

UHPLC-MS/MS를 사용한 소고기 내 다수 종의 식품 매개 촉진제 관련 잔류 약물의 동시 스크리닝

저자

Heming Qi, Zhiqiang Yin,
Shen Han, and Fengyun Cui
Technique Center,
Beijing Entry-Exit Inspection
and Quarantine Bureau
Beijing, China

Meiling Lu
Agilent Technologies (China)
Co. Limited
Beijing, China

개요

본 응용 자료는 초고성능 액체 크로마토그래피 및 탠덤 질량 분석기(UHPLC-MS/MS)를 이용해 소고기 내 4종의 주요 촉진제 관련 잔류 약물을 동시 측정하는 분석법에 대해 설명합니다. 본 분석법은 최근 출간된 연구에 기초하고 있습니다¹. 소고기 시료는 먼저 산성화된 acetonitrile을 사용해 추출한 뒤, 지질 간섭을 제거하기 위해 지질 여과 카트리지를 사용해 여과하였습니다. 그 다음 시료를 magnesium sulfate로 건조하고 질소 기화로 농축시켰습니다. 남은 잔류물은 재용해시켜 원심분리 한 후, UHPLC-MS/MS 분석을 하였으며 외부 매질 일치 표준물질 검량으로 정량하였습니다. 이 분석법에서 모든 화합물은 0.10~50µg/L 농도 범위에서 선형회귀계수 ≥ 0.995 로 우수한 직선성을 보여주었습니다. 검출 한계 범위는 0.00060~0.090µg/kg이고 정량 한계 범위는 0.0020~0.30µg/kg이었습니다. 스팅킹 농도 0.40, 1.0 및 2.0µg/kg에서 모든 화합물의 회수율 범위는 57.3~117 %였고, 대부분의 회수율 값은 70~120 %, 모든 RSD(n = 5)는 3.07~15.6 % 이내였습니다. 이 분석법은 간편하고 빠르며 높은 감도와 신뢰성을 제공하며, 소고기 내 4종의 연구 대상 촉진제 관련 잔류 약물의 정량 스크리닝에 적용할 수 있습니다.

서론

식용 동물의 근육 발육을 촉진하고 육질의 수분 함량을 높이기 위해 금지 또는 규제 대상 촉진제를 불법적으로 동물 사료에 추가하기도 합니다. 경제적 이윤을 얻기 위한 이러한 행위로 인해 식용 동물의 조직 내에 촉진제 약물이 잔류하게 됩니다. 이러한 물질로 오염된 식품을 운동선수가 섭취하게 되면 금지약물검사에서 양성 결과가 나올 수 있습니다². WADA 기구에 의한 규정에 따라, 중국 국가인증인가감독관리국(Certification and Accreditation Administration of China, CNCA)은 2008 베이징 올림픽 게임 전 β -길항제, 스테로이드, 글루코코르티코이드 및 제라놀과 같은 4종의 불법 촉진제 관련 물질을 올림픽 식품 규제 성분으로 규정하였습니다³.

이들 촉진제 관련 물질은 운동선수에게 영향을 미칠 뿐 아니라², 일반 대중에게도 호르몬에 의한 암⁴, 급성 독성 반응⁵, 남성 불임⁶ 등의 건강상 위험을 증대시킵니다. 중국 MOA B-235는 동물 조직 내 betamethasone 및 dexamethasone의 최대 허용 농도를 $0.75\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 명시하고 있습니다. 클렌부테롤, 살부타몰, 테스토스테론-17-프로피오네이트, 제라놀

및 트렌볼론의 잔류는 동물 유래 식품에서 검출이 불가능하며, 히드로코르티손은 외용제로만 사용될 수 있지만, 어디에서도 최대 잔류 허용량(MRL)을 규정한 바가 없습니다⁷. 유럽연합 위원회(European Union)는 소 조직 내 잔류 프레드니솔론 및 클렌부테롤의 MRL을 각각 $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 및 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 규정하였습니다. 소 및 돼지 조직 내 betamethasone 및 dexamethasone의 MRL은 $0.75\mu\text{g}/\text{kg}$ 입니다⁸. 규제 요건을 만족하기 위해서는 감도와 신뢰성이 높은 분석법의 개발이 필요합니다.

촉진제 관련 잔류 약물의 측정을 위한 일부 분석법에는 ELISA, HPLC, GC/MS 및 LC-MS/MS가 포함됩니다. LC-MS/MS 분석법은 다음과 같은 이점이 있습니다.

- 높은 선택성 및 감도로 여러 종류의 화합물 동시 모니터링
- 유도체화 불필요
- 위양성 결과 최소화

LC-MS/MS 분석법은 잔류 수의약품 분석에 널리 사용되어 왔습니다^{1, 9-11}. 그 신뢰성은 전적으로 시료 추출 및 클린업 절차에 달려 있습니다. 촉진제 관련 잔류 약물의 분석을 위해 현재 이용 가능한 클린업 분석법에는

고체상 추출(SPE) 분석법과 QuEChERS 분석법이 있습니다. SPE 분석법은 간섭을 효율적으로 제거하기 위해 2개의 컬럼을 연결하여 사용하는 경우가 많습니다⁹⁻¹⁰. 하지만 이 분석법은 손이 많이 가고, 시간 소비가 많고 환경에 유해한 대량의 용매를 사용한다는 단점이 있습니다. 잔류물 분석에는 QuEChERS 분석법이 널리 사용되어 왔습니다. 이 분석법은 특히 일부 혼합 매트릭스의 경우 간섭 영향으로 인한 정량 편향을 최소화하도록 주의해야 합니다¹⁰⁻¹¹.

대안 분석법으로, 상용화된 지질 제거 여과 카트리지(특정 화학 흡착제로 채워져 있음)를 진공 여과와 조합해 플라즈마로부터 지질, 단백질 및 계면활성제를 선택적으로 흡수할 수 있습니다. 이 분석법은 혈액 내 약물 농도를 효과적으로 분석하는 데 응용되어 왔습니다¹². 본 응용 자료에서는 소고기 내 식품 매개 촉진제 관련 잔류 약물을 높은 감도와 신뢰성으로 분석하기 위해 지질 제거 여과 카트리지를 사용한 클린업에 이은 UHPLC-MS/MS 분석에 기초한 분석법을 개발하였습니다.

실험

재료 및 시약

Methanol 및 acetonitrile은 LC/MS 등급으로 Merck에서 구매하였습니다. Formic acid, ammonium acetate 및 acetic acid는 모두 LC 등급으로 Dima Technologies에서 구매하였습니다. 실험 내내 Milli-Q 정제수를 사용하였습니다. 실험에 사용된 기타 모든 화학물질은 분석용 등급으로 현지 업체로부터 구매하였습니다.

Captiva nondrip 지질 카트리지 (p/n A5300635) 및 QuEChERS 추출용 패키지(p/n 5982-0032)는 애질런트 제품을 사용하였습니다. 비교 분석을 위해 Agilent QuEChERS 분산 클린업 키트 (p/n 5982-4956CH)도 사용하였습니다. 18개의 화학 표준물질은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany)로부터 구매하였습니다. 이들 표준물질은 다음과 같습니다.

- **β-길항제:** clenbuterol, penbutolol, ractopamine, salbutamol (albuterol), terbutaline

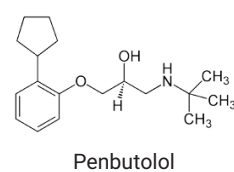
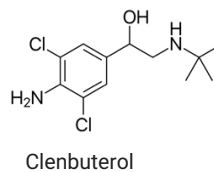
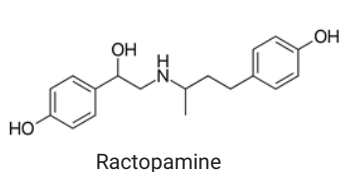
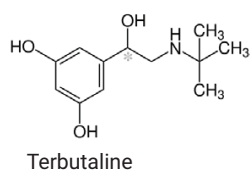
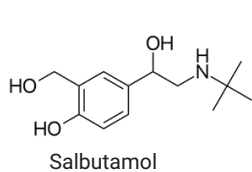
- **스테로이드:** 17-methyltestosterone, metandienone, progesterone, testosterone-17-propionate, trenbolone

- **코르티코스테로이드:** beclomethasone, betamethasone, dexamethasone, fludrocortisone acetate, hydrocortisone, prednisolone, prednisone

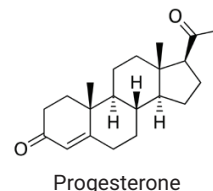
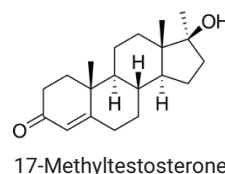
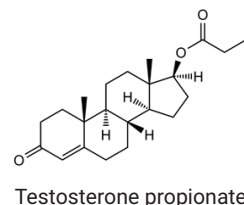
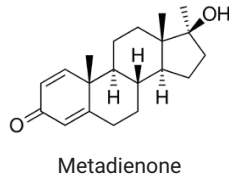
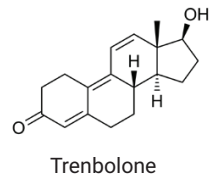
- 제라놀

그림 1은 이들 화합물의 화학적 구조를 나타냅니다.

β-Antagonists



Steroids



Corticosteroids

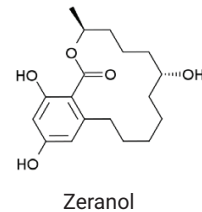
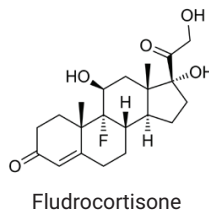
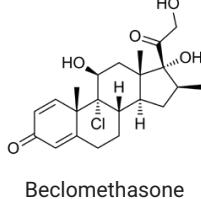
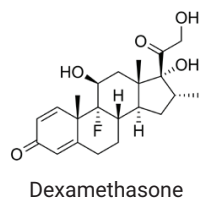
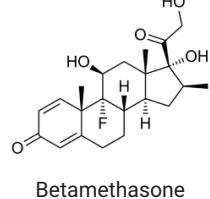
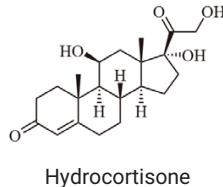
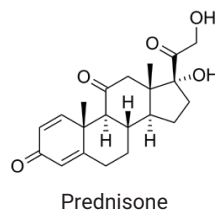
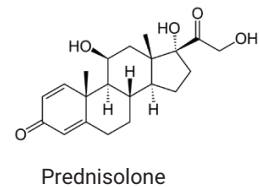


그림 1. 4종의 연구 대상 축진제 관련 물질의 화학적 구조

표준 용액 준비

각 화학 표준물질 10.0mg을 정확히 재어 methanol에 용해한 뒤 10mL 용적 플라스크에 옮겼습니다. 그 다음 methanol을 사용해 각 화합물의 양을 10mL까지 채워 각 화합물의 최종 농도가 1.0g/L 되게 표준원액을 제조하였습니다. 그리고 나서 18개 화합물의 각 표준 원액 100μL를 하나의 10mL 용적 플라스크에 옮겨, 최종 용액을 볼텍싱으로 잘 혼합하였습니다. 그 다음 methanol을 플라스크에 추가하여 총량이 10mL가 되게 하여 최종 농도가 10mg/L인 표준 혼합 용액을 얻었습니다. 이 표준 혼합 용액을 메탄올:물 (v:v = 7:3) 용액을 사용해 희석하여 일련의 표준 검량 용액을 제조하였습니다. 추출 및 클린업 과정을 통해 얻은 매질 바탕 잔류물 시료는 메탄올:물 (v:v = 7:3) 용액으로 용해하였습니다. 그 다음 이 용액을 매질 일치 검량 용액 전처리를 위한 용매로 사용하였습니다.

LC/MS 상세 조건

표 1. 기기 조건

LC 조건	
기기	Agilent 1290 Infinity II LC(내장형 탈기 장치)
자동 시료 주입기	Agilent 1290 Infinity II 자동 시료 주입기(온도 조절 기능 포함)
컬럼 장치	Agilent 1290 Infinity II 항온 컬럼 장치
컬럼	Agilent ZORBAX Phenyl-Hexyl, 2.1 × 150mm, 1.8μm
컬럼 온도	40°C
이동상	A) 5.0mM NH ₄ Ac/0.01% HAc in H ₂ O B) Methanol:acetonitrile (v/v 7:3)
유속	0.4mL/분
주입량	3.0μL
평형 시간	3.0분
그라디언트 용리 프로파일	0 ~ 3분: 5 %B ~ 15 %B, 3 ~ 3.5분: 15 %B ~ 40 %B, 3.5 ~ 13분: 40 %B에서 유지, 13 ~ 15분: 40 %B ~ 55 %B, 15 ~ 18분: 55 %B ~ 95 %B, 18 ~ 20분: 95 %B에서 유지
MS/MS 조건	
기기	Agilent 6490 QQQ LC/MS 및 Agilent Jet Stream ESI 이온화원
이온화 모드	양이온/음이온
건조 가스 온도	200°C (±)
건조 가스 유속	14L/분(±)
분무 가스 압력	35psi(±)
Sheath 가스 온도	350°C (±)
Sheath gas 유속	11L/분(±)
캐필러리 전압	3,500V (+)/3,000V (-)
노즐 전압	500V (+)/1,500V (-)
Fragmentor 전압	380V
고압 RF	150V (+)/90V (-)
저압 RF	60V (±)
스캔 모드	다중 반응 모니터링

시료 추출 및 클린업

소고기 시료를 잘라 균질화한 뒤, (5.0 ±0.1)g을 50mL 원심분리 튜브에 옮겼습니다. 그 다음 산성화된 acetonitrile(acetonitrile에 1.0% acetic acid 용해) 10mL를 원심분리 튜브에 추가하였습니다. 튜브를 즉시 2분간 볼텍싱 처리하였습니다. 그 다음 sodium sulfate 4.0g 및 sodium chloride 1.0g이 포함된 염 패키지를 튜브에 추가하였습니다. 튜브를 다시 즉시 2분간 볼텍싱 하고 5,000rpm에서 5분간 원심분리 하였습니다. 상층액 (2.25mL)은 0.75mL의 Milli-Q 정제수를 포함한 Captiva nondrip 지질 카트리지를 (p/n A5300635)로 옮겼습니다. 여과 카트리지의 용액을 5회 피펫팅으로 완전히 혼합하였습니다. 카트리지를 진공 여과를 통해 완전히 건조시키고, 여과액은 수집 튜브 (5mL 원심분리 튜브)에 수집하였습니다. 수집 튜브에 magnesium sulfate(0.30g)을 추가하고, 튜브는 즉시 볼텍싱으로 혼합한 뒤 5,000rpm에서 5분간 원심분리 하였습니다. 그 다음 상층액 1.0mL를 깨끗한 5mL 원심분리 튜브에 옮기고, 40°C에서 질소로 건조하였습니다. 그 다음 잔류물을 0.35mL methanol에 용해시키고, 물 0.15mL를 추가해 희석하여, 최종 비율이 메탄올:물 (v:v) = 7:3인 주입 용액을 제조하였습니다. 최종 시료 용액을 14,000rpm에서 5분간 원심분리 하였고, 상층액은 LC-MS/MS 분석을 위해 2mL 바이알의 바이알 인서트로 옮겼습니다.

결과 및 토의

UHPLC-MS/MS 조건의 최적화

각 화합물의 MS/MS 수집 파라미터는 우선 Agilent veterinary drug MRM 데이터베이스에서 선택하였습니다. MRM 데이터베이스에 없는 약물은 Agilent Masshunter Optimizer 소프트웨어로 최적화하여 MRM 전이

(transition) 파라미터를 얻었습니다. 이 파라미터에는 한 개의 전구 이온, 두 개의 조각 이온 및 각 조각 이온당 얻을 수 있는 최대 강도의 충돌 에너지가 포함됩니다. 정량 분석을 위해 더 높은 강도를 제공하는 MRM 전이 이온쌍을 선택하였으며 나머지는 화합물 확인에 사용하였습니다. 표 2는 18개 화합물의 최종 파라미터를 보여줍니다.

표 2. 18개의 촉진제 관련 화합물 검출을 위한 MRM 파라미터

시간 세그먼트	화합물	RT (분)	전구 이온 **	정량 이온/ 정성 이온 **	충돌 에너지(V)	측정 시간(ms)	이온화 모드
1	N/A	흐름 방향을 폐액 방향으로 전환					
2	Salbutamol (Albuterol)	3.13	240.2	148.1*/166.1	20*/10	100	+
2	Terbutaline	3.15	226.1	152.1*/107	10*/40	100	+
3	Ractopamine	5.06	302.2	284.2*/107	10*/40	100	+
3	Clenbuterol	5.58	277.1	203*/259.1	20*/10	100	+
4	Prednisolone	9.88	361.2	147.1*/307.1	24*/8	80	+
4	Prednisone	9.99	359.2	323.2*/147.1	10*/20	80	+
4	Hydrocortisone	10.13	363.2	121.1*/309.2	20*/20	80	+
4	Fludrocortisone acetate	10.19	381.1	239.1*/181.1	27*/35	80	+
5	Betamethasone	13.95	393.2	373.2*/355.2	10*/10	100	+
5	Dexamethasone	14.44	393.2	355.2*/373.2	10*/10	100	+
5	Beclomethasone	15.63	409.2	391.2*/279.2	10*/20	120	+
5	Trenbolone	15.76	271.2	253.2*/199.1	20*/20	110	+
6	Zeranol	16.61	321.1	277.1*/303.0	23*/23	100	-
6	Penbutolol	16.59	292.2	236.2*/201.1	20*/20	10	+
6	Metandienone	16.83	301.2	149*/121	15*/29	30	+
6	17-Methyltestosterone	17.21	303.2	97.1*/109.1	30*/32	30	+
7	Progesterone	17.83	315.2	109.1*/97.1	20*/20	150	+
7	Testosterone-17-propionate	18.14	345.2	109.1*/97.1	40*/20	150	+

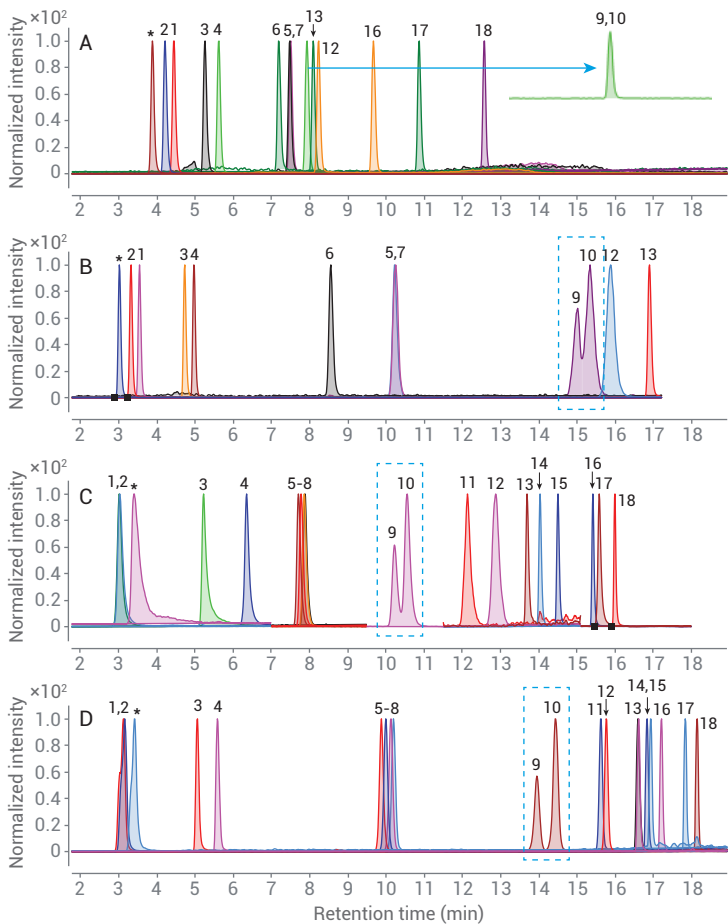
* 정량 이온

** 단위 질량 분리능이 전구 및 생성 이온 모두에 사용되었음

표준 화합 혼합물은 최적화된 MS 수집 조건 하에서 여러 컬럼을 사용해 분리하였습니다. 우선 Agilent Poroshell C18 컬럼으로 시험하였습니다. 이동상 성분 및 그레디언트 용리 프로파일을 다양하게 변경하였지만 (그림 2의 조건 참조), 두 이성질체 betamethasone과 dexamethasone은 어떠한 분리 경향도 보이지 않았습니다 (그림 2A 삽도). 동일한 이동상 성분 및 그레디언트 용리 프로파일을 사용해 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 컬럼에서 분석하니 두 이성질체가 어느 정도 분리되는 경향을 보였습니다. 이동상 및 그레디언트 용리 프로파일을 변경하면서, 2개 용매

이동상 중 하나인 methanol/acetonitrile (v/v = 7/3)을 사용하였을 때 이성질체 쌍의 분리는 더 나아졌으나, 머무름 시간은 더욱 길어지고(약 15분), 이성질체의 피크 폭이 더 넓어집니다(그림 2B). 대부분의 표적 화합물이 유사한 방향족 또는 헤테로고리 구조를 공유한다는 점을 고려하면, phenyl-hexyl 고정상은 C18 컬럼과 다른 분리 선택성을 제공할 수 있습니다. 그러므로 동일 길이의 Agilent ZORBAX Phenyl-Hexyl 컬럼으로 분석하였습니다. 그림 2C에서는 짧아진 머무름 시간(10~11분)과 함께 거의 베이스라인 분리가 이루어진 것을 볼 수 있습니다.

Phenyl-Hexyl 컬럼의 길이를 늘리면 이성질체 쌍을 더 확실하게 분리할 수 있습니다. 만족스런 감도 확보를 위해 제라놀이 높은 pH에서 분석되어야 한다는 점을 고려해 물에 추가되는 물질을 0.1% formic acid/5mM ammonium acetate 에서 0.01% acetic acid/5mM ammonium acetate로 변경하였습니다. 그림 2D에서는 대부분의 화합물에서 좁아진 피크와 함께 베이스라인 분리가 이루어진 것을 볼 수 있습니다. 그리하여 ZORBAX Phenyl-Hexyl 컬럼 (2.1 × 150mm, 1.8μm)을 분리를 위한 분석 컬럼으로 선택하였습니다. 표 1은 선택된 컬럼에 대해 최적화된 이동상 성분



이동상: A) 0.1% Formic acid/(5 mmol/L ammonium acetate in water)
B) Methanol
유속: 0.3mL/분
그레디언트: 0~3분, 5 ~ 15 %B;
3~3.5분, 15 ~ 45 %B;
3.5~5분, 45 %B에서 유지;
5~5.1분, 45 ~ 65 %B;
5.1~9분: 65 ~ 75 %B;
9~12분: 75 ~ 95 %B

이동상: A) 5mmol/L Ammonium acetate/0.1% formic acid in water
B) 5mmol/L ammonium acetate/0.1% formic acid in methanol/acetonitrile (7/3, v/v)
유속: 0.4mL/분
그레디언트: 0~3분, 5 ~ 15 %B;
3~3.5분, 15 ~ 45 %B;
3.5~15분, 45 ~ 55 %B;
15~23분, 55 ~ 95 %B

이동상: A) 2mmol/L Ammonium acetate in water
B) Methanol/acetonitrile (7/3, v/v)
유속: 0.4mL/분
그레디언트: 0~3분, 5 ~ 15 %B;
3~3.5분, 15 ~ 40 %B;
3.5~12분, 40 %B에서 유지;
12~12.5분, 40 ~ 55 %B;
12.5~16분, 55 ~ 95 %B;
16~18분, 95 %B에서 유지

그림 2. MRM 크로마토그램 오버레이는 18개 화합물, 특히 이성질체 쌍인 betamethasone/dexamethasone의 분리를 보여주고 있으며, 해당 최적 기율기 용리 조건으로 4개의 컬럼을 사용하여 분리하였습니다. A) Poroshell C18 (100 × 2.1mm, 2.7μm); B) ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 × 2.1mm, 1.8μm); C) ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (100 × 2.1mm, 1.8μm); D) ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (100 × 2.1mm, 1.8μm); 컬럼 D의 이동상 및 기율기 프로파일은 "실험" 섹션에 나와 있습니다. **참조:** A의 화합물 및 B~D의 점선으로 된 사각형은 이성질체 쌍의 크로마토그래피 피크를 표시하며, *가 달린 피크는 최종 분석법에 포함되지 않았습니다. 표시된 피크의 시퀀스는 표 2의 화합물에 대한 머무름 시간 순으로 되어 있습니다.

및 그레디언트 용리 프로파일을 보여주며, 표 2는 각 화합물의 최종 머무름 시간을 나타냅니다.

시료 추출 및 클린업 절차의 최적화

이 분석법은 시료 추출 및 클린업 절차의 간소화로 높은 처리량을 확보하고 비용 및 인건비를 절감할 수 있습니다. 시료 추출의 직접 분석은 간단하고, 간편하지만 가끔 심각한 간섭 문제를 일으켜 유효한 측정 결과를 제공하기 어렵습니다. 예를 들어, 18개 표적 화합물에 2.0µg/kg 농도로 스파이킹한 소고기 시료의 산성화된 acetonitrile 추출물을 직접 분석한 결과 18개 화합물 전부 60% 미만의 회수율을 보였으며, 이들 중 salbutamol 및 terbutaline의 회수율은 그림 3 절차 1의 막대 그래프에 표시된 바와 같이 20% 미만이었습니(절차 1을 이용한 그림 3의 왼쪽 막대). 이는 표적 화합물과 동시 추출된 매트릭스가 무시할 수 없는 간섭을 일으켜 18개 화합물 모두의 정확한 측정에 영향을 미쳤음을 나타냅니다.

소고기 매질의 주요 성분은 단백질 및 지질입니다. 산성화된 acetonitrile 추출을 통해 소고기로부터 대부분의 단백질을 침전시키므로, 매트릭스 간섭은 주로 매질에서 동시 추출되는 지질에서 발생합니다. 우선 QuEChERS 분산 클린업을 시험하였습니다. 추출물은 PSA 및 C18을 흡착제로 사용해 클린업 한 후 원심분리하여 LC-MS/MS 분석에 사용하였습니다. 절차 2를 사용한 그림 3에서 볼 수 있는 바와 같이 18개 화합물 중 13개가 70~120%의 회수율을 보였습니다. 하지만 나머지 화합물의 회수율은 만족스런 범위 밖으로, 특히 penbutolol 및 testosterone-17-propionate의 경우 회수율은 각각 21%와 25%였습니다. 지질을 효과적으로 제거하기 위해 Captiva 지질 카트리지를 사용하였습니다. 여과액 분석에서 18개 화합물 중 15개의 회수율 범위가 70~120 %로 나타나 매트릭스 대부분이 제거되었음을 알 수 있습니다 (그림 3의 절차 3을 사용한 막대). 그림 3의 절차 2를 사용한 막대로 보여지는 상업용 QuEChERS 패키지와 비교해 보면 화합물

대부분의 회수율은 유사합니다. 하지만 penbutolol의 경우 소고기에서 회수율은 Captiva를 사용했을 때가(71%) QuEChERS를 사용했을 때보다(21%) 훨씬 높았습니다. 그러므로 이 화합물군에서는 Captiva 지질 카트리지가 QuEChERS 분석법보다 더 나은 성능을 보였습니다.

하지만 절차 3을 사용한 그림 3에서 보여지듯, 스파이킹 농도가 2.0µg/kg인 한 화합물 시료를 Captiva 카트리지로 여과하니 40% 미만의 회수율을 얻었습니다. 시료가 추출 및 여과 후 원래 스파이킹 농도의 3/8로 희석되었다는 점을 고려할 때, 일부 화합물은 낮은 MS 감응으로 정확한 분석이 더욱 어렵게 됩니다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 건조제 유형 및 양을 분석한 뒤 농도 수준을 원래의 스파이킹 농도로 만들기 위한 질소 건조를 수행하였습니다. Magnesium sulfate 0.30g을 사용하면 (절차 4를 사용한 그림 3의 오른쪽 막대), 약 58%의 회수율을 보인 2개 화합물을 제외한 모든 화합물이 70~120% 내의 회수율을 보였습니다. 이러한 결과는

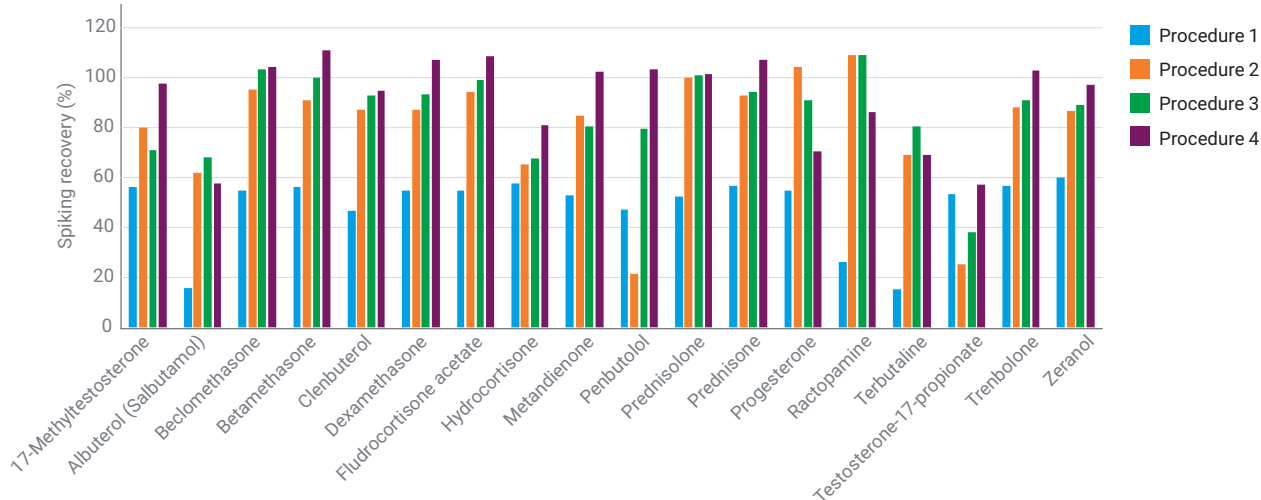


그림 3. 스파이킹 시료에 대한 표적 화합물 회수율 비교를 위해 다른 클린업 절차를 사용하였습니다. 절차 1: 산성화된 acetonitrile 추출 후 상층액 직접 분석; 절차 2: QuEChERS 분산 SPE 클린업 후 상층액 분석; 절차 3: Captiva 지질 제거 여과 카트리지를로부터 수집된 여과액 분석; 절차 4: 절차 3 이후 얻어진 여과액을 분석 전 추가로 농축 **참조:** 각 화합물의 스파이킹 농도는 2.0 µg/kg입니다.

Captiva 지질 카트리지의 사용에 이은 최적화 농축 단계가 효율적이며, 시료 클린업 방법으로 선택될 수 있음을 나타냅니다. "실험" 섹션에서 전반적인 시료 추출 및 클린업 절차를 확인할 수 있습니다.

매트릭스 효과 평가

매트릭스 간섭은 LC/MS 분석에서 발생하는 일반적 현상입니다. 매트릭스의 존재가 분석법 성능에 영향을 미치는지를 평가하기 위해 두 세트의 검량 용액을 준비하였습니다. 하나는 순수 용매로 준비하였으며 다른 하나는 바탕 매질로 준비하였습니다. 두 용액으로 준비한 표적 화합물 모두 선형 감응을 얻었습니다. 그 다음 매질 일치 표준 용액을 통해 얻은

검량선의 직선 기울기($\text{slope}_{\text{matrix}}$)에 대한 용매 표준 용액을 통해 얻은 검량선의 직선 기울기($\text{slope}_{\text{solvent}}$)의 비율을 사용해 매트릭스 효과(ME%)를 평가하였습니다. 이 비율이 100%로부터의 편차가 커질수록 매트릭스 효과는 더욱 강해집니다. 그림 4는 18개 화합물 중 13개가 상대 기울기 80~120% 이내로 무시할 만한 매트릭스 효과를 나타냄을 보여줍니다. Turbutaline은 예외로 상대 기울기 비율이 140%에 달해 강한 매트릭스 상승 효과를 보여주는 반면, 그 외 trenbolone, 17-methyltestosterone, progesterone, testosterone-17-propionate 4개 화합물은 매트릭스 억제 효과를 보였습니다. 4개 화합물 중 trenbolone과 17-methyltestosterone은

상대 기울기 비율 45~75% 이내로 약간 억제된 효과를 보이는 반면, progesterone과 testosterone-17-propionate는 상대 기울기 비율 25% 미만으로 두 화합물의 경우 매트릭스 억제가 75% 이상일 수 있음을 나타냅니다. 그러므로 매트릭스 효과로 인한 측정 편향을 최소화하기 위해 정량 분석에 매질 일치 외부 표준물질 검량을 선택하였습니다. 표 3은 각 화합물의 매질 일치 검량 방정식을 보여줍니다. 모든 화합물은 검사 농도 범위 0.10~50.0 µg/L 내에서 모든 선형회귀계수가 0.995 이상으로 매우 훌륭한 직선성을 보여줍니다.

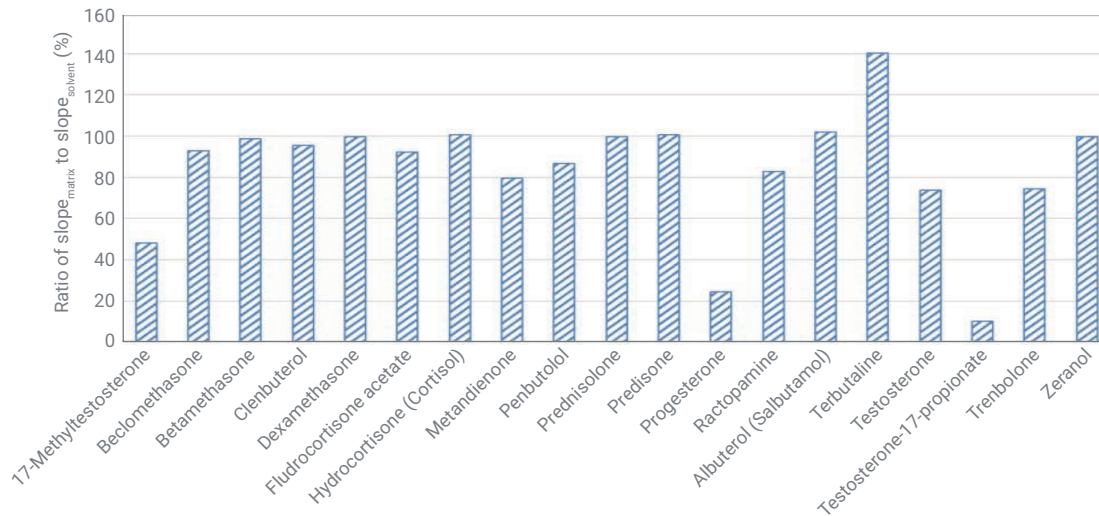


그림 4. 매질 일치 검량 표준물질로 얻은 검량선의 기울기에 대한 순수 용매 용액으로 얻은 검량선의 기울기 비율. 이 비율은 일부 화합물에서 매트릭스 간섭을 무시할 수 없음을 보여줍니다.

검출 한계(LOD)와 정량 한계(LOQ)

외부 정량 분석에는 매질 일치 표준 용액을 사용하였으며 매질 일치 검량 표준 용액이 0.10~0.50µg/L 검량 농도에서의 신호대 잡음비(S/N)를 사용하여 LOD 및 LOQ를 계산하였습니다. 표 3은 18개 화합물 중 6개가 0.010µg/L 이하의 LOQ를 가지며, 18개 중 7개가 0.010~0.10µg/L 이내의 LOQ를 가지는 것을 보여줍니다. 나머지 5개 화합물은 0.10~0.30µg/L 이내의 LOQ를 가집니다. 현재 식품 규정에서 정한 MRL보다 상당히 낮은 LOQ를 가집니다⁷⁻⁸.

정확도 및 정밀도

분석법의 정확도 및 정밀도 테스트를 위해 바탕 매질을 사용해 스파이킹 회수율 테스트를 수행하였습니다. 이 화합물 그룹의 스파이킹 농도는 0.40, 1.0, 및 2.0µg/kg으로 설정하였습니다. 바탕 매질을 대조군으로 사용하여 각 스파이킹 농도당 5회 반복 분석하였습니다. 표 4는 평균 스파이킹 회수율 범위가 57.3~113%로 대부분의 회수율은 70~120% 이내이고 모든 RSD (n=5)는 3.07~15.9%임을 보여줍니다. 이 결과는 분석법이 정확도와 신뢰성을 가지고 있으며, 소고기 내 이들 화합물의 일반적 스크리닝을 위한 요건을 충족함을 나타냅니다.

표 3. 18개 촉진제 관련 화합물에 대한 LOD, LOQ 및 매질 일치 검량 방정식

화합물	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	선형 방정식	R ²
17-Methyltestosterone	0.017	0.058	$y = 38630.633850x - 2712.183670$	0.9963
Beclomethasone	0.019	0.063	$y = 24440.261255x - 1287.045836$	0.9982
Betamethasone	0.0060	0.020	$y = 12658.873102x - 765.317191$	0.9978
Clenbuterol	0.00060	0.0020	$y = 168775.128370x - 12445.538604$	0.9984
Dexamethasone	0.0045	0.015	$y = 13052.936867x - 784.381709$	0.9987
Fludrocortisone acetate	0.057	0.19	$y = 4764.510997x - 387.251224$	0.9975
Hydrocortisone (Cortisol)	0.0010	0.0030	$y = 12488.904021x + 36166.820636$	0.9951
Metandienone	0.023	0.078	$y = 52368.606723x - 2751.669276$	0.9985
Penbutolol	0.0021	0.0070	$y = 402604.216811x - 15468.821823$	0.9989
Prednisolone	0.018	0.061	$y = 8134.435245x - 647.343434$	0.9978
Prednisone	0.066	0.22	$y = 5669.367470x - 542.548363$	0.9984
Progesterone	0.033	0.11	$y = 23658.649124x + 20011.903129$	0.9967
Ractopamine	0.0030	0.010	$y = 225111.886998x - 10996.048625$	0.9978
Salbutamol	0.0015	0.0050	$y = 254890.265922x - 21764.566926$	0.9982
Terbutaline	0.0012	0.0040	$y = 182589.673043x - 18301.549800$	0.9969
Testosterone-17-propionate	0.090	0.30	$y = 9994.984007x - 1569.091728$	0.9950
Trenbolone	0.026	0.088	$y = 33847.383500x - 2730.721444$	0.9975
Zeranol	0.081	0.27	$y = 2997.532529x - 248.546671$	0.9986

표 4. 소고기 내 세 가지 스파이킹 농도별 18개 화합물의 회수율 및 정확도 요약표

화합물	스파이킹 농도					
	0.40µg/kg		1.0µg/kg		2.0µg/kg	
	Rec.	RSD	Rec.	RSD	Rec.	RSD
17-Methyltestosterone	69.7	10.5	87.6	7.13	97.6	6.38
Beclomethasone	92.0	8.58	94.4	8.61	104	4.72
Betamethasone	97.4	6.79	98.4	9.16	111	3.09
Clenbuterol	80.8	6.06	80.8	9.93	94.4	3.87
Dexamethasone	94.5	6.89	95.5	9.17	107	3.09
Fludrocortisone acetate	96.3	7.34	97.7	7.04	109	4.33
Hydrocortisone (Cortisol)	113	10.2	73.6	12.5	80.7	15.6
Metandienone	89.8	4.93	95.6	9.34	102	5.78
Penbutolol	92.3	10.7	93.8	6.96	103	7.11
Prednisolone	91.1	7.80	91.0	8.10	101	4.31
Prednisone	95.0	8.91	95.9	9.10	107	4.35
Progesterone	105	12.8	78.0	15.9	70.3	12.9
Ractopamine	71.8	7.45	71.4	15.0	86.3	4.97
Salbutamol (Albuterol)	58.0	5.41	72.5	3.07	57.7	3.34
Terbutaline	76.0	4.35	63.6	9.15	69.1	4.93
Testosterone-17-propionate	73.4	4.35	66.8	15.4	57.3	10.7
Trenbolone	84.5	10.4	89.5	9.72	103	6.47
Zeranol	78.4	9.40	86.3	10.0	97.2	4.47

결론

본 응용 자료는 산성화된 acetonitrile 추출에 의한 지질 카트리지 여과 및 농축 절차를 UHPLC-MS/MS 분석과 결합한 분석법을 소개합니다. 모든 4종의 18개 촉진제 관련 물질은 모두 선형회귀계수 0.995를 초과하며 훌륭한 직선성을 보였습니다. 이들 화합물의 LOQ는 0.30µg/kg 이하였고, 화합물 2/3가 0.10µg/kg 이하로 나타났습니다. 본 분석법은 운용이 간편하고, 신속, 정확하며, 신뢰성을 제공합니다. 때문에 소고기 조직 내 다수 종의 촉진제 관련 잔류 약물의 동시적 정량 스크리닝에 적용이 가능하며, 기타 유래의 동물 근조직 내 이들 화합물의 분석으로 확대시킬 수 있는 가능성을 가집니다.

참고 문헌

1. Qi, H. M.; *et al. Chin. J. Chromatogr.* In press.
2. Martizez-Sanz, J. M.; *et al. Nutrients*, **2017**, 9, 1093.
3. Wang, H.; Lu, R.; Wu, Y. *Liaoning Sport Sci. Technol.* **2013**, 35(6), 36-39.
4. EFSA. *The EFSA Journal* **2007**, 510, 1-62.
5. Barbosa, J.; *et al. Food Additives and Contaminants* **2005**, 22, 563-566.
6. Anway, M. D.; *et al. Science* **2005**, 308, 1466-69.
7. Ministry of Agriculture. No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. (2002-12-24). <http://yz.hz-agri.gov.cn/uploadFiles/2005-10/1130221564406.doc>
8. Commission Regulation (EU) No 37/2010. Dec. 22, **2009**.
9. Shao, B.; *et al. Food Chem.* **2009**, 114(3), 1115-21.
10. Masia, A.; *et al. Anal. Chim. Acta.* **2016**, 936, 40-61.
11. Cai, Q. R.; *et al. Chin. J. Chromatogr.* **2011**, 29(8), 712-717.
12. Kudo, K.; *et al. Forensic Toxicol.* **2014**, 32(1), 97-104.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 4월 10일, 한국에서 인쇄
5991-8948KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr