

축산식품 중 비스테로이드성 항염증 약물의 잔류함량 모니터링

최윤화* · 김연주 · 신방우 · 이정학

서울특별시보건환경연구원

(접수 2011. 8. 8; 수정 2011. 9. 2; 게재승인 2011. 9. 10)

Mornitoring of non-steroidal anti-inflammatory drugs in livestock products

Yoon-Hwa Choi*, Yoen-Joo Kim, Bang-Woo Shin, Jung-Hark Lee

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Seoul 427-070, Korea

(Received 8 August 2011; revised 2 Septemper 2011; accepted 10 September 2011)

Abstract

This study was conducted to determine the content of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in meats available on the Korean markets. The analysis was carried out using following conditions; C18 column (100×2.1 mm, 1.7 μm), mobile phase composed of DW (containing 0.1% formic acid): acetonitrile (containing 0.1% formic acid), binary pump at a flow rate of 0.3 ml/min and 5 μl of injection volume, MS/MS detector with ESI positive mode. The calibration range of five NSAIDs showed linearity ($r^2 \geq 0.99$) at concentration range of 3.125~200 μg/kg. The recoveries in fortified muscle more than 78.7~100.3%. The detection limits for meloxicam, ketoprofen, flunixin, carprofen and tolfenamic acid were 3.5, 1.6, 1.7, 9.8 and 4.8 μg/kg, respectively. We also monitored NSAIDs residue in cattle muscle 51 samples. The test results, NSAIDs were all not founded.

Key words : NSAIDs, Flunixin, LC-MS/MS

서 론

산업의 발달, 축산의 기업화 등에 따라 가축이 화학 물질에 노출될 가능성은 점점 높아지고 있다. 축산식품의 국제교역도 가속화되고 있어 축산식품의 안전성 확보가 필요하다. 최근 국제식품규격위원회(CODEX), 미국, 유럽연합 등에서 권장하는 위험평가지침에는 축산식품의 안전성 평가에 대한 항목이 개설되고 있는 추세이다(전, 2008; 장과 명, 2009).

비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs)은 cyclooxygenase를 억제시켜 prostaglandin 생성을 감소시킴으로

써 염증과 통증을 완화(Igualada 등, 2007; Brunton 등, 2010)하는데 항염증, 진통, 해열 등을 목적으로 수의 영역에서 널리 사용되고 있다(Daeseleire 등, 2003; Dowling 등, 2009; Gallo 등, 2010). 그러나 이들 약물의 과다복용이나 장기 치료로 몇 가지 부작용이 발생할 수 있다(Jedziniak 등, 2010). NSAIDs는 위장관 궤양, 신장 이상, 피부반응, 신장중추신경계 이상, 두통, 환각 등에 관련이 있으며(Smolinske 등, 1990), 위장관 궤양이 가장 흔한 부작용이다(Jedziniak 등, 2010). 식용동물에 NSAIDs를 사용하면 축산물에 잔류될 수 있으므로 EU, 일본 및 미국에서는 이들 약물에 대한 잔류허용기준을 설정하고 있으며, 우리나라에서는 국내 사용되고 있으나 아직까지 기준이 설정되어 있지 않다.

*Corresponding author: Yoon-Hwa Choi, Tel. +82-2-570-3445, Fax. +82-2-570-3043, E-mail. cyw1215@seoul.go.kr

축산식품 중 비스테로이드성 항염증 약물의 분석방법과 관련한 국내 연구는 거의 없고 국외 연구에서는 소변을 비롯한 생체시료(Gonzalez Martin 등, 2002)와 육류(Igualada 등, 2007; Peters 등, 2009; Jedziniak 등, 2010), 우유(Daeseleire 등, 2003; Dowling 등, 2009; Malone 등, 2009; Gallo 등, 2010), 계란(Peters 등, 2009) 등의 축산식품에 대한 보고는 충분하지 않은 편이다.

이 연구는 2008년 국립수의과학검역원에서 수행한 축산물 중 항염증성 약물에 대한 연구결과보고서의 분석법을 토대로 서울시내에서 유통되는 식육에서 비스테로이드성 항염증 약물 5종(meloxicam, ketoprofen, flunixin, carprofen, tolfenamic acid)에 대한 함량을 조사하여 그 오염실태를 파악하고 축산물의 안전성 확보를 위한 기초 자료로 활용하고자 수행되었다.

재료 및 방법

시약 및 기구

실험에 사용한 표준물질인 meloxicam, ketoprofen, flunixin, carprofen, tolfenamic acid와 내부표준물질인 d3-flunixin은 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였고 methanol, acetonitrile은 Merck사(Darmstadt, Germany)의 HPLC급으로, formic acid는 KANTO Chemical (Tokyo, Japan) 특급으로 사용하였다. 분석물질 추출에 사용한 고체상 카트리지는 Oasis HLB (60 mg, 3 ml, Waters, USA)를 사용하였고 시료의 농축을 위한 농축기는 EZ-2 plus (Genevac, UK)를 사용하였다.

분석기기 및 분석조건

분석기기로는 UPLC-MS/MS (Waters Premire XE, USA)를, 컬럼은 BEH C₁₈ (100×2.1 mm, 1.7 μm, Waters)를 이용하였다. 이동상 용매는 formic acid를 증류수와 아세트나이트릴에 각각 0.1%가 되도록 조제하여 기용기용리법으로 아세트나이트릴 농도가 40~80%로 변경하면서 분당 0.3 ml로 흘려, 컬럼 온도는 35°C, 주입량은 5 μl로 하여 실험하였다(Table 1). 질량분석기는 capillary 3.5 kV, source 온도 120°C, desolvation 온도 300°C로, gas flow는 desolvation 800 L/hr, cone 50 L/hr로 하여 ESI positive mode로 이온화하였고, 각 물질별 단일 표준물질 0.5 μg/ml의 농도를 직접 MS/MS에 주입하여 precursor ion을 선발하였으며, collision energy를 조절하여 물질별로 두개의 product ion을 선발하였다. 각 물질별 precursor ion 및 product ion에 대한 cone voltage, collision energy 등 물질별 MRM 분석조건은 Table 2와 같았다.

Table 1. Mobile phase conditions of UPLC for NSAIDs

Min	H ₂ O with 0.1% formic acid (A)	Acetonitrile with 0.1% formic acid (B)
0.0	60	40
9.0	50	50
9.1	20	80
14.0	20	80
14.1	60	40
15.0	60	40

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

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Polarity type
Ketoprofen	255	105	0.1	30	24	+
		209		30	14	
Meloxicam	352	184	0.1	30	16	+
		115		30	18	
Tolfenamic acid	262	209	0.1	26	26	+
		244		26	14	
Carprofen	274	193	0.1	10	36	+
		228		10	16	
Flunixin	297	264	0.1	28	36	+
		279		28	24	
d3-flunixin	300	264	0.1	30	34	+
		282		30	24	

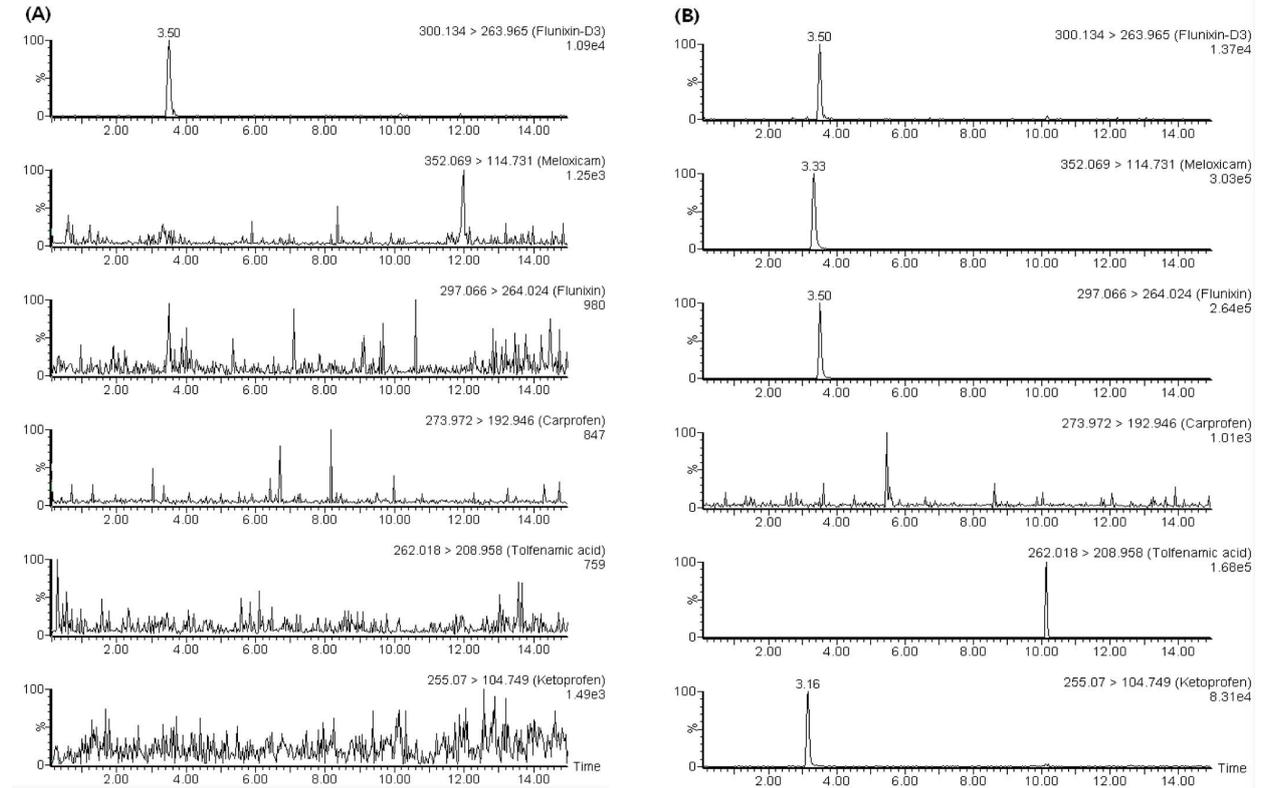


Fig. 1. Chromatogram of a blank bovine muscle (A) and a spiked bovine muscle at 50 ng/ml (B).

표준용액 및 첨가시료 제조

각각의 표준품을 10 mg씩 취하여 100 ml 용량 플라스크에 넣고 methanol에 완전히 녹여 표준원액(100 µg/ml)으로 하였다. 또 표준원액을 methanol로 희석하여 1 µg/ml로 만들어 표준용액으로 사용하였다. 첨가시료(spiked sample)는 분쇄한 근육시료에 농도가 10, 20, 30 µg/kg이 되도록 5종의 표준용액혼합액을 첨가하여 제조하였다.

시료전처리

균질화한 시료 5.0 g을 50 ml 원심튜브에 취한 후 내부표준물질인 d3-flunixin (100 µg/kg) 20 µl 첨가하고 분석물질의 추출을 위해 아세토나이트릴 15 ml 가해 0°C, 5,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취해 600°C에서 완전 농축 후 50% 메탄올 3 ml로 잔사를 녹인 다음, 1 ml 메탄올과 1 ml 증류수로 활성화한 HLB 카트리지에 시료액을 loading한다. 5% 메탄올 1 ml로 세척 후 진공 걸어 10분간 건조시켰다. 이어서 메탄올 3 ml로 용출하여 60°C에서 농축시킨 후 메탄올 1 ml에 잔사를 녹여 0.2 µm syringe fil-

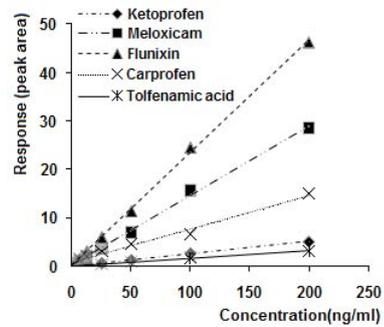


Fig. 2. The standard calibration curves of 5 NSAIDs ($r^2 \geq 0.99$). The response value of carprofen was redrawn as five hundred times because the sensitivity of carprofen is lower than other compounds.

ter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

크로마토그램 및 표준곡선 작성

국립수의과학검역원에서 수행한 연구결과보고서에

Table 3. Recovery of the NSAIDs in meat

Analyte	Recovery rate (% , mean±SD, n=3)				Coefficient of variation (%)			
	10 (ng/g)	20 (ng/g)	30 (ng/g)	Mean	10 (ng/g)	20 (ng/g)	30 (ng/g)	Mean
Ketoprofen	104.3±3.7	95.2±4.0	99.6±6.4	99.7±4.7	3.5	4.2	6.5	4.7
Meloxicam	105.7±5.7	96.2±6.1	99.0±1.9	100.3±4.6	5.4	6.3	1.9	4.5
Tolfenamic acid	84.3±2.4	77.1±7.5	78.2±8.4	79.9±6.1	2.9	9.8	10.7	7.8
Carprofen	82.4±5.7	87.4±2.0	101.9±3.7	90.6±3.8	6.9	2.3	3.7	4.3
Flunixin	82.3±1.0	75.8±0.9	78.1±0.3	78.8±0.7	1.2	1.2	0.4	0.9

서는 이동상 용매로 10 mM ammonium formate (pH 3.0)를 사용하였으나 formic acid와 비교해 본 결과 formic acid가 signal의 분리 및 intensity가 더 좋았는데 Jedziniak 등(2010)의 연구에서도 같은 결과를 보였다.

NSAIDs 5종(ketoprofen, meloxicam, tolfenamic acid, carprofen, flunixin)의 동시분석 크로마토그램은 Fig. 1과 같다. 5종의 NSAIDs는 3.125~200 ng/ml의 농도에서 표준곡선을 작성 한 결과 5종 모두 0.99 이상의 정적 상관관계(r^2)를 보였다(Fig. 2). Carprofen은 감도가 다른 물질에 비해 낮아 response값을 500배로 하여 그래프로 나타냈다.

정확도 및 정밀도

5종의 NSAIDs 물질이 검출되지 않은 시료에 농도가 10, 20, 30 µg/kg이 되도록 표준용액 혼합액을 첨가하여 정확도(평균 회수율) 및 정밀도(변이계수)를 조사한 결과 회수율은 78.7~100.3%, 정밀도는 0.9~7.8%였다(Table 3). 이는 분석법 validation에 관한 Codex 권장범위가 10~100 µg/kg에서 회수율이 70~120%, 변동계수는 20~30%이므로 적합함을 알 수 있었다.

검출한계 및 정량한계

5종의 NSAIDs 표준물질을 첨가한 근육 시료를 가지고 International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology에 따라 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 구한 결과, 검출한계는 1.6~9.8 µg/kg이고, 정량한계는 4.9~29.8 µg/kg 범위로 나타났다(Table 4). 이러한 결과는 국립수의과학검역원의 연구 보다 다소 높게 나타났다지만 EU에서 소근육에 대해 carprofen 500 µg/kg, flunixin과 meloxicam 20 µg/kg, tolfenamic acid 50 µg/kg

Table 4. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of heavy metals

Analyte	LOD* (µg/kg)	LOQ [†] (µg/kg)
Ketoprofen	1.6	4.9
Meloxicam	3.5	10.5
Tolfenamic acid	4.8	14.6
Carprofen	9.8	29.8
Flunixin	1.7	5.0

*3.3 (σ/S), [†]10 (σ/S). σ=standard deviation of the response. S=slope of the calibration curve.

이하로 규정한 기준과 비교했을 때 정량한계가 더 낮게 나타났으므로 분석에 적합함을 알 수 있었다.

유통 식육에서의 NSAIDs 함량

2010년 4월부터 6월까지 유통 중인 식육을 대상으로 서울시내 대형마트에서 수거한 소고기 51건에서 meloxicam, ketoprofen, flunixin, carprofen, tolfenamic acid 등 5종의 비스테로이드성 항염증 약물의 잔류함량을 조사한 결과 검출내역은 없었다. 국내의 NSAIDs 분석에 관한 연구논문들은 분석법 개발에 관한 것으로 잔류조사연구가 없어서 비교할 수 없었다. 그러나 미국 식품안전검사국(Food safety and inspection service, FSIS)의 2009 residue sample results (FSIS, 2011)에 따르면 소고기 579건에 대해 flunixin을 검사하였는데 검출내역은 없었다고 한다. 호주 농림수산부(Department of agriculture, fisheries and forestry, DAFF)의 2009-10 annual report (DAFF, 2010)는 소 신장에서 flunixin, ketoprofen, oxyphenbutazone, phenylbutazone, tolfenamic acid 등 5종의 NSAIDs 321건을 검사하였으나 모두 불검출이었다고 보고했다.

영국 수의잔류물질위원회(Veterinary residues committee, VRC)의 2007년 annual report (VRC, 2008)에 의하면 소혈장 284건에 대해 phenylbutazone을 검사하여 1건에서 6 µg/kg을 검출했는데, phenylbutazone은 사람

에서 드물게 재생불량성 빈혈과 같은 심각한 장애를 유발하기 때문에 영국에서는 사용을 금지하고 있다. 이렇듯 외국의 국가 잔류조사 결과를 보면 검사건수에 비해 검출건수와 그 양은 극히 미미하나 가축에서 해열, 진통, 염증치료를 목적으로 많이 사용되고 있고, 이러한 약물의 잔류로 인해 인체에 유해성이 인정되는 바 지속적인 검사가 필요하다고 생각된다.

결 론

소고기에서 5종의 비스테로이드성 항염증 약물 5종(meloxicam, ketoprofen, flunixin, carprofen, tolfenamic acid)를 고체상추출법으로 추출하여 HPLC-MSMS를 이용하여 동시 정량분석하였으며 분석조건으로 측정된 meloxicam, ketoprofen, flunixin, carprofen, tolfenamic acid 표준품의 표준곡선식에서 모두 상관계수 0.99 이상의 양호한 직선성을 보였다. 10~30 µg/kg으로 첨가한 시료에서 평균 회수율은 meloxicam 96.2~105.7%, ketoprofen 95.2~104.3%, flunixin 75.8~82.3%, carprofen 82.4~101.9%, tolfenamic acid 77.1~84.3% 이었으며 검출한계 및 정량한계는 각각 meloxicam 3.5 µg/kg, 10.5 µg/kg, ketoprofen 1.6 µg/kg, 4.9 µg/kg, flunixin 1.7 µg/kg, 5.0 µg/kg, carprofen 9.8 µg/kg, 29.8 µg/kg, tolfenamic acid 4.8 µg/kg, 14.6 µg/kg 수준이었다.

서울시 관내에서 유통되고 있는 소고기에 대해 비스테로이드성 항염증 약물 5종에 대한 함량을 조사한 결과 검출 내역은 없었다.

참 고 문 헌

- 전찬홍. 2008. 당질코르티코이드의 부작용과 예방. 대한의사협회지 51: 189-196.
- 장미애, 명승운. 2009. LC/MS/MS를 이용한 계란 중 글루코코르티코이드의 동시분석. 분석과학 22: 326-335.
- Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. 2010. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12 ed. pp. 959-977. McGraw-Hill, New York.
- Daeseleire E, Mortier L, De Ruyck H, Geerts N. 2003. Determination of flunixin and ketoprofen in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 488: 25-34.
- DAFF. 2010. National residue survey annual report 2009-2010. <http://www.daff.gov.au/agriculture-food/nrs/publications/annual-reports/nrs-annual-report-2009-2010>.
- Dowling G, Gallo P, Malone E, Regan L. 2009. Rapid confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216: 8117-8131.
- FSIS. 2011. National residue program 2009 residue sample results. http://www.fsis.usda.gov/PDF/2009_red_book.pdf.
- Gallo P, Fabbrocino S, Dowling G, Salini M, Fiori M, Perretta G, Serpe L. 2010. Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1217: 2832-2839.
- Gonzalez Martin MI, Sanchez Gonzalez CI, Jimenez Hernandez A, Garcia Cachan MD, Castro de Cabo MJ, Garzon Guadrado AL. 2002. Determination of high-performance liquid chromatography of phenylbutazone in samples of plasma from fighting bulls. *J Chromatogr B* 769: 119-126.
- Igualada C, Moragues F, Pitarch J. 2007. Rapid method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography-mass spectrometry with ion-trap detector. *Anal Chim Acta* 586: 432-439.
- Jedziniak P, Szprengier-Juskiewicz T, Olejnik M, Zmudazki J. 2010. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 672: 85-92.
- Malone EM, Dowling G, Elliott CT, Kennedy DG, Regan L. 2009. Development of a rapid, multi-class method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216: 8132-8140.
- Peters RJB, Bolck YJC, Rutgers P, Stolker AAM, Nielen MWF. 2009. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216: 8206-8216.
- Smolinske SC, Hall AH, Vandenberg SA, Spoerke DG, McBride PV. 1990. Toxic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in overdose. An overview of recent evidence on clinical effects and dose-response relationships. *Drug Saf* 5: 252-274.
- VRC. 2008. Annual report on surveillance for veterinary residues in food in the UK 2007. <http://www.official-documents.gov.uk/document/other/9780108507656/9780108507656.asp>.