험 시료에 내부표준물질을 첨가하여 전처리

과정을 거쳐 분석·정량 하여 일내(intra-day) 정확도 및 정밀도를 계산하였다. 이 과정을 3일간 반복하여 일간(inter-day) 정확도 및 정밀도를 계산하였다. 정확도 계산을 위해 회수율 값을 이용하였으며, 정밀도는 하루에 5번 측정된 분석결과와 상대표준편차를 이용하여 계산하였다. 검출 한계와 정량한계는 FDA(US Food and Drug Administration)가 정의한 검출한계의 개념, 즉, 검정곡선의 표준오차를 기울기로 나누어서 3.3을 곱하는 식을 사용하였다.

Table 1. Mass spectrometry parameters for analysis of fipronil and fipronil sulfone

Compounds	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP ¹⁾	CE ²⁾	CXP ³⁾
Fipronil	436.1	330.9	-80	-24	-5
Fipronil Sulfone	450.8	281.8	-75	-38	-15

¹⁾DP: Declustering Potential²⁾CE: Collision Energy³⁾CXP: Collision Cell Exit Potential**Table 2.** Optimized LC-MS/MS conditions for analysis of fipronil and fipronil-sulfone

Parameter		Condition					
Mobile Phase		A: water, B: acetonitrile					
HPLC	Gradient	Time (min)	0	4	5	5.1	10
		B (%)	30	100	100	30	30
Flow rate		300 μ l/min			Injection volume		5 μ l
Ionspray voltage		-4500 kV		Curtain gas		25 psi	
MS/MS	Gas1	30 psi		Gas 2		50 psi	
	TEM	400 $^{\circ}$ C		CAD		8 eV	

결과 및 고찰

전처리법 비교

혈청 중 피프로닐 및 피프로닐 설폰의 전처리 방법을 고체상 추출과 액체-액체 추출 두가지를 비교 해본 결과 고체상 추출은 80~120%의 회수율을 보였고, 액체-액체 추출은 140%이상의 초과된 회수율을 보였다. 이는 내부표준물질로써 동위원소를 이용하지 않고 구조가 유사한 에티프롤을 이용하였기 때문에 추출방법에 따라 달라진 결과를 보였을 가능성이 있다. 따라서 본 연구에서는 고체상 추출을 전처리 방법으로 이용하였다. 이동상 용매로 5가지의 용매들(증류수, 아세트니트릴, 5 mM 아세트산 암모늄, 5 mM 폼산 암모늄, 메탄올) 비교 실험 해본 결과 증류수와 아세트니트릴을 이용한 경우 다른 용매들과 비교하였을때 분석물질의 감도가 가장 좋게 나타났다.

분석법 검증 결과

분석법의 유효성 검증을 위한 실험에서 일내 정확도는 피프로닐 82.2%~95.6%, 피프로닐 설폰 93.6~103.2%로 계산되었고 일내 정밀도는 피프로닐 1.3~10%, 피프로닐 설폰 2.2~8.5%로 계산되었다. 3일간 반복 실험한 일간 정확

도는 피프로닐 95.9~99.2%, 피프로닐 설폰 100.8~114.1%를 나타냈으며, 일간 정밀도는 피프로닐 2.4~12.4%, 피프로닐 설폰 4.8~11.6%로 준수한 값을 나타내었다(Table 3). 검정곡선 회귀식의 결정계수(r^2)는 0.99 이상으로 우수한 직선성을 보여주었다. 분석대상물질의 검출한계는 피프로닐은 0.027 ng/mL이고 피프로닐 설폰 0.087 ng/mL이었다.

Raju 등(2016)¹³의 연구와 비교하였을 때 검출 한계가 피프로닐 0.01 ng/mL, 피프로닐 설폰 0.01 ng/mL로 나타났다. 이는 본 연구의 검출한계보다 낮은 농도를 나타내지만 사용한 시료의 차이가 있었다. 이는 본 연구에서 사용된 시료인 혈청과 다른 DBS를 이용한 블러드 스팟을 시료로 사용하여 다른 결과값이 나타난 것 같다. Lacroix 등¹⁴의 연구에서는 본 연구에서와 같이 고체상추출을 이용하여 전처리 하였으며, 정량한계가 2.5 ppb로 나타났다. 이는 본 연구에서와 달리 HPLC/DAD를 이용하였고, 사용된 시료양도 75 μ l로 차이가 있다.¹⁴

동물 혈청 분석 결과

본 연구에서 개발된 분석법을 실제 동물 시료에 적용시킨 결과 피프로닐은 돼지 시료 하나에서만 검출되었으며 (0.179 ng/mL) 피프로닐 설폰은 13개의 시료 중 7개에서

Table 3. Intra-day and Inter-day accuracies and precisions

Test	Compound	Accuracy (%)			Precision (%)		
		0.1 ng/mL	1 ng/mL	5 ng/mL	0.1 ng/mL	1 ng/mL	5 ng/mL
Intra-day (n=7)	Fipronil	82.2	95.6	92.9	10	6	1.3
	Firponil sulfone	103.2	98.3	93.6	8.5	3.5	2.2
Inter-day (3days)	Fipronil	95.9	99.2	97.7	12.4	5.4	2.5
	Firponil sulfone	108.2	114.1	100.8	8.2	11.6	4.8

Table 4. Concentration of fipronil and fipronil sulfone in animal serum samples

Animal species	n	Fipronil, ng/mL (Detected Sample)	Fipronil-sulfone, ng/mL (Detected Sample)
Cow	5	ND	ND ~ 0.43 (4)
Pig	4	ND~0.18 (1)	ND ~ 0.16 (1)
Chicken	3	ND	ND ~ 0.13 (1)
Horse	1	ND	0.12 (1)

검출되었다. 피프로닐 설폰의 농도는 소 ND~0.428 ng/mL, 돼지 ND~0.155 ng/mL, 닭 ND~0.132 ng/mL, 말 0.121 ng/mL로 나타났다(Table 4).

현재까지는 고농도의 사고나 응급상황에서의 혈청시료 분석만 이루어졌으므로¹⁵ 본 분석법을 활용하여 식품섭취와 같은 원인으로 노출된 사람이나 동물의 혈청에서 저농도의 피프로닐 및 피프로닐 설폰 분석에 활용할 수 있을 것이다. 실제 동물 혈청 13건 중에서 1건에서 피프로닐이 검출되었으며, 7건에서 피프로닐 설폰이 검출되는 것을 보아 다양한 오염이 이루어지고 있는 것으로 판단된다. 따라서, 애완동물이나 가축 등의 동물 혈청뿐만 아니라 인간 혈청 분석을 통해 피프로닐의 동물이나 사람에게 노출되는 양을 확인하고, 피프로닐에 대한 노출 경로 조사 및 사용제한 등 관리의 필요성이 제기된다.

결 론

본 연구에서 동물 혈청 중 피프로닐 및 피프로닐 설폰을 추출하는 전처리 방법과 이를 위한 LC-MS/MS 시스템 조건을 확립하였다. 확립된 분석법의 검증결과 우수한 직선성($r^2 > 0.99$)을 보였으며, 동물 혈청 내 농도 분석에 적합한 정확도(82.2~103.2%), 정밀도(20% 이하) 및 검출한계값을 나타내었다. 이를 통해, 동물 혈청뿐만 아니라 추후 피프로닐 및 피프로닐 설폰의 인체 모니터링을 위한 분석법으로 활용 될 수 있을 것으로 판단된다.

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

REFERENCES

- Lee, J. G. Royal Animal Medical Center 38.
- Fung, H. T.; Chan, K. K.; Ching, W. M.; Kam, C. W. *J. Clin. Toxicol.* **2003**, *41*, 245.
- Mohammed, F.; Senarathna, L.; Percy, A.; Abeyewardene, M.; Eaglesham, G.; Cheng, R.; et al. *J. Clin. Toxicol.* **2004**, *42*, 955.
- Fahim, M.; Lalith, S.; Adrian, P.; Manel, A.; Geoffrey, E.; Ron, C.; et al. *J. Clin. Toxicol.* **2004**, *42*, 189.
- Lee, S. J.; Mulay, P.; Diebolt-brown, B.; Lackovic, M. J.; Mehler, L. N.; Beckman, J.; et al. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48*, 737.
- Romero, A.; Ramos, E.; Ares, I.; Castellano, V.; Martinez, M.; Martinez-Larranaga, M. R.; et al. *Toxicol. Lett.* **2016**, *252*, 42.
- EFSA.; In technical report; *European Commission*; 2016 EN-1012.
- EPA; Richard P.; 7423, 14; EPA-HQ-OPP-2011-0448.
- Kim, Y. A.; Yeong, Y. K.; Kim, H. S.; Jeon, S. J.; Cole, E.; Lee, J. S.; Kho, Y. L.; Cho, Y. H. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2019**, *222*, 524.
- Bichon, E. Richard, C. A.; Bizec, B. L. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1201*, 91.
- Jimenez, J.; Bernal, J. L.; Del, M. J.; Marin, M. T.; Mayo, R.; Chromato, J. *J. Chromatogr. A* **2008**, *40*.
- Herin, F.; Boutet-Robinet, E.; Levant, A.; Dulaurent, S.; Manika, M.; Galatry-Bouju, F.; et al; Mary Ann Liebert, Inc.; 2011; DOI: 10.1089/thy.2010.0449.
- Raju, K. S. R.; Taneja, I.; Rashid, M.; Sonkar, A.; Scientific Reports; DOI: 10.1038/srep22447.
- Lacroix, M. Z.; Puel, S.; Toutain, P. L.; Viguie, C. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 1934.
- Manhusha, Y.; Singiri, S.; Nazma, A.; Megha, U.; Arlappa, N. *Saudi. J. Kidney. Dis. Transpl.* **2017**, *28*, 1432.