

## 식육 및 계란에서 플루오로퀴놀론계 항균물질 정량분석 및 잔류조사 (II)

최윤화\* · 김연주 · 이경혜 · 강영일 · 이정학

서울특별시 보건환경연구원

(접수 2009. 9. 3, 게재승인 2009. 9. 25)

## Determination and survey of fluoroquinolones in meats and eggs (II)

Yoon-Hwa Choi\*, Yeon-Ju Kim, Kyung-Hye Lee, Young-Il Kang, Jung-Hark Lee

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment

(Received 3 September 2009, accepted in revised from 25 September 2009)

### Abstract

Fluoroquinolones in muscle and egg were separated by liquid extraction and determined. The analysis was carried out using following conditions; C18 column (150×4.6mm, 5 $\mu$ m), mobile phase composed of D.W. (containing 0.4% triethylamine and phosphoric acid) : methanol : acetonitrile (780:100:120, v/v/v), quaternary pump at a flow rate of 0.9ml/min and 20 $\mu$ l of injection volume, fluorescence detector with EX 278nm/Em 456nm. The calibration range of seven fluoroquinolones showed linearity ( $r^2 \geq 0.999$ ) at concentration range of 0.025 ~ 0.8 $\mu$ g/ml. The recoveries in fortified muscle and egg represented more than 81.3%. The detection limits for ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin and orbifloxacin were 3.1, 2.5, 3.6, 1.7, 0.9, 2.5 and 2.1 $\mu$ g/kg, respectively. We also monitored fluoroquinolones residue in the sample (chicken muscle 182, cattle muscle 140, pig muscle 139, egg 212) using EEC-plate (*E. coli* ATCC 11303) screening and HPLC confirmation methods. The screening test results, fluoroquinolones, antibacterial substances were all negative.

**Key words** : Fluoroquinolone, Residue analysis, HPLC, HPLC-MSMS

### 서 론

플루오로퀴놀론계 약물은 세균의 DNA-gyrase 활성을 억제하여 항균작용을 나타내는(Gellert, 1981) 광범위 합성항균제로서 그람양성세균, 그람음성세균, *Mycoplasma* spp. 등에도 강한 항균력을 지니고 있어 사람과 가축의 치료 및 예방약제로 널리 이용되고 있다(Mituyama, 1999; Sara 등, 2008; Eliopoulos 등, 1993;

Seo 등, 2002). 주요 가축에서 플루오로퀴놀론 사용은, 닭의 만성 호흡기 질병, 대장균 감염증, 살모넬라 감염증, 전염성 코라이자 감염증 및 마이코플라즈마 병 등에(Kang 등, 1997) 돼지에서는 유행성 폐렴, 흉막폐렴, 위축성 폐렴, 대장균 감염증, 살모넬라성 설사의 예방 및 치료(Schoevers 등, 1999)에, 그리고 소에서는 기관지 폐렴, 수송열, 대장균 감염증, 살모넬라성 설사의 예방과 치료에 사용이 허가되었으며 앞으로 더욱 더 많은 동물에서의 사용이 예상되고 있다(Kang 등, 1997; Gaugain과 Abjean, 1998). 그러나 최근에 미국 등 여러

\*Corresponding author: Yoon-Hwa Choi, Tel. +82-2-570-3448, Fax. +82-2-570-3043, E-mail. cyw1215@seoul.go.kr

국가에서 플루오로퀴놀론계 저항성 *Salmonella* (Herikstad 등, 1997)와 *Campylobacter* (Smith 등, 1999)가 검출되는 등 잔류로 인한 약제내성이 문제가 되어 미국(FDA, 2003), 캐나다(Barry, 1993), 유럽(EMEA/MRL/820/02-Final, 2002), 일본(Horie 등, 1994) 등에서도 규제가 강화되고 있고 우리나라에서도 2003~2004년 국립수의과학검역원에서 전국적으로 도축장 및 농장을 대상으로 대장균과 장구균, 병원성 세균으로서는 살모넬라균을 대상으로 항생제 내성균 조사결과 닭에서 분리된 대장균은 enrofloxacin, cipro-floxacin 등의 퀴놀론계 항생제에 약 50% 이상의 내성률을 보였으며, 2008년 8월 norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin 등에 대한 잔류 허용기준이 불검출로 신설되어 규제가 강화되고 있다(식품의약품안전청, 2008).

본 연구에서는 2007년에(최, 2009) 이어 국내에서 많이 사용하고 있는 플루오로퀴놀론계 7종의 약물에 대해 2008년 서울시내에 유통 중인 소고기, 돼지고기, 닭고기 등 식육 및 계란에서 플루오로퀴놀론 합성항균제 잔류량을 조사하여 축산물의 안전성 확보를 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 표준품 및 시약

플루오로퀴놀론계 표준품은 ofloxacin (OF, Sigma), norfloxacin (NF, Sigma), ciprofloxacin (CF, Fluka), enrofloxacin (EF, Fluka), danofloxacin (DF, Riedel), sarafloxacin (SF, Sigma), orbifloxacin (OrF, Riedel)을

사용하였고, methanol, acetonitrile, ethyl acetate, n-Hexane은 HPLC급으로 사용하였으며 trichloroacetic acid, phosphoric acid, triethylamine은 특급으로 사용하였다.

### 액체크로마토그래피 분석조건

분석기기로는 HPLC-FLD (Agilent 1200series, USA)를 컬럼은 Symmetry C<sub>18</sub> (150×4.6mm, 5μm, Waters)를 이용하였다. 이동상 용매는 1L 증류수에 triethylamine과 phosphoric acid를 0.4%가 되도록 첨가시킨 용액, methanol 및 acetonitrile을 780:100:120(v/v/v)이 되도록 혼합한 후, 0.45μm 필터로 여과하여 사용하였고 검출파장은 형광검출기의 여기파장 278nm, 측정파장 455nm에서 유속은 0.9ml/min으로 측정하였다(Table 1). 또 검출된 성분의 확인을 위해 HPLC-MSMSD (Waters, USA)를 사용하였으며(Table 2) 이동상 용매는 formic acid를 증류수와 acetonitrile에 각각 0.3%가 되도록 조제하여 기용기용리법으로 acetonitrile의 농도를 2~50%로 변경하면서 실험하였다.

**Table 1.** Analytical condition of HPLC-FLD for fluoroquinolones

Items	Analytical condition
Instrument	Agilent 1200 series
Column	Symmetry C <sub>18</sub> (4.6×150mm, 5μm) H <sub>2</sub> O with 0.4% triethylamine and phosphoric acid (A)
Mobile phase	Acetonitrile (B) Methanol (C) (780:100:120)
Flow rate	0.9ml/min
FLD	Ex 278nm, Em 455nm

**Table 2.** Parameters of HPLC/MS-ESI analysis for fluoroquinolones

Compound	Precursorion (m/z)	Production (m/z)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Polarity type
Ciprofloxacin	332.51	231.39	0.1	32	38	+
		245.36		32	26	
Danofloxacin	358.55	96.35	0.1	34	26	+
		340.46		34	26	
Enrofloxacin	360.55	245.37	0.1	38	26	+
		316.46		38	20	
Norfloxacin	320.48	233.41	0.1	36	20	+
		276.41		36	16	
Ofloxacin	362.47	261.40	0.1	36	26	+
		318.51		36	18	
Orbifloxacin	396.53	295.38	0.1	40	28	+
		352.49		40	18	
Pefloxacin	334.48	233.42	0.1	36	28	+
		290.53		36	18	
Sarafloxacin	386.49	299.43	0.1	38	26	+
		342.45		38	18	

**표준용액 및 첨가시료 제조**

각각의 플루오로퀴놀론계 표준품 각각을 10mg씩 취하여 100ml 용량 플라스크에 넣고 methanol에 완전히 녹여 표준원액(100µg/ml)으로 하였다. 또 표준원액을 이동상으로 희석하여 10µg/ml로 만들어 표준용액으로 사용하였다. 첨가시료(spiked sample)는 분쇄한 근육과, 난황과 난백을 혼합한 전란액 1g씩을 50ml tube에 취해 7종의 혼합표준용액(1µg/ml)을 0.2, 0.1, 0.05ml씩을 첨가하여 0.2, 0.1 및 0.05µg/g으로 제조하였다.

표준검량곡선은 7종의 플루오로퀴놀론계 혼합표준용액(1µg/ml)을 10ml 용량플라스크에 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25ml씩 취하고 이동상으로 표시선까지 채워 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025µg/ml로 희석하였다. 7개 농도의 희석된 표준용액을 20µg씩 3회 반복 주입하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 플루오로퀴놀론계 약물에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X축을 농도, Y축을 면적으로 작성하였다.

**시료전처리**

균질화된 시료 1.0g을 50ml 원심튜브에 취한 후 2.5% trichloroacetic acid를 1ml 가해 15분간 multi-mixer로 진탕혼합한다. 추출용액인 acetonitrile을 8ml 넣고 혼합한 후 multi-mixer로 15분간 혼합하고 4,500 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액만 50ml 원심튜브에 취하였다. 남은 잔사에 acetonitrile을 5ml 넣고 15분간 multi-mixer로 재혼합한 후 원심분리하여 상층액을 합한다. 합해진 상층액에 15ml n-hexane을 첨가하여 혼합한 후 4,500rpm에서 5분간 원심분리하여 하층인 acetonitrile 용액만 유리 시험관에 모아 40°C, 질소하에서 농축건조시켰다. 건조물에 이동상 1ml를 가한 뒤 초음파 세척기에서 10분간 방치하여 완전히 용해시킨 후 4°C, 15,000rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 0.20µm syringe filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다(농림부 농업연수원, 2007).

**잔류조사 시료**

2008년 1월~2008년 12월 서울시내에 유통되는 식육 461건(닭고기 182건, 소고기 140건, 돼지고기 139건) 및 계란 212건을 검사대상으로 항균물질 간이검사 결과 양성인 시료에 대해 플루오로퀴놀론계 약물 잔류조사를 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**표준검량곡선**

7종(OF, NF, CF, DF, EF, SF, OrF)의 플루오로퀴놀론 항균물질 표준 혼합용액을 0.025~0.8µg/ml의 농도 범위에서 HPLC에 주입하여 형광검출기로 여기파장 278nm, 측정파장 455nm에서 측정하였을 때 OF, NF, CF, DF, EF, SF, OrF 모두에서 상관계수가 0.999 이상으로 양호한 직선성을 보였다(Fig. 1).

**HPLC 크로마토그램, 정확도 및 정밀도**

플루오로퀴놀론계 합성항균제 7종의 표준품에 대한 HPLC 동시분석 크로마토그램은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 분리도가 양호하였다(Fig. 2). HPLC에서는 Ofloxacin과 pefloxacin의 분리가 이루어지지 않았으나 MSMS 크로마토그램에서는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 8종이 모두 분리도가 되었다. 따라서 이들 8종 뿐 아니라 플루오로퀴놀론계의 새로운 합성품을 동시분석하기에는 MSMS의 사용이 불가피하다 하겠다.

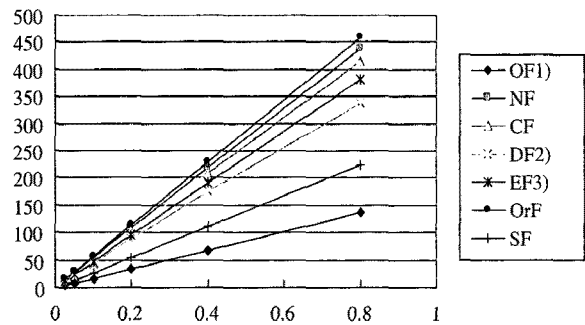


Fig. 1. Standard calibration curves of six fluoroquinolones ( $r^2 \geq 0.999$ ).

[OF: Ofloxacin, NF: Norfloxacin, CF: Ciprofloxacin, DF: Danofloxacin, EF: Enrofloxacin, SF: Sarafloxacin. OF<sup>1</sup>: peak area  $\times$  2, DF<sup>2</sup>: peak area/10, EF<sup>3</sup>: peak area/2].

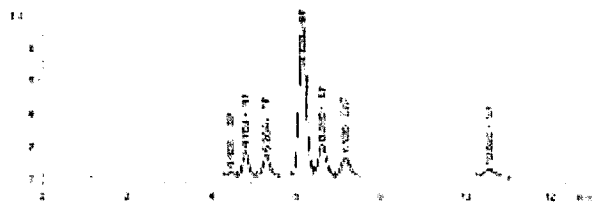


Fig. 2. HPLC chromatogram of fluoroquinolone standards (0.05 µg/ml).

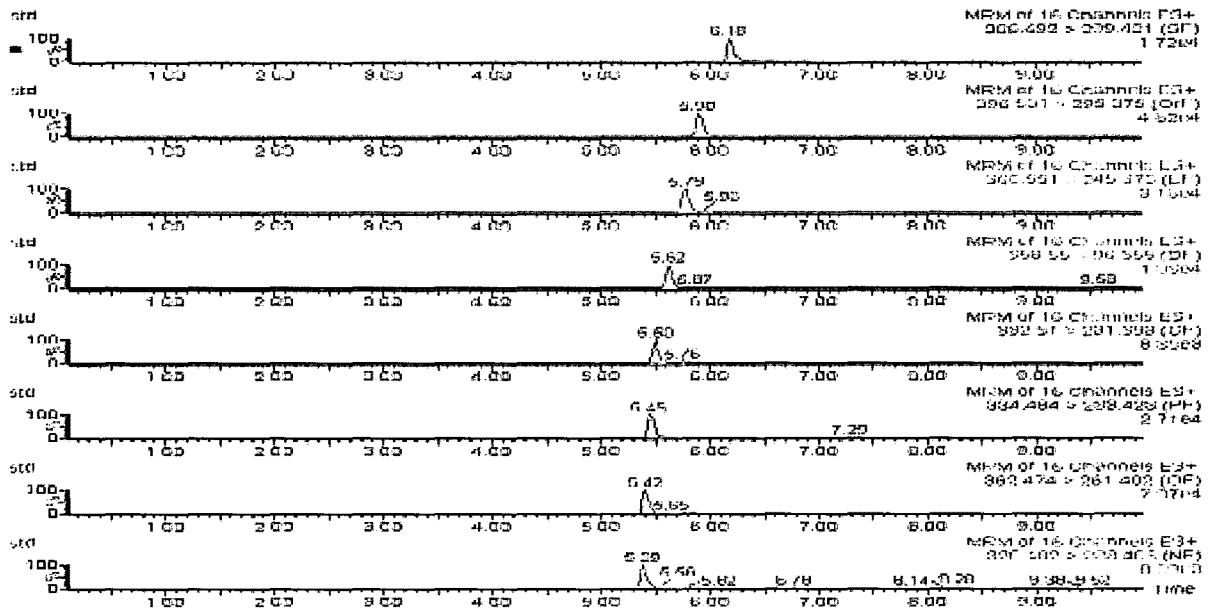


Fig. 3. LC-MS/MS chromatogram of fluoroquinolone standards (0.05µg/ml).

Table 3. Recoveries and coefficient variation of seven fluoroquinolones in spiked muscle and eggs

Fluoro-quinolones	Recovery rate (% , mean ± SD, n=3)				Coefficient of variation (%)			
	0.05µg/g	0.1µg/g	0.2µg/g	Mean	0.05µg/g	0.1µg/g	0.2µg/g	Mean
Ofloxacin	100.1 ± 8.6	98.8 ± 10.6	95.9 ± 17.0	98.3 ± 12.1	8.6	10.7	17.8	12.3
Norfloxacin	84.4 ± 4.4	81.6 ± 1.6	83.0 ± 4.5	83.0 ± 3.5	5.2	1.9	5.5	4.2
Ciprofloxacin	89.5 ± 8.5	86.9 ± 4.6	85.1 ± 5.1	87.2 ± 6.1	9.5	5.3	6.0	6.9
Danofloxacin	86.9 ± 2.0	84.7 ± 1.9	85.4 ± 0.9	85.7 ± 1.6	2.3	2.2	1.1	1.9
Enrofloxacin	90.2 ± 2.9	87.5 ± 3.2	88.6 ± 1.7	88.8 ± 2.6	3.3	3.7	1.9	2.9
Sarafloxacin	86.9 ± 0.9	81.3 ± 2.0	81.3 ± 3.0	83.2 ± 1.8	1.0	2.5	3.0	2.2
Orbifloxacin	92.9 ± 2.2	90.8 ± 2.5	90.6 ± 2.4	91.4 ± 2.6	2.4	2.8	3.3	2.8

정확도 및 정밀도를 확인하기 위해 플루오로퀴놀론계 약물이 잔류되지 않은 시료에 0.05~0.2µg/g 농도로 첨가한 후 회수율을 측정 한 결과 OF 95.9~100.1%, NF 81.6~84.4%, CF 85.1~89.5%, DF 84.7~86.9%, EF 87.5~90.2%, SF 81.3~86.9%, OrF 90.6~92.9%로 나타났으며 7종 물질에 대한 실험실내 평균 변이계수 (Coefficient of variation, CV)는 1.9~12.3%를 나타냈다 (Table 3).

7종의 약물 모두 회수율이 80% 이상으로 분석법의 정확도와 정밀도에 있어 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission, CAC)의 권장범위가 10~100ppb일 경우 회수율이 70~110%, 100ppb이상 80~110%인 점을 감안할 때 Codex 권장수준 내의 양호한 성적으로 판단되었다.

Table 4. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of seven fluoroquinolones in muscles and eggs

Fluoroquinolones	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Ofloxacin	3.1	9.4
Norfloxacin	2.5	7.7
Ciprofloxacin	3.6	11.1
Danofloxacin	0.9	2.7
Enrofloxacin	1.7	5.2
Sarafloxacin	2.5	7.5
Orbifloxacin	2.1	6.5

LOD=3.3(σ/S), LOQ=10(σ/S)  
 σ: standard deviation of the response  
 S: slope of the calibration curve

### 검출한계 및 정량한계

플루오로퀴놀론계 7종에 대한 동시분석에 있어 검출한계와 정량한계는 International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2B Metho-

logy guideline (ICH, 1996)에 따랐으며 각각 OF 3.1µg/kg, 9.4µg/kg, NF 2.5µg/kg, 7.7µg/kg, CF 3.6µg/kg, 11.1µg/kg, DF 0.9µg/kg, 2.7µg/kg, EF 1.7µg/kg, 5.2µg/kg, SF 2.5µg/kg, 7.5µg/kg, OrF 2.1µg/kg, 6.5µg/kg이었다 (Table 4). 전 연구(최, 2009)에 비해 검출한계 및 정량한계가 낮았는데 이는 기기 상태(사용연수, 램프수명 등)에 따라 달라질 수 있는 것으로 전 연구 때보다 더 상태가 좋은 기기를 사용하였기 때문이라 생각된다.

**유통축산물 중 잔류 항균물질**

2008년 1월~2008년 12월 서울시내에 유통되는 식육 461건(닭고기 182건, 소고기 140건, 돼지고기 139건) 및 계란 212건에 대해 플루오로퀴놀론계 항균물질 간이검사에서 양성 반응을 보인 시료는 없었다.

농산물품질관리원의 친환경인증통계정보에 따르면 2005년도에 소고기, 돼지고기, 닭고기, 계란, 우유 등 모든 축종을 통틀어 인증받은 축산물이 256톤이었으나 2008년엔 148,286톤으로 급격히 증가하였다. 또한 전 연구(최, 2009)에서 검사했던 계란 중 6%가 친환경 계란이었으나 본 연구에서는 33%가 그러했다.

전 연구(최, 2009)와 비교했을 때 검사건수가 2.5배 늘었음에도 불구하고 검출건수가 없었던 결과는 2007년 검사 수행시 부적합 사항에 대한 언론보도(연합뉴스, 2007)로 소비자의 인식이 많이 변화되었고 규제가 강화됨은 물론 우리나라의 축산형태가 친환경축산 즉 유기축산 및 무항생제 축산으로 전환되었기 때문이라 생각된다.

그러나 검사시료가 대형유통마트를 중심으로 검사가 되었음을 감안할 때 검사사각지대인 재래시장 같은 곳의 검사가 포함되지 않았기 때문에 앞으로 이러한 곳의 조사가 필요하다 하겠다. 또한 조(2007)의 연구에서 보듯이 국내 퀴놀론계 항생제 사용량은 축종별로 보면 닭에서 가장 많이 사용되었고, 성분별로 보면 소, 돼지, 닭 모두 enrofloxacin의 사용량이 많았는데 특히, 닭에서 enrofloxacin의 사용량은 전체 enrofloxacin의 사용량에 약 83.8%를 차지하였다고 한다. 규제가 강화되고 있으나 국내에서 사용량이 줄어들지 않은 이상 지속적인 감시가 필요하다 생각된다.

**결 론**

식육 및 포장육과 계란에서 7종의 플루오로퀴놀론

계 합성항균제(ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin, orbifloxacin)를 액상추출법으로 추출하여 HPLC-FLD를 이용하여 동시 정량분석하였으며 분석조건으로서 컬럼은 Symmetry C<sub>18</sub>(150×4.6mm, 5µm), 이동상은 0.4% triethylamine 및 0.4% phosphoric acid 수용액, methanol 및 acetonitrile 혼합용액(780:100:120, v/v/v)을 사용하였으며, 형광검출기는 여기파장 278nm, 측정파장 456nm으로 유속은 0.9ml/min, 주입량은 20µl로 하였다. 분석조건으로 측정된 ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, sarafloxacin, orbifloxacin 표준품의 표준곡선식에서 모두 상관계수 0.999이상의 양호한 직선성을 보였다. 0.05~0.2µg/g 첨가한 시료에서 평균 회수율은 ofloxacin 95.9~100.1%, norfloxacin 81.6~84.4%, ciprofloxacin 85.1~89.5%, danofloxacin 84.7~86.9%, enrofloxacin 87.5~90.2%, sarafloxacin 81.3~86.9%, orbifloxacin 90.6~92.9%이었으며 검출한계 및 정량한계는 각각 OF 3.1µg/kg, 9.4µg/kg, NF 2.5µg/kg, 7.7µg/kg, CF 3.6µg/kg, 11.1µg/kg, DF 0.9µg/kg, 2.7µg/kg, EF 1.7µg/kg, 5.2µg/kg, SF 2.5µg/kg, 7.5µg/kg, OrF 2.1µg/kg, 6.5µg/kg 수준이었다.

서울시내에서 유통 중인 식육 461건(닭고기 182건, 소고기 140건, 돼지고기 139건) 및 계란 212건에 대해 플루오로퀴놀론계 항균물질 간이검사 결과 모두 음성 반응을 나타내었다.

**참 고 문 헌**

농림부 농업연수원. 2007. 축산물잔류물질검사과정: 236-239.  
 식품의약품안전청. 2008. 식품 중 동물용의약품 잔류허용기준 및 시험법 제개정.  
 연합뉴스. 2007. 서울시, 여름철 먹을거리 안전성 검사 강화.  
 조희정. 2007. 국내 축산식품 중 퀴놀론계 항생제의 잔류에 관한 연구. 건국대학교 대학원 석사학위논문. 1-48.  
 최윤화. 2009. 액체크로마토그래피-형광검출기를 이용한 식육 및 계란에서 플루오로퀴놀론계 항균물질 동시분석 및 잔류조사. 경북대학교 대학원 석사학위논문. 1-25.  
 Barry C. 1993. The analytical testing followed by laboratory services devision of agriculture Canada for veterinary drug residues in eggs. In proceedings of the euroresidues II conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven, The Netherlands 3-5 May: 170-175.  
 Eliopoulos GM, Eliopoulos CT. 1993. Activity in vitro of the quinolones. In Hooper DC (ed)., Quinolone antimicrobial agents. 2nd ed. American Society for Micro-

- biology, Washington: 161-193.
- EMA/MRL/820/02-Final. 2002. The European agency for the evaluation of medicinal products. Veterinary medicines and inspections, Committee for veterinary medicinal products, Enrofloxacin, Summary report (5).
- FDA. 2003. Approved animal drug products. NADA. 140-828. 21 CFR 520.813.
- Gaugain JM, Abjean JP. 1998. Screening of quinolone residues in pig muscle by planar chromatography. *Chromatographia* 47(1/2): 101-104.
- Gellert M. 1981. DNA topoisomerase. *Annu Rev Biochem* 50: 879-910.
- Herikstad H, Hayes P, Mokhtar M, Fracaro ML, Threlfall EJ, Angulo FJ. 1997. Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. *Emerg Infect Dis* 3(3): 371-372.
- Horie M, Saito K, Nose N, Nakazawa H. 1994. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 653(1): 69-76.
- ICH. 1996. Topic Q2B. Validation of analytical procedure methodology in International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2B Methodology guideline.
- Kang HG, Son SW, Lee HS, Kim JH, Cho MH. 1997. Matrix Solid phase Dispersion (MSPD) extraction and HPLC determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pork muscle tissue. *Korean J Vet Res* 37: 195-202.
- Mitsuyama J. 1999. Structures of existing and new quinolones and relationship to bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 44(2): 201-207.
- Sara B, Giuseppe D, Antonio DC, Aldo L, Simone N. 2008. A simple and rapid assay based on hot water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring quinolone residues in bovine milk. *Food Chemistry* 108(1): 354-360.
- Schoevers EJ, van Leengoed LA, Verheijden JH, Niewold TA. 1999. Effects of enrofloxacin on porcine phagocytic function. *Antimicrob Agents Chemother* 43(9): 2138-2143.
- Seo KW, Lee JI, Lee CY, Kim ES, Lee JC. 2002. Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) for the isolation and LC determination of fluoroquinolones in eggs. *Kor J Vet Publ Hlth* 26(4): 269-281.
- Smith KE, Besser JM, Hedberg CW, Leano FT, Bender JB, Wicklund JH, Johnson BP, Moore KA, Osterholm MT. 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. Investigation Team. *N Engl J Med* 340(20): 1525-1532.