Kor. J. Food Hygiene 8 (1), 9-15 (1993)

식육중의 잔류 항생·항균제의 검정에 관한 연구(II)

-Penicillin G, Chloramphenicol, Thiamphenicol의 Gas Chromatography/Mass Spectrometry 동시 분석-

류재천 · 양종순 · 서자원 · 김명수 · 박종세
한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터

A Study on the Determination of Residual Antibiotics and Synthetic Antibacterial Agents in Meat (II)

-Simultaneous Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Penicillin G, Chloramphenicol and Thiamphenicol-

Jae-Chun Ryu, Jong-Soon Yang, Ja-Won Seo, Myungsoo Kim and Jongsei Park
Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

ABSTRACT-In an attempt to quantitate and qualitate residual antibiotics and antibacterial agents in meat simultaneously, we studied a gas chromatography-mass spectrometry(GC/MS) analysis. For a simultaneous analysis of penicillin G, chloramphenicol and thiamphenicol in meat, a simple and rapid clean-up procedure including extraction with 0.01 M EDTA-2Na McIlvaine buffer (pH 4.0), defatting with n-hexane, and elution with 0.01M-methanolic oxalic acid from Bond Elute C_{18} cartridge, and quantitation by selected ion monitoring (SIM) mode after derivatization was performed.

The recoveries (%) of penicillin G, chloramphenicol and thiamphenicol (CV, %) at 1 ppm fortification level were 63.5 (7.6), 76.3 (8.1) and 84.7 (2.0), and the detection limits of those were 0.6, 0.085 and 0.084 μg/g beef, respectively.

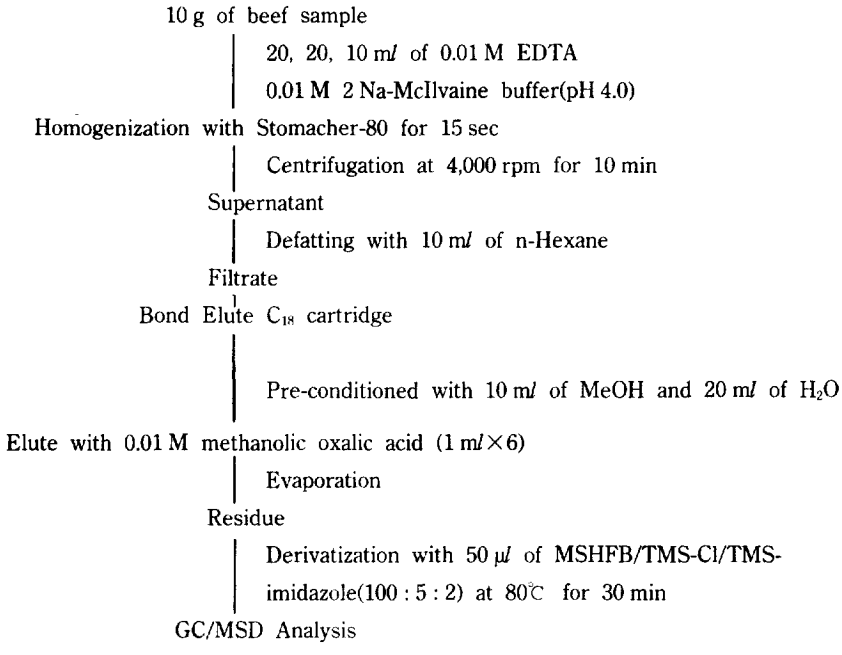
This method using SIM mode allows excellent detection and quantitation of residual antibiotics and antibacterial agents in meat. Moreover, confirmation by a full scan electron impact mass spectrum is possible if residual level in the sample in above 1 ppm.

Keywords □ Penicillin G, Chloramphenicol, Thiamphenicol, Gas chromatography/Mass spectrometry, Simultaneous analysis

양축 농가 및 양어장 등에서의 항생제 및 합성 항균제의 오남용은 이미 전보[17]에서도 밝힌 바와 같이 국민건강의 유지라는 측면에서 큰 사회적 문제라 아니할 수 없다. 여러 항생·항균제 중에서 penicillin G, thiamphenicol, chloramphenicol 등의 항생·항균제 역시 양축 농가나 양어장 등에서 가축류와 어류의 질병치료 목적으로 사용되어 이들 항생제들의 식육 중의 잔류량을 검출하기 위해 많은 방법들이 연구 개발되고 있다. 검출방법으로는 전보에서 설명한 바와 같이 미생물을 이용한 검정방법이 널리 사용되며, 높은 sensitivity를 나타낸다. 그러나, 이 미생물학적 방법은 specificity가 좋지 않아, 규제목적을 위한 방법으로는 방법상의 한계가 있다고 할 수 있다. 따라서, 더욱 감수성과 선택성이 크며 정확한 분석방법이 동물의 조직속에 잔류하는 인체유해물질을 검색하는데 요구되어지게 되었다.

Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS) 방법은 지금까지 사용된 microbiological assay 방법에 비하여, 잔류항생물질의 정성과 정량을 위해 더욱 sensitive하며 specific한 정밀분석방법이라 할

Received for publication 20 December, 1992
Reprint request: J.-C. Ryu, Ph.D. at the above address



Scheme 1. Extraction and clean-up procedure of penicillin G, chloramphenicol and thiamphenicol in beef.

수 있다. 그러나, penicillin,[1-5] chloramphenicol[6-11] 그리고 thiamphenicol 각각에 대한 분석방법은 많이 보고되어 있으나, GC/MSD를 이용한 동시분석 방법은 그들 개개의 화학구조 차이로 인한 물리적인 특성차이로 인해 거의 보고되어 있지 않았다.

이에 본 연구에서는 육류속에 잔류하는 penicillin G, chloramphenicol 그리고 thiamphenicol을 동시에 분석, 정량하는 Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS) 방법을 확립하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약

Penicillin계의 penicillin G, chloramphenicol계의 chloramphenicol과 thiamphenicol, 내부 표준물질인 cholesteryl isobutyrate는 Sigma Co.(U.S.A.)에서 모두 구입하였다. 추출에 사용된 시약은 모두 분석용 특급 시약이었으며, methanol은 증류한 후 사용하였다. Reversed phase column인 Bond Elut C_{18} Cartridge는 Varian Co.(U.S.A.)로부터 구입하였다. 유도체화 반응에 사용한 MSHFB(N-methyl N-trimethylsilylheptafluorobutyramide)는 Macherey Nagel Co.(Germany)에서 구입하였고, TMS-Cl(Trimethylchlorosilane)과 TMS-imidazole(Trimethylsilylimidazole)은 Sigma Co.(St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다.

추출 및 유도체화

Scheme 1에서와 같이 beef sample 10 g에 0.01 M 2 Na-EDTA-McIlvaine buffer(pH 4.0) 20 ml, 20 ml, 10 ml씩을 가지고 각각 Stomacher-80에 의해 15초 동안 homogenize한 다음, 3,000~4,000 rpm에서 10~15분 동안 원심분리한다. 상등액을 취한 후, hexane 10 ml을 첨가시켜 homogenize한 후 원심분리하여 지방 등을 제거한 후 여과하였다. 이것을 미리 MeOH 10 ml과 H_2O 20 ml로 condition해 놓은 Bond Elute C_{18}에 loading시킨 다음 0.01 M methanolic oxalic acid로 1 ml씩 6번 용출시킨 후, 용출액을 evaporate한 다음, 유도체화시켜 분석되어질 때까지 P_2O_5/KOH가 들어있는 vacuum dessicator에서 보관하였다. 완전히 건조시킨 잔사에 MSHFB/TMS-Cl/TMS-imidazole(100 : 5 : 2, v : v : v) 혼합용액 50 μl를 넣고 80℃ heating block(Gebr.

Table 1. Instrumental analysis of residual antibiotics and antibacterial agents in beef

A. Analytical Instruments

- HP 5890A Gas Chromatograph(GC)
- HP 5970B Mass Selective Detector(MSD)
- HP 59970C MS Chemstation
- HP 7673A Auto liquid Sampler

B. Chromatographic Condition

- Column: Fused silica capillary, cross-linked 5% phenylmethylsilicone(SE-54) (15 m/(L)×0.2 mm(I.D.)×0.33 μm(F.T.))
- Injection temperature: 280℃
- Transfer line temperature: 300℃
- Ion source temperature: 200℃
- Injection mode: splitless
- Carrier gas: Helium(0.91 ml/min)
- Electron Energy: 70 eV

Table 2. Oven temperature program for simultaneous GC/MSD analysis

Initial Temperature (℃)	Initial Time (min)	Rate (℃/min)	Final Temperature (℃)	Final Time (min)
200	0	20	300	10

Liebisch. Bielefeld-14, FRG)에서 30분간 가열시켰다. 추출과정 및 유도체화 과정을 Scheme 1에 요약하여 나타내었다.

분석기기 및 장치

Chromatographic parameters－본 실험에 사용한 분석기기 및 조건은 Table 1에 나타내었다. Table 1에서와 같이 모든 mass spectrum은 Hewlett Packard사의 GC/MSD(5890/5970B)를 사용하였으며, GC 분리관으로는 cross link된 5% phenylmethylsilicone capillary column(15 m×0.2 mm I.D., 0.33 μm film thickness)을 사용하였다.

주입기 및 transfer line의 온도는 280℃와 300℃였으며 주입방법은 splitless mode였다. 서로 다른 계열의 화합물들로 인한 물리적 성질의 차이를 극복하기 위한 GC oven temperature programs은 Table 2에 제시한 것과 같이 초기온도를 200℃로 하여 분당 20℃씩 상승시켜 300℃에 도달 후 10분간 유지토록 하였다.

Selected Ion Monitoring(SIM)－Data Acquisition은 SIM mode로 하였고 특징적인 ion들로서 penicillin G는 m/z 232, chloramphenicol은 m/z 225, thiamphenicol은 m/z 257 및 내부표준 물질로 사용한 cholesteryl isobutyrate는 m/z 368 ion들을 선택하여 사용하였다. 분리하고자 한 항생제 및 항균제들의 분자량, retention time 및 특징 ion들은 Table 3에 나타내었다.

검량곡선의 작성

Beef 10 g에 penicillin G, chloramphenicol, thiamphenicol을 표준품의 농도가 각각 0.25에서 2.5 ppm이 되도록 첨가시켰으며, 내부표준 물질인 cholesteryl isobutyrate은 0.5 ppm을 첨가시켰다. 각각의 beef 시료는 위에서 설명한 추출방법으로서 추출한 후 유도체와 반응을 거쳐 GC/MSD에서 각 화합물의 특징적인 ion의 면적을 내부표준물질인 cholesteryl isobutyrate의 m/z 368 ion의 면적비로 나눈 비율을 구하여 검량곡선을 만들었다. Fig. 1은 penicillin G, thiamphenicol, chloramphenicol을 spike한 후의 검량곡선으로서 상관계수(γ값)가 thiamphenicol은 0.995, chloramphenicol은 0.992, penicillin G는 0.988로서 모든 검량곡선이 0.98이상을 보이는 높은 직선성을 보여줌을 알 수 있었다.

결과 및 고찰

항생제 및 항균제들이 현대의학에 공헌한 바는 매우 크다고 할 수 있다. 이와같은 인간의 질병치료, 예방 등의 목적과 더불어 동·식물의 치료 및 예방에도 매우 큰 역할을 담당하여 왔다. 그러나 축산 및 어류 양식업에서의 이런 항생제, 항균제의 남용은 심각한 문제를 야기하기에 이르렀다. 예를 들면 생체내에서 잔류하는 이런 성분들이 인간에로의 이행을 통한 문제점과 환경공해 등이다.

예를 들면 chloramphenicol의 경우, 이 약제의 bone marrow stem cell에 대한 독성[10]으로 인하여, 미루어 파생될 수 있는 식육에 잔류로 인한 인간에의

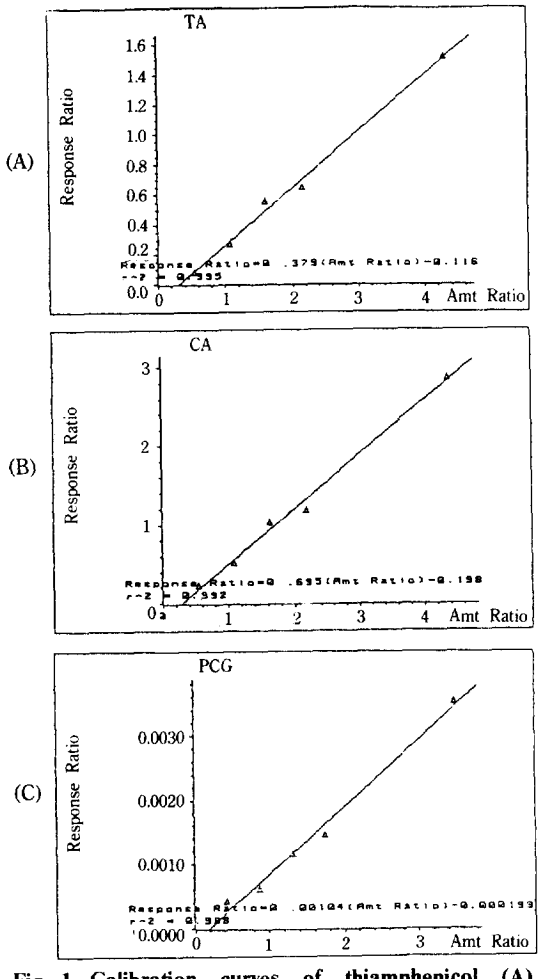


Fig. 1. Calibration curves of thiamphenicol (A), chloramphenicol (B) and penicillin G (C) in beef.

이행으로 야기될 수 있는 독성 등을 간과할 수 없게 되었고, FAO/WHO Expert Committee on Antibiotics에서는 이런 문제점으로 인하여, chloramphenicol은 식육제품에서의 zero tolerance level을 추천하고 있다. 그러므로 이와같은 항생제, 항균제 등의 미량잔류로 인한 인간에의 독성과 다량 사용으로 인한 환경공해 등을 monitoring해야 할 필요성이 대두되었고, 더불어 정밀한 분석법이 요구되어지게 되었다.

이와 같은 요구에 부응하여 생물학적 검정법[14-17]은 널리 사용되고 있으나 specificity나 precision 등에서의 단점을 극복하는데는 한계가 있는 것 같다. 그러므로 보다 정확한 분석과 정량을 위해서는 기

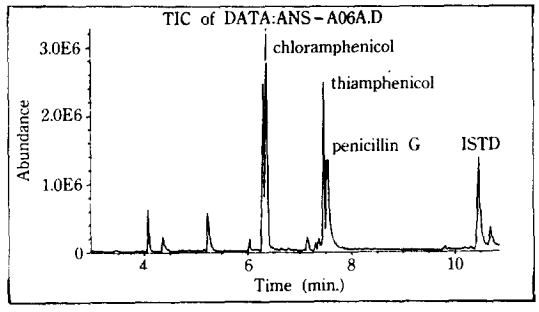


Fig. 2. Total ion chromatogram of penicillin G, chloramphenicol and thiamphenicol in GC/MSD.

기분석학적 방법이 필요하게 되었다. 그러나 penicillin,[1-5] chloramphenicol[6-11]에 관한, 개개물질들의 GC 및 LC 분석법은 다수 보고되어 있으나, 광범위한 review[12,13]에도 불구하고 다른 계통의 항생제들과의 동시분석법은 거의 전무한 실정이었다.

본 연구에서는 이와 같은 개개 기기분석법의 단점을 보완하고 다수의 항균제에 대한 동시분석법을 개발하기 위한 연구를 수행하여 우선 penicillin G와 chloramphenicol, thiamphenicol의 동시분석법을 GC/MSD를 사용하여 개발하였고, 류 등[14]은 이미 이 방법을 국내의 보건사회부 산하요원[15] 및 농림수산부 산하요원[16]들의 교육훈련에도 적용한 바 있다.

Fig. 2의 total ion chromatogram에서 볼 수 있듯이 각 물질의 retention time은 chloramphenicol은 6.36분, thiamphenicol은 7.46분, penicillin G는 7.53분과 내부표준물질인 cholesteryl isobutyrate는 10.47분으로써 이들의 정확한 retention time은 Table 3에 정리하여 나타내었다. 또 각각 물질들의 검량선 또한 상관계수가 0.98 이상으로 좋은 직선성을 보임을 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 정량을 하기 위해 좋은 결과가 얻어졌다고 사료된다.

회수율을 측정하기 위해 beef에 2.5 ppm을 spike한 후 실험해 본 결과(Table 4), Penicillin G는 63.50%, chloramphenicol은 76.31%, thiamphenicol은 84.71%의 좋은 회수율을 얻을 수 있었다. 또한 이들의 검출한계치는 Table 5에 나타내었고 이 표에서 알 수 있듯이 penicilin G가 0.6 μg/g, chloramphenicol은 0.085 μg/g, thiamphenicol은 0.084 μg/g의 좋은 검출한계치를 나타내었다.

Table 3. Characteristic ions of antibiotics in GC/MSD analysis

Antibiotics	M.W.	Retention time	Characteristic ions
Penicillin G	334.38	7.533	232, 172, 298, 406
Chloramphenicol	323.14	6.364	225, 208, 361, 451
Thiamphenicol	356.14	7.468	242, 257, 330, 394
Cholesteryl isobutyrate	456.8	10.470	368, 353, 147, 247

Table 4. Recoveries of antibiotics from beef spiked at 2.5 ppm concentration

Antibiotics	Beef	
	Recovery (%)*	C.V.(%)
Penicillin G	63.50	7.61
Chloramphenicol	76.31	8.14
Thiamphenicol	84.71	1.99

Table 5. The limits of detection of antibiotics from beef

Antibiotics	Limit of detection (μg/g)
Penicillin G	0.6
Chloramphenicol	0.085
Thiamphenicol	0.084

*The recovery data are based on three samples.

이와 같이 recovery(Table 4)에서는 chloramphenicol과 thiamphenicol은 76~84%, penicillin G는 63%로서 비교적 좋은 회수율을 보여주나 1차 screening법으로서의 활용성을 고려하여 이들 물질에 대한 Bio-Assay법에서는 높은 sensitivity로서 거의 검정이 가능하므로, 이 GC/MSD 방법에서는 이들 물질의 확인에 큰 비중을 두어 서로 상호 보완적으로, 특히 Bio-Assay에서 매우 높은 sensitivity을 보이는 penicillin G 등의 검출은 Bio-Assay에서 검정하고 이 기기분석에서는 확인 및 정량쪽으로 의미를 두면 매우 큰 도움이 되리라 사료된다. 검출한계에서는 Table 5에서 볼 수 있듯이 chloramphenicol, thiamphenicol은 거의 84 ppb에 이르는 좋은 검출한계를 보였고, penicillin G은 조금 낮은 검출한계를 보이나 위에서 설명한 바와 같이 Bio-Assay와의 상호보완적인 cross-checking을 하여 확인 및 정량을 위해서는 기기분석에 의미를 더 부여하는 것이 바람직하다고 사료된다.

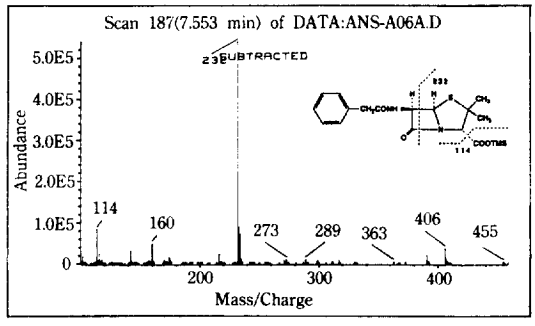


Fig. 3. Scan mass spectrum of penicillin G in beef.

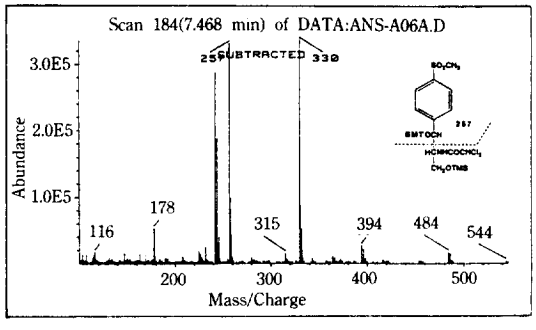


Fig. 4. Scan mass spectrum of chloramphenicol in beef.

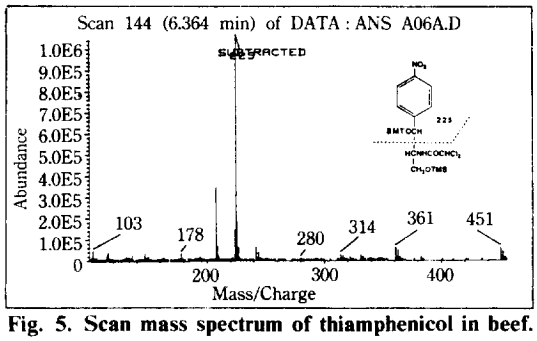


Fig. 5. Scan mass spectrum of thiamphenicol in beef.

한편 Fig. 3에서는 penicillin G를, Fig. 4에서는 chloramphenicol을, Fig. 5에서는 thiamphenicol의

(A) Thiamphenicol (B) Chloramphenicol (C) Pencillin G

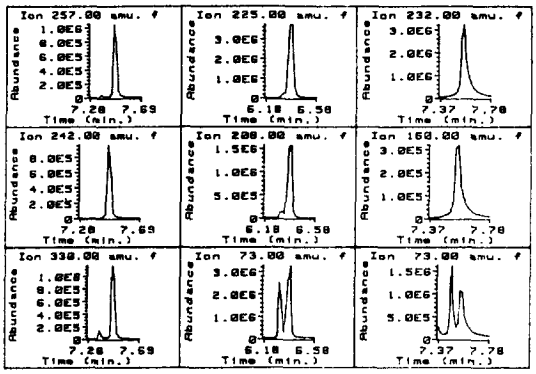


Fig. 6. Macro program profile of thiamphenicol (A), chloramphenicol (B) and penicillin G (C) in GC/MSD.

O-trimethylsilyl(O-TMS) 유도체의 scan mass spectrum과 fragmentation pattern을 나타내었다. Fig. 3의 spectrum에서는 penicillin G의 특징적인 이온 232의 경우 penicillin계의 공통구조인 β-lactam cleavage에 따른 pattern이며, Fig. 4, 5의 spectrum에서는 특징적인 이온으로서 225와 257과 같은 fragmentation pattern을 나타낸다.

Fig. 6은 실제적인 응용을 위한 Macro program으로서, 특징적인 ion들을 잘 선택하여 즉 selected ion monitoring mode를 사용한 Macro program을 이용하여 다른 방해의 peak을 받지 않게 각 ion의 retention time의 window를 정하여 사용함으로써 GC/MSD에서의 분석 및 정량이 가능하도록 활용할 수 있음을 보여주었고, total ion chromatogram에서도 알 수 있듯이 각 물질들이 서로 다른 retention time을 보여, 이 방법을 이용하여, 항생·항균제들을 분리, 정량, 확인할 수 있다고 사료되며, 이 program을 이용하여 검역소 등에서 실용적으로 사용될 수 있으리라 사료된다.

이와같은 확인 및 정량조작의 가능은 식품중에 잔류하는 극미량 인체 유해물질들의 검출을 가능케 할 뿐 아니라 무역마찰시 파생되는 과학적 근거제시를 가능케하며, 극미량의 검출로 인한 기초과학 분야에의 응용, 더 나아가 무역마찰 해소, 국민건강 보호 및 복지향상에 이바지할 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건사회부 및 농림수산부의 위탁연구비에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

국문요약

어패류를 포함한 식용육류중에 잔류하는 항생물질 및 항균성물질을 검출하기 위하여, 분석기기로서 Gas chromatography/Mass spectrometry(GC/MS)를 사용한 동시분석법을 개발하였다. 여러 항생·항균제중에서 penicillin G, chloramphenicol, thiamphenicol을 중심으로 간단한 전처리과정과 유도체화를 하여 GC/MS 분석을 시행하였다.

전처리과정을 요약하면 pH 4.0의 0.01 M EDTA-2 Na McIlvaine buffer로의 추출, n-hexane으로의 탈지, Bond-Elute C_{18} cartridge에 흡착된 물질의 0.01 M-methanolic oxalic acid로의 용출 그리고 건조 후 유도체화의 순으로 되어 있다.

본 방법에 의한 1 ppm spike시의 회수율은 penicillin G, chloramphenicol, thiamphenicol 각각 63.5%, 76.3%, 84.7%이었고, 검출한계는 각각 시료 g당 0.6, 0.085, 0.084 μg이었다. 또한 GC/MS 확인과정에서 실제 잔류농도가 1 ppm 이상이면 full scan spectrum으로 확인이 가능하였다.

이와 같은 GC/MS에 의한 잔류물질의 정량 및 확인시험은 앞의 미생물학적 방법의 보완은 물론 식품의 안전성 재고 및 규제독성의 측면에서도 매우 뜻있는 연구라 하겠다.

참고문헌

1. Martin, J., Mendez, R. & Negro, A.: Effect of temperature on HPLC separations of penicillins, *J. Liquid Chromatogr.*, **11**, 1707-1716 (1988).

2. Suwanrumpha, S., Flory, D.A., Freas, R.B. and Vestal, M.L.: Tandem mass spectrometric studies of the fragmentation of penicillins and their metabolites, *Biomed. Environ. Mass Spectro.*, **16**, 381-386 (1988).

3. Tyczkowska, K., Hedeen, K.M., Aucoin, D.P. and Aronson, A.L.: Simple LC method for determination of chloramphenicol in equine, canine, and feline serum, *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 533-536 (1988).
4. Gower, J.L.: Fast atom bombardment mass spectrometry of β-Lactam antibiotics, *International J. Mass Spectro. & Ion Phys.*, **46**, 431-434 (1983).
5. Haginaka, J., Wakai, J., Nishimura, Y. & Yasuda, H.: Liquid chromatographic determination of penicillins by postcolumn degradation with sodium hypochlorite using a hollow-fibre membrane reactor, *J. Chromatogr.*, **447**, 365-372 (1988).
6. Aerts, N.M.L., Beek, W.M.J. & Brinkman, U.A.T.: Monitoring of veterinary drug residues by a combination of continuous flow techniques and column-switching high-performance liquid chromatography, I. sulphonamides in egg, meat and milk using post-column derivatization with dimethylaminobenzaldehyde, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **435**, 97-112 (1988).
7. Haagsma, N., Schreuder, C. & Rensen, E.R.A.: Rapid sample preparation method for the determination of chloramphenicol in swine muscle by high performance liquid chromatography, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **363**, 353-359 (1986).
8. Allen, E.H.: Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues from food-producing animals, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 990-999 (1985).
9. Bories, G.S.F., Peleran, J. & Wal, J.: Drug residues in Animal Tissues; Liquid chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 1521-1526 (1983).
10. Nelson, J.R., Copeland, K.F.T., Forster, R.J., Campbell, D.J. & Black, W.D.: Sensitive gas-liquid chromatographic method for chloramphenicol in animal tissues using electron-capture detection, *J. Chromatogr.*, **276**, 438-444 (1983).
11. Pickering, L.K., Hoecker, J.L., Kramer, W.G., Liehr, J.G. & Caprioli, R.M.: Assays for chloramphenicol compared: Radioenzymatic, gas chromatographic with electron capture, and gas chromatographic mass spectrometric, *Clin Chem.*, **25**, 300-305 (1979).
12. Tsuji, K.: Antimicrobial agents, antimycotics, and antiparasitics in *GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents, Part 2*, K. Tsuji, (Ed), Marcel Dekker, Inc., New York and Bassel, pp. 739-806 (1980).
13. Borders, D.B. *& Hargreaves, R.T.: Antibiotics in *Biomedical Applications of Mass Spectrometry*, G.R. Waller & O.C. Dermer (Eds), John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, pp. 567-609 (1980).
14. 류재천, 서자원, 송윤선, 박종세: Detection and Quantitation of Residual Antibiotics and Antibacterial Agents in Foods, *Kor. J. Food Hygiene*, **5**(3), 159-164 (1990).
15. 식품중에 인체 유해물질 검정교육 훈련과 분석방법 개발에 관한 연구보고서, 제3부: 식품중 인체 유해물질의 분석방법, 한국과학기술연구원, p. 85-142 (1991).
16. 축산식품내 유해잔류물질 검사교육과 분석방법 개발에 관한 연구, 한국과학기술연구원, p. 457-531 (1992).
17. 류재천, 송윤선, 박종세, 장준식, 神保勝彦: 식육중의 잔류 항생·항균제의 검정에 관한 연구(I), 생물학적 검정법, *Kor. J. Food Hyg.*, submitted.