

MSPD 方法에 의한 豚肉中 Carbadox와 Olaquinox 分析法 研究

試驗科

황래홍·김영수·김기근

Study on Determination of Carbadox and Olaquinox in Swine Tissues by Matrix Solid Phase Disperse Method

Division of Experiment

Lae-Hwong Hwang, Young-Soo Kim and Ki-Keun Kim

= Abstracts =

This study was carried out to explore the optimal condition for determination of carbadox and olaquinox residues in swine tissues by MSPD (matrix solid phase disperse) method.

The results obtained were as follows;

1. Optimal mobile phases for carbadox and olaquinox were 18% acetonitrile and 15% methanol, respectively.
2. Optimal wavelengths for carbadox and olaquinox were 310 and 370 nm, respectively.
3. Ethyl acetate-acetonitrile (8:2) was found to be the most adequate extractant in this method.
4. The average overall recovery of carbadox at the 0.01, 0.05, and 1.0 ppm spike levels was 89.2% and that of olaquinox was 89.9%.

The detection limits were 0.5 ng for carbadox and olaquinox.

Key words : Carbadox, Olaquinox, Matrix solid phase disperse (MSPD)

緒 論

카바독스 (Carbadox)와 올라퀸독스 (Olaquinox)는 돼지의腸管疾患 治療와 豫防 및 成長促進을 위한 飼料 添加劑로 使用되고 있는 抗菌劑로서 이들 중 카바독스는 發癌性이 있는 것으로 알려져 있으며 특히 그 代謝物인 Desoxycarbadox는 發癌性 化合物로 規定되어 있다.¹⁻⁸⁾

이에 FDA에서는 카바독스가 添加된 飼料를 給與한 돼지의 屠畜前 休藥期間을 10週로 정하고 있으며 美聯邦 施行法規에는 料理되지 않은 可食部의 豚肉에 대해 카바독스는 檢出되어서는 아니된다고 規定하고^{1,2)} 있는 등 嚴格한 管理가 行해지고 있으며 國內에서도 역시 豚肉에 대해 카바독스는 檢出되어서는 아니된다고 規定하고 있다.⁹⁾

한편 올라퀸독스는 食肉에 殘留시 公衆保健學的 側面

에서 바람직하지 않은 것으로⁷⁾ 報告되고 있으나 그 有害性 與否에 관한 報告는 發見하지 못하였으며 國內에서는 牛肉과 豚肉에 대해 그 許容基準을 0.05 ppm으로 規定하고 있다.⁹⁾ 따라서 이들 藥劑를 分析하는데는 精密한 方法이 適用되어야 할 것으로 思料된다.

現在까지 이들에 관한 分析은 仔豚에 대한 比較藥理學과 毒性學 研究分野에서 TLC,⁶⁾ GC,⁴⁾ SP,^{5,6)} LC^{1,5,6)} 등을 利用하여 飼料에 대해 주로 이루어져 왔으며⁶⁾ 筋肉에 대한 分析報告는 많지 않은 實情이다.

現在 國內에서는 HPLC를 利用하여 豚肉에서 카바독스와 올라퀸독스를 分析하는 方法이 告示되어 있으나⁹⁾ 이러한 分析 方法은 그 前處理가 古典인 것으로서 많은 有機溶媒의 使用과 分析時間이 要求되며 그에 따른 回收率의 低下를 가져올 수 있는데 이는 카바독스와 올라퀸독스가 自然 또는 人爲인 빛에 매우 약한 特性을 지니고 있기 때문이다.¹⁻⁷⁾ 따라서 빛의 影響을 最少化하고 微量을 檢出할 수 있는 迅速하고 精密한 分析方法이 要求되는 것이다.

이에 본 試驗에서는 最近 有害物質 分析시 많이 利用되고 있는 MSPD(matrix solid phase disperse) 前處理方法을 利用하여 豚肉中の 카바독스와 올라퀸독스의 보다 迅速하고 精確한 分析方法을 研究하여 食肉中 有害殘留物質 分析法 發展에 寄與코져 한다.

材料 및 方法

1. 試藥 및 裝備

1) 試藥

Acetonitrile, Methanol, n-Hexane, Ethyl acetate, Dichloromethane는 HPLC grade를 使用하였으며 N,N-Dimethylformamide와 Carbadox 標準品은 SIGMA 製品을 使用하였고 Olaquinox 標準品은 國立保健院에서 分讓받은 것을 試驗에 使用하였다.

C₁₈ (40 μm prep LC packing: J.T. Baker)는 試驗에 使用하기 前에 必要한 量을 취하여 그 量의 2배에 해당하는 n-Hexane, Ethyl acetate, Methanol로 차례로 洗滌後 乾燥하였다.

카바독스와 올라퀸독스는 빛에 매우 약하기 때문에 모든 試驗過程은 可能한 빛에 露出되지 않도록 하였다.

2) 裝備

(1) HPLC

-Pump: 600E multisolvent delivery system

-Injector: Waters U6K

-Detector: Waters 996 Photodiode Array Detector

-Column: μ-Bondapak C18, 10 μm 3.9×300 mm (Waters)

-Data system: millennium 2010

(2) Rotary evaporator (heidolph vv2001)

2. 試料 및 標準溶液 調製

1) 試料

豚肉試料를 서울시 관내 畜協 共販場에서 購入하였으며 豫備試驗을 거쳐 카바독스와 올라퀸독스가 殘留하지 않은 것으로 確認된 試料를 -20°C의 冷凍庫에 保管하여 試驗에 使用하였다.

2) 標準溶液 調製

(1) Stock sol

① Carbadox-標準品 10 mg을 正確히 달아 100 ml 메스플라스크에 취하고 DMF 약 10 ml를 加하여 녹인 후 메탄올로 채워 100 ml가 되게 하였다 (100 ppm).

② Olaquinox-標準品 10 mg을 正確히 달아 100 ml 메스플라스크에 취하고 D.W 약 10 ml를 加하여 녹인 후 메탄올로 채워 100 ml가 되게 하였다 (100 ppm).

(2) Working sol

stock sol ① ②를 각각 취하여 메탄올로 10, 100 및 1000배로 稀釋 하여 使用 하였다 (10.0, 1.0, 0.1 ppm).

3. 試驗方法

試料 0.5 g에 0.1, 1.0 및 10 ppm 濃度の 카바독스와 올라퀸독스 working sol를 각각 50, 25, 50 μ씩 添加하여 (시료로서 0.01, 0.05 및 1 ppm) MSPD(matrix solid phase disperse) 方法에 따라 前處理(Fig. 1) 한 後 이들과 같은 濃도로 희석한 표준용액을 각각 50 μ씩 HPLC에 注入하여 回收率을 測定하였다.

抽出溶媒로는 Dichloromethane, Ethyl acetate 및 Ethyl acetate-Acetonitrile (8:2)를 使用하여 比較 選定 하였으며, 分析時 Photodiode Array Detector의 波長은 200 nm에서 500 nm사이에서 1.2 nm 間隔으로 測定하여 적정과장을 選定하였고, 이동상용매는 카

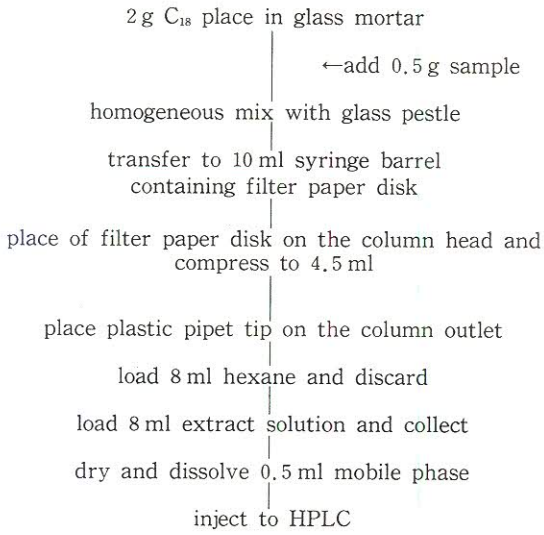


Fig. 1. Analysis process of MSPD method.

바독스의 분석시 18% 아세토니트릴을 분당 1 ml 유속으로 사용하였고 올라퀸독스 분석시에는 15% 메탄올을 사용하였다.

結果 및 考察

카바독스와 올라퀸독스 표준용액의 파장을 Photodiode Array Detector로 scanning한 結果 이들의 最大吸收波長은 각각 305와 260 nm이었으며 그 스펙트럼은 다음과 같았다 (Fig. 2).

測定波長의 選定에 있어서 重要的 것은 어떤 特定波長에서 分離하고자 하는 藥劑의 特異性으로서 비록 最大의 吸收波長이 아니라 해도 適定 感度を 維持할 수 있는 範圍內에서 特異的인 波長을 選定하여야 하는데¹⁰⁾ 本試驗에서는 카바독스와 올라퀸독스를 前處理하여 分析한 結果 카바독스는 最大 吸收波長에서 100% 特異성을 보였으나 올라퀸독스는 最大 吸收波長에서 많은 妨害 피크가 出現하여 100% 特異的이지 못한 것으로 나타났다.

이에 올라퀸독스의 스펙트럼에서 2次로 높은 吸收를 보이는 370 nm를 波長으로 하여 測定한 結果 100%의 特異성을 나타내었다. 이러한 結果는 Nagata, T. and Saeki, M.⁷⁾ 등 여러 研究結果와 一致하는 것으로 前述한 바와 같이 波長 選定時 感도와 特異성을 適切히 活

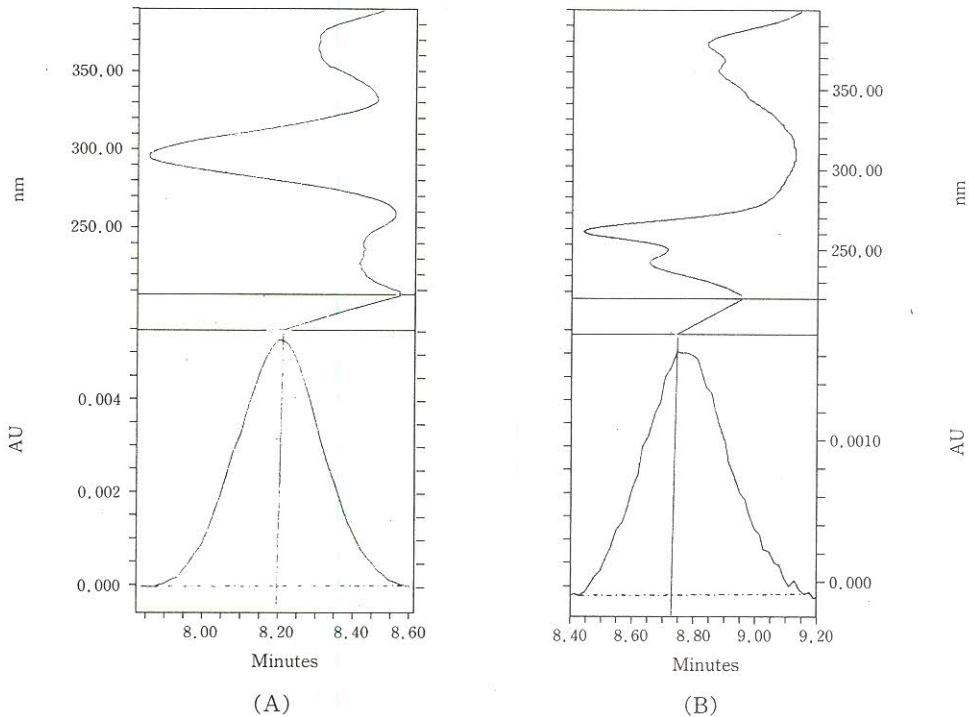


Fig. 2. UV spectra of carbadox (A) and olaquinox (B).

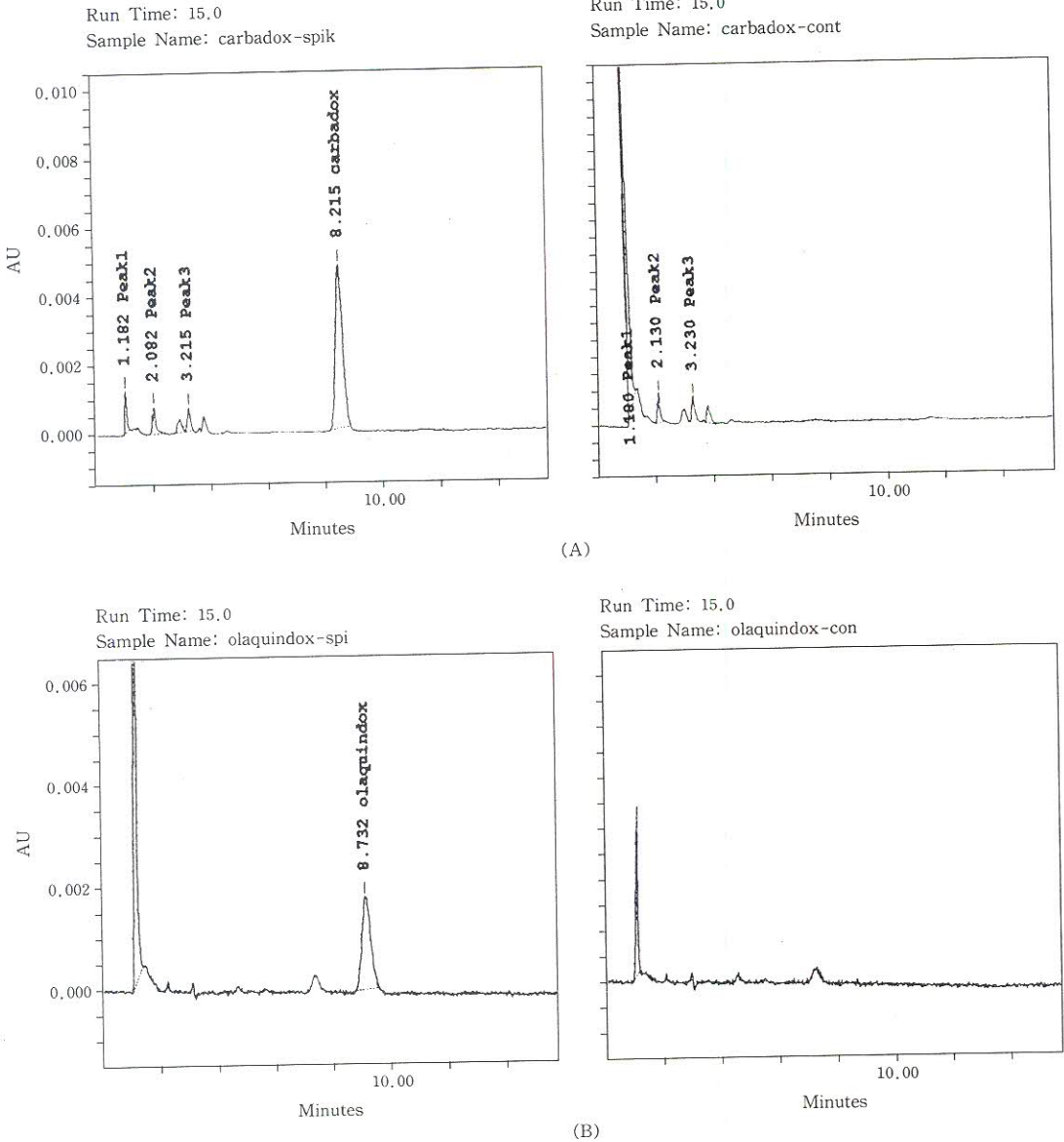


Fig. 3. Chromatogram of fortified and control tissue. (A: carbadox (20 ng), detection at 310 nm) (B: olaquinoxid (20 ng), detection at 370 nm)

用해야 한다는 것을 確認 할 수 있게 하는 것이었다.

이에 본 試驗에서는 카바독스는 310 nm를 그리고 올라퀸독스는 370 nm를 分析 波長으로 使用하였다 (Fig. 3).

한편 MSPD方法의 前處理에서 使用되는 抽出溶媒를 選定하기 위하여 먼저 디크로메탄과 초산에틸을 使用하여 豫備實驗을 한 結果 디크로메탄으로 抽出시 카바

독스와 올라퀸독스 모두에서 回收率이 10% 以下로 거의 抽出이 되지않는 것으로 나타났으며, 초산에틸로 抽出시 는 카바독스에서 全體平均 80% 以上の 回收率을 보였으나 올라퀸독스에 있어서는 40% 以下の 낮은 回收率과 높은 변이계수로 信賴度에 問題가 있는 것으로 調査되었다 (Table 1).

Table 1. Recovery of carbadox and olaquinox extracted with ethyl acetate from swine tissues.

Added, ppm	Carbadox		Olaquinox	
	Rec., ppm	Rec., %	Rec., ppm	Rec., %
0.05	0.04727	94.5	0.01771	35.4
	0.04787	95.7	0.02011	40.2
	0.04759	95.2	0.01929	38.6
	0.04928	98.6	0.01686	33.7
	0.04854	97.1	0.01697	33.9
	0.04793	95.9	0.02242	44.8
	0.04239	84.8	0.01841	36.8
	0.04401	88.0	0.01785	35.7
	0.04307	86.1	0.02021	40.4
	Av., %	92.9		37.7
SD, %	5.132		3.628	
CV, %	5.525		9.618	
1.0	0.824	82.4	0.398	39.8
	0.821	82.1	0.389	38.9
	0.821	82.1	0.383	38.3
	0.771	77.1	0.352	35.2
	0.782	78.2	0.355	35.5
	0.767	76.7	0.351	35.1
	0.798	79.8	0.398	39.8
	0.804	80.4	0.395	39.5
	0.796	79.6	0.397	39.7
	Av., %	79.8		38.0
SD, %	2.156		2.092	
CV, %	2.701		5.509	

이에 본 試驗에서는 초산에틸을 아세토니트릴과 8:2로 혼합하여 抽出溶媒의 극성을 增加시켜 보았는데 그 結果 카바독스는 豚肉試料에 0.01, 0.05, 1.0ppm 添加시 각각 96.6, 91.1, 80.0%로 全體平均 89.2%, 올라퀸독스는 각각 92.6, 93.4, 83.3%로 全體平均 89.9%의 높은 回收率을 나타내었으며 변이계수에 있어서도 대체로 適切한 것으로 調査되었다 (Table 2).

한편 이들 藥劑들의 回收率이 添加된 藥劑의 濃도가 높아 질수록 떨어지는 傾向이 있는데 이는 Macintosh, A.I. and Nevile, G.A.¹⁾가 試驗한 結果와 類似한 것으로서 試料의 前處理時 外部의 빛에 露出되는 量이 많아지기 때문인 것으로 思料되나 그 精確한 原因은 確인 할수 없었다.

본 시험結果는 Macintosh, A.I. and Nevile, G. A.¹⁾ 및 Nagata, T. and Saeki, M.⁷⁾ 등의 試驗結果와 比較해 대체로 優秀한 것으로서 이는 試料의 前處理에 가장 큰 原因이 있을 것으로 推측되는데 이들의 前處理는 試料의 抽出과 濃縮 및 pH의 矯正 등의 過程을 거치는 典型的인 方法으로서 본 試驗의 MSPD (metrix solid phase disperse)方法에 비해 많은 時間과 段階가

Table 2. recovery of carbadox and olaquinox extracted with ethyl acetate- acetonitrile (8:2) from swine tissues.

Added, ppm	Carbadox		Olaquinox	
	Rec., ppm	Rec., %	Rec., ppm	Rec., %
0.01	0.00942	94.2	0.00933	93.3
	0.00946	94.6	0.00922	92.2
	0.00964	96.4	0.00893	89.3
	0.00983	98.3	0.00891	89.1
	0.00960	96.0	0.00892	89.2
	0.00983	98.3	0.00934	93.4
	0.00962	96.2	0.01001	100.1
	0.00977	97.7	0.00962	96.2
	0.00979	97.9	0.00906	90.6
	Av., %	96.6		92.6
SD, %	1.541		3.695	
CV, %	1.595		3.990	
0.05	0.04755	95.1	0.04740	94.8
	0.04275	85.5	0.04630	92.6
	0.04635	92.7	0.04780	95.6
	0.04470	89.4	0.04640	92.8
	0.04515	90.3	0.04575	91.5
	0.04735	94.7	0.04695	93.9
	0.04670	93.4	0.04735	94.7
	0.04470	89.4	0.04725	94.5
	0.04460	89.2	0.04515	90.3
	Av., %	91.1		93.4
SD, %	3.126		1.738	
CV, %	3.433		1.861	
1.0	0.771	77.1	0.809	80.9
	0.771	77.1	0.827	82.7
	0.768	76.8	0.826	82.6
	0.834	83.4	0.841	84.1
	0.823	82.3	0.845	84.5
	0.824	82.4	0.842	84.2
	0.807	80.7	0.840	84.0
	0.800	80.0	0.835	83.5
	0.804	80.4	0.833	83.3
	Av., %	80.0		83.3
SD, %	2.508		1.120	
CV, %	3.134		1.344	

要求되며 그에 따른 分析過程에서의 損失과 빛에 露出되는 時間이 길어지게 된다. 따라서 이러한 것들이 回收率에 影響을 미친 것으로 思料된다.

실제 Macintosh, A.I. and Nevile, G.A.¹⁾이 試驗한 結果에 의하면 후드內에서 前處理동안 (2時間 以內) 60 와트의 螢光燈과의 거리에 따라 Desoxycarbadox의 回收率에 큰 差異를 보여 위의 사실을 뒷받침하여 주었다.

本 試驗은 카바독스와 올라퀸독스를 MSPD 前處理方法을 利用하여 分析 하고자 한 것으로서 이 두가지 藥劑를 同時에 前處理하여 溶媒 消耗을 줄이고 分析 時間

을 短縮할 수 있었으며 또한 分析感度에서도 優秀한 것으로 調査 되었다.

한편 이들 藥劑들은 體內에서 여러 化合物質로 代謝가 이루어지기 때문에^{6,8)} 此後 이러한 代謝物質에 대한 分析研究도 함께 이루어져야 할 것으로 思料된다.

結 論

MSPD (matrix solid phase disperse) 方法을 利用하여 豚肉中 殘留 카바독스 및 올라퀸독스를 分析하기 위한 最適의 추출용매, 파장, 이동상용매 등을 연구한 시험 結果는 다음과 같았다.

1. 카바독스와 올라퀸독스의 이동상 용매로는 각각 18% 아세토니트릴과 15% 메탄올이 適合 하였다.
2. 카바독스와 올라퀸독스의 分析 波長으로는 각각 310 nm와 370 nm가 가장 適合 하였다.
3. 抽出溶媒로는 초산에틸과 아세토니트릴을 8:2로 混合한 溶媒가 適合 하였다.
4. 本 實驗에 의한 回收率은 카바독스가 0.01, 0.05 및 1.0 ppm 添加시 全體平均 89.2%, 올라퀸독스는 89.8%로 調査되었으며 이들의 檢出限界는 0.5 ng이었다.

參 考 文 獻

1. Macintosh, A.I. and Nevile, G.A. : Liquid Chromatographic Determination of Carbadox, Desoxycarbadox, and Nitrofurazones in Pork Tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67:958(1984).
2. Roybal, J.E. Munns, R.K. and Shimoda, W. : Liquid Chromatographic Determination of Car-

- badox Residues in Animal Feed. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68:653(1985).
3. Macintosh, A.I. Lauriault, G. and Neville, G. A. : Liquid Chromatographic Monitoring of the Depletion of Carbadox and Its Metabolite Desoxycarbadox in Swine Tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68:665(1985).
4. de Graaf, G.J. and Spierenburg, T.J. : Liquid Chromatographic Determination of Carbadox and Desoxycarbadox in Medicated Feeds and in Porcine Gastrointestinal Tract. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68:658(1985).
5. Lowie, D.M. Teague, R.T. Quick, F.E. and Foster, C.L. : High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Carbadox and Pyrantel Tartrate in Swine Feed and Supplements. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66:602(1983).
6. Spierenburg, T.J. van Lenthe, H. de Graaf, G. and Jager, L.P. : Liquid Chromatographic Determination of Olaquinox in Medicated Feeds and in Contents of Porcine Gastrointestinal Tract. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71:1106(1988).
7. Nagata, T. and Saeki, M. : Determination of Olaquinox in Swine Tissues by Liquid Chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70:706(1987).
8. Lynch, M.J. and Bartolucci, S.R. : Confirmatory Identification of Carbadox-Related Residues in Swine Liver by Gas-Liquid Chromatography/Mass spectrometry with Selected Ion Monitoring. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65:66(1982).
9. 韓國食品工業協會. 식품공전. 한일인쇄. p36(1995).
10. 황래홍 : HPLC를 이용한 축산식품 중 잔류 설펜아미드제의 동시분석법 연구. 서울대 保健大學院 碩士學位論文(1995).