

수산물 중 penicillin계열 항생제의 분석

배진한*·김보미·최미선·노혜진·박미정
국립수산물품질검사원 부산지원

Analysis of Penicillin Antibiotics in Aquatic Products

Jin Han Bae, Bo Mi Kim, Mi Sun Choi,
Hye Jin Roh and Mi Jung Park

Busan branch, National Fisheries Products Quality Inspection Service,
Busan 600-016, Korea

A simple, rapid method for determining amoxicillin (AMO) and ampicillin (AMP) in aquatic products (flatfish, salmon, shrimp, tilapia, and yellow croaker) was evaluated. For quantification, the AMO and AMP ions at m/z 348.9 and 105.9, respectively, were selected. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for detecting AMO were 0.09 and 0.25 $\mu\text{g/L}$, respectively. The respective values for AMP were 0.02 and 0.05 $\mu\text{g/L}$. After 100 $\mu\text{g/L}$ AMO treatment, the level decreased 10% after 7 days at 5°C, while it decreased 20% at 25°C. After 7 days, 94.9–100% of 100 $\mu\text{g/L}$ AMP remained after storage at 5°C, while 62.3–100% remained after storage at 25°C. Using the food code method, the recovery of AMO ranged from 64.1–92.0% and that of AMP from 44.8–86.2%. With a protein centrifugation method, the recovery of AMO ranged from 39.8–87.9% and that of AMP from 78.0–98.1%. With liquid-liquid extraction, the recovery of AMO ranged from 36.5–88.3% and that of AMP from 31.8–75.1%.

Key words: Amoxicillin, Ampicillin, Aquatic products, Recoveries

서론

항생물질은 미생물, 생합성, 반합성 등에 의하여 생산되는 화학물질로서, 저농도에서 다른 미생물의 증식을 억제하거나 죽이는 능력을 가진 화학물질로 정의된다. 지금까지 발견된 항생물질은 1만종 이상이며 생성하는 생물체, 저해되는 생물체, 화학구조 등에 의하여 분류된다. 세계적으로 소비되는 항생제는 100,000-200,000톤에 이를 정도로 많이 사용되어지고 있으며 우리나라에서는 연간 1,500여톤의 항생제가 동물의 질병방지와 성장촉진 등 생산성을 높이기 위하여 사용되었다 (Wise, 2002; KFDA, 2007). 주로 사용되는 동물용의약품은 tetracycline계열이 약 700톤 정도로 가장 높은 비율을 차지하고 있으며, penicillin계열이 170톤, sulfa계열이 160톤 등이 사용되는 것으로 보고되었다 (KFDA, 2006). 이러한 항생제는 적절하게도 사용되기도 하지만 안전사용 기준을 따르지 않고 무분별하게 과용, 오·남용되어 사용된 항생제가 동물과 그 가공품에 잔류하여 내성균의 출현을 비롯하여 균교대증과 allergy 증상 등을 초래하게 되었다 (Choi and Lee, 2009). 항생물질의 내성문제는 사람의 건강 및 생명과 직결되는 문제로서 항생물질의 적절한 사용, 안전관리 등의 중요성이 대두되고 있다 (Oh et al., 2009). 우리나라에서는 1990년도 처음으로 약 40여종의 동물용의약품에 대한 축종별 잔류허용기준을 설정한 이래 2006년도 63종, 2009년도에는 116종, 2010년까지 총 160여종에 대한 기준을 확대하여 설정하고자 추진 중에 있다. 우리나라의 경우 축·수산물에서 주로 검출되는 동물용

의약품은 tetracycline, quinolone, penicillin 및 sulfa계열 인 것으로 보고되었다 (NIFDS, 2009).

Penicillin계열 항생제는 β -lactam 골격의 화학구조를 갖고 있어 β -lactam계 항생제라 불리며 살균작용이 강하지만 화학적으로 불안정하여 빛, 열, 산소에 노출되면 효능이 감소되거나 분해된다. 오늘날에는 페니실린 내성 등으로 여러 가지 문제점이 있지만 아직까지 전 세계적으로 널리 사용되고 있다 (Shitandi and Sternesjo, 2004). Penicillin계열 항생제의 세균에 대한 살균작용은 세균의 세포벽 물질인 peptidoglycan의 합성을 촉매하는 transpeptidase와 D-alanine carboxypeptidase에 작용하여 peptidoglycan의 합성을 저해함으로써 세균의 성장을 억제하거나 사멸시키는 것으로 알려져 있다 (Lee, 2001). 주로 사용되는 penicillin계열 항생제는 amoxicillin (AMO), ampicillin (AMP), dicloxacillin, penicillin G, penicillin V 등이며 우리나라에서 2007년도에 어류와 갑각류의 AMO 및 AMP 최대잔류허용기준 (maximum residue level)을 각각 0.05 mg/kg으로 설정하였다. 미국은 쇠고기에 대하여 AMO 및 AMP 최대잔류허용기준을 각각 0.01 mg/kg으로 설정하였고 EU는 동물로부터 제조되는 모든 식품 및 가공품에 대하여 0.05 mg/kg으로 설정하고 있다 (FSIS, 2002; CEC, 2003). AMO는 반합성 penicillin계열 항생제로 그람양성균의 세포벽 합성을 방해하며 최근에 클라부란산과 조합되어서 사용되고 AMP는 천연 penicillin G와 비슷한 작용을 하는 penicillin계열 항생제로 위산에 안정하여 경구투여가 가능하여 널리 사용된다.

식품공전에 등재된 수산물의 AMO 및 AMP 분석방법은 trichloroacetic acid (TCA), diethyl ether를 사용하여 단백질, 지

*Corresponding author: jina404@nfis.go.kr

질을 제거하고 formaldehyde에 의한 유도체과정을 거쳐서 액체크로마토그래프-자의부검출기 (HPLC-UV)로 분석한다 (KFIA, 2010). 최근에 AMO 및 AMP 분석방법의 유효성 및 신뢰성 향상을 위하여 액체크로마토그래피-질량분석기 (LC-MS/MS)를 통한 확인시험방법이 보고되었다 (Kim et al., 2009). 하지만 Reyns et al. (2008)은 AMO의 안정성에서 등전 위점 (pH 4.8)보다 낮을수록 β -lactam 고리의 가수분해가 쉽게 일어나고 pH 1.2에서 AMO의 반감기가 약 4시간이지만 pH 4.0 이상에서는 최소 100시간 이상인 것으로 보고하였다. 식품공전에서 AMO 및 AMP 분석방법은 제단백을 위하여 TCA를 사용하는데 이는 AMO의 안정성에 영향을 끼칠 것으로 사료된다. 또한 농축 및 유도체과정 등으로 전처리시간이 다소 많이 소비되는 단점을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 식품공전에 소개된 AMO 및 AMP 분석방법의 유효성을 확인하고 유도체과정이 없는 몇몇의 분석방법들을 수산물에 적용하여 회수율을 살펴보고 간편·신속한 AMO 및 AMP 분석방법을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Anhydrous의 AMO 및 AMP를 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 각각의 구조식 및 분자량은 Fig. 1에 나타내었다. 표준품 10 mg을 정량하여 탈이온수 100 mL로 정용하고 초음파로 녹여 표준원액을 조제하여 -20°C에 보관하면서 사용하였다. 실험에 사용된 모든 유기용매는 Burdick & Jackson (Muskegon, MI)사의 HPLC 급을 사용하였으며 그 이외에 사용한 시약은 특급 또는 HPLC 급을 사용하였다. 본 실험에서는 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 홍다리얼룩새우 (*Penaeus semisulcatus*), 대서양연어 (*Salmo salar*), 틸라피아 (*Sarotherodon niloticus*), 부세 (*Larimichthys crocea*)의 근육부위만 취하여 homogenizer (HMF-985, Hanil, Korea)로 균질화하였다. 조제된 시료는 원심분리관에 넣어 -20°C에서 보관하였고 실험 당일에 상온에서 녹인 후, AMO 및 AMP 혼합용액을 각 농도별로 시료에 spiking하여 분석용 시료로 사용하였다. 수산물 종류에 따른 분석방법별로 5회 반복실험을 실시하였다.

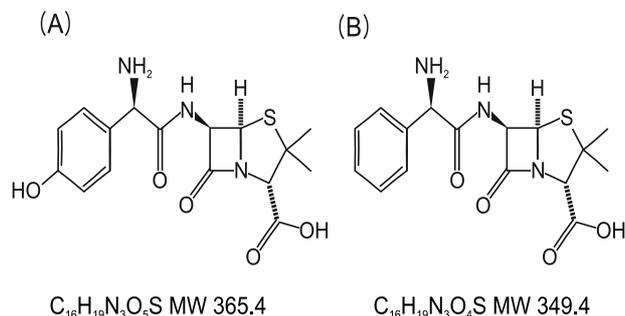


Fig. 1. Chemical structures of AMO (A) and AMP (B).

분석기기 및 조건

HPLC-PDA는 Agilent 1100 series (Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며 분석조건은 Table 1에 나타내었다. UPLC-MS/MS는 ACQUITY Ultra Performance LCTM system (Waters, Milford, MA, USA) 및 Micromass Quattro Premier XE API triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Micromass, Manchester, UK)를 사용하였으며 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

Table 1. HPLC-PDA conditions for AMO and AMP

Instrument	Agilent 1100 series
Detector	PDA, 360 nm
Column	Shiseido C ₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)
Mobile phase	0.05 M phosphate buffer (pH 6.5):Acetonitrile=8:2 (v/v)
Oven temperature	35°C
Flow rate	1.0 mL/min
Injection column	100 μ L

Table 2. UPLC-MS/MS conditions for AMO and AMP

Instrument	UPLC: Waters ACQUITY UPLC MS/MS: Waters, Micromass Quattro Premier XE		
Column	ACQUITY UPLC _{TH} BEH C ₁₈ (Waters, 1.7 μ m, 2.1 mm×50 mm)		
Mobile phase A: 0.1% formic acid in distilled water B: 0.1% formic acid in acetonitrile	Time (min)	A (%)	B (%)
	Initial	90	10
	0.5	90	10
	2.0	40	60
	3.5	0	100
	3.6	90	10
	5.0	90	10
Oven temperature	35°C		
Flow rate	0.3 mL/min		
Injection column	2 μ L		
MS/MS	Ionization mode	ESI+	
	Multiple reaction monitoring	AMO: 365.9→348.9 AMP: 349.9→105.9	
	Capillary (kV)	0.9	
	Source temp. (°C)	120	
	Desolvation (°C)	350	
	Corn voltage (V)	23	

AMO 및 AMP의 표준곡선, 검출한계, 정량한계

HPLC-PDA 분석을 위한 표준곡선은 AMO 및 AMP 표준원액을 0.2, 0.5, 1.0, 5.0 mg/L의 농도로 탈이온수로 희석하였다. 유도체를 위해 희석한 각 표준용액 1 mL에 탈이온수 4 mL, 20% TCA 0.5 mL를 가하여 진탕한 후 다시 7% formaldehyde 용액 1 mL를 가하고 진탕 후 100°C에서 30분간 유도체하고 방냉하였다. 이 유도체 액에 diethyl ether 6 mL을 넣어 30초간 진탕하고 1,800×g에서 2분간 원심분리하여 diethyl ether층을 취하였다. 이 과정을 반복하여 diethyl ether 추출액 12 mL을 50°C에서 농축한 후 탈이온수 1 mL을 가하여 용해한 다음

0.2 μm syringe filter로 여과하여 HPLC-PDA로 분석한 다음 농도에 따른 peak 면적비를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. UPLC-MS/MS 분석을 위한 표준곡선은 AMO 및 AMP 표준원액을 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ 의 농도로 탈이온수로 희석하여 유도체과정 없이 UPLC-MS/MS로 분석한 다음 농도에 따른 peak 면적비를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. UPLC-MS/MS의 검출한계 (LOD, limit of detection)는 MassLynx software에서 신호대 잡음비 (S/N, signal to noise ratio)가 >3으로 하였으며, 정량한계 (LOQ, limit of quantitation)는 >10으로 하였다.

AMO 및 AMP의 안정성

AMO 및 AMP의 안정성은 표준원액을 10, 100, 1000 $\mu\text{g/L}$ 농도로 탈이온수로 희석하여 각각 만든 후, 5 $^{\circ}\text{C}$ 와 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하면서 UPLC-MS/MS를 이용하여 안정성을 살펴보았다.

식품공전에 의한 분석방법

KFIA (2010)에서 소개된 AMO 및 AMP의 분석방법으로 전처리를 실시하였다. 시료 5 g을 원심분리관에 넣고 탈이온수 40 mL을 첨가하여 10분 동안 교반한 다음, 6,600 $\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액에 70% TCA 1 mL을 가하여 제단백시킨 다음 6,600 $\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리한 후 여과하여 상층액을 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2-3 mL로 감압농축하여 얻은 액을 5 mL정도 되게 탈이온수로 정용하였다. 정용액을 diethyl ether 6 mL을 가하여 30분간 진탕 후 1,800 $\times\text{g}$ 에서 2분간 원심분리하고 하층을 취하였다. 하층은 20% TCA 0.5 mL를 가하여 진탕한 후 다시 7% formaldehyde 용액 1 mL을 가하고 진탕 후 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 유도체하고 방냉하였다. 이 유도체 액에 diethyl ether 6 mL을 넣어 30초간 진탕하고 1,800 $\times\text{g}$ 에서 2분간 원심분리하여 diethyl ether층을 취하였다. 이 과정을 반복하여 diethyl ether 추출액 12 mL을 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 농축한 후 탈이온수 1 mL을 가하여 용해한 다음 0.2 μm syringe filter로 여과하여 HPLC-PDA로 분석하여 표준용액과 비교한 후 회수율을 산출하였다.

Protein centrifugal devices에 의한 분석방법

Reyns et al. (2008)의 방법을 변형하여 시료 1 g을 원심분리관에 넣고 탈이온수 8 mL을 첨가하여 10분 동안 교반한 다음, 6,600 $\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리를 하였다. 상층액 1.2 mL을 eppendorf tube에 옮기고 10,000 $\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하고 상층액 0.5 mL을 Nanosep 30K Centrifugal Devices (Pall Life Science, East, Hills, NY, USA)에 옮겨서 10,000 $\times\text{g}$ 에서 35분간 원심분리를 하였다. 원심분리를 실시한 액을 0.2 μm syringe filter로 여과하여 UPLC-MS/MS로 분석하여 표준용액과 비교한 후 회수율을 산출하였다.

Liquid-liquid extraction에 의한 분석방법

Ternandez-Torres et al. (2010)에서 소개한 방법을 변형하여 시료 1 g을 원심분리관에 넣고 0.2 M citrate solution 4 mL과 methanol 4 mL을 가하여 균질화하고 초음파로 5분간 처리한 다음, 6,600 $\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리를 하여 상층액은 새 원심분리관에 담았다. 새 원심분리관에 있는 상층액에 대하여

dichloromethane 8 mL을 첨가하여 교반 및 원심분리를 하였다. 원심분리가 끝난 상층액을 0.2 μm syringe filter로 여과하여 UPLC-MS/MS로 분석하여 표준용액과 비교한 후 회수율을 산출하였다.

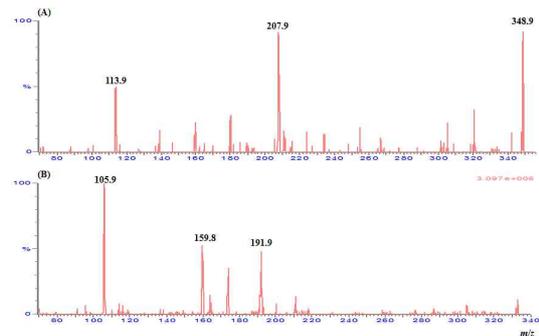


Fig. 2. ESI-MS/MS spectrum of AMO (A) and AMP (B).

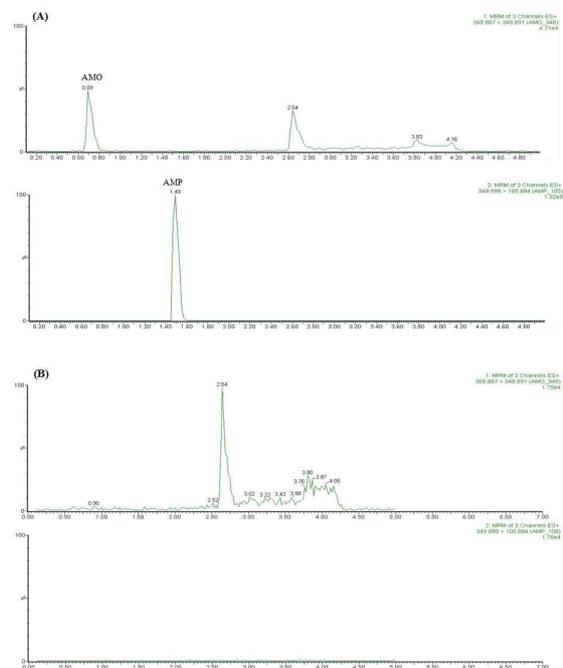


Fig. 3. ESI-MS/MS chromatogram of AMO (365.9>348.9) and AMP (349.9>105.9) for a blank flatfish muscle spiked at 25 $\mu\text{g/L}$ (A) and a blank flatfish muscle (B).

결과 및 고찰

질량분석법

질량분석법은 대상물질의 분자 중 전자를 얻거나 잃음으로써 이온 (ion)으로 전환된 질량 (mass)을 측정하는 방법으로, 분자에서 생성된 이온의 질량전하비 (m/z ratio, mass-to-charge ratio)로 나타난다. AMO 및 AMP의 ESI-MS/MS 스펙트럼 (spectrum)을 Fig. 2에 나타내었다. AMO의 딸이온 (product ion)은 m/z 348.9, 207.9 및 113.9로 나타났다. 어미이온

(precursor ion)으로부터 NH₃가 떨어진 m/z 348.9이 이온세기가 가장 크고 안정하기 때문에 AMO의 정량이온 (quantification ion)으로 선택하였다. AMP의 딸이온은 m/z 191.9, 159.8 및 105.9로 나타났으며 정량이온은 m/z 105.9로 선택하였다. m/z 159.8은 β-lactam 골격에서 생성되는 딸이온으로 AMO 및 AMP의 MS/MS 스펙트럼에서 나타났다. 넓치육에 AMO 및 AMP를 spike 처리한 MS/MS 크로마토그램 (chromatogram)을 Fig. 3에 나타내었다. 다른 수산물에서도 MS/MS 크로마토그램은 비슷하게 나타났으며 표준물질과 수산물의 방해물질의 retention time이 분리되어 있어서 양호한 크로마토그램을 얻을 수 있었다. Reyns et al. (2008)은 AMO 및 AMP의 정량이온을 m/z 349 및 106으로 선택하였으며 본 연구와 일치하였다. Kim et al. (2009)은 AMO 및 AMP의 정량이온을 m/z 184.6 및 169.1으로 선택하였는데 이는 TCA와 formaldehyde를 이용한 유도체과정에서 생성된 최종 반응생성물을 대상으로 딸이온을 선택하였기 때문이다. Straub and Boyksner (1993)은 penicillin계열 항생제를 negative 이온화모드에서 분석을 시도하였지만 분석감도가 낮게 나타난 것으로 보고하였다.

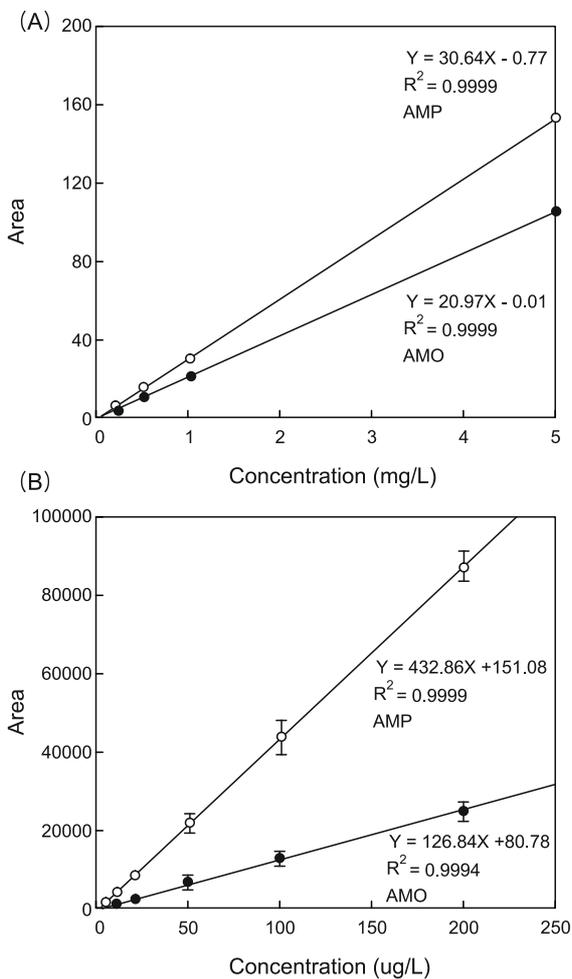


Fig. 4. Calibration curves of AMO and AMP at different concentrations by HPLC-PDA (A) and UPLC-MS/MS (B).

Table 3. LOD and LOQ for detection of AMO and AMP by UPLC-MS/MS

	LOD (μg/L) ¹⁾	LOQ (μg/L) ²⁾
AMO	0.09	0.25
AMP	0.02	0.05

¹⁾LOD: limit of detection.

²⁾LOQ: limit of quantification.

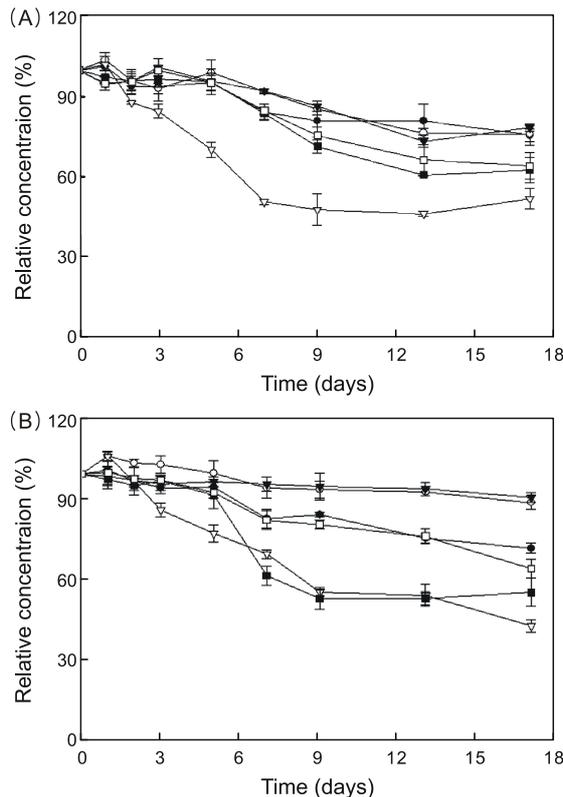


Fig. 5. Storage stability of AMO (A) and AMP (B) at different temperature (●, 10 μg/L at 5°C; ○, 100 μg/L at 5°C; ▼, 1000 μg/L at 5°C; ▽, 10 μg/L at 25°C; ■, 100 μg/L at 25°C; □, 1000 μg/L at 25°C).

AMO 및 AMP의 표준곡선, 검출한계, 정량한계

AMO 및 AMP의 표준곡선을 Fig. 4에 나타내었다. AMO 및 AMP의 표준용액의 각 농도를 각각 HPLC-PAD와 UPLC-MS/MS로 측정 후 1차 회귀식으로부터 얻은 R²값은 양쪽 모두 0.9994-0.9999의 높은 직선성을 보여주었다. UPLC-MS/MS에 의한 AMO 및 AMP의 검출한계와 정량한계를 Table 3에 나타내었다. 크로마토그램 결과를 smoothing method (2:1)를 적용하여 peak-to-peak 방식으로 계산하여 S/N을 구하였다. AMO의 검출한계와 정량한계는 각각 0.09, 0.25 μg/L로 나타났으며 AMP는 0.02, 0.05 μg/L으로 만족할 만한 수준을 보여 주었다. De Baere et al. (2002)는 돈육에서 LC-MS/MS를 이용한 AMO 및 AMO 대사산물의 정량 분석법에서 정량한계는 25 ng/g, 검출한계는 2.3-12.0 ng/g으로 보고하였다. 또한 Ang et al. (1996)은 분석시료의 무게에 따라서

검출한계가 0.5-0.8 ng/g로 나타나는 것으로 보고하였으며 Yoon et al. (2004)은 negative 이온화모드로 혈장에서의 AMO 정량한계를 120 ng/mL으로 보고하였다.

AMO 및 AMP의 안정성

Fig. 5는 AMO 및 AMP의 보관온도 (5, 25°C)에 따른 농도별 (10, 100, 1000 µg/L) 안정성을 나타내었다. 100 µg/L 농도의 AMO를 5°C 보관하였을 경우, 7일 경과 후에 약 10%가 감소하였지만 25°C에서는 20%가 감소하여 나타났다. 100 µg/L 농도의 AMP를 5°C 보관하였을 경우, 7일 경과 후에 약 94.8%로 나타났지만 25°C에서는 62.2%로 감소하여 나타났다. Reyns et al. (2008)는 AMO 및 AMP를 -70°C 이하에서 보관하면 12개월 정도 안정하고 5°C에서 보관하면서 24시간이 안정한 것으로 보고하였다. Jo et al. (2006)는 AMO 및 AMP의 stock solution을 냉장이하에서 보관하면 1개월 이상 안정하지만 working solution의 경우 온도에 따라서 안정성이 거의 보장되지 않기 때문에 시험 당일 조제하여 사용하여야 한다고 보고하였다. 따라서 AMO 및 AMP의 안정성을 위하여 고농도, 저온 보관이 필요한 것으로 생각된다.

Table 4. Recoveries of AMO and AMP of aquatic products by food code method

Aquatic products	Concentration (µg/L)	AMO		AMP	
		Recovery (%)	RSD (%) ¹⁾	Recovery (%)	RSD (%)
Flatfish	200	86.5 ± 3.4 ²⁾	3.9	86.0 ± 1.6	1.8
	100	89.0 ± 3.8	4.2	86.2 ± 3.3	3.9
Salmon	200	91.9 ± 2.7	2.9	48.4 ± 2.9	5.9
	100	89.7 ± 4.0	4.5	44.8 ± 2.5	5.5
Shrimp	200	84.3 ± 4.5	5.4	66.4 ± 5.5	8.2
	100	72.9 ± 1.1	1.5	66.6 ± 4.1	6.1
Tilapia	200	64.1 ± 1.7	2.7	45.7 ± 1.8	3.9
	100	74.8 ± 0.7	1.0	50.5 ± 2.6	5.1
Yellow croaker	200	84.7 ± 2.6	3.1	64.3 ± 1.2	1.9
	100	92.0 ± 0.5	0.6	57.6 ± 3.4	5.9
Average		83.0 ± 9.3		61.7 ± 15.0	

¹⁾RSD: relative standard deviation.

²⁾Values are mean ± standard deviation (n=5).

식품공전 회수율

Table 4은 식품공전 분석방법에 의한 AMO 및 AMP의 회수율을 나타내었다. AMO는 64.1% (틸라피아류)에서 92.0% (부세), AMP는 44.8% (연어류)에서 86.2% (넙치)으로 나타났다. 식품공전 분석방법에서 수산물의 종류에 따라 회수율 차이는 있었지만 평균적으로 AMO는 83.0%, AMP는 61.7%의 회수율이 나타났으며 AMO가 AMP보다 회수율이 높게 나타났다. Jo et al. (2006)은 넙치의 AMO 및 AMP의 회수율이 95.4%와 81.4%였으며 AMP보다 AMO가 회수율이 높다고 보고하였는데 본 연구와 비슷한 경향이 나타났다. 또한 Kim et al. (2009)은 넙치, 조피볼락, 장어의 AMO 및 AMP의 평균회수율을 90.9 ± 4.8%와 87.9 ± 4.8%로 나타냈지만 대하의 경우 67.3 ± 2.9%와

64.9 ± 3.6%로 다른 수산물에 비교할 때 낮은 회수율을 보인 것으로 보고하였는데 이는 시료마다 가지고 있는 각기 다른 matrix의 영향인 것으로 생각된다. Matrix는 분석물질을 제외하고 미지시료 중에 함유되어 있는 모든 화학물질을 말하며, matrix effect는 시료 중에 존재하고 있는 분석물질이 아닌 다른 어떤 물질에 의해서 일으키는 분석신호의 변화를 의미한다 (Harris, 2007). Luo and Ang (2000)는 동물육에서 AMO를 추출하여 C₁₈ cartridge로 정제하고 유도체과정을 거쳐 HPLC-FLD로 분석한 결과 83.9-95.4%의 회수율을 보고하였다. 식품공전에서 수산물에 대한 AMO 및 AMP의 분석방법은 물로 추출한 후 TCA 및 diethyl ether를 사용하여 단백질 및 지질을 제거하고 유도체과정을 거친 후 diethyl ether로 추출하여 UV검출기로 측정하였다. 이 방법은 AMO에서 양호한 회수율을 보이지만 diethyl ether의 사용으로 분석자의 건강에 악영향을 주고 추출물의 농축, 유도체과정 등으로 전처리시간이 다소 긴 단점을 가지고 있었다.

Table 5. Recoveries of AMO and AMP of aquatic products by protein centrifugal devices method

Aquatic products	Concentration (µg/L)	AMO		AMP	
		Recovery (%)	RSD (%) ¹⁾	Recovery (%)	RSD (%)
Flatfish	125	73.7 ± 6.6 ²⁾	9.0	83.8 ± 1.6	1.9
	12.5	79.2 ± 3.1	3.9	95.2 ± 3.6	3.7
Salmon	125	41.1 ± 1.3	3.0	88.2 ± 2.6	3.0
	12.5	53.6 ± 1.4	2.7	87.5 ± 2.3	2.6
Shrimp	125	65.7 ± 1.7	2.6	88.4 ± 1.4	1.6
	12.5	87.9 ± 4.2	4.8	98.1 ± 2.8	2.9
Tilapia	125	39.8 ± 1.6	4.0	80.7 ± 2.2	2.7
	12.5	57.6 ± 1.6	2.8	79.2 ± 6.6	8.3
Yellow croaker	125	44.7 ± 2.2	5.0	82.0 ± 1.3	1.6
	12.5	56.2 ± 0.6	1.0	78.0 ± 3.5	4.5
Average		61.1 ± 16.3		86.8 ± 6.9	

¹⁾RSD: relative standard deviation.

²⁾Values are mean ± standard deviation (n=5).

Protein centrifugal devices 회수율

Table 5은 protein centrifugal devices 분석방법에 의한 AMO 및 AMP의 회수율을 나타내었다. AMO는 39.8% (틸라피아류)에서 87.9% (새우류), AMP는 78.0% (부세)에서 98.1% (새우류)으로 나타났다. Protein centrifugal devices 분석방법에서 수산물의 종류에 따라 회수율 차이는 있었지만 평균적으로 AMO는 61.1%, AMP는 86.8%의 회수율이 나타났다. Wang (2004)은 AMO 및 AMP는 양쪽성 화합물로서 추출과정에서의 손실, matrix에 의한 이온화과정 영향 등으로 회수율이 낮게 나타나는 것으로 보고하였다. Nagata and Saeki (1986)는 방어에서 AMP를 추출하여 florasil cartridge를 거쳐 정제하고 유도체과정 없이 분석한 결과 61.5-73.2%의 회수율이 나타났으며 Sørensen et al. (1999)는 송어에서 AMO를 추출하여 Oasis HLB cartridge를 거쳐 정제하고 유도체과정을 거쳐 분석한 결과 80.5%의 회수율을 보고하였다. Reyns et al. (2008)의 전처리

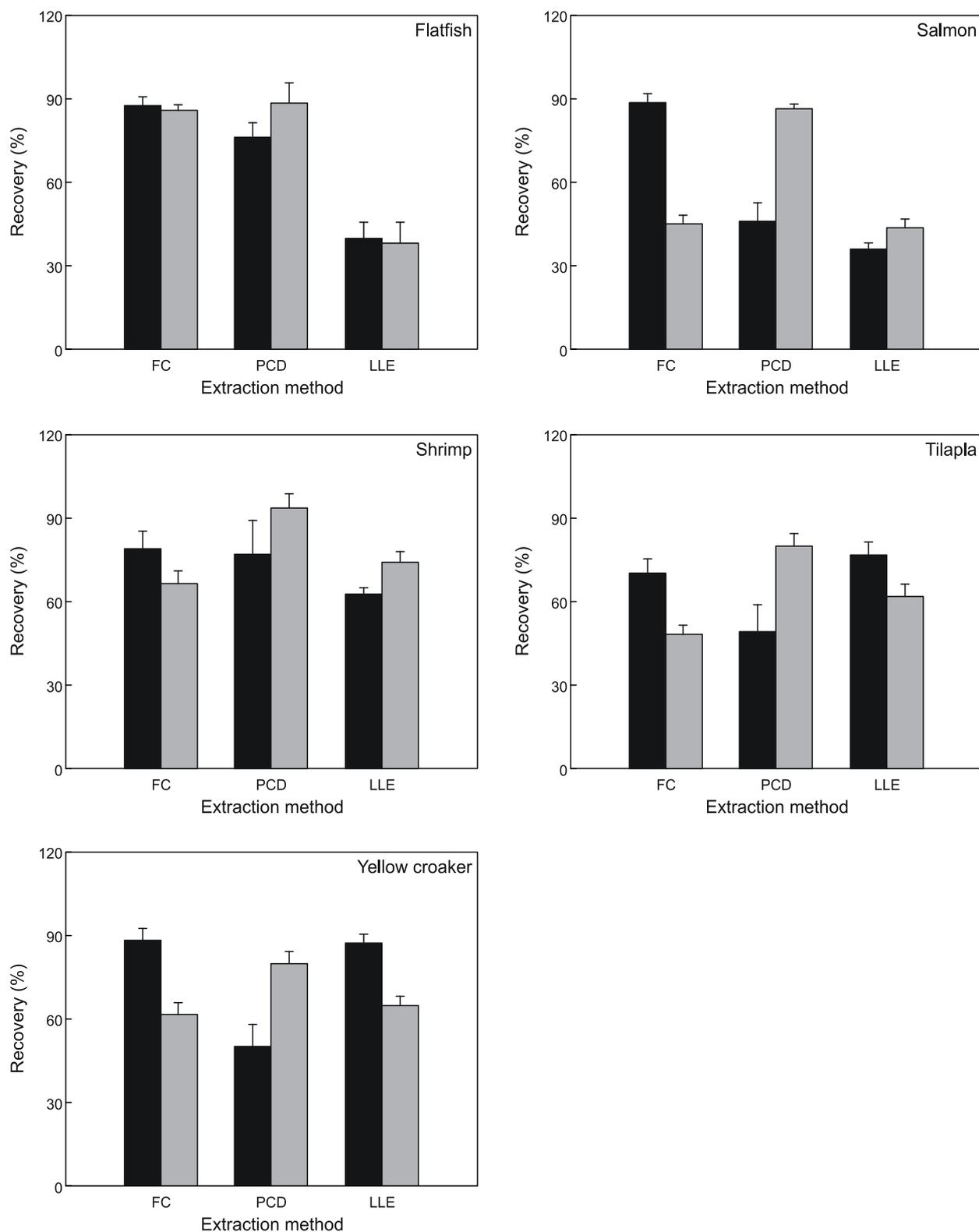


Fig. 6. Recoveries of AMO and AMP from aquatic products by extraction methods. FC, food code; PCD, protein centrifugal devices; LLE, liquid-liquid extraction; ■, AMO; ▒, AMP.

방법은 돈육에서 거의 100% 회수율을 보이면서 간단하고 빠른 시간에 전처리가 가능한 것으로 보고하였지만 AMO의 고유한 특성에 의하여 회수율이 낮게 나타났지만 간단하고 빠른 전처리가 가능한 장점을 가지고 있었다.

Table 6. Recoveries of AMO and AMP of aquatic products by liquid-liquid extraction method

Aquatic products	Concentration (µg/L)	AMO		AMP	
		Recovery (%)	RSD (%) ¹⁾	Recovery (%)	RSD (%)
Flatfish	125	44.3 ± 3.7 ²⁾	8.3	31.8 ± 0.7	2.3
	12.5	36.5 ± 2.8	7.7	44.9 ± 3.2	7.1
Salmon	125	36.5 ± 1.4	3.7	42.9 ± 2.3	5.3
	12.5	39.2 ± 2.0	5.1	47.2 ± 0.8	1.7
Shrimp	125	62.4 ± 2.9	4.6	73.6 ± 2.8	3.8
	12.5	62.7 ± 1.7	2.7	75.1 ± 3.6	4.8
Tilapia	125	78.4 ± 3.7	4.7	61.1 ± 3.6	5.9
	12.5	74.9 ± 2.8	3.7	63.6 ± 2.4	3.8
Yellow croaker	125	86.6 ± 4.4	5.1	63.8 ± 2.3	3.6
	12.5	88.3 ± 1.9	2.1	65.3 ± 1.3	2.0
Average		61.0 ± 20.1		56.9 ± 14.0	

¹⁾RSD: relative standard deviation.

²⁾Values are mean ± standard deviation (n=5).

Liquid-liquid extraction 회수율

Table 6은 liquid-liquid extraction 분석방법에 의한 AMO 및 AMP의 회수율을 나타내었다. AMO는 36.5% (넙치)에서 88.3% (부세), AMP는 31.8% (넙치)에서 75.1% (새우)으로 나타났다. Liquid-liquid extraction 분석방법에서 수산물의 종류에 따라 회수율 차이는 있었지만 평균적으로 AMO는 61.0%, AMP는 56.9%의 회수율이 나타났다. De Baere et al. (2002)는 AMO 및 AMP 대사산물을 추출하여 C₁₈ cartridge로 정제하고 유도체과정 없이 LC-MS/MS로 분석한 결과 회수율이 40-90%로 다양하게 나타났는데 이는 matrix 영향인 것으로 보고하였다. Fernandez-Torres et al. (2010)은 수산물에서 유도체과정 없이 효소 및 초음파 전처리를 거친 AMO 및 AMP의 회수율을 56.8-66.3%, 65.9-72.6%로 보고하였는데 본 연구결과와 비슷하게 나타났다. 수산물 종류에 따른 회수율이 다양하게 나타났지만 유도체과정이 없고 liquid-liquid extraction을 통하여 간단하고 빠른 전처리가 가능하였지만 회수율이 낮았다.

양식업은 어류의 질병과 기생충 등을 해결하기 위하여 각종 항생물질 등을 사용한다. AMO 및 AMP는 penicillin계열 항생제로서 세균의 세포벽 형성을 저해하여 세균의 성장을 억제하거나 사멸시킨다. Penicillin계열 항생제는 화학적으로 불안정하여 빛, 열, 산소에 노출되면 효능이 감소되거나 분해되기 때문에 이러한 문제점을 해결하기 위하여 다양한 반합성 유도체가 개발되었다 (Lim, 2004). 수산 양식업에 널리 사용되는 AMO 및 AMP는 2007년도에 수산물에 대한 최대잔류허용기준이 각각 0.05 mg/kg 으로 설정되었다. 식품공전에서는 AMO 및 AMP를 유도체과정을 거쳐서 분석하고 있지만 본 연구에서는 유도체과정이 없는 몇몇의 분석방법들을 수산물에 적용

하여 검토하였다 (Fig. 6). 식품공전 분석방법은 AMO에서 양호한 회수율을 보였지만 diethyl ether의 사용, 추출물의 농축, 유도체과정 등으로 전처리시간이 다소 긴 단점을 가지고 있었다. Protein centrifugal devices 분석방법은 AMP에서 양호한 회수율을 보였지만 추출과정에서의 손실, matrix에 의한 이온화과정 영향 등으로 AMO의 회수율이 수산물 종류에 따라서 다르게 나타났다. Liquid-liquid extraction 분석방법은 간단한 전처리가 가능하지만 AMO 및 AMP 회수율이 낮게 나타났다. 분석방법에 의한 회수율이 수산물 종류별로 다양하게 나타났다. 이는 수산물 종류별로 가지고 있는 고유의 matrix 특성 및 분석방법에 따른 차이인 것으로 사료된다. 유도체과정이 없는 protein centrifugal devices 및 liquid-liquid extraction 분석방법은 간단한 전처리에 의한 분석시간 절약, 재현성 있는 결과, 검출감도의 우수성 등이 확인되었지만 몇몇 수산물에서 낮은 회수율이 문제가 되었다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 분석물질의 안정성 향상, matrix effect 최소화 등이 필요한 것으로 사료된다.

참고문헌

- Ang CYW, Luo W, Hansen EB, Freeman JP and Thompson HC. 1996. Determination of amoxicillin in catfish and salmon tissues by liquid chromatography with precolumn formaldehyde derivatization. *J AOAC Int* 79, 389-396.
- CEC (Commission of the European Communities). 2003. Annex I, 1.2. Antibiotics, maximum residue limits. Retrieved from <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/penicillins.pdf>.
- Choi JE and Lee EY. 2009. An investigation on the antibiotic resistant condition and label-stated of domestically distributed livestock-environment improving agents. *Kor J Microbiol Biotechnol* 37, 258-265.
- De Baere S, Cherlet M, Baert K and De Backer P. 2002. Quantitative analysis of amoxicillin and its major metabolites in animal tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 74, 1393-1401.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service). 2002. Unavoidable contaminants 2002 FSIS National residue program, Residue limits for veterinary drug. Retrieved from <http://www.fsis.usda.gov/ophs/blue2002/appendix2.pdf>.
- Jo MR, Kim PH, Lee TS, Oh EG, Yu HS and Lee HJ. 2006. Simultaneous determination of amoxicillin and ampicillin in fish meat using high-performance liquid chromatography. *J Kor Fish Soc* 39, 454-459.
- Harris DC. 2007. Quantitative chemical analysis 7th ed. Free-dom academy publishing Co., Seoul, Korea, 107.

- KFDA (Korea Food and Drug Administration). 2006. Veterinary drug residue monitoring. KFDA Report, 530-531.
- KFDA (Korea Food and Drug Administration). 2007. Monitoring of antimicrobial resistance on the food animals and meats. KFDA Report, 1-110.
- KFIA (Korea Foods Industry Association). 2010. Food Code. KFIA Press, Seoul, Korea, 1079-1081.
- Kim HY, Choi HJ, Kim YH, Choi SH, Cheong SY, Lee HJ, Kim JI, Choi GS and Choi JC. 2009. Analysis of amoxicillin, ampicillin, oxolinic acid and flumequin in foods. *Kor J Food Sci Technol* 41, 490-497.
- Lee UJ. 2001. Pharmacology lecture of Lee uh joo. Medrang press, Seoul, Korea, 572-575.
- Lim BS. 2004. B-lactam antibiotic fermentation and market trading. *Tech News BRIEF*, 1-2.
- Luo W and Ang CYW. 2000. Determination of amoxicillin residues in animal tissues by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J AOAC Int* 83, 20-25.
- Nagata T and Saeki M. 1986. Determination of ampicillin residues in fish tissues by liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 69, 448-450.
- NIFDS (National Institute of Food and Drug Safety Evaluation). 2009. 2009 veterinary drug residues monitoring. NIFDS Report, 4-6.
- Oh JH, Kwon CH, Jeon JS and Choi DM. 2009. Management of veterinary drug residues in food. *Korean Journal of Environmental Agriculture* 28, 310-325.
- Reyns T, Cherlet M, De Baere S, De Backer P and Croubels S. 2008. Rapid method for the quantification of amoxicillin and its major metabolites in pig tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with emphasis on stability issues. *J Chromatogr B* 861, 108-116.
- Shitandi A and Sternesjo A. 2004. Factors contributing to the occurrence of antimicrobial drug residues in Kenyan milk. *J Food Prot* 67, 399-402.
- Sørensen LK, Hansen H and Snor L. 1999. Determination of amoxicillin in trout by liquid chromatography with UV detection after derivatization. *J AOAC Int* 82, 1345-1352.
- Straub RF and Voyksner FD. 1993. Determination of penicillin-G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin and cephapirin by electrospray mass-spectrometry. *J Chromatogr* 647, 167-181.
- Ternandez-Torres R, Bello Lopez MA, Olias Consentino M, Callejon Mochon M and Perez-Bernal JL. 2010. Application of enzymatic probe sonication extraction for the determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples. *Analytica Chimica Acta* 675, 156-164.
- Yoon KH, Lee SY, Kim W, Park JS and Kim HJ. 2004. Simultaneous determination of amoxicillin and clavulanic acid in human plasma by HPLC-ESI mass spectrometry. *J Chromatogr B* 813, 121-127.
- Wang J. 2004. Confirmatory determination of six penicillins in honey by liquid chromatography /electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J AOAC Int* 87, 45-55.
- Wise R. 2002. Antimicrobial resistance: priorities for action. *J Antimicrob Chemoth* 49, 585-586.

2010년 9월 14일 접수
 2010년 10월 14일 수정
 2010년 10월 20일 수리