

식품 중 테트라사이클린계 항생물질의 분석

최동미 *·정지윤·장문익·임우혁·박건상·홍무기
식품의약품안전청, 잔류화학물질과
(2005. 4. 8 접수, 2005. 4. 21 승인)

Determination of tetracycline antibiotics in food

Dongmi Choi *, Jiyeon Jeong, Moonik Chang, Moohyeog Im, Kunsang Park and Mooki Hong

Residue & Chemicals Division, Korea Food & Drug Administration, #231 Jinheung-Ro, Eunpyung-Gu, Seoul
122-704, Korea

(Received April 8, 2005, Accepted April 21, 2005)

요 약 : 고속액체크로마토그래피를 이용하여 동물성 식품 중 테트라사이클린계

항생물질의 동시분석을 시도하였다. 대상물질은 동물의 질병치료 예방, 성장촉진 및 사료효율 개선에 널리 사용되는 클로르테트라사이클린, 독시사이클린, 옥시테트라사이클린 및 테트라사이클린이었으며, 대상식품은 쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 우유, 계란, 낱치, 우럭, 참돔, 뱀장어 및 바다가재이었다. 시료를 McIlvaine 완충액 및 20% 삼염화초산으로 추출한 후 C₁₈ 카트리지로 정제하여 고속액체크로마토그래피로 분석하였다. 이동상으로는 0.01M 수산화 아세토니트릴의 혼합용액을 85:15에서 60:40까지 기울기로 사용하였으며 UV의 검출파장은 365 nm 이었다. 평균 회수율은 71~98% 이었으며, 검출한계는 신호대 잡음비 3 이상에서 클로르테트라사이클린은 0.022, 독시사이클린은 0.012, 옥시테트라사이클린은 0.012 및 테트라사이클린은 0.009 mg/kg이었다. 대부분의 시료에서 클로르테트라사이클린, 독시사이클린 및 테트라사이클린은 검출되지 않았으나, 돼지고기, 낱치 및 참돔(2시료)에서 옥시테트라사이클린이 각각 0.04, 0.17, 0.05 및 0.08 mg/kg로 모두 잔류허용기준을 초과하지 않은 수준으로 검출되었다.

Abstracts : A selective method of high performance liquid chromatography with UV detector has been applied to determine 4 tetracycline antibiotics in the animal food, simultaneously. The targets were chlortetracycline (CTC), doxycycline (DC), oxytetracycline (OTC), and tetracycline (TC) that are used routinely in veterinary medicine for prevention and control of disease. Food samples were beef, pork, chicken, milk, whole egg, flatfish (*Limanda yokohamae*), jacopecover (*Sebastes hubbsi*), seabream (*Chrysophrys major*), eel (*Anguilla japonica*) and lobster (*Hommarus americanus*). After extracting food samples with 20% trichloroacetic acid and McIlvaine buffer, they were purified by a C₁₈ SPE cartridge with 0.01M methanolic oxalic acid solution. The concentrated residue was re-dissolved in methanol, filtered, cleaned up and analyzed on a C₁₈ column. The mobile phase was a mixture of 0.01M oxalic acid and acetonitrile with a gradient ratio from 85:15 to 60:40. The UV wavelength was 365 nm. The overall recoveries were ranged from 71% to 98% and the limit of detections were 0.022 for CTC, 0.012 for DC and OTC and 0.009 mg/kg for TC at signal/noise > 3, respectively. As results, CTC, DC and TC were not detected in all selected food samples, however, OTC was detected in meat and fishes. The determined level of OTC was 0.04 ppm for pork,

0.17 ppm for flatfish and 0.05 and 0.08 ppm for jacopever, that were within the Maximum Residue Limits (MRLs) in the food.

Key words : chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline, tetracycline, food, HPLC

1. 서 론

식품을 생산하는 동물의 질병 예방 치료, 성장촉진 및 사료효율을 개선하고 양질의 동물성 식품을 공급하기 위하여 항생물질, 합성항균제, 성장촉진제 등 여러 다양한 동물용의약품이 사용되고 있다. 이중 항생물질이란 미생물에 의하여 만들어지는 물질로서 세균이나 그 밖의 미생물의 성장과 활동을 억제하거나 그 생명을 파괴시키는 의약품으로 현재는 공업적으로도 생산되고 있다.¹⁻³ 특히 1950년대 초 개발된 4고리모양체라는 의미를 가진 테트라사이클린계 항생물질로는 *Streptomyces rimosus*나 *Streptomyces aureofaciens* 균주의 증식에 의해 생성되는 옥시테트라사이클린, 클로르테트라사이클린이 있으며, 반합성 테트라사이클린계 항생물질로는 독시사이클린, 테트라사이클린 등이 포함된다. 이중에서 옥시테트라사이클린은 성장촉진 및 사료효율 개선 효과를 위한 사료첨가제용으로 1950년대 후반 시판이 개시된 항생물질이기도 하다.⁴ 현재도 옥시테트라사이클린 염산염, 옥시테트라사이클린 4급암모늄 및 클로르테트라사이클린 염산염 또는 칼슘은 사료내 혼합가능 동물용의약품의 범위 및 동물용의약품의 안전사용기준에 포함되어 있으며, 옥시테트라사이클린 염산염 및 독시사이클린은 수산용약품 사용안내에 포함되어 있다.⁵⁻⁷

테트라사이클린계 항생물질의 항균범위 및 기본 약리작용은 서로 유사하며, 교차내성을 나타내는데, 그람양성균과 그람음성균 및 클라미디아 등에 모두 유효한 광범위항생물질로서 단백질의 합성을 저해하여 정균작용을 하는 것이 작용 메카니즘이다. 따라서 *Mycoplasma*속, *Streptococcus*속, *Pasteurella*속 등 병원미생물에 의해 발병되는 소, 돼지, 가금 등의 폐렴, 유방염, 출혈성패혈증 및 방어, 뱀장어, 잉어 등의 절창병, 비브리오팀, 연쇄상구균증의 치료에 사용되고 있다.¹⁻³

이와 같이 테트라사이클린계 항생물질은 동물의 질병 치료 뿐만 아니라 사료효율을 개선하기

위하여 많이 사용되고 있으므로 오 남용이 우려되는 동물용 의약품이라 할 수 있다. 따라서 식품의 안전을 제고하고 국민 건강의 위해를 방지하기 위하여 우리나라는 테트라사이클린계 항생물질인 클로르테트라사이클린, 옥시테트라사이클린 및 테트라사이클린 3종에 대해 축산물 및 수산물에 잔류허용기준을 설정하고 있으며, Codex (국제식품규격), 일본, 미국 및 EU에서도 동 물질에 대해 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있다(*Table 1*).⁸⁻⁹

식품 중 테트라사이클린계 항생물질의 잔류물질시험법으로는 정성시험법과 정량분석을 위한 기기분석법 및 미생물시험법이 있다.^{8,10-14} 정성시험법에는 미생물분석법, 면역분석법, 박충크로마토그래피법 등이 있으며, 이중 몇개의 서로 다른 미생물균주로 만든 평판에 시료를 직접 배양하거나 디스크 또는 면봉을 이용하여 배양 후 억제대 폭이 일정수준 이상인 것을 양성으로 판정하여 항생물질의 계통을 추정하는 방법인 EEC 4 Plate Test, CAST (California

Antibiotic and Sulfa Test), Star Test 및 STOP (Swab Test on Premises), Charm II 등이 주로 사용되고 있다.^{8,10,15-16} 식품 중에 잔류하는 테트라사이클린계 항생물질은 금속이온과 킬레이트화합물을 형성, 단백질과 결합되어 있으므로 단백질을 제거하기 위하여 pH가 2 이하인 강산으로 처리하면 anhydro 형태로 되었다가 시간이 지남에 따라 epimer로 변형될 수 있다. 따라서 고속액체크로마토그래피 (HPLC) 등을 이용한 기기분석법에 적용하기 위한 시료 전처리 방법으로 EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)를 포함한 약산성 용액 하에서 추출하여 C₁₈ 카트리지가 HLB (hydrophilic lipophilic balance) 컬럼 등으로 정제하는 방법이 주로 사용되고 있으며, 시료를 C₁₈ 분말과 혼합하여 시린지 컬럼에 채우고 수산화유 메탄올로 용출하는 방법도 사용되고 있다.^{8,17-18} 또한 각각의 항생물질에 대해 *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 등 미생물 균주를 이용하여 개별적으로 정량하는 방법도 있다.⁸

이에 본 연구에서는 테트라사이클린계 항생물질인 클로르테트라사이클린, 독시사이클린, 옥시테트라사이클린 및 테트라사이클린 4종을 동시에 분석하기 위하여 식품시료의 전처리 방법 및 HPLC/UV의 최적 분석조건을 확립하여 국내 유통식품에 대해 분석한 결과를 보고하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

분석용 시약은 HPLC급 또는 잔류농약급을 Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA), Wako Pure Chemical Industries Inc. (Osaka, Japan) 및 Merck Inc. (Darmstadt, Germany)에서 구매하였다. 표준물질 클로르테트라사이클린, 독시사이클린, 옥시테트라사이클린 및 테트라사이클린은 Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 시료 전처리에 사용한 McIlvaine 완충액은 citric acid monohydrate 11.8 g, disodium hydrogenophosphate dihydrate 13.72 g 및 ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt 33.62 g을 증류수에 녹여 1 L로 제조하였다.

2.2. 기기

고속액체크로마토그래피 (High Performance Liquid Chromatography) 및 photodiode array (PDA) 검출기는 Nanospace SI-2 (Shiseido Fine Chemicals, Yokohama, Japan)을 사용하였으며, C₁₈ 컬럼은 Type UG120 (Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 대상물질

클로르테트라사이클린, 독시사이클린, 옥시테트라사이클린 및 테트라사이클린 4종을 대상으로 하였으며 구조식, 화학식 및 분자량은 Fig. 1과 같다. 내부표준물질은 디메틸클로르테트라사이클린을 사용하였다.

2.3.2. 대상시료

시중에 유통되는 축산물 (쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 우유, 계란) 및 수산물 (넙치, 우럭, 돔,

뱅장어, 바닷가재)에 대해 전국 6개 지역 (서울, 부산, 인천, 대전, 목포, 강릉)의 도매 시장 각각 2곳에서 계절별로 4회에 걸쳐 채취하였다. 두곳에서 채취한 시료는 가식부만

분쇄 혼합하여 대상검체로 240건을 조제하였으며, 분석 전까지 냉동보관 하였다. 분석방법에 따른 회수율 측정을 위하여 테트라사이클린계 항생물질을 함유하지 않은 돼지고기, 우유 및 광어에 표준물질 일정량을 첨가하여 시료로 조제하였다.

2.3.3. 실험방법

2.3.3.1. 시료 중 대상물질 추출

냉동 보관한 시료를 해동하여 다시 균질화한 후 일정량 (5 g)을 취해 20% 삼염화초산 (2 mL) 및 McIlvaine 완충액 (20 mL)을 가하여 2분간 추출하고 원심분리 (6,000 rpm, 20분간)하여 층을 분리하였다. 상등액을 취하여 여과한 후 미리 메탄올 (4 mL) 및 증류수 (4 mL)로 세척한 C₁₈ 카트리지에 흡착시키고 증류수 (4 mL)로 세척한 후 0.01M 메탄올성 수산용액 (4 mL)로 유출하였다. 유출액을 농축하고 메탄올 (2 mL)로 희석하여 시험용액으로 하였다.

2.3.3.2. 기기 분석

HPLC 컬럼은 C₁₈ (4.6 mm id, 250 mm, 5 μm)를 사용하였으며 UV의 검출파장은 365 nm 이었다. 이동상으로는 0.01M 수산과 아세트니트릴의 혼합용액을 초기 85:15에서 5분간 유지하고, 60:40로 20분간 상승하는 기울기를 사용하였다. 시료는 10 μL를 주입하였으며 유속은 1.0 mL/min이었다. 분석결과 머무름 시간에 의해 정성 확인을 하였으며 피이크 면적법에 의해 정량을 하였다.

3. 결과 및 고찰

테트라사이클린계 항생물질의 표준물질 4종 혼합액에 대한 크로마토그램은 Fig. 2와 같으며 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린, 독시사이클린의 순으로 용리되었으며 내부표준물질로 사용한 디메틸클로르테트라사이클린은 테트라사이클린과 클로르테트라사이클린의 사이에서 용리되었다.

검량선 작성을 위하여 식품 중 테트라사이클린계 항생물질 잔류허용기준의 0.5 , 1 , 2 , 4 , 8 ,

10×에 해당하는 표준물질 6개 농도범위(0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mg/kg)에서 측정 분석한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 상관계수 r^2 는 옥시테트라사이클린 0.9974, 테트라사이클린 0.9989, 클로르테트라사이클린 0.9966, 및 독시사이클린 0.9980으로 Codex에서 권장하는 $r^2 \geq 0.95$ 과 비교해도 매우 만족할 만한 수준이었다. 검출한계는 신호대 잡음비 3이상에서 옥시테트라사이클린 0.012 mg/kg, 테트라사이클린 0.009 mg/kg, 클로르테트라사이클린 0.022 mg/kg 및 독시사이클린 0.012 mg/kg로 우리나라의 식품 중 테트라사이클린계 항생물질 잔류허용기준의 범위 0.1~0.6 mg/kg를 고려할 때 만족할 만한 수준이었다.

쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 우유, 계란, 낱치, 참돔, 뱀장어, 바다가재 등 축수산 식품의 단백질과 결합되어 있는 테트라사이클린계 항생물질 4종의 신속한 동시분석을 위하여 EDTA를 함유하고 있는 McIlvaine 완충액 및 C₁₈ 카트리지를 사용한 결과 효율적으로 추출 및 정제할 수 있었다.

Codex에서 정한 규격에 의하면 잔류허용기준의 0, 0.5, 1, 및 2 갓 농도로 시료에 표준물질을 첨가하여 시험하였을 때 변이계수 CV(coefficient of variation)의 허용범위는 농도 ≤ 0.001 mg/kg인 경우 35%, 0.001 mg/kg < 농도 ≤ 0.01 mg/kg인 경우 30%, 0.01 mg/kg < 농도 ≤ 0.1 mg/kg인 경우 20%, 0.1 mg/kg < 농도인 경우 15%이며, 회수율 허용범위는 농도 ≤ 0.001 mg/kg인 경우 50~120%, 0.001 mg/kg < 농도 ≤ 0.01 mg/kg인 경우 60~120%, 0.01

mg/kg<농도≤0.1 mg/kg인 경우 70~110%, 0.1 mg/kg<농도인 경우 80~110% 이다. 따라서 분석방법의 효율을 재고하기 위하여 시중에 유통되는 돼지고기, 우유 및 광어에 표준물질을 첨가하여 회수율을 측정된 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 CV는 12~18 %이고 회수율은 71~98%로 상기의 Codex 규격에 적합한 매우 만족한 결과를 얻었다.

이와 같이 최적화한 분석방법을 식품시료에 적용한 결과 대부분의 식품시료에서 클로르테트라사이클린, 독시사이클린 및 테트라사이클린은 검출되지 않았으나, 돼지고기, 낫치 및 참돔(2시료)에서 옥시테트라사이클린이 각각 0.04 ppm, 0.17 ppm, 0.05 ppm 및 0.08 ppm 수준으로 검출되었다. 따라서 축산동물이나 수산동물의 사육 시 옥시테트라사이클린이 사용되고 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 이와 같은 결과는 항생물질 사용실태 결과와도 일치함을 알 수 있었다.¹⁹

현재 농림부에서는 축산물의 안전성 확보를 위한 축산물 위생 안전성제고 종합대책의 일환으로 사료관리법에 의한 유해사료의 범위와 기준을 개정하여 사료 내 혼합가능 동물용의약품의 종류를 53종에서 옥시테트라사이클린 염산염 등 28종을 삭제하고 25종으로 감축하였다.²⁰ 또한 삭제(제외)된 품목이 배합사료 제조 시 사용되지 않도록 정비하기 위하여 사료 내 항생물질 등 유해물질의 관리를 강화하는 유해사료의 범위와 기준 중 개정(안)을 입안예고 중에 있는데, 사료 내 혼합가능 동물용의약품의 범위에서 옥시테트라사이클린 염산염이 제외되어 있다.²¹

따라서 향후 유통식품의 안전을 확보하기 위하여, 본 연구내용인 식품 중 테트라사이클린계 항생물질 4종을 동시에 분석하는 방법은 축 수산물 식품분석에 매우 유용하게 적용할 수 있으리라 사료된다.

참고 문헌

1. 동물용의약품등편람, 한국동물약품협회, 2001.
2. The Merck Veterinary Manual (<http://merckvetmanual.com>)
3. 이장락, “동물약품해설”, 서울대학교출판부, 1991.
4. 신형태, *한국영양학회*, **7**, 53-70(1983).
5. 배합사료제조용 동물용 의약품 등 사용기준, 국립수의과학검역원 고시 제2002-6호, 2002.09.16.
6. 동물용 의약품 안전사용기준, 국립수의과학검역원 고시 제2003-4호, 2002.07.26.
7. 양식어업인을 위한 수산용약품사용안내, 국립수산과학원, 1996.
8. 식품공전, 식품의약품안전청, 2002.
9. 식품중 동물용의약품 잔류허용기준(행정간행물등록번호: 11-1470000-000532-01), 식품의약품안전청 잔류화학물질과, 2004.
10. 이선녀, 홍종기, *분석과학*, **17**, 43A-58A(2004).
11. H. Oka, Y. Ito and H. Matsumoto, *J. Chromatogr. A*, **882**, 109-133(2002).
12. S. Yang and K. Carson, *Water, Research*, **38**, 3155-3166(2004).
13. A. Cinquina, F. Long, G. Anastasi and L. Cozzani, *J. Chromatogr. A*, **987**, 227-233(2003).
14. M. Hernandez, F. Borrull and M. Calull, *Trends in Anal. Chem.*, **22**, 416-427(2003).
15. FAO/IAEA 동물용의약품잔류분석기술 훈련자료집, 국립수의과학검역원, 2004.
16. W. Moats, K. Anderson, J. Rushing and D. Wesen, *Am. J. Vet. Res.*, **56**(6), 795-800(1995).

17. J. MacNeil, V. Martz, G. Korsrud, C. Salisbury, H. Oka, R. Epstein and C. Barnes, *J. AOAC International*, **79**, 405-417(1996)
18. M. Cherlet, M. Schelkens, S. Croubels and P. Backer, *Anal. Chim. Acta.*, **492**, 199-213(2003).
19. 정석찬, “축산용 항생제 관리시스템 구축”, 국립수의과학검역원, 식품의약품안전청, 2003.
20. 유해사료의 범위와 기준중개정, 농림부 고시 제2004-72호, 2004.12.10
21. 배합사료제조용 동물용 의약품 등 사용기준 고시개정(안) 입안예고, 국립수의과학검역원 공고 제2005-116호, 2005.02.03.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-380-1674

Fax : +82+(0)2-382-4892

E-mail: mechoi@kfda.go.kr

Table 1. Maximum residue limit for tetracycline antibiotics in food¹

| Tetracycline | Species | MRL (mg/kg) | | | | |
|-------------------------|------------------|-------------|--------------------|-------------------|------------------|-----|
| | | Korea | Codex ² | Japan | USA ⁴ | EU |
| Chlortetracycline (CTC) | Cattle, Meat | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 2 | 0.1 |
| | Pigs, Liver | | 0.6 | 0.6 | 6 | 0.3 |
| | Poultry & Kidney | | 1.2 | 1.2 | 12 | 0.6 |
| | Sheep Fat | | | | 12 | |
| | Egg | | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.2 |
| | Milk | | 0.1 | 0.1 | | 0.1 |
| | Fish | | | 0.2 | | 0.1 |
| Doxycycline (DC) | Cattle, Liver | | | | | 0.3 |
| | Pigs & Kidney | | | | | 0.6 |
| | Poultry Fat | | | | | 0.3 |
| Oxytetracycline (OTC) | Cattle, Meat | 0.1 | 0.2 | 0.10 ³ | 2 | 0.1 |
| | Pigs, Liver | 0.3 | 0.6 | 0.30 ³ | 6 | 0.3 |
| | Poultry & Kidney | 0.6 | 1.2 | 0.60 ³ | 12 | 0.6 |
| | Sheep Fat | | | 0.01 ³ | 12 | |
| | Egg | 0.2 | 0.4 | | 0.4 | 0.2 |
| | Milk | 0.1 | 0.1 | | | 0.1 |

| | | | | | | | |
|----------------------|-----------|--------|------|-----|-----|-----|-----|
| | Fish | | 0.2 | 0.2 | 0.2 | | |
| Tetracycline (TC) | Cattle, | Meat | 0.25 | 0.2 | | 2 | 0.1 |
| | Pigs, | Liver | | 0.6 | | 6 | 0.3 |
| | Poultry & | Kidney | | 1.2 | | 12 | 0.6 |
| | Sheep | Fat | | | | 12 | |
| | | Egg | | 0.4 | | 0.4 | 0.2 |
| | | Milk | | 0.1 | | | 0.1 |
| | | Fish | | 0.2 | | | |

1. Reference: 식품중 동물용의약품 잔류허용기준 (식품의약품안전청, 2004)
2. Residue definition: parent drugs, singly or in combination of CTC, OTC and TC
3. Only for horse
4. Tolerances are for the sum of all approved tetracycline residues (i.e., TC, CTC, OTC)

Table 2. Calibration equations and LOD for tetracycline antibiotics

| Compounds | Calibration | r ² | LOD (mg/kg) |
|-------------------|------------------|----------------|-------------|
| Chlortetracycline | y=0.0013x-0.0124 | 0.9966 | 0.022 |
| Doxytetracycline | y=0.0026x-0.0721 | 0.9980 | 0.012 |
| Oxytetracycline | y=0.0017x+0.0454 | 0.9974 | 0.012 |
| Tetracycline | y=0.0027x-0.0377 | 0.9989 | 0.009 |

Table 3. Recoveries of tetracycline antibiotics in the spiked food samples (%)

| Food (no. of sample) | Spiked (mg/kg) | CTC | | DC | | OTC | | TC | |
|-------------------------|-------------------|------------------|-----------------|-----|----|-----|----|-----|----|
| | | Rev ¹ | CV ² | Rev | CV | Rev | CV | Rev | CV |
| Pork (6) | 0.05 | 74 | 18 | 73 | 18 | 78 | 17 | 80 | 12 |
| | 0.10 | 74 | 16 | 74 | 16 | 81 | 16 | 76 | 15 |
| | 0.20 | 96 | 14 | 95 | 14 | 95 | 14 | 82 | 14 |
| Milk (6) | 0.05 | 86 | 17 | 86 | 17 | 71 | 18 | 72 | 18 |
| | 0.10 | 98 | 15 | 86 | 15 | 73 | 16 | 73 | 16 |
| | 0.20 | 94 | 14 | 87 | 14 | 97 | 14 | 82 | 14 |
| Flatfish | 0.05 | 81 | 17 | 74 | 18 | 75 | 18 | 73 | 18 |

| | | | | | | | | | |
|-----|------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | | | 8 | | | | | |
| (6) | 0.10 | 85 | 16 | 83 | 16 | 85 | 16 | 79 | 16 |
| | 0.20 | 91 | 14 | 98 | 14 | 92 | 14 | 85 | 14 |

1. Recovery
2. Coefficient of Variation

K C I