

우유 및 우유 분말에서 217종의 잔류 동물용 의약품 스크리닝

액체 크로마토그래피와 Tandem 질량 분석기(LC/MS/MS)
이용

저자

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

개요

이 응용 자료는 우유 및 우유 분말에서 217종의 동물 의약품을 분석하기 위해 개발된 워크플로 솔루션을 소개합니다. 31가지 서로 다른 화학물질 종류에 속하는 이 동물 의약품은 macrolides, sulfonamides, tetracyclines, β -lactams, β -agonists, chloramphenicols, nitroimidazoles, cepheems, avermectins, benzimidazoles, nonsteroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs), hormones, aflatoxins, tranquilizers 및 기타 성분을 포함합니다.

시료 전처리에는 Na_2EDTA -McIlvaine 버퍼 용액과 아세토니트릴(ACN)을 이용한 빠르고 효율적인 단백질 침전물 추출에 이어 EMR—Lipid dSPE(p/n 5982-1010) 및 polish 키트 (p/n 5982-0102)를 이용한 추가 정제 과정이 포함됩니다.

소개

우유는 높은 영양적 가치 때문에 모든 연령대의 소비자에게 최고의 천연 식품입니다. 우유는 단백질이 풍부하며, 칼슘, 비타민 및 항산화제의 소중한 공급원입니다¹. 또한 우유는 많은 다른 가공 제품의 원료로도 사용되어 전 세계에서 가장 많이 소비되는 농산물 중 하나입니다. 이러한 사실 때문에 우유의 품질 관리는 정부 당국의 큰 관심 사항입니다.

동물용 항생제는 유방염, 설사 및 폐병과 같은 젖소 질병을 치료하거나 우유 생산량을 높이기 위해 널리 사용됩니다. 그러나, 동물용 의약품의 과다 사용이나 남용으로 우유 및 유제품에 잔류 의약품 문제를 야기합니다. 이러한 잔류 의약품은 알레르기 반응, 장내미생물상의 복잡한 균형 변화 및 항생제 내성과 같이 인간의 건강에 부정적 효과를 야기할 수 있습니다².

이 응용 자료는 우유 및 우유 분말에서 다양한 화학물질 종류에 걸쳐 일반적으로 감시되는 217종의 동물용 의약품(VD)을 동시에 분석할 수 있는 워크플로 솔루션을 소개합니다. 이 솔루션에서 VD의 목록은 general notice No. 235(MOA, 중국)에 기초했습니다³.

실험

표준물질 및 시약

동물용 의약품 표준물질은 Dr. Ehrenstorfer GmbH, WITEGA laboratorien Berlin-Adlershof GmbH, Toronto Research Chemicals(TRC) 또는 AccuStandard, Inc.에서 구매했습니다. 초순수(>18.2 MΩ, ELGA VEOLIA PureLab Chrous system), 불화 암모늄(LC/MS를 위한 용리 첨가제, ≥98.0%, Fluka), 아세트니트릴(LC/MS 등급, Fluka) 및 포름산(~98%, 질량분석법용, Fluka)이 이동상 준비에 사용되었습니다.

아세트니트릴(ACN, HPLC 등급, Sigma-Aldrich), 시트르산(시약 등급, ~99%, Vetec), 인산(85%, Ashland), 수산화나트륨(>96.0%, Sigma-Aldrich), 인산수소이나트륨(≥99.5%, Merck), 디메틸설폭사이드(DMSO, >99.9%, Sigma-Aldrich), 에틸렌디아민사아세트산 디나트륨 염(Na₂-EDTA, ACS 시약, 99.0-101.0%, Sigma-Aldrich), 아세트산 암모늄(≥98%, Sigma-Aldrich) 및 포름산(FA, ~98%, HPLC 등급, Fluka)이 시료 전처리 중에 사용되었습니다.

시료 전처리

우유 분말은 먼저 온수를 이용해 액상 우유로 만들었습니다. 액체 우유 시료를 Na₂EDTA-McIlvaine 버퍼 용액과 아세트니트릴로 추출하여 단백질을 침전시키는 단계를 거쳤습니다. 추출물은 EMR-Lipid dSPE(p/n 5982-1010)를 이용해 정제하여 관심 오염물질을 제외한 지질만 선택적으로 제거할 수 있었습니다. 정제 후, 포름산을 이용해 추출물을 산화시켰으며 polish 키트(p/n 5982-0102)를 이용해 추가적인 정제를 위한 최종 polish 단계를 거쳤습니다.

기기

분석은 Agilent 1290 Infinity II LC를 이용해 수행되었으며, 시스템은 다음과 같이 구성되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity II binary pump with a 35 µL Jet Weaver(G7120A)
- Agilent 1290 multisampler with a 20µL loop(G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II MCT(G7116B)

사용된 질량 분석기는 애질런트 iFunnel 및 애질런트 Jet Stream 기술을 이용한 Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS(G6495A)였습니다.

결과 및 토의

표 1은 본 솔루션을 이용해 분석된 화합물을 나타냅니다.

표 1. 분석된 동물 의약품

| 분류 | 화합물 | CAS |
|----------------------|--|-------------------------------|
| β-Agonists | Cimaterol | 54239-37-1 |
| | Clenbuterol hydrochloride | 21898-19-1 |
| | Clorprenaline | 3811-25-4 |
| | Penbutolol | 38363-40-5 |
| | Propranolol hydrochloride | 318-98-9 |
| | Ractopamine | 90274-24-1 |
| | Salbutamol | 18559-94-9 |
| | Terbutaline hemisulfate salt | 23031-32-5 |
| | Tulobuterol hydrochloride | 56776-01-3 |
| | Triphenylmethanes | Crystal Violet/Basic violet 3 |
| Leucomalachite green | | 129-73-7 |
| Growth promoters | Quinoxaline-2-carboxylic acid | 879-65-2 |
| | 3-Methyl quinoxaline-2-carboxylic acid | 74003-63-7 |
| β-lactams | Olaquinox | 23696-28-8 |
| | Amoxicillin | 26787-78-0 |
| | Ampicillin | 69-53-4 |
| | Cloxacillin | 7081-44-9 |
| | Dicloxacillin | 13412-64-1 |
| | Oxacillin | 66-79-5 |
| | Penicillin V | 132-98-9 |
| | Piperacillin | 61477-96-1 |
| Sulbactam | 68373-14-8 | |
| Diterpenes | Valnemulin hydrochloride | 133868-46-9 |
| Phenothiazines | Chlorpromazine | 50-53-3 |
| | Xylazine | 7361-61-7 |
| Furans | Nifurstyrenate | 54992-23-3 |
| | Nitrovin | 2315-20-0 |
| Quinolones | Ciprofloxacin | 85721-33-1 |
| | Danofloxacin | 112398-08-0 |
| | Difloxacin | 98106-17-3 |
| | Enoxacin | 74011-58-8 |
| | Enrofloxacin | 93106-60-6 |
| | Fleroxacin | 79660-72-3 |
| | Flumequin | 42835-25-6 |
| | Lomefloxacin | 98079-51-7 |
| | Marbofloxacin | 115550-35-1 |
| | Nalidixic acid | 389-08-2 |
| | Norfloxacin | 70458-96-7 |
| | Ofloxacin | 82419-36-1 |
| | Orbifloxacin | 113617-63-3 |
| | Oxolinic acid | 14698-29-4 |
| | Pefloxacin | 70458-92-3 |
| | Sarafloxacin | 98105-99-8 |
| | Sparfloxacin | 110871-86-8 |
| Tetracyclines | Chlortetracycline | 57-62-5 |
| | Doxycycline | 564-25-0 |
| | Oxytetracycline | 6153-64-6 |
| | Tetracycline | 60-54-8 |
| Peptides | Virginiamycin M1 | 211411-53-0 |

| 분류 | 화합물 | CAS |
|-----------------|------------------------------------|-------------------------|
| Macrolides | Erythromycin | 59319-72-1 |
| | Kitasamycin/Leucomycin | 1392-21-8 |
| | Oleandomycin | 7060-74-4 |
| | Pimaricin | 7681-93-8 |
| | Spiramycin | 8025-81-8 |
| | Tilmicosin | 108050-54-0 |
| | Tylosin | 74610-55-2 |
| | Acetylisovaleryltirosin/Tylvalosin | 63409-12-1 |
| Cephems | Cefaclor | 53994-73-3 |
| | Cefamandole | 34444-01-4/58648-57-0 |
| | Cefapirin | 21593-23-7 |
| | Cefazolin | 25953-19-9 |
| | Cefetamet pivoxyl | 65243-33-6 |
| | Cefoperazone | 62893-19-0 / 62893-20-3 |
| | Cefotaxime | 63527-52-6 |
| | Cefquinome | 118443-89-3 |
| | Ceftiofur | 80370-57-6 |
| | Cephalexin | 15686-71-2 |
| Trematocides | Cephalonium | 5575-21-3 |
| | Cephradine | 38821-53-3 |
| Anticoccidiosis | Nitroxinil | 1689-89-0 |
| | Rafoxanide | 22662-39-1 |
| | 3-Amino-5-nitro-o-toluamide (ANOT) | 3572-44-9 |
| | Clopidol | 2971-90-6 |
| | Decoquinatate | 18507-89-6 |
| | Diclazuril | 101831-37-2 |
| | Ethopabate | 59-06-3 |
| | Halofuginone | 55837-20-2 |
| | Nequinatate | 13997-19-8 |
| | Nicarbazin | 330-95-0 |
| | Robenidine | 25875-50-7 |
| | Toltrazuril | 69004-03-1 |
| Antivirus | Toltrazuril sulfone | 69004-04-2 |
| | Toltrazuril sulfoxide | 69004-15-5 |
| Pesticides | Zoalene | 148-01-6 |
| | Amantadine | 768-94-5 |
| | Carbofuran | 1563-66-2 |
| | Chlordimeform | 6164-98-3 |
| | Closantel | 57808-65-8 |
| | Coumaphos | 56-72-4 |
| | Diazinon | 333-41-5 |
| | Dichlorvos | 62-73-7 |
| | Fenthion | 55-38-9 |
| | Fenthion sulfoxide | 3761-41-9 |
| | Fenthion sulfone | 3761-42-0 |
| | Phoxim | 14816-18-3 |
| | Trichlorfon | 52-68-6 |
| Lincomycins | Lincomycin | 7179-49-9 |

| 분류 | 화합물 | CAS |
|-----------------|---|--------------|
| Dapsones | Dapsone | 80-08-0 |
| | N-Acetyl dapsone | 565-20-8 |
| Contaminants | Bisphenol A (BPA) | 80-05-7 |
| | Perfluorooctanoic acid | 335-67-1 |
| Hormones | Heptadecafluorooctanesulfonic acid (PFOS) | 1763-23-1 |
| | Zearalanone | 5975-78-0 |
| | Estradiol | 50-28-2 |
| | Zearalanol | 26538-44-3 |
| | β-Zeranol/Zearalanol | 42422-68-4 |
| | Chlormadinone acetate | 302-22-7 |
| | Dienestrol | 84-17-3 |
| | Estradiol benzoate | 50-50-0 |
| | Mengestrol acetate | 595-33-5 |
| | Melengestrol acetate | 2919-66-6 |
| | Methyltestosterone | 58-18-4 |
| | Nandrolone phenylpropionate | 62-90-8 |
| | Progesterone | 57-83-0 |
| | Testosterone | 58-22-0 |
| | Testosterone propionate | 57-85-2 |
| | Trenbolone | 10161-33-8 |
| | Aflatoxins | Aflatoxin B1 |
| Aflatoxin B2 | | 7220-81-7 |
| Aflatoxin G1 | | 1165-39-5 |
| Aflatoxin G2 | | 7241-98-7 |
| Aflatoxin M1 | | 6795-23-9 |
| Nitroimidazoles | Dimetridazole | 551-92-8 |
| | Dimetridazole-OH (HMMNI) | 936-05-0 |
| | Metronidazole-OH | 4812-40-2 |
| | Metronidazole | 443-48-1 |
| | Ronidazole | 7681-76-7 |
| 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 |
| | Sulfamethazine/Sulfadimidine | 57-68-1 |
| | Sulfadoxin | 2447-57-6 |
| | Sulfaguandine | 57-67-0 |
| | Sulfamerazine | 127-79-7 |
| | Sulfameter/Sulfamethoxydiazine | 651-06-9 |
| | Sulfamethizole | 144-82-1 |
| | Sulfamethoxazole | 723-46-6 |
| | Sulfamethoxypyridazine | 80-35-3 |
| | Sulfamonomethoxine | 1220-83-3 |

| 분류 | 화합물 | CAS |
|----------------------|--|------------|
| Sulfonamides (계속) | Sulfamoxole | 729-99-7 |
| | Sulfantran | 122-16-7 |
| | 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 |
| Glucocorticosteroids | Trimethoprim | 738-70-5 |
| | Beclomethasone | 4419-39-0 |
| | Betamethasone | 378-44-9 |
| | Cortisone | 53-06-5 |
| | Cortisone acetate | 50-04-4 |
| | Dexamethasone | 50-02-2 |
| | Fludrocortisone acetate | 514-36-3 |
| | Flumethasone | 2135-17-3 |
| | Hydrocortisone | 50-23-7 |
| | Methylprednisolone | 83-43-2 |
| | Prednisolone | 50-24-8 |
| | Prednisone | 53-03-2 |
| Polyethers | Triamcinolone | 124-94-7 |
| | Triamcinolone acetonide | 76-25-5 |
| | Lasalocid | 25999-20-6 |
| | Maduramicin | 61991-54-6 |
| | Monensin | 22373-78-0 |
| | Nigericin | 28643-80-3 |
| Benzimidazoles | Salinomycin | 55721-31-8 |
| | 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 |
| | Hydroxy-thiabendazole | 948-71-0 |
| | 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 | |
| Triclabendazole | 68786-66-3 | |

| 분류 | 화합물 | CAS |
|------------------|--------------------|-------------|
| Chloramphenicols | Chloramphenicol | 56-75-7 |
| | Florfenicol | 73231-34-2 |
| | Thiamphenicol | 15318-45-3 |
| Tranquilizer | Acetopromazine | 3598-37-6 |
| | Azaperol | 2804-05-9 |
| | Azaperone | 1649-18-9 |
| | Carazolol | 57775-29-8 |
| | Haloperidol | 52-86-8 |
| | Propionylpromazine | 7681-67-6 |
| Avermectins | Avermectin B1a | 65195-55-3 |
| | Doramectin | 117704-25-3 |
| | Eprinomectin | 123997-26-2 |
| | Ivermectin | 70288-86-7 |

| 분류 | 화합물 | CAS |
|--------------|----------------------------|------------|
| NSAID | 4-Acetylamino antipyrine | 83-15-8 |
| | 4-Formylaminoantipyrine | 1672-58-8 |
| | Sodium nitrophenolate | 63317-67-9 |
| | Carprofen | 53716-49-7 |
| | Diclofenac/Diclofenac acid | 15307-86-5 |
| | Indomethacin | 53-86-1 |
| | Indoprofen | 31842-01-0 |
| | Ketoprofen | 22071-15-4 |
| | Mefenamic acid | 61-68-7 |
| | Meloxicam | 71125-38-7 |
| | Piroxicam | 36322-90-4 |
| | Sasapyrine | 552-94-3 |
| | Sulindac | 38194-50-2 |
| | Tenoxicam | 59804-37-4 |
| | Tolfenamic acid | 13710-19-5 |
| Tolmetin | 26171-23-3 | |
| Parasiticide | Levamisole | 14769-73-4 |

매트릭스 spike한 9가지 검량 표준물질 세트(0.1ng/g, 0.2ng/g, 0.5ng/g, 1.0ng/g, 2.0ng/g, 5.0ng/g, 10ng/g, 20ng/g 및 40ng/g)가 연속해서 분석되었으며, 상관계수 값을 이용해 선형 피팅(fitting)이 생성되었습니다(R^2). 그림 1 및 2는

5.0ng/g spike 농도에서 우유의 대표적인 크로마토그램을 보여줍니다. 그림 3 및 4는 10개의 화합물에 대해 G6495A Tandem 질량 분석기에서 얻어진 검량선을 보여줍니다. 이러한 화합물은 서로 다른 화학물질 종류 amoxicillin, cephalaxin,

tetracycline, tilmicosin, chloramphenicol, clenbuterol, betamethasone, enrofloxacin, metronidazole 및 sulfadimidine에 속해 있습니다.

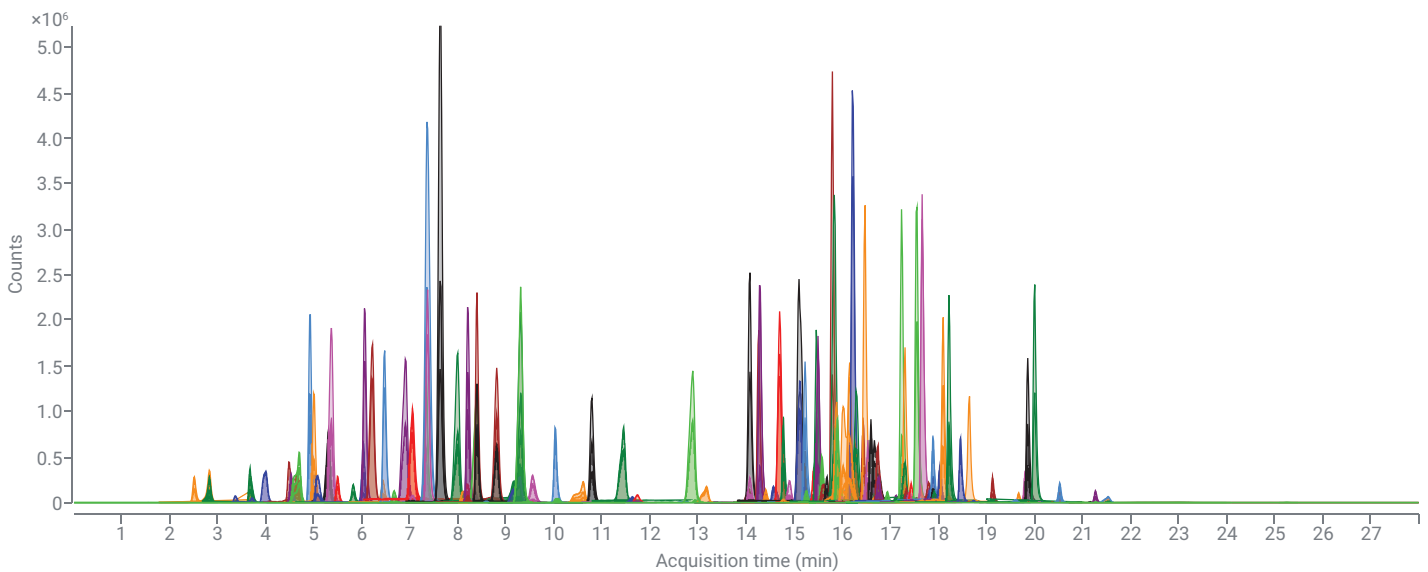


그림 1. 분석법 1을 이용해 분석된 우유의 대표적인 크로마토그램(5ng/g 농도)

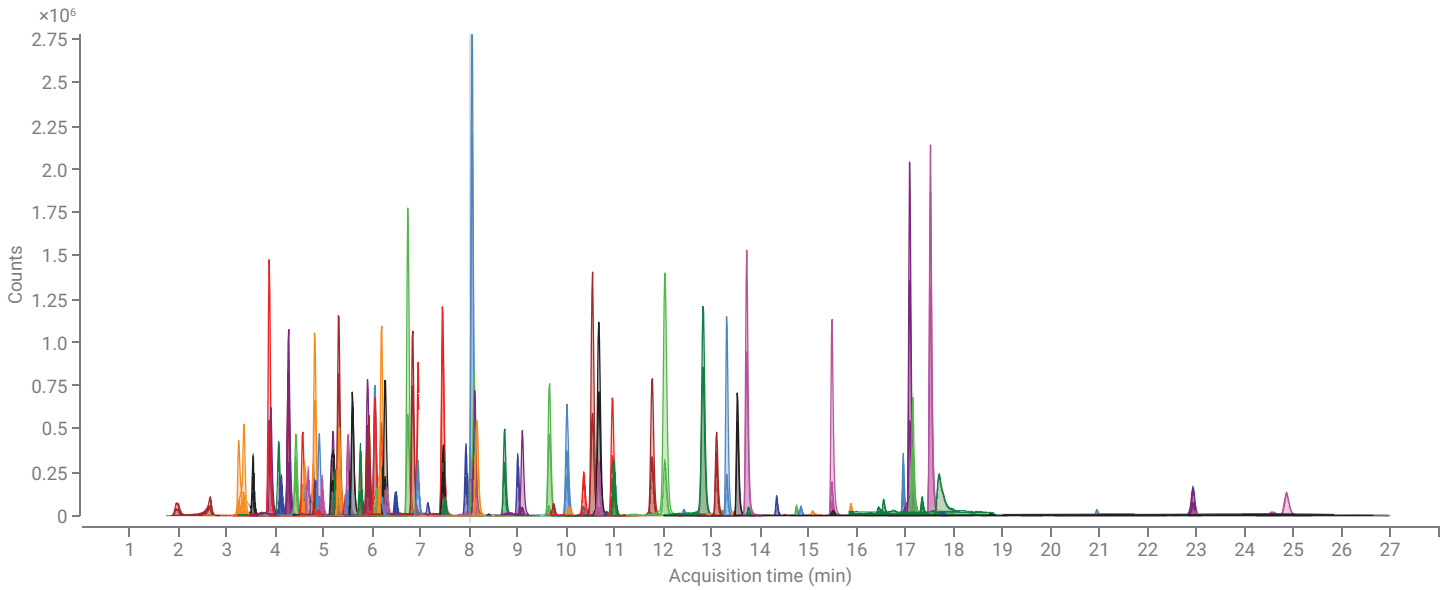


그림 2. 분석법 2를 이용해 분석된 우유의 대표적인 크로마토그램(5ng/g 농도)

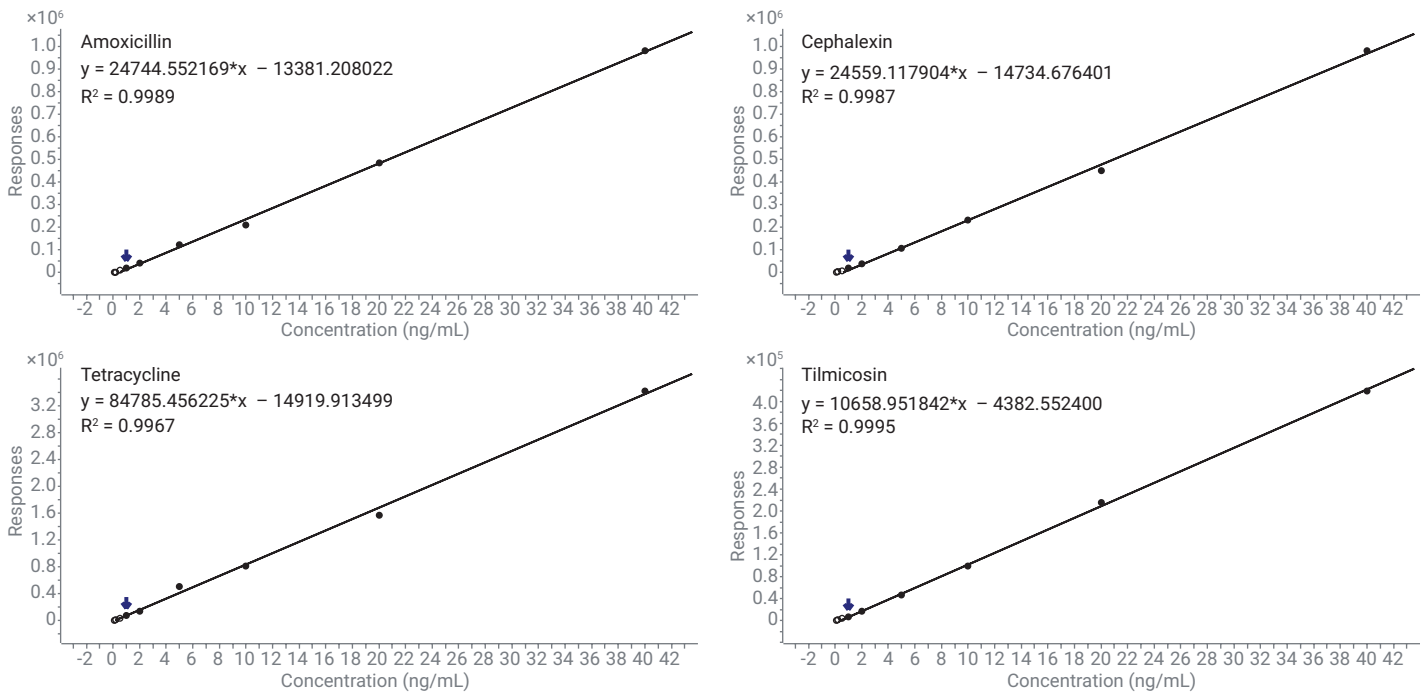


그림 3. 애질런트 iFunnel 및 애질런트 Jet Stream 기술을 이용한 Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS(G6495A)로 분석된 우유 내 amoxicillin, cephalalexin, tetracycline 및 tilimicosin의 검량선(1-40ng/g 농도)

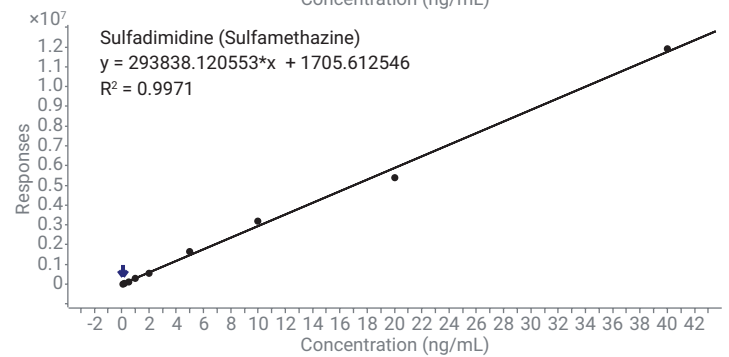
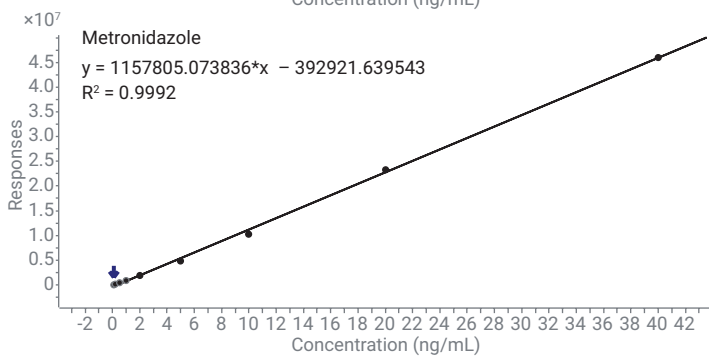
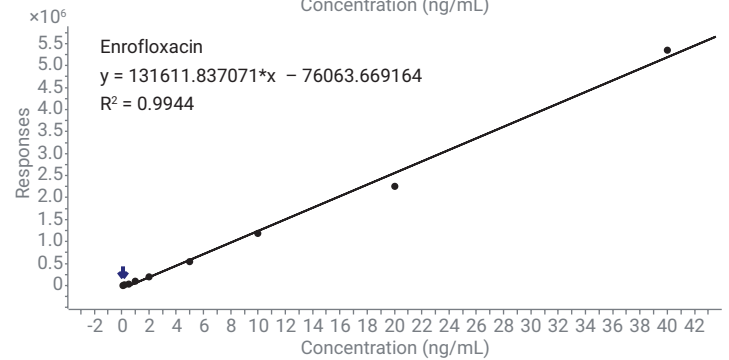
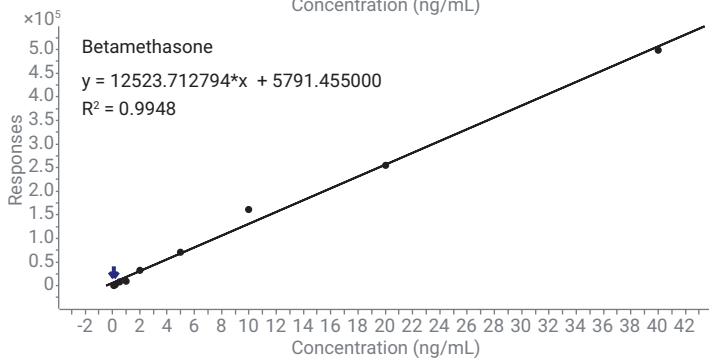
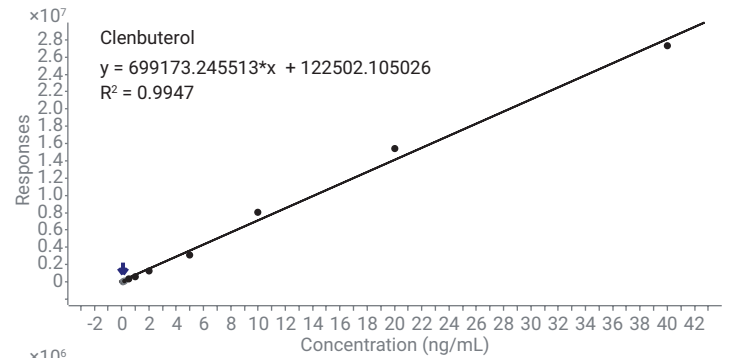
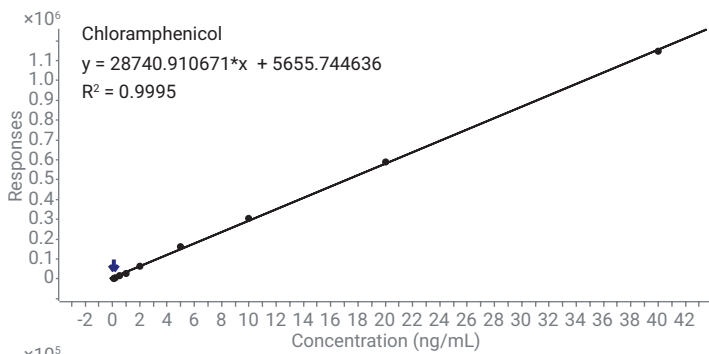


그림 4. 애질런트 iFunnel 및 애질런트 Jet Stream 기술을 이용한 Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS(G6495A)로 분석된 우유 내 chloramphenicol, clenbuterol, betamethasone, enrofloxacin, metronidazole 및 sulfadimidine의 검량선(0.1-40ng/g 농도)

본 워크플로 솔루션의 성능을 증명하기 위해 G6495A Tandem 질량 분석기를 이용한 우유 확인 결과가 요약되어 있습니다.

- 93%의 화합물에서 $R^2 \geq 0.990$ 의 양호한 직선성 결과를 얻었습니다.
- 세 가지 다른 농도의 회수율 데이터가 네 가지 카테고리 그룹화되었습니다.
 - 50-79 사이의 % 회수율
 - 80-120 사이의 % 회수율
 - 121-150 사이의 % 회수율
 - 150 초과 % 회수율
- 그림 5는 매트릭스 spike 검량 분석법을 통해 얻어진 우수한 회수율 결과를 보여줍니다. 예를 들어, 5ng/g spike 농도에서 86%의 화합물이 80-120% 사이의 회수율을 가집니다.
- 세 가지 다른 농도의 재현성도 네 가지 카테고리 그룹화되었습니다.
 - 0-10 사이의 %RSD
 - 11-15 사이의 %RSD
 - 16-20 사이의 %RSD
 - 20 초과 %RSD
- 그림 6은 이 분석법을 이용해 검사된 모든 동물용 의약품의 결과를 보여줍니다. 단 몇 가지 화합물만 20%가 넘는 %RSD를 가졌습니다. 예를 들어, 5ng/g spike 농도에서, 두 개의 화합물(bisphenol A와 toltrazuril-sulfoxide)만 RSD가 20%를 넘었으며 약한 신호 반응에 의한 것일 수 있습니다.

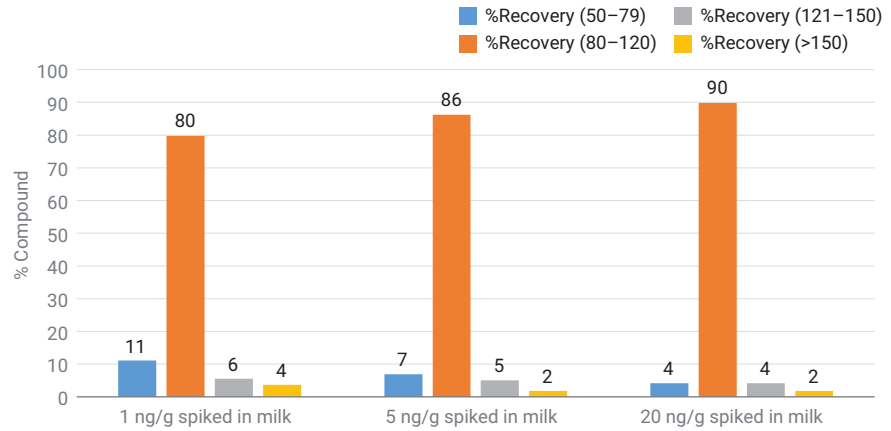


그림 5. 애질런트 iFunnel 및 애질런트 Jet Stream 기술을 이용한 Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS(G6495A)로 분석된 우유의 서로 다른 spike 농도에서 분석물질 회수율

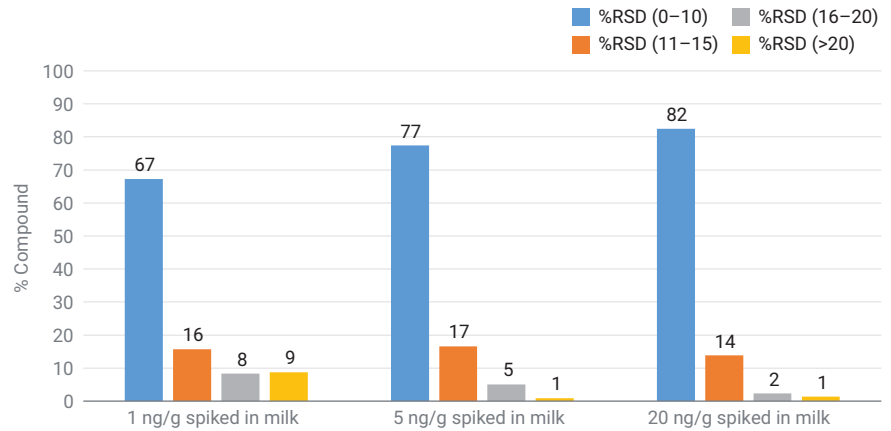


그림 6. 애질런트 iFunnel 및 애질런트 Jet Stream 기술을 이용한 Agilent 6495 Triple Quadrupole LC/MS(G6495A)로 분석된 우유의 서로 다른 spike 수준에서 분석물질 재현성

결론

이 응용 자료는 우유 및 우유 분말에서 다종의 잔류 동물용 의약품 스크리닝을 하기 위해 개발한 워크플로 솔루션을 소개했습니다. 본 자료는 전체 워크플로 솔루션이 높은 감도의 정확하고 정밀한 결과를 제공했음을 나타냅니다. 이 분석법은 데이터 품질에 영향을 주지 않고 시료 처리량을 크게 증가시킵니다.

감사의 글

저자는 Chunxiao Wang(프로젝트 리더), Jianguo Ji, Zhixu Zhang, Chunye Sun, Jimmy Chan, Jerry Zweigenbaum 및 Thomas Glauner(Agilent Technologies, Inc.)에게 그들의 기여에 감사의 말을 전합니다.

참고문헌

- Zeluta, A.; et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.* **2009**, *19*, 380-385.
- Han, R. W.; et al. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry* **2015**, *181*, 119-126.
- Announcement No. 235, issued by the Ministry of Agriculture. Maximum residue limits in animal derived food samples. China. **2002**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 3월 9일, 한국에서 인쇄
5991-9108KO

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