

오토샘플러 자동 희석 기능을 이용한 테트라사이클린 스크리닝 분석

Screening Analysis for Tetracyclines Using the Autosampler's Automatic Dilution Function

사용자 활용 포인트

- ◆ 오토샘플러의 자동 희석 기능을 사용하여 번거로운 전처리를 피할 수 있다.
- ◆ 금속 착물에 의한 피크 테일링을 억제할 수 있다.

■ 서론

동물용 의약품은 감염을 예방하고 치료하기 위해 동물에게만 사용된다. 대표적인 예로는 항생제(항생제 및 항미생물제)가 있다. 그러나 이러한 물질이 의도하지 않게 가축이나 수산물에 남게 되면 사람에게 알레르기 반응을 일으키거나 약물에 내성이 있는 박테리아 균주의 출현을 이룰 수 있다. 사람들이 안전하게 먹을 수 있도록 다양한 국가에서 인체 건강에 영향을 미치지 않는 화합물의 양을 고려하여 최대잔류허용기준(MRL)¹⁾을 설정했다. 이와 동시에 여러 국가에서 위반 사례가 보고되고 있으며, 시험해야 할 화합물이 많아 여러 성분에 대한 신속한 동시 분석 및 고감도 분석을 위해 LC/MS 분석이 증가하고 있다. 그러나 LC/MS 분석에서 이동상의 경우, 테트라사이클린 및 기타 금속 착물은 LC 시스템 및 컬럼에 사용되는 금속 물질과 컬럼 필러 표면의 잔류 금속에 의해 흡착된다. 따라서 지금도 금속 흡착을 억제하는 이동상을 이용하여 HPLC로 분석하는 경우가 많다.

이 뉴스레터에서는 식품안전검사를 위한 전처리 효율 제고를 목적으로 오토샘플러의 자동 희석 기능을 이용한 테트라사이클린 분석 사례를 소개한다.

■ 자동 전처리 기능

Nexera lite의 오토샘플러에는 희석, 시약 첨가, 공동 주입(co-injection) 세 가지 모드의 자동 전처리 기능이 있다. 이 뉴스레터에서는 희석 모드를 사용하였다. 이 기능은 사용자가 지정한 파라미터로 희석된 샘플을 자동으로 준비하고, 분석 컬럼에 주입 할 수 있다. 혼합 과정과 관련된 희석 배수 및 조건은 LabSolutions™ 워크스테이션을 사용하여 설정하며, 희석 모드 설정 창은 그림 1과 같다.

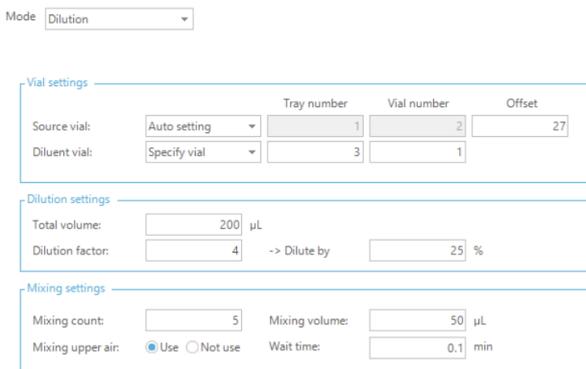


그림 1. 희석 모드 설정

■ 테트라사이클린 혼합 표준 용액의 분석

테트라사이클린은 여러 국가에서 위반 사례에 자주 나타나는 항생제 유형이다. 일본 후생노동성 지침 "옥시테트라사이클린, 클로르테트라사이클린, 테트라사이클린의 분석법"에 나와 있는 바와 같이, 테트라사이클린의 HPLC 분석에는 이미다졸 완충용액과 유기용매를 혼합한 것을 이동상으로 사용한다.

이 뉴스레터에서는 희석 모드를 사용하여 테트라사이클린을 분석하였다. 분석 조건은 표 1과 같으며, 이동상 및 희석용액의 제조 방법은 표 2와 같다 (다음 장). 표 1과 표 2의 조건은 위에서 언급한 분석 방법에 설명된 조건을 참조한다. 오토샘플러의 희석 모드 설정은 그림 1에 나타내었다. 메탄올로 용해하여 조제한 테트라사이클린 혼합 표준 용액은 희석용액을 이용하여 자동으로 4 배 희석하였다. 테트라사이클린 혼합 표준용액 (메탄올로 조제, 희석 전 각 화합물의 농도: 100 µg/L)에 대한 크로마토그램은 그림 2에 나타내었다. 이 농도는 위에서 언급한 분석 방법에서 제시한 전처리 과정 중 SPE(고상추출)까지 실시했을 때, MRL(0.2 mg/kg)에 해당한다. 이 분석 방법은 균질화, 추출, 지방 제거, 고상추출, 증발 및 재용해의 6 가지 전처리 과정을 권장한다. 이 뉴스레터의 분석 방법을 사용할 경우에는 그 중 2개의 과정 (증발 및 재용해)를 생략할 수 있다.

반면, 이미다졸 완충용액을 이동상으로 사용하더라도 사용하는 컬럼에 따라 컬럼에 흡착이 억제되지 않을 수 있다. 이 뉴스레터에서는 잔류 금속이 적은 Shim-pack™ FC-ODS 컬럼을 사용하여 피크 테일링 없이 날카로운 피크를 얻었다. 이때, 클로르테트라사이클린 (피크 3)의 S/N비는 36이었다. (계산방법: ASTM; 범위: 5~15분, 간격: 0.5분)

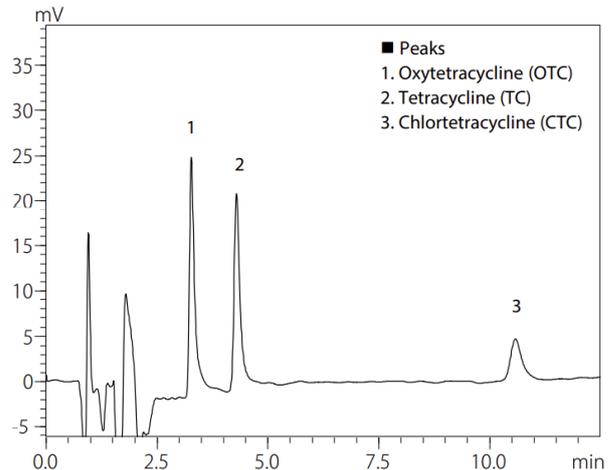


그림 2. 테트라사이클린 혼합 표준용액의 크로마토그램 (각 성분의 농도 100 µg/L) (자동 희석 후 각 성분의 농도: 25 µg/L)

표 1. 분석 방법

System	Nexera lite
Column	Shim-pack FC-ODS ^{*1} (150 mm x 4.6 mm I.D., 3 µm)
Flow rate	1.0 mL/min
Mobile phase	(A) 1 mol/L Magnesium imidazole buffer (pH 7.2) (B) Methanol A / B = 78 / 22
Oven temp.	40 °C
Injection volume	100 µL
Vial for Samples and Mixing	Shimadzu Vial, LC, 1 mL, Polypropylene ^{*2}
Vial for Diluent	Shimadzu Vial, LC, 4 mL, Polypropylene ^{*3}
Detection	Ex: 380 nm, Em: 520 nm (RF-20AXS)

*1 P/N: 228-40511-93 *2 P/N: 228-31600-91 *3 P/N: 228-31537-91

표 2. 이동상 용액과 희석 용액을 준비하는 방법

1 mol/L Magnesium imidazole buffer (pH 7.2)
 초순수 800 mL에 이마다졸 68.08 g, EDTA·2Na 0.37 g 및 초산 마그네슘 10.72 g을 넣어 완전히 녹인다. 초산으로 pH 7.2로 맞추고 1000 mL 부피 플라스크를 사용하여 초순수로 1000 mL를 채운다. 그 다음, 0.22 µm 멤브레인 필터로 감압 여과 한다.

1.36 % potassium phosphate solution
 초순수 100 mL에 인산이수소칼륨 1.36 mg을 넣고 완전히 녹인다.

■ 재현성

자동 희석 기능을 이용하여 혼합표준용액 (희석 전 각 성분의 농도: 100 µg/L)을 연속으로 6 회 분석하였다. 머무름 시간 및 피크면적의 재현성 (%RSD)은 표 3에 나타났다.

표 3. 6회 연속 분석의 재현성 (%RSD)

성분명	머무름 시간	피크면적
OTC	0.06	5.69
TC	0.03	2.85
CTC	0.03	1.42

■ 오토샘플러에서 샘플 위치 지정

오토샘플러 내 위치 지정의 예는 그림 3과 같다. 조금 더 많은 용량의 희석용액이 필요하기 때문에 4 mL 바이알을 사용하였고, 샘플 랙 #3에 4 mL 바이알용 샘플 플레이트를 사용했다. Nexera lite는 플레이트 자동 인식 기능이 탑재되어 있어 이 플레이트를 랙에 올려놓기만 하면 바로 사용할 수 있다. 즉, 바늘의 위치 조절이 필요하지 않다. 이러한 방식으로 서로 다른 용량의 바이알을 동시에 배치할 수 있다.

분석을 시작하기 전에 희석용액 (파란색), 표준용액 또는 샘플 용액 (주황색) 및 혼합용 바이알 (초록색)을 샘플 랙에 배치했다. 희석 용액은 4 mL 폴리프로필렌(PP) 바이알을 사용하였으며, 샘플 및 혼합용 바이알은 1 mL 폴리프로필렌(PP) 바이알을 사용하였다.

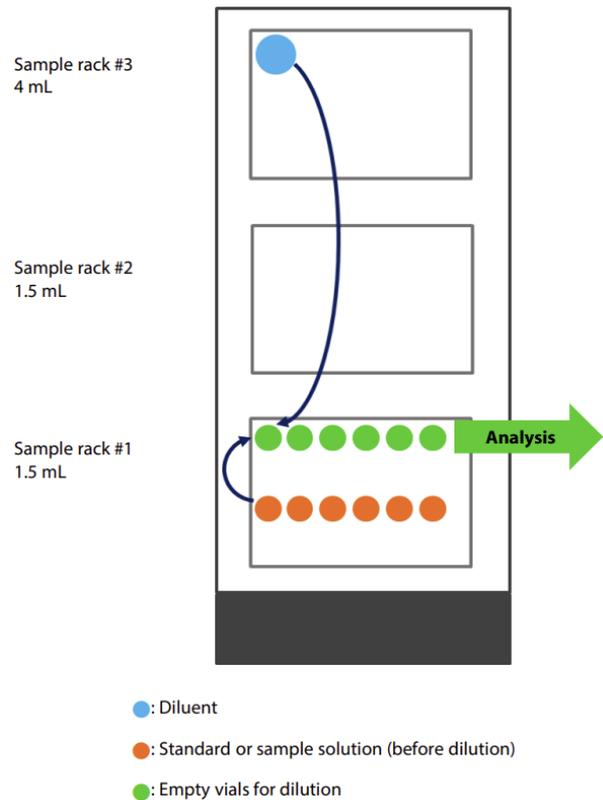


그림 3. 오토샘플러 내 위치 설정의 예

■ 결론

오토샘플러를 이용한 자동 희석 기능으로 수작업 전처리에 대한 수고를 줄일 수 있으며, 실제 샘플에 대한 증발 및 재용해를 생략할 수 있다. 이로 인해, 테트라사이클린 스크리닝 분석시 작업 효율이 향상되었다.

■ 참고문헌

- 1) "New System Related to Residual Pesticides in Foods (Positive List System)" from the Ministry of Health, Labour and Welfare
- 2) "Analytical Methods for Oxytetracycline, Chlortetracycline, and Tetracycline" Food Safety Directive 0124001 issued by the Manager of the Food Safety Division, Pharmaceuticals and Foods Department, Ministry of Health, Labour and Welfare (January 24, 2005)
- 3) "Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation (for Veterinary Drugs and Animal Feed Additives)" Edited under the Supervision of the Japan's Ministry of Health, Labour and Welfare, pages 68 to 79, Japan Food Hygiene Association (2003)