pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 28, No. 3, pp. 247~251 (2013)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2013.28.3.247

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

LC/ESI-MS/MS를 이용한 식품 중 불법적으로 첨가된 비스테로이드성 소염진통제 및 스테로이드 의약품 동시분석

이용철* · 박주성 · 김성단 · 양혜란 · 김은희 · 이윤정 · 조성자 · 조한빈 · 김정헌 · 채영주
서울특별시 보건환경연구원

Simultaneous Determination of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Corticosteroids Added to Foods as Adulterants using LC-ESI-tandem Mass Spectrometry

Yongcheol Lee*, Ju-Sung Park, Sung-Dan Kim, Hye-Ran Yang, Eun-Hee Kim, Yun-Jung Yi, Sung-Ja Cho, Han-Bin Jo, Jung-Hun Kim, and Young-Zoo Chae
Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment
(Received April 19, 2013/Revised August 5, 2013/Accepted August 27, 2013)

ABSTRACT - The objective of present study was to develop a simultaneous determination method of 5 medical compounds, including beclomethasone, dexamethasone, prednisolone, ketoprofen, phenylbutazone in foods, using LC-MS/MS. To optimize MS analytical condition of 5 compounds, each parameter was established by MRM mode. The chromatographic separation was achieved on a C18 column successfully, with a mobile phase made up of A (0.1% formic acid) and B (0.1% formic acid in acetonitrile), at a flow rate of 0.3 mL/min for 17 min with a gradient elution. LOD and LOQ of 5 compounds were in the range of 0.40~4.60 ng/mL and 0.81~11.46 ng/mL, respectively. As a result of analyzing the three concentrations of the standard mixture added to blank samples, the results showed that the mean recovery rate of 5 compounds was in the range of 81.52~103.83%, and RSD (%) of Intra- and Inter-day assay were 0.52-10.45. Since relatively fine selectivity, accuracy and reproducibility were shown in this qualified experimental method, it could be utilized efficiently to investigating those 5 compounds to see if it is added to food products illegally.

Key words: ketoprofen, phenylbutazone, dexamethasone, prednisolone, LC-MS/MS

서 론

최근 건강의 유지와 증진에 관심이 증가하면서 효과가 기대되는 건강기능식품의 소비가 증가하고 있다[1,2]. 이러한 제품들 중 일부에는 생리효과를 증대시키거나 과도하게 효능을 나타낼 수 있도록 의도적으로 식품에는 사용이 금지된 화학적 합성물질 혹은 의약품이 첨가된 채 판매가 되고 있어 소비자의 건강상 위해를 끼치는 경우가 발생하고 있다. 이와 관련하여 염증성 질환에 효과가 기대되는 건강관련식품에 소염·진통 의약품 성분이 불법적으로 혼입되어 유통되는 경우가 보고되고 있으며, 이러한 의약품이 혼입된 식품을 장기간 또는 다량으로 섭취 시, 심각한 부작용으로 건강악화가 우려되고 있어 사회적으로 큰 문제를 일으키는 실정이다.

소염 · 진통 효과를 보이는 성분으로 비스테로이드성 소염·진통제에는 이부프로펜(ibuprofen), 케토프로펜(ketoprofen), 페닐부타존(phenylbutazone) 등이 있고, 스테로이드 제제 중 베타메타손(betamethasone), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 베클로메타손(beclomethasone) 등이 또한 탁월한 효과를 보인다고 알려져 있어, 실제 의사의 처방전에 의해 사용되는 성분들 또한 포함되어 있다. 식품위생법상에는 의약품 성분을 포함한 부정유해물질들을 함유하고 있는 식품들은 판매하거나 또는 판매할 목적으로 채취 · 제조 · 수입 · 가공 · 사용 · 조리 · 저장 또는 운반하거나 진열이 금지되어 있다[3].

*Correspondence to: Yongcheol Lee, Food Safety Team, Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Gwacheon, Gyeonggi 427-070, Korea
Tel: 82-2-570-3265, Fax: 82-2-570-3243
E-mail: dreamykafka@seoul.go.kr

지금까지 포괄적인 의약품 성분에 대한 연구나 스테로이드 의약품 성분에 대한 동시분석 연구는 다소 보고되어 있다. HPLC에 의한 동시분석으로 스테로이드 9 종 성분에 대해 QuEChERS 기법을 이용한 연구[4]는 다양한 시료에 적용하여 분석이 가능하나, LC-MS 비해 복잡한 전처리 과정을 거쳐야 하고, 미량성분의 검출에는 한계가 있다. 따라서 최근의 연구는 주로 LC-MS/MS를 이용하여 좀 더 선택적이면서 동시에 신속한 동시분석법이 주로 보고되었다. 소변 및 혈장에서 검출되는 스테로이드 성분 동시분석연구[5,6], 수질환경 시료 중 산성의약물질 분석[7], 그리고 동시분석은 아니지만 우유 중 비스테로이드성 소염진통제 및 그 유사체를 분석한 연구[8]와 약초치료제 중 의도적으로 첨가된 합성의약품 성분의 총괄적인 분석법을 제시한 연구[9]가 LC-MS/MS를 이용한 분석법으로 보고되었다. 그러나 이 연구들의 대부분은 유사한 생리효과를 나타낼 수 있는 성분들에 초점을 맞추기 보다는 유사한 구조를 지닌 성분들의 그룹으로 동시분석을 진행하였다. 식품에 의도적으로 이들 의약품 성분이 첨가된 경우에는 그 기대효능에 따라 유사한 생리효과를 지닌 성분들의 혼입 가능성이 높으므로, 선택적이면서 효율적인 동시분석법이 필요하다. 소염・진통에 유사한 생리효과를 나타낼 수 있는 비스테로이드성 소염진통제 및 스테로이드성 소염진통 성분들의 복합적인 동시분석에 대한 연구는 아직 미미한 실정이며, 따라서 본 연구에서는 검출빈도가 있어 문제가 되고 있는 소염・진통 효과를 나타내는 의약품 성분의 선별적인 분석의 일환으로, 비스테로이드성 소염・진통제 2종과 스테로이드 의약품 성분 3종에 대해 LC-MS/MS를 이용한 동시분석법을 확립하여 실제 유통 중인 제품에 적용하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

표준품 ketoprofen (98.0%)은 Wako Chemicals (Osaka, Japan), phenylbutazone과 dexamethasone, prednisolone은 Sigma-Aldrich (Saint Louis, Mo, USA), beclomethasone은 Steraloids Inc. (RI, USA)에서 구입하여 사용하였다. 아세토니트릴과 메탄올은 Merck사(HPLC Grade, Darmstadt, Germany), 개미산은 LC-MS 분석용으로 Fisher Chemical사(Leicestershire, UK), 인산(HPLC Grade, 85%)은 Fluka Analytical (Buchs, Switzerland)에서 구입하였고, 실험에 사용된 물은 PRIMA & UHQ-MKII water purification (ELGA, High Wycombe, Buckinghamshire, England)을 이용하여 초순수로 정제(18.2 MΩ・cm) 한 후 사용하였다. 분석법 검증에 사용한 공시료는 충남 공주시 소재 업체에서 제조한 것으로, 인터넷 구매 사이트에서 2012년 10월 경 구입한 환형태의 기타가공품이었고, 원료는 홍화씨, 백출, 죽염, 산약, 건강, 찹쌀 등이 혼합된 제품이었다. 실제 유통중인 식품에서 위 5종 성분의 혼입 여부를 모니터링하고자 관절염 등에 소염 및 진통효과가 있다고 기대되는 환형태 및 추출액 형태의 기타가공품 및 추출가공식품 21건, 다류 및 음료류 9건, 건강기능식품 중 개별인정형 제품 9건, 총 39개 제품을 인터넷에서 구매하여 분석하였다.

기기 및 분석조건

원심분리기는 Combi-514R Model (Hanil science industrial Co., Incheon, Korea)을 사용하였고, 질량분석기는 API 4000Qtrap (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하였고, LC system은 Agilent 1200 series (Agilent technology, Waldbronn, Germany), 컬럼은 Eclipse plus C-18 (2.1 × 150 mm, 3.5 μm, Agilent, USA)을 사용하였다. 표준용액을 positive ion mode로 EP (Entrance Potential), DP (Declustering Potential), CE (Collision Energy), CXP (Collision cell Exit Potential) 등 MS 각각의 파라미터를 최적화한 MRM (Multi Reaction Mode)조건을 확립하고 (Table 2), Ion spray voltage 5500, Temperature 400°C, Ion source gas1 20.0, Ion source gas2 20.0, Curtain gas 20.0으로 Table 1의 HPLC 조건을 이용하여 분석하였고, 재평형시간은 5분을 유지하였다.

표준용액의 조제

표준용액은 메탄올에 녹여 각 1000 μg/mL 수준으로 만들었고, 이를 약 100 μg/mL 농도로 working standard 혼합용액으로 만든 후 분석에 사용하였다.

시험용액의 조제

약 0.5 g 의 시료에 working standard 용액을 첨가하여 70% 메탄올용액 10 mL로 교반 후 15분 동안 초음파 추출하였다. 이를 10분 동안 원심분리하고(4500 rpm), 이 과정을 2회 반복하여 20 mL 부피플라스크에 합쳐 정용하였다. 다시 이 용액의 1 mL를 10 mL 부피플라스크에 넣고 메탄올로 정용하여 0.22 μm 멤브레인 필터로 여과 후 LC-MS/MS 분석을 진행하였다.

Table 1. Operating condition of HPLC/MS-MS

Mobile solvent	A : 0.1% formic acid B : 0.1% formic acid in acetonitrile					
Injection volume	5 μL					
Column temperature	40°C					
Flow rate	0.3 mL/min					
Pump gradient program	Time (min)	A(%)	B(%)	Time (min)	A(%)	B(%)
	0.0	90	10	12.0	10	90
	2.0	90	10	13.0	90	10
	7.0	10	90	17.0	90	10

회수율, 재현성 및 검출한계, 정량한계 실험

혼합표준용액을 2~100 ng/mL 수준으로 희석하여 검량선을 작성하였고, 검출한계 및 정량한계는 각각 신호대잡음비 3배 이상, 10배 이상인 농도로 계산하였다. 회수율 측정은 이들 5종 성분이 들어있지 않음을 확인한 공시료에 최종농도가 5.0 ng/mL, 20.0 ng/mL, 50.0 ng/mL 수준으로 될 수 있도록 첨가한 후 시험용액의 조제 방법에 따라 3회 이상 반복 실험하였고, 분석의 정확성은 3회 반복하여 얻은 회수율의 평균으로써, 재현성은 일내 및 일간 3회 반복 분석하여 얻은 결과의 상대표준편차(%)로써 나타내었다.

결과 및 고찰

MS/MS 분석 조건 중 MRM모드는 분석하고자 하는 모분자에 MS 각각의 파라미터를 조정하여 쪼개짐 이온의 감도를 최적으로 높이고, 형성된 이온들의 패턴을 비교하여 분석물질에 대한 높은 특이성을 나타내는 것으로 알려져 있다[10]. 각 표준용액을 주입하여 양이온모드와 음이온모드를 모두 이용하여 분석한 후 감도가 더 좋은 양이온모드로 최적화시킨 MRM조건을 Table 2에 나타내었고, 각 전구이온과 생성이온들은 기존의 연구[5,9]와 일치하는 결과였다. 5종 성분 모두 전구이온에서 2개의 생성이온을 기준으로 그 중 감도가 높은 이온을 정량이온으로 결정하여 위 Table 1의 HPLC조건을 이용하여 혼합표준용액을 분석한 이온 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다.

Table 3은 5종 성분 표준용액의 직선성과 검출한계, 정량한계를 나타내고 있다. 약 2-100 ng/mL 범위의 농도에서 모든 성분의 R^2 값이 0.999 이상인 훌륭한 직선성을 나타내었고, prednisolone을 제외한 4종 성분의 검출한계가 0.40-0.90 ng/mL, 정량한계는 0.81-2.22 ng/mL 로 낮은 농도까지 정량성을 나타내었다. 이는 Bogusz 등[9]의 연구

Table 2. MRM condition of 5 target compounds

Compound	Exact mass	Q1 mass	Q3 mass	DP[1] (volts)	EP[2] (volts)	CE[3] (volts)	CXP[4] (volts)
beclomethasone	408.2	409.1	391.0	61	10	17	10
			283.1	61	10	15	10
dexamethasone	392.5	393.1	372.9	91	10	13	10
			355.2	91	10	19	10
prednisolone	360.4	361.0	343.1	86	10	15	20
			147.0	86	10	31	10
ketoprofen	254.3	255.0	209.0	71	10	21	12
			104.9	71	10	35	20
phenylbutazone	308.4	309.1	160.1	81	10	29	12
			104.0	81	10	47	18

[1]Declustering Potential.
[2]Entrance Potential.
[3]Collision Energy.
[4]Collision cell Exit Potential.

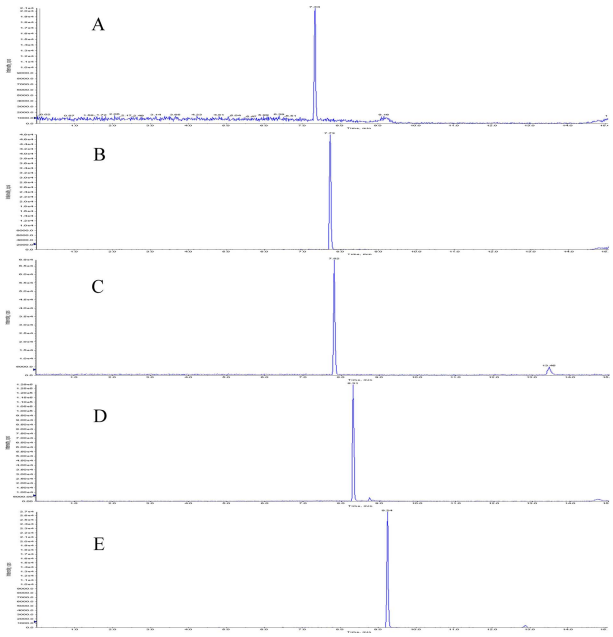

Fig. 1. XIC of 5 target compounds. Peak identification: A. prednisolone(t_R: 7.34 min), B. dexamethasone(t_R: 7.73 min), C. beclomethasone(t_R: 7.82 min), D. phenylbutazone(t_R: 8.31 min), E. ketoprofen(t_R: 9.24 min).

Table 3. Linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of 5 target compounds

Analyte	R^2	Linear range (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
beclomethasone	0.9997	2.2-111.2	0.90	2.22
dexamethasone	0.9998	2.0-100.0	0.40	1.00
prednisolone	0.9989	11.5-114.6	4.60	11.46
ketoprofen	0.9995	2.1-105.5	0.42	1.06
phenylbutazone	0.9996	2.0-101.0	0.40	0.81

결과인 ketoprofen, phenylbutazone 각각 검출한계 0.2, 0.4 ng/mL와 유사하였으나, Lau 등[11]의 phenylbutazone 검출한계 3.69 ng/mL, 정량한계 12.29 ng/mL와, Dikunets 등[12]의 dexamethasone, beclomethasone의 검출한계 3 ng/mL, 정량한계 5 ng/mL 보다는 낮은 수준이었다.

약 5 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL, 3개 수준의 농도로 표준용액을 공시료에 첨가하여 얻은 회수율 결과를 Table 4에 나타내었다. ketoprofen과 prednisolone을 5 ng/mL 수준으로 첨가한 시료를 제외하고 각 성분 모든 농도에서 80% 이상의 우수한 회수율을 얻을 수 있었다. Piotr 등[8]이 보고한 ketoprofen을 15 ng/mL 수준에서 얻은 회수율 93%보다 다소 낮은 수준으로 회수율 84%(20 ng/mL 수준)를 얻었으나(Table 4), 상대표준편차로 비교한 반복 재현성(RSD, %)은 그들이 얻은 11.2 보다 낮은 2.35로 더 우수한 결과를 보여주었다(Table 5). 상대표준편차(%)로 나타낸 Table 5의 일내, 일간 반복 재현성은 약 0.5-10 이내로, 전

Table 4. Recovery of 5 target compounds

Analyte	Added (ng/mL)	Found (ng/mL)	Recovery (%)	Mean ± SD (%)
	5.51	4.33	78.34	
beclomethasone	22.24	20.83	93.68	
	55.60	51.63	92.87	88.30 ± 8.63
	5.00	4.69	93.87	
dexamethasone	20.00	19.63	98.17	
	50.00	50.60	101.20	97.75 ± 3.68
	-	-	-	
prednisolone	22.91	23.30	101.70	
	57.23	60.63	105.95	103.83 ± 3.01
	5.28	3.74	70.90	
ketoprofen	21.10	17.73	84.04	
	52.75	47.27	89.61	81.52 ± 9.61
	5.05	4.34	86.01	
phenylbutazone	20.20	19.67	97.36	
	50.50	51.57	102.1	95.16 ± 8.27

Table 5. Intra-day and inter-day precision of 5 target compounds

Analyte	Added (ng/mL)	Intra-assay (RSD, %)	Inter-assay (RSD, %)
	5.51	2.34	3.38
beclomethasone	22.24	4.19	0.56
	55.60	2.18	0.52
	5.00	2.47	2.32
dexamethasone	20.00	2.90	3.61
	50.00	6.71	0.89
	-	-	-
prednisolone	22.91	2.39	3.37
	57.23	4.96	0.76
	5.28	8.67	6.12
ketoprofen	21.10	2.35	1.43
	52.75	3.21	3.40
	5.05	5.93	3.59
phenylbutazone	20.20	2.29	4.91
	50.50	0.92	10.45

반적으로 우수한 재현성을 보여주었고, Piotr 등[8]이 보고한 반복 재현성 결과인 ketoprofen 8.5 (5 ng/mL), 11.2 (15 ng/mL)와 phenylbutazone 5.7 (5 ng/mL)과 유사하였다. LC-MS/MS를 이용하여 소염・진통에 효과를 나타내는 위 5종 성분의 선택성 및 직선성, 회수율로 측정한 정확성 및 반복 재현성 분석 결과, 효율적인 동시분석법으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

위에서 검증한 동시분석법을 이용하여 인터넷에서 구매한 건강기능식품 및 기타식품류 39개 제품에 대해 위 5종 성분의 검출여부를 모니터링 한 결과, 모든 제품에서 검출되지 않았다.

요 약

소염・진통 의약품 성분인 beclomethasone, dexamethasone, prednisolone, ketoprofen, phenylbutazone 5종에 대한 동시분석을 위해 LC-MS/MS 분석 조건 중 MRM 방식으로 각 성분의 MS 분석 최적조건을 결정하고, 정량이온으로 beclomethasone 409.1/391.0, dexamethasone은 393.1/372.9, prednisolone은 361.0/343.1, ketoprofen은 255.0/209.0, phenylbutazone은 309.1/160.1 을 분석하였다. 혼합표준용액을 기울기용매 조건으로 이동상 A(0.1% 개미산), B(0.1% 개미산을 함유한 아세토니트릴)를 이용하여 17분 동안 분석한 결과, prednisolone (t_R: 7.34 min), dexamethasone (t_R: 7.73 min), beclomethasone (t_R: 7.82 min), phenylbutazone (t_R: 8.31 min), ketoprofen (t_R: 9.24 min) 순서로 검출되었다. 5종 성분 모두 약 2-100 ng/mL 농도 수준의 검정곡선에서 R^2 값이 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었고, prednisolone을 제외한 4종 성분의 검출한계는 0.4-0.9 ng/mL, 정량한계는 0.81-2.22 ng/mL 였으며, prednisolone은 그보다 다소 높은 4.60, 11.46 ng/mL 이었다. 환제품의 기타가공품 공시료에 5종 성분 혼합표준용액을 최종농도가 5, 20, 50 ng/mL 이 되도록 직접 첨가하여 분석한 결과, 모든 농도에서 80% 이상의 우수한 회수율을 얻을 수 있었고, 일내 일간 반복 분석의 상대표준편차(%)를 통해 모든 성분에서 비교적 재현성 있는 결과가 나타났다. 실제 인터넷 상에서 유통중인 식품에 이 분석법을 적용한 결과 모든 제품에서 검출되진 않았으나, 소비자들의 건강상 위해를 끼칠 수 있는 이들 성분의 동시분석법을 활용한 지속적인 모니터링이 필요한 실정이다.

참고문헌

1. 박유경, 박미영, 성미경, 권훈정: 건강기능식품에 의해 고시된 원료 포함여부에 따른 건강증진용 식품의 섭취양상 비교, 한국식품영양과학회지, **34**, 374-379 (2005).
2. 김현구: 건강기능식품의 현황 및 건강, 식품산업과 영양, **9**, 1-14 (2004).
3. 식품위생법, 보건복지가족부 (2010).
4. Klinsunthorn N., Petsom A. and Nhujak T.: Determination of steroids adulterated in liquid herbal medicines using QuEChERS sample preparation and high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55**, 1175-1178 (2011).
5. McWhinney B.C., Briscoe S.E., Ungerer J.P.J. and Pretorius C.J.: Measurement of cortisol, cortisone, prednisolone, dexamethasone and 11-deoxycortisol with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application for plasma, plasma ultrafiltrate, urine and saliva in a routine laboratory. *J. Chromatogr. B.*, **878**, 2863-2869 (2010).
6. Andersen T.H., Hansen L.G. and Pedersen M.: Optimization of solid phase extraction clean up and validation of quantita-

tive determination of corticosteroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, **617**, 216-224 (2008).
7. 심영은, 조현우, 명승운: LC/ESI-MS/MS를 이용한 수질 환경 시료 중 산성의약물질 분석방법비교, 분석과학, **21**, 191-200 (2008).
8. Piotr J., Teresa S.J., Konrad P., Edyta S. and Jan Z.: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 2955-2963 (2012).
9. Bogusz M.J., Hassan H., Al-Enazi E., Ibrahim Z. and Al-Tufail M.: Application of LC-ESI-MS-MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 554-564 (2006).
10. 명승운, 박서희, 조현우: LC/MS/MS를 이용한 sildenafil 및 그 유사체 분석, 분석과학, **16**, 488-498 (2003).
11. Lau A.J., Holmes M.J., Woo S.O. and Koh H.L.: Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 401-406 (2003).
12. Dikunets M.A., Appolonova S.A. and Rodchenkov G.M.: Identification of endogenous and exogenous glucocorticoids by HPLC-MS in human urine. *Pharm. Chem. J.*, **44**, 328-333 (2010).