

동위원소희석 액체크로마토그래피-질량분석법을 이용한 육류 중 클로람페니콜의 정밀한 정량 분석에 관한 연구

송혜민^{1,2} · 김병주² · 정 혁¹ · 안성희² ★

¹숙명여자대학교 화학과, ²한국표준과학연구원 분석화학표준센터
(2010. 9. 9. 접수, 2010. 11. 16. 승인)

Accurate determination of chloramphenicol in meat by isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry (ID-LC/MS)

Hyemin Song^{1,2}, Byungjoo Kim², Hyuk Jeong¹ and Seonghee Ahn² ★

¹Department of Chemistry, Sookmyung Women's University, Chungpa-dong, Yongsan-Gu, Seoul, 140-742, Korea

²Division of Quality of Life, Korea Research Institute of Standards and Science,
267 Gajeong-Ro, Yuseong-Gu, Daejeon, 305-600, Korea

(Received September 9, 2010; Accepted November 16, 2010)

요 약: 클로람페니콜은 미생물과 박테리아들의 활동을 억제시킴으로써 동물 치료에 효과적인 축산 항생제 중의 하나이다. 그러나 사람에게 재생 불량성 빈혈과 같은 치명적인 부작용이 발생하여 식용으로 사육하는 동물들에 대한 클로람페니콜의 사용을 유럽을 포함한 많은 나라에서 금지하였다. 본 연구에서는 돼지고기 시료 중 클로람페니콜을 분석하기 위하여 동위원소희석 액체크로마토그래피-질량분석법(ID-LC/MS/MS)을 이용하여 정확하고 정밀한 정량분석을 하였다. 돼지고기 시료중의 클로람페니콜은 에틸아세테이트로 추출하였으며, 회수율을 높이기 위하여 고체상 추출법(Solid Phase Extraction)을 이용하였다. 액체크로마토그래피/질량분석기는 전기 분무 이온화 장치(Electrospray Ionization, ESI)를 장착하여 음이온 모드로 선택반응분석법(Selected Reaction Monitoring mode)에서 수행하였다. 클로람페니콜의 분자이온 $[M-H]^-$ 이온이 조각이온인 $[M-H-(HCOCl)]^-$ 로 가는 m/z 321 → 257와 동위원소의 m/z 326 → 262 채널을 선택하여 분석하였다. 클로람페니콜을 약 0.2, 1, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도가 되도록 첨가한 돼지고기 시료로부터 제조값과 측정 분석값을 비교하여 검토한 결과, 측정값들은 불확도 범위 내에서 제조값과 일치함을 보였다. 또한 IRMM (Institute for Reference Materials and Measurement)의 클로람페니콜 분석용 돼지고기 시료인 인증 표준물질 BCR 445를 분석한 결과, 본 실험의 측정값은 불확도 범위 내에서 인증값과 일치함을 보였으며 불확도의 경우에는 IRMM이 제공한 값보다 훨씬 향상된 값을 보였다.

Abstract: Chloramphenicol is one of the most effective antibiotics for treatment of food-producing animals for typhoid fever. However, it has been reported that it caused severe side effects such as aplastic anemia in human, therefore the use of chloramphenicol for food-producing animal is prohibited by European Union and other countries. In this study, the analytical method using isotope dilution liquid chromatography-mass

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-868-5652 Fax : +82-(0)42-868-5800

E-mail : sahn@kriss.re.kr

www.kci.go.kr

spectrometry (ID-LC/MS) was established for accurate determination of chloramphenicol in meat. Chloramphenicol was extracted with ethylacetate from porcine and solid phase extraction cartridge was used for enhancing the recovery. The residue of chloramphenicol in porcine was analyzed using the liquid chromatography mass spectrometer (LC/MS) interfaced with electrospray ionization source. Analysis was performed in negative mode with selected reaction monitoring mode at m/z 321 \rightarrow 257 of $[M-H]^- \rightarrow [M-H-(HCOCl)]^-$ and m/z 326 \rightarrow 262 channels for its isotope. The established method was tested using fortified samples at the level of 0.2 l, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and analytical results agreed with the gravimetrically fortified values within their uncertainties. This method was validated by analyzing a certified reference material, BCR 445, from IRMM (Institute for Reference Materials and Measurement). Our measurement values agreed with the certified value within their uncertainties. The uncertainty of our measured value was much lower than that the certified value from IRMM.

Key words: chloramphenicol, ID-LC/MS/MS, selected reaction monitoring(SRM)

1. 서 론

클로람페니콜(Chloramphenicol, CAP)은 넓은 범위에서 사용되는 대표적인 항생물질이며 구조는 Fig. 1과 같다. 클로람페니콜은 대부분의 혐기성 생물을 포함한 그람-양성(Gram-positive), 그람-음성(Gram-negative) 박테리아에 대해 효과적인 항생 물질이다.^{1,2} 클로람페니콜이 50S 리보솜의 서브유닛에 결합하고, 리보솜에 아미노아실 tRNA가 붙는 것을 막아줌으로써 결과적으로 박테리아가 단백질을 합성하는 것을 방지한다.^{3,4} 이것은 식용으로 사육되는 동물의 치료에 사용되기는 하지만, 사람에게 재생 불량성 빈혈이나 과민증과 같은 여러 가지 심각한 부작용을 일으켜 1994년에 유럽연합(European Union)에서 사용을 금지시켰다.⁵ 그러나 사용이 금지되었음에도 불구하고 육류나 어류 등에서 사용되는 경우가 있어 문제가 되고 있다. 실제로 2009년 3월 브라질산 냉동 닭고기와 5월 중국산 열처리 오리가공육제품에서 클로람페니콜이 검출되었다. 클로람페니콜은 사용이 금지되었고, 그것의 독성이 복

용량에 비례해서 나타나는 것이 아니기 때문에 최대 잔류허용치(Maximum Residue Limit, MRL)도 확립되어 있지 않다.⁶ EU에서는 식품 중 클로람페니콜의 검출을 위한 최소요구수행기준(Minimum Required Performance Limit, MRPL)을 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 정의하였다.^{7,8}

허용기준이 없는 클로람페니콜을 모니터링하고 컨트롤하기 위해서는 민감하고 정확한 분석방법이 필요하다. 이전에 클로람페니콜을 분석하는 데에 가장 민감하게 반응하는 방법은 클로람페니콜의 휘발성 유도체의 전자 포획 검출법(Electron Capture Detection, ECD)을 이용한 기체크로마토그래피 방법이었다. 자외선 검출법(Ultra Violet Detection)을 이용한 액체크로마토그래피, 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC), 효소결합 면역흡착검사(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) 그리고 면역학적 검정(Immunoassay)도 또한 사용되었다.⁹⁻¹¹ 그러나 기체크로마토그래피를 이용하기 위해서는 클로람페니콜의 유도체화가 필요하고, UV 검출기는 시료의 매트릭스와 오염물질로 인해 결과를 얻는 데 있어서 쉽게 영향을 받는다. 반면 tandem 질량분석법(Tandem mass spectrometry)은 매트릭스의 노이즈로부터 분석물질의 이온을 분리하는데 매우 효과적인 정교한 방법이다. 액체크로마토그래피-전기 분무 이온화-탠덤 질량분석법(Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)이 육류 매트릭스가 있는 시료 속의 클로람페니콜을 분석하기 위한 가장 선택적이고 감도가 좋은 방법이라는 것이라고 보고되었다.¹²⁻¹⁵

본 연구에서는 동위원소 희석 액체크로마토그래피-질량분석법을 이용하여 육류 속 클로람페니콜을 분석하고, 전처리 과정의 회수율 및 기기 감도를 보정할

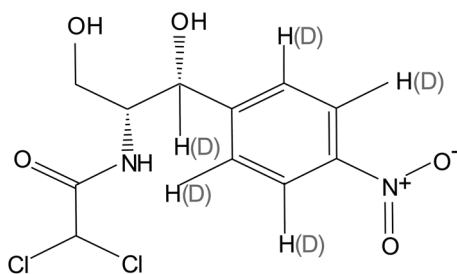


Fig. 1. Structure of chloramphenicol. (D) is the position of deuterium of d_5 -chloramphenicol isotope analogue.

수 있는 절대 정량법을 확립하고자 한다. ID/MS 방법을 이용하면 위에서 나열한 여러 가지 바이어스와 매트릭스 영향을 줄이기 때문에 전처리 과정을 간단히 하여도 정확한 결과를 얻을 수 있다고 알려져 있지만, 육류나 어류 등과 같은 시료의 경우 분석물질과 같이 용출된 여러 가지 물질이 동위원소비의 흔들림이나 회수율의 변동을 야기한다. 그러므로 고체상 추출법(Solid Phase Extraction, SPE)을 이용하여 시료 측정 시 바이어스와 매트릭스의 영향을 줄이고 액체크로마토그래피의 이동상의 분리 조건을 최적화하여 분석의 정확성을 높이고자 하였다. 여러 가지 농도 범위로 첨가된 돼지고기 시료를 분석하여 분석법의 유효함을 검증하였으며, IRMM사의 인증표준물질을 분석하여 인증값과 비교함으로써 방법의 유효성을 확인하였다.

2. 실험

2.1. 시약

표준용액 제조를 위한 클로람페니콜 시약은 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)에서 구입하였고, 동위원소표준용액을 제조하기 위한 클로람페니콜의 동위원소(Ring- d_4 , Benzyl- d_1 CAP, 98%) 시약은 Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA)에서 구입하였다. 본 실험에서 사용된 돼지고기 시료는 일반 소매점, BCR 445는 IRMM에서 구입하였다.

메탄올, 아세트나이트릴과 같은 유기 용매들은 HPLC 등급으로 Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)에서 구입하였고, 완충용액을 만들기 위한 ammonium acetate (minimum 98%)와 acetic acid (purified by double-distillation)는 Sigma Aldrich에서 구입하였다. Sodium sulfate는 Junsei chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서, sodium chloride는 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 각각 구입하였다.

이 연구에서 사용되는 모든 용매는 고성능 액체크로마토그래피에서 사용 가능 하도록 0.22 μm 여과지 (Milford, Ireland)로 여과한 후 사용하였다.

2.2. 표준용액 준비

클로람페니콜의 표준용액은 2 mg/kg 수준이 되도록 무게 증량법으로 제조하였다. 클로람페니콜 시약 약 0.1 mg을 백금 펜에 취하여 그 무게를 정확히 측정하고, 약 50 mL 메탄올에 첨가한 후 정확한 무게를 측정하여 농도를 계산하였다. d_4 -클로람페니콜 표준용액

또한 클로람페니콜 표준용액과 같은 방법으로 2 mg/kg 수준이 되도록 제조하였다. 이 두 표준용액을 무게 증량법으로 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 각각 묶힌 후 농도비가 1:1이 되도록 혼합하여 동위원소비 표준용액을 제조하였다.

2.3. 시료의 준비

분석법 확립에 사용된 시료는 클로람페니콜이 포함되지 않은 돼지고기에 클로람페니콜 표준용액을 정확한 무게로 첨가하여 자체 분석용 시료를 제조하여 사용하였다. 본 연구에서는 0.2, 1, 10, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도가 되도록 5 g의 돼지고기 시료에 표준용액을 첨가한 후 농도비가 1:1이 되도록 동위원소 표준용액을 첨가하여 시료를 준비하였다. 개발된 분석법 검증을 위하여 인증값이 제공되는 IRMM사의 시료 BCR 445를 이용하였다. 이 시료는 동결건조 된 파우더 형태의 돼지고기이며, 제조사가 제공하는 프로토콜에 따라서 시료 1 g을 정확히 측정 후 물 2.75 g을 첨가하여 복원된 돼지고기 시료에, 농도비가 1:1이 되도록 동위원소 표준용액을 첨가한 후 무게를 정확히 측정하여 준비하였다.

2.4. 추출 및 정제

시료로부터 클로람페니콜의 추출 및 정제는 Stuart 등¹⁵⁾의 전처리 방법을 변형하여 진행하였다. 정확하게 무게를 측정된 시료가 들어있는 50 mL 원심관에 10 mL 에틸아세테이트를 넣고 10분간 균질화한 후 3900 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 취한다. 이것을 한 번 더 반복한 후 상층액을 처음 상층액과 합친 후 45 °C에서 0.5 mL까지 질소 환경에서 증발시킨다. 여기에 2 mL의 에틸아세테이트를 넣고 잘 섞은 후 원심 분리하여 밑에 가라앉은 것을 제외한 용액만을 취하여 다른 원심관에 옮긴다. 이것을 0.5 mL까지 45 °C에서 증발시키고 여기에 2 mL 메탄올을 첨가하여 잘 섞은 후 4% 염화나트륨 용액을 15 mL가 될 때까지 첨가한다. 헥산 20 mL를 넣어 5분간 섞어준 후 3900 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액(헥산층)을 버리고 이 과정을 한 번 더 반복한다. 이 원심관에 10 mL 에틸아세테이트를 넣어 5분간 잘 흔들어 준 후 층이 분리되도록 가만히 두고 상층액(에틸아세테이트층)을 취하여 다른 원심관에 옮긴다. 이 과정을 한 번 더 반복한 후 에틸아세테이트 층을 모은 원심관에 5 g의 무수황산나트륨을 넣어 수분을 제거한 후 용액만을 다른 원심관에 옮겨 45 °C에서 완전히 증발시킨다. 여기에 2 mL의 10% 메탄올을 넣어 재용해한 후 고체상 추출과정을 거친다. 이 때 고체상 추출 카

트리지는 Waters의 OASIS HLB (60 mg, 3 cc)를 사용하였다. 먼저 HLB 카트리지에 3 mL 메탄올과 3 mL 물로 컨디셔닝 한 후 시료를 넣는다(loading). 그 다음 물 3 mL로 씻어내고 물이 완전히 빠진 후 메탄올 3 mL로 용출한다. 이것을 0.1 mL까지 농축한 후 vial에 담아 분석한다.

2.5. 액체크로마토그래피-질량분석기

분석에 사용된 고성능 액체크로마토그래피는 Agilent 1200 series (Waldbronn, Germany)를 사용하였고, 컬럼은 C18 보호 컬럼 (guard column)을 연결한 Waters의 SymmetryShield RP18을 사용하였다. 이동상 A는 10 mM 암모늄 아세테이트에 0.1%의 초산을 첨가한 용액(pH 4.4)을 사용하였고, 이동상 B는 아세트나이트릴 (ACN)을 사용하였다. 이동상의 기울기 조건은 처음 0 분~0.3분은 이동상 A와 B의 비율이 80% : 20%가 되도록 유지하다가 5분까지 B가 100%가 되도록 서서히 증가시켰다. 이 후 5.5분까지 B가 100%가 되도록 유지한 후 11분이 될 때까지 A와 B의 비율이 80%:20%가 되도록 점차적으로 변화시키고 15분까지 그 비율을 유지하였다. 유속은 0.3 mL/min으로 일정하게 흘려주었다. 시료는 자동 주입기(Autosampler)를 사용하여 10 µL씩 주입하였고 매 분석 시 순차적으로 4회 이상 반복 측정하였다.

분석에 사용된 질량분석기는 전기 분무 이온화 (Electrospray Ionization, ESI) 장치를 장착한 API 4000 질량분석기(Applied Biosystems, Foster City, USA)를 사용하였으며, 음이온 모드(negative ion mode)에서 분석을 수행하였다. tandem 질량분석기의 선택반응분석법 (Selected Reaction Monitoring, SRM)을 이용하여 클로람페니콜 대 d_5 -클로람페니콜의 면적비를 측정하였다. 이온화원 조건으로 IonSpray voltage는 -3500 V를 사용하였으며, 선택반응분석법을 위한 충돌에너지 (collision energy)는 -16 V를 주었다.

선택반응분석법은 클로람페니콜 조각이온이 m/z 321 → 257와 동위원소의 조각이온의 m/z 326 → 262로 깨어지는 채널에서 적용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ID-LC/MS/MS 분석의 최적화 조건

시료의 분석에 앞서 클로람페니콜 표준용액과 그것의 동위원소 표준용액의 질량 스펙트럼을 얻었고 Fig. 2에 나타내었다. 클로람페니콜의 monoisotopic mass는

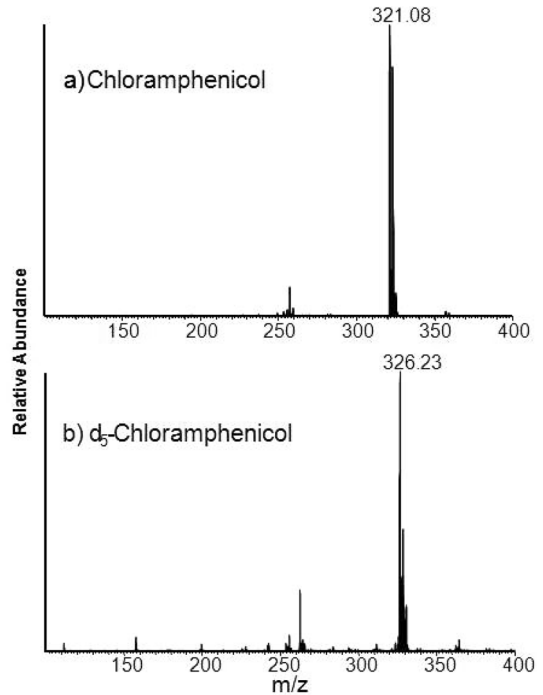


Fig. 2. Mass spectra of chloramphenicol (a) and d_5 -chloramphenicol (b) in methanol with negative mode at the level of 500 µg/kg.

322.01이므로 전기 분무 이온화법으로 음이온을 생성시켜 측정하면 $[M-H]^-$ 의 구조로 m/z 321의 값이 주 피크로 나타난다. 또한 d_5 -클로람페니콜의 경우에는 m/z 326의 값이 주 피크로 나타난다.

액체크로마토그래피-질량분석법의 분석 방법으로는 선택이온분석법(SIM)과 선택반응분석법(SRM)이 있다. Fig. 3에서 돼지고기 시료로부터 추출된 클로람페니콜의 선택이온분석법과 선택반응분석법을 비교해 보여주었다. 선택이온분석법에서는 $[M-H]^-$ 의 구조를 갖는 클로람페니콜과 그의 동위원소물질의 모분자 이온(m/z 321과 m/z 326)을 검출하였고, 선택반응분석법에서는 m/z 321 → 257과 m/z 326 → 262로 깨어지는 채널을 이용하여 검출하였다. 선택이온분석법의 크로마토그램에서는 분석 물질의 피크 이후에 다른 background 물질들의 피크가 높게 나오는 반면에 선택반응분석법의 크로마토그램은 깨끗하게 분석 물질의 피크만 나오기 때문에 더 민감하고 선택적인 분석을 할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 선택반응분석법으로 실험을 진행하였다. 선택반응분석법은 조각이온이 m/z 257과 m/z 152로 깨지는 두 가지 채널이 가능하지만, 불확도가 작고 동위원소비가 안정한 m/z 257로

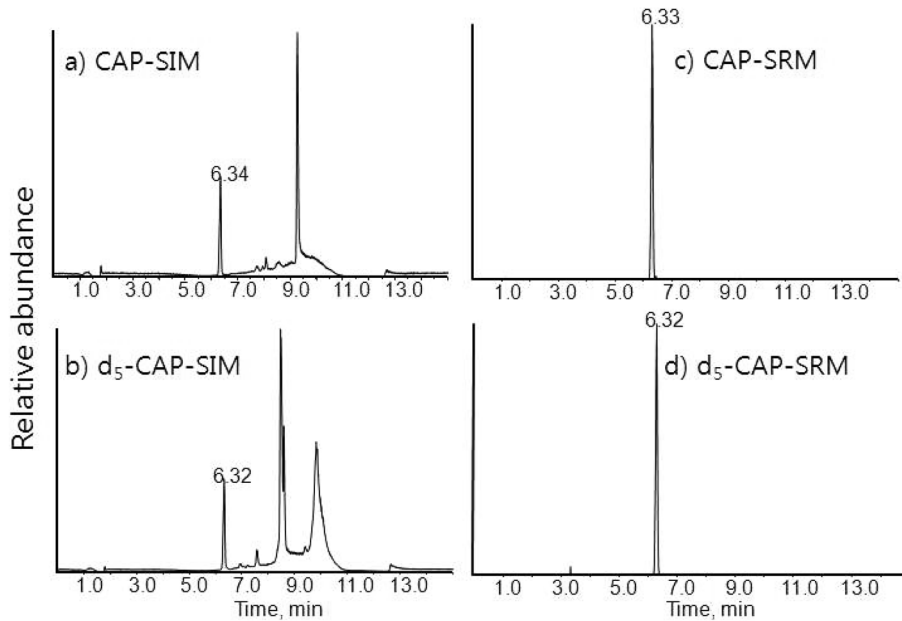


Fig. 3. Comparison of SIM mode and SRM mode of chloramphenicol (a and c) and d_5 -chloramphenicol (b and d) from fortified porcine sample at the level of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Chromatograms of chloramphenicol (a) and d_5 -chloramphenicol (b) by SIM mode showed big other background peaks while chromatograms by SRM showed the sensitive and selective target analyte peak.

깨지는 채널을 선택하여 정량분석을 하였다.

돼지고기 시료로부터 나온 방해물질이 클로람페니콜의 피크에 영향을 미치지 않도록 분리 조건을 최적화하여 실험을 진행하였다. 클로람페니콜과 그의 동위원소의 머무름 시간(Retention time, RT)은 6.3~6.4분이다.

3.2. 클로람페니콜의 정량 및 결과

실제 시료로부터 회수율과 분석법의 유효성을 검증하기 위해 알고 있는 양을 돼지고기 시료에 첨가한 후 모든 최적화 된 조건과 방법으로 분석하였다. 시중에서 판매하는 돼지고기 시료를 구입하여 돼지고기 시료 자체로부터 클로람페니콜이 이 실험의 조건에서 검출되지 않는 것을 확인한 후, 클로람페니콜 표준용액을 돼지고기 시료에 첨가하여 0.2~25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도 범위를 갖는 분석용 시료로 제조하였다. 약 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 네 가지 농도의 시료를 제조하고, 제조된 시료에 농도비가 1:1이 되도록 동위원소 표준용액을 첨가하였다. 이 시료들을 동위원소희석 질량분석법(ID-LC/MS/MS)의 측정 결과를 Table 1에 나타내었다. 0.2~25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도범위에서 측정값이 제조값과 불확도 범위에서 잘 일치하며, 측정값의

Table 1. ID-LC/MS/MS results of gravimetrically fortified sample at the various levels of chloramphenicol in porcine

Subsample	Fortified concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Measured concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Ratio (%)
# 1-1	0.18	0.17 \pm 0.004	98.8
# 1-2	0.17	0.17 \pm 0.003	98.3
# 2-1	0.93	0.90 \pm 0.02	96.1
# 2-2	0.97	0.95 \pm 0.02	97.5
# 3-1	9.67	9.47 \pm 0.20	98.0
# 3-2	9.69	9.65 \pm 0.16	99.6
# 4-1	24.37	24.31 \pm 0.32	99.8
# 4-2	24.24	24.20 \pm 0.58	99.8

상대측정불확도가 0.7% 이하로 나왔다. 이 결과로부터, 본 연구의 분석법이 육류 속 클로람페니콜의 정확하고 정밀한 분석에 적용 가능함을 알 수 있었다. 시료 중의 클로람페니콜 정량분석의 정확도나 정밀도에 관한 데이터를 제시한 논문은 농도의 레벨이나, 표현 방식이 달라서 직접적으로 비교하기는 어렵지만, Pascal Mottier 그룹⁶의 결과에서 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서의 정밀도(accuracy, %)의 편차가 10%와 8%

인 것에 비하여(각각 18번씩의 측정 결과), 본 실험실의 결과는 0.2 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 25 µg/kg에서 모두 약 1% 정도로(각각 2번씩의 측정결과) 정확도나 정밀도가 훨씬 향상된 결과라는 것을 알 수 있다.

3.3. 검출한계와 정량한계

클로람페니콜의 신호 대 잡음비에 기초하여 검출한계와 정량한계를 측정하였다. 검출한계는 클로람페니콜의 표준용액을 사용하여 신호 대 잡음비가 3이 될 때의 농도를 측정하였고, 그 결과 0.07 µg/kg까지 검출 가능함을 확인하였다. 또한 정량한계는 육류 속 클로람페니콜의 신호 대 잡음비가 10이 될 때의 농도를 측정하였으며, 0.10 µg/kg까지 정량 가능함을 확인하였다.

3.4. ID-LC/MS/MS 분석법의 유효성 확인

분석법의 유효성을 검증하는 또 다른 방법은 인증값을 가지고 있는 인증표준물질을 사용하여 그 값을 비교하는 것이다. 그러므로 육류 속 클로람페니콜을 분석하기 위한 ID-LC/MS/MS 분석법이 유효한지를 검증하기 위하여 IRMM이 제조하여 인증값을 제공하는 BCR 445 시료(클로람페니콜 분석용 돼지고기 시료)를 구입하여 분석하였다. 한 개의 시료병에서 2 번 시료를 취하여 분석한 결과, BCR 445의 인증값(8.9 ± 0.9) µg/kg에 대하여 측정값은(8.63 ± 0.15)와(8.60 ± 0.12) µg/kg으로 불확도 범위 내에서 일치함을 보였다(Table 2). 그러나, BCR 445의 인증값은 여러 실험실에서(inter-laboratory) 다양한 방법으로 측정된 값들을 합성하여 얻은 값으로, 본 실험에서 얻은 측정값의 불확도는 IRMM에서 제시한 인증값의 불확도보다 약 6배가 작다. 이 실험을 통하여 육류 속 클로람페니콜을 분석하기 위한 ID-LC/MS/MS 분석법이 정확하며 정밀한 측정법이라는 것을 유효화 할 수 있었다.

Table 2. Certified value of chloramphenicol in BCR 445 from IRMM and measured values of chloramphenicol by ID-LC/MS/MS

Subsample	Certified concentration (µg/kg)	Measured concentration (µg/kg)
# BCR 445-1	8.9 ± 0.9	8.63 ± 0.15
# BCR 445-2	8.9 ± 0.9	8.60 ± 0.12

*인증값과 측정값 뒤에 나오는 “±”는 확장불확도로서 95% 신뢰 수준에서 구함.

4. 결 론

본 연구에서는 육류 중 클로람페니콜을 정량 분석하기 위하여 LC/MS/MS법에 기초를 둔 동위원소 희석 액체크로마토그래피-질량분석법을 개발하였다. 클로람페니콜과 그 동위원소물질을 민감하게 검출하기 위해 선택반응분석법으로 실험을 진행하였고, 이 때 [M-H-(HCOCl)]⁻의 이온(클로람페니콜의 m/z 321 → 257 채널과 d₅-클로람페니콜의 m/z 326 → 262 채널)을 측정하였다. 육류 중 클로람페니콜의 분석을 위한 ID-LC/MS/MS법은 분석 물질과 물리적, 화학적 성질이 같은 동위원소물질을 사용하기 때문에 다른 분석 방법에 비해 더 정확한 결과 값을 얻을 수 있었고, 0.2~25 µg/kg의 농도범위에서 적용 가능하여 낮은 농도까지 분석해야 하는 클로람페니콜의 분석에 매우 적합한 방법이었다. 또한, 이 방법을 이용하여 IRMM의 인증표준물질 BCR 445 시료를 분석한 결과, 측정값은 IRMM이 제공한 인증값과 불확도 범위 내에서 농도가 일치함을 보였으며 그 측정값의 불확도는 인증값의 불확도 보다 6배 정도 감소한 결과를 보였다. 이 분석법이 육류 속 클로람페니콜을 분석하는 데에 정확, 정밀한 정량값을 제시하는 방법임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. H. T. Ronning, K. Einarsen and T. N. Asp, *J. Chromatogr. A*, **1118**, 226-233(2006).
2. B. K. Neuhaus, J. A. Hurlbut and W. Hammack, *FDA/ORA/DFS*, **4290**, 1-18.
3. K. Vivekanandan, M. G. Swamy, S. Prasad and R. Mukherjee, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 3025-3030(2005).
4. H. P. Rang and M. M. Dale, *Pharmacology*, 2nd Ed, Churchill Livingstone: UK 1994.
5. A. Gantverg, I. Shishani and M. Hoffman, *Anal. Chim. Acta*, **483**, 125-135(2003).
6. P. Mottier, V. Parisod, E. Gremaud, P. A. Guy and R. H. Stadler, *J. Chromatogr. A*, **994**, 75-84(2003).
7. Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin (2003/181/EC), Off. J. Eur. Commun. L71(2003).

8. A. F. Forti, G. Campana, A. Simonella, M. Multari and G. Scortichini, *Anal. Chim. Acta*, **529**, 257-263(2005).
9. E. H. Allen, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 965-1020 (1985).
10. L. Weber, *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 501-504(1990).
11. Th. Gude, A. Preiss and K. Rubach, *J. Chromatogr. B*, **673**, 197-204(1995).
12. P. A. Guy, D. Royer, P. Mottier, E. Gremaud, A. Perisset and R. H. Stadler, *J. Chromatogr. A*, **1054**, 365-371(2004).
13. A. A. Stolker, W. Niesing, E. A. Hogendoorn, J. F. Versteegh, R. Fuchs and U. A. Brinkmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 955-963(2003).
14. M. Ramos, P. Munoz, A. Aranda, I. Rodriguez, R. Diaz and J. Blanca, *J. Chromatogr. B*, **791**, 31-38(2003).
15. J. S. Stuart, H. S. Rupp and J. A. Hurlbut, *Laboratory Information Bulletin*, **19**, No.4, 2003.