J. Fd Hyg. Safety
Vol. 22, No. 4, pp. 370~374 (2007)

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

액체크로마토그래피를 이용한 계란 중 테트라사이클린계 항생물질의 동시분석법 개발

이상희 · 심유신 · 최윤희 · 이범길 · 김현주 · 신동빈*
한국식품연구원 식품분석센터

Multiresidue Determination of Tetracyclines in Eggs using Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection

Sang-hee Lee, Yousin Shim, Yoon-hee Choi, Beom-Gil Lee, Hyunju Kim, and Dong-bin Shin*
Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Bundang, Seongnam, Gyeonggi, Korea
(Received November 13, 2007/Accepted December 21, 2007)

ABSTRACT – An analytical method for the simultaneous determination of four tetracycline (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, doxycycline) in egg samples was developed and validated using liquid chromatography with ultraviolet detection. Egg samples were extracted by the liquid-liquid extraction based on acetonitrile. The chromatographic separation was achieved on a reverse phase C8 column with gradient elution using a mobile phase of 20 mM oxalic acid (pH 1.5)/acetonitrile. The procedure was validated according to the Food Drugs Administration guideline determining accuracy, precision, and limit of detection. Mean recovery of tetracyclines from spiked egg samples (50, 100, 200, 400, and 800 μg/kg) were 78.8-109.3%. Linearity in concentration range of 50-800 μg/kg was obtained with the correlation coefficient (r^2) of 0.994-0.999. The intra- and inter-day precision (relative standard deviation; RSD) was between 0.3-12.8 and 0.2-11.7%, respectively. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for the investigated tetracyclines were 30 and 50 μg/kg depending on egg samples, respectively. This method was reliable, sensitive, economical and suitable for routine monitoring of tetracycline residues in dairy egg.

Key words: Tetracycline, HPLC-UV, egg, method validation

테트라사이클린(TCs)계는 광범위 항생제(broad spectrum)로, 수의분야에서 축산물내의 동물의 질병을 예방하고 가축의 생산성을 향상시키기 위해, 가축용 항생제 중 국내에서 연간 800톤 정도로 가장 많이 사용되고 있다.[1] 가축에서 가장 흔하게 사용되는 테트라사이클린계 항생물질은 옥시테트라사이클린(OTC), 테트라사이클린(TC), 클로르테트라사이클린(CTC)이며, 이들에 대하여 Codex, 미국, 유럽 등 세계각국은 물론 우리나라에서도 식육, 유 및 식용란에서 잔류허용기준(maximum residue limit; MRL)를 설정하고 있는 추세로서, 우유와 근육 100 μg/kg, 간 300 μg/kg, 신장 600 μg/kg, 계란 200 μg/kg별로 다소 차이는 있지만 100-600 μg/kg 수준으로 설정하여 규제하고 있다.[2] 이러한 TCs 계 항생물질을 사료에 섞어, 닭에 급여하게 되면 계란으로 이행되는 것으로 보고되고 있어,[3] 이들 항생제의 과다 사용시 계란 내 잔류가능성이 높으므로, 동물성식품의 안전성에 심각한 문제가 대두되고 있다. 따라서, 이러한 항생제의 오,남용으로 식품의 안전성 문제가 우려됨에 따라, 이에 대한 체계적인 관리를 위해 식품 중 잔류 항생물질을 정확히 분석할 수 있는 분석법확립에 대한 식품 종류에 따른 정밀성, 정확성, 재현성에 대한 정확한 검증이 필요한 실정이다.[4] 따라서, 최근 항생물질에 대한 새로운 분석전처리 기술 및 검출분석기술의 발달로 항생물질 계열별에 따른 다성분 동시분석법의 개발이 활발히 진행되고 있으나,[4] 국내의 경우에는 이에 대한 연구가 매우 미약한 실정이다.[5]

국내외의 현재까지 보고되어 있는, 식품 중 테트라사이클린계 항생물질의 잔류시험법으로는, 스크리닝법으로 미생물분석법, 면역분석법, 박층크로마토그래피법[6-8] 등이 있다. 그러나, 이는 한번의 전처리로 많은 수의 시료를 간편하고 신속하게 검색하는데 이용할 수 있으나, 각 약물들에 대한 특이성과 민감도가 부족하여, 미량의 정량분석에는 어려운 단점이 있다. 한편, 정량법으로는 시

*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

료의 전처리가 비교적 용이하고 재현성이 높으며, 정밀한 분석결과를 얻을 수 있는 HPLC(high performance liquid chromatography)[9-11]를 이용한 분석법이 가장 많이 사용되고 있다. 또한, 시료 전처리법으로는 시료를 C18 분말에 혼합하여 시린지 컬럼에 충진시키고 수산이 함유된 메탄올로 용출하는 시료고체상 분산처리법(matrix solid phase dispersion: MSPD)[9,12]과 EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)나 McIlvaine, oxalate buffer를 포함한 산성 용액 하에서 추출하여 C18 카트리지로 정제하는 고체상추출법[13]과, EDTA-McIlvaine buffer, sodium succinate buffer, citrate buffer 등의 산성 용액하에서 ethyl acetate, actonitrile[11,14] 등의 유기용매로 추출하는 액상추출법이 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는, 국내외에서 보고된 테트라사이클린계 항생물질인 OTC, TC, CTC, DC 4종을 동시에 분석할 수 있는 분석법의 문헌고찰을 토대로, 계란에서의 경제적이고 실용적인 최적의 전처리 방법을 개발하여 HPLC를 이용한 확인, 정량법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

표준품 및 시약

본 실험에 사용된 테트라사이크린계(TCs) 표준품은 oxytetracycline(OTC), tetracycline(TC), chlortetracycline(CTC), 그리고 doxycycline(DC)은 모두 Sigma(St. Louis, MO, USA) 회사제품을 사용하였고, acetonitrile, methanol(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA)은 HPLC용을 사용하였으며, oxalic acid(Junsei Chemicals Co., Tokyo, Japan) 등은 특급 시약을 사용하였다.

표준용액 조제

TCs 표준품을 각각 10 mg을 정밀히 달아 100 ml 용량 플라스크에 취하고 메탄올로 용해시켜 100 mg/kg 농도로 만들어 표준원액으로 하였다. 표준용액은 표준원액을 20 mM oxalic acid(pH 1.5)로 희석하여 50, 100, 200, 400 및 800 μg/kg 농도가 되도록 하여 사용하였다.

HPLC 조건의 최적화

계란 중 TCs계의 분석을 위해 사용된 기기는 Waters HPLC로 486 자외선검출기가 장착된 기기를 사용하였으며, 분석 컬럼은 Zorbax Eclipse XDB-C8(150×4.6 mm id, 5 μm, Waters)를, 그리고 주입량은 10 μL로 하였다. 이동상으로는 (A) 20 mM oxalic acid(pH 1.5)와, (B) acetonitrile을 0.2 μm membrane filter로 여과하고, 초음파 세척기로 탈기하여 사용하였고, 기울기 용리조건(gradient system)을 이용하여 A용매와 B용매를 초기에 85:15에서 5분간 유지시키고, 75:25로 변경하여 2분동안 유지킨 후, 다시 70:30으로 3분간 변경하였고, 컬럼의 재평형을 위해 85:15로 22분까지 흘려주었다(Table 1). 또한, 자외선검출기 흡광파장은 360 nm로 설정하여 분석하였다.

Table 1. Analytical conditions for HPLC determination of TCs

Column	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)
Detector	360 nm
Mobile phase	A: 20 mM oxalic acid (pH1.5), B: acetonitrile
Column temperature	room temperature
Flow rate	1 ml/min
Injection volume	10 μl

시료 전처리 과정

완전히 균질화된 계란 시료 1 g을 25 ml 원심분리용 튜브에 취하고, 1M citrate buffer(pH 4) 1.2 ml을 가한 후, acetonitrile 10 ml을 가하고, 15분간 진탕, 혼합한 후, 10분간 3000 g로 원심분리하였다. 상등액은 다른 튜브에 옮겨 담고, 잔사물에 1.2 ml 증류수에 녹여 acetonitrile 10 ml을 가한 후, 추출과정을 반복하였다. 모아진 상등액은 완전히 건고시키고, 1 ml 메탄올로 정용하여, 시험용액으로 사용하였다.

표준검정곡선의 작성 및 분석법 검증

TCs 표준원액을 이동상 A용매로 희석하여 혼합된 표준용액을 50, 100, 200, 400, 800 μg/kg의 농도가 되도록 시료에 각각 spike하고, 시료 전처리 과정에 따라 추출한 후, HPLC-UV에 주입하여 얻은 농도 별 피크면적으로 회귀곡선을 작성하여 검정곡선을 얻었다.

그리고, 하루에 실험을 5회 반복 시행하여 일내 정밀도와 정확도를 측정하였고, 5일간 동일실험을 반복 수행하여 일간 정밀도를 측정하였다.

결과 및 고찰

계란 중 TCs의 분석법 개발 및 검증

LC-UV분석 – 계란 중 TCs 항생제의 동시분석을 위하여, 식품공전[12]에 고시된 기기조건을 변형하여 새로운 분석조건을 확립하였다. 식품공전[12]에 고시된 조건으로 계란 중의 TCs 항생제를 분석할 경우, 등용리 조건(isocratic system)에서, 15분 내에 4성분 모두 검출되었으나, 머무름 시간이 OTC와 TC의 경우, 상대적으로 2.2분과 3.8분으로 나타나, 이 경우 계란 속에 혼재되어 있는 여러 가지 방해물질로 시료 중의 항생제를 정확하게 분석하는데 많은 어려움이 있는 것으로 확인되었다. 또한 CTC와 DC 의 경우, 머무름 시간이 8.4분과 13.9분이었으나, 이들은 검출감도가 매우 낮아 실질적인 계란 중 항생제의 미량 검출에 적용하기에는 일부 문제점이 있는 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구에서는 식품공전[12]에서 고시된 기기적인 조건 등을 변경하고 기울기 용리조건을 사용한 최적의 분리, 분석조건을 확립하였다. 그 결과, 4종의 TCs 항생물질의 머무름 시간은 OTC 4.4분, TC 5.8분, CTC 11.4분, DC 12.8분으로 14분내에 모두 검출되었으며, 분석대상물질과 시료 내 방해물질을 분리시키고 분석대상물질의 감도를 증대시킨 최적화된 분석 크로마토그램은, Fig. 1과 같다.

전처리 방법에 따른 회수율 시험

기기분석방법과 마찬가지로 계란 중 TCs 항생물질의 동시분석을 위하여, 본 연구에서는 식품공전[12]에 고시된 전처리 시험법과 비교하여 효율적이고 경제적인 전 처리법을 확립하고자 하였다. 위에 제시한, 본 연구에서 확립한 전 처리법의 결과는, 식품공전[12]과 Long[9] 등이 제시한 matrix solid-phase dispersion(MSPD)을 이용하는 시료분산처리법(회수율: 63.5-93.3%)이나 Cooper[14] 등이 이용한 metal chelate affinity chromatography(MCAC) 방법(회수율: 42-101%)과 같은 고체상 추출법을 이용하는 방법보다 현저히 높은 것으로 나타났다. 또한, Sczesny[6] 등이 제시한 액-액 추출법을 이용하는 방법(회수율: 79-109%)과 회수율이 거의 비슷하거나 조금 더 높은 결과로, 이는 Food Drugs Administration guideline[4] 에서 설정한 회수율의 80-120%에 적합한 매우 만족스러운 실험결과를 얻을 수 있었다.

검량곡선 및 상관계수

TCs 표준물질을 항생제 없는 계란(바탕시료)에 첨가하

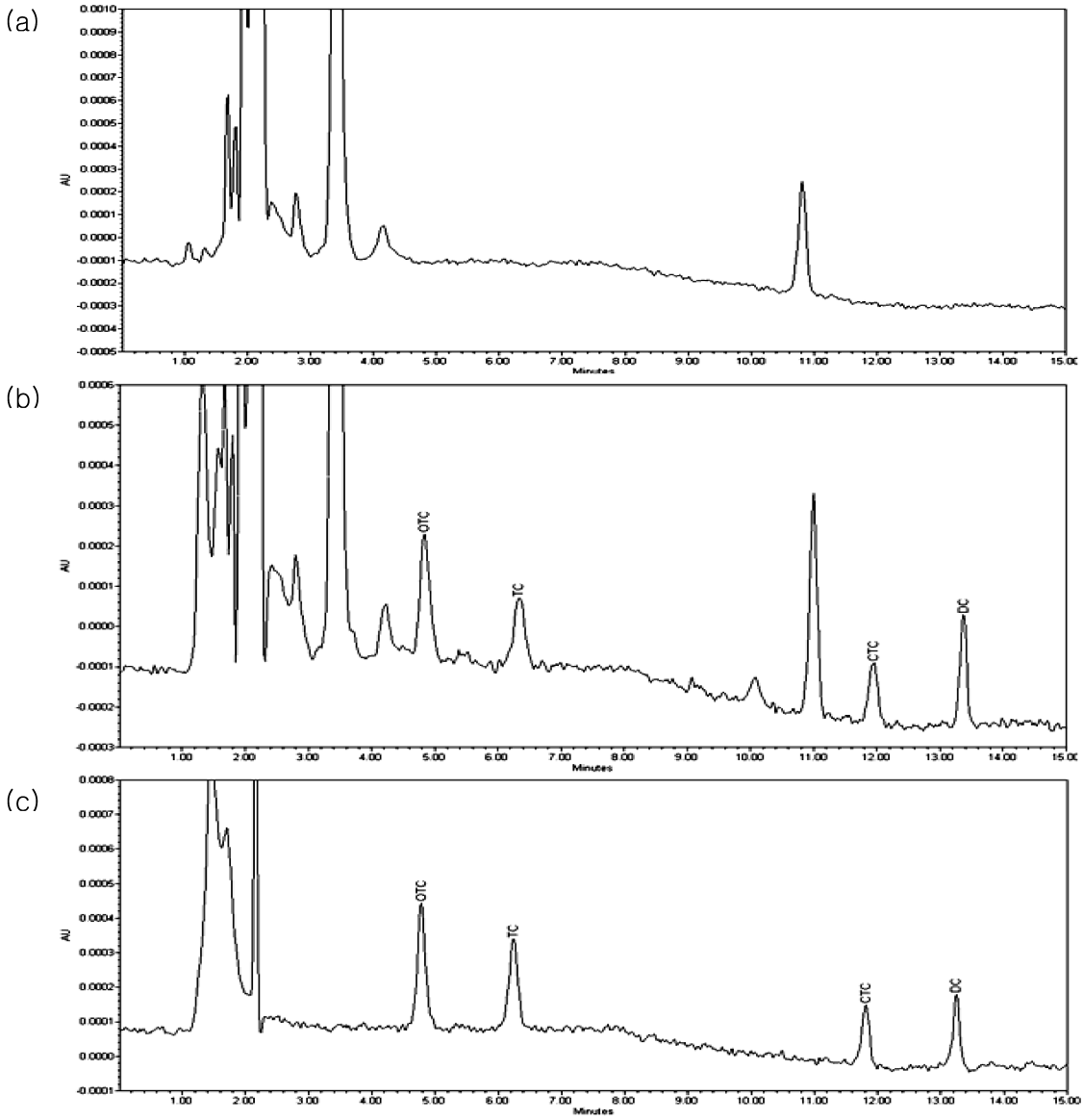

Fig. 1. HPLC chromatograms for (a) blank egg sample, (b) spiked (200 μg/kg of each TCs) egg sample and (c) standard of TCs (200 μg/kg of each TCs).

여 전처리 과정을 거쳐 얻어진 자료를 토대로 검량곡선을 작성하고, 검량식을 구하였다. 검량곡선은 TCs 계란의 잔류허용기준의 MRL/4, MRL/2, MRL, MRL×2, MRL×4에 해당하는 50~800 μg/kg 농도범위에서 정량한계를 포함한 5개 지점의 농도로부터, 회수율은 78.8-109.3%의 결과를 얻었고, 대부분의 상관계수 r^2는 0.994 이상으로 좋은 직선성을 보였으며, Codex에서 권장하는 $r^2 \geq 0.95$와 비교하여도 매우 만족할 만한 수준의 결과를 얻을 수 있었다 (Table 2, 3).

Table 2. Calibration and sensitivity data of the four examined TCs

Analyte	Calibration equation		r^2	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
	a	b			
Standard solutions					
OTC	2.37	-3.68	1.000	9	27
TC	1.55	9.76	1.000	15	45
CTC	0.39	7.59	0.998	16	49
DC	0.31	3.02	0.999	14	43
egg					
OTC	14.21	-128.98	0.999	30	50
TC	8.24	-34.16	0.997	30	50
CTC	5.12	-59.31	0.997	30	50
DC	7.82	-222.83	0.994	30	50

유효성 평가

TCs 표준용액을 바탕시료(계란)에 spike시켜 전처리 후, 표준물질의 농도 40 μg/kg으로 부터 점차 농도를 낮춰가면서 기기로 분석시, 검출한계(limit of detection, LOD)는 신호 대 잡음비가 3인 값으로 정하였다. 또한, 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 구하였고, 이때 LOQ는 상대표준편차가 20% 이하의 값이며, 신호 대 잡음비(signal to noise ratio)가 10인 값으로 정하였다. 대부분의 TCs에 대해 LOD는 30 μg/kg이었으며, 정량을 위한 LOQ는 50 μg/kg을 나타내었다. 이는 다른 문헌에 나타난 LOD 및 LOQ값과 유사한 결과[15]를 나타낸다.

또한, 계란에서 잔류허용기준의 MRL/4, MRL/2, MRL, MRL×2, MRL×4에 해당하는 농도범위에서, 위의 방법에 따라 전처리 후, 하루에 실험을 5회 반복 시행하여 일내(intra-day) 정밀도와 정확도를 구하였고, 5일간 실험을 반복 수행하여 일간(inter-day) 정밀도를 구하였다. 본 실험 방법의 정확도와 정밀도는 RSD값이 각각 0.1-10.9%, 1.1-13.7%으로 Food Drugs Administration guideline[4]에서 설정한 정확도와 정밀도의 15% 이내에 해당하므로 매우 만족할 결과라고 할 수 있다.

따라서, 본 방법은 계란 중에 TCs를 분석하기에 효과적인 시료 전처리 및 기기분석법으로 생각된다.

Table 3. Intra- and Inter-day accuracy and precision, and recovery of the developed method for the determination of four TCs in egg samples

Analyte	Added (μg/kg)	Intra-day(n=5)			Inter-day (n=7)		
		Measured ± SD (μg/kg)	RSD	Recovery (%)	Measured ± SD (μg/kg)	RSD	Recovery (%)
OTC	50	50.5 ± 4.0	8.0	108.1	52.0 ± 4.5	8.6	104.5
	100	99.7 ± 3.4	3.4	99.5	97.9 ± 6.2	6.4	99.4
	200	200.1 ± 2.7	1.3	95.6	198.7 ± 4.0	5.7	97.3
	400	397.2 ± 8.6	2.2	97.1	395.5 ± 8.6	3.7	96.8
	800	802.3 ± 5.5	0.7	98.3	800.3 ± 8.6	1.1	99.7
TC	50	47.4 ± 3.7	7.9	90.0	51.4 ± 6.0	11.7	87.7
	100	97.5 ± 3.7	3.8	82.6	103.1 ± 10.0	9.7	83.7
	200	199.6 ± 11.6	5.9	81.4	198.4 ± 9.7	8.6	83.9
	400	406.7 ± 11.2	4.8	83.0	406.1 ± 9.8	4.4	82.6
	800	790.7 ± 7.2	0.9	78.8	793.9 ± 8.7	2.2	79.6
CTC	50	57.7 ± 0.7	1.2	97.4	56.0 ± 2.3	4.2	99.6
	100	96.7 ± 5.3	5.5	81.0	98.6 ± 5.4	5.5	86.7
	200	198.8 ± 4.3	2.2	82.5	197.2 ± 4.5	2.3	82.9
	400	397.5 ± 3.8	1.0	83.0	396.8 ± 3.8	1.0	83.4
	800	802.7 ± 2.1	0.3	80.3	803.1 ± 1.8	0.2	82.2
DC	50	56.9 ± 7.3	12.8	108.4	57.3 ± 5.3	9.3	109.3
	100	97.0 ± 4.5	4.7	97.1	96.3 ± 4.1	4.3	97.4
	200	195.2 ± 6.8	3.5	101.5	195.1 ± 5.6	2.9	101.7
	400	402.4 ± 4.4	4.8	104.4	401.9 ± 3.7	4.0	104.8
	800	799.2 ± 2.2	1.6	103.9	800.1 ± 1.6	1.2	105.0

요 약

본 논문에서는 테트라사이클린(TCs)계 항생물질 4종(옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린, 독시사이클린)에 대하여, 액-액 추출 과정을 거쳐서 자외선검출기가 장착된 액체크로마토그래피를 이용하여 계란 중에서 TCs를 효율적으로 분석하는 방법을 확립하였다. 컬럼은 Zorbax Eclipse XDB-C8(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 이동상 용매는 20 mM oxalic acid(pH 1.5), acetonitrile로 기울기 용리를 사용하였으며, 검출파장은 360 nm로, 그리고 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 10 ml로 설정하여 분석하였다. 확립된 분석조건으로, TCs 4종에 대한 표준검정곡선은 50-800 μg/kg의 농도범위에서 상관계수가 0.994 이상의 양호한 직선성을 나타내었다. 회수율은 50-800 μg/kg의 농도범위에서 79.6-109.3%로, 향상된 추출효율을 나타내었으며, 검출한계는 30 μg/kg이었고, 정량한계는 50 μg/kg으로서 MRL/4 수준 이하까지는 충분히 검출가능하였다. 또한, 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 정밀도(RSD)는 0.1-10.9%, 1.1-13.7%이었다. 따라서, 확립된 분석방법은 계란 중의 TCs을 효과적으로 분석하는데 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ha, H. I., Hong, K. S., Song, S.W., Jong, S.C., Min, Y.S., Shin, H.C., Lee, G.O., Lim, K.J., and Park, J. M. : Survey of antimicrobial agents used in livestock and fishes. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* **27**, 205-217 (2003)
2. 2002/657/EC, Commission of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun*. **L221**, 8-36 (2002)
3. Kan, C. A., Petz, M. : Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *J Agric Food Chem*. **48**(12), 6397-403 (2000)
4. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, FDA (2001).
5. 제2 차 국가 항생제내성 안전성관리사업 비전보고서, 식약청 (2004)
6. Sczesny, S., Nau, H., and Hamscher, G. : Residue analysis of tetracyclines and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* **51**(3), 697-703 (2003)
7. Kurittu, J., Lönnberg, S., Virta, M., and Karp, M. : Qualitative detection of tetracycline residues in milk with a luminescence-based microbial method: the effect of milk composition and assay performance in relation to an immunoassay and a microbial inhibition assay. *J. Food. Prot.* **63**(7), 953-7 (2000)
8. Choma, I., Grenda, D., Malinowska, I., and Suprynowicz, Z. : Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **734**(1), 7-14 (1999)
9. Long, A. R., Hsieh, L. C., Malbrough, M. S., Short, C. R., and Barker, S. A. : Matrix solid-phase dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**(3), 379-84 (1990)
10. Oka, H., Ito, Y., Ikai, Y., Kagami, T., and Harada, K. : Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr. A.* **812**(1-2), 309-19 (1998)
11. Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T., Ito, Y., and Oka, H. : Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **732**(1), 55-64 (1999)
12. 식품공전, 식품의약품안전청, (2006).
13. Samanidou, V. F., Nikolaidou, K. I., and Papadoyannis, I. N. : Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J. Sep. Sci.* **30**(15), 2430-9 (2007)
14. Cooper, A. D., Stubbings, G. W., Kelly, M., Tarbin, J. A., Farrington, W. H., and Shearer, G. : Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography–high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products. *J. Chromatogr. A.* **812**(1-2), 321-6 (1998)
15. 최동미, 정지윤, 장문익, 임무혁, 박건상, 홍무기. : 식품 중 테트라싸이클린계 항생물질의 분석. *Anal. Sci. & Tech.* **18**(3), 250-256 (2005)