J. Fd Hyg. Safety 11(2), 143 - 147(1996)

HPLC의 Photodiode Array Detector에 의한 과채류중의 Diamino Diphenyl Sulfone 분석

김명희† · 명노홍 · 박성배
서울특별시 보건환경연구원

Determination of Diamino Diphenyl Sulfone in Vegetable and Fruits by HPLC

Myung-Hee Kim†, Noh-Hong Myung and Sung-Bae Park
Seoul Institute of Health and Enviroment, seoul, 137-130, Korea

ABSTRACT — This study was carried out to determine and confirm of Dapsone in vegetables and fruits which were illegally used for freshness. We have developed a simple, rapid and precise method that Dapsone can be analyzed in the cabbages, grapes and strawberry by HPLC with photodiode array detector. Experimental subjects were included 15 cases of cabbages, 10 cases of grapes and 10 cases of strawberries purchased in Kangwon, Chungchong province and the Seoul area. The results were obtained that Dapsone in the experimental subject was separated completely within 10 min. Detection limit of Dapsone was 0.5 ng. Aberage recoveries from cabbages,grapes and strawberries were 93.3±0.26%, 92.5±0.37%, 91.4±0.65% respectively. 4 cases of cabbages were detected Dapsone and the amount was below the 0.3 ppm. There was not detected Dapsone in any grape and strawberry samples.

Key words □ Diamino diphenyl sulfone, cabbages, grapes, strawberries, HPLC 990 photodiode array detector

서 론

국가경제의 발전에 따라 국민들의 식생활 의식수준이 향상되면서 식품안전성에 대한 문제가 사회적으로 자주 대두되고 있다. 식품중에서도 농산물과 그 가공품에 대한 농약, 중금속, 미생물등에 의한 오염여부에 관심도가 높아지면서 소비자들은 신선하고 오염되지 않은 식품을 요구하게 되고 공급자들은 이런 식품의 신선도유지를 위하여 나병치료제로 사용되는 Dapsone이 일부 지역에서 부분적으로 사용되고 있는 것으로 알려졌다.

Dapsone은 Sulfone 계 약물로서 1937년 처음 발견된 이래 1940년대에 들어 결핵균과 나병에 효과가 있다고 발표되었다.[1] 이 약물은 diamino diphenyl sulfone(DDS)의 구조를 가지며(Fig. 1), antibacterial과 antiprotozoanal 효과가 있어 실제로 나병이나 피부병의 치료에 널리 사용되고 있다.[1-3] 이러한 약물이 과채류의 신선도를 유지하기 위하여 불법적으로 사용되고 있으나 Dapsone 제제나 체액중의 Dapsone에 대한 연구만이 보고되었을뿐 식품에 산포된 Dapsone을 확인, 정량한 보고나 그 사용량에 대한 규제 등은 없는 실정이다.[4-8]

이에 저자등은 산지 및 유통 과정중의 배추와 포도, 딸기 등을 구득하여 타성분의 방해없이 Dapsone을 확인, 정량하는 실험방법을 개발하고 이를 실제로 검정업무에 활용하므로서 식품안전성 확보에 일익을 담당하고자 본 실험을 시도 하였다.

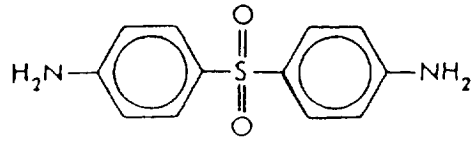

Fig. 1. Structure of diamino diphenyl sulfone (Dapsone; DDS).

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

기 기

High performance liquid chromatograph with 990 photodiode array detector(Waters 사)

시 약

Dapsone(99.8%)은 국립보건원에서 분양받은 working standard를, methyl alcohol과 acetonitrile은 HPLC용을, 그리고 물은 Millipopre system을 거친 3차 정제수를 사용하였으며 트라이톤을 전착제로 사용하였다.

시 료

배추는 출하시기인 1990년 8월~9월 사이에 강원도 산지에서 6건, 가락시장에서 9건을 구득하였으며, 포도는 1991년 8월~9월 사이에 가락시장에서 7건, 충청남도 산지에서 2건, 잠실 새마을 시장에서 1건을 구입하였고, 딸기는 1992년 5월~6월사이에 가락시장을 비롯한 서울지역 시장에서 10건을 구입하여 시료로 사용하였다.

실험방법

시료를 일정량 정확히 취한 후 500 m*l* 삼각flask에 넣고 70% MeOH 50 m*l*(포도의 경우는 25 m*l*)를 넣고 마개를 한후 5분간 추출하였으며 시료당 2회 반복 추출, 정량하여 그 평균치를 택하였다(Fig. 2). 이때 측정조건은 Table 1과 같다.

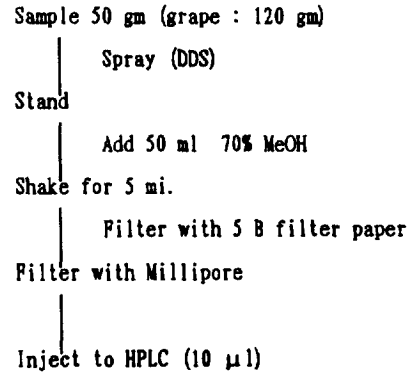

Fig. 2. Systematic scheme of extraction method.

Table 1. Analytical condition of HPLC

Instrument :	HPLC (Waters)	
Injector :	u-6K Injector	
Column :	μ Bondapak C 18	
Mobile phase :	Acetonitrile/ water (40:60)	
Flow rate :	0.8 ml/min.	
Sample size :	10 μl	
	Detection	Confirmation
Pump :	Model 510 waters	Model 590 waters
Detector :	Lamda-Max Model 481 Waters(UV 295 nm)	Photodiode array
Data module :	Waters 745	NEC power mate 2 computer pinwriter CP6

Table 2 Recovery rates of dapsone from cabbages, grapes and strawberries

	Cabbages			Grapes			Strawberries		
	Add (mg)	Found (mg)	Recovery	Add (mg)	Found (mg)	Recovery	Add (mg)	Found (mg)	Recovery
1	0.236	0.217	91.9	0.396	0.358	90.4	0.201	0.179	89.0
2	0.236	0.219	92.8	0.396	0.363	91.7	0.201	0.181	90.2
3	0.236	0.220	93.2	0.396	0.365	92.1	0.201	0.178	88.4
4	0.236	0.223	94.5	0.396	0.369	93.3	0.201	0.190	94.4
5	0.236	0.220	93.2	0.396	0.363	91.6	0.201	0.187	92.8
6	0.236	0.221	93.6	0.396	0.366	92.3	0.201	0.182	90.5
7	0.236	0.221	93.6	0.396	0.367	92.6	0.201	0.190	94.4
8	0.236	0.222	94.1	0.396	0.375	94.8	0.201	0.185	92.1
9	0.236	0.223	94.3	0.396	0.368	92.8	0.201	0.180	89.7
10	0.236	0.217	92.1	0.396	0.371	93.8	0.201	0.186	92.7
Mean			93.3			92.5			91.4
SE			0.26			0.37			0.65
RSD			0.89			1.27			2.24

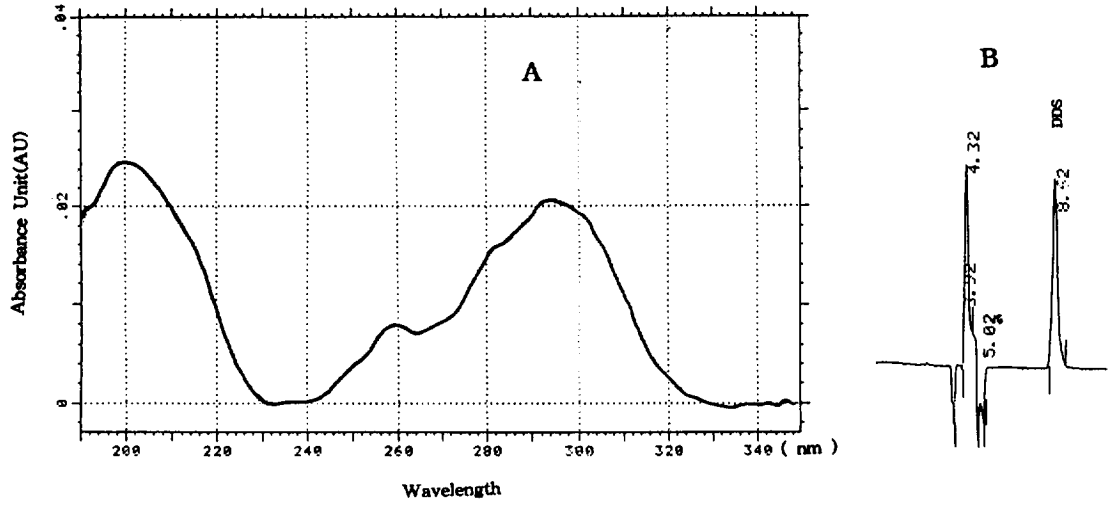

Fig. 3. Chromatogram and spectrum of DDS standard.(A: photodiode array spectrum of DDS peak. B: chromatogram of DDS)

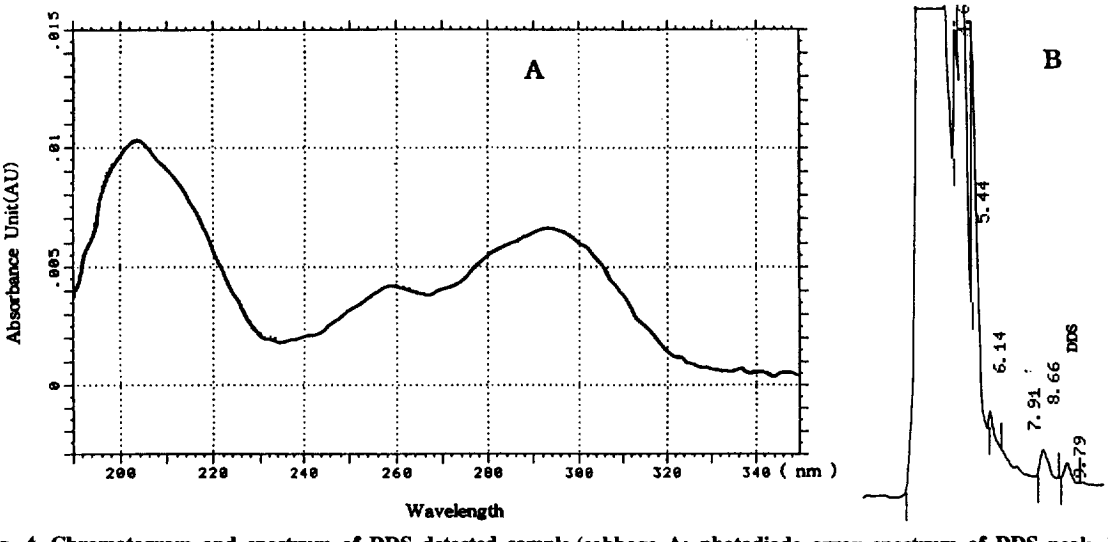

Fig. 4. Chromatogram and spectrum of DDS detected sample.(cabbage A: photodiode array spectrum of DDS peak. B: chromatogram of DDS)

따로 Dapsone 표준품 50 mg을 MeOH 50 ml에 녹여 표준원액(1 mg/ml)으로 하고 이를 MeOH로 희석하여 1, 5, 10, 25 및 50 ppm으로 만들어 10 μl씩 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였다.

또한 일정량의 Dapsone표준원액을 수돗물로 희석하여 그 희석액을 Dapsone 이 검출되지 않은 시료에 뿌려 Fig. 2와 같이 추출한 후 회수율을 측정하였다.

결과 및 고찰

Dapsone은 sulfone계 약물로서 위 장관에서 거의 완전하게 흡수되어 약 70%가 plasma 단백질과 결합한다.[9] LD_{50}은 mouse에 있어서 496 mg/kg이며,[10] hemolysis와 두통, Heinze-body 형성, 신경과민과 구토 등의 부작용이 있다.[11-12] 이 약물은 주로 4-N-acetylamino-4'-aminodiphenylsulfone

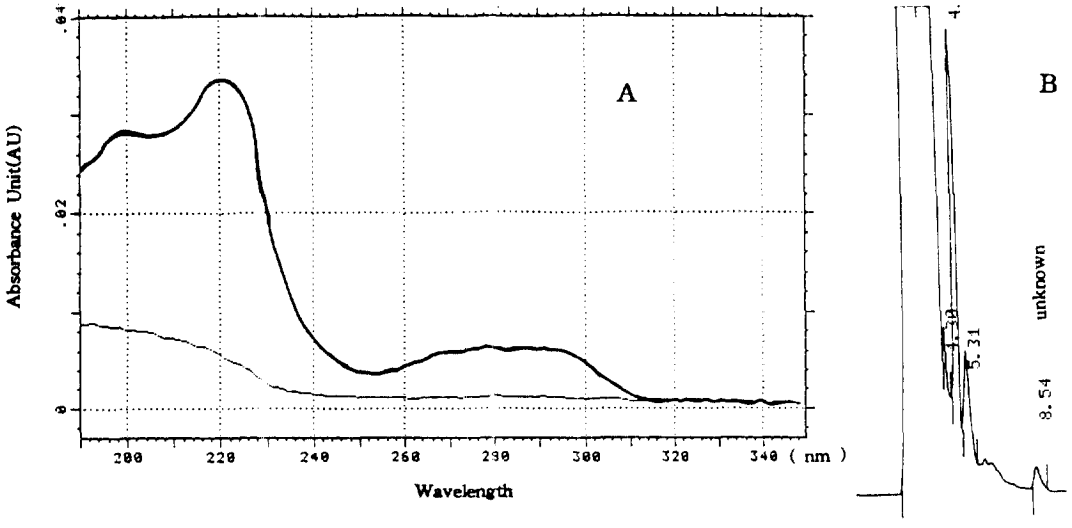

Fig. 5. Chromatogram and spectrum of DDS nondetected sample.(cabbage A: photodiode array spectrum of unknown peak. B: chromatogram of unknown)

(MADDS)로 대사되며 alcohol, methanol, acetone, d-HCl용매에 잘녹으나 물에는 녹지않는다.[13]

Dapsone의 UV 최대파장을 알아보기 위하여 UV full scanning을 한 결과 202 nm에서 가장 흡광계수가 높았으나 이동상으로 쓰인 acetonitrile의 UV-cut off치가 190 nm로 210 nm까지 흡광계수에 영향을 미쳐 그 측정이 불안정하므로 그다음으로 흡광계수가 높은 파장인 295 nm에서 정량을 시도하였다.

표준원액을 희석하여 얻은 검량선은 1 ppm에서 50 ppm까지 양호한 직선을 나타냈으며, 검출한계는 0.5 ng이었다.

일정량의 Dapsone 희석액을 시료에 전착제와 함께 뿌려 회수 실험을 한 결과는 Table 2와 같다. 회수율은 배추의 경우 93.3±0.26%(RSD : 0.89), 포도는 92.5±0.37%(RSD : 1.27), 딸기는 91.4±0.65%(RSD : 2.24)로 매우 양호한 회수율을 나타냈다.(Table 2)

Dapsone 표준원액을 희석하여 HPLC에 주입하여 얻은 chromatogtram이 Fig. 3에 제시되었다. 이동상으로는 acetonitrile과 물의 40:60 혼합액이 적합하였으며 8.6 분대에서 양호한 Dapsone peak를 얻었다. 실제 시료에서 추출하여 분석한 결과는 Fig. 4와 같았으며 시료에서도 다른 성분의 방해없이 8.6분대에서 양호한 peak를 얻을수 있었다. Fig. 4의 chromatogram에서 나타난 8.6분대의 peak는 990 photodiode array detector로 UV full scanning한 결과 Dapsone 표준용액의 UV 흡광pattern과 동일하여 Dapson임을 확인하였고 실제로 Dapsone이 산포된 배추임을 알았다.

Table 3. Residual amount of dapsone in cabbages (ug/g)

Sample	Kangwon Area	Sample	Seoul Area
1	0.13	7	ND
2	0.11	8	ND
3	ND	9	ND
4	0.26	10	ND
5	0.12	11	ND
6	ND	12	ND
		13	ND
		14	ND
		15	ND

그러나 Fig. 5에 제시된 chromatogram에서는 8.5분대에 나타난 peak를 990 photodiode array detector로 UV full scanning 하여본 결과 표준용액과는 그 pattern이 상이하여 이는 배추의 다른 미지 성분이 검출된 것으로 Dapsone은 산포되지 않은 배추였다. 포도와 딸기의 경우에는 Dapsone은 전혀 검출되지 않았다.배추시료중 검출된 Dapsone의 양은 Table 3과 같다.

위의 결과에 의하면 일부 강원도 지역에서 재배되는 고냉지채소인 배추에 Dapsone이 산포되고 있으며 그 잔류량은 0.3 ppm 이내였다.

또한 Sep-pak을 이용하여 추출액중 Dapsone만을 제외한 타 미지성분을 제거하기 위하여 clean-up 과정을 검토하였으나 시료중의 Dapsone을 70 % MeOH로 추출하기 때문에

Sep-pak alumina B, Sep-pak C18, Sep-pak florisil catridge에 추출액을 통과시킨 결과 Dapsone이 여과 초액에 시료의 타성분과 함께 거의 유출되어 Dapsone만을 정제 분리하기가 어려웠다.

따라서 앞으로 본 실험방법의 clean-up 과정이 더욱 검토되어져야 할 것으로 사려되며 아울러 이분야에 더 많은 연구가 이루어져 배추, 포도, 딸기뿐만 아니라 다른과일이나 야채에도 적용할 수 있는 연구가 이루어져야 될것이다.

국문요약

배추는 출하시기인 90년 8~9월 사이에 15건의 시료를, 포도는 91년 8~9월 사이에 10건의 시료를, 딸기는 92년 5~6월 사이에 10건의 시료를 구득하여 시료중의 산포된 Dapsone을 신속, 정확하고 간편하게 추출 확인, 정량하는 방법을 검토하였다. 시료중의 Dapsone은 u-Bondapak C_{18} column을 이용하여 photodiode array detector가 부착된 HPLC로 분석하였다. 이동상은 40% acetonitrile 이었으며 유속은 분당 0.8 m*l*, 측정파장은 UV 295 nm 이었다. Detection limit는 0.5 ng 이였으며 배추중의 회수율은 93.3±0.26%(RSD:0.89), 포도중에서의 회수율은 92.5±0.37%(RSD:1.27), 딸기중에서는 91.4±0.65%(RSD : 2.24)이었다. Dapsone peak는 시료중의 다른성분의 방해없이 8분 이내에 완전하게 분리되었으며 추출과정에서 부터 분석까지는 20분 이내였다. 배추시료 15건중 4건에서 Dapsone이 검출되었으며 그 양은 0.3 ppm이하 였다.포도와 딸기에서는 Dapsone 이 전혀 검출되지 않았다.

참고문헌

1. 한국 약학대학 협의회, 약물학 분과회 : 약물학. 문성사, 서울, pp. 551 (1987).
2. 약품식물학연구회 : 약품식물학개론. 제 3판 한국학습교재사, 서울,pp. 252 (1982).
3. 육창수: 원색 한국약용식물도감. 재판. 아카데미서적, 서울, pp. 348 (1989).
4. 명노홍, 김명희, 박성배: HPLC의 Photodiode Array Detector에 의한 배추중의 Diamino Diphenyl Sulfone(DDS)의 분석. 서울특별시 보건환경연구원보, 26, 46-51 (1990).
5. Ribi, E., Harries, S.C., Matsumoto, J., Parker, R., Smith, R.F and Strain, S.M.: Pressure Accelerated Chromatography Through Microparticulate Silica Columns Packed by Centrifugation. *J. Chromatog. Sci.* **10,** 708-711 (1972).
6. Jones. C.R. and Ovenell, S.M.: Determination of Plasma Concentrations of Dapsone, Monoacetyldapsone and Pyrimethamine in Human Subjects Dosed with Maloprim. *J. Chromatogr.* **163,** 179-185 (1979).
7. Zuidema, J., Modderman, E.S. M., Hivers, H.W. and Merkus, F.W.H.M.: Rapid High-performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Dapsone and Monoacetyldapsone in Biological Fluids. *J. Chromatogr.* **182,** 130-135 (1980).
8. Edstein, M.: Quantification of Antimalarial Drugs. II. Simultaneous Measurement of Dapsone, Monoacetyldapsone and Pyrimethamine in Human Plasma. *J. Chromatogr.* **307,** 426-431 (1984).
9. Schwarz, V.: Drug Level Monitoring Chromatography of some Minor Groups of Drugs. *J. Chromatogr.* **340,** 401-479 (1985).
10. Horai, Y. and Ishizaki, T.: Rapid and Sensitive Liquid Chromatographic Method for the Determination of Dapsone and Monoacetyldapsone in Plasma and Urine. *J. Chromatogr.* **345,** 447-452 (1985).
11. Pieters, F.A.J.M., Vincken, B.J. and Zuidema, J.: Dapsone and Monoacetyldapsone Determined in Serum and Saliva by Sensitive High performance Liquid Chromatographic Method with a Single Extraction step. *J. Chromatogr.* **422,** 322-327 (1987).
12. Goodman, L.S. and Gilman, A.: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7th. ed. Macmillan publishing Co. INC., New York, pp. 1682 (1985).
13. 환경청: 유해화학물질조사집. pp. 207 (1988).