

식육 중 메타미졸 잔류물의 LC/MS/MS 시험법 개발

김태욱* · 양윤경 · 곽순철 · 강동영

한경대학교 환경분석센터

(2010. 10. 1. 접수, 2011. 8. 11. 승인)

Analytical method development for residual metamizol in meat using LC/MS/MS

Taewook Kim*, Yeung Kyong Yang, Soon-Chul Gwoak and Dong Young Kang

Hankyong Analysis center, 167, Chungang-ro, Anseong-si, Gyeonggi-do 456-749, Korea

(Received October 1, 2010; Accepted August 11, 2011)

요 약: 본 연구에서는 쇠고기 및 돼지고기 중 의약품인 메타미졸(metamizol)의 잔류량을 LC/MS/MS를 이용하여 정량하는 방법을 개발하였다. 분석은 그 주대사체인 4-methylaminoantipyrin (MAA)을 대상으로 하였으며, 식육에서 acetonitrile로 추출하여 간단한 정제를 거쳐 multiple reaction monitoring (MRM) 법으로 분석하였다. 정량을 위해 바탕시료에 MAA를 첨가한 식육을 추출하여 검정곡선을 작성하였다. MAA의 검량선의 결정계수는 위 두 가지의 시료에 대해 > 0.99 이었다. 개발된 시험법으로 본 실험실 내에서 6회 반복실험을 실시하였고 타 기관 두 곳에 의뢰하여 실험실간 비교 시험을 실시하였다. 쇠고기 분석의 실험실내 정확도는 78-102% (CV 5.5-9.1%), 실험실간 정확도 98% (CV 14%), 돼지고기 분석의 실험실내 정확도는 95-99% (CV 3.9-5.6%), 실험실간 정확도는 111% (CV 13%)를 보였다.

Abstract: In this study, an analytical method was developed for residual metamizol in beef and pork using LC/MS/MS. 4-methylaminoantipyrin (MAA), the main metabolite of metamizol was targeted for analysis instead of its parent compound. MAA was simply extracted from meat by acetonitrile, purified and then analyzed by multiple reaction monitoring method (MRM). Standard addition method was used for calibration. The calibration curves showed the linearity of $r^2 > 0.99$ for both matrices included. The developed method was validated by six-time intra-lab tests and inter-lab tests with two other institutes. The validation of the whole procedure for beef showed the intra-lab accuracies of 78-102% (CV 5.5-9.1%) and the inter-lab accuracy of 98% (CV 14%); the intra-lab accuracies of 95-99% (CV 3.9-5.6%) and the inter-lab accuracy of 111% (CV 13%).

Key words : LC/MS/MS, MRM, MAA, Residue

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-678-4980 Fax : +82-(0)31-670-5078

E-mail : ktw@hknu.ac.kr

1. 서 론

일상생활 속에서도 건강한 개인들에게 의약품이 잔류하고 있는 식품물을 통한 의약품의 섭취는 섭취당 사자의 의도와 무관하게 의약품의 오남용과 같은 효과를 가져오며, 동시에 알러지와 과민반응등의 부작용을 유발하기도 한다.^{1,2} 이에 따라 정부에서는 축산물의 안정성 확보를 위하여 축산물가공처리법 및 식육 중 잔류물질분석 요령에 의거하여 항생물질 등 유해 잔류물질이 들어있는 육류의 생산유통을 방지하고 국내 소비자의 욕구와 국가간의 수입자유화에 따른 무역마찰 등에 대비하기 위하여 1991년부터 국가잔류검 사프로그램을 도입하여 축산물에 대하여 유해잔류물질 분석을 실시하고 있으며 이에 농림부와 보사부에서는 축산물 중 잔류물질 분석법 및 허용기준을 제정 고시하고 도축장에서 출하되는 소, 돼지에 대한 합성 항균제, 항생제, 농약, 호르몬의 모니터링 분석 등 잔류분석을 규정하고 있다.³⁻⁶

유해잔류물질의 정확한 분석은 식육 중의 유해 잔류물질을 파악하여 잔류물질이 남아있는 식육이 식탁에 오르는 것을 방지함으로써 식육의 안정성을 확보하고 항생제 등을 포함한 의약품의 바른 사용에 대한 기준을 제시할 것으로 기대한다. 이렇게 축산물에 잔류하는 의약품의 관리를 위하여 그 사용 여부를 판단할 수 있는 분석 방법이 필요하며, 이는 축산물을 포함한 식품 중에 극미량에 해당하는 잔류량을 분석할 수 있는 기술이 뒷받침 되어야 한다.

본 연구에서는 동물용 의약품 중에서 진통해열제로 쓰였지만 1970년대 무과세 포증(agranulocytosis, 백혈구감소)을 일으키는 부작용으로 인해 여러나라에서 식품내 잔류가 규제되고 있는 메타미졸(metamizol, Sodium [(2,3-dihydro-1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methylamino] methanesulfonate)을 분석하는 방법을 개발하였다. 메타미졸은 생체 내에서 빠르게 대사되어 그 모체는 보통 검출되지 않기 때문에 그 주된 대사체인 MMA (4-methylamino antipyrine)를 분석대상으로 하였다.⁷⁻¹⁰ 메타미졸과 주 대사체인 MAA의 구조는 Fig. 1에 나타내었다. USDA (United States Department of Agriculture)는 식육내의 MAA를 HPLC로 분석하는 방법을 개발한바 있으며⁹ Malone 등이 우유내의 MAA를 LC/MS/MS로 분석한 바 있다.¹⁰

대한민국 식품의약품 안전평가원에서는 이 대사체의 소, 돼지고기의 잔류허용기준(MRL, maximum residue limits)을 100 µg/kg로 잠정 결정하였다. 본 연구에서

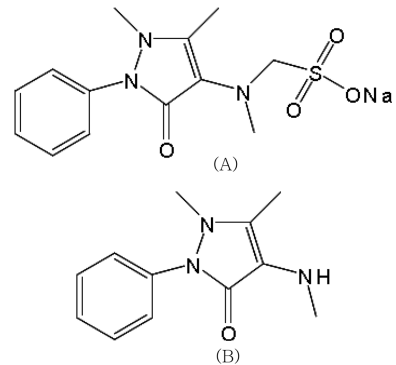


Fig. 1. Chemical structures of metamizol (A) and MAA (B).

는, 신속하고 재현성 있는 분석을 위하여 시료의 전처리하는 최대한 간단히 하였으며 높은 감도의 LC/MS/MS의 MRM 방식으로 분석하였다. 분석법의 신뢰성을 확인하고자 정확도 측정을 6회 반복하고, 타 실험실 두 곳에서 실험실간 상호 검증을 실시하였다.

2. 실험

2.1. 시료 및 시료 전처리 방법

본 연구에서 사용한 시료는 축산물 중 분석 대표식품인 쇠고기와 돼지고기로써 각각을 시중에서 신선한 상태로 구입하여 실험에 이용하였다.

먼저 쇠고기와 돼지고기 시료를 믹서기를 이용하여 균질화하고 염(NaCl) 존재하에서 아세토니트릴(acetonitrile)로 추출한 후 헥세인(hexane)으로 지방을 제거하였다. 이어서 농축과 여과를 거쳐 LC/MS/MS의 MRM법으로 분석하였다. 정량은 Standard Addition Method (SAM)를 사용하였다. 내부표준물질로는 Dimethylaminoantipyrine (DAA, Fig. 2)를 사용하였다. 자세한 실험 순서는 다음과 같다.

검량시료의 준비를 위하여 일곱 개의 50 mL 원심 분리 튜브에 MAA가 검출되지 않은 같은 쇠고기시료 5 g 넣고 각각에 50 mg/L의 MAA 시험분석용액을 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µL 첨가하고 DAA 시험분석용

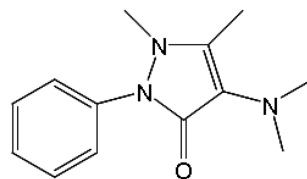


Fig. 2. Chemical structure of DAA.

액(20 mg/L) 을 각각 50 μ L 첨가한다. 각각의 원심분리 튜브에 20% 염화나트륨 수용액을 4 mL 씩 넣고 충분히 섞고 아세트니트릴 5 mL 씩 넣고 10분간 흔들어 섞는다. 각각의 튜브를 4 $^{\circ}$ C에서 4000 rpm으로

10분간 원심분리하여 아세트니트릴 층을 분리하여 각각 15 mL 원심분리관에 넣고 남은 검체에 다시 아세트니트릴 5 mL 넣고 섞은 후 원심분리하는 과정을 반복하고 아세트니트릴 층을 분리하여 먼저 추출한

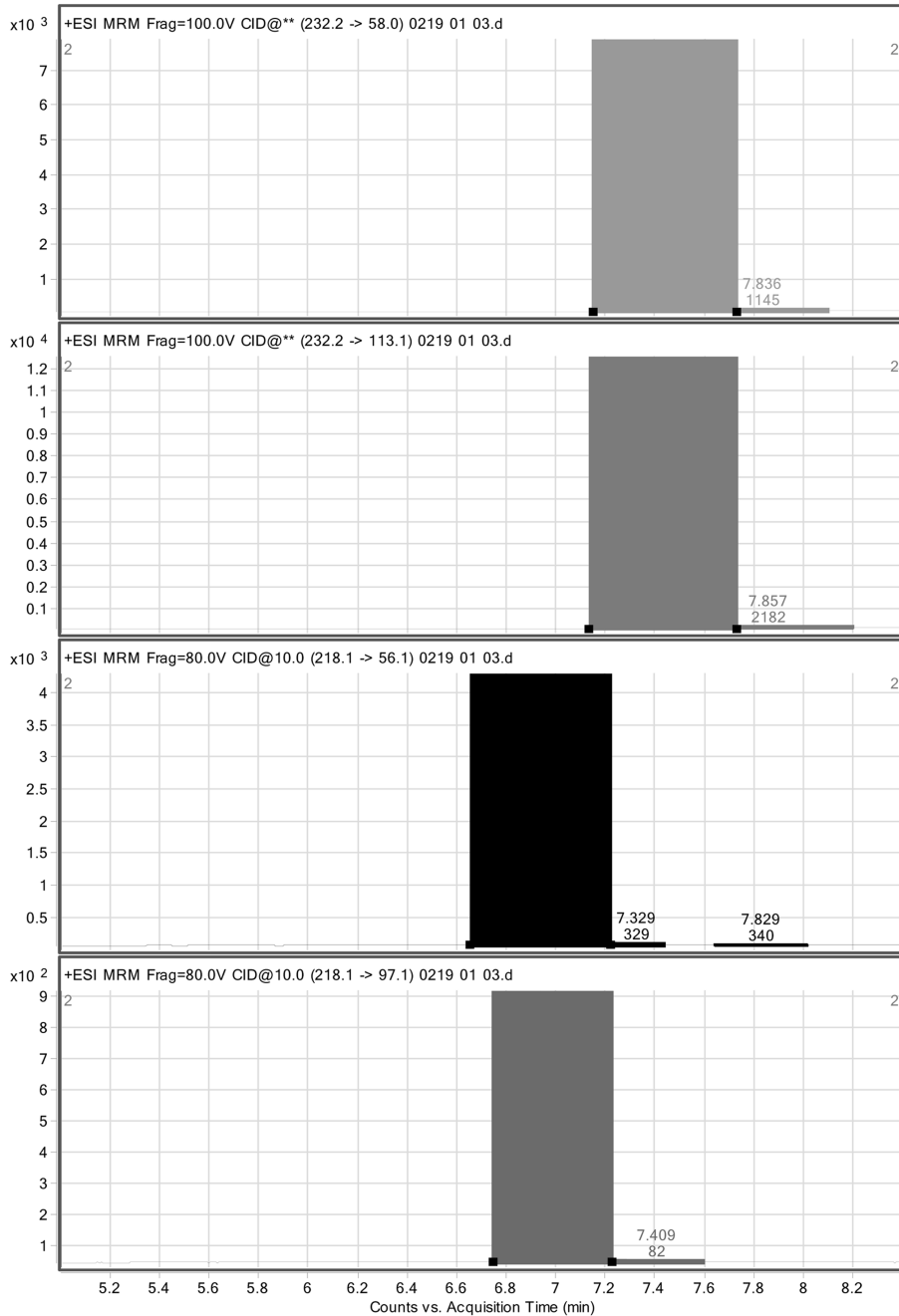


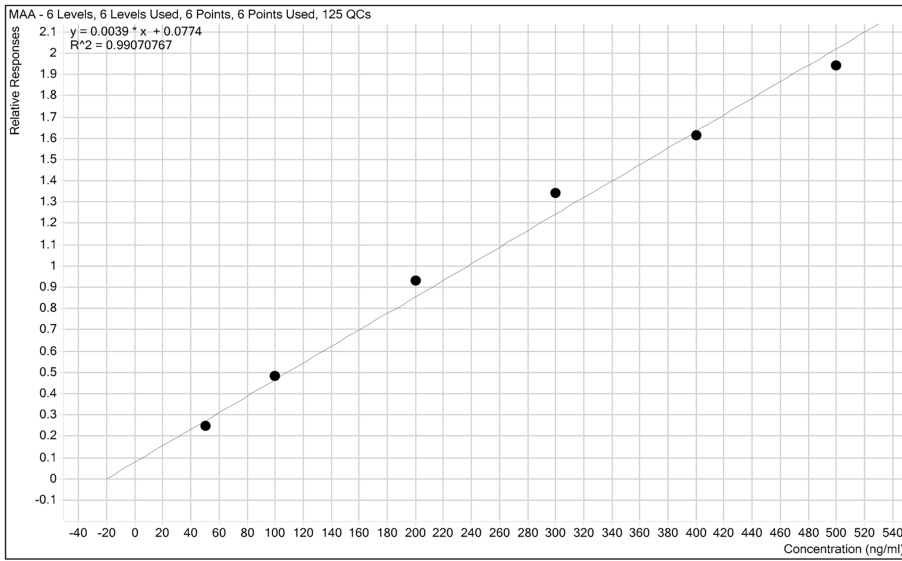
Fig. 3. LC/MS/MS chromatograms of the extract from beef spiked up to 200 ppb of DAA (upper two) and 100 ppb of MAA (lower two).

아세트오니트릴층과 합친다. 분리된 아세트오니트릴 층에, 준비된 아세트오니트릴이 포화된 헥세인을 4 mL 씩 넣고 1 분간 흔들고, 원심분리한 다음, 헥세인층을 제거하고 50 °C에서 질소흐름으로써 0.5 mL로 줄어든 때까지 증발시킨다. 이동상 A 2.5 mL 를 0.5 mL 로 줄어든 아세트오니트릴 층에 섞고 추출액을 4 °C에서 4000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상등액을 PTFE syringe filter (0.2 μm)로 여과하고, 5~15 μL를 LC/

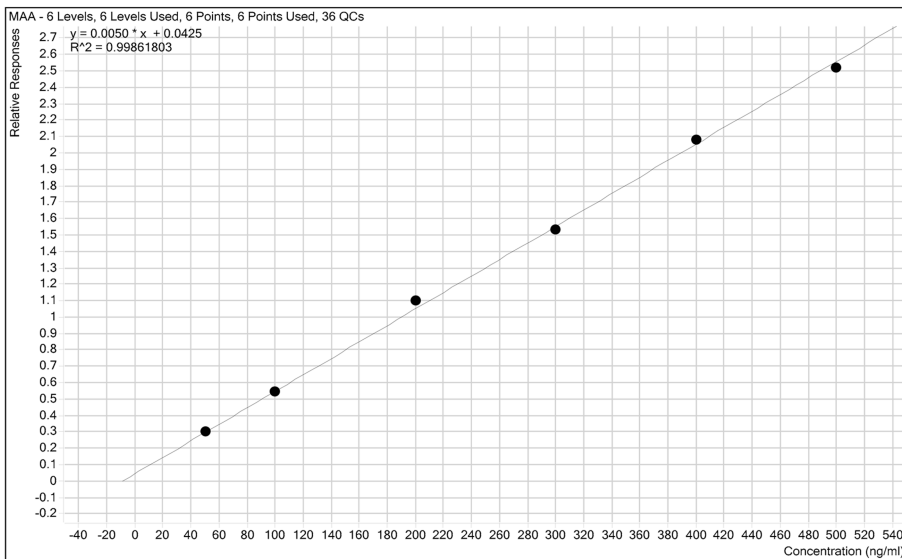
MS/MS로 분석한다.

2.2. 기기 및 시약

MAA 표준물질은 독일의 LGC사에서, DAA는 Alfa Aesar에서 구입하였고 구입한 표준물질들은 분석전까지 -15 °C에서 보관하였다. 이로부터 제조된 표준용액들을 빛이 차단된 용기에 담아 4 °C 이하에서 보관하고, 1주일 이내 사용하였다.



(A) Calibration curve of MAA for beef.



(B) Calibration curve of MAA for pork.

Fig. 4. Calibration curves of MAA for beef (A) and pork (B).

장비는 Agilent사의 1200 LC-6410 Triple Quad MS 모델을 사용하였다. 고정상으로 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, Narrow-Bore, 3.5 μ m, 2.1 \times 150 mm을 사용하였고, 0.05% 암모늄아세테이트와 0.2% 아세트산 수용액(이동상 A)과 HPLC급 아세토니트릴(이동상 B)을 사용하였다.

LC의 분리조건은 0.3 mL/min의 유속으로 이동상 A 95%에서 50%까지 8분동안에 변화시켰으며 이후 100% 이동상 B로 컬럼을 세척하였다.

MS조건은 ESI (Electrospray Ionization)에 capillary voltage 4 kV, gas 온도 350 $^{\circ}$ C, 질소가스량 9 L/min, nebulizer 압력 40 psi이며 선택이온은 MAA의 1차이온 218.1, 2차이온 56.1 및 97.1, DAA의 1차이온 232.2, 2차이온 113.1 및 58.0이었다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. 시험법 확립

기존에 USDA에서 사용한 시험법은⁹ HPLC를 이용했기 때문에 200 μ g/kg 이하 농도의 시료에 적용하기 어렵고, 전처리는 추출과정에 고체상 추출법을 사용하였으며 전처리 과정이 비교적 여러 단계를 거쳐야 하기 때문에 시간 소모가 크다. Malone 등이¹⁰ 보고한 방법은 우유를 대상으로 한 것이지만 LC/MS/MS를 이용하기에 적당한 전처리 방법을 제시하여 본 연구에서는 그 방법을 일부 수정하여 전처리 하였다.

본 연구에서 내부표준물질(DAA)과 MAA를 각각 200 μ g/kg 및 100 μ g/kg가 되도록 첨가한 쇠고기 시료에서 추출한 검체의 LC/MS/MS 크로마토그램은 Fig. 3에서 보여준다. Fig. 3에서 위로부터 두 개의 크로마토그램은 내부표준물질인 DAA의 결과로서 7.41 min의 머무름 시간을 보이며, 아래 두 개는 MAA의 결과로서 6.94 min의 머무름 시간을 보이는 것을 확인하였다. 시험용액과 표준용액에서 각각 얻은 머무름시간과 2차이온들의 크기의 비율이 일치하였으므로 정성분석이 가능하였고, 시험결과에 의해서 DAA의 m/z 113.1 이온에 대한 MAA의 m/z 56.1 이온의 면적비를 검량선식에 대입하여 정량분석 또한 가능하였다.

3.2. 시험 방법의 검증

식품의약품 안전평가원에서 잠정적으로 결정한 쇠고기와 돼지고기에서 MAA의 잔류허용기준(MRL)은 시료 1 g당 100 ng 이다. 이에 따라 바탕시료 5 g의

Table 1. Intra and inter-lab method validation for analysis of MAA in beef and pork

Matrix	Exp. Conc. (ng/g)	Accuracy (%)	CV (%)
Beef	Intra-lab	50	9.1
		100	5.7
	Inter-lab	200	5.5
		100	14
Pork	Intra-lab	50	5.6
		100	4.4
	Inter-lab	200	3.9
		100	13

7 개 시료에 각각 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/kg이 되도록 MAA를 첨가하고 여기 모두에 내부표준물질 DAA를 200 μ g/kg이 되도록 첨가하여, SAM (Standard Addition Method)으로써 구한 쇠고기와 돼지고기의 검량선은 각각 Fig. 4에 보였다. 해당 검량선 모두 결정계수가 0.99 이상으로 직선성이 우수하였다.

MRL의 0.5, 1, 2 배가 되도록 바탕시료에 MAA를 첨가한 시료를 대상으로 6회 전처리 과정 후 비교 분석한 결과와 MRL 수준에서 타 기관 2곳과 실험실간 비교 시험한 결과는 Table 1에서 보였다. LC/MS/MS를 이용한 쇠고기와 돼지고기에 포함된 MAA의 검량선의 결정계수는 두 시료에 대해 0.99 이상이었으며 쇠고기 분석의 실험실내 정확도는 78~102% (CV 5.5~9.1%), 실험실간 정확도 98% (CV 14%)였으며 돼지고기 분석의 실험실내 정확도는 95~99% (CV 3.9~5.6%), 실험실간 정확도는 111% (CV 13%)로 나타났다. 따라서 본 연구에서 사용된 시험방법이 실제 쇠고기와 돼지고기에 잔류하는 100 μ g/kg 이상의 MAA 분석에 적합하다는 것을 확인하였다.

4. 결 론

쇠고기와 돼지고기 중 동물용 의약품인 메타미졸의 추출 및 정제를 위한 시료 전처리 방법 및 LC/MS/MS 분석조건을 확립하였으며, 다른 두 실험실과 동일한 방법으로 실험했을 때 얻은 결과를 비교하였다. 전처리 방법은 단순하였고 검량선의 직선성과 실험실내, 실험실간 정확도를 확인하였다. 이 방법으로 100 μ g/kg 이상 잔류된 메타미졸 대사체를 성공적으로 정량할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구의 수행을 위해 “동물용 의약품 안전관리를 위한 시험법 개발” 연구개발과제비를 제공한 식품의약품 안전평가원에 감사드리며 아울러 실험실간 검증에 참여한 건국대학교 동물자원연구센터 분석기술지원실 및 농협중앙회 축산연구원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Huber, W. G., Booth, N. H. and Bevill, R. F., *Veterinary Pharmacology and Therapeutics 6 ed.* 785-821, 1168-1178 (1988).
2. Neidert, E. and Peter, W., “Drug residues in animal tissue”, *JAOAC* **70**, 197-200 (1987).
3. Ministry of Health and Welfare, No. 89-67.
4. Ministry of Agriculture and Forestry, No. 2003-3, 2003.
5. Ministry of Agriculture and Forestry, No. 2003-27, 2003.
6. National Veterinary Research and Quarantine Service, No. 2002-12, 2002.
7. Erdal Dinc, Dumitru Baleanu and Feyyaz Onur, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **26**, 946-957 (2001).
8. Julia, C. Wessel, Magdalena Matyja, Michael Neugebauer, Heiko Kiefer, Thomas Daldrup, Fuad A. Tarbah and Horst Weber, *European J. Pharm. Sci.*, **28**, 15-25 (2006).
9. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, CLG-DPN1.00, 10/25/04 (<http://www.usda.gov>).
10. E. M. Malone, G. Dowling, C. T. Elliott, D. G. Kennedy and L. Regan, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 8132-8140 (2009).