pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 6, pp. 432~438 (2016)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.6.432

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

수산물 중 에톡시퀸의 LC-MS/MS 정량분석법 개발

신다솜 · 채영식 · 강희승 · 이수빈 · 조윤제 · 천소영 · 정지윤* · 이규식
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 잔류물질과

Development of LC-MS/MS Quantitation Method for Ethoxyquin in Fishery Products

Dasom Shin, Young-Sik Chae, Hui-Seung Kang, Soo-Bin Lee, Yoon-Jae Cho, So-Young Cheon, Jiyoon Jeong*, and Gyu-Seek Rhee
Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food & Drug Safety Evaluation, Osong, Chungcheongbuk-do 28159, South Korea
(Received September 13, 2016/Revised September 19, 2016/Accepted September 30, 2016)

ABSTRACT - Ethoxyquin (EQ, 1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline) is quinoline-based antioxidant used in the animal feed and food industry to protect the raw materials and final products against oxidation. In recent years the use of synthetic antioxidants in fishmeal ingredients carry-over to farmed fish fillets has received increasing attention in food safety. This study was conducted to develop an analytical method to determine EQ in aquatic products. The analytes were confirmed and quantified via liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). The sample was extracted with 1 N HCl (in case of flatfish extracted with 1 N HCl containing 10% acetonitrile). Then, solid phase extraction (SPE) was used for the cleanup. Standard calibration curves presented linearity with the correlation coefficient (r^2) > 0.99, analyzed at 0.005-0.2 mg/kg concentration. The developed method was validated according to the Codex Alimentarius Commission (CAC) guideline. The limits of quantitation for EQ were 0.01 mg/kg. Average recoveries ranged from 81.3% to 107%. The repeatability of measurements, expressed as the coefficient of variation (CV, %), was below 10%. The analytical method was characterized with high accuracy and acceptable sensitivity to meet CODEX guideline requirements and would be applicable to analyze the EQ residue in aquatic products.

Key words : ethoxyquin, synthetic antioxidant, fish, shrimp, LC-MS/MS

에톡시퀸 (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethyl-quinoline)은 사과나 배 등의 수확 후 갈색 반점의 형성을 방지하고 파프리카 등의 수확 후 카로티노이드의 색소 유지 및 살균 용도로 이용되고 있다[1,2]. 또한, 비타민 및 지질의 산패 방지 효과로 분산성과 안전성이 높은 물질로 연어를 포함한 어류 및 닭 등 동물사료에 산패 방지를 위해 사용되고 있다[3-5]. 합성 항산화제에 속하는 에톡시퀸, BHA (butylhydroxyanisol), BHT (dibutylhydroxytoulene), TBHQ (t-butylhydroquinone), PG (propyl gallate) 등은 식품과 사료에서 주로 사용되며 천연 항산화제 보다 가격이 저렴하고 방부 역할이 뛰어나, 산업적으로 주로 쓰이고 있다[6]. 퀴놀론계 항산화제 물질인 에톡시퀸은 1921년 *p*-페네티딘과 아세톤의 반응으로 합성되었으며 항산화작용이 발견되었고, 1965년부터는 가축사료의 산화방지제로 사용되기 시작했다[1]. 현재까지도 수산업 사료의 방부제로 가장 널리 사용되고 있는 실정으로 매년 어분이 약 500 만톤이 생산되는데 생산량의 66% 이상은 에톡시퀸이 처리된다. 어분은 연어와 해양어류, 갑각류를 양식하는데 활용되고 있다[7].

하지만, 발암성, 아토피, 간과 신장에 손상을 주는 등 여러 질병의 원인이라는 주장이 여러 곳에서 나오기 시작하면서 잠재적인 우려가 제기되고 있다[8-10]. 또한, EFSA (European Food Safety Authority)는 에톡시퀸 분자 구조인 퀴논 이민(imine) 중 하나가 유전 독성이 되어 생체 내 DNA에 손상을 줄 수 있다는 것을 보고하였다. 사료첨가제로써 안전성을 평가하기 위해 더 많은 데이터와 연구가 필요하다고 언급했고, 동물, 소비자, 사용자 및 환경을 위해서 에톡시퀸의 안전성 재평가 자료를 EC Regulation

*Correspondence to: Jiyoon Jeong, Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Osong, Chungcheongbuk-do 28159, South Korea
Tel: 82-43-719-4203, Fax: 82-43-719-4200
E-mail: stopyoon@korea.kr

(No. 1831/2003)에 제시하였다[11]. FDA (Food and Drug Administration)나 EPA (US Environmental Protection Agency)를 비롯한 국제적인 기관에서 에톡시퀸에 대한 사용량을 엄격히 규제하고 있다.

우리나라에는 농약으로써 배, 사과에 대해서만 각각 3 mg/kg 으로 잔류허용기준(maximum residue limit, MRL)을 설정하고 있으며, 그 외 동물사료의 산화방지제로 사용이 허가되어있다. 국제식품규격위원회는 배에 대해서만 3 mg/kg으로 MRL을 설정하고 있으며[12,13], 일본은 식품에 따라 0.1-7 mg/kg 으로[14], 미국에서는 산화방지제와 동물사료 등에 첨가하는 용도로 사용하며, EU의 경우 인간이 섭취하는 식품을 제외한 작물에 대한 살충제로 사용이 허가되어있다[3].

농・축수산물 및 사료에 대한 에톡시퀸을 분석하기 위한 기체크로마토그래피(gas chromatography), 액체크로마토그래피(liquid chromatography) 등의 시험법이 주로 개발되어 왔다[15-20]. 현재, 우리나라 식품공전(4.1.4.14)에서는 농산물에 대하여 액체크로마토그래프를 이용하여 분석하며, 기존 시험법은 시료 전처리 방법이 복잡하고 많은 용매가 사용되며 시간이 길게 소요되는 단점이 있다. 또한, 농산물에 대한 에톡시퀸의 MRL이 설정 되어 있으며, 사료의 산화방지제로 사용이 허가되어 있어 양식 어류에 잔류 가능성이 있음에도 불구하고, 수산용 동물용의약품으로서 사용허가가 되지 않아 수산물에 대한 기준・규격과 잔류분석법은 확립되어 있지 않은 실정이다. 따라서, 수산물에 대한 에톡시퀸의 MRL과 이에 적합한 분석법이 요구되는 상황이다.

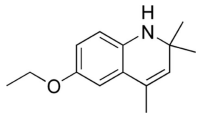
본 연구에서는 에톡시퀸[7] 검출 가능성이 높은 양식산 새우, 연어 및 넙치에 대하여 LC-MS/MS를 이용하여 기존 분석법보다 신속하고 정확하게 에톡시퀸을 분석하며, 정량성 및 정밀성을 확보할 수 있는 분석법을 개발하여 국내 생산 및 수입 수산물에 대한 안전관리 강화 기반을 마련하는데 기여하고자 하였다.

Materials and Methods

시약 및 재료

에톡시퀸(ethoxyquin, 98.8%) 표준품은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)로부터 구입하여 사용하였다 (Table 1). 전처리 시약으로 사용된 아세토니트릴(acetonitrile), 메탄올(methanol) 등은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 HPLC 등급으로 구입하여 사용하였고, 개미산(formic acid, ≥ 95%), 포름산암모늄(ammonium formate, ≥ 99%), 수산화암모늄(ammonium hydroxide, 28-30%) 등 그 이외의 분석용 시약 및 용매는 특급 또는 분석용을 사용하였다. 또한, 고상추출(solid phase extraction, SPE) 카트리지(cartridge)는 MCX (Mixed-mode cation exchange, 6 cc, 500 mg, Waters, Oasis, MA, USA)를 이용하였으며, 활성화 과정을 거쳐 추출물을 흡착시킨 후 용출하는 과정에 사용하였다. 시험용 시료는 시중에서 유통되고 있는 새우, 연어 및 넙치를 대상으로 껍질, 내장을 제거한 부위(근육)만을 분쇄하여 균질화하였다. 균질화한 시료는 분석 전까지 냉동고(–20°C)에 보관하였다. 공시료(blank) 시험을 거쳐 에톡시퀸이 잔류되지 않음을 확인한 후 시험용 시료로 사용하였다.

Table 1. Molecular structure and physico-chemical properties of ethoxyquin

Property	Content
IUPAC Name	6-Ethoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline
CAS No.	91-53-2
Classification	Fungicide, Antioxidant
Molecular formula	$C_{14}H_{19}NO$
Molecular weight	217.31 g/mol
Boiling point	123-125°C (at 2 mmHg)
Density	1.029-1.031 (25°C)
Log P_{ow}	3.39 (pH 7.0)
pKa	4.56 (22°C)
Vapor pressure	1.82×10^{-5} mm Hg (32°F)
Solubility in water	< 0.1 g/100 mL at 20°C
Solubility in solvent	Ethanol: > 50 mL/L
Structure	

표준원액 및 표준용액의 조제

에톡시퀸 표준품 10.1 mg을 저울로 정밀히 달아 100 mL 볼륨플라스크에 아세토니트릴로 정용하여, 100 mg/L (100 ppm)이 되도록 표준원액을 조제하였다. 이를 10 mM 암모늄포메이트:아세토니트릴(50/50:v/v) 용매로 단계적으로 희석하여 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2 mg/L의 표준용액으로 각각 준비하였다. 표준원액과 표준용액은 갈색 유리병에 담아 4°C 냉장실에 보관하면서 실험 직전에 희석하여 사용하였다.

추출 및 정제

각각의 시료를 균질화하여 2 g 을 정밀히 달아 50 mL 폴리프로필렌 재질의 튜브에 취하고 추출용액 1 N HCl 10 mL (넙치의 경우 10% 아세토니트릴을 함유한 1 N HCL 10 mL)를 넣고 가볍게 진탕한 후 10,000 × g, 4°C 에서 약 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 다른 50 mL 폴리프로필렌 재질의 튜브에 취한 후 남은 잔사에 위와 동일하게 처리하여 상층액을 합하였다. 미리 메탄올 5 mL와 물 5 mL로 MCX 카트리지를 활성화시킨 후 추출액을

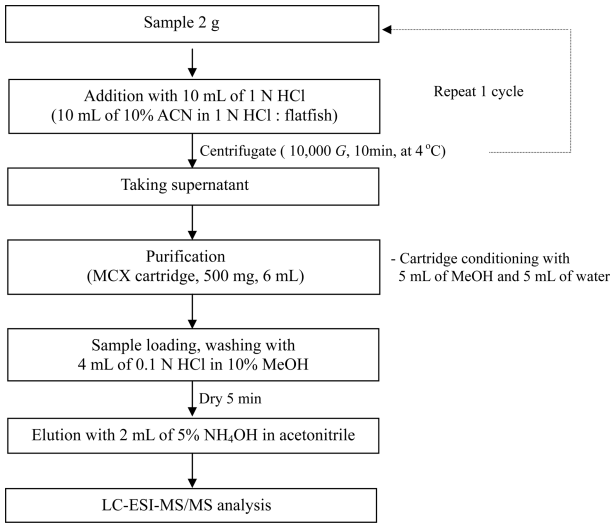


Fig. 1. Flow chart of analysis procedure for ethoxyquin.

1~3 mL/min의 속도로 충진제에 흡착시키고 0.1 N HCl을 함유한 10% 메탄올 4 mL를 넣어 같은 유속으로 세척하였다. 이 때, 감압하여 수분을 완전히 제거 한 후 공기를 통과시켜 건조하였다. 아세토니트릴성 5% 수산화암모늄 2 mL를 15 mL 폴리프로필렌 재질의 튜브에 용출하였다. 이 용액을 균질화 한 후 나일론(Nylon) 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하여 유리 바이알에 담아 시험용액으로 사용하였다(Fig. 1).

기기분석조건

수산물 시료 중 에톡시퀸 분석을 위하여 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS, Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer) Waters US/Xevo TQ-S (Milford, MA, USA)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 역상컬럼인 X-Bridge C_{18} (2.1 × 150 mm, 3.5 μm, Waters, Dublin, Ireland), 컬럼 온도는 40°C를 유지하였으며, 이동상 A는 10 mM 암모늄포메이트, 이동상 B는 아세토니트릴을 선택하여 기울기 용리 방식을 선택하였다. 유속은 0.3 mL/min, 주입량은 5 μL로 하였다. 질량분석기 조건 확립을 위해서 에톡시퀸의 표준용액(50 ng/mL)을 사용하여 컬럼을 통과하지 않고 직접 질량분석기로 infusion하여 분석하였다. 이온화법은 전기분무이온화(electro-spray ionization, ESI)법의 양이온모드(positive ion mode)에서 물질의 전구이온(precursor ion)를 선택하였고, 충돌에너지(collision energy)를 조절하여 토막이온(product ion)을 생성한 후 정량 및 정성 이온을 결정하는 multiple reation monitoring (MRM) 조건을 확립하여 모든 MS조건을 최적화 한 뒤 분석하였다(Table 2).

분석법 검증

분석법은 CAC guideline 16번과 71번에 따라서 직선성

Table 2. LC-MS/MS parameter for the analysis of ethoxyquin

LC system	Waters, UPLC		
Column	Waters X-Bridge ® C_{18} (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 μm)		
Column temp.	40°C		
Injection vol.	5 μL		
Flow rate	0.3 mL/min.		
Mobile phase	A = 10 mM Ammonium formate B = Acetonitrile		
Gradient	Time (min)	Mobile phase	
		A (%)	B (%)
	0	40	60
	1	40	60
	8	0	100
	9	0	100
	9.5	40	60
	12	40	60
Mass spectrometry	Waters, Xevo TQ-S		
Ionization mode	ESI positive		
Capillary temp.	350°C		
Spray voltage	3.5 kV		
Collision gas	Ar		

(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 측정하여 유효성을 검증하였다. 연어, 새우 및 넙치로부터 MRL이 설정되지 않은 에톡시퀸은 10 mM 암모늄포메이트:아세토니트릴(50/50:v/v) 용매로 단계적으로 희석하여 LC-MS/MS에 주입하여 얻어진 정량이온의 피크면적으로 검량곡선을 작성하였고, 각 검량선의 상관 계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(signal to noise ratio, S/N ratio)가 10 이상이 되는 농도 값을 이용해 다음과 같은 계산식에 의해 산출하였다.

Limit of quantitation (mg/kg) = (a × b/w)
a: 에톡시퀸의 검출량(mg/L)
b: 최종 희석부피(L)
w: 시료량(kg)

정확성과 정밀성은 공시료에 정량한계를 기준으로 1, 2 및 10배 농도가 되도록 첨가하여 확립된 분석법에 따라 시험용액을 조제한 후 LC-MS/MS로 분석하였으며, 각 5반복 실험을 통해 정확성과 정밀성을 평가하였다.

Results and Discussion

분석법 선정 및 조건확립

에톡시퀸은 Log P_{ow} 값이 3.39로 비극성 물질이며, 증기

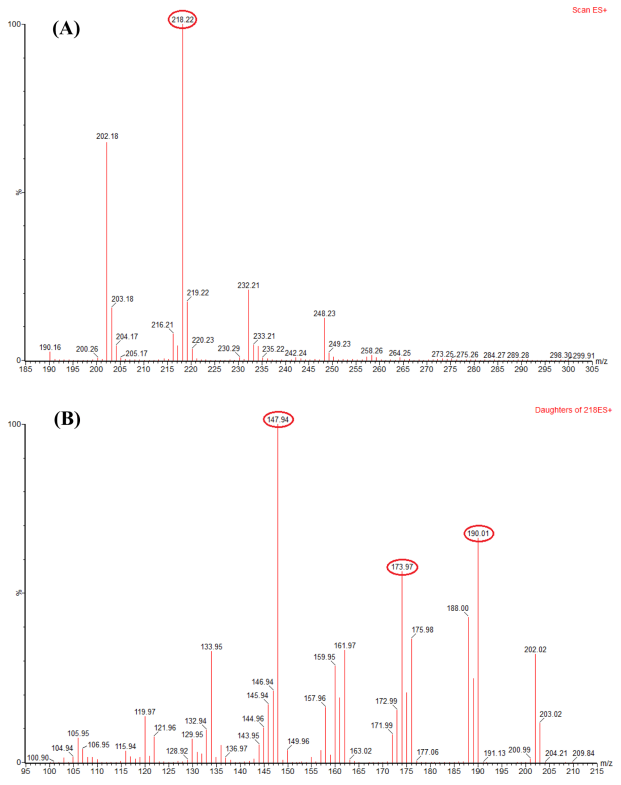


Fig. 2. Precursor ion spectra (A) and product ion spectra of ethoxyquin (B).

압이 1.82×10^{-5} mmHg로 휘발성이 낮고 해리되는 특성으로 인하여 기기분석에 있어서 고감도 및 정량·정성 분석이 가능한 LC-MS/MS를 선택하였다. 이온화법으로는 전기분무이온화법으로 positive mode 조건으로 분석되었다. 표준용액(10 μL/min)을 질량검출기에 직접 주입하여 cone voltage (10-50 V)조절을 통해 35 V 에서 최대 강도를 나타내는 것을 확인하였다. 선구이온(precursor ion)은 full scan mode에서 질량 스펙트럼을 확인하여 에톡시퀸의 질량 값(exact mass, M)에 양성자(H^+)가 결합되어 $[M+H]^+$ 형태인 m/z 218의 선구이온을 확인하였다. MS/MS 분석 시 collision energy를 조절하여 정량이온인 m/z 148 ($C_9H_{10}NO$)과 정성이온(qualification ion)인 m/z 134 (C_8H_8NO), 176 ($C_{11}H_{14}NO$)을 얻을 수 있었다(Fig. 2). 3개 이상의 생성이온(product ion)을 확인하며 최적의 MRM조건을 확립하였으며, 선정된 이온과 머무름 시간은 Table 3에 나타내었다.

추출 및 정제조건 확립

에톡시퀸은 극성물질이며, pKa가 4.56으로 약염기성 화합물인 것을 고려하였다. 따라서, 약산성 또는 약염기성 성분인 해당 성분의 pKa 값을 고려하여 극성 추출액의 pH를 조절한 후 비극성 용매를 이용하여 높은 효율로 분배정제하는 ion-associated partition 분배법을 적용하였다[22]. 본 시험법의 경우 분석대상이 약염기성 성분에 해당하기 때문에 짝산의 pKa를 기준으로 pH 조절 작업을 반대로 수행하여 추출용매를 산성용매로 사용하였다. 산성용매와 비극성 시료간의 분배법은 그 효율이 월등한 편이나, 대상물질이 낮은 pH에서 가수 분해 될 가능성이 있기 때문에, 분석 물질의 pKa와 추출용매의 pH 차이를 1.5배 정도로 한 뒤, 추출효율을 높이기 위해서 2회 반복 추출하였다[10]. 분배법을 적용하여 불순물 제거효율을 높여 추출액 자체의 분석을 가능하게 하였다. 따라서, 에톡시퀸에 1 N 염산을 이용하여 전체적으로 산성조건으로 만들어[30] 이온을 해리상태로 만들어 수용액으로 추출되게 함과 동시에 비극성 불순물을 제거 하였다. 넙치의 경우 연어와 새우에 적용된 추출용매로는 회수율이 20~40%로 낮은 수준이었기 때문에 추출용매에 아세토니트릴을 10% 첨가하여 추출하였다. 이는 아세토니트릴이 비극성 간섭물질의 추출률이 비교적 낮으며 단백질을 변형시켜 침전물의 형태로 제거할 수 있는 성질[31]을 이용하기 위함이었다. 수산물의 경우 시료에 따라 수용액으로만 추출할 경우 심한 에멀전(emulsion)이 생기게 되며, 이는 전처리 정제과정 중 카트리지가 막히는 현상을 발생시킬 수 있다. 이때, 유기용매를 첨가하면 에멀전이 생기는 것을 감소시킬 수 있다. 그러나 지방 함량이 높은 시료는 유기용매 비율을 높이면 지방성분이 과다하게 추출되기 때문에 연어의 경우 적용하지 못하였다. 또한 연어와 새우의 경우 1 N 염산에서의 회수율은 높은 결과를 얻을 수 있었지만 넙치의 경우 에멀전이 심하게 생겨 카트리지 정제과정에서 어려움을 겪었기 때문에 유기용매의 첨가가 필요하였다.

고상 추출법에 따른 정제과정에서 분석대상물질의 분자구조와 pKa값을 고려한 카트리지의 선택은 회수율에 큰 영향을 미친다. 에톡시퀸은 물리화학적 특성과 추출액이 산성인 점을 고려하여 본 시험법에서 선택된 MCX 카트리지는 강한 양이온 교환 메커니즘으로 양이온 형태의 염기성 물질을 분석대상물질을 선택적으로 흡착시키며, 수용성을 포함한 불순물을 제거하는 역상 흡착제인 MCX 카

Table 3. Selected-ion of LC-MS/MS for ethoxyquin

Compound	Retention time (min)	Exact mass (m/z)	Precursor ion (m/z)	Confirmation ion (m/z)	Collision Energy (eV)
Ethoxyquin	3.8	217.15	218	148*	23
				134	26
				176	18

*Quantification ion

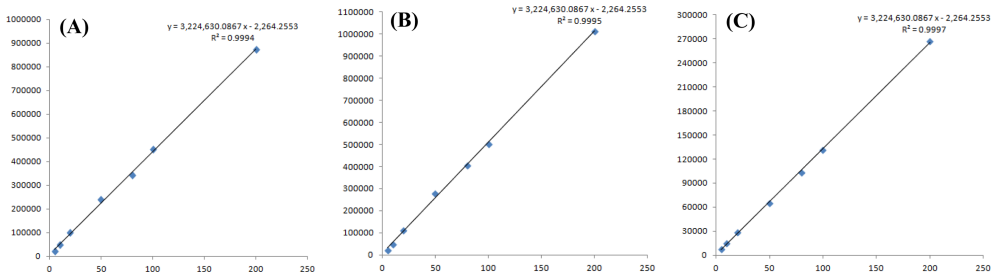


Fig. 3. Standard calibration curve ranges, linearities and correlation coefficients (r^2) of ethoxyquin in shrimp (A), salmon (B) and flatfish (C).

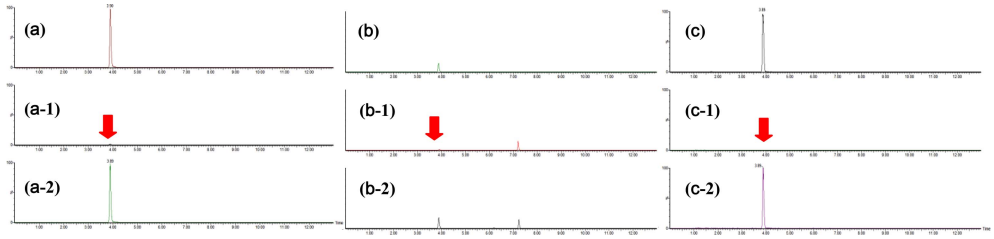


Fig. 4. LC-MS/MS chromatogram of ethoxyquin (m/z 218 → m/z 148) in salmon, shrimp and flatfish sample. Chromatogram of ethoxyquin in standard at 0.01 mg/kg (a,b,c), blank shrimp (a-1) and fortified shrimp sample at 0.01 mg/kg (a-2). Chromatogram of blank salmon (b-1) and fortified salmon sample at 0.01 mg/kg (b-2). Chromatogram of blank flatfish (c-1) and fortified flatfish sample at 0.01 mg/kg (c-2).

트리지를 선택하였다[22-24]. 시료로부터 에톡시퀸을 0.1 N 염산 용액으로 추출하여 카트리지에 흡착 시킨 후 세척 단계에서 0.1 N 염산을 함유한 10% 메탄올로 불순물을 제거하고 아세토니트릴성 5% 수산화암모늄용액을 사용하여 염기성 물질이 용출되는 특성을 분석법에 적용하여 확립하였다.

분석법 검증

에톡시퀸 분석법의 선택성(Selectivity), 특이성(Specificity), 직선성(Linearity)을 검증하기 위해 새우, 연어 및 넙치의 무처리 시료, 표준용액, 표준용액을 첨가한 회수율 시료의 크로마토그램을 서로 비교하였다(Fig. 4). 그 결과, 무처리 검체 중 에톡시퀸과 같은 머무름 시간을 갖는 어떤 방해물질도 검출되지 않았다. 따라서, 에톡시퀸을 분석하기 위한 본 시험법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인할 수 있었다. 에톡시퀸 표준원액을 10 mM 암모늄포메이트:아세토니트릴(50/50:v/v)로 희석하였다. 정량한계는 크로마토그램 상에서 S/N ratio를 10 이상으로 하여 0.01 mg/kg으로 나타났고, 정량한계를 포함한 1/2, 1, 2, 5, 8, 10, 20배가 되도록 검량곡선을 작성하였다(Fig. 3). 상관계수가 0.99 이상으로 CODEX에서 권장하는 $r^2 > 0.98$와 비교해도 매우 만족할 만한 수준이었다. 본 시험법의 정확성을 평가하기 위하여 새우, 연어 및 넙치의 처리농도를 정량한계의 1, 2, 10배 농도가 되도록 표준용액을 첨가하여 회수율 실험을 5회 반복으로 수행하여 정확성과 정밀성을 평가하였다. 그 결과 연어, 새우 및 넙치 시료의 에톡시퀸 평균 회수율과 정밀성(Coefficient variation, CV)은 81.3~107%, 5.02~10.1%로 조사되어 정확성과 정밀성 모두 CAC 권장기준을 충족하며, 잔류동물용의약품 시험법의 적합성을 확인할 수 있었다(Table 4).

LC-MS/MS를 이용한 어분, 어유 등에 대한 에톡시퀸을 분석한 연구결과는 많은 편이지만, 수산물에 대한 연구결과는 부족하다[2,3,16,18-20,27]. EURM-SRM (EU Reference Laboratorie for Residues of Pesticide)[30] 의 에톡시퀸 원물질에 대한 연구는 Ascorbic acid (AA)을 이용하여 산성조건으로 만들어 분석물질을 추출 하였고, 두 번의 정제과정을

Table 4. Validation results for the analytical method of EQ in salmon, shrimp and flatfish (n = 5)

Concentration (mg/kg)	Shrimp		Salmon		Flatfish	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
0.01 (LOQ)	97.11	5.52	93.06	9.81	94.11	10.08
0.02 (2LOQ)	106.28	7.14	89.52	10.18	107.98	7.94
0.1 (10LOQ)	87.48	7.58	81.28	5.02	99.93	9.13

거치는 방법이다. AA를 두 번 첨가한 경우는 첨가하지 않은 샘플을 추출 후 AA를 넣은 경우보다 회수율이 32% 높게 나왔다. AA를 첨가하여 97.0~108%의 높은 회수율을 얻었지만, AA를 두 번 첨가 해야 하는 번거로움이 있다.

하지만, 본 시험법에서는 에톡시퀸 원물질 자체의 분석법으로 산성용매를 이용한 ion-associated partition 을 적용한 추출법이기 때문에 불순물 제거 효율을 높일 뿐만 아니라, 추출액 자체의 분석을 가능하게 하였다. 또한, 시료 특성에 따라서 추출용매를 다르게 하였으며 정제법으로는 역상 흡착제인 MCX 카트리지를 사용하여 에톡시퀸을 분석하였다.

European Commission에서 2016년 5월 유통 중 수산물에 대해 양식연어 10건, 새우 4건, 돔류 1건, 메기 1건을 에톡시퀸과 그 대사체에 대한 모니터링을 실시하였다. 그 결과, 양식연어 10건에서 에톡시퀸과 에톡시퀸 다이머(ethoxyquin dimer, EQDM)이 모두 검출되었고 그 이외의 대사체는 검출되지 않았으며, 나머지 샘플에서는 모든 성분이 검출되지 않았다. 에톡시퀸 보다 에톡시퀸 다이머의 수치가 최저 0.62배 - 최고 135배 높은 결과[30]가 나왔으며, 다른 연구[26,28,29]에서도 비슷한 결과이다. 에톡시퀸은 물질 내에서 EQDM, N-N'-ethoxyquin dimer, ethoxyquin quinine imine (EQI or QI), EQI N-oxide, Deethylated EQ (DEQ), Dihydroethoxyquin (DHEQ) 등의 대사체로 변환된다[25]. 이 중 어류 생체 내에서는 에톡시퀸 다이머 형태로 가장 쉽게 변형되어 원물질 에톡시퀸과 대사체 에톡시퀸 다이머 동시에 존재하게 된다. DEQ 또한 검출 가능성이 있지만 에톡시퀸과 에톡시퀸 다이머 보다는 훨씬 낮은 수준이다[26]. 하지만, 현재 에톡시퀸 원물질에 대한 수산물 중 분석법은 어분과 어유 등의 식품보다 연구가 적은 편이다.

앞서 확립한 시험법을 적용하여 양식 수산물에 잔류할 수 있는 에톡시퀸 원물질에 대한 안전관리에 활용을 할 수 있을 것으로 사료 되는 바이다. 향후 에톡시퀸 원물질 뿐만 아니라 대사체와 동시에 분석할 수 있도록 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 식품의약품안전처 연구개발과제(15161MFDS665 and 16161MFDS602)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 수산물 중 에톡시퀸 정량시험법을 확립하여 국내 생산 및 수입 양식 수산물에 대한 잔류할 수 있는 동물용의약품인 에톡시퀸에 대한 안전관리 강화기반을 위해 마련되었다. LC-MS/MS를 이용하여 신속하고 효과적으로 정량성 및 정밀성을 확보하였으며, 확립된 시험법의 선택성, 정량한계 및 회수율에 대한 검증을 통하여 에톡시퀸 시험법으로서의 유효성을 확인하였다. 표준용액을 정량한계를 포함한 농도에 따라 검량선을 작성한 결과 $r^2 > 0.99$ 이상의 직선성을 확인하였으며, 산성용매로 추출 후 MCX 카트리지를 이용해 정제하였다. 본 실험에서의 검출한계는 0.001 mg/kg, 정량한계는 0.01 mg/kg 수준이었고, 평균 회수율은 81.3~107%이었다. 또한, 분석오차는 10% 이하로 정확성 및 재현성이 우수하였으며, CODEX 가이드라인 규정에 만족하는 수준이었다. 따라서, 개발된 시험법은 안전한 국내유통 수산물과 국민보건을 위해 지속적인 잔류실태조사에 활용되고, 수산물 중 잔류동물용의약품의 안전관리에 기여할 것으로 판단된다.

References

1. FDA (Food and drug administration), Available from: http://www.fda.gov/animalveterinary/. (2015).
2. G.J.A. Osuna, M.M. Wall and C.A. Waddell: Natural antioxidants for preventing color loss in stored paprika. *J. of Food Sceince*, **62**, 1017-1021 (1997).
3. S. Thorrisson, F.D. Gunstone, R. Hardy: The antioxidant properties of EQ and of some of its oxidation products in fish oil and meal. *J. Am. Oil Chem. Soc*., **69**, 806-809 (1992).
4. FAO (United Nations Food and Agriculture Organization) Corporate document repository: Aquaculture development and coordination programme, fish feed technology, Available from: http://www.fao.org/docrep/. Accessed (25.7.2016).
5. FDA In Code federal regulation: Ethoxyquin the office of the federal register national archives and records administration. Washington, USA, **172**, 26-32.
6. S.H. Kim, M.H. Kim, S.Y. Park: The newest edition of Feed additives, Heungwang, 355-357 (2003).
7. IFFO (The Marine Ingredients Organisation): Ethoxyquin and the potential impacts of its withdrawal from use in EU28 on the Fishmeal, Aquaculture and Agriculture industries, Available from: http://www.eufishmeal.org/cmwebpic/iffo/ethoxyquin/. Accessed (25.7.2016).
8. C. Savini, R. Morelli, E. Piancastelli, S. Restani: Contact dermatitis due to ethoxyquin. **21**, 342-343 (1989).
9. D.A. Dzanis: Safety of ethoxyquin in dog foods. *The J. of Nutrition*, **121**, 163-164 (1991).
10. K. Alanko, R. Jolanki, T. Estlander, L. Kanerva: Occupational 'multivitamin allergy' caused by the antioxidant ethoxyquin. **39**, 263-264 (1998).
11. EFSA (European Food Safety Aurthority): Ethoxyquin - EFSA safety assessment inconclusive, Available from: https://www.efsa.europa.eu/. Accessed (30.7.2016).
12. MFDS (Ministry of Food and Drug Safety): Pesticides and Veterinary Drugs Information, Available from: http://www.foodnara.go.kr/residue/search/. Accessed (2.8.2016).
13. CAC (Codex Alimentarius Committee), Available from: http://

www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/. Accessed (5.8.2016).
14. The Japan Food Chemical Research Foundation, Available from: http://www.ffcr.or.jp/zaidan/ffcrhome.nsf/. Accessed (6. 8.2016).
15. A.K. Lundebye, H. Hove, A. Mage, V.J.B. Bohne, K. Hamre: Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoulene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish. *Food Addit. Contam*., **27**(12), 1652-1657 (2010).
16. V.J.B. Bohen, A-K. Lundebye, K. Hamre: Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant ethoxyquin in the muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food and chem. Toxicol*., **46**, 1834-1843 (2008).
17. H. Ping, G.A. Robert: HPLC determination of ethoxyquin and its major oxidation products in fresh and stored fish meals and fish fees. *J. of Sci. Food Agri*., **80**, 10-16 (2000).
18. M. Olek, B. Decleroq, M. Caboche, F. Blanchard, G. Sudraud: Application of electrochemical detection to the determination of ethoxyquin residues by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr. A*, **281**, 309-313 (1983).
19. P. Corti, E. Dreassi, N. Politi, C. Aprea: Comparison of HPTLC and HPLC procedures for the determination of certain xenobiotic residues in apples and pears. *Food Addit. And Contam*., **9**, 243-251 (1992).
20. K.D. Hans, U.S. Janneche: Gas chromatographic Determination of Ethoxyquin in Feed and Food Products. *J. of Agric. Food Chem*., **23**, 1093-1095 (1975).
21. Saigon Times: Shrimp exports to South Korea face ethoxyquin tests, Available from: http://english.thesaigontimes.vn/. Accessed (8.8.2016).
22. MFDS (Ministry of Food and Drug Safety): Analysis Practice Reference of Veterinary drug Residue. (2014).
23. NIER (National Institute of Environmental Research): Development of analytical method and study of exposure of pharmaceuticals and personal care products in environment. (2006).
24. M.S. Diaz-Cruz, M.J. Garcia-Galan and D. Barcelo: Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics. *J. Chromatogr. A*., **1193**, 50-59 (2008).
25. IFFO (The Marine Ingredients Organisation), Available from: http://www.iffo.net/system/files/Ethoxyquin%201987-2.pdf/. Accessed (2.8.2016).
26. EFSA (European Food Safety Aurthority), Available from: https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4272/. Accessed (20.07.2016).
27. B. Alina, A. Aleksandra, S. Janusz: Ethoxyquin: An Antioxidant Used in Animal Feed. *Int. J. of Food Sci*., **585931**, (2013)
28. Ortelli et al.: Available from: http://ge.ch/dares/Silverpeas Web FileServer/ORTELLI_poster_Ethoxyquin_Rafa2011/. Accessed (27.7.2016).
29. Lundebye et al.: In Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and in commercially farmed fish. *Food Addit. And Contam*., **27**, 1652-1657 (2010).
30. European Commission: Analytical Observations Report (Analysis of Ethoxyquin and its Metabolites in Fish Using the QuEChERS Method). EURM-SRM (EU Reference Laboratorie for Residues of Pesticide), **1**, (2016).
31. A.Y. Ko, H.J. Kim et al.: Development of an Official Analytical Method for Determination of Phorate and its Metabolites in Livestock Using LC-MS/MS. *J. Fd Hyg. Safety*, **30**, 272-280 (2015).