

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)에서 cephalixin의 잔류농도 연구를 위한 LC-MS/MS 분석법 연구

양찬영 · 배준성 · 이채원 · 정은하 · 이지훈* · 박수진* · 최상훈 · 박관하[†]

전라북도 군산시 대학로 558 군산대학교 해양과학대학 수산생명의학과

*부산광역시 영도구 해양로 337 국립수산물품질관리원

Analytical method study for cephalixin with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) applicable for residue studies in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*

Chan Yeong Yang, Jun Sung Bae, Chae Won Lee, Eun Ha Jeong, Ji-Hoon Lee*,
Su-Jin Bak*, Sang-Hoon Choi and Kwan Ha Park[†]

Departments of Aquatic Life Medicine, College of Ocean Science and Technology,
Kunsan National University, Gunsan City, Jeonbuk, Korea

*National Fishery Products Quality Management Service, 337 Haeyang-ro,
Yeongdo-gu, Busan, Republic of Korea

Cephalixin, a semi-synthetic cephalosporin antibiotic, has long been used in fish aquaculture in various countries under legal authorization. The drug is thus widely available for use in other aquatic species except fishes like the crustacean whiteleg shrimp. This study aims to develop a sensitive method for laboratory residue studies to adopt in withdrawal period determinations. Through repeated trials from the existing methods developed for other food animal tissues, it was possible to achieve a sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method. The results showed that at a concentration of 0.1 mg/kg, the recovery rate was 81.79%, and C.V. value was 8.2%, which meet the recovery rate and C.V. recommended by Codex guideline. After satisfactory validation of analytical procedures, applicability to the shrimp tissue was confirmed in experimentally cephalixin-treated whiteleg shrimp. As a result, most muscle samples were detected below the limit of quantification (0.05 mg/kg) after day 3, and most hepatopancreas samples were detected below the limit of quantification after day 14. In particular, the limit of quantification 0.05 ppm with the presently developed method suggests sufficient sensitive over the current legal maximum residue limit of 0.2 mg/kg set for fishes.

Key words: cephalixin, whiteleg shrimp *L. vannamei*, LC-MS/MS, residue study

[†]Corresponding author: Kwan Ha Park
Tel: +82-63-469-1885, Fax: +82-63-463-9493
E-mail: khpark@kunsan.ac.kr

서 론

β -Lactam ring을 가지고 있는 세팔로스포린(cephalosporin) 계열의 항생제는 cephazolin, cefadroxil, cefaclor, ceftiofur, cefquinome 및 cephalexin 등 다양한 구조의 물질이 1세대부터 4세대에 걸쳐 개발되어 있으며 이 중 세팔렉신(cephalexin)은 1세대에 속하는 반합성 항생제이다(Fig. 1).

세팔로스포린 계열의 항생제는 대체로 독성이 낮아 가장 안전한 약물 중 하나이며, β -lactam ring을 가지고 있어 페니실린(penicillin)과 약리학적 특성이 유사한 것으로 알려져 있다(Lim, 2014). 이들은 세균의 세포벽 내 peptidoglycan층에 존재하는 아미노산인 D-alanyl-D-alanine과 유사한 구조(Chae *et al.*, 2018)로 인해, 세포벽 형성에 필수적인 penicillin-binding proteins에 비가역적으로 결합함으로써 peptidoglycan층의 합성을 억제한다(Wang *et al.*, 2019). Cephalexin은 축산산업에서 살모넬라증, 대장균증, 호흡기질환 등의 치료제로 사용되고 있으며(Kim *et al.*, 2015), 어류 양식에서는 장내세균과 포도상구균, 연쇄상구균 등 그람양성균과 그람음성균에 대해 높은 항균력을 가지고 있다(Lim *et al.*, 2003; Benarab and Fangninou, 2020).

흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)는 광범위한 염분 조건에서 양식이 가능하여 환경 조건의 제한을 적게 받음으로써 세계적으로 가장 많이 양식이 되는 갑각류이다(Kim *et al.*, 2017). 우리나라에서는 2019년 약 7,542톤을 생산, 현재 국내 새우양식 생산량 중 99% 이상을 차지하기 때문에 새우 양식에서 가장 중요한 품종으로 자리 잡았다(KOSIS, 2021). 현재 우리나라 흰다리새우 양식장에서 발생하는 질병은 비감염성 질병이 더 지배적이나 감

염성 질병도 상당 부분 차지하고 있다(Kim *et al.*, 2012). 흰다리새우의 양식이 증가함에 따라 흰반점바이러스(white spot syndrome virus)나 급성간췌장괴사병(acute hepatopancreatic necrosis disease)과 같은 감염성 질병에 의한 피해가 커지고 있다(Kim and Kim, 2015).

수산양식에서 항생제는 질병의 치료와 예방에 필수적이기 때문에, 수산양식의 급속한 성장으로 인하여 수산생물 생산량의 증가에 수반하여 항생·항균성 수산용의약품의 사용빈도도 매년 증가하고 있다(Kim *et al.*, 2014). 이러한 항생제의 사용이 지속되고 증가함에 따라, 오남용으로 인한 항생제 내성균의 증가로 인해 항생제 잔류에 의한 식품 위생학적 안전성에 심각한 문제를 야기하고 있다(Kim *et al.*, 2019). 따라서 국내, 국제식품규격(Codex), 일본, 미국 및 EU에서는 식품에 대한 잔류허용기준(MRL, maximum residue level)을 설정하여 관리하고 있다(Lee *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2012). 현재 국내에서는 278종의 동물용의약품에 대한 잔류허용기준을 설정하여 관리하고 있으며 그 중 수산용의약품도 64종으로 상당수라고 볼 수 있다(KFDA, 2021a).

식품에 잔류하는 동물용의약품의 안전성을 평가하기 위해서는 정확하고 신뢰성 있는 분석법이 필요하다(Lee and Zoh, 2016). 특히 신뢰성 있는 분석에는 잔류허용기준보다 낮은 농도에 대한 분석능력이 요구된다. 이러한 목적으로 대상 성분만을 선택적으로 검출할 수 있는 고성능 분석기법이 필요하며 현재 대표적으로 고성능 액체 크로마토그래피와 질량분석기를 이용한 검출법(high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)이 가장 일반적으로 이용된다(Lee, 2016; NIFDS, 2016).

현재 세팔렉신의 경우 이미 소고기, 우유, 가금류 및 어류에서 HPLC-MS/MS를 사용한 분석법이 개발되어 있다(KFDA, 2021b). 세팔렉신은 이미 어류에서의 사용이 허가되어 있으므로 아직 허가 생물종이 아닌 흰다리새우에서의 사용 가능성도 충분히 있다고 판단된다. 그러나 흰다리새우에서 세팔렉신 투여 후의 조직에 잔류하는 연구를 수행한 사례가 없음으로 인하여, 해당 분석법의 개발 및

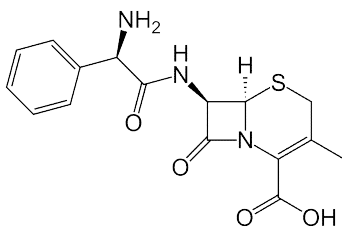


Fig. 1. Chemical structure of cephalexin. $C_{16}H_{17}N_3O_4S$ (molecular weight 347.389 g/mol)

투여에 따른 잔류농도 시험에 적용하는 연구가 필요하게 되었다. 따라서 본 연구에서는 어류 근육에서의 잔류분석방법을 바탕으로 하여 갑각류 중 흰다리새우에서 HPLC-MS/MS를 이용한 세팔렉신의 잔류분석방법을 개발하였다. 이와 같은 연구는 허가된 동물용의약품들 중 세팔렉신이 흰다리새우에서 잔류허용기준과 잔류분석방법이 마련되지 않은 현재 상황에서 모델 연구로서 매우 중요한 의미를 가진다고 판단된다.

재료 및 방법

시료

분석법의 연구를 위해 시중에서 유통되는 냉동 흰다리새우를 구입하여 분석법 개발 대상 시료로 사용하였다. 새우의 껍질과 내장 부위를 제거한 근육만을 분쇄하여 균질화하고, HPLC-MS/MS를 사용하여 시험에 사용한 흰다리새우에 세팔렉신이 잔류되어 있지 않음을 확인한 후 사용하였다. 균질화한 시료는 분석 전까지 초저온 냉동고(-80℃)에 보관하였다.

시험동물 및 사육관리

세팔렉신 투여 시험을 위한 목적으로, 흰다리새우를 입수하여 부산 소재의 양식장에서 체중 10-26 g의 수준으로 사육 후 사용하였다. 사육 및 시험은 3톤의 해수 순환여과수조에서 수행하였다. 사육수의 염도는 26 p.s.u., pH는 7.0-8.0, 수온은 28±3℃를 유지하였으며, 지속적으로 폭기를 하며 용존 산소를 6.0 ppm 이상으로 유지하였다.

세팔렉신 투여 및 시료 채취

순환여과식 양식시설에서 3톤의 사육조에 체중

10-26 g 즉, 평균 18 g의 흰다리새우를 500마리씩 수용하고 시험하였다. 경구투여를 위해 세팔렉신을 증류수에 용해하고 포식 수준 이하인 급이율을 체중의 2.0%를 기준으로 조정된 세팔렉신 농도의 용액을 사료에 혼합하여 투여하였다. 세팔렉신(TCI, Tokyo, Japan)을 새우 1 kg당 40 mg 용량으로 사료에 혼합하여 7일 동안 매일 경구투여하였으며, 하루 중 3회(9시, 12시, 6시)로 균등하게 분할하여 투여하였다(Fig. 2). 투여가 종료된 날을 0일로 계산하여 3일 및 14일에 간체장과 근육을 각각 10-15마리씩 채취하여 분석에 사용하였다.

시약 및 재료

세팔렉신 표준물질은 Tokyo chemical industry사(98% 순도)에서 구입하여 사용하였다. HPLC-MS/MS에 사용된 증류수(water), 아세토니트릴(acetonitrile, ACN) 및 메탄올(methanol)은 Burdick & Jackson사(Muskegon, MI, USA), 헥산(hexane)은 J.T. Baker사(Phillipsburg, NJ, USA) 그리고 아세트산에틸(ethyl acetate)은 Fisher Bank사(Hampton, NH, USA)의 HPLC급 시약을 사용하였다. 또한 옥살산(oxalic acid)과 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA), 개미산(formic acid)은 Junsei사(Tokyo, Japan)의 시약을 각각 사용하였다. QuEChERS kit의 경우 Phenomenex사(Torrance, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세팔렉신 표준용액의 조제

표준원액의 경우 표준물질을 정밀히 달아 물에 녹여 100 mg/L가 되도록 조제하여 냉동(-20℃) 보관하였다. 표준용액의 경우 표준원액을 50% 아세토니트릴로 시험 직전에 단계적으로 희석하여 0.05-0.8 mg/L의 농도로 분석에 사용하였다.

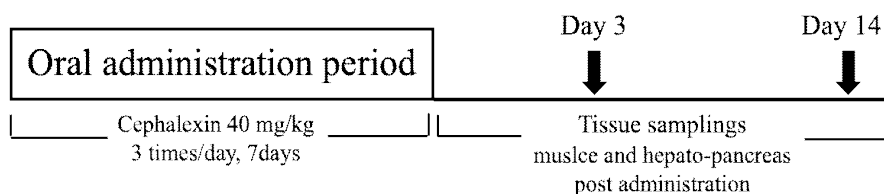


Fig. 2. Schematic representation of cephalixin residue experiments in whiteleg shrimp following oral administration of cephalixin

시료의 추출

Homogenizer로 균질화한 흰다리새우 근육 조직 2 g(간체장의 경우 0.1 g)을 50 ml 원심분리관에 취하여 옥살산과 EDTA 각각 0.08 g을 가하여 진탕한 뒤, 아세트니트릴 : 아세트산에틸(2:1, v:v) 혼합액 15 ml를 넣고 10분간 multi-tube vortexer (Hangzhou MIU Instrument, Hangzhou, China)를 사용하여 진탕·혼합하였다. 그 후 4,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 다른 50 ml 원심분리관에 취하였다. 추출한 용액에 핵산 15 ml를 넣어 5분간 진탕·혼합하여 4,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리한 후 하층액을 15 ml 원심분리관에 옮겨 60℃에서 질소로 농축하였다. 농축 후 메탄올 1 ml을 가한 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 1 ml을 0.2 µm polyvinylidene fluoride membrane filter (PVDF)로 여과하여 HPLC-MS/MS로 세팔렉신 분석을 위한 시험 용액으로 사용하였다. 간체장의 경우 근육에서 사용한 시약들과 동일한 비율로 맞춰 추출에 사용하였다.

HPLC-MS/MS 분석 조건

세팔렉신 분석을 위하여 고성능 액체 크로마토그래피(1260 infinity, Agilent, USA)와 Triple quadrupole 질량분석기(6420 Triple Quad LC/MS, Agilent,

USA)를 사용하였다. 분석용 칼럼은 Xbridge C₁₈(2.1 × 100 mm, 3.5 µm, Waters, USA)을 사용하였으며, 칼럼 온도는 25℃를 유지하였다. 0.1% 개미산을 함유한 물을 이동상 A로 사용하였고 0.1% 개미산을 함유한 아세트니트릴을 이동상 B로 사용하였으며, 유속은 200 µl/min, 시료 주입량은 2 µl로 하였다. 질량분석기의 이온화 방법은 전기분무이온화방법(electro-spray ionization, ESI)의 양이온 모드(positive ion mode)에서 full scan을 통해 질량 스펙트럼을 얻은 후 물질의 전구이온(precursor ion)을 선택하였다. 선택된 전구이온에 충돌 에너지(collision energy)를 조절하여 최적의 생성이온(product ion)을 생성하였고, 이를 바탕으로 multiple reaction monitoring (MRM) 조건을 확립하여 분석에 사용하였다(Table 1).

분석법 검증

최적의 분석조건에 도달하기 위해 유사한 목적으로 개발된 분석법을 기반으로 다양한 확립된 조건의 변화를 시도하였다. 그 결과 최종적으로 얻어진 분석법에 대해 CODEX CAC/GL-16 guideline에 따라서 직선성(linearity), 회수율(recovery로 평가), 정밀성(coefficient variation, C.V.로 평가), 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quan-

Table 1. HPLC-MS/MS analytical conditions

System/parameter		Condition	
HPLC	HPLC system	Agilent, 1260 infinity	
	Column	Waters X-bridge C ₁₈ (2.1 × 100 mm, 3.5 µm)	
	Column temperature	25℃	
	Injection volume	2 µl	
	Flow rate	200 µl/min	
	Mobile phase	A, 0.1% formic acid in water B, 0.1% formic acid in acetonitrile	
	Elution	Time (min)	Composition
MS/MS	Mass spectrometry	Agilent, 6420 Triple Quad	
	Ionization	ESI (positive)	
	Gas temperature	350℃	
	Gas flow	7 ml/min	
	Collision gas	N ₂	
	Neublizer pressure	30 psi	

tification, LOQ)를 측정하여 적정성을 검증하였다. 검출한계는 각 신호 대 잡음 비(signal to noise ratio, S/N ratio)가 3배 이상인 농도로 계산하였으며, 흰다리새우에 대해 아직 잔류허용기준이 설정되어 있지 않은 세팔렉신은 어류에서의 잔류허용기준을 고려하여 필요한 수준(잔류허용기준 이상)의 정량한계를 설정하였다. 정량한계는 S/N ratio가 10배 이상인 농도로 하였으며, 이에 따라 흰다리새우에 대한 세팔렉신의 정량한계를 0.05 mg/kg로 설정하였다. 공시료에 세팔렉신 표준원액을 0.05-0.8 mg/L의 농도가 되도록 희석하여 소량 첨가한 뒤 시료 전처리 과정과 동일하게 진행하였다. 이를 HPLC-MS/MS에 주입하여 얻어진 피크 면적으로 검량곡선을 작성하고, 검량선의 상관계수(correlation coefficient, r^2)를 구하였다. 정확성과 정밀성은 정량한계를 기준으로 2, 4 및 8배 농도의 세팔렉신을 첨가한 후 변동 계수(C.V.)와 회수율을 측정하였으며, 각각 15회 실험을 통하여 평가하였다.

결과 및 고찰

분석법의 최적조건 확립

현행 식품공전(2020)에서는 수산물(어류)에서

세팔렉신의 분석을 위해 LC-MS/MS 또는 LC-UV photometric detector를 이용하도록 고시되어있다. UV photometric detector의 경우 시료에 포함된 각 성분이 검출기에서 방사되는 파장의 빛을 흡수해야만 가능하다는 단점을 가지고 있다. 때문에 세팔렉신의 분석은 고감도 및 정량, 정성 분석이 가능한 HPLC-MS/MS를 선택하여 사용하였으며, MS/MS 분석 시 선구이온과 생성이온만을 선택적으로 검출할 수 있는 MRM모드로 분석하였다. 항생제 분석을 위해 많이 사용하는 이온화방법은 전기분무이온화법이며, 이 방법은 극성, 비극성 물질에 모두 적용이 가능하고, 열에 의해 변하기 쉬운 물질의 분석에 매우 효과적이다(Kim *et al.*, 2016). 따라서 확립한 분석법의 이온화 방법은 ESI의 positive mode 조건으로 분석하였다. 선구이온은 full scan mode를 통해 질량 스펙트럼을 확인하여 세팔렉신의 질량 값(exact mass, M)에 양성자(H^+)가 결합된 형태인 $[M+H]^+$ 의 m/z 348로 확인하였고, product ion scan을 통해 collision energy의 변화에 따른 peak 강도를 확인하여 3개의 생성이온 중 정량이온인 m/z 106.0과 정성이온인 m/z 157.8과 68.0을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 현재의 분석조건에서 HPLC-MS/MS를 통해 검출된 세팔렉신의 머무름 시간은

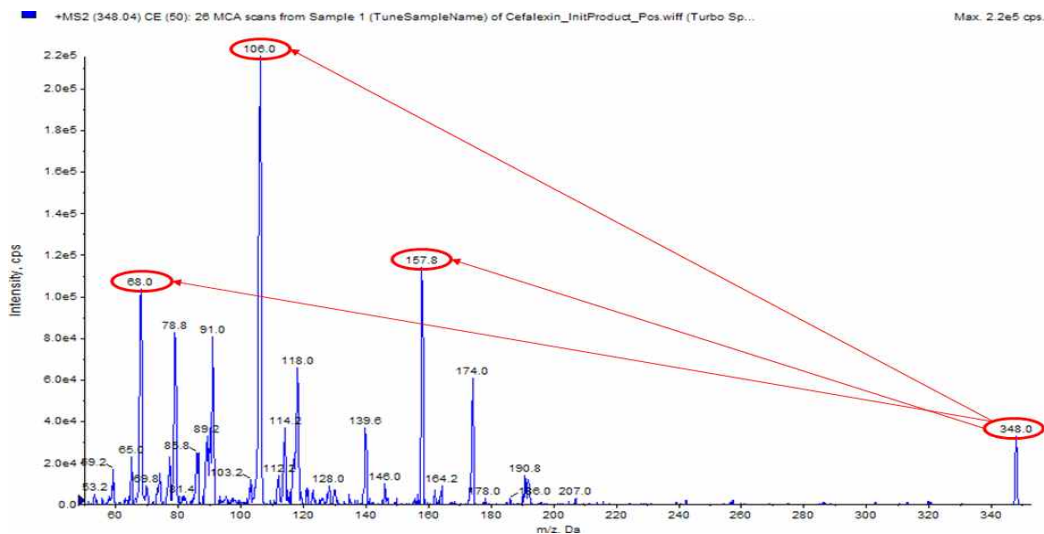


Fig. 3. Precursor ion and product ion chromatogram of cephalixin standard according to the screening mode. Fragment ion species used for quantification was 106.0 m/z produced at 41 eV collision; 157.8 (17 eV) and 68.0 m/z (53 eV) were used for reference ions; 348.0 m/z was from the precursor cephalixin

1.67분이었으며, chromatography의 총 분석 시간은 5분으로 설정하였다.

추출법의 최적조건 확립과정

항생제 추출법은 크게 액상-액상 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)과 고상추출법(solid phase extraction, SPE)으로 나눌 수 있는데, 본 실험에서는 이 두 가지 추출법의 복합형태인 QuEChERS법과 액상-액상 추출법을 중심으로 세팔렉신 추출에 적용하였다. QuEChERS법의 경우 추출용액을 ACN으로 사용하였다. 그 결과 회수율이 0.15%, C.V.값은 42.80%로 낮은 회수율을 보여 추출 용액을 0.1% Formic acid를 첨가한 ACN으로 변경하였다. 그 결과 회수율이 6.32%, C.V.값은 29.04%로 여전히 좋지 않은 회수율을 보였다. QuEChERS kit를 사용한 추출법 모두 회수율이 낮은 것을 보아 Q2과정에서 세팔렉신이 같이 흡수되었다고 사료되어졌다. Jung *et al.* (2021)의 경우 흰다리새우에서 QuEChERS kit를 사용하여 구충제를 분석한 결과 낮은 회수율을 보여 단백질 함량이 높은 흰다리새우에는 적합하지 않다고 판단하였다. 따라서 QuEChERS법은 조작과정이 단순하기는 하나 현재의 목적으로 적합하지는 않기 때문에, 액상-액상 추출법으로 전환하고 식품공전의 방법을 바탕으로 수행하였다. 그 결과 회수율과 C.V.값이 각각 50.35% 및 13.20%로 나타났으며, 농축 후 재분산 과정에서 두 개의 층으로 나뉘는 현상을 나타내었다. 그리하여 재분산 용액을 이동상과 60, 70, 80, 90 및 100% ACN으로 변경하여 재분산을 해보았지만 2개의 층은 여전히 있었다. 100% ACN의 경우 층이 없어졌지만, 실험 결과 signal-to-noise의 차이뿐만 아니라 회수율 또한 좋지 않았다. 이러한 내용을 바탕으로 고찰해본 결과, Mustafa Ünlüsayın *et al.* (2010)의 논문에서 새우의 근육에 20%의 염이 포함되어있음을 확인하였고 추출 후 재분산 과정에서 이동상 층의 나뉘는 Toshiyuki Takamuku *et al.* (2001)의 논문에서와 같이 염이 물과 ACN을 분리할 수 있는 것을 확인할 수 있었다. 이로 인해 추출하는 과정에서 두 개의 층으로 분리되는 현상이 흰다리새우 근육 내 염의 영향을 받는 것으로 판단하였다. 따라서 1차 농축 후 메탄올로 재용해 시킨 뒤, 원심분리하여

상층액을 시험용액으로 사용하는 방법을 활용하였다. 또한 최초의 추출단계에서 Lee (2020)의 옥살산과 EDTA를 첨가하는 방법을 활용하여 만족하는 수준의 분석법에 도달하였다(Fig. 4).

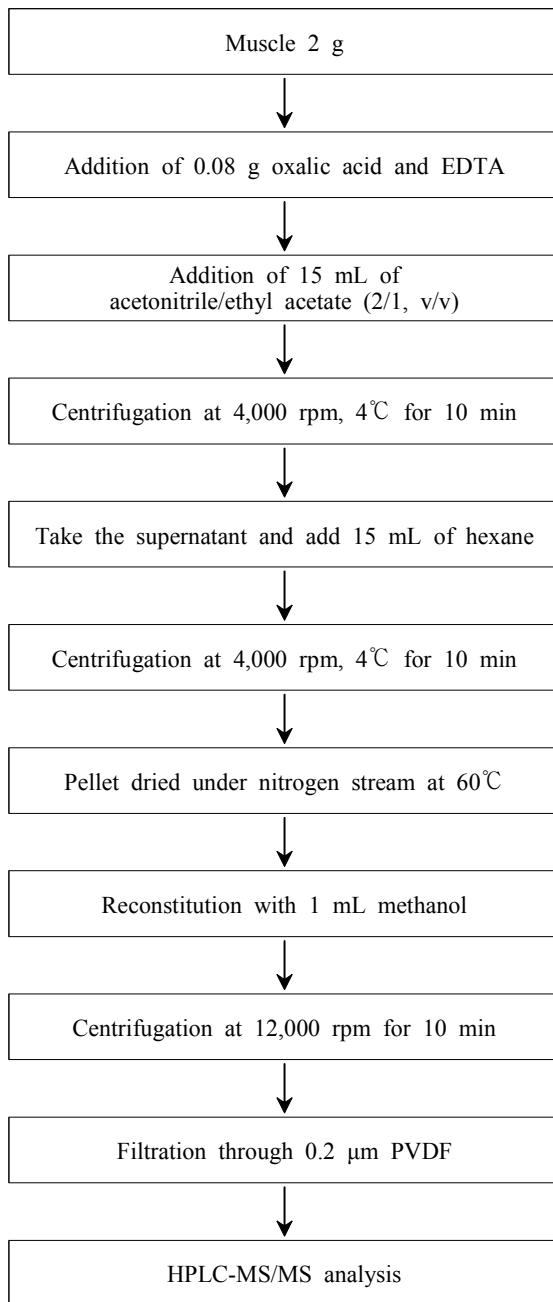


Fig. 4. Developed analytical method through the study

분석법의 검증

세팔렉신 분석법의 선택성(selectivity), 특이성(specificity)을 검증하기 위해 공시험을 수행하였다. 그 결과, 음성 검체에 세팔렉신과 같은 머무름 시간을 갖는 어떤 방해물질도 검출되지 않은 것으로 나타내어 본 분석법이 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인하였다(Fig. 5a, 5b, 5d, 5e).

세팔렉신의 정량한계는 크로마토그램 상에서 S/N ratio를 10배 이상으로 하여 0.05 mg/kg으로 나타났고, 여러 농도에 대한 peak area비를 이용하여 검량곡선을 작성한 결과, 세팔렉신에 대한 상관계수(r^2)가 0.999의 수치를 보여 Codex guideline에서 권장하는 r^2 의 기준인 0.99를 충족하는 수준의 결과임을 확인하였다(Fig. 5c, 5f).

본 분석법의 정확성을 평가하기 위하여 정량한계를 기준으로 2, 4 및 8배의 농도가 되도록 표준물질을 첨가하고 전처리 과정을 거쳐 분석하였다. 검량곡선에 전처리 과정을 거친 세팔렉신의 면적을 대입하여 회수율을 구하였으며, 15회 반복으로 수행하여 정확성과 정밀성을 평가하였다. 그 결과 근육에서의 각각 평균 회수율과 C.V.값이 0.1-0.4 mg/kg의 농도에서 81.79-86.76% 및 5.5-8.2%임을 확인하여 Codex guideline에서 권장하는 회수율 및 C.V.에 충족하는 결과를 나타내어 수산물 중 잔류항생제 분석법의 적합성을 확인할 수 있었다(Table 2). 간체장의 경우 0.05 mg/kg의 농도에서 회수율과 C.V.값이 81.23% 및 7.56%로 Codex guideline에 충족하는 결과임을 확인할 수 있었다(Table 3).

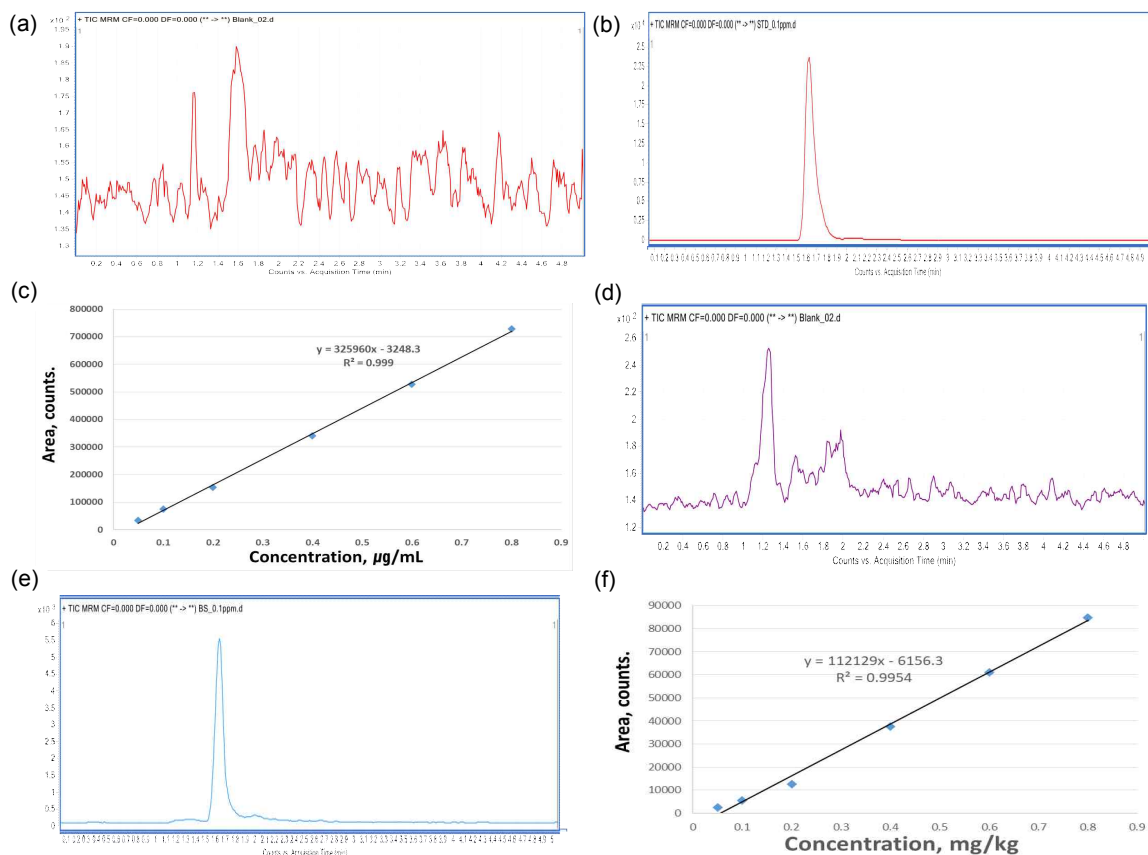


Fig. 5. Validation of the developed method. (a) blank shrimp muscle (b) shrimp muscle spiked at 0.1 mg/kg cephalixin (c) standard curve of cephalixin in shrimp muscle (d) blank shrimp hepatopancreas (e) shrimp hepatopancreas spiked at 0.1 mg/kg cephalixin (f) standard curve of cephalixin in shrimp hepatopancreas

Table 2. Recovery of cephalexin spiked at different concentrations to whiteleg shrimp muscle (n=15)

Compound	Concentration (mg/kg)	Recovery (%) (Mean±S.D.)	C.V. (%) (Mean±S.D.)
Cephalexin	0.1	81.79±4.92	8.2±2.15
	0.2	86.36±7.12	6.17±1.28
	0.4	86.76±12.20	5.5±1.76

C.V.: coefficient of variation

Table 3. Recovery of cephalexin spiked at different concentrations to whiteleg shrimp hepatopancreas (n=15)

Compound	Concentration (mg/kg)	Recovery (%) (Mean±S.D.)	C.V. (%) (Mean±S.D.)
Cephalexin	0.05	81.23±5.25	7.56±2.10
	0.1	84.69±5.87	6.93±1.50
	0.2	87.70±4.88	5.56±1.38

세팔렉신 투여 후 조직에서의 잔류

흰다리새우의 사육 적수온인 28℃에서 근육 및 간체장에 잔류하는 세팔렉신의 농도를 측정하였으며 그 결과를 Table 4에서 나타내었다. 현재 어류에서 허가된 세팔렉신의 투여방법과 최고용량은 1일 1회 7일간 경구투여로써 5-40 mg/kg이다. 따라서 허가된 세팔렉신의 용량 중 최고 투여 용량인 40 mg/kg으로 1주일간 연속 투여하였다. 투여 후 3일이 경과했을 때 간체장에서의 농도는 19.43±5.7 mg/kg으로 상당히 높지만 주 가식부인 근육 중의 농도는 대부분의 시료에서 정량한계(0.05 mg/kg) 이하로 잔류하였다. 14일이 경과했을 때는 간체장 내의 농도가 대부분 정량한계 이하로 잔류하였고, 근육에서는 모든 개체에서 세팔렉신이 검출되지 않아 세팔렉신이 거의 완전히 배설되었다. 이는 일반적인 의약품의 근육 내 잔류농도가 흰다리새우 간체장에서 상대적으로 훨씬 높게 지속되는 현상 (Faroongsamg *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2018)과 크게 다름이 없다고 판단된다. 전체적으로는 실제로 흰다리새우에 세팔렉신을 투여한 후에 두 조직에서 발견되는 잔류농도가 예상되는 패턴과 일치함으로써 본 연구에서 개발된 방법이 실제로 적용함에 도 합리적임을 간접적으로 시사한다.

흰다리새우의 양식이 증가함에 따라 발생하는 질병에 대하여 다양한 항생제의 사용이 요구되고

Table 4. Residue levels of cephalexin in the whiteleg shrimp administered 40 mg/kg cephalexin orally for 7 days

Tissues	Residue levels (mg/kg)			
	Day 3 after administration		Day 14 after administration	
	Individual levels	Mean± S.D.	Individual levels	Mean± S.D.
Muscle	<0.05		<0.05	
	<0.05		<0.05	
	<0.05		<0.05	
	<0.05		<0.05	
	<0.05		<0.05	
	<0.05		<0.05	
	0.09	0.04±0.0 (n=15)	<0.05	0.0±0.0 (n=15)
	<0.05		<0.05	
	0.08		<0.05	
	0.07		<0.05	
	0.11		<0.05	
	0.06		<0.05	
	0.09		<0.05	
	0.06		<0.05	
	0.06		<0.05	
Hepato-pancreas	25.17		0.08	
	15.21		<0.05	
	21.55		0.07	
	17.06		<0.05	
	12.08	19.43±5.7 (n=10)	0.07	0.03±0.0 (n=10)
	24.03		<0.05	
	20.09		<0.05	
	21.62		0.06	
	10.23		0.06	
	27.30		<0.05	

In calculation for standard deviations, levels less than the detection limits were assumed as level zero (0.05 mg/kg)

있다. 새로운 생물 중에서 의약품의 작용은 잔류허용기준과 휴약기간의 정확한 기준 설정이 필요하다. 이를 위해서는 잔류농도를 분석하는 감도 높은 방법의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 이러한 기준을 마련하기 위해 필요한 자료 중 잔류항생제 분석법을 개발하였고, 그 결과는 흰다리새우에서 세팔렉신의 잔류허용기준을 마련하기 위한 방법

으로 활용될 수 있을 것이다.

초 록

세팔로스포린계열의 반합성 항생제인 세팔렉신은 법적 허가를 받은 여러 나라의 양식장에서 사용되어 왔다. 따라서 이 항생제는 갑각류 중 흰다리새우와 같은 어류를 제외한 다른 수생 생물 중에서 광범위하게 사용할 수 있다. 본 연구는 흰다리새우에서 세팔렉신의 잔류기간 설정을 위해 잔류분석법을 개발하였고, 이를 바탕으로 잔류실험을 수행하였다. 분석법 개발을 위하여 이미 존재하고 있는 여러 식용동물 조직에서의 분석법을 바탕으로 반복 시도하여 고성능 액체 크로마토그래피와 질량분석기(high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)를 이용한 분석법을 개발하였다. 그 결과, 0.1 mg/kg의 농도에서 회수율이 81.79%, C.V.값은 8.2%로 Codex guideline에서 권장하는 회수율 및 C.V.에 충족하는 결과를 나타내었다. 개발한 분석법의 적정성을 검증 후, 흰다리새우에 세팔렉신을 경구투여 한 뒤 잔류량을 분석하여 흰다리새우 조직에서의 적용 가능성을 확인하였다. 그 결과, 투여 종료 3일 후에 대부분의 근육 시료에서 정량한계(0.05 mg/kg)이하로 검출되었고, 투여 종료 14일 후에 대부분의 간췌장 시료에서 정량한계 이하로 검출되었다. 특히 본 연구에서 개발한 분석법에서 설정된 정량한계(0.05 ppm)는 어류에서 법적으로 설정된 잔류허용기준 0.2 mg/kg에 대해 충분한 감도를 나타낸다.

References

- Benarab, N. and Fangninou, F.F.: The issues of antibiotics: cephalixin antibiotic as emerging environmental contaminant. *J. Sci. Res. Pub.*, 10:306-318, 2020.
- Chae, W.S., Lee, S.J., Son, S.E., Kim, S. and Lee, H.J.: Analytical method for determination of cephalixin in bovine edible tissues using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Food Hyg. Saf.*, 33:58-64, 2018.
- Codex Alimentarius Commission: Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods (CAC/GL-16). <http://www.fao.org/fao-who-codex-alimentarius/home/pt/>, 1993.
- Faroongsarn, D., Chiayvareesajja, S., Chandumpai, A., Theapparat, Y.: Hepatopancreatic and muscular distribution of oxytetracycline antibiotics in farmed pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*): a physiological-based pharmacokinetic model approach. *Aquacult. Res.*, 41:143-152, 2009.
- Jung, H.N., Park, D.H., Yoo, K.H., Cho, H.J., Shim, J.H., Shin, H.C. and Abd El-Aty A.M.: Simultaneous quantification of 12 veterinary drug residues in fishery products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Food Chem.*, 348:1-10, 2021.
- KFDA (Korea Food & Drug Administration): Pesticides and veterinary drugs information. <https://www.foodsafetykorea.go.kr/residue/main.do>, 2021a
- KFDA (Korea Food & Drug Administration): Food code. http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_02.jsp?idx=263, 2021b
- Kim, M.R., Choi, Y.H., Kim, D.H., Kim, Y.S. and Lee, J.H.: Monitoring for cephalosporin residues in raw meat in Seoul. *J. Vet. Serv.*, 38:259-264, 2015.
- Kim, J.W., Cho, M.Y., Jee, B.Y., Park, M.A and Kim, N.Y.: Administration and use of aquaculture drugs in Korea. *J. Fish Pathol.*, 27:67-75, 2014.
- Kim, N.E. and Kim, D.H.: Acute hepatopancreatic necrosis disease of shrimp and import health measures. *J. Fish Pathol.*, 28:1-7, 2015.
- Kim, J.W., Lee, H.N., Jee, B.Y., Woo, S.H., Kim, Y.J. and Lee, M.K.: Monitoring of the mortalities in the aquaculture farms of South Korea. *J. Fish Pathol.*, 25:271-277, 2012.
- Kim, C.S., Ryu, H.D., Chung, E.G., Kim, Y.S. and Rhew, D.H.: Determination of antibiotic residues: I. Extraction and clean-up Methods for solid samples: a review. *J. Kor. Soc. Water Environ.*, 32:600-627, 2016.
- Kim, Y.J., Seo, J.S., Park, J.O., Jeong, A.R. and Lee, J.H.: Monitoring of aquatic medicine managements in South Korea. *J. Fish Pathol.*, 32:37-43, 2019.
- Kim, S.K., Shim, N.Y., Jang, J.W., Jun, J.C., Kim, S.K. and Shin, Y.K.: Effect of acclimation methods on physiological status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae to low salinities. *J. Kor. Soc. Environ. Biol.*, 35:6-12, 2017.
- KOSIS (Korean Statistical Information Service): Statistics for each variety of fishery. <https://kosis.kr/statisticsList/statisticsListIndex.do?vwcd>, 2021.

- Lee, C.W.: An analytical method development of cephalixin in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using LC-MS/MS and its application in residue concentration studies. Thesis for Master's Degree, Kunsan National University, Korea, February 2020.
- Lee, J.H.: Development of cefadroxil analysis and its application to residue analysis in fishes by LC-MS/MS, Thesis for Master's Degree, Kunsan National University, Korea, February 2016.
- Lee, K.B., Kim, N.W., Kim, D.U., Sin, M.H. and Lee, M.Y.: Monitoring of veterinary drug residues in cultured fishery products in Chungcheongnam-do Province. J. Food Hyg. Saf., 35:447-451, 2020.
- Lee, Y.M. and Zoh, K.D.: Recent analysis of veterinary drug residues in food. J. Pub. Health, 53:27-37, 2016.
- Lim, J.H., Jang, B.S., Park, B.K. and Yun, H.I.: Residue depletion of cephalixin in the flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Vet. Res., 43:435-438, 2003.
- Lim, S.K.: Careful use of cephalosporin antibiotics. J. Kor. Vet. Med. Assoc., 50:734-738, 2014.
- Ma, R., Huang, L., Wei, W., Wang, Y., Zou, X., Zhou, J., Li, X. and Fang, W.: Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* after multiple-dose oral administration. Fish. Sci., 84:869-876, 2018.
- NIFDS (National Institute of Food and Drug Safety): A casebook of excellence in MFDS research and development projects in 2016. https://www.nifds.go.kr/brd/m_347/view.do?seq=10503, 2016.
- Song, J.Y., Hu, S.J., Joo, H.J., Kim, M.O., Hwang, J.B., Han, Y.J., Kwon, Y.J., Kang, S.J. and Cho, D.H.: Residue analysis of penicillines in livestock and marine products. J. Anal. Sci. Technol., 25:257-264, 2012.
- Takamuku, T., Yamaguchi, A., Matsue, D., Tabata, M., Kumamoto, M., Nishimoto, J., Yoshida, K., Yamaguchi, T., Nagao, M., Otomo, T. and Adachi, T.: Large-angle X-ray scattering and small-angle neutron scattering study on phase separation of acetonitrile-water mixtures by addition of NaCl. J. Phys. Chem. B, 105:6236-6245, 2001.
- Ünlüsayın, M., Erdilal, R., Gümüş, B. and Gülyavuz, H.: The effects of salt boiling on protein loss of *Penaeus semisulcatus*. J. Fish. Aquat. Sci., 10:75-79, 2010.
- Wang, L., Li, W., Wang, Y., Wang, C., Ye, D., Zhou, L., Hu, X., Ke, Y. and Xia, X.: Determination of cephalixin residual level using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: residue depletion study in swine. J. Chromatogr. B, 1124:233-238, 2019.

Manuscript Received : May 03, 2021

Revised : Jun 08, 2021

Accepted : Jun 08, 2021