한국환경농학회지 제28권 제3호 (2009)
Korean Journal of Environmental Agriculture Vol. 28, No. 3, pp. 266-273

연구보문

MSPD와 HPLC를 이용한 돼지고기 및 광어 중의 테트라싸이클린계 항생제와 sulfonamide의 다성분 잔류분석법 개발

길근환 · 고광용[1),2)] · 이용재[3)] · 박혜진[4)] · 이규승[1)*]

농촌진흥청 국립농업과학원, [1)]충남대학교 농화학과, [2)]CJ 제일제당 식품안전센터 [3)]KT&G 중앙연구원,
[4)]사우스다코타 주립대학교 식품화학부

(2009년 7월 1일 접수, 2009년 9월 25일 수리)

Simultaneous Determination of Tetracyclines and Sulfonamides Residues in Pork and Flatfish Using Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) Extraction and HPLC

Geun-Hwan Gil, Kwang-Yong Ko[1),2)], Yong-Jae Lee[3)], Hye-Jin Park[4)], and Kyu-Seung Lee[1)*](National Academy of Agricultural Science, RDA, [1)]Dept. of Agriculture Chemistry, Chungnam National University, [2)]CJ Cheiljedang Food Safety Center, [3)]Central Research Institute, KT&G, [4)]Food Science Department South Dakota State University Brookings, SD 57007)

ABSTRACT: This study was conducted to develop more convenient simultaneous determination method by matrix solid phase dispersion (MSPD) and HPLC for sulfonamides such as sulfamerazine (SMR), sulfamethazine (SMT), sulfamonomethoxine (SMM), sulfadimethoxine (SDM), sulfaquinoxaline (SQX), and tetracyclines including oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) chlortetracycline (CTC) in prok and flatfish. The limits of detection were 0.047 ㎎·kg^{-1} for OTC, TC, SMR, SMT and SMM, and 0.033 ㎎·kg^{-1} for CTC, SDM, and SQX, respectively. So it is sufficiently possible to detect the eight tetracyclines and sulfonamides under their MRLs (0.1~0.2 mg·kg^{-1}). The average percentage recoveries of sulfonamides and tetracyclines from pig muscle and flatfish spiked standard solution were approximately 80.25~101.25% and 85.77~121.42%, respectively. Therefore this method was efficient for simultaneous analysis of eight tetracyclines and sulfonamides.

Key Words: tetracyclines, sulfonamides, pig muscle, flatfish, MSPD, HPLC

서 론

육류 및 어류의 소비량은 지속적으로 증가하여 축산업 및 양식업이 산업화되고 그 방법이 다양화되어 육류 및 어류의 대량공급이 행해지고 있는 실정이다. 이에 축산업과 양식업계에서는 질병 발생 시 치료뿐만이 아니라 예방의 목적과 가축 및 어류의 생장촉진을 목적으로 항생제 및 항균제가 사용되고 있다[1)]. 하지만 이들 화합물이 휴약기간을 지키지 않고 무분별하게 오용, 남용되면 육류 및 어류의 체내에 이행 잔류하여 최종소비자인 인체에 유해할 지도 모른다는 우려가 제기되고 있어 양축농가와 양어장 및 일반 소비자에 이르기까지 큰 관심의 대상이 되고 있다[2)]. 따라서 미국, 유럽연합을 비롯한 세계 모든 국가는 물론 국제식품규격위원회 (Codex alimentarius commission) 등에서 최대잔류허용기준을 설정하여 규제하고 있고 우리나라에서도 식품 중 84종의 동물의약품에 대하여 잔류허용기준을 설정하여 규제하고 있다[3)].

항균, 항생제 중 tetracycline계열의 항생제는 그람음성균, 그람양성균 및 마이코플라스마에 대하여 정균효과가 우수한 항생제로 가축에서는 장내세균 감염증, 호흡기 질병, 아나플라스마 감염증 및 타일레리아 감염증 등의 치료제로 사용될 뿐만 아니라 각종 질병을 예방하고 사료효율을 높이기 위한 사료첨가제로 매우 많이 사용되는 항생제이다[4-5)]. 특히 돼지, 닭, 소의 사료첨가제로써 많이 사용되는데, 그 소비가 많은 만큼 조직에 잔류할 가능성이 많기 때문에 소비자뿐만

*연락저자:
Tel: +82-42-821-6735 Fax: +82-42-822-5781
E-mail: kslee@cnu.ac.kr

아니라 공중보건담당자들에게도 지대한 관심거리이다. 또한 sulfonamide는 1932년 Domark에 의해 Prontosil을 개발한 후 각종 화합물이 계속 개발되어 가축의 세균성, 원충성 감염질환의 치료와 예방목적으로 널리 사용되어 왔으며 안정된 구조와 경제적인 면에서 탁월하여 다양한 형태로 시판되고 있다[2,5]. Sulfonamide는 가축에 경구투여 시 흡수가 빠르며 뇨의 pH와 밀접한 관계가 있어 돼지에서는 반추가축이나 말보다 배설되는 시간이 오래 걸리며 주로 비뇨기 계통으로 배설되는데 sulfonamide를 과량으로 장기간 투여할 경우 조직 내에 잔류할 가능성이 매우 높은 것으로 알려져 있다[6-7].

Tetracycline계열의 항생제 및 sulfonamide들을 비롯한 잔류항생물질 검사과정은 STOP(swab test on premises), CAST(calf antibiotics and sulfa test), FAST(fast antibiotics screen test), BBRT(brilliant black reduction test) 등의 미생물을 이용한 발육억제시험법과 TLB (thin layer chromatography & bioautography)법, 방사성동위원소를 이용하는 charmⅡ 시험법, 효소면역학적 방법 등을 적용하고 있으며 더욱 정밀한 정량을 위해 HPLC, LC-MS, LC-MS/MS GC, GC/MS를 이용한 기기분석법 등을 사용하고 있다. 미생물학적 검사법[8,9]이나 TLB법[9,10]은 특이성이 낮을 뿐만 아니라 검출감도도 낮으며 효소면역학적 방법과 방사성동위원소 수용체 시험법 (charmⅡ)[11]은 검출감도는 높으나 특이성이 낮으며 비특이 반응이 존재할 수 있다는 단점이 있다. 그래서 최근에는 개개의 항생제 및 화학적 특성이 비슷한 계열의 항생물질에 대한 정량분석을 위하여 특이성이 높은 HPLC나 GC, GC/MS를 이용한 기기분석법들이 많이 보고되고 있다. GC방법은 HPLC방법에 비하여 시료 전처리가 비교적 복잡하고 분석조건에 따라 각 화합물을 유도체화 하는데 장시간이 소요되기 때문에 대부분의 항생, 항균제의 동시분석 연구에서는 HPLC를 사용하고 있다[11].

MSPD (matrix solid phase dispersion) 방법은 lipophilic solid phase material(C_{18})을 조직 내로 분산시켜 시료의 표면적을 넓혀 전시료가 추출과정에 노출되도록 반건조 상태로 한 후 유기용매로 직접추출, 정제하는 방법으로 전처리 시 그 조작이 간단하며, 유기용매가 적게 들고 전처리 시간이 짧다는 장점이 있어 현재 sulfonamide와 tetracycline을 비롯하여 chlorsulfuron, furazolidone, benzimidazoles, chloramphenicol, organophosphates에 까지 응용되고 있다[12-14]. MSPD와 HPLC를 이용한 tetracycline계열의 항생제 및 sulfonamide들과 각각의 계열별 분석방법은 많이 보고되고 있으나 각 분석방법의 정량한계가 MRL과 같은 수준(돼지근육 중 총 tetracyclins 0.2 $mg{\cdot}kg^{-1}$, 총 sulfonamides 0.1 $mg{\cdot}kg^{-1}$)이거나 그 이상이고, 더욱이 회수율이 낮아 각 성분의 MRL수준까지 검출이 불가능할 수 있으므로 좀 더 낮은 수준의 정량한계와 높은 회수율을 갖는 분석방법이 요구되고 있다.[2,8,13,15-18] 또한 tetracycline계열의 항생제 및 sulfonamide들의 동시분석은 보고된 사례는 없다. Hah 등[2]은 MSPD와 HPLC를 이용하여 어류의 잔류 tetracycline계열 항생제 및 sulfonamide들의 동시분석을 실시하여 보고하였는데 MSPD를 이용한 균질화과정만 동일하고 sulfonamide들은 dichloromethane으로, tetracycline계열은 benzene과 methanolic oxalic acid로 용출한 후 서로 다른 조건의 HPLC로 각각 분석하였다.

본 연구는 Baker와 Walker[5]가 제시한 MSPD방법을 응용하여 가축 중 현재 국내에서 소비량이 가장 많고, 지방의 함량이 비교적 높은 돼지고기와, 회로 가장 많이 소비되고 있는 광어 중 잔류 가능성이 높은 oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) 및 chlortetracycline (CTC)를 포함한 3종의 tetracycline계열 항생제와 sulfamerazine (SMR), sulfamethazine (SMT), sulfamonomethoxine (SMM), sulfadimethoxine (SDM), sulfaquinoxaline (SQX)을 포함한 5종의 sulfonamide들을 MSPD와 HPLC를 이용한 정량분석법을 확립하고 현행 분석방법의 문제점도 보완하여 보다 낮은 검출한계와 높은 회수율을 얻을 수 있는 효율적인 축산물 및 수산물 중 tetracycline계 항생제와 sulfonamide들의 동시분석방법을 확립하고자하였다.

재료 및 방법

시료조제 및 보관

실험에 사용된 돼지고기는 대전광역시 대형마트에서, 광어는 대전광역시 노은동 노은농수산물 도매시장에서 유통 판매되는 것을 구입하여 냉장상태로 실험실에 운반하고 지방부분을 제거한 근육만을 균질화 한 후 각각 3 g으로 칭량하여 polyethylene bag에 밀봉한 후 -20℃ 상태로 보관하며 사용하였다.

표준품 및 시약

실험에 사용한 표준품은 OTC, TC, CTC 등 tetracycline계 항생제 3종과 SMR, SMT, SMM, SDM, SQX 등 sulfonamide들 5종을 Sigma-Aldrich 사(U.S.A.)의 제품을 직접 구매하여 사용하였고, 실험에 사용한 항생, 항균제들의 특성은 Table 1과 같다.

돼지고기 및 광어 중 잔류항생제의 분석

시료 3 g에 petroleum ether 20 mL를 넣고 homogenizer로 균질화시킨 다음 20분간 원심분리한 후 상징액(petroleum ether)을 분리하여 버렸다. 위의 작업을 2번 더 반복하여 지방을 제거한 후 잔류물에 C_{18} 분말 3 g과 NaOH와 EDTA를 각각 0.1 g씩 유발에 넣고 유봉으로 균질화하였다. Frit를 주사기 밑에 밀착시켜 넣고 균질화시킨 시료 전량을 조심스럽게 옮긴 후 다시 그 위에 frit을 올려놓고 피스톤을 이용하여 부피가 최소가 되도록 압착시킨 다음 여기에 15

Table 1. Physicochemical properties and MRLs of veterinary medicines used in this experiment

Antibiotics	M.W.[1]	M.P.[2] (℃)	LD_{50} ($mg \cdot kg^{-1}$)	Solubility	MRLs[3] in pig muscle ($mg \cdot kg^{-1}$)
Oxytetracycline	460.44	181−182		water 500 $g \cdot L^{-1}$ methanol 22 $g \cdot L^{-1}$	0.2[4]
Tetracycline	444.43	170−175	807	water 400 $mg \cdot L^{-1}$, methanol 20 $g \cdot L^{-1}$	0.2[4]
Chlortetrcycline	478.85		10300		0.2[4]
Sulfamerazine	264.30	234−238		water 1700 $mg \cdot L^{-1}$ (37℃, pH7.5),	0.1[5]
Sulfamethazine	278.33	197−200	1776	water 1920 $mg \cdot L^{-1}$ (37℃, pH7)	0.1[5]
Sulfamonomethoxine	298.32	204−206	3662		0.1[5]
Sulfadimethoxine	310.33	201−203	10000	water(mg·100 mL^{-1} : 37℃) 4.6 (pH 4.1), 29.5 (pH 6.7), 58.0 (pH 7.06), 5170 (pH 8.71)	0.1[5]
Sulfaquinoxaline	300.33	247−248		water 7.5 $mg \cdot L^{-1}$ (pH7), methanol 730 $mg \cdot L^{-1}$, 4300$mg \cdot L^{-1}$	0.1[5]

[1] M.W. : Molecular Weight
[2] M.P. : Melting Point
[3] MRLs : Maximum Residue Limits
[4] A sum of tetracyclins : oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline
[5] A sum of sulfonamides : sulfachlorpyridazine, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamethoxypyridazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfadimidine, sulfamethoxazole, sulfamonomethoxine, sulfathiazole, sulfaquinoxaline, sulfadoxine, sulfapenazole, sulfisoxazole, sulfaxhlorpyrazine, sulfaclozine

Table 2. Instrument operating conditions of HPLC for tetracyclines and sulfonamides

Instrument	Agilent 1100 Series			
Column	Symmetry RP−C_{18} (Waters)			
Detector	UV/DAD			
Wavelength	270 nm (sulfonamides), 360 nm (tetracyclines)			
Mobile phase	Time (min)	0.005M oxalic acid (pH 4.5)	0.005M oxalic acid (pH 6.1)	Acetonitrile
	0~15	78.5%	0.0%	21.5%
	15~30	0.0%	81.0%	19.0%
Injection volume	: 10 μL			
Flow rate	: 0.78 mL/min			

mL의 n−hexane을 흘려보내 중력 하에서 지방을 제거하고 진공매니폴드로 옮겨 감압하에 남아있는 n−hexane을 완전히 제거하였다. 여기에 dichloromethane 20 mL를 용출시켜 받고 이어서 methanol 20 mL를 용출시켜 받은 후 용출액을 35℃에서 감압농축한 다음 2 mL methanol로 용해시킨 후 0℃ 이하에서 원심분리 시켜 상징액을 0.45 μm필터로 여과하여 10 μL를 HPLC에 주입하였다. 대상 항생제의 분석조건은 Table 2와 같다.

결과 및 고찰

HPLC 분석조건의 설정

일반적인 sulfonamide의 최적 분석파장은 약 247~272 nm이고[16], tetracycline계열의 항생제는 270~370 nm인 것으로 알려져 있다[17]. Park 등[13]은 UV 220 ~ 360 nm의 파장으로 각각의 tetracycline계 항생제를 scanning한 결과 TC 및 OTC는 266 nm, CTC는 360nm에서 최대흡광도를 나타내었고, Jung 등[19]은 UV 190 ~ 380 nm에서 각각의

sulfonamide들을 scanning한 결과 SMR 265 nm, SMT 266 nm, SMM 273 nm, SDM 270 nm, SQX 248 nm에서 최대흡광도를 나타내었다고 보고하였다. 또한 Hah 등[2)]은 272 nm에서 tetracycline계 항생물질과 sulfonamide들을 각각 분석을 한 보고가 있으나 tetracycline계 항생물질 중 최대흡수파장이 360 nm인 CTC의 회수율이 30.01~37.12%로 매우 저조하게 나타났다. 그러므로 동일한 파장에서 OTC, TC, CTC, SMR, SMT, SMM, SDM 및 SQX를 동시에 분석할 수 없어 OTC, TC, CTC 3종은 식품공전 및 AOAC에 제시되어 있는 테트라싸이클린계열 항생물질 동시분석 파장인 360 nm에서, SMR, SMT, SMM, SDM, SQX는 AOAC에 제시되어있는 sulfonamide 동시분석 파장인 270 nm에서 UV/DAD를 이용하여 8가지 성분을 동시분석하였다[3,20)].

Tetracycline계열 항생제와 sulfonamide들의 분석에 널리 사용되고 있는 이동상은 methanol과 acetonitrile이고, 완충용액으로는 tetracycline계열의 항생물질은 oxalic acid[13)], sulfonamide는 oxalic acid[21)], phosphoric acid[22)] 등이 주로 사용되고 있는데, 유기용매와 완충용액의 비율은 분석하고자하는 물질의 종류와 특성에 따라 각각 달리하고 있다. Jnug 등[19)]은 HPLC를 이용한 합성항균제의 동시분석 시 SMR, SMT, SMM, SDM, SQX 가 이동상의 pH에 따라 각 성분의 머무름 시간이 달라지는 것을 보고한 바 있고, Lu와 Jiang[23)]도 HPLC를 이용한 tetracycline계열 항생물질의 동시분석 시 sulfonamide들과 마찬가지로 OTC, TC, CTC가 이동상의 pH에 따라 각 성분의 머무름 시간이 달라지는 것을 보고한 바 있다. HPLC를 이용한 tetracycline계 항생제와 sulfonamide들의 동시분석에 있어서 이동상의 pH가 각 성분의 분리도에 큰 영향을 끼칠 수 있다.

따라서 본 실험에서는 pH변화에 따른 이동상 용매들의 피크분리 양상과 8가지 항생, 항균제들의 동시분석 시 적절한 피크분리를 유도하기 위하여 예비실험을 거쳐 분리도가 비교적 좋은 0.005 M oxalic acid : acetonitrile(79:21, v/v)의 이동상을 선정한 다음 각 항생제 및 항균제 표준용액 5 $mg{\cdot}L^{-1}$로 완충용액의 pH 변화에 따른 머무름 시간의 양상을 조사하였다. Oxalic acid 완충용액에 0.1N NaOH용액 또는 0.1N HCl용액을 사용하여 인위적으로 pH를 조절하여 pH 변화에 따른 각 항생, 항균제의 피크분리양상과 머무름 시간의 변화를 알아본 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 농도가 중성에 가까울수록 대부분 성분들의 머무름 시간이 조금씩 길어졌고, SDM과 SQX만이 완충액의 pH가 5일 때를 기준으로 머무름 시간이 급속히 짧아졌다. 그리고 8가지 성분의 검출 순서는 실험을 실시한 거의 대부분의 pH에서 OTC, TC, SMR, SMT, SMM, CTC, SDM, SQX의 순으로 나타났으며 TC와 SMR, SDM과 SQX를 제외하고는 비교적 좋은 분리양상을 보였다. TC와 SMR은 pH 4.5를 제외한 모든 pH에서 서로 분리가 이루어지지 않았고, SDM과 SQX의 경우 pH에 따라 두성분간의 머무름 시간에서는 차이를 보였으나 피크가 많이 늘어지는 양상을 보여 완벽하게 분리되지 않았으나 pH 6.1에서는 SQX가 SDM보다 먼저 검출되면서 가장 좋은 분리를 보였고 이 둘의 머무름 시간이 17분 안쪽으로 단축되었다.

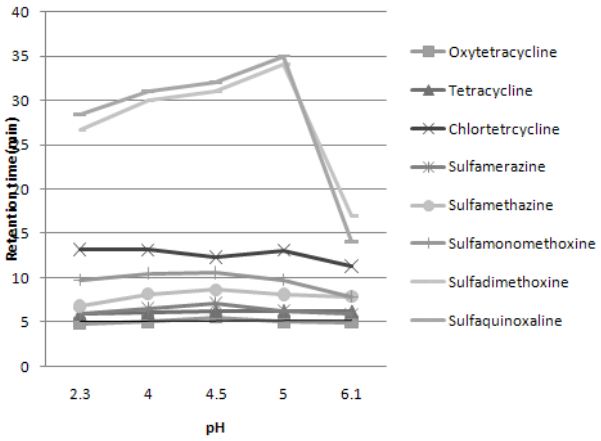

Fig. 1. Variation of retention time of tetracyclines and sulfonamides according to different pHs of mobile phase.

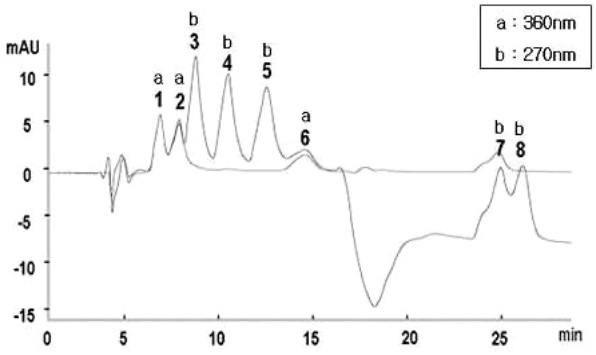

Fig. 2. Typical HPLC/DAD chromatogram of 10ng tetracyclines and sulfonamides standards on conditions of Table 2.
1. oxytetracycline (OTC), 2. tetracycline (TC),
3. sulfamerazine (SMR), 4. sulfamethazine (SMT),
5. sulfamonomethoxine (SMM), 6. chlortetracycline (CTC),
7. sulfaquinoxaline (SQX), 8. sulfadimethoxine (SDM)

이러한 결과를 바탕으로 TC와 SMR이 분리되는 시점까지는 pH 4.5의 0.005 M oxalic acid 완충용액으로 분석하고 SDM과 SQX를 분리하기 위하여 pH 6.1의 0.005 M oxalic acid 완충용액으로 분석을 실시하였다. 위의 실험을 거쳐 설정한 이동상 용매와 분석조건은 Table 2에 나타내었다. 이 조건에서 8가지 항생, 항균제 혼합표준액 각각의 머무름시간은 OTC는 6.0분, TC는 7.0분, SMR은 7.8분, SMT는 9.5분, SMM은 11.5분, CTC는 13.8분, SQX는 23.8분, SDM은 25.1분으로 Fig. 2의 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

MSPD방법을 이용한 시료의 전처리

Reimer와 Suarez[24]는 연어육에서 MSPD방법을 이용하여 sulfonamide분석 실험을 실시한 결과 회수율이 66~82%로 본 실험의 결과보다 낮은 것으로 나타났는데, Reimer와 Suarez는 연어에서 회수율이 낮은 원인으로 콜레스테롤과 지방함량이 비교적 높기 때문이라고 하였다. 또한 Hah 등[2]은 MSPD방법을 이용한 어류 중 잔류 설파제의 분석 시 hexane을 통한 유출과정에서 지방이 제거되었기 때문에 회수율이 좋아졌다는 보고를 하였다. MSPD방법은 시료량이 0.5 g 이하로 제한이 된다는 단점을 가지고 있는데, 그 이유 중 시료에 포함되어있는 지방이 큰 비중을 차지한다[17]. 실제로 MSPD방법을 이용하여 분석하였을 때 최종적으로 조제된 분석시료에도 상당량의 지방이 남아있는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 이 지방은 HPLC를 이용한 분석 시 피크의 분리도에 큰 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 그러므로 MSPD방법을 이용한 tetracycline계 항생제와 sulfonamide의 추출 시 지방의 제거는 시료량의 증가와 동시에 정확하고 효율적인 분석에 중요한 요인이라 할 수 있다. 지방제거를 위하여 시료의 균질화 전에 petroleum ether를 이용하여 0℃에서 원심분리하여 돼지고기 및 광어 중 지방을 제거하였고, 용출과정에서 hexane을 이용하여 다시 한번 지방을 제거하고 기기분석 전에 0℃에서 원심분리하여 지방을 제거하였다. 그 결과 효과적으로 지방을 제거할 수 있었으며 이전의 0.5 g으로 제한된 시료량도 3 g으로 늘릴 수 있었다. 한편 Baker와 Long[25]과 Long 등[22]은 각각 우유와 어육에서 tetracycline계 항생제와 OTC 분석과정 중 EDTA와 oxalic acid를 전처리과정에 첨가하였을 때 회수율이 높아진다고 하였고, Kang 등[4]은 시료 0.5 g에 EDTA와 oxalic acid를 0.05 g씩 넣어 균질화시켜 추출한 결과 최소한 3배 이상의 회수율의 증가를 나타냈다고 보고하였기에 본 실험에서는 시료량이 0.5 g에서 3 g으로 증가한 것을 감안하여 EDTA와 oxalic acid를 0.1 g씩 넣어 균질화한 후 추출하였다.

Tetracycline계 항생제와 sulfonamide들은 물리화학적 특성이 서로 다르기 때문에 동물근육 중의 잔류된 tetracycline계 항생제와 sulfonamide들을 시료로부터 완전히 회수할 수 있는 추출용매와 세정용매의 선택이 무엇보다 중요하다[19]. Park 등[13]은 sulfonamide의 추출 시 0.5 g의 돼지고기 시료에 대하여 n-hexane 8 mL로 세척하고 ethyl acetate: dichloromethane (1:3, v/v)으로 용출하여 분석한 결과 SMR은 84.7~94.9%, SMT는 87.6~93.6%, SMM은 85.1~96.2%, SDM은 90.1~94.8%, SQX는 83.0~92.8%로 모두 80%이상의 회수율을 보고하였다. Hah 등[2]은 sulfonamide들의 추출 시 0.5 g의 연어시료에 대하여 n-hexane 10 mL로 세척하고 dichloromethane 10 mL로 용출하여 분석한 결과 SMR은 81.46~93.90%, SMT는 82.13~92.23%, SMM은 81.16~94.16%, SDM은 80.86~96.52%, SQX는 82.49~95.21%로 이 역시 모두 80%이상의 회수율을 보고하였다. 그리고 Hah 등[2]은 테트라싸이클린 계열 항생제의 추출 시 0.5 g의 연어시료에 대하여 n-hexane 10 mL로 세척하고 benzene 10 mL와 methanolic oxalic acid 10 mL로 용출하여 분석한 결과 OTC의 회수율은 65.89~73.40%, TC의 회수율은 51.43~53.25%, CTC의 회수율은 30.01~37.12%로 보고하였으며, Kang 등[4]은 tetracycline 계열 항생제의 추출 시 0.5 g의 돼지고기 시료에 대하여 n-hexane 8 mL로 세척하고 methanol 8 mL와 0.01 M metanolic oxalic acid 8 mL로 각각 용출시켜 분석한 결과 methanol로 용출시켰을 경우 OTC의 회수율은 93.59~97.78%, TC의 회수율은 75.47~78.44%, CTC의 회수율은 72.77~80.95%로 보고하였고, 0.01 M metanolic oxalic acid로 용출시켰을 경우 OTC의 회수율은 103.73~104.54%, TC의 회수율은 62.28~66.79%, CTC의 회수율은 72.02~81.57%를 보인 것으로 보고하여 Hah 등[2]이 보고한 것보다 높은 회수율을 보여 tetracycline계열의 항생제 분석의 세정 및 용출시 n-hexane으로 지방을 제거한 후 methanol 및 methanolic oxalic acid로 용출하여 분석하는 것이 효율적이라 판단하였다. 그래서 시료의 증가와 8가지 성분의 특성을 고려하여 n-hexane 10 mL로 지방을 제거한 후 dichloromethane 20 mL와 methanol 20 mL로 연속적으로 용출한 결과 sulfonamide의 회수율은 80.25~101.25%, tetracycline계 항생물질의 회수율은 85.77~121.42%였다.

분석법의 검출한계 및 회수율

잔류항생제의 농도를 정량하기 위하여 OTC와 TC는 0.05~5.0 $mg{\cdot}L^{-1}$, sulfonamide들과 CTC는 0.07~7 $mg{\cdot}L^{-1}$의 표준용액을 조제하여 검량선을 작성한 결과 r^2값은 OTC 0.9997, TC 0.9997, CTC 0.9998, SMR 0.9990, SMT 0.9999, SMM 1.0000, SDM 0.9998, SQX 0.9990의 직선성을 나타내었으며, 각 표준 항생, 항균제의 기기상의 최소검출량은 OTC 0.5, TC 0.5, CTC 0.7, SMR 0.5, SMT 0.5, SMM 0.5, SDM 0.7, SQX 0.7 ng 으로, 각 방법에 따른 검출한계 및 정량한계를 Table 3에 나타내었다. 8가지 성분의 검출한계는 0.033~0.047 $\mu g{\cdot}mL^{-1}$로 8가지 성분의 MRLs (Maximum Residue Levels) 인 0.1~0.2 $mg{\cdot}kg^{-1}$ 수준의 분석에 적합한 것으로 판단된다.

항생제가 잔류하지 않은 무처리 시료 3 g에 1 $mg{\cdot}kg^{-1}$ 및 5 $mg{\cdot}kg^{-1}$이 되도록 8종의 항생, 항균제 혼합표준용액을 첨가하고 회수율 검사를 실시하였다. 돼지고기 1 $mg{\cdot}kg^{-1}$에서 sulfonamide가 80.25~90.32%, tetracycline계 항생물질이 85.77~111.36%로 나타났고 5 $mg{\cdot}kg^{-1}$에서 sulfonamide들은 81.86~94.21%, 테트라싸이클린계 항생물질은 87.69~120.60%로 나타나 모두 80% 이상의 회수율을 보였다. 광어에서의 회수율은 1 $mg{\cdot}kg^{-1}$에서 sulfonamide들이 82.99~97.28%였고, tetracycline계 항생물질이 87.43~119.55%로 나타났고 5 $mg{\cdot}kg^{-1}$에서 sulfonamide는 83.56~101.28%였고, tetracy-

Table 3. Limit of detection of the analytical methods of tetracyclines and sulfonamides

Sulfonamides & Tetracyclines	OTC[1)]	TC[2)]	CTC[3)]	SMR[4)]	SMT[5)]	SMM[6)]	SDM[7)]	SQX[8)]
LOQ* (ng)	0.5	0.5	0.7	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7
LOD**(mg·kg^{-1})	0.033	0.033	0.047	0.033	0.033	0.033	0.047	0.047

* LOQ : limit of quantitation ** LOD : limit of detection
1) oxytetracycline (OTC), 2) tetracycline (TC), 3) chlortetracycline (CTC), 4) sulfamerazine (SMR), 5) sulfamethazine (SMT), 6) sulfamonomethoxine (SMM), 7) sulfadimethoxine (SDM), 8) sulfaquinoxaline (SQX)

Table 4. Recoveries of tetracyclines and sulfonamides residues in Pig muscle and flat fish

Sulfonamides & Tetracyclines	Spiked conc. (mg·kg^{-1})	Recovery (%)	
		Pig muscle	Flat fish
		(Ave.±S.D.)	(Ave.±S.D.)
Oxytetracycline	1.0	111.36±2.05	119.55±3.12
	5.0	120.60±1.67	121.42±2.56
Tetracycline	1.0	85.77±3.26	87.43±4.22
	5.0	87.69±3.72	91.35±3.56
Chlortetrcycline	1.0	90.27±3.95	90.52±3.44
	5.0	92.55±2.55	94.70±2.25
Sulfamerazine	1.0	87.22±2.12	97.28±6.22
	5.0	88.34±3.22	101.28±2.53
Sulfamethazine	1.0	90.32±3.55	94.15±1.06
	5.0	92.11±2.42	96.15±1.00
Sulfamonomethoxine	1.0	80.25±2.82	95.97±1.89
	5.0	94.21±3.24	98.21±2.05
Sulfadimethoxine	1.0	82.44±3.66	85.18±2.65
	5.0	85.11±3.54	86.24±1.85
Sulfaquinoxaline	1.0	81.46±3.25	82.99±2.78
	5.0	81.86±2.55	83.56±4.12

cline계 항생물질은 91.35~121.42%로 나타나 모두 80 % 이상의 회수율을 보였다. 저농도(1 mg·kg^{-1})보다 고농도(5 mg·kg^{-1})에서 회수율이 높았고, 돼지고기보다 광어가 회수율이 높았는데, 이는 돼지고기가 광어보다 지방이 비교적 많아 추출 시 방해요인으로 작용했기 때문으로 생각된다[24)].

요 약

HPLC를 이용한 분석은 항균, 항생제의 정량분석에 있어 가장 널리 이용되고 있으며, 최근에 개발된 MSPD방법은 고정상을 직접 갈아서 추출, 정제하는 방법으로 전처리 시 그 조작이 간단하며, 유기용매가 적게 들고 전처리 시간이 짧다는 장점이 있다. 본 연구는 HPLC와 MSPD방법을 이용하여 가축 중 소비량이 가장 많은 돼지고기와 생선 중 회로 가장 많이 소비되는 광어에 대하여, 식품 중 잔류 가능성이 높은 tetracycline계 항생제 3종(oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline)과 sulfonamide(sulfadimethoxine, sulfamerazine, sulfamethazine, slfaquinoxaline, sulfamonomethoxine) 5종의 동시분석방법을 개발코자 하였다. HPLC의 최적 분석조건으로 파장은 tetracycline계 항생물질은 360 nm에서 sulfonamide는 270 nm였으며, 이동상은 TC와 SMR이 분리되는 시점인 15분까지는 pH 4.5, oxalic acid : acetonitrile (78.5 : 21.5, v/v)로 분석하고 이후 30분까지는 pH 6.1, oxalic acid : acetonitrile (78.5 : 21.5, v/v)로 분석을 실시하였을 때 기존의 실험방법보다 피크의 분리도와 검출한계의 개선이 이루어졌으며 이를 토대로 8가지 성분의 MRLs인 0.1~0.2 mg·kg^{-1}까지 충분히 분석이 가능하였다. MSPD 적용을 위한 시료의 전처리 방법개선은 기존의 0.5 g으로 제한된 시료량을 3 g으로 늘릴 수 있었고 dichloromethane 20 mL와 methanol 20 mL로 연속적으로 8가지 성분을 동시에 용출시켜 sulfonamide는 80.25~101.25%, tetracycline계 항생물질은 85.77~121.42%의 회수율을 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Heo, G. J., Shin, K. S. and Lee, M. H. (1992) Diseases of aquaculture animals and prevention of drug residues, *Kor. J. Food Hygiene* 7(2, 3), 7−9.
2. Hah, D. S., Kim, J. S. and Kim, G. S. (1997) Simultaneous quantification of sulfonamide and tetracyclines in fish muscle tissue by matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and HPLC, *J. Fd. Hyg. safety* 12(2), 117−124.
3. KFDA (2008), Korea food code, Attached table 7.1−7.19, pp. 807−809.
4. Kang, H. G., Son, S. W., Cho, B. H., Lee, H. S., Park, S. J., Kim, J. H. and Cho, M. H. (1996) Multiresidue matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and HPLC determination of tetracyclines in animal muscle tissue, *Korean J. Vet. Res.* 36(3), 541−550.
5. Baker, S. A. and Walker, C. C. (1992) Chromatographic methods for tetracycline analysis in food, *J. Chrom.* 624, 195−209.
6. Bevill, R. F., Sharma, R. M., Meachum, S. H., Wozniak, S. C., Bourne, D. W. A. and Ditert, L. W. (1977) Disposition of sulfonamides in food producing animals : Concentrations of sulfamethazine and its metabolites in plasma, urine and tissues of lambs following intravenous administration, *Am. J. Vet. Res.* 38, 973−977.
7. Blood, D. C., Henderson, J. A. and Radostitis, O. M. (1979) Verterinary medicine 5th ed., Cassel Ltd., London, U.K., pp. 87−90.
8. Tsai, C. E. and Kondo, F. (1994) Simple continuous and simultaneous determination of tetracycline residue, *Research in Vet. Science* 56, 277−283.
9. Ryu, J. C., Song, Y. S., Park, J. S., Chang, J. S. and Jinbo, K. (1993) A study on the determination of residual antibiotics and synthetic antibacterial agents in meat (1)− microbiological assay, *Kor. J. Food Hygiene* 8(1), 1−8.
10. Yoshimura, H., Osawa, N. and Sugimori, T. (1991) Residues of doxycycline and oxytetracycline in eggs after medication via drinking water to laying hen, *Food Addit. Contam.* 8, 65−69.
11. Horwits, W. (1981) Review of analytical method for sulfonamides analytical methods for sulfonamides in food and feeds, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64(1), 104−130.
12. Long, A. R., Hsieh, L. C., Malbrough, M. S., Short C. R. and Baker, S. A. (1990) Matrix solid phase dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline, chlorotetracycline in milk, *J. Assoc. Off. Ana. Chem.* 73(3), 379−384.
13. Park, J. M., Namgoong, S., Lee, M. H., Cho, T. H., Lee, K. J. and Jin, N. S. (1993) Simultaneous determination of tetracyclines in beef, pork and chicken by high performance liquid chromatography using matrix solid phase dispersion extraction, *Kor. J. Vet. Publ. Health.* 17(3), 321−328.
14. Baker, S. A., Long, A. R. and Short, C. R. (1989) Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, *J. Chrom.* 475, 353−36.
15. Austin, R. L. (1991) Matrix solid phase dispersion and gas chromatographic screening of nine chlorinated pesticides in beef fat, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74(3), 493−496.
16. Smedley M. D. and Weber J. D. (1990) Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73(6), 875−879.
17. Onji, Y., Uno, M. and Tanigawa, K. (1984) Liquid chromatographic determination of tetracycline residues in meat and fish, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67(6), 1135−1137.
18. Oka, H., Ikai, Y. and Hayakawa, J. (1994) Improvement of chemical analysis of antibiotics, part XIX, chromatography and thin layer chromatography / fast atom bombardment mass spectrophotometry, *J. Agri. Food Chem.* 42, 615−622.
19. Jung, K. S., Chae, M. S., Kim, C. D. and Kim, J. B. (1993) Simultaneous determination of residual synthetic antimicrobials in animal muscles by high performance liquid chromatography, *Kor. J. Food Hygiene* 8(1), 25−35.
20. AOAC 18th edition (2005), Official methods of analysis of AOAC international Vol. 1, Chapter 23, pp. 18−19.
21. Horie, M., Saito, H., Hosinno, Y., Nose, H., Nakajawa, H. and Yamane, Y. (1991) Simultaneous determination of residual synthetic antibacterials in fish by high performance liquid chromatography, *J. Chrom.* 538, 484−491.
22. Long, A. R., Hsieh, L .C., Malbrough, M. S., Short, C. R. and Baker, S. A. (1990) Multiresidue

method for the determination of sulfonamides in pork tissue, *J. Agric. Food Chem.* 38(2), 423-426.
23. Lu, H. T. and Jiang, Y. (2004) Simultaneous determination of oxytetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline in tetracycline antibiotics by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Chromatographia* 60(5-6), 259-264.
24. Reimer, G. J. and Suarez, A. (1992) Liquid chromatographic confirmatory method for five sulfonamides in salmon muscle tissue by matrix solid-phase dispersion, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 75(6), 979-981.
25. Baker, S. A. and Long, A. R. (1994) Preparation of milk sample for immunoassay and liquid chromatographic screening using MSPD, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 77, 848-854.
26. Booth, N. H. and Mcdonald, L. E. (1988) Drug and chemical residues in edible tissues of animals : Verterinary pharmacology and therapeutics 6th ed., Iowa State University, Iowa, United States of Ametica, pp. 1149-1201.
27. Long, A. R., Hsieh, L. C. and Baker S. A. (1990) Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline in catfish muscle tissue, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73, 864-867.
28. Park, J. J., Lee, K. C. and Koh, H. B. (1994) A study on the sulfonamide residues in bovin, swine, chicken by high performance liquid chromatography, *Kor. J. Vet. Publ. Health.* 18(4), 317-326.