

시료고체상분산처리와 액체크로마토그래피를 이용한 소의 근육, 간 및 천엽에서의 벤지미다졸계 구충제 잔류분석

김충희, 김곤섭, 박정희, 하대식¹, 류재두², 손성기³, 허정호⁴, 정명호⁴, 김종수^{*}
경상대학교 수의과대학(동물의학연구소), ¹경상남도 보건 환경 연구원, ²국립수의과학 검역원 부산지원,
³경상남도축산진흥연구소, ⁴경상남도 축산진흥연구소 남부지소
(게재승인 : 2002년 4월 19일)

Matrix solid phase dispersion isolation and high performance liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in bovine muscle, liver and omasum

Chung-Hui Kim, Gon-Sup Kim, Jung-Hee Park, Dae-Sik Hah¹, Jae-Doo Ryu², Sung-Gi Son³, Jung-Ho Heo⁴,
Myung-Ho Jung⁴, and Jong-Shu Kim

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University(Institute of Animal Medicine)

Gyeongnam Provincial Government Institute of Health and Environment¹

National Veterinary Research and Quarantine Service Pusan Regional Office²

Gyeongnam Livestock Promotion Institute³, Gyeongnam Livestock Promotion Institute South-branch⁴

(Accepted : April 19, 2002)

Abstracts : Simultaneous multiresidue analysis using liquid chromatography determination for five benzimidazole anthelmintics(thiabendazole, oxbendazole, albendazole, mebendazole and fenbendazole) in bovine muscle, liver and omasum has been described. Blank or benzimidazole-fortified samples(0.5g) were blended with bulk C₁₈(40 μ m, 18% load, endcapped, 2g). A column made from the resultant C₁₈/animal tissue matrix was first washed with hexane(8ml), following which the benzimidazoles were eluted with acetonitrile(8ml). Analytes of extracted sample were determined by liquid chromatography with UV detector at 290nm. Correlation coefficients of standard curves for individual benzimidazole isolated from fortified samples, using internal standardization, were linear(0.991 \pm 0.007 to 0.996 \pm 0.005) with average relative percentage recoveries from 62.1 \pm 3.8(%) to 92.3 \pm 7.5(%) for the concentration range(0.2~6.4 μ g/g), respectively. Recoveries rates of TBZ, MBZ in liver, OBZ, MBZ in muscle and TBZ, MBZ in omasium from fortified benzimidazole were 92.%, 87.3%, 74.5%, 82.7%, 75.2% and 83.5% at condition II, respectively. Condition II showed higher recoveries rates than condition I. These results indicated that the matrix solid phase dispersion(MSPD) methodology is acceptable for the determination of 5 benzimidazole anthelmintics and may also suitable for other matrixes of food animal origin.

Key words : benzimidazoles, MSPD, liquid chromatography, bovine muscle, liver, omasum

서 론

산업동물의 생산성 향상과 동물의 질병치료와 예방을

목적으로 다양한 종류의 항균성물질(항생물질 및 합성 항균제)과 사료첨가제가 개발되어 많은 농가에서 사용되고 있다. 이러한 항균성물질과 사료첨가제는 사용이

* Corresponding author : Dr. Jong-shu Kim, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Gyeongnam, Republic of Korea.

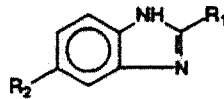
엄격히 규제되고 있지만 양축 농가에서의 안전휴약기간과 잔류허용기준에 대한 인식 부족으로 유해성 잔류물질이 축산물에 잔류될 가능성이 높다¹⁴.

Benzimidazole은 소 돼지 등에 기생하는 회충, 촌충, 간질충, 및 폐충등을 구제하는데 널리 사용되는 구충제로서 본 실험에 사용될 benzimidazole 계의 화학적 구조는 text-fig. 1과 같다⁵.

동물에 회충, 촌충, 간질충, 및 폐충 등을 구제할 목적으로 benzimidazole 계 구충제를 투여한후 안전 휴약기간을 지키지 않으면 이 구충제는 동물의 체내에 잔류하게 된다고 한다⁶.

Benzimidazole이 구충효과를 나타내는 기전에 관하여

Leen⁷, Carles et al⁸은 충체에 흡수된 benzimidazole이 protein tubulin에 결합하여 microtubule을 파괴하고 기생충의 혐기성 에너지 생산 기구로부터 fumaric acid 환원효소를 저해하여 에너지 공급을 차단함으로써 충체를 사멸시킨다고 보고하였으며, 또한 glycogen uptake를 억제하고 oxidative phosphorylation의 coupling을 방해하여 구충제로 이용된다고 한다. Benzimidazole계 구충제는 동물에서 회충, 촌충, 간질충, 및 폐충 등에 광범위 구충제로 사용되어질 뿐만 아니라⁹ 각종 과일과 채소의 항공팡이 제제로서 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 널리 사용되고 있다.^{9,10} Susan et al¹¹은 소에서, Yess et al¹²은 사람에서, Delatour et al¹³은 임신 7-10일경에 경구로



Compound	R ₁ =	R ₂ =
albendazole	-NHCOOCH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ S-
fenbendazole	-NHCOOCH ₃	
oxfendazole	-NHCOOCH ₃	
mebendazole	-NHCOOCH ₃	
thiabendazole		H-

Text-fig 1. Principal benzimidazole anthelmintics and related compounds, including haptent(I)

투여된 benzimidazole이 발육중인 양의 태아에서 근골격 이형성을 일으키고 수태율을 저하시키며 면역체계를 억제하여 제2차 감염에 쉽게 노출하게 된다고 보고하였으며 치료나 예방을 위하여 사용된 가축에서 약물내성을 일으킬 뿐만 아니라 사람에게 이행되어 축적되면 기형을 유발하고 면역체계를 억제하여 병원 미생물에 의한 2차 감염을 받기 쉽다고 한다.

Yess¹²는 미국의 2세 이상의 어린이들이 benzimidazole을 하루에 체중당 0.7 μg을 식욕을 통해서 섭취하고 있다고 하였고, 이 용량은 WHO¹⁴의 하루기준치인 100 μg/Kg의 0.7% 수준으로서 점차 식욕이외도 다른 식품을 통해서 섭취율이 증가하고 있어 이에 대한 위험성을 경고 하였다.

이러한 위험성 때문에 1991년부터 미국 USDA Food Safety and Inspection Service(FSIS)와 Environmental Protection Agency(EPA)에서 이 benzimidazole계 제제들을 식품안전성검사 대상항목으로 지정하여 검사하고 있다.^{15,17} 우리나라에서도 1994년부터 식육내 잔류물질허용기준을 정하여 검사하고 있으나¹⁸ 검출 방법이 복잡하며 효율적인 검사는 이루어지지 않고 있는 실정이다. Benzimidazole계 분석은 Long¹⁹, 및 Marti²⁰ 이 돼지 식육에서 HPLC법으로 분석을 시도하였고, Long et al⁶ 이 소의 간장에서 benzimidazole을 MSPD와 LC를 이용하여 분석보고하였고, Barker et al^{21,22}도 소의 간장에서 benzimidazole을 분석 보고하였다.

그러나 우리나라에서는 아직 benzimidazole 구충제에 대한 분석 보고도 드물며, 또한 외국에서의 보고는 주로 간장에서 분석 보고하였으며, 근육이나 천엽에서의 분석 보고는 찾아보기 힘들고, 기존의 HPLC를 이용한 분석도 역시 복잡한 전처리 과정, 많은 경비와 시간적 소모, 대량의 유기용매사용 및 대량의 시료 사용등과 같은 비효율적인 조건을 내포하고 있다. 따라서 복합 잔류 물질 분석을 위한 검출율과 회수율이 보다 높고 신속하고 정확한 분석법의 확립이 절실히 요구되어지고 있다. 따라서 본 연구는 식육중의 유해잔류 물질을 monitoring 하는 방법으로 기존의 MSPD와 HPLC 방법을 약간 변경하여 간단하고 신속하며 유기 용매 사용을 최소화 할 수 있는 효율적인 방법을 확립하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

공시재료

창원, 마산, 진주 지역 시장에서 유통되고 있는 소의 근육, 간 및 천엽(각각 108예)을 2000년 9월부터 11월 3개월 동안 구입하여 -20℃ 상태로 보관하면서 2주일 이

내에 실험에 이용하였다.

용매 및 시약

Benzimidazole의 추출과 HPLC분석에 사용된 hexane, methylene chloride(DCM), methanol, dimethyl formamide (DMF), acetonitrile, phosphoric acid와 같은 용매는 추가적 정제과정이 필요없는 특급 HPLC용을 사용하였고, 증류수는 18.3 Ω(Milli-Q-System) 이상의 3차 증류수를 사용하였다. 그리고 albendazole(ABZ), fenbendazole(FBZ), oxibendazole(OBZ), mebendazole(MEZ) 및 thiabendazole(TBZ)은 Sigma사(St. Louise, MO, U.S.A.)제품을 사용하였다.

표준 benzimidazole 혼합용액 제조

본 실험에 사용된 albendazole, fenbendazole, oxibendazole, mebendazole, thiabendazole은 LC급 dimethyl formamide로 8 μg/g의 농도로 용해하여 혼합용액을 만들고, 냉장 보관 하면서 필요로 하는 농도로 희석하여 사용하였다.

칼럼충진제와 정제용칼럼 제조

MSPD법에 의한 전처리를 위하여 칼럼물질로 BulkC₁₈(40 μm, 18% load, endcapped, J.T. Baker, USA)을 사용하였고, C₁₈ material 22g을 50ml syringe barrel에 취하고 그 두배량의 hexane, methylene chloride(DCM), methanol로 순차적으로 세척하였다. 세척된 C₁₈ material은 vacuum aspirated하여 건조시켰다. 추출을 위한 10ml 주사기는 뜨거운 비눗물로 세척하고 증류수로 행군다음 건조시켜 준비하였다. 추출능을 비교하기 위하여 activated alumina column과 florisil column 2가지 column을 사용하였고, filter paper(Whatman No.1)로 10ml 주사기의 밑바닥을 막고 활성 알루미늄과 florisil을 각각 0.5 g씩 넣은 뒤 다시 filter paper로 막은 다음 acetonitrile 4ml로 세척하여 사용하였다.

시료 추출방법

소의 근육, 간, 천엽의 시료 여러 부위에서 샘플을 5~25g 씩 채취하여 균질한 다음, 각각 0.5 g 씩 채취하여 시료로 사용하였고, 일부분의 시료 0.5g은 회수를 검사에 이용하였다.

C₁₈ 2g과 시료 0.5g을 유발에 취하고 10, 20, 40, 80, 160, 320 μg/ml 농도로 희석한 benzimidazole 표준혼합용액과 40 μg/ml 로 희석한 내부표준물질(MBZ)을 각각 10 μl 씩 첨가하여 2분간 방치한후 부드럽게 균질화 시켰다. Blank 시료는 benzimidazole이 없는 DMF를 20 μl 씩 취하여 위와 같은 방법으로 준비하였다.

시료 추출과 HPLC분석은 다음 두 가지 방법으로 실험하였다.

(1) 추출조건 I

C₁₈/Matrix 혼합물을 10ml 주사기에 넣고 filter paper로 막은 뒤 final volume이 4.5ml이 되게 한 다음 칼럼 끝에 100 μ l 피펫팁을 장착하여 용매 추출 잔류시간을 증가시켜 주었다. 먼저 10ml 주사기에 LC급 hexane 8ml을 vacuum filter(ALLTECH St.)를 이용하여 흘려주었다. 이때 유출되어 나온 hexane은 버리고 같은 방법으로 acetonitrile 8ml을 흘려준후 benzimidazole을 함유하는 acetonitrile 추출물을 10ml cornical glass test tube에 수집하였다. Acetonitrile 추출물은 activated alumina column과 florisil column에 통과시킨 후 10ml를 cornical glass test tube에 수집하고 질소가스를 일정하게 흘려주어 acetonitrile을 제거하였다.

Acetonitrile이 제거된 건조물에 0.1ml methanol과 0.017M H₃PO₄ 0.4ml을 투여한후 5-10분간 초음파처리 하여 용해시켰다. 이 용액을 microcentrifuge tube에 옮겨 17,000 \times g에서 5분 동안 원심분리하고, 맑은 상층액을 0.45 μ m filter에 여과한후 액의 20 μ l를 HPLC에 주입하여 분석하였다.

(2) 추출조건 II

C₁₈/Matrix 혼합물을 8ml hexane으로 세척하는 과정까지는 조건 I 과 같지만, 조건 I 에서와 달리 benzimidazole을 용출시키기 위하여 두 가지 용매를 사용하였다. F1은 8ml methylene chloride로, F2는 8ml ethyl acetate로 추출한 후 각각의 추출물을 수집하여 40 $^{\circ}$ C에서 회전 농축기를 이용하여 농축시키고 이 건조물에 이동상 용매 250 μ l를 넣어 용해시켰다.

이동상 용매는 ammonium acetate buffer(0.1M, pH5.2) : acetonitrile : methanol을 F1은 86:10:4(v/v/v), F2는 56:31:13(v/v/v)의 구성으로 사용하였다.

HPLC 분석

HPLC장치는 photodiode array detector가 장착된 Hewlett Packard사의 제품으로 분석파장은 290nm로 설정하고, 역상 octadecylsilyl(ODS) 유도 silica 칼럼(10 μ m, 250mm \times 4.6mm i.d. μ Bondapak St.)을 사용하였으며 분석하는 동안 칼럼의 온도는 45 $^{\circ}$ C로 일정하게 유지하였다.

(1) 분석조건 I

이동상 용매로 0.017M H₃PO₄-acetonitrile(60+40, v/v)을 1ml/min으로 일정하게 흘려주고 UV 290nm에서 분석하였다.

(2) 분석조건 II

시료추출 방법은 조건 I 과 같이 하되, 추출물 F1은 methylene chloride로 추출하였고, 추출물 F2는 ethyl acetate 8 mL로 추출하였다. 둘다 40 $^{\circ}$ C에서 회전농축기로 농축시키고 건조물은 이동상 용매 500 μ l로 용해하였다. 이동상 용매는 ammonium acetate buffer(0.01 M, pH 5.2) : acetonitrile : methanol으로 F1은 86:10:4(v/v/v), F2는 56:31:13(v/v/v)의 구성으로 용해 하였다.

분석은 A상이 ammonium acetate buffer 0.01 M, pH 5.2를 감압하에서 0.45 μ m pore size 여과지에 여과한 것과 B상이 acetonitrile : methanol(70/30 ; v/v) 혼합물을 위와 같이 여과한 후 35 $^{\circ}$ C 이하에서 분석하되 F1은 A에서 B로 14%로 5분간 유지한 다음 A에서 B로 5분에서 22분 동안 20%로 증가시켰다. 다음 A에서 B로 22분에서 30분 동안 54%로 증가시키고 다음 샘플 주입전까지 A에서 B로 14%로 재평형시켰다. 이때 유속은 1 mL/min으로 고정하였다. F2는 A에서 B로 44%로 5분간 유지하고, A에서 B로 5분에서 15분간 64%로 증가시킨 다음 A에서 B로 15분에서 25분간 64%로 유지하고 마지막으로 앞에서와 같이 재 평형 시키기 위하여 A에서 B로 44%로 5분간 유지하였다. 유속은 0.5 mL/min으로 고정하였고,

Table 1. Analysis for liquid chromatography conditions in condition II

F1 ^a		F2 ^b	
Time(min)	% of B in A	Time(min)	% of B in A
0~5	14	0~5	44
5~22	14 to 22	5~15	44 to 64
22~30	22 to 54	15~25	64
30~35	14	25~30	44

a : Flow rate 1ml/min, b : Flow rate 0.5ml/min.

시료량은 20 μ l을 주입하여 분석하였다.

검량선 작성

표준용액을 각각 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 μ g/g의 농도로 희석한 후 내부표준용액을 첨가하고 이동상 용매로 다시 10배 희석하고 20 μ l 씩 HPLC에 주입하여 얻은 표준용액과 내부표준 용액의 peak area 값의 비를 plotting 하여 작성하였다.

회수율 시험

위의 방법을 이용한 예비실험을 실시하여 benzimidazole이 잔류하지 않은 것으로 확인된 소의근육, 간 및 천엽에 benzimidazoles 표준용액을 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 μ g/g 농도로 10 μ l 씩 투여하고 2분간 방치한 후 위와 같은 추출방법으로 시료를 처리하여 HPLC에 20 μ l 씩 주입하여 분석하였다. 또 benzimidazoles이 들어있지 않는 DMF를 20 μ l 씩 넣은 blank 시료도 동일한 방법으로 분석하였다.

결 과

HPLC 분석을 위한 standard benzimidazole의 표준곡선 작성과 chromatogram

Standard benzimidazole의 혼합표준용액을 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 μ g/g의 농도로 희석하고 다시 이동상 용매로 10배 희석하여 각 농도별로 20 μ l 씩 주입하였다. HPLC 분석으로 얻어진 피크면적을 Y축으로, 표준용액의 농도를 X축으로 하여 산정한 회귀방정식에서 standard benzimidazole 각각의 상관계수 r값은 TBZ는 r=0.996, OBZ는 r=0.996, ABZ는 r=0.994, MBZ는 r=0.995, FBZ는 r=0.991로서 유의상관을 보이는 직선을 나타내어 식육에 잔류하는 benzimidazole의 양 및 회수율 산정에 이용하였다.

Fig.1-A는 표준 benzimidazole의 연속적인 크로마토그램이고, Fig.1-B는 benzimidazole이 fortified되지 않은 blank control의 크로마토그램이며, Fig.1-C는 8 μ g/g의 농도로 fortified한 시료에서 검출한 benzimidazole의 연속적인 크로마토그램이다. Fig.1-C에서 5종류의 benzimidazole의 peak가 모두 양호하게 나타났으며 10분 이내에 분석할 수 있었다.

추출칼럼간의 유출능 비교

활성알루미나 칼럼과 florisil 칼럼의 추출정도의 차이성을 검토한 결과는 Fig 2와 같다. 두 칼럼 모두 양호한

유출능을 보였으나 활성알루미나 칼럼의 용출율이 91.62%로 florisil 칼럼보다 우수한 회수율을 나타내었다. Fig2의 결과를 바탕으로 본 연구에서 활성알루미나 칼럼을 이용한 추출방법으로 회수율을 측정하였다.

Benzimidazoles의 회수율

(1) 조건 I

조건 I 을 이용한 소의근육, 간, 천엽에서의 농도별 회수율은 Table3-5와 같다. 평균회수율은 mebendazole이 6.4 μ g/g의 농도에서 간에서 84.6%, 근육에서 79.6%, 천엽에서 78.6%로 가장 높았으며, 투여된 benzimidazole의 농도가 증가할수록 높은 회수율을 나타내었다. 전체적인 회수율은 양호하였으며 간과 근육에서의 회수율이 비교적 높았다.

(2) 조건 II

조건 II 를 이용한 소의근육, 간, 천엽에서의 농도별 회수율은 Table 6-8과 같다. 조건 I 에서와 달리 간에서의 평균회수율은 6.4 μ g/g 농도에서 thiabendazole이 92.3%로 가장 높게 나타났으며, 소의 근육과 천엽에서는 mebendazole이 각각 82.7%, 83.5%로 가장 높았고, 간, 근육, 천엽에서 fenbendazole의 회수율이 가장 낮았다.

잔류조사

경남 창원, 마산 및 진주 지역에서 유통되고 있는 소의근육, 간 및 천엽 108예에 대하여 활성 알루미나 칼럼을 이용하여 조건 I, II의 방법으로 HPLC 분석을 수행한 결과는 Table 9와 같다. 시료중의 benzimidazole 검출빈도는 조건 I 에서 비교적 높게 나타났으며 간과 천엽에서 높은 농도로 검출되었다. 검출량은 기준치인 0.1 μ g/g 이하로 낮은 수준이었다.

고 찰

여러 가지 혼합물질로부터 특정한 유해잔류물질인 benzimidazoles을 보다 효율적이며 간편하게 분리 정량하는 기술적 방법들이 최근에 많이 개발되고 있다. 그러나 이러한 방법들은 유기용매의 소모가 많으며 번거롭고 시료 전처리 시간이 많이 소요되기 때문에 다량의 시료를 동시에 분석하는데는 적합하지 않다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 최근에 시료와 고정상을 직접 갈아 유리주사기에 packing하고 지방을 제거한 후 용출 용매로 추출하는 MSPD 방법이 보고되었다^{16,19,22,24}. 이러한 방법은 0.5g의 시료와 2.0g의 C₁₈을 혼합하여 유발에서 균질화시키는데 이때 시료와 C₁₈ 사이의 반응면적은 약

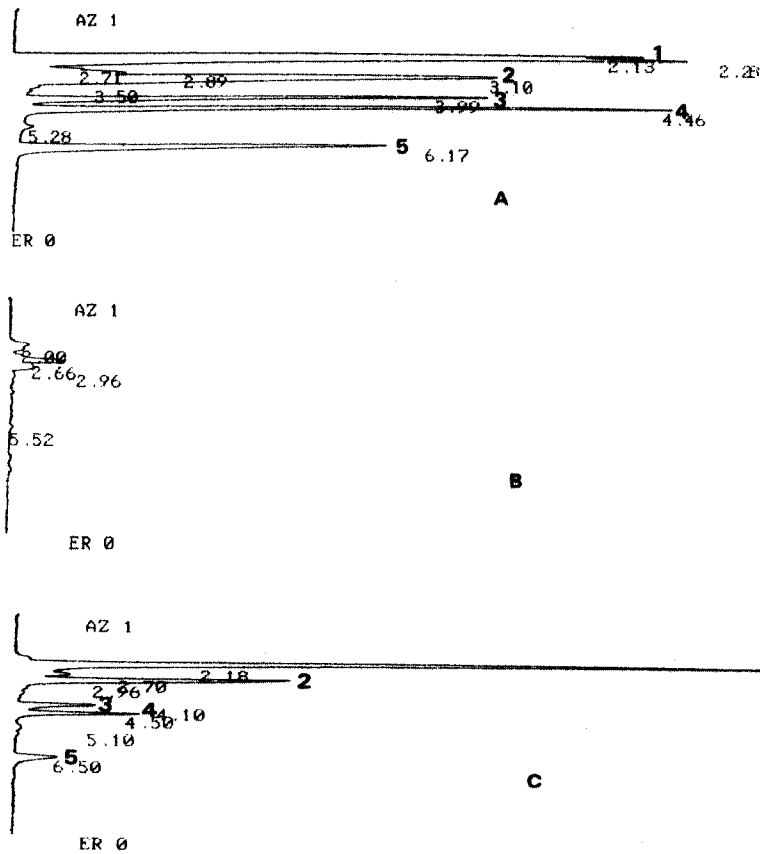


Fig 1. Representative chromatograms of acetonitrile extract of (A) standard benzimidazole, (B) blank control, (C) benzimidazole fortified samples(8 $\mu\text{g/g}$ tissue). Orders of elution are thiabendazole(1), oxibendazole(2), albendazole(3), mebendazole(4) and fenbendazole(5).

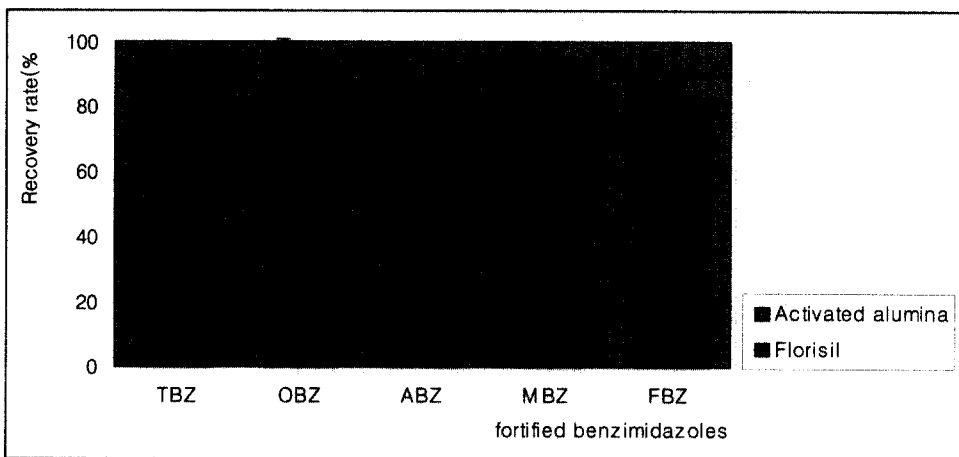


Fig 2. Comparison of extractive activity of benzimidazoles at 8 $\mu\text{g/g}$ in liver between activated alumina and florisil column.

Table 3. Recoveries of oxibendazole, fenbendazole, mebendazole, albendazole, and thiabendazole at concentrations of 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g/g}$ in liver; at condition I

Fortified level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery(%)				
	TBZ (mean \pm S.D)	OBZ (mean \pm S.D)	ABZ (mean \pm S.D)	MBZ (mean \pm S.D)	FBZ (mean \pm S.D)
0.2	73.4 \pm 7.2	72.6 \pm 6.2	68.4 \pm 4.8	69.7 \pm 9.2	53.7 \pm 5.5
0.4	72.6 \pm 7.4	73.2 \pm 5.1	69.2 \pm 6.2	74.3 \pm 4.6	54.6 \pm 4.3
0.8	74.2 \pm 6.8	73.7 \pm 4.3	70.1 \pm 1.3	76.7 \pm 3.7	63.5 \pm 3.8
1.6	76.3 \pm 6.1	74.6 \pm 3.1	70.6 \pm 3.2	80.6 \pm 3.1	67.4 \pm 3.1
3.2	75.2 \pm 5.4	77.5 \pm 2.5	72.3 \pm 3.8	82.2 \pm 2.8	69.5 \pm 4.1
6.4	82.4 \pm 3.2	82.3 \pm 2.8	74.6 \pm 2.3	84.6 \pm 2.6	72.1 \pm 3.5

Number of sample : n=3.

TBZ : thiabendazole, OBZ : oxibendazole, ABZ : albendazole, MBZ : mebendazole, FBZ : fenbendazole

Table 4. Recoveries of oxibendazole, fenbendazole, mebendazole, albendazole, and thiabendazole at concentration of 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g/g}$ in muscle; at condition I

Fortified level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery(%)				
	TBZ (mean \pm S.D)	OBZ (mean \pm S.D)	ABZ (mean \pm S.D)	MBZ (mean \pm S.D)	FBZ (mean \pm S.D)
0.2	67.4 \pm 4.6	70.3 \pm 6.4	65.7 \pm 3.6	67.5 \pm 3.6	52.8 \pm 9.2
0.4	69.6 \pm 4.4	70.7 \pm 6.2	67.7 \pm 6.1	69.7 \pm 3.8	53.6 \pm 7.6
0.8	70.2 \pm 3.5	71.5 \pm 5.8	68.1 \pm 5.3	73.3 \pm 2.6	54.5 \pm 7.2
1.6	70.6 \pm 3.4	72.4 \pm 6.2	69.2 \pm 1.6	75.6 \pm 2.1	58.3 \pm 5.8
3.2	73.7 \pm 4.2	73.6 \pm 4.6	70.5 \pm 2.5	78.2 \pm 3.1	61.2 \pm 6.1
6.4	75.2 \pm 3.8	74.2 \pm 3.8	76.2 \pm 5.7	79.6 \pm 3.2	61.2 \pm 3.9

Number of sample : n=3

Table 5. Recoveries of oxibendazole, fenbendazole, mebendazole, albendazole, and thiabendazole at concentration of 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g/g}$ in omasum; at condition I

Fortified level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery(%)				
	TBZ (mean \pm S.D)	OBZ (mean \pm S.D)	ABZ (mean \pm S.D)	MBZ (mean \pm S.D)	FBZ (mean \pm S.D)
0.2	62.1 \pm 3.8	67.5 \pm 6.3	63.6 \pm 5.7	67.5 \pm 6.4	52.1 \pm 8.3
0.4	63.4 \pm 4.2	65.6 \pm 3.5	64.2 \pm 5.8	68.7 \pm 6.5	52.6 \pm 7.2
0.8	65.7 \pm 3.5	69.2 \pm 3.6	67.3 \pm 6.1	70.2 \pm 8.2	54.7 \pm 6.8
1.6	67.2 \pm 3.3	70.6 \pm 4.2	69.5 \pm 4.9	73.3 \pm 6.5	56.9 \pm 5.9
3.2	70.3 \pm 2.2	70.9 \pm 4.8	70.3 \pm 4.2	74.2 \pm 4.3	62.5 \pm 4.3
6.4	73.2 \pm 2.8	73.9 \pm 6.1	74.6 \pm 3.1	78.6 \pm 3.8	64.7 \pm 3.8

Number of sample : n=3.

Table 6. Recoveries of oxibendazole, fenbendazole, mebendazole, albendazole, and thiabendazole at concentration of 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g/g}$ in liver; at condition II

Fortified level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery(%)				
	TBZ (mean \pm S.D)	OBZ (mean \pm S.D)	ABZ (mean \pm S.D)	MBZ (mean \pm S.D)	FBZ (mean \pm S.D)
0.2	80.5 \pm 4.6	71.7 \pm 3.2	69.4 \pm 2.2	72.4 \pm 4.1	53.4 \pm 4.6
0.4	83.2 \pm 3.9	70.6 \pm 2.5	68.7 \pm 7.3	72.7 \pm 4.6	54.2 \pm 5.5
0.8	85.7 \pm 2.9	74.2 \pm 6.4	70.3 \pm 4.6	76.8 \pm 4.3	57.2 \pm 5.2
1.6	87.6 \pm 2.8	74.7 \pm 6.6	72.2 \pm 3.7	83.4 \pm 5.8	59.6 \pm 6.3
3.2	89.4 \pm 6.8	77.2 \pm 4.3	72.7 \pm 2.4	85.6 \pm 2.8	64.5 \pm 4.3
6.4	92.3 \pm 7.5	79.6 \pm 2.8	74.6 \pm 1.6	87.3 \pm 2.3	67.7 \pm 2.9

Number of sample : n=3.

Table 7. Recoveries of oxibendazole, fenbendazole, mebendazole, albendazole, and thiabendazole at concentration of 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g/g}$ in muscle; at condition II

Fortified level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery(%)				
	TBZ (mean \pm S.D)	OBZ (mean \pm S.D)	ABZ (mean \pm S.D)	MBZ (mean \pm S.D)	FBZ (mean \pm S.D)
0.2	68.5 \pm 3.1	69.2 \pm 7.8	65.7 \pm 2.7	69.6 \pm 2.8	52.4 \pm 6.4
0.4	70.1 \pm 3.2	69.6 \pm 7.5	62.4 \pm 2.6	72.3 \pm 2.1	52.6 \pm 6.3
0.8	71.3 \pm 4.3	70.3 \pm 6.8	66.8 \pm 2.5	76.7 \pm 7.1	53.9 \pm 2.8
1.6	72.6 \pm 4.2	73.2 \pm 6.1	69.2 \pm 1.3	79.4 \pm 4.6	56.7 \pm 2.6
3.2	73.2 \pm 2.3	73.6 \pm 5.2	70.4 \pm 3.7	81.6 \pm 5.3	59.4 \pm 3.3
6.4	74.4 \pm 2.7	74.5 \pm 2.8	73.6 \pm 2.1	82.7 \pm 2.2	63.7 \pm 3.1

Number of sample : n=3.

Table 8. Recoveries of oxibendazole, fenbendazole, mebendazole, albendazole, and thiabendazole at concentration of 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g/g}$ in omasum; at condition II

Fortified level ($\mu\text{g/g}$)	Recovery(%)				
	TBZ (mean \pm S.D)	OBZ (mean \pm S.D)	ABZ (mean \pm S.D)	MBZ (mean \pm S.D)	FBZ (mean \pm S.D)
0.2	63.2 \pm 3.8	66.5 \pm 4.9	64.1 \pm 4.2	69.7 \pm 5.2	51.8 \pm 8.9
0.4	65.5 \pm 5.2	64.8 \pm 5.6	63.2 \pm 6.3	70.3 \pm 2.4	52.1 \pm 4.6
0.8	66.3 \pm 3.8	68.7 \pm 5.4	65.7 \pm 7.2	74.4 \pm 2.1	53.6 \pm 4.4
1.6	68.4 \pm 6.1	70.3 \pm 4.1	67.2 \pm 5.6	76.7 \pm 1.3	55.4 \pm 5.2
3.2	71.6 \pm 2.8	70.1 \pm 4.2	67.7 \pm 4.7	80.2 \pm 1.2	58.4 \pm 5.5
6.4	75.2 \pm 2.7	72.9 \pm 3.2	71.6 \pm 2.9	83.5 \pm 1.1	62.6 \pm 3.7

Number of sample : n=3.

Table 9. Detection of benzimidazoles residues in specimens by analysis condition I and II

	Detection range($\mu\text{g/g}$)					
	Condition I			Condition II		
	Liver	Muscle	Omasum	Liver	Muscle	Omasum
TBZ	0.011	ND	0.042	0.013-0.026	0.076	ND
OBZ	0.036	0.030	0.010-0.064	0.019-0.071	ND	0.005
ABZ	0.06	0.025	ND	0.003-0.082	ND	0.023
MBZ	0.05-0.014	ND	0.017	0.002-0.037	ND	ND
FBZ	ND	ND	0.006	0.004-0.006	ND	ND

Number of sample : n=5.

ND : not detected.

1,000m²에 해당되며 여기에 혼합시의 기계적인 힘과 소수성함이 합쳐져 시료와 C₁₈이 매우 수월하게 반응한다는 것과 지방이나 비극성 물질은 비극성인 C₁₈에 붙게 되나 단백질이나 극성인 물질은 C₁₈의 말단에 노출되게 된다는 점을 이용한 시료 전처리 방법이다. 이러한 방법은 세척용매와 용출용매를 알맞게 선택할 때 시료전처리 과정이 매우 간단하며 회수율이 높을 뿐만 아니라 시간이 짧게 소요되므로 다수의 시료에 대하여 잔류물질을 신속하게 검사할 수 있는 매우 간편한 방법으로 알려져 있다^{19,28}.

MSPD 방법에서 C₁₈은 친지성이 아주 강하므로 이 점을 이용하여 시료 0.5 g을 C₁₈과 균질화하면 조직내 지방성분이 C₁₈의 친지성 때문에 결합되고 또 지방이 acetonitrile에 benzimidazole보다 용해성이 낮으므로 benzimidazole에 비해 상대적으로 늦게 용출됨으로써 분리가 일어나며, C₁₈에서 분리가 일어나서 acetonitrile 용액 중에 남아있는 수분과 지방성분은 보조칼럼으로 사용된 활성 알루미늄과 florisil 층을 통과하면서 제거되기 때문에 원하는 benzimidazole은 머무르지 않고 방해가 최소한으로 줄면서 곧바로 용출된다.

본 실험의 결과 Fig.1의 크로마토그램은 10 분 이내에 분석되었고 Long et al⁶의 결과는 본 결과 보다 약간 용출되는 시간(15분)이 더 길어지는 것 외에는 본 결과와 일치 하였다. 그리고 acetonitrile로 benzimidazole을 추출시 용매에 의한 방해피크가 기존의 방법보다 적게 나타났는데 친지성인 C₁₈에 친화성이 있음에도 불구하고 칼럼으로부터 지방의 추출없이 benzimidazole이 시료로부터 잘 분리되어지는 것은 MSPD 추출방법과 florisil과 활성 알루미늄 칼럼 사용으로 인하여 나타난 효과로 사료되어진다.

Barker et al²¹은 추출칼럼으로 Florisil층을 사용하고

acetonitrile로 유출 하였을 때 ABZ의 회수율은 소의 식육과 간에서 73.9±8.0 및 72.4±2.6, FBZ는 74.0±11.8 및 62.0±5.3, MBZ는 63±4.2 및 93.0±5.7, TBZ는 63.8±9.6 및 78.5±1.0이었다. 이는 본 실험에서 거의 일률적으로 식육과 천엽에서 조금 낮은 회수율을 보인 것과는 차이가 있으나 회수율의 측면에서는 유사한 결과를 보였다. 또한 Barker et al²⁴은 식육에서 본 연구와 같은 전처리 방법을 사용하고 ethylacetate 8mL로 추출하여 acetonitrile 50 μ L와 0.05 N Phosphoric acid 450 μ L로 건조물을 용해하여 분석하였을 때 TBZ는 63.82±9.57, MBZ는 63.01±4.24, ABZ는 73.92±7.99, FBZ는 73.97±11.82의 회수율을 보인 것은 본 실험과 유사하였으나 TBZ와 MBZ만 다른 결과를 보였다. 이는 분석칼럼의 길이와 분석용매 등 다양한 원인에서 올 수 있는 차이로 사료된다.

Marti et al²⁰은 benzimidazole을 0.1 $\mu\text{g/g}$ 수준으로 fortified 했을 경우 간장과 식육에서 ABZ는 각각 71±4.1 및 71±5.7, FBZ는 87±3.6 및 77±3.5, MBZ는 65±5.1 및 66±11.6, OBZ는 75±6.9 및 70±8.2, TBZ는 66±4.4 및 66±5.5의 회수율을 보였다. 이들 결과 중 OBZ의 결과를 제외한 나머지 결과는 본 연구의 결과와 서로 다른 차이를 보였는데 이는 pH 3.5에서 ion-pair reagent pentasulphonate를 사용하여 분리한 결과로서 전혀 다른 전처리 방법의 차이로 사료된다.

Long et al⁶의 방법을 변경하여 실험한 결과 TBZ, MBZ 및 FBZ의 회수율이 낮아서 이를 극복할 수 있는 방안으로 유출용매와 분석용매를 달리하여 gradient 방식으로 실험한 Boulaire et al²³의 방법을 응용한 조건 II로 실험한 결과 Table 6~8과 같이 두 분석조건간의 표준품 각각의 회수율은 거의 차이가 나지 않았으나 TBZ와 MBZ의 회수율은 약간 상승하는 경향을 보였고, FBZ

는 여전히 낮은 회수율을 보였다.

결 론

본 연구에서는 축산물내의 잔류물질 분석을 위한 효율적인 시료 추출-정제방법을 정립하고, benzimidazole 복합잔류물을 동일한 과정에서 우수한 감도로 정성-정량, 분석 할 수 있는 방법을 확립하기 위하여 MSPD와 HPLC 법을 약간 변경하여 시험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각 standard benzimidazole의 표준곡선에 대한 회귀방정식에서 얻은 상관계수 r 값은 thiabendazole (TBZ)는 $Y=186636X-10468$ ($r=0.996$), oxibendazole (OBZ)는 $Y=338557X-13468$ ($r=0.996$), mebendazole (MBZ)는 $Y=437820X-20135$ ($r=0.995$), albendazole(ABZ)는 $Y=268430X-13319$ ($r=0.994$), fenbendazole(FBZ)는 $Y=162813X-40830$ ($r=0.991$)로서 유의상관을 보이는 직선이었다.
2. TBZ, OBZ, ABZ, MBZ, FBZ의 회수율은 표준용액을 0.2~6.4 $\mu\text{g/g}$ 농도로 fortified한 간, 식육과 천엽에서의 평균 회수율은 $62.1 \pm 3.8(\%)$ 에서 $92.3 \pm 7.5(\%)$ 이었고, 천엽에서 약간 낮은 회수율을 나타내었다.
3. 조건 I, II의 방법으로 소의 근육, 간 및 천엽에서 benzimidazole을 fortified한 시료의 회수율을 측정할 결과 조건 II 에서 간에서는 TBZ이 92.3%, MBZ이 87.3%이었고, 근육에서는 OBZ이 74.5%, MBZ이 82.7%였으며, 천엽에서는 TBZ이 75.2%, MBZ이 83.5%로서 조건II의 방법이 조건I의 방법에 비하여 더 높은 회수율을 나타내었다.
4. 조건 I 및II의 방법으로 시중에서 시판되고 있는 간, 식육, 천엽에 대하여 HPLC 분석을 수행한 결과 검출량은 기준치인 0.1 $\mu\text{g/g}$ 이하로 비교적 낮은 수준이었다.
5. 이상과 같은 결과로 보아 MSPD법은 생체구조와 같이 복잡한 구조를 가지고 있는 시료로부터 잔류 benzimidazoles을 추출, 분리, 정량하는데 보다 효율적인 방법이 될 것으로 사료되며, 이 방법은 다른 축산물의 잔류물질을 분석하는데도 적절한 방법이 될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 하대식, 김종수, 김곤섭. HPLC에 의한 계육의 설파 메타진 잔류량 분석. *대한수의학회지*, 34:55-62. 1994.
2. 하대식, 김종수, 김곤섭. MSPD와 HPLC를 이용한 어류의 잔류 설파제와 테트라사이클린계 항생물질

의 동시 분석. *한국 식품위생 학회지*, 5(3):139-158. 1997.

3. 김종수, 김곤섭, 하대식. 수입 축산식품에서의 잔류 농약 동시분석 개발에 관한 연구. *대한수의학회지*, 37(1) :213-220. 1997.
4. Delatour P, Parish R. Benzimidazole anthelmintics and related compounds: Toxicity and evaluation or residues. In *Drug Residues in Animals*. Rico, A. G., Ed., Academic Press: Orlando, FL, 175-204. 1986.
5. David LB, Ronald GB, Anne HB, and William CM. Monoclonal antibody for multiresidue ELISA of benzimidazole anthelmintics in liver. *J Agric Food Chem*, 42(7) :1588-1594, 1994.
6. Long AR, Hsieh LC, Malbrough MS. et al. Matrix Solid Phase Dispersion Isolation and Liquid Chromatographic Determination of five benzimidazole anthelmintics in fortified beef liver. *J Assoc Off Anal Chem*, 73(6) : 860-863. 1990.
7. Leen CD. Benzimidazole fungicides : Mechanism of action and biological impact. *Ann Rev Phytopathol*, 24:43-65. 1986.
8. Cares C, Marc. Disposition of netobimin, albendazole and its metabolites in the pregnant rat : Developmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144 : 56-61. 1986
9. Malisch R, Bourgeois B, Lippold R. Multiresidue analysis of selected chemotherapeutics and antiparasitics. *Deut Lebensm-Rundsch*, 88(7) : 205-216. 1992.
10. Canon P, De La Plaza JL, Munoz-delgado L. Determination and persistence of several fungicides in post-harvest apples during their cold storage. *J Agri Food Chem* 35 : 114-148. 1987.
11. Susan EP, Charlotte EF, Stephan AB. Determination of concentration of albendazole sulfoxide in plasma and uterine fluid of heifers. *AJVR*, 158 : 62-65. 1997.
12. Yess NJ, Gunderson EL, Roy RR. US Food and Drug Administration monitoring of pesticide residues in infant foods and adult foods eaten by infants-children. *Journal of the AOAC Interna*, 76 : 492-507. 1993.
13. Delatour P, Parish R, Gyurik RJ. Albendazole : a comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites. *Ann Research Vet*, 12:159-167. 1981.
14. WHO. Tiabendazole(TBZ) in Toxicological Evaluation of certain Veterinary Drug Residues in Food. WHO

- Food Additives. Vol. 31. WHO, Geneva, Switzerland. 37-62. 1993.
15. U. S. Department of Administration. General Principles for Evaluating the Safety of Compounds Used in Food-producing Animals, Washington, DC. 1986.
 16. U. S. Department of Agriculture. Compound evaluation and analytical capability national residue program plan, Food Safety and Inspection Service, Brown, J.(Ed.), Washington, DC. 1988.
 17. U. S. Department of Administration, Fenbendazole drugs for animal use, Code of Federal Regulations. Title 21, Part 556:730. 1988
 18. 농림수산부. FAO/WHO, 국제식품 규격위원회, 축산 식품 위생 지침(동물약품 잔류, 식육 위생), p 7. 1994.
 19. Long AR, Hsieh LC, Malbrough MS, et al. Matrix solid-phase dispersion(MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in pork muscle tissue. *J Food Compos anal*, 3 : 20-26. 1990.
 20. Marti AM, Mooser AE, Koch H. Determination of benzimidazole anthelmintics in meat samples. *J Chromatogr*, 498 : 145-157. 1990.
 21. Barker SA, Long AR, Hines ME. II. Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion. *J Chromatogr*, 629 : 23-24. 1993.
 22. Barker SA, Long AR, Short CR. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J Chromatogr*, 475 : 353-361. 1989.
 23. Boulaire SL, Bauduret JC, Andre F. Veterinary Drug Residues Survey in Meat : An HPLC Method with a Matrix Solid Phase Dispersion Extraction. *J Agric Food Chem*, 45 : 2134-2142. 1997.
 24. Barker SA, McDowell T, Charkhian B, et al. Methodology for the Analysis of Benzimidazole Anthelmintics as Drug Residues in Animal Tissues. *J Assoc Off Chem*, 73(1) : 22-25. 1990.
 25. Barker SA, McDowell T, Charkhian B, et al. Methodology for the Analysis of fenbendazole and its metabolites in plasma, urine, feces, and tissue homogenates. *Anal Biochem*, 155 : 112-118. 1986.
 26. Bogan JA, Marriner S. Analysis of benzimidazoles in body fluids by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci*, 69 : 422-423. 1980.
 27. Rene VA and Neslon AJ. Liquid Chromatographic fluorescence method for multiresidue determination of thiabendazole 5-hydroxy-thiabendazole in milk. *Journal of AOAC Internation*, 78(3) : 642-646. 1995.
 28. Susas SC, Tai NC, Charlie JB. Determination of thiabendazole, 5-hydroxythiabendazole, fenbendazole, and oxfendazole in milk. *J Assoc off Anal Chem*, 73(3) : 368-37. 1990.