

총설

시료 중 잔류 항생제 분석 방법: I. 고상 시료 전처리 방법

김찬식 · 류홍덕 · 정유진[†] · 김용석 · 류덕희

국립환경과학원 물환경연구부 유역총량연구과

Determination of Antibiotic Residues: I. Extraction and Clean-up Methods for Solid Samples_A Review

Chansik Kim · Hong-Duck Ryu · Eu Gene Chung[†] · Yongseok Kim · Doug Hee Rhew

Watershed and Total Load Management Research Division, Water Environment Research Department,
National Institute of Environmental Research

(Received 11 July 2016, Revised 15 November 2016, Accepted 21 November 2016)

Abstract

Korea is one of the countries with a large veterinary antibiotics market, although antimicrobial resistance in bacteria is becoming a serious issue in many countries. The Korean government started to take interest in estimating the effects of livestock manure on rivers and agricultural soils and in monitoring of heavy metals, organic pollutants and antibiotics in the ambient water and soil. In this paper, pre-treatment methods to separate the selected antibiotics from solid samples were reviewed. It is essential to select an efficient and appropriate procedure for pre-treatment due to the high proportion of proteins and organics in biosolid samples. Pre-treatment consists of extraction followed by clean-up. Initially, homogenized samples were extracted by sonication, mechanical agitation or pressurized liquid extraction with methanol/acetonitrile/water mixture under acidic/basic conditions depending on the compound. However, aminoglycosides and colistin were extracted with 5% trichloroacetic acid and HCl, respectively. Since the β -lactams are easily decomposed in acidic and basic conditions, they were extracted in neutral pH. Filtration with a membrane (pore size, 0.2 μ m) or solid phase extraction with HLB and methanol, as eluents, was normally applied for the clean-up. At least, three different pre-treatment procedures should be adopted to screen all the selected antibiotics in solid samples.

Key words : Antimicrobial, Extraction, HPLC-MS/MS, Pre-treatment, Solid sample, Veterinary antibiotic residues

1. Introduction

축산업의 발달에 따라 동물 치료와 감염 예방, 생산성의 향상을 목적으로 다양한 종류의 동물용 항생제가 사용되고 있다. 식품의약품안전처와 농림축산식품부의 보고에 따르면 2014년 기준 식용 동물(소, 돼지, 닭, 수산용)에 사용을 목적으로 판매된 항생제는 635톤으로 나타났다(Lim et al., 2015) 미국과 EU 국가들의 연간 항생제 판매량과 비교하여도 높은 순위를 차지하고 있다(Fig. 1). 우리나라와 유럽은 가축 사료에 항생제를 첨가하는 것을 금지하고 있으며 항생제 사용을 위해서는 처방전이 필수적으로 필요하지만 여전히 많은 양이 사용 중이며(EU, 2003; USDA, 2011) 이렇게 소비된 항생제는 다양한 경로를 통해 환경으로 유입되어 잠재적인 위험을 야기할 수 있으리라 예측되고 있다.

가축용 항생제의 상당부분은 모화합물 그대로 또는 활성

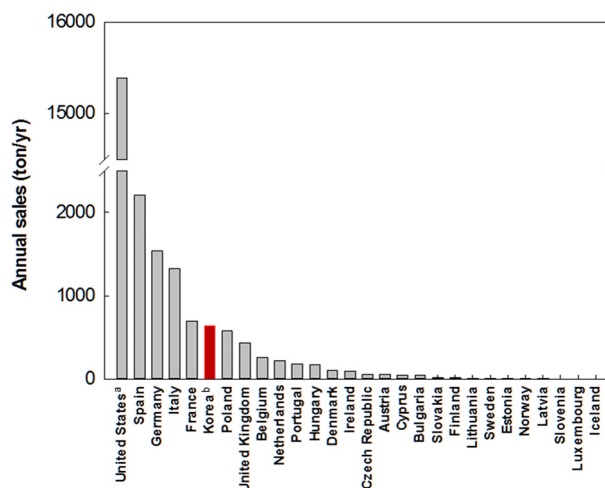


Fig. 1. Annual sales of veterinary antimicrobials for food-producing animals in 2013 (European medicines agency, 2015) a: sales in 2014 (U. S. FDA, 2015); b: sales in 2014 (Lim et al., 2015).

상태의 대사물질 형태로 대변·소변을 통해 배출되기 때문에 (Sarmah et al., 2006) 돼지(Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006; Martinez-Carballo et al., 2007; Zhao et al., 2010), 소

[†] To whom correspondence should be addressed.
egchung@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.

(Zhao et al., 2010), 가금류(Martinez-Carballo et al., 2007; Zhao et al., 2010) 등의 분뇨에서 수백 mg/kg 수준의 농도로 여러 종류의 항생제가 빈번하게 검출되어 왔다. 또한 축산업의 특성상 축산폐수 처리시설이 갖추어지지 않은 중소규모의 농가가 다수 분포되어 있고, 퇴비화 및 유통, 살포과정에서 알려지지 않은 경로로 오염물질이 유출될 가능성이 매우 크다. 실제로 하수처리장의 슬러지뿐 아니라 가축 농장 주변의 토지나 퇴비를 뿌린 경작지에서 다양한 종류의 항생제가 검출되는 것으로 조사되었다(Table 1).

환경 중 잔류 항생제의 검출뿐 아니라 잔류 항생제가 생태계 및 인체에 미치는 영향에 대한 연구도 다양하게 진행되어 왔는데 수 ng/L~µg/L 농도로 검출되는 수준에서도 수생생물의 세포성장이나 생식기능을 저하시키는 등 생태계에 악영향을 주는 것으로 보고되고 있다(Liu and Wong, 2013; Rahman et al., 2009). Migliore et al. (1998)와 Migliore et al. (2003)은 숄파디메톡신(sulfadimethoxine)과 엔로플록사신(enrofloxacin)이 식물의 성장을 저하하는 독성을 나타내는 것을 보고하기도 하였다.

Malch et al. (2014)은 잔류 의약품질이 존재하는 하수처리장 처리수를 이용해 당근, 고구마 등을 재배하여 검출되는 의약품질을 조사하고 재배된 뿌리식물의 섭취가 인간의 건강에 미치는 영향을 평가하였다. 카바마제핀(carbamazepine), 카페인(caffeine), 라모트리진(lamotrigine) 등이 뿌리와 잎에서 검출되었고, 매일 당근을 섭취할 경우 아이들에게 독성을 나타낼 수 있다고 보고하였다. 또한 Pomati et al. (2008)은 인체 세포로 의약품질의 독성을 평가하여 ng/L

수준으로 존재하는 베자피브레이트(bezafibrate), 아테놀롤(atenolol), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 린코마이신(lincomycin)이 세포증식을 억제하여 임산부와 신생아에게 위험성을 나타내는 것을 보고하기도 하였다.

특히 잔류항생제로 인해 발생하는 항생제 내성 박테리아의 위험성에 대한 연구와 새로운 항생제의 개발은 오랜 기간 지속되어 왔다(Bonnet, 2004; Chander et al., 2011; Fischbach and Walsh, 2009; Hasman et al., 2005; Hur et al., 2012; Kim et al., 2012; Neu, 1992; Persoons et al., 2011; Pfeifer et al., 2010; Straus and Hancock, 2006). 그럼에도 불구하고 하수 및 하수슬러지(Biswal et al., 2014; Chen and Zhang, 2013), 물놀이 공간(Santiago-Rodriguez et al., 2013), 육어류 가공식품(Carretero et al., 2008; Chafer-Pericas et al., 2010; Wan et al., 2006; Xu et al., 2012) 등 다양한 시료에서 항생제 내성 미생물의 검출이 보고되고 있고, 인간은 여러 경로를 통해 항생제 내성균에 노출된다. 미국 보건사회복지부에서 발표한 자료에 따르면 미국에서만 항생제 내성균에 의해 연간 2백만 명 이상의 환자와 2만 3천명의 사망자가 발생하였다(CDC, 2013).

이러한 다양한 환경적, 보건적 문제가 보고되고 있음에도 불구하고 우리나라를 포함한 많은 나라들은 하수처리 비용의 절감, 분뇨 중의 인, 질소 회수 및 자원화를 목적으로 가축분뇨를 퇴비화하여 농업 비료로 사용하고 있다. 퇴비의 양이 이미 경작지에서 필요로 하는 수준을 넘고 있으며 (Kim et al., 2015; Kim et al., 2005; OECD, 2001) 퇴비의 반출입량과 시비량 등에 대한 파악이 부정확하여 이로 인

Table 1. Occurrence of antibiotics in common solid samples

Sample matrix	Detected compound	Reference
Livestock products (cattle, chicken, pig, fish)	Apramycin, dihydrostreptomycin, gentamycin, kanamycin, neomycin, enrofloxacin, oxytetracycline, tylosin, tilmicosin, sulfadiazine, chlortetracycline, lincomycin, colistin, albendazole, fenbendazole, mebendazole, oxfendazole, thiabendazole, ciprofloxacin, sulfisoxazole, sulfamethoxypyridazine	Carretero et al., 2008 Chafer-Pericas et al., 2010 Dasenaki and Thomaidis, 2010 Tao et al., 2012 Wan et al., 2006 Xu et al., 2012
Manure	Monensin, chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline, enrofloxacin, ofloxacin, trimethoprim, norfloxacin, sulfadiazine, flumequine, tilmicosin, tylosin, methacycline, erythromycin, sulfamonomethoxine, tetracycline	Bak et al., 2013 Ho et al., 2012 Ho et al., 2014 Jacobsen and Halling-Sorensen, 2006 Karci and Balcioglu, 2009 Zhou et al., 2012
Excreta	Doxycycline, sulfachloropyridazine, enrofloxacin, tetracycline, oxytetracycline, ofloxacin, chlortetracycline, trimethoprim, amoxicillin, difloxacin, sulfamonomethoxine, norfloxacin, fleroxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, sulfaguanidine,	Gorissen et al., 2015 Martinez-Carballo et al., 2007 Zhao et al., 2010 Zhou et al., 2013
Sludge	Sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfamethazine, sulfachloropyridazine, chlortetracycline, doxycycline, trimethoprim, oxytetracycline, enrofloxacin, norfloxacin, methacycline, tetracycline, ciprofloxacin, fleroxacin, lemfloxacin, ofloxacin, clarithromycin, roxythromycin	Zhou et al., 2012 Zhou et al., 2013
Agricultural soil, sediment	Monensin, salinomycin, doxycycline, enrofloxacin, flumequine, norfloxacin, trimethoprim, tylosin, chlortetracycline, oxytetracycline, sulfathiazole, monensin, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine, salinomycin, sulfachloropyridazine, narasin, tetracycline, demeclocycline, roxythromycin,	Bak et al., 2013 Ho et al., 2012 Ho et al., 2014 Kim and Carlson, 2007 Zhou et al., 2012

한 환경오염의 가능성은 높을 것으로 예상되나 과학적인 실험과약이 어려운 상황이다. 뿐만 아니라 응집-침전-모래여과를 통한 입자물질 제거를 주요 메커니즘으로 설계된 기존의 정수처리기술(Adams et al., 2002; Kim et al., 2007; Stackelberg et al., 2004)과 하수처리기술의 활성슬러지법(Clara et al., 2005; Radjenovic et al., 2009)은 지하수나 지표수로 유입되는 대부분의 의약품물질을 제거하기 어려운 것으로 알려져 있어 축산업에서 항생제의 사용 특성과 환경 중 영향을 평가할 수 있는 방안 마련에 대한 요구가 지속되어 왔다.

이에 따라 2015년 환경부는 비료의 공급량, 가축분뇨 등으로 인한 환경오염 실태를 조사하고 축산업에 의해 발생하는 잔류 항생물질의 거동 조사 등을 포함한 「가축분뇨의 관리 및 이용에 관한 법률」과 「가축분뇨실태조사의 세부 절차 및 방법 등에 관한 고시」를 제정·발표하였다(Korea Ministry of Government Legislation, 2015). 고시에 따르면 실태 조사를 위해 가축분뇨, 하천 및 호소, 지하수 등의 시료를 채취하고, 기본적인 수질측정 항목을 비롯해 중금속, 약취 및 잔류항생물질의 농도를 측정하게 된다. 조사방법으로 「비료의 품질검사방법 및 시료채취기준」, 「수질오염공정시험기준」, 「토양오염공정시험기준」, 「약취공정시험법」 등을 따르도록 명시하고 있으나 잔류항생물질을 분석하기 위한 표준시험방법을 언급하지 않고 있다. 미국 EPA method 1694에서 고체, 액체 시료에 대해 액체크로마토그래피(HPLC)와 질량분석기(MS)를 사용하는 잔류의약품물질의 분석방법을 제안하고 있으나 가축분뇨에 대한 전처리방법을 설명하지는 않았다(U. S. EPA, 2007). 액체크로마토그래피와 질량분석기를 이용하여 하천 및 호소수 등 액체 시료의 잔류 항생제를 분석하는 방법은 총설 II에서 고찰한 바와 같이 다양한 계열의 항생제를 대상으로 연구가 진행되어 왔으나, 고체 시료를 대상으로 한 연구는 상대적으로 부족한 상태이다. 인간의 공공보건과 직접적인 연관성으로 인해 식재료인 생선(Evangelopoulou and Samanidou, 2013; Kaufmann et al., 2012; Lopes et al., 2012; Xu et al., 2012), 육류(Berendsen et al., 2013; Bousova et al., 2013; Carretero et al., 2008; Tao et al., 2012; Zhu et al., 2008) 등의 고형 시료를 대상으로 전처리방법을 개발하고 실제 제품을 대상으로 잔류항생제 농도를 측정하여 보고한 사례가 있으나 가축분뇨, 퇴비중의 항생제 분석방법을 제시한 연구는 상대적으로 미미한 것으로 나타났다(Gorissen et al., 2015; Zhao et al., 2010; Zhou et al., 2012).

더욱이 진행된 연구에서 제안된 잔류 항생제 분석방법은 그 대상물질의 범위가 제한적이고, 다종의 항생제 계열에 적용 가능하도록 정립된 분석 방법이 없어 대부분의 연구는 테트라사이클린계(tetracyclines), 설펜아미드계(sulfonamides), 플로로퀴놀론계(fluoroquinolones) 항생제를 주로 분석하고 있고 린코마이신(lincomycin), 플로르페니콜(flofenicol), 콜리스틴(colistin), 클로피돌(clopidol) 등의 동물용 의약품에 대한 연구는 극히 드물게 나타나고 있다(Ben et al., 2008; Chen et al., 2012; Jacobsen and Halling-Sorensen,

2006; Karci and Balcioglu, 2009; Watanabe et al., 2010; Zhao et al., 2010). 따라서 축산농가와 농가 주변의 토양, 하천 등 환경에 대한 실태 조사와 동물용 잔류 항생제의 영향에 대한 심도 있는 평가를 위해서는 다양한 계열의 항생제를 측정할 수 있는 방법에 대한 조사와 이해가 필요하다.

본 연구에서는 1) 동물용 항생제의 국내 판매량 순위를 검토하여 대상 물질을 선정하고, 2) LC-MS를 이용해 선정된 물질을 분석하기 위한 고체 시료의 전처리 과정을 조사하여 향후 가축분뇨 중 잔류항생물질의 분석 방법에 대한 기초 자료를 마련하고자 하였다.

2. Selection of Veterinary Antibiotics

대상물질을 선정하기 위하여 국내 가축용 항생제 판매순위를 조사하였다. 판매량은 『2014년도 국가항생제 사용 및 내성 모니터링』(Lim et al., 2015)자료를 인용하였다. Fig. 2는 연간 판매량이 5톤을 넘는 항생제에 대해 축종별 판매량을 보여준다. 22종의 항생제가 연 5톤 이상 판매되고 이중 15종의 항생제는 돼지용으로 가장 많이 판매되었다. 소와 돼지용으로는 아목시실린(amoxycillin)이, 가금류용으로는 살리노마이신(salinomycin)이 가장 많이 판매되는 것으로 조사되었다. Fig. 3은 판매량 상위 10~50종을 선정 기준으로 하였을 때 선정된 항생제의 연간 판매량이 전체 판매량에서 차지하는 비율을 보여주고 있다. 상위 10종과 20종의 항생제만을 선정할 경우, 판매량이 차지하는 비율은 각각 73%와 87%이고, 상위 40종과 50종의 항생제를 선정할 경우 선정된 판매량은 98%와 99%를 차지하는 것으로 나타났다. 선정된 항생제가 판매된 전체 항생제를 대변하기에 충분하도록 판매량이 차지하는 비율을 90% 이상으로 하여 적정 수의 대상물질을 선정코자하였고 상위 30종을 선정하여 축종에 따라 중복되는 물질과 염(salt)의 형태로 판매되는 물질들을 고려하였을 때, 약 95%의 판매비율을 갖는

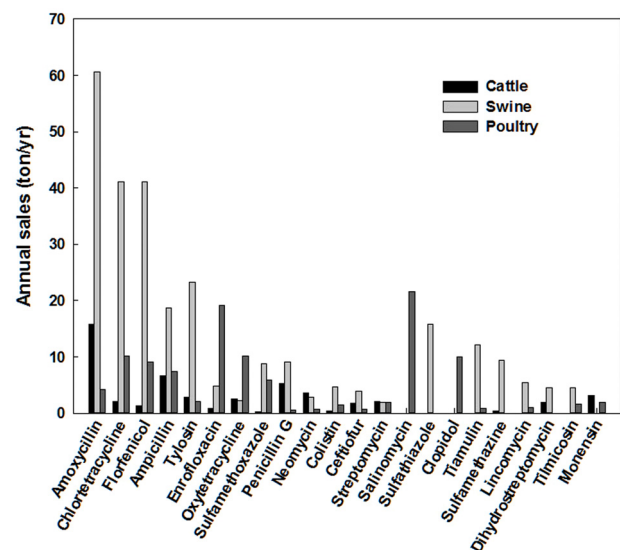


Fig. 2. Annual sales of major antibiotics with livestock species in South Korea, 2014 (Lim et al., 2015).

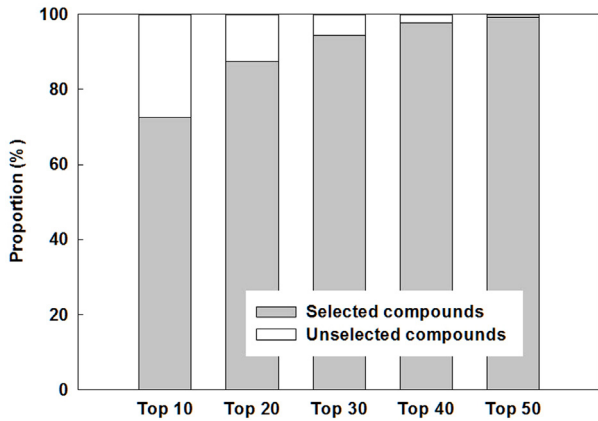


Fig. 3. Comparison of proportions of selected antibiotics sales according to the number of the antibiotics.

37종의 대상물질이 선정되었다(Table 2). 선정된 37종의 항생제는 최소 12개 이상의 계열로 분류되며 다음과 같이 계열별로 상이한 화학적 특성을 갖는다.

테트라사이클린계는 나프타센(naphthacene)구조를 골격으로 하고 산에서 비교적 안정적이나 염기에서 불안정하며 빛에 의해 쉽게 분해되는 특성을 갖는다(Halling-Sorensen et al., 2002). 또한, 2가, 3가의 금속이온과 킬레이트 화합물을 형성하고 실리카의 실라놀 작용기(silanol groups)와 강하게 결합한다(Halling-Sorensen et al., 2002; Oka et al., 2000; Petrovic et al., 2005). 플로로퀴놀론계는 가수분해와 온도의 증가에 안정적이지만 광분해 되기 쉽다(Pico and Andreu, 2007). 테트라사이클린계, 플로로퀴놀론계와 비교하여 설포아마이드계 항생제는 토양 중에서 흡수나 흡착하는 성질이 약하기 때문에 매우 이동이 자유로운 특징이 있고(Tolls, 2001), 이러한 이유로 자연수 중에서 매우 빈번하게 검출되는 계열 중 하나이다. 매크로라이드계 항생제는 10개 이상

의 탄소를 포함하는 락톤(lactone)링으로 구성된다. 대부분의 매크로라이드계는 약한 염기성을 띄며 산에서 매우 불안정한 것으로 알려져 있다(Hou et al., 2015). 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항생제 또한 염기성을 띄고 친수성이 강해 수용해도가 높으며 광분해 되기 쉽다(Thiele-Bruhn, 2003). 베타-락탐(β -lactam)계는 페니실린(penicillin)계열과 세팔로스포린계열을 포함하는데 베타-락탐 링은 산성과 염기성 매체에서 쉽게 분리되는 특징을 갖는다(Thiele-Bruhn, 2003). 카르복실폴리에테르(carboxylic polyether)를 백본(backbone)으로 하는 이오노포어 폴리에테르(ionophore polyether) 계열은 양이온 결합하여 가상의 매크로사이클릭 착물을 형성하는 특성을 갖는다(Volmer and Lock, 1998).

이러한 화학적 특성으로 인해 항생제에 따른 효과적인 전처리 방법이 다를 수 있고, 따라서 본 논문에서는 각 항생물질에 따른 효과적인 전처리 방법을 확인하고자 하였으며 다양한 종의 항생물질을 동시에 분석 가능하도록 하는 전처리 방안을 찾고자 하였다. EPA method 1694 분석방법을 우선 고려하였으며, 선정된 모든 물질들에 대한 분석방법을 검토할 목적으로 EPA method 1694에 제시되지 않은 물질들에 대해서는 문헌조사를 통해 분석방법을 검토하였다. 고체 시료에 포함된 잔류항생제를 분석한 연구를 대상으로 하였고, 고체 시료로는 동물과 생선의 조직이나 계란 등의 식품, 동물의 사료, 자연시료인 토양, 퇴적물, 비료와 가축의 생 분뇨를 대상으로 검토하였다.

3. Pre-treatment Methods of Solid Samples

대표적인 고체 시료인 동물 조직(tissue)은 단백질과 지질을 다량 함유하고 있기 때문에 동물의 근육, 간, 콩팥 등에 포함된 항생제를 분석하기 위해서는 적절하고 충분한 정제

Table 2. The 37 selected antibiotics according to the annual sales of veterinary antibiotics in South Korea, 2014

Compound	Class	Compound	Class
Dihydrostreptomycin	Aminoglycosides	Enrofloxacin	Fluoroquinolones
Gentamicin		Flumequine	
Kanamycin		Marbofloxacin	
Neomycin		Tiamulin	Pleuromutilins
Spectinomycin		Colistin	Polymyxins
Streptomycin		Sulfachloropyridazine	Sulfonamides
Apramycin		Sulfadiazine	
Chloramphenicol		Sulfadimethoxine	
Florfenicol	Sulfamethazine		
Amoxicillin	Sulfamethoxazole		
Ampicillin	β -Lactams (Cephalosporins, penicillins)	Sulfaquinoxaline	Tetracyclines
Ceftiofur		Sulfathiazole	
Penicillin G		Chlortetracycline	
Lasalocid		Doxycycline	
Monensin	Ionophore polyethers	Oxytetracycline	Others
Salinomycin		Clopidol	
Lincomycin	Lincosamides	Fenbendazole	
Tilmicosin	Macrolides	Trimethoprim	
Tylosin			

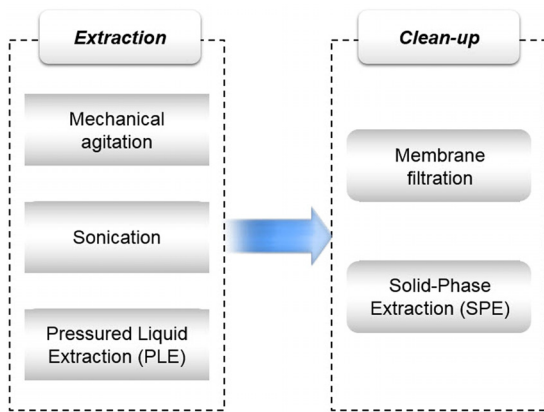


Fig. 4. Schema of a basic concept and common methods for sample preparation of solid samples.

과정을 적용할 필요가 있다. 또한 분뇨, 비료 등의 고체 시료도 단백질을 포함 하는 성상이 복잡한 고체 시료이기 때문에 정확한 분석을 위해서는 적절한 전처리 단계의 선정 및 개발이 중요하다. 특히, 액체 크로마토그래피(liquid chromatography, LC)와 질량분석기(mass spectrometry, MS)를 이용한 분석을 위해서는 시료의 전처리 단계가 매우 중요하며 전처리 방법의 핵심 목적은 분석 대상 물질의 농도를 고농도로 농축하고 여타 방해물질을 제거하는데 있다. 일반적으로 고체 시료의 전처리 방법은 시료중의 항생제를 액체상으로 추출해 내기 위한 추출 과정(extraction)과 항생제가 추출된 추출액에서 불순물과 간섭물질들을 제거하고 고성능액체크로마토그래피에 주입할 수 있는 상태로 시료를 제조하는 정제(clean-up) 과정을 거친다(Fig. 4).

고체 시료에 포함된 항생제를 추출하는 방법으로는 크게 액-액추출법(liquid-liquid extraction; LLE)과 고상추출법(solid-phase extraction, SPE)으로 나뉜다. 전통적인 액-액추출법의 효율을 높이기 위한 목적으로 기계적인 교반(Kim and Carlson, 2007; Lopes et al., 2012; Schlusener et al., 2006), 초음파(Boscher et al., 2010; Gorissen et al., 2015; Ho et al., 2012; Zhou et al., 2012), 가압용매추출법(pressurized liquid extraction)(Bak et al., 2013; Carretero et al., 2008; Messi et al., 2005) 등의 방법이 사용된다. 압력과 온도를 조절하고 초임계유체(supercritical fluid)의 용해력 변화를 통해 용질을 추출·분리하는 초임계유체추출법(supercritical fluid extraction)이 고체 시료에 적용이 가능하나 자연물질로부터 정유(精油, essential oil)를 추출하는데 주로 사용되며(Lang and Wai, 2001; Reverchon and De Marco, 2006) 항생제 추출에는 거의 적용되지 않는 것으로 나타났다. 고상추출법에서는 주로 상용화된 카트리지를 적용하여 추출을 수행하며 항생제 분석을 위한 전처리 과정에서 가장 많이 사용되는 방법 중 하나이다. 그러나 고체 시료의 전처리 과정에서는 용매를 이용하여 고체 시료로부터 대상 물질을 추출한 후 농축 및 정제의 목적으로 고상추출법이 적용되며(Ho et al., 2012; Kaufmann et al., 2012) 정제과정으로 분리막 여과나(Bousova et al., 2013; Gorissen et al., 2015; Kaklamanos et al., 2013; Lopes et al., 2012) 둘 이상의 카트리

지를 연속 결합한 고상추출법을 적용하기도 한다(Hong et al., 2015; Zhou et al., 2012). 고체 시료로부터 직접 물질을 추출하는 방법으로 대상 시료와 고상 흡착물질을 혼합하여 균질화한 후 추출을 수행하는 시료고체상분산(matrix solid phase dispersion)을 사용하기도 하는데 식품 중의 독성물질이나 단일계열의 항생제를 추출하는데 주로 사용되며 다계열 항생제 분석을 위한 전처리로 사용되는 경우는 극히 드문 것으로 나타났다(Barker, 2007; Capriotti et al., 2010). 농약과 살충제를 효과적으로 분석할 목적으로 시료 고체상분산법을 개량하여 2003년 미국농무부(U. S. Department of Agriculture, USDA)에서 개발한 QuEChERS(Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)방법(Anastassiades et al., 2003)은 지속적인 연구가 진행되어 다양한 분석용 키트(kit)가 개발되어 사용되고 있으며 고체나 점도가 높은 액체(우유, 꿀 등) 식품으로부터 항생제를 추출하기 위한 전처리 기법으로 그 적용 분야가 확대되고 있다(Amelin et al., 2015; Shendy et al., 2016; Stubbings and Bigwood, 2009).

추출과정에서는 제단백(deproteinization)이 필요하며 동물용 항생제 추출을 보고한 대부분의 문헌은 과염소산(perchloric acid), 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA) 등의 유기산을 첨가하고 변성 침전된 단백질을 원심분리나 여과를 통해 제거하는 방법을 사용하는 것으로 나타났다(Bousova et al., 2013; Kaufmann et al., 2012; Tao et al., 2012).

3.1. 아미노글리코사이드계 항생제 분석을 위한 고체 시료 전처리

앞서 언급한 바와 같이 유럽연합, 중국, 일본, 미국, 식품첨가물 전문가위원회(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA) 등에서 식품 중의 아미노글리코사이드계 항생제의 최대 허용 농도를 제시하고 있기 때문에 동물성 식품 중의 잔류 항생제 분석을 위한 많은 연구가 진행되었지만(Bousova et al., 2013; Kaufmann et al., 2012; Tao et al., 2012; Zhu et al., 2008), 타 계열 항생제와 동시 분석을 수행하거나 분뇨, 퇴비, 퇴적물 등 식품 이외의 매질에 대한 분석방법이나 전처리방법을 연구한 문헌은 제한적이다. 따라서 아미노글리코사이드계열 항생제의 전처리 방법은 분류하여 Table 3에 정리하고 나머지 항생제의 전처리 방법은 Table 4에 나타내었다.

고체 시료를 사용하는 모든 분석방법은 시료 균질화 과정을 거친다. 잔류 항생물질의 추출을 위한 용매는 균질화 전 또는 후에 시료에 투입하며 균질화 과정을 거치면서 고체 입자는 분자상으로까지 파쇄되어 용매와 접촉한다. 대부분의 아미노글리코사이드 계열의 항생제는 균질화를 통한 추출방법을 적용하는 것으로 조사되었다(Table 3). 일반적으로 동물 조직으로부터 항생제를 추출하는 과정에서 제단백을 수행하는데, 시료 중에 단백질이 존재하는 경우 화학반응을 방해하거나 거품 또는 혼탁을 일으켜 분석과정에 오차를 유발할 수 있기 때문이다. 과거의 연구에서 유기용매인 아세토나이트릴(acetonitrile, ACN)을 사용하여 계란에서 스트렙토마이신(streptomycin)을 72%의 회수율로 추출하

Table 3. Extraction and clean-up method for the determination of aminoglycosides in solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%)	Reference
		Method	Solvent and/or solution			
Dihydrostreptomycin	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	10 mM KH ₂ PO ₄ , 5% TCA, 5 ml n-hexane	pH 7.5 (ammonia) CBA cartridge Eluent: 20 mM ammonium acetate	85-103	Tao et al., 2012
	Hen egg				71-82	
	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	5% TCA, 0.2 M HFBA	pH 8.5 (ammonia) Oasis HLB Eluent: ACN/0.2M HFBA (8.2, v/v)	84-103	Zhu et al., 2008
	Liver			pH 5.5-6.5 (LiOH) Oasis MCX	83 (1 mg/kg)	
	Tissue (pork)	Homogenize, centrifuge	5% TCA	Eluent: 1 M ammonium formate in H ₂ O/ACN (8.2, v/v)	77 (1 mg/kg)	Kaufmann et al., 2012
	Fish				80 (1 mg/kg)	
Gentamicin	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	10 mM KH ₂ PO ₄ , 5% TCA, 5 ml n-hexane	pH 7.5 (ammonia) CBA cartridge Eluent: 20 mM ammonium acetate	74-101	Tao et al., 2012
	Hen egg				76-88	
	Veal liver	Homogenize, centrifuge	5% TCA	pH 5.5-6.5 (LiOH) Oasis MCX Eluent: 1 M ammonium formate in H ₂ O/ACN (8.2, v/v)	86 (1 mg/kg)	Kaufmann et al., 2012
	Tissue (pork)				70 (1 mg/kg)	
	Fish				79 (1 mg/kg)	
	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	10 mM KH ₂ PO ₄ , 5% TCA, 5 ml n-hexane	pH 7.5 (ammonia) CBA cartridge Eluent: 20 mM ammonium acetate	75-98	Tao et al., 2012
Kanamycin	Hen egg				82-97	
	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	5% TCA, 0.2 M HFBA	pH 8.5 (ammonia) Oasis HLB Elute: ACN/0.2M HFBA (8.2, v/v)	83-98	Zhu et al., 2008
	Veal liver	Homogenize, centrifuge	5% TCA	pH 5.5-6.5 (LiOH) Oasis MCX Eluent: 1 M ammonium formate in H ₂ O/ACN (8.2, v/v)	85 (1 mg/kg)	Kaufmann et al., 2012
Neomycin	Tissue (pork)				85 (1 mg/kg)	
	Fish				81 (1 mg/kg)	
	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon	109 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	10 mM KH ₂ PO ₄ , 5% TCA, 5 ml n-hexane	pH 7.5 (ammonia) CBA cartridge Eluent: 20 mM ammonium acetate	72-88	Tao et al., 2012
	Hen egg				83-94	
	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	5% TCA, 0.2 M HFBA	pH 8.5 (ammonia) Oasis HLB Eluent: ACN/0.2M HFBA (8.2, v/v)	77-92	Zhu et al., 2008

Table 3. Extraction and clean-up method for the determination of aminoglycosides in solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Method	Extraction		Clean-up	Recovery (%)	Reference
			Solvent and/or solution	Method			
	Veal liver	Homogenize, centrifuge	5% TCA	pH 5.5-6.5 (LiOH) Oasis MCX	Eluent: 1 M ammonium formate in H ₂ O/ACN (8:2, v/v)	83 (1 mg/kg)	Kaufmann et al., 2012
	Tissue (pork)					73 (1 mg/kg)	
	Fish					67 (1 mg/kg)	
Spectinomycin	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon		84 (250 µg/kg)	Bousova et al., 2013
	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	10 mM KH ₂ PO ₄ , 5% TCA, 5 ml n-hexane	pH 7.5 (ammonia) CBA cartridge	Eluent: 20 mM ammonium acetate	89-106	Tao et al., 2012
	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	5% TCA, 0.2 M HFBA	pH 8.5 (ammonia) Oasis HLB	Eluent: ACN/0.2M HFBA (8:2, v/v)	89-105	Zhu et al., 2008
	Veal liver	Homogenize, centrifuge	5% TCA	pH 5.5-6.5 (LiOH) Oasis MCX	Eluent: 1 M ammonium formate in H ₂ O/ACN (8:2, v/v)	65 (1 mg/kg)	Kaufmann et al., 2012
	Tissue (pork)					76 (1 mg/kg)	
	Fish					77 (1 mg/kg)	
Streptomycin	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	10 mM KH ₂ PO ₄ , 5% TCA, 5 ml n-hexane	pH 7.5 (ammonia) CBA cartridge	Eluent: 20 mM ammonium acetate	78-101	Tao et al., 2012
	Hen egg					75-91	
	Veal liver					64 (1 mg/kg)	
	Tissue (pork)	Homogenize, centrifuge	5% TCA	pH 5.5-6.5 (LiOH) Oasis MCX	Eluent: 1 M ammonium formate in H ₂ O/ACN (8:2, v/v)	62 (1 mg/kg)	Kaufmann et al., 2012
	Fish					65 (1 mg/kg)	
	Tissue (cattle, chicken, pig)					72-96	
Apramycin	Tissue (cattle, chicken, pig)	Homogenize, centrifuge	10 mM KH ₂ PO ₄ , 5% TCA, 5 ml n-hexane	pH 7.5 (ammonia) CBA cartridge	Eluent: 20 mM ammonium acetate	71-96	Tao et al., 2012
	Hen egg					73-87	
	Tissue (cattle, chicken, pig)					73-98	
	Tissue (pork)	Homogenize, centrifuge	5% TCA	pH 8.5 (ammonia) Oasis HLB	Eluent: ACN/0.2M HFBA (8:2, v/v)	84 (1 mg/kg)	Kaufmann et al., 2012
	Fish					83 (1 mg/kg)	
	Tissue (pork)					85 (1 mg/kg)	

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference			
		Method	Solvent						
Chloramphenicol	Manure Sludge Sediment	Vortex mix, ultrasonic	ACN, citric acid buffer (pH 3)	SAX-HBL	56 (40 ng/g)	Zhou et al., 2012			
					63 (40 ng/g)				
					71 (50 ng/g)				
Chloramphenicol	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	105 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010			
					Tissue (fish)		Vortex, sonicate, centrifuge	H ₂ O/acetone (50/50, v/v)	96 (25 µg/kg)
									Oasis HLB Eluent: ACN, MeOH
Chloramphenicol	Manure Sludge Sediment	Vortex mix, ultrasonic	ACN, citric acid buffer(pH 3)	SAX-HBL	43 (40 ng/g)	Zhou et al., 2012			
					59 (40 ng/g)				
					73 (50 ng/g)				
Florfenicol	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	113 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010			
					Tissue (fish)		Vortex, sonicate, centrifuge	H ₂ O/acetone (50/50, v/v)	99 (500 µg/kg)
									Oasis HLB Eluent: ACN, MeOH
Amoxicillin	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	54 (80 ng/g)	Boscher et al., 2010			
					Poultry excreta		Vortex, sonicate, centrifuge	ACN/Mellvaine buffer (75/25, v/v)	96 (100 ng/g)
									Filtration 0.2 µm PVDF
Amoxicillin	Tissue (Poultry)	Shaking, incubation shaking, centrifuge	borate solution and piperidine n-hexane	pH 7.2 (acetic acid or ammonia) Strata-X Eluent: MeOH/ACN (1:1, v/v)	97 (25 µg/kg)	Berendsen et al., 2013			
					98 (50 µg/kg)				
					100 (75 µg/kg)				
Ampicillin	Tissue (fish)	Vortex, sonicate, centrifuge	H ₂ O/acetone (50/50, v/v)	Oasis HLB Elute: ACN, MeOH	102 (25 µg/kg)	Evangelopoulou and Samanidou, 2013			
					101 (50 µg/kg)				
					97 (75 µg/kg)				
Ampicillin	Tissue (Poultry)	Shaking, incubation shaking, centrifuge	borate solution and piperidine n-hexane	pH 7.2 (acetic acid or ammonia) Strata-X Eluent: MeOH/ACN (1:1, v/v)	106 (25 µg/kg)	Berendsen et al., 2013			
					102 (50 µg/kg)				
					99 (75 µg/kg)				
Ampicillin	Tissue (fish)	Shaking, centrifuge,	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v) MgSO ₄ , sodium acetate	Filtration 0.2 µm nylon	118 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012			

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
		Method	Solvent			
Ceftiofur	Manure Sludge Sediment	Evaporate, reconstitute	1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	SAX-HBL	133 (40 ng/g) 132 (40 ng/g) 44 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
		Vortex mix, sonicate	ACN, citric acid buffer (pH 3)			
	Tissue (Poultry)	Shaking, incubation	borate solution and piperidine	pH 7.2 (acetic acid or ammonia)	95 (25 µg/kg)	Berendsen et al., 2013
		shaking, centrifuge	n-hexane	Eluent: MeOH/ACN (1:1, v/v)	97 (50 µg/kg) 101 (75 µg/kg)	
Penicillin G	Solid Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	214 99	U. S. EPA, 2007
		Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	83 (40 ng/g)	
	Tissue (fish)	Vortex, sonicate, centrifuge	H ₂ O/acetone (50/50, v/v)	Oasis HLB Eluent: ACN, MeOH	96 (25 µg/kg) 99 (50 µg/kg) 102 (75 µg/kg)	Evaggelopoulos and Samanidou, 2013
	Tissue (Poultry)	Shaking, incubation shaking, centrifuge	borate solution and piperidine n-hexane	pH 7.2 (acetic acid or ammonia) Eluent: MeOH/ACN (1:1, v/v)	100 (25 µg/kg) 98 (50 µg/kg) 100 (75 µg/kg)	Berendsen et al., 2013
Tissue (fish)	Evaporate, reconstitute	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v)		Filtration 0.2 µm nylon	76 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
		MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)				
Soil Sediment Manure	PLE	MeOH/H ₂ O, 40°C		Oasis HLB	111 (100 µg/kg) 93 (100 µg/kg) 102 (100 µg/kg)	Bak et al., 2013
		MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2			Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	101 (80 ng/g)
Animal feed	Sonicate, shaking, centrifuge	Ammonium solution in MeOH, acetic acid in MeOH		-	104 (625 µg/kg)	Pietruk et al., 2015

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
		Method	Solvent			
Monensin	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 μm nylon	87-89 (50-500 μg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
	Soil Sediment Manure	PLE	MeOH/H ₂ O, 40°C	Oasis HLB	117 (100 μg/kg) 95 (100 μg/kg) 108 (100 μg/kg)	Bak et al., 2013
	Manure Sludge Sediment	Vortex mix, sonicate	ACN, citric acid buffer (pH 3)	SAX-HBL	<10 (40 ng/g) <10 (40 ng/g) 81 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
Salinomycin	Sediment	Mix, centrifuge	Mellvain buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Eluent: MeOH	71 (30 μg/kg)	Kim and Carlson, 2007
	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	99 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010
	Animal feed	Sonicate, shaking, centrifuge	Ammonium solution in MeOH, acetic acid in MeOH	-	96 (623 μg/kg)	Pietruk et al., 2015
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 μm nylon	98-101 (50-500 μg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
Salinomycin	Soil Sediment Manure	PLE	MeOH/H ₂ O, 40°C	Oasis HLB	102 (100 μg/kg) 96 (100 μg/kg) 107 (100 μg/kg)	Bak et al., 2013
	Manure Sludge Sediment	Vortex mix, sonicate	ACN, citric acid buffer (pH 3)	SAX-HBL	<10 (40 ng/g) <10 (40 ng/g) 112 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
	Sediment	Mix, centrifuge	Mellvain buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Eluent: MeOH	74 (30 μg/kg)	Kim and Carlson, 2007
	Manure	Shaking, centrifuge	Phosphate buffer (pH 8), ethyl acetate	UCT Doil hydrophilic Elute: 8 ml ACN/0.1 M ammonium acetate (aq) (3:2, v/v)	119 (2-2000 μg/kg)	Schlusener et al., 2006
Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	65 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010	

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference	
	Sample matrix	Method				Solvent
Lincomycin	Animal feed	Sonicate, shaking, centrifuge	Ammonium solution in MeOH, acetic acid in MeOH	94 (350 µg/kg)	Pietruk et al., 2015	
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	91-98 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013	
	Solid Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	56 199 U. S. EPA, 2007	
Tilmicosin	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	90 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010	
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	88 (100 µg/kg)	Carretero et al., 2008	
	Manure Sludge Sediment	Vortex mix, sonicate	ACN, citric acid buffer(pH 3)	SAX-HBL	110 (40 ng/g) 160 (40 ng/g) 92 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
Animal feed	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon	94 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	91-111 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
	Manure, Soil	Vortex, sonicate,	MeOH/ACN/0.1 M EDTA/Mclvaine buffer (30:20:25:25, v/v/v/v)	pH 2.5 (H ₃ PO ₄) Oasis HLB Eluent: MeOH	93 103	Ho et al., 2012
Tissue (Cattle and pig)	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	60 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	82 (50 µg/kg)	Carretero et al., 2008

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
	Sample matrix	Method			
Tylosin	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon	105 (75 µg/kg) Bousova et al., 2013
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	103-111 (50-250 µg/kg) Kaklamamos et al., 2013
	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	61 48 U. S. EPA, 2007
	Manure, Soil	Vortex, sonicate,	MeOH/ACN/0.1 M EDTA/McIlvaine buffer (30:20:25:25, v/v/v/v)	pH 2.5 (H ₃ PO ₄) Oasis HLB Elute: MeOH	103 89 Ho et al., 2012
	Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, sonicate	ACN, citric acid buffer (pH 3)	SAX-HBL	137 (40 ng/g) 84 (40 ng/g) 130 (50 ng/g) Zhou et al., 2012
	Sediment	Mix, centrifuge	McIlvaine buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Elute: MeOH	75 (30 µg/kg) Kim and Carlson, 2007
	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/McIlvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	73 (40 ng/g) Boscher et al., 2010
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	91 (100 µg/kg) Carretero et al., 2008
	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon	84 (100 µg/kg) Bousova et al., 2013
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	112-115 (50-500 µg/kg) Kaklamamos et al., 2013
Enrofloxacin	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	pH 2.0 Oasis HLB	97 109 U. S. EPA, 2007
	Poultry excreta	Vortex, sonicate, centrifuge	ACN/McIlvaine buffer (75/25, v/v)	Filtration 0.2 µm PVDF	105 (100 ng/g) Gorissen et al., 2015

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
		Method	Solvent			
	Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, sonicate	ACN,	SAX-HBL	162 (40 ng/g)	Zhou et al., 2012
			citric acid buffer (pH 3)		193 (40 ng/g)	
					280 (50 ng/g)	
	Manure, Soil	Vortex, sonicate,	MeOH/ACN/0.1 M EDTA/Mclvaine buffer (30:20:25:25, v/v/v/v)	pH 2.5 (H ₃ PO ₄) Oasis HLB Eluent: MeOH	102	Ho et al., 2012
					113	
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	106-105 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mclvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	66 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	88 (100 µg/kg)	Carretero et al., 2008
	Tissue (fish)	Shaking, centrifuge, Evaporate, reconstitute	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	109 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
			MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)			
	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon	108 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	151	U. S. EPA, 2007
					92	
	Poultry excreta	Vortex, sonicate, centrifuge	ACN/Mclvaine buffer (75/25, v/v)	Filtration 0.2 µm PVDF	90 (100 ng/g)	Gorissen et al., 2015
Flumequine	Manure, Soil	Vortex, sonicate,	MeOH/ACN/0.1 M EDTA/Mclvaine buffer (30:20:25:25, v/v/v/v)	pH 2.5 (H ₃ PO ₄) Oasis HLB Eluent: MeOH	92	Ho et al., 2012
					99	
	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mclvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	81 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
		Method	Solvent			
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	93 (200 µg/kg)	Carretero et al., 2008
		Shaking, centrifuge,	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v)	Filtration	101 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
		Evaporate, reconstitute	MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	0.2 µm nylon		
	Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, sonicate	ACN, citric acid buffer(pH 3)	SAX-HBL	119 (40 ng/g) 104 (40 ng/g) 116 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
		Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration	106 (30 µg/kg)	Bousova et al., 2013
		Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	70 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010
Marbofloxacin	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	100-113 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	77 (150 µg/kg)	Carretero et al., 2008
		Shaking, centrifuge,	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v)	Filtration	112 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
		Evaporate, reconstitute	MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	0.2 µm nylon		
Tiamulin	Manure	Shaking, centrifuge	Phosphate buffer (pH 8), ethyl acetate	UCT Doil hydrophilic Elute: 8 ml ACN/0.1 M ammonium acetate (aq) (3:2, v/v)	123 (2-2000 µg/kg)	Schlusener et al., 2006
		Homogenize, centrifuge	H ₂ O/MeOH (1:1, v/v), acetone/tetrahydrofuran (6:4, v/v), DCM	Filtration centrifuge filter	105 (30 µg/kg) 109 (100 µg/kg)	Hormazabal et al., 2003
		Homogenize, sonicate, centrifuge	MeOH/H ₂ O (5/4, v/v), 10M HCl	PLS cartridge Elute: FA/MeOH/H ₂ O (0.2/70/30, v/v/v/v)	73-83 (200 µg/kg)	Xu et al., 2012

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
	Sample matrix	Method			
Bovine milk	Poultry liver	Vortex, centrifuge	Phenomenex Strata-X Eluent: FA/MeOH/H ₂ O (0.2/70/30, v/v/v)	Colistin A: 98 Colistin B: 97	Wan et al., 2006
		Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	
Solid, Biosolid	Sediment	Mix, centrifuge	Mcllvain buffer solution (pH 4)	112 (30 µg/kg)	Kim and Carlson, 2007
Tissue (chicken)		Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	102 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
Poultry excreta		Vortex, sonicate, centrifuge	ACN/Mcllvain buffer (75/25, v/v)	90 (100 ng/g)	Gorissen et al., 2015
Animal feed		Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	63-95 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
Tissue (fish)		Shaking, centrifuge, Evaporate, reconstitute	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v) MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	93 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
Solid, Biosolid		Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	159 108	U. S. EPA, 2007
Manure, Sludge, Sediment		Vortex mix, ultrasonic	ACN, citric acid buffer (pH 3)	97 (40 ng/g) 127 (40 ng/g) 107 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
Poultry excreta		Vortex, sonicate, centrifuge	ACN/Mcllvain buffer (75/25, v/v)	92 (50 ng/g)	Gorissen et al., 2015
Animal feed		Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	74-84 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction Method	Solvent	Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
Sulfadimethoxine	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	96 (100 µg/kg)	Carretero et al., 2008
	Manure, Soil	Vortex, sonicate,	MeOH/ACN/0.1 M EDTA/Mclvaine buffer (30:20:25:25, v/v/v/v)	pH 2.5 (H ₃ PO ₄) Oasis HLB Eluent: MeOH	72 63	Ho et al., 2012
	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mclvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	81 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010
	Tissue (fish)	Shaking, centrifuge, Evaporate, reconstitute	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v) MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	Filtration	103 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
				0.2 µm nylon		
	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0	79	U. S. EPA, 2007
				Oasis HLB	68	
				Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)		
	Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, ultrasonic	ACN, citric acid buffer (pH 3)	SAX-HBL	68 (40 ng/g) 81 (40 ng/g) 73 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration	97 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013	
			0.45 µm Nylon			
Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v/v)	Filtration	91-102 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013	
			0.2 µm nylon			
Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	89 (100 µg/kg)	Carretero et al., 2008	
Tissue (fish)	Shaking, centrifuge, Evaporate, reconstitute	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v) MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	Filtration	76 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012	
			0.2 µm nylon			
Sulfamethazine	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	pH 2.0	120	U. S. EPA, 2007	
			Oasis HLB	103		
			Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)			

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
	Sample matrix	Method			
	Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, ultrasonic	ACN,	81 (40 ng/g)	Zhou et al., 2012
			citric acid buffer (pH 3)	104 (40 ng/g)	
				90 (50 ng/g)	
Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	82-92 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
Sediment	Mix, centrifuge	McIlvain buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Eluent: MeOH	106 (30 µg/kg)	Kim and Carlson, 2007
Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB	103	U. S. EPA, 2007
			Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	103	
Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, ultrasonic	ACN,	SAX-HBL	70 (40 ng/g)	Zhou et al., 2012
		citric acid buffer (pH 3)		88 (40 ng/g)	
				91 (50 ng/g)	
Sulfamethoxazole	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon	108 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
Sediment	Mix, centrifuge	McIlvain buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Eluent: MeOH	108 (30 µg/kg)	Kim and Carlson, 2007
Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	76-97 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, ultrasonic	ACN,	SAX-HLB	52 (40 ng/g)	Zhou et al., 2012
		citric acid buffer (pH 3)		66 (40 ng/g)	
				55 (50 ng/g)	
Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	89 (100 µg/kg)	Carretero et al., 2008
Sulfaquinoxaline	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	68-94 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
Tissue (fish)	Shaking, centrifuge,	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	96 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
		MgSO ₄ , sodium acetate			

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
		Method	Solvent			
Sulfathiazole		Evaporate, reconstitute	1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)			
	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filter 0.45 µm Nylon	94 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	59 92	U. S. EPA, 2007
	Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, ultrasonic	ACN, citric acid buffer (pH 3)	SAX-HLB	110 (40 ng/g) 109 (40 ng/g) 126 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	78-86 (50-500 µg/kg)	Kaklamamos et al., 2013
	Sediment	Mix, centrifuge	McIlvain buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Eluent: MeOH	106 (30 µg/kg)	Kim and Carlson, 2007
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	85 (100 µg/kg)	Carretero et al., 2008
	Tissue (fish)	Shaking, centrifuge	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	92 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
		Evaporate, reconstitute	MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)			
	Chlortetracycline	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	121 114
Manure, Sludge, Sediment		Vortex mix, sonicate	ACN, citric acid buffer (pH 3)	SAX-HLB	105 (40 ng/g) 129 (40 ng/g) 56 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
Tissue (chicken)		Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filter 0.45 µm Nylon	85 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
Sediment		Mix, centrifuge	McIlvain buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Eluent: MeOH	69 (30 µg/kg)	Kim and Carlson, 2007

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
		Method	Solvent			
	Poultry excreta	Vortex, sonicate, centrifuge	ACN/McIlvaine buffer (75/25, v/v)	Filtration 0.2 µm PVDF	89 (50 ng/g)	Gorissen et al., 2015
		Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	97-117 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	86 (100 µg/kg)	Carretero et al., 2008
		Shaking, centrifuge, Evaporate, reconstitute	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v) MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	125 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	68 87	U. S. EPA, 2007
		Vortex mix, sonicate	ACN, citric acid buffer (pH 3)	SAX-HBL	110 (40 ng/g) 117 (40 ng/g) 117 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon	98 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
		Mix, centrifuge	McIlvaine buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Eluent: MeOH	75 (30 µg/kg)	Kim and Carlson, 2007
Doxycycline	Poultry excreta	Vortex, sonicate, centrifuge	ACN/McIlvaine buffer (75/25, v/v)	Filtration 0.2 µm PVDF	102 (50 ng/g)	Gorissen et al., 2015
		Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	73-88 (100-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
	Manure, Soil	Vortex, sonicate,	MeOH/ACN/0.1 M EDTA/McIlvaine buffer (30:20:25:25, v/v/v/v)	pH 2.5 (H ₃ PO ₄) Oasis HLB Eluent: MeOH	98 76	Ho et al., 2012

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
		Method	Solvent			
Oxytetracycline	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	63 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010
	Tissue (fish)	Shaking, centrifuge, Evaporate, reconstitute	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v) MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	Filtration 0.2µm nylon	94 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	113 74	U. S. EPA, 2007
	Manure, Sludge, Sediment	Vortex mix, ultrasonic	ACN, citric acid buffer(pH 3)	SAX-HBL	259 (40 ng/g) 198 (40 ng/g) 94 (50 ng/g)	Zhou et al., 2012
	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filter 0.45 µm Nylon	109 (100 µg/kg)	Bousova et al., 2013
	Sediment	Mix, centrifuge	Mellvaine buffer solution (pH 4)	Oasis HLB Eluent: MeOH	53 (30 µg/kg)	Kim and Carlson, 2007
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	61-77 (100-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	28 (40 ng/g)	Boscher et al., 2010
	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	74 (100 µg/kg)	Carretero et al., 2008
	Tissue (fish)	Shaking, centrifuge, Evaporate, reconstitute	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v) MgSO ₄ , sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	111 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Extraction		Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference	
	Sample matrix	Method				Solvent
Clopidol	Pork meat	Homogenize, centrifuge, sonicate	ACN (homogenize, centrifuge), n-hexane (discard), ACN (sonicate), n-hexane (centrifuge, discard)	Filtration 0.45 µm	90	Fuh et al., 2000
	Animal feed	Vortex, sonicate, shaking, centrifuge	1% FA in ACN/MeOH/H ₂ O (65/25/10, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	70-86 (50-500 µg/kg)	Kaklamanos et al., 2013
	Avian muscle and egg	Homogenise, vortex, shaking, centrifuge	ACN	Filtration 0.2 µm PTFE	104 (muscle) 84 (egg)	Moloney et al., 2012
Fenbendazole	Animal feed	Sonicate, shaking, centrifuge	Ammonium solution in MeOH, acetic acid in MeOH	-	103 (50 µg/kg) 89 (300 µg/kg)	Pietruk et al., 2015
	Tissue (fish)	Shaking, centrifuge	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	96 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012
		Evaporate, reconstitute	MgSO ₄ , sodium acetate			
Trimethoprim	Solid, Biosolid	Vortex, sonicate, centrifuge	Phosphate buffer (pH 2), ACN	pH 2.0 Oasis HLB Eluent: ACN/MeOH (1:1, v/v)	103 99	U. S. EPA, 2007
	Animal feed	Shaking, sonicate, centrifuge	MeOH/ACN/Mellvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v) + 0.3% 0.5M EDTA-Na2	Dispersive SPE Sorbent: PSA vortex, centrifuge	89 (40 µg/kg)	Boscher et al., 2010
	Tissue (chicken)	Homogenize, vortex, centrifuge	ACN:2% TCA (44:55, v/v)	Filtration 0.45 µm Nylon	91 (50 µg/kg)	Bousova et al., 2013
Poultry excreta	Tissue (Cattle and pig)	PLE	Samples blended with EDTA-treated sand, extracted with water, 1500 psi, 70°C	-	75 (50 µg/kg)	Carretero et al., 2008
	Poultry excreta	Vortex, sonicate, centrifuge	ACN/Mellvaine buffer (75/25, v/v)	Filtration 0.2 µm PVDF	93 (50 ng/g)	Gorissen et al., 2015

Table 4. Extraction and clean-up method for pre-treatment of the other solid samples (TCA: trichloroacetic acid; HFBA: heptafluorobutyric acid; PLE: pressurized liquid extraction; PSA: primary secondary amine; FA: formic acid; DCM: dichloromethane; ACN: acetonitrile)

Analyte	Sample matrix	Extraction			Clean-up	Recovery (%) and concentration	Reference
		Method	Solvent				
Manure, Soil		Vortex, sonicate	MeOH/ACN/0.1 M EDTA/McIlvaine buffer (30:20:25:25, v/v/v/v)	pH 2.5 (H ₃ PO ₄) Oasis HLB Eluent: MeOH	102 90	Ho et al., 2012	
		Shaking, centrifuge	H ₂ O/ACN/MeOH (4/15/5, v/v/v)				
Tissue (fish)		Evaporate, reconstitute	MgSO ₄ sodium acetate 1% FA in H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	Filtration 0.2 µm nylon	115 (50 µg/kg)	Lopes et al., 2012	

기도 하였으나(Kowalski et al., 1999) 최근의 연구에서는 산을 주로 사용한다. 파염소산(Vinas et al., 2007)이나 포름산(formic acid)(Heller et al., 2000)을 사용한 연구도 보고되고 있으나 아미노글리코사이드계열의 항생제를 분석한 최근의 연구들은 트리클로로아세트산을 주로 사용하는 것으로 나타났다. 첨가된 트리클로로아세트산은 음이온으로 해리되고 단백질과 결합하여 침전물을 형성하는 것으로 알려져 있다. 또한 Kaufmann and Maden (2005)은 최적화된 농도인 5%에서 만족할 만한 회수율을 나타내는 것으로 보고하였다. Kaufmann and Maden (2005)의 연구에 따르면 2% 이하의 농도(0.1, 1, 2%)에서는 탁도를 갖는 추출액이 생성되고 이는 정제과정에 어려움을 줄 뿐만 아니라 회수율도 감소하는 것으로 나타났다. 또한 10%의 트리클로로아세트산을 적용하였을 때 회수율은 가장 높았으나 높은 이온세기로 인해 고상추출단계에서 부정적인 효과를 나타내고 질량분석기에서 높은 이온억제(ion suppression)현상이 나타날 수 있다고 하였다.

추출된 액상시료는 고상추출법을 통해 정제과정을 거치는데 주로 약한 양이온교환 카트리지(weak cation exchanger)가 사용되며(Chen et al., 2010; Cherlet et al., 2007; Ishii et al., 2008; Van Holthoon et al., 2009) 이온교환 카트리지의 분자의 이온화형태에 따라 결합·분리 여부가 결정되기 때문에 적재시료의 pH 조절이 매우 중요하다(Kaufmann et al., 2012). 조사 결과 시료의 pH는 약산성 또는 약염기성인 5.5~8.5 범위에서 결정되는 것으로 나타났다. Tao et al. (2012)은 자동화 고상추출시스템인 Gilson Aspec XL4 automated SPE system(carboxy propyl phase(CBA))으로 아미노글리코사이드계 항생제 분석을 위한 시료를 처리하였는데 pH 6.5이하, 8.5이상에서 급격한 회수율 감소를 확인하였고 7.5를 최적 조건으로 제시하기도 하였다(Table 3).

3.2. 콜리스틴 분석을 위한 고체시료 전처리

콜리스틴은 콜리스틴 A, 콜리스틴 B(두 물질이 약 85%를 구성함)를 포함하여 30종 이상의 유사구조를 갖는 폴리펩티드(polypeptide) 분자의 혼합물이다(Elverdam et al., 1981; Orwa et al., 2001). 이러한 화학적 특성으로 인해 정확한 정량이 어렵고 특히, 매질이 복잡한 생물학적 시료(분뇨 포함)를 대상으로 콜리스틴을 분석한 문헌은 극히 드물게 보고되고 있으나 염산으로 처리한 후 고상추출법을 적용하는 것으로 나타났다(Table 4). 염산으로 처리하는 경우 산 가수분해로 지방질 제거와 단백질 입자의 석출이 일어나고 결과적으로 회수율이 향상된다고 보고되고 있다(Wan et al., 2006; Xu et al., 2012).

3.3. 나머지 항생제 분석을 위한 고체시료 전처리

아미노글리코사이드계와 콜리스틴을 제외한 항생제를 분석하는 시료(Table 4)는 추출단계에서 유기용매(메탄올 또는 아세트나이트릴) 또는 완충용액(McIlvaine buffer)과 함께 균질화 된 시료를 볼텍스 믹서(vortex mixer)나 진탕기(shaker) 등을 사용하여 일정 시간동안 제단백과 추출을 수

행한다. 그러나 고체 시료는 고농도의 매질을 함유하기 때문에 추출효율을 높이기 위한 추가적인 방법으로 초음파처리를 적용하는 경우가 많다(Boscher et al., 2010; Gorissen et al., 2015; Kaklamanos et al., 2013; U. S. EPA. 2007; Zhou et al., 2012). 초음파는 단백질을 분해하고 분자간 결합을 분리하여 고체 시료에 포함된 잔류 항생물질을 추출, 용매에 용해되도록 한다. 시료 균질화와 추출과정을 거친 시료는 원심분리를 통해 고상과 액상을 분리하고 상등액을 취합하여 분리막 여과, 고상추출법 등을 통한 정제과정을 거친다. 추출과정은 필요에 따라 2~3회 반복되는 경우도 있다.

항생제들은 유사한 추출방법을 적용하고 있으며 아세트나이트릴, 메탄올, 물을 혼합하여 추출 용매로 사용하는 경우가 대부분이며 포름산, 인산 완충액, 구연산 완충액 등으로 pH를 조정하기도 한다. 최근에는 설펜아마이드계, 플로로퀴놀론계, 테트라사이클린계, 이오노포어계, 베타-락탐계(β -lactams) 등 다계열(multi-class) 항생제를 동시에 분석하기 위한 시료 전처리 방법 및 분석방법을 개발, 적용한 연구가 많이 보고되고 있다(Boscher et al., 2010; Bousova et al., 2013; Carretero et al., 2008; Kaklamanos et al., 2013; Lopes et al., 2012; Moloney et al., 2012; Pietruk et al., 2015; Tao et al., 2012; Zhou et al., 2012).

다양한 계열의 항생제를 동시 분석하는 경우 아세트나이트릴과 메탄올 혼합액을 용매로 사용하였는데 아세트나이트릴은 단백질과 효소성분을 제거하여 깨끗한 추출물을 제공하고 잔류항생제는 메탄올에 의해 추출된다. 그러나 메탄올 비율이 높은 경우 항생제 이외에 방해 물질의 추출량이 증가하여 정제과정이 복잡해지는 문제가 발생할 수 있다. 또한 매크로라이드나 테트라사이클린 등 극성을 띄는 물질에 대한 추출효율을 높일 목적으로 아세트나이트릴과 메탄올에 물을 첨가하기도 한다(Kaklamanos et al., 2013). 추출 용매의 pH도 매우 중요한 요인으로 작용한다. 특히 테트라사이클린계 항생제의 경우 단백질과 결합하는 성질 때문에, 가축분뇨, 육류, 퇴비 등 바이오고체(biosolids) 시료 분석 시 회수율을 감소시키는 원인이 된다(Kaklamanos et al., 2013). 따라서 산성 용매를 이용한 시료추출이 필수적이다. Kaklamanos는 1% 포름산을 최적 조건으로 제시하였고 1% 이상 조건에서는 테트라사이클린 이외의 다른 항생제가 분해되는 문제점을 보고하였다.

가압용매추출법은 고체 시료를 균질화하여 추출 셀(extraction cell)에 충전하고 고온·고압으로 용매를 통과시켜 시료 중의 대상물질을 추출하는 방법이다. 가압용매추출법은 셀 내부부를 고압으로 유지하기 때문에 셀 내부에서 용매의 끓는점이 높아진다. 따라서 고온의 용매가 시료와 접촉하면서 추출대상물질의 용해도와 확산 속도가 증가되어 추출속도와 효율을 높이는 방법이다. 가압용매추출법의 추출 효율은 주로 용매의 종류와 온도에 큰 영향을 받고(Bjorklund et al., 2000; Boscher et al., 2010) 추출시간, 반복횟수, 세척시간, 셀 크기 등이 일부 영향을 미친다. Bak et al. (2013)은 5종의 이오노포어(ionophore)계 항생물질을 대상으로 메

탄올과 아세톤의 혼합비와 추출 온도에 따른 효율을 평가하여 MeOH:H₂O (1:1, v/v)와 40°C를 최적 용매와 온도 조건으로 제안하였고 90~105% 회수율을 얻었다. Boscher et al. (2010)은 50, 60, 70°C에서 가압용매추출법으로 13개 계열의 항생제를 동물 사료로부터 추출하여 온도에 의한 효율을 평가하였는데, 60°C까지는 회수율이 증가하는 것을 확인하였으나 70°C에서는 이오노포어계, 페니콜계(phenicols), 항콕시딕제제(coccidiostat), 설펜아미이드계, 페니실린계(penicillins) 항생제에서 회수율이 감소되는 것을 관찰하였다. 특히 설펜아미이드계 항생제는 회수율이 절반으로 감소하였으며 이는 특정 항생제들이 열에 약하기 때문이라 하였다. 또한 가압용매추출법과 초음파추출법의 회수율 차이를 비교하여 효율을 평가하였는데 두 방법에서 큰 회수율의 차이는 관찰되지 않았고 초음파추출법을 적용하였을 때 짧은 추출 시간에 다량의 시료를 동시 처리 가능하다고 보고하고 있다. Carretero et al. (2008)은 육류 중 31종의 잔류항생물질을 분석하기 위한 방법을 개발하였고, 가압용매추출법의 최적 조건을 평가·보고하였다. 추출시간(2, 5, 10, 15, 20분), 추출온도(50, 70, 90, 100°C), 셀 부피(5, 11, 22, 33 ml), 추출압력(1000, 1500, 2000, 2500 psi), 추출 반복 횟수(1, 2, 3회) 등을 평가한 결과 추출시간 10분, 셀 부피 22 ml, 추출압력 1500 psi까지는 일부 회수율이 증가하였으나 그 이상에서는 큰 차이가 없는 것으로 보고하였다. 또한 미미하지만 반복 횟수의 증가는 회수율을 감소시키는 것으로 나타났는데 이는 반복적인 고온 용매와의 접촉으로 인해 대상물질의 분해가 일어났을 것이라 추측하였다. 동일한 이유로 추출 온도가 70°C까지 증가함에 따라 회수율이 향상되었으나 일부 항생제의 경우 70°C 이상에서 회수율이 감소하는 것으로 나타났다. 이처럼 가압용매추출법 역시 다양한 물리·화학적 메커니즘이 동시에 일어나기 때문에 통용 가능한 최적조건의 도출이 어렵고 특히 다양한 계열의 항생제를 분석할 목적으로 가압용매추출법을 적용할 경우 용매 및 온도에 대한 최적화가 필수적이라 할 수 있다.

추출과정을 거친 시료는 여과 또는 고상추출법을 통한 정제를 수행하는데 여과를 수행하는 경우 주로 0.2 μm의 공극 크기를 갖는 분리막을 이용하는 것으로 나타났다 (Table 4). 고상추출법은 액체 시료를 적용할 때와 동일하게 카트리지의 컨디셔닝, 시료 적재, 카트리지 건조 및 세척, 추출, 추출액의 농축, 재용해, 여과 등의 과정을 필요에 따라 순차적으로 진행하였다. 카트리는 주로 Oasis HLB (hydrophilic lipophilic balanced sorbent)를 사용하는 것으로 나타났고, 드물게 Strata-X를 적용하는 것으로 나타났다. 적재 시료는 추출과정에서 산성화된 시료를 그대로 적용하거나 pH 2.0~2.5범위로 조절하는 것으로 나타났는데, 액체시료의 전처리방법과 유사하게 베타-락탐계 항생제의 경우 시료의 pH를 조절하지 않거나 중성(pH 7.2)(Berendsen et al., 2013)으로 조절하여 적재하는 것으로 나타났다. 이는 베타-락탐계 항생제가 산성 또는 염기성에서 분해되는 특성에 따른 것으로 판단된다(Diaz-Cruz and Barcelo, 2006;

Thiele-Bruhn, 2003). 용리액으로는 메탄올이 주로 사용되거나 메탄올과 아세토나이트릴, 물 혼합액을 사용하기도 한다.

Zhou et al., (2012)는 고체시료(슬러지, 퇴적물, 비료)를 대상으로 11개 계열에 해당하는 총 50종의 항생제를 분석하는 방법을 제안하였는데 고상추출 과정에서 SAX-HLB 카트리지를 직렬로 결합하여 사용한 것을 보고하였다. 상단에 결합된 SAX(strong anion exchange sorbent)카트리지에서 (-)전하를 갖는 휴믹산(humic acid), 풀빅산(fulvic acid)과 같은 자연유기물질이 제거되고, pH 3에서 중성 또는 (+)이온으로 존재하는 항생물질은 하단에 결합된 HLB 카트리지에 흡착되어 분리되는 원리를 이용하였다. 두 카트리지를 결합하는 방법은 유기물이 다량 함유된 슬러지, 비료 등에서 특히 다종의 항생제를 분석하고자 할 때 적용 가능한 방법 중 하나로 종종 보고되고 있다.

4. Conclusions

가축분뇨실태조사 항목인 항생제 분석을 성공적으로 수행하기 위하여 본 연구에서는 국내에 판매된 축산용 항생제 판매량을 조사하여 37종의 대상 물질을 선정하고 가축분뇨 중의 대상 항생제 잔류량을 분석하기 위해 필요한 전처리 방법을 확인하고자 고상시료를 대상으로 전처리 방법을 연구한 문헌을 조사, 다음과 같은 결론을 도출하였다.

일반적으로 고상시료의 추출방법으로 기계적인 혼합법, 초음파추출법, 가압용매추출법 등을 적용하며 추출액은 분리막 여과나 고상추출법을 통해 정제되는 것으로 조사되었다. 아미노글리코사이드 계열의 항생제에 대한 연구는 주로 동물의 신체나 어류를 대상 시료로 하고 있어 추출과정에서 5% 트리클로로아세트산용액을 사용하여 단백질을 제거하고, 폴리스틴은 염산을 이용해 지방질과 단백질을 제거하여 높은 회수율을 얻을 수 있는 것으로 보고되었다. 이를 제외한 물질들은 주로 아세토나이트릴과 메탄올을 혼합용매로 사용하며 초음파추출법을 많이 적용하는 것으로 나타났다. 일부 문헌에서 가압용매추출법을 적용하고 있으며 추출용매의 온도와 종류에 따른 추출효율을 평가하기도 하였으나 분석대상물질의 특성에 따라 최적 조건이 다르게 나타나 가압용매추출법을 적용하기 위해서는 대상 시료를 바탕으로 조건의 최적화가 선행되어야 한다. 대부분의 항생물질은 산성시료 조건에서 전처리를 수행하며 추출 또는 정제과정에서 pH는 2.0~4.0 범위로 조절하는 것으로 나타났으나 아미노글리코사이드 계열과 베타-락탐 계열의 항생제는 중성 pH 조건에서 전처리를 수행하는 것으로 조사되었다. 이는 항생제의 화학적 특성에 기인한 것으로 고상추출법을 적용하는 액체시료의 전처리에서도 동일한 원리를 이용하여 시료의 pH를 결정하는 것으로 판단되었다. 정제를 위한 여과는 0.2 μm의 공극크기를 갖는 분리막을 주로 사용하는 것으로 조사되었고, Oasis HLB 카트리지와 메탄올을 사용한 고상추출법이 가장 많이 적용되고 있는 것으로 나타났다.

고상시료는 고농도의 단백질 및 유기물을 함유하고 있기

때문에 정확한 분석을 위해서는 적절한 추출과 정제과정의 전처리 방법을 적용해야 하며 전처리 효율은 분석대상물질의 화학적 특성에 따라 상이하게 나타난다. 본 연구에서 선정된 37종의 대상물질을 분석하기 위해 고체 시료의 전처리를 수행하는 경우 아미노글리코사이드계와 베타-락탐계 항생제를 측정하기 위한 별도의 전처리가 수행되어야 한다. 즉, 최소 3가지의 전처리 과정을 적용해야 할 것으로 판단된다.

References

- Adams, C., Wang, Y., Lofin, K., and Meyer, M. (2002). Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Process, *Journal of environmental engineering*, 128(3), pp. 253-260.
- Amelin, V. G., Volkova, N. M., Timofeev, A. A., and Tretyakov, A. V. (2015). QuEChERS Sample Preparation in the Simultaneous Determination of Residual Amounts of Quinolones, Sulfanilamides, and Amphenicols in Food Using HPLC with a Diode-Array Detector, *Journal of Analytical Chemistry*, 70(9), pp. 1076-1084.
- Anastassiades, M., Lehoutay, S. J., Stajnbaher, D., and Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *Journal of AOAC International*, 86(2), pp. 412-431.
- Barket, S. A. (2007). Matrix Solid Dispersion (MSPD), *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), pp. 151-162.
- Bak, S. A., Hansen, M., Pederson, K. M., Halling-Sorensen, B., and Bjoklund, E. (2013). Quantification of Four Ionophores in Soil, Sediment and Manure Using Pressurised Liquid Extraction, *Journal of Chromatography A*, 1307, pp. 27-33.
- Ben, W., Qiang, Z., Adams, C., Zhang, H., and Chen, L. (2008). Simultaneous Determination of Sulfonamides, Tetracyclines and Tiamulin in Swine Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1202(2), pp. 173-180.
- Berendsen, B. J., Gerritsen, H. W., Wegh, R. S., Lameris, S., van Seville, R., Stolker, A. A., and Nielen, M. W. (2013). Comprehensive Analysis of β -Lactam Antibiotics Including Penicillins, Cephalosporins, and Carbapenems in Poultry Muscle Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(24), pp. 7859-7874.
- Biswal, B. K., Mazza, A., Masson, L., Gehr, R., and Frigon, D. (2014). Impact of Wastewater Treatment Processes on Antimicrobial Resistance Genes and Their Co-occurrence with Virulence Genes in Escherichia Coli, *Water Research*, 50, pp. 245-253.
- Bjorklund, E., Nilsson, T., and Bowadt, S. (2000). Pressurised Liquid Extraction of Persistent Organic Pollutants in Environmental Analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(7), pp. 434-445.
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), pp. 1-14.
- Boscher, A., Guignard, C., Pellet, T., Hoffmann, L., and Bohn, T. (2010). Development of a Multi-Class Method for the Quantification of Veterinary Drug Residues in Feedingstuffs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217(41), pp. 6394-6404.
- Bousova, K., Senyuva, H., and Mittendorf, K. (2013). Quantitative Multi-Residue Method for Determination Antibiotics in Chicken Meat Using Turbulent Flow Chromatography Coupled to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1274, pp. 19-27.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbio, R., Samperi, R., and Lagana, A. (2010). Recent Developments in Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction, *Journal of Chromatography A*, 1217(16), pp. 2521-2532.
- Carretero, V., Blasco, C., and Pico, Y. (2008). Multi-Class Determination of Antimicrobials in Meat by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1209(1), pp. 162-173.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*, Center for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services, Atlanta, Georgia, pp. 13-17.
- Chafer-Pericas, C., Maquieira, A., Puchades, R., Company, B., Miralles, J., and Moreno, A. (2010). Multiresidue Determination of Antibiotics in Aquaculture Fish Samples by HPLC-MS/MS, *Aquaculture Research*, 41(9), pp. e217-e225.
- Chander, Y., Oliveira, S., and Goyal, S. M. (2011). Characterisation of Ceftiofur Resistance in Swine Bacterial Pathogens, *The Veterinary Journal*, 187(1), pp. 139-141.
- Chen, Y., Hu, X., and Xiao, X. (2010). Sample Preparation for Determination of Neomycin in Swine Tissues by Liquid Chromatography-Fluorescence Detection, *Analytical Letters*, 43(16), pp. 2496-2504.
- Chen, H. and Zhang, M. (2013). Effects of Advanced Treatment Systems on the Removal of Antibiotic Resistance Genes in Wastewater Treatment Plants from Hangzhou, China, *Environmental Science & Technology*, 47, pp. 8157-8163.
- Chen, Y., Zhang, H., Luo, Y., and Song, J. (2012). Occurrence and Dissipation of Veterinary Antibiotics in Two Typical Swine Wastewater Treatment Systems in East China, *Environmental Monitoring and Assessment*, 148(4), pp. 2205-2217.
- Cherlet, M., De Baere, S., and De Backer, P. (2007). Quantitative Determination of Dihydrostreptomycin in Bovine Tissues and Milk by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Journal of mass spectrometry*, 42(5), pp. 647-656.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., and Kroiss, H. (2005). Removing of Selected Pharmaceuticals, Fragrances and Endocrine Disrupting Compounds in a Membrane Bioreactor and Conventional Wastewater Treatment Plants, *Water Research*, 39(19), pp. 4797-4807.
- Dasenaki, M. E. and Thomaidis, N. S. (2010). Multi-Residue Determination of Seventeen Sulfonamides and Five Tetracyclines in Fish Tissue Using a Multi-Stage LC-ESI-MS/MS Approach Based on Advanced Mass Spectrometric Techniques, *Analytica Chimica Acta*, 672(1), pp. 93-102.

- Diaz-Cruz, M. S. and Barcelo, D. (2006). Determination of Antimicrobial Residues and Metabolites in the Aquatic Environment by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(4), pp. 973-985.
- Elverdam, I., Larsen, P., and Lund, E. (1981). Isolation and Characterization of Three New Polymyxins in Polymyxins B and E by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 218, pp. 653-661.
- European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. (2015). *Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 26 EU/EEA Countries in 2013*, EMA/387934/2015, European Medicines Agency, London, United Kingdom, pp. 20-26.
- European Union (EU). (2003). *Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition*, European Union.
- Evangelopoulou, E. N. and Samanidou, V. F. (2013). Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Six Penicillin and Three Amphenicol Antibiotics in Gilthead Seabream (*Sparus Aurata*) Tissue According to the European Union Decision 2002/657/EC, *Food Chemistry*, 136(3), pp.1322-1329.
- Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for Emerging Pathogens, *Science*, 325(5944), pp. 1089-1093.
- Gorissen, B., Reyns, T., Devreese, M., De Backer, P., Van Loco, J., and Croubels, S. (2015). Determination of Selected Veterinary Antimicrobials in Poultry Excreta by UHPLC-MS/MS, for Application in Salmonella Control Programs, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(15), pp. 4447-4457.
- Halling-Sorensen, B., Sengelov, G., and Tjornelund, G. (2002). Toxicity of Tetracyclines and Tetracycline Degradation Products to Environmentally Relevant Bacteria, Including Selected Tetracycline-Resistant Bacteria, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), pp. 263-271.
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., and Aarestrup, F. M. (2005). β -Lactamases Among Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Resistant Salmonella from Poultry, Poultry Products and Human Patients in The Netherlands, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), pp. 115-121.
- Heller, D. N., Clark, S. B., and Righter, H. F. (2000). Confirmation of Gentamicin and Neomycin in Milk by Weak Cation-Exchange Extraction and Electrospray Ionization/Ion Trap Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 35(1), pp. 39-49.
- Ho, Y. B., Zakaria, M. P., Latif, P. A., and Saari, N. (2012). Simultaneous Determination of Veterinary Antibiotics and Hormone in Broiler Manure, Soil and Manure Compost by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1262, pp. 160-168.
- Ho, Y. B., Zakaria, M. P., Latif, P. A., and Saari, N. (2014). Occurrence of Veterinary Antibiotics and Progesterone in Broiler Manure and Agricultural Soil in Malaysia, *Science of the Total Environment*, 488, pp. 261-267.
- Hong, Y., Sharma, V. K., Chiang, P. C., and Kim, H. (2015). Fast-Target Analysis and Hourly Variation of 60 Pharmaceuticals in Wastewater Using UPLC-High Resolution Mass Spectrometry, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 69(4), pp. 525-534.
- Hormazabal, V., Yndestad, M., and Ostensvik, O. (2003). Determination of Flunixin and Tiamulin Hydrogen Fumarate in Meat and Toltrazuril and the Metabolite Toltrazurilsulfon in Meat and Eggs Using LC/MS, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26(5), pp. 791-801.
- Hou, J., Wan, W., Mao, D., Wang, C., Mu, Q., Qin, S., and Luo, Y. (2015). Occurrence and Distribution of Sulfonamides, Tetracyclines, Quinolones, Macrolides, and Nitrofurans in Livestock Manure and Amended Soils of Northern China, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), pp. 4545-4554.
- Hur, J., Jawale, C., and Lee, J. H. (2012). Antimicrobial Resistance of Salmonella Isolated from Food Animals: A Review, *Food Research International*, 45(2), pp. 819-830.
- Ishii, R., Horie, M., Chan, W., and MacNeil, J. (2008). Multi-Residue Quantitation of Aminoglycoside Antibiotics in Kidney and Meat by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, 25(12), pp. 1509-1519.
- Jacobsen, A. M. and Halling-Sorensen, B. (2006). Multi-Component Analysis of Tetracyclines, Sulfonamides and Tylosin in Swine Manure by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(5), pp. 1164-1174.
- Kaklamanos, G., Vincent, U., and von Holst, C. (2013). Analysis of Antimicrobial Agents in Pig Feed by Liquid Chromatography Coupled to Orbitrap Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1293, pp. 60-74.
- Karci, A. and Balcioglu, I. A. (2009). Investigation of the Tetracycline, Sulfonamide, and Fluoroquinolone Antimicrobial Compounds in Animal Manure and Agricultural Soils in Turkey, *Science of the Total Environment*, 407(16), pp. 4652-4664.
- Kaufmann, A. and Maden, K. (2005). Determination of 11 Aminoglycosides in Meat and Liver by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, *Journal of AOAC International*, 88, pp. 1118-1125.
- Kaufmann, A., Butcher, P., and Maden, K. (2012). Determination of Aminoglycoside Residues by Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry in a Variety of Matrices, *Analytica chimica acta*, 711, pp. 46-53.
- Kim, D., Oh, J., and Kim, S. (2012). The Experimental Model Development of Antibiotic Resistance Gene Transfer Characteristics with Various Micropollutants, *Journal of Korean Society on Water Environment*, 28(6), pp. 911-916.
- Kim, C. G., Jeong, H. K., Im, P. E., and Kim, T. H. (2015). *Directions for Introducing Total Maximum Nutrient Loading System of Cultivated Land*, C-2015-5, Korea Rural Economic Institute, Seoul, Korea.
- Kim, S. C. and Carlson, K. (2007). Quantification of Human and Veterinary Antibiotics in Water and Sediment Using SPE/LC/MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), pp. 1301-1315.
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., and Snyder, S. A. (2007). Occurrence and Removal of Pharmaceuticals

- and Endocrine Disruptors in South Korea Surface, Drinking, and Waste Waters, *Water Research*, 41(5), pp. 1013-1021.
- Kim, S. C., Park, Y. H., Lee, Y., and Kim, P. J. (2005). Comparison of OECD Nitrogen Balances of Korea and Japan, *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 24(4), pp. 295-302.
- Korea Ministry of Government Legislation. (2015). *Act On The Management and Use of Livestock Excreta*, 13526, Korea Ministry of Government Legislation.
- Kowalski, P., Oledzka, I., Okoniewski, P., Switala, M., and Lamparczyk, H. (1999). Determination of Streptomycin in Egg Yolk by Capillary Electrophoresis, *Chromatographia*, 50(1-2), pp. 101-104.
- Lang, Q. and Wai, C. M. (2001). Supercritical Fluid Extraction in Herbal and Natural Product Studies-A Practical Review, *Talanta*, 53(4), pp. 771-782.
- Lim, S. K., Moon, D. C., Joo, I. S., Kim, Y. H., Jang, G. C., Lee, H. S., Lee, J. E., Jang, S. C., Gwak, H. S., Kim, H. Y., Kim, J. W., Jung, Y. G., Park, Y. J., Kim, S. R., Jung, S. K., and Jang, J. H. (2015). *National Monitoring of Antibiotic Usage and Resistance in 2014: Livestock and Food of Animal Origin*, 11-1543061-000142-01, Ministry of Agriculture and Ministry, Food and Rural Affairs, pp. 13-17. [Korean Literature]
- Liu, J. L. and Wong, M. H. (2013). Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs): A Review on Environmental Contamination in China, *Environment International*, 59, pp. 208-224.
- Lopes, R. P., Reyes, R. C., Romero-Gonzalez, R., Vidal, J. L. M., and Frenich, A. G. (2012). Multiresidue Determination of Veterinary Drugs in Aquaculture Fish Samples by Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 895, pp. 39-47.
- Malchi, T., Maor, Y., Tadmor, G., Shenker, M., and Chefetz, B. (2014). Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks, *Environmental Science & Technology*, 48(16), pp. 9325-9333.
- Martinez-Carballo, E., Gonzalez-Barreiro, C., Scharf, S., and Gans, O. (2007). Environmental Monitoring Study of Selected Veterinary Antibiotics in Animal Manure and Soils in Austria, *Environmental Pollution*, 148(2), pp. 570-579.
- Messi, P., Guerrieri, E., and Bondi, M. (2005). Antibiotic Resistance and Antibacterial Activity in Heterotrophic Bacteria of Mineral Water Origin, *Science of the Total Environment*, 346(1), pp. 213-219.
- Migliore, L., Civitareale, C., Cozzolino, S., Casoria, P., Brambilla, G. and Gaudio, L. (1998). Laboratory Models to Evaluate Phytotoxicity of Sulphadimethoxine on Terrestrial Plants, *Chemosphere*, 37(14), pp. 2957-2961.
- Migliore, L., Cozzolino, S., and Fiori, M. (2003). Phytotoxicity to and Uptake of Enrofloxacin in Crop Plants, *Chemosphere*, 52(7), pp.1233-1244.
- Moloney, M., Clarke, L., O'Mahony, J., Gadaj, A., O'Kennedy, R., and Danaher, M. (2012). Determination of 20 Coccidiostats in Egg and Avian Muscle Tissue Using Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1253, pp. 94-104.
- Neu, H. C. (1992). The Crisis in Antibiotic Resistance, *Science*, 257(5073), pp. 1064-1073.
- Oka, H., Ito, Y., and Matsumoto, H. (2000). Chromatographic Analysis of Tetracycline Antibiotics in Foods, *Journal of Chromatography A*, 882(1-2), pp. 109-133.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2001). *Use of Farm Inputs and Natural Resources, In Volume 3. Methods and Results, Environmental Indicators for Agriculture*, OECD, Paris, France. pp. 134-135.
- Orwa, J. A., Govaeris, C., Busson, R., Roets, E., Schepdael, A. V., and Hoogmartens, J. (2001). Isolation and Structural Characterization of Colistin Components, *The Journal of Antibiotics*, 54(7), pp. 595-599.
- Persoons, D., Haesebrouck, F., Smet, A., Herman, L., Heyndrickx, M., Martel, A., Catry, B., Berge, A. C., Butaye, P., and Dewulf, J. (2011). Risk Factors for Ceftiofur Resistance in Escherichia Coli from Belgian Broilers, *Epidemiology & Infection*, 139(5), pp. 765-771.
- Petrovic, M., Hemando, M. D., Diaz-Cruz, M. S., and Barcelo, D. (2005). Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Pharmaceutical Residues in Environmental Sample: a Review, *Journal of Chromatography A*, 1067(1-2), pp. 1-14.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., and Witte, W. (2010). Resistance to Cephalosporins and Carbapenems in Gram-Negative Bacterial Pathogens, *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), pp. 371-379.
- Pico, Y. and Andreu, V. (2007). Fluoroquinolones in Soil-Risks and Challenges, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), pp. 1287-1299.
- Pietruk, K., Olejnik, M., Jedziniak, P., and Szprengier-Juszkiewicz, T. (2015). Determination of Fifteen Coccidiostats in Feed at Carry-Over Levels Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 112, pp. 50-59.
- Pomati, F., Orlandi, C., Clerici, M., Luciani, F., and Zuccato, E. (2008). Effects and Interactions in an Environmentally Relevant Mixture of Pharmaceuticals, *Toxicological Sciences*, 102(1), pp. 129-137.
- Radjenovic, J., Petrovic, M., and Barcelo, D. (2009). Fate and Distribution of Pharmaceuticals in Wastewater and Sewage Sludge of the Conventional Activated Sludge (CAS) and Advanced Membrane Bioreactor (MBR) Treatment, *Water Research*, 43(3), pp. 831-841.
- Rahman, M. F., Yanful, E. K., and Jasim, S. Y. (2009). Endocrine Disrupting Compounds(EDCs) and Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in the Aquatic Environment: Implications for the Drinking Water Industry and Global Environmental Health, *Journal of Water and Health*, 7(2), pp. 224-243.
- Reverchon, E. and De Marco, I. (2006). Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of Natural Matter, *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(2), pp. 146-166.
- Santiago-Rodriguez, T. M., Rivera, J. I., Coradin, M., and Toranzos, G.A. (2013). Antibiotic-resistance and Virulence Genes in Enterococcus Isolated from Tropical Recreational Waters, *Journal of Water and Health*, pp. 387-396.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., and Boxall, A. B. A. (2006). A

- Global Perspective on the Use, Sales, Exposure Pathways, Occurrence, Fate and Effects of Veterinary Antibiotics (VAs) in the Environment, *Chemosphere*, 65(5), pp. 725-759.
- Schlusener, M. P., Con Arb, M. A., and Bester, K. (2006). Elimination of Macrolides Tiamulin and, Salinomycin During Manure Storage, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(1), pp. 21-28.
- Shendy, A. H., Al-Ghobashy, M. A., Alla, S. A. G., and Lotfy, H. M. (2016). Development and Validation of a Modified QuEChERS Protocol Coupled to LC-MS/MS for Simultaneous Determination of Multi-Class Antibiotic Residues in Honey, *Food Chemistry*, 190, pp. 982-989.
- Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K., and Reissman, D. B. (2004). Persistence of Pharmaceutical Compounds and Other Organic Wastewater Contaminants in a Conventional Drinking-Water-Treatment Plant, *Science of the Total Environment*, 329(1), pp. 99-113.
- Straus, S. K. and Hancock, R. E. (2006). Mode of Action of the New Antibiotic for Gram-Positive Pathogens Daptomycin: Comparison with Cationic Antimicrobial Peptides and Lipopeptides, *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Biomembranes*, 1758(9), pp. 1215-1223.
- Stubbings, G. and Bigwood, T. (2009). The Development and Validation of a Multiclass Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Procedure for the Determination of Veterinary Drug Residues in Animal Tissue Using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective Rugged and Safe) Approach, *Analytica Chimica Acta*, 637(1), pp. 68-78.
- Tao, Y., Chen, D., Yu, H., Huang, L., Liu, Z., Cao, X., Yan, C., Pan, Y., Liu, Z., and Yuan, Z. (2012). Simultaneous Determination of 15 Aminoglycoside (s) Residues in Animal Derived Foods by Automated Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Food Chemistry*, 135(2), pp. 676-683.
- Thiele-Bruhn, S. (2003). Pharmaceutical Antibiotic Compounds in Soils - a Review, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(2), pp. 145-167.
- Tolls, J. (2001). Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review, *Environmental Science & Technology*, 35(17), pp. 3397-3406.
- United States Environmental Protection Agency (U. S. EPA.). (2007). *Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS*, EPA-821-R-08-002, U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- United States Food and Drug Administration (U. S. FDA). (2015). *2014 Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals*, Food and Drug Administration, Washington, DC, pp. 26-29.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2011). *Korea Phases Out Antibiotic Usage in Compound Feed*, KS1128, USDA Foreign Agricultural Service.
- Van Holthoon, F. L., Essers, M. L., Mulder, P. J., Stead, S. L., Caldow, M., Ashwin, H. M., and Sharman, M. (2009). A Generic Method for the Quantitative Analysis of Aminoglycosides (and Spectinomycin) in Animal Tissue Using Methylated Internal Standards and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 637(1), pp. 135-143.
- Vinas, P., Balsalobre, N., and Hernandez-Cordoba, M. (2007). Liquid Chromatography on an Amine Stationary Phase with Post-Column Derivatization and Fluorimetric Detection for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Foods, *Talanta*, 72(2), pp. 808-812.
- Volmer, D. A. and Lock, C. M. (1998). Electrospray Ionization and Collision-Induced Dissociation of Antibiotic Polyether Ionophores, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(4), pp. 157-164.
- Wan, E. C. H., Ho, C., Sin, D. W. M., and Wong, Y. C. (2006). Detection of Residual Bacitracin A, Colistin A, and Colistin B in Milk and Animal Tissues by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(1), pp. 181-188.
- Watanabe, N., Bergamaschi, B. A., Loftin, K. A., Meyer, M. T., and Harter, T. (2010). Use and Environmental Occurrence of Antibiotics in Freestall Dairy Farms with Manured Forage Fields, *Environmental Science and Technology*, 44(17), pp. 6591-6600.
- Xu, Y., Tian, X., Ren, C., Huang, H., Zhang, X., Gong, X., Liu, H., Yu, Z., and Zhang, L. (2012). Analysis of Colistin A and B in Fishery Products by Ultra Performance Liquid Chromatography with Positive Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 899, pp. 14-20.
- Zhao, L., Dong, Y. H., and Wang, H. (2010). Residues of Veterinary Antibiotics in Manures from Feedlot Livestock in Eight Provinces of China, *Science of the Total Environment*, 408(5), pp. 1069-1075.
- Zhou, L. J., Ying, G. G., Liu, S., Zhao, J. L., Chen, F., Zhang, R. Q., Peng, F. Q., and Zhang, Q. Q. (2012). Simultaneous Determination of Human and Veterinary Antibiotics in Various Environmental Matrices by Rapid Resolution Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1244, pp. 123-138.
- Zhou, L. J., Ying, G. G., Liu, S., Zhang, R. Q., Lai, H. J., Chen, Z. F., and Pan, C. G. (2013). Excretion Masses and Environmental Occurrence of Antibiotics in Typical Swine and Dairy Cattle Farms in China, *Science of the Total Environment*, 444, pp. 183-195.
- Zhu, W. X., Yang, J. Z., Wei, W., Liu, Y. F., and Zhang, S. S. (2008). Simultaneous Determination of 13 Aminoglycoside Residues in Foods of Animal Origin by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with Two Consecutive Solid-Phase Extraction Steps, *Journal of Chromatography A*, 1207(1), pp. 29-37.