

연구과제 연차실적·계획서

과제명	농산물 및 재배환경 중 주요 항생제 분석법 개발				
총연구기간	2017년 1월 ~ 2018년 11월	당해연도 연구기간	2018년 6월 ~ 2018년 11월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 안전성분석과 (용역)	연구 책임자	구분	직위	성명
			정	과장	김동호
			부	팀장	문지영
		참여 연구원	직위	성명	
			주무관	김종찬	
			주무관	김성연	
주무관	김민주				
		연구원	서동연		
참여부서	중앙대학교 산학협력단 (이찬 교수)				
사업구분	단년도 () 다년도 (√)	총 (2)개년 중 (2)차 연도			
연구결과 요약	<p>○ 국내의 항생제의 연구현황, 관련기준, 분석법 현황 자료조사</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항생제 5계열(sulfonamide계열, tetracycline계열, beta-lactam계열, macrolide계열, aminoglycoside계열)의 연구현황, 관련기준, 분석법 현황 등을 조사 - 여러 공인기관의 홈페이지나 문헌조사를 통한 자료를 수집 <p>○ 농산물 및 재배환경 중 주요 항생제의 기기분석조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수집한 자료를 바탕으로 대상 항생제에 대한 기기분석조건을 비교 및 수정하여 항생제 동시분석법(HPLC, LC-MS/MS)을 최적화 <p>○ 농산물 및 재배환경 중 항생제의 시료 전처리 조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수집한 분석법 자료를 바탕으로 항생제 전처리 조건을 확립 <p>○ 농산물 및 재배환경 중 항생제 분석법 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> - 직선성, 검출 및 정량한계, 회수율을 이용하여 확립된 분석법 검증 <p>○ 농산물 및 재배환경 400여건에 대한 모니터링 수행</p> <ul style="list-style-type: none"> - 농산물, 토양, 용수, 퇴비 400여건을 수집하여 모니터링을 수행 				

농산물 및 재배환경 중 주요 항생제 분석법 개발

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

- 2003년부터 2012년까지 국내 축산용 및 수산용으로 판매 된 항생제는 연간 약 936~1,553톤(평균 1,249톤)임. 2003년부터 2007년까지 약 1,368~ 1,553톤 판매되었으나, 2008년부터 감소함. 2011년과 2012년에는 1,000톤 이하로, 가장 판매량이 많았던 2005년 비해서 약 40% 감소함.
- 용도에 따라 항생제 판매량을 조사한 결과, 자가치료 및 예방용 항생제가 약 674~839톤(평균 735톤, 전체 판매량의 평균 59%)으로 가장 많이 판매됨. 2007년까지 배합사료 제조용으로 약 27~683톤(평균 423톤, 전체 판매량의 평균 40%)이 판매되었으나 2008년부터 점차 감소하여 2012년에는 약 27톤(약 3%) 정도가 유통됨. 그러나 자가치료 및 예방용으로 판매된 항생제는 2003년 658톤에서 2012년 828톤으로 약 26% 증가함. 수의사 처방용은 약 82~110톤 (평균 92톤, 전체 사용량 평균 7%)임.
- 항생제를 계열별로 조사한 결과, tetracycline 계열(평균 503톤), penicillin 계열(평균 183톤), sulfonamide 계열(평균 148톤)의 항생제가 가장 많이 판매됨. 가장 판매량이 많은 tetracycline 계열 항생제가 연간 약 282~724톤(평균 503톤) 판매되었으며, 2007년까지는 약 600톤 이상이 판매되었으나 2008년부터는 점차 감소하여 2011년부터는 약 300톤으로 약 50% 이상 감소함. 그 외 판매량이 비교적 높았던 penicillin 계열 및 sulfonamide 계열의 항생제는 연도별로 다소 차이는 있으나 점차 감소하는 추세를 나타냄.

나. 연구목표

- 농산물 및 재배환경 중 항생제 다중 동시분석법과 최적의 전처리 방법을 개발하고, 오염실태를 파악하여 안전한 농식품 생산에 기여하고자 함.
- 농산물 및 재배환경에 잔류하는 항생제의 다중 동시분석법을 개발하고, 오염도를 조사하기 위한 모니터링을 수행하여 안정성을 확보하고자 함.

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

- 1) 국내외 항생제의 연구현황, 관련기준, 분석법 현황 자료조사
 - HPLC 및 LC-MS/MS를 이용한 농산물 및 재배환경 중 항생제 다중 동시 분석법 개발을 위한 항생제 5종(sulfonamide계열, tetracycline계열, beta-lactam계열, macrolide계열, aminoglycoside계열)의 연구현황, 오염 실태사례, 관련기준, 분석법 현황 등을 조사.
 - 여러 공인기관의 홈페이지나 문헌조사를 통한 자료를 수집함.
- 2) 농산물 및 재배환경 중 주요 항생제의 기기분석조건 확립
 - 수집한 자료를 바탕으로 대상 항생제에 대한 기기분석조건을 수정하여 항생제 동시분석법(HPLC, LC-MS/MS)을 최적화함.
- 3) 농산물 및 재배환경 중 항생제의 시료 전처리 조건 확립
 - 수집한 분석법 자료를 바탕으로 항생제 전처리 조건을 확립
 - Modified QuEChERS 전처리법을 이용한 전처리법 연구
- 4) 농산물 및 재배환경 중 항생제 분석법 유효성 검증
 - 직선성, 검출 및 정량한계, 정밀도, 정확도, 회수율을 이용하여 확립된 분석법 검증

나. 연구 방법

1) 항생제 분석조건 확립

- 수집한 실험방법들의 항생제 분석조건을 확인함.
 - 작년에 확립한 항생제 분석조건을 바탕으로 시간 단축을 위해 개선함.
- (1) 작년에 확립한 분석조건
- Eclipse Plus C18 (dimensions: 4.6x100 mm, particle size: 3.5 mm) column 에 온도는 36°C, The flow rate 와 injection volume 은 각각 0.5 mL/min, 10 μ L이며 이동상으로 A: 0.1% formic acid in

water, B: 0.1% formic acid in acetonitrile을 이용함, gradient를 A(90%),B(10%)-(0 min), A(90%),B(10%)-(20 min), A(60%),B(40%)-(60 min), A(0%),B(100%)-(70 min), A(0%),B(100%)-(75 min), A(90%),B(10%)-(75.03 min), A(90%),B(10%)-(80 min)로 하여 분석, mass 조건으로 Source voltage을 5 kV, capillary temperature를 275°C, Sheath gas 와 Auxiliary gas를 35, 5 units로 하여 분석.

2) 전처리 조건 확립

- 식품의약품안전처에서 수산물 내 잔류항생제분석에 사용하는 Modified QuEChERS 전처리 방법에 대해 조사함. 이 자료를 바탕으로 농산물 및 재배환경 잔류항생제 분석에 효율적인 전처리방법이 되도록 수정하여 과제를 수행함. (잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서, 2014)

○ 기존 식약처 전처리법

- 검체 2g 측정
- 2mM 개미산암모늄용액(ammonium formate + ACN/Water(80/20, v/v) 10mL 첨가
- 1분간 Vortex 후 20분간 Shaking
- 15000 rpm에서 10분간 원심분리
- 상등액을 C18 흡착제 0.5g에 가함
- hexane 10 mL 첨가 후 30초간 Shaking
- 15000 rpm에서 5분간 원심분리
- 하층액 5mL를 시험관에 옮김
- 40°C 수욕상에서 1mL 남을 때까지 질소건조
- 0.2 μ m PVDF syringe filter로 filtering
- LC-MS/MS 측정

3) 항생제 동시분석법 유의성 검증

(1) 회수율

- ① 검량선 범위 내에서 서로 다른 3가지 농도를 선택하여 표준용액을 제조하여 이것을 이론값으로 함

- ② ①의 3가지 농도 각각을 식품 매트릭스에 spike하여 3회 반복 분석한 것을 측정값으로 함
- ③ 3회 반복 분석한 결과 값의 평균을 구하여 회수율 측정값을 산출함
* 회수율 = 측정값/이론값 × 100

(2) 직선성 (Linearity)

- 표준용액을 5~6 point 으로 분석하여 얻은 검량선의 직선성을 검토함
ex) 5, 10, 20, 50, 100, 300 µg/mL

(3) 검출한계(Limit of detection) 및 정량한계(Limit of quantification)

- 저농도로 제조된 표준용액 3개의 검량선에서 구할 수 있는 기울기 값과 중간농도를 7회 분석하여 구한 표준편차(SD)값을 이용하여 ICH에서 제안한 다음과 같은 계산식을 이용하여 산출함
- LOD = 3.3 × σ/S
- LOQ = 10 × σ/S (σ: 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)

(4) 정밀도 및 정확도 (Precision and Accuracy)

- Inter-day 측정 : 직선성에 해당하는 검량 농도 5 point를 지정하여 하루에 1회 분석씩 3일간 측정 후 합산하여 정밀도 및 정확도를 산출함
- Intra-day 측정 : 직선성에 해당하는 검량 농도 5 point를 지정하여, 검량선은 1회 분석하고, 검량선 외 다른 농도 4개의 농도에 대해서는 5회 분석 하여 그 결과 값을 이용해 정밀도 및 정확도(Precision)를 산출함

3. 결과 및 고찰

가. LC-MS/MS 동시분석법 개발을 기기분석조건 확립

1) 작년에 확립한 LC-MS/MS 분석조건

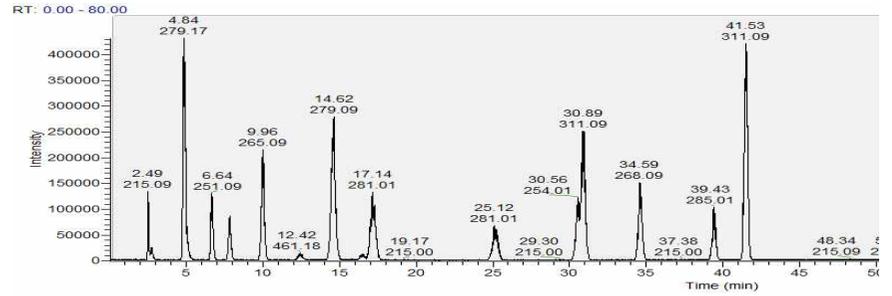


Figure 01. sulfonamide 계열 antibiotics LC-MS/MS 분석결과

Table 01. 작년에 확립한 HPLC 기기분석 조건

HPLC	Agilent Technologies 1260 infinity		
Column	Eclipse Plus C18(4.6x100, 3.5µm)		
injection volume	10µL		
time	Flow(ml/min)	MPA(%)	MPB(%)
initial	0.5	90	10
20	0.5	90	10
60	0.5	60	40
70	0.5	0	100
75	0.5	0	100
75.03	0.5	90	10
80	0.5	90	10
column temp.	36℃		
MPA	0.1% Formic acid in Water		
MPB	0.1% Formic acid in Acetonitrile		

- 작년에 확립한 분석조건의 경우 각 항생제 Peak가 잘 분리되었으나 시간이 80분으로 너무 오래 걸려서 개선 할 필요성이 있음. 그래서 이동상의 gradient를 조정하는 과정을 통하여 분석시간을 30분으로 단축시키는데 성공함.

2) 최종분석조건 확립

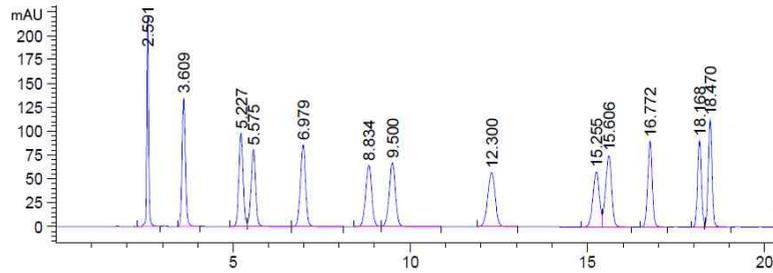


Figure 02. 최종 HPLC 분석법 확립

Table 02. 최종 HPLC 기기분석 조건

HPLC	Agilent Technologies 1260 infinity		
Column	Eclipse Plus C18(4.6x100, 3.5µm)		
injection volume	10µL		
time	Flow(ml/min)	MPA(%)	MPB(%)
initial	0.5	85	15
10	0.5	80	20
15	0.5	60	40
20	0.5	50	50
22	0.5	0	100
25	0.5	0	100
25.01	0.5	85	15
30	0.5	85	15
column temp.	36℃		
MPA	0.1% Formic acid in Water		
MPB	0.1% Formic acid in Acetonitrile		

- 작년에 확립한 LC-MS/MS 분석법을 개선한 최종 HPLC 분석법 확립
- 최종 확립한 HPLC 분석조건으로 13종의 sulfonamide 항생제(sulfisomidin, sulfaguandine, sulfadiazine, sulfamerazine, sulfaclozine, sulfathiazole, sulfadimethoxine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazole, sulfamethoxypridazine, sulfadoxin, sulfamethoxazole, sulfamethazine)의 표준물질 13종을 mix하여 분석을 진행함. 그 결과 sulfaguandine, sulfisomidin, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxypridazine, sulfamonomethoxine, sulfadoxin, sulfamethoxazole, sulfisoxazole, sulfaclozine, sulfadimethoxine의 순으로 분석이 되는 것을 확인함. 각 retention time은 2.5, 3.6, 5.2, 5.5, 6.9, 8.8, 9.5, 12.3, 15.2, 15.6, 16.7, 18.1, 18.4로 나타남.
- 최종 확립한 HPLC 분석조건으로 LC-MS/MS 조건을 확립하고 항생제 24종의 표준물질을 분석함.

3) 개선한 HPLC 분석조건으로 MS-Scan 분석

Table 03. 개선한 LC-MS/MS 기기분석 조건

LC-Mass spectrometer	Thermo Scientific LTQ-Velos				
Column	Eclipse Plus C18(4.6x100, 3.5µm)				
injection volume	10µL				
time	Flow(ml/min)	MPA(%)	MPB(%)		
0	0.5	85	15	Capillary Temp.(c)	275
10	0.5	80	20	Source Heater Temp.(c)	250
15	0.5	60	40	Sheath Gas Flow	35
20	0.5	50	50	Aux Gas Flow	5
22	0.5	0	100	Sweep Gas Flow	5
25	0.5	0	100	Normalized collision energy	35V
25.01	0.5	85	15		
30	0.5	85	15		
column temp.	36℃				
MPA	0.1% Formic acid in Water				
MPB	0.1% Formic acid in Acetonitrile				

4) LC-MS/MS에서 항생제 표준물질 분석

- Sulfonamide 계열 항생제 13종과 tetracycline 계열 3종, macrolide 계열 3종, beta-lactam계열 2종, aminoglycoside 계열 3종의 표준물질을 4ppm의 농도로 LC-MS/MS 분석해본 결과 positive조건에서 분석이 더 잘되었고 MS1값이 sulfaguandine은 215, sulfisomidin은 279, sulfadiazine은 251, sulfathiazole은 256, sulfamerazine은 265, sulfamethazine은 279, sulfamethoxypridazine은 281, sulfamonomethoxine은 281, sulfadoxin은 311, sulfamethoxazole은 254, sulfisoxazole은 268, sulfaclozine은 285, sulfadimethoxine은 311값이 나왔으며 oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline은 각각 461, 445, 479의 값이, tilmicosin은 435, spiramycin은 422, erythromycin은 734, penicillin G, amoxicillin은 각각 335, 366, streptomycin, neomycin, apramycin은 201, 205, 540이 나옴.

나. 전처리법

- 식품의약품안전처 수산물 내 잔류항생제분석에 사용하는 Modified QuEChERS 전처리 방법을 바탕으로 농산물 및 재배환경 잔류항생제 분석의 최적 전처리방법을 개발함.

1) 전처리법

- 검체 2g 측정
- 2mM 개미산암모늄용액(ammonium formate + ACN/Water(80/20, v/v) 10mL 첨가
- 1분간 Vortex 후 20분간 Shaking
- 15000 rpm에서 10분간 원심분리
- 상등액을 C18 흡착제 0.5g에 가함
- 30초간 Shaking
- 15000 rpm에서 5분간 원심분리
- 상층액 5mL를 시험관에 옮김
- 40°C 수욕상에서 1mL 남을 때까지 질소건고
- 0.2µm PVDF syringe filter로 filtering
- LC-MS/MS 측정

2) 전처리법에 따른 기기분석 결과

(1) HPLC

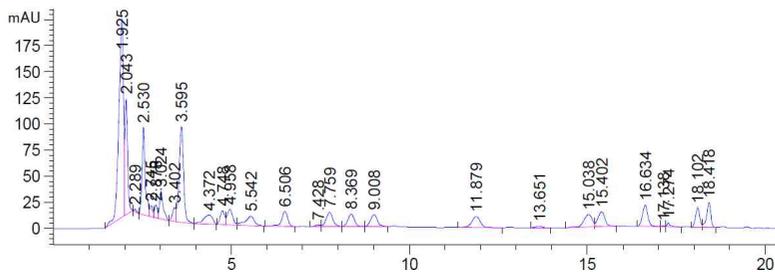


Figure 03. sulfonamide antibiotics 표준물질의 전처리 후 HPLC 분석결과

- 농산물 샘플에 sulfonamide계열 항생제 13종을 spiking한 후 개선한 방법으로 전처리. 그 후 HPLC로 분석시 13종의 sulfonamide계열 항생제가 검출되는 것을 확인할 수 있음. 따라서 해당 전처리법으로 sulfonamide계열 항생제를 분석할 수 있다고 판단함.

(2) LC-MS/MS

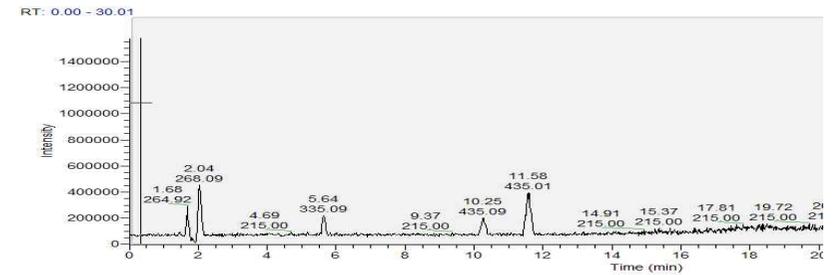


Figure 04. blank sample 전처리 후 LC-MS/MS 분석결과

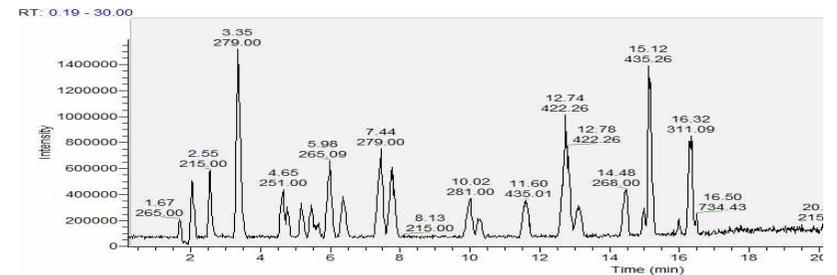


Figure 05. 24종 항생제를 spiking한 sample 전처리 후 LC-MS/MS 분석결과

- 샘플에 항생제 24종의 표준물질을 spiking 한 후 전처리를 거쳐 LC-MS/MS분석을 해본 결과 아미노 계열에 속하는 3종의 항생제 (streptomycin, neomycin, apramycin)를 제외한 나머지 4계열 21종의 항생제가 검출됨을 확인함.

다. LC-MS/MS spectrum 결과

- LC-MS/MS 분석을 통하여 얻은 항생제 21종에 대한 MS2값은 다음과 같음. Sulfaguandinine은 155, 172, 121, sulfisomidin은 185, 123, 203, sulfadiazine은 155, 107, 94, 157, sulfathiazole은 155, 108, 92, 189, sulfamerazine은 155, 171, 109, 107, 92, 189, 173, 246, sulfamethazine은 185, 203, 155, 123, sulfamethoxypyridazine은 155, 125, 107, 187, 214, 92, sulfamonomethoxine은 155, 214, 189, 125, 107, 262, 280, 91, sulfadoxin은 155, 108, 244, 92, sulfamethoxazole은 155, 187, 146, 189, 193, 235, 107, 145, 159, sulfisoxazole은 155, 112, 107, 91, sulfaclozine은 93, 155, 107, 129, 191, sulfadimethoxine은 155, 244, 217, 107, oxytetracycline은 442, 425, 446, tetracycline은 426, 409, 429,

tilmicosin은 695, 340, spiramycin은 699, 350, 702, 540, 522, penicillin G는 159, 175, erythromycin은 576, 716, 558, 552, 698, chlortetracycline은 462, 444, amoxicillin은 349으로 각각 이온화 됨.

라. 항생제 동시분석법 유의성 검증

1) 회수율

- ① 검량선 범위 내에서 서로 다른 3가지 농도(0.1ppm, 1ppm, 2ppm)를 선택하여 표준용액을 제조하여 이것을 이론값으로 함
 - ② ①의 3가지 농도 각각을 농산물, 토양, 용수 매트릭스에 spike하여 3회 반복 분석한 것을 측정값으로 함
 - ③ 이론값은 추출 후 spiking 한 것으로 함.
 - ④ 3회 반복 분석한 결과 값의 평균을 구하여 회수율 측정값을 산출함
* 회수율 = 측정값/이론값 × 100
- Sulfonamide 계열 항생제는 대부분의 경우 회수율이 높게 나타남. 그러나 Tetracycline 계열의 경우 토양에서는 항생제 회수가 되지 않은 것을 확인할 수 있었고 erythromycin의 경우 3가지 매트릭스, 3가지 농도에서 전부 회수율이 낮게 나타난 것을 확인함. 그 밖의 나머지 항생제들은 특정 농도에서는 회수율이 높고 특정농도에서는 회수율이 낮게 나타나는 경향을 보임.

2) 직선성 (Linearity)

- 표준용액을 5~6 point 으로 분석하여 얻은 검량선의 직선성을 검토
- LC-MS/MS 분석에서 0.05ppm, 0.1ppm, 0.2ppm, 0.5ppm, 1ppm, 2ppm의 농도로 직선성을 측정함.

Table 04. LC-MS/MS에서 측정된 항생제 19종의 직선성

	Sulfaguandine	Sulfisomidin	Sulfadiazine	Sulfathiazole	Sulfamerazine	
R ²	0.9989	0.9962	0.9987	0.9986	0.9987	
	Sulfamethazine	Sulfamethoxy-pyridazine	Sulfamono-methoxine	Sulfadoxin	Sulfamethoxazole	
R ²	0.9994	0.9979	1	0.9982	0.9998	
	Sulfisoxazole	Sulfaclozine	Sulfadimethoxine	Oxytetracycline	Tetracycline	
R ²	1	0.9972	0.9998	0.9971	0.9977	
	PenicillinG	Erythromycin	Chlortetracycline	Amoxicillin	Tilmicosin	Spiramycin
R ²	0.9999	0.9999	0.9993	1	x	x

- 직선성 측정 시 19종의 항생제의 R² 값이 0.99 이상으로 나타남. tilmicosin과 spiramycin의 경우 직선성을 구하기 위해 여러 번 반복 실험하였으나 그 결과 값이 일정하지 않아 직선성을 구할 수 없었음.

3) 검출한계(Limit of detection) 및 정량한계(Limit of quantification)

- 저 농도로 제조된 표준용액 3개의 검량선에서 구할 수 있는 기울기 값과 중간농도를 7회 분석하여 구한 표준편차(SD)값을 이용하여 ICH에서 제안한 다음과 같은 계산식을 이용하여 산출함
- LOD = 3.3 × σ/S
- LOQ = 10 × σ/S (σ: 반응의 표준편차, S: 검량선의 기울기)
- 검출한계, 정량한계 측정을 위해서 항생제 표준물질 0.05, 0.1, 0.2 μg/mL의 농도에서 검량선을 작성한 뒤 위의 식에 대입하여 LOD, LOQ를 구함.

Table 05. LC-MS/MS에서 21종 항생제 LOD, LOQ

	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Sulfonamides		
Sulfaguandine	0.022	0.068
Sulfisomidin	0.005	0.017
Sulfadiazine	0.012	0.036
Sulfathiazole	0.011	0.035
Sulfamerazine	0.010	0.031
Sulfamethazine	0.011	0.034
Sulfamethoxypyridazine	0.007	0.021
Sulfamonomethoxine	0.011	0.033
Sulfadoxin	0.009	0.030
Sulfamethoxazole	0.020	0.063
Sulfisoxazole	0.014	0.042
Sulfaclozine	0.012	0.036
Sulfadimethoxine	0.022	0.067
Tetracyclines		
Oxytetracycline	0.026	0.080
Tetracycline	0.008	0.025
Chlortetracycline	0.012	0.036
Macrolides		
Erythromycin	0.010	0.030
Tilmicosin	-	-
Spiramycin	-	-
Beta-lactams		
PenicillinG	0.015	0.048
Amoxicillin	0.010	0.033

4) 정밀도 및 정확도 (Precision and Accuracy)

Table 06. LC-MS/MS에서 21종 항생제 정밀도-interday

Precision(%) , interday					
Conc.(µg/mL)					
	0.1	0.2	0.5	1	2
Sulfaguanidine	7.12	1.17	6.27	3.67	3.51
Sulfisomidin	2.17	3.32	0.27	2.57	1.23
Sulfadiazine	3.56	4.55	4.56	1.68	0.54
Sulfathiazole	3.76	2.71	2.02	2.43	2.89
Sulfamerazine	3.09	2.11	1.05	1.80	1.05
Sulfamethazine	3.30	1.93	2.42	3.39	1.47
Sulfamethoxyipyridazine	2.26	2.28	1.11	2.18	0.93
Sulfamonomethoxine	3.64	2.92	5.00	2.85	1.01
Sulfadoxin	3.36	4.63	0.17	2.23	1.29
Sulfamethoxazole	6.60	2.36	1.98	2.40	0.66
Sulfisoxazole	4.03	6.21	1.34	0.99	0.44
Sulfaclozine	3.81	2.04	6.09	2.74	3.80
Sulfadimethoxine	6.39	2.70	2.78	3.10	4.63
Oxytetracycline	7.77	4.71	5.12	2.99	2.65
Tetracycline	3.15	9.12	2.38	1.33	4.67
PenicillinG	4.31	2.99	1.80	3.41	2.98
Erythromycin	5.77	2.82	1.40	3.29	2.87
Chlortetracycline	4.43	6.64	3.46	4.31	3.81
Amoxicillin	3.43	1.75	2.83	2.60	0.82

Table 07. LC-MS/MS에서 21종 항생제 정밀도-intraday

Precision(%) , intraday				
Conc.(µg/mL)				
	0.15	0.4	0.8	1.5
Sulfaguanidine	2.34	1.17	3.67	6.27
Sulfisomidin	3.58	3.32	2.57	0.27
Sulfadiazine	12.15	4.55	1.68	4.56
Sulfathiazole	7.02	2.71	2.43	2.02
Sulfamerazine	7.73	2.11	1.80	1.05
Sulfamethazine	1.06	1.93	3.39	2.42
Sulfamethoxyipyridazine	2.25	2.28	2.18	1.11
Sulfamonomethoxine	0.61	2.92	2.85	5.00
Sulfadoxin	2.65	4.63	2.23	0.17
Sulfamethoxazole	4.77	2.36	2.40	1.98
Sulfisoxazole	2.46	6.21	0.99	1.34
Sulfaclozine	2.73	2.04	2.74	6.09
Sulfadimethoxine	0.68	2.70	3.10	2.78
Oxytetracycline	4.97	4.39	2.99	5.12
Tetracycline	3.72	9.12	1.33	2.38
PenicillinG	5.98	2.99	3.41	1.80
Erythromycin	7.58	2.82	3.29	1.40
Chlortetracycline	3.87	6.64	4.31	3.46
Amoxicillin	4.82	1.75	2.60	2.83

Table 08. LC-MS/MS에서 21종 항생제 정확도-interday

Accuracy(%) , interday					
Conc.(µg/mL)					
	0.1	0.2	0.5	1	2
Sulfaguanidine	86.24	95.21	94.98	96.06	91.29
Sulfisomidin	90.63	106.46	107.96	105.07	106.90
Sulfadiazine	84.05	91.33	99.21	96.72	92.26
Sulfathiazole	87.50	96.50	106.19	106.67	100.51
Sulfamerazine	88.59	103.58	101.36	108.66	103.87
Sulfamethazine	89.12	95.91	98.54	99.21	95.47
Sulfamethoxyipyridazine	84.19	98.81	109.40	106.73	100.51
Sulfamonomethoxine	102.65	101.68	105.00	103.07	103.80
Sulfadoxin	83.01	96.84	108.14	105.73	99.81
Sulfamethoxazole	97.11	100.68	99.90	102.81	100.49
Sulfisoxazole	95.02	92.66	93.20	92.72	93.58
Sulfaclozine	107.33	108.11	82.30	88.89	94.79
Sulfadimethoxine	100.77	90.91	95.86	94.20	96.11
Oxytetracycline	105.63	91.41	86.73	94.84	100.79
Tetracycline	105.48	86.85	86.26	101.46	101.17
PenicillinG	103.95	109.47	93.76	106.81	97.15
Erythromycin	93.50	83.62	94.29	93.51	93.91
Chlortetracycline	94.04	106.62	104.13	100.19	105.31
Amoxicillin	103.31	109.67	103.05	101.30	101.52

Table 09. LC-MS/MS에서 21종 항생제 정확도-intraday

Accuracy(%) , intraday				
Conc.(µg/mL)				
	0.15	0.4	0.8	1.5
Sulfaguanidine	103.82	101.10	95.45	98.26
Sulfisomidin	102.87	106.04	102.77	101.05
Sulfadiazine	83.52	96.38	96.17	102.25
Sulfathiazole	78.62	98.13	106.49	107.16
Sulfamerazine	100.29	101.29	107.82	96.03
Sulfamethazine	93.24	99.92	98.79	100.81
Sulfamethoxyipyridazine	90.72	105.69	105.96	103.68
Sulfamonomethoxine	96.89	98.95	103.35	103.53
Sulfadoxin	92.30	102.24	105.13	101.49
Sulfamethoxazole	95.22	100.34	102.84	99.72
Sulfisoxazole	89.53	90.99	92.88	92.31
Sulfaclozine	99.69	102.84	89.32	80.23
Sulfadimethoxine	92.91	87.11	94.58	93.79
Oxytetracycline	97.89	89.60	96.46	80.13
Tetracycline	99.67	80.94	103.26	81.42
PenicillinG	109.49	101.70	107.55	109.97
Erythromycin	93.16	73.42	94.59	88.66
Chlortetracycline	86.24	103.37	107.52	102.47
Amoxicillin	93.72	105.48	108.72	106.80

○ 정밀도는 0.17~12.15%, 정확도는 73.42~109.97%의 결과를 얻었음.

마. 모니터링 진행

1) 모니터링 시료 수집

- 농산물, 토양, 용수, 퇴비를 대상으로 모니터링 진행
- 피산, 예산, 나주, 안동, 대전 등에서 샘플 406건을 수집하여 모니터링 시행
- 농산물 206건, 토양 100건, 용수 65건, 퇴비 35건
- 총 406건의 샘플 중 예산에서 74건(토양 21건, 용수 21건, 농산물 32건), 피산에서 64건(토양 12건, 용수 12건, 농산물 40건), 안동에서 60건(토양 17건, 용수 17건, 26건), 나주에서 68건(토양 12건, 용수 12건, 농산물 44건), 국립농산물품질관리원에서 105건(토양 35건, 퇴비 35건, 농산물 35건) 총 308건의 샘플을 수집하였음.

2) 모니터링 결과

- 농산물 및 재배환경 샘플 406건에 대한 모니터링 결과 충남아산토양, 충북보은토양, 경기양평토양, 경남밀양토양, 강원속초양양토양, 전북김제토양, 경남밀양퇴비, 전북김제퇴비, 경기여주퇴비, 전북부안퇴비, 전북김제복숭아에서 tilmicosin이 검출됨. 또한 경기양평토양, 강원속초양양토양, 경남밀양퇴비, 강원속초양양퇴비, 전북김제퇴비에서 spiramycin이 검출됨을 확인함.
- 농산물 및 재배환경 샘플 406건 중 16건에서 항생제가 검출됨. 검출된 항생제는 macrolide 계열인 tilmicosin과 spiramycin으로 tilmicosin은 11건, spiramycin은 5건의 샘플에서 검출됨. 검출된 2종의 항생제는 LC-MS/MS상에서 반복성이 떨어져서 직선성, LOD, LOQ를 구할 수 없었기에 정성만 가능하고 정량은 불가능 함.

사. 요약

- 21종의 항생제를 분석할 수 있는 조건을 확립함. Eclipse Plus C18(4.6x100, 3.5 μ m) 컬럼을 사용하였으며 온도를 36도, 0.1% formic acid in water와, 0.1% formic acid in Acetonitrile을 이동상으로 이용하였음. Gradient(time, 0.1% formic acid in water)를 (0,85), (10,80), (15,60), (20,50), (22,0), (25,0), (25.01,85), (30,85)로 하여 분석함. 21종의 항생제를 LC-MS/MS 분석해본

결과 positive조건에서 분석이 더 잘되었고 MS1값이 sulfaguanidine은 215, sulfisomidin은 279, sulfadiazine은 251, sulfathiazole은 256, sulfamerazine은 265, sulfamethazine은 279, sulfamethoxypyridazine은 281, sulfamonomethoxine은 281, sulfadoxin은 311, sulfamethoxazole은 254, sulfisoxazole은 268, sulfaclozine은 285, sulfadimethoxine은 311값이 나왔으며 oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline은 각각 461, 445, 479의 값이, tilmicosin은 435, spiramycin은 422, erythromycin은 734, penicillin G, amoxicillin은 각각 335, 366, streptomycin, neomycin, apramycin은 201, 205, 540이 나옴.

- 식약처 방법을 변경하여 전처리법으로 사용함. 검체에 2mM 개미산암모늄 용액을 넣고 20분간 shaking 함. 그 후 원심분리를 10분간 하여 상등액에 C18 흡착제를 넣고 섞고 다시 원심분리를 함. 상등액을 시험관에 옮겨 1mL까지 질소건고 시킨 후 필터링하여 LC-MS/MS를 측정함. 샘플에 항생제 24종의 표준물질을 spiking 한 후 전처리를 거쳐 LC-MS/MS분석을 해본 결과 아미노 계열에 속하는 3종의 항생제를 제외한 나머지 4계열 21종의 항생제가 검출됨을 확인함.
- 3가지 매트릭스, 3가지 농도로 회수율 실험을 진행함. Sulfonamide 계열 항생제는 대부분의 경우 회수율이 높게 나타남. 그러나 Tetracycline 계열이 토양에서는 회수가 되지 않았고 erythromycin의 경우 3가지 매트릭스, 3가지 농도에서 전부 회수율이 낮게 나타남. 나머지 항생제들은 특정 농도에서는 회수율이 높고 특정농도에서는 회수율이 낮게 나타남.
- 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2ppm의 농도로 직선성을 측정함. 2종의 항생제(tilmicosin, spiramycin)을 제외한 19종의 항생제는 R^2 값이 0.99이상으로 나타남. LOD, LOQ는 0.05, 0.1, 0.2ppm에서 검량선을 작성하여 구함. LOD는 0.005~0.026ppm, LOQ는 0.017~0.080ppm으로 나타남.
- Interday와 intraday로 나누어서 정밀도 정확도 실험을 진행함. Inter-day는 직선성에 해당하는 검량 농도 5 point 를 지정하여 하루에 1회 분석씩 3일간

측정 후 합산하여 정밀도 및 정확도를 산출함. Intra-day 는 직선성에 해당하는 검량 농도 5 point 를 지정하여, 검량선은 1회 분석하고, 검량선 외 다른 농도 4개의 농도에 대해서는 5회 분석 하여 그 결과 값을 이용해 정밀도 및 정확도(Precision)를 산출함. 밀도는 0.17~12.15%, 정확도는 73.42~109.97%를 얻음.

- 국내 지역에서 농산물, 토양, 용수, 퇴비 406건을 수집하여 모니터링을 시행함. 농산물 및 재배환경 샘플 406건 중 16건에서 항생제가 검출됨. 검출된 항생제는 macrolide 계열인 tilmicosin과 spiramycin으로 tilmicosin은 11건, spiramycin은 5건의 샘플에서 검출됨.

4. 결론

- 작년 개발한 LC-MS/MS 분석방법의 gradient조절을 통하여 분석시간을 단축시킨 새로운 LC-MS/MS 분석조건을 확립함.
- 식품의약품안전처에서 수산물을 분석할 때 사용하던 전처리 방법을 농산물 전처리에 알맞게 변형하여 새로운 전처리 방법을 최적화함.
- 최적화한 Modified QuEChERS 전처리법으로 먼저 sulfonamide 계열 항생제를 주입한 샘플을 전처리하여 HPLC분석을 함. 그 결과 13종의 sulfonamide계열 항생제가 잘 검출이 되었다고 판단되어 추가적인 MS/MS 분석을 시행하였음.
- 샘플에 24종의 항생제를 주입하여 최적화한 Modified QuEChERS 전처리법으로 전처리를 하여 LC-MS/MS 분석을 실시함. 그 결과 24종의 항생제 중 aminoglycoside계열 3종을 제외한 21종의 항생제가 검출이 되었음을 확인함.
- LC-MS/MS에서의 Method validation을 진행함, 직선성, LOD, LOQ, 정밀도, 정확도, 회수율을 검증함
- 406종의 농산물, 토양, 용수, 퇴비 샘플에서 모니터링을 시행하여 16건의 샘플에서 tilmicosin과 spiramycin 항생제가 검출됨을 확인. 해당 항생제는 LC-MS/MS 상에서 반복성이 떨어져서 직선성, LOD, LOQ를 구할 수 없었기에 정성만 가능하고 정량은 불가능 함.
- 이 실험을 통해서 sulfonamide 계열, tetracycline 계열, macrolide 계열, Beta-lactam 계열 항생제 21종의 동시분석법 개발이 완료됨.

5. 참고문헌

- 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링, 2015, 농림축산식품부, 농림축산검역본부, 식품의약품안전평가원
- 국내 가축 및 수산에서 항생제 판매 추이(2003-2012), 임숙경 외, Korean J Vet Res(2014) 54(2) : 81~86
- 동물용 항생제의 환경영향과 잔류 항생제 분석 기술, 2016, 국가환경정보센터
- 식품 중 잔류동물용의약품 안전성 연구 (I);2011년 잔류동물용의약품 시험법 개발 및 잔류실태조사, 식품의약품안전평가원
- 국내 우분 퇴비화 시설 인근 농경지 및 수계 중 Tetracycline 및 Sulfonamide 계열 항생물질의 분포특성, 2009, 임정은 외
- Transport of Selected Veterinary Antibiotics (Tetracyclines and Sulfonamides) in a Sandy Loam Soil: Laboratory-Scale Soil Column Experiments, 2009, 이현용 외
- Solid phase extraction coupled to liquid chromatographytandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg, Pailler J. Y. et al, *Science of The Total Environment*, 2009, 407 (16), 4736~4743
- Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance, Kolpin D. W. et al, *Environmental Science & Technology*, 2002, 36 (6), 1202~1211
- 축수산식품 중 테트라사이클린 및 설파계 동물용의약품 잔류실태조사, 김동술, 원소영, 장혜숙, 식품의약품 안전청연구보고서, 2008
- Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, 2003, M. Silvia D ı “Laz-Cruz, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22
- Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG), 2006, water research, vol. 40, 2427-35

- Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. Martinez-Carballo, E, 2007, Environ Pollut. 2007 Jul;148(2):570-9
- LC-MS/MS를 이용한 육류 중 페니실린계 항생제 8종의 동시분석 및 적용성 검증, 2014, 김명애 외, J. Fd Hyg. Safety, Vol. 29, No. 2, pp. 131~140
- 국내 유통 축·수산물 중 페니실린계 동물용의약품에 대한 잔류실태조사, 송지영 외, *ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 2012, 25 (4), 257-264
- Macrolide계 항생물질 동시분석법 확립 및 모니터링, 2010, 박상욱 외, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 42, No. 3, pp. 287~291
- Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland, Christa S. McArdell et al, *Environmental Science & Technology*, 2003, 37 (24), 5479-5486
- Analysis and Monitoring of Residues of Aminoglycoside Antibiotics in Livestock Products, 2011, 강영운, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 43, No. 1, pp. 1~5
- 벌꿀 중 동물용의약품 잔류량 모니터링, 강은귀 외, 한국식품과학회지, 2010, 42 (6), 643-647
- LC-MS/MS를 이용한 육류 중 아미노글리코사이드계 항생제 9종의 동시분석 및 적용성 검증, 2014, 조윤제 외, J. Fd Hyg. Safety Vol. 29, No. 2, pp. 123~130
- 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서, 2014, 식품의약품안전처 잔류물질과