

SOS Test Kit 및 HPLC법에 의한 도축돈의 뇨, 신장 및 근육내 설파메타진 잔류량 조사

황인진 · 박병옥 · 김창수 · 우기방
경기도 가축위생시험소

Determination of Sulfamethazine Residues in Urine, Kidney and Muscle of Slaughtered Pigs by SOS(sulfa on site) Test Kit and High-Performans Liquid Chromatography

In-Jin Hwang, Byong-Ok Park, Chang-Soo Kim, Kee-Bang Woo
Gyeonggi Veterinary Service Laboratory

Abstract

This survey was carried out to determine sulfamethazine residues in urine, kidney and muscle of slaughtered pigs

For this investigation, 20 samples for export and 30 samples for domestic market were collected at slaughterplant in Anyang city from the early of November to the end of December and comparatively were analyzed by SOS test kit and HPLC the results obtained were summarized as follows:

1. Five of 50 samples of swine urine which were inspected by SOS test kit were appeared to sulfamethazine positive
2. The sulfamethazine residue in one of 50 samples of swine muscle was exceeded 0.1ppm
3. The positive samples by SOS test kit were agreed with the results of HPLC quantitative analysis

서론

설파메타진은 pyrimidine sulfonamide 제제로서 단일 또는 다른 항균제와 혼합하여 주로 돼지에서 대장균에 기인한 세균성 장염 및 폐렴을 예방, 치료키 위해 경구투여하거나 사료효율 증가와 위축성비염 발생을 감소키 위해 어린 돼지용 사료 첨가제로 사용된다.¹⁻⁵⁾

설파제는 가축에 경구투여시 흡수가 빠르나 돼지에서는 반추수 馬보다 배설되는 시간이 오래 걸리며²⁾ 주로 비뇨기 계통으로 체외로 배설되고 尿의 PH와 밀접한 관계가 있다.³⁾ 따라서 설파제를 과량장기투여시 食肉에 잔류될 가능성이 높을뿐 아니라 잔류된 설파제가 인체내에서는 내성균 유발, 발진, 정신장애, 신장장애, 심한피부반응 (Stevens-Johnson syndrome) 갑상선 기능부조

등의 부작용이 나타날 수 있다고 알려져 있다.⁵⁾ 이러한 견지에서 미국, 일본등 선진외국에서는 축산식품내 유해잔류물질에 대한 검사와 연구가 꾸준히 계속되어 왔으며 식용도축전 휴약기간 및 잔류물질 허용기준을 정하고 있고⁷⁾ 이를 근거로 축산물 수출입시 비관세 무역장벽으로 최대 활용하고 있다.

우리나라에서도 농약 및 동물약품사용 증가와 국민보건의식수준 향상으로 축산식품의 안전성 문제가 점차 고조되고 있으며 정부에서도 이러한 추세에 발맞추어 농림수산부 고시로 수육중 잔류물질 허용기준을 정한 바 있다.

현재 알려져 있는 축산식품 및 사료내 설파메타진 분석방법은 Bratton Marshal 비색법,¹⁰⁾ TLC,¹²⁾ ELIZA,¹³⁾ GC,¹⁴⁾ HPLC¹⁵⁾법 등이 있으나 국내에서는 진단키트를 이용, 尿 등에서 짧은 시간내

screen 검사를 할 수 있는 박층크로마토그래프법¹⁰⁾ (thin layer chromatography)과 전처리가 간단하고 회수율이 높은 고성능 액체크로마토그래프법 (high performance liquid chromatography)이 많이 이용되고 있다.

근래에 대일돈육 수출이 활발해지고 있으나 89.9월말 현재 수출돈육중 331M/T이 설파메타진 일본검사 기준치 0.05ppm을 초과하여 불합격 반송돼 잔류물질에 대한 문제가 제기되고 있는 바, 본 연구자 등은 관내 도축장에서 도축되는 돼지중 대일수출돈육에서만 실시하고 있는 설파메타진검사를 수출용과 국내시판용으로 구분하여 TLC법으로 豚尿中 설파메타진 양성비율을 조사하고 양성돈과 음성돈의 신장 및 근육내 잔류농도를 HPLC법으로 정량분석 검토하여 양축농가에게 유해잔류물질에 대한 계몽 및 교육자료로 활용코자 조사를 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본소관내 수출지정 도축장에서 89. 11~89. 12 사이에 도축한 돼지중에서 출하지역 수출 및 국내시판용으로 구분하여 경기지역 20두(수출용), 충남 14두 및 전북 16두(국내시판용)을 개체별로, 尿는 주사기로 10ml씩 그리고 신장은 한쪽 부위를 후지근육은 약 100g 정도를 각각 채취하였으며 尿시료는 현장실험실에서 SOS 진단키트¹⁰⁾로 바로 검사하였고 신장 및 근육은 실험실로 옮겨 -20℃ 이하에 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 시험방법

1) Thin layer chromatography(TLC법)

본 TLC법은 미농무성 산하 식품안전검사청(FSIS)에서 개발한 SOS(sulfa on site) test kit¹⁰⁾를 이용하였다.

가) 기구 및 시약

- A. Fluorescamine in acetone and spray pump
- B. Methanol and ethylacetate(특급)
- C. Thin layer chromatography(TLC) plates
- D. Sulfamethazine standards
- E. Labels for TLC plate
- F. Blow dryer

G. UV viewing light box and UV lamp

H. Chromatography tank-labelled methanol ethylacetate

나) 시험방법

시약 tank에 methanol과 ethylacetate를 각각 tank 바닥에서 1/4inch 높이로 붓는다. TLC plate 를 실험대 위에 놓고 label을 spotting area(두꺼운 부분) 반대편 끝에 붙이고 실험할 sample의 번호를 기입한다.

그리고 spotting area 상단 2cm 부위를 자로 재서 연필로 표시한다. 검사할 尿를 micropipette으로 20μl씩 채취하여 각 lane의 spotting area 중앙부위에 분주하고 중앙 2개 lane에 저농도 및 고농도 설파메타진 표준시액을 20μl씩 붓고 dryer로 분주부분을 2분동안 건조시킨 후 methanol tank에 침지하여 spotting area까지 methanol이 잠긴 즉시 꺼내 다시 dryer로 건조시킨다. 건조된 plate를 ethylacetate tank에 침지하여 spotting area 상단 2cm 부위까지 ethylacetate에 잠긴 후 꺼내 dryer로 다시 건조시킨다. 건조후 plate를 45°로 기울고 spray pump를 장착한 fluorescamine 시액을 4~6inch 떨어진 거리에서 TLC plate 全面을 고르게 3~4회 분무한다. 분무후 TLC plate를 UV viewing box속에 10~15분 정치후 UV lamp를 켜고 설파메타진 표준시액 lane의 형광색 band를 보고 sample 부분 lane을 비교하여 결과를 판정한다.

다) 결과판정

- A. LS 및 HS lane에 형광색 band가 있고 sample lane에 형광색 band가 없을 때 : 음성
- B. LS 및 HS lane에 형광색 band가 있고 sample lane에 standard band와 다른 높이에 형광색 band가 있을 때 : 음성
- C. LS 및 HS lane에 형광색 band가 있고 sample lane에 형광색 band가 있으나 LS band보다 밝고 HS band보다 덜 밝을 때 : 양성
- D. LS 및 HS lane에 형광색 band가 있고 sample lane의 형광색 band가 HS band보다 더 밝을 때 : 양성

2) High-performance liquid chromatography(HPLC법)

SOS 검사에서 양성으로 판정된 5두와 음성으로

관정된 45두중 10두를 선별해서 각 신장과 근육을 수육중 잔류물질검사에^{16, 17)} 준하여 HPLC로 설파메타진 잔류량을 측정했다.

가) 장 치

A. High-performance liquid chromatography (HPLC)

검출기 : Waters absorbance detector model 441

기록기 : Waters data module model 730

B. 초고속 균질기

C. 회전식 증발농축기

D. 원심분리기

E. 분리용 알루미늄칼람

나) 기 구

A. 원심관 50ml

B. 분액여두 100ml

C. 나스형 flask 100ml

D. 삼각 flask 100ml

E. Microsyringe

다) 시 약

A. Acetone, Acetonitril, Chloroform, N-propyl alcohol, Hexane, Sodium chloride, Acetic acid, Methanol, Sodium sulfate(특급)

B. Aluminum : Column chromatography용 염기활성도 I

C. 설파메타진 표준원액 : 설파메타진 10.0mg을 methanol에 용해하여 100ml로 한다(100 μ g/ml).

D. 설파메타진 표준용액 : 설파메타진 표준원액을 HPLC 이동상 용매를 사용하여 10배로 희석한다(10 μ g/ml).

E. 내부표준용액 : 설파메타진 10.0mg을 메타놀에 용해하여 100ml로 한다(100 μ g/ml). 이용액을 HPLC 이동상 용매를 사용하여 10배 희석한다(10 μ g/ml).

라) 검량선 작성

설파메타진 표준용액 10, 25, 50 및 100 μ l씩을 각각 10ml 시험관에 취하여 내부표준용액 200 μ l를 가하고 나서 회전식 증발농축기를 사용해서 40~45 $^{\circ}$ C 수조에서 감압하여 농축건조한다. 잔류물에 HPLC 이동상 용매 1ml를 가하여 용해한다. 용액 50 μ l씩을 HPLC에 주입하고 설파메타진 및 내부표준품의 peak 높이에 대한 비를 설파메타

진 주입량에 대해 plot하여 검량선을 작성한다.

마) 시료분석

시료(근육 및 신장) 5g을 취해 내부표준용액 0.2ml와 acetone 25ml을 가하여 균질기에서 균질화한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리한다. 상층액을 삼각후라스크에 담고 잔류물에 다시 acetone 25ml을 가하여 반복 조작한후 상층액을 합하여 n-propyl alcohol 5ml를 가한후 여과하여 나스형 후라스크에 취하여 회전식 증발농축기를 사용 40~45 $^{\circ}$ C 수조에서 2~3ml까지 감압농축한다. 농축액을 분액여두에 옮긴후 후라스크를 acetone 5ml씩으로 2회 씻어 세척액을 다시 분액여두에 넣고 3% NaCl 30ml와 핵산 15ml를 가한후 가볍에 진탕한다. hexane을 제거하고 다시 hexanl 15ml를 가하여 진탕한다. 하층을 새로운 분액여두에 옮겨 chloroform 12.5ml를 가하여 진탕한후 chloroform층을 삼각 후라스크에 취한후 이 조작을 다시 2회 반복하여 chloroform층을 합하여 적당량의 무수황산나트륨을 가하여 탈수시킨다. 액이 투명하게 되면 여과하여 나스형 후라스크에 취하여 회전식 증발농축기를 사용하여 40~45 $^{\circ}$ C 수조에서 약 1ml까지 감압농축한다. 농축액을 분리용 alumina column에 가하고 다시 후라스크를 chloroform 5ml씩 2회 세척하여 column에 옮기고 액을 유출시킨다. 유출후 95% acetonitril 20ml로 세척한후 85% acetonitril 30ml를 가하고 용출액을 나스형 후라스크에 받아 회전식 증발농축기를 사용하여 40~45 $^{\circ}$ C 수조에서 감압건조시킨다. 잔류물을 HPLC 이동상 용매 1ml를 가하여 용해하여 시험용액으로 사용한다. 시험용액 50 μ l를 HPLC로 측정한다.

바) HPLC 조건

A. Column : Radial park C₁₈(8mmid \times 10cm)

B. Mobile phase : Acetonitril; Acetic acid; Water(12 : 1 : 8)

C. 유속 : 2ml / 분

D. 측정과장 : 272nm

E. Chart speed : 0.25cm / 분

결과 및 고찰

돼지 50두분의 尿를 채취하여 SOS(sulfa on site) 진단키트로 설파메타진 잔류여부를 검사한 결과는 표 1과 같았다.

Table 1. Results of SOS test kit

The place of shipment	No. of samples	SOS test		Remarks
		Positive	Negative	
Gyeonggi	20	—	20	for export
Jeon buk	14	—	14	for domestic market
Cheung nam	16	4	12	for domestic market
Total	50	4	46	

표 1에서 검사한 50두중 국내시판용 돼지 30두에서 4두(8%)가 설파메타진 양성으로 판정되었고 수출용 돼지 20두에서는 전두수 음성으로 판정되었다. 또한 출하지역별로는 충남지역에서 출하한 돼지에서 설파메타진 양성으로 판정되었다.

양성뇨에 대한 설파메타진 잔류량을 설파메타진 표준시액 lane의 형광색 band의 밝기와 비교하여 간접적으로 측정 가능하며 양성으로 판정된 4두와 음성으로 판정된 46두중 10두를 선택하여 각 신장과 근육을 HPLC로 분석검토한 결과는 표 2와 같았다.

Table 2. Comparative analysis of sulfamethazine residues by SOS test kit and HPLC in individual urine, kidney and muscle of slaughtered pigs

Individual samples	(unit : ppm)		
	SOS test	HPLC	
	Urine	Kidney	Muscle
C- 1	0.4-1.3	0.043	ND*
C- 2	>1.3	0.383	0.081
C- 5	>1.3	0.194	0.200
C- 9	0.4-1.3	0.036	ND
G- 1	Negative	ND	ND
G- 5	"	"	"
G- 9	"	"	"
G-14	"	"	"
G-18	"	"	"
J- 5	"	"	"
J-10	"	"	"
J-14	"	"	"
C- 3	"	"	"
C- 8	"	"	"

* Not detectable

표 2에서 SOS 진단키트로 검사하여 음성으로 판정된 돼지의 각 신장 및 근육을 HPLC로 분석한 결과 설파메타진이 검출되지 않았으며 양성으로 판정된 돼지 4두중 2두에서는 신장에서만 그리고 나머지 2두에서는 신장 및 근육에서 설파메타진이 검출되었다. 따라서 SOS 진단키트와 HPLC로 설파메타진 잔류량을 검사한 결과를 비교해 볼 때 서로 일치하였다.

본 조사에서 설파메타진 양성으로 판정된 경우는 사료선택이 잘못되었거나 장염 및 위축성비염 등 질병예방을 위해 경구 또는 비강구투여 했을 경우^{1, 2, 3)} 또는 분변이나 尿를 통해 다시 체내에 유입되었으리라⁴⁾ 사료된다. 豚肉內 설파메타진 잔류를 방지하기 위해 미국에서는 도축전 최소한 15일정도 안전휴약기간을 정하고⁵⁾ 있으며 우리나라에서도 어린돼지용 사료(8주령이하)에서만 100ppm을 첨가할 수 있도록 定⁶⁾하고 있다.

미국의 경우 1976년부터 1979년까지 시판돈육중 약 10%가 미국잔류 허용기준인 0.1ppm을 초과하였고 80년초에는 4%로 감소하였다는 통계⁷⁾가 있으며 金²⁰⁾은 서울시내 정육점에서 시판중인 돈육을 검사한 결과 5%가 국내허용기준치 0.1ppm을 초과한 것으로 보고되어 있다.

本 調査에서는 50두의 도축돈을 SOS 진단키트로 검사한 결과 4두(8%)가 설파메타진 양성으로 판정되었고 HPLC법으로는 1두(2%)가 국내허용기준치 0.1ppm을 초과하였고 2두(14%)가 일본허용기준치 0.05ppm을 초과하였다.

일관적인 장기별 잔류농도는 뇨>혈청>간장>신장>근육 순이나 휴약기간이 길수록 신장과 근육이 다소 차이가 있다고 보고되어져 있으며^{2, 1, 23)} Bourne²²⁾ 등은 어린양에서 혈장이나 尿의 잔류량 측정으로 어느 한계 허용치까지는 조직내 오염도 검사를 대신할 수 있다고 보고했으며 Randecker²³⁾ 등은 혈청과 尿를 가지고 신장, 간

장, 근육등 조직내 잔류량을 예측할 수 있으며 돼지근육내 설파메타진 농도와 혈청 및 尿중의 농도비는 각각 0.24, 0.08인 것으로 보고하였다.

따라서 본 조사에서 SOS test kit에 의한 尿中 설파메타진 잔류량 검사는 豚肉내 잔류여부를 예측할 수 있으며 특히 1.3ppm 이상에서는 豚肉내 국내잔류허용치 0.1ppm을 초과할 수 있음을 알 수 있었다.

또한 SOS test kit와 HPLC法으로 본 조사성적을 비교해 볼때 서로 일치하였고 예비검사법인 SOS(sulfa on site) test kit는 짧은 시간내 豚肉에서 설파메타진 잔류여부를 손쉽게 확인할 수 있으므로 국내에서도 값싼 진단키트를 개발 도축업무를 담당하는 일선기관(시험소)에 공급하여 검사업무를 수행케 함으로서 양성돈을 출하한 양돈장에 대해 유해잔류물질에 대한 계몽과 교육을 실시하여 축산식품에 유해물질이 잔류되지 않도록 노력해야 할 것으로 사료된다.

결 론

수출지정 도축장에서 도축되는 돼지중에서 50두분의 尿 신장 근육을 채취하여 SOS test kit 및 HPLC법으로 설파메타진 잔류량을 검사 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 50두분의 尿를 SOS(sulfa on site) test kit로 검사한 결과 4두(8%)가 설파메타진 양성으로 판정되었다.

2. 양성 4두와 음성 10두분의 근육을 HPLC로 검사한 결과 1두(2%)에서 국내허용기준치인 0.1ppm을 초과된 것으로 나타났다.

3. SOS test kit에 의해 양성으로 판정된 시료에 대하여 HPLC법에 의한 정량분석 결과는 서로 잘 일치함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Booth, N.H. and L.E. McDonald, 1988 : Veterinary pharmacology and therapeutics, 6th ed., Iowa state. 785-795.
2. Blood, D.C., J.A. Henderson and O.M. Radostitis, 1979 : Veterinary Medicine. 5th ed., Cassel Ltd., London, 87-90.

3. 이장락, 1972 : 설파아미드제와 抗生物質. 3판, 민중서관. 3-34.
4. 이방환 외, 1979 : 최신 가축임상진료학. 가림출판사. 439-446, 454-464.
5. 한국동물약품협회, 1984 : 동물약품편람. 삼광문화사. 179-184.
6. M. Grayson, 1982 : Antibiotics, chemotherapeutics and antibacterial agents for disease control. John Wiley & Sons Inc., USA. 14-26.
7. Booth, N.H. and L.E. McDonald, 1980 : Veterinary pharmacology and therapeutics, 6th ed., Iowa State. 1159-1168.
8. Goodman, L.S. and A. Gilman, 1980 : The pharmacological basis of therapeutics. 16th ed., MacMillan Pub., N.Y. 1113.
9. 농림수산부, 1989 : 수육중 잔류물질 시험방법 및 허용기준. 농림수산부 고시제39-33호. 137-138.
10. U.S.D.A. : Performing the sulfa on site test (SOS), Environmental diagnostics, Inc.
11. Bratton, A.C., E.K. Marshall, et al., 1939 : J. Biol. Chem. 128 : 537-550.
12. Sigel, C.W., J.L. Woolley and C.A. Nichol, 1975 : J. Pharm. Sci. 64 : 973-976.
13. Dixon-Holland, D.E. and S.E. Katz, 1988 : J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71(6) : 1137-1140.
14. Munns, R.K. and J.E. Roybal, 1982 : J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65 : 1048-1053.
15. Johnson, K.L., D.T. Jeter and R.C. Claiborne, 1975 : J. Pharm. Sci. 64 : 1657-1660.
16. 농림수산부, 1989 : 수육중 잔류물질 시험방법 및 허용기준. 농림수산부 고시제39-33호. 60-64.
17. 박종명, 1988 : 축산식품중의 잔류물질검사법. 현대출판사. 77-82.
18. Whipple, D.M. G. Samuelson, et al., 1980 : Tissue residue depletion and recycling of sulfamethazine in swine. JAVMA. 176(2) : 1348-1352.
19. 농림수산부, 1986 : 배합사료제조용 동물약품 첨가 사용기준. 농림수산부 고시제87-1호. 241.
20. 김영철, 1989 : 일부지역 돼지장기 및 근육내 잔류 설파메타진에 대한 조사연구. 서울대 보건대학원.
21. Biehl, L.G., R.F. Bevil, et al., 1989 : Sulfamethazine residues in swine. J. Vet. Pharm. Therap. 4 : 285-290.

22. Bourne, D.W.A., R.F. Bevill, et al., 1977 : Disposition of sulfonamides in food-producing animals : pharmacokinetics of sulfamethazine in lambs. *Am. J. Vet. Res.* 38 : 967-972.

23. V.W. Randecker, et al., 1987 : Serum and Urine as predictors of sulfamethazine levels in swine muscle, Liver and Kidney. *T. Foodprotection.* 50(2) : 115-122.