Kor. J. Food Hygiene 8 (1), 17-23 (1993)

식육중의 잔류 항생·항균제의 검정에 관한 연구(III)
Macrolide계 항생물질인 Erythromycin과 Tylosin의 Gas Chromatography/Mass Spectrometry 동시분석

류재천 · 송윤선 · 양종순 · 서자원 · 김명수 · 박종세
한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터

A Study on the Determination of Residual Antibiotics and Synthetic Antibacterial Agents in Meat(III)
Simultaneous Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Erythromycin and Tylosin

Jae-Chun Ryu, Yun-Seon Song, 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 macrolide antibiotics such as erythromycin and tylosin in meat, the homogenization with MeOH, defatting with n-hexane, extraction with $CHCl_3$, elution with $CHCl_3$: MeOH = 2 : 1 from Sep-Pak silica cartridge, acid hydrolysis, back extraction with $CHCl_3$, and quantitation by selected ion monitoring (SIM) mode after trimethylsilyl derivatization were performed. The recoveries of erythromycin and tylosin (CV, %) at 10 ppm fortification level were 90.59 (4.89) and 45.91 (0.20), and the detection limits of those were 0.02 and 2.0 μg/g beef, respectively.**

From these results, the developed analytical method using GC/MS-SIM mode allows excellent detection and quantitation of residual macrolide antibiotics in meats, using complementary method with bio-assay.

Keywords □ **Erythromycin, Tylosin, Gas chromatography/Mass spectrometry, Macrolide, Simultaneous Analysis**

양축 농가 및 양어장 등에서의 항생제 및 합성 항균제의 오남용은 이미 전보[1,2]에서도 밝힌 바와 같이 국민건강의 유지라는 측면에서 큰 사회적 문제라 아니할 수 없다. 여러 항생·항균제 중에서 macrolide계의 항생제 등도 가축류와 어류의 질병 치료 목적으로 사용되어 이들 항생제들의 식육 중의 잔류량을 검출하기 위해 많은 방법들이 연구 개발되고 있다. 검출방법으로는 전보[1]에서 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 분석 방법이 동물의 조직속에 잔류하는 인체유해물질을 검색하는데 요구되어지게 되었다. 기기분석학적 방법은 여러면에서의 잇점을 갖고 있으나 항생물질의 구조적인 다양성으로 인한 물리, 화학적 차이로 인하여 동시분석에는 상당한 어려움이 뒤따르고 있다. 이러한 점들을 감안하여, 분자가 큰 거대분자로 되어 있어 기기분석상의 어려움이 많았던 macrolide계

Received for publication 19 May, 1993
Reprint request: J.-C. Ryu, Ph.D. at the above address

항생제 중에서 erythromycin과 tylosin을 동시에 확인하는 방법을 연구하였다.

Gas chromatography/Mass spectrometry(GC/MS) 방법은 지금까지 사용된 microbiological assay 방법에 비하여, 잔류항생물질의 정성과 정량을 위해 더욱 sensitive하며 specific한 정밀분석방법이라 할 수 있다. 그러나 macrolide계 항생제인 erythromycin,[3-12] oleandomycin,[13] spiramycin,[13,14] tylosin,[13,15-18] 등에 관한 분석방법은 액체 또는 기체 크로마토그라피법으로 많이 보고되어 있으나, GC/MSD를 이용한 동시분석방법은 그들 개개의 화학구조차이로 인한 물리적인 특성차이로 인해 거의 보고되어 있지 않았다.

그러나, 일본의 Takatsuki 등[13]은 최근 single ion monitoring mode를 이용해 beef와 pork 중에서 oleandomycin, kitasamycin, spiramycin, tylosin 등의 macrolide계 항생제의 gas chromatography-mass spectrometry 분석방법을 연구하여 acid hydrolysis와 acetylation, hydrogenation을 시켜 GC/MS에서 동시에 분석하는 방법을 보고하였다.

당 연구실에서도 이와같은 Takatsuki 등의 acid hydrolysis에 의한, macrolide의 거대분자를 transformation 시키는 방법을 수용하고, 더욱 더 sensitivity를 높일 목적으로 acetylation과 hydrogenation에 의한 단점을 보완하고, 불편을 덜 목적으로 유도체화 과정을 연구하여 trimethylsilyl 유도체화시켜 macrolide계 항생제인 erythromycin과 tylosin의 GC/MS에서의 동시분석방법을 연구, 정립하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약

Macrolide계 항생제인 erythromycin, tylosin과 내부 표준물질인 cholesteryl isobutyrate는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo. USA)에서 모두 구입하였다. 추출에 사용된 시약은 모두 분석용 특급 시약이었으며, methanol은 증류한 후 사용하였다. Sep-Pak silica gel column은 Waters Co.(USA)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 Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다.

Macrolide의 추출과정

Erythromycin : Scheme 1에 나타낸 바와 같이 육류 sample 10 g에 20 ml methanol을 첨가하여 Stomacher 80에서 15초간 homogenize한 다음, 2,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한다. 상등액을 여과한 후 *n*-hexane 20 ml를 첨가시켜 잘 흔들어 defatting 시킨 후, 상온에서 정치하여 두 층으로 나눈 후, methanol층을 취한다. 1 N-NaOH 2 ml와 30 ml $CHCl_3$을 위에서 취한 methanol층에 넣고 약간 흔들어준 다음, 1% Na_2HPO_4 30 ml를 넣고 약 5분간 잘 흔들어 준다. $CHCl_3$ 30 ml에 의해 condition 되어진 Sep-Pak Silica gel column에 위의 $CHCl_3$에 녹인 것을 loading한 후 $CHCl_3$: MeOH(2 : 1)의 용출제로 10 ml씩, 3번 용출시킨다. 이것을 증발건조한 후 0.3 N-HCl 15 ml를 첨가시켜 50℃에서 1시간 동안 산가수분해 시킨다. 그후 냉각시키고 5 N-NaOH(1.2~1.3 ml)을 가하여 alkali성으로 만들고 20 ml $CHCl_3$으로 추출한 후 $CHCl_3$층을 모아 증발건조시켜 vacuum dessicator에서 완전히 건조시킨다.

Tylosin : Tylosin의 추출과정은 erythromycin과 동일하며 단지 산가수분해시킬 때 0.3 M HBr 15 ml를 첨가시켜 50℃에서 30분 동안 reflux시킨다. 마찬가지로 대략적인 clean-up 및 extraction 방법을 Scheme 1에 나타내었다.

유도체화 반응

완전히 건조시킨 잔사에 MSHFB/TMS-Cl/TMS-imidazole(100 : 5 : 2, v : v : v) 혼합용액 50 μl를 넣고 80℃에서 30분간 가열시킨다. 추출과정 및 유도체화 과정을 Scheme 1에 나타내었다.

분석기기 및 장치

Chromatographic parameters : 본 실험에 사용한 분석기기 및 조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1에서와 같이 모든 mass spectrum은 Hewlett Packard GC/MSD(5890/5970B)를 사용하여 얻었으며, GC 분리관으로는 cross link된 5% phenylmethylsilicone capillary column을 사용하였다. 주

Scheme 1. Extraction and clean-up procedure of macrolides in beef.

10 g of beef sample
↓ homogenization with 20 ml of MeOH
centrifugation at 2,000 rpm for 10 min.
Supernatant
↓ defatting with 20 ml of n-hexane
MeOH layer
↓ Add 2 ml of 1N-NaOH, 30 ml of $CHCl_3$
and 1% Na_2HPO_4 solution, and shake vigorously
$CHCl_3$ layer
↓ evaporate and dissolve in 5 ml of $CHCl_3$
Sep-Pak silica cartridge preconditioned with $CHCl_3$ 30 ml
↓
Elute with 30 ml of $CHCl_3$: MeOH = 2 : 1
↓ Evaporate at 40~45℃
Acid Hydrolysis
↓ (1) 15 ml of 0.3N-HCl, heating at 50℃ for 1 hr
(2) 15 ml of 0.3M-HBr refluxing, heating at 50℃ for 30 min.
Extraction with 20 ml of $CHCl_3$
↓ Add 1.3 ml of 5N-NaOH
$CHCl_3$ layer
↓ Evaporate at 40~45℃
Residue
↓ derivatization with 50 μl of MSHFB/TMS-Cl/
TMS-imidazole (100 : 5 : 2) at 80℃ for 30 min.
GC/MSD Analysis

입기 및 transfer line 온도는 280℃ 와 300℃ 였으며 주입방법은 splitless mode였다. GC oven temperature programs은 Table 2에 제시한 것과 같이 초기온도를 200℃ 로 하여 분당 10℃ 씩 상승시켜 300℃ 에 도달 후 20분간 유지토록 하였다.

Selected Ion Monitoring(SIM) : Data Acquisition은 SIM mode로 하여 erythromycin은 m/z 230, tylosin은 m/z 159 그리고 내부표준물질로 사용한 cholesteryl isobutyrate는 m/z 368 ion 등의 특징적인 ion들을 골라 사용하였다. 분리하고자 한 항생제, 항균제들의 분자량, retention time 및 특징적인 ion들을 Table 3에 나타내었다.

결과 및 고찰

항생제의 등장으로 인해 인류가 질병이란 고통으로부터 많이 해방되어 온 것은 사실이다. 인류에의 공헌 못지 않게 항생제의 등장으로 인해 가축 등 여러 동·식물도 질병에서 많이 해방되게 되었다. 그러나 일부 양축, 양식업에서의 이와같은 항생제들의 오·남용으로 인해, 역으로 식품이란 매체를 통해 인간에게 이행되어 많은 질병에 대한 저항성 약화, 균에 대한 내성증가, 환경공해 등 적지 않게 문제점을 야기시켜온 것 또한 사실이다.

이와같은 항생제의 오·남용으로 인한 문제점들

Table 1. Instrumental Analysis of Residual Macrolide Antibiotics 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) [23 m(L.)×0.33 mm (I.D.)×0.53 μm (F.T.)]
- Injection temperature: 280℃
- Transfer line temperature: 300℃
- Ion Source temperature: 200℃
- Injection mode: splitless
- Carrier gas: Helium (2.0 ml/min.)
- Electron Energy: 70 eV

Table 2. Oven Temperature Program for Simultaneous GC/MSD Analysis for Macrolide Antibiotics in Beef

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

을 극복하기 위하여는 식품 중에 잔류하는 항생제에 대한 정확한 분석법이 요구되어지게 되었다. 이제까지는 생물학적인 방법 등[1,2,19-21]이 많이 보고되어 있으나, macrolide계 항생제는 분자적인 특징 즉 거대분자인 관계로 인하여 기기분석학적 방법을 정립하는데 많은 어려움이 뒤따랐다. 본 연구에서는 이와 같은 개개 기기분석법의 단점을 보완하고 다수의 항생제에 대한 동시분석법을 개발하기 위한 연구를 수행하여 이미 동시분석법 등을 보고[1,2,19-21]하였고, 류[19] 등은 이미 이 방법을 국내의 보건사회부 산하요원[20] 및 농림수산부 산하요원[21]들의 교육훈련에도 적용한 바 있다.

본 방법에는 Takatsuki[13]의 방법을 변형하고 원리를 응용하여 보았다. 즉 Fig. 1에 제시된 바와 같이 acid hydrolysis에 의해 macrolide계 항생제인 erythromycin은 erythralosamine으로, tylosin은 *o*-mycaminosyl tylonolide로 chemical transformation시켜, 보다 분석이 용이하도록, 구조적 변화를 주었다. 이미 앞에서도 언급하였듯이 이제까지 macrolide계 항생제의 분석법은 erythromycin,[3-12] oleandomycin,[13] spiramycin,[13,14] tylosin[13,15-18] 등이 보고되어 있으나, 개별적인 기기분석법에 불과하였다.

Fig. 2는 erythromycin을 beef속에 spike하여, 전처리 clean-up하고 acid hydrolysis에 의해 chemical transformation시킨 후 TMS-derivatization하여 얻은 total ion chromatogram과 scan mass spectrum을 나타내었다. m/z ion 230은 erythralosamine-OTMS cleavage에 의한 것으로서 glycoside bonding에 의한 aglycone의 hydroxyl기에 연결된 sugar molecules에서 특징적으로 나타나는 fragment ion이다.

Fig. 3은 산가수분해 후의 tylosin의 total ion chromatogram과 scan mass spectrum을 나타내었다. Tylosin의 화학변형체인 *o*-mycaminosyl tylonolide의 경우 특징적인 m/z 159와 318 ion 등이 Fig. 3에서와 같이 나타난다.[13]

이와 같이 chemical transformation과 TMS derivatization에 따른 회수율을 측정하기 위해 beef에 10 ppm을 spike한 후 실험해본 결과 Table 4에서 알 수 있듯이 erythromycin의 경우는 약 90.59%이고, tylosin은 약 45.91%로서, erythromycin의 경우는 높은 회수율을 보인 반면 tylosin은 약간 낮은

Table 3. Characteristic Ions of Erythromycin and Tylosin after Acid Hydrolysis in GC/MSD Analysis

Antibiotics	M.W.	Retention time (min.)	Characteristic ions
Erythromycin	733.92	10.411	230, 123, 157, 437
Tylosin	916.14	28.319	159, 318, 334
Cholesteryl isobutyrate	456.8	11.981	368, 353, 147, 247

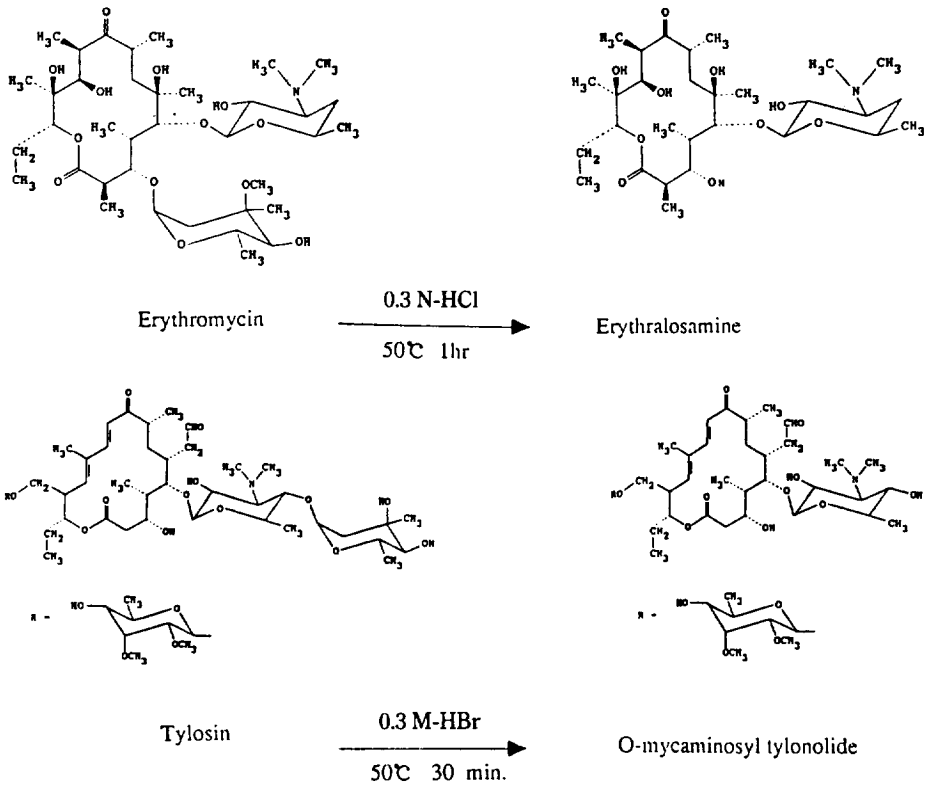

Fig. 1. Chemical transformation of Macrolide Antibiotics by acid hydrolysis.

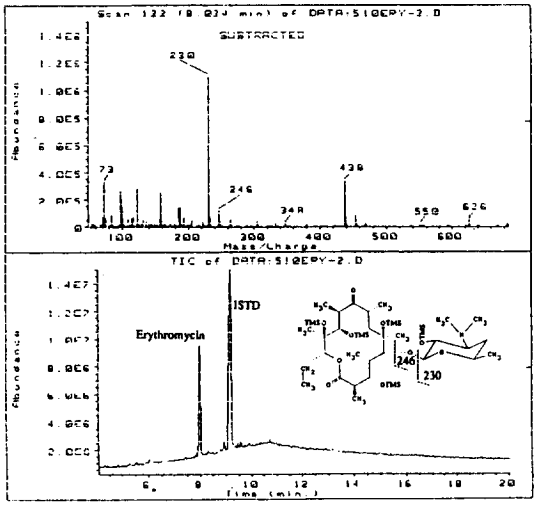

Fig. 2. Total ion chromatogram and scan mass spectrum of erythromycin after acid hydrolysis in GC/MSD.

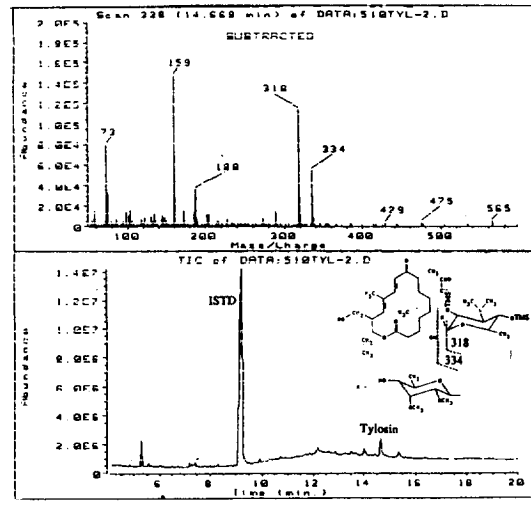

Fig. 3. Total ion chromatogram and scan mass spectrum of tylosin after acid hydrolysis in GC/MSD.

Table 4. Recoveries of Erythromycin and Tylosin from Beef Spiked at 10 ppm Concentration

Antibiotics	Beef	
	Recover(%)*	C.V.(%)
Erythromycin	90.59	4.89
Tylosin	45.91	0.20

The recovery data are based on three samples.

recovery를 보여주어, acid hydorlysis에 의한 것인지 derivatization에 의한 것인지 등을 앞으로 좀 더 규명할 예정이다.

또한 이들의 검출한계치는 Table 5에서 알 수 있듯이 erythromycin의 경우 0.02 μg/g, tylosin은 2 μg/g을 보여주어 역시 감도면에서도 tylosin은 erythromycin에 비해 저조함을 알 수 있었으나 erythromycin의 경우는 좋은 감도를 보여주었다.

이상과 같이 본 실험법에서는 acid hydrolysis에 의한 chemical transformation, 그리고 TMS-derivatization과 각 항생제의 특징적인 ion들을 선택한 selected ion monitoring mode를 사용하여 GC/MSD에서의 분석이 가능하도록 하여, 거대분자로 인한 어려움에도 불구하고, macrolide계 항생제를 분리, 정량, 확인이 가능하도록 정립하여 보았다. 그러나 같은 macrolide 계통임에도 불구하고 tylosin의 경우는 recovery, 검출한계 등에서 약간의 문제점이 있는 바 앞으로 좀더 연구를 해야할 과제라 사료되었다. 이와 같은 기기를 사용한 동시분석법의 확립은 이미 전보[1]에서 밝힌 Bio-Assay와의 병용으로 식품류에 잔류하는 극미량 인체유해물질들의 검출을 가능케 할 뿐 아니라 무역마찰시 파생되는 문제에 과학적 근거제시가 가능해지고 극미량의 검출로 인한 기초과학 분야에의 응용, 더 나아가 국민건강보호 및 복지향상에 이바지할 수 있으리라 사료된다.

Table 5. The Limit of Detection of Erythromycin and Tylosin in Beef

	Limit of Detection (μg/g)
Erythromycin	0.02
Tylosin	2

감사의 글

본 연구는 보건사회부 및 농림수산부의 위탁연구비에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

국문요약

식용육류 중에 잔류하는 항생물질 및 항균성물질들을 검출하기 위하여, 초정밀분석기기인 Gas chromatography/Mass spectrometry(GC/MS)를 사용한 동시분석법을 개발하고자 하여 이미 계속 발표한 바 있다. 본보에서는 그중에서 분자구조상 거대분자들인 macrolide계의 항생물질인 erythromycin과 tylosin의 동시분석법에 촛점을 맞추어 acid hydrolysis와 TMS-derivatization에 의한 Selected Ion Monitoring(SIM) mode에 따른 GC/MS 동시분석법을 확립하였다. 본 방법에 의한 10 ppm spike시의 회수율은 erythromycin이 91%, tylosin이 약 46%로서 erythromycin은 높은 회수율을 보인반면, tylosin은 약간 낮은 회수율을 보였고, 검출한계는 erythromycin이 0.02 μg/g, tylosin은 2 μg/g으로서 erythromycin이 높은 검출한계치를 나타내었다. 또한 이러한 기기분석방법을 Bio-Assay법과 병용하여 Bio-Assay법에서의 검출을 이 기기분석법으로 확인하면, 양 방법간의 보완은 물론 식품의 잔류유해물질에 따른 안전성 제고 및 규제독성의 측면에서도 매우 의미있는 연구로 사료된다.

참고문헌

1. 류재천, 송윤선, 박종세, 장준식, 神保勝彦: 식육 중의 잔류 항생·항균제의 검정에 관한 연구(I), 생물학적 검정법, *Kor. J. Food Hyg.*, (in press) (1993).
2. 류재천, 양종순, 서자원, 김명수, 박종세: 식육 중의 잔류 항생·항균제의 검정에 관한 연구(II), Penici-

llin G, chloramphenicol, thiamphenicol의 gas chromatography/mass spectrometry 동시 분석, *Kor. J. Food Hyg.*, (in press) (1993).

3. Tsuji, K. and Kane, M.P.: Improved high pressure liquid chromatographic method for the analysis of erythromycin in solid dosage forms, *J. Pharm. Sci.* **71**, 1160-1164 (1982).
4. Geria, T., Hong, W.-H. and Daly. R.E.: Improved high-performance liquid chromatographic assay of erythromycin in pharmaceutical solid dosage forms, *J. Chromatogr.*, **396**, 1991-198 (1987).
5. Stubbs, C. and Kanfer, I.: High-performance liquid chromatography of erythromycin propionyl ester and drythromycin base in biological fluids, *Ibid.*, **427**, 93-101 (1988).
6. Grgurinovich, N. and Matthews, A.: Analysis of erythromycin and roxithromycin in plasma or serum by high-performance liquid chromatography using electrochemical detection., *Ibid*, **433**, 298-304 (1988).
7. Chen, M.-L. and Chiou, W.L.: Analysis of erythromycin in biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Ibid.*, **278**, 91-100 (1983).
8. Sugden, K., Cox, G.B. and Loscombe, C.R.: Chromatographic behavior of basic amino compounds on silica and ODS-silica using aqueous methanol mobile phases, *Ibid*, **149**, 377-390 (1978).
9. Stubbs, C., Haigh, J.M. and Kanfer, I.: Determination of erythromycin in serum and urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 1126-1128 (1985).
10. Croteau, D., Vallee, F., Bergeron, M.G. and Lebel, M.: High-performance liquid chromatographic assay of erythromycin and its esters using electrochemical detection, *J. Chromatogr.*, **419**, **20**, 205-212 (1987).
11. Takatuki, K., Suzuki, S., Sato, N., Ushizawa, I. and Shoji, T.: Gas chromatographic/mass spectrometric determination of erythromycin in beef and pork, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 708-713 (1987).
12. Mitscher, L.A., Foltz, R.L. and Levenberg, M.I.: Mass spectra of macrolide antibiotics. The utility of the N-oxide derivatives in enhanciang fragmentation of the non-sugar portion of basic antibiotics, *Org. Mass Spectrometry*, **5**, 1229-1232 (1971).
13. Takatsuki, K., Ushizawa, I. and Shoji, T.: Gas chromatographic-mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring, *J. Chromatogr.*, **391**, 207-217 (1987).
14. Nagata, T. and Saeki, M.: Liquid chromatographic determination of spiramycin residues in chicken tissues, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **69**, 644-646 (1986).
15. Jardim, M.E., Varenne, P. and Ferreira, M.A.A.: Structure elucidation of some 14 and 16 membered ring macrolide antibiotics by CIMS, *Int. J. Mass Spectro. & Ion Physics*, **48**, 189-192 (1983).
16. Kennedy, J. H.: Influence of column temperature on the liquid chromatographic separation of tylosin and related macrolides, *J. Chromatogr.*, **281**, 288-292 (1983).
17. Yeh, W.-K., Bauer, N.J. and Dotzlaf, J.E.: High-performance liquid chromatographic assay for S-adenosyl-l-methionine: macrocin *O*-methyltransferase, *Ibid.*, **288**, 157-165 (1984).
18. Bhuwapathanapun, S. and Gray. P.: High pressure liquid chromatography of the macrolide antibiotic tylosin, *J. Antibiotics*, **30**, 673-674 (1977).
19. 류재천, 서자원, 송윤선, 박종세: Detection and quantitation of residual antibiotics and antibacterial agents in foods. *Kor. J. Food Hygiene*, **5(3)**, 159-164 (1990).
20. 식품 중 인체 유해물질 검정교육훈련과 분석방법 개발에 관한 연구보고서, 제3부: 식품 중 인체 유해물질의 분석방법, 한국과학기술연구원, p. 85-142 (1991).
21. 축산식품내 유해잔류물질 검사교육과 분석방법 개발에 관한 연구, 한국과학기술연구원, p. 457-531 (1992).