

HPLC와 LC/MS에 의한 식육내 잔류 설파제의 동시 분석법

정봉수, 박준조¹, 금모래, 김인경, 박병옥, 한정희*

경기도축산위생연구소, 강원대학교 수의학과*
(접수 2004. 2. 2, 게재승인 2004. 3. 23)

Simultaneous analysis of sulfonamides in beef and pork by high performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry

Bong-Su Jung, Jun-Jo Bark¹, Mo-Rae Gum, In-Kyoung Kim,
Byoung-Ok Park, Jeong-Hee Han*

¹*Gyeonggi Livestock and Veterinary Research Institute, Suwon, 441-460, Korea*

**Department of Verterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea*

(Received 2 February 2004, accepted in revised from 23 March 2004)

Abstract

A multiresidual analysis was performed to determine 12 sulfonamides(sulfacetamide, sulfadiazine, sulfisomidine, sulfathiazole, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfisoxazole, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline, and sulfadimethoxine) in beef and pork simultaneously. The multiresidual analysis for the sulfonamides currently used was able to analyze 5 kinds of sulfonamides at the same time. The method of this 12 sulfonamides multiresidual analysis in this study was matrix solid-phase dispersion(MSPD) by high performance liquid chromatography(HPLC) and liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS). The recovery rate of the materials was measured by MSPD method with 3 different extraction solvents; Dichloromethane, DCM : Ethylacetate(3 : 1), DCM : EA(9 : 1). Also, samples (84 beef and 205 pork samples) which were positive by EEC-4 plate test from 2001 to 2003 were tested to investigate the kinds of sulfonamides using HPLC. The results from the study were as follows;

1. The recovery rate of the materials was measured by MSPD method with 3 different extraction solvents; Dichloromethane, DCM : Ethylacetate(3 : 1), DCM : EA(9 : 1). The method

¹Corresponding author

Phone : +82-31-294-6763, Fax : +82-31-249-5304

E-mail : junjc99@gg.go.kr

of extraction solvent with DCM:ethyl acetate(9:1) was the most excellent(87.7~99.3%) in separation and reappearance.

2. In the LC/MS analysis of sulfonamides, signal to noise ratio was showed relatively high in the positive mode and special ion in the quality analysis was determined via $[M+H]^+$ and m/z 156. A spectrum of sulfonamides was showed from all 12 sulfonamides.
3. The samples positive by the EEC-4 plate, a screening test method, were categorized by sulfonamides through Charm II and confirmed the kinds of sulfonamides through HPLC.
 - 1) Among 84 beef samples positive by EEC-4 plate, 20 samples were positive by Charm II and identified as 7 sulfamethazine, 9 sulfadimethoxine, 1 sulfamonomethoxine and 3 unknown status.
 - 2) Among 205 pork samples positive by EEC-4 plate, 42 samples were positive by Charm II and identified as 19 sulfamethazine, 1 sulfadimethoxine, 4 sulfamonomethoxine and 5 unknown status.

Key words : Sulfanilamides, Electrospray ionization mass spectrometry, Fraction ion

서 론

설파제는 항생제가 발견되기 이전에 세균감염에 사용된 최초의 화학요법제로 오늘날 가축의 질병 치료 또는 사료에 첨가하여 질병예방과 성장촉진 목적으로 널리 사용되고 있다. 설파제는 백색 결정형 결합물로 물에서 잘 녹지 않으며 sulfonamide(-SO₂NH₂)기 혹은 para 위치에 amino(-NH₂)기를 지닌 p-aminobenzene sulfonamide의 화합물로 그 유도체들은 Fig 1 그리고 Table 1과 같이 sulfonamide group의 amide기의 치환으로 만들어진다. 또 설파제의 혈류로 이행은 수동확산에 의하며 체액이나 조직으로 이동은 이온화 정도, 조직의 혈류분포, 혈장단백과의 결합정도에 따라 흡수 분포되며 PABA(para-aminobenzoic acid)와 구조가 비슷하여 효소부위에 경쟁적으로 작용하여 folic acid의 합성을 방해함으로써 세균의 성장을 억

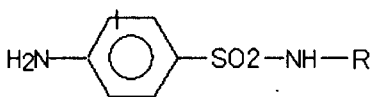


Fig 1. Basic structure of sulfonamides

제하고 아세틸화, 수산화, 포합 등의 대사과정을 거쳐 뇨, 변, 담즙, 우유, 눈물 및 땀으로 배설된다^{1,2)}.

설파제를 장기간 투여할 경우 조직내 잔류되어 국민보건상 문제시 될 수 있기 때문에 도축전 안전휴약기간 및 최대잔류허용기준을 설정하여 고시하고 있다. 분석방법으로는 동시에 많은 수의 재료를 간편하고 신속하게 screening 할 수 있는 thin-layer chromatography(TLC)³⁾, enzyme-linked immuno-sorbent assay(ELISA)⁴⁾가 있으며, 각 설파제의 단일 성분을 정성·정량할 수 있는 gas chromatography(GC/ECD)⁵⁾, gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS)법⁶⁾과 high-performance liquid chromatography(HPLC)으로 UV 검출법⁷⁾과 o-phthalaldehyde와 fluorescamine을 이용한 형광 검출법⁸⁾등 여러 가지 분석방법이 보고되어 분석자에 따라 다양하게 응용할 수 있다. 또한 추출방법도 액-액 추출법(liquid-liquid extraction method), 산-염기 평행에 의한 추출, solid phase extraction(SPE)⁹⁾, matrix solid phase dispersion(MSPD)¹⁰⁾, microwave extraction¹¹⁾, supercritical fluid extraction(SFE)¹²⁾등이 보고되어 있다.

Table 1. Chemical structures of 12 sulfonamides

Compounds	Structure of R-group	Compounds	Structure of R-group
Sulfacetamide		Sulfamethazine	
Sulfadiazine		Sulfisoxazole	
Sulfisomidine		Sulfamonomethoxine	
Sulfathiazole		Sulfamethoxazole	
Sulfapyridine		Sulfaquinoxaline	
Sulfamerazine		Sulfadimethoxine	

최근 액체질량분석기(LC/MS)는 대기압하에서 이온화방법의 개발로 급속히 발전하여 Bogialli 등¹³⁾은 LC/MS로 식육중 미량의 잔류 설파제를 보다 선택적이고 고감도로 정성·정량분석하여 보고하였으며 Haller 등¹⁴⁾은 6종의 설파제와 대사물을 액-액추출방법으로 추출하여 LC/MS를 이용하여 동시분석방법을 보고하여 다양한 분석방법이 시도되고 있다.

이에 본 연구는 12종의 설파제에 대하여 HPLC로 정량분석방법을 확립하고 식육에서 추출이 용이한 MSPD법의 용출용매를 다르게 추출하여 회수율을 비교하였다. 또 설파제 잔류실태를 조사하기 위하여 간이검사방법인 EEC-4plate법으로 잔류물질 양성 판정된 재료에 대하여 설파제의 검출율과 종류를 확인하였으며 설파제의 종류를 정확히 확인(Confirmation)하기 위하여 LC/MS 분석방법을 확립하여 잔류물질에 대한 안전성을 확보하고자 실시하였다.

재료 및 방법

시약 및 표준용액조제

본 실험에 사용되는 시약은 methanol, acetonitril, deionized water, ethylene dichloride,

ethyl acetate는 HPLC grade(J.T.Baker USA), ammonium acetate, trifloroacetic acid, octadecylsilane(C₁₈), hexane 등은 시약특급(sigma, USA)을 사용하였다.

설파제 표준용액은 sulfacetamide, sulfadiazine, sulfisomidine, sulfathiazole, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfisoxazole, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline, sulfadimethoxine은 Sigma(USA)에서 구입하여 각 10mg을 정밀히 달아 methanol로 100ml가 되게하여 표준원액으로 냉동 보관하며 사용하였다. 표준원액을 0.1, 0.25, 0.5µg/ml 되도록 이동상으로 용해하여 검량곡선을 작성하여 재료로부터 잔류량을 측정하였다.

HPLC 및 LC/MS 조건

설파제를 정량분석하기 위하여 HPLC의 분석조건은 Table 2와 같이 컬럼은 BDS C₁₈(5.0 µm, 300× 4.6mm)를 사용하였으며, LC 펌프, 시료자동주입기, 질량분석기는 agilent 1100 series(Agilent USA)사용하였고 data system은 Chemstation(Agilent USA)을 사용하였다.

이동상은 유속을 0.5ml/min으로 초기에서 5분까지 0.1%KH₂PO₄ 90%와 acetonitril 10%로 시작하여, 20분에 0.1%KH₂PO₄ 65%와 ace

Table 2. HPLC and LC/MS conditions

HPLC	LC/MS
Instrument : Agilent 1100 Column : BDS C ₁₈ (250×4.6mm, 5 μ m) Mobile phase A : 0.1%KH ₂ PO ₄ Mobile phase B : CH ₃ CN Gradient elution : B 10%(5min)→ 35%(20min)→35%(30min) Flow rate : 0.5ml/min Wavelength : UV 270nm Injection vol. : 50 μ l Column temp. : 40°C	Column : Extend C ₁₈ (250×3.0mm, 5 μ m) Mobile phase A : 5mM ammonium acetate Mobile phase B : CH ₃ CN Gradient elution : B 5%(10min)→40%(30min) Flow rate : 0.5ml/min Mass range 100~500amu Ionization : electrospray Fragment voltage : 70V Mode : positive Neburizer pressure : N ₂ (25 psi) Drying gas : 10 l /min

tonitril 35% 35분에 0.1%KH₂PO₄ 65%와 acetonitril 35%로 gradient를 작성하여 실험하였다.

설파제를 확인하기 위하여 LC/MS의 분석조건은 Table 1과 같이 이동상은 초기에 5mM ammonium acetate(pH 4.7, 10mM trifluoacetic acid) 95%와 acetonitril 5%로 시작하여 30분에 5mM ammonium acetate(pH 4.7, 10mM trifluoacetic acid) 60%와 acetonitril 40%로 gradient를 작성하여 실험하였으며, mass spectrophotometer(HP1100 MSD : Hewlett Packard USA)의 분석조건은 mass range : 100~500amu, fragment voltage : 70V, polarity : positive, ionization mode : API-ES, nebulizer pressure : 25psig, capillary voltage : 3500V로 하여 scan과 sim mode 각 설파제의 spectrum과 chromatogram을 측정하였다.

재료의 추출

Long¹⁵⁾의 방법을 응용하여 EEC-4plate 법으로 검사하여 음성인 소고기와 돼지고기 재료 0.5g을 octadecylsilyl(C₁₈) 2g과 혼합 균질화한 후 filter paper disc가 장치되어 있는 10ml sylinge에 옮겨 4ml까지 피스톤에 압력을 가한 후 8ml n-hexane으로 세척하였다. 그리고 용

출용매에 따른 회수율을 비교하기 위하여 용출용매를 dichloromethane(DCM), DCM : ethylacetate(EA) (3 : 1), DCM : EA(9 : 1)로 각각 8 ml로 용출한 다음 다시 4 ml로 용출하였다. Air purge 하면서 40°C에서 농축한 다음 HPLC 이동상으로 용해시킨 후 원심분리하여 상층액을 0.45 μ m filter로 여과하였다. 여과액 50 μ l를 HPLC에 주입하여 정량분석하였고 LC/MS에 50 μ l를 주입하여 scan mode로 정성 분석하였으며 sim mode로 정량분석하였다.

설파제 잔류실태조사

2001년 1월부터 2003년 7월까지 잔류물질 간이검사법중 EEC 4-plate법으로 검사하여 양성 판정된 소고기 84건과 돼지고기 205건에 대하여 Charm-II(Charm Science, USA)로 계열 분리하여 설파제가 의심된 재료에 대하여 앞에서 설명한 재료의 추출방법으로 시료를 추출하여 HPLC에서 정량분석하였고 검출된 설파제의 종류를 LC/MS로 확인 실험하였다.

결 과

용출용매에 따른 회수율

설파제 12종에 대하여 0.1, 0.25, 0.5 μ g/ml를

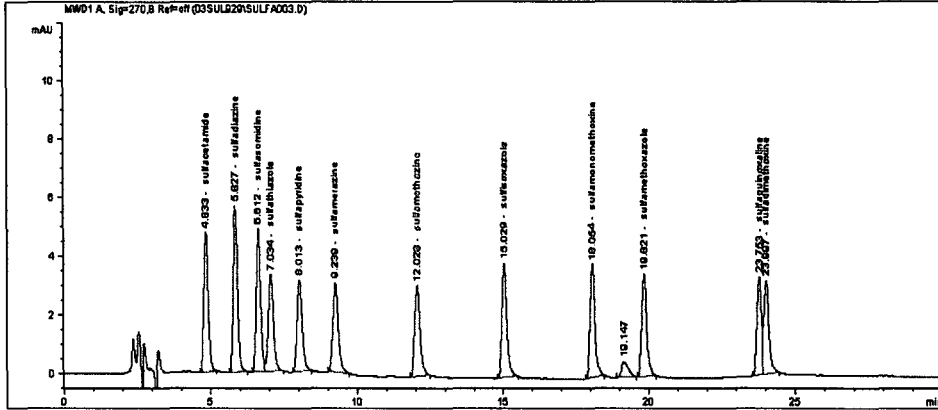


Fig 2. Chromatograms of 12 sulfonamide standards by HPLC

Table 3. Recovery rate (%) of sulfonamides spiked to beef samples by elution solvent

Compounds	DCM		DCM/EA (3 : 1)		DCM/EA (9 : 1)	
	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2
Sulfacetamide	78.2	77.9	89.8	88.2	98.7	98.2
Sulfadiazine	87.4	88.1	89.2	88.9	97.2	96.8
Sulfisomidine	27.8	28.6	84.4	85.3	87.8	88.1
Sulfathiazole	31.8	30.8	76.6	76.2	90.8	91.3
Sulfapyridine	77.4	77.9	90.4	89.7	99.1	98.8
Sulfamerazine	67.3	68.4	87.6	88.0	93.6	93.7
Sulfamethazine	79.5	78.2	94.1	94.6	99.3	99.1
Sulfisoxazole	70.3	69.4	85.0	86.2	94.3	95.1
Sulfamonomethoxine	76.1	77.0	80.5	81.2	91.8	90.2
Sulfamethoxazole	63.7	63.3	85.2	84.8	87.7	88.5
Sulfaquinolaxine	77.3	79.1	88.6	89.0	93.8	94.4
Sulfadimethoxine	71.0	72.8	81.3	81.8	88.6	89.2

50 μ l씩 HPLC에 주입하여 얻은 검량곡선의 평균 correlation=0.99996으로 직선상을 나타냈으며 Fig 2와 같이 분리능도 우수하였다.

회수율을 측정하기 위하여 소고기와 돼지고기에 설파제 12종을 0.1 μ g/g, 0.2 μ g/g되게 첨가하여 MSPD 방법으로 용출용액을 8 ml dichloromethane(DCM)추출하고 다시 4 ml DCM추출하였고 또 8 ml DCM : EA(3 : 1)로 추출하고 다시 4 ml DCM : EA(3 : 1)추출하였으며 그리고 8ml DCM : EA(9 : 1)으로 추출하고 다시 4ml DCM : EA(9 : 1)으로 추출하여 각각의 회수율을 측정한 결과 Table 3, 4

와 같이 DCM으로 추출하였을 경우 sulfisomidine과 sulfathiazole의 회수율이 27.8~40.4%로 매우 낮았으며, DCM : EA(3 : 1)로 용출하였을 때 설파제 12종의 회수율은 소고기에서 76.2~94.6%이었으며, 돼지고기에서 86.9~97.8%로 나타났다. 또 DCM : EA(9 : 1)로 용출하였을 때 설파제 12종의 회수율은 소고기에서 87.7~99.3% 이었으며, 돼지고기에서 92.4~99.3%로 우수한 결과를 나타내 공시재료의 용출용액을 DCM : EA(9 : 1)로 HPLC로 정량분석 및 LC/MS로 정성 실험의 추출용매로 하였다.

Table 4. Recovery rate(%) of sulfonamides spiked to pork samples by elution solvent

compunds	DCM		DCM/EA(3:1)		DCM/EA(9:1)	
	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.2
sulfacetamide	77.9	79.2	93.8	94.1	97.5	98.1
sulfadiazine	90.9	90.0	93.3	93.5	96.5	95.8
sulfisomidine	28.8	31.8	94.3	95.2	92.4	93.3
sulfathiazole	40.4	40.0	86.9	88.2	93.3	94.2
sulfapyridine	94.3	92.6	96.6	95.2	97.7	98.1
sulfamerazine	85.8	87.3	95.2	94.8	98.2	98.9
sulfamethazine	92.1	93.3	93.9	94.2	96.3	95.3
sulfisoxazole	93.2	89.3	93.6	92.9	98.6	98.8
sulfamonomethoxine	98.3	97.2	92.4	93.0	99.3	98.4
sulfamethoxazole	94.5	95.3	90.7	91.3	94.8	95.1
sulfaquinolaxine	91.1	92.1	97.8	96.6	92.5	93.2
sulfadimethoxine	94.0	93.9	93.4	92.7	97.7	98.5

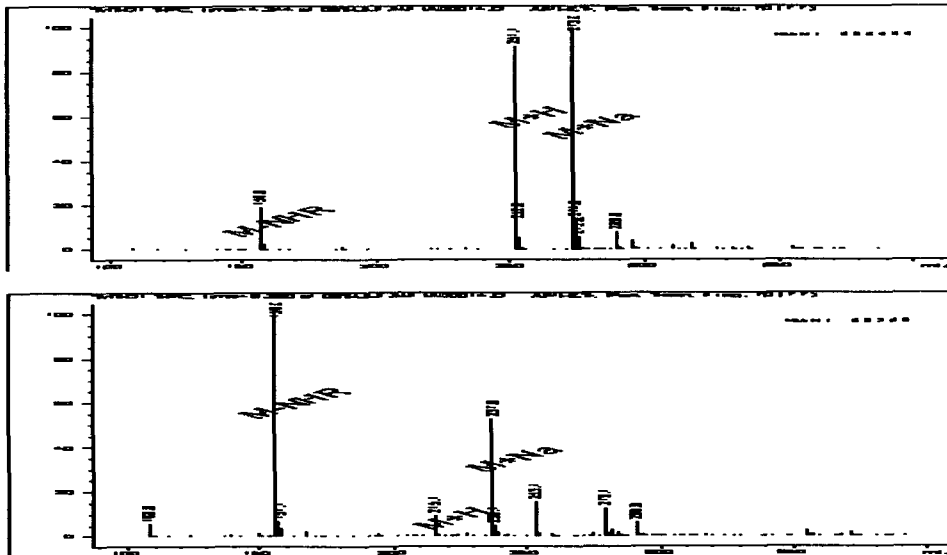


Fig 3. Mass spectra of sulfacetamide(upper) and sulfadiazine(low).

설파제의 확인

설파제의 확인방법으로 지금까지는 diazo-methane으로 유도체화하여 GC/MSD로 실시하였으나 전처리방법이 복잡할 뿐만 아니라 유도체화 과정이 없어 간편한 확인방법으로 LC/MS를 많이 사용하고 있는 추세다. 본 연구에

서 12종의 설파제에 대한 정성실험을 위하여 fragment voltage를 70V로 100~500amu범위에 대하여 각각의 spectrum을 측정 한 결과 Fig 3~8과 같이 $[M+H]^+$ 이 12종의 설파제에서 확인되었으며 설파제를 확인할 수 있는 조각이온으로 $[M-NHR]^+$ 이온이 생성되었음을 알 수 있었다. Sulfacetamide는 Table 5와 같이 $[M+H]^+$

이 10%정도로 작게 형성되었으나 $[M-NHR]^+$ 이 100% 생성되었다.

설파제의 잔류조사 결과

2001년부터 2003년 7월까지 소고기, 돼지고기 중 EEC-4 plate법으로 실험하여 양성 판정된 재료에 대하여 설파제의 잔류실태를 조사한결과 Table 6과 같이 소고기는 CharmII(Charm

science. U.S.A)에서 설파제 양성율이 2001년 30.3%(10건/33건), 2002년 15.2%(5건/33건), 2003년 27.8%(5건/18건) 수준으로 나타났으며 돼지고기는 Table 7과 같이 CharmII(Charm science. U.S.A)에서 설파제 양성율이 2001년 21.0%(21건/100건), 2002년 22.6%(12건/53건), 2003년 17.3%(19건/42건) 수준으로 검출비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 또 HPLC로 정밀

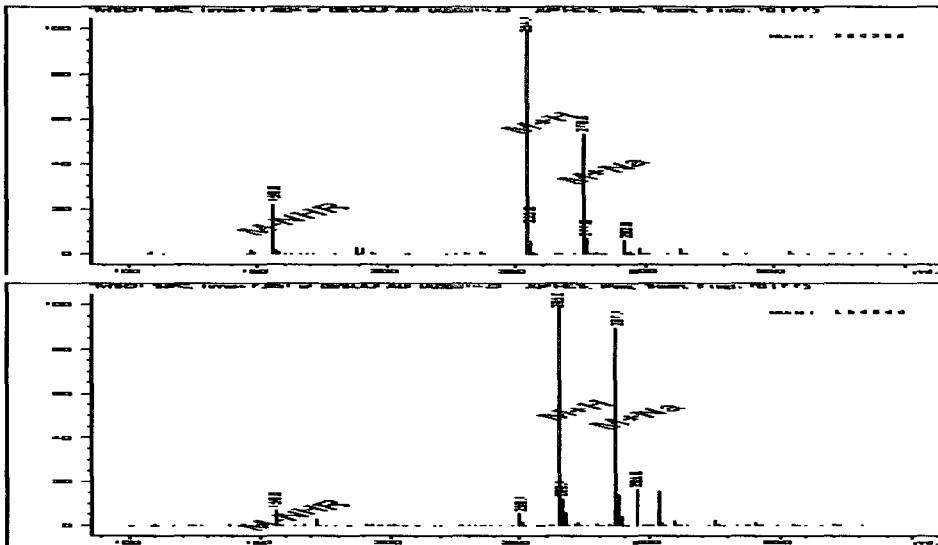


Fig 4. Mass spectra of sulfadimethoxine (upper) and sulfamerazine (lower)

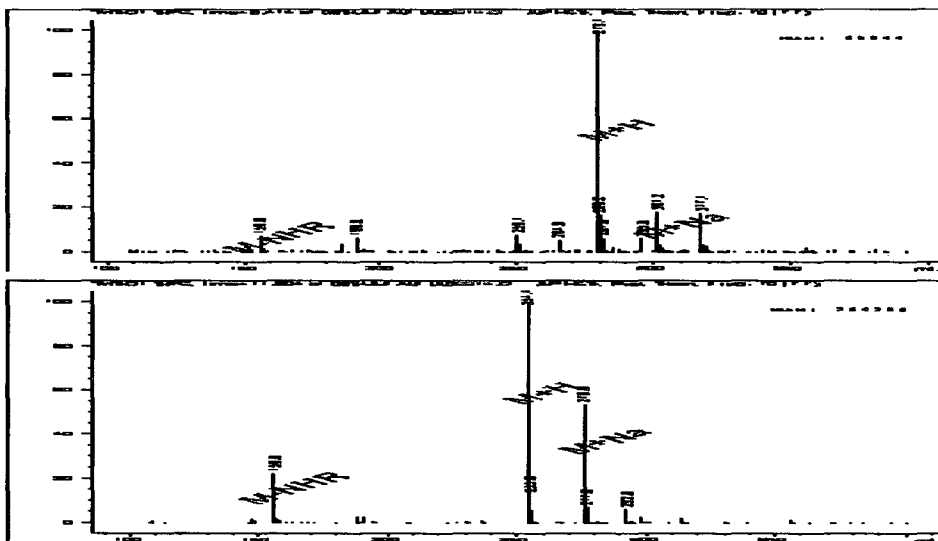


Fig 5. Mass spectra of sulfamethazine (upper) and sulfamethoxazole (lower)

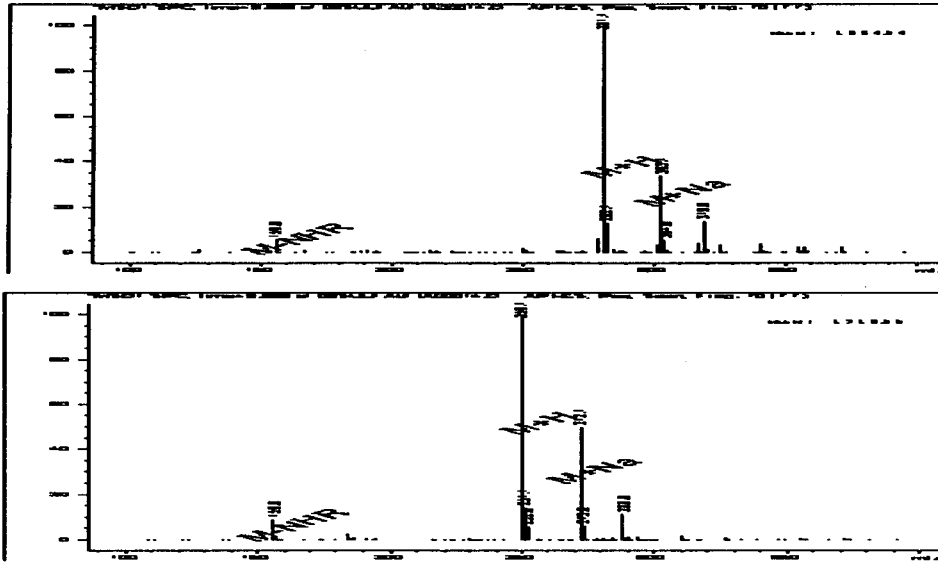


Fig 6. Mass spectra of sulfamonomethoxine (upper) and sulfapyridine (low)

Table 5. Summary of mass spectra in 12 sulfonamides

Sulfonamides	m/z (%)		
	M-NHR	M+R	M+Na
Sulfacetamide	156 (100.0)	215 (10.0)	237 (55.0)
Sulfisomidine	156 (12.0)	279 (100.0)	301 (20.0)
Sulfadiazine	156 (20.0)	251 (92.0)	273 (100.0)
Sulfathiazole	156 (80.0)	256 (100.0)	278 (87.0)
Sulfisoxazole	156 (40.0)	268 (100.0)	290 (40.0)
Sulfapyridine	156 (10.0)	250 (100.0)	272 (50.0)
Sulfamerazine	156 (8.0)	265 (100.0)	287 (60.0)
Sulfamethazine	156 (8.0)	279 (100.0)	301 (18.0)
Sulfamonomethoxine	156 (6.0)	281 (100.0)	303 (36.0)
Sulfamethoxazole	156 (20.0)	254 (100.0)	276 (55.0)
Sulfaquinoxaline	156 (10.0)	301 (100.0)	323 (65.0)
Sulfadimethoxine	156 (8.0)	311 (100.0)	333 (40.0)

분석한 결과 sulfamethazine이 2001년도 19건으로 61.3% 검출되었으나 2002년도 4건으로 23.5%, 2003년도에는 3건으로 21.4%로 나타나 설파제의 검출종류가 다양해지면서 확인정성 실험이 요구되었다. 따라서 본 실험에서 설파제 12종에 대하여 검사한 결과 Fig 9와 같이 돼지고

기에서 HPLC로 sulfadimethoxine이 검출된 재료를 LC/MS로 정밀분석한 결과 scan mode에서 3개의 peak가 관찰되었으며, 이온을 추출하여 spectrum을 확인한 결과 m/z 333, 311, 156 이온이 확인되어 $[M+Na]^+$ $[M+H]^+$ $[M-NHR]^+$ 인 sulfadimethoxine으로 확인할 수 있었다.

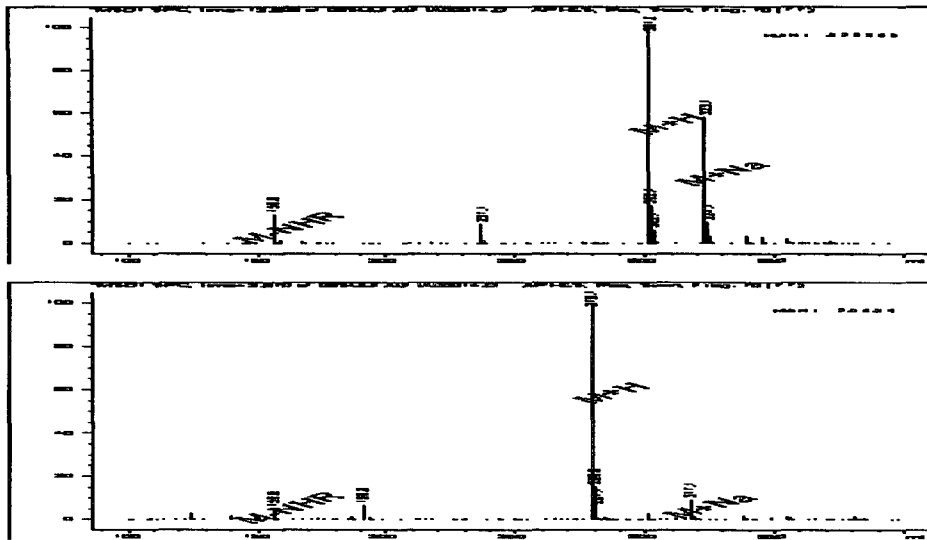


Fig 7. Mass spectra of sulfaquinoxaline(upper) and sulfisomidine(low).

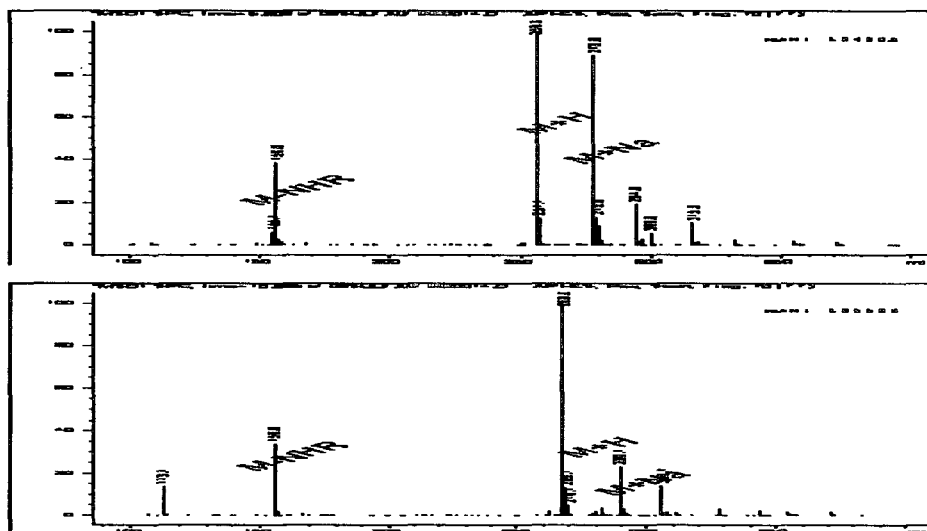


Fig 8. Mass spectra of sulfathiazole (upper) and sulfisoxazole (low)

Table 6. Sulfonamide residues from EEC-4 plate positive samples in beef by HPLC

Year	EEC-4plate positive	Charm II suspect	HPLC				
			SMT*	SDM	SMM	STZ	Unknown
2001	33	10	5	3		-	2
2002	33	5	1	2	1	-	1
2003	18	5	1	4		-	
Total	84	20	7	9	1	-	3

* SMT: sulfamethazine, SDM: sulfadimethoxine, SMM: sulfamonomethoxine, STZ: sulfathiazole

Table 7. Sulfonamide residues from EEC-4 plate positive samples in pork by HPLC

Year	EEC-4plate positive	Charm II suspect	HPLC				
			SMT*	SDM	SMM	STZ	Unknown
2001	100	21	14 (7)			-	7
2002	53	12	3 (1)	1	4	-	4
2003	52	9	2 (2)			3	4
Total	205	42	19 (10)	1	4	3	15

* SMT: sulfamethazine, SDM: sulfadimethoxine, SMM: sulfamonomethoxine, STZ: sulfathiazole, () is low tolerance limit.

고 찰

우리나라 식품위생법에 고시되어 있는 동물성의약품의 잔류허용기준 및 시험법에 식육중 설파제 5종에 대하여 동시분석방법으로 HPLC 법과 추출방법도 비교적 쉽고 간편한 MSPD를 채택하고 있다¹⁶⁾. 또한 MSPD법은 추출용매의 극성에 따라 회수율의 차이의 변화가 많아 응용범위가 넓어 여러분야에서 응용되고 있다. 본 실험에서 비교적 극성이 낮은 공인분석법의 DCM으로 추출하였을 때 sulfisomidine과 sulfathiazole의 회수율이 소고기와 돼지고기에서 27.8~40.4%로 매우 낮게 나타나는 단점이 있었으며, ethylacetate를 첨가하여 극성도를 상승시켜 DCM:EA(3:1)로 용출하였을 때 회수율은 소고기에서 76.2~94.6%이었으며, 돼지고기에서 86.9~97.8%로 나타나 우수한 편이었으나 중간강도의 극성을 유지한 DCM:EA(9:1)로 용출하였을 때 회수율이 소고기에서 87.7~99.3% 이었으며, 돼지고기에서 92.4~99.3%로 우수한 결과를 얻었다.

국내에서 설파제 잔류량 분석결과는 다양하게 보고되고 있으며 특히 본 실험과 유사한 추출방법으로 박 등¹⁷⁾이 돼지고기에 sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline 등 5종을 농도별로 첨가하여 MSPD법으로 sorbent를 C₁₈로하고 ethylacetate와 dichloromethane으로 추출하여 회수율을 측정할 결과 84.0~96.2%로 보고하여본 실험과 비슷한 결과를 나타냈다. 또 심 등⁸⁾은 우유중 설파제를 액체-액체추출하

여 fluorsamin으로 유도체화 시켜 형광검출기로 측정하여 53.3~97.5%라고 보고하여 본 실험결과가 우수하였으며, 설파제를 유도체화시켜 분취하여도 정성 실험을 할 수 없는 단점이 있다.

K Kishida와 N Furusawa는 닭고기에 sulfathiazole, sulfadimidine, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine과 sulfaquinoxaline을 첨가하여 sorbent로 alumina N-S를 사용하여 MSPD방법으로 70% 에탄올로 추출하였을 때 회수율을 85~117%라고 보고하였으며, sorbent로 C₁₈를 사용하여 용출용액을 70%에탄올로 하였을 때 회수율은 32~85%라고 보고하여¹⁰⁾ 본 실험에서 sorbent로 C₁₈를 사용하여 DCM:EA(9:1)을 용출용액으로 용출한 결과 회수율이 92.4~99.3%로 우수하였다. 그러나 실험실에서 유독성 유기용매의 사용은 실험자의 건강관리를 위한 필수적인 고려사항으로 Kishida와 Furusawa의 실험방법¹⁰⁾은 회수율이 다소 낮았지만 무독성인 70% 에탄올을 용출용매로 사용하여 향후 새로운 분석방법 개발에 고려해야 될 사항으로 판단되어 진다.

한편 HPLC법의 정성방법은 머무름시간에 의존하고 있어 가끔 분석결과를 오판 할 수 있게 됨에 따라 최근 LC/MS방법이 많이 응용되고 있다. LC/MS방법은 머무름시간 뿐만 아니라 특징적인 이온을 선택하여 정량함으로서 검출감도를 높일 수 있다. 질량분석법은 시료의 질량을 쉽게 측정할 수 있고 스펙트럼과 이온 분해패턴은 분자이온의 구조에 대해 매우 특성적이며 이로부터 분자구조의 결정 및 확인이

가능하게 된다. 또 질량분석법은 시료의 회수가 힘든 단점은 있으나 다른 분석법에 비해 질량분석관에서 이온들이 공간적으로 분리되어 다른 이온들의 간섭이 없어지며 전자증배관을 검출기로 사용함으로써 한 개의 이온도 감지할 수 있는 높은 감도를 가지고 있어 극미량의 시료만으로도 스펙트럼을 측정할 수 있고 선택성과 특이성이 매우 좋아 여러 분야에서 널리 응용되고 있다.

Boglialli 등¹³⁾은 LC/MS로 설파제와 대사물에 대한 MS 분석조건에서 negative mode 보다 positive mode에서 signal-to-noise 비율이 높게 형성된다고 보고하여 본 실험에서도 positive mode에서 실험하여 일치한 결과를 보여주었다.

Kennedy 등¹⁸⁾은 LC/MS 분석에서 설파제의 특징적인 이온으로 m/z 156 이온과 108 이온이라고 보고하였으며, Niessen¹⁹⁾은 sulfamethazine으로 분류할 수 있는 특수이온을 m/z 156 이온이라고 보고하여 본 실험에서도 m/z 156 이온을 12종의 설파제에서 확인되어 설파제로 확인할 수 있는 이온은 $[M+H]^+$ 과 m/z 156 이온으로 확인되었다.

Vollmer²⁰⁾은 우유에서 21종의 설파제를 LC/MS를 이용하여 동시분석하였는데 확인방법으로 scan mode를 사용하였으며 selective reaction monitoring하여 각각의 설파제에 대하여 확인하였고 함량을 측정하기 위하여 $[M+Na]^+$ 과 group-specific ion(m/z 156)으로 정량하여본 실험과 일치한 결과를 보였다.

설파제에 잔류량에 대한 국내조사는 김 등²¹⁾이 서울 시내 소재 22개 정육점에서 돼지고기 22건중 설파메타진의 잔류농도가 0.1ppm 이상이 1건 0.05~0.1ppm이 1건 0.05ppm이하가 12건 검출되었다고 보고하였으며, 황 등²²⁾은 도축된 돼지 50두의 뇨와 신장, 근육을 채취하여 sulfa on site(SOS) test kit 및 HPLC 법으로 설파메타진 잔류량을 분석한 결과 4두에서 양성반응을 보였으며 HPLC 방법으로 정량 검사한 결과 1건에서 국내잔류허용기준 0.1ppm을 초과하였다고 보고하였다. 본 실험에서도 Charm II에서 설파제 양성률이 2001년 23.3%,

2002년 19%, 2003년 20% 수준으로 나타났으며, HPLC로 정밀분석한 결과 2001년에는 sulfamethazine이 19건으로 61% 검출되었으나 2003년도에 3건으로 21%로 나타나 설파제의 검출종류가 다양해지고 있어 사료첨가제가 sulfamethazine에서 그 종류가 다변화되고 있는 것으로 판단된다. 또 축산업의 규모가 대형화 되면서 질병예방 및 사료효율 등을 고려하여 사료첨가제의 사용이 더욱 증가할 것으로 예상됨에 따라 설파제의 잔류허용기준 설정을 확대되어야 할 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 설파제의 12종을 동시에 분석하기 위하여 재료로부터 추출을 효과적으로 실행하기 위하여 MSPD방법의 용출용액을 DCM:EA(9:1)로 추출하였을 때 회수율이 87.7~99.3%로 가장 우수하였으며, 분리능은 BDS C₁₈ 컬럼이 우수하였다. 또 설파제를 확인실험하기 위하여 특징적인 이온으로 $[M+H]^+$ 이온과 $[M-NHR]^+$ 156 이온이 확인되었으며, EEC-4 plate method 양성 재료를 Charm II로 계열분리하였으며, HPLC로 정성·정량검사하여 sulfadimethoxine 검출재료에 대하여 최종확인검사를 위하여 LC/MS로 분석한 결과 일치한 결과를 얻어 LC/MS로 정성 및 정량분석을 실시해야한다고 판단된다.

결 론

식육중에 잔류하는 sulfacetamide, sulfadiazine, sulfisomidine, sulfathiazole, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfisoxazole, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole, sulfaquinolaxine, sulfadimethoxine 설파제 12종에 대하여 LC/MS로 동시검출 방법을 확립하였으며, 회수율을 측정하기 위하여 소고기와 돼지고기에 설파제를 인위적으로 첨가하여 MSPD 추출방법의 용출용액을 다르게 추출하여 비교하였다. 또 식육중 설파제의 잔류실태를 조사하기 위하여 EEC-4 plate법으로 양성 판정된 재료에 대하여 설파제의 잔류량과 종류를 확인할 수 있는 방법을 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 소고기와 돼지고기에 설파제 12종을 첨가하여 MSPD법으로 용출용액을 dichloromethane(DCM), DCM : Ethylacetate(3 : 1), DCM : Ethylacetate(9 : 1)로 각각 추출하여 회수율을 비교한 결과 DCM : Ethylacetate (9 : 1)로 용출하였을때 87.7~99.3%로 가장 우수하였고 분리능 및 재현성도 우수하였다.
2. LC/MS를 이용한 설파제 분석방법은 positive mode에서 signal-to-noise 비율이 높게 형성되었고 설파제 정성실험을 위하여 특수이온은 $[M+H]^+$ 과 m/z 156 이온으로 확인할 수 있었다.
3. EEC-4 plate 법으로 양성 판정된 재료중 설파제 검출률은 2001년도에 31건으로 23.3%, 2002년도에 17건으로 19%, 2003년 7월에 14건으로 20%로 나타났으며, sulfamethazine 검출률은 2001년도에 19건으로 61%에서 2003년도에 3건으로 21%로 낮게 나타났으나, 설파제의 검출률은 매년 비슷하였으며 검출종류가 다양하게 나타났다.

참고문헌

1. 권명상, 김종수, 김진선 등. 1994. 최신수의 약리학, 경복인쇄(주) : 338-347.
2. Booth NH, Mcdonald LE. 1988. *Drug and chemical residues in edible tissues of animals*. In: *Verterinary pharmacology and therapeutics* 6th ed. Iowa State University Press, Iowa : 1149-1201.
3. Thomas MH, Soroka KE Thomas SH. 1983. Quantitative thin layer chromatographic multisulfonamide screening procedure. *JAOAC* 66(4) : 881-892.
4. Dixon-Holland DE, Katz SE. 1989. Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for sulfamethazine residues in milk. *JAOAC* 72 0 : 447-450.
5. Manuel AJ, Steller WA. 1981. Gas-liquid chromatographic determination of sul-

- famethazine in swine and cattle tissues. *JAOAC* 64 : 794-799.
6. Matusik JE, Stermal RS, Barnes CJ, et al. 1990. Confirmation of identify by gas chromatography/tandem mass spectrometry of sulfathiazol, sulfamethazine, sulfachloropyridazine and sulfadimethoxine from bovine or swine liver extracts after quantitation by gas chromatography/electron-capture detection. *JAOAC* 73(4) : 529-533.
7. Nose N, Hoshino Y, Kikuchi Y, et al. 1987. Simultaneous liquid chromatographic determination of residual synthetic antibacterials in cultured fish. *JAOAC* 70 : 714-717.
8. 심영화, 이문환, 한수남, 이영재, 박종명, 손성완, 박근식. 1992. 우유중의 잔류설파제 동시다체분석법에 관한 연구. *수의공중보건학회지* 16 : 16-70.
9. Cavaliere C, Curini R, Di Corcia A, et al. 2003. A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confirmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg. *J Agric Food Chem* 51(3) : 558-566.
10. Kishida K, Furusawa N. 2001. Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken. *J Chromatogr A* 937 : 49-55.
11. Akhtar MH, Wong M, Crooks SR, et al. 1998. Extraction of incurred sulphamethazine in swine tissue by microwave assisted extraction and quantification without clean up by high performance liquid chromatography following derivatization with dimethylaminobenzaldehyde. *Food Addit Contam* 15(5) : 542-549.
12. Maxwell RJ, Lightfield AR. 1998. Multiresidue supercritical fluid extraction method for the recovery at low ppb

- levels of three sulfonamides from fortified chicken liver. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 715(2) : 431-435.
13. Bogialli S, Curini R, Di Corcia A, et al. 2003. Confirmatory analysis of sulfonamide antibacterials in bovine liver and kidney: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to a single- or triple-quadrupole mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17(11) : 1146-1156.
 14. Haller MY, Müller SR, McArdell CS, et al. 2002. Quantification of veterinary antibiotics(sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 952 : 111-120.
 15. Long AR, Hsieh LC, Malbrough MS, et al. 1990. Matrix solid phase dispersion (MSPD) isolation and liquid chromatographic determination of sulfadimethoxine in catfish(*ictalurus punctatus*) muscle tissue. *JAOAC* 73(6) : 868-871.
 16. 식품의약품안전청고시 제 2002-22호(2002. 5. 4) 2002. 1-104.
 17. 박준조, 이규춘, 고흥범. 1994. 고속액체크로마토그래피에 의한 식육중 설파제 잔류량 분석에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 18 : 317-326.
 18. Kennedy DG, McCracken RJ, Cannavan A, et al. 1998. Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotic in meat and milk. *J Chromatogr A* 812 : 77-98.
 19. Niessen WMA. 1998. analysis of antibiotics by liquid chromatography -mass spectrometry. *J Chromatogr A* 812 : 58-62,
 20. Volmer DA. 1996. Multiresidue determination of sulfonamide antibiotics in milk by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10(13) : 1615-1620.
 21. 김영철, 이용욱. 1990. 일부지역 돼지 장기 및 근육내 잔류설파메타진에 대한 조사연구, 식품위생학회지 5(4) : 197-204.
 22. 황인진, 박병욱, 김창수 등. 1990. SOS test kit 및 HPLC에 의한 도축돈의 뇨, 신장 미근육내 설파메타진 잔류량 조사. 한가위지 13(1) : 21-26.