



LC-MS/MS를 이용한 소의 식용조직 중 세팔렉신의 잔류검사법

채원석 · 이성중¹ · 손송이² · 김 석² · 이후장^{2*}

대전대학교 자연과학대학 화학과, ¹경상대학교 화학과 · 생명과학연구원, ²경상대학교 수의과대학 · 동물의학연구소

Analytical Method for Determination of Cephalexin in Bovine Edible Tissues using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry

Won-Seok Chae, Sung Joong Lee¹, Song-Ee Son², Suk Kim², and Hu-Jang Lee^{2*}

Department of Chemistry, Daejin University, Pocheon, Korea

¹Department of Chemistry and Research Institute of Live Science, Gyeongsang National University, Chinju, Korea

²Institute of Animal Medicine and College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju, Korea

(Received November 11, 2017/Revised December 3, 2017/Accepted December 16, 2017)

ABSTRACT - An analytical method for the determination of cephalexin (CEX) in bovine tissues (muscle, liver, kidney and fat tissues) was developed and validated using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Tissue samples were extracted by the liquid-liquid extraction based on 5% trichloroacetic acid (TCA). The chromatographic separation was achieved on a reverse phase C₁₈ column with gradient elution using a mobile phase of 20 mM hexafluoroacetylacetone (HFAC)/50% acetonitrile (40:60). The procedure was validated according to the Ministry of Food and Drug Safety guideline determining accuracy, precision, and limit of detection. Mean recoveries of CEX from spiked edible tissues (6~1,500 µg/kg) were 83.9~106.8%, and the relative standard deviation was between 2.3 and 14.8%. Linearities were obtained with the correlation coefficient (r²) of > 0.999. Limit of detection and limit of quantification for the investigated CEX were 2~10 and 6~30 µg/kg, respectively. This method was reliable, sensitive, economical and suitable for routine monitoring of CEX residues in bovine edible tissues.

Key words : Cephalexin, Bovine edible tissues, LC-MS/MS

많은 항생물질들이 가축의 질병예방과 치료를 목적으로 오랜 기간 동안 사용되어 왔다¹⁾. 이러한 항생물질들의 사용에 의해, 미량의 항생물질 혹은 이들의 대사물질들이 축산식품 중에 잔류할 가능성이 상존하고 있다. 미량 항생물질들이 잔류한 축산식품을 지속적으로 섭취한다면 알레르기 혹은 내성균의 출현 등과 같은 부작용을 야기함에 따라 인체의 건강을 위협하는 심각한 문제가 될 수 있다^{2,3)}.

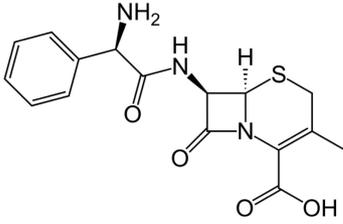
Cephalexin (CEX) (Table 1)은 강력한 cephalosporin계 항생물질로서 그람 양성 및 그람 음성균에 대해 광범위하게 작용하는 것으로 알려져 있으며, 혈액단백질과의 약한 결합능력, 낮은 독성, 경구투여 시 단기간 내 높은 혈장 및 요 농도 유지 그리고 대사물질이 존재하지 않는 등의 장점이 있어 가축의 세균성 감염을 예방하고 치료하는데 광

범위하게 사용되고 있다⁴⁾. CEX는 세균의 세포벽 내 peptidoglycan 층에 존재하는 아미노산인 D-alanyl-D-alanine 과 유사한 구조를 갖고 있어서, 세균 세포벽의 합성에 필수적인 페니실린-결합 단백질의 활성부위에 비가역적으로 결합한다. 그 결과 peptidoglycan 층의 합성을 저해하여 세균을 사멸시키는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 하지만, 몇몇 세균들은 β-lactamase라는 효소를 갖고 있어서 β-lactam ring의 가수분해로 CEX를 비활성화시켜 CEX에 대한 내성을 획득하는 것으로 알려져 있다⁶⁾. CEX가 축산식품 내 잔류할 경우 인체에 심각한 부작용을 초래할 수 있어서, 세계 각국에서는 CEX에 대해 축산식품 중 최대잔류허용기준을 설정하여 운용하고 있다. 우리나라를 포함하여 유럽연합과 미국 등에서는, 소의 우유, 근육, 간장, 신장 그리고 지방 등에 대한 CEX의 최대잔류허용기준을 각각 100, 200, 200, 1,000, 200 µg/kg으로 설정하고 있다^{7,8)}.

다양한 시료에 대한 CEX 정량분석 방법들이 보고되고 있는데, 이들 방법들에는 spectrophotometry⁹⁾, high performance thin layer chromatography¹⁰⁾, molecular imprinted

*Correspondence to: Hu Jang Lee, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju 52828, Korea
Tel: 82-55-772-2352, Fax: 82-55-772-2308
E-mail: hujang@gnu.ac.kr

Table 1. Molecular structure and physico-chemical properties of cephalixin

Property	Content
IUPAC Name	(6R,7R)-7-[[[(2R)-2-amino-2-phenylacetyl]amino]-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid
CAS No.	15686-71-2
Classification	Cephalosporins
Molecular formula	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄ S
Molecular weight	347.389 g/mol
Boiling point	727.4°C at 760 mmHg
Density	1.5 g/cm ³
Log Pow	0.65 at pH 7.0
pKa	4.5
Solubility in water	1.789 mg/mL
Solubility in solvent	in alcohol, and ether
Structure	

solid phase extraction¹¹⁾, high performance liquid chromatography^{12,13)}, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)¹⁴⁻¹⁷⁾ 그리고 ultra- high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry¹⁸⁾ 등이 있다. 이들 분석법들 중 몇몇 분석법들은 추출시간¹¹⁾과 chromatography 분석시간이 길거나¹⁹⁾, 낮은 회수율²⁰⁾을 보이는 것이 단점으로 보고되고 있다. 또한, 일부 분석법들은 약리학적 용량 제형^{9,10)} 혹은 우유¹⁵⁾에서 CEX를 분석하기 위해 개발되었거나, 고도로 숙련된 분석기술자만이 다룰 수 있는 장비를 필요로 하는 것으로 알려져 있다²⁰⁾.

따라서 본 연구에서는 소의 근육, 간장, 신장 및 지방 조직에서 기존 분석법보다 신속하고 정확하게 CEX를 분석할 수 있는 분석법을 개발하여 국내 생산 및 수입 축산물에 대한 안전관리 강화에 기여하고자 한다.

Materials and Methods

시약 및 재료

CEX (≥98.0%)와 tobramycin (≥98.0%) 표준품은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 전처리 시약으로 사용된 삼염화초산(trichloroacetic acid, TCA), 메탄올, heptafluorobutyric acid (HFBA, ≥99.5%)

등은 Merck (Darmstadt, Hesse, Germany)사에서 HPLC 등급으로 구입하여 사용하였고, 이외의 분석용 시약 및 용매는 특급 또는 분석용을 사용하였다. 또한, 고상추출(solid phase extraction, SPE)용 카트리지는 HyperSep 카트리지를 (C₁₈, 6 mL, 500 mg)를 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 시험용 시료는 3주 동안 CEX가 함유된 동물용의약품을 처치하지 않은 육우를 도축장에서 도축하여 근육, 간, 신장, 지방 조직 등을 채취하여 분석 전까지 냉동고(-20°C)에 보관하면서, 공시험(blank) 시험을 거쳐 CEX가 잔류되지 않음을 확인한 후 시험용 시료로 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

CEX와 tobramycin 표준품 1.0 g을 각각 저울로 정밀히 달아 1,000 mL 정량플라스크에 넣고, 증류수를 사용하여 1 mg/mL이 되도록 표준원액을 각각 조제하였다. 조제한 tobramycin의 표준원액은 메탄올을 사용하여 단계적으로 희석하여 농도가 1 µg/mL이 되도록 하였다. 또한, 조제한 CEX 표준원액은 증류수를 사용하여 단계적으로 희석하여 각각의 조직시료에 대한 표준곡선을 작성하는데 사용하였다. 조제한 CEX 표준원액은 증류수를 사용하여 단계적으로 희석하여, 근육은 6, 12, 24, 60, 120, 600 ng/mL의 표준용액을 각각 준비하였고, 간은 3, 6, 12, 30, 60, 300 ng/mL의 표준용액을 각각 준비하였으며, 신장은 7.5, 15, 30, 75, 150, 750 ng/mL의 표준용액을 각각 준비하였고, 지방 조직은 6, 12, 24, 60, 120, 600 ng/mL의 표준용액을 각각 준비하였다. Tobramycin 표준용액(1.0 µg/mL)과 각각의 표준용액은 갈색 유리병에 담아 4°C 냉장실에 보관하면서 실험 직전에 꺼내어 사용하였다.

추출 및 정제

균질기를 이용하여 분쇄한 조직시료 각 2 g과 50 µL의 내부표준물질인 tobramycin (1.0 µg/mL)을 50 mL falcon tube에 넣고, 10 mL의 5% TCA를 가한 다음 1분 동안 vortex mixer를 이용하여 혼합해 주었다. 이어서 4,000 rpm, 8°C 조건에서 10분 동안 원심분리시킨 후 상층액을 분리하였다. 상층액을 분리하고 남은 잔액은 위와 같은 방법을 반복 시행하여 다시 얻은 상층액을 앞서 얻은 상층액과 혼합한 다음, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입한 거름종이(Whatman filter paper No. 1)로 여과하였다. 진공분리장치와 연결된 SPE 카트리지를 5 mL의 메탄올과 물로 각각 활성화시킨 다음 앞서 거름종이로 거른 여액 2 mL을 적하한 후 0.5 mL/min의 속도로 흘러주면서 추출하였다. 여액이 SPE 카트리지를 모두 통과한 후 다시 SPE 카트리지에 2 mL의 메탄올과 2 mL의 25 mM 구연산을 적하하여 잔류여액을 씻어내고 진공을 이용하여 완전히 제거한 다음, 3 mL의 메탄올에 HCl을 넣어 0.1%

Table 2. Multiple reaction monitoring condition of cephalexin

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell (m/s)	DP	CE	CXP
CEX	348	158	150	51	11	8
		106	150	51	33	20
TBM (IS)	468.212	163	150	71	30	35

CEX, cephalexin; TBM (IS), tobramycin (internal standard); DP, declustering, potential (volts); CE, collision energy (volts); CXP, collision cell exit potential (volts).

로 만든 용액을 이용하여 SPE 카트리지로부터 분석물질들을 용출시켰다. 용출액을 40°C heating block 위에서 질소가스를 이용하여 건조·증발시킨 다음 잔유물을 1 mL의 5 mM HFBA로 녹이고 Nylon 0.2 µm membrane filter (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 여과하여 유리 vial에 담아 분석용액으로 사용하였다.

기기분석조건

식품공전 중 잔류동물용의약품시험법의 정량시험법²¹⁾을 변형하여, CEX의 분석을 위한 기기분석조건을 다음과 같이 확립하였다. 육우의 근육, 간, 신장, 지방 조직 등에 대한 CEX의 분석에는 LC-MS/MS 검출기로 AB SCIEX (Concord, ON, Canada)사의 API 4000을, column은 Waters (Milford, MA, USA)사의 XTerra MS C₁₈(3.0 × 50 mm, 5 µm)을 각각 사용하였으며 분석조건은 Table 2에 나타내었다. Column 온도는 30°C를 유지하였다. 또한, 이동상 용매 A는 증류수에 HFAC를 용해시켜 20 mM 농도로 조제한 용매를 사용하였으며, 이동상 용매 B는 50% 아세트니트릴을 사용하였다. 분석 시, 이동상 용매 A와 B는 각각 40%와 60%로 하여 분석기간 동안 계속 흘러 보내주었다. Chromatography의 총 분석시간은 3분으로 하였으며, 표준용액을 positive ion mode로 Declustering Potential (DP), Collision Energy (CE), Collision cell Exit Potential (CXP) 등 LC-MS/MS의 MS 각각의 parameter를 최적화한 multiple reaction monitoring (MRM) 조건을 확립하여 분석에 사용하였다.

분석법 검증

앞서 준비한 각각의 표준용액을 이용하여 검량곡선을 작성한 후 표준곡선의 직선성을 확인하기 위해 상관계수 (coefficient of correlation, r²)를 구하였다. 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 chromatogram 상에서 신호 대 잡음비(signal to noise ratio, S/N ratio)의 각각 3배와 10배 농도로 산출하였다²²⁾. 회수율 측정에는 CEX가 들어있지 않음을 확인한 공시료에 CEX를 첨가하여 최종농도가 근육의 경우에는 12, 60, 600 ng/mL이 되도록 하였고, 간의 경우에는 6, 30,

300 ng/mL이 되도록 하였고, 신장의 경우에는 15, 75, 750 ng/mL이 되도록 하였으며, 지방조직의 경우에는 30, 150, 1,500 ng/mL이 되도록 하여, 앞서의 ‘추출 및 정제’ 방법에 따라 3 반복 실험하였다. CEX 표준품의 peak 면적에 대한 추출한 시료들의 peak 면적비로부터 CEX의 회수율(%)을 구하였다. 또한, 회수율의 정밀성을 검증하기 위해, 3 반복 회수율로부터 상대표준편차를 구하였다. 측정된 정량한계, 회수율 그리고 상대표준편차의 적정성은 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서²³⁾에서 분석법 검증에 요구되는 기준인 잔류허용기준의 1/2의 정량한계, 60~120%의 회수율 그리고 20~30%의 상대표준편차 이하로 판단하였다.

Results

LC-MS/MS

HPLC를 통과하여 질량분석기에서 검출된 CEX의 머무름 시간은 근육, 간, 신장, 지방조직에서 각각 1.34, 1.31, 1.30, 1.31분이었으며, chromatography의 총 분석시간은 3분으로 나타났다. 본 연구에서 확립한 CEX 분석을 위한 LC-MS/MS는 정성 및 정량의 선택성과 검출감도를 향상시키기 위하여 MS/MS 분석 시 MRM 모드로 분석하였으며, 충돌 에너지의 강도를 조절함으로써 생성이온(product ion)의 감응도가 크도록 조정하였다. 또한, 최적의 선구이온(precursor ion)과 생성이온을 각각 선정하였다. 각각의 조직들에 CEX를 LOQ 농도로 spike하여 분석한 CEX의 chromatogram을 Fig. 1에 나타내었다. 양이온 모드에서 [M+H]⁺인 m/z 348이 기준이온(base ion)으로 검출되어 이를 선구이온(precursor ion)으로 선택 하였으며, product ion scan을 통하여 m/z 158과 106 이온이 특성 이온으로 나타나 이들을 정성이온으로 선정하였다.

분석법의 LOD 및 LOQ

본 시험방법에 따른 분석기기의 LOD 및 LOQ는 각 시료 별로 Table 3에 나타내었다. 근육, 간, 신장, 지방조직에 대한 LOD는 각각 4, 2, 5, 10 µg/kg이었으며, LOQ는 각각 12, 6, 15, 30 µg/kg으로 나타났다.

표준곡선, 회수율 및 정밀성

각각의 시료들에 대해 CEX 표준용액을 6개의 서로 다른 농도로 희석하여 LC-MS/MS로 분석한 후 표준곡선의 직선성을 확인한 결과, 근육, 간, 신장, 지방조직의 상관계수가 각각 0.9993, 0.9997, 0.9995, 0.9992로 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 2). Table 3은 CEX의 정량분석을 위해 각각의 시료에 여러 농도로 CEX의 표준용액을 첨가한 후 ‘추출 및 정제’ 방법과 기기조건으로 3회 반복 분석 후 회수율과 정밀성을 측정된 결과를 나타낸 것이다. 근육,

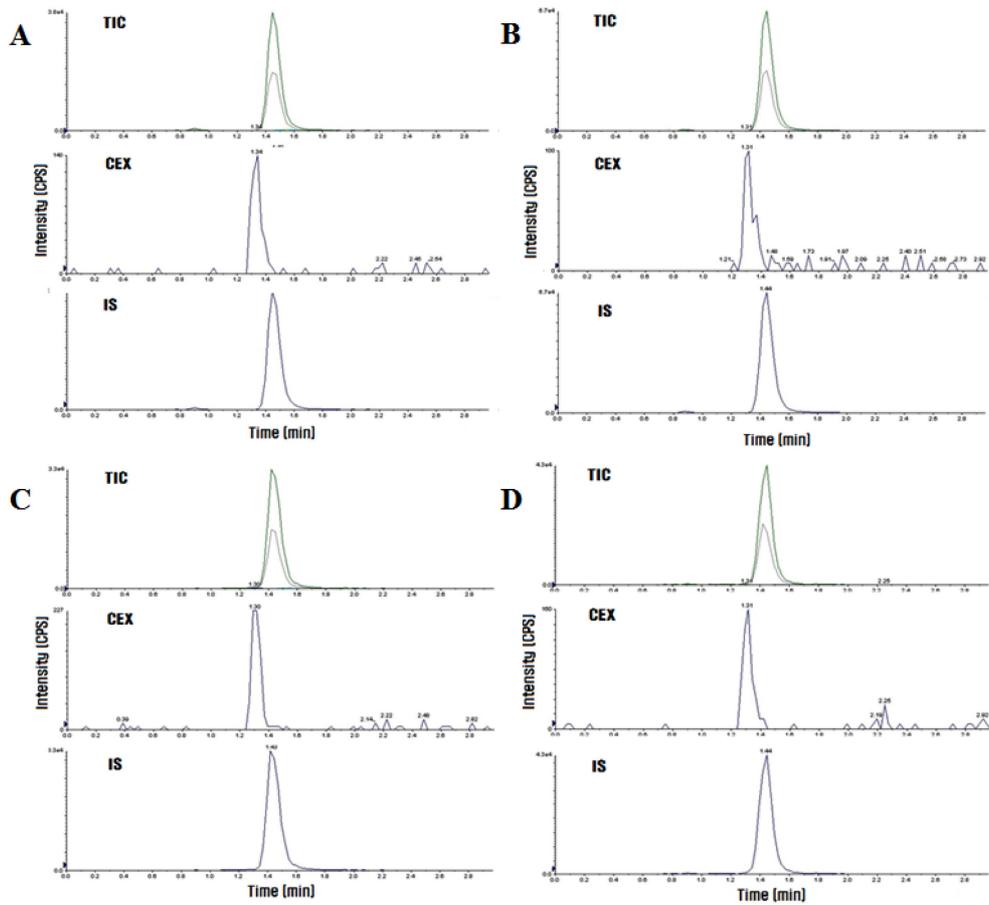


Fig. 1. LC-MS/MS chromatogram (MRM mode) of spiked bovine tissue samples at the limit of quantification of cephalexin. TIC, total ion chromatogram; CEX, cephalexin; IS, internal standard (tobramycin). (A) muscle spiked with 12 ng/g of CEX, (B) liver spiked with 6 ng/g of CEX, (C) kidney spiked with 15 ng/g, (D) fat tissue spiked with 30 ng/g of CEX.

Table 3. Recoveries, relative standard deviations (RSD), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of CEX from bovine tissues by LC-MS/MS

Tissues	Spike level (µg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Tissues	Spike level (µg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Muscle	12	90.0	3.2			Kidney	15	89.6	3.5		
	60	97.7	6.6	4.0	12.0		75	101.3	14.0	5.0	15.0
	600	99.5	2.3				750	97.2	3.4		
Liver	6	106.8	2.6			Fat	30	96.1	3.2		
	30	83.9	14.8	2.0	6.0		150	94.4	2.7	10.0	30.0
	300	97.9	3.5				1,500	94.7	3.1		

Recovery and RSD, mean of 3 replicate studies.

간, 신장, 지방조직에서, 회수율의 범위는 각각 90.0~99.5%, 83.9~106.8%, 89.6~101.3%, 94.4~96.1%로 나타났으며, 상대표준편차의 범위는 각각 2.3~6.6%, 2.6~14.8%, 3.4~14.0%, 2.7~3.2%로 나타났다.

Discussion

2015년도 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링 자료에 따르면²⁴⁾, 2015년 항생제 종류별 판매량은 tetracycline계(237톤)와 penicillin계(223톤) 항생제가 가장 많이 판매되었으며, 대부분의 항생제 판매량은 감소 추세를 나타내었

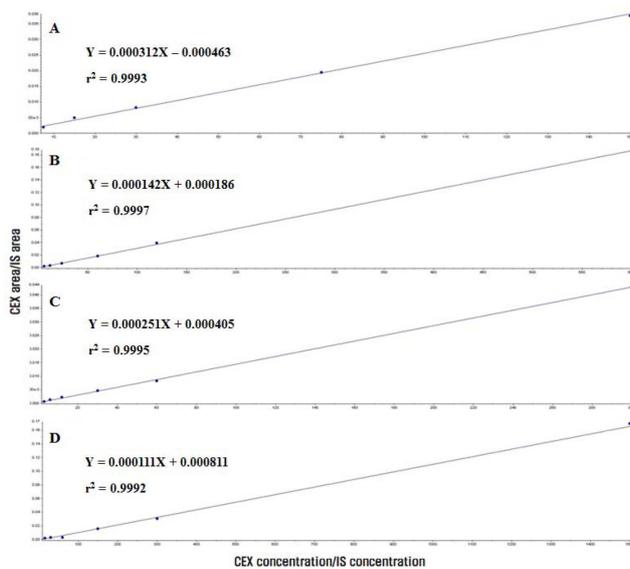


Fig. 2. Standard calibration curves, linearities and correlation coefficients (r^2) of cephalixin in bovine tissues. CEX, cephalixin; IS, internal standard (tobramycin). (A) muscle, (B) liver, (C) kidney, (D) fat tissue.

지만 cephalosporin계 항생제 판매량은 점차 증가하여 2007년에 비해 5배 증가한 것으로 조사되었다. 또한, CEX는 cephalosporin계 항생제 중 ceftiofur 다음으로 가장 많이 판매된 것으로 나타났다. 경남 지역에서 살모넬라성 설사에 걸린 송아지의 분변으로부터 분리한 *Salmonella* spp. 23주에 대해 항생제 내성 검사를 실시한 결과, CEX는 95.6%의 내성을 보였고, penicillin, oxytetracycline, tetracycline 등은 100% 내성을 나타내었다고 보고하였다²⁵. 이는 CEX가 농가에서 빈번하게 사용되고 있어서, 소의 식용조직에 잔류할 가능성이 높다는 것을 의미한다.

CEX가 속한 β -lactam계 항생제는 3개의 탄소 원자와 1개의 질소 원자로 이루어진 이종원자 환형 고리 구조를 갖고 있으며, 이러한 4환 고리 구조는 안정성이 낮아 화학적으로 반응하기 용이하다. 따라서 다른 효소들과 반응하여 고리가 분해되어 원래의 구조대로 존재하는 경우가 드물기 때문에 이들 항생제의 잔류량을 파악하기 위해 신속하고 정확한 분석방법이 요구된다²⁶.

앞선 연구에서, LC-MS/MS를 이용해 소 근육 중에서 CEX를 포함한 cephalosporin계 항생제들에 대한 분석법을 확립한 결과, CEX의 머무름 시간은 3.94분이었으며, chromatography의 총 run time은 9분이었다고 보고하였다¹⁷. 또한, 유통 식육 중에 cephalosporin계 항생제들을 검출하기 위해 확립한 LC-MS/MS법에서, CEX의 머무름 시간은 3.15분이었으며, chromatography의 총 분석시간은 10분이었다고 보고하였다¹⁴. 한편, 우유 중에서 cephalosporin계 항생제들을 검출하기 위해 확립한 LC-MS/MS법에서, CEX의 머무름 시간은 1.05분이었으며, chromatography의 총 분석

시간은 3분이었다고 보고하였다¹⁶. 앞선 연구 결과들로부터, 본 연구를 통해 확립된 LC-MS/MS법의 축산물에 대한 CEX의 분석시간은 Pérez-Burgos 등¹⁷의 연구와 Kim 등¹⁴의 연구를 통해 확립된 LC-MS/MS법보다는 3배 이상 빠른 것으로 나타났으며, Liu 등¹⁶의 연구에서 확립한 LC-MS/MS법과는 같았던 것으로 나타났다.

소의 근육 중 CEX를 LC-MS/MS로 분석한 앞선 연구 결과, LOD와 LOQ는 각각 5와 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다고 보고하였다¹⁷. 또한, 시판 중인 식육 중에서 cephalosporin계 항생물질을 LC-MS/MS로 분석한 연구에서, CEX의 LOD와 LOQ는 각각 6.9와 20.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다고 보고하였다¹⁴. 한편, 식육 중에서 여러 계열의 항생제를 동시에 분석할 수 있는 LC-MS/MS법을 확립한 연구에서, CEX의 LOD와 LOQ는 각각 15와 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다고 보고하였다²⁷. 앞선 연구들과 비교하여, 본 연구에서 확립한 분석법의 소 근육 중 CEX의 LOD는 가장 낮은 것으로 나타났으며, LOQ는 Kim 등¹⁴과 Carretero 등²⁷의 연구결과보다는 낮았으며, Pérez-Burgos 등¹⁷의 연구결과와는 같은 것으로 나타났다. 한편, 식품공전 중 식품 중 동물용의약품의 잔류허용기준²¹과 유럽의약품청의 기준²⁸에 따르면, 소의 우유, 근육, 간장, 신장 그리고 지방 등에 대한 CEX의 최대잔류허용기준은 각각 100, 200, 200, 1,000, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 설정하고 있어서, 본 연구에서 확립한 분석법은 소의 우유, 근육, 간장, 신장, 지방조직 중의 최대잔류허용기준 이하로 CEX의 잔류를 분석하는 것이 가능한 것으로 확인되었다. 또한, 식품의약품안전처의 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서의 식품에 대한 잔류동물용의약품 분석법 기준에 따르면, 잔류허용기준이 50 ng/mL 이하인 경우, LOD는 잔류허용기준의 1/2 이하이어야 하며, LOQ는 10 ng/mL 이하이어야 한다고 규정하고 있다²³. 따라서 본 연구에서 확립한 LC-MS/MS법의 경우, 소의 가식부위(근육, 간, 신장, 지방)에 대한 LOD와 LOQ의 범위는 각각 2~10과 6~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타나, 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서²³의 분석법 기준을 충족하고 있는 것으로 나타났다.

선행연구에서, CEX 표준곡선의 직선성과 회수율을 확인한 결과, r^2 는 0.982이었으며, 회수율은 65%이었다고 보고하였다¹⁷. 또한, 돈육에서 22종의 cephalosporin계 항생제 동시분석을 위한 LC-MS/MS법을 확립한 연구에서, CEX의 r^2 는 약 0.997이었으며, 회수율의 범위는 86.8~96.3%이었다고 보고하였다¹⁵. 한편, 식육 중에서 여러 계열의 항생제를 LC-MS/MS를 이용해 다중 분석한 연구에서, 우육과 돈육에서 CEX의 r^2 는 각각 0.999와 0.997이었으며, 회수율의 범위는 74~82%이었다고 보고하였다²⁷. 본 연구에서 확립한 LC-MS/MS법의 경우, 소의 가식부위에서의 CEX의 r^2 는 모두 0.999 이상이었으며, 소의 근육에서 CEX의 회수율 범위는 90~99.5%를 나타나, 앞선 연구들과 비교하여 높은 직선성과 회수율을 나타내었으며, CODEX^{29,30}에서

설정 한, $r^2 \geq 0.95$ 와 회수율 80~110%를 모두 충족하였다.

이상의 연구결과로부터, 본 연구에서 LC-MS/MS를 이용하여 확립한 소의 식용조직에서 CEX의 정량분석법은 잔류동물용의약품 분석법 실무해설서²³⁾의 검증기준을 모두 충족하는 것으로 나타났다. 또한, 기존 시험법에 비해 높은 회수율, 정밀성, 검출감도 그리고 빠른 분석시간을 갖고 있어서, 축산식품 중에 CEX의 신속한 분석이 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 논문은 (주) 대한뉴팜(서울)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

국문 요약

본 연구는 소의 가식부위(근육, 신장, 간장, 지방) 중에서 세팔렉신을 효과적으로 정량분석하기 위한 LC-MS/MS법을 확립하고 이를 검증하기 위해 수행되었다. 확립된 LC-MS/MS에 대해 특이성, 검출한계, 정량한계, 정확도 및 정밀도에 대한 검증을 통하여 유효성을 확인하였다. 표준용액을 이용하여 검량성을 작성한 결과, $r^2 > 0.999$ 이상의 직선성을 나타내었으며, 세팔렉신에 대한 검출한계와 정량한계는 각각 2~10과 6~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 나타났다. 또한, 회수율은 83.9~106.8%로 나타났으며, 상대표준편차는 2.3~14.8%로 나타나 정확성이 우수하였다. 이는 식품의약품안전처의 잔류동물용의약품 분석법에서 제시한 기준에 모두 적합한 수준이었다. 따라서 본 연구를 통해 개발된 LC-MS/MS법은 향후 소의 가식부위 중 세팔렉신을 분석하는데 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Mainero Rocca, L., Gentili, A., Pérez-Fernández, V. and Tomai, P.: Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **34**, 766-784 (2017).
2. Farouk, F., Azzazy, H.M. and Niessen, W.M.: Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. *Anal. Chim. Acta.* **890**, 21-43 (2015).
3. Moreno-Bondi, M.C., Marazuela, M.D., Herranz, S. and Rodriguez, E.: An overview of sample preparation procedures for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 921-943 (2009).
4. Sawant, A.A., Sordillo, L.M. and Jayarao, B.M.: A survey on antibiotic usage in dairy herds in pennsylvania. *J. Dairy Sci.* **88**, 2991-2999 (2005).
5. Fisher, J.F., Meroueh, S.O. and Mobashery, S.: Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem. Rev.* **105**, 395-424 (2005).
6. Drawz, S.M. and Bonomo, R.A.: Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 160-201 (2010).
7. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Korean Food Standards Codex. Appendix 6: Maximum residue limits of veterinary drugs in food. MFDS, Cheongju, Korea, pp. 21 (2017).
8. The European Agency for the Evaluation of Medical Products.: Committee for veterinary medicinal products cephalixin summary report: EMEA/MRL/627/99-FINAL. Veterinary Medicines Evaluation Unit, London, U.K., pp. 8 (1999).
9. Panda, S.S., Ravi, K., Bera, V.V., Dash, R. and Mohanta, G.: Determination of cephalexin monohydrate in pharmaceutical dosage form by stability-indicating RP-UFLC and UV spectroscopic methods. *Sci. Pharm.* **81**, 1029-1036 (2013).
10. Jeswani, R.M., Sinha, P.K., Topagi, K.S., Damle, M.C.: A validated stability indicating HPTLC method for determination of cephalexin in bulk and pharmaceutical formulation. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **1**, 527-536 (2009).
11. Edward, P.C. and Stanley, G.W.: Molecularly imprinted solid phase extraction for rapid screening of cephalexin in human plasma and serum. *Anal. Chim. Acta.* **481**, 165-174 (2003).
12. Argekkara, A.P., Raja, S.V. and Kapadiaa, S.U.: Simultaneous determination of cephalexin and carbocisteine from capsules by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *Anal. Lett.* **30**, 821-831 (1997).
13. Regina, V.O., Angela, C.D. and Quezia, B.C.: Quantification of cephalexin as residue levels in bovine milk by high-performance liquid chromatography with on-line sample cleanup. *Talanta.* **71**, 1233-1238 (2007).
14. Kim, M.R., Choi, Y.H., Choi, H., Kim, D.H., Kim, Y.S. and Lee, J.H.: Monitoring for cephalosporins residues in raw meat in Seoul. *Korean J. Vet. Serv.* **38**, 259-264 (2015).
15. Li, W., Shen, H., Hong, Y., Zhang, Y., Yuan, F. and Zhang, F.: Simultaneous determination of 22 cephalosporins drug residues in pork muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1022**, 298-307 (2016).
16. Liu, X., Yu, Y., Zhao, M., Zhang, H., Li, Y. and Duan, G.: Solid phase extraction using magnetic core mesoporous shell microspheres with C18-modified interior pore-walls for residue analysis of cephalosporins in milk by LC-MS/MS. *Food Chem.* **150**, 206-212 (2014).
17. Pérez-Burgos, R., Grzelak, E.M., Gokce, G., Saurina, J., Barbosa, J. and Barrón, D.: Quechers methodologies as an alternative to solid phase extraction (SPE) for the determination and characterization of residues of cephalosporins in beef muscle using LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **899**, 57-65. (2012).
18. Chen, H., Li, X. and Zhu, S.: Occurrence and distribution of selected pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments: a comparative study of regions in China with different urbanization levels. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*

- 19, 2381-2389 (2012).
19. Lee, Y.J. and Lee, H.S.: Simultaneous determination of cefoxitin, cefuroxime, cephalixin and cephaloridine in plasma using HPLC and a column-switching technique. *Chromatographia*. **30**, 80-84 (1990).
 20. Pecavar, A., Smidovnik, A., Milivojevic, D. and ProSek, M.: A reversed phase high-performance liquid chromatographic method for determination of cephalixin in human plasma. *J. High Resol. Chromatogr.* **20**, 674-678 (1997).
 21. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS): Korean Food Standards Codex. Chapter 7. General analytical method, 5. Monitoring of veterinary drug residues in foods. MFDS, Cheongju (2016).
 22. Li, W., Shen, H., Hong, Y., Zhang, Y., Yuan, F. and Zhang, F.: Simultaneous determination of 22 cephalosporins drug residues in pork muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*. **1022**, 298-307 (2016).
 23. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS): Handbook of residue analytical methods for veterinary drugs in food. NIFDS, Cheongju, Korea, pp. 3-4 (2014).
 24. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Animal and Plant Quarantine Agency (APQA) and National Institute of Food and Drug Safety Evaluation (NIFDS): National antimicrobial usage and resistance monitoring in 2015 - livestock and animal products. MAFRA, Sejong, Korea, pp. 9-10 (2016).
 25. Heo, J.H., Cho, M.H., Lee, K.C., Park, M.N., Cho, E.J., Choi, M.S., Kim, C.H., Kang, J.B., Kim, E. and Kim, J.S.: An epidemiological study on the calves with clinical diarrhea in southern Gyeongnam. *Korean J. Vet. Serv.* **31**, 305-313 (2008).
 26. Son, B., Kim, J., An, C., Lee, S. and Kim, B., Chung, D.: Simultaneous analysis of β -lactam antibiotics and β -blockers by LC-MS/MS. *Anal. Sci. Technol.* **29**, 179-185 (2016).
 27. Carretero, V., Blasco, C. and Picó, Y.: Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **1209**, 162-173 (2008).
 28. The European Agency for the Evaluation of Medical Products (EMA): Cefalexin - summary report. Committee for veterinary medicinal products. Veterinary Medicines Evaluation Unit (EMA/MRL/627/99) (1999).
 29. Codex guidelines for the establishment of a regulatory programme for control of veterinary drug residues in foods (CAC/GL 16) (1993).
 30. Validation guidelines, Codex committee on residues of veterinary drugs in foods, 11th session (1998).