pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 2, pp. 94~98 (2016)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.2.94

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

HPLC-MS/MS를 이용한 벌꿀 중 동물용의약품 동시분석방법 연구

김종화* · 문선애 · 김기유 · 정유정 · 이창희 · 구은정 · 윤미혜 · 이정복
경기도보건환경연구원 첨가물분석팀

Simultaneous Analysis for Veterinary Drug Residues in Honey by HPLC/MS/MS

Jong-Hwa Kim*, Sun-Ea Moon, Ki-Yu Kim, You-Jung Jung,
Chang-Hee Lee, Eun-Jung Ku, Mi-Hye Yoon, and Jong-Bok Lee
Team of Additives Analysis Gyeonggi-do Institute of Health and Environment
(Received October 2, 2015/Revised December 10, 2015/Accepted April 5, 2016)

ABSTRACT - This study was conducted to establish the simultaneous analysis method for veterinary drug residues in honey by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS). The eleven targeting veterinary drugs with honey test method in Korean Food Standards Codex were divided into Group 1 (streptomycine dihydrostreptomycine, neomycine) and Group 2 (oxytetracycline, enrofloxacin, ciprofloxacin, cymiazole, chloramphenicol, amitraz, coumaphos, fluvalinate) to be analyzed simultaneously. From the results, the retention time (RT) of the targeting drugs was within 15 min, the range of detection limits was 0.0056 to 0.0643 μg/g and the range of quantification limits was 0.0169 to 0.1948 μg/g. The coefficients of determination (R^2) for Group 1 (0.05~1.0 μg/mL) and Group 2 (0.01~1.0 μg/mL) were 0.9917~0.9987 and 0.9923~1.000 respectively, and showed the good linearity. The recovery rates for Group 1 (final conc. 0.25 μg/g) and Group 2 (final conc. 1.0 μg/g) were 65.1~80.6% and 64.2~90.3% respectively. Also, the analysis results of inter day (n = 3) and intra day (n = 6) RSD (%) for area and retention time showed that the RSD (%) for area and retention time was below 10.92% and 1.57%. Therefore, the simultaneous analysis method of this study is evaluated to be a good test method for veterinary drug residues in honey.

Key words : HPLC-MS/MS, honey, veterinary drugs, simultaneous analysis

벌꿀을 만드는 벌은 좁은 장소에서 집단생활을 하기 때문에 각종 전염병이 발병될 가능성이 높아 양봉농가에서는 질병 예방 및 치료를위해 다양한 동물용의약품 (살충제 및 항생제)을 사용하고 있다. 동물용의약품의 남용으로 약제에 대한 저항성이 유발되어 그 사용량이 점점 더 증가되고있는 실정이며, 그로 인해 벌꿀 및 양봉 부산물내에 약제가 잔류하게[1] 되어 이를 섭취하는 사람에게도 약제 저항성에 대한 문제를 유발할 가능성이 있다[2,3].

국내에서는 이런 동물용의약품의 오남용에 따른 약제 저항성에 대한 문제를 막기 위해 2007년 벌꿀에 주로 사용되는 동물용의약품인 neomycine (0.1 mg/kg), dihydrostreptomycine/ streptomycine(불검출), oxytetracycline (0.3 mg/kg), amitraz(그 대사산물 포함하여 0.2 mg/kg), coumaphos (0.1 mg/kg), fluvalinate (0.05 mg/kg), cymiazole (1.0 mg/kg), chloram phenicol(불검출), flumethrin (0.01 mg/kg)에 대한 기준을 설정하여 관리하고 있다[4].

현재 우리나라 식품공전 동물용의약품 분석법은 각각 개별 분석법으로 정하고 있어 장시간의 분석시간이 소요되고 있다. 이에 경제성, 효율성을 고려하여 짧은 시간 내 여러 항목을 동시에 검사할 수 있도록 벌꿀에 대한 국내 규격 설정된 11종의 동물용의약품 및 살충제에 대해 HPLC-MS/MS로 동시 분석할 수 있는 효율적인 분석법을 개발하고자 한다.

Materials and Methods

표준품 및 시약

벌꿀 중 동물용의약품 동시분석을 위해 구조와 화학적 특성을 고려하여 2개의 그룹으로 나누어 표준품을 만들었다. Group 1의 아미노글리코사이드계 동물용의약품 표준품은 neomycine streptomycine, dihydrostreptomycine 으로 구성하였고, Group 2는 oxytetracycline, enrofloxcin, ciprofloxacin, cymiazole, chloramphenicol, coumaphos, amitraz, fluvalinate로 구성하였다. 사용된 모든 표준품은 Sigma-Aldrich (USA)

*Correspondence to: Jong-hwa Kim, Gyeonggi-do Institute of Health and Environment, 95 Pa-jangcheon-ro, Jangan-gu, Suwon-si Gyeonggi-do, Korea
Tel: 82-31-250-2575, E-mail: kim001@gg.go.kr

제품 중 순도가 99.9% 이상의 제품을 사용하였다.

전처리와 이동상으로 사용한 methanol과 acetonitrile의 경우 HPLC grade인 Burdick & Jackson사의 제품이며 heptafluorobutric acid 와 formic acid는 Sigma-Aldrich (USA) 사 제품으로 특급을 사용하였다. water는 Thermo Scientific 사 (USA)로 제조한 3차 water (> 18.2 MΩ cm resistivity)를 사용하였다. SPE cartridge로 사용한 WCX (60 mg, 3 cc), HLB (60 mg, 3 cc)는 Waters Corporation (USA)의 제품을 사용하였다.

표준용액 조제

Group 1의 아미노글리코사이드계 동물용의약품의 개별 표준원액(stock solution)은 최종 농도가 약 100 μg/mL 정도가 되도록 water로 녹여 조제하여 냉장 보관하여 사용하였다. 혼합 표준용액(working standards)은 water로 희석하여 조제하였다. 아미노글리코사이드계 동물용의약품은 유리에 흡착성이 있으므로 폴리프로필렌(polypropylene) 재질의 실험 기구를 사용하였다. Group 2의 개별 표준원액(stock solution)은 각 표준원액의 최종 농도가 약 100 μg/mL 정도가 되도록 acetonitrile로 녹여 조제하여 냉동 보관하여 사용하였다. 혼합 표준용액(working standards)은 acetonitrile로 희석하여 조제하였다.

시료 전처리

Group 1의 시료 전처리는 벌꿀 3 g을 50 mL원심튜브에 취하고 water 20 mL을 넣어 5분간 진탕하여 충분히 녹인 후 이 용액을 미리 methanol 5 mL와 water 5 mL로 활성화시킨 WCX cartridge에 흡착시키고 water 5 mL로 세척하고 진공을 가하여 약 10분간 건조하였다. 3 mL 100 mM HFBA/methanol 용액으로 용출한 후 45°C에서 질소로 농축하고, 20 mM HFBA/water용액 1 mL로 용해하고 0.2 μm filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

Group 2의 시료 전처리는 벌꿀 3 g을 50 mL 튜브에 취하고 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.8) 15 mL을 넣고 5분간 진탕하여 충분히 녹인다. 이 용액을 미리 methanol 5 mL와 water 5 mL로 활성화시킨 HLB cartridge에 흡착시키고 water 5 mL로 세척 하고 진공을 가하여 약 10분간 건조하였다. 5 mL methanol 용액으로 용출한 후 45°C에서 질소로 농축하고, 50% methanol용액 1 mL로 용해하고 0.2 μm filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

장비 및 분석조건

HPLC 분석은 Shiseido사 (Japan)의 SPLC (5100 Auto-sampler NASCA, 3301 Dual pump MSI, 3014 oven)와 HPLC-MS/MS는 Thermo Scientific사 (USA)의 triplequadrupole mass spectrometry TSQ Quantum Ultra를 사용하였으며 컬럼은 Thermo Hypersil gold C_{18} (2.1 mm × 100 mm, 5 μm)를 이용하였고 컬럼 온도는 40°C, 유속은 0.3 mL/min으로 시료 주입량은 5.0 μL씩 주입 하였다. HPLC의 이동상 조건은 Table 1 (Group 1)과 Table 2 (Group 2)와 같고, selected reaction monitoring (SRM)을 위한 이온화는 electrospray ionization (ESI) 방식으로 하였으며 각 성분의 정량분석을 위한 product ion 및 collision energy (CE)는 표준용액을 질량분석기에 직접 주입하여 선정하였고 이동상과 함께 표준용액을 주입하면서 MS parameter의 조건을 최적화 하였다.

Table 1. Gradient time table of mobile phase (Group 1)

Time (min)	A%	B%
0	90	10
2.0	90	10
9.0	5	95
10.0	5	95
10.1	90	10
15.0	90	10

A : 10 mM HFBA in water, B : 10 mM HFBA in acetonitrile

Table 2. Gradient time table of mobile phase (Group 2)

Time (min)	A%	B%
0	90	10
2.0	90	10
9.0	0	100
10.0	0	100
11.0	90	10
15.0	90	10

A : 0.1% formic acid in water, B : 0.1% formic acid in acetonitrile

Results and Discussion

시료전처리법 확립

Group 1의 아미노글리코사이드 중 극성이면서 양이온성을 띄는 물질은 reversed-phase SPE 보다 cation exchange SPE을 사용하는 것이 더 효과적인 것으로 알려져 있다[5,6]. 본 실험에서도 약 양이온성인 WCX cartridge를 사용했을 때 가장 높은 회수율을 얻을 수 있었고 이는 Heller DN[7] 등과 같은 결과이다. 휘발성이 강한 ion pairing reagent로서 컬럼 내 머무름을 강하게 하는 HFBA를 이용하여 20 mM HFBA가 포함된 water와 acetonitrile의 혼합 용매를 사용하여 gradient program을 이용하여 각 물질들을 분리하였다(Fig. 1).

아미노글리코사이드계 동물용의약품은 여러 물질과 쉽게 흡착되는 경향이 있는데, 특히 유리 표면과의 흡착력은 매우 강한 것으로 알려져 있다[8]. 실제 glass volumetric flask나 glass vial에 보관된 아미노글리코사이드계 표준용액의 감도는 시간이 지남에 따라 점차적으로 감소하는 경

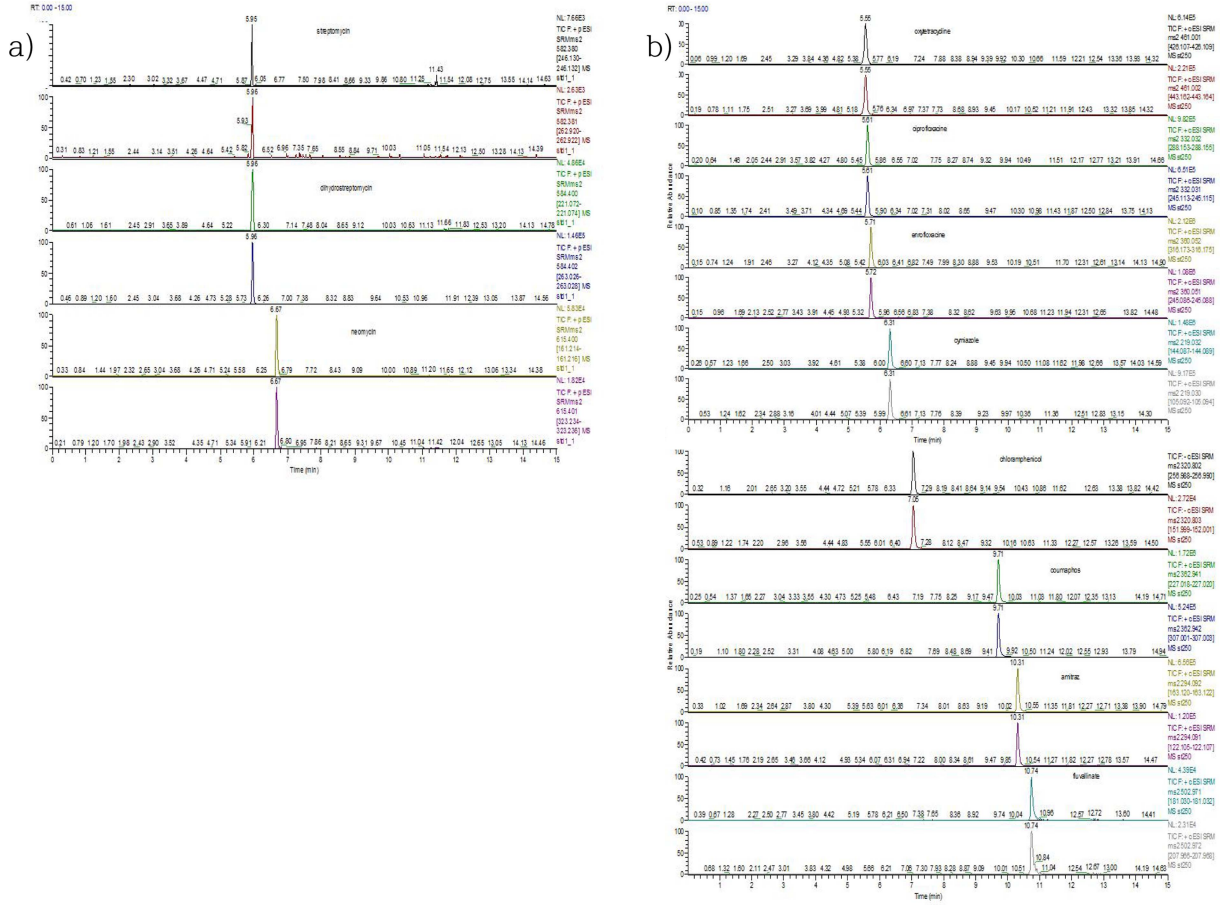

Fig. 1. SRM chromatograms of eleven veterinary drugs ; a) group 1, b) group 2.

향을 보였다. 따라서 Group 1을 분석할 때 표준용액은 플라스틱 vial을 사용하였다. Group 2의 경우 양이온 형태나 중성 형태를 띄게 하여 회수율을 높이고자 0.2 M sodium phosphate buffer로 pH 7.8로 조정하여 Hydrophilic lipophilic balance (HLB) cartridge에 잘 흡착될 수 있도록 하였다.

MS/MS 조건

각 표준용액(1 μg/mL)을 개별적으로 질량분석기에 직접 주입하여 ESI positive 와 negative mode에서의 이온화 조건을 검토하였다. 각 성분의 이온화된 parent ion과 product ion으로의 이행조건을 검토하여 product ion에 대한 최적의 collision energy를 선정하였으며 Table 3과 Table 4에 나타내었다. Group 1은 Ion source ESI+ Spray voltage는 positive mode 4000 V, negative mode 3000 V, sheath gas pressure 40.0, auxiliarygas pressure 20.0, capillary temperature 350°C, vaporizer temperature 300°C로 설정하였다. Group 2의 Ion source는 ESI+와 ESI–, spray voltage positive 4000 V, negative 3000 V, sheath gas pressure 40.0, auxiliary gas pressure 20.0, capillary temperature 350°C, vaporizer temperature 200°C로 설정하였다. 동물용의약품 11종에 대

Table 3. SRM parameters for Group 1

Veterinary drugs	Parent ion	Product ion	CE (V)	Polarity	Tube lens
Streptomycin	582.3	246.1	29	+	46
		262.9	32		
Dihydro streptomycin	584.4	221.0	34	+	146
		245.9	28		
Neomycin	615.4	161.2	31	+	131
		323.2	21		

한 SRM chromatogram은 Fig. 1과 같다.

직선성

Group 1의 혼합 표준용액을 공시료에 spiking 하여 0.05~1.0 μg/g 농도를 5단계로 조제하고 Group 2의 혼합 표준용액을 공시료에 spiking 하여 표준용액을 0.01~1.0 μg/g 농도를 7단계로 조제한 후 HPLC-MS/MS로 분석하여 검량선을 작성한 결과를 Table 5에 나타내었다. Group 1의 각 동물용의약품의 상관계수(R^2)는 0.9917~0.9987으로 양호한 직선성을 확인할 수 있었으며, Group 2는 0.9923~1.0000 으로 2013년 축수산물 유해물질 분석법 편람[9] 실

Table 4. SRM parameters for Group 2

Veterinary drugs	Parent ion	Product ion	CE (V)	Polarity	Tube lens
Oxytetra cycline	461.0	426.1	18	+	101
		443.1	11		
Ciprofloxacin	332.0	288.1	16	+	99
		245.1	22		
Enrofloxacin	360.0	316.1	18	+	103
		245.0	25		
Cymiazole	219.0	144.0	29	+	88
		105.0	30		
Chloram phenicol	320.8	256.9	14	-	102
		151.0	19		
Coumaphos	362.9	227.0	24	+	94
		307.0	15		
Amitraz	294.0	163.1	15	+	72
		122.1	29		
Fluvalinate	502.9	181.0	31	+	98
		207.9	10		

험실 잔류물질 운영가이드 권장사항인 $R^2 \geq 0.98$이상으로 양호한 직선성을 확인 할 수 있었다.

정밀성

분석 조건의 정밀성을 확인하기 위해 공시료에 혼합 표준용액을 첨가하여 각 물질의 농도가 0.25 μg/g, 1.0 μg/g이 되도록 시료를 전처리하여 6회 반복 측정하여 intra day relative standard deviation (% RSD, 상대표준편차)을 확인하였다. 또한 이 시험용액을 3일간 반복 측정하여 inter day relative standard deviation (% RSD, 상대표준편차)를 구하였다. 그 결과 Group 1의 각 성분에 대한 inter day RT RSD (%)는 0.23~1.57, area RSD (%)의 경우 6.10~10.92, intra day RT RSD (%)는 0.01~0.1, area RSD (%)는 1.23~7.73 으로 나타났다. Group 2 각 성분에 대한 inter day RT RSD (%)는 0.13~0.95 이고 area RSD (%)는 3.43~12.29, intra day RT RSD (%)는 0.01~0.2, area RSD (%)는 0.31~4.10로 나타났다. 각각의 측정값은 13% 이하로서 codex 권장기준 20%이내로서 양호한 수준이며 이를 Table 6에 나타내었다.

Table 6. Chromatographic Precision of standard solutions

Veterinary drug	Conc. (μg/g)	Inter day (% RSD), n = 3		Intra day (% RSD), n = 6	
		0.25	1.0	0.25	1.0
Streptomycin	Area	10.92	6.86	7.31	7.73
	RT	0.41	0.23	0.10	0.08
Dihydro streptomycin	Area	10.65	9.43	1.23	5.49
	RT	0.50	0.35	0.09	0.01
Neomycin	Area	10.02	6.10	1.59	2.02
	RT	1.25	1.57	0.02	0.01
Oxytetracycline	Area	6.34	10.44	3.55	1.31
	RT	0.39	0.29	0.05	0.11
Ciprofloxacin	Area	6.62	3.99	1.48	0.34
	RT	0.24	0.28	0.14	0.20
Enrofloxacin	Area	3.99	4.00	3.12	1.67
	RT	0.27	0.13	0.11	0.04
Cymiazole	Area	4.37	10.62	0.63	0.31
	RT	0.44	0.33	0.06	0.05
Chloramphenicol	Area	9.95	6.65	3.94	3.07
	RT	0.48	0.44	0.18	0.03
Coumaphos	Area	4.73	3.43	3.57	2.37
	RT	0.64	0.75	0.04	0.01
Amitraz	Area	9.05	12.29	0.41	1.39
	RT	0.95	0.94	0.06	0.01
Fluvalinate	Area	4.03	10.50	4.10	2.85
	RT	0.73	0.19	0.04	0.01

회수율

공시료에 Group 1과 Group 2의 각 혼합 표준용액을 첨가하여 각 물질의 농도가 0.25 μg/g, 1.0 μg/g이 되도록 한 시료를 전처리하여 3회 반복 분석하였다. Group 1은 65.1~80.6%, Group 2 는 64.2~90.3%로 나타났다.

Table 5. Linearity of Veterinary drugs

	Veterinary drugs	Range (μg/g)	Linear regression equation	Correlation Coefficient (R^2)
Group1	streptomycin	0.05~1.0	Y = 13.1567X – 533.892	0.9934
	dihydrostreptomycin	0.05~1.0	Y = 130.26X – 3817.73	0.9987
	neomycin	0.05~1.0	Y = 1512.06X – 43100.9	0.9917
Group2	oxytetracycline	0.01~1.0	Y = 6170.65X – 86333.5	0.9992
	ciprofloxacin	0.01~1.0	Y = 3778.64X – 19331.6	1.0000
	enrofloxacin	0.01~1.0	Y = 9364.66X – 13662.6	0.9993
	cymiazole	0.01~1.0	Y = 16160.8X – 245327	0.9959
	chloramphenicol	0.01~1.0	Y = 142.919X – 4302.91	0.9993
	coumaphos	0.01~1.0	Y = 9725.25X + 322069	0.9923
	amitraz	0.01~1.0	Y = 139364X – 949713	0.9992
	fluvalinate	0.01~1.0	Y = 1526.17X – 3355.17	0.9994

Table 7. Recovery of the veterinary drugs

Veterinary Drugs	Conc. (μg/g)	Recovery (%)
		Honey
Streptomycin	0.25	74.3 ± 4.2
	1.0	80.6 ± 1.4
Dihydrostreptomycin	0.25	65.1 ± 2.3
	1.0	71.2 ± 3.3
Neomycin	0.25	70.6 ± 8.6
	1.0	72.6 ± 0.2
Oxytetracycline	0.25	80.3 ± 4.2
	1.0	85.1 ± 1.4
Ciprofloxacin	0.25	79.2 ± 7.2
	1.0	83.1 ± 3.3
Enrofloxacin	0.25	76.1 ± 8.6
	1.0	82.3 ± 0.2
Cymiazole	0.25	85.1 ± 6.2
	1.0	90.3 ± 8.4
Chloramphenicol	0.25	64.2 ± 3.1
	1.0	65.3 ± 1.9
Coumaphos	0.25	73.6 ± 3.1
	1.0	74.9 ± 1.9
Amitraz	0.25	74.3 ± 3.1
	1.0	72.1 ± 1.9
Fluvalinate	0.25	70.3 ± 3.1
	1.0	71.3 ± 1.9

Table 8. Limit of detection and quantification of the veterinary drugs

Veterinary Drug	LOD* (μg/g)	LOQ** (μg/g)
Streptomycin	0.0643	0.1948
Dihydrostrptomycin	0.0402	0.1219
Neomycin	0.0443	0.0955
Oxytetracycline	0.0056	0.0169
Ciprofloxacin	0.0258	0.0782
Enrofloxacin	0.0090	0.0272
Cymiazole	0.0103	0.0312
Chloramphenicol	0.0149	0.0451
Coumaphos	0.0093	0.0282
Amitraz	0.0090	0.0272
Fluvalinate	0.0180	0.0546

LOD*: Limit of Detection, LOQ**: Limit of Quantification

검출한계 및 정량한계

Group 1과 Group 2의 기기적 검출한계를 구한 결과 검출한계는 0.0056~0.0643 μg/g, 정량한계는 0.0169~0.1948로 나타났다(Table 8).

국문 요약

HPLC-MS/MS를 이용하여 벌꿀의 동물용의약품 동시분석을 위한 분석법을 정립하고자 식품공전 중 벌꿀에 규격이 설정된 11종의 동물용의약품을 2개 그룹 Group 1 (streptomycine, dihydrostreptomycine, neomycine)과 Group 2 (oxytetracycline, enrofloxacin, ciprofloxacin, cymiazole, chloramphenicol, amitraz, coumaphos, fluvalinate)으로 나눠서 동시에 분석 할 수 있는 방법을 연구 하였다. 두 그룹 모두 RT는 15분 이내였고, 검출한계는 0.0056~0.0643 μg/g, 정량한계는 0.0169~0.1948 μg/g으로 나타났으며 Group 1 (0.05~1.0 μg/g의 농도범위)과 Group 2 (0.01~1.0 μg/mL)의 검량선을 작성한 결과 각 동물용의약품의 직선상관계수(R^2)는 0.9917~0.9987, 0.9923~1.000으로 매우 양호한 상태를 보였고, 최종 농도가 0.25 μg/g, 1.0 μg/g에서의 회수율은 Group 1 65.1~80.6%, Group 2 64.2~90.3%를 나타났다, 또한 area 및 RT 에 대한 inter (n = 3), intra day (n = 6) RSD (%) 분석결과는 area는 10.92%이하, RT은 1.57% 이하로 나타나 양호한 수준을 보여 벌꿀 중 동물용의약품 동시분석 방법으로 적합하다고 판단된다.

References

1. Jo D.H.: Beekeeping management for four seasons. 2nd Ed. *Osung publisher*, Korea. pp. 30-36 (2009).
2. Won S.Y., Kang H.I., Jang H.S., Lee H.J. and Kim S.H.: Monitoring of acaricide residues in honey. *Annu. Rep. KFDA*, **11**, 189-201 (2007).
3. Rial-Otero R., Gaspar E.M., Moura I. and Capelo J.L.: Gas chromatography mass spectrometry determination of acaricides from honey after a new fast ultrasonic-based solid phase micro-extraction sample treatment. *Talanta*, **71**, 1906-1914 (2007).
4. MFDS: Korean food standards codex Annex 7. Maximum residue limits of veterinary drugs in food. *Ministry of Food and Drug Safety, Korea*, (2015).
5. McLaughlin L. and Henion J.D.: Determination of aminoglycoside antibiotics by reversed phase ion-pair high performance liquid chromatography coupled with pulsed amperometry and ion spray mass spectrometry. *J chromatogr*, **591**, 195-206 (1992).
6. McLaughlin L.G., Henion J.D. and Kijak P.J.: Multi-residue confirmation of aminoglycoside antibiotics and bovine kidney by ion spray high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biol MassSpectrom*, **23(7)**, 417-429 (1994).
7. Heller D.N., Clark S.B. and Righter H.F.: Confirmation of gentamicin and neomycin in milk by weak cation-exchange extraction and electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **35(1)**, 38-49 (2000).
8. Kaufmann A. and Maden K.: Determination of 11 aminoglycosides in meat and liver by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J AOAC Int*, **88(4)**, 1118-1125 (2005).
9. MFDS.: Hazardous substances analysis of livestock and seafood products. *Ministry of Food and Drug Safety, Korea*, 286-288 (2013).