

## LC-MS/MS를 이용한 수산물 중 니트로빈의 정량분석법 개발 및 검증

김주혜 · 신다솜 · 강희승\* · 정지윤 · 이규식

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

### Determination of Nitrovin in Fishery Products by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

Joohye Kim, Dasom Shin, Hui-Seung Kang\*, Jiyeon Jeong, and Gyu-Seek Rhee

*Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Cheongju, Korea*

(Received October 19, 2017/Revised November 8, 2017/Accepted February 22, 2018)

**ABSTRACT** - The objective of this study was to develop a sensitive method for the identification and determination of nitrovin in fishery products by using a solid-phase extraction (SPE), as performed with a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were extracted with a mixture of acetonitrile and water, and were then defatted with acetonitrile saturated hexane, after which further clean-up was accomplished with SPE on the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) cartridges. The analytes were subsequently ionized in the positive mode of an electrospray ionization (ESI), and were thereby detected in a process of multiple reaction monitoring (MRM). The linearity (expressed as correlation coefficients) of the matrix calibration curves was  $> 0.985$ . The limit of the quantification for the nitrovin was measured at 0.001 mg/kg. The accuracy (expressed as average recovery) was noted between 72.1 and 122%. The precision (expressed as coefficient variation) was noted from 2.9 to 16.9%. According to the CODEX CAC/GL-71 guideline accuracy, precision, linearity, and limit of detection were determined in three matrices (which were flatfish, eel and shrimp). The proposed method was suitable for analyzing the associated nitrovin residues. This application and result can also be a factor to contribute to the non-detection drugs management in fishery products.

**Key words** : Nitrovin, Nitrofurantoin, Analytical method, Fishery product, LC-MS/MS

니트로빈(nitrovin)은 주로 동물의 사료에 혼합되어 가축의 성장 촉진제로 사용되며<sup>1)</sup>, 니트로푸란(nitrofurantoin)계 약물로서 가축과 수산물의 감염성 질환을 통제 및 예방하기 위해 사용되었던 동물용의약품이다<sup>2)</sup>. 하지만 니트로푸란계 약물과 그 대사체의 유전자 변이와 암 유발 가능성이 보고되고 있어 대부분의 국가에서는 식품원료로 사용되는 동물에게 사용을 금지하고 있다<sup>2,3)</sup>. 니트로빈도 다른 니트로푸란계 약물과 마찬가지로 발암 성질 및 쥐티푸스균(*Salmonella typhimurium*)에서 유전성 변이를 일으키는 것이 밝혀졌다<sup>4,5)</sup>. 이로 인해 유럽과 중국을 포함하는 많은 나라에서는 니트로빈을 금지 약물로 관리하고 있다<sup>2,6)</sup>. 우

리나라는 식약처에서 니트로빈을 모든 축·수산물에 대해서 사용 금지 동물용의약품으로 정의하고 사료 내에서 검출되지 않도록 규제하고 있으며, 잔류허용기준(MRL)도 불검출 물질로 관리하고 있다. 그럼에도 불구하고 2016년 식품의약품안전처 보도에 따르면 수입 ‘흰다리새우’에서 니트로푸란계 대사물질이 검출되어 당해 제품을 회수 조치 내린 바 있다<sup>7)</sup>. 여전히 베트남, 태국, 인도 등에서 니트로푸란계 물질이 효과 대비 상대적으로 싼 가격을 이유로 사용되고 있다<sup>8,9)</sup>.

우리나라 식품공전에서 니트로빈 분석은 디클로로메탄, 메탄올 및 암모니아수 혼합액으로 추출하여 감압 농축한 후 헥산을 이용하여 지방을 제거하고 이를 멤브레인 필터(membrane filter)로 여과하여 액체크로마토그래프-자외선흡광검출기(liquid chromatography-ultraviolet detector, HPLC-UV)를 사용하여 분석하였으며, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 0.05 mg/kg으로 제시하고있다. 그러나 그 정량한계는 허용물질목록관리제도(Positive List System)의

\*Correspondence to: Hui-Seung Kang, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation #187 Osongsaengmyeong 2ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28159, Korea  
Tel: 82-43-719-4208, Fax: 82-43-719-4200  
E-mail: [hskang1235@korea.kr](mailto:hskang1235@korea.kr)

일률 기준치인 0.01 mg/kg을 초과하여 국제적인 수준에 미치지 못하였으며<sup>10)</sup>, 식품공전에 등재되어 있는 니트로빈의 시험법이 실험실 간 재현성이 낮아 시험법 개선이 필요하였다.

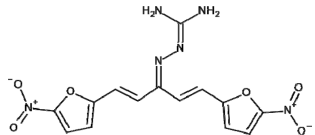
니트로빈은 다른 니트로푸란계 약물과 달리 구조적으로 안정하다. 니트로푸란계 약물이 보통 푸란링에 형성된 C=N 결합이 체내에서 결합이 깨져 대사체를 만들기 쉬운 것과 달리 니트로빈은 같은 자리에 C=C 결합을 가지고 있어 상대적으로 안정하고 그 결합이 쉽게 깨지지 않는다. 그렇기 때문에 니트로빈은 동물의 체내에서 대사되기 어렵고 원물질로 배출되거나 축적된다. Yan 등<sup>6)</sup> 연구에 따르면 니트로빈이 첨가된 사료를 7일간 먹여 사육된 가금류에서 니트로빈의 잔류 농도 변화를 측정해본 결과, 다른 니트로푸란계 약물의 원물질이 수 시간 내에 체내에서 대사되어 사라지는 것과 달리 니트로빈은 약물 처치 후 21일 이후까지 모든 검체에서 원물질이 검출되었다. 이 연구 결과는 주입된 대부분의 니트로빈이 체내에서 대사되지 않고 원물질의 형태로 잔류하는 것을 보여준다. 본 연구에서는 니트로빈 원물질을 분석 표적물질로 정의하고 분석을 수행하였으며, 수산물에 대한 니트로빈의 시험법을 수정하고 고감도 및 정량·정성 분석이 가능한 액체크로마토그래프-질량분석기(liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS/MS)를 적용하여 니트로빈의 안전관리를 위하여 적합한 분석법을 제시하고자 하였다.

## Materials and Methods

### 시약 및 재료

니트로빈(Nitrovin hydrochloride, 98.5%) 표준품은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Bayern, Germany)로부터 구입하였다(Table 1). 전처리 시약으로 사용된 아세토니트릴(acetonitrile), 헥산(n-hexane) 등은 Merck (Darmstadt, Hesse, Germany)에서 HPLC 등급으로 구입하였으며, 개미산(formic acid, ≥ 95%), 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO, 99.9%), octadecylsilane (C<sub>18</sub>), primary secondary amine (PSA) 등 그 이외의 분석용 시약 및 용매는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Waters (Milford, MA, USA) 및 Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)에서 구입한 특급 또는 분석용을 사용하였다. 추출에는 교반진탕장비(MMV-1000W, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하였고, 고상추출(solid phase extraction, SPE) 카트리지는(cartridge)는 hydrophilic-lipophilic balance (HLB, 6 mL, 200 mg)로 Waters (Milford, MA, USA)에서 구입하여, 활성화 과정을 거쳐 추출물을 흡착시킨 후 용출하는 과정에 사용하였다. 시험용액 여과용 필터 polyvinylidene difluoride (PVDF) syringe filter는 Teknokroma (Sant Cugat Del Valles, Barcelona, Spain)에서 구입하여 사용하였다. 시험용 공시료는 시중에

**Table 1.** Molecular structure and properties of nitrovin

| Property            | Content  |
|---------------------|--|
| IUPAC name          | 2-[[[(1E,4E)-1,5-bis(5-nitrofuran-2-yl)penta-1,4-dien-3-ylidene]amino]guanidine                              |
| CAS No.             | 804-36-4   |
| Class               | Antibiotics, nitrofurans   |
| Molecular formula   | C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>  |
| Molecular weight    | 360.28 mol/L   |
| Boiling point       | 420°C  |
| Vapor pressure      | 1.43E-10 mmHg (at 25°C)  |
| Log P <sub>ow</sub> | 2.910  |
| Solubility          | Ethanol, DMSO, Dimethyl formamide, Pyridine and other organic solvents but hardly soluble in water and ether |
| Structure           |                           |

서 유통되고 있는 넙치, 장어 및 새우를 대상으로 껍질, 내장을 제거한 부위(근육)만을 분쇄하여 균질화하고, 공시료(blank) 시험을 거쳐 니트로빈이 잔류되어 있지 않음을 확인한 후 사용하였다. 균질화한 시료는 분석 전까지 냉동(-20°C)에 보관하였다.

### 표준원액 및 표준용액의 조제

니트로빈 표준품 11.2 mg을 저울로 정밀히 달아 100 mL 볼륨플라스크에 메탄올로 정용하여, 100 mg/L이 되도록 표준원액을 조제하였다. 이를 0.1% 개미산 수용액 함유 아세토니트릴로 단계적으로 적당한 농도가 되게 희석하여 표준용액으로 각각 준비하였다. 수산물 시료의 간섭효과(matrix effect)를 고려하여 matrix matched calibration을 적용하였으며, 각 수산물 시료에 각각에 해당하는 표준용액 200 µL를 첨가하여 시료 전처리 과정과 동일하게 처리하여 matrix matched standard로 준비하였다. 표준원액(stock solution)은 갈색 유리병에 담아 4°C 냉장실에 보관하고, 표준용액(working solution)은 실험 직전에 표준원액을 희석하여 사용하였다.

### 추출 및 정제

각각의 시료를 균질화하여 2 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 취하고 아세토니트릴/물(4/1, v/v) 5 mL를 가하여 5분간 진탕하였다. 4,700 × g, 4°C에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 다른 50 mL 원심분리관에 따로 취하였다. 하층액은 위의 추출과정을 한번 더 진행하여 앞의 상등액과 합하였다. 추출한 용액에 아세토니트릴 포화 헥산

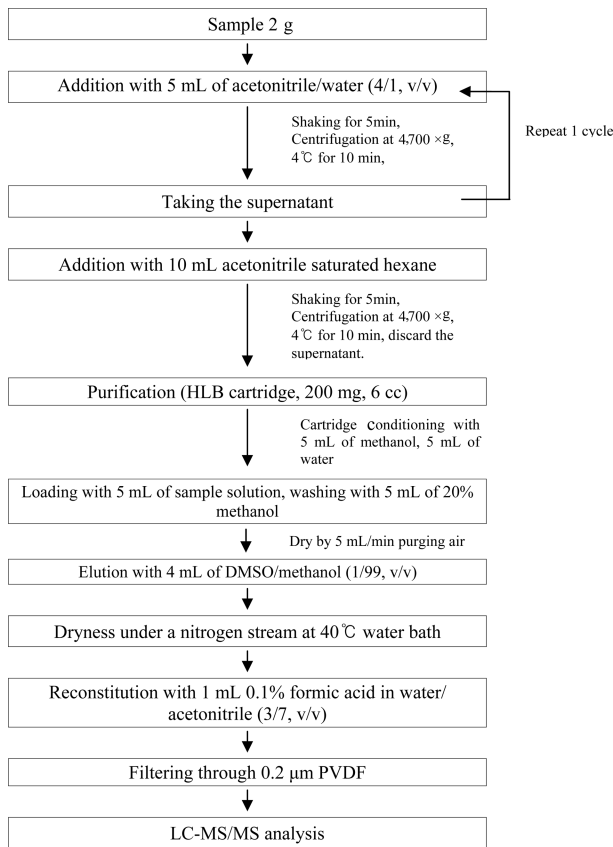


Fig. 1. Analytical procedure for nitrovin in samples.

10 mL를 넣어 5분간 진탕한 후, 4,700 × g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 하층액을 취하여 추출액으로 하였다. HLB 카트리지는 미리 메탄올 5 mL, 증류수 5 mL를 순차적으로 넣어 활성화시켰다. 활성화된 카트리지에 추출액의 5 mL를 흡착시키고, 메탄올/물(1/4, v/v) 5 mL를 넣어 세척한 후, 감압하여 건조시켰다. 흡착된 물질은 DMSO/메탄올(1/99, v/v) 4 mL로 용출시키고, 용출액은 40°C 수욕상에서 질소 하에 농축시켰다. 0.1% 개미산 수용액/아세토니트릴(3/7, v/v) 1 mL로 재용해하고 0.2 µm PVDF로 여과하여 시험 용액으로 사용하였다(Fig. 1).

**기기분석조건**

니트로빈 분석을 위하여 LC-MS/MS (US/Xevo TQ-S, Waters, Milford, USA)와 역상컬럼인 X-SELECT C<sub>18</sub> (2.1 ×

Table 3. LC-MS/MS parameter for the analysis of nitrovin

| Parameter         | Condition   |      |      |
|-------------------|---|------|------|
| LC system         | Waters, UPLC  |      |      |
| Column            | Waters X-SELECT <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 µm) |      |      |
| Column temp.      | 40°C  |      |      |
| Injection vol.    | 5 µL  |      |      |
| Flow rate         | 0.3 mL/min.   |      |      |
| Mobile phase      | A = 0.1% formic acid in water<br>B = 0.1% formic acid in acetonitrile       |      |      |
| Gradient          | Mobile phase  |      |      |
|                   | Time (min)  | A(%) | B(%) |
|                   | 0   | 90   | 10   |
|                   | 6   | 10   | 90   |
|                   | 8.1   | 90   | 10   |
| 10                | 90  | 10   |      |
| Mass spectrometry | Waters, US/Xevo TQ-S  |      |      |
| Ionization mode   | ESI (positive)  |      |      |
| Capillary temp.   | 500°C   |      |      |
| Spray voltage     | 3.8 kV  |      |      |
| Collision gas     | Ar  |      |      |

150 mm, 3.5 µm, Dublin, Ireland)를 사용하였으며, 컬럼 온도는 40°C를 유지하였다. 이동상은 0.1% 개미산 수용액과 0.1% 개미산이 함유된 아세토니트릴을 선택하여 최적화된 기울기 용리 방식을 적용하고, 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 5 µL로 하였다. 질량분석기 조건 확립을 위해서 니트로빈 표준용액(0.5 mg/L)을 사용하여 컬럼을 통과하지 않고 질량분석기로 직접 주입하여 분석하였다. 대상 성분의 이온화는 전기분무이온화(electrospray ionization, ESI)법의 positive-ion mode를 사용하여 물질의 선구이온(precursor ion)을 선택하였고, 충돌에너지(collision energy)를 조절하여 생성이온(product ion)을 생성한 후 정량이온(Quantification ion) 및 정성이온(Qualification ion)을 결정하는 multiple reaction monitoring (MRM)조건을 확립하였다(Table 2). 최적화된 LC-MS/MS 분석조건은 Table 3과 같다.

Table 2. Retention time and multiple reaction monitoring (MRM) parameters for nitrovin

| Compound | Retention time (min) | Exact mass (m/z) | Precursor ion (m/z) | Product ion (m/z) | Collision energy (eV) |
|----------|----------------------|------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|
| Nitrovin | 3.64                 | 360.1            | 361                 | 180.1             | 20                    |
|          |                      |                  |                     | 222.2*            | 15                    |
|          |                      |                  |                     | 302.3             | 19                    |

\*Quantification ion

### 분석법 검증

확립된 시험법은 CODEX CAC/GL-71 가이드라인<sup>11)</sup>에 따라서 정확성(recovery), 정밀성(coefficient variation, CV), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(LOQ)에 대해 유효성을 검증하였다. 니트로빈 시험법은 용매추출 후에 HLB 카트리지에 적용시켜 간섭물질을 제거한 뒤, LC-MS/MS 로 분석한다. 검출한계는 각 신호 대 잡음비(signal to noise ratio, S/N ratio) 3배 이상인 농도로 계산하였으며, 정량한계는 S/N ratio가 10배 이상인 농도로 하였다. 이에 따라 수산물에 대한 니트로빈의 정량한계를 0.001 mg/kg으로 설정하고 표준시료는 정량한계 농도의 1, 2, 5, 10, 15 및 20배가 되도록 하여 시료 전처리 과정과 동일하게 진행하였다. 표준시료의 시험용액을 LC-MS/MS에 주입하여 얻어진 피크면적으로 검량곡선을 작성하고, 검량선의 상관계수(coefficient of correlation,  $r^2$ )를 구하였다. 정확성과 정밀성은 공시료에 0.001 mg/kg을 기준으로 1, 2 및 10배 농도가 되도록 표준용액을 첨가한 후, 회수율과 변동 계수(CV)를 측정하였으며, 각 5반복 실험을 통하여 평가하였다.

## Results and Discussion

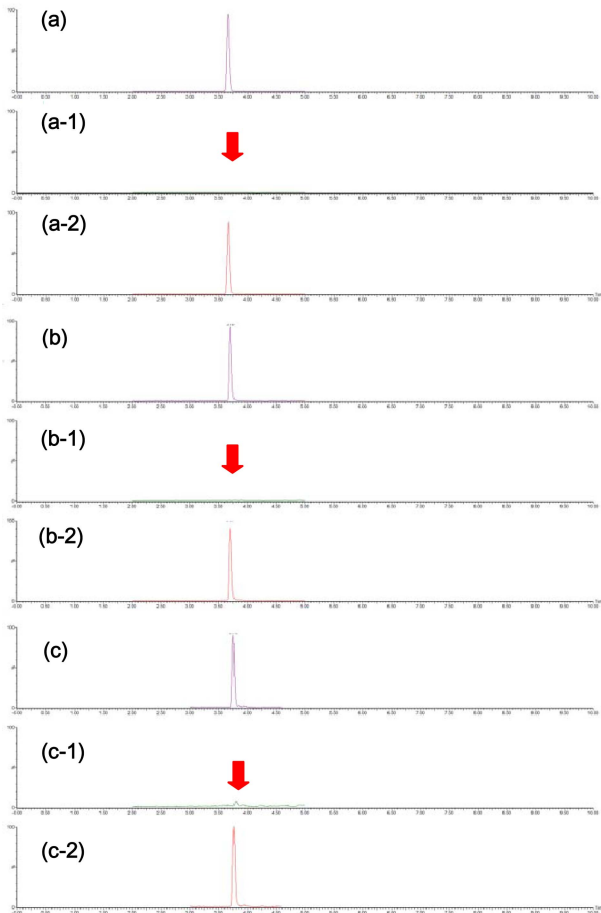
### 분석법 선정 및 조건확립

니트로빈 분석에 대한 선행연구에서는 주로 HPLC와 LC-MS를 사용하여 니트로빈을 분석하였다<sup>12,13,14)</sup>. HPLC로 분석한 연구의 경우, 검출한계 5 mg/kg으로 분석하여 회수율 66%, 상대표준편차 6.7%를 보였으며<sup>13)</sup>, LC-MS로 분석한 연구에서는 검출한계 0.05 mg/kg, 정량한계 0.2 mg/kg으로<sup>14)</sup> 불검출 물질인 니트로빈을 분석하기에는 상대적으로 낮은 감도를 보였다. 이에 따라 니트로빈의 기기분석에 대한 감도와 선택성을 고려하여 고감도 및 정량·정성 분석이 가능한 LC-MS/MS를 선택하였다. 분석용 칼럼은 니트로빈의 Log  $P_{ow}$  값이 2.910 로 비극성 물질이므로 비극성 물질에서 극성 물질까지 폭넓게 분리 가능한  $C_{18}$  칼럼을 선택하였다. 이동상은 0.1% 개미산 수용액과 0.1% 개미산 함유 아세트니트릴로 기울기 용리 방식을 적용하고, 개미산으로 니트로빈의 이온화를 조절하여 머무름 시간을 조정하였다. MRM 조건은 표준용액(0.05 mg/L)을 질량검출기에 직접 주입하여 cone voltage (10-50 V) 조절을 통해 30 V에서 최대 강도를 나타내는 것을 확인하였다. 선구이온은 full scan mode에서 질량 스펙트럼을 확인하여 니트로빈의 질량 값(exact mass, M)에 양성자( $H^+$ )가 결합된 형태인  $[M+H]^+$ 의 m/z 361으로 확인하였다. 또한, MS/MS 분석 시 collision energy의 변화에 따른 peak 강도를 확인하여 최적화 과정을 거쳐 3개 이상의 생성이온을 확인하였다. 가장 좋은 감도를 보이는 생성이온을 정량이온

으로, 다음으로 크게 검출되는 두 개의 생성이온을 정성이온으로 설정하였다.

### 추출 및 정제조건 확립

선행연구들에 따르면 니트로빈은 아세트니트릴, 암모니아 수를 함유한 아세트니트릴, DMSO를 함유한 아세트니트릴 등 유기 용매에서 높은 용해도를 보였다<sup>12,13,14)</sup>. 이를 바탕으로 추출용매에 따른 회수율을 비교하여 추출용매를 결정하고자 하였다. 동일한 정제 조건 하에서 0.5% 암모니아를 함유하는 아세트니트릴로 추출 시에 회수율은 표준용액과 비교하여 보았을 때 0.36%로 아세트니트릴/물(4/1, v/v)을 사용한 시험 용액의 회수율인 5.86% 보다 낮게 나타났다. 간섭물질을 제거하기 위한 정제 방법은 SPE와 d-SPE (dispersive solid-phase extraction)로 나누어 실시하였다. Wang 등<sup>12)</sup> 연구에 따르면 HLB와 MAX (mixed-mode anion exchanger column) 및 MCX (mixed-mode cation exchanger column) 카트리지를 니트로빈 대하여 사용하였을 때, HLB 카트리는 95% 이상의 회수율을 보였고 MAX와 MCX 카트리는 이에 미치지 못하였다. 이를 통해 정제과정에서 사용된 SPE는 역상 카트리지로 보편적으로 사용되는 친수성 및 친유성기를 둘 다 가진 혼성 중합체인 HLB 카트리지를 선택하였다. d-SPE는  $C_{18}$ 과 PSA를 선정하여 두 정제 과정의 분석 감도를 비교하였다. 또한, 용리양과 재용해 용매에 따른 회수율 차이를 비교하고, 추출 및 정제 조건을 최적화하기 위해 각 그룹으로 나누어서 2반복 실험을 진행하였다. 실험결과 전처리 과정 중 재용해 용매에 아세트니트릴이 포함되지 않은 분석 시료에서는 물에 대한 니트로빈의 낮은 용해도로 인해 회수율이 0 이하로 나타나 분석이 불가하였다. 용리량을 달리 한 경우 회수율에 큰 차이를 나타내지 않지만 DMSO/메탄올(1/99, v/v) 4 mL를 사용한 분석시료에서 상대적으로 높게 나타났다. 동일한 추출용매에서 SPE와 d-SPE로 각각 정제한 시료를 분석한 결과는 d-SPE를 적용한 분석시료가 감도대비 SPE 시료보다 S/N ratio가 더 낮게 나타나 저 농도 분석에는 SPE를 적용할 경우 정제 효과가 더 클 것이라 판단되었다. 이러한 결과를 토대로 추출용매는 아세트니트릴/물(4/1, v/v)를 선정하였고, HLB 카트리지를 사용하여 정제과정을 거쳐 0.1% 개미산 수용액/아세트니트릴(v/v)로 재용해하는 실험 방법을 채택하였다. 또한, 세부적으로는 카트리지 흡착량, 카트리지 세척용매의 유기용매 비율을 조정하여 최적의 정제조건을 찾고자 하였다. 흡착시키는 양은 HLB 카트리지의 용량을 고려하여 흡착량 10 mL와 5 mL를 비교해 보았을 때, 5 mL가 더 적합하였다. 카트리지 세척 용매는 유기용매인 메탄올이 포함된 것의 결과 값이 더 유의하며 메탄올의 비율(10%와 20%)은 큰 차이를 나타내지 않았다.



**Fig. 2.** LC-MS/MS chromatogram of nitrovin in flatfish, eel, shrimp samples: Chromatogram of nitrovin in standard at 0.01 mg/kg (a,b,c), blank flatfish (a-1) and fortified flatfish sample at 0.01 mg/kg (a-2). Chromatogram of blank eel (b-1) and fortified eel sample at 0.01 mg/kg (b-2). Chromatogram of blank shrimp (c-1) and fortified shrimp sample at 0.01 mg/kg (c-2).

**분석법 검증**

니트로빈 분석법의 선택성(selectivity), 특이성(specificity), 직선성(linearity)을 검증하기 위해 넙치, 장어 및 새우의 무처리 시료, 표준용액, 표준용액을 첨가한 표준시료의 크로마토그램을 서로 비교하였다(Fig. 2). 그 결과, 무처리 시료 중 니트로빈과 같은 머무름 시간을 갖는 어떤 방해 물질도 검출되지 않았다. 따라서, 니트로빈을 분석하기 위한 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할

수 있었다. 정량한계는 크로마토그램 상에서 S/N ratio를 10배 이상으로 하여 0.001 mg/kg으로 나타났고, 검량곡선은 정량한계를 포함한 1, 2, 5, 10, 15, 20배가 되도록 제조한 표준시료의 시험용액을 분석하여 얻은 면적으로 작성하였다. 상관계수가 0.985 이상으로 CODEX가이드라인에서 제안하는  $r^2 \geq 0.98$ 와 비교해도 매우 만족할 만한 수준이었다. 본 시험법의 정확성을 평가하기 위하여 넙치, 장어 및 새우의 처리농도를 정량한계의 1, 2 및 10배 농도가 되도록 표준용액을 첨가하여 회수율 실험을 5회 반복으로 수행하여 정확성과 정밀성을 평가하였다. 그 결과 넙치, 장어 및 새우 시료에 대한 니트로빈의 평균 회수율과 변동계수는 CODEX가이드라인에 부합하는 수준인 72.1~122%, 2.9~16.9%로 확인되었으며, 잔류동물용의약품 시험법으로서 적합한 수준의 검증 결과를 얻었다(Table 4). 시험법 검증과정에서 실제 수산물에 니트로빈을 투약하여 적용성을 검토하여야 하는 것이 가장 좋은 검증 방법이지만 현실적으로 적용이 어려운 경우가 많기 때문에 본 시험법의 검증은 대표 공시료(넙치, 장어, 새우)에 분석물질을 주입하여 잔류량을 측정하는 방법으로 검증하였다<sup>15)</sup>. 본 연구를 통해 개발된 시험법은 수산물 중 니트로빈 잔류검사 및 모니터링에 활용 가능할 것으로 보인다.

**Acknowledgement**

본 연구는 식품의약품안전처 연구개발과제(17161MFDS651)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

**국문요약**

본 연구에서는 우리나라 식품공전에서 불검출 물질로 관리하고 있는 니트로빈(nitrovin)에 대해 고감도 정량·정성 분석이 가능한 LC-MS/MS를 적용하여 적합한 분석법을 제시하고자 하였다. 수산물 시료는 아세트니트릴/물로 추출하고 아세트니트릴 포화 hexan으로 지방을 제거하여 고상추출 카트리지를 적용하여 정제하였다. 분석물질은 전기분무이온화방법의 positive mode에서 이온화하여 MRM 조건을 확립하여 분석하였다. 개선된 시험법은 CODEX CAC/GL-71 가이드라인에 따라서 정확성, 정밀성, 직선성, 정량한계에 대한 검증을 통하여 유효성을 확인하였다. 본

**Table 4.** Validation results for the analytical method of nitrovin in flatfish, eel, and shrimp (n = 5)

| Target concentration (mg/kg) | Flatfish     |        | Eel          |        | Shrimp       |        |
|------------------------------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|                              | Recovery (%) | CV (%) | Recovery (%) | CV (%) | Recovery (%) | CV (%) |
| 0.001                        | 110          | 10.9   | 72.1         | 15.5   | 103          | 11.9   |
| 0.002                        | 102          | 2.9    | 95.4         | 16.9   | 111          | 8.2    |
| 0.01                         | 81.9         | 13.6   | 108          | 5.2    | 122          | 3.9    |

실험에서의 정량한계는 0.001 mg/kg 수준이며, 정량한계를 포함하는 표준시료에서 얻어진 검량선의 상관계수( $r^2$ )는 0.985 이상으로 시험법의 직선성이 유효함을 판단할 수 있었다. 또한, 수산물(넙치, 장어 및 새우) 시료에 대한 니트로빈의 평균 회수율과 변동 계수는 72.1~122%, 2.9~16.9%로 확인되어 정확성 및 정밀성이 CODEX 가이드라인에 부합하였다. 따라서, 개선된 니트로빈 정량분석법은 수산물 중 니트로빈을 분석하는데 적합하며, 니트로빈에 대한 지속적인 잔류실태조사에 활용되어 수산물 중 니트로빈의 안전관리에 기여할 것으로 판단된다.

## References

1. MFDS (Ministry of Food and Drug Safety), Analysis Practice Reference of Veterinary drug Residue. 73-79 (2014).
2. Tao, Y., Yu, H., Chen, D., Liu, Z.Y., Yang, D., Pan, Y., Wang.: Determination of sodium nifurstyrenate and nitrovin residues in edible food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after ultrasound-assisted extraction. *J. Chromatogr. B.*, **878**, 3415-3420 (2010).
3. Vass, M., Hruska, K., Franek, M.: Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis. *Vet Med Czech.*, **53**, 469-500 (2008).
4. Jøner, P.E., Dahle, H.K., Aune, T., Dybing, E.: Mutagenicity of nitrovin-a nitrofurantoin feed additive. *Mutat. Res.*, **48**, 313-318 (1997).
5. Miertus, S., Svore, J., Sturdik, E., Vojtekova, H.: Use of specific bacteria for the determination of mutagenic and carcinogenic compounds. *Anal. Chem.*, **59**, 504-508 (1987).
6. Yan, X.D., Zhang, L.J., Wang, J.P.: Residue depletion of nitrovin in chicken after oral administration. *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 3414-3419 (2011).
7. MFDS (Ministry of Food and Drug Safety), Available from: <http://www.mfds.go.kr/>. Accessed (19.10.2016).
8. Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., Widmer, M.: Determination of nitrofurantoin and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.*, **862**, 41-52 (2015).
9. RASFF (The Rapid Alert System for Food and Feed), Available from: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&NewSearch=1&Keywords=nitrofurantoin#>. Accessed (13.02.2016).
10. Cho, H.R., Park, J.S, Kim, J.H., Han, S.B., Choi, Y.S.: Multi-residue method for the quantitation of 20 pesticides in aquatic products. *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 9043-9052 (2015).
11. CODEX Alimentarius Commission. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals, CAC/GL-71 (2009).
12. Wang, J.R., Zhang, L.Y.: Simultaneous determination and identification of furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, and nitrovin in feeds by HPLC and LC-MS. *Chromatogr. Relat. Technol.*, **29**, 377-390 (2006).
13. Lin, S.Y., Jeng, S.L.: High-Performance liquid chromatographic determination of carbadox, olaquinox, furazolidone, nitrofurazone, and nitrovin in feed. *J. Food prot.*, **64**, 1231-1234 (2001).
14. Wang, J., Fu, Z., Wang, J.: Improving the determination of nitrovin in feeds by reversed-phase LC with SPE. *J. Chroma.*, **70**, 1259-1263 (2009).
15. Shin, D.S., Kang, H.S., Jeong, J.Y., Kim, J.H., Choe, W.J., Lee, G.S., Rhee, G.S.: Multi-residue determination of veterinary drugs in fishery products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods.*, 1-17 (2018).