

HPLC를 이용한 우유 중에 잔류 항생물질(Streptomycin)의 정량 분석

변장원 · 박환석 · 홍고은 · 홍무기¹ · 박관하² · 이치호

건국대학교 축산식품생물공학, ¹식품의약품안전청, ²군산대학교 해양대학

서 론

축산식품에 있어 가축 생산성을 높이거나 질병치료 및 예방에 사용되는 항생물질이나 합성항균제의 남용으로 이들이 축적된 축산식품을 장기간 섭취할 경우 인체로 이행됨으로써 내성균의 출현 및 조혈기능장애와 같은 인체에 대한 위험성이 크므로 이들에 대한 식품 내 항생물질 잔류 검사에 관심이 높아지고 있다.

Streptomycin(STP)은 방선균의 일종인 *Streptomyces griseus* 의 대사 물에서 발견된 항결핵성 항생물질로 많은 그람 음성 균을 비롯한 광범위한 병원미생물에 작용하는 아미노 글리코사이드계 항생물질로 잘 알려져 있다^(1, 2). Streptomycin의 구조는 Fig. 1에 나타난 바와 같다.

아미노글리코사이드 항생물질은 streptomycin 및 dihydrostreptomycin을 비롯해 16종에 이르고 있다. 지금까지의 항생물질 분석법으로 Bioassay 법, TLC(thin layer chromatography)법, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)법, GC(gas chromatography)법 및 HPLC(high performance liquid chromatography)법 등이 주로 이용 되어지고 있다^(3, 4, 5).

Streptomycin 등에 대한 공인분석법으로 Bioassay 법과 HPLC법이 있으나, 이 같은 분석방법으로는 추출방법 및 유도체화 과정을 통해야만 하는 매우 복잡하고 검출감도가 매우 낮은 것이 문제점으로 지적되어 왔다. Whall 등이 Streptomycin의 HPLC분석법을 소개한 바가 있으며,^(6, 7, 8) Edder등이 또한, streptomycin 분석을 형광 검출기와 LC를 이용해 측정 한 바가 있다.⁽⁹⁾ 본 연구에서는 이러한 여러 가지 방법들 중 특히, Edder의 분석법을 개선하여 회수율과 재현성을 높이하고자 하였다.

본 연구에서는 추출 및 clean-up 과정을 통해 형광 검출기를 이용해 신속, 정확하고도 고감도인 잔류항생물질 시험법을 개발할 목적으로 새로이 개발된 Parallax kit screen test(IDEXX Lab. Inc.)

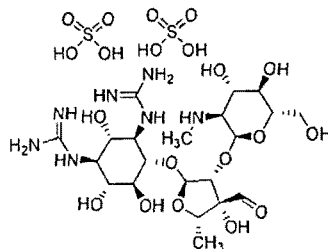


Fig. 1. Structure of streptomycin sulfate salt

와 Edder 등이 보고한 Streptomycin의 추출과정 및 정제과정을 병용 수정해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시료

서울시내에 유통되고 있는 시료용 우유를 CODEX의 권장량에 따라 구입하였고, 채취한 시료는 -20°C 상태로 보관한 후 1주 이내 실험 하였다.

2. 기기 및 시약

시료 제조에 이용된 Streptomycin sulfate salt와 이동상 제조 및 시료의 희석 용매제조에 이용된 Sodium 1-heptane-sulfonate(AHS) SigmaUltra, 이동상 제조에 이용된 1,2-Naphtho-quinone-4-sulfonic acid (NQS), 유도체화 장치의 용매 제조에 이용된 Sodium hydroxide (NaOH)와 0.2M 인산 완충용액 제조에 이용된 Potassium Phosphate monobasic(KH_2PO_4)과 Potassium Phosphate dibasic(K_2HPO_4)은 모두 Sigma-Aldrich사(SIGMA-ALDRICH, Inc., U.S.A.)에서 구입하였다. SPE clean-up 세척 단계에 이용된 Methanol(MeOH)과 이동상 제조에 이용된 Acetonitrile(ACN), HPLC용 증류수는 모두 J. T. Baker(Mallinckrodt Baker, Inc. Phillipsburg, NJ U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.

Perchloric acid (HClO_4) 70% ACS grade는 Samchun Pure Chemical (Columbus, U.S.A.)에서 구입하였다. 이동상 및 시료 등의 pH조정용 시약으로 이용된 Phosphoric acid(H_3PO_4)는 Showa(Showa chemical co., LTD. Japan)에서 구입하였다.

3. HPLC에 의한 시료의 분석조건

Agilent 1100 series HPLC system에 형광 검출기 ProStar 363 Fluorescence (Varian, U.S.A.)를 사용하였다. 분리는 45°C 에서 $4.0 \times 100\text{mm}$, $3\mu\text{m}$ 의 Hypersil BDS-C18 칼럼(Agilent, U.S.A.)을 사용하였다.

이동상은 0.01M AHS 880ml에 0.8g NQS를 녹인 용액과 ACN의 비율을 880:120의 비율로 하여 섞은 후에 갈색병에 보관하여 이용하였다.

측정파장은 입사광 파장(λ_{ex})=260nm, 형광 파장(λ_{em})=435nm이며, 이동상의 유속은 0.8 mL/min 로 하였다.

1) 시료조제 및 HPLC 방법

Edder의 방법을 수정한 전체적인 조제 및 측정 과정은 다음과 같다.

추출은 우유 시료를 5mL로 하였다.

전처리 과정은 우유시료 5mL을 50mL 원심관에 취한 후 0.01M perchloric acid (pH 2.0) 20mL를 가한 후 3분간 균질화하고, 이를 3,500rpm에서 20분간 원심분리를 하고 paper filtering(Whatman No. 1)한 후 추출액으로 하였다.

그 후 Strong Cation Exchange(SCX) 카트리지 Oasis[®] MCX(60mg/3mL, Waters OASIS U.S.A.)에 추출액을 흡착시킨 후 0.1N HCl 2ml와 MeOH 2ml로 세척한 후 0.02M 인산완충액

(pH 8.0) 25mL로 용출시켰다. 용출액은 C18 카트리지(500mg)에 흡착 추출 과정(clean-up)을 배제시킨 후 55°C water bath에서 30분간 진공 농축했다.

2) 크로마토그래픽 조건

크로마토그래픽 분리는 이동상은 0.01M AHS 880ml에 0.8g NQS를 녹인 용액과 ACN의 비율을 880:120의 비율로 하여 섞고 phosphoric acid을 이용해 pH 3.3으로 조정해 제조한 후, 갈색병에 보관하여 이용하였다. 칼럼은 Hypersil BDS-C18 (4.0 × 100mm, 3 μ m)이며 유속은 0.8ml/min, 측정 파장은 입사광 파장 260nm, 형광파장 435nm이며 칼럼 후 유도체화 장치는 반응 온도는 55°C, 이동상은 0.1M 수산화나트륨으로 하였다.

4. 우유 내 잔류 항생물질(STP)을 분석하기 위한 Parallax System(Parallax processor, Model 89-31099, IDEXX Lab. Inc.)

시료조제과정에 얻어진 용출액을 감압 농축 한 후 우유에 잔류하는 항생물질을 여부를 4분 이내에 알아낼 수 있는 최신의 장비로 항체를 기질로 면역반응에 근거한 것으로 측정과정이 2단계로 매우 신속하고 정확하게 측정할 수 있는 장비이다. 즉 바코드를 읽은 뒤 Reagent tray의 각 well에 100 μ l씩 분주해 결과를 입력하여 출력된다. 여기에서 제조된 combo kit를 이용해 STP를 분석해 내었다. 여기서 LOQ를 알아보기 위해서 시료인 우유에 STP의 농도를 400ppm, 200ppm, 40ppm, 4ppm, 0.2ppm으로 spiking 한 뒤 perchloric acid(pH 2.0) 20mL를 첨가해 3분간 균질 한 뒤 5°C 3500rpm에서 20분간 균질한 후 여과한 뒤 clean up과정을 거치게 했다. 이 과정에서는 SCX(Oasis[®] MCX) cation-exchange column(60mg/3ml)을 이용해 시료를 추출해 내었다. 칼럼세척은 2ml 0.1N HCl, 2ml 100% MeOH를 흘려내게 하고 인산완충액(pH8.0)으로 용출시켜 Parallax system에 적용시켰다.

결과 및 고찰

본 연구에서 개발된 HPLC 분석법은 우유에서 Streptomycin 잔류 항생물질 분석에 선택성 및 감도 면에서 뛰어나 실제 적용 가능하다. 재현성, 표준곡선 상관관계수 범위, 검출 및 정량관계는 CODEX와 관련해서 Streptomycin 분석 감도에 거의 접근해 있다. 우유 내 잔류 항생물질 분석에 대하여 HPLC 법이 IDEXX ELISA KIT test와 비교한 바, ELISA 결과는 HPLC 법과 양의 상관관을 보였다.

이러한 경우에, screening test 로써 ELISA KIT test는 아직까지 측정방법이 확립되지 않은 Streptomycin과 같은 항생물질 screening에 매우 유리할 것으로 판단되었다.

1. 검량선 작성 정량정도의 검증

우유내 잔류항생물질을 검출하기 위해 STP의 각 농도별로 피크 면적을 구한 뒤 검량선을 작성하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타내었듯이 피크면적으로부터 STP의 양호한 검량선을 나타냈다. Fig. 2으로부터 $r^2=0.984$ 인 직선상의 검량선이었다.

2. The Qualitative and Quantitative aspects of the LC system

표준시료와 항생제를 첨가한 우유 시료로부터 STP를 본 연구의 방법대로 추출해 HPLC 분석

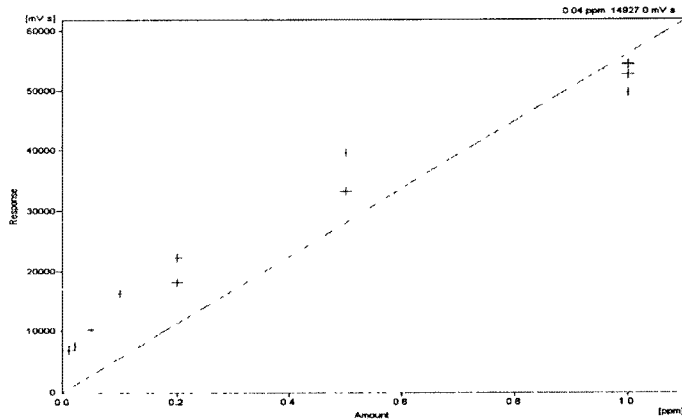


Fig. 2. Standard curves between peak area and concentration of streptomycin by high performance liquid chromatography. The curves were composed with the residual concentration between 0.02~1.0ppm ($r^2 = 0.984$).

을 한 결과는 다음 Fig. 3 과 Fig. 4 와 같다.

3. 검출한계

우유 내에서의 streptomycin CODEX MRL, LOD 및 LOQ를 Table 1에 나타냈다.

우유 내 시료(n=6)로부터 streptomycin LOD를 측정 한 결과 LOD는 0.02ppm이었으며, Whall의 195nm에서 나타난 2ppm보다 더 낮은 수치였다. LOQ는 우유에 streptomycin 0.5 ppm을 spiking 한 우유 시료로부터 LOD와 같은 방법으로 추출과정을 거친 후 분석한 결과

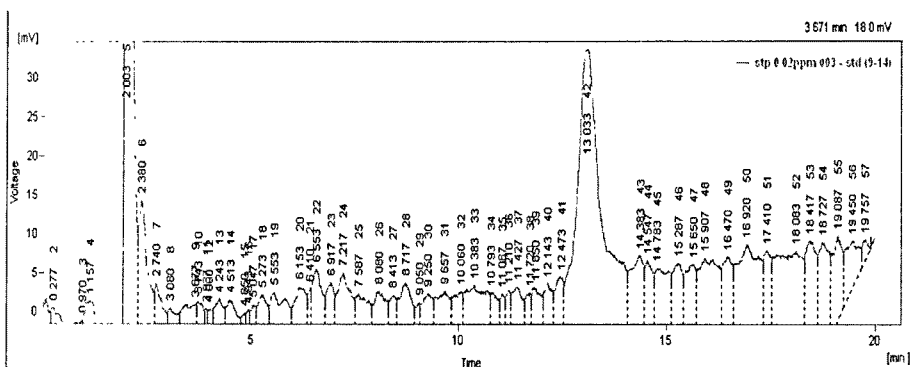


Fig. 3. Presentative chromatogram of the streptomycin standard.

Stationary phase, Hypersil BDS-C18, 3 μ m, (4.0 \times 100mm), Column temperature, 45 $^{\circ}$ C, Mobile phase, an aqueous solution containing 0.8g of NQS in 0.01M AHS 880ml be adulterated with ACN 120ml (pH 3.3). Flow rate 0.8ml/min, Sample size: 100ul, Detector: Fluorescence at 435nm, and Retention Time(RT): 13.033 42, streptomycin

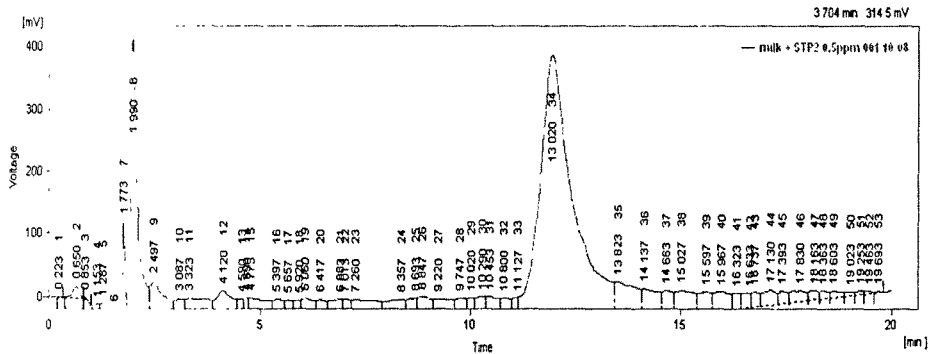


Fig. 4. Presentative chromatogram of the fortified streptomycin(0.5ppm) in milk. Stationary phase, Hypersil BDS-C18. 3 μ m, (4.0 \times 100mm), Column temperature, 45 $^{\circ}$ C, Mobile phase, an aqueous solution containing 0.8g of NQS in 0.01M AHS 880ml be adulterated with ACN 120ml (pH 3.3). Flow rate 0.8ml/min, Sample size: 100ul, Detector: Fluorescence at 435nm, and RT: 13.020 34, streptomycin.

0.44ppm수준으로 나타나 이러한 결과로부터 본 방법을 통하여 CODEX MRL인 0.6ppm에 도달한 것으로 나타났다.

Table 1. Limits of detection(LOD), limits of quantification(LOQ) and maximum residual levels(MRL) for streptomycin residual in milk

LOD(mg/kg, ppm)	LOQ(mg/kg, ppm)	MRL(mg/kg, ppm)
0.02	0.5	0.6

¹⁾LOD: limit of detection, ²⁾LOQ: limit of quantification, ³⁾MRL: maximum residual levels.

Table 1에서 나타낸 바와 같이 0.02ppm 수준의 STP에서도 정확도가 매우 높게 측정할 수 있었으며 또한 이때의 피크면적이 7543.21(mV·S)인 것을 유추해 보면 아마도 0.6ppm수준에서의 측정은 매우 용이하게 측정할 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서 STP의 MRL이 0.6ppm으로 상당히 높은 감도로 정확하게 측정할 수 있는 것으로 판단되었다.

2. Streptomycin Recoveries and Repeatabilities

우유 내 잔류 streptomycin에 대한 회수율과 재현성은 Table 2에 나타낸 바와 같다.

본 실험의 추출법을 이용한 우유내의 streptomycin의 회수율은 89.7 \pm 2.3%였으며, 재현성은 83.3%를 나타냈다. 재현성에 미치는 가장 중요한 시험단계는 SPE(solid phase extraction) clean-up단계로, 본 연구에 의하면 C18 cartridge column에 의한 두 번째 clean-up과정에서 세척단계 중에 손실이 큰 결과로 회수율이 낮게 나타난 것을 발견했다. 따라서 본 연구에서는 C18 SPE를 이용한 Clean-up 단계를 제외시켰다. 그 결과 회수율은 89.7 \pm 2.3%이었으며, 재현성은 기존의 6%보다 월등히 높은 83.3%로 나타났다.

Table 2. Recovery and repeatability of 0.5ppm streptomycin fortified milk

Recovery(%)	Repeatability(%)
Milk(n=6 : 89.7±2.3)	83.3

Mean±S.D.(n=6) of the recovery percentage.

4. 우유 내 잔류 항생물질(STP)을 분석하기 위한 Parallax System(Parallax processor, Model 89-31099, IDEXX Lab. Inc.)

본 실험기와 관련된 combo kit를 이용해 STP를 분석해 낸 결과는 우유에서 STP의 LOD는 0.2ppm이었으며, LOQ는 0.2ppm인 것을 확인하였다. STP 400ppm을 spiking한 후 clean-up 과정을 거친 경우 positive로 1.55±0.019(n=6)의 수치를 나타냈고, 200ppm인 경우 1.41±0.007, 40ppm인 경우 1.59±0.049, 4ppm인 경우 1.54±0.024, 0.2ppm인 경우 positive로 1.13±0.07(n=10)를 나타내었다.

Table 3. Qualitative comparison for streptomycin residual analyses in milk by HPLC with Parallax with SPE clean-up

	Parallax with clean-up	
	Negative	Positive
HPLC-positive	0	5
HPLC-negative	1	0

우유 시료 내의 streptomycin 잔류량을 Parallax screening test의 시험결과와 비교한 HPLC 크로마토그래픽 결과를 Table 3에 요약했다.

본 Parallax screening test의 시험목적은 우유 내의 streptomycin을 알아내는데 사용 가능한 지 여부와 본 연구에서 개발하고자하는 HPLC법과 정량관계를 알아보기 위하여 실시하였다. 본 연구에 사용된 Parallax screening test기는 현재 streptomycin 잔류량을 파악하는데 사용되고 있는 간편 측정 기기이다. Table 3은 Edder의 추출방법을 획기적으로 수정한 clean-up기술 이용해 Parallax screening test 및 HPLC 결과를 요약한 것이다. Parallax screening test에서 얻어진 결과를 토대로 HPLC분석을 실시한 결과 Parallax screening test에서 얻어진 결과가 positive인 것을 HPLC분석을 통해서 거의 같은 수준으로 positive하게 나타났으며, 그 후 정량값을 구할 수 있었다.

요 약

축산식품(우유)내의 잔류항생물질을 신속하고 간편하고 정확하게 분석하기 위한 시험법 개발을 목적으로 하였다.

축산식품내의 일반적인 잔류항생물질에 대한 지금까지의 분석법으로는 Bioassay법, TLC법, ELISA법, GC법 및 HPLC법 등이 있지만 Streptomycin/dihydrostreptomycin, neomycin에 대한 HPLC법은 거의 확립되어 있지 않은 실정이다. 우리나라의 공인 검사법으로는 Bioassay법

및 HPLC법등이 있지만 그러나 지금까지의 방법으로는 검출감도가 낮은 것이 큰 문제점으로 되어 왔다. 본 연구에서는 STP에 대한 HPLC법에 대한 보고한 Edder 방법 중에 clean-up 과정 및 이동상 조건을 대폭 수정하여 STP의 분리 및 검출감도를 낮추려고 시도하였다. 본 연구에 사용된 유도체화 장치 Post-Column Derivatization Instrument PCX 5100 (Pickering Laboratories, Inc.)의 컬럼온도는 40°C, 오븐온도 55°C, 유도체화 용매 유속 0.6ml/min 이동상 유속 0.8ml/min으로 검출기는 형광검출기를 이용하여 STP 검출에 대해 만족할 만한 결과를 얻었다. 이때의 분석소요시간은 약 15분이었다. 표준시료 STP의 검량선은 넓은 농도범위(0.02~1.0ppm)에서 양호한 직선성을 나타냈다. 본 시험법에 의한 검출한계는 limit of detection (LOD)은 0.02ppm이었으며, 적어도 우유에서의 MRL이 0.6ppm임을 감안하면 STP를 정량적으로 정도 좋게 측정할 수 있다는 것을 확인했다. 상기의 조건하에서 실제시료인 우유에 표준 STP를 0.5ppm을 spiking한 후 SPE상에서 SCX(Strong cation exchange column)을 통한 clean-up과정을 거친 후의 STP의 limit of quantification(LOQ)는 약 0.44ppm이었으며, 이에 대한 회수율은 89.7±2.3%(n=6)를 나타냈다. 실제 CODEX에서 권장한 우유의 MRL이 0.6ppm인 점을 감안하면 CODEX 권고치에 도달할 수 있는 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서 개발된 시험법은 지금까지 국내적으로 STP에 대한 시험법이 확립되어 있지 않은 것으로 이와 아울러 간편한 parallux와 병용해 STP에 대한 정량 및 정성 분석을 유도체화 장치 및 형광검출기를 이용해 잔류항생물질 STP에 대한 분석시험법을 개발하였다.

참 고 문 헌

1. Lynn G. Friedlander, Rockville, Rainer W. Stephany, Bilthoven, Dihydrostreptomycin and streptomycin, 41/14.
2. A.Schatz, E. bugie and S. A. Waksman, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 55(1944)66.
3. St. Bogdanov, Current state of analytical methods for the detection of residues in bee products, 19-22, 2003.
4. M. Horie and H. Nakazawa, Analysis of residual chemicals in food. Bunseki Kagaku, 45(4)(1996), 279-308.
5. Masakazu Horie and Hiroyuki Nakazawa, Analysis of residual chemicals in food(Review), Bunseki Kagaku, 45(4)(1996) 279-308.
6. Michel van Bruijnsvoort, Stef J. M. Ottink, Klaas M, Jonker, Enne de Boer, Determination of streptomycin and dihydro streptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 1058(2004) 137-142.
7. T. J. Whall, *J. Chromatogr.*, 161(1981) 89-100.
8. E. Adams, M. Rafiee, E. Roets, J. Hoogmartens, Liquid chromatographic analysis of streptomycin sulfate. *J. Pharm. and Biomed. Analysis*, 24(200) 219-226.
9. P. Edder*, A. Cominoli, C.Corvi, Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection, 830(1999) 345-351.