

LC/MS를 이용한 축산물 중 잔류 마크로라이드계 항생물질 분석법 연구

황래홍¹, 윤은선, 김연주, 김동언, 양윤모, 이정학, 이병동

서울특별시보건환경연구원
(접수 2002. 4. 2, 게재승인 2002. 5. 8)

Study on analytical method of residual macrolide antibiotic in livestock products by LC/MS

Lac-Hwong Hwang¹, En-Sun Yun, Yoon-Joo Kim, Dong-Eon Kim,
Yoon-Mo Yang, Jung-Hark Lee, Byung-Dong Lee

Seoul Metropolitan Health & Environment Research Institute, Seoul, 137-130, Korea
(Received 2 April 2002, accepted in revised form 8 May 2002)

Abstract

This study was carried out to confirm analytical method of residual macrolides in livestock products by LC/MS.

1. Macrolides were analyzed by LC/MS on XTerra C₁₈ column with 0.1%TFA(trifluoroacetic acid)-methanol in a gradient mode as mobile phase, and that were identified by positive chemical ionization with selective ion monitoring at 50~1000 mass range.

2. Residual macrolides were extracted from tissue with acetonitrile, and the extract is purified with a Sep-pak C₁₈ cartridge, and elute macrolides with 0.1M methanolic ammonium acetate.

3. The procedure confirms the presence of each macrolide at 50µg/kg in spiked sample.

Key words : Macrolide antibiotics, LC/MS, Livestock products

서 론

축산물은 식생활의 영향학적 측면이나 경제적 측면에서의 중요성을 감안할 때 그 생산

과정에서 직간접적으로 오염 가능한 유해잔류 물질의 검사능력 향상은 국가적으로 매우 중요한 과제라 할 수 있겠다.

축산물에 사용되는 유해잔류물질중 마크로라

¹Corresponding author

Phone : 02-570-3236, Fax : 02-570-3206

E-mail : ohadolb4@netian.com

이드계 항생물질은 그람양성균과 *Mycoplasma* spp에 강한 항균작용을 지니고 있어 호흡기계 치료제 또는 성장촉진을 위한 사료첨가제 등으로 사용되고 있으나 인체에 독성효과나 과민반응을 유발할 수 있으며, 또한 내성균을 생성할 수도 있는 것으로도 알려져 있다¹⁻³⁾. 이에 선진국가에서는 이들의 잔류방지를 위해 잔류허용기준을 철저히 준수하도록 하는 등 많은 노력을 기울이고 있는 실정인데, European Union (EU)의 경우 이들 항생물질에 대한 최대잔류허용한계를 spiramycin, tylosin 및 erythromycin 등에 대해 각각 200, 100, 400 μ g/kg으로 규정하고 있다⁴⁾. 한편 국내에서도 이들 선진국처럼 엄격한 허용기준을 두고 있으나 검사기술 면에서는 아직 많은 노력이 요구되고 있는 실정이다.

현재 축산물에 대한 유해성잔류물질의 검사는 미생물학적 검사에 의한 간이정성 검사와 GC, LC, GC/MS, LC/MS 등 정밀장비에 의한 정량검사가 이루어지고 있으나, 일부 항생물질 등은 그 특성상 microbial inhibition test, microbial receptor test, immunological method, swab test on premises(STOP) + thin layer chromatography bioautography(TLCB) 등의 미생물학적 분석에 의존하고 있는 실정이다⁴⁻⁸⁾. 이와 같은 미생물학적 방법들은 특이적이지 못하여 정확한 정량검사에 어려움이 있으며, 이러한 비특이성을 해결하기 위하여 최근에는 유도체화 방법^{4,8,9)}이나 automated liquid chromatography clean-up method 등^{8,10-13)} 새로운 방법이 시도되고 있다.

이에 본 시험에서는 LC/MS를 이용하여 축산물 중 마크로라이드계 항생물질 확인정량 방법을 연구하여 축산물에 대한 유해성잔류물질 검사능력 향상에 기여코자 한다.

재료 및 방법

시약

Acetonitrile과 methanol은 HPLC용을, iso-octane, ammonium acetate, trifluoroacetic

acid, dipotassium hydrogen phosphate 등은 시약특급을, 기타 5% dimethyldichlorosilane in toluene(Supelco)과 spiramycin, tylosin, erythromycin 표준품(Sigma)을 각각 사용하였다.

시험용액 조제

Elution solution : 0.1M methanolic ammonium acetate

0.2M buffer solution : 34.84g dipotassium hydrogen phosphate을 distilled water(DW) 1 l 에 녹였다.

Mobile phase : 0.1%TFA용액과 100% methanol을 gradient mode로 사용하였다.

장비

LC/MS는 HP사의 HP1100 series를 사용하였으며, 분석칼럼은 XTerra C₁₈(5 μ m, 3.9 \times 150 mm)을, 기기운영은 chemstation을 사용하여 분석하였다(Table 1).

전처리에 사용되는 vacuum manifold는 Supelco사의 visiprep DL을, SPE cartridges는 waters의 Sep-pak C₁₈ plus cartridge(500mg)를 사용하였으며 감압농축기는 Heidolph vv2001을 사용하였다.

Table 1. Analytical conditions of macrolide antibiotics by LC/MS

Column	XTerra C ₁₈ (5 μ m, 3.9 \times 150mm)
Mobile phase	0.1%TFA-MeOH* with elution gradient 1) 0 min, 0.1%TFA (100) 2) 1 min, 0.1%TFA(100) 3) 5 min, MeOH(100) 4) 20 min, MeOH(100) 5) 25min, 0.1%TFA(100)
Flow rate	0.5ml/min
Mass range	50-1000
MSD mode	SIM
Injection vol	50 μ l

*TFA-MeOH : Trifluoroacetic acid-methyl alcohol

시료 및 표준용액 조제

시료 : 축협공판장에서 생산되는 우유를 구입하여 charmII를 이용하여 마크로라이드계 항생물질이 잔류하지 않은 것으로 확인된 시료를 -20℃ 냉동고에 보관하여 사용하였다.

표준용액 조제 : Spiramycin, tylosin, erythromycin 각 표준품을 메탄올에 용해하여 100ppm 농도로 조제하여 4℃ 냉장보관 후 실험시 이를 DW로 희석하여 사용하였다.

시험방법

시료 전처리 : 세절한 시료 5g을 50ml test tube에 넣고 아세토니트릴 10ml를 가하여 균질화한 후 tube mixer로 10분간 voltex한 다음 iso-octane 10ml를 가하여 5분간 약하게 voltex한 후 5000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 아세토니트릴 층을 취하여 농축기로 약 1ml까지 농축한 다음 농축액을 15ml tube에 옮기고 아세토니트릴을 가하여 2ml로 하였으며 여기에 DW 12ml를 가하여 잘 혼합하였다

SPE column cleanup : Sep-pak C₁₈ cartridge에 10ml 1회용 주사기를 연결하여 vacuum manifold에 고정한 다음 5% dimethyldichlorosilane 1ml와 MeOH, DW 10ml씩을 분당 2~3ml 속도로 차례로 흘려보내 activation하였다. Activation한 C₁₈ column에 추출용액을 같은 속도로 통과시킨 후 DW 10ml로 세척하고 2분 동안 공기를 통하여 건조시킨 후 0.1M methanolic ammonium acetate 1.5ml로 용출하였다. 용출액에 인산완충액 1.5ml를 가하여 0.5ml 또는 그 이하로 농축한 후 인산완충액을 가하여 전량을 1ml로 하여 0.45µm 필터로 필터 후 50µl를 기기에 주입하였다.

Mass spectrometer condition : Drying gas 유

Table 2. Ions monitored in SIM

Compound	m/z at PCI		
Spiramycin	843.5	540.5	522.5
Tylosin	917.0	742.8	582.7
Erythromycin	734.8	576.7	522.6

속은 13 l/min, nebulizer pressure는 30psi, drying gas temperature는 350℃, capillary voltage는 3,500V로 하여 PCI mode로 분석하였으며 SIM mode로 monitoring하였다(Table 2).

결과 및 고찰

마크로라이드계 항생물질인 spiramycin, tylosin, erythromycin을 분석하기 위해 먼저 UV detector를 이용하여 보았으나, 이들 약제들 간의 파장의 차이(spiramycin 232nm, tylosin과 erythromycin 287nm)와 머무름 시간의 차이로 인해 동시분석에 어려움이 있었는데, 이는 Juhel-Gaugain과 Anger²⁾가 시험한 결과와 일치하는 것으로 조사되었으며 본 시험에서는 UV대신 MS를 이용하여 분석하기 위해 이동상 용매와 칼럼 그리고 전처리 방법을 시험하였다.

이동상 용매로는 0.1% TFA와 MeOH를 사용하였는데 이는 Bernard delepine 등¹⁾이 MS를 이용한 분석시 0.1% TFA를 이동상 용매로 사용했을 때 검출감도가 formic acid 등 다른 용매를 사용했을 때 보다 우수하였다고 보고하였으며, Juhel-gaugain 등²⁾의 시험에서도 같은 결과를 보여 본시험에서도 이를 이동상 용매로 사용하여 분석하였다.

칼럼에 있어서는 µ-Bondapak C₁₈(3.9×300mm, 10µm)와 µ-Novapak C₁₈(3.9×150mm, 5µm) 및 XTerra C₁₈(5µm, 3.9×150mm)을 사용하여 시험한 결과 µ-Bondapak C₁₈ 칼럼에서는 spiramycin과 tylosin의 머무름 시간 차이가 10분이 넘었으며, µ-Novapak C₁₈ 칼럼에서는 완전한 피크분리가 이루어지지 못하는 경향이 있는 것으로 조사되었다.

XTerra C₁₈ 칼럼에서는 감도가 높고 일정한 머무름시간을 보였으나 피크분리가 100% 완전하지는 않은 것으로 조사되었다. 그러나 본 시험은 MS spectra로 확인이 가능하기 때문에 비록 100% 분리되지는 않았지만 감도나 머무름 시간에서 우수한 XTerra C₁₈ 칼럼이 다른 칼럼보다 적합한 것으로 조사되었으며, 이러한 분석조건에 따라 3종의 마크로라이드계 항생물

질을 분석한 결과 spiramycin 10.16, tylosin 10.86, erythromycin 11.02분의 머무름 시간을 보여 이들 약제들이 10분에서 12분 사이에 적절히 분리되는 것으로 조사되었다(Fig 1).

전처리 과정에서는 Sep-pak C₁₈와 bond elut diol을 이용하여 clean-up 하여 예비 시험한 결과 Sep-pak C₁₈가 순상 칼럼인 bond elut diol 보다 clean-up이 더 우수한 것으로 조사되었으

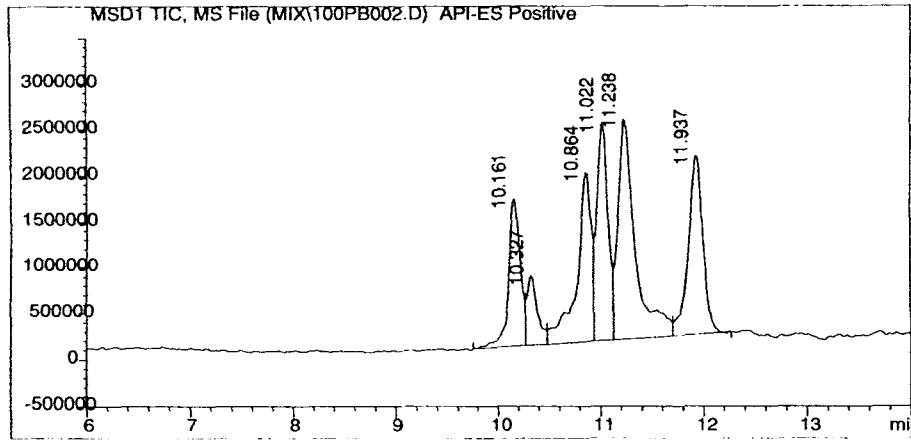
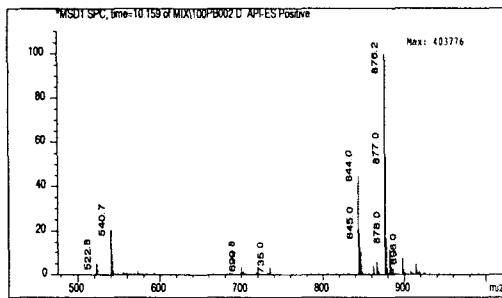
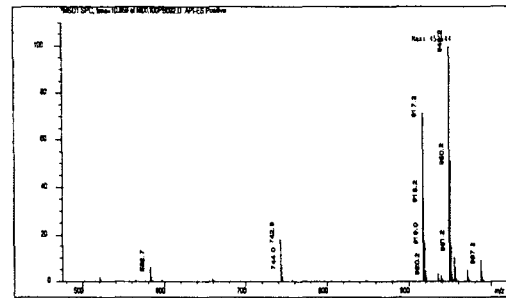


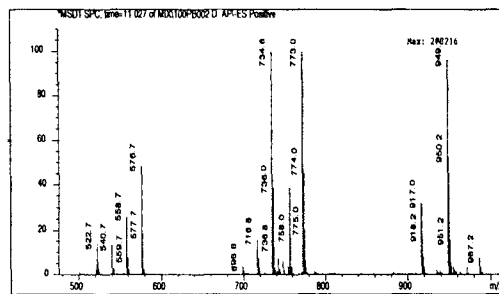
Fig 1. LC/MS ion current chromatogram of each drugs, obtained under PCI mode. Peaks and ions monitored : spiramycin(RT10.16 m/z843.5 540.5 522.5), tylosin(RT10.86 m/z 917.0 742.8 582.7), erythromycin(RT11.02 m/z734.8 576.7 522.6)



(A)



(B)



(C)

Fig 2. Selective ion monitoring mass spectra of A) spiramycin, B) tylosin, C) erythromycin, obtained under PCI.

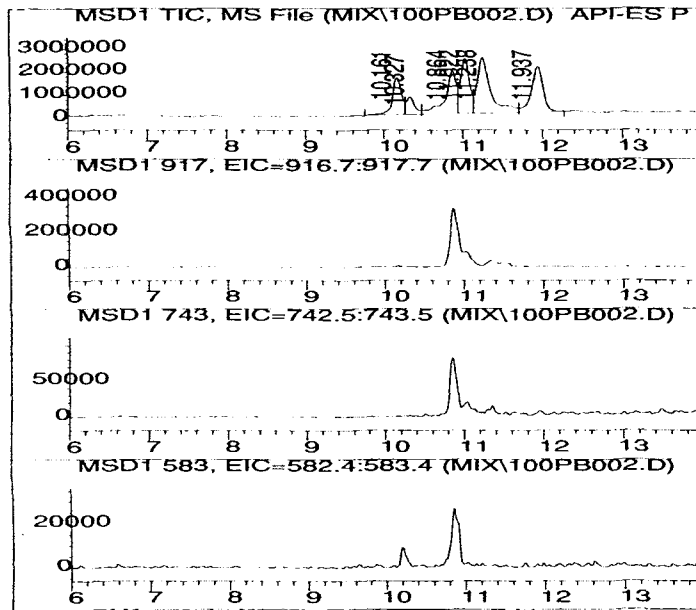


Fig 3. Extracted ion chromatograms of spiramycin at $m/z=843.5$, 540.5 , 522.5 , obtained under PCI mode.

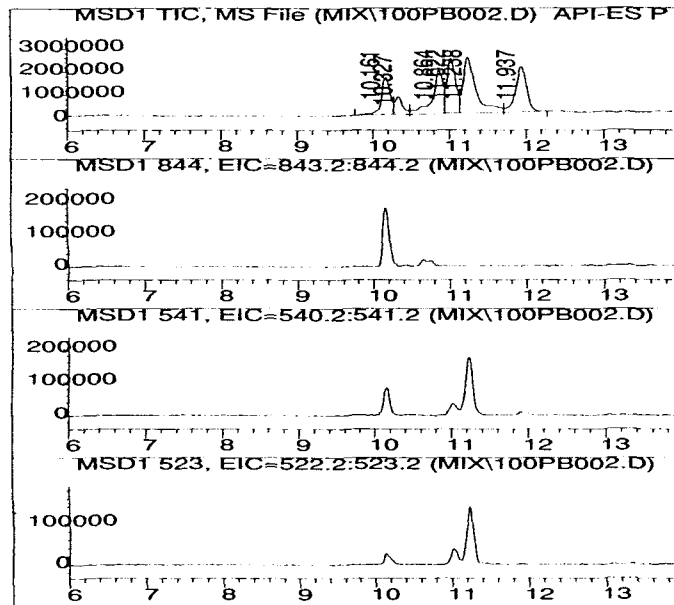


Fig 4. Extracted ion chromatograms of tylosin at $m/z=917.0$, 742.8 , 582.7 , obtained under PCI mode.

며 이는 Sep-pak C_{18} 을 이용하여 분석한 Juhel-gaugain 등²⁾의 시험결과 검출감도가 bond elut diol을 이용한 Bernard delepine¹⁾등

의 시험결과 보다 우수한 것으로 조사된 사실과도 관련이 있을 것으로 추정된다. 전처리시 본시험에서는 Juhel-gaugain 및

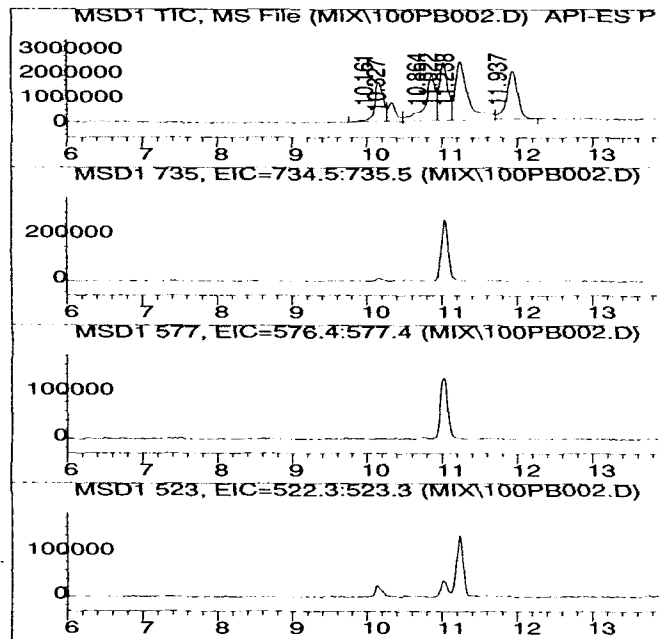


Fig 5. Extracted ion chromatograms of erythromycin at $m/z=734.8, 576.7, 522.6$, obtained under PCI mode.

Anger²⁾와 달리 아세토니트릴 추출 후 직접 Sep-pak C₁₈에 통과시키지 않고 1ml까지 농축한 후 통과시켰는데, 이는 추출액이 많으면 Sep-pak C₁₈ 통과시간이 길어지고 따라서 회수율이 저하되는 것을 방지하기 위한 것이었는데 예비시험 결과 회수율에는 차이를 보이지 않았으며, 통과시간에서는 30분 정도가 빠른 것으로 조사되었다. 이는 농축에서 오는 회수율 저하와 Sep-pak C₁₈ 통과량에 따른 회수율 저하가 비슷하기 때문인 것으로 추정되었다.

또한 Sep pak C₁₈ cartridge 활성화시 Juhel-gaugain과 Anger²⁾의 시험방법에서와 같이 계면활성물질인 5% dimethyldichlorosilane을 사용하였는데, 예비시험에서는 이를 사용하지 않은 것과 큰 차이가 없었으며 그 원인은 확인할 수 없었다.

본 시험에 의한 검출감도는 약 50 μ g/kg으로 Bernard delepine¹⁾의 시험결과와 일치하였으나 Juhel gaugain과 Anger²⁾의 시험결과 보다는 감도가 다소 낮은 것으로 조사되었는데, 이는 Juhel gaugain과 Anger²⁾는 UV detector에

의해 단지 피크인지가 가능한 농도를 조사한 것인 반면, 본 시험이나 Bernard delepine¹⁾은 확인정량이 가능한 농도를 조사한 것이기 때문에 생긴 차이로 사료된다.

본 시험을 통하여 LC/MS를 이용하여 축산물에 대한 마크로라이드계 항생물질의 확인정량이 가능함을 알 수 있었으나(Fig 2~5), 검출 감도와 피크분리능력 향상을 위한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료되며, 또한 마크로라이드계 항생물질뿐 아니라 다른 유해성 잔류물질들에 대한 확인 정량 방법들도 모색해 나가야 할 것으로 사료된다.

결 론

LC/MS를 이용하여 축산물중 잔류 마크로라이드계 항생물질을 분석하는 방법을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 이동상 용매로는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 및 100% methanol을 gradient로 사용하고 칼럼으로는 XTerra C₁₈칼럼(5

- μm , $3.9 \times 150\text{mm}$)을 사용하였으며, MS는 positive chemical ionization(PCI) 및 selective ion monitoring(SIM) mode로 50 ~ 1000 Mass 범위에서 분석하였다.
2. 전처리 방법으로는 아세토니트릴로 추출하여 Sep-pak C_{18} cartridge를 사용하여 clean-up 하였으며, 0.1M methanolic ammonium acetate로 용출하였다
 3. 본 시험으로 우유에 대한 분석결과 검출 한계는 spiramycin, tylosin, erythromycin 각각 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다.

참고문헌

1. Delepine B, Hurtaud-Pessel D, Sanders P. 1996. Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. *JAOAC Int* 79 : 397~404.
2. Juhel-Gaugain M, Anger B. 1999. Multiresidue chromatographic method for the determination of macrolide residues in muscle by high-performance liquid chromatography with UV detection. *JAOAC Int* 82 : 1046~1052.
3. Chan W, Gerhardt GC, Salisbury CDC. 1994. Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by reversed-phase liquid chromatography. *JAOAC int* 77 : 331~333.
4. Boison JO, Salisbury CDC, Waynechan, et al. 1991. Determination of penicillin G residues in edible animal tissues by liquid chromatography. *JAOAC Int* 74 : 497~501.
5. Meetschen U, Petz M. 1990. Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk. *JAOAC Int* 73 : 373~378.
6. Zomer E, Quintana J, Saul S, et al. 1995. A method for identification and quantitation of β -lactams in milk by liquid chromatography with microbial receptor assay. *JAOAC Int* 78 : 1165~1172.
7. Cutting JH, Kiessling WM, Bond FL, et al. 1995. Agarose gel electrophoretic detection of six β -lactam antibiotic residues in milk. *JAOAC Int* 78 : 663~667.
8. Rogers ME, Adlard MW, Saunders G, et al. 1984. Derivatization techniques for high performance liquid chromatographic analysis of β -lactams. *J Chromatogr* 297 : 385~391.
9. Boison JOK, Keng LJY, MacNel JD. 1994. Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. *JAOAC Int* 77 : 565~569.
10. Moats WA. 1994. Determination of ampicillin and amoxicillin in milk with an automated liquid chromatographic clean-up. *JAOAC Int* 77 : 41~45.
11. Moats WA, Harik-Khan R. 1995. Liquid chromatographic determination of β -lactams antibiotics in milk : A multiresidue approach. *JAOAC Int* 78 : 49~54.
12. Moats WA. 1992. Determination of cloxacillin and penicillin V in milk using an automated liquid chromatographic cleanup. *JAOAC Int* 75 : 257~260.
13. Moats WA. 1997. Advances in determination of antibiotic residues. *JAOAC Int* 80 : 1~4.