J. Fd Hyg. Safety 13(4), 344 - 354(1998)

MSPD법에 의한 축산물중 합성항균제 동시분석

김재관† · 도영숙 · 박준조 · 황혜정*
*경기도보건환경연구원, *중앙대학교 식품공학과*

Simultaneous Determination of Residual Synthetic Antimicrobials in Livestock products by MSPD Method

Jae-Kwan Kim†, Young-Sook Do, Jun-Jo Park and Hea-Jeung Whang*
Gyeonggi-do Institute of Health and Environment, Suwon 324-1, Korea
**Chung-Ang University, Department of Food Science and Technology, Ansung 456-830, Korea*

ABSTRACT — This study was conducted to evaluate the MSPD and HPLC method about simultaneous determination for residual synthetic antimicrobials of sixteen species such as sulfonamide etc. in livestock products. Elution solvent used in HPLC was ethylacetate : acetonitrile (4 : 1), and mobile phases for solvent A and B were water : methanol : acetonit rile : phosphric acid (700 : 250 : 50 : 0.2) and 100% acetonitrile respectively. The detector and absorbency used in HPLC was UV 266 nm. This study showed the reduction effect of 99.1% for organic solvents, 94% for experimental steps, 95% for analytical time and manpower and 98.9% for costs compared with korea food standard method. The average recovery rates for chicken, bovine, pork and milk were 67.7% 96.2 %, 67.7%~96.6%, 70.0%~96.2%, and 13.8%~97.8%.

Key words □ MSPD, Synthetic antimicrobails, Livestock

축산분야에서 합성항균제는 경구용, 주사용, 유방주입용, 사료첨가제 등[1-6] 다양한 형태로서 널리 사용되고 있다. 이들이 식품을 통해 인간에게 전이될 경우 알러지 반응의 유발과 조혈기능의 장애, 신장 및 요로장애, 내성균의 출현, 면역체 형성저해로 질병에 대한 저항성의 약화와 관절염 등의 부작용을[7-9] 유발 할 수 있다. 특히 가축의 폐염과 세균성 장염 및 장관질환의 예방과 치료에 쓰이는 sulfamethazine (SMT)과 carbadox(CA)는 발암성이 있는 것으로 알려져 있다.[10,11]

이러한 문제는 국제적으로 통상마찰의 원인이 되고 있으며 축산식품의 안전성 확보는 금세기 말 최대 과제로 대두되고 있다. 따라서 세계각국은 합성항균제에 대한 잔류허용기준을 설정하는 등 안전성 확보 및 대책마련에 주력하고 있는 실정이다. 이와 같은 추세에 따라 우리나라도 설파메타진 등 22종의 합성항균제에 대해 축종별로 잔류허용기준을 설정하였고 96년에는 우유에도 항생물질 2종과 합성항균제인 설파제 7종에 대해 잔류허용기준을 설정하여[12] 시행하고 있으며 앞으로 축산식품에 대한 규제 범위가 더욱 확대 될 전망이다.

오늘날 합성항균제 분석은 미량의 물질을 정성, 정량하는 것으로 특이성과 정밀성 그리고 정확성이 요구되는데, 이를 실현하기 위해서는 정밀도가 높은 장비 뿐만 아니라, 시료의 전처리방법도 대단히 중요한부분을 차지하게 된다. 현재 널리 사용되는 식육중의 합성항균제의 분석방법에는 비색법,[1] enzyme immuno assay(EIA)법,[13] thin-layer chromatography (TLC)법,[14] 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride(TTC)환원시험법,[15] GC-FPD법,[16] GC-MSD법,[17,18] HPLC법 등[6,10,19-48] 여러방법들이 있으며, 시료의 전처리방법으로는 용매-용매추출법[3,10,22,24,26,29,41,42] solid phase extraction(SPE)법,[23] supercritical fluid extraction (SFE),[43-45] matrix solid phase extraction(MSPD)법 등[6,11,19,38,46,47] 여러 방법들이 보고되어 있다. 비색법, EIA법, TTC환원시험법 등은 정량에 부적합하고 GC, GC/MSD법은 전처리과정이 복잡하여 장시간이 소요되기 때문에 합성항균제 동시다종 분석은 전처리 방법이 비교적 간단하고 회수율과 재현성이 높은 HPLC법을 사용하고 있다.

우리나라 식품공전에 의한 식육 및 유제품의 합성항균제 중 설파제 이외는 각 제제별로 잔류량을 분석하게 되어 있

† Author to whom correspondence should be addressed.

다. 그러나 이러한 분석방법은 대상약제의 종류에 따라 분석기기, UV흡수파장, 전처리방법, 이동상 및 칼럼의 종류가 다양하여 잔류허용기준이 정해진 약제를 모두 분석하기에는 많은 인력과 시간 그리고 비용을 필요로 한다. 따라서 유해잔류물질의 신속하고 정확한 분석방법 및 신뢰성의 제고가 간절히 요구된다. 이에 본 연구는 각종 합성항균제의 잔류량을 HPLC로 동시에 분석할 수 있는 방법을 찾고자 지금까지 보고된 합성항균제 분석방법을 검토하여 그 단점을 보완하고 현행 식품공전의 식육 13종 및 유제품의 설파제 8종 등 잔류허용기준이 고시된 16종의 합성항균제를 동시에 분석할 수 있는 전처리 방법의 개선을 시도하여 경제적인 시료 전처리법을 정립하고 추출된 합성항균제를 동일한 파장에서 우수한 감도로 정성, 정량할 수 있는 가능성을 타진하여 기타 관련기관에서 활용할 수 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

시판되는 닭고기, 소고기, 돼지고기 및 우유를 구입하여 우유는 그대로 사용하고 식육은 지방과 인대를 제외하고 근육부위를 취하여 호모게나이저로 균질화한 후 -18°C 이하에서 냉동 또는 5°C 이하에서 냉장 보관하면서 매 실험때마다 일정량을 취하여 사용하였다.

실험방법

시약—HPLC 및 추출 용매로서는 acetonitrile(HPLC grade Baker, USA), water(HPLC grade Baker, USA), methanol (HPLC grade Baker, USA), ethylacetate 300(잔류농약용, WAKO), n-hexane 300(잔류농약용, WA KO), C18(40 μm prep LC paking Baker, USA), phosphoric acid(Sigma, USA)를 사용하였다.

합성항균제 표준품은 Sigma Chemical(U.S.A)의 sulfadiazine(SDZ), sul fatiazole(STA), sulfamerazine(SMR), sulfamethazine(SMT), sulfachloropyridazine(SCP), sulfamonomethoxine(SMM), sulfadimethoxine(SDM), sulfaquinoxaline (SQX) 등 8종의 설파제와 thiabendazole(TBZ), oxolinic acid(OXO), carb adox(CA), furazolidone(FZ), clopidol(CP) Wako Chemical(Japan)의 olaquindox(OLA), Nanogen Chemical(USA)의 zoalene(ZOL), ethopabate(EPB) 등 총 16종을 사용하였다.

합성항균제 표준용액은 TBZ, OLA, CP, CA, FZ, ZOL, OXO, EPB, STA, SDZ, SMR, SMT, SMM, SCP, SDM, SQX를 각각 100mg을 정확하게 달아 SDZ, SMR, SQX는 water로, TBZ, CP, STA, SMT, SCP, SMM, SDM, OLA는 methanol로, CA, FZ는 N'N'-dimethylformamide로, OXO은 소량의 0.01N-NaOH에 용해하여 methanol로 100 m*l*가 되도록 용해하여 표준원액으로 사용하였고 ZOL, EPB는 1000 ppm으로 조제된 것을 그대로 사용하였다. 그리고 위의 표준원액 10 m*l*를 취하여 methanol을 가한 뒤 100 m*l*로하여 표준용액으로 사용하였다. 표준용액은 실험결과의 정확성과 재현성을 기하기 위하여 1개월마다 표준원액으로부터 다시 만들어 사용하였다.

장치—시료의 전처리에는 homogenizer(Janke & Kunkel D-2300 Kile, U.S.A), dry block bath(Torika, Japan), vortex mixer(USA)를 사용하였다. 합성항균제 분석에 사용된 기기는 spectrophotometer(DU 650, Beckman, U.S.A)와 HPLC system(Waters 510 pump, Waters automated gradient controller, Waters 746 data module, WatersTM 717 plus autosampler, Waters 490E multiwave length detector, symmetry C8 column(4.6×250 mm)이었다.

HPLC 분석조건은 Table 1과 같이 칼럼은 symmetry C_8 (4.6×250 mm, Waters)이었으며 이동상은 A용매로 water : methanol : acetonitrile : phosphoric acid(700 : 250 : 50 : 0.2)를 B용매로 100% acetonitrile을 사용하였다. 그리고 시료 일회 주입량은 20 μ*l*이었으며 UV 266 nm에서 검출하였다.

Table 1. Conditions of HPLC

Instrument	Waters 510 pump Waters automated gradient controller WatersTM 717 plus autosampler Waters 490E multiwave length detector Waters 746 data module
Column	Symmetry C_8 (4.5×250 mm, Waters)
Injection volume	20 μ*l*
Detector	UV 266 nm

Mobile phase
A-water:methanol:aceto nitrile:phosphric acid(700:250:50:0.2)
B-acetonitrile

Time (min)	m*l*/min	A (%)	B (%)
0	0.45	100	0
8	0.45	100	0
16	0.6	85	15
25	0.7	85	15
26	0.7	90	10
30	0.7	90	10
31	0.6	95	5
35	0.6	95	5
40	0.5	100	0
50	0.45	100	0

합성항균제분석

UV 흡수파장시험—16종의 합성항균제 각각의 최대흡수파장을 알아보기 위하여 표준용액을 이동상으로 1 mg/*l*가되게 희석하여 190~400 nm에서 자외선 흡수파장을 시험하였다.

검량선의 작성—표준용액을 각각의 농도가 0.1, 0.5, 1 mg/*l*되게 이동상으로 희석한뒤 20 μ*l*씩 HPLC에 주입하여 각 합성항균제의 peak area에 의하여 표준 검량곡선을 작성하였다.

재료의 전처리—재료로부터 octadecyl(C_{18})에 분산, 흡착된 합성항균제 16종을 동시에 추출하면서 background에 영향을 미치지 않는 용출용매를 설정하기위하여 octadecyl(C_{18}) 2배량의 n-hexane, ethylaectate : acetonitrile(4 : 1)과 methanol에 차례로 세척하여 감압 후 실온에서 건조한다. Table 1과 같이 식육은 약 0.5 g을 취하고, 우유는 0.5 m*l*를 취하여 octadecyl(C_{18}) 2 g과 혼합 균질화한 후 15 mm filter paper disk가 장치되어 있는 10 m*l* sylinge에 옮겨 n-hexane 8 m*l*로 세척하여 지방을 제거한다. n-H exane을 완전히 제거한 후 ethylacetate : acetonitrile(4 : 1) 8 m*l*로 용출하고 질소가스를 가하며 40°C 이하에서 농축하였다. 여기에 이동상 1 m*l*를 가하여 vortex mixer으로 30초간 진탕한 뒤 0.45 μm membrane filter로 여과하여 20 μ*l*을 HPLC에 주입하였다. 한편 합성항균제는 빛에 약하기 때문에 모든 과정은 가능한한 빛에 노출되지 않도록 하였다.[10,22,24,25]

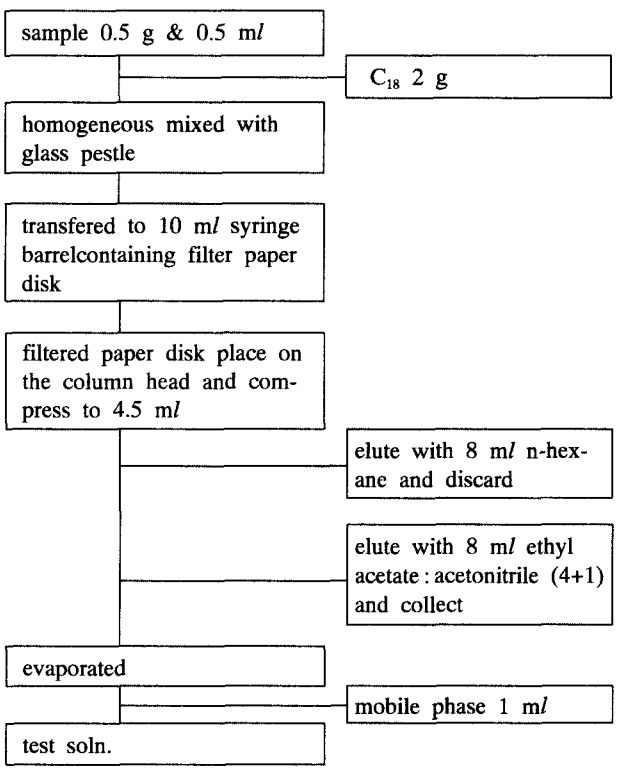

Fig. 1. Procedures of MSPD method for antibacterium in muscles of bovine, pork, chicken and milk.

회수율시험—Fig. 1 및 식품공전방법으로 예비실험을 하여 합성항균제가 잔류하지않은 닭고기, 소고기, 돼지고기, 우유에 표준용액을 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg/*l*되게 첨가하고 추출용매를 ethylaectate : acetonitrile(4 : 1)로 한 후 Fig. 1의 방법으로 전처리를 하여 회수율을 측정하였다.

결 과

동시분석파장의 선정

고정된 UV 검출기를 사용하여 동시분석파장을 선정할 때 각 항균제의 최대흡수파장이 서로 다르기 때문에 각 제제간 파장이 유사한 지점을 선정하여야 흡수파장의 차이에서 오는 오차를 줄일 수 있다. 이에 본 실험에서는 각 합성항균제를 1.0 mg/*l*가 되게 이동상으로 희석한 후 spectrophotometer를 사용하여 190~400 nm에서 scanning하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 TBZ 300 nm, OLA 256 nm, CP 266 nm, CA 304 nm, FZ 360 nm, ZOL 242 nm, OXO 260 nm, EPB 268 nm, STA 284 nm, SDZ 268 nm, SMR 266 nm, SMT 262 nm, SMM 270 nm, SCP 268 nm, SDM 260 nm 그리고 SQX는 246 nm에서 최대 흡광치를 나타내 대부분의 항균제가 256 nm~284 nm에서 최대흡광치를 가지는 것으로 나타났다. 따라서 CP, EPB, SDZ, SMR, SMT, SMM, SCP, OXO, ZOL, SDM은 95%~100%의 흡광치를 가지고 TBZ 30%, OLA 63%, CA 84%, FZ 73%, STA 82% SQX은 70%의 흡광치를 가져 각 제제별 흡수량이 가장 적은 차이를 보이는 266 nm를 적정 파장으로 선정하였다.

검량선의 작성

16종의 합성항균제 혼합 표준용액을 0.1, 0.5, 1 mg/*l*되게 이동상으로 희석한 뒤 여과하여 20 μ*l*씩 HPLC에 3회 반복 주입하여 얻은 피크면적을 Y축으로 주입량을 X축으로 하여 작성한 회귀방정식에서 TBZ은 Y=186645X-10473(r=0.9998), OLA는 Y=358570X-11810(r=0.9995), SDZ은 Y=340959X-14523(r=0.9999), STA은 Y=437815X-20144(r=0.9999), SMR은 Y=335857X-13466(r=0.9999), CP은 Y=285268X-10879(r=0.9999), SMT은 Y=323022X-13096(r=0.9999), CA는 Y=146433X-60749(r=0.9997), FZ은 Y=188759X-69949(r=0.9999), SCP은 Y=268425X-13424(r=0.9999), SMM은 Y=290834X-10371(r=0.9997), ZOL은 Y=162803X-40829(r=0.9994), OXO은 Y=474594X-10175(r=0.9997), SDM은 Y=261857X-10604(r=0.9999), SQX은 Y=

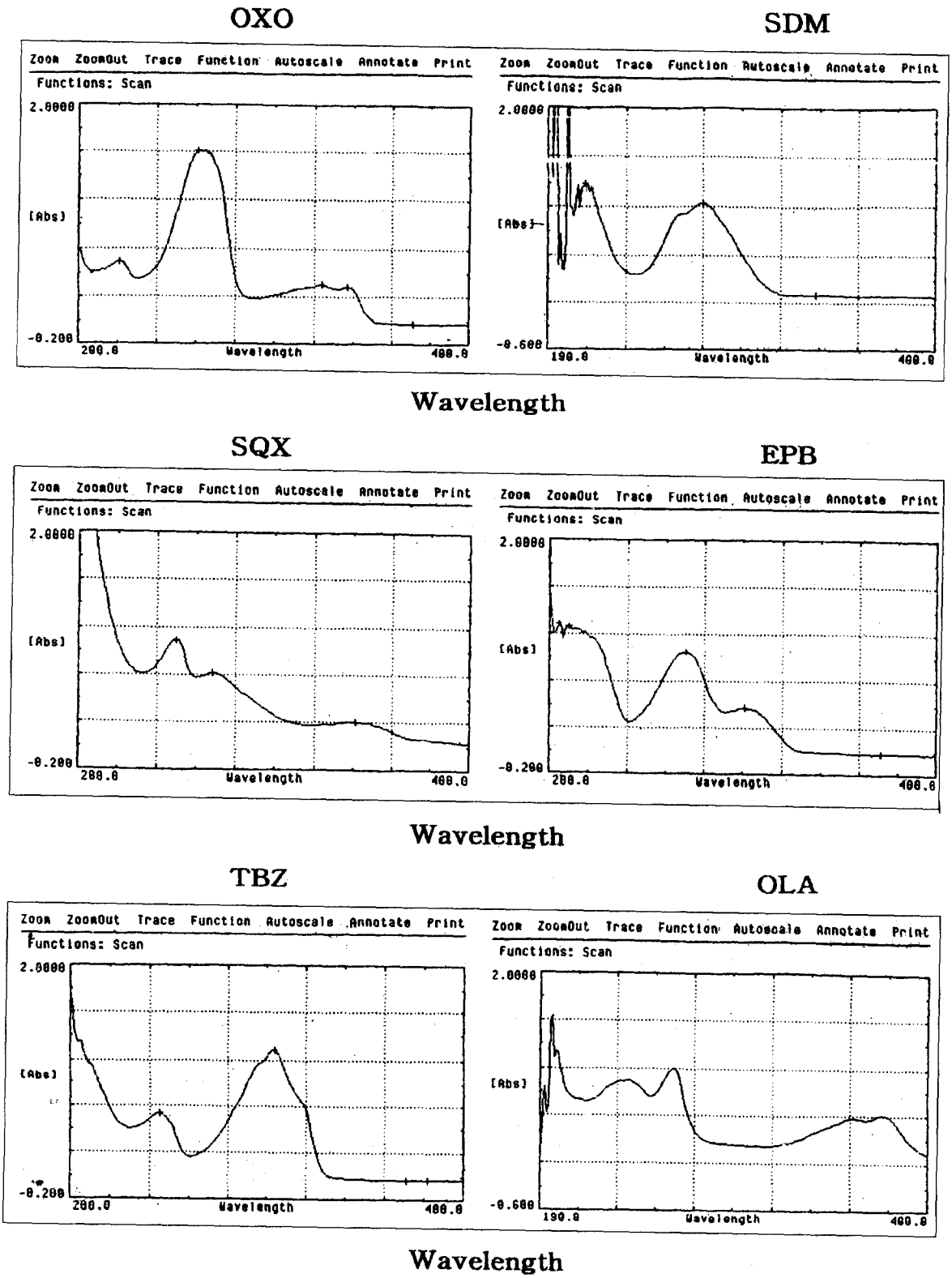

Fig. 2. Absorbance spectra of TBZ, OLA, CP, CA, FZ, ZOL, OXO, EPB, STA, SDZ, SMR, SMT, SMM, SCP, SDM and SQX.

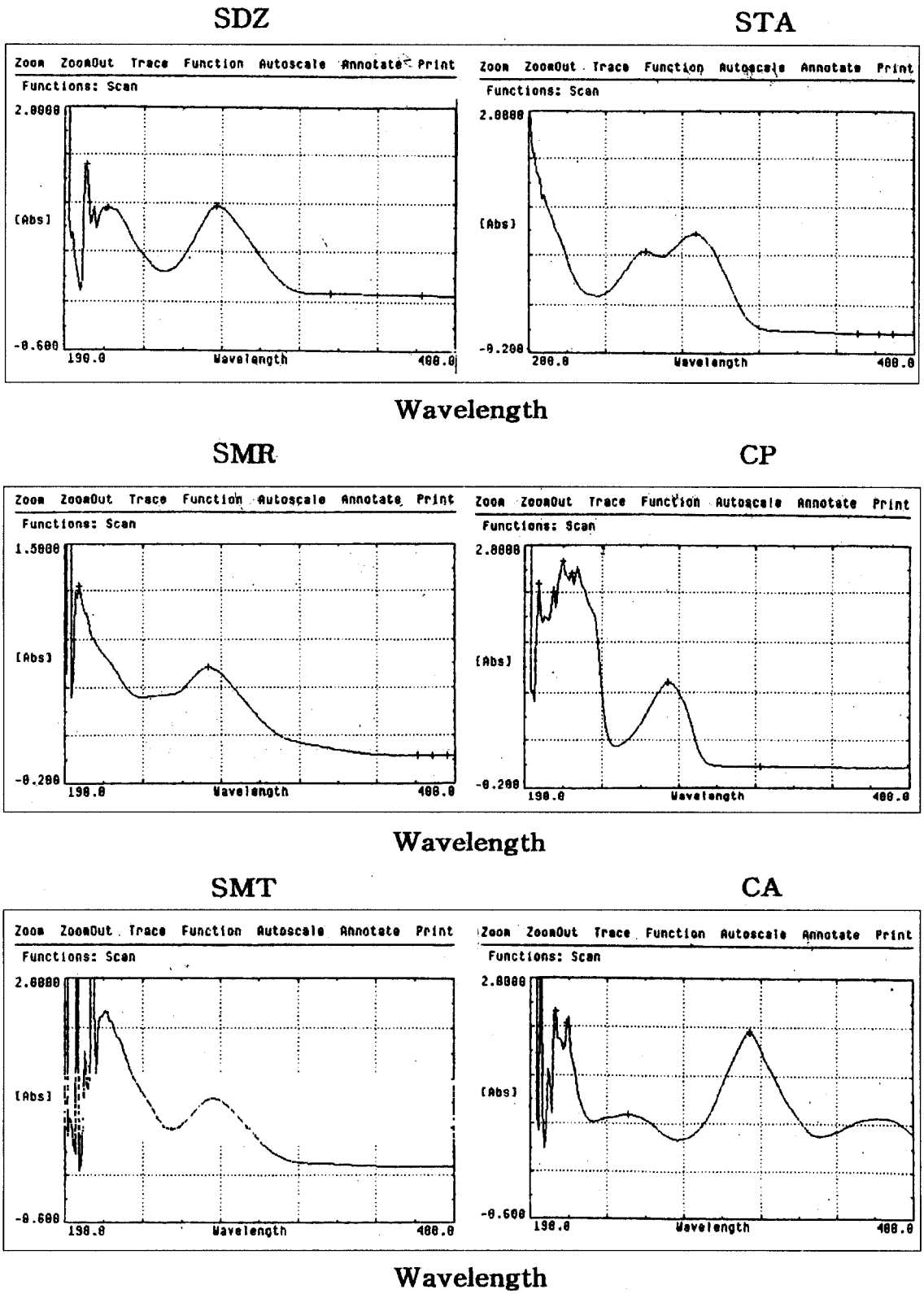

Fig. 2. Continued.

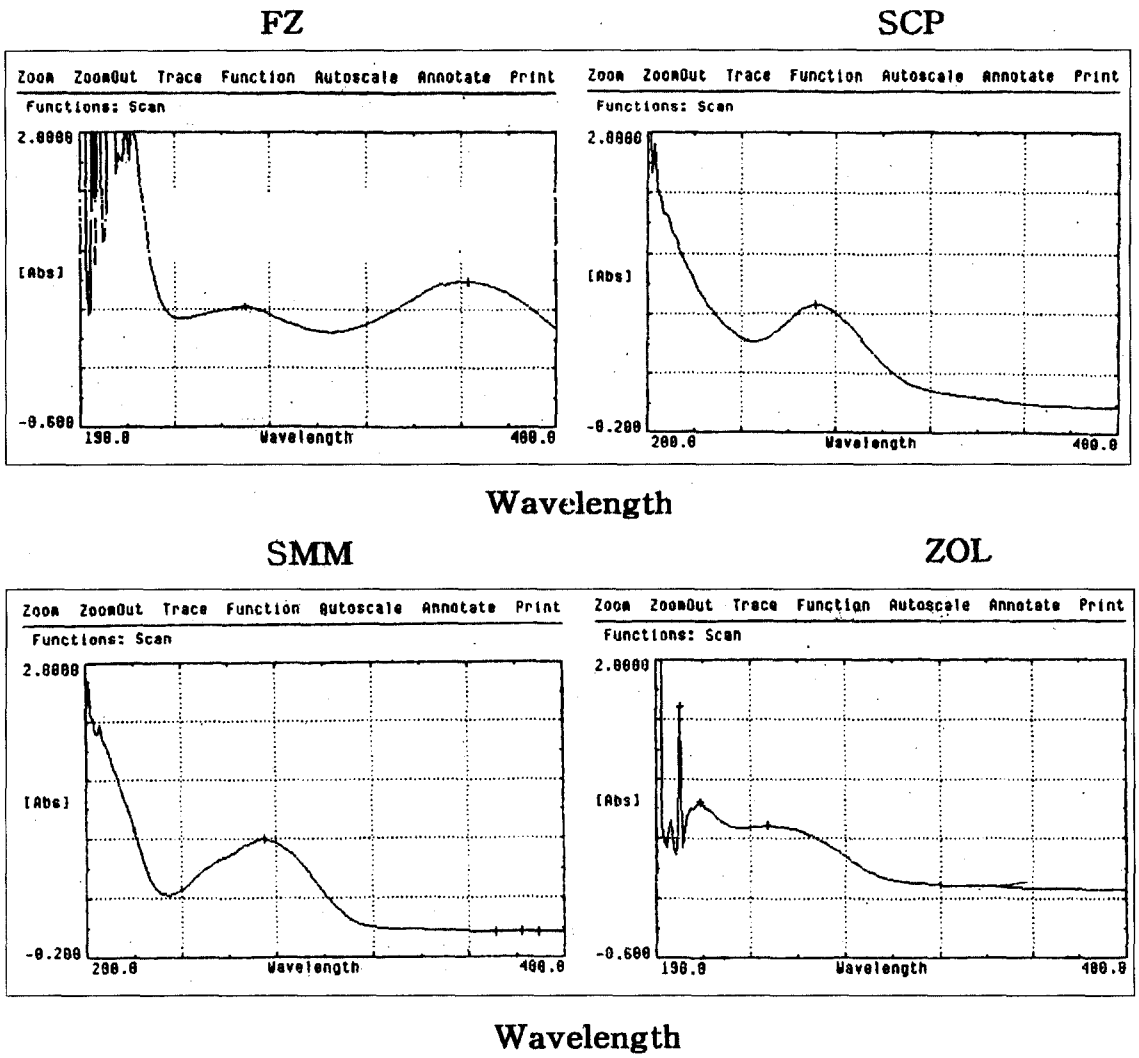

Fig. 2. Continued.

230664X-11690(r=0.9999) 그리고 EPB는 Y=353018X-10482 (r=0.9999)로서 양호한 직선성을 나타내었다.

추출용매의 선정

추출용매를 선정하기 위해 주로 사용되는 dichloromethane, ethyl acetate, acetonitrile을 사용하여 예비실험을 하였다. dichloromethane으로 추출시 분석에 방해가 되는 어떠한 피크도 검출되지 않았으나 CA, OLA, OXO가 20% 이하의 낮은 회수율을 보였다. ethylacetate로 추출했을때는 OLA가 30% 이하의 회수율을 보였다. acetonitrile로 추출시 회수율은 좋았으나 분석에 방해되는 피크가 많았다. 이에 본실험에서는 1차로 ethylacetate을 선정하고 여기에 acetonitrile을 9:1에서 5:5까지 점차적으로 극성을 증가시켜 실험한 결과 각각 4:1로 혼합했을때가 방해피크의 간섭을 최소화하고 회수율도 비교적 우수하여 최종 추출 용매로 ethylacetate : acetontrile(4 : 1)을 선정하였다.

회수율

닭고기, 소고기, 돼지고기, 우유에 표준용액을 각각 0.1, 0.5, 1.0 mg/*l*의 농도로 첨가하여 Fig. 1에서와 같은 방법으로 추출 및 정제한 후 그 회수율을 구하였던 바 Table 2~5와 같았다. 즉 닭고기 시료의 평균 회수율은 Table 2에서와 같이 TBZ 75.2%, OLA 72.3%, SDZ 84.8%, STA 74.5%, SMR 90.6%, CP 91.0%, SMT 87.7%, CA 89.1%, FZ 96.2%, SCP 79.4%, SMM 83.0%, ZOL 87.4%, OXO 68.8%, SDM 76.2%, SQX 67.7% 그리고 EPB는 88.6%였다. 소고기 시료에서는 Table 3과 같이 TBZ 77.6%, OLA 70.5%, SDZ 86.1%, STA 76.5%, SMR 89.4%, CP 90.3%, SMT 87.8

Table 2. Recorvery data for the determination of sulfonamides in chicken

antibacterial \ level (μg/g)	0.1	0.5	1.0
Thiabendazole	72.3±3.8	75.6±3.4	77.7±5.2
Olaquindox	70.2±3.9	73.2±3.8	73.5±4.2
Sulfadiazine	83.6±3.6	85.6±4.4	85.1±4.9
Sulfatiazole	73.9±3.9	72.7±3.9	76.8±4.5
Sulfamerazine	91.7±4.3	89.7±5.1	90.3±4.0
Clopidol	90.8±4.8	90.1±3.9	92.1±4.8
Sulfamethazine	87.2±4.2	86.7±3.5	89.3±3.8
Carbadox	88.0±4.2	89.3±3.8	90.1±4.1
Furazolidone	96.8±3.4	95.8±4.6	96.1±3.9
Sulfachloropyridazine	79.1±3.7	77.9±4.1	81.1±3.8
Sulfamonomethoxine	82.2±5.2	83.3±3.4	83.6±4.2
Zoalene	85.9±3.7	88.8±4.1	87.5±4.9
Oxolinic acid	67.7±3.7	68.7±3.1	70.1±3.9
Sulfadimethoxine	76.3±3.8	75.1±3.8	77.1±4.2
Sulfaquinoxaline	67.8±3.9	67.4±3.9	68.1±4.2
Ethopabate	89.7±5.2	87.3±4.5	88.7±4.4

Table 3. Recorvery data for the determination of sulfonamides in bovine

antibacterial \ level (μg/g)	0.1	0.5	1.0
Thiabendazole	80.4±4.4	74.7±3.8	77.7±3.3
Olaquindox	66.5±5.3	72.6±4.3	72.4±3.6
Sulfadiazine	84.9±4.5	85.5±3.9	87.9±4.3
Sulfatiazole	76.9±5.1	72.8±4.3	79.7±3.8
Sulfamerazine	91.3±2.9	87.7±3.8	89.3±2.9
Clopidol	89.4±4.6	88.4±3.5	93.2±4.5
Sulfamethazine	88.3±5.3	85.8±3.9	89.3±3.5
Carbadox	89.3±5.6	88.9±4.3	92.9±4.6
Furazolidone	97.7±4.3	96.2±3.9	96.0±3.9
Sulfachloropyridazine	80.7±3.9	78.9±4.5	81.7±4.9
Sulfamonomethoxine	83.8±5.1	87.7±5.4	86.7±5.3
Zoalene	86.1±3.4	90.6±2.3	90.7±5.1
Oxolinic acid	69.5±4.8	67.5±5.4	70.3±4.7
Sulfadimethoxine	75.2±3.8	73.6±5.1	75.7±4.1
Sulfaquinoxaline	65.9±3.8	67.9±5.1	69.3±4.7
Ethopabate	88.8±4.3	85.3±4.7	89.7±5.2

Table 4. Recorvery data for the determination of sulfonamides in pork

antibacterial \ level (μg/g)	0.1	0.5	1.0
Thiabendazole	79.3±5.3	80.6±4.7	80.1±4.9
Olaquindox	71.2±3.6	73.2±5.1	75.5±5.5
Sulfadiazine	84.3±3.8	82.5±6.3	87.5±4.8
Sulfatiazole	73.6±4.3	72.3±4.6	76.2±5.1
Sulfamerazine	90.6±4.2	90.1±3.7	90.5±5.6
Clopidol	88.6±5.2	91.2±4.6	90.7±5.9
Sulfamethazine	87.6±4.6	87.1±3.9	88.6±5.4
Carbadox	88.9±3.9	90.6±6.1	90.8±5.4
Furazolidone	96.5±5.2	94.9±5.8	97.2±4.3
Sulfachloropyridazine	81.2±4.8	81.5±4.5	83.6±3.9
Sulfamonomethoxine	81.5±3.9	80.4±3.8	81.7±4.6
Zoalene	89.4±5.2	90.0±5.2	90.7±4.8
Oxolinic acid	70.5±4.5	71.2±4.6	73.5±4.6
Sulfadimethoxine	77.6±3.9	80.4±4.5	81.2±5.4
Sulfaquinoxaline	70.1±4.8	69.5±3.9	70.4±5.3
Ethopabate	85.9±5.5	88.4±4.8	89.5±5.3

Table 5. Recorvery data for the determination of sulfonamides in milk

antibacterial \ level (μg/g)	0.1	0.5	1.0
Thiabendazole	50.8±4.8	52.7±5.3	53.5±3.6
Olaquindox	53.9±4.2	56.2±3.7	55.8±4.1
Sulfadiazine	90.6±4.5	89.8±3.8	91.8±5.1
Sulfatiazole	77.4±5.3	80.2±4.8	80.5±3.6
Sulfamerazine	89.9±3.8	88.7±3.9	91.9±4.1
Clopidol	95.7±3.6	99.1±3.6	98.7±2.5
Sulfamethazine	89.9±3.5	88.6±4.3	91.6±4.5
Carbadox	94.3±3.2	96.4±4.1	95.9±3.8
Furazolidone	96.8±3.5	97.8±3.9	97.6±4.6
Sulfachloropyridazine	81.2±3.7	83.6±4.3	84.3±5.2
Sulfamonomethoxine	86.9±3.9	87.7±4.6	88.4±5.6
Zoalene	91.2±3.1	89.6±4.2	90.7±3.5
Oxolinic acid	12.6±3.4	13.3±4.3	15.4±3.3
Sulfadimethoxine	76.9±2.9	76.9±3.7	79.8±3.9
Sulfaquinoxaline	69.9±3.8	66.9±5.2	72.4±5.4
Ethopabate	94.1±3.7	97.2±3.8	96.5±3.5

%, CA 90.4%, FZ 96.6%, SCP 80.4%, SMM 86.1%, ZOL 89.1%, OXO 69.1%, SDM 74.8%, SQX 67.7% 그리고 EPB는 87.9%였다. 돼지고기 시료에서는 Table 4와 같이 TBZ 80.0%, OLA 73.3%, SDZ 84.8%, STA 74.0%, SMR 87.8%, CP 90.2%, SMT 87.8%, CA 90.1%, FZ 96.2%, SCP 82.1%, SMM 81.2%, ZOL 90.0%, OXO 71.7%, SDM 79.7%, SQX 70.0% 그리고 EPB는 87.9%였다. 우유에서는 Table 5와 같이 TBZ 52.3%, OLA 55.3%, SDZ 90.7%, STA 79.4%, SMR 90.2%, CP 97.8%, SMT 90.0%, CA 95.5 %, FZ 97.4%, SCP 83.0%, SMM 87.6%, ZOL 90.5%, OXO 13.8%, SDM 77.9%, SQX 70.7% 그리고 EPB는 95.9 %였다. 한편 Fig. 3의 크로마토그램에서 보는 바와 같이 각 합성항균제 1.0 mg/l를 첨가했을때 각 peak들이 잘 분리되었고 분석에 영향을 줄 수 있는 방해 peak는 발견되지 않았다.

고 찰

축산식품중 유해물질의 잔류 문제는 국제적으로도 많은

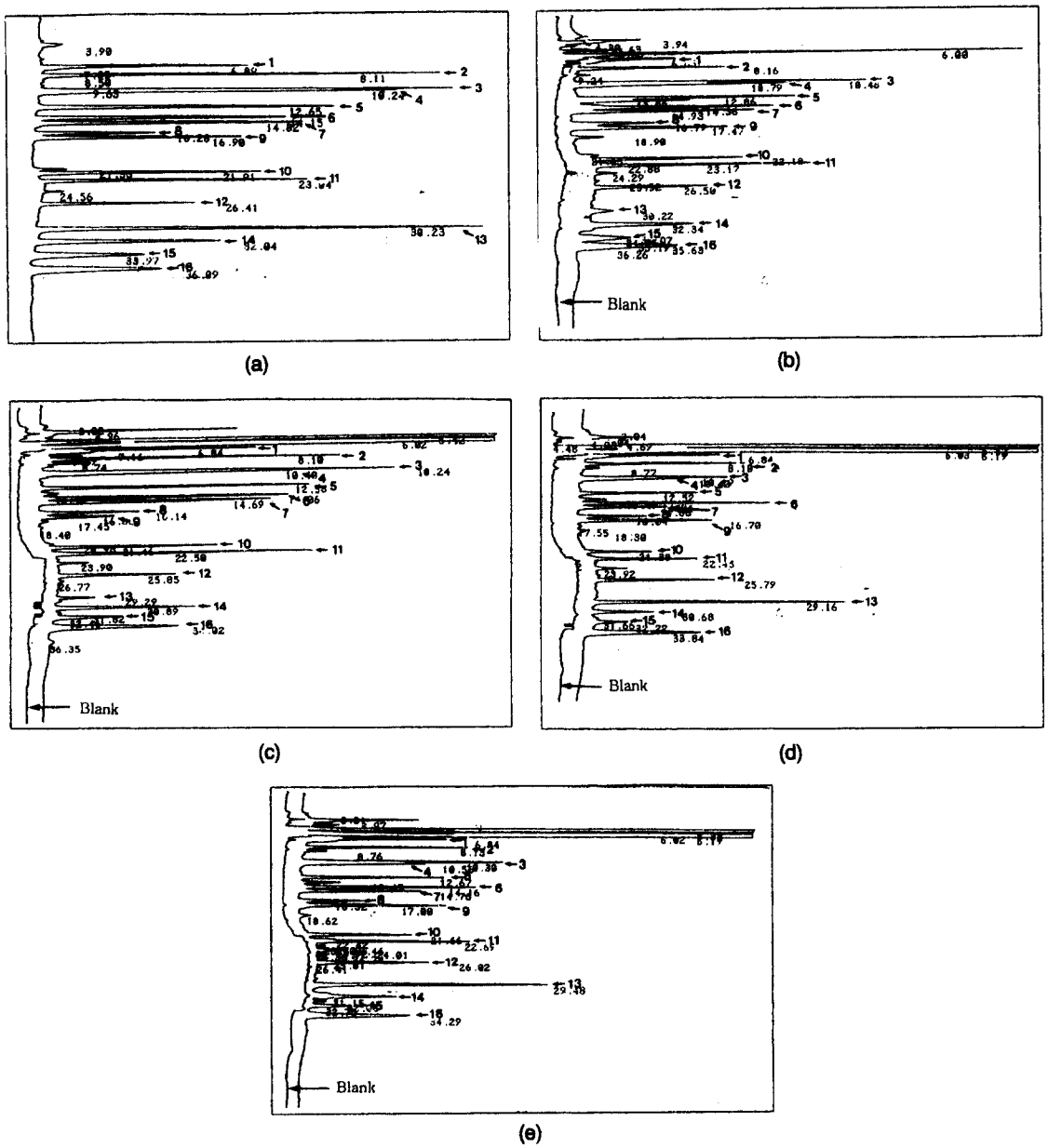

Fig. 3. Chromatogram of (A) standard, (B) milk, (C) bovine, (D) pork (E) chicken muscle tissue spiked with 1 mg/l antibacterial by MSPD method.

논쟁을 일으키고, 통상 마찰을 일으킬 가능성이 높아지면서 세계 각국은 각종 물질에 대한 잔류허용 한계를 설정하여 식품의 안전성 확보를 기하고 있다. 이에 우리나라에서도 축산식품중 유해물질 최대잔류허용한계를 설정하여 규제하고 있다. 국내에서 고시된 합성항균제중 설파제 이외에는 각 제제별로 분석하게 되어 있는데 설파제, 올라퀸독스, 옥소린산, 카바독스, 에토파베이트는 HPLC-UV법, 티아벤다졸은 HPLC-fluorescence법, 후라졸리돈, 죠렌, 클로피돌은 GC-ECD법을 공인시험법으로 채택하고 있다.[12] 그러나 이러한 분석방법은 각 제제별로 분석기기, 측정파장, 칼럼의 종류, 이동상이 다르고 전처리시 pH조절 및 유도체화 과정을 거쳐야하는 등 전처리방법이 다르기 때문에 각 제제의 정확한 분석에는 유용하더라도 잔류허용기준이 정해진 약제를 일일이 분석하기에는 많은 인력과 시간이 필요하며 또한 유기용매의 다량 소비로 많은 비용을 필요로 한다. 따라서 유해잔류물질의 신속하고 정확한 실험방법 및 신뢰성

이 간절히 요구되는 바이다. 이에 본 실험은 현재 가장 널리 보급되어 있는 HPLC-UV detector를 이용하였으며 시료용액 조제시 후로리실, 알루미나 및 C_{18} 카트리지 등을 이용한 정제과정과 pH조절을 생략함으로서 분석시간과 인력을 절감하고 추출용매에 의한 전처리 단계를 최소화하여 회수율의 향상 및 유기용매의 사용량 감소에 의한 비용절감 등, 신속하고 정확한 분석방법을 확립하고자 하였다.

한편 합성항균제의 물리화학적 특성이 서로 다르기 때문에 축산식품중의 잔류 합성항균제를 분석하기 위해선 전처리시 시료에서 원하는 물질을 완전히 추출 할 수 있는 추출용매와 정제과정이 중요하다. 현재 잔류 합성항균제 분석에 많이 사용되는 추출용매는 aceton, acetonitrile, chloroform, ethylacetate, dichloromethane 등의 유기용매가 단독 또는 혼합되어 사용되고 있고 전처리 방법으로는 용매추출법과 octadesilyl(C_{18})와 같은 고상기질체의 넓은 표면적을 이용한 matrix solid phase dispersion(MSPD)법이 많이 이용되고 있다. 용매추출법은 유기용매를 사용하여 시료내의 잔류약제를 추출하고 추출액을 증발건고 다음 다시n-hexane/water 분배를 통하여 지용성 물질을 제거하고 다시 물층에 존재하는 잔류약제를 유기용매로 재추출하여 그대로 혹은 알루미나 등으로 정제하여 시험용액으로 하는 방법이 많이 이용되고 있다. 그러나 여러단계를 거쳐 번거롭고 시료 전처리 시간이 많이 걸리기 때문에 다량의 시료를 동시에 분석하는데는 적합하지 않다. 또한 회수율이 떨어지며 용매의 사용량이 많아 비용이 많이드는 단점이 있다.

MSPD법은 칼럼충진물인 C_{18}을 시료와 혼합하여 반건조상태로 한후 ethyl acetate 등의 유기용매로 직접 용출하는 방법으로 시료와 혼합시 기계적인 힘과 소수성의 힘이 합쳐져 시료와 C_{18}이 매우 수월하게 반응하여 지방이나 비극성물질은 C_{18}에 붙게되며 단백질이나 극성물질은 C_{18}의 말단에 노출되는 점을 이용한 전처리방법으로 시료의 량에 제한을 받는 단점이 있으나, 시료 전처리과정이 간단하여 다수의 시료를 신속하게 검사할 수 있는 매우 간단한 방법이다. 본 실험에서는 이 방법을 응용하여 분석시간 및 비용을 획기적으로 줄일 수 있었다. 그 예로 식품공전법에 의한 16종의 합성항균제를 분석하는데 소요되는 유기용매량은 3,000 m*l*, 시약종류는 33종인데 비해 본 실험에서는 각각 28 m*l*, 5종으로 유기용매는 99.1%, 시약종류는 84.8% 줄일 수 있었으며 실험단계도 약 200단계에서 12단계로 94% 줄일 수 있어 분석시간과 인력은 95%, 비용은 98.8% 절감할 수 있었다.

이와 같이 잔류 합성항균제의 전처리 방법은 가장 간단하고 경제적이며 누구나 쉽게 이용할 수 있는 방법으로 실행해야 할 것으로 판단된다. 설파제를 비롯한 합성항균제는 비록 적은 양이라도 오랜시간 체내에 축적됨으로서 건강상 위해요소로 작용할 수 있기 때문에 이를 방지하고 축산식품의 잔류물질에 대한 안전성을 확보하기 위해서는 보다 정기적이고 지속적인 연구가 있어야 한다. 또한 이런 약제들은 체내에서 여러화합물질로 대사가 이루어지기 때문에 아직 설정이 안된 식육내 대사물질의[3,5,18,23-28] 잔류허용량도 설정해야 할 것으로 사료된다.

이상의 연구에서 얻어진 결과는 설파제 등 16종의 합성항균제 동시분석의 보편적인 방법을 제시하고자 한 것으로 축산식품중에 존재하는 미량의 합성항균제 잔류량을 간편하고 신속하게 스크리닝하는데 적당한 시험법이라고 사료된다. 그리고 이러한 연구에서 나타난 여러 가지 문제점들을 보완해 나가면 향후 축산식품의 잔류물질분석과 안전성 제고에 크게 기여 할 수 있을것으로 사료된다.

국문요약

식육 및 우유중에 고시된 설파제 등 16종의 합성항균제를 HPLC로 동시에 정성, 정량할 수 있는 동시분석방법을 검토하였다. MSPD법으로 시료를 전처리를 하였으며 용출용매로는 ethylacetate : acetonitrile(4 : 1)을 사용하였다. 이동상으로는 A 용매로 water : methanol : acetonitrile : phosphric acid(700 : 250 : 50 : 0.2)와 B 용매로서 100% acetonitrile을 선택하여 그래디언트 컨트롤러를 사용하여 UV 266 nm에서 HPLC로 분석하였다. 현 식품공전법에 비해 유기용매는 99.1%, 실험단계는 94% 줄일 수 있어 분석시간과 인력은 95%, 비용은 98.8% 절감할 수 있었다. 각 시료의 평균회수율은 닭고기에서는 67.7% 96.2%, 소고기에서는 67.7% 96.6%, 돼지고기에서는 70.0% 96.2 % 그리고 우유에서는 13.8% 97.8%로 나타났다.

참고문헌

1. Schwartz, D.P.: Quantitative colorimetric method for sulfamethazine in swine feeds. *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, **68**(2), 214-217 (1985).
2. Ashworth, R.B., Epstein, R.L., Thomas, M.H. and Frobish, L.T.: Sulfamethazine blood/tissue correlation study in swine. *Am. J. Vet. Res,* **47**(12), 2596-2603 (1986).
3. Theo, J.S., Henk van L., Gertjan de G. and Lowie, P.J.: Liquid chromatographic determination of olaquindox in medicated feeds and in contents of porcine gastrointestinal tract, *J. Assoc. off. Anal. Chem.,* **71**(6), 1106-1109 (1988).
4. Blood, D.C.: Veterinary medicines, "practial antimicrobial therapen tics", Bailliere Tindall, 5th ed., 87-90 (1979).
5. 박종명, 심영화, 김인천, 진남섭, 이문한: 랫트 및 돼지 체내에서 후 라졸리돈의 환원대사에 관한 연구, 한국수의공중보건학회지, **19**(1), 81-88 (1995).
6. Austin, R.L., Lily, C.H., Marsha, S.M., Charles, R.S. and Steven A.B.: Matrix solid-phase dispersion(MSPD) isolation and liquid chromatographic deternimation of furazolidone in pork muscles tissue, *J. Assoc. off. Anal. Chem.,* **74**(2), 292-294 (1991).
7. Booth, N.H. and Mcdonald, L.E.: Drug and chemical residues in edible tissues of animals : Verterinary pharmacology and therapeutics, 6th ed., Iowa State University press, Iowa, 1149-1201 (1988).
8. Doull, J., Klaassen, C.D. and Amdur, M.O.: Toxic responses of the kidney. Toxicology, 2nd ed., Macmillan Pub., New York, 168-243 (1980).
9. Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F.: Antimic- robial agents. The pharmacological basis of therapeutics, 7th ed., Macmillan Pub., New York, 1104-1102 (1985).
10. Jose, E.R., Robert, K.M. and Wilbert, S.: Liquid chromatographic of carbadox residues in animal feed, *J. Assoc off Anal Chem,* **68**(4), 653-657 (1985).
11. Walker, L.V., Walsh, J.R, and Webber, J.J.: High-performance liquid chromatography of sulfonamides extracted from bovine and porcine muscle by solid-phase dispersion, *J. Chromatogr,* **595**, 179-184 (1992).
12. 보건복지부: 식품공전, 문영사, 313-333 (1996).
13. Deborah, E. Dixon-holland and Stanley, E.K.: Competitivedirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue, *J. Assoc. off. Anal. Chem,* **71**(6), 1137-1140 (1983).
14. Michael, H.T., Karen, E.S. and Sahron, H.T.: Quantitative thin layer chromatographic multi-sulfonamide screening procedure. *J. Assoc. off. Anal. Chem,* **66**(4), 881-883 (1983).
15. 조병훈, 김봉환, 손성완, 진남성, 박종법: 원유중 잔류 설파제 검출을 위한 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride(TTC) 환원 시험법의 개량, 한국수의공중보건학회지, **17**(1), 77-86 (1993).
16. Tsukuru, O., Masakiyo, U., Toshiki, O., Toshitaka, O., Kaoru, T., Hiraokatasu, A. and Eigo, T.: Gas chromatographic determination of ethopabate in chicken tissues using flame photometric detector, *Shokuhin Eiseigaku,* **22** (4), 279-284 (1981).
17. Keigo, T.: Gas chromatographic/Mass spectrometric determination of oxolinic, nalidixic, and piromidic acid in fish, *Journal of AOAC Internation.,* **75**(6), 982-986 (1992).
18. Martin, J.L. and Richard, B.: Confirmatory identification of carbadox-related residue in swine liver by gas-liquid chromatography/mass spectrometry with slected ion monitoring, *J. Assoc off Anal Chem,* **65**(1), 66-70 (1982).
19. Herman, H.J. and Kevin, M.K.: Matrix solid-phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxolinic acid in channel catfish(Ictalurus punctatus) muscles tissue, *Journal of AOAC Internation.,* **75**(3), 428-432 (1992).
20. Robert, K.M., Sherri, B.T., Allen, P.P., Jose, E.R., David, C.H. and Austin, R.L.: Determination of residues of flumequine and nalidixic, oxolinic and piromidic acids in catfish by liquid chromatography with fluorescence and UV detection, *Journal of AOAC Internation.,* **78**(2), 343-352 (1995).
21. Lyse, L., Mary, S., Stephen, S. and Andrea, W.: Determination of oxolinic acid and residues in salmon muscle tissue by liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Assoc off Anal Chem,* **74**(4), 608-611 (1991).
22. Tomoko, N. and Masanobu, S.: Determination of olaquindox residues in swine tissues by liquid chromatography, *J. Assoc off Anal Chem,* **70**(4), 706-707 (1987).
23. Rene, V.A. and Neslon, A.J.: Liquid chromatographic fluorescence method for multiresidue determination of thiabendazole and 5-hydroxythiabendazole in milk, *Journal of AOAC Interna Tion.,* **78**(3), 642-646 (1995).
24. Susas, S.-C. Tai, N.C., Charlie, J.B.: Determination of thiabendazole, 5-hydroxythiabendazole, fenbendazole, and oxfen dazole in milk, *J. Assoc off Anal Chem,* **73**(3), 368-373 (1990).
25. Dwight, M.L. JR, Robert, T.T. JR, Floyd, E.Q., and Clarence, L.F.: High pressure liquid chromatographic determination of carbadox and pyrantel tartrate in swine feed and supplements, *J. Assoc off Anal Chem,* **66**(3), 602-605 (1983).
26. Milter, G.L., Carl, L. and Merete, J.: Determination and depletion of residues of carbadox, tylosin, and virginiamycin in kidney, liver, and muscle of pigs in feeding ex-

periments, *J. Assoc off Anal Chem,* **71**(5), 921-925 (1988).
27. Gerrit, J.de G. and Theodorus, J.S.: Liquid chromatographic determination of carbadox and desoxycarbadox in medicated feeds and in porcine gastrointestinal tract, *J. Assoc off Anal Chem,* **68**(4), 658-660 (1985).
28. Agnes, I.M., Ginette, L., and George, A.N.: Liquid chromatographic monitoring of the depleton of carbadox and its metabolite desoxycarbadox in swine tissues, *J. Assoc off Anal Chem,* **68**(4), 665-671 (1985).
29. Edward, A.S., Agnes, I.M. and Arnost, B.V.: High pressure liquid chromatographic determination of nitrofurazone and furazoldone in chicken and pork tissues, *J. Assoc off Anal Chem,* **66**(4), 874-880 (1983).
30. Hoener, B.-A., Lee, G. and William, L.: High pressure liquid chromatographic determination of furazoldone in turkey tissues, *J. Assoc off Anal Chem,* **62**(2), 257-261 (1979).
31. Wray, W., Gregory, H. and Charles, M.: Ultra trace determination of furazoldone in turkey tissues by partitioning and high performance liquid chromatography, *J. Assoc off Anal Chem,* **64**(5), 1055-1059 (1981).
32. 이문한, 임재영, 정순관, 손성완, 박종명: 보리새우에 잔류하는 oxolinic acid의 HPLC를 이용한 검출법, 한국식품위생학회지, **8**(3), 147-150 (1993).
33. Virginia, A.T.: Sample preparation of carbadox, furazoldone, nitrofurazone, and ethopabate in medicated feeds for high pressure liquid chromatographic, *J. Assoc off Anal Chem,* **63**(5), 981-985 (1980).
34. Owen, W.P.: Liquid chromatographic-elctrochemical detection screening procedure for six nitro-containing drugs in chicken tissues at low ppb level, *J. Assoc off Anal Chem,* **72**(4), 567-569 (1989).
35. Steven, A.B., Austin, R.L. and Charles, R.S.: Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, *J. of ch romatogr,* **475**, 353-361 (1989).
36. Robert, L.S.: Liquid chromatographic method for determ ination of furazoldone in premixes and complete feeds: Collaborative study, *J. Assoc off Anal Chem,* **68**(5), 1033-1036 (1985).
37. Owen, W.P.: Liquid chromatography-electrochemical detection of furazoldone and metabolite in extracts of incurred tissues, *J. Assoc off Anal Chem,* **73**(4), 526-528 (1990).
38. Austin, R.L., Lily, C.H., Marsha, S.M., Charles, R.S. and Steven, A.B.: Method for the isolation and liquid chromatographic deternimation of furazolidone in milk, *J. Agric, Food Chem.,* **38**, 430-432 (1990).
39. George, W., Paul, D.D. and Leonard, G.: HPLC for the simultaneous analysis of sulfadimethoxine and ormetoprim in tissues and blood of cattle, chickens, and catfish, *J. Agric, Food Chem.,* **35**, 905-909 (1987).
40. 강희곤: HPLC에 의한 식육조직중의 잔류설파제 동시분석, 한국식품위생학회지, **9**(1), 37-42 (1994).
41. 정동수, 윤교복, 김종술, 신명균, 김교승: HPLC를 이용한 원유중 잔 류 Sulfonamides분석법연구, 한국가축위생학회지, **16**(1), 11-19 (1993).
42. Michale, D.S.: Liquid chromatography deternimation of multiple sulfonamide residues in bovine milk : Collaborative study, *Journal of AOAC Internation,* **77**(5), 1112-1121 (1994).
43. Michale, T.C., Scott, B., Mehdi, A.-K. and Larry, T.T.: Quantitative recovery of sulfonamide from chicken liver, beef liver, and egg yolk via modified supercritical carbon dioxide, *J. Agric, Food Chem.,* **45**, 1779-1783 (1997).
44. Reginald, F.C., John, L.E. and Bruce, E.R.: The supercritical fluid extraction of polor drugs(sulphonamides) from inert matrices and meat animal products, *Journal of Chromatographic Science,* **31**, 162-169 (1993).
45. Owen, W.P. and Robert, J.M.: Isolation of sulfonamide from fortified chicken tissues with supercritical CO_2 andin-line adsorption, *Journal of Chromatographic Science,* **32**, 290-293 (1994).
46. 박준조, 이규춘, 고홍범: 고속액체 크로마토그라피에 의한 식육중 설 파제잔류에 관한연구, 한국수의공중보건학회지, **18**(4), 317-324 (1994)
47. Calvin, C.W. and Steven, A.B.: Extraction and liquid chromatographic analysis of sulfadimethoxine and 4-N-acetyl sulfadimethoxine residues in channel catfish(Ictalurus puncatus) muscle and piasma, *Journal of AOAC Internation,* **77**(6), 1460-1466 (1994).
48. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrouch, M.S., Short, C.R. and Barker, S.A.: Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue, *J. Agric. Food Chem,* **38**(2), 423-426 (1990).