

***Corresponding author:**

Hu-Jang Lee

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju 52828, Korea

Tel: +82-55-772-2352

E-mail: hujang@gnu.ac.kr

<https://orcid.org/0000-0002-7552-6416>

[†]These authors contributed equally to this work.

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Received: May 27, 2023

Revised: Aug 9, 2023

Accepted: Aug 16, 2023

육계의 조직 중 티아몰린의 잔류 분석 및 휴약기간 설정 연구

김우현^{1,†}, 김준영^{2,†}, 박광일¹, 진영배¹, 김석¹, 이후장^{1,*}

¹경상국립대학교 수의과대학

²강원대학교 수의과대학

Establishment of withdrawal time and analysis of tiamulin residue in tissues of orally dosed broiler chickens

Woo H. Kim^{1,†}, Jun Young Kim^{2,†}, Kwang Il Park¹, Yeung Bae Jin¹, Suk Kim¹, Hu-Jang Lee^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate tiamulin (TML) residues in the edible tissues of orally dosed broiler chickens and to re-establish the withdrawal time (WT). Thirty-six healthy Ross broiler chickens were administered 0.5 (TML-1) and 2.5 kg (TML-2) per ton feed, respectively, of the drug containing TML 78 g/kg for 10 days. Twenty-four tissue samples were collected from 6 chickens in each of the TML-1 and TML-2 groups on 0, 1, 3, and 5 days after drug administration, respectively. The residual concentrations of TML were measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The correlation coefficient of the calibration curves was 0.9978 to 0.9998, and the limits of detection and the limits of quantification (LOQ) were in the range of 0.03 to 0.06, and 0.1 to 0.2 µg/kg, respectively. Recoveries ranged between 89.0% to 116.7%, and the coefficients of variation were less than 13.9%. After the drug administration, TML in the TML-1 and TML-2 groups was detected above the LOQ in 1 and 6 samples of liver, respectively, at day 0, and in 1 liver sample from both groups on day one. At 3 days after administration, TML was detected below the LOQ in all samples of TML-1 and TML-2. The calculated WT of TML in both TML-1 and TML-2 using the WT calculation program WT 1.4 was 0 days. In conclusion, the developed analytical method is suitable for detection, and the calculated WT of TML in poultry edible tissues is shorter than the current recommended WT of 7 days for TML in broiler chickens.

Keywords: tiamulin; liquid chromatography-mass spectrometer; broiler chicken; withdrawal time

서론

전 세계적으로 인구증가와 소득수준 향상으로 육류 및 육가공 식품에 대한 소비는 꾸준히 증가하고 있으며, 양적인 면에서 질적인 면으로 소비패턴이 전환되고 있다[1]. 이들 육류 및 육가공 식품의 품질과 안전성 문제는 소비자와 정책 담당자뿐만 아니라 생

산자와 육가공업자들의 주된 관심사가 되고 있다[2].

일반적으로 항생제는 가축의 생산성을 높이고, 질병을 예방하고 치료할 목적으로 사용되고 있다[3,4]. 하지만 이렇게 사용된 항생물 질들은 식육 등에 대한 잔류 문제와 항생제 내성균 출현 문제로 인 해, 유럽연합(European Union)은 2006년부터 우리나라는 2011년 부터 항생제의 배합사료 첨가를 전면 금지하였다[5]. 우리나라의 경 우, 배합사료 내 항생제 첨가 전면 금지 이후에, 가축에 대한 항생제 사용이 감소하였으나, 2016년부터 항생제 사용량은 오히려 배합사 료 내 첨가 금지 이후보다 증가하였다[1]. 한편, 가축에 사용되는 성 장 호르몬 제제들은 성호르몬 수용체에 대해 친화성이 높아서, 식육 및 축산제품에 잔류할 경우에 섭취를 통해 인체 내 호르몬 작용을 방해하는 것으로 알려져 있다[6,7]. 또한 동물용의약품이 잔류하는 식육, 우유, 계란, 꿀벌 등을 섭취할 경우에, 과민반응, 다양한 암 발 생, 장내 균총 교란 등이 발생할 수 있다[3].

Tiamulin (TML)은 pleuromutilin 계열에 속하는 반합성 항생제 로 valnemulin과 유사한 구조를 갖고 있으며, 세균 50S ribosomal subunit의 23rRNA에 작용하여 peptide 결합을 방해하고 세포벽 합 성을 억제함으로써 정균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다[8-10]. TML은 *Mycoplasma* spp. 및 그람 양성균에 대한 항균활성이 뛰어나, 돼지와 닭에서 돈적리, 폐렴, 마이코플라즈마병 등의 예방 및 치 료에 사용되고 있다[10]. 한편, TML은 ionophore계 항록시톱제인 모넨신, 살리노마이신, 나라신 등과 같이 사용하게 되면 폐사를 포 함한 상호작용이 발생하기 때문에 TML과 병행해서 사용하면 안된 다[11]. TML은 인체에 사용되지 않고 있어서, 가축의 식용 조직에 잔류할 경우에, 인체에 다양한 생물학적 부작용과 알레르기 반응을 유발할 수 있다[12]. 따라서 인체의 안전을 보장하기 위해서는 동물 용의약품을 처치한 동물 유래 식용 제품에서 항생제 등 동물용의약 품의 잔류를 방지하는 것이 필수적이다[13]. 유럽연합의 Commit tee for Veterinary Medicinal Product는 닭 근육, 피부/지방, 간에 서 TML의 최대잔류허용기준(maximum residue limit, MRL)을 각 각 0.1, 0.1, 1.0 mg/kg으로 설정하고 있으며[14], 한국의 식품공전 에서는 TML의 MRL을 가금 근육, 신장, 지방에서는 0.1 mg/kg으 로, 간에서는 0.2 mg/kg으로 설정하고 있다[15].

미국 등 선진국들은 식품의 안전성을 강화하기 위해 MRL이 설정 되어 있지 않은 동물용의약품에 대해 일률 기준치(0.01 mg/kg)로 식품 내 잔류를 관리하는 positive list system (PLS)을 도입하고 있 다[16].

우리나라도 2024년 1월 1일부터, 국민들에게 안전한 축·수산물을 공급하기 위해서 잔류허용물질 목록관리제도(PLS)를 시행할 계획이 다[17]. PLS 제도 도입에 앞서서, 농림축산검역본부는 잔류성 시험 자료가 필요한 동물용의약품을 선별하여 잔류휴약기간을 재설정 하는 사업을 2020년부터 진행하고 있다[18].

본 연구는 우리나라에서 잔류성 시험자료가 필요한 TML 사료첨 가제에 대해 가금의 조직들(근육, 간, 신장, 지방)에서 잔류휴약기간

을 재설정하기 위해, 육계를 대상으로 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

TML 함유 시험약제(1 kg 중, TML 78 g)는 (주)성원(South Korea) 으로부터 제공받았으며, TML 표준품(순도, 98%), 4-dimethylami noantipyrine (DAP) 표준품(순도, 97%), acetonitrile (ACN), for mic acid (순도, 95%)는 Merck KGaA (Germany)로부터 구입하여 시험에 사용하였다.

실험동물

경상남도 진주 인근 양계장(달성농장, South Korea)에서 사육하 고 있는 건강한 Ross계 육계 48마리(평균 체중, 959.4 ± 98.4 g)를 구입하여 경상국립대학교 수의과대학 사육장에서 사육하였다. 동물 실험은 경상국립대학교 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받아(승 인번호: GNU-220121-C00008) 연구윤리지침에 따라 진행하였다.

시험약제 투여 및 시료채취

모든 실험동물은 10일 동안 환경에 적응시킨 후에 시험에 공시하 였다. 육계는 시험약제의 최대 권장용량(0.5 kg/ton feed) 투여군 (TML-1, n = 24)과 최대 권장용량의 5배 용량(2.5 kg/ton feed) 투 여군(TML-2, n = 24)으로 나누어 시험군 별로 시험약제를 사료에 혼합하여 10일 동안 경구 투여하였다. 육계의 조직 시료(근육, 간, 신장, 피부/지방)는 시험약제 투여 종료시점, 투여 종료 후 1, 3, 5일 째에 각각 100 g씩 채취하여, 잔류 분석에 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

표준원액 조제를 위해, 정량플라스크(1,000 mL)에 TML 표준품 1.0 mg을 넣고, 메탄올로 1.0 mg/L이 되도록 하였다. 10% ACN을 사용하여 조제한 표준원액을 희석하여 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 50, 100 µg/kg의 용액을 준비하여, 냉장실 (4℃)에 보관하면서 사용하였다. DAP 표준품 1.0 mg을 정량플라스 크(1,000 mL)에 넣고, 메탄올로 1.0 mg/L이 되도록 조제하여, 냉장 실(4℃)에 보관하면서 사용하였다.

공시료 2 g에 TML과 DAP 표준용액을 첨가하여 검량선 시료와 QC 시료를 준비하였다. 간, 신장, 근육의 각 공시료에 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 100 µg/kg 농도가 되도록 TML 표준용액을 첨가하였고, 지방의 공시료에는 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 5.0, 50 µg/kg 농도가 되도록 TML 표준용액을 첨가한 다음, 모든 시료에 DAP 용액 20 µL씩을 첨가하였다.

시료 전처리

식품공전[19]에 따라, 균질화 시킨 시료 2 g을 원심분리관(50 mL)

에 넣고, DAP 용액 20 μ L과 ACN 10 mL를 가하여 15분 동안 vortex한 다음, 상온에서 4,700 \times g로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액 50 mL를 원심분리관에 넣고 ACN 포화헥산 10 mL를 가한 다음, 10분 동안 vortex하고 상온에서 4,700 \times g로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 하층액을 40 $^{\circ}$ C에서 질소로 농축시킨 다음 0.1% 개미산 용액과 메탄올을 각각 2 mL씩을 가하여 재분산시키고, 10분 동안 초음파 처리한 후 4 $^{\circ}$ C에서 4,700 \times g로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 취하여 polytetrafluoroethylene membrane filter (0.2 μ m; Merck KGaA, Korea)로 여과시킨 것을 시험용액으로 하였다.

기기분석 조건

식품공전[19]의 분석법을 변형하여, 시료 중 TML 분석을 수행하였다. 분석 장비는 liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, API4000; AB SCIEX, Canada)와 LC system (Agilent 1260 series; Agilent Technologies, Germany)을 사용하였으며, 분석용 column은 Xbridge C18 (2.1 \times 100 mm, 3.0 μ m; Waters, USA)을 사용하였고, column 온도는 40 $^{\circ}$ C로 하였다. 또한, 이동상 A는 0.1% 개미산 수용액을, 이동상 B는 0.1% 개미산 함유 ACN 용액을 각각 사용하였다. 유속은 0.2 mL/min으로 하였고, 크로마토그래프상 총 running time은 10분으로 하였다. Mass spectrometer는 Triple Quad 4500 System (SCIEX, USA)을 사용하였다. TLM의 이온화는 전기분무이온화법(electro-spray ionization)의 positive-ion mode로 MS 조건을 최적화하였으며, TML과 DAP의 multiple reaction monitoring transition (m/z)는 각각 494.3 \rightarrow 192.4와 232.0 \rightarrow 113.2를 사용하였다.

분석법 검증

여러 농도의 표준용액(0.025-100 ng/mL)을 이용하여 작성한 검량곡선의 직선성을 확인하기 위해 상관계수(coefficient of correlation, R^2)를 구하였다. 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantitation, LOQ)는, 앞선 연구[20]의 방법에 따라, 공시료에 각 시료의 0.5 \times MRL (근육, 지방, 신장: 0.05 ng/mL, 간: 0.1 ng/mL) 농도가 되도록 TML 표준용액을 가하여 전처리하여 분석한 chromatogram에서 signal to noise ratio (S/N ratio)의 각각 3배와 10배 농도로 하였다. 회수를 측정은 근육, 간, 신장의 공시료에 TML을 가하여 각각 0.1, 10, 100 ng/mL 농도로 만들고, 지방의 공시료에는 TML을 첨가하여 각각 0.2, 20, 200 ng/mL 농도로 만들어, 3 반복으로 전처리하였다. TML 표준품에 대한 chromatogram의 peak 면적에 대한 추출한 각 시료에서의 peak 면적비로부터 TML의 회수율(%)을 구하였다. 또한 3 반복 회수율로부터 변이계수(coefficient of variation, CV)를 구하였다. 측정된 LOQ, 회수율 그리고 CV의 검증기준은 농림축산검역본부의 동물용의약품등 잔류성 시험지침(LOQ, 0.5 \times MRL 이하; 회수율, 60-120%; CV,

30% 이하) [21]에 따랐다.

TML의 잔류휴약기간 설정

가금의 근육, 간, 신장, 지방에서 TML의 MRL (근육, 신장, 지방 0.1 mg/kg, 간 0.2 mg/kg)을 기준으로, WT 1.4 Program을 이용하여 95% 신뢰수준과 99% 허용한계 상한값을 적용하여 적정휴약기간을 계산하였다[22]. LOQ 미만으로 검출된 시료는 0.5 \times LOQ 값을 잔류량으로 하였다.

결과

TML의 크로마토그램

Fig. 1은 공시료에 TML을 LOQ 농도(근육, 간, 신장 0.1 μ g/kg, 지방 0.2 μ g/kg)가 되도록 첨가하여 전처리한 다음, LC-MS/MS를 이용하여 분석한 chromatogram을 나타낸 것이다. TML의 머무름 시간은 4.56분(근육, 4.57분)이었으며, total run time은 10분이었다. Positive-ion mode에서 기준이온(base ion)으로 검출된 $[M+H]^+$ 인 m/z 494.3을 선구이온(precursor ion)으로 하였으며, product ion scan을 통하여 특성이온으로 나타난 m/z 192.4를 정성이온으로 하였다.

검량곡선, LOD 및 LOQ

본 시험에서, TML 표준용액을 근육, 간, 신장의 공시료에는 0.05-100 μ g/kg의 농도가 되도록 조제하고, 지방에는 0.025-50 μ g/kg의 농도가 되도록 조제하여 전처리한 다음, LC-MS/MS로 분석하여 검량선의 R^2 을 확인하였다. 근육, 간, 신장, 지방에 대한 검량선의 R^2 는 각각 0.9978, 0.9990, 0.9998, 0.9984였다(Fig. 2). 또한, 근육, 간, 신장에 대한 LOD와 LOQ는 각각 0.03과 0.1 ng/mL였으며, 지방에 대한 LOD와 LOQ는 각각 0.06과 0.2 ng/mL였다.

회수율과 정밀성

Table 1은 육계 조직 시료에서 측정된 TML의 회수율과 정밀성 결과를 나타낸 것이다. 근육, 간, 신장, 지방에서의 회수율 범위는 각각 84.4-95.1, 102-120, 98.0-119, 83.0-103%였으며, CV의 범위는 각각 1.42-3.89, 2.59-3.90, 5.32-9.67, 1.49-7.09%로 나타났다.

조직 중 TML 잔류 분석

Table 2는 육계에 TML을 39와 195 mg/kg 농도로 첨가한 사료를 각각 10일 동안 투여한 후, 경시별로 분석한 조직 시료 중 TML 농도를 나타낸 것이다.

TML-1의 경우, 약제 투여 종료 당일과 종료 후, 1일째부터 5일째까지 간 조직을 제외한 모든 조직에서 TML이 LOQ 미만으로 검출되었으며, 간 조직에서는 투여 종료 당일과 종료 후 1일째에 모두 1개 시료에서 TML이 각각 2.0과 0.5 μ g/kg 농도로 검출되었고, 나

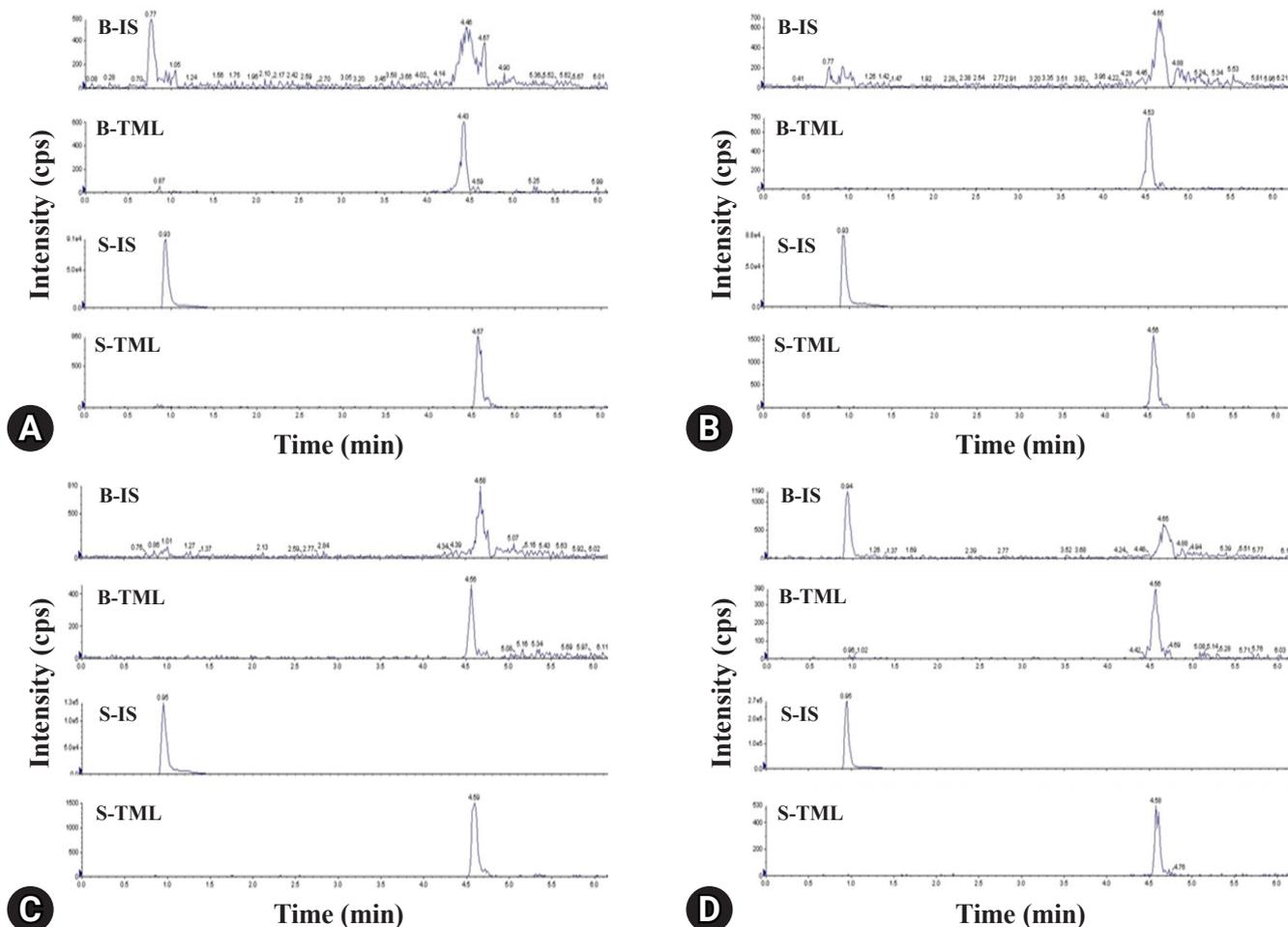


Fig. 1. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) chromatogram of blank and poultry tissues spiked with tiamulin at the concentration of 0.1 (muscle, liver, and kidney) and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (fat). (A) Muscle, (B) liver, (C) kidney, and (D) fat. B-IS, internal standard (dimethylaminoantipyrine, [DAP]) peak in blank tissue; B-TML, tiamulin peak in blank tissues; S-IS, DAP peak in poultry tissue spiked with tiamulin; S-TML, tiamulin standard peak in poultry tissue spiked with tiamulin.

머지 개체들의 시료 중 TML 농도는 모두 LOQ 농도 미만으로 검출되었으며, 투여 종료 후 3일째와 5일째에는 TML 농도가 모두 LOQ 미만으로 검출되었다. TML-2의 경우, 약제 투여 종료 당일에 근육, 간, 신장 시료 중 각각 2, 6, 2개에서 TML이 LOQ 이상으로 검출되었으나, TML 농도는 모두 MRL 농도(근육, 신장, 지방 0.1 mg/kg, 간 0.2 mg/kg) 미만인 것으로 나타났다. 또한 투여 종료 후 1일째에 근육, 신장, 지방 조직에서 TML은 모두 LOQ 미만으로 검출되었으며, 간 조직에서는 6개 시료 중 1개 시료에서 TML이 LOQ 이상으로 검출되었다.

조직 시료 중 TML 잔류휴약기간 설정

Fig. 3은 간 시료 중 TML의 잔류휴약기간을 계산하기 위해 WT 1.4 Program을 이용하여 산출된 결과를 나타낸 것이다. TML-1과 TML-2에서 근육, 신장, 지방 조직은 약제 투여 종료 후 1일째부터

모든 시료들의 TML 농도가 LOQ 미만으로 검출되어 잔류휴약기간은 모두 0일로 평가되었다. 다만 TML-1과 TML-2의 간 조직에서 적정휴약기간을 WT 1.4 Program으로 계산한 결과, 모두 0일로 산출되어, TML-1과 TML-2의 적정휴약기간은 모두 0일로 평가되었다.

고찰

본 연구에서는 TML을 사료 kg 당 39 mg과 195 mg을 혼합하여 육계에 10일 동안 투여한 다음, 시간대 별로 조직 시료 중 TML 농도를 LC-MS/MS로 분석한 후, 육계 조직 중 TML의 적정휴약기간을 평가하였다.

육계 조직에서 TML 농도를 LC-MS/MS로 분석한 앞선 연구들에서, TML의 chromatogram peak의 머무름 시간은 7.26분[23], 9.72분[24], 9.87분[12]으로 나타났다. 본 연구에서, TML의 chro-

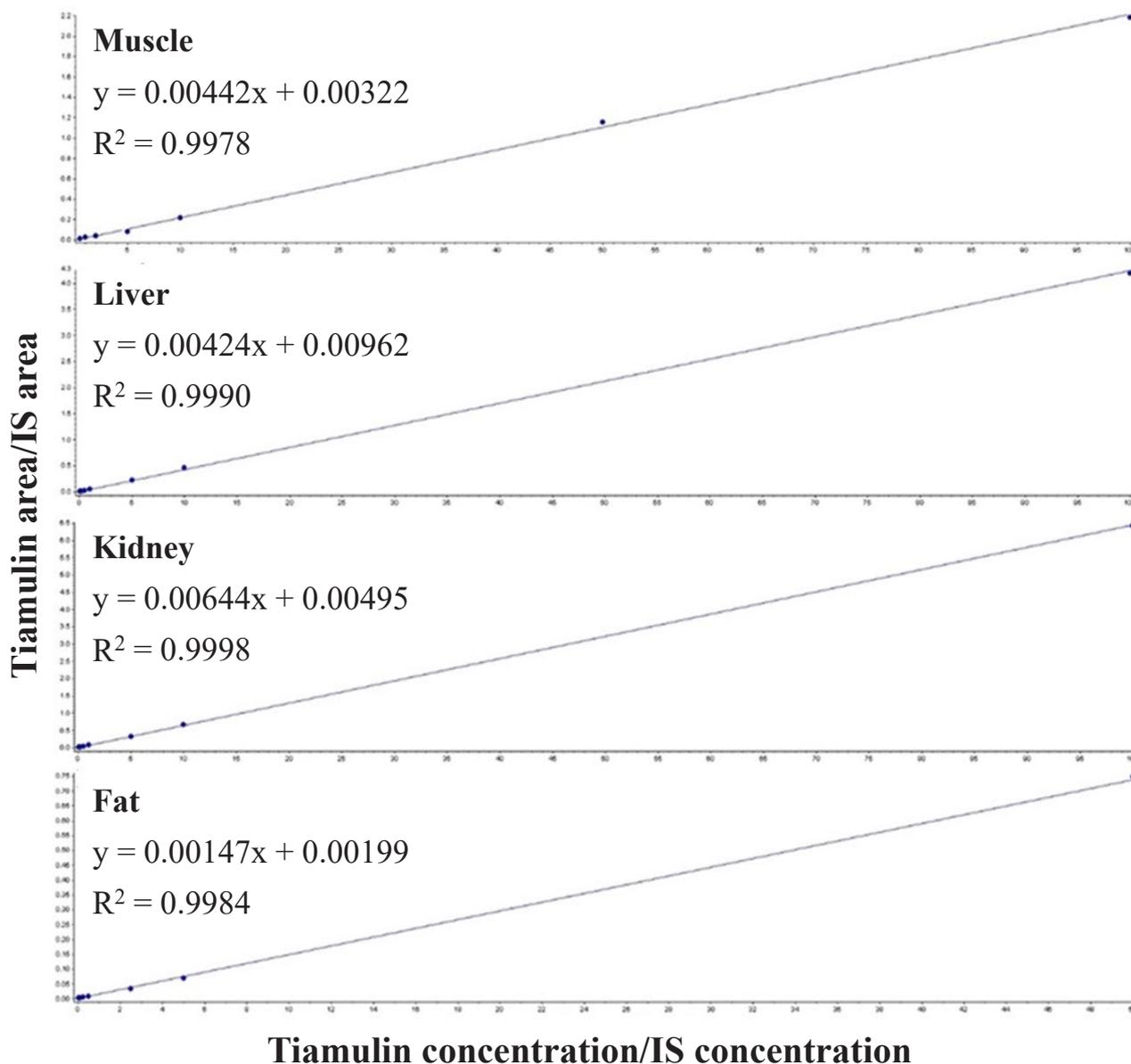


Fig. 2. Calibration curves for tiamulin in poultry tissues. IS, internal standard.

matogram peak의 머무름 시간은 4.56–4.57분으로, 앞선 연구들 [12,23,24]에 비해 peak의 머무름 시간이 매우 짧게 나타내었다. 이와 같이, 크로마토그램 peak의 머무름 시간에 차이가 발생한 것은 분석기기의 설정 조건이 달라서 발생한 것으로 판단된다[20]. 본 연구에서 확립한 육계 조직 중 TML의 잔류 분석 방법은 식품공전[19]의 시험법과 비교해서도 분석시간이 단축되어 분석의 효율성을 증진시켰다.

앞선 연구들 모두에서[23–25], TML에 대한 검량곡선의 R^2 가 0.999 이상을 나타내었다. 앞선 연구들과 비교하여, 본 연구에서 TML에 대한 검량곡선의 R^2 는 0.9978–0.9998로 다소 낮거나 유사하

였으며, Codex 기준(0.98)을 충족하였다[26].

식품공전에 따르면[15], 가금 근육, 간, 신장, 지방 중 TML의 MRL은 각각 0.1, 0.2, 0.1, 0.1 mg/kg으로 설정하고 있다. 본 연구에서 TML 잔류 분석에 사용한 분석법은 가금 식용 조직 중 TML을 $0.5 \times$ MRL 이하로 분석 가능한 것으로 평가되었다. 농림축산검역본부의 동물용의약품등 잔류성 시험지침에 따르면[21], 분석기기의 LOQ 기준을 $0.5 \times$ MRL 이하로 하고 있다. 따라서 본 연구에서 확립한 TML의 LOQ (근육, 간, 신장 0.1 μ g/kg, 지방 0.2 μ g/kg)는 동물용의약품등 잔류성 시험지침[21]의 기준을 충족하였다. LC-MS/MS를 이용하여 TML의 잔류를 분석한 연구들에서, Zhang 등

Table 1. Recovery and precision of tiamulin spiked into poultry tissues

Tissue	Concentration (µg/kg)	Recovery (%)			Mean recovery (mean ± SD, %)	CV (%)
		No. 1	No. 2	No. 3		
Muscle	0.1	112	90	87.7	96.6 ± 13.4	13.89
	10	90.2	95.1	84.4	89.9 ± 5.4	5.96
	100	93.0	90.8	90.7	91.5 ± 1.3	1.42
Liver	0.1	113	117	120	116.7 ± 3.5	3.01
	10	115	110	110	111.7 ± 2.9	2.59
	100	110	102	108	106.7 ± 4.2	3.9
Kidney	0.1	119	110	98.0	109.0 ± 10.5	9.67
	10	101	116	106	107.7 ± 7.6	7.09
	100	119	114	107	113.3 ± 6.0	5.32
Fat	0.2	90.0	89.5	87.5	89.0 ± 1.3	1.49
	20	95.5	83.0	91.5	90.0 ± 6.4	7.09
	200	103	98.0	89.5	96.8 ± 6.8	7.05

CV = (standard deviation/mean) × 100.
SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

Table 2. Tiamulin concentration in poultry tissues of treatment groups on day before treatment and at 1, 3 and 5 days after oral administration of tiamulin for 10 days (unit: concentration, µg/kg)

Tissues	No.	0*		1*		3*		5*	
		TML-1	TML-2	TML-1	TML-2	TML-1	TML-2	TML-1	TML-2
Muscle	1	< LOQ	0.4	< LOQ					
	2	< LOQ	0.5	< LOQ					
	3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Mean ± SD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Liver	1	< LOQ	2.1	0.5	< LOQ				
	2	< LOQ	4.5	< LOQ					
	3	< LOQ	1.2	< LOQ					
	4	< LOQ	0.8	< LOQ					
	5	< LOQ	0.4	< LOQ					
	6	2	0.5	< LOQ	11.4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Mean ± SD	< LOQ	1.6 ± 1.6	< LOQ					
Kidney	1	< LOQ	1.3	< LOQ					
	2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	4	< LOQ	0.3	< LOQ					
	5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Mean ± SD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Fat	1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	Mean ± SD	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

TML, tiamulin, TML-1, orally administered with TML 39 mg/kg feed for 10 days; TML-2, orally administered with TML 195 mg/kg feed for 10 days; LOQ, limit of quantitation (muscle, liver, kidney, 0.1 µg/kg; fat, 0.2 µg/kg); SD, standard deviation.

*Time after treatment (day): at the point after termination of test product-administration.

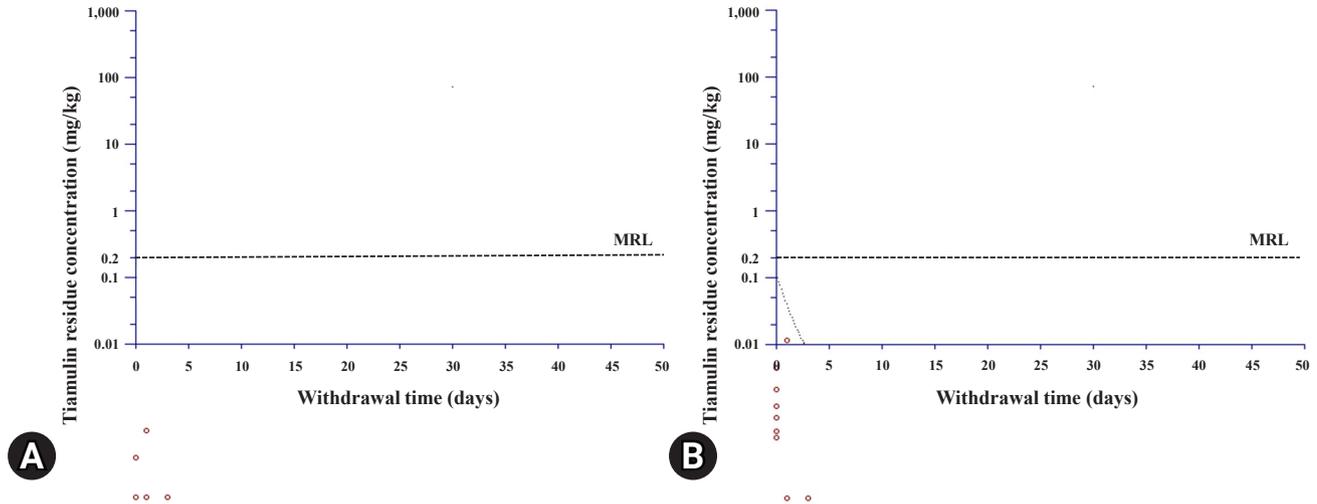


Fig. 3. Withdrawal period of tiamulin (TML) in liver samples of broiler chickens orally administered with TML 39 (A) and 195 mg/kg feed (B) for 10 days. MRL, maximum residue limit.

[23]은 가금 근육에서 TML에 대한 LOD와 LOQ가 각각 0.3과 2.0 µg/kg이었다고 보고하였으며, Yamada 등[25]은 가금 근육에서 TML의 LOD와 LOQ가 각각 0.2와 0.5 µg/kg이었다고 보고하였으며, Patyra 등[27]은 가축 사료에서 TML의 LOD와 LOQ가 각각 92.2와 128.0 µg/kg이었다고 보고하였다. 본 연구에서 TML의 LOD와 LOQ는 앞선 연구들에 비해 모두 낮게 나타나, TML에 대한 검출감도가 높은 것으로 나타났다.

농림축산검역본부의 동물용의약품 등 잔류성 시험지침에 따르면 [21], 0.1 µg/kg 이하의 농도에서, 회수율과 CV는 각각 50-120%와 35% 이하이어야 하며, 1-10 µg/kg 농도에서, 회수율과 CV는 각각 60-120%와 30% 이하이어야 하며, 10-100 µg/kg 농도에서, 회수율과 CV는 각각 70-110%와 20% 이하이어야 한다고 분석법의 요건을 정하고 있다. 본 연구에서 TML (0.1-100 µg/kg)의 회수율과 CV는 각각 83.0-120.0%와 1.42-9.67%로 나타나, 동물용의약품등 잔류성 시험지침[21]에서 제시한 분석법 요건을 모두 만족하였다. 가금 조직 중 TML의 회수율과 CV의 범위는, Zhang 등[23]의 연구에서는 각각 73.3-76.8%와 6.5-10.0%였으며, Yamada 등[25]의 연구에서는 각각 81.5%와 12.7%였으며, Patyra 등[27]의 연구에서는 각각 116.5%와 6.97-19.53%였다고 보고하였다. 본 연구의 회수율은 앞선 연구결과들과 유사하였으며, CV는 Zhang 등[23]의 연구결과와 비슷하였으나, Yamada 등[25]과 Patyra 등[27]의 연구결과보다는 낮게 나타났다.

Vinothini 등[28]은 육계에 TML을 체중 kg 당 40 mg을 사료에 혼합하여 3일 동안 투여한 후, 1, 3, 5일째에 근육, 간, 피부/지방 시료를 채취하여 TML의 잔류 농도를 분석한 결과, 약제 투여 후, 1일째에 근육, 간, 피부/지방 시료 중 TML 농도는 각각 0.25, 2.6, 0.03 mg/kg이었으며, 3일째에는 간 시료에서 만 0.11 mg/kg이었으며,

5일째에는 모든 시료에서 LOQ 미만으로 검출되었다고 보고하였다. Ciucă 등[12]은 육계에 TML을 체중 kg 당 20 mg씩을 7일 동안 강제 경구 투여한 후, 1, 3, 7일째에 근육, 간, 피부/지방 조직을 채취하여 TML의 잔류 농도를 LC-MS/MS로 분석한 결과, 1일째에 근육, 간, 피부/지방 조직 중 TML 농도는 각각 91.2, 462.8, 121.0 µg/kg이었으며, 3일째에 근육, 간, 피부/지방 조직 중 TML 농도는 각각 37.8, 164.8, 49.0 µg/kg이었고, 7일째에 근육, 간, 피부/지방 조직 중 TML 농도는 각각 20.1, 100.8, 21.1 µg/kg이었다고 보고하였다. Elazab 등[13]은 오리에 TML을 체중 kg 당 40 mg을 3일 동안 강제 경구 투여한 후, 1, 3, 5, 7, 9일째에 근육, 간, 지방 시료를 채취하여, TML의 농도를 분석한 결과, 1일째에 근육, 간, 지방 조직 중 TML 농도는 각각 0.89, 3.62, 0.28 mg/kg이었으며, 3일째에 근육, 간, 지방 조직 중 TML 농도는 각각 0.31, 1.48, 0.05 mg/kg이었고, 5일째에 근육과 간 조직 중 TML 농도는 각각 0.04와 0.73 mg/kg이었으며, 약제 투여 후 7일째에는 간 조직에서 만 TML이 0.17 mg/kg으로 검출되었다고 보고하였다. 앞선 연구들은 모두 본 연구에서 투여한 TML의 용량과 비교하여 고용량의 TML을 투여하였으나, 본 연구에서와 같이 간 조직에서의 TML 잔류 농도가 다른 조직들에 비해 더 높게 더 오랫동안 검출되었다. 본 연구의 TML-2와 유사한 농도를 투여한 Ciucă 등[12]의 연구결과에서, 약제 투여 후 1일째에 간 조직의 TML 잔류 농도는 본 연구결과에 비해 높게 나타났다. 이러한 결과는 대상 육계의 종류, 체중의 차이, TML의 잔류분석법의 차이로부터 기인한 것으로 추정된다.

본 연구에서 사료 kg 당 TML을 39와 195 mg을 혼합하여 육계에 10일 동안 투여하고, 조직 시료를 채취하여 TML의 잔류분석 결과를 바탕으로 설정한 적정휴약기간이 모두 0일이었다. 투약 종료시점에 TML-2의 간 조직 중 TML 잔류 농도는 TML-1에 비해 높았

으나, 투약 종료 후 1일째에는 TML-1과 TML-2의 간 조직에서 LOQ 이상으로 검출된 시료수는 모두 1 개씩이었으며, 투약 종료 후 3일째에는 TML-1과 TML-2의 모든 조직들의 TML 농도가 LOQ 미만으로 나타나, TML-1과 TML-2의 잔류휴약기간이 동일하게 0일로 나타났다. Vinothini 등[28]은 육계에 TML을 체중 kg 당 40 mg을 사료에 혼합하여 3일 동안 투여한 결과, 육계의 식용 조직 중 잔류휴약기간은 5일 이하라고 보고하였다. Ciucă 등[12]은 육계에 TML을 체중 kg 당 20 mg씩을 7일 동안 강제로 경구 투여한 결과, 육계의 식용 조직 중 잔류휴약기간은 3일 이하라고 보고하였다. 하지만 농림축산검역본부 동물용의약품관리시스템에서[29], TML 함유 약제를 최대 권장용량(TML 39 g/kg feed)으로 투여할 경우, 가금의 식용 조직에서 잔류휴약기간을 7일로 설정하고 있다. 본 연구에서 권장용량을 투여한 경우, TML의 육계 조직 중 잔류휴약기간은 앞선 연구들과 비교하여 낮게 설정되었다.

이상의 연구결과로부터, 본 연구에서 육계의 식용 조직 중 TML의 잔류분석에 사용한 분석법의 회수율, CV, 검출감도 등은 농림축산검역본부의 동물용의약품 등 잔류성 시험지침[21]의 기준을 모두 충족하였다. 또한 본 연구에서 산출된 육계 조직 중 TML의 잔류휴약기간은 시험약제에 설정되어 있는 잔류휴약기간보다 짧게 평가되어, 육계에 대한 TML 함유 약제의 투여 시 출하시기를 단축시킬 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgments

This study was supported by Livestock Health Control Association.

ORCID

Woo H. Kim, <https://orcid.org/0000-0002-6874-6787>

Jun Young Kim, <https://orcid.org/0009-0004-7222-8351>

Kwang Il Park, <https://orcid.org/0000-0002-0199-8090>

Yeung Bae Jin, <https://orcid.org/0000-0001-6783-7970>

Suk Kim, <https://orcid.org/0000-0003-3474-9047>

Hu-Jang Lee, <https://orcid.org/0000-0002-7552-6416>

References

- Lee GI, Han HS, Son EY. Analysis of Trends in Korean Food Consumption. pp. 17-22, Korea Rural Economic Institute, Naju, 2007.
- Piras C, Roncada P, Rodrigues PM, Bonizzi L, Soggiu A. Proteomics in food: quality, safety, microbes, and allergens. *Proteomics* 2016;16:799-815.

- Beyene T. Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. *J Vet Sci Technol* 2016;7:1-7.
- Robles-Jimenez LE, Aranda-Aguirre E, Castelan-Ortega OA, Shettino-Bermudez BS, Ortiz-Salinas R, Miranda M, Li X, Angeles-Hernandez JC, Vargas-Bello-Pérez E, Gonzalez-Ronquillo M. Worldwide traceability of antibiotic residues from livestock in wastewater and soil: a systematic review. *Animals (Basel)* 2021;12:60.
- Baynes RE, Dedonder K, Kissell L, Mzyk D, Marmulak T, Smith G, Tell L, Gehring R, Davis J, Riviere JE. Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food Chem Toxicol* 2016;88:112-122.
- Jeong SH, Kang D, Lim MW, Kang CS, Sung HJ. Risk assessment of growth hormones and antimicrobial residues in meat. *Toxicol Res* 2010;26:301-313.
- Malekinejad H, Rezabakhsh A. Hormones in dairy foods and their impact on public health: a narrative review article. *Iran J Public Health* 2015;44:742-758.
- Park S, Yun H, Lee K. Synergistic effects of oxytetracycline and tiamulin against swine respiratory bacteria and their pharmacokinetics in the pigs. *Korean J Vet Res* 2002;42:45-54.
- Xiao X, Sun J, Yang T, Fang X, Cheng J, Xiong YQ, Liu YH. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profiles of tiamulin in an experimental intratracheal infection model of mycoplasma gallisepticum. *Front Vet Sci* 2016;3:75.
- Poulsen SM, Karlsson M, Johansson LB, Vester B. The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Mol Microbiol* 2001;41:1091-1099.
- Islam KM, Klein U, Burch DG. The activity and compatibility of the antibiotic tiamulin with other drugs in poultry medicine: a review. *Poult Sci* 2009;88:2353-2359.
- Ciucă VC, Rusănescu CO, Safta VV. Analysis of transfer of tiamulin to animal tissue after oral administration: an important factor for ensuring food safety and environmental protection. *Pharmaceuticals (Basel)* 2023;16:387.
- Elazab ST, Elshater NS, Hashem YH, Park SC, Hsu WH. Tissue residues and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of tiamulin against mycoplasma anatis in ducks. *Front Vet Sci* 2020;7:603950.
- Committee for Veterinary Medicinal Product. Tiamulin (extension to rabbits). Summary report (2). EMEA/MRL/724/00-Final [Internet]. European Agency for the Evaluation of

- Medicinal Products, London, 2000 [cited 2023 May 8]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/tiamulin-extension-rabbits-summary-report-2-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf.
15. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Food code. Appendix 5. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Food-(162) Tiamulin. MFDS, Cheongju, 2022.
 16. Oh JH, Kwon CH, Jeon JS, Choi D. Management of veterinary drug residues in food. *Korean J Environ Agric* 2009;28:310–325.
 17. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Press Release: Reinforcement of Veterinary Drug Residue Management for Livestock and Fishery Products. MFDS, Cheongju, 2020.
 18. Animal and Plant Quarantine Agency (APQA). Press Release: Preliminary Preparation for the Introduction of the Positive List System for Livestock Products. APQA, Gimcheon, 2022.
 19. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Food Code. Chapter 8. General Test methods. 8. Residue Analytical Methods for Veterinary Drugs in Food. 8.3.5. Novobiocin and Tiamulin. MFDS, Cheongju, 2022.
 20. Cha CN, Park EK, Yoo CY, Lee SJ, Son SE, Kim S, Lee HJ. Development of an analytical method for the determination of dexamethasone in bovine milk using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Food Hyg Saf* 2017;32:418–423.
 21. Animal and Plant Quarantine Agency (APQA). Press Release: Preliminary Preparation for the Introduction of the Positive List System for Livestock Products. APQA, Gimcheon, 2022.
 22. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Determination of Withdrawal Periods for Milk. EMA, Amsterdam, 2022.
 23. Zhang M, Li E, Su Y, Zhang Y, Xie J, He L. Quick multi-class determination of residues of antimicrobial veterinary drugs in animal muscle by LC-MS/MS. *Molecules* 2018;23:1736.
 24. Chen HC, Cheng SH, Tsai YH, Hwang DF. Determination of tiamulin residue in pork and chicken by solid phase extraction and HPLC. *J Food Drug Anal* 2006;14:80–83.
 25. Yamada R, Kozono M, Ohmori T, Morimatsu F, Kitayama M. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:54–65.
 26. Codex Alimentarius. Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programme Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals CAC/GL 71. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2009.
 27. Patyra E, Nebot C, Gavilán RE, Cepeda A, Kwiatek K. Development and validation of multi-residue and multi-class method for antibacterial substances analysis in non-target feed by liquid chromatography: tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2018;35:467–478.
 28. Vinothini P, Ramesh S, Sooraj Nair V, Preetha SP, Sriram P. Pharmacokinetics and relative bioavailability of tiamulin in broiler chicken as influenced by different routes of administration. *J Vet Pharmacol Ther* 2019;42:447–451.
 29. Animal and Plant Quarantine Agency (APQA). Veterinary Drugs Management System: Electronic Civil Complaint Application. APQA, Gimcheon, 2022.