

식용란중 벤지미다졸계 구충제 분석

강형주¹, 김문배, 이재봉, 김봉식, 김영갑

충청남도축산위생연구소
(접수 2003. 4. 13, 게재승인 2003. 5. 8)

Analysis for benzimidazoles in eggs

Hyung-Joo Kang¹, Mun-Bae Kim, Jae-Bong Lee,
Bong-Sik Kim, Young-Kab Kim

Chungnam Livestock & Veterinary Research Institute, Hongsung, 350-821, Korea
(Received 13 April 2003, accepted in revised form 8 May 2003)

Abstract

This study was attempted to detect six benzimidazoles [thiabendazole(TBZ), oxfendazole (OFZ), mebendazole(MBZ), flubendazole(FLBZ), albendazole(ABZ), and febendazole(FBZ)] in eggs using high performance liquid chromatography(HPLC) with photodiode array detector (DAD) simultaneously. The eluates were determined by HPLC on a waters X-TerraTM C₁₈ reverse-phase column(4.6 × 250 nm, 5 μ m) with DAD at 295nm. The mobile phase was 0.04M ammonium phosphate(pH 7.5) / ACN(62.28 v/v) run isocratically. The calibration curves were linear(r>0.999) for six benzimidazoles. Average recovery rate from eggs were 94.54% for TBZ, 97.71% for OFZ, 88.82% for MBZ, 93.71% for FLBZ, 78.61% for ABZ, and 75.09% for FBZ, respectively. The limits of detection and quantification were 2.27ppb, 3.88 for TBZ, 9.34ppb, 15.61ppb for OFZ, 28.53ppb, 45.15ppb for MBZ, 27.39ppb, 40.95ppb for FBZ, 8.61ppb, 13.95ppb for ABZ and 12.79ppb, 22.34ppb for FBZ, respectively.

Key words : Benzimidazoles, Eggs, HPLC, DAD

서 론

벤지미다졸계 구충제는 가축뿐만 아니라 인 의에서 널리 사용되어지고 특히 소 및 양의 위

장관내에 기생하는 선충 또는 회충에 감수성이 높다. 벤지미다졸계 구충제의 급성독성은 강하지는 않지만 쉽게 태반을 통과하고 세포분열시 방추사의 형성을 억제함으로써 배아독성과 최

¹Corresponding author

Phone : +82-41-631-3091, Fax : +82-41-631-3092

E-mail : kanghj007@hanmail.net

기형성을 일으키는 것으로 보고 되고 있다. 가축에서의 이러한 약품의 사용으로 축산식품내 잔류가능성이 높기 때문에 우리나라뿐만 아니라 국제적으로 잔류허용기준을 설정하여 이들 물질에 대한 잔류여부를 검사하여 왔다¹⁻⁴⁾.

벤지미다졸계 구충제에 대한 고전적인 분석 방법은 한가지의 물질을 분석하는데 다량의 시료가 요구되고 여러 단계의 pH조절, 복잡한 분배과정 및 다량의 추출시료의 농축 등으로 많은 시간과 노동력이 소요되었다^{5,6)}. 그러나 최근에는 우유에서 고정상 추출 방법과 BHT의 첨가로 산화과정을 차단함으로써 5ppb 까지 분석 가능한 방법이 보고 된 바 있으며, 양과 닭의 간에서 6종의 벤지미다졸계 구충제를 핵산과 클로르포름으로 추출하고 C₁₈SPE를 통하여 아세트니트릴을 용출하는 방법 등이 보고 된 바 있다^{7,8)}.

최근 tetracycline계 항생물질이나 carbamate계 농약 등의 시료전처리법으로 사용हे은 시료 고체상분산처리법(matrix solid phase dispersion, MSPD)^{9,10)}과 HPLC를 이용하여 치아벤다졸 등 5종의 벤지미다졸 구충제에 대해 우육, 돈육 및 계육에서의 동시다제 정량법을 국립수의과학 검역원에서 정립한 바 있으며, 2003년에는 식용란에서도 벤지미다졸계 구충제의 잔류규제가 시행됨에 따라 보다 간단한 방법을 식용란에 적용하여 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

표준품 및 시약

표준품으로서 thiabendazole, albendazole, oxfendazole, mebendazole 및 fenendazole은 Sigma사, flubandazole은 Dr. Ehrenstorfer사 제품을 사용하였으며, 시료전처리를 위한 유기용매는 모두 HPLC급으로 JT Baker사의 제품을 사용하였다.

표준용액의 조제

벤지미다졸계 구충제 표준품 10 mg을 정밀히 달아 100 ml 용량플라스크에 취하고 DMSO 10

ml에 잘 녹인 다음 50% acetonitrile로 표시선까지 채워 잘 혼합하여 100 µg/ml가 되도록 만든 후 소량으로 나누어 냉장 보관하면서 사용하였다.

시료의 추출 및 정제

먼저 균질화한 식용란 1.0g을 50 ml 원심관에 취한 후 여기에 1 ml의 50% ACN(acetonitrile)을 균질화하였다. 여기에 5 ml의 ethylacetate를 넣어 약 5분 동안 섞어준 후 3,700 rpm에서 10분간 원심분리하여 ethylacetate층을 채취하였다. 채취된 ethylacetate층은 질소농축기를 사용하여 완전건조 시킨 후 1.0 ml의 50% ACN으로 용해하여 0.45 µm의 여과지로 여과한 후 HPLC에 주입하였다.

HPLC 조건

HPLC(Waters Co, No 2690), UV Detector(Waters Co, No 2487), 벤지미다졸계를 분리하기 위한 column은 XTerra C₁₈(4.6 × 250 mm, 5 µm)을, 그리고 이동상은 0.04M(NH₄)₂HPO₄와 acetonitrile을 각각 사용하였다.

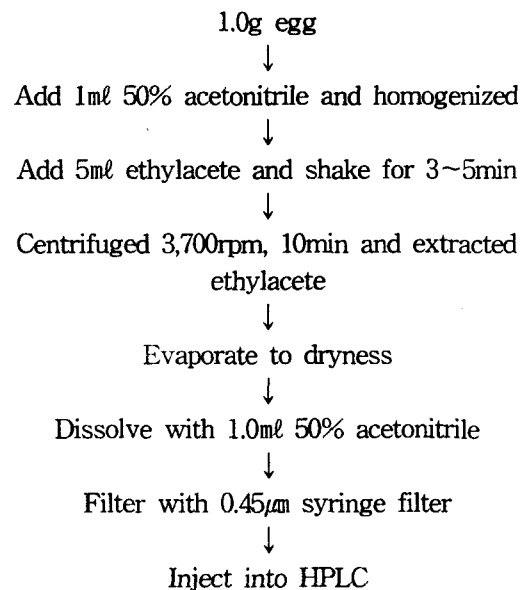


Fig 1. The sample preparation scheme of benzimidazole anthelmintics in egg.

결과 및 고찰

HPLC 분석결과

Table 1과 같이 0.04M(NH₄)₂HPO₄/acetonitrile(62:38, v/v) 조건에서 6종의 벤지미다졸계 구충제의 동시분석이 가능했으며, Fig 2에서와 같이 식용란 공시료와 인위적으로 벤지미다졸을 첨가한 시료의 분석에서도 피크의 겹침이 없이 분석이 가능하였으며, 6종의 벤지미다졸계 표준품의 검량선 또한 모두 직선성($r > 0.999$)을 나타내었다. 이와같은 성적은 LC에 의해 우수로부터 검사한 성적과 유사하게 조사되었다¹¹⁾.

물질별 회수율

6종의 벤지미다졸을 섞어 농도별(0.2 µg/g, 0/4 µg/g, 0.8 µg/g)로 5개의 시료에 섞어 전처리하여 HPLC에 주입하여 얻은 결과로 회수율을 측정하여 Table 2에서와 같이 thiabendazole은 회수율 94.21, 92.94, 96.47%, 변이계수 4.88, 8.83, 4.58, oxfendazole은 회수율 98.34, 95.91, 98.89%, 변이계수 1.98, 6.61, 5.32, mebendazole은 회수율 83.88, 88.47, 94.11%, 변이계수 8.62, 2.66, 4.21, flubendazole은 회수율 95.60, 91.14, 94.38%, 변이계수 2.46, 4.58, 4.18, albendazole은 회수율 78.43, 75.76, 81.65%, 변이계수 6.24, 4.89, 6.65, fen-

Table 1. Analytical conditions of benzimidazole anthelmintics

Compound	Column	Mobile phase	Detection wavelength
Thiabendazole	XTerra C ₁₈ (4.6 × 250 mm, 5µm)	0.04M(NH ₄) ₂ HPO ₄ / acetonitrile(62:38, v/v)	UV 360 nm
Oxfendazole			
Mebendazole			
Flubendazole			
Albendazole			
Fenbendazole			

Flow rate : 1.0 ml/min

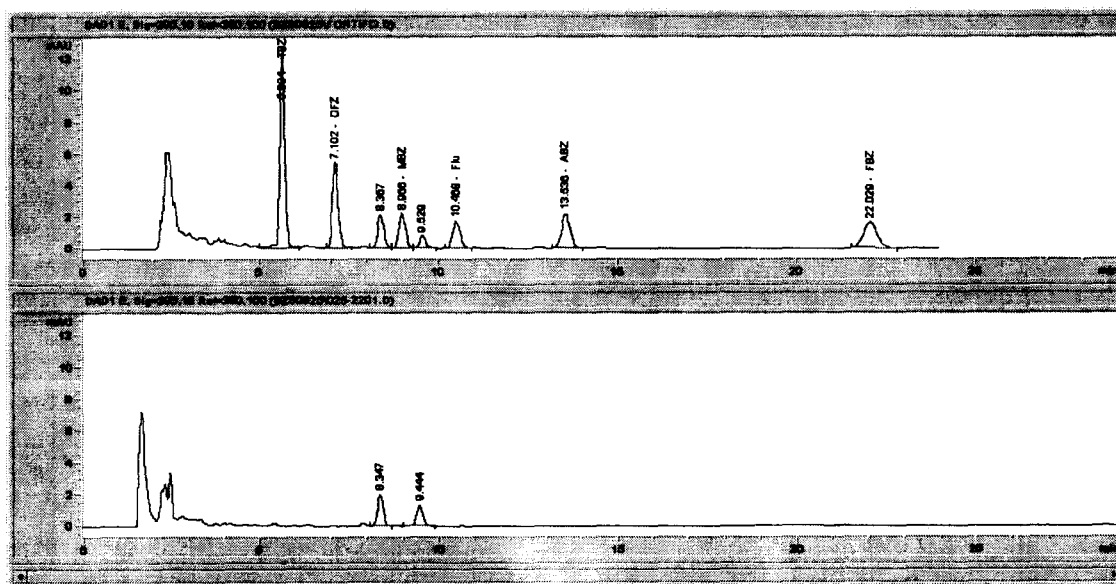


Fig 2. HPLC chromatograms of benzimidazole anthelmintics fortified egg at 0.4 µg/g and blank

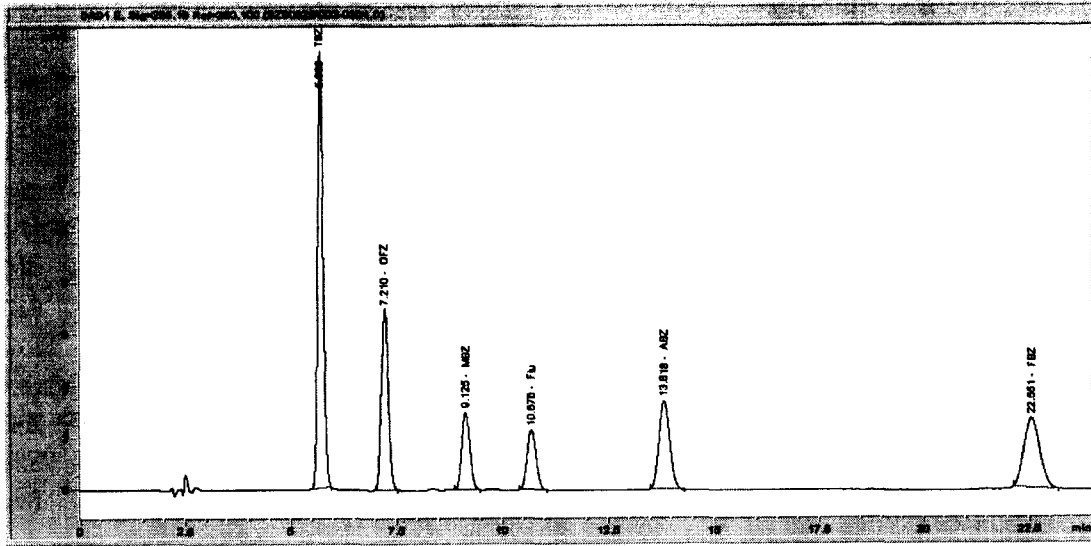


Fig 3. HPLC chromatograms of standard benzimidazole anthelmintics at 0.5 $\mu\text{g/ml}$ TBZ, Thiabendazole; OFZ, Oxfendazole, MBZ, Mebendazole; Flu, Flubendazole; ABZ, Albendazole; FBZ, Fenbendazole

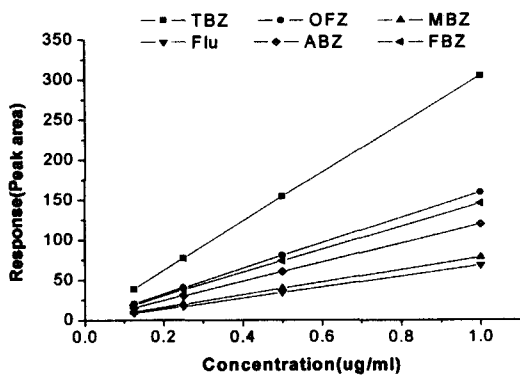


Fig 4. The standard calibration curves of benzimidazole anthelmintics ($r > 0.999$). TBZ, Thiabendazole; OFZ, Oxfendazole, MBZ, Mebendazole; Flu, Flubendazole; ABZ, Albendazole; FBZ, Fenbendazole.

bendazole은 회수율 75.59, 72.25, 77.42%, 변이계수 2.28, 3.62, 6.34로 모두 평균 75%이상의 회수율과 10이하의 변이계수를 보여 회수율 및 변이계수 모두 양호하였다. 이와같은 성적은 육우 간으로부터 회수율을 측정된 결과 thiabendazole은 회수율 95.22, 91.23, 96.74%, 변이계수 4.78, 8.93, 4.85, oxfendazole은 회수

율 97.43, 95.94, 98.98%, 변이계수 1.89, 6.51, 5.23, mebendazole은 회수율 82.86, 88.74, 93.98%, 변이계수 8.52, 2.76, 4.31, flubendazole은 회수율 96.60, 92.41, 93.83%, 변이계수 2.56, 4.47, 4.09, albendazole은 회수율 79.34, 76.67, 82.18%, 변이계수 6.14, 4.79, 6.56, fenbendazole은 회수율 75.59, 73.23, 76.88%, 변이계수 2.31, 3.52, 6.40로 모두 평균 75%이상의 회수율과 10이하의 변이계수를 보여 회수율 및 변이계수 모두 유사하게 분석되었다¹²⁾.

검출한계

위와 같은 실험으로 6종의 벤지미다졸계의 실험으로 각각의 검출한계 및 정량한계는 각각 thiabendazole 2.27ppb와 3.88ppb, oxfendazole 9.34ppb와 15.61ppb, mebendazole 28.53ppb와 45.15ppb, flubendazole 27.39ppb와 40.95ppb, albendazole 8.61ppb와 13.95ppb, fenbendazole 12.79ppb와 22.34ppb로 thiabendazole의 검출한계가 가장 낮았으며 그와 반대로 mebendazole과 flubendazole은 검출한계가 높아 정량시험시 50ppb의 농도이하에서는 검출이 어려운 것으로 나타났다. 이와같은 성적은 Fletouris등¹¹⁾

Table 2. Recovery rates of benzimidazole anthelmintics in spiked egg

Compounds	Recovery rate (%)				Coefficient of variation			
	M/2	M*	Mx2	Mean	M/2	M	Mx2	Mean
Thiabendazole	94.21	92.94	96.47	94.54	4.88	8.83	4.58	6.10
Oxfendazole	98.34	95.91	98.89	97.71	1.98	6.61	5.32	4.64
Mebendazole	83.88	88.47	94.11	88.82	8.62	2.66	4.21	5.16
Flubendazole	95.60	91.14	94.38	93.71	2.46	4.58	4.18	3.74
Albendazole	78.43	75.76	81.65	78.61	8.82	6.24	4.89	6.65
Fenbendazole	75.59	72.25	77.42	75.09	13.13	2.28	3.62	6.34

* M : benzimidazole anthelmintics 0.4 µg/g

의 정량검사 결과 검출한계 및 정량한계는 각각 thiabendazole 2.26ppb와 3.91ppb, oxfendazole 9.41ppb와 15.59ppb, mebendazole 28.49ppb와 45.23ppb, flubendazole 26.98ppb와 41.05ppb, albendazole 8.59ppb와 14.01ppb, fenbendazole 13.23ppb와 23.22ppb로 thiabendazole의 검출한계가 가장 낮았으며 그와 반대로 mebendazole과 flubendazole은 검출한계가 높아 정량시험시 50ppb의 농도이하에서는 검출이 어려웠다는 성적과 매우 유사하게 조사되었다.

Table 3. Limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) of benzimidazole anthelmintics in spiked egg

Compounds	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Thiabendazole	2.27	3.88
Oxfendazole	9.34	15.61
Mebendazole	28.53	45.15
Flubendazole	27.39	40.95
Albendazole	8.61	13.95
Fenbendazole	12.79	22.34

결 론

6종의 벤지미다졸계 구충제(thiabendazole, oxfendazole, mebendazole, flubendazole, albendazole, fenbendazole)에 대한 HPLC를 이용한 최적분석조건을 조사하였을 때 칼럼은 Waters, XTerra C₁₈(4.6 × 250mm, 5µm), 이동상

용매는 0.04M(NH₄)₂HPO₄와 아세트나이트릴의 혼합용액, 검출파장은 자외부 295 nm로 동시 검출할 때 표준 검량선은 모두 직선상(r>0.999)을 나타냈다.

식용란에서의 회수율을 구한 결과 thiabendazole 94.54%, oxfendazole 97.71%, mebendazole 88.82%, flubendazole 93.71%, albendazole 78.61%, fenbendazole 75.09%의 회수율을 나타냈다.

검출한계와 정량한계는 각각 thiabendazole 2.27ppb와 3.88ppb, oxfendazole 9.34ppb와 15.61ppb, mebendazole 28.53ppb와 45.15ppb, flubendazole 27.39ppb와 40.95ppb, albendazole 8.61ppb와 13.95ppb, fenbendazole 12.79ppb와 22.34ppb이었다.

참고문헌

1. Mckellar QA, Scott EW. 1990. The benzimidazole antihelmintic agents a review. *Vet Pharmacol Ther* 13(3) : 223~247.
2. Russell GJ, Gill JH, Lacey E. 1992. Binding of [³H]benzimidazole carbamates to mammalian brain tubulin and the mechanism of selective toxicity of the benzimidazole anthelmintics. *Biochem Pharmacol* 43(5) : 1095~1100.
3. Whittaker SG, Faustman EM. 1992. Effects of benzimidazole analogs on

- cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 113(1) : 144~151.
4. 식품의약품안전청. 2002. 식품의 기준 및 규격중 개정. 263.
 5. Barker SA, Hsieh LC, Short CR. 1986. Methodology for the analysis of febendazole and its metabolites in plasma, urine, feces, and tissue homogenates. *Anal Biochem* 155(1) : 112 ~118.
 6. Short CR, Barker SA, Hsieh LC, et al. 1987. Disposition of febendazole in the goat. *Am J Vet Res* 48(5) : 811~815.
 7. Long AR, Malbrough MS, Hsieh LC, et al. 1992. Matrix solid phase dispersion isolation and LC determination of five benzimidazole anthelmintics in fortified pork liver. *JAOAC* 75(9) : 961~965.
 8. Rose MD. 1999. A method for the separation of residues of nine compounds in cattle liver related to treatment with oxfendazole. *Analyst* 124(7) : 1023~1026.
 9. Russell AD, Quesnel LB. 1983 *Antibiotics: Assessment of antimicrobial activity and resistance*. U.S. ed. Academic Press Inc, New York : 384.
 10. 강환구, 손성완, 조병훈 등. 1996. 시료 고체상 분산(MSPD) 전처리법을 이용한 식육중 테트라싸이클린계 항생물질 동시정량 분석. *대한수의학회지* 36(3) : 541~550.
 11. Fletouris D, Botsoglou N, Psomas I, et al. 1996. Rapid quantitative screening assay of trace benzimidazole residues in milk by LC. *JAOAC* 79(6) : 1281~1287.
 12. Long AR, Malborough MS, Short CR. 1990. Matrix solid phase dispersion isolation and LC determination of five benzimidazole anthelmintics in fortified beef liver. *JAOAC* 73(6) : 860~863.