Journal of Food Hygiene and Safety 9(1), 1-13(1994)

Gas Chromatography/Mass Spectrometry에 의한 우육 중의 잔류 Zeranol, Zearalenone 및 그 대사산물들의 동시 분석법에 대한 연구

이은섭 · 이용욱

서울대학교 보건대학원 환경보건학과

A Study on the Simultaneous Determination of Residual Zeranol, Zearalenone and Their Metabolites in Beef by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Eune-Sub Lee and Yong-Wook Lee

Department of Environmental Health

Graduate School of Public Health, Seoul National University

ABSTRACT-A simultaneous determination method was improved for the determination and confirmation of zeranol, zearalenone, as well as their isomers and metabolites, in beef. The analytes were extracted from tissue by CH_3CN, hydrolyzed enzymatically(for glucuronide conjugates), cleaned up by a strong basic anion exchange resin combined with a liquid/liquid partitioning, derivatized using MSTFA and confirmed, quantified by GC/MS/SIM with a internal standard, zearalane. The results were as follows : (1) All the estrogens were separated on the GC/MS chromatogram under the extraction method and the chromatographic conditions improved, the retention times of zearalane-TMS_2, zearalanone-TMS_2, zearalenone-TMS_2, zeranol-TMS_3, taleranol-TMS_3, and α-zearalenol-TMS_3, β-zearalenol-TMS_3, were 18.49, 19.44, 19.63, 19.71, 19.79 and 19.99, 20.08 minutes, respectively. (2) The calibration curves of residual zeranol, zearalenone and their metabolites showed constantly linear($r=0.99$) in the range of 5~20 ng. The minimum detection concentration of residual zeranol, zearalenone and their metabolites was 1 ppb. (3) The total average recovery of residual zeranol, zearalenone and their metabolites from spiked beef was 60.2%(CV=29.7%) at the 1 ppb and 63.5%(CV=26.5%) at the 2 ppb, 72.9%(CV=18.2%) at the 4 ppb. (4) The preservation method for analysis of 6 estrogens was more simplified than Jose's preservation method and GC/MS/SIM method for 6 estrogens was improved for the fast running time(21 min) and MSTFA was utilized for derivatizing 6 estrogens for improvement of recovery, for good resolution, for characteristic mass spectra unlike Jose's method and Tina's method. The utilization of zearalane as internal standard showed good quantification result for zeranol, zearalenone, as well as their isomers and metabolites, in beef.

Keyword □ Beef, GC/MS/SIM, residual zeranol, zearalenone and their metabolites, MSTFA, internal standard

Zeranol(상품명 : Ralgro)은 성장촉진과 사료효율 개선을 위해 한국, 미국, 캐나다 그리고 일부 유럽 국가 등에서 소 및 면양 등에 상업적으로 널리 쓰이고 있는 non-steroid anabolic estrogen으로서 곰팡이 독소인 zearalenone의 환원물이다.[1)]

Zeranol의 건강상 위해는 zearalenone과 마찬가지로 중독시 주로 zeranol의 에스트로겐과 비슷한 약리작용에 의해 일어나며 게다가 만성적으로 섭취하게

Received for publication January 31, 1994.

Reprint request: Dr. Y.W. Lee. at the above address.

되면 체내의 정상적인 호르몬 분비에 장애를 일으킬 수 있다고 하였다.[2]

Zeranol은 간에서 대사되어 주로 담즙으로 배설되는데 zeranol의 대사산물의 잔류는 간에서는 taleranol >zeranol>zearalnone 순으로 신장에서는 taleranol> zeranol 순으로 많고 근육에서는 zeranol>zearaleenone 순으로 많이 잔류한다고 하였다.[3] Rat에서 zeranol의 LD_{50}은 40 g/kg고 taleranol이나 zearalenone 등은 LD_{50}이 10 g/kg이라고 하였다.[4]

FAO/WHO(Food and Agriculture Organization/-World Health Organization, 1987)에서 zeranol에 대한 일일섭취허용량 ADI(Acceptable Daily Intake)을 0.5 μg/kg으로 그리고 최대잔류허용한계를 근육에서는 1.4 μg/kg, 간에서는 10 μg/kg으로 할 것을 제안하였다.[5] 유럽지역에서는 zeranol의 사용을 인정하지 않고 있으며 따라서 잔류도 허용되지 않으며[6] 미국의 경우는 zeranol과 taleranol 등의 잔류량을 합쳐 우육의 경우는 0.15 ppm, 간에서는 0.3 ppm으로[7,8] 호주의 경우는 우육에서 0.02 ppm으로 최대잔류허용한계를 설정해 놓고 있다.[9] 한국에서는 우육에서 zeranol의 경우 2 ppb로 규제하고 있다.[10]

그런데 zeranol이 투약되고 있는 동물들이 Fusarium속 곰팡이에 의해 생산된 F-2 toxin으로 오염된 곡물을 먹게 될 경우 zeranol과 zearalenone이 동시에 섭취되게 되고 따라서 이러한 동물들에게 생산된 식육의 경우 zearalenone 및 zeranol과 그 대사산물들이 같이 잔류할 가능성이 있기 때문에 zeranol 및 zearalenone과 이들의 대사산물들 모두(6종)에 대해 동시에 分離, 定性 및 定量하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 그러나 우육중에 잔류하는 이들 6종의 동시분석에 대한 보고문헌은 그렇게 많지 않은 실정이고 대사산물과 이성체들과 동시에 분석하는 것보다는 zeranol의 경우 DES(Diethylstilbestrol)이나 17β-estradiol 등의 다른 anabolic steroid 등과의 동시분석에, zearalenone의 경우 식육이 아닌 곡물이나 사료에서의 parent drug의 분석에 대해서 관심이 주어졌다. 한편 우육이라는 생체시료내에는 free drug 이외에 glucuronide conjugate 형태로도 존재하고 있는 일부의 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들도 추출해내기 위해 산이나 효소에 의한 가수분해가 필요하고, 육류처럼 조성이 복잡한 생체시료의 경우 다량의 간섭물질들로 인해 분석에 방해가 될 수 있다. 또한 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들처럼 極微量으로 잔류하고 있는 물질들을 동시에 분석하기 위해서는 敏感度 및 特異性이 중요하므로 HPLC(High Performance Liquid Chromatography), TLC(Thin Layer Chromatography), RIA(Radio Immunoassay, EIA(Enzyme Immunosorbent Assay), GC(Gas Chromatography))법들은 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들 6종을 동시에 분석하기에 그다지 좋은 방법들이 아니라고 판단되며 비록 GC/MS에의 시료주입을 위한 전처리에 많은 시간과 노력이 필요한 단점은 있으나 이들 각 에스트로겐별로 고유하면서 감도가 좋은 이온들만 검출하는 Selected Ion Monitoring (SIM) Capillary Gas Chromatography Mass Spectrometry(GC/MS)방법(검출감도 pg)이 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들의 檢出과 確認, 定量을 위한 적절한 敏感度와 정확한 特異性을 提供해 줄 수 있는 것으로 사료된다.[2-4]

따라서 본 연구는 이미 발표된 우육중의 잔류 에스트로겐들의 분석을 위한 추출, 정제 및 유도체화방법, GC/MS/SIM방법 등을 검토하여 그 단점을 보완하고, 보다 정확한 정량을 위해 적절한 내부표준물질을 선택한 후 우육 시료를 대상으로 실험을 실시하여 현재 세계적으로 문제가 되고 있는 성장촉진호르몬제인 zeranol과 그 이성체 및 대사산물은 물론 곰팡이 독소로서 곡물에 오염되어 우육 등의 축산물에 잔류될 우려가 높은 zearalenone 및 그 대사산물들인 모두 6종의 에스트로겐들을 동시에 정성 및 정량할 수 있는 방법으로 개선하고자 실시하였다.

材料 및 方法

시 약

Zearalane, zeranol, taleranol은 International Minerals and chemicals사로부터(Terre Haute, Indiana, U.S.A), zearalenone, α-zearalenol, β-zearalenol, zearalanone, β-glucuronidase(type H-5), MSTFA

(N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide)등은 Sigma사로부터(St. Louis, Missouri, USA) Bio-Rad AG^{r} MP-1 resin은 Bio-Rad사로부터 구입했으며 기타 시약은 일급 이상의 것을 사용하였다.

기 구

본 실험에서 사용된 기구들은 다음과 같다. Homogeniger(Polytronr PT 3000, Kinematica AG and capable of achieving>10,000 rpm), centrifuge (IEC P-7000, equipped with 20 place angle rotor, and capable of achieving G>2,500, 반경 15cm), evaporator with water bath(Model-RE 121, Buchi Laboratoriums Technik AG, Switzerland), gas chromatograph/mass spectrometer(Model 5989A, Hewlett Packard Co., U.S.A.), Reacti-Therm Ⅲ dry block heater(Pierce Chemical Co.), pH meter(Corning N 250 or equivalent) 및 extract clean empty columns(8 ml, Alltech C/N:210714)

에스트로겐들의 추출, 정제, 농축 및 유도체화[2,3,11~19]

우육 5.0±0.1 g을 재어 50 ml polypropylene centrifuge tube에 넣은 다음 각 시료들 및 contol 시료에 zearalane(0.2 ng/μl)을 내부표준물질로서 50 μl를 첨가하고 0.04 M sodium acetate buffer를 11 μl 정도 가한 후 흔들어서 1분간 균질화한 후 빙초산으로 pH를 4.25에서 4.75로 맞추고 산을 가하는 동안 저은 후 각 시료들에 물질별 및 농도별로 Table 2처럼 표준용액을 혼합 첨가한 후 흔들고 30분간 세워둔 후 37℃에서 16시간 이상 배양시켰다. 여기에 20 ml의 acetonitrile을 각 시험관에 가하고 5분 동안 빠른 속도로 흔든 후 3,000 g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 50 ml screw cap polypropylene centrifuge tube에 따른 후 2 ml의 dichloromethane, 8 ml의 n-hexane을 상층액에 가하고 1분간 흔들고 3분간 800 g에서 원심분리한 후 중간층(중간 극성 : acetonitrile layer)을 50 ml 둥근바닥 플라스크에 옮긴 후에 남아 있는 용매층(상층과 하층)에 4 ml의 acetonitrile, 1 ml 정도의 dichloromethane을 가한 후 1분간 빠른 속도로 흔든 후 3분간 800 g에서 원심분리한 후 acetonitrile layer만 앞에서 옮겼던 50 ml 둥근 바닥 플라스크에 다시 합쳤다. 다음에 합쳐진 acetonitrile layer을 60℃의 수용상에서 강압 건조시킨 후 isopropanol / methanol 용액 2 ml 정도를 가하고 잘 흔들어 녹인 후 플라스크에 남아 있는 잔류물에 1.5 ml의 2 M NaOH을 가해 알칼리화시켰다. 다음 미리 준비된 강염기성 음이온 교환수지 컬럼들(증류수에 수지 약 1 g 정도를 현탁시킨 후 원심분리하거나 vacuum manifold를 사용해 물을 제거한 후 사용하였다)을 3 ml methanol, 다음 3 ml 증류수로 활성화시킨 후 컬럼위로 강알칼리(pH 11이상)화된 추출액을 옮긴 후, 2 N NaOH 0.5 ml를 사용해서 시료가 들어있는 50 ml 둥근 바닥 플라스크를 세척하고 세척된 것을 컬럼위로 다시 옮기고 100% methanol 4 ml, 증류수 2 ml, 5% 초산액 3 ml, 25% methanol 2 ml 순으로 컬럼을 세척하고 100% methanol 3 ml로 2회 정도 카트리지 내에 흡착되어 있는 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들을 용출시켜, 15 ml 용량의 시험관에 모아 55℃의 수욕상에서 감압건조시켰다. 다음에 진공이 걸린 건조용 desiccator에서 15분 정도 놔둬 수분을 제거한 후 잔류물을 50 μl의 MSTFA로 녹이고 60℃로 유지된 히팅블록에서 20분 동안 반응시킨 후 마이크로 주사기로 2 μl을 취해 GC/MS에 주입하였다.

GC/MS에 의한 분석

본 실험에서의 GC의 조건은 다음과 같았다.[2,3,11-15] 비극성 100% methylsilicon HP-1 capillary column (id 0.2 mm, length 20 m, film thickness 0.1 μm)를 선택하였고 helium gas의 선속도는 36 cm/sec이었다. Column head pressure는 18 psi, split vent flow는 분당 5에서 6 ml로 하여 10 : 1의 split비를 주었다. stainless steel split/splitless injector는 270℃에서 유지하였고 transfer line의 온도를 290℃에서 유지하였다. GC oven의 온도프로그램을 다음과 같이 설정하였다. 즉 80℃에서 분당 12℃씩 150℃까지 상승시킨 후 분단 8℃씩 온도를 서서히 상승시켜 235℃에 이르도록 한 다음 분당 20℃씩 급격히 상승시켜 310℃에 이르게 한 후 2분간 유지시켰다.

MS의 조건은 다음과 같았다.[2,3,11-14,20] Ion source는 176℃, mass filter는 100℃로 설정하였으며 electron impact ionization mode(70 electron volt)를 사용하였고, electron multiplier의 값은 tune값보다 600정도 높게 설정하였다. SIM mode에 앞서 SCAN mode에서 정성분석을 실시하고 그 결과를 이용하여 Table 1과 같이 각 물질별로 예측되는 머무름 시간대에 각 물질별로 3에서 5개의 특성 이온들을 조사하였다.

각 이온별 조사시간은 200 msec로 하였다.

6종의 에스트로겐별 표준곡선의 작성[12,13,20]

Zeranol, taleranol, zearalanone, zearalenone 그리고 α-, β-zearalenol 등의 working solution을 1, 2 및 4 ppb의 농도로 15 ml-pyrex 시험관에 혼합 첨가한 후 50℃의 수욕상에서 감압건조시킨 후 15분정도 진공 데시케이터에서 수분을 제거하고 50 μl의 MSTFA를 가하여 녹인 후 20분간 60℃의 히팅 블록에서 유도체화시킨 후 100 μl의 시료병에 옮겨 이중 2μl를 GC/MS에 주입하여 SIM mode에서 Table 1과 같이 각 에스트로겐별로 가장 감도가 좋고 특징적인 이온들을 조사하였고 각 에스트로겐의 농도와 각 에스트로겐들의 면적과 내부표준물질인 zeranol의 화학적 유사체인 zearalane-TMS_2(m/z 435)의 면적과의 비를 서로 대비시켜 6종의 에스트로겐별로 표준곡선을 작성하였다.

Table 1. SIM(Selected Ion Monitoring) of six estrogens

Name	Specific ions	Retention time (min)
Zearalane-TMS_2	435	18.49
Taleranol-TMS_3	379, 433, 453, 523, 538	19.79
Zearalanone-TMS_2	335, 449, 464	19.44
Zearalenone-TMS_2	317, 333, 429, 447, 462	19.63
α-Zearalenol-TMS_3	305, 333, 446, 536	19.99
β-Zearalenol-TMS_3	305, 333, 446, 536	20.08

Table 2. Spiking of standard solutions

Conc. of 6 estrogens in beef(5g) (ppb)	Vol. of working solutions (0.2ng/μl) (μl)
0	0
1	25
2	50
4	100

혼합된 6종의 에스트로겐들의 회수율 측정

먼저 깨끗한 우육에서 내부표준물질로 zearalane (0.2 ng/μl)을 50 μl를 첨가한 후 6종의 에스트로겐들을 Table 2와 같이 혼합첨가한 다음 앞에서 설명한 실험방법대로 각 시료들을 추출 및 정제, 유도체화하였다.

다음 앞서 설명된대로 GC/MS/SIM mode에서 3회반복 주입하여 얻어진 각 에스트로겐의 평균 면적값들과 내부표준물질로 zearalane(0.2 ng/μl)을 50 μl 첨가하고 6종의 에스트로겐들을 우육시료와 마찬가지로 Table 2처럼 혼합첨가하여 별도의 전처리 과정없이 60℃의 수욕상에서 감압건조시킨 후 MS-TFA에 의해 유도체화시킨 동일농도의 표준품을 GC/MS에 3회 반복 주입하여 얻은 평균 면적값과 비교하여 회수율을 구하였다.

結果 및 考察

6종의 에스트로겐별 표준곡선

6종의 에스트로겐들의 1, 2 및 4 ppb 농도별로 3회 반복 주입 후 얻어진 표준곡선은 5에서 20 ng(1에서 4 ppb) 범위에서 직선을 유지하였다. 우육에서 이들의 최소검출 농도는 1 ppb였고, 6종의 에스트로겐들의 양에 대한 내부표준물질인 zearalane 면적(반응)값에 대한 각 물질별 면적(반응)값들이 비(Area=Response=Abundance Ratio)와의 상관계수가 모두 0.99 이상으로 나타났다.

혼합된 6종의 에스트로겐들의 회수율

6종의 에스트로겐들의 농도별 평균 회수율을 구하

기 위하여 깨끗한 우육 5g에 각 물질별 표준용액을 각각 1, 2 및 4 ppb의 농도로 혼합첨가한 시료를 각 농도별로 각 5회씩 앞에서와 같은 방법으로 추출, 정제 및 유도체화하여 GC/MS/SIM을 이용하여 얻어진 크로마토그램으로부터 그 회수율을 구하였던 바 Table 3과 같았다.

우육 시료에서 6종의 에스트로겐들의 각 농도별 총 평균 회수율은 1 ppb에서는 60.2%(CV=29.7%), 2 ppb에서는 63.5%(CV=26.5%), 4 ppb에서 72.9%(CV=18.2%)로 농도가 높아질수록 회수율도 높아지고 시료간 분석오차의 척도인 변이계수(CV)도 작아지는 경향을 보였다.

Zeranol은 농도별 평균 회수율이 81.3%로 가장 높았고 이는 Jose 등[2]이 HPLC/Electrochemical Detection에 의해 6종의 에스트로겐들을 동시 분석한 결과에서 우육에 5에서 10 ppb로 첨가하여 구한 zeranol의 평균 회수율 62.1% 및 Tina등[3]에 의해 개발된 GC/MS/SIM에 의한 zeranol과 그 대사산물을 분석한 결과 우육에서 zeranol의 변이계값은 6.1%이었다. Taleranol도 농도별 평균 회수율이 80.5%이었고 변이계수는 3.3%로 zeranol과 taleranol은 1에서 4 ppb 범위에서 안정되게 분석되는 것으로 보였다. Zearalanone은 농도별 평균 회수율이 67.3%. 변이계수는 27.2%로 zeranol의 대사산물 중에서는 가장 분석감도가 떨어지는 것으로 보였다. 한편 zearalenone은 농도별 평균 회수율이 43.2%로 가장 낮았고 변이계수는 12.0%로 나타났다. α-Zearalenol은 농도별 평균 회수율이 54.7%, 변이계수는 12.6%, β-zearalenol은 농도별 평균 회수율이 66.2%, 변이계수는 7.5%로 나타났다.

6종의 에스트로겐들의 정성 본석[2,3,11~15]

내부표준물질인 zearalane과 6종의 에스트로겐들 모두 피크의 겹침이 없이 서로 잘 분리되었다. 그리고 Fig 8에서 알 수 있듯이 13분대 및 15분대에서 관찰되는 우육에서 유래된 간섭물질들이 18분대 이전에 분리되어 나오도록 GC oven의 온도 및 가스의 선속도(linear velocity)를 설정하였다. 또한 21분 이내의 짧은 시간내에 이들 6종의 에스트로겐들을 동시에 분석할 수 있었다.

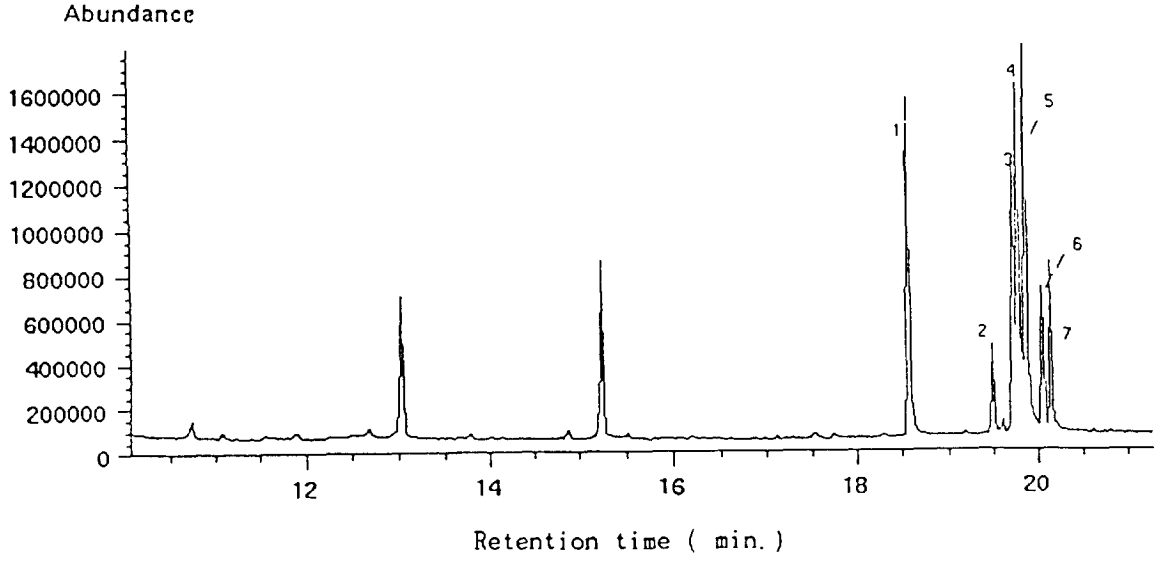
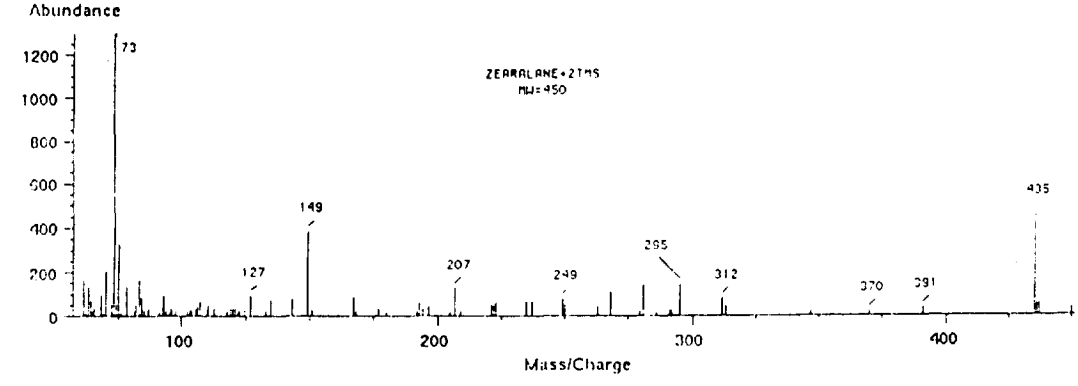
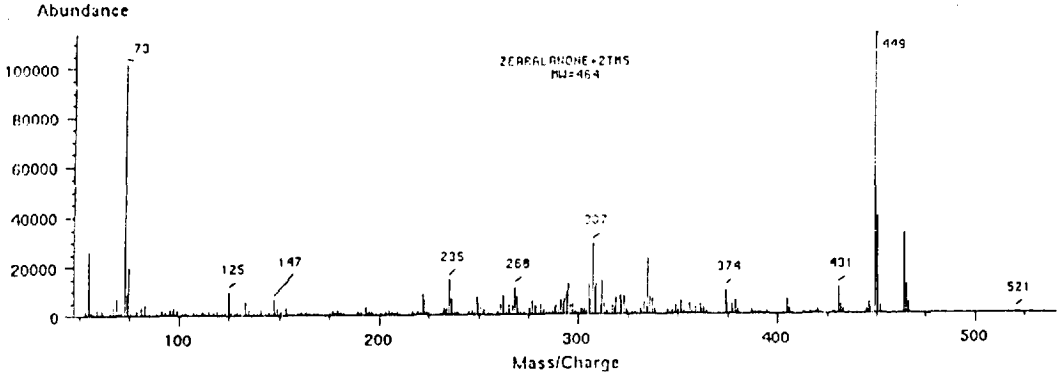
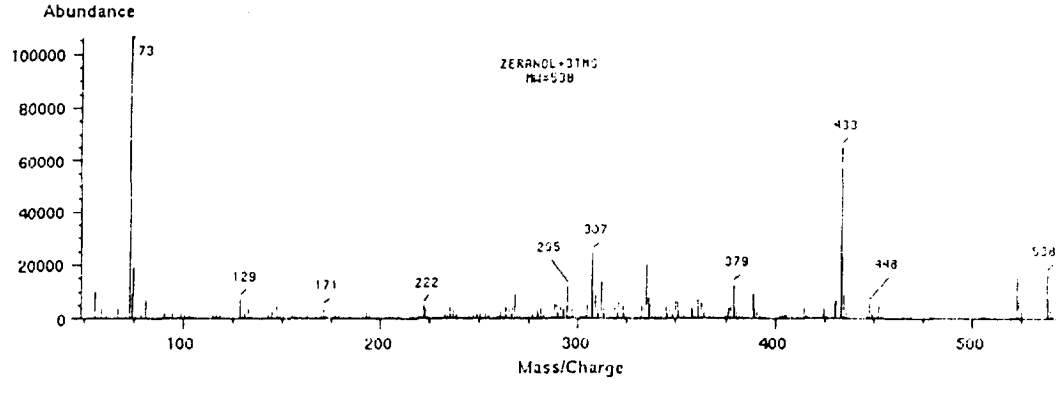


Fig. 1. TIC(Total Ion Chromatograms) of six estrogens from a spiked beef(SCAN mode, 각 1 ppm conc. : 1 ; zearalane 2 ; zearalanone, 3 ; zearalenone, 4 ; zeranol, 5 ; taleranol, 6 ; α-zearalenol, 7 ; β-zearalenol).


Abundance
ZEARALANE+2TMS
MW=450
73
149
127
207
249
295
312
370
391
435
Mass/Charge


Abundance
ZEARALANONE+2TMS
MW=464
73
125
147
235
268
297
374
431
449
521
Mass/Charge


Abundance
ZERANOL+3TMS
MW=538
73
129
171
222
295
307
379
433
448
538
Mass/Charge

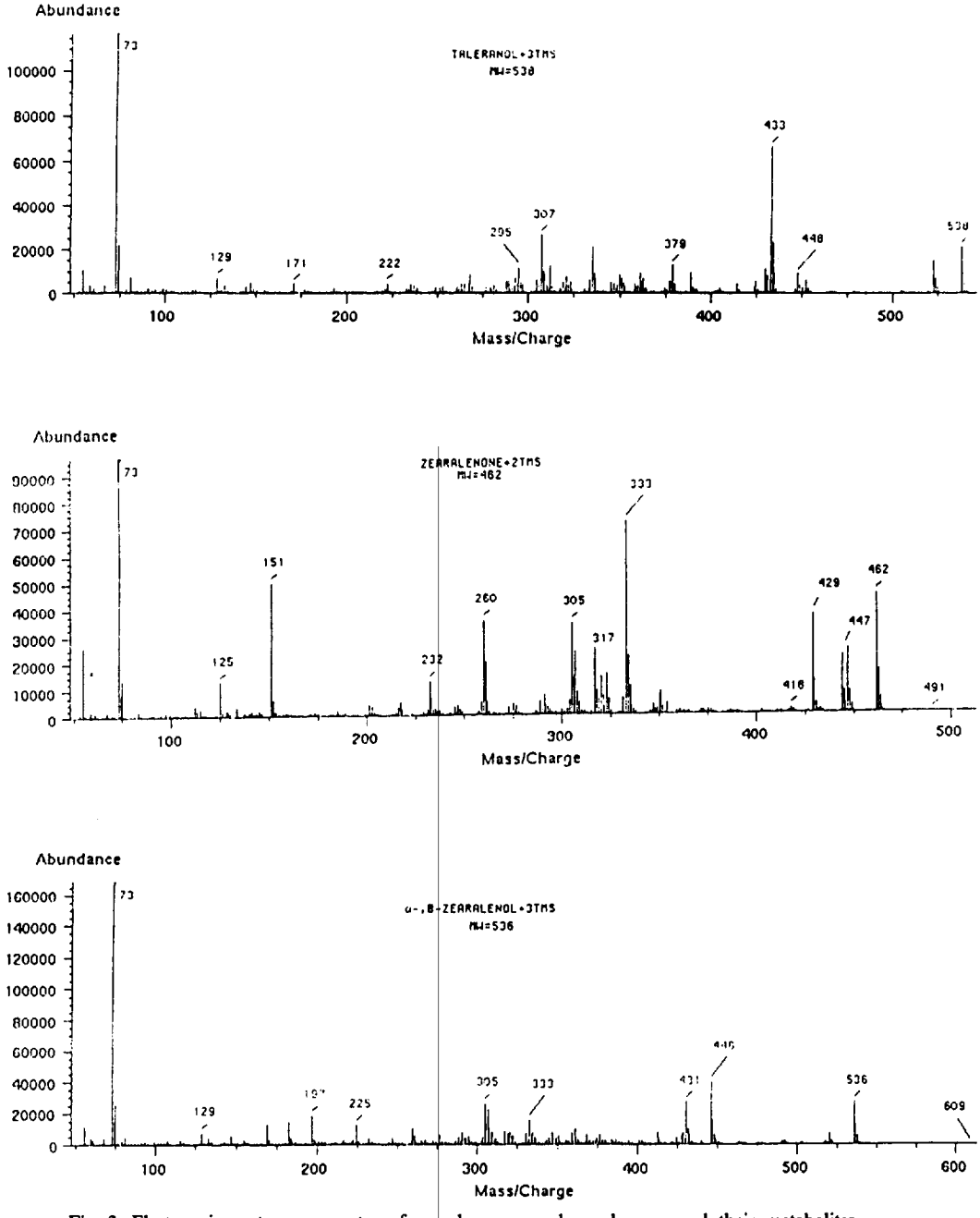


Fig. 2. Electron impact mass spectra of zearalane, zeranol, zeralenone, and their metabolites.

MSTFA를 silylation 시약으로 사용한 결과 각 에스트로겐별로 서로 겹치지 않고 좋은 분리도와 함께 분자량이온을 포함한 각각의 특성이온들을 모두 뚜렷하게 관찰할 수 있어 확인이 용이하였다.

Zeranol과 taleranol은 서로 이성체로서 3개의 hydroxy기와 ester기를 가지고 있으며 MSTFA에 의해 silylation되어 3개의 OH기는 치환되어 tri-TMS 유도체가 되지만 ester기는 치환되지 않고 분자량 M^+인 m/z=538의 tri-TMS 형태를 이루어 확인이 용이하였다. 그외 m/z=433(base peak : abundance 또는 response가 가장 큰 이온을 말함), m/z=523, 453, 307, 379 등의 특성이온들을 잘 관찰할 수 있었다. 그러나 m/z=307은 컬럼으로부터 나올 수 있기 때문에 SIM에 넣지 않았다.

Fig. 1에서 알 수 있듯이 이들은 GC 컬럼상에서 서로 잘 분리되었다. Zeranol이 약 0.08분 앞선 머무름 시간을 보였다. Zearalanone은 zeranol의 산화물로서 2개의 OH기가 치환되어 di-TMS 유도체가 되어 m/z=464가 분자량이온이었고, 그외 449(base peak), 335, 307 등이 특징적인 이온들이었다. Zearalenone은 estrogenic mycotoxin으로 2개의 OH기가 치환된 di-TMS 유도체로서 m/z=462가 분자량이온이었고 그외 m/z=447, 429, 333(base peak), 317 등이 특성이온이었다.

식육 중 잔류 에스트로겐들의 분석법에 대한 고찰

우육 중에 잔류하는 6종의 에스트로겐들 모두에 대한 동시분석의 필요성은 높으나 보고문헌은 그렇게 많지 않은 실정이고 대사산물이나 이성체 등과 동시에 분석하는 것보다는 zeranol의 경우 17β-estradiol 등과 같은 유사 anabolic steroid 등과의 동시분석에, zearalenone의 경우 우육이 아닌 곡물이나 사료에서의 parent drug의 분석에 대해서 관심이 주어졌다.

이들이 ether, benzene, chloroform, methanol 등의 유기용매에 잘 녹고 비휘발성이기 때문에 주로 HPLC를 이용한 분석 방법이 개발되어져 왔지만 HPLC에 의한 분석 방법은 시료 전처리의 단계가 복잡하고 따라서 회수율이 떨어지며 이성체, 대사산물들을 효과적으로 분리할 수 없다. 한편 우육이라는 생체시료내에 free drug 이외에 glucuronide conjugate 형태로도 존재하고 있는 일부의 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들도 추출해내기 위해 산이나 효소에 의한 가수분해가 필요하고 또한 육류처럼 조성이 복잡한 생체시료의 경우 다량의 간섭물질들로 인해 분석에 방해가 될 수 있고 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들처럼 極微量으로 잔류하고 있는 물질들을 동시분석하기 위해서는 敏感度 및 特異性이 중요하므로 HPLC(High Performance Liquid Chromatography), TLC(Thin Layer Chromatography), RIA(Radio Immunoassay), EIA (Enzyme Immunosorbent Assay), GC(Gas Chromatography)법들은 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들 6종을 동시에 분석하기에 그다지 좋은 방법들이 아니라고 판단되며 GC/MS에의 주입을 위한 시료전처리에 많은 시간과 노력이 필요한 단점은 있으나 단지 이들 각 에스트로겐별로 고유한 특성을 나타내면서 감도가 좋은 이온들만 검출하는 Selected Ion Monitoring(SIM) Capilary Gas Chromatography/Mass Spectrometry(GC/MS)방법(검출감도 pg)이 zeranol, zearalenone 및 그 대사산물들의 檢出과 確認, 定量을 위한 적절한 敏感度와 정확한 選擇性을 提供해 줄 수 있는 것으로 사료된다. 그러나, Jose 등[2]이 개발한 방법 중 GC/MS에 의한 식육중의 잔류 에스트로겐 6종의 동시분석 방법은 정량방법이 아니라 정성 방법이었고 전처리 방법이 복잡하고 HPLC/Electrochemical Detection 위주로 만들어졌고 Tina[2] 등이 개발한 방법은 GC/MS/SIM 에 의해 zeranol과 taleranol, zearalenone을 동시에 분석하는 방법이었기에 이미 발표된 zeranol과 stilben 중의 일종인 DES(diethylstilbestrol)과 17β-estradiol, zearalenone 등의 에스트로겐들의 식육 중에서 추출, 정제 및 유도체화 방법, GC/MS/SIM방법 등을 검토하고 다음과 같이 그 단점을 개선하였다.

6 N HCl 등 산에 의한 glucuronide conjugate의 가수분해는 위험하고 재차 수회에 걸쳐 유기용매(methanol 등)에 의한 분배를 이용하기 때문에 번거롭기에 Michael 등[13]과 Tina 등[3]이 사용한 방법을 이

용하였다. 즉 우육내에 free drug 이외에 glucuronide conjugate된 대사산물의 형태로 존재하고 있는 에스트로겐들을 유기용매에 잘 녹는 free drug 형태로 추출하기 위해 달팽이(*Helix pomatia*)에서 추출한 효소인 β-glucuronidase(10만 unit/μl, 1 unit는 pH 5.0에서 glucuronide conjugate로부터 1.0 μg의 free form을 추출할 수 있다) 100 μl를 사용하여 16내지 18시간 동안 37℃에서 배양시켰다. 이때 sodium acetate buffer와 빙초산으로 우육 추출액의 pH는 5.0 정도로 조절하였다.

우육은 조성이 복잡하여 GC/MS에 의한 분석시 여러가지 간접물질들이 존재한다. 이러한 간섭물질로서 작용하는 성분 중 단백질은 산 처리, 알칼리처리, 염석, 유기용매 처리 등의 다양한 방법들에 의해 제거된다. 이 중에서도 acetone과 acetonitrile등의 유기용매는 제단백효과가 다른 방법보다도 우수하다.[19] 그런데 acetonitrile의 경우 acetone보다 지방의 용출량이 적으면서 제단백효과가 뛰어나고 물과의 섞임성이 좋고[21] 대부분의 에스트로겐들이 비교적 잘 용해되고 균질화될 때 동물조직으로 잘 침윤되고 원심분리 후 깨끗한 상태의 추출액을 보이기에 추출용매로 선정하였다. 그러나 B.P.가 81.6℃[21]로 기존의 방법으로는 기화가 어려워 50 ml의 둥근 바닥 플라스크를 이용하고 수욕의 온도를 60℃로 하고 회전식 감압농축기에 건조시킨 결과 완전히 건조시키는데 5분이 걸렸다.

동물성지방은 제거하기 위해 석유 에테르나 isooctane, toluene, n-hexane등이 쓰이고 있으나 석유 에테르, iso-octane, toluene 등은 유독한 용매이고 n-hexane보다 지방제거능력이 떨어지고 또한 n-hexane(가장 상층)에는 대부분의 에스트로겐들이 잘 용해되지 않아 별 다른 손실없이 지방성분을 제거할 수 있었다.[21]

Sodium acetate buffer 중의 물성분을 제거하기 위하여 처음에 Jose등[2]이 사용한 sodium sulfate 약 10 g을 buffer 및 acetonitrile 혼합액에 가하고 흔들어서 물을 제거하려고 하였으나 sodium sulfate가 buffer 및 acetonitrile 혼합액 내에서 재빨리 응고되어 수층과 acetonitrile층과 서로 분리가 이루어지지 않아 Michael등[13]이 DES와 zeranol의 溶液分配시 사용하였던 것으로서 sodium sulfate와 마찬가지로 물과의 결합력이 강한 유기용매인 dichloromethane을 이용하게 되었다. 즉 dichloromethane은 에스트로겐들의 용해도가 거의 없고 약간의 지방제거능력이 있으며 또한 물과의 결합력이 강하므로 dichloromethane을 acetonitrile과 sodium acetate buffer(물 성분이 존재)와의 추출 혼합액에 가하여 물성분과 결합하게 하여 층분리를 함으로써 물에 녹아 있는 극성물질들과 함께 제거하고 대부분의 에스트로겐들이 중간층의 acetonitrile층에 녹아 있도록 조작하였다. 또한 회수율을 높이기 위해 dichloromethane 1 ml와 acetonitrile 4 ml를 가해 추출하였다. 그리고 유기용매에 의한 액분배후 acetonitrile 추출액을 말릴 때 걸리는 시간을 단축하기 위하여 앞에서 설명하였듯이 60℃의 수욕상에서 50 ml 둥근 바닥 플라스크를 사용하여 감압건조한 결과 Michael[13]과 Tina등[3]이 사용한 방법(20ml의 scintilation tubes를 사용하여 질소가스를 흘려 45분 정도 말림)과 비교하여 질소가스의 사용없이 40분 정도 단축시킬 수 있다. 또한 GC/MS에의 주입을 위해 시료의 정제과정이 더 필요하므로 보다 빠른 시간내에 시료의 정제를 하기 위해 Tina등[3]이 zeranol의 정제를 위해 이용했던 강염기성 음이온 교환수지(pH 11 이상에서 에스트로겐들은 이 수지에 친화성이 있게 된다. 즉 2 M NaOH용액에 의하여 에스트로겐들은 강염기성으로 바뀌게 되고 이때 수지의 chloride 이온과 교환하게 된다.)를 이용하여 효과적으로 우육에서 유래된 음이온 간섭물질들을 제거하고 zeranol을 포함한 6종의 에스트로겐들을 모두 정제할 수 있었다.

MS 분석을 위한 유도체화의 목적은 휘발성을 증대시키고 분석하고자 하는 대상물질의 열변성이나 붕괴를 저하시키는 역할과 아울러 대상물질과 안정된 결합을 유지하여 일정한 fragmentation pattern과 mass ion을 부여함으로써 유기화합물의 경우 그 물질의 확인과 정량은 물론 구조해석을 위한 실마리를 제공해 준다. 유도체반응에는 alkylation, acylation외에 silylation등이 있는데 silylation이 현재 가장 많이 쓰여진다.

Silylation을 위해 현재 널리 쓰이고 있는 유도체화 시약으로서 TMSI, BSI 및 MSTFA, TMCS(Trimethylchlorosilalane)등이 있으나 이중에서 MSTFA가 가장 휘발성이 좋고 보다 강한 silylation doner strength를 갖고 있고, GC에서 뛰어난 특징으로 부산물로서 형성되는 물질인 N-methyltrifluoroacetamide가 MSTFA 그 자체보다 빠른 머무름 시간을 갖고 있어 부산물로 인해 유도체화 산물의 분석에 방해를 받지 않는다. 한편 BSA, BSTFA도 MSTFA와 거의 대등한 silyl doner이나 이들은 고온에서(metal 또는 metal ion이 존재할 경우)열적으로 변성되기 쉽다는 보고[22,23]에 따라 본 실험에서 Jose등[2]에 의한 50 μl n-hexane에 녹여 50 μ의 BSA를 사용하여 유도체화시킨 후 3~4 μl를 GC의 stainless steel capillary injector에 주입하여 기화시키거나 Tina등[3]의 방법처럼 10 μl의 ethyl acetate로 최종 농축액을 녹인 후 1 μl를 GC용 주사기에 취하고 다시 2 μl의 BSTFA를 취하여 GC의 stainless steel injector내에서 고온(270℃)에서의 순간적인 휘발에 의한 유도체화 반응으로 인한 유도체 시약과 유도체화 산물의 열적변성을 낮추기 위하여 MSTFA를 사용하여 60℃에서 20분간 시료를 충분히 유도체화시킨 후 GC의 injector에 2 μl를 주입하고 또한 50 μl의 과량의 MSTFA로 시료를 직접 녹이고 20분간 충분히 유도체화시킴으로써 먼저 유기용매에 녹인 후 유도체화 시약을 가하여 유도체화시키거나 또는 GC injector상에서의 유도체반응에 의한 회수율의 떨어짐을 막고 보다 간편하게 유도체화시킬 수 있고 재현성에서 유리하다. 그리고 MSTFA가 수분에 민감하기에 시료에 함유되어 있는 수분에 의한 유도체화 시약과 유도체 산물의 변형을 막기 위해 시료의 최종 농축 후 진공이 걸린 건조용 데시케이터에서 15분 정도 놔두어 수분을 제거하고 MSTFA를 50 μl 정도(MSTFA 1 μl는 시료 1 ng과 결합한다는 사실이 알려져 있고 따라서 충분한 양이라고 생각된다.)[22]를 가하여 과량의 유도체화 시약과 시료내 수분과의 반응을 일으켜 화학적으로 다시 수분을 제거시켜 유도체화 반응을 시켰다. 그 결과 모든 에스트로겐들의 1, 2 및 4 ppb에서 총 회수율은 65%로 나타났다. Zeranol의 경우는 그 회수율이 80%정도였다. 또 각 에스트로겐별로 각 특성이론들이 잘 나타나는 질량 스펙트럼(Fig. 2)들을 얻을 수 있었다.

한편 유도체산물의 GC/MS에 의한 분석에서 정량을 위해서는 가능하다면 내부표준물질을 쓰는게 좋다. 이는 mass detector의 민감성 때문에 외부 표준법 등은 반응의 변이가 심하여 정확한 정량을 하기가 곤란하기 때문이다. 그리고 내부표준물질은 화학구조가 유사하며 시료에 존재하지 않는 물질이어야 하는데 Tina등[3]이 zeranol의 분석을 위해 이용한 화학 합성품인 zearalane은 zeranol과 화학구조가 유사하므로(zeranol의 7번 탄소위치에서 -OH기가 탈락된 가수분해 산물임), zeranol과 화학 구조가 유사한 대사산물이나 이성체 그리고 zearalenone과 그 대사 산물들에게도 적절한 내부표준물질인 것으로 생각되어 zearalane을 내부표준물질로 선택하여 실험한 결과 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 우육 유래 간섭물질들과 6종의 에스트로겐들하고 명확히 분리되었고 안정된 피크 형태를 얻을 수 있었다.

가능한한 짧은 분석시간(총 21분)과 적절한 분리능을 얻기 위해 적절한 gas chromatography 조건을 설정하였다. 즉 MSTFA에 의한 에스트로겐 유도체화 산물이 상대적으로 고분자량(대체로 분자량 200 이상)의 비극성물질인데 반하여 우육 유래 간섭물질들의 MSTFA 산물들은 주로 저분자 비극성물질이므로 비극성 100% methyl silicon HP-1 capillary column(id 0.2mm, 20m)을 사용한 결과 이들은 에스트로겐들의 유도체화산물보다 훨씬 빠른 머무름 시간을 보여 효과적으로 간섭물질들을 제거할 수 있었다. 또한 helium gas를 이동상으로 이용하였고 이때 기체선속도는 36 cm/sec로 하고 column hear pressure는 18 psi, split vent flow는 분당 5에서 6 ml로 하여 10 : 1의 split비를 주어 시료의 높은 농도에 의한 MS의 오염을 막고 ppb라는 미량의 에스트로겐을 분석하기에 적절한 감도를 얻을 수 있었다. Zeranol등 6종의 에스트로겐의 MSTFA에 의한 TMS 유도체들의 적절한 휘발온도을 주기 위하여 stainless steel split/splitless injector는 270℃에서 유지하였고 column에서 분리되어 기화된 6종의 에스트로겐들의 응축을 막기

위하여 GC와 MS와의 연결부위인 transfer line의 온도를 290℃에서 유지하였다. 6종의 에스트로겐들의 좋은 분리능을 얻기 위해 GC oven의 온도프로그램을 다음과 같이 설정하였다. 즉 80℃에서 분당 12℃씩 150℃까지 상승시켜 용매와 불순물을 흘려보내고 다시 분당 8℃씩 온도를 서서히 상승시켜 235℃에 이르게 한 다음, 비극성물질인 이들 에스트로겐 물질들과 우육 유래 간섭물질들의 피크가 서로 겹치는 것을 피하기 위하여 분당 20℃씩 급격히 상승시켜 290℃부근의 온도대에 이르는 시간대인 18분대에 분석이 시작되어 약 4분 이내에 모든 분석이 완료되도록 하였고 분석이 끝난 후 에스트로겐 등의 불순물을 제거하기 위하여 310℃까지 온도를 수직상승시킨 후 1.7내지 2분간 유지시켰다. 그 결과 컬럼내 잔류 불순물로 인한 분석의 방해없이 계속적으로 분석할 수 있었다. 각 에스트로겐별로 특징적인 이온들을 잡기 위하여 MS의 조건은 다음과 같이 설정하였다. 즉 시료의 이온화가 일어나는 ion source는 176℃를 유지시켰고, 생성된 이온들을 하전된 질량 크기대로 배열하는 mass filter는 100℃로 유지시켰으며 electron impact ionization mode(70 electron volt)를 사용하였고, 高感度를 얻기 위해 electron multiplier의 값은 tune값보다 600 정도 높게 설정하였다. 다음 먼저 SCAN mode에서 정성분석을 하여 6종의 mass spectra를 얻어서 머무름 시간대별로 특성이온들을 각 에스트로겐별로 3내지 5개 정도로 설정한 후 Table 1과 같이 SIM mode에서 정성 및 정량분석을 하였다. 이때 각 이온당 dwell time은 모두 200 msec로 하여 적절한 감도로 특성이 뚜렷한 질량 스펙트럼을 얻을 수 있었다

이상과 같이 실험해본 결과는 우육시료에서 6종의 에스트로겐들을 동시에 최저 1 ppb까지 定性 및 定量할 수 있었고 따라서 zeranol의 경우 한국의 허용기준(우육 : 2 ppb)은 물론 FAO/WHO에서 설정한 최대잔류허용한계(근육 : 1.4 ppb)를 충분히 만족시킬 수 있는 분석감도를 얻었으며 6종의 에스트로겐들의 총평균 회수율은 1 ppb에서 60.2%(CV=29.7%), 2ppb에서는 63.5%(CV=26.5%), 4ppb에서는 72.9%(CV=18.2%)로 농도가 높아질 수록 회수율도 높아지고 시료간 분석오차의 척도인 변이계수(CV, coefficient of variation)도 작아지는 경향을 볼 수 있었다.

국문 요약

우육내에 잔류하는 6종의 에스트로겐들 zeranol, taleranol, zearalanone 그리고 zearalenone, α-, β-zearalenol등을 동시에 정성 및 정량 분석하는 개선된 방법을 확립하였다. 즉 우육이라는 생체시료내에서 free form 및 대사과정의 결과로 일부 수용성의 glucuronide conjugate형태(미리 β-glucuronidase로 가수분해하여 유기용매에 잘 녹는 형태로 바꿈.)로 잔류하는 6종의 에스트로겐들을 acetonitrile을 사용하여 추출하고 n-hexane, dichloromethane 등의 유기용매에 의한 溶液分配로 지방 및 간섭물질을 제거하고 acetonitrile을 최종 농축시킨 후 2 M NaOH로 강알칼리화시켜 강염기성 음이온 교환 수지를 통과시켜 정제하고 내부표준물질로 zeranol의 화학적 유사체인 zearalane을 첨가한 다음 에스트로겐들에 휘발성을 주고 각 물질별로 특성이 뚜렷한 질량 스텍트럼을 얻기 위해 MSTFA로 유도체화시킨 후 개선된 GC/MS/SIM(Selected Ion Monitoring) mode에서 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 각 에스트로겐들은 서로 잘 분리되었으며 용출시간은 다음과 같다. 내부표준물질인 zearalane TMS_2의 경우 18.49분이었으며, zearalanone-TMS_2는 19.44분이었고, zearalenone-TMS_2는 19.63분, zeranol-TMS_3의 경우는 19.71분이었으며, 또 taleranol-TMS_3의 경우 19.79, α-zearalenol-TMS_3의

경우 19.99분이었고 β-zearalenol-TMS_3의 경우 20.08분이었다.

2. 6종의 에스트로겐들의 표준곡선은 1, 2 및 4 ppb(5에서 20 mg)의 농도범위에서 직선(r=0.99 이상)을 보였고, 6종의 에스트로겐들의 최저검출농도는 1 ppb였다. 따라서 zeranol의 경우 한국의 허용기준(우육 : 2 ppb)은 물론 FAO/WHO에서 설정한 최대 잔류허용한계(근육 : 1.4 ppb)를 충분히 만족시킬 수 있는 분석감도를 가진 것으로 사료된다.

3. 우육 시료에서 6종의 에스트로겐들의 총 평균 회수율은 1 ppb에서는 60.2%(CV=29.7%), 2 ppb에서는 63.5%(CV26.5%), 4 ppb에서는 72.9%(CV=18.2%)로 농도가 높아질수록 회수율도 높아지고 시료간 분석오차의 척도인 변이계수(CV, coefficient of variation)도 작아지는 경향을 보였다.

4. Joes등이 발표한 6종의 에스트로겐들의 동시 분석을 위한 추출 및 정제 등의 전처리방법과 달리 전처리방법을 단순화하였고 단시간내(21분 정도)의 분석시간에 이들 6종의 동시 분석이 가능하도록 Jose, Michael 및 Tina등의 방법과 다르게 GC/MS/SIM 방법을 개선하였으며 또한 MSTFA를 이용하여 6종의 에스트로겐들을 유도체화시켜 분석한 결과 zeranol의 경우 Jose나 Tina의 방법보다 회수율이 향상되었고 비극성 컬럼에서 6종의 에스트로겐들은 서로 잘 분리되었으며 각 에스트로겐별로 특성 이온들을 뚜렷히 관찰할 수 있었으며, zeranol의 화학적 유사체인 zearalane을 내부표준물질로 하여 우육 중에 잔류하고 있는 6종의 에스트로겐들을 보다 정확하게 정량할 수 있었다.

참고 문헌

1. Andre, Rico, A. G.: *Drug residues in animals*, Academic Press INC, London, 111-142 (1986).
2. Roybal, J. E., Munns, R. K. and Morris, W. J.: Determination of zeranol, zearalenone and their metabolites in edible animal tissue by liquid chromatography with electrochemical detection and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Assoc. of. Anal. Chem.*, **71**, 264-271 (1988).
3. Chichilla T.M.P., Silverstere, D., covey, T. R. and Henion, J.D: Distribution of zeranol in bovine tissues determined by selected ion monitoring capillary gas chromatography/mass spectrometry. *J. Anal. Tox.* **12**, 310-318 (1988).
4. Williams, R.D., Bladwin, R.S.: A review of the metabolism, toxicology and analytical methods for detection of zeranol in edible animal tissues. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **3**, 9-25 (1983).
5. Food and Agriculture Organization(FAO): Residues of some veterinary drugs in animals and foods. *FAO food nutrition paper.* **41**, 38-49 (1988).
6. Bloomfield, G.: *The hormone file-anabolic growth promoters*, V & O *Publ.* Ltd., London, 1-4 (1987).
7. Food and drug administration(FDA): *Code of federal regulations 21, Parts 500 to 599,* U.S Gov. printing office, Washinton D.C., 476-481 (1991).
8. Food safety inspection service(FSIS): *Compound evaluation and analytical capability national residue program plan,* (1990).
9. National Health and Medical Council: *Australia food standards code A-14,* (1990).
10. 보건사회부 : 식품 등의 기준 및 규격 개정, 보사부 고시 91-24호, (1991).
11. Hans, J.S., Bernd, A.: Determination of residues of anabolic drugs in meat by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **195**, 231-241 (1980).
12. Tuinstra, L.G.M.Th., Traag, W.A. and Eukens, H.J.: Procedure for the gas chromatographic/mass spectrometric confirmation of some exogenous growth-promoting compounds in the urine of cattle. *J. Chromatograr.*, **279**, 533-542 (1983).
13. Hoffman, M.K., Silvestere, D., Covey, T.R. and Henion, J.D.: A gas chromatography/mass spectrometric screening, confirmation and quantification method for esterogenic compounds, *Biomedical and environmental mass spectrometry,* **15**, 45-56 (1988).
14. Food Safety and Inspection Service(FSIS): Determination and confirmation of diethylstilbestrol and zeranol in bovin liver, *Chemical laboratory guide*

book **5**, 051(1987).
15. 박종명 : 축산식품 중 잔류물질 검사법, 상록 출판사, 서울, 226-238 (1991)
16. Hunt, D.C., Bourdon, A.T. and Crosby, N.T. :HPLC procedure for residual zearalenone in meat, dairy products, and cereals, *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 239-244 (1978).
17. Watabe, K., Kikiwa, H., Kawamura, T., Miyazaki, T., Matsumoto, M., Nakaza, H. and Fuzita, M : Simultaneous determination of zeranol, 17 betaestradiol and DES in beef by HPLC with amperometric detection using column N switching, *Bunseki Kagaku* **38**, 712-717 (1989).
18. Medina, M.D. and Sherman, J. T : High performance liquid chromatographic separation of anabolic oestrogens and ultraviolet detection of 17-beta-oestradiol, zeranol, diethylstilbesterol, zearlenone in avian muscle tissus extracts, *Food Additives and Contaminants* **3**, 263-272 (1986).
19. 농촌진흥청 농약연구소 : 농약잔류성시험법, 4-13 (1992).
20. Hewlett Packard Co. : *HP 5989 AMS engine hard ware manual*, (1990).
21. Budavari, S. : *The Merck Index*, 11th Ed., Merk & Co., Inc., Rahway, (1989).
22. *Chromatography Catalog & Handbook*, Pierce, Rockford, Illinois, 4-30 (1992).
23. Knapp, O.R. : *Handbook of analytical derivatization reactions*, Wiley-Interscience Publ. New York, 1-21 (1979).