Journal of Korean Society on Water Environment, Vol. 32, No. 6, pp. 649-669 (November, 2016)
pISSN 2289-0971 eISSN 2289-098X https://doi.org/10.15681/KSWE.2016.32.6.649

총설

시료 중 잔류 항생제 분석 방법: III. 기기 분석 방법

김찬식 · 류홍덕 · 정유진† · 김용석 · 류덕희

국립환경과학원 물환경연구부 유역총량연구과

Determination of Veterinary Antibiotic Residues: III. Analytical Methods_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 23 August 2016, Revised 17 November 2016, Accepted 21 November 2016)

Abstract

This study explored the analytical conditions for 21 veterinary antibiotics which have been popularly sold in South Korea in 2014 but have not yet been targeted in EPA method 1694. Most of the selected antibiotics were separated by a reverse-phase C18 column with a combination of (buffered) water and organic polar solvent, which was commonly methanol and acetonitrile in the gradient elution mode. Volatile additives such as formic acid, ammonium acetate and ammonium formate were usually added to the mobile phases to minimize asymmetrical and tailing of antibiotics' peaks and to increase their ionization in mass spectrometry. The analytical methods of aminoglycoside antibiotics were distinct from those of the other antibiotics in terms of adoption of ion-pair chromatography (IPC) and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) capable of retaining and separating extremely polar compounds due to their hydrophilicity. Trifluoroacetic acid or heptafluorobutyric acid was frequently added to the mobile phase as an ion-pair reagent for the IPC. Tandem mass spectrometry was numerously applied to the detection of antibiotics using positive electrospray ionization (ESI) and the selected reaction monitoring (SRM) mode. All reviewed analytical methods had been/were validated by evaluating recovery, limits of detection and quantification, decision limit or detection capability of the methods.

Key words : Aminoglycosides, Analytical methods, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Method validation, Veterinary antibiotics

1. Introduction

항생제는 날로 그 사용량이 증가함에 따라 이로 인한 오염과 피해 때문에 신종오염물질의 한 부분으로 심각하게 다루어지고 있다(Centers for Disease Control and Prevention (US), 2013; Liu and Wong, 2013). 2009년 미국에서 연간 12,800 톤이 판매되던 동물용 항생제는 그 판매량이 꾸준히 증가하여 2014년에는 약 20%가 늘어난 15,400 톤이 판매된 것으로 조사되었다(Food and Drug Administration, 2015). 유럽의약청에서는 EU 26개국의 2013년 동물용 항생제의 판매량을 8,122 톤으로 보고하기도 하였다(European Medicines Agency EU, 2015). 중국 또한 축산업에서 많은 동물용 항생제를 소비하는 나라 중 하나로 알려져 있고 성장 촉진을 위한 사료 첨가물의 용도로만 매년 약 6,000~8,000 톤의 항생제가 사용된 것으로 보고되고 있다(Ben et al., 2008; Zhao et al., 2010; Zhou et al., 2008). 우리나라도 비교적 큰 항생제 시장을 보유하고 있으며 2014년 판매량은 635 톤으로 폴란드(578 톤), 영국(436 톤) 보다 많고 프랑스(697 톤)와 유사한 수준의 판매량을 보이는 것으로 조사되었다.

항생제는 대사산물 뿐 아니라 모화합물의 형태 그대로 사람과 동물의 배설물을 통해 배출된다(Kemper, 2008; McArdell et al., 2003). 특히 인간 생활에서 배출되는 항생제와 대사산물에 비해 축산업에서 배출되는 동물용 항생제의 경우 처리와 반·출입 과정에서 효율적인 관리가 이루어지지 않는 경우가 많아 환경 중으로 쉽게 유입될 가능성이 높은 특성을 갖는다. 항생제가 함유된 동물의 배설물은 퇴비화 과정을 거치는데 일부 물질은 퇴비화 과정에서 그 농도가 그대로 유지되기도 하며(Dolliver et al., 2008; Schlusener et al., 2006), 퇴비화된 분뇨는 비료로 농지에 살포된다. 이렇게 살포된 비료중의 항생제는 강우 등에 의해 지하수나 강물로 유입되거나 일부 계열의 항생제는 토양에 흡착된다. 설폰아마이드계열(sulfonamides)의 항생제는 상대적으로 높은 친수성으로 인해 물에 잘 녹으며 지하수, 지표수, 하수처리장 등에서 검출빈도가 높다(Babic et al., 2006; Diaz-Cruz and Barcelo, 2005; Zhou et al., 2013). 그러나 테트라사이

† 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.

클린(tetracycline)계열, 플로로퀴놀론(fluoroquinolone)계열, 메크로라이드(macrolide)계열 등의 항생제는 강한 흡착성질을 가지며(Diaz-Cruz et al., 2003) Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Al^{3+} 등과 착물을 형성하기 때문에(Petrovic et al., 2005) 토양 등의 환경에서 높은 잔존율을 나타낸다(Ho et al., 2012; Schlusener et al., 2003b; Zhou et al., 2013). 그러나 본 연구에서 관심을 갖는 아미노글리코사이드계, 암페니콜계(amphenicols), 이오노포어(ionophore)계 등의 항생제는 분석 기술에 대한 연구가 상대적으로 미미하여(Zhou et al., 2013) 환경중의 분포 특성이나 거동에 대한 연구가 많이 이루어지지 못하고 있다.

환경 시료는 그 성상이 매우 복잡하고 대부분의 잔류의 약물질은 ppb (ng/L) 수준의 낮은 농도로 존재하기 때문에, 시료 중의 항생제를 분석하는 것은 어려운 과제 중 하나이며 여전히 액체크로마토그래피(liquid chromatography: LC)와 질량분석기(mass spectrometer: MS)를 기초로 한 다양한 분석기법과 전처리 방법에 대한 개발과 연구가 진행되고 있다. 총설 I, II는 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) 또는 초고성능액체크로마토그래피(ultra performance liquid chromatography, UPLC)와 MS를 이용하여 동물용 항생제를 분석한 논문을 조사하고, 시료의 형태(고체/액체)에 따른 전처리 방법을 고찰하였다. LC-MS/MS 분석에 있어서 전처리 방법은 매우 중요하며 분석 대상 물질을 추출 및 농축하고 방해물질을 제거함이 전처리 과정의 핵심 목적이다. 액체시료의 경우 고상추출법(solid phase extraction, SPE)이 전처리 방법으로 주로 적용되고 고체시료의 경우 용매를 투입한 후 물리적인 교반이나 초음파 등을 통해 분석대상물질을 추출하여 고상추출법이나 분리막 여과를 통해 정제한 후 액체크로마토그래피(HPLC 또는 UPLC)-질량분석기로 물질들을 분리, 분석한다.

최근에 LC 기술의 발전으로 UPLC의 연구와 적용이 늘어나고 있다. UPLC의 사용은 컬럼 충진 물질의 개발에 의해 가속화되었는데 2 ㎛이하의 입자를 고정상으로 충진하여 사용함에 따라 높은 분리효율을 유지하면서 유량과 선속도를 증가시킬 수 있게 되었다. LC의 분리효율은 컬럼의 길이에 비례하고, 입자 크기에 반비례하기 때문에 입자크기의 감소는 기존의 HPLC 기술에 비해 많은 물질을 짧은 시간에 분리하고 향상된 감도(sensitivity)와 분해능(resolution)을 구현할 수 있게 한다.

LC로 분리된 물질들은 ultraviolet, photodiode array (PDA) 검출기(Babic et al., 2006; Blackwell et al., 2004; Karci and Balcioglu, 2009; Malintan and Mohd, 2006), 형광검출기(fluorescence detector, FLD)(Blackwell et al., 2004; Karci and Balcioglu, 2009), 질량분석기(MS)(Ben et al., 2008; Lillenberg et al., 2009) 또는 탠덤질량분석기(MS/MS)(Hou et al., 2015; Kaufmann et al., 2012; Tao et al., 2012a; Tao et al., 2012b; Zhou et al., 2012) 등을 이용해 검출한다. PDA검출기와 형광검출기는 분석 원리가 간단하고 운전비용이 저렴한 장점으로 인해 항생제 분석기술 개발 초기에 적용되기 시작하였으나 질량분석기에 비해 낮은 민감도로 인해 미량농도의 항생제를 분석하는데 어려움이 따른다. 또한 흡광도와 형광도를 사용하는 특성으로 인해 분석 가능한 물질의 범위가 제한적이다. 흡광도의 경우 설폰아마이드계열의 항생제 분석에 주로 사용되어 왔고(Babic et al., 2006; Blackwell et al., 2004; Karci and Balcioglu, 2009), 플로로퀴놀론계열의 항생제는 형광검출기를 주로 적용하는 것으로 나타났다(Blackwell et al., 2004; Nakata et al., 2005). LC와 조합되는 질량분석기술은 PDA검출기나 형광검출기에 비해 원리가 복잡하고 고가임에도 불구하고 많은 연구가 진행되었고 항생제 분석에 매우 효과적이기 때문에 가장 많이 적용되어 왔다. 기술 개발 초기 설폰아마이드, 테트라사이클린, 매크로라이드 등의 단일 계열 항생제들을 분석하는 방법이 주로 보고되었으나(Balakrishnan et al., 2006; Dubois et al., 2001; Oka et al., 2000) 최근에는 다양한 계열의 항생물질들을 동시에 분석할 수 있는 방법에 대한 연구가 활발히 진행됨에 따라 MS/MS를 이용한 검출방법이 주로 사용된다(Boscher et al., 2010; Gorissen et al., 2015; Gros et al., 2013; Lopes et al., 2012). 그러나 우리나라 축산업에 주로 사용되는 37종 항생제의 잔류농도를 측정하기 위한 분석 방법을 연구한 논문은 보고된바 없다.

또한, 다 계열(multi-class)의 항생제 분석에 대한 필요가 증가함에 따라 HPLC-Orbitrap (Chitescu et al., 2015; Gros et al., 2012), LC-MS/TOF(time-of-flight)(Amelin and Timofeev, 2016; Perez-Parada et al., 2011) 등과 같은 고 분해능의 질량분석기의 사용도 증가하고 있는데 Chitescu et al. (2015)은 LC-Orbitrap을 이용하여 하천수에서 67종의 의약물질을 분석하였고, Amelin and Timofeev (2016)는 동물 사료로부터 25종의 진균독소(mycotoxin)와 항 콕시듐제 8종을 분석하는데 HPLC-MS/TOF를 적용하기도 하였다. 이러한 장비들은 텐덤 질량분석기와 유사하거나 그 이상의 높은 분해능을 갖고 있으며, 시료 중에 존재하는 미지 물질(unknown compounds)의 종류와 화학적 구조를 식별하는데 탁월한 성능을 나타낸다(Turnipseed et al., 2011).

우리나라는 2015년 퇴비와 가축분뇨 등으로 인한 발생하는 잔류 항생물질의 거동 및 환경오염 실태를 조사하고자 「가축분뇨의 관리 및 이용에 관한 법률」과 「가축분뇨실태조사의 세부 절차 및 방법 등에 관한 고시」를 제정·발표하였다(Korea Ministry of Government Legislation, 2015). 이에 따르면 가축분뇨, 하천 및 호소, 지하수 등의 시료를 채취, 기본적인 수질측정 항목과 중금속, 잔류항생물질의 농도를 측정하게 된다. 구체적인 조사 및 분석방법으로 「비료의 품질검사방법 및 시료채취기준」, 「수질오염공정시험기준」, 「토양오염공정시험기준」, 「악취공정시험법」 등을 따르도록 명시하고 있으나 잔류항생물질을 분석하기 위한 적정시험방법은 규정하지 않고 있다.

앞선 연구를 통해 37종의 동물용 항생제를 대상물질로 선정하고 해당 물질에 대해 시료의 성상에 따른 전처리 방법을 조사·보고하였고, 잔류항생물질의 오염현황을 조사하고 적절한 대책과 대안 마련을 위해서는 올바른 분석방법의 적용을 통한 데이터의 신뢰도를 확보하는 것이 매우 중

요하기 때문에 본 연구에서는 HPLC와 MS를 활용한 분석 방법과 기술개발 수준을 확인하고자 하였다.

총설 III에서, 선정된 37종 동물용 항생제 중 미국 EPA method 1694(U.S. EPA, 2007) 비대상(non-targeted) 항생제, 특히 국내에서 연구가 미미한 아미노글리코사이드 계열 항생제에 대해 1) 해당 물질들의 LC와 MS를 사용한 분석방법 및 조건을 조사하고 2) 방법의 유효성을 평가하여, 향후 EPA method 1694에 포함된 항생제와 동시 분석에 적용될 수 있는 분석 방법의 수립을 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

2. Materials and Methods

2.1. 대상물질의 선정

대상물질은『2014년도 국가항생제 사용 및 내성 모니터링』(Lim et al., 2015)자료를 바탕으로 소, 돼지, 닭 사육 목적으로 판매된 항생제의 판매량을 고려하여 결정하였다. 선행연구에서 총 37종의 항생제가 선정 되었고 EPA method 1694를 적용할 수 있는 물질들을 대상으로 분석방법을 조사한 바 있어(총설 IV) 본 연구에서는 EPA method 1694를 적용할 수 없는 물질 21종(9개 계열)을 대상물질로 분류하였다(Table 1).

2.2. LC-MS/MS 분석

액체(지표수, 하수 등), 고체(가축분뇨, 퇴비, 토양 등)의 환경시료대상물질로 선정된 21종의 항생제를 LC-MS, LC-MS/MS, LC-MS/TOF, LC-MS/Orbitrap 등의 방법으로 분석한 문헌을 검토하여 LC와 MS의 분석조건을 고찰하였다. LC 조건으로는 사용된 컬럼의 종류와 온도, 이동상의 종류 등을 조사하여 항생제 종류에 따른 분석방법의 유사성이나 특이성 등을 검토하였다. 질량분석기 조건으로는 대상물질에 따른 분석기기의 종류, 이온화방식, 전구물질과 전이물질들의 질량 대 전하 비(mass to charge ratio, *m/z*), 전이체 생성을 위한 collision energy 등을 조사하였다.

2.3. 분석방법의 검증

개발 및 적용된 분석방법에 대한 검증을 위해 각 문헌에서 제시한 표준용액의 선형 구간(linear range), 상관계수(correlation coefficient, r^2), 회수율(recovery), 시험방법의 검출한계 및 정량한계 등을 비교하여 정리하였다. 검출한계(limit of detection, LOD)는 검출 가능한 최소량을 의미하며 정확한 정량은 불가능한 농도이다. 기기에 시료를 직접 주입하여 측정되는 기기검출한계(instrument detection limit, IDL)와 전처리를 포함한 전체 분석과정과 매질의 특성을 고려하여 결정되는 방법검출한계(method detection limit, MDL)로 구분한다(NIER, 2011). 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 검출 한계보다 높은 농도로 정확한 정량이 가능한 가장 낮은 농도를 의미한다. 검출한계와 동일하게 기기정량한계(instrument quantification limit, IQL), 방법정량한계(method quantification limit, MQL)로 구분하기도 한다(NIER, (2011). 아미노글리코사이드계열의 항생제를 대상으로 한 경우 검출한계 및 정량한계를 대신하여 결정 한계(decision limit, CC_α)와 탐지 역량(detection capability, CC_β)을(EU Commission, 2002) 계산하여 방법을 검증하는 경우가 많아 이에 대한 조사와 고찰을 수행하였다.

3. Liquid Chromatographic Methods

3.1. 컬럼의 종류

Table 2는 대상 항생제에 적용한 분석 방법과 크로마토그래피에 사용된 컬럼, 이동상의 종류를 나타낸다. 항생제 계열에 따른 큰 차이가 관찰되지는 않았으며 대부분의 문헌은 비극성 고정상과 극성 용매를 이동상으로 사용하는 역상 C_{18} 컬럼을 사용하는 것으로 조사되었으나 특정 계열의 항생제를 분리하기 위한 목적으로 C_8, phenyl 컬럼 또는 CAPCELL PAK ST 컬럼이 적용된 연구도 있다.

계란과 새의 근육에서 이오노포어계열의 항생제를 포함한 총 20종의 항콕시듐제의 잔류 농도를 측정한 Moloney et al. (2012)의 연구에서는 C_8 컬럼을 사용하기도 하였는데 극성이 없는 이오노포어계열의 항생제가 C_{18} 컬럼에 비해 소수성이 약한 C_8 컬럼에서 더 빠르게 용리될 수 있기 때문이다. Nebot et al. (2012)과 Iglesias et al. (2012)은 각각 18종, 21종의 동물용 의약품의 잔류량 측정에 Synergi Polar RP 컬럼을 사용하였다. Synergi Polar RP 컬럼은 실리카 입자에 phenyl이 결합되어 있는 구조로 C_{18} 컬럼을

Table 1. The 21 selected antibiotics popularly been sold in South Korea among non-targeted antibiotics in EPA method 1694

Class	Compound	Class	Compound
Aminoglycosides	Apramycin	Ionophore polyethers	Clopidol
	Dihydrostreptomycin		Fenbendazole
	Gentamicin		Lasalocid
	Kanamycin		Monensin
	Neomycin		Salinomycin
	Spectinomycin	Macrolides	Tilmicosin
	Streptomycin	Fluoroquinolones	Marbofloxacin
Amphenicols	Chloramphenicol	Pleuromutilins	Tiamulin
	Florfenicol	Polymyxins	Colistin
β-Lactams (Cephalosporins, penicillins)	Amoxicillin	Sulfonamides	Sulfaquinoxaline
	Ceftiofur		

Table 2. Comparison of chromatographic conditions for detection of the 21 selected antibiotics (FA: formic acid; ACN: acetonitrile; RRLC: rapid resolution liquid chromatography; UPLC: ultra performance chromatography; AF: ammonium formate; MeOH: methanol; HFBA: heptafluorobutyric acid; TFA: trifluoroacetic acid; TEA: triethylamine)

Reference	Detection method	Mobile phase	Column	Column temperature (°C)	Flow rate (ml/min)
Amelin and Timofeev, 2016	HPLC-MS/TOF	A: 0.1% FA in water (5mM AF) B: 0.1% FA in ACN	Acclaim 120 C_{18} (150×2.1 mm, 2.2 ㎛)	40	0.3
	Analyte	Clopidol, lasalocid, monensin, salinomycin,			
Ben et al., 2008	HPLC-MS/MS	A: 0.2% FA in water (vol %) B: MeOH, C: ACN	Symmetry C_{18} (150×2.1 mm, 5 ㎛) with guard column (10×2.1 mm)	30	0.23
	Analyte	Tiamulin			
Berendsen et al., 2013	UPLC-MS/MS	A: 0.0032% ammonia in water B: 0.0032% ammonia in water/ACN(1:9, v/v)	Acquity UPLC CSH C_{18} (100×2.1 mm, 1.7 ㎛)	50	0.4
	Analyte	Amoxicillin, ceftiofur			
Bohm et al., 2012	HPLC-MS/MS	A: 0.2% FA in water B: 0.2% FA in ACN	Aqua C_{18} (150×2.0 mm, 3.0 ㎛)	30	0.3
	Analyte	Tilmicosin, marbofloxacin, tiamulin			
Boscher et al., 2010	UPLC-MS/MS	A: 0.1% FA in water B: 0.1% FA in ACN/MeOH mixture (7:3, v/v)	Eclipse XDB plus (150×2.1 mm, 5 ㎛)	40	0.25
	Analyte	Chloramphenicol, florfenicol, amoxycillin, lasalocid, monensin, salinomycin, tilmicosin, marbofloxacin			
Carretero et al., 2008	HPLC-MS/MS	A: 10mM FA in MeOH B: 10mM FA in water	Xtera C_{18} (100×2.1 mm, 3.5 ㎛)	-	0.2
	Analyte	tilmicosin, marbofloxacin, sulfaquinoxaline			
Gorissen et al., 2015	UPLC-MS/MS	A: 0.1% FA in water B: 0.1% FA in ACN	Acquity UPLC BEH C_{18} (100×2.1 mm, 1.7 ㎛)	40	0.4
	Analyte	Amoxicillin, colistin A			
Gros et al., 2013	UPLC-MS/MS	A: ACN B: 0.1% FA in water	Acquity HSS T_3 (50×2.1 mm, 1.8 ㎛)	-	-
	Analyte	Amoxicillin, ceftiofur, tilmicosin, marbofloxacin			
Ho et al., 2012 Ho et al., 2014	HPLC-MS/MS	A: 0.3% FA and 0.1% AF in water B: ACN:MeOH (1:1)	Xterra MSC_{18} (100×2.1 mm, 3.5 ㎛)	40	0.25
	Analyte	Tilmicosin			
Hong et al., 2015	UPLC-MS/MS	A: 0.1% FA in water (vol %) B: ACN	Ethylene bridged hybrid C_{18} (50×2.1 mm, 1.7 ㎛)	40	0.4
	Analyte	Florfenicol, amoxicillin, fenbendazole,			
Iglesias et al., 2012	HPLC-MS/MS	A: 0.1% FA in ACN B: 0.1% FA in water	Synergi Polar-RP 100Å (50×2.0 mm, 2.5 ㎛) with SecurityGuard (4.0×2.0 mm)	-	0.15
	Analyte	Monensin, salinomycin, sulfaquinoxaline			
Kaklamanos et al., 2013	HPLC-Orbitrap	A: 0.5% FA in water B: 0.5% FA in MeOH	Altima HP C_{18} (150×3.2 mm, 5 ㎛)	35	0.35
	Analyte	Clopidol, lasalocid, monensin, salinomycin, tilmicosin, marbofloxacin, sulfaquinoxaline			

Table 2. Comparison of chromatographic conditions for detection of the 21 selected antibiotics (FA: formic acid; ACN: acetonitrile; RRLC: rapid resolution liquid chromatography; UPLC: ultra performance chromatography; AF: ammonium formate; MeOH: methanol; HFBA: heptafluorobutyric acid; TFA: trifluoroacetic acid; TEA: triethylamine)

Reference	Detection method	Mobile phase	Column	Column temperature (°C)	Flow rate (ml/min)
Kaufmann et al., 2012	UPLC-MS/MS	A: 5% ACN and 0.13% HFBA in water (vol %) B: 5% water and 0.13% HFBA in ACN (vol %)	Kinetex C_{18} (150×2.1 mm, 2.6 ㎛)	25	0.3
	Analyte	Apramycin, dihydrostreptomycin, gentamicin, kanamycin B, neomycin B, spectinomycin, steptomycin			
Lopes et al., 2012	UPLC-MS/MS	A: 0.1% FA in ACN B: 0.1% FA in water	Acquity BEH C_{18} (100×2.1 mm, 1.7 ㎛)	30	0.3
	Analyte	Fenbendazole, marbofloxacin, sulfaquinoxaline			
Moloney et al., 2012	UPLC-MS/MS	A: 0.1% FA in water B: 0.1% FA in ACN	Acquity BEH C_8 (50×2.1 mm, 1.7 ㎛)	60	0.6
	Analyte	Clopidol, lasalocid, monensin, salinomycin			
Nebot et al., 2012	HPLC-MS/MS	A: 0.1% FA in water (vol %) B: 0.1% FA in ACN (vol %)	Synergi Polar-RP 100Å (50×2.0 mm, 2.5 ㎛) with SecurityGuard (4.0×2.0 mm)	-	0.2
	Analyte	Lasalocid, monensin, salinomycin, sulfaquinoxaline			
Pietruk et al., 2015	HPLC-MS/MS	A: 0.01M AF (pH 4.0) B: ACN/MeOH/mobile phase A mixture (60:35:5)	Poroshell 120 EC-C_{18} (100×2.1 mm, 2.7 ㎛)	55	0.25
	Analyte	Clopidol, lasalocid, monensin, salinomycin,			
Pozo et al., 2006	HPLC-MS/MS	A: 0.01% FA in water (vol %) B: 0.01% FA in MeOH (vol %)	Kromasil C_{18} (100×2.1 mm, 5 ㎛)	-	0.2
	Analyte	Marbofloxacin			
Salvia et al., 2012	HPLC-MS/MS	A: MilliQ water B: ACN/MeOH (1:1)	Eclipse XDB C_{18} (100×2.1 mm, 1.8 ㎛)	50	0.3
	Analyte	Florfenicol			
Schlusener et al., 2003a	HPLC-MS/MS	A: 0.1 M ammonium acetate in water B: ACN	Phenosphere-Next RP_{18} (150×2.0 mm, 3 ㎛) with SecurityGuard	25	0.2
	Analyte	Monensin, salinomycin, tiamulin			
Tang et al., 2012	UPLC-MS/MS	A: 0.05% FA in water B: ACN	Acquity HSS T_3 (100×2.1mm, 1.8㎛)	-	0.3
	Analyte	Tilmicosin			
Tao et al., 2012a	HPLC-MS/MS	A: ACN B: 0.1% TFA in water	CAPCELL PAK ST (150×2.0 mm, 3 ㎛)	30	0.3
	Analyte	Apramycin, dihydrostreptomycin, gentamicin C1, kanamycin B, neomycin B, spectinomycin, streptomycin			
Tao et al., 2012b	HPLC-MS/MS	A: MeOH B: 0.1% FA and 5mM AF in water	Hypersil Gold C_{18} (100×2.1 mm, 5 ㎛)	35	0.25~0.4
	Analyte	Tilmicosin			
van Holthoon et al., 2009	HPLC-MS/MS	A: 0.065% HFBA in water B: 0.065% HFBA in MeOH	Symmetry C_{18} (150×3.0 mm, 5 ㎛)	30	0.4
	Analyte	Apramycin, dihydrostreptomycin, gentamicin, kanamycin, neomycin, spectinomycin, steptomycin,			
Vucicevic-Prcetic et al., 2011	HPLC-MS/MS	A: 0.1% TFA in water (pH 2.5 with ammonia) B: 0.1% TFA in water (pH 2.5 with TEA) C: ACN	Eclipse Plus C_{18} (50×4.6 mm, 1.8 ㎛)	Gentamicin: 32 Spectinomycin: 25	0.25
	Analyte	Gentamicin, spectinomycin			

Table 2. Comparison of chromatographic conditions for detection of the 21 selected antibiotics (FA: formic acid; ACN: acetonitrile; RRLC: rapid resolution liquid chromatography; UPLC: ultra performance chromatography; AF: ammonium formate; MeOH: methanol; HFBA: heptafluorobutyric acid; TFA: trifluoroacetic acid; TEA: triethylamine)

Reference	Detection method	Mobile phase	Column	Column temperature (℃)	Flow rate (ml/min)
Wan et al., 2006	HPLC-MS/MS	A: 0.1% FA in water B: 0.1% FA in ACN	Luna C_{18} (150×2.1 mm, 5.0 ㎛) with Alltime C_{18} guard (7.5×4.6 mm)	-	0.25
	Analyte	Colistin A, colistin B			
Wei et al., 2015	HPLC-MS/MS	A: 12.5 mM AF in water (pH 4) B: 12.5 mM AF in ACN/MeOH (1:1, v/v)	Hypersil C_{18} (150×2.1 mm, 5 ㎛)	40	0.2
	Analyte	Clopidol, fenbendazole, lasalocid, monensin, salinomycin, sulfaquinoxaline			
Xu et al., 2012	UPLC-MS/MS	A: 0.2% FA in ACN B: 0.2% FA in water	Acquity BEH C_{18} (100×2.1 mm, 1.7 ㎛)	40	0.2
	Analyte	Colistin A, colistin B			
Zhou et al., 2012 Zhou et al., 2013	RRLC-MS/MS	A: ACN B: 0.2% FA and 2mM ammonium acetate (ESI+) B: Water (ESI-)	Eclipse plus C_{18} (100×2.1 mm, 1.8 ㎛) and pre-column filter (0.2 ㎛)	40	0.3
	Analyte	Chloramphenicol, florfenicol, ceftiofur, monensin, salinomycin, marbofloxacin, sulfaquinoxaline			
Zhu et al., 2008	HPLC-MS/MS	A: 5% ACN in 20 mM HFBA water B: 50% ACN in 20 mM HFBA water	CAPCELL PAK C_{18} UG120 (150×2.0 mm, 5 ㎛)	30	0.3
	Analyte	Apramycin, dihydrostreptomycin, gentamicin C1, gentamicin C1, kanamycin, neomycin, spectinomycin, streptomycin			

보완하기 위해 개발되었다. 이 컬럼은 물질 분리할 때 극성 뿐 아니라 벤젠고리의 파이(π)결합을 이용하기 때문에 방향족화합물과의 결합력이 상대적으로 높아 보다 넓은 선택성을 갖는 것으로 알려져 있다. Tao et al. (2012a)은 15종의 아미노글리코사이드계열의 항생제를 분석하였는데, 친수성이 강한 스트렙토마이신(streptomycin)을 분리하기 위해 개발된 CAPCELL PAK ST 컬럼을 사용하기도 하였다.

HPLC의 경우 2.2~5.0 ㎛ 사이의 입자크기를 갖는 고정상으로 충전된 100~150 mm의 길이의 컬럼을 주로 사용한다. 2010년 이후에 수행된 대다수의 연구에서는 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC) 기술이 적용되고 있는 것으로 조사되었는데 2 ㎛ 이하의 크기를 갖는 입자로 충전된 길이가 짧은 컬럼(50~100 mm)을 사용한다. 컬럼의 길이가 감소한 만큼 상대적으로 짧은 시간에 물질의 분리가 이루어지는 장점을 가지고 있으며 좁고 높은 피크(peak)로 인해 향상된 분해성능을 나타낸다.

3.2. 이동상의 선택

LC에서 이동상 물질은 보통 극성용매와 비극성용매를 혼합하여 사용하고 있는데, 극성용매로는 물, 비극성 용매로는 아세토나이트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol) 또는 아세토나이트릴과 메탄올의 혼합액을 주로 사용한다. 극성과 비극성 물질의 혼합 비율은 컬럼을 지나가는 입자의 머무름 시간(retention time)에 영향을 미친다. 물과 비극성 물질을 용매로 사용하는 조건에서, 비극성 용매의 극성이 낮은 경우 용출속도가 증가하여 짧은 머무름 시간을 갖고 극성이 높은 경우에 상대적으로 긴 머무름 시간을 갖는 특성을 나타낸다. 특히 극성 정도가 다른 비극성물질의 혼합액을 용매로 사용하는 경우 혼합용매의 혼합비율이 머무름 시간에 영향을 미치기도 한다. 모든 연구가 복잡한 시료에서 하나 이상의 다양한 종류의 물질을 분류하는 것을 목적으로 하기 때문에 극성용매와 비극성용매의 혼합비율을 시간에 따라 변화시키는 구배용출법(gradient elution)을 적용하고 있다. 아미노글리코사이드계열의 항생제를 분석한 논문을 제외한 나머지 연구에서는 0.01~0.5% 농도로 포름산(formic acid)이나 포름산암모늄(ammonium formate)을 이동상 용매에 첨가하는 것으로 나타났다. 이러한 휘발성 첨가제를 첨가함으로 인해 분석대상 항생제의 이온화 효율과 질량분석기의 감도(sensitivity)를 향상시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Seifrtova et al., 2009). Amelin and Timofeev (2016), Wei et al. (2015)는 이동상에 초산암모늄(ammonium acetate)을 첨가제로 투입하였는데 포름산암모늄과 마찬가지로 질량분석기의 민감도를 향상시켜 피크의 세기를 증가시키는 역할을 하는 것으로 나타났다. Amelin and Timofeev (2016)는 모넨신(monensin), 나라신(narasin) 등을 분석하였는데, 초산암모늄의 투입에 의해 피크의 세기가 2배까지 증가됨을 보고하고 있다. 이동상에 대한 다양한 연구들이 있었으나 포름산과 아세토나이트릴, 물을 혼합하여 구배용출법을 사용하는 경우 좌우 대칭을 이루는 피크와 가장 높은 분해능을 나타내고, 포름산의 첨가로 인해 충분한 이온화가 진행됨과 동시에 피크의 테일링(tailing) 현상이 최소화되는 것으로 알려져 있다(Nebot et al., 2012).

3.3. 아미노글리코사이드 계열의 항생제 분리

총설 I, II의 결과 아미노글리코사이드 계열의 항생제는 타 계열의 항생제에 비해 매우 높은 친수성을 가지고 있기 때문에 전처리 과정에서도 구별된 방법의 적용이 필수적인 것으로 알려져 있다. 동일한 화학적 구조와 특성으로 인해 항생제 분석에 일반적으로 사용되는 C_{18} 역상 크로마토그래피 컬럼들에 의한 분리의 어려움이 다수 보고되어 왔다(Farouk et al., 2015; Kaufmann et al., 2012; Oertel et al., 2004). 역상 컬럼에서는 분자 극성의 차이를 바탕으로 고정상과 극성결합을 하려는 성질과 이동상에 의해 용리되려는 성질의 크기에 따라 물질이 분리되는데, 친수성이 매우 높은 아미노글리코사이드 계열의 항생제는 극성결합을 통해 컬럼의 고정상에 머무르기 힘들고 머무름 시간의 차이를 이용한 물질 분리가 어렵기 때문이다.

최근의 연구에서는 이온쌍 크로마토그래피(ion-pair chromatography, IPC)나 친수성 상호작용 크로마토그래피(hydrophilic interaction chromatography, HILIC)기법을 이용한 물질 분류 기술을 사용한다. 이온쌍 크로마토그래피는 분리대상물질이 이온으로 해리되는 친수성 물질을 분리할 때 사용되는 방법으로 이온쌍 시약(ion-pair reagent)을 사용한다. 이동상에 첨가하는 이온쌍 시약은 소수성을 띄는 컬럼의 충전물질 표면에 머무르게 되고 주입되는 시료 중에 이온 형태로 존재하는 분리대상물질들은 이온쌍 시약과의 이온교환(ion-exchange) 과정을 통해 물질간의 머무름 속도 차이가 발생하여 순차적인 물질의 분리가 일어난다. 기본적으로 이동상으로는 물과 아세토나이트릴을 사용하며 이온쌍 시약으로는 트리플로로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)(Tao et al., 2012a; Vucicevic-Prcetic et al., 2011)과 헵타플로로부티르산(heptafluorobutyric acid, HFBA)(Kaufmann et al., 2012; van Holthoon et al., 2009; Zhu et al., 2008)을 주로 사용하는 것으로 조사되었다. TFA의 농도가 0.1%일 때 피크의 모양과 분해능이 향상되는 것으로 나타났으며 Tao et al. (2012a)는 TFA의 농도를 0.005~1%로 변화시키면서 피크의 모양을 분석하여 15종의 아미노글리코사이드계열의 항생제 분석에 적합한 농도를 0.1%로 보고하였다.

친수성 상호작용 크로마토그래피가 적용된 연구들은 2000년대 초반부터 급격히 증가하였는데 역상 컬럼에서 분리가 어려운 탄수화물(Churms, 1996; Hao et al., 2007), 펩타이드(Hao et al., 2007; Yoshida, 2004) 또는 극성 의약물질(Li and Huang, 2004; Zhu et al., 2008) 등을 분리할 목적으로 적용된다. Diol, amino, amide 등의 극성 작용기로 치환되거나 쌍성 이온(zwitterion)과 공유결합으로 결합된 실리카 입자를 고정상으로 하는 컬럼을 사용하고 역상 크로마토그래피에서 사용하는 극성, 비극성 용매를 이동상으로 사용한다. 아세토나이트릴과 물이 가장 많이 사용되며 초산암모늄이나 포름산암모늄을 첨가물로 사용하기도 한다(Vucicecic-Prcetic et al., 2011; Zhu et al., 2008). 이러한 첨가제는 이

동상의 pH와 이온강도를 제어하는데 기여하며, 비대칭적인 피크와 테일링 현상을 감소시키고 고정상에서의 회수율을 향상시키는 역할을 한다. 특히, 아미노글리코사이드계열의 항생제와 같이 이온화되는 물질들은 단일 이온의 형태로 존재할 수 있는 pH로 조절되어야 한다고 보고되고 있다 (Buszewski and Noga, 2012).

높은 비율의 비극성 용매를 포함하는 이동상이 컬럼을 흐를 때 친수성 정지상 입자 표면 가까이에 물 층이 형성된다. 시료가 주입되고 이동상에 흐르는 분석물질은 강한 극성을 가지므로 친수성 환경인 물 층으로 이동하고 머무름을 갖게 된다. 서서히 이동상의 극성 용매 분율을 감소시키면 친수성 정도의 차이에 따라 컬럼 내에 물 층에 머무르던 분석 물질들이 순차적으로 분리된다. 유기용매의 분율이 높을수록 머무름 시간이 증가하며 물의 분율이 증가하면 물질이 분리되어 용리가 진행된다. 이동상에서 적절한 물의 비율은 컬럼의 종류에 따라 차이가 있으나 최소 3~5%, 최대 60%를 넘지 않는 것으로 나타났다(Appelblad et al., 2008).

4. MS/MS Detection

4.1. 이온화

의약물질의 분석을 위해 LC-MS, LC-MS/MS 등을 이용할 때 가장 많이 사용되는 이온화 방법은 전자분무이온화(electrospray ionization, ESI)법과 대기압화학이온화(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)법이 있다. Schlusener et al. (2003a)은 APCI법을 이용하기도 하였으나 동물용 항생제를 분석한 대부분의 연구들은 ESI 방법을 사용하는 것으로 나타났다(Table 3). ESI 기술은 극성, 비극성 물질에 모두 적용이 가능하며 열에 의해 변하기 쉬운 물질의 분석에 매우 효과적이다. Schlusener and Bester (2005)는 하수처리장 유입수와 유출수에서 호르몬과 매크로라이드 계열의 항생제를 분석하면서 APCI와 ESI의 성능을 비교하였는데, 매크로라이드 계열의 항생제에 대해서 ESI 방법을 적용한 결과 더 좋은 민감도를 나타내는 것을 관찰하였고, Stolker et al. (2004)는 3종의 항생제를 포함한 13종의 의약물질 분석 결과 APCI 방식 보다 ESI방식을 사용한 경우에 10배 이상의 민감도를 나타내는 것을 관찰하였다.

ESI법은 positive 또는 negative 방식으로 이온화를 수행하며 분석대상 물질은 화학적 특성에 따라 양성자를 얻거나($[M+H]^+$) 잃은($[M-H]^-$)형태의 전구이온으로 변환되는 것이 일반적이다. 대부분의 항생제는 비휘발성과 높은 분자량을 갖고 있고 positive 방식에서 쉽게 이온화된다(Seifrtova et al., 2009). Hao et al. (2006)은 27종의 항생제를 분석하였는데 대부분의 항생제는 주로 positive 방식에서 쉽게 이온화가 일어나는 것을 확인 하였고, 설폰아마이드계열의 항생제는 positive와 negative방식 모두에서 이온화가 잘 이루어지는 것을 확인하였으나 positive 방식을 적용하고 있다. 조사 결과 암페니콜계열의 클로람페니콜(chloramphenicol), 플로르페니콜(florfenicol)을 분석한 연구들은 negative 방식의 이온화 방법을 적용하여 $[M-H]^-$형태의 전구이온을 형성시키는 것으로 나타났으며 나머지 물질들은 positive 방식의 ESI를 적용하는 것으로 조사되었다(Table 3). 아미노글리코사이드계열의 항생제인 스펙티노마이신(spectinomycin)은 $[M+H_2O+H]^+$형태, 이오노포어계열의 항생제인 라살로시드(lasalocid), 모넨신, 살리노마이신(salinomycin)은 나트륨이 결합된 $[M+Na]^+$의 형태로 이온화되는 것으로 나타났으며 나머지 물질들은 수소이온과 결합한 $[M+H]^+$ 형태로 이온화가 이루어진다.

4.2. Detection mode

선정된 동물용 항생제의 분석을 위해 사용된 분석기법에서는 HPLC에서 분리된 대상물질을 이온화하여 MS/MS, MS/TOF, MS/Orbitrap 등 연속된 질량분석기에서 검출한다. 선택반응검출(selected reaction monitoring, SRM) 방식을 주로 사용하는데 이온화된 전구이온을 첫 번째 질량 분석기에서 분리하고 일정한 충돌 에너지(collision energy)를 가하여 쪼갠 후 두 번째 질량 분석기에서 쪼개진 이온들을 검출한다. 일반적으로 두 번째 질량분석기에서 검출되는 물질들(fragments) 중 가장 강한 신호를 갖는 물질을 원 물질의 농도를 정량하기 위한 전이체로 간주하며 두 번째로 강한 신호를 갖는 물질은 모 분자의 분자구조를 검증할 목적으로 확인한다. SRM 모드는 정확성과 민감도를 향상시킬 수 있는 유용한 방법으로 알려져 있으나 분석대상물질들이 정해지고 각 물질들에 대한 전구 이온(precursor ion)과 전이체(transitions)가 갖는 질량 대 전하 비(*m/z*)를 아는 경우에 적용 가능 하며 full scan 방식과는 달리 추가적인 미지 물질은 검출하지 못하는 한계가 있다. 본 연구에서 선정된 항생제 종류에 따른 전구이온과 전이체가 나타내는 질량 대 전하 비(*m/z*)는 Table 3에 정리하였다.

5. Method Validation

5.1. 분석방법의 검증 기준

검증과정은 분석 방법을 통해 대상 물질을 정확히 식별하고, 정량할 수 있는지에 대한 성능을 평가하는 단계로 신뢰할 수 있는 분석방법을 개발하기 위해 반드시 필요한 절차이다. 우리나라의 경우 국립환경과학원에서 발간한 환경시험·검사 QA/QC 핸드북에 분석방법의 검증을 위한 구체적인 방법을 설명하고 있다(NIER, 2011).

시험방법의 검증은 직선성(linearity), 범위(range), 정확도, 정밀도(precision), 검출한계, 정량한계 등을 고려하는 것으로 나타났다. 검정곡선의 선형관계는 선형 회기분석(linear regression)을 통해 구해진 상관계수인 r^2값을 고려하여 평가하고 검출농도를 포함할 수 있는 범위를 대상으로 직선성이 검증되어야 한다. 회수율은 전처리와 기기분석 전 과정에서 나타나는 분석대상물질의 손실율을 고려한 값으로 상대 정확도(relative accuracy)로 정의되기도 하며, 분석결과의 정확도(accuracy)를 평가하는 척도로 사용되는데(NIER, 2011) 항생제 분석 시 고려되는 회수율은 시료 전처리 과정의 효율을

Table 3. Comparion of mass spectrometric conditions for detection of the 21 selected antibiotics

Analyte	Detection method	Ionization mode	Precursor (m/z)	Transitions (m/z) (collision energy (eV))		Reference
				Quantification	Confirmation	
Dihydrostreptomycin	UPLC-MS/MS	ESI+	584	263 (30)	246 (34)	Kaufmann et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	584.0	262.9 (28)	245.9 (35)	Tao et al., 2012a
	HPLC-MS/MS	ESI+	584.3	263.2 (30)	246.1 (30)	van Holthoon et al., 2009
	HPLC-MS/MS	ESI+	584.2	263.0 (40)	246.2 (50)	Zhu et al., 2008
Gentamicin	HPLC-MS/MS	ESI+	478[a] 450[b] 464c	322 (14) 322 (14) 322 (14)	157 (21) - (-) - (-)	Kaufmann et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	478.1[a]	139.3 (27)	321.8 (12)	Tao et al., 2012a
	HPLC-MS/MS	ESI+	478.3[a] 450.3[b] 464.3[c]	322.2 (15) 322.2 (17) 322.2 (17)	157.1 (15) 160.1 (17) 160.1 (17)	van Holthoon et al., 2009
	HPLC-MS/MS	ESI+	478.0[a] 450.0[b]	322.0 (10) 322.0 (10)	157.0 (10) 160.0 (10)	Vucicevic-Prcetic et al., 2011
	HPLC-MS/MS	ESI+	478.2[a] 450.2[b]	157.3 (30) 160.2 (15)	322.4 (20) 322.2 (30)	Zhu et al., 2008
Kanamycin	UPLC-MS/MS	ESI+	485[e]	163 (26)	324 (17)	Kaufmann et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	484.8[e]	163.0 (23)	323.9 (16)	Tao et al., 2012a
	HPLC-MS/MS	ESI+	485.2[d]	163.1 (25)	205.1 (25)	van Holthoon et al., 2009
	HPLC-MS/MS	ESI+	485.1	163.1 (35)	324.3 (26)	Zhu et al., 2008
Neomycin	UPLC-MS/MS	ESI+	615[f]	161 (30)	455 (23)	Kaufmann et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	615.6	160.9 (30)	293.1 (25)	Tao et al., 2012a
	HPLC-MS/MS	ESI+	615.3[f]	161.1 (35)	163.1 (35)	van Holthoon et al., 2009
	HPLC-MS/MS	ESI+	615.4	161.3 (43)	293.2 (32)	Zhu et al., 2008
Spectinomycin	UPLC-MS/MS	ESI+	351	333 (19)	207 (21)	Kaufmann et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	350.9	189.0 (22)	207.1 (21)	Tao et al., 2012a
	HPLC-MS/MS	ESI+	351.2	100.0 (25)	189.1 (25)	van Holthoon et al., 2009
	HPLC-MS/MS	ESI+	333.3	140.0 (24)	98.2 (24)	Vucicevic-Prcetic et al., 2011
	HPLC-MS/MS	ESI+	351.2	333.2 (24)	207.2 (32)	Zhu et al., 2008
Streptomycin	UPLC-MS/MS	ESI+	582	263 (31)	246 (36)	Kaufmann et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	582.0	262.9 (29)	245.6 (35)	Tao et al., 2012a
	HPLC-MS/MS	ESI+	582.3	263.2 (35)	246.1 (35)	van Holthoon et al., 2009
	HPLC-MS/MS	ESI+	582.2	263.2 (40)	246.2 (50)	Zhu et al., 2008
Apramycin	UPLC-MS/MS	ESI+	540	217 (28)	378 (17)	Kaufmann et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	540.0	216.9 (25)	377.7 (14)	Tao et al., 2012a
	HPLC-MS/MS	ESI+	540.3	378.2 (20)	217.1 (20)	van Holthoon et al., 2009
	HPLC-MS/MS	ESI+	540.3	217.3 (40)	378.2 (25)	Zhu et al., 2008

Table 3. Comparion of mass spectrometric conditions for detection of the 21 selected antibiotics

Analyte	Detection method	Ionization mode	Precursor (m/z)	Transitions (m/z) (collision energy (eV))		Reference
				Quantification	Confirmation	
Chloramphenicol	HPLC-MS/MS	ESI-	321	152 (-23)	257 (-17)	Boscher et al., 2010
	HPLC-MS/MS	ESI-	321	152 (-25)	- (-)	Hao et al., 2006
	RRLC-MS/MS	ESI-	321.1	152.1 (4)	257 (0)	Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013
Florfenicol	HPLC-MS/MS	ESI-	356	184.9 (-26)	119 (-48)	Boscher et al., 2010
	UPLC-MS/MS	ESI-	356	336 (-10)	185 (-20)	Hong et al., 2015
	HPLC-MS/MS	ESI-	356	336 (-22)	185 (-12)	Salvia et al., 2012
	RRLC-MS/MS	ESI-	357.2	337 (4)	185 (12)	Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013
Amoxicillin	UPLC-MS/MS	ESI+	451.2	275.2 (15)	302.2 (15)	Berendsen et al., 2013
	HPLC-MS/MS	ESI-	364	223.1 (-12)	129 (-28)	Boscher et al., 2010
	UPLC-MS/MS	ESI+	366	114 (15)	207.9 (10)	Gorissen et al., 2015
	UPLC-MS/MS	ESI+	366	349 (13)	114 (27)	Gros et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	366	349 (10)	114 (25)	Hong et al., 2015
Ceftiofur	UPLC-MS/MS	ESI+	326.1	169.0 (20)	241.0 (15)	Berendsen et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	524	125 (91)	241 (25)	Gros et al., 2013
	RRLC-MS/MS	ESI+	524.5	241.1 (16)	125.0 (76)	Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013
Lasalocid	HPLC-MS/TOF	ESI+	613.3711	- (-)	- (-)	Amelin and Timofeev, 2016
	HPLC-MS/MS	ESI+	613.5	377.4 (48)	577.4 (48)	Boscher et al., 2010
	HPLC-Orbitrap	ESI+	613.37109	- (-)	- (-)	Kaklamanos et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	613.4	377.3 (37)	595.3 (30)	Moloney et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	613	377 (33)	595 (33)	Nebot et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	613.3	577.3 (34)	377.2 (37)	Pietruk et al., 2015
	HPLC-MS/MS	ESI+	613.4	377.5 (32)	359.4 (37)	Wei et al., 2015
Monensin	HPLC-MS/TOF	ESI+	693.4184	- (-)	- (-)	Amelin and Timofeev, 2016
	HPLC-MS/MS	ESI+	693.5	461.4 (68)	479.4 (73)	Boscher et al., 2010
	HPLC-MS/MS	ESI+	693	675 (31)	461 (31	Iglesias et al., 2012
	HPLC-Orbitrap	ESI+	693.41843	- (-)	- (-)	Kaklamanos et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	693.4	461.2 (52)	675.3 (40)	Moloney et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	693	675 (31)	461 (31)	Nebot et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	693.3	675.4 (40)	479.3 (53)	Pietruk et al., 2015
	HPLC-MS/MS	APCI	688.5	461.3 (-27)	- (-)	Schlusener et al., 2003a
	HPLC-MS/MS	ESI+	693.5	461.4 (46)	321.2 (49)	Wei et al., 2015
	RRLC-MS/MS	ESI+	693.8	675.5 (40)	479.3 (56)	Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013
Salinomycin	HPLC-MS/TOF	ESI+	773.4810	- (-)	- (-)	Amelin and Timofeev, 2016
	HPLC-MS/MS	ESI+	773.6	265.2 (70)	431.3 (67)	Boscher et al., 2010
	HPLC-MS/MS	ESI+	773	431 (47)	531 (47)	Iglesias et al., 2012
	HPLC-Orbitrap	ESI+	773.48103	- (-)	- (-)	Kaklamanos et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	773.4	431.1 (50)	531.3 (45)	Moloney et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	773	431 (47)	531 (47)	Nebot et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	773.4	531.3 (44)	431.1 (52)	Pietruk et al., 2015
	HPLC-MS/MS	APCI	768.7	733.6 (-22)	- (-)	Schlusener et al., 2003a
	HPLC-MS/MS	ESI+	773.5	413.2 (42)	265.4 (44)	Wei et al., 2015
	RRLC-MS/MS	ESI+	773.5	431.2 (56)	265.1 (60)	Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013

Table 3. Comparion of mass spectrometric conditions for detection of the 21 selected antibiotics

Analyte	Detection method	Ionization mode	Precursor (m/z)	Transitions (m/z) (collision energy (eV))		Reference
				Quantification	Confirmation	
Tilmicosin	HPLC-MS/MS	ESI+	869.8	174.2 (63)	696.6 (55)	Bohm et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	869.7	88.2 (111)	174.2 (62)	Boscher et al., 2010
	HPLC-MS/MS	ESI+	870	174 (45)	696 (45)	Carretero et al., 2008
	UPLC-MS/MS	ESI+	869	88 (119)	696 (57)	Gros et al., 2013
	HPLC-MS/MS	ESI+	869.5	696.3 (51)	- (-)	Ho et al., 2012
	HPLC-Orbitrap	ESI+	869.57332	- (-)	- (-)	Kaklamanos et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	869.84	174.071 (-)	- (-)	Tang et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	869	339.9 (18)	125.8 (33)	Tao et al., 2012b
Marbofloxacin	HPLC-MS/MS	ESI+	363.2	320.1 (23)	277.2 (29)	Bohm et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	363.2	72.1 (46)	320.2 (21)	Boscher et al., 2010
	HPLC-MS/MS	ESI+	363	72 (15)	320 (15)	Carretero et al., 2008
	UPLC-MS/MS	ESI+	363	72 (27)	320 (23)	Gros et al., 2013
	HPLC-Orbitrap	ESI+	363.14631	- (-)	- (-)	Kaklamanos et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	363.1	320.4 (15)	345.4 (20)	Lopes et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	363.1	72.0 (25)	- (-)	Pozo et al., 2006
	RRLC-MS/MS	ESI+	363.4	72.1 (24)	70.1 (44)	Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013
Tiamulin	HPLC-MS/MS	ESI+	494	192 (30)	- (-)	Ben et al., 2008
	HPLC-MS/MS	ESI+	494.5	192.2 (29)	119.2 (55)	Bohm et al., 2012
	HPLC-MS/MS	APCI	494.6	1923 (-27)	- (-)	Schlusener et al., 2003a
Colistin	UPLC-MS/MS	ESI+	390.8[g]	- (-)	379.2 (10)	Gorissen et al., 2015
	HPLC-MS/MS	ESI+	391[g] 386[h]	385 (12) 380 (12)	379 (14) 374 (13)	Wan et al., 2006
	UPLC-MS/MS	ESI+	390.76[g] 385.15[h]	385.0 (11) 380.0 (11)	101.1 (19) 101.0 (19)	Xu et al., 2012
Sulfaquinoxaline	HPLC-MS/MS	ESI+	301	108 (20)	156 (20)	Carretero et al., 2008
	HPLC-Orbitrap	ESI+	301.07537	- (-)	- (-)	Kaklamanos et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	301.2	156.1 (35)	108.1 (30)	Lopes et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	301	166 (17)	92 (17)	Nebot et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	301.0	108.1 (25)	92.1 (29)	Wei et al., 2015
	RRLC-MS/MS	ESI+	301.3	92.1 (36)	108.1 (28)	Zhou et al., 2012; Zhou et al., 2013
Clopidol	HPLC-MS/TOF	ESI+	191.9978	- (-)	- (-)	Amelin and Timofeev, 2016
	HPLC-Orbitrap	ESI+	191.99775	- (-)	- (-)	Kaklamanos et al., 2013
	UPLC-MS/MS	ESI+	192.0	87.0 (30)	101.0 (25)	Moloney et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	192.0	101.2 (28)	87.1 (30)	Pietruk et al., 2015
	HPLC-MS/MS	ESI+	193.9	103.2 (32)	100.8 (25	Wei et al., 2015
Fenbendazole	UPLC-MS/MS	ESI+	300	268 (20)	159 (35)	Hong et al., 2015
	UPLC-MS/MS	ESI+	300.0	268.2 (20)	159.1 (35)	Lopes et al., 2012
	HPLC-MS/MS	ESI+	300.2	190.3 (29)	159.3 (34)	Wei et al., 2015

[a] Gentamicin$_{C1}$, [b] Gentamicin$_{C1a}$, [c] Gentamicin$_{C2+C2a}$, [d] Kanamycin A, [e] Kanamycin B, [f] Neomycin B, [g] Colistin A, [h] Colistin B

평가하는 기준으로 사용되는 경우가 많다. 정밀도를 나타내기 위한 방법으로는 표준편차(standard deviation), 표준 오차(standard error), 분산(variance), 상대표준편차(relative standard deviation, RSD) 등이 있으나(NIER, 2011) 일반적으로는 상대표준편차와 변동계수 (coefficient of variance, CV)로 정밀도를 평가하고 있다. LOD와 LOQ는 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio, S/N)를 바탕으로 결정하거나 미국의 수질오염방지법(Clean Water Act)에서 제시한 방법을 사용한다. 신호 대 잡음비를 사용하는 경우 S/N이 3, 10이 되는 농도 값을 각각 LOD, LOQ로 결정한다. 미국의 수질오염방지법에서는 검출한계 부근의 낮은 농도를 갖는 최소 7개 시료를 분석하고 측정값의 표준편차에 3.143(신뢰도 98%, 자유도 6에 대한 값), 10을 곱하여 각각 LOD, LOQ로 결정한다. 미국공중보건협회(American Public Health Association, APHA), 미국수도협회(American Water Works Association, AWWA), 미국물환경연합(Water Environment Federation, WEF)에서 발간하는 표준시험방법(standard method for the examination of water and wastewater)과 미국재료시험학회(American Society for Testing and Materials, ASTM)의 시험방법에서도 미국 수질오염방지법에서 정의한 LOD를 사용하고 있다(NIER, 2011).

유럽연합 집행위원회(European Commission)는 2002년 동물성 식품들에 잔류하는 오염물질의 분석방법과 성능을 평가하기 위한 기준을 발표하였다(EU Commission, 2002). 항생제를 포함하여 동물용 의약품 및 살충제 등 미량 환경오염 물질 등에 대해 적용 가능한 분석 기법(technique)을 제시하고 있으며 정확도, 진도(trueness)/회수율, 정밀도, 반복성(repeatability), 재현성(reproducibility), 검정곡선, 결정 한계, 탐지 역량 등의 검증 항목을 정의하고 측정 방법을 설명한다(EU Commission, 2002). 분석 목적(스크리닝 또는 정량), 검출 농도 범위, 분석 기법 등에 따라 검증이 필요한 항목들과 검증기준을 제시한다.

5.2. 동물용 항생제 분석방법의 검증

본 연구에서는 검정용액의 농도 범위와 직선성(linearity), 시료의 종류와 회수율, 방법검출한계(method detection limits, MDL), 방법정량한계(method quantification limits, MQL), 결정 한계(decision limit, CC_{α}), 검출 성능(detection capability, CC_{β}) 등을 확인하였다(Table 4).

일반적으로 성분의 구성이 복잡한 환경 시료의 경우 LC-MS를 통해 최종 검출되는 신호의 강도가 원 시료 중의 대상물질이 갖는 신호의 세기보다 약하거나 혹은 강해지는 매트릭스 효과(matrix effect)를 나타낼 수 있다(Gros et al., 2013; Zhou et al., 2012). Seifrtova et al. (2009)는 항생제 분석에 있어서 매트릭스 효과를 나타내는 인자로 세 가지를 제시하였는데 원치 않는 물질이 검출되면서 크로마토그램의 바탕선(baseline)이 상승하여 분석대상물질의 피크 검출을 방해하는 경우가 있다고 하였다. 또한 시료중의 유기물질에 항생제가 흡착되어 전처리 효율(추출 및 농축)이 감소되거나, 함께 추출된 물질들이 이온화과정에서 분석대상물질의 이온화 효율을 감소시킬 수 있는데 이러한 경우 분석 값이 실제보다 낮게 측정되거나 검출되지 않는 현상이 나타나기도 하였다(Gros et al., 2006; Kasprzyk-Horden et al., 2007; Vanderford et al., 2003). 추출/분석 중 발생하는 손실과 오차를 보정하여 정량과 회수율의 정확성을 높이기 위한 방법으로 matrix-matched calibration과 내부표준물질(internal standard)을 사용하여 검량 곡선을 작성하는 방법이 주로 사용되고 있다(Bousova et al., 2013). Matrix-matched calibration은 분석 대상 시료와 유사한 매트릭스를 갖는 바탕시료를 표준용액 제조 시 용매로 사용하는 방법으로 표준용액 제조 용매와 시료의 매트릭스 차이로 인해 발생하는 오차를 최소화할 수 있으나 환경시료와 유사한 매트릭스를 갖는 바탕시료를 얻기 어려운 단점을 가지고 있다. 이러한 경우 내부표준물질을 사용하며 내부표준물질과 분석 대상물질의 농도비와 피크 면적비를 사용하여 검량 곡선을 작성한다. 내부표준물질은 분석을 수행하는 전 과정에서 분석대상물질의 특성을 반영할 수 있도록 유사한 화학구조를 갖는 물질을 선택해야 하며 일반적으로 질소나 탄소의 동위원소 또는 중수소로 치환된 물질이 사용된다(Ho et al., 2014; Yang et al., 2010).

조사된 문헌들은 동물의 근육, 우유, 계란, 지표수, 하수, 분뇨 등 다양한 시료를 대상으로 하고 있으며 검정 곡선의 범위는 0에서 수천 μg/L (μg/kg) 사이를 사용하는 것으로 나타났다. Vucicevic-Prcetic et al. (2011)은 아미노글리코사이드 계열 의약품의 순도를 측정할 목적으로 고농도 범위에 적용 가능한 분석방법을 개발하기도 하였는데, 최대 164,000 μg/L 의 농도를 갖는 표준용액을 사용하여 검정곡선을 작성하기도 하였다. 검정곡선의 직선성을 검증하기 위해 r^2 값을 검토하였고 대부분의 검정선은 0.990 이상의 값을 갖는 것으로 나타났으나 Lopes et al. (2012)와 Nebot et al. (2012)은 r^2>0.98의 검량선으로 잔류농도를 측정하였다.

분석방법의 정확도를 평가하기 위해 분석과정 전체의 회수율을 검토하기도 하지만 환경시료 분석과 같이 전처리가 중요시 되는 분석 과정에서는 전처리 방법의 효율을 평가하기 위한 목적으로 회수율을 사용하기도 한다. 전처리 전과 후에 특정 농도의 표준용액을 투입한 두 시료에서 표준물질의 농도를 측정하고 전처리 과정에서 회수되는 비율을 계산한다. 대부분의 방법에서 60~120% 범위의 회수율을 나타내고 있으나 퇴비와 같은 매우 복잡한 매질에서(Zhou et al., 2012)나 pH에 의해 영향을 받는 베타 락탐계열의 항생제 등은 50% 이하의 회수율(Gros et al., 2013)을 나타내기도 하는 것으로 알려져 있다.

LOD와 LOQ는 분석 장비, 분석 방법 분석자의 숙련도에 따라 그 값이 달라질 수 있기 때문에 특정 분석방법에 대한 한계 값들을 방법검출한계(MDL)와 방법정량한계(MQL)로 구분하여 나타내기도 한다. 특히, 환경시료와 같이 복잡한 시료의 경우, 전처리 방법에 따라 그 한계값이 변하는 경우가 많아 분석 장비에 표준용액을 직접 주입하여 측정하는 장비검출한계(instrument detection limit, IDL)와 장비정량한계(instrument quantification limit, IQL)를 구분하여

Table 4. Comparison of analytical method validations for the 21 selected antibiotics according to original sample matrixes (MDL: method detection limit; MQL: method quantification limit; SW: surface water; MAN: manure; WWI: wastewater influent; WWE: wastewater effluent; SWW: swine wastewater; GW: ground water)

Analyte	Original sample matrix	Calibration range	r^2	Recovery (%)	MDL	MQL	Reference
Dihydrostreptomycin	Fish	-	0.9975	71~80	-	2 ng/g	Kaufmann et al., 2012
	Milk Egg	10~1000 μg/kg	> 0.990	71~82 72~89	9.1 ng/g[a] 11.3 ng/g[a]	18.2 ng/g[b] 18.6 ng/g[b]	Tao et al., 2012a
	Porcine muscle	125~2000 μg/kg	0.999	101	564 ng/g[a]	628 ng/g[b]	van Holthoon et al., 2009
	Animal kidney Honey	0~10000 μg/kg 0~86 μg/kg	0.9987 0.9916	85~98 64~85	1080.4 ng/g[a] 8.6 ng/g[a]	1160.1 ng/g[b] 11.4 ng/g[b]	Zhu et al., 2008
Gentamicin	Fish	-	0.9967	38~79	-	10 ng/g	Kaufmann et al., 2012
	Milk Egg	10~1000 μg/kg	> 0.990	76-89 76-88	11.2 ng/g[a] 11.2 ng/g[a]	21.1 ng/g[b] 18.1 ng/g[b]	Tao et al., 2012a
	Porcine muscle	12.5~200 μg/kg	0.997	71	65 ng/g[a]	80 ng/g[b]	van Holthoon et al., 2009
	Pharmaceutical	16400~164000 μg/L	0.9977c 0.9958d	97~102c 95~98d	-	-	Vucicevic-Prcetic et al., 2011
	Animal kidney Honey	0~2000 μg/kg 0~186 μg/kg	0.9997 0.9992	80~94 86~96	223.3 ng/g[a] 18.6 ng/g[a]	247.1 ng/g[b] 23.8 ng/g[b]	Zhu et al., 2008
Kanamycin	Fish		0.9967	79~81	-	5 ng/g	Kaufmann et al., 2012
	Milk Egg	10~1000 μg/kg	> 0.990	81~91 82~97	11.5 ng/g[a] 8.5 ng/g[a]	18.5 ng/g[b] 21.9 ng/g[b]	Tao et al., 2012a
	Porcine muscle	25~400 μg/kg	0.999	92	120 ng/g[a]	139 ng/g[b]	van Holthoon et al., 2009
	Animal kidney Honey	0~400 μg/kg 0~98 μg/kg	0.9993c 0.9964c	71~100 81~99	49.1 ng/g[a] 9.8 ng/g[a]	59.4 ng/g[b] 12.4 ng/g[b]	Zhu et al., 2008
Neomycin	Fish	-	0.9908	61~74	-	15 ng/g	Kaufmann et al., 2012
	Milk Egg	10~1000 μg/kg	> 0.990	83~94 81~96	10.2 ng/g[a] 8.6 ng/g[a]	18.6 ng/g[b] 20.3 ng/g[b]	Tao et al., 2012a
	Porcine muscle	125~2000 μg/kg	0.998	65	674 ng/g[a]	849 ng/g[b]	van Holthoon et al., 2009
	Animal kidney Honey	0~50000 μg/kg 0~405 μg/kg	0.9993 0.9925	92~101 64~85	5278.8 ng/g[a] 40.5 ng/g[a]	5538.5 ng/g[b] 52.1 ng/g[b]	Zhu et al., 2008
Spectinomycin	Fish	-	0.9977	71~77	-	15 ng/g	Kaufmann et al., 2012
	Milk Egg	10~1000 μg/kg	> 0.990	88~101 70~86	11.0 ng/g[a] 9.4 ng/g[a]	9.4 ng/g[b] 17.6 ng/g[b]	Tao et al., 2012a
	Porcine muscle	75~1200 μg/kg	0.999	61	584 ng/g[a]	668 ng/g[b]	van Holthoon et al., 2009
	Pharmaceutical	10000~100000 μg/L	0.9974	97~100	-	-	Vucicevic-Prcetic et al., 2011
	Animal kidney Honey	0~5000 μg/kg 0~86 μg/kg	0.9989 0.9905	84~106 71~97	577.9 ng/g[a] 8.6 ng/g[a]	657.5 ng/g[b] 11.5 ng/g[b]	Zhu et al., 2008

Table 4. Comparison of analytical method validations for the 21 selected antibiotics according to original sample matrixes (MDL: method detection limit; MQL: method quantification limit; SW: surface water; MAN: manure; WWI: wastewater influent; WWE: wastewater effluent; SWW: swine wastewater; GW: ground water)

Analyte	Original sample matrix	Calibration range	r^2	Recovery (%)	MDL	MQL	Reference
Streptomycin	Fish		0.9947	45~67	-	25 ng/g	Kaufmann et al., 2012
	Milk Egg	10~1000 μg/kg	> 0.990	75~91 75~91	11.0 ng/g[a] 8.7 ng/g[a]	19.4 ng/g[b] 17.4 ng/g[b]	Tao et al., 2012a
	Porcine muscle	125~2000 μg/kg	0.999	84	563 ng/g[a]	625 ng/g[b]	van Holthoon et al., 2009
	Animal kidney Honey	0~10000 μg/kg 0~113 μg/kg	0.9995 0.9997	81~96 79~116	1131.2 ng/g[a] 11.3 ng/g[a]	1313.0 ng/g[b] 14.7 ng/g[b]	Zhu et al., 2008
Apramycin	Fish	-	0.9924	60~85	-	2 ng/g	Kaufmann et al., 2012
	Milk Egg	10~1000 μg/kg	> 0.990	73~87 79~89	8.9 ng/g[a] 11.1 ng/g[a]	17.0 ng/g[b] 21.3 ng/g[b]	Tao et al., 2012a
	Porcine muscle	250-4000 μg/kg	0.995	72	1188 ng/g[a]	1375 ng/g[b]	van Holthoon et al., 2009
	Animal kidney Honey	0~1000 μg/kg 0~216 μg/kg	0.9931 0.9993	73~99 78~106	223.3 ng/g[a] 18.6 ng/g[a]	247.1 ng/g[b] 23.8 ng/g[b]	Zhu et al., 2008
Chloramphenicol	Animal feeds	0~40 μg/L	0.997	105~107	-	15.0 ng/g	Boscher et al., 2010
	SW MAN	5~200 μg/L	> 0.995	89~103 56~61	0.77 ng/L 1.17 ng/g	2.57 ng/L 3.90 ng/g	Zhou et al., 2012
Florfenicol	Animal feeds	0~40 μg/L	0.993	111~123	-	21.8 ng/g	Boscher et al., 2010
	WWI	1~1000 μg/L	0.998	97~103	3.4 ng/L	-	Hong et al., 2015
	Agricultural soil	0.1~130 μg/kg	0.997	94~114	0.004 ng/g	0.013 ng/g	Salvia et al., 2012
	SW MAN	5~200 μg/L	> 0.995	80~113 34~56	0.65 ng/L 2.03 ng/g	2.17 ng/L 6.77 ng/g	Zhou et al., 2012
Amoxicillin	Poultry muscle	0~250 μg/kg	0.999	97~100	53.9 ng/g[a]	57.9 ng/g[b]	Berendsen et al., 2013
	Animal feeds	0~40 μg/L	0.997	54~74	-	23.2 ng/g	Boscher et al., 2010
	Poultry excreta	50~5000 μg/kg	0.996	96~108	7.50 ng/g	50 ng/g	Gorissen et al., 2015
	SW WWE	20~50 μg/L	0.9942	20 20	1.32 ng/L 2.65 ng/L	4.38 ng/L 8.83 ng/L	Gros et al., 2013
	WWI	1~1000 μg/L	0.996	91~107	7.0 ng/L	-	Hong et al., 2015
Ceftiofur	Poultry muscle	0~50 μg/kg	0.998	95~101	1.3 ng/g[a]	2.7 ng/g[b]	Berendsen et al., 2013
	SW WWE	20~50 μg/L	0.9971	77 50	1.26 ng/L 5.32 ng/L	4.19 ng/L 17.72 ng/L	Gros et al., 2013
	SW MAN	5~200 μg/L	> 0.995	121~153 54-~133	1.15 ng/L 5.22 ng/g	3.85 ng/L 17.4 ng/g	Zhou et al., 2012
Lasalocid	Milk	-	-	-	500 ng/L	1000 ng/L	Amelin et al., 2016
	Animal feeds	0~80 μg/L	0.998	93~101	-	10 ng/g	Boscher et al., 2010
	Pig feed	25~1000 μg/kg	0.9956	86.9~88.7	10 ng/g	25 ng/g	Kaklamanos et al., 2013
	Egg	1~50 μg/kg	0.99	55	179 ng/g[a]	209 ng/g[b]	Moloney et al., 2012
	Milk	0~5 μg/L	0.981	-	0.2 ng/ml[a]	0.3 ng/ml[b]	Nebot et al., 2012
	Swine meat	0.5~5 μg/kg	-	-	-	10.22 ng/[b]b	Wei et al., 2015

Table 4. Comparison of analytical method validations for the 21 selected antibiotics according to original sample matrixes (MDL: method detection limit; MQL: method quantification limit; SW: surface water; MAN: manure; WWI: wastewater influent; WWE: wastewater effluent; SWW: swine wastewater; GW: ground water)

Analyte	Original sample matrix	Calibration range	r^2	Recovery (%)	MDL	MQL	Reference
Monensin	Milk	-	-	-	300 ng/L	500 ng/L	Amelin et al., 2016
	Animal feeds	0~40 μg/L	0.998	54~99	-	5.0 ng/g	Boscher et al., 2010
	SW	0.006~0.25 μg/L	0.995	69~142	7.0 ng/L	-	Iglesias et al., 2012
	Pig feed	25~1000 μg/kg	0.9982	100.6~98.1	10 ng/g	25 ng/g	Kaklamanos et al., 2013
	Egg	1~50 μg/kg	0.99	81	2.32 ng/g[a]	2.56 ng/g[b]	Moloney et al., 2012
	Milk	0~10 μg/L	0.990	-	0.2 ng/ml[a]	0.4 ng/ml[b]	Nebot et al., 2012
	Swine meat	0.5~5 μg/kg	-	-	-	4.19 ng/g[b]	Wei et al., 2015
	SW MAN	5~200 μg/L	> 0.995	62~70 < 0	0.36 ng/L -	1.20 ng/L -	Zhou et al., 2012
Salinomycin	Milk	-	-	-	500 ng/L	2000 ng/L	Amelin et al., 2016
	Animal feeds	0~40 μg/L	0.997	65~92	-	4.2 ng/g	Boscher et al., 2010
	SW	0.006~0.25 μg/L	0.991	73~142	17.3 ng/L	-	Iglesias et al., 2012
	Pig feed	25~1000 μg/kg	0.9988	91.0~97.5	10 ng/g	25 ng/g	Kaklamanos et al., 2013
	Egg	1~50 μg/kg	0.99	59	3.82 ng/g[a]	4.67 ng/g[b]	Moloney et al., 2012
	Milk	0~10 μg/L	0.980	-	0.2 ng/ml[a]	0.4 ng/ml[b]	Nebot et al., 2012
	Liquid manure	5~5000 μg/L	0.991	119	3.2 ng/g	10.7 ng/g	Schlusener et al., 2003b
	Swine meat	0.5~5 μg/kg	-	-	-	10.19[b]	Wei et al., 2015
	SW MAN	5~200 μg/L	> 0.995	53~92 < 10	0.24 ng/L -	0.78 ng/L -	Zhou et al., 2012
Tilmicosin	Honey	0~50 μg/kg	-	98	8.1 ng/g[a]	10.7 ng/g[b]	Bohm et al., 2012
	Animal feeds	0~40 μg/L	0.995	60~102	-	6.5 ng/g	Boscher et al., 2010
	SW WWE	20~50 μg/L	1.000	160 156	3.73 ng/L 7.68 ng/L	12.44 ng/L 25.61 ng/L	Gros et al., 2013
	Agricultural soil Broiler manure	0.1~500 μg/L	0.9994	93 103	3 ng/g 4 ng/g	10 ng/g 14 ng/g	Ho et al., 2012
	Pig feed	25~1000 μg/kg	0.9996	102.5~110.5	10 ng/g	25 ng/g	Kaklamanos et al., 2013
	Milk	25~100 μg/L	> 0.99	118~126	2.5 ng/L	5 ng/L	Tang et al., 2012
	Animal muscle Animul kidney	2~400 μg/kg	>0.999	86~93 86~101	<0.32 ng/g <0.25 ng/g	5 ng/g 5 ng/g	Tao et al., 2012b
Marbofloxacin	Honey	0~50 μg/kg	-	100	7.7 ng/g[a]	10.1 ng/g[b]	Bohm et al., 2012
	Animal feeds	0~40 μg/L	0.997	59~62	-	4.8 ng/g	Boscher et al., 2010
	Meat	10~000 ng/g	0.997	77	3 ng/g	10 ng/g	Carretero et al., 2008
	SW WWE	20~50 μg/L	0.9993	94 79	2.50 ng/L 2.23 ng/L	8.34 ng/L 7.45 ng/L	Gros et al., 2013
	Pig feed	25~500 μg/kg	0.9940	100.2~113.4	10 ng/g	25 ng/g	Kaklamanos et al., 2013
	Sea bream	10~150 μg/kg	> 0.98	100~118	7.5 ng/g	25.0 ng/g	Lopes et al., 2012
	GW SW	0.005~0.5 μg/L	> 0.99	80~99 87~97	0.8 ng/L	-	Pozo et al., 2006
	SW MAN	5~200 μg/L	> 0.995	103~129 63~119	0.29 ng/L 0.55 ng/g	0.95 ng/L 1.82 ng/g	Zhou et al., 2012

Table 4. Comparison of analytical method validations for the 21 selected antibiotics according to original sample matrixes (MDL: method detection limit; MQL: method quantification limit; SW: surface water; MAN: manure; WWI: wastewater influent; WWE: wastewater effluent; SWW: swine wastewater; GW: ground water)

Analyte	Original sample matrix	Calibration range	r^2	Recovery (%)	MDL	MQL	Reference
Tiamulin	SWW	0.5~25 μg/L	0.999	99	1.32 ng/L	-	Ben et al., 2008
	Honey	0~50 μg/kg	-	103	8.6 ng/g[a]	11.4 ng/g[b]	Bohm et al., 2012
	Meat	25~1000 ng/g	0.998	79	5 ng/g	25 ng/g	Carretero et al., 2008
	Liquid manure	5~5000 μg/L	0.998	123	0.4 ng/g	1.4 ng/g	Schlusener et al., 2003b
Colistin	Poultry muscle Milk	13.4~134 μg/kg 33.6~336 μg/L	0.999	93.2~94.5 92.2~98.1	4 ng/g 1 ng/g	-	Wan et al., 2006
	Fish	200~2000 μg/L	0.9967	74.8~81.9	10.0 ng/g	40.0 ng/g	Xu et al., 2012
Sulfaquinoxaline	Meat	10~1000 ng/g	0.999	85	3 ng/g	10 ng/g	Carretero et al., 2008
	SW	0.006~0.25 μg/L	0.996	80~121	23.9 ng/L	-	Iglesias et al., 2012
	Pig feed	50~1000 μg/kg	0.9974	68.0~93.7	-	25 ng/g	Kaklamanos et al., 2013
	Sea bream	10~150 μg/kg	> 0.98	86~96	7.5 ng/g	25.0 ng/g	Lopes et al., 2012
	Milk	0~500 μg/L	0.997	-	18.7 ng/ml[a]	31.8 ng/ml[b]	Nebot et al., 2012
	Swine meat	0.5~5 μg/kg	-	-	-	50.13 ng/g[b]	Wei et al., 2015
	SW MAN	5~200 μg/L	> 0.995	60~63 36~52	0.19 ng/L 1.44 ng/g	0.63 ng/L 4.80 ng/g	Zhou et al., 2012
Clopidol	Milk	-	-	-	10 ng/L	30 ng/L	Amelin et al., 2016
	Pig feed	25~1000 μg/kg	0.9986	69.3~86.2	-	50 ng/g	Kaklamanos et al., 2013
	Egg	1~50 μg/kg	0.99	84	1.13 ng/g[a]	1.29 ng/g[b]	Moloney et al., 2012
	Swine meat	0.5~5 μg/kg	-	-	-	10.24 ng/[b]b	Wei et al., 2015
Fenbendazole	WWI	1~1000 μg/L	1.000	62~64	3.2 ng/L	-	Hong et al., 2015
	Sea bream	10~150 μg/kg	> 0.98	92~111	3.0 ng/g	50.0 ng/g	Lopes et al., 2012
	Swine meat	0.5~5 μg/kg	-	-	-	25.13 ng/g[b]	Wei et al., 2015

[a] CC_α (decision limit), [b] CC_β (detection capability), [c] Gentamicin C1, [d] Gentamicin C1a

평가하기도 한다(Ho et al., 2012; Iglesias et al., 2012).

대상 항생제를 분석한 문헌을 조사한 결과 1 ng/L (ng/g) 이상에서 수백 ng/L (ng/g)의 MDL과 1 ng/L에서 최대 2,000 ng/L의 MQL을 갖는 것으로 나타났다. 그러나 대부분의 방법들은 수십 ng/L이하의 정량한계를 나타내고 있고, 이는 ppt 수준으로 환경 중에 존재하는 미량농도의 잔류항생제를 분석하기에 충분한 정량한계를 가지는 것으로 판단된다.

일부 문헌들은 LOD와 LOQ 대신 CC_{α}, CC_{β}값을 계산하여 분석방법을 검증하기도 하였다(Nebot et al., 2012; Tao et al., 2012a; Zhu et al., 2008). 유럽연합 집행위원회(European Commission)는 최대잔류허용량(maximum residue limit, MRL)을 가지는 의약물질의 분석방법에 대한 신뢰도를 높이고 검증 기준 지침을 통해 CC_{α}, CC_{β}를 포함한 검증 기준들에 대한 계산 방법을 제시하고 있다(EU Commission, 2002). 최대잔류허용량이 제시된 경우, CC_{α}는 최대잔류 허용농도로 첨가(fortified)된 시료 20 개의 농도를 측정하고 최대잔류허용량에 표준편차 값의 1.64배를 더하여 계산하며 이 값을 최대잔류허용량 초과여부를 판단하는 기준으로 한다(95% 신뢰수준). CC_{β}는 CC_{α}농도로 첨가된 시료 20개의 농도를 측정하고 표준편차 값의 1.64배를 CC_{α}에 더하여 계산하며 이 값은 분석 대상 물질의 정량 가능한 최저농도이다(95% 신뢰수준). EU, 중국, 일본 등은 본 연구에서 대상 항생제로 선정한 물질들 중 아미노글리코사이드 계열의 항생제 일부에 대해 최대잔류허용기준을 가지고 있어 아미노글리코사이드 계열의 항생제에 대한 연구 문헌들은 CC_{α}, CC_{β}값으로 분석 방법을 검증하고 있으며(Tao et al., 2012; van Holthoon et al., 2009; Zhu et al., 2008) 항생제의 종류에 따른 기준 농도의 차이로 인해 수십~수천 ng/g의 CC_{α}, CC_{β}값을 갖는 것으로 조사되었다(Table 4). 우리나라 또한 아미노글리코사이드계 항생제에 대한 최대잔류허용량 기준이 존재하나 CC_{α}, CC_{β}를 통해 분석방법을 검증한 논문은 보고된 바 없으며 직선성, 정확성, 정밀성, 정량한계 등을 통한 검증을 수행하는 것으로 조사되었다(Cho et al., 2014; Lim et al., 2012).

6. Conclusions

본 연구에서는 우리나라의 동물용 항생제 판매 현황을 토대로 선정된 동물용 항생제 38종 중, EPA method 1694 비대상 21종의 물질을 중심으로 LC-MS 분석조건과 특성을 조사하였다. LC를 통한 분리과정에서 아미노글리코사이드 계열의 항생제를 제외한 나머지 물질들은 역상 C_{18} 컬럼에 의해 효율적인 분리가 일어나는 것으로 나타났고, 극성용매인 물과 비극성용매인 아세토나이트릴 혼합액이 이동상으로 주로 사용되는 것으로 나타났다. 질량분석기에서 나타나는 피크의 비대칭과 테일링을 방지하기 위한 목적으로 포름산, 포름산암모늄, 초산암모늄 등을 첨가하기도 하는 것으로 나타났다. 일부 문헌에서는 물질 분리 과정에서 극성결합 뿐 아니라 벤젠고리의 파이결합을 이용하여 효과적으로 방향족 화합물을 분리하는데 phenyl 작용기를 갖는 실리카 고정상을 이용한 컬럼을 사용하기도 하였다.

LC 기술은 분리과정에서 컬럼의 고정상과 이동상, 대상 물질의 상호 친화력을 이용하기 때문에 일반적인 항생제 분리에 사용되는 역상 컬럼에서는 강한 친수성을 갖는 아미노글리코사이드 계열의 항생제가 효과적으로 분리되지 않는 것으로 나타났다. 아미노글리코사이드 계열의 물질을 분석한 문헌 중 일부는 스트렙토마이신 분리를 목적으로 하는 컬럼을 사용하기도 하였으나 대부분의 문헌은 이온쌍 크로마토그래피와 친수성 상호작용 크로마토그래피(HILIC)를 사용하여 친수성 물질을 분리하는 것으로 나타났다. 이온쌍 크로마토그래피를 활용하는 경우 ion-pair reagent의 첨가가 필요하며 트리플로로아세트산과 헵타플로로부티르산을 주로 사용하는 것으로 조사되었다. 이온쌍 크로마토그래피와 친수성 상호작용 크로마토그래피도 대부분의 경우 물과 아세토나이트릴을 혼합하여 이동상으로 사용한다.

질량분석기를 이용해 물질을 검출하기 위해서 이온화 과정이 필요하며 암페니콜 계열의 항생제를 제외한 모든 항생제는 (+)이온화 방법에 의해 이온화가 이루어지는 것으로 나타났다. 두 개 이상의 질량분석기를 연결한 MS/MS, MS/TOF, MS/Orbitrap을 사용하며 선택반응검출(SRM)방식으로 물질의 성분과 농도를 검출한다.

분석방법을 개발한 모든 문헌은 개발된 방법의 정확성과 정밀성, 검출 한계 등을 확인하고 있으며 검정선의 농도범위, 직선성(linearity), 회수율, 검출한계, 정량한계, 결정한계, 검출 성능 등을 검사하는 것으로 나타났다. 모든 분석법은 검정곡선의 r^2가 0.998 이상인 조건에서 개발되었으며, ppt 수준의 정량한계를 보이고 있어 환경시료 분석에 충분한 감도를 가지는 것으로 판단된다. 아미노글리코사이드 계열 항생제와 관련된 연구는 동물성 식품 중의 잔류항생제 농도를 측정하기 위한 분석법에 대한 연구가 주를 이루고 있으며 이로 인해 LOD, LOQ 대신 CC_{α}, CC_{β}를 계산하여 분석법의 적용성을 평가하고 있는 것으로 나타났다.

본 연구와 전처리방법을 고찰한 선행 연구를 통해 확인한 바와 같이 선정된 37종의 항생제를 분석하고자 할 때 고상추출법(solid-phase extraction, SPE) 및 HPLC 분리 과정에서 가장 중요한 화학적 특성인 극성(친수성)이 상이한 아미노글리코사이드계열의 항생제에 대하여 별도의 전처리 단계와 분리방법을 마련할 필요가 있을 것으로 판단된다. 또한 EPA method 1694에 적용 가능한 물질들의 분석조건을 고찰하여 본 연구에서 선정된 항생제와 동시 분석 가능한 물질들의 그룹화가 필요하며 적절한 분석법의 검증과정을 통한 분석법의 확립이 이루어져야 할 것이다. 검증된 분석법의 확립이 선행될 때 다양한 경로로 환경에 유입되고 비점오염원의 특성을 나타내는 동물용 항생제의 효과적인 관리가 이루어질 수 있을 것이다.

References

Amelin, V. G. and Timofeev, A. A. (2016). Identification and Determination of Mycotoxins and Food Additives in Feed by

HPLC-High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Journal of Analytical Chemistry,* 71(4), 401-417.

Appelblad, P., Jonsson, T., Ponten, E., Viklund, C., and Jianf, W. (2008). A Practical Guide to HILIC, Merck SeQuant AB, Sweden.

Babic, S., Asperger, D., Mutavdzic, D., Horvat, A. J., and Kastelan-Macan, M. (2006). Solid Phase Extraction and HPLC Determination of Veterinary Pharmaceuticals in Wastewater, *Talanta,* 70(4), pp. 732-738.

Balakrishnan, V. K., Terry, K. A. and Toito, J. (2006). Determination of Sulfonamide Antibiotics in Wastewater: a Comparison of Solid Phase Microextraction and Solid Phase Extraction Methods, *Journal of Chromatography A,* 1131(1), pp. 1-10.

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.

Blackwell, P. A., Lutzhoft, H. C. H., Ma, H. P., Halling-Sorensen, B., Boxall, A. B., and Kay, P. (2004). Ultrasonic Extraction of Veterinary Antibiotics from Soils and Pig Slurry with SPE Clean-Up and LC-UV and Fluorescence Detection, *Talanta,* 64(4), pp. 1058-1064.

Bohm, D. A., Stachel, C. S., and Gowik, P. (2012). Validation of a Multi-Residue Method for the Determination of Several Antibiotic Groups in Honey by LC-MS/MS. Analytical and *Bioanalytical Chemistry,* 403(10), pp.2943-2953.

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.

Buszewski, B. and Noga, S. (2012) Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)-a Powerful Separation Technique, *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 402(1), pp. 231-247

Centers for Disease Control and Prevention (US). (2013). *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.* Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services.

Chitescu, C. L., Kaklamanos, G., Nicolau, A. I., and Stolker, A. A. M. L. (2015). High Sensitive Multiresidue Analysis of Pharmaceuticals and Antifungals in Surface Water Using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube River Basin on the Romanian Territory, *Science of The Total Environment,* 532, pp. 501-511.

Cho, Y. J., Choi, S. J., Kim, M. A., Kim, M., Yoon, S. J., Chang, M. I., Lee, S. M., Kim, H. J., Jeong, J., Rhee, G. S., and Lee, S. J. (2014). Simultaneous Determination of Aminoglycoside Antibiotics in Meat using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Food Hygiene and Safety,* 29(2), pp. 123-130. [Korean Literature]

Churms, S. C. (1996). Recent Progress in Carbohydrate Separation by High-Performance Liquid Chromatography Based on Size Exclusion, *Journal of Chromatography A,* 720(1), pp. 151-166.

Diaz-Cruz, M. S. and Barcelo, D. (2005). LC-MS 2 Trace Analysis of Antimicrobials in Water, Sediment and Soil, *TrAC Trends in Analytical Chemistry,* 24(7), pp. 645-657.

Diaz-Cruz, M. S., de Alda, M. J. L., and Barcelo, D. (2003). Environmental Behavior and Analysis of Veterinary and Human Drugs in Soils, Sediments and Sludge, *TrAC Trends in Analytical Chemistry,* 22(6), pp. 340-351.

Dolliver, H., Gupta, S., and Noll, S. (2008). Antibiotic Degradation During Manure Composting, *Journal of Environmental Quality,* 37(3) pp. 1245-1253.

Dubois, M., Fluchard, D., Sior, E., and Delahaut, P. (2001). Identification and Quantification of Five Macrolide Antibiotics in Several Tissues, Eggs and Milk by Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications,* 753(2), pp. 189-202.

EU Commission. (2002). *Commission Decision EC 2002/657 of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results,* Official Journal of European Communities, L 221, pp. 8-36.

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. 23-28.

Farouk, F., Azzazy, H. M.. and Niessen, W. M. (2015). Challenges in the Determination of Aminoglycoside Antibiotics, a Review, *Analytica Chimica Acta*, 890, pp. 21-43.

Food and Drug Administration. (2015). *2014 Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals,* Food and Drug Administration, pp. 28-40.

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.

Gros, M., Petrovic, M., and Barcelo, D. (2006). Development of a Multi-Residue Analytical Methodology Based on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) for Screening and Trace Level Determination of Pharmaceuticals in Surface and Wastewaters, *Talanta,* 70(4), pp. 678-690.

Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S. and Barcelo, D. (2012). Fast and Comprehensive Multi-Residue Analysis of a Broad Range of Human and Veterinary Pharmaceuticals and Some of Their Metabolites in Surface and Treated Waters by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A,* 1248, pp. 104-121.

Gros, M., Rodriguze-Mozaz, S., and Barcelo, D. (2013). Rapid Analysis of Multiclass Antibiotic Residues and Some of Their Metabolites in Hospital, Urban Wastewater and River Water by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A,* 1292, pp. 173-188.

Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., and Solomon, K. (2006). Determination of Pharmaceuticals in Environmental Waters by Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(2), pp. 505-513.

Hao, Z., Lu, C. Y. J., Xiao, B., Weng, N., Parker, B., Knapp, M.,

and Ho, C. T. (2007). Separation of Amino Acids, Peptides and Corresponding Amadori Compounds on a Silica Column at Elevated Temperature, *Journal of Chromatography A,* 1147(2), pp. 165-171.

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.

Hou, J., Wan, W., Mao, D., Wang, C., Mu, Q., Qin, S., and Luo, Y. (2015). Occurrence and Distribution of Sulfonamides, Tetracyclines, Quonolones, Macrolides, and Nitrofurans in Livestock Manure and Amended Soils of Northern China, *Environmental Science and Pollution Research,* 22(6), pp. 4545-4554.

Iglesias, A., Nebot, C., Miranda, J. M., Vazquez, B. I., and Cepeda, A. (2012). Detection and Quantitative Analysis of 21 Veterinary Drugs in River Water Using High-pressure Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry, *Environmental Science and Pollution Research,* 19(8), pp. 3235-3249.

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.

Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale, R. M., and Guwy, A. J. (2007). Multi-Residue Method for the Determination of Basic/Neutral Pharmaceuticals and Illicit Drugs in Surface Water by Solid-Phase Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography-Positive Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatographyh A,* 1161(1), pp. 132-145.

Kaufmann, A., Butcher, P., and Maden, K. (2012). Determination of Aminoglycoside Residues by Liquid Chromatography and Tandem Mmass Spectrometry in a Variety of Matrices, *Analytica chimica acta,* 711, pp. 46-53.

Kemper, N. (2008). Veterinary Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment, *Ecological Indicators,* 8(1), pp. 1-13.

Korea Ministry of Government Legislation. (2015). *Act On The Management and Use of Livestock Excreta*, 13526, Korea Ministry of Government Legislation. [Korean Literature]

Li, R. and Huang, J. (2004). Chromatographic Behavior of Epirubicin and its Analogues on High-Purity Silica in Hydrophilic Interaction Chromatography, *Journal of Chromatography A,* 1041(1), pp. 163-169.

Lim, C. M., Cho, B. H., Chung, G. S., and Son, S. W. (2012). Determination of Aminoglycosides in Milk by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, *Korean Journal of Veterinary Public Health,* 36(3), pp. 121-130. [Korean Literature]

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.

Lillenberg, M., Yurchenko, S., Kipper, K., Herodes, K., Pihl, V., Sepp, K., Lohmus, R., and Nei, L. (2009). Simultaneous Determination of Fluoroquinolones, Sulfonamides and Tetracyclines in Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A,* 1216(32), pp. 5949-5954.

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.

Malintan, N. T. and Mohd, M. A. (2006). Determination of Sulfonamides in Selected Malaysian Swine Wastewater by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A,* 1127(1), pp. 154-160.

McArdell, C. S., Molnar, E., Suter, M. J. F., and Giger, W. (2003). Occurrence and Fate o Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plants and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environmental Science & Technology,* 37(24), pp. 5479-5486.

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.

Nakata, H., Kannan, K., Jones, P. D., and Giesy, J. P. (2005). Determination of Fluoroquinolone Antibiotics in Wastewater Effluents by Liquid chromatography-Mass Spectrometry and Fluorescence Detection, *Chemosphere,* 58(6), pp. 759-766.

National Institute of Environmental Research (NIER). (2010). *Environmental Examination·Inspection QA/QC Handbook,* 2nd ed, 11-1480083-000291-01, National Institute of Environmental Research, pp. 21-25.

Nebot, C., Iglesias, A., Regal, P., Miranda, J., Cepeda, A., and Fente, C. (2012). Development of a Multi-class Method for the Identification and Quantification of Residues of Antibiotics, Coccidiostats and Corticosteroids in Milk by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *International Dairy Journal,* 22(1), pp.78-85.

Oertel, R., Renner, U., and Kirch, W. (2004). Determination of Neomycin by LC-Tandem Mass Spectrometry Using Hydrophilic Interaction Chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 35(3), pp. 633-638.

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.

Perez-Parada, A., Aguera, A., Gomez-Ramos, M. D. M., Garcia-Reyes, J. F., Heinzen, H., and Fernandez-Alba, A. R. (2011). Behavior of Amoxicillin in Wastewater and River Water: Identification of its Main Transformation Products by Liquid Chromatography/Electrospray Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* 25(6), pp. 731-742.

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.

Pietruk, K., Olejink, 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.

Pozo, O. J., Guerrero, C., Sancho, J. V., Ibanez, M., Pitarch, E., Hogendoorn, E., and Hernandez, F. (2006). Efficient Approach for the Reliable Quantification and Confirmation of Antibiotics in Water Using On-Line Solid-Phase Extraction Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A,* 1103(1), pp. 83-93.

Schlusener, M. P. and Bester, K. (2005). Determination of Steroid Hormones, Hormone Conjugates and Macrolide Antibiotics in Influents and Effluents of Sewage Treatment Plants Utilising High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry with Electrospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionization, *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* 19(22), pp. 3269-3278.

Schlusener, M. P., Bester, K., and Spiteller, M. (2003a). Determination of Antibiotics Such as Macrolides, Ionophores and Tiamulin in Liquid Manure by HPLC-MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375(7), pp. 942-947.

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.

Schlusener, M. P., Spiteller, M., and Bester, K. (2003b). Determination of Antibiotics from Soil by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A,* 1003(1), pp. 21-28.

Seifrtova, M., Novakova, L., Lino, C., Pena, A., and Solich, P. (2009). An Overview of Analytical Methodologies for the Determination of Antibiotics in Environmental Waters. *Analytica Chimica Acta,* 649(2), pp. 158-179.

Stolker, A. A., Niesing, W., Hogendoorn, E. A., Versteegh, J. F., Fuchs, R., and Udo, A. T. (2004). Liquid Chromatography with Triple-Quadrupole or Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry for Screening and Confirmation of Residues of Pharmaceuticals in Water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 378(4), pp. 955-963.

Tang, Y. Y., Lu, H. F., Lin, H. Y., Shih, Y. C., and Hwang, D. F. (2012). Multiclass Analysis of 23 Veterinary Drugs in Milk by Ultraperformance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography B,* 881, pp. 12-19.

Tao, Y., Chen, D., Yu, H., Huang, L., Liu, Z., Cao, X., Yan, C., Pan, Y., Liu, Z., and Yuan, Z. (2012a). 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.

Tao Y., Yu, G., Chen, D., Pan, Y., Liu, Z., Wei, H., Peng, D., Huang, L., Wang, Y., and Yuan, Z. (2012b). Determination of 17 Macrolide Antibiotics and Avermectins Residues in Meat with Accelerated Solvent Extraction by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography B,* 897, pp. 64-71.

Turnipseed, S. B., Storey, J. M., Clark, S. B., and Miller, K. E. (2011). Analysis of Veterinary Drugs and Metabolites in Milk Using Quadrupole Time-of-Flight Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 59(14), pp. 7569-7581.

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.

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.

Vanderford, B. J., Pearson, R. A., Rexing, D. J., and Snyder, S. A. (2003). Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in Water Using Liquid chromatograpy/Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 75(22), pp. 6256-6274.

Vucicevic-Prcetic, K., Cservenak, R., and Radulovic, N. (2011). Development and Validation of Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Methods for the Determination of Gentamicin, Lincomycin, and Spectinomycin in the Presence of Their Impurities in Pharmaceutical Formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 56(4), pp. 736-742.

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.

Wei, H., Tao, Y., Chen, D., Xie, S., Pan, Y., Liu, Z., Huang, L., and Yuan, Z. (2015). Development and Validation of a Multi-Residue Screening Method for Veterinary Drugs, Their Metabolites and Pesticides in Meat Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Food Additives & Contaminants: Part A,* 32(5), pp. 686-701.

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.

Yang, J. F., Ying, G. G., Zhao, J. L., Tao, R., Su, H. C., and Chen, F. (2010). Simultaneous Determination of Four Classes

of Antibiotics in Sediments of the Pearl Rivers Using RRLC-MS/MS, *Science of the Total Environment,* 408(16), pp. 3424-3432.

Yoshida, T. (2004). Peptide Separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: A Review, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods,* 60(3), pp. 265-280.

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 Antibioics in Typical Swine and Dairy Cattle Farms in China, *Science of the Total Environment,* 444, pp. 183-195.

Zhou, Q., Wang, M., and Liang, J. (2008). Ecological Detoxification of Methamidophos by Earthworms in Phaiozem Co-Contaminated with Acetochlor and Copper, *Applied Soil Ecology,* 40(1), pp. 138-145.

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.