

# 시험동물에서 설파제 투여에 의한 체내 잔류량 조사

정경태 · 조현호 · 이강록 · 김근규

가축위생시험소

## 시험동물에서 설파제 투여에 의한 체내 잔류량 조사

가축위생시험소

정경태 · 조현호 · 이강록 · 김근규

## Determination of multiple sulfonamide residues in experimental animal

Veterinary Service Laboratory

K. T. Chung, H. H. Cho, K. R. Lee, K. K. Kim

### 서 론

소극의 증대와 현대 축산업의 경영형태가 대규모, 다두사육으로 변하여 감에 따라 가축의 질병예방, 치료를 위한 각종 약제의 사용이 증가되고 있는 반면 소비자들의 소비형태가 양적인 면보다 질적인 면으로, 즉 더욱 위생적이고 안전한 축산물

을 선호하고 있다.

또한 세계무역기구(WTO)의 출범에 따라 축산물 등 각종 식품의 국가간 수출·입시 식품위생 및 검역규정(SPS) 협정에 의하여 국내에서 유통되는 축산물도 수출·입 축산물의 검역수준과 동등한 검사를 요구하고 있는 형편이다.

이에따라 국민의 건강과 양축농가의 소득 보호를 위한 한 방법으로 1990년대부터 축산물 유해잔류물질에 관한 많은 연구가 이루어져 오고 있다.<sup>1-3, 8, 10)</sup>

Sulfonamides는 병원성 세균에 대한 항균작용을 하며<sup>4,5)</sup>, 비교적 안정된 화학구조를 가지고 있으며, 항균작용의 범위가 넓어<sup>6,7)</sup> 동물질병의 예방, 치료 또는 성장촉진의 목적으로 많이 사용하고 있다.<sup>8)</sup>

현재 사용되고 있는 유해잔류물질의 분석방법은 비색법, TLC<sup>10)</sup>, ELISA, HPLC<sup>11)</sup>, GC, CHARM 법 등이 사용되고 있다.

지금까지 많은 연구자들에 의하여 잔류물질, 특히 설파제의 분석방법, 잔류량 등의 연구가 이루어지고 있으나, 축종별 휴약기간 등의 연구는 미비한 실정임을 감안하여 우선 실험동물로 마우스를 이용 5종의 설파제를 투여하여 그 잔류량을 알아보고, 아울러 설파제의 동시분석 방법에 대한 기초자료를 제시하고자 다음의 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시험시료

본 실험에, 사용한 동물에 부산광역시 보건환경연구원 가축위생시험소에서 사용되고 있는 임상적으로 건강한 마우스를 암수 구별없이 사용하였으며, 마우스는 50두씩 분리하여 사육하며 실험에 임하였는바 음수에 각각 100 $\mu$ g/ml의 농도로 설파표준품(Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfamonomethoxine, Sulfadimethoxine, Sulfamonomethoxine)을 첨가하여 7일간 급여시키고, 사료는 항상, 항균물질 등이 첨가되지 않은 마우스용 pellet사료(제일제당)를 구입 급여하였다. 사육은 cage사육을 원칙으

로 하였고 비타민 등 기타 약제는 투여하지 않았다. 설과제 투여후 1일부터 10일까지 설과제별 각각 5두씩 단계별로 도살 실험에 공하였다.

## 2. Reagents

- Sulfamerazine : Sigma's S-8876
- Sulfamethazine : Sigma's S-6256
- Sulfamonomethoxine : Sigma's S-0508
- Sulfadimethoxine : Sigma's S-7007
- Sulfaquinoxaline : Sigma's S-7382
- Potassium dihydrogen phosphate : Sigma's P-5504
- Acetonitrile : HPLC grade
- Dichlormetane : HPLC grade
- n-Hexane : HPLC grade
- Methanol : HPLC grade
- C<sub>18</sub> : LiChroprep RP-18 : Merch's

## 3. Apparatus

- Liquid chromatograph : Waters LC, UV/Vis detector model 486, U6K injector.
- Column : Nova-Pak C<sub>18</sub>(3.9x150mm, 4 $\mu$ m)

## 4. LC solution

- 시험에 사용된 DW는 Millipore사 초순수제조장치를 이용하였다.
- Mobile phase : Potassium dihydrogen phosphate(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 1g을 DW 1ℓ에 녹인후, 이액 900ml과 Acetonitrile(CH<sub>3</sub>CN) 100ml을 혼합하고 Phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)로 pH 3.5가 되도록하여 0.45 $\mu$ m filter에 여과하여 사용하였다.

· Standard solution

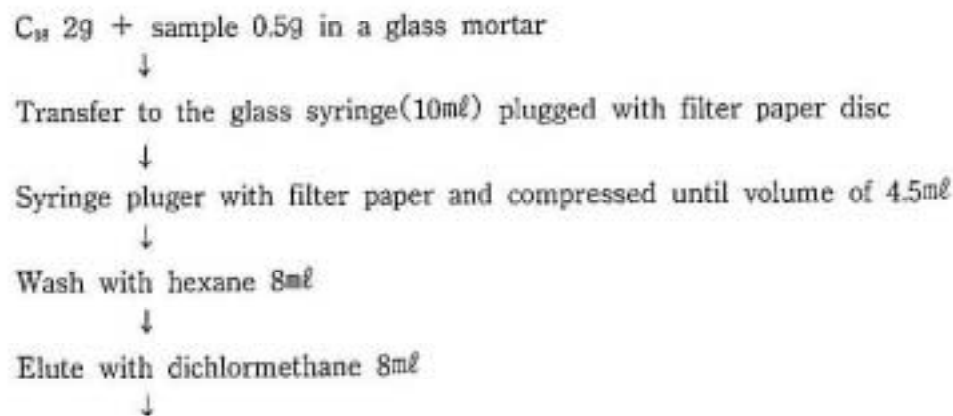
- Stock solution : Sulfamerazine(SMR), Sulfamethazine(SMT), Sulfamonomethoxine(SMM), Sulfadimethoxine(SDM), Sulfaquinoxaline(SQX)를 10 mg씩 위하여 Methanol 100ml에 녹여(100µg/ml) 냉장보관하였다.
- Working solution : 상기 Stock solution을 Mobile phase로 10배 희석(10µg/ml)시켜 냉장보관하였다.

## 5. Determination

표준점량곡선 작성은 상기 각각의 표준용액을 0.1, 0.2, 0.5ppm으로 희석한 다음 50µl를 HPLC에 주입하여 얻은 면적을 구하여 작성하였으며, 정량방법은 외부표준법을 사용하였다. 분석파장은 250~300nm의 파장범위내에서 일정 범위의 변경시키며 적정검출파장을 추정하였고, Flow rate 1.0ml/min, AUFS 0.005로 하였다.

시험동물 시료의 전처리는 근육부위 0.5g을 채취하여 Matrix solid phase dispersion(MSPD)법을 이용하였다.

즉, Octadecyl( $C_{18}$ ) 2g에 마우스 근육시료 0.5g을 넣고 균질화시킨 다음 10ml용량의 Open column에 충전시키고 n-Hexane 8ml로 세척 후 8ml의 Dichlormethane으로 용출시키고, 이액을 진공농축시켜 건조시켰다. 건조물에 0.5ml의 이동상용액으로 잘 녹이고 15,000x g에서 10분간 원심분리 후 0.45µm acro disc로 여과하여 50µl씩 HPLC에 주입하였다(Fig. 1)



Evaporate until dryness



Dissolved with mobile phase 0.5ml for HPLC determination

Fig. 1. Pretreatment procedure for the determination of sulfonamides in mouse muscle by HPLC

## 6. HPLC condition

HPLC condition은 Table 1과 같다.

Table 1. HPLC conditions of for analysis of 5 Sulfonamides.

Items	conditions
Column	Nova-Pak C <sub>18</sub> (3.9x 150mm, 4μm)
Mobile phase	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> CN=900 : 100(v/v, pH 3.5)
Flow rate	1ml/min
Detector	0.005AUFS at UV
Column temperature	Room temperature
Injection volume	50μl

## 결 과

### 1. 설파제별 적정 검출파장

5종의 설파제(SMR, SMT, SMM, SDM, SQX)를 설파제별 표준용액을 제조하여 250~300nm의 파장범위 내에서 일정 범위씩 파장을 변경시켜며 각 설파제별 적정 검출파장을 조사한 결과 SMR 265nm, SMT 270nm, SMM 274nm, SDM 270nm 그

리고 SQX 254nm에서 최대흡광치를 나타내었다(Table 2).

Table 2. Detection pertaining wavelength of residual sulfonamides by HPLC.

Sulfonamides	Wavelength(nm)
Sulfamerazine	265
Sulfamethazine	270
Sulfamonomethoxine	274
Sulfadimethoxine	270
Sulfaquinoxaline	254

## 2. 설파제별 투약중지 후 체내 잔류량

5종의 설파제(SMR, SMT, SMM, SDM, SQX)를 설파제의 투약을 중지한 후 1일부터 10일까지 1일 5두씩 도살하여 체내(근육내) 잔류량을 조사한 결과의 평균치는 Table 3에서와 같이 다소의 차이가 있으나 투여 후 7일 이후부터는 검출되지 않았다.

Table 3. Average of sulfonamides levels at slaughter in moust muscle.

Sulfonamides	Residual levels(ppm)							
	Days off sulfa	1	2	3	4	5	6	7
Sulfamerazine		0.98	0.41	0.22	0.04	0.02	ND	
Sulfamethazine		0.96	0.32	0.12	0.06	0.03	ND	
Sulfamonomethoxine		1.51	0.80	0.20	0.02	ND		
Sulfadimethoxine		0.99	0.72	0.41	0.20	0.03	0.01	ND
Sulfaquinoxaline		1.21	0.60	0.30	0.11	0.05	0.02	ND

※ ND : not detected

## 고 찰

설파제는 가축의 세균 및 원충성질병을 치료 또는 예방하고, 성장을 촉진할 목적으로 많이 사용되고 있다<sup>4, 5)</sup>. 치료제 또는 사료첨가제로 사용되고 있기 때문에 과제는 내성균을 생기게 할 수 있고, 인체내에서 각종 효소활동을 파괴시켜 생리 기능의 이상을 유발할 수 있으며<sup>12)</sup>, Rat와 토끼에서 장기 투여시 갑상선 암종을 일으킬 수 있다는 보고도 있다.

이에따라 국내에서는 보건복지부 고시 제 1996-10('96. 3. 4)호에 의거 국민보건상 문제시 될 수 있는 설파제 등 항생·항균물질에 대하여 축산물중의 유해잔류물질 허용기준을 고시하였고, 그 한계치는 미국의 FDA 규정에 따라 0.1ppm 이하로 정하였다.

현재까지 설파제의 검사법은 식품공전<sup>13)</sup>에 식육중 설파제의 동시분석법으로 소개되어 공정시험법으로 정해져 있는 HPLC에 의한 분석법이다.

김종배<sup>14)</sup> 등은 동물의 근육조직중의 합성항균제 동시분석을 위한 연구에서 HPLC의 각 설파제별 적정파장을 연구한 결과의 SMR 265nm, SMT 266nm, SMM 273nm, SDM 270nm 그리고 SQX 248nm 등이 적당한 설파제의 검출파장이라고 보고하였는바, 본 연구결과와 SMR 265nm, SMT 270nm, SMM 274nm, SDM 270nm 그리고 SQX 254nm와는 거의 일치하는 수준이었고, 이 두 결과를 놓고 볼 때 SMR, SMT, SMM, SDM 그리고 SQX의 동시분석을 위한 적정파장은 270nm의 자외선 파장이 적합할 것으로 판단된다.

국내에서의 가축위생시험소 등의 시험여건을 생각해 보면 설파제의 HPLC에 의한 분석 방법은 많은 시간과 용매 등을 필요로 하는 Liquid-liquid extraction법 보다는 상대적으로 적은 시간과 비용을 들일 수 있는 Matrix solid phase dispersion(MSPD)법이 다량의 시료를 분석하는데는 더 효과적일 것으로 판단된다.

국내외에서 설파제 등 항생·항균물질의 분석방법, 잔류량 시험 등의 조사 연구가 많이 이루어져 왔지만 실험동물에 의한 설파제의 부여와 잔류량에 관한 조사는 흔하지 않다.

Victor W. Randecker 등<sup>15)</sup>은 돼지를 실험동물로 선정 Sulfamethazine을 투여하고



(110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 투여 중지 후 근육, 간 그리고 신장 등의 조직에서 HPLC MSPD법으로 잔류량을 조사하였는데 투여중지 후 1일에 약 1ppm 수준이던 것이 투여중지 후 6일경부터는 검출되지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 다소의 차이가 인정되나 5종의 설파제(SMR, SMT, SMM, SDM, SQX)에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 설파제를 투여하고, 투여중지 후 1일에 1~1.5ppm이던 것이 5일에 SMM, 6일에 SMR, SMT 7일에 SDM SQX가 검출되지 않아 이 두 결과를 놓고 볼 때 설파제에 대한 휴약기간은 약 7일 정도가 적당하리라 판단된다.

설파제의 체내 잔류를 막기 위해서는 농가에서는 휴약기간을 반드시 준수하여야 할 것이며, 사육농가에 대한 교육프로그램의 개발과 아울러 가축의 축종별, 약제별 잔류기간과 잔류량 등의 연구와 더욱 신속하고 정확한 검사법 개발이 병행되어야 할 것이다.

## 결 론

5종 설파제(Sulfamerazine, Sulfamethazine, Sulfamonomethoxine, Sulfadimethoxine, Sulfaquinoxaline)의 마우스 투여에 의한 체내 잔류량 조사에서 설파제 동시 분석을 위한 적정 검출파장과 잔류량, 잔류기간을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 5종 설파제의 동시분석을 위한 적정 검출파장은 270nm였다.
2. 설파제 투여중지 후 1일에 체내잔류량이 1~1.5ppm이던 것이 대체로 7일 이후에는 검출되지 않았다.
3. 설파제의 휴약기간은 7일정도가 적당한 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. 박병욱, 백미순, 권기호 등. 1991. 원유중 잔류항생물질 및 설파제 조사. 한국가

- 축위생학회지 14(1) : 63-69.
2. 황태홍, 김영수, 윤은선 등. 1995. HPLC를 이용한 축산식품중 잔류 설펜아미드제의 동시분석법 연구. 한국가축위생학회지 19(1) : 13-28
  3. 박종명, 이광식, 조태행 등. 1991. 국내산 우유, 돈육 및 계육중의 항생물질 잔류조사. 농사시험연구논문집(가축위생편) 33(3) : 38-42
  4. 수의내과학 교수협의회편. 1983. 수의내과학 I (대가측편) p. 141.
  5. 이장락. 1988. 수의약리학 p. 363-370
  6. Rosenberg MC. 1985. Update on the sulfonamide residue problem. J. A. V. M. A 187 : 702-705.
  7. 신광순. 1989. 축산물중의 항균성물질 잔류문제에 대한 고찰(상). 대한수의사회지 25 : 161-167.
  8. Larocque et. al. 1990. Sulfamethazine residues in canadian consumer milk. J. Ass. Off. Anal. Chem Vol. 73, No. 3.
  9. Michael D. Smedley and John D. Weber. 1990. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. J. Ass. Off. Anal. Chem Vol. 73, No. 6
  10. USDA-FSIS. 1987. Swine urine screen sulfa-onOsite test kit, the scientific basis in on SOS. Environmental Diagnostics. Inc. 4.
  11. 한국과학기술원 도핑컨트롤센터. 1991. 식육중 유해물질 검정교육과 분석방법 개발에 관한 연구. p. 401~410.
  12. 심영하, 이문한, 한수남 등. 1992. 우유중의 잔류 설펜아미드제 동시 다제분석법에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 16(1) : 61-71
  13. Booth, NH and McDonald, LE. 1988. Drug and chemical residues in edible tissue of animals. Veterinary pharmacology and therapeutics. 6th ed.. Iowa State Univ.

Press. p. 1149-1201

14. NCTR. 1988 Technical report for experiment Number 420. Chronic toxicity and carcinogenesis study on sulfamethazine in Fisher 344 rats. National Toxicological Research.
15. 식품공업협회. 1996. 식품공전(식육종 설과제 동시분석법) p. 81-84.
16. 김종배, 최영, 조정옥 등. 1994. 액체크로마토그래피를 이용한 동물 근육조직중의 합성항균제 동시분석 연구. 대구보건환경연구원보. p. 54-71.
17. Victor W. Randecker, James A. Reagan, Ronald E. Engel et. al., 1987. Serum and urine as predictors of sulfamethazine levels in swine muscle, liver and kidney. J. of Food Protection. Vol. 50(2) : 115-122.