

Agilent 6495 QQQ LC/MS 장비를 이용한 축산물 중 동물용의약품 24계열 연속분석 솔루션

저자

김지훈, 최나영, 우지훈
한국애질런트테크놀로지스(주)

개요

축산물에 대한 동물용의약품의 오·남용은 인간을 비롯한 동·식물의 건강 및 환경에 큰 위협으로 다가오고 있습니다. 이러한 문제를 해결하고자 많은 국가에서 관련 규제를 강화하고 있으며, 이와 더불어 보다 체계화되고 효율성 높은 시험법이 요구되고 있습니다.

한국애질런트는 이러한 변화 대응에 기여하고자 보다 효율적이면서 생산성 높은 분석 솔루션을 개발하였습니다. 이번 솔루션은 생산단계 축산물 관리를 위하여 적용하고 있는 동물용의약품 24개 계열 분석에 대하여 분석자가 컬럼, 이동상 등 기기적 변경 없이 단순히 분석조건을 불러오는 것만으로 연속적인 분석이 가능하도록 개발하였습니다. 연속적인 분석이 가능한 동물용의약품은 24개 계열 약 200성분이며, 이는 생산단계 축산물 관리 대상 항목 중 호르몬제 3성분과 아미노글리코사이드계 12성분을 제외한 전 항목에 해당됩니다.

연속분석법으로 개발된 24개 계열 분석법은 현 동물용의약품 관리기준 및 실무에서 요구되는 검출농도 수준을 반영하여 최저 검량 농도 및 검량선 범위를 설정하였으며, 이를 기준으로 최상의 결과 및 생산성 극대화가 이루어질 수 있도록 기기적 최적화를 완료하였습니다. 개발된 솔루션의 적용은 분석 실무적인 편리함은 물론 생산성 향상에 크게 기여할 것으로 기대합니다.

서론

축산물의 안정적인 생산을 위한 목적으로 다양한 동물용의약품이 제조되고 있으며, 또한 많은 축산농가에서 이러한 동물용의약품들이 사용되고 있습니다. 그러나 오·남용된 동물용의약품은 의약품에 대한 저항성 문제를 야기시키게 되므로 인간을 비롯한 동·식물의 건강 및 환경에 큰 위협으로 다가오고 있습니다. 동물용의약품은 다양한 물리·화학적 특성을 가진 많은 계열로 구분되는데, 이러한 특성으로 인하여 시험법 또한 여러 가지로 구분되어 있습니다. 이렇게 구분된 시험법은 분석의 정확성 측면에서는 적절하지만, 분석 실무자의 입장에서는 많은 인력과 시간 소요로 인한 어려움을 감당할 수밖에 없습니다. 한국애질런트에서는 분석 실무자에게 도움을 드리고자, 동물용의약품 24개 계열에 대하여 분석자가 컬럼, 이동상 등의 기기적 변경 없이 단순히 분석조건을 불러오는 것만으로 연속적인 분석이 가능한 솔루션을 개발하였습니다. 개발된 솔루션은 일반적인 모니터링 정성검사는 물론 생물학적 시험법을 통한 양성판정 후 보다 신속 정확한 검출성분 확인이 가능하도록 지원함으로써 실험실의 분석효율 및 생산성 향상에 크게 기여할 것으로 기대합니다.

실험

시료 정보

실험에 사용된 표준품은 케미다스사에서 국내 동물위생시험소에 판매하고 있는 계열별 혼합 표준품과 개별 성분 표준품을 사용하였습니다. 빠른 정성 모니터링 목적으로 시험법을 개발하였으므로, 표준품 제조는 음성 검체를 이용한 매질 희석 제조법이 아닌 단순 용매 희석 방법을 적용하였습니다. 계열별 실험된 검량선 범위는 식품공전에서 요구되는 계열별 검출농도 수준 및 현재 동물위생시험소에서 모니터링 정성분석 및 계열별 정량분석에서 요구되는 최소농도를 만족하는 범위를 기준으로 제조 분석하였습니다.

분석 기기 및 조건

빠르고 안정적인 분리를 위하여 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 시스템을 사용하였으며, 분리된 물질의 고감도 검출 분석을 위하여 Agilent Jet Stream 기술이 탑재된 Agilent 6495C QQQ MS를 사용하였습니다. 특히 1290 Infinity II UHPLC 시스템에는 바이오 비활성 시료 경로를 적용하여 강극성 성분 및 금속에 대한 흡착성이 있는 성분들에 대한 감도를 개선하였습니다. 또한 효율적인 시료 분석 및 획득된 데이터의 보다 빠르고 편리한 처리를 위하여 Agilent MassHunter Acquisition(ver.10.1)와 MassHunter Quant 소프트웨어(ver.10.1)를 사용하였습니다.

하나의 기기에서 서로 다른 특성을 가진 동물용 의약품 24개 계열의 연속적인 분석이 가능하도록 하기 위하여, 4개의 서로 다른 이동상 및 다른 성상의 컬럼 2개를 장착하였으며, 소프트웨어상에서 각기 다른 조합의 선택을 통한 24개 계열별 분석을 최적화하였습니다.

표 1. 분석 기기 및 조건.

Agilent 1290 Infinity II UHPLC 시스템(펌프: Binary)	
컬럼	컬럼 1: Agilent Poroshell 120 EC-C18 3.0 x 100mm, 2.7-Micron (P/N: 695575-302) 컬럼 2: Agilent Poroshell 120 CS-C18 2.7 x 100mm, 2.7-Micron PEEK Lined(P/N: 675775-942)
이동상	A1: 0.1% Formic acid in DW A2: 0.1% Formic acid + 5mM Ammonium acetate in DW B1: 0.1% Formic acid in ACN B2: 0.1% Formic acid + 5mM Ammonium acetate in MeOH
바이오 비활성 시료 경로	Capillary PK/ST 0.17mm x 500mm, inch, 2 x fittings (P/N: G5667-81005) Capillary PK/ST 0.17mm x 105mm, inch, 2 x fittings (P/N: G5667-81000) Bio-inert quick connect heat exchanger(P/N: G7116-60041)
Agilent 6495C QQQ MS 시스템	
이온화원	ESI + Agilent Jet Stream(AJS)
수집모드	tMRM/dMRM/MRM
극성	양이온/음이온

표 2. 24개 계열별(그룹별) 분석조건, 검량선 분석 범위 및 총 분석시간.

분석조건	계열명(그룹명)	성분 수	이동상	컬럼	검량선 범위(ppb)	총 분석시간
M1	Vet. drug multi-analysis 그룹	103	A1, B1	컬럼1	0.39~100, 9단계	15분
M2	Macrolide계	9	A1, B1	컬럼1	0.39~100, 9단계	15분
M3	Cephalosporin계	11	A1, B1	컬럼1	0.39~100, 9단계	15분
M4	Quinolone계	13	A1, B1	컬럼1	0.078~5, 7단계	8분
M5	Beta lactam계	7	A1, B1	컬럼1	0.39~100, 9단계	15분
M6	Sulfonamide계	15	A1, B1	컬럼1	0.39~100, 9단계	15분
M7	Tetracycline계	4	A1, B1	컬럼1	0.39~100, 9단계	15분
M8	Amphenicol계	4	A1, B1	컬럼1	0.39~100, 9단계	15분
M9	Nitrofurane계	4	A1, B1	컬럼1	0.31~5, 5단계	8분
M10	NSAIDs계	9	A1, B1	컬럼1	0.31~5, 5단계	5.5분
M11	Steroid계	9	A1, B1	컬럼1	0.31~5, 5단계	5분
M12	Vermicide_Abameetin 그룹	19	A2, B2	컬럼1	7.8~250, 6단계	7.5분
M13	Vermicide_Albandazole 그룹	18	A2, B2	컬럼1	12.5~200, 5단계	7.5분
M14	Dimetridazole계	7	A1, B1	컬럼1	3.12~100, 6단계	6분
M15	Narasin 그룹	5	A2, B2	컬럼1	1.56~200, 8단계	7분
M16	Amprolium 그룹	5	A1, B1	컬럼1	7.8~500, 7단계	7.5분
M17	Sulpyrine_MAP	1	A1, B1	컬럼1	1.33~200, 5단계	8분
M18	Glyphosate계	2	A1, B1	컬럼2	6.25~200, 6단계	7분
M19	Colistin계	2	A1, B1	컬럼2	6.25~200, 6단계	7.5분
M20	Bacitracin	1	A1, B1	컬럼2	31.25~500, 5단계	9분
M21	Zilpaterol	1	A1, B1	컬럼1	0.31~5, 5단계	6.5분
M22	Pesticides multi-analysis 그룹	42	A2, B2	컬럼1	3.12~100, 6단계	7.5분
M23	Pesticides_Carbamate계	8	A2, B2	컬럼1	3.13~200, 7단계	7.5분
M24	Cypermethrin, Deltamethrin	2	A2, B2	컬럼1	3.13~200, 7단계	7.5분

- 계열의 구분은 식품공전에서 시험법이 분리된 계열 및 성분 그룹을 기준으로 나누었습니다. 이 때 구분된 시험법에 대하여 명확한 계열명이 없는 경우는 대표성분을 해당 그룹의 계열명 또는 그룹명으로 임의로 설정하였습니다. 따라서 해당 계열, 그룹명이 공식적인 명칭이 아님을 참조 바랍니다
- 각 계열별(그룹별) 최적화된 분석법은 단순히 감도의 최적화가 아닌 검량선 전체 범위에서의 안정적인 선형성이 고려되었으며, 또한 분석 생산성의 향상을 위하여 총 분석시간도 최소화하였습니다
- 상기 분석조건에서 제외된 호르몬제 3종의 경우, 기기적 변경 없이 연속 분석은 불가능하지만, 이동상 중 A1과 B1을 A3(0.1mM Ammonium fluoride in DW)과 B3(MeOH)으로 바꾸는 것만으로 안정적인 분석이 가능하며, 현재 M25 분석법으로 각 성분의 MRM 및 기기조건 최적화는 완료되어 있습니다. 그 외 연속분석에서 제외된 계열인 아미노글리코사이드계 12종의 경우는 이동상에 HFBA(Heptafluorobutyric acid)를 사용하는 이온페어링 분석법 적용이 필요하므로 안정적이고 연속적인 분석을 위한 별도의 시스템 사용이 권장되고 있습니다. 따라서 아미노글리코사이드계 12종의 경우, 이번 연속분석 솔루션에는 포함되어 있지 않지만, 별도의 분리된 M26 분석법으로 각 성분의 MRM 및 기기조건 최적화가 완료되어 있습니다

결과

Vet. drug multi-analysis 그룹

축산물 중 항균제 등 동물용의약품 동시 다성분 시험법에 해당되는 분석법으로써 총 103성분이 포함되어 있습니다. 103성분들은 개별 계열분석법으로 구분되는 Macrolide계, Cephalosporin계, Quinolone계, Beta lactam계, Sulfonamide계, Tetracycline계, Amphenicol계 성분과 다수가 겹치므로 해당 분석결과를 기준으로 포함된 다른 계열 분석법의 성분도 함께 평가하였습니다. 다만, 추가적인 최적화가 진행된 Quinolone계 13성분의 결과는 분리하였습니다. 검출감도 평가를 위하여 최소 검량선 농도 0.39ppb에서의 성분별 S/N(Signal to Noise) 비를 조사한 결과, 최소 13.7에서 최대 67,458 수준으로 평균 3,650.4의 안정적인 검출감도를 확인할 수 있었습니다. 또한 검량선 농도 0.39~100ppb 범위, 9단계에서의 검량선 선형성을 평가한 결과도 최소 0.9623에서 최대 0.9999 범위를 가지며 평균 0.9955의 양호한 결과를 나타내었습니다.

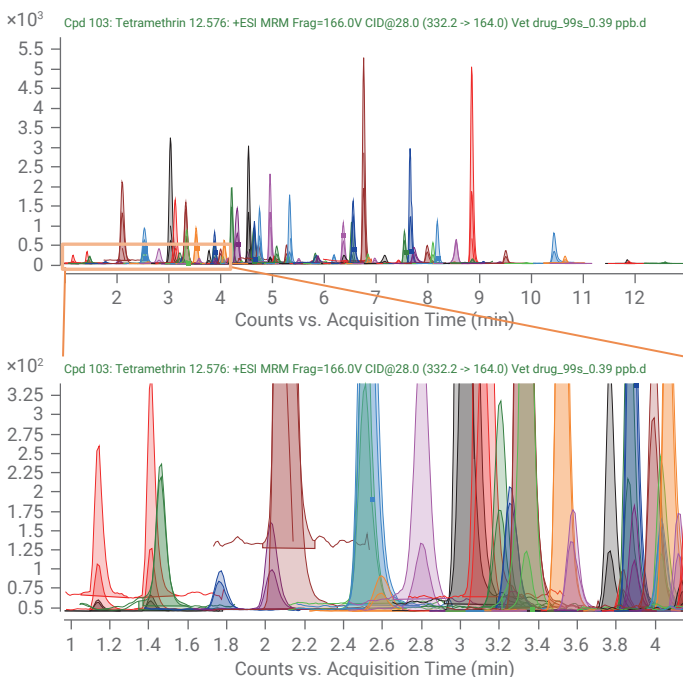


그림 1. Vet. drug multi-analysis 그룹 103성분 검량선 최저농도(0.39ppb) MRM overlapped 크로마토그램.

표 3. Vet. drug multi-analysis 그룹 103성분 최저농도 0.39ppb에서의 S/N 비 및 검량선 범위(0.39~100ppb, 9단계) 선형성.

성분명	S/N 비*	선형성	성분명	S/N 비*	선형성
Acetanilide	136.8	0.9975	Nandrolone	47.4	0.9979
Acriflavine	4200.9	0.9968	Novobiocin	320.0	0.9986
Altrenogest	1491.7	0.9995	Olaquinox	13.7	0.9984
Aminopyrine	558.3	0.9949	Oleandomycin	4428.9	0.9992
Amoxicillin	50.1	0.9989	Ormetoprim	19263.6	0.9845
Ampicillin	5018.7	0.9980	Oxacillin	244.6	0.9980
Antipyrine	561.2	0.9998	Oxytetracycline	21.7	0.9958
Benzympenicillin	908.1	0.9996	Phenacetin	1365.8	0.9991
Berberine	23659.2	0.9977	Phenothiazine	132.9	0.9678
Carbadox	26.9	0.9968	Praziquantel	670.7	0.9992
Carbendazim	34424.5	0.9988	Ractopamine	2539.3	0.9820
Cefalonium	1843.2	0.9974	Rifaximin	155.2	0.9952
Cefazolin	256.2	0.9985	Ronidazole	252.1	0.9994
Cefoperazone	311.4	0.9989	Roxithromycin	4398.1	0.9986
Cefquinome	25.3	0.9996	Scopolamine	865.8	0.9889
Ceftiofur	77.3	0.9980	Spiramycin	977.5	0.9909
Cephalexin	1527.3	0.9968	Sulfachloropyridazine	651.7	0.9964
Cephapirin	49.6	0.9940	Sulfachlozine	1729.1	0.9959
Chloramphenicol	27.7	0.9999	Sulfadiazine	1481.9	0.9988
Chlortetracycline	57.3	0.9934	Sulfadimethoxine	727.5	0.9958
Clenbuterol	249.3	0.9993	Sulfadoxine	977.9	0.9985
Cloxacillin	252.6	0.9993	Sulfaguandine	127.2	0.9999
Cyproheptadine	373.9	0.9993	Sulfamerazine	3035.6	0.9996
Dapsone	147.4	0.9974	Sulfamethazine	2040.8	0.9994
Desacetyl cephapirin	325.8	0.9878	Sulfamethoxazole	2057.6	0.9975
Desfuoylceftiofur	46.4	0.9972	Sulfamethoxypridazine	903.6	0.9993
Dicloxacillin	278.5	0.9990	Sulfamonomethoxine	499.7	0.9972
Diethylcarbamazine	4486.6	0.9977	Sulfaphenazole	107.1	0.9988
Diphenhydramine	7656.5	0.9985	Sulfaquinoxaline	1173.1	0.9973
DL-methylephedrine	410.4	0.9996	Sulfathiazole	395.3	0.9974
Doxycycline	13.8	0.9944	Sulfisoxazole	157.9	0.9977
Erythromycin	1866.7	0.9993	Tetracycline	33.3	0.9935
Fenobucarb	196.9	0.9990	Tetramethrin	93.1	0.9986
Florfenicol amine	60.5	0.9985	Tetramisole	5420.3	0.9994
Florfenicol	51.4	0.9981	Thiamphenicol	57.8	0.9926
Josamycin	888.1	0.9993	Tiamulin	67457.8	0.9940
Lincomycin	28058.1	0.9994	Tildipirosin	346.5	0.9672
Loperamide	57823.1	0.9979	Tilmicosin	1960.7	0.9859
Methomyl	3803.7	0.9926	Trimethoprim	11062.9	0.9878
Metoclopramide	1772.5	0.9992	Tripelennamine	1372.3	0.9706
Metronidazole	475.1	0.9998	Tulathromycin	153.0	0.9623
Metronidazole-OH	242.4	0.9991	Tylosin A	518.7	0.9996
Monoacetyl dapsone	107.2	0.9975	Valnemulin	1104.1	0.9953
Naficillin	31.3	0.9981	Virginiamycin M1	88.5	0.9992
Naloxone	166.1	0.9846	Yohimbine	2103.6	0.9997

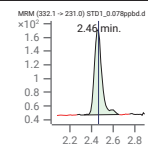
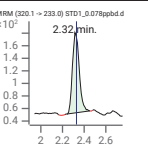
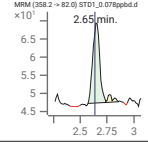
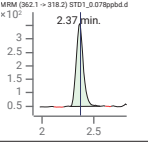
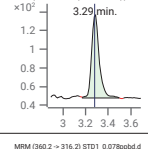
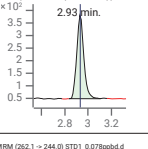
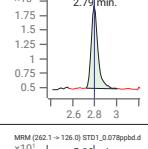
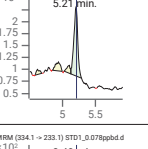
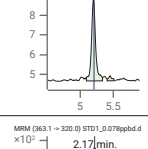
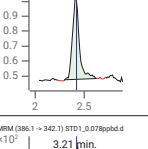
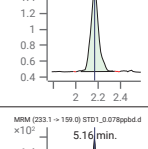
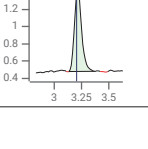
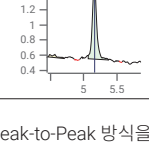
* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

동시 다성분 시험법(103성분)에 포함되지는 않지만, Macrolide 계열에 포함되는 Kitasamycin 및 Cephalosporin 계열에 포함되는 Cefacetrile과 Cefuroxim 성분은 모두 최적화하여 각 계열별 분석법에 포함시켰습니다.

Quinolone계

Quinolone계의 경우 동시 다성분 103성분 시험법에 포함되는 계열이지만, 불검출 관리 성분이 포함되어 있으며 최근 일부 축산물에서 해당 불검출 성분이 검출되는 사례가 발생됨으로 인하여 더 낮은 농도에서의 추가적인 최적화가 진행되었습니다. 불검출 관리 성분의 정확한 분석관리를 위하여 0.1ppb 미만에 해당되는 0.078ppb까지 검량선을 작성하였으며, 해당 농도에서도 13성분 모두 안정적인 검출이 가능함을 확인하였습니다.

표 4. Quinolone계 13성분 검량선 최저농도 0.078pp에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선 범위(0.078~5ppb, 7단계) 선형성.

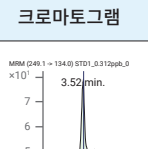
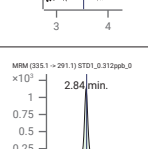
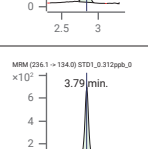
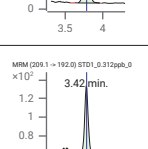
성분	크로마토그램	성분	크로마토그램
Ciprofloxacin S/N 비* 105.4		Norfloxacin S/N 비* 103.2	
선형성 0.9932		선형성 0.9917	
Danofloxacin S/N 비* 36.4		Ofloxacin S/N 비* 164.7	
선형성 0.9945		선형성 0.9982	
Difloxacin S/N 비* 131.2		Orbifloxacin S/N 비* 186.1	
선형성 0.9993		선형성 0.9999	
Enrofloxacin S/N 비* 31.8		Oxolinic acid S/N 비* 37.8	
선형성 0.9988		선형성 0.9977	
Flumequine S/N 비* 359.5		Pefloxacin S/N 비* 41.4	
선형성 0.9967		선형성 0.9954	
Marbofloxacin S/N 비* 131.6		Sarafloxacin S/N 비* 133.0	
선형성 0.9971		선형성 0.9995	
Nalidixic acid S/N 비* 48.9			
선형성 1.0000			

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Nitrofuran계

Nitrofuran계에 속하는 4성분은 모두 대표적인 불검출 항목으로 최근 수입식품의 국가간 이슈 등으로 인하여 분석관리에 관심이 높아지고 있으며, 또한 검사물량도 지속적으로 증가하고 있는 동물용의약품입니다. 4성분 모두 요구되는 최저농도 0.31ppb에서의 안정적인 검출은 물론 검량선 범위에서의 검량선 선형성도 평균 0.999 수준의 안정적인 값이 확인되었습니다.

표 5. Nitrofuran계 4성분 검량선 최저농도 0.31ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
AHD S/N 비: 25.5		AHD - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QC's y = 376.830946 * x - 0.691788 R ² = 0.99979828 Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
AMOZ S/N 비: 826.7		AMOZ - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QC's y = 13470.115279 * x - 728.198529 R ² = 0.99852500 Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
AOZ S/N 비: 528.4		AoZ - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QC's y = 8050.988282 * x - 191.153728 R ² = 0.99950450 Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
SEM S/N 비: 13.4		SEM - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QC's y = 866.100835 * x - 24.572770 R ² = 0.99910916 Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

NSAIDs계

비스테로이드성 소염진통제에 해당되는 NSAIDs계는 총 9종으로 이루어져 있으며, 미량농도에서의 관리가 요구됨으로 인하여 검량선 최저농도 0.31ppb 부터 5단계의 검량선을 이용한 실험이 수행되었습니다. 실험결과 최저농도 0.31ppb에서의 S/N 비가 최소 45.3에서 최대 5,773.8 수준으로 평균 879의 안정적인 검출이 확인되었으며, 검량선 범위 0.31~5ppb, 5단계에서의 선형성 또한 최소 0.9934에서 최대 0.9999 수준으로 평균 0.9976의 안정적인 선형성을 가지는 것으로 나타났습니다.

표 6. NSAIDs계 9성분 검량선 최저농도 0.31ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Acetyl salicylic acid S/N 비: 57.2		
Carprofen S/N 비: 56		
Diclofenac S/N 비: 825.1		
Flunixin S/N 비: 5773.8		
Ketoprofen S/N 비: 78.9		
Meloxicam S/N 비: 321.8		
Paracetamol S/N 비: 665.1		
Phenylbutazone S/N 비: 45.3		
Tolfenamic acid S/N 비: 88.1		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Steroid계

Steroid계 또한 미량농도에서의 관리 요구로 인하여 NSAIDs계와 동일하게 검량선 최저농도 0.31ppb부터 5단계의 검량선을 이용하여 확인한 결과, 9성분 모두 최저농도까지 안정적인 검출이 확인되었으며, 검량선 범위에서의 선형성 또한 최소 0.9945에서 최대 0.9999 수준으로 평균 0.9982의 안정적인 값을 나타내었습니다.

표 7. Steroid계 9성분 검량선 최저농도 0.31ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Aldosterone S/N 비: 34.7		
Betamethasone S/N 비: 2628.5		
Corticosterone S/N 비: 22.9		
Cortisone S/N 비: 56.4		
Dexamethasone S/N 비: 442.2		
Flumethasone S/N 비: 1744		
Methylprednisolone S/N 비: 37.3		
Prednisolone S/N 비: 54		
Prednisone S/N 비: 220		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Vermicide_Abamectin 그룹

Abamectin이 포함된 첫 번째 구충제 분석 그룹은 총 19성분으로 구성되어 있습니다. 해당 성분들은 축산물 대상 동물용의약품 분석 그룹 중 비교적 높은 농도 수준에서의 분석관리가 요구되고 있으므로 검량선 범위를 7.8~250ppb까지 적용하여 분석을 수행하였습니다. 해당 범위에서의 최저농도에 해당되는 7.8ppb에서 19성분이 모두 안정적으로 검출되었음은 물론 평균적인 S/N 비가 14,307 수준의 고감도 검출을 확인할 수 있었습니다. 고농도 넓은 범위의 검량선 작성으로 인하여 일부 성분에 있어서는 검량선 Type을 Linear Type이 아닌 Second Order In Type을 적용하여 평가한 결과, 7.8~250ppb 범위 6단계 검량선에서의 선형성이 최소 0.9949에서 최대 0.9999 수준으로 평균 0.9991의 안정적인 값을 나타내었습니다.

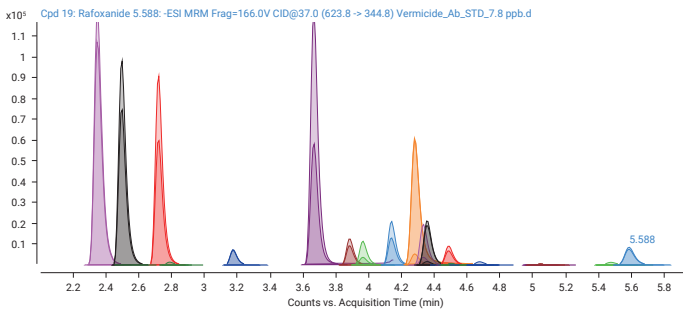


그림 2. Vermicide Abamectin 그룹 19성분 검량선 최저농도(7.8ppb) MRM overlapped 크로마토그램.

표 8. Vermicide Abamectin 그룹 19성분 최저농도 7.8ppb에서의 S/N 비 및 검량선 범위(7.8~250ppb, 6단계) 선형성.

성분명	S/N 비*	선형성	성분명	S/N 비*	선형성
Abamectin	107.0	0.9993	Levamisole	191699	0.9949
Bithionol	1526.6	0.9999	Morantel	3102.9	0.9998
Chlorfluazuron	729.9	0.9975	Moxidectin	594.2	0.9999
Clorsulon	38041.6	0.9983	Niclosamide	1769.5	0.9995
Closantel	698.8	0.9986	Nitroxylin	4120.4	0.9997
Doramectin	67.5	0.9998	Oxyclozanide	9878.9	0.9998
Emamectin benzoate	6957.8	0.9995	Praziquantel	4179.4	0.9999
Eprinomectin	1562.9	0.9995	Pyrantel	2805.0	0.9998
Fluazuron	2442.4	0.9998	Rafoxanide	1004.0	0.9981
Ivermectin	544.9	0.9994	평균	14307	0.9991

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Vermicide_Albendazole 그룹

Albendazole이 포함된 두 번째 구충제 분석그룹은 총 18성분으로 구성되어 있습니다. 해당 성분들 또한 축산물 대상 동물용의약품 분석그룹 중 비교적 높은 농도의 분석관리가 요구되고 있으므로 검량선 범위를 12.5~200ppb까지 적용하여 분석을 수행하였습니다. 해당 범위에서의 최저농도에 해당되는 12.5ppb에서 18성분이 모두 안정적으로 검출되었음은 물론 평균적인 S/N 비가 10749 수준의 고감도 검출을 확인할 수 있었습니다. 또한 고농도 분석임에도 불구하고 검량선의 선형성이 최소 0.9918에서 최대 1.0000 수준으로 평균 0.9987의 안정적인 값을 나타내었습니다.

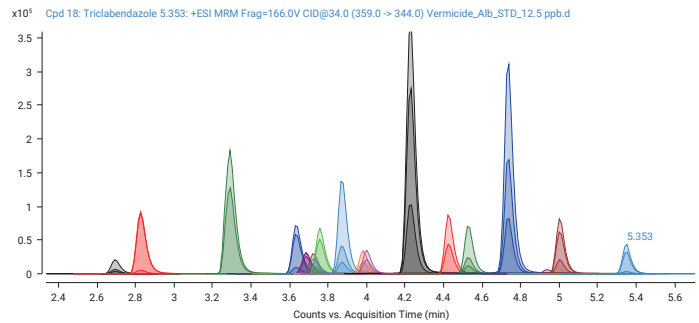


그림 3. Vermicide Albendazole 그룹 18성분 검량선 최저농도(12.5ppb) MRM overlapped 크로마토그램.

표 9. Vermicide Albendazole 그룹 18성분 성분별 최저농도 12.5ppb에서의 S/N 비 및 검량선 범위(12.5~200ppb, 5단계) 선형성.

성분명	S/N 비*	선형성	성분명	S/N 비*	선형성
2-Amino albendazole sulfone	3965.7	0.9993	keto triclabendazole	167.9	0.9997
2-Amino flubendazole	1284.7	0.9987	Mebendazole	7431.7	1.0000
5-hydroxy Mebendazole	31533.0	0.9997	Mebendazole amine	5427.4	0.9989
5-hydroxy Thiabendazole	52795.0	0.9918	Oxfendazole	2074.5	0.9999
Albendazole	10909.8	0.9976	Oxfendazole sulfone	27366.5	1.0000
Albendazole sulfone	1758.1	1.0000	Oxibendazole	4243.9	0.9939
Albendazole sulfoxide	5670.6	0.9999	Thiabendazole	29969.0	0.9991
Febantel	1123.3	0.9995	Triclabendazole	6370.4	1.0000
Fendendazole	491.7	0.9994	평균	10748.6	0.9987
Flubendazole	892.3	1.0000			

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Dimetridazole계

Dimetridazole계 항균제는 총 7성분으로 구성되어 있으며, 단단위 ppb에서 수십 ppb 수준의 관리가 요구되고 있습니다. 따라서 검량선 범위를 3.12~100ppb(6단계)까지 적용하여 분석을 진행하였습니다. 실험결과 요구되는 최저 농도에서의 평균 S/N 비가 31,988 수준으로 나타나 안정적인 고감도 검출이 가능한 것으로 확인되었으며, 또한 전체 검량선 범위에서의 선형성도 평균 0.9978 수준의 안정적인 값으로 나타났습니다.

표 10. Dimetridazole계 7성분 검량선 최저농도 3.12ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Dimetridazole S/N 비: 20752.4		
HMMNI S/N 비: 3300.7		
Ipronidazole S/N 비: 177359		
Ipronidazole-OH S/N 비: 4668.7		
Metronidazole S/N 비: 14354.6		
Metronidazole-OH S/N 비: 1531.5		
Ronidazole S/N 비: 1945.2		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Narasin 그룹

Narasin 그룹은 항원충 항생제로서 Narasin을 포함한 5종이 분석 관리 대상입니다. 요구되는 관리 농도를 기준으로 작성한 검량선 범위는 1.56~200ppb까지 비교적 넓은 범위였으며, 총 8단계의 검량선을 작성하여 분석을 진행하였습니다. 분석결과 최저 검량선 농도 1.56ppb에서의 S/N 비가 1,680.3~2,803.9 수준으로 평균 2,124.5의 안정적인 고감도 검출이 확인되었습니다. 또한 8단계의 넓은 범위 검량선 작성에도 불구하고 검량선의 선형성 범위가 0.9979~0.9992 수준의 안정적인 값을 나타내었습니다.

표 11. Narasin 그룹 5성분 검량선 최저농도 1.56ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Lasalocid S/N 비: 2049.5		
Maduramycin S/N 비: 2186.5		
Monensin S/N 비: 1680.3		
Narasin S/N 비: 2803.9		
Salinomycin S/N 비: 1902.5		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Amprolium 그룹

항원충 합성항생제에 해당하는 Amprolium 그룹은 Amprolium을 포함한 총 5종으로 구성되어 있습니다. 해당 5종은 동물용의약품으로 관리되는 성분들 중 가장 높은 농도 그리고 가장 넓은 검량선 범위의 분석이 요구되고 있습니다. 따라서 검량선 범위를 7단계의 7.8~500ppb 범위로 설정하여 분석을 수행하였습니다. 분석결과 교차 오염 영향이 나타난 Imidocarb를 제외하고 검량선 최저 농도 7.8ppb에서의 S/N비가 335.9~3,128.7 수준으로 평균 1,747.7의 안정적인 검출이 확인되었습니다. 또한 500ppb까지의 넓은 검량선 범위에도 불구하고 검량선의 선형성이 0.9988~0.9994 수준으로 평균 0.9990의 안정적인 선형성을 나타내었습니다. 교차 오염 영향으로 인하여 최소 검출농도의 확인이 어려웠던 Imidocarb의 경우 31.25~500ppb까지 5단계의 검량선으로 분석이 진행되었으며, 해당 검량선 범위에서는 검량선 Type을 Quadratic으로 설정할 경우 안정적인 분석이 가능한 것으로 나타났습니다.

표 12. Amprolium 그룹 5성분 검량선 최저농도 7.8ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

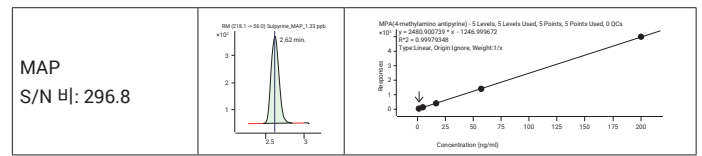
성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Amprolium S/N 비: 335.9		
Clopidol S/N 비: 2642.7		
Diclazuril S/N 비: 883.5		
Toltrazuril sulfone S/N 비: 3128.7		
Imidocarb (31.25ppb) S/N 비: 8170		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Sulpyrine_MAP

Sulpyrine_MAP는 시료 중의 Sulpyrine에 대하여 주대사체인 4-methylamino antipyrine(MAP)을 분석대상으로 합니다. 시험법상 정량한계(0.005mg/kg) 등을 고려하여 안정적인 분석을 위한 검량선 범위를 1.33~200ppb 5단계로 설정한 뒤 분석조건 최적화를 진행하였습니다. 최적화된 조건으로 분석을 수행한 결과, 검량선 최소 농도 1.33ppb에서 S/N 비 296.8의 안정적인 검출이 가능함을 확인하였으며, 전체 검량선 범위에서의 선형성 또한 0.9998로 안정적인 결과를 나타내었습니다.

표 13. MAP 검량선 최저농도 1.33ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

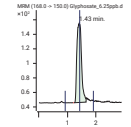
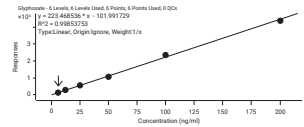
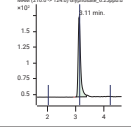
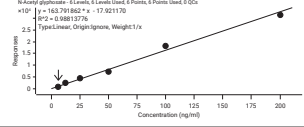


* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Glyphosate계

Glyphosate계는 Glyphosate와 대사산물인 N-Acetyl glyphosate가 분석대상 성분입니다. 두 성분 모두 글리신 유사물로 강극성 성질을 가지고 있으므로 일반적인 C18컬럼으로는 매질과의 분리가 어렵습니다. 또한 Phosphonate기를 가지고 있음으로 인하여 쉽게 금속재질과 킬레이트화하므로 일반적인 조건으로는 피크 형상을 보기가 어려울 정도의 아주 까다로운 분석 성분입니다. 따라서 Glyphosate계의 경우, 안정적인 분석을 위한 특수 컬럼 및 특수한 시료 경로를 적용하였습니다. 사용한 컬럼은 Agilent Poroshell 120 CS-C18 컬럼으로 강극성 잔류용액 분석 응용으로 개발된 컬럼이며, Glyphosate 전용 컬럼으로 구분되기도 합니다. 또한 해당 컬럼은 컬럼내부 재질을 금속이 아닌 Peek 재질을 사용함으로써 목적성분과 금속표면과의 킬레이트화에 의한 영향을 최소화하였습니다. 시료 주입 후 컬럼까지의 유로에 대하여서도 바이오 비활성 시료 이송 경로를 적용하여 흡착 및 킬레이트화에 의한 피크 무너짐 현상을 최소화하였습니다. 검량선은 요구되는 분석농도 범위를 만족하는 6.25~200ppb 범위로 제조하여 실험을 진행하였으며, 최소농도에서의 안정적인 피크 검출과 검량선 선형성을 확인할 수 있었습니다. 또한 식품공전의 분석법에서 요구하는 "Glyphosate와 N-Acetyl glyphosate의 머무름 시간이 1.5분 이상 분리 가능한 컬럼" 기준도 Glyphosate(1.43분), N-Acetyl glyphosate(3.11분)로 만족하는 것으로 확인되었습니다.

표 14. Glyphosate 그룹 2성분 검량선 최저농도 6.25ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

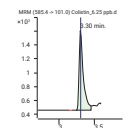
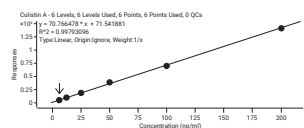
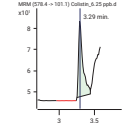
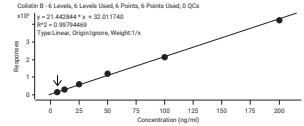
성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Glyphosate S/N 비: 940.8		
N-Acetyl glyphosate S/N 비: 4506.9		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Colistin계

Colistin은 폴리믹신 계열의 폴리펩타이드계 항균제로써 Colistin A와 Colistin B 두 성분으로 구분됩니다. Colistin은 분자량이 크고 극성 또한 높은 성질을 가지고 있으므로 컬럼 및 시료 이송 유로에서의 흡착으로 인한 피크 테일링이 심하게 나타나며, 또한 교차 오염 현상도 많이 발생됨으로 표준품 분석 후 Blank 확인이 꼭 필요한 성분입니다. Colistin 분석에서의 이러한 문제점을 극복하고자 Glyphosate에서 사용된 컬럼 및 바이오 비활성 시료 이송 경로를 그대로 적용하여 최적화를 수행하였습니다. 실무분석에서 요구되는 농도인 6.25~200ppb까지의 검량선으로 실험한 결과 가장 낮은 농도인 6.25ppb에서 Colistin A(S/N 비: 5514), Colistin B(S/N 비: 593) 모두 안정적인 감도로 검출됨을 확인하였으며, 검량선의 선형성 또한 안정적으로 나타났습니다. 뿐만 아니라 Blank 시료 두 번째 분석 결과에서 무시할 정도의 면적값이 확인됨으로 인하여 교차 오염 문제 또한 해결 가능함을 확인하였습니다.

표 15. Colistin계 2성분 검량선 최저농도 6.25ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

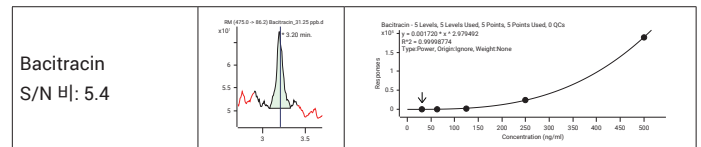
성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Colistin A S/N 비: 5513.5		
Colistin B S/N 비: 593.3		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Bacitracin

Bacitracin은 단일성분이 아닌 성질이 유사한 동족체 수십종의 합제로 알려져 있으며, Colistin과 유사한 폴리펩타이드 계열 항균제이므로 흡착 및 교차 오염 현상이 심하게 나타납니다. 더욱이 농도별 검량선 선형성이 확보되지 않으므로 짧은 범위의 검량선 작성이 권고되고 있으며, 만약 모니터링 정성확인 목적의 넓은 범위 검량선이 요구된다면 검량선 타입 변경을 통한 검량선 작성이 필요합니다. 모니터링 정성확인 목적으로 검량선 범위를 31.25~500ppb 수준까지 넓게 작성하여 실험한 결과, 최소 농도인 31.25ppb 검출이 가능한 것으로 확인되었으며, 고농도(500ppb) 분석 후에는 교차 오염 영향을 배제하기 위해서는 최소 3개 이상의 Blank 시료 분석이 필요할 것으로 추정되었습니다.

표 16. Bacitracin 검량선 최저농도 31.25ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

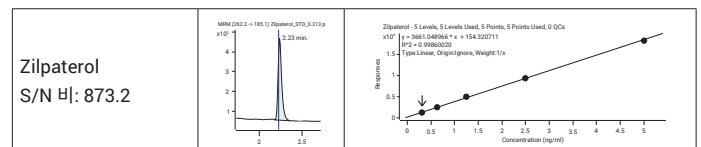


* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Zilpaterol

실무분석에서 요구된 최저 검량농도 0.31ppb 및 5ppb 까지의 5 단계 검량선에 대하여 실험한 결과, 최저 농도 0.31ppb에서 S/N 비 873 수준의 안정적인 고감도 검출을 확인하였으며, 검량선의 선형성 또한 0.9986으로 안정적인 분석이 가능함을 확인하였습니다.

표 17. Zilpaterol 검량선 최저농도 0.31ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.



* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Pesticides multi-analysis 그룹

축산물 중 잔류농약은 직접 사용이 아니더라도 비의도적 오염 (사료, 환경오염 등)에 의한 살충제, 살균제 등이 축산물 내 잔류를 유발하게 되므로 잔류허용 기준에 따른 관리가 요구되고 있습니다. 생산단계 축산물 중 동시 다성분 분석을 통한 잔류농약분석 성분은 총 42성분이며, 최소 농도 3.12ppb 부터 100ppb까지 6단계 검량선을 이용하여 분석을 수행하였습니다. 실험결과 최저 농도 3.12ppb에서 거의 모든 성분이 아주 안정적인 고감도로 검출되었습니다. 감도가 상대적으로 낮게 나타난 성분은 2,4-dimethylaniline으로 3.12ppb에서 S/N 비가 7.1 수준으로 확인되었습니다. 감도가 좋지 않았던 2,4-dimethylaniline 포함한 전체 성분의 평균 S/N 비는 6,500 수준으로 나타나 대부분의 성분들이 고감도로 검출 가능함을 확인하였습니다. 6단계 검량선 범위 분석을 통한 검량선의 선형성을 확인한 결과, 최소 0.9976에서 최대 1.0000 수준으로 평균 0.9996을 나타내어 아주 안정적인 선형성을 가지는 것으로 확인되었습니다.

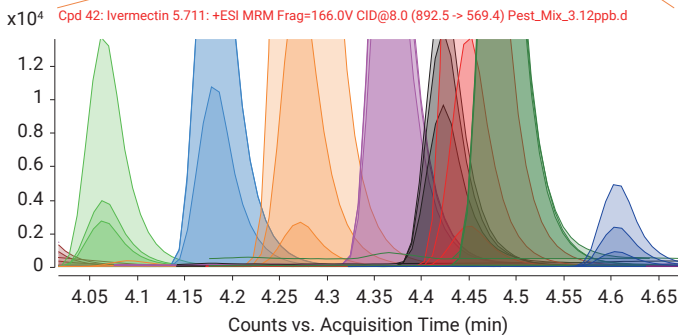
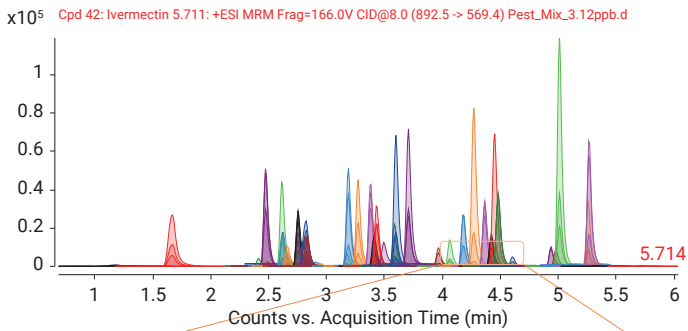


그림 4. Pesticides multi-analysis 그룹 42성분 검량선 최저농도(3.12ppb) MRM overlapped 크로마토그램.

표 18. Pesticides multi-analysis 그룹 42성분 최저농도 3.12ppb에서의 S/N 비 및 검량선 범위(3.12~100ppb, 6단계) 선형성.

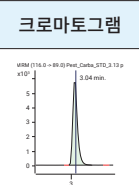
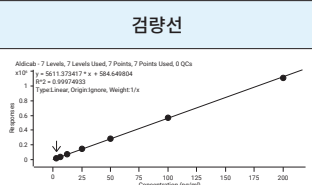
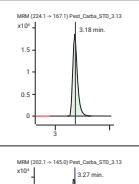
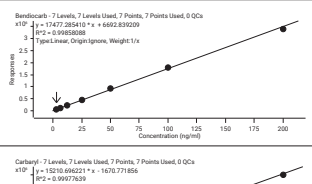
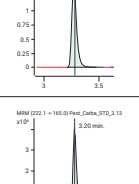
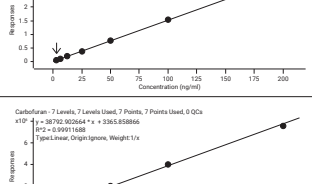
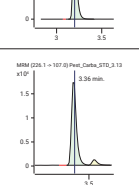
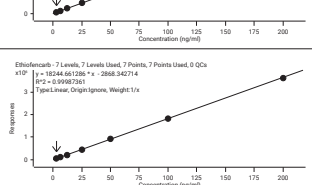
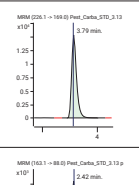
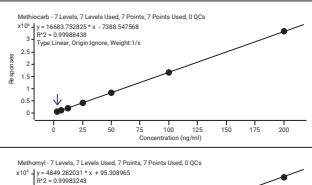
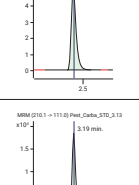
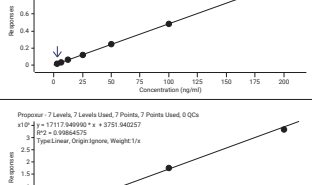
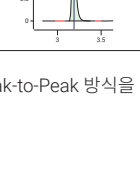
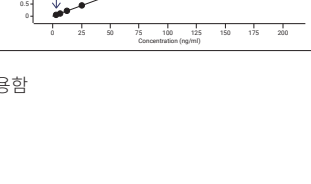


성분명	S/N 비*	선형성	성분명	S/N 비*	선형성
2,4-dimethylaniline	7.1	0.9976	Isofenphos	3838.7	0.9997
5-Hydroxy imidacloprid	975.8	0.9999	Ivermectin	37.8	0.9991
6-Chloronicotinic acid	32.2	0.9994	Methamidophos	84109.9	0.9997
Abamectin	157.6	0.9990	Methidathion	3436.5	0.9998
Amitraz	1259.4	0.9998	Monocrotophos	16920.5	0.9998
Carbaryl	30643.6	0.9999	Nereistoxin	1362.2	0.9995
Clothianidin	196.6	0.9998	Phorate	3067.6	0.9999
Cypermethrin	110.8	0.9996	Phorate oxon	1242.4	0.9997
Diazinon	2255.4	0.9993	Phorate oxon sulfone	3042.3	1.0000
Dichlorvos(DDVP)	268.7	0.9999	Phorate oxon sulfoxide	1670.0	1.0000
Etoxazole	30643.6	0.9995	Phorate sulfone	1084.5	1.0000
Fenitrothion	1076.0	1.0000	Phorate sulfoxide	3399.1	0.9996
Fenobucarb	5321.2	0.9995	Pirimiphos-methyl	3360.2	0.9994
Fensulfothion	4892.0	1.0000	Propoxur	11306.3	0.9995
Fipronil	1170.1	0.9998	Pyridaben	5318.8	0.9996
Fipronil sulfone	3479.9	0.9998	Spinosyn A	5047.0	0.9987
Flufenoxuron	1344.7	0.9994	Spinosyn D	30643.6	0.9978
Fluralaner	389.1	0.9997	Spiromesifen	1476.9	0.9999
Imidacloprid	301.7	0.9998	Sulfoxaflor	1579.2	0.9998
Imidacloprid olefin	112.6	0.9997	Tetraconazole	815.6	0.9999
Imidacloprid urea	5976.9	0.9996	Trichlorfon	379.6	0.9994

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Pesticides_Carbamate계

Carbamate계 농약은 카바산과 아민의 반응 과정을 통하여 제조되는 농약으로 염소와 인을 함유하지 않는 농약류입니다. 분석대상 성분은 총 8성분이며, 요구되는 관리 농도를 기준으로 작성한 검량선 범위는 3.13~200ppb까지 비교적 넓은 범위의 총 7단계 검량선으로 분석을 진행하였습니다. 분석결과 8성분 모두 최저농도에서의 고감도 검출은 물론 안정적인 검량선 선형성까지 확인할 수 있었습니다.

표 19. Pesticides Carbamate계 8성분 검량선 최저농도 3.13ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

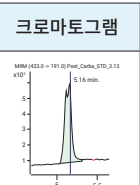
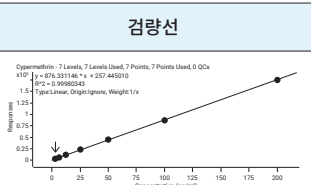
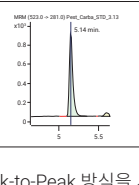
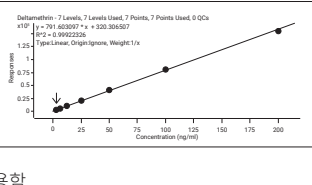
성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Aldicab S/N 비: 2456.1		
Bendiocarb S/N 비: 9167.8		
Carbaryl S/N 비: 3240.1		
Carbofuran S/N 비: 44444.4		
Ethiofencarb S/N 비: 2819.7		
Methiocarb S/N 비: 2248.7		
Methomyl S/N 비: 7980.0		
Propoxur S/N 비: 4802.1		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

Cypermethrin & Deltamethrin

식품공전 시험법에서 GC/ECD를 이용한 정량분석이 기본 시험법이지만, 식품공전 8.8.3.69 사이퍼메스린(Cypermethrin) 축산물 시험법에서 정성시험으로 LC/QQQ 조건이 추가됨으로 인하여 정성 분석이 가능한 성분에 해당됩니다. 요구되는 관리 농도를 기준으로 작성한 검량선 범위는 3.13~200ppb까지 총 7단계였으며, 해당 검량선을 기준으로 실험한 결과, 최저농도에서의 안정적인 검출은 물론 검량선의 선형성 또한 안정적임을 확인하였습니다.

표 20. Cypermethrin, Deltamethrin 검량선 최저농도 3.13ppb에서의 S/N 비, 크로마토그램 및 검량선.

성분 및 S/N 비*	크로마토그램	검량선
Cypermethrin S/N 비: 185.1		
Deltamethrin S/N 비: 892.6		

* S/N 비 산출방식은 Peak-to-Peak 방식을 사용함

결론 및 고찰

생산단계 축산물 분석관리에 있어 더욱 편리하고 생산성 높은 시험분석을 위하여 한국에질런트는 24개 주요 분석 계열에 대한 연속분석 솔루션을 개발하였습니다. 개발된 솔루션의 검증을 위하여 각 분석 계열(그룹)에 대하여 요구되는 최소 검출 농도를 포함하는 검량선 최소농도 및 실무에서 분석되는 검출농도 수준을 고려한 검량선 범위에서의 안정적인 분석 가능 여부를 확인하였습니다.

실험 결과 모든 계열(그룹)에서의 모든 성분이 요구되는 기준에 만족하는 검출이 가능한 것으로 나타났습니다.

이번 솔루션은 빠른 모니터링 정성검사 및 생물학적 시험법을 통한 양성판정 후 보다 신속 정확한 검출성분 확인을 목적으로 개발되었습니다. 따라서 정량분석을 위해서는 음성 검체에 표준품을 주입 후 전처리 과정을 거친 검량선 작성 등 식품공전에서 명시한 정량시험법에 따라 진행하여야만 합니다.

본 실험에서 사용된 기기는 전문 엔지니어가 점검 후 안정적인 상태로 확인된 기기를 사용하였으며, 또한 실험에 사용된 시약, 용매는 검증된 제품을 사용하였습니다. 따라서 기기의 이상 여부, 용매 및 시약의 상태에 따라 결과의 차이가 발생할 수 있습니다. 특히 페니실린계, 베타락탐계, 세팔로스포린계 등 동물용의약품은 안정성이 아주 낮은 성분이 많이 존재하므로 표준품의 안정성에 대한 주의가 필요합니다.

참고 문헌

1. 2020 생산단계 축산물 안전성 검사 계획, 농림축산검역본부, 2020.
2. 2021 생산단계 축산물 잔류물질 검사 계획, 농림축산검역본부, 2021.
3. 식품의 기준 및 규격(제2021-69호), 식품의약품안전처, 식품공전, 2021.
4. 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서, 식품의약품안전처, 식품의약품안전평가원, 2014.
5. 축수산물 유해물질 분석법 편람, 식품의약품안전처, 2017.

www.agilent.com/chem

DE44473.8636458333

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2021
2021년 10월 20일, 한국에서 발행
5994-4246KOKR

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com