

벌꿀에 함유된 chloramphenicol의 검출, 확인 및 정량

Agilent Ultivo LC/TQ와 Agilent 1260 Infinity II LC
시스템의 결합 사용

저자

Vikrant Goel
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료는 벌꿀 시료에서 매우 낮은 피코그램 수준의 chloramphenicol(CAP)을 분석하기 위해 Agilent Ultivo LC/TQ와 Agilent 1260 Infinity II LC 시스템을 결합하여 사용한 방법을 보여줍니다. 해당 분석법은 Agilent Ultivo LC/TQ에서 개발하였으며, 이는 소형 폼 팩터임에도 탁월한 결과를 제공하였습니다. 이 응용은 벌꿀 시료의 제조, 가공 및 상업적 검사와 관련한 식품 산업의 일상적 분석 또는 학술 연구 목적에 이상적입니다. 간단한 액체-액체 추출(LLE) 기반의 시료 전처리를 통해 매트릭스 내 50ppt의 정량 한계(LOQ)를 달성할 수 있었습니다.

서론

Chloramphenicol(CAP)은 단백질 합성을 억제하는 광범위 항생제(broad-spectrum antibiotic)입니다. 장기간 노출 시 심각한 희귀 혈액 질환(재생 불량성 빈혈)과 골수 손상을 일으킵니다. CAP는 인간에게 심각한 독성 영향을 나타내기 때문에 식품 내 최소 요구 검출 한계치(MRPL)인 0.3ppb 이하로 규제되고 있습니다^{1,2}.

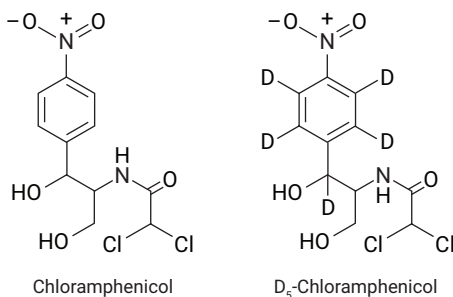


그림 1. CAP 및 중수소화된 CAP

TQ LC/MS 시스템은 미국, EU, FSSAI (인도) 및 기타 국가의 가이드라인에 따라 벌꿀에 함유된 CAP를 확인하는 가장 신뢰할 수 있는 표준입니다. 본 응용에서는 최신 TQ LC/MS 시스템인 Ultivo LC/TQ를 사용하였습니다. Ultivo LC/TQ에서 얻은 감도는 EU 식품 규제에서 확립한 MRPL 수준을 증가했습니다.

기존 분석법에서는 LLE와 고체상 추출(SPE)을 함께 사용하지만 이 워크플로에서는 LLE만을 사용하였습니다. SPE 단계를 제거함으로써 간단하고 비용 효율적이며 시간을 절약할 수 있는 솔루션을 얻을 수 있습니다(그림 2)^{3,4,5}.

편차를 줄이기 위해 구조적으로 유사한 CAP-d₅를 내부 표준물질로 사용한 결과, 제시한 Ultivo LC/TQ 솔루션은 특이성, 직선성, 견고성 및 신뢰성을 갖춘 결과를 나타냈습니다.

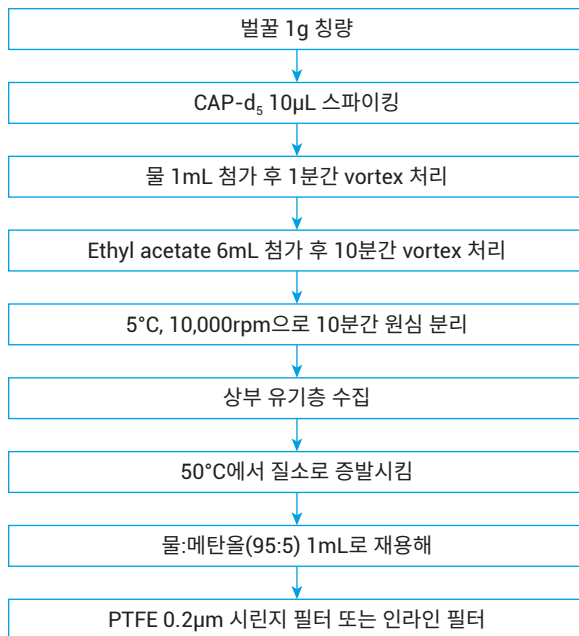


그림 2. LLE 기반 시료 전처리

실험

사용한 용매는 다음과 같습니다: acetonitrile(Honeywell, LC/MS, 품번 34967); 메탄올(Honeywell, LC/MS, 품번 34966); 물(Millipore, Milli-Q); ethyl acetate(AR 등급, Rankem) 및 chloramphenicol(Agilent Technologies, 품번 5091-0591). 모든 CAP 작업 희석액은 100% 메탄올로 조제하였습니다.

표 1. HPLC 그레디언트 분석법

파라미터	값		
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100mm, 2.7µm(p/n 685775-922)		
이동상	A) 물 B) 메탄올; 500µL/분		
주입 부피	25µL		
컬럼 온도	50°C		
그레디언트	시간(분)	물(100%)	메탄올(100%)
	0.0	95	5
	2.5	2	98
	3.0	2	98
	3.5	95	5
	5.0	95	5

기기

- Agilent 1260 Infinity II Flexible 펌프 (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II Vialsampler (G7129C)
- Agilent 1260 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116A)
- Agilent Ultivo LC/TQ(AJS 이온화원) (G6465A)

결과 및 토의

이상적 MRPL이 300ppt로 규정되어 있는 점을 고려하여 대부분의 분석 실험실에서는 일반적인 농도로 100ppt를 일상적 LOQ로 설정합니다. 제안한 분석법의 검출 한계 (LOD)는 25ppt입니다. 그러나 벌꿀 시료의 다양한 특성을 감안하여 LOQ를 50ppt로 설정하는 것이 좋습니다. 그림 3에 나타나 있는 MRM 크로마토그램은 희석액에서의 바탕 시료, LOD 및 LOQ를 보여줍니다. 또한, 그림 4에 나타난 바와 같이 희석액으로 조제한 다양한 농도의 CAP를 주입하여 재현성 있는 용리 프로파일을 얻었습니다.

표 2. Agilent Ultivo LC/TQ 조건

파라미터	설정	
이온화 모드	AJS(음이온 모드)	
Nebulizer 가스	35psi	
건조 가스	350°C에서 10L/분	
Sheath 가스	400°C에서 12L/분	
캐필러리 전압	2,000V	
노즐 전압	1,500V	
Fragmentor 전압	90V	
CAV	9V	
측정 시간(Dwell Time)	50ms	
분해능	Unit/Unit	
분석물질	MRM 전이	CE(V)
CAP	321/151.9	9
CAP	321/257.1	2
CAP	321/194.0	3
CAP-d ₅	326/157.0	9

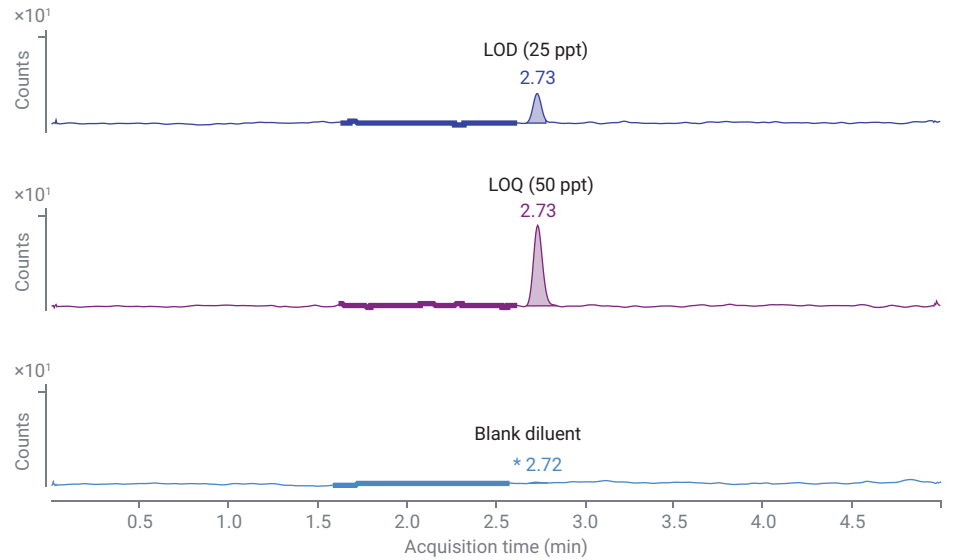


그림 3. Agilent Ultivo LC/TQ에서의 CAP 감도

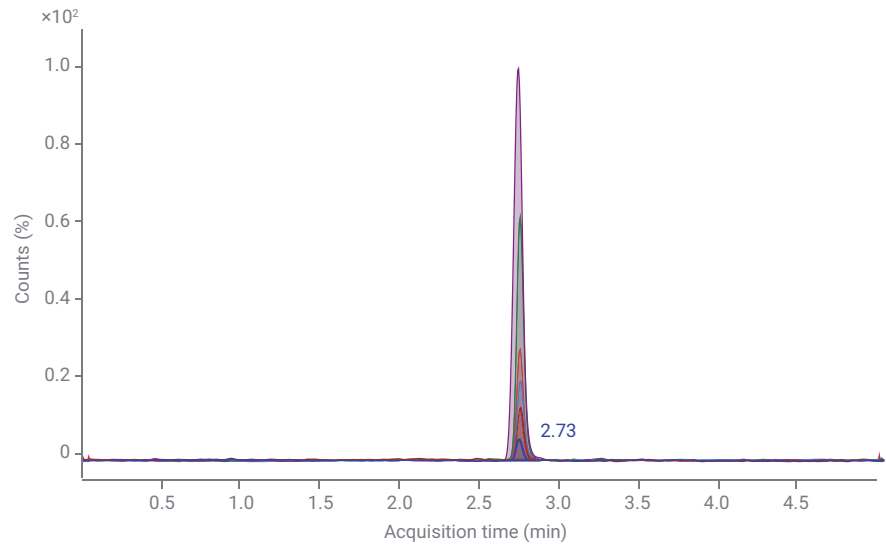


그림 4. 다양한 농도의 CAP 오버레이

검량 및 직선성

50~600ppt의 농도 수준에서 상대 감응 (CAP와 CAP-d₅의 면적 비율)에 대한 선형 검량 플롯을 생성하였습니다(그림 5). 견고한 데이터를 얻기 위해 각 농도 수준에서 3회 반복 분석을 수행하였으며, LOQ 수준에서는 6회 반복 분석을 수행하였습니다. 규제에 따라 하나의 정량 이온, 두 개의 정성 이온 및 MRM 비율을 포함한 검량 테이블의 스크린샷이 그림 6에 나타나 있습니다.

벌꿀 시료 정량

본 자료에서 소개한 분석법을 시판 벌꿀 시료에까지 적용해보았습니다. 벌꿀은 인도 델리의 현지 상점(Brand 1, Brand 2 및 Brand G)과 노점상(Local 및 Local 2)에서 구입하였으며, 모든 시료는 3회 반복 분석하였습니다. 그림 7에서 CAP 결과는 EU-MRPL 수준인 300ppt보다 낮게 존재하는 것으로 보고된 것을 확인할 수 있습니다.

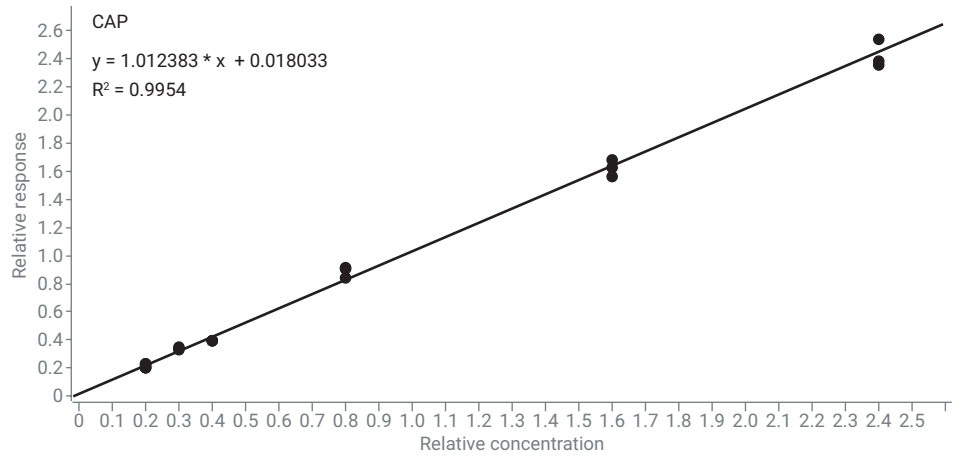


그림 5. 50~600ppt(R² = 0.9953) 범위에서의 선형 플롯

Sample			CAP Met..	CAP Results				Qualifier..	Qualifier..	CAP-IS (ISTD) R..
Type	Level	Acq. Date-Time (Inst.)	Exp. Conc.	RT	Calc. Conc.	Accuracy	ISTD Resp. Ratio	Ratio	Ratio	RT
Blank		8/24/2018 4:18 AM		2.59	0.00		0.0061		208.3	2.72
Cal	1	8/24/2018 1:54 AM	50.00	2.73	43.47	86.9	0.2061	87.3	47.7	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:06 AM	50.00	2.73	42.73	85.5	0.2031	110.6	44.4	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:12 AM	50.00	2.73	48.06	96.1	0.2244	92.0	38.5	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:18 AM	50.00	2.73	48.88	97.8	0.2277	84.6	40.7	2.72
Cal	1	8/24/2018 2:24 AM	50.00	2.73	49.16	98.3	0.2288	104.3	47.7	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:30 AM	50.00	2.73	42.17	84.3	0.2008	80.7	39.1	2.73
Cal	2	8/24/2018 2:42 AM	75.00	2.73	86.21	114.9	0.3768	88.0	41.5	2.72
Cal	2	8/24/2018 2:48 AM	75.00	2.73	82.51	110.0	0.3621	105.0	43.3	2.73
Cal	2	8/24/2018 2:54 AM	75.00	2.73	81.06	108.1	0.3563	87.4	47.4	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:06 AM	100.00	2.73	89.71	89.7	0.3908	96.7	48.9	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:12 AM	100.00	2.73	89.93	89.9	0.3917	100.9	39.7	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:18 AM	100.00	2.73	91.81	91.8	0.3992	90.0	38.6	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:24 AM	200.00	2.73	219.27	109.6	0.9086	103.6	47.5	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:36 AM	200.00	2.73	217.76	108.9	0.9025	104.5	46.3	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:42 AM	200.00	2.73	205.06	102.5	0.8518	109.8	46.2	2.72
Cal	5	8/24/2018 3:48 AM	400.00	2.72	399.33	99.8	1.6281	90.5	43.9	2.71
Cal	5	8/24/2018 3:54 AM	400.00	2.72	380.87	95.2	1.5543	95.3	46.6	2.71
Cal	5	8/24/2018 4:00 AM	400.00	2.71	412.19	103.0	1.6795	94.3	43.7	2.71
Cal	6	8/24/2018 11:48 AM	600.00	2.73	583.31	97.2	2.3633	94.6	42.2	2.72
Cal	6	8/24/2018 11:54 AM	600.00	2.72	584.87	97.5	2.3696	98.3	43.3	2.71
Cal	6	8/24/2018 12:00 PM	600.00	2.71	626.66	104.4	2.5366	95.1	41.4	2.71

그림 6. 50~600ppt 범위에서의 CAP 검량 테이블

벌꿀 시료의 회수율

2.73±0.1분의 크로마토그래피 피크 RT가 없고 이온 비율이 EU 가이드라인을 벗어나는 시료는 음성 시료로 간주됩니다⁶. 시료 Brand-G의 CAP 농도는 LOD 값보다 높았고 시료 Local-2의 CAP 농도는 LOQ 값보다 높았습니다. 또한 벌꿀 시료에 50ppt CAP를 추가하여 스파이크 실험을 수행하였습니다(그림 7 참조). 표 3에 나타난 스파이크 실험을 통해 5개 시료 모두에서 양호한 회수율(80~120%)이 나타나 제안된 분석법이 벌꿀의 일상적 CAP 분석에 적합하다는 것을 확인하였습니다.

결론

본 분석법의 LOQ는 EU-MRPL의 1/6에 해당됩니다. LC 분석법은 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 2.7µm 컬럼을 사용하여 낮은 압력에서 UHPLC 분리를 제공합니다. LLE 기반의 시료 전처리법은 절차가 간단하고 시간 소모가 적습니다. EU 표준에 따라 실제 벌꿀 시료에서의 CAP를 성공적으로 분석하였습니다.

Sample				CAP Results			Qualifi...	Qualifi...	CAP-IS (...
Name	Type	Acq. Date-Time	RT	MI	Final Conc.	Ratio	Ratio	RT	
Brand1	Sample	8/24/2018 12:12 P...	2.973		4.55			2.721	
Brand1	Sample	8/24/2018 12:18 P...	2.978		15.36	102.6		2.721	
Brand1	Sample	8/24/2018 12:24 P...	2.431		23.49	63.9		2.726	
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:30 P...	2.732		40.89	101.6	47.1	2.726	
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:36 P...	2.727		41.76	95.4	54.6	2.726	
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:42 P...	2.732		41.39	77.4	51.9	2.726	
Brand2	Sample	8/24/2018 12:48 P...	2.978		89.47	15.6	3.3	2.726	
Brand2	Sample	8/24/2018 12:54 P...	2.431		67.75	55.8	146.5	2.726	
Brand2	Sample	8/24/2018 1:00 PM	2.983		128.01	15.8	9.6	2.726	
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:06 PM	2.732		44.81	93.7	36.4	2.721	
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:12 PM	2.732		42.73	87.3	57.8	2.726	
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:18 PM	2.727		38.41	93.1	49.7	2.726	
BrandG	Sample	8/24/2018 1:24 PM	2.727		25.90	100.0	47.1	2.726	
BrandG	Sample	8/24/2018 1:30 PM	2.732		30.59	96.2	49.4	2.726	
BrandG	Sample	8/24/2018 1:36 PM	2.732		28.61	112.0	57.6	2.726	
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:42 PM	2.732		74.66	90.6	49.7	2.720	
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:48 PM	2.727		77.49	103.1	51.1	2.721	
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:54 PM	2.732		83.27	107.3	42.1	2.726	
Local	Sample	8/24/2018 2:00 PM	2.743		0.00	318.5		2.726	
Local	Sample	8/24/2018 2:06 PM	2.732		2.10		156.5	2.726	
Local	Sample	8/24/2018 2:12 PM	2.620		0.00	390.9	72.5	2.726	
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:18 PM	2.732		48.68	77.2	39.2	2.726	
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:24 PM	2.732		41.78	113.2	53.8	2.726	
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:30 PM	2.732		51.07	75.9	55.6	2.726	
Local2	Sample	8/24/2018 2:36 PM	2.732		130.33	95.7	40.3	2.726	
Local2	Sample	8/24/2018 2:42 PM	2.732		142.36	99.0	41.4	2.726	
Local2	Sample	8/24/2018 2:48 PM	2.727		164.55	88.2	47.4	2.721	
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 2:54 PM	2.732		193.57	100.3	44.1	2.726	
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 3:00 PM	2.732		207.12	83.0	45.5	2.726	
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 3:06 PM	2.732		197.05	96.4	44.8	2.726	

그림 7. 시판 시료 및 LOQ 농도 스파이킹한 시판 시료

표 3. 다양한 벌꿀 시료에서의 chloramphenicol

시판 시료	스파이크 하지 않은 시료 농도(a)	스파이크 한 시료 농도(b)	% 회수율 = 100(b - a)/50
Brand 1	ND	41.35ppt	82.69%
Brand 2	ND	41.98ppt	83.96%
Brand G	28.37ppt	78.47ppt	100.20%
Local	ND	47.18ppt	94.35%
Local 2	145.75ppt	199.25ppt	107.0%

참고문헌

1. Scientific Opinion on Chloramphenicol in Food and Feed. *EFSA Journal* **2014**, 12(11), 3907.
2. Commission Decision 2003/181/EC.
3. Fang, Y. *et al.* Detection, Confirmation, and Quantification of Chloramphenicol in Honey and Shrimp at Regulatory Levels Using Quadrupole and Ion Trap LC/MS Application. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5988-9920EN, **2007**.
4. Zhao, L. *et al.* Determination of Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Honey Using Agilent SampliQ OPT Solid-Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-3615EN, **2009**.
5. Jin-Lan, S. *et al.* Screening 36 Veterinary Drugs in Animal Origin Food by LC-MS/MS Combined with Modified QuEChERS Method. *Agilent Technologies Application Note*, publication note 5991-0013EN, **2012**.
6. SANTE/11813/2017.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 9월 6일, 한국에서 인쇄
5994-1317KO

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