

Agilent 1290/6545 UHPLC-Q-TOF 시스템의 All Ions MS/MS를 이용한 육류 내 122종 동물용 의약품 분석

응용 자료

저자

Tarun Anumol, Joan Stevens,
Dan-Hui Dorothy Yang,
Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies Inc.,
Wilmington, DE

개요

육류에 함유된 동물용 의약품(VD) 섭취는 인체 건강에 해로울 수 있으므로 규제 시행 및 건강 위해성 평가 차원에서 잔류 VD 모니터링을 일반적으로 수행합니다. 매우 상이한 화학적 특성을 띠는 수백 종의 VD가 다수의 계열에 걸쳐 존재합니다. 이것은 일반적으로 분석법과 LC-MS/MS 기반의 정교한 기기, 수준 높은 워크플로 그리고 (흔히) 지루한 데이터 처리 과정을 필요로 합니다. 이 연구에서는 육류 내 122종 우선적 VD를 분석하기 위해 12분이 소요되는 분석법을 개발하였습니다. 해당 분석법을 시험하기 위해 Agilent 동물용 의약품 개별 화합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL)와 함께 Agilent Q-TOF LC/MS 기기에서 Agilent All Ions MS/MS를 사용하였습니다. 모든 122종의 VD를 소의 간, 신장, 근육 조직에 첨가하였으며, 이 때 농도는 각 약품 최대 허용 농도의 0.5, 1, 2배 농도였습니다. 그 다음 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS에서 All Ions 데이터 수집 모드를 사용해 첨가 약품 시료를 분석하였습니다. 이러한 화합물을 검출하고 존재를 입증하는데에는 Agilent MassHunter Find by Formula 소프트웨어를 사용하였습니다. PCDL은 각 화합물의 MS/MS 스펙트럼 및 머무름 시간 정보를 제공하여 데이터 검토 절차에서 신속하고 확실하게 위양성(false positive) 결과를 걸러낼 수 있도록 합니다. 세 가지 첨가 농도 전체에 대해 모든 매트릭스에서 92% 이상의 VD를 검출하였습니다. 이 시스템의 정량 결과 도출 성능을 입증하기 위해 간(ground) 쇠고기와 간(liver)에 대해 낮은 ng/g 농도로 시작하는 검량선을 생성하였습니다. 이 분석법은 어떠한 내부 표준물질 보정없이 $R^2 > 0.99$ 인 85% 이상의 VD 결과와 함께 한 번의 분석만으로 동물 매트릭스 내 VD를 스크리닝하고 정량할 수 있습니다.



Agilent Technologies

소개

식용으로 사용하는 가축의 질병을 예방하거나 성장을 촉진하는 동물용 의약품(VD)은 통제 하에 사용되어야 합니다. 하지만 가축에 사용되는 약품의 미흡한 관리와 부적절한 투여로 인해 섭취 시 인체 건강에 해로울 수 있는 잔류 약품이 육류 및 기타 장기에 존재할 수 있습니다. 농산물에 사용되는 항생제는 항생제 내성이라는 또 다른 문제를 야기합니다. 따라서 의약품마다 현저하게 다른 최대 잔류 수준(MRL) 또는 허용 농도(tolerance level)에 따라 육류 및 기타 식품의 VD 농도를 규제하고 있습니다[1~3]. 가축에 사용되는 것으로 알려진 VD는 수백 가지에 달하고 종류, 화학적 구조 및 극성에 따라 크게 달라 동일한 분석법으로 처리하기가 어렵습니다. 게다가 MRL은 낮은 경우가 빈번하고 복잡한 매트릭스에서 분석해야 하므로 감도가 뛰어나고 견고한 분석 장비가 필요합니다[4,5].

LC/MS 기술은 여러 계열의 다성분 잔류 분석법을 통해 뛰어난 감도와 선택성을 제공할 뿐만 아니라 시간과 노동력, 비용도 절감해 줍니다[2,6]. 하지만 accurate mass 고분해능 Time-of-Flight(TOF) 질량 분석기를 활용하면 몇 가지 특별한 추가 기능을 사용할 수 있습니다. 전체 스펙트럼 데이터 수집을 적용하면 시료에서 이온화하는 모든 화합물의 신호를 포착할 수 있습니다. 따라서 분석법을 개발할 필요 없이 이 기술을 활용하는 간접 계획을 확장시켜 새로운 우려 화합물을 수용할 수 있습니다. 또한 시료를 재분석하지 않고 새 분석물질의 소급적 데이터 마이닝을 수행할 수 있습니다. 게다가 TOF 스펙트럼을 사용하면 분석 표준물질이 없을 수 있는 새로운 VD와 대사체를 검출하고 해석할 수 있습니다.

이 연구에서는 다양한 계열별로 일상적으로 모니터링되는 120종 이상의 VD에 대한 빠른 스크리닝 분석법을 개발하고자 하였습니다. 분석 VD 목록은 미국 농무부의 농업연구청(USDA-ARS) 및 식품안전검사국(USDA-FSIS)에서 이전에 수행한 연구를 기반으로 하였습니다[2,7]. Agilent Q-TOF LC/MS에서 All Ions MS/MS 수집을 실행하여 소근육, 신장 및 간의 VD를 분석하였습니다. 이러한 데이터 수집 모드로 분자 이온(저에너지 채널) 및 조각 이온(고에너지 채널)에 대한 고분해능의 accurate mass 스펙트럼을 얻을 수 있습니다.

그런 다음 Agilent PCDL의 MS/MS 스펙트럼을 사용하여 분자 이온 및 해당 조각 이온이 시료의 이온과 일치하는지 확인하였습니다. 또한 이 연구에서는 상용화된 Agilent QuEChERS Enhanced Matrix Removal(EMR-Lipid)을 통해 육류 추출액을 cleanup 하였습니다. 이 방법은 고지방 식품의 지질을 효과적이고 선택적으로 제거하는 것으로 이미 확인된 바 있습니다.

이 종합적인 분석법의 정량 성능은 ng/g 농도에서 간(ground) 쇠고기 및 간(liver)의 매트릭스 일치 검량선을 생성하여 평가하였습니다.

실험

표준물질 및 시약

상당수의 동물용 의약품 표준물질은 214~1,200mg/L의 Acetonitrile(MeCN), methanol 및 수용액 또는 이들을 조합한 용액으로 USDA-ARS 동부 지역 연구 센터(Wyndmoor, PA)를 통해 입수하였으며, Abamectin, Ivermectin, Thiouracil 및 베타-락탐계열 항생물질(Amoxicillin, Ampicillin, Cefazolin, Desacetyl Cephapirin, Cloxacillin, Nafcillin, Oxacillin, Penicillin)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 구매하였습니다. 18.2 MW-cm이상의 초순수는 Millipore(Billerica, MA) 시스템을 통해 얻었습니다. MeCN(LC-MS 등급)은 VWR International(Radnor, PA)로부터 구매하였고 Formic acid(88% 이중 종류)는 GFS Chemicals(Powell, OH)로부터 구매하였습니다.

시료 추출

미리 균질화한 소 근육, 간 및 신장 시료(각 2g)를 122종의 VD 및 미리 선정해 둔 2개의 내부 표준물질(Flunixin-d₃ 및 Sulfamethazine-¹³C₆)에 첨가하였습니다[2]. 모든 3 개 매트릭스의 첨가 농도는 USDA 허용 농도(배, 표 1에 표시)의 0.5배, 1배, 2배로 하였습니다. 이전 응용 자료(5991-6096EN)에 서술된 바와 같이 Agilent Bond Elut EMR-Lipid 절차를 사용하여 시료 전처리를 수행하였습니다[8]. 최종 추출액은 물과 MeCN(80:20)로 희석하여 2mL의 Polypropylene 자동 시료 주입기 바이알에 보관한 후에 LC/MS에 주입하였습니다. 첨가 용액을 0.5, 1 및 2배 농도로 용매와 바탕(blank) 매트릭스 추출액에 추가하여(추출 후) 기기 및 분석법 성능, 매트릭스 효과를 평가하였습니다. 모든 추출액은 -10°C의 온도로 냉동 보관하고 시료 전처리 2주 후에 분석하였습니다.

표 1. PCDL에서 모니터링되는 동물용 의약품 및 허용 농도

동물용 의약품	계열	1배 허용 농도(ng/g)	동물용 의약품	계열	1배 허용치 농도(ng/g)
2-Amino Flubendazole	구충제	10	Doxycycline	테트라사이클린계	100
2-Amino Mebendazole	구충제	10	Emamectin	구충제	10
2-Hydroxy Dimetridazole	항 콕시듬제	50	Enrofloxacin	플루오로퀴놀론계	100
2-Mercaptobenzimidazole	항 갑상선제	25	Eprinomectin B1a	구충제	100
2-Thiouracil	항 갑상선제	400	Erythromycin A	마크로라이드계/ 린코사마이드계	100
5-Hydroxy thiabendazole	구충제	100	Fenbendazole	구충제	400
6-Methylthiouracil	항 갑상선제	400	Fenbendazole sulphone	구충제	400
6-Phenylthiouracil	항 갑상선제	400	Florfenicol	페니콜계	300
6-Propyl-2-thiouracil	항 갑상선제	50	Florfenicol amine	페니콜계	300
Abamectin	구충제	20	Flubendazole	구충제	10
Acetopromazine	진정제	10	Flunixin	소염제	25
Albendazole	구충제	50	Flunixin-d3	내부 표준물질	250
Albendazole sulfoxide	구충제	50	Gamithromycin	마크로라이드계/ 린코사마이드계	100
Albendazole sulphone	구충제	50	Haloperidol	진정제	10
Albendazole-2-amino sulphone	구충제	50	Haloxon	구충제	100
Amoxicillin	베타-락탐계	10	Hydroxy-Ipronidazole	항 콕시듬제	10
Ampicillin	베타-락탐계	10	Ipronidazole	항 콕시듬제	10
Azaperone	진정제	10	Ivermectin B1a	구충제	10
Bacitracin	기타	500	Ketoprofen	소염제	10
Betamethasone	소염제	100	Levamisole	구충제	100
Cambendazole	구충제	10	Lincomycin	마크로라이드계/ 린코사마이드계	100
Carazolol	진정제	10	Mebendazole	구충제	10
Carbadox	기타	30	Melengesterol acetate	기타	25
Cefazolin	베타-락탐계	100	Meloxicam	소염제	100
Cephapirin	베타-락탐계	100	Metronidazole	항 콕시듬제	10
Chloramphenicol	페니콜계	10	Morantel	구충제	100
Chlorpromazine(Thorazine)	진정제	10	Moxidectin	구충제	50
Chlortetracycline	테트라사이클린계	1,000	Nafcillin	베타-락탐계	100
Cimaterol	베타-아고니스트계	10	Norfloxacin	플루오로퀴놀론계	50
Ciprofloxacin	플루오로퀴놀론계	50	Novobiocin	기타	1,000
Clenbuterol	베타-아고니스트계	10	Orbifloxacin	플루오로퀴놀론계	50
Clindamycin	마크로라이드계/ 린코사마이드계	100	Oxacillin	베타-락탐계	100
Cloxacillin	베타-락탐계	10	Oxfendazole	구충제	800
Danofloxacin	플루오로퀴놀론계	200	Oxibendazole	구충제	10
DCCD(Ceftiofur용 마커)	베타-락탐계	400	Oxyphenylbutazone	소염제	100
Desacetyl cephapirin	베타-락탐계	100	Oxytetracycline	테트라사이클린계	1000
Desethylene ciprofloxacin	플루오로퀴놀론계	100	Penicillin G	베타-락탐계	50
Diclofenac	소염제	200	Phenylbutazone	소염제	100
Dicloxacillin	베타-락탐계	100	Pirlimycin	마크로라이드계/ 린코사마이드계	300
Difloxacin	플루오로퀴놀론계	50	Prednisone	소염제	100
Dimetridazole	항 콕시듬제	10	Promethazine	진정제	10
Dipyrone(Metabolite)	소염제	200	Propionylpromazine	진정제	10
Doramectin	구충제	30	Quinoxaline-2-carboxylic acid	기타	30

동물용 의약품	계열	1배 허용치 농도(ng/g)
Ractopamine	베타-아고니스트계	30
Ronidazole	항 콕시듐제	10
Salbutamol	베타-아고니스트계	10
Sarafloxacin	플루오로퀴놀론계	50
Selamectin	구충제	200
Sulfabromomethazine	설폰아미드계	100
Sulfachloropyridazine	설폰아미드계	100
Sulfadiazine	설폰아미드계	100
Sulfadimethoxine	설폰아미드계	100
Sulfadoxine	설폰아미드계	100
Sulfaethoxypyridazine	설폰아미드계	100
Sulfamerazine	설폰아미드계	100
Sulfamethazine	설폰아미드계	100
Sulfamethazine- ¹³ C ₆	내부 표준물질	250
Sulfamethizole	설폰아미드계	100
Sulfamethoxazole	설폰아미드계	100
Sulfamethoxypyridazine	설폰아미드계	100
Sulfanilamide	설폰아미드계	100
Sulfanitran	설폰아미드계	100
Sulfapyridine	설폰아미드계	100
Sulfaquinoxaline	설폰아미드계	100
Sulfathiazole	설폰아미드계	100
Tetracycline	테트라사이클린계	1,000
Thiabendazole	구충제	100
Thiamphenicol	페니콜계	10
Tildipirosin	마크로라이드계/ 린코사마이드계	100
Tilmicosin	마크로라이드계/ 린코사마이드계	100
Tolfenamic acid	소염제	200
Triclabendazole	구충제	50
Triclabendazole sulfoxide	구충제	50
Triflupromazine	진정제	10
Troleandomycin	마크로라이드계/ 린코사마이드계	1,000
Tulathromycin A	마크로라이드계/ 린코사마이드계	5,500
Tylosin	마크로라이드계/ 린코사마이드계	200
Virginiamycin	기타	100
Xylazine	진정제	10
Zeranol(b-Zearalanol)	기타	100
Zilpaterol	베타-아고니스트계	12

기기 분석

이 분석법에는 40 μ L 루프 고성능 자동 시료 주입기가 장착된 Agilent 1290 Infinity 초고성능 액체 크로마토그래프(UHPLC)를 사용하였습니다. 분리는 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18(2.1 × 150mm, 1.8 μ m) 컬럼에서 물과 0.1% Formic acid(A) 및 MeCN과 0.1% Formic acid(B)의 그레디언트를 사용하였습니다. 컬럼 수명을 보호하고 늘리기 위해 자동 시료 주입기 뒤에 Agilent 인라인 필터(p/n 5067-4638)를 설치하고, 분석 컬럼 앞에 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 가드 컬럼(p/n 959757-902)을 사용하였습니다. 이 분석에 사용한 LC 조건이 표 2에 나와 있습니다. 그림 1은 물과 MeCN(80:20) 용액으로 제조한 50ng/mL의 VD 표준물질 시료 크로마토그램을 보여줍니다.

표 2. LC 조건

파라미터	값	
기기	Agilent 1290 Infinity LC	
컬럼	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 150mm, 1.8 μ m(p/n 959759-902)	
이동상	A) 물 + 0.1% Formic acid B) Acetonitrile + 0.1% Formic acid	
그레디언트	시간(분) B(%)	
	0.0 2	
	1.0 2	
	10 100	
	11 100	
	11.1 2	
유속	0.5mL/분	
사후 시간	3.0분	
컬럼 온도	30°C	
주입량	15 μ L	

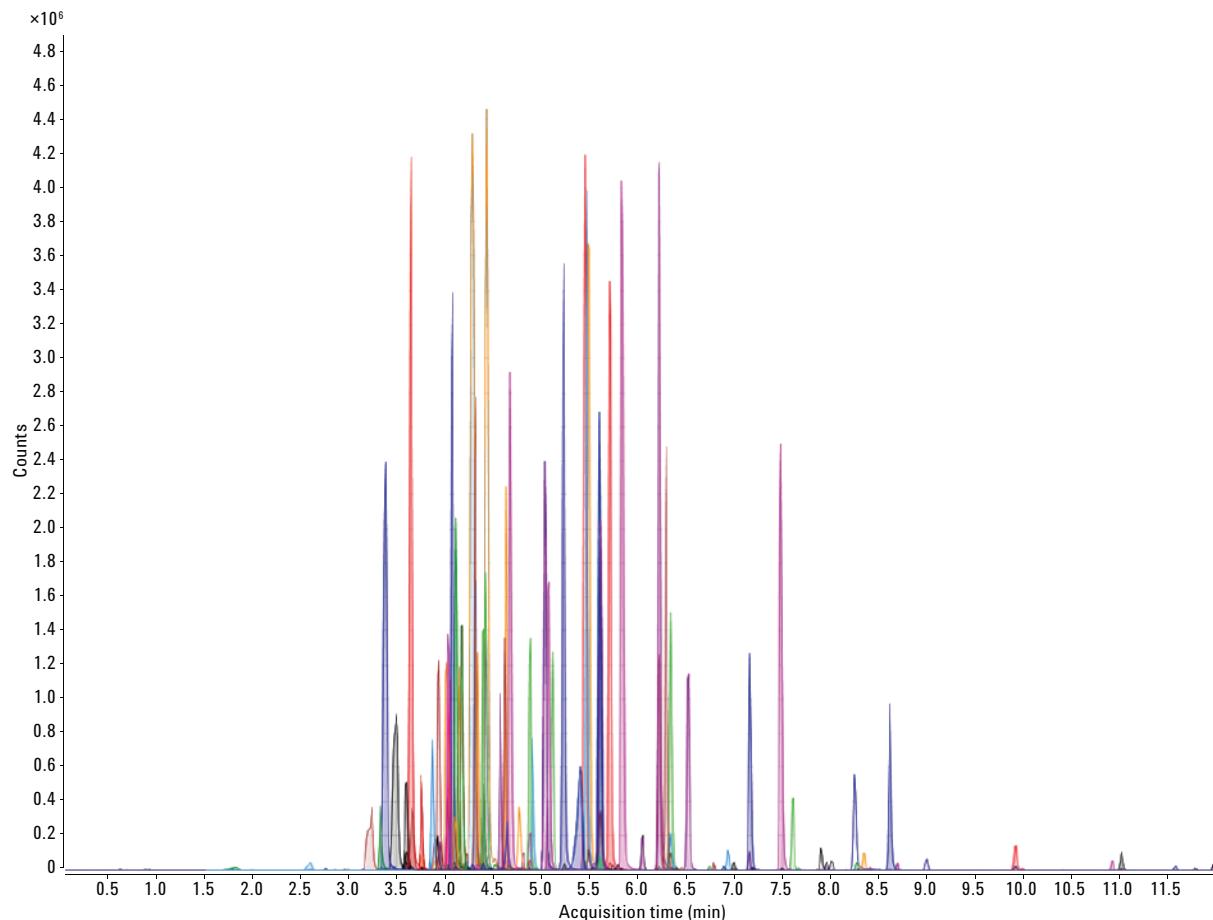


그림 1. 122가지 동물용 의약품에 대한 50ng/g에서의 시료 크로마토그램

본 분석에서는 Agilent 6545 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight LC/MS 시스템과 양이온 모드에서 작동하는 Agilent Jet Stream 이중 전자 분무 이온화원을 사용하여 분석을 수행하였습니다. 질량 분석기 운용 조건은 표 3에 자세히 나와 있습니다. Agilent 투닝 솔루션 (p/n G1969-85000)을 사용하여 전체 질량 범위에 대해 6545 Q-TOF LC/MS를 투닝하였습니다. 6545 Q-TOF LC/MS의 SWARM 투닝 기능을 사용하여 2GHz의 확장된 측정 범위에서 m/z 50~750의 질량 범위로 Fragile Ion 투닝을 함께 진행하였습니다. 분석 중 Purine(m/z 122.0509) 및 HP-921(m/z 922.0098)로 구성된 참조 이온을 질량 분석기의 참조 용기 A로부터 질량 분석기로 전달하였습니다.

표 3. 질량 분석기 조건

파라미터	값
기기	Agilent 6545 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS
이온화 모드	Jet Stream을 사용한 양이온 전기분무 이온화
기기 모드	2GHz의 확장된 측정 범위(dynamic range)
기기 투닝 범위	SWARM 투닝(Fragile Ion m/z 50~750 선택)
질량 범위	m/z 50~1,000
건조 가스 온도	200°C
건조 가스 유속	11L/분
Sheath 가스 온도	375°C
Sheath 가스 유속	11L/분
분무 가스	35psi
Fragmentor	135V
캐필러리	3,500
노즐 전압	300V
스키머	45
총돌 에너지	0, 10, 40V

All Ions MS/MS 워크플로 및 데이터 분석

All Ions MS/MS 워크플로는 (A) 낮은 충돌 에너지(CE) 채널에서의 유사 분자 이온 또는 전구 이온 데이터 및 (B) 높은 CE 채널에서의 조각 이온 정보를 수집함으로써 즉, 높고 낮은 CE 채널 각각에서 고분해능 MS 데이터를 동시에 획득하도록 설계되었습니다. 이 실험에서는 기기를 0, 10 및 40V의 CE로 설정하였습니다. 전구체 정보를 얻는 데에는 0V로 설정한 반면, 대부분의 VD에 대해서 좋은 조각 이온 정보를 얻는 데에는 10V로 충분하였습니다. 그러나 Mectin류와 같이 크기가 상대적으로 큰 일부 VD의 경우 전구 이온을 조각화하기 위해 더 높은 CE가 필요하기 때문에 40V 채널 또한 사용하여 세 번째 데이터 채널을 수집하였습니다.

Agilent MassHunter 소프트웨어(버전 B.06.01)를 사용하여 데이터 수집을 수행하였으며, Agilent MassHunter Qualitative 소프트웨어(버전 B.07.00)를 데이터 분석에 사용하였습니다. 데이터베이스 검색 기능과 함께 MassHunter Qualitative Analysis의 Find by Formula 기능을 사용하여 PCDL 정보를 활용하였습니다. PCDL은 본 연구에 필요한 모든 VD로 구성되어 있었으며, 분자식, 정확한 단일 동위원소 질량, CAS 번호, 0, 10, 20 및 40V에서 수집된 $[M+H]^+$ 이온의 MS/MS 스펙트럼과 이미 개발된 LC 분석법에 표준물질을 분석하여 얻은 머무름 시간 정보를 포함하고 있었습니다. 이것은 식별 특이성을 크게 증가시켰습니다. 그림 2는 본 연구에서 VD 분석에 사용된 All Ions MS/MS 워크플로를 데이터 처리 필터를 포함하여 보여줍니다.

결과 및 토의

육류 내 VD의 식별

All Ions MS/MS 워크플로는 전구 질량을 식별하고 Agilent PCDL에 존재하는 스펙트럼 데이터를 사용하여 높은 충돌 에너지 채널의 동시 용리 조각을 찾아냅니다. 고효율 시나리오에서 어떻게 이러한 데이터를 검토할 수 있는지 알아보기 전에, 그림 3은 MassHunter Qualitative에서 All Ions MS/MS 접근으로 결과를 자동 확인하는 데 사용되는 데이터 구성 요소를 보여줍니다. 삽도 3A는 1배 허용 농도에서 식별된 소 근육 내 novobiocin의 질량 스펙트럼을 나타내며, 빨간색 상자 안의 예상 동위원소 존재비 및 간격이 실제 데이터(빨간색 수직 막대)와 일치하고 있습니다. 질량 정확도, 동위원소 간격, 동위원소 존재비 및 머무름 시간(RT)과 PCDL의 매칭 점수는 총 98.41점으로 확인되었습니다. 그림 3B의 삽도는 Agilent PCDL에 있는 10V CE의 novobiocin에 대한 MS/MS 스펙트럼으로, $[M+H]^+$ 전구 이온(I) 및 가장 존재비가 높은 조각 이온 3개(II, III, IV)를 표시하였습니다. 그림 3C는 4가지 이온에 대해 일치하는 RT에서 근육 시료에 나타나는 실제 크로마토그래피 피크를 보여줍니다. 조각 II(m/z 189.0910) 및 III(m/z 218.1023)은 적격성이 검증되었지만 IV(m/z 396.1442)의 S/N은 9.0미만이었기 때문에 추가 검증에 포함하지 않았습니다(데이터 분석법에 설정된 S/N 임계값에 기반함: 그림 2 참고). MassHunter Qualitative에서 동시 용리 점수 및 플롯을 통해 조각 데이터를 평가하였습니다.



그림 2. Agilent All Ions MS/MS 데이터 분석 워크플로

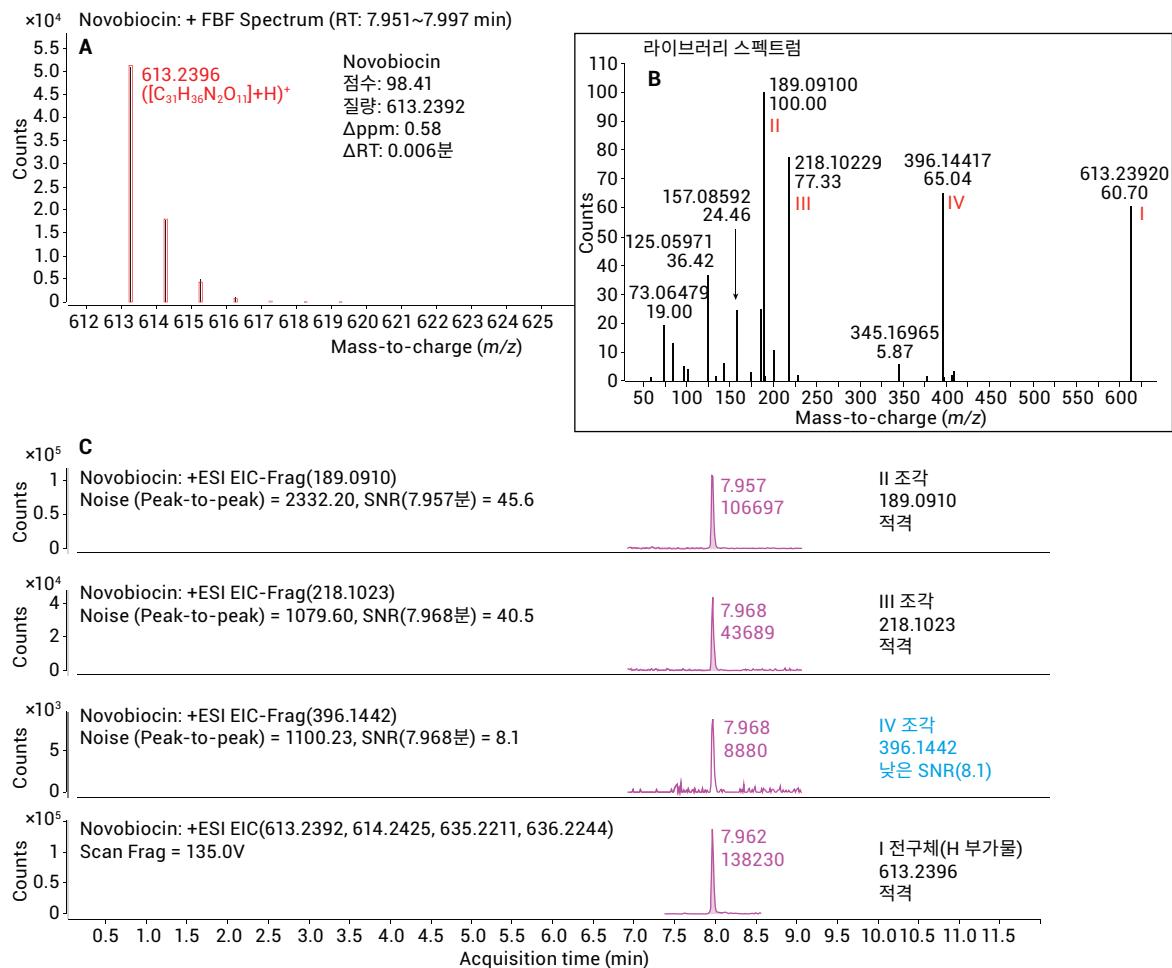


그림 3. A) 근육 내 novobiocin의 질량 스펙트럼 및 동위원소 간격. B) Novobiocin에 대한 Agilent PCDL의 라이브러리 스펙트럼(CE: 10eV)은 (C) 실제 시료 데이터와 비교하여 전구 이온(I) 및 가장 존재비 높은 조각 3개(II, III, IV)를 포함. 확실하게 식별된 화합물

그림 4A에는 소 균육 내 novobiocin에 대한 조각 이온 피크의 추출 이온크로마토그램(EIC)에 분자 이온 피크의 EIC가 오버레이된 플롯이 나타나 있습니다. 각 조각 이온의 동시 용리 점수(0~100범위의 값, 100이 가장 높은 점수)는 정규화 이후 용리 시간 범위에 걸친 참조 이온에 대한 강도의 비율에 근거하여 계산되었고, 참조 이온 피크의 시작과 끝 부분의 영향이 강조되지 않도록 가중치를 적용하였습니다. RT 변화, 서로 다른 피크 폭 또는 서로 다른 피크 대칭성(앞쪽 끌림, 테일링)이 모두 동시 용리 점수에 부정적인 영향을 미칠 수 있습니다. 그림 4B는 균육 시료 내 novobiocin의 이온 동시 용리 플롯을 보여줍니다. 동시 용리 플롯은 참조 이온의 용리 시간 범위 내에서 최대 강도에 대해 정규화하고 해당 시간 범위 내에서 강도 비율을 플롯으로 나타낸 후에 각 조각 이온의 크로마토그램을 참조 이온(LC/MS의 전구

이온)과 겹쳐서 준비하였습니다. 참조 이온 피크의 중심을 가로질러 1 또는 1에 근접한 강도 비율이 나타난다는 것은 조각 이온이 강한 동시 용리를 보임을 시사합니다. 해당 플롯은 조각 신호의 타당성에 대해 강력한 시각적 평가를 제공합니다.

관련 이온 동시 용리 점수는 또한 소프트웨어 내 검색 결과의 신뢰성을 생산적으로 검증할 수 있는 방법입니다. 뿐만 아니라 잠재적인 위양성(false positive)을 걸러내는데 도움이 되도록 임계값을 설정할 수 있습니다. 이 분석법에서는 데이터 분석에서 적어도 하나의 조각 이온이 90.0점 이상의 동시 용리 점수를 제공하도록 설정하였습니다. 그 결과, 그림 4와 같이 시료 내 novobiocin을 확실하게 식별하였습니다.

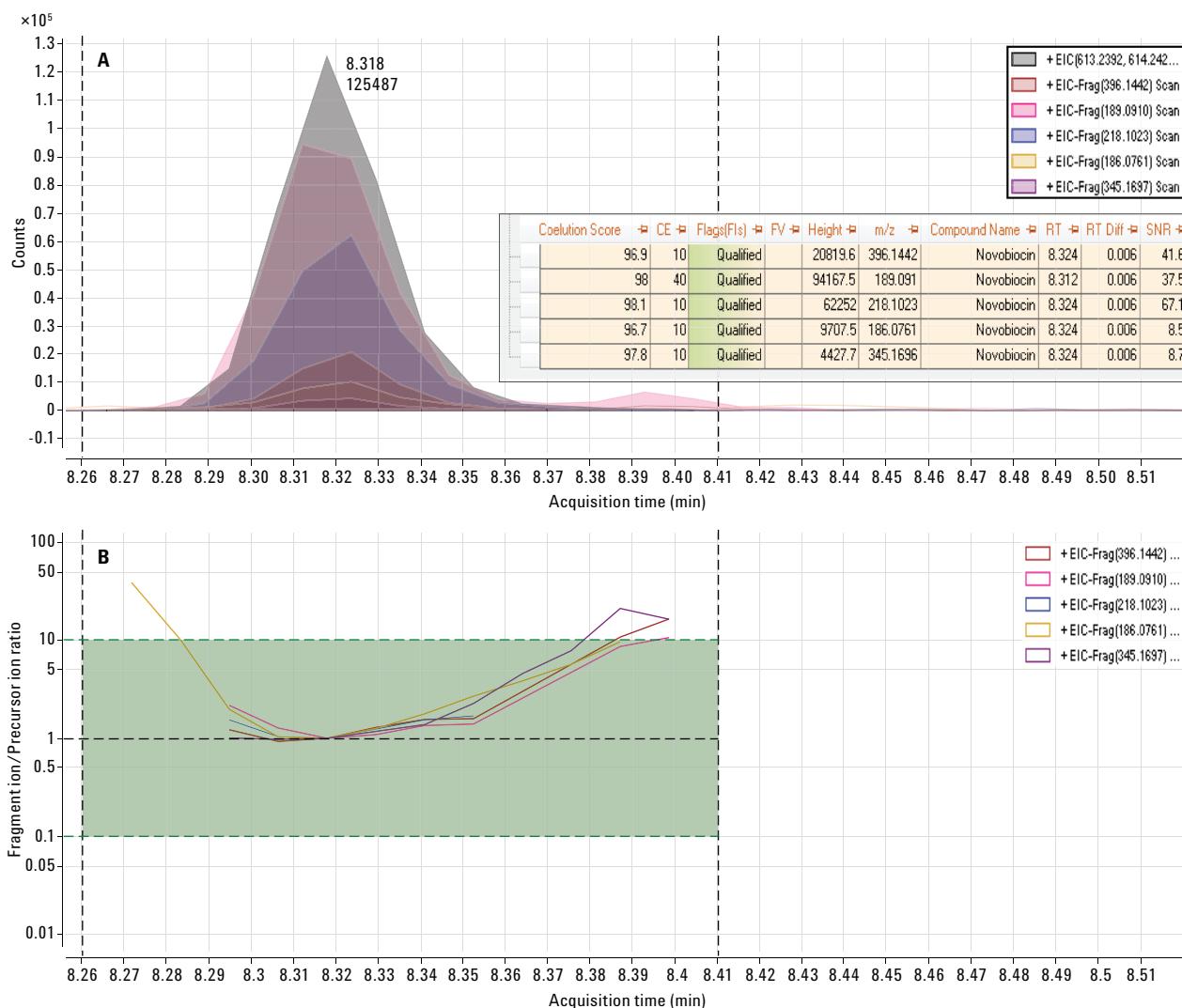


그림 4. A) 소 균육 내 novobiocin에 대한 전구 이온 및 조각 이온의 EIC. B) 머무름 시간에 따라 플롯에 표시한 정규화된 조각 이온 대 전구 이온 비율

위양성 감소

실제 시료에 존재하는 이성질체, 동중원소 화합물, 간섭 및 동시 용리하는 매트릭스 요소로 인해 전구 이온의 accurate mass를 측정하는 것만으로는 결정적인 화합물 식별을 이끌어낼 수 없는 경우가 종종 있습니다. 물론 위에 설명된 All Ions MS/MS 워크플로가 결정적인 화합물 식별을 달성할 수 있는 강력한 도구이지만, 가장 강력한 것은 RT 요구사항과 결합하는 것입니다. 그래서 이 연구에서 소개한 LC 분석법에 따른 RT를 포함하는 동물용 의약품 AMRT PCDL을 사용하였습니다. Agilent PCDL에 머무름 시간을 포함하는 고분해능 조각 이온 스펙트럼이 있는 경우에는 분석 표준물질을 지속적으로 주입할 필요 없이도 위양성 검출을 상당히 줄일 수 있습니다.

그림 5는 Agilent VD PCDL을 통해 사용 가능한 RT 매칭 및 조각 이온 검증을 이용하여 위양성을 방지한 예를 보여줍니다. 신장 추출액의 첨가 시료에서 4.088분과 6.015분에 플루오로퀴놀론계 항생제의 일종인 enrofloxacin이 검출되었습니다. 두 종 모두 enrofloxacin의 $[M+H]^+$ 이온 (360.1718) 대비 2.0ppm 미만의 질량오차를 나타냈으며, 5.0ppm의 엄격한 질량 허용 오차 구간 조건에서 조차 두 가지 모두 해당 화합물의 검출로서 특성화되었을 것입니다. 하지만 MassHunter Qualitative 소프트웨어에서 **verify with fragment ions** 옵션을 사용한 결과 6.015분 피크에서는 enrofloxacin에 대한 가장 높은 존재비의 조각 4개가 모두 나타나지 않은 반면 4.088분 피크에서 모든 이온 조각이 검출되었습니다.

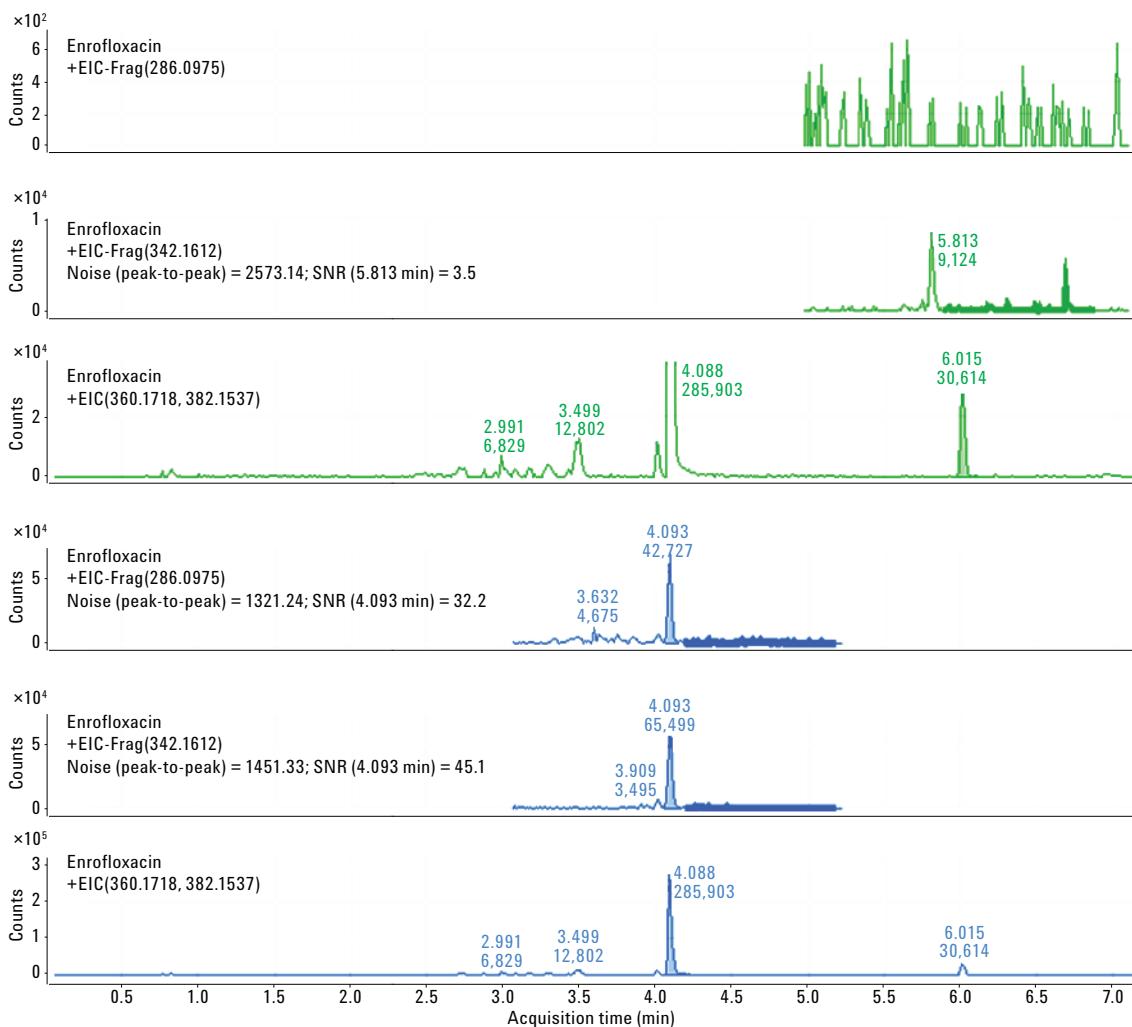


그림 5. Agilent All Ions 워크플로를 사용한 조각 이온 확인을 통해 식별된 enrofloxacin의 잠재적인 위양성(false positive)

이것은 앞서 설명한 것과 같이 머무름 시간 또한 강력한 검증 인자로서 PCDL에 포함하여 결과를 확인하는 데에도 사용되었음을 보여주었습니다. 이 화합물에 대한 RT 정보를 포함한 Agilent 동물용 의약품 PCDL을 사용하여 본 분석법에서 enrofloxacin 피크가 4.23분에 예상됨을 확인하였습니다. 이것은 MassHunter Qualitative 소프트웨어의 **Mass and Retention time** 기능에서 $RT \pm 0.2$ 분으로 설정하고 검증 이온을 선택하여 얻은 결과입니다. 따라서 분석할 때마다 모든 분석 표준물질을 주입할 필요가 없어졌기 때문에 100가지 이상의 화합물을 처리할 때 큰 이점으로 작용했습니다. 이것은 다른 실험실에서도 이 분석법 및 머무름 시간이 포함된 PCDL을 매우 쉽게 적용할 수 있으며, 비용 효율성이 뛰어나고 직관적으로 실행할 수 있음을 의미합니다.

소 신장, 간 및 근육 추출액 내 VD의 고감도 검출

VD는 분자량의 허용 오차 한도(< 10.0ppm) 이내에서, S/N 비율이 9.0이상, RT 0.2분 이내인 동시 용리 조각 이온이 하나 이상 존재하는 조건에 일치하는 물질이 있으면 검출된 것으로 분류하였습니다. 화합물은 전구 이온이 허용 오차 10.0ppm 이내이지만 RT가 0.2분 이상으로 벗어나거나 또는 조각 이온이 발견되지 않았거나 이온 동시 용리 점수가 90.0 미만인 경우 잠정적으로 식별된 것으로 특성화하였습니다. 그림 6은 3가지 스파이킹 농도에서의 3가지 모든 매트릭스와 바탕 시약에 대한 결과를 보여줍니다. 모든 시료에서 92% 이상의 VD를 확실하거나 잠정적으로 식별하였습니다. 표준물질의 경우에는 98%(2배), 96%(1배) 및 94%(0.5배)의 VD를 검출하였습니다. 매트릭스 첨가 시료에 따른 검출 범위는 간에서 94~96%, 근육에서 94~97% 그리고 신장에서 93~97%였습니다. 표준물질에서 확실하게 검출된 VD(조각 이온 및 RT 일치)는 3가지 첨가 농도에서 88~90%였습니다. 이와 유사하게, 매트릭스 시료에서도 81~88%(간), 82~88%(근육) 및 79~86%(신장)의 VD를 확실하게 식별하였습니다.

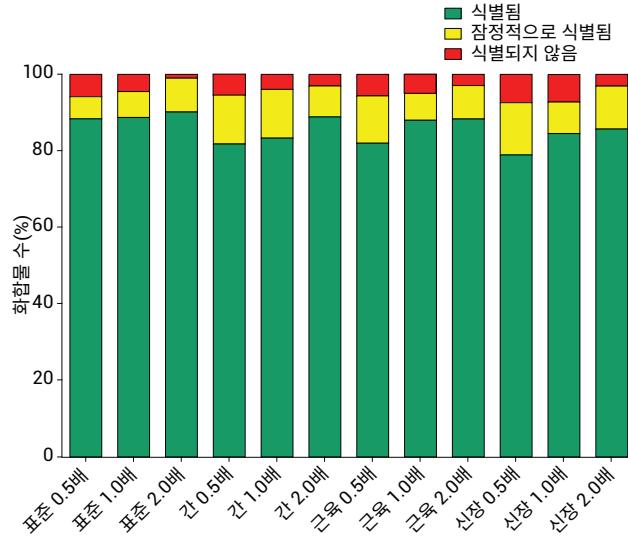


그림 6. 3가지 다른 농도의 바탕 시약 및 매트릭스에 첨가된 시료로부터 식별된 동물용 의약품의 비율(배: 허용 농도)

2가지 화합물(cephapirin 및 cimaterol)만이 모든 첨가 농도의 어떠한 시료 또는 표준물질에서도 검출되지 않았습니다. 표 4에는 일부 시료에서 식별되지 않은 몇 가지 화합물이 나와 있습니다. 표4에 정리된 9개 화합물에 대해서는 현재 분석법에 의한 분석 타당성을 확인하기 위해 몇 가지 추가 연구가 필요합니다. 모두는 아니지만 대부분의 경우 첨가 시료 및 일부 혼합물 용액으로만 구할 수 있는 표준물질 자체에서 변성이 일어난 결과일 가능성이 높습니다. 두 경우 모두 첨가 추출액과 표준물질을 제조하고 기기에 주입할 때까지 불가피하게 2주 정도의 시간 지연이 있었기 때문입니다. 다른 Agilent Q-TOF 기기에서 진행한 별도의 프로젝트에서는 동일한 분석법을 사용하여 이미 설명한 매트릭스에 대해 문제의 6종 베타-락탐계 성분 모두를 절반의 스파이킹 농도로 정확히 검출할 수 있었습니다. 이 경우 훨씬 더 신선한 시료와 표준물질을 사용했습니다. 위의 스크리닝 분석법을 사용하여 9종 화합물 모두 나머지 화합물처럼 허용 농도의 절반에서 검출 및 식별이 가능한지 확인하기 위한 추가 연구를 계획한 상태입니다.

표 4. 시료에서 식별되지 않은 VD의 목록

계열	표준 0.5배	표준 1.0배	표준 2.0배	간 0.5배	간 1.0배	간 2.0배
베타-아고니스트계	Cimaterol	Cimaterol	Cimaterol	Cimaterol	Cimaterol	Cimaterol
베타-락탐계	Cephapirin	Cephapirin	Cephapirin	Cephapirin	Cephapirin	Cephapirin
베타-락탐계	Cloxacillin	Cloxacillin	✓	Cloxacillin	Cloxacillin	Cloxacillin
베타-락탐계	Amoxicillin	Amoxicillin	✓	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin
베타-락탐계	Ampicillin	Ampicillin	✓	Ampicillin	Ampicillin	✓
베타-락탐계	Nafcillin	✓	✓	Nafcillin	✓	✓
베타-락탐계	Oxacillin	✓	✓	Oxacillin	✓	✓
기타 모든 화합물	✓	✓	✓	✓	✓	✓

계열	신장 0.5배	신장 1.0배	신장 2.0배	근육 0.5배	근육 1.0배	근육 2.0배
베타-아고니스트계	Cimaterol	Cimaterol	Cimaterol	Cimaterol	Cimaterol	Cimaterol
베타-락탐계	Cephapirin	Cephapirin	Cephapirin	Cephapirin	Cephapirin	Cephapirin
베타-락탐계	Cloxacillin	Cloxacillin	Cloxacillin	Cloxacillin	Cloxacillin	Cloxacillin
베타-락탐계	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin
베타-락탐계	Ampicillin	Ampicillin	✓	Ampicillin	Ampicillin	✓
베타-락탐계	Nafcillin	Nafcillin	✓	Nafcillin	✓	✓
베타-락탐계	Oxacillin	Oxacillin	✓	Oxacillin	✓	✓
기타.	Zeranol	Zeranol	✓	✓	Zeranol	✓
향 갑상선제	Propyl-thiouracil	Propyl-thiouracil	✓	✓	✓	✓
기타 모든 화합물	✓	✓	✓	✓	✓	✓

3가지 매트릭스 각각에서 약 10%의 화합물을 잠정적으로 식별하였습니다. 더 신선한 첨가물질과 표준물질을 분석하여 전구 이온을 검출할 수 있는지, 그리고 이 분석법으로 설정된 요구사항(앞서 서술한)에 따라 완전한 확인에 필요한 진단용 조각을 얻을 수 있는지 조사하기 위해 일부 화합물을 추가로 실험할 예정입니다.

전반적으로 3가지 매트릭스의 결과가 유사하였으며, 모든 매트릭스에 대한 15분 이하의 단일 분석에서 높은 검출률을 보였습니다.

Q-TOF LC/MS를 사용한 VD 정량

VD를 위해 개발된 All Ions MS/MS 분석법에서 LC Q-TOF의 직선성을 확인하기 위해 EMR-Lipid 절차로 추출한 간 쇠고기 및 간 시료에서 113개 VD의 4~5포인트 매트릭스 보정 검량선을 작성하였습니다. 농도는 2(또는 10)~100ng/g 범위에 있었습니다.

복잡한 매트릭스에서 다수의 전혀 다른 분석 물질을 정량하는 것은 어려운 작업이고, 대개 항상 여러 대체 표준물질 및 내부 표준물질을 사용해야 추출 및 분석 과정 중의 다양한 이온 억제 효과를 보정할 수 있습니다. 좋은 내부 표준물질의 선택은 분석적 요인 및 경제적 요인을 포함하는 기타

다양한 요인에 따라 달라질 수 있습니다. 편향을 방지하기 위해 이 섹션에서는 내부 표준물질로 보정하지 않은 원본 데이터를 제공하였습니다. 정량 직선성을 결정하기 위해 간 쇠고기 및 간 매트릭스에서의 각 분석 물질에 대한 결정 계수(R^2)를 계산하였습니다. 간 쇠고기 및 간 시료에 대해서 각각 표적 분석 물질의 95% 이상 및 93% 이상이 $R^2 > 0.90$ ($R^2 > 0.99$ 인 경우는 각각 85% 및 86%)의 결과를 보였습니다. 분석한 VD의 5% 및 7%만이 쇠고기 및 간에서 $R^2 < 0.90$ 의 결과를 보였습니다. 그림 7은 간 쇠고기 및 간에서 2~100ng/g 범위를 갖는 ipronidazole 및 enrofloxacin의 검량선을 나타냅니다. 모든 검량선은 가중치 없이 선형으로 맞았습니다.

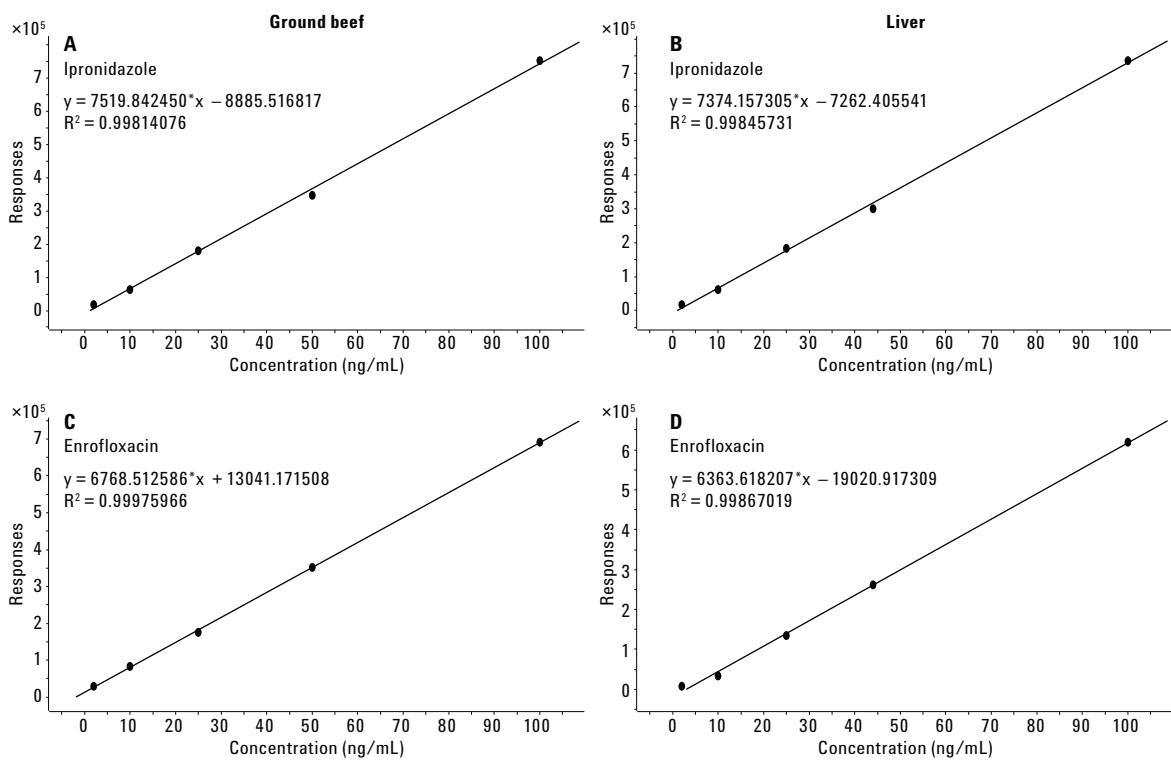


그림 7. 간(ground) 쇠고기 및 간(liver)에 ipronidazole(A 및 B) 및 enrofloxacin(C 및 D)에 대한 검량선(2~100ng/g)

결론

이 응용 자료에서는 소 근육, 간, 신장을 포함한 관련 매트릭스에서 120가지 이상의 VD를 ng/g 농도로 분석할 수 있는 고분해능 및 고감도 Agilent 6545 Q-TOF LC/MS의 성능을 소개합니다. 간단하고 효율적인 Agilent All Ions MS/MS 워크플로를 활용하면 동일한 분석 내에서 조각 이온을 사용하여 분석 물질을 검출하고 식별할 수 있으며, 이를 통해 잠재적인 위양성(false positive)을 상당히 줄일 수 있습니다. Agilent 동물용 의약품 PCDL의 특정 LC 조건에서 accurate mass, MS/MS 스펙트럼 및 업데이트된 머무름 시간을 이용하면 복잡한 매트릭스에서의 화합물 식별 견고성이 더욱 향상됩니다. 정량 능력은 검량선 생성을 통해 입증하였습니다. 그 결과, 6545 Q-TOF LC/MS 기기를 사용하여 단 한 번의 분석으로 육류 내 VD에 대한 뛰어난 감도의 정성적 및 정량적 정보를 얻을 수 있습니다.

감사의 말

본 연구와 응용 자료에서 동물용 의약품 용액 및 피드백을 제공해 주신 USDA-ARS 동부 지역 연구 센터의 Steven Lehotay 씨께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

1. European Commission, Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, O.J.E.C. L221, Editor. (2002).
2. M. J. Schneider, S. J. Lehotay, A. R. Lightfield. "Validation of a streamlined multiclass, multi-residue method for determination of veterinary drug residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2014).
3. Health Canada. Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada. (2012).
4. J. A. Park, et al. "Single-step multi-residue determination of ten multiclass veterinary drugs in pork, milk, and eggs using liquid chromatography with tandem mass spectrometry" *Journal of Separation Science* **38**(16), 2772-2780 (2015).
5. H. Wei, et al. "Development and validation of a multi-residue screening method for veterinary drugs, their metabolites and pesticides in meat using liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **32**(5), 686-701 (2015).
6. R. Yamada, et al. "Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry" *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **70**(1), 54-65 (2006).
7. L. Geis-Asteggiante, et al. "Structural characterization of product ions by electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry to support regulatory analysis of veterinary drug residues in foods" *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **28**(10), 1061-1081 (2014).
8. L. Zhao, D. Lucas, Multiresidue analysis of veterinary drugs in bovine liver by LC/MS/MS, *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-6096 (2015).

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. Agilent 제품 및 서비스에 대한 자세한 내용은 Agilent 웹 사이트 (www.agilent.com/chem)를 참조하십시오.

www.agilent.com/chem

Agilent는 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., 2016
한국에서 인쇄
2016년 4월 8일
5991-6651KO

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



Agilent Technologies