말라카이트 그린-고성능액체크로마토그래피

2019

Malachite green-High Performance Liquid Chromatography

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 염료 및 소독제에 함유된 말라카이트 그린의 측정방법으로서, 염료 및 소독제 중에 말라카이트 그린을 아세토나이트릴 및 디클로로메테인으로 추출하여 감압 농축한 후 메테인올에 녹여 액체크로마토그래피로 분리한 다음 자외선검출기나 형광검출기로 정량하는 방법이다.

1.2 적용범위

1.2.1 이 시험방법은 염료 및 소독제 중에 말라카이트 그린(malachite green, CAS No: 10309-95-2) 및 말라카이트 그린 옥살레이트(malachite green oxalate, CAS No: 18015-76-4)의 분석에 적용한다.

1.2.2 이 방법에 의한 염료 및 소독제 중에 말라카이트 그린의 정량한계는 6 mg/L이다.

1.3 간섭 물질

1.3.1 유리기구는 세정제, 수돗물 정제수 그리고 아세톤으로 차례로 닦아준 후 105 ℃에서 건조한 후 식혀 알루미늄포일로 덮어 깨끗한 곳에 보관하여 사용한다.

2.0 용어정의

“내용 없음”

3.0 분석기기 및 기구

3.1 고성능액체크로마토그래피

3.1.1 고성능액체크로마토그래피는 이동상보관부, 용매전달부, 시료주입부, 분리관 및 검출부로 구성되고 검출부에서 나온 신호은 기록부에서 측정목적에 따라 여러 가지 형식으로 보고한다.

3.1.2 컬럼은 안지름 3 mm ~ 5 mm, 길이 5 cm ~ 30 cm의 스테인리스 강관에 옥타데실실릴기(ODS)를 화학 결합시킨 실리카겔(입경 3 μm ~ 10 μm)을 충전한 것 또는 이와 동등의 분리능을 갖는 것을 택하여 시험한다.

3.1.3 이동상은 0.1 % 1-헥세인설폰산소듐(sodium-1-hexanesulfonate)을 함유하는 0.05 M 암모늄아세테이트(ammonium acetate)와 0.05 M 아세트산(acetic acid) 혼합액(용매 A) 및 아세토나이트릴(용매 B)로 사용한다.

3.1.4 고성능액체크로마토그래피의 조건은 표 1과 같이 수행할 수 있다.

3.2 자외선 검출기

파장 620 nm에서 방출하는 가시광선 검출기가 부착된 것을 사용한다.

3.3 형광 검출기

형광 검출기를 사용할 때에는 여기파장 265 nm 및 방출파장 360 nm를 사용한다.

3.4 원심분리기

원심분리기는 3,500 rpm 이상 가능한 것을 사용한다.

3.5 농축장치

구데르나다니쉬(KD) 농축기 또는 회전증발농축기를 사용한다.

3.6 시린지 필터

0.45 μm 이하, 테프론(polytetrafluoroethylene, PTFE) 재질의 유기용매 전용필터를 사용한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 물

시험에 쓰는 물은 따로 규정이 없는 한 증류수 또는 정제수로 사용한다.

4.1.2 1-헥세인설폰산소듐(0.1 %)/암모늄아세테이트(0.05 M)/아세트산(0.05 M) 완충용액

100 mL 용량플라스크에 1-헥세인설폰산소듐(1-hexanesulfonate, $C_6H_{13}O_3Na$, 분자량 : 188.22) 1.28 g과 암모늄아세테이트(ammonium acetate, $C_2H_3O_2NH_4$, 분자량 : 77.08) 3.85 g을 정제수에 녹인 후, 아세트산(acetic acid, $C_2H_4O_2$, 분자량 : 60.05) 2.86 g을 가하고 정제수로 물로 녹여 100 mL가 되게 한다(pH = 4.8). 이 용액은 이동상 A용액으로 사용하며, 제조 후 2주 이내의 것을 사용한다.

4.1.3 디클로로메테인

디클로로메테인(dichloromethane, CH_2Cl_2, 분자량 : 84.93)은 바탕 시험할 때 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 특급 이상의 것을 사용한다.

4.1.4 메테인올

메테인올(methanol, CH_3OH, 분자량 : 32.04)은 바탕 시험할 때 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 특급 이상의 것을 사용한다.

4.1.5 아세토나이트릴

아세토나이트릴(acetonitrile, C_2H_3N, 분자량 : 41.05)은 특급 이상의 것을 사용한다.

4.1.6 아세트산

아세트산(acetic acid, CH_3COOH, 분자량 : 60.05)은 특급 이상의 것을 사용한다.

4.2 표준용액

4.2.1 말라카이트 그린 표준원액(1,000 mg/L)

50 mL 부피플라스크에 말라카이트 그린(malachite green, $C_{23}H_{25}ClN_2$, 분자량 : 364.92) 50 mg을 정확히 취하여 메테인올에 녹여 표시선까지 채우고 갈색병에 넣어 4 ℃에 보관한다.

4.2.2 말라카이트 그린 옥살레이트 표준원액(1,000 mg/L)

50 mL 부피플라스크에 말라카이트 그린 옥살레이트(malachite green oxalate, $C_{48}H_{50}N_4O_4$, 분자량 : 746.94) 50 mg을 정확히 취하여 메테인올에 녹여 표시선까지 채우고 갈색병에 넣어 4 ℃에 보관한다.

4.2.3 말라카이트 그린 표준용액(200 mg/L)

50 mL 부피플라스크에 말라카이트 그린 표준원액(1,000 mg/L) 10 mL를 취해 메테인올로 정확히 표시선 까지 채운다. 이 용액 1 mL는 말라카이트 그린 0.2 mg을 함유한다. 이 용액은 6주 이내에 사용한다.

4.2.4 말라카이트 그린 옥살레이트 표준용액(200 mg/L)

50 mL 부피플라스크에 말라카이트 그린 옥살레이트 표준용액(1,000 mg/L) 10 mL를

취해 메테인올로 정확히 표시선까지 채운다. 이 용액 1 mL는 말라카이트 그린 0.2 mg을 함유한다. 이 용액은 6주 이내에 사용한다.

4.2.5 말라카이트 그린류 혼합 표준용액(100 ㎎/L)

100 mL 부피플라스크에 말라카이트 그린 표준용액 (200 mg/L) 및 말라카이트 그린 옥살레이트 표준용액 (200 mg/L)을 각각 1:1로 취하여 혼합한다. 이 용액 1 mL는 말라카이트 그린 0.1 mg을 함유한다. 이 용액은 6주 이내에 사용한다.

5.0 시료채취 및 관리

5.1 시료 채취 시 접촉면이 테프론으로 처리된 마개 또는 격막을 가진 유리병에 공간이 없도록 채취하여 밀봉한다.

5.2 모든 시료는 시료채취 후 추출하기 전까지 4 ℃ 냉암소에서 보관하고, 채취 후 7일 이내에 추출하고 14일 이내에 분석해야한다.

6.0 정도보증/정도관리 (QA/QC)

6.1 방법검출한계 및 정량한계

6.1.1 방법검출한계 및 정량한계는 ES 08001 정도보증/정도관리에 따라 계산한다. 정제수에 각각의 표준용액을 5 mg/L가 되도록 첨가한 7개의 첨가시료를 준비하여 7.0 분석절차와 동일하게 추출하여, 표준편차를 구한다.

6.1.2 표준편차에 3.14를 곱한 값을 방법검출한계로, 10을 곱한 값을 정량한계로 나타낸다. 측정한 정량한계는 5 mg/L 이하의 값이어야 한다.

6.2 방법바탕시료의 측정

ES 08001 정도보증/정도관리에 따라 시료군마다 1개의 방법바탕시료를 측정한다. 방법바탕시료는 말라카이드 그린이 없는 것으로 확인된 염료 및 소독제를 사용하여 7.0

분석절차와 동일하게 전처리·측정하며 측정값은 방법검출한계 이하이어야 한다.

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

6.3.1 검정곡선은 검정곡선 작성 농도 범위 내의 5개 이상의 농도에 대해 작성하고 얻어진 검정곡선의 결정계수(R^2)가 0.98 이상 또는 결정계수의 상대표준편차가 15 % 이내이어야 하며 결정계수나 상대표준편차가 허용범위를 벗어나면 재작성 하도록 한다.

6.3.2 검정곡선의 직선성을 검증하기 위하여 검정곡선을 작성할 때에는 검정곡선 작성 농도 범위를 1 mg/L ~ 50 mg/L로 한다. 만약 측정값이 이 농도범위를 벗어날 경우에는 시료를 묽히거나 농축하여 다시 분석한다.

6.4 정밀도 및 정확도

6.4.1 정확도 및 정밀도의 측정은 ES 08001 정도보증/정도관리에 따른다. 정제수에 정량한계 농도의 10 배가 되도록 동일하게 표준물질을 첨가한 시료를 4개 이상 준비하여, 7.0항의 절차와 동일하게 측정하여 평균값과 표준편차를 구한다.

6.4.2 정확도는 인증시료를 확보할 수 있는 경우 인증표준물질을 분석한 결과값(C_M)과 인증값(C_c)과의 상대백분율로 나타내고, 인증시료를 확보할 수 없는 경우 이를 정확한 농도로 첨가한 시료로 대체한다. 이 때 정확도는 첨가시료를 분석한 농도(C_{AM})와 첨가하지 않은 시료를 분석한 농도(C_s)와의 차이에 대한 첨가농도(C_A)의 상대 백분율로서 나타내며 그 값의 80 % ~ 120 % 이내이어야 한다.

$$\text{정확도} = \frac{C_M}{C_C} \times 100\ \% = \frac{C_{AM} - C_S}{C_A} \times 100\ \% \qquad \text{(식 1)}$$

여기서, C_M : 인증표준물질을 분석한 농도(mg/L)

C_c : 인증농도(mg/L)

C_{AM} : 첨가시료를 분석한 농도(mg/L)

C_S : 첨가하지 않은 시료를 분석한 농도(mg/L)

C_A : 첨가농도(mg/L)

6.4.3 정밀도는 측정값의 %상대표준편차로 계산한 값이 20 % 이내이어야 한다.

$$\text{정밀도} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\ \% \qquad \text{(식 2)}$$

여기서, s : 표준 편차

$\bar{x}$: 평균

6.5 내부정도관리 주기 및 목표

6.5.1 방법검출한계, 정밀도·정확도 및 회수율의 측정은 연 1회 이상 측정하는 것을 원칙으로 하며 분석자의 교체, 분석 장비의 수리 및 이동 등의 주요 변동사항이 생길 경우에는 다시 실시한다. 단, 장비의 청소, 컬럼의 교체 시와 측정 장비의 감도가 의심될 때에는 언제든지 측정하여 확인한다.

6.5.2 검정곡선 검증 및 시약바탕시료의 분석은 각 시료군마다 실시하며, 고농도의 시료 다음에는 시약바탕시료를 측정하여 오염여부를 점검한다.

6.5.3 각 정도관리 항목에 대한 정도관리 목표 값은 표 2와 같다.

7.0 분석절차

7.1 시료전처리

7.1.1 액체 시료의 경우, 균질화된 시료 1 g을 정확히 100 mL 부피플라스크에 취하고 정제수로 눈금까지 채운 다음 혼합한다.

7.1.2 고체의 경우, 균질화된 시료 1 g을 정확히 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣고 소량의 메테인올이나 정제수로 녹인 후, 정제수로 눈금까지 채운 다음 혼합한다.

7.1.3 시료의 pH를 묽은 아세트산 또는 묽은 암모니아수를 적당량 가하여 pH가 4.0 ~ 6.5가 되도록 조절한다.

7.1.4 pH 조절된 시료 2 mL를 취하여 250 mL 분액깔대기에 넣고 정제수 50 mL와 디클로로메테인 50 mL를 가하여 5분간 흔들어 혼합한 후 정치하여 층을 분리시키고, 디클로로메테인층(하층)을 취한다.

7.1.5 상층액에 다시 디클로메테인 30 mL를 가하여 5분 동안 세차게 흔들어 혼합하고 층을 분리한 후, 디클로로메테인층(하층)을 취하여 7.1.4의 디클로로메테인층 용액과 합한다.

7.1.6 모아진 디클로로메테인층 용액을 40 ℃ 수욕 상에서 감압 농축한 후, 메테인올 2 mL에 녹여 0.20 μm 멤브레인 필터로 여과한 후 이를 시험용액으로 한다.

7.2 검정곡선의 작성

7.2.1 100 mL 부피플라스크에 말라카이트 그린류 혼합표준용액(100 mg/L)을 0, 5, 10, 25, 50 mg/L의 농도가 되도록 단계적으로 조제한다.

7.2.2 이하 실험방법은 7.1.3에 따른다.

7.2.3 말라카이트 그린의 농도(mg/L)를 가로축(x 축)에(시료 중의 농도로 계산), 말라카이트 그린에 해당하는 피크 면적을 세로축(y 축)에 취하여 검정곡선을 작성한다.

7.3 측정법

7.3.1 추출액 10 μL를 취하여 0.2 μm 나일론 시린지 필터를 이용해 필터한 후, 액체크로마토그래피에 주입하여 분석한다.

7.3.2 액체크로마토그래피로부터 얻은 크로마토그램에서 말라카이트 그린의 머무름 시간에 해당하는 위치의 피크로부터 피크 면적을 구한다.

8.0 결과보고

8.1 계산

8.1.1 말라카이트 그린 피크의 면적(Ax)을 구한다음 검정곡선식의 y(i)값에 대입하여 x(i)값을 계산하면 분석물질의 농도(Cs, mg/L)를 구할 수 있다.

$$Cs = \frac{A_X - b}{a} (mg/L) \quad \text{(식 3)}$$

여기서, C_s : 말라카이트 그린 농도(mg/L)

A_X : 말라카이트 그린 피크 면적

a : 검정곡선의 기울기

b : 검정곡선의 절편 값

8.2. 결과의 표시

8.2.1 시험결과는 정량한계와 같은 자릿수까지 표기하며, 이하는 반올림한다.

8.2.2 모든 농도결과는 정량한계를 적용하여 나타내고 정량한계 미만은 불검출로 표시한다.

9.0 참고문헌

9.1 식약처, 식품공전, 말라카이트 그린(Malachite Green) 및 크리스탈 바이올렛(Crystal Violet)

9.2 G. Chen and S. Miao, HPLC Determination and MS Confirmation of Malachite Green, Gentian Violet, and Their Leuco Metabolite Residues in Channel Catfish Muscle, J. Agric. Food Chem, 58, 109 - 114, (2010).

9.3 M. J. M. Bueno, S. Herrera, A. Ucles, A. Aguera, M. D. Hernando, O. Shimelis, M. Rudolfsson, A. R. Fernandez-Alba, Determination of malachite green residues in fish using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography-inear ion trap mass spectrometry, Analytica Chimica Acta, 665, 47 - 4, (2010).

9.4 Y. Tao, D. Chen, X. Chao, H. Yu, P. Yuanhu, Z. Liu, L. Huang, Y. Wang and Z. Yuan, Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in shrimp and salmon by liquid chromatographyetandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and auto solid-phase clean-up, Food Control, 22, 1246 - 1252, (2011).

9.5 K. Mitrowska, A. Posyniak and J. Zmudzki, Determination of malachite green and leucomalachite green residues in water using liquid chromatography with visible and fluorescence detection and confirmation by tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1207, 94 -100, (2008).

9.6 A. Afkhami, R. Moosavi and T. Madrakian, Preconcentration and spectrophotometric determination of low concentrations of malachite green and leuco-malachite green in water samples by high performance solid phase extraction using maghemite nanoparticles, Talanta 82, 785 - 89, (2010).

10.0 부록

표 1. 말라카이트 그린의 고성능액체크로마토그래피 분석조건

항목	조건
컬럼 이동상 유속 자외선 검출파장 형광 검출파장 (여기파장/검출파장) 주입량 오븐 온도	C_{18}(4.6 mm I.D.×150 mm) 또는 이와 동등한 것 A : 0.1% 1-hexanesulfonic acid를 함유하는 0.05M acetic acid와 0.05M sodium acetate 혼합액 B : 아세토나이트릴 1 mL/분 620 nm 265 nm/360 nm 5 µL 30 ℃

표 2. 정도관리 목표 값

정도관리 항목	정도관리 목표
정량한계 방법검출한계 검정곡선 정밀도 정확도	6 mg/L 2 mg/L 결정계수(R^2) ≥ 0.98 또는 감응계수(RF)의 상대표준편차 ≤15 % 이내 상대표준편차 ± 20 % 이내 80 % ~ 120 %

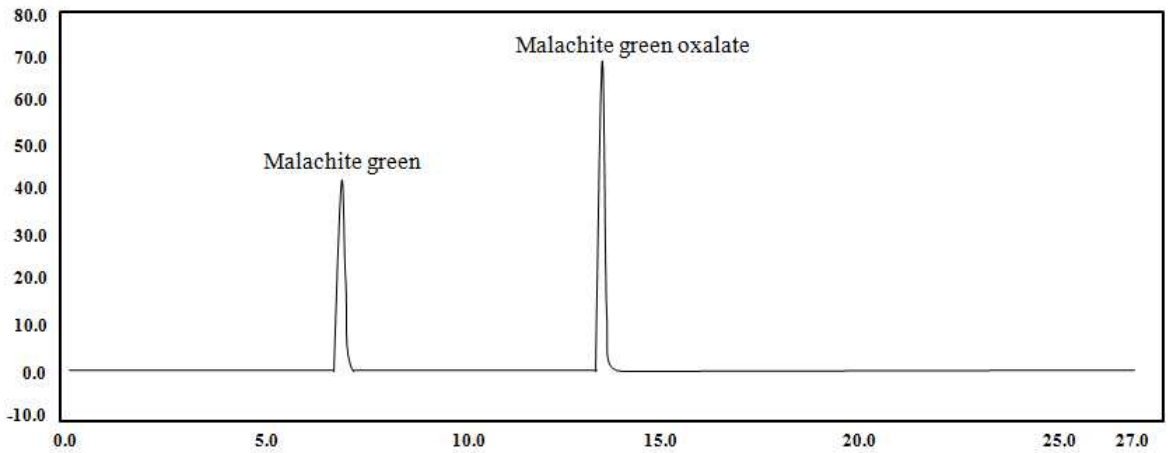


그림 1. 말라카이트 그린류 혼합표준용액(10 mg/L)의 크로마토그램