

HPLC-MSD를 이용한 식육 중 합성항균제의 동시분석

홍인석¹, 최윤화, 권택부, 이정학

서울특별시 보건환경연구원

(접수 2006. 7. 21, 게재승인 2006. 9. 6.)

Simultaneous detection for synthetic antimicrobials in muscle by high performance liquid chromatography-mass selective detector (HPLC-MSD)

In-Suk Hong¹, Yoon-Hwa Choi, Taek-Boo Kwon, Jung-Hark Lee

Seoul Metropolitan Health & Environment Research Institute, Seoul, 137-130, Korea

(Received 21 July 2006, accepted in revised from 6 September 2006)

Abstract

This study was conducted to develop the analytical method about simultaneous determination for synthetic antimicrobials in muscle by high performance liquid chromatography - mass selective detector (HPLC-MSD). Solid phase extraction (SPE), matrix solid phase dispersion (MSPD) and liquid-liquid extraction (LLE) have been adapted as pretreatment procedures for HPLC-MSD. Among various solvent tested, methanol was chosen for extraction of synthetic antimicrobials in muscles. For the optimized response, the values of various MS parameters including fragment voltage, drying gas flow, nebulizer pressure, drying gas temperature were verified. The average recovery rates using MSPD and SPE for muscles of bovine and pork were 78.9-127.1% and 78.3-121.7%, respectively. This method was verified the satisfactory performance for fourteen synthetic antimicrobials excepting carbadox in muscle of pork as detection limit of 0.05 $\mu\text{g/g}$ on API/ES SIM mode.

Key words : HPLC-MSD, Synthetic antimicrobials, Residue analysis

¹Corresponding author

Phone : +82-2-570-3430, Fax : +82-2-570-3043

E-mail : fafahong@kornet.net

서 론

항균제는 광의의 의미로서 미생물의 성장을 억제하거나 죽임으로써 미생물의 감염을 치료하기 위한 약물의 총칭으로서 합성을 통하여 만들어진 합성항균제와 미생물이 필요에 의해서 만든 자연물질인 항생물질로 구분된다. 항균제들의 사용은 가축을 질병으로 보호하는 긍정적인 측면이 있으나 내성균의 발생이나 식육 중 잔류하여 인체에 유입되는 문제 등 부정적인 측면도 있으므로 사육농가의 항균제 적합한 사용에 대한 관리와 규제를 하게 되는데 이를 위해서는 출하단계에 있어서의 신속하고도 정확한 검사방법들이 필요하다¹⁾.

미국에서는 연방법으로 약 70여종의 항균제들을 규제하고 있으며 우리나라에서는 식품공전에 의하면 59종의 항균제를 규제하고 있는데 그 중의 33종이 합성항균제이다²⁾.

농림부에서는 식육 중 잔류물질검사요령을 제정하고, 전국적으로 시도 보건환경연구원 및 가축위생시험소를 통하여 도축장에서 출하되는 식육에 대한 잔류물질 검사프로그램을 매년 실시해 오고 있는데 2005년도에는 항생물질 23종, 합성항균제 26종, 농약 29종, 호르몬 2종을 대상으로 시행하였다. 많은 두수의 검사를 위해서는 미생물을 이용한 EEC 4 plate 정성검사를 통하여 1차 스크리닝하고, 양성검체에 대하여는 항원항체반응을 이용한 계열별 검사와 아울러 HPLC를 이용한 정밀정량검사를 시행하고 있으나 약제의 물리화학적 차이가 크기 때문에 현재 정밀정량검사의 경우 대부분이 단성분 검사방법에 근거하고 있어 다종의 항균제들을 검사하기 위해서는 시간과 장비, 인력의 제한이라는 문제점을 가지고 있다.

우리나라에서의 식육 중 합성항균제 분석방법으로 기준이 되고 있는 것은 식품의약품안전청의 식품공전분석법²⁾과 수의과학검역원의 식육중 잔류물질검사요령에 의한 분석방법^{1,3)}들로서 HPLC의 UVD나 FLD가 주로

사용되어 왔었으나 최근에는 니트로퓨란계 대사물질의 경우에는 HPLC-MSD를 이용한 분석법이 기본분석법으로 추가되는 등 MSD의 가격의 저하와 기기성능의 발달, 분리능이 우수한 컬럼의 개발 등으로 인하여 점차 그 사용범위가 확대되어가고 있다⁴⁾.

Mass selective detector(MSD)는 높은 정성능력을 가지고 있어 과거에는 검출 성분에 대한 정성확인용으로만 주로 사용되었으나 분석대상 물질종들에 대한 범용성과 높은 정성능력의 장점을 이용하여 신속한 다중분석 방법으로 이용하려는 분석법연구들이 국내·외에서 다수 보고되어지고 있다⁵⁻⁹⁾. 그러나 국내에서 항균제에 대한 동시분석법의 연구들은 대부분이 HPLC-UV와 FLD를 이용한 것으로¹⁰⁻¹³⁾ MS를 이용한 동시분석법의 개발에 대한 연구는 김이 설파제 5종에 대한 LC/MS/MS APCI 분석법을 보고¹⁴⁾하였을 뿐 외국에서의 연구 성과에 비추어 볼 때 극히 미흡하다.

본 연구는 HPLC-MSD를 이용한 신속하고도 정확한 다중검사법을 연구개발함으로써 출하단계에 있어서의 신속한 항균제 부적사용의 관리 및 범용의 UVD 검출시 오인으로 인한 축산농가의 피해를 최소화하기 위한 목적으로 수행되었다.

재료 및 방법

1. 재료

서울시소재 도축장에서 갓 도축한 소와 돼지의 근육을 EEC 4-plates법에 의한 실험결과 음성인 것으로 지방과 인대를 제외한 근육부위를 blender로 잘 분쇄한 뒤 수분이 증발되지 않도록 밀봉하여 -23℃이하로 냉동보관하였고, 이를 매 실험시마다 일정량을 취하여 분석시료로서 사용하였다.

2. 표준품 및 시약

1) 합성항균제 표준품

실험에 사용된 합성항균제들은 albendazole, carbadox, danofloxacin, enrofloxacin, ethopabate, ormethoprim, oxolinic acid, sulfadimethoxine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfaquinoxaline, sulfamonomethoxine 및 thiabendazole들은 Sigma사 (USA)의 제품으로 amprolium, fenbendazole, clopidol, nicarbazin, olaquinox 및 thiamphenicol 들은 Kanto사 (Japan)의 제품을, 그리고 diclazuril과 flubendazole 은 Wako사 (Japan)의 제품으로 사용하였으며 순도는 모두 98% 이상이었다. 각 표준품들은 10-20 mg 범위에서 정확히 재어 10-50% 메탄올로 녹인 뒤 100 ml 용량플라스크에 물로 정용하여 100-200 µg/g의 보관용액으로 조제하고 이를 4°C 이하 냉장고에 보관하며 필요시마다 꺼내 상온에서 희석하여 사용하였는데 oxolinic acid와 flubendazole은 메탄올에서도 잘 녹지 않아 1N NaOH를 1-2 ml 가하여 조제하였다.

2) 시약 및 초자

추출과 정제에 사용된 acetonitrile과 methanol은 HPLC분석용 (Merck, Germany)으로 ethyl acetate와 dicloromethane은 잔류분석용 300 (Wako, Japan)으로 물은 비저항계수 18 M Ω 이상의 초순수를 바로 제조한 것으로 사용하였으며, 이동상 용매로 조제 후에는 공기 제거 필터한 뒤에 사용하였다. 용매에 첨가한 acetic acid (Kanto, Japan)와 기타 무기시약 등은 모두 특급 이상이였으며 50 ml 원심튜브 (Falcon, USA)와 HPLC/MS 분석 전에 최종 추출물의 필터로는 0.45 µm filter (Acrodisc 13 CR PTFE, Germany)를 사용하였다.

MSPD법의 추출을 위해 octadecyl (C₁₈) (40 µm prep LC packing, JT Baker, USA)과 정제를 위한 C18 SPE로 Oasis MAX cartridges (6 ml tube, 150 mg, Waters, USA), Oasis HLB cartridges (6 ml tube, 200 mg, Waters, USA) 그리고 reservoirs (12 ml tube with 20 µm fits, Altech, USA) 등을 사용하였다.

3. 분석기기

실험에서 HPLC-Mass Spectrometer (Hewlett Packed 1100 series, USA), 질소농축기 (Organomation Associates, USA), 진공펌프 (Waters, USA), 원심분리기 (Allegra X-22R, Beckman, Germany), SPE vacuum manifold (Supelco, USA) 및 vortex mixer (Maxi Mix II, Branstead Thermolyne, USA) 등을 사용하였으며, 예비실험을 통하여 합성항균제의 동시분석을 위한 HPLC-MSD의 분석조건을 설정하였다 (Table 1).

4. 실험방법

1) 합성항균제의 분리용 컬럼 및 이동상 조건 선정실험

합성항균제들의 동시분석을 위한 혼합액 조제와 각 성분의 최적분리조건을 선정하기 위하여 국립수의과학검역원의 8종 합성항균제 동시분석법에서 사용된 ODS 80 Tm 컬럼과³⁾ 본 실험실에서 가장 많이 사용하는 symmetry C₁₈ 컬럼 2 종을 비교하였다. 이동상으로는 합성항균제인 설파제 5종의 분석법을 보고한 김의 논문에서 이동상 용매비교실험을 통하여 가장 적합하였다고 추천된 acetonitrile과 물을 사용하였고¹⁴⁾, 여기에 LC/MSD 분석에서 buffer로서 많이 첨가되고 있는 0.1 % acetic acid로 각각 조제하여 기울기용리법으로 아세트나이트릴의 농도를 10-50 %로 변경해가면서 HPLC/MS API-ES 에서 scan 모드로 각각 peak 들의 분리정도를 비교 실험하였다^{5,6)}.

2) 합성항균제들의 HPLC/MSD 최적분석조건 선정실험

합성항균제들의 LC/MS API-ES 분석시 최적분석감도를 얻기 위하여 각각의 합성항균제들을 FIA 방법을 이용하여 MSD의 설정인자인 fragment voltage, drying gas flow, nebulizer pressure, drying gas temperature,

capillary voltage 등을 변화시켜가며 측정감도를 비교하였다. 항균제들의 LC/MS 분석의 정성과 정량을 위한 모분자 이온과 fragment ion들의 질량값을 구하였으며, 최종적으로 선

정된 컬럼과 이동상의 조건에서 scan과 SIM 모드로 정성 및 정량을 위한 동시분석의 최적조건으로 설정하였다.

Table 1. Analytical condition of HPLC-MSD for synthetic antimicrobials

Items	Analytical condition		
Instrument	Hewlett Packed 1100 MSD series Ionization type : API / ESI		
Column	Symmetry C ₁₈ (4.6 x 150 mm, 5 μm) Column temperature : 30°C		
Mobile phase	H ₂ O with 0.1% acetic acid (A), Acetonitile with 0.1% Acetic acid (B) Flow: 1.0 ml/min (gradient mode)		
	Time (min.)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	5	90	10
	7	85	15
	10	85	15
	12	70	30
	20	70	30
	22	50	50
	25	50	50
	30	90	10
	35	90	10
Ionization mode	API/ES positive		
Drying gas flow	13 ml / min.		
Drying gas temp.	350°C		
Nebulizer pressure	40 psi		
Capillary voltage	4000 v		

3) 합성항균제들의 추출 및 정제실험

소의 근육시료중에 합성항균제들을 동시에 추출하기 위하여 기존의 합성항균제분석에서 간편한 추출법으로 많이 사용되고 있는 MSPD법^{3,10,15}과 액-액분배법^{3,11}을 비교 시험하였고 정제를 위하여 C18 SPE^{6,7,15}로 Oasis HLB와 MAX cartridge를 사용하여 정제효과를 비교하였다 (Fig 1).

Matrix solid phase dispersion (MSPD)법 :

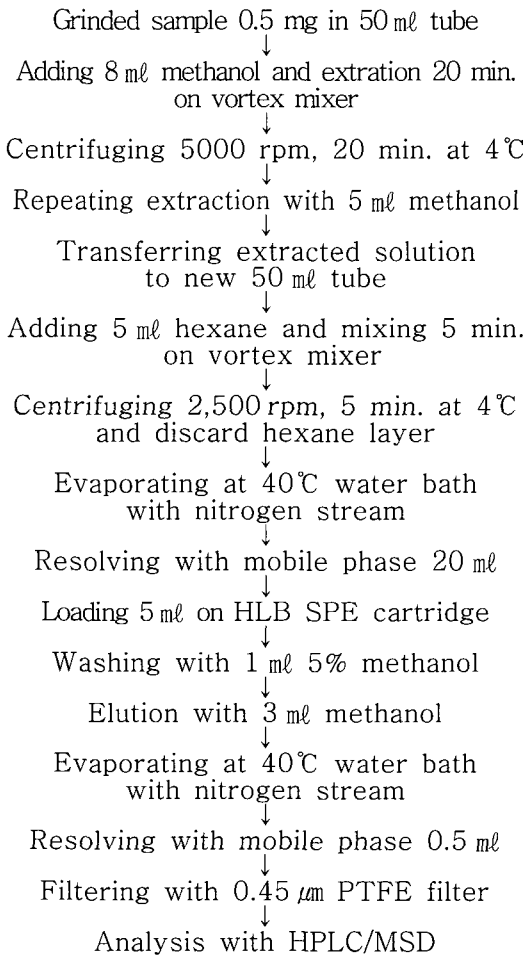
약 2 배량의 hexane과 acetonitrile로 세척하여 상온에서 건조시킨 2g의 옥타데실 (C18) 분말과 표준품 혼합액 A와 B를 5 μg/g수준으로 처리한 소근육 0.5g을 유발에 넣고 잘 혼합 분쇄하여 12 ml 주사기형튜브 (reservoir with frits, Waters)에 옮기고 상부를 frit로 덮은 뒤 주사기유리봉으로 잘 눌러 약 4.5 cm가 되도록 압축하고 SPE vaccum manifold 상에서 8 ml hexane을 약 1 ml/min 유속으로 흘려

주어 지방을 제거하고 음압하에서 건조 한 뒤 추출용매로 추출하여 40°C의 수욕상에서 질소가스로 용매를 휘발시키고 0.5 ml 이동상으로 녹여 분석액으로 하였다.

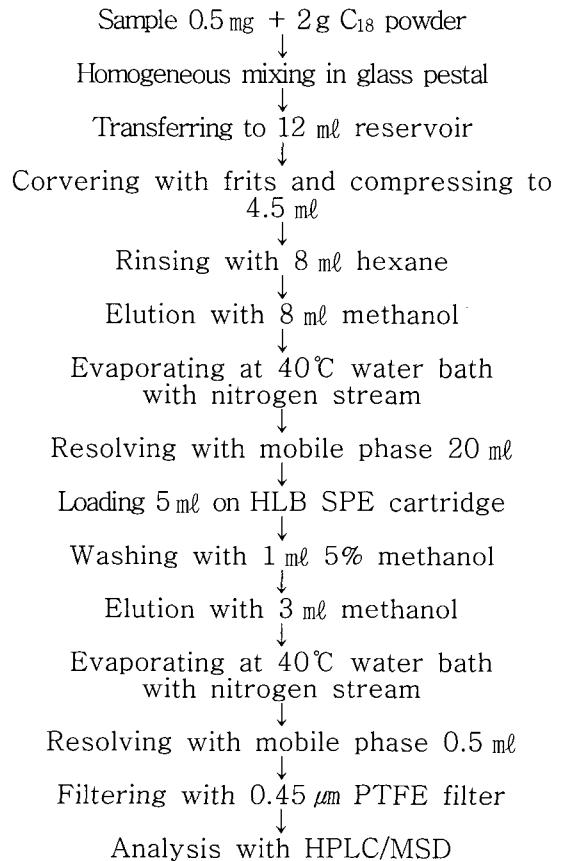
Liquid-liquid extraction(LLE)법 전처리 : 소량의 시료를 50 ml 원심튜브에 넣고 추출용매를 8 ml 넣은 뒤 vortex mixer에서 20 분간 진탕시키고 4°C에서 5000 rpm으로 10 분간 원심분리시키고 상층의 추출액을 50 ml 새튜브에 옮긴 후 다시 5 ml의 추출액으로 반복

추출하여 새 튜브의 이전 추출액과 합하였다. 추출액이든 튜브에 5 ml hexane을 넣고 5 분간 진탕한 뒤 3,000 rpm에서 5 분간 원심분리 후 하부의 추출액 층을 취하여 40°C의 수욕상에서 질소가스로 용매를 휘발시키고 0.5 ml 이동상으로 녹여 분석액으로 하였다.

단 hexane과 층이 분리되지 않는 디클로메탄이 추출액인 경우는 먼저 날려보내고, 물과 아세트나이트릴용액 (50:50)으로 재용해시켜 5 ml hexane과 층분리가 되도록 하여 정제하였다.



LLE method



MSPD method

Fig 1. Flow diagram of MSPD and LLE method for analysis of synthetic antimicrobials in muscle

Solid phase extraction (SPE)법 전처리 : SPE cartridge를 vacuum manifold에 장착하고 10 ml methanol과 10 ml 물을 차례로 흘려주어 conditioning 시킨 후 20배의 물로 희석한 추출액을 정확히 5 ml씩 loading시켰다. Oasis HLB cartridge의 경우는 1 ml 5% methanol로 흘려주어 추출액을 버리고, 3 ml의 100% methanol로 추출한 액을 수집액으로 하였으며 Oasis MAX cartridge 경우는 1 ml의 2% NH₄OH와 1 ml 100% methanol를 차례로 흘려주어 추출액을 버리고, 3 ml의 2% acetic acid로 추출액을 수집하였다. 각 추출액들은 40°C의 수욕상에서 질소가스로 용매를 휘발시키고 0.5 ml 이동상으로 녹여 분석액으로 하였다.

4) 합성항균제들의 회수를 실험

본 실험에서 얻어진 동시전처리방법을 이용하여 각 합성항균제의 검출한계를 구하기 위하여 항균제의 농도를 5 µg/g에서 0.1 ppb까지 10단계로 조제하여 SIM mode로 분석하였으며 S/N비가 3-4 이상인 농도를 검출한계로 정하였다.

소와 돼지의 근육에 14종의 합성항균제들을 각각 1 µg/g 수준으로 첨가하고 밀봉하여 하루 밤동안 근육조직에 흡수시킨 뒤 동시전처리방법을 이용하여 추출 및 정제를 하고, HPLC/MS-ES SIM mode 상에서 회수율을 측정하였다 (Fig 1).

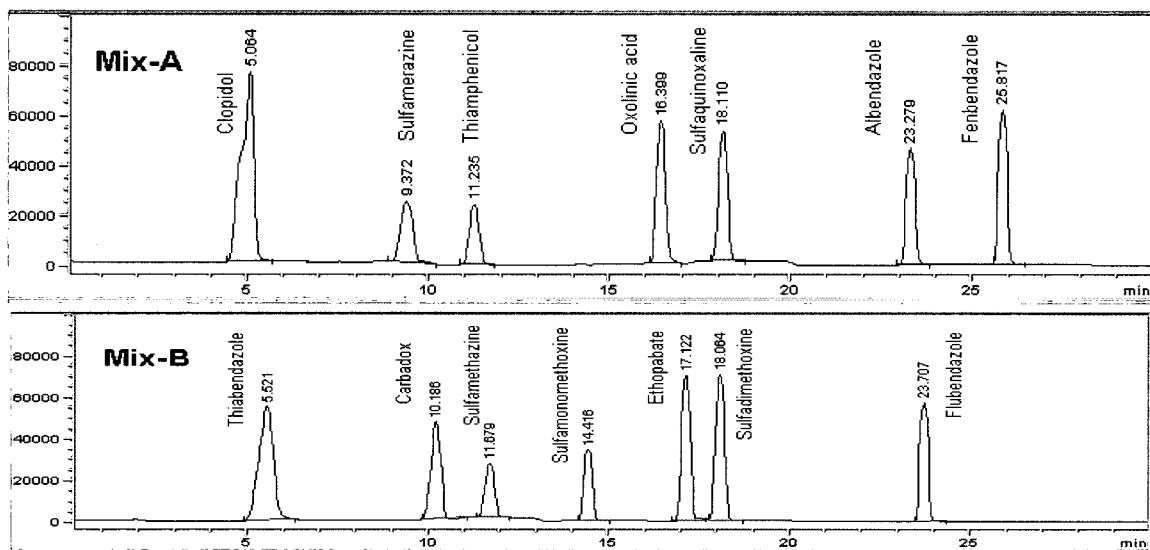


Fig 2. Chromatograms obtained on SIM mode of HPLC/MSD for synthetic antimicrobials with symmertry C₁₈

결과 및 고찰

분리의 최적화

합성항균제들의 동시분석을 위한 혼합액조제와 각 성분의 최적분리조건을 선정하기 위하여 국립수의과학검역원에서 합성항균제 동시분석용 컬럼으로 이용된 ODS 80 Tm 컬럼³⁾과

본 실험실에서 범용으로 이용하는 symmetry C₁₈ 컬럼을 비교하였는데 이동상으로 사용한 0.1% 초산을 함유한 acetonitrile과 물의 pH는 약 3.5 수준이었다. 아세트나이트릴과 물을 사용하여 동일 이동상 조건에서 각각의 컬럼 상에서의 항균제들의 분리순서를 확인한 뒤 이를 두 그룹으로 나누고 acetotrite의 농도를 10-50%로 변화시켜가면서 합성항균제들의 분리정도를 시험하였다.

HPLC/UV의 8종 합성항균제 동시분석법에서 지정된 ODS 80 컬럼은 Mix A와 Mix B 두그룹 모두에서 분리도와 항균제 피크의 모양이 symmetry C₁₈ 보다 떨어진 것으로 나타나 symmetry C₁₈을 분리용 컬럼으로 선정하였는데, 선정된 Table 1의 분석조건에서 symmetry C₁₈의 분리 chromatogram은 아래 그림과 같다 (Fig 2).

측정의 최적화

약 20여종의 합성항균제들의 정성과 정량을 위한 모분자이온(molecular ion)과 조각이

온(fragment ion)들의 질량값들을 찾았으며, 정량에 적합하도록 이온화되는 +, - 극성의 타입을 구하였다 (Table 2).

LC/MS API-ES 모드상에서 FIA 분석을 통해 각 항균제 성분들의 최적 분석 감도를 얻기 위하여 fragment voltage, capillary voltage, drying gas flow, nebulizer pressure 및 drying gas temperature 등의 MSD의 파라미터의 값들을 변화시켜가며 최대의 반응감도를 나타내는 설정값들을 구하였다 (Fig 3).

합성항균제들의 측정감도에 가장 큰 영향을 미치는 것은 fragment voltage로 thiabendazole의 140 V를 제외하고는 대부분이 80-

Table 2. Parameters of HPLC/MS-ESI analysis for synthetic antimicrobials

Compounds	Molecular formular	Molecular weight	Polarity type	Optimized fragment voltage (V)	Quantification ion (m/z)	Confirmation ion (m/z)
Albendazole	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	265.3	+	90	266	234, 191
Amprolium	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ Cl·HCl	315.2	+	80	243	150, 122
Carbadox	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ₄	262.2	+	90	263	231
Clopidol	C ₇ H ₇ Cl ₂ NO	192.0	+	100	192	145, 69
Danofloxacin	C ₁₉ H ₂₀ FN ₃ O ₃	357.4	+	110	358	340, 180
Diclazuril	C ₁₇ H ₉ Cl ₃ N ₄ O ₂	407.6	-	110	407	336, 141
Enrofloxacin	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	359.4	+	110	360	342, 316
Ethopabate	C ₁₆ H ₂₀ NO ₂	237.0	+	80	238	206
Fenbendazole	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	299.4	+	120	300	268, 159
Flubendazole	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	313.3	+	100	314	282
Nicarbazin	C ₁₉ H ₁₈ N ₆ O ₆	426.4	+	90	125	148
Olaquinox	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄	263.3	+	90	264	229, 246
Ormethoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290.3	+	120	291	261, 230
Oxolinic acid	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	261.2	+	100	262	244, 245
Sulfadimethoxine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	310.3	+	100	311	156, 187
Sulfamerazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	264.3	+	90	265	156, 172
Sulfamethazine	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278.3	+	100	279	186, 156
Sulfamonomethoxine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	280.3	+	90	281	156, 126
Sulfaquinoxaline	C ₁₄ H ₁₁ N ₄ O ₂ SNa	322.3	+	80	323	156, 105
Thiabendazole	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	201.2	+	140	202	175, 131
Thiamphenicol	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₂ NO ₅ S	356.2	+	90	356	338, 308

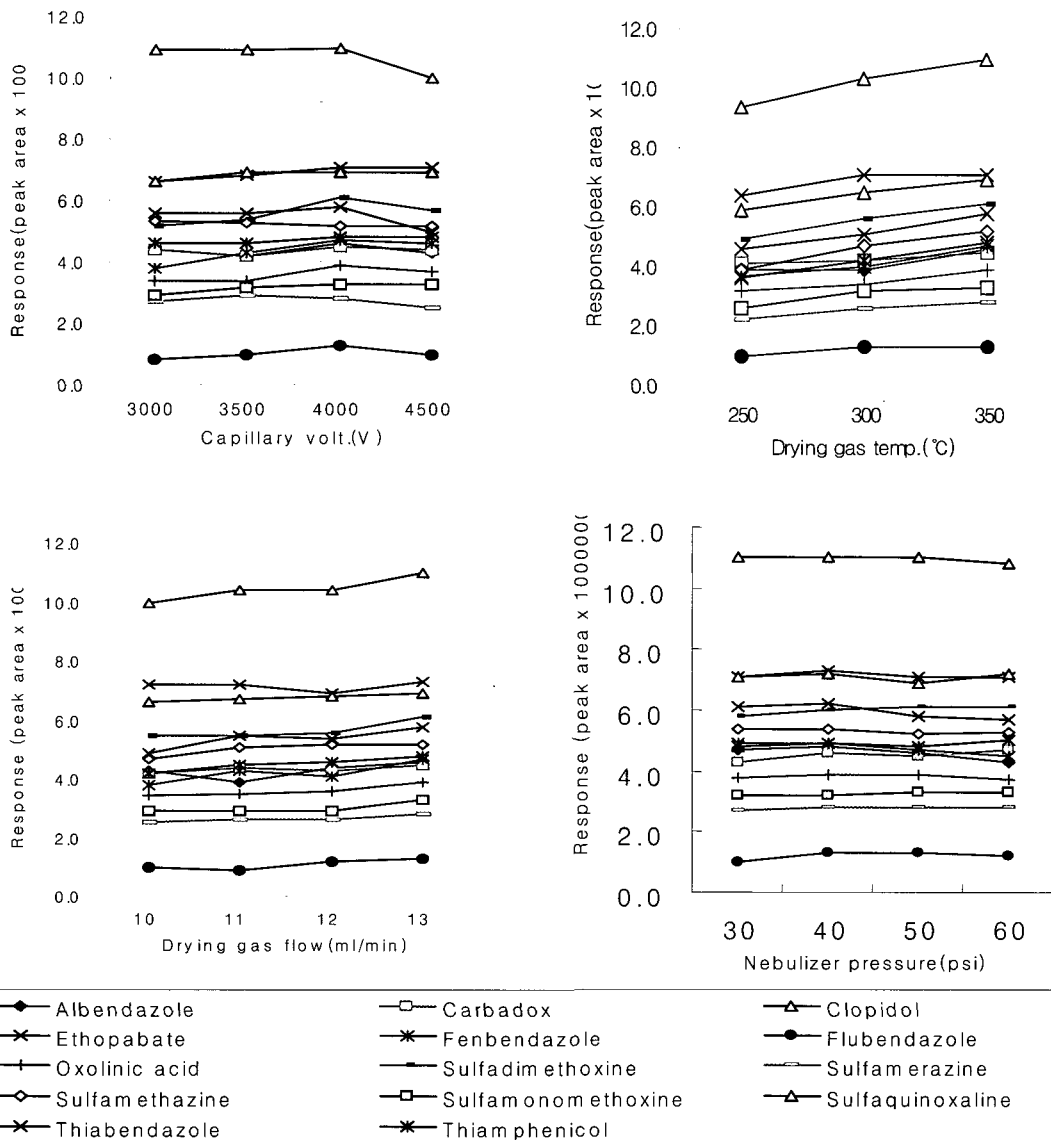


Fig 3. Variation of response with the voltage of capillary, drying gas temperature, nebulizer pressure and drying flow in HPLC/MS-ESI

120 V의 범위에서 최적의 이온화된 mass (m/z) 값들을 나타내었다. 각 항균제 혼합액의 검출 순서와 시간 (retention time)에 따라 최적화를 보인 항균제의 fragment voltage값으로 프로그램 설정하였고, 일부 간격의 차이가 협소한 경우는 감도의 저하를 최소화하는 교차값으로 조정하여 동시분석을 위한 최적의 SIM 분석조건으로 설정하였다. 이온화를 시키는

극성모드로는 diclazuril을 제외한 항균제들에서 모두가 positive (+) mode에 적합한 것으로 나타나 분석시간을 최소화시키기 위하여 동시분석에서 diclazuril을 배제하고 positive mode의 동일조건으로 설정하였다. 기타의 조건들은 항균제간의 약간의 차이는 있었지만 큰 영향을 나타내지 않았으며, 공통적으로 최적감도를 나타낸 MSD의 조건으로는 drying

gas flow가 13 ml/min, drying gas temperature가 350°C, nebulizer pressure가 40 psi, 그리고 capillary voltage가 4000 v 일 때였다 (Fig 3).

위에서 선정된 컬럼과 이동상의 분리조건 상에서, 동시에 정성 및 정량분석을 위한 MSD 파라메타들의 최적조건들을 설정하여 적용함으로써 SIM 분석을 통해 기기반응값 (response)이 최적감도가 되도록 하였다.

전처리 방법의 최적화

합성항균제의 물리화학적 특성이 서로 다르기 때문에 축산식품중의 잔류 합성항균제들을 동시분석하기 위해서는 전처리시 시료에서 항균제성분들을 완전히 추출해낼 수 있는 추출용매와 아울러 기기분석시에 간섭을 배제할 수 있는 정제과정이 매우 중요하므로 HPLC/MSD에 적용할 수 있는 적합한 전처리방법을 선정하기 위하여 기존의 HPLC UV 방법에서 사용되고 있는 MSPD법과 액체-액체추출법 (LLE법)을 비교하였다³⁾.

MSPD법은 컬럼충진물로 많이 사용되는 옥타데실 (C18)을 시료와 혼합하여 반건조상태로 한 뒤 유기용매로 직접 용출하는 방법으로 시료와 혼합시 분쇄되는 기계적인 힘과 C18의 소수성으로 인하여 지방이나 비극성물질은 달라붙게 되며 단백질이나 극성물질은 C18 말단으로 배척이 되는 점을 이용한 전처리법인데 시료의 양에 제한을 받는 단점이 있지만 다수의 시료를 신속하게 처리할 수 있는 방법이다.

LLE법은 분액깔대기를 이용한 유기물질 추출정제에서 기본방법인 분액깔대기를 이용한 액체-액체 분배법 (liquid-liquid extraction)을 소량의 시료와 추출용매의 사용으로 간소화한 것으로 유기용매를 이용하여 시료중의 비극성인 지방과 합성항균제를 추출하고 이를 hexane과 water (또는 acetonitrile이나 methanol 등)의 분배를 통하여 지용성물질을 hexane 층으로 옮겨 제거시킨 뒤 농축하여 그대로

또는 SPE 등의 정제 후 분석하는 방법인데 기존의 액체-액체분배법에 비교할 때 시료의 양과 정확도에 제한을 받는 단점이 있지만 용매의 사용이나 추출 및 농축시간들에 있어서 단축시킴으로서 다수의 시료들을 신속하게 전처리 할 수 있다.

MSPD법으로 합성항균제들을 동시에 추출하기 위한 최적용매를 선정하기 위한 예비실험에서 합성항균제 추출 및 정제용매로 사용되는 acetonitrile, ethyl acetate, dichloromethane, methanol 4종의 용매들을 4, 8, 12 ml 로 추출하여 넣어 추출한 결과 추출용매의 양은 용매에 따라 차이가 있었지만 4 ml에서 대부분의 추출되었고 8 ml에서 약간의 증가가 있었으나 12 ml는 8 ml 추출보다 차이를 보이지 않아 8 ml가 적당한 것으로 나타났다.

ethyl acetate는 김¹⁴⁾의 UV 검출기를 이용한 합성항균제동시분석법 연구에서 회수율은 다소 떨어지지만 UV 검출기상의 방해성분이 적어 적합하였다고 추천되었으나, 본 실험의 MSPD추출에서는 벤지미다미졸계의 항균제에 대한 추출효율이 매우 저조하였고 설파제에 경우 methanol과 acetonitrile 보다 낮은 추출률을 보였으며, LLE법 추출에서도 시료의 용매추출 후 지방제거를 위한 hexane 정제시 용매를 농축 후 다시 물 등으로 재 용해시킨 뒤 hexane의 분배를 시켜야 하는 추가 과정의 불편함이 있어 배제하였다.

소의 근육시료에 5 µg/g 정도로 합성항균제를 처리한 뒤 MSPD법과 LLE법으로 acetonitrile, dichloromethane, methanol 3종의 용매를 사용하여 추출효율을 비교하였다 (Table 3).

디클로메탄은 티암페니콜과 클로피돌 등에서의 추출율이 매우 낮았고, 일부 성분에서는 간섭성분을 배제하지 못하여 높은 추출율을 보이는 등 추출율의 차이가 심하였으므로 배제하였으며, 메탄올의 추출은 아세트나이트릴의 경우보다 MSPD법과 LLE법 모두에서 높은 회수율을 나타내어 MSPD법과 LLE법을 위한 추출용매로 선정하였다. MSPD법과 LLE법간에는 큰 차이가 보이지 않았으나 두

방법 모두 시간과 절차를 간소화한 추출방식으로 LC/MS 분석시 chromatogram 앞쪽에 큰 방해 피크가 있어 앞쪽에 추출되는 올라퀸톡스와 암프롤리움 및 엔로플록사신 등을 정량할 수가 없었고, ethophabate와 flubenda-

zole 등에서는 간섭성분의 영향으로 인하여 140% 이상의 높은 값의 회수율을 보였으므로, 보다 낮은 농도의 항균제에 대한 정성 및 정량분석을 위해서는 SPE 등의 추가 정제과정의 필요성이 있었다.

Table 3. Comparison of extraction solutions on pretreatment of synthetic antimicrobials

Compounds	Recovery(%) from					
	Acetonitrile		Methanol		Dichlormethane	
	MSPD	LLE	MSPD	LLE	MSPD	LLE
Albendazole	75.2	70.4	78.0	83.4	49	60.4
Amprolium	- ¹⁾	-	-	-	-	-
Carbadox	103.3	68.6	93.9	53.3	83	45.7
Clopidol	68.4	68.2	125.2	90.8	28	8.5
Enrofloxacin	-	-	-	-	-	-
Ethopabate	152.5	140.4	152.5	131.0	100	187.1
Fenbendazole	98.8	133.3	92.6	97.0	36	48.5
Flubendazole	150.0	162.0	147.0	166.7	137	133.3
Olaquinox	-	-	-	-	-	-
Oxolinic acid	62.5	109.1	79.4	105.1	-	72.7
Sulfadimethoxine	86.0	89.0	118.3	86.0	95	120.4
Sulfamerazine	65.0	72.1	97.6	100.9	92	86.5
Sulfamethazine	77.4	67.9	107.1	87.3	88	106.7
Sulfamono-methoxine	105.3	121.9	130.5	158.6	82	167.6
Sulfaquinoxaline	68.8	75.3	79.7	69.0	41	75.3
Thiabendazole	45.3	74.1	107.0	81.5	103	88.9
Thiamphenicol	52.4	94.6	95.2	94.6	49	25.8

1) : Not detected

정제를 위한 방법으로는 C₁₈ SPE를 사용하였는데 높은 pH 안정성과 건조에 대한 안정성을 지닌 Oasis HLB 와 예비실험을 통하여 동시분석대상 항균제들의 추출이 확인된 양이온교환수지방식인 Oasis MAX 2종을 비교하기 위하여 소의 근육에 1 µg/g 농도로 처리하고 MSPD와 LLE전처리 과정을 거친 성분

에 대한 회수율 비교실험을 하였다 (Table 4).

항균제성분들의 극성의 특성을 이용한 이

온교환 방식의 경우 정제의 효율이 일반 C₁₈ SPE보다 우수할 수 있지만 범용성의 한계로 동시분석법에는 제한적인 요인을 가지고 있는데 이러한 특성으로 인하여 MAX SPE는 카바독스에서 낮은 회수율을 보였으며 회수율에서도 전반적으로 HLB SPE가 우수하게 나타났으므로 정제를 위한 SPE로는 HLB가 동시분석을 위한 정제방법으로 적합한 것으로 나타났다.

Table 4. Comparison of recoveries for synthetic antimicrobials on SPE clean-up methods

Compounds	Recovery (%)			
	HLB		MAX	
	MSPD	LLE	MSPD	LLE
Albendazole	80.9	76.7	89.4	73.5
Amprolium	- ¹⁾	-	-	-
Carbadox	83.3	53.3	58.5	37.4
Clopidol	116.3	121.7	107.7	97.6
Danofloxacin	-	-	120.0	133.3
Ethopabate	126.4	110.3	101.0	97.0
Fenbendazole	96.8	68.8	105.7	117.1
Flubendazole	123.3	130.0	129.0	133.3
Olaquinox	-	-	-	-
Oxolinic acid	105.3	112.3	104.8	91.4
Sulfadimethoxine	107.5	86.0	150.0	106.7
Sulfamerazine	104.2	83.3	103.4	73.6
Sulfamethazine	94.3	80.5	97.2	77.8
Sulfamono-methoxine	127.1	129.6	122.2	119.3
Sulfaquinoxaline	94.7	72.4	99.5	71.6
Thiabendazole	101.9	81.5	121.2	87.3
Thiamphenicol	105.3	93.6	79.4	88.9

1) : Not detected

회수율

소와 돼지의 근육에 14 종의 합성항균제들을 각각 1 µg/g 수준으로 첨가하고 MSPD법의 메탄올 추출과 C18 SPE인 Oasis HLB의 정제과정을 거쳐 symmetry C₁₈ 컬럼의 0.1% acetic acid 함유 acetonitrile과 물의 기울기용 리상에서 성분분리한 뒤 HPLC/MS-ES 검출기의 positive mode 로 분석한 합성항균제들의 회수율을 구하였다 (Table 5).

소의 근육시료에서의 회수율은 78.9 - 127.1%이었고, 돼지의 근육에서는 78.3 - 121.7%로 분석법으로서의 적합한 회수율을 나타내었다. 각 항균제들의 검출한계는 thiamphenicol 이 0.05 µg/g으로 가장 저조하였고, albendazole,

fenbendazole, flubendazole 등의 벤지미다졸계가 0.005 µg/g으로 가장 좋은 검출한계를 보였으며, 기타 sulfadimethoxine 의 0.005 µg/g 외에는 모두가 0.01 µg/g의 검출한계를 보여 카바독스의 돼지근육에 대한 기준 (근육:0.005 µg/g, 간: 0.05 µg/g)을 제외하면 14종 항균제들에 대한 동시분석 검사로서의 적용이 가능하였다.

결론

본 연구는 식육 중의 잔류하는 합성항균제들을 HPLC/MS로 검출 및 정량할 수 있는 동시분석법 개발을 위한 목적으로 수행하여

다음과 같은 결과를 얻었다.

합성항균제들의 성분별 분리를 위하여 symmetry C₁₈ 과 ODS-80 Tm 2 종류의 컬럼에 대하여 0.1% acetic acid를 각각 함유시킨 물과 아세트나이트릴을 조합한 기용기용리방법

으로 이동상조건을 변경하며 시험한 결과 symmetry C₁₈ 컬럼으로 30 분 이내의 시간에 항균제 성분들을 보다 양호하게 분리시킬 수가 있었다.

Table 5. Detection limits and recoveries of synthetic antimicrobials in bovine and pork on analytical condition by LC/ MSD

Compounds	Recovery from muscles (%)		Detection limit (µg/g)	MRL (µg/g)
	Bovine	Pork		
Albendazole	78.9 ± 3.2	82.7 ± 3.4	0.005	0.1 (cattle, pig)
Carbadox	81.3 ± 5.5	78.3 ± 5.2	0.01	0.005 (pig)
Clopidol	118.1 ± 4.3	121.7 ± 5.3	0.01	0.2 (cattle, pig)
Ethopabate	121.4 ± 4.5	114.3 ± 4.9	0.01	0.5 (chicken)
Fenbendazole	91.2 ± 2.3	88.8 ± 4.3	0.005	0.1 (cattle, pig)
Flubendazole	127.1 ± 5.1	110.7 ± 3.3	0.005	0.01 (pig)
Oxolinic acid	106.2 ± 2.9	108.3 ± 4.4	0.01	0.05 (cattle, pig)
Sulfadimethoxine	97.5 ± 3.2	86.0 ± 3.3	0.005	0.1 (cattle, pig)
Sulfamerazine	94.2 ± 4.6	89.3 ± 3.6	0.01	0.1 (cattle, pig)
Sulfamethazine	94.7 ± 4.1	83.5 ± 4.3	0.01	0.1 (cattle, pig)
Sulfamonomethoxine	102.1 ± 3.7	109.3 ± 5.4	0.01	0.1 (cattle, pig)
Sulfaquinoxaline	83.7 ± 3.9	79.4 ± 3.8	0.01	0.1 (cattle, pig)
Thiabendazole	89.5 ± 4.6	82.5 ± 3.5	0.01	0.1 (cattle, pig)
Thiamphenicol	105.3 ± 3.8	99.6 ± 4.1	0.05	0.5 (cattle, pig)

HPLC/MS API-ES mode 상에서 FIA 분석을 통해 각 항균제 성분들의 최적감도를 얻기 위하여 fragment voltage, drying gas flow, nebulizer pressure, drying gas temperature, capillary voltage 등을 변화시킨 결과 MSD 파라메타들 중 가장 큰 영향력을 나타내는 것은 Fragment voltage로 thiabendazole의 140 V를 제외하고는 모두가 80 - 120 V 범위내에서 최적의 이온화된 mass (m/z) 값을 나타내었으며 이온화를 시키는 극성모드로는 diclazuril을 제외한 항균제들에서 모두가 positive (+) mode에 적합하였고, 기타의 조건들은 영향력이 미소하였지만 drying gas flow는 13 ml/min, drying gas temperature는 350°C, nebulizer pressure로는

40 psi, 그리고 capillary voltage는 4000 V가 공통적인 최적감도를 나타내는 조건이었다.

합성항균제들을 동시에 전처리하기 위한 추출 및 정제방법을 선정하기 위하여 MSPD 법과 액체-액체추출법 (LLE법)을 대상으로 아세트나이트릴과 메탄올, 디클로로메탄, 에칠 아세테이트 등 4종의 추출용매를 비교실험한 결과 methanol 이 가장 우수하였으며 사용량은 8ml가 적합하였다.

낮은 농도의 항균제들에 대한 HPLC/MSD SIM 분석시, 시료 매트릭스의 간섭을 배제하기 위한 정제방법으로는 C18 SPE를 사용하였으며, Oasis HLB cartridge와 MAX를 비교한 결과 HLB SPE가 우수하였다.

축산물중 2005년도 모니터링검사로 관리대

상인 표준품 합성항균제 14종에 대한 동시분석방법으로서의 적합성을 검증하기 위하여 채택된 설정조건하에서 소와 돼지의 근육 시료에 표준 합성항균제들을 1 µg/g의 수준으로 처리하고, 각각의 회수율을 구한 결과 소에서는 78.9 - 127.1%, 돼지에서는 78.3 - 121.7%이었으며 검출한계는 모두가 0.05 µg/g 이하로서 돼지근육의 carbadox 잔류기준인 0.005 µg/g을 제외하고는 항균제검사로의 적용이 가능한 것으로 나타났다.

HPLC/MSD를 이용한 본 분석법은 이상의 14종의 항균제들의 정량 및 정성 분석에 이용할 시 기존의 개별 분석법을 이용할 때에 비하여 동일한 전처리와 동시분석으로 인하여 월등한 시간 및 인력의 절감효과가 있어 유해농축산물의 국내유통차단 및 수출입검역 등에 있어서 적극 활용될 경우 항균제의 검출에 대한 신속하고도 정확한 평가를 내릴 수 있는 분석법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 농림부. 2005. 식육 중 잔류물질 검사요령 및 식육 중 미생물검사요령(농림부고시 제 2005-17호).
2. 식품의약품안전청. 2005. 식품공전 : 954-961.
3. 국립수의과학검역원. 2006. 축산물 중 유해물질 분석법 편람.
4. Joshi S. 2002. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *J Pharm Bio-med Anal* 28(5) : 795-809.
5. Hatano K. 2003. Simultaneous determination of five penicillins in muscle, liver, and kidney from slaughtered animals using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 44(1) : 1-6.
6. Reverte S, Borrull F, Pocurull E, et al. 2003. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1010 : 225-232.
7. Thompson TS, Noot DK, Calvert J, et al. 2003. Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1020 (2) : 241-250.
8. Becker M, Zittlau E, Petz M. 2003. Quantitative determination of cef-tiofur-related residues in bovine raw milk by LC-MS/MS with electrospray ionization. *Eur Food Res Technol* 217 : 449-456.
9. Dubois M, Fluchard D, Sior E, et al. 2001. Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 753 : 189-202.
10. 김재관, 도영숙, 박준조 등. 1998. MSPD 법에 의한 축산물중 합성항균제 동시분석. *한국식품위생안전성학회지* 13(4) : 344-354.
11. 정규생, 채명식, 김창동 등. 1993. 액체 크로마토그래피를 이용한 동물 근육조직 중의 합성항균제 동시분석. *한국식품위생안전성학회지* 8(1) : 25-35.
12. 박은정, 임지훈, 이성모. 2004. 액체 크로마토그래피-형광검출기를 이용한 닭고기 중 플루오로퀴놀론계 항균물질 정량분석 및 잔류조사. *한국식품안전성학회지* 19 (1) : 12-18.

13. 김현철, 백승천, 문지웅. 1997. HPLC 및 신속검출 방법을 이용한 Sulfamethazine의 분석에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지 12(1) : 71-77.
14. 김달호. 2002. 액체크로마토그래피 이온트랩 질량분석법을 이용한 합성항균제 의 분석. 연세대학교 대학원 박사학위논문 : 1-156.
15. Brandsteterova E, Kubalec P, Bova-nova L, et al. 1997. SPE and MSPD as pre-separation techniques for HPLC of tetracyclines in meat, milk and cheese. *Food Res Technol* 205 : 311-315.