

## HPLC를 이용한 어류 종의 Amoxicillin과 Ampicillin 항생제 동시 분석법

조미라\* · 김풍호 · 이태식 · 오은경 · 유희식 · 이희정  
국립수산물과학원 식품위생팀

### Simultaneous Determination of Amoxicillin and Ampicillin in Fish Meat Using High-Performance Liquid Chromatography

Mi Ra JO\*, Poog Ho KIM, Tae Seek LEE, Eun Gyoung OH,  
Hong Sik YU and Hee Jung LEE  
Food Sanitation Research Team, National Fisheries Research and  
Development Institute, Busan 619-902, Korea

A simultaneous high-performance liquid chromatography assay method for amoxicillin and ampicillin in fish products was developed, evaluated, and validated by monitoring these antibiotics in fish samples obtained from aquaculture and distribution. The recovery rate of this method was higher than those of conventional methods and was 95.3-106.6% for amoxicillin and 81.4-92.4% for ampicillin. Our pretreatment procedure sufficiently removed or reduced materials affecting HPLC analysis, such as low-molecular-weight substances. The performance limit of this method was evaluated as 0.01 ppm of amoxicillin and ampicillin in fish muscle. Finally, 171 fish samples, including olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), common sea bass (*Lateolabrax japonicus*), and black rock fish (*Sebastes schlegeli*) collected from fish farms in the coastal area between April and September 2005 were analyzed to evaluate the overall efficiency of the method and to monitor the actual of amoxicillin and ampicillin usage in fish farms. The results indicated that the developed method was suitable for analyzing amoxicillin and ampicillin in fish muscle, and determined that those antibiotics were being used for fish farming but were not detected in fish samples during the shipping and distribution stages.

Key words: Penicillins, amoxicillin, ampicillin, HPLC

#### 서 론

Amoxicillin과 ampicillin은 penicillin계열의 항생제로서 그람양성균과 그람음성균에 유효하고 병원균의 대수증식기에 세포벽 mucopeptide의 생합성을 억제함으로써 살균작용을 나타낸다(Lee, 1987). 이들 항생제는 직접적인 독성은 미미하지만 동물에게 알레르기 반응을 일으키는 경우가 있으며 특히 사람에서는 약 10%가 알레르기 반응을 보이며 어떤 사람은 극소량에 의해서도 과민반응을 일으킨다고 한다(Lee, 1987; Huber, 1988). 그러나 이 계열의 항생제들은 이미 세계적으로 널리 사용하고 있고 동물용뿐만 아니라 수산용으로 어류 양식업계에서 어류질병인 유결절증, 절창병의 치료제로 사용하고 있는 실정이다(KAHPA, 2001). 이와 같이 이들 항생제가 식품에 잔류하였을 때 사람에게 알레르기 반응을 일으킬 가능성이 있는 약물 그룹으로 전 세계적으로 엄격하게 규제하고 있다. 미국은 쇠고기에서 대해서 amoxicillin이 0.01 ppm, ampicillin을 0.01 ppm의 최대잔류허용기준(maximum residue limit)으로 설정(FSIS, 2002)하고 있고, EU는 육류에 구분없이 모든 식품 및 식품가공품에 대하여 0.05 ppm으로 규정(CEC, 2003)하고 있다. 그러나 우리나라의 경우 식품공전(제 3. 6,

2004)에 쇠고기와 돼지고기에 대해서 0.01 ppm으로 규정되어 있으며, 수산용으로 판매되고 있는 amoxicillin과 ampicillin은 최근 판매량이 증가하고 있는데 반해서 식품위생안전확보를 위한 관리지침이 마련되어 있지 않고 있다.

지금까지 알려져 있는 식품 중의 항생제 분석방법도 축육 및 가공류를 대상으로 한 것이 대부분이었으며, 어류 및 패류 등 수산물을 대상으로 개발된 경우는 그리 많지 않았다. 축산물을 대상으로 개발된 시험방법들은 여러 가지 요인으로 인하여 수산물 분석에 부적합한 경우가 많았으며, 특히 회수율에서 큰 문제점을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 어육 중의 amoxicillin과 ampicillin을 동시에 분석할 수 있는 방법을 확립하고자 기존의 연구자들의 보고한 방법(Ang et al., 1996; Lee, 1998; Sørensen et al., 1999; KFDA, 2004)을 개량하였다. 즉 어육에서 이들 항생제를 추출하는 방법과 여러 가지 HPLC 분석조건들에 대한 비교 검토를 거쳐 정밀하고 회수율도 높은 분석방법을 확립하였다.

#### 재료 및 방법

##### 시약 및 시료

항생제의 표준품은 amoxicillin (AMOX)와 ampicillin try-

\*Corresponding author: mirajo@momaf.go.kr

hydrate (AMP) (Sigma, USA)를 사용하였으며, 시료 중의 항생제 추출에는 증류수, diethyl ether (B&J, SK Chemicals, Korea)를 사용하였다. 유도체화 시약으로는 37% formaldehyde (Merck, Germany)와 trichloroacetic acid (Sigma, USA)를 사용하였다. 양식어류 중의 amoxicillin과 ampicillin의 잔류모니터링은 부산, 경남 및 전남지역 양식장에서 양식중인 어류 및 출하단계 어류를 대상으로 하였다.

#### 항생제 표준용액 조제

Amoxicillin과 ampicillin 표준품 각 10 mg씩을 100 mL 용량 플라스크에 취하고 증류수로 녹여 100 ppm 농도의 stock solution을 조제하였다. Working solution은 stock solution 10 mL을 정확히 취하여 100 mL 용량 플라스크에 옮기고 증류수로 표시선까지 채운 표준용액을 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 ppm로 희석하여 사용하였다.

#### 표준곡선의 작성 및 계산

각 농도의 amoxicillin과 ampicillin 표준용액 (2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 ppm)을 50  $\mu$ L씩 취하여 3회 반복 분석한 chromatography로부터 각각의 항생제에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X축을 농도, Y축을 면적으로 하여 검량선을 작성하였다.

시험용액 분석에서 얻은 chromatogram으로부터 각 성분에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 peak에 대한 평균면적을 구한 다음 검량선 좌표의 Y축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 검량선상 만나는 점에서 수직으로 X축과 만나는 점이 시험용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시험용액의 희석배수(잔류물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료무게로 나누어 최종시료 중 각 성분의 농도를 산출하였다.

#### Amoxicillin과 ampicillin의 추출

어육 중의 amoxicillin과 ampicillin의 추출 및 분석은 Ang et al. (1996)이 보고한 방법을 다음과 같이 개량하여 실시하였다. 어류의 껍질을 벗긴 후 fillet을 뜬 어육 5 g을 취하여 증류수 40 mL를 가하여 homogenizer (Ploytron PT3000, Switzerland)로 10,000 rpm에서 2분간 균질화시켜 amoxicillin과 ampicillin을 추출하였다. 추출액은 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 잔사를 제거한 후 상층액을 취하여 50 mL tube로 옮겨 70% trichloroacetic acid (TCA) 1 mL를 가하여 단백질을 침전시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 이 여과액을 45°C에서 2-3 mL로 감압농축하여 얻은 액을 증류수로 5 mL되게 정용한 다음 지질제거를 위하여 diethyl ether 6 mL를 가하여 30분간 진탕 후 하층을 취하였다. 지질을 제거한 하층은 검출감도를 높이기 위하여 유도체화 과정을 거쳐야 하므로 20% trichloroacetic acid 0.5 mL를 가하여 진탕한 후 다시 7% formaldehyde 용액 1 mL를 가하여 60초간 진탕하여 100°C에서 30분간 가열한 후 즉시 방냉하였다. 이 유도체화된 액에 NaCl 1 g을 첨가하여 약하게 흔든 후 diethyl ether 6 mL를 넣어 30초간 진탕하고 3,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 diethyl ether층을 수거하였다. 이 과정을 반복하여 diethyl ether

추출액 약 12 mL를 50°C에서 질소 농축시켜 완전히 건조시킨 후 증류수 1 mL로 정용하고 여과(0.2  $\mu$ m, PTFE, Millipore, USA)시켜 HPLC 분석에 사용하였다.

Amoxicillin과 ampicillin 항생제 표준품 및 시료 추출액의 기기분석 조건은 다음과 같다. 항생제 표준품 및 추출액의 분석에는 Shiseido nanospace SI-2 HPLC system (Shiseido Co., Japan)과 C<sub>18</sub> column (4.6 mm ID×250 mm, MG type, 5  $\mu$ m, Shiseido Co., Japan)을 사용하였다. HPLC 이동상은 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.5)용액, acetonitrile을 4:1의 비율로 혼합한 후 1 mL/min의 속도로 하여 UV 검출기 360 nm에서 검출하였으며, injection량을 50  $\mu$ L로 주입하고 column 온도는 30°C로 고정하여 30분간 분석하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Amoxicillin과 ampicillin의 분석을 위한 기준방법들

Amoxicillin과 ampicillin의 최적분석을 위하여 이미 보고되어진 Ang et al. (1996), Lee (1998)의 방법, Sørensen et al. (1999), 식품공전 (2004)의 방법을 어육에 적용하여 좀 더 나은 방법을 찾고자 전처리 과정과 기기분석조건을 변형하였다.

식품공전 (2004)에서는 시료 중의 amoxicillin을 methanol로 추출한 후 buthanol 및 ethanol을 가해 감압건고하고 원층액에 용해하여 ether로 다시 추출하여 UV검출기로 측정하는 방법으로 이를 분석하였을 때 표준물질의 peak의 머무름 시간이 시료의 방해 peak와 겹쳐져서 적당하지 않았다. Lee (1998)의 방법도 시료를 물과 함께 균질화하여 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 phosphate buffer로 단백질을 침전시킨 후 상층액을 취하여 tC<sub>18</sub> cartridge를 이용해 amoxicillin과 ampicillin을 용출하고 mercapted mercury로 유도체화하여 UV검출기로 측정하는 방법으로 전처리 과정이 매우 복잡하여 재현성있는 실험을 하는데 어려움이 많았으며 표준물질에 대한 검출감도도 다른 방법들에 비하여 현저히 낮아 적당하지 않은 것으로 확인되었다. 또한 Sørensen et al. (1999)의 방법은 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>과 텅스텐산나트륨을 사용하여 추출하였으며 정제시 Oasis HLB cartridge를 사용하여 amoxicillin과 ampicillin을 용출하고 유도체화 시약을 사용하여 UV검출기로 측정하였다. 이 방법은 Lee (1998)의 방법보다 전처리 과정에 소요되는 시간이 많이 걸릴 뿐만 아니라 시약용액 조제가 상당히 많고 pH의 조정이 빈번하며, 또한 적은 양 (2.5 g)의 시료를 채취하여 실험을 하였기 때문에 회수율이 상당히 떨어지는 결과를 얻어 수산물에 적용하기에는 부적합한 것으로 판단되었다.

##### Amoxicillin과 ampicillin의 최적분석조건 구명

Ang et al. (1996)의 방법은 칼럼 전 유도체화법을 이용한 것으로 시료중의 amoxicillin을 인산완충액으로 추출하여 trichloroacetic acid로 불순물을 침전시키고 C<sub>18</sub> cartridge로 용출하여 다시 ether로 추출한 다음 유도체화하여 형광검출기로 측정하는 방법으로 표준물질과 시료중의 방해물질의 retention time이 거의 일치하여 분리가 확실해 되지 않는다는 단점

보고들에 비하여 충분히 분리될 가능성이 있었다. 전처리가 간편하고 회수율이 양호한 이 방법을 채택하여 수산물에 적용할 수 있는 방법으로 개선하였다. 또한 형광검출기를 사용한 Ang et al. (1996)의 방법을 따르면 시료뿐만 아니라 표준물질을 분석하였을 때에도 방해 peak들이 많이 검출되기 때문에 UV 검출기로 분석한 결과 감도는 약간 낮으나 오히려 비교적 양호한 크로마토그램을 얻을 수 있었다 (Fig. 1).

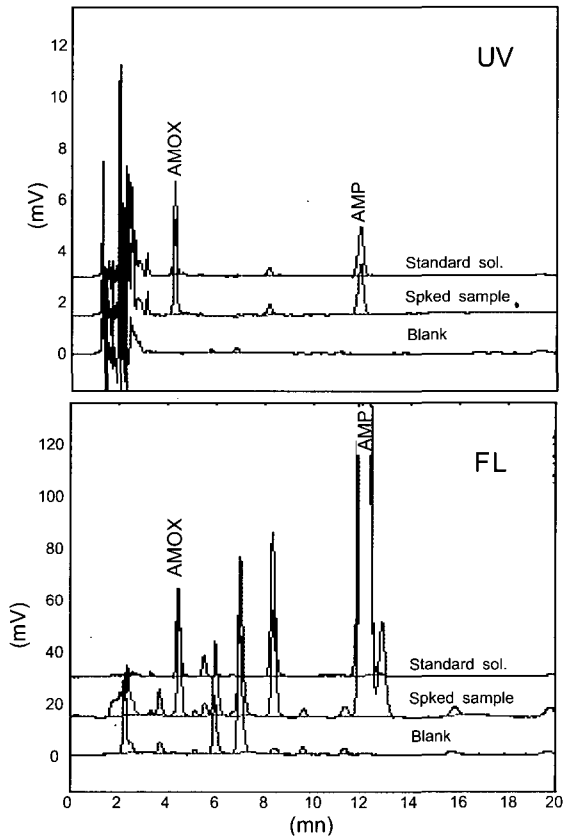


Fig. 1. Comparison of UV and fluorometric HPLC chromatogram of amoxicillin (AMOX, R.T. 4.2 min) and ampicillin (AMP, R.T. 11.8 min) in spiked oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*) sample (1.0 ppm).

이상의 개선된 방법으로 어육에 각각의 항생제를 0.5 ppm 첨가하여 HPLC로 분석한 결과를 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 우수한 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

표준 검량선 작성 및 회수율

Amoxicillin 및 ampicillin 표준품으로 stock solution을 만들고 증류수로 희석하여 0.1-2.0 ppm 농도가 되게 희석하여 HPLC로 분석하여 농도에 대한 peak 면적비를 이용해 표준곡선을 작성한 결과 amoxicillin과 ampicillin의 직선성 ( $r^2$ 값)은 각각 0.9990, 0.9993을 나타내어 아주 양호한 것으로 확인되었다 (Fig. 3).

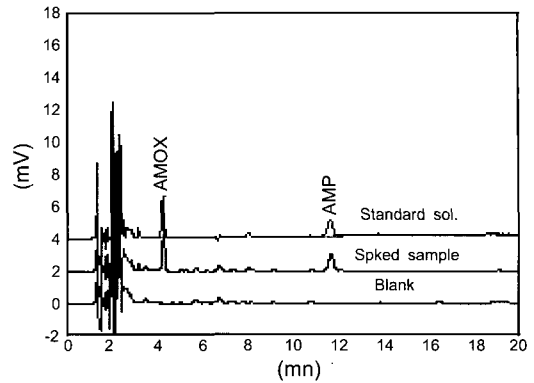


Fig. 2. HPLC Chromatogram (UV detected) of amoxicillin (AMOX) and ampicillin (AMP) in spiked oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*) samples (0.5 ppm).

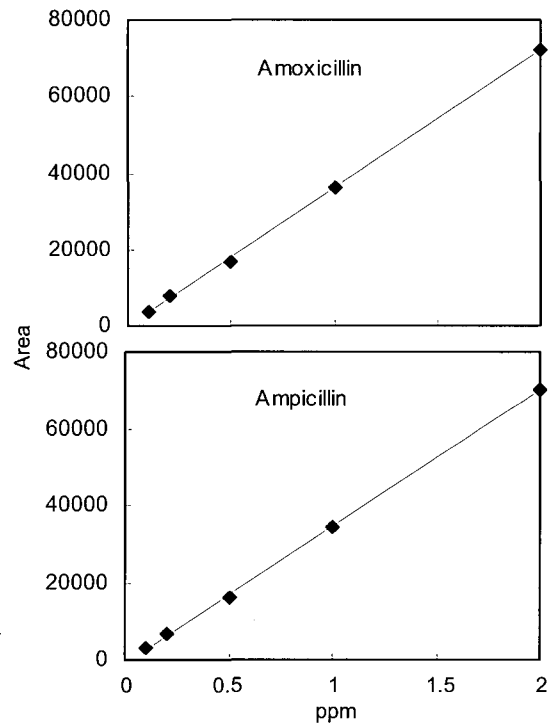


Fig. 3. Calibration curves of amoxicillin and ampicillin.

또한 넙치 근육에 첨가한 amoxicillin의 회수율 실험결과 표준품을 각각 0.5 ppm, 1.0 ppm 첨가한 시료구에서의 평균 회수율은 106.1% 및 95.3%였으며, 변이계수 (CV)값은 각각 9.1 및 4.5%이었다. 또한 ampicillin의 경우 0.5, 1.0 ppm을 첨가한 넙치 근육에서의 평균 회수율이 92.4% 및 81.4%였으며, 변이계수는 4.5 및 8.9%를 나타내어 ampicillin보다 amoxicillin의 회수율이 높았다 (Table 1). 또한 메기과 (catfish) 어육에서 amoxicillin이 약 78.0%의 회수율을 가진 Ang et al. (1996)의 결과보다는 다소 높은 회수율을 나타내었으며, Lee (1998)가 발표한 최고기, 돼지고기, 닭고기의 근육에서 amoxicillin과 ampicillin 회수율이 각각 22.3-42.7%, 38.2-53.1%이었던 것에

Table 1. Recovery of amoxicillin and ampicillin from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle

Antibiotics	Recovery (%)		
	0.5 ppm	1.0 ppm	
Amoxicillin	1	117.0	
	2	103.0	
	3	98.4	
	Average	106.1	
	S.D.	9.7	
Ampicillin	1	90.2	
	2	97.2	
	3	89.8	
	Average	92.4	
	S.D.	4.2	
		CV	4.5

<sup>1</sup>S.D.: standard deviation, <sup>2</sup>CV: coefficient variation.

비해서도 현저히 높은 값을 나타내었다. 그리고 잔류물질 분석을 위한 방법개발에 있어서 검출한계는 적어도 0.05 ppm이어야 하고 1-2 ppm 첨가하였을 때 회수율은 적어도 70% 이상 되어야 한다는 지침 (CJVPA, 1988)에 따라 개발된 시험방법의 검출한계는 0.01 ppm으로 그 기준에 합당하였다. 따라서 본 연구에서 제시된 시험법은 어육에 존재하는 amoxicillin과 ampicillin을 효율적으로 분석가능하다는 것이 입증되었고,

국내산 및 수입산 어패류에 대한 시험분석법으로 활용되고 자 식품공전에 등재할 수 있도록 식품의약품안전청에 건의하였다.

Amoxicillin과 ampicillin 분석을 위한 표준용액의 안정성

Stock solution

Amoxicillin과 ampicillin 분석에서의 표준품으로 사용하는 stock solution의 안정성 확인을 위하여 표준품에 증류수를 소량 가하여 녹인 다음 methanol로 100 ppm 농도가 되도록 조제하고 이것을 냉장과 냉동으로 보관하면서 저장중의 안정성을 조사하였으며, 표준용액의 안정성은 표준용액을 각각 1.0 및 0.5 ppm으로 희석한 용액으로 측정하였다 (Fig. 4). 이들 항생제의 저장안정성은 다소 차이는 있었지만, 냉동 저장시 amoxicillin은 4개월까지 초기농도의 약 13%, ampicillin은 약 15%가 감소되었고, 냉장 보관하였을 때는 각각 22.8%, 33.2%가 감소하였다. 따라서 stock solution을 조제한 경우 약제 안정성을 고려하여 저장 가능 기간은 냉동보관은 3개월, 냉장보관은 1개월인 것으로 확인하였다.

Working solution

Amoxicillin과 ampicillin의 표준용액 (100 ppm)으로 조제한 working solution (0.5, 1 ppm)을 만들어 냉장 및 실온 조건하에

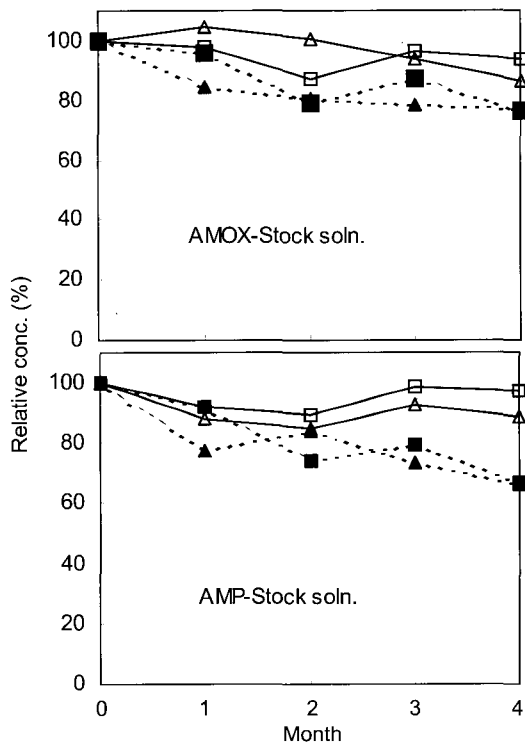


Fig. 4. Stability of standard amoxicillin and ampicillin solution under refrigeration at 4°C and freezing at -20°C (□, freezing 1 ppm; ■, refrigeration 1 ppm; △, freezing 0.5 ppm; ▲, refrigeration 0.5 ppm).

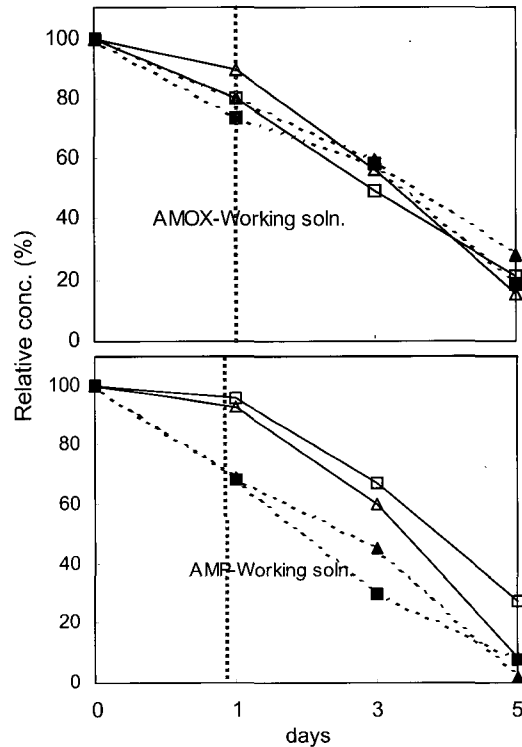


Fig. 5. Stability of working amoxicillin and ampicillin solution under room temperature and refrigeration at 4°C (□, refrigeration 1 ppm; ■, room temperature 1 ppm; △, refrigeration 0.5 ppm; ▲, room temperature 0.5 ppm).

Table 2. Level of amoxicillin (AMOX) and ampicillin (AMP) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegelii*) and sea bass (*Lateolabrax japonicus*) being cultured in fish farm and shipping step for market place

Location	Fish species	Sampling condition	Content (ppm)		Detection ratio (%)		No. of species
			AMOX	AMP	AMOX	AMP	
Busan	Olive flounder	F <sup>1)</sup>	ND <sup>3)</sup> -0.03	ND	11.1	0	9
Tongyoung	Black rockfish	F	ND	ND	0	0	9
		S <sup>2)</sup>	ND	ND	0	0	18
Geoje	Olive flounder	F	ND	ND	0	0	9
		S	ND	ND	0	0	18
	Sea bass	F	ND-0.02	ND	11.1	0	9
Yeosu	Black rockfish	F	ND	ND	0	0	9
		S	ND	ND	0.0	0	18
	Sea bass	F	ND	ND-0.03	0.0	22.2	9
Wando	Olive flounder	F	ND	ND-0.16	0	11.1	9
		S	ND	ND	0	0	18
Jeju	Olive flounder	F	ND	ND-0.03	0	11.1	18
		S	ND	ND	0	0	18
Total	171	F	ND-0.03	ND-0.16	2.5	6.2	81
		S	ND	ND	0	0	90

<sup>1)</sup>F, Farming fish; <sup>2)</sup>S, Shipping step for market; <sup>3)</sup>Not detected.

서의 안전성을 확인한 결과, 4°C 냉장 보관하였을 경우, amoxicillin은 1일 경과 후 초기농도의 약 20.2%, ampicillin은 약 7.5%가 감소하였으나 3일 경과 후에는 각각 50.9%, 40.0%가 감소하였다. 실온보관의 경우도 1일째 amoxicillin은 25.4%, ampicillin은 31.5%가 감소하였고, 3일째는 각각 74.8%, 70.2%가 감소하는 경향을 보였다 (Fig 5).

이상의 결과 stock solution의 경우 조제 후 냉장이하의 조건에서는 1개월 이상 안정성을 유지하였으나, working solution의 경우 저온이나 실온에서 안정성이 거의 보장되지 않기 때문에 시험당일 조제하여 사용하여야 하는 것으로 확인되었다.

#### 어류에 대한 penicillin계열 항생제의 모니터링

본 연구에서 개발된 분석방법의 현장 적용성 검토 및 어류 양식장에서의 amoxicillin과 ampicillin의 사용실태를 파악하기 위하여 2005년 4월부터 9월까지 어류양식이 성행하고 있는 남해안의 넙치, 조피볼락, 농어 양식장의 양식어류 및 출하단계의 동일한 어류 총 171점의 시료를 대상으로 amoxicillin과 ampicillin에 대한 모니터링을 실시하였다.

Penicillin계열 중 amoxicillin 항생제가 생산단계에서 최대 0.03 ppm으로 전체 시료에 대하여 2.5%의 검출율을 나타내었고 검출지역은 부산, 거제지역이었다. 반면 amoxicillin 항생제는 출하단계에서의 양식어류에서는 전혀 검출되지 않았다. Ampicillin도 생산단계에서 검출되었으며 검출농도는 최대 0.16 ppm으로 전체시료에 대하여 6.2% 정도로 검출되었고 검출지역은 거제, 완도와 제주지역이었다. 반면 출하단계에서의 양식어류에 대한 ampicillin 항생제는 amoxicillin과 같이 전혀 검출되지 않았다.

이상의 결과 생산단계에서의 양식어류는 amoxicillin과 ampicillin 항생제가 일부 사용되고 있는 것으로 확인되었고

출하단계에서는 전혀 검출되지 않아 식품위생상 문제는 없는 것으로 확인되었으나 양식어류에 대한 국민보건 위생안전 확보를 위해서는 어류양식장에서 사용 중인 다양한 종류의 항생제 대한 사용실태와 잔류모니터링을 지속적으로 실시되어야 할 필요가 있다고 사료된다 (Table 2).

#### 사 사

본 연구는 국립수산물과학원의 이화학적 위생안전위해관리 연구 및 식품의약품안전청 기관지정용역과제 (과제번호 -04062항내안677) 연구비지원에 의해 수행되었습니다(RP-2006-FS-005).

#### 참 고 문 헌

- Ang, Y.W.C., W. Luo, E.B. Hansen, J.P. Freeman and H.C. Thompson. 1996. Determination of amoxicillin in catfish and salmon tissues by liquid chromatography with precolumn formaldehyde derivatization. J. AOAC Int., 79, 389-396.
- CJVA (Corporation of Japan Veterinary Pharmaceutical Associations). 1988. GLP standard of the veterinary drugs, Livestock Agency, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tokyo, Japan, 1-106.
- Commission of the European Communities. 2003. Annex I, 1.2. Antibiotics, maximum residue limits. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/penicillins.pdf>.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service). 2002. United States Department of Agriculture (USDA): Unavoidable contaminants 2002 FSIS National residue program, Residue limits for veterinary drugs. <http://www.>

- fsis.usda.gov/ophs/blue2002/appendix2.pdf.
- Huber, W.G. 1988. Penicillins: Veterinary pharmacology and therapeutics. 6th ed, Booth, N.H. and McDonald, L.E. Eds, Iowa State University Press, Iowa, 796-811.
- KAHPA (Korea Animal Health Products Association). 2001. The Guidebook of Veterinary Antibiotics, Kyung-sung Munhwas, Gyeonggi-do, 898-923.
- KFDA (Korea Food and Drug Administration). 2004. Korea Food Code (A supplementary), Chapter 3, Munyoungsa, Seoul, 50-52.
- KFDA (Korea Food and Drug Administration). 2004. Korea Food Code (A supplementary), Chapter 7, Munyoungsa, Seoul, 418-422.
- Lee, J.R. 1987. Veterinary Pharmacology, 1st, Seoul National University Publishing Department, 382-390.
- Lee, U.J. 1987. Pharmacology Lecture, 2nd, Sun-il Publishing Department, 537-542.
- Lee, D.S. 1998. Simultaneous determination of six penicillins in beef, pork and chicken meats by high performance liquid chromatography. Department of veterinary medicine, graduate school Seoul National University, 8-18.
- Sørensen, L.K., L.K. Snor, T. Elkær and H. Hansen. 1999. Simultaneous determination of seven penicillins in muscle, liver and kidney tissues from cattle and pigs by a multi residue high-performance liquid chromatographic method. J. Chromatogr. B, 734, 307-318.

---

2006년 10월 18일 접수  
2006년 12월 22일 수리