

## 마우스 근육내 설파제 잔류량조사 및 동시분석파장 연구

정경태, 조현호, 이강록, 이우원, 양 주, 김근규

부산광역시 보건환경연구원 축산물위생검사소

### Investigation of residual levels and pertaining detection wavelength of 5 sulfonamides in the mouse muscle

Kyung-Tae Chung, Hyun-Ho Cho, Gang-Rog Lee, Woo-Won Lee,  
Ju Yang, Geun-kyu Kim

*Division of Veterinary Service Laboratory,  
Pusan Metropolitan City Institute of Health and Environment*

#### Abstract

This survey was carried out to determine 5 residual sulfonamides(sulfamerazine : SMR, sulfamethazine : SMT, sulfamonomethoxine : SMM, sulfadimethoxine : SDM, sulfaquinoxaline : SQX) in muscle of mouse. For this investigation, pertaining detection wavelength, residual levels and residual times in muscle of mouse were summarized as follows ;

1. Pertaining detection wavelength of 5 residual sulfonamides(SMR, SMT, SMM, SDM, SQX) was 270nm by HPLC/UV detection.
2. After 1 day put a stop to sulfonamides administration, residual levels was 1~1.5ppm, but were not detected at day 7.
3. Withdrawal time of 5 sulfonamides were about 7 days suspectly.

---

Key words : Residues. Sulfonamides, Mouse, HPLC

#### 서 론

소득의 증대와 현대 축산업의 경영형태가 대규모, 다두사육으로 변하여 감에 따라 가축의

질병예방과 치료를 위한 각종 약제의 사용이 증가되고 있는 반면 소비자들의 소비형태가 양적인 면보다 질적인 면으로, 즉 더욱 위생적이고 안전한 축산물을 선호하고 있다.

또한 세계무역기구 (WTO)의 출범에 따라 축산물 등 각종 식품의 국가간 수출·입시식품 위생 및 검역규정 (SPS) 협정에 의하여 국내에서 유통되는 축산물도 수출·입 축산물의 검역수준과 동등한 검사를 요구하고 있는 형편이다.

이에따라 국민의 건강과 양축농가의 소득 보호를 위한 한 방법으로 1990년대부터 축산물 유해잔류물질에 관한 많은 연구가 이루어져 오고 있다<sup>1,5)</sup>.

Sulfonamides는 병원성 세균에 대한 항균작용을 하며<sup>6,7)</sup>, 비교적 안정된 화학구조를 가지고 있으며, 항균작용의 범위도 넓어<sup>8,9)</sup> 동물질병의 예방, 치료 또는 성장촉진의 목적으로 많이 사용하고 있다<sup>10)</sup>.

현재 사용되고 있는 유해잔류물질의 분석방법은 비색법, TLC, ELISA, HPLC, GC, 미생물수용체검사법(Charm test) 등이 사용되고 있다<sup>11,12)</sup>.

지금까지 많은 연구자들에 의하여 잔류물질, 특히 설파제의 분석방법, 잔류량 등의 연구가 이루어지고 있으나, 축종별 휴약기간 등의 연구는 미비한 실정임을 감안하여 우선 실험동물로 마우스를 이용 5종의 설파제를 투여하여 그 잔류량을 알아보고, 아울러 설파제의 동시 분석 방법에 대한 기초자료를 제시하고자 다음의 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시험재료

본 실험에 사용한 동물은 부산광역시 보건환경연구원 축산물위생검사소에서 사육되고 있는 임상적으로 건강한 마우스를 암수 구별없이 사용하였으며, 마우스는 50두씩 분리하여 사육하며 실험에 공하였는바 음수에 각각 100 $\mu$ g/ml의 농도로 설파표준품 (sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxiline)을 첨가하여 7일간 급여시키고, 사료는 항생, 항균물질 등이 첨가되지 않은 마우스용 pellet사료 (제일제당)를 구입 급여하였다. 사육은 cage사육을 원칙으로

하였고 비타민 등 기타 약제는 투여하지 않았다. 설파제 투여후 1일부터 10일까지 설파제별 각각 5두씩 단계별로 도살 실험에 공하였다.

### 시 약

실험에 사용한 시약은 sulfamerazine(S-8876), sulfamethazine(S-6256), sulfamonomethoxine(S-0508), sulfadimethoxine(S-7007), sulfaquinoxaline(S-7382), potassium dihydrogen phosphate(P-5504) 등은 Sigma제품을, acetonitrile, dichlorometane, n-hexane, methanol 등은 HPLC grade를, C<sub>18</sub>(LiChroprep RP-18)은 Merck 제품을 각각 사용하였다.

### Apparatus

Liquid chromatograph(Waters LC, UV/Vis detector model 486, U6K injector)와 column (Nova-Pak C18, 3.9 $\times$ 150mm, 4 $\mu$ m)를 사용하였다.

### LC solution

시험에 사용한 증류수는 초순수제조장치 (Millipore사)를 이용하여 이온교환수를 사용하였다.

Mobile phase는 potassium dihydrogen phosphate 1g을 증류수 1 $l$ 에 녹인후, 이 액 900ml와 acetonitrile 100ml을 혼합하고, phosphoric acid 로 pH 3.5가 되도록 조정된 다음 0.45 $\mu$ m filter에 여과하여 사용하였다.

표준용액은 stock과 working solution으로 구분하여 제조하였다. 요약하면, stock solution은 sulfamerazine(SMR), sulfamethazine (SMT), sulfamonomethoxine(SMM), sulfadimethoxine(SDM), sulfaquinoxaline(SQX)를 10mg씩 취하여 methanol 100ml에 녹여(100 $\mu$ g/ml) 냉장보관 하였다. Working solution은 상기의 stock solution을 mobile phase로 10배 희석(10 $\mu$ g/ml)시켜 냉장보관 하면서 시험에 사용하였다.

### Determination

표준검량곡선 작성은 상기 각각의 표준용액을

0.1, 0.2, 0.5ppm으로 희석한 다음 50 $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 얻은 면적을 구하여 작성하였으며, 정량방법은 외부표준법을 사용하였다. 분석파장은 250~300nm의 파장범위내에서 일정 범위씩 변경시키며 적정검출파장을 추정하였고, flow rate 1.0ml/min, AUFS 0.005로 하였다.

시험동물 시료의 전처리는 근육부위 0.5g을 채취하여 matrix solid phase dispersion (MSPD)법을 이용하였다. 즉, octadesyl(C<sub>18</sub>) 2g에 마우스 근육시료 0.5g을 넣고 균질화시킨 다음 10ml용량의 open column에 충전시키고 n-hexane 8ml로 세척 후 8ml의 dichlormethane으로 용출시키고, 이 액을 진공농축시켜 건조시켰다. 건조물에 0.5ml의 이동상용액으로 잘 녹이고 15,000g에서 10분간 원심분리 후 0.45  $\mu$ m acro disc로 여과하여 50 $\mu$ m씩 HPLC에 주입하였다(Fig 1).

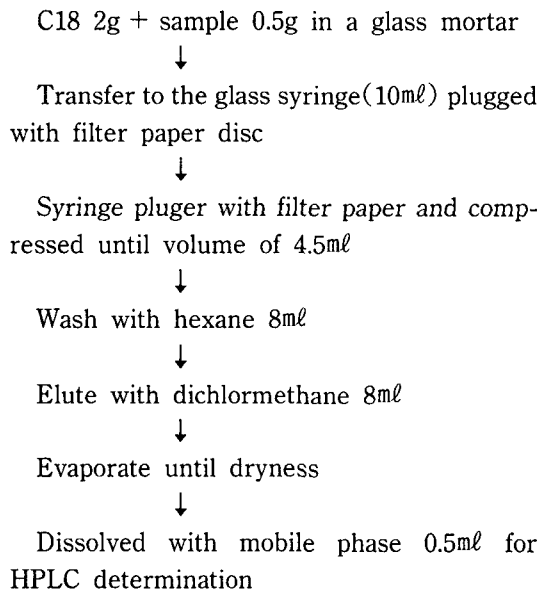


Fig 1. Pretreatment procedure for the determination of sulfonamides in mouse muscle by HPLC

HPLC condition  
HPLC condition은 Table 1과 같다.

Table 1. HPLC conditions of for analysis of 5 Sulfonamides

Items	Conditions
Column	Nova-Pak C <sub>18</sub> (3.9×150mm, 4 $\mu$ m)
Mobile phase	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> CN = 900 : 100(v/v, pH 3.5)
Flow rate	1ml/min
Detector	0.005AUFS at UV
Column temperature	Room temperature
Injection volume	50 $\mu$ l

## 결 과

### 1. 설파제별 적정 검출파장

5종의 설파제(SMR, SMT, SMM, SDM, SQX)를 설파제별 표준용액을 제조하여 250-300nm의 파장범위 내에서 일정 범위씩 파장을 변경시키며 각 설파제별 적정 검출파장을 조사한 결과 SMR 265nm, SMT 270nm, SMM 274nm, SDM 270nm 그리고 SQX 254nm에서 최대흡광치를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Detection pertaining wavelength of residual sulfonamides by HPLC

Sulfonamides	Wavelength(nm)
Sulfamerazine	265
Sulfamethazine	270
Sulfamonomethoxine	274
Sulfadimethoxine	270
Sulfaquinoxaline	254

### 2. 설파제별 투약중지 후 체내 잔류량

5종의 설파제(SMR, SMT, SMM, SDM, SQX)를 설파제의 투약을 중지한 후 1일부터 10일까지 1일 5두씩 도살하여 체내(근육내) 잔류량을 조사한 결과의 평균치는 Table 3에서와 같이 투약중지 후 1일에 1~1.5ppm이던 것이 점차 감소하여 투약중지 후 5~7일부터는 검출되지 않았다.

Table 3. Average of sulfonamides levels at slaughter in mouse muscle.

Sulfonamides	Residual levels(ppm) on day						
	1	2	3	4	5	6	7
Sulfamerazine	0.98	0.41	0.22	0.04	0.02	ND	
Sulfamethazine	0.96	0.32	0.12	0.06	0.03	ND	
Sulfamonomethoxine	1.51	0.80	0.20	0.02	ND		
Sulfadimethoxine	0.99	0.72	0.41	0.20	0.03	0.01	ND
Sulfaquinoxaline	1.21	0.60	0.30	0.11	0.05	0.02	ND

\* ND : not detected

## 고찰

설파제는 가축의 세균 및 원충성질병을 치료 또는 예방하고, 성장을 촉진할 목적으로 많이 사용되고 있다<sup>6,7)</sup>. 치료제 또는 사료첨가제로 사용되고 있기 때문에 설파제는 내성균을 생기기 할 수 있고, 인체내에서 각종 효소활동을 파괴시켜 생리기능의 이상을 유발할 수 있으며<sup>13)</sup>, rat와 토끼에서 장기 투여시 갑상선 암종을 일으킬 수 있다는 보고도 있다<sup>12)</sup>.

이에따라 국내에서는 보건복지부 고시 제 1996-10('96. 3. 4)호에 의거 국민보건상 문제시 될 수 있는 설파제 등 항생·항균물질에 대하여 축산물중의 유해잔류물질 허용기준을 고시하였고, 그 한계치는 미국의 FDA 규정에 따라 0.1 ppm 이하로 정하였다<sup>14,15)</sup>.

국내외에서 설파제 등 항생, 항균물질의 분석 방법, 잔류량 시험 등의 조사 연구가 많이 이루어져 왔지만 실험동물에 의한 설파제의 투여와 잔류량에 관한 조사는 흔하지 않다<sup>1~4,10,12)</sup>.

김 등<sup>16)</sup>은 동물의 근육조직중의 합성항균제 동시분석을 위한 연구에서 HPLC의 각 설파제별 적정파장을 연구한 결과 SMR 265nm, SMT 266nm, SMM 273nm, SDM 270nm 그리고 SQX 248nm 등이 적당한 설파제의 검출파장이라고 보고하였는 바, 본 연구결과의 SMR 265 nm, SMT 270nm, SMM 274nm, SDM 270nm 그리고 SQX 254nm와는 거의 일치하는 수준이었고, 이 두 결과를 놓고 볼 때 SMR, SMT, SMM, SDM 그리고 SQX의 동시분석을 위한 적정파장은 270nm의 자외선 파장이 적합할 것으로 판단된다.

Randecker 등<sup>17)</sup>은 돼지를 실험동물로 선정 sulfamethazine을 투여하고(110 $\mu$ g/ml), 투여 중지 후 근육, 간 그리고 신장 등의 조직에서 HPLC MSPD법으로 잔류량을 조사하였는데 투여중지 후 1일에 약 1ppm 수준이던 것이 투여중지 후 6일경부터는 검출되지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 다소의 차이가 인정되나 5종의 설파제에서 100 $\mu$ g/ml 농도의 설파제를 투여하고, 투여중지 후 1일에 1~1.5 ppm이던 것이 5일에 SMM, 6일에 SMR, SMT, 7일에 SDM, SQX가 검출되지 않아 이 두 결과를 놓고 볼 때 설파제에 대한 휴약기간은 약 7일 정도가 적당하리라 판단된다.

한편 HPLC를 이용한 설파제의 분석방법에는 liquid-liquid extraction 방법과 matrix solid phase dispersion(MSPD) 방법 등이 이용되고 있으나 현재 국내 공공검사기관인 가축위생시험소 등의 시험여건상으로는 상대적으로 많은 시간과 용매 등을 필요로 하는 liquid-liquid extraction법 보다는 적은 시간과 비용을 들이며 한 번에 다량의 시료를 분석할 수 있는 MSPD법이 더 효과적일 것으로 사료된다.

현재 우리나라에서는 HPLC를 이용한 설파제의 동시분석법이 공식방법으로 인정되고 있는 실정이므로 이에 대한 정확하고 신속한 분석 방법의 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 설파제의 체내 잔류를 막기 위해서는 농가에서는 휴약기간을 반드시 준수하여야 할 것이며, 사육농가에 대한 교육프로그램의 개발과 아울러 가축의 축종별, 약제별 잔류기간과 잔류량 등의 연구도 병행되어야 할 것이다.

## 결 론

5종 설파제(Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfamonomethoxine, Sulfadimethoxine, Sulfafloxaline)의 마우스 투여에 의한 체내(근육내) 잔류량 조사에서 설파제 동시분석을 위한 적정 검출파장과 잔류량, 잔류기간을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 5종 설파제의 동시분석을 위한 적정 검출파장은 270nm가 적당하였다.
2. 설파제 투여중지 후 1일에 체내잔류량이 1~1.5ppm이던 것이 점차 감소하여 대체로 7일 이후에는 검출되지 않았다.
3. 설파제의 휴약기간은 7일정도가 적당한 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

1. 박병옥, 백미순, 권기호 등. 1991. 원유중 잔류항생물질 및 설파제 조사. 한가위지 14(1) : 63~69.
2. 황래홍, 김영수, 윤은선 등. 1995. HPLC를 이용한 축산식품중 잔류 설폰아마이드제의 동시분석법 연구. 한가위지 19(1) : 13~28.
3. 박종명, 이광식, 조태행 등. 1991. 국내산 우유, 돈육 및 계육중의 항생물질 잔류조사. 농사시험연구논문집(가축위생편) 33(3) : 38142.
4. Lyse Larocque, Germain Cargnion and Stephen Sved. 1990. Sulfamethazine residues in Canadian consumer milk. *J. Ass. Off. Anal. Chem Vol. 73 No. 3*. p. 365~367.
5. 심영하, 이문한, 한수남 등. 1992. 우유중의 잔류 설파제 동시 다제분석법에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 16(1) : 61~71.
6. 수의내과학 교수협의회편. 1983. 수의내과학 I(대가측편) p. 141.
7. 이장락. 1988. 수의약리학 p. 363~370.
8. Rosenberg MC. 1985. Update on the sulfonamide residue problem. *JAVMA* 187 : 704~705.
9. 신광순. 1989. 축산물중의 항균성물질 잔류 문제에 대한 고찰(상). 대한수의사회지 25 : 161~167.
10. Michael D. Smedley and John D. Weber. 1990. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. *J. Ass. Off. Anal. Chem Vol. 73 No. 6*. p. 875~879.
11. USDA-FSIS. 1987. Swine urine screen sulfa-on site test kit, the scientific basis is on SOS. Environmental Diagnostics. Inc. 4.
12. 한국과학기술원 도핑컨트롤센터. 1991. 식육중 유해물질 검정교육과 분석방법 개발에 관한 연구. 401~410.
13. 식품공업협회. 1996. 식품공전(식육중 설파제 동시분석법) : 81~84.
14. Booth NH, McDonald LE. 1988. Drug and chemical residues in edible tissue of animals. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 6th ed. Iowa State Univ. Press. p.1149~1201.
15. 김종배, 최영, 조정옥 등. 1994. 액체크로마토그래피를 이용한 동물 근육조직중의 합성항균제 동시분석 연구. 대구보건환경연구원보 : 54~71.
16. Victor W. Randecker, James A. Reagan, Ronald E Engel et. al., 1987. Serum and urine as predictors of sulfamethazine levels in swine muscle, liver and kidney. *J of Food Protection Vol. 50(2)* : 115~122.