韓家衛誌 第19卷 第1號
Korean J. Vet. Serv. (1995), 19(1) : 13~28

HPLC를 利用한 畜産食品中 殘留 설폰아미드제의 同時分析法 硏究

황래홍·김영수 · 윤은선·김기근·이규학
서울특별시 보건환경연구원 축산물부

A study on simultaneous determination of residual sulfonamides in livestock productions by high performance liquid chromatography

Lae-hwong Hwang, Young-soo Kim, Eun-sun Youn, Ki-keun Kim, Kyu-hak Lee
Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment
Division of Experiment

Abstract

This study was carried out to explore the most sensitive and useful method for simultaneous determination of five sulfa drugs(sulfamethazine, sulfamerazine, sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline) in livestock productions(pork muscle, bovine muscle, chicken muscle, milk) by HPLC with UV detector and reverse phase column.

The results obtained were as follows :

1. For mobile phase acetonitrile-0.01M ammonium acetate(23:77) showed more applicable sensitivity and retention times than acetonitrile-1% acetic acid(23:77). Thus acetonitrile-0.01M ammonium acetate(23:77) selected and applied to the modification test, from which it was found pH 6.75 was the most adequate.
2. Optimal wavelength of UV for SMT(sulfamethazine), SMR(sulfamerazine), SMM(sulfamonomethoxine), SD(sulfadimethoxine), and SQ(sulfaquinoxaline) were 266, 266, 265, 269 and 250nm, respectivery, and that for simultaneous application it was 263nm.
3. The average recovery rate by extractant(chloroform, dichloromethane, chlorform+dichloromethane) in the classic method was not significantly different($p>0.05$) but that by chloroform higher than the others. Thus chloroform was found to be adequate as extractant in this classic method.

4. The average recovery rate was 86.5% by the MSPD(matrix solid phase disperse) method, which was significantly higher than that by the classic method($p<0.05$). Also the recovery rates by method were significantly different($p<0.05$) in accordance with sample and type of drug.

The MSPD method was much superior to classic method on clean-up.

Key word : simultaneous determination, sulfonamides, livestock productions, HPLC.

Ⅰ. 緖 論

食生活의 高級化와 農畜産物의 開放에 따른 食品의 安全性에 關心이 날로 增加하고 있으며 특히 良質의 蛋白質 供給源인 畜産食品은 그 生産過程에서 使用되는 藥劑들의 殘留가 큰 問題가 되고 있다.

오늘날 歐美 先進國들은 高度의 分析技術을 바탕으로 輸入食品에 對한 殘留藥劑의 嚴格한 規制를 함으로써 이를 非關稅 貿易障壁으로 活用하고 있으며[1,2] 앞으로 이를 더욱 強化할 것으로 사료된다. 80年代 國內産 對日 輸出豚肉에서 설파메타진이 일본 기준치를 超過하여 返送 廢棄된 것이 그 좋은 例라 할 수 있겠다.

이에 國內에서도 1989年 保健社會部와 農林水産部에서 각각 畜産食品에 對한 殘留藥劑의 許容基準 및 試驗法을 制定하였으며 이를 1992年에 保健社會部로 一元化하고 現在까지 施行되고 있으며 많은 豫算을 投資하고 있는 實情이다. 그러나 이러한 問題는 단시간 내에 行政的, 經濟的으로 解決될 수 있는 것이 아니며 오랜 시간을 통한 蓄積된 技術을 바탕으로 解決될 수 있는 것이라 생각된다. 現在 畜産食品에 對한 試驗法이 告示된 藥劑는 37種으로 이들은 抗生物質 17種, 合成抗菌劑 18種, 성장홀몬제 2種이며 이들을 定性 및 定量分析 하도록 되어 있다.[3] 그러나 現行 定量法은 같은 系列의 여러 藥劑들 間에도 多樣하여 비록 簡易檢査에서 어떤 系列의 藥劑가 존재함을 認識하더라도 正確한 藥劑를 追迹하는데는 많은 時間이 所要된다.[4] 따라서 같은 系列의 藥劑들 中諸性狀이 類似한 것들을 한번의 分析으로 同時檢出이 可能하다면 매우 效率的일 것이며 또한 이는 國際的 趨勢이다. 어떤 藥劑들을 同時分析하기 위해 필요한 條件은 이들 藥劑들의 化學的 構造 및 性狀의 類似性이다.[5] 위에서 提示한 37種의 藥劑들 中 이러한 要所를 所有한 代表的인 것으로서 合成抗菌劑를 들수 있겠으며 그 중에서도 설파제가 가장 適合한 것으로 이는 國內外에 發表되는 同時分析에 關한 論文에 가장 頻繁히 登場하는 것을 봐도 쉽게 알 수 있다.

설파제는 1932年 最初로 發見한 이래 약 6,000여 種이 開發된 化學療法劑로서 이들은 共通的으로 설파닐아미드기를 가지고 있는 類似構造로 되어 있다.[6] 이들은 細菌發育에 必須的인 PABA (para-amino benzoic acid)와 競合的 拮抗作用을 일으키며 트리메토프림과 같은 藥劑와는 相乘作用을 일으키는데 이는 설파제가 菌의 葉酸 合成에 PABA를 利用하는 것을 妨害하고 트리메토프림이 還元酵素인 Dihydrofolate reductase를 選擇的으로 抑制함으로써 菌이 葉酸을 合成해 가는 過程에서 連續的 遮斷이 일어나기 때문이다.[7] 이러한 機轉으로 그람 陽性 및 陰性菌에 넓은 抗菌力을 가짐으로써 家畜에 있어서 治療學的으로

매우 重要한 抗菌劑[6]이지만 이들이 人體에 移行殘留時 耐性菌 誘發, 造血機能 障碍, 腎臟障碍 過敏反應 등을 일으킬 수 있으며[8~16] 특히 설파메타진은 發癌性이 疑心되는 것으로도 알려져 있다.[30]

한편 이들 설파제의 定量分析은 모든 分析에서와 마찬가지로 器機條件과 前處理 方法으로 나누어 질 수 있으며 器機條件에서는 器機의 種類와 그 構成成分에 따라 細分된다. 器機의 種類로는 主로 GC,[17,18] GC/MS,[19,20] HPLC[21~34]等이 利用되고 있으나 GC는 前處理가 比較的 複雜하고 分析條件에 따라 各 化合物을 誘導體化 하는데 長時間이 消遙되며 GC/MS는 高價 裝備로서 쉽게 利用할 수 없는 短點 때문에 比較的 前處理가 簡便하고 檢出限界置가 낮은 고속액체크로마토그래피(HPLC)가 가장 많이 使用되고 있다.[4] 또한 HPLC의 構成要素에 있어서도 검출기(Detector)의 種類, 吸收波長, 溶媒, 칼람등에 따라 多樣하게 利用되고 있으나 Photodiode-array detector와 같은 것은 역시 高價의 裝備로 熟練된 技術이 要求되므로 쉽게 利用할 수 없는 問題가 있는데,[25] 일반적으로 分析裝備는 쉽게 利用可能하고 재 使用 할 수 있거나 그렇지 않으면 사용 후 廢棄할 수 있을 정도로 낮은 費用이어야 한다.[30]

한편 前處理 方法에 있어서는 抽出 및 Clean-up에 따라 재래식(Classic) 方法과 最近 많이 利用되는 MSPD(matrix solid phase disperse) 方法[25]으로 나눌 수 있는데 後者는 lipophilic solid phase packing material(C_{18})를 組織內로 분산(disperse)시켜 半乾燥狀態로 한 후 유기溶媒로 直接 抽出하는 方法으로,[35] 前者에 비해 매우 簡單한 方法이라 할 수 있으나 사료의 량에 制限이 되는 短點이 있다.[30]

이와같은 多樣性들은 實驗室의 與件 및 實驗者의 主觀에 따른것으로 이러한 條件들을 客觀的으로 比較評價 한다는 것은 많은 어려움이 따르게 된다. 그러나 이들중 比較的 接近可能한 一般的인 條件들을 選定 比較하고 適定條件을 設定하여 보다 普遍的인 分析法을 提示할 必要가 있을 것으로 思料된다.

이에 本 研究에서는 牛肉, 豚肉, 鷄肉, 乳牛 4가지 畜産食品에 對해 現在 普遍的으로 使用되는 器機인 고속액체크로마토그래피(HPLC with UV detector and reverse phase column)[4]를 利用하여 그 器機條件 및 前處理 方法의 最適條件을 比較設定하여 現在 保社部에 告示된 5種의 설파제[설파메라진(Sulfamerazine), 설파메타진(Sulfamethazine), 설파디메톡신(Sulfadimethoxine), 설파모노메톡신(Sulfamonomethoxine), 설파퀴녹살린(Sulfaquinoxaline)]의 同時分析法을 提示하여 有害殘留物質 檢査技術의 發展에 寄與하고 나아가 國民保健 向上에 이바지 하고자 한다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 試　　料

豚肉, 牛肉, 鷄肉 및 牛乳를 市中에서 購入하여 可視脂肪과 結體組織을 除去한 後 豫備試驗을 거쳐 설파제가 전혀 存在하지 않는 試料를 고기 試料는 −20℃의 冷凍庫에, 牛乳는 冷藏庫에 保管하여 使用하였다.[27]

2. 標準溶液 調劑

Sulfamethazine, Sulfamerazine, Sulfamonomethoxine, Sulfadimethoxine, Sulfaquinoxaline(SIGMA) 각 標準品 10㎎을 正確히 달아 100㎖ 아세토니트릴에 溶解(100ppm)한 後 이 溶液을 이동상 溶媒를 使用하여 10배(10ppm) 및 100배(1ppm)로 稀釋하여 使用하였다.

3. Clean-up column의 活性化(activation)方法

a) **Alumina** : 알루미나 6g을 내경 1.5cm 길이 30cm의 column에 충진한 후 증류수 100mℓ와 100% 아세토니트릴 및 95% 아세토니트릴 각 30mℓ를 연속으로 흘려준후 95% 아세토니트릴에 채워 시험에 사용하였다.[3]

b) C_{18} : 50g의 C_{18}를 100mℓ의 핵산, 디크로로메탄 및 메탄올로 차례대로 세척한 후 건조하고 2g씩 취하여 시험에 사용하였다.[25]

4. 試驗方法

1) 이동상 용매 選定

설파제의 同時分析에서 이동상 용매의 緩衝液으로 많이 利用되고 있는 초산과 초산암모늄을 選定하여 이들을 1%[3] 및 0.01M[5] 濃度로 調劑한 다음 이를 아세토니트릴과 77:23[4]으로 各各 混合한 後(Acetonitrile : 1% Acetic acid=23:77, Acetonitrile : 0.01M Ammonium acetate=23:77) 一般的으로 설파제 分析에 많이 利用되고 있는 器機條件(260nm파장, μ-Bondapak C_{18} 칼람, 유속 1mℓ/min)下에 各 설파제 피크의 感度 및 머무름 시간(Retention time)을 比較하여 適合한 용매를 1차로 選定하였으며, 1차로 選定된 용매를 0.1N NaOH 및 HCl로 pH를 變化시켜 各 설파제 間의 分離 및 머무름 시간(Retention time)을 調整하여 最適의 용매를 選定하였다.

2) UV 파장의 選定

選定된 용매에 5種의 설파제를 1ppm 濃度로 稀釋한 後 Spectrophotometer를 使用하여 200nm에서 500nm 사이의 파장에서 Scanning하여 各 설파제의 最大吸收 파장을 구하고 이들이 共通的으로 適用될 수 있는 最適波長을 選定하였다.

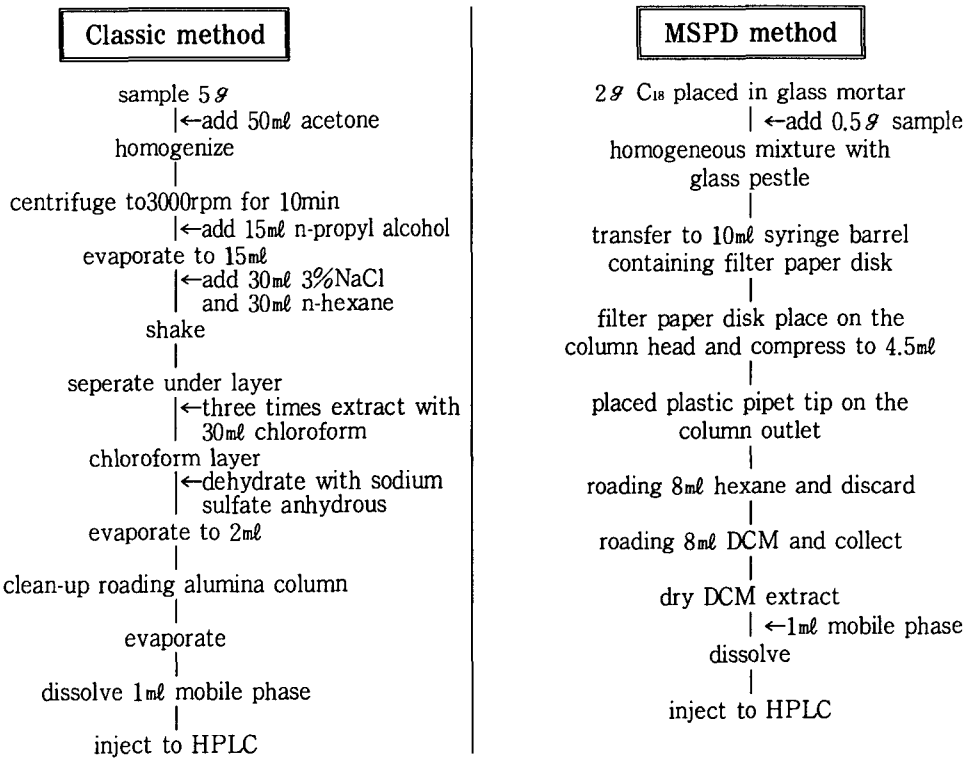


Fig. 1. Comparison of analysis process between Classic and MSPD method

3) 재래식(Classic) 方法의 前處理에서 추출용매의 選定

10ppm의 각 설파제 標準溶液 100㎕를 4가지 시료에 注入한 後 지금까지 合成抗菌劑의 分析에서 추출용매로 많이 使用되는 크로로포름[3,8]과 디크로로메탄[4,25]을 選定하여 재래식(Classic) 方法에 따라 前處理하여 分析한 後 回收率을 比較하여 適合한 추출용매를 選定하였다.

4) 前處理 方法의 選定

10ppm의 각 설파제 標準溶液 100㎕를 4가지의 시료에 注入한 後 위에서 選定된 條件下에 재래식(Classic) 方法과 MSPD(matrix solid phase disperse)에 의한 方法(Fig. 1)으로 前處理하여 그 回收率 및 Clean-up을 比較하여 適合한 前處理 方法을 選定하였다.

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 이동상 용매의 選定

이동상 용매는 주로 아세토니트릴고 옥살산,[26] 인산,[25,29,33] 초산,[28] 초산암모늄[5,23]과 같은 緩衝液을 一定比率로 混合한 것이 利用되는데[4] 이들의 混合化는 藥劑의 種類에 따라 多樣하나 普通 20% 內外의 유기용매의 比率이 主로 使用되고 있다. 本 實驗에서는 이들중 5種의 설파제를 同時分析하는데 適合한 이동상용매를 選定하기 위해 2가지 용매(Acetonitrile : 1% Acetic acid=23:77, Acetonitrile : 0.01M Ammonium acetate=23:77)를 比較 實驗한 結果는 다음과 같았다.(Fig. 2, Table 1, 2)

이 結果에서 먼저 머무름 시간(Retention Time)을 比較해 보면 초산을 완충액으로 使用한 酸性溶媒에서는 설파모노메톡신과 설파퀴녹살린의 差가 11.707分으로 다른 설파제들으 差異와 比較해 매우 큰 差異를 보였으며 最大 머무름 시간도 21.95分으로 너무 길게 나타났다. 또한 感度에 있어서도 설파메타진이 最大의 感度를 보였으며 설파디메톡신이 最少로 이들의 差가 약 3.3배로 매우 큰 差異를 보였다.

한편 초산암모늄을 완충액으로 使用한 中性溶

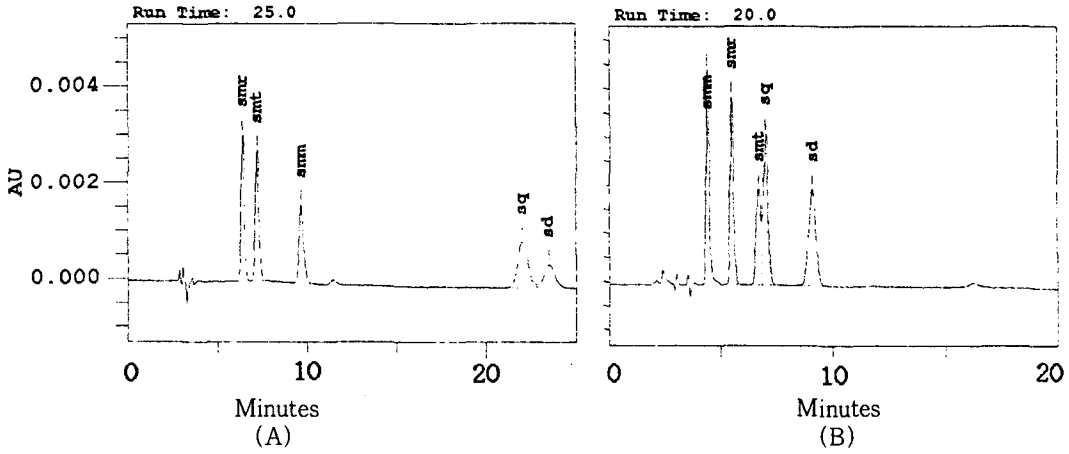


Fig. 2 Chromatogram of five sulfa drugs for two mobile phase.
(A)Acetonitrile : 1%Acetic acid=23:77, (B)Acetonitrile : 0.01M Ammoniun acetate=23:77, SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamonomethoxine, SQ : sulfaquinoxaline, SSD : sulfadimethoxine

Table 1. Retention time and sensitivity for Acetonitrile : 1% Acetic acid=23:77(pH3.03)

	SMR	SMT	SMM	SQ	SD
Retention Time(min)	6.250	7.117	9.233	20.940	21.950
Sensitivity	13.27	15.51	18.97	42.43	43.71

Sensitivity=peak area/peak height
SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamononethoxine
SQ : sulfaquinoxaline, SD : sulfadimethoxine

Table 2. Retention time and sensitivity for Acetonitrile : 0.01M Ammonium acetate=23:77 (pH6.96)

	SMM	SMR	SMT	SQ	SD
Retention Time(min)	4.692	5.692	7.017	7.292	9.842
Sensitivity	10.15	11.89	15.99	15.99	21.19

Sensitivity=peak area/peak height
SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamononethoxine
SQ : sulfaquinoxaline, SD : sulfadimethoxine

媒에서는 最大 머무름 시간 差를 보이는 것은 설파퀴녹살린과 설파디메톡신 間의 2.55分으로 各 설파제 間에 비슷한 差를 보였으며 最大 머무름 시간도 9.842分으로 適定水準을 나타냈다. 感度에서는 역시 最大를 보이는 설파모노메톡신과 最少의 설파디메토신의 差가 2.1배로 초산을 완충액으로 한 용매에 比해 적은 差를 보였다. 그러나 초산암모늄을 완충액으로 한 溶媒에서는 설파메타진과 설파퀴녹살린이 完全 分離되지 않았는데 이는 溶媒의 pH를 變化 시킴으로써 調節이 可能할 것으로 생각된다.

이와 같은 結果는 一定溶媒하에 그 溶媒의 pH가 分離能에 중요한 影響을 미친다는 普遍的인 事實을 確認시켜 주는 것이었다. 여러 藥劑들을 同時分析 할때는 藥劑들의 머무름 시간이 너무 빠르거나 그 間隔이 너무 적으면 Clean-up이 完全하지 않을時 假陽性이나 假陰性의 可能性이 있으며 너무 멀때는 머무름 시간의 誤差가 커져 역시 같은 結果를 招來할 수 있게 된다.

또한 感度에 있어서도 그 差가 크면 試料에 殘留하는 藥劑가 少量일때 感度가 弱한 藥劑에서이를 피크로 感知하지 못하여 假陰性의 結果를 招來할 수 있게 된다. 따라서 이러한 感度와 머무름 시간에 따른 測定置 誤差를 줄이기 위해 各 藥劑들의 용매에 對한 感度의 類似性과 適定 머무름 시간을 維持하여야 할 것으로 思料된다.

이에 本 實驗에서는 초산암모늄을 완충액으로 하는 용매를 1次로 選定하여 이 選定된 溶媒의

最適分離를 위해 0.1N HCl과 0.1N NaOH로 溶媒의 pH를 變化시켜 實驗한 結果는 다음과 같았다.(Fig. 3)

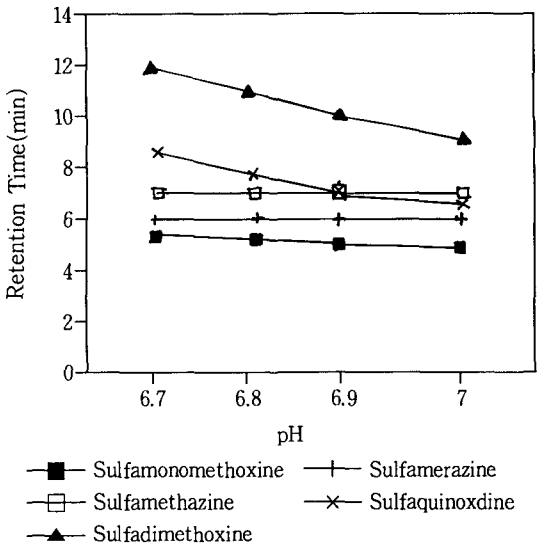


Fig. 3 The variation of Retention Times by modification of pH in Acetonitrile −0.01M Ammonium acetate(23:77)

pH 變化를 試驗한 結果를 보면 설파퀴녹살린 및 설파디메톡신이 pH에 敏感한 反應을 보였으며 설파메타진이 가장 적은 反應을 보였다. pH가 7.0 및 6.9에서는 설파메타진과 설파퀴녹살린이 完全히 分離되지 않았으며 分離順序도 바뀌어지고 各 설파제 間의 머무름시간(Retention time) 間隔이 너무 적게 나타났다. pH 6.8에서는 完全分離가 可能하였으나 역시 설파메타진과 설파퀴녹살린 사이가 너무 가깝게 分離되었으며 pH 6.7에서는 100% 分離가 可能했으나 설파모노메톡신과 설파메라진이 가까와져 바뀌기 시작하고 설파퀴녹살린과 설파디메톡신의 머무름 시간(Retention time)이 멀어지며 感度가 약해져서 1차 용매 선정시의 醋酸을 완충액으로 한 溶媒의 模樣과 類似해지기 시작했다. 따라서 pH 6.8과 6.7 사이가 가장 適定한 pH로 思料되어 本 實驗에서는 아세토니트릴과 0.01M 초산암모늄을 23:77로 混合하고 그 pH 6.75로 矯正하여 最終溶媒로 選定하였다.(Fig. 4)

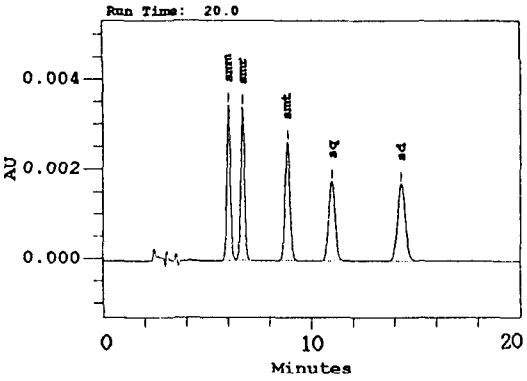


Fig. 4 Chromatogram of five sulfa drugs for mobile phase(Acetonitrile : 0.01M Ammonium acetate=23:77) adjusted to pH 6.75.
SMT : sulfamethazine
SMR : sulfamerazine
SMM : sulfamonomethoxine
SQ : sulfaquinoxaline
SD : sulfadimethoxine

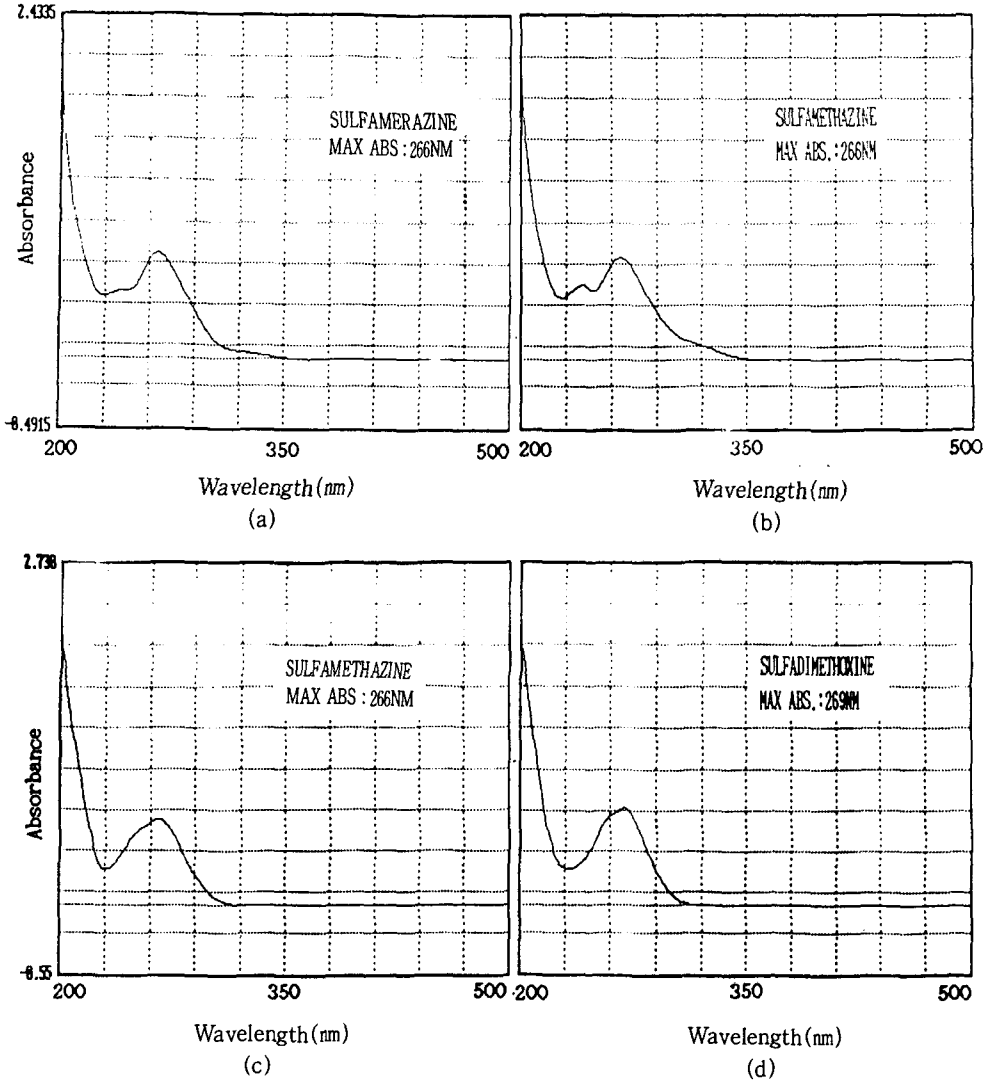
한편 本 實驗에서는 溫度變化에 따라 pH값에 多少 變化가 있었으나 全體 變化 樣相에는 差異가 없었으며 이러한 樣相은 정 등[4]이 實驗한 pH 變化 結果와도 類似한 것이었다. 그러나 정 등은 最終溶媒로 0.005M 옥살산을 아세토니트릴과 78:22(pH=2.35)으로 混合한 溶媒를 選定하였는데 이는 本實驗의 초산을 완충액으로 한 용매를 使用한 境遇와 같이 머무름 시간(Retention time)이 길고 感度差가 매우 컸으나 本實驗과는 달리 8개의 藥劑를 同時分析하는 것으로 이들 藥劑들을 適定으로 分離하기 위해서 그러한 結果를 보인 것으로 思料되기 때문에 直接 比較 評價할 수는 없었다.

本 實驗을 통해 여러 藥劑의 同時分析時 各 藥劑의 分離에는 特定 pH 값 보다 pH의 變化에 따른 各 藥劑들의 變化程度를 파악하는 것이 더욱 重要하다는 것을 確認할 수 있었다.

2. UV 파장의 選定

5種의 설파제를 同時分析하는데 가장 適合한 UV 波長을 구하기 위해 Spectrophotometer을 利用하여 Scanning한 結果는 다음과 같았다. (Fig. 5)

試驗結果 설파메라진과 설파메타진은 266nm, 설파모노메톡신은 265nm, 설파디메톡신은 269nm, 설파퀴녹살린은 250nm에서 各各 最大吸收置를 보여 설파퀴녹살린을 除外하고 거의 비슷한 波長을 보였으며 最大吸收量은 各各 0.7418, 0.7517, 0.6880, 0.7870, 0.8538이었다. 이러한 結果는 정等[4]과 한국과학기술원[5] 等 여러 硏究結果와 약간의 差異가 있는데 이는 이동상 溶媒의 差異에 起因한 것으로 各 藥劑의 吸收波長은 그 藥劑를 溶解한 溶媒에 따라 달라지기 때문이다.



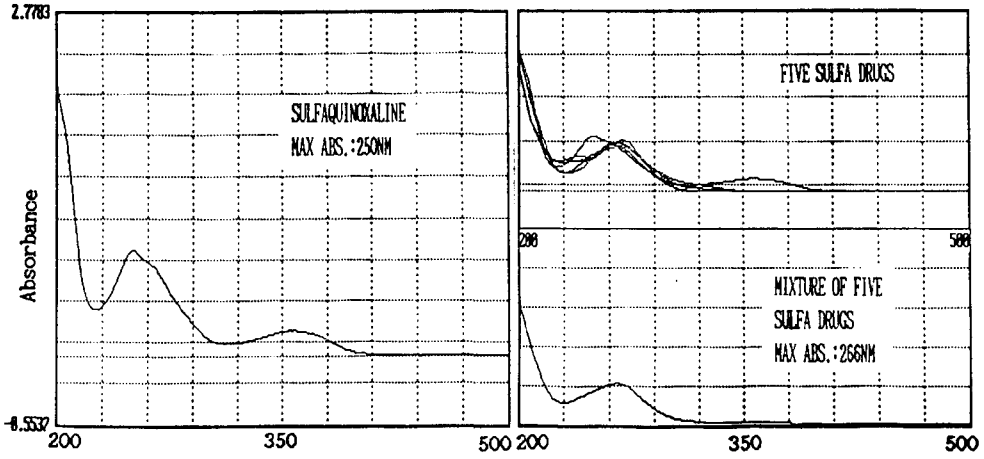


Fig. 5 Absorbance spectra of Sulfa drugs

한편 固定된 UV 檢出機를 사용한 여러 藥劑들의 同時分析時 波長을 選定 할때는 各 藥劑間의 最大 吸收波長이 다름으로 비록 各各의 最大 吸收波長이 아니라도 藥劑間의 吸收가 類似한 波長을 選定하여야 吸收 程度의 差異에서 오는 誤差를 줄일수 있을 것으로 思料된다.

이에 本 實驗에서는 共通的으로 높은 吸收를 보이는 파장범위인 255nm와 270nm 사이의 吸收量을 2nm 간격으로 比較하여 본 結果 263nm에서 各 藥劑間의 吸收量이 가장 적은 差를 보였다. (Table 3) 따라서 本 實驗에서는 263nm을 適定波長으로 選定하였다.

Table 3. The absorbance of sulfa drugs at scanning by Spectrophotometer

Sulfa drugs	Wavelengths(nm)						
	257	259	261	263	265	267	269
SMR	0.6416	0.6791	0.7100	0.7303	0.7410	0.7410	0.7260
SMT	0.6416	0.6812	0.7232	0.7373	0.7500	0.7510	0.7390
SMM	0.6356	0.6506	0.6675	0.6792	0.6880	0.6860	0.6700
S D	0.6871	0.7106	0.7260	0.7393	0.7570	0.7770	0.7870
S Q	0.7803	0.7625	0.7474	0.7286	0.7040	0.6690	0.6270
MAX↔MIN	0.1447	0.1119	0.0799	0.0601	0.0690	0.1080	0.1600

* SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamonomethoxine
SQ : sulfaquinoxaline, SD : sulfadimethoxine
MAX↔MIN : difference between maximum and minimum absorbance

3. 추출용매의 選定

現在 가장 많이 利用되는 크로로포름과 디크로로메탄을 抽出溶媒로 하여 回收率을 比較한 實驗結果는 다음과 같았다.(Table. 4,5,6)

實驗 結果 크로로포름으로 抽出한 것에서는 試料別로 보면 牛乳(Milk)가 平均 76.3%로 가장 높은 回收率을 보였으며 牛肉(Bovine muscle)에서는 標準偏差가 매우 커서 藥劑間 回收率이 가장 큰 差를 보이는 것으로 나타났다.

디크로로메탄으로 抽出한 것에서는 鷄肉(Chicken muscle)이 72.1%로 回收率이 가장 높았으며 豚肉(Pork muscle)이 69.7%로 가장 낮았다.

그러나 牛乳(Milk)에서 설파디메톡신이 18.2%로 매우 낮은 回收率을 보였기 때문으로 이를 除外하면 牛乳(Milk)가 80% 이상으로 매우 높

Table 4. Recovery rate(%) of five sulfa drugs extracted with Chloroform from livestock productions fortified at 0.2㎍/g

Samples	Sulfa drugs						
	SMM	SMR	SMT	S Q	S D	Mean	S.D.
Pork muscle	73.3	73.5	77.3	73.0	72.3	73.9	2.0
Bovine muscle	72.4	69.3	66.0	67.1	24.3	59.8	20.0
Chicken muscle	79.7	78.5	78.3	77.8	62.4	75.3	7.3
Milk	80.8	81.9	80.4	82.3	56.0	76.3	11.4
Mean	76.6	75.8	75.5	75.1	53.8	71.3	13.1
S.D.	4.3	5.5	6.5	6.5	20.8		

* Values represent the averages of three analyses.
SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamonomethoxine
SQ : sulfaquinoxaline, SD : sulfadimethoxine

Table 5. Recovery rate(%) of five sulfa drugs extracted with Dichloromethane from livestock productions fortified at 0.2㎍/g

Samples	Sulfa drugs						
	SMM	SMR	SMT	S Q	S D	Mean	S.D.
Pork muscle	69.7	72.7	69.7	67.4	69.2	69.7	1.9
Bovine muscle	77.9	78.7	72.4	63.8	59.0	70.4	8.7
Chicken muscle	75.2	75.3	75.2	74.7	60.1	72.1	6.7
Milk	84.8	82.4	84.4	80.5	18.2	70.1	29.0
Mean	76.9	77.3	75.4	71.6	51.6	70.6	14.3
S.D.	6.3	4.2	6.4	7.5	22.8		

* Values represent the averages of three analyses.
SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamonomethoxine
SQ : sulfaquinoxaline, SD : sulfadimethoxine

Table 6. Recovery rate(%) of five sulfa drugs extracted with Chloroform + Dichloromethane from livestock products fortified at 0.2㎍/g

Samples	Sulfa drugs						
	SMM	SMR	SMT	S Q	S D	Mean	S.D.
Pork muscle	64.5	64.0	66.5	62.9	64.0	64.4	1.3
Bovine muscle	75.0	72.7	75.3	71.5	71.9	73.3	1.8
Chicken muscle	74.0	72.9	104.7	66.5	9.2	65.5	34.8
Milk	85.0	83.6	43.4	82.6	6.8	60.3	34.6
Mean	74.6	73.3	72.5	70.9	38.0	65.9	23.1
S.D.	8.4	8.0	25.4	8.6	34.8		

* Values represent the averages of three analyses.
SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamonomethoxine
SQ : sulfaquinoxaline, SD : sulfadimethoxine

은 回收率을 보였다.

藥劑別로서는 설파메라진이 77.3%로 가장 높았으며 설파디메톡신이 역시 가장 낮은 回收率을 보였다.

크로로포름으로 먼저 抽出後 다시 디크로로메탄으로 抽出한 境遇에서는 牛肉(Bovine muscle)이 73.3%로 가장 큰 回收率을 보였으며 牛乳(Milk)가 60.3%로 가장 낮았는데 이 역시 標準偏差가 매우 크기 때문으로 나타난 結果로 풀이된다.

藥劑에 있어서는 설파모노메톡신이 74.6%로 가장 높았으며 설파디메톡신이 38%로 가장 낮게 나타나 抽出溶媒에 關係없이 매우 낮은 回收率을 보였다.

또한 시료에 있어서 牛乳(Milk)에서는 설파디메톡신을 除外하고 모든 藥劑에 대해 다른 試料보다 높은 回收率을 보였는데 이는 牛乳(Milk)가 液體狀態로 고기 試料보다 抽出이 容易하기 때문인 것으로 사료된다.

한편 抽出溶媒와 試料 그리고 藥劑間의 有意性을 보기 위해 SAS 統計프로그램[36,37]을 利用하여 分散分析한 結果(α=0.05) 抽出溶媒間에(p=0.3981) 그리고 試料別, 藥劑別 抽出溶媒間의 回收率에는 有意한 差가 없었으며(p=0.360, 0.9809)

또한 試料에 따른 回收率에도 有意한 差가 없었으나(p=0.9353) 藥劑에 따른 回收率에서는 有意한 差가 認定되어(p=0.0001) 이를 Tukey's Studentized Range(HSD) Test한 結果 역시 설파디메톡신이 다른 藥劑와 有意하게 적은 回收率을 보였다.

비록 有意한 差는 아니었지만 平均 回收率이 크로로포름, 디크로로메탄, 크로로포름+디크로로메탄의 順序로 높게 나타나 1992年 한국과학기술원의 豚肉試料에 對한 同時分析法 硏究에서 설파제 抽出時 平均 回收率이 크로로포름+디크로로메탄이 가장 높았고 다음 크로로포름과 디크로로메탄 順으로 나타나 本 實驗結果와 다르게 調査되었는데, 이는 本 實驗이 Alumina colunm으로 Clean-up後 이동상 용매에 녹여 기기에 주입한 것인데 比해 그들은 Alumina colunm 통과後 다시 재추출(Back extraction) 過程을 거친 것이기 때문으로 思料되나 그들은 설파제 以外의 藥劑와 同時分析하는 實驗이므로 이러한 差異를 比較 確認할 수 없었다. 그러나 이들의 實驗에서

도 本 實驗과 같이 藥劑間의 回收率에 매우 큰 差를 보였으며 特히 설파디메톡신은 抽出溶媒에 關係없이 매우 낮은 回收率을 보여 本實驗과 類似한 結果를 보였다.

이에 本實驗에서는 平均 回收率이 가장 높고 標準偏差가 가장 적은 크로로포름을 재래식(Classic) 前處理 方法의 抽出溶媒로 選定하였다.

4. 前處理 方法의 選定

最近 많이 利用되고 있는 MSPD(matrix solid phase disperse)에 의한 前處理 方法과 위에서 選定된 재래식(Classic) 方法에 의한 前處理 方法을 比較하기 위해 MSPD 法으로 前處理한 結果는 다음과 같았다.(Table 7)

實驗結果 平均 回收率이 86.5%로 모든 試料와 藥劑에서 높은 回收率을 보였으며 標準偏差도 매우 적게 나타나 재래식(Classic) 方法에 의한 것보다 매우 優秀한 結果를 보였다.

Table 7. Recovery rate(%) sulfa drugs from livestock productions by MSPD method

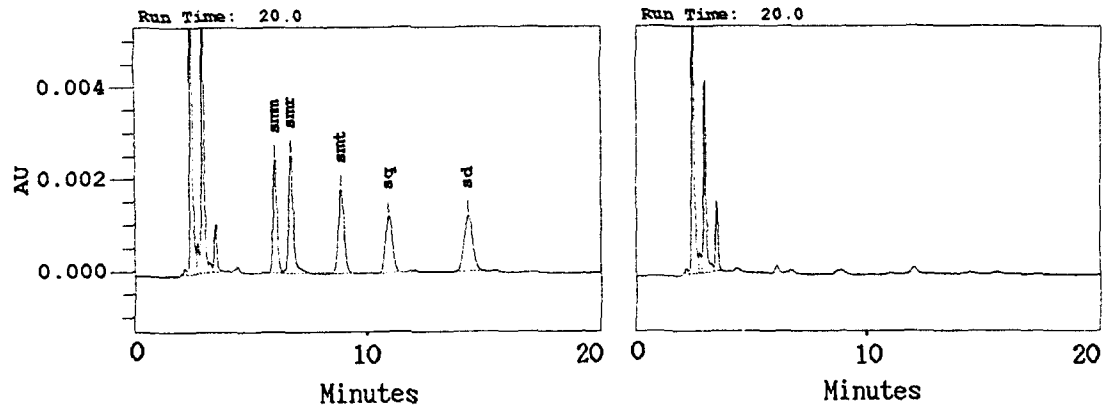
Samples	Sulfa drugs						
	SMM	SMR	SMT	SQX	SDM	Mean	S.D.
Pork muscle	84.0	88.2	84.1	86.9	87.9	86.2	2.0
Bovine muscle	77.2	86.7	83.0	87.7	89.7	84.9	4.9
Chicken muscle	79.1	88.5	85.8	90.7	91.6	87.0	4.9
Milk	78.5	90.0	89.2	91.0	90.8	87.9	5.3
Mean	79.7	88.4	85.5	89.1	89.9	86.5	4.3
S.D.	3.0	1.4	2.7	2.1	1.4		

* Values represent the averages of three analyses.
SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamonomethoxine
SQ : sulfaquinoxaline, SD : sulfadimethoxine

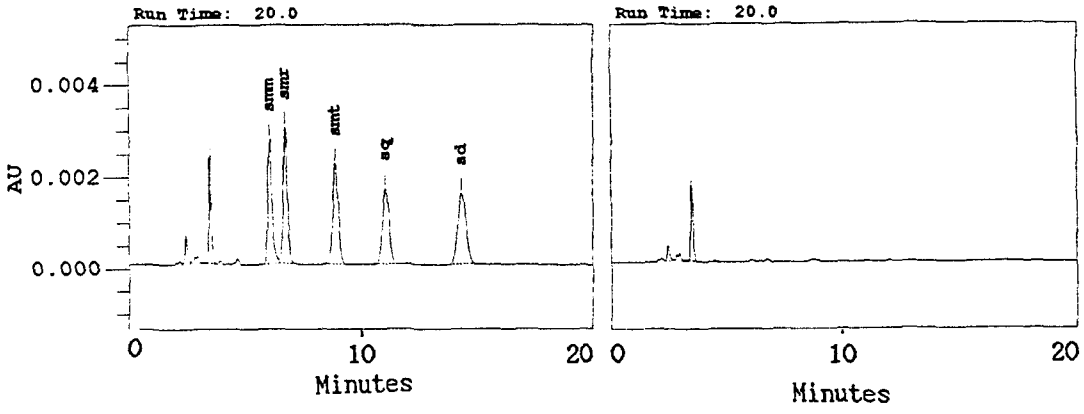
이에 이를 위에서 選定된 크로로포름을 抽出溶媒로 使用한 재래식(classic) 前處理 方法과 比較하기 위해 分散分析을 實施한 結果(α=0.05) 前處理 方法에 따라 有意한 差가 認定되었으며 (p=0.0001) 前處理 方法에 따른 試料別, 藥劑別 回收率에서도 有意한 差가 認定되었다(p=0.0471, 0.0002), 또한 試料(p=0.0043) 및 藥劑(p=0.0109)에서도 有意한 差가 認定된바 이를 HSD test한 結果 試料에서는 牛肉(Bovine muscle)이 다른 試料와 有意하게 적은 回收率을 보였으며 藥劑에서는 설파메라진 및 설파퀴녹살린이 설파디메톡신과 有意한 差를 나타냈다.

한편 크로마토그램을 比較한 結果(Fig. 6,7) 재래식(Classic) 方法에 의한 前處理時에는 豚肉(Pork muscle)이 가장 優秀한 Clean-up을 보였으며 MSPD 方法에서는 牛乳(Milk)가 가장 좋은 Clean-up을 나타냈으나 試料에 따른 큰 差異가 없었으며 MSPD에 의한 方法이 재래식(classic) 方法에 의한 것보다 優秀한 Clean-up을 나타내었다. 이러한 Clean-up의 優秀性과 前處理 過程의 單純化가 또한 回收率을 높이는데 크게 寄與한 것으로 思料된다.

이에 本 前處理 方法의 選定實驗에서는 回收率 및 clean-up이 優秀한 MSPD에 의한 前處理 方法을 選定하였다.



(A)



(B)

Fig. 6 Chromatogram of fortified and control tissues by classic(A) and MSPD method(B)(pork muscle fortified at 0.2μg / g)
SMT : sulfamethazine, SMR : sulfamerazine, SMM : sulfamonomethoxine
SQ : sulfaquinoxaline, SD : sulfadimethoxine

前述한 바와 같이 多樣한 條件과 與件들로 다른 硏究結果와 比較評價하는데는 多少 無理가 있겠으나 藥劑들의 同時分析法 開發에 있어서 이러한 方法上의 過程이 큰 意義가 있을 것으로 思料되며 此後 더 많은 多樣한 特性을 지닌 藥劑들을 同時分析하기 위해서는 이러한 分析過程을 通해 分析하고자 하는 藥劑들의 特性을 理解하고 그들의 共通的인 事項을 찾아 내는 것이 必須的이라고 생각된다.

本 硏究는 설파제 同時分析의 普遍的인 方法을 提示하고자 한 것으로서 이러한 硏究에서 나타난 여러가지 未備點을 補完해 나가면 畜産食品에 殘留하는 설파제의 分析은 물론 많은 藥劑들의 分析法 發展에 寄與할 수 있으리라 思料되며 나아가 畜産食品에 對한 安全性 提高로 國民保健向上에 寄與할 수 있을 것으로 思料된다.

Ⅳ. 結　論

고속액체크로마토그래피(HPLC with UV Detector and Reverse Phase Column)을 利用하여 畜産食品(豚肉, 牛肉, 鷄肉, 牛乳)에 對한 5種의 殘留 설파제(설파메타진, 설파메라진, 설파모노메톡신, 설파퀴녹살린, 설파디메톡신)를 同時分析하기 위해 段階別로 나누어 比較 選定 實驗한 結果는 다음과 같았다.

1) **이동상 용매** : 초산을 緩衝液으로 한 이동상 용매(Acetonitrile : 1% Acetic acid=23:77 (pH 3.03) 보다 초산암모늄을 緩衝液으로 한 이동상 용매(Acetonitrile : 0.01M Ammonium acetate=23:77(pH 6.96)가 感度 및 머무름 시간(Retention time)에서 더 適合했으며 이를 pH 6.75로 矯正한 것이 가장 適合하였다.

2) **UV 파장** : 설파메라진과 설파메타진은 266㎚, 설파모노메톡신은 265㎚, 설파디메톡신은 269㎚, 설파퀴녹살린은 250㎚의 파장에서 各各 最大 吸收를 보였으며 이들을 共通 適用時 파장으로 263㎚가 가장 適合하였다.

3) **재래식(Classic) 方法** : 전처리에서 추출용매－크로로포름, 디크로로메탄 및 크로로포름＋디크로로메탄 間의 平均 回收率에 有意한 差는 없었으며($P>0.05$), 試料 및 藥劑別 抽出溶媒間 回收率에서도 有意한 差가 없었다.($P>0.05$) 그러나 크로로포름의 平均回收率이 71.3%로 다른 溶媒보다 높아 抽出溶媒로 適合하였다.

4) **前處理 方法** : MSPD(matrix solid phase disperse)에 依한 前處理時 平均 回收率이 86.5%로 재래식(Classic)方法의 71.3%보다 有意하게 높은 回收率($P>0.05$)을 보였으며 前處理 方法에 따른 試料別, 藥劑別 回收率에서도 有意한 差가 認定되었다.($P>0.05$) 또한 Clean-up에서도 재래식(Classic) 方法보다 優秀하여 MSPD에 依한 前處理方法이 適合하였다.

Ⅴ. 參考文獻

1. 황인진, 박병옥, 김창수, 우기방. 1990. SOS Test Kit 및 HPLC법에 의한 도축돈의 뇨, 신장 및 근육내 설파메타진 잔유량 조사. 한국가축위생학회지. 13(1):21～26.
2. 박종명, 박근식. 1991. 축산식품의 유해물질 잔류와 그 관리 방안, 한국식품위생학회 학술심포지움.
3. 한국식품공업협회. 1994. 식품공전. 한일인쇄:807～859.
4. 정규생, 채명식, 김창동, 김종배. 1993. 액체크로마토그라피를 이용한 동물 근육조직중의 합성항균제 동시분석. 한국식품위생학회지. 8(1):25～35.
5. 한국과학기술원. 1992. 축산식품내 유해잔류물질 검사교육과 분석방법 개발에 관한 연구.
6. Gerald L. Mandell and Merle A.Sande. 1980. Sulfonamides, Trimethoprim-Sulfamethoxazole, and Agents for Urinary Tract Infections, The Pharmacological Basis of Therapeutics. 16th Macmillan Pub.10 N Y:1095～1105.7. 김영수, 황래홍. 1992. Sulfamethazine 및 Trimethoprim이 원유의 TTC test에 미치는 영향에 관한 연구. 한국가축위생학회지. 15:(2):101～102.
8. 김영철, 이용욱. 1990. 일부지역 돼지장기 및 근육내 잔류설파메타진에 대한 조사연구. 한국식품위생학회지. 5(4):197～204.
9. Barnett H L. 1943. The use Sulfapyrazine in Infants and Children. Am J Med Sci:599.

10. Goodman L S. and Gilman A. 1980. The Pharmachological Basis of Therapeutics. 16th Macmilan Pub Co., N Y.
11. Stowe C M. 1965. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa State Pub.:408~502.
12. John D.Weber and Michael D.Smedley. 1989. Liquid Chromatographic Determination of Sulfamethazine in milk. J Assoc Off Anal Chem. 72:445.
13. Stanley E. Charm,, Ehezer Zomer and Robert Salter. 1988. Confirmation of Widespread Sulfonamide Contamination in Northeast U.S Market milk. J of food protection. 51.
14. Van Houweling, C.D. 1978. Subtherapeutic antibacterial agents in animal feeds. F D A A:58~69.
15. Berill, R.F. 1982. Sulfonamides, Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 5th ed. Iowa State:717~726.
16. 이문한. 1989. 돈육중의 약제잔류의 문제점과 잔류방지 대책, 수출돈육중의 약제잔류 방지대책 세미나:5~12.
17. Tsukuru, O., Masakiyo, U., Toshiki, O., Toshitaka, O., Kaoru, T., Hiraokatasu, A., and Eigo, T. 1981. Gas chromatographic determination of ethopabate in chicken tissues using flame photometric detector. Shokuhin Eiseigaku. 22(4):279~284.
18. Deborah e.Dixon-Holland and Stanley Katz. 1989. Direct Competitive Enzyme linked Immunosorbent Assay for Sulfamethazine Residues in milk. J Assoc Off Anal Chem. 72:447.
19. Matusik, J.E., Sternal, R.S., Barnes, C.J. and Spone, J.A. 1991. 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.
20. Randall M, Simpson, Francis B.Suhre, and J.W.Shafer. 1985. Quantitative Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Assay of Five Sulfonamide Residues in Animal Tissue. J Assoc Off Anal Chem. 68(1):23~26.
21. Horwitz, W.1981. Analytical methods for sulfonamides in foods and feeds, J Assoc Off Anal Chem. 64(1):104.
22. Horwitz, W. 1981. Performance characteristics of sulfonamide methods. J Assoc Off Anal Chem. 64(4):814.
23. 한국과학기술원 도핑콘트롤센타. 1991. 식품중 인체유해물질 검정교육과 분석방법 개발에 관한 연구:145~166.
24. Torel, J., Cillard, J., Cilard, P.and Vie, M. 1985. Simultaneous analysis of three antimicrobial agents in feed premixes by reserve phase high performance liquid chromatography. J Chromatogr. 323:447~450.

25. Long, A.R., Hsieh, L.C., Malbrouth, M.S., Short C.R. and Baker, S.A. 1990. Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue. J Agric Food Chem. 38:423~426.
26. Horie, M., Saito, H., Hosinno, Y., Nose, H., Nakajawa, H., Yamane, Y. 1991. Simultanious determination of residual synthetic antibacterials in fish by high performance liquid chromatography. J chromatogr. 538:484~491.
27. Takeda, N. and Akiyama, Y. 1991. Pre-colunm derivatization of sulfa drugs with fluorescamine and high-performance liquid chromatographic determination at their residual levels in meat and meat products. J chromatogr. 558:175~180.
28. Takeda, N. and Akiyama, Y. 1992. Rapid determination of sulfonamides in milk using liquid chromatographic separation and fluoresamine derivatization. J Chronatogr. 607:31~35.
29. Horii, S., Momma, C., Miyahara, K., Mareyama, T. and Matsunot, M. 1990. Liquid chromatographic determination of three sulfonamides in animal tissue and egg. J Assoc Off Anal Chem. 73(6):990~992.
30. Walker, L.V., Walsh, J.R. and Webber, J.J. 1992. High-performance liquid chromatography of sulphonamides extracted from bovine and porcine muscle by solid-phase dispersion. J Chromatogr. 595:179~184.
31. Wiess, G., Duke, P.D. and Ganzes, L. 1987. HPLC method for simultaneous analysis of sulfadimethoxine and ormethoprim in tissues and blood of cattle, chicken and catfish. J Agric Food Chem. 35:905~909.
32. Bergqvist, Y., Eckerbom, S., Larsson, H. and Zadeh, N.M. 1991. Reverse phase liquid chromatographic method for the simultanious determination of the antimalarial durgs sulfadoxine, pyrimethadine, mefloquine and its major carboxylic metabolite in plasma. J Chromatogr. 571:169~177.
33. Hori, Y. 1983. Systematic analysis of synthetic antibacterials in chicken muscle and eggs by high performance liquid chromatography. Kor J Food Hygiene. 24:447~453.
34. Cox BL and Krzeminski LF. 1982. High performance liquid chromatographic determination of sulfamethazine in pork tissue. JAOC. 65:1311~1315.
35. STEVEN A.BARKER, AUSTIN R.LONG and CHARLES R.SHORT. 1989. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. J Chromatogr. 475:353~361.
36. Ronald P.Cody, Jeffrey K.Smity. 1991. Applied Statistics and the SAS Programming Language. third Edition:136~202.
37. 송문섭, 이영조, 조신섭, 김병천. 1989. SAS를 이용한 통계자료 분석. 자유아카데미:61~151.