J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 2, pp. 125~141 (2011)

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

생체시료 중 멜라민 화합물의 미량분석법 개발연구

한경문* · 김진호 · 조수열 · 심선보 · 이진희 · 이지현 · 황인선 · 김성일 · 조양하 · 채갑용 · 권순재 · 이준호
식품의약품안전평가원 독성평가연구부 첨단분석팀

Establishment of Analytical Methods for Melamine Related Compounds in Biological Samples

Kyoungmoon Han*, Jinho Kim, Sooyeul Cho, Sun Bo Shim, Jin Hee Lee, Jihyun Lee, In Sun Hwang, Sungil Kim, Yang Ha Cho, Gap Yong Chai, Soonjae Kwon, and Junho Lee
National Institute of Food And Drug Safety Evaluation, Toxicological Evaluation and Research Department, Advanced Analysis Team Osong Health Technology Administration Complex, 643 Yeonje-ri, Gangoe-myeon, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do 363-951, Korea
(Received August 30, 2010/Revised October 3, 2010/Accepted May 3, 2011)

ABSTRACT - Melamine has raised international concerns for its catastrophic health effects from tainted infant formula. This report concerns the developmental validation of a sensitive HPLC/MS/MS and GC/MS methods about melamine and cyanuric acid in human urine and serum. Analytical detection ranges of LC/MS was from 0.2 to 5.0 ng/mL and 2.0 to 60.0 ng/mL about melamine and cyanuric acid, respectively. The limits of quantification and confirmation are 0.2 ng/mL for both analytes in human urine and serum by LC/MS/MS. The range of recovery was 91.6%, and 107.6% for cyanuric acid and melamine in urine, respectively. The range of precision coefficient variation was from 2.0%, to 11.8% for cyanuric acid and melamine in urine. The range of recovery was from 94.9%, to 119.0% about cyanuric acid and melamine in serum, respectively. The range of precision coefficient variation from was 3.7%, and 13.5% about cyanuric acid and melamine in serum. Analytical detection ranges of GC/MS were 5.0 to 100.0 ng/mL about melamine and cyanuric acid, respectively. The limits of quantification and confirmation are 5.0 ng/mL for both analytes in human urine and serum by GC/MS. The range of recovery was from 83.7%, to 114.5% for cyanuric acid and melamine in urine, respectively. The range of precision coefficient variation was 3.5%, and 10.7% for cyanuric acid and melamine in urine. The range of recovery was 94.4%, and 110.7% for cyanuric acid and melamine in serum, respectively. The range of precision coefficient variation from was 3.9%, and 13.8% for cyanuric acid and melamine in serum. Several changes were taken to optimize performance by this method.

Key words: Melamine, Cyanuric acid, LC/MS/MS, GC/MS

최근 유해물질에 대한 사건사고가 빈번하게 발생하고 있는 추세이며, 그 중에서도 멜라민에 오염된 분유 섭취로 인해 영유아가 신부전 및 사망에 이르는 사고가 발생함에 따라, 소비자의 안전을 확보하기 위해 철저한 사전·사후 관리가 필요하다. 멜라민 합성수지는 내열성, 내연성이 있어 바닥 타일, 화이트보드 및 주방기구 등 플라스틱 제품, 아교 및 난연제 등 광범위하게 사용되는 공업용 수지로써 질량 전체에 66%가 질소인 멜라민 수지를 이용하여 단백질의 함유량을 높이는데 사용되었다. 멜라민은 1958년에 소의 비단백질소로 사료에 사용되었으나 1978년 이후부터 사용이 금지된 물질로써 멜라민은 사용범위가 매우 넓기에 식품과 접촉되는 경우가 많아 인위적 첨가의 경우가 아닌 상황에서도 멜라민에 노출될 수 있다. 산성인 레몬, 오렌지 주스, 응고된 우유 등에 의해 멜라민 용기로부터 멜라민이 이행될 가능성도 있다고 보고되었다. 멜라민은 '2, 4, 6-triamino-1, 3, 5,-triazine' 으로 불리는 질소·유기 화합물로 암모니아와 탄산가스로 요소비료(urea)를 가열하여 합성하며 이때 부산물로 시아누르 산, 아멜린, 아멜라이드(cyanuric acid, ammeline, ammelide) 등이 함께 생성되기에 Organization for Economic Cooperation and Development

*Correspondence to: Kyoungmoon Han, National Institute of Food And Drug Safety Evaluation, Toxicological Evaluation and Research Department, Advanced Analysis Team Osong Health Technology Administration Complex, 643 Yeonje-ri, Gangoe-myeon, Cheongwon-gun, Chungcheongbuk-do 363-951, Korea
E-mail : lovelyhkm@korea.kr

OECD(1998)에서는 일일 멜라민 경구섭취량을 체중 1 kg 당 0.007 mg으로 정하고 있다. 또한, 멜라민 유사물질인 시아누르 산 (cyanuric acid) 역시 반추동물의 사료첨가물로 사용이 허용되어있어 수영장 물의 소독과정에서 해리 산물로 생성되기도 하여 음용수, 수영장물, 또는 생선 등의 섭취를 통해 시아누르산에 노출될 가능성도 있다. 또한, 멜라민과 시아누르산의 결합으로 인해 불용성 결정이 생성되면 이때 생성된 결정은 신장손상을 일으킬 수 있다[1]. 기존 멜라민 분석은 wheat gluten및 쌀과 같이 단백질을 함유한 식품에서 멜라민이 연소되면서 생성하는 질소로부터 암모니아의 양을 적정 분석하여 단백질의 양을 계산하였지만 비단백질 질소가 존재 시 변별력이 없다는 것을 이용하여 단백질 함유량을 높이기 위해 멜라민을 식품에 첨가하여 만든 제품들이 문제를 야기하면서, 멜라민에 대한 인체노출은 그 사용범위 등을 고려할 때 빈번하게 발생될 수 있으며 미량이나 지속적인 노출 시 인체에 위해성을 나타날 수 있는 문제를 갖고 있어 인체모니터링이 요구되는 실정이다. 미국 질병관리본부에서는 2003-2004년도 1회에 걸쳐 인체모니터링을 수행한 보고가 있으나 현재까지 멜라민의 인체노출에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 이 연구를 통해 인체시료를 이용하여 멜라민 및 시아누르산의 최적분석법을 확립하고 인체모니터링 및 인체노출평가에 활용 가능한 기초자료를 생산하여 유해물질 안전관리정책에 기여하고자 한다.

이 론

멜라민 합성수지의 생성 기전

멜라민은 포름알데히드와 함께 가열하면 축합 반응해 만들어진 멜라민 수지의 원료가 된다(Fig. 1.).

멜라민 화합물의 대사관련 연구

미생물에서의 대사

멜라민은 높은 질소함량으로 인해 식물의 생장을 위한 비료로서의 활용가능성이 있다. 그러나 이를 위해서는 토양 내 미생물에 의한 멜라민 대사가 전제되어야 하며 일부 미생물(*Pseudomonas*)에서 멜라민을 분해하여 질소를 사용할 수 있는 것으로 알려있다(Shelton et al., 1997).

돼지에서의 대사 및 pharmacokinetics (Baynes et al., 2008)

동물사료에 멜라민이 혼입되는 경우들이 발생하고 있으나 동물에서의 대사에 대한 정보는 부족한 상황이다. 돼지

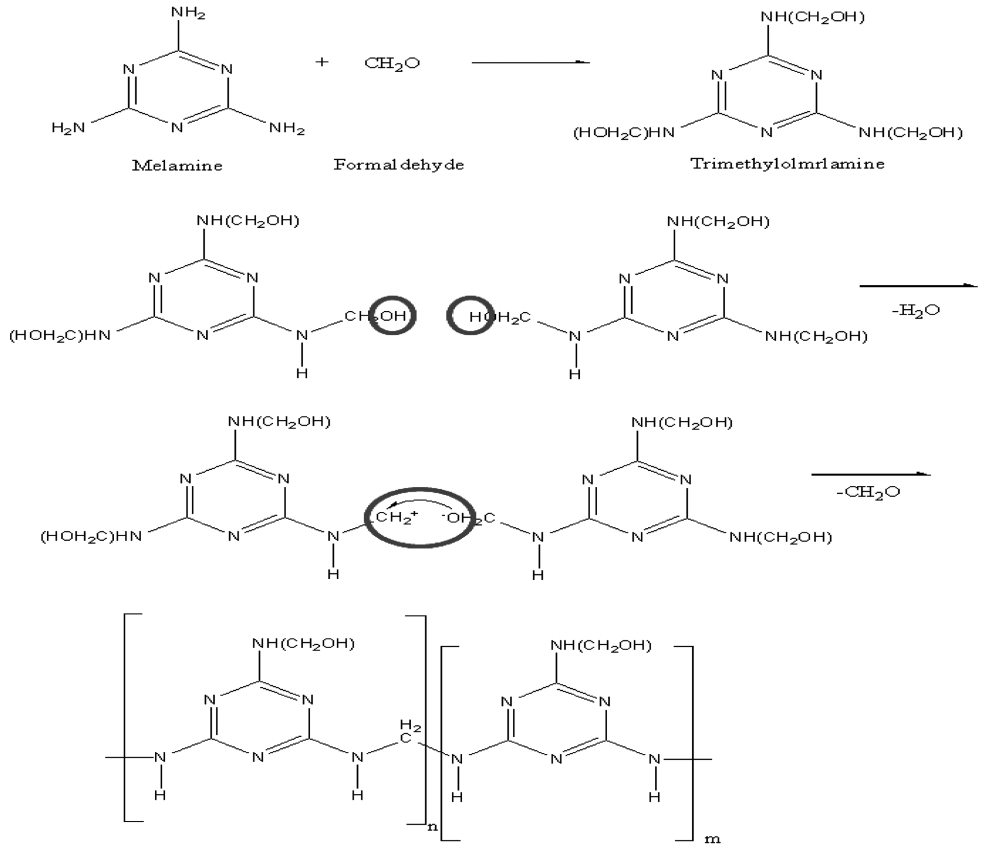


Fig. 1. Synthetic mechanism of melamine resins.

에 정맥주사를 이용해 5 마리의 이유기 돼지에 6.13 mg/kg로 투여하고 24시간동안 채혈하여 HPLC-UV를 이용하여 멜라민을 분석하였다. 그 결과, 반감기는 4.04h이었으며 clearance는 0.11 L/h/kg, 분포 volume은 0.61 L/kg이었다. 이는 유일한 포유류 실험인 쥐실험(멜라민은 체내에서 대사되지 않으며 3시간 정도의 짧은 반감기를 가지고 뇨를 통해 체외로 배출(OECD 1998))에서의 결과와 유사하였으며 멜라민은 신장을 통해 빠르게 제거되어 조직과의 결합은 우려되지 않는 것으로 판단되었다.

멜라민 화합물의 독성정보

멜라민의 독성

멜라민 섭취로 인하여 혈 중 질소를 함유한 urea가 높은 농도로 존재하게 되고 크레아티닌 수치가 높아져 신장기능의 이상에 영향을 미치는 것으로 추정된다. 인체에서 멜라민의 경구 섭취로 인한 독성에 관한 자료는 없으나 동물 실험에서 멜라민이 포함된 사료를 섭취 시 주요 독성 영향은 결석형성, 방광내 염증반응, 세포이상증식(hyperplasia) 등이었으며, 개에서 멜라민 결정 뇨, 쥐에서는 혈뇨가 보고되었다. 쥐에서의 경구 LD50 값은 3,161 mg/kg 으로 급성 독성은 낮다. 멜라민만 섭취 시 독성은 이뇨작용만 있을 뿐 신장독성은 나타나지 않았다[8-9]. 시아누르산도 급성독성, 아만성독성, 만성독성시험에서는 신장독성 또는 세관에 결정이 생기는 증상은 나타나지 않았다[10-11]. World Health Organization (WHO), International Agency FOR Research on Cancer (IARC)에서는 동물에서는 일정 조건하에서 암을 일으키는 충분한 증거가 있으나, 사람에서는 증거가 부족하여 Group 3으로 분류하였다(IARC, 1999). 멜라민을 섭취하였을 때 동물에서 대사되지 않고 빠르게 소변으로 배설되어 90% 이상이 24시간 내에 배설된다. 반감기는 2.7-4.04시간이며 일반적으로 독성물질에 대한 상대평가는 반수치사량(Lethal dose 50)으로 설명한다. 쥐에서의 반수치사량(LD50)은 3.161 g/kg이며 10-100 g/일 또는 사료 무게의 3% (30,000 ppm)정도 대량으로 투여하면 멜라민 결정 뇨, 신증후군, 출혈성 방광염, 신부전이 발생하여 7-31일 내에 대부분 사망한다[12].

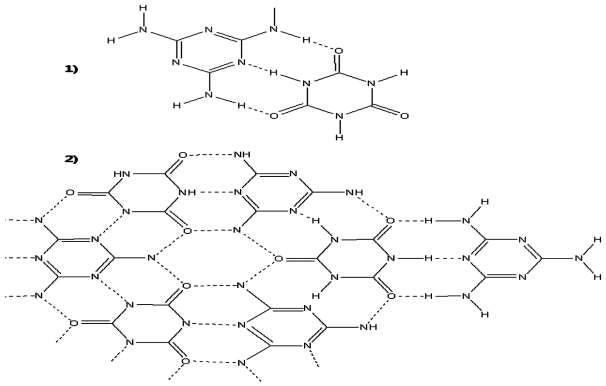


Fig. 2. Schematic of the hysrogen bonding that occurs between melamine and cyanuric acid (Whiteside et al., 1991).

시아누르산의 독성

OECD(1999)가 보고한 시아누르산의 LD50는 경구섭취 7,700 mg/kg이었다. 일부 아만성 독성 시험에서는 결정형성에 의한 신장손상이 보고되었다. 사람에서는 경구섭취시 98% 이상이 24시간 이내에 소변으로 배설된다. 시아누르산 나트륨을 이용한 동물실험에서 유전독성, 발암성, 기형원성을 나타내지는 않았다.

복합노출 독성

멜라민과 시아누르산 각각은 급성 독성이 낮다고 하지만, 2007년 미국 애완동물 사건에서 보았듯이 함께 섭취했을 경우 신장독성을 유발할 수 있다. 두 물질이 결합한 시아누르산 멜라민은 물에 잘 녹지 않기 때문에 이것이 신장에서 시아누르산 멜라민 결정 형성을 유발하는 것으로 추정하고 있다. 시아누르산 멜라민 결정 형성의 구조는 다음 Fig. 2와 같다.

멜라민 화합물의 안전성 평가

멜라민의 세계적인 일일허용기준을 보면, 미국 식품의약국 (Food and Drug Administration, FDA)에서는 잠정적으로 하루 섭취 허용량 (Tolerable daily intake, TDI)을 멜라민에 대하여 0.63 mg/kg bw per day으로 하였고, 유럽 식품안전청 (Europe Food Safety Authority)는 멜라민의 하루 섭취 허용량을 0.5 mg/kg bw per day로, 캐나다 보건부 (Health Canada)에서는 0.35 mg/kg bw per day, 뉴질랜드

Table 1. Tolerable daily intake (TDI) of melamine and cyanuric acid in various conturies

국가	기관	TDI	Reference
미국	USFDA	0.63 mg/kg bw per day for melamine	USFDA, 2007
유럽식품안전국	EFSA	0.5 mg/kg bw per day for melamine	EFSA, 2008b
캐나다	Health Canada	0.35 mg/kg bw per day for melamine	Health Canada, 2008b
뉴질랜드	NZFSA	0.5 mg/kg bw per day for melamine 1.5 mg/kg bw per day for cyanuric acid	NZFSA, 2008c
세계보건기구	WHO	0.2 mg/kg bw per day	

식품안전청 (New Zealand Food Safety Authority, NZFSA)는 멜라민에 대해 0.5 mg/kg bw per day, 시아누르산에 대하여 1.5 mg/kg bw per day으로 제시하였다. 우리나라의 경우 농약(싸이로마진)의 분해산물이나 멜라민 용기·표장 등에 의해 식품 중에 비의도적 오염물질로 존재할 수 있는 멜라민을 고려하여 유통 혼란 등을 방지하기 위해 식품일반에 대한 공통기준 및 규격으로 2.5 mg/kg 이하로 하되, 영·유아나 환자에게 절대적인 영양소 공급원이 되는 특수용도식품의 기준은 불검출로 하는 식품 중 멜라민 시험법을 신설하였다(Table 1).

실험방법

분석대상물질 및 시약

멜라민, 시아누르산과 내부표준물질(internal standard, $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-melamine, $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-cyanuric acid)은 CIL (Cambridge Isotope lab.)에서 구입하였으며 그 구조는 아래 Fig. 3과 같다. 멜라민과 시아누르산의 농도는 각각 100 ug/mL이고 순도는 각각 98% 이상이었다. 표준품은 희석법으로 단계적으로 묽혀서 사용하였으며 이때 사용한 용매는 50% acetonitrile이었다. 추출과정 및 LC/MS/MS 분석에는 사용된 용매는 acetonitrile, methanol, formic acid (Aldrich, > 99.0%)

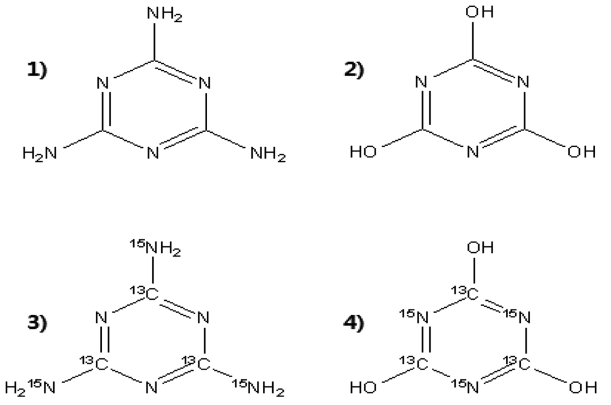


Fig. 3. Chemical structure of melamine, cyanuric acid and ISTD.

으로서 HPLC용 특급시약으로 각각 Sigma 및 Merck사에서 구입하여 사용하였다. LC/MS 이동상인 acetonitrile과 3차 증류수는 각각 pore size 0.45 um의 Millipore사제 membrane filter로 여과한 후 20분간 탈기시켰다. N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) ± 1%trimethylchlorosilane (TMCS)은 Sigma사제로서 유도체 시약으로 사용하였다. 일반 고체상 추출법(solid phase extraction, SPE) column은 Oasis사의 MAX Cartridge, 1 cc/30 mg(30 μm, particle size), MCX Cartridge, 1 cc/30 mg(30 μm, particle size)을 사용하였고 각각의 칼럼은 충분한 conditioning, activation, elution, washing의 단계를 거쳤다. Serdolite PAD-I resin (100-200 um)은 독일 Serva사제로서, 아세톤 및 메탄올로 씻은 후 증류수로 침강시키는 방법으로 활성화시켜 사용하였다.

멜라민의 working solution은 10 ng/ml, 25 ng/ml, 35 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 250 ng/ml의 농도가 되도록 50% acetonitrile로 제조하였다. 각각의 표준품을 200 uL씩 취하여 시료 중 각각 0.2 ng/ml, 0.5 ng/ml, 0.7 ng/ml, 0.8 ng/ml, 1.0 ng/ml, 2.0 ng/ml, 3.0 ng/ml, 5.0 ng/ml의 농도 범위가 되도록 하였다. 시아누르산의 working solution은 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 1.0 ug/ml, 1.5 ug/ml, 3.0 ug/ml의 농도가 되도록 50% acetonitrile로 제조하였다. 각각의 표준품을 200 uL씩 취하여 시료 중 각각 1.0 ng/ml, 2.0 ng/ml, 4.0 ng/ml, 8.0 ng/ml, 10.0 ng/ml, 20.0 ng/ml, 30.0 ng/ml, 60.0 ng/ml의 농도 범위가 되도록 하였다. 내부표준품 $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-melamine은 1.0 ng/mL, $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-cyanuric acid은 10.0 ng/ml이 되도록 하였다(Table 2).

측정기기 및 실험기구

본 연구에서는 뇨 및 혈청 중 멜라민, 시아누르산의 정성 및 정량분석을 위하여 Agilent사의 1200 series 액체 크로마토그래피에 Applied Biosystems (MDS Sciex, Concord, ON, Canada) 사의 API 5500 질량검출기가 직접 연결된 LC/MS를 사용하였으며, LC/MS방식은 LC/MS-ESI positive mode, negative mode를 적용하였다. 이때 data는 analyst software

Table 2. Preparation of working solution and quality control sample

	Working solution 의 농도	Stock solution 의 농도	spiked volume	Working solution 의 농도	Stock solution 의 농도	spiked volume
C1	0.2 ng/mL	10 ng/mL	200 uL	1.0 ng/mL	50 ng/mL	200 uL
C2	0.5 ng/mL	25 ng/mL	200 uL	2.0 ng/mL	100 ng/mL	200 uL
C3	0.7 ng/mL	35 ng/mL	200 uL	4.0 ng/mL	200 ng/mL	200 uL
C4	0.8 ng/mL	40 ng/mL	200 uL	8.0 ng/mL	400 ng/mL	200 uL
C5	1.0 ng/mL	50 ng/mL	200 uL	10.0 ng/mL	500 ng/mL	200 uL
C6	2.0 ng/mL	100 ng/mL	200 uL	20.0 ng/mL	1.0 ug/mL	200 uL
C7	3.0 ng/mL	150 ng/mL	200 uL	30.0 ng/mL	1.5 ug/mL	200 uL
C8	5.0 ng/mL	250 ng/mL	200 uL	60.0 ng/mL	3.0 ug/mL	200 uL

Table 3. A process of melamine and cyanuric acid quality control sample (serum andurine)

STD conc.	Spiked volume	Sample volume	Actual melamine Conc. in sample
10 ng/mL	200 uL	10 mL	0.2 ng/mL
25 ng/mL	200 uL	10 mL	0.5 ng/mL
35 ng/mL	200 uL	10 mL	0.7 ng/mL
40 ng/mL	200 uL	10 mL	0.8 ng/mL
50 ng/mL	200 uL	10 mL	1.0 ng/mL
100 ng/mL	200 uL	10 mL	2.0 ng/mL
150 ng/mL	200 uL	10 mL	3.0 ng/mL
250 ng/mL	200 uL	10 mL	5.0 ng/mL
STD conc.	Spiked volume	Sample volume	Actual cyanuric acid Conc. in sample
100 ng/mL	200 uL	10 mL	2.0 ng/mL
200 ng/mL	200 uL	10 mL	4.0 ng/mL
400 ng/mL	200 uL	10 mL	8.0 ng/mL
500 ng/mL	200 uL	10 mL	10.0 ng/mL
1.0 ug/mL	200 uL	10 mL	20.0 ng/mL
1.5 ug/mL	200 uL	10 mL	30.0 ng/mL
3.0 ug/mL	200 uL	10 mL	60.0 ng/mL

Table 4. Conditioning test of Liquid liquid extraction (LLE)

액체상 추출법 (Liquid liquid extraction) 의 setting 조건 시험	
Set 1	Solvent : 5 mL n-Hexane, pentane pH adjust : acetic acid, 0.1N NaOH Shaking : 20 min Evaporation : N_2 Evaporation (40°C, 20 min) Reconstitution : 50% acetonitrile
Set 2	Solvent : 5 mL Ethyl acetate pH adjust : acetic acid, 0.1N NaOH Shaking : 20 min Evaporation : N_2 Evaporation (40°C, 20 min) Reconstitution : 50% acetonitrile
Set 3	Solvent : 5 mL methyl-tert-butyl ether pH adjust : acetic acid, 0.1N NaOH Shaking : 20 min Evaporation : N_2 Evaporation (40°C, 20 min) Reconstitution : 50% acetonitrile

(1.4.1 version, Applied Biosystems/MDS Sciex)를 이용하여 처리하였다. 시료 자동주입기 (HP 7683 Autosampler) 및 Hewlett Packard사의 6890N 기체 크로마토그래피에 5975 질량선택검출기를 직접 연결한 GC/MSD를 사용하였다. Software Revision 3.1.1.인 Chemstation (HP 59970C)을 프로그램으로 사용하였고, 원심분리기는 Tomy(Japan)사의 High Speed Micro Centrifuge (Model MX-300)와 Technospin® centrifuge (Sorvall® Instruments; Du Pont, Wilmington, DE)를 사용하였으며, 시료혼합을 위해서는 IKA-Werke (GmbH

Table 5. Conditioning test of solid phase extraction (SPE)

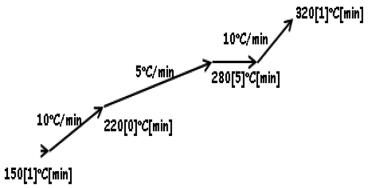
고체상 추출법 (SPE) 의 setting 조건 시험	
Set 1 (cation exchange)	washing : 5 mL MeOH, 5 mL D.W loading sample washing : 5 mL 0.1N HCl, 2 mL MeOH elution : 5% NH_4OH in MeOH
Set 2 (cation exchange)	washing : 5 mL ACN, 5 mL 4% formic acid in D.W. loading sample washing : 5 mL ACN elution : 0.2% diethylamine in ACN
Set 3 (anion exchange)	washing : 5 mL ACN, 5 mL 5% ammonium hydroxide in D.W. loading sample washing : 5 mL ACN elution : 4% formic acid in ACN
Set 4 (HLB)	washing : 5 mL MeOH, 5 mL D.W. loading sample washing : 5% meOH in D.W. elution : 5.0 mL meOH
Set 4 (XAD)	washing : 1 mL D.W loading sample elution : 2 mL meOH

and. Co., Stauffen, Germany)사의 shaker (IKA Labortechnik HS250)를, 시료 농축을 위해서는 nitrogen evaporator (TurboVap LV. Evaporator, Zymark)를, 유도체화 반응을 위해서는 Eyela(Tokyo, Japan)사의 dry thermo bath MG-2100를 사용하였다. HPLC에서 사용한 이동상은 각각 20 mM ammonium formate가 포함된 distilled water와 95% acetonitrile이었으며 기울기 용리법을 사용하여 짜여진 프로그램으로 분석물질과 방해물질을 분리하였고 이때의 유속은 0.30 ml/min이었다. 이동상의 용매조성은 Table 6과 같다. 시료주입은 Agilent사의 1200 high performance autosampler SL을 써서 10 μl를 주입하였고 column은 HILIC (normal phase column I.D. 2.0 mm, length 150 mm, particle size 5-micron; SHISEIDO, tokyo, Japan)을 사용하였고 컬럼 온도는 35°C를 유지하였다 (Table 7).

멜라민, 시아누르산의 LC/MS를 이용한 분석에서는 이온화 소스는 ESI (electrospray ionization)의 positive mode와 negative mode를 사용하여 분석물질을 이온화 하였다. 전체 질량범위를 *m/z* 100~500으로 하여 분자량을 확인하였고 tandem mass방법 (MS/MS)을 이용하여 fragment ion pattern을 확인함으로써 정성분석을 실시하였다. 정량분석은 정확성과 재현성이 개선된 방법인 multiple reaction monitoring (MRM) mode를 사용하였다. Table 6과 같이 모분자 이온과 모분자가 깨진 daughter ion의 감도를 최상으로 유지할 수 있는 방법으로 질량분석기 조건을 설정하였다.

질량분석기의 parameter는 분석의 감도를 최상으로 유지하기 위하여 curtain gas 20 Mpsi, GS1 50 Mpsi, GS2 50 Mpsi, detector temperature 500°C를 이용하였으며 Ion souce는 electrospray ionization (ESI) positive, negative 방식을

Table 6. Instrument and sample preparation conditions

<table>
<tr><th>분석물질</th><th>시료</th><th>전처리법</th><th>장비</th><th></th></tr>
<tr><td>melamine
cyanuric acid</td><td>뇨 , 혈액</td><td>단백질침전법</td><td>LC/MS/MS</td><td>
LC : column : HILIC column
A- 20 mM ammonium formate 95% ACN
B- 20 mM ammonium formate D.W.
<table>
<tr><th>Time</th><th>Flow (μl/min)</th><th>Eluent A (%)</th><th>Eluent B (%)</th></tr>
<tr><td>Initial</td><td>300</td><td>100.0</td><td>0.0</td></tr>
<tr><td>5.0</td><td>300</td><td>100.0</td><td>0.0</td></tr>
<tr><td>7.5</td><td>300</td><td>20.0</td><td>80.0</td></tr>
<tr><td>8.0</td><td>300</td><td>20.0</td><td>80.0</td></tr>
<tr><td>8.2</td><td>300</td><td>100.0</td><td>0.0</td></tr>
<tr><td>30.0</td><td>300</td><td>100.0</td><td>0.0</td></tr>
</table>
MS :
<table>
<tr><th>Compound</th><th>Q1 Mass</th><th>Q3 Mass</th></tr>
<tr><td>Melamine</td><td>127.2</td><td>85.2
68.2
43.1</td></tr>
<tr><td>$^{13}C_3$, $^{15}N_3$-melamine</td><td>133.1</td><td>89.2
55.1
45.2</td></tr>
<tr><td>Cyanuric acid</td><td>128.1</td><td>80.1
42.1</td></tr>
<tr><td>$^{13}C_3$, $^{15}N_3$-cyanuric acid</td><td>133.9</td><td>89.1
44.1</td></tr>
</table>
</td></tr>
<tr><td>melamine
cyanuric acid</td><td>뇨 , 혈액</td><td>액체상추출법</td><td>GC/MS</td><td>
Extraction solvent : Ethyl acetate
pH adjust(acidic, basic)
GC
Column : DB-5, length 30 m, I.D. 0.25 mm, film thickness 0.25 uL
Flow rate : 1.0 mL/ min (carrier gas: He)
Injection parameter : Mode split 1/5
Injection temperature : 280°C
Injection volume : 2 uL
Oven temperature program :


MS
Interface temp. : 280°C
Source temp. : 180°C
Ionization mode : EI
Ions monitored : m/z 345, 330, 351, 336, 342, 327, 348, 333
Dwell time : 50
Multiplier voltage : autotune value + 200 eV
Acquisition mode : SIM
</td></tr>
</table>

polar switching으로 이용하였으며 Ion source energy는 4500V를 유지하였다. 질량분석기의 분석조건은 Table 6과 같다. GC/MS 분석을 위해서는 시료를 추출 후 질소 농축하여 진공으로 수분을 완전히 제거 한 후 이에 유도체화 한후 GC/MS 분석하였다. He을 carrier gas로 사용하여 flow rate를 1.0 mL/min로 유지하였다. Injection을 split mode(1:5)에서 2 μl를 주입하였고 injection port의 온도를 280°C 하였다. Interface의 온도는 280°C를 유지하고 EI mode로 이온화하였으며 ion multiplier는 200 eV로 설정하여 Software Revision 3.1.1.인 Chemstation (HP 59970C)을 프로그램을 이용하여 integration 하였다(Table 6).

Table 7. Calibration data of melamine and cyanuric acid using LC/MS

	Analyte	Regression line			Calibration range (ng/mL)	Retention time (min)
		Slope, *a*	Intercept, *b*	r^2		
Urine	Melamine	1.223	0.005	0.9990	0.2 ~ 5.0	9.83
	Cyanuric acid	0.083	0.262	0.9990	2.0 ~ 60.0	2.88
Serum	Melamine	1.353	−0.115	0.9990	0.2 ~ 5.0	9.83
	Cyanuric acid	0.085	0.056	0.9990	2.0 ~ 60.0	2.88

분석시료

성인 남자 5명 이상의 뇨를 수집하여 합한 뒤 내인성 물질들의 농도를 감소시키기 위하여 증류수로 1:1로 묽힌 후 4°C에서 12시간 동안 혼합하여 0.2 uL filter paper로 여과하여 모든 실험에 사용하였다[26]. 혈청은 PAA사의 Human serum converted를 구입하여 사용하였다.

Quality control 시료제조

0.2 uL filter paper로 여과한 뇨를 이용하였고 멜라민의 검량선 농도범위는 0.2 ng/mL에서 5.0 ng/mL으로 각각의 농도는 0.2 ng/mL, 0.5 ng/mL, 0.7 ng/mL, 0.8 ng/mL, 1.0 ng/mL, 2.0 ng/mL, 3.0 ng/mL, 5.0 ng/mL이다. 시아누르산의 검량선 농도 범위는 2.0 ng/mL에서 60.0 ng/mL으로 각각의 농도는 2.0 ng/mL, 4.0 ng/mL, 8.0 ng/mL, 10.0 ng/mL, 20.0 ng/mL, 30.0 ng/mL, 60.0 ng/mL이다. 각각 Quality control 시료는 다음의 Table 3과 같이 표준품을 spiking 하는 방법으로 제조하였다.

전처리의 비교분석

액체상 추출법(Liquid liquid extraction)을 이용한 전처리

Acetic acid, 0.1N NaOH를 이용하여 pH 5로 조절한 뒤 n-hexane, pentane, ethyl acetate, methyl-tert-butyl ether를 5 mL 가한 다음 shaker를 사용하여 20분간 진탕하여 추출하였다. 이 혼합 용액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하고 수용액층을 freezer를 이용하여 얼린 후 상층액을 다른 시험관에 옮겨 담은 후 질소 가스로 완전히 증발시켜 건조한 추출물을 얻었다(Table 4).

고체상 추출법(Solid phase extraction) 비교분석

원심분리한 시료에 내부표준물질을 첨가한 후 고체상 추출을 하였다. 이때 XAD column, 양이온 교환반응, 음이온 교환반응 등 여러 카트리지를 이용하여 컨디션, 활성화, 시료주입, 세척, 용리 등을 수행하였다. SPE의 종류에 따른 수율 확인을 위한 예비조사의 결과 XAD컬럼 및 HLB 컬럼보다 이온교환 카트리지를 사용한 결과에서 방해물질이 제거되고 바탕선이 안정하게 됨을 확인하였다. OASIS MCX column은 멜라민에 대하여, OASIS MAX column은 시아누르산에 대하여 선택성이 뛰어난 것으로 확인되었다. 고체상 추출을 위한 카트리지는 MCX, MAX를 이용하였으며, 예비조사결과 MCX는 0.1N HCl, MeOH로 세척할 경우 방해물질이 제거되어 분석대상물질의 specificity가 증가함을 확인하였다. 용리용액은 5% NH_4OH in MeOH을 이용하여 용리하였을 때 가장 높은 수율을 얻을 수 있었다(Table 5).

단백질 침전(Deproteinization)법을 이용한 분석

단백질을 침강시키는 방법은 산처리, 열, 용매처리 등 다양한 방법이 있다. 본 연구에서는 비교적 전처리가 간단하고 시험자간의 오차가 가장 적은 용매처리법을 선택하였다. 멜라민 및 시아누르산은 초자 및 실험 전처리에서 추가적인 오염이 발생하므로 실험단계를 최소화하면서 방해물질을 제거할 수 있는 과정을 거쳤다. 뇨 및 혈액 0.5 mL를 glass tube에 담고, acetinitrile 1.0 mL를 첨가하여 30초 동안 vortex로 혼합한다. 3000 rpm에서 10분동안 원심분리시킨 후 상등액을 취하여 LC/MS/MS로 분석하였다.

실험결과

생체시료 중 멜라민 및 시아누르산의 전처리법

고체상추출법(solid phase extraction)은 세척 및 용리시키는 과정에서 시약 및 카트리지 등에 함유되어있는 melamine이 용출되어 negative control 시료를 얻을 수 없었다.

LC/MS/MS분석에서는 실험과정을 최소화하며 바탕시료의 불순물을 제거하는 방법으로 단백질침전법을 사용하였다. GC/MS분석 시 유도체화 과정이 필수적이며 이때 수분을 제거해야하므로 단백질침전법을 적용하는데 제한이 있었다. 따라서 액체추출법(Liquid liquid extraction)에서 추출효율이 가장 좋은 ethyl acetate를 산, 염기 순으로 pH를 조정하여 2회 추출한 후 TMS 유도체화를 거쳐 GC/MS로 분석하였다.

LC/MS를 이용한 멜라민 및 시아누르산의 정성분석

멜라민 및 시아누르산의 정성분석을 위하여 고농도의 표준품으로 분자량을 확인 한 후 tandem mass의 full spectrum에서 딸이온 중 가장 높은 감도를 나타내는 이온을 정량이온으로 선택하였다. 본 실험에서 얻어진 Fig. 4-7의 멜라민 및 시아누르산의 mass spectrum은 참고문헌과 비교 시

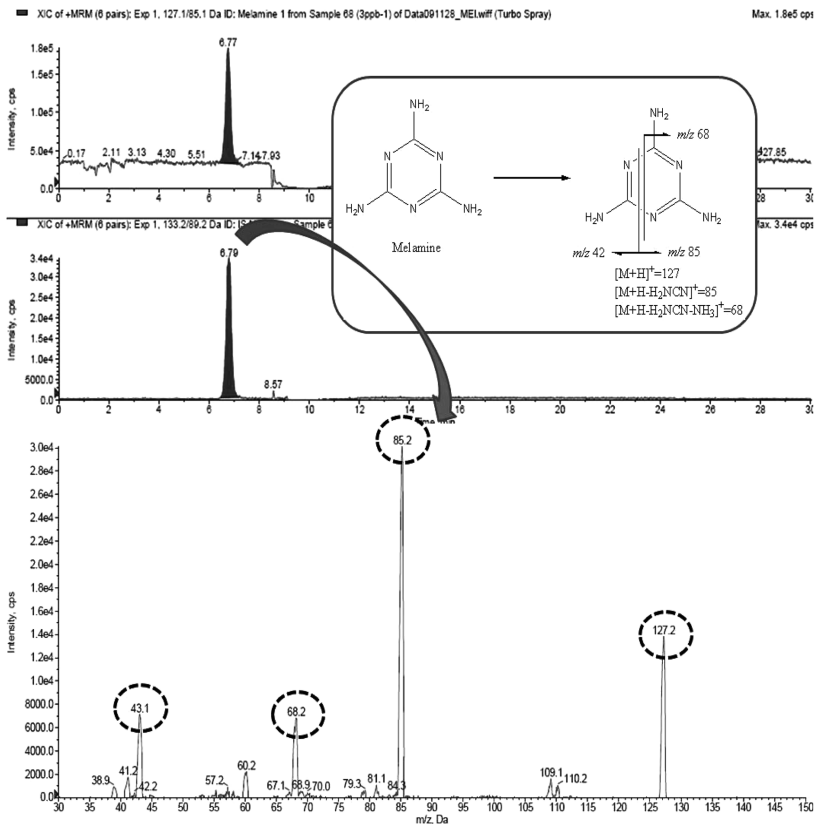


Fig. 4. Fragmentation pattern and MS2 spectrum of melamine.

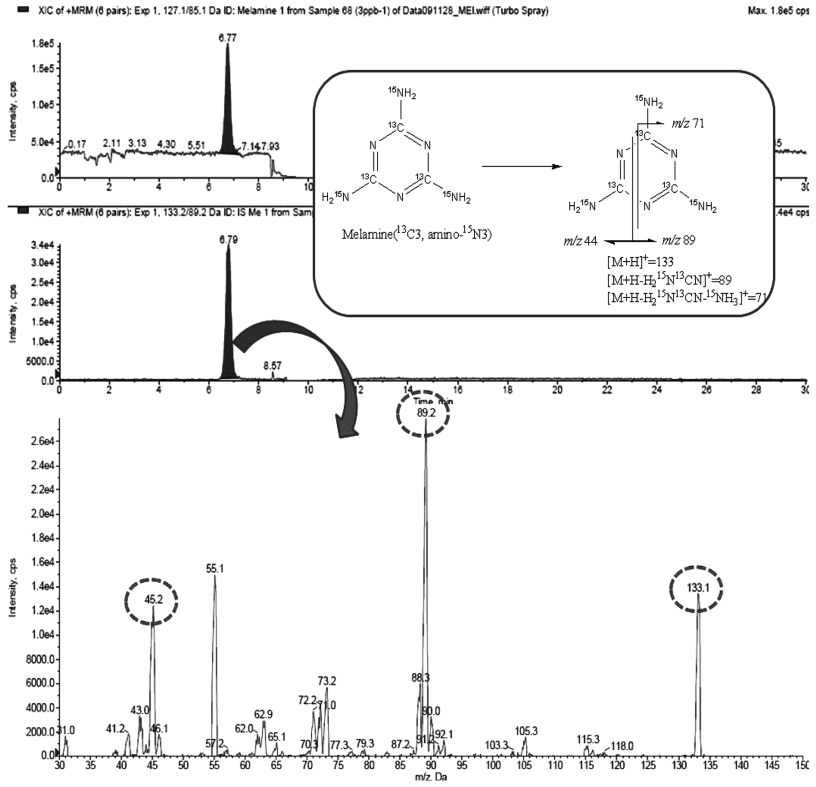


Fig. 5. Fragmentation pattern and MS^2 spectrum of $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-melamine (IS) (J. Agric. Food. Chem., 2008; 56: 7593-7599).

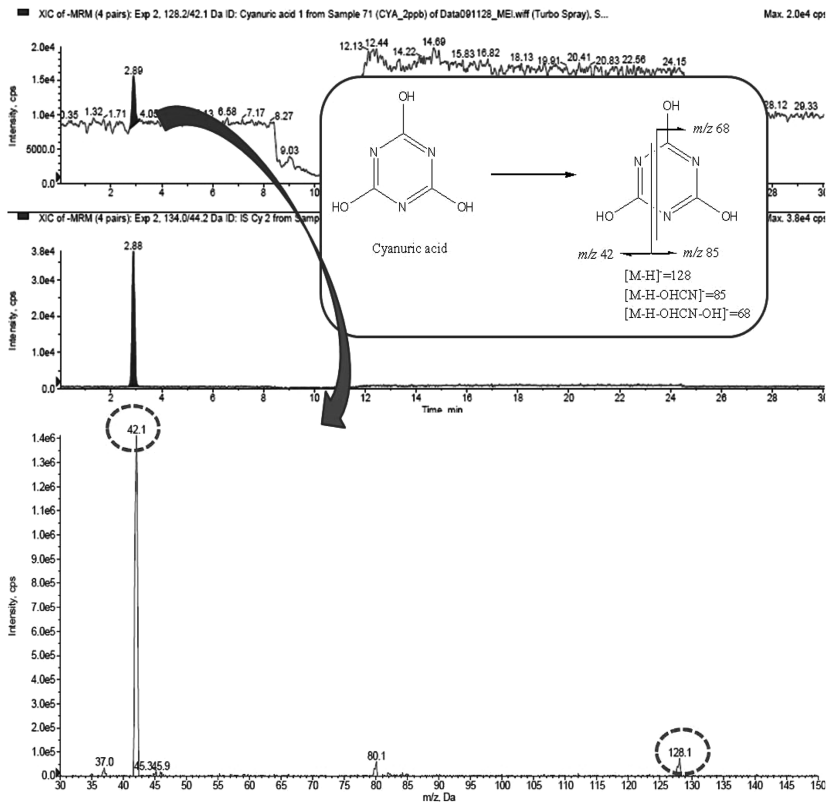


Fig. 6. Fragmentation pattern and MS^2 spectrum of cyanuric acid (J. Agric. Food. Chem., 2008; 56: 7593-7599).

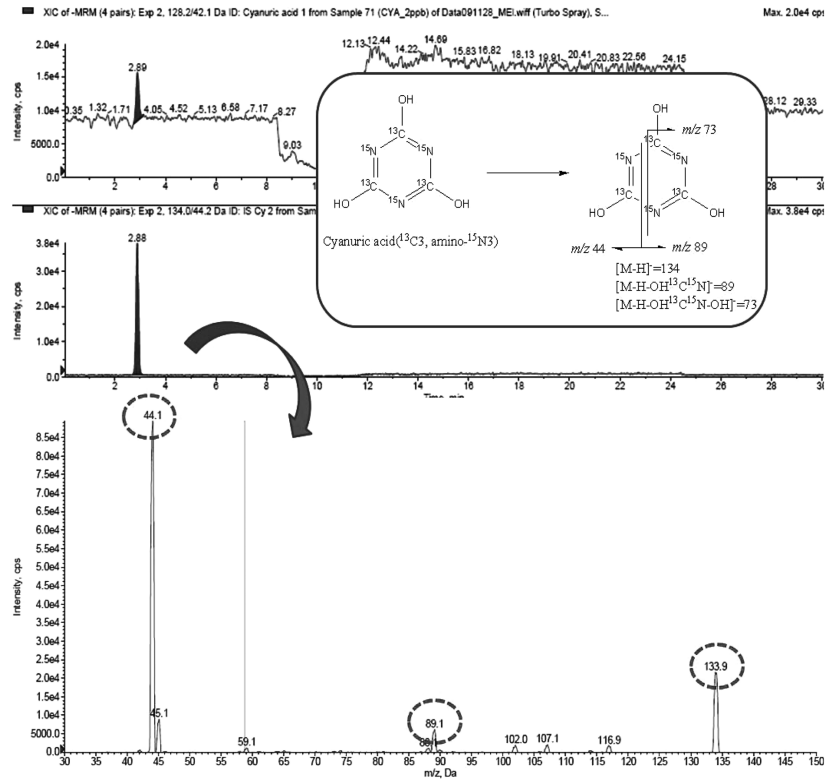


Fig. 7. Fragmentation pattern and MS^2 spectrum of $^{13}C_3$, $^{15}N_3$- cyanuric acid (IS) (J. Agric. Food. Chem., 2008; 56: 7593-7599).

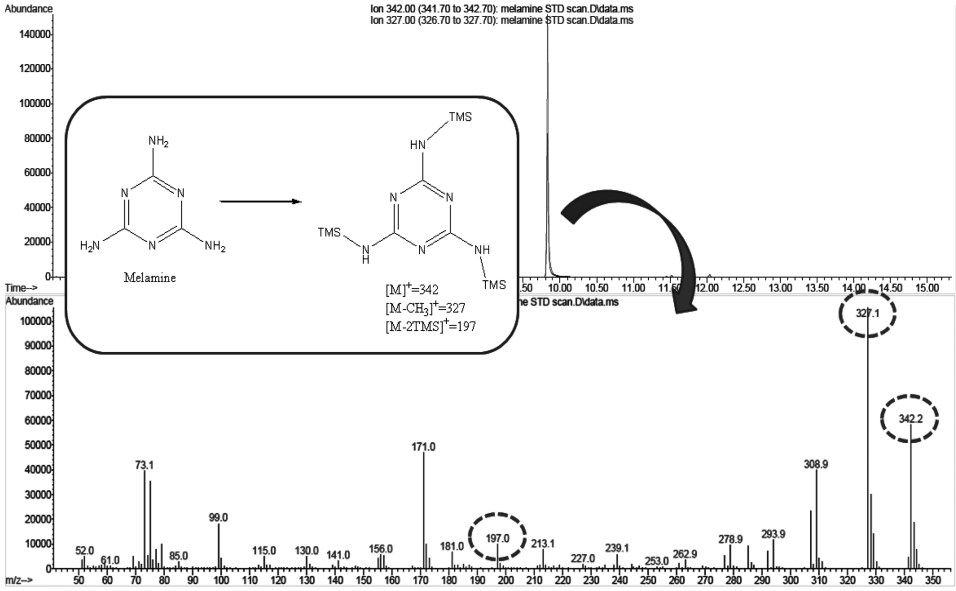


Fig. 8. Mass spectrum of TMS derivatizated melamine using GC/MS.

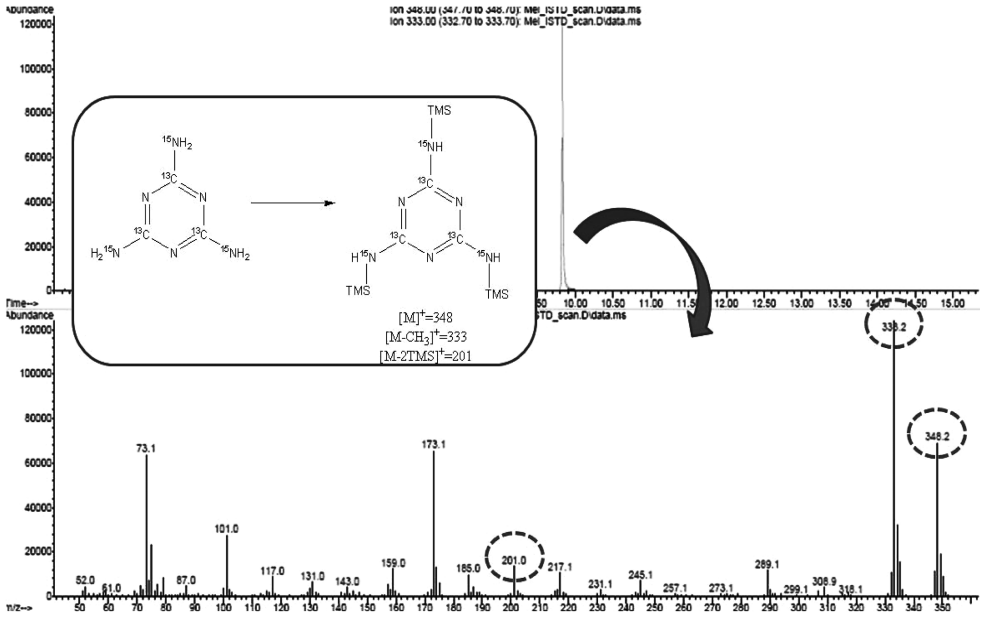


Fig. 9. Mass spectrum of TMS derivatizated $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-melamine (IS) using GC/MS.

fragment ion과 fragment pattern이 일치함을 확인하였다. 멜라민은 $[M+H]^+$ 이온을 모분자로 하고 $m/z = 127.2$을 갖는다. MRM (multiple reaction monitoring) 분석은 멜라민의 딸이온 중 가장 높은 감도를 나타내고 생체시료의 방해물질과 구분되는 $m/z = 85.2$으로 $[M+H-H_2NCN]^+$, $m/z = [M+H-H_2NCN-NH_3]^+$ 68.2, 43.1이온을 선택하였다[26]. 내부표준품은 $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-melamine, $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-cyanuric acid으로서 $[M+H]^+$ 이온을 모분자로 하고 $m/z = 133.1$을 갖으며 이때 정량이온은 $m/z = 89.2$이온으로 하였다.

GC/MS를 이용한 멜라민 및 시아누르산의 정성분석

분석물질의 휘발성을 증가시켜 감도를 개선하기 위한 방법으로 TMS (trimethylsilane)유도체화를 하였다. 멜라민 및 시아누르산 유도체화한 표준품의 GC/MS spectrum은 Fig. 8-11과 같다. 멜라민은 tri-TMS 유도체로서 $m/z = 342.2$ 이온이 molecular ion으로 검출되었고 $m/z = 327.1$이온은 $[M^+ - CH_3]$로서 메틸기가 떨어진 것, $m/z = 197.0$은 $[M^+ - 2TMS]$으로 특징적인 토막이온으로 검출되었다. 정량분석에 있어서 SIM (Selected ion monitoring) mode에서는 m/z 342.2,

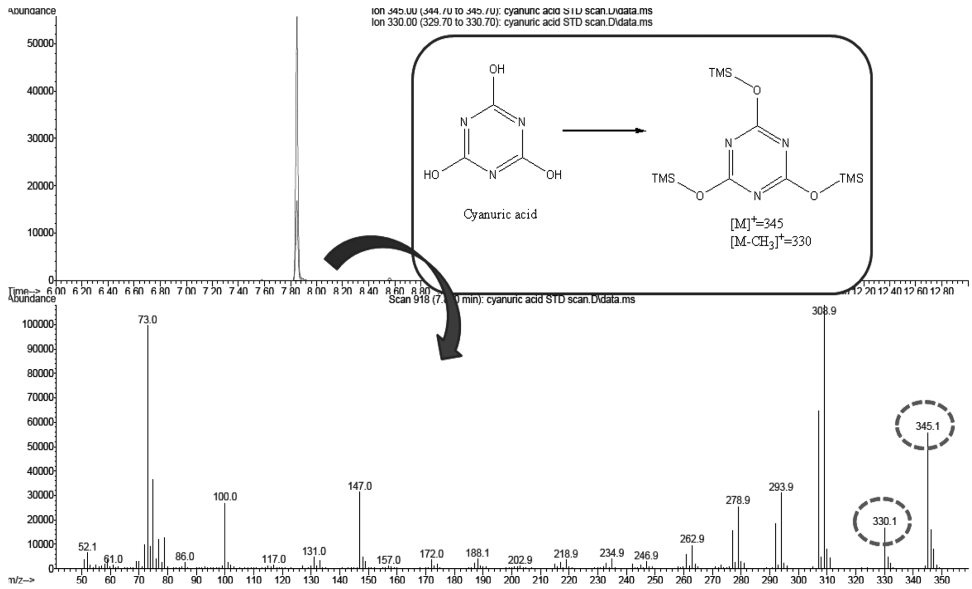


Fig. 10. Mass spectrum of TMS derivatizated melamine using GC/MS.

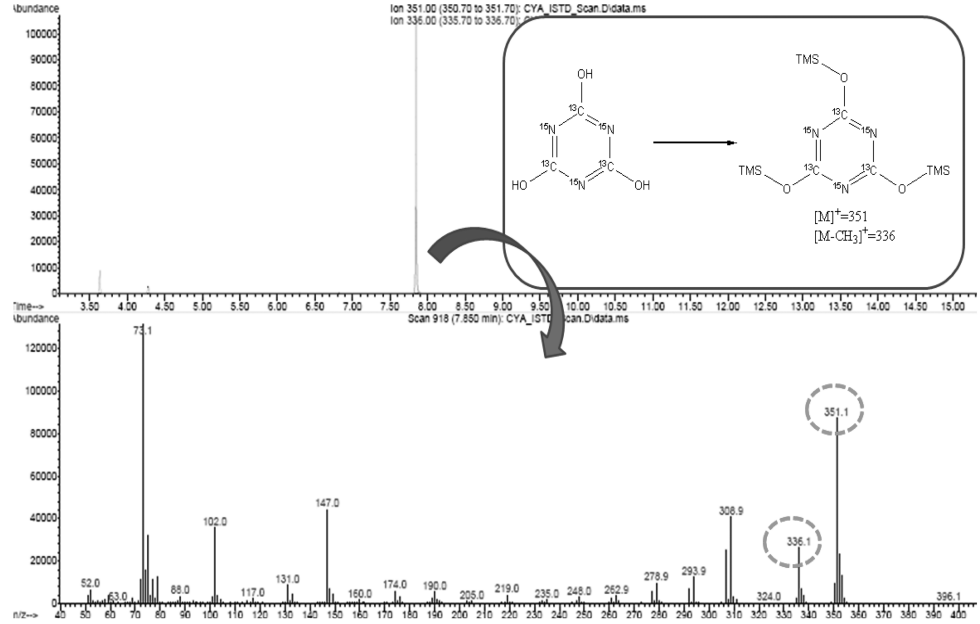


Fig. 11. Mass spectrum of TMS derivatizated melamine using GC/MS.

m/z 327.1, *m/z* 197.0 이온을 선택하였다.

분석방법의 신뢰성 검증의 평가결과

분석방법의 신뢰성 검증을 위한 방법은 미국 FDA(2001)에서 제공하는 guideline (Bioanalytical method validation)을 참고로 하여 부분적인 validation을 수행하였다. 이때 사용한 quality control sample은 blank human serum과 human urine으로서, low quality control (0.5 ng/mL, 0.7 ng/mL melamine, cyanuric acid), middle quality control (0.8 ng/mL, 1.0 ng/mL melamine, cyanuric acid), high quality control (2.0 ng/mL, 3.0 ng/mL melamine, cyanuric acid) 시료는 표준품을 각각 첨가하는 방법으로 제조하였다. 선택성은 확립된 분석법을 적용하여 전처리한 시료에서 다른 조성을 가진 물질과 분석하고자 하는 물질을 구별하고 정량할 수 있는 능력으로, 정량한계 수준의 농도인 0.2 ng/mL 멜라민, 2.0 ng/mL cyanuric acid에서 방해물질이 없음을 확인하여 평가하였다. 정확도는 각각의 측정값 평균이 참값(농도)에 근접하는 능력으로 정확도를 측정하기 위하여 선택한 농도는 low qual-

Table 8. Calibration data of melamine and cyanuric acid using GC/MS

	Analyte	Regression line			Calibration range (ng/mL)	Retention time (min)
		Slope, *a*	Intercept, *b*	r^2		
Urine	Melamine	0.017	0.255	0.9990	5.0 ~ 100.0	9.85
	Cyanuric acid	0.019	0.324	0.9990	5.0 ~ 100.0	7.85
Serum	Melamine	0.059	−0.010	0.9980	5.0 ~ 100.0	9.85
	Cyanuric acid	0.018	0.027	0.998	5.0 ~ 100.0	7.85

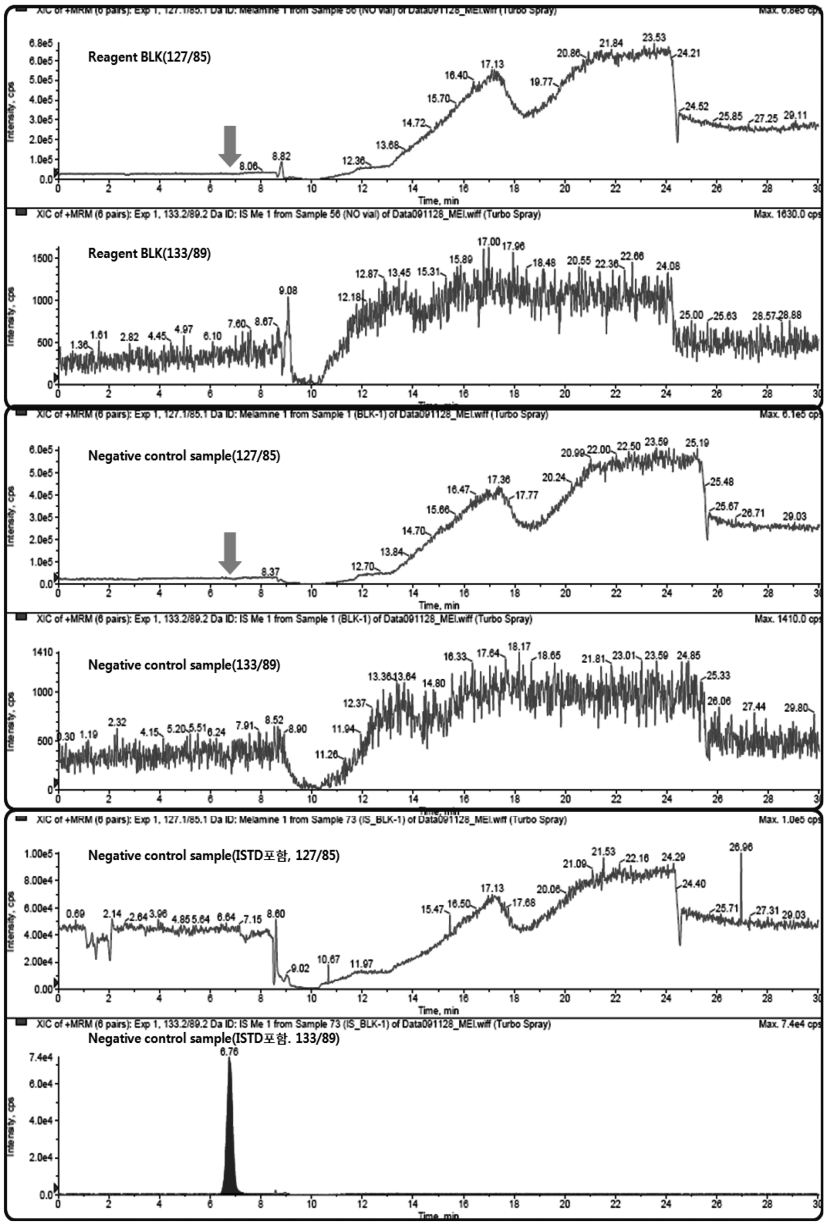


Fig. 12. Extracted chromatogram of reagent blank, negative control urine and negative control urine (spiked ISTD).

ity control (0.5 ng, 0.7 ng/mL melamine, cyanuric acid), middle quality control (0.8 ng/mL, 1.0ng/mL melamine, cyanuric acid), high quality control (2.0 ng/mL, 3.0 ng/mL melamine, cyanuric acid)으로 정량된 결과가 참값에 근접하는 정도를 통계적 기준에 결과가 포함하는 여부로 평가하였다. 정밀도는 분석을 반복 수행하였을 때 개개 측정값의 근접한 정도로서 정밀도를 측정하기 위하여 선택한 농도는 low quality control, middle quality control, high quality control 으로 각 농도 당 5회 반복실험을 하였을 때 통계적 기준에 결과가 포함하는 여부로 평가하였다. 회수율은 100%를 요구하지 않

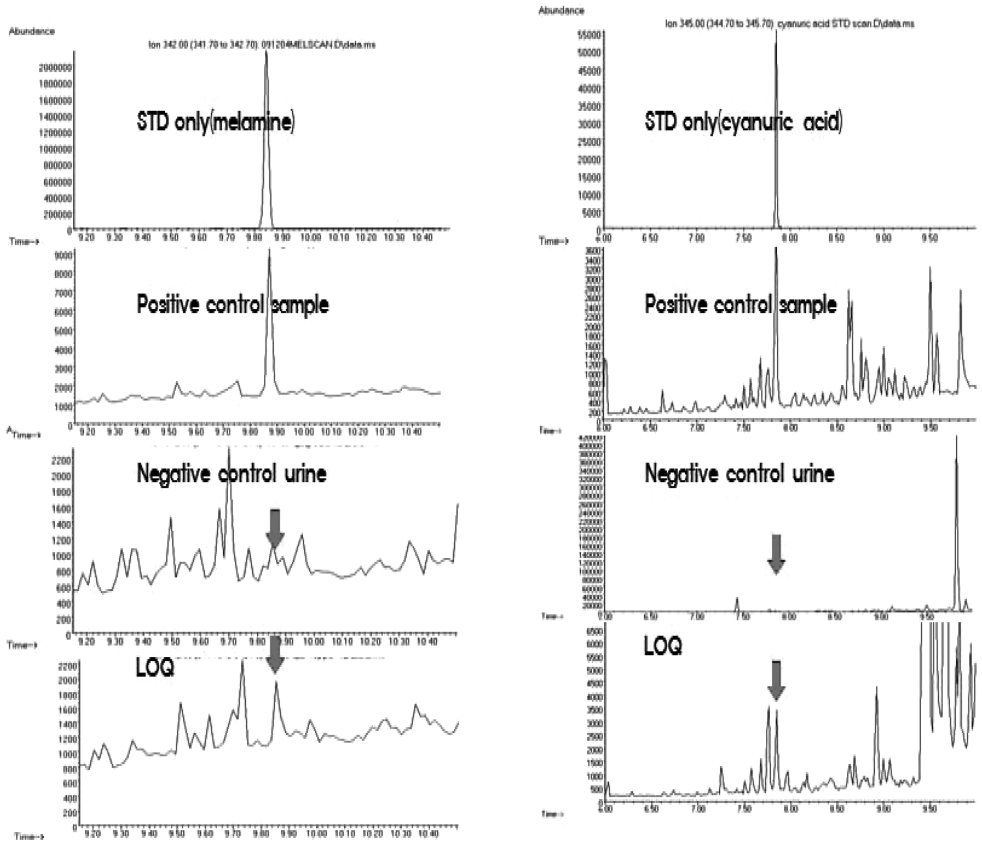


Fig. 13. Extracted chromatogram of melamine and cyanuric acid at LOQ level of STD only, positive control sample, negative control urine (spiked ISTD).

지만 그 값은 분석하는 농도 범위 내에 일관되고 정밀하며 재현성 있다는 조건으로 바탕시료에서 분석물질을 추출한 검출기 반응과 표준품의 검출기 반응을 100%로 하여 비교함으로서 회수율을 평가하였다. 검량선은 분석물질의 농도와 반응과의 상관성을 충분히 설명가능한가의 여부로서 동일한 공시료에 농도를 알고 있는 표준품을 첨가하여 작성하였다. 검량선을 위한 시료는 표준품이 첨가되는 양을 모두 동일하게 하였다. 정량한계는 주어진 신뢰수준에서, 즉 정확성과 정밀도 범위에서 정량할 수 있는 가장 낮은 농도로서 통계적 기준에 결과가 포함하는 여부로 평가하였다.

선택성

선택성은 시료에서 다른 조성을 가진 물질과 분석하고자 하는 물질을 구별하고 정량할 수 있는 능력으로 Fig. 12는 재건축하는 용매인 50% ACN, negative control urine, negative control urine(공시료에 $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-melamine만 첨가된 시료)을 LC/MS/MS로 분석한 extracted ion chromatogram이다. 내부 표준품에서 유도되는 피크가 없고 분석하고자 하는 머무름 시간에서 방해물질이 없음을 확인하였다.

Fig. 14는 cyanuric acid의 MRM transition에서 용매인 50% ACN, negative control urine, negative control urine(공시료에 $^{13}C_3$, $^{15}N_3$-cyanuric acid만 첨가된 시료)을 LC/MS로 분석한 extracted ion chromatogram이다. 내부표준품에서 유도되는 피크가 없고 분석하고자 하는 머무름 시간에서 방해물질이 없음을 확인하였다.

Fig. 13은 GC/MS로 분석한 멜라민 및 시아누르산의 표준품, positive control sample, negative control sample, LOQ 수준에서의 extracted ion chromatogram이다.

정확도 및 정밀도

Table 9는 LC/MS/MS를 이용한 멜라민 및 시아누르산의 정확도 평가 결과이다. 멜라민은 농도 수준(저, 중, 고농도)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 평균 82.2%~ 129.7.%의 수준으로 참값에 근접하는 정도가 양호하였다. 시아누르산은 농도 수준(저, 중, 고농도)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 평균 88.9%~114.6%의 수준으로 참값에 근접하였고, 정밀도 평가 결과 멜라민은 농도 수준(저, 중, 고농도)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 Coefficient of Variation(CV)은 3.7%~13.5%의 분산정도로서 측정값의 근접하였다. 시아누르산은 농도 수준(저, 중, 고농도)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 Coefficient of Variation(CV)은 3.3%~5.9%의 분산정도로서 측정값의 근접하였다.

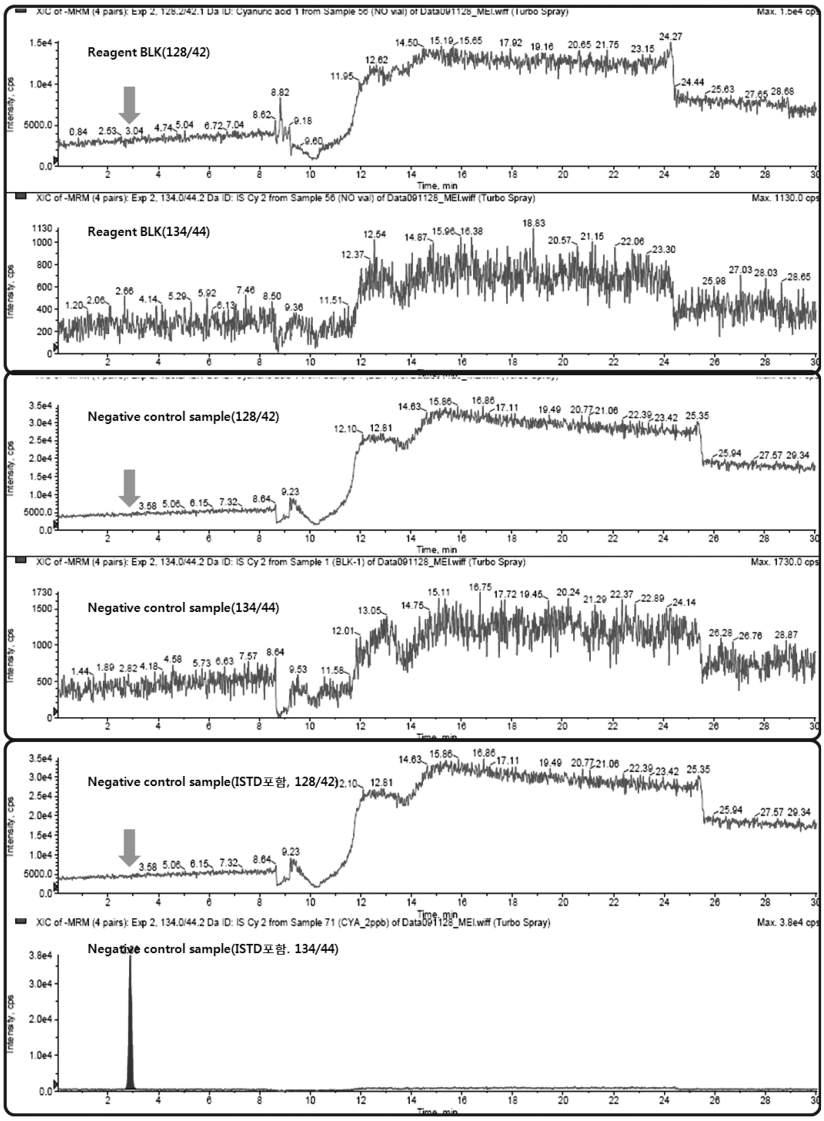


Fig. 14. Extracted chromatogram of reagent blank, negative control urine and negative control urine (spiked ISTD).

Table 9. Precision data of melamine and cyanuric acid at LOQ using LC/MS

구 분	LOQ(melmaine)		LOQ(cyanuric acid)	
	Serum 0.2 ng/mL	Urine 0.2 ng/mL	Serum 2.0 ng/mL	Urine 2.0 ng/mL
농도	0.23	0.18	1.91	1.75
	0.26	0.19	2.15	1.58
	0.24	0.17	2.17	2.03
	0.25	0.18	1.99	2.08
	0.18	0.19	2.12	1.77
평균	0.23	0.18	0.11	1.84
CV, %	13.4	4.3	5.47	11.3

Table 10. Precision data of melamine and cyanuric acid at LOQ using GC/MS

구 분	LOQ(melamine)		LOQ(cyanuric acid)	
	Serum 5.0 ng/mL	Urine 5.0 ng/mL	Serum 5.0 ng/mL	Urine 5.0 ng/mL
농도	4.23	5.23	5.03	4.74
	4.84	4.93	4.84	4.49
	4.26	5.08	5.43	5.57
	4.65	5.42	4.57	4.93
	5.85	5.23	4.76	4.41
평균	4.77	5.18	4.93	4.83
CV, %	13.8	3.5	6.6	9.5

Table 10은 GC/MS를 이용한 멜라민 및 시아누르산의 정확도 평가 결과이다. 멜라민은 농도 수준(저, 중, 고농도)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 평균 83.7%~ 108.3.%의 수준으로 참값에 근접하는 정도가 양호하였다. 시아누

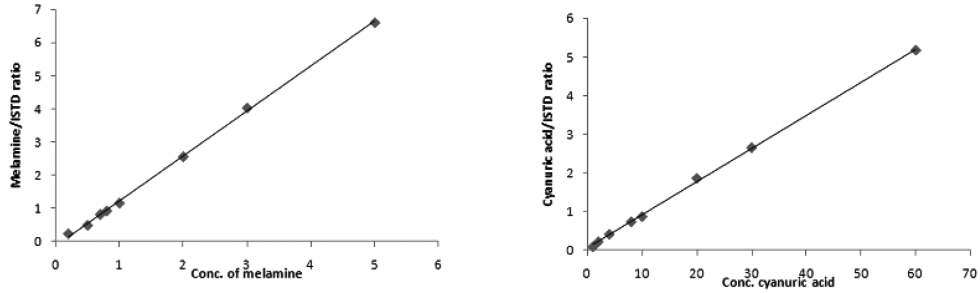


Fig. 15. Calibration curve for quantification of melamine on LC/MS/MS.

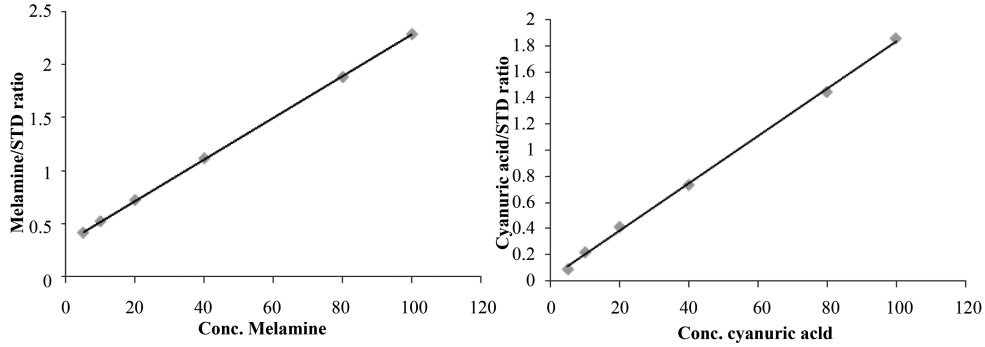


Fig. 16. Calibration curve for quantification of cyanuric acid on GC/MS.

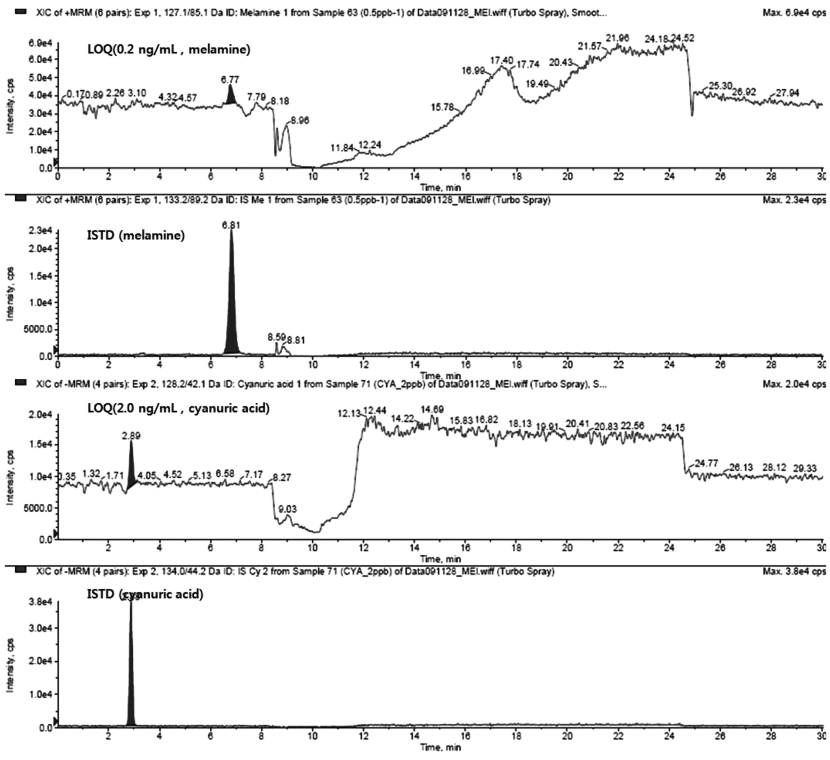


Fig. 17. EIC of melamine and cyanuric acid at LOQ level.

르산은 농도 수준(저, 중, 고농도)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 평균 91.1%~114.5%의 수준으로 참값에 근접하는 정도가 양호하였다. 정밀도 평가 결과 멜라민은 농도 수준(저, 중, 고농도)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 Coefficient of Variation(CV)은 3.5%~13.8%의 분산정도로서 측정값의 근접함이 양호함을 확인하였다. 시아누르산은 농

도 수준(저, 중, 고농도)에서 각각 5회 반복하여 실시한 결과 Coefficient of Variation(CV)은 3.9%~9.5%의 분산정도로서 측정값의 근접함이 양호함을 확인하였다.

검량선

멜라민의 검량선은 0.2 ng/mL ~ 5 ng/mL의 농도범위가 되도록 제조한 quality control sample을 이용하여 작성되었다. 검량선의 Y축은 멜라민과 내부표준물질의 면적 비율을 적용하였고 X축은 멜라민의 농도를 적용하였다. Table 7-8과 Fig. 15-16에서 보이는 바와 같이 멜라민의 검량선은 $y = 1.3530x - 0.115$, 시아누르산은 $y = 0.085x + 0.056$으로 나타났다. r^2은 0.999이상을 유지하는 것으로 나타났다.

정량한계

혈액시료의 정량한계는 signal to noise 비율이 10이상 되며 CV 20%의 허용범위이내인 농도로 멜라민은 0.2 ng/mL, 시아누르산은 2.0 ng/mL으로 결과를 확인하였다.

고찰 및 결론

멜라민 및 시아누르산에 대한 식품 중 분석관련 문헌은 보고되고 있으나 생체시료 중 분석법은 미비한 실정이다. 보고된 분석법을 검토한 결과 특정 식품유형에 국한되어 있고 검출한계가 높았다. 멜라민에 대한 다수 식품군의 섭취나 음용수 및 생활환경으로부터의 복합노출을 반영하기 위해서는 인체모니터링이 필요하나, 인체시료를 분석하기 위한 연구방법의 개발은 미미한 실정이다. 이러한 문제점을 개선하고 멜라민 및 시아누르산의 분석에 공통으로 적용될 수 있는 정성 및 정량 법을 확립하고자 하였다. 생체시료 중에 함유된 멜라민 및 시아누르산을 분석하기 위해 먼저 전처리방법, 정성 및 정량 방법을 문헌검색 등을 통해 확립하였다. 전처리에서는 생체시료 중에 함유된 멜라민 및 시아누르산을 분리할 때 다른 불순물이 섞여 나오지 않도록 액체추출법, 음이온, 양이온 교환법, 단백질 침전법을 적용하여 시료 유래 불순물을 제거하여 비교분석하였다. 모니터링의 연구에서 노출 지표 요건으로는 민감성을 가져 검출하기 용이하여 궁극적으로 false positive가 없어야한다. 또한 노출을 반영하는 지표는 물질자체의 특이성, 재현성 및 오랜 기간 노출에 대한 정보를 지녀야 하며 정량적인 측정이 가능하고 침윤되지 않으며 분석비용에 있어서 저렴하고 수행하기 쉬운 물질이어야 한다. 멜라민은 섭취한 대부분이 parent 형태로 배설되며 시아누르산의 복합노출시 인체위해영향이 나타날 우려가 있으므로 멜라민의 노출량을 산출하기 위한 지표로 멜라민 및 시아누르산이 고려되어야 한다. 인체시료 중의 미량 분석을 위해서는 일상 노출수준을 분석하기 위한 분석법의 민감성이 요구되므로 전처리단계 및 기기분석에서 최신 연구기법을 도입하여 분석감도를 향상시킬 필요가 있다. 이를 위해 기기분석법의 접근에서 고감도 장비인 LC/MS/MS를 이용하여 정성분석을 실시하고 tandem mass 방법으로 재현성과 감도가 뛰어난 정량분석법을 적용하였다. 생체시료 중 멜라민과 같은 미량분석에서 실험실 내 오염 등으로 결과가 왜곡되는 것을 방지하여야한다. 분자량이 작아 바탕시료로부터 동일한 분자량을 갖는 물질들에 대한 false positive를 막고 특이성을 개선하기 위하여 멜라민 및 시아누르산의 TMS 유도체화를 통해 GC/MS를 이용하여 정성 및 정량분석을 실시하였다. 확립된 분석방법으로 직선성, 정확성, 정밀성, 특이성 등의 벨리데이션을 수행하여 허용 오차범위 내의 결과를 확인함으로써 신뢰성을 확보하였다. 생체시료 중 멜라민과 시아누르산의 검출한계는 각각 0.2 ng/mL, 2.0 ng/mL으로 정밀성이 CV 20%의 허용오차 이내로 나타나 FDA의 생체시료 분석의 기준치를 만족시키는 정량한계 값으로 나타났다. 최저정량한계 이상의 3가지 농도에서 정확성 정밀성이 15%이내를 만족하였다.

본 연구결과를 토대로 생체시료 중 멜라민의 노출에 대한 지표인 멜라민 및 시아누르산을 모니터링하는 분석방법이 체계화 되었다. 이를 통해 인체모니터링 및 인체노출평가에 활용 가능한 기초자료를 생산하여 유해물질 안전관리정책에 기여하고자하였다. 멜라민은 미량 또는 시아누르산과 복합노출시 건강위해영향을 일으킬 우려가 있으므로 본 연구와 연계성을 갖는 인체모니터링 연구가 필요하다고 사료된다.

요 약

본 연구에서는 비료나 수지의 원료물질로 알려진 멜라민이 최근 수입식품 및 가공식품 등에서 검출되어 국제적으로 문제가 되어 생체시료 중 멜라민의 분석법을 확립하고 벨리데이션을 실시하여 신뢰성을 확보하고자 하였다. 생체시료(뇨 및 혈액) 중 멜라민 및 시아누르산 분석을 위해 단백질 침전법, 액체상 추출법으로 불순물을 제거하였고 LC/MS를 이용한 멜라민 최적분석법의 벨리데이션 결과에서 검출한계는 0.2 ng/mL(멜라민), 2.0 ng/mL(시아누르산)이었으며 각 정량범위내의 직선성은 0.9990이상을 가졌다. 뇨 및 혈 중 멜라민의 quality control 시료는 0.5 ng/mL, 0.8 ng/mL, 2.0 ng/mL, 3.0 ng/mL으로서 뇨 중 멜라민 및 시아누르산의 정확성은 91.6%-107.6%범위를 나타내었고 정밀성은 2.0%-11.8%으로 나타났다. 혈 중 멜라민 및 시아누르산의 정확성은 94.9%-119.0%범위를 나타내었고 정밀성은 3.7%-13.5%으로 나타났다. 또한, GC/MS를 이용한 멜라민 분석의 검출한계는 5.0 ng/mL(멜라민), 5.0 ng/mL(시아누르산)이었고, 뇨 및 혈중 멜라민의 quality control 시료는 10.0~40.0 ng/mL이었으며, 뇨 및 혈 중 멜라민 및 시아누르산의 정확성은 83.7%~110.7% 범위를 나타내었고, 정밀성은 3.5%-

13.8% 으로 나타났다.

참고문헌

1. Steven Reinberg : FDA Recalls Animal Feed Tainted With Melamine From U.S. Supplier. HealthDay Reporter.
2. Anderson F.A. : Final report on the safety assessment of melamine/formaldehyde resin. *J.AmCollToxicol.* **14**(5), 373-385 (1995).
3. Weil, E.D. and Choudhary, V. : Flame-retarding plastics and Elastomers with Melamine. *J. Fire Sci.* **13**(2), 104-126 (1995).
4. Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., Karbiwnyk, C. M., Clark, S. B., Madson, M. R., Gieseker, C. M., Miller, R. A., Rummel, N. G. and Reimschuessel R. : Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Agric Food Chem.* **56**(12), 4340-4347 (2008).
5. Canadian Food Inspection Agency : Determination of melamine and cyanuric acid using liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS), Version 1.0. Canadian Food Inspection Agency (2008).
6. Dobson, R.L., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R.T., Baker, T.R., Pullen, A.M., Regg, B.T., Bigalow-Kern, A.S., Vennard, T., Fix, A., Reimschuessel, R., Overmann, G., Shan, Y. and Daston, G.P. : Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicol Sci*. **106**(1), 251-262 (2008).
7. Turnipseed, S. : Determination of melamine and cyanuric acid residues in infant formula using LCMS/MS. Silver Spring, MD, United States Department of Health and Human Services, Center for Food Safety and Nutrition, pp. 1-13. (Laboratory Information Bulletin **No. 4421**) (2008).
8. Report on cyromazine of the European Medicines Agency EMEA/MRL/770/00- FINAL (2001).
9. Melnick, R. L., Boorman, G. A., Haseman, J. K., Montali, R. J. and Huff J. : Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol.* **72**(2), 292-303 (1984).
10. Ogasawara, H., Imaida, K., Ishiwata, H., Toyoda, K., Kawanishi, T., Uneyama, C., Hayashi. S., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats. correlation between carcinogenicity and urolith formation *Carcinogenesis*. **16**(11), 2773-2777 (1995).
11. Jeong, W. I., Do, S. H., Jeong, da H., Chung, J. Y., Yang, H. J., Yuan, D. W., Hong, I. H., Park, J. K., Goo, M. J. and Jeong, K. S.: Canine renal failure syndrome in three dogs. *J. Vet Sci.* **7**(3), 299-301 (2006).
12. Esteban, E. : LC/MS/MS screen for the presence of melamine in swine and poultry tissues. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service Western Laboratory, Food Emergency Response Network, p. 1-15 (FERN-CHE.0003.00) (2007).
13. Muniz-Valencia, R., Ceballos-Magana, S. G., Rosales-Martinez, D., Gonzalo-Lumbreras, R., Santos-Montes, A., Cubedo-Fernandez-Trapiella, A., and Izquierdo-Hornillos, R. C. : Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Anal Bioanal Chem*. **392**(3), 523-531 (2008).
14. Chou, S.S., Hwang, D.F. and Lee, H.F. : High performance liquid chromatographic determination of cyromazine and its derivative melamine in poultry meats and eggs. *J.Food Drug Anal.* **11**(4), 290-295 (2003).
15. Epstein R.L., Randecker, V., Corrao, P., Keeton, J.T. and Russell Cross, H. : Influence of heat and cure preservatives on residues of sulfamethazine, chloramphenicol, and cyromazine in muscle tissue. *J. Agric Food Chem.* **36**, 1009-1012 (1988).
16. Litzau J., Mercer G., and Mulligan K. : GC-MS screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid. Version 2.1. Rockville, MD, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, pp. 1-13 (2007).
17. Veyrand B et al: Identification et dosage de la mélamine et de ses produits de dégradation dans les aliments par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrometrie de mass en tandem. Nantes. Laboratoire d'Etude des Ridus et Contaminants dans les Aliments, pp. 1-15 (Mhode LABERCA/08MELAl. 7) (2008).
18. Filigenzi, M. S., Puschner, B., Aston, L. S. and Poppenga, R. H.: Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Agric Food Chem*. **56**(17), 7593-7599 (2008).
19. Litzau J. J., Mercer G. E. and Mulligan K. J.: GC-MS screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide, and cyanuric acid. Rockville, MD, United States Department of Health and Human Services. Food and Drug administration, Center for Veterinary Medicine (Laboratory Information Bulletin **No. 4423**) (2008).
20. National Health and Nutrition Examination survey 2003-2004 SAS Transport file: SSMEL_C.XPT.
21. Garber E. A.: Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology *J. Food Prot*. **71(3)**, 590-594 (2008).
22. F. Yang, Y. Mao, X. Zhang and Z. Ma.: LC-MS/MS method for the determination of melamine in rat plasma. toxicokinetic study in Sprague-Dawley rats *J Sep Sci* **32(17)**, 2974-2978 (2009).