

# Liquid Chromatography/Mass Spectrometry 를 이용한 축산물중 잔류마크로라이드계 항생물질 분석법 연구

축산물부 시험팀

황래홍 · 윤은선 · 김연주 · 김동언 · 양윤모 · 이정학 · 이병동

## A study on determination of residual macrolide antibiotics in livestock products by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry

*Livestock Products Experiment Team*

**Lae-hwong Hwang, En-sun Yun, Yoen-joo Kim, Dong-eon Kim,  
Yoon-mo Yang, Jung-hark Lee, and Byung-dong Lee**

### Abstract

This study was carried out to simultaneous determination of macrolide antibiotics (tylosin, spiramycin, erythromycin) in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry(LC/MS). Macrolides were extracted from tissue with acetonitrile, and the extract was purified with a sep-pak C<sub>18</sub> cartridge and eluted with 0.1M methanolic ammonium acetate. The 3macrolides were analyzed by LC/MS on XTerra C<sub>18</sub> column with 0.1%TFA(trifluoroacetic acid)-Methanol in a gradient mode as mobile phase, and identified by positive chemical ionization with selective ion monitoring at 50-1000 mass range. The procedure confirms the presence of each macrolide at 50mg/kg in spiked sample. The method affords good specificity for macrolide antibiotics by structural information(molecular weight), but more work is needed to improve sensitivity and chromatographic separation.

Key words : macrolide antibiotics, bovine muscle, LC/MS

### 서론

축산물은 식생활의 영향학적 측면이나 경제적인 측면에서의 중요성을 감안할때 그 생산과정에서 직간접적으로 오염가능한 유해잔류물질의 검사능력 향상은 국가적으로 매우 중요한 과제라 할수있겠다.

축산물에 사용되는 유해잔류물질중 마크로라이드계 항생물질은 그람양성균과 Mycoplasma spp.에 강한 항균작용을 지니고 있어 호흡기계 치료제 또는 성장촉진을 위한 사료첨가제 등으로 사용되고 있으나 인체에 독성효과나 과민반응을 유발할수 있으며, 또한 내성균을 생성할수도 있는 것으로도 알려져 있다.<sup>1-3)</sup>

이에 선진국가에서는 이들의 잔류방지를 위해 잔류허용기준을 철저히 준수하도록 하는 등 많은 노력을 기울이고 있는 실정인데 EU(European Union)의 경우 이들 항생물질에 대한 최대잔류허용한계를 spiramycin, tylosin 및 erythromycin 등에 대해 각각 200 $\mu$ g/kg, 100 $\mu$ g/kg, 400 $\mu$ g/kg 으로 규정하고 있다.<sup>1,2)</sup>

한편 국내에서도 이들 선진국처럼 엄격한 허용기준을 두고 시행하고 있으나 검사기술 면에서는 아직 많은 노력이 요구되고 있는 실정이다.

현재 축산물에 대한 유해잔류물질의 검사는 미생물학적 검사에 의한 간이정성 검사와 GC, LC, GC/MS, LC/MS 등 정밀장비에 의한 정량검사가 이루어지고 있으나 일부 항생물질등은 그 특성상 Microbial inhibition test, Microbial receptor test, Immunological method, STOP(swab test on premises)+TLCB(thin layer chromatography bioautography) 등의 미생물학적 분석에 의존하고 있는 실정이다.<sup>4-8)</sup>

이와같은 미생물학적 방법들은 특이적이지 못하여 정확한 정량검사에 어려움이 있으며 이러한 비특이성을 해결하기 위하여 최근에는 유도체화 방법<sup>4,8,9)</sup>이나 Automated liquid chromatography cleanup method<sup>8,10,11,12,13)</sup> 등 새로운 방법이 시도되고 있다.

이에 본 시험에서는 LC/MS를 이용하여 축산물중 마크로라이드계 항생물질 확인정량 방법을 연구하여 축산물에 대한 유해잔류물질 검사능력 향상에 기여코자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시 약

Acetonitrile, methanol 은 HPLC용(J.T Baker, 미국)을 사용하였으며 iso-octane, ammonium acetate, trifluoroacetic acid, dipotassium hydrogen phosphate, 5% dimethyldichlorosilane in toluene (Supelco, 미국)은 시약특급을 사용하였다.

Spiramycin, tylosin, erythromycin(Sigma, 미국) 각 표준품은 최순품을 사용하였다.

#### a) 시험용액 조제

- Elution solution: 0.1M methanolic ammonium acetate

- 0.2M buffer solution: 34.84g dipotassium

hydrogen phosphate을 증류수 1 l 에 녹였다

- Mobile phase: 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) 용액과 100% methanol을 gradient mode로 사용하였다

### 2. 장비

Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS)는 HP1100 series(Hewlett Packard, 미국)를 사용하였으며 분석칼럼은 XTerra C<sub>18</sub>(5 $\mu$ m, 3.9x150mm)을, 기기운영은 chemstation을 사용하여 분석하였다(Table 1).

전처리에 사용되는 vaccum manifold 는 Supelco사의 visiprep DL을 SPE cartridges 는 waters의 Sep-pak C<sub>18</sub> plus cartridge(500mg)를 사용하였으며 감압농축기는 heidolph vv2001(독일)을 사용하였다.

### 3. 시료 및 표준용액 조제

#### 1) 시료

2001년 3월 축협공판장에서 생산되는 우육의 대퇴부 근육 약 1Kg을 구입하여 가시지방을 제거한후 charm II를 이용하여 마크로라이드계 항생물질이 잔류하지 않은 것으로 확인된 시료를 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하여 사용하였다.

#### 2) 표준용액 조제

Spiramycin, tylosin, erythromycin 각 표준품을 메탄올에 용해하여 100ppm 농도로 조제 하고 냉장보관 후 실험시 이를 증류수로 희석하여 사용 하였다.

### 4. 시험방법

#### a) 시료 전처리

세절한 시료 5g을 50ml test tube에 넣고 아세트니트

**Table 1.** Analytical conditions of macrolide antibiotics by LC/MS

Column	XTerra C <sub>18</sub> (5 $\mu$ m, 3.9x150mm)
Mobile phase	0.1%TFA-MeOH with elution gradient 1) 0 min, 0.1%TFA (100) 2) 1min, 0.1%TFA(100) 3) 5 min, MeOH(100) 4) 20 min, MeOH(100) 5) 25min, 0.1%TFA(100)
Flow rate	0.5ml/min
Mass range	50-1000
MSD mode	SIM
Injection vol.	50 $\mu$ l

릴 10ml를 가하여 균질화 한후 tube mixer로 10분간 voltex 하였다. 이에 iso-octane 10ml를 가하여 다시 5분간 약하게 voltex 한후 5000rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 아세트니트릴층을 취하여 농축기로 약 1ml까지 농축한 다음 농축액을 15ml tube에 옮기고 아세트니트릴을 가하여 2ml로 하였으며 여기에 증류수 12ml를 가하여 잘 혼합하였다.

#### b) SPE column cleanup

Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 10ml 1회용 주사기를 연결하여 vaccum manifold 에 고정 한 다음 5% dimethyldichlorosilane 1ml 와 methanol, 증류수 10ml씩을 분당 2-3ml 속도로 차례로 흘려보내 activation 하였다.

Activation 한 C<sub>18</sub> column 에 추출용액을 같은 속도로 통과시킨후 증류수 10ml로 세척하고 2분동안 공기를 통하여 건조 시킨후 0.1M methanolic ammonium acetate 1.5ml로 용출하였다. 용출액에 인산완충액 1.5ml를 가하여 0.5ml 또는 그 이하로 농축한후 인산완충액을 가하여 전량을 1ml로 하여 0.45µm 필터로 필터후 50µl를 기기에 주입하였다.

#### c) Mass spectrometer condition

Drying gas 유속은 13 l/min, nebulizer pressure는 30psig, drying gas temperature는 350°C, capillary voltage 는 3500V로 하여 PCI mode로 분석하였으며 SIM mode로 monitoring 하였다(Table. 2).

## 결과 및 고찰

마크로라이드계 항생물질인 spiramycin, tylosin, erythromycin을 분석하기 위해 먼저 uv detector를 이용하여 보았으나 이들 약제들간의 파장의 차이(spiramycin 232nm, tylosin and erythromycin 287nm)와 머무름시간의 차이로 인해 동시분석에 어려움이 있었는데 이는 Juhel-gaugain 등이 시험한 결과

**Table 2.** Ions monitored in SIM

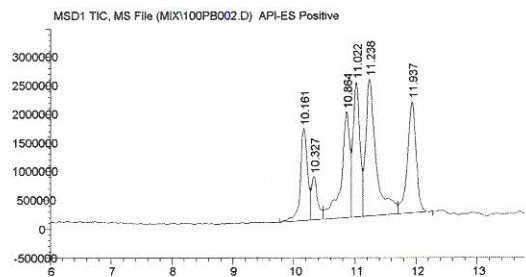
Compound	m/z at PCI
Spiramycin	843.5 540.5 522.5
Tylosin	917.0 742.8 582.7
Erythromycin	734.8 576.7 522.6

와 일치하는 것으로 조사되었으며 본 시험에서는 UV대신 MS를 이용하여 분석하기 위해 이동상용매와 칼람 그리고 전처리 방법을 시험하였다.

이동상 용매로는 0.1%TFA 와 MeOH를 사용하였는데 이는 Delepine등이 MS를 이용한 분석시 사용된 이동상 용매로, Delepine등은 0.1%TFA를 이동상 용매로 사용했을 때 검출감도가 formic acid등 다른 용매를 사용했을 때 보다 우수하였다고 보고 하였으며 Juhel-gaugain 등의 시험에서도 같은결과를 보여 본시험에서도 이를 이동상 용매로 사용하여 분석하였다.

칼람에 있어서는 Bondapak C<sub>18</sub>(3.9×300mm,10µm) 와 Novapak C<sub>18</sub>(3.9×150mm,5µm) 및 XTerra C<sub>18</sub>(5µm, 3.9×150mm)을 사용하여 시험한 결과 Bondapak C<sub>18</sub> 칼람에서는 spiramycin과 tylosin의 머무름시간 차이가 10분이 넘었으며 Novapak C<sub>18</sub>칼람에서는 완전한 피크분리가 이루어지지 못하는 경향이 있는 것으로 조사 되었다. XTerra C<sub>18</sub>칼람에서는 감도가 높고 일정한 머무름시간을 보였으나 피크분리가 100%완전하지는 않은 것으로 조사 되었다. 그러나 본 시험은 MS spectra로 확인이 가능하기 때문에 비록 100% 분리되지는 않았지만 감도나 머무름시간에서 우수한 XTerra C18칼람이 다른 칼람보다 적합한 것으로 조사 되었으며 이러한 분석조건에 따라 3종의 마크로라이드계 항생물질을 분석한 결과 spiramycin 10.16, tylosin 10.86, erythromycin 11.02분의 머무름시간을 보여 이들 약제들이 10분에서 12분 사이에 적절히 분리되는 것으로 조사 되었다(Fig. 1)

전처리 과정에서는 sep-pak C<sub>18</sub>와 bond elut diol을



**Fig. 1.** LC/MS ion current chromatogram of each drugs, obtained under PCI mode.





또한 sep-pak C<sub>18</sub> cartridge활성화시 Juhel-gaugain 등의 시험방법에서와 같이 계면활성물질인 5% dimethyldichlorosilane을 사용 하였는데 예비시험에 서는 이를 사용하지 않은 것과 큰 차이가 없었으며 그 원인은 확인할수 없었다.

본 시험에 의한 검출감도는 약 50 $\mu$ g/kg 으로 Delepine등의 시험결과와 일치 하였으나 Juhel-gaugain등의 시험결과 보다는 감도가 다소 낮은 것으로 조사 되었는데 이는 Juhel-gaugain등은 UV detector에 의해 단지 피크인지 가 가능한 농도를 조사한 것인 반면 본시험이나 Delepine등은 확인정량이 가능한 농도를 조사한 것이기 때문에 생긴 차이로 사료된다.

본 시험을 통하여 LC/MS를 이용하여 축산물에 대한 마크로라이드계 항생물질의 확인정량이 가능함을 알수 있었으나(Fig. 2-5) 검출감도와 피크분리능력 향상을 위한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료되며 또한 마크로라이드계 항생물질뿐 아니라 다른 유해성 잔류물질들에 대한 확인정량 방법들도 모색해 나가야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS)를 이용하여 축산물(소 근육)중 잔류 마크로라이드계 항생물질을 분석하는 방법을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 마크로라이드계 항생물질은 아세트니트릴로 추출 하여 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge를 사용하여 Clean-up 하였으며 0.1M methanolic ammonium acetate로 용출 하였다.
2. 이동상용매로는 0.1 %TFA(trifluoroacetic acid) 및 100 %Methanol을 Gradient로 사용하고 칼럼으로는 XTerra C<sub>18</sub> 칼럼(5 $\mu$ m, 3.9 $\times$ 150mm)을 사용하였으며, MS는 PCI(Positive chemical ionization) 및 SIM(selective ion monitoring) mode로 50-1000 Mass 범위에서 분석 하였다.
3. 본 시험으로 우육(근육)에 대한 분석결과 검출한계는 Spiramycin, Tylosin, Erythromycin 각각 50  $\mu$ g/kg 이었다.

## 참 고 문 헌

1. Delepine,B. Hurt-Pessel,D. and Sanders,P.: Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. JAOAC Int. 79:397-404(1996).
2. Juhel-Gaugain,M. Anger,B. and Laurentie, M.: Multiresidue chromatographic method for the determination of macrolide residues in muscle by high-performance liquid chromatography with UV detection. JAOAC Int. 82:1046-1052(1999).
3. Chan,W. Gerhardt,G.C. and Salisbury,C.D.: Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by reversed-phase liquid chromatography. JAOAC Int. 77:331-333(1994).
4. Boison,J.O. Salisbury,C.D. Waynechan and Macneil,J.D.: Determination of penicillin G residues in edible animal tissues by liquid chromatography. JAOAC Int. 74:497-501(1991).
5. eetschen,U. and Petz,M.: Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk.JAOAC Int.73:373-378(1990).
6. Zomer,E. Quintana,J. Saul,S. and Charm, S.E.: A method for identification and quantitation of  $\beta$ -Lactams in milk by liquid chromatography with microbial receptor assay. JAOAC Int. 78:1165-1172(1995).
7. Cutting,J.H. Kiessling,W.M. Bond,F.L. McCarron,J.E. and Kreuzer,K.S.: Agarose gel electrophoretic detection of six  $\beta$ -Lactam antibiotic residues in milk. JAOAC Int. 78:663-667(1995).
8. Rogers,M.E. Adlard,M.W. Saunders,G. and Holt,G.: Derivatization techniques for high performance liquid chromatographic analysis of  $\beta$ -Lactams. J.Chrom. 297:385-391(1984).

9. Boison, J.O. Keng, L.J. and MacNel, J.D.: Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. *JAOAC Int.* 77:565-569(1994).
10. Moats, W.A.: Determination of ampicillin and amoxicillin in milk with an automated liquid chromatographic cleanup. *JAOAC Int.* 77:41-45(1994).
11. Moats, W.A. and Harik-Khan, R.: Liquid chromatographic determination of  $\beta$ -Lactams antibiotics in milk: A multiresidue approach. *JAOAC Int.* 78:49-54(1995).
12. Moats, W.A.: Determination of cloxacillin and penicillin V in milk using an automated liquid chromatographic cleanup. *JAOAC Int.* 75:257-260(1992).
13. Moats, W.A.: Advances in determination of antibiotic residues. *JAOAC Int.* 80:1-4(1997).