Journal of Convergence for Information Technology
Vol. 11. No. 2, pp. 107-116, 2021
e-ISSN 2586-4440
DOI : https://doi.org/10.22156/CS4SMB.2021.11.02.107

축산물 중 잔류 성장보조제 분석을 위한 액체크로마토그라피-질량분석법 개발 및 적용

이수현
공주대학교 의료정보학과 교수

Development of Analytic Methods for Veterinary Drug Residue in Animal Products by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Soo Hyun Lee
Professor, Department of Medical Records and Health Information Management, Kongju National University

요 약 본 연구에서는 동물식품 내 잔류하는 동물의약품 중 성장보조제인 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스토스테론(Testosterone), 프로게스테론(Progesterone)에 대한 분석법을 개발하고자 하였다. 분석대상 물질은 액체크로마토그라피를 사용하여 분리하였고, electrospray ionization(ESI) 과정을 거쳐 질량분석기에 주입되어 multiple reaction monitoring(MRM) 모드로 검출하였다. 개발된 분석법은 CODEX CAC/GL 71-2009에 근거하여 유효성을 검증하였고, 분석의 실효성 허용범위를 충족함을 확인하였다. 국내 유통되는 소고기, 돼지고기, 닭고기에 대해 확립된 분석법으로 분석을 진행하여 실제시료 적용성을 확인하였다. 이를 통해 개발된 분석법이 국내 유통 축산물에서 확인되고 있는 성장보조제 일부에 대해 신속하고 신뢰성 높은 분석이 가능함을 확인하였다. 후속 연구를 통해 확립된 분석법을 기반으로 분석대상 성장보조제의 범위를 확장하고, 이를 모두 포함시켜 동시분석법을 확립한다면 활용성이 높은 분석법이 완성될 것으로 확신한다.

주제어 : 잔류, 동물의약품, 성장보조제, 축산물, 액체크로마토그라피-질량분석법

Abstract In this study, an analytical method was developed for estradiol-17β, testosterone, and progesterone, which are growth promoters as veterinary drug residues in animal food. The analytes were separated using liquid chromatography, and was injected into a mass spectrometer through the electrospray ionization(ESI) process and detected in multiple reaction monitoring(MRM) mode. As the method was validated by CODEX CAC/GL 71-2009 guideline, it met the acceptable. The analysis of beef, pork, and chicken distributed in Korea was conducted with an established method to confirm the applicability of the actual sample. It was confirmed that the developed method can be quickly and reliably in the analysis for the growth promoters identified in domestic distributed livestock products. Through subsequent research, a highly utilized analysis method will be completed if the number of growth promoters is expanded based on the method and the simultaneous analytical method is established by including all of it.

Key Words : Residue, Veterinary Drug, Growth promoters, Animal products, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

*Corresponding Author : Soo Hyun Lee(lsh5027@kongju.ac.kr)
Received December 25, 2020
Revised January 3, 2021
Accepted February 20, 2021
Published February 28, 2021

1. 서론

1.1 연구의 필요성

동물용의약품은 식품으로 활용되는 동물에 적용하여 질병을 치료, 예방, 진단하거나 생리기능 또는 행동양식의 변화를 이끌어 내는 물질이다[1]. 최근 육류를 포함한 고단백 식품의 소비가 크게 증가하면서 국내 축산업 규모가 확장되면서 식용 동물의 질병예방 및 치료, 그리고 성장촉진의 목적으로 동물용 의약품이 빈번하게 사용되고 있다[1]. 이들 동물용의약품은 동물체내에 잔존하여 동물 식품 내 잔류물질로 식품을 섭취하는 사람들에게 여러 가지 건강상 위험인자로 작용한다[2,3]. 대표적인 동물식품 내 잔류 동물의약품으로는 항생제, 합성항균제, 신경계작용약물, 호르몬제, 항콕시듐제, 항원충제, 구충제 등이 있다[4]. 이들은 내성균 생성 및 전파, 과민반응 유발, 종양 유발, 신체발육 이상, 기형 발생 등의 유해성이 있음이 보고되고 있다[2].

동물의약품으로 적용되는 성장보조제는 주로 동물의 근육량을 증가시키고 성장을 촉진할 목적으로 사용된다[5]. 디에틸스틸베스트롤(Diethylstilbestrol), 디에네스트롤(Dienestrol), 제라놀(Zeranol)과 같은 합성호르몬제[6]와 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스토스테론(Testosterone), 프로게스테론(Progesterone)과 같은 생체 유래 호르몬들이 적용된다[7]. 이중 에스트라디올(Estradiol-17β)은 대표적인 여성 호르몬으로 장기간 노출되는 경우 유방통이나 질출혈과 같은 여성호르몬 투여에 의한 일반적 부작용이 나타날 수 있으며, 발암성과 유전독성이 보고되어 있다[8,9]. 프로게스테론(Progesterone)과 테스토스테론(Testosterone)은 남성호르몬으로 장기 노출 시 생식독성 및 최기형성을 일으키며 발암성이 보고되고 있다[8,9]. 또한 프로게스테론(Progesterone)은 고농도에 노출되는 경우 성호르몬의 불균형, 면역력 감소, 무기력 등과 같은 부작용도 보고되고 있다[8,9].

국내·외적으로 식품 중 잔류하고 있는 동물의약품에 의한 건강상 위해성이 제기되면서 우리나라를 비롯해서 세계 각국이 식품 중 동물의약품의 잔류허용기준을 설정하고 엄격히 규제하고 있다[10-13]. 식품 중 동물의약품의 잔류허용기준은 시험법의 발전과 함께 계속 개정되고 있는데, 안전한 식품관리를 위해서는 민감도와 정확도가 확보된 시험법의 확립이 뒷받침되어야 한다[14,15].

최근 국제식품규격위원회인 CODEX나 European Union (EU) 등에서는 동물용의약품에 대한 잔류허용기준을 엄격히 하고 있어서 낮은 농도까지 검출 가능한 시험법이 요구되고 있다[10]. 이에 따라 민감도와 특이도가 낮은 시험법에 대한 개선이 필요하다. 기존의 액체크로마토그래피(High-performance liquid chromatography, HPLC)를 이용한 시험법은 민감도나 특이도가 낮아서 국제적 잔류허용기준을 확인하기 위해 적용하는 것은 한계가 있다. 그래서 최근에는 검출능이 뛰어난 액체크로마토그래피-질량분석법(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)[16]나 액체크로마토그래피-텐덤질량분석법(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer, LC-MS/MS)[17, 18] 또는 가스크로마토그래피-질량분석법(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)[19], 등을 활용하여 분석 효율성과 신뢰성을 높인 시험법 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

1.2 연구 목적

본 연구에서는 동물 식품 중 소고기, 돼지고기, 닭고기의 근육부위에 잔류하는 성장보조제인 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스토스테론(Testosterone), 프로게스테론(Progesterone) 3종을 분석할 수 있는 LC-MS/MS 분석법을 확립하고 유효성 검증 후, 시판되고 있는 소고기, 돼지고기, 닭고기의 실제 시료를 분석하여 확립된 분석법이 실제 시료에 적용됨을 확인하고자 하였다.

2. 연구 방법

2.1 대사 시료, 시약 및 기기

2.1.1 대상 시료

시중에서 유통되는 소고기, 돼지고기, 닭고기를 구입하여 육안으로 확인되는 지방부위는 제거한 후 근육부위만을 선별하고 믹서기로 분쇄하여 균질화 하였다. 균질화한 시료는 10 g 단위로 소분하여 -20 ℃에서 보관하였다, 공시험을 진행하여 분석물질이 검출되지 않는 시료를 선별하여 유효성을 검증하였다.

2.1.2 시약

분석대상물질인 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스

토스테론(Testosterone), 프로게스테론(Progesterone)은 Sigma Aldrich (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

실험용 유기 용매로는 메탄올, 아세토니트릴, n-헥산을 사용하였으며, 모두 HPLC 등급으로 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다. n-헥산은 시험용액 제조에 사용하였고 메탄올은 표준원액 제조에 사용하였다. 아세토니트릴은 표준용액과 시험용액 조제 및 HPLC용 분석용매 제조에 사용하였다. 증류수는 Milli-Q 시스템 (Millipore, Co., Massachusetts 01821, USA)을 사용하여 18.0 MΩ 이상을 확보하였다. 개미산은 Sigma Aldrich(ST. Louise, MO, USA)에서 구입하였다.

2.1.3 분석기기

시료분석 분석기기는 HPLC 1200 series (Agilent, USA)와 triple quadrupole mass spectrometer 6410 model (Agilent, USA)를 사용하였다. 질량분석에서는 electrospray ionization (ESI) 법을 이온화 방법으로 하여 Positive mode와 Negative mode을 동시에 사용하였다. 컬럼은 agilent사의 Eclipse plus C8, 3.5 μm (2.1 mm I.D x 100 mm length)를 사용하였다.

2.2 실험 방법

2.2.1 표준용액 조제

표준원액은 각각의 분석물질에 대한 표준품 0.1 g을 정밀하게 측량하여 100 mL 용량플라스크에 넣고 메탄올에 녹인 후 표시선까지 채워 1,000 μg/mL 농도로 조제하였고, -20℃에 보관하였다.

표준용액은 각각의 100 mL 용량플라스크에 표준원액을 분취 후 혼합하고 표시선까지 아세토니트릴을 채워 0.05 μg/mL 농도로 조제하였다.

2.2.2 시험용액 조제

2 g의 균질화된 시료를 50 mL 원심분리관에 넣고 탈이온수(DI water) 2 mL를 가한 후 5분간 교반하였다. 아세토니트릴 10 mL를 넣어 다시 강하게 15분간 교반하고, -4℃, 9,358 xg 에서 10분간 원심분리하였다. DI watar 및 아세토니트릴층을 50 mL 시험관으로 옮기고 n-헥산 10 mL를 넣어 5분간 강하게 교반하였다. -4℃에서 9,358 xg로 5분간 원심분리한 후 상층액인 n-헥산층을 버리고 나머지 용액인 DI water 및 아세토니트릴층을 둥근바닥플라스크에 옮겨 감압 농축하였다. 농축된 시료는 50% 아세토니트릴 1 mL를 가하여 녹였다. 이를 마이크로 원심분리기 튜브에 옮기고 상온에서 15,814 xg로 10분간 원심분리하여 상층액을 시험용액으로 하였다.

2.2.3 유효성 검증용액 조제

유효성 검증을 위해 시험용액에 3종의 분석물질 각각을 저, 중, 고 농도로 첨가하여 조제하였다. 저농도는 0.005 mg/kg, 중농도는 0.01 mg/kg, 고농도는 0.005 mg/kg로 하였다.

2.2.4 HPLC용 분석용매 조제

HPLC용 분석용매는 0.1% 개미산 함유 수용액과 0.1% 개미산 함유 아세토니트릴용액이었다. 제조한 분석용매는 멤브레인 필터 0.2 μm를 통과시켜 여과한 후, 약 10 분간의 탈 가스 과정을 거쳤다.

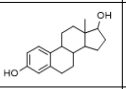
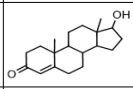
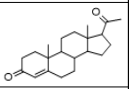
2.2.5 기기 분석

잔류 성장보조제 분석을 위해 소고기, 돼지고기 및 닭고기 등 대상 시료는 시험용액 조제 과정을 거쳐 준비하였다. 분석 시료는 HPLC로 분리한 후 electrospray ionization(ESI) 모드로 이온화한 후 질량분석기(MS)에서 multiple reaction monitoring(MRM) 방법으로 positive & negative alternative switching mode에서 기기분석을 진행하였다. 본 연구에 적용된 기기분석 조건은 Table 1 및 Table 2와 같다.

Table 1. Analytical condition of LC-MS

Liquid chromatography	
Mobile phase	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile
Gradient	50% → 100% B (0.0~ 4.0min) 100% → 100% B (4.0 ~ 7 min) 100% → 50% B (7.0 ~ 7.01min) 50% → 50% B (7.01 ~ 10 min)
Flow rate	350 μL/min
Injection volume	50 μL
Mass spectrometry	
Ionization source	ESI
Polarity	Positive & negative alternative switching mode
Scan type	MRM mode
Analyzer type	Triple quadrupole

Table 2. MRM condition

Compound	Estradiol-17β	Testosterone	Progesterone
Structure			
Ionization mode	Negative	Positive	Positive
Retention time	3.67	3.73	4.28
Moleculae weight	272.4	288.4	314.5
Precusor ion (m/z)	271.0	289.0	315.0
Product ion (m/z)	144.9	97.1	96.9
Collision Energy(eV)	41.0	-25.0	-26.0

2.3 LC-MS 분석법의 유효성 검증

2.3.1 특이성(Specificity)

특이성은 혼합 성분 중 분석 성분만을 정확하게 식별하는 능력으로 정량 시험뿐 아니라 확인시험, 순도시험 등에서도 반드시 평가되어야 한다. 크로마토그래피 시험법에서는 각각의 성분들이 표시된 크로마토그램을 적절히 제시하고, 공시료 중 방해물질이 해당 성분의 머무름시간(retention time)에서 검출되지 않음을 확인하여 입증하였다.

2.3.2 직선성(Linearity)

직선성은 선택된 범위에서 시료 중 분석물질의 농도 또는 양과 검출반응과의 직접 비례 관계를 확인할 수 있는 능력이며, 저, 중, 고농도의 유효성 검증용액을 포함하고 적절한 5단계 이상의 농도 범위에서 검량선을 작성하여 확인하였다. 분석물질의 크로마토그램 피크 면적과 대상물질의 농도 또는 양에 대한 함수로 표시된 그래프에서 회귀직선의 기울기, y-절편, 및 상관계수(correlation coefficient, r^2)를 구하고, 상관계수로 직선성을 평가하였다.

2.3.3 정확도(Accuracy)와 정밀도(Precision)

정확도와 정밀도는 저, 중, 고농도의 유효성 검증용액에 대해서 각 농도 당 5회씩 분석법의 모든 조작을 반복하여 측정한 결과로 평가하였다.

정확도는 각각의 유효성 검증용액에서 5회 반복 측정한 농도의 평균값을 실제 농도로 나눈 값의 백분율(%)로 표시하였다.

정밀도는 각각의 유효성 검증용액에 대해 하루 동안 5회 반복적으로 실험하여 일내 정밀도(Intraday-precision)를 측정하였고, 연속 5일 동안의 반복 실험으로 일간 정밀도(Interday precision)를 구하고 상대표준편차(RSD)로 표시하였다.

2.3.4 회수율 (Recovery)

회수율은 분석법의 추출효율을 의미한다. 바탕시료에 기지 농도의 분석물질을 가하고 추출 후 얻어진 시료 내 분석물질의 검출반응(피크 면적; A)과 분석 용매 내 동일 농도의 표준물질의 검출반응(피크 면적;B)을 비교한 값으로 평가하였다.

회수율 (Extraction Recovery) : (A/B) × 100 (%)

각 회수율 실험은 바탕시료마다 저, 중, 고농도의 유효성 검증용액을 제조하여 각 농도별 5회 반복 추출하여 회수율을 계산하였다.

2.3.5 검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantitation, LOQ)

바탕시료에 목표 LOQ농도(0.005 mg/kg)의 표준물질을 가하여 5회 반복실험을 진행하여 다음과 같은 식으로 검출한계 3.3 SD와 정량한계 10 SD를 계산하였다.

검출한계 (ng) = $3.3 \times \sigma / S$
정량한계 (ng) = $10 \times \sigma / S$

이때 σ는 검출반응의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말한다. 표준편차는 5회의 바탕시료 분석 측정값으로부터 계산하며, 기울기는 분석물질의 검량선으로부터 확인하였다.

2.4 시료내 성장보조제 3종의 잔류량 확인

바탕시료에 일정한 농도의 표준용액을 첨가하여 측정된 표준물질의 피크 면적으로부터 각각의 표준물질 검량선을 작성하였고 각 검량선에 따라 시료 낸 분석물질인 성장보조제를 정량하였다. 이때 시료 중 분석대상물질의 정량이온(quantitative ion)의 피크 면적을 이용하였다.

3. 연구 결과

3.1 LC 분석법의 적절성 확인

Fig 1은 분석대상 물질 3종의 크로마토그램이다. 에스트라디올(Estradiol-17β)은 음이온모드에서, 테스토스테론(Testosterone)과 프로게스테론(Progesterone)은 양이온모드에서 검출되었다. 각각의 머무름 시간은 에스트라디올(Estradiol-17β)이 3.67분, 테스토스테론(Testosterone)이 3.73분, 프로게스테론(Progesterone)이 4.28분이었다. 3종 모두 짧은 분석 시간(총 10분) 내에 분리되었음을 확인할 수 있다.

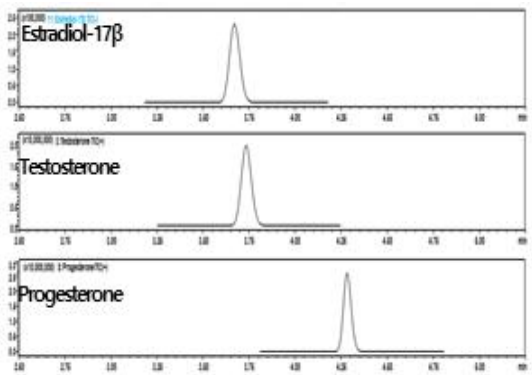


Fig. 1. Chromatogram of analytes

3.2 LC-MS 분석법의 유효성 검증

확립된 LC-MS 분석법의 유효성은 CODEX CCVDRF CAC/GL 71-2009 기준에 따라 확인하였다[20].

3.2.1 특이성(Specificity)

Fig1에서 보는 바와 같이 해당 분석물질과 같은 머무름 시간에 방해물질이 검출되지 않았다. 이를 통해서 각 분석물질의 특이성을 확인하였다. 따라서 본 분석법은 높은 분리능과 선택성을 있다고 할 수 있다.

3.2.2 직선성(Linearity)

Fig 2은 각 분석물질에 대한 직선성을 확인하기 위해 구한 검량선이다. 각 분석물질에 대해 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 mg/kg 5단계 농도의 유효성 검증 용액을 분석한 후 분석물질 농도 대비 검출반응(피크면적)에 대한 검량선을 구하였다. 에스트라디올(Estradiol-17β)의 검량선은 y=2.7859x이고, 테스토스테론(Testosterone)은 y=26.8380x이며, 프로게스테론(Progesterone)은 y=27.6709x이었다. 분석물질 3종 모두 상관계수(r^2)가 0.99 이상으로 높은 직선성을 보였다.

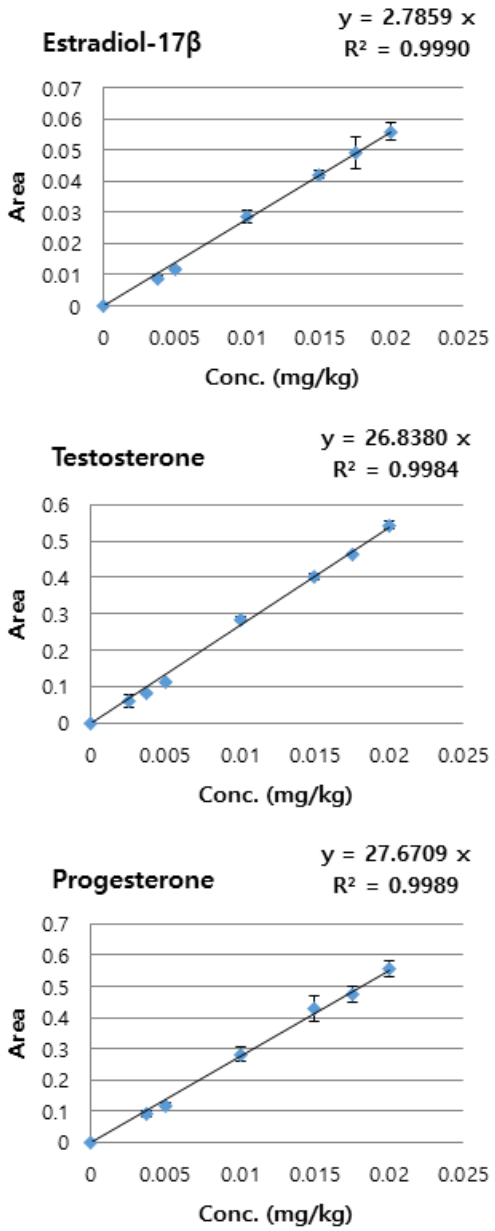


Fig 2. Calibration curves of analytes

3.2.3 정확도(Accuracy)와 정밀도(Precision)

Table 3에서는 바탕시료 별 정확도를 표시하였다. 소고기 근육에서의 정확도는 다음과 같다; 에스트라디올(Estradiol-17β)은 79~112%이고, 테스토스테론

(Testosterone)은 85~110%이며, 프로게스테론(Progesterone)은 81~111%이었다. 돼지고기 근육에서의 정확도는 다음과 같다; 에스트라디올(Estradiol-17β)은 84~107%이고, 테스토스테론(Testosterone)은 89~105%이며, 프로게스테론(Progesterone)은 105~108%이었다. 닭고기 근육에서의 정확도는 다음과 같다; 에스트라디올(Estradiol-17β)은 94~102%이고, 테스토스테론(Testosterone)은 99~103%이며, 프로게스테론(Progesterone)은 93~107%이었다. 이는 CODEX 가이드라인의 허용 범위인 50~120%에 속하기 때문에 각 바탕시료에서 분석물질 3종에 대한 분석 정확도가 확보되었음을 알 수 있었다.

Table 3. Accuracy(%)

	Estradiol-17β	Testosterone	Progesterone
Low Level (0.005 mg/kg)			
Cattle	79	85	81
Pork	84	97	108
Chicken	94	103	93
Medium Level (0.01 mg/kg)			
Cattle	112	110	111
Pork	102	89	105
Chicken	102	99	107
High Level (0.02 mg/kg)			
Cattle	99	95	98
Pork	107	105	108
Chicken	101	100	105

Table 4에서는 바탕시료 별 정밀도를 표시하였다. 소고기 근육에서 3종 분석물질에 대한 정밀도는 다음과 같다; 일내 정밀도는 1.9~11.2%이고, 일간 정밀도는 3.9~18.8%이었다. 돼지고기 근육에서 3종 분석물질에 대한 정밀도는 다음과 같다; 일내 정밀도는 3.0~8.7%이고, 일간 정밀도는 4.0~18.2%이었다. 닭고기 근육에서 3종 분석물질에 대한 정밀도는 다음과 같다; 일내 정밀도는 2.1~13.8%이고, 일간 정밀도는 2.8~17.9%이었다. 이는 CODEX 가이드라인의 허용 범위인 RSD〈35%에 속하기 때문에 각 바탕시료에서 분석물질 3종에 대한 분석 정밀도가 확보되었음을 알 수 있었다.

Table 4. Precision(RSD %)

		Estradiol-17β	Testosterone	Progesterone
Low Level (1xtarget LOQ)				
Cattle	intraday	11.2	2.8	4.5
	interday	14.1	13.9	12.8
Pork	intraday	3.0	3.9	4.8
	interday	11.2	18.2	14.9
Chicken	intraday	6.6	2.1	8.2
	interday	11.2	17.9	11.4
Medium Level (2xtarget LOQ)				
Cattle	intraday	5.5	5.7	7.6
	interday	18.8	6.3	3.9
Pork	intraday	8.6	4.6	8.7
	interday	11.0	13.0	12.9
Chicken	intraday	13.8	6.3	12.3
	interday	2.8	12.7	5.3
High Level (4xtarget LOQ)				
Cattle	intraday	7.8	1.9	3.3
	interday	13.7	10.1	8.0
Pork	intraday	3.9	5.0	6.1
	interday	4.0	12.9	14.8
Chicken	intraday	6.6	3.6	5.9
	interday	7.7	11.8	8.9

3.2.4 회수율 (Recovery)

Table 5에서는 추출회수율을 표시하였다. 에스트라디올(Estradiol-17β)과 테스토스테론(Testosterone)은 소고기 근육과 돼지고기 근육에서의 추출회수율은 30% 이상이었으나 닭고기 근육에서는 30% 이하였다. 프로게스테론(Progesterone)은 3종의 분석시료 모두에서 30%이하였다. 회수율에 대한 CODEX 가이드라인 허용 범위는 30% 이상이기 때문에 시료 분석 시 회수율을 보정해야 함을 확인하였다.

Table 5. Recovery(%)

	Estradiol-17β	Testosterone	Progesterone
Low Level (1xtarget LOQ)			
Cattle	103	97	64
Pork	92	111	83
Chicken	69	61	57
Medium Level (2xtarget LOQ)			
Cattle	89	98	72
Pork	98	98	69
Chicken	77	57	66
High Level (4xtarget LOQ)			
Cattle	82	82	67
Pork	115	120	81
Chicken	96	66	72

3.2.5 검출한계(LOD)와 정량한계 (LOQ)

검출한계(LOD)는 에스트라디올(Estradiol-17β)의 경우 소고기와 닭고기에서 0.001, 돼지고기에서 0.0004이며, 테스토스테론(Testosterone)는 소고기와 닭고기에서 0.0004, 돼지고기에서 0.0006이었고, 프로게스테론(Progesterone)의 경우 소고기에서 0.006, 돼지고기에서는 0.0009, 닭고기에서 0.001이었다.

정량한계(LOQ)는 에스트라디올(Estradiol-17β)의 경우 소고기에서 0.004, 돼지고기에서 0.001, 닭고기에서는 0.003이었고, 테스토스테론(Testosterone)는 소고기와 닭고기에서 0.001, 돼지고기에서 0.002이었고, 프로게스테론(Progesterone)은 소고기에서 0.002, 돼지고기에서 0.003, 닭고기에서는 0.004이었다. CODEX 가이드라인에 의하면 잔류물 분석을 위한 정량한계(LOQ)는 목표 정량한계(LOQ) 이하를 만족해야 한다. 본 분석법에서는 목표 정량한계(LOQ)를 0.005 mg/kg으로 설정하였고 모든 바탕시료에서 3종의 분석물질 각각의 정량한계(LOQ)는 목표 정량한계(LOQ)인 0.005 mg.kg 이하임을 확인하였다.

Table 6. Detection limit(LOD) and Quantitation limit(LOQ)

	Estradiol-17β	Testosterone	Progesterone
Cattle			
LOD (mg/kg)	0.001	0.0004	0.0006
LOQ (mg/kg)	0.004	0.001	0.002
Pork			
LOD (mg/kg)	0.0004	0.0006	0.0009
LOQ (mg/kg)	0.001	0.002	0.003
Chicken			
LOD (mg/kg)	0.001	0.0004	0.001
LOQ (mg/kg)	0.003	0.001	0.004

3.3 시료내 성장보조제 3종의 잔류량 확인

Table 7은 3종의 분석시료(소고기, 돼지고기, 닭고기의 근육)를 확립된 분석법으로 분석하여 잔류하는 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스토스테론(Testosterone), 프로게스테론(Progesterone)을 정량한 결과이다. 분석결과 정량한계 이상의 농도가 확인된 경우 검출 농도를 표시하였고, 정량한계 이하의 농도가 확인된 경우는 불검출로 표시하였다.

다른 유통 경로를 통해 3종의 분석시료를 각각 5개씩 구입하고 확립된 분석법을 적용하여 분석한 결과, 에스트라디올(Estradiol-17β)과 테스토스테론(Testosterone)은 모든 시료에서 정량한계 이하로 검출되었지만, 프로게스테론(Progesterone)은 2개의 소고기에서 0.002~0.003 mg/kg 농도로 검출되었다.

Table 7. Analysis of growth hormone in animal product

Compound	Estradiol-17β	Testosterone	Progesterone
Cattle 1	N.D	N.D	N.D
Cattle 2	N.D	N.D	N.D
Cattle 3	N.D	N.D	0.003
Cattle 4	N.D	N.D	0.002
Cattle 5	N.D	N.D	N.D
Pork 1	N.D	N.D	N.D
Pork 2	N.D	N.D	N.D
Pork 3	N.D	N.D	N.D
Pork 4	N.D	N.D	N.D
Pork 5	N.D	N.D	N.D
Chicken 1	N.D	N.D	N.D
Chicken 2	N.D	N.D	N.D
Chicken 3	N.D	N.D	N.D
Chicken 4	N.D	N.D	N.D
Chicken 5	N.D	N.D	N.D

N.D: Not detected(Under LOQ)

4. 논의

우리나라 식품 중 동물의약품의 잔류허용기준은 1990년 초반부터 설정되고 관리되었으나 기초자료가 미비한 상태였기 때문에 국외의 평가나 사례 등을 토대로 설정되는 경우가 많아 국내 실정에 적절하지 않는 경우가 대부분이었다. 국내·외 식품 중 동물의약품의 잔류가 사회적인 이슈로 부각되기 시작한 2000년대 초반에 들어서야 국제적 수준의 관리가 필요함을 인식하기 시작하였다. 동물의약품의 관리 체계를 현대화하면서 연구 사업을 진행하여 다양한 종류의 동물의약품에 대한 잔류허용기준을 신설하고, 기존에 제정된 잔류허용기준을 제·개정하였다[21-24]. 이러한 잔류허용기준의 재정비를 뒷받침하는 과학적 근거를 확보하기 위해 민감도와 특이도가 확보된 시험법 연구가 진행되고 있다.

시험법 연구는 주로 시료 전처리와 분석대상물질을 검출하여 정량할 수 있는 분석법 확립이 주가 되고 있다. 식품 중 물질 분석을 위해서는 주로 HPLC 또는 GC가 활용되며, 「축수산물 유해물질 분석법편람」[13] 또는 「식품 등의 기준 및 규격」[12]에 포함된 시험법들 대부분도 HPLC 또는 GC 기반 분석법이다. 최근에서는 식품 내 물질 분석에 MS를 도입하여 민감도와 특이도를 높이고 있다. 이에 따라 LC-MS 또는 GC-MS과 같은 고성능 장비를 활용하여 식품 내 극미량의 잔류물

질을 정량할 수 있는 분석법을 확립하는 연구들이 진행되고 있다.

본 연구에는 분석 시료의 전처리법에 대한 연구는 포함시키지 않았지만 추출용매를 달리하여 추출효율을 비교하였을 때, 기존 연구된 고체상 추출법보다 n-헥산 정제법이 분석 물질의 회수율이 높고 직선성이 우수하다는 것을 확인하였다. 고체상 추출법으로는 HLB(Hydrophilic-Lipophilic Balance)정제법[25]과 dispersive C18 정제법을 확인하였다. HLB정제법의 경우 에스트라디올(Estradiol-17β)이 추출되지 않았고, dispersive C18 정제법은 매질영향으로 크로마토그램의 피크에서 끌림 현상이 확인되어 정확한 정량이 어렵다고 판단하였다. 이에 비해 액체-액체 추출방법인 n-헥산 정제법을 적용했을 때 3종의 분석물질 모두 좋은 추출효율을 보였고 피크 끌림 현상 등도 확인되지 않았다. 따라서 본 실험에서 모든 시료의 전처리는 n-헥산 정제법을 적용하였다[26].

분석대상물질인 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스토스테론(Testosterone), 프로게스테론(Progesterone)은 각각 HPLC를 사용하여 분리하였고, ESI 이온화 과정을 거쳐 질량분석기에 주입되어 검출하였다. GC-MS 분석법은 본 실험의 분석 대상 물질 3종을 포함하는 스테로이드계열 물질 분석에 가장 많이 적용되고 있다[19]. 하지만 스테로이드계열 물질을 GC-MS으로 분석하기 위해서는 시료 내 분석대상물질에 대해 번거로운 유도체화를 진행하고, 여러 번의 정제 과정을 거치기 때문에 분석시료 전처리 과정이 복잡하고 시간이 많이 소요된다[19]. 본 연구에서 개발된 시험법은 LC-MS을 활용하였기 때문에 분석시료 전처리 과정에서 유도체화를 진행할 필요가 없었으며, 간단한 n-헥산 정제법을 포함하였다. 따라서 본 시험법을 적용하면 GC-MS 기반 시험법보다 간단하고 신속하게 시료 내 분석대상물질을 검출할 수 있다.

질량분석은 MRM 방법으로 positive & negative alternative switching mode로 진행하였다. MRM 방법은 분석대상물질의 모이온(precursor ion)에 대한 조각이온(product ion)을 검출하는 방식으로 선택성이 우수하여 특이성 확보에 유리하다[27]. 식품 시료의 경우 다양한 물질을 포함하고 있기 때문에 추출과 정제 과정만으로 간섭물질을 배제하는 데에는 한계가 있다. 또한 크로마토그램 상에서 분석 대상물질만 명확하게 분리하기 위해서는 10분 이상의 긴 분석 시간이 요구된다. 본 시험법은 MRM 방법을 적용하여 다양한 간섭물질이 존재하는 시료 내에서 머무름 시간이 유사한 물질 분석에 특이성을 확보할 수 있었다. 또한 positive & negative alternative switching mode로 대상이온을 검출하기 때문에 분석이온의 전하 상태를 고려하지 않아도 되는 편리함이 있다. 이러한 장점이 있기 때문에 본 연구에서 확립된 시험법은 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스토스테론(Testosterone), 프로게스테론(Progesterone)을 동시에 분석할 수 있는 동시시험법으로 확장시킬 수 있다.

개발된 분석법의 활용도를 높이기 위해서는 신뢰성 자료의 제출이 필수적으로 요구되고 있기 때문에 CODEX CAC/GL 71-2009에 근거하여[20] 유효성을 검증하였다. 유효성은 특이성, 직선성, 정밀도, 정확도, 추출 회수율, 검출한계와 정량한계를 확인하여 검증하였고 추출회수율을 제외한 항목에서 실효성 허용범위를 충족함을 확인하였다. 추출회수율은 CODEX 가이드라인 허용 범위인 30%보다 낮은 경우도 확인되었으나[20], 시료 분석에서는 바탕시료에 표준품을 첨가하여 작성한 검량선을 기준으로 정량하여 회수율을 보정하기 때문에 정확도는 확보된다고 판단하였다.

국내 유통되는 소고기, 돼지고기, 닭고기에 대해 확립된 분석법으로 분석을 진행하여 실제시료 적용성을 확인하였다. 분석 결과 13건의 시료는 모든 분석대상물질이 불검출이었고, 소고기 2건에서는 프로게스테론(Progesterone)농도가 0.002~0.003 mg/kg으로 확인되었다. 기존 문헌상에서도 자연 유래 프로게스테론(Progesterone)이 소고기에서 0.010 mg/kg 됨을 보고하고 있다[28]. 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스토스테론(Testosterone)과 다르게 프로게스테론(progessterone)은 자연 유래 호르몬으로 다양한 식품에서 확인되고 있다. 특히 계란과 우유 등의 낙농 식품에서 때에 따라 고농도의 프로게스테론(Progesterone)이 확인되기도 하므로 낙농 제품에서의 프로게스테론(Progesterone)의 잔류허용기준은 설정하지 않고 있다[29].

최근 식약처에서는 과학적 근거에 기반하여 식품 중 잔류동물의약품을 관리하기 위해서 약물의 모화합물 뿐 만 아니라 대사산물도 잔류물에 포함시켜 관리하고자 시도하고 있다. 이를 위해서는 식품 중 잔류 가능한

동물의약품과 그 대사산물을 검출할 수 있는 분석법의 확립이 선행되어야 한다. 본 연구에 포함된 에스트라디올(Estradiol-17β), 테스토스테론(Testosterone), 프로게스테론(Progesterone)의 경우는 식품 중 유의미한 대사산물이 보고되고 있지 않지만 지속적인 모니터링을 통해 대사산물의 검출 가능성을 확인하고[30], 필요하다면 이들 모화합물과 대사산물을 동시에 검출할 수 있는 분석법을 확립하여 관리체계의 기반으로 활용해야 한다[31].

5. 결론 및 제언

본 연구에서는 국내 유통 축산물 (국내산 및 수입품 포함)에서 확인되고 있는 성장보조제 일부에 대한 신속하고 신뢰성 높은 분석법을 확립하였다. 후속 연구를 통해 확립된 분석법을 기반으로 분석대상 성장보조제의 범위를 확장하고, 이를 모두 포함시켜 동시분석법을 확립한다면 활용성이 높은 분석법이 완성될 것으로 확신한다. 이를 통해 잔류동물용의약품의 안전 관리에 기여할 것으로 예상한다.

REFERENCES

[1] R. Zeleny, F. Ulberth, P. Gowik, J. Polzer, L. A. van Ginkel & H. Emons. (2006). *Veterinary drug residues in food-producing animals: A survey on current legislation, analytical techniques, and the impact of future (certified) reference materials in this field.* Geel : European Commission

[2] T. Beyene. (2016). Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *Journal of Veterinary Science and Technology, 07(01)*, 285-291. DOI : 10.4172/2157-7579.1000285

[3] N. Raza & K. H. Kim. (2018). Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products. *TrAC Trends Anal. Chem, 98*, 79-94. DOI : 10.1016/j.trac.2017.11.002.

[4] L. Moreno & C. Lanusse. (2017). *Veterinary drug residues in meat-related edible tissues. In: New Aspects of Meat Quality.* Cambridge : Woodhead Publishing Limited.

[5] T. Herago & A. Agonafir. (2017). Growth Promoters in Cattle. *Advances in Biological Research, 11(1)*, 24-34. DOI : 10.5829/idosi.abr.2017.24.34

[6] L. C. Dickson, J. D. MacNeil, J. Reid, & A. C. E. Fesser. (2003). Validation of Screening Method for Residues of Diethylstilbestrol, Dienestrol, Hexestrol, and Zeranol in Bovine Urine Using Immunoaffinity Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of AOAC international, 86(4),* 631-639. DOI : 10.1093/jaoac/86.4.631

[7] R. W. Stephany. (2010). Hormonal growth promoting agents in food producing animals. *Handb Exp Pharmacol,.195,* 355-367. DOI : 10.1007/978-3-540-79088-4_16

[8] E. Diamanti-Kandarakis et al. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews, 30(4),* 293-342. DOI : 10.1210/er.2009-0002

[9] C. Donovan. (2015). If FDA does not regulate food, who will? a study of hormones and antibiotics in meat production. *American Journal of Law and Medicine, 41(2-3),* 459-482. DOI : 10.1177/0098858815591528

[10] Codex Alimentarius. (2020). *Codex Veterinary Drug Residue in Food Online Database*. Food and Agriculture Organization of the United Nations(Online). http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/en/

[11] *Chapter I: Food and Drugs Administration, Department of Health and Human Services, Subchapter E: Animal Drugs, Feed, and Related Products, Part 556: Tolerances for residues of New Animal Drugs in food.* (2019). Washington D. C. : U.S. Food and Drug Administration.

[12] *Food Code(FC) No. 2020-128.* (2020). Oseong : National Institute of Food and Drug Safety Evaluation.

[13] *Manual of hazardous substances analysis in livestock and fishery products(MHSA).* (2017). Oseong : National Institute of Food and Drug Safety Evaluation.

[14] S. J. Lehotay & Y, Chen. (2018). Hits and misses in research trends to monitor contaminants in foods. *Anal. Bioanal. Chem, 410,* 5331-5351. DOI : 10.1007/s00216-018-1195-3

[15] N. Raza & K.-H. Kim. (2018). Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products. *TrAC*

Trends Anal. Chem, 98, 79-94.
DOI : 10.1016/j.trac.2017.11.002.

[16] H. Han, B. Kim, S. G. Lee & J. Kim. (2013). An optimised method for the accurate determination of zeranol and diethylstilbestrol in animal tissues using isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Chem., 140(1-2),* 44-51.
DOI : 10.1016/j.foodchem.2013.02.070

[17] R. Barreiro, P. Regal, M. Diaz-Bao, C. A. Fente & A. Cepeda. (2015). Analysis of Naturally Occurring Steroid Hormones in Infant Formulas by HPLC-MS/MS and Contribution to Dietary Intake. *Foods, 4(4),* 605-621.
DOI : 10.3390/foods4040605

[18] A. Goyon, J. Z. Cai, K. Kraehenbuehl, C. Hartmann, B. Shao & P. Mottier. (2016). Determination of steroid hormones in bovine milk by LC-MS/MS and their levels in Swiss Holstein cow milk. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 33(5),* 804-16.
DOI : 10.1080/19440049.2016.1175186

[19] I. Matraszek-Zuchowskal, B. Wozniak & A. Posyniak. (2017). Determination of Hormones Residues in Milk by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Anal. Methods, 10,* 727-739.
DOI : I 10.1007/s12161-016-0620-5

[20] CODEX alimentarius. (2012). *Guidelines for the Design and Implementation of National Regulatory Food Safety Assurance Programmes Associated with the Use of Veterinary Drugs in Food Producing Animals (CAC/GL 71-2009).* Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations

[21] H. C. Shin et al. (2010). *Planning study on the development of residue standardization for veterinary drugs.* Oseong : National Institute of Food and Drug Safety Evaluation.

[22] J. Hong et al. (2012). *Method development and monitoring on Residues of Veterinary Drugs in foods.* Oseong : National Institute of Food and Drug Safety Evaluation.

[23] G. S. Rhee et al. (2016). *Studies on the revision of analytical methods for veterinary drug residues in food code.* Oseong : National Institute of Food and Drug Safety Evaluation.

[24] J. H. Oh et al. (2019). *Improvement of analytical method for veterinary drugs in livestock products.* Oseong : National Institute of Food and Drug Safety Evaluation.

[25] H Schott. (1995). Hydrophilic-lipophilic balance, solubility parameter, and oil-water partition coefficient as universal parameters of nonionic surfactants. *J Pharm Sci., 84(10),* 1215-22.
DOI : 0.1002/jps.2600841014

[26] G. Schmidt & H. Steinhart. (2002). Impact of extraction solvents on steroid contents determined in beef. *Food Chemistry, 76(1),* 83-88.
DOI : 10.1016/S0308-8146(01)00237-0

[27] P. Stone, T. Glauner, F. Kuhlmann, T. Schlabach & K. Miller. (2009). *New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Analyses.* [Brochure]. Agilent publication.

[28] T. Nakajima et al. (2015). Determination and surveillance of hydrocortisone and progesterone in livestock products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A, 32(11),* 1833-1841.
DOI : 10.1080/19440049.2015.1084053.

[29] O. M. Palacios, H. N. Cortes, B. H. Jenks & K. C. Maki1. (2020). Naturally occurring hormones in foods and potential health effects. *Toxicology Research and Application, 4,* 1-12.
DOI : 10.1177/2397847320936281

[30] B. B. Hirpessa, B. H. Ulusoy & C. Hecer. (2020). Hormones and Hormonal Anabolics: Residues in Animal Source Food, Potential Public Health Impacts, and Methods of Analysis. *Journal of Food Quality, 3,* 1-12.
DOI : 10.1155/2020/5065386

[31] X. Tan, Z. Li, L. Deng, S. Zhao & M. Wang. (2016). Analysis of 13 kinds of steroid hormones in raw milk using modified QuEChERS method combined with UPLC-QTOF-MS. *Journal of Integrative Agriculture, 15(9),* 2163-2174.
DOI : 10.1016/S2095-3119(16)61386-2

이 수 현(Soo Hyun Lee) **[정회원]**

· 1993년 2월 : 서울대학교 약학과 학사
· 1996년 2월 : 서울대학교 약학대학 약학석사
· 2009년 8월 : 서울대학교 약학대학 약학박사
· 2010년 3월 ~ 2013년 2월 : 한국과학기술연구원(KIST) 박사후 연구원
· 2013년 3월 ~ 현재 : 공주대학교 의료정보학과 교수
· 관심분야 : 약학, 헬스케어서비스, 의료정보, 융합
· E-Mail : lsh5027@kongju.ac.kr