

이온쌍 시약 직접 주입법을 활용한 육류 및 세포배양액 내 아미노글리코사이드계 항생제 분석

박경호¹ · 구송이¹ · 박건우¹ · 김종집¹ · 이종수¹ · 김상구¹ · 이상윤¹ · 전향숙^{2*}

¹(주)풀무원 풀무원기술원 식품안전실

²중앙대학교 식품안전규제과학과

Analysis of Aminoglycoside Antibiotics in Meat and Cell Culture Medium Coupled with Direct Injection of an Ion-pairing Reagent

Kyung-Ho Park¹, Song-Yi Gu¹, Geon-Woo Park¹, Jong-Jib Kim¹, Jong-soo Lee¹,
Sang-Gu Kim¹, Sang-Yun Lee¹, Hyang Sook Chun^{2*}

¹Food Safety Center, Food Safety division, Pulmuone Co. Ltd., Heungdeok-gu, Cheongju, Korea

²Department of Food Safety and Regulatory Science, Chung-Ang University, Anseong, Korea

(Received August 29, 2023/Revised September 22, 2023/Accepted October 4, 2023)

ABSTRACT - Aminoglycoside antibiotics, also known as aminoglycosides (AGs), are veterinary drugs effective against a wide range of gram-negative and gram-positive bacteria. Owing to their recent use in cultured meats, it has become essential to establish an analytical method for safety management. AGs are highly polar compounds, and ion-pair reagents (IPRs) are used to ensure component separation. Owing to the high possibility of potential mechanical problems resulting from IPR addition to the mobile phase, an analytical method in which IPRs are added directly to the vial was explored. In this study, methods for analyzing 10 AGs via liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with the addition of two IPRs were validated for selectivity, detection limit, quantitation limit, recovery, and precision. The detection limit was 0.0001–0.0038 mg/kg, the quantification limit was 0.004–0.011 mg/kg, and the linearity (R^2) within the concentration range of 0.01–0.5 mg/kg was over 0.99. Recovery and precision (expressed as relative standard deviation) evaluated in the two matrices (beef and cell culture media) ranged from 70.7% to 120.6% and 0.2% to 24.7%, respectively. The validated AG analytical method was then applied to 15 meats prepared from chicken, beef, and pork, and 6 culture media and additives used in cultured meat. No AGs were detected in any of the 15 meats distributed in Korea; however, streptomycin and dihydrostreptomycin were detected at levels ranging from 695.85 to 1152.71 mg/kg and 6.35 to 11.11 mg/kg, respectively, in the culture media additives. The LC-MS/MS method coupled with direct addition of IPRs to the vial can provide useful basic data for AG analysis and safety evaluation of meats as well as culture media and additives for cultured meats.

Key words: Aminoglycosides, Ion-pair reagent, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Meat, Culture media and additives for cultured meat.

육류는 단백질 공급원으로 인체에 필요한 다양한 영양분을 충분히 제공한다^{1,2}). 지난 수십 년 동안 육류를 포함한 다양한 동물성 제품에 대한 소비자의 선호도는 점진적

으로 증가해왔고 앞으로도 계속될 전망이다³). 하지만 환경 문제와 식품 안전 등 축산 산업에서 지속적으로 발생하는 문제들이 있다⁴). 또한 비윤리적으로 도축된 동물로 만들어진 축산물이 인간과 공중 보건 모두에 부정적인 영향을 주는 가능성도 꾸준히 제기되고 있다⁵). 이러한 문제를 해결하기 위한 대체 식품에 대한 활발한 연구가 이루어지며, 최근 다양한 대체 육류 제품이 출시되고 있다^{6,7}).

배양육(cultured meat)은 대체 육류의 한 종류로 실험실 내 세포 배양으로 생산되어, *in vivo* meat, synthetic meat, artificial meat, lab-grown meat 등으로 불린다⁸). 배양육은

*Correspondence to: Hyang-Sook Chun, School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea
Phone: +82-31-670-3290, Fax: +82-31-676-2102
Email: hschun@cau.ac.kr

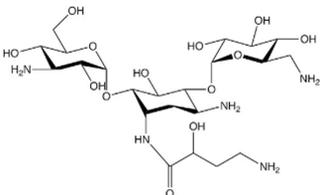
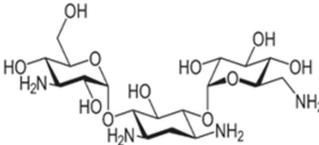
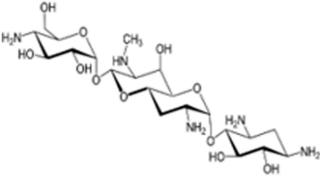
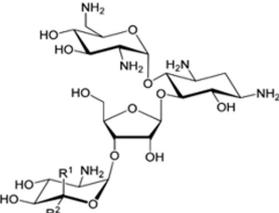
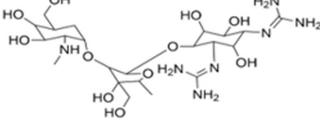
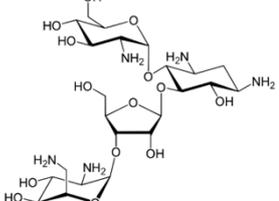
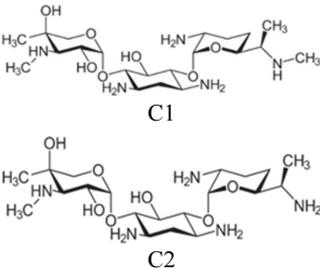
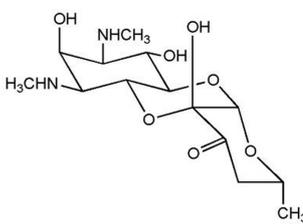
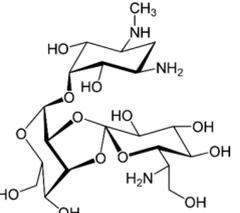
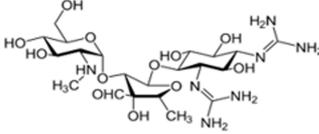
Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

크게 2단계 생산과정을 통해 만들어지는데, 자가 조직화 (self-organization) 및 스캐폴딩(scaffolding)이다⁹⁻¹¹⁾. 첫번째 단계인 자가 조직화 과정에서 동물 근육 조직을 이식하여 구조화된 고기를 생산하고, 다음 단계인 스캐폴딩 과정 동안 배양 세포는 스캐폴드 내에서 성장하고 배양 배지에서 증식한다¹²⁾. 증식된 세포는 근섬유와 같은 생성물로 분화되며 배양육이 만들어지는데¹²⁾, 배양배지에서 증식되는 과정에서 원하는 세포의 성장은 돕고 박테리아와 곰팡이, 바이러스 등 유해물질의 성장은 막기 위해 항생제 사용이 필수적이다¹³⁾. 배양육 생산 시 스트렙토마이신과 겐타마이신 등 아미노글리코사이드 계열 항생제(aminoglycosides, AGs)

와 함께, 세포 성장과 유지를 촉진하기 위한 호르몬과 기타 성장 인자도 사용된다고 보고되었다¹⁴⁾.

AGs는 그람 음성 및 양성 박테리아에 광범위하게 작용하는 동물용의약품으로¹⁵⁾, 극성이 높아(log Kow<-3) 일반적인 분석법으로 분석이 어려워 가장 적게 분석되는 물질이다^{16,17)}. 이러한 분석법의 한계에도 불구하고 AGs는 육류, 우유, 꿀 등 여러 식품에서 빈번하게 검출되어 개선된 분석법에 대한 검토가 필요한 실정이다¹⁸⁾. AGs는 식품의약품안전처 고시 식품의 기준 및 규격에 따라 기준과 시험방법, 잔류허용기준 등이 정의되어 있다¹⁹⁾. 또한 동물용 의약품 등의 오남용 방지와 수입 축산물 안전관리 강화를

Table 1. Structures of aminoglycoside antibiotics, log octanol-water partition coefficient (log Kow)

Compound /log Kow	Aminoglycoside structures	Compound /log Kow	Aminoglycoside structures
Amikacin /-8.8		Kanamycin /-6.7	
Apramycin /-6.5		Neomycin /-3.7	
Dihydrostreptomycin /-7.3		Paromomycin /-8.3	
Gentamicin /-3.1		Spectinomycin /-3.2	
Hygromycin /-6.4		Streptomycin /-7.6	

위한 잔류물질 안전관리체계 개선 요구에 따라 24년 1월 1일 동물용의약품 Positive List System (PLS) 제도가 시행되고, 기준이 없는 육류나 배양육 및 배양배지의 경우에도 불검출 수준인 0.01 mg/kg으로 관리가 필요하다²⁰⁾.

PLS 시행으로 강화된 동물용의약품 관리 기준을 충족할 수 있는 분석법을 보다 효율적으로 활용하기 위해 AGs 시험에 대해 다양한 분석방법을 검토하였다. 친수성 상호 작용 크로마토그래피(Hydrophilic interaction chromatography, HILIC) 컬럼을 이용하여 기존 역상 액체 크로마토그래피 분리에서 잘 유지되지 않는 고극성의 화합물 분리를 기대하였으나, 피크 모양이 고르지 못하고, 이동상의 조성, pH, 버퍼의 농도, 온도의 변화에 따라 선택성과 머무름의 재현성이 떨어지는 단점이 있었다²¹⁾. 이러한 머무름 시간과 재현성의 단점을 보완하고자 이온쌍(ion-pairing) 액체 크로마토그래피 기술을 검토하였고, 대부분의 연구에서 heptafluorobutyric acid (HFBA)²²⁾, perfluoropentanic acid (PFPEA)²³⁾, trichloroacetic acid (TCA), trifluoroacetic acid (TFA)²⁴⁾ 물질을 이동상에 추가하는 방법을 사용하였다. 하지만 이러한 물질은 질량분석기의 신호를 억제하고, 검출 및 정량 한계를 증가시키는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 또한 불소계열의 고농도 이동상용매로 분석하면, 분석기기에 많은 부담을 주어 또다른 문제가 야기될 수 있다²⁶⁾. 이러한 문제를 개선하기 위해 분석 바이알에 ion pairing reagent (IPR)를 직접 첨가하여, LC 컬럼과 질량 분석기에 접촉하는 시간을 줄여 기기에 부담을 줄이는 방법을 검토하였다²⁷⁾. IP는 질량분석기에 영향을 줄이기 위해 alkanesulfonate salts를 검토하였고, 특히 머무름 시간 (retention time, RT) 분리를 위해 탄소 개수가 6-7 사이인 sodium hexanesulfonate, sodium heptanesulfonate를 적용하였다²⁸⁾.

본 연구에서는 AGs 10성분(amikacin, apramycin, dihydro

-streptomycin, gentamicin, hygromycin, kanamycin, neomycin, paromomycin, spectinomycin, streptomycin)에 대하여 바이알 내 IP를 적용한 방법에 대해 검증하였고, LC 이동상용매에 HFBA 시약을 적용한 분석방법을 비교하였다. 검토한 분석법을 토대로 국내 유통 중인 소고기, 돼지고기, 닭고기 등 축산물 15품목과, 배양육에 사용되는 배지 및 배지첨가제 6품목에 대해 AGs 잔류량을 조사하였다. 이를 통해 향후 배양육 제조 시 해당 물질에 대한 분석 도구 및 안전성 확보를 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 표준품

AGs 분석에 사용한 용제는 acetonitrile과 methanol (LC-MS grade, Honeywell, Seelze, Germany), water (LC-MS grade, Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), formic acid (UPLC grade, Thermo Fisher Scientific)을 사용하였다.

AGs 성분 중 paromomycin은 Sigma Aldrich (Buchs, Switzerland)사의 표준물질을 사용하였고, 그 외 성분(amikacin, apramycin, dihydrostreptomycin, gentamicin, hygromycin, kanamycin, neomycin, spectinomycin, streptomycin)은 Chiron (Trondheim, Norway)사의 표준물질을 사용하였다. 분석에 사용된 표준물질의 구조 및 옥탄올-물 분배계수(n-octanol/water partition coefficient)값은 Table 1과 같다. Gentamicin 표준물질은 gentamicin C1, C1a, C2, C2a 성분이 포함되어 있으며, 각각의 표준물질 원액(1000 mg/kg)은 10 mg 분말을 칭량하여 10 mL의 물로 정용 조제하였다.

AGs 전처리 및 IP 첨가에 사용한 시약은 trichloroacetic

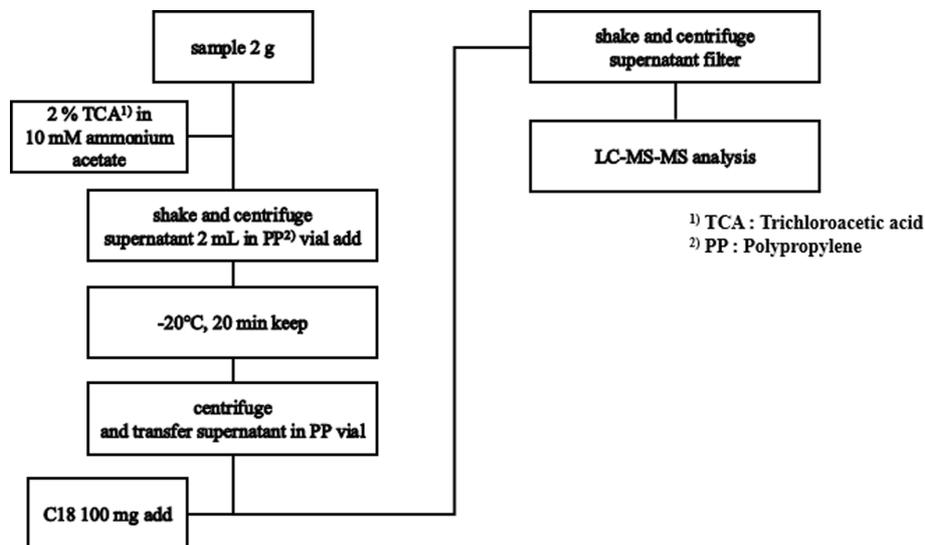


Fig. 1. Schematic diagram of aminoglycoside pretreatment method.

acid(99%, Sigma Aldrich), ammonium acetate (LC-MS grade, Sigma Aldrich), heptafluorobutyric acid (Ion pair reagent for LC-MS, Sigma Aldrich), sodium hexanesulfonate (Ion pair reagent for LC-MS, Sigma Aldrich), sodium heptanesulfonate (Ion pair reagent for LC-MS, Sigma Aldrich), ODS-C18 40–60 μm , 60 Å(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다.

전처리 방법

균질화된 시료 2 g을 50 mL 폴리프로필렌 튜브에 넣고 2% trichloroacetic acid을 함유한 10 mM ammonium acetate 용액 5 mL을 넣고 20분간 진탕한 후 4,000×g로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 2 mL 폴리프로필렌 튜브에 넣고 -20°C에서 20분간 보관한 후 4°C, 20,000×g로 10분간 원심분리하였다. 상층액 전량을 C₁₈ 분말 100 mg이 들어 있는 2 mL 폴리프로필렌 튜브에 넣고 10분간 진탕한 후 4°C, 20,000×g로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 0.2 μm 필터로 여과하여 폴리프로필렌 바이알에 담아 LC-MS-MS를 이용하여 분석하였다. 전반적인 AGs 항생제 분석 방법은 Fig. 1로 나타내었다.

Ion-Pairing 시약 적용방법

이동상 용매에 IP를 추가하는 방법과 바이알에 IP를 직접 첨가하는 2가지 방법을 비교 적용하였다. 이동상 용매에 IP를 추가하는 방법은 이동상 A용액인 5% acetonitrile 용액 중 heptafluorobutyric acid성분이 20 mM 함유하도록 조제하였고, 이동상 B용액인 50% acetonitrile 용액 중 heptafluorobutyric acid이 20 mM 함유하도록 조제하여 적용하였다. 바이알에 IP를 직접 첨가하는 방법은 분석 바이알에 sodium hexanesulfonate과 sodium heptanesulfonate 75 mM 용액을 각각 100 μL 을 첨가하였다.

기기 분석 조건

AGs는 LC-MS-MS를 통해 분석되었고, Shiseido (Tokyo, Japan)사의 Nanospace Nasca 2와 AB Sciex (Framingham, MA, USA)사의 Triple-quadrupole 4500 장비를 사용하였다. 분석용 컬럼은 Imtakt (Kyoto, Japan)사의 Unison UK-C18 column (2.0 mm × 100 mm, 3 μm)을 사용하였고, 각 기기의 분석 조건은 Table 2에, LC-MS-MS의 MRM 조건은 Table 3에 나타내었다.

유효성 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대한 유효성은 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인²⁹⁾에 따라 선택성(selectivity)과 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ), 회수율(recovery) 및 정밀도(precision)를 확인하였다.

Table 2. Analytical condition of LC-MS-MS for aminoglycosides

Instrument																									
LC	Shiseido Nanospace Nasca 2																								
MS-MS	AB Sciex Triple-quadrupole 4500																								
LC condition																									
Column	Imtakt Unison UK-C18 column (2.0 mm × 100 mm, 3 μm)																								
Flow rate	0.3 mL/min																								
Injection volume	10 μL																								
Column temperature	40°C																								
Mobile phase in ion-pairing reagent	A: 5% ACN in 20 mM HFBA B: 50% ACN in 20 mM HFBA																								
Ion-pairing reagent direct injection mobile phase	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in MeOH:ACN(50:50, v:v)																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>Gradient</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>10.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>10.1</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	A (%)	B (%)	0.0	80	20	0.5	80	20	Gradient			9.0	5	95	10.0	5	95	10.1	80	20	15	80	20
Time (min)	A (%)	B (%)																							
0.0	80	20																							
0.5	80	20																							
Gradient																									
9.0	5	95																							
10.0	5	95																							
10.1	80	20																							
15	80	20																							
MS-MS condition																									
Collision gas	N ₂																								
Ionization mode	ESI (positive mode)																								
Electrospray voltage	5000 V																								

AGs 불검출 시료를 기본으로 표준용액을 첨가하는 방법으로 Table 3의 MRM 조건에 따라 비교하여 확인하였다. 직선성은 무처리 시료 시험용액에 표준용액을 첨가 후 3번에 걸쳐 검량선을 작성하여 검토하였다. 검출한계와 정량한계는 국제 의약품규제조사위원회(international council for harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human us, ICH)³⁰⁾에서 제시한 방법을 따라, 검출한계는 $3.3 \times \delta/S$ (δ : The standard deviation of the response, S: The slope of the calibration curve) 식에 대입하여 적용하였으며, 정량한계는 $10 \times \delta/S$ 식에 따라 산출하였다. 회수율과 상대표준편차로 나타낸 정밀도는 AGs가 처리되지 않은 소고기와 배양육에 사용되는 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)에 각각 AGs 10성분의 혼합표준물질을 0.02, 0.1, 0.2 mg/kg 수준으로 처리하여 수행하였으며, 각 3반복 시험을 통해 측정하였다.

Table 3. Mass spectrometry parameters for quantification and confirmation for aminoglycosides

Compound	MRM Transition (m/z)	DP (Volts) ¹⁾	CE (Volts) ²⁾	CXP (Volts) ³⁾
Amikacin	586.4→163.1	80	45	12
	586.4→425.2		30	12
Apramycin	540.3→217.1	80	26	12
	540.3→378.2		16	12
Dihydrostreptomycin	584.2→263.1	140	38	32
	584.2→246.0		46	12
Gentamicin C1	478.3→322.1	100	16	28
	478.3→157.1		36	21
Gentamicin C1a	450.2→322.2	80	24	20
	450.2→159.9		28	11
Gentamicin C2	464.2→322.1	80	19	19
	464.2→160.1		26	20
Gentamicin C2a	464.2→322.1	80	20	26
	464.2→160.1		34	42
Hygromycin	528.3→177.2	100	32	12
	528.3→352.2		33	12
Kanamycin	485.1→163.2	80	35	22
	485.1→324.2		23	14
Neomycin	615.2→293.0	180	35	22
	615.2→161.0		50	18
Paromomycin	616.3→163.1	120	41	12
	616.3→293.1		27	12
Spectinomycin	351.0→333.2	40	27	12
	351.0→207.1		31	14
Streptomycin	582.2→263.1	160	43	16
	582.2→246.0		48	18

¹⁾ DP: Declustering potential, ²⁾ CE: Collision energy, ³⁾ CXP: Collision cell exit potential.

Table 4. The list of tested meat products, cell culture media, and additive

Group	Sample	Specification	Country of origin/brand
Beef	B-1	Cattle	Korea
	B-2	Neck, soup	US
	B-3	Bulgogi, slice	Australia
	B-4	Rump, stewed	Australia
	B-5	ribs, LA	Australia
Pork	P-1	Front leg meat, for bulgogi	Spain
	P-2	Neck for bulgogi	US
	P-3	Belly, grilled	Chile
	P-4	Back bone	Canada
	P-5	Front leg meat	Korea
Chicken	C-1	Chicken	Korea
	C-2	Breast cube meat	Korea
	C-3	Breast, chunks	Korea
	C-4	Whole chicken	Korea
	C-5	Chicken	Korea
Cell culture medium and additive	M-1	Antimycotic solution	Sigma Aldrich
	M-2	Penicillin streptomycin 50X	Welgene
	M-3	Pen strep Gibco	Thermo Fisher Scientific
	M-4	Konckout	Thermo Fisher Scientific
	M-5	CellCor CD MSC	Xcell
	M-6	DMEM	Welgene

시중유통 육류와 배양육에 사용되는 배지 및 배지 첨가제 시료 정보

본 연구에 사용된 소고기, 닭고기, 돼지고기 15품목과 배양육에 사용되는 배지 및 배지 첨가제 6품목은 온라인 쇼핑몰 및 취급 브랜드 회사에 유통되는 품목을 대상으로 하였다. 시료 목록은 Table 4와 같다.

Results and Discussion

Ion-Pairing 방법에 따른 분석법 유효성 검증

본 연구에서는 이동상 용매에 IP를 추가하는 방법과 바이알에 IP를 직접 첨가하는 2가지 방법을 비교 적용하여 유효성 검증을 진행하였고, 두 방법의 직선성, 검출한계, 정량한계를 Table 5에 나타내었다. 이동상 용매에 IP를 추가하는 방법으로 유효성 검증을 진행한 결과 AGs 10성분 모두 0.01-0.5 mg/kg 범위 내의 직선성(R^2)은 1.000-0.997 이상으로 양호하였다. 검출한계의 경우 neomycin 성분이 0.0011 mg/kg 수준으로 10성분 중 가장 낮았으며, hygromycin 성분이 0.0045 mg/kg 수준으로 가장 높았다. 정량한계의 경우 neomycin 성분이 0.0032 mg/kg, hygromycin 성분이 0.0126 mg/kg 수준으로 확인되어, hygromycin을 제외한 9성분 모두 0.01 mg/kg 이하 수준임을 확인하였다.

바이알 내 IP 직접 주입 방법으로 유효성 검증을 진행한 결과 AGs 10성분 모두 0.01-0.5 mg/kg 범위 내의 직선성(R^2)은 0.999-0.991 이상으로 양호하였다. 검출 한계는 neomycin이 0.0001 mg/kg 수준으로 기존의 이동상 용매에 IP 첨가 방법보다 더 낮은 수치를 나타내었으며, amikacin

성분이 0.0038 mg/kg 수준으로 가장 높은 수치를 나타내었다. 정량한계의 경우 검출한계와 마찬가지로 neomycin 성분은 0.0004 mg/kg, amikacin 성분은 0.0115 mg/kg 수준으로 amikacin을 제외한 9성분 모두 0.01 mg/kg 이하 수준으로 확인하였다.

IP를 이동상 용매에 추가하는 방법과 바이알에 직접 첨가하는 방법에 대한 0.01 mg/kg 및 0.5 mg/kg 농도의 크로마토그램을 Table 6에 나타내었다. 두 방법 모두 AGs 10성분이 간섭없이 분리되었고, IP를 이동상에 추가하는 방법과 비교하여 바이알에 직접 추가하는 방법은 저농도에서 베이스라인이 낮음을 확인하였다. 이동상 용매에 IP를 추가하는 방법의 RT는 4.75분에서 10.05분으로 상대적으로 넓게 분리되었고, 바이알에 IP를 직접 첨가하는 방법은 2.06분에서 3.96분으로 이동상 변화에 따라 4분 이내에 검출되었다.

두가지 방법에서 소고기와 배양육에 사용되는 배지(DMEM)에 대해 AGs를 0.02, 0.1, 0.2 mg/kg의 농도로 처리하여 시험법의 회수율을 검토하였고, 3수준 농도에서 회수율은 70-120% 범위로 확인하였다(Table 7). IP를 이동상에 추가하는 방법의 회수율은 70.7-117.6%, 상대표준편차(relative standard deviation, RSD%)는 2.1-19.2%로 나타났으며, DMEM 배지의 경우 회수율은 73.7-117.6%, 상대표준편차는 0.4-20.6%로 확인하였다. 바이알에 IP를 직접 첨가하는 방법에서 소고기 시료의 회수율은 78.6-120.6% 범위이며, 상대표준편차는 1.0-18.1% 수준이었고, DMEM 배지의 경우 72.7-120.1%, 상대표준편차는 0.2-24.7% 범위로 나타났다. 해당 결과는 ‘CODEX 가이드라인(CAC/GL 40)’

Table 5. Linearity, LOD and LOQ of aminoglycosides in two different ion-pairing reagent addition methods

Compounds	Addition method of ion-pairing reagent to mobile phase			Direct addition method of ion-pairing reagent to test vial		
	Linearity (R^2)	LOD ¹⁾ (mg/kg)	LOQ ²⁾ (mg/kg)	Linearity (R^2)	LOD ¹⁾ (mg/kg)	LOQ ²⁾ (mg/kg)
Amikacin	0.999	0.0026	0.0078	0.991	0.0038	0.0115
Apramycin	0.997	0.0041	0.0095	0.998	0.0029	0.0088
Dihydrostreptomycin	0.999	0.0030	0.0087	0.997	0.0003	0.0011
Gentamicin C1	0.998	0.0028	0.0085	0.999	0.0028	0.0084
Gentamicin C1a	0.998	0.0026	0.0078	0.999	0.0030	0.0090
Gentamicin C2&C2a	0.991	0.0031	0.0093	0.999	0.0004	0.0012
Hygromycin	0.999	0.0045	0.0126	0.997	0.0005	0.0014
Kanamycin	0.999	0.0024	0.0073	0.997	0.0002	0.0007
Neomycin	1.000	0.0011	0.0032	0.998	0.0001	0.0004
Paromomycin	0.998	0.0017	0.0051	0.998	0.0004	0.0011
Spectinomycin	0.999	0.0014	0.0041	0.998	0.0004	0.0012
Streptomycin	1.000	0.0030	0.0081	0.999	0.0003	0.0008

¹⁾ LOD: $3.3 \times \delta / S$, limit of detection.

²⁾ LOQ: $10 \times \delta / S$, limit of quantification.

Table 6. Chromatogram of aminoglycosides at concentrations of 0.01 mg/kg and 0.5 mg/kg in two different ion-pairing reagent addition methods

Compound	Addition method of ion-pairing reagent to mobile phase		Direct addition method of ion-pairing reagent to test vial	
	0.01 mg/kg	0.5 mg/kg	0.01 mg/kg	0.5 mg/kg
Amikacin	<p>AGs 10 ppb_HFBA - Amikacin 1 586.4 / 163.1 Intensity vs Time, min. Peak at 7.57 min.</p>	<p>AGs 500 ppb_HFBA - Amikacin 1 586.4 / 163.1 Intensity vs Time, min. Peak at 7.56 min.</p>	<p>STD 10ppb- Amikacin 1 586.4 / 163.1 Intensity vs Time, min. Peak at 2.64 min.</p>	<p>STD 500ppb- Amikacin 1 586.4 / 163.1 Intensity vs Time, min. Peak at 2.64 min.</p>
Apramycin	<p>AGs 10 ppb_HFBA - Apramycin 2 540.3 / 378.2 Intensity vs Time, min. Peak at 9.07 min.</p>	<p>AGs 500 ppb_HFBA - Apramycin 2 540.3 / 378.2 Intensity vs Time, min. Peak at 9.05 min.</p>	<p>STD 10ppb- Apramycin 1 540.3 / 217.1 Intensity vs Time, min. Peak at 3.10 min.</p>	<p>STD 500ppb- Apramycin 1 540.3 / 217.1 Intensity vs Time, min. Peak at 3.10 min.</p>
Dihydrostreptomycin	<p>AGs 10 ppb_HFBA - Dihydrostreptomycin 1 584.2 / 263.1 Intensity vs Time, min. Peak at 6.41 min.</p>	<p>AGs 500 ppb_HFBA - Dihydrostreptomycin 1 584.2 / 263.1 Intensity vs Time, min. Peak at 6.41 min.</p>	<p>STD 10ppb- Dihydrostreptomycin 1 584.2 / 263.1 Intensity vs Time, min. Peak at 2.55 min.</p>	<p>STD 500ppb- Dihydrostreptomycin 1 584.2 / 263.1 Intensity vs Time, min. Peak at 2.53 min.</p>
Gentamicin C1	<p>AGs 10 ppb_HFBA - Gentamicin C1 1 478.3 / 322.1 Intensity vs Time, min. Peak at 9.87 min.</p>	<p>AGs 500 ppb_HFBA - Gentamicin C1 1 478.3 / 322.1 Intensity vs Time, min. Peak at 9.87 min.</p>	<p>STD 10 ppb - Gentamicin C1 1 478.3 / 322.1 Intensity vs Time, min. Peak at 3.78 min.</p>	<p>STD 500 ppb - Gentamicin C1 1 478.3 / 322.1 Intensity vs Time, min. Peak at 3.78 min.</p>

Table 6. (Continued) Chromatogram of aminoglycosides at concentrations of 0.01 mg/kg and 0.5 mg/kg in two different ion-pairing reagent addition methods

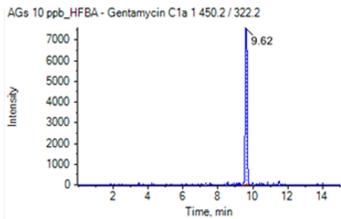
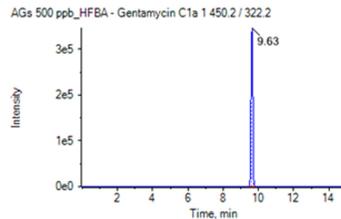
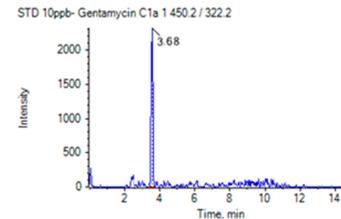
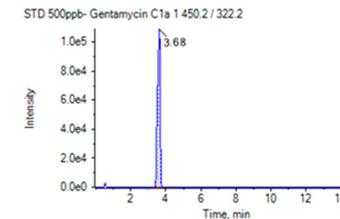
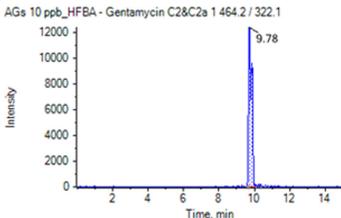
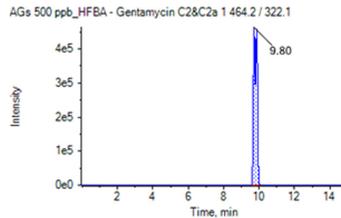
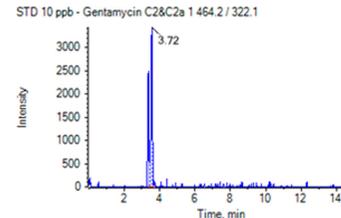
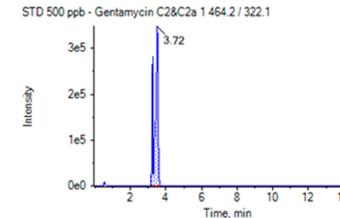
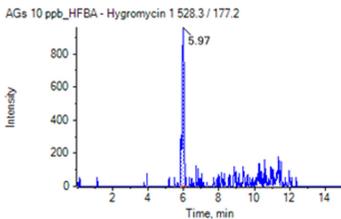
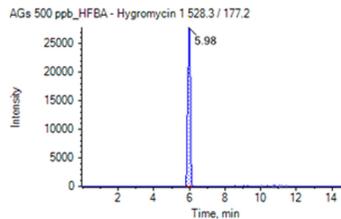
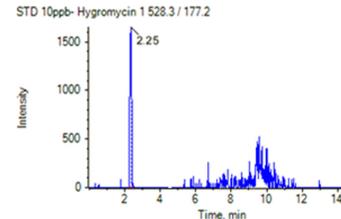
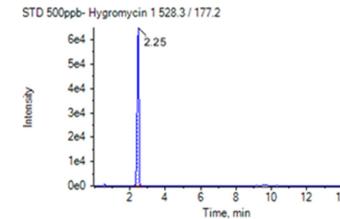
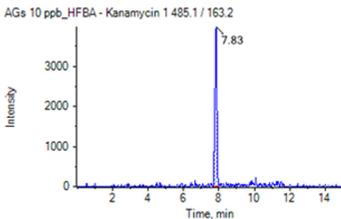
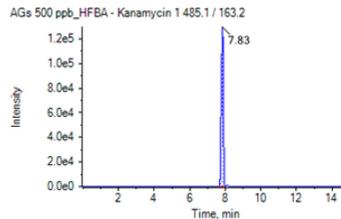
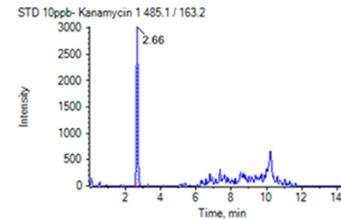
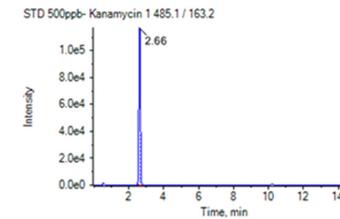
Compound	Addition method of ion-pairing reagent to mobile phase		Direct addition method of ion-pairing reagent to test vial	
	0.01 mg/kg	0.5 mg/kg	0.01 mg/kg	0.5 mg/kg
Gentamicin C1a				
Gentamicin C2&C2a				
Hygromycin				
Kanamycin				

Table 6. (Continued) Chromatogram of aminoglycosides at concentrations of 0.01 mg/kg and 0.5 mg/kg in two different ion-pairing reagent addition methods

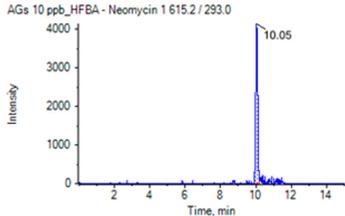
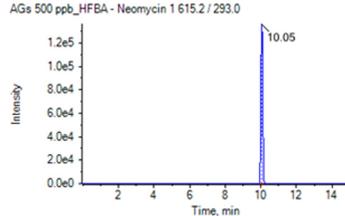
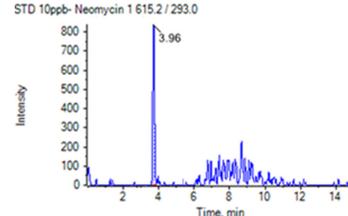
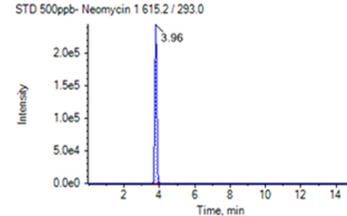
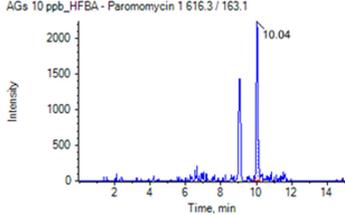
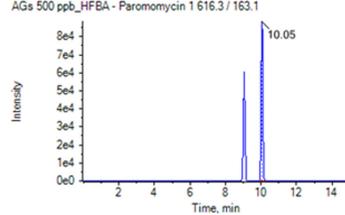
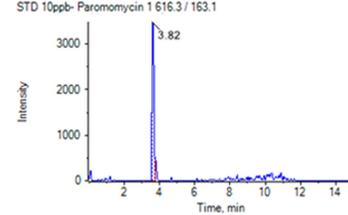
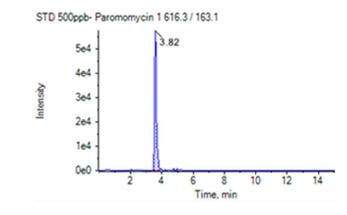
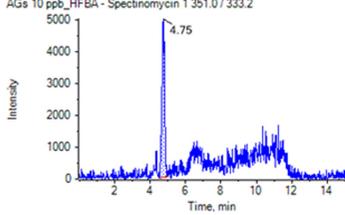
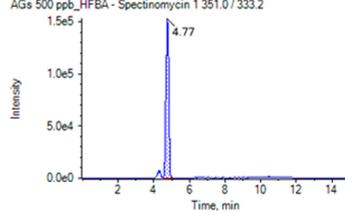
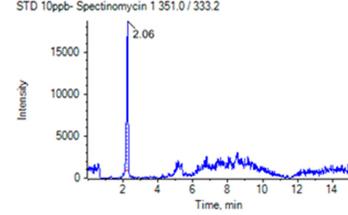
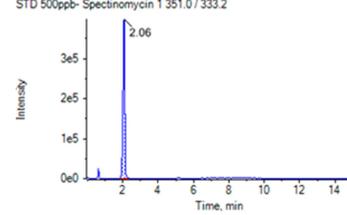
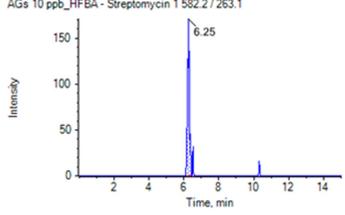
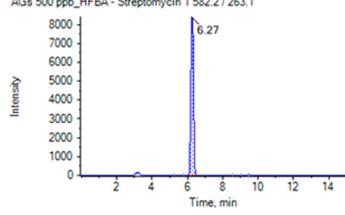
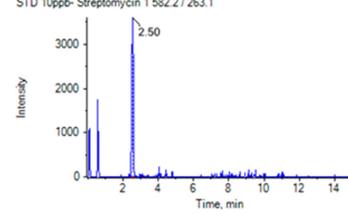
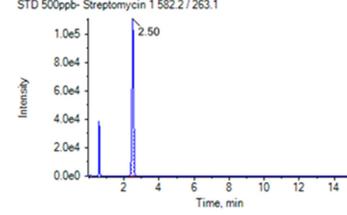
Compound	Addition method of ion-pairing reagent to mobile phase		Direct addition method of ion-pairing reagent to test vial	
	0.01 mg/kg	0.5 mg/kg	0.01 mg/kg	0.5 mg/kg
Neomycin				
Paromomycin				
Spectinomycin				
Streptomycin				

Table 7. Comparisons of recovery (relative standard deviation, %) for aminoglycosides in sample matrices

Compound	Conc. ¹⁾ (mg/kg)	Addition method of ion-pairing reagent to mobile phase		Direct addition method of ion-pairing reagent to test vial	
		Beef	Cell culture medium	Beef	Cell culture medium
Amikacin	0.02	104.3±2.5 ²⁾	116.4±7.8	105.0±1.9	107.0±1.0
	0.1	95.1±13.9	98.5±6.4	88.4±1.0	113.7±2.5
	0.2	104.9±2.9	95.9±12.9	88.3±4.4	120.1±18.3
Apramycin	0.02	76.7±8.1	95.8±1.7	92.9±15.8	109.0±0.3
	0.1	111.9±9.7	100.4±4.6	100.2±11.1	98.0±17.1
	0.2	99.0±10.1	102.0±15.0	99.3±3.0	99.6±18.9
Dihydrostreptomycin	0.02	111.2±2.2	117.6±2.4	105.7±4.8	105.1±0.5
	0.1	94.2±14.3	102.1±1.8	78.6±2.3	114.3±11.4
	0.2	99.1±2.1	93.5±5.4	82.2±4.7	100.3±9.8
Gentamicin C1	0.02	95.5±10.9	104.4±0.9	95.8±13.8	117.6±1.0
	0.1	113.6±2.9	73.7±5.4	94.5±9.5	95.2±22.3
	0.2	89.5±9.5	99.4±11.8	97.4±5.8	97.1±6.9
Gentamicin C1a	0.02	96.2±7.9	109.0±1.7	114.0±21.9	92.3±5.0
	0.1	80.6±5.0	92.8±8.0	100.6±9.1	100.9±14.7
	0.2	83.4±9.3	88.4±7.5	104.0±8.2	118.7±15.5
Gentamicin C2&C2a	0.02	117.6±2.3	106.0±1.8	96.9±12.3	109.7±0.2
	0.1	99.2±2.8	80.4±3.4	105.3±9.6	102.7±18.6
	0.2	89.8±6.9	85.8±10.4	104.1±5.8	114.3±4.3
Hygromycin	0.02	110.2±3.5	105.4±1.3	120.6±3.7	103.8±0.3
	0.1	103.2±9.3	114.6±5.2	92.9±3.5	111.4±7.1
	0.2	74.9±8.0	106.9±3.8	91.1±3.1	109.9±6.3
Kanamycin	0.02	95.7±2.7	108.8±4.4	100.7±11.1	112.5±0.4
	0.1	98.6±12.5	101.3±6.0	96.8±5.5	72.7±8.5
	0.2	88.1±5.5	94.9±4.6	100.3±1.7	118.4±4.8
Neomycin	0.02	104.0±8.5	103.7±0.4	85.2±18.1	105.8±0.3
	0.1	114.7±10.2	94.8±2.6	82.0±5.2	75.8±8.6
	0.2	97.7±9.5	88.9±6.9	88.6±4.4	112.4±5.8
Paromomycin	0.02	75.2±6.8	105.7±15.1	95.4±1.1	116.1±1.0
	0.1	78.6±2.5	113.4±10.6	87.2±4.1	98.5±7.8
	0.2	70.7±7.9	101.3±10.0	90.5±5.0	110.4±5.9
Spectinomycin	0.02	101.3±2.9	92.5±20.6	78.7±1.1	117.1±0.4
	0.1	114.9±14.1	90.8±4.6	84.3±5.7	104.8±6.1
	0.2	100.9±4.6	98.9±2.6	87.1±5.7	101.5±20.6
Streptomycin	0.02	104.0±18.8	103.0±7.0	102.7±7.7	94.3±2.5
	0.1	114.7±19.2	117.5±3.0	83.6±4.4	85.0±24.7
	0.2	97.7±2.3	117.3±3.9	86.7±4.3	84.0±7.6

¹⁾ Concentration.

²⁾ Values are means±RSD. Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation.

및 ‘식품등 시험법 마련표준절차에 관한 가이드라인(2016)’에 따라 회수율 60-120%, 반복 간 변동계수 ≤30%에 만족하는 것을 확인하였다³⁾).

시중유통 육류와 배양육에 사용되는 배지 및 배지 첨가제 분석결과

이동상용매에 IP를 추가하는 기존의 분석 방법과 비

Table 8. Aminoglycosides in meat products, cell culture media, and serum replacement

Group	Sample	8 Aminoglycosides except streptomycin and dehydrostreptomycin	Streptomycin (mg/kg, %)	Dehydrostreptomycin (mg/kg, %)
Beef	B-1 - 5	N.D. ¹⁾	N.D.	N.D.
Pork	P-1 - 5	N.D.	N.D.	N.D.
Chicken	C-1 - 5	N.D.	N.D.	N.D.
Cell culture medium and additive	M-1	N.D.	N.D.	N.D.
	M-2	N.D.	695.84±6.14 ²⁾	6.35±6.58
	M-3	N.D.	1152.71±2.41	11.11±3.52
	M-4	N.D.	N.D.	N.D.
	M-5	N.D.	N.D.	N.D.
	M-6	N.D.	N.D.	N.D.

¹⁾ Not detected.

²⁾ Values are means ± RSD. Mean values of 3 times repetitions with relative standard deviation.

교 시 유효한 수준으로 확인된 IP 바이알 직접 첨가법으로 국내 유통 중인 축산물 15품목(소고기 5품목, 돼지고기 5품목, 닭고기 5품목)과 배양육에 사용되는 배지 및 배지첨가제 8품목에 대한 안전성 검증을 진행하였다 (Table 8). 검증 결과 축산물 15품목과 배지 3품목에서 AGs 10 성분은 확인되지 않았으나, 배지 첨가제 2품목 (M-2 및 M-3)에서 검출되었다. M-2 시료에서 streptomycin 695.85 mg/kg, dehydrostreptomycin 6.35 mg/kg 수준으로 검출되었고, M-3 시료에서 streptomycin 1152.71 mg/kg, dehydrostreptomycin 11.11 mg/kg 수준으로 확인하였다.

본 연구에서는 ion-pairing 첨가에 따른 아미노글리코사이드계 항생제 분석방법의 유효성 검증 및 검증된 방법을 토대로 국내 유통 중인 육류와 배양육에 사용되는 배지 및 첨가제에 대한 검증을 진행하였다. IP를 이동상용매에 추가하는 방법과 이를 보완한 IP를 바이알에 직접 첨가하는 방법에 대한 직선성, 검출한계, 정량한계, 회수율은 모두 양호한 수준임을 확인하였다. 바이알 내 IP 직접 주입 방법을 활용한다면, 기기의 부담을 줄이면서 보다 광범위한 시료의 AGs 분석이 가능할 것으로 사료된다. 이로 인한 분석 업무의 효율성이 증대되고 향후 배양육 시장의 확대 시 배양육 배지에서 기인되는 AGs의 안전성 평가 도구로서 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgement

이 연구는 식품의약품안전처의 2021년도 연구비 지원 (21153MFD5605) 및 ㈜풀무원, 풀무원기술원 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

아미노글리코사이드계 항생제(Aminoglycosides, AGs)는 그람음성균과 양성균에 광범위하게 작용하는 동물용 의약품으로, 최근 배양육에 사용된다고 알려져 있어, 안전성 관리를 위한 분석법 마련이 반드시 필요하다. AGs는 고극성 화합물로 성분 간의 분리를 위해 이온쌍 시약(ion-pairing reagent, IPR)을 사용하고 있으나 IPR을 이동상에 첨가하는 기존 분석방법의 경우 용매가 흐르는 동안 질량분석기로 주입되는 IPR로 인해 기기적인 문제가 발생할 가능성이 높아, IPR를 바이알에 직접 첨가하는 분석방법을 검토하였다. 본 연구에서 10종 AGs 성분에 대한 분석방법을 확인하고 유효성을 검증하였다. 검출한계와 정량한계는 각각 0.0001-0.0038 mg/kg 와 0.004-0.011 mg/kg의 범위로 나타났으며, 0.01-0.5 mg/kg 범위 내의 직선성(R²)은 0.99 이상이였다. AGs의 시료 회수율을 확인하고자 소고기와 세포배양배지(cell culture medium) 매질에서 회수율과 상대표준편차로 나타난 정밀도를 확인한 결과 각각 70.7-120.6% 및 0.2 to 24.7%로 나타났다. 기존의 이동상에 IP 첨가 방법과 비교하였을 때 유사한 수준으로 양호하였다. 검증된 AGs 분석법은 국내 유통되는 닭고기, 소고기, 돼지고기 15품목과 배양육 배지 첨가제 6품목에 적용해보았다. 그 결과 국내 유통되는 육류 15품목 모두 AGs 성분이 검출되지 않았으나, 세포배양배지에서 streptomycin은 695.85-1152.71 mg/kg, dehydrostreptomycin은 6.35-11.11 mg/kg로 검출되었다. 따라서 IRR을 바이알에 직접 첨가하는 LC-MS/MS 방식은 육류, 세포배양배지, 배지첨가제 중 AGs 분석 및 안전성 평가를 위한 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Kyung Ho Park <https://orcid.org/0000-0001-7027-6510>
 Song-Yi Gu <https://orcid.org/0000-0001-8562-5226>
 Geon Woo Park <https://orcid.org/0000-0002-5664-5620>
 Jong Jib Kim <https://orcid.org/0000-0003-0238-8742>
 Jong soo Lee <https://orcid.org/0009-0006-8745-409x>
 Sang Gu Kim <https://orcid.org/0000-0002-8392-2267>
 Sang Yun Lee <https://orcid.org/0000-0002-7652-5714>
 Hyang Sook Chun <https://orcid.org/0000-0003-2522-4847>

References

- Font-I-Furnols, M., Guerrero, L., Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: an overview. *Meat Sci.*, **98**, 361-371 (2014).
- Moe, S.M., Zidehsarai, M.P., Chambers, M.A., Jackman, L.A., Radcliffe, J.S., Trevino, L.L., Donahue, S.E., Asplin, J.R., Vegetarian compared with meat dietary protein source and phosphorus homeostasis in chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **6**, 257-264 (2011).
- Gerhardt, C., Suhlmann, G., Ziemßen, F., Donnan, D., Warschun, M., Kühnle, H.J., How will cultured meat and meat alternatives disrupt the agricultural and food industry? *Ind. Biotechnol.*, **16**, 262-270 (2020).
- Bryant, C.J., Culture, meat, and cultured meat. *J. Anim. Sci.*, **98**, 1-7 (2020).
- Njoga, U.J., Njoga, E.O., Nwobi, O.C., Abonyi, F.O., Edeh, H.O., Ajibo, F.E., Azor, N., Bello, A., Upadhyay, A.K., Okpala, C.O.R., Korzeniowska, M., Guiné, R.P.F., Slaughter conditions and slaughtering of pregnant cows in southeast Nigeria: Implications to meat quality, food safety and security. *Foods*, **10**, 1298 (2021).
- Britt, J.H., Cushman, R.A., Dechow, C.D., Dobson, H., Humblot, P., Hutjens, M.F., Jones, G.A., Ruegg, P.S., Sheldon, I.M., Stevenson, J.S., Invited review: Learning from the future—A vision for dairy farms and cows in 2067. *J. Dairy Sci.*, **101**, 3722-3741 (2018).
- Kumar, P., Chatli, M.K., Mehta, N., Singh, P., Malav, O.P., Verma, A.K., Meat analogues: health promising sustainable meat substitutes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **57**, 923-932 (2017).
- Bryant, C.J., Barnett, J.C., What's in a name? consumer perceptions of in vitro meat under different names. *Appetite*, **137**, 104-113 (2019).
- Djislav, M., Knežić, T., Podunavac, I., Živojević, K., Radonic, V., Knežević, N.Ž., Bobrinetskiy, I., Gadjanski, I., Cultivating multidisciplinary: manufacturing and sensing challenges in cultured meat production. *Biology*, **10**, 204 (2021).
- Lee, S.Y., Kang, H.J., Lee, D.Y., Kang, J.H., Ramani, S., Park, S., Hur, S.J., Principal protocols for the processing of cultured meat. *J. Anim. Sci. Technol.*, **63**, 673-680 (2021).
- Bhat, Z.F., Kumar, S., Fayaz, H., In vitro meat production: challenges and benefits over conventional meat production. *J. Integr. Agric.*, **14**, 241-248 (2015).
- Choudhury, D., Tseng, T.W., Swartz, E., The business of cultured meat. *Trends Biotechnol.*, **38**, 573-577 (2020).
- Ong, K.J., Johnston, J., Datar, I., Sewalt, V., Holmes, D., Shatkin, J.A., Food safety considerations and research priorities for the cultured meat and seafood industry. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **20**, 5421-5448 (2021).
- Choi, K.H., Yoon, J.W., Kim, M., Lee, H.J., Jeong, J., Ryu, M., Jo, C., Lee, C.K., Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **20**, 429-457 (2021).
- Lalitha Aishwarya, K.V., Venkataramana Geetha, P., Eswaran, S., Mariappan, S., Sekar, U., Spectrum of aminoglycoside modifying enzymes in gram-negative bacteria causing human infections. *J. Lab. Physicians*, **12**, 27-31 (2020).
- Reemtsma, T., Berger, U., Arp, H.P.H., Gallard, H., Knepper, T.P., Neumann, M., Quintana, J.B., Voegt, P.D., Mind the gap: Persistent and mobile organic compounds- water contaminants that slip through. *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 10308-10315 (2016).
- Hong, Y.M., Lee, S.K., Kim, H.A., Hwang, Y.K., Simultaneous analytical method for the neomycin, gentamicin residues in seafood. *J. Appl. Biol. Chem.*, **53**, 25-30 (2010).
- Kang, Y.W., Joo, H.J., Kim, Y.S., Cho, Y.J., Kim, H.Y., Lee, G.H., Kim, M.H., Analysis and monitoring of residues of aminoglycoside antibiotics in livestock products. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **43**, 1-5 (2011).
- Cho, Y.J., Choi, S.J., Kim, M.A., Kim, M.K., Yoon, S.J., Chang, M.I., Lee, S.M., Kim, H.J., Jeong, J.Y., Rhee, G.S., Lee, S.J., Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in meat using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Saf.*, **29**, 123-130 (2014).
- Jo, H.W., Sun, J.H., Heo, H.M., Lee, S.H., Kim, J.E., Moon, J.K., Development and validation of Dithiocarbamates fungicide analytical method using CS2 trap method in livestock product. *Korean J. Environ. Agric.*, **40**, 127-133 (2021).
- McCalley, D.V., Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1523**, 49-71 (2017).
- Asakawa, D., Uemura, M., Sakiyama, T., Yamano, T., Sensitivity enhancement of aminoglycosides in hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry by post-column addition of trace sodium acetate in methanol. *Food Addit. Contam.: Part A*, **35**, 1116-1126 (2018).
- Bijleveld, Y., de Haan, T.R., Toersche, J., Jorjani, S., van der Lee, J., Groenendaal, F., Dijk, P., van Heijst, A., Gavilanes, A.W.D., de Jonge, R., Dijkman, K.P., van Straaten, H., Rijken, M., Zonnenberg, I., Cools, F., Nuytemans, D.,

- Mathôt, R., A simple quantitative method analysing amikacin, gentamicin, and vancomycin levels in human newborn plasma using ion-pair liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its applicability to a clinical study. *J. Chromatogr. B*, **951-952**, 110-118 (2014).
24. Joseph, A., Rustum, A., Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of gentamicin sulfate and its related substances in a pharmaceutical cream using a short pentafluorophenyl column and a charged aerosol detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 521-531 (2010).
25. Guironnet, A., Sanchez-Cid, C., Vogel, T. M., Wiest, L., Vulliet, E., Aminoglycosides analysis optimization using ion pairing liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and application on wastewater samples. *J. Chromatogr. A*, **1651**, 462133 (2021).
26. Wang, X., Yang, S., Li, Y., Zhang, J., Jin, Y., Zhao, W., Zhang, Y., Huang, J., Wang, P., Wu, C., Zhou, J., Optimization and application of parallel solid-phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of 11 aminoglycoside residues in honey and royal jelly. *J. Chromatogr. A*, **1542**, 28-36 (2018).
27. Mokh, S., Jaber, F., Kouzayha, A., Budzinski, H., Al Iskandarani, M., Optimization and comparisons for separation, detection and quantification of 12 aminoglycosides using 2 chromatographic conditions by LC-MS/MS. *Am. J. Anal. Chem.*, **5**, 982-994 (2014).
28. Gustavsson, S.Å., Samskog, J., Markides, K.E., Långström, B., Studies of signal suppression in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *J. Chromatogr. A*, **937**, 41-47 (2001).
29. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), (2023, May 30). Guidelines on standard procedures for preparing analysis method. Retrieved from http://www.nifds.go.kr/brd/m_15/view.do?seq=8215
30. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH), (2023, May 30). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Retrieved from https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf
31. Bae, J.Y., Yun, D.Y., Kang, N.S., Choe, W.J., Jeong, Y.H., Jang, G.H., Moon, G., Investigation on pesticide residues in agricultural products in domestic markets using LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Food Hyg. Saf.*, **38**, 131-139 (2023).