

Application News

No. SSK-LCMS-1903

LC-MS

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

Simultaneous analysis of Veterinary drugs Using LC-MS/MS

■ 연구배경

동물용의약품은 동물의 질병 예방 및 치료, 진단에 사용되는 의약품으로써 양봉용, 양잠용, 수산용 및 애완동물(관상어를 포함) 의약품을 포함한다. 동물용의약품의 종류에는 항생제, 합성 항균제, 성장호르몬, 구충제, 해열, 진통, 소염제 등이 있으며, 일반적으로 사람들이 사용하는 의약품과는 사용 대상이 다를 뿐 대부분 사용되는 약품성분과 거의 동일하다. 동물용의약품을 관리하는 이유는 사용 기준을 지키지 않았을 경우, 위해 가능성이 있을 뿐만 아니라 항생제의 경우에는 오남용 하게 되면 내성균이 생겨 사람과 가축의 질병치료를 어렵게 만들 수 있기 때문이다. 이에 식품의약품안전처에서는 동물용의약품에 대한 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있다. 이에 본 뉴스레터에서는 식품의약품안전처에 고시된 동물용의약품 분석법을 바탕으로 분석을 진행하였으며, Insight Library Screening 소프트웨어(Shimadzu corp.)를 활용하여 라이브러리를 구축하였다.

■ 장비 구성 및 분석 조건

본 뉴스레터는 식품의약품안전처 고시 제2019-65호 '식품의 기준 및 규격'¹⁾ 중 '축산물 중 동물용의약품 동시 다성분 시험법'에 근거하여 축산물 및 수산물에 대해 분석을 진행하였다. 적용 분석방법은 <표 1>, <표 2>에 나타내었으며 나타내었으며, 대상 성분은 <표 3>, <표 4>에 나타내었다.

표 1. 분석조건 (축산물)

HPLC (Nexera UHPLC)	
Column	: Shim-pack GIST-HP C18 (150 x 2.1 mm, 3.0 μm)
Mobile phase A	: 0.1 % Formic acid in Water
Mobile phase B	: 0.1 % Formic acid in Ace-tonitrile
Gradient	: 10 % B (1.0 min) – 40 % B (6.0 min) – 95 % B (10.0 – 15.0 min) – 10 % B (15.1 – 20.0 min)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Oven temp	: 40 °C
Injection volume	: 20 μL
MS (LCMS-8060)	
Nebulizing Gas Flow	: 3 L/min
Drying Gas Flow	: 10 L/min
Heating Gas Flow	: 10 L/min
DL Temp.	: 150 °C
IF Temp.	: 350 °C
Heating Block Temp.	: 300 °C
Ionization Mode	: ESI (+, -)
Data Acquisition Mode	: MRM mode

표 2. 분석조건 (수산물)

HPLC (Nexera UHPLC)	
Column	: Shim-pack GIST-HP C18(150 x 2.1 mm, 3.0 μm)
Mobile phase A	: 0.1 % Formic acid in Water
Mobile phase B	: 2 mM Ammonium formate + 0.1 % formic acid in Ace-tonitrile
Gradient program	: 10 % B (1.0 min) – 40 % B (6.0 min) – 95 % B (10.0 – 15.0 min) – 10 % B (15.1 – 20.0 min)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Oven temp.	: 40 °C
Injection volume	: 20 μL
MS (LCMS-8060)	
Nebulizing Gas Flow	: 3 L/min
Drying Gas Flow	: 10 L/min
Heating Gas Flow	: 10 L/min
DL Temp.	: 150 °C
IF Temp.	: 350 °C
Heating Block Temp.	: 300 °C
Ionization Mode	: ESI (+, -)
Data Acquisition Mode	: MRM mode

표 3. 축산물 중 동물용의약품 133 성분

NO	Compounds	NO	Compounds	NO	Compounds	NO	Compounds	NO	Compounds
1	Abamectin	31	Cyproheptadine	61	Marbofloxacin	91	Phenylbutazone	121	Thiamphenicol
2	Acetanilide	32	Danofloxacin	62	Meloxicam	92	Phthalsulfathiazole	122	Tiamulin
3	Acetyl salicylic acid	33	Dapsone	63	Methomyl	93	Praziquantel	123	Tildipirosin
4	Acriflavine	34	Desacetyl cephalirin	64	Metoclopramide	94	Pyrantel	124	Tilmicosin
5	Altrenogest	35	Desfuroylceftiofur	65	Metronidazole	95	Ractopamine	125	Tolfenamic acid
6	Aminopyrine	36	Diclofenac	66	Metronidazole-OH	96	Rafoxanide	126	Tetramethrin
7	Amoxicillin	37	Dicloxacillin	67	Monoacetyl dapson	97	Rifaximin	127	Trimethoprim
8	Ampicillin	38	Diethylcarbamazine	68	Morantel	98	Ronidazole	128	Tripelennamine
9	Antipyrine	39	Difloxacin	69	Moxidectin	99	Roxithromycin	129	Tulathromycin
10	Benzylpenicillin	40	Diphenhydramine	70	Nafcillin	100	Sarafloxacin	130	Tylosin A
11	Berberine	41	DL-	71	Nalidixic acid	101	Scopolamine	131	Valnemulin
12	Bithionol	42	methylephedrine	72	Naloxone	102	Selamectin	132	Virginiamycin M1
13	Carbadox	43	Doramectin	73	Nandrolone	103	Spiramycin	133	Yohimbine
14	Carbendazim	44	Doxycycline	74	Niclosamide	104	Sulfachloropyridazine		
15	Carprofen	45	Emamectin	75	Nitroxinil	105	Sulfadiazine		
16	Cefalonium	46	Enofloxacin	76	Norfloxacin	106	Sulfadiazine		
17	Cefazolin	47	Eprinomectin	77	Novobiocin	107	Sulfadimethoxine		
18	Cefoperazone	48	Erythromycin	78	Ofloxacin	108	Sulfadoxin		
19	Cefquinome	49	Fenobucarb	79	Olaquinox	109	Sulfaethoxypyridazine		
20	Ceftiofur	50	Florfenicol	80	Oleandomycin	110	Sulfaguanidine		
21	Cephalexin	51	Florfenicol amine	81	Orbifloxacin	111	Sulfamerazine		
22	Cephapirin	52	Fluazuron	82	Ormetoprim	112	Sulfamethazine		
23	Chloramphenicol	53	Flumequine	83	Oxacillin	113	Sulfamethoxazole		
24	Chlorfluazuron	54	Flunixin	84	Oxolinic acid	114	Sulfamethoxypridazine		
25	Chlortetracycline	55	Ivermectin	85	Oxyclozanide	115	Sulfamonomethoxine		
26	Ciprofloxacin	56	Josamycin	86	Oxytetracycline	116	Sulfaphenazole		
27	Clenbuterol	57	Ketoprofen	87	Paracetamol	117	Sulfaquinoxaline		
28	Clorsulon	58	Levamisol	88	Pefloxacin	118	Sulfathiazole		
29	Closantel	59	Lincomycin	89	Phenacetin	119	Sulfisoxazole		
30	Cloxacillin	60	Loperamide	90	Phenothiazine	120	Tetracycline		

표 4. 수산물 중 동물용의약품 52 성분

NO	Compounds	NO	Compounds	NO	Compounds	NO	Compounds	NO	Compounds
1	Amoxicillin	12	Desfuroylceftiofur	23	Kitasamycin	34	Sulfachloropyridazine	45	Sulfaphenazole
2	Ampicillin	13	Difloxacin	24	Lincomycin	35	Sulfachlorpyrazine	46	Sulfaquinoxaline
3	Bithionol	14	DDoxycycline	25	Nalidixic acid	36	Sulfadiazine	47	Sulfathiazole
4	Cefadroxil	15	Enrofloxacin	26	Norfloxacin	37	Sulfadimethoxine	48	Sulfisoxazole
5	Cefalexin	16	Erythromycin	27	Ofloxacin	38	Sulfadoxin	49	Tetracycline
6	Ceftiofur	17	Fenobucarb	28	Ormetoprim	39	Sulfaguanidine	50	Thiamphenicol
7	Chloramphenicol	18	Florfenicol	29	Oxolinic acid	40	Sulfamerazine	51	Tiamulin
8	Chlortetracycline	19	Florfenicol amine	30	Oxytetracycline	41	Sulfamethazine	52	Trimethoprim
9	Ciprofloxacin	20	Flumequine	31	Pefloxacin	42	Sulfamethoxazole		
10	Clindamycin	21	Fumagillin	32	Praziquantel	43	Sulfamethoxypridazine		
11	Dehydrocholic acid	22	Josamycin	33	Spiramycin	44	Sulfamonomethoxine		

■ 분석 결과

1. 검량선

축산물의 경우, 동물용의약품 133 성분이 포함된 표준물질을 0.1 % formic acid가 함유된 Acetonitrile을 이용하여 검량선을 작성하였다. 검량선 범위는 (0.1 ~ 50) ng/mL로 하였으며, 직선성은 모든 성분에서 $R^2=0.99$ 이상으로 나타났다. 수산물의 경우에도 축산물과 동일한 검량선 범위에서 52 성분에 대해 3차 증류수를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 직선성은 $R^2=0.99$ 이상으로 나타났다. 축산물 및 수산물의 동물용의약품 크로마토그램은 <그림 1>, <그림 2>와 같으며 우수한 감도와 분리능을 보이는 것으로 나타났다.

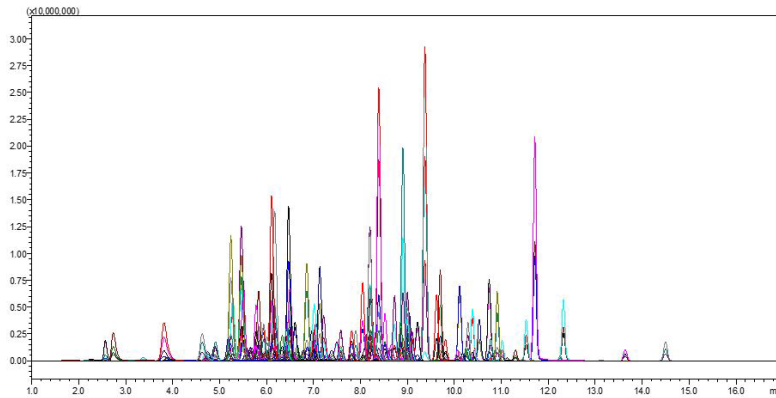


그림 1. 축산물 중 133종 동물용의약품 크로마토그램 (10 ng/mL)

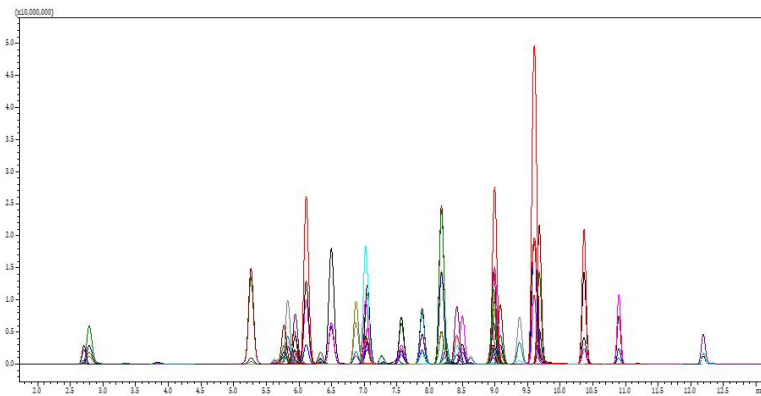


그림 2. 수산물 중 52종 동물용의약품 크로마토그램 (10 ng/mL)

2. 데이터베이스 구축

Labsolution insight library screening software를 이용하여 분석을 통해 얻어진 대상 성분(축산물 133 종, 수산물 52 종)들의 fragmentation ion 정보를 활용하여 동물용의약품 데이터베이스를 구축하였다. 이와 같이 구축된 데이터베이스는 <그림 3>과 같이 MRM 스펙트럼 모드로 측정하여 얻어진 시료의 Collision energy별 MRM 스펙트럼과 <그림 4>의 MRM reference 스펙트럼과의 비교를 통해 대상 성분에 대한 정성적인 확인에 활용이 가능하다.

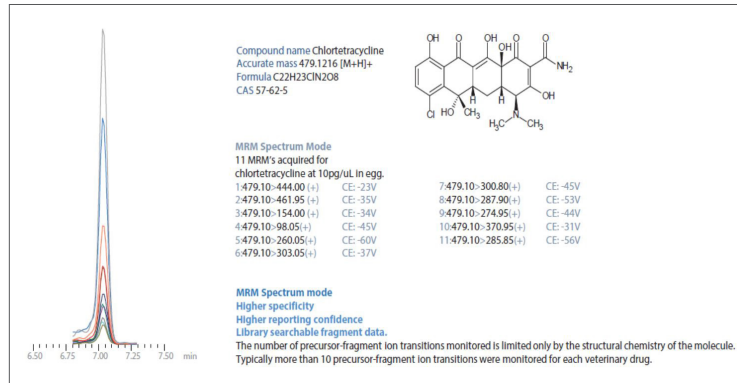


그림 3. MRM 스펙트럼 모드 (예, Chlortetracycline)

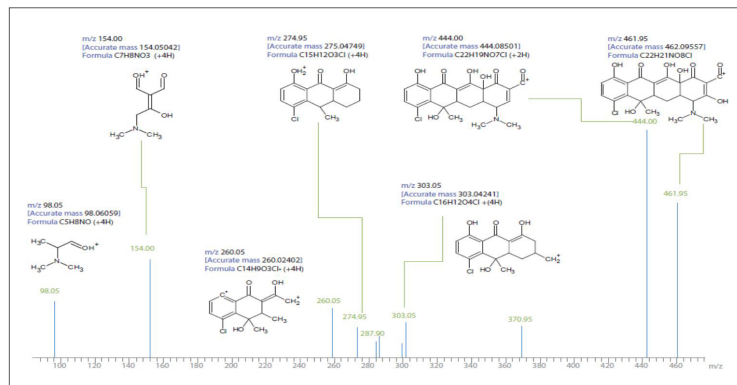


그림 4. MRM Reference 스펙트럼

■ 결론

식품의약품안전처 고시 제2019-65호 '식품의 기준 및 규격' 중 '축산물 중 동물용의약품 동시 다성분 시험법'을 바탕으로 실험을 진행하였다. 대상 성분은 축산물 133 종, 수산물 55 종에 대해서 각각 다성분 동시 분석을 진행하였으며, 직선성은 모든 성분에서 R²=0.99 이상으로 나타났다. 또한, Labsolution insight Library 소프트웨어를 이용하여 대상 성분에 대한 라이브러리를 구축하였으며, 이를 통해 정량 분석과 더불어 정성 분석에서도 보다 신뢰할 수 있는 결과를 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

■ 참고 문헌

- 1) 식품의약품안전처 고시 제2019-65호, 식품의 기준 및 규격 (2019. 7. 25)