KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 41, No. 1, pp. 7~10 (2009)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

식육 중 항생제 flumequine의 분석

국주희 · 고용석 · 김용훈[1] · 윤창용[2] · 선남규[3] · 김은정 · 서지우 · 박지원 · 강길진[4,*]
광주지방식품의약품안전청, [1]서울지방식품의약품안전청, [2]국립독성과학원, [3]대전지방식품의약품안전청,
[4]식품의약품안전청 영양기능식품국

Analysis of Flumeqnine in Meats

Ju-Hee Kuk, Yong-Seok Ko, Yong-Hoon Kim[1], Chang-Yong Yoon[2], Nam-Kyu Sun[3], Eun-Jung Kim, Jee-Woo Seo, Ji-Won Park, and Kil-Jin Kang[4,*]

Gwangju Regional Korea Food and Drug Administration
[1]Seoul Regional Korea Food and Drug Administration
[2] National Institute of Toxicological Research
[3]Daejeon Regional Korea Food and Drug Administration
[4]Korea Food and Drug Administration

Abstract An analytical method for the determination of flumequine in meats was developed and validated using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. The samples were mixed with sodium sulfate and extracted with ethyl acetate. After clean-up, the residues were dissolved in mobile phase. The calibration curves showed high linearity ($r^2 = 0.9979$) within the concentration range of 0.1-1.0 mg/kg. The limit of detection and limit of quantification were validated at 0.005 and 0.017 mg/kg, respectively. The recoveries in fortified meats ranged from 90.8 to 101.1%. The method was then validated in correspondence with the CODEX guidelines for flumequine residue in meats. Herein we monitored 150 samples of meats that were purchased in Korea (Seoul, Busan, Daegu, Daejeon, and Gwangju). Among the tested samples, flumequine was detected in 1 of beef and 1 of pork at levels in the range of 0.048-0.080 mg/kg. Overall, the flumequine residues in the tested samples were within the Maximun residue limit.

Key words: veterinary drugs, flumequine, monitoring

서 론

오늘날 축산 기술은 그 생산성을 극대화하는 방향으로 발전하고 있으며 가축질병의 치료 및 예방, 성장촉진, 사료효율 증가를 목적으로 항생물질, 합성항균제, 호르몬제 등 동물용 의약품의 사용이 크게 증가하고 있다. 이들 동물용 의약품의 사용방법은 취급규격이나 안전사용기준 등의 법령으로 엄격하게 규제되고 있지만 축산 및 양식농가에서의 안전휴약기간과 잔류허용기준에 대한 인식부족으로 잔류될 가능성이 높아, 최종 유통단계에서의 관리는 필수적이다.

동물용의약품의 안전관리를 위해서는 축·수산물 중에 잔류하고 있는 항생제를 정확하고 신속하게 분석하기 위한 유효성이 검증된 시험법이 요구된다.

현재 우리나라 식품공전에서는 식육, 어류갑각류, 알 등에서 항생물질, 합성항균제, 성장호르몬제 등 101종의 동물용의약품에 대한 잔류허용기준(Maximum residue limit, MRL)을 설정하여 규제하고 있다(1,2).

*Corresponding author: Kil-Jin Kang, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea
Tel: 82-2-380-1311
Fax: 82-2-382-6380
E-mail: kjkang@kfda.go.kr
Received August 29, 2008; revised November 18, 2008; accepted November 20, 2008

퀴놀론(quinolone)계 항생제인 플루메퀸(flumequine)은 광범위한 Gram 음성 미생물의 감염을 억제하기 위하여 사용되는 항생물질로서 CODEX 및 EU 등에서 잔류허용기준을 규정하고 있으며, 최근, 우리나라에서도 식육, 어류 및 갑각류 중 플루메퀸에 대한 잔류허용기준을 규정하여 관리하고 있다(1,2).

플루메퀸에 대한 분석법으로는 대부분 형광검출기를 이용한 HPLC 방법이 많이 이용되며(3-9), UV 검출기를 이용한 방법도 이용된다(10-12). 또한 LC-MS 또는 LC-MS/MS를 이용하여 플루메퀸을 포함한 다양한 퀴놀론을 동시분석하는 방법도 보고되어 있다(9,12-16). 하지만, 우리나라의 식육 중 플루메퀸 분석에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 식육중 플루메퀸 분석에 대한 선형성, 회수율, 검출한계, 정량한계 등 유효성 평가를 통한 시험법을 확립하고, 시중에 유통되는 식육(쇠고기, 돼지고기, 닭고기) 150건에 대한 플루메퀸의 잔류 실태를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

2006년 6-7월중 시중에 유통되는 식육(쇠고기 양지, 돼지고기 등심, 닭고기)의 근육을 서울(S1-S10), 부산(B1-B10), 대구(D1-D10), 광주(G1-G10), 대전(J1-J10) 지역 각각 10곳에서 냉장상태로 채취하여 시료를 균질화한 다음 분석 전까지 –20°C로 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

시약 및 분석조건

플루메퀸 표준품은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 표준용액의 조제 및 시료의 추출용매(ethyl acetate, acetonitrile, *n*-hexane)는 Merck사(Darmstadt, Germany)의 HPLC급을 사용하였고, sodium sulfate는 Merck사의 특급시약을 사용하였다. HPLC, 형광검출기(fluorescence detector)는 Nanospace SI-2 (Shiseido Fine Chemicals, Yokohama, Japan)를 사용하였으며, 분석조건을 Table 1에 나타내었다.

표준용액의 조제

플루메퀸 표준품 100 mg을 정밀히 달아 100 mL 용량플라스크에 취하고 acetonitrile 10 mL를 가하여 잘 녹인 다음 acetonitrile로 표시선까지 채워 잘 혼합한 용액을 표준원액으로 사용하였으며, 표준원액을 이동상으로 희석하여 각 농도(0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/kg)의 표준용액을 조제하였다.

검출한계 및 정량한계

얻어진 크로마토그램의 signal과 noise 비율(S/N ratio) 3에 해당하는 피크 면적으로부터 계산된 플루메퀸의 농도를 기기적인 검출한계로 하였으며, 또한 signal과 noise 비율 10배에 해당하는 농도를 정량한계로 하였다.

회수율 시험

분석방법에 따른 회수율 측정을 위하여 플루메퀸이 함유되어 있지 않은 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에 각 표준용액을 0.1, 0.2, 0.4 mg/kg이 되도록 첨가하여 본 실험방법에 따라 6회 반복 실험하여 구하였다.

시료의 전처리

검체를 잘게 마쇄한 후 2 g을 50 mL 원심분리관에 취하여 무수황산나트륨 5 g, ethyl acetate 40 mL를 첨가하고 균질기로 2분간 균질화한 후 균질액을 8,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 전량 수거하여 농축수기에 옮기고 잔사에 대하여는 같은 조작을 1회 더 반복하였다. 모아진 추출액은 1 mL 정도가 되도록 35°C에서 감압 농축하고 이 농축액에 acetonitrile 100 mL를 가하여 분액깔대기에 씻어넣고, *n*-hexane 50 mL를 가하여 5분간 격렬하게 흔들어 *n*-hexane층과 acetonitrile층으로 분리하였다. 분리된 acetonitrile층을 35°C에서 감압농축으로 건조시키고, 이동상 2 mL를 가하여 녹여 0.2 μm membrane filter로 여과한 후 시험용액으로 사용하였으며, 검체당 3회 반복실험하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석조건 검토

시료를 ethylacetate로 추출 농축한 후 acetonitrile과 hexane으로 분리하여 acetonitrile 층을 농축하고 이를 C_{18} 칼럼을 이용한 HPLC로 분석한 결과, 표준물질 플루메퀸은 머무름시간 12.8분대에서 검출되었으며, 플루메퀸을 첨가하지 않은 blank 시료에서는 이 시간대에 아무런 피크도 나타나지 않아 방해피크가 없음을 확인하였다. 반면 식육에 플루메퀸을 첨가한 경우 12.8분대에서 검출되었다. 이에 대한 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1(쇠고기), Fig. 2(돼지고기), Fig. 3(닭고기)에 나타내었다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC for flumequine

	Analytical conditions
Column	Merck Hybar C_{18}(4.6×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	0.01 M oxalic acid : acetonitrile : methanol (6:3:1, v/v/v)
Detection	FL ex. = 327 nm, em. = 369 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Column temp.	35°C
Injection volume	10 μL

직선성 및 검량선

검량선 작성을 위한 표준물질 농도범위는 CODEX 및 EU의 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기의 플루메퀸의 잔류허용기준 중 최저농도 즉, 쇠고기 및 돼지고기의 우리나라 및 EU 잔류허용기준인 0.2 mg/kg의 0.5, 1, 2, 3, 4, 5배에 해당되는 표준물질 농도범위(0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/kg)에서 3회 반복하여 분석한 결과 상관계수(correlation coefficient) r^2는 0.9979로 CODEX에서 권장하는 $r^2 \geq 0.95$와 비교했을 때 높은 수준으로 매우 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 4)(17).

검출한계 및 정량한계

식육 중 플루메퀸 검출한계(Limit of detection, LOD) 및 정량한계(Limit of quantification, LOQ)는 표 2와 같으며, 각각 0.005 mg/kg 및 0.017 mg/kg이었다. 플루메퀸의 잔류허용기준이 우리나라 및 EU가 0.2-0.4 mg/kg이고, CODEX가 0.5 mg/kg 임을 고려할 때 유효한 수준이었다(1,2,17).

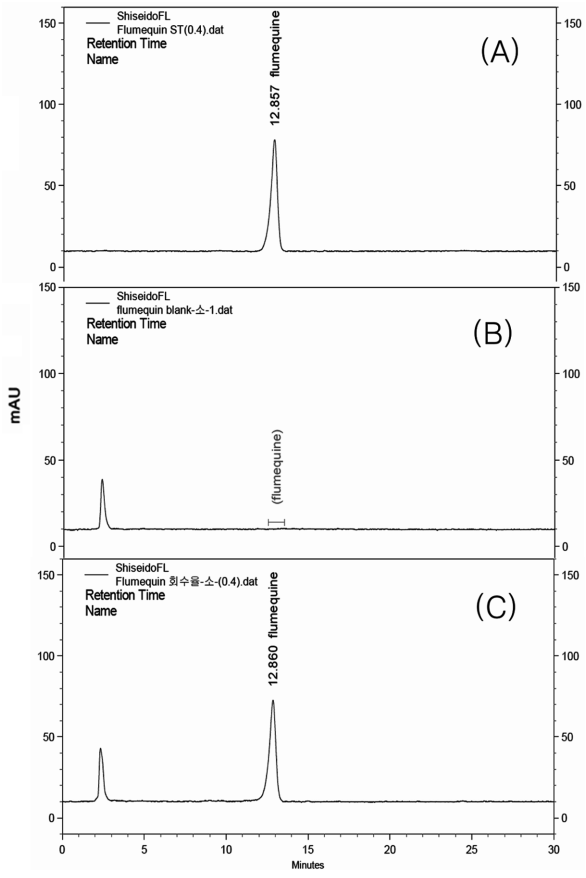

Fig. 1. Typical chromatogram of flumequine for (A) standard flumequine (0.4 mg/kg) (B) blank cattle, and (C) spiked cattle with 0.4 mg/kg.

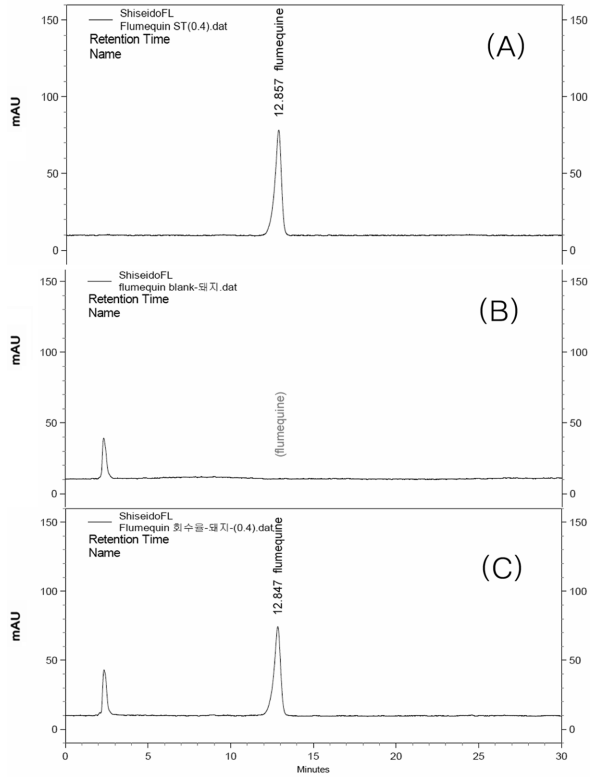

Fig. 2. Typical chromatogram of flumequine for (A) standard flumequine (0.4 mg/kg) (B) blank pork, and (C) spiked pork with 0.4 mg/kg.

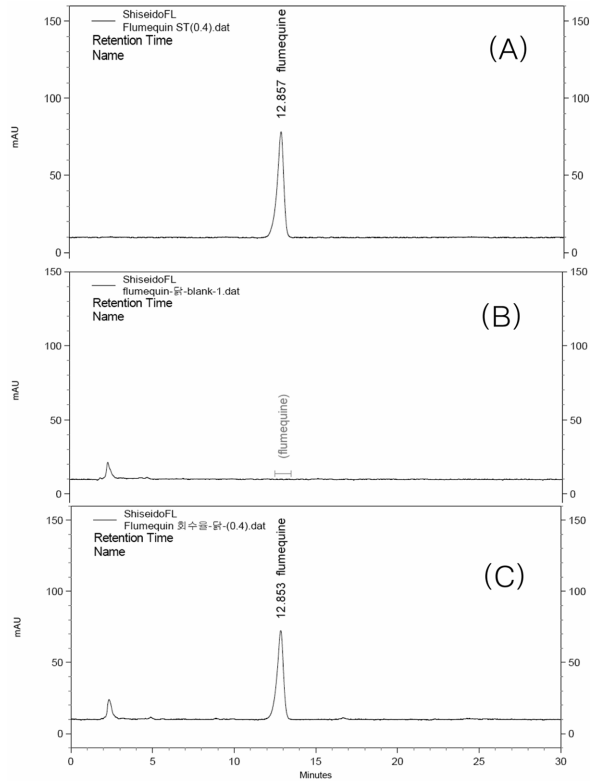

Fig. 3. Typical chromatogram of flumequine for (A) standard flumequine (0.4 mg/kg) (B) blank chicken, and (C) spiked chicken with 0.4 mg/kg.

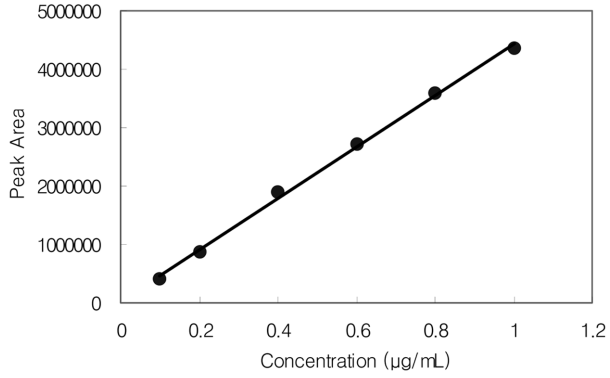

Fig. 4. Calibration curve of flumequine.

Table 2. Calibration equations, LOD and LOQ for flumequine

Calibration	Correlation coefficient (r^2)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
y = 4410285x + 32407	0.9979	0.005	0.017

시료 중 플루메퀸의 회수율

분석방법의 유효성 평가를 위하여 시중에 유통되는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에 표준물질 0.1, 0.2, 0.4 mg/kg을 첨가하여 회수율을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 회수율은 쇠고기에서 90.8-96.7%, 돼지고기에서 96.4-96.6%, 닭고기에서 94.0-101.1%이었으며, 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에서 각각 5.3-8.6%, 3.0-6.8%, 3.1-4.1%이었다(Table 3).

CODEX 잔류동물용의약품 시험법 검증(validation) 기준에 따르면, 표준물질 농도 0.1 mg/kg 이상의 범위에서 회수율 허용범위는 80-110%이며, 상대표준편차 허용범위는 15%미만이다(17). 따라서 본 시험법은 CODEX 규정에 부합하였다.

이상의 확립된 시험법은 HPLC 크로마토그램상의 머무름 시간, 직선성(r^2), 검출한계, 정량한계, 회수율의 결과로 볼때 CODEX 시험법 검증(validation) 기준에 모두 적합하여 그 유효성이 인정되었다(Table 4).

우리나라 식육중 잔류량

식육 중 플루메퀸 잔류량을 모니터링하기 위하여 상기의 최적화한 분석방법을 식육에 적용하여 플루메퀸 잔류량을 조사하였다. 시중에 유통되는 식육 150건을 전국 5개 지역별로 수거하여 잔류량을 조사한 결과, 쇠고기 1건, 돼지고기 1건에서 각각 0.080,

Table 3. Recoveries of flumequine at different spiked level food samples

Sample	Spiked (mg/kg)	Recovery(%)	RSD(%)
Cattle	0.1	96.7	7.9
	0.2	90.8	5.3
	0.4	93.1	8.6
Pig	0.1	96.6	6.8
	0.2	96.4	4.0
	0.4	96.5	3.0
Chicken	0.1	101.1	4.1
	0.2	94.0	3.9
	0.4	94.9	3.1

Table 4. Method validation parameters for flumequine

Parameter	CODEX validation guideline	In this work
Coefficient of variation (Within Laboratory Repeatability)	15%	3.0-8.6%
Recovery	80-110%	90.8-101.1%
Regression coefficient (r^2)	0.95	0.9979

Table 5. Residuals of flumequine in samples

Sample	Number of sample	Number of sample detected	Residual level (mg/kg)	MRL(mg/kg)		
				Korea	CODEX	EU
Beef	50	1	0.080	0.2	0.5	0.2
Pork	50	1	0.048	0.2	0.5	0.2
Chicken	50	0	-	0.4	0.5	0.4

0.048 mg/kg 수준으로 검출되었다(Table 5). 우리나라에서 플루메퀸 잔류허용기준은 소근육, 돼지근육, 가금근육에서 각각 0.2, 0.2, 0.4 mg/kg으로 설정되어 있으며, CODEX 잔류허용기준은 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 근육에서 모두 0.5 mg/kg, EU 잔류허용기준은 쇠고기, 돼지고기 근육에서 0.2 mg/kg, 닭고기 근육에서 0.4 mg/kg으로 규정되어 있다. 본 조사결과 식육 150건에 대한 플루메퀸 잔류량은 CODEX 및 EU 뿐만 아니라 우리나라 잔류허용기준 이하의 수준으로 나타나, 우리나라에서 유통중인 식육은 국내 및 국제기준에 안전한 것으로 사료되었다.

요 약

플루메퀸의 분석은 시료를 ethyl acetate로 추출 농축한 후 이 농축액에 acetonitrile과 *n*-hexane을 가하여 분리하고, 분리된 acetonitrile층을 농축하였다. 이를 이동상에 녹여 여과한 후 C_{18} 컬럼을 이용한 HPLC-FLD로 분석하였다. 분석법은 표준물질 0.1-1.0 mg/kg의 농도범위에서 직선성(r^2 = 0.9979)을 나타냈으며, 검출한계는 0.005 mg/kg, 정량한계는 0.017 mg/kg이었다. 또한 회수율은 쇠고기에서 90.8-96.7%, 돼지고기에서 96.4-96.6%, 닭고기에서 94.0-101.1%이었으며, 상대표준편차(RSD)는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에서 각각 5.3-8.6%, 3.0-6.8%, 3.1-4.1%이었다. 확립된 분석방법으로 유통 중인 식육(쇠고기, 돼지고기, 닭고기) 150건을 전국 지역(서울, 부산, 대구, 대전, 광주)별로 수거하여 플루메퀸의 잔류 실태를 조사한 결과, 쇠고기 1건(0.080 mg/kg), 돼지고기 1건(0.048 mg/kg)에서 검출되었으며, 조사한 식육 150건의 플루메퀸 잔류량은 모두 잔류허용기준 이하의 수준이었다.

문 헌

1. KFDA. MRLs for veterinary drugs in foods. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 9-31 (2007)
2. KFDA. Korea food code. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2008)
3. Pecorelli I, Galarini R, Bibi R, Floridi A, Casciarri E, Floridi A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 483: 81-89 (2003)
4. Ramos M, Aranda A, Garcia E, Reuvers T, Hooghuis H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. B 789: 373-381 (2003)
5. Roudaut B, Yorke JC. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine, and sarafloxacin in fish. J. Chromatogr. B 780: 481-485 (2002)
6. Hassouan MK, Ballesteros O, Taoufiki J, Vilchez JL, Cabrera-Aguilera M, Navalõn A. Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluoresccence detection. J. Chromatogr. B 852: 625-630 (2007)
7. Clare H, Sin DWM, Tang HPO, Chung LPK, Siu SMP. Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in cattle milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. J. Chromatogr. A 1061: 123-131 (2004)
8. Pilorz K, Choma I. Isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of tetracyclines and flumequine controlled by a chaotropic effect. J. Chromatogr. A 1031: 303-305 (2004)
9. Karbiwnyk CM, Carr LE, Turnipseed SB, Andersen WC, Miller KE. Determination of quinolone residues in shrimp using liquid chromatography with fluorescence detection and residue confirmation by mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 596: 257-263 (2007)
10. Delmas JM, Chapel AM, Sanders P. Determination of flumequine and 7-hydroxyflumequine in plasma of sheep by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B 712: 263-268 (1998)
11. Touraki M, Ladoukakis M, Prokopiou C. High-performance liquid chromatographic determination of oxolinic acid and flumequine in the live fish feed *Artemia*. J. Chromatogr. B 751: 247-256 (2001)
12. Clemente M, Hermo MP, Barr?n D, Barbosa J. Confirmatory and quantitative analysis using experimental design for the extraction and liquid chromatography-UV, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectry/mass spectrometry determination of quinolones in turkey muscle. J. Chromatogr. A 1135: 170-178 (2006)
13. Hoof NV, Wasch KD, Okerman L, Reybroeck W, Poelmans S, Noppe H, Brabander HD. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in cattle muscle, milk, and aquacultured products. Anal Chim. Acta. 529: 265-272 (2005)
14. Vyncht GV, Janosi A, Bordin G, Toussaint B, Maghuin-Rogister G, Pauw ED, Rodriguez AR. Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 952: 121-129 (2002)
15. Johnston L, Mackay L, Croft M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A 982: 97-109 (2002)
16. Toussaint B, Bordin G, Rodriguez AR. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 11 (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney. J. Chromatogr. A 976: 195-206 (2002)
17. CODEX guidelines for the establishment of a regulatory program for control of veterinary drug residues in foods (CAC/GL16). Available from:http://www.codexalimentarius.net/download/standards/47/CXG_016e.pdf. Accessed Jul. 20, 2008.