J. Fd Hyg. Safety 12(2), 117 - 124(1997)

MSPD와 HPLC를 이용한 어류의 잔류 설파제와 테트라사이클린계 항생물질의 동시분석

하대식 · 김종수* · 김곤섭*

*경상남도 보건환경연구원, 경상대학교 수의과대학 경상대학교 부설 농어촌 개발연구소**

Simultaneous Quantification of Sulfonamide and Tetracyclines in Fish Muscle Tissue by Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) Extraction and HPLC

Dae Sik Hah, Jong Shu Kim* and Gon Sup Kim*

Kyongsangnam-do Provincial Government Institute of Health and Environment, Kyong-nam, 641-241, Korea

**College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University (Inst. Agri. Fish. Develop.), Jin-ju, 660-701, Korea*

ABSTRACT — A simple, rapid and simultaneous analytical method is described for the detection of Sulfonamide and Tetracycline residues, i.e., Sulfamerazine (SMR), Sulfamethazine (SMT), Sulfamonomethoxine (SMM), Sulfadimethoxine (SDM), Sulfaquinoxaline (SQN), Oxytetracycline (OXY), Tetracycline (TC), Chlortetracycline (CTC). Blank control and sulfonamide and tetracycline fortified fish muscle samples (0.5 g) were blended with octadecylsilyl (C_{18}, 40 μm, 21% load, 60Å) derivatized silica packing material (2 g). Blended fish samples were washed with hexane, then, benzene and dichloromethane were used for the elution of tetracycline and sulfonamide, respectively, The eluants containg tetracycline and sulfonamide were analyzed by HPLC. Correlation coefficients of standard curves for individual sulfonamide and tetracycline isolated from fortified samples were linear (0.9993±0.0003~0.9997±0.0003, 0.9493±0.078~0.9753±0.036), respectively. The average percentage recoveries of sulfonamide and tetracycline ranged as 80.86~96.52% to 85.88~92.23%, and 30.01~37.12% to 65.89~73.40%, for the concentration range (0.1~1.0 ppm) examined, respectively. Limit of detection for sulfonamide was 0.05 μg/g, then, tetracycline was 0.1 μg/g. Detection of quantitation of sulfonamide residue was 0.0012 ppm for SMR in *Paralichthys Olivacleus* and 0.0020 ppm for SMR, 0.015 ppm for SMM in *Cyprinus Carpio*. The applicability of this procedure is demonstrated by separation and detection of incurred tetracycline and sulfonamide residues in fish muscle tissue.

Key words □ MSPD, HPLC, Sulfonamide, Tetracycline

생활수준의 향상과 소득수준 향상으로 인하여 식생활 형태변화와 고급식품에 대한 요구가 급증하고 있으며, 특히 저 콜레스테롤이며 고단백질인 고급어류의 소비량은 지속적으로 날로 증가하여 자연 및 민물어류 양식업이 산업화되고 양식방법이 다양화되어 대량 공급이 행해지고 있는 실정이다. 근간 이들 양식업계에서는 어류의 집단 양식시 발생되는 질병으로 인한 경제적 손실과 생산성 저하를 방지하기 위해 20여종의 약품 단일 혹은 복합제로 항생제, 합성항균제 및 홀몬제, 구충제, 소독제, 마취제, 영양제등 동물약품을 많이 사용하고 있으며, 이러한 약품은 질병 발생시 치료 뿐만이 아니라 예방의 목적으로 사료와 함께 경구투여제로 사용되고 있다고 한다.[1] 하지만 이들 화합물이 무분별하게 과용, 남용되면 어류의 체내에 이행 잔류하여 최종소비자인 인체에 유해할지도 모른다는 우려가 제기되고 있는 실정이다. 따라서 이들 양식어류의 안전성 및 품질관리에 대한 국민의 관심과 기대욕구가 상승하고 있는 실정이나 최근에야 잔류허용기준을 설정하였고,[2] 분석방법 또한 디스크법으로 확인한 후 정량시험으로 몹시 까다롭게

† Author to whom correspondence should be addressed.

되어 있다.[3] 현재 주로 이용되는 항생, 항균제 분석방법으로는 TLC,[4,5] GC,[6,7] GC/MS,[8,9] ELISA,[10,11] HPLC[12-14]방법 등이 있다. TLC법[4,5]은 일시에 많은 수의 시료를 간편하고 신속하게 검색하는데 이용할 수 있으나 정량에는 부적합하며, 특이성이 낮을 뿐만 아니라 검출감도도 낮다. 효소 면역학적 방법[10,11]은 개별적인 잔류 항생, 항제를 검색하기에는 적합하나 여러 종류의 샘플을 동시에 분석하는데는 부적합하다. GC,[6,7] GC/MS법[8,9]은 개별적으로 확인 정량하는데는 매우 정확하나 전처리가 복잡하며 동시에 많은 수의 샘플을 분석할 수 있는 방법은 아직 확립되어 있지 않은 실정이다. 최근에 항생, 항균물질 잔류량 분석에 있어 동일 조작으로 다성분을 분석할 수 있는 여러가지 시험방법의 개발이 시도되고 있으며 시료의 추출과정이 간단하고 빠른 시간내 전처리 할 수 있는 Charm II Kit[15] 및 Matrix Solid Phase Dispersion(MSPD)[12,16-20] 방법이 개발되어 응용되고 있다. Charm II kit[15]는 Radioimmuno assay와 microbial receptor의 원리를 이용하여 시료중에 항균물질이 ^{14}C이나 ^{3}H의 방사선 동위원소가 표식된 항균물질시약과 경쟁적으로 미생물수용체와 결합하여 방사능측정치를 저하시켜 검출하는 방법으로 감도가 뛰어나고 단기간내에 6가지 계열(Sulfa drugs, β-lactams, Tetracyclines, Aminoglycosides, Macrolides, Chloramphenicol)을 검출할 수 있는 장점이 있으며, MSPD법[12,16-20]은 lipophilic solid phase material(C_{18})을 조직내로 분산시켜 시료와 표면적(1000 m^2/2 g)을 넓혀 전 시료가 추출과정에 노출되도록 반 건조상태로 한 후 유기용매로 직접추출하는 방법으로 Sulfonamides[17]와 Tetracyclines[12], Organophosphates[20]까지 응용되고 있다. 그러나 전자는 정성정량이 어려우며 시약의 가격이 비싸고 일상적인 검사에 사용하기에 다소 어려운 점이 있고, 후자는 시료의 양이 제한되는 단점이 있으나 시료의 추출과정이 간단하고 빠른 시간내 전처리 할 수 있어서 본 실험에서는 후자를 선택하였다. 본 연구의 목적은 어류에 설파제 5종과 테트라사이클린제 3종을 동시분석할 수 있는 방법을 MSPD법으로 확립하며, 이들 약제의 잔류유무와 그 정도를 알아봄으로써 향후 예상되는 수산제품의 유해물질 잔류문제해결과 품질개선 및 수출입 문제에 대처하기 위한 기초자료를 제공 하고자 실시 하였다.

材料 및 方法

실험재료

시중에 유통되고 있는 향어(*Cyprinus Carpio*), 광어(*Paralichthys Olivacleus*)각 48건씩 채취하여 냉장상태로 실험실에 운반하여 즉시 실험하거나 20°C 상태로 보관한 후 5일 이내에 실험하였으며, 예비실험에서 항생, 항균제가 잔류되어 있지 않은 각 시료에 항생, 항균제를 농도별 첨가하여 회수율검사 실험재료로 사용하였다.

기기 및 시약

표준품 및 시약—본 실험에 사용된 시약은 Phosphoric acid, n-hexane, dichlomethane(Junsei, Japan)은 특급을 사용하고 acetonitrile, methanol(Baker, USA)은 HPLC용을 사용하였다. 증류수는 18 MΩ 이상 또는 HPLC급을 사용하였으며, octadecylsilyl (pore size 40 μm)는 J.T Baker 회사제품을 사용하였다. 표준품인 sulfamethazine(SMT), sulfamerazine(SMR), sulfamonomethoxine(SMM), sulfadimethoxine(SDM), sulfaquinoxaline(SQN), tetracycline(TC), oxytracycline(OTC), chlortetracycline (CTC)은 모두 Sigma(USA) 회사제품을 사용하였다.

실험기기—본 실험에서는 Spectra-physics p-2000, Spectra-physics UV 2000 Detector, SP-Datajet Integrator(USA), 유봉 및 유발, Heidolph UV 200 Evaporator, Ultrasonic bath, 초순수 제조장치(Mili-Q, Milipore USA) 등을 사용하였다.

시약조제

표준용액조제—각 표준품 100 mg을 정밀히 달아 100 mL 용량 플라스크에 취하고 메탄올로 녹여 표지선까지 채우고 잘 혼합한다(1000 μg/mL). 이액 10 mL를 정확히 취하여 100 mL 용량플라스크에 옮기고 methanol로 표지선까지 채워 100 mL(100 μg/mL)되게하여 표준용액으로 사용하였다.

이동상 용매조제—Potassium dihydrogen phosphate(KH_2PO_4) 1 g을 증류수 1 L에 잘 녹인다음 이액 820 mL과 Acetonitrile(CH_3CN) 180 mL를 혼합하였다. Phosphoric acid(H_3PO_4)로 pH 3.5가 되게 조정하고 0.45 μm 필터가 부착된 흡인여과기에 여과한 후 이동상으로 사용하였다. 테트라사이클린제제의 이동상용매는 Oxalic acid 1.26 g을 물 1 L에 녹여 이 용액과 Acetonitrile및 Methanol을 7:2:1(v/v/v)의 비율로 혼합한 후 0.45 μm 필터가 부착된 여과기에 여과한 후 사용하였다.

C_{18}분말 세척—유리칼럼의 출구부분 내부에 유리솜을 깔고 C_{18}분말 20 g을 채운 다음 음압하에서 헥산, 디클로로메탄, 메탄올을 각 40 mL(C_{18}분말 2배용량)을 차례로 흘려 세척한 후 완전히 건조될 때까지 음압을 유지한다. 건조된 C_{18}은 갈색유리병에 밀봉하여 냉암소에 보관하면서 사용하였다.

흡광도의 선택—흔히 설파제의 검출최적 파장은 247~272 nm인것으로 알려져 있고,[13] 테트라싸이클린제제는 270~370 nm가 최적검출파장인 것으로 알려져 있다.[14] 조 등[16]은

UV 220 nm에서 340 nm의 파장으로 테트라싸이클린계를 scanning한 결과 OTC 및 TC의 최대흡수파장인 266 nm보다 분석하기 곤란한 CTC 및 doxycycline(DOXY)의 최대흡수파장인 365 nm에서 분석하였으나 예비실험에서 크로마토그람상 잔피크가 너무 심하여 설파제와 테트라싸이클린제제와의 공통파장인 272 nm으로 실험해본 결과 모두 깨끗하게 나와 이파장을 선택하였다.

표준곡선 작성—표준용액을 mL당 50, 30, 15, 5 μg 농도로 희석한 다음 이 액 2 mL씩을 100 mL용량 플라스크에 취하고 이동상으로 표지선까지 채워 표준곡선작성을 위한 표준용액으로 사용하였다. 이때 농도는 1000 ng/mL, 600 ng/mL, 300 ng/mL, 100 ng/mL가 된다. 이 표준용액을 HPLC에 주입하여 각 표준용액에 대한 표준곡선을 작성한다.

회수율검사—항생, 항균제가 함유되어 있지 않은 향어(*Cyprinus Carpio*), 광어(*Paralichthys Olivacleus*) 0.5 g을 유발기에 놓인 C_{18}위에 놓고 표준용액(5 μg/mL, 15 μg/mL, 30 μg/mL, 100 μg/mL) 2 mL를 조직에 무작위로 주사하여 2분동안 방치하였다가 시료전처리 방법과 같이 처리하였다 (Fig. 1).

MSPD(Matrix Solid Phase Dispersion)법을 이용한 시액조제—MSPD법은 Barker 등[20]과 Long 등[12,17-19]의 법을 응용하여 활성 C_{18}분말 2 g을 유발에 취하고 시험재료 0.5 g을 달아 C_{18}위에 놓는다. 유봉으로 C_{18}과 시료를 부드럽게 혼합하여 균질화 되도록 한다. 여과지(Whatman NO. 1, USA)를 직경 15 mm되게 만든다음 디스크 2장을 10 mL 유리주사기에 넣고 균질화된 혼합물을 주사기에 옮겨 담는다. 혼합물위에 디스크 2장을 올려놓고 주사봉을 이용하여 혼합물의 부피가 약 4.5 mL되게 압축한 후 주사기 끝에 200 μL 피펫팁을 알맞게 잘라 고정시킨다. 주사기에 헥산 10 mL를 가하여 흘려 보내고 주사기내 잔류하는 헥산을 양압하에서 제거한다. 피펫팁을 바꾸고 농축액을 받을 시험관을 장치하고 디클로로메탄 10 mL를 흘려 설파제를 용출하고 한편, 테트라싸이클린제제는 헥산 10 mL로 세척하고 나서 Benzene 10 mL를 가하여 용출하여 rotary evaporator로 건조시킨 후 methanolic oxalic acid solution 10 mL로 가하여 용출하여 이 각각의 용출액을 증발 플라스크에 취해 rotary evaporator로 증발건조 시킨 후 건조물에 각각의 이동상 용매를 1 mL 가한 뒤 초음파세척기에서 10분간 진탕하여 완전히 녹인다(Fig. 1). 이 액을 0.45 μm여과기로 여과하여 HPLC에 10 μL를 주입하여 Table 1의 조건하에서 분석하였다.

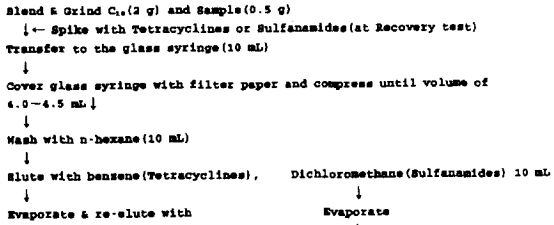

Fig. 1. Flow chart for the detection of tetracycline and sulfanamide in fish meat.

Table 1. Analytical conditions for HPLC determination of tetracyclines and sulfanamides

compounds analyzed	Sulfanamides and Tetracyclines
Column:	Nova-pak C_{18} (3.9×150 mm, 4 μm, Waters, USA), Necleosil 5 C_{18} (4.60×250 mm, Phenomenex, USA)
Detector:	UV 272 nm, 0.01 AUFS
Mobile phase:	0.017 M H_3PO_4:Acetonitrile (82:18 v/v, pH 3.5) 0.01 M Oxalic acid:Acetonitrile:Methanol (7:2:1 v/v/v)
Column temperature:	Room temperature
Flow rate:	1.0 mL/min
Injection volume:	10 μL

結 果

검량선

표준사용 용액 설파제 및 테트라싸이클린제제를 각각 100 ng/mL, 300 ng/mL, 600 ng/mL, 1000 ng/mL 취해 HPLC에 주입하여 얻은 피크면적을 Y축으로, X축을 표준액의 농도로 하여 작성한 회귀방정식에서 각 설파제 및 테트라싸이클린의 직선상은 Table 2와 같았으며 양호한 결과를 보였다.

MSPD법을 이용한 회수율 검사

잔류항생, 항균제를 추출하기 위하여 일반적으로 이용되는 액상추출(Solid phase extraction)과정없이 단지 C_{18}과 식육간에 표면적을 넓혀 회수율을 높이고 신속하게 추출할 수 있는 MSPD방법으로 예비실험에서 설파제 및 테트라싸이클린제제가 검출되지 않은 광어, 향어고기에 5종의 설파제 및 3종의 테트라사이클린제제를 0.1~1.0 μg/mL의 수준으로 투여하여 회수율을 검사한 결과 크로마토그람상은 Fig. 2와 같이 분리능이 우수 하였다. 그리고 회수율은 설파제에서 SMR이 81.46~93.90%, SMT는 85.88~92.23%, SMM은 81.16~94.16%, SDM은 80.86~96.52%, 그리고

Table 2. Calibration equation of five sulfonamides and three tetracycline from mixed standard solution

Compound	Correlation coefficient $r^2 \pm SD^*$ (n**=4)	Linear regression equation
Sulfamerazine	0.9993±0.0002	Y=240649χ+3366.48
Sulfamethazine	0.9993±0.0003	Y=209629χ+1319.45
Sulfamonomethoxine	0.9997±0.0002	Y=236861χ+2899.75
Sulfadimethoxine	0.9997±0.0003	Y=208009χ+3864.36
Sulfaquinoxaline	0.9992±0.0005	Y=357955χ-28397.19
Oxytetracycline	0.9753±0.036	Y=537028χ+192764.51
Tetracycline	0.9872±0.027	Y=1344850χ+191090.43
Chlortetracycline	0.9493±0.078	Y=1817989χ-22658.67

*SD: Standard deviation.
**n: Number of replicates.

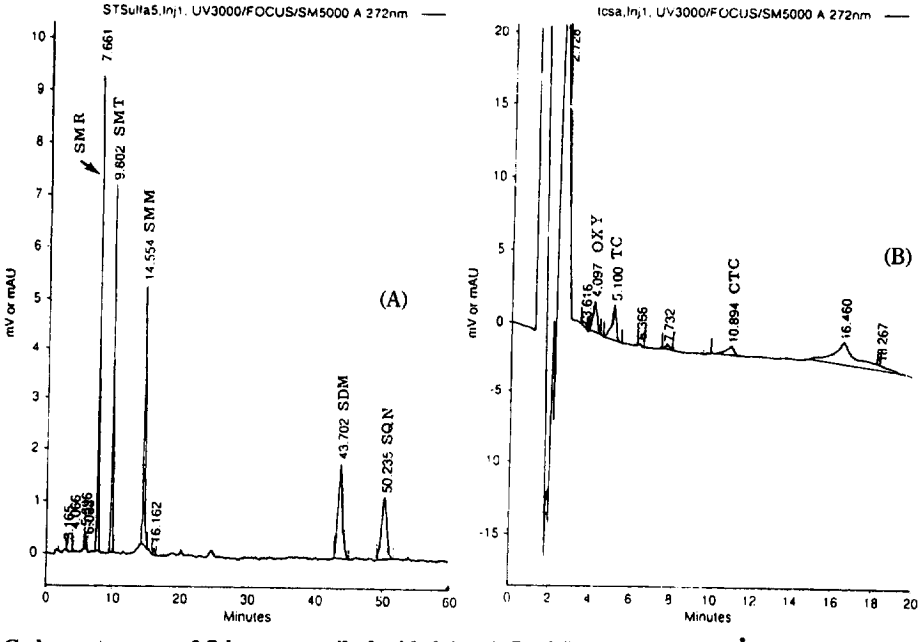

Fig. 2. HPLC chromatograms of fishes meat spiked with 0.1 μg/mL of five sulfanamides (Å), and 0.3 μg/mL of three tetracyclines (B); peak labeling: SMR, SMT, SMM, SDM, SQN, and OXY, TC, CTC; UV detector wavelength 272 nm (see the materials and methods for the detailed information).

SQN은 82.49~95.21%의 비교적 높은 회수율을 보였으나 (Table 3), 테트라싸이클린제제는 OXY가 65.89~73.40%, TC가 51.43~53.25%, 그리고 CTC의 경우 30.01~37.12%로 매우 저조한 회수율을 보였고(Table 4), 각 제제는 광어, 향어육 회수율간의 의미와 유의성은 찾을 수 없었다.

설파제 및 테트라싸이클린제제의 잔류조사

경남지역내 유통되는 향어 및 광어를 6차에 걸쳐(총 96건) 수거하여 설파제 및 테트라사이클린제제의 잔류 정도를 조사한 결과 테트라싸이클린제제는 간혹 OXY와 TC가 의심되는 크로마토그람상 trace정도 나타는게 있었으나 전혀 검출되지 않았고 광어, 향어에서 SMR이 각각 0.0012 ppm, 0.0020 ppm이 검출되었고 향어에서 SMM이 0.0015 ppm으로 아주 미미한 수준으로 검출되었다(Table 5). 계절별 유의성과 특이성은 없었으나 수온이 높아지는 5, 7월에 설파제가 미량 검출되었다.

考 察

어류에 발생하는 질병은 그 원인에 따라서 중금속오염,

Table 3. Recovery rate of sulfonamides from fortified *Cyprinus Carpio* and *Paralichthys Olivacleus* muscle tissue

Fortified level (μg/mL)	SMR[n*=4] (mean±SD**)	SMT[n=4] (mean±SD)	SMM[n=4] (mean±SD)	SDM[n=4] (mean±SD)	SQN[n=4] (mean±SD)
0.1	81.46±0.10	85.88±0.25	81.16±0.17	80.86±1.47	82.49±2.96
0.3	84.97±0.50	82.13±0.12	82.92±0.20	81.16±0.20	82.88±0.50
0.6	86.50±0.65	88.50±0.78	89.90±0.25	84.20±0.39	86.93±0.31
1.0	93.90±0.19	92.23±0.28	94.16±0.39	96.52±0.56	95.21±0.31

*n: Number of replicates.
**SD: Standard deviation.

Table 4. Recovery rate of tetracyclines from fortified *Cyprinus Carpio* and *Paralichthys Olivacleus* muscle tissue

Fortified level (μg/mL)	Oxytetracycline (mean±SD*, n**=4)	Tetracycline (mean±SD, n=4)	Chlortetracycline (mean±SD, n=4)
0.1	65.89±0.63	51.43±0.76	30.01±0.81
0.3	67.74±0.26	51.82±0.46	31.31±0.81
0.6	71.26±0.25	52.86±0.39	35.01±1.61
1.0	73.40±1.86	53.25±1.71	37.12±0.83

*SD: Standard deviation.
**n: Number of replicates.

Table 5. Detection of quantitation of sulfonamides residues in fish muscle tissue

Sampling month	NO. of sample	NO. of detection (%)	SMR[a] (ppm)		SMM[b] (ppm)	
			PO[c]	CC[d]	PO[c]	CC[d]
1, 3	32	0				
5, 7	32	3 (9.4)	0.0012 (SMR)	0.0020 (SMR)		0.0015 (SMM)
9, 11	32	0				

[a]: Sulfamerrazine.
[b]: Sulfamonomethoxine.
[c]: *Paralichthys Olivacleus.*
[d]: *Cyprinus Carpio.*

화학약품 및 농약의 오염에 의해 발생되는 물리 화학적인 환경요인, 각종 영양소의 결핍 등에 의한 영양성 요인, 바이러스, 세균 등의 감염에 의한 생물적인 요인 등 여러가지로 나눌 수 있다.[1] 특히 대부분 물고기 양식은 밀집사육으로 각종 감염증에 노출될 수 밖에 없으며, 정도에 차이가 있을 수 있으나 급성 또는 만성으로 높은 사망률을 나타내며, 외관상 변화를 일으켜 상품으로서 가치를 하락시킨다. 따라서 어류 양식업의 성패는 적절한 항균, 항생제 요법에 달려 있다고 보아도 과언이 아니다. 지금까지의 어류 감염질환에 대한 항균, 항생제 요법은 통상적으로 물고기 사료에 첨가하는 형태로 투여하며, 특히 이들 항균, 항생제 중 설파제는 1935년 Prontosil이 발견한 후 각종 화합물이 계속 개발되어 가축의 세균성, 원충성 감염질환의 치료와 예방목적으로 널리 사용되어 왔으며 안정된 구조와 경제적인 면에서 탁월하여 다양한 형태로 시판되어 특별한 규제없이 투약되고 있는 실정이다.[21] 또한 테트라사이클린계열의 항생물질은 그람양성균, 그람음성균 및 마이크로플라스마에 대하여 정균효과가 우수한 항생제로[22] 1990년도 우리나라 동물용 항생제제 총 생산량 중 유효성분을 기준으로 했을경우 CTC와 OTC가 29%를 차지하여[23] 그만큼 범용으로 쓰임을 시사한 바 있다. 이러한 제제의 투약법에는 경구법과 침적법, 분무법 등이 있으나 현재 인건비 상승 등 여러가지 요건으로 인해 일선에서는 사료에 섞는 경구법과 살포하는 침지법을 주로 사용하는 것으로 알려져 있다.[1,24,25] 이러한 법은 수의사의 권고없이 단지 경험에만 의존함으로써 약제를 균등하게 혼합하기가 곤란하며, 약품의 농도 차이가 생기기 쉽고 개체간의 섭취량의 차이 등 여러가지 요인의 소지가 다분히 있다. 어류는 수생동물로서 서식 환경적 특성상 생체내 약물대사능이 포유류에 비해서 매우 낮다.[26] 따라서 같은 항균성 물질일지라도 체내 잔류기간이 긴 것으로 알

려져 있다. 이와같이 일률적인 투여법에 의해 약물을 투여할 경우 잔류독성의 문제가 대두될 수 있다. 따라서 국내에서 이들 항생, 항균제 잔류가 국민 보건상 문제시 될 수 있다는 판단하에 최근 유해잔류물질 허용기준을 고시하여 규제하고 있다.[2] 한편, 식품의 안정성 여부를 검사하는 기관에서는 단시간내에 많은 시료를 검사하는 스크리닝법과 어떤 물질이 어느 정도 잔류되었는지 확인할 수 있는 신속하면서 정확한 분석법이 절실하게 필요한 실정이다. 따라서 같은 계열의 약제들 중 성상이 유사한 것들을 한번의 분석으로 동시검출이 가능한 효율적인 여러 가지 방법이 연구되어지고 있다.[8,9,12,13,16-19] 설파제와 테트라싸이클린제제를 분석할 수 있는 방법으로는 여러가지가 있겠으나 최근 C_{18} 고정상과 시료를 혼합하여 유발에서 균질화시키는 MSPD 방법[12,16-20]은 기계적인 힘과 소수성힘이 합쳐져 시료와 C_{18}이 매우 수월하게 반응하며 지방이나 비극성물질은 C_{18}의 말단에 노출되게 하는 방법인데 세척용매와 용출용매를 알맞게 선택할 경우는 시료 전처리 시간이 짧아 다수의 시료중에서 잔류물질을 신속하게 검사할 수 있는 매우 간편한 방법이다. 본 실험과 같이 C_{18}을 이용하여 실험한 Long 등[18,19]은 메기에 실험적으로 50~1000 ng/g 농도로 첨가하여 MSPD법으로 시료를 전 처리하여 SDM의 회수율을 본 결과 101.1±4.2%이라고 보고 하였으며, 돼지고기[17]에 첨가하여 MSPD법으로 추출한 설파제 다성분 분석에서 회수율을 측정한 결과 70.4~95.8%라고 보고 하였으며, 전 등[24]은 잉어에서 설파제를 투여한 결과 80.8~89.8%의 수준을 보였다고 보고하였으며, Reimer와 Suarez[25]는 연어육에서 Sulfapyridine(SPD), SMR, SMT을 각각 48, 66, 228 ppb 그리고 SDM은 150 ppb, Sulfadiazine(SDZ)는 100 ppb를 첨가한 후 MSPD로 측정한 결과 회수율은 각각 66%, 66%, 71% 그리고 82%와 75%라고 보고 하였는데 이는 본 실험의 결과(Table 3)보다는 다소 높은 것으로 나타났으며 이러한 차이는 추출용매와 이동상용매의 선택과 칼럼의 선택, 파장의 선택 등 여러가지의 차이때문이라고 사료된다. 또한, Reimer와 Suarez[25]는 연어육에서 회수율이 낮은 것은 콜레스테롤과 지방/기름 량이 비교적 높기 때문이라고 하였는데, 본 실험에서는 지방성분을 제거시키는 n-hexane 유출과정이 있기때문에 회수율이 높아지지 않았나 사료된다. 또한 설파제간의 개별적인 회수율 차이는 약간 있었지만 검출한계치는 0.05 μg/g이었다.

Onji 등[14]은 식육과 어류에서 OTC, TC 및 CTC를 추출하기 위해 1 N HCl을 사용하였으며, Amberite XAD-2 resin (Rohm and Hass Ltd., USA)으로 정제한 다음 methanol로 용출하여 HPLC로 분석한 결과 OTC, TC 및 CTC를 각각 1, 1 및 3 ppm 되게 첨가한 식육과 어육에서 회수율이 82.6, 81.5 및 67%를 보여 양호한 성적을 보였으나 시료량과 용매량이 너무많아 시간이 많이 소요되는것이 지적되었다. 또한 Carignan 등[27]은 연어육에서 OTC를 분석하기위해 1% metaphosphoric acid와 dichlormethane을 시료 전처리과정에 사용하여 85.8~90.3%의 좋은 회수율을 보고 하였으나 다른 테트라싸이클린제제의 추출가능성에 관한 보고는 없었다. 본 실험과 마찬가지로 실험한 조 등[16]은 OTC, TC 및 CTC의 회수율이 각각 68.5, 51.0 및 30.4%로 저조한 회수율을 보였다고 하였으며, 강 등[28]은 MSPD법에 일정량의 Na_2 EDTA와 옥살산을 투여하여 methanol과 0.01 M methanolic 옥살산 용액을 용출용매로 사용하여 시료에 0.1~1.0 ppm을 투여하여 분석한 결과 돈육에서 OTC, TC 및 CTC가 각각 91.84~110.16%, 57.70~79.45% 및 78.10~88.61%를 보였고, 우육에서 101.08~126.80, 66.36~75.35% 및 79.15~88.10%이였으며, 계육에서 90.83~95.57%, 66.18~84.43% 및 75.65~77.22%로 높은 회수율을 보였다. 송 등[29]에 의하면 우육, 돈육, 계육에서 OTC, TC 및 CTC를 0.1과 0.2 ppm 농도로 첨가하여 0.1 M Na_2 EDTA McIlvaine buffer를 사용하고 C_{18} cartridge로 정제하고 methanol로 용출하여 분석한 결과 OTC는 56.6~81.4%, TC는 55.2~74.4%, CTC는 57.7~68.5%의 회수율을 보였다고 보고하였다. 본 실험결과(Table 4) OTC의 경우 65.89~73.40%, TC는 51.43~53.25%, CTC의 경우 30.01~37.12%로 매우 저조하여 조 등[16]의 결과와 비슷한 결과를 보였으나 다른 실험자와는 매우 상이한 결과를 보였고, CTC가 0.05 μg/g에서 흔적만 보이고 판독 불가능 하였으며, OTC와 TC의 검출 한계치는 0.1 μg/g으로 나타났다. 이같은 차이는 정제과정 및 전처리과정과 칼럼의 차이도 있겠지만 최근의 연구에 의하면 테트라싸이클린이 Calcium 등의 2가 양이온의 금속이온과 결합하여 선택적 chealating 형성이 쉬워 생물학적 시료로부터 추출 되기가 어려우므로 Oka 등[30]은 alkyl기가 결합된 역상칼럼에 흡착되기 쉬워서 methanol, acetonitrile 혹은 ethanol로 C_{18} cartridge로 부터 유출되지 않아, 이러한 형상을 극복하기 위해 0.2 M 수용성 Na_2 EDTA로 전처리하여 0.01 M methanolic oxalic acid 액을 유출액으로 사용하여 높은 회수율을 얻었다고 보고 하였다. 송 등[29]은 위와 같은 문제점을 해결하기 위하여 0.1 M Na_2 EDTA McIlvaine buffer를 추출용매로 선택했으며 Whatman GF/B 여과지(USA)를 사용하여 정제 하였을때 본 실험에서도 이같은 과정을 거치면 좋은 결과를 보일것으로 사료되어 전처리과정에서 0.05 g Na_2 EDTA와 0.05 g Oxalic acid를 투여하여 일부 분석하여 보았는데 상당히 개선되는 경향이 보였으나 추후 Column과 이동상용매 등을 보강하여 실험해 보아야할 과제로 남겨졌다.

전 등[24]은 대구근교 양식장에서 수거한 어류에서 6월에 잉어 및 향어에서 0.01 ppm과 0.016 ppm의 SMM이, 8월에 대구근교 잉어, 안동호 잉어, 대청호 향어에서 각각 0.050 ppm, 0.028 ppm, 0.04 ppm의 SMM이, 8월의 대구근교 양식장 잉어에서 0.050 ppm의 SMM과 함께 0.018 ppm의 SMR이 동시 검출되었다고 보고하여 수온이 높아지는 여름철에 많이 검출되는 경향을 보였다. 본 실험에서 이는 alumina column에 85% methanol을 용출용매로 사용하고 1% acetic acid를 함유한 21% acetonitrile의 이동상을 사용한 결과로 본 실험방법과 다르지만 본 실험결과로 수온이 높아지는 여름철인 5, 7월에 광어, 향어내 항균, 항생제의 잔류수준이 매우 미미한 수준이긴 하지만 검출되는 것으로 보아 전 등[24]의 결과와 거의 일치하였으며, 수온증가로 인한 질병 발생확률이 높아지고 이에따라 항생물질이 이시기에 많이 투여되고 있다는 것을 짐작할 수 있다.

이상의 결과를 요약하면 어육중 설파제와 테트라싸이클린제제를 동시에 분석할 수 있는 방법을 찾고자 MSPD법으로 전처리한 후 동일한 파장과 유속, 흡광도, 칼럼으로 설파제와 테트라싸이클린제제를 동시에 검출할 수 있었으며 Na_2 EDTA를 첨가하거나, McIlvaine buffer용액을 추출용매로 선택하거나, Whatman GF/B 여과지를 이용하여 정제하여 실험적으로 좀더 보강을 하면 식육뿐만 아니라 어육중에서 설파제와 테트라싸이클린제제를 동시분석할 수 있는 법으로 적용 가능하리라 생각된다.

국문요약

어육중 설파제와 테트라싸이클린제제의 동시분석법을 확립하기 위해 MSPD법으로 전처리한 후 HPLC를 이용하여 시험한 결과 다음과 같은 결과를 얻을수 있었다. 1. 어육중의 설파제와 테트라싸이클린제제를 0.1~1.0 ppm 농도로 첨가하여 분석한 결과 SMR은 81.46~93.90%, SMT는 85.88~92.23%, SMM은 81.16~94.16%, SDM은 80.86~96.52%, 그리고 SQN은 82.49~95.21%의 회수율을 보였으며, 테트라싸이클린제제에서는 OXY가 65.89~73.40%, TC가 51.43~53.25%, 그리고 CTC의 경우 30.01~37.12%로 매우 낮은 회수율을 보였다. 2. 시중유통중인 향어, 광어 각각 96례를 MSPD법으로 전처리한 후 HPLC로 설파제와 테트라싸이클린제제의 잔류수준을 검사한 결과 어육중 테트라싸이클린제제는 모두 검출되지 않았고 광어에서 SMR이 0.0012 ppm, 향어에서 SMR이 0.0020 ppm, SMM이 0.0015 ppm으로 극히 미미한 수준으로 검출되었다. 3. 각 어류간의 계절별 특이성은 없었으나 수온이 높아지는 5, 7월에 설파제가 미량 검출되었다.

참고문헌

1. 허강준, 신광순, 이문한: 양식어류의 질병과 수산동물용의 의약품의 잔류방지 대책, 한국식품위생학회지 제7권 제2,3호, s7-s19, 1992.
2. 보건복지부 고시 제 1996-10호, 1996.
3. 식품공전, 제3, 식품일반에 대한 공통기준 및 규격, 7. 기준.규격의 적용, 2) 항생물질 등의 잔류 허용기준 및 14. 축산식품 중의 잔류물질시험법. 보건사회부, p.35, p.287-292, 1996.
4. Thomas M.J., Soroka K.E., and Thomas S.H.: Quantitative thin layer Chromatographic multisulfonamide screening procedure, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**(4), 881-892, 1983.
5. Ryan, J. J., and J. A., Dupont: Chemical analysis of Tetracycline residues in animal tissues, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **57**(4), 828-831, 1974.
6. Nelson, JR., Copeland, KT., Forster, Rj., Campbell, Dj., and Black, WD.: Sensitive gas liquid chromatographic method for chloramphenicol in animal tissues using electron capture detector, *J. Chromatogr.*, **276**, 438-444, 1983.
7. Manuel, AJ., and Steller, WA.: Gas-liquid chromatographic determination of Sulfamethazine in swine and cattle tissues, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**(4), 794, 1981.
8. Simpson, RM., Suhre, FB., and Shafer, JW.: Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of five sulfonamide residues in animal tissue, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**(1), 23, 1985.
9. Schwartz, DP., and McDonough, FE.: Practical screening procedure for chloramphenicol in milk at low parts per billion level, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 563-565, 1984.
10. Water, CVD. and Haagsma, N.: Sensitive streptavidin-biotin enzymelinked immunosorbent assay for rapid

screening of chloramphenicol residues in swine muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 534-540, 1990.

11. Dixon-Holland, DE., and Katz, SE.: Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for sulfamethazine residues in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**(3), 447, 1989.
12. Long A.R., Hsieh L.C., Malbrough M.S., Short C.R., and Barker S.A.: Matrix solid phase dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline in milk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**(3), 379-384, 1990.
13. Michael D., Smedley and John D., Weber: Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**(6), 1990.
14. Onji, Y., Uno, M., and Tanigawa, K.: Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in meat and fish, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**(6), 1135-1137, 1984.
15. Charm, SE.: Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 304, 1988.
16. 조태형, 이광식, 진남섭, 남궁 선, 박종명, 이문한: 테트라사이클린계 항생물질의 분석기법 개발 및 잔류조사에 관한 연구, 한국수의공중보건학회지, 제17권 제3호, 321-328, 1993.
17. Long A.R., Hsieh L.C., Malbrough M.S., Short C.R., and Barker S.A.: Multiresidue for the determination of sulfonamides in pork tissue. *J. Agric. Food Chem.*, **38**(2), 423-426, 1990.
18. Long A.R., Hsieh L.C., Malbrough M.S., Short C.R., and Barker S.A.: Matrix solid phase dispersion isolation and Liquid Chromatographic determination of oxytetracycline in catfish(Ictalurus punctatus) muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**(6), 864-867, 1990.
19. Long A.R., Hsieh L.C., Malbrough M.S., Short C.R., and Barker S.A. : Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of sulfadimethoxine in catfish(Ictalurus Punctatus) muscle tissue, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**(6), 868-871, 1990.
20. Barker S.A., Long A.R., and Short C.R.: Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, *J. Chromatogr.*, **475**, 353-361, 1989.
21. Bevil, RF: Veterinary pharmacology and therapeutics " sulfonamides" Iowa State Univ., 6th ed., 1988.
22. Baker SA., Walker CC. Review: Chromatographic methods fortetracycline analysis in food. *J. Chromatogr.*, **624**, 195-209, 1992.
23. 박종명, 신진호, 이광직, 남궁선: 동물약품 수급정보 전산화 연구. 농진청 가위연 시험연구 보고서, **90**, 36, 1990.
24. 전태환, 김경태, 고복실, 이준탁, 이상갑, 정규생: 내수면 양식어류중의 합성항균제 잔류량에 관한 조사연구, 대구직할시 보건원보, 5권, 72-79, 1994.
25. Reimer G.J., and Suarez A.: Liquid Chromatographic confirmatory method for five sulfonamides in Salmon muscle tissue by matrix solid-phase dispersion, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **75**(6), 979-981, 1992.
26. Prescott, JF and Baggot, JD: Antimicrobial drug action and interaction: An introduction In: Antimicrobial therapy in veterinary medicine. Iowa State Univ., 2nd(Ed)., 1-10, 1991.
27. Carignan, G., Carrier, K., and Sved, S.: Assay of oxytetracycline residues in salmon muscle by liquid chromatography with ultraviolet detection., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **76**, 325, 1993.
28. 강환구, 손성환, 조병훈, 박신자, 김재학, 조명행: MSPD (Matrix Solid Phase Dispersion) 전처리 방법을 이용한 식육중 잔류테트라사이클린 동시분석법 개발에 관한연구, 대한수의학회지, 제36권 제3호, 541-550, 1996.
29. 송성옥, 조명행, 신광순, 이문한, 류판동, 정병곤, 이승원, 이홍길: HPLC를 이용한 식육류의 잔류 테트라싸이클린계 항생물질의 동시분석법, 한국수의공중보건학회지, 제18권, 제4호, 343-352, 1994.
30. Oka, H., Matsumoto, H., Uno, K., Harada, KI., Kadowaki, S., Suzuki, M.: Improvement of chemical analysis of antibiotics. VIII. Application of prepacked C_{18} cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver, *J. Chromatogr.*, **325**, 265-274, 1985.