Journal of Food Hygiene and Safety 9(1), 37-42(1994)

HPLC에 의한 식육조직중의 잔류 설파제 동시 분석

강 희 곤
서울시보건환경연구원

Simultaneous Determination of Residual Sulfonamides in Meat Tissues by High Performance Liquid Chromatography

Hee-Gon Kang
Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment

ABSTRACT-Four sulfoanmides ; sulfamerazine, sulfamethazine, sulfathiazole and sulfadimethoxine from muscle, kindney, liver and heart tissues of pork and chicken by LC. Residual sulfonamides were extracted with dichloromethane and determined on a Sperisorb ODS-1 column(250 mm×4.6 mm id) with acetonitrile/water/acetic acid (30/70/0.3 v/v) as a mobile phase at 260 nm. Recoveries from 4 tissues of pork and chicken samples fortified with 50 and 100 ppb were 71.2~87.2% and 73.7~89.6%, respectively. The detection limit was 0.03 μg/g in each drug. Sulfamethazine in 5 samples, sulfathiazole in 2 samples and sulfadimethoxine in 1 sample were detected from 30 samples of pork. And sulfadimethoxine in 5 samples and sulfamethazine in 3 samples were also detected from 41 samples of chicken. The order of residue levels of sulfonamides in tissues was kidney>liver>heart>muscle, respectively. The residue levels of sulfonamides from kidney and liver were 0.03~0.15 μg/g in porks and 0.03~0.10 μg/g in chickens.

家畜疾病 様相의 變化 및 酪農經營의 大型化에 따라 飼料에 添加되고 있는 動物用 醫藥品에 대한 의존도는 높아지고 있다. 이중 설파제는 抗菌範圍가 특이하고 組織移行性이 他 藥品에 비하여 우수하기 때문에 全世界的으로 널리 사용되고 있어 組織중에 殘留할 가능성이 큰 藥劑에 속한다.[1]

FAO / WHO 食品規格委員會에서는 1986년에 殘留動物用藥品規格部會를 설치하고 抗菌性 物質에 대한 殘留基準을 설정하는 작업을 진행하고 있다, 日本에서도 1991년 부터 抗菌性物質의 無殘留規制에 대한 수정 조치가 진행되고 있다.[2] 우리나라에서도 '90년 12월 保社部에서 合成抗菌劑(18種)에 대한 HPLC를 利用한 분석법[3]을 設定하여 牛, 豚, 鷄肉 中의 殘留物質을 規制하고 있다.

설파제의 경우 最近 많은 學者들에 의하여 Enzyme Immunoassay法[4]와 GC를 利用한 分析方法[5]이 보고되어 있으나 일반적으로 HPLC를 利用한 분석법이 널리 쓰이고 있다.[6-14]

本報에서는 家畜의 疾病豫防 및 成長促進 目的 등으로 널리 사용되고 있는 설파제를 중심으로 豚, 鷄 組織에 따라 殘留하고 있는 4종의 설파제를 組織別(근육, 신장, 심장, 간장)로 分析하여 약간의 知見을 얻었기에 報告하고자 한다.

實驗 材料 및 方法

供試材料

1993년 5월부터 12월 사이에 全國 各地域에서 서울地域의 축협공판장과 우성 도축장으로 流入되는 豚 30頭의 試料를 部位別(근육, 신장, 심장, 간장)로 採取하였고, 鷄는 서울 성동구 관내에 위치한 한국 브로일로 처리장으로 반입되는 鷄 41首를 部位別(근

육, 신장, 심장, 간장)로 採取한 後 냉장 보관하여 實驗室로 迅速 운반하여 −25℃ 이하에서 冷凍保管하면서 10일이내에 供試試料로 使用하였다.

試 藥

본 실험에서는 dichloromethane은 Wako, acetonitrile, hexane은 Fisher, sulfamemazine, sulfathiazole, sulfamethazine, sulfadimethoxine은 Sigma, sodium sulfate anhydrous, sodium chloride등은 Kanto 제품을 사용하였다.

標準溶液의 조제 : sulfamerazine, sulfathiazole, sulfamethazine, sulfadimethoxine의 標準品 100mg을 정확히 秤量하고 acetonitrile 100mℓ로 溶解하여 표준원액으로 사용하였다. 이 溶液을 acetonitrile로 稀釋하여 0.01~1 μg/mℓ 濃度로 調製하여 회수율 측정과 HPLC분석시 표준용액으로 사용하였다.

機 器

본 실험에서는 HPLC(Spectraphysics P-2000), Centrifuge(Hanil Industrial Co., HRT-5000IV), Ultrasonicator(Cole-Parmer, 8854), Rotaevaporator(Switerzland Buch, 461), Vertical shaker(Sugiyamagen Environmental Science Co.), Vortex Mixer(Thermolyne, 3760), Tissue grinder(Gold Star, GPM-1018), Integrator(Spectraphysics SP-4600)등을 사용하였다.

HPLC 條件

column : Spherisorb ODS-1 5μ(250mm×4.6mm), mobile phase : acetonitrile : water : acetic acid(30 : 70 : 0.3 v/v), flow rate : 1 mℓ/min, detector : 260nm at UV, chart speed : 0.5cm/min, injection volumn : 20 μℓ. mobile phase는 注入後 8분까지는 acetonitrile : water : acetic acid(30 : 70 : 0.3 v/v)을 사용하였으며 이후는 70 : 30 : 0.3으로 gradient하여 사용하였다.

試驗溶液 調製

合成抗菌劑는 抽出時 光照射, 空氣酸化, 酸, 鹽基等에 의하여 쉽게 分解[18]되기 때문에 可能한 簡便하고 迅速한 試驗을 위해서 dichlromethane 抽出法[19-22]을 活用하여 同時 抽出하였다. 즉, 各 部位別 組織은 Grinder mixer로 갈아 잘 混合하고 3~5g을 원심분리용 갈색유리 원침관에 秤量하여 10% sodium chloride solution 10 mℓ, dichloromethane 20 mℓ를 가하여 초음파추출기로 10분간 抽出후에 원심분리기로 10분간 3000 rpm으로 분리하였다. dichloromethane층을 증류후라스크에 옮기고 다시 원침관에 dichloromethane 20 mℓ를 가하여 上記 過程에 따라 추출후 증류후라스크에 합하여 40℃에서 감압 농축하였다. Hexane 20 mℓ와 물 20 mℓ 사용하여 분액여두에 옮긴 후 10분간 진탕하여 水層을 별도의 분액여두에 옮기고 dichloromethane 20 mℓ로 2回씩 10분간 抽出後 dichloromethane층을 여과(무수황산나트륨 10g을 glass wool로 막은 깔대기에 가함)하여 탈수 처리하였다. 여액을 감압농축한 다음 잔유물에 이동상 1 mℓ을 가하고 Vortex mixer상에서 2분정도 진탕 용해한 후 試驗溶液으로 使用하였다.

각 설파제의 회수율을 측정하기 위하여 조직 시료에 0.1~1.0 ppm되게 표준액을 첨가하여 위에서와 같은 방법으로 추출하였다.

Fig. 1과 Fig. 2는 上記 前處理 過程을 거쳐 調製된 豚, 鷄肉시료에 대한 空試驗과 抗菌劑를 添加한 후의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

檢量線 作成

標準溶液을 25, 50, 및 100 ng/mℓ으로 稀釋調製하여 20 μℓ를 HPLC에 注入하여 算出된 peak area로 檢量線을 作成하였다.

結果 및 考察

試料前處理 抽出法으로는 chloroform[10], aceton-chloroform[15], acetonitrile[8,17,18,20], ethylacetate[16] 等을 利用하고 있으나 ODS cartridge column, Sep-Pack cartrige 等을 使用하여 clean up을 竝行하여야 하는 試驗過程의 煩雜으로 處理時間과 費用이 많이 소요된다.

따라서 본 실험에서는 비교적 간편한 추출법에 속

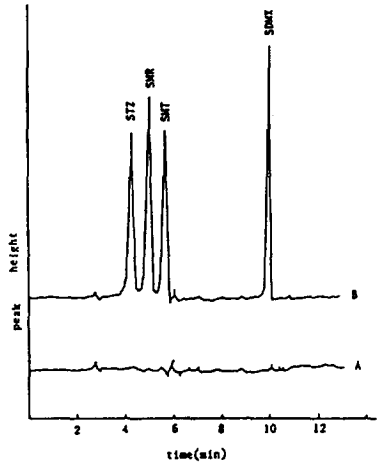

Fig. 1 Chromatogram of (A) blank pork muscle tissue, (B) blank pork muscle tissue spiked with 50 ppb sulfonamides. Sulfathiazole(STZ), sulfamerazine(SMR), sulfamethazine(SMT), sulfadimethoxine(SDMX)

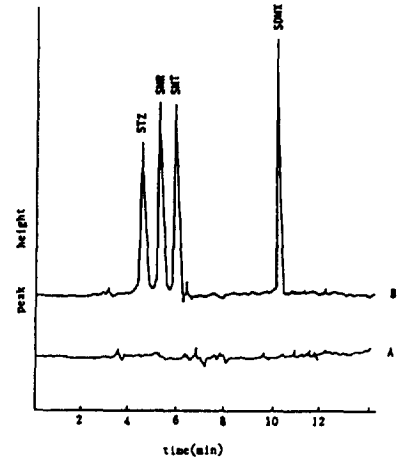

Fig. 2 Chromatogram of (A) blank chicken muscle tissue, (B) blank chicken muscle tissue spiked with 50 ppb sulfonamides.

Table 1. Recoveries of sulfonamides from spiked pork tissues

Drugs	Amount added (ppb)	Recovery[a] (%)			
		Muscle	Kidney	Liver	Heart
STZ	50	80.6±5.4	73.7±4.8	83.2±4.3	77.8±3.8
	100	82.5±3.6	71.2±4.2	80.7±3.6	79.2±3.5
SMR	50	81.5±3.3	75.4±2.9	80.9±1.3	82.1±3.2
	100	80.9±4.3	76.6±3.7	82.3±2.9	80.7±4.1
SMT	50	85.2±4.0	80.1±3.7	85.4±3.4	84.3±5.2
	100	87.0±2.5	79.4±2.7	83.5±4.6	82.6±4.2
SDMX	50	85.7±3.5	80.5±2.0	87.1±5.7	83.3±2.5
	100	87.2±3.9	82.1±2.9	85.7±3.1	85.9±4.7

[a] Mean±SD(n=3)

Table 2. Recoveries of sulfonamides from spiked chicken tissues

Drugs	Amount added (ppb)	Recovery[a] (%)			
		Muscle	Kidney	Liver	Heart
STZ	50	82.4±3.8	73.8±4.0	82.7±4.7	85.2±3.0
	100	81.7±4.1	75.2±3.5	81.2±3.5	82.4±2.7
SMR	50	84.1±2.7	80.2±3.5	81.2±5.0	81.2±4.3
	100	81.5±2.9	78.7±4.1	84.5±2.2	83.6±3.6
SMT	50	87.3±4.1	83.1±4.7	85.2±3.8	84.3±2.6
	100	87.8±3.6	80.7±3.2	89.1±5.1	82.1±4.4
SDMX	50	89.6±4.3	82.6±2.5	86.3±2.4	85.1±3.8
	100	82.1±2.4	79.9±4.7	88.4±4.5	80.5±3.9

[a] Mean±SD(n=3)

Table 3. Residue levels(μg/g) of sulfonamides in pork and chicken tissues

Sample	Tissue	S T Z	S M T	S D M X	S M R
		Residue level	Residue level	Residue level	Residue level
pork (n=30)	Muscle	0.07(1)*	0.04~0.09(3)	ND[a]	ND
	Kidney	0.05~0.15(2)	0.07~0.14(5, 3[b])	0.09 (1)	ND
	Liver	0.03~0.09(2)	0.05~0.11(5, 1[b])	0.06 (1)	ND
	Heart	0.08(2)	0.06~0.09(4)	0.06 (1)	ND
chicken (n=41)	Muscle	ND	0.03~0.07(2)	0.05~0.08(3)	ND
	Kidney	ND	0.05~0.16(3, 2[b])	0.03~0.14(5, 2[b])	ND
	Liver	ND	0.05~0.09(3)	0.05~0.13(5, 1[b])	ND
	Heart	ND	0.03~0.06(3)	0.05~0.12(5, 1[b])	ND

[a] None Detected, [b] No. of samples which exceed tolerance(0.1μg/g)
*Numbers in parentheses indicate detected sample number.

하는 dichloromethane 추출법을 사용하여 각 설파제의 회수율을 측정하고 조직중에 잔류량을 조사하였다.

豚, 鷄肉의 部位別 試料를 取하여 표준용액을 添加하여 試驗溶液 調製過程에 따라 回收率 3回 측정한 結果는 Table 1와 Table 2과 같다. Table 1의 나타난 豚 組織中 sulfamethazine를 添加한 근육과 신장의 回收率은 50 ppb의 경우 85.2±4.0%와 80.1±3.7%, 100 ppb의 경우 80.1±2.5%와 79.4±2.7%로서 Nel Haagsma등[22]의 回收率 50 ppb의 경우 각각 92%와 86%, 100 ppb의 경우 각각 78%와 81% 그리고 정 等[17]이 報告한 回收率과 유사하였다. 各 部位중 신장에서 抗菌劑 回收率은 他部位에 比하여 낮게 나타났다. Table 2의 鷄 部位別 組織에서 回收率 73.8~89.6%로 豚 部位別 組織의 回收率과 비슷한 경향을 보이고 있다.

豚 30頭, 鷄 41首에 대한 部位別 組織에 대한 殘留抗菌劑에 分析결과는 Table 3와 같다. 豚 30 檢體中 sulfathiazole이 신장과 간장조직에서 各 2件(6.7%), 근육과 심장조직에서 各 1件(3.3%)이 檢出되었다. 檢出濃度는 근육에서는 0.07μg/g으로 적은 量이 檢出되었지만 sulfathiazole은 許用外 抗菌劑로서 飼育農家에서 임의로 사용한 것으로 생각된다.

豚 組織에서 가장 많이 殘留되고 있는 抗菌劑는 sulfamethazine으로 신장과 간장에서 5件(16.7%)이 檢出되었고, 근육 3件(10%)이 檢出되었으며, 檢出濃度는 0.04~0.08μg/g으로 殘留量은 許容基準値(0.1μg/g) 以內로 나타났다. 이 濃度는 Masakazu Horie等[16]이 1990년에 報告한 日本 輸入 豚肉의 檢出濃度 0.05~1.05μg/g과 비슷하게 나타났다. sulfadimethoxine은 신장, 간장, 심장 組織에서 낮은 濃度로 1件이 檢出되었고, 豚 30頭의 檢體에서 sulfamerazine은 1件도 檢出되지 않았다.

鷄 組織에서는 41檢體中 sulfamethazine이 筋肉에서 2件, 신장, 간장, 심장에서 各 3件(7.3%)이 檢出되었다. 신장에서의 檢出濃度範圍는 0.05~0.16μg/g였으며, 他組織보다 다소 높게 나타났다. sulfadimethoxine은 신장, 간장, 심장에서 各 5件(12.2%)이 檢出되었고 檢出濃度는 0.03~0.14μg/g범위로 나타났다.

豚과 鷄肉의 主可食部位인 근육 시료 70件에서는 1件도 許容基準을 초과하지 않았다. 豚과 鷄肉 組織에서 殘留되는 量은 신장>간장>심장>근육 順이었으며, 신장 檢體中에서 肉의 許容基準値를 초과한 檢體는 8件으로 나타났다. 신장과 간장등에서 다소 높게 檢出된 要因은 農場에서 使用하는 汚染 容器間의 相互汚染과 시설물의 청결 미비로 인한 汚染, 休藥期間 미준수, 용기에 쉽게 부착되는 溶解性 粉末藥劑 使用등으로 생각된다.

安全한 畜產食品 生產을 위한 畜產物의 殘留抗菌

劑 管理를 위해서는 養豚과 養鷄 農家 등을 선정하여 그곳에서 使用하고 있는 飼料와 生産된 畜肉을 주기적으로 採取하여 殘留抗菌劑에 대한 monitoring 檢査를 實施하고 生産農家들이 規定事項에 대한 준수이행 여부를 確認하는데 적극 參與하여야 될 것으로 생각된다.

국문 요약

서울지역의 도축장 및 브로일러 처리장으로 반입된 豚 30頭, 鷄 41首의 組織部位別(근육, 신장, 간장, 심장)로 채취하여 널리 사용되고 있는 合成抗菌劑인 sulfamemazine, sulfamethazine, sulfathiazole, sulfadimethoxine을 中心으로 分析하였다.

試料前處理는 dichloromethane으로 抽出하였고 분리용 column은 Spherisorb ODS-1 5μ(250 mm ×4.6 mm), 移動相은 acetonitrile : water : acetic acid(70 : 30 : 0.3)를 使用하고, 流速은 1.0 ㎖/min, 檢出波長은 260 nm를 使用하여 HPLC로 설파제를 검출하였다.

豚肉과 鷄肉 部位에 50, 100 ppb를 添加한 合成抗菌劑 回收率은 71.2~87.2%, 73.7~89.6% 범위로 나타났으며, 檢出限界는 0.03 μg/g까지 檢出이 可能하였다.

豚, 鷄肉의 殘留量檢査結果 豚 30檢體中 sulfamethazine 使用이 5件(16.6%), sulfathiazole 2件(6.7%), sulfadimethoxine 1件(3.3%)이었고, 鷄肉에서는 sulfadimethoxine 5件(12.2%), sulfamethazine이 3件(7.3%)이 檢出되었다. 근육조직에 殘留된 抗菌劑 檢出量은 0.04~0.08 μg/g이었다.

部位別 抗菌劑 殘留量은 신장>간장>심장>근육 順으로 나타났다. 신장과 간장 부위의 殘留量은 豚肉이 0.03~0.15 μg/g, 鷄肉이 0.03~0.10 μg/g 範圍로 나타났다.

참고 문헌

1. Bloomfieled, G. : Veterinary Drug Residues, 2 (1990).
2. 한국식품공업협회 : 식육햄 소시지의 유해 분석, 63~97. 1993.
3. 保健社會部 : 食品公典, 일지문화사, 548~568 (1992).
4. Dixon-Holland, D.E. and Katz, S.E. : Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1137~1140 (1988).
5. Matusik, J.E. : Confirmation of identity by gas chromatography/Tandemn mass spectrometry of sulfathiazol sulfamethazine, sulfachloropyridazine amd sulfadimethoxine from bovine or swine liver extracts after quantitation by gas chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73** (1990).
6. Takeda, M. and Akiyama, Y. : Precolumn derivatization of sulfa drugs with fluoresamine and high performance liquid chromatographic determination at their residual levels in meat and meat products. *J. chromatogr.*, **558**, 175~180 (1991).
7. Negata, T. and Saeki M. : Simultaneous determination of 17 antibacterials in chicken tissue by high performance liquid chromatography. *J. Food Hygine*, **29**, 13~20 (1988).
8. Shozohorii, Chie Momma, Miyahara, K., Maruyama, T. and Matsumuto, M. : Liquid chromatographic determination of three sulfonamides in animal Tissue and egg. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 990~992 (1990).
9. Ueno, R., Uno, K., Saburoh, M. K., Sauroh, S.K.

and Omki, K. : Simultaneous determination of sulfamonomethoxine, suldadinethoxine and their N. acetylated forms in fish tissue by high performance liquid chromatography. *Nippon Suisan and Gakkaishi* **57**, 549~554 (1991).

10. Weber, J.D. and D. Smedly, M.D. : Liquid chromatographic method for determination of sulfamethazine residued in Milk. *J. AOAC. International*, **74**, 725~729 (1993).
11. Horii, S., Momma, C., Miyahara, K., Maruyama, T. and Matsunot, M., : Liquid chromatographic determination of three sulfonamides in animal tissue and egg. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 990~992 (1990).
12. Long, A.R., Hsich, L.C., Malbrouth, M.S., Short, C.R. and Baker, S.A. : Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue. *J. Agric Food Chem.*, **38**, 423~426 (1990).
13. Larecque, L., Carignan. G. and Sved, S. : Sulfamethazine Residues in Canadian consumer milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73** (1990).
14. Horie, M., Saito, K., Hoshino, Y., Nose, N., Tera, M., Kitsuwa, T. and Nakazawa, H. : Simultaneous determination of sulfanamides in meat by thermospray liquid chromatography–mass sectrometry. *Eisei Kagaku*, **36** (1990).
15. Bui, L.V. : Liquid chromatographic determination of six sulfonamide in animal tissue using post column derivatization. *J. AOAC International*, **76**, 965~976 (1993).
16. Takuhashi, Y., Said, A.A., Hashizume, M. and Kido, Y. : Sulfadimethoxine in broiler-chicken skin. *J. Vet. Met. Sci.*, **53**, 33~36 (1991).
17. Negata, T. and Saeki, M. : Simultaneous determination of 17 antibacterials in chicken tissue by high performance liquid chromatography. *J. Food Hygine* **29**, 13~20 (1988).
18. Murayama, M., Uchiyama, S. and Saito, Y. : Rapid determination of residual synthetic antibacterials in fish and meat by high performance liquid chromatography with stepwise gradient elution. *J. Food Hygine*, **32**, 1~6 (1991).
19. 정규생, 채명식, 김창동, 김종배 ; 액체크로마토그라피를 이용한 동물 근조직중의 합성항균제 동시 분석. 한국 위생학회지, **8**, 25~35 (1993).
20. Haagsma, N., Nooteboom, R.J., Gortemaker, B.G.M. and Maas, M.J. : A rapid sample preparation method for the determination of sulfamethazine in swine tissues by high performance liquid chromatoraphy. *Z Labemsm Unters Forsch*, **181**, 194~197 (1985).
21. Horie, H., Satto, K. and Nose, N. : Simultaneous determination o fsulfonamides in honey by liquid chromatography. *J. AOAC International*, **75**, 786~789 (1992).
22. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrouth, M.S., Short, C.R. and Baker, S.A. ; Multiresidue method for the determination of sulfonamides in prok tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 423~426 (1990).