

## HPLC를 이용한 축산물중 잔류페니실린 및 클로람페니콜의 동시분석법 연구

황래홍, 윤은선, 김현정, 김연주, 정형기, 한인규, 이병동

서울특별시보건환경연구원 축산물부

### A study on simultaneous determination of residual penicillin G and chloramphenicol in livestock products by high performance liquid chromatography

Lae-Hwong Hwang, En-Sun Yun, Hyun-Jung Kim  
Yoen-Joo Kim, Hyeoung-Ki Jung, In-Kyou Han, Byung-Dong Lee

*Livestock Product Division  
Seoul Metropolitan Health & Environment Research Institute*

#### Abstract

This study was carried out to simultaneous determination of penicillin G and chloramphenicol in livestock products by HPLC.

The results obtained were as follows ;

1. Penicillin G and chloramphenicol were analyzed by HPLC on symmetry C<sub>18</sub> column with acetonitrile-0.1 M phosphate buffer containing 0.0157 M thiosulfate (25 : 75) as mobile phase at UV 325nm and 280nm, respectively.
2. Samples were applied to a Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge, from which eluted penicillin derivatized with 2 M 1,2,4-triazole containing 0.001 M mercuric chloride.
3. The average recovery rates of penicillin G and chloramphenicol were 81.8% and 80.3%, respectively, and the detection limits were 5 ppb (5µg/kg; 7.9IU/kg) for penicillin G and chloramphenicol in porcine and bovine muscle.

Key words : Antibiotic residues, Meat, High performance liquid chromatography

#### 서 론

최근 유럽에서 발생한 축산물의 다이옥신 오

염사건은 전세계적으로 엄청난 파문을 일으켰는데 이러한 식품오염은 수출입 자유화가 가속화 됨에 따라 특정국가에 국한되지 않는 세계적

인 문제가 된다는 것을 보여주는 대표적인 사례라 할 수 있겠다.

축산물은 그 생산과정에서 많은 약제들을 사용하기 때문에 유해물질의 오염가능성이 매우 높다고 볼 수 있는데 축산물에 사용되고 있는 약제들 중 페니실린과 클로람페니콜은 유방염, 수송열 및 기타감염증 치료에 가장 널리 사용되는 대표적 항생제<sup>1-10)</sup>로서 이들은 인체에 과민반응을 유발하거나 골수기능장애, 면역기능장애 등을 유발<sup>1,3,6,8-10)</sup> 함으로서 구미 선진국들은 식용가축에 대한 이들의 잔류허용기준을 ppb 단위 또는 불검출 등으로 엄격히 규정하고 있는 실정이다<sup>1,3,7-9,11,12)</sup>. 따라서 이들 유해물질에 대한 검출감도가 우수한 정밀 분석기술을 확보하는 것은 안전하고 위생적인 축산물 생산에 필수적인 것이라 하겠다.

축산물에 대한 항생물질의 분석은 그 특성상 microbial inhibition test, microbial receptor test, immunological method, STOP (swab test on premises) + TLCB (thin layer chromatography bioautography) 등의 미생물학적 분석<sup>3,11,13-15)</sup>에 의존하고 있으나 이들 방법은 특이적이지 못하며 이러한 비특이성을 해결하기 위해 TLC, LC, LC/MS 등의 기기를 이용한 이화학적 방법<sup>1,3,8,11,13-15)</sup>이 보편화되고 있으며 최근에는 유도체화 방법<sup>1,3,15)</sup>이나 automated liquid chromatography cleanup method (시료를 간단한 전처리 후 LC를 이용하여 gradient 로 분리하고 원하는 fraction을 선별하여 LC로 재분석 후 MS등으로 확인) 등<sup>12,15-18)</sup>이 시도되고 있는데 후자는 특이성과 감도가 우수하나 LC/MS 등의 장비에 고도의 숙련이 요구되는 단점이 있다.

따라서 현재 실험실에서 보편적으로 사용되고 있는 기기를 이용하면서도 검출감도가 우수한 항생물질 분석방법으로는 유도체화 방법이 가장 합리적이라 사료되는데 이러한 방법을 이용한

대표적인 것으로 Joe 등에 의한 페니실린 분석법<sup>1,3)</sup>을 들 수 있겠다. 또한 페니실린과 클로람페니콜은 화학구조가 다른 계열의 항생물질들이들을 각각 분석하기 위해서는 많은 시간이 소요되는데 이들 약제에 대한 동시분석이 가능하다면 매우 효율적일 것으로 사료되었다.

이에 본 연구에서는 Joe 등의 실험방법<sup>1,3)</sup>을 기초로 하여 페니실린과 클로람페니콜을 동시 분석할 수 있는 방법을 연구함으로써 축산물에 대한 유해 잔류물질 분석법 발전에 기여코자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시 약

Acetonitrile, methanol 은 HPLC용을 사용하였으며, sulfuric acid, sodium chloride, dibasic sodium phosphate, monobasic sodium phosphate, sodium thiosulfate, sodium tungstate, mercuric chloride는 특급시약을, penicillin G potassium salt (1580IU) 및 chloramphenicol 은 Sigma 제품을 사용하였다.

### 시험용액 조제

1. **Derivatizing reagent (2M 1,2,4-triazole containing 0.001M mercuric chloride):** 1,2,4-triazole (Sigma) 34.45 g을 400ml 비이커에 넣고 DW 150ml를 가하여 용해한 후 0.01M mercuric chloride 25ml를 가하여 혼합, 이를 5 M NaOH로 pH 9.0±0.5가 되게 조절한 후 DW를 가하여 250ml로 하였다.

2. **0.2 M Phosphate buffer :** dibasic sodium phosphate 와 monobasic sodium phosphate를 각각 0.07 M 및 0.13 M이 되게 혼합 (pH 6.5)하였다.

3. **Elution solution :** 60ml acetonitrile과 5ml 0.2 M phosphate buffer를 혼합하고 DW를 가

해 100ml로 하였다.

4. 0.1 M Phosphate buffer containing 0.0157M thiosulfate : dibasic sodium phosphate와 monobasic sodium phosphate 및 sodium thiosulfate를 각각 0.035M, 0.065M 및 0.0157M이 되게 혼합하였다.

5. Mobile phase : 0.1M phosphate buffer containing 0.0157M thiosulfate 750ml와 acetonitrile 250ml를 혼합하고 0.45 $\mu$ m로 여과하였다.

## 장 비

본 실험에는 Waters사의 HPLC를 사용하였다. Pump는 Waters 600E system controller를, injector는 U6K를, detector는 996 photodiode array를, column은 symmetry C<sub>18</sub> column (5 $\mu$ m, 3.9 $\times$ 150mm)을, 기기운영은 Millennium 2010 chromatography manager를 각각 사용하였다.

그리고 시료를 분쇄하기 위한 균질기는 ACE (Japan)를, 원심분리에는 Beckman사의 Avanti 30 centrifuge를, 유도체화를 위한 incubator는 Charm사의 항온맨틀을, 감압농축기로는 Heidolph vv2001를, vacuum manifold는 Supelco사의 visiprep DL을, SPE cartridges는 Waters의 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridges(500mg, Classic)와 6ml (500mg) BondElut C<sub>18</sub>를, filter는 Whatman의 GF/B(5.5cm)를 각각 사용하였다.

## 시료 및 표준용액 조제

1. 시료 : 축협 공판장에서 생산되는 돈육 및 우유를 구입한 후 예비시험을 거쳐 페니실린 및 클로람페니콜이 잔류하지 않은 것으로 확인된 시료를 -20 $^{\circ}$ C이하의 냉동고에 보관하여 시험에 사용하였다.

### 2. 표준용액 조제

a) Penicillin G : Penicillin G potassium salt (1580IU/mg) 0.01g을 10ml methanol에 녹인 후

DW를 가하여 100ml(100 $\mu$ g/ml)로 하고 이를 DW로 10배(10 $\mu$ g/ml) 및 100배(1 $\mu$ g/ml)로 희석하여 사용하였다. 표준용액은 1주일마다 새로 조제하였고, 냉장 보관하면서 사용하였다.

b) Chloramphenicol : Chloramphenicol 0.01g을 10ml methanol에 녹인 후 DW를 가하여 100ml(100 $\mu$ g/ml)로 하고 이를 DW로 10배(10 $\mu$ g/ml) 및 100배 (1 $\mu$ g/ml)로 희석하여 냉장 보관하면서 사용하였다

## 시험방법

시료 전처리 : 시료 5g에 DW 20ml를 가하여 5분간 균질화한 후 50ml 원심분리관에 취하고 DW 10ml로 용기를 세척하여 앞의 원심분리관에 합한 후 약 5분간 세계 흔든 다음 5ml의 0.17M sulfuric acid와 5% sodium tungstate 5ml를 가하여 약 20초간 혼합하였다, 이를 6,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 취하고 잔사에 DW 15ml를 가하여 다시 5분간 세계 흔들어 이를 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 앞의 상청액과 합하고 이를 GF/B filter를 통하여 150ml정도의 플라스크로 감압 여과하고 20% sodium chloride 10ml를 가하여 혼합하였다.

SPE column cleanup을 위하여 Sep-pak C<sub>18</sub> Cartridge에 10ml 주사기를 연결하여 vacuum manifold에 고정된 다음 methanol 20ml와 DW 20ml 및 2% sodium chloride 10ml를 차례로 흘려보낸 다음 (이 과정에서 C<sub>18</sub>를 건조시키지 말 것) 시료추출용액을 분당 2ml 수준의 유속으로 흘려보냈다. 다시 2% sodium chloride 10ml와 DW 10ml로 C<sub>18</sub>를 세척한 다음 vacuum하에 5분간 C<sub>18</sub>를 건조시켰다. Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge를 vacuum manifold에서 분리하여 100ml의 가지형 플라스크에 옮기고 1ml의 용출액을 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 가하여 분당 1~2ml 정도의 유속으로 용출하였다.

Table 1. Analytical conditions of penicillin G and chloramphenicol by HPLC

Column	Symmetry C <sub>18</sub> (3.9 × 150mm)
Mobile phase	Acetonitrile-0.1M phosphate buffer containing 0.0157M thiosulfate(25 : 75)
Detector	UV(penicillin : 325nm, chloramphenicol : 280nm)
Flow rate	1.0ml/min
Injection volume	50μl

**유도체화**: 용출액을 진공농축기로 농축 건조시킨 다음 즉시 유도체시약 0.5ml을 가하여 약 1분간 vortex하고 이를 5~6ml의 시험관에 옮겨 마개를 한 다음 65°C의 항온블록에서 30분간 배양하였다. 그후 시험관을 즉시 찬물에 담구어 실온으로 식히고 vortex한 다음 0.45μm 여과지에서 여과시킨 후 50μl를 LC에 주입하였다.

### 결과 및 고찰

페니실린과 클로람페니콜을 동시분석 하는데 적합한 column 선정을 위해 Novapak C<sub>18</sub> column, symmetry C<sub>18</sub> column, Bondapak C<sub>18</sub> column으로 예비 시험한 결과 Novapak C<sub>18</sub> column의 경우 retention time이 너무 빠르고 클로람페니콜이 완전 분리되지 못하였으며, Bondapak C<sub>18</sub> column에서는 retention time이 너무 느리고 클로람페니콜과 페니실린이 중복되는 경향을 보인 반면 Symmetry C<sub>18</sub> column의 경우는 Novapak C<sub>18</sub> column과 Bondapak C<sub>18</sub> column의 중간 정도로 페니실린과 클로람페니콜이 적절하게 분리되었으며 다른 방해 피크는 존재하지 않았다 (Fig 1).

이러한 시험 결과는 Joe 등<sup>3)</sup>이 Novapak C<sub>18</sub> column을 이용하여 페니실린을 분석하면서 클로람페니콜과의 동시분석 가능성을 제기하면서도 실제 보고하지는 않은 원인이 된 것으로 추정된다.

시료는 DW 20ml로 추출하였으며 추출한 시

료를 cleanup 하기 위하여 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge를 사용하였는데 Joe 등<sup>3)</sup>은 BondElut C<sub>18</sub> cartridge가 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge보다 cleanup 이 우수하다고 하였으나 본시험 결과 차이가 없었으며 회수율에 있어서도 (Table 3) Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge를 사용하여 전처리시 평균 81.1%로 BondElut C<sub>18</sub> cartridge 사용시의 77.1%와 큰 차이가 없었으며 본 시험의 용이성에서는 오히려 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge가 더 우수한 것으로 확인되었다.

SPE cartridge을 이용한 시료의 cleanup에는 시료의 pH가 매우 중요한데 추출물의 pH 예비 시험 결과 pH 2.0인 산성추출물에서는 회수율이 30% 이하였으며 pH 5.0인 추출물은 회수율이 100% 이상이었다. 본 시험에서 추출물은 pH가 약 5.4로 별도의 pH 교정이 필요치 않았는데 이는 Joe 등<sup>3)</sup>이 실험한 결과와 일치하는 것이었다.

C<sub>18</sub> cartridge를 통한 시료의 유출 속도는 분당 약 2ml정도로 조정하였으며 cleanup 후에 C<sub>18</sub> cartridge를 5분간 공기를 통하여 건조시키고 1ml의 용출액으로 페니실린과 클로람페니콜을 용출하였다, Joe 등<sup>3)</sup>은 이러한 과정이 제대로 실행되지 않으면 회수율이 떨어진다고 하였다.

용출된 시료는 유도체 시약(2M 1,2,4-triazole containing 0.001M mercuric chloride)을 가하여 65°C에서 30분간 배양함으로써 mercuric mercaptide penicillin complex를 형성하게 되는데

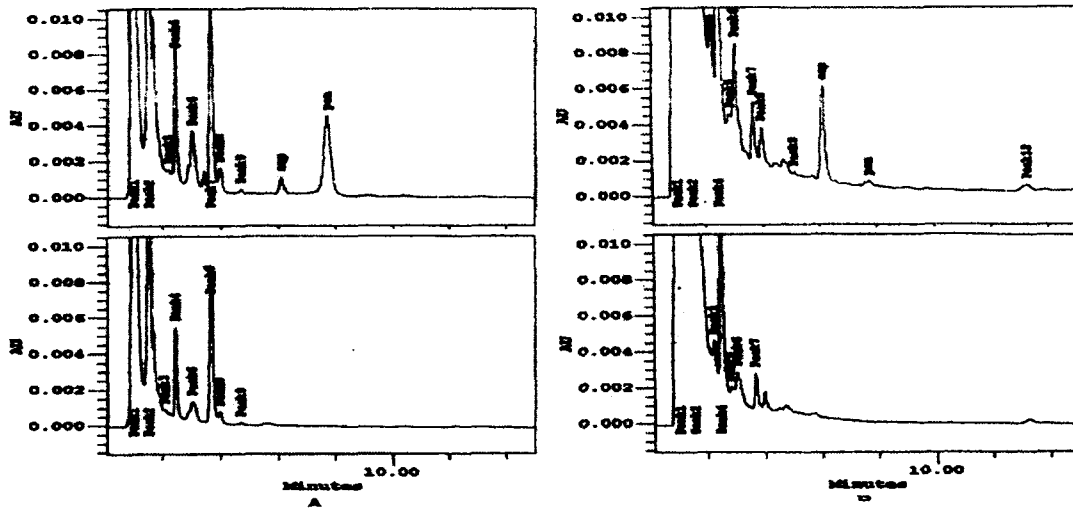


Fig 1. Chromatograms of a 50  $\mu$ l injection of derivatized extract from porcine control muscle tissue fortified with penicillin G (100 $\mu$ g/kg) and chloramphenicol(100 $\mu$ g/kg) and detected at 325nm(A) and 280nm(B).

Pen : mercuric mercaptide penicillin complex

Cap : chloramphenicol

\* low chromatogram : control muscle tissue

이 유도체는 최대흡수파장이 220nm정도로 짧아 분석이 어려운 페니실린의 파장을 325nm로 변화시켜 줌으로서 분석을 용이하게 하기 위한 것이다.<sup>3)</sup>

Joe 등<sup>3)</sup>은 1ml의 용출액에 1ml의 유도체 시약을 가하여 유도체화한 후 분석한 결과 페니실린의 경우 검출한계가 쇠고기에서 5ppb(8.4IU/kg) 이었다고 하였으나 본시험 결과 실제 스펙트럼 등으로 확인 가능한 검출한계는 페니실린과 클로람페니콜 모두 10ppb 수준이었다.

현재 국내 유해잔류물질 허용기준은 페니실린의 경우 쇠고기와 돼지고기에 50ppb, 클로람페니콜의 경우 각각 불검출로 규정하고 있는데 잔류물질 분석방법을 승인하기 위한 미국 FDA 가이드라인에 따르면 검출감도가 검출허용한계의 1.5~2배가 되어야 하며 평균 회수율이 60~110%가 되어야 한다고 규정하고 있다<sup>4)</sup>. 따라서 페니실린의 경우는 Joe 등<sup>3)</sup>의 시험방법으로도 가능하지만 클로람페니콜의 경우 좀 더 검출감

도를 증가시킬 필요가 있다고 사료되어 본시험에서는 Joe 등<sup>3)</sup>의 시험방법에서 검출감도를 개선하고자 먼저 용출액 1ml에 가하는 유도체 시약의 양을 0.5ml로 줄여 배양 후 시험한 결과 용출액 1ml에 유도체 시약 1ml를 가한 것에 비해 페니실린의 회수율이 70%이었으며 유도체 시약을 0.1ml로 줄였을 때는 회수율이 20% 수준이었다. 한편 유도체시약 대신 용출액의 양을 줄여본 결과 80% 이상의 회수율을 보여 유도체 시약이 적으면 완전한 유도체가 형성되지 못함을 확인할 수 있었다 (Table 2). 이에 본시험에서는 용출액 1ml로 용출후 이를 농축기를 이용하여 농축건조하고 여기에 유도체시약 0.5ml를 가하여 약 1분간 vortex하여 녹인 후 배양한 결과 5ppb까지 확인 정량이 가능 하였다.

돈육 및 우육을 대상으로 본시험방법에 따라 분석한 결과 (Table 3) 페니실린은 평균 81.9%, 클로람페니콜은 80.3%의 회수율을 보였다, 이러한 결과는 Joe 등<sup>5)</sup>이 우육 및 우유 등을 대상으

Table 2. The recovery of penicillin G and chloramphenicol by mix of elution solution and derivatizing reagent

	Penicillin G Mean, %	Chloramphenicol Mean, %
Elute sol 1ml + derivatizing reagent, 0.5ml	67	80
Elute sol 1ml + derivatizing reagent, 0.1ml	18	73
Elute sol concentrate + derivatizing reagent, 1ml	86	80
Elute sol concentrate + derivatizing reagent, 0.5ml	85	80

Table 3. The recovery of penicillin G and chloramphenicol from fortified control muscle tissues

Spiked, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Penicillin G		Chloramphenicol		
	Porcine	Bovine	Porcine	Bovine	
S1*	100	90.1 $\pm$ 4.8**	81.2 $\pm$ 3.5	80.7 $\pm$ 1.5	85.6 $\pm$ 2.6
	10	83.9 $\pm$ 1.8	72.4 $\pm$ 4.0	80.6 $\pm$ 1.3	74.2 $\pm$ 2.5
S2	100	85.4 $\pm$ 5.0	80.6 $\pm$ 1.2	85.3 $\pm$ 4.3	81.1 $\pm$ 4.6
	10	71.8 $\pm$ 1.0	70.7 $\pm$ 2.4	73.1 $\pm$ 2.2	68.4 $\pm$ 1.3

\* S1= cleanup by Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge

S2= cleanup by BondElut C<sub>18</sub> cartridge

\*\* Mean  $\pm$  SD %

로 실험한 결과<sup>1,3)</sup>와 비슷한 것이었으며 확인정량이 가능한 최소검출 한계는 Joe 등<sup>5)</sup>의 시험방법 보다 우수하였다. 특히 본 시험법은 검출감도를 높여 클로람페니콜의 적용이 어느 정도 가능함을 확인할 수 있었다.

이와 같은 동시분석법은 무엇보다도 분석에 필요한 시간을 절약하는데 가장 큰 장점이 있는데 본시험 결과 페니실린과 클로람페니콜을 동시분석 하는데 약 10시간이 소요되어 기존의 각각 분석시 소요되는 20시간을 반으로 줄일 수 있어 잔류물질 분석에 효율을 기할 수 있을 것으로 판단되었다.

## 결 론

HPLC를 이용하여 축산물 중 잔류 페니실린 및 클로람페니콜을 동시분석하는 방법을 연구

하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 이동상 용매는 acetonitrile-0.1M phosphate buffer containing 0.0157M thiosulfate(25:75)을, column은 Symmetry C<sub>18</sub>을 사용하고, UV 파장은 페니실린에는 325nm, 클로람페니콜에는 280nm을 각각 사용하였다.
2. 전처리시 SPE cartridge로는 Sep-pak C<sub>18</sub>를 사용하였으며 페니실린은 2M 1,2,4-triazole containing 0.001M mercuric chloride로 유도체화하여 분석하였다.
3. 돈육 및 우유를 대상으로 분석한 결과 평균 회수율이 페니실린의 경우 81.9%, 클로람페니콜의 경우 80.3%이었으며 확인정량이 가능한 최소검출 한계는 페니실린과 클로람페니콜 모두 5ppb(7.9IU/kg)이었다.

## 참고문헌

1. Joe OK, Lily B, Keng J-Y, et al. 1994. Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. *JAOAC Int* 77:565~569.
2. Tyczkowska KL, Voyksner RD, Straub RF. 1994. Simultaneous multiresidue analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection and confirmation by electrospray mass spectrometry. *JAOAC Int* 77:1122~1131.
3. Boison JO, Craig DC, Waynechan S, et al. 1991. Determination of penicillin G residues in edible animal tissues by liquid chromatography. *JAOAC* 74:497~501.
4. Ang CYW, Luo W. 1997. Rapid determination of ampicillin in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *JAOAC Int* 80:25~30.
5. Abjean J-P, Lahogue V. 1997. Planar chromatography for quantitative determination of ampicillin residues in milk and muscle. *JAOAC Int* 80:1171~1176.
6. Bayo J, Moreno MA, Prieta J, et al. 1994. Chloramphenicol extraction from milk by using the diphasic dialysis method followed by liquid chromatographic determination. *JAOAC Int* 77:854~856.
7. Keukens HJ, Aerts MML, Traag WA. 1992. Analytical strategy for the regulatory control of residues of chloramphenicol in meat: Preliminary studies in milk. *JAOAC Int* 75:245~255.
8. Epstein RL. 1994. International validation study for the determination of chloramphenicol in bovine muscle. *JAOAC Int* 77:570~576.
9. Long AR, Hsieh LC, Bello AC, et al. 1990. Method for the isolation and liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk. *J Agric Food Chem* 38:427~429.
10. Wal J-M, Peleran J-C, Bories GF. 1980. High performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk. *JAOAC* 63:1044~1047.
11. Meetschen U, Petz M, 1990. Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk. *JAOAC* 73:373~378.
12. Moats WA. 1994. Determination of ampicillin and amoxicillin in milk with an automated liquid chromatographic Clean-up. *JAOAC Int* 77:41~45.
13. Zomer E, Quintana J, Saul S, et al. 1995. LC-receptogram: A method for identification and quantitation of  $\beta$ -lactams in milk by liquid chromatography with microbial receptor assay. *JAOAC Int* 78:1165~1172.
14. Cutting JH, Kiessling WM, Bond FL, et al. 1995. Agarose gel electrophoretic detection of six  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk. *JAOAC Int* 78:663~667.
15. Rogers ME, Adlard MW, Saunderd G, et al. 1984. Derivatization techniques for high performance liquid chromatographic analysis of  $\beta$ -lactams. *J Chromatog* 297:385~391.
16. Moats WA, Harik-Khan R. 1995. Liquid chromatographic determination of  $\beta$ -

- lactam antibiotics in milk: A multiresidue approach. *JAOAC Int* 78: 49~54.
17. Moats WA. 1992. Determination of cloxacillin and penicillin V in milk using an automated liquid chromatography cleanup. *JAOAC Int* 75: 257~260.
18. Moats WA. 1997. Advances in determination of antibiotic residues. *JAOAC Int* 80: 1~4.