

HPLC를 이용한 우유중의 클로람페니콜의 정량 분석

김경래 · 김정한* · 최경숙*

성균관대학교 약학대학 · *연세대학교 식품공학과

(Received January 5, 1985)

Determination of Chloramphenicol in Milk by High Performance Liquid Chromatography

Kyoung Rae Kim, Jung Han Kim* and Kyoung Sook Choi*

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 170 and *Department of Food Engineering, Yon Sei University, Seoul 122, Korea

Abstract—Seven different sorbents were evaluated for their adsorptivity and desorptivity of antibiotic, chloramphenicol. Among the sorbents studied, Carbopak B was found to be the most efficient in enriching the chloramphenicol from dilute aqueous solution. Interfering components in the milk matrix could be washed off by water and petroleum ether from Carbopak B column, while the chloramphenicol was retained on the surface of Carbopak B. The method of simple and efficient purification and enrichment of chloramphenicol using Carbopak B, followed by quantitative analysis employing C₁₈ reversed phase high performance liquid chromatography has been applied to the determination of chloramphenicol in milk.

클로람페니콜(CP) (D-threo-2-dichloroacetamide-1-nitrophenyl 1,3-propanediol)은 *Streptomyces venezuelae*가 생산하는 항생제¹⁾로서, 가축의 질병치료에 널리 사용되고 있는데, 젖소의 유선염 및 유방염의 치료시 혈액을 통해 CP가 우유로 혼입되고 있어 식품위생에 문제가 되고 있다.^{2,3)} CP는 적혈구의 기능을 약화시켜 hemoglobin의 생산을 억제하여 재생불능의 빈혈을 유발하므로⁵⁾ 유제품의 CP잔유량을 측정하는 것은 국민보건상 매우 큰 의미가 있다. CP의 정량법으로는 biological assay,⁴⁾ electrophoretic assay,⁶⁾ gas-liquid chromatography(GLC)^{7,8)}와 high performance liquid chromatography(HPLC)가⁹⁻¹⁶⁾ 있는데, biological assay와 electrophoretic assay는 감도가 낮고 (0.5~1ppm) 선택성이 적으며, GLC는 휘발성의 유도체를 만들어야 하므로 최근에는 HPLC를 이용한 분석이 활발해지고 있다.

생체내의 미량 성분을 분석할 때는 첫째, 미량 성분을 순수분리하여야 하고, 둘째 기존의 기기로 감지할 수 있도록 농축해 주어야 한다. Wal⁹⁾ 등은 에틸 아세테이트 抽出과 2회의 液-液分配 3회의 농축 과정으로 우유로부터 CP를 분리, 농축하였으며 Crechiolo¹¹⁾ 등은 에틸 아세테이트 抽出과 2회의 液-液分配가 포함된 방법으로 혈액에서 CP를 분리, 농축하였다. 따라서, 본 연구에서는 CP를 잘 흡착시키는 흡착제를 선정하여 液-液分配 조작없이 CP를 우유로부터 분리, 농축할 수 있는 방법을 개발하여 본 방법으로 우유 중의 CP잔유량을 측정하였다.

실 험 방 법

기기 및 시약—시판중(1984년 10월~12월 사이)인 우유와 분유를 시료로 선택하여 품질보증한 날짜내에 사용하였으며, 시약으로는 CP(국제약품, Korea), thiamphenicol(TP) (Sigma Chem.

Co., USA), methanol, 물과 석유 에텔 (Rots Chem. N.V., Belgium) 을 사용하였고, 흡착제는 Boron nitride(BN) (80/100mesh, Union Carbide, USA), Carbopak B (CB) (80/100mesh, Supelco Inc., USA), XAD-2(60/80mesh, Supelco Inc., USA), XAD-7(60/80mesh, Supelco Inc., USA), Sep-pak C₁₈(200/400mesh, Waters Assoc. Inc., USA), Alumina(60/80mesh, Su-pelco Inc., USA)와 Porapak Q(50/80mesh, Alltech Assoc. Inc., USA) 를 이용하였다.

정량곡선의 작성을 위한 CP 용액은 내부표준 물질 TP가 첨가된 methanol($2.5 \times 10^{-8} \text{g}/\mu\text{l}$)에 CP를 녹여 사용하였으며, 그 외의 CP표준 용액은 탈이온수에 CP를 녹여 $10^{-8} \text{g}/\mu\text{l}$ 용액을 조제하여 사용하였다. 분석에 사용한 HPLC는 Waters Model 244이며, 분석조건은 Table I과 같다.

Table I-HPLC conditions of chloramphenicol.

Column	10 μm μ Bondapak C ₁₈ (300 \times 3.9mm I.D.)
Mobile phase	40% methanol in water, 1ml/min.
Detector	UV at 280nm
Sample size	10 μl

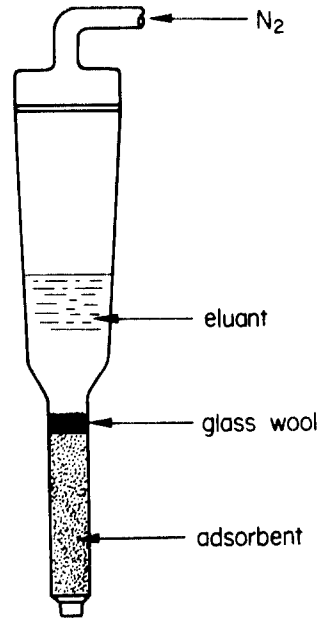


Fig. 1-Sampling apparatus.

흡착제의 CP 흡착능 시험—회석된 수용액중의 CP를 가장 잘 흡착시키는 흡착제를 선정하기 위해 Sep-pak C₁₈을 제외한 흡착제를 0.2g씩 Polypropylene Econo Column™(0.7 \times 4.0cm, Bio-rad Lab., USA)에 넣어 사용하였고(Fig. 1), Sep-pak C₁₈은 0.35g의 시판되는 것을 그대로 사용하였다. BN, CB, Sep-pak C₁₈과 Alumina는 methanol로, XAD-2, XAD-7과 Porapak Q는 acetone, methanol, methylene dichloride와 methanol의 순으로 씻어주고, 물로 평형시킨후 사용하였다. CP표준용액 1ml를 column에 넣어 filtrate(A)와 물로 용출시킨액(B)을 모아, (A+B)가 2ml가 되도록 한 다음, column내의 수용액을 없앤 다음, methanol로 용출하여 methanol 용출액 2ml(C)를 모은 후, (A+B)와 (C)용출액내의 CP량을 측정하였다.

CB의 적정용출량 시험—CB에 흡착된 10 μg CP를 회수하기 위한 methanol의 최소량을 정하기 위해, methanol 용출액 5ml를 1ml씩 모아서 1ml내의 CP량을 측정하였다.

CB의 적정량 시험—CB의 적정량을 선정하기 위해 CP 10 ^{-5}g 을 50ml물에 녹여 0.2g과 0.5g CB로 충전된 각각의 column에 넣은 후, 물과 석유 에텔로 씻어주었다. 석유 에텔을 완전히 제거한 후 methanol용출액중의 CP함량을 측정하여 회석에 의한 CB의 흡착능을 조사하여 CB의 최소적정량을 선정하였다.

CB를 이용한 sampling 방법의 효능시험—본 방법의 재현성과 회수율 및 정제된 정도를 측정하기 위하여 CP가 첨가된 우유 50ml(10ppb)를 시료로 하여 본 방법으로 실험하였다.

우유와 유분중의 CP 정량분석—시유와 분유 50ml를 CB에 통과시킨 후 물과 석유 에텔로 씻어

내고, TP가 첨가된 methanol로 용출하여 TP의 peak 높이에 대한 CP의 peak 높이비로서 CP의 잔유량을 측정하였다.

실험 결과 및 고찰

흡착제의 선정—흡착제의 CP흡착능을 시험한 결과(Table II), 비극성인 CB와 Sep-pak C₁₈은 CP를 모두 흡착하였고, XAD-2와 Alumina는 그대로 통과시켰으며 BN, XAD-7과 Porapak Q는 CB와 Sep-pak C₁₈보다 흡착능이 적었다. 무기흡착제 CB는 산 또는 알카리로 재생할 수 있으나, 반면에 Sep-pak C₁₈은 알카리 용액으로 씻어내면 siloxane bond가 깨어진다. 예비실험결과 Sep-

Table II—Adsorptivity and desorptivity of adsorbents with chloramphenicol solution(10⁻⁵g/ml).

Adsorbent	Recovery of CP(%)	
	Water eluate	Methanol eluate
Boron nitride	68.1	31.9
Carbopak B	0.0	100.0
XAD-2	100.0	0.0
XAD-7	53.8	46.2
Sep-pak C ₁₈ *	0.0	100.0
Alumina	100.0	0.0
Porapak Q	3.1	96.9

*0.35g

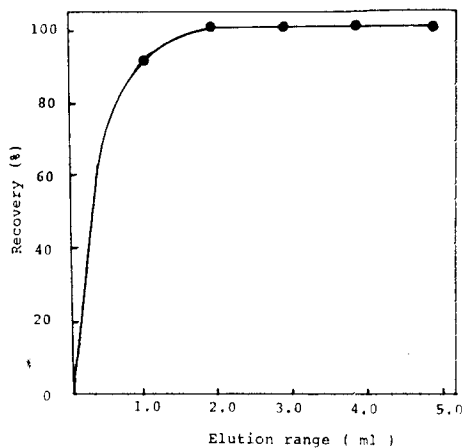


Fig. 2. Recovery of chloramphenicol (10⁻⁵g) from Carbopak B column with methanol elution.

pak C₁₈이 물로 완전히 포화되지 않았을 경우 CB에 대한 흡착능이 현저하게 감소됨이 확인되었고, CB보다 입자의 크기가 적어 우유를 시료로 사용할 경우 plugging현상으로 인해 sampling에 어려움을 겪었다. 이상의 실험결과로 CB를 선정하였다.

CB의 적정 methanol 용출량 선정—CB(0.2g)에 10⁻⁵g CP를 흡착시킨 후, CP를 100% 회수하기 위한 methanol의 최소량을 측정한 결과 2ml의 methanol이 필요하였다(Fig. 2). CB 0.1g당 methanol 적정용출량을 1ml로 선정하였다.

CB의 적정량 선정—CP의 회수된 수용액(10⁻⁵g CP/50ml)을 사용하여 0.2g과 0.5g CB로 충전된 column으로 CP의 흡착 회수실험을 한 결과, 각각 85.5±2.4%와 90.5±2.5%의 CP를 회수

Table III—Effect of dilution of chloramphenicol(10⁻⁵g) with aqueous solution on Carbopak B adsorptivity*.

Amount of Carbopak B(g)	Recovery from dilute sample(%)		
	10ml	50ml	100ml
0.2	91.7±2.2	85.5±2.4	82.0±2.5
0.5		90.5±2.5	

* After loading each chloramphenicol solution, wash with water and petroleum ether.

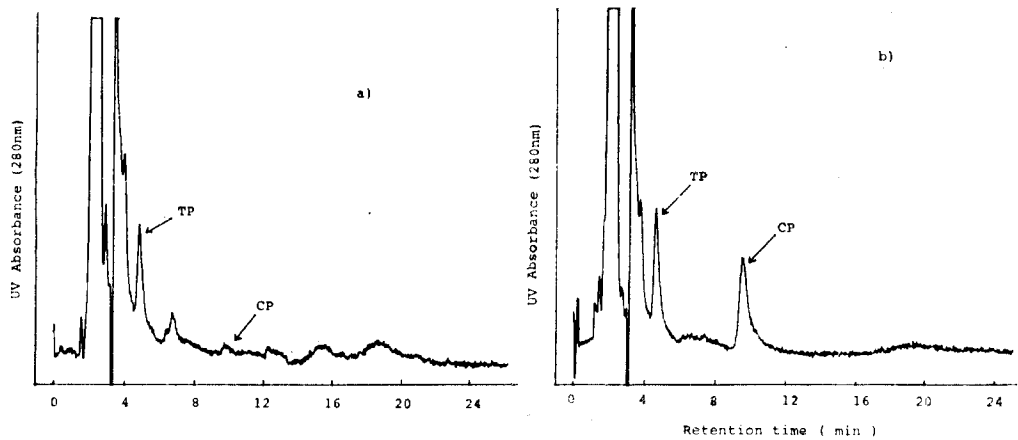


Fig. 3-HPLC chromatograms of milk sample.

a) blank milk. b) spiked with chloramphenicol(4ng).

Table IV-Efficiency of sampling procedure.

Matrix*	Amount of chloramphenicol		
	Added(ng)	Found(ng)	Recovery(%)
Water	500	452.5±12.5	90.5±2.5
Milk	500	355.0±24.5	71.0±4.9

*amount of matrix=50ml

하였다(Table III). 따라서, CB의 충전량은 0.5g이면 충분하다고 생각되어 0.5g CB column을 선정하였다.

CB를 이용한 sampling의 효능 측정—CP가 첨가된 우유를 시료로 하여 CP의 회수율을 측정 한 결과, 71.0±4.9%로 나타났으며(Table IV), Wal[®]등보다 정제된 시료를 얻을 수 있었다.

시유 및 분유의 CP정량—본 방법으로 시유 및 분유를 분석한 결과, 제품에 따른 CP의 농도차이는 다소 있었지만, 모든 시료가 0.5ppb이상의 CP를 함유하고 있었다.

Table V-Levels of chloramphenicol in milks.

Milk sample(50ml)	Found(ppb)	Milk sample(50ml)	Found(ppb)
A	0.9	E	0.6
B	0.6	F	1.0
C	0.7	G	0.5
D	0.8		

결 론

Carbopak B를 이용하여 液-液 分配조작 없이 우유중의 클로람페니콜(CP)를 분리, 농축할 수 있었으며, Wal 등의 방법보다 처리조작이 간단하면서도 더 정제된 시료를 얻을 수 있었다. 본 연구의 방법을 이용하여 우유와 분유의 CP함량을 측정 한 결과, 검토한 7종의 시료중에는 제품간

의 농도차이는 다소 있지만, 0.5ppb이상의 CP를 함유하고 있었다.

본 연구는 1984학년도 문교부 학술연구조성비의 지원으로 이루어졌으며 본 연구의 수행에 도움을 주신 GINSCO회사에 감사드립니다.

문 헌

1. R.Y. Stainer, E.A. Adelberg and J.L. Ingraham, *Microbial World*. Prentice-Hall Inc., New Jersey, 844 (1976).
2. P. Michael, High-pressure liquid chromatographic method for the determination of residual chloramphenicol, furazolidone and five sulfonamides in eggs, meat and milk, *Z. Lebensm-Unters Forsch.* **176**, 289 (1983). [C.A., **98**, 196502f].
3. J.H. Van der Stroom-Kruyswijk, H.W. Van Gend and R. Kommerij, Testing chloramphenicol for its excretion in milk using FAST liquid chromatography, *Tijdschr. Diergeneesk.* **108**, 145 (1983)[C.A., **98**, 196461s].
4. R.M. Hans, M. Galbraith and W.C. Alegnam in F. Kavanagh (Ed), *Analytical Microbiology*, Academic Press, New York, 271 (1963).
5. B.J. Gross, R.V. Branchflower, T.R. Burke, D.E. Lees and L.R. Pahl, Bone marrow toxicity in vitro of chloramphenicol and its metabolites, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **64**, 557 (1982)
6. J. Stadhouders, F. Hassing and T.E. Galesloot, An electrophoretic method for the identification of antibiotic residues in small volumes of milk, *Neth. Milk Dairy J.* **35**, 23 (1981).
7. J.J. Van der Lee, H.B.J. Van der Lee-Rijsbergen, U.R. Tjaden and W.P. Van Bennekom, A liquid chromatographic method for chloramphenicol and its nitro degradation products with reductive amperometric detection at a mercury electrode, *Anal. Chim. Acta.* **149**, 29 (1983).
8. J.M. Wal, J.C. Peleraan and G.F. Bories, Electroncapture detection of chloramphenicol using a heptafluorobutyrate derivative, *J. Chromatogr.* **168**, 179 (1979).
9. J.M. Wal, J.C. Peleraan and G.F. Bories, High performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**(5), 1044 (1980).
10. R. Kutter, D. Jahr and H. Stritzinger, Detection and determination of chloramphenicol by HPLC and GC/MS, *Fleischwirtschaft* **62**, 515 (1982).
11. J. Crechiolo and R.E. Hill, Determination of serum chloramphenicol by HPLC, *J. Chromatogr.* **162**, 480 (1979).
12. J.T. Burke, W.A. Wargin and M.R. Blum, HPLC assay for chloramphenicol, chloramphenicol-3-monosuccinate and chloramphenicol-1-monosuccinate, *J. Pharm. Sci.* **69**, 909 (1980).
13. M.C. Nahata and D. A. Powell, Simultaneous determination of chloramphenicol and its succinate esters by HPLC, *J. Chromatogr.* **223**, 247 (1981).
14. M.K. Aravind, J.N. Miceli, R.E. Kauffman, L.E. Strelbel and A.K. Done, Simultaneous measurement of chloramphenicol and chloramphenicol succinate by HPLC, *J. Chromatogr.* **221**, 176 (1980).
15. R. Velagapudi, R.V. Smith, T.M. Ludden and R.S. Sagraves, Simultaneous determination of chloramphenicol and chloramphenicol succinate in plasma using HPLC, *J. Chromatogr.* **228**, 423 (1982).