

HPLC/MS을 이용한 aminoglycoside 항생제 동시 분석에 관한 연구

노영선¹, 백귀정, 김승용, 최은영, 서형석, 허부홍, 정동석

전라북도축산진흥연구소

(접수 2007. 1. 29, 게재승인 2007. 3. 22.)

Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics by HPLC/MS

Young-Sun Roh¹, Gui-Jung Baek, Seung-Yong Kim, Eun-Young Choi,
Heyng-Seok Seo, Boo-Hong Hur, Dong-Suk Joung

Jeonbuk Livestock Development and Research Institute, Jeonju, 560-860, Korea

(Received 29 January 2007, accepted in revised from 22 March 2007)

Abstract

A liquid chromatographic method has been developed for the analysis of aminoglycoside antibiotics (AMGs) using Heptafluorobutyric acid (HFBA) as a ion-pairing reagent. AMGs (amikacin, apramycin, dihydrostreptomycin, gentamicin, hygrosin B, kanamycin, neomycin, spectinomycin and tobramycin) were formed by reaction with HFBA as ion-pairing reagent. HFBA was attached to corresponding amino group of AMGs. These AMGs compounds were separated and detected by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The experimental conditions for separation of AMGs were optimized and validated. A simple liquid chromatographic method for the determination of AMGs was demonstrated.

Key words : Aminoglycoside antibiotics (AMGs), Gentamicin, Dihydrostreptomycin, HFBA, ESI-MS

¹Corresponding author

Phone : +82-63-220-6544, Fax : +82-63-220-6511

E-mail : roh815@hanmail.net

서 론

Aminoglycoside antibiotics (AMGs)의 효시는 1944년 Waksman 등이 *Streptomyces griseus*라는 진균에서 streptomycin을 분리하여 결핵환자의 치료로 사용된 이후 AMGs 항생제들이 순차적으로 개발되어 오늘날 널리 쓰이고 있는 항생제의 한 종류로 자리 잡고 있다^{1,2)}. AMGs는 크게 두개 또는 그 이상의 아미노당 (amino-sugar)이 배당체성 결합 (glycosidic linkage)으로 중심부의 육탄당 핵 (hexose nucleus)에 연결된 화학적 구조를 가지고 있으며 이 육탄당 핵은 화학적으로 aminocyclitol로서 streptomycin에서는 streptidine이고 기타 항생물질에서는 2-deoxystreptamine의 구조를 가진다. 그러므로 이들 항생물질은 화학구조상 aminoglycosidic aminocyclitols로서 간단히 aminoglycoside antibiotics 항생물질이라고 부르고 있다. 또한 AMGs는 gentamicin을 제외한 물질은 *Streptomyces*속 미생물에서 생성되며 gentamicin은 *Micromonospora purpurea*에서 생성되는 특징을 가지고 있다. 또한 spectinomycin만은 화학구조상 aminocyclitol이 amino 당이 아닌 중성당 (neutral sugar)과 결합되어 있으므로 aminocyclitol 이긴 하지만 다른 AMGs 항생제와는 차이가 있다. 하지만 spectinomycin의 물질 특성은 유사하다. AMGs는 폭 넓은 영역의 항균력을 가진 항생제로 Gram(+)와 Gram(-) 세균에 대하여 억제력이 우수하다^{2,3)}.

AMGs는 그 구조 내에 hydroxyl과 amino기를 가진 비휘발성이며, 극성과 친수성이 강한 특성을 가지고 있다⁴⁾. 또한 AMGs 계열 중 gentamicin (C1a, C2a, C2b, C1, C2), neomycin (B, C), kanamycin (A, B)은 2~5

개의 물질로 이루어져 있다^{5,6,7)}. 대부분의 AMGs의 분석은 컬럼 전후(pre-column or post-column) 유도체화 과정을 통하여 검출하는 방법들이 보고되었으며 주로 1,2-phthalic dicarboxaldehyde (OPA), 1-fluoro-2-4-dinitrobenzene (DNFB), 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid (TNBS), 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) 등의 시약을 사용하였다^{5,8-10)}.

TNBS나 DNFB와의 반응은 UV검출기로, FMOC-Cl이나 OPA와의 반응은 형광물질검출기로 분석을 하였으며, phenylisocyanate와 triethylamine과의 반응은 evaporative light scattering detector (ELSD)로 검사를 하였다^{6,11-16)}. 그러나 유도체화는 AMGs 항생물질 각각 성분들에 대하여 분석을 다르게 응용 적용하여 왔으며, 매 시험마다 유도체화 반응정도에 따른 감도가 변한다는 단점 때문에 electrochemical detector (ECD)와 pulse electrochemical detector (PED)를 사용하기도 하였다¹⁷⁾. 그러나 최근 질량분석기의 발달에 의하여 heptafluorobutyric acid (HFBA) ion-pairing 시약을 이동상으로 이용하여 유도체화 시약을 사용하지 않고 AMGs 항생물질을 동시 분석하는 방법으로 단순화 되어지고 있다^{18,19)}. 따라서 본 시험은 CBX wide pore cartilage를 이용한 시료 전처리법을 적용하였고, 역상 (reverse-phase) column과 질량분석기를 이용하여 분석을 실시하였다.

국내에서는 AMGs에 대한 계란 및 식육에서의 잔류허용기준을 설정 운용하고 있으며 허용기준은 알에서 neomycin 0.5ppm 이하 및 spectinomycin 2.0ppm 이하이고 근육에서는 hygrosin B 불검출, neomycin 0.5ppm 이하, gentamicin 0.1 ppm 이하, streptomycin 0.5ppm 이하, dihydrostreptomycin 0.5ppm

이하 및 spectinomycin 0.5ppm 이하로 다른 항생제들보다 높은 농도의 잔류허용량을 설정하고 있다²⁰⁾. 그러나 기존의 검사법은 잔류물질 간이검사 (EEC-4 plate)와 미생물 수용체법 (Charm-II)에 의한 AMGs 의심 시료에 대하여 정량하기에 용이하지 못하여 적절한 접근이 이루어지지 않아 미온적인 검사에 그쳐 왔다. 따라서 본 연구는 AMGs 항생제 동시검출을 위한 시료전처리 및 분석법에 대하여 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

시 약

AMGs (amikacin, apramycin, dihydro streptomycin, gentamicin, hygrosin B, kanamycin, neomycin, spectinomycin, tobramycin) 표준품과 ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)는 Sigma(USA) 제품을, heptafluorobutyric acid (HFBA)는 Lancaster 제품을 사용하였으며, 분석에서는 HPLC grade로 사용하였다. 시험에 사용된 증류수는 Barnstead 증류수 제조기를 이용하여 제조하였으며 검사 당일 0.2 μ m membrane filter (Alltech 2106718)로 여과 후 검사에 사용하였다.

시약 및 용액 : 1) 100 mM HFBA-HFBA 6.5 ml에 DW 500 ml를 가하여 제조하였다. 2) 5.0 mM HFBA-100 mM HFBA 25 ml에 DW 475 ml를 가하여 제조하였다. 3) 0.1% Formic acid-10 μ l Formic acid에 D.W 10 ml를 가하여 제조하였다. 4) 10% Acetic acid in MeOH(HOAC/MeOH)-5 ml glacial acetic acid (HPLC grade)에 MeOH 45 ml를 가하여 제조하였다. 5) 30% W/V NaOH-NaOH 30 g을 D.W 100 ml로 채워서 제조하였다. 6) 10 mM KH₂PO₄ with 0.4 mM

EDTA, 2% TCA-KH₂PO₄ 1.36g에 DW 1 l를 가하여 pH 4.0로 조정후 EDTA 0.15 g과 trichloroacetic acid (TCA) 20 g을 넣어서 D.W 2 l로 채웠다. 7) SPE-cartridge : BakerBond SPE Wide Pore CBX 500 mg, J. T. Baker를 사용하였다.

육계 약물투여 및 시료채취

현재 주사제로 사용하는 AMGs 항생물질 5종 (gentamicin, apramycin, kanamycin, amikacin, streptomycin)을 체중 1.5-2 kg (9 주령) 내외의 육계에 펠렛형 육계 후기사료와 음용수는 사육기간 중 무제한 급여하면서 1일 2회 3일간 근육내로 약물을 투여하였으며, 약물 최종 투여 후 6시간 뒤에 경정맥 방혈 후 가슴살을 채취 냉동보관 후 실험에 공여하였다.

AMGs 분석 방법

곱게 간 시료 1g을 50 ml polypropylene 원심관에 취하고 10 ml phosphate buffer/TCA를 가하여 homogenizing (30-60 sec, moderate)하였다. Shaker를 이용 10분간 강하게 혼든 다음 4,000 rpm으로 15분간 원심 분리 후 상층액을 새로운 50 ml 원심관에 취하였다. 남은 잔사에 7 ml phosphate buffer/TCA를 넣고 강하게 10분간 혼든 다음 원심 분리 후 상층액을 50 ml 코니칼 튜브에 더하여 시험용액으로 하였다. 시험용액을 pH 7.5

8.0 (약 0.20 ml 30% NaOH)으로 조정하였다. 필요에 따라 1N HCl과 1N NaOH를 사용하였다. 원심분리기에서 4,000 rpm으로 15분간 원심 분리한 뒤 상층액을 새로운 원심관에 취하고 지방을 제거하였다. SPE cartridge 를 5 ml MeOH과 5 ml DW로 세척 후 음압을 걸어 완전 건조시킨 후 시험용액

을 1-3 ml/min 속도로 내려주었다. 시험용액이 cartridge 를 모두 통과한 후 4-5ml DW로 세척한 후 음압을 걸어 최소한 5분간 건조시켰다. 추출액은 5 ml 10% HOAC/MeOH를 사용 1-3 ml/min의 속도로 농축관에 모은 다음 40°C의 항온수조에서 질소를 이용하여 농축하였다(약 90분). 농축액에 0.5 ml 20 mM HFBA 용액으로 용해하여 교반기를 이용 잘 흔들어 준 다음 초음파로 15분간 처리하여 2,500 rpm에서 10분간 원심분리 후 Ependorf tube에 옮겨 담았다. 16,000 rpm 10분간 원심분리한 뒤 중간층에서 200 µl를 취하여 바이알에 옮겨 검사 하였다.

HPLC 이동상은 100 mM HFBA, ACN과 DW를 사용하여 Table 1과 같은 기울기 용매조건으로 동시분석을 하였다. 분석용 column은 XTerra (Waters) 2.1×150 mm, 3.5µm를 사용하였으며 분석은 35분으로 검사했다. 전처리한 시료를 Table 2의 조건하에서 30 µl를 HPLC (Waters 2690)에 주입하여 분석하였으며, LC/MS (Waters ZQ)을 이용하여 Fig 1 및 Fig 2와 같이 정성·정량을 하였다. 각각의 시료는 3회 반복 실시 하였으며, 분석 결과 AMG의 면적비를 구하여 회귀 분석한 표준곡선에 대입하여 농도를 구하였다. 검출된 시료에 대해서는 LC/MS/MS (Waters Quattro Micro)로 확인 검사하였다.

HPLC 및 LC/MS 분석 조건

Table 1. HPLC mobile phase gradient

Time (min)	A%	B%	C%	Curve	Flow rate (ml / min)	Column temp
0	20	10	70	1	0.13	35°C
1	20	10	70	6	0.13	
13	20	30	50	6	0.13	
18	20	50	30	6	0.13	
23	20	70	10	6	0.13	
25	20	80	0	6	0.13	
25.1	20	10	70	6	0.13	
45	20	10	70	6	0.13	

A : 100 mM HFBA, B : ACN, C : DW

Table 2. HPLC and MS, MS-MS conditions for analysis of AMG

Conditions	HPLC	MS, MS-MS
Column	XTerra MS C ₁₈ (3.5 µm, 2.1×150 mm)	Ionization ESI+
Flow rate	0.13 ml/min	Capillary voltage 3.70
Sample temp	20°C	Source temp 130°C
Column temp	30°C	Desolvation gas flow (L/hour) 350 (MS) 500 (MS/MS)
Mobile phase	(A)100 mM HFBA, (B) ACN, (C) DW	Cone voltage 40~60V
Injection volume	30 µl	Collision gas 4.2×10 ⁻³ (MS/MS)

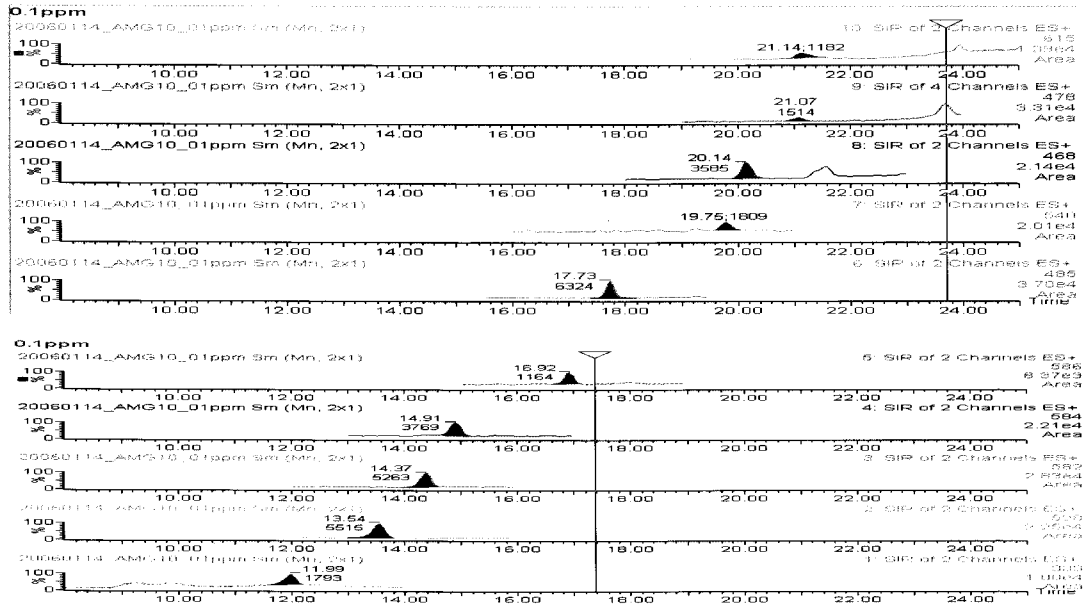


Fig 1. Analytical HPLC/MS chromatogram of AMG standard (0.1 µg/ml).

- 1: SIR spectinomycin, 2: SIR hygrozin B, 3: SIR dihydrostreptomycin 4: SIR streptomycin,
 5: SIR amikacin, 6: SIR kanamycin, 7: SIR tobramycin, 8: SIR apramycin, 9: SIR gentamicin,
 10: SIR neomycin

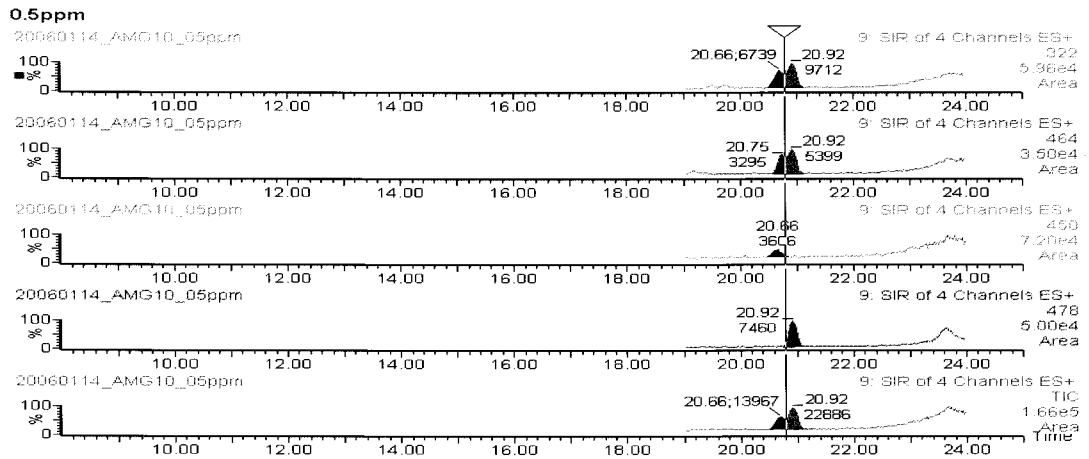


Fig 2. Chromatogram demonstrated total ion chromatogram (TIC) and single ion recording (SIR), 464 (C2), 450 (C1a), 478 (C1) 322 (Confirm ion) of gentamicin (0.5 µg/ml).

표준곡선 작성

Amikacin, apramycin, dihydrostreptomycin, gentamicin, hygrozin B, kanamycin,

neomycin, spectinomycin 및 tobramycin의 AMGs 표준품을 제조사의 정보에 의하여 함량과 순도를 고려하여 10 mg을 정

확히 달아 100 ml 용량플라스크에 DW로 채워서 각기 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 표준용액을 제조하여 1,000 μl 를 vial에 넣고 1 μl 의 formic acid를 첨가 후 교반 하여 Polyethylene Vial에 넣어 분석하였다(주의 유리 바이알은 일부 표준품이 흡착 될 수 있음). 각 표준품에 대한 농도별로 3회 반복분석을 하였으며 각 물질별 면적비를 구한 후 회귀 분석하여 Fig3과 같이 표준곡선(X coefficient value : 0.999939~996713, curve : quadratic)을 작성하였고, 각각의 표준품에 대한 mass spectra는 Fig4와 같았다.

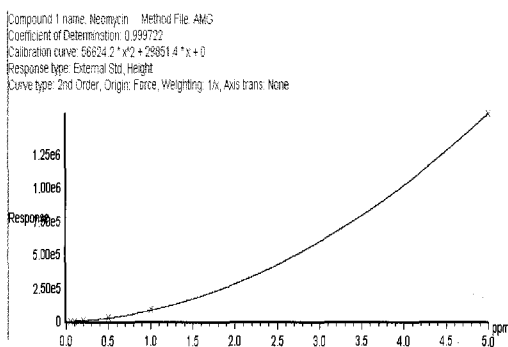


Fig 3. Standard calibration curve according to the peak area ratio of neomycin. (neomycin calibration curve R = 0.999722)

결과 및 고찰

최적의 ion-pairing 시약 용해 농도 시험 결과

AMGs 물질을 분석하는데 있어 ion-pairing 시약으로 20 mM HFBA를 이동상으로 사용하였으며, 시료전처리 시 추출용액의 농축 후 5 mM과 20 mM HFBA의 용액 0.5ml를 각각 사용하여 용해한 후 크로마토그램을 확인한 결과 5 mM의 농도에서는

Fig 5에서와 같이 물질들이 서서히 용출되어 머무름 시간이 넓어지며 피크의 모양이 길게 끌리며, AMGs 10종의 물질 중 크로마토그램 내에서 분리되어지는 시간이 비교적 짧은 spectino mycin, hygrocin B, streptomycin, dihydro streptomycin의 경우에 두드러졌다. 그러나 분리되어지는 시간이 비교적 오래 걸리는 gentamicin, neomycin의 경우에는 5 mM의 농도에서도 분리가 좋았다. 20 mM의 농도를 가하여 용해시킨 시험용액에서는 10종의 모든 물질이 일정한 머무름 시간과 함께 분리도 높은 크로마토그램을 확인하였다. 따라서 농축액 용해에는 20 mM HFBA를 사용하는 것이 적합하였다.

AMGs분석을 위한 회수율

AMGs 항생제 10종의 회수율을 검증하기 위하여 시료에 AMGs 물질10종을 0.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ 농도가 되도록 시료에 spike후 시료 전처리하여 검사한 결과는 Table 3과 같았다. 회수율은 72% ~ 110%정도로 물질 간 다소 차이를 보였으며 안정적인 회수율을 확인할 수 있었다.

육계에 AMGs 항생제 투여 후 잔류정도 조사 결과

육계에 amikacin, apramycin, kanamycin, gentamicin, streptomycin을 투여하고 근육을 채취 시료 전처리 후 MS로 분석한 결과는 Table 4와 같다. 평균검출농도는 gentamicin 0.84ppm, kanamycin 0.37ppm, streptomycin 2.14ppm, apramycin 1.11ppm, amikacin 0.31ppm의 농도로 검출되었다. 각 물질은 다른 물질과 교차되어 검출되지 않았으며, 육계에 투여되었던 물질만이 각각 검출되었다. MS에의해서 gentamicin 0.84ppm이 검출되었던 쇠고기 시료를 MS-MS로 확

인 분석한 크로마토그램은 Fig 6과 같았으며 C1 478.4>322.4, C2 464.3> 322.4, C1a 450.3> 322.4의 각각의 multiple reaction monito

ring (MRM)을 확인하였다.

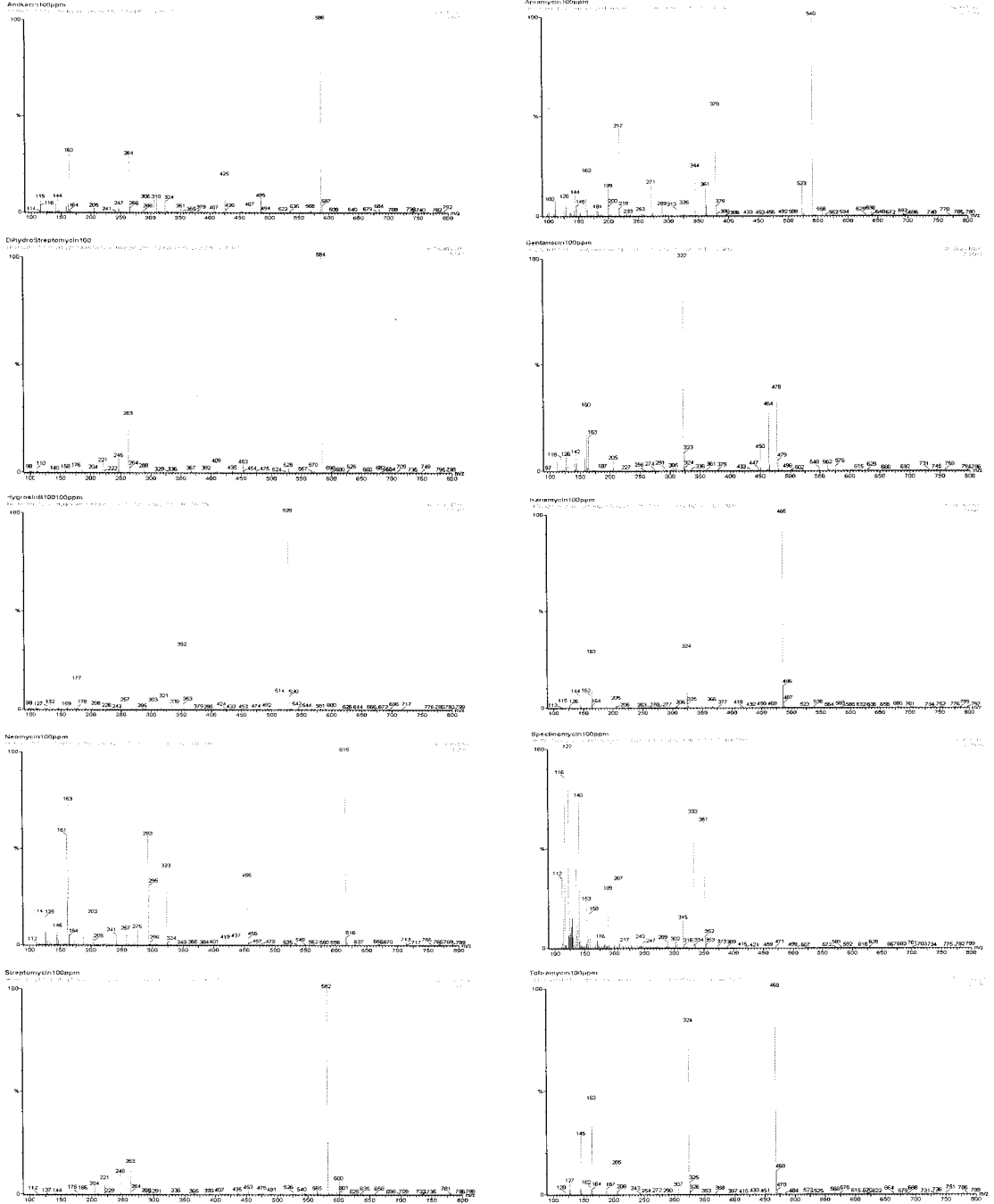


Fig 4. Ion monitoring mass spectra of AMGs.

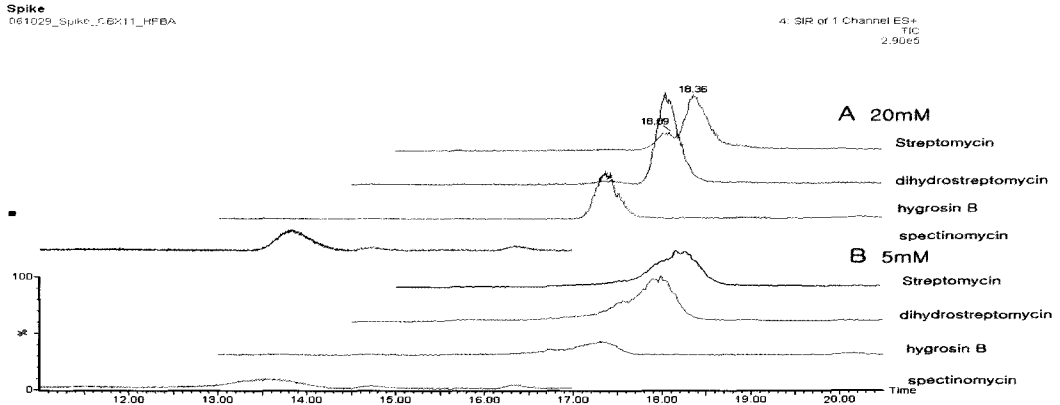


Fig 5. Chromatogram of AMG-spiked bovine muscle tissue (0.5 ppm spike). Sample dissolved with 20 mM HFBA sol (A), sample dissolved with 5 mM HFBA sol (B)

Table 3 Recovery of aminoglycoside antibiotics from bovine muscle tissue*

Compounds	Neomycin	Gentamicin	Tobramycin	Apramycin	Kanamycin
Recovery **($\mu\text{g/g}$)	0.55	0.54	0.51	0.51	0.37
(%)	110.0	108.0	102.0	102.0	74.0
Compounds	Amikacin	Dihydrostreptomycin	Streptomycin	Hygrocin B	Spectinomycin
Recovery **($\mu\text{g/g}$)	0.39	0.42	0.41	0.36	0.41
(%)	78.0	84.0	82.0	72.0	82.0

* Samples were spiked with 0.5 $\mu\text{g/g}$ of AMGs

** Average of six replicates

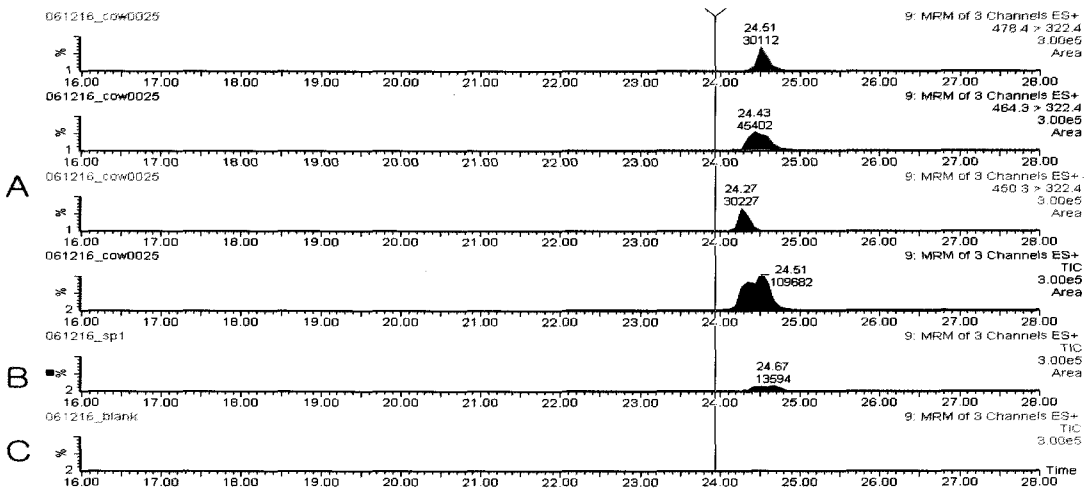


Fig 6. Chromatogram of bovine sample (A), bovine sample spiked with gentamicin (0.5mg/ml) (B) and bovine blank sample (C).

Table 4. The residual quantity of AMGs in broiler muscle after injection(n=6)

Compound	Concentration (mg/ml)	Injection vol. (ml)	Frequency* (2 times/day)	Recovery (Average, µg/g)
Amikacin	100	0.5l	6	0.31
Apramycin	200	0.5l	6	1.11
Gentamicin	200	0.2l	6	0.84
Kanamycin	100	0.5l	6	0.37
Streptomycin	50	0.3l	6	2.14

*Frequency: 3days × 2times/day

간이정성검사(Charm-II) 결과 AMGs 의심 시료에 대한 검사결과

전라북도축산진흥연구소에서 2005년부터 2006년까지 포유류 도축장에서 규제검사(간이검사) 양성시료에 대한 미생물수용체법(Charm II) 검사 결과 AMGs 의심 시료 7건을 정밀검사한 결과는 Table 5와 같았다. 7건의 시료 중 gentamicin 1건, dihydro streptomycin 4건으로 Charm-II에 의한 양성시료 7건 중 5건(71%) 정도의 시료에서 검출되었다.

근년에 축산물 생산에 있어 동물약품의 사용은 날로 증가되고 있으며 이러한 동물약품의 사용증가는 질병치료, 예방 및 생산성 향상에 많은 도움을 주었으나 항생제의 오남용은 축산물 내에 잔류되어 내성균의 생성 및 발현, 과민증 유발 등 인체에 유해한 결과를 초래하고 있다. 현재 잔류물질검사는 모니터링검사와 규제검사로 나뉘어져 있으며, 규제검사의 경우는 신속한 검사가 요구 되어지고 있고 이러한 잔류물질검사는 신속하고 정확한 검사로 축산물의 적합성 여부가 결정되어야 한다. 따라서 전처리법과 검출방법이 용이하지 않은 경우에는 신속한 검사가 이루어질 수 없으며 그 결과 또한 부정확하여 적용에 어려운 점이 있다. 따라서 검사법은 보다 단순화 되어져야 하며 쉽게 적용할 수 있

어야 한다.

이러한 요구에 따라 본 실험에서는 ion-paring 시약 HFBA와 질량분석기를 이용해 AMGs 물질들을 검출할 수 있는 검사법을 적용하였다. 시료전처리 cartilage를 이용하였으며, 시험결과 시료전처리 시료의 양은 1g을 사용하였다. 이는 시료전처리 과정에서 1g 보다 많은 양의 시료를 사용할 경우 원심력이 약하여 시험용액이 혼탁해지며, 혼탁해진 시료는 CBX cartilage 통과 시 AMGs 물질과 cartilage 사이에 이루어져야 할 화학적 상호작용을 물리적으로 저지함으로 추출이 용이하지 않았다. 따라서 1g의 적량을 사용할 경우 원심분리 시 충분한 원심력에 의해 고체 시료가 하층에 모여지고 투명한 상층액을 취할 수 있었으며, 투명한 상층액은 cartilage와 pH의 변화에 따른 화학적인 반응에 의하여 pH가 약염기성과 중성일 때에는 cartilage에 이온화된 AMGs 물질들이 흡착되며, cartilage를 세척 한 후 산성의 추출용매가 cartilage를 통과할 때 cartilage에 흡착되었던 AMGs 물질들이 cartilage와 결합력을 잃고 추출되어졌으며 반복 시험 시에도 재현성 있는 결과를 얻을 수 있었다.

시료 전처리 과정 중 농축된 시료를 용해 시 5mM HFBA과 20mM HFBA의 용액을 사용하여 비교한 결과 5mM HFBA의 경우

AMGs 물질과 함께 추출된 다른 물질들이 HFBA와 반응을 하여 AMGs 물질들과 충분히 반응을 하지 못하여 column 내에서 상호작용을 정확하게 이루지를 못하였다.

Table 5. Assays of AMGs using HPLC/MS in bovine muscle tissue suspected by Charm-II (n=7)

Detected compounds	Result (Average, µg/g)
Gentamicin	1.19
Dihydrostreptomycin	0.17
Dihydrostreptomycin	0.16
Dihydrostreptomycin	0.13
Dihydrostreptomycin	5.48
Not found	-
Not found	-

반면 20 mM의 농도에서는 함께 추출된 물질과의 간섭현상이 최소화되어 검출된 AMGs 물질이 column과 충분한 상호작용으로 분리되는 것으로 판단된다. 이러한 현상은 AMGs 10종의 물질 분석 중 비교적 초기에 검출되어지는 물질인 spectinomycin, streptomycin, dihydrostreptomycin, amikacin에서 두드러지며 머무름 시간이 긴 물질인 gentamicin, neomycine의 경우는 용해 시 사용되어지는 5mM HFBA와 20mM HFBA의 농도에 따른 영향을 받지 않았다. 이는 액체크로마토그래피 분석기간 중 지속적으로 이동상의 HFBA와 추출된 AMGs 물질이 반응하여 column과 상호작용이 이루어짐으로 사료된다.

육계에 근육주사 후 얻어진 시료에서는 각각 투여하였던 물질만이 검출되어지므로 기존 검사법은 각각의 물질별로 다른 유도체화 시약을 사용하거나 각기 다른 검출기를 이용

하여 분석하는 번거로움이 있었으나 이번 AMGs 분석법은 단일 검사법에 의해 동시에 AMGs 물질들 10종을 질량검출기에 의해 분석이 가능함을 확인하였다. cartridge를 이용한 전처리법은 다량의 시료 검사에 용이하게 이루어질 수 있으며 기존의 검사법은 불완전 반응과 시료 전처리에서 오는 각 단계에서의 검출 물질의 손실 등으로 검출이 쉽지 않은 단점이 있었으나 이번 실험은 질량분석기와 카트리지를 이용한 전처리법의 적용으로 시험시간의 단축과 검출이 용이하여짐을 확인하였다. 이번 실험의 이동상 조건, HPLC 조건 및 MS의 분석 조건은 높은 분리도를 보이나, 분석시간이 45분으로 비교적 장시간 소요되는 단점을 가지고 있다. 그러므로 물질 분리를 크게 요하지 않으면서 목적하는 물질을 확인할 수 있는 MS-MS의 장점을 이용하여 분석시간을 단축하는 방법이 개발되어 신속한 검사법으로 적용되어야 할 것이다.

미생물수용체법(Charm-II)에 의하여 AMGs 물질이 의심되어지는 시료 7건에 대한 검사 결과 5건의 시료에서 gentamicin, dihydrostreptomycin이 검출되었다. 축산물의 안전성 확보 및 약제의 잔류 예방을 위해서 이번 실험과 같은 검사방법에 대한 연구 및 적용이 꾸준히 시도 되어야 할 것으로 판단된다.

결 론

국내에서는 계란 및 식육에 대해 AMGs 물질의 잔류허용기준을 설정 운용하고 있으나 기존의 검사법은 검출감도도 낮고 다성분의 동시분석이 용이하지 못하였다. 본 연구는 이러한 문제점을 극복하고 보다 정확

하고 안정적인 AMGs 10종 동시 분석을 고찰하고자 하였으며 결과는 다음과 같았다.

1. AMGs 분석을 위한 용매 HFBA의 농도가 20mM 일 때 분리도 높은 크로마토그램을 얻을 수 있었다.
2. AMGs 분석을 위한 질량분석기 최적조건을 설정하고 각 물질별 회수율을 분석한 결과 amikacin 78%, apramycin 102%, dihydrostreptomycin 84%, hygrosin B 72%, kanamycin 74%, gentamicin 108%, neomycin 110%, spectinomycin 82%, streptomycin 82% 및 tobramycin 102%의 안정적이고 유의성 있는 평균 회수율(72~110%)을 보였다.
3. AMGs 5종을 육계에 투여하고 조직 내 잔류조사 검사를 실시한 결과 각각의 투여한 물질만이 검출됨을 확인하였다.
4. 잔류물질 간이검사 결과 AMGs 항생제 의심 시료에 대하여 검사한 결과 총 7건 중 gentamicin 1건, dihydrostreptomycin 4건, 불검출은 2건으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 AMGs 10종의 동시분석과 효율적인 전처리법 적용으로 보다 신속하고 정확한 검사를 통하여 축산물내의 AMGs 물질을 검사 할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 정희영. 1985. 항생제의 길잡이. 수문사. 서울 : 238-265.
2. 홍사덕. 1987. 이우주의 약리학강의. 의학문화사. 서울 : 547-5512.
3. 이장락. 1987. 수의약리학. 서울대학교 출판부. 서울 : 392-394.
4. Brown SA, Newkirk DR, Hunter RP, et al. 1990. Extraction methods for quantitation of gentamicin residues from tissues using fluorescence polarization immunoassay. *J Assoc Off Anal Chem* 73(3) : 479-483.
5. Kim BH, Lee SC, Lee HJ, et al. 2003. Reverse-phase liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using pre-column derivatization with phenylisocyanate. *Biomed Chromatogr* 17(6) : 396-403.
6. Posyniak A, Zmudzki J, Niedzielska J. 2001. Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography. *J Chromatogr A* 914(1-2) : 59-66.
7. Isoherranen N, Soback S. 2000. Determination of gentamicins C₁, C_{1a} and C₂ in plasma and urine by HPLC. *Clin Chem* 46(6 Pt 1) : 837-842.
8. Shaikh B, Jackson J. 1992. Improved liquid chromatographic determination of neomycin B in bovine kidney. *J AOAC Int* 76(3) : 543-548.
9. Per H, Sonja K. 1982. Improved high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of neamine, neomycin B and neomycin C in neomycin sulfate. *J Chromatogr* 235 : 215-220.
10. Claes PJ, Busson R, Vanderhaeghe H. 1984. Determination of the component ratio of commercial gentamicins by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization. *J Chromatogr* 298(3) : 445-457.

11. Maitra SK, Yoshikawa TT, Hansen JL, et al. 1977. Serum gentamicin assay by high-performance liquid chromatography. *Clin Chem* 23(12) : 2275-2278.
12. Reid JA, MacNeil JD. 1999. Determination of neomycin in animal tissues by liquid chromatography. *J AOAC Int* 82(1) : 61-67.
13. Clarot I, Chaimbault P, Hasdenteufel F, et al. 2004. Determination of gentamicin sulfate and related compound by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 1031(1-2) : 281-287.
14. Megoulas NC, Koupparis MA. 2004. Development and validation of a novel LC/ELSD method for the quantitation of gentamicin sulfate components in pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* 36 (1) : 73-79.
15. Kubo H, Kobayashi Y, Nishikawa T. 1985. Rapid method for determination of kanamycin and dibekacin in serum by use of high-pressure liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 28(4) : 521-523.
16. Frank J. Shenck, Patrick SC. 1998. Chromatographic method of analysis of antibiotics in milk. *J AOAC Int* 812 : 99-109.
17. Getek TA, Vestal ML. 1991. Analysis of gentamicin sulfate by high-performance liquid chromatography combine with thermospray mass spectrometry. *J Chromatogr* 554 : 191-203.
18. United State Department of Agriculture. 2003. *Confirmation of Aminoglycosides by HPLC-MS/MS*. United State Department of Agriculture Food Safety Inspection Service, Office of Public Health and Science. CLG-AMG 1.00 : 1-18.
19. Oertel R, Neumeister V, Kirch W. 2004. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six AMGs in serum. *J Chromatogr A* 1058(1-2) : 197-201.
20. 식품의약품안정청. 2005. 식품의 기준 및 규격(식품의약품안정청고시 2005-27호) : 59-69.