Kor. J. Food Hygiene 8 (1), 25-35 (1993)

액체 크로마토그라피를 이용한 동물 근육조직 중의 합성항균제 동시 분석

정규생 · 채명식 · 김창동 · 김종배
대구직할시 보건환경연구원

Simultaneous Determination of Residual Synthetic Antimicrobials in Animal Muscles by High Performance Liquid Chromatography

Kyu-Saeng Jung, Mung-Sik Chae, Chang-Dong Kim and Jong-Bea Kim
Public Health and Environment Institute Dea-gu

ABSTRACT－**This study is conducted to develop more convenient simultaneous determination method by HPLC for mixed antimicrobial agents (sulfamerazine; SMR, sulfamethazine; SMT, sulfamonomethoxine; SMMX, sulfadimethoxine; SDMX, sulfaquinoxaline; SQX, furazolidone; FZ, zolene; ZOL and ethopabate; EPB in muscles of bovine, pork and chicken. The drugs were extracted by dichloromethane and water. The extract, after solvent evaporation, was partitioned in hexane/water and water/dichloromethane. The dichloromethane layer was filtrated with anhydrous Na_5SO_4 in $_3G_3$ glass filter and was evaporated to dryness. The residue was dissolved in mobile phase. The test solution analyzed by HPLC. The chromatograpic conditions were as follows; Column-Spheri 5 RP-18(4.6×220, 5 μ), Wavelength-270 nm, Mobile phase-acetonitrile: 0.005 M oxalic acid (22 : 78). The average recoveries of drugs from muscles of bovine, pork and chicken spiked standard solution were approximately 74～99%, 73～99% and 75～96%, respectively. The limits of detection were 5 ppb for SMR, SMT, SMMX, SDMX and EPB, and 8 ppb for SQX, FZ and ZOL.**

국민소득수준의 향상으로 축산물의 소비가 날로 늘어가고 있고 수입 자유화로 인한 외국 축산물의 수입이 급증하고 있는 현 시점에서 이들 축산물내에 동물의 질병을 예방하고 가축의 생산성을 향상시키기 위해 사육시 투여되는 합성항균제의 잔류량을 적절하게 모니터링하기 위해서는 무엇보다도 이들 약제에 대한 간편하고 신속한 검정방법이 요구된다.

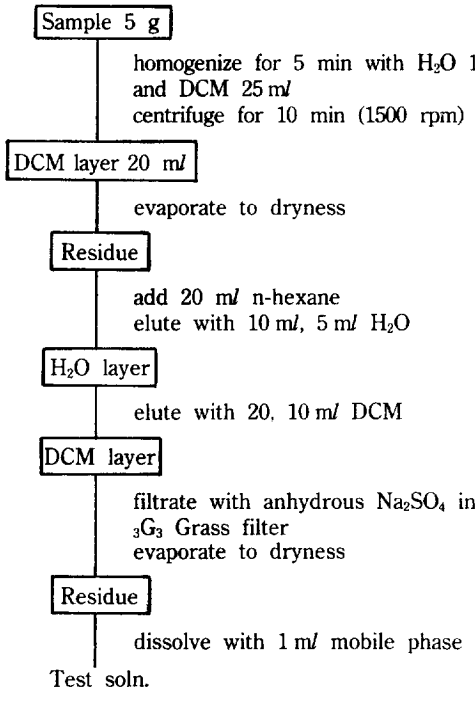
현재 우리나라 식품공전[1]에 의한 합성항균제 분석방법으로는 미국[2]이나 일본[3] 등과 마찬가지로 약제별로 그 잔류량을 개별분석하게 되어 있다. 그러나 이러한 약제별 개별분석방법은 각 약제의 정확한 분석에는 유용하다 할지라도 잔류 허용기준이 정해진 많은 약제를 일일이 분석하기에는 많은 시간과 경비를 필요로한다.

식품 중에 존재하는 합성항균제의 정량분석방법으로는 과거에는 colorimetry, thin-layer chromatography[4], bioassay법[5] 등이 주로 이용되어 왔으나 이 방법들은 각 약제에 대한 특이성과 민감도가 부족하다.[6] 오늘날 각종 분석기기의 발전으로 GC[7], GC-Mass[8], HPLC[9-24] 방법 등이 이용되고 있으나 GC법은 HPLC법에 비하여 시료 전처리가 비교적 복잡하고 분석조건에 따라 각 화합물을 유도체화하는데 장시간이 소요되기 때문에 대부분의 합성항균제 동시분석 연구에서 HPLC를 사용하고 있다.[9-24]

HPLC를 이용한 동시분석방법의 연구에 있어서[9-24] 서로 유사한 점도 있지만 대상 약제의 종류에 따라 분석기기, 자외선 흡수파장, 이동상용매, 칼럼 등의 선정에 따른 기기 분석조건과 다양한 시료 추출용매 그리고 세정과정에서의 액/액 분배 또는 흡착제 및 고상기질체의 사용 등에 따른 시험용액의 조제에서 많은 차이점을 보여주고 있다.

따라서 본 시험에서는 여태까지 보고된 합성항균제 동시분석방법을 토대로 하여 현재 식품공전에 잔류허용기준이 정해진 설파메라진(Sulfamera-

Scheme 1. Analytical method for antimicrobials in muscles of bovine, pork and chicken.



zine ; SMR), 설파메타진(Sulfamethazine ; SMT), 설파모노메톡신(Sulfamonomethoxine ; SMMX), 설파디메톡신(Sulfadimethoxine ; SDMX), 설파퀴녹살린(Sulfaquinoxaline ; SQX), 후라졸리돈(Furazolidone ; FZ), 죠렌(Zolene ; ZOL), 에토파베이트(Ethopabate ; EPB) 등 합성항균제 8종에 대한 보다 간편하고 신속한 동시분석방법을 검토하여 다소의 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시료

시판되는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기를 구입하여 근육부분을 취하고 호모게나이저로 균질화한 후 −10℃에서 동결시킨 후 매 시험마다 일정량을 취하여 시험에 사용하였다.

시약 · 초자 · 장비

시약－아세토니트릴, 메탄올은 Merck사의 HPLC용을, 디클로로메탄, 헥산, 무수황산나트륨, 수산화나트륨, 염산 등은 실험용시약 특급을, 증류수는 비저항계수 18 MΩ 이상의 초순수를 사용하였다.

초자－100 ml 원심분리용 튜브, 50 ml, 100 ml 공전플라스크, 100 ml 분액여두, $_3G_3$ 유리여과기

장비－SP-8810 pump, Sephari C_{18} column, Spectra 200 UV-VIS detector, Datjet, integrator ; Buchi RE 121 rotaovapor, Buchi 461 water bath, Centrifuser : 第一科學(Max 2000 rpm, Volume 100 ml), Spectrophotometer : unikon-860, Homogenizer (Ace)

표준원액 · 표준용액

표준원액－설파메라진, 설파메타진, 살파디메톡신, 설파퀴녹살린, 후라졸리돈, 죠렌은 표준품(Sigma사) 0.10 g을 정확히 취하여 아세토니트릴로, 설파모노메톡신은 메탄올 100 ml로 용해하여 사용하였고 죠렌과 에토파베이트는 1000 ppm으로 조제된 것(Sigma사)을 그대로 사용하였다.

표준용액－각 합성항균제 표준원액(1 mg/ml)을 이동상용액으로 희석하여 최종 농도를 0.01～1 μg/ml가 되게하여 사용하였다.

시험용액의 제조

시료 5 g을 50 ml 원심분리용 튜브에 취하고 증류수 10 ml와 디클로로메탄 25 ml를 가하여 5분간 진탕 혼합한 후 1500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 디클로로메탄층 20 ml를 100 ml 농축플라스크에 취한 후 40℃에서 감압농축하였다. 여기에 증류수 10 ml와 헥산 20 ml를 넣고 2분간 진탕혼합한 후 분액여두에 옮겼다. 플라스크 내부를 증류수 5 ml로 씻고, 씻은 액을 분액여두에 합쳤다. 5분간 정치하고 물층을 다른 분액여두에 옮긴 다음 디클로로메탄 20 ml를 가하여 2분간 진탕혼합하고 정치한 후 디클로로메탄층을 취하여 무수황산나트륨 5 g을 넣은 $_3G_3$ 유리여과기로 여과하였다(디클로로메탄 10 ml로 재추출). 여과기를 디클로로메탄 5 ml로 씻고 여액을 40℃에서 감압농축하여 증발 건고한 다음 잔유물을 이동상 1 ml에 녹인 후 시험용액으로 하였다.

자외선 흡수파장시험

각 합성항균제 표준원액을 이동상용매를 사용하여 검출농도 수준으로 희석한 다음 190～380 nm 사이의 자외선 흡수파장을 시험하였다.

검량선

합성항균제 표준원액을 이동상용매로 희석하여 5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng이 함유된 표준용액을 만들고 이를 HPLC에 주입하여 얻은 피크면적을 Y로 하고 X축을 주입량으로 하여 작성하였다.

회수율 시험

시판되고 있는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기를 구입하여 예비실험을 통해 대상 합성항균제가 잔류되지 않은 시료에 0.1(0.5 μg/5 g), 0.5(2.5 μg/5 g), 1.0(5 μg/5 g) ppm의 농도로 합성항균제 표준용액을 첨가하고 위의 시료용액의 조제에 의한 방법으로 전처리하여 얻은 시험용액을 HPLC에 10 μl 주입하여 분리된 각 합성항균제의 크로마토그람의 피크면적에 의해 회수율을 구하였다.

결 과

HPLC 측정조건의 검토

측정파장의 선정－Fig. 1은 각 합성항균제 표준원액을 0.005 M oxalic acid : acetonitile(78 : 22)를 이동상용매로 사용하여 검출농도 수준으로 희석하여 180～380 nm 사이에서 각 합성항균제들의 자외선 흡수파장을 시험한 결과를 나타내고 있다. SMR 265 nm, SMT 266 nm, SMMX 273 nm, SDMX 270 nm, SQX 248 nm, FZ 367 nm, ZOL 246 nm 그리고 EPB는 268 nm에서 최대흡광치를 나타내었다.

이 결과에서 SMR, SMT, SMMX, SDMX 그리고 EPB는 95～100%의 흡광치를 가지고 SQX, FZ 그리고 ZOL은 약 70～75% 정도의 흡광치를 가지는 270 nm의 자외선 파장이 이들 8종류의 합성항균제들을 분석하기 위한 가장 적합한 파장으로 나타났다.

칼럼의 선정

본 실험에 이용된 칼럼은 Spheri C_{18}(4.6×220 mm, 5 μ), μ-bondpark C_{18}(3.9×300 mm, 10 μ), inersil ODS-2(4.6×150 mm, 5μ), Supecosil LC-18(4.6×250) 칼럼을 사용하였으며 기타 다른 HPLC 조건은 Table 1과 같다. 피크분리도에 있어서(R : Resolution) Spheri C_{18} 칼럼과 Supecosil 칼럼을 사용하였을 때 각 합성항균제의 R값은 1.6 이상으로 나타났지만 μ-bondpark C_{18} 칼럼에서는 SMR과 SMT의 분리도(R)은 1.0이었고 SDMX과 SQX의 분리도는 1.2로 불완전한 분리를 이루었으며 그외 합성항균제들의 피크분리는 좋았다. Inersil ODS-2 칼럼에서는 다른 칼럼에서와 같이 SMMX, FZ, ZOL 그리고 EPB의 분리는 좋았으나 SMR과 SMT의 R값은 0.6 그리고 SDMX과 SQX의 R값은 1.0으로 나타났으며 각 합성항균제들의 t_R은 다른 칼럼에서보다 빠르게 나타났다.

그리고 이동상용매의 유량을 1.0 ml/min로 하였을 때 Spheri C_{18} 칼럼에서 HPLC 펌프의 압력은 2580 psi였고, Supecosil LC-18 칼럼에서는 1350 psi, μ-bondpark C_{18} 칼럼에서는 1380 psi 그리고 inersil ODS-2 칼럼에서는 1240 psi로 나타났다. 이로서 볼 때 본 실험에 가장 적합한 칼럼으로는 5 μm 입자를 가진 길이 220 mm 이상의 이론단수를 가지는 C_{18}이 충진된 칼럼을 사용하는 것이 바람직할 것으로 나타났다.

이동상용매의 선정

합성항균제의 동시분석시 흔히 이용되고 있는 이동상용매 중의 유기용매는 메탄올과 아세토니트릴이고 완충용액으로는 옥살산[13], 인산[12,18,22], 초산[15,23,24], 초산나트륨[20], 암모늄아세테이트[9], 황산[11], 수산화나트륨[21] 등이 주로 사용되고 있는데 유기용매와 완충용액의 비율은 분석하고자 하는 합성항균제의 종류와 특성에 따라 각각 달리하고 있다. 본 실험에서는 pH 변화에 따른 이동상 용매들의 피크분리 양상과 합성항균제들의 동시분석시 적절한 피크분

Table 1. Condition of HPLC

Column:	Spheri-5 RP-18 (220×4.6 mm, 5 micron)
Guard column:	RP-18 NEWGUARD 7 micron, 15×3.2 mm
Mobile phase:	acetonitrile : 0.005 M oxalic acid (22 : 78)
Column temperature:	Room temperature
Flow rate:	10 ml/min
Wavelength:	270 nm
Injection volume:	10 μl
attenuation:	2
chart speed:	0.5 cm/min

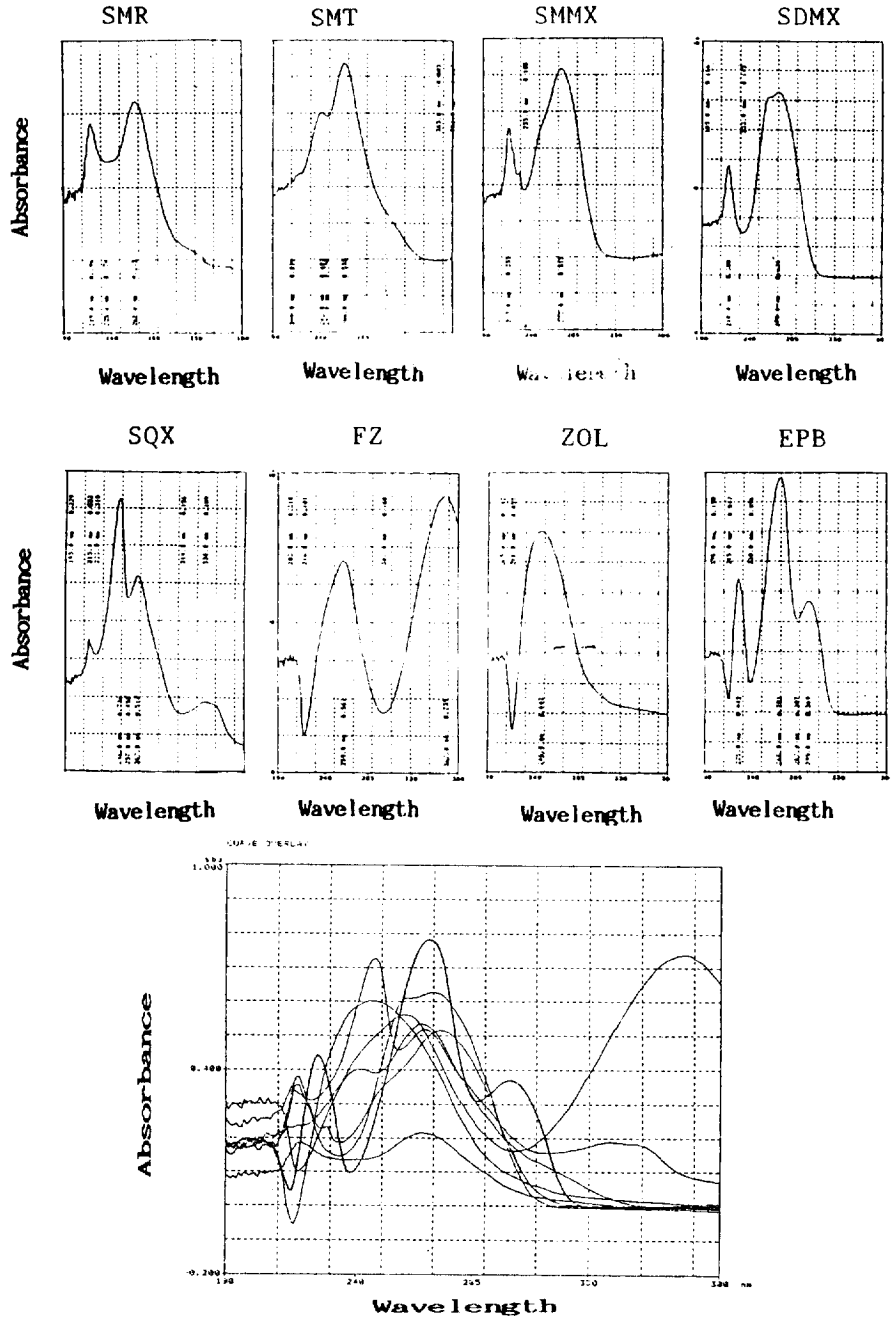


Fig. 1. Absorbance spectra of SMR, SMT, SMMX, SDMX, SQX, FZ, ZOL and EPB.

리를 유도하기 위하여 예비실험을 거쳐 분리도가 비교적 좋은 Table 2와 같은 이동상용매를 선정한 다음 각 합성항균제 표준용액 0.5 ppm으로 피크분리실험 및 그들의 pH 변화에 의한 지연시간(t_R)의 양상을 시험하였는데 이동상용매를 제외한 다른 HPLC 조건은 Table 1과 같다.

이 실험에서 각 합성항균제들의 t_R과 피크분리양상은 위의 세가지 이동상용매에서 대체적으로 R값이

Table 2. The sorts and ratio of mobile phase

Mobile phase	Ratio
0.005 M oxalic acid : acetonitrile	78 : 23
0.02 M phosphoric acid : acetonitrile	78 : 23
0.017 M ammonium acetate : water: acetonitrile	10 : 67 : 23 adj pH 5

1.6 이상의 양호한 피크분리를 이루었다. 그러나 1회 분석시간은 옥살산과 인산을 사용한 이동상용매에서는 약 25분이었으나 암모늄아세테이트를 사용한 이동상용매에서는 약 40분이 소요되었다.

그리고 위의 이동상용매에 0.1 N NaOH 용액 또는 0.1 N HCl 용액을 사용하여 인위적으로 pH를 조절하여 pH 변화에 따른 각 합성항균제의 피크분리 양상과 t_R의 변화를 알아보았다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 옥살산과 인산을 사용한 이동상용매에서는 pH 농도가 중성에 가까울수록 대부분 합성항균제들의 t_R은 길어졌으나 암모늄아세테이트를 사용한 것에서는 반대로 나타났다. 그리고 SDMX, SQX의 경우 pH 7.0에서 옥살산을 사용한 이동상용매를 제외하고는 빠른 t_R을 가져 설파제의 피크분리는 불완전하였다. 위의 실험을 거쳐 최종적으로 선정되어진 이동상용매는 0.005 M oxalic acid : acetonitrile(78 : 22, pH 2.35)였다.

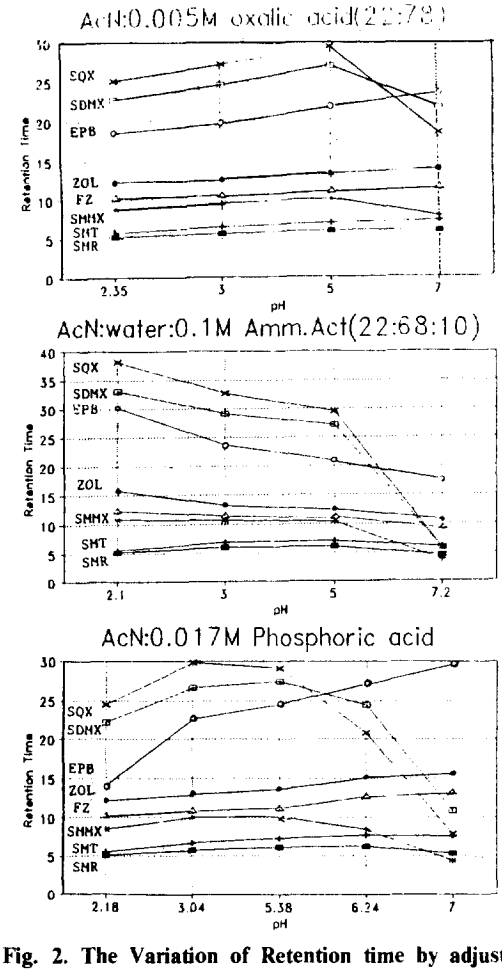


Fig. 2. The Variation of Retention time by adjusted pH of mobile phase.

이 이동상용매를 사용하여 분리된 각 합성항균제 표준용액 약 0.5 ppm의 크로마토그람은 Fig. 3과 같으며 각 합성항균제의 지연시간은 설파메라진 5.4, 설파메타진 6.0, 설파모노메톡신 8.8, 후라졸리돈 10.2, 죠렌 12.5, 에토파베이트 17.6, 설파디메톡신 22.1, 설파퀴녹살린 25.0분대로 나타났다.

한편 이동상용매 중의 아세토니트릴 농도의 증가는 각 합성항균제들의 분리를 빠르게 하지만 26% 이상의 농도에서 SMR과 SMT 그리고 SDMX와 SQX의 피크의 분리가 불완전하게 나타나므로 본 합성항균제 8종의 동시분석시 아세토니트릴 농도는 22~25%가 적당하였고 이동상용매의 유속을 1.0~1.5 ml/min 정도로 유지시킴으로 해서 적절한 분석시간을 단축시킬 수 있으리라고 생각되었다.

검량선의 작성

합성항균제 표준용액 5 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng을 HPLC에 주입하여 얻은 피크면적을 Y축으로, X축을

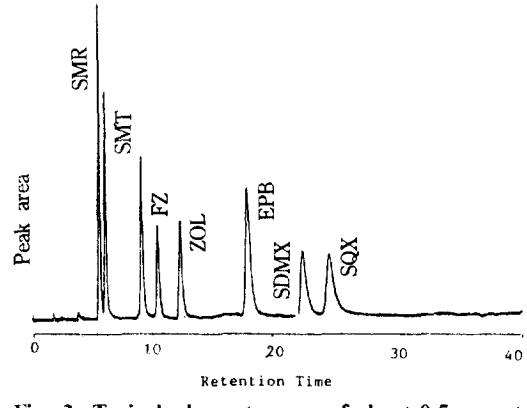


Fig. 3. Typical chromatogram of about 0.5 ppm stantards.

주입량으로 하여 작성한 회귀방정식에서 설파메라진은 Y=1016X+1060(r=0.999), 설파메타진은 Y=906X−167(0.999), 설파모노메톡신은 Y=558X+237(0.999), 설파디메톡신은 Y=1271X−4510(0.999), 설파퀴녹살린은 Y=1258X-5272(0.998), 후라졸리돈은 Y=678X-1624(0.999), 죠렌은 Y=723X-741(0.999) 그리고 EPB는 Y=1831X−6463(0.995)로서 양호한 직선성을 나타내었다.

시험용액의 조제

본 실험에서는 시료추출용매로 물과 디클로로메탄을 사용하였다. 즉 극성용매인 물과 비극성용매인 디클로로메탄을 시료에 넣어 진탕혼합함으로서 시료내에 존재하는 미량합성항균제를 두 가지 서로 다른 시료추출용매내에서 함께 균질화시킨다. 균질화된 시료 추출물은 그 후 미세 소립자와 잔류 약제와의 전기적 결합이나 생물학적 사이클의 전환(entramment)으로 일어날 수 있는 잔류약제의 손실을 방지하고 크고 작은 고형물 및 세포부스러기를 제거하기 위하여 1200 rpm으로 원심분리하였다. 이런 과정은 일반적으로 회수율을 높여줄 뿐 아니라[12] 물층으로 이행된 소량의 합성항균제를 디클로로메탄층으로 재추출하여 얻을 수 있도록 하였다. 이 과정에서 원심분리된 디클로롤메탄층의 최종추출액이 예비실험에서 메탄올과 아세토니트릴을 단독 또는 제 단백제로 사용되는 메타인산수용액과 혼합한 추출용매의 최종추출액보다 시료에서 유래되는 각종 방해물질과 수분이 제거된 비교적 깨끗한 추출액을 얻을 수 있어 세정과정의 단계를 단축시키는 효과를 가질 수 있었다.

세정과정은 추출액을 진공회전농축기로 증발 건고시킨 뒤 헥산/물 분배 그리고 물/디클로로메탄 분배를 이용하였다. 추출용매에 의해 추출된 시료 추출물내의 Chromosphore나 지방 등을 헥산 20 ml를 사용하여 제거한 결과 최종시험용액의 HPLC 주입시 UV검출기에서 감지되는 Base line의 상승이나 방해 피크는 나타나지 않았다.

그리고 헥산이 제거된 물층에 남아있는 잔류약제가 디클로로메탄으로 재추출되는 정도를 시험하기 위해 쇠고기 근육 추출물에 각 합성항균제 표준용액 1 ppm을 첨가시키고 헥산과 처음 pH 농도가 7.0인 증류수(물)와 0.1 N 염산, 0.1 N 수산화나트륨으로 조절한 물을 시험용액의 조제와 같이 넣은 후 그와 동일한 방법으로 전처리한 후 회수율을 시험하였다.

Table 3에서 볼 수 있듯이 SMR, SMT, SMMX, SDMX, SQX은 물의 pH 농도가 산성에 가까울수록 디클로로메탄층으로 재추출되는 회수율이 중성에서보다 다소 적게 나타났으며 pH 10.5에서는 1% 이하의 극히 낮은 이행율을 보여주고 있다. 그러나 후라졸리돈, 죠렌, 에토파베이트는 물의 pH 농도에 큰 영향을 받지 않았다. 이 결과로서 추정해 볼때 시료추출용매로 제 단백제 및 시료 중의 pH 조절을 위한 메타인산용액의 사용은 설파제 계통의 잔류약제를 효과적으로 추출해 내는데 좋은 추출용매로 생각되었다.

그러나 본 실험에서 시료추출용매로 메타인산 수용액 대신 물을 사용한 것은 메타인산 수용액은 주로 극성에 가까운 메탄올 등과 함께 일정비율로 사용되어지고[6,13] 예비실험에서 메타인산수용액을 디클로로메탄과 함께 시료추출용매로 사용했을 때 디클로로메탄층으로 이행되는 회수율이 낮았기 때문이었다. 따라서 헥산/물, 물/디클로로메탄 분배과정에서 별도의 pH 조절이 필요하지 않았다.

Fig. 4, 5, 6은 위의 전처리과정을 거쳐 조제된 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 시료의 공시험 크로마토그람과 위의 시료에 각 합성항균제 0.2 ppm을 첨가

Table 3. Recovery data by pH of water in extracts

pH	Average Recovery (%)							
	SMR	SMT	SMMX	SDMX	SQX	FZ	ZOL	EPB
2.5	49.3	55.1	64.2	78.8	74.6	76.1	85.3	92.5
7.0	80.2	86.8	74.0	80.9	80.6	79.6	94.0	99.5
10.5	0.3	0.6	0.3	0.3	0.2	78.5	86.4	93.8

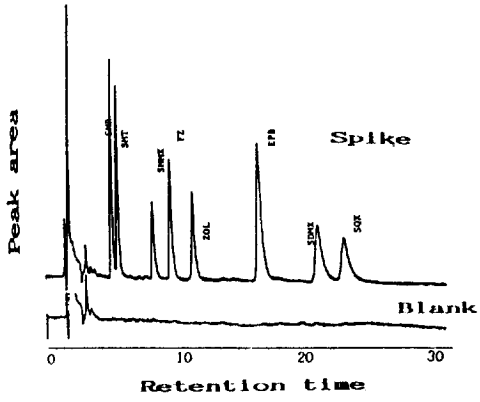


Fig. 4. Chromatograms of spiked and unspiked bovine muscle.

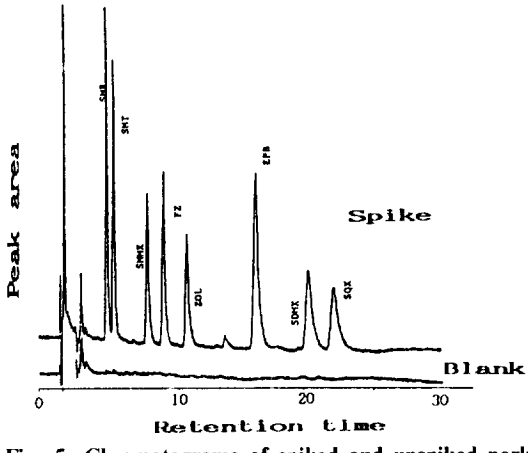


Fig. 5. Chromatograms of spiked and unspiked pork muscle.

한 후 분리된 크로마토그람을 보여주고 있다. 그림에서 보는 바와 같이 대상 합성항균제의 지연시간대에 분석에 영향을 줄 수 있는 어떠한 피크도 발견되지 않았으며, 합성항균제를 첨가한 시료에서 나타난 크로마토그람 역시 깨끗하였다.

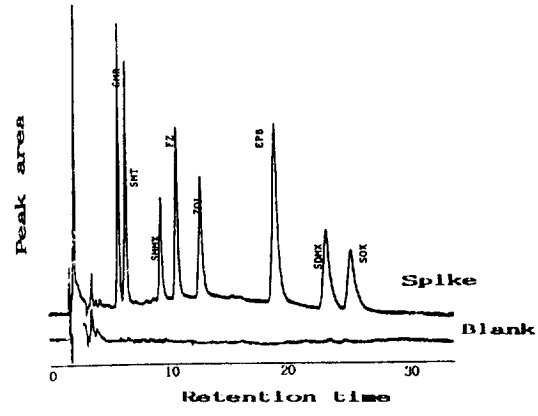


Fig. 6. Chromatograms of spiked and unspiked chicken muscle.

회수율 시험

실험에 사용한 시료는 예비실험을 통하여 대상 합성항균제가 잔류되지 않은 것을 사용하였으며 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 시료에 0.05 ppm 0.1 ppm, 1.0 ppm을 넣어 10분 후에 시료 추출용매를 넣어 시험용액의 조제와 동일하게 처리하여 3회 분석하였는데 쇠고기 시료에서 회수율은 Table 4에서 보는 바와 같이 설파메라진 80.8%, 설파메타진 84.0%, 설파모노메톡신 74.9%, 설파디메톡신 88.2%, 설파퀴녹살린 85.0%, 후라졸리돈 80.6%, 죠렌 90.2%, 에토파베이트 98.7%로 나타났다.

그리고 돼지고기 시료에서 첨가회수율은 Table 5에서 보는 바와 같이 설파메라진 80.6%, 설파메타진 84.5%, 설파모노메톡신 73.5%, 설파디메톡신 83.6%, 설파퀴녹살린 79.8%, 후라졸리돈 81.0%, 죠렌 88.9%, 에토파베이트 99.0%로 나타났다.

Table 4. Recovery data for the determination of antimicrobial agents in bovine muscle

Fortification level, ppm	Average Recovery(%)*± SD							
	SMR	SMT	SMMX	SDM.	SQX	FZ	ZOL	EPB
0.05	82.5± 3.5	88.7± 5.2	75.8± 1.9	89.1± 2.9	84.5± 2.5	81.0± 6.1	90.2± 4.1	99.4± 3.0
0.1	80.9± 2.0	88.0± 5.8	72.1± 3.6	85.6± 3.0	80.3± 3.4	78.2± 3.8	91.4± 3.3	97.2± 2.4
1.0	78.9± 4.0	84.9± 3.2	76.8± 4.1	90.0± 4.0	80.2± 6.0	82.5± 3.3	88.9± 2.8	99.5± 2.9
Total	80.8± 1.8	84.0± 3.9	74.9± 2.5	88.2± 2.3	85.0± 4.2	80.6± 2.2	90.2± 1.3	98.7± 1.3

*Replicate of three

Table 5. Recovery data for the determination of antimicrobial agents in pork muscle

Fortification level, ppm	Average Recovery(%)*± SD							
	SMR	SMT	SMMX	SDMX	SQX	FZ	ZOL	EPB
0.05	79.6± 4.0	83.5± 3.8	74.1± 2.8	84.8± 5.9	83.4± 5.2	85.4± 8.0	84.1± 3.6	98.3± 2.9
0.1	82.1± 2.7	83.1± 2.8	72.5± 3.1	85.0± 4.0	75.4± 2.8	78.1± 4.0	88.6± 3.5	99.1± 4.1
1.0	80.2± 3.5	86.8± 4.1	74.0± 2.1	80.9± 3.1	80.6± 3.9	79.6± 3.8	94.0± 5.8	99.5± 5.8
Total	80.6± 1.3	84.5± 2.0	73.5± 0.9	83.6± 2.3	79.8± 4.1	81.0± 3.9	88.9± 5.0	99.0± 0.6

*Replicate of three

Table 6. Recovery data for the determination of antimicrobial agents in chicken muscle

Fortification level, ppm	Average Recovery(%)*± SD							
	SMR	SMT	SMMX	SDMX	SQX	FZ	ZOL	EPB
0.05	86.4± 4.4	89.1± 5.2	76.4± 2.9	88.1± 6.2	79.2± 3.6	83.6± 5.1	92.1± 3.5	94.7± 4.0
0.1	80.7± 3.8	86.1± 4.0	70.5± 3.4	85.2± 4.8	76.8± 3.5	76.9± 2.9	88.0± 4.8	95.2± 3.8
1.0	81.5± 3.2	87.4± 5.0	77.1± 4.8	82.4± 4.0	81.5± 2.9	82.8± 3.8	91.2± 4.2	98.2± 4.0
Total	82.9± 3.1	87.5± 1.5	74.7± 3.6	85.2± 2.9	79.2± 2.4	81.1± 3.7	90.4± 2.2	96.0± 1.9

*Replicate of three

그리고 닭고기시료에서 회수율은 Table 6에서 보는 바와 같이 설파메라진 82.9%, 설파메타진 87.5 %, 설파모노메톡신 74.7%, 설파디메톡신 85.2%, 설파퀴녹살린 79.2%, 후라졸리돈 81.1%, 죠렌 90.4%, 에토파베이트 96.0%로 나타났다.

고 찰

현재 식품공전에서는 설파메라진, 설파디메톡신, 설파모노메톡신, 설파퀴녹살린 그리고 후라졸리돈은 GC-ECD로 설파메타진, 죠렌 그리고 에토파베이트는 HPLC를 사용하여 각 약제별로 개별분석하게 되어 있어 축산물 중의 잔류약제를 모니터링하기 위해서는 시간 재료 소모가 많을 뿐 아니라 시료 전처리과정도 비교적 복잡하다. 예를 들어 식품공전상 설파디메톡신의 개별분석시 1회 분석에 소요되는 재료량은 유기용매 800 ml, 무수황산나트륨 300 g 정도이고 시료 전처리과정에서 pH 조절과 유도체화 과정을 요구하고 있어 본 실험의 대상 합성항균제를 개별로 분석할 때 많은 경비와 시간이 소모된다.

따라서 본 동시분석법의 검토에 있어서는 분석장비로 가능한 한 기초실험장비를 사용하고자 하였고 HPLC 검출기 중에서 가장 많이 보급되어 있는 UV-VIS 검출기를 사용하였다. 또한 시료용액의 조제시 활성알루미나 등과 같은 흡착제나 C_{18} 카트리지 등을 이용한 정제과정을 생략함으로 해서 분석시간 및 경비의 절감과 분석자와 제품성능의 차이에서 나타나는 추출 회수율의 오류를 방지하고자 하였고, 추출용매에 의한 추출물의 세정단계를 최소화함과 동시에 유기용매의 소량 사용 및 추출용매의 pH 미조절로 간편하고 신속 정확한 분석방법을 확립하고자 하였다.

한편 합성항균제의 물리화학적 특성이 서로 다르기 때문에 가금동물과 축산 생산물 중의 잔류합성항균제를 분석하기 위해서는 선택되어진 시료에서 원하는 화합물을 완전히 회수할 수 있는 추출용매와 세정과정이 무엇보다도 중요하다. 이는 회수율에 절대적인 영향을 미치기 때문이다. 지금까지 잔류 합성항균제의 분석에 사용되어진 추출용매들은 대부분이 아세토니트릴, 아세톤, 클로로포름, 디메틸포름아미드, 초산에칠, 디클로로메탄 등의 유기용매가 단독으로 또는 혼합되어 사용되어져 왔고, 분석코자하는 합성항균제가 특정한 pH 농도에서 추출회수율이 높

다는 것과 시료 중에 존재하는 단백질을 효율적으로 제거하기 위하여 메타인산수용액 등과 같은 제 단백제가 위의 유기용매와 함께 추출용매로 사용되기도 하고,[6,13] 최근에는 C_{18}과 같은 고상기질체의 넓은 표면적을 이용한 MSPD(Matrix Soild Phase Dispersion) 방법[12,20]이 사용되어지기도 한다.

본 실험에서는 시료추출용매로 물과 디크로로메탄을 사용하여 시료내의 잔류 약제를 추출하고 추출액을 증발건고한 다음 헥산/물 분배를 통하여 추출물내 존재하는 지용성물질을 제거한 다음 물층에 존재하는 잔류약제를 비극성용매인 디클로로메탄으로 재추출함으로해서 극성물질의 방해를 최소화 하였다. 일반적으로 액/액 분배의 단점으로 지적되고 있는 에멀션의 형성은 용매간의 분리를 불완전하게 함으로서 회수율 저하의 요인을 만들게 하지만[2,4] 본 실험에 사용된 시료추출용매에 의해 추출된 디클로로메탄 중의 방해물질의 소량으로 분배과정에 있어서 수분의 정치에도 에멀션의 형성없이 깨끗한 분리를 이루었다. 그러나 예비 실험에서 메탄올과 아세토니트릴을 단독으로 또는 메타인산수용액과 혼합하여 사용한 추출액에서는 액/액 분배시 에멀션 형성이 심하여 흡착제나 C_{18} 카트리지 또는 원심분리과정을 필요로 했다.

그리고 최종추출액을 무수황산나트륨이 함유된 $_3G_3$ 유리여과기로 여과한 다음 감압농축기로 증발건고해서 이동상 1 ml에 녹인 시험용액을 HPLC에 주입해서 나타난 크로마토그람에서 50분 이내 분석에 방해를 일으킬 수 있는 어떠한 피크도 발견되지 않았으며 각 시료에서 대상 합성항균제의 첨가회수율 및 재현성은 비교적 좋았다. 그리고 검출한계는 근육시료 5 g에 대하여 설파메라진 5 ppb, 설파메타진 5 ppb, 설파모노메톡신 5 ppb, 설파디메톡신 5 ppb, 설파퀴녹살린 8 ppb, 후라졸리돈 8 ppb, 죠렌 8 ppb, 그리고 에토파베이트가 5 ppb였으며 검출감도와 시료주입량을 높히고 최종시험용액의 양을 줄임으로 검출한계를 더욱 높힐 수 있을 것이므로 본 동시분석방법은 식육제품 중에 존재하는 미량의 합성항균제 잔류량을 간편하고 신속하게 모니터링하는데 좋은 분석방법이라고 생각된다.

또한 여러가지 이동상용매와 그들의 pH 변화에 의한 각 합성항균제들의 t_R 및 피크 분리양상은 실제 업무수행 중 검출된 각 합성항균제들의 확인과정에 TLC, GC, GC-Mass 등의 다른 장비를 사용하지 않고 앞에서 제시된 자외선 흡수파장 시험에서 각 파장에서의 흡광도시험과 병행하여 단지 HPLC만으로 각 합성항균제의 성분확인이 충분히 가능하리라 생각된다.

그리고 예비실험에서 본 실험의 대상 약제는 아니지만 올라퀸독스는 2.7분대, 옥소린산은 3.2분대, 카바독스는 4.3분대에 분리되었으나 위의 8개 합성항균제와 동시분석시 t_R이 너무 빠르고 피크분리가 불완전하여 본 실험에서 제외시켰고 나이카바진은 이동상용매 중의 아세토니트릴의 함량을 65%로 할 때 5분대 분리되어 본 동시분석연구에서 두 가지 이동상용매를 사용해야 하는 불편함으로 제외되었다.

국문요약

본 연구에서는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 중에 잔류하는 설파메라진(SMR), 설파메타진(SMT), 설파모노메톡신(SMMX), 설파디메톡신(SDMX), 설파퀴녹살린(SQX), 후라졸리돈(FZ), 죠렌(ZOL), 에토파베이트(EPB) 등 합성항균제 8종에 대한 신속하고 간편한 동시분석방법을 검토하였다. 동시분석파장으로는 270 nm, 이동상 용매로는 0.005 M Oxalic acid : Acetonitile(22 : 78), 시료추출용매로 물과 디클로로메탄을 사용하였고 세정과정은 헥산/물, 물/디클로로메탄 분배를 이용하였다. 각 시료에 합성항균제 표준용액을 첨가하고 위의 과정을 거친 최종추출액을 HPLC에 주입하여 나타난 각 합성항균제의 분리는 좋았고, 각 시료에서의 대상합성항균제들의 회수율은 쇠고기에서 74~99%, 돼지고기에서 73~99%, 닭에서 75~96%로 나타났다. 검출한계는 SMR, SMT, SMMX, SDMX, EPB에서 5 ppb, SQX, FZ, ZOL에서 8 ppb로 나타났으며 각 합성항균제들의 흡수파장시험 및 pH 변화에 의한 피크분리실험에서 실제 업무수행 중에 검출된 약제를 다른 장비를 사용하지 않고 단지 HPLC만으로도 확인이 가능하였다.

참고문헌

1. 보건사회부 : 식품공전, 일지문화사, 548-567 (1991).
2. AOAC: Association of official analytical chemists, Virginia, 15th ed, 607-636 (1991)
3. 日本食品衛生協會 : 日本衛生檢查指針,432-434(1991).
4. Thomas, M.H., Soroka, K.E. and Thomas, S.H: Quantitative thin layer chromatographic multi-sulfonamide screening procedure, *J. Assoc. Anal. Chem,* **66**(4), 881-883 (1983).
5. 김교준, 김상근, 강오동: Sulfadimethoxine의 계육 및 계란내 이행잔류에 관한 연구, 농업기술연구소보, **12**(2), 349-355 (1985).
6. Horie, M., Hoshino, Y., Nose, M., Iwasaki, H. and Nakajawa, H.: Simultanious determination of antibiotics and synthetic antibacterials in fish by high performance liquid chromatography, *Eisei Kagaku,* **31**(6), 371-376 (1985).
7. 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).
8. Matusik, J.E., Sternal, R.S., Barnes, C.J. and Spone, J.A.: Confirmation of identify by gas chromatography/tendom mass spectrometry of sulfathiazole, sulfamethazine, sulfachloropyridazine and sulfadimethoxine from bovine or swine liver extracts after quantitation by gas chromatography/electron-capture detection, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* **73**(4), 529-523 (1991).
9. 한국과학기술연구원 도핑콘트롤센타 : 식품 중 인체 유해물질 검정교육과 분석방법 개발에 관한 연구, 145-166 (1991).
10. Oka, H., Ikai, Y., Kayamura, N., Yamada, K.O., Harada, K.I., Hirohiko, M.U. and Suzuki, A.M.: Determination of eitht tetracycline using thin layer and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.,* **393**, 285-296 (1987).
11. Torel, J., Cillard, J., Cilard, P. and Vie, M.: Simultanious analysis of three antimicrobial agents in feed premixes by reserve phase high performance liguid chromatography, *J. Chromatogr.,* **323**, 447-450 (1985).
12. Long, A.R., Hsieh, 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. Horie, M., Saito, H., Hosinno, Y., Nose, H., Nakajawa, H., Yamane, Y.: Simultanious determination of residual synthetic antibacterials in fish by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.,* **538**, 484-491 (1991).
14. 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).
15. Takeda, M. and Akiyama, Y.: Rapid determination of sulfonamides in milk using liquid chromatographic separation and fluoresamine derivatization, *J. Chromatogr.,* **607**, 31-35 (1992).
16. Park, O.W.: Liquid chromatographic-electrochemical 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).
17. Ueno, R., Uno, K., Saburoh, M.K., Sauroh, S.K. and Omki, K.: Simultanious determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine and their N4-acetylated forms in fish tissues by high performance liquid chromatography, *Nippon Suisan Gakkaishi,* **57**(3), 549-554 (1991).
18. Horii, S., Momma, C., Miyahara, K., Maruyama, T. and Matsunot, M.: Liquid chromatographic determination of three sulfonamides in aminal tissue and egg, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* **73**(6), 990-992 (1990).
19. Walker, L.V., Walsh, J.R. and Webber, J.J.: High performance liquid chromatography of sulfonamides extracted from bovine and porcine muscle by soild-phase disperation. *J. Chromatogr.,* **595**, 179-184 (1992).
20. Wiess, G., Duke, P.D. and Ganzes, L.: HPLC method for simultanious analysis of sulfadimethoxine and ormetoprim in tissues and blood of cattle, chicken and catfish, *J. Agric. Food Chem.,* **35**, 905-909 (1987).
21. Bergqvist, Y., Eckerbom, S., Larsson, H. and Zadeh, N.M.: Reverse phase liquid chromatographic method for the simultanious determination of the antimalarial drugs sulfadoxine, pyrimethadine, mefloquine and its major carboxylic metabolite in plasma, *J. Chromatogr.,* **571**, 169-177 (1991).
22. Hori, Y.: Systematic analysis of synthetic antibacterials in chicken muscle and eggs by high performance liquid chromatography, *Kor. J. Food. Hygiene.* **24**(5), 447-453 (1983).

23. Hori, Y.: Determination of synthetic antimicrobials in culture fish by high performance liquid chromatography, *Kor. J. Food. Hygiene*, **25**(2), 158-162 (1984).
24. Ikai, Y., Oka, H., Kawamura, H., Hayakaya, J., Yamada, M., Harada, K.I., Suzeki, M. and Kazawa, H.: Application of an amimo cartridge to the determination of residual sulfonamide antimicrobacterials in meat, fish and egg, *J. Chromatogr.*, **541**, 393-400 (1991).