pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 5, pp. 319~326 (2016)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.5.319

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

LC-MS/MS를 이용한 수산물 중 콜리스틴 분석법 개발

신다솜 · 강희승 · 이수빈 · 조윤제 · 천소영 · 정지윤* · 이규식
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

Development of Analytical Method for Colistin in Fish and Shrimp using Liquid Chromatography Mass Spectrometry

Dasom Shin, Hui-Seung Kang, Soo-Bin Lee, Yoon-Jae Cho, So-Young Cheon, Jiyoon Jeong*, and Gyu-Seek Rhee
Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Osong, Chungcheongbuk-do 28159, Korea
(Received July 11,2016/Revised August 16, 2016/Accepted September 6, 2016)

ABSTRACT - Colistin is a last resort antimicrobial agent against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. This study was conducted to develop an analytical method to determine colistin in fish and shrimp. The analytes were confirmed and quantified via liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). The sample was extracted with acidified 5% methanol (containing 0.5% formic acid). Then, solid phase extraction (SPE) was used for cleanup. Matrix-matched calibration curves were linear over the calibration ranges (0.05-1.2 mg/kg) for all the analytes into blank sample with $r^2 > 0.99$. All the values fulfilled the criteria requested by the Codex guidelines. Average recoveries ranged from 85.9% to 107.9%. The repeatability of measurements, expressed as the coefficient of variation (CV, %), was less than 15%. The limit of detection (LOD) was 0.02 mg/kg, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.05 mg/kg. This improved method showed higher accuracy and acceptable sensitivity to meet the CAC guideline requirements and is applicable for the analysis of residual colistin (A+B) in fish and shrimp.

Key words : colistin, fish, shrimp, analytical method, LC-MS/MS

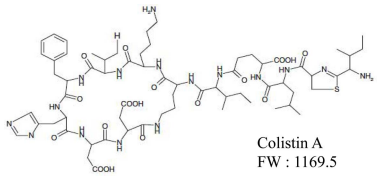
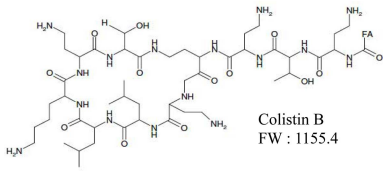
콜리스틴(Colistin)은 폴리믹신 계열의 폴리펩타이드계 항균제로 *Bacillus colistinus*로 부터 1950년에 분리되어 발견되었으며, 콜리스틴 A(폴리믹신 E1)와 B(폴리믹신 E2)로 분류되어 있다[1]. 콜리스틴 A와 B는 구조적으로 지방산의 사슬 일부가 다른 형태로 구성되어 있다(Table 1). 콜리스틴은 대표적인 부작용으로 신장독성이 있어 주요 항생제로 사용되지 하였으나, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, and *Acinetobacter* spp. 등 항생제 다제내성균이 많아지면서 사용되기 시작하였다[2,3]. 최근 임상연구에서 폐렴 및 뇌수막염 치료에 콜리스틴 유효성이 확인됨에 따라 다제내성균 치료를 목적으로 사용이 늘어나고 있는 추세이다[4]. 콜리스틴은 전세계적으로 축수산물의 양식에 연간 12,000톤 이상이 사용되는 것으로 추정되고 있으며, 중국, 유럽 등에서 널리 사용되고 있다. 하지만 돼지에서 분리된 *E. coli*에서의 콜리스틴 내성유전자(*mcr-1*)가 최근 발견되면서 콜리스틴 내성과 관련된 우려가 증가하고 있다[5].

일본의 후생노동성에서는 허용물질목록관리제도(positive list system, PLS)를 통하여 축산물 중 콜리스틴의 잔류허용기준(maximum residue level, MRL)을 0.15~0.2 mg/kg, 계란 0.3 mg/kg으로 설정하여 관리하고 있다[6]. 국제식품규격위원회(CODEX) 및 유럽연합(EU)에서도 축산물(0.15~0.2 mg/kg) 및 계란(0.3 mg/kg) 중 콜리스틴에 대한 잔류허용기준을 동일하게 관리하고 있다[7]. 우리나라에서도 식품의약품안전처는 축산물에 대해 국외기관과 유사한 수준인 0.15~0.3 mg/kg, 어류 및 갑각류에 대해 0.15 mg/kg로 잔류허용기준(MRL)을 설정하여 관리하고 있다[11].

콜리스틴을 분석하기 위한 액체크로마토그래피(liquid chromatography)와 형광검출법(fluorescence detection), 효소면역분석법(ELISA) 등의 시험법이 개발 되어 왔다[12-16].

*Correspondence to: Jiyoon Jeong, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Osong, Chungcheongbuk-do 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4203, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: stopyoon@korea.kr

Table 1. Molecular structure and physico-chemical properties of colistin

Property	Content
IUPAC Name	*N*-(4-amino-1-(1-(4-amino-1-oxo-1-(3,12,23-tris(2-aminoethyl)-20-(1-hydroxyethyl)-6,9-diisobutyl-2,5,8,11,14,19,22-heptaoxo-1,4,7,10,13,18-hexaazacyclotricosan-15-Ylamino)butan-2-ylamino)-3-hydroxybutan-2-ylamino)-1-oxobutan-2-yl)-*N*,5-dimethyl-heptanamide
Classification	Polymyxin antibiotic
Molecular formula	Colistin A : $C_{53}H_{100}N_{16}O_{13}$ Colistin B : $C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$
Molecular weight	Colistin A : 1169 g/mol Colistin B : 1155 g/mol
pKa	11.6
pK_{ow}	–2.4
Solubility	Freely soluble (in water)
Structure	 Colistin A FW : 1169.5  Colistin B FW : 1155.4

Li 등 (2003)은 액체크로마토그래프(HPLC) UV 및 형광검출기를 이용하여 인체 혈장 중 콜리스틴 A와 B, 콜리스틴 메탄 설포네이트를 분석하였으며, 최적 온도(37°C)와 pH 7.4를 확립하였다. Wan 등 (2006)은 LC-MS/MS와 고상추출법(SPE, solid phase extraction)을 활용하여 콜리스틴 A와 B에 대한 시험법을 개발하였으며, 폴리믹신 B를 내부표준물질로 활용하여, 콜리스틴 A와 B에 대한 정량한계(LOQ)를 1-16 μg/kg로 확보하였다. Ma 등 (2008) LC-MS/MS와 HLB 카트리지를 활용하여 인체시료에서 콜리스틴을 분석한 결과 소변 및 혈장 중 콜리스틴 A와 B에 대해서 정량한계를 각각 0.016-0.056 μg/mL 수준으로 확보하였다. Xu 등 (2012)는 수산물 8종에 대한 콜리스틴 A와 B에 대해 LC-MS/MS와 고상추출법을 활용한 시험법을 개발하였으며, 회수율은 73~83% 수준이었으며 정량한계는 40 μg/kg로 확보하였다. Mercier 등 (2014) 등은 콜리스틴과 콜리스티메테이트 소디움(colistimethate sodium, CMS)에 대한 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)와 HLB 카트리지를 활용하여 인체시료에서 고감도 분석법을 확보하였다(정량한계, 0.006-0.014 μg/mL). 하지만, 우리나라 식품공전(5.3.35)에서는 LC-MS를 이용하여 콜리스틴 A와 아프라마이신에 대한 동시분석으로 제시되어 있다. 현재의 시험법을 적용하였을 경우 40% 이하의 낮은 회수율을 보여주었다. 본 연구를 통해 회수율 개선뿐만 아니라 콜리스틴 A와 B를 모두 포함하여 잔류허용기준(MRL)에 따라 수산물 중 콜리스틴에 대해 고감도로 분석이 가능한 공인된 분석법을 개발하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

콜리스틴 설페이트(colistin sulfate, 62.9%)의 표준품은 U.S.Pharmacopeial (MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다(Table 1). 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol) 등은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 HPLC 등급으로 구입하여 사용하였다. 또한, 고상추출 카트리지로 사용한 hydrophilic-lipophilic balance (HLB, 6cc, 200 mg)는 Waters (Oasis, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 개미산(formic acid) 등 그 이외의 분석용 시약 및 용매는 특급 또는 분석용을 사용하였다. 시험용 시료는 수산물 섭취량과 소비량을 고려하였으며[8], 수산물의 지방함량 및 조직특성을 고려하여 갑각류(새우), 해수어(넙치), 담수어(장어)를 선정하였다. 시중에서 유통되고 있는 시료를 껍질, 내장을 제거한 부위(근육)만을 분쇄하고 균질화 한 후, 분석 전까지 냉동고(–20°C)에 보관하였다. 공시료(blank)는 동일한 시험법을 거쳐 콜리스틴이 잔류되지 않음을 확인한 후 시험용 시료로 사용하였다.

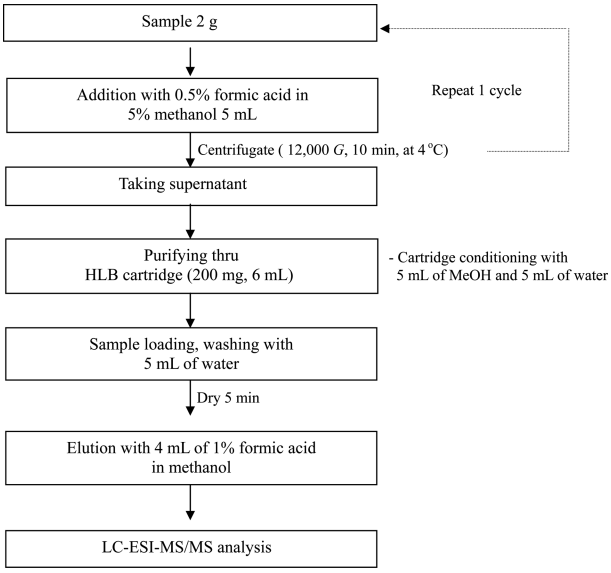


Fig. 1. Flow chart of analysis procedure for colistin.

표준원액 및 표준용액의 조제

콜리스틴 표준품을 15.89 mg을 정밀히 달아 100 mL 폴리프로필렌(polypropylene) 재질의 볼륨플라스크에 50% 메탄올로 정용하여, 100 mg/L 표준원액을 조제하였다. 이를 1% 개미산을 함유한 메탄올로 0.5, 0.75, 1.5, 3, 6, 12 mg/L 희석하여 시료에 각각 200 µL 첨가하여 시료전처리 과정과 동일하게 처리한 뒤 표준용액으로 준비하였다. 표준원액과 표준용액은 폴리프로필렌재질용기에 담아 냉동보관(−20ºC) 하였으며, 표준용액은 사용직전에 희석하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 모든 시험용기는 폴리프로필렌 재질을 사용하였다.

추출 및 정제

넙치, 장어, 새우 각각의 시료를 균질화하여 2 g을 50 mL 폴리프로필렌 재질의 튜브에 취하고 추출용액 0.5% 개미산을 함유한 5% 메탄올 5 mL를 넣고 가볍게 진탕한 후 12,000 ×g, 4ºC에서 약 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 다른 50 mL 폴리프로필렌 재질의 튜브에 취한 후 남은 잔사에 위와 동일하게 처리하여 상층액을 합하였다. 미리 메탄올 5 mL와 물 5 mL로 HLB 카트리지를 활성화시킨 후 추출액을 1~3 mL/min의 속도로 충진제에 흡착시키고 물 5 mL를 넣어 같은 유속으로 세척하였다. 이 때, 감압하여 물을 완전히 제거 한 후 공기를 통과시켜 건조하였다. 1% 개미산을 함유한 메탄올 4 mL를 15 mL 폴리프로필렌 재질의 튜브에 용출하였다. 이 용액을 균질화 한 후 polytetrafluoroethylene (PTFE) 0.2 µm 멤브레인 소수성 필터로 여과하여 폴리프로필렌 재질의 바이알에 담아 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

Table 2. LC-MS/MS parameter for the analysis of colistin

LC system	Waters, UPLC		
Column	Waters X-SELECT C_{18} (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 µm)		
Column temp.	40ºC		
Injection vol.	5 µL		
Flow rate	0.3 mL/min.		
Mobile phase	A = ammonium formate : formic acid : water (1:2.5:497.5 = v/v/v) B = 1% formic acid in acetonitrile		
Gradient	Time (min)	Mobile phase	
		A(%)	B(%)
	0	100	0
	1	100	0
	8	10	90
	9	10	90
	9.5	100	0
	12	100	0
Mass spectrometry	Waters, Xevo TQ-S		
Ionization mode	ESI positive		
Capillary temp.	500ºC		
Spray voltage	3.5 kV		
Collision gas	Ar		

기기분석조건

콜리스틴 분석을 위해 사용한 LC-MS/MS와 컬럼은 Waters 사의 US/Xevo TQ-S (Milford, MA, USA), X-SELECT C_{18} (2.1 × 150 mm, 3.5 µm, Dublin, Ireland)을 각각 사용하였다. 이동상 A는 암모늄 포메이트 : 개미산 : 물(1 : 2.5 : 497.5 = v/v/v), 이동상 B는 1% 개미산을 함유한 아세토니트릴을 선택하여 기울기 용리 방식을 선택하였다. 콜리스틴의 이온화법은 electro-spray ionization (ESI)법의 양이온모드(positive ion mode)로 MS조건을 최적화 하였으며, multiple reaction monitoring (MRM) 조건으로 분석하였다(Table 2).

분석법 검증

개선된 분석법은 CAC/GL 16번과 71번[9,10] 및 최근 식품의약품안전처에서 발간한 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인[11]에 따라서 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 측정하여 유효성을 검증하였다. 직선성은 혼합표준용액을 잔류허용기준 농도의 1/3, 1/2, 1, 2, 4, 8배가 되도록 시료전처리 과정과 동일하게 거친 시료액을 이용하여 LC-MS/MS에 주입하여 얻어진 피크면적으로 검량곡선을 작성하고 직선성을 구하였다. 정확성과 정밀성은 공시료에 잔류허용기준의 0.5, 1, 2배 농도로 표준용액을 첨가

한 후, 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD, %)를 측정하였다. 검출한계(Limit of detection, LOD)는 각 신호 대 잡음비(signal to noise ratio, S/N ratio) 3배 이상인 농도로 계산하였으며, 정량한계는 각각 신호대비 잡음 비가 10배 이상인 농도로 계산하였다. 또한, 신뢰성 재고를 위하여 실험실간 시험법 검증(inter-laboratory verification)을 수행하였다. 시험법을 검증하기 위해 식품 등 시험검사기관 A와 식품 등 시험검사기관 B를 선정하여 수행하였고, 대상시료는 시험법을 확립한 곳과 동일하게 넙치, 장어 및 새우에서 회수율 검증을 수행하였다. 수행 농도는 분석법 확립에 대한 CODEX의 식품 중 동물용 의약품 잔류분석법에 대한 가이드라인에 근거하여 진행하였으며, 재현성 검증을 위하여 5회 반복이상, 모든 기기분석 조건은 동일하게 진행하였다.

Results and Discussion

분석법 조건 선정

현 식품공전(5.3.35)에서는 LC-MS를 이용하여 분석하도록 고시되어 있지만, 수산물 시료의 복잡한 매트릭스(matrix)에서 콜리스틴 대상 물질의 존재 여부를 정확하고 낮은 농도의 정량한계 확보와 고감도 분석을 위해 LC-MS/MS를 선택하였다. 이온화법으로는 전기분무이온화(electro spray ionization, ESI) 방법으로 positive mode 조건으로 분석되었다. 콜리스틴은 평균 분자량이 1162 g/mol의 고분자 물질이지만, amine기(-NH_2)가 여러 개 붙어있고 Log P_{ow}값이 –2.4로 극성 물질이기 때문에 전기분무이온화를 통해 되어 전하를 띠게 되어 다가이온형태로 확인 할 수 있었다.

콜리스틴(A[M_1]+B[M_2])의 최적 MS조건 및 기기조건을 Table 2에 제시하였다. 이동상에 사용된 암모늄 포메이트는 protonation enhancer로서 분자 내 amine기에서 protonation을 용이하게 하여 콜리스틴 A의 $[M_1+2H]^{2+}$, B의 $[M_2+2H]^{2+}$를 생성하도록 하였다.

콜리스틴 표준용액(50 μg/L)을 질량검출기에 직접 주입하여 cone voltage (10-50 V)를 조절하여 35 V에서 최대 강도를 나타내는 것을 확인 하였다. 선구이온(precursor ion)은 full scan mode 에서 질량 스펙트럼을 확인하여, 콜리스틴 A의 $[M_1+2H]^{2+}$ (m/z 585), B의 $[M_2+2H]^{2+}$ (m/z 578)

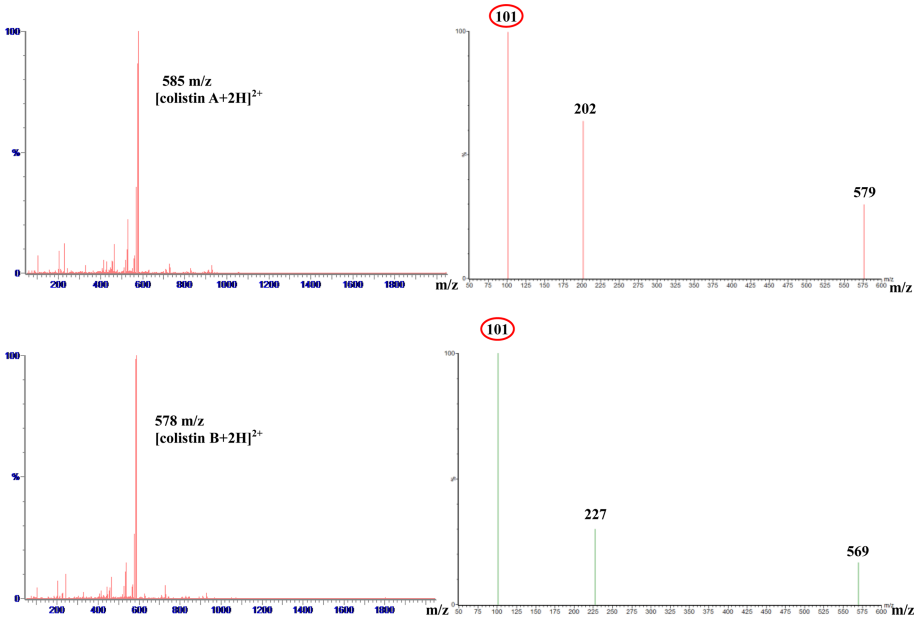


Fig. 2. Precursor-products ions full scan mass spectrum of colistin A and B.

Table 3. Selected-ion of LC-MS/MS for colistin

Compound	Retention time (min)	Exact mass (m/z)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision Energy (eV)
Colistin A	4.65	1169.5	585	101*	30
				202	13
				569	16
Colistin B	4.45	1155.4	578	101*	30
				227	20
				579	16

*Quantification ion

형태의 이온의 peak를 확인 하였다. MS/MS 분석 시 collision cell에서의 energy를 조절하여 콜리스틴 A에서의 가장 높은 감도를 보이는 생성이온 m/z 101 ([α,γ-diaminobutyric acid-γ-NH_2]$^+$)을 정량이온(quantification ion)으로 선택하고, 다음으로 크게 검출되는 두 개의 생성이온 m/z 202 ([α,γ-diaminobutyric acid-threonine-H]$^+$), m/z 569 ([M_1+2H-H_2O]$^{2+}$)을 정성이온(qualification ion)으로 설정하였다. 콜리스틴 B에서의 가장 높은 감도를 보이는 생성이온 m/z 101 ([α,γ-diaminobutyric acid-γ-NH_2]$^+$)을 정량이온으로 선택하고, 다음으로 크게 검출되는 두 개의 생성이온, m/z 227 ([6-methylheptanoic acid- α,γ-diaminobutyric acid-γ-NH_2+H]$^+$), m/z 576 ([M_2+2H-H_2O]$^{2+}$)을 정성이온으로 설정 하였다(Fig. 2). 선정된 이온과 머무름 시간은 Table 3에 나타내었다.

추출 및 정제조건 선정

식품공전(5.3.35) 축·수산물에 대한 콜리스틴 시험법은 아프라마이신과 동시분석법으로 적용하게 되어 있으나 수산물 시료에 적용하였을 경우, 전처리 과정에서 극성인 콜리스틴의 물질 특성을 만족하지 못한 채 아세토니트릴로 추출하여 농축 후 비극성인 용매로 재용해하는 과정으로

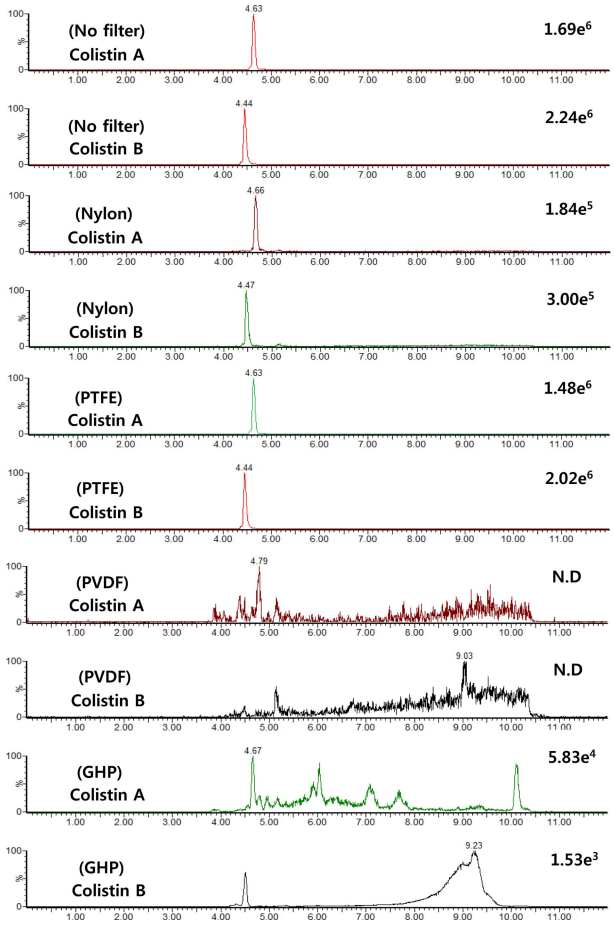


Fig. 3. Comparison of peak intensity by membrane disc filter type (0.15 mg/L).

인하여 회수율이 낮은 결과를 보여주었다. 또한, 식품공전의 정제과정에서 사용된 florisil 카트리지는 약한 염기성을 갖는 흡착제로 유기용매로부터 낮은 극성부터 중간 극성물질의 분석에 사용되기 때문에 분석물질인 콜리스틴과는 맞지 않는 시험법이라고 판단하였다. 본 연구를 통하여 시험법을 개선하고자 폴리펩타이드계인 콜리스틴의 특성[17]을 고려하여 추출용매를 극성용매로 선택하였다. 콜리스틴이 수산물에 존재하는 경우 중 cell membrane 내 인지질에 단단히 결합되어있는 조직적 특성을 고려하여 단백질의 가수분해하여 침전시키는 역할을 하는 개미산을 선택 후 비율을 조절하여 0.5%의 개미산을 추출용매에 포함시켰다. 하지만 개미산 수용액을 사용할 경우에는 전처리 과정 중 시료에 유화액(emulsion)이 생길 수 있기 때문에 전처리 과정이 어려워진다. 이 유화액 속의 모든 간섭물질을 카트리지로 정제하였을 때 matrix effect가 크게 나타나지 않았기 때문에 0.5%개미산 용매에서 극성도는 최대한 높이고 비극성 간섭물질의 추출률을 비교적 낮추기 위해서 5%의 메탄올을 첨가하였다. 0.5% 개미산을 포함한 5% 메탄올로 추출 후 모든 화합물을 위한 균형-역상 흡착제인 HLB 카트리지를 사용하여 정제과정을 거쳤다. 시험용액을 기기 분석 전 불순물을 한번 더 제거하기 위한 멤브레인 필터를 선택하기 위하여 분석에 가장 많이 쓰이는 4가지를 선정하여 회수율 실험을 수행하여 산/염기가 함유된 유기용매 정제에 가장 적합하고 감도가 가장 뛰어난 0.2 μm PTFE 멤브레인 필터를 선택하였다(Fig. 3).

분석법 검증

콜리스틴 분석법의 선택성, 특이성, 직선성을 검증하기 위해 넙치, 장어, 새우의 무처리 시료, 표준용액, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하였다(Fig. 4). 그 결과, 무처리 검체 중 콜리스틴(A+B)과 같은 머무름 시간을 갖는 어떤 방해물질도 검출되지 않았다. 따라서, 콜리스틴(A+B)을 분석하기 위한 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다

콜리스틴 표준원액을 물로 희석하여 시료에 잔류허용기준의 농도별로 spiking 하여 시료전처리 과정과 동일하게 거친 시료액을 위에서 제시한 기기분석 조건으로 측정하여 matrix-matched 검량곡선을 작성한 결과를 Table 4에 제시하였다. 상관계수가 0.99 이상으로 Codex에서 권장하는 r^2> 0.98와 비교해도 매우 만족할 만한 수준이었으며, 검출한계와 정량한계는 각각 0.02 mg/kg, 0.05 mg/kg이었다.

본 시험법의 정확성을 평가하기 위하여 넙치, 장어, 새우에 처리농도를 잔류허용기준(MRL)의 0.5, 1, 2배 농도로 표준용액을 spiking하여 회수율 실험을 5회 반복으로 수행하여 정확성과 정밀성을 평가하였다. 그 결과 넙치, 장어 및 새우 시료에 대한 콜리스틴의 회수율과 정밀성은 92.1~107%, 4.64~11.8%로 조사되어 정확성과 정밀성 모

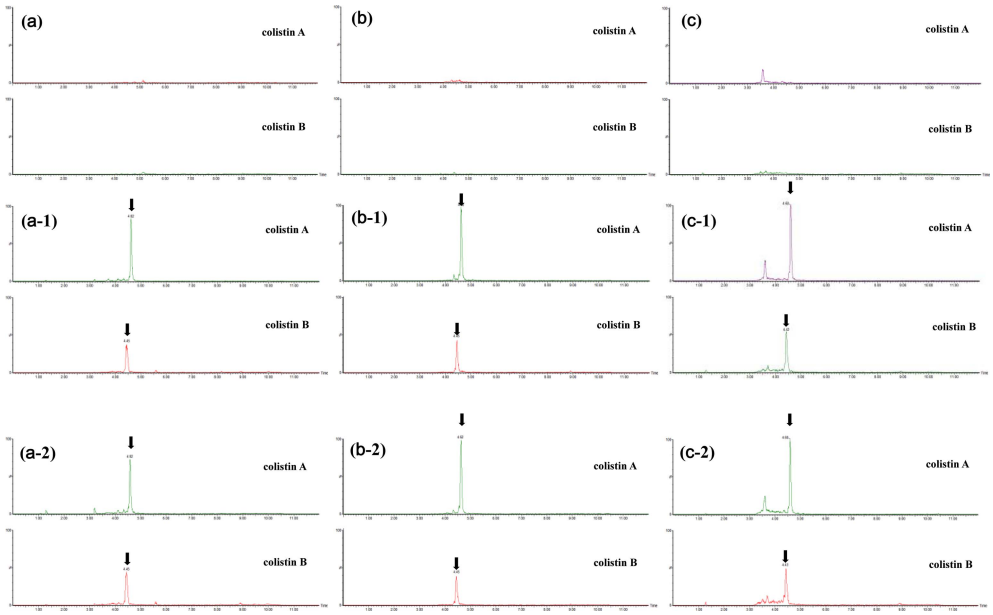


Fig. 4. Chromatograms of colistin A (m/z 585 → m/z 101) and B (m/z 578 → m/z 101) : (a) blank in flatfish, (a-1) matrix matched standards at 0.15 mg/kg in flatfish, (a-2) colistin MRL (0.15 mg/kg) recovery test in flatfish, (b) blank in eel, (b-1) matrix matched standards at 0.15 mg/kg in eel, (b-2) colistin MRL (0.15 mg/kg) recovery test in eel, (c) blank in shrimp, (c-1) matrix matched standards at 0.15 mg/kg in shrimp and (c-2) colistin MRL (0.15 mg/kg) recovery test in shrimp.

Table 4. Standard curve range, linearity, correlation coefficients, LOD and LOQ of colistin

Compound	Matrices	Standard curve range (mg/kg)	Linearity	r^2
Colistin	Flatfish	0.05-1.2	y = 44,901.1135x + 4,343.3532	0.9990
	Eel		y = 58,373.5229x + 3,018.2587	0.9906
	Shrimp		y = 28,294.1862x + 2,005.1642	0.9986

Table 5. Validation results of the analytical method of colistin (A + B) in flatfish, eel and shrimp (n = 5)

Concentration (mg/kg)	flatfish		eel		shrimp	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
0.075 (1/2MRL)	102	4.64	85.9	7.06	95.5	9.38
0.15 (MRL)	102	8.61	105	7.51	87.6	11.8
0.30 (2MRL)	95.7	10.8	108	8.71	92.7	7.21

두 CAC 권장기준을 충족하며, 잔류동물용의약품 시험법의 적합성을 확인할 수 있었다(Table 5). 신뢰성과 재현성 확보를 위해 실험실간 검증을 실시하였으며 직선성, 회수율과 정밀성을 평가한 결과 직선성은 모든 분석기관에서의 상관계수가 0.99이상으로 확인되었고, 전체 회수율 평균은 82.3~111% 이었으며, CV값은 0.18~9.91%로 모두 적합한 수준이었다(Table 6).

현재까지 수산물 중 잔류하는 동물용의약품 콜리스틴 분석법에 대한 연구자료는 저조한 편이다[12-16]. 하지만 가장 유사한 Xu 등 (2012)의 연구결과와 비교하였을 때, 우수한 감도와 10% 이상 높은 회수율 및 상대적으로 낮은 상대표준편차를 얻을 수 있었고, 정량한계 또한 2배 적은 injection volume 으로도 유사한 수준의 정량성을 확보할 수 있었다.

현 식품공전의 시험법은 수산물에 적용하였을 때, 분석대상물질과 시험법이 맞지 않아 회수율이 낮았다. 따라서, 확립된 시험법을 통해 높은 회수율과 정확성 그리고 정량성을 확보하였고 콜리스틴 A, B 성분 모두를 관리하게 되면서 수산물 중 잔류할 수 있는 콜리스틴에 대한 안전관리에 활용 할 수 있을 것으로 사료되는 바이다.

검출한계 및 정량한계

콜리스틴의 검출한계는 기기상에서 S/N ratio 3 이상으로 결정하여 수산물의 경우 분석기기에 따른 검출 한계는

Table 6. Recovery and CV of colistin by inter-laboratory verification (n = 5)

	Fortified Conc. (mg/kg)	Inter-laboratory verification (colistin)							
		Laboratory A		Laboratory B		Laboratory C		Total	
		Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Flatfish	0.075	102	4.64	96.7	0.86	96.7	8.17	98.6	4.56
	0.150	102	8.61	112	0.61	91.8	3.26	102	4.16
	0.300	95.7	10.8	95.7	0.19	85.8	14.3	92.4	8.45
Eel	0.075	85.9	7.06	98.4	0.18	110	5.16	98.0	4.13
	0.150	105	7.51	94.2	0.81	84.7	4.64	94.7	4.32
	0.300	108	8.71	92.4	0.38	83.3	10.2	94.6	6.44
Shrimp	0.075	95.5	9.38	79.5	8.16	103	0.78	92.8	6.11
	0.150	87.6	11.8	76.2	2.76	103	15.1	88.9	9.91
	0.300	92.7	7.21	82.3	8.96	83.9	6.74	86.3	7.64

0.02 mg/kg이었고, 정량한계는 S/N ratio 10 이상으로 결정하여 0.05 mg/kg이었다. 우리나라의 수산물에 대한 콜리스틴 잔류허용기준인 0.15 mg/kg의 1/2 미만으로 본 분석법으로 잔류허용기준 준수여부를 판별하기에 문제가 없을 것으로 판단된다.

Acknowledgement

본 연구는 식품의약품안전처 연구개발과제(15161MFDS665 and 16161MFDS602)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

LC-MS/MS를 이용하여 폴리펩타이드계 동물용의약품인 콜리스틴에 대한 시험법을 확립하여 정량성 및 정밀성을 확보하였으며, 확립된 시험법의 적용성 검증을 위해 국제식품규격위원회 기준에 따라 특이성, 정확성, 직선성, 정밀성, 검출한계, 정량한계 등을 검증하였다. 콜리스틴 표준용액을 잔류허용기준의 농도에 따라 검량선을 작성한 결과 0.99 이상의 직선성을 확인 할 수 있었으며, 본 실험에서의 평균 회수율은 85.9~107%이었다. 또한, 분석오차는 11.8% 이하로 정확성 및 재현성이 우수하였으며, 검출한계는 0.02 mg/kg, 정량한계는 0.05 mg/kg이었다. 또한, 실험실간 교차검증을 통하여 신뢰성을 확보하였다. 확립된 분석법은 양식 수산물 중 잔류할 수 있는 동물용의약품인 콜리스틴에 대한 안전관리에 활용 할 수 있을 것으로 판단된다.

References

1. J. A. Orwa, A. V. Gerven, E. Roets, J. Hoogmartens: Validation of a Liquid Chromatography Method for Analysis of Colistin Sulphate. Chromatographia, **51**, No. 7/8 (2000).
2. V. Pintado, Lucía García San Miguel, G. Fabio, M. Blanca, C. Javier, F. Jesu´s, M. D. Pilar, M. Santiago: Intravenous colistin sulphomethate sodium for therapy of infections due to multi-drug-resistant gram-negative bacteria. *J. of Infection*, **56**, 185-190 (2008).
3. C. Boudewijn, C. Marco, B. Keith, G. Kari, G. Kornelia, H. Anja, J. Helen, L. Ernesto, L. N. Antonio, *et al.*: Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int. J. of Antimicrob. Agents*, **46**, 297-306 (2015).
4. Y. H. Choi, MD.: Treatment of drug resistant bacteria: new bugs, old drugs, and new therapeutic approaches. *J. Korean Med. Assoc*., **57(10)**, 837-844 (2014).
5. M. Joseph B and L. Shawn: From Pigs to Patients: Transmissible, Single Gene-mediated Resistandce to Colistin. *J. of Med. Microbiol. & Diagnosis*, **5:1** (2016).
6. Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW), Available from: http://www.mhlw.go.jp/english/. Accessed (2002).
7. European Medicines Evaluation Agency (EMEA), Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/. Accessed (2006).
8. Ministry of Helth and Welfare: Korea National Health and Nutrition Examination Survey, Available from: http://knhanes.cdc.go.kr/. Accessed (2014).
9. Codex guidelines for the establishment of a regulatory program for control of veterinary drug residues in foods. CAC/GL **16**, 1-46 (1993).
10. Codex Alimentarius Committee. Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safty assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL **71** (2012).
11. Korean Food Standards Codex: Ministry of Food and Drug Safety (2016).
12. Jian Li, W. M. Robert, L. N. Roger, J. D. Turnidge and Kingsley Coulthard: Stability of Colistin and Colistin Methanesulfonate in Aqueous Media and Plasma as Determined

by High-Performance Liquid Chromatography. Antimicrob. Agents and Chemother., **47**, 1364-1370 (2003).
13. C. H. W. Eric, C. Ho, W. M. S. Della, Y. C. Wong: Detection of residual bacitracin A, colistin A, and colistin B in milk and animal tissues by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal. Bioanal. Chem., **385**, 181-188 (2006).
14. M. Zheng, J. Wang, P. G. Jacobus, W. M. Robert: Determination of colistin in human plasma, urine and other biological samples using LC-MS/MS. *J. of chromatography B*, **826**, 205-212 (2008).
15. Y. Xu, X. Tian, C. Ren, H. Huang, X. Zhang, X. Gong, H. Liu, Z. Yu, L. Zhang: Analysis of colistin A and B in fishery products by ultra performance liquid chromatography with positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. of chromatography B*, **899**, 14-20 (2012).
16. M. Thomas, T. Fréderic, G. Céline, C. Natascia, W. Stéphane, G. Monia, C. Chantal, B. Thierry, C. William, M. Oscar, A. L. Decosterd: High-throughput hydrophilic interaction chromatography coupled totandem mass spectrometry for the optimized quantification of theanti-Gram-negatives antibiotic colistin A/B and its pro-drugcolistimethate. *J. of chromatography A*, **1369**, 52-63 (2014).
17. K. Matti, UPPSALA UNIVERSITET: Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine. 889.
18. EMA: Use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. EUROPEAN MEDICINES AGENCY, **755938** (2012).