전문교육과정(축산물잔류물질검사반)

구충제 및 항원충제 기기분석법

국립수의과학검역원
위생검역부 독성화학과
수의연구사 박 수 정
전화 (031)467-1835
sjpark@nvrqs.go.kr

<목 차>

I. LC를 이용한 벤지미다졸계 잔류분석법

II. LC를 이용한 목시덱틴 및 아버멕틴계 잔류분석법

III. LC-MS/MS를 이용한 폴리에테르계 잔류분석법

IV. LC-MS/MS를 이용한 항원충제 잔류분석법

V. LC-MS/MS를 이용한 레바미졸 및 클로산텔 잔류분석법

1. LC를 이용한 벤지미다졸계 잔류분석법

벤지미다졸계 구충제는 소, 돼지 등에 기생하는 회충, 촌충, 간질충 및 폐충 등을 구제하는데 널리 사용되고 있다. 대표적인 약물로는 albendazole, thiabendazole, flubendazole, fenbendazole, oxfendazole 등이 있다. 이들 약물이 구충효과를 나타내는 기전은 충체에 흡수되어 protein tubulin에 결합하여 microtubule을 파괴하고 기생충의 혐기성 에너지 생산기구로부터 fumaric acid 환원 효소를 저해하여 에너지 공급을 차단함으로서 충체를 사멸시키고, glycogen uptake을 억제하고 oxidative phosphorylation의 coupling을 방해해서 구충효과를 나타낸다. 가축의 기생충성 질병의 치료나 예방을 위하여 사용될 경우 가축에서 약물내성을 일으킬 뿐만 아니라 사람에게 이행되어 축적되면 기형을 유발하고 면역체계를 억제하여 병원성 미생물에 의한 2차 감염이 쉽게 일어날 수 있다. 이러한 위험성 때문에 우리나라에서 식육에서의 잔류허용기준은 albendazole과 thiabendazole이 0.1 μg/g, flubendazole이 돼지에서 0.01 μg/g, 가금육에서 0.2 μg/g, triclabendazole이 소에서 0.2 μg/g, 양에서 0.1 μg/g으로 설정되어 있고, 식용란에서는 flubendazole이 0.2 μg/g으로 설정되어 있다.

1) 원 리

시료 중 벤지미다졸계 구충제를 ethyl acetate로 추출·농축한 후 재용해하고 0.20 μm filter로 여과하여 HPLC로 분석한다.

2) 측정기기

액체크로마토그래피 (HPLC), Agilent 1100 series

3) 시약·시액 및 기구

가) 표준품 및 시약

(1) 표준품 : Flubendazole (FLU), albendazole (ABZ), fenbendazole (FBZ), oxfendazole (OFZ), thiabendazole (TBZ), mebendazole (MBZ)

(2) Acetonitrile : HPLC grade

(3) n-Hexane : HPLC grade

(4) Ethyl acetate : HPLC grade

(5) Methanol : HPLC grade

(6) Ammonium phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$) : 시약특급

(7) Dimethyl sulfoxide (DMSO) : 시약특급

(8) EDTA : 시약특급

(9) 증류수 : 18 MΩ 이상

나) 기 구

(1) 50 mL 원심분리용 튜브

(2) 유리시험관 : 160 x 100 ㎜

(3) 마이크로필터 : 0.20 μm 또는 0.45 μm

(4) 마이크로피펫 : 100 μL, 1000 μL

(5) Vortex mixer

(6) Ultrasonic bath(Branson 8510)

(7) 원심분리기

(8) 질소농축기(TurboVap® LV, Caliper Lifescience)

(9) 수소 이온농도측정기

(10) 정밀저울 (Chemical Balance) ± 0.001 g 정밀도

(11) 일반저울 : ± 0.1 g 정밀도

(12) Multi-mixer(TAITEC vial mixer, vix-100)

4) 시험용액의 조제

가) 표준원액(Stock solution) :

각 표준물질 10 mg을 칭량하여 10 mL DMSO로 녹인 다음 acetonitrile를 첨가하여 100 mL로 한다(100 μg/mL).

나) 표준용액(Working solution) :

Stock solution을 증류수로 100 배 희석하여 사용한다(1 μg/mL).

다) Spike sample 조제 : 균질화한 시료 1g에 1 μg/mL 농도의 표준용액을 100 μL를 첨가하여 0.1 μg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

라) 0.04 M ammonium phosphate (pH 7.5)

Ammonium phosphate 5.3 g을 증류수 900 mL에 녹인 후 phosphoric acid로 pH 7.5로 조절한 후 증류수로 1 L까지 채운 후 0.45 μm filter로 여과하여 이동상으로 사용한다.

5) 검사방법

가) 시료전처리

(1) 균질화된 시료 1 g을 50 mL 원심분리용 튜브에 취한다.

(2) 1 mL 50 % acetonitrile을 넣은 후 약 10 분간 multi-mixer로 진탕 혼합한다.

(3) 5 mL ethyl acetate을 넣고 15 분간 multi-mixer로 진탕 혼합한 다음 4 500 rpm으로 10 분간 원심분리한다.

(4) 상층액 (Ⅰ)을 14 mL 유리관에 담고 잔사에 ethyl acetate 5 mL를 가하고 다시 15 분간 multi-mixer로 진탕 혼합한 다음 4 500 rpm으로 10 분간 원심분리한다.

(5) 위의 2) 와 3) 의 과정을 반복하여 얻은 상층액(Ⅱ)을 상층액 (Ⅰ)과 합한다.

(6) 모아진 상층액을 45 ℃, 질소하에서 농축 건조시킨다.

(7) 50 % acetonitrile 1 mL로 용해해서 초음파로 10 분간

완전히 용해한 후 eppendorf tube에 옮겨 원심분리 (15 000 rpm, 10 min, 4 ℃)한다.

(8) 상층액을 0.20 μm filter로 여과하여 HPLC로 분석한다.

나) HPLC 분석조건

(1) Column : Waters XTerra C_{18} (4.6×250 ㎜, 5 μm) 또는 동등의 분석용 칼럼

(2) Mobile phase : 0.04 M ammonium phosphate (pH 7.5)/ acetonitrile (62:38, v/v)

(3) 유속(flow rate) : 1.0 mL/min

(4) Detector : UV-Visible

(5) 파장 : 295 ㎚

다) 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

6) 실험결과 분석

시료용액 분석에서 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 표준물질 피크에 대한 평균면적을 구한 다음 표준곡선 좌표의 Y 축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 표준곡선상 만나는 점에서 수직으로 X 축과 만나는 점이 시료용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시료용액의 희석배수 (건조물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료 무게로 나누어 최종 시료 중 각 표준물질의 농도를 산출한다.

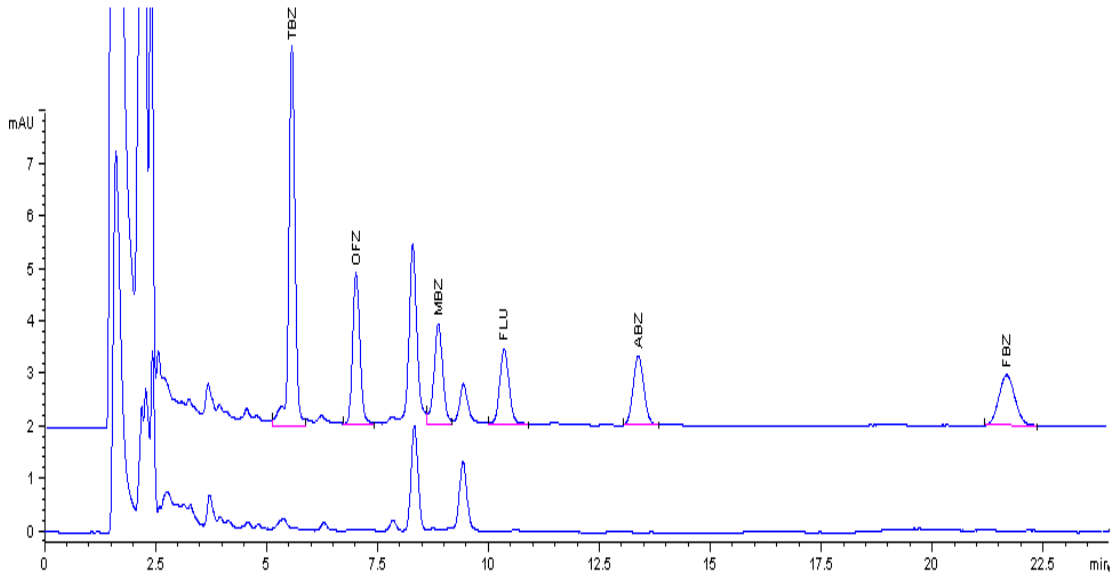

Fig 1. HPLC chromatograms of 6 benzimidazole anthelmintics in whole egg fortified at 0.5μg/g and blank.

2. LC를 이용한 목시덱틴 및 아버멕틴계 분석법

1) 원 리

시료 중의 macrocyclic lactone계 구충제인 moxidectin, abamectin, doramectin 및 ivermectin을 acetonitrile로 추출·농축한 후 N-methylimidazole와 trifluoroacetic anhydride로 유도체화하여 액체크로마토그래피(HPLC)로 분석한다.

2) 측정기기

액체크로마토그래프 (HPLC), Agilent 1100 series

3) 표준품·시약 및 기구

가) 표준품 및 시약

(1) 표준품 : Moxidectin, abamectin, doramectin, ivermectin
(2) Acetonitrile(ACN) : HPLC grade
(3) Methanol : HPLC grade
(4) Triethylamine (FW 101.2, 99%) : 시약특급
(5) N-methylimidazole (FW 82.10) : 시약특급
(6) Trifluoroacetic anhydride : 시약특급
(7) 증류수 : 18 ㏁ 이상

나) 기구

(1) 50 mL 원심분리용 튜브
(2) 유리시험관 : 160 x 100 ㎜
(3) 마이크로피펫 : 100 µL, 1000 µL
(4) 마이크로필터 : 0.20 µm 또는 0.45 µm
(5) 원심분리기 (한일 MEGA 17R)
(6) 질소농축기(TurboVap® LV, Caliper Lifescience)
(7) 일반저울 : ± 0.1 g 정밀도

(8) Ultrasonic bath(Branson 8510)

(9) Vortex mixer

(10) SPE C_{18} cartridge : Agilent AccuBOND II ODS-C_{18} (500 ㎎, 6 mL)

4) 시험용액의 조제

가) 표준원액(Stock solution) :

각각의 구충제 표준품 10 mg을 정밀히 달아 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol로 녹인 다음 표시선까지 채워 녹인다 (100 μg/mL).

나) 표준용액(Working solution) :

Stock solution 10 mL를 정확히 취하여 100 mL 용량 플라스크에 옮기고 methanol로 표시선까지 채운 다음 잘 혼합하여 표준용액으로 사용한다 (10 μg/mL).

다) Spike sample 조제 : 균질화한 시료 1g에 1 μg/mL 농도의 표준용액을 100 μL를 첨가하여 0.1 μg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

라) 시험용액

(1) N-methylimidazole : ACN (1 : 1, v/v) 용액, ACN 5mL에 N-methylimidazole 5 mL를 가하여 혼합한 후 갈색병에 담아 유도체화 시약으로 사용한다.

(2) Trifluoroacetic anhydride : ACN (1 : 2, v/v) 용액, ACN 10 mL에 trifluoroacetic anhydride 5 mL를 첨가하여 혼합한 후 갈색병에 담아 유도체화 시약으로 사용한다.

※ 유도체화 시약은 당일 제조하여 사용한다.

(3) 30 % ACN : 증류수 70 mL에 ACN 30 mL를 가해 혼합한다.

(4) 70 % ACN : 증류수 30 mL에 ACN 70 mL를 가해 혼합한다.

(5) 90 % ACN : 증류수 10 mL에 ACN 90 mL를 가해 혼합한다.

(6) 0.1 % triethylamine 첨가 30 % ACN 용액, 30 % ACN 500 mL에 triethylamine을 0.5 mL를 가해 잘 혼합한다.

5) 검사방법

가) 시료전처리

(1) 균질화된 시료 1 g을 50 mL 원심분리용 튜브에 취한다.
(2) Methanol 0.1 mL와 ACN 7 mL를 첨가한 후 10 분간 multi-mixer로 혼합진탕 한다.
(3) 5 000 rpm으로 15 분간 원심분리한 다음 상층액을 새로운 원심관에 옮긴다.
(4) 잔사에 ACN 5 mL를 첨가한 후 10 분간 multi-mixer로 혼합・진탕한다.
(5) 잔사를 제거하기 위해 5 000 rpm에서 10 분간 원심분리하고 상층액을 3)에 옮겨 합한다.
(6) 모은 상층액에 증류수 10 mL를 첨가한다.
(7) SPE C_{18} cartridge에 먼저 0.1 % triethylamine가 첨가된 30 % ACN 용액을 5 mL 통과시킨 다음, ACN 5 mL 통과시킨 후 위의 6)용액을 통과시킨다.
(8) 0.1 % triethylamine가 첨가된 30 % ACN 용액 1 mL로 원심관과 cartridge를 세척한다.
(9) 70 % ACN 1 mL로 cartridge를 세척한 후 약 1분간 말린다.
(10) 90 % ACN 3 mL로 용출한 후 40 ℃에서 질소하 농축・건조한다.
(11) N-methylimidazole : ACN (1:1, v/v) 200 μL로 먼저 녹인후, trifluoroacetic anhydride : ACN (1:2, v/v) 300 μL를 첨가하여 녹인다.
(12) 유도체화된 시료용액을 0.2 μm nylon filter로 여과하고 HPLC로 분석한다.

1 g sample in 50 mL centrifuge tube

↓

Add 0.1 mL MeOH and 7 mL ACN

↓

Mix for 10 min

↓

Centrifuge at 5 000 rpm, -4 ℃ for 15 min

↓

Transfer the supernatant into new tube and add 5 mL ACN to the residues

↓

Mix for 10 min

↓

Centrifuge at 5 000 rpm, -4 ℃ for 15 min

↓

Transfer the supernatant into tube and combine

↓

Add 10 mL D.W. into combined supernatant

↓

Load the sample to SPE C_{18} cartridge

▶ Preconditioning

Flow 5 mL 30% ACN containing 0.1 % triethylamine followed by 5 mL ACN

※ Load the solution at a flow rate of 0.3 mL min^{-1}

↓

Wash the centrifuge tube and cartridge with 1 mL 30% ACN containing 0.1 % triethylamine

↓

Wash the cartridge with 1 mL 70% ACN

and dry for 1 min

↓

Elute with 3 mL 90 % ACN

↓

Evaporate to dryness at 40 ℃

↓

Dissolve with 200 µL N-methylimidazole : ACN (1:1, v/v) and then

with 300 µL trifluoroacetic anhydride : ACN (1:2, v/v)

※ These solutions should be made the day of use

↓

After mixing, transfer to the vials

※ Keep the vials protected from sunlight until the injection

※ Carry out HPLC analyses within 6 hours to avoid the degradation of the fluorescent derivatives.

↓

Inject into HPLC

Fig. 1. The sample preparation scheme of macrocyclic lactones in animal origin samples.

나) HPLC 분석조건

(1) 컬럼 : precolumn이 장착된 C_{18} column (125 × 4 mm, 5 µm) 또는 동등품

(2) 이동상 : 94% ACN

(3) 유속 : 2 mL/min

(5) Detector : 형광검출기

(6) 파장 : excitation 361 nm, emission 465 nm

다) 표준곡선 작성

(1) 표준용액의 유도체화 : 1 mL eppendorf tube에 각각의 구충제 혼합표준용액 1 μg/mL를 200, 100, 50 μL를 취하고 이동상으로 표시선까지 채워 0.2, 0.1, 0.05 μg/mL으로 희석한다. 40 ℃에서 질소하 농축건조 한 후 N-methylimidazole : ACN (1:1, v/v) 200 μL로 먼저 녹인 다음, trifluoroacetic anhydride : ACN (1:2, v/v) 300 μL를 첨가하여 녹인다.

(2) 표준곡선 작성 : 유도체화된 각각의 표준용액을 20 μL씩 주입하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 구충제에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X축을 농도, Y축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

6) 시험결과 분석

시료용액 분석에서 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 표준물질 피크에 대한 평균면적을 구한 다음 표준곡선 좌표의 Y 축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 표준곡선상 만나는 점에서 수직으로 X 축과 만나는 점이 시료용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시료용액의 희석배수(건조물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료무게로 나누어 최종시료 중 각 표준물질의 농도를 산출한다.

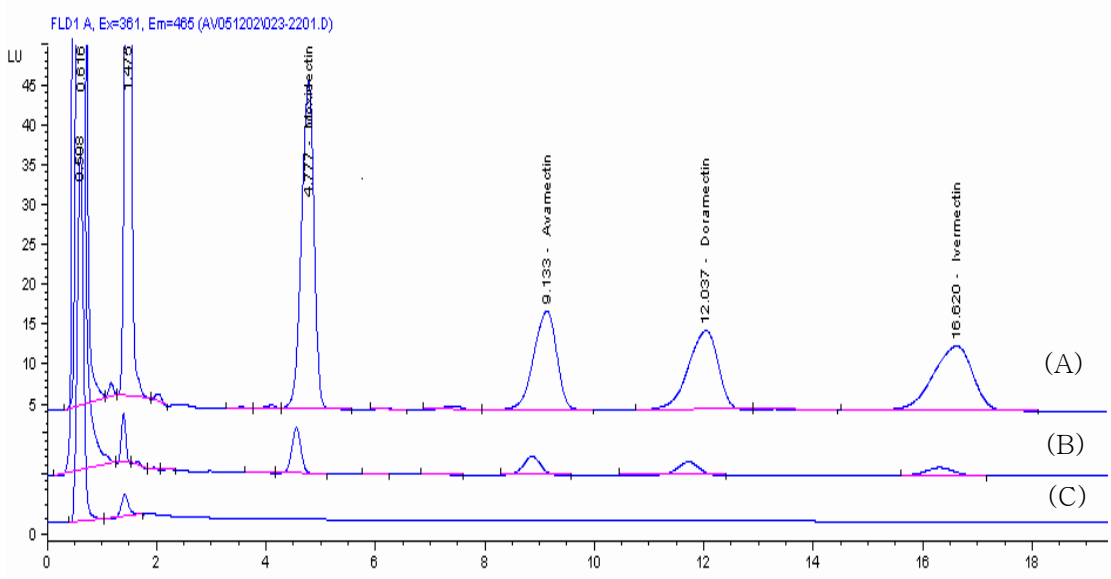

Fig. 2. HPLC chromatograms of 4 macrocyclic lactones fortified in pig liver(100 ng/g, A), muscle(10 ng/g, B) samples and blank (C).

3. LC-MS/MS를 이용한 폴리에테르계 분석법

폴리에테르계 항생제에는 나라신, 라살로시드, 마두라마이신, 모넨신, 밤버마이신, 아빌라마이신, 살리노마이신, 셈두라마이신 등이 있으며, 주로 닭의 콕시듐증의 예방 및 치료 및 성장촉진 목적으로 사용되나 소, 돼지에도 일부 사용되며, 배합사료 제조용으로 년간 60여톤이 사용되고 있다.

1. 원리

균질화한 시료를 아세토니트릴로 추출한 후 원심분리하여 얻어진 상층액을 여과한 후 액체크로마토그래피/질량분석기로 분석한다.

2. 측정기기

액체크로마토그래프-질량분석기

LC-MS/MS (Triple-quadrupole mass spectrometer)

3. 표준품, 시약 및 기구

가. 표준품 및 시약

1) 표준품 : Avilamycin, Lasalocid, Maduramicin, Monensin, Narasin, Salinomycin, Semduramicin
2) Acetonitrile : HPLC grade
3) Formic acid : HPLC grade
4) 증류수 : 18 MΩ 이상

나. 기 구

1) 50 mL centrifuge tube
2) 유리시험관 : 160 x 100 mm
3) 마이크로피펫 : 100 µL, 1000 µL

4) 마이크로필터 : 0.2 μm filter
5) 원심분리기
6) 정밀저울 (Chemical balance) ± 0.0001 g 정밀도
7) 일반저울 : ± 0.1 g 정밀도
8) Vortex mixer
9) Multi-mixer(TAITEC vial mixer, vix-100)
10) Ultrasonic bath(Branson 8510)

4. 시험용액 조제

가. 표준용액(Stock solution) : 표준품을 각각 10 mg씩 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol 100 mL로 용해한 후 4 ℃ 냉장 보관한다 (100 μg/mL).

나. 표준용액(Working solution) : Stock solution을 증류수로 100 배 희석하여 사용한다 (1 μg/mL).

다. Spike sample 조제 : 균질화한 시료 1g에 1 μg/mL 농 도의 표 준용액을 100 μL를 첨가하여 0.1 μg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

라. 시험용액

1) 0.3 % formic acid in DW (0.3 % FA in DW) :
증류수 100 mL에 formic acid 0.3 mL을 넣고 혼합한다.
2) 0.3 % formic acid in acetonitrile (0.3 % FA in ACN) :
Acetonitrile 100 mL에 formic acid 0.3 mL을 넣고 혼합한다.
3) 0.2M 인산완충액(pH 7.2) :
500 mL 용량플라스크에 제이인산나트륨(Na_2HPO_4 · H_2O) 5.11 g과 제일인산나트륨(NaH_2PO_4 · H_2O) 1.68 g을 달아 증류수로 녹여 표시선까지 채운다.

5. 검사방법

가. 시료전처리

1) 균질화된 시료 1 g에 0.2 M 인산완충액(pH 7.2) 1 mL를 넣어 균질화한 다음 acetonitrile 10 mL를 넣고 multi-mixer로 5 분간 강하게 진탕 혼합한다.
2) -4 ℃, 5 000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 상층액을 취한다.
3) 얻어진 상층액은 40 ℃에서 질소 농축시킨다.
4) 잔류물을 50 % acetonitrile 1 mL에 녹인 후 0.2 μm filter로 여과하여 시험용액으로 한다.

나. 분석조건

1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : C_8 (2.1 × 100 ㎜, 3.5 μm) 또는 동등품

나) 이동상 :

0.3 % FA in DW (A) / 0.3 % FA in ACN (B) gradient

- Gradient 조건

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL)
0.0	50	50	0.25
10.0	10	90	0.25
14.0	10	90	0.25
15.0	0	100	0.25
25.0	0	100	0.25
25.5	50	50	0.25
30.0	50	50	0.25

다) 칼럼온도 : 35 ℃

라) 주입량 : 10 μL

2) 질량분석기 조건

가) Ionization : ESI (positive)

나) Capillary (kV) : 3.5, Extractor (V) : 3

다) Temperature : Source Temp 150 ℃,
Desolvation Temp : 400 ℃

라) Gas flow : Desolvation 650 L/hr, Cone 50 L/hr

마) Auxiliary Gas : 질소, Collision Gas : 아르곤

물질명	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Dwell time(s)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Avilamycin	1426.29	917.61	0.2	75	56
		791.69	0.2	85	56
Lasalocid	613.16	377.20	0.2	50	35
		577.30	0.2	50	35
Maduramicin	940.00	720.00	0.2	30	65
		878.16	0.2	30	40
Monensin	693.31	461.33	0.2	54	52
		479.34	0.2	54	52
Narasin	787.58	431.36	0.2	54	44
		531.35	0.2	54	44
Salinomycin	773.23	431.14	0.2	50	55
		531.23	0.2	50	55
Semduramicin	877.74	815.75	0.3	33	31
		833.70	0.3	33	35

다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

6. 시험결과 분석

시료용액 분석에서 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질의 이온에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 표준물질 피크에 대한 평균면적을 구한 다음 표준곡선 좌표의 Y 축에 동일한 값을 표시

하고 이 값과 표준곡선상 만나는 점에서 수직으로 X 축과 만나는 점이 시료용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시료용액의 희석배수(건조물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료 무게로 나누어 최종 시료 중 각 표준물질의 농도를 산출한다.

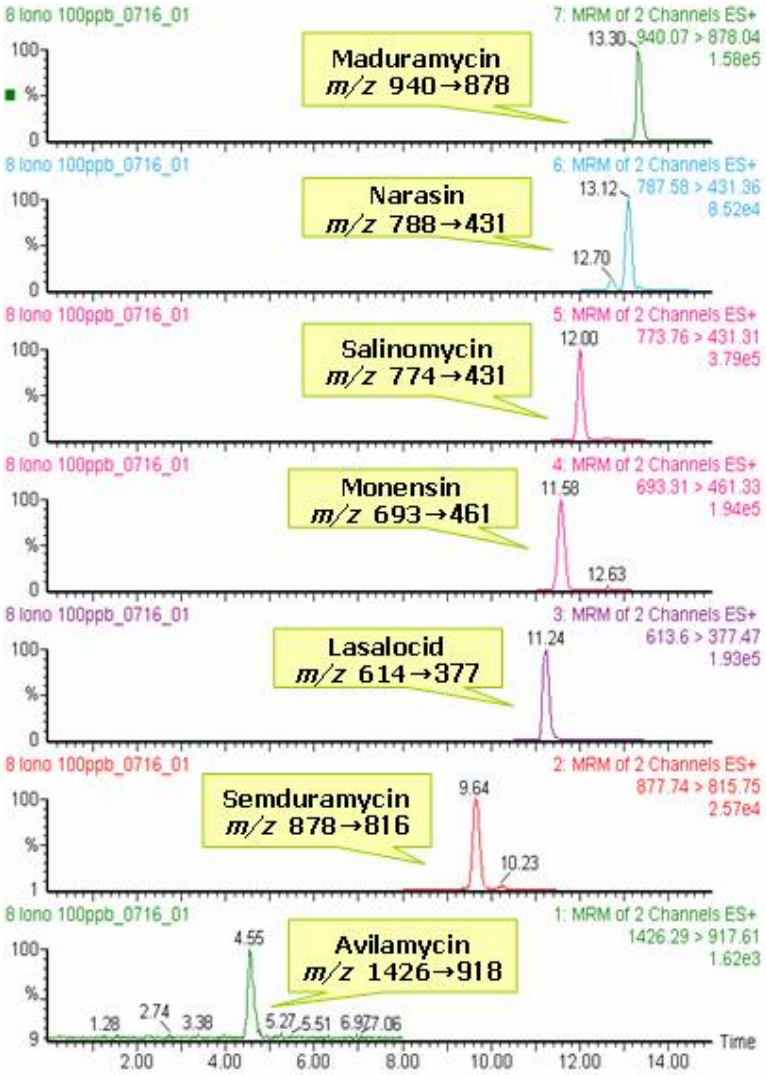

Fig 1. LC-MS/MS chromatograms of 7 polyether standards at 100 ng/g

4. LC-MS/MS를 이용한 항원충제 잔류분석법

1. 원리

균질화한 시료를 아세토니트릴로 추출하여 농축건조한 후 SPE cartridge를 이용하여 정제과정을 거친 다음 이동상 혼합액으로 용해하여 여과한 후 액체크로마토그래피/질량분석기로 분석한다.

2. 측정기기

액체크로마토그래프-질량분석기

LC-MS/MS (Triple-quadrupole mass spectrometer)

3. 표준품, 시약 및 기구

가. 표준품 및 시약

1) 표준품 : Amprolium, Clopidol, Decoquinate, Diaveridine, Diclazuril, Dicyclanil, Ethopabate, Halofuginone, Imidocarb, Nicarbazin, Robenidine, Roxarsone, Toltrazuril, Toltrazuril sulfone, Zoalene
2) Acetonitrile : HPLC grade
3) Formic acid : HPLC grade
4) 증류수 : 18 MΩ 이상

나. 기 구

1) 50 mL centrifuge tube
2) 유리시험관 : 160 × 100 mm
3) 마이크로피펫 : 100 µL, 1000 µL
4) 마이크로필터 : 0.2 µm filter
5) 원심분리기
6) 정밀저울 (Chemical balance) ± 0.0001 g 정밀도
7) 일반저울 : ± 0.1 g 정밀도

8) Vortex mixer
9) Multi-mixer(TAITEC vial mixer, vix-100)
10) Ultrasonic bath(Branson 8510)

4. 시험용액 조제

가. 표준용액(Stock solution) : 표준품을 각각 10 mg씩 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol 100 mL로 용해한 후 4 ℃ 냉장 보관한다 (100 µg/mL).

나. 표준용액(Working solution) : Stock solution을 0.1% formic acid로 100배 희석하여 사용한다 (1 µg/mL).

다. Spike sample 조제 : 균질화한 시료 1g에 1 µg/mL 농도의 표준용액을 100 µL를 첨가하여 0.1 µg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

라. 시험용액

1) 0.1 % formic acid in DW (0.1 % FA in DW) :
증류수 100 mL에 formic acid 0.1 mL을 넣고 혼합한다.

2) 0.1 % formic acid in acetonitrile (0.1 % FA in ACN) :
Acetonitrile 100 mL에 formic acid 0.1 mL을 넣고 혼합한다.

3) 5mM KH_2PO_4 :
KH_2PO_4 0.68 g을 증류수 1 L에 용해시킨 후 20분간 sonication 한 후, 0.2 µm filter로 여과하여 사용한다.

5. 검사 방법

가. 시료 전처리 방법

시료(균질화한 조직, 계란, 우유) 2.0 g을 정량하여 50 mL 원심튜브에 취한 후 5 mM potassium phosphate 1 mL을 가하고 약 2 분간 균질화 한다. 추출액인 acetonitrile을 10 mL 넣고 10 분간 혼합한 후 5,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상층액만 새로운 50 mL 튜브에 취한다. 이 과정을 한번 더 반복하여 취한 상층액을 합하여 40 ℃에서 질소 농축시킨다. 잔류물을 5% acetonitrile 3 mL에 녹인 후,

미리 3 mL methanol과 3 mL 증류수로 활성화시킨 SPE (Oasis® HLB 3cc, 60 mg) cartridge에 녹여놓은 잔류물을 대략 분당 1 mL의 속도로 통과시킨다. 5 % methanol 3 mL로 세척하고 약 5 분정도 vacuum을 이용하여 말린 후 MeOH 3 mL로 용출한 다음 40 ℃에서 질소하 농축 건조시킨다. 이를 0.1% formic acid 0.5 mL로 용해하여 10 분간 초음파로 완전히 용해시킨 다음 0.2 μm syringe filter로 여과하여 시료용액으로 사용한다.

나. 분석 조건

1) UPLC 분석 조건

(1) 컬 럼: ACQUITY UPLC™ BEH C_{18}(2.1×100 mm, 1.7 μm) 또는 동등품

(2) 이동상 : 이동상 A / 이동상 B 의 gradient

(3) 칼럼온도 : 35 ℃

(4) 주입량 : 5 μL

Table 1. Analytical conditions of sulfonamides by LC-MS/MS

Compounds	Column	Mobile phase
14 antiprotozoals	ACQUITY UPLC™ BEH C_{18} (2.1 × 100 ㎜, 1.7 μm)	A : 0.1% formic acid in DW B : 0.1% formic acid in acetonitrile A와 B의 gradient

Table 2. Mobile phase gradient program

Time(min)	A (%)	B (%)	Flow rate (min/mL)
0.0	98	2	0.45
0.5	98	2	0.45
3.0	90	10	0.45
6.0	80	20	0.45
8.0	70	30	0.45
9.0	60	40	0.45
10.0	50	50	0.45
14.0	50	50	0.45
14.1	50	50	0.45
15.0	98	2	0.45

2) 질량분석기 조건

(1) Ionization : ESI (positive/negative switching)

(2) Capillary (kV) : 3.0 Extractor (V) : 3.0

(3) Temperature : Source Temp 120 ℃, Desolvation Temp : 400 ℃

(4) Gas flow : Desolvation 900 L/hr, Cone 50 L/hr

(5) Auxiliary Gas : 질소, Collision Gas : 아르곤

Table 2. Multiple reaction monitoring parameter of antiprotozoals in LC-MS/MS

Compound	Ionization mode	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Amprolium	ES+	251.18	94.12	14	12
			149.48		10
Clopidol	ES+	265.25	87.08	35	29
			101.10		25
Decoquinate	ES+	281.26	204.19	25	45
			372.22		25
Diaveridine	ES+	254.31	123.08	25	25
			245.16		25
Diclazuril	ES-	404.74	333.84	25	25
		406.77	336.00		25
Dicyclanil	ES+	285.21	92.20	16	16
			315.28		20
Ethopabate	ES-	311.25	162.00	23	25
			192.00		23
Halofuginone	ES+	414.00	100.00	15	32
			121.20		25
Imidocarb	ES+	175.09	162.11	10	12
			101.10		24
Nicarbazin	ES-	301.04	106.76	16	34
			136.76		10
Robenidine	ES+	334.00	111.00	25	44
			155.00		20
Roxarsone	ES-	261.84	244.00	19	19
			153.00		19
Toltrazuril	ES-	423.93	98.80	16	16
			42.30	18	15
Toltrazuril sulfone	ES-	455.88	42.23	21	15
			148.00		16
Zoalene	ES-	224.00	77.16	16	24
			181.00		13

다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

6. 시험결과 분석

표준용액을 위의 분석 조건에 따라 LC-MS/MS로 분석하여 각 분석물질별 특이이온을 확인한다. 시료용액 분석에서 얻은 크로마토그램에서 설파제 의 각 물질에 대하여 주요 이온이 일치되는 대사물질 피크에 대한 평균면적을 구한 다음 표준곡선 좌표의 Y 축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 표준곡선상 만나는 점에서 수직으로 X 축과 만나는 점이 시료용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시료용액의 희석배수 (건조물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료 무게로 나누어 최종 시료 중 각 대사물질의 농도를 산출한다.

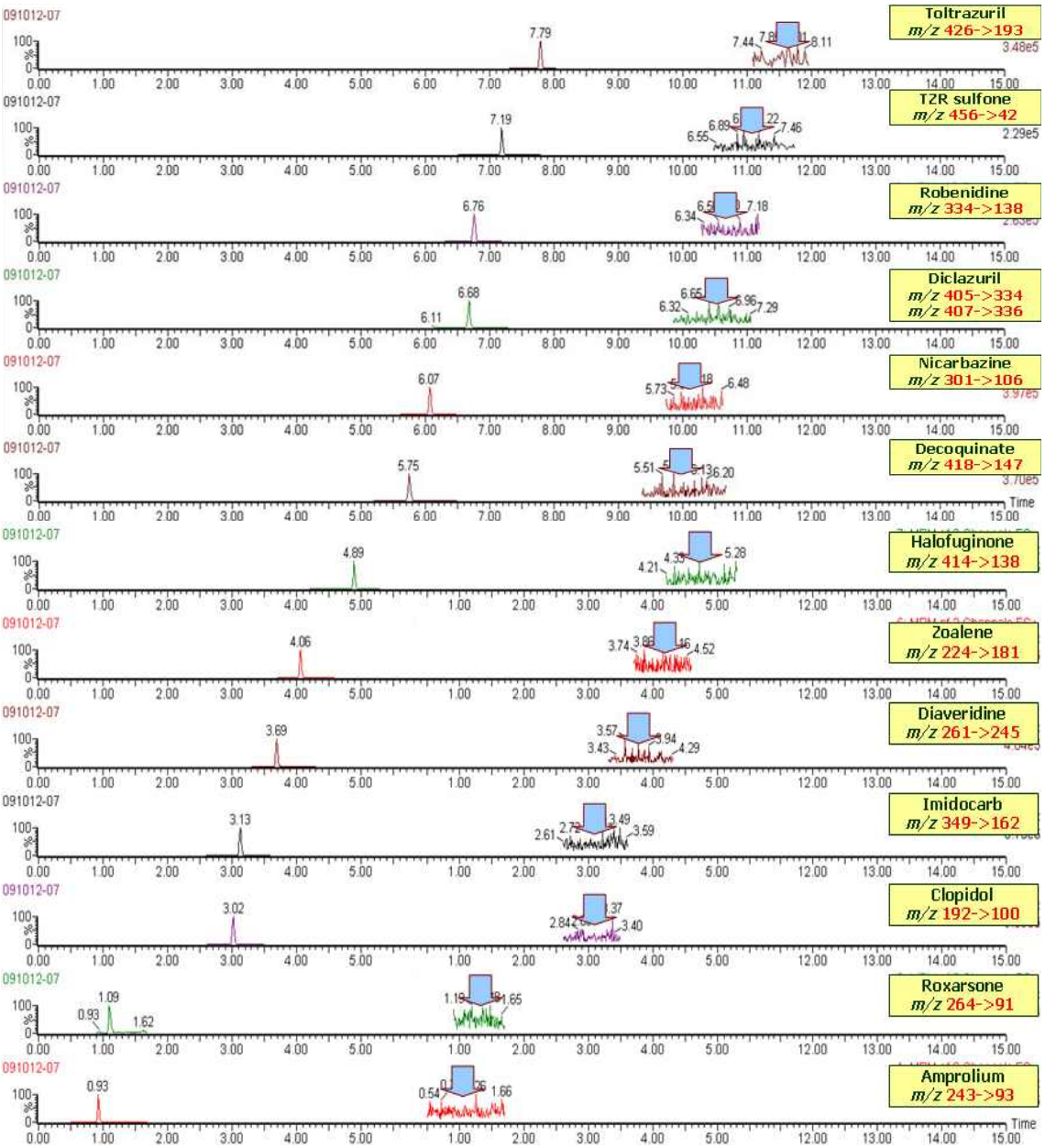

Fig 1.

Extracted mass chromatograms of 14 antiprotozoals spiked at 100 ng/g(left) and blank chicken muscle samples(right).

V. 레바미졸 및 클로산텔 잔류분석법

1. 원리

시료 중의 levamisole과 closantel을 acetonitrile로 추출하여 LC-MS/MS로 분석한다.

2. 측정기기

액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS/MS) :

US/6410 triple-quadrupole mass spectrometer(Agilent, USA) 등

3. 시험용액 조제

가. 표준원액(Stock solution) : 표준물질 10 mg을 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol로 용해한 후 표시선까지 채워 -20 ℃ 냉동 보관한다(100 μg/mL).

나. 표준용액(Working solution) : 표준원액을 50 % methanol로 100배 희석하여 사용한다(1 μg/mL).

다. Spike sample 조제 : 균질화한 시료 2g에 1 μg/mL 농도의 표준용액을 100 ㎕를 첨가하여 0.05 μg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

4. 검사방법

가. 시료전처리

1) 시료 2 g을 칭량하여 50 mL 원심튜브에 취한 후 DW 1 mL를 가해 약 2분간 균질화하고 10분간 초음파세척기를 작동시킨 후 다시 2분간 혼합하고 추출액인 acetonitrile을 8 mL 넣고 혼합한 후 5 000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 새 원심튜브에 취한다.
2) 남은 잔사에 추출액 5 mL를 넣고 재혼합한 후 원심분리하여 상층액을 합한다.
3) 합해진 상층액을 50 ℃ 질소하에서 농축건조시킨다.
4) 50 % ACN 1 mL를 가한 뒤 초음파세척기를 10분간 작동시켜 완전히

용해시킨다.

5) 위의 혼합액을 -4℃, 15,000 rpm, 15 min 동안 원심분리하여 맑은 상층만 취하여 0.2 μm nylon filter로 여과한 후 LC-MS/MS로 분석한다.

나. 분석조건

1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : Agilent Eclipse plus C_{18} (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) 또는 동등품

나) 이동상 (A) 10mM Ammonium Formate, (B) Acetonitrile

- Mobile phase gradient program

Time (min)	% A	% B	Flow rate (mL)
0.00	90	10	0.3
0.50	90	10	0.3
2.00	10	90	0.3
5.00	10	90	0.3
5.10	90	10	0.3
8.00	90	10	0.3

다) 칼럼온도 : 실온

라) 주입량 : 5 μL

2) 질량분석기 분석조건

가) Ionization : ESI positive/negative mode

나) Capillary : 4,000 V

다) Nebulizer : 40 psi

라) Gas Temperature : 350 ℃

마) Gas flow : 10 L/min

- Multiple reaction monitering parameter of levamisole and closantel

물질명	Precursor ion *(m/z)*	Product ion (*m/z*)	Dwell time(sec)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)	Ionization mode
Levamisole	205.2	123.0	0.2	110	30	Positive
	205.2	178.0	0.2	110	20	
Closantel	661.0	126.8	0.2	130	50	Negative
	661.0	344.8	0.2	130	35	

다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

5. 시험결과 분석

표준용액과 시험용액을 각각 LC-MS/MS에 주입하여 각 물질별 특이이온을 확인한다. 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 비교하고, m/z 178.0, 126.8 각 이온에 대한 면적을 구하고 검량선을 작성한 후 시료전처리시 최종 용매 용해량(mL)과 시료량(g)을 환산하여 검체 중 levamisole, closantel의 함량을 구한다.

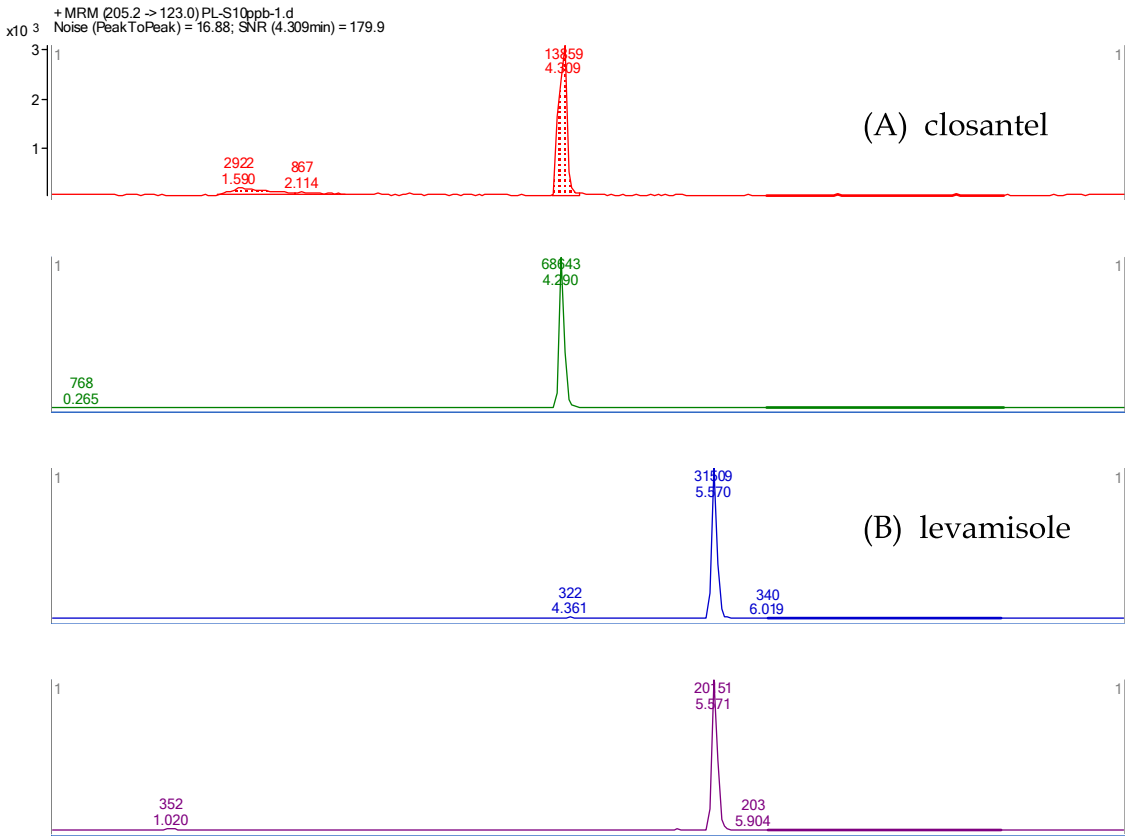

Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms of (A) closantel and (B) levamisole in spiked pork liver at 10 ng/g.