pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 28, No. 1, pp. 19~23 (2013)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

액체크로마토그래피를 이용한 닭고기 시료에서의 마크로라이드계 동시분석법 개발

이상희 · 유미영 · 신동빈*
한국식품연구원, 식품분석센터

Determination of Four Macrolide Antibiotics Residues in Chicken Muscle Using High-Performance Liquid Chromatography

Sang-hee Lee, Miyoung Yoo, and Dong-bin Shin*
Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Bundang, Seongnam, Gyeonggi, Korea
(Received September 5, 2012/Revised October 7, 2012/Accepted December 24, 2012)

ASTRACT - A simple and rapid method has been developed and validated for simultaneous determination of each macrolides residues (spiramycin, josamycin, tilmicosin, tylosin) in chicken muscle by high-performance liquid chromatography-photo diode array (HPLC-PDA). Chicken muscle sample have been extracted with liquid-liquid extraction process; analytes was extracted by acetonitrile, and then defatted with hexane saturated by acetonitrile. The HPLC separation was performed on a Unison UK-C_{18} (150 mm × 3.0 mm, 3 μm) with a gradient system of 0.1% trifloroacetic acid (TFA) and 0.1% trifloroacetic acid (TFA) in acetonitrile as the mobile phase. The drugs were detected at 232 nm for spiramycin and josamycin, and 287 nm for tilmicosin and tylosin. The limits of quantification (LOQs) were between 27 and 59 μg/kg; and the intra- and inter-day precision (relative standard deviation; RSD) was between 0.9-13.2 and 2.4-13.1%, respectively in chicken muscle sample. The method may has been successfully applied for multiresidue determination of four macrolides below the maximum residue limits (MRLs) established by the European Union (EU).

Key words: macrolides, chicken muscle, HPLC-PDA, validation

마크로라이드계(MLs) 항생물질은 일반적으로 정균작용을 나타내는 약물로, 주로 호기성 그람 양성 구균 및 간균에서 나타나는 세균성 감염증의 치료에 효과가 있어 광범위하게 가축의 치료 목적으로 사용되고 있다[1]. 우리나라의 경우 가축에는 tylosin (TS), erythromycin (EM), kitasamycin (KT), spiramycin (SPM), josamycin (JM), sedecamycin (SDM), oleandomycin (OM), tilmicosin (TLM) 등이 사용되고 있다. 그러나, 이들 약제의 오.남용으로 인하여 세균에 있어서 그 내성을 증가시킴으로써 식품 중에 항생물질의 잔류로 인한 인체에 미치는 영향이 심각하게 문제시되고 있다[2]. 그리하여, MLs에 대해 EU, FDA, China 등 세계각국에서 잔류허용기준(maximum residue limit; MRL)을 설정하여 규제를 강화하고 있다[3,4]. 우리나라에서도 MLs의 일부 항목에 대한 사용을 규제하고 있는데, 현재 SPM, EM, TS, TLM, 및 OM 등이 속한다. 그러나, roxithromycin (ROM), medecamycin (MEM), troleandomycin (TRM), JM 등에 대해서는 아직 MRLs이 설정되어 있지 않다(Table 1)[3].

그러므로, 이러한 항생물질의 오,남용으로 식품의 안전성 문제가 우려되므로, 이에 대한 체계적인 관리를 위해 식품 중 잔류 항생물질을 식품 종류에 따라 정확히 분석할 수 있는 분석법확립에 대한 정밀성, 정확성, 재현성에 대한 정확한 검증이 필요한 실정이다[5-7]. 따라서, 최근 항생물질에 대한 새로운 분석전처리 기술 및 검출분석기술의 발달로 항생물질 계열별에 따른 다성분 동시분석법의 개발이 활발히 진행되고 있으나, 국내의 경우에는 이에 대한 연구가 매우 미약한 실정이다[5,8].

식품 중 MLs 항생물질의 잔류시험법으로는 미생물분석법과 화학적 방법이 있다[9-13]. 그러나, 미생물분석법은 각 약물들에 대한 특이성과 민감도가 부족하여, 미량의 정량분석에는 어려운 단점이 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해, 정량법으로는 시료의 전처리가 비교적 용이하고 재현성이 높으며, 정밀한 분석결과를 얻을 수 있는 HPLC (high performance liquid chromatography)-자외선검출기(ultraviolet)이나 형광검출기(fluorometric detection)를 이용한 분석법

*Correspondence to: Dong-bin Shin, Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Bundang, Seongnam, Gyeonggi, Korea
Tel: 82-31-780-9126, Fax: 82-31-780-9280
E-mail: shindb@kfri.re.kr

Table 1. The maximum residue limits of MLs (μg/kg)

Pharmacologically active substances[1)]	Animal species	Target tissues	EU	Korea
SPM	Bovine	Muscle	200	200
		Milk	200	200
	Chicken	Muscle	200	200
	Porcine	Muscle	250	200
TS	Porcine	Muscle	50	200
	Muscle	Muscle	-	200
	Chicken	Muscle	-	200
	Poultry	Muscle	-	200
TLM	Bovine/ Sheep	Muscle	100	100
	Sheep	Milk	50	-
	Chicken	Muscle	75	-
EM	Bovine/ Porcine	Muscle	200	100
	Chicken/ poultry	Muscle	200	125
		Milk	40	
		Egg	150	-
OM	Porcine/ Chicken/ poultry	Muscle	-	150

[1)]Spiramycin (SPM), Tylosin (TS), Tilmicosin (TLM), Erythromycin (EM), Oleandomycin (OM)

이 사용되고 있다. 최근에는 미량분석을 위한 LC-Mass Spectrometry (MS)를 이용한 분석법이 이용되고 있다[5,8,14]. 또한, 시료 전처리법으로는 일반적으로 유기용매로 추출하고 카트리지를 이용해 정제하는 고체상추출법[11,15,16]과, 유기용매와 함께 온도와 압력을 증가시킴으로 소량의 용매로 대상물질을 추출하는 가속용매 추출법이 일부 보고되고 있다[17].

따라서 본 연구에서는, 마크로라이드계 항생물질인 SPM, JM, TLM, 그리고 TS의 4종을 동시에 분석할 수 있는 분석법의 문헌고찰을 토대로, 축산물 내에 잔류하는 MLs의 분석법을 개발하였고, CODEX 기준에 의한 분석법 검증을 실시하여 분석법의 신뢰성을 제고함으로써, HPLC-PDA (Photodiode Array)를 이용한 최적의 분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 표준품

닭고기 시료는 분당소재의 대형유통마트에서 구입하였으며, 분석 전까지 냉동보관 하였다. 본 실험에 사용된 마크로라이드계(MLs) 표준품, spiramycin (SPM), josamycin (JM), tilmicosin (TLM), 그리고 tylosin (TS)은 모두 Sigma (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. 아세토니트릴과 헥산(J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA)은 HPLC 용을 사용하였으며, 나머지 시약 등은 특급 시약을 사용하였다.

표준용액 조제

MLs 표준품 4성분을 각각 10 mg을 정밀히 달아 아세토니트릴을 소량 가하여 녹인 후, 100 mL 갈색 용량플라스크에 메탄올로 100 mg/kg의 농도로 조제한 것을 표준원액으로 하여, 4°C에서 냉장보관하였다. 표준용액은 표준원액을 50 mM 인산완충용액(pH 4.5)과 아세토니트릴 혼합액(70:30, v/v)로 50-1000 μg/kg 농도가 되도록 희석하여 사용하였다.

HPLC 조건

본 실험에서 MLs의 분석을 위해 HPLC-PDA (Shiseido) 검출기가 장착된 기기를 사용하였으며, 분석 컬럼은 Imtakt Unison UK-C18 (150 mm × 3 mm id, 3 μm)를, 그리고 주입량은 10 μL로 하였다. 이동상으로는 (A) 0.1% TFA와, (B) 0.1% TFA in ACN을 0.2 μm membrane filter로 여과하고, 초음파 세척기로 탈기하여 사용하였고, 기울기 용리조건 및 PDA검출기의 측정파장은 프로그램화하여 분석하였다.

시료 전처리 과정

완전히 균질화된 닭고기 시료 1 g을 취하고, 아세토니트릴 20 mL을 가한 후, 진탕, 혼합한 다음 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 분액여두로 옮기고, 아세토니트릴을 이용하여 상기 반복하여 상층액을 모았다 (40 mL). 이에 아세토니트릴 포화 헥산 10 mL을 넣고 진탕한 후 층이 분리되면 헥산층을 제거하고 추출된 용액을 완전히 건고시켰다. 50 mM 인산완충용액(pH 4.5)과 아세토니트릴 혼합액(70:30, v/v) 1 mL로 정용하여, membrane filter로 여과한 후, 여과액 10 μL를 HPLC-PDA에 주입, 분석하였다.

분석법의 검증

MLs 50-1000 μg/kg의 농도가 되도록 시료에 각각 첨가하고, 시료 전처리 과정에 따라 추출한 후, HPLC-PDA에 주입하여 얻은 농도별 피크 면적의 비를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 각 검량선의 상관성(coefficient of correlation, r^2)을 구하였다.

그리고, MLs 분석법의 정밀도 및 정확도(coefficient of variation, C.V., %)를 평가하기 위하여, 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내 정밀도와 정확도를 측정하였고, 3일간 동일실험을 반복 수행하여 일간 정밀도를 구하였다.

검출한계(LOD)는 3.3σ/S (y-intercepts of regression analysis (σ), the slope (S) of a calibration curve)으로, 정량한계(LOQ)는 10σ/S의 수식에 의해 산출하였다.

결과 및 고찰

식품 중 MLs의 분석법 개발 및 검증

SPM, JM, TLM과 TS는 상대적으로 강한 UV 흡광도를 갖기 때문에, 본 연구에서 분석하고자 하는 4종의MLs는 UV 검출기를 이용하여 분석하였다. HPLC-UV 분석에서, 적절한 파장을 선택하는 것은 간섭물질에 의한 방해를 받지 않고, 최대 흡수파장을 선택하여 민감도를 높이는 것이 절대적으로 중요하다. SPM, JM은 232 nm, TLM와 TS는 287 nm 에서 최대 흡수 파장을 나타내었다.

컬럼은 Imtakt Unison UK-C18 (150 mm × 3 mm id, 3 μm)을 사용하여 분석조건에 따라 분석한 결과, SPM 6.1, TLM 11.2, TS 12.6, 그리고 JM은 16.1 분의 머무름 시간을 보여 이들 4종의 MLs 를 완전하게 분리 할 수 있었다. 그 결과, 4종의 MLs 분석대상물질과 시료 내 방해물질을 분리시키고, 분석대상물질의 감도를 증대시킨 최적화된 분석 크로마토그램은 Fig. 1과 같다.

분석방법확립에 있어서 분리도를 향상시키기 위한 분석조건 확립도 중요하지만 시료에 따른 추출조건의 확립 또한 매우 중요한 단계이다. MLs 항생물질의 동시분석을 위하여, 대부분 tissue 및 수산물내의 MLs을 유기용매가 포함되는 산성용액으로 추출한 후, Bond Elut SCX나 OASIS HLB 카트리지로 정제하는 고체상 추출법을 사용하였으나[11,15,16,18], 본 실험과 비교하여 SPM 피크주변에 다른 피크가 간섭의 영향을 미치므로, 미량을 정량분석하기에는 문제점이 있는 것으로 나타났다[15]. 또한, 이는 전처리 시간이 길고, 고가의 카트리지를 사용하여야 하는 문제점이 있어, 이러한 단점을 보완하기 위하여 여러 가지 예비실험을 수행한 바, 본 연구에서는 추출과정이 단시간에 쉽게 동시 전처리가 가능함과 함께 시료의 matrix effects를 받지 않으며 재현성이 우수한 액상추출법을 선택고자 하였다. 이는 SPM과 TS 분석의 경우, 간섭 물질의 제거를 방해하는 과도한 에멀젼 형성으로 간이나 신장 시료에 대해서는 적합하지 않으나, muscle 시료에서는 액-액 추출법의 적합함을 보고한 Horie 등[19]의 문헌을 참고하였다. 액-액 추출법은 분석물질에 대한 추출 물질의 용해도가 매우 중요하여 추출 시에는 적합한 용매선택이 이루어져야 하는데, MLs 항생물질의 용해도는 용매의 극성이 증가될수록 증가하였다. 따라서, 본 실험에서는 아세토니트릴 용매로 추출하고, 아세토니트릴 포화 헥산으로 지방을 제거하는 액-액 추출법을 이용하여, CODEX[6,7] 에서 설정한 회수율의 80-110%에 적합한 매우 만족스러운 실험결과를 얻을 수 있었다.

Method validation의 결과

특이성

분석 조건의 특이성을 위해, blank시료에 200 μg/kg의 농도로 닭고기 시료에 첨가하여 본 연구의 시료 전처리법으로 검체를 처리하여 LC-PDA로 분석한 결과, 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서와 같이, MLs 4종이 들어있지 않은 무항생제 닭고기 (바탕시료)과 첨가시료 사이에 어떠한 방해 피크없이 표준용액과 동일한 분리도를 확인할 수 있었다.

검량곡선, 검출한계 및 정량한계

MLs 표준물질을 무항생제 시료로 확인된 닭고기 (바탕시료)에 첨가하여 전처리 과정을 거쳐 얻어진 자료를 토대로 검량곡선을 작성하고, 검량식을 구하였다. 검량곡선은 50~1000 μg/kg 농도범위에서, 대부분의 상관계수 r^2는 0.9975 이상으로 좋은 직선성을 보였으며, CODEX[6,7] 에서 권장하는 $r^2 \geq 0.95$와 비교하여도 매우 만족할 만한 수준의 결과를 얻을 수 있었다(Table 2).

MLs 표준용액을 닭고기 (바탕시료)에 spike시켜 전처리 후, 검출한계(LOD)는 3.3σ/S (y-intercepts of regression analysis (σ), the slope (S) of a calibration curve)의 수식에

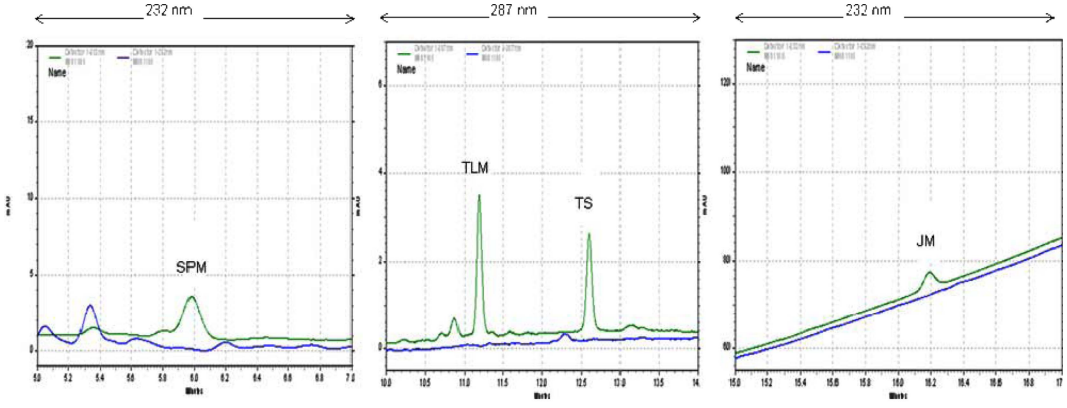

Fig. 1. HPLC chromatograms at 232 and 287 nm of a standard mixture MLs with 200 μg/kg and blank chicken muscle using LC-PDA. Green line: std mixture, blue line: unspiked chicken muscle (blank).

Table 2. Linearity and sensitivity data of the developed method for the determination of MLs in spiked food samples

Analytes	Concentration range (μg/kg)	r^2	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
SPM	50-1000	0.9989	19.6	59.4
JM	50-1000	0.9989	11.5	34.8
TS	50-750	0.9993	14.3	43.2
TLM	50-750	0.9975	8.8	26.6

[1)]Spiramycin (SPM), Josamycin (JM), Tylosin (TS), Tilmicosin (TLM)

Table 3. Intra-day (n = 3) and inter-day (over a period of three consecutive days) precision and accuracy data for the determination of MLs in spiked food samples

Analytes	Added (μg/kg)	Recovery (%)	Intra-day (CV%)	Inter-day (CV%)
SPM	100	87.1 ± 5.7	9.3	13.1
	200	87.1 ± 1.5	3.7	4.9
	500	81.6 ± 9.4	8.0	6.4
JM	100	96.5 ± 2.6	6.6	5.6
	200	95.0 ± 3.4	1.1	2.7
	500	92.7 ± 2.8	1.3	2.4
TLM	50	90.5 ± 3.3	5.2	7.0
	100	97.7 ± 1.8	1.9	2.4
	200	99.1 ± 4.1	0.9	6.0
TS	50	90.9 ± 2.1	13.2	11.1
	100	81.3 ± 0.4	5.5	6.7
	200	80.4 ± 5.4	2.0	8.7

[1)]Spiramycin (SPM), Josamycin (JM), Tylosin (TS), Tilmicosin (TLM)

의해 산출하고, 정량한계(LOQ)는 10σ/S의 수식에 의해 산출하였다. MLs에 대해 LOD는 8.8-19.6 μg/kg이었으며, LOQ는 26.6-59.4 μg/kg을 나타내었다. 이는 LOD가 LC-MS로 분석한 결과(< 10 μg/kg)[16,20)]보다는 높았지만, 우리나라에서 제시한 MRLs보다는 낮은 수치를 나타내므로, MLs을 정량하는 데 적합한 방법으로 사료된다. 그러나, 국제적인 추세에 발맞추기 위해서는 유해성 잔류물질의 최종 확인동정을 위한 잔류분석법의 요건이 강화되고 있으므로, 미량 분석의 확인. 정량을 위해서는 LC-MS/MS로의 분석이 더 요구되는 바이다.

재현성 및 회수율

또한, 닭고기 시료에서 50, 100, 그리고 500 μg/kg 에 해당하는 농도에서, 위의 방법에 따라 전처리 후, 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내(within-day) 정밀도와 정확도를 구하였고, 3일간 실험을 반복 수행하여 일간(day-to-day) 정밀도를 구하였다(Table 3). 본 실험 방법의 정확도와 정밀도는 CV%값이 각각 0.9-13.2%, 2.4-13.1%로 CODEX[6,7)]에서 설정한 정확도와 정밀도의 15%이내에 해당하므로 매우 만족할 결과라고 할 수 있다.

또한, MLs 이 잔류하지 않은 닭고기 시료에 농도가 저, 중, 고농도로 spiking하여 각 시료에 대한 회수율을 검토한 결과, 80.4-99.1%로 양호한 회수율을 보이는 결과로, 이는 CODEX[6,7)] 에서 설정한 회수율의 80-110%에 적합한 매우 만족스러운 실험결과를 얻을 수 있었다.

따라서, 본 방법은 닭고기 중에 MLs 를 분석하기에 효과적인 시료 전처리 및 기기분석법으로 생각된다.

요 약

본 논문에서는 축산물 중 닭고기 내 마크로라이드계(MLs) 항생물질(spiramycin, josamycin, tilmicosin, 그리고 tylosin) 4종을 분석하기 위하여, 액-액 추출 과정을 거쳐서 PDA 검출기가 장착된 액체크로마토그래피를 이용하여 MLs를 효율적으로 동시분석하는 방법을 확립하였다. 컬럼은 Unison UK-C18 (150 mm × 3 mm id, 3 μm), 이동상 용매는 0.1% TFA와 0.1% TFA in ACN로 기울기 용리를 사용하였으며, 유속은 0.7 mL/min, 그리고, 주입량은 10 μL로 설정하여 분석하였다. 확립된 분석조건으로, 표준검정곡선은 50-1000 μg/kg의 농도범위에서 상관계수가 0.9975 이상의 양호한 직선성을 나타내었으며, 회수율은 저, 중, 고농도로 첨가하여 분석한 결과, 80.4-99.1%를 나타내었다. 검출한계는 8.8-19.6 μg/kg이었고, 정량한계는 26.6-59.4 μg/kg이었으며, 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 정밀도(CV%)는 0.9-13.2%, 2.4-13.1%이었다. 따라서, 확립된 분석방법은 축산물 중 닭고기 시료 내 MLs를 효과적으로 분석하는데 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Berrada, H., Borrull, F., Font, G., and Marce, R. M. : Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1208**, 83-89 (2008).
2. McClinchey, T. A., Rafter, P. A., Regan, F., and McMahon, G. P.: A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Anal. Chim. Acta.* **624**, 1-15 (2008).
3. Official Journal of the European Union, (EU) No 37/2010, December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.
4. USDA Foreign Agricultural Service. Veterinary drug MRL database. http://www.mrldatabase.com/default.cfm.
5. Tao, Y., Yu, G., Chen, D., Pan, Y., Liu, Z., Wei, H., Peng, D., Huang, L., Wang, Y., and Yuan, Z.: Determination of 17 macrolide antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent extraction by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* **897**, 64-71 (2012).

6. Codex guidelines for the establishment of a regulatory programme for control of veterinary drug residues in foods (CAC/GL 16) (1993).
7. Validation guidelines, Codex committee on residues of veterinary drugs in foods, 11th session (1998).
8. Le Bizec, B., Pinel, G., and Antignac, J. P.: Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1216**, 8016-8034 (2009).
9. Pol-Hofstad, I., Driessen-Van Lankveld, W., Tomassen, M., De Jong, J., and Van Egmond, H. : Collaborative study of a microbiological screening method (three-plate) for the banned antimicrobial growth promotors tylosin, virginiamycin, spiramycin, zinc bacitracin and avoparcin in animal feed. *Food. Addit. Contam.* **25**, 1465-1474 (2008).
10. Vincent, U., Gizzi, G., von Holst, C., De Jong, J., and Michard, J. : Validation of an analytical method for the determination of spiramycin, virginiamycin and tylosin in feeding-stuffs by thin-layer chromatography and bio-autography. *Food. Addit. Contam.* **24**, 351-359 (2007).
11. Stobba-Wiley, C. M., Chang, J. P., Elsbury, D. T., Moran, J. W., Turner, J. M., Readnour, R. S., Stobba-Wiley, C. M., Chang JP, Elsbury DT, Moran, J. W., Turner, J. M., and Readnour, R. S.: Determination of tilimicosin residues in chicken, cattle, swine, and sheep tissues by liquid chromatography. *J. AOAC. Int.* **83**, 837-846 (2000).
12. Zhang, Y., Jiang, H., Jin, X., Shen, Z., Shen, J., Fu, C., and Guo, J.: Residue depletion of timicosin in chicken tissues. *J. Agric. Food. Chem.* **52**, 2602-2605 (2004).
13. Maher, H. M., Youssef, R. M., Khalil, R. H., and El-Bahr, S. M.: Simultaneous multiresidue determination of metronidazole and spiramycin in fish muscle using high performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. B.* **876**, 175-181 (2008).
14. Wang, J., Leung, D., and Butterworth, F.: Determination of five macrolide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric. Food. Chem*. **53**, 1857-1865 (2005).
15. Leal, C., Codony, R., Compañó, R., Granados, M., and Prat, M. D.: Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **910**, 285-290 (2001).
16. Horie, M., Takegami, H., Toya, Kazuo., and Nakazawa, H.: Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **492**, 187-197 (2003).
17. Abend, A. M., Chung, L., McCollum, D. G., and Wuelfing, W. P.: Development and validation of an automated extraction method (accelerated solvent extraction) and a reverse-phase HPLC analysis method for assay of ivermectin in a meat-based chewable formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **31**, 177-183 (2003).
18. Hwang, L. H., Yun, E. S., Kim, Y. J., Kim, D.E., Yang, Y.M., Lee, J. H., and Lee, B.D.: Study on analytical method of residual macrolide antibiotic in livestock products by LC/MS. *Korean. J. Vet. Serv.* **25**, 221-227 (2002).
19. Horie, M., Saito, K., Hoshino, Y., Nose, N., and Nakazawa, H.: Determination of tylosin in chicken, pork and beef by high-performance liquid chromatography. *EISEI KAGAKU*. **34**, 128-134 (1988).
20. Hwang, Y. H., Lim, J. H., Park, B. K., and Yun, H. I.: Simultaneous determination of various macrolides by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Vet.Sci.* **3**, 103-108 (2002).