

Research Article



CrossMark

Open Access

## LC-MS/MS를 이용한 농경지 토양 중 항생제 모니터링

이영준<sup>1</sup>, 최정희<sup>1</sup>, 정형석<sup>1</sup>, 이한솔<sup>1</sup>, 박병준<sup>2</sup>, 김장억<sup>3</sup>, 심재한<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 농업생명과학대학 농식품생명화학부, <sup>2</sup>국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과,  
<sup>3</sup>경북대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부

### Monitoring of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soils using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry

Young-Jun Lee<sup>1</sup>, Jeong-Heui Choi<sup>1</sup>, Hyung Suk Chung<sup>1</sup>, Han Sol Lee<sup>1</sup>, Byung-Jun Park<sup>2</sup>, Jang-Eok Kim<sup>3</sup> and Jae-Han Shim<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Division of Applied Bioscience and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea, <sup>2</sup>Chemical Safety Division, Department of Agro-Food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Science, Wanju 53365, Korea, <sup>3</sup>School of Applied Biosciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea)

Received: 31 August 2016 / Revised: 19 September 2016 / Accepted: 26 September 2016

Copyright © 2016 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

#### ORCID

Jae-Han Shim

<http://orcid.org/0000-0002-5361-2903>

Young-Jun Lee

<http://orcid.org/0000-0001-8672-8809>

#### Abstract

**BACKGROUND:** The current study developed a monitoring method of 6 veterinary antibiotics (amoxicillin, ampicillin, enrofloxacin, tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline) in agricultural soils using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in positive electrospray ionization mode.

**METHODS AND RESULTS:** Sample preparation was carried out using acidic acetonitrile and citrate salts followed by purification with dispersive solid phase extraction (d-SPE). Separation on Eclipse Plus C<sub>18</sub> column was conducted in gradient of the mobile phase, 0.1% formic acid and 5 mM ammonium formate in methanol (A) and 0.1% formic acid and 5 mM ammonium formate in distilled water (B). The linearity of the matrix-matched calibrations expressed as the coefficient of determination was good with  $R^2 \geq 0.9900$ . The limit of quantifications (LOQs) ranged from 0.5 to 10 µg/kg for all analytes. Analysis of 51

agricultural soil samples taken in the Republic of Korea revealed concentrations less than 1.9 µg/kg for enrofloxacin, 75.5 µg/kg for chlortetracycline.

**CONCLUSION:** The method was successfully applied to monitor 6 veterinary antibiotics from 51 field incurred agricultural soil samples in 17 provincial areas throughout the Republic of Korea. The developed method was simple, easy, and versatile and can be used for monitoring various veterinary antibiotics in soil.

**Key words:** Agricultural soil, LC-MS/MS, Monitoring, Veterinary antibiotics

#### 서론

가축용 항생제는 병을 치료 또는 예방하기 위해 사용되며 가축의 사료에 혼합함으로써 성장촉진제로 사용되기도 한다. 이러한 목적으로 가축에 투여된 항생제의 대부분은 소변과 대변으로 배출되어 (Arikan *et al.*, 2009) 높은 잔류농도를 보이는 것으로 알려져 있다 (Broekaert *et al.*, 2011). 특히 가축에 투여된 penicillin계와 tetracycline계 항생제는 각각 30-60%와 70-80%가 배출되는 것으로 보고되었다 (Seo *et*

\*Corresponding author: Jae-Han Shim

Phone: +82-62-530-2135; Fax: +82-62-530-0219;

E-mail: [jhshim@jnu.ac.kr](mailto:jhshim@jnu.ac.kr)

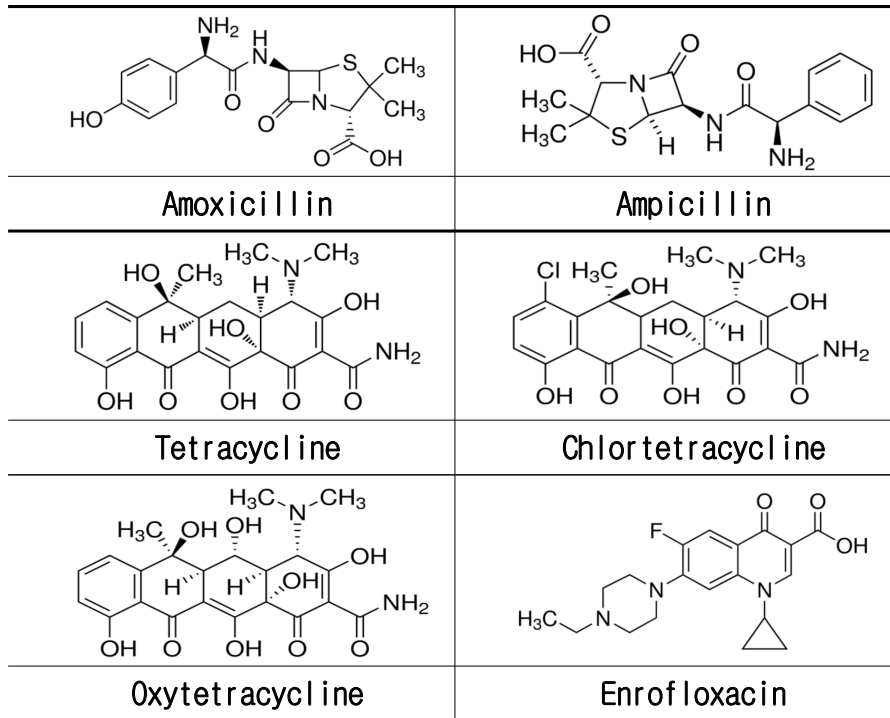


Fig. 1. Chemical structure of the tested veterinary antibiotics.

*al.*, 2007). 고농도의 항생제가 함유된 가축분뇨를 사용하여 오염된 토양에서 작물을 재배할 경우 작물에 흡수 이행되어 작물에 잔류할 뿐만 아니라 작물 성장에 영향을 준다는 연구 결과도 있었다 (Broekaert *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2015). 또한 토양 외의 환경에서 잔류하는 항생제도 내성균을 생성하여 인간과 가축에게 피해를 줄 수 있다 (Son *et al.*, 2008).

최근 들어 가축용 항생제는 농경지, 퇴 액비, 수질 등에서 다양한 연구가 진행되고 있다(Choi *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Ok *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2014). Ok 등(2011)은 물, 퇴적물과 토양 시료에서 가축용 항생제 7종 (chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfathiazole, tylosin)을 고상추출법을 이용하여 LC-MS/MS로 분석하였으며 Charm II 항생제 조사방법을 사용하여 퇴비에서 tetracyclines, sulfonamides, macrolides를 모니터링하였다 (Kwon *et al.*, 2011). 토양 중 florfenicol과 대사산물 (florfenicol amines)을 분석하기 위한 original QuEChERS 추출법과 LC-MS/MS를 이용한 연구결과도 있다 (Xu *et al.*, 2015). 그러나 토양 중 가축용 항생제 6종 tetracycline계 (chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline), penicillin 계 (amoxicillin, ampicillin), fluoroquinolone (enrofloxacin) (Fig. 1)를 EN-QuEChERS 방법을 사용하여 LC-MS/MS로 정량한 분석법은 없으며 현재까지 전국적으로 농경지 토양에서의 모니터링 연구는 아직 발표된 결과가 없어 본 연구에서는 국내 농경지 토양 중 가축용 항생제 6종을 선정하여 모니터링을 실시하여 이에 대한 잔류수준을 평가하였다. 결과를

통해 토양에 잔류된 항생제의 실태를 파악함으로써 항생제 오염을 줄이기 위한 관리방안 마련의 기초자료로 사용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

표준물질로 amoxicillin (AM, 90.0%), ampicillin (AP, 95.0%), enrofloxacin (ER, 98.0%), chlortetracycline hydrochloride (CTC, 93.1%), oxytetracycline hydrochloride (OTC, 95.0%), tetracycline (TC, 98.0%) 등은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구입하였다. HPLC 급의 아세트 니트릴과 메탄올, 증류수는 SK chemical(울산, 대한민국)에서 구입하였고 아세트산 (acetic acid, HAc), 개미산(formic acid, FA), 포름산 암모늄(ammonium formate, AF), sodium citrate dibasic sesquihydrate ( $\text{Na}_2\text{Cit} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 99.0%)는 Sigma-Aldrich (MO, USA)사 제품을 구매하였고 sodium citrate tribasic dihydrate ( $\text{Na}_3\text{Cit} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 99.0%), disodium dihydrogen ethylene-diaminetetraacetate dihydrate ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 99.5%)는 Junsei Chemical Co. Ltd. (Kyoto, Japan) 제품을 사용하였다.

### 표준용액

CTC를 제외한 모든 표준물질은 메탄올에 용해하여 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표준원액을 만들었고 CTC는 증류수에 용해하여 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 제조하였다. 각각 같은 용매로 희석하여 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 중간표준용액을 만든 뒤 최저정량수준(the lowest

Table 1. Physicochemical properties of the tested sandy loam soils

No.	Sampling site	pH	Exchangeable cations (cmolc/kg)			OM <sup>a)</sup> (g/kg)	EC <sup>b)</sup> (dS/m)
			K	Ca	Mg		
1	Hoengseong-1	6.0	2.24	8.3	1.7	38	3.58
	Hoengseong-2	7.4	2.06	12.2	4.3	69	1.04
	Hoengseong-3	6.9	1.65	7.7	2.1	58	0.48
2	Anseong-1	6.5	0.59	4.3	1.6	11	0.38
	Anseong-2	6.6	0.83	5.0	1.4	17	0.66
	Anseong-3	6.1	0.31	5.1	1.3	18	0.42
3	Icheon-1	7.3	2.61	6.3	2.7	39	0.65
	Icheon-2	6.1	0.75	3.1	1.3	27	0.20
	Icheon-3	5.9	0.50	4.5	1.0	30	0.28
4	Pocheon-1	6.1	0.73	6.4	2.4	22	0.33
	Pocheon-2	5.7	4.41	12.3	5.3	26	13.73
	Pocheon-3	6.0	1.47	6.4	2.0	21	0.48
5	Gimhae-1	5.7	0.44	6.4	1.7	13	0.48
	Gimhae-2	6.2	0.48	7.3	2.0	15	0.44
	Gimhae-3	5.7	0.55	5.6	1.5	11	0.24
6	Sancheong-1	5.6	1.99	6.2	2.3	27	1.48
	Sancheong-2	5.6	0.60	4.8	0.9	21	0.46
	Sancheong-3	5.5	0.18	3.3	0.7	22	0.24
7	Jinju-1	6.6	0.94	3.4	0.5	10	0.33
	Jinju-2	6.1	0.71	2.9	0.4	38	0.20
	Jinju-3	6.3	0.42	1.9	0.4	3	0.11
8	Seongju-1	5.8	0.37	6.3	1.4	16	0.14
	Seongju-2	5.4	0.36	3.5	0.6	14	0.21
	Seongju-3	5.4	0.45	5.3	1.0	16	0.20
9	Uiseong-1	6.4	0.44	7.9	2.0	17	0.75
	Uiseong-2	6.0	0.42	5.6	2.9	14	0.28
	Uiseong-3	5.1	0.29	5.3	2.1	11	0.33
10	Sejong-1	5.8	0.37	3.7	1.0	20	0.38
	Sejong-2	6.4	4.17	10.9	5.2	72	4.54
	Sejong-3	7.4	4.63	10.0	4.7	46	4.16
11	Muan-1	6.2	0.91	7.0	2.4	12	0.89
	Muan-2	5.2	1.56	3.8	1.6	25	0.73
	Muan-3	6.5	2.63	7.2	2.8	21	1.73
12	Jangheung-1	6.0	3.07	15.6	5.2	86	4.68
	Jangheung-2	6.9	2.08	13.0	4.0	61	0.50
	Jangheung-3	5.9	3.01	14.8	4.6	77	3.06
13	Namwon-1	6.0	0.71	3.3	1.6	10	1.05
	Namwon-2	6.6	1.40	6.1	2.8	39	0.62
	Namwon-3	6.0	0.42	2.8	0.5	22	0.38
14	Jeongeup-1	6.5	5.74	8.2	3.7	32	4.8
	Jeongeup-2	6.6	1.71	7.9	3.3	18	0.96
	Jeongeup-3	5.2	1.73	5.2	2.2	16	1.59
15	Yesan-1	6.3	3.67	7.9	3.5	51	1.89
	Yesan-2	6.8	7.58	6.6	2.0	29	4.66
	Yesan-3	6.9	2.74	6.6	2.8	36	1.22
16	Hongseong-1	6.0	0.30	7.6	1.7	38	0.84
	Hongseong-2	6.9	1.89	16.9	7.7	49	6.48
	Hongseong-3	5.8	0.25	4.1	1.5	23	0.32
17	Goesan-1	5.3	0.35	2.4	0.4	17	0.63
	Goesan-2	5.2	0.40	2.8	0.5	15	0.42
	Goesan-3	5.5	1.64	4.1	1.3	16	3.22

a) OM, organic matter, b) EC, electrical conductivity

calibrated level, LCL)의 500배의 혼합 표준용액을 만들어 사용하였다. 혼합 표준용액을 무처리 토양시료 추출물로 LCL 1, 2, 4, 10, 20, 100 수준으로 희석하여 matrix-matched 검량곡선을 작성하였다. 모든 표준용액은 갈색병에 넣어 -20°C 냉동보관하고 표준용액은 4°C 냉장보관 하였다.

#### 토양 채취

국내의 서로 다른 17개의 시군에서 농경지 토양으로부터 0-15 cm 표토층을 채취하였다. 채취한 토양은 그늘에서 48시간 풍건하고 막자사발로 파쇄하여 2 mm 체에 통과시켜 시료로 사용하였다. 제조된 시료는 -20°C 에서 냉동 보관하였다. 채취한 토양의 물리화학적 특징은 Table 1에 자세히 정리하였다.

**Table 2. Analytical HPLC conditions for the veterinary antibiotics**

Column	Eclipse C <sub>18</sub> (3.5 $\mu$ m, 3.0×150 mm, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)		
Column temp.	35°C		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 $\mu$ L		
Mobile phase	A: 0.1% formic acid + 5 mM ammonium formate in Methanol B: 0.1% formic acid + 5 mM ammonium formate in Water		
Gradient	Time	A	B
	0	5	95
	1	5	95
	4	50	50
	9	100	0
	18	100	0
	18.5	5	95
	21	5	95

**Table 3. Molecular weight (MW), precursor and product ion masses, cone voltage (CV), capillary voltage (kV), collision energy (CE), and retention time (Rt) of the tested veterinary antibiotics in LC-(ESI)-MS/MS**

No.	Veterinary antibiotics	MW	Precursor ion ( <i>m/z</i> , [M+H] <sup>+</sup> )	Product ion ( <i>m/z</i> )		CV (V)	CP (kV)	Rt(min)
				Quantitation (CE)	Confirmation (CE)			
1	Amoxicillin	365	366.03	114 (23)	208 (13)	18	3.25	7.77
2	Ampicillin	349	350.03	106 (23)	160 (15)	22	3.25	9.38
3	Tetracycline	444	445.03	154 (29)	410 (17)	26	3.25	9.34
4	Chlortetracycline	478	479.03	444 (19)	154 (31)	28	3.25	10.36
5	Oxytetracycline	460	461.10	426 (19)	226 (27)	24	3.25	9.42
6	Enrofloxacin	359	360.10	245 (26)	286 (36)	32	3.25	9.27

### 시료추출 및 정제

토양시료 10 g을 50 mL 원심분리관에 넣은 후 증류수 5 mL을 첨가한 뒤 30초간 볼텍싱한 후 10분간 방치한다. 아세트산 함유(1%) 아세토니트릴을 10 mL 넣은 후 1 g Na<sub>2</sub>Cit.5H<sub>2</sub>O, 0.5 g Na<sub>3</sub>Cit.2H<sub>2</sub>O, 0.1 g Na<sub>2</sub>-EDTA를 넣은 뒤 10분간 초음파추출을 한 뒤 원심분리(4,000 rpm, 5 min, 5°C)하였다. 정제를 위해 상층액 6.5 mL를 취하여 C<sub>18</sub> 0.5 g을 넣은 후 1분간 볼텍싱 후 원심분리(4,000 rpm, 5 min, 5°C)하였다. 분석법의 감도를 높이기 위하여 원심분리 후 상층액 5 mL을 취하여 질소농축 하여 완전 건조시켜 0.1% 개미산 함유 메탄올/물 혼합액(50/50, v/v) 1 mL로 용해하고 syringe filter(PTFE-hydrophilic, 0.2  $\mu$ m)로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다.

### 분석조건 설정

#### *High-performance liquid chromatography*

Amoxicillin과 ampicillin, chlortetracycline, enrofloxacin, oxytetracycline, tetracycline 총 6성분의 항생제는 Waters Alliance 2695 Separations Module의 LC와 Waters TQ

detector API tandem quadrupole mass spectrometer (Waters, MA, USA)의 MS/MS를 사용하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Eclipse C<sub>18</sub>(3.0 mm i.d. 150 mm, 3.5  $\mu$ m, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)이고, 컬럼 온도는 35°C, 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 5  $\mu$ L이었다. 화합물의 peak 모양과 intensity를 최상의 조건으로 만들기 위해 gradient mode를 사용하였고 Table 2에 자세히 정리하였다.

#### *Tandem mass spectrometry (MS/MS)*

모든 항생제는 electrospray ionization (ESI) mode의 positive mode에서 이온화되었고, multiple reaction monitoring (MRM) mode 조건을 확립하였다. MS/MS의 조건 precursor ion 및 product ion mass, collision energy(CE)와 cone voltage(CV), capillary voltage(CP)는 Table 3에 정리하였다.

### 분석법의 검증

분석법을 검증하기 위해 European Commission Decision 2002/657/EC을 참고하여 최저정량수준 (LCL), matrix

Table 4. Selected area based on solid and liquid manure in the Republic of Korea (2014, ton)

Area	Sales of liquid manure	Sales of solid manure	Sum
Hoengseong	0	42,896	42,896
Anseong	0	150,015	150,015
Icheon	30,593	45,923	76,516
Pocheon	0	74,178	74,178
Gimhae	0	79,466	79,466
Sancheong	14,931	18,863	33,794
Jinju	9,000	26,450	35,450
Seongju	19,719	78,615	98,334
Uiseong	600	67,699	68,299
Sejong	9,795	48,525	58,320
Muan	21,435	20,562	41,997
Jangheung	0	42,488	42,488
Namwon	39,385	51,696	91,081
Jeongeup	29,778	39,659	69,437
Yesan	40,746	15,310	56,056
Hongseong	18,706	31,275	49,981
Goesan	31,026	41,984	73,010
Total	422,485	2,223,685	2,646,170

effect (ME), 직선성, 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ), 회수율을 통한 정확성(accuracy)과 정밀성(precision) 등을 조사하였다. 최저정량수준 (LCL)은 기기상 정량이 가능한 최저 농도를 matrix-matched 표준용액으로 선택하였다. Matrix effect (ME, %)는 LC-MS/MS는 시료에 따라 ME의 영향을 많이 받기 때문에 정량 시 matrix-matched 검량곡선으로 정량을 하여야 한다. 다음 식을 이용하여 ME(%)를 구하였다 (Lee et al., 2011).

$$\text{Matrix effect (\%)} = (\text{slope of matrix-matched calibration curve} / \text{slope of non-matrix matched calibration curve}) \times 100$$

직선성을 확인하기 위해 각 항생제의 peak 면적으로 검량 곡선(LOQ 1-LOQ 100)을 작성하였고 결정계수 (coefficient of determination,  $R^2$ )으로 평가하였다. 회수율은 토양 무처리 시료에 각 항생제 표준용액을 첨가한 후 분석하여 실험하였다. 두 처리구(4 LOQ, 10 LOQ)로 수행하였으며 각각의 시료에 3반복으로 수행하여 그에 따른 평균과 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD)를 계산하여 분석법의 정확성과 정밀성을 평가하였다. 검출한계(LOD) 및 정량한계 (LOQ)는 크로마토그램의 신호 대 잡음비(signal to noise (S/N) ratio)로 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 조사지점 및 동물용의약품 선정

2014년 퇴액비 판매량 자료를 근거로 전국 총 판매량 (2,646,170 톤) 대비 1% 이상인 17개 시 군을 선정하였다(농촌진흥청, 2014년도 가축분뇨 발효액, 가축분퇴비, 퇴비 생산 판매 실적). 1% 이상은 전국을 기준으로 봤을 때 충분히 많다고 가정하였고, 17개 시 군은 전국의 도가 모두 포함되도록 하였다 (Table 4). 강원도 횡성군, 경기도 안성군, 경기도 포천시, 경기도 이천시, 경남 김해시, 경남 산청군, 경남 진주시, 경북 성주군, 경북 의성군, 세종특별자치시, 전남 무안군, 전남 장흥군, 전북 남원시, 전북 정읍시, 충남 예산군, 충남 홍성군, 충북 괴산군, 서울특별시, 광역시, 제주도 제외)

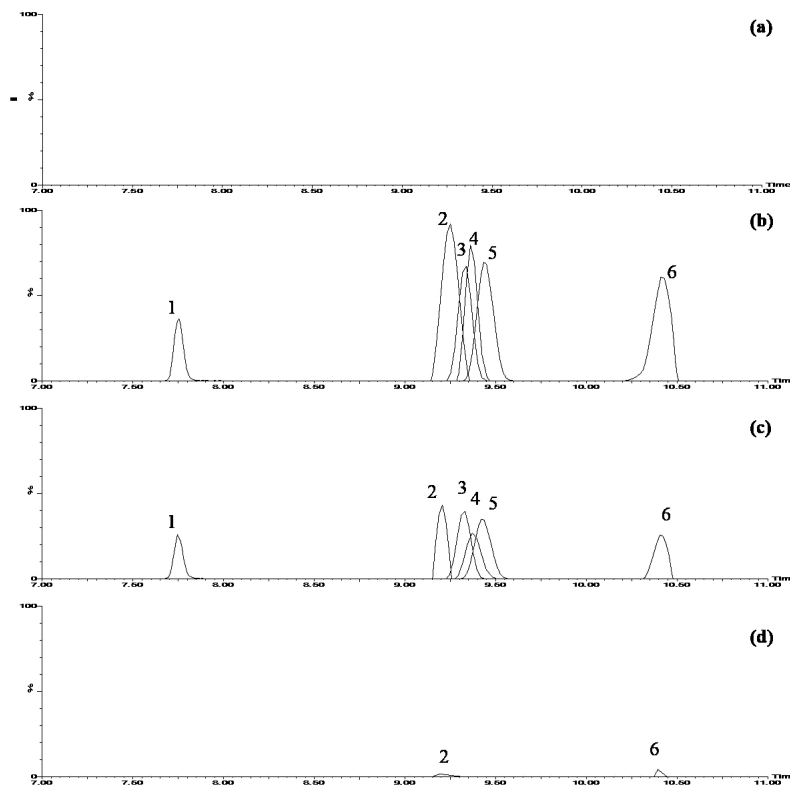
선정된 지점의 토양 채취는 2015년 10월 12일부터 2015년 10월 23일까지 각 지역에서 3지점씩 총 51개 지점의 토양을 채취하였다.

### 분석법의 최적화

6종의 항생제의 동시분석법을 확립하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. Ho 등(2012)은 토양과 퇴액비 중 9종의 항생제(doxycycline, enrofloxacin 등)를 메탄올, 아세트나이트릴, Na<sub>2</sub>-EDTA과 McIlvaine 완충용액을 사용하여 추출 후 HLB 카트리지로 정제하는 동시분석법으로 회수율은 63-121%, 상대표준편차 20%이내로 본 논문의 분석성분에 적용하여 회수율 실험하였으나 화합물이 회수되지 않거나 미

**Table 5.** The recovery rate of diverse salts used in various “QuEChERS” version the tested veterinary antibiotics in agricultural soil using LC-MS/MS

No.	Veterinary antibiotics	Recovery (Mean ± RSD)%, <i>n</i> =3		
		Trial 1	Trial 2	Trial 3
		NaCl (1 g)	NaOAc (1.5 g)	Na <sub>3</sub> Cit.2H <sub>2</sub> O (1 g)+Na <sub>2</sub> Cit.5H <sub>2</sub> O (0.5 g)
1	Amoxicillin			45.3±1.2
2	Ampicillin			40.8±10.8
3	Chlortetracycline	Not detected	Not detected	58.3±4.2
4	Enrofloxacin			41.0±5.1
5	Oxytetracycline			45.1±5.0
6	Tetracycline			65.2±4.7

**Fig. 2.** LC-MS/MS chromatograms of the tested veterinary antibiotics in a blank soil sample (a); matrix-matched standard (10 LOQ) (b); the blank soil fortifying the antibiotics at 10 LOQ (c); and the quantitated antibiotics in a soil collected from Jeongeup-3 (d).

1: amoxicillin, 2: enrofloxacin, 3: tetracycline, 4: ampicillin, 5: oxytetracycline, 6: chlortetracycline.

량으로 회수되어 적용할 수 없었다 (Ho *et al.*, 2012). 토양 시료는 다른 시료와 비교하였을 때 다양한 유기산 및 각종 지질이 많으며 특히 tetracyclines와 fluoroquinolones은 킬레이트화합물로 토양시료에서 추출이 어려운 단점을 가지고 있어 Na<sub>2</sub>-EDTA를 사용함으로써 킬레이트 효과를 감소시킨다 (Hu *et al.*, 2008). Bourdat-Deschamps 등 (2014)은 13종 (fluoroquinolones, tetracyclines, sulfonamides, macrolide 등)의 의약품질에 대해 환경시료(물, 토양, 가축폐수 등)에서 동시분석 한 논문으로 적은양의 시료로 미량의 아세트니트릴과 아세트산나트륨 및 다양한 염(Na<sub>2</sub>-EDTA, MgSO<sub>4</sub>,

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)으로 추출한 추출법을 참고하여 Table 5와 같이 다양한 QuEChERS 추출법을 이용하여 비교 분석하였다 (Bourdat-Deschamps *et al.*, 2014).

#### LC-MS/MS 분석

모든 항생제는 positive mode에서 이온화되어 proton adduct [M+H]<sup>+</sup> 형태를 보였다. 이동상에 들어간 포름산암모늄 (5 mM)은 화합물의 이온화를 증가시켜주는 역할을 하였으며 모든 화합물의 Peak 머무름 시간은 약 11분 이하에서 검출되었다(Fig. 2).

**Table 6. Linear range (LR,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), coefficient of determination ( $R^2$ ), matrix effect (%), recovery (%), relative standard deviation (RSD, %), lowest calibration level (LCL,  $\mu\text{g}/\text{L}$ ), limit of detection (LOD,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), and limit of quantitation (LOQ,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) of the tested veterinary antibiotics in agricultural soil using LC-MS/MS ( $n=3$ )**

No.	Veterinary antibiotics	LR	$R^2$	ME	Recovery (Mean $\pm$ RSD)%		LCL	LOD	LOQ
					4 LOQ	10 LOQ			
1	Amoxicillin	10-1000	0.9919	57.4	50.0 $\pm$ 0.66	40.9 $\pm$ 0.60	100	3	10
2	Ampicillin	5-500	0.9909	160.4	32.5 $\pm$ 3.32	32.1 $\pm$ 2.42	50	1.5	5
3	Tetracycline	5-500	0.9900	101.2	51.5 $\pm$ 3.75	66.7 $\pm$ 2.76	50	1.5	5
4	Chlortetracycline	10-1000	0.9918	37.2	42.8 $\pm$ 1.47	55.5 $\pm$ 3.72	100	3	10
5	Oxytetracycline	5-500	0.9955	100.9	50.7 $\pm$ 2.95	51.3 $\pm$ 2.76	50	1.5	5
6	Enrofloxacin	0.5-50	0.9944	173.4	40.3 $\pm$ 2.52	38.9 $\pm$ 5.82	5	0.15	0.5

**Table 7. Monitoring results of the veterinary antibiotics in 51 agricultural soils ( $n=3$ ,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )**

No.	Area	Antibiotic	Residue (SD, %)					ER <sup>f)</sup>
			AM <sup>a)</sup>	AP <sup>b)</sup>	TC <sup>c)</sup>	CTC <sup>d)</sup>	OTC <sup>e)</sup>	
1	Hoengseong-1	—	—	—	—	—	—	1.9 $\pm$ 1.08
	Hoengseong-2	—	—	—	—	—	—	—
	Hoengseong-3	—	—	—	—	—	—	—
2	Anseong-1	—	—	—	—	—	—	—
	Anseong-2	—	—	—	—	—	—	—
	Anseong-3	—	—	—	—	—	—	—
3	Icheon-1	—	—	—	—	—	—	—
	Icheon-2	—	—	—	—	—	—	0.8 $\pm$ 0.12
	Icheon-3	—	—	—	—	—	—	—
4	Pocheon-1	—	—	—	—	—	—	—
	Pocheon-2	—	—	—	—	—	—	1.8 $\pm$ 0.22
	Pocheon-3	—	—	—	—	—	—	—
5	Gimhae-1	—	—	—	—	—	—	—
	Gimhae-2	—	—	—	—	—	—	—
	Gimhae-3	—	—	—	—	—	—	—
6	Sancheong-1	—	—	—	—	—	—	—
	Sancheong-2	—	—	—	73.9 $\pm$ 4.47	—	—	—
	Sancheong-3	—	—	—	—	—	—	—
7	Jinju-1	—	—	—	—	—	—	—
	Jinju-2	—	—	—	—	—	—	—
	Jinju-3	—	—	—	—	—	—	—
8	Seongju-1	—	—	—	—	—	—	—
	Seongju-2	—	—	—	—	—	—	—
	Seongju-3	—	—	—	—	—	—	—
9	Uiseong-1	—	—	—	—	—	—	—
	Uiseong-2	—	—	—	—	—	—	—
	Uiseong-3	—	—	—	—	—	—	—
10	Sejong-1	—	—	—	—	—	—	—
	Sejong-2	—	—	—	—	—	—	—
	Sejong-3	—	—	—	—	—	—	—
11	Muan-1	—	—	—	—	—	—	—
	Muan-2	—	—	—	—	—	—	—
	Muan-3	—	—	—	—	—	—	—
12	Jangheung-1	—	—	—	—	—	—	—
	Jangheung-2	—	—	—	—	—	—	—
	Jangheung-3	—	—	—	—	—	—	—
13	Namwon-1	—	—	—	—	—	—	—
	Namwon-2	—	—	—	—	—	—	—
	Namwon-3	—	—	—	—	—	—	—
14	Jeongeup-1	—	—	—	75.5 $\pm$ 1.91	—	—	—
	Jeongeup-2	—	—	—	—	—	—	—
	Jeongeup-3	—	—	—	65.4 $\pm$ 0.97	—	—	1.1 $\pm$ 0.46
15	Yesan-1	—	—	—	68.3 $\pm$ 2.99	—	—	—
	Yesan-2	—	—	—	—	—	—	0.5 $\pm$ 0.29
	Yesan-3	—	—	—	—	—	—	—
16	Hongseong-1	—	—	—	—	—	—	—
	Hongseong-2	—	—	—	—	—	—	—
	Hongseong-3	—	—	—	—	—	—	—
17	Goesan-1	—	—	—	—	—	—	—
	Goesan-2	—	—	—	—	—	—	—
	Goesan-3	—	—	—	—	—	—	—

a) AM, amoxicillin, b) AP, ampicillin, c) TC, tetracycline, d) CTC, chlortetracycline, e) OTC, oxytetracycline, f) ER, enrofloxacin.

### 분석법검증

분석법의 특이성을 평가하기 위해 무처리시료와 무처리시료에 항생제를 첨가한 샘플을 비교하였다. 각 항생제의 머무름 시간에 방해 peak는 나타나지 않았다 (Fig. 2). Table 6에서 볼 수 있듯이 항생제의 ME 범위는 37.2 - 173.4%이며 amoxicillin, chlortetracycline은 100% 이하로 이온억압 (ion suppression)되었으며 나머지 항생제인 ampicillin, tetracycline, oxytetracycline, enrofloxacin은 100% 이상으로 이온상승(ion enhancement)되었다. 정량의 정확성을 높이기 위하여 고가의 동위원소 내부표준물질을 사용하거나 경제적인 방법으로 matrix-matched 검량곡선을 사용하여 정량하는데 본 연구에서는 후자의 방법을 이용하였다 (Salvia *et al.*, 2012). 각 항생제의 직선성은 결정계수( $R^2$ )  $\geq 0.9900$ 으로 만족할 만한 직선성을 나타내었다. 회수율을 통한 정확성, 정밀성 검증은 무처리 토양시료에 4 LOQ, 10 LOQ 수준으로 항생제를 처리하여 32.1-66.7% 범위를 보였으며 상대표준편차는 5.82% 이하이었다. 계열이 다른 항생제를 동시분석법으로 분석하였고 내부표준물질을 사용하지 않아 추출과정에서의 회수율 손실을 보정하지 못하여 각 화합물의 회수율은 낮았지만 정량적인 측면에서 감도가 좋다고 판단되어 (정량한계 및 검출한계 0.15-3, 0.5-10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 모니터링을 위한 간편한 동시분석법으로 제시할 수 있었다. 농경지 토양에서 대상항생제를 분석하기에 충분히 높은 감도라고 판단되었다.

### 토양 시료 중 항생제 모니터링

검증 한 분석법으로 국내 17지역에서 채취한 총 51지점의 농경지 토양에서 항생제를 모니터링 한 결과 Table 7과 같다. European Commission Decision 2002/657/EC 기준에 의해 matrix-matched 표준용액과 검출된 실제시료를 비교하였을 때 peak 머무름 시간과 정량, 정성이온이 일치하면 검출되었다고 판단하여 정량하였다. 총 6개의 항생제 중 chlortetracycline과 enrofloxacin 등 2개의 항생제가 검출되었다. chlortetracycline의 잔류량과 검출빈도는 각각 65.4-75.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 7.8% 이었고 enrofloxacin은 0.5-1.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 9.8% 이었다 (Table 7).

Chlortetracycline, enrofloxacin 항생제가 검출된 '정읍'에서 토양 채취 시 악취가 심했던 걸로 보아 발효가 완전히 되지 않은 퇴비, 액비, 혹은 가축분을 살포한지 며칠 되지 않은 걸로 추측되어 잔류량이 다른 토양과 비교했을 때 높은 걸로 추정되었다. Carlson과 Mabury(2003)은 토양 중에 chlortetracycline 1 ppm 수준으로 4주에서 4달 동안 보관한 결과 농도의 변화가 거의 없는 것으로 볼 때 분해가 미미함을 알 수 있었으며 반감기 역시 다른 화합물과 비교하였을 때 13-36일 까지 느리게 분해 된 것으로 확인하였다.

### 요 약

농경지 토양에서 대상항생제 6종(amoxicillin, ampicillin, chlortetracycline, enrofloxacin, oxytetracycline, tetracycline

을 아세트산 함유 아세토니트릴,  $\text{Na}_2\text{Cit}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_3\text{Cit}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  과  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 로 추출 후  $\text{C}_{18}$ 으로 정제하여 LC-MS/MS로 분석하는 모니터링을 수행하였다. 그 중 2종의 항생제, chlortetracycline과 enrofloxacin이 국내 농경지 토양에서 검출되었다. 제안한 분석법은 토양 중 잔류 항생제 모니터링을 위한 빠르고 간편한 시험법이었고 다양한 활용이 가능할 것으로 보인다.

### Acknowledgment

This study was supported by the MSIP (Ministry of Science, Ict and Future Planning) and the Rural Development Administration (Grant No. PJ011435).

### References

- Ahmed, M. B., Rajapaksha, A. U., Lim, J. E., Vu, N. T., Kim, I. S., Kang, H. M., Lee, S. S., & Ok, Y. S. (2015). Distribution and accumulative pattern of tetracyclines and sulfonamides in edible vegetables of cucumber, tomato, and lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 398-405.
- Arikan, O. A., Mulbry, W., & Rice, C. (2009). Management of antibiotic residues from agricultural sources: use of composting to reduce chlortetracycline residues in beef manure from treated animals. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2), 483-489.
- Bourdat-Deschamps, M., Leang, S., Bernet, N., Daudin, J., & Nélieu, S. (2014). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. *Journal of Chromatography A*, 1349, 11-23.
- Broekaert, N., Daeseleire, E., Delezie, E., Vandecasteele, B., De Beer, T., & Van Poucke, C. (2012). Can the use of coccidiostats in poultry breeding lead to residues in vegetables? An experimental study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(50), 12411-12418.
- Broekaert, N., VanPeteghem, C., Daeseleire, E., Sticker, D., & VanPoucke, C. (2011). Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the determination of ionophoric and synthetic coccidiostats in vegetables. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(10), 3335-3344.
- Carlson, J. C., & Mabury, S. A. (2006). Dissipation kinetics and mobility of chlortetracycline, tylosin, and monensin in an agricultural soil in Northumberland



- County, Ontario, Canada. *Environmental toxicology and chemistry*, 25(1), 1-10.
- Choi, K. H., Kim, Y. H., Park, J. I., Park, C. K., Kim, M. Y., & Kim, H. S. (2008). Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Science of The Total Environment*, 405(1), 120-128.
- Ho, Y. B., Zakaria, M. P., Laif, P. A., & Saari, N. (2012). Simultaneous determination of veterinary antibiotics and hormone in broiler manure, soil manure compost by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1262, 160-168.
- Hu, X. G., Yi, L., Zhou, Q. X., & Xu, L. (2008). Determination of thirteen antibiotics residues in manure by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36(9), 1162-1166.
- Kim, K. R., Owens, G., Ok, Y. S., Park, W. K., Lee, D. B., & Kwon, S. I. (2012). Decline in extractable antibiotics in manure-based composts during composting. *Waste Management*, 32(1), 110-116.
- Kwon, S. I., Owens, G., Ok, Y. S., Lee, D. B., Jeon, W. T., Kim, J. G., & Kim, K. R. (2011). Applicability of the Charm II system for monitoring antibiotic residues in manure-based composts. *Waste Management*, 31(1), 39-44.
- Lee, H. Y., Lim, J. E., Kim, S. C., Kim, K. R., Lee, S. S., & Kwon, O. K. (2010). Environmental monitoring of selected veterinary antibiotics in soils, sediments and water adjacent to a poultry manure composting facility in Gangwon province, Korea. *Journal Korean Society of Environmental Engineers*, 32(3), 278-286.
- Lee, S. W., Choi, J. H., Cho, S. K., Yu, H. A., Abd El-Aty, A. M., & Shim, J. H. (2011). Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4366-4377.
- Lim, J. E., Kim, S. C., Lee, H. Y., Kwon, O. K., Yang, J. E., & Ok, Y. S. (2009). Occurrence and distribution of selected veterinary antibiotics in soils, sediments and water adjacent to a cattle manure composting facility in Korea. *Journal Korean Society of Environmental Engineers*, 31(10), 845-854.
- Lim, J. E., Rajapaksha, A. U., Jeong, S. H., Kim, S. C., Kim, K. H., Lee, S. S., & Ok, Y. S. (2014). Monitoring of selected veterinary antibiotics in animal carcass disposal site and adjacent agricultural soil. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 57(3), 189-196.
- Ok, Y. S., Kim, S. C., Kim, K. R., Lee, S. S., Moon, D. H., & Lim, K. J. (2011). Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 174(1), 693-701.
- Salvia, M. V., Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., & Cren-Olivé, C. (2012). Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *Journal of Chromatography A*, 1245, 122-133.
- Seo, Y. H., Choi, J. K., Kim, S. K., Min, H. K., & Jung, Y. S. (2007). Prioritizing environmental risks of veterinary antibiotics based on the use and the potential to reach environment, *Korean Journal Soil Science and Fertilizer*, 40(1), 43-50.
- Son, H. J., Jung, J. M., Hwang, Y. D., Roh, J. S., & Yu, J. P. (2008). Effects of activated carbon types and service life on adsorption of tetracycline antibiotic compounds in GAC process. *Journal Korean Society of Environmental Engineers*, 30(9), 925-932.
- Xu, M., Qian, M., Zhang, H., Ma, J., Wang, J., & Wu, H. (2015). Simultaneous determination of florfenicol with its metabolite based on modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample pretreatment and evaluation of their degradation behavior in agricultural soils. *Journal of Separation Science*, 38(2), 211-217.