

## LC/MS를 이용한 식육중 잔류 벤지미다졸계 구충제 분석법 연구

최은영<sup>1</sup>, 서형석, 백귀정, 허부홍, 서이원, 정동석

전라북도 축산진흥연구소  
(접수 2005. 1. 20, 게재승인 2005. 2. 24.)

### Study on analytical method of residual benzimidazole anthelmintics in meat by LC/MS

Eun-Young Choi<sup>1</sup>, Heyng-Seok Seo, Kui-Jeong Baek, Boo-Hong Hur,  
Lee-Won Seo, Dong-Suk Joung

*Jeollabuk-do Livestock Development and Research Institute, Jeonju 560-860, Korea*  
(Received 20 January 2005, accepted in revised from 24 February 2005)

#### Abstract

Recently, mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC/MS) has been a preferred technique for determination of organic compounds in complex matrixes. LC/MS provides a high degree sensitivity and specificity of the compounds of interest. The purpose of this study was to confirm analytical method of residual 6 benzimidazoles (thiabendazole, oxfendazole, mebendazole, albendazole, flubendazole and fenbendazole) in meat by LC/MS. Benzimidazoles were analyzed by LC/MS on XTerra C<sub>18</sub> column with 0.01% trifluoroacetic acid-acetonitrile (TFA) in a gradient mode as mobile phase, and that were identified by electrospray ionization with selected ion recording mode at 150-350 amu mass range. Residual benzimidazoles were extracted from tissue with ethylacetate, and elute benzimidazoles with 50% acetonitrile. In the LC/MS analysis of benzimidazoles, signal to noise ratio was showed relatively high in the positive mode and special ion in the quality analysis was determined via [M+H]<sup>+</sup> and Fragment ions. A spectrum of benzimidazoles was showed from all 6 benzimidazoles

Key words : Benzimidazoles, LC/MS, Meat, Electrospray ionization

---

<sup>1</sup> Corresponding author

TEL : +82-63-834-4918, FAX : +82-63-834-4916

E-mail : [choiey1102@hanmail.net](mailto:choiey1102@hanmail.net)

## 서 론

산업동물의 생산성 향상과 동물의 질병치료와 예방을 목적으로 다양한 종류의 항균성물질 (항생물질 및 합성항균제)과 사료첨가제가 개발되어 많은 농가에서 사용되고 있다. 이러한 항균성물질과 사료첨가제는 사용이 엄격히 규제되고 있지만 양축농가에서의 안전휴약기간과 잔류허용기준에 대한 인식 부족으로 인하여 유해성 잔류물질이 축산물에 잔류될 가능성이 높다<sup>1)</sup>.

Benzimidazole은 소, 돼지 등에 기생하는 회충, 촌충, 간질충 및 폐충 등을 구제하는데 널리 사용되는 구충제로서 동물에 투여한 후 안전휴약기간을 지키지 않으면 동물의 체내에 잔류하게 되며<sup>2)</sup>, 본 실험에 사용된 benzimidazole계의 화학적 구조는 Fig 1과 같다<sup>3)</sup>.

Benzimidazole이 구충효과를 나타내는 기전에 관하여 Leen<sup>4)</sup>, Cares 등<sup>5)</sup>은 충체에 흡수된 benzimidazole이 protein tubulin에 결합하여 미세소관(microtubule)을 파괴하고 기생충의 혐기성 에너지 생산기구로부터 fumaric acid 환원효소를 저해하여 에너지 공급을 차단함으로써 충체를 사멸시킨다고 보고하였으며, 또한 glycogen uptake를 억제하고 oxidative phosphorylation의 coupling을 방해하여 구충제로 이용된다고 한다. Benzimidazole계 구충제는 동물에서 광범위 구충제로 사용되어질 뿐만 아니라<sup>6)</sup> 각종 과일과 채소의 향균력이 제제로서 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 널리 사용되고 있다<sup>6,7)</sup>. Susan 등<sup>8)</sup>은 소에서, Yess 등<sup>9)</sup>은 사람에서, Delatour 등<sup>10)</sup>은 임신 7-10일경 경구로 투여된 benzimidazole이 발육중인 양의 태아에서 근골격 이형성을 일으키고 수태울

을 저하시키면서 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 쉬운 것으로 알려져 있다.

이러한 위험성 때문에 1991년부터 미국 USDA Food Safty and Inspection Service (FSIS)와 Environmental Protection Agency (EPA)에서 이 benzimidazole계 제제들을 식품안전성검사 대상항목으로 지정하여 검사하고 있으며<sup>11-13)</sup>, 우리나라에서도 1994년부터 식육내 잔류물질허용기준을 정하여 검사하고 있다<sup>14)</sup>. Benzimidazole계 분석은 Long<sup>15)</sup> 및 Marti<sup>16)</sup>가 돼지 식육에서 HPLC법으로 분석을 시도하였고 Long 등<sup>3)</sup>이 소의 간장에서 MSPD와 LC를 이용하여 분석보고하였으며, Barker 등<sup>17,18)</sup>도 소의 간장에서 benzimidazole을 분석 보고하였다. 그 외에도 benzimidazole계 분석은 혈장, 혈청, 체액<sup>19-21)</sup> 및 조직<sup>22-25)</sup>에서 자외선 및 형광검출기를 이용한 액체크로마토그래피 보고들이 다수 있다.

그러나 아직 benzimidazole 구충제의 양성 시료에 대한 정성확인 시험 분석 보고가 드물며 재검사를 위한 많은 경비와 시간적 소모, 대량의 유기용매 사용 등과 같은 비효율적인 조건을 내포하고 있다. 따라서 복합(다성분) 잔류 물질 분석을 위한 신속하고 정확한 분석법의 확립이 절실히 요구되어지고 있다. 그러므로 본 연구는 식육중의 유해잔류물질을 모니터링하고 확인하는 방법으로 liquid chromatography/mass selective detector (LC/MS)를 이용하여 정성 및 정량을 편리하고 신속하게 검사하고자 실시하였다.

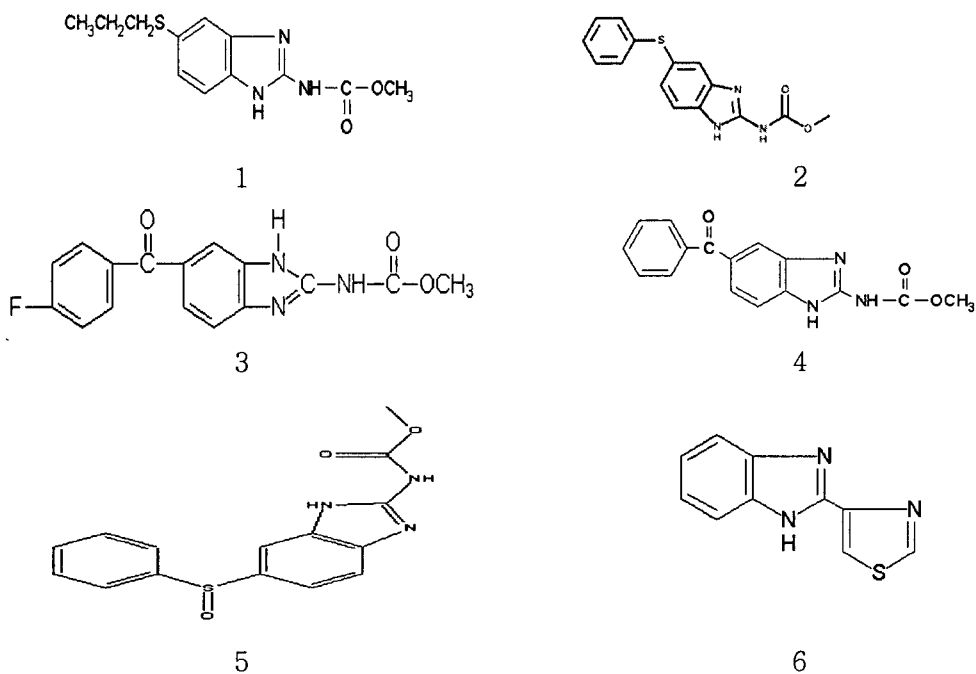


Fig 1. Benzimidazoles investigated.

1. Albendazole, Methyl 5-propylthio-2-benzimidazolecarbamate; 2. Fenbendazole, Methyl 5-phenylthio-2-benzimidazolecarbamate; 3. Flubendazole, Methyl 5-(4-fluorobenzoyl)-2-benzimidazolecarbamate; 4. Mebendazole, Methyl 5-benzoyl-2-benzimidazolecarbamate; 5. Oxfendazole, Methyl 5-phenylsulfinyl-2-benzimidazolecarbamate; 6. Thiabendazole, 2-(4-Thiazolyl)benzimidazole.

## 재료 및 방법

### 표준품 및 시약

표준품으로서 thiabendazole, albendazole, mebendazole 및 fenbendazole은 Sigma사, oxfendazole은 Dr. Ehrenstorfer사, flubendazole은 Wako사 제품을 사용하였으며, 시료전처리를 위한 유기용매는 모두 HPLC급으로 구입하여 사용하였다.

### 표준용액 제조

벤지미다졸계 구충제 표준품 10 mg을 100ml

용량플라스크에 취하고 10 ml DMSO에 녹인 다음 acetonitrile로 표시선까지 채워 잘 혼합하여 100 µg/ml가 되도록 만든 후 냉장보관하면서 실험시에는 50% ACN로 희석하여 사용하였다.

### 시료의 추출 및 정제

균질화한 시료 1.0 g을 50% acetonitrile (ACN) 1 ml로 균질화한 다음 ethylacetate 5 ml를 가하여 약 5분 동안 섞어준 후 3,700 rpm으로 10분간 원심분리하여 ethylacetate층을 채취하였다. 잔사에 ethylacetate 5 ml를 다시 가하여 원심분리하고 ethylacetate층을 합친 후 질소하에서 농축 건조시키고 1.0 ml의

50 % ACN으로 용해하여 초음파세척기에 10 분간 방치하고 원심분리한 후 0.2  $\mu\text{m}$ 의 여과지로 여과한 후 HPLC에 주입하였다.

#### HPLC/Mass 조건

LC/MS는 Waters사의 Alliance HT 2795와 Micromass ZQ2000을 사용하였으며 분석칼럼은 XTerra MS C<sub>18</sub> (3.5  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  150 mm)을, 이동상은 0.01 % TFA와 ACN을 gradient mode로 사용하였고 기기운영은 Masslynx를 사용하여 분석하였다 (Table 1).

이동상은 유속을 0.2 ml/min으로 초기에서 12분까지 0.01 % TFA 70 %와 acetonitril 30

%로 시작하여 14분에 0.01 % TFA 65 %와 acetonitril 25 %, 20분에 0.01 % TFA 70 %와 acetonitril 30 %로 gradient를 작성하여 실험하였다.

MS의 분석조건은 mass range: 150-350 amu, ionization mode: electrospray ionization, polarity: positive, capillary voltage: 3.2 Kv, source temp: 120  $^{\circ}\text{C}$ , desolvation temp.: 350  $^{\circ}\text{C}$ , desolvation gas flow: 250  $\ell$  /hr, cone gas flow: 50  $\ell$  /hr, cone voltage: 25-40 V로 하여 SIR mode로 각 벤지מידazole계 구충제의 spectrum과 chromatogram을 보았다 (Table 2).

Table 1. HPLC and MS conditions

Conditions		HPLC	MS
Column	XTerra MS C <sub>18</sub> (3.5 $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 150mm)		Ionization: ESI+*
Flow rate	0.2ml/min		Capillary Voltage: 3.2 kv
Sample temp	5 $^{\circ}\text{C}$		Source Temp: 120 $^{\circ}\text{C}$
Column temp	40 $^{\circ}\text{C}$		Desolvation Temp: 350 $^{\circ}\text{C}$
Mobile phase	(A) Water with 0.01% Trifluoroacetic acid (B) CH <sub>3</sub> CN		Desolvation Gas Flow(L/Hr): 250
Gradient elution	A 70%(12min) $\rightarrow$ 65%(14min) $\rightarrow$ 70%(20min)		Cone Gas Flow(L/Hr): 50
Injection vol	7 $\mu\text{l}$		Cone Voltage 25-40V

\*ESI : Electrospray Ionization

Table 2. Ions monitored in SIR\* at ESI

Compound	[M-OCH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> or [M-SOph] <sup>+</sup> or [M-CNH] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>
Albendazole	234	266
Fenbendazole	268	300
Flubendazole	282	314
Mebendazole	264	296
Oxfendazole	191,284	316
Thiabendazole	175	202

\*SIR : Selected or single ion recording

## 결과 및 고찰

벤지미다졸계 구충제를 분석하기 위해 먼저 UV detector를 이용하였으며, 정성 및 확인을 위하여 Mass detector를 적용한 결과 6종의 벤지미다졸계 구충제의 동시분석이 가능하였다 (Fig 2). Capillary voltage를 3.2 kv로 150~350 amu 범위에 대하여 각각의 spectrum을 측정한 결과 Fig 3~8과 같이  $[M+H]^+$ 과 조각이온이 6종의 벤지미다졸계 구충제에서 확인되었다.

6종의 벤지미다졸계 표준품의 검량선 또한 모두 직선성 ( $r^2 > 0.998$ )을 나타내었으며 (Fig 3-8) 이와 같은 성적은 LC에 의해 소의 근육, 간, 천엽<sup>1)</sup> 및 식용린<sup>26)</sup>에서 검사한 성적과 유사하게 조사되었다.

회수율을 측정하기 위하여 벤지미다졸계 구충제 6종을 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 되게 첨가하여 각각의 회수율을 측정한 결과 75%이상으로 LC에 의해 소의 근육, 간, 천엽<sup>1)</sup> 및 식용린<sup>26)</sup>에서 검사한 성적과 유사하게 조사되었다.

HPLC법의 정성방법은 머무름 시간에 의존하고 있어 가끔 분석결과를 오판할 수 있게 됨에 따라 최근 LC/MS 방법이 많이 응용되고 있다. LC/MS방법은 머무름 시간 뿐 아니라 특징적인 이온을 선택하여 정량함으로써 검출감도를 높일 수 있다. 질량분석법은 시료의 질량을 쉽게 측정할 수 있고 스펙트럼과 이온 분해 패턴은 분자이온의 구조에 대해 매우 특성적이며 이로부터 분자구조의 결정 및 확인이 가능하여 여러 분야에서 널리 응용되고 있다.

검사방법의 실제 적용을 위하여 도내에서 정상적으로 도축된 소 30건, 돼지 50건의 근육을 채취하여 검사한 결과 벤지미다졸의 잔류는 보이지 않았다.

여러 가지 혼합물질로부터 특정한 유해 잔류 물질을 보다 효율적이며 간편하게 분리 정량하는 기술적 방법들이 최근에 많이 개발되고 있는데 축산물중 다양한 유해성 잔류물질에 대하여 정성 및 확인 정량방법들의 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

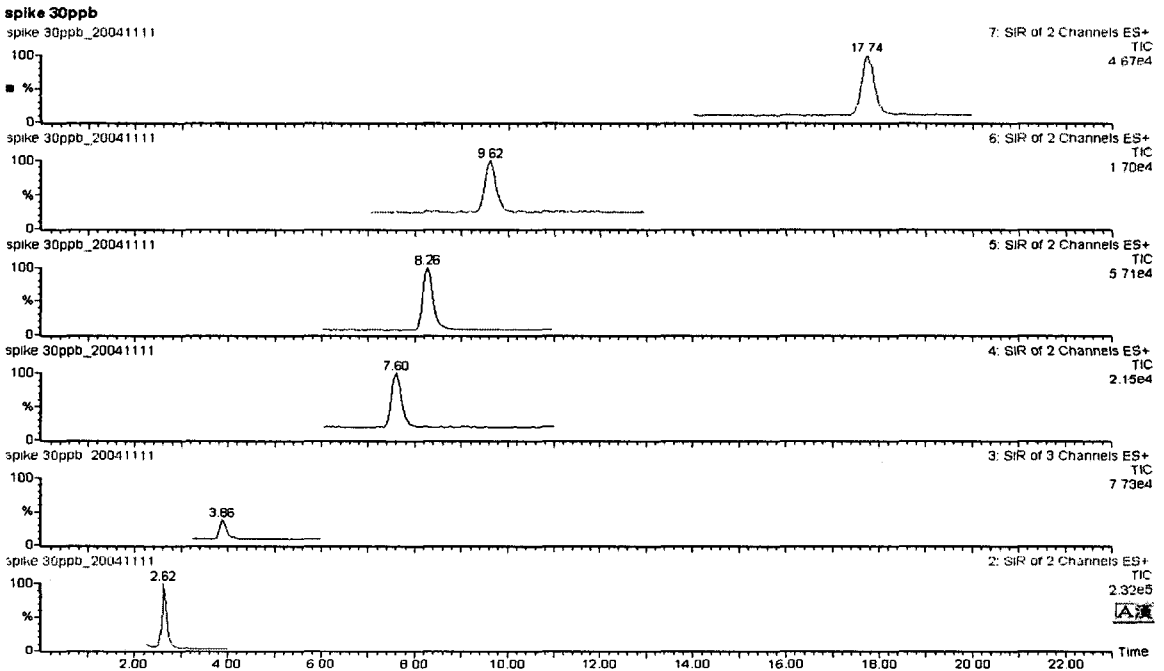


Fig 2. 6 MS full scan traces of benzimidazole

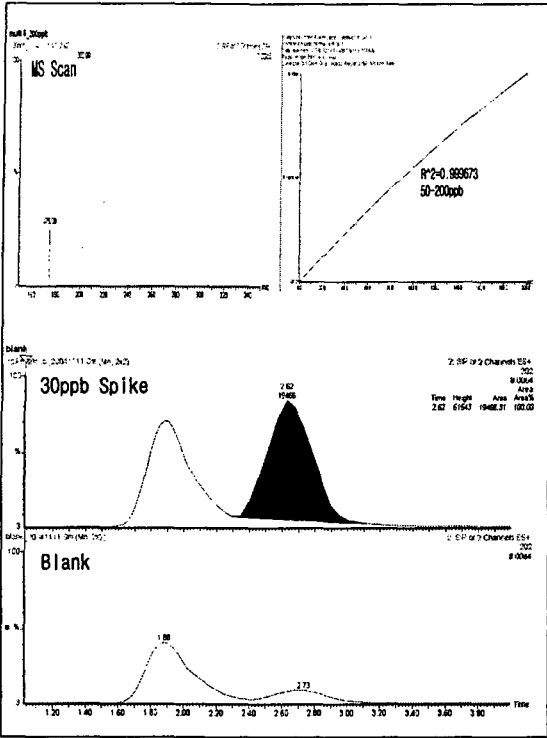


Fig 3. LC/MS for thiabendazole

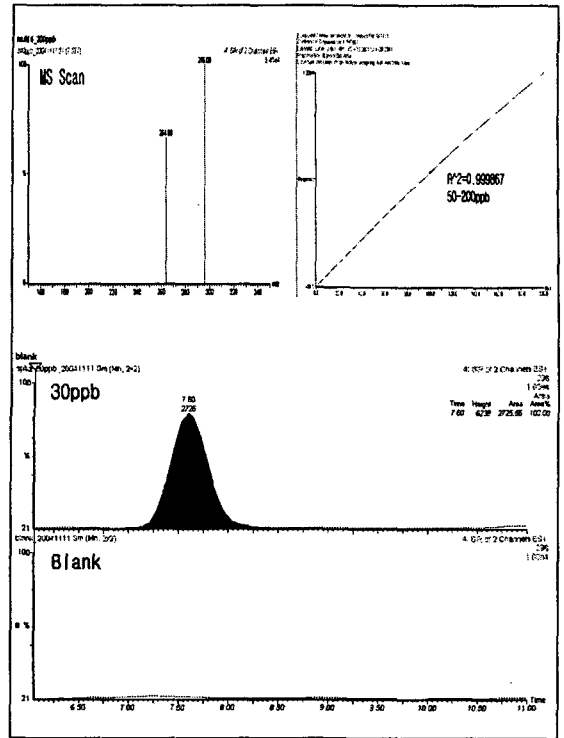


Fig 5. LC/MS for mebendazole

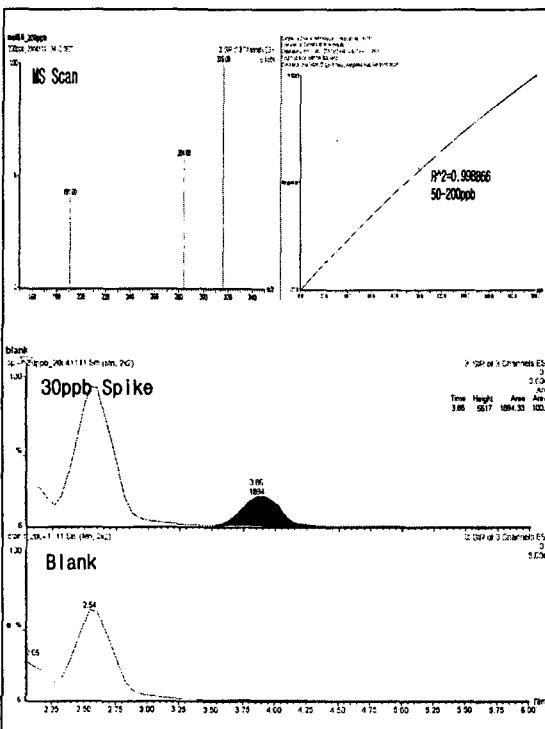


Fig 4. LC/MS for oxfendazole

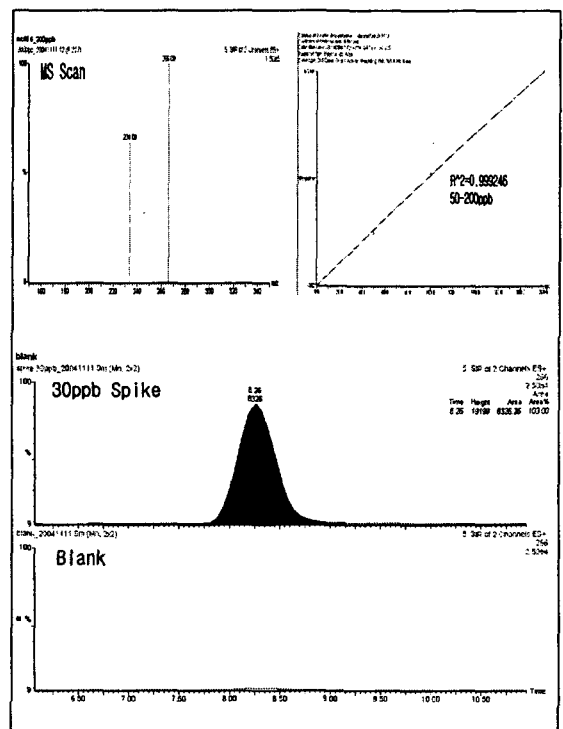


Fig 6. LC/MS for albendazole

## 결론

LC/MS를 이용하여 축산물중에 잔류하는 thiabendazole, oxfendazole, mebendazole, albendazole, flubendazole 및 fenbendazole 벤지미다졸계 구충제 6종을 분석하는 방법을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 이 동상 용매로는 0.01% trifluoroacetic acid (TFA) 및 100% acetonitrile을 gradient로 사용하고 칼럼으로는 XTerra C<sub>18</sub>칼럼 (3.5 $\mu$ m, 2.1 $\times$ 150mm)을 사용하였으며, MS는 Electrospray Ionization(ESI) 및 Selected Ion Recording(SIR) mode로 150~350 Mass 범위에서 분석하였다. 전처리방법으로는 에틸아세테이트로 추출하여 50% acetonitrile로 용출하였다. LC/MS를 이용한 벤지미다졸계 구충제 분석방법은 positive mode에서 signal-to-noise 비율이 높게 형성되었고 벤지미다졸계 구충제 정성실험을 위하여 특수이온은 [M+H]<sup>+</sup>과 조각이온으로 확인할 수 있었다.

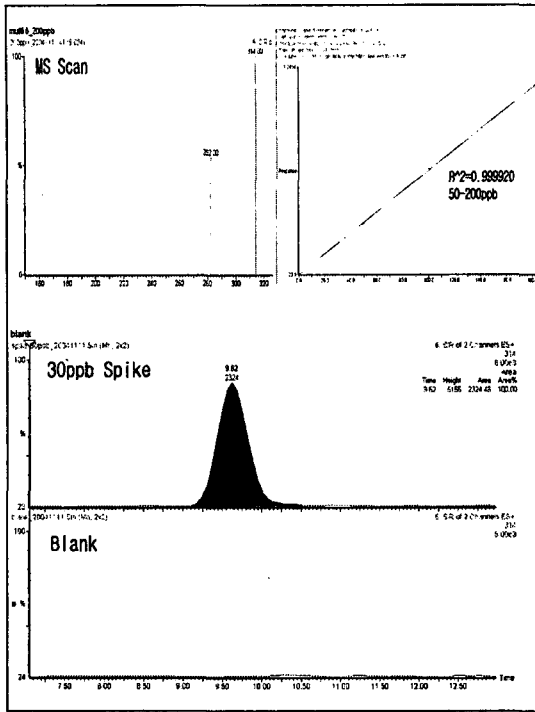


Fig 7. LC/MS for flubendazole

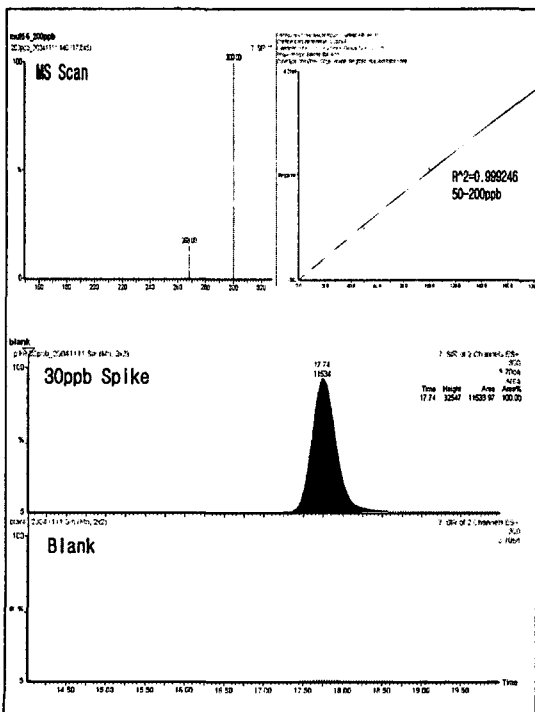


Fig 8. LC/MS for fenbendazole

## 참고문헌

1. 김충희, 김근섭, 박정희 등. 2002. 시료고체상분산처리와 액체크로마토그래피를 이용한 소의 근육, 간 및 천엽에서의 벤지미다졸계 구충제 잔류분석. 대한수의학회지 42(2) : 171-181.
2. Long AR, Hsieh LC, Malbrough MS, et al. 1990. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in fortified beef liver. *JAOAC* 73(6) : 860-863.
3. Marti AM, Mooser AE, Koch H. 1990. Determination of benzimidazole anthelmintics in meat samples. *J Chromatogr* 498 : 145-157.
4. Leen CD. 1986. Benzimidazole fungicides : Mechanism of action and

- biological impact. *Ann Rev Phytopathol* 24 : 43-65 .
5. Cares C, Marc. 1986. Disposition of netobimin, albendazole and its metabolites in the pregnant rat: Developmental toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 144 : 56-61.
  6. Malisch R, Bourgeois B, Lippoid R. 1992. Multiresidue analysis of selected chemotherapeutics and antiparasitics. *Deut Ledensm-Rundsch* 88(7) : 205-216.
  7. Canon P, De La Plaza JL, Munoz-Delgado L. 1987. Determination and persistence of several fungicides in post-harvest apples during their cold storage. *J Agri Food Chem* 35 : 144-148.
  8. Susan EP, Charriotte EF, Stephan AB. 1997. Determination of concentration of albendazole sulfoxide in plasma and uterine fluid of heifers. *AJVR* 158 : 62-65.
  9. Yess NJ, Gunderson EL, Roy RR. 1993. US Food and Drug Administration monitoring of pesticide residues in infant foods and adult foods eaten by infants-children. *JAOAC Int* 76 : 492-507.
  10. Delatour P, Parish R, Gyueik RJ. 1981. Albendazole: a comparison of relay embryotoxicity with embryotoxicity of individual metabolites. *Ann Rech Vet* 12 : 159-167.
  11. U. S. Department of Administration. 1986. *General principles for evaluating the safety of compounds used in food-producing animals*. Washington, DC.
  12. U. S. Department of Agriculture. 1988. Compound evaluation and analytical capability national residue program plan. Food Safety and Inspection Service, Brown, J.(Ed), Washington, DC.
  13. U. S. Department of Administration, 1988. Fenbendazole. drugs for animal use Code of Federal Regulation. Title 21, Part 556 : 730.
  14. 농림수산부. 1994. FAO/WHO, 국제식품규격위원회, 축산식품 위생 지침 (동물약품 잔류, 식육위생) : 7.
  15. Long AR, Hsieh LC, Malbrough MS, et al. 1990. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in pork muscle tissue. *J Food Compos Ann* 3 : 20-26.
  16. Marti AM, Mooser AE, Koch H. 1990. Determination of benzimidazole anthelmintics in meat samples. *J Chromatogr* 498 : 145-157.
  17. Barker SA, Long AR, Hines ME. II. 1993. Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion. *J Chromatogr* 629 : 23-24.
  18. Barker SA, Long AR, Short CR. 1989. Isolation of drug residues from tissue by solid phase dispersion. *J Chromatogr* 475 : 353-361.
  19. Alton K, Patrick J, McGuire J. 1979. High-performance liquid chromatographic assay for the anthelmintic agent mebendazole in human plasma. *J Pharm Sci* 68 : 880-882.
  20. Watts MT, Raisys VA, Bauer JA. 1982. Determination of thiabendazole and 5-hydroxythiabendazole in human serum by fluorescence-detected high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 230 : 79-86.
  21. Bogan JA, Marriner S. 1980. Analysis of benzimidazoles in body fluids by high-performance liquid chromatography.



- J Pharm Sci* 69 (1980) 422-423.
22. Petz M. 1985. Chemical analysis of veterinary drugs in food. 1. General methods and gas chromatographic procedures. Review. *Z Lebensm Unters Forsch* 180(4) : 267-279.
23. Malisch R. 1986. Multimethod for the determination of residues of chemotherapeutic drugs, antiparasitic agents and growth promoters in foodstuffs of animal origin. 1. General procedure and determination of sulfonamides. *Z Lebensm Unters Forsch* 182(5) : 385-399.
24. Malisch R. 1986. Multi-method for determining residues of chemotherapeutics, antiparasitics and growth promoters in foods of animal origin. 2. Determination of nitrofurans and nicarbazin (dinitrocarbanilide components). *Z Lebensm Unters Forsch* 183(4) : 253-266.
25. Malisch R. 1987. Method for the simultaneous determination of residues of chemotherapeutic agents, antiparasitic agents and growth promoters in food of animal origin. 3. Determination of chloramphenicol and meticlorpindol. *Z Lebensm Unters Forsch* 184(6) : 467-477.
26. 강형주, 김문배, 이재봉 등. 2003. 식용란 중 벤지미다졸계 구충제 분석. *한국가축위생학회지* 26(2) : 157-162.