서울特別市保健環境研究院報 第38號 (2002)
Report of S.I.H.E., 38:516~521 (2002)

테트라싸이클린계 잔류항생물질 분석을 위한 전처리 방법 비교

시험팀

김동언 · 황래홍 · 윤은선 · 함희진 · 양윤모 · 김창기 · 기노준 · 이정학

Comparison of Pretreatment Methods for Tetracyclines Analysis by HPLC

Livestock Products Experiment Team

Dong-eon Kim, Lae-hwong Hwang, En-sun Yun, Hee-jin Ham, Yoon-mo Yang, Chang-gi Kim, No-jun Ki, and Jung-hark Lee

Abstract

Solid phase extraction(SPE) and matrix solid phase dispersion(MSPD) have been studied as preparation procedures for tetracyclines analysis by high-performance liquid chromatography(HPLC) in meat. The recovery range was 74-98 % for SPE, and 72-93 % for MSPD at spiked levels of 100 ng/g for oxytetracycline(OTC), tetracycline(TC), chlortetracycline(CTC), and doxycycline(DC). The detection limits were 15~78 ng/g for SPE and 25~84 ng/g for MSPD, respectively. Analytical method was HPLC with UV detector. The purpose of this study was developing a practical, accurate and precise method for rapid extraction and quantitation of tetracycline residues in meat.

Key words : SPE, MSPD, antibiotics, HPLC

서 론

1928년 영국의 Fleming이 곰팡이에서 penicillin을 발견 이후 여러 종류의 항생제 개발, 연구 및 임상적 이용과 축산업을 비롯한 양식업에 이르기까지 그 이용이 급속히 증가해왔다.

테트라싸이클린계 항생물질은 가축의 질병치료와 예방 및 증체율을 증가시키기 위해서 널리 쓰이는 대표적인 광범위 항생물질이다. 최근 축산물의 생산성을 높이기 위해서 각종 약제의 남용이나, 휴약 기간을 준수하지 않는 등의 부주의로 인하여 축산식품에 이행 잔류되어 공중 위생학적인 문제가 발생하고 있는 실정이다[1~3].

임상에서 테트라싸이클린계 항생물질은 anaplasmosis, theileriasis와 같은 원충성 질병과 brucellosis, atrophic rhinitis의 치료 및 각

종 소화기와 호흡기계의 병원성 세균감염증에 유효한 물질로 널리 알려져 있다.

테트라싸이클린계 잔류항생물질은 타 항생제와 달리 혈장 농도를 지속적으로 하는데, 예를 들면, oxytetracycline은 근육 주사 후 15분에 혈장에 나타나고 1시간 후에 최고 농도를 유지하며 12시간 동안 지속된다.

축산물에서 테트라싸이클린계 항생제의 투여와 분석에 관한 연구가 이미 많이 행하여졌고, 식육 등에 잔류하는 테트라싸이클린계 항생제의 검출을 위한 방법으로 생물학적 검사법(Bioassay), 박층크로마토그래피법(Thin Layer Chromatogrphy, TLC), 방사면역 분석법(Radioimmunoassay, RIA), 액체크로마토그래피법(High Performance Liquid Chromatography, HPLC), 기체크로마토그래피법(Gas Chromatography, GC) 및 질량분석법(GC-MS)을 비롯한 다양한 방법이 연구되고 있다[4~8].

국내 최대잔류허용량(maximum residual limit)은 근육에서 oxytetracycline과 chlortetracycline이 각각 0.1mg/Kg, tetracycline이 0.25mg/Kg으로 각각 규제되고 있다.

전통적으로 미생물학적 방법과 면역학적방법이 이용되었지만 특이성 한계 때문에 제한적으로만 사용되고 있고, HPLC를 이용한 방법이 주로 confirming 단계에서 이용되고 있다.

본 연구는 식육 중 잔류항생물질 분석에 관한 효율적인 시험방법 개발의 측면에서 테트라싸이클린계 분석에 대한 두 가지의 전처리 방법의 회수율과 검출한계 등을 비교 분석함으로써 Peak의 분리와 감도가 국내 잔류허용기준 범위에서 정성 및 정량 분석법으로써 응용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

농협공판장에서 채취한 식육(쇠고기, 돼지고기)에 대하여 Bioassay 및 CharmⅡ를 이용하여 Radioimmunoassay로 검사한 후 잔류항생물질이 검출되지 않은 시료를 -18℃이하로 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

표준시약으로는 oxytetracycline hydrochloride, chlortetracycline hydrochloride, tetracycline hydrochloride, doxycycline hydrochloride(Sigma, USA)를 사용하였고, 1,000ppm 농도로 희석하여 냉장(4℃)보관하였다. Methanol, acetonitril 등의 유기용매는 HPLC grade를 citric acid, ethylene diamine tetraacetic acid, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, oxalic acid 등의 시약은 시약급 이상의 것을 사용하였다. MSPD를 위한 bulk material은 Bakerbond C-18 Bulk LC packing(40㎛, 60Å)을 사용하였다. Buffer I은 citric acid, disodium hydrogen phosphate, EDTA를 1.29g, 2.76g, 0.37g씩 각각 넣고 증류수를 넣어 100ml로 만들고 pH는4.5로 조정하였다. 이동상 용매는 methanol/acetonitril/0.01M oxalic acd (17.5:17.5:65)로 만들어 membrane filter (0.45㎛)로 여과하였다.

본 실험에서 사용한 HPLC 기기는 Waters 2690 Alliance system, 486 UV detector, Auto sampler 그리고 Date system으로 Millenium 32 chromatography manager를 사용하였고, 원심분리기는 Beckman사의 Avanti 30 centrifuger를, rotary evaporator는 Heidolph vv20001, 그리고 시료정제를 위해서 Supelco의 visi prep DL을 vacuum manifold system으로 사용하였다. 칼럼은 Nova-Pak C18 column(4.6㎛, 3.9 × 150)을 사용하였고, SPE에서는 Sep-Pak (Waters, USA)를 사용하였으며, syringe filter는 0.45㎛ acrodisc를 시료 주입 전 여과에 사용하였다(Table 1).

Table 1. Analytical condition of tetracyclines by HPLC

Column	Nova-Pak C18 (3.9 ×150 mm)
Mobile phase	methanol / acetonitril / 0.01M oxalic acd(17.5 : 17.5 : 65)
Detection	UV @ 360 nm
Flow rate	0.7 ㎖/min
Injection volume	50 ㎕

3. 실험방법

표준용액을 10ppm의 농도로 희석 후, control 시료가 100ng/g, 200ng/g, 1,000ng/g의 농도가 되도록 각각 첨가하여 상온에서 약 30분간 방치한 다음 실험하였다.

시료에서의 각 테트라싸이클린계 항생물질에 대한 회수율을 구하기 위해서 각 농도의 표준용액의 peak 면적 값을 얻은 다음, 농도에 대한 peak 면적 값의 직선 회귀 방정식을 구하여 약제 첨가한 시료의 면적 값을 대입하여 농도를 구한 후 회수율을 계산하였다(Fig. 1, 2).

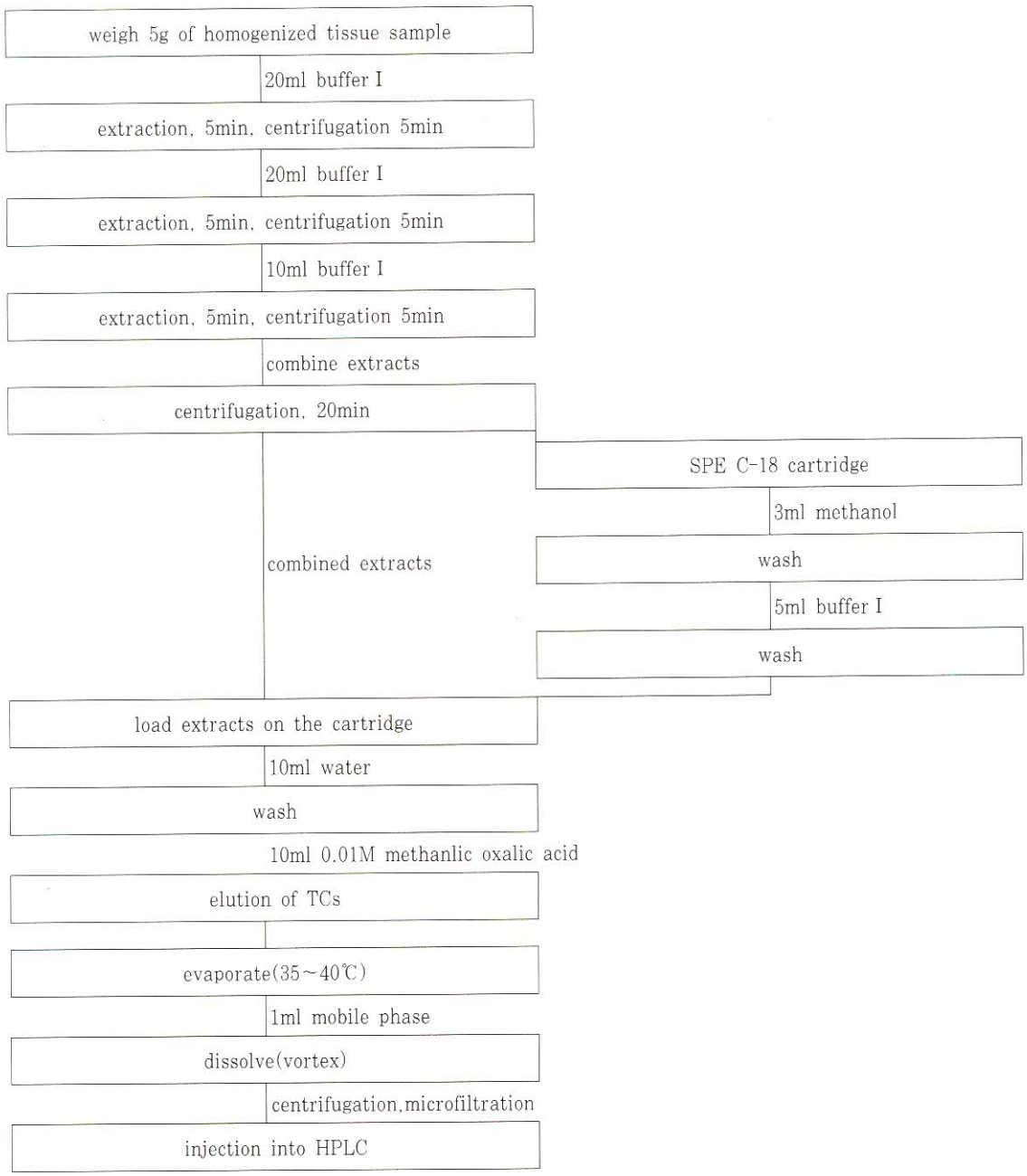

Fig. 1. Flow diagram of Solid phase extraction(SPE) procedures for tetracycline residue analysis in meats.

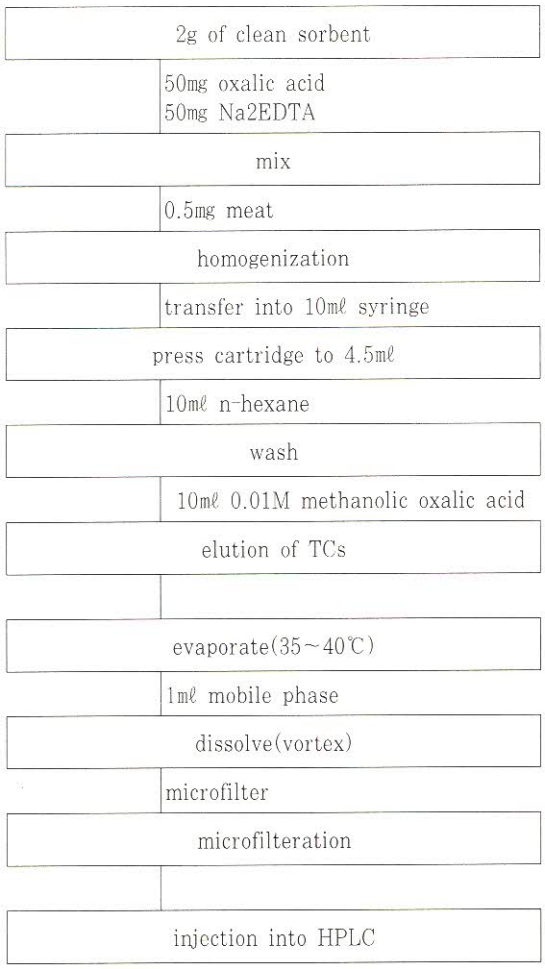

Fig. 2. Flow diagram of matrix solid phase dispersion(MSPD) procedures for tetracycline residue analysis in meats.

결과 및 고찰

Symmetry column C18(150×3.9mm)으로 분석한 결과, 분리능은 Nova-Pak C18칼럼보다 더 좋았으나, OTC와 TC가 겹쳐 나오는 등의 Peak의 분리에 문제점이 있었고, Symmetry column C18(100×3.9mm, 50×3.9mm)에서는 retention time이 너무 빨랐으며, interference가 있어 분석조건이 좋지 않았고, 이동상 용매는 극성도, pH 등에 따라 최적의 용매를 선택하였다. Retention time은 OTC, TC는 3분대, CTC는 8분대, 그리고 DC는 16분대에 각각 분리되었고, 테트라싸이클린계 항생물질의 농도가 0.1ppm되게 첨가했을 때 회수율은 SPE법에서는 74~98%, MSPD법에서는 72~93%의 좋은 회수율을 보여주었고 0.2ppm되게 첨가했을 때는 각각 69~92%, 67~89%의 회수율을, 1ppm의 농도로 첨가했을 때는 각각 69~92%, 67~87%의 회수율을 나타내었다. 첨가 농도가 높아질수록 회수율이 점진적으로 낮아지는 경향을 보였고 MSPD법보다 SPE법이 회수율이 약간 높았지만, SPE법은 추출과정이 다소 복잡하고, 시간이 많이 걸리며, 용매량이 많이 사용되는 단점이 지적되었다.

이상의 결과에서 각각의 시료를 전처리하여 분석한 결과 peak의 분리와 감도가 국내 잔류허용기준 범위에서 정성 및 정량 분석법으로서 적용될 수 있음을 볼 수 있었다(Table 2, Fig. 3, 4).

Table 2. Mean recoveries and standard deviations of tetracyclines isolated from fortified meat samples(n=6)

		OTC(%)	TC(%)	CTC(%)	DC(%)
SPE	100 ng/g	98.1±7.3	93.4±7.1	85.1±8.6	74.4±9.5
	200 ng/g	92.7±6.1	89.7±6.8	83.9±8.8	69.2±5.1
	1000 ng/g	92.5±3.2	89.5±6.3	78.5±7.2	69.5±5.7
MSPD	100 ng/g	93.2±8.5	91.6±8.5	82.2±8.5	72.2±5.3
	200 ng/g	89.6±8.5	88.6±7.7	79.9±8.5	67.4±8.5
	1000 ng/g	87.2±4.3	88.2±7.1	75.1±7.9	67.2±3.7

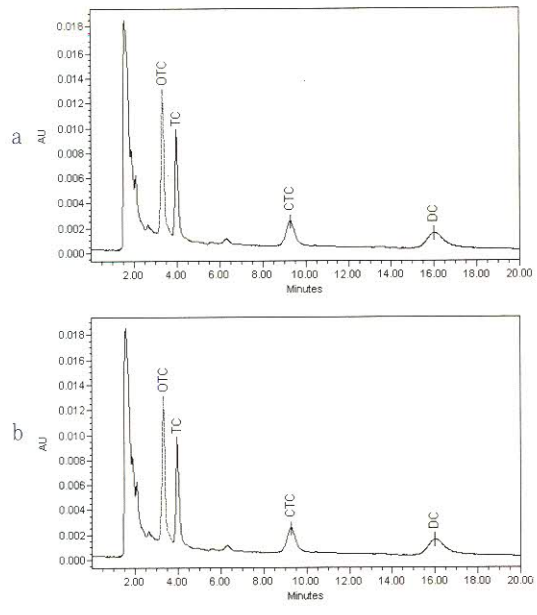

Fig. 3. HPLC chromatograms of MSPD extracts of control(a) and fortified (1,000 ng/g) meat sample(b).

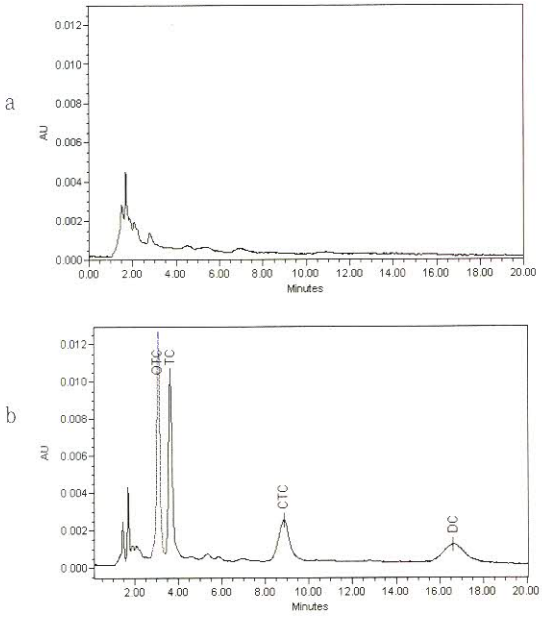

Fig. 4. HPLC chromatograms of SPE extracts of control(a) and fortified(1,000 ng/g) meat sample(b)

결 론

식육의 HPLC법에 의한 테트라싸이클린계 잔류항생물질 분석을 위한 전처리 방법 중 SPE(Solid phase extraction)법과 MSPD(Matrix solid phase dispersion)법에 대하여 비교 실험을 실시하였다. 옥시테트라싸이클린(OTC), 테트라싸이클린(TC), 클로르테트라싸이클린 그리고 독시싸이클린 등 잔류항생물질에 대해 100ng/g의 농도 수준에서 회수율은 SPE에서는 74~98%, MSPD에서는 72~93%로 각각 나타났고, UV 검출기에 의한 검출한계는 SPE법은 15~78ng/g, MSPD법은 25~84ng/g으로 각각 나타났다.

이상의 결과에서 각각의 시료를 두 가지 방법으로 전처리 후 분석한 결과 Peak의 분리와 감도가 국내 잔류허용기준 범위에서 정성 및 정량 분석법으로서 적용될 수 있음을 알 수 있었다.

참고문헌

1. The Miller Publishing co.: Feed additive compendium, p334(1992)
2. Code of Federal Regulation: The office of the federal register national archives and records administration., Food & Drug, part 21(1991)
3. Nicholas, H.B., and Mcdonald L.E. : Veterinary pharmacology and therapeutics. 6ed. Iowa State University Press, p813(1985)
4. Thomas, M. H. : Simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk by liquid chromatography. J. of AOAC International, 72:564(1989)
5. Noben, J. P., Missotten, M., Hendriks, L., Leyssens, L., and Raus, J. : Determination of oxytetracycline in kidney and diaphragm. proceedings of euroresidue III, Veldhoven, p760(1996)

6. Farrington, W. H., Tarbin, J., Bygrave, J., and Shearer, G. : Analysis of trace residues of tetracyclines in animal tissues and fluids using metal chelate affinity chromatography / HPLC. Food additives and contaminants, 8:55(1991)
7. Frgalova, K., Hera, A., and Valova, J. : Determination of veal calves by high performance liquid chromatography and ELISA. Proceedings of euroresidue III, Veldhoven, p407(1996)
8. Michel, M. : Analysis of antibiotics by gas chromatography II. J. chromatography, 47:341(1970)