

## LC-MS/MS를 이용한 육류 중 페니실린계 항생제 8종의 동시분석 및 적용성 검증

김명애<sup>1</sup> · 윤수진<sup>1</sup> · 김미경<sup>1\*</sup> · 조윤제<sup>1</sup> · 최선주<sup>1</sup> · 장문익<sup>1</sup>  
이상목<sup>1</sup> · 김희정<sup>1</sup> · 정지윤<sup>1</sup> · 이규식<sup>1</sup> · 이상재<sup>2</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과, <sup>2</sup>식품의약품안전평가원 식품위해평가부

### Simultaneous Determination of Penicillin Antibiotics in Meat using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

Myeong-Ae Kim<sup>1</sup>, Su-Jin Yoon<sup>1</sup>, MeeKyung Kim<sup>1\*</sup>, Yoon-Jae Cho<sup>1</sup>, Sun-Ju Choi<sup>1</sup>, Moon-Ik Chang<sup>1</sup>, Sang-Mok Lee<sup>1</sup>, Hee-Jeong Kim<sup>1</sup>, JiYoon Jeong<sup>1</sup>, Gyu-Seek Rhee<sup>1</sup>, and Sang-Jae Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Osong, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea

<sup>2</sup>Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Osong, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea

(Received February 12, 2014/Revised March 20, 2014/Accepted May 16, 2014)

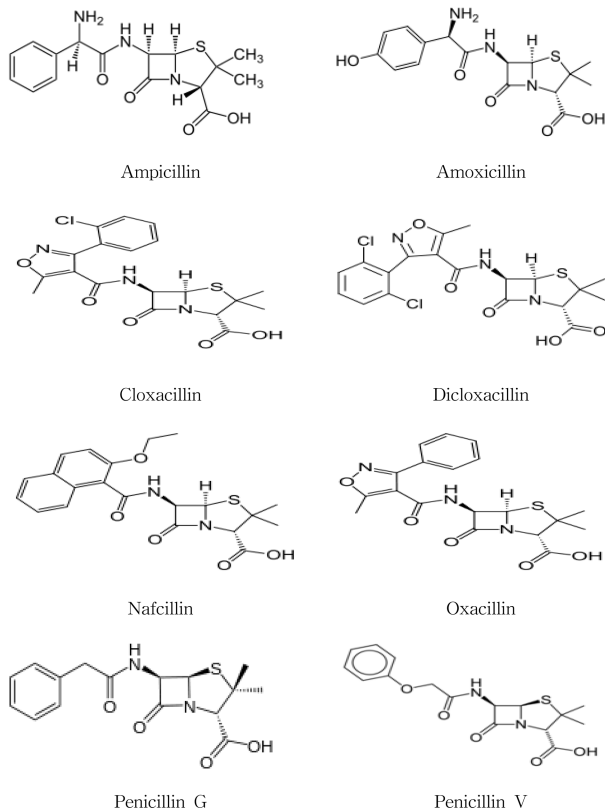
**ABSTRACT** - The objective of this study was to develop a simultaneous method of 8 penicillin antibiotics including amoxicillin, ampicillin, cloxacillin, dicloxacillin, nafcillin, oxacillin, penicillin G and penicillin V in meat using LC-MS/MS. The procedure involves solid phase extraction with HLB cartridge and subsequent analysis by LC-MS/MS. To optimize MS analytical condition of 8 compounds, each parameter was established by multiple reaction monitoring in positive ion mode. The chromatographic separation was achieved on a C<sub>18</sub> column with a mobile phase of 0.05% formic acid and 0.05% formic acid in acetonitrile at a flow rate of 0.2 mL/min for 20 min with a gradient elution. The developed method was validated for specificity, linearity, accuracy and precision in beef, pork and chicken. The recoveries were 71.0~106%, and relative standard deviations (RSD) were 4.0~11.2%. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0.003~0.008 mg/kg and 0.01~0.03 mg/kg, respectively, that are below maximum residue limit (MRL) of the penicillins. This study also performed survey of residual penicillin antibiotics for 193 samples of beef, pork and chicken collected from 9 cities in Korea. Penicillins were not found in all the samples except a sample of pork which contained cloxacillin (concentration of 0.08 mg/kg) below the MRL (0.3 mg/kg).

**Key words** : penicillin antibiotics, meat, validation, LC-MS/MS

우리 국민의 식생활 수준 향상으로 육류 및 단백질 식품의 소비가 증가하면서 축산식품의 대량생산을 위한 동물용의약품 사용 또한 증가하였다<sup>1)</sup>. 이에 따라 동물용의약품이 잔류하는 축산물을 사람이 섭취하여 나타나는 부작용과 인체 내성률 증가에 대한 우려가 제기되고 있다<sup>2)</sup>. 국내에서 가장 많이 사용되는 동물용의약품은 항생제와 합성항균제이다<sup>3-4)</sup>. 국외에서의 연간 항생제 사용량은 미국 약 9,100톤, 프랑스 1,390톤, 일본 1,059톤, 영국 459톤, 호주 199톤, 덴마크 112톤, 뉴질랜드 80톤, 스웨덴 16톤, 노

르웨이 6톤 정도를 사용하고 있는 것으로 조사되었다<sup>5-6)</sup>. 국내의 축산용 항생제 전체 사용량은 2012년 기준 약 936톤으로, 이는 2001년의 항생제 사용량과 비교하여 41%가 감소하였다<sup>7)</sup>. 2001년부터 2012년까지 국내 동물용의약품의 사용량은 전체적으로 감소하는 추세이며, 이는 2005년부터 농림수산식품부에서 추진해온 배합사료 제조용 항생제 감축정책이 영향을 미친 것으로 분석되고 있다<sup>8)</sup>. 국내에서 사용량이 많은 항생제 및 합성항균제는 테트라사이클린계, 페니실린계, 설폰아마이드계, 아미글리코사이드, 마크로라이드계, 퀴놀론계 순으로 조사되었다<sup>9)</sup>. 사용량이 가장 많은 테트라사이클린계 항생제는 2001년의 약 752톤에서 2012년의 약 282톤으로 약 63% 감소한 반면, 두 번째로 사용량이 많은 페니실린계 항생제의 경우는 2001년 약 114톤, 2007년 267톤에서 2012년 약 190톤으로 연

\*Correspondence to: MeeKyung Kim, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Osong, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea  
Tel : 82-43-719-4202, Fax : 82-43-719-4200  
E-mail : mkim@korea.kr



**Fig. 1.** Molecular structures of penicillins.

도별로 차이가 있으나 현재 감소추세에 있으며 지속적인 관심이 필요한 것으로 사료된다<sup>7)</sup>.

항생제는 작용기전에 따라 세포벽 합성 억제, DNA 합성 억제, DNA 및 RNA 관련 효소작용 억제, 단백질 합성 억제 등으로 나뉘는데, 페니실린은 세포벽 합성을 저해하는 대표적인 항생제로 특히 그람양성균에서 세포벽을 약화시킴으로써 박테리아를 용균하여 사멸시킨다<sup>10-11)</sup>. 페니실린은 동물의 호흡기관, 비뇨기관, 피부와 관련한 질병에 효과가 있으며, 그 작용범위가 넓어 대중적으로 많이 사용되는 항생제이다<sup>12)</sup>. 대표적인  $\beta$ -lactam계열 항생제인 페니실린은  $\beta$ -lactam 고리를 갖는 구조적 특징을 갖는다<sup>13-16)</sup>. 페니실린에 내성을 가진 박테리아는 이러한 구조적 특징과 관련하여,  $\beta$ -lactam 고리를 분해하는  $\beta$ -lactamase라는 효소를 생성하여 페니실린으로 하여금 항생력을 잃게 한다<sup>17)</sup>. 이러한 페니실린에 내성인 박테리아에 의해 인체가 감염되었을 경우에는 페니실린계 항생제로 치료가 어려워질 수 있다. 또한 페니실린의 분해산물인 페니실린산, 페니시로산 등은 체내 단백질과 결합하여 유발항원이 되어 인체에서 부작용이 발생할 수 있다<sup>18)</sup>. 부작용의 증상으로는 발열, 발진, 피부염, 정맥염 등이 있으며, 대량 투여 시에는 백혈구 증다증, 용혈성 빈혈, 혈소판 감소증과 더불어 중추신경계나 간장, 신장 등에 장애를 유발할 수 있다<sup>19)</sup>. 페니실린 과민증인 사람에게는 심한 아나필락틱 쇼크

(Anaphylactic shock)를 나타내기도 한다<sup>20)</sup>.

국내·외의 항생제 및 항균제 잔류 위반율을 살펴보면 2008년도 기준으로 우리나라 0.17%, 미국 0.78%, 영국 0.56%, 호주 0.06%, 일본은 0.02%로 분석되고 있다<sup>21)</sup>. 이에 따라 우리나라의 항생제 및 항균제 잔류 위반율은 미국과 영국보다는 낮은 수준이지만, 호주와 일본보다는 다소 높은 수준인 것으로 해석할 수 있다. 최근 국내산 축산물 중 식육의 잔류 위반율은 2006년 0.26%, 2007년 0.23%, 2008년 0.17%, 2009년 0.16%, 2010년 0.15%로서 지속적으로 감소 추세를 보이고 있으나, 꾸준한 잔류 위반율을 보이고 있다고도 판단할 수 있다<sup>8)</sup>. 2008년도 항생제 잔류허용기준(maximum residue limit, MRL) 위반사례로는 식육 136건과 식용란 13건으로 조사되었고, 이중 아목시실린, 암피실린 등 페니실린계열에 대한 위반사례는 식육이 31건으로 나타나 연속적인 잔류동물용의약품의 모니터링이 필요한 것으로 사료된다<sup>22)</sup>.

우리나라는 식품 중 동물용의약품의 MRL을 124종 (개별 물질로는 156종)에 대하여 설정하고 있으며, 국내에 MRL이 설정된 페니실린계 동물용의약품은 아목시실린, 암피실린, 벤질페니실린, 클록사실린, 디클록사실린, 나프실린, 프로케인 벤질페니실린으로 7종이다(Fig. 1). 식품공전에서는 이들 7종과 옥사실린에 대해 LC 및 LC-MS/MS를 이용한 단성분 또는 동시단성분 시험법을 규정하고 있으나, 지방 및 단백질이 대부분인 축산식품을 신속하게 분석하기 어려운 경우가 있으며, 특히 페니실린 V에 대한 시험법은 규정되어있지 않은 실정이다.

페니실린계 항생제 분석에 대한 연구를 살펴보면, 소, 돼지, 닭, 우유와 같은 축산물에 대한 분석법이 간이나 신장에 이르는 부산물까지 다양하게 개발되어있다<sup>23-25)</sup>. 기기 분석 종류에 따라 HPLC-UV, HPLC-UV/Vis, HPLC-PDA부터 LC-MS/MS에 이르기 까지 다양하며, 최근에는 UPLC-MS/MS와 nano-LC-MS를 이용한 분석법도 개발되고 있다<sup>26-30)</sup>. 이와 같이 세계적으로 식품 중 동물용의약품의 정성 및 정량 분석에 대해 효율성 및 신뢰성을 증대시킨 분석법 개발을 위해 노력하고 있다. 국내에서도 다양한 연구 결과들이 나오고 있으며, 최근에는 기존의 HPLC를 이용한 방법을 개선하여 이보다 검출능이 뛰어난 LC-MS나 LC-MS/MS를 이용한 분석법을 중심으로 개발되고 있다<sup>6,11,31,32)</sup>.

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 아목시실린, 암피실린, 클록사실린, 디클록사실린, 나프실린, 옥사실린, 페니실린 G, 페니실린 V의 동시분석법을 소고기, 돼지고기, 닭고기에 대해 검증하고, 피페라실린을 내부표준물질로 이용하여 회수율 및 재현성을 높이고자 하였다. 또한 확립된 분석법의 실제 적용성을 검증하기 위하여 국내 유통 축산식품 중 페니실린 계열 8종에 대한 잔류실태조사를 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

표준물질로 사용한 디클록사실린(dicloxacillin)은 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구매하였고, 아목시실린(amoxicillin), 암피실린(ampicillin), 클록사실린(cloxacillin), 나프실린(nafcillin), 옥사실린(oxacillin), 페니실린 G(penicillin G), 페니실린 V (penicillin V), 피페라실린(piperacillin)은 USP (MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 포름산(formic acid), 인산이수소나트륨(sodium dihydrogen phosphate), 황산(sulfuric acid), 텅스텐산나트륨(sodium tungstate), 인산이수소칼륨(potassium dihydrogen phosphate), 염화나트륨(sodium chloride), 수산화나트륨(sodium hydroxide)은 모두 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구매하였다. 분석에 사용된 물은 3차 증류수를 사용하였으며, 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol)은 Merck Inc. (Darmstadt, Germany)와 J.T. Baker (Phillipsburg, USA)에서 HPLC grade로 구매하여 사용하였다. 또한 고체상 추출 카트리지(Solid-phase extraction cartridge)는 Waters (Milford, MA, USA)의 HLB (200 mg, 6 mL)의 카트리지를 사용하였다.

### 표준원액 및 표준용액

표준물질을 각각 10 mg씩 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 메탄올 50 mL로 용해한 후 증류수로 100 mL가 되도록 하여 표준원액을 만들었으며  $-20^{\circ}\text{C}$  냉동보관하였다. 이 용액을 증류수로 MRL의 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 배 농도가 되도록 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

### 시료 전처리

근육시료 2 g을 칭량하여 50 mL 원심분리관에 취하고, 내부표준물질을 첨가하였다. 여기에 0.1 M 인산나트륨완충용액(pH 4.5) 6 mL를 넣어 균질화 하였다. 0.17 M 황산 1.5 mL과 5% 텅스텐산나트륨 1.5 mL를 넣고 잘 혼합한 후 5,000 G,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 5 M 수산화나트륨을 이용하여 pH 8.1~8.5로 조정하였다. 이때, pH 10 이상이면 암피실린의 회수율이 낮아질 수 있으므로 주의하며, pH 조절 후 5,000 G,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 원심분리하고 다시 상층액을 분리하였다. 모아진 상층액에 20% 염화나트륨 6 mL를 넣어 잘 흔들어 준다. 미리 메탄올 5 mL, 물 5 mL, 2% 염화나트륨 5 mL로 활성화 시킨 HLB 카트리지에 시료추출액을 충전하였으며, 2% 염화나트륨 5 mL, 25 mM 인산칼륨완충용액 (pH 9.0) 5 mL 순서로 세척한 후 카트리지를 건조 시켰다. 아세토니트릴 3 mL로 두 번에 걸쳐 대상성분을 용출시키고  $40^{\circ}\text{C}$  이하의 수욕상에서 질소가스를 이용하여 아세토니트릴을 날려 보내었다. 5 mM 인산칼륨완충용액(pH 9.0) 1 mL로 재용해하고 GHP (Pall, 0.2  $\mu\text{m}$ ) 필터로 여과하여 분석용

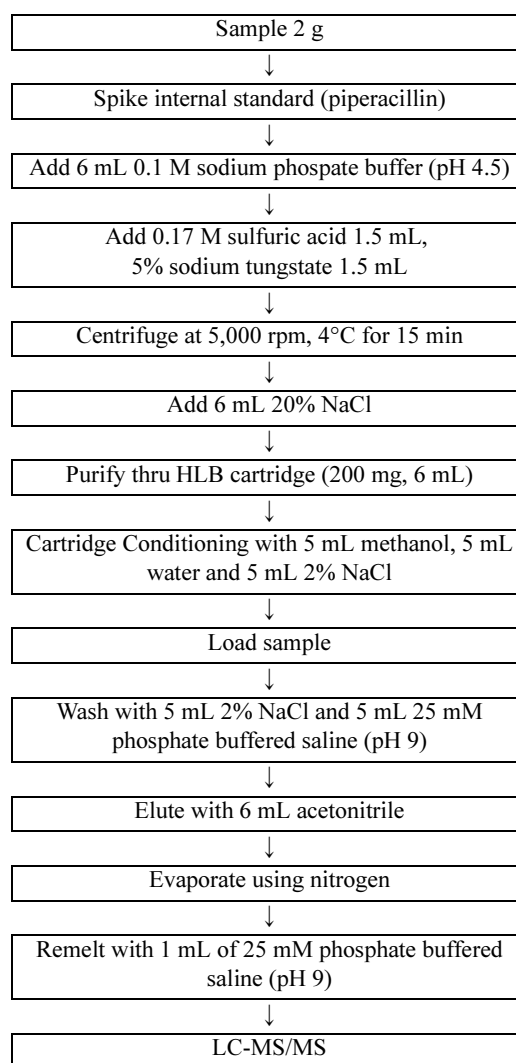


Fig. 2. Analytical procedure of penicillins in meat.

액으로 사용하였다. Fig. 2에 시료전처리 과정을 도식으로 나타내었다.

### 사용기기 및 분석조건

시료의 전처리를 위해서 진탕기(SR-2w, TAITEC, Japan), 원심분리기(HERAEUS MEGAFUGE 16R, Thermo, MA, USA), 질소농축기(N-EVAPTM111, Organomation Associates, MA, USA)를 사용하였다. pH meter는 Sartorius (Sartorius, Goettingen, Germany)를 사용하였으며, Vacuum manifold는 Supelco의 제품을 사용하였다. 분석기기는 고속액체크로마토그래프/질량분석기(Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometer, LC-MS/MS)로 고속액체크로마토그래프는 Shiseido의 NANOSPACE SI-1을 사용하였으며, 질량 분석기로는 Thermo의 TSQ Quantum 모델을 사용하였다. 칼럼은 Waters (Milford, MA, USA)의  $\text{C}_{18}$  (2.1  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ )을 분석에 사용하였다. 이동상으로는 0.05% 포름산 용액과 0.05% 포름산 아세토니트릴 용액을 gradient

**Table 1.** Conditions of LC for the analysis of penicillins

Description	Condition		
Column	XBridge C <sub>18</sub> (2.1 × 150 mm, 3.5 μm)		
Column temperature	35°C		
Injection volume	10 μL		
Flow rate	0.2 mL/min		
Mobile phase	A : 0.05% formic acid in water B : 0.05% formic acid in acetonitrile		
	Time (min)	Mobile phase A (%)	B (%)
Gradient	0	90	10
	10.0	50	50
	15	25	75
	15.1	90	10
	20	90	10

mode로 사용하였고 유속은 0.2 mL/min으로 흘려주었다. HPLC 분석 조건은 Table 1, 질량분석기의 조건은 Table 2와 같다.

### 분석법 검증

본 연구에서는 소고기, 돼지고기, 닭고기를 대상으로 검증하였으며, 검증하고자 하는 페니실린계 항생제 8종 성분이 들어있지 않음을 확인한 blank 시료를 사용하였다.

검증결과는 blank 시료에 MRL의 0.5, 1, 2배 농도의 표준 물질을 첨가한 후 본 연구에서 확립된 시험법으로 6회 반복 실험하여 확인하였다. 다른 성분이 존재 할 때 표적 분석물질만을 명확하게 식별해 낼 수 있는 능력을 의미하는 특이성(specificity)을 입증하기 위하여 blank 시료와 표준 물질을 첨가한 시료의 크로마토그램을 비교하여 주성분의 피크에서 간섭인자가 없음을 확인하였다. 직선성(linearity)을 통하여 주어진 범위에서 시료 중의 분석물질 농도에 직접 비례하는 분석 결과를 얻을 수 있는 재현성을 확인하기 위해 MRL의 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8배 농도 범위에서 검량선을 작성하고 직선성( $R^2 \geq 0.99$ )을 확인하였다. 정확도(accuracy)는 일정 농도를 첨가한 시료에 대한 회수율(%)로 평가하였으며, 정밀도(precision)는 시료를 반복하여 분석하였을 때 얻어진 분석값의 상대표준편차(RSD, %)로 확인하였다. 검출한계(limit of detection, LOD)는 각각 신호대비 잡음비 3배 이상인 농도로 계산하였으며, 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 각각 신호대비 잡음비 10배 이상인 농도로 계산하였다.

### 적용성 검증을 위한 잔류실태조사

확립된 분석법의 실제 적용성을 검증하기 위한 잔류실태 조사를 수행하였다. 소고기, 돼지고기, 닭고기를 대상 식품으로 전국의 주요 소비 지역(서울, 부산, 인천, 대구, 대전, 광주, 강원 등)을 중심으로 한 인구비례와 소고기, 돼지고기

**Table 2.** Optimized MS parameters for penicillins

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision Energy (eV)	Tube Lens (eV)	Cycle Time (s)
Ampicillin	349.947	106.215	17	108	0.2
		114.152	29		
Amoxicillin	365.947	114.088	20	97	0.2
		349.040	7		
Cloxacillin	435.947	164.032	33	99	0.2
		276.989	14		
Dicloxacillin	469.968	114.251	36	111	0.2
		198.049	36		
		311.016	15		
Nafcillin	414.959	171.046	33	111	0.2
		199.045	14		
Oxacillin	402.000	114.324	33	119	0.2
		144.175	27		
		243.109	13		
Penicillin G	334.946	160.070	12	104	0.2
		176.105	13		
Penicillin V	351.034	114.210	34	63	0.2
		160.080	11		
Piperacillin (I.S)	518.271	143.190	20	101	0.2
		160.098	12		

**Table 3.** Number of samples of beef, pork, and chicken collected for monitoring of penicillins

Location	Beef		Pork	Chicken	Total
	Imported	Domestic			
Seoul	4	13	15	8	40
Incheon/Gyeonggi	2	20	25	13	60
Gangwon	-	4	2	-	6
Daegu/Gyeongbuk	-	8	8	4	20
Busan/Gyeongnam	-	11	9	1	21
Gwangju/Jeonnam	-	8	8	4	20
Jeonbuk	-	2	2	1	5
Sejong/Chungbuk	-	2	3	2	9
Daejeon/Chungnam	-	5	6	3	14
Total	6	73	78	36	193

기, 닭고기의 지역별 생산량을 함께 고려하여 검체를 수거하였다. 전국의 주요 소비 지역 인구비례는 통계청의 2012년도 국내 인구분포 현황을 근거로 하였다. 수거한 검체는 가식부분을 손질하여 분쇄한 후 균질화 하였으며 분석이 되기 전까지 -20°C 냉동실에서 보관하였다. 본 연구의 잔류실태조사를 위한 지역별 검체수집 결과는 Table 3과 같다.

### 결과 및 고찰

#### 분석법 선정 및 조건 확립

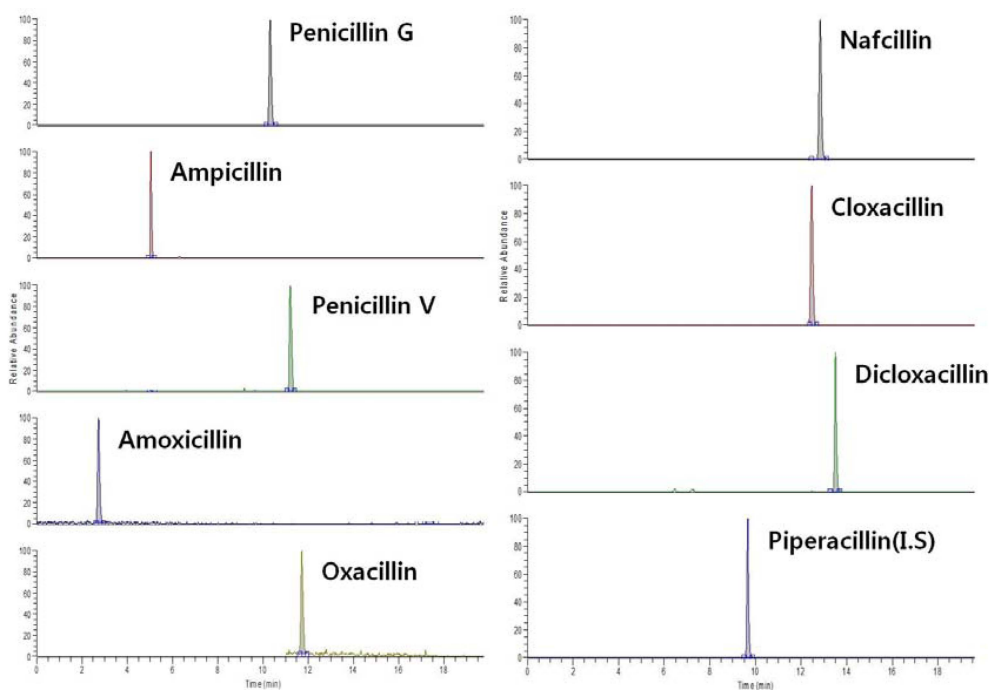
「축수산물 유해물질 분석법 편람」<sup>33)</sup>의 페니실린계열 동

시분석법을 근간으로 하여 회수율을 높이고 재현성을 증대시킬 수 있도록 내부표준물질(피페라실린)을 사용하여 시험법을 개선하였다. 이동상은 0.05% 포름산 용액과 0.05% 포름산 아세트니트릴 용액으로 C<sub>18</sub> 칼럼을 사용하여 분석하였다. 기울기 용리 조건에서 분석 대상 물질은 모두 분리되어 용출되었다.

MS/MS 분석을 위해 ESI를 선택하였고, full scan mode에서 질량 스펙트럼을 확인한 다음 precursor ion과 product ion을 생성한 후 특정이온을 선택하여 최적의 MRM 조건을 확립하였다. 분자의 선택성과 이온의 감도를 향상시키기 위하여 scan time, voltage, collision energy 등을 조정하여 최적의 감도를 나타내도록 하였다.

#### 분석법 검증

페니실린계 항생제 8종 동시다성분 분석법을 소고기, 돼지고기, 닭고기에 적용하여 검증하였다. 아목시실린, 암피실린, 클록사실린, 디클록사실린, 나프실린, 옥사실린, 페니실린 G, 페니실린 V에 대하여 blank 시료에 각 표준물질을 첨가하여 분석한 크로마토그램은 Fig. 3과 같으며, 주성분의 피크에서 간섭인자가 없음을 확인하였다. MRL의 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8배 농도 범위에서 검량선을 작성하여 직선성을 확인한 결과, 모든 분석물질에 대하여 R<sup>2</sup> 값은 0.99 이상으로 나타났으며 재현성을 확인하였다(Table 4-6). 정확도는 회수율(%)로 평가하였으며, 정밀도는 시료를 반복하여 분석하였을 때 얻어진 분석값의 상대표준편차(RSD, %)로 확인하였다. 아목시실린은 0.025, 0.05,



**Fig. 3.** Chromatogram of penicillins by LC-MS/MS.

**Table 4.** Validation results of analytical method of penicillin antibiotics in beef

Compound	Concentration(mg/kg)	Recovery <sup>1)</sup> (%)	RSD <sup>2)</sup> (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	R <sup>2</sup>
Ampicillin	0.025	90.0 ± 7.7	8.5	0.003	0.01	0.9997
	0.05	88.5 ± 5.7	6.4			
	0.1	87.8 ± 3.5	4.0			
Amoxicillin	0.025	89.7 ± 5.7	6.4	0.003	0.01	0.9983
	0.05	84.7 ± 5.8	6.8			
	0.1	85.5 ± 5.4	6.3			
Cloxacillin	0.15	84.5 ± 8.3	9.8	0.008	0.03	0.9963
	0.3	80.1 ± 5.1	6.4			
	0.6	92.8 ± 4.7	5.1			
Dicloxacillin	0.15	79.4 ± 7.4	9.3	0.008	0.03	0.9959
	0.3	75.3 ± 5.3	7.0			
	0.6	82.0 ± 5.6	6.8			
Nafcillin	0.15	81.4 ± 6.4	7.9	0.008	0.03	0.9974
	0.3	73.0 ± 6.1	8.4			
	0.6	85.5 ± 5.2	6.1			
Oxacillin	0.025	85.2 ± 7.4	8.7	0.003	0.01	0.9990
	0.05	82.1 ± 5.3	6.5			
	0.1	80.9 ± 7.2	8.9			
Penicillin G	0.025	93.5 ± 5.6	5.9	0.003	0.01	0.9995
	0.05	90.7 ± 9.3	10.3			
	0.1	93.5 ± 7.7	8.3			
Penicillin V	0.025	82.3 ± 4.2	5.2	0.003	0.01	0.9993
	0.05	75.1 ± 7.3	9.7			
	0.1	83.0 ± 6.3	7.6			

<sup>1)</sup>Average value of recoveries (n = 6).

<sup>2)</sup>Average value of relative standard deviations (n = 6).

0.1 mg/kg의 농도로 검증하였으며, 그 결과 소고기 시료에서의 평균 회수율이 84.7~89.7%, 상대표준편차는 6.3~6.8%로 조사되었다. 돼지고기 시료에서의 평균 회수율은 91.3~102%, 상대표준편차는 4.2~8.7%, 닭고기 시료의 평균 회수율은 85.4~91.7%, 상대표준편차는 7.8~10.0%로 조사되었다. 암피실린은 0.025, 0.05, 0.1 mg/kg의 농도로 검증하였으며, 그 결과 소고기 시료에서의 평균 회수율은 87.8~90.0%, 상대표준편차는 4.0~8.5%로 조사되었다. 돼지고기 시료에서의 평균 회수율은 102~105%, 상대표준편차는 6.3~8.9%, 닭고기 시료의 평균 회수율은 86.5~90.8%, 상대표준편차는 4.7~8.8%로 조사되었다. 클록사실린은 0.15, 0.3, 0.6 mg/kg의 농도로 검증하였으며, 그 결과 소고기 시료에서의 평균 회수율이 80.1~92.8%, 상대표준편차는 5.1~9.8%로 조사되었다. 돼지고기 시료에서의 평균 회수율은 74.8~95.6%, 상대표준편차는 7.0~8.6%, 닭고기 시료의 평균 회수율은 80.9~85.6%, 상대표준편차는 7.6~10.6%로 조사되었다. 디클록사실린은 0.15, 0.3, 0.6 mg/kg의 농도로 검증하였으며, 그 결과 소고기 시료에서의 평균 회수율이 75.3~82.0%, 상대표준편차는 6.8~9.3%로 조사되었다. 돼지고기 시료에서의 평균 회수율은 72.8~80.4, 상대표준편

차는 5.7~8.8%, 닭고기 시료의 평균 회수율은 79.7~84.4%, 상대표준편차는 4.5~10.8%로 조사되었다. 나프실린은 0.15, 0.3, 0.6 mg/kg의 농도로 검증하였으며, 그 결과 소고기 시료에서의 평균 회수율이 73.0~85.5%, 상대표준편차는 76.1~8.4%로 조사되었다. 돼지고기 시료에서의 평균 회수율은 71.0~84.5%, 상대표준편차는 4.5~8.0%, 닭고기 시료의 평균 회수율은 80.4~84.5%, 상대표준편차는 4.0~9.6%로 조사되었다. 옥사실린은 0.025, 0.05, 0.1 mg/kg의 농도로 검증하였으며, 그 결과 소고기 시료에서의 평균 회수율이 80.9~85.2%, 상대표준편차는 6.5~8.9%로 조사되었다. 돼지고기 시료에서의 평균 회수율은 98.9~106%, 상대표준편차는 4.9~9.9%, 닭고기 시료의 평균 회수율은 86.4~89.3%, 상대표준편차는 7.2~11.2%로 조사되었다. 페니실린 G는 0.025, 0.05, 0.1 mg/kg의 농도로 검증하였으며, 그 결과 소고기 시료에서의 평균 회수율이 90.7~93.5%, 상대표준편차는 5.9~10.3%로 조사되었다. 돼지고기 시료에서의 평균 회수율은 86.3~101%, 상대표준편차는 5.8~8.5%, 닭고기 시료의 평균 회수율은 89.3~94.2%, 상대표준편차는 5.4~8.0%로 조사되었다. 페니실린 V은 0.025, 0.05, 0.1 mg/kg의 농도로 검증하였으며, 그 결과 소고기 시료에서

**Table 5.** Validation results of analytical method of penicillin antibiotics in pork

Compound	Concentration(mg/kg)	Recovery <sup>1)</sup> (%)	RSD <sup>2)</sup> (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	R <sup>2</sup>
Ampicillin	0.025	101.5 ± 6.9	6.3	0.003	0.01	0.9998
	0.05	105.3 ± 8.5	8.1			
	0.1	103.5 ± 9.2	8.9			
Amoxicillin	0.025	91.3 ± 3.9	4.2	0.003	0.01	0.9983
	0.05	100.8 ± 8.0	8.0			
	0.1	102.2 ± 8.9	8.7			
Cloxacillin	0.15	74.8 ± 5.2	7.0	0.008	0.03	0.9928
	0.3	90.7 ± 6.5	7.1			
	0.6	95.6 ± 8.2	8.6			
Dicloxacillin	0.15	72.8 ± 4.2	5.7	0.008	0.03	0.9946
	0.3	79.3 ± 6.6	8.3			
	0.6	80.4 ± 7.0	8.8			
Nafcillin	0.15	71.0 ± 3.2	4.5	0.008	0.03	0.9955
	0.3	84.2 ± 6.3	7.5			
	0.6	84.5 ± 6.8	8.0			
Oxacillin	0.025	103.0 ± 5.0	4.9	0.003	0.01	0.9999
	0.05	106.3 ± 10.5	9.9			
	0.1	98.9 ± 8.6	8.7			
Penicillin G	0.025	86.3 ± 5.0	5.8	0.003	0.01	0.9998
	0.05	100.6 ± 8.6	8.5			
	0.1	93.6 ± 7.9	8.4			
Penicillin V	0.025	82.4 ± 6.7	8.1	0.003	0.01	0.9992
	0.05	90.9 ± 8.8	9.7			
	0.1	90.1 ± 8.2	9.1			

<sup>1)</sup>Average value of recoveries (n = 6).

<sup>2)</sup>Average value of relative standard deviations (n = 6).

의 평균 회수율이 75.1~83.0%, 상대표준편차는 5.2~9.7%로 조사되었다. 돼지고기 시료에서의 평균 회수율은 82.4~90.9%, 상대표준편차는 8.1~9.7%, 닭고기 시료의 평균 회수율은 83.3~86.5%, 상대표준편차는 7.9~9.4%로 조사되었다.

각 물질의 검출한계는, MRL이 0.05 mg/kg인 암피실린, 아목시실린, 페니실린 G는 0.003 mg/kg 으로 분석되었고 MRL이 0.3 mg/kg인 클록사실린, 디클록사실린, 나프실린은 0.008 mg/kg으로 나타났으며, MRL이 설정되어있지 않은 옥사실린과 페니실린 V의 검출한계는 0.003 mg/kg으로 분석되었다(Table 4-6). 또한 각 물질의 정량한계는, MRL이 0.05 mg/kg인 암피실린, 아목시실린, 페니실린 G는 0.01 mg/kg 으로 분석되었고 MRL이 0.3 mg/kg인 클록사실린, 디클록사실린, 나프실린은 0.03 mg/kg으로 분석되었으며, MRL이 설정되어있지 않은 옥사실린과 페니실린 V의 정량한계는 0.01 mg/kg의 결과를 얻을 수 있었다(Table 4-6). 본 연구의 페니실린계 항생제 8종 동시다성분 분석법을 소고기, 돼지고기, 닭고기에 대해 검증을 실시한 결과, 특이성, 직선성, 정확도, 정밀도에 대해 CODEX 기준에 부합하는 것으로 나타났다<sup>34)</sup>. 따라서 본 분석법은 객관성 및 신뢰성을 확보한 유효한 분석법으로 사료되는 바이다.

### 적용성 검증을 위한 잔류실태조사

분석법의 실제 적용성 검증을 위하여 국내 유통 중인 식육 (소고기, 돼지고기, 닭고기) 193건을 수거하여 페니실린계 동물용의약품 8종에 대한 잔류실태조사를 실시하였다(Table 3). 조사대상 193건 중 경기도 지역의 국내산 소고기 1건에서 클록사실린이 MRL (0.3 mg/kg) 이하인 0.08 mg/kg 수준으로 검출되었다. 그 이외의 192건 검체에서는 모두 불검출로 나타났다. 본 잔류실태조사로 확립된 분석법의 적용성 검토와 동시에 수거 식육의 안전성을 확인할 수 있었다. 2006년에 수행된 잔류실태조사 결과, 축산물 시료 300건 중 아목시실린이 소고기 2건과 돼지고기 1건에서 그리고 암피실린이 돼지고기 1건에서 잔류허용기준치 이상으로 검출된 사례와 비교하면 부적합율이 1.3%에서 0.5%로 다소 감소하였다<sup>1)</sup>. 또한 2012년에 아목시실린, 암피실린, 벤질페니실린, 클록사실린, 디클록사실린, 나프실린, 옥사실린의 페니실린계 동물용의약품 7종에 대해 국내 축·수산물 225건을 잔류실태조사한 결과, 벤질페니실린이 소고기 7건, 돼지고기 2건, 닭고기 3건에서 0.001~0.009 mg/kg으로 미량이 검출되고 모두 적합으로 조사된 연구결과보다 부적합율이 감소한 추세이다<sup>1)</sup>. 이는 농가에

**Table 6.** Validation results of the analytical method of penicillins in chicken

Compound	Concentration(mg/kg)	Recovery <sup>1)</sup> (%)	RSD <sup>2)</sup> (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	R <sup>2</sup>
Ampicillin	0.025	86.5 ± 5.3	6.2	0.003	0.01	0.9995
	0.05	90.8 ± 4.3	4.7			
	0.1	87.5 ± 7.7	8.8			
Amoxicillin	0.025	91.7 ± 9.1	10.0	0.003	0.01	0.9992
	0.05	90.0 ± 7.0	7.8			
	0.1	85.4 ± 8.1	9.5			
Cloxacillin	0.15	81.9 ± 8.7	10.6	0.008	0.03	0.9982
	0.3	80.9 ± 6.2	7.6			
	0.6	85.6 ± 8.6	10.0			
Dicloxacillin	0.15	79.7 ± 7.0	8.8	0.008	0.03	0.9985
	0.3	80.8 ± 3.6	4.5			
	0.6	84.4 ± 9.1	10.8			
Nafcillin	0.15	80.4 ± 7.7	9.5	0.008	0.03	0.9973
	0.3	84.5 ± 8.1	9.6			
	0.6	80.4 ± 3.2	4.0			
Oxacillin	0.025	86.4 ± 7.4	8.6	0.003	0.01	0.9987
	0.05	89.3 ± 10.0	11.2			
	0.1	89.2 ± 6.4	7.2			
Penicillin G	0.025	89.3 ± 6.5	7.3	0.003	0.01	0.9997
	0.05	92.6 ± 7.4	8.0			
	0.1	94.2 ± 5.1	5.4			
Penicillin V	0.025	83.3 ± 7.1	8.5	0.003	0.01	0.9910
	0.05	86.5 ± 6.8	7.9			
	0.1	84.2 ± 7.9	9.4			

<sup>1)</sup>Average value of recoveries (n = 6).

<sup>2)</sup>Average value of relative standard deviations (RSD) (n = 6).

대한 적정 투여량 및 휴약 기간에 대한 지속적인 교육 및 관리와 더불어 2001년 이후 축산물 생산량 대비 항생제 사용량의 감소 추세와 관련이 있는 것으로 보인다.

본 연구의 잔류실태조사 결과로부터, 확립된 분석법이 실제 시료에 적용 가능하며 국내 유통 식육에 페니실린계 항생제의 잔류가 거의 없는 것으로 확인되었다. 그러나 과거에 거의 검출실적이 없던 클록사실린이 미량 검출됨에 따라 국민의 식품 안전과 동물용의약품 안전관리를 위한 지속적인 잔류실태조사 및 안전관리는 필요한 것으로 사료된다.

## 요 약

본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 페니실린계 동물용의약품 8종, 암피실린, 아목시실린, 클록사실린, 디클록사실린, 나프실린, 옥사실린, 페니실린 G, 페니실린 V의 동시분석법을 확립하고 잔류실태조사를 수행하였다. 피페라실린을 내부표준물질로 적용하였으며, 이동상으로는 0.05% 포름산 용액와 0.05% 포름산 아세트니트릴 용액을 gradient mode로 사용하였고 C<sub>18</sub> 칼럼을 이용하여 분석하

였다. 각 분석물질은 MRL의 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8배 농도 범위에서 검량선을 작성하여 R<sup>2</sup> ≥ 0.99의 직선성 및 재현성을 확인하였다. 소고기, 돼지고기, 닭고기에 대하여 MRL의 0.5, 1, 2배인 세 가지 농도에서 6회 반복으로 분석을 실시한 결과, 평균 회수율은 71.0~106%, 상대표준편차는 4.0~11.2%, LOD는 0.003~0.008 mg/kg, LOQ는 0.01~0.03 mg/kg이었다. 국내 유통 소고기, 돼지고기, 닭고기에서 페니실린계 항생제 8종의 분석결과, 총 193건 중 경기도 지역의 국내산 소고기 1건에 대해서 클록사실린이 MRL 이하인 0.08 mg/kg이 검출되었으며, 나머지 192건의 검체에서는 불검출로 분석되었다. 본 연구를 통하여 확립된 페니실린계 동물용의약품 8종 동시분석법은 식육에 대한 페니실린계 동물용의약품의 안전관리 체계 방안을 제시하기 위한 기초자료로 활용 가능한 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처 연구개발과제의 연구개발비 지원(13161축산물921)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.



## 참고문헌

- Shin H.C., Park K.H.: Veterinary drugs residue monitoring. *KFDA*, 9-61 (2006).
- Gil G.H., Ko K.Y., Lee Y.J., Park H.J., Lee K.S.: Simultaneous determination of tetracyclines and sulfonamides residues in pork and flatfish using Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) extraction and HPLC. *Korean J. Environ. Agr.*, **28**, 266-273 (2009).
- Shin H.C., Han S.B., Park K.H.: Residue monitoring and analytical method development of veterinary drugs permitted and not-permitted to use in food producing animals and fishes. *KFDA*, 11-13 (2007).
- Lee M.H., Yun S.M., Lee K.J., Kim H.R., Son S.W.: Regulation and issue of veterinary drug ; Overview of the herbals for animal drug use and quality specifications. *Korean J. Vet. Public Health*, **30**, 147-151 (2006).
- Turnipseed S.B., Roybal J.E., Andersen W.C., Kuck L.R.: Analysis of avermectin an moxidectin residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. *Anal. Chim. Acta.*, **529**, 159-165 (2005).
- Kim H.Y., Chung S.Y., Choi S.H., Lee J.S., Choi I.S., Cho M.J., Shin M.S., Song J.S., Choi J.C., Park H.O., Ha S.C., Shin I.S., Seo E.C.: Monitoring of veterinary drug residues in foods produced in Korea. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **42**, 653-663 (2010).
- [http://www.qia.go.kr/viewwebQiaCom.do?id=34070&type=6\\_18\\_1bdsm](http://www.qia.go.kr/viewwebQiaCom.do?id=34070&type=6_18_1bdsm): 축산 항생제 사용량 2년 연속 최저. *농림축산검역본부* (2013).
- Hong J.H.: Method development and monitoring on residues of veterinary drugs in foods. *KFDA*, 11-35 (2012).
- Kim M.K., Cho B.H., C.M., Kim D.G., Yune S.Y., Shin J.Y., Bong Y.H., Kang J.W., Kim M.A., Son S.W.: Chemical Residues and Contaminants in Foods of Animal Origin in Korea during the Past Decade. *J. Agr Food Chem.*, **61**, 2293-2298 (2013).
- Anfossi P., Zaghini A., Grassigli G., Menotta S., Fedrizzi G.: Relative oral bioavailability of microgranulated amoxicillin in pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, **25**, 329-334 (2002).
- Song J.Y., Hu S.J., Joo H.J., Kim M.O., Hwang J.B., Han Y.J., Kwon Y.J., Kang S.J., Cho D.H.: Residue analysis of penicillins in livestock and marine products. *Anal. Sci. Tech.*, **25**, 257-264 (2012).
- Macarov C.A., Tong L., Martínez-Huélamo M., Hermo M.P., Chirila E., Wang Y.X., Barrón D., Barbosa J.: Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC-MS/MS. *Food Chem.*, **135**, 2612-2621 (2012).
- Boison JO, Keng LJ, MacNeil JD.: Analysis of penicillin G in milk by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, **77**, 565-570 (1994).
- Tyczkowska K.L., Voyksner R.D., Straub R.F., Aronson A.L.: Simultaneous multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine milk by liquid chromatography with ultraviolet detection and confirmation by electrospray mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, **77**, 1122-1131 (1994).
- Ang C.Y.W., Luo W.: Rapid determination of ampicillin in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.*, **80**, 25-30 (1997).
- Abjean J.P., Lahogue V.: Planar chromatography for quantitative determination of ampicillin residues in milk and muscle. *J. AOAC Int.*, **80**, 1171-1176 (1997).
- Yoon S.B., Im C.U.:  $\beta$ -lactamase inhibitory activity and comparative activity of 6-benzothiazole penicillin derivatives in combination with  $\beta$ -lactam antibiotics. *Pharm. Soc. Korea*, **52**, 306-310 (2008).
- Cunha B.A.: Antibiotic side effects. *Med. Clin. N. Am.*, **85**, 149-185 (2001).
- 서울대학교약학교육연수원: 의약품집. *서울대학교출판부*, 258 (2002).
- 의학교육연수원: 가정의학. *서울대학교출판부*, 서울, 1129 (1998).
- Rhee G.S.: Method improvement and monitoring on residues of veterinary drugs in foods *Ministry of Food and Drug Safety*, 13 (2013).
- Choi D.M.: 2009 Veterinary drug residues monitoring. *KFDA*, 4-14 (2009).
- Kukusamudea C., Burakhama R., Chailapakulb O., Srijaranai S.: High performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of penicillin residues in beef and milk using ion-paired extraction and binary water-acetonitrile mixture. *Talanta*, **92**, 38-44 (2012).
- Ito Y., Ikai Y., Oka H., Kagami T., Takeba K.: Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis: II. Determination of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in meat using liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, **855**, 247-253 (1999).
- Ito Y., Ikai Y., Oka H., Matsumoto H., Kagami T., Takeba K.: Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis: III. Determination of benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in bovine liver and kidney by liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. A*, **880**, 85-91 (2000).
- Goto T., Ito Y., Yamada S., Matsumoto H., Oka H.: High-throughput analysis of tetracycline and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition. *J. Chromatogr. A*, **1100**, 193-199 (2005).
- Chico J., Rúbies A., Centrich F., Companyó R., Prat M.D., Granados M.: High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1213**, 189-199 (2008).
- Ito Y., Goto T., Oka H., Matsumoto H., Takeba K.: Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis: VI. Determination of six penicillins in bovine tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1042**, 107-111 (2004).

29. Junza A., Amatya R., Barrón D., Barbosa J.: 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*, **879**, 2601-2610 (2011).
30. Hsieh S.H., Huang H.Y., Lee S.: Determination of eight penicillin antibiotics in pharmaceuticals, milk and porcine tissues by nano-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1216**, 7186-7194 (2009).
31. Hwang L.H., Yun E.S., Kim H.J., Kim Y.J., Jung H.K., Han I.K., Lee B.D.: A study on simultaneous determination of residual penicillin G and chloramphenicol in livestock products by high performance liquid chromatography. *Korean J. Vet. Serv.*, **23**, 1-8 (2000).
32. Lim C.M., Kwon H.J., Cho B.H., Park S.J., Chung G.S., Son S.W.: Confirmatory assay for the simultaneous detection of eight penicillin antibiotics in swine muscle and kidney by Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Korean J. Vet. Public Health*, **35**, 275-283 (2011).
33. 축수산물 유해물질 분석법 편람. *식품의약품안전평가원* (2013).
34. Codex Committee on Pesticide Residues: Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis, CODEX, CAC/GL 40-1993 (2010).