

Fluorescamine을 이용한 sulfonamide의 형광 분석법

임재영 · 한수남 · 이문한 · 박종명*

서울대학교 수의과대학

농촌진흥청 가축위생연구소*

(1989. 12. 30 접수)

Spectrofluometry of sulfonamides using fluorescamine

Jae-young Lim, Su-nam Han, Mun-han Lee, Jong-myung Park*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Veterinary Research Institute, Rural Development Administration*

(Received Dec 30, 1989)

Abstract: These experiments were carried out to develop a novel, simple, and rapid method to determine urinary sulfonamides using fluorescamine by spectrofluorometry. To get optimal conditions for the sulfonamide-fluorescamine reaction, sulfonamides such as sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine and sulfamonomethoxine, dissolved in buffers with various pH ranges were reacted with various concentrations of fluorescamine, and then, the fluorescence intensity and stability of the fluorophore were measured. To eliminate the interfering substances in urine, the fluorophore in buffers and urine with a definite pH range was extracted with some organic solvents. After then the fluorescence intensity was measured in organic and aqueous phases.

The results obtained were summarized as follows:

1. The maximal fluorescence of sulfonamides was presented in acidic state, pH 4.5~5.0, at 30 minutes after reaction.
2. The optimal concentration ratio of sulfamethazine and fluorescamine was more than 1 : 40 in mole.
3. In pH 4.0, the intensity was maximal but was time-dependent, whereas in pH 8.0, the intensity was time-independent.
4. Sulfamethazine-fluorescamine conjugate could be dissolved in some of organic solvents in acidic state such as chloroform, n-butanol, and ethylacetate.
5. Sulfamethazine-fluorescamine conjugate in swine urine could be extracted with ethylacetate in acidic state, pH 4.0~5.0.

Key word: sulfamethazine, fluorescamine, spectrofluorometry, sulfonamides, swine urine.

서 론

가축의 질병을 예방하고 성장을 촉진시키기 위하여 사료 첨가제로서의 항균제 및 항생제의 사용이 날로 증가하고 있으며, 이들 중에서 합성항균제인 sulfonamide

는 항균 범위가 특이하고 값이 저렴하기 때문에 국내외에서 널리 사용되고 있다.^{1,2} 한편 축산 식품중에 잔류하는 sulfonamide을 비롯한 항균성 물질은 인체에 유해하게 작용할 수 있기 때문에 미국을 비롯한 선진 외국에서는 이들 항균성 물질에 대한 사용지침을 만들

이 시행하고 있다. 즉, 식육중에서의 잔류량을 줄이기 위하여 도축전 안전휴약기간과 최대 잔류허용량을 정하여 이를 규제하고 있다.³

축산 식품중에 잔류하고 있는 sulfonamide를 정성 정량하기 위한 방법으로는 비색법, GC법, GLC법, TLC법 및 HPLC법 등이 있으며 이 중에서 비색법인 Bratton-Marshall법은 가장 고전적인 방법으로서 방법이 간편하고 특수한 기기를 필요로 하지 않기 때문에 널리 사용되고 있다.^{4,5} 이 방법은 더 개량되어 안정성이 높고 간섭물질의 작용을 줄일수 있게 되었으나^{6,7} 30여종이 넘는 sulfonamide을 분별하여 정량할 수 없을뿐만 아니라 방향족 이민기나 1급 이민기를 갖는 물질과도 반응하여 정색반응을 나타내기 때문에 이들 물질이 방해 물질로 작용할 수 있다.^{8,9} TLC법은 sulfonamide에 대한 screening test로서 그 방법이 간편하고 신속하여 일시에 많은 시료를 처리할 수 있어 널리 이용되고 있으나¹⁰⁻¹² 각종 sulfonamide을 분별할 수 있는 Rf치가 매우 근사하여 각 sulfonamide의 종류를 정확하게 식별하기가 어려우며 정확한 정량 분석 또한 어려운 실정이다. GC법, GLC법 및 HPLC법 등은 회수율이 높고 정확하게 정성 및 정량할 수 있는 장점이 있어 최근 널리 사용되고 있으나¹³⁻¹⁶ 이들 방법은 시료의 전처리 과정이 복잡하여 다량의 시료를 단시간 내에 처리하는 데는 어려움이 있다.

Weigle et al¹⁷에 의해 처음으로 합성된 4-phenylspiro[furan-2(3H), 1'-phthalan]-3,3'-dione, 즉 fluorescamine은 primary amine을 정량하기 위한 새로운 물질로서 그 자체만으로는 형광을 띄우지 않으나 아미노산, 펩타이드, 단백질, sulfonamide 등과 같은 primary amine과 반응하여 형광을 나타내는 pyrrolinone을 형성한다.

이때 fluorescamine은 100~500msec내에 primary amine과 반응하며 반응에 관계하지 않는 것은 물과 반응하여 수초내에 가수분해 된다.¹⁸ 이 fluorescamine을 이용한 형광법은 Bratton-Marshall법 혹은, ninhydrin 비색법 보다는 훨씬 감도가 높아^{19,20} primary amine을 갖는 물질을 정량하기 위한 새로운 방법으로서의 개발 가능성을 제시하였다.

Stein et al²¹은 이 fluorescamine을 전기영동에서 단백질의 아미노산 조성분석에 이용하였고 Veening et al²²은 이온교환 chromatography을 이용하여 체액중에 존재하는 polyamin분석에 사용하였다. 또한, 아미노산, 펩타이드 등을 정량분석함에 있어 HPLC에 적용할 수 있음이 보고되었다.^{23,24}

특히 TLC에 fluorescamine을 발색시약으로서 사용

한 예가 많이 보고 되었는데 Felix와 Jimenez²⁵는 10% triethylamine을 peptide-resin에 전처리 하였을때 형광강도가 증가하고 또 정색성을 오래 지속시킬 수 있다고 보고하였으며, Imai et al²⁶은 fuorophore를 직접 TLC에 전개하여 아미노산, 펩타이드, catecholamine등을 검출하는 방법을 개발하였다. 또한 Furlan과 Beck²⁷는 cellulose plate을 이용하여 펩타이드를 mapping하는데, 그리고 Nakamura와 Pisano²⁸는 펩타이드, 단백질, 그리고 생물학적으로 중요한 대부분의 아민화합물을 TLC에 전개한후 plate를 직접 fluorescamine 용액에 침지(dipping)시켜 발색시키는 방법을 보고하였다. 웨지의 조직과 혈액에 잔류하는 sulfonamide을 검출하기 위하여 TLC-fluorescamine 방법²⁹을 이용하고 있는데 Bevil et al³⁰은 돼지의 혈액내 존재하는 sulfonamide을 검출하기 위한 방법으로 TLC에 전개한후 fluorescamine용액에 침지(dipping)시키는 방법을 보고 하였으며 또한 Thomas et al³¹은 돈육내 잔류하는 sulfamethazine을 검출하는 방법으로서 TLC-fluorescamine방법을 사용하였다.

따라서 본 실험에서는 도축후 돈육내에 잔류하는 sulfamethazine을 검출하는 방법대신에 도축전의 돼지 오줌에 잔류하는 sulfamethazine에 fluorescamine을 반응시켜 반응생성물인 fuorophore을 적절한 유기용매로 1회 추출하여 간편하게 정량할 수 있는 형광법(spectrofluorometry)을 개발하고자 본 실험에 임하였다.

이를 위하여 현재 국내에서 널리 사용되고 있는 sulfonamide중 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine, sulfamonomethoxine을 pH범위가 다양한 완충액에 녹여 fluorescamine과 반응시킴으로써 pH변화에 따른 형광강도 변화를 조사하고 sulfonamide와 fluorescamine의 적정 반응 물농도를 조사하였다.

또한 이 반응 생성물의 안정성을 조사하기 위하여 반응개시후 경시별로 형광강도를 조사하였으며, 아울리 chloroform, ethylacetate, n-butanol, hexane, cyclohexane, benzene등과 같은 유기용매에 대한 fuorophore의 용해도를 조사하였다.

재료 및 방법

Fluorescamine 용액 조제 : Fluorescamine(SIGMA) 100mg을 재 증류한 acetone 100ml에 녹여 밀폐된 용기에 담아 상온에서 보관하며 사용 하였다.

Sulfonamide 표준 용액 조제 : Sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine, sulfamonomethoxine(SIGMA)을 각각 10mg씩 증류수 100ml에 녹여 방장 보관하며 사용하였다.

완충 용액 : 본실험에 사용한 모든 완충액은 0.2M로서 pH 4.0~5.0은 sodium acetate buffer, pH 6.0~8.0인 것은 phosphate buffer, pH 8.1~9.5인 것은 sodium borate buffer 그리고 pH 10.0~11.0인것은 carbonate-bicarbonate buffer를 사용하였다.

형광강도 측정법 : 본 실험에서 형광강도는 Shimadzu model RF-500 Spectrophotofluorometer를 사용하였으며 형광활성파장은 413nm, 형광방출파장은 498nm로 하여 측정하였다.

pH변화에 따른 형광강도의 측정법 : pH변화에 따른 형광강도의 변화를 알아보기 위하여 pH 4.0에서 pH11.0에 이르는 각각의 완충액 5ml에 sulfonamide의 농도가 1ppm되도록 첨가한후 sulfonamide와 fluorescamine의 물농도 비율이 1 : 40되게 fluorescamine용액을 vortex mixer를 사용하여 빠르게 혼합하였다. 이때, 형광강도의 안정성을 조사하기 위하여 동일조건하에서 경시별로 측정하였다.

Sulfonamide와 fluorescamine의 적정 반응농도 결정 : pH 4.0인 sod. acetate buffer와 pH 8.0인 phosphate buffer에 sulfonamide농도가 1ppm되도록 가한 다음 sulfonamide와 fluorescamine의 물농도 비율을 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 50, 1 : 60 및 1 : 80되게 변화시키면서 형광강도를 경시별로 측정하였다.

유기용매에 대한 Fluorophore의 용해도 : SMZ-fluorescamine complex 즉, fluorophore의 유기용매에 대한 용해도를 알아보기 위하여 sulfamethazine의 농도가 1ppm되도록 가한 sod. acetate buffer (pH 4.0)와 phosphate buffer (pH 8.0)에 신속하게 fluorescamine 용액을 반응시킨다음, 이것에 유기용매 즉, hexane, ethylacetate, chloroform, n-butanol 그리고 benzene 등을 동량 가하고 vortex mixer를 사용하여 충분히 혼합한후 유기용매층이 분리될때까지 정치 시키었다. 분리된 두 액층의 형광강도를 각각 측정하여 fluorophore의 용해도를 조사 하였다.

돼지 오줌 중에 존재하는 sulfamethazine의 검출법 : 돼지 오줌내에 잔류하는 sulfamethazine을 유기용매로 추출할때 오줌 중의 방해물질이 추출되는지 여부를 알아보기 위하여 sulfamethazine의 농도가 1ppm되도록 첨가한 돼지오줌을 2,000rpm에서 5분간 원심분리한후 상층액을 3N.HCl로써 pH 2.0에서 pH 5.0되게 조절하고, 이에 물농도비가 1 : 60되게 fluorescamine 용액을 반응시킨 후 총 형광강도를 측정하였다. 그리고 fluorescamine과 반응시킨 오줌을 다시 유기용매인 ethylacetate로 추출하여 유기용매층과 오줌층의 형광강도를 각각 측정하였다.

결 과

Sulfonamide와 fluorescamine반응에 대한 최대 형광 활성 및 방출파장 : 본 실험에서 sulfonamide와 fluorescamine반응의 최대 형광강도를 나타내는 형광 활성 및 방출파장을 조사한 결과 그림 1에서의 같은 결과를 얻었다. 형광 활성파장은 413nm, 형광 방출파장은 498nm였다.

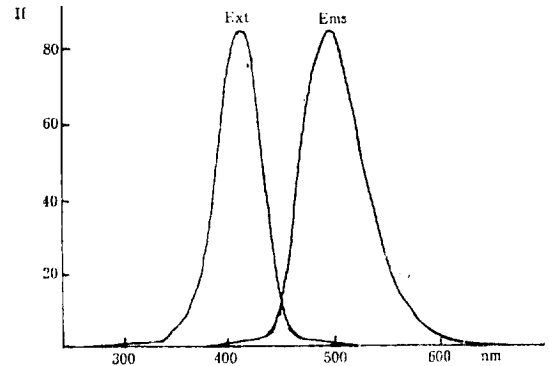


Fig 1. Fluorescence excitation and emission spectra of fluorophore formed from fluorescamine and sulfamethazine.

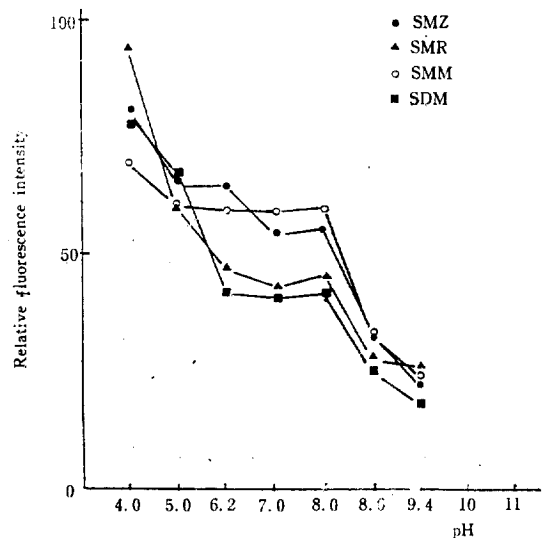


Fig 2. Effect of pH on the fluorophore formation in the reaction of fluorescamine with sulfonamides.

SMZ : sulfamethazine.
SMR : sulfamerazine.
SMM : sulfamonomethoxine.
SDM : sulfadimethoxine.

pH가 sulfonamide와 fluorescamine의 반응에 미치는 영향 : pH를 4.0에서 11.0까지 변화를 시킨 완충액에 각각 4종류의 sulfonamide을 각각 녹인 다음 sulfonamide와 fluorescamine의 몰 농도 비율이 1 : 40이 되도록 fluorescamine 용액을 가하여 반응시킨 30분 후에 형광강도 변화를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다(그림 2). 즉, pH 4.0인 sod. acetate buffer에 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine 및 sulfamonomethoxine을 1ppm이게 녹인 것의 형광강도는 각각 82.0, 95.0, 82.0 및 70.0으로서 다른 pH의 완충액에 녹인 것에 비하여 모두 최대 형광강도를 나타내었으며 pH가 증가함에 따라 모든 sulfonamide의 형광강도는 감소하는 경향을 나타내었다. pH 6.0, 7.0 그리고 8.0인 phosphate buffer에서의 형광강도는 sulfamethazine은 65.0, 54.0, 56.0, sulfamerazine은 47.0, 43.0, 46.0, sulfadimethoxine은 40.0, 41.0, 42.0, 그리고 sulfamonomethoxine은 60.2, 61.8, 60.0으로서 4가지 sulfonamide모두 비슷한 형광강도를 유지함을 알 수 있었다. pH 10.0 이상의 carbonate-bicarbonate buffer

에서는 4가지 sulfonamide모두 형광강도가 1.0 이하를 보여 거의 형광을 발현하지 않았다.

Sulfonamide와 fluorescamine과의 적정 반응 농도 : Sulfonamide와 fluorescamine의 적정 반응 몰농도를 알아보기 위하여 pH 4.0, sod. acetate buffer와 pH 8.0, phosphate buffer에 4종류의 sulfonamide을 녹인 다음 농도를 달리한 fluorescamine을 가하여 형광강도를 측정 한 바 다음과 같은 결과를 얻었다(그림 3). 즉, pH 4.0인 sod. acetate buffer에서는 sulfamethazine, sulfamerazine 그리고 sulfamonomethoxine은 sulfonamide와 fluorescamine 몰 농도 비율이 1 : 40 이상일 때 100 이상의 형광강도를 나타내었으며 sulfadimethoxine은 1 : 60 이상일 때 100 이상의 형광강도를 보였다. pH 8.0인 phosphate buffer에서는 4가지 sulfonamide 모두 몰농도 비율이 1 : 40 이상일 때 가장 높은 형광강도를 나타내었다.

Fluorescamine 반응후 경과시간에 따른 형광강도 변화 : pH 4.0인 sod. acetate buffer와 pH 8.0인 phosphate buffer에서 fluorescamine을 몰농도 비율 1 : 40에서 반응시킨 후 시간의 경과에 따른 형광강도의 변화를 측정 한 바 표 1에서의와 같은 결과를 얻었다. 즉, pH 4.0인 sod. acetate buffer에서는 반응후 30분 이후에 최대 형광강도를 보였다가 2시간 이후에는 형광강도가 점차 감소 하였다. 그러나, pH 8.0인 phosphate buffer에서는 반응 직후부터 2시간까지도 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine 및 sulfamono-

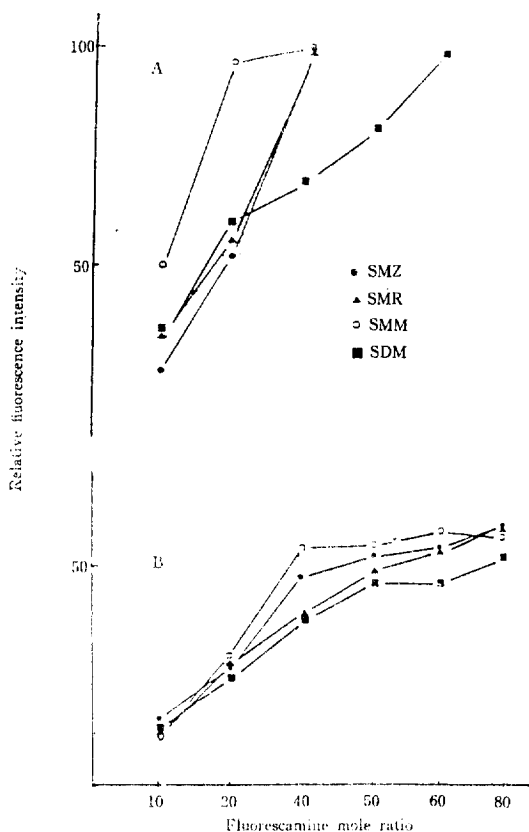


Fig 3. The optimal concentration of fluorescamine. A : pH 4.0, B : pH 8.0.

Table 1. Time dependent relative fluorescence intensity of sulfonamides (pH 4.0)

Drugs	Time			
	0	30	60	120
SMZ	76.2	95.0	>100.0	70.0
SMR	70.0	>100.0	>100.0	96.5
SDM	32.0	72.0	82.0	81.0
SMM	55.0	>100.0	>100.0	95.5

(pH 8.0)

Drugs	Time			
	0	30	60	120
SMZ	52.0	55.0	57.0	59.0
SMR	37.0	39.0	39.0	38.5
SDM	30.4	36.5	42.0	47.5
SMM	55.0	55.0	54.0	55.2

SMZ : sulfamethazine.

SMR : sulfamerazine.

SDM : sulfadimethoxine.

SMM : sulfamonomethoxine.

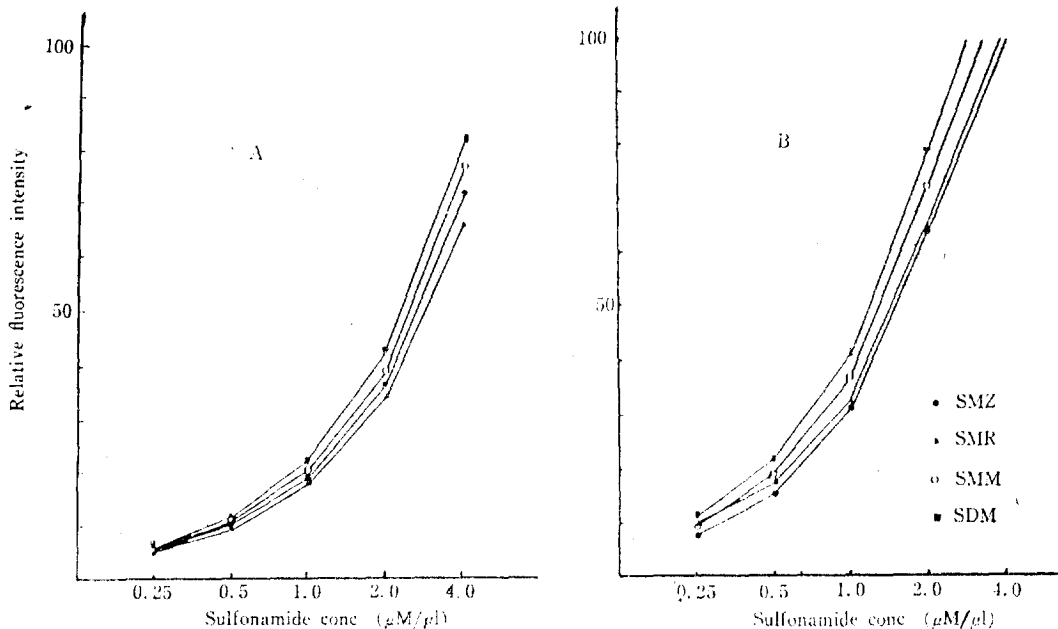


Fig 4. The standard curves of sulfonamides by spectrofluorometry. A: 0.2M phosphate buffer, pH 8.0, B: 0.2M sod. acetate buffer, pH 4.0.

methoxine 모두가 안정된 형광강도를 유지 하였다.

형광법을 이용한 sulfonamide의 표준곡선 : 본 실험에서 얻어진 실험 결과를 토대로 pH 4.0인 sod. acetate buffer와 pH 8.0인 phosphate buffer에서 sulfonamide와 fluorescamine의 반응 몰농도 비율은 1 : 40에서 그리고 반응 후 30분에 형광강도를 측정하여 그림 4에서와 같은 표준 곡선을 얻었다.

유기용매에 대한 SMZ-fluorescamine complex의 용해도 : SMZ-Fluorescamine complex, 즉 fluorophore의 유기용매에 대한 용해도를 조사하였던 파 표 2에서와 같은 결과를 얻었다. 즉 pH 4.0인 sod. acetate buffer에서는 hexane 및 cyclohexane에는 용해되지 않았으나, n-butanol, chloroform, ethyl acetate에는 fluorophore가 잘 용해되었으며 benzene에는 중등도로 용해되었다. 반면, pH 8.0인 phosphate buffer에서는

Table 2. Partition of sulfamethazine-fluorescamine complex in organic solvents

Solvent	Layer	pH			
		4.0	8.0		
n-Hexane		—	91.0	—	56.0
Cyclohexane		—	94.0	—	57.0
Ethyl acetate		>100.0	—	—	54.0
n-Butanol		>100.0	—	22.0	5.0
Chloroform		>100.0	—	—	55.0
Benzene		54.0	43.0	—	54.5

hexane, cyclohexane, ethylacetate, chloroform 및 benzene에 전혀 용해 되지 않았으며, n-butanol에는 다소 용해 되었다. 따라서, fluorophore는 산성상태하

Table 3. Determination of sulfamethazine in swine urine*

Layer	pH	2.0	3.0	4.0	5.0
Urine before extraction		11.0	14.0	20.0	27.0
Ethyl acetate layer		49.0(51.0)	56.5(60.0)	67.5(72.0)	62.0(65.5)**
Urine layer		8.0	13.0	25.0	32.0
Standard in buffer soln				82.0	64.0

* : adjust urine pH with 3N-HCl, ** : intensity after 30 min.

에서 ethylacetate, n-butanol 및 chloroform 등의 유기용매에 잘 용해 됨을 안 수 있었다.

돼지 오줌에 잔류하는 sulfamethazine의 검출 : 이상의 실험결과를 토대로 돼지 오줌 중에 잔류하는 sulfamethazine의 검출방법을 개발하기 위하여 오줌의 pH를 pH 2.0~5.0으로 조절한후 fluorescamine(물농도비율, 1 : 60)을 반응시킨다음 ethylacetate로 추출하여 오줌층과 ethylacetate층의 형광강도를 조사하였던 바 표 3에서와 같은 결과를 얻었다. 오줌층의 형광강도보다 ethylacetate층의 형광강도가 훨씬 높게 나타났으며 특히, pH 4.0~5.0에서 최대 형광 강도를 나타내었다.

고 찰

수용액 중에서 fluorescamine은 primary amine화합물과 순간적으로 반응하며 그 반응물은 매우 높은 형광성을 띠는 반면에 fluorescamine자체와 수용액중에서 가수분해된 산물은 형광성을 나타내지 않기 때문에 primary amine화합물을 picomole수준까지 검출할 수 있는 새로운 물질이다.

Fluorescamine은 primary amine과 반응 할 뿐만아니라 다른 nucleophils, 예를 들면 알코올, 2차아민 등 과도 반응하나 그 반응 산물은 형광성을 나타내지 않는다.³² 그리고 fluorescamine과 primary amine의 반응은 2차아민 화합물이 많이 존재할때 방해될 받을 수 있으므로 inorganic buffer인 phosphate buffer나 borate buffer가 적당하다.³³ 따라서 본 실험에서는 phosphate buffer, borate buffer 및 sodium acetate buffer를 사용하였으며 phosphate buffer에서 특히 안정된 형광강도를 유지함을 알 수 있었다(표 1).

또한 Stein et al³⁴은 primary amine과 fluorescamine이 반응하여 나타나는 형광강도는 pH, 용매, 온도, 완충액의 이온강도, 그리고 buffer salt의 종류에 따라서 영향을 받으며 pH 8.0인 0.1M phosphate buffer는 pH 8.0인 0.1M sod. borate buffer에 비하여 4배이상 형광강도가 높다고 하였다. 본 실험에서도 pH 8.0인 0.2M phosphate buffer에서의 형광강도가 sulfamethazine의 경우 56.0, sulfamerazine의 경우 46.0, sulfadimethoxine의 경우 42.0 그리고 sulfamonomethoxine의 경우 60.0인 반면에 pH 8.6인 0.2M sod. borate buffer에서는 sulfamethazine의 경우 32.0, sulfamerazine의 경우 27.5, sulfadimethoxine의 경우 25.0 그리고 sulfamonomethoxine의 경우 33.5로서 phosphate buffer에서의 형광강도가 borate buffer에 비해 2배 정도 더 높게 나타남을 알 수 있었다.

그리고 Bohlen et al³²은 검출하고자하는 아민의 종류에 따라 반응액의 pH가 결정되는데 일반적으로 aliphatic amine, 펩타이드 등은 pH 8.0~8.5인 것이 좋으며 아미노산과 단백질은 pH 8.5~9.5인 것이 좋다고 하였다. 또한 Udenfriend et al¹⁸은 펩타이드는 pH 7.0에서 최대 형광을 띄우나 아미노산의 경우 pH 9.0에서 최대 형광강도를 보이는 반면 pH 7.0에서는 형광을 나타내지 않는다고 보고 하였다. 또한 Silva와 Strojny³⁵는 sulfanilamide, sulfadoxidine, sulfamethoxazole, isosulfisoxazole, sulfisoxazole 그리고 sulfadiazine 등과 같은 sulfonamide를 fluorescamine과 반응시켜 형광 환성파장과 형광 방출파장을 조사한 결과 각각 405nm 및 495nm가 최적 파장이었으며 적정 반응 pH는 pH 3.0~6.5로 산성 상태임을 보고하였다. 본 실험에서도 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine, 그리고 sulfamonomethoxine에 대하여 조사한 결과 형광 활성 및 방출 파장은 각각 413nm 및 498nm였으며 적정 반응 pH는 4.0~5.0이었다.

Fluorescamine은 수용액중에서 쉽게 가수분해 되기 때문에 정량하고자하는 물질과 충분히 반응할 수 있을 정도로 높은 양을 반응시켜야 할 것이다. 본 실험에서 정량물질과 fluorescamine의 반응 물농도비를 알아보기 위하여 sulfonamide의 농도를 1ppm으로 고정하고 이것의 10~80배 물농도에 해당되는 fluorescamine용액과 반응시켜 형광강도를 조사하였던바 1 : 40 이상에서 최대 형광강도를 나타냈다.

한편, 형광강도는 약 1시간정도 일정하게 유지하다가 시간이 지남에 따라 감소하기 때문에³⁶ 반응후에 일정한 시간이 경과한 다음 형광강도를 측정하는 것이 바람직하다고 하였다.³³ 본 실험에서는 반응 직후부터 2시간 까지 형광강도의 변화를 조사한 결과 pH 4.0인 sod. acetate buffer에서는 30분 이후에 최대형광강도를 유지하였다가 2시간 부터는 감소하는 경향을 나타낸 반면 pH 8.0인 phosphate buffer에서는 반응 직후부터 2시간 까지도 안정된 형광강도를 유지하였다. 따라서 sulfonamide는 pH 4.0~5.0 사이의 완충액중에서 fluorescamine과 반응하여 최대 형광강도를 나타내기 때문에 fluorescamine을 반응시킨후 30분에 형광 강도를 측정함이 좋을 것으로 사료된다.

Bohlen et al³²은 fluorescamine의 용매로서는 acetone 혹은, dioxane이 적당하지만 acetonitrile, dimethylsulfoxide 그리고 tetrahydrofuran 등도 사용할 수 있다고 하였다. 즉, acetone, acetonitrile, dioxane 등에 fluorescamine을 녹인후 4°C와 25°C에서 12주간 보관하면서 안정성을 조사한 결과 acetone 및 acetonitrile

은 12주간 안정을 유지한 반면에 dioxane은 2주간만 안정성을 나타냈다고 보고 하였다. 따라서 본 실험에서는 acetone을 재증류하여 fluorescamine용매로 사용하였으며 8주 까지는 안정성을 보였다.

그리고 Udenfriend et al¹⁸은 buffer와 fluorescamine을 반응시키며 재현성있는 결과를 얻기 위해서는 fluorescamine이 쉽게 가수 분해되기 때문에 빠른 속도로 혼합하는 것이 좋다고 하였다. 본 실험에서는 vortex mixer와 micropipette을 이용하여 신속하게 반응시키었으며 buffer와 fluorescamine용액과의 체적비율이 1:1 이상일때 혼탁한 침전이 생길수 있기 때문에 이를 넘지 않도록 하였다.

Silva와 Strojny³⁵는 pH 5.0~5.5상태에서 유기용매인 ethylacetate로 fluorophore를 추출한 다음 그 형광강도를 측정함으로써 정량분석이 가능하다고 하였다. 본 실험에서도 ethylacetate와 그밖의 다른 유기용매에 대한 fluorophore의 용해도를 pH 4.0인 sod. acetate buffer와 pH 8.0인 phosphate buffer에서 조사한 결과 산성상태(pH 4.0)하에서 ethylacetate는 물론 chloroform, n-butanol 등에서 fluorophore가 잘 용해됨을 알 수 있었다. 또한 돼지 오줌 중에 존재하는 SMZ-Fluorescamine complex, 즉 fluorophore는 pH 4.0~5.0에서 ethylacetate로 추출 할 수 있었다.

Stein et al³⁷은 높은 농도의 암모니아는 ninhydrin 반응에는 영향을 미치나 fluorescamine과 반응하여 형광성을 띄우지 않으므로 암모니아를 함유한 시료에도 fluorescamine을 사용 가능하다고 보고 하였다. Lai³⁶는 대부분의 inorganic buffer, urea, guanidine hydrochloride, sod. dodecyl sulfate 등은 fluorescamine과 반응하지 않으나 암모니아가 다량 존재할 때에는 fluorescamine과 1차아민이 경쟁적으로 반응할 수 있다고 보고 하였다.

돼지의 오줌중에는 암모니아를 비롯한 여러가지 방해물질이 존재하더라도 이들 물질은 ethylacetate에 대부분 녹지 않음으로 fluorescamine을 사용하여 오줌중의 sulfonamide를 정량할 때에는 방해물질로 작용하지 않을 것으로 사료된다. 그러나 1차 아민기를 갖는 다른 약제를 돼지에 투여 하였을 때에는 이들이 오줌으로 배설될때 양성반응을 보일 수 있을 것이다.

Fluorescamine은 아미노산과 펩타이드 등을 분석하기 위한 생리-생화학적 연구 뿐만 아니라 약물의 빠른 검출을 위한 약리-독성학적 연구에도 널리 이용되고 있다.³⁵ 특히 암환자에서 1,3-diaminopropane, putrescine, cadaverine, spermidine, 그리고 spermine과 같은 polyamine이 오줌 중에 증가 됨으로 fluorescamine

을 사용한 이온-교환 chromatography로 이들 물질을 분리·검출함으로써 진단할 수 있다고 하였다.^{22,38} 따라서 앞으로 fluorescamine은 primary amine화합물 분석에 매우 널리 이용될 수 있으리라 생각된다.

이상의 실험 결과를 토대로 돼지 오줌 중의 sulfonamide를 정량 분석하기 위한 실험법을 정리하면 다음과 같다.

〈Determination of sulfamethazine in swine urine〉

Swine urine(5ml)
↓
Adjust pH 2.0~5.0 with 3N HCl
↓
Centrifuge at 2000rpm for 10min.
↓
React with 300 μ l fluorescamine(0.1%) rapidly
↓
Mix with ethyl acetate(5ml)
↓
Place it for 10min.
↓
Measure the intensity of the ethyl acetate layer

결 론

본 실험에서는 fluorescamine을 이용한 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfadimethoxine, sulfamonomethoxine 등을 형광법으로 정량하는 방법을 개발하기 위하여 pH에 따른 형광강도 변화, 반응후 경과시간에 따른 형광강도 변화, 그리고 fluorescamine과의 적정 반응 물농도를 조사하였으며 아울러 chloroform, ethylacetate, n-butanol 등과 같은 유기용매에 대한 fluorophore의 용해도를 조사하였다. 또한 돼지 오줌중에 잔류하는 sulfamethazine을 fluorescamine과 반응시켜 이 fluorophore을 유기용매인 ethylacetate로 추출하여 빠르고 간편하게 정량검사는 새로운 방법을 제시하고자 본 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Sulfonamides(SMZ, SMR, SDM, SMM)의 최대 형광 강도는 pH 4.0~5.0인 산성상태에서 나타내었다.
2. Sulfamethazine과 fluorescamine의 적정반응 물농도 비율은 1:40 이상이였다.
3. pH 4.0인 sod. acetate buffer를 사용하였을 경우 fluorescamine반응후 30분에서 2시간까지 안정된 형광 강도를 나타내었으나 pH 8.0인 phosphate buffer에서는 2시간까지는 일정한 형광강도를 유지하였다.
4. SMZ-Fluorescamine conjugate 즉, fluorophore는 산성상태하에서 ethylacetate, chloroform, n-butanol 등과 같은 유기용매에 잘 용해 되었다.
5. 돼지 오줌 중에 존재하는 SMZ-Fluorescamine conjugate는 pH 4.0~5.0인 산성상태하에서 유기용매인 ethylacetate로써 추출할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Rosenberg MC. Update on the sulfonamide residue problem. *JAVMA* 1985;187:704~705.
2. 신광순. 축산물중의 항균성물질 잔류분체에 대한 고찰(상). 대한수의사회지 1989;25:161~167.
3. Booth NH. Toxicology of drug and chemical residue. In: Booth NH, McDonald LE, ed. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 6th ed. Iowa: Iowa State Univ Press, 1988:1149~1205.
4. Felling J, Westheimer J. Determination of sulfadimethoxine in animal tissues. *J Agr Food Chem* 1968;16:738~740.
5. Horwitz W. Review of analytical methods for sulfonamides. *JAOAC* of 1981;64:814~824.
6. MacIntosh AI, Lauriault G, Neville GA. Liquid chromatographic monitoring of the depletion of carbadox and its metabolite deoxycarbadox in swine tissues. *JAOAC* 1985;68:665~671.
7. Tishler F, Sutter JL, Bathish JN, et al. Improved methods for determination of sulfonamides in milk and tissues. *J Agr Food Chem* 1968;16:50~53.
8. Lloyd WE, Jenny AL, Cox DF, et al. Relationship of sulfamethazine in swine diets and resultant tissue concentration, using Tishler and gas liquid chromatographic method. *Am J Vet Res* 1981;42:339~343.
9. Parks OW. Drug residues in animal tissues, Screening test for sulfamethazine and sulfathiazole in swine liver. *JAOAC* 1982;65:632~634.
10. Phillips WF, Trafton JE. Drug residues in animal tissues, A screening method for sulfonamides extracted from animal tissues. *JAOAC* 1975;58:44~47.
11. Thomas MH, Epstein RE, Ashworth RB, et al. Quantitative thin layer chromatographic multi-sulfonamide screening procedure. *JAOAC* 1983; 66:884~892.
12. 이창업, 이장락. 축산식품중의 잔류 설파제 분별 정량법에 관한 비교 연구, 1. Thin-layer chromatography. 수의대논문집 1981;6:167~172.
13. Alled MC, Dunmire DL. High performance liquid chromatographic determination of sulfamethazine at low levels in nonmedicated swine feeds. *J Chromatogr Sci* 1978;16:533-537.
14. Cieri UR. Drugs in feeds, High pressure liquid chromatographic determination of sulfamethazine or sulfathiazole and colorimetric determination of sulfathiazole in feeds. *JAOAC* 1980;63:727~735.
15. Daun RJ. Simultaneous gas-liquid chromatographic determination of four sulfonamides in feeds. *JAOAC* 1971;54:1277~1282.
16. Malanoski AJ, Barnes CJ, Fazio T. Drug residues in animal tissues, Comparison of three methods for determination of sulfamethazine in swine tissues. *JAOAC* 1981;64:1386~1391.
17. Weigele M, DeBernardo SL, Tengi JP, et al. A novel reagent for the fluorometric assay of primary amines. *J Amer Chem Soc* 1972;94: 5927~5928.
18. Udenfriend S, Stein S, Bohlen P, et al. Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. *Science* 1972;178:871~872.
19. Nakai N, Lai CY, Horecker BL. Use of fluorescamine in the chromatographic analysis of peptides from proteins. *Anal Biochem* 1974;58: 563~570.
20. Samejima K, Dairman W, Udenfriend S. Condensation of ninhydrin with aldehydes and primary amines to yield highly fluorescent ternary products. *Anal Biochem* 1971;42:222~236.
21. Stein S, Chang CH, Bohlen P, et al. Amino acid analysis with fluorescamine of stained protein bands from polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1974;272~277.
22. Veening H, Pitt WW, Jones G. Ion-exchange chromatographic separation and fluorometric detection of urinary polyamines. *J Chromatogr* 1974;90:129~139.
23. McHugh W, Sandmann RA, Haney WG. Characterization of selected fluorescamine amino acid reaction products by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1976;124:376-380.
24. Rubinstein M, Selina CK, Stein S, et al. Characterization of proteins and peptides by high-

- performance liquid chromatography and fluorescence monitoring of their tryptic digests. *Anal Biochem* 1979;95:117~121.
25. Felix AM, Jimenez MH. Usage of fluorescamine as a spray reagent for thin layer chromatography. *J Chromatogr* 1974;89:361~364.
 26. Imai K, Bohlen P, Stein S, et al. Detection of fluorescamine-labeled amino acids, peptides, and other primary amines on thin-layer chromatograms. *Arch Biochem Biophys* 1974;161:161~163.
 27. Furlan M, Beck EA. Use of fluorescamine in peptide mapping on thin-layer cellulose plates. *J Chromatogr* 1974;101:244~246.
 28. Nakamura H, Pisano JJ. Detection of compounds with primary groups on thin-layer plates by dipping in a fluorescamine solution. *J Chromatogr* 1976;121:79~81.
 29. Ashworth RB, Epstein RL, Thomas MH, et al. Sulfamethazine blood/tissue correlation study in swine. *Am J Vet Res* 1986;47:2596~2608.
 30. Bevilil RF, Schemske KM, Luther HG, et al. Determination of sulfonamides in swine plasma. *J Agr Food Chem* 1978;26:1201~1203.
 31. Thomas MH, Sorka KE, Simpson RM, et al. Determination of sulfamethazine in swine tissues by quantitative thin-layer chromatography. *J Agr Food Chem* 1981;29:621~624.
 32. DeBernardo S, Weigele M, Toome V, et al. Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines. *Arch Biochem Biophys* 1974;163:390~399.
 33. Bohlen P, Stein S, Datrman W, et al. Fluometric assay of proteins in the nanogram range. *Arch Biochem Biophys* 1973;155:213~220.
 34. Stein S, Bohlen P, Udenfriend S. Studies on the kinetics of reaction and hydrolysis of fluorescamine. *Arch Biochem Biophys* 1974;163:400~403.
 35. DeSilva JA, Strojny N. Spectrofluometric determination of pharmaceuticals containing aromatic or aliphatic primary amino groups as their fluorescamine derivatives. *Anal Chem* 1975;47:714~718.
 36. Lai CY. Detection of peptides by fluorescence methods. *Meth Enzy* 1977;47:236~243.
 37. Stein S, Bolhen P, Stone J, et al. Amino acid analysis with fluorescamine at the picomole level. *Arch Biochem Biophys* 1973;155:202~212.
 38. Samejima K. Separation of fluorescamine derivatives of aliphatic diamines and polyamines by high-speed liquid chromatography. *J Chromatogr* 1974;96:250~254.