

농산물 중의 항생물질 다성분 분석을 통한 잔류성에 관한 연구

강서지소

김일영 · 두옥주 · 이영주 · 홍미선 · 전수진 · 신재민 · 신기영

Multiresidual Determination of Antibiotics in Agricultural Products

Inspection Branch of Gangseo

**Il-young Kim, Ock-ju Tu, Young-ju Lee, Mi-sun Hong,
Su-jin Chun, Jae-min Shin and Ki-young Shin**

Abstract

A selected method for multiresidual determination of eight antibiotics in agricultural products was developed and validated via high performance liquid chromatography using a diode array detector. The analytes were separated in one chromatographic run and evidenced unique spectra. The eight-compound calibration curve evidenced linear behavior ($R^2=0.9986\sim0.9999$) in a working range between 0.1 and 10 mg/kg. The average recoveries for the 8 compound-spiked vegetables(cabbage, lettuce and cucumber) at levels of 1.0 mg/kg ranged between 54.2% to 90.5%, with relative standard deviations of 8.8% or lower. The limits of detection ranged between 0.02 and 0.05 mg/kg. Antibiotic residues in 43 of the samples were not detected.

Key words : antibiotics, HPLC

서 론

1942년 미국의 S. A. Waksman이 미생물에 의해 생산되는 화학물질로서 저농도에서 다른 미생물의 증식을 억제하거나 죽이는 능력을 가진 화학물질을 최초로 antibiotics로 정의하였다. 그 후

다양한 생물체에서 항생효과가 나타남에 따라 미생물에 국한된 정의가 광의의 의미로 확대되어 사용하고 있다. 지금까지 발견된 항생물질은 8,000종 이상이며 항생물질의 발견으로 인류는 비로소 세균·rickettsia 감염증을 극복하고, fungi·virus질환과 암의 치료도 기대하게 되었다(1).

오늘날 항생물질은 사람·가축의 의약품뿐 만 아니라 경제발달과 도시인구의 증가로 농축수산물에 대규모 재배·사육·양식되면서 집단이나 무리의 질병예방과 성장촉진 증산을 위한 사료첨가제 및 농산물 살균제 등 다양한 목적으로 사용되고 있다. 그러나 농·축·수산에서 사용되는 항생물질의 남·오용으로 항생물질에 대한 내성 발현과 확산이 계속되고 있어 이에 대한 대책이 필요하다(2).

이러한 항생제의 안전한 사용을 위해 우리나라에서는 1989년 농림부(소관: 국립수의과학검역원)가 처음으로 축산물 위생처리법 시행규칙으로 27종의 물질에 대한 잔류허용기준과 58종 약제에 대한 잔류분석법을 제정 고시하였다. 1990년 보건복지부(소관: 식품의약품안전청)에서도 식육의 항생물질 기준을 제정(항생제 17종, 합성항균제 18종, hormone제 5종) 및 축산물의 잔류물질(항생물질 등) 시험법을 제정 시행하였다. 그 이후 기준을 확대하여 2007년 현재 gentamicin 등 59종의 동물용의약품(항생제 23종, 합성항균제 34종, hormone제 5종)에 대해 식품(어류 및 갑각류, 우유류) 및 식육 부위별로 잔류허용기준(maximum residue limits)을 설정하였으며, 수산물, 벌꿀 등에도 계속해서 잔류허용기준을 확대해 나가고 있다(3). 농업용으로 사용되는 항생물질은 20여종으로 그 중 병해 방제용으로 많이 사용되고 있는 6종이 실용화되고 있으며, 농업진흥청에서 설정 고시한 농약 안전 사용기준에 의해 관리되고 있으나, 농약잔류허용기준은 설정되어 있지 않다(4).

농산물의 친환경농업이 증대하면서 농가에서 사용되는 친환경자재(인축 및 환경에 무해하면서 농작물 양분공급, 병해충 억제 및 식물 생육촉진에 사용되는 물질)의 사용이 증가하는 추세에 있다. 항생물질은 직접 농약 살포, 친환경 자재로 사용되는 농장 및 가금류의 퇴구비에서 농산물에 이완 될 가능성이 크다. 따라서 농산물 중의 잔류항생물질의 잔류 여부를 확인하기 위해 항생물질 중 농약으로 등록된 품목과 가금류에 많이 사용되는 항생물질을 대상으로 다성분 분석이 가능한 분석법을 개발하여 강서농산물도매시장에 반입된 농산물을 대상으로 항생물질의 잔류성 조사에 활용코자 한다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기구

표준품으로 Sigma사의 ceftazidime, doxycycline, minocycline, oxytetracycline, tetracycline, chloramphenicol, MP Biomedicals사의 ciprofloxacin, enrofloxacin 을 사용하였다. 추출 및 HPLC분석을 위해 acetonitrile, methanol (HPLC용, J.T.Baker), trifluoroacetic acid (TFA, Aldrich)을 사용하였고, 정제를 위해 NH₂ cartridge(Agilent, USA)를 사용하였다.

전처리를 위해 믹서(BLIXER 5 Plus, France), 진탕기(XLVIS, Japan), 원심분리기(SUPRA30K, Korea), 질소농축기(N-EVAP 112, USA)를 사용하였고, HPLC분석을 위해 Agilent HPLC-DAD(1100 series)를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 표준용액조제 및 검량선 작성

항생물질 표준품은 methanol용액으로 각각 표준원액(150 ppm)을 제조한 후, 단계적으로 희석하여 검량선 작성 및 회수율 시험 표준용액으로 사용하였다. 검량선 작성을 위해 각각의 표준용액을 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석에서 얻은 피크면적을 이용하여 검량선을 작성하였다.

2) 시료전처리

분쇄기로 파쇄한 시료 5g과 0.1% TFA acetonitrile 20mL을 추출용기에 넣고 shaker (100 speed, 20분)에서 추출한다. 추출 후 원심분리기 (6000 rpm, 20분)으로 원심분리하여 10 mL acetonitrile 액층을 공기를 통하여 건조시킨 후 methanol 2 mL로 하여 methanol로 활성화한 500 mg NH₂ cartridge에 시료를 로딩 시킨 후 methanol 5 mL로 추출하여 0.20 μm cartridge filter로 여과하여 HPLC분석하였다.

3) 회수율 검토 및 검출한계

혼합 항생물질 표준액을 시료에 가한 후, 시료

전처리와 동일한 방법으로 처리하여 회수율을 구하였으며, 검출한계를 위해 표준액을 단계적으로 희석하여 외부표준법에 의한 검량선을 작성하고 3회 반복 실험하였다.

4) 기기 분석

항생물질을 분석하기 위한 HPLC-DAD의 기기 조건은 표 2와 같다. HPLC-DAD분석을 통해 개별 항생물질의 머무름 시간과 그 피이크의 스펙트럼을 라이브러리화하고 동시분석 가능성을 파악하였다.

Table 1. Formular, molecular weight and chemical structure of 8 antibiotics

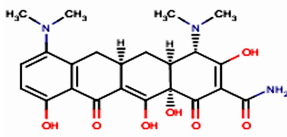
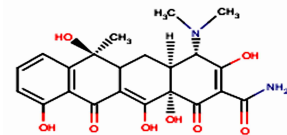
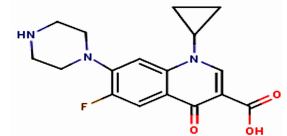
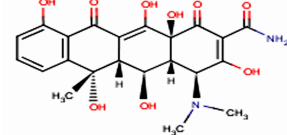
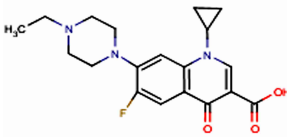
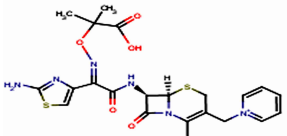
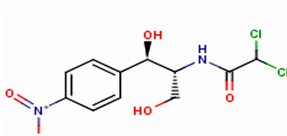
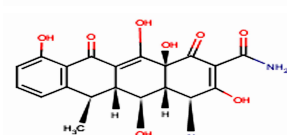
Antibiotics	Formular	Molecular weight	Chemical structure
Minocycline	$C_{23}H_{27}N_3O_7$	457.48	
Tetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	443.44	
Ciprofloxacin	$C_{17}H_{18}F-N_3-O_3$	331.34	
Oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460.43	
Enrofloxacin	$C_{19}H_{22}F-N_3-O_3$	359.39	
Ceftazidime	$C_{22}H_{22}N_6O_7S_2$	546.6	
Chloramphenicol	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	323.13	
Doxycycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.43	

Table 2. HPLC analytical conditions for antibiotics

Model	Agilent HPLC-DAD(1100 series)			
Column	ZOBAK Eclipse XDB-C8, 5.0 μ m, 4.6 \times 150 mm			
Detector	DAD 190.0 to 400.0 nm at 2 nm 1.00 mAU Signal 254, 270, 350 nm			
Gradient mobile phase	Solvent A: Acetonitrile		Solvent B: 0.1% TFA	
	Time	Solvent A	Solvent B	Flow
	1.00	5	95	1.0
	15.00	30	70	1.0
25.00	5	95	1.0	
Injection volume	10 μ l			

결과 및 고찰

1. 8종의 항생물질 분석 조건

항생물질 8종 혼합 표준품을 HPLC-DAD에 분석한 결과는 그림 1과 같다.

각각의 항생물질이 겹침 없이 비교적 잘 분리되었으며 분석 파장의 경우 254, 350 nm보다 270 nm의 분리능이 더 좋았다. 8 종의 스펙트럼은 그림 2와 같으며, 그 흡수 스펙트럼을 통해 각각의 성분을 보다 더 정확하게 확인 할 수 있었다.

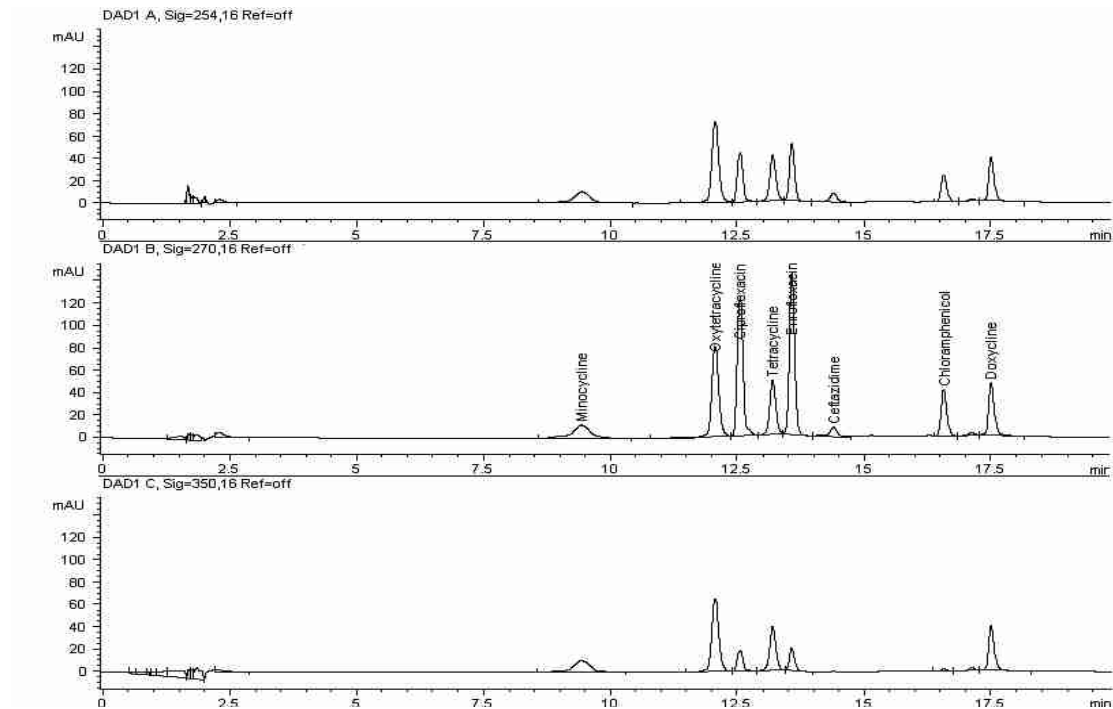


Fig. 1. HPLC chromatogram of mixed antibiotics.

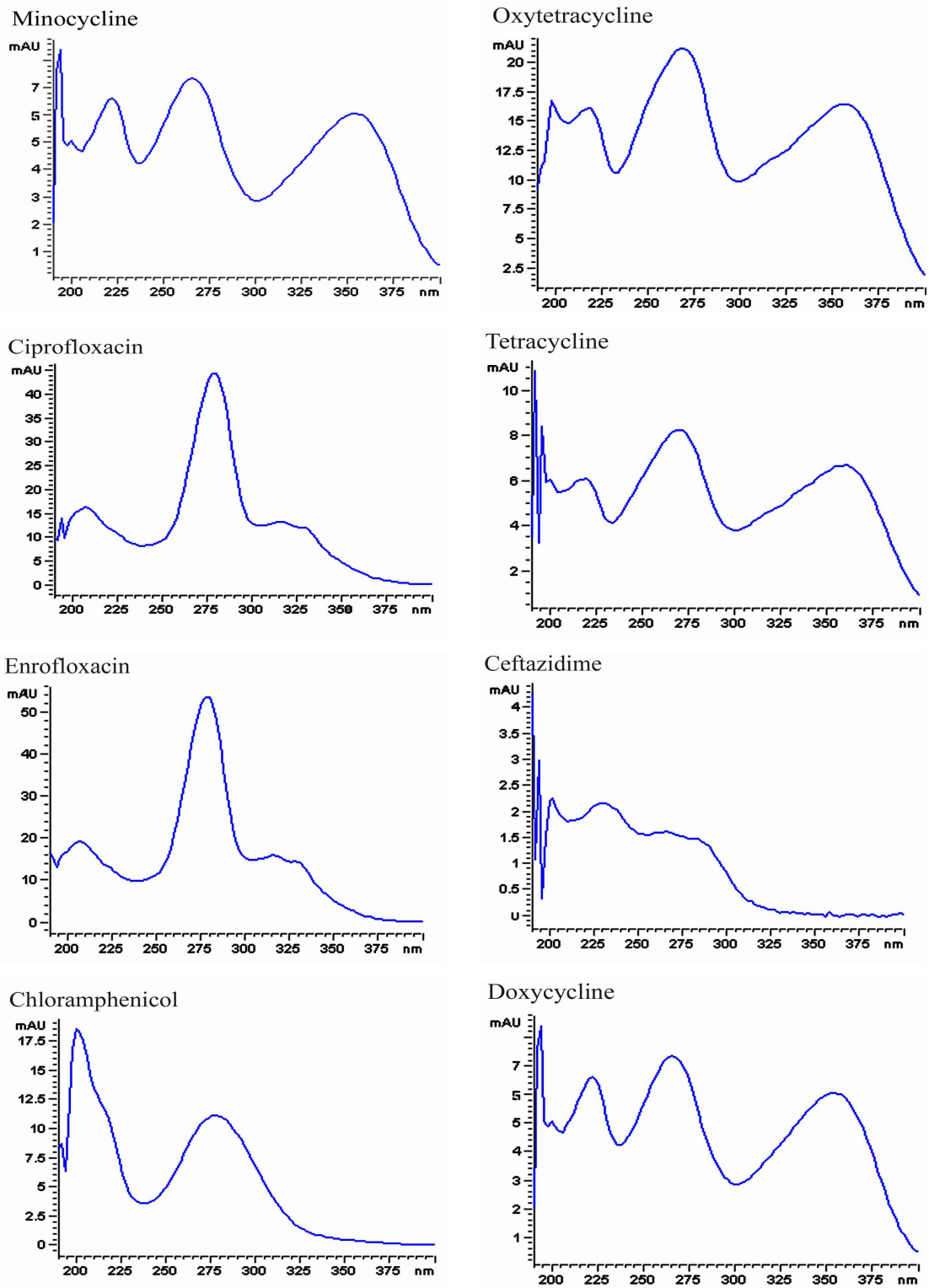


Fig. 2. Unique spectra of the 8 antibiotics by DAD.

2. 검량선 작성 및 검출한계

항생물질 표준액을 0.1~10 mg/kg의 농도로 조제한 후 검량선을 작성하였다. 그림 3에서 보는바와 같이 각각 항생물질의 상관계수(R^2)는 0.9986~0.9999로 양호한 직선상의 그래프를 얻을 수 있었다. 각각의 항생물질을 단계적으로 희석하여 분석한 결과 검출한계는 oxytetracycline, ciprofloxacin, tetracycline, fnrofloxacin의 경우 0.02 ppm, ceftazidime은 0.1 ppm, minocycline,

chloramphenicol, doxycycline의 경우 0.05 ppm이었다. 이는 농산물에서 낮은 농도의 항생물질 분석이 가능함을 나타내고 있다.

3. 회수율

농산물(배추, 상추, 오이) 5g에 항생물질 혼합 표준용액(각각 농도 1 mg/L)을 첨가한 후 회수율 시험을 3회 반복한 결과는 표 3과 같다.

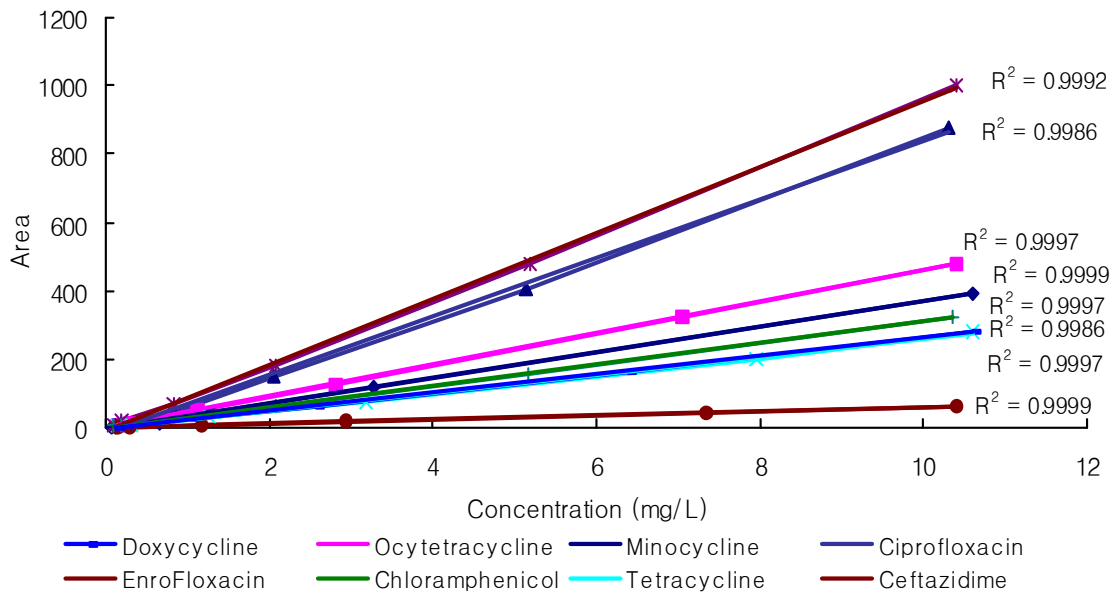


Fig. 3. Calibration curves of the 8 antibiotics by HPLC-DAD.

Table 3. Recoveries of antibiotics in spiked samples by HPLC-DAD

Antibiotics	Recovery(%)		
	Korean cabbage	Korean lettuce	Cucumber
Minocycline	64.4±4.5 ¹⁾	62.7±5.6	62.1±3.6
Oxytetracycline	68.7±2.8	69.7±2.6	68.9±2.7
Ciprofloxacin	80.1±4.2	74.2±3.3	80.9±4.2
Tetracycline	57.5±2.5	68.6±5.9	63.1±2.0
Enrofloxacin	76.6±5.8	72.5±4.2	81.7±2.8
Ceftazidime	54.2±4.3	57.3±5.0	61.3±3.8
Chloramphenicol	90.5±1.1	84.5±3.5	85.3±2.7
Doxycycline	65.9±5.7	68.6±5.2	64.0±4.8

¹⁾ Mean ± S.D.

비교적 항생물질의 회수율은 농약과 달리 여러 요인에 의해 높지 않음을 알 수 있다.

항생물질별 회수율을 살펴보면 chloramphenicol의 경우 84.5%~90.5%로 회수율이 가장 높았으며, ceftazidime의 경우 54.2%~61.3%로 회수율이 가장 낮았다. fluoroquinolone 계열의 enrofloxacin, ciprofloxacin의 경우 72.5%~81.7%정도의 비교적 양호한 회수율을 보였으며, tetracycline계열의 회수율이 62.1~69.7%대로 나타났다. 이는 최 등(5, 6)이 식품 중에서 얻은 결과(71%~98%)와 보다 다소 낮게 낮으며, chloramphenicol의 경우 김 등(7)이 벌꿀에서 얻은 회수율(90.5%)과 비슷한 결과를 나타내었다. Minocycline, oxytetracycline, tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin, enrofloxacin, ceftazidime 및 chloramphenicol의 경우 농산물과 상관없이 유사한 회수율을 보였다. 보다 정확하고 정밀함을 위해서는 많은 종류의 농산물을 대상한 실험이 요구된다.

4. 유통농산물 검사

8종의 항생물질의 분석조건을 확립하고 회수율 검정을 통하여 양호한 결과를 얻어 강서농산물도매시장에 유통되고 있는 상추 등 잔류항생물질 잔류 가능성이 높은 17품목 43건을 대상으로 항생물질의 잔류실태를 검사한 결과는 표 4와 같다. 43건의 검사 농산물에서는 8종의 항생물질은 검출되지 않았다. 보다 더 잔류성 실태 조사를 위해서는 재배방법에 따른 연관성 조사와 병행하여 항생물질 잔류 가능성 있는 유기농 농산물에 대한 조사가 필요하다고 생각된다.

결 론

농산물 중의 잔류항생물질의 잔류여부를 확인하기 위해 항생물질 중 농약으로 등록된 품목과 가금류에 많이 사용되고 있는 8종성분의 항생물질

Table 4. Results of antibiotics analysis

No.	Agricultural product	No. of samples	Result
1	Korean lettuce	4	ND ¹⁾
2	Korean cabbage	7	ND
3	Spinach	4	ND
4	Crown daisy	3	ND
5	Chicory	3	ND
6	Marsh mallow	2	ND
7	Perilla leaves	2	ND
8	Pepper	2	ND
9	Chamnamul	1	ND
10	Kale	1	ND
11	Pumpkin	2	ND
12	Cucumber	2	ND
13	Chongkyoungchae	1	ND
14	Cabbage	1	ND
15	Chwinamul	1	ND
16	Water dropwort	1	ND
17	Lettuce	6	ND
Total		43	

¹⁾ Not Detected.

minocycline, oxytetracycline, ciprofloxacin, tetracycline, enrofloxacin, ceftazidime, chloramphenicol 및 doxycycline에 대해 동시 다성분 가능성을 파악하고 강서농산물도매시장에 유통되고 있는 농산물을 대상으로 항생물질의 잔류 실태를 조사하였다.

1. 8종의 항생물질을 HPLC-DAD로 분석한 결과 270 nm에서 분리능이 가장 좋았으며, 반응시간은 9.3~17.5분 사이였고 겹쳐짐 없이 잘 분리됨을 알 수 있으며 각 물질 별로 고유한 스펙트럼을 얻을 수 있었다.
2. 각각 항생물질의 직선상(R^2)은 0.9986~0.9990로 양호한 결과를 나타내었다. 검출한계는 oxytetracycline, ciprofloxacin, tetracycline, enrofloxacin의 경우 0.02 ppm, ceftazidime의 경우 0.1 ppm, minocycline, chloramphenicol, doxycycline의 경우 0.05 ppm 이었다.
3. 상추, 배추 및 오이에 8종의 항생물질 혼합표준용액을 첨가하여 회수율을 구한 결과 chloramphenicol의 경우 84.5~90.5%로 회수율이 가장 높았으며, ceftazidime의 경우 54.2~61.3%로 회수율이 가장 낮았다.

4. 강서도매시장에서 유통되는 농산물 43건(17 품목)을 검사한 결과 항생물질은 검출되지 않았다.

참고문헌

1. 박부길 : 항생물질학, 도서출판 효일, 2005.
2. 이선녀, 홍종기 : 식품 및 수질시료 중 항생제 분석법. 분석과학, 17(6):43A-58A, 2004.
3. 식품의약품안전청, 식품공전, 2007.
4. 농약공업협회, 농약사용지침서, 2007.
5. Mario A, Evelyn C and Ricardo V : Determination of oxytetracycline in honey by ion-pair HPLC with cationic -SPE. Electronic Journal of Food and Plants Chemistry, 1(1):12~15, 2006.
6. 최동미, 정지윤, 장문익, 임무혁, 박건상, 홍무기 : 식품 중 테트라사이클린계 항생물질 분석. 분석과학, 18(3):250~256, 2005.
7. 김지연, 서해점, 임효정, 한상배, 강찬순 : 국내유통 벌꿀제품 중 항생물질 모니터링. 식품의약품안전청연구보고서, 제9권, 2005.