

고속액체크로마토그래피를 이용한 우유 중 노보비오신 분석에 관한 연구

김현정, 황래홍, 정지현, 윤은선, 박노운, 한인규

서울특별시보건환경연구원 축산물부

A study on determination of novobiocin residues in milk by high performance liquid chromatography

Hyun-jeong Kim, Lae-hwong Hwang, Ji-heon Joeng,
En-sun Yoon, Noh-woon Park, In-Gyou Han

*Department of Livestock Products
Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment*

Abstract

A method for the determination of novobiocin in milk was presented by high performance liquid chromatography(HPLC). The novobiocin in the spiked sample was extracted with methanol and evaporated under vacuum. After evaporating, the residue was mixed with distilled water for 2ml, filtrates with 0.45µm acrodisc was injected into HPLC.

The results obtained were as follows ;

1. The calibration curve of novobiocin was showed constantly linear(r 0.999) in the range of 100~500ng/ml.
2. The mean recovery rate of novobiocin from the spiked milk sample were 88~98%.
3. The coefficients of variation were 2.6~5.8%.
4. The lowest detectable limit of novobiocin was 25ppb.

Key words : HPLC, Novobiocin, Milk, Residues

서 론

노보비오신(Novobiocin, N-(7-3-O-(Amino-carbonyl)-6-deoxy-5-C-methyl-4-O-methyl-β-L-lyxo-hexopyranosyl)oxy)-4-hydroxy-8-methyl-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-yl]-4-hydroxy-3-(3methyl-2-butenyl)benzamide)은 *Streptomyces niveus*에 의해서 생산되며 그람양성세균에 대해 주로 항균력을 나타낸다²⁾ 외국에서는 노보비오신을 가금의 사료에 첨가하기 위한 사료첨가제의 형태와 젖소의 유방염을 치료하기 위한 주입제의 형태로 생산하고 있다^{1,2)}. 유방염 주입제로 사용된 노보비오신은 휴약기간을 준수하지 않는 경우 우유에 잔류하여 공중보건상의 위해를 발생할 수 있으며, 유가공을 위한 공정에 부정적인 영향을 일으키므로 미국에서는 이미 1982년에 노보비오신의 우유중의 잔류허용 한계를 0.1ppm으로 설정한 바 있다^{2,3,4)}.

국내에서도 노보비오신은 페니실린 및 디하이드로스트렙토마이신과의 복합제로 유방염치료용 주입제가 생산, 시판되고 있으나 노보비오신의 잔류허용한계가 설정되지 않는 등 신속 정확한 검출기법 개발이 요구되고 있다. 노보비오신 자체는 미생물을 이용한 방법으로 충분히 정량적인 분석이 가능하나, 주입제로 사용되는 노보비오신제제는 다른 항생물질제제와 혼합된 복합제의 제형이 주로 사용되고 있기 때문에 정확한 정성 및 정량적 검출을 위해 HPLC를 이용한 분석이 유리하다 하겠다^{5),6),7),8)}.

Moats와 Leskinen¹⁾이 HPLC를 이용하여 식육 및 우유 등에서 노보비오신을 검출하는 기법을 개발한 바 있으며, 본 연구에서는 이들의 분석법을 개량 보완하여 우유 중에서 신속, 정확하게 노보비오신의 잔류량을 검출하는 분석법을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 실험장비

① High Performance Liquid Chromatography

- Waters 510 pump

- Waters U6K injector

- Waters 486 tunable absorbance detector

- Waters μ-bondapak C₁₈, 10μm 3.9×300mm

- Waters 746 data module integrator

② Centrifuge : BECKMAN Avanti 30 centrifuge

③ Concentrator : Turbovap 11(Zymark), Heidolph VV2001 rotary evaporator

④ Milli-Q water system (Millipore)

2) 표준품 및 시약

① Novobiocin(Sigma N-1628)

② Methanol (HPLC grade, Fisher)

③ Acetonitrile (HPLC grade, Fisher)

④ Phosphoric acid (GR grade, Hanawa)

3) 표준용액 조제

노보비오신 50mg을 정밀히 달아 50 ml volumetric flask에 취한 뒤 증류수로 희석하여 50ml (1mg/ml) 되게 하였다.

위의 용액을 희석하여 0.5mg/ml (2배 희석)와 0.2mg/ml (5배 희석)용액을 만든다.

4) 이동상 용매의 조제

85%의 phosphoric acid 0.34ml를 1000ml 증류수에 용해시킨다(5mM 농도). 5mM phosphoric acid : acetonitrile를 45 : 55의 비율로 혼합한 후 여과하여 sonication하였다.

5) Fortified sample 조제

3개의 삼각 플라스크에 우유 200ml를 각각 취한 뒤 100μl micro-syringe를 이용해 3개의 표준용액을 각각 100μl씩 가한 뒤 magnetic stirrer에서 약 10분간 혼합한다.

이 때 우유의 첨가 농도는 각각 500, 250, 100 ng/ml가 된다.

6) 시료 전처리

조제된 fortified sample을 15ml conical

tube에 각각 2ml 씩 정밀히 취한 다음 methanol 6ml를 가하고서 vortex mixer에서 수분간(1분 이상) 진탕한 뒤 5000rpm에서 5분간 원심 분리한다. 이 상청액 4ml를 취해 새로운 conical tube 혹은 100ml 가지형 플라스크에 옮겨 담고, 질소 혹은 진공 하에서 최종 volume이 1ml 정도로 농축시킨 다음 증류수를 가해 정확히 2ml가 되도록 한 뒤 0.45µm acrodisc에 여과하여 HPLC에 주입한다.

7) 회수율 및 농도의 계산

시료를 액체크로마토그래프에 적용하여 얻은 노보비오신 peak의 면적과 각 농도별 표준용액의 peak 면적을 아래의 ①, ②식에 대입하여 시료중의 노보비오신의 농도와 회수율을 구하였다.

$$\text{시료중의 노보비오신의 농도(ppb)} = \frac{\text{시료의 peak 면적}}{\text{표준용액의 peak 면적}} \times \frac{\text{회석배수(2배)}}{\text{시료무게}} \dots ①$$

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{시료에서 회수된 노보비오신의 양}}{\text{시료에 첨가된 노보비오신의 양}} \times 100 \dots ②$$

8) 분석흐름도

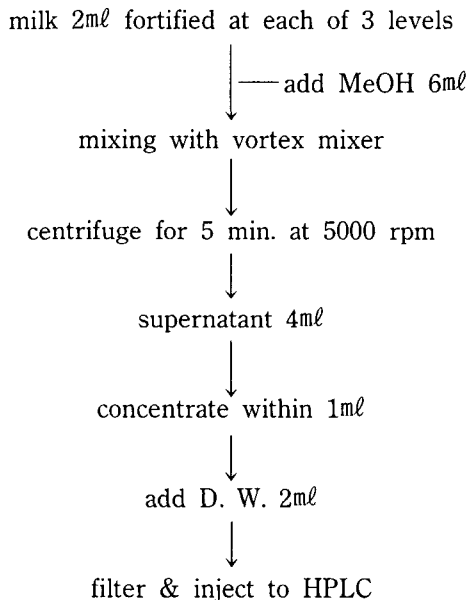


Fig 1. Clean-up method for novobiocin in milk

결과 및 고찰

1. 최적분석조건 설정

HPLC를 이용하여 우유 중에 잔류하는 미량의 노보비오신을 검출하기 위하여 고속액체크로마토그래프의 이동상 용매로 5mM phosphoric acid 와 acetonitrile을 45 : 55 (V/V)의 비율로 혼합하여 사용하였으며 자외선 340nm에서 µ-bondapak C₁₈ column을 사용하여 우유 중에 노보비오신을 첨가하여 만든 spiked sample에서 노보비오신의 분리능을 조사하였다.

이 때 이동상의 유속을 분당 1.0ml로 유지하였을 때 노보비오신이 약 3.9분대에 용출되었다. 이와 동일한 조건(Table 1)에서 우유의 blank 시료와 spiked 시료를 전처리한 뒤 액체크로마토그래프에 주입하였을 때 노보비오신의 용출 시간인 3.9분 전후에서 어떠한 방해 peak도 나타나지 않았다.

본 실험 결과는 Reeves²⁾가 gradient 이동상을 이용하여 23~25분대에 노보비오신을 용출한 것보다 훨씬 신속하고 간편할 뿐만 아니라 유기용매의 사용도 절약할 수 있는 이점이 있다.

또한 Moats와 Leskinen¹⁾등이 설정한 0.01M H₃PO₄-acetonitrile-methanol의 이동상 용매 제조방법이 매우 까다로운 점을 고려할 때 누구나 쉽게 만들 수 있는 장점이 있다.

Table 1. Optimal conditions for analysis

Detector : Waters 486 tunable absorbance detector
Column : µ-bondapak C ₁₈ column(1019mm 3.9 × 300mm)
Mobile phase : 5mM phosphoric acid/acetonitrile=45/55
Flow rate : 1.0ml/min.
Wavelength : 340nm.
Absorbance unit full scale (AUFS) : 0.001
Temperature : room temperature
Retention time range : 3.5~4.5 min.

2. UV (ultraviolet wavelength)에 대한 표준용액의 직선성

본 분석법에서 노보비오신 표준용액 500, 200, 100ppb 농도에 대한 표준곡선의 직선성은 Fig 2에서와 같이 매우 양호하였다

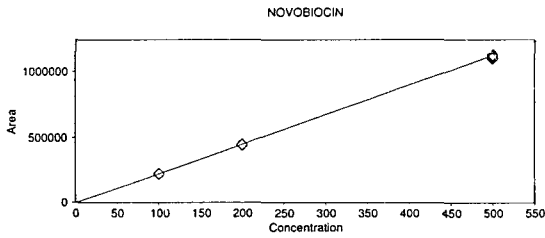


Fig 2. Standard curve for the assay of novobiocin

3. 본 분석으로 실험한 결과 노보비오신의 표준용액의 크로마토그램과 우유중 공시험 용액의 크로마토그램이 Fig 3, Fig 4와 같다. 우유 중에 노보비오신을 첨가하여 시험한 결과 노보비오신은 Fig 5에서와 같이 특이적으로 분리되었다. 이는 본 실험방법으로 Moats와 Leskinen¹⁾, Reeves²⁾의 복잡한 전처리 과정을 최소화, 단순화하였고 본 실험 방법에 의한 회수율 또한 매우 높았다. 이러한 전처리 과정에 의한 머무름 시간은 22~25분대에서 3~5분대로 단축되었으며 이는 실험 시간의 절감 및 비용의 절약을 가져왔다.

4. 회수율 및 재현성

노보비오신이 잔류하지 않는 우유에 노보비오신을 잔류농도 50, 100, 250 ppb 되도록 첨가하여 각 농도별로 3회씩 분석한 결과 평균 회수율은 Table 2에서 보는 바와 같이 각각 88%, 91%, 98%이었다. 회수율은 시료에 첨가한 노보비오신의 농도가 높을수록 높아졌으며, 시료간 분석 오차는 감소됨을 알 수 있었다.

본 실험에서 노보비오신의 최저 검출 한계는 약 25ppb 이었다.

Table 2. Recovery rate of novobiocin from spiked milk samples

Spiked concentration (ppb)	검출수치 (ppb)	Recovery rate (%)	Mean (%)	CV* (%)
50	42.5	85	88	5.8
	45.0	90		
	44.5	89		
100	96.0	96	91	3.0
	87.0	87		
	90.0	90		
250	235.0	94	98	2.6
	247.5	99		
	257.5	103		

* Coefficient of variation

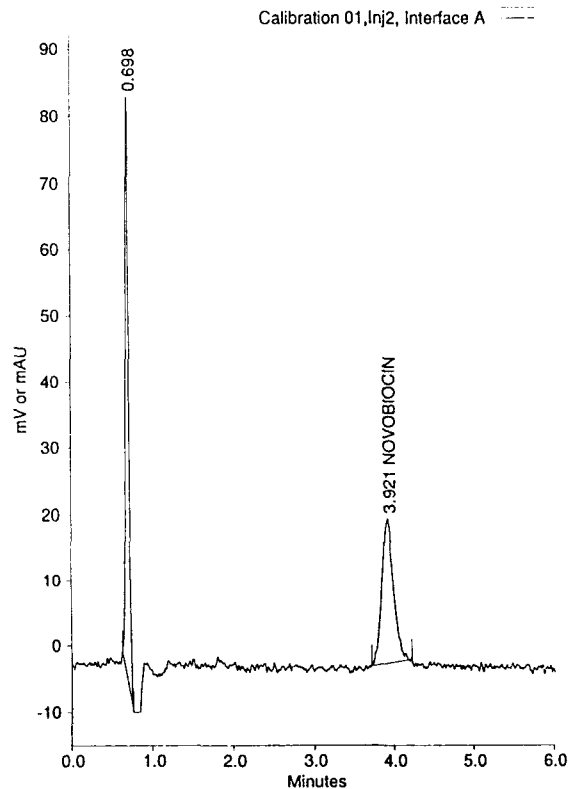


Fig 3. Chromatograms of novobiocin(50ppb)

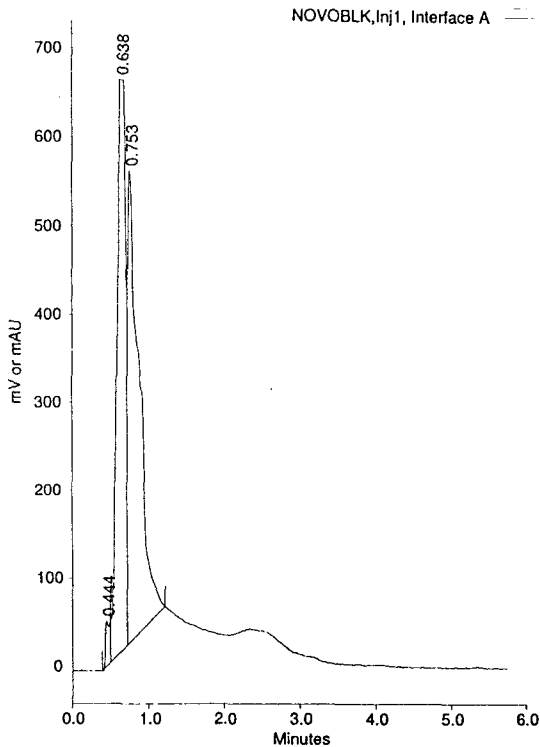


Fig 4. Chromatogram of blank milk

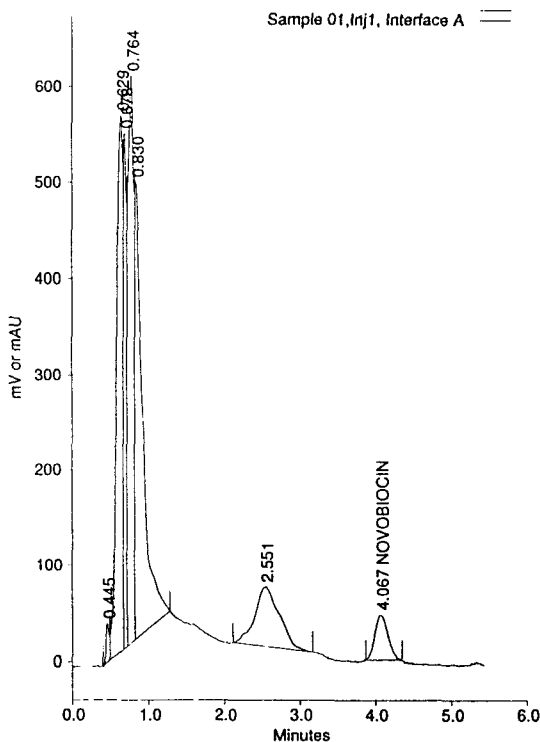


Fig 5. Chromatogram of spiked milk(250 ppb, novobiocin)

결론

고속액체크로마토그래프를 이용하여 우유 중에 잔류하는 미량의 노보비오신을 정량 분석하는 방법을 확립하기 위하여 메타놀을 가하여 농축시킨 다음 증류수를 혼합, 여과하여 액체크로마토그래프에 적용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 노보비오신 표준용액 100, 200, 500ppb 농도에 대한 표준 곡선은 양호한 직선성을 나타내었다.

2. 본 실험에서 노보비오신의 회수율은 88~98%이었으며, 동일한 실험조건과 전처리 과정에서 노보비오신의 정량이 가능함을 알 수 있었다.

3. 각 농도별 회수율에 대한 변이계수는 2.6~5.8%이었다.

4. 본 실험에서 노보비오신의 최저검출한계는 약 25ppb 이었다.

5. 노보비오신의 용출시간은 약 4분대이고 주변의 방해 peak가 존재하지 않았으므로 본 실험방법은 우유 중의 잔류 노보비오신을 정량하기 위한 방법으로 적합함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Moats W.A. Leskinen, L. 1988. Determination of novobiocin residues in milk, blood and tissue by liquid chromatography. AOAC. 71 : 776~778.
2. Valerie B. Reeves. 1995. Liquid chromatographic procedure for the determination of novobiocin residues in bovine milk. interlaboratory study. JAOAC. Vol. 78(1) : 55~58.
3. Leidahl R. 1984. Feed additive compendium. Miller Publishing Co. Minneapolis. MN. : 247.
4. Schultze X.D. 1986. In agricultural uses of antibiotics. Moats W.A. ACS Symposium Series 320. American Chemical Society. Washington. DC : 23~34.

5. Hornish R.E. 1982. Paired-ion high-performance liquid-chromatographic method for determination of novobiocin in mastitis products sterilized by cobalt-60 irradiation. *J. Chromatography*. 236 : 481.
6. Tsuji, K., Rahn P.D., and Kane, M.P. 1982. High-performance liquid-chromatographic method for determination of novobiocin. *J. Chromatography*. 235 : 205.
7. Schirmer R.E. 1991. *Modern methods of pharmaceutical analysis* 2nd Ed. Vol.II.
8. Szepesi G. 1991. *HPLC in pharmaceutical analysis* Vol.II. Chapter 4. Antibiotics.