

< Short Communication >

## 서울지역 유통 식육 중의 세팔로스포린계 항균물질 잔류실태 조사

김미란\* · 최윤화 · 최 훈 · 김두환 · 김영섭 · 이주형

서울특별시보건환경연구원

### Monitoring for cephalosporins residues in raw meat in Seoul

Mi-Ran Kim\*, Yoon-Hwa Choi, Hoon Choi, Doo-Hwan Kim, Young-Seob Kim, Ju-Hyung Lee

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health & Environment, Gwacheon 13818, Korea

(Received 7 August 2015; revised 14 December 2015; accepted 16 December 2015)

#### Abstract

We investigated the residues of 6 cephalosporins (cefquinome, cephalixin, cephalonium, cefazolin, ceftiofur, cefuroxime) using LC-MS/MS in raw meat in Seoul. This method involves extraction of the residue from the meat by distilled water and methanol followed by a manual of residue analysis published by the National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. The recoveries ranged between 74.71 ~ 90.01% in beef, 73.37 ~ 101.40% in pork and 70.87 ~ 95.53% in chicken, respectively. The limits of detection were 0.0004 ~ 0.0563 mg/kg, and the limits of quantification were 0.001 ~ 0.169 mg/kg respectively. Residues of cephalosporins which exceeded maximum residue limits (MRL) were not exceed in any of the 287 samples. However, it is necessary to develop multi-method, which includes the active metabolites of ceftiofur.

**Key words :** Cephalosporins residues, Raw meat, LC-MS/MS

## 서 론

가축에서 저농도 항생제는 증체율 향상을 위해 사용되었으며 중농도는 질병예방을 위해, 고농도는 치료 목적으로 사용하는 등 동물용 항생제는 가축의 효율적인 생산관리에 필수적이었다(Samanadiu 등, 2007; Hammerum 등, 2007). 다량으로 사용된 동물용 항생제는 가축 체내에 잔류하게 되었고, 이러한 축산물을 사람이 과다 섭취할 경우 항생제 내성을 유발할 수 있는 우려가 제기되어 왔다(Wegener, 2003).

세팔로스포린계 항균제는 가축에서 유방염, 호흡기 질환, 살모넬라증, 대장균증 등의 치료제로 사용되고 있다(농림수산검역검사본부, 2009; 한국수의내과학교수협의회, 2013). 국내 가축에서 항생제의 판매량은 최근 3년간 점차 감소 추세를 나타냈으나, 세팔로스

포린계 항균제의 판매량은 지속적으로 증가하여 전년 대비 '12년 37%, '13년 4% 증가하였고, 축종별로는 돼지, 소, 닭 순으로 판매되고 있다(농림수산검역검사본부, 2012; 농림축산검역본부, 2013a; 농림축산검역본부, 2014).

세팔로스포린계 항균제의 과도한 사용은 가축 체내에 내성균을 발생시키며 이들 내성균은 사람에게 전달될 수 있다고 보고되었고(Dancer, 2001; Santos 등, 2013) 세팔로스포린계 항균제를 투여한 가축의 식육, 알, 우유 등에서는 항균제가 잔류될 가능성이 있기 때문에 축산물의 안전성을 확보하기 위해서 국내뿐만 아니라 CODEX (2014), 유럽 등 세계 각국에서는 잔류허용기준을 설정하여 이들 약물에 대한 식품의 안전성 관리에 활용하고 있다(식품의약품안전처, 2013; Perez-Burgos, 2012; FDA, 2015; Haas와 Gryaznor, 2011).

이와 같이 세팔로스포린계 항균제의 내성문제는 세계적으로 중요한 공중보건학적 문제로 부각되고

\*Corresponding author: Mi-Ran Kim, Tel. +82-2-570-3447,  
Fax. +82-2-570-3043, E-mail. [jjsea77@seoul.go.kr](mailto:jjsea77@seoul.go.kr)

있어 세팔로스포린계 항균제의 식육 내 잔류량에 대한 모니터링이 필요하다(Cho 등, 2011). 그러나 국내에서 유통 식육에 대한 세팔로스포린계 항균제에 대한 잔류실태조사 자료는 거의 없으며, 국외에서도 분석방법에 대한 연구는 활발하나 식품에서의 잔류실태 조사는 매우 부족한 실정이다(Perez-Burgos, 2012; Junza 등, 2010; Junza 등, 2011; Bjorn와 Berendsen, 2012).

이 연구에서는 서울지역에서 유통되고 있는 식육을 대상으로 LC-MS/MS를 이용하여 세팔로스포린계 중 가축에 사용량이 많은 cefquinome, cephalixin, cephalonium, cefazoline, ceftiofur, cefuroxime 등 6종의 항균제를 동시분석하여 잔류실태를 조사함으로써 국내 유통 식육에 대한 안전성을 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 시료

서울지역 학교 급식소에서 147건, 정육점에서 66건, 마트에서 74건의 국내산 식육을 수거하였으며 축종별로는 쇠고기 101건, 돼지고기 105건, 닭고기 81건 등 총 287건을 공시하였다. 이 중 쇠고기, 돼지고기는 2014년 3월에 수거하였고 닭고기는 소비가 많은 7월에 수거하였다. 수거된 검체는 얼음이 채워진 아이스박스에 넣어 실험실로 곧바로 이송하였고, 도착 즉시 영하 20°C 이하의 냉동고에 보관하였으며, 실험 시 실온에서 해동하여 근육부위를 시료로 사용

하였다.

### 표준용액 조제

Cefquinome, cephalixin, cephalonium, cefazolin, ceftiofur, cefuroxime 등 6종의 표준품(Fluka co, Seelze, Germany)을 각각 10.0 mg씩 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol (Merck사, Darmstadt, Germany) 50 mL로 용해한 후 증류수로 표시선 까지 채워 표준원액으로 사용하였다. 이 표준원액을 증류수로 적당한 농도로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

### 시험용액의 조제

시험용액은 축수산물 유해물질 분석법 편람(식품의약품안전평가원, 2013)에 따라, 균질화한 시료 1 g을 50 mL 원심분리관에 취한 후 증류수 1 mL를 넣고 5분간 균일하게 혼합하였다. 여기에 methanol 2 mL를 50 mL centrifuge tube에 넣고 15분간 균질화 하였다. 4,500 rpm/min에서 15분간 원심분리(Beckman Coulter® 사, California, USA) 후 상층액을 취한 후 0.2 µm filter로 두 번 여과하여 시험용액으로 하였다.

### 분석기기 및 분석조건

이번 연구에 사용한 분석기기로는 Tandem quadrupole mass spectrometer (Water US/XEVO TQS, USA)를, 컬럼은 BEH C<sub>18</sub> (2.1×100 mm, 1.7 µm, Waters co, USA)을 사용하였다.

Table 1. HPLC and MS conditions

Column	C <sub>18</sub> (2.1×100 mm, 1.7 µm)			
Mobile solvent	A: 0.05% Formic acid in water B: 0.05% Formic acid in acetonitrile			
Column temperature	Room temp.			
Flow rate	0.2 mL/min			
Injection volume	10 µL			
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)	Curve
	0.00	90	10	
	8.00	50	50	6
	8.10	90	10	6
	10.00	90	10	6
Ionization	ESI (positive mode)			
Capillary	3.4 kV			
Nebulizer	45 psi			
Gas	Source temp. 150°C			
Temperature	Desolvation temp. 400°C			
Gas flow	Desolvation 800 L/hr			

Table 2. MRM parameters for analysis of cephalosporins residues

Compounds	Precursorion (m/z)	Production (m/z)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Cefquinome	529	134	0.2	17	15
		396			11
Cephalixin	348	158	0.2	16	7
		174			15
Cephalonium	459	152	0.2	30	20
		337			9
Cefazolin	455	156	0.2	11	15
		323			10
Ceftiofur	524	241	0.2	40	16
		285			18
Cefuroxime	447	386	0.2	30	11
		342			12

이동상 용매는 증류수 999.5 mL에 formic acid (Kanto Chemical co., Tokyo, Japan) 0.5 mL을 넣고 혼합하여 여과한 것과 acetonitrile (Merck사, Darmstadt, Germany) 999.5 mL에 formic acid 0.5 mL을 넣고 혼합하여 여과한 것으로 이용하였으며 실제 시료 매트릭스 및 불순물의 간섭을 최소화하는 이동상 조성 및 gradient 조건을 최적화하여 분석에 이용하였다(Table 1). 각 물질별 단일 표준물질 0.1 µg/mL 농도를 직접 MS/MS에 주입하여 식품의약품안전평가원(2013)에서 제공한 항균제 분석물질별 정량이온 EIC (extracted ion chromatogram)표에 의거 Precursor ion을 선별하였으

며, collision energy를 조절하여 물질별로 두 개의 product ion을 선별하였다. 각 물질별 precursor ion 및 product ion에 대한 cone voltage, collision energy 등 물질별 MRM (multiple reaction monitoring) 분석조건은 Table 2와 같으며, 6종의 세팔로스포린계 항균제의 각 물질별 MRM은 Fig. 1과 같다.

시료용액 분석에서 얻은 크로마토그램에서 각 성분에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 피크에 대한 평균면적을 구한 다음 표준곡선 좌표의 Y축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 표준곡선 상에서 만나는 점에서 수직으로 X축과 만나는 점에서 시료용액

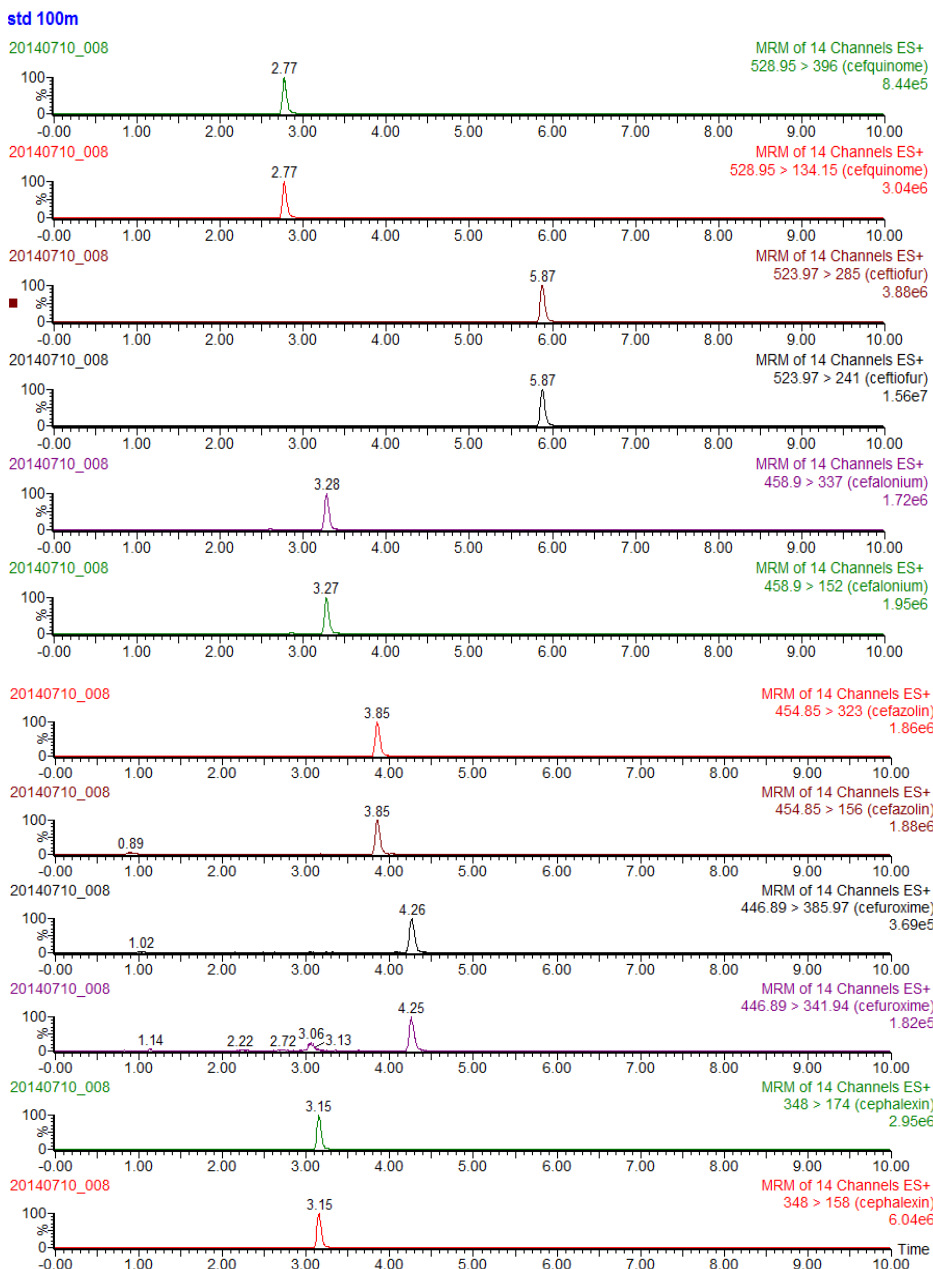


Fig. 1. MRM of cephalosporins.

의 농도를 구하였다.

### 결과 및 고찰

#### 크로마토그램 및 표준곡선

Blank를 포함하여 각 물질별 validation level농도의 0.1×, 0.5×, 1×, 2×, 4× 6단계로 조직표준곡선(matrix standard curve)을 작성하고, LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 표준곡선을 작성한 결과 상관계수 값이 모두 0.98 이상의 정의 상관관계( $r^2$ )를 보였다. 또한 세팔로스포린계 항균제 각각의 peak들의 분리능은 양호하였다(Fig. 2).

#### 정확도 및 정밀도

정확도와 정밀도는 세팔로스포린계 항균제가 검출되지 않은 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 시료에 표준물질을 3가지 농도가 되도록 첨가하여 공시시료와 동일한 방법으로 3회 반복 실험하였다. 회수율은 70.87~101.40%이었으며, 농도 구간별로는 5 µg/kg 농도에서

87.91%, 10~100 µg/kg 미만 농도에서 70.87~99.57%, 100 µg/kg 이상 농도에서 80.38~101.40%이었고, 상대표준편차(RSD%)는 9.36% 이하로 조사되었다(Table 3). 이는 분석법 validation에 관한 Codex guidelines (FDA, 2012) 권장범위가 1~10 µg/kg에서 회수율 60~120%, 10~100 µg/kg에서 회수율 70~110%, 100 µg/kg 이상에서 회수율 80~110%, 상대표준편차 15%임을 감안할 때 적절함을 알 수 있었다.

기존의 식품공전법(식품의약품안전처, 2013)의 경우 cefitiofur를 단독으로 분석하기 때문에 6종을 분석하기 위해서는 두 번의 실험을 실시하여야 하나 이번

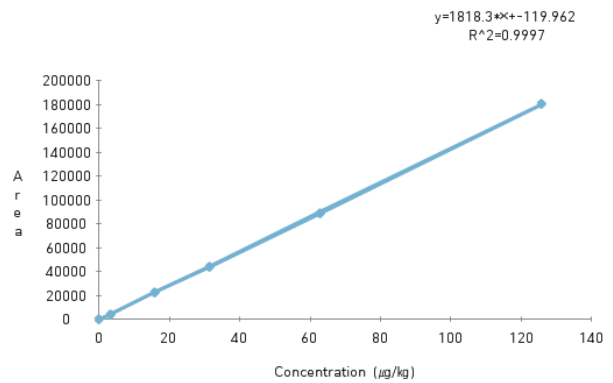


Fig. 2. Example of a standard calibration curve : cefquinome in chicken.

Table 3. Recovery data of cephalosporins

Compounds	Beef			Pork			Chicken		
	Fortified concentration (µg/kg)	Recovery (% , n=3)	RSD (%)	Fortified concentration (µg/kg)	Recovery (% , n=3)	RSD (%)	Fortified concentration (µg/kg)	Recovery (% , n=3)	RSD (%)
Cefquinome	25	80.63	0.82	25	73.37	5.41	15	71.34	1.55
	50	74.71	5.57	50	73.54	3.84	30	70.91	1.86
	100	87.54	5.21	100	81.66	1.61	60	70.87	0.73
Cephalexin	100	83.38	0.74	100	97.84	3.77	100	85.55	4.20
	200	81.47	2.14	200	100.54	0.98	200	95.53	1.29
	400	80.38	3.59	400	101.40	3.74	400	90.88	4.26
Cephalonium	5	87.91	3.94	15	93.27	3.27	15	91.97	5.77
	10	82.92	5.52	30	99.57	8.35	30	83.92	4.12
	20	86.91	5.97	60	95.40	3.66	60	78.75	6.03
Cefazolin	25	81.49	6.23	25	93.41	4.00	15	84.73	4.77
	50	90.01	2.45	50	86.82	3.30	30	84.71	2.88
	100	88.36	4.85	100	93.21	4.42	60	79.05	7.36
Ceftiofur	500	89.53	1.03	500	92.53	2.60	15	72.69	9.36
	1000	86.99	5.41	1000	91.99	2.69	30	72.04	3.43
	2000	81.55	2.16	2000	95.89	3.79	60	73.67	5.46
Cefuroxime	10	83.33	1.79	15	93.93	1.59	15	81.54	1.39
	20	87.80	1.69	30	92.30	1.62	30	79.00	8.11
	40	78.37	2.39	60	93.12	3.58	60	85.13	1.52

연구에 사용한 축수산물 유해물질 분석법 편람법은 ceftiofur를 포함하여 6종을 동시분석 할 수 있었다. 분석방법에 있어서도 ceftiofur를 제외한 세팔로스포린계 항균제 분석은 acetonitrile을 이용하여 2회 추출 하던 것을 methanol을 이용하여 1회 추출하였을 뿐만 아니라 농축과정을 거치지 않아 전처리 시간을 대폭 줄일 수 있었다. 또한 기기분석 시간을 35분에서 10분으로 줄일 수 있어 대량의 시료를 단시간에 검사하여야 하는 모니터링 검사에 매우 효과적이었다.

**검출한계 및 정량한계**

6종의 세팔로스포린계 항균제가 검출되지 않은 쇠고기 시료 7개에 잔류허용기준 농도의 1/2 농도를 첨가하여 시험법에 따라 시험한 후, 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 구한 결과, 검출한계는 0.0004~0.0563 mg/kg이고, 정량한계는 0.001~0.169 mg/kg 범위로 나타났다(Table 4). 이러한 결과는 식품공전에서 규정한 정량한계보다 더 낮게 나타났으며, 정량한계 기준이 없는 ceftiofur의 경우, 잔류허용기준 1.0 mg/kg보다 훨씬 낮게 나타났으므로 분석에 적합함을 알 수 있었다.

**유통 식육 내 세팔로스포린계 항균제 잔류량**

식육 287건에서 대해 cefquinome, cephalixin, cephalonium, cefazolin, ceftiofur, cefuroxime 등 6종의 세팔로스포린계 항균제 잔류량을 조사한 결과 모두 검출한계 이하로 나타났다(Table 5).

국내외에서 유통 식육 중 세팔로스포린 항균제의 잔류실태에 대하여 비교할 만한 보고가 없으나, 도축장에서 채취한 소 근육 44건 중 cefazolin은 검출이 없

었으며(Geis-Asteggiante, 2012), Becker (2004)는 우유 1건에서 cefquinome은 검출되었으나 근육 시료에서는 cephalixin, cephalonium, cefquinome, cefazolin이 검출되지 않았다고 보고한 바 있다. 또한, 2013~2014년 닭의 간 300건과 소의 신장 970건 중 ceftiofur, cefuroxime, cephalonium은 기준치 이상으로 검출되지 않았다는 보고(호주 농림부, 2014)와 국내 도축장의 식육 862건 중 1건에서 cephalixin이 기준치 이상으로 검출되었다는 보고(농림축산검역본부, 2015)는 이번 조사 결과와 유사하였다.

이번 조사에서 세팔로스포린계 항균제가 검출되지 않았지만 서울시청에서 축산물 위생 점검 시기에 국내산 식육만을 수거하여 수입 축산물에 대한 검사를 하지 못하였고, 수거지역과 수거량이 소수인 한계점이 있다는 점을 고려 할 때 앞으로 더 광범위한 지역과 다양한 시료를 대상으로 한 지속적인 실태조사가 필요한 것으로 판단된다.

또한 이번 실험법으로는 ceftiofur 대사물질을 동시 분석 할 수 없었으나 Bjorn과 Berendsen (2012)은 ceftiofur를 닭에 근육주사 4시간 경과 후 ceftiofur는 검출되지 않은 반면에 ceftiofur의 대사물질인 desfur-oylceftiofur는 12시간 이후에도 검출되었다고 보고한 바 있으며, 닭에서의 휴약기간 및 잔류기준이 설정되어 있지 않으므로(농림축산검역본부, 2013b; 식품의약품안전처, 2013) ceftiofur 대사물질의 안전관리를 위해 대사물질을 동시분석 할 수 있는 시험법의 개발이 필요하다고 판단된다.

**결 론**

서울지역에서 유통 중인 식육 287건에 대하여 세팔로스포린계 항균제 중 cefquinome, cephalixin, cephalonium, cefazolin, ceftiofur, cefuroxime의 잔류실태를 조사하기 위해 LC-MS/MS로 동시 정량 분석하였다. 검량선의 직선성을 검증한 결과 모두 상관계수 0.98

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

Compounds	LOD* (mg/kg)	LOQ <sup>†</sup> (mg/kg)
Cefquinome	0.0010	0.0032
Cephalixin	0.0069	0.0209
Cephalonium	0.0004	0.0014
Cefazolin	0.0007	0.0021
Ceftiofur	0.0563	0.1691
Cefuroxime	0.0009	0.0027

\* $(\delta/m) \times 3$ ; <sup>†</sup>LOD $\times 3$ .

$\delta$ =standard deviation of the response, m=slope of the calibration curve.

**Table 5.** The result of monitoring for cephalosporins residues in meat

Commodity	Number of test	No. of samples detected
Total	287	0
Beef	101	0
Pork	105	0
Chicken	81	0

이상의 양호한 직선성을 보였으며, 평균 회수율은 소 74.71~90.01%, 돼지 73.37~101.40%, 닭 70.87~95.53% 이었다. 검출한계는 0.0004~0.0563 mg/kg, 정량한계는 0.001~0.169 mg/kg 범위로 나타났다. 검사결과 식육 287건 전체에서 잔류허용기준인 0.01~1 mg/kg 이상으로 검출된 식육은 없었다. 이번 조사 결과 서울 지역 내 유통 중인 식육에서 세팔로스포린계 항균제는 검출되지 않았으나, 가축에서 이들 항균제의 사용량을 고려할 때, 축산물의 안전성을 확보하기 위해 지속적인 조사가 필요하다고 생각된다.

## REFERENCES

- 농림수산검역검사본부. 2009. 수의과학기술개발연구사업 연구성과 활용집. pp. 243-432.
- 농림수산검역검사본부. 2012. 2011년도 축산 항생제내성균 감시체계 구축 보고서.
- 농림축산검역본부. 2013a. 2012년도 축산 항생제내성균 감시체계 구축 보고서.
- 농림축산검역본부. 2013b. 동물용 의약품 안전사용 기준. 농림축산검역본부고시 제2013-28호.
- 농림축산검역본부. 2014. 2013년도 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링 : 가축, 축·수산식품.
- 농림축산검역본부. 2015. 2014년도 국내산 식육 잔류물질 검사결과 보고.
- 식품의약품안전처. 2013. 식품공전. 식품의약품안전처고시 제2014-117호.
- 식품의약품안전평가원. 2013. 축수산물 유해물질 분석법 편람. pp. 78-82.
- 한국수의내과학교수협의회. 2013. 대동물내과학. 교육문화원, 서울.
- Australian Government department of agriculture, Animal product monitoring results tables 2013-14 Meat, Poultry Annual Results 2013-2014, Beef Annual Report 2013-2014 <http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/agriculture-food/nrs/2013-14-results/cattle.pdf>, <http://www.agriculture.gov.au/SiteCollectionDocuments/agriculture-food/nrs/2013-14-results/poultry.pdf>
- Becker M. 2004. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 520: 19-32.
- Berendsen BJ, Stolker LA, Nielen MW. 2012. Assessment of liquid chromatography-tandem mass spectrometry approaches for the analysis of ceftiofur metabolites in poultry muscle. *Food Addit Contam* 29: 197-207.
- Cho JK, Sung MS, Kim JH, Kim KS. 2011. Detection of CTX-M and TEM type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Escherichia coli* isolated from livestock in Korea. *Korean J Vet serv* 34: 37-43.
- Dancer SJ. 2001. The problem with cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 48: 463-478.
- FDA. 2012. CODEX Guideline for validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program. Appendix 2. pp. 25-26.
- FDA. 2015. Electronic Code of Federal Regulations, Food and drugs, Chapter I Subchapter E.
- Geis-Asteggiante L, Lehotay SJ, Lightfield AR, Dutko T, Ng C, Bluhm L. 2012. Ruggedness testing and validation of practical analytical method for > 100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J chromatogr A* 1258: 43-54.
- Haas M, Gryaznor A. 2011. Amendment to sanitary norms establishes several new MRLs. USDA Foreign agricultural service Appendix 21. pp. 20-21
- Junza A, Amatya R, Perez-burgos R, Gokce G, Grzelak E, Barron D, Barbosa J. 2010. Residues of  $\beta$ -lactams and quinolones in tissues and milk samples. Confirmatory analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Annals of Chemistry* 21: 109-122.
- Junza A, Amatya R, Barron D, Barbosa J. 2011. Comparative study of the LC-MS/MS and UPLC-MS/MS for the multi-residue analysis of quinolones, penicillins and cephalosporins in cow milk and validation according to the regulation 2002/657/EC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 879: 2601-2610.
- Perez-Burgos R, Grzelak EM, Gokce G, Saurina J, Barbosa J, Barrón D. 2012. Quenchers methodologies as an alternative to solid phase extraction(SPE) for the determination and characterization of residues of cephalosporins in beef muscle using LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 899: 57-65.
- Phillip I. 2007. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. *Int J Antimicrob Agents* 30: 466-468.
- Samanadiu VF, Nisyriou SA, Papadoyannis IN. 2007. Development and validation of an HPLC method for the determination of penicillin antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union Decision. *J Sep Sci* 30: 3193-3201.
- Santos LLD, Moura RA, Aguilar-Ramires P, Castro APD, Lincopan N. 2013. Current status of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase(ESBL)-producing Enterobacteriaceae in animals. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education FORMATEX 2013: 1600-1607.
- The Codex Alimentarius Commission. 2014. Maximum residue limits(MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods. pp. 7.
- Wegener HC. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr opin Microbiol* 6: 439-445.