

LC-MS/MS를 이용한 벌꿀 중 스트렙토마이신 분석

심영은 · 명승운*

경기대학교 이과대학 화학과
(2008. 8. 1. 접수. 2008. 10. 9. 승인)

Analysis of streptomycin in honey by LC-MS/MS

Young-Eun Shim and Seung-Woon Myung*

Dept. of Chemistry, Kyonggi University, 94-6 Yui-dong, Yeongtong-gu, Suwon, 443-760 Korea
(Received August 1, 2008, Accepted October 9, 2008)

요 약: 스트렙토마이신은 아미노글리코사이드계 항생제중의 하나로써 가축, 가금류의 질병 치료와 예방에 널리 사용되고 있다. 국내에서는 양봉용으로는 허가되어 있지 않지만 일부 국가에서는 유럽형 부저병과 같은 세균성 벌꿀 질병의 치료에 사용되는 것으로 알려져 있다. LC-MS/MS를 이용하여 벌꿀 중에 잔류하는 스트렙토마이신(streptomycin)을 분석하는 방법을 확립하였다. 확립된 분석법은 재현성과 정밀성을 높이고 미량까지 검출할 수 있도록 회수율을 높이기 위하여 정제 및 추출과정을 최적화 하였으며, 효과적인 분석을 위해서 액체 크로마토그래피(HPLC)와 텐덤 질량분석법(tandem mass spectrometry)의 조건들을 최적화하였다. 확립된 방법은 5.0~50.0 ug/kg 농도에서 5.5~14%인 정밀성(RSD)을 나타내었으며, bias로써 -10.0~8.0%의 정확도를 나타내었다. 한편, 스트렙토마이신을 벌꿀 공 시료에 10.0 ug/kg의 농도로 소량첨가한 후 얻은 회수율은 74%이었고, 정량한계(LOQ)는 0.75 ug/kg이었다. 확립된 벌꿀 중 스트렙토마이신 분석법을 이용하여 실제 벌꿀시료에 적용한 결과 몇몇 시료에서 소량의 스트렙토마이신이 검출되었다.

Abstract: Streptomycin, which is one of aminoglycoside antibiotics, has been widely used in the rearing of food-producing animals to prevent and treat diseases in cattle, pigs and poultry. Although not licensed in South Korea, streptomycin has also been used for the treatment of bacterial honeybee disease, such as European foulbrood in Third World countries. A reliable and effective method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed for the determination of streptomycin in honey. A established method was optimized the clean-up and extraction procedure for the trace determination, good precision and accuracy. And the chromatographic and tandem mass spectrometric parameters were also optimized. The precision (RSD) and accuracy (bias) in the concentration range of 5.0~50.0 ug/kg were 5.5~14% and -10.0~8.0%, respectively. Limit of detection was 0.75 ug/kg and recovery of streptomycin spiked at level of 10 ug/kg in honey was 74%. The established and validated method was applied to determine streptomycin in honey which was on the market.

Key words : Streptomycin, antibiotics, LC-MS/MS, honey

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-249-9647 Fax : +82-(0)31-249-9647

E-mail : swmyung@kgu.ac.kr

1. 서 론

스트렙토마이신은 아미노글리코사이드계 항생제로 세균성 질병치료에 매우 중요하며, 그람-음성(Gram-negative) 생물체 감염의 치료에 널리 사용되는 항생제이기 때문에 꿀벌과 같이 식품을 생산하는 동물의 사육에서 질병 예방과 치료에 광범위하게 사용되고 있다. 스트렙토마이신은 꿀벌의 유럽 부저병(European Foulbrood)와 같은 질병 치료에 사용하는 것으로 알려져 있다. 또한, 감귤, 매실, 참다래, 복숭아, 고추, 담배, 배추에 세균성 병해를 방지하기 위하여 살충제로 사용등록 되어 있으며, 외국에서도 과일류, 채소류, 담배, 면화 등의 세균성 질병 치료를 위하여 허가되어 사용되고 있으나, 우리나라뿐만 아니라 EU, 미국, 일본 등에서도 양봉용으로 허가되어 있지 않다.¹ 따라서, 현재 우리나라에서 양봉용으로 허가되어 있지 않은 동물용의약품에 대해서 최대잔류허용기준(MRL)을 설정할 수 없기 때문에 극미량 분석과 정확한 정성확인이 필요한 실정이다.

동물성 의약품의 축산제품 잔류성과 같은 식품 위생에 대한 관심은 고조되고 있는 실정이다.² 잔류하는 항생제는 소비자들에게 알리지 반응을 일으키거나 내성 박테리아를 생성하는 등의 영향을 미칠 수도 있다.³⁻⁵

스트렙토마이신은 UV 흡수 발색단이 강하지 않기 때문에 대부분 HPLC에서 post-column 유도체화 후 형광검출기로 분석하는 것이 일반적인 방법이었으며,^{6,7} ELSD와 같은 다른 검출기를 사용한 예도 있다.⁸ 하지만, 최근에는 텐텀 질량분석법(MS/MS)이 HPLC-형광검출기(FLD) 방법을 대체하는 추세이다.⁹⁻¹¹ 텐텀 질량분석법은 ESI (electrospray ionization) 모드를 사용하여 이온화 효율을 증가시키고 MRM (multiple reaction monitoring)을 사용함으로써 신호 대 바탕비가 향상시킬 수 있다. 따라서, 검출감과 선택성이 증가하여 수 ppb (ng/g) 수준의 극미량으로 존재하는 스트렙토마이신 분석시에 나타날 수 있는 거짓양성(false-positive) 결과를 줄일 수 있는 장점이 있으며, 형광 검출기에서와 같은 유도체화 과정도 필요 없다. 이들 논문에서는 정량한계(LOQ) 또는 검출한계(LOD)가 2 ng/g이고 정밀도(R.S.D.)도 10%를 나타내고 있다.^{1, 10}

가장 최근에는 LC/MS/MS를 사용하여 벌꿀중에 잔류하는 17종의 항생제를 분석하는 방법이 소개되고 있지만 여러 약물들을 동시에 분석하기 위한 방법

에 초점을 두고 있으므로 시료 전처리 방법이 복잡하고 크로마토그램도 정량하기에는 부적합할 정도의 leading peak을 나타내고 있다.¹²

벌꿀 시료의 매트릭스는 매우 복잡하기 때문에 효과적으로 추출하고 크로마토그래피 분리를 하고 신호 대 바탕비(S/N)를 높이기 위해서는 HPLC로 분석하기 전에 정제 과정을 거쳐야 한다.

본 논문에서는 국내에서 양봉에 허가 되어있지 않은 스트렙토마이신을 극미량까지 정성 및 정량확인이 가능하도록 기존의 고체상(SPE) 시료 전처리 방법을 개선한 후 LC-MS/MS로 분석하는 방법에 대한 유효성 확인 시험을 실시하였다. 확립된 시험방법을 국내에서 시판되는 벌꿀시료에 적용한 예를 보여 줌으로써 벌꿀중의 스트렙토마이신 확인을 위한 시험 방법으로 활용될 수 있으며, 벌꿀 중에서 잔류 실태를 파악함으로써 안전관리 방향을 설정하는데 활용할 수 있을 것이다.

2. 실험방법

2.1. 기구

시료의 혼합을 위해 사용된 shaker는 EYELA사(Tokyo, Japan)의 Multi Shaker MMS 제품을 사용하였으며, 시료 농축을 위한 회전 증발기도 EYELA사(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. 시린지 필터는 National Scientific사(Rockwood, TN, USA)의 0.45 μm 크기를 사용하였으며, 초음파 장치는 NEURON FIT사(Tokyo, Japan)의 JAC Ultrasonic 4020 제품, 고체상 추출을 위한 진공감압장치로는 Supelco사(Bellefonte, PA, USA)의 SPE vacuum manifold 제품을 사용하였다. 고체상 추출 카트리지는 Oasis HLB (hydrophilic lipophilic balance, 60 mg, 3 cc) 카트리지는 Waters사(Milford, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2.2. 시약

스트렙토마이신(streptomycin) 표준품은 Riedel-deHaen사(Seelze, Germany)의 고순도 시약을 사용하였고, 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3차 증류수를 사용하였다. 표준품은 증류수를 이용하여 1 mg/mL 농도로 만든 후 4°C 냉장 보관하였고, 이 용액을 증류수로 희석하여 사용하였다.

메탄올, 물, 아세트나이트릴은 J.T. Baker사(Phillipsburg, NJ, USA)의 HPLC급 고순도 용매를 사용하였

고, 아세트산과 이온쌍 시약으로 사용된 1-heptanesulfonic acid는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)제 품을 사용하였다.

2.3. 분석기기

분석 장비인 LC-MS/MS는 시료 자동주입기(Agilent 1200 Series G1313A Autosampler)가 장착된 Agilent 사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1200 Series HPLC와 결합된 Agilent 6410 Triple-Quadrupole 텐덱 질량분석기이었다. 사용된 HPLC 칼럼은 Zorbax Rx-SIL (2.1×150 mm (length), 5 μm particle size)이었으며, 유량은 0.3 mL/min, 주입량은 2 μL이었다. HPLC의 이동상은 10 mM ammonium acetate 95%에 아세토 나이트릴(ACN)이 5%, formic acid가 0.2% 함유된 이동상 A와 아세토나이트릴 95%에 10 mM ammonium acetate 5%와 formic acid 0.2%가 함유된 이동상 B를 Table 1의 기울기 용매 조건으로 사용하였다.

사용된 질량분석기는 3중 사중극자형(triple qua-

Table 1. Gradient parameters of HPLC mobile phase

Time(min)	A (%)	B (%)	Flow (mL/min)
0	20	80	0.3
2	20	80	-
6	100	0	-
8	100	0	0.5
8.1	20	80	0.5
10	20	80	0.3

drupole) 형태를 사용하였으며 이온화 방식은 전기분 무 방식(electrospray ionization, ESI)의 양이온 모드를 사용하였고 MRM (multiple reaction monitoring) 방식으로 검출하였으며, nebulizing gas (N₂)의 온도는 350°C, 유량은 8 L/min, collision voltage는 35 V이었다.

2.4. 시료 전처리

벌꿀 시료 5 g에 물 20 mL를 넣고 진탕하여 충분

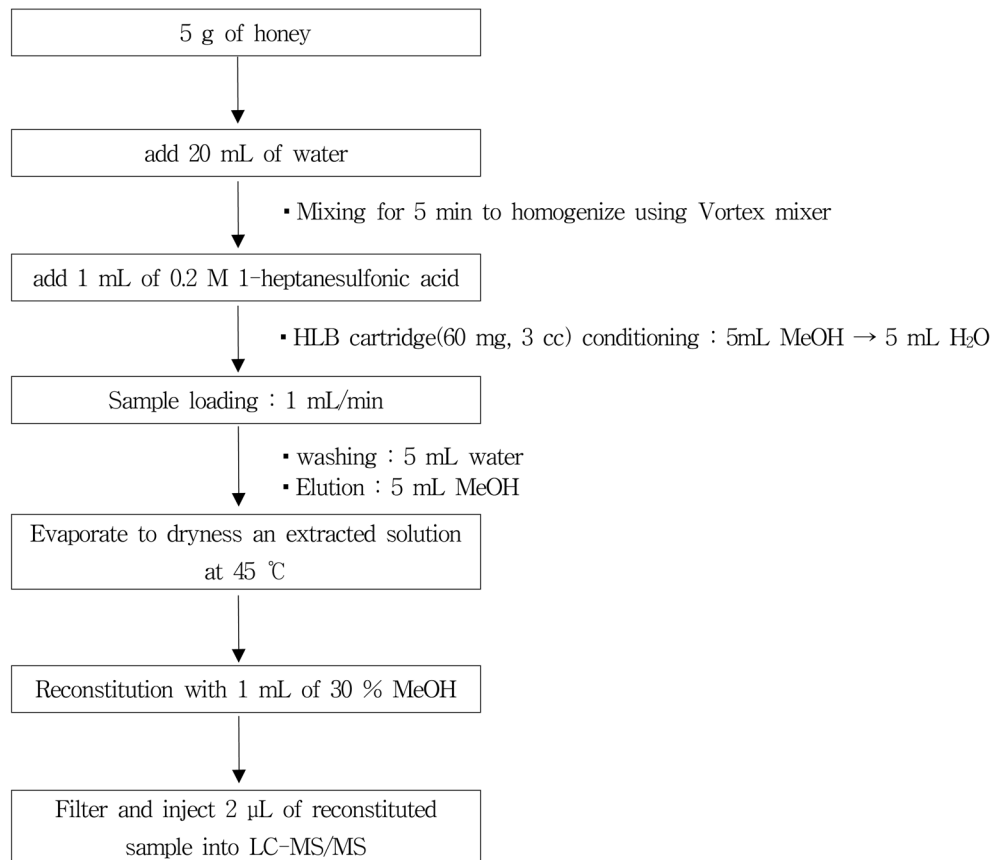


Fig. 1. Schematic diagram of sample preparation for the analysis of streptomycin in the honey by LC-MS/MS.

히 녹인 후 vortexing해서 균질화를 시키 후, 0.2 M 1-heptanesulfonic acid 1 mL을 첨가하였는데, 이는 streptomycin-sulfonate 이온쌍을 생성함으로써 스트렙토마이신의 극성을 감소시켜서 추출효율을 높이기 위한 이온쌍 시약이다. 이 시료 용액을 미리 메탄올 5 mL와 물 5 mL로 활성화시킨 HLB (hydrophilic lipophilic balance) 카트리지(60 mg, 3 cc)에 loading시켜서 흡착시키고 증류수로 세척한 후 메탄올 5 mL로 용출한다. 용출액은 45°C 이하의 수욕 중에서 감압하여 농축하고 잔류물은 30% 메탄올 1 mL에 녹인 후 시린지 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 만든 후 용액 2 uL를 LC-MS/MS에 주입한다(Fig. 1).

2.5. 검량선 작성

검량선을 작성하기 위하여 스트렙토마이신이 검출되지 않은 벌꿀 공 시료(blank sample)에 스트렙토마이신의 농도가 0.75, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 50.0 µg/kg이 되도록 spike한 후 2.4의 시료 전처리방법과 동일한 방법으로 처리한 후 LC-MS/MS에 주입하여 크로마토그램을 얻은 후 검량곡선을 작성하였다.

2.6. 유효성 확인 시험

스트렙토마이신을 spike한 벌꿀 시료 5 g을 분석하였을 때 정량한계(limit of quantitation, LOQ) 농도는 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 하고 정밀성이 20% 이하이고 정확성은 bias로써 ±20%인 조건을 만족하는 농도로 정하였다.

LC-MS/MS를 이용한 벌꿀 시료에 대한 스트렙토마이신 분석법의 정확성과 정밀성을 평가하기 위하여, 시료 중 스트렙토마이신의 농도가 5.0, 20.0, 50.0 µg/kg이 되도록 spike한 5 g의 벌꿀 시료를 각 농도에 대해서 3회 시험하였다.

절대 회수율(absolute recovery)을 평가하기 위하여, 시료 중 스트렙토마이신의 농도가 10 µg/kg이 되도록 spike한 벌꿀 시료 5 g을 위의 시료 전처리 방법으로 분석하고, 이와 동일한 농도의 스트렙토마이신 표준물질을 시료 전처리를 거치지 않고 직접 동일 조건의 LC-MS/MS에서 분석하여 피크 면적비를 비교하여 회수율을 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 스트렙토마이신의 LC-MS/MS

HPLC 칼럼의 고정상으로는 역상 칼럼인 Zorbax

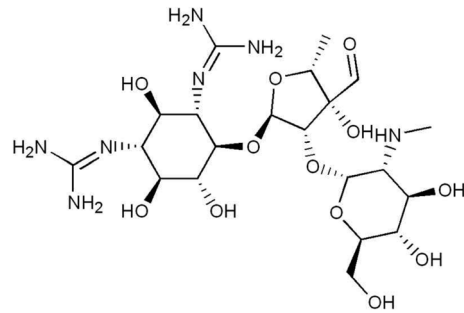


Fig. 2. Chemical structure of streptomycin (MW : 581.57).

Rx-SIL로써 내경 2.1 mm, 길이 150 mm, 입자크기가 5 µm의 칼럼을 선택하였으며, 이동상의 유량은 0.3 mL/min로 흘려주었고 칼럼 온도는 실온에서 양호한 결과를 나타내었다.

스트렙토마이신의 구조는 Fig. 2와 같으며 분자량이 581.57이며 극성이 큰 -OH와 -NH₂ 기능기가 많이 존재하므로 극성이 매우 크며 크로마토그래피 분석이 쉽지 않은 물질이다.

스트렙토마이신 표준물질을 대상으로 HPLC 칼럼을 통과시키지 않고 직접 질량분석기로 주입한 후 ESI와 APCI(atmospheric pressure chemical ionization) 이온화 방법 중에서 이온화가 효과적이며 감도가 좋은 조건을 비교한 결과, ESI 방식에서 검출이 용이하였다. 또한, ESI의 양이온 (+) 모드와 음이온 (-) 모드를 비교한 결과 양이온 모드에서 훨씬 더 좋은 감도를 보였다.

분석의 선택성과 검출감도를 향상시키기 위하여 MS/MS 분석시 MRM 모드로 분석하였다. 이 때 각 성분별로 collision cell에서 collision energy강도를 조절하여 생성 이온(product ion)의 감응도가 크도록 조정하였으며, 그 결과 최적의 precursor/product ion pair를 선정하였다.

텐템 질량분석을 위해서 먼저 full scan 모드에서 스트렙토마이신의 스펙트럼을 얻었다(Fig. 3의 상단 스펙트럼). 양이온 모드에서 [M+H]⁺인 m/z 582가 base ion으로 검출되어 이를 선구이온(precursor ion)으로 선택하였으며, product ion scan을 통하여 m/z 176, 221, 246, 263, 407 이온이 특성이온을 나타내었으므로 이들을 정성이온으로 선정하였다(Fig. 3의 하단 스펙트럼).

스트렙토마이신을 확립된 크로마토그래피 조건에서 HPLC를 통과시킨 후 ESI-MS/MS의 MRM 방식으로 분석한 결과 스트렙토마이신의 머무름 시간은 약 6.7분이었으며, TIC (total ion chromatogram)과 EIC (extracted

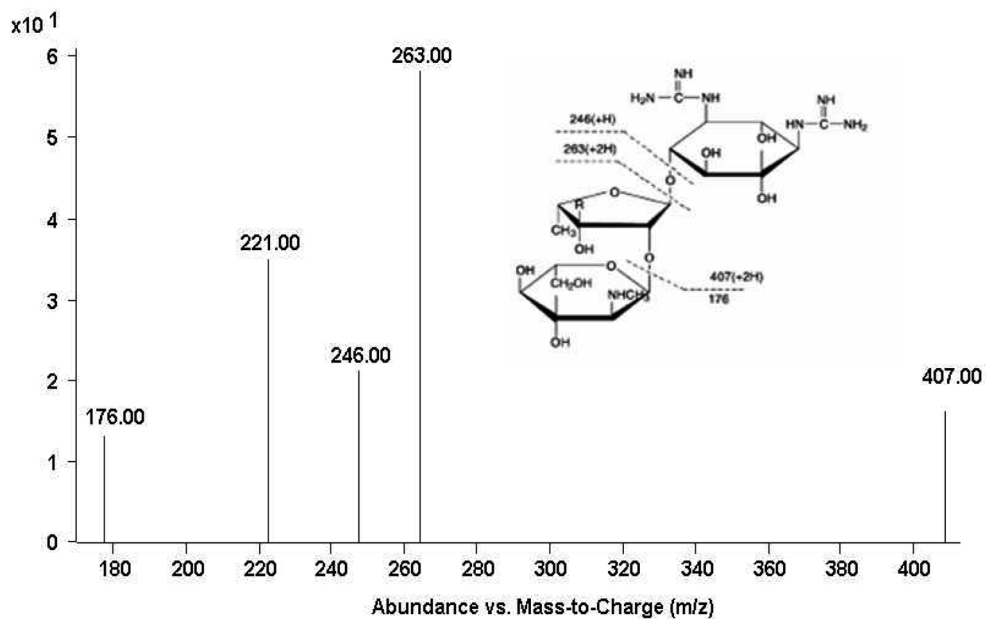
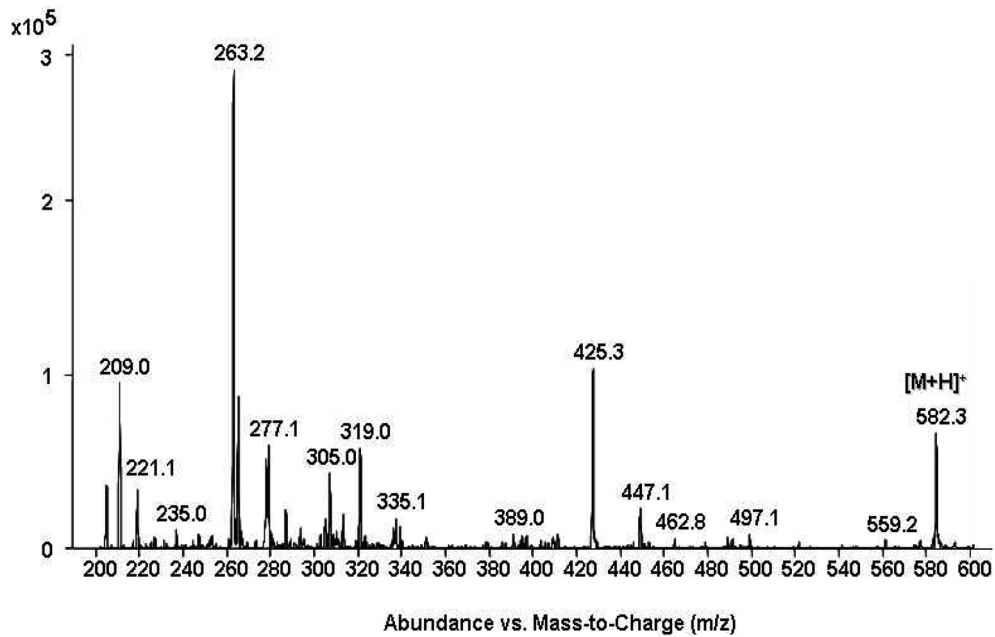


Fig. 3. Electrospray positive ion Q1 mass spectrum (upper) and product ion mass spectrum (lower) used in MRM for streptomycin (lower).

ion chromatogram)은 Fig. 4에 나타내었다.

3.2. 유효성 확인

스트렙토마이신의 머무름 시간은 각각 약 6.7분으

로 다른 성분들로부터 간섭을 받지 않고 양호하게 분리되었다(Fig. 4).

스트렙토마이신이 검출되지 않은 벌꿀 시료에 0.75, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로

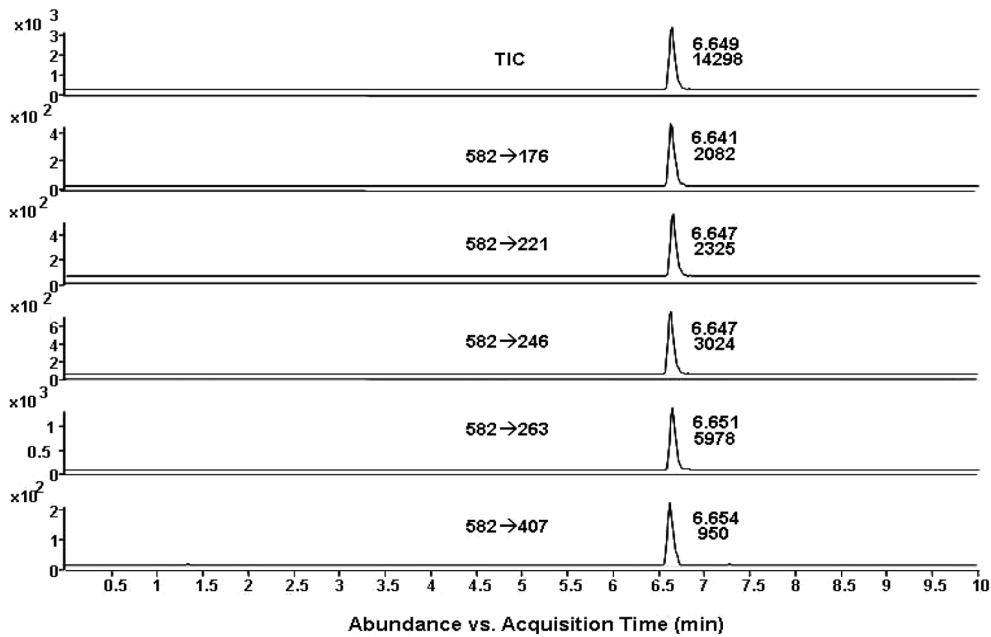


Fig. 4. Representative LC-MS/MS TIC and extracted ion chromatograms (EIC) of authentic standard streptomycin (10 ng/g).

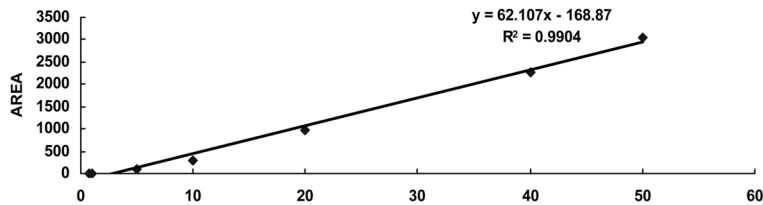


Fig. 5. Calibration curve of streptomycin in honey.

스트렙토마이신을 첨가한 후 확립된 시료 전처리방법에 따라서 전처리한 후 LC-MS/MS로 분석한 피크 면적으로부터 검량선을 작성한 결과 상관계수 (coefficient of correlation, r^2)는 0.9904로 CODEX 기준 ($r^2 > 0.95$)에 적합한 직선성을 보였다(Fig. 5).

스트렙토마이신이 검출되지 않은 벌꿀 시료 (공시료)에 예측되는 정량한계 농도 수준으로 스트렙토마이신을 spike한 벌꿀 시료 5 g을 분석하였을 때 정량한계 (LOQ) 농도는 신호대 잡음비(S/N ratio)가 10 이상이며 정밀성을 표현하는 상대표준편차(RSD)가 20% 이하이고 정확성을 나타내는 bias가 $\pm 20\%$ 인 조건을 만족하는 농도로 하였을 때 0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 가 정량한계로 정하였다.

벌꿀 시료에 대한 스트렙토마이신 분석법의 정밀성과 정확성을 평가하기 위하여, 스트렙토마이신의 농도가 5.0, 20.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이 되도록 spike한 5 g의 벌꿀 시료를 처리하여 분석하였으며 각 농도에 대하

여 3번 반복 실험하였다.

상대표준편차가 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서는 8.5%, 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서는 5.5%, 그리고 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서는 14.0%를 나타냄으로 모두 20%이내의 좋은 정밀성을 나타내었다.

정확성은 bias로 나타내었으며, 이는 검정곡선에 의하여 기지의 농도 (X_a)에서 측정된 농도(X_m)의 평균값을 뺀 후 기지의 농도 (X_a)로 나눈 비의 백분율 (%) (Bias = $(X_a - X_m) / X_a \times 100$)로서 구하였으며, 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서는 -10.0%, 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서는 -8.0%, 그리고

Table 2. Precision and accuracy for assay of streptomycin in honey (n=3)

Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)	Bias (%)
5.0	8.5	-10.0
20.0	5.5	-8.0
50.0	14.0	3.8

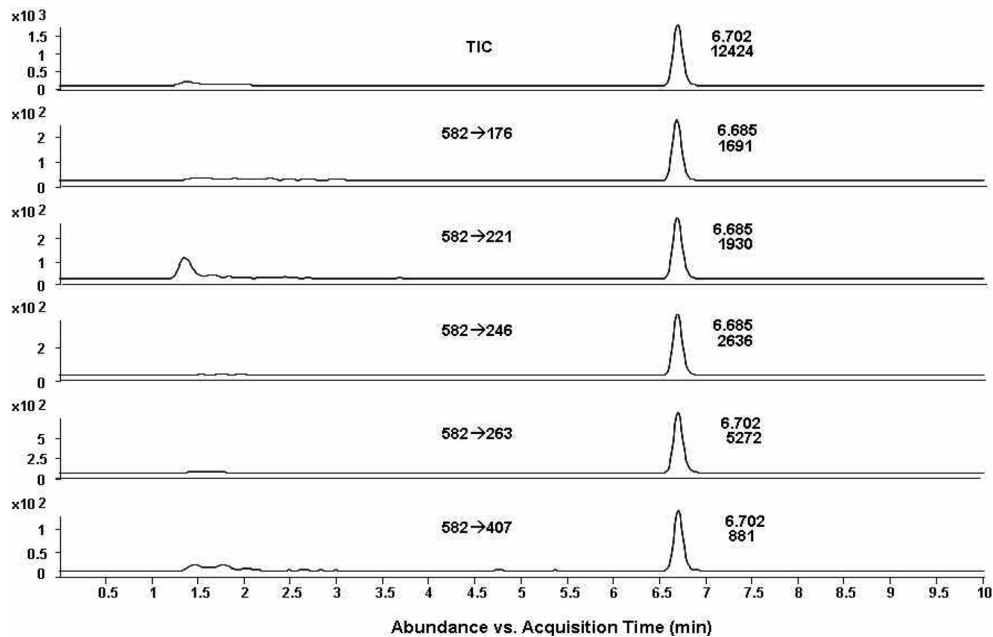


Fig. 6. Representative LC-MS/MS TIC and extracted ion chromatograms (EIC) of streptomycin on the marketing honey sample (0.09 mg/kg).

50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서는 3.8%를 나타내었다(Table 2).

확립된 분석법의 벌꿀 시료에 대한 스트렙토마이신의 회수율을 평가하기 위하여, 시료 중 스트렙토마이신의 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이 되도록 spike한 벌꿀 시료 5 g을 “2.4 시료전처리”에 기술된 절차에 따라 분석하였고, 이와 동일한 농도의 스트렙토마이신 표준용액을 시료 전처리 과정 없이 직접 LC-MS/MS에서 분석한 결과의 피크면적을 비교한 결과 3회 반복 실험에서 평균 회수율은 74%이었다.

3.3. 실제 시료 분석

국내에서 판매 중에 있는 실제 벌꿀시료를 분석한 크로마토그램은 Fig. 6에 나타내었다. 표준물질만을 주입했을 때와 동일하게 6.7분에서 검출되었으며 정성 기준 이온(criteria ions)들도 그들의 상대적 크기가 표준물질과 거의 동일하였다.

4. 결 론

벌꿀 중에 잔류하는 스트렙토마이신을 LC-MS/MS로 분석하기 위해서 HLB 카트리지를 사용한 고체상 추출법으로 크로마토그래피 분리에 방해되는 매트릭스를 효과적으로 제거함으로써 스트렙토마이신을 양

호한 추출율, 정밀도, 정확도를 나타내는 분석방법을 확립하였다. 5.0, 20.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 농도에서 정밀도는 5.5~14%, 정확도는 bias로써 -10.0~3.8%를 나타내었고 정량한계(LOQ)는 0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다.

기존의 분석방법^{1,10,12}과는 차별화되는 정량 및 정성 확인이 가능한 좋은 크로마토그램을 나타내는 기기분석 조건 확립과 극미량까지 좋은 정밀도 및 정확도를 유지하면서 측정할 수 있는 방법을 확립하였다.

확립된 분석방법은 벌꿀 중에 잔류하는 스트렙토마이신을 효과적으로 분석하는데 이용하였으며, 벌꿀의 안전 관리에 이용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 연구용역과제인 “벌꿀 중 항생제 분석법 개발 및 모니터링”사업의 지원으로 이루어진 것이며, 경기대학교 특성화사업단의 기자재를 사용하였음.

참고문헌

1. M. van Bruijnsvoort, S. J. M. Ottink, K. M. Jonker and E. de Boer, *J. Chromatogr. A*, **1058**, 137-142(2004).

2. M. Horie, H. Saito, T. Natori, J. Nagata and H. Nakazawa, *J. Liquid Chromatogr. Related Tech.*, **27**, 863-874(2005).
3. J. P. Ferguson, G. A. Baxter, J. D. G. McEvoy, S. Stead, E. Rawlingsc and M. Sharman, *Analyst*, **127**, 951-956 (2002).
4. S. B. Levy, "The Antibiotic Paradox", Plenum Press, New York, 1992.
5. D. G. Tinkelman and S. A. Bock, *Ann. Allergy*, **53**, 243-244(1984).
6. H. Kubo, Y. Kobayashi and T. Kinoshita, *Anal. Chem.*, **58**, 2653-2655(1986).
7. P. Viñasa, N. Balsalobrea and M. H.-Córdoba, *Talanta*, **72**, 808-812(2007).
8. A. K. Sarri, N. C. Megoulas and M. A. Koupparis, *J. Chromatogr. A*, **1122**, 275-278(2006).
9. M. Preu and M. Petz, *J. Chromatogr. A.*, **840**, 81-91 (1999).
10. A. Kaufmann, P. Butcher and P. Kölbener, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **22**, 2575-2577(2003).
11. S. Bogialli, R. Curini, A. D. Corcia, A. Lagana, M. Mele and M. Nazzari, *J. Chromatogr. A.*, 1067, 93-100 (2005).
12. M. Lopez, J. Pettis, I. Smith and P.-S. Chu, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1553-1559(2008).