

## LC-MS/MS를 이용한 소의 근육과 간 중에 잔류하는 glucocorticoids 동시 분석

신상은 · 조현우 · 명승운★

경기대학교 화학과

(2010. 2. 16. 접수, 2010. 6. 24. 승인)

### Simultaneous analysis of glucocorticoids in bovine muscle and liver by LC-MS/MS

Sang-Eun Shin, Hyun-Woo Cho and Seung-Woon Myung★

*Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon, 443-760, South Korea*

(Received February 16, 2010; Accepted June 24, 2010)

**요 약:** 축산물(소의 근육 및 간)중에 잔류하는 합성 글루코코티코이드 6종 (betamethasone, dexamethasone, prednisone, prednisolone, methylprednisolone, flumethasone)에 대한 동시분석방법을 확립하였다. 효과적인 기 분석을 위해서 시료는 C18 고체상 카트리지를 사용하여 에틸아세테이트 용매를 사용하여 추출/정제하였다. C18 컬럼을 사용하여 분리한 후 음이온 전기분부 질량분석법의 multiple reaction monitoring 방법을 사용하여 정량 및 정성 분석을 수행하였다. 효과적이고 감도있는 HPLC-MS/MS 분석을 위해서 0.1% 포름산이 포함된 물과 아세트나이트릴이 이동상 용매로 사용되었다. 매트릭스와 약물의 종류에 따라서 검출한계(LOD)는 0.2-0.1 µg/kg, 정량한계(LOQ)는 0.8-3.4 µg/kg 이었으며, 회수율은 89.5-119.6%이었다. 확립된 기존의 방법들에 비해 6종의 글루코코티코이드의 동시분석 방법이 간소화되었고, 좋은 정확도, 정밀도 및 회수율을 나타내었으며, 축산 육류 중에 잔류하는 글루코코티코이드들 분석하는데 사용될 수 있을 것이다.

**Abstract:** A new method for the simultaneous determination of six glucocorticoids (betamethasone, dexamethasone, prednisone, prednisolone, methylprednisolone, and flumethasone) in meats (bovine muscle, bovine liver) were established. Samples were effectively extracted using C18 cartridge with ethylacetate. Chromatographic separation was achieved using C18 column and negative electrospray ionization mass spectrometry was performed in the Multiple Reaction Monitoring mode for the effective quantitation and qualification of glucocorticoids. Acetonitrile and water (0.1% formic acid) were used as mobile phase and additive for effective electrospray ionization, and gave good chromatographic separation and mass spectrometric sensitivity. The limit of detection (LODs) and the limit of quantitation (LOQs) in spiked blank samples depending on types of matrix and pharmaceuticals were ranged from 0.2 to 1.0 µg/kg and 0.8 to 3.4 µg/kg, respectively. And the recoveries were between 89.5 to 119.6%. The established method showed good recoveries, accuracies, precisions and fast sample preparation and it will be applied to assay of glucocorticoids residues in meat.

**Key words:** glucocorticoids, meat, LC-MS/MS, residual analysis

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-241-9639 Fax : +82-(0)31-249-9639

E-mail : swmyung@kgu.ac.kr

## 1. 서 론

합성 글루코코티코이드(synthetic glucocorticoids)는 항염증성 약물뿐만 아니라 성장촉진제로써 가축에 널리 사용되고 있다. 따라서, 유럽연합(EU)을 비롯한 각국에서는 소비자들의 건강을 보호하기 위해서 일부 약물은 사용이 금지되어 있거나, 최대잔류허용치(MRL)을 설정하여 규제하고 있다.<sup>1,2</sup> 대표적인 합성 글루코코티코이드인 dexamethasone, betamethasone, prednisolone 등은 가축 사육을 위한 치료제로만 허용되어 있으며, 잔류되어 인체에서는 비만, 고혈압, 골다공증 등의 부작용을 나타낼 수 있기 때문에 우유, 소의 간, 근육 등의 부위에 최대잔류허용치를 설정하였다.

유럽연합(EU)의 최대 잔류 허용치(MRL)을 살펴보면 betamethasone, dexamethasone, prednisolone은 소 간에서 2 µg/kg, 근육에서 0.5 µg/kg, 우유에서 0.3 µg/kg로 설정되어 있다. Methylprednisolone은 근육과 간에서 10 µg/kg으로 설정되어 있다.<sup>3-5</sup>

따라서, 축산물 특별히 소의 간, 근육 이나 머리카락, 소변 중에 미량(수 µg/kg)으로 잔류하는 글루코코티코이드는 구조상 극성기(-OH, C=O 등)가 존재하기 때문에 기존에는 유도체화 반응을 시켜서 극성기를 비극성기로 만들어 휘발성있는 화합물로 만들어서 GC/MS로 분석하였지만, 유도체화 반응이 필요하지 않고 매트릭스 방해도 최소화할 수 있는 액체 크로마토그래피 질량 분석법(LC-MS/MS)을 사용하여 분석하는 방법들이 일반적인 추세이다.<sup>6-13</sup>

한편, 분자량이 같아서 질량스펙트럼상에서는 구분이 안되는<sup>13-14</sup> 입체이성질체인 dexamethasone과 betamethasone을 분리하기 위해서는 면역친화 칼럼이나 HPLC-UV에서 정제 후에 유도체를 만든 후 GC-MS로 분석하는 방법<sup>15</sup>을 사용하고 있다.

본 연구에서는 6종의 글루코코티코이드(betamethasone, dexamethasone, prednisone, prednisolone, methylprednisolone, flumethasone)(Fig. 1)에 대해서 소의 근육과 간에 대한 시료 전처리 방법 및 기기분석방법을 확립한 후 실험 방법에 대한 유효성 시험도 실시하였다.

항염증성 약물의 잔류검사 기술 확보하고, 국가 및 민간 검사기관의 잔류분석법으로 활용할 수 있고, 기타 생체 물질에서의 글루코코티코이드계 분석물질 분석에 응용되어 임상 의학과 법과학 등에서도 응용이 가능하게 하기 위하여 동시 분석방법을 확립하고자 하였다.

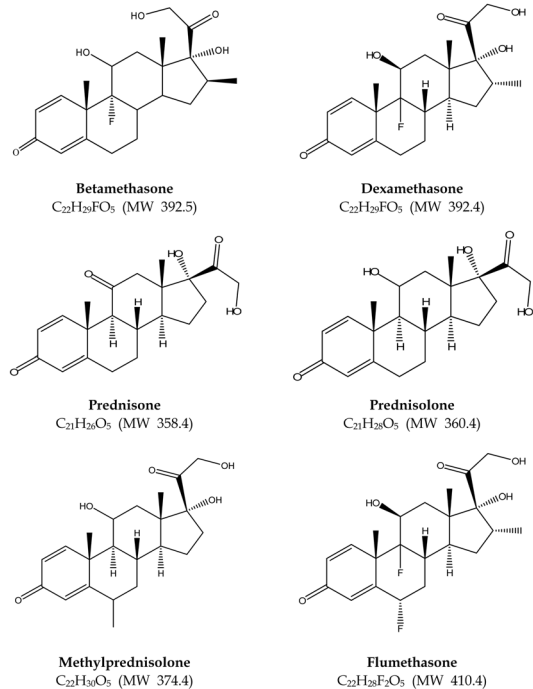


Fig. 1. Chemical structures of glucocorticoids.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 표준물질 및 시약

실험에 사용한 표준물질인 betamethasone, dexamethasone, prednisone, prednisolone, methylprednisolone, flumethasone과 내부 표준물질인 fluorometholone은 Sigma-Aldrich사 (St Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 메탄올에 용해시켜 사용하였다. 다이클로로메테인, 에틸아세테이트, 헥세인, 메탄올, 에탄올, 아세트나이트릴 등의 용매는 Burdick & Jackson사 (Muskegon, MI, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였고, formic acid는 Fluka사(St Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였다.  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase (*Helix pomatia*)는 Roche사 (Mannheim, Germany)에서 구입하였으며, 증류수는 Milli-Q system을 통과한 3차 증류수를 사용하였다. 본 실험에 사용된 분석물질과 내부 표준물질은 메탄올을 이용하여 1000 µg/mL의 표준용액으로 만든 후 -20 °C 냉동고에 보관하였고, 용도에 따라서 메탄올로 묽혀서 사용하였다.

### 2.2. 기구

실험에 사용한 모든 유리 기구는 세척액, 메탄올,

아세트산과 3차 증류수로 세척 후 건조하여 사용하였고 polypropylene conical 튜브는 Falcon사(Texas, USA)의 제품을 사용하였다. 시료의 원심분리에 사용한 기기는 한일과학사(Seoul, Korea)의 Supra 22K를 사용하였고 원심분리 튜브(50 mL)는 Nalgene사(New York, USA)의 제품을 사용하였다. 시료를 여과하기 위해 Whatman 사(Maidstone, UK)의 GF/B glass 여과지를 사용하였고, reconstitution 한 시료의 여과를 위한 0.45  $\mu\text{m}$ 의 13 mm 실린지 디스크 필터는 Life Sciences사 (UK)의 제품을 사용하였다.

분석물질 추출에 사용한 고체상 카트리지는 Water사(Milford, Massachusetts, USA)의 Oasis HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) (500 mg, 6 cc), Varian사의 Bond elut plexa (500 mg, 6 cc)와 Waters사의 Sep-Pak C18 (1 g, 6 cc)을 사용하였고 vacuum manifold는 Supelco사 (Bellefonte, PA, USA)의 제품을 사용하였다. 시료의 농축을 위한 질소농축기는 Caliper Lifescience 사(Seattle, WA, USA)의 TurboVap LV 농축기를 사용하였으며, vortex mixer는 Vision Scientific사(Bucheon, Korea)의 제품을 사용하였다.

### 2.3. 분석기기

사용한 액체크로마토그래프-전기분무이온화-텐덤 질량분석기(LC-ESI-MS/MS)는 시료 자동주입기(Agilent 1200 series Autosampler)가 장착된 Agilent 사(Palo Alto, CA, USA)의 Agilent 1200 series HPLC를 사용하였다. 분리된 각 물질의 분자량 확인을 위해 Triple Quadrupole Tandem Mass spectrometer (Agilent 6410 Triple Quad., Palo Alto, CA, USA)를 사용하였으며, 이온화방식은 ESI (electrospray ionization)로써 음이온 모드에서 분석하였다.

글루코코티코이드 6종을 동시에 분리하기 위해 액체 크로마토그래프에 사용된 컬럼은 Agilent사 (Palo Alto, CA, USA)의 Eclipse plus C<sub>18</sub> 으로 길이는 100 mm, 내경은 2.1 mm이고 입자 크기는 3.5  $\mu\text{m}$ 이었다. 이동상으로는 0.1% formic acid가 포함된 수용액(A)과 아세트나이트릴에 0.1% formic acid 가 함유된 유기용매(B)가 사용되었으며, 기울기 용매 방법을 사용하여 분석물질을 분리하였다. 기울기 용매의 조건은 유기용매(B) 25%, 10분 동안 30%, 8분 동안 60%를 유지하고 컬럼 안정화를 하였으며, 이동상 유속은 0.3 mL/min, 시료 주입량은 5  $\mu\text{L}$ 이었다.

질량분석기의 조건을 확립하기 위해서 각각의 분석 물질은 표준물질을 사용하여 컬럼을 통과하지 않고

Table 1. The operation parameters of the HPLC-ESI-MS/MS for analysis of six glucocorticoids

Parameters	Conditions		
Column	Eclipse plus C <sub>18</sub> , 2.1 × 100 mm, 3.5 $\mu\text{m}$		
Mobile phase	A : water (0.1% Formic acid) B : acetonitrile (0.1% Formic acid)		
Gradient	Time (min)	0	10
	Solvent B (%)	25	30
Column flow rate	0.3 mL/min		
Injection volume	5 $\mu\text{L}$		
Column temperature	25 °C		
Ionization mode	Negative ion electrospray		
Capillary voltage	3.50 kV		
Gas temperature	350 °C		
Gas flow	10 L/min (N <sub>2</sub> )		
Nebulizer	35 psi (N <sub>2</sub> )		

직접 텐덤 질량 분석기로 분석하였다. 텐덤 질량 분석기를 통해 1) 스캔 모드(scan mode)에서 각 물질의 질량 스펙트럼을 확인한 후, 2) 각 물질별 선구 이온 스캔(precursor ion scan)을 선택하고 최적의 충돌 에너지(collision energy)를 선택하여 생성이온(product ion)을 생성한 후, 3) 특성 이온을 선택하여 MRM (multiple reaction monitoring) 방법으로 분석하였다. 전기분무이온화의 음이온 모드에서 글루코코티코이드를 분석하기 위한 최적의 이온화원 파라미터는 다음과 같다. 질소 기체의 온도는 350이며 유량은 10 L/min 이었고 nebulizer pressure는 35 psi이고 capillary voltage는 3.5 kV이다. 글루코코티코이드 분석을 위한 LC-ESI-MS/MS 조건은 Table 1에 나타내었다.

### 2.4. 시료 전처리 방법

식육(소의 근육과 간) 중에 잔류하는 미량의 글루코코티코이드를 추출하기 위해서 액체-액체 추출법과 고체상 추출법을 이용하여 방해 매트릭스를 제거, 추출 및 농축하며 전처리 과정은 다음과 같다.

식육 5 g을 취하여 잘게 자른 후 내부표준물질 fluorometholone과 3 M 아세트이트 완충용액(pH 4.6) 10 mL을 첨가한다. 균일하게 혼합하고 효소 가수분해를 위한 Helix pomatia 로서  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 1시간 동안 60 °C의 오븐에서 가수분해시킨다. 시간경과 후 상온에서 냉각한 시료에 아세트나이트릴 15 mL를 2번 첨가하여 0 °C에서 3600 rpm 속도로 10분간 원심 분리한다. 상층액을 새로운 시험관에 취하고 8 mL 헥세인과 2 mL 다이

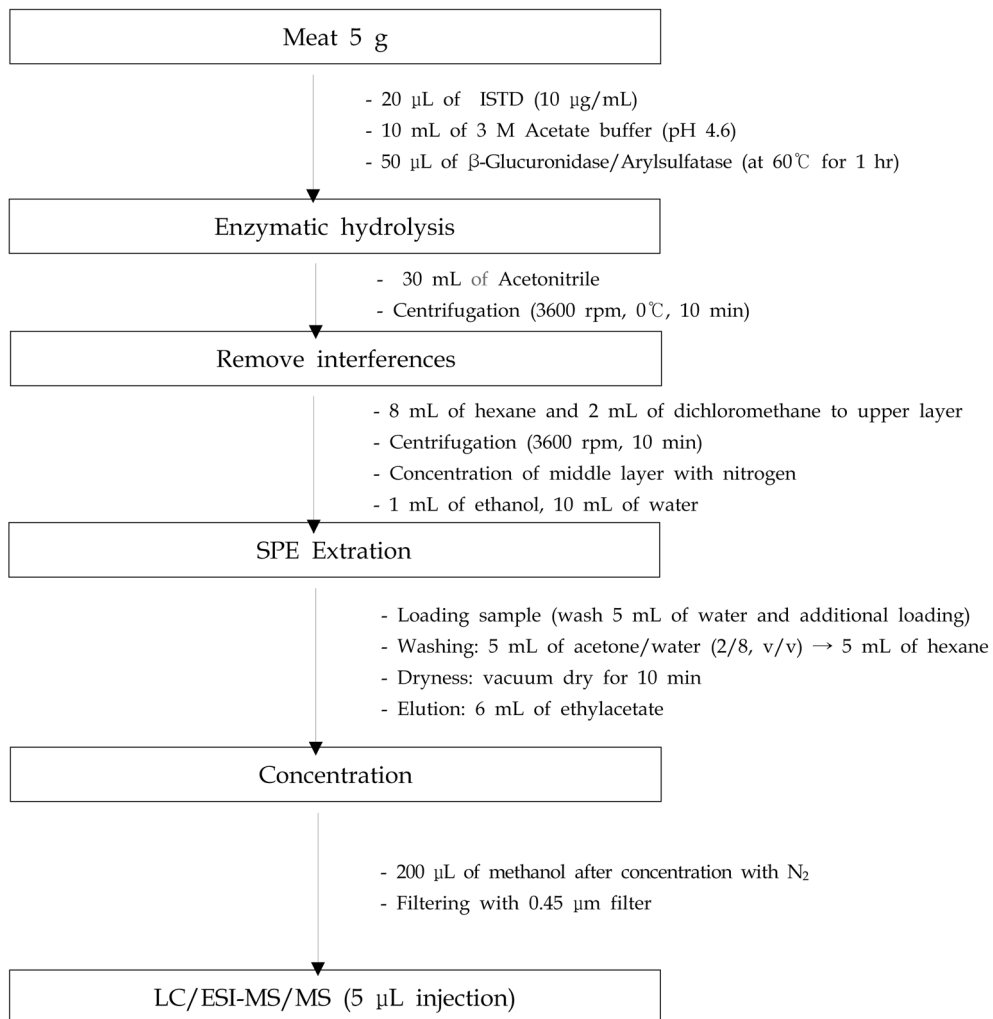


Fig. 2. Schematic diagram of sample preparation for the bovine muscle and liver.

클로로메테인을 첨가하여 시료의 방해물질을 정제한 다. 중간층을 새로운 시험관으로 옮긴 후 질소 증발기에서 농축한다. 완전히 건조된 잔사를 에탄올 1 mL와 증류수 10 mL로 녹여준다. Sep-Pak C<sub>18</sub> 카트리지(1 g, 6 cc)를 vacuum manifold에 장착한 후 메탄올 10 mL와 증류수 10 mL를 흘려서 활성화한다. 그리고 시료를 C18 SPE 카트리지에 적재한 후 시험 튜브를 증류수 5 mL로 한 번 더 씻어준 후 추가 적재한다. 카트리지를 아세톤/증류수(2/8, v/v) 5 mL와 n-헥세인 5 mL로 세척한 후, 진공을 이용하여 10분간 카트리지를 건조한다. 최종 용출 용매인 에틸아세테이트 6 mL로 용리하여 질소증발기로 완전히 증발시킨다. 메탄올 200  $\mu$ L로 잔사를 녹여 0.45 여과지로 여과한 후 2

mL 갈색 바이알에 옮겨 LC-ESI-MS/MS 로 분석한다 (Fig. 2).

## 2.5. 카트리지 종류 및 용량 선택

분석물질이 흡착/용리되는 카트리지의 종류와 용량에 따른 절대 회수율을 비교하여 최적의 카트리지를 선택하였다. 다른 물질의 분석에 많이 사용되고 있으며 글루코코티코이드 분석에 적합한 같은 용량의 카트리지는 Water사의 Oasis HLB (500 mg, 6 cc), Varian사의 Bond elut plexa (500 mg, 6 cc)와 Waters사의 Sep-Pak C18 (1 g, 6 cc)을 사용하였다. 또한 동일한 종류에 대한 카트리지 용량의 절대 회수율을 비교하여 최

적의 카트리지를 선택하였다.

## 2.6. 추출 용매 선택

고체상 추출 시 추출용매에 따른 절대 회수율을 비교하기 위해서 메탄올과 아세트나이트릴을 비교하여 최적의 용매를 선택하였다.

## 2.7. 최종 용매 양의 선택

고체상 추출시 얻은 용리액을 질소증발기로 농축하고 잔사를 녹이는 용매의 양에 따른 절대 회수율을 조사함으로써 최적의 최종 용매의 양을 선택할 수 있다. 따라서 최종 용매인 메탄올의 양을 100  $\mu$ L과 200  $\mu$ L로 조절하여 최적의 용매 양을 선택하였다.

## 2.8. 검출한계, 정량한계와 검정 곡선의 측정

본 연구에서 사용한 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 측정하는 방법은 다음과 같다. 검출한계와 정량한계의 농도를 추정 후, 추정된 검출한계의 1에서 5배 사이의 농도를 가진 바탕시료(n=7)를 준비했다. 바탕시료는 분석물질이 검출되지 않은 소의 간과 근육을 사용하였다. 측정에 대한 표준편차(s)를 계산하고 선형검정 곡선을 작성하여 기울기(m) 값을 측정하였다. 검출한계는 3 s/m, 정량한계는 10 s/m으로 정하였다. 식육은 glucocorticoids 6종의 표준물질 혼합 용액을 첨가하여 소 간 시료 중의 농도가 3, 4.5, 6, 10, 15  $\mu$ g/kg이 되도록 하고, 소 근육 중의 농도가 1.5, 3, 4.5, 6, 10  $\mu$ g/kg가 되도록 하였으며 내부표준물질(flurumetholone)은 10  $\mu$ g/mL 용액 20  $\mu$ L를 첨가하여 내부표준물질로 검정곡선을 작성하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 크로마토그램과 질량 스펙트럼

Glucocorticoids 6종의 분리를 위해 LC-ESI-MS/MS를 사용하여 표준물질의 크로마토그램과 질량 스펙트럼을 확인하였다. 기울기 용리 조건에서 분석물질의 머무름 시간은 prednisolone 4.4분, prednisone 4.7분, methylprednisolone 8.2분, betamethasone 8.8분, dexamethasone 9.2분, flumethasone은 9.8분이고 내부표준물질인 flurumetholone은 14.3분에서 용출되었다. 이때 prednisolone과 prednisone의 경우 완전히 분리되어 이루어지지 않았지만 질량 스펙트럼의 선구이온과 정량이온이 다르며, 재현성 있는 머무름 시간을 나타내

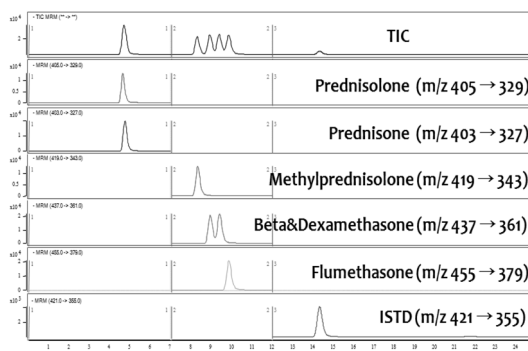


Fig. 3. Total ion chromatogram and Extracted ion chromatograms of glucocorticoids.

어 정성적으로 머무름 시간을 확인하는 데는 큰 어려움이 없었다. 입체이성질체인 betamethasone과 dexamethasone은 역상 크로마토그래피(RPLC) 시스템에서도 잘 분리되었다(Fig. 3).

Full scan mode에서 얻은 질량스펙트럼으로부터 유사분자이온(pseudo-molecular ion)인  $[M+CHCOO]^-$ 을 확인하였는데 이는 이동상이 0.1% formic acid를 포함하고 있기 때문이며, 양이온(+) 모드에 비해 감도가 좋은 음이온(-) 전기분무이온화 모드에서 분석하였다. 유사분자이온(pseudo-molecular ion)을 선구이온(precursor ion)으로 선택한 후 최적의 충돌 에너지(collision energy)를 선택하여 생성이온(product ion)을 생성하였다. 극미량의 분석물질을 효과적으로 검출하고 매트릭스의 방해 효과를 최소화하여 높은 신호 대 잡음비(signal to noise, S/N)를 얻기 위하여 각 물질의 생성이온 중에서 특성이온(characteristic ion)을 선택하여 MRM(multiple reaction monitoring) 방법으로 분석하였으며, 각 물질에 대한 머무름 시간, 선구이온과 특성이온들을 Table 2에 나타내었다.

### 3.2. 카트리지 종류 및 용량 선택

분석물질이 흡착되는 카트리지의 종류와 용량에 따라 절대 회수율을 확인하기 위해 Waters사의 Oasis HLB, Varian사의 Bond elut plexa와 Waters사의 Sep-Pak C18을 사용하여 절대 회수율을 비교해 보았는데 이 때 사용한 추출용매는 메탄올이었다.

3종의 카트리지를 비교 실험한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Waters사의 HLB 카트리지는 시료 적재 과정에서 분석물질이 카트리지에 흡착되지 않고 손실되어 가장 낮은 절대 회수율을 보였는데, flumethasone 이 9.2%의 절대 회수율로 가장 낮았으며 prednisolone

Table 2. Retention time, precursor ion, and product ion of glucocorticoids

Pharmaceuticals	R.T. (min)	Precursor ion (m/z)	Criteria ion (m/z)	Quantitation ion (m/z)	Collision Energy (eV)
Prednisolone	4.4	405	405	329	5
Prednisone	4.7	403	357, 403	327	5
Methylprednisolone	8.2	419	373, 419	343	5
Betamethasone	8.8	437	437	361	10
Dexamethasone	9.2	437	307, 437	361	10
Flumethasone	9.8	455	307, 455	379	10
Fluorometholone (ISTD)	14.3	421	421	355	9

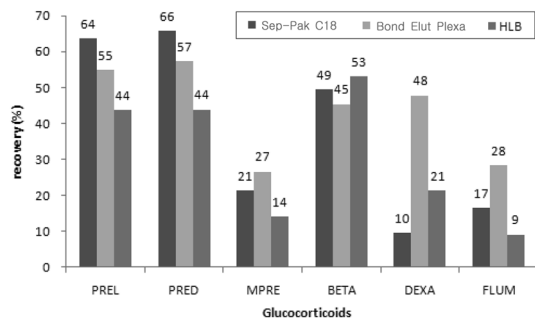


Fig. 4. Comparison of the absolute recovery according to cartridge type.

43.8%, prednisone 43.9%, methylprednisone 14.1%, betamethasone 53.0%, dexamethasone 21.4%로 대체적으로 낮은 회수율을 보였다. Varian사의 Bond elut plexa 카트리지는 Water사의 HLB 카트리지가 보다 dexamethasone과 flumethasone에서는 다소 높은 회수율을 보였으나, 재현성이 크게 떨어졌다. Waters사의 C<sub>18</sub> 카트리지는 prednisolone 63.6%, prednisone 65.7%, methylprednisolone 21.5%, betamethasone 49.4%, dexamethasone 9.7%, flumethasone 16.5%로 다른 두 종류에 비해 평균적으로 다소 높은 회수율을 나타냈으므로 이를 글루코코티코이드의 분석에 사용하기로 하고 계속해서 다른 파라미터에 대한 실험을 실시하였다.

### 3.3. 추출 용매 선택

선택된 Waters사의 C<sub>18</sub> 카트리지에 대해서, 고체상 추출 시 가장 일반적으로 사용되며 비교적 비극성 용매인 메탄올과 에틸아세테이트에 대한 추출율을 비교하였다(Fig. 5). 메탄올로 용리한 경우 prednisolone 63.6%, prednisone 65.7%, methylprednisolone 21.5%로 에틸아세테이트로 용리한 경우 prednisolone 74.6%, prednisone 74.4%, methylprednisolone 23.5%로 미소한

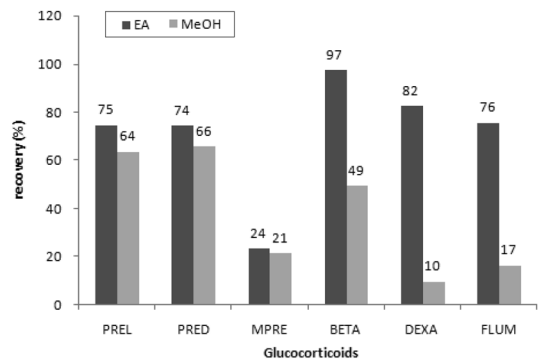


Fig. 5. Comparison of the recovery according to the extraction solvent.

차이를 보인다. 그러나 betamethasone, dexamethasone, flumethasone의 경우 메탄올로 용리 시 betamethasone 49.4%, dexamethasone 9.7%, flumethasone 16.5%이었고, 에틸아세테이트로 용리 시 betamethasone 97.4%, dexamethasone 82.5%, flumethasone 75.6%로 작게는 2배에서 8배까지 절대 회수율의 차이를 나타내었다. 따라서, 극성도가 약간 큰 에틸아세테이트를 이용한 추출이 효율적이라고 판단되어 추출용매로 선택하였다.

### 3.4. 최종 용매 양의 선택

분석물질의 농축효과를 조절하기 위하여 용리액을 질소 증발기로 농축하고 잔사를 녹이는 용매의 양에 따른 절대 회수율을 조사하였다. 최종 용매인 메탄올의 양을 100  $\mu$ L로 한 경우, prednisolone 48.5%, prednisone 43.6%, methylprednisolone 34.9%, betamethasone 63.9%, dexamethasone 64.6%, flumethasone 55.1%의 절대 회수율을 보인 반면, 200  $\mu$ L의 경우 prednisolone 91.0%, prednisone 85.0%, methylprednisolone 40.3%, betamethasone 108.6%, dexamethasone 108.3%, flumethasone 101.4%로 거의 2배 이상 절대 회수율 차이를 보였다. 농축된 잔사의 양이 많고, 질소증발기로 농축 시 잔사

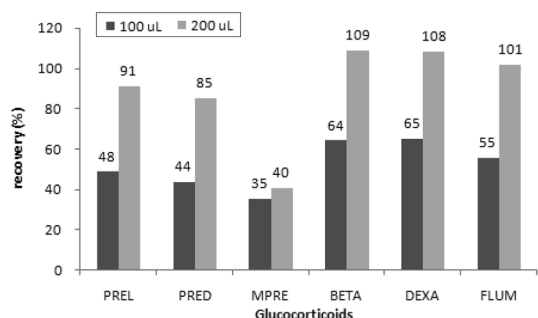


Fig. 6. Comparison of the recovery according to the volume of the reconstitution solvent.

가 초자 내벽에 산발적으로 분포하여 용매의 양이 적으면 잔사를 모두 용해 시키지 못하여 낮은 절대 회수율을 보였다. 따라서 최종 용매의 양은 200 μL로 확립하였다(Fig. 6).

### 3.5. 검정식과 상관계수

검정곡선은 미지 양에 대한 감응을 알 수 있도록 기지양의 분석물질에 대한 감응을 평가한다. 이를 위해 실제 식육 시료 중에 잔류하는 분석물질을 분석하기 위해 표준물질을 분석물질이 검출되지 않는 식육에 소 근육은 1.5, 3, 4.5, 6, 10 μg/kg가 되도록 spike 시키고, 소 간은 3, 4.5, 6, 10, 15 μg/kg가 되도록 spike 시켜서 확립된 분석조건으로 분석물질을 추출하여 LC-ESI-MS/MS로 6종의 분석물질에 대한 검정곡선을 작성하였다. 검정곡선의 결과는 내부표준물질을 사용하여 작성하였고 검정식의 상관 계수를 얻었다

(Table 3). 작업구간 내에서 상관계수( $r^2$ )가 0.99이상의 좋은 직선성을 나타냈다.

### 3.6. 회수율, 검출한계, 정량한계 및 정밀도

확립된 분석방법의 유효성 검정을 위해서 대상 약물이 검출되지 않은 소의 근육과 간에 표준물질을 소량첨가(spike)함으로써 글루코코티코이드 6 종에 대한 검출한계, 정량한계 및 상대 회수율을 구하였다.

소 근육의 경우 검출한계(LOD)는 0.2~0.5 μg/kg, 정량한계(LOQ)는 0.8~1.8 μg/kg이었으며, 세가지 농도(1.5, 3, 6 μg/kg)에서의 회수율은 92.4%에서 119.6%로 양호한 회수율을 나타냈으며, 각 농도에서의 정밀도(n=4)도 1.0~11.7% 상대표준편차(RSD)를 나타내었다(Table 4).

소 간의 경우는 근육에 비해서 다소 높은 검출한계와 정량한계를 나타내었는데, 각각 0.6~1.0 μg/kg와 2.2~3.4 μg/kg이었다. 회수율은 89.5~116.8%이었으며, 정밀도는 1.5~17.6%(RSD)로써 근육에 비해 다소 떨어진 정밀도를 나타내었다(Table 5).

## 4. 결 론

식육(소의 근육과 간)중에 잔류하는 글루코코티코이드를 LC-MS/MS를 사용하여 동시에 분석하기 위한 시료 전처리방법과 기기분석조건을 확립하였다. 본 논문에서는 첨가제와 이동상 조건을 사용하여 역상크로마토그래피(RP) 시스템으로 효과적으로 HPLC에서 이들 두 물질을 포함한 여섯 종류의 글리코코티코이드를

Table 3. Calibration curves and coefficient of correlation for the assay of glucocorticoids from bovine muscle and liver

Pharmaceuticals	Bovine	Linear equation	Coefficient of correlation ( $r^2$ )
Prednisolone	muscle	$y = 1.2271x - 0.0807$	0.9958
	liver	$y = 1.9835x + 0.0853$	0.9951
Prednisone	muscle	$y = 1.5195x - 0.2659$	0.9969
	liver	$y = 2.3622x + 0.9058$	0.9958
Methylprednisolone	muscle	$y = 1.0139x + 0.0920$	0.9922
	liver	$y = 1.3640x + 0.8040$	0.9907
Betamethasone	muscle	$y = 1.9967x - 0.3281$	0.9967
	liver	$y = 3.9964x + 2.3561$	0.9922
Dexamethsone	muscle	$y = 2.4807x - 0.7642$	0.9984
	liver	$y = 4.9433x + 2.4096$	0.9921
Flumethasone	muscle	$y = 2.0054x - 0.0927$	0.9910
	liver	$y = 4.3134x + 3.1629$	0.9912

Table 4. Recovery, LOD, LOQ and precision for the assay of glucocorticoids from bovine muscle

Pharmaceuticals	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%) (n=4)	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RSD (%) (n=4)
Prednisolone	1.5	110.2	0.5	1.8	6.5
	3	105.2			4.2
	6	95.7			7.6
Prednisone	1.5	103.4	0.5	1.6	3.5
	3	107.4			6.9
	6	96.4			11.7
Methylprednisolone	1.5	119.6	0.5	1.8	8.6
	3	103.1			8.3
	6	94.7			7.9
Betamethasone	1.5	103.7	0.5	1.6	6.7
	3	102.2			6.4
	6	94.7			6.1
Dexamethasone	1.5	99.4	0.2	0.8	8.4
	3	101.6			4.3
	6	96.3			3.8
Flumethasone	1.5	113.8	0.5	1.6	3.0
	3	105.6			2.2
	6	92.4			1.0

Table 5. Recovery, LOD, LOQ and precision for the assay of glucocorticoids from bovine liver

Pharmaceuticals	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%) (n=4)	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RSD (%) (n=4)
Prednisolone	3	112.9	0.8	2.5	3.2
	6	91.7			14.6
	15	100.1			4.1
Prednisone	3	110.8	0.6	2.2	3.1
	6	93.3			17.6
	15	101.3			18.1
Methylprednisolone	3	116.8	0.8	2.6	8.5
	6	89.7			14.1
	15	100.6			1.5
Betamethasone	3	103.8	0.8	2.5	6.3
	6	90.0			8.4
	15	100.3			11.6
Dexamethasone	3	108.1	0.6	2.2	5.1
	6	89.5			16.8
	15	100.6			9.3
Flumethasone	3	111.6	1.0	3.4	4.8
	6	89.8			16.1
	15	101.2			8.6

동시에 분리 후 정량할 수 있었다. 확립된 분석방법에 대한 유효성확인을 위해 회수율, LOD, LOQ, 정밀도 등을 측정하였는데, 매트릭스와 약물의 종류에 따라서

검출한계(LOD)는 0.2~1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 정량한계(LOQ)는 0.8~3.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  이었으며 회수율은 89.5~119.6%이었다. 정밀도는 1.0~17.6% 이내로써 매우 만족한 결과를 얻



을 수 있었다. 그 결과 타 논문<sup>3,7, 10-11</sup>에 비해 향상된 회수율과 정밀도를 나타내었고 분석시간도 단축되었다. 확립된 분석방법은 소의 근육과 간 중에 잔류하는 글루코코르티코이드의 모니터링에 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 국립수의과학검역원의 2008년도 “축산물 중 항염증성 약물의 잔류분석법 개발 연구” 연구용역 사업의 지원으로 이루어진 것이며, 경기대학교 특성화 사업단의 LC-ESI-MS/MS를 사용하였기에 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. L. Istasse, V. De Haan, C. Van Eenaeme, B. Buts, P. Baldwin, M. Gielen, D. Demeyer and J.M. Bienfait, *J. Anim. Physiol., Anim. Nutr.* **62**, 150(1984).
2. M. L. J. Rijckaert and H. P. J. Vlemmix, *The growth promoting effect of glucocorticoids, Department of Chemical Engineering, Eindhoven University of Technology*, 1992.
3. O. Van den hauwe, F. Dumoulin, J. P. Antignac, M. P. Bouche, C. Elliott and C. Van Peteghema, *Anal. Chim. Acta.*, **473**, 127-134(2002).
4. M. J. O'Keefe, S. Martin and L. Regan, *Anal. Chim. Acta.*, **483**, 341-350(2003).
5. J.-P. Antignac, B. Le Bizec, F. Monteau, F. Poulain and F. Andre, *J. Chromatogr. B*, **757**, 11-19(2001).
6. V. Cirimele, P. Kintz, V. Dumestre, J. P. Goulle and B. Ludes, *Forensic Sci. Int.*, 107, 381-388(2000).
7. O. Van den Hauwe, M. Schneider, A. Sahin, C. H. Van Peteghem and H. Naegeli, *J. Agric. Food Chem*, **51**, 326-330(2003).
8. J.-P. Antignac, B. Le Bizec, F. Monteau and F. Andre. *J. Mass Spectrom*, **37**, 69-75(2002).
9. K. De Wasch, H. F. De Brabander, M. Van de Wiele, J. Vercammen and D. Courtheyn, *J. Chromatogr. A*, **926**, 79-86(2001).
10. R. Draisci, C. Marchiafava, L. Palleschi, P. Cammarata and S. Cavalli. *J. Chromatogr. B*, **753**, 217-223(2001).
11. O. Van den Hauwea, F. Dumoulina, C. Elliottb and C. Van Peteghema, *J. Chromatogr. B*, **817**, 215-223(2005).
12. J.-P. Antignac, B. Le Bizec, F. Monteau, F. Poulain and F. Andre, *Rapid Commun. Mass Spectrom*, **14**, 33-39(2000).
13. Y. Xiong, K. P. Xiao and A. M. Rustum, *J. Pharm. Biomed. Anal*, **49**, 646-654(2009).
14. L. Cun, W. Yinliang, Y. Ting and Z. Yan, *J. Chromatogr. A.*, **1217**, 411-414(2010).
15. A. Santos-Montes, AI Gasco-Lopez, and R. Izquierdo-Hornillos, *Chromatographia*, **39**, 539(1994).
16. J. P. Noben, B. Gielen, E. Royackers, M. Missotten, A. Jacobs and J. Raus, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1590-1594(2002).