LC-MS/MS를 이용한 축산물 중 clenbuterol과 ractopamine의 동시 분석법 개선

조윤제 · 채영식 · 김재영 · 김형수 · 강일현 · 도정아 · 오재호 · 권기성 · 장문익*
식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 화학물질과

Improvement of an Simultaneous Determination for Clenbuterol and Ractopamine in Livestock Products using LC-MS/MS

Yoon-Jae Cho, Young-Sik Chae, Jae-Young Kim, Hyung-Soo Kim, Ilhyun Kang,
Jung-Ah Do, Jae-Ho Oh, Kisung Kwon, and Moon-Ik Chang*

Food Chemical Residues Division, Department of Food Safety Evaluation,
National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea Food and Drug Administration

Abstract Clenbuterol and ractopamine, which are β -agonists, have been misused as a growth promoting agent in meat producing animals. Clenbuterol was banned for veterinary drug in Korea because of its problems regarding safety. Due to their adverse effects, such as cardiovascular and central nervous diseases on human health proper control and monitoring should be conducted. The existing analytical method of clenbuterol and ractopamine in the Food code was improved through our present study. The bovine muscle samples were subjected to enzymatic hydrolysis, extracted with ethyl acetate and defatted by hexane-methanol partitioning. A molecular imprinted polymer (MIP) solid phase extraction cartridge was used for clean-up and LC-MS/MS was operated in positive multiple reaction monitoring (MRM). Clenbuterol- d_3 and ractopamine- d_3 were used as an internal standard. The renewed method was validated according to the CODEX guideline. The limits of quantitation for clenbuterol and ractopamine were 0.2 and 0.5 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The mean recoveries ranged in 104.2-113.5% for clenbuterol and in 107.6-118.1% for ractopamine. The improved method was able to save both time and expenses.

Keywords: clenbuterol, ractopamine, beef, pork, LC-MS/MS

서 론

경제발전과 생활수준의 향상으로 인하여 사람들은 건강을 고려한 ‘절대적 안전식품’을 요구하고 있으나 식품과학의 발달로 인한 조리 기구 및 용기에 관련된 신소재 개발과 새로운 유해물질의 검출 등으로 주요 외국에서는 이러한 물질들에 대한 기준·규격을 강화하고 있다(1-4). 이와 같은 화학적 유해물질 중 하나인 잔류동물용의약품의 경우도 최근 국제적으로 국제식품규격위원회(CODEX) 및 유럽연합(EU) 등에서 기준이 엄격해짐에 따라 낮은 농도의 정량한계가 함께 요구되고 있으며(5,6), 기준이 급격히 증가됨에 따라 안전관리를 위한 분석법 개발 및 오래전에 확립되어 효율성이 낮은 분석법에 대한 개선이 반드시 필요한 실정이다. 이에 발맞추어 국내의 경우에도 2007년부터 약 50여종의 분석법이 신설되기 시작하여(7) 2012년 현재까지 약 100여개

의 분석법이 개발되었고(8), 고상추출법(solid-phase extraction)에 의한 정제법 및 액체크로마토그래피/질량분석기(LC-MS/MS, liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry(tandem mass spectrometry))를 이용하여 분석의 효율성 및 신뢰성을 증대시킨 분석법 개발이 확대되는 추세이며(9), 분석기기의 검출감도와 더불어 분석 재현성의 저하 등의 이유로 식품공전의 분석법 중 추출효율이 낮은 분석법들을 개선하여 분석효율을 증가시키고 분석법을 현대화하는데 주력하고 있다(10).

현재 식품공전에 고시된 클렌부테롤(clenbuterol) 및 락토파민(ractopamine) 분석법은 동일한 β -agonist 계열로서 분석원리가 매우 유사하나(11,12), 개별 분석법으로 수제되어 있을 뿐만 아니라 시간과 경제적인 측면에서 낮은 효율성을 나타내고 있기 때문에 개선이 필요한 분석법이다.

클렌부테롤과 락토파민은 β -agonist 또는 β -adrenergic agonist 계열 물질로 phenethanolamine 합성으로 만들어지며, 구조적으로 유사성을 가진다. β -Agonist 계열 물질들은 축산식품에서 단백질 증가 및 성장을 촉진하고 지방조직의 불순물을 감소시키는 카테콜아민, 도파민, 노르에피네프린 그리고 에피네프린 같은 작용을 하지만 독성연구 결과, 중추신경계나 심혈관 질환의 원인으로 국민 건강에 위해가 될 수 있다(13-15). 이에 클렌부테롤은 2001년 미국에서 개최된 13차 CODEX CCRVDF에서 치료용 이외의 사용을 금지하였고, 우리나라에서도 2007년부터 사용금지 품목으로 관리하고 있으며(7), 락토파민의 경우에도 EU에서 전면 사용이

*Corresponding author: Moon-Ik Chang, Food Chemical Residues Division, Department of Food Safety Evaluation, National Institute of Food & Drug Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Chungbuk 363-700, Korea
Tel: 82-43-719-4204
Fax: 82-43-719-4200
E-mail: 1004@korea.kr
Received November 29, 2012; revised January 19, 2013;
accepted January 21, 2013

금지된 물질로 관리하고 있다(16). 이러한 β -agonist 계열 물질은 검출유무 판별이 반드시 필요하며, 이미 많은 연구를 통해 보고되어 있지만(13,16-23), 본 연구와 같이 β -agonist 전용 고체상 카트리지인 MIP(molecular imprinted polymer)를 적용하여 분석한 사례는 몇몇 연구에 국한되며(21-23), 국내의 기준 및 실정에 맞는 잔류 분석법의 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 시간적, 경제적인 측면에서 비효율적인 기존 클렌부테롤 및 락토파민 분석법을 검토하고, 이 두 분석법에 대한 전처리, 추출 및 정제 등의 과정을 통일하여, 검출능이 뛰어나면서 고감도 정량 및 정성 분석이 가능한 LC-MS/MS를 이용하여 기존 분석법보다 빠르고 정확하며, 현장재현성을 증대시킬 수 있는 동시 분석법을 개발 및 개선하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

시료는 시중에서 유통되고 있는 쇠고기 및 돼지고기를 구입하여 사용하였다. 대상 시료는 구입 후 먹서기로 근육을 마쇄하여 균질화한 후 20 g 단위로 소분하여 분석 전까지 냉동실(-20°C)에 보관하면서 사용하였다.

시약 및 재료

클렌부테롤(clenbuterol hydrochloride, 99.8%)과 락토파민(ractopamine, 99.8%)의 각 표준품은 Dr. Ehrenstorfer GmbH사(Augsburg, Germany)로부터 구입하여 사용하였으며, 내부 표준물질로는 clenbuterol- d_9 (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany)과 ractopamine- d_3 (Dr. Ehrenstorfer(CDN-ISOTOPES, Quebec, Canada)을 사용하였다. 표준용액은 메탄올(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하여 제조하였으며, 그 구조는 Fig. 1에 나타내었다.

액체크로마토그래피 이동상 및 전처리용 시약으로는 에틸아세테이트, 아세토니트릴, 메탄올, n -헥산의 경우 HPLC급 시약(Merck, Darmstadt, Germany)을, 분해효소제는 베타-글루쿠로니다아제(β -

glucuronidase: Merck, Darmstadt, Germany)를 구입하여 사용하였다. 또한, 초산암모늄, 염화나트륨, 무수황산나트륨, 수산화나트륨 등은 특급 시약(Wako, Osaka, Japan)을 구입하여 사용하였다. 분석에 사용한 고상추출 카트리지(SPE)는 MIP 카트리지(molecular imprinted polymer: Supel MIP Beta-Agonist LRC Column(25 mg, 10 mL), Supelco, Bellefonte, PA, USA)를 이용하였으며, 활성화 과정을 거쳐 추출물을 흡착시킨 후 용출하는 과정에 사용하였다.

표준용액의 조제

클렌부테롤 및 락토파민 표준물질과 클렌부테롤- d_9 및 락토파민- d_3 내부 표준물질 적당량을 각각 정밀히 달아 메탄올에 녹였으며, 이를 100 $\mu\text{g/mL}$ 표준원액으로 조제하였다. 내부 표준물질 표준원액은 메탄올로 희석하여 클렌부테롤- d_9 의 경우 40 ng/mL, 락토파민- d_3 은 100 ng/mL로 조제하여 내부 표준용액으로 사용하였다. 표준물질의 표준용액은 표준원액을 메탄올로 희석하여 농도별로 시험관에 취한 후, 각각 내부 표준용액 100 μL 를 넣고 질소 농축한 후 이동상 A 용액인 10 mM 초산암모늄(pH 4.3):아세토니트릴(95:5, v/v) 2 mL에 녹여 조제하였다. 표준원액과 표준용액은 모두 갈색병에 담아 4°C 냉장실에 보관하면서 실험 직전에 희석하여 사용하였다.

시료 전처리

균질화한 시료 5 g을 50 mL 원심분리관에 취해 각각의 내부표준용액 100 μL 를 넣고, 0.2 M 초산 암모늄완충용액(pH 5.2) 10 mL, 포화염화나트륨 2 mL 및 분해효소제 100 μL 를 가한 후, 37°C 에서 12시간 반응시켰다. 반응 후 5 M 수산화나트륨용액을 사용하여 pH 12로 조정된 뒤, 이 용액에 에틸아세테이트 10 mL를 가하여 진탕하고 6,000 $\times g$ 에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 여기에 에틸아세테이트 10 mL를 가해 추출을 재 반복한 후 상층액을 모아 55°C 수욕 상에서 감압 농축 하였다. 여기에 20 mL 메탄올 포화 헥산 용액으로 재 용해한 후, 분액 여과에 옮긴 뒤 20 mL 헥산 포화 메탄올 용액을 첨가하여 3분간 진탕 한 후, 분

Fig. 1. The chemical structures of clenbuterol and ractopamine.

Fig. 2. Analytical procedure for clenbuterol and ractopamine residues in sample.

리된 하층액은 무수황산나트륨에 통과시켰으며, 이 과정을 재 반복한 뒤, 하층액을 모아 55°C 수욕 상에서 감압 농축하였다. 잔류물은 0.025 M 초산암모늄 용액 2 mL로 재용해한 후, 미리 메탄올 1 mL, 물 1 mL 및 0.025 M 초산암모늄용액 1 mL로 활성화시킨 MIP 카트리지에 추출액을 흡착시켰다. 이에 메탄올 1 mL를 넣어 카트리지를 세척한 후 메탄올:초산(9:1, v/v) 용액 5 mL로 용출하였다. 용출액은 50°C에서 질소 농축하고 잔류물은 10 mM 초산암모늄(pH 4.3):아세트니트릴(95:5, v/v) 용액 2 mL에 녹인 후 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다(Fig. 2).

기기 분석 조건

락토파민과 클렌부테롤의 동시 분석법을 확인하기 위하여 액체크로마토그래피-질량분석기(Thermo Finnigan TSQ Quantum Ultra, Waltham, USA)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 XBridge C₁₈(2.1 mm×150 mm, 3.5 µm; Waters, Dublin, Ireland), 컬럼 온도는 40°C, 이동상으로는 용매 A-10 mM 초산암모늄(pH 4.3):아세트니트릴(95:5, v/v)과 용매 B-아세트니트릴을 이용하여 Table 1의 기울기 용매 조건으로 분석하였으며, 유속은 0.2 mL/min 속도로 유지시켰고, 주입량은 10 µL로 하였다(Table 1).

질량분석기 조건을 확립하기 위해서 각각의 분석물질은 표준물질을 사용하여 컬럼을 통과하지 않고 직접 텐덤 질량분석기로 분석하였다. 전기 분무 이온화(ESI: electrospray ionization)의 양이온(+, positive) 모드에서 각 물질별 모분자(precursor ion)를 선택하고 충돌 에너지(collision energy)를 최적화하여 딸분자(product ion)를 생성한 후 정성 및 정량 이온을 결정하는 MRM(multiple reaction monitoring) 모드로 조건을 설정하여 분석하였다(Table 1).

분석법 검증

최종적으로 쇠고기와 돼지고기 시료에 대하여 개선된 클렌부테롤과 락토파민의 분석법을 CODEX guideline에 준하여(24) 직

선성(linearity), 회수율, 정량 한계(LOQ, limit of quantification), 재현성(reproducibility) 등으로 유효성 검증을 실시하였다. 또한, 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS/MS)를 보유한 특정 실험실 2곳을 선정하여 동일한 전처리 과정과 분석 조건으로 5 반복 이상 분석을 통해 정확성과 정밀성을 평가하는 방법으로, 실험실간 검증을 수행하였다.

쇠고기 및 돼지고기 시료로부터 클렌부테롤의 경우는 0.2-8.0 µg/kg, 락토파민의 경우 0.5-20.0 µg/kg의 농도에 대한 각각의 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 각 검량선의 상관 계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 또한, 정량 한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 하였다. 이에 대한 분석법의 정확성을 평가하기 위하여 잔류허용기준(MRL)이 설정되어 있는 락토파민의 경우 0.5배, 1배 및 2배 MRL(0.005, 0.01 및 0.02 mg/kg) 농도로 회수율을 측정하였고, 불검출 기준으로 설정된 클렌부테롤의 경우에는 1, 2 및 5배 LOQ(0.2, 0.4, 1 µg/kg) 농도로 회수율을 측정하였다. 분석 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 비교하고, 내부표준물질 락토파민-d₃의 m/z 107 이온에 대한 락토파민 m/z 284 이온, 클렌부테롤-d₃의 m/z 203 이온에 대한 클렌부테롤 m/z 203 이온의 면적비를 구하였으며, 검량선의 상관성을 통해 시험용액 중의 클렌부테롤 및 락토파민 함량을 확인함으로써 회수율을 구하였고, 5반복 실험을 통해 정확성과 정밀성을 평가하였다.

결과 및 고찰

분석법의 최적 조건 확립

식품공전에 고시된 클렌부테롤과 락토파민의 분석법은 지방 및 불순물을 제거하기 위하여 헵탄을 사용하였다(11,12). 하지만 본 연구에서는 헵탄을 대체하여 메탄올 포화 헥산 및 헥산 포화 메탄올을 이용함으로써 액-액 분배 효율을 더욱 향상시켰다. 이동

Table 1. Instrument conditions for the analysis of clenbuterol and ractopamine

Parameter	Condition		
LC	Thermo Accela High Speed LC		
Column	XBridge C ₁₈ (2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Column temperature	40°C		
	A: 10 mM ammonium acetate (pH 4.3) : acetonitrile (95 : 5, v/v)		
	B: acetonitrile		
Mobile phase	min	A (%)	B (%)
	1	100	0
	2	100	0
	6	10	90
	8	0	100
	10	0	100
	11	100	0
	15	100	0
Mass Spectrometry	Thermo TSQ Vantage		
Ionization mode	ESI (positive ion electrospray)		
Spray voltage	4.8 kV		
Sheath gas	N ₂ (35 psi)		
Capillary temperature	350°C		
Auxiliary gas	N ₂ (50 psi)		
Collision gas	Air		
Collision energy	Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Collision energy
	Clenbuterol	277-203	15
		277-259	10
	Clenbuterol-d ₉	286-204	16
		286-268	16
	Ractopamine	302-107	29
		302-284	10
	Ractopamine-d ₃	305-107	32
		305-124	21

상의 경우는 0.1% 개미산:아세트니트릴(80:20, v/v)과 아세트니트릴 함유 10 mM 아세트산암모늄(pH 4.3):아세트니트릴(80:20, v/v)을 등용매 분석으로 시험한 결과, 모두 적당한 머무름 시간과 좋은 피크모양을 보였으나 저감도로 분석되었고, 10 mM 아세트산암모늄(pH 4.3):아세트니트릴(95:5, v/v)(A)과 아세트니트릴(B)의 두 용매를 기울기 분석으로 시험한 결과, 알맞은 머무름 시간과 피크 모양 그리고 높은 감도로 분석되어 이동상으로 선택하였다. β-Agonist 계열의 SPE 추출은 기존 연구에 따르면 alumina A(17), HCX(18), HLB(19), MCX(20), MIP(21-23) 및 PCX(13)등이 이용되고 있는데, 식품공전에 고시된 기존 분석법에서도 클렌부테롤의 경우 HLB, 락토파민의 경우 MIP를 이용하고 있다(11,12). 이렇게 다양한 카트리지를 동시 분석법에는 모두 적용할 수 없기 때문에 본 연구에서는 β-agonist 전용인 MIP 카트리지를 선택하여 적용하였다. MIP 카트리는 β-agonist계열 물질을 선택적으로 결합하고, 높은 안정성을 나타내는 특성이 있을 뿐만 아니라, 분석 시 불필요한 중합체들을 충전제에서 제거하여 분석 물질의 분석효율을 증대시키는 기능이 있다. 따라서 β-agonist계열 물질인 클렌부테롤 및 락토파민의 정제 과정에서 높은 효율을 보일 것으로 판단되어 분석에 적용하였다(25). 한편, 내부표준

물질은 기존 분석법에서 두 가지 적용물질 모두 클렌부테롤-d₉을 사용하였지만, 락토파민의 경우는 물리화학적 특성이 상이하여 분석에 많은 어려움이 존재하였다. 이러한 이유로 Blanka 등(16)의 분석법을 인용하여 물리화학적 특성이 유사한 듀테륨(deuterium) 물질인 락토파민-d₃을 적용함으로써 재현성 및 회수율을 증대시켰다. 또한, 고감도 정량 및 정성 분석이 가능한 LC-MS/MS 방법을 적용하여 보다 신속하고 효율적인 분석이 가능하게 하여 현장 재현성을 증대시킬 수 있도록 개선하였다.

분석법 크로마토그램

클렌부테롤과 락토파민의 내부표준물질로 클렌부테롤-d₉과 락토파민-d₃을 사용하였고, 모든 분석을 positive mode 조건 하에서 수행하였다. 그 결과, full scan mode에서 질량 스펙트럼을 확인하였고, precursor ion을 선택하여 product ion을 생성한 후 특징이온을 선택하여 최적의 MRM(multiple reaction monitoring) 조건을 확립하였다. 클렌부테롤은 product ion인 *m/z* 277에 collision energy 15 eV를 가해 정량이온 *m/z* 203를 얻었고, collision energy 10 eV를 가해 확인이온 *m/z* 259를 얻었다. 클렌부테롤-d₉는 product ion인 *m/z* 286에 collision energy 16 eV를 가해 정량이온 *m/z* 204

 Fig. 3. Precursor ion spectra and product ion spectra of clenbuterol (A), clenbuterol-d, (B), ractopamine (C), and ractopamine-d₃ (D).

Fig. 4. LC-MS/MS analysis of clenbuterol and ractopamine in blank beef (A) and pork muscle (B).

와 확인이온 m/z 268을 얻었다. 락토파민은 product ion인 m/z 302에 collision energy 10 eV를 가해 정량이온 m/z 284를 얻었고, collision energy 29 eV를 가해 확인이온 m/z 107을 얻었다. 락토파민- d_3 은 product ion인 m/z 305에 collision energy 32 eV를 가해 정량이온 m/z 107을 얻었고, 21 eV collision energy를 가해 확인이온 m/z 124를 얻었다. 분자구조로 살펴보면 락토파민의 경우, hydroxyl기 및 benzylic hydroxyl 그룹이 이탈되어 각각 m/z 284 및 107 fragment ion에서 최적의 감도를 확인할 수 있었다. 아울러 클렌부테롤은 benzylic hydroxyl 그룹으로부터 hydroxyl기가 이탈되고, amine group에 인접한 일부분의 isobutene이 이탈되어 각각 m/z 203 및 259 fragment ion에서 최적의 감도를 확인할 수 있었다. 따라서 각각의 fragment ion을 MRM 모드에 적용하여 분석하였다(Fig. 3)(26).

특이성 및 검량곡선

본 연구의 분석 조건에 대한 특이성(specificity)을 검증하기 위해, blank test를 한 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 클렌부테롤 및 락토파민의 머무름 시간대에 blank 검체의 경우에는 어떠한 방해 물질도 검출되지 않은 결과를 나타내어 본 분석법의 높은 분리능과 선택성을 가짐을 확인하였다.

락토파민과 클렌부테롤의 직선성(linearity)을 구하기 위하여 표

준용액을 농도별로 시험관에 취하고 각각 내부표준용액 100 μ L를 넣고 질소 농축한 후 이동상 2 mL에 녹인 시험용액을 각각 질량분석기에 주입하여 특정이온을 확인했다. 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 비교하고, 내부표준물질 락토파민- d_3 의 m/z 107 이온에 대한 락토파민 m/z 284 이온, 클렌부테롤- d_9 의 m/z 203 이온에 대한 클렌부테롤 m/z 203 이온의 면적비를 구하고 검량선을 작성하여 시험용액 중 락토파민과 클렌부테롤의 함량을 구하였다. Commission Decision 2002/657/EC에 따르면, 금지된 물질의 경우 최소 한 개의 모분자와 두 개의 딸이온으로 확인시험을 요구하고 있는데(27), 본 연구에서는 이에 부합한 클렌부테롤 및 락토파민과 내부 표준물질로서 클렌부테롤- d_9 와 락토파민- d_3 의 확인시험을 수행하였다.

그 결과, 클렌부테롤 및 락토파민의 직선성(linearity)은 각각 0.5, 1, 2.5, 5, 10 및 20 μ g/kg, 0.2, 0.4, 1, 2, 4 및 8 μ g/kg 범위에서 상관계수(r^2) 0.999인 높은 직선성을 나타내었으며(Table 2), 이는 CODEX에서 권장하는 $r^2 > 0.95$ 에 적합하여(24) 매우 만족할만한 수준의 결과를 나타내었다.

정량한계 및 회수율

클렌부테롤과 락토파민의 정량한계는 크로마토그램 상에서 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 하였다. 분석법의 정확성

Table 2. Standard curve ranges, linearities and correlation coefficients (r^2) of clenbuterol and ractopamine

Compounds	Matrixs	Standard curve range ($\mu\text{g/kg}$)	Linearity	r^2
Clenbuterol	Beef	0.2-8.0	$y=49.869x-0.0454$	0.999
	Pork		$y=49.881x-0.0480$	0.999
Ractopamine	Beef	0.5-20.0	$y=25.845x-0.0216$	0.999
	Pork		$y=25.486x-0.0751$	0.999

Table 3. Recoveries, CVs and LOQs of clenbuterol and ractopamine in beef and pork

Compounds	Samples	Fortification level (mg/kg)	Recovery ¹⁾ (%)	CV (%)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
Clenbuterol	Beef	0.0002	106.6 $\pm$ 4.2	4.0	0.2
		0.0004	105.8 $\pm$ 4.4	4.2	
		0.001	104.2 $\pm$ 4.2	4.0	
	Pork	0.0002	109.5 $\pm$ 11.5	10.5	
		0.0004	113.5 $\pm$ 7.9	6.9	
		0.001	106.1 $\pm$ 2.9	2.8	
Ractopamine	Beef	0.005	112.3 $\pm$ 2.6	2.3	0.5
		0.01	111.2 $\pm$ 3.1	2.8	
		0.02	107.6 $\pm$ 1.7	1.6	
	Pork	0.005	112.8 $\pm$ 5.8	5.2	
		0.01	118.1 $\pm$ 2.4	2.0	
		0.02	114.2 $\pm$ 2.8	2.5	

¹⁾Mean values of five replicate with standard deviations**Table 4. Validation of analytical methods for clenbuterol and ractopamine in interlaboratory test**

Samples (Laboratory)	Ractopamine			Clenbuterol		
	Spiked Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery ¹⁾ (%)	CV (%)	Spiked Conc. ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery (%)	CV (%)
Beef (A)	5	98.3	5.9	0.2	101.2	4.8
	10	102.6	7.0		89.7	2.7
	20	93.5	8.3			
Beef (B)	5	89.6	6.0	0.2	114.5	5.0
	10	86.9	2.2	0.4	105.1	7.5
	20	90.1	5.6	2.0	108.9	7.2
Pork (A)	5	100.8	7.7	0.2	104.8	5.6
	10	101.0	5.1		92.7	9.6
	20	95.6	4.2			
Pork (B)	5	89.6	6.0	0.2	114.5	5.0
	10	86.9	2.2	0.4	105.1	7.5
	20	90.1	5.6	2.0	108.9	7.2

¹⁾Mean values of five replicate with standard deviations

을 평가하기 위하여 MRL이 설정된 락토파민의 경우 0.5, 1.0 및 2.0 MRL(0.005, 0.01 및 0.02 mg/kg)의 농도로, 불검출로 설정된 클렌부테롤의 경우에는 1.0, 2.0 및 5.0 LOQ(0.2, 0.4 및 1 $\mu\text{g/kg}$) 농도로 회수를 실험을 수행하였다. 분석 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 비교하고, 내부표준물질 락토파민- d_3 의 m/z 107 이온에 대한 락토파민 m/z 284 이온, 클렌부테롤- d_6 의 m/z 203 이온에 대한 클렌부테롤 m/z 203 이온의 면적비를 구하고 검량선을 통해 시험용액 중 락토파민과 클렌부테롤의 함량을 확인함으로써 회수율을 구하였으며, 5반복 실험하여 정확성과 정밀성을 평가하였다. 그 결과, 쇠고기에서의 클렌부테롤과 락토파민의 평균 회수율은 각각 104.2-106.6 및 107.6-112.3%였으며, 변동계수는 4.0-4.2 및 1.6-2.8%로 나타났다. 돼지고기에서는

평균 회수율이 106.1-113.5 및 112.8-118.1%, 변동계수가 2.7-10.5 및 2.0-5.2%로 나타나, 쇠고기와 돼지고기 모두 CODEX에서 설정한 회수율 및 변동계수에(24) 만족하는 결과를 나타내어 동시 분석법의 적합성을 확인할 수 있었다(Table 3). 또한, 기존에 보고된 연구 결과(13,17,20,21)보다 회수율이 더 향상된 분석법인 것으로 판단되었다.

실험실 간 분석법 검증

개선된 분석법인 클렌부테롤과 락토파민의 동시 분석법에 대한 실험실간 검증을 LC-MS/MS를 보유한 특정 실험실 2곳을 선정하여 동일한 전처리 과정 및 분석 조건으로 5회 이상 반복 실험을 수행하여 정확성과 정밀성을 평가하였다. 그 결과, 확립된

분석법의 회수율은 쇠고기 근육에서 클렌부테롤의 경우는 89.7-101.2%(A실험실) 및 105.1-114.5%(B실험실), 락토파민의 경우, 93.5-102.6%(A실험실) 및 86.9-90.1%(B실험실) 수준이었고, 돼지고기 근육에서 클렌부테롤 92.7-104.8%(A실험실) 및 105.1-114.5%(B실험실) 락토파민 95.6-101.0%(A실험실) 및 86.9-90.1%(B실험실)로 매우 만족할만한 수준으로 분석되었다(Table 4).

따라서 본 연구에서는 추출 효율과 재현성이 낮아 분석 시에 어려움이 있고, 각각 개별 분석법으로 나뉘어져 있어 시간적이나 경제적 측면으로 손실이 컸던 클렌부테롤 및 락토파민 분석법에 대한 문제를 통일시켜 해결하고자 한 결과, 쇠고기 및 돼지고기에 대한 효율적인 시료 전처리 방법과 최적의 정제 과정이 확립되었으며, 만족스러운 정밀성, 정확성 및 재현성을 나타내어 효과적인 동시 분석법으로 판단되었다. 따라서 클렌부테롤 및 락토파민의 동시 분석법은 국내·외 잔류동물용의약품 가이드라인에 맞추어 설정되었기 때문에, 축산 식품의 안전 확보에 기여할 뿐만 아니라, 잔류동물용의약품 안전 관리에 도움이 될 것으로 판단된다.

요 약

동물용의약품은 2007년부터 급격한 잔류허용기준 신설에 따라 많은 수의 분석법도 함께 신설하였으며, 국제식품규격위원회(CODEX), EU 등에서 동물용의약품에 대한 기준이 국제적으로 엄격해지고 있어, 낮은 농도의 정량한계 및 재현성이 높은 분석법이 요구되어지고 있다. 하지만 국내 식품공전에서 클렌부테롤 및 락토파민 분석법은 각각 개별 분석법으로 나뉘어져 있고, 시간적 및 경제적으로 손실이 있을 뿐 아니라 추출 효율 및 재현성이 낮아 분석에 어려움이 있다. 따라서 본 연구는 물리화학적 특성이 유사한 β -agonist계 동물용의약품인 클렌부테롤 및 락토파민의 기존 개별 분석법을 동시 분석법으로 개선하고 검사 효율성을 증대시키고자 하였다. 분석에 사용된 검체는 소와 돼지의 근육을 이용하였다. 검체에 내부표준물질인 클렌부테롤- d_3 과 락토파민- d_3 을 각각 첨가하고 β -글루쿠로니다제/아릴설파타제 효소를 사용하여 가수분해한 후 에틸아세테이트로 추출하였다. 추출액을 농축한 후 헥산과 메탄올을 포화시킨 용매를 적용하여 지방 제거과정을 거친 뒤 MIP 카트리지로 정제한 후 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS/MS)에 주입하였다. 기기분석은 ESI(Electro-Spray Ionization) 및 positive MRM(Multiple Reaction Monitoring) 모드로 하였고, 검증은 CODEX 가이드라인 규정에 따라 실시하였다. 그 결과, 클렌부테롤과 락토파민의 LOQ는 각각 0.2 및 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 수준이었고, 평균회수율은 각각 104.2-113.5% 및 107.6-118.1%로 나타났다. 또한, 분석오차는 각각 2.8-10.5% 및 1.6-5.2%로 CODEX 가이드라인 규정에 만족하는 수준이었다. 따라서 개선된 동시 분석법은 잔류동물용의약품의 분석에 있어 보다 신속하고 경제적인 분석 및 모니터링에 적용 가능할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 2011년 식품의약품안전평가원 ‘2011년 잔류동물의약품 시험법 개발 및 잔류실태조사’(11161식품안전035)의 연구개발비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. FAO/WHO-JECFA. Evaluation of certain veterinary drug residues

- in food: Seventy-fifth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (WHO technical report series; No. 969). FAO/WHO, Geneva, Switzerland. pp. 1-101 (2012)
- MHLW. Available from: <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/mrls/final/mrls.html>. Accessed May 31, 2005.
- FDA. Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/default.htm>. Accessed January 30, 2013.
- European Union. Commission Regulation (EU) No. 37/2010: On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Union L 15: 1-72 (2010)
- Oh JH, Kwon CH, Jeon JS, Choi DM. Management of veterinary drug residues in food. Korean J. Environ. Agric. 28: 310-325 (2009)
- European Union. Council Regulation (EEC) No. 2377/90: Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Union L 224: 1-8 (1990)
- KFDA. Notice No. 2007-68. Available from: <http://kfda.go.kr/index.kfda?mid=95>. Accessed October 18, 2007.
- KFDA. Notice No. 2012-17. Available from: <http://kfda.go.kr/index.kfda?mid=92>. Accessed May 10, 2012.
- Park MS, Lee JJ, Myung SW. Analysis of phoxim residue in animal food production (cattle and pig) by LC/ESI-MS/MS. J. Korean Chem. Soc. 55: 626-632 (2011)
- KFDA. 2011 Safety evaluation on residues of veterinary drugs in foods. Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Korea (2011)
- KFDA. Food code. Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Korea. pp. 10.5.121-123 (2011)
- KFDA. Food code. Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Korea. pp. 10.5.161-164 (2011)
- Juan C, Igualada C, Moragues F, León N, Mañes J. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of β -agonists in animal feed and drinking water. J. Chromatogr. A 1217: 6061-6068 (2010)
- KFDA. Clenbuterol risk profile. Available from: <http://www.foodnara.go.kr/foodnara/board-list.do> Accessed December, 2010.
- Elanco. Material safety data sheet. Available from: http://www.elancocentral.com/topmax_msd.pdf. Accessed October 17, 2008.
- Blanca J, Muñoz P, Morgado M, Méndez N, Aranda A, Reuvers T, Hooghuis H. Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 529: 199-205 (2005)
- Shishani E(I), Chai SC, Jamokha S, Aznar G, Hoffman MK. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 483: 137-145 (2003)
- Lee DW, Mona IC, Daniel RD. Multiresidue confirmation of β -agonists in bovine retina and liver using LC-ES/MS/MS. J. Chromatogr. B 813: 35-45 (2004)
- Li C, Wu YL, Yang T, Zhang Y, Huang-Fu WG. Simultaneous determination of clenbuterol, salbutamol, and ractopamine in milk by reversed-phase liquid chromatography tandem mass spectrometry with isotope dilution. J. Chromatogr. A 1217: 7873-7877 (2010)
- Fesser ACE, Dickson LC, Macneil JD, Patterson JR, Lee S, Gedir RD. Determination of β -agonists in liver and retina by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. AOAC Int. 88: 61-69 (2005)
- Widstrand C, Larsson F, Fiori M, Civitareale C, Mirante S, Brambilla G. Evaluation of MISPE for the multi-residue extraction of β -agonists from calves urine. J. Chromatogr. B 804: 85-91 (2004)
- Xu Z, Hu Y, Hu Y, Li G. Investigation of ractopamine molecularly imprinted stir bar sorptive extraction and its application for trace analysis β_2 -agonists in complex samples. J. Chromatogr. A 1217: 3612-3618 (2010)
- Masci G, Casati G, Crescenzi V. Synthesis and LC characterization of clenbuterol molecularly imprinted polymers. J. Pharmaceut. Biomed. 25: 211-217 (2001)
- Codex Alimentarius Committee. Codex guidelines for the estab-

- lishment of a regulatory programme for control of veterinary drug residues in foods, CAC/GL 16. Codex, Rome, Italy. pp. 1-46 (1993)
25. Zhang X, Chen L, Xu Y, Wang H, Zhao Q, Zhao Q, Ren N, Ding L. Determination of β -lactam antibiotics in milk based on magnetic molecularly imprinted polymer extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 878: 3421-3426 (2010)
26. Guy PA, Savoy MC, Stadler RH. Quantitative analysis of clenbuterol in meat products using liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 736: 209-219 (1999)
27. EU Council. Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). *Off. J. Eur. Commun. L221*: 8-36 (2002)