

LC-MS/MS를 이용한 해수 및 수산용수 중 니트로푸란계 및 클로람페니콜 항생제 동시분석

이미경 · 이인석¹ · 최민규[†] · 이원찬

국립수산과학원 기반연구부 어장환경과
¹국립수산과학원 남동해수산연구소

Simultaneous Analysis of four Nitrofurans and Chloramphenicol Antibiotics in Seawater and Fisheries water using LC-MS/MS

Mikyung Lee, In-Seok Lee¹, Minkyu Choi[†], and Wonchan Lee

Marine Environment Research Division, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Busan, Republic of Korea
¹Southeast Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science (NIFS), Tongyeong, Republic of Korea

Received February 28, 2020 / Revised April 17, 2020 / Accepted May 26, 2020

A simultaneous analysis of four nitrofurans (NFs) and chloramphenicol (CAP) in seawater and water for aquaculture, was performed using solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The detection of NFs and CAP in seafood is prohibited by the Agricultural Products Quality Control Act and the Food Sanitation Act in Korea as well as in the EU and USA. Types of SPE cartridges, optimal pH conditions in water samples, and mobile phases of LC were tested and selected. Target antibiotics were ionized in positive mode for furazolidone and furaltadone and in negative mode for nitrofurantoin, nitrofurazone, and CAP. The HLB cartridge showed more stable recoveries (81-89%), compared to WAX and MCX. The extraction efficiency of the target antibiotics was more than 80% between a pH of 3 and 8. Lower the pH of the water samples, the more stable was their recovery. The mobile phase of ammonium formate and MeOH enhanced the resolution and sensitivity by five times compared with those in previous reports. Moreover, the retention time of the target compounds was accelerated, and the overall analytical time was reduced by 1/2. The accuracy and precision of the analytical method were 85-93% and 3-19%, respectively, and the recovery of internal standards was 83-88%. Instrumental detection limits were 0.18-1.02 ng/L, and method detection limits and limits of quantification were 0.60-3.99 ng/L and 1.92-12.7 ng/L, respectively, which were 20 times higher than those reported in previous studies. The optimized analytical method in the present study can be used as a proactive method for the detection of banned substances in water for aquaculture farms and seawater in coastal areas.

Key words Simultaneous analysis, Nitrofurans, Chloramphenicol, Seawater, LC-MS/MS.

1. 서 론

항생제는 인간과 동물에 대한 치료 목적으로 수십 년 동안 사용되어 왔다. 그러나 일부 유해한 항생제는 인간 및 동물에 돌연변이, 생식 기능 장애 등 악영향을 초래하여 몇몇 국가에서 사용 규제를 시행하였다.¹⁻³⁾ 이러한

유해한 대표적인 항생제로는 니트로푸란계(nitrofurans, NFs)와 클로람페니콜(chloramphenicol, CAP)이 있다.

NFs는 광범위 합성 항생제로, 조직과 결합된 대사체를 형성하기 위해 소화된 후에 빠르게 대사된다.^{4,5)} 이러한 문제 때문에 NFs는 인체 및 환경 중에서 모니터링 하는데 많은 어려움이 있을 뿐 아니라 NFs 원물질

[†]To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-51-720-2531, Fax: 82-51-720-2515, E-mail: mkchoi3@korea.kr

이 혈액과 조직에서 빠르게 소모되는데 반해 형성된 대사체들은 인체 조직 단백질과 결합을 한다.⁶⁾ 규제 전 NFs는 돼지, 닭 등 가축에서 대장균과 살모넬라균에 의해 주로 유발되는 세균성 장염과 가금 콜레라 및 콕시들통증에 매우 효과적인 치료제였을 뿐만 아니라^{7,8)} 성장 촉진제로 많은 축수산 농가에서 광범위하게 사용되었다.⁸⁾ 그러나 축수산 식품 내 항생제 잔류에 의한 발암성 등 인체 잠재적 악영향이 우려됨에 따라 유럽연합, 미국, 일본 등에서는 1990년대 중반부터 사용 규제를 시작하였으며,⁷⁻¹¹⁾ 국내의 경우 식품의약품안전처를 중심으로 2003년부터 사용이 금지됨과 동시에 ‘국가 항생제 사용 및 내성 모니터링’을 실시하고 있다.¹²⁾ 그럼에도 불구하고 여전히 일부 국가에서 NFs가 효과 대비 가격이 저렴하다는 이유로 사용되고 있다.¹³⁾ NFs의 대표적인 약물로는 푸라졸리돈(furazolidone, FZD), 푸랄타돈(furaltadone, FTD), 니트로푸란토인(nitrofurantoin, NFT), 니트로푸라존(nitrofurazone, NFZ)이 있다.

또 다른 범용 항생제인 CAP은 그람음성과 그람양성 세균 모두에 활성을 나타내는 광범위 항생제로¹⁴⁻¹⁶⁾ 일반적으로 양식업에서 질병을 예방하기 위해 사용된다. 그러나 항생제가 투여된 사료나 동물의 배설물에 의해 환경에 직접 노출 될 수 있으며,¹⁷⁻¹⁹⁾ 제약 폐수를 통해 환경으로 유입될 수 있는데,²⁰⁾ CAP 항생제가 골수억제, 재생불량 빈혈, 저형성 빈혈, 혈소판 감소증 및 백혈구 감소증 등 잠재적인 독성 영향이 제기됨에 따라²¹⁻²³⁾ 1990년대 초반부터 한국을 포함한 미국, EU 등 많은 국가에서 식용 동물에 사용을 금지하고 있다. 그러나 CAP의 규제 기준이 없는 일부 국가에서는 NFs와 마찬가지로 가격에 비해 효과가 뛰어나다는 이유로 여전히 사용되고 있다.²³⁻²⁵⁾

국내에서는 이러한 항생제들에 대한 식품 안전성 조사를 수행하고 있으며, 농수산물 품질관리법 제61조(안전성 조사)에 따르면 농수산물의 안전관리를 위하여 농수산물 또는 농수산물의 생산에 이용·사용하는 농지·어장·용수(用水)·자재 등에 대하여 안전성조사를 하여야 한다고 명시되어 있다.²⁶⁾ 또한 식품위생법 제7조에 따라 식품 등의 기준 및 규격에서는 유해물질 등의 분석항목 중 금지물질은 6종이며 이들 금지물질에는 NFs 항생제(4종)와 CAP가 포함되어 있다.²⁷⁾

2018년 11월 고창의 한 뱀장어 양식장에서 출하된 뱀장어 체내에서 FZD의 대사체인 AOX (3-amino-2-oxazolidinone)가 검출되어 해양수산부는 해당 양식장의 뱀장어 출하 중지를 명하고 전량 폐기한 바 있다.²⁸⁾ 저

렴한 가격에 약효가 좋다는 이유로 사용금지 물질임에도 불구하고 불법적으로 오용되고 있으며, 다양한 경로를 통해 수 환경 중으로 유입되어 잔류할 가능성이 높은 항생제에 대한 수 환경 영향을 평가하기 위해서라도 이들 항생제에 대한 분석법 마련이 요구되고 있다. 현재 양식장 수조 내 수산용수에 대해 이러한 항생제에 대한 잔류량을 평가하기 위한 공정시험법은 마련되지 않은 실정이다. 국내에서 수 환경을 대상으로 한 이들 NFs와 CAP 항생제 관련 연구는 전무하고 수질 시료에서의 분석법이 보고된 바 없다. 국외에서도 수 환경 내 NFs 및 CAP를 분석한 연구는 매우 부족한 실정일 뿐만 아니라 수산용수에 대해 NFs와 CAP 동시분석법을 제시한 연구결과는 현재까지 Ardsongneam 등²⁹⁾이 유일하였다.

본 연구에서는 「식품 또는 식품 첨가물에 관한 기준 및 규격」의 동물용의약품 잔류허용기준에서 제시하는 ‘식품 중 검출되어서는 아니 되는 물질’ 중 NFs 4종(FZD, FTD, NFT, NFZ) 및 CAP에 대한 동시분석법을 정립하고자 한다. 또한 정립된 분석방법은 사용금지 항생제에 대한 수산물의 검사와 더불어, 양식장의 수산용수 및 주변해역 내 검출 및 잔류수준을 파악하는 선제적 대응기법으로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 재료

NFs 4종의 표준물질 FZD, FTD, NFT, NFZ와 내부 표준물질 FTD-d₅, NFZ-¹³C,¹⁵N₂는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, CAP의 표준물질은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany), 내부표준물질 CAP-d₅는 LGC Standards (Molsheim, Germany)로부터 구입하였다. 전처리 시약으로 사용된 아세토니트릴(acetonitrile, ACN), 메탄올(methanol, MeOH) 등 유기용매, 초순수, 아세트산(acetic acid, AA) 및 빙초산(glacial acid)은 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 HPLC 등급으로 구입하여 사용하였으며, 수산화나트륨(sodium hydroxide) 및 티오 황산나트륨(sodium thiosulfate)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA), 아세트산 암모늄(ammonium acetate), 포름산 암모늄(ammonium formate) 및 포름산(formic acid) 등 그 이외의 분석용 시약 및 용매는 Wako Pure Chemical Industries (Tokyo, Japan)에서 구입한 특급 또는 분석용을 사용하였다. 전처리 과정에서 고상추출(solid phase

extraction, SPE) 카트리지가인 Oasis HLB (200 mg, 6 cc), MCX (150 mg, 6 cc), WAX (150 mg, 6 cc)는 Waters (Milford, MA, USA)에서 구입하여 시험용액 용출 시 사용하였다. 시험용액 여과용으로 사용한 Nylon syringe filter는 Whatman (Clifton, NJ, USA)에서 구입하였다.

2.2. 표준물질 및 내부표준물질

이들 대상물질 5종에 대한 구조 및 물리화학적 특성을 Table 1에 나타내었다.³⁰⁾ 5종의 분석대상 표준물질 및 내부표준물질을 갈색 유리병에 각각 정밀히 달아 ACN에 녹여 1000 µg/mL가 되도록 표준원액 및 내부표준물질 원액을 제조하였다. 이를 4°C 냉장실에서 보관하고, 실험 직전에 표준원액 및 내부표준물질 원액을 각각 ACN으로 희석하여 0.1 µg/mL가 되도록 혼합표준용액 및 내부표준물질 혼합용액을 제조하였다. 검정곡선의 범위를 0-20 ng/mL로 하여 혼합표준용액을 단계적으로 희석하였으며, 내부표준물질의 농도는 10 ng/mL가 되도록 하였다.

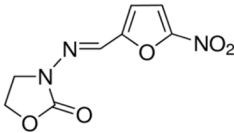
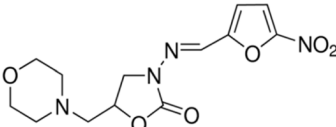
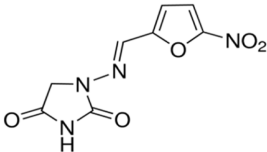
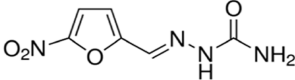
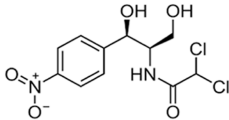
2.3. 전처리 방법

5종 항생제에 대한 전처리 방법은 Ardsongneam 등²⁹⁾

을 참고하였는데 이 방법에서는 NFs, CAP외에도 니트로이미다졸(nitroimidazoles) 항생제를 포함하고 있다. 이 전처리 방법은 대략적으로 Oasis HLB 카트리지를 장착하여 MeOH, ACN, AA 등의 추출 용매로 SPE 효율을 테스트하였으며, 이 중 1% AA in MeOH:ACN = 8:2에서 가장 높은 효율을 보여 이를 추출 용매로 한다. 본 연구에서는 Ardsongneam 등²⁹⁾의 결과에서 추출 용매는 그대로 적용하되 카트리지 비교와 pH 조절을 통해 대상물질 5종에 대한 방법으로 최적화하고자 하였다.

초순수 200 mL에 대해 pH를 3-10의 8단계로 하여 3회 반복 실험을 하였다. pH가 조정된 시료에 금속불순물 제거를 위해 2 M 티오 황산나트륨 1 mL를 주입한 후 30분간 방치한 후 정량용 내부표준물질 0.1 µg/mL (ISTD. FTD-d₅, NFZ-¹³C, ¹⁵N₂, CAP-d₃) 100 µL를 첨가하고 10분 동안 방치하였다. SPE 추출에 있어서는 Oasis HLB, MCX, WAX 카트리지를 비교하였으며, 카트리지를 진공감압장치(vacuum manifold)에 장착하여 MeOH 5 mL, 초순수 5 mL를 차례로 통과시켜 카트리지를 컨디셔닝(conditioning) 하였다. 카트리지가 완전히 건조되지 않도록 유지하면서 시료를 4 mL/min 속도로 적재하였다. 시료가 통과된 카트리지를 5% MeOH가

Table 1. Molecular structure and physical properties of four nitrofurans and chloramphenicol³⁰⁾

| Compound | Structure | Content | |
|--------------------------|---|---------------------|---|
| Furazolidone (FZD) |  | Formula | C ₈ H ₇ N ₃ O ₅ |
| | | Water solubility | 40 mg/L |
| | | pK _a | 4.9 |
| | | Log K _{ow} | -0.04 |
| Furaltadone (FTD) |  | Formula | C ₁₃ H ₁₆ N ₄ O ₆ |
| | | Water solubility | 750 mg/L |
| | | pK _a | 5.0 |
| | | Log K _{ow} | 0.25 |
| Nitrofurantoin (NFT) |  | Formula | C ₈ H ₆ N ₄ O ₅ |
| | | Water solubility | 79 mg/L |
| | | pK _a | 7.2 |
| | | Log K _{ow} | -0.47 |
| Nitrofurazone (NFZ) |  | Formula | C ₆ H ₆ N ₄ O ₄ |
| | | Water solubility | 210 mg/L |
| | | pK _a | 10 |
| | | Log K _{ow} | 0.23 |
| Chloramphenicol (CAP) |  | Formula | C ₁₁ H ₁₂ C ₁₂ N ₂ O ₅ |
| | | Water solubility | 2500 mg/L |
| | | pK _a | 11.03 |
| | | Log K _{ow} | 1.14 |

첨가된 초순수 5 mL로 세척한 후 4 mL/min를 유지하면서 약 30분간 카트리지를 건조시켰다. 흡착된 분석물질을 1% AA in MeOH:ACN = 80:20로 두 번 용리시킨 후 용리액을 질소농축기(Zymark, TurboVap® LV, Hopkinton, MA, USA)를 사용하여 건조시켰다. 이후 20 mM 아세트산 암모늄(at pH 4.5):MeOH = 8:2 1 mL로 잔사를 녹여 Nylon syringe filter (0.45 µm)로 여과 후 최종 부피가 1 mL가 되도록 하여 기기분석하였다.

2.4. 기기분석 방법

5종 항생제 동시분석을 위해 액체크로마토그래프/텐덤질량분석기(LC-MS/MS, SCIEX Exion LC system coupled with SCIEX QTRAP 4500, Toronto, ON, Canada)를 사용하였으며, 컬럼은 Prodigy ODS-3 C18 (150 × 2 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였다. 기기 분석조건을 Table 2에 나타내었으며, 각 대상물질에 적합한 정량이온과 정성이온을 각

하나씩 선정하여 MRM (multiple reaction monitoring) 모드로 분석하였는데 각 물질의 조건은 Table 3에 나타내었다. 5종 항생제(NFs, CAP)는 8단계 검량선용 표준용액(0, 0.5, 1, 2, 4, 5, 10, 20 ng/mL)을 이용하여 분석대상 물질의 상대반응계수(relative response factor)에 근거하여 검량선을 작성하였으며, 표준용액의 검량선 결정계수(R²)는 0.999 이상이었다. 기기분석 방법에 있어서는 본 연구에서 사용한 컬럼과 기기의 특성에 맞는 최적화된 이동상 선정하고자 하였으며, 이에 Ardsongneam 등²⁹⁾에서 제시한 이동상과의 비교를 통해 대상물질의 감도를 높이고자 하였다..

2.5. 정확도, 정밀도, 회수율, 검출한계 산정

카트리지가 및 pH 최적화를 통해 분석법을 정립하였으며, 이를 통해 분석법 검증은 수행하였다. 분석법 검증은 Glass fiber filter (47 mm)로 여과한 해수 시료 200 mL에 대상물질 0.1 ng/µL를 20 µL 주입한 7개 시료를 반

Table 2. Instrumental conditions for the analysis of the five target compounds using LC-MS/MS

| Parameter | Condition | | | | | | |
|-----------------|---|----|-----|----|----|------|----|
| Column | Phenomenex Prodigy ODS-3 C ₁₈ (150 × 2 mm, 5 µm) | | | | | | |
| Mobile phase | A : 10 mM Ammonium formate ; B : Methanol | | | | | | |
| Gradient | Time (min) | 0 | 0.5 | 7 | 12 | 12.1 | 15 |
| | Solvent A (%) | 90 | 90 | 10 | 10 | 90 | 90 |
| | Solvent B (%) | 10 | 10 | 90 | 90 | 10 | 10 |
| Flow rate | 400 µL/min | | | | | | |
| Injection vol. | 5 µL | | | | | | |
| Column temp. | 40°C | | | | | | |
| Ionization mode | FZD, FTD : Positive ion electrospray | | | | | | |
| | NFT, NFZ, CAP : Negative ion electrospray | | | | | | |
| Source temp. | 450°C | | | | | | |
| Capillary temp. | Positive : 4500 V ; Negative : -4500 V | | | | | | |

Table 3. Mass spectrometer parameters for determination of four nitrofurans and chloramphenicol

| Compound | RT (min) | Precursorion (m/z) | Productions (m/z) | | DP (V) | CE (V) | | CXP(V) | |
|-----------------------|----------|--------------------|---------------------|------------------------|--------|--------|----------|--------|----------|
| | | | Quan. ¹⁾ | Confirm. ²⁾ | | Quan. | Confirm. | Quan. | Confirm. |
| Furazolidone (FZD) | 4.86 | 225.8 | 208.6 | 138.9 | 66 | 21 | 21 | 14 | 10 |
| Furaltadone (FTD) | 5.70 | 324.8 | 281.0 | 252.0 | 41 | 17 | 23 | 18 | 16 |
| Nitrofurantoin (NFT) | 4.77 | 236.8 | 151.8 | 123.9 | -60 | -16 | -20 | -11 | -9 |
| Nitrofurazone (NFZ) | 5.01 | 196.8 | 149.9 | 123.7 | -5 | -10 | -12 | -7 | -9 |
| Chloramphenicol (CAP) | 6.42 | 320.8 | 151.9 | 256.7 | -75 | -22 | -14 | -11 | -15 |

¹⁾Quan.: Quantification, ²⁾Confirm.: Confirmation

복 분석하였다. 또한 초순수를 이용하여 분석과정과 동일한 절차로 바탕시료를 분석하여 바탕시료 오염도를 확인하였다. 분석법 검증을 수행하기 위해 실제 수산용수(해수)를 대상으로 표준물질을 첨가한 7개 반복실험 결과와 기기분석을 통해 대상물질의 회수율에 따른 정확도(accuracy)와 정밀도(precision) 및 검량선용 표준용액과 실제시료에서 내부표준물질의 비를 통한 내부표준물질 회수율(recovery)을 평가하였다. 또한 각 대상물질별 검출한계를 산정하였으며, 기기검출한계(instrument detection limit, IDL), 방법검출한계(method detection limit, MDL), 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 산정하였다. IDL은 표준물질 검량선(calibration standard)에서 검출된 신호 대 잡음의 비(signal to noise ratio, S/N)에 근거하여 3 이상을 기준으로 산정하였고, MDL은 표준물질 첨가 시료 7개 반복실험을 통해 얻은 표준편차에 자유도($t=3.143$, 99% 신뢰도)를 곱하여 산정하였으며, LOQ는 표준편차에 10을 곱하여 산정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. LC-MS/MS의 이동상에 따른 대상물질 분리 및 감도 비교

본 연구에서 적용한 기기분석 조건은 Ardsongneam 등²⁹⁾에서 제시한 조건에 따라 테스트를 진행하였다. 그러나 동일한 LC 컬럼(Prodigy ODS-3 C₁₈) 및 이동상

(A: 10% ACN, B: 30% ACN in acidified water at pH 5)의 조건에도 불구하고 대상물질의 분리(separation)가 어렵거나 대상물질의 감도(sensitivity)가 낮게 나타나는 결과를 보였다(Fig. 1). 5종 대상물질 중 FTD와 FZD는 positive mode로 분석하는데, FTD의 높은 감도에 비해 FZD는 피크의 머무름 시간(retention time, RT) 정도만 확인될 뿐 피크의 감도는 현저히 낮게 나타났다. 또한 Negative mode로 분석하는 NFT, NFZ 및 CAP의 경우 피크 확인이 가능할 정도의 감도를 보인 것으나, NFT와 NFZ의 분리가 쉽지 않은 것으로 나타나 실제 시료에서 이 두 물질을 정량할 경우 정확한 정량이 힘들 것으로 판단되었다.

동일한 LC 컬럼 등의 기기분석 조건 하에 대상물질 분리 및 감도를 높일 수 있는 방법으로 이동상 변경을 수행하였다. 최적의 이동상을 선정하는데 있어 검토한 결과 LC-MS/MS 분석 시 이동상 첨가제로 많이 사용되는 휘발성 산 중에 포름산을 선정하였다. Peng 등³¹⁾은 포름산과 같은 이동상을 낮은 pH를 유지해 적용함으로써 컬럼 표면에 잔류하는 실라놀 그룹(silanol groups)의 이온화를 최소화하여 좋은 감도를 얻을 수 있다고 하였다. 또한 Seifrtova 등³¹⁾은 포름산 암모늄 등을 첨가제로 사용함으로써 항생제의 이온화 효율이 증가하고 질량분석기에서 감도가 향상된다고 보고하였다. 이를 참고하여 본 연구에서는 10 mM 포름산 암모늄을 첨가한 초순수를 이동상 A로 선정하였다. 이동상

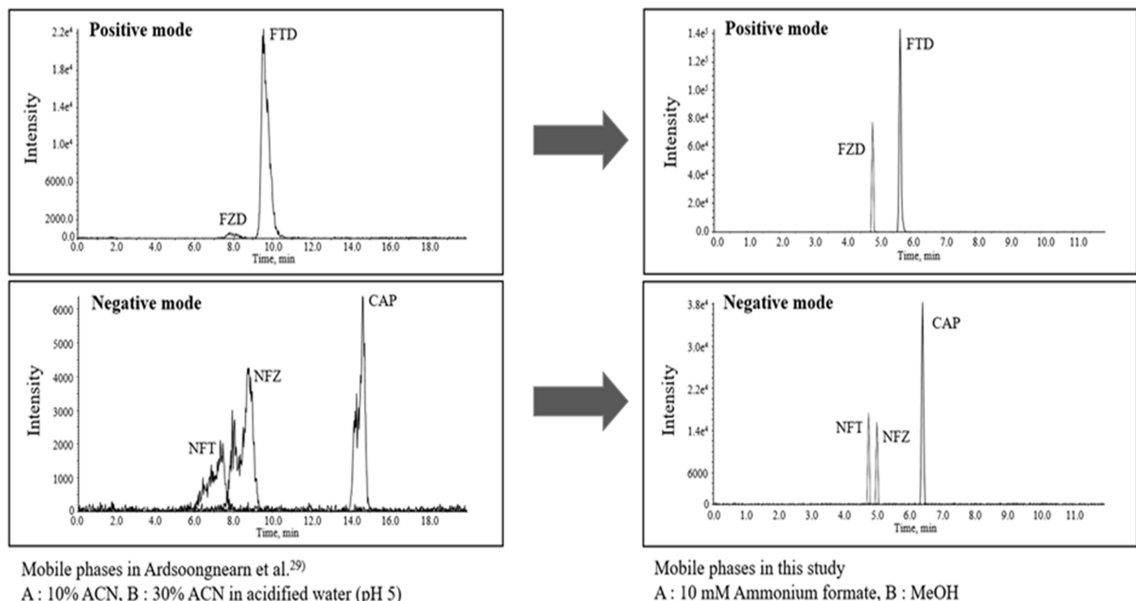


Fig. 1. Improved peak separation and sensitivity after changes in mobile phases compared to the previous study²⁹⁾.

B의 경우 비극성 용매인 MeOH과 ACN로 각각 테스트하여 비교한 결과, 극성이 낮은 MeOH에서 보다 빠른 검출이 진행되었다. 이에 MeOH를 이동상 B로 선정하여 대상물질을 분석하였다. 그 결과 대상물질의 RT가 앞당겨짐에 따라 전체적인 분석 시간이 줄어들었으며, 대상물질의 분리와 감도가 향상되는 결과가 나타났다(Fig. 1).

Positive mode의 FZD의 경우 뚜렷한 감도 증가를 보였으며, FTD의 경우도 피크 늘어짐이 줄어들었다. Negative mode에서 분리가 잘 이루어지지 않았던 NFT와 NFZ의 경우 뚜렷한 분리를 보였으며, 3종 대상물질 모두 5배 이상의 감도 향상이 나타났다. 게다가 대상물질의 RT가 대체로 3-4분씩 앞당겨짐에 따라 전체 분석 시간도 1/2 가량 줄어든 것으로 나타나 효율적인 기기분석을 가능하게 하였다. 이처럼 LC-MS/MS의 이동상 변경을 통해 대상물질 5종에 대한 동시분석의 분리능 및 감도 향상이 가능하였으며, 기기분석 시간을 줄여 최적화된 기기분석 조건을 마련하였다.

3.2 카트리지 타입 및 pH 조절에 따른 대상물질 회수율 비교

전처리 방법 최적화를 위해 우선 적용한 것은 카트리지 선정으로, 본 연구에서는 각각 성상이 다른 3종의 카트리지를 테스트하였다. 범용적으로 사용되는 polymeric 흡착제 타입의 HLB와 polymeric 흡착제에 양이온 교환 타입인 MCX, polymeric 흡착제에 음이온 교환 타입인 WAX를 비교 카트리지로 하여 최적의 카트리지를 선정하고자 하였다. 3종 카트리지에 대한 추출 효율 결과를 Fig. 2에 나타내었으며, HLB 카트리지에서 5종의 항생제 모두 안정적인 회수율(81-89%)을

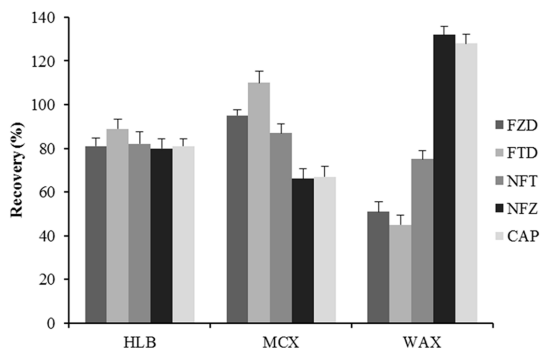


Fig. 2. The results of elution recoveries of four nitrofurans and chloramphenicol in the three SPE cartridges tests (n = 3).

보였다. MCX 카트리지에서 FZD, FTD, NFZ의 회수율이 87-110%로 HLB보다 다소 높게 나타났으나 NFZ와 CAP의 회수율이 약 66%로 HLB보다 낮게 나타났다. 반면에 WAX 카트리지에서는 NFZ와 CAP의 회수율이 128-132%로 과대평가 되는 반면 FZD, FTD의 회수율은 약 48%로 낮게 나타나 본 연구에 사용하기에 부적합하였다. 이에 HLB 카트리지가 가장 적합한 것으로 판단되어 최적의 카트리지로 선정하였다.

일반적으로 항생제와 같이 이온성 물질의 회수율에 대해 pH의 영향은 큰 것으로 알려져 있다.³²⁾ 이에 본 연구에서는 pH 6인 초순수에 0.1% 포름산 10-3000 μ L 주입하여 pH 3, 4, 5로 맞추었으며, 0.1 M 수산화나트륨 30-300 μ L 주입하여 pH 7, 8, 9, 10으로 조절 후 최적 카트리지로 선정한 HLB 카트리지를 이용해 시료액의 pH 변화에 따른 추출 효율을 비교하였다(Fig. 3). 5종 항생제는 pH 3에서 8까지 모두 80% 이상의 회수율을 보였으나, pH 9 이상에서부터 FZD와 FTD의 회수율이 각각 53-67%, 51-63%로 비교적 감소하였으며, 표준편차는 5% 이하인 것으로 나타났다. Mitrowska 등³³⁾은 산해리상수(pKa) 값이 낮을수록 pH가 증가함에 따라 대상물질의 회수율이 낮아짐을 보고하였다. 본 연구에서도 pKa 값이 NFT, NFZ, CAP의 경우 7.2-11.03인 반면, FZD, FTD는 4.9-5.0으로 상대적으로 낮았다(Table 1). 전반적으로 pH가 낮을수록 더 안정적인 회수율을 보이는 하나, pH 3-8 사이에서는 대상물질의 추출효율이 80% 이상인 것으로 나타났다. 여기에 수산용수로 사용되는 해수의 pH가 국내연안에서 7.5-8.5 수준인 것을 고려하면,³⁴⁾ 해수 및 수산용수 중 NFs와 CAP 항생제를 조사할 경우에는 인위적으로 pH를 조절하지 않고 대상물질 분석을 수행할 수 있을 것으로 판단되었다. 단, pH가 8이상일 경우 FZD와 FTD의 회

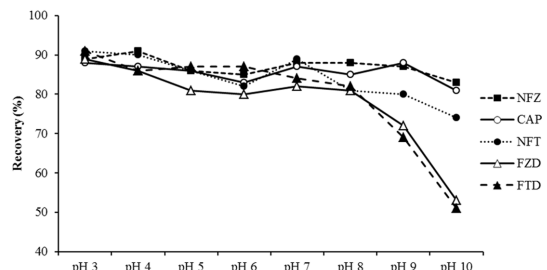


Fig. 3. The influence of sample pH on the recovery of four nitrofurans and chloramphenicol using HLB cartridges (n = 3). The standard deviations of the recoveries were less than 5%.

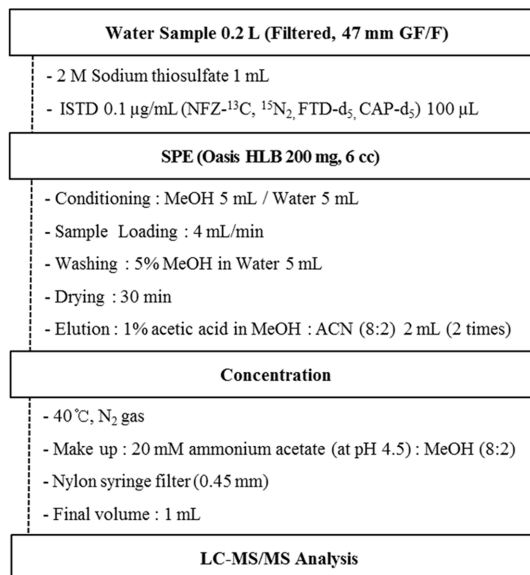
Table 4. Accuracy and precision of the five target compounds and recoveries of three surrogate standards using the optimized analytical method

| Compound | Spiked amount (ng/mL) | Result (ng/mL) | | | | | | | Accuracy (%) | Precision (%) |
|--|-----------------------|----------------|------|------|------|------|------|------|--------------|---------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | | |
| Furazolidone (FZD) | 2 | 1.89 | 1.83 | 1.53 | 1.71 | 1.51 | 1.92 | 1.49 | 84.9 | 11.0 |
| Furaltadone (FTD) | 2 | 1.89 | 1.83 | 1.53 | 1.71 | 1.51 | 1.92 | 1.49 | 85.6 | 2.9 |
| Nitrofurantoin (NFT) | 2 | 1.64 | 2.16 | 1.45 | 1.49 | 1.62 | 1.60 | 2.28 | 87.4 | 18.9 |
| Nitrofurazone (NFZ) | 2 | 1.89 | 1.99 | 2.08 | 1.82 | 1.50 | 1.88 | 1.89 | 93.2 | 9.8 |
| Chloramphenicol (CAP) | 2 | 1.58 | 1.84 | 1.52 | 1.77 | 1.67 | 1.89 | 1.66 | 85.2 | 7.9 |
| FTD-d ₅ | 10 | 9.3 | 9.0 | 7.6 | 8.2 | 7.4 | 9.2 | 7.4 | 83.0 | 10.1 |
| NFZ- ¹³ C, ¹⁵ N ₂ | 10 | 9.4 | 9.2 | 8.0 | 8.7 | 8.1 | 9.3 | 8.2 | 87.1 | 7.1 |
| CAP-d ₅ | 10 | 8.5 | 8.9 | 7.9 | 9.0 | 9.2 | 8.7 | 9.1 | 87.6 | 5.0 |

수율이 80% 이하로 감소하는 것을 고려하여 pH를 8 이하로 조절하는 별도의 과정이 필요할 것으로 판단된다.

3.3 분석법 검증(Method validation)

전처리 과정에서 HLB 카트리지와 적절한 pH(3-8)를 선정하였으며, 이를 바탕으로 한 해수 및 수산용수 중 4종의 NFs와 CAP에 대한 동시분석법을 정립하였다(Fig. 4). 대상물질을 첨가한 해수 시료의 경우 pH가 7.9이었고, 이에 따라 별도의 pH 조절은 수행하지 않았으며, 반복실험 과정에서 시료간 교차오염(cross contamination)을 평가하기 위한 바탕시료(procedural blank)는 pH를 7.9로 조정된 초순수를 사용하였다. 7개 시료 반복실험

**Fig. 4.** Optimized flowchart for the simultaneous analysis of four nitrofurans and chloramphenicol antibiotics in seawater and fisheries water.**Table 5.** Instrumental detection limit (IDL), method detection limit (MDL), and limit of quantitation (LOQ) of the five target compounds

| Target compound | IDL (ng/L) | MDL (ng/L) | LOQ (ng/L) |
|-----------------------|------------|------------|------------|
| Furazolidone (FZD) | 1.02 | 2.25 | 7.16 |
| Furaltadone (FTD) | 0.18 | 0.60 | 1.92 |
| Nitrofurantoin (NFT) | 0.91 | 3.99 | 12.7 |
| Nitrofurazone (NFZ) | 0.64 | 2.26 | 7.21 |
| Chloramphenicol (CAP) | 0.30 | 1.37 | 4.36 |

결과, 바탕시료에서는 대상물질이 검출되지 않았으며, 대상물질의 정확도는 평균 85-93%, 정밀도는 20% 이하(3-19%)로 우수한 정확도와 정밀도를 나타냈다. 또한 3종의 내부표준물질의 회수율 또한 83-88% 이상으로 높게 나타났다(Table 4). 본 연구에서 참조한 Ardsongnearn 등²⁹⁾과 비교했을 때, 정확도(88-110%), 정밀도(3-27%), 및 회수율(60-106%)은 유사하거나 더 높게 나타났다.

대상물질별 IDL은 0.18-1.02 ng/L로 나타났으며, MDL과 LOQ는 각각 0.60-3.99 ng/L, 1.92-12.7 ng/L 수준이었다(Table 5). Ardsongnearn 등²⁹⁾에서는 5종 물질에 대한 MDL과 LOQ를 2-60 ng/L, 50-250 ng/L로 보고하고 있어 본 연구를 통해 산출된 NFs 4종과 CAP의 분석 감도가 더 나은 것으로 판단되었다. 이는 LC-MS/MS의 이동상을 바꾼 후 대상물질의 분리능과 감도가 향상된 결과에 따른 것으로 판단된다.

4. 결 론

양식 수산물 폐사를 예방하고자 다양한 항생제가 사용되고 있고 이러한 항생제 중에는 그 독성으로 인해 사용 금지된 물질이 있으며, 이들은 금지물질로 농수산물 품질관리법과 식품위생법에 따라 양식 수산물 내 잔

류량 평가를 수행하고 있다. 그러나 이러한 양식 수산물에 양식하는 환경 특히 해수 및 수산용수에 대해서는 조사가 이루어지지 않고 있어, 이들 금지물질의 잔류량을 평가하기 위한 분석법 마련이 필요하다.

이에 본 연구에서는 농수산물 품질관리법과 식품위생법에서 규정한 사용금지 항생제인 니트로푸란류(4종)와 클로람페니콜에 대해 해수 및 수산용수 중 동시분석법을 정립하였다. SPE 카트리지 type, 해수 시료의 최적의 pH의 조건, LC 이동상을 테스트하여 정립하였다. 최적의 SPE는 WAX, MCX보다 HLB이었으며, 모든 성분이 안정적인 회수율(81-89%)을 보였다. 해수의 pH가 낮을수록 더 안정적인 회수율을 보이기는 하나, pH 3-8 사이에서는 대상물질의 추출효율이 80% 이상이었다. 이동상은 포름산 암모늄을 첨가한 초순수와 극성이 낮은 MeOH을 사용했을 때 향상된 분리능과 5배 이상의 감도 향상이 나타났다. 게다가 대상물질의 RT도 빨라져서 전체 분석 시간도 1/2 가량 줄어들었다. 정립된 분석법의 정확도 및 정밀도는 각각 85-93%, 3-19%으로 나타났으며, 내부표준물질 회수율은 83-88%이었다. 대상물질의 검량선을 작성한 결과 0.999 이상의 직선성을 보였으며, 기기검출한계는 0.18-1.02 ng/L, 방법검출한계는 0.60-3.99 ng/L, 정량한계는 1.92-12.7 ng/L이었다. 기존의 다성분 분석법과 비교해서 MDL과 LOQ는 20배 정도 향상되었다. 본 연구에서 정립된 분석법은 수산물 출하전 양식장에서 금지 항생제의 선제적 조사 또는 사후조사를 위한 방법으로 활용할 수 있으며, 연안환경에서도 금지 항생제의 오염에 대한 영향평가에서도 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 국립수산물과학원 수산과학연구사업(R2020048)의 지원으로 수행된 연구입니다.

참고문헌

1. G. G. Ying, R. S. Kookana, and Y. J. Ru, "Occurrence and fate of hormone steroids in the environment", *Environment International*, **2002**, 28, 545-551.
2. W. J. Langston, G. R. Burt, B. S. Chesman, and C. H. Vane, "Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment", *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **2005**, 85, 1-31.
3. J. Im and F. E. Löffler, "Fate of bisphenol A in terrestrial and aquatic environments", *Environmental Science and Technology*, **2016**, 50, 8403-8416.
4. J. F. M. Nouws and J. Laurensen, "Postmortal degradation of furazolidone and furaltadone in edible tissues of calves", *Veterinary Quarterly*, **1990**, 12, 56-59.
5. R. J. McCracken, W. John blanchflower, C. Rowan, M. A. McCoy, and D. Glenn Kennedy, "Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues", *The Analyst*, **1995**, 120, 2347-2351.
6. A. Leitner, P. Zöllner, and W. Lindner, "Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, **2001**, 939, 49-58.
7. D. R. McCalla, "Mutagenicity of nitrofurantoin derivatives: Review", *Environmental Mutagenesis*, **1983**, 5, 745-765.
8. R. Draisci, L. Giannetti, L. Lucentini, L. Palleschi, G. Brambilla, L. Serpe, and P. Gallo, "Determination of nitrofurantoin residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry", *Journal of Chromatography A*, **1997**, 777, 201-211.
9. L. H. M. Vroomen, M. C. J. Marcel, B. Van, J. Peter, J. P. Groten, C. J. Wissink, and H. A. Kuiper, "In vivo and in vitro metabolic studies of furazolidone: A risk evaluation", *Drug Metabolism Reviews*, **1990**, 22, 663-676.
10. J. E. M. van Koten-Vermeulen, M. F. A. Wouters, and F. X. R. van Leeuwen, "Report of the 40th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee On Food Additives (JECFA)", *World Health Organisation, Geneva*, **1993**, p85.
11. S. P. Khong, E. Gremaud, J. Richo, T. Delatour, P. A. Guy, R. H. Stadler, and P. Mottier, "Analysis of matrix bound nitrofurantoin residues in worldwide-originated honeys by isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**, 52, 5309-5315.
12. 식품의약품안전평가원, "수산물 중 잔류동물용의약품 모니터링 연구", 2015.
13. A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, and M. Widmer, "Determination of nitrofurantoin and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, **2015**, 862, 41-52.
14. L. K. Sørensen, T. H. Elbæk, and H. Hansen, "Determination of chloramphenicol in bovine milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry", *Journal of AOAC International*, **2003**, 86, 703-706.
15. I. S. Park, and N. Kim, "Development of a chemiluminescent immunosensor for chloramphenicol", *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 578, 19-24.
16. R. J. Shakila, S. A. P. Vyla, R. S. Kumar, G. Jeyasekaran, and G. I. Jasmine, "Stability of chloramphenicol residues

- in shrimp subjected to heat processing treatments”, *Food Microbiology*, **2006**, 23, 47-51.
17. K. E. Nusbaum and E. B. Shotts, “Absorption of selected antimicrobial drugs from water by channel catfish, *Ictalurus punctatus*”, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **1981**, 38, 993-996.
 18. J. P. Cravedi, G. Choubert, and G. Delous, “Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility”, *Aquaculture*, **1987**, 60, 133-141.
 19. A. Ervik, B. Thorsen, V. Eriksen, B. T. Lunestad, and O. B. Samuelsen, “Impact of administering antibacterial agents on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farms”, *Diseases of Aquatic Organisms*, **1994**, 18, 45-51.
 20. K. Kümmerer, “Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent”, *Clinical Microbiology and Infection*, **2003**, 9, 1203-1214.
 21. R. S. Daum, D. L. Cohen, and A. L. Smith, “Fatal aplastic anemia following apparent “dose-related” chloramphenicol toxicity”, *The Journal of Pediatrics*, **1979**, 94, 403-s406.
 22. A. Anadón, P. Bringas, M. R. Martinez-Larranaga, and M. J. Diaz, “Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken”, *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **1994**, 17, 52-58.
 23. P. Mottier, V. Parisod, E. Gremaud, P. A. Guy, and R.H. Stadler, “Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, **2003**, 994, 75-84.
 24. J. Ferguson, A. Baxter, P. Young, G. Kennedy, C. Elliott, S. Weigel, R. Gatermann, H. Ashwin, S. Stead, and M. Sharman, “Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex[®] kit chloramphenicol”, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 529, 109-113.
 25. S. Ye, Y. Y. Hu, A. Li, H. Z. Xu, J. Y. Wang, and D. Y. Ma, “Determination of chloramphenicol residues in sediment in marine environment”, *Marine Environmental Science*, **2008**, 27, 269-271.
 26. 국가법령정보센터, “농수산물 품질관리법 제61조(안전성 조사)”, <http://www.law.go.kr/lsInfoP.do?urlMode=lsInfoP&lsld=001978#J61:0>, (2020년 1월).
 27. 국가법령정보센터, “식품위생법 제 7조(식품 또는 식품첨가물에 관한 기준 및 규격)”, <http://www.law.go.kr/%EB%B2%95%EB%A0%B9/%EC%8B%9D%92%88%EC%9C%84%EC%83%9D%EB%B2%95>, (2020년 1월).
 28. YTN, “고창양식장에 부어버린 발암물질”, www.ytn.co.kr/_ln/0134_201812060644219818, (2020년 1월).
 29. C. Ardsongnearn, O. Boonbanlu, S. Kittijaruwattana, and L. Suntornsuk, “Liquid chromatography and ion trap mass spectrometry for simultaneous and multiclass analysis of antimicrobial residues in feed water”, *Journal of Chromatography B*, **2014**, 945-946, 31-38.
 30. 안전보건공단, 키워드 푸라졸리돈, 푸랄타돈, 니트로푸라존, 니토라푸란토인, 클로람페니콜, <http://www.kosha.or.kr/kcic/msdsearchMsd.do>, (2020년 1월).
 31. L. Peng and T. Farkas, “Analysis of basic compounds by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in high-pH mobile phases”, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1179, 131-144.
 32. M. Seifrtova, L. Novakova, C. Lino, A. Pena, and P. Solich, “An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters”, *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 649, 158-179.
 33. K. Mitrowska, A. Posyniak, and J. Zmudzki, “Determination of malachite green and leucomalachite green residues in water using liquid chromatography with visible and fluorescence detection and confirmation by tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1207, 94-100.
 34. 국립수산물과학원, “한국 연안 어장환경 조사 연보”, 2019, 제8권.