J. Fd Hyg. Safety 18(2), 43-50 (2003)

MSPD 전처리법과 HPLC를 이용한 Furazolidone의 계란내 잔류분석

서계원 · 이재일*† · 이채용* · 이정치*
*광주광역시 보건환경 연구원, *전남대학교 수의과대학*

Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) Isolation and Liquid Chromatographic Determination of Residual Furazolidone in Eggs

Kye Won Seo, Jae Il Lee*†, Chai Yong Lee* and Jeong Chi Lee*
Health & Environment institute of Gwang-ju, Gwang ju 502-243, Korea
**College of Veterinary Medicine, Chonnam National University*

ABSTRACT − A liquid chromatographic method, using matrix solid-phase dispersion (MSPD) is developed for the extraction of residual furazolidone in chicken eggs. Blank or fortified egg samples (0.5 g) were blended with Octadecylsilyl (Bulk C_{18}, 40 μm, 18%. load, endcapped. 2 g) derivatized silica. After homogenization, C_{18}/egg and Na_2SO_4 matrix were transferred to a column made of 10 m*l* glass syringe and filter paper and compressed 4.0~4.5 m*l* volume. The column was washed with 8 m*l* of hexane and dried under N_2 gas. Furazolidone was eluted with acetonitrile (8 m*l*) under gravity. The eluate containing furazolidone was free from interfering compounds when analyzed by HPLC with UV detection (365 nm, photodiode array). Calibration curves were linear (r = 0.99985) and inter- (1.47%) and intra-assay (5.29%) variabilities for the concentration range examined (7.8~497 ng/g of eggs, 20 μ*l* injection volume) were indicative of an acceptable methodology for the analysis of furazolidone. Average recovery of furazolidone added to egg was 96.2%. The limit of detection for the proposed method was 1 ng/g for furazolidone. The method using MSPD is proposed as an alternative assay to the classical method which involves the use of large volumes of a harmful solvent and requires a long tedious separation and clean-up processes prior to its determination.

Key words: Furazolidone, Eggs, MSPD, HPLC

Nitrofuran계의 furazolidone [N-(5-nitro-2-furfurylidene-3-amino)-2-oxazolidinone]은 1957년에FDA에서 항콕시디움제로서 0.0055~0.011%농도로 사용하도록 승인되었으며, 항균성, 항원충성, 동물약품으로서 그람양성균과 그람음성균에 대해 폭넓게 사용되고 있다.[1] *Salmonella* spp, 대장균, 탄저균, *Shigella* spp, *Klebsiella*, *Micrococcus*에 대해 효과적이며, 세균 감염 치료에서부터 피부의 만성감염에 이르기까지 그 용도가 매우 다양하다.[2] 특히, 가금류에서는 전염성 간염, 가금 티푸스, 추백리에 적용되는 약물로서 가치가 매우 높으며, 또한 적절한 성장촉진과 사료전환을 위해 사료첨가제로서 사용되기도 한다.[3]

Furazolidone의 잔류문제에 대해서는 이미 선진국에서 제기되어 왔으며 미국의 USDA/FSIS(United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service)는 계란, 우유, 식육에 대해 광범위한 모니터링을 실시한 바 있다. 1995년 6월 유럽경제공동체에서는 furazolidone의 독성 및 잔류허용한계(Maximum Residue Limit; MRL), 1일 섭취허용량(Acceptable Daily Intake; ADI)을 검토한 바 있으나, FAO/WHO 합동 전문 위원회인 JECFA(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)에서 furazolidone의 유전자 독성, 돌연변이 유발 그리고 발암성을 인정하여 선진국을 중심으로 축산식품을 생산하는 동물에 사용을 규제하기 시작하였다.[4-6] 닭에서 권장량 이상 투여하였을때 침울, 운동실조, 성장지연, 극도흥분, 신경증상등의 약물중독 현상이 일어나며,[7] 계란에서는 더 이상 대사가 이루어지지 않아 10일이 경과된 후에도 계란에서 fuazolidone이 잔류될 가능성이 높다.[8] 현재 미국을 비롯한 선진국에서는 furazolidone의 축산식품을 생산하는 동물에 사용을 금지하는 단계에 이르렀다.[9]

한편, 국내에서 furazolidone은 동물들의 질병 치료와 예방을 목적으로 다양하게 사용되고 있고, 우리나라 식품공전에는 축산물 중의 잔류허용 기준이 돼지고기에서만 불검출로 설정되어 있다. 기타 축산물, 특히 계란에 대해서는 기준이

†Author to whom correspondence should be addressed.

마련되어 있지 않아 공중보건상 우려되는 바가 크다. 또한 식품공전에 furazolidone의 분석 방법이 액상추출방법으로 전처리한 후 가스크로마토그라프(GC, 검출기: ECD)를 이용하여 정량하도록 되어있다. 그러나, 외국에서는 대부분 액체크로마토그라프를 이용하여 furazolidone을 분석하고 있으며, 전처리 방법도 액상추출법(Liquid-Liquid Extraction; LLE)과 고체상 추출법(Solid Phase Extraction; SPE)을 사용하는 방법으로 보고되고있다. 액상추출법은 분액여두(funnel)를 사용하여 지용성 물질을 분리하는 방법으로 emulsion 형성, 많은 용매소비, 많은 전처리시간 소모, 시험자 개인의 오차, 불안정한 회수율 등 많은 단점이있다. Barker 등은 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 시료 고체상분산(Matrix Solid-Phase Dispersion; MSPD) 전처리법을 보고하였는데, 그 이후 이 전처리 방법은 식육,[10-13] 어육,[5] 새우,[14] 지방,[15] 우유,[3,16] 계육[17] 및 간장,[22] 등에서 유기염소계 농약[15] 테트라사이클린계열 항생제,[18] 플루오로퀴놀론 계열,[19] 니카바진,[11] 벤지미다졸,[20,21] 후라졸리돈,[3,10,14] 이버멕틴,[22] 설파제[12,25] 및 클로람페니콜[26] 등을 분리 정량하는 방법들이 널리 적용되고 있다. 이 시료 고체상 분산처리 방법은 시료와 고체상을 직접 갈아서 반응시키고 소량의 용매를 이용하여 용출하기 때문에 분석 시간과 시약을 절약할 수 있고, 시료 조작도 매우 간편하다는 장점을 가지고 있다.

이 연구는 시료 고체상 분산(MSPD) 전처리 방법을 이용하여 계란에서의 furazolidone을 추출 정제하여 HPLC로 정량분석하는 방법을 정립하고자 하였다.

재료 및 방법

표준품 및 시약

Furazolidone은 Sigma chemical Co.(USA)에서 구입하여 사용하였고, 분석에 사용한 *n*-헥산, 메탄올, 에틸아세테이트, 아세토나이트릴, 디클로로메탄, 프로파놀 및 테트라하이드로퓨란 등의 유기용매는 HPLC급 그리고 disodium EDTA, 인산(85%), oxalic acid, 무수황산나트륨(sodium sulfate anhydrous; Na_2SO_4) 등은 순수 시약급을 사용하였다.

칼럼충진제 및 활성화

Bulk C_{18}(40 μm, 18%. load, endcapped; Baker, USA)을 구입하여 2배 용량의 헥산, 디클로로메탄 그리고 메탄올 순으로 세척하여 활성화시킨 후 진공감압농축기를 이용하여 용매를 완전히 제거하고 갈색병에 담아 데시케이터에 보관하면서 사용하였다.

표준저장용액

Furazolidone 100 mg(base)을 취하여 아세토나이트릴로 100 μg/m*l*가 되도록 제조한 다음, 갈색 용량 플라스크에 넣어 냉장 보관하면서 14일간 사용하였다.

표준사용용액

아세토나이트릴로 희석하여 표준용액을 1 μg/m*l*로 만든 후 냉장보관하면서 3일간 사용하였다.

표준곡선작성

표준사용 용액을 취하여 각각 7.8, 15.5, 31.1, 62.2, 124.3, 248.5, 497 ng/g으로 제조하여 10 μ*l*씩 취한 뒤 질소를 가하면서 40°C 수조에서 농축한 다음 이동상 1 m*l*에 용해 여과시켜 20 μ*l*씩 HPLC에 주입한 다음 농도에 대한 면적비로서 표준곡선을 작성하였다.

분석조건

HPLC는 photodiode array 검출기가 장착된 Hewlett-packard, HP1090(HP 79994A HPLC chemstation)을 사용하였다. 이때의 HPLC 측정조건은 Zorbox-SB C_{18}(150×4.6 mm id, Hewlett-packard, USA) 컬럼을 사용하였고, 이동상 용매는 0.015 M H_3PO_4와 아세토나이트릴(45:55; v/v)을 whatman 0.45 μm 필터로 여과하여 사용하였으며 분석파장은 자외부 365 nm, 유속은 0.3 m*l*/min으로 하였다.

Furazolidone 용출용매선택

C_{18}과 시료의 혼합물에 1 μg/m*l*의 표준사용용액을 10 μ*l*씩 첨가하여 유리실린지에 충진한 다음 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 아세토나이트릴, 테트라하이드로퓨란, 프로파놀 및 메탄올을 각각 8 m*l*씩 용출시켰다. 각 용액을 40°C 수조에서 농축 건조하고 이동상용매 1 m*l*에 녹여 원심 후 여과하여 20 μ*l*씩 HPLC에 주입하여 표준품의 피크면적에 대한 비율을 구하였다.

용출용매에서 furazolidone의 용출양상

Furazolidone이 잔류하지 않는 계란의 난백과 난황을 homogenizer를 이용하여 교반한 다음 0.5 g을 취하여 C_{18} 2 g, 무수황산나트륨 0.5 g이에 1 μg/m*l*의 표준사용용액을 10 μ*l*씩 첨가하여 혼합한 다음 부드럽게 균질화 시킨 다음에 유리 주사기에 충진하였다. 계란 중 추출 정제 과정에 따라 정제한 후 아세토나이트릴 8 m*l*로 용출시키면서 1.0 m*l*씩의 분획을 받아 농축건조시킨 후 이동상 1 m*l*로 녹였다. 이를 HPLC에 주입한 다음, 각 분획에 대한 면적을 구하여 전체 면적합에 대한 각 분획의 비율을 구하였다(Fig. 1).

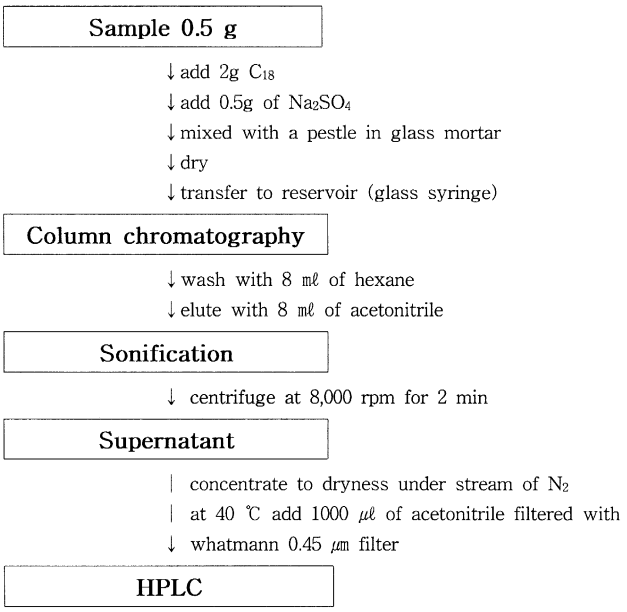

Fig. 1. Sample clean-up procedure using matrix solid-phase dispersion for the extraction of furazolidone in eggs.

계란 중 furazolidone 추출 · 정제

시판되고 있는 계란을 구입하여 예비실험을 통해 furazolidone이 잔류되지 않는 시료를 사용하였다. 추출 · 정제 방법은 Barker 등의 방법을 응용하였으며 세척용매 및 용출용매는 예비실험을 통하여 선정된 것을 사용하였다. 즉, 미리 활성화시킨 bulk C_{18} 2 g에 난백과 난황이 완전하게 혼합된 계란 0.5 g과 0.5 g 무수황산나트륨을 넣고 표준 사용액을 첨가한 다음, 유봉을 이용하여 무리한 힘을 가하지 않고 원을 그리면서 0.5~1분간 균질화시킨 다음 2~3분간 자연건조시켰다. Whatmann No. 1 거름 종이를 직경 15 mm되게 잘라 10 m*l*의 유리 주사기 밑에 밀착시켜 넣고 균질화시킨 시료 전량을 조심스럽게 부은 다음, 그 위에 같은 크기의 거름종이를 올려놓고 피스톤을 이용해 4.0~4.5 m*l*가 되도록 압착시켰다. 다시 주사기 끝에 200 μ*l* 피펫팁을 잘라서 끼우고 8 m*l*의 *n*-헥산을 중력하에서 흘려 지방을 제거하고 진공매니폴드(vaccum manifold)로 옮겨 진공을 이용해 남아있는 헥산을 완전히 제거하였다. 이 칼럼에 아세토나이트릴 8 m*l*를 넣고 중력을 이용해서 유출시켜 KD 농축수기 (20 m*l*)에 받은 다음 hood 내 40°C 수욕상에서 질소로 농축건조시켰다. 이동상 1 m*l*을 넣고 균질화 시킨 후 5분간 초음파 세척기에서 sonification 시켰으며, 균질액을 에펜돌프 튜브에 옮겨 8,000 rpm/2 min 원심분리 후 상층액을 whatmann 4.5 μm 디스크 필터로 여과하여 그 중 20 μ*l*를 HPLC에 주입하였다(Fig. 2).

자료분석

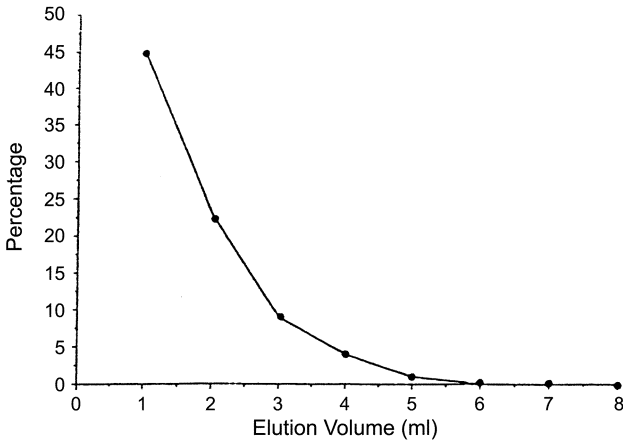

Fig. 2. The elution profile of furazolidone in eggs using matrix solid-phase dispersion extraction.

표준곡선은 각각의 농도에서 피크 면적의 평균값을 이용해 작성하였다. 회수율은 첨가시킨 시료의 피크 면적을 표준곡선식에 대입하여 농도를 구한다음 농도에 대한 백분율을 구하였는데, 각시료 농도(7.8, 15.5, 31.1, 62.2, 124.3, 248.5, 497 ng/g)에서 7개의 첨가시료에 대한 피크 면적을 표준곡선식에 대입하여 회수율을 구한 후 평균과 표준편차를 구하였다. 표준편차를 각각 평균으로 나누고 100을 곱하여 변이계수(coefficient of variation)를 구하였다. 또한, 실험간변이(interassay variability)는 각각의 농도에서 변이계수의 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험내 변이(intraassay variability)는 각각의 농도에서 7개 시료에 대한 평균값의 변이계수로 나타내었으며 Microsoft Excel로 통계처리하였다.

결 과

Furazolidone의 표준곡선

표준사용용액을 이용하여 7.8~497 ng/g되게 만든 다음, HPLC에 주입하여 얻은 각각 농도에 대한 피크 면적비를 구하고 표준곡선을 작성한 결과 furazolidone은 양호한 직선성(r=0.99985)을 나타내었다(Fig. 3).

용매추출

동일한 조건으로 C_{18}, 시료, 무수황산나트륨, 표준 사용용액의 혼합물을 충진한 6개의 주사기에 각각 아세토나이트릴, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 테트라하이드로퓨란, 메탄올, 프로판올을 8 m*l* 유출시켜 각 용매의 furazolidone 용출능력을 비교한 결과 아세토나이트릴 94.5%, 테트라하이드로퓨란 91.6%, 에틸아세테이트 77.6%, 프로판올 15.1%, 메탄올 9.2%, 디클로로메탄 6.3% 순으로 나타나 아세토나이트릴이

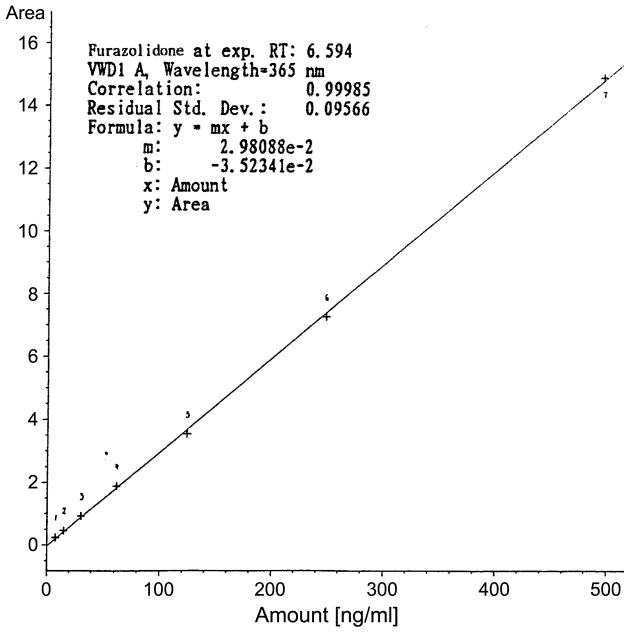

Fig. 3. Standard curve of furazolidone in the UV detection at 365 nm.

용출용매로서 가장 적합하였다(Table 1).

EDTA와 oxalic acid의 첨가시 회수율

전처리시 C_{18}/계란/무수황산나트륨에 EDTA, oxalic acid, EDTA와 oxalic acid를 각각 첨가하여 회수율을 측정하였으나 HPLC분석시 불필요한 피크만 많아질 뿐 회수율 증가에는 별로 도움이 되지않았다.

Table 1. Recovery rates of furazolidone with six different eluting solvents

Eluting solvent	Fortified amount (μg/g eggs)	Recovery rate (%) Mean±SD n=5
acetonitrile	1	94.5±0.9
tetrahydrofuran	1	91.6±1.5
ethylacetate	1	77.4±0.8
propanol	1	15.1±9.4
methanol	1	9.2±4.5
dichloromethane	1	6.3±4.3

Acetonitrile에 의한 용출양상

시료에 furazolidone을 첨가한 후 아세토나이트릴로 용출시키고 그 용출량이 5 m*l*가 되었을 때 회수율을 측정한 결과 furazolidone의 98% 이상이 용출되었다(Fig. 1). 이러한 결과를 종합하여 용출용매의 양을 8 m*l*로 정하였다.

HPLC 크로마토그램

Furazolidone의 표준사용용액을 첨가한 계란의 전처리액을 HPLC로 분석한 결과 Fig. 4와 같이 방해피크가 없는 깨끗한 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 이와 같은 과정으로 계란에 furazolidone을 7.8, 15.5, 31.1, 62.2, 124.3, 248.5, 497 ng/g을 첨가한 후 각각에 대하여 회수율을 구한 결과 90.1~103.3%의 양호한 회수율을 나타내었으며 변이계수는 1.4~16.6%이었고 실험간변이(interassay variability)는 1.47%이었으며 실험에 사용된 분석 기기와 밀접한 관계가 있는 실험내변이(intrassay variability)는 5.29%이었다(Table 2).

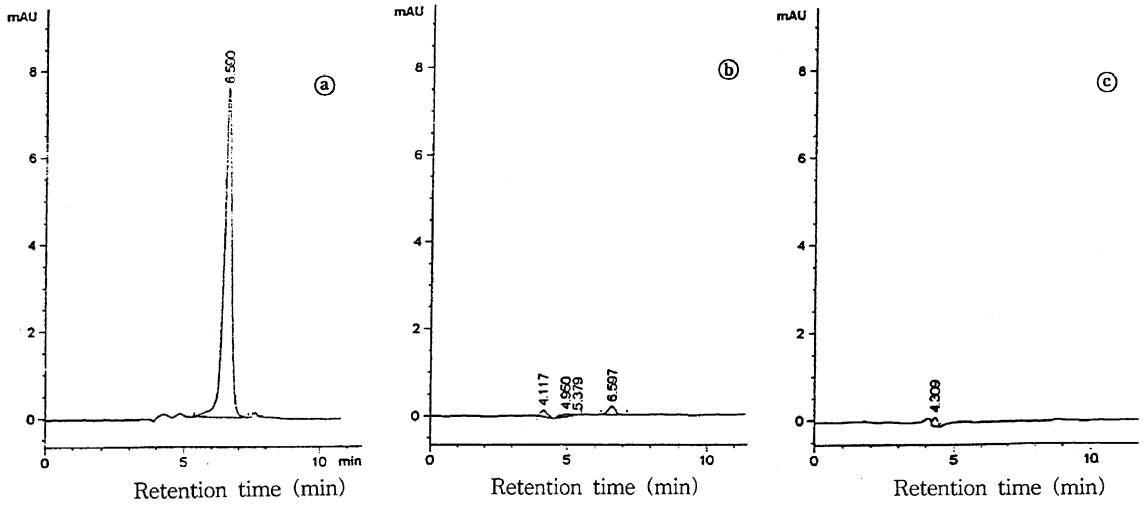

Fig. 4. Chromatograms of chicken eggs fortified with furazolidone. (a) 497 ng/g. (b) 7.8 ng/g. (c) blank. HPLC conditions: Column Zorbox-SB C18 (150×4.6 mm: id.), mobile phase : 0.015 M H_3PO_4-Acetonitrile (45:55 v/v), flow rate : 0.3 m*l*/min, detected at UV 365 nm.

Table 2. Recovery rates of furazolidone in eggs by matrix solid-phase dispersion

Furazolidone added. ng/g	Recovery (%) Mean±SD n=25	Coefficient of variation (%)
7.8	91.18±1.10	6.9
15.5	103.28±4.25	9.6
31.1	100.58±2.10	16.6
62.2	98.06±0.59	3.6
124.3	96.86±0.88	7.8
248.5	93.24±1.21	3.2
497.0	90.14±0.18	1.4
Mean recovery(SD),%	96.19 (5.09)	
Intraassay variation, %	5.29	
Interassay variation(SD), %	1.47 (1.36)	

고 찰

Furazolidone은 국내에서 소, 돼지, 닭의 질병치료에 쓰이고 있을 뿐만 아니라, 사료 첨가제로서도 널리 사용되고 있어 식육, 우유, 계란중의 잔류 가능성이 매우 높은 물질인데도 불구하고, 현재 국내에서는 furazolidone에 대한 연구가 없는 실정이다. 더욱이 국민 다소비 식품 중 하나인 계란의 연간 생산량은 1985년 315,000톤, 1995년 442,000톤으로 10년간 28.7%가 증가하였고, 세계 계란 생산량중 16위를 차지하고 있으며, 국민 1인당 계란의 연간 소비량은 1965년에 30.2개에서 1992년 178개, 일본 240개, 미국 233개로 선진국에 비하면 아직 낮은 수준이다.[30] 외국에서는 계란에 대한 잔류물질 연구가 설폰아마이드제제 계열,[31] 암프로리움,[32] 중금속,[33] 설파퀴녹살린,[34] 테트라싸이클린계열,[35] 클로람페니콜,[36] 살충제[37] 등 기타 화학적 첨가물에 이르기까지 다양하게 진행되고있다.[38]

또한 계란 중 furazolidone 전처리법으로 외국에서는 액상추출법[7,25,29]과 1970년 초에 개발된 SPE법[1,28]이 보고되고 있으며, 액상추출법은 아세토나이트릴, 헥산, 디크로르메탄 등을 사용하여 추출하고, 정제과정으로서 컬럼속에 플로리실을 충진한 다음, 벤젠으로 용출시키는 전처리방법이다. 우리나라의 식품공전에 따라 돈육 중 furazolidone을 검출하기 위한 액상추출법으로 전처리하였을 경우 1회 분석시 유기용매량이 1,300 m*l*, 무수황산나트륨 300 g 정도가 소요되며 전처리 과정에서 pH조절이 요구되어진다. 또한 SPE(solid phase extraction) 방법은 추출용매로 추출한 후 카트리지를 이용해 정제하는 방법인데, 이 방법도 유기용매가 많이 소요되고 조작이 번거로우며 시료 전처리 시간이 많이 소요되고 시험 용액 제조시 활성 알루미나, 플로리실 등과 같은 흡착제나 C_{18} 카트리지 등을 이용한 정제과정이 있어 분석자 와 카트리지의 제품 성능 차이에서 나타나는 회수율의 변화가 발생할 수 있다.

이러한 단점을 극복하기 위해서 Barker 등은 시료와 고정상을 직접 갈아서 유리주사기에 packing하고 지방을 제거한 후 적절한 용출 용매로 대상 성분을 추출하는 MSPD 방법을 보고하였다.[39] 이 실험에서는 이 방법을 응용하여, 계란중의 furazolidone을 효과적으로 분석하였다. 즉, 2.0 g의 C_{18}, 0.5 g의 시료와 0.5 g 무수황산나트륨을 혼합하여 유발에서 균질화 시켰는데, 이때 계란 중에 함유되어 있는 수분량이 74%나 되어 이것을 효과적으로 제거하기 위하여 최적량인 0.5 g의 무수황산나트륨을 첨가하였으며, 이 방법을 수분이 많이 함유되는 우유류 등에 적용한다면 높은 회수율을 기대할 수 있으리라 생각된다. MSPD 방법을 이론적인 측면에서 살펴보면, 시료와 C_{18}간의 반응면적이 약 1,000 m^2에 해당될 만큼 클 뿐만 아니라 여기에 혼합시 가해지는 기계적인 힘과 소수성 힘이 합쳐져 시료와 C_{18}이 매우 친밀하게 반응하게 되며, 지방이나 비극성 물질은 비극성인 C_{18}에 붙고, 단백질과 같은 극성 물질은 C_{18}의 말단에 노출된다는 원리를 이용한 시료 전처리 방법이다. 따라서 이 방법은 세척용매와 용출용매만 알맞게 선택해 준다면 시료 전처리 과정이 매우 간단하고 회수율이 높을 뿐만 아니라 시간이 짧게 소요되므로 시료를 간편하게 분석할 수 있다.

Furazolidone은 HPLC의 자외부 검출기를 이용하여 측정하는데 365 nm에서 최대의 흡광도를 가지고 있으며, 7.8~495 ng/g 농도의 범위에서 양호한 직선상 (r=0.99998)을 나타내었다(Fig. 3). MSPD 전처리시 6종류의 용출 용매를 이용하여 각각의 회수율을 측정한 결과 아세토나이트릴 95%, 테트라하이드로퓨란 92%, 에칠아세테이트 77.6%, 프로판올 15.1%, 메탄올 9.2%, 디클로르메탄올 6.3% 순으로 나타나 용출용매는 아세토나이트릴로 정하였으며, 용출되는 양은 5 m*l* 이전에 98%이상의 furazolidone이 용출되었기에 8 m*l*로 정하였다(Fig. 1). 이런 전처리과정은 모두 후드 내에서 수행되어졌으나, 테트라하이드로퓨란의 경우에는 특유의 악취로 인한 불편함이 있었고 에칠아세테이트와 프로판올은 질소 가스에 잘 농축되지 않는 단점이 있었다.

C_{18}과 시료로 충진된 칼럼에서 furazolidone을 아세토나이트릴로 용출시켜 40°C 수욕상태에서 질소 가스로 완전하게 농축시키게 되면 노란색의 물질이 20 m*l* KD 농축수기의 바닥에 남게 되는데, 그것은 계란 노른자에 함유되어 있는 카로틴노이드($C_{40}H_{56}$)에 속하는 색소로서 보통 3~89 mg/kg 정도가 함유되어 있는 것으로 되어있다. 이를 확인하기 위해서 식품첨가물공전 β-카로틴의 확인시험법을 이용하여 클로르포름 10 m*l*에 녹였더니 등색을 나타내었고, 그 액에 다시 삼염화 안티몬시액 1 m*l*를 가하면 녹청색으로 변하여

이 물질이 카로티노이드임을 확인할 수 있었다. 그 주요한 색소들은 루테인(Lutein), 제아잔신(Zeaxanthin), 크립토잔신(Cryptoxanthin) 등으로서, 아세토나이트릴에 쉽게 녹아 용출되었다. 그러나, MSPD 방법을 이용하여 전처리한후 HPLC로 분석한 결과 Fig. 4에서 보는 것과 같이 깨끗한 크로마토그램을 얻을 수 있어 이 색소들이 분석에 방해가 되지는 않았다.

액상추출 전처리 방법에서 회수율은 Wilhelm 등[7] 이 계란에서 86%였으며, 최저 검출한계는 15 ng/g이었다. Botsoglou[25]의 계란에서 액상추출 전처리법 회수율은 92.9%였으며, 최저 검출한계는 1 ng/g이었다. 石井里枝 등[29]은 계란을 대상으로 한 보고에서 80.3% 회수율을 보였으며, 최저 검출 한계는 0.05 μg/g이었다. SPE(solid phase extraction)에 의한 腹巻ゆかり 등[28]이 계란과 돼지 신장에서 Sep-pakTk Alumina N 카트리지를 사용한 경우 회수율은 각각 93%, 75%이었으며, Yoshda 등의 SPE 카트리지 Extrelut-3를 돼지 혈액과 계란에 사용한 경우는 각각 87.2%, 87.0%이었으며, 최저 검출 한계는 각각 0.05~5 μg/kg, 0.1~1 μg/kg이었다.

계란 중 잔류 furazolidone을 MSPD 전처리한 후 HPLC/UV 분석하는 방법이 분석법으로서의 적합한가를 조사하기 위해 대조시료에 농도별 첨가 시료(7.8, 15.5 31.1, 62.2, 124.3, 248.5 및 497 ng/g)를 제조하여 분석한 결과 전체 분석 농도 범위에서 furazolidone의 평균 회수율과 표준편차가 각각 96.2, 5.09%로 매우 우수하였다. 이 실험에서의 실험간 변이(Interassay variability)와 표준편차는 각각 1.47%와 1.36%로 우수하였고 분석기기와 관계가 있는 실험내 변이(intraassay variability)는 5.29%로 양호하였으며, 최저 검출 한계는 1 ng/g이었다.

따라서 MSPD 전처리 방법을 이용한 furazolidone의 계란내 잔류분석은 소량(0.5 g)의 시료로도 실험이 가능하고, 시료 전처리 단계가 간단하여 전처리시간이 절약될 뿐만아니라 적은 양의 유기용매(8 m*l*)를 사용하기 때문에 기존의 액상추출법이나 고상추출법(solid phase extraction)과 비교해 매우 간편하고 경제적인 방법이다. 이러한 장점 때문에 이 방법은 기존의 분석법을 대체하는 효과가 있을 뿐만아니라 많은 수의 시료에 대하여 furazolidone의 계란내 잔류여부를 신속하게 분석할 수 있는 효과적인 방법이 될 것으로 생각된다.

결 론

계란 중에 잔류되는 furazolidone을 시료 고체상분산(MSPD) 전처리법을 이용하여 추출하고 자외부 검출기를 이용한 액체 크로마토그래피법으로 정량 분석 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Acetonitrile이 C_{18}/계란/무수황산나트륨으로부터 furazolidone을 가장 우수하게 용출시켰다.
2. 0.5 g 무수황산나트륨(sodium sulfate anhydrous; Na_2SO_4) 첨가는 수분을 효과적으로 제거하였다.
3. Furazolidone은 자외부 검출기에 대하여 양호한 반응성을 나타냈으며, 각각의 농도별 표준곡선도 양호한 직선상(r=0.99998)을 나타내었다.
4. 계란중에서 furazolidone의 평균회수율과 표준편차는 첨가농도(7.8, 15.5, 31.1, 62.2, 124.3, 248.5, 497 ng/g) 범위에서 각각 96.2%와 5.09%이었으며, 실험내변이(intra-assay variability)는 5.29%로 우수하였다.
5. 계란 중에서 furazolidone 검출한계는 1 ng/g이었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 계란중 furazolidone의 분석시 시료 고체상분산 처리법(MSPD)에 의한 전처리 및 HPLC/UV 분석법은 기존의 방법을 대체할 수 있는 방법으로 생각되며, 전처리시간이 매우 짧고 조작이 간단하여 다수의 시료에서 신속하게 furazolidone을 분석하는 방법으로 편리하게 이용될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Kenichi Yoshida, Fusao Kondo: Liquid chromatographic determination of furazolidone in swine serum and avian egg. *J AOAC,* **78**, 1126-1129, 1995.
2. Alicia Valadez-Salazar, Hector Guiscafre-Gallardo, *et al.*: Detection of furazolidone in human biological fluids by high performance liquid chromatography. *J Antimicrobial Chemotheraphy,* **23**, 589-595, 1989.
3. Long, A.R., Hsien, L.C., Malbrough, M.S. *et al.*: Method for the isolation and liquid chromatographic determination furazolidone in milk. *J Agric Food Chem.,* **38**, 430-432, 1990.
4. Vroomen, L.H.M., Berghmans, M.C.J., and Vanderstruijs T. D. B.: Determination of furazolidones in swine plasma, muscle, liver, kidney, fat and based on high-performance liquid chromatographic separation after solid-phase extraction on Extrelut^{R}1. *J Chromatography,* **362**, 141-145, 1986.
5. McCracken, R.J. and Kennedy, D.G.: Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland. *J Chromatography B,* **169**, 87-94, 1997.
6. Germain Cargiman, Agnes I. MacIntosh, Stephen Saved: An assay for furazolidone residues by liquid chromatography with electrochemical detection applicable to depletion studies in pigs. *J Agric Food Chem.,* **38**, 716-720, 1990.

7. Calnek, B.W.: Diseases of poultry. Iowa State Uuniversity Press, Ames, Iowa: 979-981, 1997.
8. Wilhelmus, M.J.B. and Marinus, M.L.A.: Determination of furazolidones in eggs by HPLC followed by confirmation with a diode-array UV/Vis detector. *Z Lebenson Unters Forsch,* **180**, 211-214, 1985.
9. Parks, O.W. and Kubena, L.F.: Liquid chromatography-electrochemical detection of furazolidone and metabolite in extracts of incurred tissues. *J AOAC,* **73**, 526-528, 1990.
10. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S. *et al.*: Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of furazolidone in pork muscle tissue. *J AOAC,* **74**, 292-294, 1991.
11. Schenck, F.J., Barker, S.A., Long, A.R., *et al.*: Matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of nicarbazin in chicken tissue. *J. AOAC,* **75**, 659-662, 1992.
12. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., *et al.*: Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of sulfadimethoxine in catfish (Ictalurus punctatus) muscle tissue. *J. AOAC,* **73**, 868-871, 1990.
13. Boulaire, S.L., Bauduret, J.C., and Andre. F.: Veterinary drug residues survey in meat: An HPLC method with a matrix solid phase dispersion extraction. *J. Agri Food Chem.,* **45**, 2134-2142, 1997.
14. Stehly, G.R., Plakas, S.M., and Elsaid, K.R.: Liquid chromatographic determination of furazolidone in shrimp. *J. AOAC,* **77**, 901-904, 1994.
15. Long, A.R., Soliman, M.M., Barker, S.A., *et al.*: Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic screening of nine chlorinated pesticides in beef fat. *J. AOAC,* **74**, 493-496, 1991.
16. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., *et al.*: Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) Isolation and liquid chromatographic determination of oxgtetracycline, tetracycline and chlortetracycline in milk. *J. AOAC,* 73:379-384, 1990.
17. 田村 博, 世取山寸, 黒崎かな子: 실리카케ルを用りたマトリツクス固相分散法と高速液本クロマトグうフィ?による畜産食品中の サルファ劑の定量. 食偉誌, **35**, 271-275, 1994.
18. Walsh, J.R., Walker, L.V., *et al.*: Determination of tetracyclines in bovine and porcine muscle by high-performance liquid chromatography using solid phase extraction. *J. Chromatography,* **596**, 211-216, 1992.
19. Kang, H.G., Son, S.W., Lee, H.S., *et al.*: Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) extraction and HPLC determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pork muscle tissue. *Korean J. vet Res.,* **37**, 195-202, 1997.
20. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., *et al.*: Multiresidue method for isolation and liquid chromatographic determination of seven benzimidazole antihelminthics in milk. *J. AOAC,* **72**, 739-741, 1989.
21. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrough, M.S., *et al.*: Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of five benzimidazole antihelminthics in fortified beef liver. *J. AOAC,* **73**, 860-867, 1990.
22. Schenck, F.J., Barker, S.A., and Long, A.R.: Matrix solid phase dispersion extraction and liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine liver tissue. *J. AOAC,* **75**, 655-658, 1992.
25. Botsoglou, N.A.: Determination of furazolidone in eggs by high-performance liquid chromatography. *J. Agric Food Chem.,* **36**, 1224-1227, 1988.
26. Le Boulaire, S., Bauduret, J.C., and Andre, F.: Veterinary drug residues survey in meat: an HPLC method with a matrix solid phase dispersion extraction. *J. Agric Food Chem.,* **45**, 2134-2142, 1997.
28. 腹巻ゆかり, 反田工省三: 固相抽出法と HPLC による畜水産物中の 合成抗菌劑の一齊分析. 食偉誌, **35**, 262-270, 1994.
29. 石井里枝, 堀江正一, 星野庸二: フォトダイオ?ドアレイ檢出器付高速液本クロマトグラフィ一を用いた畜水産物中の殘留抗菌性物質の一齊分析法. 食偉誌, **35**, 173-179, 1994.
30. Watt poultry statistical year book 1996. BSc, TE. 35. poultry international. 1996.
31. Agarwal, V.K.: High-performance liquid cromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs. *J. Chromatography,* **624**, 411-423, 1992.
32. Leeuwen, W.V. and Gend, H.W.: Determination of amprolium in egg yolk and muscle tissue (chicken) by HPLC with post-column reaction and fluorometric detection, using on-line sample clean-up and pre-concentration steps. *Z Lebnsm Unters Forsch.,* **186,** 500-504, 1998.
33. Jeng, S.L. and Yang, C.P.: Determination of lead, cadmium, mercury, and copper concentrations in duck eggs in Taiwan. *Poultry Science,* **74**, 187-193, 1995.
34. Furusawa, N., Tsuzukida, Y., and Yamaguchi, H.: Decreasing profile of residual sulphaquinoxaline in eggs. *British Poultry Science,* **39**, 241-244, 1998.
35. Croubels, S.M., Vanoosthuyze, K.E.I., and Peteghem, C.H.V.: Use of metal chelate affinity chromatography and membrane-based ion-exchange as clean-up procedure for trace residue analysis of tetracyclines in animal tissues and egg. *J. Chromatography B,* **690**, 173-179, 1997.
36. Samouris, B., Nathanael, B., Tsoukali, P.H., *et al.*: Determination of chlorampenicol residues in eggs by high performance liquid chromatography (HPLC). *Vet Human Toxicol.,* **35**, 406-409, 1993.
37. Pouliquen, H., Fauconnet, V., Morvan, M.L., *et al.*: Determination of warfarin in the yolk and the white of hens'

eggs by reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatography B,* **702**, 143-148, 1997.

38. Blanchflower, W.J. and Kennedy, D.G.: Determination of monensin, salinomycin and narasin in mulscle, liver and eggs from domestic fowl using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatography B,* **675(2)**, 225-233, 1996.
39. Barker SA, Long AR, Short CR : A new approach to tissue residues analysis. Proceedings of the six biennial symposium of the american academy of veterinary pharmacology and therapeutics, Blacksburg, VA, 1988.