

경기남부지역 원유중의 설파제 잔류조사

김창수·이성권·고태오·고신일
경기도가축위생시험소남부지소

Determination of Sulfonamide Residues in Raw Milk from southern Kyeonggi Area

Chang-Soo Kim, Sung-Kwon Lee, Tae-Oh Ko, Sin-Il Ko
South Branch of Kyeonggi Veterinary Service Laboratory

Abstract

Sulfonamides are widely used to treat mastitis of cattle in field. The study was carried out to analyze sulfonamid residues in raw milk from south Kyeonggi area.

The milk sample was deproteinated with acetone and defatted with hexane.

The residual sulfonamides were extracted with ethylacetate, concentrated under vaccum, reconstituted with the acetate buffer-methanol mixture, reacted with fluorescamine, and then analyzed by HPLC-fluorescence detector(EX. 395nm, Em. 495nm) with methanol : acetate buffer system(3/2, v/v) as a mobile phase.

The results analyzed by Thin layer chromatography and High performance liquid chromatography were summarized as follows.

1. A total of 24 cases out of 478 raw milk samples(5.0%) collected during April and May showed positive reaction to sulfonamide residues. Among 24 positive reactors, 9 cases were positive to sulfanilamides(32.1%), 8 cases were positive to sulfathiazoles(28.6%) and 5 cases were positive to sulfamonomethoxines(7.9%), respectively.
2. During July and August, 31 cases out of 464 raw milk samples(6.7%) showed positive reaction to sulfonamide residues. Among them 5 cases were positive to sulfanilamides, 5 cases sulfathiazoles and 5 cases sulfamonomethoxines(16.1%), respectively.

Key Word : Sulfonamides, TLC & HPLC, Field raw milk

서 론

우유는 영양학적으로 완전한 식품으로서의 가치는 물론, 건강식품으로서도 그 가치가 널리 인정되고 있지만, 그 어느식품보다도 변패하기 쉽고 흔히 사람에게 여러가지 인수공통전염병을 옮기는 구실을 함으로써 우유위생의 중요성이 강조되어 왔을 뿐만 아니라, 질병의 예방 및 치료와 생산성 향상을 목적으로 첨가되는 항균성물질의 우유중 잔류문제 또한 공중보건학상 중요한 관심사로 대두되어 왔다.

설파제는 세균감염의 예방 및 치료에 사용된 최초의 항균물질로서 1908년 Gelmo가 처음 Sulfanilamide를 발견한 이래 5,400여종이 합성되어 그중 일부가 가축의 임상용이나 성장촉진목적으로 널리 사용되어 왔는데, 적소의 경우 전신감염증이나 유방염치료제로 사용되고 있으며 일반적으로 투여경로와 무관하게 체조직 전반에 널리 분포하여 대부분이 오줌으로 배출되지만 유즙으로도 비교적 높은 농도가 배출된다. 우유중 잔류하는 설파제는 내성균을 발현할 수 있고, 체내에서 각종 효소를 유도, 생리기능의 변화를 유발할 수 있다.¹⁾ 또한 설파제를 남용하였을 경우 신장, 조혈장기, 감상선기능, 면역계등에 이상을 일으킬 수 있다.^{2~4)}

이에따라 전세계적으로 우유중 잔류하는 설파제의 규제를 강화하고 있으나 국내에서는 아직 잔류허용 기준이 고시되어 있지 않다. 합성항균제인 설파제는 지금 시행되고 있는 우유중 세균발육억제물질 검사법인 TTC법⁵⁾으로는 감수성이 떨어지는 단점이 있어 최근 새로운 TTC법을 개발하여 사용할 예정이다. 특히 우유중에 잔류하는 설파제의 경우, TTC법에서 10ppm의 농도까지도 검출되지 않기 때문에 양축농가에서 무분별 사용하는 경향이 있어 하루 빨리 검사방법의 개

선이 요구되고 있다.⁶⁾

우유를 포함한 축산물중 잔류설파제의 분석방법으로는 비색법, TLC법, HPLC법, GC법, GC/MS법 등의 방법이 이용되고 있는데 본 실험에서는 양축농가에서 가장 많이 사용되고 있는 설파제에 대하여 사용정도 및 빈도를 알아보기 위하여 경기남부지역에서 생산되는 우유중 세균발육억제물질검사(TTC)⁷⁾에서 불합격 처리된 우유를 주대상으로 설파제의 잔류정도를 TLC법^{8~10)}으로 간이 검사한 후 HPLC법으로 정량분석하여 양축농가에 대한 적절한 규제 및 계동을 위한 자료로 활용코자 본실험을 실시하였다.

재료 및 방법

• 공시재료

경기 남부지역(송탄, 안성, 평택, 용인)에서 생산되는 원유를 '93. 4, 5월 5주간 478개, 7, 8월 5주동안 464개를 시료로 채취하여 바로 TLC로 검사하였고, 양성 시료에 한하여 냉장고에 보관하면서 HPLC로 정량 분석하였다.

Thin layer chromatography(TLC법)

가) 기구 및 시약

- A. Fluorescamine in acetone and spray pump
- B. Methanol, acetic acid and ethylacetate(특급)
- C. TLC plate
- D. Sulfonamide standards
- E. Dryer and UV lamp box
- F. Chromatography tank

나) 시험방법

- A. 원심관에 우유 5ml를 취하고 aceton 5ml을 가한 다음 Vortex mixer로 잘 혼합하여 약 5분간 원심분리 시킨다.(2,000R.P.M)

- B. 상층액을 시험관에 옮기고 ethylacetate 3ml를 가한 다음 격렬하게 섞은 후 정치시킨다.
- C. 분리된 상층액 40ul를 TLC plate에 점적시킨다.
- D. 1차 Methanol에 전개 시키고 2차로 Ethylacetate(9) : Acetic acid(1)에 전개시킨다.
- E. Fluorescamine을 분무하고 관찰한다.
- F. Low standard는 0.05ppm, High standard는 0.2ppm을 사용하였다.

High performance liquid chromatography(HPLC법)

TLC검사에서 양성으로 판정된 4, 5월의 24건과 6, 7월의 31건을 대상으로 실시하였다.

가) 장 치

- A. HPLC system(WATERS)-Solvent delivery system(Model 6,000A), Data module(Model 720), Fluorescence detector(Model 420), u Bondapak C18 column.

나) 시 약

- A. Fluorescamine(SIGMA)
- B. Glacial acetic acid(AR grade)

- C. Sodium acetate, Methanol(LC grade)
- D. Acetone, Ethylacetate, Hexane(GR grade)
- E. Sulfonamide(sulfamethazine 외 12종, SIGMA)

다) 시료분석

15ml centrifugal tube에 2ml의 원유를 취하고 여기에 acetone 2.5ml을 가한 다음 잘 혼합하여 약 5분 정치한 후 800g에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거하고 상층액을 다른 15ml tube에 옮긴 다음 hexane 3ml을 가하고 잘 혼합하여 400g에서 원심분리 하였다.

위의 hexane층을 제거하고 ethyl acetate 3ml 가한 후 잘 혼합하여 400g에서 원심분리하여 설파제를 추출하였다. 분리된 ethylacetate층을 50도에서 농축시키고, 여기에 fluorescamine 100ul을 가한 후 암소에서 1시간 반응 시킨 후 HPLC에 주입하였다.

결 과

4, 5월에 주별로 원유를 총 478개를 채취하여 TLC로 검사한 결과 표 1과 같았다.

Table 1. Positive reactions of sulfonamide residues in raw milk detected by using thin layer chromatography.

Months/Weeks	No. of samples	No. of positive reactors	Positive rate(%)	
April	1	91	4	4.4
	2	95	4	4.2
	3	99	8	8.8
	4	93	2	2.1
May	5	100	6	6.0
Total	478	24	5.0	

표 1에서 검사한 478개의 샘플중 24개(5.0%)가 양성을 판정되었고 각 주별로 약간의 차이가 있음을 알 수 있었다. 양성 원유 24개에 대해 설과제의 종류 및 잔류

량을 HPLC로 분석한 결과 표 2와 같았다.

표 2에서 HPLC로 분석한 결과 양성 건수로는 SIM이 9건(32.1%)로 가장 많았고 평균 잔류량에 있어서는 SMZ이 491.70ppb로 가장 많았다.

Table 2. Identification of residual sulfoamides in raw milk detected by using high performance liquid chromatography.

Name of Sulfonamides	No. of positive reactors	Positive rate(%)	Concentration of residues(ppb)	Mean conc. of residues(ppb)
sulfisomidine	9	32.1	13.1~ 53.5	40.40
sulfadiazole	8	28.6	10.5~546.3	185.55
sulfamonomethoxine	5	17.9	67.9~218.2	100.07
sulfamethazine	4	14.3	66.3~917.1	491.70
sulfanilamide	1	3.8	9.0	9.0
sulfaguanidine	1	3.6	109.2	109.20
sulfadiazine	—	—	—	—
sulfamerazine	—	—	—	—
sulfisoxazole,	—	—	—	—
sulfachloropyridazine	—	—	—	—
sulfamethoxazole	—	—	—	—
sulfadimethoxine	—	—	—	—

Table 3. Positive reactions of sulfonamide residues in raw milk detected by using thin layer chromatography.

Months /Weeks	No. of samples	No. of positive reactors	Positive rate(%)
July 1	70	4	5.7
2	95	4	4.2
3	99	1	1.0
4	100	11	11.0
August 1	100	11	11.0
Total	464	31	6.7

표 3에서 검사한 464개의 샘플중 31개(6.7%)가 양성으로 판정되었고, 7월말과 8월초에 양성율이 11%로 다른 주보다 월등이 높았다.

이것으로 미루어 여름에 질병으로 인한 항생제의 사용이 많음을 알 수 있다. 표 4에서 TLC법

으로 양성반응을 보인것에 대한 HPLC검사로는 양성 건수에서는 SIM, STZ, SNL이 각각 5건(16.0%)로 가장 많았고 평균 잔류량에 있어서는 STZ이 95.07ppb로 가장 많았다.

Table 4. Identification of residual sulfoamides in raw milk detected by using high performance liquid chromatography.

Name of Sulfonamides	No. of positive reactors	Positive rate(%)	Concentration of residues(ppb)	Mean conc. of residues(ppb)
SIM	5	16.1	7.0~214.3	82.16
STZ	5	16.1	21.4~190.0	95.07
SNL	5	16.1	3.3~139.3	59.52
SDZ	4	12.9	9.1~ 11.7	10.41
SMR	3	9.7	48.7~162.9	92.37
SMZ	3	9.7	38.0~ 93.5	57.30
SDM	3	9.7	9.5~110.9	66.07
SMX	2	6.4	64.5~105.5	85.00
SGN	1	3.2	51.65	51.65
SIX	-	-	-	-
SMM	-	-	-	-
SCP	-	-	-	-

고 찰

우유중에 잔류되는 항균성 물질은 가축의 성장을 촉진시키기 위하여 사용하는 사료첨가제와 질병의 치료, 예방제로 무분별하게 사용되고 있어 우유중에 잔류할 가능성이 크다. 우리나라의 경우 상당수의 젖소가 유방염에 걸려 있어 유방염을 치료할 목적으로 다양한 종류의 항균제가 사용되고 있고 특히 연고제 형태로 유방내로 직접 주입한 후 완전배출이 되지 않은 상태에서 타 우유와 섞어 납유할 시 문제를 야기시킬 수 있다. 축산물 위생처리법상 치료약제를 사용하였을 경우, 최소

72시간(휴약기간)은 납유금지토록 되어 있으나 양축농가에서 지키지 않고 있고 특히 설파제가 우유중의 세균발육억제물질 검사법인 TTC에 검출되지 않아 치료제로서 설파제를 선호하는 것으로 추정된다. 따라서 Neal and Calbert(1955)에 의한 기존의 TTC 환원시험법으로 설파메타진등 5종의 설파제에 대한 최저 검출감도는 500~5,000ppm의 낮은 수준을 보인 반면, 우유중 5.0 ppm의 농도로 TMP를 첨가한 개량 TTC 환원시험법은 10종의 설파제에 대한 최저 검출감도가 0.025~0.05ppm으로 검출감도를 높일 수 있어 Charm(1988)이 보고한 성적 0.01~0.025ppm에

비해 검출감도면에서 다소 떨어진 경향이 있으나, FAO/WHO에서 제한하는 최대잔류허용 한계치인 총 잔류량 0.025ppm을 충족시키며 검사시간이 3시간 30분 정도로 비교적 신속한 결과를 얻을 수 있고 간단한 실험기술만 있는 사람이면 별 어려움이 없어 많은량의 시료를 동시에 처리할 수 있는 장점이 있어 하루빨리 공정법을 바꾸어야 할 것이다.

국내에서는 축산물중의 잔류물질공정분석법을 정하여 시행하고 있는데 육류중의 잔류설파제 공정분석법으로는 HPLC법을 채택하고 있다.¹⁴⁾ 그러나, 이 공정분석법에는 우유중의 잔류물질검사법이 포함되지 않은 실정이다. 우유중의 잔류설파제의 경우 세균발육억제물질 검사법인 TTC에 의하여 검출되지 않기 때문에 화학적인 분석이 불가피한 실정이다.¹⁶⁾ 우유중 잔류항생물질 간이 검사법으로는 TTC외에 SNAP test, Delvo test, penzyme, Lumac, Lactec법등이 있으나 목장에서 집유시 신속검사가 가능한 것으로는 효소면역법인 SNAP test(6~10분)와 ELISA법인 Lactec법(8~10분)이 있다.

그중 설파제 간이검사가 가능한 것으로는 SNAP test(3종)와 Delvo test(4종)가 있으며 현재 집유장으로 널리 사용되고 있다. 우유중의 잔류설파제 분석법으로는 HPLC법이 가장 널리 이용되고 있으며 다제설파제 동시분석법이 적합한 것으로 알려져 있다. 우유는 여러가지 영양물질을 함유하고 있어서 HPLC에 의한 잔류물질 분석시 방해물질로서 작용한다. 방해물질로 작용할 수 있는 영양성분중 단백질은 산처리, 알카리처리, 염석, 유기용매처리등이 다양한 방법들에 의하여 제거될 수 있다.

잔류설파제의 동시다제분석법에 관한 필요성은 높으나 보고문헌은 많지 않은 실정이다.^{11,13)} 최근

Clear(1990)는 Sulfathiazole등 14종의 설파제를 동시분석하는 방법을 보고하였다.

본 실험에서는 이 방법을 이용하여 TTC에서 문제시되고 있는 양축농가에 대하여 검사를 실시하였던 바, 현재 설파제가 사료첨가, 유방염치료 또는 기타질병의 치료에 사용되고 있고 안전 휴약기간도 지켜지지 않아 우유에 함유된 것으로 확인되었다. 또한 검출된 설파제의 종류는 역학조사결과 시중에서 유방염 연고제로 가장 많이 유통되고 있는 동물약품의 설파제 성분과 일치함을 알 수 있었다. 따라서 현재 사용하고 있는 세균발육억제물질 간이검사법(TTC)을 개량된 TTC법으로 바꾸어야 하겠고 양축농가에서 휴약기간을 지킬 수 있도록 지속적인 홍보가 필요하다고 사료된다.

결 론

유방염 치료와 사료첨가제로 젖소에 투여되는 동물약품으로 인한 우유중의 설파제 잔류 실태를 파악하기 위하여 경기 남부지소 관내집유장을 남유되는 목장우유에 대하여 TLC법 및 HPLC법으로 비교조사 한 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 93년 4, 5월에 총 478건의 우유시료를 검사한 결과 TLC에서 24건(5.0%)이 양성, 7, 8월에는 464건중 31건(6.7%)이 양성으로 나타났다.
2. 양성우유 55건에 대한 설파제의 종류를 분석한 결과 SIM등 10종이 검출되었다.
3. 4, 5월에 잔류하는 설파제는 SIM(32.1%)이 가장높은 양성율을 보였고 평균잔류량에서는 SMZ(491.70ppb)이 가장 많았다.
4. 7, 8월에서는 SIM, STZ, SNL(각 16.1%)이 가장 높은 양성율을 보였고 평균잔류량에서는 STZ(95.07ppb)이 가장 많았다.

참 고 문 헌

1. Booth NH and McDonald LE. 1988. Drug and Chemical residues in edible tissue of animals. Veterinary pharmacology and therapeutics. 6th 3d. Iowa state university press : 1149~1201.
2. Doull J, Klaassen CD and Amdur MO. 1980. Toxic response of the kidney. Toxicology. 2nd ed. Macmillan Pub. New york : 168~243.
3. Gilman AG, Goodman LS, Rall TW and Murad F. 1985. Antimicrobial agent. The pharmacology basis of therapeutics. 7th ed. Macmillan Pub. New York : 1101~1102.
4. Stowe CM, Hartman DW, Pallasen D. 1956. Studies with sulfonamide combination in diary cattle. J Am Vet Med Assoc. 129:384~387.
5. 박병옥, 백미순, 권기호등. 1991. 원유중의 잔류항생물질 및 설파제 조사. 한국가축위생학회지. 14(1):63~69.
6. 황인진, 박병옥, 김창수등. 1990. SOS test kit 및 HPLC법에 의한 도축돈의 뇨, 신장 및 근육내 설파메타진 잔류량 조사. 한국가축위생학회지. 13(1):21~26.
7. 농림수산부. 1993. 축산물 시험방법. 농림수산부고시 제1993-13호. 135~136.
8. Ashworth RB, Epstein RL, Thomas MH et al. 1986. Sulfamethazine blood/tissue correlation study in swine. J Am Vet Res. 47:2596.
9. Bevill RF, Schemske KM, Luther HG et al. 1978. Determination of sulfonamide in swine plasma. J Agr Food Chem. 26:1201.
10. Tomas MH, Soroka KE, Simpson RM et al. 1981. Determination of sulfamethazine in swine tissues by quantitative thin layer chromatography. J Agr Food Che. 29:621.
11. Clear MH. 1990. Determination of sulfonamide drugs in eggs, milk and animal tissue and application in residue monitoring programs. 5th ed. AAAP Anim Sci Cong. 2:106.
12. Cox BL and Krzeminski LF. 1982. High pressure liquid chromatographic determination Anal Chem. 65(6):1311.
13. Weber JD and Smedley MD. 1989. Liquid chromatographic determination of sulfamethazine in milk. J Assoc OFF Anal Chem. 72(3):445.
14. 박종명. 1991. 축산식품중의 잔류물질 검사법. 서울. 현대출판사. 86~104.
15. 임재영, 나수남, 이문한 등. 1990. Fluorescamine을 이용한 sulfonamide의 형광분석법. 대한수의학회지. 30(1):41.
16. 정재하, 한수남, 이문한. 1991. Fluorescamine을 이용한 우유중에 잔류하는 sulfamethazine의 형광정량법. 서울대학교 수의대 논문집. 16(1):23.
17. Johman KL, DT Jeter and RC Claibrone. 1975. J Pharm Sci. 64:1657~1660.
18. Code of Federal Regulation. 1991. Title 21Parts. 500~599.
19. WHO Technical Report. 1989. Series 788.