

LC-MS/MS를 이용한 어류 및 갑각류의 잔류 Erythromycin 항생제 분석

조미라 · 목종수 · 이두석 · 김민정 · 김풍호*
국립수산물안전연구원 식품안전연구과

Determination of Residual Erythromycin Antibiotic in Fishery Products by Liquid Chromatography-electrospray Ionization Mass Spectrometry

Mi-Ra JO, Jong-Soo MOK, Doo-Seog LEE, Min-Jung KIM
and Poong Ho KIM*

Food Safety Research Division, National Fisheries Research and
Development Institute, Busan 619-705, Korea

A simple and sensitive method for erythromycin quantification by liquid chromatography electrospray mass spectrometry (LC-MS/MS) in fishery products was developed. Samples were extracted by liquid-liquid extraction using 70% acetonitrile. Lipids were removed by acetonitrile saturated hexane. LC separation was performed on a Shiseido UG C-18 column (150 mm×2.0 mm internal diameter.) with a gradient system of 0.2% acetic acid-acetonitrile containing 0.2% acetic acid as a mobile phase at flow rate of 0.2 mL/min. The mass spectrometer was operated in selected reaction monitoring with positive electro-spray interface. Transitions were monitored a m/z 734→577 and 734→158, with m/z 734→577 chosen for quantification. Recovery of erythromycin from fish and shrimp fortified at the 10 ng/mL, 50 ng/mL and 100 ng/mL were 91.6-109.4%, 84.4-111.2% and 98.8 -109.6% with high precision, respectively. Limits of quantification and limits of detection of erythromycin in both fish and shrimp were 10.0 ng/mL and 1.0 ng/mL, respectively. This analysis method for erythromycin has been proposed for registration in the Korean Official Methods of Food Analysis and has been utilized for fishery products analysis by the Korea Food and Drug Administration and the National Fisheries Products Quality Inspection Service.

Key words: Erythromycin, LC-MS/MS, Fish, Shrimp

서 론

Erythromycin은 macrolide계열의 항생제로 그람양성균과 *Mycoplasma*속에 강한 항균작용을 지니고 있으며 축산에서는 주로 성장촉진을 위한 사료첨가제나 호흡기계 치료제로서 사용되고, 수산에서는 연쇄구균증, 세균성 신장병 등 치료에 널리 사용되고 있다. 그러나 erythromycin은 인체에 독성효과나 과민반응을 유발할 수 있으며, 또한 내성균을 생성시킬 수 있다고 알려져 있다(Chan et al., 1994; Delepine et al., 1996; Juhel-Gaugain and Anger, 1999; Treves-Brown, 2000). Erythromycin 항생제는 우리나라 어류양식에서 oxy-tetracycline 항생제 다음으로 사용량이 많으며 매년 그 판매량이 증가하는 것으로 알려져 있다(KFDA, 2007).

현재 erythromycin 항생제 분석법은 미생물학적 검사에 의한 간이시험법(Smith, 1978; Bogaerts and Brussels, 1980)과 HPLC에 의한 정밀장비를 이용한 정량검사법(Horie et al., 1998; Leal et al., 2001)이 있지만, 미생물학적 방법은 특이적이지 못하며 LC 장비는 화학적 특성상 흡광치가 아주 낮아서

정확한 정량분석의 어려움이 있었다. 또한 지금까지 알려져 있는 식품 중의 항생제 분석방법도 축육 및 가금류를 대상으로 한 것이 대부분이었으며, 어류 및 갑각류와 같은 수산물을 대상으로 개발된 경우는 그리 많지 않았다. 그리고 축산물을 대상으로 개발된 시험방법들은 여러 가지 요인으로 인하여 수산물 분석에 부적합한 경우가 많았으며, 특히 낮은 회수율이 큰 문제점으로 나타났다.

따라서 본 연구에서는 어류 및 갑각류 등 수산물에 잔류하는 erythromycin 항생제 분석방법을 확립하기 위해 기존의 연구자들이 보고한 방법(Horie et al., 2003; Deubel et al., 2006; Labour and Welfare report, 2006)을 개량하여 전처리 및 분석조건을 검토하여 erythromycin 분석 방법을 확립하였다.

재료 및 방법

시약 및 시료

항생제의 표준품으로 erythromycin은 Sigma사(St. Louis MO, USA)의 제품을, 항생제 추출시약으로 증류수, acetonitrile, methanol, MgSO₄ 등은 Merck(Germany)의 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 HPLC급이나 특급을 사용하였다.

*Corresponding author: phkim@nfrdi.go.kr

실험에 사용한 넙치와 새우는 껍질을 벗기고 내장을 제거한 후 육만을 사용하여 잘게 다진 후 실험에 사용하였고, 실험 전까지 -20°C 에 보관하였다.

항생제 표준용액 조제

Erythromycin 표준품 각 10 mg씩을 100 mL 용량 플라스크에 취하고 methanol에 녹여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 stock solution을 조제하였다. Working solution은 stock solution 10 mL을 정확히 취하여 100 mL 용량 플라스크에 옮기고 이동상으로 표시선까지 채운 표준용액을 5.0, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL로 희석하여 사용하였다. 항생제 표준원액 (stock solution)은 4°C 에서 3개월까지 보관하며 사용하였고, working solution은 시험 때마다 만들어 사용하였다.

시료전처리

시료 10 g에 70% acetonitrile 100 mL과 Hyflo-Super cel 5 g을 첨가하여 균질화 (10,000 rpm, 2분)한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 추출액을 NaCl 7 g을 첨가하여 10분간 강하게 흔든 후 정치시켜서 하층액은 폐기하였다. 상층액은 다시 acetonitrile 포화 hexane 100 mL를 첨가하여 다시 10분간 강하게 흔든 다음 분리될 때까지 정치시켰다. 분리된 하층액을 받아서 n-propanol 10 mL를 첨가하여 40°C 에서 감압농축시켜 건조한 잔사를 90% methanol 2 mL로 정용한 후 다시 acetonitrile 포화 hexane 10 mL를 첨가하여 30초간 흔든 후 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 그 하층액을 여과 (0.22 μm , PTFE)하여 LC-MS/MS로 분석하였다. 시료 전처리 과정은 Fig. 1에 상세히 나타내었다.

기기분석조건

HPLC 기기는 Finnigan Surveyor (Thermo, USA)를 사용하여 C_{18} column (Shiseido UG 120 V, 2 mm ID \times 150 mm)을 사용하여 0.2% acetic acid/water 용액과 0.2% acetic acid/acetonitrile 용액을 80:20의 비율로 초기 이동상으로 하여 흘리다가 10분 후 50:50으로 gradient시킨 후 다시 초기 이동상으로 하여 20분간 분석하였다. 이때 column 온도는 40°C 를 유지하였으며, 유속은 0.2 mL/min으로 하였다.

LC-MS/MS 조건으로는 Finnigan TSQ Quantum (Thermo, USA)을 사용하여 ESI와 positive 방식으로 nebulization과 collision gas는 질소와 아르곤으로 분사 및 이온화시켰으며 spray voltage, capillary 온도, collision energy와 cone voltage는 각각 4,500 V, 350°C , 22 V 및 114 V로 고정하였다. Erythromycin 항생제의 precursor ion (m/z)은 735이며, fragment ion (m/z)은 577로 정량하고, fragment ion (m/z) 158은 확인하였다.

기기분석조건은 Table 1에 자세히 기술하였다.

표준곡선의 작성 및 계산

각 농도의 erythromycin 표준용액 (5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/g)을 10 μL 씩 취하여 3회 반복 분석한 chromatography로부터 각각의 항생제에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X축을

10 g of homogenized sample

Extract with 100 mL of 70% acetonitrile
Add Hyflo-Super cel of 5 g
Homogenize at 10,000 rpm for 2 min
Centrifuge at 5,000 rpm for 10 min

Aqueous layer

Add NaCl of 7 g
Shake for 10 min

Acetonitrile layer

Add 100 mL of acetonitrile saturated n-hexane
Shake for 10 min

Acetonitrile layer

Add n-propanol of 10 mL
Concentrate to dryness at 40°C
Dissolve the residue (90% methanol 2 mL)
Add acetonitrile saturated n-hexane of 10 mL
Shake for 30 sec
Centrifuge at 5,000 rpm for 5 min

Aqueous layer

Filter through 0.2 μm membrane filter

LC-MS/MS analysis

Fig. 1. Summary of clean-up procedure of erythromycin for fishery products sample.

Table 1. Operation conditions of LC-MS/MS for erythromycin

HPLC Conditions	
Column	Shiseido C_{18} UG 120 V, 2.0 mm ID \times 150 mm
Mobile phase	A: 0.2% Acetic acid/Water B: 0.2% Acetic acid/Acetonitrile Gradient elution ¹⁾
Flow rate	0.2 mL/min
Oven temperature	40°C
Injection volume	10 μL
Run time	20 min
MS Conditions	
Ionization	ESI, Positive
Nebulization and collision gas	N_2 , Ar
Spray voltage	4,500 V
Capillary temp.	350°C
Collision Energy	22, 33 V
Cone voltage	114 V
Precursor ion (m/z)	735
Fragment ion (m/z)	577, 158 (confirmation ion)

¹⁾For time of 0 min, 85% of 0.2% acetic acid (A) and 15% of acetonitrile (containing 0.2% acetic acid, B) were used. For time of 10 and 15 min, 50% A and 50% B were used.

농도, Y축을 면적으로 하여 검량선을 작성하였다.

시험용액 분석에서 얻은 chromatogram으로부터 각 성분에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 peak에 대한 평균면적을 구한 다음 검량선 좌표의 Y축에 동일한 값을 표시하고

이 값과 검량선상 만나는 점에서 수직으로 X축과 만나는 점이 시험용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시험용액의 회석배수(잔류물에 대한 이동상의 부피)를 곱하고 시료무게로 나누어 최종시료 중 각 성분의 농도를 산출하였다.

회수율

시험방법의 회수율을 조사하기 위하여 넘치 및 새우시료에 농도를 알고 있는 erythromycin 표준용액 10, 50, 100 ng/g을 가하여 분석하고 얻어진 크로마토그램의 peak 면적비를 이용하여 회수율을 구하였다.

결과 및 고찰

전처리조건 검토결과

일반적으로 항생제 추출법은 크게 liquid-liquid extraction법과 SPE (solid phase extraction) cartridge법으로 나눌 수 있는데 이 두가지 방법을 erythromycin 항생제 추출에 적용하였다. 그 중 SPE cartridge법을 사용한 Horie et al. (2003)은 방어와 독에 대하여 erythromycin 항생제를 분석하였는데 그 회수율이 82%-83%로 양호한 편이었으나, 본 연구에 사용하는 시료는 어류뿐만 아니라 갑각류를 적용하였을 때는 그다지 높은 회수율을 기대할 수 없었다. Cherlet et al. (2002)의 방법도 SCX cartridge를 사용하여 추출한 것으로 갑각류는 cartridge에서 시료를 용출시키는데 많은 시간이 소요되었을 뿐 아니라 회수율도 극히 저하되어 이 방법은 적용시킬 수 없었다.

한편 liquid-liquid extraction법을 사용한 일본 후생성 방법은 acetonitrile를 사용하여 시료를 추출하여 감압농축시켜 분석하는 방법으로 전처리는 비교적 간단하였으나 acetonitrile만 사용하여 추출할 경우 모든 지질, 단백질, 색소 등이 용출되어 나올 것으로 예상된 바 분석기기에 무리를 주지 않을까 생각되었다. 그러나 이 방법은 전처리 방법이 간편하다는 큰 장점을 가지고 있었기 때문에 본 연구에서는 일본 후생성 방법을 더 보완하고 변형시켜 간편하면서도 기기에 그다지 무리가 없는 erythromycin 항생제를 분석하는 방법을 고안하였다.

일본 후생성 방법의 시료추출과정은 acetonitrile를 사용하였기 때문에 본 연구에서도 acetonitrile를 50%, 60%, 70%, 90%, 100%로 각각 나누어 추출하여 그 상대회수율을 비교하였다. 그 결과 50%에서는 평균 24.6%로 나타났고 60%-80% 추출액은 96.3%-98.7%로 높게 나타내다가 100%일 때는 감소하는 경향이 보였다. 또한 시료 중에서 다소 색소를 함유한 새우시료의 경우 50%-100% 사이의 acetonitrile 추출을 비교하였을 때 acetonitrile 함유량이 높을수록 색소들이 많이 용출되어 색소층을 제거시키는데 hexane이 많이 소모되었고, 다른 한편으로 물 함유량이 높을수록 색소들은 많이 용출되지 않았으나 erythromycin이 물에 잘 용해되지 않는 특성 때문에 회수율이 낮아진 결과, 회수율도 높고 색소 등 방해물질이 비교적 적은 70% acetonitrile 추출이 가장 양호한 것으로 확인되었다 (Data not shown).

또한 일본 후생성 방법은 acetonitrile 추출액과 MgSO₄를 함께 첨가하여 수분을 제거하는 과정이 있는데 본 연구에서는 70% acetonitrile를 사용하였기 때문에 일본 후생성 방법과는 다른 NaCl을 첨가하여 층분리시켜 수분을 1차로 제거한 후 다시 acetonitrile 포화 hexane으로 층분리하고 난 후 MgSO₄ 첨가하는 방식을 취하였다. MgSO₄의 첨가량에 따라서 회수율을 비교검토한 결과, 첨가하지 않은 것과 첨가한 것 사이에 상당한 차이를 보였다. MgSO₄ 첨가하지 않은 경우 회수율이 100%에 가깝게 나타났으나, 2g 이상 첨가한 경우 회수율이 40% 이상 떨어져 본 연구에서는 MgSO₄를 첨가하지 않고 전처리를 행하였다.

마지막으로 일본 후생성 방법은 시험 마지막 단계인 정용할 때 1.0 mL acetonitrile/water (4:6) 혼합액으로 하는 사용하였다. 그러나 본 연구는 acetonitrile/water (4:6) 혼합액을 사용하여 hexane층으로 분리하였을 때 제대로 층분리가 되지 않거나 시료 속에 있는 여러 가지 방해물질들이 hexane층으로 이행되지 않고 남아 filter과정에서 filtration이 잘 되지 않는 애로사항이 있어서 methanol이 오히려 그런 현상들이 없는 것으로 예상되어 methanol을 사용하여 그 회수율을 비교해 보았다. Methanol을 50, 70, 90, 100% methanol 혼합액과 acetonitrile/water (4:6) 혼합액을 비교한 결과, acetonitrile/water 혼합액이 filtration이 되지 않음에도 불구하고 90%의 높은 회수율을 나타내었고, 50%, 70% methanol 혼합액은 약 33%, 65%의 낮은 회수율을 보였으나 90%, 100% methanol 혼합액은 100%의 가까운 회수율을 나타내어 본 연구에서는 정용액을 90% methanol을 선택하여 시험에 행하였다.

단계별 기기분석조건 검토결과

Erythromycin은 흡광치가 아주 낮은 물질로 HPLC로는 분석이 까다롭고 검출하기가 어려운 항생제로서 예전의 논문(Horie et al., 1998; Lingerfelt and Champney, 1999)들을 보더라도 회수율 면이나 복잡한 전처리, 검출감도는 그다지 양호한 편이 아니었다. 최근 들어 외국문헌들이 LC-MS기기를 이용하여 erythromycin을 분석하는 사례들이 점차 늘고 추세이고 본 연구에서도 erythromycin이 어류질병 치료목적으로 많이 사용하고 있음에도 불구하고 검출방법이 국내에는 없었기 때문에 수산물에 적합한 LC-MS-MS 분석조건을 찾고자 하였다. 그 결과 Single MS를 이용하여 erythromycin을 분석한 Horie et al. (2003)방법에서 두 가지를 적용시켜 우리 실정에 맞는 방법을 고안하였는데, 첫째로 erythromycin은 이동상을 조절할 때 pH 3 이하의 산성조건에서는 분해되어 peak의 형태가 나타나지 않으므로 그 이상이 되는 시약인 acetic acid를 사용하여 gradient 한 결과 peak의 형태와 감도면에서 대체로 양호한 결과를 나타내었다. 두번째는 precursor ion (m/z)인 734 (SIM mode)만 가지고 분석한 Horie et al. (2003)의 방법을 본 연구는 SRM mode로 한 번 더 이온화시켰다. 그 결과, erythromycin 항생제의 주요 fragment 이온 (m/z)들은 578, 577로 나타났으며, 이들 이온들을 SRM mode로 선택하여 577을

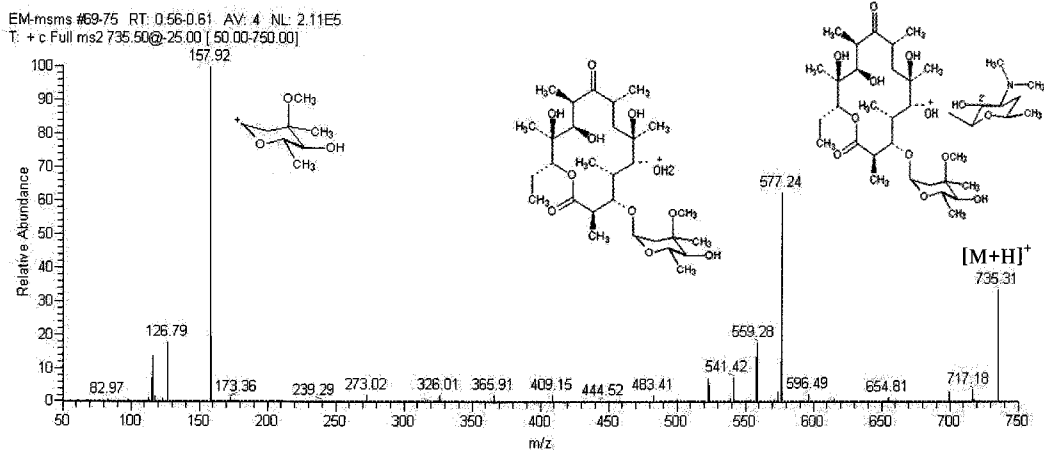


Fig. 2. Positive product ion mass spectra of erythromycin.

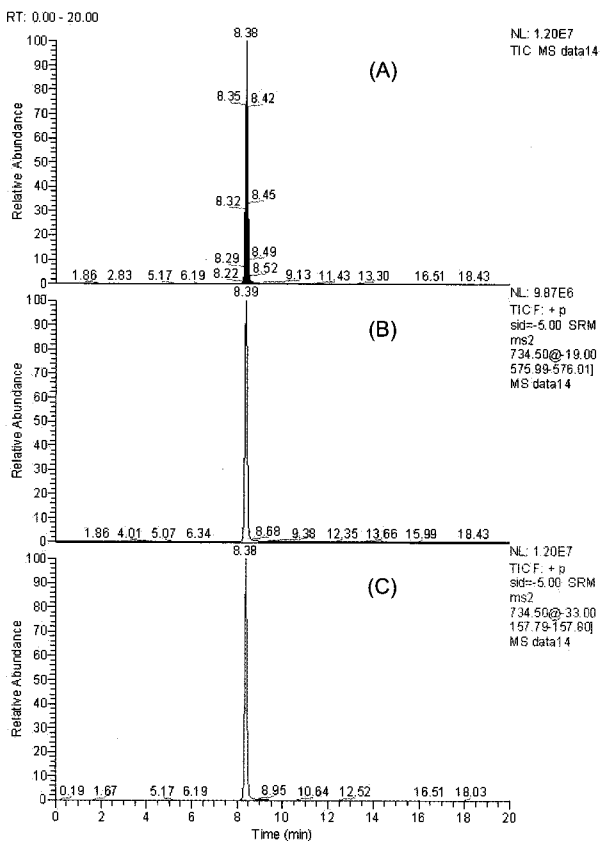


Fig. 3. Chromatograms for fish sample spiked at SRM: (A) Total ion chromatogram (TIC), (B) SRM transition 734→577, (C) SRM transition 734→158.

정량하기 위한 이온으로 하고, 158은 확인하는 이온으로 사용하였다. 따라서 질량분석기의 SRM 방식에서 precursor 이온은 $[M+H]^+$ 즉, 수소화된 분자이온을 사용하여 Q2에서 생성된 product 이온을 모니터링 하였을 때 erythromycin 항생제에 대한 질량 spectrum과 SRM 크로마토그램을 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

표준검량선, 감도 및 회수율

표준 검량선 작성은 표준물질 10 mg을 정확히 달아 100 mL 용량 플라스크에 취하고 methanol에 녹여 100 µg/mL 농도로 조제하였다. 이 표준용액을 acetonitrile로 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mL 농도로 희석하여 분석한 결과 직선성 (r^2 값)은 0.9997을 나타내어 아주 양호한 것으로 확인되었다 (Fig. 4).

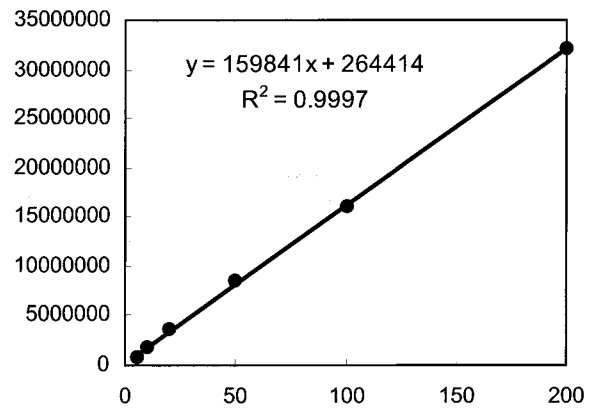


Fig. 4. Calibration curves of erythromycin.

검출한계 및 정량한계는 R. Causon (1997) 보고서에 따라서 구하였다. 그 결과 검출한계 (LOD, Limit of Detection)은 1.0 ng/mL, 정량한계 (LOQ, Limit of Quantitation)는 10 ng/mL로 대상물질의 분리도 (S/N 비) 등이 뛰어났으며, 낮은 parts per billion (ppb) 범위의 극미량 존재 시에도 정량분석이 가능함을 알 수 있었다.

새우와 넙치 시료에 표준품을 각각 10 ng/g, 50 ng/g, 100 ng/g 농도가 되도록 첨가하여 회수율을 본 결과 넙치시료는 10 ng/g 시험구에서는 평균 91.6%, 50 ng/g는 평균 84.4%, 100 ng/g는 평균 98.8%이었으며, 새우시료는 10 ng/g 시험구에서 평균 109.4%, 50 ng/g는 평균 111.2%, 100 ng/g는 평균 109.6%

로 나타나 오히려 넉치보다는 새우시료에서 약간 높은 회수율을 보였다 (Table 2).

Table 2. Recovery of erythromycin from fish and shrimp

Fortified samples		Recovery (%), n=5	
		Olive Flounder	Shrimp
10 ng/g	Mean	91.6	109.4
	S.D.	9.7	6.5
	CV	10.6	6.0
	Accuracy (%)	-8.4	9.4
50 ng/g	Mean	84.4	111.2
	S.D.	8.9	7.0
	CV	10.5	6.3
	Accuracy (%)	-15.6	11.2
100 ng/g	Mean	98.8	109.6
	S.D.	2.7	7.6
	CV	2.7	6.9
	Accuracy (%)	-1.2	9.6

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 수산물 위해요소 제어기술개발의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다 (RP-2008-FS-010).

참 고 문 헌

- Bogaerts, R. and F.W. Brussels. 1980. A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substance in fresh meat. *Fleischwirtsch*, 60, 672-673.
- Chan, W., G.C. Gerhardt and C.D.C. Salisbury. 1994. Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by reversed-phase liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 77, 331-333.
- Cherlet, M., S. De Baere, S. Croubels and P. De Backer. 2002. Quantitation of tylosin in swine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 473, 167-175.
- Causon, R. 1997. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*, 689, 175-180.
- Delepine, B., D. Hurtaud-Pessel and P. Sanders. 1996. Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 79, 397-404.
- Deubel, A., A.S. Fandiño, F. Sörgel and U. Holzgrabe. 2006. Determination of erythromycin and related substances in commercial samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1136, 39-47.
- Horie, M., K. Saito, R. Ishi, T. Yoshida, Y. Haramaki and H. Nakazawa. 1998. Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 812, 295-302.
- Horie, M., H. Takegami, K. Toya and H. Nakazawa. 2003. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 492, 187-197.
- Juhel-Gaugain, M. and B. Anger. 1999. Multiresidue chromatographic method for the determination of macrolide residues in muscle by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. AOAC Int.*, 82, 1046-1052.
- KFDA. 2007. Monitoring of antimicrobial resistance on the food-animals and meats. *KFDA report*, 22-37.
- Labour and Welfare. 2006. Analytical methods for residual compositional substances of agricultural chemicals, feed additives, and veterinary drugs in food. Department of Food Safety Ministry of Health, Labour and Welfare report. *Syoku-An No.0124001*, 43-52.
- Leal, C., R. Codony, R. Compañó, M. Granados and M.D. Prat. 2001. Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 910, 285-290.
- Lingerfelt, B. and S. Champney. 1999. Macrolide and detolide antibiotic separation by reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20, 459-469.
- Smither, R. 1978. Bacterial inhibitors formed during the adventitious growth of microorganisms in chicken liver and pig kidney. *J. Appl. Microbiol.*, 45, 267-277.
- Treves-Brown, K.M. 2000. *Applied Fish Pharmacology*, Chapter 7. Macrolides., 87-94.

2008년 11월 4일 접수

2009년 2월 17일 수리