

HPLC를 이용한 원유중 잔류 Sulfonamides 분석법 연구

정동수, 윤교복, 김종술, 신명균, 김교승

강원도 가축위생시험소

A Study on Detection Method of Sulfonamides Residues in Raw Milk by HPLC

Dong-Su Chung, Kyo-Bok Yoon, Jong-Sool Kim, Myung-Kyun Shin, Kyo-Seung Kim

Kangwon-do Veterinary Service Laboratory

Abstract

This experiment was carried out to detect the residues of sulfonamides in raw milk. Raw milks which does not contain sulfonamides was collected from one of the farm and fortified with 5 sulfonamides (sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline).

The sulfonamides in the fortified sample were extracted and detected by High Performance Liquid Chromatography. UV /vis detector was used in this experiment.

The results obtained were summarized as follows :

1. Chloroform was good as a extracting solution.
2. 15.5% methanol in PDP as a mobile phase solution was best detective condition for SMR, SMT, SMM. But for SDM and SQN the best condition was 23% methanol.
3. The detectable limits of SMR, SMT, SMM were 2ppb. but SDM and SQN were 20ppb because of delayed retention time and relatively low recovery rate.
4. The peaks of SMR, SMT, SMM and SDM were erected at baseline and the apexes were sharp but SQN was round shape.

Key Word : NPLC, sulfonamides, raw milk, chloroform

緒 論

Sulfonamide는 여러 종류의 병원성 박테리아에 대한 抗菌작용을 하고¹⁻⁴⁾ 常溫에서도 비교적 안정된 화학구조를 가지고 있으며, 항균 작용 범위도 특이하여^{5, 6)} 동물의 질병 치료 또는 성장촉진 목적으로 널리 이용되고 있다.⁷⁻¹⁵⁾ 그러나 착유중에 있는 젖소에서 이 약품을 치료목적으로 投與할 경우 성분중 일부가 우유로 分泌될 수 있으며 가공 과정을 마친후에도 우유내에 殘留될 우려가 있어 보건학적으로 여러가지 문제점을 일으킬 수 있으며,¹⁶⁻¹⁹⁾ 특히 어린이들이 즐겨 마시는 식품인 우유내의 Sulfonamide 잔류는 철저히 規制되어야 마땅하다.

선진 외국에서는 각종 규제조치로 축산물내의 Sulfonamide劑의 잔류를 규제하고 있으나^{20, 21)} 미국 FDA에서 조사한 바에 의하면 미국내 10개 도시의 수거검사 우유중 50% 이상에서 糞과제가 잔류하고 있었으며²⁶⁾, Brady와 Katz도 뉴욕의 2개지역에서 收去검사한 우유중 62%가 한두가지 항생제에 오염되어 있고 그중 42%가 Sulfonamide인 것으로 보고하였다.²²⁾

한편, 우리나라에서도 각 검사 기관에서 畜產物 衛生處理法의 규정에 따라 우유에 대한 細菌發育抑制物質 검사 등을 수행하고 있는데, 검사 방법은 T, T, C(2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chloride)법으로 검사방법이 간편하고 迅速하면서도 여러종류의 抗生物質 등의 우유내 잔류를 효과적으로 규제할 수 있음이 입증되고 있으나 牛乳내 잔류하는 Sulfonamide 製劑에 대하여는 비교적 감수성이 약하다는 연구보고가 있어왔다.^{22,23)} 이에 著者등은 HPLC를 이용하여 비교적 간편한 방법으로 원유중에 잔류하고 있는 Sulfonamide를 정확하게 檢出할 수 있는 방법을 찾고자 본 실험을 실시하였다.

材料 및 方法

Apparatus

- (a) High Performance Liquid chromatography : Waters, LC, UV/vis detector model 486 Pump model 51
- (b) Column : Nova-Pak C18(3.9×150mm)
- (c) Column heater : capable of maintaining $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ (Waters)
- (d) Rotary Evaporator : Büchi Laboratory tech
- (e) Polypropylene plastic tubes : 50ml
- (f) Filter paper : Wattman No 100, pore size $0.45\mu\text{m}$ (Millipore) syringe filter $0.45\mu\text{m}$ (gelman acrodisc)
- (g) Separatory funnel : 100ml, 250ml

Reagents

- (a) Potassium dihydrogen phosphate : quaranteed reagent
- (b) Methanol : LC reagent
- (c) Chloroform : LC reagent
- (d) Methylene Chloride : LC reagent
- (e) Hexane : LC reagent
- (f) Sulfamerazine standard : Sigma's -8876(SMR)
- (g) Sulfamethazine standard : Sigma's -6256(SMT)
- (h) Sulfamonomethoxine standard : Sigma's -0508(SMM)
- (i) Sulfadimethoxine standard : Sigma's -7007(SDM)
- (j) Sulfaquinoxaline standard : Sigma's -7382(SQN)

LC Solutions

사용된 모든 D, W는 Commercial Distilled Water(중의제약)를 純粹製造裝置(Mili Q)에 濾

過시켰다.

(a) Potassium Dihydrogen Phosphate(PDP) 0.1M sol-DW 2ℓ에上記시약 27.2g을 용해하여 0.45 μ m filter로 여과.

(c) Mobile phase solution-Methanol과 PDP sol의 비율을 23 : 77, 15.5 : 84.5의 두가지로 제조하였으며, 각각 잘록인다음 filter로 degassing하였다.

(c) Flush solution-1차에는 D.W, 2차에는 50% Methanol, 3차에는 100% Methanol

(d) Extracting solution-Chloroform 및 Methylene chloride

Standard solution

(a) Stock solution-SMR, SMT, SMM, SDM, SQN을 10mg씩 취하여 각각 methanol 100 μ ℓ에 溶解하였는데 SQN은 용해도가 낮아 sonicate하였고 모두 4 $^{\circ}$ C 냉장보관하였다.

(b) Working solution-상기 각각의 stock solution을 D.W로 100배 희석하여 1ppm이 되게 하였다.

Table 1. Sulfonamides concentration of fortified raw milk. unit : ppb

Sample No.	SMR	SMT	SMM	SDM	SQN
1	2	2	2	20	20
2	5	5	5	30	30
3	10	10	10	50	50
Control	0	0	0	0	0

Sample

Sulfonamide를 투여하지 않은 것으로 확인된 젖소에서 攪乳된 신선한 原乳를 필요량 채취하여 4 $^{\circ}$ C 냉장보관 하면서 供試하였으며 2-3일 이상 보관하여야 할 경우에는 -40 $^{\circ}$ C냉동보관 하였다.

Determination

(a) Fortification of sample

125ml separate funnel에 원유 10ml를 취한 다음 각각의 Working solution을 spike하여 Table 1과 같은 濃度가 되게 하였다.

(b) 진탕-sample이 들어있는 funnel에 50ml의 chloroform을 넣고 1분간 진탕, 1분간 정치, 1분간 격렬히 진탕, 1분간 정치 등을 반복하여 최종적으로 5분간 정치후 원유와 chloroform이 분명히 분리되도록 정치.

(c) 下層(chloroform층)을 다른 flask에 받는다.

(d) funnel에 methylene chloride를 50ml넣고 (b)의 진탕과정을 再演하여 下層을 (c)의 flask에 받아 모은다.(回收率 조사시험에만 실시 하였음)

(e) flask를 Rotary Evaporator로 32 \pm 0.2 $^{\circ}$ C에서 減壓농축건조한다.

(f) 건조된 flask에 hexane 5ml를 첨가하여 1분간 진탕한 다음 즉시 potassium dihydrogen phosphate 1ml를 넣고 다시 진탕한다.(3분 진탕 1분정치 방법으로 3-4회, 최소 15분 넘게)

(g) long niddle이 附着된 syringe로 PDP층(부유층)을 吸引한 다음 syringe를 수직으로 잠시 정치한다.(상층 hexan, 하층 PDP)

(h) syringe의 niddle을 제거한 다음 syringe filter(0.45 μ m acrodisc)를 부착한다.

(i) syringe를 돌려 여과되는 PDP액을 bottle(용량 2-3ml)에 넣는다.

(j) LC에 1회 50ml씩 injection하여 검사한다.

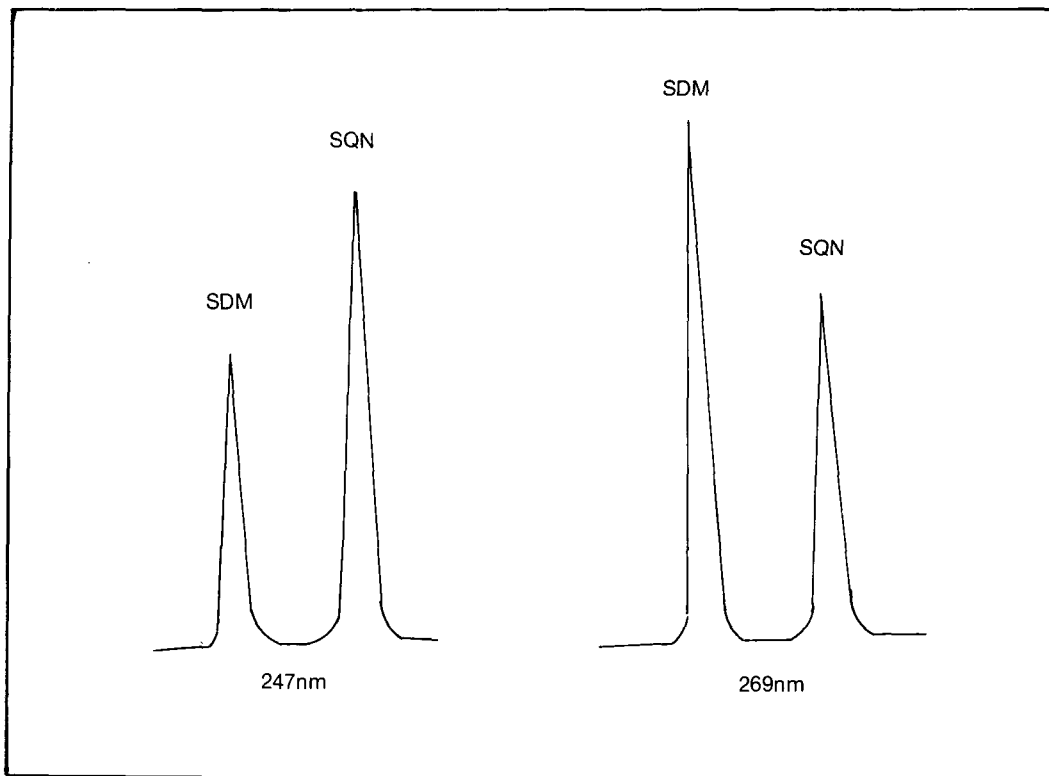
Chromatographic conditions

UV/vis detectro의 wave length는 269nm와 258nm로 하였다. flow rate는 1ml/min, column temperature는 35 \pm 0.2 $^{\circ}$ C, observance sensitivity는 0.002 AUFS로 하였다.

結果 및 考察

각각의 化學물질들은 고유의 波長에서 가장 민감하게 吸光反應을 일으킨다.

Fig 1. Comparison of SDM, SQN chromatogram at wave length 247nm and 269nm.



따라서 본 시험에서 요구되는 가장 기본적인 문제는 공시 5종의 Sulfonamide에 공통되게 적용될 수 있는 波長을 찾아내는 일이다. 설파제의 검출最適 파장은 247~272nm인 것으로 알려져 있다.^{1, 24, 25, 26, 27)} 그러나 SMR, SMT, SMM은 파장 변경에 따른 response가 비교적 적은 반면에 SDM과 SQN은 그 차이가 심한 것을 관찰할 수 있었다.

SDM과 SQN의 Working solution을 269nm와 247nm에서 검사하여 본 바 Fig. 1과 같은 peak가 나타났다.

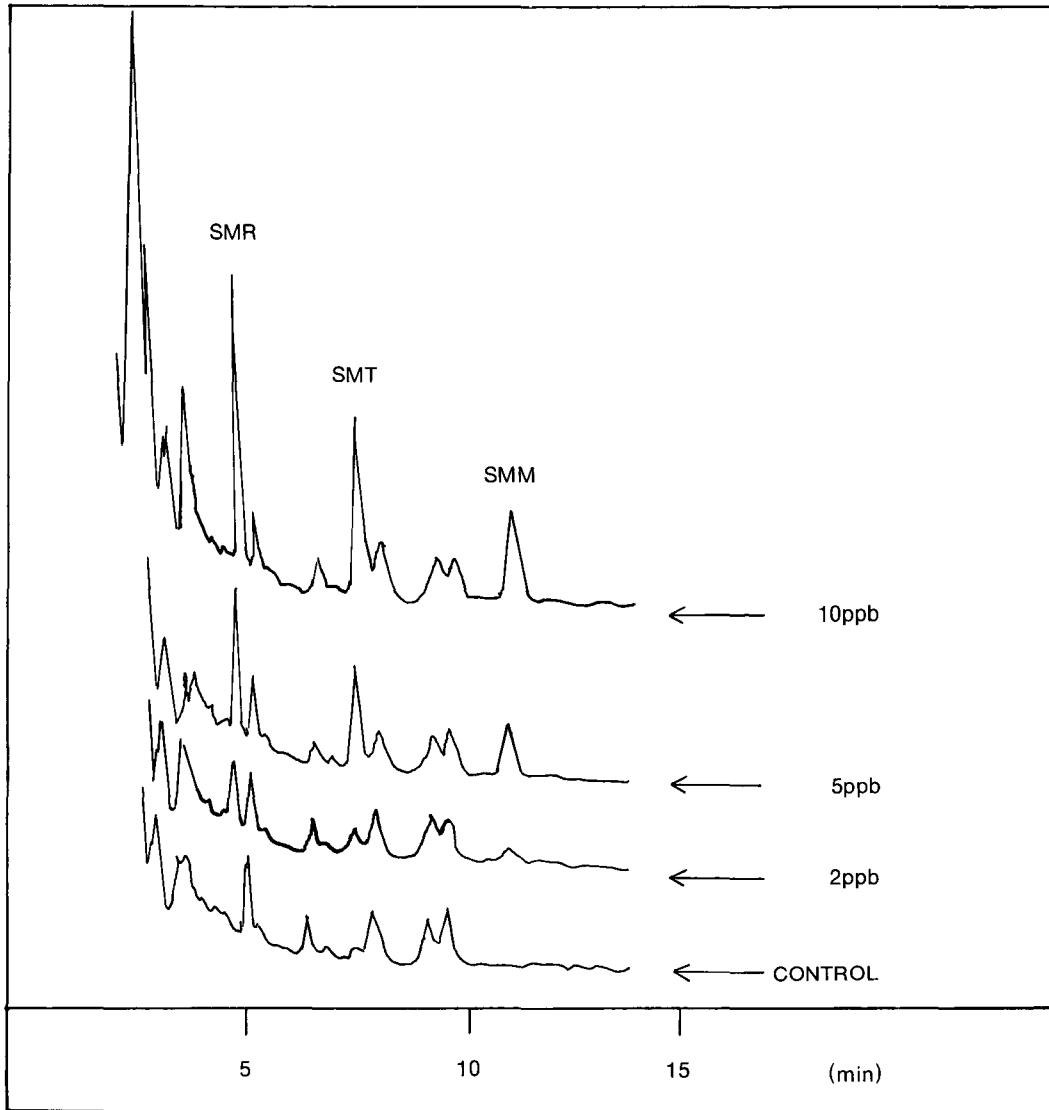
269nm에서는 SDM이 SQN보다 높은 피크를 보였으나 247nm에서는 SQN의 피크가 높아졌다. 그리고 269nm에서의 SQN과 SDM의 積分比는 0.55 : 1이었으나 247nm에서는 1 : 0.77로 반전되었다.

피크의 積分量보다는 피크의 높이가 검출목적에 부하되는 요소인바 Wave length에 따른 두 물질 피크격차를 258nm로 조정하여 비슷한 피크높이를 얻었다. 그러나 SMR, SMT, SMM 3종류를 同時 검출하기에 가장 적당한 파장은 269nm인 것을 알 수 있었다.

Mobile phase solution의 methanol함량은 peak의 retention time에 가장 큰 영향을 미치는 요소이다. 본 실험에서 조사하여 본 바 methanol함량 1%의 변화로 retention time이 5분이 내이었던 peak는 약 30초, 5-10분내 이었던 peak는 30~60초, 10분 이후이었던 peak는 1분 이상 변화 하는 것을 알았다. 즉 retention time이 낮은 peak일수록 變化幅이 크게 나타났다.

본 실험에서는 methanol함량 12%부터 40%까지를 1%씩 변화시키면서 가장 적당한 re

Fig 2. Chromatograms of SMR, SMT, SMM fortified raw milk compared with control

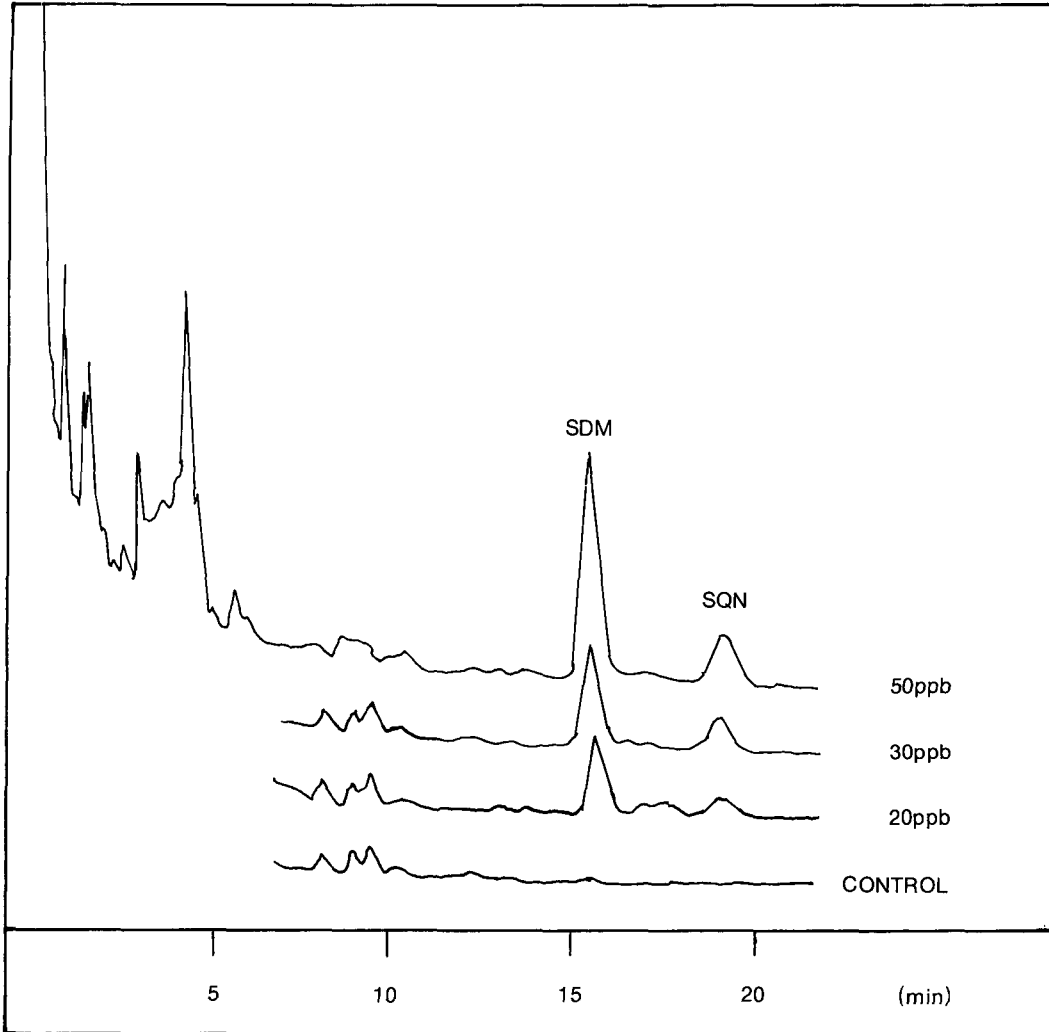


※ mobile phase solution : methanol 15.5% in PDP

tention time을 얻으려 하였다. 검출하고자 하는 물질의 peak는 원유 고유의 peak와 겹치지 않아야 하고 base line 근처의 level에서 나타나야 한다. 공시 5종의 실패제에 대한 methanol 함량별 peak를 조사하여 본 바, methanol 함량 15.5%에서 SMR, SMT, SMM의 가장 좋은 peak를 얻

을 수 있었다.(Fig. 2) SMR의 retention time은 4.48분, SMT는 7.50분, SMM은 11.53분 이었으며 peak의 頂上부분도 비교적 선명하게 나타났다. SMT의 경우 주변의 원유 固有의 noise에 peak의 base부분이 一部 침해를 받았으나 SMT 잔류량 2ppb에서도 원유 고유 noise와의 鑑別은

Fig 3. Chromatograms of SDM and SQN fortified raw milk compared with control



※ mobile phase solution : methanol 23% in PDP.

가능하였다.

한편 Wave length 258nm에서 SDM과 SQN에 대한 가장 적당한 mobile phase solution의 methanol함량을 조사하여 분비 23%가 가장 적당한 것을 확인하였다.(Fig.3)

이때 SDM의 retention time이 前後로 조금만 변경되어도 두 物質 peak 左右에 위치하고 있는 原乳 固有 peak와 중복되거나 간섭하는 현상이

있었으며, SQN는 retention time의 遲延외에 극히 低調한 回收率로 잔류량 20ppb이하는 검출하는데 다소 무리가 있었으나, SDM은 10ppb의 잔류량에서도 선명한 peak를 얻을 수 있다.

原乳는 分子構造가 대단히 복잡한 有機質이기 때문에 HPLC로 분석하는데 있어서 일반적인 化學물질에 대한 분석보다 몹시 까다롭다. 원유 중에 잔류되어 있는 설파제를 분석함에 있어 용

出液의 선택은 회수율과 관계가 깊기 때문에 그 선택이 중요하다. 본 시험에서는 chloroform과 methylene chloride를 사용하였으며 그 회수율을 조하하여 본바 Table 2와 같았다.

Table 2. Recovery rates of 5 sulfonamides in 2-50ppb fortified raw milk

Drug	Fortification, ppb	Recovery rate(%)
SMR	2	88.2
	5	89.4
	10	91.2
Average		89.6
SMT	2	89.3
	5	87.4
	10	92.2
Average		89.7
SMM	2	71.5
	5	75.8
	10	73.6
Average		73.6
SDM	20	46.2
	30	48.6
	50	51.4
Average		48.7
SQN	20	35.4
	30	33.8
	50	37.2
Average		35.5

SMR, SMT, SMM 3종류는 높은 회수율을 보였다. 그러나 SDM과 SQN의 회수율은 비교적 낮았다.

A, R, Long은 methylene chloride를 溶出液으로 사용하여 SMR 91.9 ± 4.6% SMT, 92.7% ± 5.6%, SDM 89.6 ± 8.1%의 回收率을 얻었고,²⁴⁾ Werber와 Smedely는 chloroform과 acetone(2:1)으로 SMR 69.1-85.3%, SMT 77.9-91.9%, SDM 66.8-76.4%, SQN 51.8-61.2%의 회수율을 보고 한 바 있다.¹¹⁾ 본 시험에서 SDM과 SQN의 회수율을 높이기 위하여 chloroform으로 1차 溶出 後 methylene chlor-

ide 2차용출하여 보았으나 SDM의 경우 회수율에 변화가 없었고 SQN의 경우도 2-3%의 회수율 增加에 그쳤다. 이로서 한국 과학 기술원이 식육에서 chloroform과 methylene chloride를 둘다 사용하여 SQN의 회수율을 66%에서 85%로 크게 높였다는 보고가 있었으나²⁷⁾ 원유에서는 적용되지 못함을 확인하였다. methylene chloride 처리후 다시 methylene chloride 재처리 하는 방법은 원유가 gel化 하는 경향이 있어 적용할 수 없었는바, 이 현상은 methylene chloride의 과량 사용이 gel化의 원인인 것으로 思料된다.

또한 용출과정에서의 funnel定置時 마개를 열어놓지 않으면 원유에 clog가 발생할 수 있으며, 減壓농축 乾燥 과정시 용출액이 끓지(boiling) 않게 해야 했다. 끓으면 회수율이 떨어지게 됨을 알 수 있었다.

potassium dihydrogen phosphate 용액에 hexane을 添加한 후 최소한 15분 이상의 접촉시간이 주어져야 potassium dihydrogen phosphate 용액으로의 洗과제 용해가 완료된다.¹¹⁾ 실험종료후 column세척시 Wever의 방법대로 50% methanol로 세척하면 세척이 不完全하여 column이나 tube를 막아 trouble처리시 peak time의 변화가 생겨 reset하여야 할 경우가 생긴다.

본 시험에서는 DW로 60분, 50% methanol로 40분 100% methanol로 60분 세척하므로써 column과 tube를 안전하게 保護할 수 있었다. 供試된 초자기구의 세척도 noise를 줄이는데 중요한 要因이었다. 모든 초자기구는 1N HCl로 一次세척, DW로 二次세척 100% methanol로 三次세척하여 사용하였다.

結 論

1. Chloroform은 溶出하기에 좋은 용매였다.
2. SMR, SMT, SMM의 檢출은 移動相 溶媒의 methanol 함량 15.5%에서, SDM, SQN은 23%에서 가장 적합하였다.

3. SMR, SMT, SMM의 검출한계는 2ppb였으나, SDM, SQN은 20ppb였다.
4. SMR, SMT, SMM과 SDM의 peak는 baseline 근처에서 發原하였으며 그 정점이 날카로운 반면, SQN의 peak는 완만한 형태였다.

參考文獻

1. John D Weber and Michael D, Smedley. 1988. Liquid chromatographic determination of sulfamethazine in milk food and drug administration, center for veterinary medicine, division of veterinary medical research, beltsville, MD20705.
2. 수의 내과학 교수협의회편. 1983. 수의내과학 I (대가측편). 141.
3. 이장락. 1988. 수의약리학: 363-370
4. 이현범. 1986. 가축 질병학: 72-74.
5. Rosenberg MC. 1985. Update on the sulfonamide residue problem. JAVMA. 187 : 704-705
6. 신광순. 1989. 축산물중의 항균성물질 잔류분제에 대한 고찰(상), 대한수의사회지 25 : 161-167.
7. Derorah E, Dixon-Holland and Stanley E, Kate. 1989. Direct competitive Enzyme-Linked Immuosorbent Assay for sulfamethazine residues in milk. J Assoc Off Anal Chem Vol 72 : No. 3.
8. Fed, Regist, march, 1988. Technical report for experiment. No. 418.
9. G M Jones and Erin H, Seymour. 1988. Cowside antibiotic residue testing. J Dairy Sci. 71 : 1691-1699
10. Joseph Unruh, Edwin Piotrowski, Daniel P, Schwartz and Robert Barford. 1990. Solid phase extraction of sulfamethazine in milk with quantitation at low ppb levels using thin-layer chromatography. Journal of chromatography. 519 : 179-187.
11. Michael D, Smedley and John D, Weber. 1990. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. J Assoc Off Anal Chem. Vol 73 : No.6
12. Saschenbrecker P W and N A Fish. 1980. Sulfamethazine residues in uncooked edible tissue of pork following recommended oral administration and withdrawal. Can J Comp. Med. 44 : 338-345.
13. Richard H. Gustafson. 1991. SYMPOSIUM : Antibiotic residues in meat and milk use of antibiotics in livestock and human health concerns. J Dairy Sci. 74 : 1428-1432.
14. Robert L, Epstein, Victor Randecker, Paul Corrano, Jimmy T, Keeton and H Russell. 1988. Influence of heat and cure preservatives on residues of sulfamethazine, chloramphenicol, and cyromazine in muscle tissue. J Agric Food Chem. 36. 1009-1012.
15. Vipin K, Agarwal, 1990. Detection of sulfamethazine residues in milk by high performance liquid chromatography. Journal of liquid chromatography. 13(17). 3531-3539.
16. Annual report. 1977. Animal health institute. Wasington. D.C.
17. Scott A, McEwen, William D, Black and Alan H, Meek. 1991. Antibiotic residue prevention methods, farm management and occurrence of antibiotic residues in milk. J Dairy Sci. 74 : 2128-2137.
18. 한국수의공중보건학회편. 1990. 수의공중보건학. 63-85.
19. Booth NH. 1988. Toxicology of drug and

- chemical residue. In:Booth NH. McDonald LE. 1988. Veterinary pharmacology and therapeutic. Iowa state univ press. 6th ed. :1149-1205.
20. 박종명. 1991. 축산식품중의 잔류물질. : 252-282, 99-104.
21. Brady M S, Katz S E. 1988. J Food Prot. 51. 8-11.
22. 이원창, 장경진, 김태중. 1979. 2, 3, 5, triphenyl tetrazolium chloride(T, T, C) reduction test 에 의한 우유중 잔류항생물질 검출에 관한 조사 연구. 건국대학교 축산경영 연구소 논문집. 5 : 149-155.
23. 정재하, 한수남, 이분한. 1991. Fluorescamine 을 이용한 우유중에 잔류하는 Sulfamethazine 의 HPLC 형광정량법. Seoul univ. J Vet Sci. Vol 16 : No 1.
24. Austin R Long, Charles R Short and Seven A, Barker. 1990. Method for the isolation and liquid chromatographic determination of eight sulfonamides in milk. Journal of chromatography. 502 : 87-94.
25. Larocque et al. 1990. Sulfamethazine(Sulfadimidine) residues in canadian consumer milk. J Assoc Off Anal Chem. Vol. 73 : No. 3
26. Wehr H M. 1987. "The incidence of antibiotics other than penicillin in producer raw finished milk products," presented at annual meeting IAMFES. Anaheim, CA.
27. 한국 과학기술원. 1992. 축산식품내 유해잔류 물질 검사 교육과 분석방법 개발에 관한 연구 :145-166.