

# Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC/MS 시스템을 사용하여 돼지고기와 계란에 함유된 다성분 잔류 수의약품 분석

## 저자

Tony Zhang,  
 Dan-Hui Dorothy Yang  
 Agilent Technologies, Inc.

## 소개

수의약품은 주로 항생제 및 호르몬으로 구성되어 있으며, 동물의 발육 및 사료 효율 증진과 질병 치료 및 예방을 위해 널리 사용되고 있습니다. 이렇게 동물에 사용된 수의약품 잔류물이 육류 소비 단계에서도 남아 알레르기 및 항생제 내성을 부추기는 것에 대해 전세계적인 우려가 지속되는 중입니다. 미국 FDA는 2015년 6월에 공중 보건 유지를 목적으로 **수의학 사료 지침(Veterinary Feed Directive)**을 발표함으로써, 항생제 약품 사용 규제에 대한 최종안을 내놓았습니다<sup>1</sup>. 유럽의 규제 사안은 2014/0257(COD)<sup>2</sup> 공식 제안서에 기재되었으며 이는 Directive 2001/82/EC를 대체하게 됩니다. 새로운 규제는 영향 평가 결과를 바탕으로 설정된 목표를 밝히고 항생제 내성이 공중 보건에 끼치는 악영향에 대해 다루고 있습니다. 중국 농업부 장관은 Announcement 235<sup>3</sup>를 통해 동물 유래 식품<sup>3</sup> 내 수의약품 최대 허용 기준치를 발표했습니다. 분석물질과 매트릭스에 따라 정확한 정량화 요건 범위는 ppt(parts-per-trillion) 단위에서 ppb(parts-per-billion) 단위의 농도까지 다양합니다. 수의약품은 pH 조건에 따라 소수성과 용해도가 달라지는 등 매트릭스가 복잡하고 종류가 다양한 경우가 많아, 단일 분석 실행만으로는 다양한 종류의 수의약품 잔류물을 검출해내기 어렵습니다. 일반적으로 사용되는 표준 분석법은 한 종류 또는 유사한 종류의 수의약품을 포함한 시료만 분석할 수 있습니다. 수의약품을 효과적으로 모니터링하고 공중 보건을 지키기 위해서는, 단일 분석으로 여러 종류의 분석 성분을 분석할 수 있는 능력이 절실합니다.

Agilent Ultivo triple quadrupole LC/MS 시스템은 바로 그런 목적에 부합하는 기기입니다. Ultivo는 일반 생산 실험실이 부딪치고 있는 많은 난점들을 해결하기 위해 설계되었으며, 특히 환경 및 식품 안전 분야에서 두각을 나타냅니다. 시스템에는 여러 혁신적인 기능이 포함되어 있으며, 이전 세대의 삼중 사중극자 시스템보다 훨씬 작으면서도 성능 면에서는 탁월함을 유지하였습니다. dual hexapole 설계를 통해서도 우수한 이온 전송 효율을 성취하였습니다. 극성 전환은 하드웨어 및 전자 장치 개선으로 훨씬 빨라졌습니다. 게다가 Ultivo 시스템을 유지보수할 때 사용자의 개입을 최소화했기 때문에, VacShield의 적용과 탈착 가능 검출기의 사용만으로 전문가가 아닌 MS 사용자가 시스템을 작동하고 유지보수할 수 있습니다.

이 응용 자료에서는 Ultivo Triple Quadrupole LC/MS와 Agilent 1290 Infinity II UHPLC를 함께 사용해 돼지고기와 달걀 내 27개 종류 151종 수의약품을 분석 검출하는 방법에 대해 다루고 있습니다. 또한 Agilent EMR—Lipid 시료 전처리 키트의 다양한 활용도에 대해서도 다룹니다. EMR—Lipid는 동물 시료에 다양 포함되어 있는 지질 성분을 효율적으로 제거하고 우수한 수의약품 회수율을 보여줍니다.

## 실험

### 표준물질 및 시약

수의약품 표준품은 Dr. Ehrenstorfer GmbH, WITEGA laboratorien Berlin-Adlershof GmbH, Toronto Research Chemicals (TRC), AccuStandard, Inc 등에서 구입하였습니다. 표 1에는 151종의 분석 대상 화합물이 나열되어 있습니다. 이동상 전처리에는 초순수(>18.2 MΩ, Milli-Q 정수 시스템), 아세트니트릴 (LC-MS 등급, Fluka), 포름산(~98%, 질량분석기용, Fluka)이 사용되었으며, 시료 전처리에는 아세트니트릴(HPLC grade, Sigma-Aldrich), 디메틸 설파이드(DMSO, >99.9 %, Aldrich), 아세트산 암모늄(≥98%, Sigma-Aldrich), 포름산(~98%, HPLC 등급, Fluka) 등이 사용되었습니다.

표 1. 151종의 분석 대상 수의약품

분류	명칭	CAS
β-Agonists	Cimaterol	54239-37-1
	Clenbuterol	21898-19-1
	Clorprenaline	3811-25-4
	Penbutolol	38363-40-5
	Propanolol	318-98-9
	Ractopamine	90274-24-1
	Salbutamol	18559-94-9
	Terbutaline	23031-32-5
	Tulobuterol	56776-01-3
Androgens	Mengestrol Acetate	595-33-5
	Methyltestosterone	58-18-4
	Nadrolone/19-nortestosterone	434-22-0
	Testosterone	58-22-0
Benzimidazoles	2-Aminoflubendazole	82050-13-3
	5-Hydroxymebendazole	60254-95-7
	Albendazole	54965-21-8
	Albendazole sulfone	75184-71-3
	Albendazole sulfoxide	54029-12-8
	Albendazole-2-aminosulfone	80983-34-2
	Cambendazole	26097-80-3
	Fenbantel	58306-30-2
	Fenbendazole	43210-67-9
	Flubendazole	31430-15-6
	Mebendazole	31431-39-7
	Mebendazole-amine	52329-60-9
	Oxfendazole	53716-50-0
	Oxfendazole sulfone/ fenbendazole sulfone	54029-20-8
	Oxibendazole	20559-55-1
	Thiabendazole	148-79-8
Thiabendazole-5-hydroxy	948-71-0	
Triclabendazole	68786-66-3	
Chloramphenicols	Chloramphenicol	56-75-7
	Florfenicol	73231-34-2
	Thiamphenicol	15318-45-3

분류	명칭	CAS
Glucocorticosteroids	Beclomethasone	4419-39-0
	Betamethasone	378-44-9
	Dexamethasone	50-02-2
	Flumethasone	2135-17-3
	Hydrocortisone	50-23-7
	Methylprednisolone	83-43-2
	Prednisolone	50-24-8
	Prednisone	53-03-2
	Triamcinolone	124-94-7
	Triamcinolone acetonide	76-25-5
Macrolides	Acetylisovaleryltulosin/tylvalosin	63409-12-1
	Erythromycin	59319-72-1
	Kitasamycin/eucomycin	1392-21-8
	Oleandomycin	7060-74-4
	Tilmicosin	108050-54-0
Nitroimidazoles	Tylosin	74610-55-2
	Dimetridazole	551-92-8
	Dimetridazole-OH (HMMNI)	936-05-0
	Metronidazole	443-48-1
Peptides	Metronidazole-OH	4812-40-2
	Ronidazole	7681-76-7
Quinolones	Virginiamycin M1	211411-53-0
	Ciprofloxacin	85721-33-1
	Danofloxacin	112398-08-0
	Difloxacin	98106-17-3
	Enoxacin	74011-58-8
	Enrofloxacin	93106-60-6
	Fleroxacin	79660-72-3
	Flumequine	42835-25-6
	Lomefloxacin	98079-51-7
	Nalidixic acid	389-08-2
	Norfloxacin	70458-96-7
	Oxfloxacin	82419-36-1
	Orbifloxacin	113617-63-3
	Oxolinic acid	14698-29-4
	Pefloxacin	70458-92-3
	Sarafloxacin	98105-99-8
	Sparfloxacin	110871-86-8

분류	명칭	CAS
Sulfonamides	Sulfabenzamide	127-71-9
	Sulfacetamide	144-80-9
	Sulfachloropyridazine	80-32-0
	Sulfaclozine	102-65-8
	Sulfadiazine	68-35-9
	Sulfadimethoxine	122-11-2
	Sulfadoxine	2447-57-6
	Sulfaguandine	57-67-0
	Sulfamerazine	127-79-7
	Sulfameter/sulfamethoxydiazine	651-06-9
	Sulfamethazine/sulfadimidine	57-68-1
	Sulfamethizole	144-82-1
	Sulfamethoxazole	723-46-6
	Sulfamethoxypyridazine	80-35-3
	Sulfamonomethoxine	1220-83-3
	Sulfamoxole	729-99-7
	Sulfaphenazole	526-08-9
	Sulfapyridine	144-83-2
	Sulfaquinoxaline	59-40-5
	Sulfathiazole	72-14-0
Sulfisomidine	515-64-0	
Sulfisoxazole/sulfafurazole	127-69-5	
Tetracyclines	Trimethoprim	738-70-5
	Chlortetracycline	57-62-5
	Doxycycline	564-25-0
Triphenylmethanes	Tetracycline	60-54-8
	Crystal Violet/basic violet 3	548-62-9
	Leucomalachite green	129-73-7
Diterpene	Malachite green	569-64-2
	Valnemulin	133868-46-9
Phenothiazines	Chlorpromazine	50-53-3
	Xylazine	7361-61-7
Quinoxalines	Olaquinox	23696-28-8
Trematocides	Nitroxynil	1689-89-0
Anticoccidiosis	Clopidol	2971-90-6
	Diclazuril	101831-37-2
	Ethopabate	59-06-3
	Halofuginone	55837-20-2
	Nicarbazine	330-95-0
	Robenidine	25875-50-7
	Toltrazuril	69004-03-1
	Toltrazuril sulfone	69004-04-2
	Toltrazuril sulfoxide	69004-15-5
	Zoalene	148-01-6

분류	명칭	CAS
Antivirus	Amantadine	768-94-5
Pesticides	Carbofuran	1563-66-2
	Chlordimeform	6164-98-3
	Coumaphos	56-72-4
	Dichlorvos	62-73-7
	Fenthion sulfoxide	3761-41-9
	Malathion	121-75-5
	Pentachlorophenol (PCP)	131-52-2
	Propetamphos	31218-83-4
	Trichlorfon	52-68-6
Lincosamide	Lincomycin	7179-49-9
Dapsones	Dapsone	80-08-0
	N-Acetyl dapsone	565-20-8
Organic acids	Heptadecafluorooctanesulfonic acid (PFOS)	1763-23-1
	Perfluorooctanoic acid (PFOA)	335-67-1
Nitros	4,6-Dinitro-o-cresol (DNOC)	534-52-1
	Nitrovin	2315-20-0
	Sodium nitrophenolate/4-nitrophenol	100-02-7/63317-67-9
Tranquilizer	Azaperol	2804-05-9
	Azaperone	1649-18-9
Non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs)	4-Acetylamino antipyrine	83-15-8
	4-Formylaminoantipyrine	1672-58-8
	Flufenamic acid	530-78-9
	Flunixin	42461-84-7
	Indoprofen	31842-01-0
	Ketoprofen	22071-15-4
	Mefenamic acid	61-68-7
	Meloxicam	71125-38-7
	Piroxicam	36322-90-4
	Sulindac	38194-50-2
Tenoxicam	59804-37-4	
Tolmetin	26171-23-3	
Parasiticide	Levamisole	14769-73-4
Olaquinox	3-Methyl quinoxaline-2-carboxylic acid	74003-63-7
	Quinoxaline-2-carboxylic acid	879-65-2

## 시료 전처리

1. 균질화된 시료 5 ±0.05g을 측정해 50mL 원심관으로 옮깁니다(검량 시료 및 QC 시료용 첨가 표준품).
2. 물 1.0mL와 세라믹 균질기(p/n 5982-9313) 2개를 추가한 후, 시료를 기계식 진탕기에서 잘 혼합해줍니다(달걀 시료일 경우 이 단계를 생략합니다).
3. 5% 포름산 혼합물 10mL를 아세토니트릴에 첨가하고 시료가 잘 섞이도록 손으로 흔들어준 다음, 기계식 진탕기에서 2,000rpm의 속도로 5분간 혼합합니다.
4. 4,000rpm에서 5분간 원심분리합니다.
5. **EMR 활성화:** 5mM의 아세트산 암모늄 완충액 5.0mL(달걀 시료의 경우에는 3.0mL)를 15mL EMR—Lipid dSPE 튜브(p/n 5982-1010)에 넣고 최소 30-60초간 2,000rpm의 속도로 볼텍스 처리합니다. 모든 EMR 흡착제는 수화 처리(hydrated)가 잘 되어 있어야 합니다(유액 형성).
6. 상층액 5.0mL(달걀 시료의 경우 7.0mL)를 활성화된 EMR—Lipid dSPE 튜브로 옮깁니다.
7. 2,000rpm에서 2분간 볼텍스 처리합니다.
8. 4,000rpm에서 5분간 원심분리합니다.
9. 세라믹 균질기(p/n 5982-9313) 2개를 새로운 50mL 원심관에 넣고 전체 추출액을 이 튜브로 부어 넣습니다. 그리고 1개의 polish pouch(p/n 5982-0102) 내용물을 첨가한 뒤 세계 흔들어줍니다.
10. 2,000rpm에서 2분간 볼텍스 처리합니다.
11. 4,000rpm에서 5분간 원심분리합니다.
12. 상층액 2.0mL를 유리 튜브로 옮기고 50.0µL의 DMSO를 첨가한 후, 질소 환경에서 일정 부피(40°C, ~50µL)로 농축 처리합니다.
13. 15% ACN 수용액 0.950mL를 재용해한 후 2,000rpm에서 1분간 볼텍스 처리합니다.
14. 용액을 2.0mL 원심관으로 옮기고 10,000rpm에서 5분간 원심분리한 후, 맑은 상층액을 주입 바이알로 옮겨 LC/MS 분석을 합니다.

## 기기 파라미터

표 2. LC 파라미터

LC 파라미터		
컬럼	Agilent ZORBAX Eclipse plus C18, 3.0 × 150mm, 1.8µm(p/n 959759-302)	
주입량	15µL	
컬럼 온도	40°C	
유량	0.5mL/min	
이동상	A) 0.2% formic acid in water B) 0.2% formic acid in acetonitrile	
Gradient	시간(분)	%A %B
	0	98 2
	0.5	98 2
	1.8	85 15
	3.5	80 20
	6	75 25
	7	70 30
	11	65 35
	16	0 100
26	0 100	
분석 시간	26분	
Post run 시간	4분	
니들 세척	세척 모드: flash port 니들 세척 용매: 95% 아세토니트릴/물 니들 세척 시간: 최소 15초 이상	
MS 파라미터		
이온화 모드	Positive/negative	
스캔 유형	Dynamic MRM	
가스 온도	200°C	
가스 유량	11L/분	
Nebulizer	35psi	
Sheath 가스 온도	275°C	
Sheath 가스 유량	11L/분	
모세관	3,000(positive); 3,500(negative)	
노즐 전압	200(positive); 1,500(negative)	

## 결과 및 토의

### 검출 감도

9개 매트릭스 첨가 검량 표준품 세트(0.1ng/g, 0.2ng/g, 0.5ng/g, 1.0ng/g, 2.0ng/g, 5.0ng/g, 10ng/g, 20ng/g, 40ng/g)를 연속 분석하였습니다. 각 분석물질에 대해 선형의 검량선을 그렸으며, 돼지고기 내 화합물 중에서는 87%가 R<sup>2</sup> ≥0.990, 달걀 내 화합물은 89%가 R<sup>2</sup> ≥0.990을 나타냈습니다.

그림 1은 달걀 내에 포함된 8개의 서로 다른 화학적 종류 소속 8개 화합물(albendazole, beclomethasone, chloramphenicol, tetracycline, oleandomycin, enoxacin, sulfachloropyridazine, clenbuterol) 검량선을 보여줍니다.

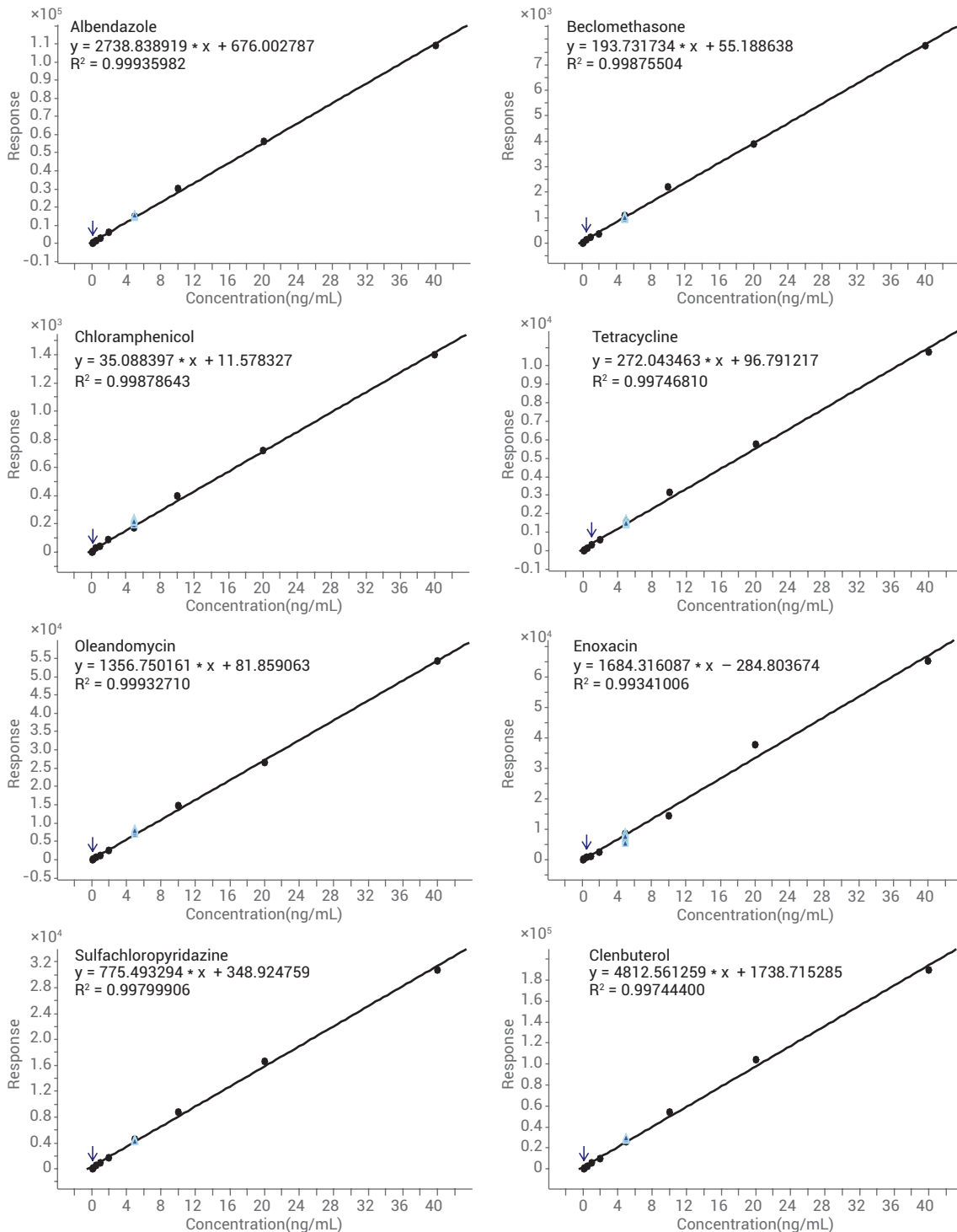


그림 1. Agilent Ultivo triple quadrupole LC/MS를 이용해 얻은 달걀 내 albendazole (A), beclomethasone (B), chloramphenicol (C), tetracycline (D), oleandomycin (E), enoxacin (F), sulfachloropyridazine (G), clenbuterol (H) 검량선

Ultivo는 매우 높은 분석 감도를 나타냈습니다. 대부분의 화합물은 매트릭스에 2ng/g 표준품을 첨가하는 것만으로도 검출되었습니다. 예를 들어 달걀 내 화합물의 93%가 qualifier 및 quantifier 모두에 대해 10 이상의 신호 대 잡음비를 나타냈습니다. 그림 2는 달걀 시료에 2ng/g 표준품을 첨가한 크로마토그램을 나타냅니다.

그림 3은 다양한 매트릭스 내 농도에서 qualifier 및 quantifier 모두에 대해 S/N >10을 나타내는 화합물의 비율을 보여줍니다.

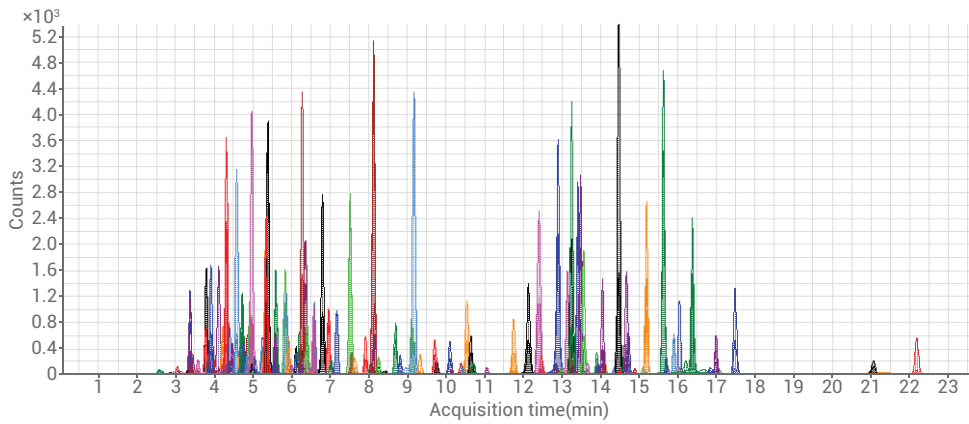


그림 2. 151종의 2ng/g 수의약물을 포함한 달걀 시료 크로마토그램 사례

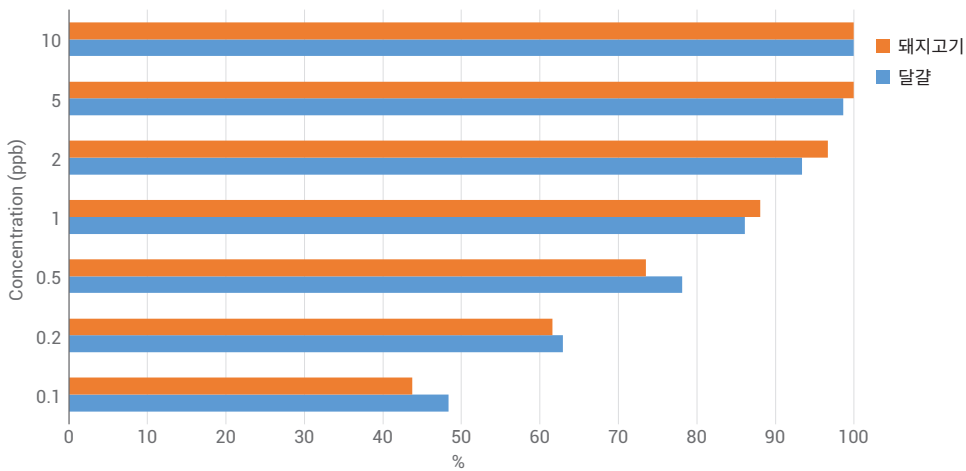
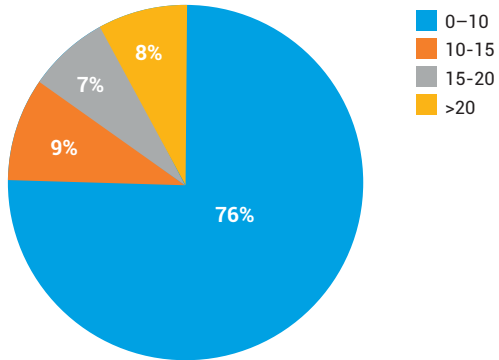


그림 3. 다양한 매트릭스 내 농도에서 qualifier 및 quantifier 모두에 대해 S/N >10을 나타내는 화합물의 비율

## 분석법 정밀도

5ng/g 첨가 농도에서 7회 반복 분석을 통해 재현성이 입증되었습니다. 그림 4는 돼지고기와 달걀 내 5µg/kg 표준품 첨가 시 분산도 %RSD(n = 7)를 보여줍니다. 92%의 화합물이 20% 미만의 %RSD를 나타냄으로써 우수한 재현성 결과가 확인되었습니다.

5µg/kg 첨가 농도에서 달걀 시료의 %RSD



5µg/kg 첨가 농도에서 돼지고기 시료의 %RSD

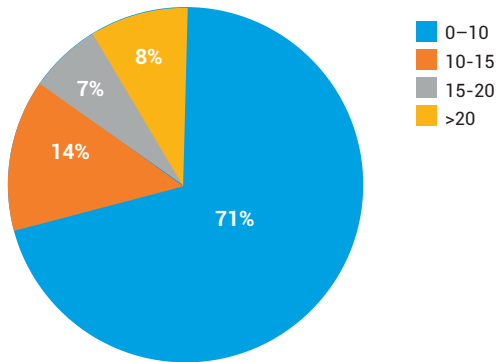


그림 4. 5µg/kg 첨가 농도에서 돼지고기 및 달걀 내 분산도 %RSD(n = 7)

## 결론

돼지고기와 달걀 내 27개 종류 151종 수의약품을 쉽고 빠르게 분석하는 방법을 개발하였습니다. 분석 감도, 정확도, 정밀도가 모두 훌륭한 수준으로 나타난 Agilent Ultivo Triple Quadrupole LC/MS는 수의약품 분석을 위한 최적의 솔루션이라 할 수 있습니다.

## 참고문헌

1. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 21 CFR Parts 514 and 558, FDA-2010-N-0155.
2. Proposal for a regulation of the European parliament and of the council on veterinary medicinal products, European Commission, 2014/0257 (COD).
3. Maximum residue limits in animal derived foods, Announcement No. 235, Ministry of Agriculture, China, **2002.**

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지할 수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2017  
2017년 12월 19일, 한국에서 발행  
5991-8746KO

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