

Agilent J&W DB-35ms 및 DB-XLB GC 컬럼을 이용한 어류 조직 내 PCB의 GC/ μ ECD 분석 및 확인

응용 자료

식품 분석

저자

Doris Smith & Ken Lynam
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
USA

개요

μ ECD가 장착된 GC를 사용해 현지 식료품점에서 구입한 어류 시료의 19종 PCB(Polychlorinated Biphenyl) 화합물에 대해 분석하였습니다. 확산 고체상 추출(dSPE)과 QuEChERS 절차(빠르고 쉽고 경제적이며 효과적이고 견고하고 안전한)로 분석 전에 시료를 세척하였습니다. 듀얼 μ ECD와 듀얼 캐필러리 GC 컬럼 접근법을 이용하여 주 분석과 확인 분석을 동시에 수행하였습니다. 주 분석 컬럼 Agilent J&W DB-35ms 30m \times 0.25mm, 0.25 μ m와 확인 컬럼 Agilent J&W DB-XLB 30m \times 0.25mm, 0.50 μ m는 효과적으로 모든 19종의 PCB를 분석하였습니다. 분석법은 10, 20, 50, 100, 250 및 400ng/mL의 PCB 농도에서 검량하였으며, 우수한 직선성과 재현성이 나타났습니다. 50ng/mL과 200ng/mL 농도의 어류 매트릭스 내에서 72~116%의 첨가 회수율 범위가 나타났습니다.



Agilent Technologies

서론

오메가 3 지방산은 콜레스테롤, 암 유발 위험 및 혈압을 낮춥니다. 인체는 이러한 지방산을 생성할 수 없기 때문에, 음식 또는 보충제를 통해 섭취해야 합니다. 어류는 오메가 3 지방산의 좋은 공급원이고, 특히 지방이 많은 어류는 높은 오메가 3 지방산 함유량을 보유하고 있습니다. 어류는 이처럼 많은 이점을 제공하는 한편, 중금속, PCB 또는 기타 오염물과 같은 오염물질도 포함하고 있습니다.

1970년대 후반에 미국 및 기타 국가에서는 polychlorinated biphenyl(PCB)의 사용을 금지하였지만, PCB 오염은 여전히 문제가 되고 있습니다. PCB는 분해가 느리며 환경에 지속적으로 잔류할 수 있고, 강과 호수의 퇴적물에 쌓이는 경향이 있습니다[1,2]. PCB는 높은 친유성을 가지고 있으며, 먹이 사슬을 통해 어류의 지방 조직 내에 축적될 수 있습니다. 오염된 어류의 섭취는 인간이 PCB에 노출되는 가장 중요한 원인입니다[3]. EPA와 같은 많은 기관 및 지방 정부는 월간 또는 연간 어류 섭취량 권장 한계를 설정하였습니다[4].

Agilent J&W DB-35ms 30m × 0.25mm, 0.25µm 주 분석 컬럼과 Agilent J&W DB-XLB 30m × 0.25mm, 0.50µm 확인 컬럼으로 구성된 듀얼 컬럼, 듀얼 µECD 시스템은 어류 시료 내의 PCB 분리 및 분석에 사용됩니다. 컬럼 활성화에 대한 지속적인 개선 및 엄격한 공정 제어로 이 컬럼 쌍을 까다로운 어류 조직 매트릭스 내의 PCB 분석에 적합하도록 만들었습니다.

QuEChERS(빠르고 쉽고 경제적이며 효과적이고 견고하고 안전한) AOAC 시료 제조 접근법은 어류 조직 내 19종 PCB 동족체의 추출 및 cleanup에 사용됩니다. 이 접근법에는 완충 수용액과 acetonitrile 시스템 내의 초기 추출, 염 추가 후의 추출 및 분할 단계, 확산 고체상 추출을 사용하는 cleanup 단계 등이 포함되어 있습니다[5].

실험

본 실험에서는 듀얼 µECD 검출기와 듀얼 캐필러리 GC 컬럼이 장착된 Agilent 7890A GC 시스템을 사용하여, 한번의 주입으로 분석물을 동시에 식별 및 확인할 수 있습니다. 여기에 사용된 GC는 또한 unpurged two-way splitter capillary flow technology(CFT) 장비가 장착되어 있어, 유지보수를 간소화하고 시스템 가동 중단 시간을 줄일 수 있습니다. 표1은 이 분석에서 사용한 크로마토그래피 조건입니다. 표2는 이 실험에서 사용한 유동 경로의 소모품입니다.

표 1. 크로마토그래피 조건

GC:	듀얼 µECD 검출기가 장착된 Agilent 7890A
시료 주입기:	Agilent 7873B 5.0µL 시린지(Agilent p/n 5181-1273)
CFT 장치:	2-way unpurged splitter capillary flow technology (Agilent p/n G3181B)
운반 가스:	수소 85cm/s, 일정 유속 3.5mL/분
주입:	1.0µL 비분할, 250°C, 0.3분에서 퍼지 유속 50mL/분 2분에서 가스 절약 모드 50mL/분
컬럼 1:	Agilent J&W DB-35 ms 30m × 0.25mm, 0.25µm (Agilent p/n 122-3832)
컬럼 2:	Agilent J&W DB-XLB 30m × 0.25mm, 0.50µm (Agilent p/n 122-1236)
오븐:	110°C(0.1분), 25°C/분으로 200°C까지(0.5분), 10°C/분으로 240°C까지(0.5분), 30°C/분으로 325°C까지 (1.5분)
주입:	1µL, 250°C 비분할, 0.3분에서 퍼지 50mL/분, 2분에서 가스 절약 모드 50mL/분
듀얼 µECD:	350 °C, 보충 가스 N ₂ ; 일정 유속 컬럼 + 보충 가스 = 30mL/분

표 2. 유동 경로 소모품

바이알:	Amber screw top glass vials(Agilent p/n 5183-2072)
바이알 캡:	Blue screw caps(Agilent p/n 5182-0717)
바이알 삽입튜브:	100µL glass/polymer feet(Agilent p/n 5181-8872)
시린지:	5µL(Agilent p/n 5181-1273)
셉텀:	Advanced green(Agilent p/n 5183-4759)
주입구 씰:	Gold plated inlet seal(Agilent p/n 5188-5367)
주입구 라이너:	Deactivated dual taper direct connect (Agilent p/n G1544-80700)
페룰:	0.4mm id short; 85/15 vespel/graphite (Agilent p/n 5181-3323)
CFT 피팅:	Internal nut(Agilent p/n G2855-20530)
CFT 페룰:	SilTite ferrules, 0.25mm id(Agilent p/n 5188-5361)
20x 확대 렌즈:	20x Magnifier loop(Agilent p/n 430-1020)

시약 및 화학물질

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 Ultra Resi 등급이었습니다. Acetonitrile(ACN)은 Honeywell(Muskegon, MI, USA)에서 구입하였고, 아세트산(HAc)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, Acetone은 VWR International(West Chester, PA, USA)에서 구입하였습니다. PCB 동족체 표준물질(RPCM-8082) 및 대체 표준물질(ISM-320)은 Ultra Scientific(North Kingstown, RI, USA)에서 구입하였습니다.

용액 및 표준물질

1L의 ACN에 10mL의 아세트산을 첨가하여 1%의 아세트산 용액을 함유하는 ACN을 제조하였습니다.

PCB 표준 원액(100µg/mL의 19종 동족체)을 Acetone으로 희석하여 1µg/mL 및 5µg/mL의 스파이킹 용액을 제조하였습니다. Acetone에 대체 원액(200µg/mL)을 희석하여 10µg/mL의 대체 스파이킹 용액을 제조하였습니다. 스파이킹 용액을 적절히 희석하여 매트릭스 바탕 추출의 검량선을 생성하기 위해 사용하였습니다.

시료 제조

Swai 어류 시료는 현지 식품점에서 구입하였습니다. 어류 시료를 작은 조각으로 자른 후 -80°C에서 하룻밤 동안 냉동하였습니다. 그리고 시료 균질성을 얻기 위해 시료를 완전히 분쇄하였습니다. 시료 추출법으로는 QuEChERS 분석법 후에 dSPE를 사용하였습니다[5]. 그림 1은 순서도를 통해 시료 제조 절차를 도표로 보여줍니다.

3.0g의 무게를 측정된 어류 시료를 원심분리 튜브에 넣었습니다. 적절한 양의 PCB 스파이킹 용액으로 QC 시료를 강화하여 10, 50, 200ng/mL 농도의 QC 시료를 생성했습니다.

QuEChERS/dSPE 시료 제조 워크플로

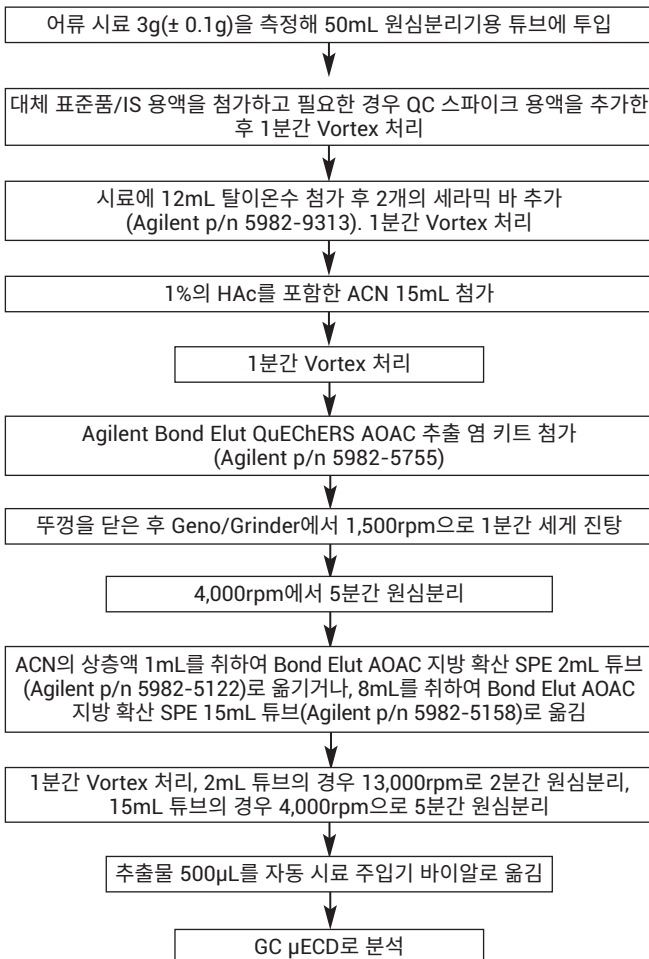


그림 1. 수정된 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 어류 시료의 추출 절차 순서도[5]

150µL의 대체 스파이킹 표준물질(10µg/mL)을 각 QC 시료에 첨가하여 100ng/mL의 농도를 생성했습니다. 각 시료는 12.0mL의 탈이온수 분취액과 15mL의 1% HAc를 함유한 ACN 분취액을 받았습니다. 시료를 1분 동안 1,500rpm으로 vortex했습니다. 시료 추출을 돕기 위해, 각 시료에 2개 세라믹 바(Agilent p/n 5982-9313)를 추가했습니다. 6g의 MgSO₄와 1.5g의 아세트산 나트륨을 포함한 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 추출 염 키트(Agilent p/n 5982-5755)를 각 원심분리 튜브에 추가했습니다. 캡핑 튜브를 1,500rpm의 속도로 1분간 Geno/Grinder에서 진탕하였습니다. 시료를 5분 동안 4,000rpm으로 원심분리하였습니다.

상층액의 8mL 분취액을 Agilent Bond Elut QuEChERS 지방 시료 분산 SPE 15mL 튜브(Agilent p/n 5982-5158)로 옮겼습니다. dSPE 튜브를 1분간 vortex한 후 5분간 4,000rpm으로 원심분리하여 시료 추출을 완성하였습니다. dSPE의 액체를 GC 바이알로 옮긴 후 표 1에 기재된 크로마토그래피 조건으로 GC-µECD를 이용해 분석하였습니다.

물과 acetonitrile 분취 추출액은 시료와 동일한 방법으로 제조하여 바탕 시료로 사용했습니다.

표 3. PCB 동족체 검량 표준물질의 10 ng/m~400 ng/mL 범위를 초과한 r² 값

Analytes	DB-35ms	DB-XLB
	r ²	r ²
IUPAC 1	0.9994	0.9994
Tetrachloro-m-xylene (surrogate)	0.9913	0.9923
IUPAC 5	0.9993	0.9998
IUPAC 18	0.9998	0.9995
IUPAC 31	0.9980	0.9984
IUPAC 52	0.9986	0.9992
IUPAC 44	0.9988	0.9993
IUPAC 66	0.9990	0.9993
IUPAC 101	0.9992	0.9994
IUPAC 87	0.9984	0.9991
IUPAC 110	0.9939	0.9991
IUPAC 151	0.9998	0.9996
IUPAC 153	0.9981	0.9993
IUPAC 141	0.9993	0.9998
IUPAC 138	0.9984	0.9994
IUPAC 187	0.9989	0.9996
IUPAC 183	0.9993	0.9998
IUPAC 180	0.9994	0.9998
IUPAC 170	0.9993	0.9997
IUPAC206	0.9995	0.9996
Decachlorobiphenyl (surrogate)	0.9910	0.9895

결과 및 토의

PCB 및 대체 표준물질은 DB-35ms 30m × 0.25mm, 0.25µm 주 분석 컬럼에서 12분 내에 분석되었습니다. 그림 2는 50ng/mL PCB 표준 용액(100ng/mL 대체 표준물질)의 분리를 보여줍니다. 그림 3은 DB-XLB 30m x 0.25mm, 0.50µm 확인 분석 컬럼에서 동일한 50ng/mL PCB 표준물질(100ng/mL 대체 표준물질)을 주입한 크로마토그램을 보여줍니다.

듀얼 컬럼 세트의 성능은 본 연구의 검량 범위에 걸친 우수한 직선성과 회수율을 보여줍니다. 10ppb의 분석법 정량 한계(MLQ)는 기존 FDA가 정한 규제 지침 중 식품 등급 어류 내의 2,000ppb PCB보다 훨씬 낮으며, Agency for Toxic Substance and Disease Registry(ATSDR)의 최대 허용 잔류 허용량(MRL)인 0.02mg/kg/일보다도 낮습니다 [6]. PCB 동족체 표준물질 곡선의 r^2 값으로 정의되는 컬럼 세트의 직선성 범위는 0.9939~0.9998이었습니다. 개별 PCB 동족체 값은 표 3에 나와 있습니다. 그림 4에서 볼 수 있듯이, 컬럼 세트에서의 가장 낮은 검량 표준물질은 탁월한 신호 대 잡음비를 나타냈습니다.

19종의 PCB 동족체를 Agilent J&W DB-35ms로 분리

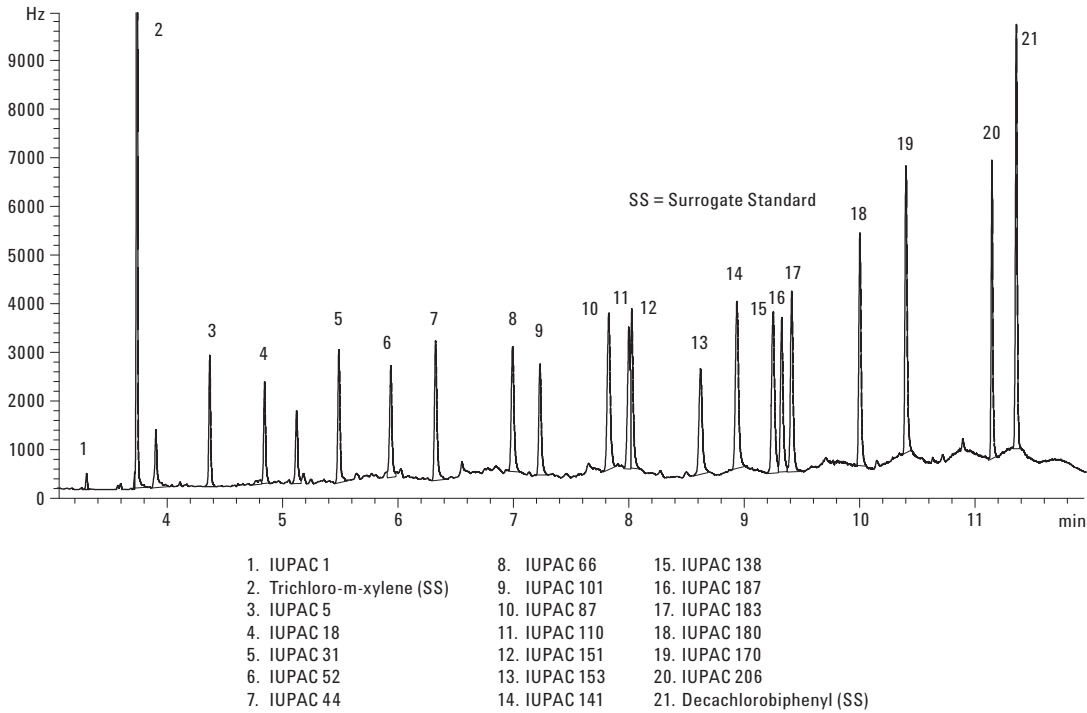


그림 2. 50ng/mL PCB 동족체 표준물질을 Agilent J&W DB-35ms 30m × 0.25mm, 0.25 µm 캐필러리 GC 컬럼(Agilent p/n 122-3832)으로 분석한 GC/µECD 크로마토그램. 크로마토그래피 조건은 표 1과 같음

19종의 PCB 동족체를 Agilent J&W DB-XLB로 분리

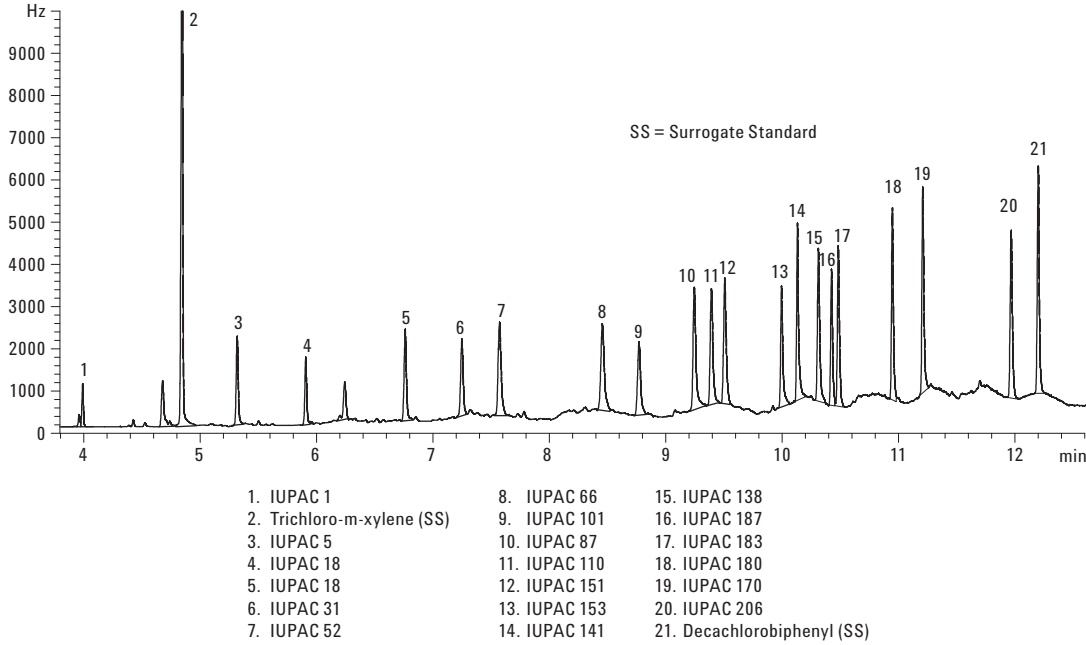


그림 3. 50ng/mL PCB 동족체 표준물질을 Agilent J&W DB-XLB 30m × 0.25mm, 0.50μm 캐필러리 GC 컬럼(Agilent p/n 122-1236)으로 분석한 GC/μECD 크로마토그램. 크로마토그래피 조건은 표 1과 같음

극미량 PCB에 대한 탁월한 신호 대 잡음비

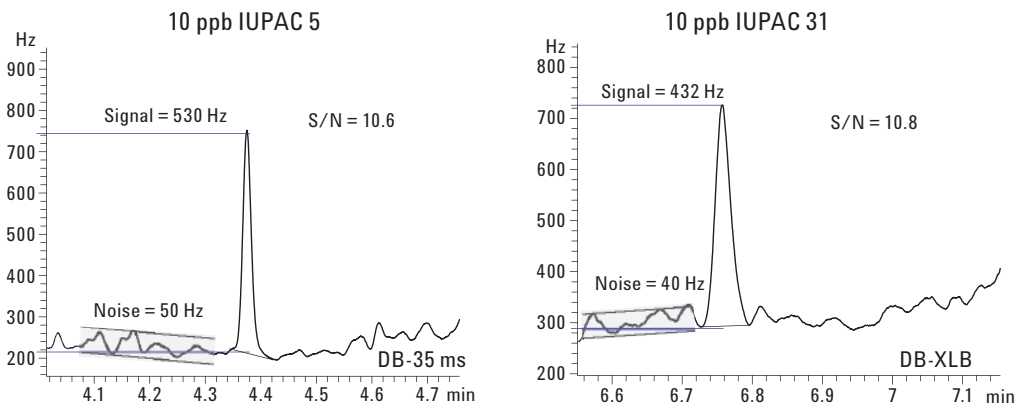


그림 4. Agilent J&W DB-35ms와 DB-XLB 캐필러리 컬럼에서 분석된 10ng/mL PCB 검량 표준물질의 두개 개별 동족체의 확대된 크로마토그램. 크로마토그래피 조건은 표 1과 같음

QuEChERS와 확산 dSPE를 이용한 추출 과정은 스파이킹 된 어류 시료 내의 PCB를 효과적으로 유지하고 GC- μ ECD 분석용 시료 매트릭스의 충분한 cleanup을 제공하였습니다. 그림 5는 주 컬럼 및 확인 컬럼 세트에서 스파이킹된 어류 시료 내의 추출 PCB의 분리를 보여줍니다.

지방 시료에 대한 Agilent Bond Elut QuEChERS 추출 및 확산 SPE를 거친 후 어류 시료 내 50ppb의 PCB

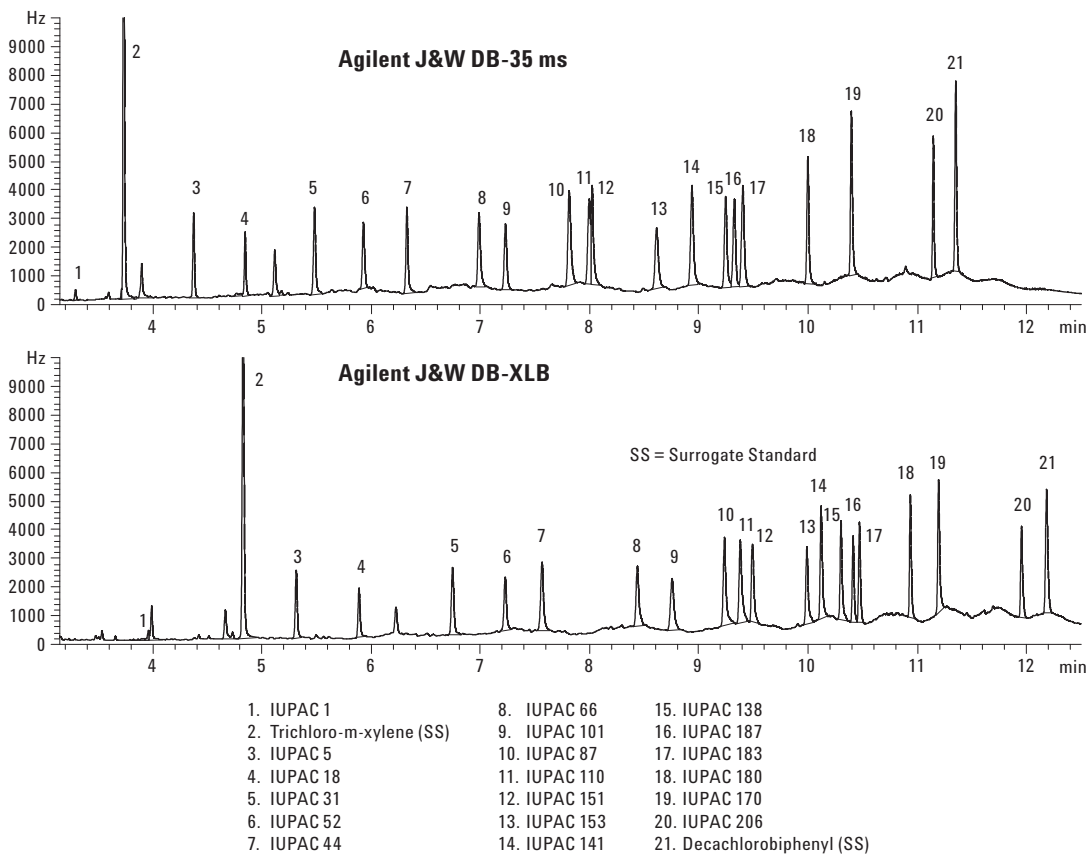


그림 5. Agilent J&W DB-35ms 및 DB-XLB GC 컬럼으로 분석된 50ng/mL 첨가 어류 추출물의 GC/ μ ECD 크로마토그램. 크로마토그래피 조건은 표 1과 같음

회수율은 10, 50, 200ng/mL의 PCB 농도에서 측정되었습니다. 각 컬럼에서의 개별 PCB에 대한 회수율은 표 4와 5에 나타나 있습니다. 조사한 모든 PCB에 대해, DB-35ms 컬럼(72~112%) 및 DB-XLB 컬럼(72~116%)의 중간 및 높은 수준의 회수율 범위는 매우 우수하게 나타났습니다.

저농도인 10ppb QC 시료 내의 19종 동족체 중의 3종은 보다 낮은 회수율을 나타냈습니다. DB-35ms 컬럼에서의 IUPAC 110 및 IUPAC 151의 동시 용리는 IUPAC 110의 보다 낮은 회수율을 초래하였으나, 두 동족체는 모두 XLB 컬럼에서 72% 이상의 회수율로 분리되었습니다.

ECD의 감도는 염소 치환기의 양과 상관 관계가 있기 때문에, PCB의 반응은 일반적으로 염소 함량의 증가함에 따라 증가됩니다. IUPAC 1은 monochlorinated biphenyl (2-chlorobiphenyl)이므로, 낮은 ECD 감도를 나타냅니다. 이것은 10ng/mL 농도에서의 IUPAC 1의 낮은 회수율에 영향을 끼쳤으나, 50ng/mL 농도에서의 회수율과 재현성은 매우 뛰어났습니다(평균 회수율 111%, 평균 재현성 2.4%).

표 4. Agilent J&W DB-35ms 컬럼(Agilent p/n 122-3832)으로 분석한 강화 Swai 어류 내 PCB의 회수율과 재현성

Analytes	10 ng/mL fortified QC		50 ng/mL fortified QC		200 ng/mL fortified QC	
	%Recovery	RSD (n=6)	%Recovery	RSD (n=6)	%Recovery	RSD (n=6)
IUPAC 1	43.2	4.0	111.9	2.4	99.0	1.6
Tetrachloro-m-xylene (surrogate)	107.5	1.2	110.4	1.4	103.9	1.8
IUPAC 5	68.5	1.3	107.0	1.8	99.6	2.2
IUPAC 18	99.3	2.9	108.5	1.9	95.1	2.5
IUPAC 31	56.7	3.3	110.5	2.0	101.8	2.3
IUPAC 52	75.7	3.4	91.8	2.1	100.5	1.9
IUPAC 44	61.4	1.7	107.8	2.2	100.6	2.1
IUPAC 66	66.9	2.0	97.2	2.8	96.2	2.4
IUPAC 101	65.8	2.5	99.5	2.8	94.7	2.2
IUPAC 87	75.7	2.8	99.1	1.5	101.4	2.4
IUPAC 110	29.7	2.6	100.0	2.6	102.8	2.8
IUPAC 151	100.1	2.1	99.8	2.6	94.5	1.9
IUPAC 153	49.9	1.9	89.9	1.6	91.5	2.9
IUPAC 141	67.7	2.1	93.1	1.5	92.2	2.3
IUPAC 138	52.2	2.9	95.9	2.4	93.4	2.2
IUPAC 187	57.0	3.4	92.1	2.3	89.5	2.2
IUPAC 183	62.1	3.2	87.3	2.2	85.7	2.2
IUPAC 180	63.1	3.2	88.6	1.1	84.0	2.6
IUPAC 170	65.4	4.2	91.0	1.6	86.7	2.3
IUPAC 206	58.8	3.2	77.7	1.5	72.5	2.4
Decachlorobiphenyl (surrogate)	75.0	2.9	81.1	2.4	75.9	2.7

표 5. Agilent J&W DB-XLB 컬럼(Agilent p/n 122-1236)에서 분석한 강화 Swai 어류 내 PCB의 회수율과 재현성

Analytes	10 ng/mL fortified QC		50 ng/mL fortified QC		200 ng/mL fortified QC	
	%Recovery	RSD (n=6)	%Recovery	RSD (n=6)	%Recovery	RSD (n=6)
IUPAC 1	56.5	3.2	116.2	2.2	99.4	2.0
Tetrachloro-m-xylene (surrogate)	108.0	1.6	110.9	1.3	105.1	1.9
IUPAC 5	87.4	2.5	112.1	1.5	100.7	1.9
IUPAC 18	69.9	1.6	112.3	2.1	100.8	2.5
IUPAC 31	63.1	3.5	108.3	1.8	103.2	2.3
IUPAC 52	59.6	3.5	104.7	2.6	100.5	1.8
IUPAC 44	75.7	2.9	105.0	1.9	101.7	2.0
IUPAC 66	83.1	2.9	101.5	2.7	98.2	2.0
IUPAC 101	73.0	2.4	98.4	1.9	96.6	2.0
IUPAC 87	60.7	2.7	109.2	1.8	100.7	1.6
IUPAC 110	72.9	2.6	103.0	2.3	100.1	1.6
IUPAC 151	75.1	3.6	93.9	2.9	93.5	2.6
IUPAC 153	36.0	6.9	104.5	3.0	91.1	1.9
IUPAC 141	74.4	2.6	98.0	1.6	91.9	2.3
IUPAC 138	65.4	3.3	98.9	2.5	93.1	2.1
IUPAC 187	68.4	2.2	94.6	1.0	88.7	2.0
IUPAC 183	72.6	3.7	92.2	2.0	86.1	2.4
IUPAC 180	76.0	3.2	92.2	2.0	84.5	2.7
IUPAC 170	74.9	8.7	94.6	2.2	87.5	2.3
IUPAC 206	60.1	3.2	78.3	2.4	72.6	2.7
Decachlorobiphenyl (surrogate)	74.6	2.4	81.4	1.6	76.7	2.3

결론

본 응용 자료에서는 식품 안전 문제를 해결하기 위해 어류 시료 내의 PCB를 모니터링할 수 있는 견고하고 경제적인 분석법에 대해 설명합니다. 이 분석법은 일상적인 어류 스크리닝에서 GC/MS의 대안으로 듀얼 컬럼 μ ECD 분석법을 채택하였습니다.

지방 시료용 Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 분석법과 dSPE는 충분한 시료 cleanup을 효과적으로 제공하여, 매트릭스 간섭을 제거하는 동시에 낮은 농도의 분석물질도 검출할 수 있습니다.

단일 기기 내에 Agilent J&W DB-35ms 주 분석 컬럼과 Agilent J&W DB-XLB 확인 컬럼의 듀얼 컬럼 세트를 설치하여, PCB의 식별과 확인을 동시에 수행할 수 있었습니다. DB-35ms 주 분석 컬럼과 듀얼 μ ECD 검출 기능을 갖춘 DB-XLB 확인 컬럼은 어류 매트릭스 내의 19종 PCB 분석과 시료 매트릭스 cleanup에 효과적이었습니다. 단일 주입, 듀얼 컬럼 접근법은 기기와 분석 시간을 절약해 생산성을 향상시켰습니다. 컬럼 활성화에 대한 지속적인 개선 및 엄격한 공정 제어는 DB-35ms와 DB-XLB 컬럼 쌍을 PCB와 같은 분석물질의 분석에 적합하도록 만들었습니다.

DB-35ms와 GC μ ECD를 갖춘 DB-XLB 듀얼 컬럼 세트의 성능은 넓은 범위의 농도에 걸쳐 탁월한 직선성을 보였으며, PCB 화합물의 r^2 값은 0.9939~0.9998이었습니다. 회수율과 재현성은 77%이상으로 나타났으며, 50ng/mL에서의 RSD는 3.0미만이었습니다. 이 접근법을 사용한 PCB 동족체의 분석법 정량 한계는 기존 어류에 대한 규정된 MRL보다 현저히 낮습니다. 이 분석법으로 얻은 결과는 μ ECD로 PCB를 측정하는 방법이 GC/MS의 신뢰할 수 있는 대안임을 입증하였습니다.

감사의 글

Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC 추출 절차에 대해 도움과 제안을 주신 Joan Stevens님께 감사를 표합니다.

참고문헌

1. S. Foran, E. Lewandrowski, J. Flood, et. al. "Measurement of Organochlorines in Commercial Over the Counter Fish Oil Prep: Implication for Dietary and Therapeutic Recommendation..." Pathology and Laboratory Medicine, 2005, 129, 74-77.
2. IPCS (International Programme on Chemical Safety) *Environmental Health Criteria 140, Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls*. second ed. World Health Organization; 1993.
3. F. Cordle, R. Locke, and J. Springer. (1982). Risk Assessment in a Federal Regulatory Agency: An Assessment of Risk Associated with the Human Consumption of Some Species of Fish Contaminated with Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *Environ Health Perspect.* 45:171-82.
4. <http://www.epa.gov/waterscience/fish/files/pcbs.pdf>
5. AOAC Method 2007.01
6. <http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/pha/pha.asp?docid=1094&pg=2>

자세한 정보

애질런트 제품 및 서비스에 대한 자세한 정보는 애질런트 웹사이트(www.agilent.com/chem)를 방문하십시오.

www.agilent.com/chem

에질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2012
2012년 1월 6일
한국에서 인쇄
5990-6236KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국에질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies