

# Application News

No. 01-00461-K

High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-9030

## Q-TOF 질량분석기를 이용한 닭고기 중 동물용 의약품 분석

Analysis of Veterinary Drugs in Chicken Tenders Using the Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer

### 사용자 활용 포인트

- ◆ 정확한 질량을 얻을 수 있는 LCMS-9030을 이용한 전체 스캔 (scan) 분석으로 동물용의약품의 종합적인 측정이 가능하다.
- ◆ 좁은 m/z 범위의 추출 이온 크로마토그램(XIC)은 노이즈와 오염 물질이 적은 피크를 얻을 수 있다.
- ◆ 일상적인 분석에 필요한 정량 하한을 충족하는 고감도 분석을 수행할 수 있다.

### ■ 서론

동물용의약품은 질병의 예방 및 치료, 가축 및 양식 어류의 성장 촉진 등 다양한 목적으로 사용된다. 동물용의약품은 축산물과 수산물을 안정적으로 공급할 수 있지만 잔류 약물로 인한 건강상의 문제가 있다. 이러한 이유로 각 지역 및 국가에서는 식품 중 동물용의약품에 대한 최대잔류허용기준(MRL)을 설정하고 이를 엄격히 규제하고 있다.

현재 식품 중 동물용의약품의 분석에는 고선택적, 고감도로 정량분석이 가능한 삼중 사중극자 질량분석기가 널리 사용되고 있다. 그러나 이 방법은 예상되는 표적 화합물만을 검출할 수 있으며 한 번에 측정할 수 있는 화합물의 수에 한계가 있다. 따라서 이 방법은 스크리닝 용으로 사용하기에 제한적이기 때문에 고해상도 질량분석기의 전체 스캔 모드를 이용한 동물용의약품의 종합 분석이 주목받고 있다.

이 뉴스레터에서는 사중극자 비행 시간 질량 분석기 (quadrupole time-of-flight mass spectrometer) LCMS-9030 (그림 1) 을 이용하여 닭고기 중 동물용의약품을 분석한 예를 소개한다.

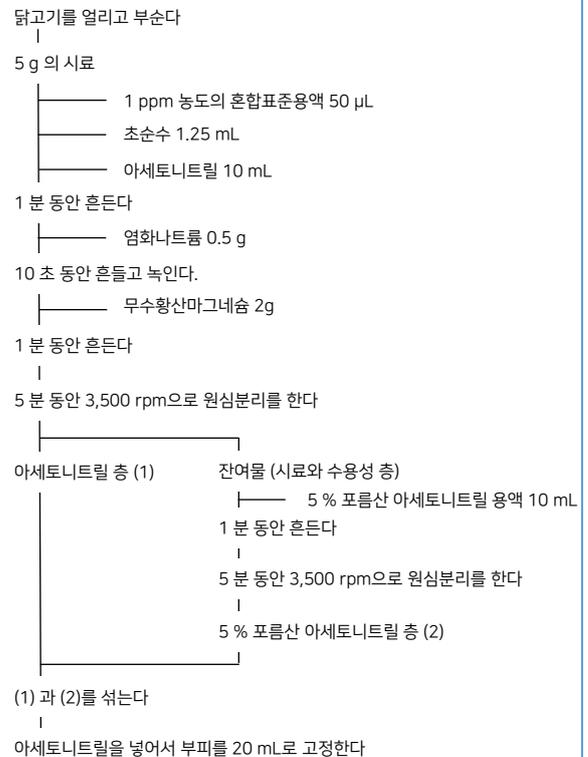


그림 1. Nexera™ X3 와 LCMS-9030의 외관

### ■ 시료 전처리

이 분석에는 상업적으로 이용 가능한 닭고기를 사용하였으며, 동물용의약품은 설파제와 퀴놀론제로 구성된 혼합표준용액 (Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd. 및 FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation)을 사용하였다. 닭고기의 추출 및 정제는 AiSTI SCIENCE Co., Ltd.에서 개발한 반복 추출 STQ-LC 방법<sup>1)</sup>에 따라 수행하였다. 자세한 과정은 그림 2와 같다. 또한 닭고기에 일정 농도의 표준용액을 첨가하여 전처리 과정 중 손실에 대한 회수율 및 매트릭스 효과도 평가하였다.

### 추출



### 정제

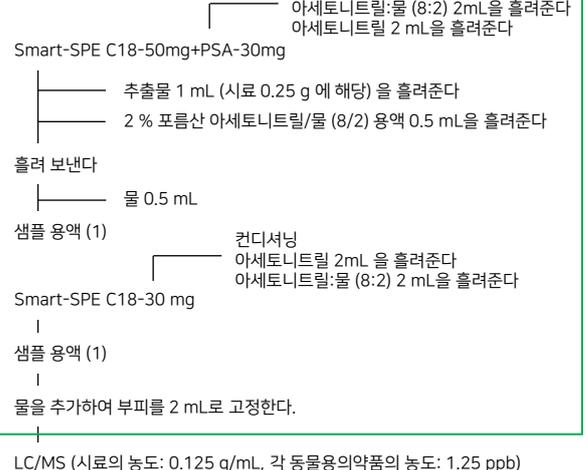


그림2. 시료 전처리 과정

■ 분석 조건

동물용의약품 분석을 위해 LC/MS/MS Method Package for Veterinary Drugs Ver.2 에 포함된 방법을 LCMS-9030에 적용하였다. HPLC 및 MS 조건은 표 1에 정리하였다.

■ 동물용의약품 성분 목록

표 2는 이 실험에 사용된 39개의 동물용의약품 성분 목록을 나타낸다. LabSolutions Insight Explore™를 사용하여 화합물의 이론적 m/z 값을 계산하였다.

표 1. 분석 조건

UHPLC (Nexera™ X3 system)		MS (LCMS-9030)	
Column:	Shim-pack™ Scepter C18-120 [Metal free column] (150 mmL × 2.1 mm I.D., 2.7 μm) P/N: 227-31073-03	Ionization:	ESI (Positive)
Mobile Phase A:	0.1 % Formic acid-Water	TOF-MS:	m/z 100-1000
Mobile Phase B:	0.1 % Formic acid-Acetonitrile	Nebulizing Gas Flow:	3.0 L/min
Gradient Program:	B conc. 1 % (0 min)-15 % (1 min)-40 % (6 min)-100 % (10-15 min)-1 % (15.01-18 min)	Drying Gas Flow:	10.0 L/min
Flow rate:	0.2 mL/min	Heating Gas Flow:	10.0 L/min
Injection Volume:	2 μL (Co-injection 10 μL Water)	DL Temp.:	250 °C
		Block Heater Temp.:	400 °C
		Interface Temp.:	250 °C

표 2. 동물용의약품 목록

성분	분자식	선택 이온	m/z	머무름 시간 (분)
Ciprofloxacin	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	332.1405	5.700
Danofloxacin	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	358.1562	5.852
Diaveridine	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	261.1346	5.302
Difloxacin	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	400.1467	6.766
Enrofloxacin	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	360.1718	6.088
Flumequine	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> FNO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	262.0874	9.708
Marbofloxacin	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	363.1463	5.469
Miloxacin	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	264.0503	8.598
Nalidixic acid	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	233.0921	9.633
Norfloxacin	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	320.1405	5.726
Ofloxacin	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	362.1511	5.620
Orbifloxacin	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	396.1530	6.318
Ormetoprim	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	275.1503	5.886
Oxolinic acid	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	262.0710	8.638
Piromidic acid	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	289.1295	10.235
Pyrimethamine	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	249.0902	7.568
Sarafloxacin	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	386.1311	6.649
Sulfabenzamide	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	277.0641	8.914
Sulfabromomethazine Na	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	357.0015	9.730
Sulfacetamide	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	215.0485	5.424
Sulfachlorpyridazine	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	285.0208	7.817
Sulfadiazine	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	251.0597	5.751
Sulfadimethoxine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	311.0809	8.980
Sulfadimidine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	279.0910	6.929
Sulfadoxine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	311.0809	8.120
Sulfaethoxypyridazine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	295.0859	8.117
Sulfamerazine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	265.0754	6.425
Sulfamethoxazole	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	254.0594	8.187
Sulfamethoxypyridazine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	281.0703	6.891
Sulfametoxydiazine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	281.0703	7.328
Sulfamonomethoxine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	281.0703	7.432
Sulfapyridine	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	250.0645	6.018
Sulfaquinoxaline	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	301.0754	8.947
Sulfathiazole	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	256.0209	5.783
Sulfatroxazole	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	268.0750	8.311
Sulfisomidine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	279.0910	4.998
Sulfisoxazole	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	268.0750	8.461
Sulfisozole sodium	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	240.0437	7.572
Trimethoprim	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	291.1452	5.567

■ LCMS-9030을 이용한 전체 스캔 분석

전체 스캔 분석은 1.25 ppb로 희석된 39종 동물용의약품 표준 혼합물, 동물용의약품을 첨가한 닭고기 추출물(시료 준비 후 각 동물용의약품의 농도는 1.25 ppb), 아세트니트릴 및 동물용의약품이 없는 닭고기 추출물을 공시료로 분석하였다. 그림 3은 각 시료 용액의 39개 화합물 각각에 대한 추출 이온 크로마토그램(XIC)을 보여준다. XIC는 이론적인 m/z 값에 ±20 ppm 허용 오차로 적용하였다.

동물용의약품이 첨가된 닭고기 추출물에서 39종 화합물 모두 1.25 ppb의 농도로 검출되었다(그림 3-D). 또한 공시료 용액에서 오염 신호가 거의 검출되지 않았으며(그림 3-A, B), 이는 LCMS-9030이 동물용의약품의 전체 스캔 분석에 충분한 해상도를 가지고 있음을 나타낸다.

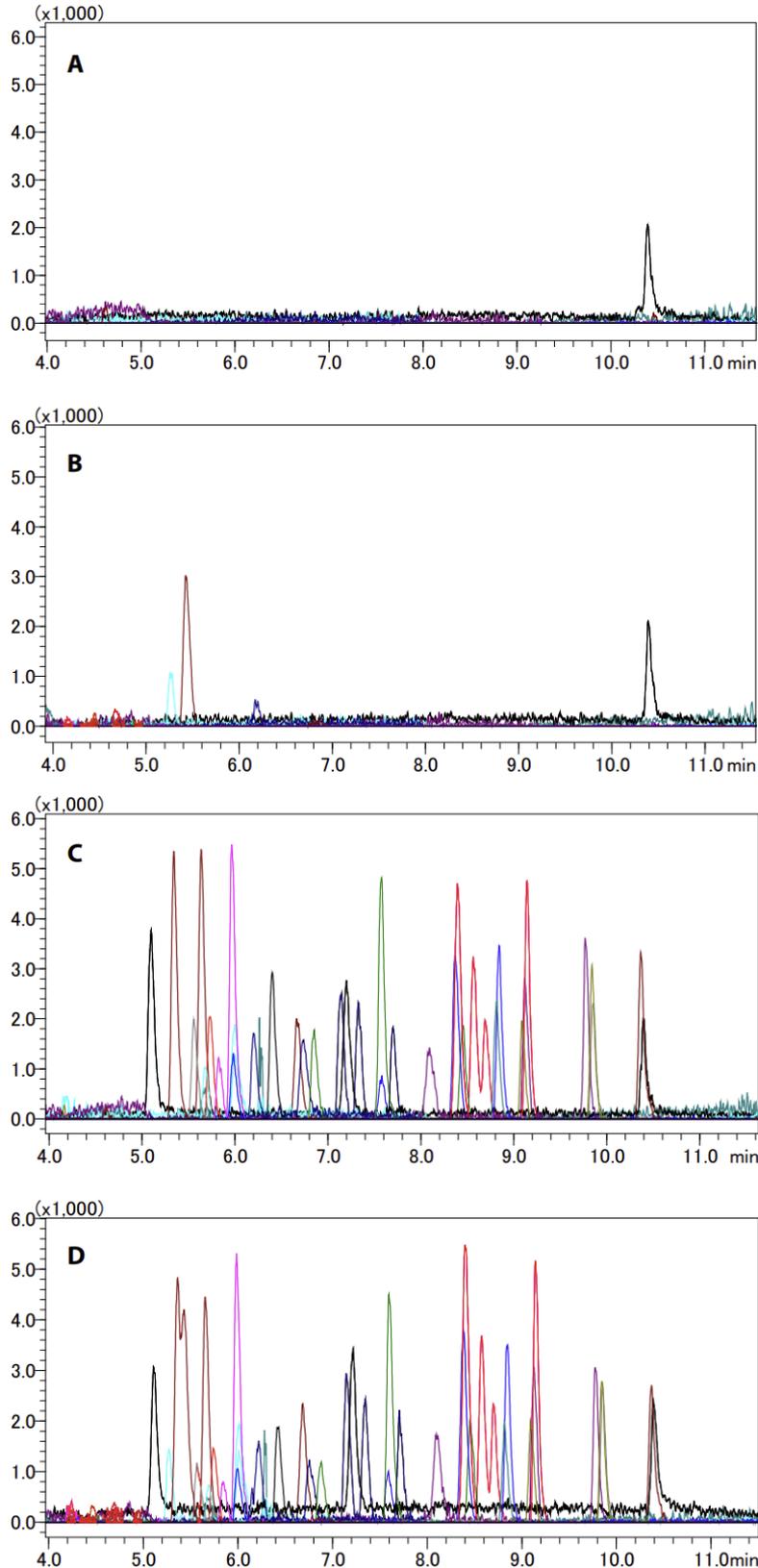


그림 3. 39개 성분의 추출 이온 크로마토그램 (XIC)  
 (A) 아세트니트릴, (B) 동물용의약품이 없는 닭고기 추출물, (C) 혼합표준용액, (D) 동물용의약품을 첨가한 닭고기 추출물

■ 검량선의 직선성

각 화합물에 대한 검량선의 직선성은 용매와 닭고기 추출물에서 0.25-50 ppb 범위 내 6개의 농도로 검량선을 작성하여 평가하였다. 용매와 추출물의 모든 화합물에 대해 매우 좋은 직선성 결과 (결정계수 R<sup>2</sup>: 0.99 이상)를 보였다.

설파계 의약품인 Sulfamethoxazole과 퀴놀론계 의약품인 Enrofloxacin에 대한 검량선을 그림 4, 5에 예를 들어 각각 나타내었으며, 39개 성분의 검량선 범위를 표 3에 나타내었다.

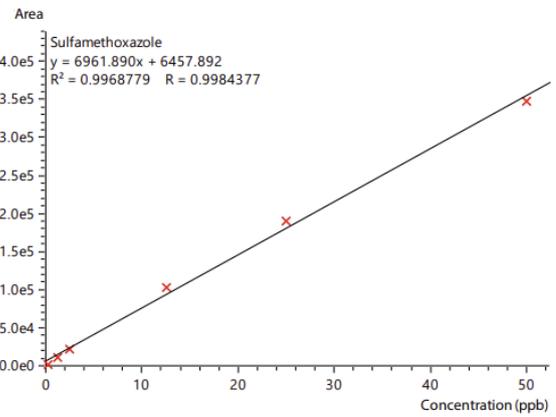
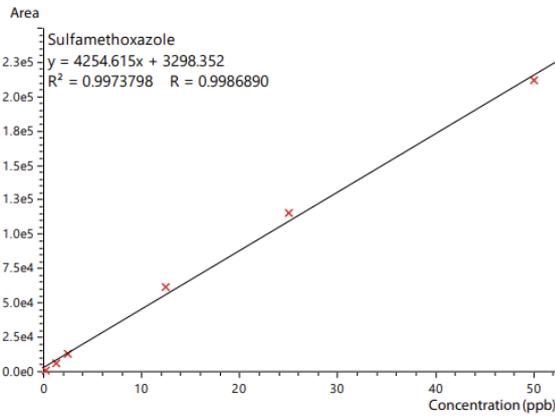


그림 4. Sulfamethoxazole의 검량선 (왼쪽: 용매, 오른쪽: 닭고기 추출물)

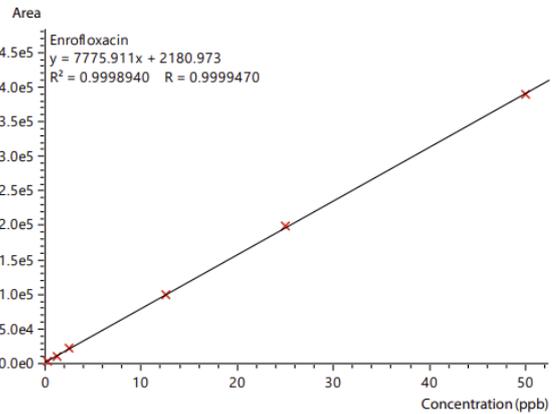
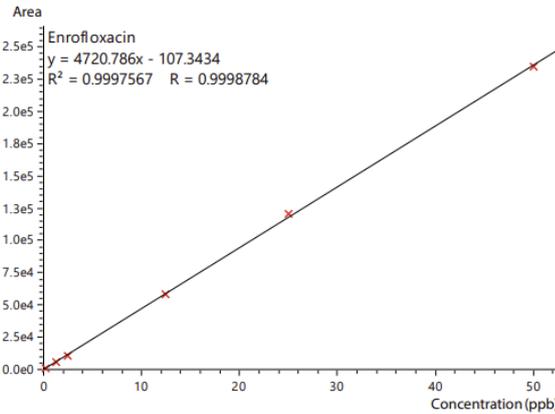


그림 5. Enrofloxacin의 검량선 (왼쪽: 용매, 오른쪽: 닭고기 추출물)

표 3. 39개 성분의 직선성 범위

성분	검량선 범위 (ppb)		성분	검량선 범위 (ppb)	
	용매	닭고기 추출물		용매	닭고기 추출물
Ciprofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfachlorpyridazine	0.25-50	0.25-50
Danofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfadiazine	0.25-50	0.25-50
Diaveridine	0.25-50	0.25-50	Sulfadimethoxine	0.25-50	0.25-50
Difloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfadimidine	0.25-50	0.25-50
Enrofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfadoxine	0.25-50	0.25-50
Flumequine	0.25-50	0.25-50	Sulfaethoxypyridazine	0.25-50	0.25-50
Marbofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfamerazine	0.25-50	0.25-50
Miloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfamethoxazole	0.25-50	0.25-50
Nalidixic acid	0.25-50	0.25-50	Sulfamethoxypridazine	0.25-50	0.25-50
Norfloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfametoxydiazine	0.25-50	0.25-50
Ofloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfamonomethoxine	0.25-50	0.25-50
Orbifloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfapyridine	1.25-50	1.25-50
Ormetoprim	0.25-50	0.25-50	Sulfaquinoxaline	0.25-50	0.25-50
Oxolinic acid	0.25-50	0.25-50	Sulfathiazole	0.25-50	0.25-50
Piromidic acid	0.25-50	0.25-50	Sulfatroxazole	0.25-50	0.25-50
Pyrimethamine	0.25-50	0.25-50	Sulfisomidine	0.25-50	0.25-50
Sarafloxacin	0.25-50	0.25-50	Sulfisoxazole	0.25-50	0.25-50
Sulfabenzamide	0.25-50	0.25-50	Sulfisozole sodium	0.25-50	0.25-50
Sulfabromomethazine Na	0.25-50	0.25-50	Trimethoprim	0.25-50	0.25-50
Sulfacetamide	0.25-50	0.25-50			

### ■ 첨가 회수율 시험

동물용 의약품 39종 혼합표준액을 시료당 0.01 mg/kg (전처리한 시료 용액 내 농도는 1.25 ppb)로 첨가한 닭고기 추출물을 이용하여 첨가 회수율 시험을 수행하였고, 회수율 및 질량 오차 (n=6)를 평가하였다. 회수율, 재현성(%RSD), 질량 오차의 결과는 표 4에, 회수율의 결과는 그림 6에 나타내었다.

39개 성분 중 32개 성분에 대한 회수율은 70-120 % 였으며, 높은 시료 농도를 포함하는 용액에서도 매트릭스 억제 없이 우수한 회수율과 재현성을 얻었다.

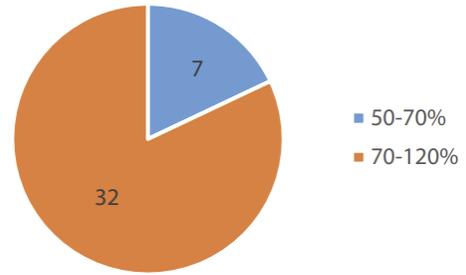


그림 6. 회수율 결과

표 4. 회수율, 재현성 (%RSD) 및 질량 오차 (n=6)

성분	회수율 (%)	%RSD	질량 오차 (mDa)	성분	회수율 (%)	%RSD	질량 오차 (mDa)
Ciprofloxacin	68.4	5.5	0.2	Sulfachlorpyridazine	125.8	8.0	0.6
Danofloxacin	90.4	5.6	1.0	Sulfadiazine	109.6	2.5	0.0
Diaveridine	92.8	3.0	0.7	Sulfadimethoxine	109.7	3.0	0.9
Difloxacin	70.1	3.7	1.4	Sulfadimidine	110.6	4.4	1.2
Enrofloxacin	116.1	12.1	1.3	Sulfadoxine	117.6	2.6	1.1
Flumequine	98.6	2.7	0.7	Sulfaethoxypyridazine	120.2	3.5	0.9
Marbofloxacin	61.9	5.0	1.0	Sulfamerazine	114.5	2.6	0.8
Miloxacin	80.3	4.3	0.6	Sulfamethoxazole	115.5	3.2	1.0
Nalidixic acid	91.8	4.0	0.7	Sulfamethoxy-pyridazine	115.4	2.8	0.6
Norfloxacin	71.3	3.3	0.8	Sulfamethoxydiazine	114.7	2.6	0.4
Ofloxacin	74.3	4.3	1.0	Sulfamonomethoxine	114.2	3.5	0.7
Orbifloxacin	68.5	4.1	1.2	Sulfapyridine	65.9	24.4	-0.3
Ormetoprim	97.1	2.8	0.8	Sulfaquinolaxine	112.3	1.9	0.6
Oxolinic acid	105.2	4.0	0.7	Sulfathiazole	109.4	4.0	0.9
Piromidic acid	86.8	3.7	0.8	Sulfatroxazole	111.3	1.8	0.7
Pyrimethamine	94.3	3.3	0.7	Sulfisomidine	78.0	7.6	1.1
Sarafloxacin	73.4	7.7	0.7	Sulfisoxazole	114.7	2.4	0.7
Sulfabenzamide	108.6	3.2	0.5	Sulfisozole sodium	120.8	4.3	0.8
Sulfabromomethazine Na	111.9	3.4	1.2	Trimethoprim	84.2	2.2	0.8
Sulfacetamide	89.7	4.9	0.6				

### ■ 결론

STQ-LC 방법은 추출을 반복하는 방법으로 전처리 과정을 가속화하고 단순화 할 수 있다. 이 방법으로 전처리한 닭고기 시료를 LCMS-9030을 이용한 전체 스캔 분석을 통해 첨가 회수율, 재현성 및 선형성에 대한 좋은 결과를 얻었다.

이 뉴스레터에서 소개한 분석법은 "신속하고 간단하며 고정밀" 분석이 가능하며, 식품 중의 동물용의약품 분석에 유용함을 입증하였다.

#### <Reference>

- Shima et al., poster presentation at the 114th Annual Meeting of the Japan Society for Food Hygiene and Safety Conference, High-speed Simultaneous Analysis of Veterinary Drugs in Meat by Combining STQ Method and LC/MS/MS (Pretreatment Edition)