

# LC-MS/MS를 이용한 해수 및 수산용수 중 플루오로퀴놀론계 항생제 동시 분석법 정립

이미경 · 이인석<sup>1</sup> · 최민규 · 이성규\* · 이원찬

국립수산과학원 기후환경연구부 해양환경연구과, <sup>1</sup>국립수산과학원 서해수산연구소

## Simultaneous Analysis of Prohibited Antibiotics (Fluoroquinolones) in Seawater and Effluents Released by Aquaculture Using LC-MS/MS

Mikyung Lee, In-Seok Lee<sup>1</sup>, Minkyu Choi, Sunggyu Lee\* and Won-Chan Lee

Division of Marine Environment Research, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Busan 46083, Republic of Korea

<sup>1</sup>West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Incheon 22383, Republic of Korea

A simultaneous analytical method was developed and validated for the analysis of prohibited fluoroquinolone (FQ) antibiotics including norfloxacin, ofloxacin, and pefloxacin, released by aquaculture in seawater and effluents. The samples were filtered, and extracts were obtained using a solid phase extraction cartridge with methanol (MeOH). The extracts were concentrated, and analyzed using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Two different columns and four different mobile phases were compared to achieve optimal separation and sensitivity for target compounds. Typical validation parameters including linearity, recovery of surrogate standard, instrument detection limit (IDL), limit of quantification (LOQ), and method detection limit (MDL) were evaluated. The linearity of calibration curves was over 0.999. Recoveries of surrogate ranged from 87.6% to 113%. The LOQ of target compounds was approximately 3–8 times lower than those reported in previous studies. The IDL and MDL were 0.06–0.57 and 0.06–0.37 ng/L, respectively. Seven effluent samples collected from an aquaculture located in Jeju were analyzed; however, not all target compounds were detected in the samples, suggesting that the banned antibiotics were not used. Overall, this established method was able to simultaneously analyze the three FQ antibiotics, and may be useful for monitoring prohibited antibiotics in the fishery industry.

Keywords: Fluoroquinolone antibiotics, Norfloxacin, Ofloxacin, Pefloxacin, LC-MS/MS

### 서 론

의약품(pharmaceuticals)은 인간 또는 동·식물의 질병을 치료하고 증상을 완화하기 위해 사용되고 있으며, 건강에 대한 관심 증가와 더불어 축·수산 양식산업의 발달과 규모가 확장함에 따라 의약품 사용량이 지속적으로 증가하면서 환경 중 의약품 노출에 대한 우려도 증가하고 있다(Nakata et al., 2005; Adeleye et al., 2022). 대부분의 의약품은 극성을 띠고 있어 환경에서의 잔류 수준이 낮은 것으로 간주되지만, 에리스로마이신(erythromycin), 펜벤다졸(fenbendazole), 프라지퀀텔(praziquantel), 카바마제핀(carbamazepine), 크로타미톤(crotamiton) 등 일부

의약품은 현장에서 사용된 후 분해가 덜 되어 환경 중에 잔류하게 되고, 결국 장기간에 걸쳐 생태계 교란 등의 부정적인 영향을 초래할 수 있다(Daughton and Ternes, 1999). 이러한 부작용에도 불구하고 수산양식 환경에서 수생균에 의해 감염된 어류는 경제적 가치가 떨어지거나 심한 경우 집단 폐사로 이어지기 때문에 이를 예방하기 위한 항생제와 같은 의약품 사용은 불가피한 실정이다. 플루오로퀴놀론계(fluoroquinolones, FQs) 항생제는 세계 시장 판매의 17%를 차지하는 세 번째로 큰 항생제 그룹으로, 축·수산업 및 인간의 처방전 등에 널리 사용되는 항생제이다(Schwarzenbach et al., 2006; Van Doorslaer et al., 2014). FQs 항생제는 광범위한 항균 효과와 생물체 내에서 소화 흡수

\*Corresponding author: Tel: +82. 51. 720. 2545 Fax: +82. 51. 720. 2515

E-mail address: chemical@korea.kr



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.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2023.0428>

Korean J Fish Aquat Sci 56(4), 428-437, August 2023

Received 23 May 2023; Revised 11 July 2023; Accepted 18 July 2023

저자 직위: 이미경(연구원), 이인석(연구사), 최민규(연구관), 이성규(연구사), 이원찬(연구관)

가 좋아 세균성 질병의 치료에 대해 매우 효과적인 항생제로 사용되어 왔으며, 대표적인 약물로는 노르플록사신(norfloracin, NOFX), 오픈플록사신(ofloxacin, OFX), 페플록사신(pefloxacine, PEFX)이 있다(Moreales-Muñoz et al., 2004; Table 1). 이 중 NOFX가 가장 먼저 미국 식품의약품안전청으로부터 허가 받아 판매되었고, 이후 OFX, PEFX 등의 FQs 항생제가 개발되어 동물용의약품으로써 사용되었다(Koga et al., 1980; Heo et al., 1998). 그러나 FQs 항생제의 가장 큰 부작용인 빠른 항생제 내성균의 출현으로 인해 항생제 내성과 관련된 잠재적 위험 가능성이 야기되었으며(Lunestad, 1992; Kümmerer, 2009), 지속적으로 노출될 경우 생체 축적뿐만 아니라 생태 독성학적 영향을 유발하여 무척추동물이나 어류의 유기체 기능과 신진 대사를 변화시킬 수 있다는 것으로 알려졌다(Le Bris and Pouliquen, 2004; Serra-Compte et al., 2019). 또한 FQ 항생제가 환경 중에 잔류할 경우 식물 속 광합성 작용을 억제할 수 있다는 자연 환경적 측면의 우려가 제기되었다(Aristilde et al., 2010). 더욱이 FQs 항생제가 인체에 노출될 경우 간질성 폐렴, 아킬레스 건 파열 및 건염, 소아의 경우 연골형성장애와 같은 심각한 부작용(Llovo et al., 2003; Park et al., 2007; Lee et al., 2008)을 일으킬 수 있다는 위험성이 제기되어 미국, 캐나다, 유럽, 일본에서 규제되기 시작했다(Barry, 1993; Horie et al., 1994; EMA, 2002; USFDA, 2003). 국내에서는 2008년에 개정된 「약사법」 제76조 및 제85조에 의거하여 같은 해 7월 1일부터 국내 제조와 수입이 전면 금지된 바 있다. 이 후 식품의약품안전처에서는 2019년 「식품의 기준 및 규격」 관련 고시를 개정하여 FQs 항생제 3종을 식품 중 신규 금지 의약품으로 포함시켰으며, 이는 2020년 4월 1일부터 시행되었다.

FQs 항생제에 대한 다양한 환경 중 관련된 연구를 살펴보면, 국외의 연구 사례에서는 담수(Chen et al., 2020; Guo et al., 2020; Zhang et al., 2021), 폐수(Ziarrusta et al., 2017; Hernández et al., 2019; Serra-Compte et al., 2021) 및 해수(Ziarrusta et al., 2017; Hernández et al., 2019; Xie et al., 2019; Qin et al., 2020; Serra-Compte et al., 2021)와 같은 다양한 수질뿐만 아니라 수중 서식 생물과 퇴적물(Ziarrusta et al., 2017; Qin et al., 2020)을 포함한 여러 수·환경 중 FQs 항생제 분석법 개발 및 환경 잔류량과 이에 따른 위해성 평가에 대한 결과가 지속적으로 보고되고 있다. 반면 FQs 항생제와 관련한 국내 연구 사례에서는 육류(Park et al., 2004; Kim et al., 2009), 알류(Koh et al., 2005; Kim et al., 2009), 유제품(Kim et al., 2009, 2010) 등 다수의 식품군을 대상으로 한 연구 결과가 보고된 바 있다. 그러나 해수 및 연안 환경을 대상으로 한 연구로는 Kim et al. (2017)의 NOFX와 OFX 2종을 포함한 30종의 의약품에 대해 분석법을 정립하고 연안 양식 환경 중 잔류량을 조사한 사례가 유일하다. 다만 연구 당해 년도는 식품의약품안전처에서 FQs 3종에 대한 금지 의약품 지정 전이었기 때문에 PEFX은 대상물질에서 제외되어 있었다. 또한 당시에는 UPLC (ultra-performance liquid chromatography)의 상용화가 많지 않았던 한계로 인하여 HPLC (high-performance liquid chromatography)를 이용하여 기기분석을 수행함으로 인한 분석 대상물질의 감도가 상대적으로 낮은 단점이 있었다. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근 국내 연구에서는 UPLC를 우선적으로 적용하여 FQs 항생제를 분석하고 있는 추세이다(Park et al., 2019). 따라서 해수 및 수산용수에서 FQs 항생제를 효과적으로 모니터링하기 위하여 우수한 검출한계를 가짐과 동시에 대상물질의 분석이 가

Table 1. Molecular structure and physical properties of 3 fluoroquinolone antibiotics

Compound	Structure	Content	
Norfloxacin (NOFX)		Formula	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$
		Molecular weight	319.33
		Solubility (at 25°C)	$1.78 \times 10^5$ mg/L
		Log P	-1.03
		Log $K_{ow}$	0.46
Ofloxacin (OFX)		Formula	$C_{17}H_{20}FN_3O_3$
		Molecular weight	361.37
		Solubility (at 25°C)	$2.83 \times 10^4$ mg/L
		Log P	-0.39
		Log $K_{ow}$	-0.39
Pefloxacin (PEFX)		Formula	$C_{17}H_{20}FN_3O_3$
		Molecular weight	333.36
		Solubility (at 25°C)	$1.14 \times 10^4$ mg/L
		Log P	0.27
		Log $K_{ow}$	-

능한 방법을 개발하는 연구가 필요한 실정이다. 앞서 언급한대로 식품의약품안전처에서 FQs 항생제 3종을 식품에서 검출되어서는 안되는 금지 의약품으로 지정하였다. 그러나 수산 환경, 특히 가공 공정 없이 양식 활동을 통해 국민에게 바로 제공되어 섭취되는 양식 수산물의 경우 양식 과정 중 다양한 항생제가 빈번하게 사용되고 있지만 해수나 수산용수에 대한 분석법은 제대로 마련되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 신규 금지물질로 지정된 FQs 항생제 3종에 대하여 연안환경의 해수나 양식장의 수산용수 내 잔류량 조사를 위해 대상물질의 동시 분석법을 정립하고자 한다. 분석법 정립에 있어 전처리 과정은 Kim et al. (2017)의 NOFX와 OFX 전처리법을 준용하여 적용하였으나, 기기분석의 경우 UPLC 컬럼을 적용하였다. 또한 대상물질 감도 향상을 위해 필요한 UPLC 컬럼 이동상(mobile phase)은 FQs 항생제를 분석한 선행 연구 중 감도가 우수한 결과의 이동상을(Ziarrusta et al., 2017; Park et al., 2019; Guo et al., 2020) 비교 적용하였다. 이를 통해 정립된 분석법으로 제주 연안에 산재한 육상 양식장 배출수에 대해 3종 FQs 항생제의 잔류 농도를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기구

아세토니트릴(acetonitrile, ACN)과 메탄올(methanol, MeOH)을 포함한 모든 유기용매 및 초순수는 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)의 제품을 사용하였고, 암모니아수(ammonia solution)는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 포름산 암모늄(ammonium formate) 및 포름산(formic acid) 등의 분석용 시약은 Wako Pure Chemical Industries (Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. 전처리 과정에서 사용된 암모니아수는 MeOH에, 포름산 암모늄과 포름산 희석에는 초순수를 각각 사용하였다. 고상추출(solid phase extraction, SPE) 과정에서 사용된 카트리지가 Oasis HLB (200 mg, 6 cc)는 Waters (Milford, MA, USA) 제품을 구입하였다. 시료 여과에 사용한 유리섬유여과지(GF/F, 47 mm circle, 0.45 µm pore size)와 추출 용액 여과용으로 사용한 폴리프로필렌(polypropylene, PP) syringe filter는 Whatman (Clifton, NJ, USA)의 0.45 µm syringe filter를 구입하여 사용하였다.

### 표준물질

FQs 항생제 3종의 분석대상 표준물질 중 PEFX는 Toronto Research Chemicals (Toronto, Ontario, Canada)에서 구입하였고, 나머지 2종의 표준물질 NOFX, OFX과 정제용 내부표준물질 NOFX-*d*<sub>5</sub>, PEFX-*d*<sub>5</sub> 및 실린지 첨가용 내부표준물질인 트리메소프림 치환체(deuterated Trimethoprim, TMP-*d*<sub>5</sub>)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 고상의 3종 분석대상 표준물질 및 정제용 표준물질, 실린지 첨가용

내부표준물질을 차광 유리병에 각각 칭량한 후, MeOH에 녹여 100 mg/L가 되도록 원액을 제조하였다. 이를 -20°C 냉동실에서 보관하고, 실험 직전에 각각 MeOH으로 희석하여 검량선 작성용 혼합표준물질의 범위를 0–100 µg/L가 되도록 하였으며, 정제용 내부표준물질과 실린지 첨가용 내부표준물질의 농도는 20 µg/L가 되도록 하였다.

### 고상추출 방법

여과한 해수 시료에 대한 대상물질 SPE 과정은 Kim et al. (2017)의 방법을 준용하였으며 간단히 기술하면 다음과 같다. 포름산을 이용하여 pH 3으로 조정된 초순수 500 mL에 0.1 mg/L Na<sub>2</sub>-EDTA (Ethylene-diamine-tetraacetic acid) 400 µL를 첨가한 후, 3종의 표준물질(NOFX, OFX, PEFX) 표준용액 50 µL (농도, 0.1 mg/L)와 2종의 정제용 내부표준물질(NOFX-*d*<sub>5</sub>, PEFX-*d*<sub>5</sub>) 표준용액 200 µL (농도, 0.1 mg/L)를 주입하였다. 조제된 추출용 시료는 Oasis HLB 카트리지를 사용하여 진공압장치(vacuum manifold)에 장착한 후, MeOH 6 mL와 초순수 (pH 3으로 조정) 6 mL를 순서대로 통과시켜 컨디셔닝(conditioning)하였다. 준비된 시료는 컨디셔닝된 카트리지가 완전히 건조되지 않도록 유지하면서 5–6 mL/min 속도로 통과시켰다. 시료가 용출된 카트리지는 초순수 6 mL로 세척한 후 약 30분간 건조시켰다. 카트리지에 흡착된 대상물질 회수를 위해 6% 암모니아수로 6 mL씩 2회 용리시킨 후 TurboVap LV (Charlotte, NC, USA)를 이용하여 약 100–200 µL까지 농축시켰다. 농축액은 0.3% 포름산 암모늄과 0.1% 포름산 혼합액 500 µL로 녹여 PP syringe filter (0.45 µm)로 여과하였다. 여과액에는 실린지 첨가용 내부표준물질 표준용액 20 µL (농도, 1 mg/L)를 주입하였으며, 최종 부피를 1 mL로 하여 기기분석에 사용하였다(Fig. 1).

### UPLC-MS/MS 기기분석법

FQs 항생제(3종)에 대한 기기분석법 정립을 위해 본 연구진의 이전 연구 기기분석 조건과 UPLC를 적용해 FQs 항생제를 분석한 연구 사례 중 감도가 높거나 분석 시간이 짧은 3건을 비교 분석하여 각각 적용하였다. UPLC 컬럼의 경우 선행 연구에서 FQs 항생제 분석에 주로 탄화수소계열의 역상 컬럼을 사용한 점을 고려하여 소입자 충전 컬럼인 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 × 50 mm, 1.8 µm; Agilent Technologies, CA, USA)을 기준으로 하였고, Lee et al. (2020)의 니트로퓨란계(Nitrofurans) 항생제 분석 시 우수한 분리능과 감도를 보였던 Prodigy ODS-3 (2.0 × 150 mm, 5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 비교 컬럼으로 하였다. 비교 적용한 각 분석법의 UPLC (high performance liquid chromatography) 이동상과 구배(gradient mode)를 포함한 기기분석 조건을 Table 2에 나타냈다. 분리한 대상물질 검출을 위해 적용한 장비는 SCIEX사의 고성능액체크로마토그래프/텐덤질량분석기(UPLC-MS/MS, SCIEX Exion LC system coupled with SCIEX QTRAP

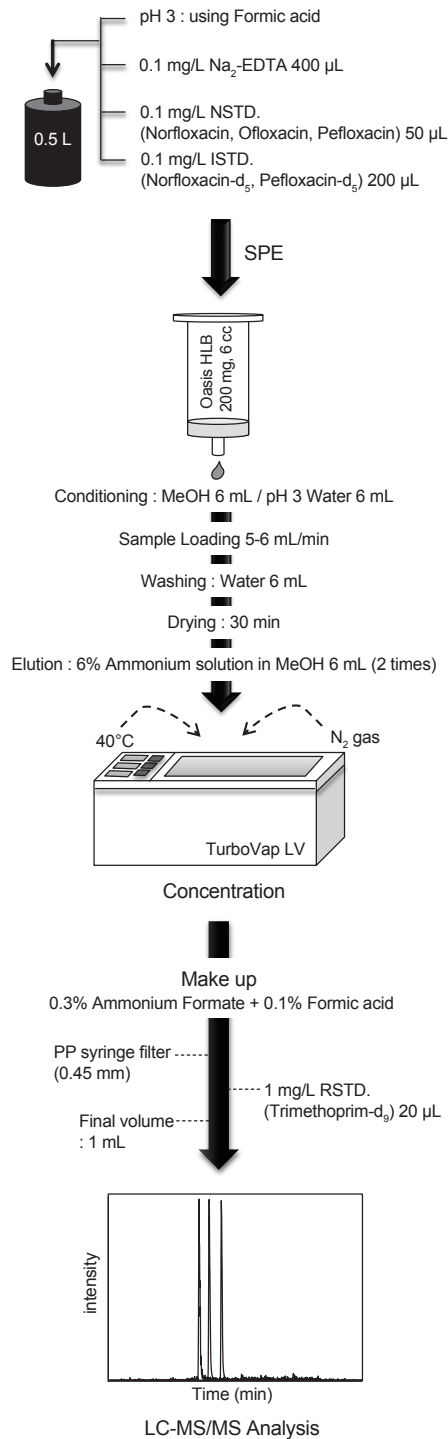


Fig. 1. Flowchart of the optimized analytical method for simultaneous analysis for 3 fluoroquinolone antibiotics in fisheries water. EDTA, Ethylene-diamine-tetraacetic acid; NSTD, Native standard; ISTD, Internal standard; SPE, Solid phase extraction; PP, Polypropylene; RSTD, Recovery standard; LC-MS/MS, Liquid chromatography-tandem mass spectrometer

4500; Toronto, ON, Canada)였으며, 각 대상물질에 대한 정량·정성 이온을 선정하여 MRM (Multiple Reaction Monitoring) 모드로 분석하였다. 공통적인 UPLC의 분석 조건으로는 유량 및 주입량을 각각 300 µL/min, 5 µL로 하였으며, 컬럼 및 소스 온도를 각각 40°C, 450°C로 하여 positive 모드에서 capillary voltage를 5,500 V로 하여 분석하였다. 그 밖의 각 물질의 MS 조건은 Table 3에 나타내었다.

### 결과 및 고찰

#### UPLC 기기 분석 조건에 따른 대상물질의 감도와 분리능 비교

UPLC 기기 분석 조건을 최적화하기 위하여 이전 문헌을 참고하여 4가지 다른 조건에 대한 대상물질의 감도와 분리능을 비교하였다(Table 2). 첫 번째 UPLC 조건(Kim et al., 2017)으로는 이동상 A를 0.3% 암모늄 포름산과 0.1% 포름산 혼합액으로 하였고, 이동상 B를 MeOH와 ACN을 1:1로 하고 구배 조건을 시간에 달리 하였다(Condition 1). 두 번째(Guo et al., 2020)는 0.2% 포름산(A)과 ACN (B)을 사용하였으며, 분석 시간은 11분으로 가장 짧았다(Condition 2). 초순수와 MeOH의 비율을 각각 95:5 (A)와 5:95 (B)로 하여 이동상으로 사용한 것을 Condition 3으로 하였으며(Ziarrusta et al., 2017), 분석 시간은 25분이었다. 마지막 조건인 Condition 4 (Park et al., 2019)는 Condition 3과 이동상이 같으나, 구배 조건을 달리하여 분석 시간을 20분으로 줄인 조건이었다. 각각의 조건은 XDB-C18과 ODS-3 컬럼으로 달리 하여 분석한 결과의 대상물질 감도(intensity)와 피크 분리(peak separation)를 Fig. 2에 나타내었다.

먼저 XDB-C18 컬럼을 이용하여 분석한 결과, 대상물질의 감도와 분리능은 Condition 1에서 가장 우수한 결과를 나타내었다. Condition 1과 2에서 모두 분리는 잘 이루어지나, Condition 2는 1에 비해 분석시간은 단축된 반면, 물질의 감도 측면에서 NOFX는 -20%, OFX와 PEFX는 5% 미만으로 나타나 상대적으로 매우 낮은 수준이었다. Condition 3의 경우 Condition 2에 비해 약 4배 더 낮은 감도를 보였으며, Condition 4의 경우 피크의 갈라짐(peak splitting) 현상을 확인하였다. 동일한 분석 조건 하에 UPLC 컬럼을 ODS-3로 변경한 결과, Condition 1-4 모두 피크의 갈라짐 현상을 보였다. 다만 OFX와 PEFX의 경우 피크의 갈라짐이 나타나긴 했지만 분리된 두 피크 중 높은 피크를 기준으로 비교하였을 때 XDB-C18 컬럼을 이용하여 분석한 감도보다 유사하거나 2-5배 높게 나타나는 결과를 보였다. 그러나 모든 분석조건에서 NOFX의 감도가 낮거나 거의 검출되지 않는 수준으로 나타났다.

모든 기기분석 조건에서 극성 용매와 비극성 용매의 혼합 비율을 시간에 따라 달리하는 구배 용출법(gradient elution)을 사용하였는데, 이는 기기분석용 시료가 초기에 높은 비율의 초순수와 함께 컬럼에 도입된 후에 고정상인 컬럼에 머물다 구배

가 달라짐에 따라 이동상 중에 비극성 용매의 비율이 높아지면 서 순차적으로 고정상에서 용리되어 컬럼 외부로 유출되는 방법이다. 이를 바탕으로 Condition 1의 조건(이동상 A, 초순수에 0.3% ammonium formate와 0.1% formic acid를 혼합한 용액; 이동상 B, methanol과 ACN을 1:1로 혼합한 용액)에서 대상물질 3종이 검출되는 시간이 8분대인 것을 감안하면 이동상 A와 B를 8:2로 혼합(구배 시간 3-10분)했을 때, 최적의 피크가 검출됨을 확인하였다. 또한 FQs 항생제의 대상성분들의 pKa가 5.9-6.7 범위의 약산성 화합물임을 감안하여 포름산 및 포름산암모늄 등의 휘발성 첨가제를 사용함으로써 pH를 조절할 뿐만 아니라 항생제의 이온화 효율이 증가하여(Peng and farkas, 2008; Seifrtova et al., 2009; Kim et al., 2017) 질량분석기의 감도가 향상된 것으로 판단된다. 전체적으로 XDB-C18 컬럼을 사용하여 Condition 1의 이동상 조건을 적용했을 경우에 대상물질인 3종 FQs 항생제의 피크 감도와 분리능이 가장 적합한 조건으로 판단되어 이 조건으로 분석법의 유효성 검증을 수행하였다.

#### 분석방법 검증(method validation) 및 정도관리 자료 생산

분석법의 유효성 검증을 위해 실제 해수 시료 500 mL를 GF/

F로 여과하여(7개) 준비한 후 대상물질 3종의 표준물질(5 ng)을 첨가하여 정립된 분석조건으로 분석하였다. 이때 초순수를 방법바탕시료(procedural blank, PB)로 하여 해수 시료와 같이 분석하여 실험과정 중의 오염도를 확인하였다. 또한 PB와 표준물질을 첨가한 7개 시료의 반복 분석결과를 통해 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 정량한계(limit of quantification, LOQ) 및 기기검출한계(instrument detection limit, IDL), 방법 검출한계(method detection limit, MDL)를 산출하여 분석법 유효성 검증을 수행하였다. 유효성 검증을 위한 대상물질의 농도 평가를 하기 위해 검량선 작성용 표준물질은 7단계(0, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/L)로 하여 그 직선성을 평가하였다. 검량선 직선성은 대상물질의 농도에 대해 일정한 범위 내 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 UPLC-MS/MS 분석 후 시료 농도(x축)와 피크 면적(y축)을 변수로 하여 검량선을 작성한 결과, NOFX, OFX 및 PEFX의 직선성 결정계수(R<sup>2</sup>) 값이 각각 0.9993, 0.9998, 0.9997으로 나타나 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 3).

대상물질 3종에 대한 해수 시료 반복 실험 결과(n=7) 바탕시료에서는 대상물질이 검출되지 않았으며, 각 대상물질의 정확도, 정밀도, 정량한계 및 검출한계를 산정한 결과를 Table 4와 Table 5에 나타내었다. 정확도(accuracy)는 측정값이 참값(true

Table 2. Instrumental conditions used for fluoroquinolone antibiotics analyses by UPLC-MS/MS

	Mobile phase		Gradient mode								
	A	B	Time (min)	0	3	10	12	14	21.5	22	30
Condition 1 (Kim et al., 2017)	0.3% ammonium formate+0.1% formic acid in water	Methanol:ACN=1:1	Time (min)	0	3	10	12	14	21.5	22	30
			A (%)	90	80	50	15	0	0	90	90
			B (%)	10	20	50	85	100	100	10	10
Condition 2 (Guo et al., 2020)	0.2% Formic acid in water	ACN	Time (min)	0	7	10	10.01	11			
			A (%)	90	60	40	90	90			
			B (%)	10	40	60	10	10			
Condition 3 (Ziarrusta et al., 2017)	Water:MeOH=95:5	Water:MeOH=5:95	Time (min)	0	0.5	4	8.5	13	17.5	25	
			A (%)	80	75	75	15	15	80	80	
			B (%)	20	25	25	85	85	20	20	
Condition 4 (Park et al., 2019)	Water:MeOH=95:5	Water:MeOH=5:95	Time (min)	0	1	10	11	14	15	20	
			A (%)	90	30	0	0	90	90	90	
			B (%)	10	70	100	100	10	10	10	

HPLC-MS/MS, HPLC-MS/MS, High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer; ACN, Acetonitrile; MeOH, Methanol.; ACN, Acetonitrile.

Table 3. Mass spectrometer parameters for determination of 3 fluoroquinolone antibiotics

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)		Declustering potentia (V)	Collision energy (V)		Collision cell exit potential (V)	
		Quantification	Confirmation		Quantification	Confirmation	Quantification	Confirmation
Norfloxacin	320.1	233.03	204.82	126	33	47	10	14
Ofloxacin	362.04	261.06	204.95	116	39	57	10	16
Pefloxacin	334.11	233.02	204.87	101	37	47	16	14

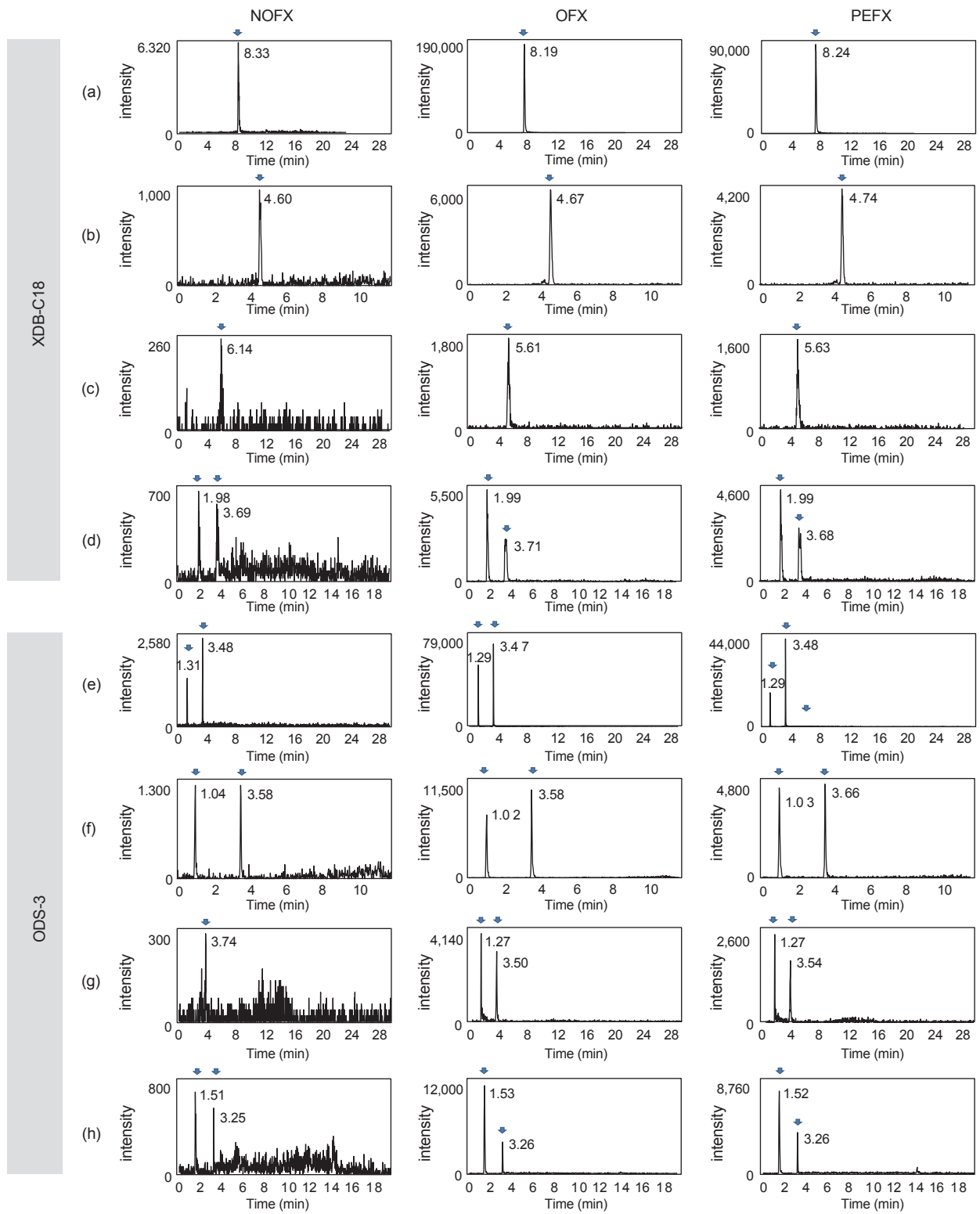


Fig. 2. Peak intensity and of 3 target compounds for 4 instrumental conditions, using the XDB-C18 column and ODS-3 column, respectively [(a), (e) Instrumental condition 1; (b), (f) Instrumental condition 2; (c), (g) Instrumental condition 3; (d), (h) Instrumental condition 4 described in Table 2]. NOFX, Norfloxacin; OFX, Ofloxacin; PEFX, Pefloxacin.

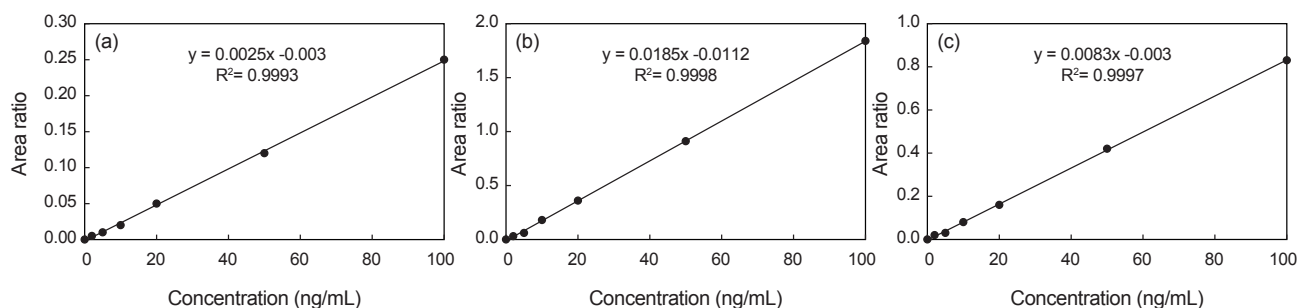


Fig. 3. Calibration curves with norfloxacin (a), ofloxacin (b), pefloxacin (C) concentrations ranging 0–100 ng/mL.

Table 4. Accuracy, precision and limit of quantitation (LOQ) of 3 target compounds in this study and other references

Target Compound	Accuracy (%)	Precision (%)	LOQ (ng/L)	Accuracy (%)	Precision (%)	LOQ (ng/L)	Accuracy (%)	Precision (%)	LOQ (ng/L)
Norfloxacin	98.4	1.2	1.19	64.0	8.3	1.18	90.0	2.0	4.00
Ofloxacin	108.7	0.2	0.20	63.7	6.8	0.35	105.0	4.0	1.60
Pefloxacin	92.7	0.5	0.47	-	-	-	101.0	2.0	1.60
Reference	This study			Guo et al. (2020)			Ziarrusta et al. (2017)		

Table 5. IDL and MDL of 3 target compounds and recoveries of surrogate standards

Target compound	IDL (ng/L)	MDL (ng/L)	Recovery (%)
Norfloxacin	0.57	0.37	
Ofloxacin	0.08	0.06	
Pefloxacin	0.06	0.15	
Norfloxacin- $d_5$			113.0
Pefloxacin- $d_5$			85.6

IDL, Instrument detection limit; MDL, Method detection limit.

value)에 얼마나 근접한 지를 나타내며, 참값에 가까울수록 정확도가 높다고 판단한다. 이를 판단하기 위해 분석대상 표준물질 5 ng을 첨가한 시료를 7회 반복 분석하여 얻은 결과의 평균값을 참값으로 나눈 후 백분율 하여 정확도를 확인하였으며, 해수 시료에 대해 FQs 항생제를 분석하고 분석법 유효성 결과를 물질별로 보고한 Ziarrusta et al. (2017)와 Guo et al. (2020)의 연구 사례와 비교하였다. 본 연구에서 제시한 분석법에 따른 FQs 항생제의 분석 정확도는 92.7–109%로 Ziarrusta et al. (2017)의 90.0–105%과는 유사한 수준이었으며, Guo et al. (2020)의 63.7–64.0%에 비해 우수한 수준이었다. 정밀도(precision)는 동일한 조건에서 여러 번 반복 측정하여 얻은 값이 서로 얼마나 분산되어 있는지를 나타내며, 재현성(reproducibility)이라고도 한다. 7회 반복 분석하여 얻은 측정값의 편차를 평균으로 나눈 후 백분율 하여 정밀도를 확인하였다. 측정값의 편차가 낮을수록 정밀함을 뜻하는데, 본 연구에서 얻은 FQs 항생제의 정밀도는 0.2–1.2% 수준으로, Ziarrusta et al. (2017)와 Guo et al. (2020)에서 제시한 값(각각 6.8–8.3, 2.0–4.0%)보다 낮게 나타

나 우수한 수준의 정밀도를 확인하였다. LOQ는 시료 내 포함되어 있는 대상물질의 정량이 가능한 최소한의 양 또는 최저 농도를 의미하며, 이는 7회 반복 분석하여 검출된 값의 표준편차에 10을 곱하여 산정하였다. 그 결과, 3종 FQs 항생제의 정량한계는 0.20–1.19 ng/L 수준으로 나타났으며, Guo et al. (2020)의 0.35–1.18 ng/L과 유사한 수준으로 나타났으나, Ziarrusta et al. (2017)에서 제시한 1.60–4.00 ng/L와 비교해 보았을 때 각 물질별로 3–8배 낮은 정량한계 결과를 보였다. IDL는 분석 장비가 대상물질을 검출할 수 있는 최소농도를 의미하며, 이는 바탕 시료에 대해 7회 반복 기기분석 하여 얻은 결과의 표준편차에 3을 곱하여 산정하였다. 그 결과, FQs 항생제의 기기검출한계는 0.06–0.57 ng/L 수준으로 나타났다. MDL는 대상물질이 포함된 시료를 전처리부터 기기분석에 이르는 전 과정에 대하여 최적의 분석방법에 따라 얻은 결과가 99% 신뢰 수준에서 0보다 큰 최소농도로, 이는 표준물질 첨가 시료 7개 반복실험을 통해 얻은 표준편차에 자유도( $t = 3.143$ , 99% 신뢰도)를 곱하여 산정하였다. 그 결과, FQs 항생제의 MDL은 0.06–0.37 ng/L 수준으로 나타났다. 또한 정제용 내부표준물질 2종(NOFX- $d_5$ , PEFX- $d_5$ )에 대한 회수율은 각각 113%, 85.6%로 높은 수준이었다. 전체적으로 여러 분석법 유효성 검증 항목을 이전 연구 사례와 비교한 결과, 본 연구에서 정립된 분석법은 유사하거나 더 우수한 수준의 결과 값들을 보여 연안 수질과 수산용수 중 3종의 FQs 항생제 분석법으로 적합하게 정립되었음을 확인할 수 있었다.

#### 제주 연안 육상 어류 양식장 방류수 시료의 FQs 항생제 분석

본 연구에서 정립된 분석법 절차(Fig. 1)에 따라 실제 수산용

수 시료에 대한 3종 FQs 항생제 잔류량을 파악하기 위해 제주 연안의 7곳(제주, 조천, 성산, 표선, 서귀포, 대정, 한림) 육상 어류 양식장 방류수를 대상으로 분석을 수행한 결과, 모든 시료에서 3종 FQs 항생제는 검출되지 않았다. FQs 항생제는 2020년도부터 국내에서 사용이 금지된 의약품으로 어류 양식장의 수산용수에서 검출되지 않은 결과를 나타낸 것으로 판단된다. 그러나 FQs 항생제를 포함한 동물용의약품이나 다양한 수산용 약제를 사용하는 시간이 각 양식장 별로 상이하고, 대상물질의 환경 중 반감기가 다른 잔류성유기오염물질(persistent organic pollutants)과 비교했을 때 상대적으로 짧기 때문에 본 연구에서 채취한 수산용수에서 검출이 되지 않았을 가능성도 배제할 수 없다. 대부분의 육상 어류양식장에서는 사용하고 있는 수산용수를 지속적으로 주변 환경으로 방류하고 있으며, 이들 물질의 생태학적 독성 영향을 고려한다면 FQs 항생제를 포함한 다양한 의약품류의 주기적인 모니터링이나 정책적 감시는 지속적으로 수행될 필요가 있을 것으로 판단된다.

개정된 식품의 기준 및 규격에 의해 2020년 4월부터 시행되어 식품에 잔류하면 안되는 금지 의약품으로 지정된 NOFX, OFX 및 PEFX의 3종 FQs 항생제에 대하여 기존 분석법을 개선하여 최적의 분석법을 정립하였다. 확립된 분석법은 UPLC-MS/MS 기반으로 XDB-C18 컬럼을 장착하여, 우수한 감도와 분리 결과를 나타내는 이동상과 구배를 선정하였다. 본 분석법은 이전 연구 결과와 비교했을 때, 유사하거나 더 우수한 수준의 분석법 유효성 결과들을 보였다. 실제 수산용수를 대상으로 한 분석결과에서는 양식장 방류수 중 대상 금지 의약품인 3종의 FQs가 검출되지는 않았다. 그러나 지속적으로 유입과 방류를 하는 육상 양식장의 특성을 고려해 특정 시간대의 조사가 아닌 24시간 연속 샘플링과 방법이 향후 고려되는 등 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 판단되었다. 이를 통해 지속 가능한 수산 양식과 안전한 수산물을 섭취할 수 있는 환경 마련을 위해 본 연구가 활용되기를 바란다.

## 사 사

이 논문은 2023년도 국립수산물과학원 수산과학연구사업(R2023014)의 지원으로 수행된 연구입니다.

## References

- Adeleye AS, Xue J, Zhao Y, Taylor AA, Zenobio JE, Sun Y and Zhu Y. 2022. Abundance, fate, and effects of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments. *J Hazard Mater* 424, 127284. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127284>.
- Aristilde L, Melis A and Sposito G. 2010. Inhibition of photosynthesis by a fluoroquinolone antibiotic. *Environ Sci Technol* 44, 1444-1450. <https://doi.org/10.1021/es902665n>.
- Barry C. 1993. The analytical testing followed by laboratory services division of agriculture Canada for veterinary drug residues in eggs. In: *Proceedings of the Euroresidues II Conference on Residues of Veterinary in Food*. Netherlands, 170-175.
- Chen Y, Xie Q, Wan J, Yang S, Wang Y and Fan H. 2020. Occurrence and risk assessment of antibiotics in multifunctional reservoirs in Dongguan, China. *Environ Sci Pollut Res* 27, 13565 -13574. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07436-5>.
- Daughton CG and Ternes TA. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. *Environ Health Perspect* 107, 907-938. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s6907>.
- EMA (European Medicines Agency). 2002. Veterinary medicines. Retrieved from <http://www.ema.europa.eu/en/about-us/who-we-are/veterinary-medicines> on Jul 13, 2022.
- Guo X, Xiaojun L, Zheng A, Chen S and Wang N. 2020. Antibiotic contamination in a typical water-rich city in southeast China: A concern for drinking water resource safety. *J Environ Sci Health B* 55, 193-209. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1679563>.
- Heo GJ, Park SC and Kim DW. 1998. A study on efficacy and safety of quinolone antibacterial (Ciprofloxacin) to bacterial diseases in cultured fish, *Cyprinus caprio* and *Oncorhynchus mykiss*. *Korean J Vet Public Health* 22, 175-186.
- Hernández FELIX, Calisto-Ulloa N, Gómez-Fuentes C, Gómez M, Ferrer J, González-Rocha G and Montory M. 2019. Occurrence of antibiotics and bacterial resistance in wastewater and sea water from the Antarctic. *J Hazard Mater* 363, 447-456. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.027>.
- Horie M, Saito K, Nose N and Nakazawa H. 1994. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 653, 69-76. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)e0428-s](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)e0428-s).
- Kim HY, Shin MS, Choi HJ, Park SJ, Song JS, Cheon SY, Choi SH, Lee HJ, Kim YS and Choi JC. 2009. Analysis of fluoroquinolone antibiotics in foods. *Korean J Food Sci Technol* 41, 636-643.
- Kim HY, Lee IS and Oh JE. 2017. Human and veterinary pharmaceuticals in the marine environment including fish farms in Korea. *Sci Total Environ* 579, 940-949. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.039>.
- Kim JH, Hong SL, Kang TB, Lee HK and Lee SH. 2010. Establishment of an analytical method of fluoroquinolones in milk by HPLC. *Korean J Food Sci Technol* 42, 521-526.
- Koga H, Itoh A, Murayama S, Suzue S and Irikura T. 1980. Structure-activity relationships of antibacterial 6, 7- and 7, 8-disubstituted 1-alkyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J Med Chem* 23, 1358-1363. <https://doi.org/10.1021/jm00186a014>.
- Koh BRD, Park SD, Jang MS, Na HM and Kim YH. 2005.



- Surveys on the residual level of fluoroquinolones in eggs. Korean J Vet Serv 28, 235-243.
- Kümmerer K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. Chemosphere 75, 435-441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.006>.
- Le Bris H and Pouliquen H. 2004. Experimental study on bioaccumulation of oxytetracycline and oxolinic acid by the blue mussel (*Mytilus edulis*). An evaluation of its ability to bio-monitor antibiotics in the marine environment. Mar Pollut Bull 48, 434-440. <https://doi.org/10.1016/j.marpollbul.2003.08.018>.
- Lee JH, Lee JH and Cho Y. 2008. Teratological effects of enrofloxacin on the embryos and fetus during the hatching of chicken eggs. J Environ Health Sci 34, 292-299.
- Lee M, Lee IS, Choi M and Lee W. 2020. Simultaneous analysis of four nitrofurans and chloramphenicol antibiotics in seawater and fisheries water using LC-MS/MS. J Environ Anal Health Toxicol 23, 81-89. <https://doi.org/10.36278/jeaht.23.2.81>.
- Llavo J, Mateo E, Munoz A, Urquijo M, On SL and Fernández-Astorga A. 2003. Molecular typing of *Campylobacter jejuni* isolates involved in a neonatal outbreak indicates nosocomial transmission. J Clin Microbiol 41, 3926-3928. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3926-3928.2003>.
- Lunestad BT. 1992. Fate and effects of antibacterial agents in aquatic environments. In: Chemotherapy in Aquaculture: From Theory to Reality. Office Internat. des Epizooties, Paris, France, 152-161.
- Morales-Muñoz S, Luque-García JL and Luque de Castro MD. 2004. Continuous microwave-assisted extraction coupled with derivatization and fluorimetric monitoring for the determination of fluoroquinolone antibacterial agents from soil samples. J Chromatogr A 1059, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.086>.
- Nakata H, Kannan K, Jones PD and Giesy JP. 2005. Determination of fluoroquinolone antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography-mass spectrometry and fluorescence detection. Chemosphere 58, 759-766. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.097>.
- Park EH, Kim JA, Choi SH, Bin JH, Cheigh HS, Suk DH, Lee SC and Kim YH. 2007. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* from diarrhea patients. J Life Sci 17, 811-815.
- Park EJ, Lim JH and Lee SM. 2004. Determination and survey of fluoroquinolones residue in chicken muscle by HPLC with fluorescence detector. J Food Saf Hyg 19, 12-18.
- Park S, Kim H, Choi B, Hong CO, Lee SY, Jeon I and Lee KJ. 2019. The development and validation of a novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of fluoroquinolones residues in chicken muscle using modified QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) method. Korean J Vet Serv 42, 289-296. <https://doi.org/10.7853/kjvs.2019.42.4.289>.
- Peng L and Farkas T. 2008. Analysis of basic compounds by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in high-pH mobile phases. J Chromatogr A 1179, 131-144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.048>.
- Qin D, Zhao M, Wang J and Lian Z. 2020. Selective extraction and detection of norfloxacin from marine sediment and seawater samples using molecularly imprinted silica sorbents coupled with HPLC. Mar Pollut Bull 150, 110677. <https://doi.org/10.1016/j.marpollbul.2019.110677>.
- Schwarzenbach RP, Escher BI, Fenner K, Hofstetter TB, Johnson CA, Von Gunten U and Wehrli B. 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. Science 313, 1072-1077. <https://doi.org/10.1126/science.1127291>.
- Seifrtova M, Novakova L, Lino C, Pena A and Solich P. 2009. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. Anal Chim Acta 649, 158-179. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.07.031>.
- Serra-Compte A, Álvarez-Muñoz D, Solé M, Cáceres N, Barceló D and Rodríguez-Mozaz S. 2019. Comprehensive study of sulfamethoxazole effects in marine mussels: Bioconcentration, enzymatic activities and metabolomics. Environ Res 173, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.03.021>.
- Serra-Compte A, Pikkemaat MG, Elferink A, Almeida D, Diogène J, Campillo JA and Rodríguez-Mozaz S. 2021. Combining an effect-based methodology with chemical analysis for antibiotics determination in wastewater and receiving freshwater and marine environment. Environ Pollut 271, 116313. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116313>.
- USFDA (U.S. Food and Drug Administration). 2003. Approved Animal Drug Products (Green book). Retrieved from <https://www.fda.gov/animal-veterinary/products/approved-animal-drug-products-green-book> on Jul 13, 2022.
- Van Doorslaer X, Dwulf J and Van Langenhve H. 2014. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. Sci Total Environ 500-501, 250-269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.075>.
- Xie H, Wang X, Chen J, Li X, Jia G, Zou Y and Cui Y. 2019. Occurrence, distribution and ecological risks of antibiotics and pesticides in coastal waters around Liaodong Peninsula, China. Sci Total Environ 656, 946-951. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.449>.
- Zhang R, Kang Y, Zhang R, Han M, Zeng W, Wang Y and Yang Y. 2021. Occurrence, source, and the fate of antibiotics in mariculture ponds near the Maowei Sea, South China: Storm caused the increase of antibiotics usage. Sci Total Environ 752, 141882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141882>.
- Ziarrusta H, Val N, Dominguez H, Mijangos L, Prieto A, Usobiaga A and Olivares M. 2017. Determination of fluo-

roquinolones in fish tissues, biological fluids, and environmental waters by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 409, 6359-6370. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0575-4>.