

## 반려동물 사료의 유해 잔류물질 모니터링 검사

안전성분석팀

권보라 · 최윤화 · 김지은 · 이종혁 · 최태석

## **Analysis of Hazardous Residues in Commercial Pet Foods for Companion Animals**

*Safety Analysis Team*

**Bo-ra Kweon, Yoon-hwa Choi, Ji-eun Kim,  
Jong-hyuk Lee and Tae-seok Choi**

### **Abstract**

This study was conducted to monitor hazardous residues including heavy metals and veterinary drugs in commercial pet food products, which were sold in the animal hospitals of Seoul, Korea, in 2017. The hazardous residues were subdivided into three categories. These were heavy metals, tetracyclines, and quinolones. The content of heavy metals, such as lead(Pb), cadmium(Cd), and arsenic(As), were analyzed using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. A selective method that combined high performance liquid chromatography with a MS/MS detector was used to simultaneously identify four tetracycline antibiotics. These were chlortetracycline, doxycycline, oxytetracycline, and tetracycline. Residual quinolones, such as enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, nalidixic acid, flumequin, sarafloxacin, marbofloxacin, danofloxacin, difloxacin, oxolinic acid, and orbifloxacin were monitored according to the method outlined in the Korea Food Code using HPLC-MS/MS for confirmation. The targets are being used routinely in veterinary medicine for the prevention and control of disease. The limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) of tetracyclines were 0.2032~0.6414  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 0.6771~2.1372  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The overall tetracycline recovery rates ranged from 74.7% to 94.7%. The HPLC-MS/MS results showed that the limit of detection and the limit of quantification of quinolones were 0.0011~0.0168 and 0.0037~0.0554  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The overall quinolone recoveries in fortified pet food ranged from 75.5% to 107.0%. Therefore, although harmful residues were not detected in any selected food sample in this study, commercial pet foods need to be continually monitored in order to ensure the safety of the companion animals and public health.

**Key words** : residue analysis, heavy metal, tetracycline, quinolone, pet food

## 서론

전통적인 가족 개념의 약화 및 소득 증대로 인해 전 세계적으로 반려동물 인구가 증가하고 있으며 반려동물 사료 시장도 그에 따라 확대·증가되어 반려동물 사료에서의 다양한 제품 생산 및 소비가 늘어나고 있다(1). 그러나 2,000년대 초, 특정 사료 회사의 제품을 먹은 동물들이 신장 독성을 일으켜 회수 조치가 일어난 적이 있으며, 2007년부터 8년간, 중국산 동물용 육포를 먹은 반려동물들이 집단 폐사하거나 중독 증상을 일으킨 사건 등 크고 작은 사료 관련 사건들의 발생으로, 모니터링의 필요성이 제기되었다. 최근 반려동물 사료는 그 종류가 더욱 세분화되고, 사람의 식생활 패턴과 함께 변화되어 유기농 사료 및 수제간식 사료, 생식 사료 등으로 다양하게 나타나고 있는 추세이다. 국내에서 현재까지는 식품원재료 즉 농산물, 수산물, 축산물에 대한 중금속 모니터링이 중점적으로 이루어져 왔으며, 가공식품에 대해서도 개별적으로 일부 보고되어 있으나, 반려동물 사료에 대한 유해물질모니터링에 대한 보고는 미흡한 실정이다. 급격한 산업발달로 인한 환경오염에 따라 식품의 오염도 증가되고 있다(2). 중금속은 환경오염이나 식품오염으로 체내로 들어와 축적되며 그 흡수량은 식품 종류와 개체의 건강상태 등에 따라 달라진다(3). 중금속 중 납, 카드뮴, 비소 등은 자체 독성이 있으면서 축적성도 있어 중추신경 및 신장 독성을 일으켜 심각한 위해를 끼칠 우려가 있다(4). FAO/WHO 합동 식품첨가물 전문위원회(The joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA), U.S. EPA 등에 보고된 바에 따르면 납은 신경, 평활근 장애와 빈혈, 뇌손상마비, 신장장애 등의 급성 독성 증상과 창백한 피부, 두통, 식욕 감퇴 등의 만성증상을 일으키는 것으로 알려졌다(5). 카드뮴은 적은 양으로도 신장독성을 일으키며, 초기증상은 단백뇨로 장기간 노출시 골조직에서 칼슘과 인 대사 불균형을 초래하여 골다공증과 골연화증, 비장의 기능장애, 고혈압, 간장손상, 폐손상, 기형발생 등을 일으킨다(6). 사료관리법에서도 사료의 종류에 따라 중금속에 대한 기준을 정하여 관리하고 있으며,

반려동물 사료의 안전기준은 납, 비소가 10 ppm, 카드뮴이 2 ppm으로 설정되어 있다. 또한 동물의 질병 예방·치료, 성장촉진 및 사료효율을 개선하기 위하여 항생물질, 합성항균제, 성장호르몬제 등 여러 다양한 동물용의약품이 사용되고 있다. 사료 내 사용 가능한 동물용의약품의 종류는 항원중제(항콕시딕제)인 나리신, 디클라주릴, 라살로시드나 트림, 마두라마이신암모늄, 모넨신나트륨, 살리노마이신, 샘두라마이신, 크로피돌의 총 8종이며 구충제인 펜벤다졸, 그리고 사료첨가제 중 비타민제, 프로비타민제, 항산화제, 항곰팡이제, 효소제, 생균제, 아미노산제, 미량광물질 및 그 합계 등이 있다. 그 외의 동물용의약품은 사용이 금지되어 있으며, 사료에서 검출되어서는 안되는 것으로 농식품부 고시(제2017-28호, 2017.4.1.) '사료 등의 기준 및 규격'에 규정되어 있다. 농림축산식품부에서는 사료 관리법에 의한 유해사료의 범위와 기준을 개정하여 사료 내 혼합가능 동물용의약품의 종류를 53종에서 25종으로 감축하고 유해물질의 관리를 강화하는 유해사료의 범위와 기준을 정비하였다(7). 동물용 의약품 중 테트라사이클린계 항생물질은 질병치료, 예방, 성장촉진 및 사료효율 개선에 널리 사용되고 퀴놀론계 항균제는 가축질병 예방 목적으로 주로 사용된다. 우리나라에서 식품공전의 식육 내 동물용 의약품의 기준은 테트라사이클린계 항생제의 경우 소와 돼지 근육에서 클로르테트라사이클린, 옥시테트라사이클린 및 테트라사이클린의 합으로서 0.2 mg/kg, 퀴놀론계 항균제는 엔로플록사신과 시프로플록사신의 합으로서 0.1 mg/kg이다(8). 그러나 소고기, 돼지고기, 닭고기 등 축산물이 원료로 사용되는 동물용 사료의 잔류기준은 불검출로 규정되어 식품에 비해 기준이 엄격하게 관리되고 있다(9). 따라서 반려동물 사료에 대한 잔류항생물질 및 항균제의 모니터링을 통하여 기준·규격 준수 여부를 확인할 필요성이 제기되었다.

본 연구에서는 2017년 현재 서울에서 유통 중인 반려동물 사료 중 중금속, 테트라사이클린 계열 항생제, 퀴놀론계 항균물질의 함유량을 조사함으로써 사료 내 유해 잔류물질을 모니터링하고 사료 관리법에 등재되어 있지 않은 퀴놀론계 항균제 분석법에 대해서는 식품공전 검사법을 적용하여

시험법의 유효성을 확인하고 올바른 안전 관리 기준설정을 위한 자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

서울시 동물병원에서 시판되는 반려동물 사료 중 처방식 배합사료 22건, 캔 형태 사료 26건, 육포 등 기타 간식사료 12건의 총 60건을 구입하여 분쇄 후 균질화하여 시험재료로 사용하였다. 사료의 종류는 세 가지로 분류하였고, 제조국은 한국, 미국, 오스트리아, 중국, 태국, 뉴질랜드로 다양하였다. 수거된 반려동물 사료의 현황은 표 1과 같다. 수거 시, 관내 동물병원 판매되는 제품 중 다 소비 제품을 중심으로 수거하였으며, 그 종류는 건조배합사료, 캔사료(처방식, 육류 통조림), 육포 등 기타 제품으로 분류하였다. 기타 제품에는 육포류 외에 반건조 타입(semi-moist type)과 파우치 타입(pouch type)이 포함되어 있다.

중금속 검사용 분해용 시약으로는 반도체급의 질산(Dongwoo Fine Chem, Iksan, Korea)과 과산화수소(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan)를 사용하였고, 실험에 사용되는 증류수는 18.2Ω 수준으로 정제된 물을 사용하였다. 표준액은 납, 카드뮴, 비소 표준액 10 µg/mL(Perkin Elmer, USA)을 적정 희석하여 사용하였다.

테트라사이클린계 항생물질 분석은 테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 클로르테트라사이클린 및 독시사이클린 4종을 대상으로 하였으며 구조식, 화학식 및 분자량은 그림 1과 같다(10). 분석

용 시약은 HPLC급으로 옥살산, 포름산, EDTA, 아세트산에틸은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서, 아세토니트릴과 헥산은 Merck

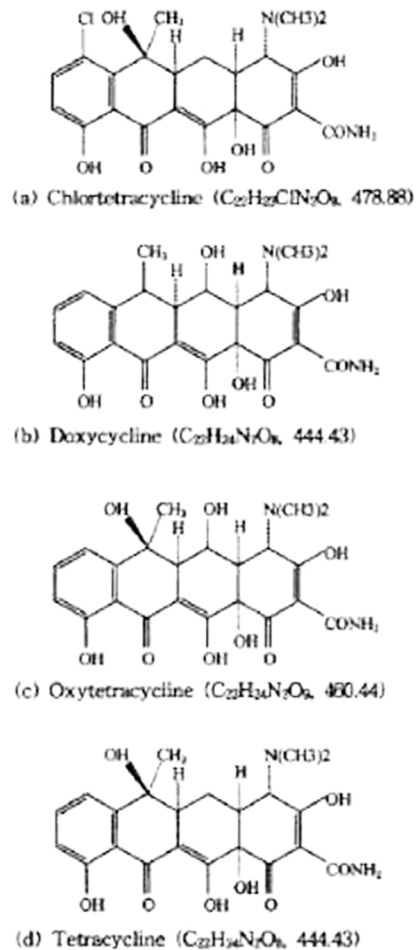


Fig. 1. Chemical structures of Chlortetracycline(a), Doxycycline(b), Oxytetracycline (c), Tetracycline(d).

Table. 1. The collection of pet foods classified by nations

Type	Nations							Sum
	Korea	USA	Austria	China	Thailand	Australia	New Zealand	
Dry food	0	20	0	0	0	2	0	22
Canned food	0	0	18	6	2	0	0	26
Other types	6	0	2	3	0	0	1	12
Sum	6	20	20	9	2	2	1	60

Inc.(Darmstadt, Germany)에서 구매하였다. 표준물질 클로르테트라싸이클린, 독시싸이클린, 옥시테트라싸이클린 및 테트라싸이클린은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

퀴놀론계 항균제 분석을 위해 표준품인 엔로플록사신, 노르플록사신, 다노플록사신, 마보플록사신, 사라플록사신, 시프로플록사신, 오비플록사신, 오픈플록사신, 페플록사신, 디플록사신, 플루메퀸, 옥소린산 및 날리딕스산은 Fluka(Büchs, Switzerland), 포름산은 Sigma(St. Louis, MO, USA)이 제품을 사용하였으며, 구조식은 그림 2와 같다(11~16). 기타 아세트니트릴, 삼염화초산, 메탄올, 헥산, 에틸아세테이트 및 옥살산 등은 Merck(Darmstadt, Germany)의 제품을 사용하였고, 시린지 필터는 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter를 사용하였다. 엔로플록사신의 12종의 표준품을 정밀히 달아 100 mL 용량 플라스크에 취하고 메탄올로 표시선까지 채워 100  $\mu\text{g/L}$ 의 농도가 되도록 하였다. 이를 다시 이동상으로 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100  $\mu\text{g/L}$ 의 농도가 되도록 희석하여 분석용 표준용액으로 사용하였다.

## 2. 분석기기 및 분석조건

이번 연구에 사용한 분석기기는 중금속의 경우, ICP-OES(Perkin Elmer, Optima 7300DV, MA, USA)로 분석하였으며 기기분석 조건은 표 2와 같았다. 납, 카드뮴, 비소 검량선은 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 표준용액을 1, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{g/kg}$ 로 희석하여 사용하였다. 중금속 분석을 위해 마이크로웨이브(StartD, Milestone, Vergamo, Italy)를 이용하여 시료를 분해하였다(17, 18).

테트라싸이클린 분석을 위해 분석기기로는 LC-MS/MS(Waters US/XEVO TQS, USA)를 사용하였고, 컬럼은 C<sub>18</sub>(Xbridge, 2.1×100 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ )을 사용하였으며 질량분석기 조건은 ES I(Positive)였다. 이동상으로는 0.1% 포름산을 함유한 물과 0.1% 포름산을 함유한 아세트니트릴의 혼합용액을 사용하였다. 시료는 10  $\mu\text{l}$ 를 주입하였으며 유속은 0.3 mL였다. 이동상 조성 및 gradient 조건 등 분석조건은 표 3과 같다. 검량선은 표준물질 6개 농도범위(12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/kg}$ )에서 작성하였다. 각 물질별 precursor ion 및 product ion에

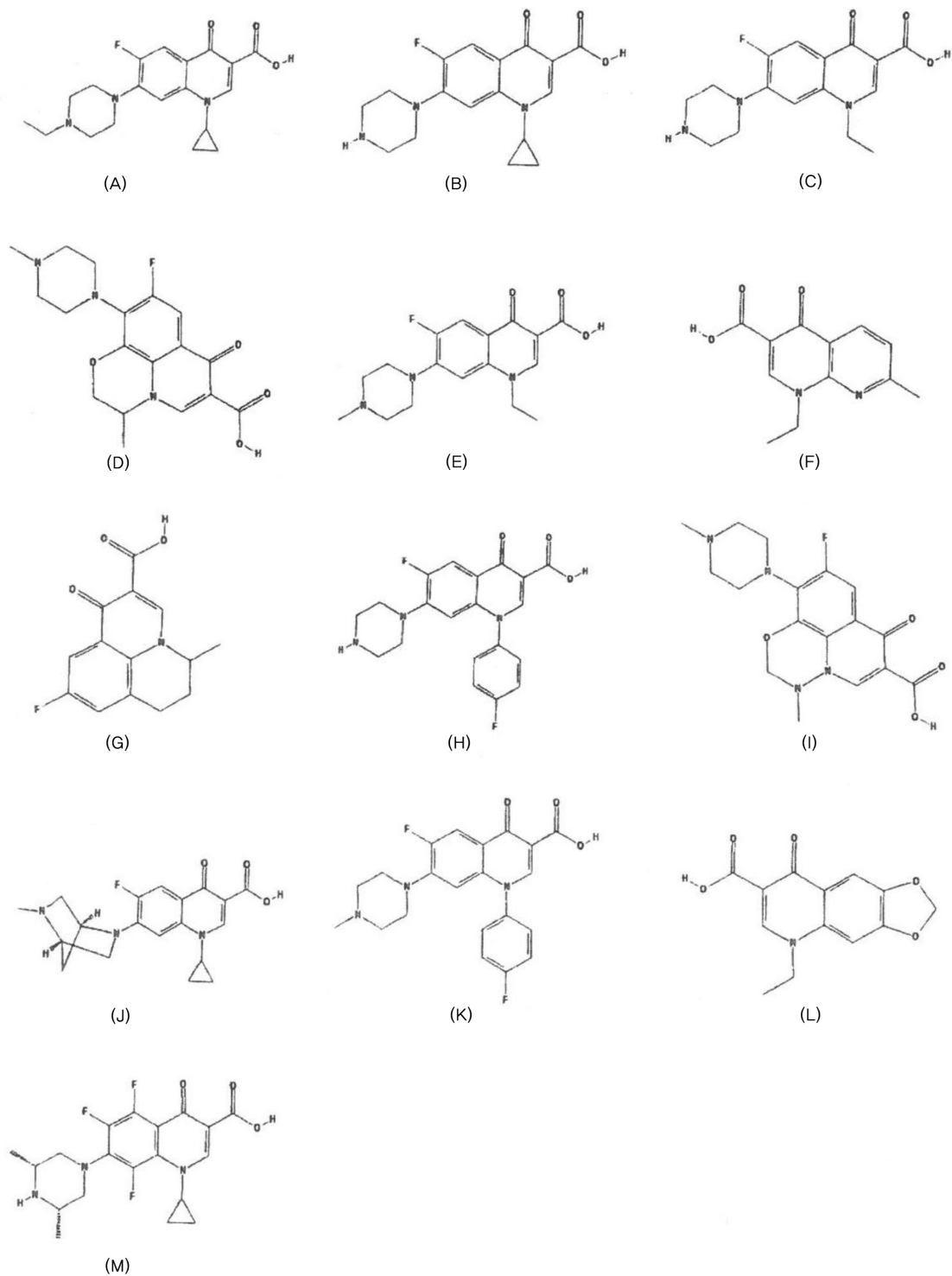
대한 물질별 MRM(multiple reaction monitoring) 분석조건은 표 4와 같다.

퀴놀론 분석을 위해 LC-MS/MS(Waters US/XEVO TQS, USA)를, 컬럼은 BEH C<sub>18</sub>(2.1×100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , Waters co, USA)를 사용하였다. 이동상 용매는 0.1% formic acid가 함유된 물과 acetonitrile을 사용하였으며 이동상 조성 및 gradient 조건은 표 5와 같다. 각 물질별 단일 표준물질을 MS/MS에 주입하여 식품공전에서 제공한 항균제 분석물질별 정량이온 EIC(extracted ion chromatogram) 표에 의거 precursor ion을 선발하였으며, collision energy를 조절하여 물질별로 두 개의 product ion을 선발하였다. 각 물질별 precursor ion 및 product ion에 대한 물질별 MRM(multiple reaction monitoring) 분석조건은 표 6과 같다.

분석의 신뢰도와 정확도를 향상시키고자 크로마토그래피/질량 분석기(HPLC-MS/MS)를 이용한 확인 시험방법을 실시하였다. Ion source는 ESI를 선택하였고, 각각의 [M+H]<sup>+</sup> 형태의 molecule ion인 엔로플록사신 360, 시프로플록사신 332, 노르플록사신 320, 오픈플록사신 362, 페플록사신 334, 플루메퀸 262, 오비플록사신 396, 옥솔린산 262, 날리딕스산 233, 사라플록사신 386, 마보플록사신 363, 다노플록사신 358 및 디플록사신 400을 precursor ion으로 하여 collision energy(Ce, V)를 이용하여 product ion을 구하였다.

**Table 2. Analytical conditions of ICP-OES**

Parameter	Value
RF power	1,430 watts
Nebulizer gas flow(Ar)	0.92 L/min
Plasma gas flow(Ar)	16 L/min
Auxillary gas flow(Ar)	1.2 L/min
Sample flow rate	1.2 mL/min
Wavelength(nm)	Pb: 222.52 Cd: 230.30 As: 182.25



**Fig. 2.** Chemical structures of Enrofloxacin(A), Ciprofloxacin(B), Norfloxacin(C), Ofloxacin(D), Pefloxacin(E), Nalidixic acid(F), Flumequin(G), Sarafloxacin(H), Marbofloxacin(I), Danofloxacin(J), Difloxacin(K), Oxolinic acid(L), Orbifloxacin(M).

### 3. 실험방법

반려동물의 사료 중 그 비율이 가장 높은 개와 고양이의 사료를 중심으로 시료를 선택하였다(19). 개와 고양이 사료의 주성분은 동물성이며 축산물의 함유량이 전체적으로 높은 것으로 나타났다(20). 시험방법은 사료관리법과 식품공전의

축산물 중 잔류물질 분석법을 적용하였다(9, 21~23). 서울 시내 동물병원에서 유통되고 있는 반려동물사료 중 처방식 배합사료 20건, 캔 형태 사료 28건, 육포 등 기타 간식사료 12건, 총 60건을 수거 및 구입하여 분쇄 후 균질화하여 시험재료로 이용하였다. 중금속으로는 비소, 납, 카드뮴을

**Table 3.** Analytical conditions of tetracyclines by HPLC and MS conditions

Instrument	HPLC: Waters US/XEVO TQS, USA			
Detector	MS/MS: Tandem quadrupole mass spectrometer			
Column	Xbridge C <sub>18</sub> (2.1 mm×100 mm×3.5 μm)			
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid/water B: 0.1% Formic acid/Acetonitrile			
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)	
	0.0	95	5	
	6.0	90	10	
	10.0	30	70	
	10.5	0	100	
	15.0	0	100	
Capillary temperature	350℃			
Flow rate	0.3 mL/min			
Injection volume	10 μl			
MS/MS	Ionization mode	ESI(positive mode)	Collision Gas	N <sub>2</sub>
	Capillary	4000V	Capillary Temperature	350℃

**Table 4.** HPLC-MS/MS parameters for analysis of Tetracyclines residues

Compounds	Ionization mode	Precursor ion(m/z)	Production ion (m/z)	Dwell time (s)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Chortetracycline	Positive	479.23	444.15	0.2	25	25
			462.2	0.2	20	17
Doxytetracycline	Positive	445.21	321.0	0.2	20	25
			428.21	0.2	20	18
Oxytetracycline	Positive	461.10	426.31	0.2	20	20
			443.06	0.2	20	18
Tetracycline	Positive	445.25	410.09	0.2	22	22
			428.20	0.2	20	20

ICP-OES로 분석하였고, 동물용의약품 중 테트라 사이클린 계열 항생제 4가지 항목과 퀴놀론 계열 항균제 13가지 항목을 HPLC-MS/MS로 분석하였다.

중금속 분석을 위해 시료는 분쇄기를 이용하여 균질화하여 시료 0.5 g을 마이크로웨이브용 PTEE (polytetrafluoroethane) teflon vessel에 정밀히 달아 질산(70%) 9 ml과 과산화수소 1 ml을 가하여 마이크로웨이브를 이용하여 1,000 W power에서 24분 동안 180°C까지 상승시킨 후 20분간 온도 유지하여 분해하고 다시 방냉한 후 탈기하였다. 이를 초순수로 총 용량 50 ml가 되도록 희석하여 분석하였다. 분해용 시약으로는 유해중금속 측정용 60% 질산과 30% 과산화수소를 사용하

였고 실험에 사용되는 모든 물은 3차 증류수를 사용하였다. 모든 실험 초자는 20% 질산에 24시간 침지 후 3차 증류수로 깨끗하게 씻어 사용하였다. ICP-OES 분석을 위한 중금속(납, 카드뮴, 비소) 표준용액은 표준액 10 µg/mL을 0.5% 질산에 희석하여 사용하였다.

테트라사이클린계 항생제 분석을 위해, 시료를 균질화한 후 일정량(5 g)을 취해 옥살산과 EDTA를 각각 0.2 g을 가하여 10분간 혼합하고, 아세트 니트릴/아세트산에틸(2/1, v/v)혼합액을 20 mL을 넣고 15분간 추출한 다음 원심분리(4°C, 2,600 rpm, 15분간)하여 층을 분리하였다. 상등액을 취하여 여과한 후 헥산 20 mL을 넣고 진탕하여 원심분리(4°C, 2,600 rpm, 15분간)한 후, 하층액을

**Table 5. Analytical conditions of quinolones by HPLC and MS conditions**

Instrument	HPLC: Waters US/XEVO TQS, USA			
Detector	MS/MS: Tandem quadrupole mass spectrometer			
Column	BEH C <sub>18</sub> (2.1 mm×100 mm×1.7 µm)			
Column Temperature	40°C			
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid B: Acetonitrile			
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)	
	0	90	10	
	1	90	10	
	10	30	70	
	11	0	100	
	14	0	100	
	15	90	10	
	20	90	10	
Oven temperature	35°C			
Flow rate	0.25 mL/min			
Injection volume	10 µl			
	Ionization mode	ESI(positive mode)	Collision Gas	Ar
MS/MS	Capillary	4000 V	Capillary Temperature	350°C
	Nebulizer	40 psi	Gas flow	12 L/min
	Source Temperature	150°C	Aux gas pressure	15 psi

40°C에서 질소농축한다. 0.1% 포름산을 함유한 아세트니트릴 1 mL을 가한 뒤 재분산하여 원심분리(4°C, 2,600 rpm, 10분간)하여 상층액을 0.45  $\mu$ m 막여과지(PTFE membrane filter)로 여과시킨 것을 시험용액으로 하였다.

퀴놀론계 항균제 분석은 식품공전 시험방법에 의하여 전처리하였다. 즉, 분쇄하여 균질화한 시료

1 g에 2.5% 삼염화초산 1 mL를 가하여 잘 혼합한다. 원심분리관에 아세트니트릴 15 mL를가하여 균질화한 후 원심분리(5,500 rpm, 15분간)한다. 상층액을 여분의 원심분리관에 옮기고 아세트니트릴 포화 헥산 15 mL를 가하여 1분간 격렬히 진탕한 후 헥산층은 버린다. 아세트니트릴층은 45°C 이하의 수욕 중에서 질소가스로 감압 농축한 후 잔

**Table 6.** HPLC-MS/MS parameters for analysis of Quinolone residues

Compounds	Ionization mode	Precursor ion(m/z)	Production ion (m/z)	Dwell time (s)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Enrofloxacin	Positive	360	316	0.02	130	20
			342	0.02	130	20
Ciprofloxacin	Positive	332	314	0.02	110	20
			288	0.02	110	15
Norfloxacin	Positive	320	276	0.02	110	15
			233	0.02	110	25
Ofloxacin	Positive	362	318	0.02	110	15
			261	0.02	110	25
Pefloxacin	Positive	334	316	0.02	110	20
			290	0.02	110	15
Nalidixic acid	Positive	233	215	0.02	90	10
			187	0.02	90	25
Flumequin	Positive	262	244	0.02	90	20
			202	0.02	90	30
Sarafloxacin	Positive	386	342	0.02	110	15
			299	0.02	110	25
Marbofloxacin	Positive	363	320	0.02	110	15
			72	0.02	110	20
Danofloxacin	Positive	358	340	0.02	110	30
			283	0.02	110	25
Difloxacin	Positive	400	299	0.02	110	25
			356	0.02	110	20
Oxolinic acid	Positive	262	244	0.02	90	15
			216	0.02	90	30
Orbifloxacin	Positive	396	352	0.02	90	15
			295	0.02	90	25



류물을 이동상으로 희석된 피로미디산 0.1 mg/L 1 mL에 녹인 후 0.2  $\mu$ m 막여과지(membrane filter)로 여과하여 시험용액으로 한다. 분석방법에 따른 회수율 측정을 위해 퀴놀론계 항균물질을 함유하지 않은 사료에 표준물질 일정량을 첨가하여 시료로 조제하였다.

### 결과 및 고찰

납, 카드뮴, 비소의 검량선은 10  $\mu$ g/mL 표준액을 혼합 희석하여 1, 2.5, 5, 10, 20  $\mu$ g/kg으로 측정하였다. 상관계수 0.999 이상의 검량선을 이용하여 검체의 희석배수를 감안하여 계산한 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 납 0.3  $\mu$ g/kg, 카드뮴 0.15  $\mu$ g/kg, 비소 0.45  $\mu$ g/kg이었다. 사료 관리법에서 비소, 납은 10 ppm, 카드뮴은 2 ppm이며 이번 분석 결과 모두 불검출로 나타났다.

테트라사이클린계 항생물질의 표준물질 4종 혼합액에 대한 크로마토그램은 그림 3, 4와 같으며 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린, 독시사이클린의 순으로 용리되었다. 검량선 작성을 위하여 표준물질 6개 농도범위(12.5, 25, 50, 100, 200  $\mu$ g/kg)에서 측정·분석한 결과 상관계수  $r^2$ 은 옥시테트라사이클린 0.99, 테트라사이클린 0.99, 클로르테트라사이클린 0.99, 독시사이클린 0.98로 Codex에서 권장하는  $r^2 \geq 0.95$ 과 비교해도 매우 만족할 만한 수준이었다. 테트라사이클린의 검출한계와 정량한계는 각각 0.2032~0.6414  $\mu$ g/kg, 0.6771~2.1372  $\mu$ g/kg로 나타났고, 평균 회수율(%)은 74.7~94.7%로 나타났다. 분석 결과 사료샘플에서 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 클로르테트라사이클린, 독시사이클린은 검출되지 않았다.

퀴놀론계 항생물질의 표준물질 13종 혼합액에 대한 크로마토그램은 그림 5, 6과 같이 나타났다.

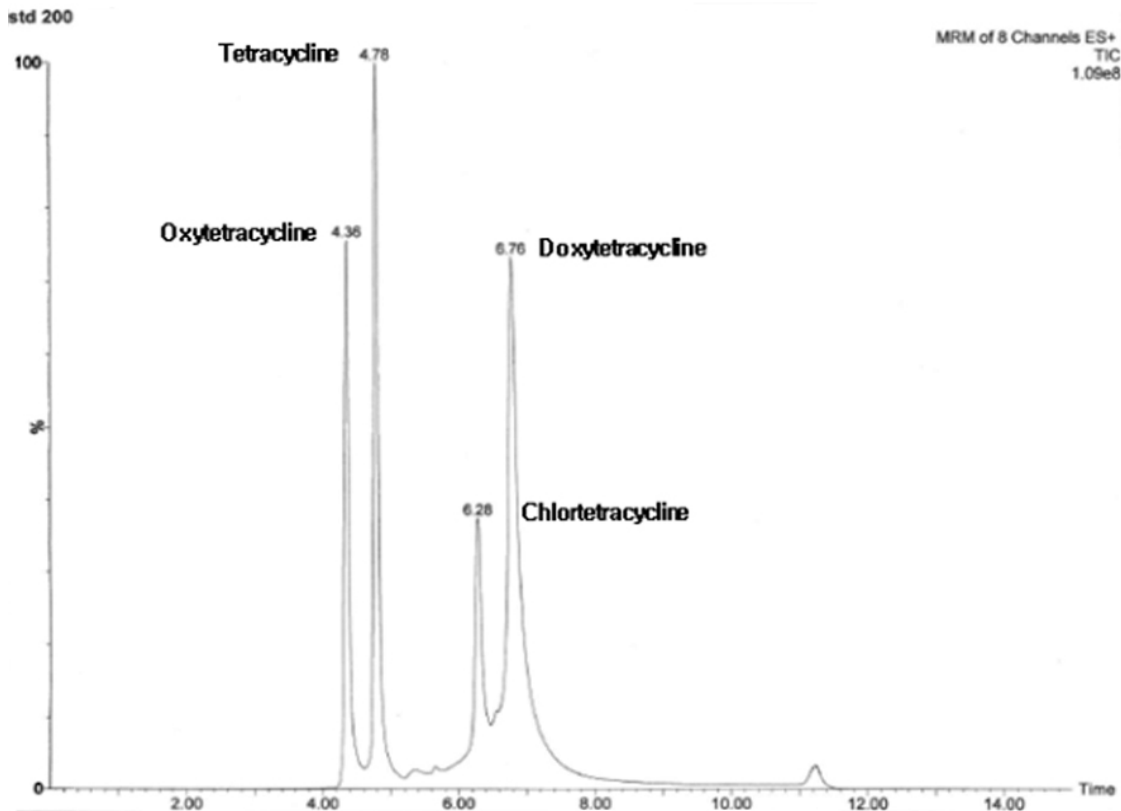
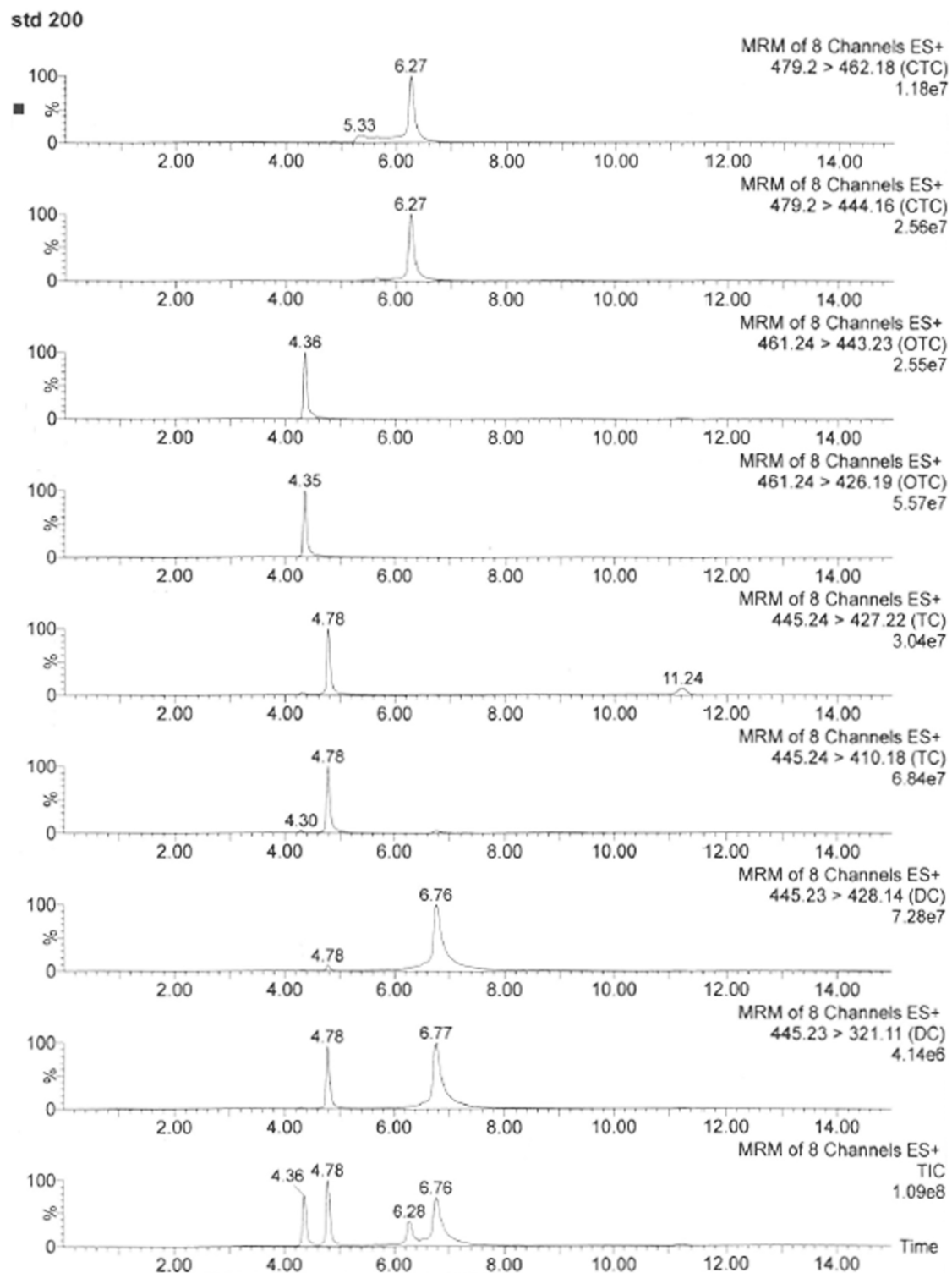


Fig. 3. Standard chromatograms of 4 residues of tetracycline at each 200  $\mu$ g/kg by HPLC-MS/MS



**Fig. 4.** Chromatogram of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxytetracycline by HPLC-MS/MS using standard solutions.

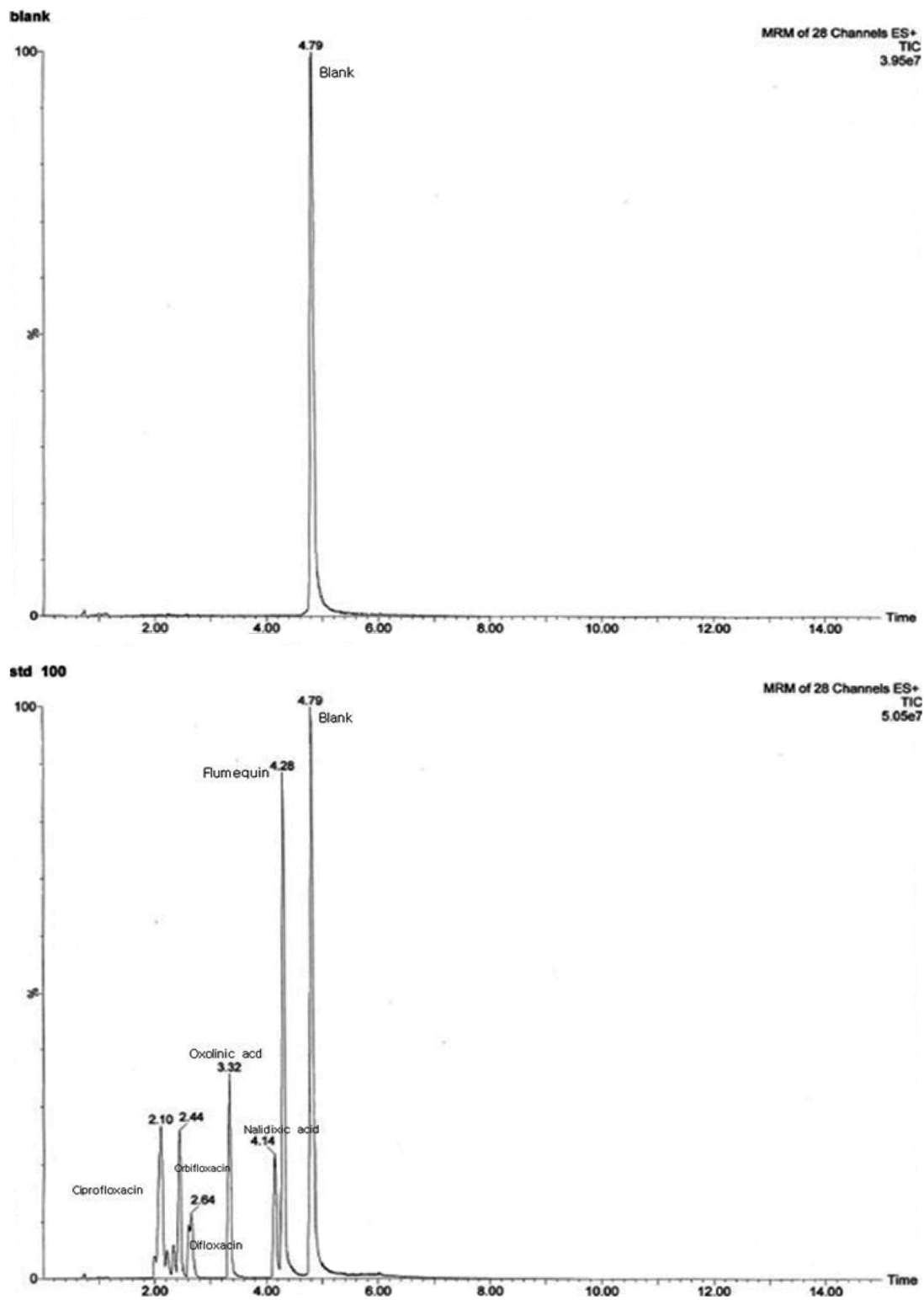


Fig. 5. Chromatograms of quinolones in blank sample(above), standard solution(below).

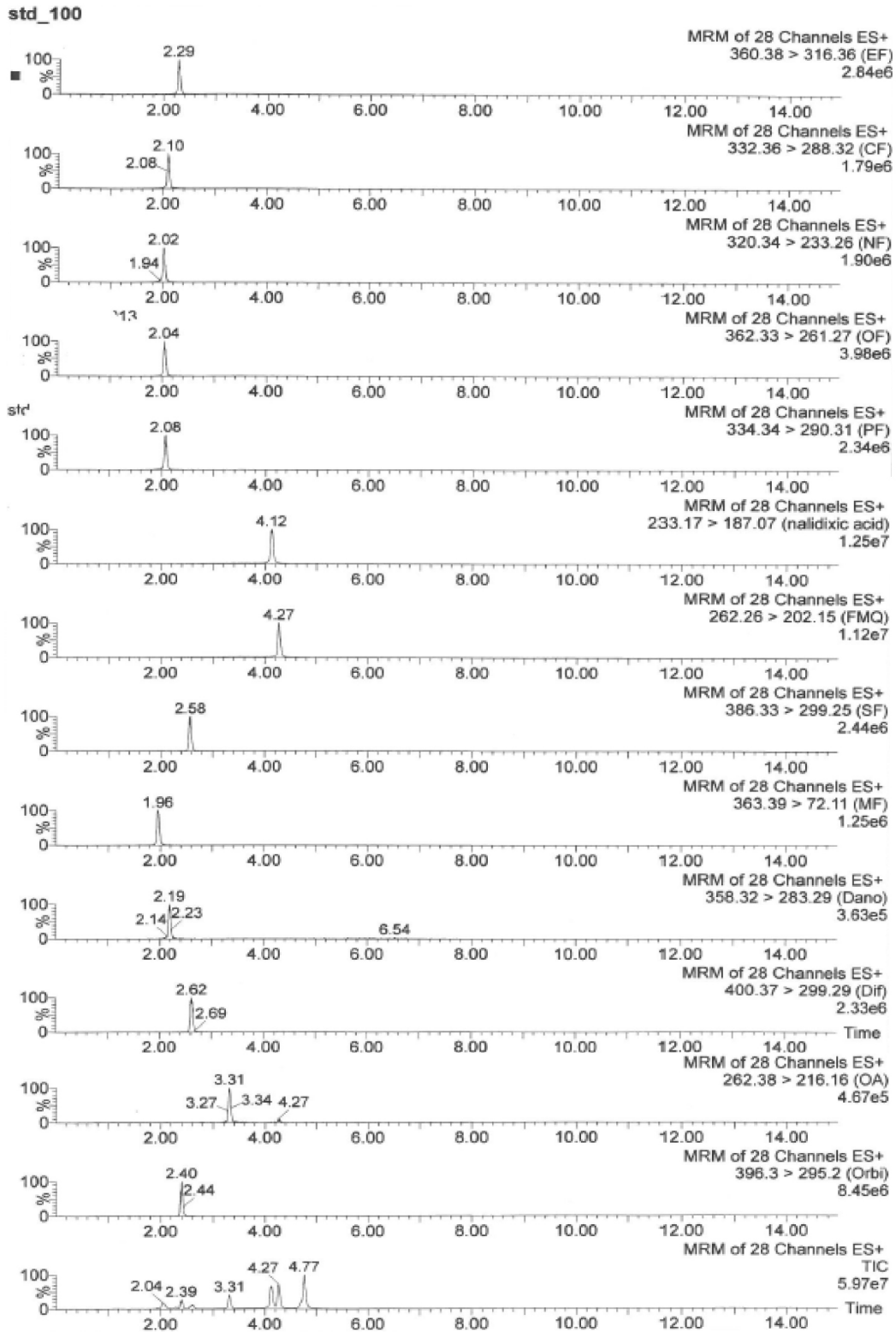
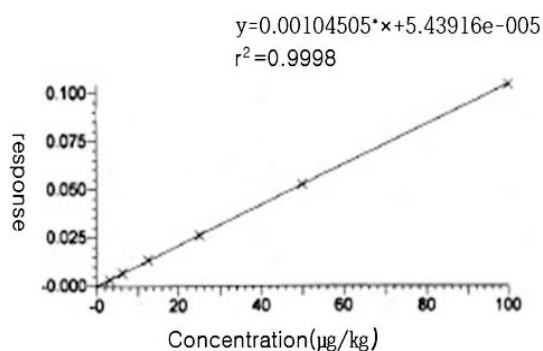


Fig. 6. Standard chromatograms of 13 residues of quinolone at each 0.1ppm by HPLC-MS/MS.

검량선 작성을 위하여 엔로플록사신, 시프로플록사신, 사라플록사신, 날리딕스산, 노르플록사신, 다노플록사신, 디플록사신, 마보플록사신, 오비플록사신, 오플록사신, 옥소린산, 페플록사신 및 플루메퀸의 검량선은 HPLC-MS/MS(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )로 측정·분석한 결과 상관계수  $r^2$ 은 엔로플록사신 0.998, 시프로플록사신 0.997, 사라플록사신 0.999, 날리딕스산 0.998, 노르플록사신 0.998, 다노플록사신 0.999, 디플록사신 0.996, 마보플록사신 0.997, 오비플록사신 0.999, 오플록사신 0.995, 옥소린산 0.999, 페플록사신 0.999, 플루메퀸 0.999로 모두 0.99 이상으로 CODEX에서 요구하는 0.98 이상으로 높은 직선성을 보여주었다(24). 그 중 페플록사신의 검량선은 그림 7과 같았다.

아래의 식으로 구한 엔로플록사신, 시프로플록사신, 사라플록사신, 날리딕스산, 노르플록사신, 다노플록사신, 디플록사신, 마보플록사신, 오비플록사신, 오플록사신, 옥소린산, 페플록사신 및 플루메퀸에 대한 HPLC-MS/MS의 각 검출한계와 정량한계가 각각 0.0011~0.0168  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 와 0.0037~0.0554  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로서 매우 만족할 만한 수준을 보여주었다. 퀴놀론계 항균제 13종의 검출한계와 정량한계는 표 7과 같이 나타났다.

회수율 결과는 평균회수율(%) 75.5~107.0%로 나타났으며, 표 8과 같았다. 이는 CODEX에서 요구하는 회수율 70~110% 및 RSD 15% 이하 기준에 만족하는 수준으로 나타났다.



**Fig. 7.** Calibration curve of pefloxacin at different concentrations by HPLC-MS/MS.

**Table 7.** Limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) for quinolones

Compounds	LOD <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	R <sup>2</sup>
Enrofloxacin	0.0056	0.0187	0.9982
Ciprofloxacin	0.0045	0.0151	0.9968
Norfloxacin	0.0018	0.0061	0.9981
Ofloxacin	0.0029	0.0095	0.9953
Pefloxacin	0.0013	0.0045	0.9998
Nalidixic acid	0.0042	0.0140	0.9980
Flumequin	0.0017	0.0058	0.9997
Sarafloxacin	0.0055	0.0184	0.9987
Marbofloxacin	0.0168	0.0554	0.9996
Danofloxacin	0.0084	0.0277	0.9993
Difloxacin	0.0025	0.0083	0.9963
Oxolinic acid	0.0054	0.0178	0.9988
Orbifloxacin	0.0011	0.0037	0.9992

1) Limit of detection(L.O.D)= $3.3 \times (\sigma/S)$

2) Limit of quantification(L.O.Q)= $10 \times (\sigma/S)$

(S, slope of the calibration curve;  $\sigma$ , standard deviation of the response)

분석 결과, 사료 샘플에서 엔로플록사신, 시프로플록사신, 사라플록사신, 날리딕스산, 노르플록사신, 다노플록사신, 디플록사신, 마보플록사신, 오비플록사신, 오플록사신, 옥소린산, 페플록사신 및 플루메퀸은 모두 검출되지 않았다(표 9).

이번 연구에서 사료 내 비소, 납, 카드뮴의 중금속 3종과 동물용 의약품 중 테트라사이클린계 항생제 4종, 퀴놀론계 항균제 13종 모두 검출되지는 않았지만, 이들 분석항목을 포함하여 현행 불검출로 규정되어 있는 사료의 규격기준이 식품에서의 기준보다 높다는 점에서 현행 규정의 재검토의 필요성이 있는 것으로 나타났다. 향후 환경오염과 사료취급 중 일어날 수 있는 여러 유해물질의 잔류확인을 위해 사료 수거지역과 종류를 확대하고 곰팡이 독소, 잔류농약, 방사능, 동물용 의약품 및 그 외 기타 성분 등 사료관리법에서 정한 다른 관리대상 유해물질에 대해서도 모니터링 검사를 추가로 실시하는 것이 필요하다.

**Table 8. Recovery of Quinolones(n=3)**

Compounds	Fortified concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Pet Foods	
		Recovery $\pm$ RSD(% , n=3)	Coefficient of variation(%)
Enrofloxacin	10	101.5 $\pm$ 2.5	2.4
	25	80.7 $\pm$ 6.7	6.8
	50	97.0 $\pm$ 1.5	1.6
Ciprofloxacin	10	86.0 $\pm$ 5.4	6.2
	25	75.6 $\pm$ 6.2	8.2
	50	96.8 $\pm$ 1.3	1.3
Norfloxacin	10	87.3 $\pm$ 5.5	6.3
	25	81.3 $\pm$ 3.3	4.0
	50	96.7 $\pm$ 4.5	4.6
Ofloxacin	10	106.3 $\pm$ 3.0	13.4
	25	87.3 $\pm$ 4.2	4.8
	50	106.7 $\pm$ 3.0	6.2
Pefloxacin	10	94.7 $\pm$ 8.2	8.6
	25	83.3 $\pm$ 3.6	4.3
	50	102.5 $\pm$ 3.0	2.9
Nalidixic acid	10	107.0 $\pm$ 2.0	3.2
	25	100.3 $\pm$ 2.6	2.6
	50	83.5 $\pm$ 8.1	9.6
Flumequin	10	93.3 $\pm$ 5.6	5.9
	25	86.3 $\pm$ 1.1	1.3
	50	77.7 $\pm$ 3.4	4.4
Sarafloxacin	10	94.0 $\pm$ 5.0	5.2
	25	75.5 $\pm$ 6.9	9.1
	50	86.3 $\pm$ 4.1	4.7
Marbofloxacin	10	90.5 $\pm$ 7.5	8.2
	25	86.0 $\pm$ 8.1	9.4
	50	106.3 $\pm$ 3.0	7.2
Danofloxacin	10	83.0 $\pm$ 11.7	14.2
	25	76.4 $\pm$ 4.6	6.0
	50	95.9 $\pm$ 7.1	7.4
Difloxacin	10	97.0 $\pm$ 11.3	11.7
	25	80.7 $\pm$ 9.5	11.8
	50	93.5 $\pm$ 6.9	7.3
Oxolinic acid	10	86.3 $\pm$ 4.5	5.2
	25	87.9 $\pm$ 4.4	5.1
	50	87.5 $\pm$ 4.5	5.0
Orbifloxacin	10	95.5 $\pm$ 8.5	8.9
	25	82.1 $\pm$ 6.5	7.9
	50	100.0 $\pm$ 5.3	5.3

**Table. 9.** The result of monitoring hazardous residues in Pet Foods

Compounds	Number of test	No. of samples detected
Heavy Metals(Pb, Cd, As)	60	0
Tetracyclines	60	0
Quinolones	60	0

## 결 론

본 연구에서는 서울지역에서 유통되고 있는 반려동물 사료 중 다소비·판매되는 건조배합사료, 캔사료, 육포 등 간식사료 3개 품목에 대한 유해물질 분석 모니터링을 실시하였다. 중금속으로 납, 카드뮴, 비소와 동물용의약품인 테트라사이클린계, 퀴놀론계의 잔류 분석을 위해 사료 총 60건을 서울 시내 동물병원에서 수거하고 각 시료를 검사하였다. 본 연구를 통해 얻어진 결과, 납과 카드뮴은 10 ppm, 비소는 2 ppm의 사료에서의 잔류허용기준에 대해 불검출로 나타나 유통사료의 안전에 아직 큰 문제가 없는 것으로 나타났다. 테트라사이클린의 검출한계와 정량한계는 각각 0.2032~0.6414 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 0.6771~2.1372 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 나타났고, 평균 회수율(%)은 74.7~94.7%로 나타났다. 엔로플록사신, 시프로플록사신, 사라플록사신, 날리딕스산, 노르플록사신, 다노플록사신, 디플록사신, 마보플록사신, 오비플록사신, 오폴록사신, 옥소린산, 페플록사신 및 플루메퀸에 대한 HPLC-MS/MS의 각 검출한계와 정량한계가 각각 0.0011~0.0168 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 와 0.0037~0.0554 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 나타났고, 평균회수율(%)은 75.5~107.0%로 만족할 만한 수준을 보여 주었다. 이번 모니터링 결과, 유통 사료 중 유해 잔류물질은 모두 불검출로 안전한 것으로 나타났다. 하지만, 환경오염으로 인한 독성 중금속의 동식물내 축적의 가속화와 현재 사용중인 동물용 의약품에 대한 내성발현으로 퀴놀론계 약물의 사용이 앞으로 더욱 증가될 것으로 예상됨에 따라 사료 내 유해 잔류물질의 지속적인 모니터링이 절실한 실정이다. 위의 연구결과는 향후 체계적인 잔류 동물용 의약품 기준 설정과 허용 기준의 준수 여부를 확인할 수 있는 시험 방법의 개선을 위한 기초 자료로 제공될 것이며, 반려

동물의 안전과 사료의 안전관리를 위해 지속적이고 광범위한 사료 모니터링과 그에 대한 관리의 필요성을 제시하고 있다.

## 참고문헌

1. Steven C. Zicker DVM, PhD Dipl ACVIM, Dipl ACVN : Evaluating Pet Foods: How Confident Are You When You Recommend a Commercial Pet Food? Topics in Companion Animal Medicine, 23(3):121~126, 2008.
2. UNEP/FAO/WHO. The Contamination of Food. United Nations Environment Programme, Nairobi, Kenya, 1992.
3. Jose MC. Food Toxicology. Part B : Contamination and Additives. Marcel Dekker, New York, NY, USA. p.1033~107, 1988.
4. Kim MH, Kim JS, Sho YS, Chung SY, Lee JO. The study on heavy metal contents in various foods. Korean J. Food Sci. Technol. 35:561~567, 2003.
5. Choi DW, Jung SH. The survey for heavy metal contents in food - survey for heavy metal contents in frequently consumed food. The Annual Report of KFDA, Korea 10:328~332, 2006.
6. Conor R. Metal Contamination of Food. 3<sup>rd</sup> ed. Blackwell Science Ltd., Melbourne Australia. p.5~11, 40~76, 81~18, 1991.
7. 유해사료의 범위와 기준 개정, 농림부 고시 제 2004-72호, 2004.12.10.

8. 식품중 동물용의약품 잔류허용기준(발간등록번호 11-1471000-000126-10), 식품의약품안전처, 2016.
9. 배합사료제조용 동물용 의약품 등 사용기준, 농림축산검역본부 고시 제 2016-25호, 2016.
10. The Merck Veterinary Manual(<http://merckvetmanual.com>).
11. Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob. Agents Ch.* 28:581~586, 1985.
12. G. M. Eliopoulos and C. T. Eliopoulos, Quinolone antimicrobial agents, 2<sup>nd</sup> Ed., 161~193, David C. Hooper and John S. Wolfson, American Society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A., 1993.
13. Eliopoulos GM, Lipoulos CT. Activity in vitro of the quinolones. *Am. Soc. Microbiol. Washington.* 2nd:161~193, 1993.
14. Posyniak A, Zmudzki J, Semeniuk S, Niedzielska J, Ellis R. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissue by liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 13:279~285, 1999.
15. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 61:377~392, 1997.
16. Lester A, Mitscher, Pratik Devasthale and Robin Zavod, Quinolone antimicrobial agents, 2nd Ed., 3-51, David C. Hooper and John S. Wolfson, American Society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A., 1993.
17. U.S. EPA. EPA Method 3052, Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. U.S. Environment Protection Agency, Washington, DC, USA, 1996.
18. Sastre JA, Sahuquillo M, Vidal & Rauret G. Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Anal. Chim. Acta.* 462:9~72, 2002.
19. Angele Thompson PhD : Ingredients: Where Pet Food Starts. *Topics in Companion Animal Medicine.*, 23(3):127~132, 2008.
20. David A. Dzanis DVM, PhD, DACVN : Understanding Regulations Affecting Pet Foods. *Topics in Companion Animal Medicine.*, 23(3):117~120, 2007.
21. 식품공전, 식품의약품안전처, 2017.
22. Bogaerts R, Brussels FW. A standardized method for the detection of residues and antibacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft* 60:672~673, 1980.
23. Horie M, Nakazawa H. Current legal regulation of veterinary drugs and their residual analysis. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 36:329~343, 1995.
24. CODEX. Codex general standard for contaminations and toxins in food and feed. CODEX STAN 193-1995:1-44(Adopted 1995; Revised 1997, 2006, 2008, 2009; Amended 2009).