J. Fd Hyg. Safety
Vol. 25, No. 3, pp. 226~231 (2010)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

유통 식육 중 성장호르몬제 초산메드록시프로게스테론의 분석

이윤애*· 심지연 · 이륜경 · 김승환 · 오현숙 · 조태용
대구지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Analysis of Medroxyprogesterone Acetate in Meats

Yoon-Ae Lee*, Jee-Youn Shim, Ryun-Kyung Lee, Seung-Hwan Kim, Hyun-Sook Oh, and Tae-Yong Cho
Hazardous Substances Analysis Division, Daegu Regional Food and Drug Administration
(Received February 25, 2010/Revised April 19, 2010/Accepted June 28, 2010)

ABSTRACT - We aimed at the monitoring medroxyprogesterone acetate (MPA) residue amount in meats and confirmed the safety of its residue in meats. Optimized condition for analytical and instrumental methods was obtained by method validation. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were validated at 1.5 and 5.0 ug/kg, respectively. The calibration curve showed good linearity (r^2 = 0.9968) within the concentration range of 5.0~50.0 ug/kg. We selected progesterone-d9 for internal standard, The recoveries in fortified meat ranged from 67.5 to 109.56% at the 3 spiking levels. As the regulation of MPA analysis method used by LC-MS/MS on other products have established. We selected 3 species of farm stock products (cattle, pig, chicken) and purchased at the markets of seven major cities. The total 196 of meat including 46 of domestic beef, 43 of import beef, 60 of domestic pork, 12 of import pork and 35 of domestic chicken. No residue of synthetic growth hormones were detected in cattle, pig and chicken samples tested.

Key words : meats, growth hormone, veterinary drug, medroxyprogesterone acetate, internal standard

합성형 성장호르몬은 호르몬 이상증세에 대한 치료의 목적으로 사용되기도 하나, 생체 내 근육단백질 합성증가로 성장촉진 효과를 나타내기 때문에 비육을 목적으로 축산동물에 이용되기도 한다. 호르몬은 생체 내 100만분의 1(mg/kg, ppm)에서 수십억분의 1밀리그램(ug/kg, ppb)의 단위로 작용할 수 있어 극미량으로도 생식기능에 영향을 줄 수 있으며, 급・만성독성과 달리 후세대에 까지 영향을 미칠 수 있다는 특성이 있다. 따라서 체외에서 호르몬의 과다복용 등 오용에 의하거나, 대기오염 및 식품에 함유되어 있는 호르몬 물질이 체내에 투입되면 생체 스스로의 생산능력을 잃어버려 불임과 발암가능성이 높아질 수 있다. 실제로 이들 잔류 성장 호르몬 물질이 있는 육류를 장기간 섭취하면 간장・신장 등 장기의 장해 및 발육 저하와 같은 형태로 인체 유해성이 나타난다고 알려져 있다[1-3].

천연 프로게스테론에 비해 20~30배 강하게 작용하는 합성형 성장호르몬인 초산메드록시프로게스테론 (Medroxyprogesteron acetate, MPA)은 사람 및 동물용 의약품으로 피임약, 항암치료의 세포증식억제제, 호르몬 장애 치료제로 사용된다. 하지만, 유럽연합에서 정한 「식용을 목적으로 하는 동물에게 사용금지 물질(Group A3, Steroid)」에 포함되어 있다. 오염 사건의 예로써, 2002년 7월 네덜란드의 355개 양돈장에 사용되고 있는 사료에 MPA가 오염되어, 이들 농장에서 프랑스, 이탈리아, 스페인 등에 수출한 돈육에 대한 우려로 인한 파동이 있었다. 이와같은 MPA에 대하여 2007년 우리나라는 「식품 중 검출되지 않아야 하는 물질」에 포함시켜 성장호르몬제에 대한 안전성 확보에 노력하고자 하였다[4-7].

식육의 검정을 위해 필요로 하는 크로마토그래피에 의한 잔류물질 분석은 1970년대에 박층크로마토그래피 (Thin Layer Chromatography)에 의하여 시작되었다. 그 후 액체크로마토그래피, 가스크로마토그래피와 가스크로마토그래피-질량분석기(Gas Chromatography Mass spectrometer)로 발전하였으며, 열에 불안정한 물질의 분석이 가능한 액체크로마토그래피-질량분석기(Liquid Chromatography Mass spectrometer)가 등장하여 물질의 잔류분석에 대한 혁명을 가져다주었다. 더욱 발전하여 두개의 질량분석기가 나란히 붙어있는 텐덤질량분석기를 이용한 시험법이 개발되고 있다[8-12]. 우리나라 식품공전 제10. 일반시험법 5.3.57 초산

*Correspondence to: Yoon-Ae Lee, Hazardous Substances Analysis Division, Daegu Regional Food and Drug Administration 72 Galsan-ro Dalseo-gu, Daegu 704-940, Korea
Tel: 82-53-592-7139, E-mail: Yoonae2@kfda.go.kr

메드록시프로게스테론 시험법은 High performance liquid chromatography tandem mass spectrometer (HPLC-MS/MS)를 이용한 방법이다[8,10].

본 논문은 초산메드록시프로게스테론에 대한 정량한계, 표준물질의 직선성, 회수율 등의 유효성 평가 및 내부표준물질(Internal Standard, IS) 선정을 통한 분석방법 최적화를 식품공전의 시험법을 기초로 수행하고, 이를 바탕으로 국내 유통식육 내 초산메드록시프로게스테론의 잔류량을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

시중 유통되는 냉장 또는 냉동 상태의 국민 다소비 식육(쇠고기, 돼지고기, 닭고기)을 서울특별시 및 수도권 지역과 부산, 대구, 인천, 대전, 광주, 울산광역시의 백화점 및 도매시장 등에서 채취하였다. 실험실로 운반한 검체는 각각 300 g을 채취하여 다른 검체와의 혼입이 없도록 Homogeniger로 분쇄하고, 분쇄육은 밀봉 후 냉동보관(–20°C이하)한 것을 시료로 하였다.

초산메드록시프로게스테론(Medroxyprogesteron acetate, MPA, 순도 98%)은 Wako사(Japan), 내부표준물질 탐색을 위하여 사용한 19-Norprogesterone은 Sigma사(USA), Progesterone-2, 2, 4, 6, 6, 17a, 21, 21, 21,-d9 (Progesteron-D9, 순도 98%)은 Isotec사(USA)에서 각각 구입하였다. 표준용액의 조제 및 시료의 추출용매로 사용된 Diethylether, Acetonitrile, Methanol은 Burdick&Jackson사(Honeywell, USA)의 HPLC 급을 사용하였고, Distilled water(증류수)는 (< 18 cm MΩ resistivity) Nanopure Diamond (Barnstead, USA)시스템으로부터 얻어서 사용하였다. Tris (hydroxymethyl) aminomethane와 Ammonium Foramte는 Sigma사의 것을 이용하였고, Formic acid(순도 98%), Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), Potassium dihydrogenphosphate (KH_2PO_4)은 Merck사(Germany)의 것을 이용하였다.

실험방법

표준용액의 조제

초산메드록시프로게스테론 표준품을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100 μg/mL로 만들어 MPA 표준원액으로 하고, 내부 표준물질 탐색을 위한 19-Norprogesteron 및 Progesterone-D9 을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100 μg/mL 로 만들어 내부표준물질 표준원액으로 한다. 표준곡선을 작성하기 위하여 농도별로 표준원액을 메탄올로 희석하여 사용하고, 내부표준물질 표준원액을 메탄올로 희석하여 100 μg/L가 되도록 조제하였다.

시험용액의 조제

균질화 한 시료 1 g을 50 mL 원심분리관에 취하고 0.1 M 트리스완충용액 (pH 9 ; Tris (hydroxymethyl) aminomethane 1.21 g을 100 mL 용량플라스크에 취하여 증류수로 녹인 후 염산을 사용하여 pH 9로 맞추고 증류수로 표시선까지 채운다) 5 mL 가한 후 5분간 초음파 추출한다. 추출액에 디에틸에테르 5 mL를 가하고 5분간 균질화한 후 3,000 *G*에서 5분간 원심분리하고 상층액을 농축수기에 옮긴다. 남은 액에 디에틸에테르 5 mL를 가하여 위의 추출과정을 2회 반복한다. 디에틸에테르 추출액을 45°C에서 감압건고한 후 잔류물을 메탄올 1 mL에 녹여 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

HPLC-MS/MS분석

HPLC-MS/MS는 Applied biosystems 사의 API 3200를 이용하였다. HPLC의 분리 컬럼으로는 Phenomex Synergi 4 um MAX-RP (50 × 2.00 mm, 4micron)를 사용하였다. 이동상 A는 5 mM Ammonium formate가 함유된 증류수(pH 4.3), 이동상 B는 0.1%의 formic acid가 함유된 아세토니트릴을 이용하였다. 이동상의 비율은 80 : 20으로 3분간 유지 후 20 : 80의 비율이 11분에 다다르도록 하였으며 1분간 유지하였다. 이때의 유속은 0.5 ml/min 으로 흘려보내졌으며 오븐온도는 40°C, 주입량은 5 ul로 하였다. 질량분석기 조건은 ESI-positive모드로 분석하였으며, 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

초산메드록시프로게스테론의 정량방법

MPA의 표준용액 및 시료를 전처리한 시험용액을 HPLC-MS/MS에 주입하고 얻어진 크로마토그램으로부터 머무름시간을 비교하고, 외부표준물질에 대한 정량은 m/z 387-327 이온의 면적으로 검량선을 작성하여 검체 중 MPA 함량을 구하였고(Not use IS), 내부표준물질의 정량이온 대한 MPA 정량이온의 면적비를 구하여 검량선을 작성하여 검체 중 MPA 함량을 구하였다(Use IS).

결과 및 고찰

검출한계(LOD), 정량한계(LOQ) 및 검량선의 직선성확인

MPA 검출한계는 신호대잡음비 (Signal to noise ratio, S/N)를 3, 정량한계는 신호대 잡음비 (S/N)를 9이상으로 하는 것을 확인하였으며, 식품공전에 제시된 값과 비교하였다. 그 결과 LOD는 1.5 ug/kg이었으며, LOQ는 5.0 ug/kg으로 알 수 있었다(Fig. 1). 또한, 표준물질 용액 5.0, 10.0, 20.0 및 50.0 ug/kg을 HPLC-MS/MS 분석한 결과 $y = 0.0198x + 0.0151$의 정량곡선과 $r^2 = 0.9968$의 상관계수가 나타났기에 Codex에서 권장하는 상관계수 0.95를 넘는 높은 직선적 상관계수를 확인 할 수 있었다(Table 2).

Table 1. HPLC-MS/MS Analytical condition

HPLC				
Agilent 1200	Column	Phenomex Synergi 4um MAX-RP (50 × 2.00 mm, 4micron)		
	Injection volumn	5 ul		
	Oven Temp	40°C		
	Flow rate	0.5 ml / min		
	solvent A	5 ml Ammonium foramate in water (pH 4.3)		
	solvent B	0.1% formic acin in Acetonitrile		
Mass spectrometer				
API 3200	Ionization mode	Electrospray positive mode		
	curtain gas	20 psi		
	Ionspray voltage	5000V		
	Capillary Temp	550°C		
	Collision gas	6		
		MRM detection		
Medroxyprogesteron acetate (MPA)	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	CXP	Dwell (msec)
	387.3	327.4	28	150
	387.3	285.4	4	150

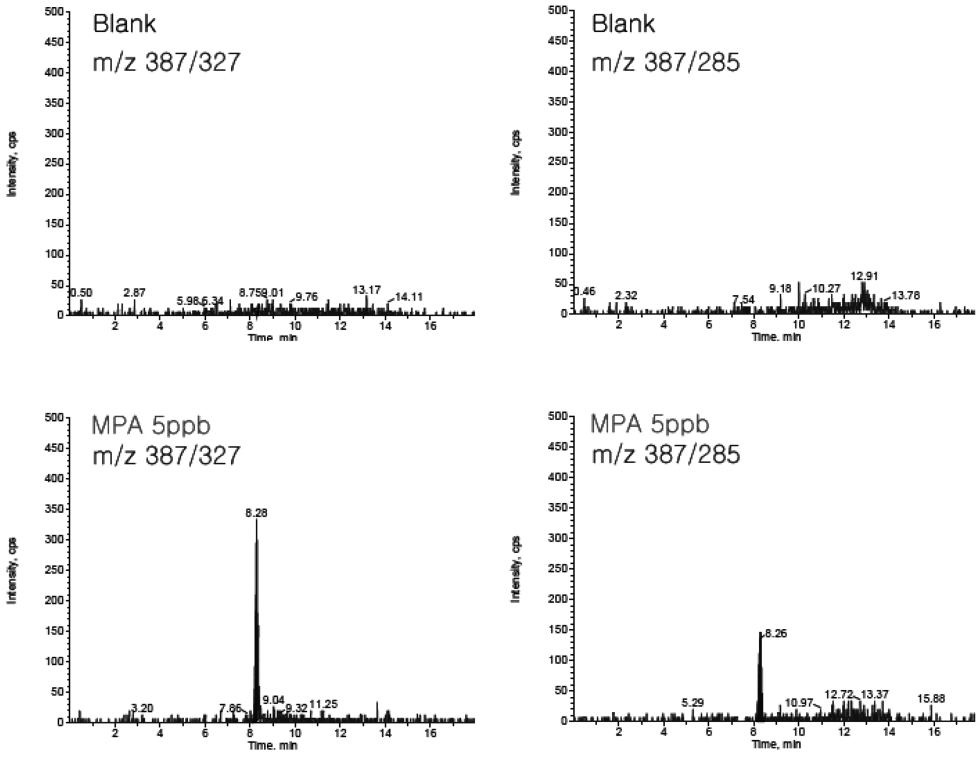
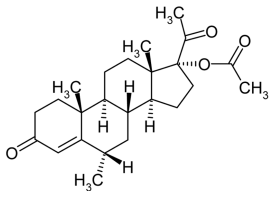
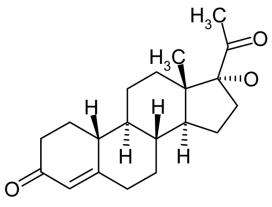
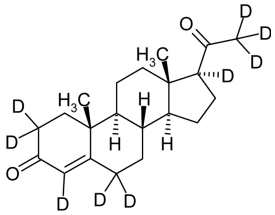


Fig. 1. Chromatography of Blank and MPA 5 ug/kg of by HPLC-MS/MS.

Table 2. LOD, LOQ and Linearity of MPA by HPLC-MS/MS

Metabolites	LOD	LOQ	LOQ in food code	Standard
MPA	1.5 ug/kg	5.0 ug/kg	5.0 ug/kg	Not detected
Metabolites	Linear range (ug/kg)	Calibration	r^2	Recommend r^2 range of Codex
MPA	0–50	y = 0.0198x + 0.0151	0.9968	≥ 0.95

Table 3. The survey of internal standard used in analysis of MPA

Compound	Medroxyprogesteron acetate	19-norprogesterone	Progesterone-D9
			
Analytic ion	m/z 387-327 m/z 387-285	m/z 301-283 m/z 301-241	m/z 324-100 m/z 324-113
Synthesis	○	○	○
contamindatin in food	○	○	X

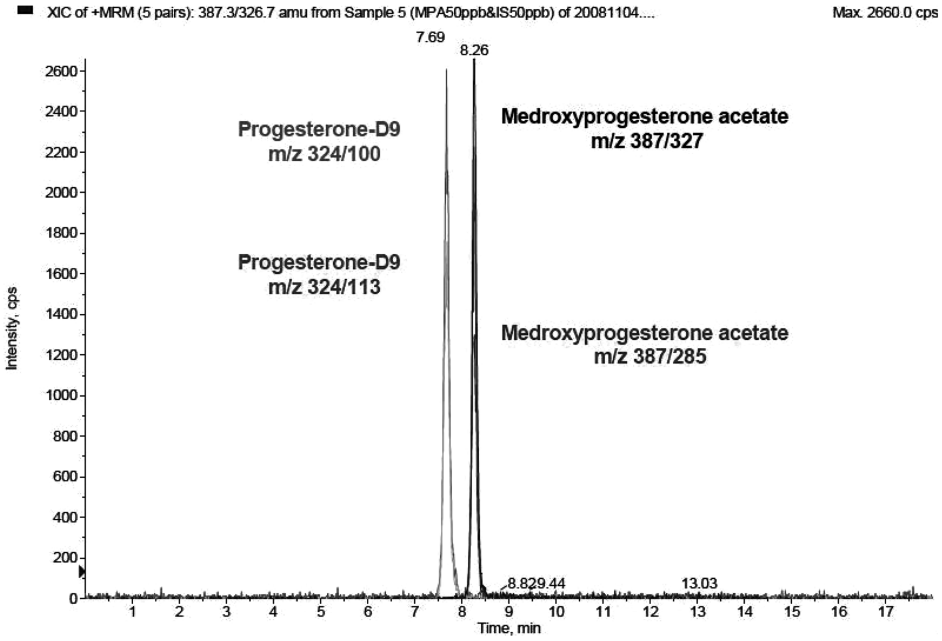


Fig. 2. Chromatography of MPA standard with progesterone-D9 of by HPLC-MS/MS.

초산메드록시프로게스테론의 내부표준물질 선정

내부표준물질의 선정을 위하여 천연호르몬인 19-norprogesterone과 유도체화 시킨 호르몬 화합물인 Progesterone-D9에 대한 자료 탐색을 하였다. 초산메드록시프로게스테론과 유사한 구조를 형성하고 있기 때문에 그 특성이 비슷하여, 두 물질 모두 HPLC-MS/MS의 분석이 가능하였고, 천연에 존재하지 않기 때문에 내부표준물질로 선정에 무리가 없다고 판단되었다. 하지만, 자료검색 결과 19-norprogesterone는 초산메드록시프로게스테론처럼 동물용 의약품으로서 식품에 오염이 될 가능성이 있기 때문에 Progesterone-D9을 내부표준물질로 선정하였다(Table 3).

선정한 내부표준물질과 표준품에 대한 크로마토그래피를 다음과 같이 얻게 되었다. 초산메드록시프로게스테론은 약 8.26분에 분자량 m/z 387-327과 m/z 387-285로 확인되었고, 내부표준물질로 선정한 Progesterone-D9는 7.69분에 분자량 m/z 324-100과 m/z 324-113으로 확인되었다(Fig. 2). 이것은 HPLC-MS/MS의 분석법 설정시 물질에서 유사 분자량이 존재할 가능성에 대한 확증을 위하여 두 개 이상의 이온쌍을 설정하는 것을 권장하는 사항에 따른 것이다.

내부표준물질 사용 여부에 따른 회수율 (Recovery) 비교

식품공전에 제시된 시험법에 따라 진행하였지만, 내부표준물질을 선정하였기에 그 정확도 및 정밀도에 관한 실험을 시행하였다. 일반적으로, 시험법에 관하여 Codex에서 권장하는 농도는 잔류허용기준인 경우 0.5배, 1배 및 2배에 대한 검정을 요구하지만, 불검출의 경우 정량한계의 1배, 2배 및 10배에 대한 회수율을 확인하도록 권장한다. 이에 따라 돼지고기, 닭고기, 쇠고기에 대하여 MPA의 정량한계의 1배, 2배 및 10배인 5.0 ug/kg, 10.0 ug/kg, 50.0 ug/kg에 대한 회수율 실험을 진행하였다. 또한 그 결과를 외부표준

Table 4. The Comparison of recovery between using or not using internal standard for analysis of MPA in pork, chicken and beef muscle

Sample	Fortification (ug/kg)	Recovery% (CV%)	
		Not use IS	Use IS
Pork	5.0	61.9 (1.7)	76.7 (3.5)
	10.0	75.1 (0.9)	96.3 (0.8)
	50.0	59.2 (4.2)	84.6 (6.0)
Chicken	5.0	54.6 (11)	67.5 (1.4)
	10.0	85.8 (1.1)	109.5 (1.5)
	50.0	64.8 (0.8)	101.7 (1.7)
Beef	5.0	63.5 (2.7)	92.2 (3.0)
	10.0	66.9 (2.7)	107.5 (5.5)
	50.0	54.2 (1.6)	86.5 (2.7)

물질에 대한 정량(Not use IS)와 내부표준물질에 대한 정량(Use IS)로 나누어 살펴본 결과 외부표준물질에 대한 정량 54.2~85.8%에서 내부표준물질에 대한 정량 67.5~109.5%로 외부표준물질에 대한 정량보다 좋은 회수율을 나타낸 것을 알 수 있었다(Table 4).

일반적으로 HPLC-MS/MS의 특이성으로 인하여, 단시간에 많은 성분의 실험을 할 수 있다는 특성을 가지고 있다. 하지만, 초산메드록시프로게스테론의 분석시 시료에 따라 이온쌍 m/z 387-327의 크로마토그래피에 머무름 시간이 다른피크가 존재함으로 데이터 확인시 면밀한 주의를 요한다(Fig. 3).

초산메드록시프로게스테론의 모니터링 결과

유통 중 식육에 대하여 초산메드록시프로게스테론의 잔류량을 모니터링하기 위해 상기의 최적화한 분석방법 이용하여 국내산 및 수입산 유통 중인 196건에 대하여 잔류량을 조사하였다. 우리나라에서는 초산메드록시프로게스테론이 「식품 중 검출되어서는 아니되는 물질」이기 때문에 모니터링의 잔류량 기준을 초산메드록시프로게스테론의 정량한계(5.0 ug/kg)로 정하였다. 전국의 서울특별시 및 6개 광역시에서 수거한 국내산 쇠고기 46건, 수입산 쇠고기 43건, 국내산 돼지고기 60건, 수입산 돼지고기 12건과 국내산 닭고기 35건에서 초산메드록시프로게스테론의 정량한계를 넘는 수치를 보이는 것은 한건도 없었다. 본 논문은 식육 중 초산메드록시프로게스테론의 기준 설정 후 처음 진행된 국내연구결과이며, 국외의 경우 유럽연합에서만 기준이 설정되어 있고, 그 모니터링 결과(2004년~2005년)로는 검출된 보고가 없다. 이에 따라 초산메드록시프로게스테론에 대한 유통 식육은 안전한 것으로 조사되었다.

요 약

본 논문은 합성형 성장호르몬으로 천연 프로게스테론에 비해 20~30배 강하게 작용하는 초산메드록시프로게스테론에 대한 정량한계, 표준물질의 직선성, 회수율 등의 유효성 평가 및 내부표준물질 선정을 통한 분석방법 최적화를 식품공전의 시험법을 기초로 수행하고, 이를 바탕으로 국내 유통식육 내 초산메드록시프로게스테론의 잔류량을 조사하였다. 그 결과 초산메드록시프로게스테론의 검출한계는 1.5 ug/kg, 정량한계는 5.0 ug/kg 으로 나타났으며 표준물질의 좋은 직선성 (r^2 = 0.9968)을 확인 하였다. 내부표준물질의 비교결과 식품에 오염될 우려가 없는 progesterone-D9으로 선정하였다. 이를 시험한 결과 7.69분의 머무름 시간을 가지며, 정량이온은 m/z 324-100, 정성이온은 m/z 324-113으로 설정하였다. 내부표준물질에 대한 정량의 회수율 실험결과 67.5~109.5%로 높아진 회수율을 나타낸 것을 알 수 있었다.

이와 함께 전국의 서울특별시 및 6개 광역시에서 수거한 국내산 쇠고기 46건, 수입산 쇠고기 43건, 국내산 돼지고기 60건, 수입산 돼지고기 12건과 국내산 닭고기 35건의 초산메드록시프로게스테론의 잔류량을 실태 조사한 결과 검출된 경우는 한건도 없었다. 따라서, 초산메드록시프로게스테론에 대한 유통 식육은 안전한 것으로 조사되었다.

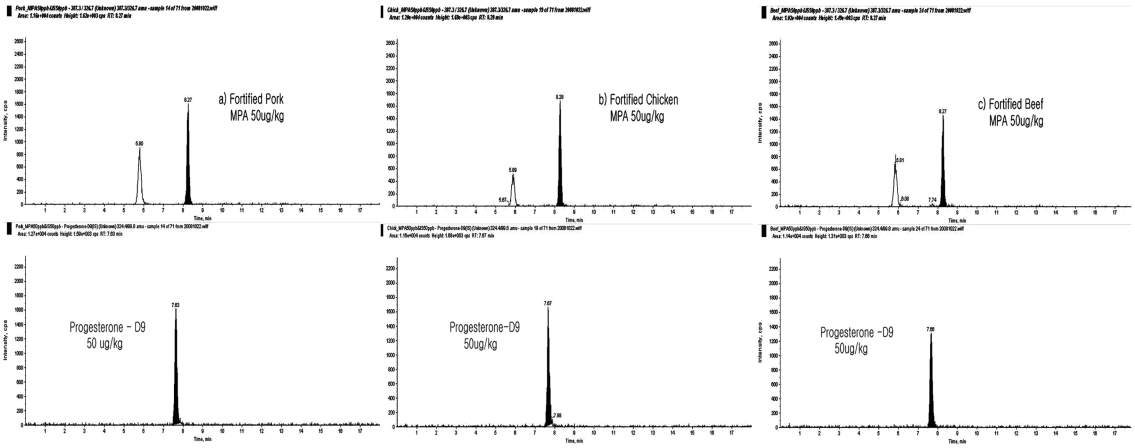


Fig. 3. Chromatography of MPA fortified pork, chicken and beef with progesterone-D9 of by HPLC-MS/MS).

참고문헌

1. Plumb, D.C. : Veterinary Drug hand book, Iowa state press, pp. 83-151 (2002).
2. Michael, J.W. and Morley, H.J.S. : Hormone Assay in Biological Fluids, Humana press, pp. 25-52 (2006).
3. Nikolaos A.B. et al: Drug Residues in Foods, Marcel Dekker, New York, pp. 269-298 (2001).
4. 식품의약품안전청 : 식품중 동물용의약품 잔류허용기준, pp. 3-5, 95-311 (2009).
5. EU : Council directive 96/23/EC, pp. 1-23 (2004).
6. CODEX Guidelines for the establishment of a regulatory programme for control of veterinary drug residues in foods. (CAC/GL 16-1993).
7. 국립수의과학검역원 : 2007 국립수의과학검역원 연보 (2008).
8. Brabander, H.F. et al : Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals, *J. Mass Spectrometry,* **42,** 83-998 (2007).
9. Faryal M. : Veterinary Drug Residues and MRLs, *Animal Pharm reports*, pp. 1-186 (2006).
10. 심재한 : Codex 동물용의약품 잔류허용기준 적용을 위한 공인시험법 개발, 식품의약품안전청 용역보고서 (2007).
11. Stolker A.A.M. and Brinkman, U.A.T. : Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review, *J. Chromatography A*, **1067**, 15-53 (2005).
12. Tiedong G. et al ; Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry, *Clinica chimica acta*, **372**, 76-82 (2006).