J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 4, pp. 319~323 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

식육 중 항생제 florfenicol의 분석

국주희 · 송영미[1] · 배민석 · 고명진 · 유명상 · 안은숙 · 박은희 · 조명식 · 강길진[2]*
광주지방식품의약품안전청, [1]경인지방식품의약품안전청
[2]식품의약품안전청 영양기능식품국

Analysis of Florfenicol in Meats

Ju-Hee Kuk, Young-Me Song[1], Min-Seok Bae, Myoung-Jin Go, Myung-Sang Yoo, Eun-Suk An, Eun-Heui Park, Myong-Shik Cho, Kil-Jin Kang[2]*
Gwangju Regional Korea Food and Drug Administration
[1]Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administration
[2]Korea Food and Drug Administration
(Received September 17, 2008/Revised October 23, 2008/Accepted December 12, 2008)

ABSTRACT – Analytical method for determination of florfenicol was developed for estimate veterinary drug residue of unestablished MRLs in meat. The method was validated in correspondence with the CODEX guideline for florfenicol residue in meat. The samples mixed with sodium sulfate were extracted with ethyl acetate. After clean-up, the residue was dissolved in mobile phase and analyzed using high-performance liquid chromatography with fluorescence detector. The calibration curve showed good linearity(r^2=0.9997) within the concentration range of 0.05~1.0 mg/kg. The limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) were validated at 0.012 and 0.039 mg/kg, respectively. The recoveries in fortified meat ranged from 85.6 to 95.6 %(1.1~5.3 % RSD) at the 0.05 to 0.4 spiking levels. We monitored 150 samples of meats that were purchased in Korea(Seoul, Busan, Daegu, Daejeon and Gwangju). Among tested samples, florfenicol was detected in 1 of pig at the level of 0.040 mg/kg, and below LOQ in 1 of cattle, 2 of pig and 2 of chicken. The residues of florfenicol in the tested samples were within the MRLs.

Key words: veterinary drugs, florfenicol

플로르페니콜(florfenicol)은 thiamphenicol의 형광유도체로써 Gram 양성 및 음성 세균에 대해 광범위한 항생제로 이용되고 있다. 플로르페니콜은 chloramphenicol과 유사한 구조를 가지고 있으며 미생물의 ribosome에 직접 결합하여 단백질합성을 저해함으로써 항균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[1-3].

플로르페니콜은 EU, 미국, 일본 등에서는 수산물과 식육 등에 대하여 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있는데 이들 기준을 보면 EU에서는 소, 돼지, 가금류 근육에 대해 0.1~0.3 mg/kg, 어류에 대해 1.0 mg/kg 등으로 잔류허용기준을 설정하고 있으며, 미국에서는 소 근육 0.3 mg/kg로 규제하고 있다. 일본에서는 소, 돼지, 닭, 가금류 근육에 대해 0.1~0.2 mg/kg, 어류에 대해 0.03~0.2 mg/kg 등으로 기준을 설정하여 관리하고 있다[4].

*Correspondence to: Kang Kil Jin, Korea Food & Drug Administration, #5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul, 122-704, Korea
Tel: 82-2-380-1311, Fax: 82-2-382-6380
E-mail: kjkang@kfda.go.kr

또한, 축 · 수산물 중 항생제 잔류로 인한 위해를 방지하기 위해 플로르페니콜의 경우 돼지 3일, 방어 5일, 송어, 은어 14일, 뱀장어 7일의 휴약기간을 준수하도록 동물용의약품의 안전사용기준(국립수의과학검역원고시 제2007-25호)이 정하여져 있다.

현재 우리나라 식품공전에서는 식육, 어류, 갑각류, 알 등에서 101종의 동물용의약품에 대한 잔류허용기준(Maximum Residue Limit, MRL)을 설정하여 규제[4-5]하고 있으나, 아직까지 플로르페니콜에 대한 잔류허용기준은 설정되어 있지 않다. 동물용의약품의 안전관리를 위해서는 잔류허용기준을 설정하여 규제할 필요가 있으며, 이를 위해서는 축 · 수산물 중에 잔류하고 있는 항생제를 정확하고 신속하게 분석하기 위한 유효성이 검증된 시험법이 요구된다.

현재 보고되어 있는 축 · 수산물 중 플로르페니콜의 잔류시험법으로는 high-performance liquid chromatography-(HPLC)법[3,6-8], gas chromatography/mass spectrometry(GC-MS)법[2,9], capillary electrophoresis(CE)법[8,10] 등이 있으나 국내에서의 연구는 미약하여 잔류 플로르페니콜 함량을

측정하기 위한 분석방법의 확립이 필요한 실정이다.

이에 본 연구에서는 우리나라에서 사용이 허용되어 있으나 아직까지 잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 동물용의약품 중 플로르페니콜에 대한 선형성, 회수율, 검출한계, 정량한계 등 유효성 평가를 통하여 식육 중 잔류 플로르페니콜 함량을 측정하기 위한 정량실험법을 확립하고, 최적화한 분석방법으로 시중에 유통되는 식육 150건을 전국 5개 지역별로 수거하여 플로르페니콜을 대상으로 잔류실태를 조사하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

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

시약 및 분석조건

플로르페니콜 표준품은 Sigma사(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. Oasis HLB cartridge(200 mg)는 Waters사(Milford, MA) 제품을 사용하였다. 고속액체크로마토그래피(HPLC), 형광검출기(Fluorescence detector)는 Nanospace SI-2(Shiseido Fine Chemicals, Yo-kohama, Japan)를 사용하였으며, 분석조건을 Table 1에 나타내었다.

표준용액의 조제

플로르페니콜 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(0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L)의 표준용액을 조제하였다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC for florfenicol

	Analytical conditions
Column	Merck Hybar C_{18}(4.6×250 mm, 5 μm)
Mobile phase	0.01M 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 ºC
Injection volume	10 μl

검출한계 및 정량한계

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

회수율 시험

분석방법에 따른 회수율 측정을 위하여 플로르페니콜이 함유되어 있지 않은 쇠고기, 돼지고기에 각 표준용액을 0.1, 0.2, 0.4 mg/kg, 닭고기에 0.05, 0.1, 0.2 mg/kg이 되도록 첨가하여 본 실험방법에 따라 6회 반복 실험하여 구하였다.

시료의 전처리

냉동보관한 시료를 해동하여 다시 균질화한 후 5 g을 취해 무수황산나트륨 5 g, ethyl acetate 40 mL를 첨가하고 균질기로 2분간 균질화한 후 균질액을 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 전량 수거하여 농축수기에 옮기고 잔사에 대하여는 같은 조작을 1회 더 반복하였다. 모아진 추출액을 1 mL 정도가 되도록 35 ºC에서 감압 농축하고, 이 농축액에 acetonitrile 100 mL를 가하여 분액여두에 씻어넣고, *n*-hexane 50 mL를 가하여 5분간 격렬하게 흔들어 *n*-hexane층과 acetonitrile층을 분리하였다[11,12]. 분리된 acetonitrile층을 35 ºC에서 감압농축한 후, 미리 acetonitrile 및 증류수 각각 5 mL을 순차적으로 흘려 활성화시킨 Oasis HLB cartridge에 흡착시키고 acetonitrile-water(15:85, v/v) 혼합액 5 mL로 세척한 후 카트리지에 흡착된 성분은 acetonitrile-water (50:50, v/v) 5 mL로 용출시키고, 용출액을 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 시험용액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

HPLC 분석조건의 최적화

시료에 플로르페니콜의 농도가 0.05～2.0 mg/L이 되도록 표준용액을 첨가하고, ethyl acetate로 추출 농축한 후 acetonitrile과 hexane으로 분리하여 acetonitrile 층을 농축하였다. 이를 Oasis HLB cartridge로 정제하고 C_{18} column을 이용한 HPLC로 분석한 결과, 표준물질 플로르페니콜은 머무름시간 9.4분대에서 검출되었으며, 플로르페니콜을 첨가하지 않은 blank 시료에서는 이 시간대에 아무런 피크도 나타내지 않아 방해피크가 없음을 확인하였다. 이에 대한 HPLC 크로마토그램은 Fig. 1(쇠고기), Fig. 2(돼지고기), Fig. 3(닭고기)에 나타내었다.

직선성 및 검량선

검량선 작성을 위한 표준물질 농도범위는 CODEX 및

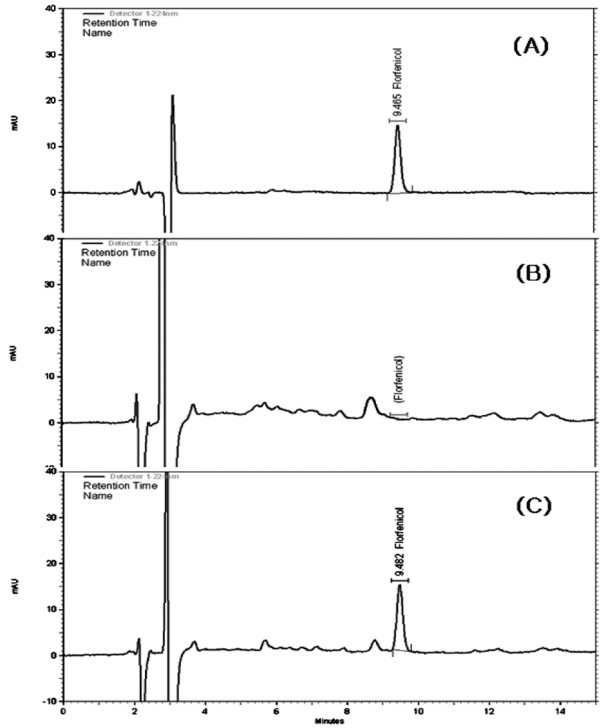

Fig. 1. Typical chromatogram of florfenicol for (A) standard florfenicol (0.4 mg/kg) (B) blank cattle, and (C) spiked cattle with 0.4 mg/kg.

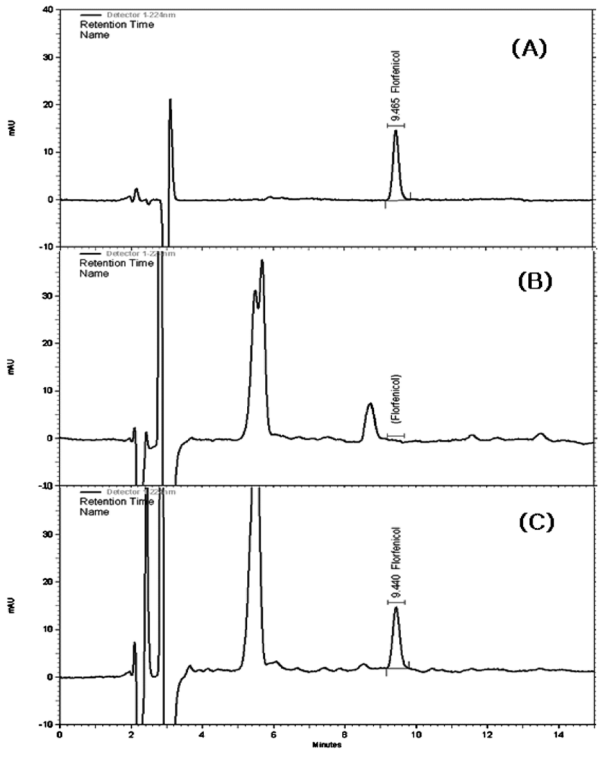

Fig. 2. Typical chromatogram of florfenicol for (A) standard florfenicol (0.4 mg/kg) (B blank pig, and (C) spiked pig with 0.4 mg/kg.

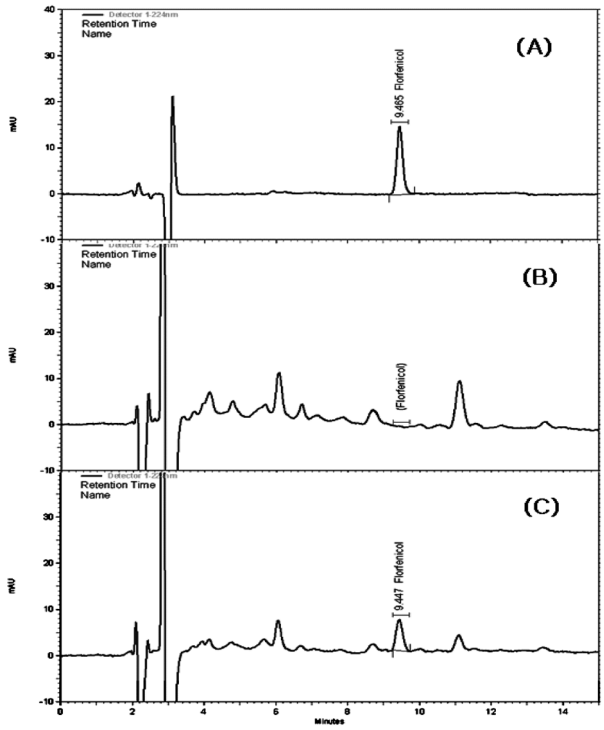

Fig. 3. Typical chromatogram of florfenicol for (A) standard florfenicol (0.4 mg/kg) (B) blank chicken, and (C) spiked chicken with 0.2 mg/kg.

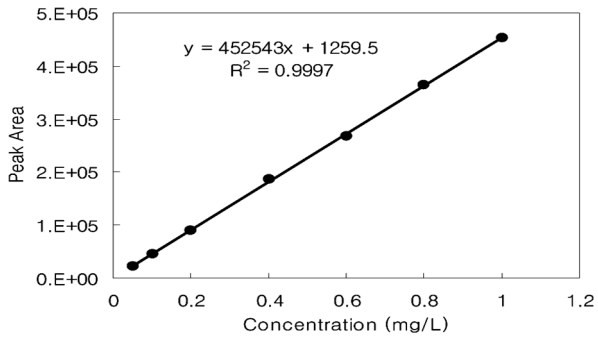

Fig. 4. Calibration curve of florfenicol.

EU의 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기의 플로르페니콜의 잔류허용기준을 고려하여 표준물질 농도범위(0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/kg)에서 3회 반복하여 분석한 결과 상관계수(Correlation coefficient) r^2는 0.9997로 CODEX에서 권장하는 $r^2 \geq 0.95$[13]와 비교했을 때 높은 수준으로 매우 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 4).

검출한계 및 정량한계

식육 중 플로르페니콜 검출한계(Limit of detection, LOD) 및 정량한계(Limit of quantification, LOQ)는 표 2와 같으며, 각각 0.012 mg/kg 및 0.039 mg/kg이었다. 플로르페니

Table 2. Calibration equations, LOD and LOQ for florfenicol

Calibration	Correlation coefficient (r^2)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
y=452543x + 1259.5	0.9997	0.012	0.039

Table 3. Recoveries of florfenicol at different spiked level in food samples

Sample	Spiked (mg/kg)	Recovery(%)	RSD(%)
Cattle (Muscle)	0.1	87.6	4.8
	0.2	92.3	1.3
	0.4	92.0	1.1
Pig (Muscle)	0.1	93.3	3.4
	0.2	90.5	2.3
	0.4	85.6	1.1
Chicken (Muscle)	0.05	95.6	5.3
	0.1	92.9	3.2
	0.2	95.4	1.0

콜의 잔류허용기준을 고려할 때 유효한 수준이었다. 플로르페니콜의 잔류허용기준은 미국의 경우 0.3 mg/kg(소근육), 일본의 경우 0.2 mg/kg(소, 돼지), 0.1 mg/kg(닭근육), EU에서는 0.2 mg/kg (소근육), 0.3 mg/kg(돼지근육), 0.1 mg/kg(가금류 근육)으로 설정되어 있다[4].

시료 중 플로르페니콜의 회수율

분석방법의 유효성 평가를 위하여 시중에 유통되는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에 표준물질 0.05~0.4 mg/kg을 첨가하여 회수율을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 회수율은 쇠고기에서 87.6~92.3 %, 돼지고기에서 85.6~93.3 %, 닭고기에서 92.9~95.6 %이었으며, 상대표준편차(Relative standard deviation, RSD)는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에서 각각 1.1~4.8 %, 1.1~3.4 %, 1.0~5.3 %이었다(Table 3).

CODEX 잔류동물용의약품 시험법 validation 기준에 따르면, 표준물질 농도 0.01~0.1 mg/kg 범위에서 회수율 허용범위는 70~110 %, 상대표준편차 허용범위는 20 % 미만이며, 0.1 mg/kg 이상의 범위에서 회수율 허용범위는 80~110 %, 상대표준편차 허용범위는 15 %미만이다[13]. 따라서 본 시험법은 CODEX 규정에 부합하였다.

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

우리나라 식육중 잔류량

식육 중 플로르페니콜 잔류량을 모니터링하기 위하여 상기의 최적화한 분석방법을 식육에 적용하여 플로르페니콜 잔류량을 조사하였다. 시중에 유통되는 식육 150건을 전국 5개 지역별로 수거하여 잔류량을 조사한 결과, 돼지고기 1건에서 0.040 mg/kg이 검출되었으며, 돼지고기 2건, 쇠고기 1건, 닭고기 2건에서는 검출되었으나 정량한계 미만의 수준이었다(Table 4). 소 근육, 돼지 근육, 닭 근육에서 플로르페니콜의 잔류허용기준이 EU 0.1~0.3 mg/kg(소, 돼지, 가금류 근육), 미국 0.3 mg/kg(소 근육), 일본 0.1~0.2 mg/kg(소, 돼지, 닭 근육)임을 고려할 때[4] 우리나라에서 유통중인 식육은 국제기준에 적합하여 안전한 것으로 조사되었다.

요 약

식육 중 플로르페니콜을 분석하기 위하여 시료를 ethyl acetate로 추출 농축한 후 이 농축액을 acetonitrile과 *n*-hexane을 가하여 분획하고, acetonitrile층을 분리하여 농축하였다. 이를 Oasis HLB cartridge로 정제하고 C_{18} 컬럼을 이용한 HPLC-FLD로 분석하였다. 분석법은 표준물질 0.05~1.0 mg/kg의 농도범위에서 직선성(r^2=0.9997)을 나타냈으며, 검출한계는 0.012 mg/kg, 정량한계는 0.039 mg/kg이었다. 또한 회수율은 쇠고기에서 87.6~92.3 %, 돼지고기에서 85.6~93.3 %, 닭고기에서 92.9~95.6 %이었으며, 상대표준편차(RSD)는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에서 각각 1.1~4.8 %, 1.1~3.4 %, 1.0~5.3 %이었다. 본 연구에서 확립된 분석방법으로 유통 중인 식육(쇠고기, 돼지고기, 닭고기) 150건을 전국 지역(서울, 부산, 대구, 대전, 광주)별로 수거하여 플로르페니콜의 잔류 실태를 조사한 결과, 돼지고기 1건에서 0.040 mg/kg이 검출되었으며, 돼지고기 2건, 쇠고기 1건, 닭고기 2건에서는 검출되었으나 정량한계 미

Table 4. Residuals of florfenicol in food samples

Sample	Number of sample	Number of sample detected	Residual level (mg/kg)	MRL(mg/kg)		
				EU	USA	Japan
Cattle (Muscle)	50	1	≤LOQ	0.2	0.3	0.2
Pig (Muscle)	50	3	≤LOQ(2 samples), 0.040(1 sample)	0.3	-	0.2
Chicken (Muscle)	50	2	≤LOQ	0.1	-	0.1

만의 수준이었다. 이들 결과로부터 우리나라에서 유통 중인 조사한 식육 150건의 플로르페니콜 잔류량은 모두 국제기준에 적합한 것으로 조사되었다.

참고문헌

1. Moore, E.: Florfenicol. *J. Exotic Pet. Med*., **16**, 52-54 (2007).
2. Nagata, T. and Lka, H.: Detection of residual chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol in yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography-mass spectrometry. J. *Agric. Food Chem*., **44**, 1280-1284 (1996).
3. Vue, C., Schmidt, L.J., Stehly, G.R. and Gingerich, W.H.: Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish. *J. Chromatogr. B*., **780**, 111-117 (2002).
4. 식품 중 동물용의약품 잔류허용기준, 식품의약품안전청 (2007).
5. 식품공전, 식품의약품안전청 (2008).
6. Hormazabal, V., Steffenak, I. and Yndestad, M.: Simultaneous extraction and determination of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in sediment by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*., **724**, 364-366 (1996).
7. Hormazabal, V., Steffenak, I. and Yndestad, M.: Simultaneous determination of residues of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in fish tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B:Biomed.Appl.*,**616**, 161-165 (1993).
8. Kowalski, P., Konieczna, L., Chmielewska, A., Oldzka, I., Plenis, A., Bieniecki, M. and Lamparczyk, H.: Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. J. Pharm. Biomed. Anal., 39, 983-989 (2005).
9. Li, P., Qiu, Y., Cai, X., Kong, Y., Tang, Y., Wang, D. and Xie, M.: Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry. *Chin. J. Chromatogr*., **24**, 14-18 (2006).
10. Hillaert, S. and Bossche, W.V.D.: Optimization and validation of a micellar electrokinetic chromatographic method for the analysis of florfenicol. *J. Pharm. Biomed. Anal*., **36**, 437-440 (2004).
11. Samuelsen, O.B.: Simple and rapid method for determination of flumequine and oxolinic acid in salmon plasma by HPLC and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B:Biomed.Appl.,* **530**, 452-457 (1990).
12. Samuelsen, O.B. and Ervik, A.: Absorption, tissue distribution and excretion of flumequine and oxolinic acid in croking wrass following a single intraperitoneal injection or bath treatment. *J. Vet. Pharmacol. Therap*., **24**, 111-116 (2001).
13. CODEX guidelines for the establishment of a regulatory program for control of veterinary drug residues in foods (CAC/GL16-1993).