

HPLC-PDA를 이용한 Amitraz의 분석법 확립 및 검증

윤형준 · 윤소미 · 이명헌* · 손성완

국립수의과학검역원

(게재승인: 2008년 1월 30일)

Determination of amitraz by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and method validation

Hyeong-Jun Yun, So-Mi Yun, Myoung-Heon Lee*, Seong-Wan Son

National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

(Accepted: January 30, 2008)

Abstract : In veterinary medicine amitraz has been used as an insecticide to eliminates mites, lice, and ticks in dogs, cats, goats, swine and cattle. The objective of present study was to developed an analytical method using one-step extraction and determination of the amitraz in veterinary drugs by liquid chromatography (LC). The amitraz was analyzed by LC equipped with Waters XTerra RP18 (4.8 × 250 mm; 5 μm; Waters, USA) analytical column, using 75% acetonitrile (acetonitrile/D.W; 75/25) at 1.0 ml/min. The UV-VIS detection of amitraz was made at 290 nm. Calibration graphs were linear with very good correlation coefficients ($r^2 > 0.9999$) from 80~120 μg/ml. The limit of detection was 0.09 μg/ml and limit of quantification was 0.27 μg/ml. The method showed good intra-day precision (CV 0.05~0.09%) and inter-day precision (CV 0.06~0.18%).

Keywords : amitraz, LC, veterinary drug

서 론

Amitraz(N'-(2,4-Dimethylphenyl)-N-[[2,4-dimethylphenyl]imino]methyl]-N-methylmethanimidamide)는 formamidine계의 살충제로써 농업분야와 수의학 분야에서 널리 사용되고 있다 [7, 16]. 농업분야에서는 붉은 잎 응애(red spider mites)와 잎벌레(leaf miners), 각지벌레(scale insects) 및 진딧물(aphids)의 박멸에 폭 넓게 사용되고 있으며 [5, 19], 수의학분야에서는 개 [9, 10]와 고양이 [8]의 모낭충증, 염소 [20], 돼지, 소 [18]등에서 살충제로 사용되어 지고 있다. Amitraz를 과량 사용 시 다양한 중독증상이 동물뿐만 아니라 인간에게서도 유발 되는데 [3] 가장 두드러지는 amitraz의 중독증상은 척추동물의 중추신경계 억제 [2], 서맥, 고혈당, 동공확대, 구토, 고창증 등이 있다 [11, 12]. 따라서 수의학 분야에서 해충구제의

목적으로 사용되어지는 amitraz의 품질관리가 매우 중요하다고 할 수 있다. 현재까지 amitraz 분석은 주로 가스 크로마토그래피(GC) [6]를 이용하였고 식품에서 amitraz 분석을 위한 고성능액체크로마토그래피(LC) [17] 방법 등이 있다. 그러나 기존의 amitraz의 분석법은 주로 벌집이나 꿀 자체에서 amitraz를 분석하는 방법으로 수많은 방해물질을 제거하고 그 분해산물까지 추출하는 방법으로 acetone/증류수 혼합물을 이용하여 추출하고 hexane 등으로 재추출하는 방식이었다. 검출기도 주로 GC-ECD를 이용한 방법이었으나 ECD 검출기의 경우 안정화 되는 시간이 오래 걸리고 사용 방법이 복잡하여 일 반화된 방법으로 사용하기에는 제한적이었다. 이외에도 SPE를 사용하여 전 처리한 후 GC/MS로 분석하는 방법 등도 알려져 있으나, 방법이 복잡하고, 비용이 많이 들며, 방해물질을 제거하기 위해 다양한 조건의 전 처리

*Corresponding author: Myoung-Heon Lee
National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
[Tel: +82-31-467-1848, Fax: +82-31-467-1795, E-mail: leemh@nvrqs.go.kr]

과정 등이 필요하다 [14, 15].

현재 동물용의약품에서 LC를 이용한 amitraz 분석방법은 전무한 실정으로 amitraz 제제의 품질관리 방법이 매우 제한적이다. 동물용의약품에서 amitraz 분석을 위해서는 International Conference on Harmonization(ICH) guideline [13]에 따라 system suitability test를 통한 capacity factor(K), plate count(N) 등의 parameter 충족은 기본이며, 확립된 분석법은 유효성 검증 parameter인 recovery, intra-, inter-day precision등을 확보해야 하는데, 현재 amitraz에 대해 이러한 parameter를 충족시키는 분석법은 전무한 실정이다. 따라서 본 연구를 통해 LC를 이용한 간편하고 빠른, 유효성이 검증된 amitraz 분석방법을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기기

측정에 사용한 LC는 Agilent 1100 series(Agilent, USA), photodiode array 검출기와 운영 프로그램을 사용하였고 amitraz 표준품(USP, USA)에서 구입하였으며, 시중에서 유통되고 있는 amitraz 제제 3종 그린티스(녹십자, Korea), 이미트라즈 12.5EC(Hockley, UK), 텍틱(동진, Korea)을 구입하여 시료로 사용하였고, HPLC 분석에 사용된 acetonitrile (J.T.Baker, USA)은 HPLC급 시약으로 구입하여 사용하였다. 칼럼은 Purospher STAR RP18(4.6×150 mm; 5 µm; Merck, USA), Xterra RP18 (4.6×250 mm; 5 µm; Waters, USA), CAPCELL PAK C18 UG 80 (4.6×250 mm; 5 µm; Shiseido, Japan)을 사용하였다. 증류수는 ELGA PURELAB Classic water system(ELGA, UK)을 사용하여 전기전도도 18.2 MΩ 이상을 사용하였다.

표준액의 조제

Amitraz 표준품 0.05 g을 정확히 제어 50 ml volumetric flask에 넣고 HPLC급 acetonitrile 에 녹여 1 mg/ml의 농도로 stock solution을 만들어 냉장보관 하였다. 준비된 stock solution을 A그룹(80, 100, 120 µg/ml)과 B그룹(400, 500, 600 µg/ml)으로 각각 단계적으로 희석하여 검량용 표준 용액을 조제 하였다. 각각의 표준용액 10 µl를 LC로 분석하여 두 그룹의 chromatogram 면적을 구하고 이들의 면적과 표준용액의 농도를 변수로 한 검량선을 작성하였다.

LC 분석 조건 선정

최적 분석 조건 확립을 위해 XTerra RP18(4.6×250 mm; 5 µm; Waters, USA)등 총 3종의 칼럼을 테스트하

였고, 최적이동상조건을 선정하기 위해 물/acetonitrile 혼합용액에서 물의 비율을 0~25%로 변화를 주며 테스트 하고, 이동상의 pH에 따른 amitraz의 영향을 확인하기 위해 pH 3, 7, 9에서 각각 테스트 하였다. Photodiode array detector를 통해 최대흡수파장을 선정하였고, 이동상의 속도는 1.0 ml/min를 이용하였다.

시스템 적합성

확립된 기기분석법에 대해 시스템적합성 parameter (plate count, N, symmetry factor, R, capacity factor, K)의 검증은 ICH guideline [13]에 따라 검증하였다.

확립된 기기분석법의 유효성 검증

분석방법의 특이성, 정밀도, 직선성, 정확도를 검증하였다. 직선성을 평가하기 위해 1 mg/ml의 농도로 만들어 놓은 표준품 stock solution을 acetonitrile에 희석하여 A그룹(80, 100, 120 µg/ml)과 B그룹(400, 500, 600 µg/ml)으로 만든 후 각 그룹을 3반복하여 직선성을 확인하였다. 정밀도를 결정하기 위해 10, 50, 100 µg/ml 농도로 inter-day 와 intra-day assay를 실행하였고 정확도(%bias)는 계산값(C_{nom})과 측정값(C_{obs})를 통하여 다음과 같이 계산하였다. : bias(%) = [(C_{obs} - C_{nom})/(C_{nom})] × 100. 상대 표준편차(%RSD)는 C_{obs}로부터 다음과 같이 계산하였다. : %RSD = [표준편차(SD)/C_{obs}] × 100. HPLC를 사용한 amitraz의 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 ICH guideline [13] 의해 결정하였다.

결 과

최적분석조건 확립

Amitraz에 대한 기기분석 조건을 확립하기 위해 표준품을 acetonitrile에 희석하여 표준액을 제조한 후 XTerra RP18(4.6×250 mm; 5 µm; Waters, USA)등 총 3종의 칼럼에 대한 테스트를 시행하였다. 3종의 칼럼을 테스트한 결과 XTerra 칼럼이 ICH guideline [13]에 가장 적합하였다(Table 1). 이동상의 조성에 따른 amitraz의 분해능을 확인하기 위해 물/acetonitrile 혼합용액에서 물의 비율을 0~25%로 조정하여 테스트한 결과 물/아세토니트릴의 비율이 25/75(v/v, %) 조건에서 가장 좋은 분해능과 해상도를 보였다. 또한 amitraz의 경우 기존문헌에 따르면 산성용액에서 분해가 일어난다고 밝혀져 있어 [4] 본연구에서도 이동상의 pH변화에 따른 amitraz의 영향을 확인하기 위해 이동상의 pH를 3, 7, 9로 만든 후 각각 테스트 하였다. 그 결과 pH 3인 경우 문헌과 마찬가지로 amitraz가 현저히 분해 됨을 확인할 수 있었고 pH 7, 9 간에는 유의할만한 차이가 없었다. 이에 pH 7 조

Table 1. Chromatographic performance on columns for amitraz

| Column | Plate count ^a | Symmetry factor ^a | K ^{1a} | Corr ^b | Corr ^c |
|--|--------------------------|------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Waters XTerra RP18 (4.8 × 250 mm; 5 μm) | 11662 | 1.3 | 2.18 | 1.00000 | 0.99999 |
| Purospher STAR RP18e (4.6 × 250 mm; 5 μm) | 19766 | 0.87 | 5.82 | 0.99997 | 0.99996 |
| Shiseido UG 80 C18 (4.6 × 50 mm; 5 μm) | 20596 | 0.95 | 5.98 | 0.99994 | 0.99976 |

^aTheoretical plate count > 2000, Symmetry factor < 2, K > 2 are recommended by ICH.

^{b,c}Correlation range, 80~120 μg/ml and 400~600 μg/ml, respectively (n = 3).

Table 2. Influence of mobile phase pH on chromatographic parameters of amitraz

| pH | Plate count ^a | Symmetry factor ^a | K ^{1a} |
|----|--------------------------|------------------------------|-----------------|
| 3 | 4775 | 2.01 | 0.96 |
| 7 | 13168 | 0.91 | 2.45 |
| 9 | 13205 | 0.92 | 2.64 |

^aTheoretical plate count > 2000, symmetry factor < 2, K > 2, are recommended by ICH (n = 3).

Table 3. Optimal condition of amitraz analysis by the developed HPLC

| Parameter | Condition of HPLC method |
|------------------|---------------------------------------|
| Detection wave | UV 290 nm |
| Column (temp.) | XTerra RP18 4.8 × 250 mm, 5 μm (30°C) |
| Mobile phase | Acetonitrile/D.W (75/25, pH 7) |
| Flow rate | 1.0 ml/min |
| Injection volume | 10 μl |
| Diluent | Acetonitrile |

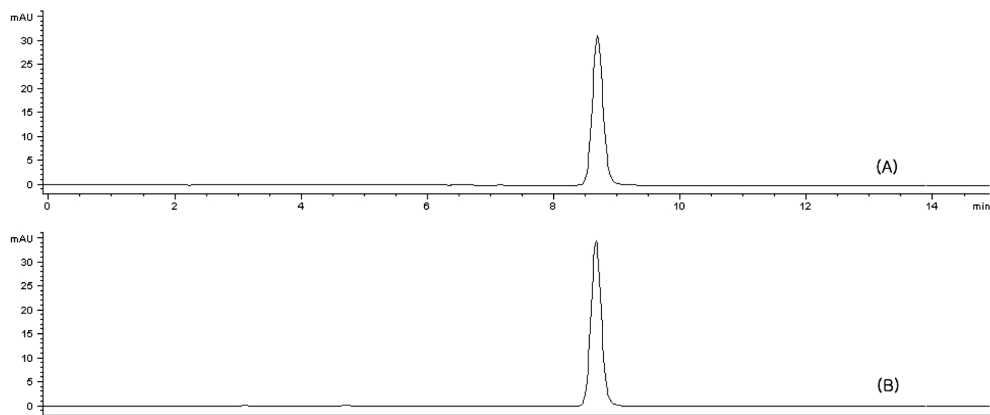
건을 이동상의 pH로 선정하였다(Table 2). 이동상 속도는 1.0 ml/min으로 하여 분석시간 15분 이내로 최적분석 조건을 확립하였다(Table 3). 확립된 분석조건을 이용하여 표준품과 시료를 분석한 결과 머무름 시간 8.7분에서 표준품과 시료에서 어떠한 방해물질 없이 동일한 피크를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 또한 시료 내 amitraz와 표준품의 스펙트럼을 비교한 결과 동일한 물질임을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

시스템 적합성

확립한 조건의 시스템 적합성을 확인한 결과 plate count(N) 11662, symmetry factor(R) 1.3, capacity factor(K') 2.18로 국제기준인 ICH guideline [13]에 적합하였다.

확립된 기기분석법의 유효성 검증

표준품의 농도를 각각 A그룹(80~120 μg/ml), B그룹(400~600 μg/ml)으로 하여 표준곡선을 확인한 결과 우수한 직선성 ($r^2 > 0.9999$)을 나타내었다(Fig. 3). 확립된 분석조건에서 샘플의 검출한계와 정량한계는 각각 0.09 μg/ml와 0.27 μg/ml로 낮은 농도까지 분석이 가능하였

**Fig. 1.** HPLC Chromatogram of the amitraz standard at 100 μg/ml (A) and the sample (B).

다(Table 4). 세 가지 농도(10, 50, 100 µg/ml)에서 amitraz에 대한 intra-day precision(t = 3, n = 3)과 inter-day precision(t = 3, n = 3, d = 3)을 조사한 결과 각각 0.09%와 0.18%이하의 우수한 정밀도를 나타내었다(Table 5).

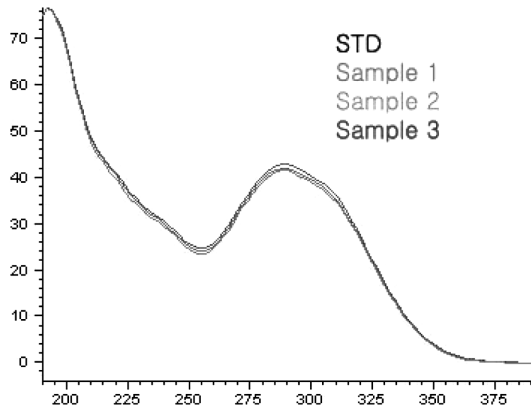


Fig. 2. Comparison with the spectrum of amitraz standard and commercial products.

Table 4. Limit of detection and limit of quantification of amitraz[†]

| Compound | LOD (µg/ml)* | LOQ (µg/ml)* |
|----------|--------------|--------------|
| Amitraz | 0.09 (µg/ml) | 0.27 (µg/ml) |

*LOD : $3.3 \times (\text{SD of the response} / \text{slope of the calibration curve})$.

LOQ : $10 \times (\text{SD of the response} / \text{slope of the calibration curve})$.

[†]Cited from ICH guideline [13].

Table 5. Precision of developed HPLC method

| QC sample (µg/ml) | Intra-day studies (n = 6) | | Inter-day studies (n = 18) | |
|-------------------|---------------------------|----------|----------------------------|---------|
| | Measured amount (µg/ml) | RSD (%)* | Measured amount (µg/ml) | RSD (%) |
| 10 | 9.80 ± 0.01 | 0.08 | 9.79 ± 0.02 | 0.18 |
| 50 | 50.18 ± 0.03 | 0.05 | 50.11 ± 0.03 | 0.06 |
| 100 | 100.11 ± 0.09 | 0.09 | 99.96 ± 0.09 | 0.09 |

*RSD (%) ≤ 1 on intra (t = 3, n = 3), and inter assay (t = 3, n = 3, d = 3) are recommended by ICH, respectively.

Table 6. Recovery rate of amitraz in commercial products

| Compound | Low level ± SD ^a (RSD), % | Mid level ± SD ^a (RSD), % | High level ± SD ^a (RSD), % | Recovery (%) mean ± SD ^b | RSD ^b , % |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| Sample 1 | 100.1 ± 0.27 (0.27) | 99.8 ± 0.43 (0.43) | 99.7 ± 0.37 (0.37) | 99.9 ± 0.08 | 0.08 |
| Sample 2 | 98.1 ± 0.32 (0.32) | 99.3 ± 0.19 (0.19) | 99.4 ± 0.33 (0.33) | 98.9 ± 0.08 | 0.08 |
| Sample 3 | 101.5 ± 1.19 (1.19) | 100.3 ± 0.13 (0.13) | 100.2 ± 0.26 (0.26) | 100.7 ± 0.58 | 0.58 |

^{a,b}Recovery, 100 ± 2 and RSD (%) ≤ 1 are recommended by ICH, respectively.

^an = 5, ^bn = 15

확립된 방법의 정확성을 평가하기 위해 시중에 판매되는 제품에 표준물질을 Low(10 µg/ml), Middle(20 µg/ml), High(40 µg/ml) 3개 농도로 spike하여 회수율을 확인한 결과 100 ± 2%의 우수한 회수율을 나타내었으며 평균 %RSD값도 0.08~0.58 %로 매우 우수하였다(Table 6).

고 찰

본 연구의 목적은 동물약품의 효과적인 품질관리를 위해 LC를 이용한 amitraz 제제의 분석법을 확립하는데 있었다. Amitraz는 동물약품공정서나 미국약전 등에 등재된 방법이 GC를 이용한 방법이 대부분이었으나 [1], 최근 식품에서 LC를 이용하는 등의 새로운 분석법이 시도되고 있다 [15]. 본 연구에서는 LC를 이용한 amitraz의 최적기기분석조건을 확립하고 확립된 분석방법에 대한 유효성을 검증 하였다.

LC를 이용한 amitraz의 최적 기기분석조건은 XTerra RP18(4.6 × 250 mm; 5 µm; Waters, USA) 칼럼을 이용, 이동상은 75% 아세토니트릴(pH 7), 검출과장은 UV 290 nm에서 가장 우수한 분리 능력 및 해상도를 나타내었다. 확립된 기기분석법에 대해 시스템 적합성 parameter를 조사한 결과 Plate count 11662, Symmetry factor 1.3, capacity factor 2.18로 국제기준인 ICH guideline [13]에 적합하였다. A 그룹(80~120 µg/ml), B 그룹(400~600 µg/ml)의 각각 3개 농도구간에서 표준곡선을 작성하고, 직선성을 조사한 결과 r^2 값이 0.9999 이상으로 우수한 직선성을 나타내었고, 검출한계와 정량한계는 각각

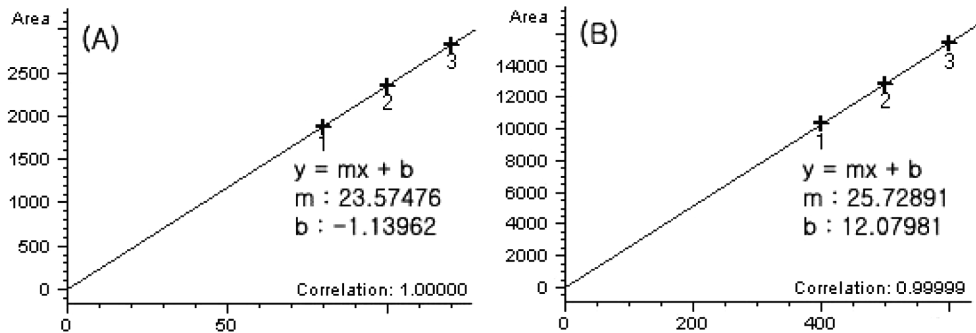


Fig. 3. Calibration curves for amitraz standard, A (80~120 µg/ml) and B (400~600 µg/ml), (A : $r^2 > 1.0000$, B : $r^2 > 0.9999$)

0.09 µg/ml와 0.27 µg/ml로 낮은 농도까지 분석이 가능하였으며, inter-day precision과 intra-day precision 테스트 결과 각각 0.09%와 0.18% 이하의 우수한 정밀도를 나타내었고, 시료에서 회수율을 확인한 결과 세 개의 농도 그룹(Low, Mid, High)에서 98.7~100.7%의 우수한 회수율을 나타내었다. 이때 평균 %RSD 값도 0.08~0.58%로 매우 우수하였다.

본 연구를 통해 확립된 LC를 이용한 amitraz 분석법은 보다 정확하고 빠른 동물용의약품의 품질관리에 기여할 것으로 기대된다.

결론

LC를 이용한 빠르고 간편한 amitraz 분석조건을 확립하고 정확성, 정밀성, 직선성, 특이성 등 확립분석법의 유효성을 국제기준인 ICH guideline [13]에 맞춰서 검증하였다.

참고문헌

1. 한국동물약품공업협동조합. 동물약품공정서. pp. 305-306, 한국동물약품공업협동조합, 성남, 1990.
2. Agin H, Calkavur S, Uzun H, Bak M. Amitraz poisoning: clinical and laboratory findings. *Indian Pediatr* 2004, **41**, 482-486.
3. Avsarogullari L, Ikizceli I, Sungur M, Szer E, Akdur O, Ycei M. Acute amitraz poisoning in adults: clinical features, laboratory findings, and management. *Clin Toxicol (Phila)* 2006, **44**, 19-23.
4. Berzas Nevado J, Mahedero MC, Olibares JA, Salinas F. Determination of Amitraz in Honey by First-Derivative Spectrophotometry. *Int J Environ Anal Chem* 1991, **43**, 187-194.
5. Budavari S. *The Merck Index*. 11th ed. p. 85, Merck & Co., Rathway, 1989.
6. Caldwell M, Fussell RJ, Smith F, Sharman M. Development and validation of an analytical method for total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Addit Contam* 2007, **24**, 280-284.
7. Costa LG, Olibet G, Murphy SD. Alpha 2-adrenoceptors as a target for formamidine pesticides: in vitro and in vivo studies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988, **93**, 319-328.
8. Cowan LA, Campbell K. Generalized demodicosis in a cat responsive to amitraz. *J Am Vet Med Assoc* 1988, **192**, 1442-1444.
9. Farmer H, Seawright AA. The use of amitraz (N1-(2,4-dimethylphenyl)-N-[(2,4-dimethylphenyl)imino]-methyl]-N-methylmethanimidamide) in demodicosis in dogs. *Aust Vet J* 1980, **56**, 537-541.
10. Folz SD, Kakuk TJ, Henke CL, Rector DL, Tesar FB. Clinical evaluation of amitraz as a treatment for canine demodicosis. *Vet Parasitol* 1984, **16**, 335-341.
11. Hsu WH, Hopper DL. Effect of yohimbine on amitraz-induced CNS depression and bradycardia in dogs. *J Toxicol Environ Health* 1986, **18**, 423-429.
12. Hsu WH, Schaffer DD. Effects of topical application of amitraz on plasma glucose and insulin concentrations in dogs. *Am J Vet Res* 1988, **49**, 130-131.
13. International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). In: *ICH Guidelines*. ICH, Geneva, 2005.
14. Jimnez JJ, Bernal JL, del Nozal MJ, Alonso C. Extraction and clean-up methods for the determination of amitraz total residues in beeswax by gas

- chromatography with electron capture detection. *Anal Chim Acta* 2005, **524**, 271-278.
15. **Korta E, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Bogdanov S.** Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax. *Anal Chim Acta* 2003, **475**, 97-103.
 16. **Liu MY, Plapp FW.** Formamidines as synergists of cypermethrin in susceptible and pyrethroid resistant house flies (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 1990, **83**, 2181-2186.
 17. **Martel AC, Zeggane S.** Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Chromatogr A* 2002, **954**, 173-180.
 18. **McDougall KW, Lewis IJ.** Behaviour of amitraz in cattle dipping baths. *Aust Vet J* 1984, **61**, 137-140.
 19. **Thomson WT.** *Agricultural Chemicals. Book II: Herbicides.* Thomson Publications, Fresno, 1993.
 20. **Wright FC, Guillot FS, George JE.** Efficacy of acaricides against chorioptic mange of goats. *Am J Res* 1988, **49**, 903-904.