

시료고체상분산(matrix solid phase dispersion)전처리법을 이용한 식육중 테트라사이클린계 항생물질 동시정량분석

강환구 · 손성완 · 조병훈 · 이혜숙 · 박신자* · 김재학 · 조명행**

수의과학연구소 · 경기대학교 이과대학*

서울대학교 수의과대학**

(1996년 2월 2일 접수)

Multiresidue matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and HPLC determination of tetracyclines in animal muscle tissue

Hwan-goo Kang, Seong-wan Son, Byung-hoon Cho, Hye-sook Lee

Shin-ja Park*, Jae-hak Kim, Myung-haing Cho**

*National Veterinary Research Institute · College of Natural Science, Kyung-gi University**

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University***

(Received Feb 2, 1996)

Abstract : Tetracycline antibiotics have been widely used not only therapeutics but feed additives. There are many methods for the isolation and determination of tetracycline antibiotics in animal muscle tissue. But those methods take much time and labor, so it is difficult to analyse many samples simultaneously. A rapid isolation method and liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal muscle tissue (bovine, porcine, chicken) is presented.

Blank control and tetracyclines fortified samples (0.5g) were blended with C_{18} containing 0.05g each of oxalic acid and disodium ethylenediaminetetraacetate. After homogenize, homogenate was transferred to glass column made from 10ml glass syringe and compressed to 4~4.5ml volume. A column made from the C_{18} /meat matrix was washed with hexane (8ml) and dichloromethane (8ml, if needed), following which the tetracyclines were eluted with methanol or 0.01M methanolic oxalic acid (8ml). The eluates containing tetracyclines analytes were free from interfering compounds when analysed by HPLC with UV detection (photodiode array at 360nm). Standard curve for each tetracycline showed a linear response at the range of 0.05~1.0 μ g/ml and tetracycline antibiotics were eluted within 4ml of eluted volume. All tetracycline antibiotics except tetracycline were stable during the concentration process at 40 $^{\circ}$ C and time required for concentration was 3~4 hours.

Fortified samples containing oxalic acid and EDTA represented more good recoveries than those of not-contained sample. Recoveries were 91.8~110.1% (oxytetracycline; OTC), 57.7~79.5% (tetracycline; TC), 78.1~88.6% (chlortetracyclines; CTC) and 88.4~100.6% (doxycycline; DC) in pork tissue, 101.1~126.8% (OTC), 66.4~75.4% (TC), 79.2~88.1% (CTC) and 69.3~86.7% (DC) in beef tissue, and 90.8~95.6% (OTC), 66.2~84.4% (TC), 75.7~77.2% (CTC) and 55.6~80.7% (DC) in chicken muscle tissue. The detection limits validated in muscle tissue by this method were 0.05µg/g for OTC and TC, and 0.1µg/g for CTC and DC.

Key words : MSPD, tetracyclines, HPLC, muscle.

서 론

테트라사이클린계열의 항생물질은 그람양성균, 그람양성균 및 마이코플라스마에 대하여 정균효과가 우수한 항생제로서 가축에서는 장내세균 감염증, 호흡기 질병, 아나플라즈마 감염증 및 타이페리아 감염증 등의 치료제로서 뿐만 아니라 각종 질병을 예방하고 사료효율을 높이기 위한 사료첨가제로서 매우 많이 사용되는 항생제이다¹. 따라서 이 약물의 오용 및 남용으로 인한 식육 및 우유중에 잔류가능성이 매우 높다고 할 수 있다. 이러한 약물잔류문제는 공중보건학적인 측면에서 사람에게 직접영향을 주거나 약제에 대한 내성을 유발시켜 뿐만 아니라 원유중에 잔류시는 유제품 제조시 발효세균을 억제하여 경제적으로 많은 손실을 가져올 수 있다².

이러한 잔류문제 때문에 미국 FDA, EU 및 국제식품규격위원회(CODEX)에서는 이미 식육중 최대잔류허용기준(MRL; maximum residue level)을 설정하여 규제하고 있으며, 우리나라에서도 식육중에서 옥시테트라사이클린(OTC)과 클로르테트라사이클린(CTC)은 돼지고기와 쇠고기에서 0.1ppm, 닭고기에서는 1.0ppm으로 그리고 테트라사이클린(TC)은 돼지고기, 쇠고기 및 닭고기에서 모두 0.25 ppm으로 최대잔류허용한계를 설정하여 규제하고 있다(보건사회부 고시 1994-29, '95).

식육이나 우유중에서 테트라사이클린계열의 항생물질을 검사하는 방법으로는 STOP (swab test on premises), CAST (calf antibiotic and sulfa test), FAST (fast antibiotic screen test), BBRT (brilliant black reduction test) 등의 미생물을 이용한 발육억제시험법, 박층크로마토그래피법, 방사선 동위원소를 이용하는 Charm II 시험법, 효

소면역학적 방법 및 HPLC를 이용한 기기분석법 등이 있으나² 미생물학적 검사법^{3,4}이나 박층크로마토그래피법¹은 특이성이 낮을 뿐만 아니라 검출감도도 낮다. 효소면역학적 방법과 방사선 동위원소 수용체시험법²(Charm II)은 검출감도는 높으나 특이성이 낮으며 비특이반응이 존재할 수 있다는 단점이 있다. 최근에는 개개의 항생제에 대한 정량분석을 위하여 특이성이 높은 고속액체크로마토그래피나 가스크로마토그래피를 이용한 기기분석법들이 많이 보고된 바 있으며 이러한 방법들은 시료를 전처리하는 방법으로 액상분획법⁵⁻¹¹, SPE(solid phase extraction)¹²⁻¹⁵, 금속친화크로마토그래피용 추출법(metal affinity chromatography extraction)¹⁶⁻¹⁸ 등을 사용하는데 대부분이 유기용매가 많이 소요되거나 전처리 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 한편 MSPD (matrix solid phase dispersion)방법^{2,19,20}은 시료와 고정상을 직접 갈아서 추출·정제하는 방법으로 전처리시 그 조작이 간단하며, 유기용매가 적게 들고 전처리 시간이 짧다는 장점이 있다.

본 실험에서는 Baker et al¹⁹이 제시한 MSPD방법을 이용하여 식육중에서 4종의 테트라사이클린을 전처리시 가장 적합한 방법과 용출용매를 선정하였고 HPLC를 이용한 정량분석법을 확립하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

표준품 및 시약 : Tetracycline (TC) HCl, chlortetracycline (CTC) HCl 및 oxytetracycline (OTC)는 Fluka사에서 구입하여 사용하였고 doxycycline (DC) HCl은 Sigma사의 제품을 구입해 사용하였다. n-Hexane, methanol, ethylacetate, acetonitrile 및 dichloromethane 등의 유기용매는 HPLC급을 그리고 disodium EDTA 및 oxalic acid 등은

순수 시약급을 사용하였다.

컬럼침전제 및 활성화 : Bulk C₁₈ (J. T Baker, USA)을 구입하여 4배의 hexane, dichloromethane 그리고 methanol 순으로 세척하여 불순물을 제거한 후 진공을 이용해 수분을 완전히 제거하여 사용하였다.

표준용액의 조제 및 표준곡선의 작성 :

혼합 표준원용액 : OTC, TC, CTC 및 DC를 각각 10mg(base)씩 정확히 달아 methanol로 100µg/ml이 되도록 만든 후 소량으로 나누어 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

혼합 표준용액 : 혼합 표준원용액을 각각 1ml씩 취해 이동상으로 10µg/ml 되도록 만들어 냉장보관하면서 7일 간 사용하였다.

표준곡선의 작성 : 혼합 표준용액을 사용해 이동상으로 50, 100, 200, 500 및 1000ng/ml 용액으로 만들고 50µl씩 HPLC에 주입한 다음 농도에 대한 면적비로서 각각 4종의 테트라사이클린에 대한 표준곡선을 작성하였다.

분석조건 : HPLC는 photodiode array 검출기가 장착된 Spectraphysis사 system을 사용하였으며 컬럼은 µ-bondapak C₁₈ (300 x 3.9mm ID, Waters, USA)를 그리고 주입량은 50µl로 하였다. 이동상용매는 0.01M oxalic acid : acetonitrile : methanol을 7 : 2 : 1 (v/v/v)의 비율로 혼합하고 0.45µm 여과하여 사용하였으며 분석파장은 자외부 360nm, 유속은 1.0ml/min 그리고 측정감도는 0.005~0.01 AUFS로 하였다.

용출용매의 선정 및 농축온도에서 안정성 : Methanol, acetonitrile : ethylacetate (3 : 1, v/v) 및 0.01M methanolic oxalic acid 각각 8ml에 10µg/ml의 혼합 표준용액을 100µl씩 첨가시킨 다음, 40℃ 및 60℃의 진공감압회전농축장치에서 농축건조 후 이동상용매 1ml로 녹여 HPLC에 주입하여 회수율을 구하였다.

EDTA 및 oxalic acid의 첨가가 회수율에 미치는 영향 : 0.05g의 EDTA와 oxalic acid를 첨가시킨 돈육시료와 첨가하지 않은 시료에 테트라사이클린 혼합 표준용액을 1µg/g가 되게 첨가시킨 후 시료중 테트라사이클린 추출법에 따라 methanol : acetonitrile (1 : 1, v/v), acetonitrile : ethylacetate (3 : 1, v/v) 및 0.01M methanolic oxalic acid를 elution용매로 추출 후 각각의 용매에 대한 회수율을 구하였다.

용출용매에 따른 테트라사이클린의 회수율 : 4종의 테트라사이클린이 잔류되지 않은 얇게 자른 조직 0.5g에

10µg/ml의 혼합 표준용액을 100µl씩 첨가 후 시료중 테트라사이클린 추출방법과 같이 처리후 methanol, acetonitrile : ethylacetate (3 : 1, v/v) 및 0.01M methanolic oxalic acid 각각 8ml로 용출시키고 진공감압회전농축장치에서 농축건조 후 이동상용매 1ml로 녹여 HPLC에 주입하여 회수율을 구하였다.

Methanol 및 0.01M methanolic oxalic acid의 테트라사이클린 용출 양상 : 4종의 테트라사이클린이 잔류하지 않은 얇게 자른 조직 0.5g에 10µg/ml의 혼합 표준용액을 100µl씩 첨가 후 methanol 및 0.01M methanolic oxalic acid 9ml로 용출시키면서 0.5ml씩 분획을 받아 농축건조시킨 후 이동상 1ml로 녹여 HPLC에 주입한 후 각분획에 대한 면적을 구한 다음, 전체면적합에 대한 각 분획면적의 백분율을 구하였고 3번 반복하였다.

시료중 테트라사이클린의 추출·정제 : 식육중 테트라사이클린의 추출·정제방법은 Baker et al¹⁹의 방법을 응용하였는데 세척용매 및 용출용매는 실험을 통하여 선정하였다.

즉, EDTA와 oxalic acid를 각각 0.05g 달아 유리유발에 넣은 다음, 미리 활성화시킨 C₁₈ 분말을 2g 넣고 수술용 칼을 이용하여 냉동된 조직을 가능한 지방이 포함되지 않게 얇게 썰어 0.5g을 넣은 후 테트라사이클린 혼합 표준용액을 첨가한 다음, 유봉을 이용하여 무리한 힘을 가하지 않고 원을 그리면서 0.5~1분간 균질화 시켰다. Whatmann No 1 거름종이를 직경 15mm 되게 잘라 10ml의 유리주사기 밑에 밀착시켜 넣고 균질화시킨 시료 전량을 조심스럽게 옮긴 후 다시 그 위에 같은 크기의 거름종이를 올려놓고 피스톤을 이용하여 부피가 4~4.5ml이 되도록 압착시켰다. 주사기 끝에 200µl 마이크로피펫을 잘라서 끼우고 8ml의 hexane으로 중력하에서 지방을 제거하고 진공매니폴드(Supeleco, USA) 옮겨 진공을 이용해 남아있는 hexane을 완전히 제거하였다. 시료에 혈액이 다량 포함된 경우는 다시 dichloromethane 8ml로 재 세척하였으며 이후 methanol이나 0.01M methanolic oxalic acid와 같은 용출용매를 8ml 넣고 중력을 이용해 유출시켜 시험관에 받아 40℃의 진공감압회전농축기에서 농축건조시키고 이동상 0.5ml을 넣고 균질화시킨 후 5분간 초음파세척기에서 sonication시켰으며 균질액을 에펜들프 튜브에 옮겨 12,000xg/10min 원심분리 후 상층액을 0.45µm 디스크 필터로 여과하여 HPLC에 주입하였다.

데이터 분석 : 회수율은 같은 농도의 표준물질 피크면적

에 대한 첨가시료의 피크면적의 백분율로서 구하였으며 결과는 평균±표준편차로 나타내었고 용매의 비교는 Student's *t*-test를 이용하였다.

결 과

표준곡선 작성 : 테트라사이클린 혼합용액을 이동상으로 50~1000ng/ml 농도가 되게 희석한 후 HPLC에 주입하여 농도에 피크면적비를 이용해 표준곡선을 작성한 결과 모두 양호한 직선성($R > 0.999$)을 나타내었다(Fig 1).

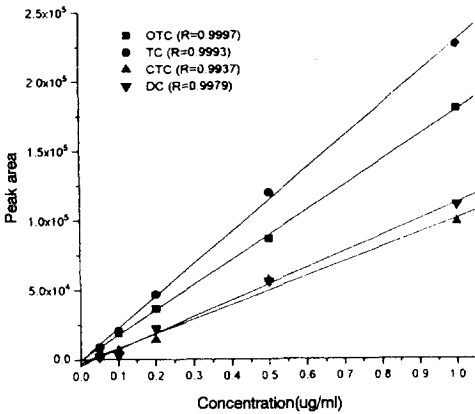


Fig 1. Standard curve of tetracycline antibiotics in the UV detection at 360nm. HPLC condition; column, u-bonda Pak C¹⁸(3.9×300mm, ID), mobile phase, 0.01M oxalic acid-methanol-acetonitrile(7:2:1, v/v/v), Flow rate, 1.2ml/min, injection volume, 50ul, solid line were expressed by regression.

테트라사이클린의 온도에 따른 안정성 및 용출용매의 선정 : 테트라사이클린계 항생물질은 60℃에서 농축할 때 사용한 모든 용매에서 DC를 제외한 3종의 테트라사이클린 모두 많은 양이 파괴되었으나, 40℃에서 농축하였을 때는 모든 용매에서 TC를 제외하고는 비교적 안정하였으며, OTC를 제외한 다른 테트라사이클린계 항생물질은 0.01M methanolic oxalic acid와 methanol이 비슷한 결과를 나타냈다. DC 이외의 다른 테트라사이클린계 항생물질은 이 2 용매에서 acetonitrile : ethylacetate (3:1, v/v)보다 안정하였다(Table 1).

EDTA와 oxalic acid의 첨가에 따른 회수율에 미치는 영향 : 돈육에 EDTA와 oxalic acid를 각각 0.05g씩 첨가하였을 때는 Table 2에서 보는 바와 같이 3가지 용출용매

에서 모두 50~101%의 회수율을 나타낸 반면 첨가하지 않은 돈육에서는 A용출용매에서는 CTC, B용출용매의 경우는 CTC와 DC가 전혀 검출되지 않았으며 모든 용출용매에서 62% 이내의 낮은 회수율을 나타내었다.

테트라사이클린의 용출양상 : Methanol과 0.01M methanolic oxalic acid로 테트라사이클린계 항생물질을 용출시 용출량이 4ml 이전에서 대부분이 용출되었으며 0.01M methanolic oxalic acid가 다소 빠르게 각각의 테트라사이클린을 용출시켰다. 이러한 결과를 종합하면 용출용매를 8ml 사용시 모든 테트라사이클린이 용출되어 8ml을 적합한 용출용매의 양으로 정하였다(Fig 2).

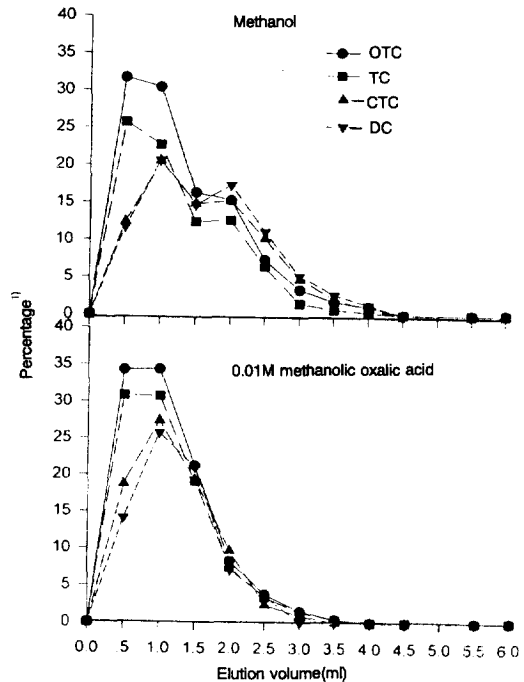


Fig 2. Elution profile of tetracyclines eluted with methanol & 0.01M methanolic oxalic acid.

¹⁾ : Ratio of peak area of each fraction to the total.

테트라사이클린의 크로마토그램 및 첨가 식육중에서 회수율 : 우육, 돈육 및 계육에 테트라사이클린 혼합표준용액을 0.5µg/g 및 1.0µg/g 첨가하고 시료중 테트라사이클린 추출법에 따라 추출정제 후 HPLC 주입하여 Fig 3에서 보는 것과 같이 OTC는 약 4.8분, TC는 약 5.5분, CTC는 9.6분 그리고 DC는 13.8분에 방해피크없는 깨끗한 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 이와같은 과정으로 각각의 식육에 대하여 각각의 테트라사이클린의 회수율을

구한 결과, 돈육의 경우 methanol과 0.01M methanolic oxalic acid 모두 62~105%의 양호한 회수율을 나타내었으며, TC의 회수율은 다른 테트라사이클린과 비교해 다소 낮았고 methanol이 용출용매로서 양호하였다. 우육의 경우는 TC는 methanol을 추출용매로 사용시 39~52%, 0.01M methanolic oxalic acid를 사용시는 53~73%로 회수율이 다소 낮았으나, OTC, CTC 및 DC의 경우는 65~103%

의 양호한 회수율을 나타냈으며 TC와 CTC의 경우 0.01M methanolic oxalic acid에서 methanol 보다 회수율이 다소 양호하였다. 계육은 methanol과 0.01M methanolic oxalic acid가 비슷한 회수율을 나타내었고 TC는 60~66%로 낮았으나 다른 테트라사이클린은 63~116%로 비교적 양호하였다(Table 3).

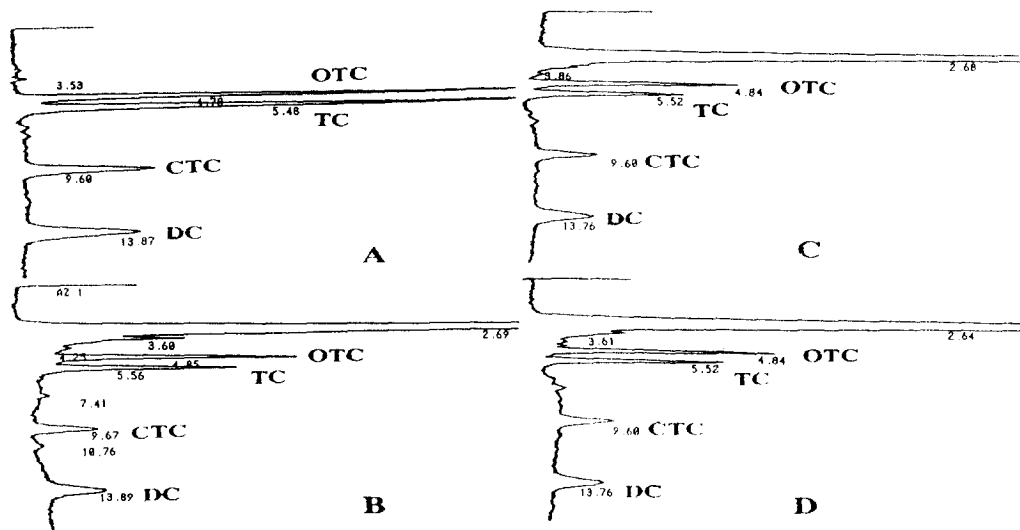


Fig 3. (a) Chromatogram of four tetracyclines : 50ng of oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC) & doxycycline (DC). (B), (C), (D) Chromatograms of bovine, porcine & poultry muscle tissue spiked with four tetracyclines at 0.5µg/g. HPLC condition : column, µ-bonda Pak C₁₈ (3.9×300mm, id), mobile phase, 0.01M oxalic acid + acetonitrile + methanol (7 : 2 : 1, v/v/v) ; flow rate, 1.0ml/min ; detection at 360nm.

Table 1. Stability of tetracyclines in each elution solution during the concentration process at 40℃ and 60℃

Elution solution	Temperature (℃)	Recovery rate ¹⁾ (% , Mean±SD, n=3)			
		OTC	TC	CTC	DC
Methanol	40	87.43±2.36 ²⁾	50.27±3.68	83.44±7.15	96.05±5.19
	60	60.56±10.25	29.22±1.06	73.99±13.94	88.55±12.26
Acetonitrile: ethylacetate= 3 : 1(v/v)	40	75.53±7.53	16.88±6.79	68.47±4.69	91.76±11.26
	60	30.92±2.42	5.86±0.68	25.33±2.42	79.48±3.93
0.01M Methanolic oxalic acid	40	93.11±1.48 ²⁾	63.52±2.93	90.66±1.41	92.87±2.09
	60	7.99±1.89	ND	45.80±2.16	92.44±5.82

¹⁾ : Peak area of each elution solution / Peak area of standard 1ppm × 100, ND : not detected

²⁾ : Significantly different from each other (p < 0.05)

Table 2. Recovery rates of tetracyclines isolated from Na-EDTA/oxalic acid added and not added fortified pork tissue in different elution solutions

Na-EDTA /oxalic acid	Elution solution (8ml)	Recovery rate ¹⁾ (%)			
		OTC	TC	CTC	DC
Added (0.05g)	A	88.99	59.76	92.59	94.18
	B	66.69	50.23	100.62	97.37
	C	86.63	65.76	99.94	91.65
Not-added	A	27.23	14.81	ND	12.04
	B	21.55	11.98	ND	ND
	C	61.63	33.18	15.81	48.58

¹⁾ : Peak area ratio to the peak area of standard 1 ppm

* All samples were concentrated at 40°C

A : acetonitrile : methanol = 1 : 1 (v/v, %), B : ethylacetate : acetonitrile = 1 : 3 (v/v, %)

C : 0.01M methanolic oxalic acid

ND : not detected

Table 3. Recoveries of tetracyclines isolated from fortified pork, beef and chicken muscle tissue

Elution solution	Tissue	Fortified Conc. (0.5µg/g)	Recoveries ¹⁾ (% , Mean ±SD, n=3)			
			OTC	TC	CTC	DC
0.01M Methanolic oxalic acid	Pork	0.5	104.54±11.63	66.79±11.57	72.07±6.59	90.09±2.06
		1.0	103.73±8.86	62.28±7.23	81.57±14.20	88.07±6.01
	Beef	0.5	102.64±4.78	53.14±2.34	83.45±12.31	97.89±8.11
		1.0	97.35±10.13	72.90±9.53	87.95±8.85	92.03±6.78
	Chicken	0.5	97.88±10.68	61.36±4.66	73.38±11.50	73.85±4.25
		1.0	100.88±4.82	60.81±12.82	71.05±15.96	94.56±13.45
Methanol	Pork	0.5	97.78±8.39	75.47±7.20	72.77±4.97	81.02±1.86
		1.0	93.59±7.54	78.44±3.37	80.95±9.00	82.24±1.87
	Beef	0.5	94.96±6.07	38.89±2.30	64.77±6.36	74.83±5.80
		1.0	92.55±2.16	51.52±10.18	67.51±1.98	81.10±9.05
	Chicken	0.5	115.51±2.61	65.80±9.41	63.08±8.92	82.21±4.26
		1.0	104.31±7.35	63.78±5.77	70.60±2.77	87.71±3.40

1) : Peak area ratio to the peak area of standard

* All samples were concentrated at 40°C

고 찰

테트라사이클린계 항생물질은 가축에 있어서 그람음성 균이나 마이코플라스마 감염증의 치료와 가축의 성장을 돕기 위한 사료첨가제로서 국내에서 가장 많이 사용되는 항생제이다. 식육용 테트라사이클린계 항생물질을 분석하는 방법으로는 전통적으로 미생물학적 방법이 널리 쓰여 왔으나 정성 및 정량에 문제점이 있다. 1980년대 중반부터는 HPLC나 GC/MS를 이용한 정량 및 정성방법으로 보고되고 있다.^{1,3,5-9,12-23} 현재 국내에서는 미생물학적 방법과 형광검출기와 자외부검출기를 이용한 HPLC분석법이 공정검사항목으로 되어있으나 HPLC분석법은 시료전처리 시간이나 오래 걸릴 뿐만 아니라 회수율과 재현성이 낮다. 이는 테트라사이클린의 구조상 자외부에 대한 반응성이 낮으며 형광검출기를 이용시도 검출감도가 높지 않기 때문으로 알려져 있다.^{14,24} 본 실험에서는 μ -bondaPak C₁₈ (3.9×300mm, 10 μ m)컬럼과 자외부검출기 360nm를 이용하여 0.01M oxalic acid : methanol : acetonitrile (7:2:1, v/v/v)를 이동상으로 분석한 결과 4종의 테트라사이클린 모두 50~1,000ng/ml농도에서 직선성을 나타내었으며 유속을 분당 1ml로 하였을 때 4종의 테트라사이클린의 피크가 모두 15분 이내에 나타나 Oka et al¹⁵의 보고와 일치하였다. 조직중이나 우유중에서 테트라사이클린계 항생물질을 추출정제하는 여러 방법들이 보고된 바 있으며 이들 중 가장 먼저 사용한 방법은 액상추출법으로 Agasoster et al⁵은 조직 및 우유중에서 옥시테트라사이클린을 용매로 추출 후 투석하여 유도체화시켜 형광검출기로 검출하는 방법을, Carginan et al⁶은 meta-phosphoric acid를 이용하여 추출하는 방법을 보고하였고 Kondo et al⁷은 5종의 테트라사이클린계 항생물질을 액상추출한 후 자외부검출기 254nm에서 검출하는 방법을 보고하였다. 그러나 이런 방법은 추출시간이 많이 걸릴 뿐만 아니라 유기용매가 많이 소요되며, CTC가 유기용매에 잘 녹지 않기 때문에 회수율이 매우 낮다는 문제점이 있다.⁵ 이러한 문제점을 극복하기 위해 최근에는 고정상인 카트리지를 이용하여 시료를 전처리하는 방법들이 많이 보고되었는데^{1,3,12-15} 대부분이 C₁₈카트리지를 사용하며, 추출용매로 EDTA-McIlvaine buffer를 사용하면 회수율이 높은 것으로 알려져 있다. 또한 Farington et al^{16,18}과 Carson et al⁷은 테트라사이클린이 금속이온들과 매우 잘 결합한다는 성질을 이용

하여 metal chelate affinity chromatography로 식육이나 우유중 테트라사이클린을 전처리함으로써 회수율을 높이는 방법을 보고하였다. 그러나 이와같이 카트리지를 사용한 전처리 방법은 카트리지의 제조회사마다 차이가 있어 재현성이 낮으며 사용전 카트리지를 활성화시키는 방법에 따라 결과의 차이가 나타나는 것으로 알려져 있다²⁵.

최근에는 시료와 고정상을 직접 갈아서 유리시린지에 packing하고 지방을 제거한 후 용출용매로 추출하는 MSPD (matrix solid phase dispersion)방법이 보고되고 있는데, Long et al^{18,19,21,22,28-30}은 우유중에서 7종의 benzimidazole과 chlorsulfan, 어육중에서 옥시테트라사이클린과 설파디메톡신, 어육과 지방중에서 유기염소계농약 그리고 소의 간중에서 5종의 benzimidazole을 MSPD방법으로 추출정제하는 방법을 보고하였으며, Baker et al¹은 우유중의 항생제, 농약 및 합성항균제 등을 MSPD전처리한 후 HPLC분석하는 방법을 보고하였고 Schenck et al^{31,32}은 계육에서 nicarbazine 그리고 소의 간에서 ivermectin을 MSPD법으로 전처리하였으며 Jaboe et al³³은 어육중에서 oxolonic acid를 MSPD법을 이용하여 전처리하는 방법을 보고한 바 있다. 이러한 방법은 0.5g의 시료와 2.0g의 C₁₈을 혼합하여 유발에서 균질화시키는데 이때 시료와 C₁₈간의 반응면적은 약 1,000m²에 해당되며 여기에 혼합시의 기계적인 힘과 소수성힘이 합쳐져 시료와 C₁₈이 매우 수월하게 반응하며 지방이나 비극성 물질은 비극성인 C₁₈에 붙게 되나 단백질이나 극성인 물질은 C₁₈의 말단에 노출되게 된다는 점을 이용한 시료전처리 방법이다². 이러한 방법은 세척용매와 용출용매를 알맞게 선택할 경우는 시료전처리 과정이 매우 간단하며 회수율이 높을 뿐만 아니라 시료전처리 시간이 짧아 다수의 시료중에서 잔류물질을 신속하게 검사할 수 있는 매우 간편한 방법이다.

테트라사이클린계 항생물질은 온도에 민감한 것으로 알려져 있어^{20,25} 농축과정에서의 안정성을 살펴본 결과, 60℃에서 농축시는 DC를 제외한 다른 테트라사이클린은 3가지 추출용매에서 상당히 파괴되었으나, 40℃에서 농축시는 methanol과 0.01M methanolic oxalic acid를 용출용매로 사용시 테트라사이클린(TC)을 제외하고는 모두 안정하였고 농축 소요시간은 3~4시간이었다. 일반적으로 테트라사이클린계열의 항생물질은 다가이온이나 단백질과 결합하기 때문에 액상추출이 어려우며 회수율이 낮은 것으로 알려져 있다. Baker et al¹⁹과 Long et al¹⁸은 각각 우유와 어육에서 테트라사이클린계 항생제와 OTC를 전처

리시 EDTA와 oxalic acid를 첨가하였을 때 회수율이 높아진다고 하였는데 본 실험에서도 시료를 균질화시키기 전에 각각 0.05g씩 시료에 첨가하는 최소한 3배이상의 회수율의 증가를 나타내었다. MSPD법으로 전처리시에는 세척용매와 용출용매의 선택이 제일 중요하기 때문에 세척용매와 용출용매의 선별하기 위해 실험한 결과, 세척용매의 경우 돈육과 계육에서는 대부분 hexane 8ml로 세척시 방해피크가 없이 깨끗한 크로마토그램을 나타냈으나 우육의 경우는 같은 검출조건에서 간혹 피크가 뜨는 현상이 나타났다. 이것은 hexane으로 세척후 다시 dichloromethane 8ml로 세척할 경우 상당히 감소하였다. 또한 용출용매는 acetonitrile : methanol (1:1, v/v)¹⁸, ethylacetate : acetonitrile (1:3, v/v), methanol²⁵ 및 0.01M methanolic oxalic acid¹⁵를 사용하여 비교하였는데 methanol과 0.01M methanolic oxalic acid를 사용시에 회수율이 우수하게 나타났다. 이러한 용출용매는 Mulders와 Lagemaat²⁶와 Oka et al¹⁵이 각각 methanol과 0.01M methanolic oxalic acid를 사용하였던 것을 응용하였다. 이러한 결과를 바탕으로 하여 적합한 용출용매의 양을 결정하기 위해 각각의 테트라사이클린계 항생물질의 2가지 용매에서의 용출양상을 조사한 결과 모두 용출되는 양이 4ml(용출용매의 량으로 6ml 정도 해당)이전에 대부분 용출되어 용출용매의 양은 8ml로 결정하였으며 증력하에서 용출시켰다. 이와 같은 실험결과를 바탕으로 methanol과 0.01M methanolic oxalic acid를 용출용매로 사용하여 우육, 돈육 및 계육에서의 회수율을 조사한 결과 돈육의 경우 methanol을 사용시 회수율이 양호하였으며 범위는 73~98%이었고, 우육은 methanol보다 0.01M methanolic oxalic acid이 용출용매로서 양호하였으며 회수율은 TC는 53~98%로 다소 낮았으나 나머지 테트라사이클린들은 84~103%로 양호하였다. 계육은 두가지 용매가 비슷한 회수율을 보였으며 TC는 회수율이 61~65%로 다소 낮았으나 그외의 테트라사이클린들은 63~116%로 양호하였다. 또한 시료중 검출한계는 OTC와 TC는 0.05µg/g, CTC와 DC는 0.1µg/g이었다. 이러한 결과는 회수율을 액상추출법과 비교시 다소 높거나 비슷한 수준이었으며^{7-9,25} 카트리지를 이용한 SPE (solid phase extraction)방법과 비슷한 수준이었다^{12-15,26}. 시료중 검출한계는 시료의 양을 적게 사용하는 관계로 위의 두가지 방법보다 낮게 나타났다. 그러나 국내에 식육중 잔류허용한계를 OTC와 CTC는 0.1µg/g, TC는 0.25µg/g으로 규정하고 있는 것을 고려한다면 공정검사법으로도

적용할 수 있다고 사료되며 또한 이러한 시험법은 시험조각이 간단하고 유기용매의 소모가 적을 뿐만 아니라 실험 소요시간도 기존의 방법에 비해 적게 소요되기 때문에 다수의 시료를 동시에 신속하게 검사할 수 있는 검사방법으로 유용하게 사용될 수 있다고 사료된다. 그러나 이러한 방법도 테트라사이클린(TC)의 회수율이 70%를 넘지 못하는 단점이 있으며 이러한 원인은 농축과정에서 파괴되기 때문으로 추정되며 추후에 농축과정의 보완에 대한 연구가 수행되어야 할 필요가 있다고 사료된다.

결 론

식육중 테트라사이클린계 항생물질을 신속하게 추출정제하여 HPLC 분석하기 위해 전처리 방법으로 MSPD 방법을 적용한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 테트라사이클린계 항생물질을 40℃에서 농축시 TC는 불안정하였으나 OTC, CTC 및 DC는 안정하였다.

2. 테트라사이클린계 항생물질을 용출시키기 위한 용출용매를 선정한 결과, 우육에서는 0.01M methanolic oxalic acid, 돈육에서는 methanol이 용출용매로 양호하였으나 계육은 두가지 용출용매에서 회수율이 비슷하였고 농축시간은 3~4시간 소요되었다.

3. EDTA와 oxalic acid를 시료에 첨가시 3가지 용출용매에서 테트라사이클린계 항생물질의 회수율이 3배 이상 증가되었다.

4. 식육에서 각 테트라사이클린계 항생물질의 회수율은 돈육의 경우는 methanol을 용출용매로 사용시 73~98%이었으며, 우육은 0.01M methanolic oxalic acid를 용출용매로 사용시 TC는 62~67%로 낮았으나 OTC, CTC 및 DC는 84~103%로 높았고, 계육은 2가지 용출용매의 회수율이 비슷하였고 TC는 60~66%로 낮았으나 다른 테트라사이클린들은 65~103%로 양호하였다.

5. 식육에서의 검출한계는 OTC와 TC는 0.05µg/g, CTC와 DC는 0.1µg/g이었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 MSPD 전처리 방법에 의한 식육중 테트라사이클린계 항생물질의 HPLC 분석방법은 기존의 방법과 비교할 때 분석시간이 절약되며 유기용매가 적게 소요된다는 점에서 다수의 시료에서 신속하게 테트라사이클린계 항생물질을 동시 검출할 수 있는 방법으로 적합할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Baker SA, Walker CC. Review: Chromatographic methods fortetracycline analysis in food. *J of Chromatography*, 624 : 195-209, 1992.
2. Tsai CE, Kondo F. Simple continuous and simultaneous determination of tetracycline residue. *Research in Vet Science*, 56 : 277-283, 1994.
3. Yoshimura H, Osawa N, Sugimori T, et al. Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking water to laying hen. *Food Addit Contam*, 8 : 65-69, 1991.
4. Oka H, Ikai Y, Hayakawa J, et al. Improvement of chemical analysis of antibiotics. Part XIX. Chromatography and thin layer chromatography/ Fast atom bombardment mass spectrophotometry. *J Agri Food Chem*, 42 : 2215-2219, 1994.
5. Agasoster T. Automated determination of oxytetracycline residue in muscle, liver, milk and egg by on-line dialysis and post column reaction detection HPLC. *Food Addit Contam*, 9 : 615-622, 1992.
6. Carginan G, Carrier K, Sved S, et al. Assay of oxytetracycline residue in salmon muscle by liquid chromatography with ultraviolet detection. *J of AOAC*, 76 : 325-328, 1993.
7. Kondo F, Morikawa S, Tateyama S, et al. Simultaneous determination of six tetracyclines in bovine tissue, plasma and urine by reverse phase HPLC. *J of Food Protection*, 52 : 41-44, 1988.
8. Sharma JP, Bevil RF. Improved HPLC procedure for the determination of tetracyclines in plasma, urine and tissue. *J of Chromatography*, 166 : 213-220, 1978.
9. Moats WA. Determination of tetracycline antibiotics in tissue and blood serum of cattle and swine by HPLC. *J of Chromatography*, 358 : 253-259, 1986.
10. Meijer LA, Ceyssens KGF, Bruijm WD, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline hydrate after oral administration in calves. *Vet Quart*, 15 : 1-5, 1993.
11. Ibrahim A, Moats WA. Effect of cooking procedure on oxytetracycline residues in lamb muscle. *J Agri Food Chem*, 42 : 2561-2563, 1994.
12. Sokol J, Matisova E. Determination of tetracycline antibiotics in animal tissue of food producing animals by HPLC using solid phase extraction. *J of chromatography*, 27 : 669 : 75-80, 1994.
13. Walsh JR, Walker LV, Webber JJ. Determination of tetracyclines in bovine and porcine muscle by HPLC using solid phase extraction. *J of Chromatography*, 596 : 211-216, 1992.
14. Blanchflower WJ, McCracken RJ, Rice DS, et al. Determination of chlortetracycline residues in tissue using HPLC with fluorescence detection. *Analyst*, 114 : 421-423, 1989.
15. Oka H, Matsumoto H, Suzuki M, et al. Improvement of chemical analysis antibiotics. VIII. Application of prepacked C₁₈ cartridge for the analysis of tetracycline residue in animal liver.
16. Farrington WH, Tarbin J, Bygrave J, et al. Analysis of trace residues of tetracyclines in animal tissue and fluids using metal chelate affinity chromatography/HPLC. *Food Addit Contam*, 8 : 55-64, 1991.
17. Carson MC. Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk using metal chelate affinity chromatography. *J of AOAC*, 76 : 329-334, 1993.
18. Long AR, Hsieh LC, Baker SA, et al. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline in catfish muscle tissue. *J of AOAC*, 73 : 864-867, 1990.
19. Baker SA, Long AR. Preparation of milk sample for immunoassay and liquid chromatographic screening using MSPD. *J of AOAC*, 77 : 848-854, 1994.
20. Ikai Y, Oka H, Suzuki M, et al. Improvement of chemical analysis of antibiotics. XIII. Systemic simultaneous analysis of residual tetracyclines in animal tissues using TLC and HPLC. *J of Chromatography*, 411 : 313-323, 1987.
21. Long AR, Hsieh LC, Baker SA, et al. Isolation and

- gas chromatographic determination of chlorsulfan in milk. *J of AOAC*, 72(5): 813-815, 1989.
22. Long AR, Hsieh LC, Baker SA, et al. Multiresidue method for isolation and liquid chromatographic determination of seven benzimidazole antihelmintics in milk. *J of AOAC*, 72 : 739-741, 1989.
 23. Oka H, Ikai Y, MacNeil JD, et al. Improvement of chemical analysis of antibiotics: Identification of residual tetracyclines in honey by frit FAB/LC/MS using a volatile mobile phase. *J Agri Food Chem*, 42: 2215-2219, 1994.
 24. Yoneda Y, Furashiro N, Andom R, et al. Determination of residual tetracyclines in meat by HPLC. *食衛誌*, 30 : 42-47, 1989.
 25. Mulders EJ, Delvagemaat DV. Determination of residues of tetracycline antibiotics in animal tissues by HPLC. *J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7 : 1829-1835, 1989.
 26. Long AR, Crouch MD, Baker SA, et al. Multiresidue matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and gas chromatographic screening of chlorinated pesticide in catfish muscle tissue. *J of AOAC*, 74 : 667-670, 1991.
 27. Long AR, Soliman, Baker SA, et al. Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and gas chromatographic screening of nine chlorinated pesticide in beef fat. *J of AOAC*, 74 : 493-496, 1991.
 28. Long AR, Hsieh LC, Baker SA. Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of furazolidone in pork muscle tissue. *J of AOAC*, 74 : 292-294, 1991.
 29. Long AR, Hsieh LC, Baker SA, et al. MSPD isolation and liquid chromatographic determination of sulfadimethoxine in catfish muscle tissue. *J of AOAC*, 73 : 868-871, 1990.
 30. Long AR, Malbrough MS, Baker SA. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of five benzimidazole antihelmintics in fortified beef liver. *J of AOAC*, 73 : 860-867, 1990.
 31. Schenck FJ, Baker SA, Long AR, et al. Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of nicarbazin in chicken tissue. *J of AOAC*, 75 : 659-662, 1992.
 32. Schenck FJ, Baker SA, Long AR, et al. Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine liver tissue. *J of AOAC*, 75 : 655-658, 1992.
 33. Jarboe HH, Kleinow KM. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxolonic acid in channel catfish muscle tissue. *J of AOAC*, 75 : 428-431, 1992, 77 : 891-895, 1994.