

# 식품 중 불검출 등 대상물질 분석법

국립수의과학검역원  
위생검역부 독성화학과  
수의연구사 김 명 애  
전화 (031)467-1842  
mmongi@korea.kr

## <목 차>

- I. LC-MS/MS를 이용한 니트로푸란제 대사물질 분석법
- II. 클로람페니콜, 플로르페니콜, 치암페니콜 분석법
- III. GC-MS를 이용한 DES 및 Zeranol 분석법
- IV. 디메트리다졸, 메트로니다졸, 로니다졸 동시 분석법
- V. 클렌부테롤 (Clenbuterol) 및 락토파민 (Ractopamine) 동시 분석법
- VI. 반코마이신 (Vancomycin) 잔류시험법
- VII. 클로르프로마진, 피리메타민, 콜치신 잔류시험법
- VIII. 티오우라실 (Thiouracil) 잔류시험법
- IX. 메드록시프로게스테론 아세테이트 잔류시험법
- X. 아자페론, 카라졸롤 잔류시험법
- XI. 페닐부타존 잔류시험법

식품의 안전성에 대한 관심이 높아지고 어류에서의 말라카이트그린이 검출되는 등 최근의 식품안전사고에 신속히 대응하기 위한 위생규격을 강화하고, 식생활과 식품산업 환경변화에 대응할 수 있는 새로운 패러다임의 안전관리 체계를 갖추기 위하여 식품 중 검출되어서는 아니 되는 동물용의약품 목록을 신설(표 참조)\*하였다. 현행 식품공전에는 “관련법령에서 안전성 및 유효성에 문제가 있는 것으로 확인되어 제조 또는 수입품목허가를 하지 아니하는 동물용의약품(대사물질 포함)은 검출되어서는 아니 된다.”라고 규정되어 있으나 이에 해당하는 물질이 명확히 제시되지 않아 동물용의약품 잔류기준 적용에 혼란이 야기되고 있어, 타 법령 및 Codex, EU, 일본, 미국 등에서 안전성에 문제가 있어 사용금지하고 있는 품목을 명확히 하고자 12가지의 동물용의약품의 목록을 발표하였으며 (식품의약품안전청고시 제2007- 68호, 2007. 10. 18), 이의 기준 적용은 2008년 4월 1일부터 시작되었다.

번호	식품 중 검출되어서는 아니 되는 물질
1	니트로푸란 {푸라졸리돈(Furazolidone), 푸랄타돈(Furaltadone), 니트로푸라존(Nitrofurazone), 니트로푸란토인(Nitrofurantoin)}, 니트로빈(Nitrovin) 등 제제 및 대사물질
2	클로람페니콜 (Chloramphenicol)
3	말라카이트 그린 (Malachite green) 및 대사물질
4	디에틸stil베스트롤 (Diethylstilbestrol, DES)
5	디메트리다졸 (Dimetridazole)
6	클렌부테롤 (Clenbuterol)
7	반코마이신 (Vancomycin)
8	클로르프로마진 (Chlorpromazine)
9	티오우라실 (Thiouracil)
10	콜치신 (Colchicine)
11	피리메타민 (Pyrimethamine)
12	메드록시프로게스테론 아세테이트(Medroxyprogesterone acetate, MPA)

\*주1. 니트로푸라존의 대사물질인 세미카바자이드 (Semicarbazide, SEM)의 경우 단순 축산물 및 동물성 수산물 (raw material)에 한하여 적용한다.

## I. LC-MS/MS를 이용한 니트로푸란제 대사물질 분석법

니트로푸란제는 5-니트로기를 갖는 모노니트로화합물군에 속하는 광범위 합성항균제로서 대표적인 약물로는 furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin 등이 포함된다. 이들 약물은 최근까지도 수의임상에서 주로 소, 돼지, 가금에서 *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* 등에 의한 세균성 장염, 콕시듐 등 각종 질병을 예방하거나 성장을 촉진할 목적으로 사료첨가제나 음수용 제제로서 널리 사용되었다. 그러나 니트로푸란제는 니트로기의 효소적 환원과정에서 생성된 대사물질에 의해 유발되는 변이원성과 발암성 때문에 유럽연합(EU)에서는 1995년 furazolidone에 이어 1997년부터는 식용동물에서 모든 니트로푸란제의 사용을 금지하였다. 또한 미국에서는 이전까지 furazolidone과 nitrofurazone에 대해서는 국소적인 사용을 허용하여 왔으나 2002년 5월부터 전면적으로 사용을 금지하였고, 국내에서도 2003년 2월부터 국내 제조 및 수입을 전면 금지하였다.

니트로푸란제는 경구투여 후 빠르게 흡수되어 간, 신장, 지방, 근육 등에 분포하며 주로 뇨로 배출되는데, 원물질은 체내에서 반감기가 수시간에 지나지 않고 빠르게 대사되어 검출하기 어려우나 조직결합형 대사물질은 원물질보다 안정하여 수주까지 잔류하므로 표적 잔류물질(marker residue)로서 니트로푸란제의 불법사용에 따른 조직내 잔류물질검사 목적으로 활용할 수 있는 것으로 알려져 있다.

니트로푸란제의 조직결합형 대사물질은 furazolidone의 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), furaltadone의 3-amino-5-morpholinomethyl-1,3-oxazolidin-2-one (AMOZ), nitrofurazone의 semicarbazide (SEM), nitrofurantoin의 1-aminohydantoin (AHD) 등이 알려져 있으며, 특히, nitrofurazone의 대사물질인 SEM(Semicarbazide)은 병가스켓 제품이나 밀가루 함유제품 뿐만 아니라 해조류 등의 자연계 존재, 식품 가공공정에서의 생성 등 다양한 생성경로가 확인됨에 따라 SEM에 대한 기준 및 검사에 있어 대상 식품을 단순 축산물 및 동물성 수산물 (raw material)에 한하여 적용하고 있다. 이들 대사물질은 분자량이 적고 UV 흡광능력이 낮아 2-nitrobenzaldehyde(NBA)와 같은 시약으로 유도체화한 화합물을 LC-MS/MS를 이용하여 주로 분석하고 있다.

## 1. 원 리

시료 중의 furazolidone, furaltadone, nitrofurazone 및 nitrofurantoin의 대사 물질을 HCl 용액으로 처리하여 nitrobenzialdehyde (NBA)로 유도체화한 후 ethyl acetate로 추출·농축하여 액체크로마토그래프/질량분석기(LC-MS/MS)로 분석한다.

## 2. 측정기기

액체크로마토그래피-질량분석기

LC-MS/MS (Waters Micromass Quattro micro<sup>TM</sup> triple-quadrupole mass spectrometer)

## 3. 표준품 · 시약 및 기구

### 가) 표준품 및 시약

- 1) 표준품 : Semicarbazide (SEM), 3-amino-2-oxazolidinone(AOZ),  
3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone(AMOZ),  
1-aminohydantoin(AHD)
- 2) 내부표준품 : 3-amino-2-oxazolidinone-D<sup>4</sup>(AOZ-D<sup>4</sup>),  
3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone-D<sup>5</sup>(AMOZ-D<sup>5</sup>)
- 3) 2-Nitrobenzaldehyde (NBA, MW 151.12, 99 %) : 시약특급
- 4) Acetonitrile : HPLC grade
- 5) n-Hexane : HPLC grade
- 6) Dichloromethane : HPLC grade
- 7) Methanol : HPLC grade
- 8) Ethyl acetate : HPLC grade
- 9) Acetic acid : 시약특급
- 10) Ammonium acetate (MW 77.08, 98 %) : 시약특급
- 11) Dipotassium phosphate (K<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub>, MW 174.2, 99.2 %) : 시약특급
- 12) Dimethyl sulfoxide (DMSO) : 시약특급
- 13) Hydrochloride (HCl) : 시약특급
- 14) 증류수 : 18 MΩ 이상

## 나. 기구

- 1) 50 mL 원심분리용 튜브
- 2) 유리시험관 : 160 x 100 mm
- 3) 마이크로피펫 : 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- 4) 마이크로필터 : 0.20  $\mu$ m, 0.45  $\mu$ m
- 5) 원심분리기
- 6) 질소농축기(Turbo Vap<sup>R</sup> LV), Caliper Life science
- 7) 수소이온농도측정기
- 8) 정밀저울(Chemical Balance)  $\pm$  0.0001 g 정밀도
- 9) 일반저울 :  $\pm$  0.1 g 정밀도
- 10) Ultrasonic bath(Branson 8510)
- 11) Vortex mixer
- 12) Shaking water bath
- 13) Multi-mixer(TAITEC vial mixer, vix-100)

## 4. 시험용액의 조제

### 가. 표준용액

- 1) Stock solution : 각각의 니트로푸란제 대사물질 표준품 (AOZ, AMOZ, SEM, AHD) 10 mg을 정밀히 달아 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol로 녹인 다음 표시선까지 채워 녹인다 (100  $\mu$ g/mL).
- 2) Working solution : Stock solution 10 mL을 정확히 취하여 100 mL 용량플라스크에 옮기고 acetonitrile로 표시선까지 채운 다음 잘 혼합하여 표준용액으로 사용한다 (10  $\mu$ g/mL).

### 나. 내부표준용액

- 1) Stock solution : 각각의 내부표준용액 표준품 10 mg을 정밀히 달아 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol로 녹인 다음 표시선까지 채워 녹인다 (100  $\mu$ g/mL).
- 2) Working solution : Stock solution 10 mL을 정확히 취하여 100 mL 용량플라스크에 옮기고 acetonitrile로 표시선까지 채운 다음 잘 혼합하여 표준용액으로 사용한다 (10  $\mu$ g/mL).

## 다. 시험용액

### 1) 이동상용액

#### 가) 5 mM ammonium acetate in 20 % methanol (A sol.)

증류수 800 mL에 methanol 200 mL를 혼합한 후 ammonium acetate 0.39 g을 녹여 용매여과장치 (0.2  $\mu$ m membrane filter)로 여과하여 사용한다.

#### 나) 5 mM ammonium acetate in 90 % methanol (B sol.)

증류수 100 mL에 methanol 900 mL를 혼합한 후 ammonium acetate 0.39 g을 녹여 용매여과장치 (0.45  $\mu$ m membrane filter)로 여과하여 사용한다.

### 2) 시험용액 조제

가) 0.05 M NBA (유도체화 용액) : 2-Nitrobenzaldehyde 0.7613 g을 dimethylsulfoxide (DMSO) 100 mL에 녹여 갈색병에 담아 유도체화 시약으로 사용한다. 이 용액은 사용 직전에 만들어 사용한다.

나) 0.125 M HCl : 증류수 975 mL에 5 M HCl 용액 25 mL를 가하여 혼합한다.

다) 0.1 M  $K_2HPO_4$  : 증류수 900 mL에  $K_2HPO_4$  17.56 g을 가하여 녹인 후 1 L로 맞춘다.

라) 1 M NaOH : 1M NaOH 용액을 그대로 이용한다.

바) 50 % ACN : 증류수 50 mL에 acetonitrile 50 mL를 가해 잘 혼합한다.

## 5. 검사방법

### 가. 시료전처리

- 1) 시료 1 g을 평량하여 50 mL 원심분리용 튜브에 담는다.
- 2) 내부표준용액 (100 ng/mL) 40  $\mu$ L를 첨가한 후 15 분간 정치한다.
- 3) 0.125 M HCL 용액 10 mL와 유도체화 용액 (0.05 M NBA) 100  $\mu$ L를 넣고 37  $^{\circ}$ C 수욕조에서 16 시간 진탕한다.
- 4) 유도체화한 시료를 실온으로 냉각한 후 0.1 M  $K_2HPO_4$  10 mL과 1 N NaOH 1 mL를 가하여 약 pH 7.4로 조정한다.
- 5) 잔사를 제거하기 위해 5,000 rpm에서 5 분간 원심분리를 하고 상층액을 새로운 원심관에 옮겨 n-hexane 10 mL를 가하여 혼합한 후 5,000 rpm에서

15 분간 원심분리한다.

- 6) 하층을 새로운 원심관에 취하고 ethyl acetate 7 mL를 가하여 혼합하고 5,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 취하여 유리시험관에 담는다.
- 7) 이런 과정을 2 회 반복하여 얻어진 상층액을 질소하 (40 °C)에서 농축 건조한다.
- 8) 50 % methanol 1 mL를 넣어 초음파로 완전 용해한 후 eppendorf tube로 옮겨 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리를 한다.
- 9) 상층액을 0.20  $\mu$ m filter로 여과하여 시험용액으로 한다.

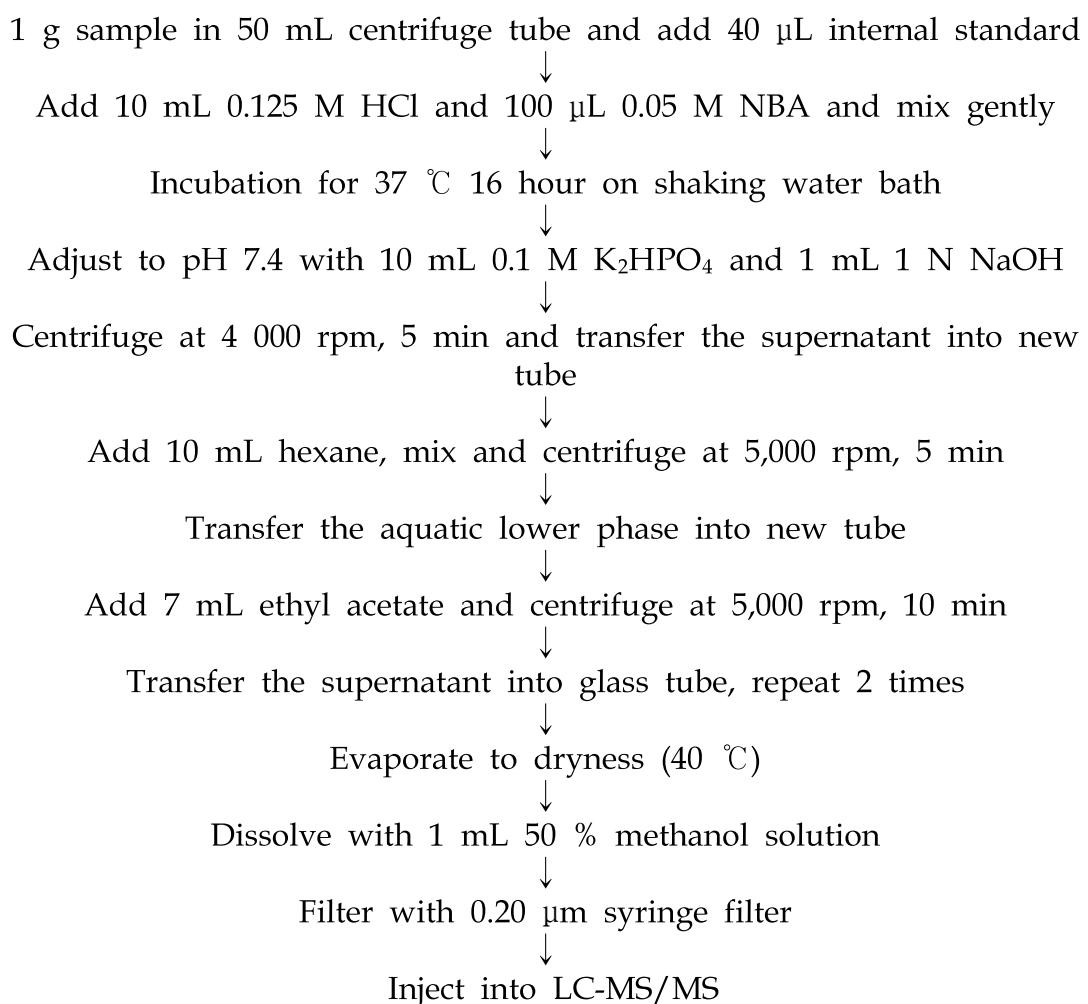


Fig. 1. The sample preparation scheme of nitrofurans metabolites in animal origin samples.

## 나. 분석조건

### 1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : XTerra C<sub>18</sub> (2.1 × 150 mm, 3.5 μm) 또는 동등품

나) 이동상 : A 용액 (5 mM ammonium acetate in 20 % MeOH)

B 용액 (5 mM ammonium acetate in 90 % MeOH)

다) 유속 : 0.2 mL/min

- Gradient 조건

시간(분)	% A	% B	유속	Flow curve
0.0	100	0	0.2	1
0.5	100	70	0.2	11
10.0	0	100	0.2	6
12.0	0	100	0.2	11
12.1	100	0	0.2	1
20.0	100	0	0.2	11

### 2) 질량분석기 분석조건

- Electrospray ionization (ESI) positive mode

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time(s)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(eV)
AOZ	236	149	0.5	24	12
		134	0.5	24	12
AMTZ	335	262	0.5	22	16
		291	0.5	22	12
AHD	249	178	0.5	24	11
		134	0.5	24	15
SEM	209	192	0.5	22	10
		166	0.5	22	11
D <sup>4</sup>	240	134	0.5	25	25
D <sup>5</sup>	340	296	0.5	12	12



## 다. 표준곡선 작성

### 1) 표준용액의 유도체화

음성 시료 1 g을 50 mL 원심 튜브에 넣고 니트로푸란제 대사물질 혼합표준용액 100 ng/mL를 200, 100, 40, 20, 10  $\mu$ L를 취하여 내부표준용액(100 ng/mL) 40  $\mu$ L를 넣고 15 분간 방치한 후 0.125 M HCl 용액 10 mL를 넣고 잘 혼합한 다음 0.05 M NBA 용액 100  $\mu$ L를 넣고 1 분간 혼합하여 준 후 37  $^{\circ}$ C에서 16 시간동안 진탕한다.

### 2) 표준곡선의 작성

유도체화 된 표준용액을 시료와 동일한 과정을 통하여 에칠아세테이트로 추출·정제하여 6개 농도의 표준용액을 10  $\mu$ L씩 주입하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 니트로푸란제 대사물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

## 6. 실험결과 분석

유도체화한 시험용액 10  $\mu$ L를 위의 분석조건에 따라 LC-MS/MS에 주입하여 각 분석물질별 특이이온을 확인한다. 시료용액 분석에서 얻은 크로마토그램에서 각각의 니트로푸란제 대사물질에 대하여 특이이온을 확인한 후 정량 이온이 일치되는 대사물질 피크에 대한 평균면적을 구한 다음 표준곡선 좌표의 Y 축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 표준곡선상 만나는 점에서 수직으로 X 축과 만나는 점이 시료용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시료용액의 희석배수(건조물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료 무게로 나누어 최종 시료 중 각 대사물질의 농도를 산출한다.

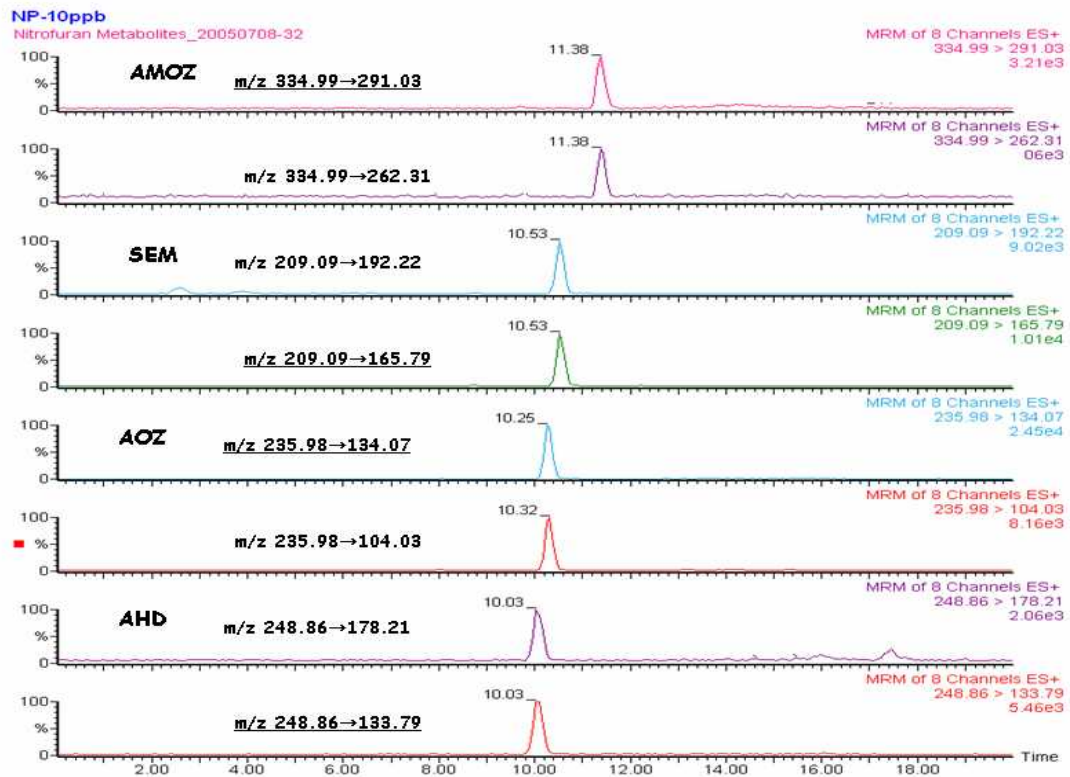


Fig. 1. Mass chromatograms of 4 nitrofuran metabolites.

## II. LC-MS/MS를 이용한 암페니콜계열 분석법

클로람페니콜 (Chloramphenicol; CAP)은 1947년 *Streptomyces venezuelae*에서 첫 번째로 분리된 항생제이며 70S 리보솜의 50S subunit을 결합하여 세균내의 단백질 합성을 억제시키는 광범위 항생제로 동물질병을 치료하는 데 있어 매우 효과적인 약물로 알려져 있다. 하지만 클로람페니콜은 다양한 혈액독성을 일으킨다고 알려져 있으며, 망상 적혈구 감소증 (reticulocytopenia), 백혈구 감소증 (leucopenia) 및 혈소판 감소증 (thrombocytopenia), 재생불량성 빈혈 등이 주요 증상이다. 이러한 잠재된 독성에 의한 안전성 문제로 1990년대 초반부터 한국, 미국, EU 등 세계 각국에서 식용동물에 사용을 금지하고 있다. 그럼에도 불구하고 클로람페니콜의 광범위한 항균효과 때문에 전 세계적으로 여전히 불법적으로 많이 사용되고 있는 실정이다. FAO/WHO에서는 이런 문제점으로 인하여 클로람페니콜은 식육제품에서의 zero tolerance level을 추천하고 있으며, 항생제 및 합성항균제 등의 미량 잔류로 인한 인간에의 독성과 다량 사용으로 인한 환경 공해 등을 모니터링 해야 할 필요성이 대두되었고 더불어 정밀한 분석법이 요구되고 있다. 그러나 이러한 선진 각국의 클로람페니콜에 대한 사용규제에도 불구하고 2002년 중국, 베트남 등 동남아 국가에서 사육하는 식용동물, 어류, 꿀벌 등에서 불법사용으로 인해 스위스와 EU 국가로 수출한 닭고기, 새우 등에서 잔류문제가 발생한 바 있으며, 클로람페니콜을 비롯한 사용금지약물에 대한 국가별 잔류분석법의 검출감도 차이는 국제 무역마찰의 소지가 있으므로 2003.3 미국에서 개최된 제14차 CODEX 식품중 동물용의약품잔류분과위원회(CC/RVDF)에서는 “새우에서 클로람페니콜 잔류문제”가 정식의제로 채택되어 국가간의 조화를 위하여 분석법의 요건에 대해 논의한 바 있으며, 최근 EU에서는 축·수산식품에서의 클로람페니콜 분석법의 최소검출한계치 (Minimum Required Performance Limit; MRPL)를 0.3 ng/g 이하로 정하였다. 현재 축산물에서 클로람페니콜의 잔류분석법으로 면역분석법을 이용한 Charm II receptor assay (Charm Science Inc., USA)나 다양한 ELISA 키트 (Ridascreen, R-Biopharm GMBH, Germany) 등이 스크리닝법으로 사용되고 있다. 미국 FDA에서는 세계적인 추세에 발맞추어 LC-MS/MS를 이용하여 새우, 게, 가재 및 벌꿀에서 정량한계 0.3 ng/g 수

준의 잔류분석법을 개발하여 채택하고 있다. 이렇듯 사용금지약물에 대한 잔류분석법의 검출감도는 국제적으로 매우 중요시 되고 있으나 우리나라 식품공전에서 정하는 HPLC에 의한 클로람페니콜 공정분석법의 검출한계치 (LOD)는 2 ng/g 수준에 불과하기 때문에 최근 EU가 정하는 분석법의 최소검출한계치 (MRPL) 0.3 ng/g 이하를 검출 및 정량할 수 있는 방법으로서의 개선이 필요하여 국가에서는 2008년 식품공전의 HPLC를 이용한 클로람페니콜 분석법을 폐지하고 LC-MS/MS를 이용한 분석법으로 개정하였다. 플로르페니콜은 소, 돼지, 양, 염소 가금, 어류 및 갑각류에서 0.1~3.0 mg/kg 으로 설정(2010. 4. 30, 식약청 고시 제2010-25호)되어 있으며, 티암페니콜은 소, 돼지, 닭에서 0.5 mg/kg 로 설정되어 있다.

## 1. 원리

조직 5 g에 증류수 2 mL, ethyl acetate 6 mL를 넣고 균질화시킨 후 원심분리하여 상층액을 취하여 건조시킨다. Hexane : chloroform (1 : 1, v/v) 2 mL로 용해시키고 여기에 증류수 1 mL을 더하여 잘 혼합한 후 상층액을 취하여 여과한 후 LC-MS/MS로 분석한다.

## 2. 측정기기

액체크로마토그래피-질량분석기

Agilent, US/6410 triple-quadrupole mass spectrometer

## 3. 표준품, 시약 및 기구

### 가. 표준품 및 시약

- 1) 표준품 : Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol
- 2) Acetonitrile : HPLC grade
- 3) n-Hexane : HPLC grade
- 4) Ethyl acetate : HPLC grade
- 5) Chloroform : HPLC grade
- 6) Methanol : HPLC grade
- 7) 증류수 : 18 MΩ 이상

## 나. 기 구

- 1) 50 mL centrifuge tube
- 2) 유리시험관 : 160 x 100 mm
- 3) 마이크로피펫 : 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- 4) 마이크로필터 : 0.2  $\mu$ m filter
- 5) 원심분리기
- 6) 정밀저울 (Chemical balance)  $\pm$  0.0001 g 정밀도
- 7) 일반저울 :  $\pm$  0.1 g 정밀도
- 8) Multi-mixer(TAITEC vial mixer, vix-100)
- 9) Ultrasonic bath(Branson 8510)

## 4. 시험용액 조제

### 가. 표준용액

- 1) **표준원액 (Stock solution)** : Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol 10 mg을 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol 2mL로 용해한 후 증류수로 표시선까지 채워 -20  $^{\circ}$ C 냉동 보관한다 (100  $\mu$ g/mL).
- 2) **표준용액 (Working solution)**
  - 가) 1 단계 **working solution** : Stock solution을 증류수로 100배 희석하여 사용한다 (1  $\mu$ g/mL).
  - 나) 2 단계 **working solution** : 1단계 working solution을 증류수로 100배 희석하여 사용한다(10 ng/mL).

### 나. 시험용액

- 1) **Hexane : chloroform (1:1, v/v)**  
250 mL n-hexane과 250 mL chloroform을 혼합하여 사용한다.

**다. Spike sample 조제** : 균질화한 시료 5g에 10 ng/mL 농도의 표준용액을 150  $\mu$ l를 첨가하여 0.3 ng/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

## 5. 검사방법

### 가. 시료전처리

- 1) 균질화 된 시료 5 g에 증류수 2 mL를 넣고 multi-mixer로 15 분간 진탕 혼합한다.
- 2) Ethyl acetate 10 mL를 50 mL centrifuge tube에 넣고 multi-mixer로 15 분간 진탕 혼합한다.
- 3) -4 °C, 5,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 유리시험관에 모은다.
- 4) 남은 잔사에 ethyl acetate 5 mL를 넣고 위의 2)와 3)의 과정을 반복하여 상층액을 합한다.
- 5) 모아진 상층액을 40 °C, 질소하 농축 건조한다.
- 6) 농축된 시료에 hexane : chloroform (1:1, v/v) 2 mL을 넣어 완전 용해시킨다.
- 7) 증류수 1 mL를 더하여 multi-mixer로 450~500 rpm의 속도로 10 분간 진탕 혼합한다. 너무 강하게 진탕 혼합하면 emulsion이 생길 수 있으며, 너무 약하게 혼합하면 회수율이 저하될 수 있으므로 주의해야 한다.
- 8) 실온에서 5,000 rpm으로 5 분간 원심분리한 후 조심스럽게 상층액을 취하여 eppendorf tube에 넣는다.
- 9) -4 °C, 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리하고 상층액을 취하여 0.2 µm filter로 여과한 후 LC-MS/MS로 분석한다.

### 나. 분석조건

#### 1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.8 µm) 또는 동등품

나) 이동상 : DW : Methanol (gradient)

Time (min)	% DW	% MeOH	Flow rate (mL)
0.00	90	10	0.3
1.00	30	70	0.3
3.00	30	70	0.3
3.10	90	10	0.3
6.00	90	10	0.3

다) 칼럼온도 : 실온

라) 주입량 : 5 µL

## 2) 질량분석기 분석조건

가) Ionization : ESI negative

나) Capillary (V) : 4,000

다) Nebulizer (psi) : 40

라) Gas Temperature : 350 °C

마) Gas flow (L/min) : 10

물 질 명	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Dwell time(sec)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Chloramphenicol	321	152	0.05	95	16
	321	257	0.05	95	5
Thiamphenicol	354	185	0.05	110	17
	354	289	0.05	110	6
Florfenicol	356	185	0.05	95	12
	356	336	0.05	95	3

## 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, .375, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

## 6. 시험결과 분석

표준용액 10  $\mu$ L를 위의 분석 조건에 따라 LC-MS/MS로 분석하여 각 분석물질별 특이이온을 확인하고, 이온별 비율을 만족해야 한다. 시험용액 및 표준용액을 각각 질량분석기에 주입하여 아래표의 특이이온을 확인하고, 이온별 비율을 만족해야 한다. 각각에서 얻은 크로마토그램으로부터 머무름 시간을 비교하고  $m/z$  152, 185, 185 의 피크에 대한 평균면적으로 검량선을 작성하여 검체 중 클로람페니콜, 티암페니콜, 플로르페니콜의 함량을 구한다.

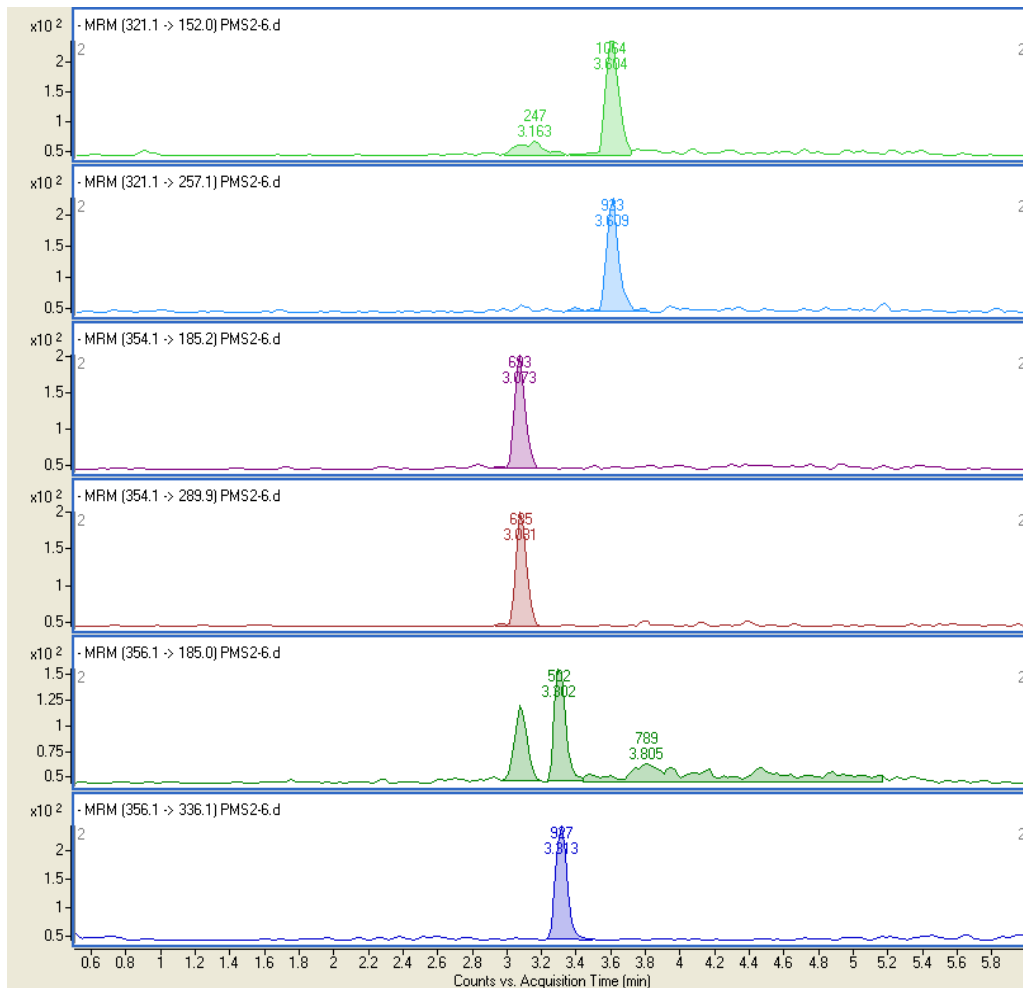


Fig 1. Mass chromatograms of Thiamphenicol, Florfenicol and chloramphenicol spiked at 2 ng/g.



### III. GC-MS를 이용한 DES 및 Zeranol 분석법

DES (Diethylstilbestrol)와 zeranol은 가축의 성장 촉진과 사료 효율의 개선을 위하여 주로 사용되는 성장 촉진 호르몬의 일종이다. DES는 내분비교란물질 가운데 처음 알려진 호르몬이나 발암성 등 안전성에 대한 논란으로 사용이 전면 금지되었다. Zeranol은 간에서 대사되어 주로 담즙으로 배설되는데 zeranol의 대사산물의 잔류는 간에서는 taleranol > zeranol > zearalenone의 순이며, 신장에서는 taleranol > zeranol 순으로 많고 근육에서는 zeranol > zearalenone 순으로 잔류하는 것으로 알려져 있다.

우리나라에서는 축산의 생산성 향상을 위하여 성장 촉진용 호르몬 물질로 estradiol, progesterone, zeranol의 사용을 허가하고 있으나, zeranol의 경우 쇠고기에서 2 ng/g의 잔류허용기준을 설정하고 있으며, DES는 식품 중 검출되어서는 아니 되는 물질에 포함되어 있다.

#### 1. 원리

이 방법은 GC-MS를 이용한 방법으로 식육 중 hormone 성분을 acetonitrile, 는 글리세라이드와 비극성물질을 제거하여 컬럼의 과부하를 막아 회수율을 높이며 동시에 3개의 극성 구분에 따라 성분들을 분획한다. Acetonitrile 추출액은 농축한 다음 알칼리화하여 강염기성 SPE cartridge를 사용하여 DES와 zeranol을 흡착시킨다. 이들 물질은 pH 12.0 이상에서 이 SPE cartridge에 강한 친화성을 갖는다. SPE cartridge의 간섭물질을 제거하기 위하여 5 % trichloroacetic acid로 세척한다. 이 과정에서 SPE cartridge에 흡착된 다량의 음이온성 간섭물질이 유출된다. SPE cartridge를 25 % methanol을 가하여 씻어내고 methanol을 사용하여 DES와 zeranol을 용출한 후 GC-MS로 분석한다.

#### 2. 측정기기 : 가스크로마토그래프-질량분석기

GC-MSD, Agilent 1100 series

### 3. 표준품 · 시약 및 기구

#### 가. 표준품 및 시약

- 1) 표준품 : Diethylstilbestrol (DES), zeranol
- 2) 내부표준물질 : D<sub>8</sub> DES (DES 내부표준물질),  
zearalane (zeranol 내부표준물질)
- 3) Acetonitrile, methanol, dichlormethane, hexane, isopropanol, ethyl acetate,  
acetic acid : HPLC grade
- 4) BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide) : Sigma 또는 이와 동등품
- 5) TMSI (N-trimethylsilylimidazole) : Sigma 또는 이와 동등품
- 6)  $\beta$ -Glucuronidase (100 000 unit ) : Sigma 또는 이와 동등품
- 7) Sodium acetate, NaOH, Trichloroacetic acid (TCA) : 시약특급

#### 나. 기구

- 1) Water bath
- 2) 50 mL centrifuge tube
- 3) Centrifuge
- 4) 강염기성 SPE cartridge : Sep-pak Accel QMA, vac 3 cc 또는  
이와 동등품
- 5) Vacuum manifold : J.T. Baker
- 6) Volumetric flask : 10, 50, 100 mL
- 7) Evaporator (Turbovap, LV)
- 8) Vortex mixer
- 9) 정밀저울 :  $\pm 0.0001$  g 정밀도
- 10) 일반저울 :  $\pm 0.01$  g 정밀도
- 11) Filter : Acrodisc 0.20, 0.45  $\mu$ m
- 12) 유리시험관 : 100×16 mm
- 13) Heating block

#### 4. 시험용액의 조제

##### 가. 표준용액

- 1) 표준원액(Stock solution) : Zeranol과 zeralene은 각각 20 mg을 취하고, DES와 D<sub>8</sub> DES는 10 mg 씩을 정밀히 달아 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol 20 mL에 잘 녹인 다음 methanol로 표시선까지 채워 잘 혼합한다 (zeranol과 zeralene 200 µg/mL과 DES와 D<sub>8</sub> DES 100 µg/mL).
- 2) 표준용액(Working solution) : Stock solution 각 100 µL씩을 100 mL 용량플라스크에 옮기고 methanol로 표시선까지 채운 다음 잘 혼합하여 표준용액으로 사용한다 (DES 및 D<sub>8</sub> DES 0.1 µg/mL, zeranol 및 zeralene 0.2 µg/mL).

##### 나. 시험용액

- 1) 0.04 M sodium acetate : Sodium acetate 3.28 g을 1 L 용량플라스크에 넣고 증류수로 용해한 후 눈금까지 채운다.
- 2) 2 N NaOH : NaOH 40 g을 물에 녹여 500 mL까지 물로 희석한다.
- 3) Isopropanol : MeOH (1:1, v/v) 혼합액  
Isopropanol 100 mL과 methanol 100 mL을 혼합하여 사용한다.

#### 5. 검사방법

##### 가. 시료전처리

- 1) 분쇄된 시료 5 g을 정밀히 달아 50 ml centrifuge tube에 취한다.
- 2) 제랄란과 D<sub>8</sub> DES 측정용 표준용액 50 µL씩 각각 시료에 가한다.
- 3) 0.04 M Sodium acetate 완충액 11 mL를 넣고 multi-mixdr로 15분간 진탕 혼합한다.
- 4) 위의 혼합물에 glacial acetic acid 6 방울을 가하여 pH를 4.25~4.75로 조정한다.
- 5) 표준곡선을 작성하기 위하여 DES와 zeranol이 함유되지 않은 표준시료 4개에 제랄란과 D<sub>8</sub>DES 측정용 표준용액을 50 µL씩 가한 다음 zeranol과 DES-MG 측정용 표준용액을 0, 25, 50, 100 µL씩 가한다.
- 6) β-glucuronidase 100 µL (약 10,000 단위) 씩 넣고 마개를 막아 10초 동안

잘 혼합한다.

- 7) 37 °C incubator에서 16~18 시간 (하룻밤) 동안 둔다.
- 8) 시험관을 incubator에서 꺼내어 acetonitrile을 16 mL 가한 다음 마개를 막고 5 분 동안 흔들어 준다.
- 9) 원심분리기에서 4,500 rpm으로 5 분간 원심분리한 후 상층액을 50 mL 유리시험관에 취한다.
- 10) Dichloromethane 2 mL, n-hexane 8 mL 를 가하여 마개를 막고 1 분 동안 흔들어서 혼합한다.
- 11) 위의 액을 4,000 rpm으로 3 분간 원심분리하여 중간의 acetonitrile 층을 다른 유리시험관으로 옮긴다.
- 12) 잔류물에 다시 acetonitrile 4 mL을 가하여 1 분간 흔들어서 혼합한 후 4,000 rpm으로 3 분간 원심분리한 다음 acetonitrile 층을 취하여 위의 11) 유리시험관에 합한다.
- 13) 시료농축기에서 질소하 농축 건조한다.
- 14) Isopropanol과 methanol 동량 혼합액 2 mL를 가하여 5 분간 정치한 후 vortex mixer를 이용하여 건조물을 용해한다.
- 15) 2 N NaOH 1.5 mL을 가하여 10 초간 혼합한 후 시료용액으로 사용한다.
- 16) 강염기성 SPE cartridge를 vacuum manifold에 장착한다.
- 17) 장착된 SPE cartridge는 3 mL methanol, 이어서 3 mL 증류수로 활성화 화시킨다.
- 18) 위의 15)의 시료 용액을 SPE cartridge에 서서히 통과시킨다.
- 19) Methanol 4 mL, 증류수 2 mL, 5 % TCA 3 mL 및 25 % methanol 2 mL의 순서대로 SPE cartridge를 세척한다.
- 20) Methanol 3 mL로 cartridge에 흡착되어 있는 DES와 zeranol를 용출시킨다.
- 21) 용출액을 55 °C에서 질소하 농축 건조시킨다.
- 22) 잔류물을 2 % TMSI가 혼합된 BSTFA 용액 20 µL을 가하여 trimethylsilyl 유도체를 만든 후 GC-MS로 분석한다.

#### 나. GC-MS 분석조건

- 1) Column : DB-5, 0.25µm, 0.259mm×15mm(Fused Silica Capillary column)
- 2) 주입구 : heat splitless , 275 °C

- 3) 캐리어 가스 : Helium 30 cm/sec
- 4) Source temp.: 250 °C
- 5) Interface temp.: 260 °C
- 6) 온도 프로그램 설정 : 100 °C 에서 1.5 분간 유지시킨 후 220 °C 까지는 1 분당 30 °C 씩 상승시키고 이후 290 °C까지는 1 분당 15 °C씩 상승시키고 나서 290 °C에서 7.5 분간 유지시킴
- 7) Ionization mode : Electron impact
- 8) Electron energy : 70 eV

<표 1> GC/MS에서의 분석치

물 질	retention time	물 질	Ions
cis DES	6.8	Zearalane	435
trans DES	7.2	Zranol	538, 523, 433, 379
Zearalane	8.5	D <sub>8</sub> DES	420
Zeranol	9.4	DES	412, 397, 383

## 6. 시험결과 분석

가. Peak 면적이나 높이를 계산한다.

나. 다음과 같은 Ion비율을 구한다.

Zeranol : 523/538, 433/538, 379/538

Cis-DES : 397/412      Trans-DES:383/412

다. 다음과 같이 내부표준물질에 대한 표준물질의 면적 혹은 높이비율을 구하여 표준곡선을 작성하기 위한 값을 구한다.

Zeranol = Ion 538, 523 및 433의 면적의 합/Ion 435의 면적 합

DES = Ion 412 cis 및 trans 면적의 합/Ion 420 cis 및 trans 면적의 합.

라. 다음 회귀방정식을 이용하여 표준물질의 농도에 따른 ion비를 구하여 표준곡선을 작성한다.

마. 제라놀의 확인은 특이 이온 433, 523, 538 이 함께 검출되어야 한다.

## III-1. 디에틸스틸베스트롤 잔류시험법

### 1. 원리

시료 중의 DES를 분해효소제( $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase)를 사용하여 조직에서 분해한 후 냉동 및 카트리지를 이용하여 지방 및 단백질을 제거한 후 유도체화 하여 가스크로마토그래프/질량분석기로 분석한다.

### 2. 분석기기 : 가스크로마토그래프/질량분석기

### 3. 표준품 및 시약

가. 표준품 : Diethylstilbestrol (DES), DES-D8 (내부표준물질로 사용)

나. 일반시약

- 1) Methanol, ethyl acetate : HPLC grade
- 2)  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase : 분해효소제로 사용
- 3) BSTFA(N, O-Bis(trimethyl)-trifluoroacetamide), TMSI (N-Trimethyl silylimidazole)  
: 유도체화 시약으로 사용
- 4) SPE cartridge : C8 SPE (500 mg, 6 mL), NH2 SPE (500 mg, 6 mL) 또는 이와 동등한 것

### 4. 시험용액의 조제

가. 표준용액 : DES 표준품을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100  $\mu\text{g/mL}$ 로 한다.

나. 표준용액 : 표준곡선을 작성하기 위하여 5가지 농도로 표준원액을 메탄올로 희석한 후 각각 시험관에 100  $\mu\text{L}$ 를 취하고 내부 표준물질 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 가한다. 이를 농축 및 건조시킨 시험관에 유도체화 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고 밀봉하여 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 반응시킨 후 원심분리하여 상층액을 각각의 표준용액으로 한다.

다. 내부 표준물질 표준원액 : DES-d8 표준품을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100  $\mu\text{g/mL}$ 로 한다.

라. 내부 표준물질 용액 : 내부 표준물질 표준원액을 메탄올로 희석하여 100  $\mu\text{g/L}$ 가 되도록 한다.

마. 유도체화용액 : BSTFA와 TMSI의 혼합액 (98 : 2, v/v)

## 5. 검사방법

### 가. 시료전처리

- 1) 균질화 한 시료 5 g을 50 mL 원심 분리관에 취하고 증류수 5 mL를 가한 후 microwave로 30초간 추출한다.
- 2) 이 추출액에 분해효소제 80  $\mu$ L를 가하고 균질화시켜 인큐베이터에 넣고 52℃에서 15시간 이상 반응시킨다.
- 3) 실온으로 냉각한 후 내부 표준물질 용액 100  $\mu$ L와 메탄올 30 mL 가한 후 20분간 초음파 추출한다.
- 4) 이 추출용액을 -20℃의 냉동고에 30분 이상 넣어두어 지질을 응고시킨 후 상층액을 취한다. 이 때 석출된 지방질을 거름종이로 제거하고 용기를 메탄올로 씻어 준다.
- 5) 상층액과 세척액을 합한 후 40℃에서 감압 농축하여 메탄올을 휘발시킨다.
- 6) 미리 메탄올 5 mL와 증류수 5 mL로 활성화시킨 C8 SPE cartridge에 농축 후 남은 액을 10% 메탄올 용액 15 mL에 녹여 흡착시킨다.
- 7) 증류수 5 mL로 용기와 카트리지를 세척하여 버리고 메탄올 5 mL로 용출시킨다.
- 8) 용출액을 60℃에서 질소로 농축시킨 후 ethyl acetate : methanol (80 : 20, v/v/) 혼합용액 2 mL에 녹여 추출액으로 한다.
- 9) 미리 포화에틸아세테이트 5 mL와 ethyl acetate : methanol (80:20) 혼합용액 5 mL로 활성화시킨 NH2 SPE 카트리지에 추출액을 흡착시키고 에틸아세테이트 : 메탄올 (80 : 20, v/v) 혼합용액 6 mL로 용출시킨다.
- 10) 용출액을 60℃에서 질소로 농축시키고 완전히 농축시킨 시험관에 유도제화 용액 100  $\mu$ L를 넣고 밀봉한 후 60℃에서 20분간 반응시킨다. 반응액을 4,000 G에서 5분간 원심분리하고 상층액을 취하여 0.2  $\mu$ m filter로 여과한 후 시험용액으로 한다.

### 나. 분석조건

#### 1) 기체크로마토그래프 조건

- 가) 칼럼 : Ultra 2, DB 5(5%-phenyl-methylpolysiloxane)(50 m  $\times$  0.2 mm, 0.33  $\mu$ m) 또는 이와 동등한 것
- 나) 캐리어가스 및 유량 : 헬륨, 1 mL/분
- 다) 시료주입부 : Split(5:1)

라) 주입부온도 : 280℃

마) 오븐온도 : 초기온도 160℃에서 10℃/min 비율로 270℃까지 승온한 후 10분간 유지하고 5℃/min 비율로 315℃까지 승온한 후 10분간 유지

바) 시료주입량 : 1 µL

## 2) 질량분석기 조건

가) 이온 mode : EI

나) 이온에너지 : 70 eV

다) Interface 온도 : 350℃

라) SIM ion : m/z 412 (DES), m/z 420 (DES D8)

## 다. 표준곡선 작성

표준용액 working solution (1 µg/mL)을 각각의 10 mL 용량플라스크에 4, 2, 1, 0.5, 0.25 mL씩 취하고 증류수로 표시선까지 채워 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 µg/mL으로 희석한다. 5개 농도의 희석된 표준용액을 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

## 6. 시험결과 분석

유도체화한 시험용액 및 표준용액을 질량분석기에 주입한 후, 각각에서 얻은 크로마토그램으로부터 머무름 시간을 비교하여 내부표준물질 DES D8의 Cis 및 Trans 피이크 면적 또는 높이의 합에 대한 DES의 Cis 및 Trans 피이크 면적 또는 높이의 합의 비를 구하여 검량선을 작성하여 검체 중 DES의 함량을 구한다.

※ 시험용액 중 디에틸스틸베스트롤의 함량

$$= \frac{\text{이온 412의 Cis 및 Trans 피이크 면적 또는 높이의 합}}{\text{이온 420의 Cis 및 Trans 피이크 면적 또는 높이의 합}}$$

정량한계 : 0.5 µg/kg



## IV. 디메트리다졸, 메트로니다졸, 로니다졸 동시 분석법

### 1. 원리

시료에 ethyl acetate를 가하여 추출하고 감압농축한 후 HPLC-UVD 또는 LC-MS/MS로 분석한다.

2. 측정기기 : 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기 (HPLC-UVD) 또는 LC-MS/MS (Triple-quadrupole mass spectrometer)

### 3. 표준품 · 시약

#### 가. 표준품 및 시약

- 1) 표준품 : Dimetridazole, ronidazole, metronidazole
- 2) Acetonitrile, ethyl acetate, methanol, hexane : HPLC grade
- 3)  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  : 시약특급
- 4) 증류수 : 18 M $\Omega$  이상

### 4. 시험용액의 제조

#### 가. 표준용액

- 1) 표준원액(Stock solution) : 디메트리다졸, 메트로니다졸 및 로니다졸 표준품을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 한다.
- 2) 표준용액(working solution) : 표준원액을 25% Acetonitrile에 적당한 농도로 희석하여 사용한다.

나. Spike sample 조제 : 균질화한 시료 5g에 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도의 표준용액을 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 0.02  $\mu\text{g}/\text{g}$  농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

다. 0.05 M 인산완충용액 (pH 7.0) : 1 L 플라스크에  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  5.75 g을 넣고 물로 표시선까지 채운다.

## 5. 검사방법

### 가. 시료전처리

- 1) 균질화한 시료 5 g을 50 mL 원심분리관에 취하고 ethyl acetate 20 mL을 넣어 균질화한 후 5,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리한다.
- 2) 상층인 ethyl acetate 층을 취하여 40℃ 이하의 수욕 중에서 감압하여 농축한 후 잔류물을 증류수 1 mL에 녹이고 0.2 µm 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

### 나. 분석조건

#### 1) HPLC 분석 조건

- 가) 칼럼 : C18(4.6×250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상 : 0.05 M 인산완충용액 : acetonitrile (88:12, v/v)
- 다) 유속 : 1.0 mL/min
- 라) 측정파장 : UV 312 nm

#### 2) LC-MS/MS 분석 조건

##### (1) HPLC 분석조건

- 가) 컬럼 : Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.8 µm) 또는 동등품
- 나) 이동상 : (A) 0.1 % formic acid in DW (B) acetonitrile (gradient)

Time (min)	% A	% B	Flow rate (mL)
0.0	95	5	0.25
1.0	95	5	0.25
5.0	50	50	0.25
7.0	50	50	0.25
7.5	95	5	0.25
12.0	95	5	0.25

다) 칼럼온도 : 40℃

라) 주입량 : 10 µL

##### (2) 질량분석기 분석조건

- 가) Ionization : ESI positive
- 나) Capillary (V) : 4,000
- 다) Nebulizer (psi) : 40
- 라) Gas Temperature : 325 °C
- 마) Gas flow (L/min) : 12

물질명	Precursor ion (m/z)	Product ion(m/z)	Dwell time(msec)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Dimetridazole	142.1	96.1	100	90	15
		81.1	100	90	25
Metronidazole	172.1	128.1	100	90	10
		82.1	100	90	25
Ronidazole	201.1	140.1	100	90	10
		55.1	100	90	20

#### 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준 물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

#### 6. 시험결과 분석

시험용액 및 표준용액을 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입한다. 얻어진 각 피크의 머무름 시간을 비교하여 피크의 높이 또는 면적으로 검량선을 작성하여 검체중 디메트리다졸, 메트로니다졸 및 로니다졸의 함량을 각각 구한다.

- 정량한계(0.02 mg/kg)

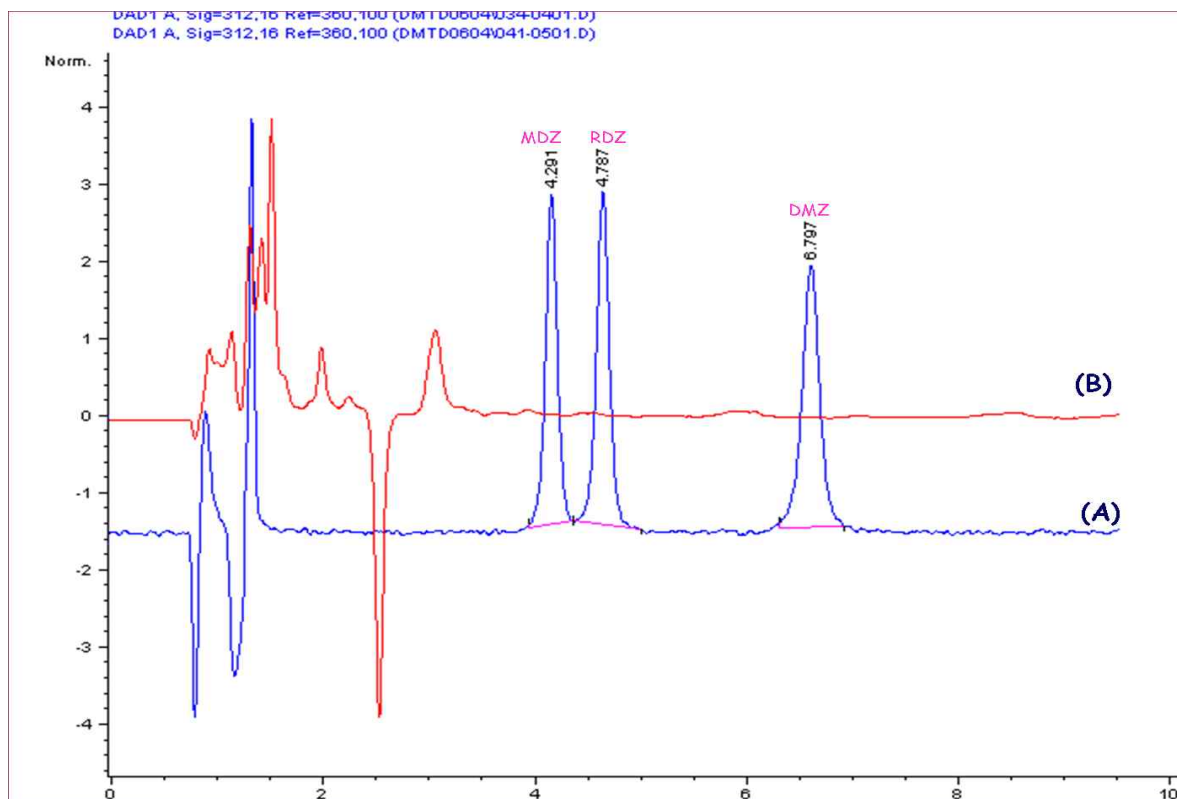


Fig. 1. HPLC chromatogram of metronidazole (MDZ), ronidazole (RDZ), and dimetridazole (DMZ) standards at 20 ng/mL (A), and blank sample (B).

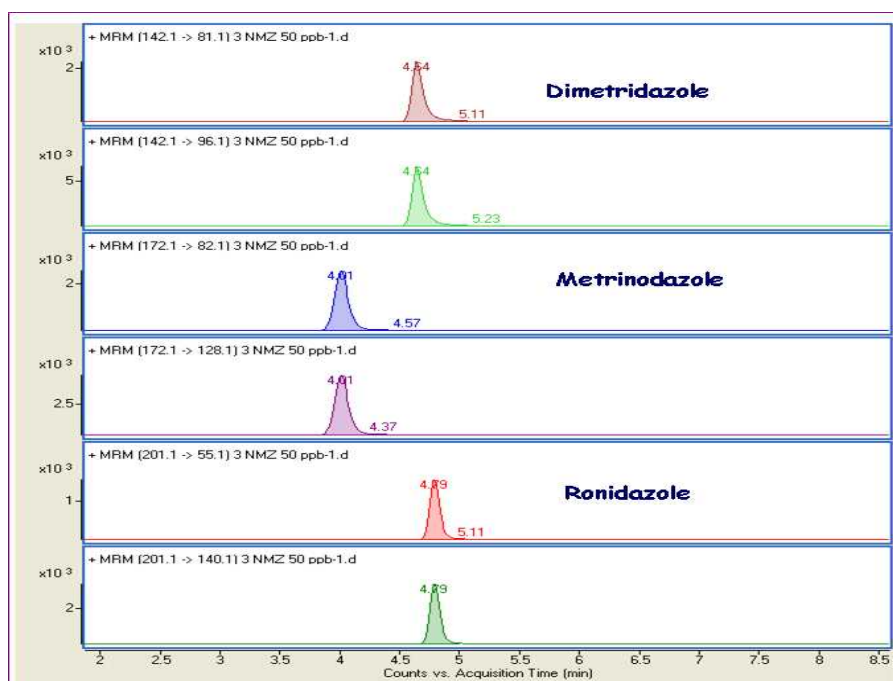


Fig. 2. LC-MS/MS chromatogram of metronidazole, ronidazole, and dimetridazole standards at 50 ng/mL.

## V. 클렌부테롤 (Clenbuterol) 및 락토파민 (Ractopamine) 동시 분석법

### 1. 원리

Clenbuterol과 ractopamine을 동시분석하기 위하여 시료를 강산 용액으로 가수분해한 후 pH 12.0으로 조절하여 ethyl acetate로 추출하여 0.1 % formic acid로 용해한 다음 여과하여 LC-MS/MS로 분석한다.

### 2. 분석기기 : 액체크로마토그래피-질량분석기 (LC-MS/MS)

### 3. 표준품 및 시약

가. 표준품 : clenbuterol, clenbuterol-D9 (내부표준물질로 사용), ractopamine

나. Acetonitrile, ethyl acetate, heptane, hexane, methanol : HPLC grade

### 4. 시험용액의 제조

#### 가. 표준용액

1) 표준원액(Stock solution) : 각각의 표준품을 정밀히 달아 methanol에 녹여 100 µg/mL로 한다. 50 % methanol에 녹여도 된다.

2) 표준용액(working solution) : 표준원액을 메탄올로 희석하여 10 ng/mL로 한다.

나. 내부표준용액 : 클렌부테롤-D9의 10 ng/mL 메탄올용액으로 한다.

다. 0.4 N perchloric acid (pH 1.0 이하임) : 70~73 % perchloric acid를 사용하여 조제함, 분자량 100.46함. perchloric acid 28.7 g (mL이 아님. 비중이 높으니 반드시 칭량해서 사용할 것)을 증류수 500 mL에 희석하여 사용

라. Spike sample 조제 : 균질화한 시료 5g에 10ng/mL 농도의 표준용액을 150 µL를 첨가하여 0.3 µg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

### 5. 검사방법

#### 가. 시료전처리

가) 균질화한 시료 5 g을 50 mL 원심분리관에 취하여 내부표준용액 400 µL를 넣는다(4 ng/mL의 농도임).

- 나) 0.4 N perchloric acid 20 mL을 넣고 15분간 진탕혼합한 후, 5,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심 분리한다.
- 다) 상층액을 모으고 5 M NaOH로 pH 12로 조절한다. (약 1.5 mL 소요)
- 라) 10 mL ethyl acetate를 넣어 10분간 진탕혼합한 후 5,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심 분리하여 상층액인 ethyl acetate를 모은다. 이 과정을 2번 반복한다.
- 마) 45℃, 질소하 농축하고 1 mL 0.1 % formic acid로 녹이고 여과하여 분석한다.

## 나. 분석조건

### 1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.8 μm) 또는 동등품

나) 이동상 : (A) 0.1 % formic acid in DW (B) acetonitrile (gradient)

Time (min)	% A	% B	Flow rate (mL)
0.0	95	5	0.25
1.0	95	5	0.25
7.0	20	80	0.25
10.0	0	100	0.25
11.0	95	5	0.25
20.0	95	5	0.25

다) 칼럼온도 : 40℃

라) 주입량 : 10 μL

### 2) 질량분석기 분석조건

가) Ionization : ESI positive

나) Capillary (V) : 4,000

다) Nebulizer (psi) : 40

라) Gas Temperature : 325 °C

마) Gas flow (L/min) : 12

물질명	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time(msec)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Clenbuterol	277	203	50	90	20
		132	50	90	10
Clenbuterol-D9	286	204	50	90	10
		268	50	90	5
Ractopamine	302	107	50	110	30
		164	50	110	10

## 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 ng/mL의 농도로 혼합표준용액과 4.0 ng/mL 농도로 내부표준물질을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

## 6. 시험결과 분석

시험용액 및 표준용액을 각각 질량분석기에 주입하여 물질별 특이이온을 확인한다. 이후, 각각에서 얻은 크로마토그램으로부터 물질별 머무름시간을 비교하고 내부표준물질의 정량이온 면적에 대한 각 물질별 정량이온 면적비를 가지고 농도를 계산한다.

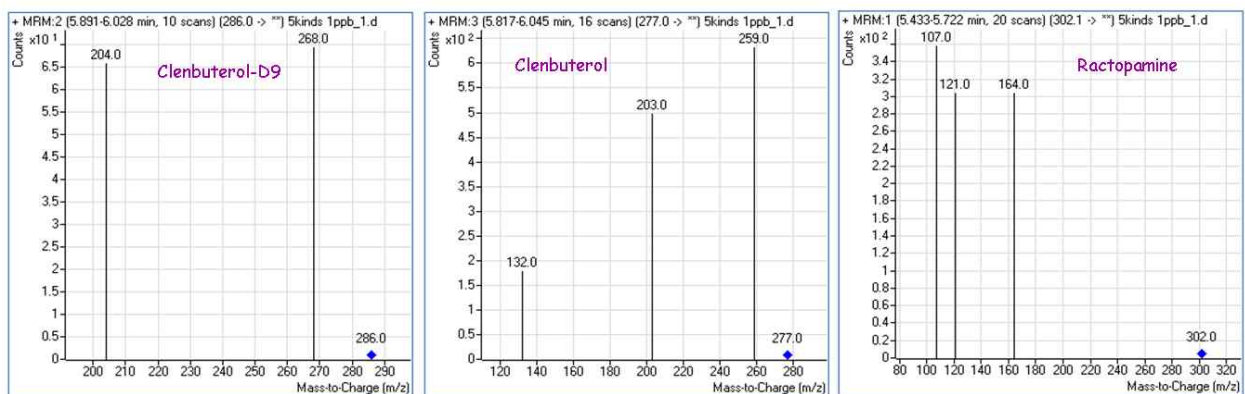


Fig. 1. Full scan electrospray mass spectra and product ion mode spectra of clenbuterol and ractopamine.

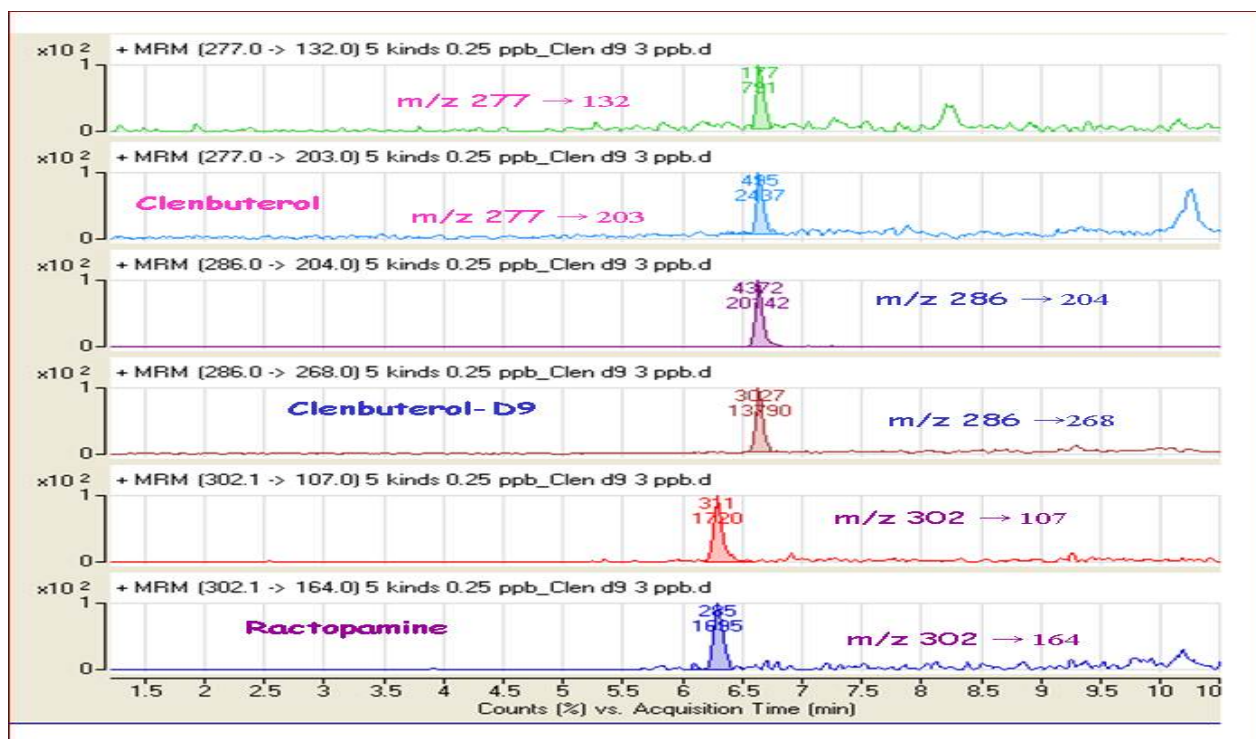


Fig. 2. Chromatograms of clenbuterol and ractopamine residues in bovine liver spiked 0.25 ng/g.



## VI. 반코마이신(Vancomycin) 잔류시험법

### 1. 원리

시료 중의 vancomycin을 20% acetonitrile로 추출하고 SPE (Solid Phase Extraction) 칼럼으로 정제하여 LC-MS/MS로 분석한다.

### 2. 분석기기 : 액체크로마토그래프/ 질량분석기

### 3. 표준품 및 시약

가. 표준품 : vancomycin

나. Acetonitrile, methanol, hexane : HPLC grade

다. Ammonium hydroxide, formic acid : 시약특급

라. SPE cartridge : X-C(styrene-divinylbenzene polymer surfaced with a strong cation exchanger group) 또는 MCX(Mixed Mode Cation Exchange) 칼럼 카트리지(60 mg, 3 mL) 또는 이와 동등한 것- 강 양이온성 칼럼에 해당됨

### 4. 시험용액의 조제

가. 표준원액(stock solution) : Vancomycin 표준품을 정밀히 달아 증류수에 녹여 100 µg/mL로 한다.

나. 표준용액(working solution) : 표준원액을 25% Acetonitrile에 100ng/mL 농도로 희석하여 사용한다.

다. Spike sample 조제 : 균질화한 시료 5g에 100ng/mL 농도의 표준용액을 50 µL를 첨가하여 1 ng/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

### 5. 검사방법

#### 가. 시료전처리

- 1) 균질화한 시료 5 g을 50 mL 원심 분리관에 취하고 20% acetonitrile 15 mL를 가한 후 20분간 균질화한 후, 7,600 G에서 10분간 원심분리하고 상층액을 50 mL 원심 분리관에 옮긴다.

- 2) 남은 액에 20% acetonitrile 10 mL를 가하여 위의 과정을 반복한 후 상층액을 합한다.
- 3) 이 상층액에 hexane 10 mL를 가하고 10분간 균질화한 후, 7,600 G에서 원심분리하고 하층액을 취한다.
- 4) 위의 과정을 반복하여 하층액을 합하여 추출액으로 한다.
- 5) 미리 메탄올 3 mL와 증류수 3 mL 그리고 0.1% formic acid 3 mL로 활성화시킨 X-C 카트리지에 추출용액을 흡착시킨다.
- 6) 증류수 3 mL로 카트리지를 세척하여 버리고 메탄올 : 수산화암모늄 (97 : 3) 혼합용액 3 mL로 용출시킨다.
- 7) 용출액을 50℃에서 질소로 농축시킨 시험관에 증류수 1 mL를 넣고 녹인 후 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

## 나. 분석조건

### 1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.8 µm) 또는 동등품

나) 이동상 : (A) 0.1 % formic acid in DW (B) acetonitrile (gradient)

Time (min)	% A	% B	Flow rate (mL)
0.0	95	5	0.25
1.0	95	5	0.25
7.0	20	80	0.25
7.5	95	5	0.25
13	95	5	0.25

다) 칼럼온도 : 40℃

라) 주입량 : 10 µL

### 2) 질량분석기 분석조건

가) Ionization : ESI positive

나) Capillary (V) : 4,000

다) Nebulizer (psi) : 40

라) Gas Temperature : 325 °C

마) Gas flow (L/min) : 12

물질명	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Dwell time(sec)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Vancomycin	725	144	0.2	110	10
	725	1305	0.2	110	10

#### 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

#### 6. 시험결과 분석

표준용액과 시험용액을 각각 질량분석기에 주입하여 물질의 특이이온을 확인한다. 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 비교하고, 반코마이신은  $m/z$  144 이온에 대한 면적을 구하고 검량선을 작성하여 검체 중 반코마이신의 함량을 구한다.

정량한계 : 1 ng/g

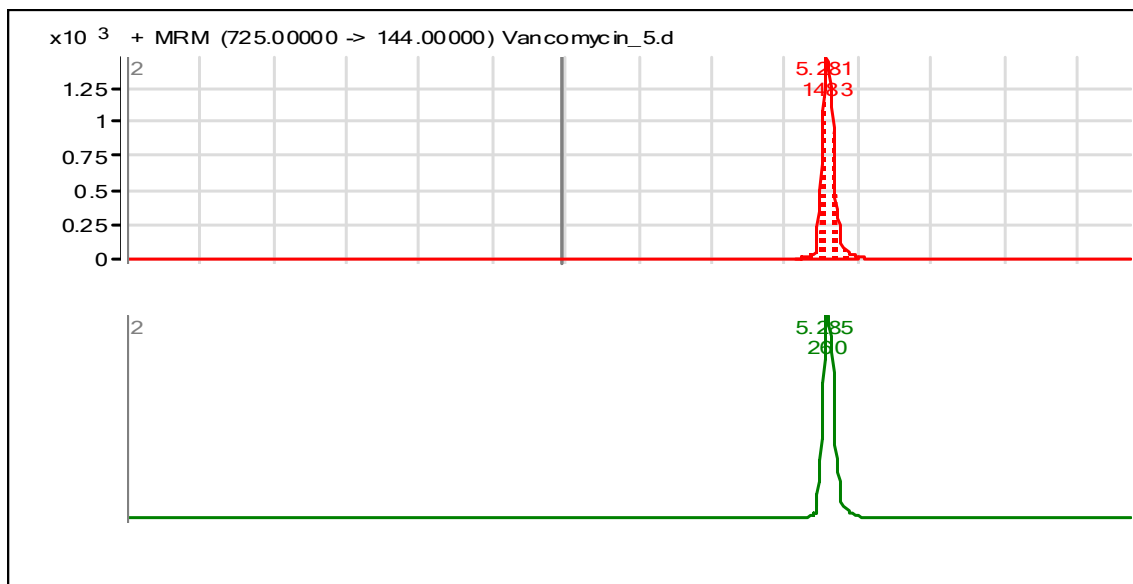


Fig. 1. LC-MS/MS chromatogram of vancomycin standards at 1 ng/mL.

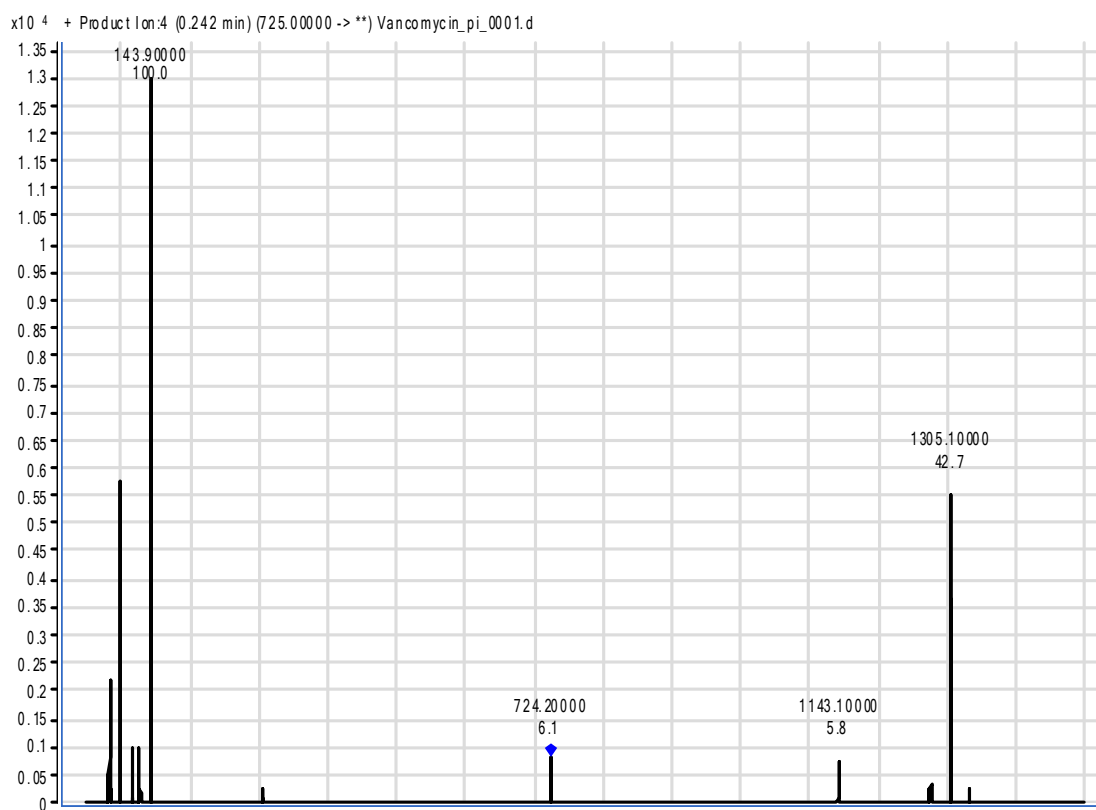


Fig. 2. Vancomycin spectrum.

## VII. 클로르프로마진, 피리메타민, 콜치신 동시 잔류시험법

### 1. 원리

시료 중의 chlorpromazine, pyrimethamine, colchicine을 ethyl acetate로 추출하고 농축한 후 여과하여 LC-MS/MS로 분석한다.

### 2. 측정기기

액체크로마토그래피-질량분석기

LC-MS/MS (Waters<sup>®</sup> Micromass<sup>®</sup> Quattro micro<sup>™</sup> API  
triple-quadrupole mass spectrometer)

### 3. 시험용액 조제

#### 가. 표준용액

- 1) **표준 원액 (Stock solution)** : 각 표준물질 10 mg을 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol로 용해한 후 표시선까지 채워 4 °C 냉장 보관한다 (100 µg/mL).
- 2) **표준 용액 (Working solution)**
  - 가) 1 단계 working solution : Stock solution을 메탄올로 100배 희석하여 사용한다 (1 µg/mL).
  - 나) 2 단계 working solution : 1단계 working solution을 증류수로 100배 희석하여 사용한다(10 ng/mL).

**나. Spike sample 조제** : 균질화한 시료 2g에 10 ng/mL 농도의 표준용액을 100 µl를 첨가하여 0.5 ng/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

### 4. 검사방법

#### 가. 시료전처리

- 1) 균질화 된 시료 2 g에 증류수 2 mL를 넣고 multi-mixer로 15 분간 진탕 혼합한다.
- 2) Ethyl acetate 10 mL를 50 mL centrifuge tube에 넣고 multi-mixer로 15 분간 진탕 혼합한다.
- 3) -4 °C, 5,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 유리시험관에 모은다.

- 4) 남은 잔사에 ethyl acetate 10 ml를 넣고 위의 2)와 3)의 과정을 반복하여 상층액을 합한다.
- 5) 모아진 상층액을 40 °C, 질소하 농축 건조한다.
- 6) 농축된 시료에 25 % methanol 1 mL을 넣어 완전 용해한 후 초음파에 10분간 방치한다.
- 7) 상층액을 취하여 eppendorf tube에 넣는다.
- 8) -4 °C, 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리하고 상층액을 취하여 0.20 µm filter 로 여과한 후 LC-MS/MS로 분석한다.

## 나. 분석조건

### 1) HPLC 분석조건

- 가) 컬럼 : XBridge C<sub>18</sub> (2.1 × 150 mm, 3.5µm) 또는 동등품
- 나) 이동상 : 0.1 % formic acid in DW(A), 0.1 % formic acid in ACN (B)
- 다) 유속 : 0.25 mL/min
- Gradient 조건

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL)
0.00	90	10	0.25
1.00	90	10	0.25
10.00	20	80	0.25
10.10	90	10	0.25
15.0	90	10	0.25

### 2) 질량분석기 분석조건

- Electrospray ionization positive mode

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time(s)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(eV)
Pyrimethamine	249.02	177.05	0.2	25	30
		233.13	0.2	25	30
Colchicine	400.05	310.17	0.2	30	27
		326.16	0.2	30	25
		358.16	0.2	30	25
Chlorpromazine	319.05	57.89	0.2	20	23
		86.15	0.2	20	20

#### 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

#### 5. 시험결과 분석

표준용액 10  $\mu$ L를 위의 분석 조건에 따라 LC-MS/MS로 분석하여 각 분석물질별 특이이온을 확인한다. 시료용액 분석에서 얻은 크로마토그램에서 각 물질에 대하여 주요 이온이 일치되는 대사물질 피크에 대한 평균면적을 구한 다음 표준곡선 좌표의 Y 축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 표준곡선상 만나는 점에서 수직으로 X 축과 만나는 점이 시료용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시료용액의 희석배수 (건조물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료 무게로 나누어 최종 시료 중 각 대사물질의 농도를 산출한다.

#### 6. 물질별 정량한계

가. 클로르프로마진 : 1 ng/g

나. 콜치신 : 1 ng/g

다. 피리메타민 : 0.5 ng/g

## VIII. 티오우라실 (Thiouracil) 잔류시험법

사용금지 동물약품 12 항목에 thiouracil이 포함되어 미국 FSIS(Food Safety and Inspection Service)의 잔류시험법을 사용하고 있음

### 1. 원리

시료 중의 thiouracil을 acetonitrile로 추출하고 SPE (Solid Phase Extraction) 칼럼으로 정제하여 LC-MS/MS로 분석한다.

### 2. 분석기기 : 액체크로마토그래프/질량분석기

### 3. 표준품 및 시약

가. 표준품 : 6-phenyl-2-thiouracil 6-methyl-2-thiouracil, 6-propyl-2-thiouracil 및 2-thiouracil

나. Acetonitrile, methanol, dichloromethane : HPLC grade

다. Formic acid : 시약특급

라. SPE cartridge : SPE용 Silica gel 카트리지(500 mg, 10 mL)에 무수황산나트륨 (sodium sulfate) 1 g을 가한 것 또는 이와 동등한 것

### 4. 시험용액의 조제

가. 표준원액(Stock solution) : 2-thiouracil, 6-methyl-2-thiouracil, 6-propyl-2-thiouracil 및 6-phenyl-2-thiouracil 표준품을 각각 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100 µg/mL로 한다.

나. 표준용액(Working solution) : Stock solution을 메탄올로 100배 희석하여 사용한다 (1 µg/mL).

다. Spike sample 조제 : 균질화한 시료 5g에 1µg/mL 농도의 표준용액을 100 µl를 첨가하여 0.02 µg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

### 5. 검사방법

#### 가. 시료전처리

1) 균질화 한 시료 5 g을 50 mL 원심 분리관에 취하고 acetonitrile 10 mL를 가한 후 5분간 균질화 한다.



- 2) 균질화한 용액을 3,000 G에서 5분간 원심분리하고 상등액 중 5 mL를 취하여 시험관에 옮긴 후 이를 60℃ 이하에서 질소 농축한다.
- 3) Dichloromethane 0.5 mL에 충분히 녹인 후 5분간 초음파 추출한다.
- 4) 이 추출액을 Dichloromethane 2 mL로 미리 활성화시킨 무수황산나트륨 함유 silica gel SPE cartridge에 흡착시키고 dichloromethane 0.5 mL로 추출액을 담았던 시험관에 가하여 초음파 추출하여 카트리지에 흡착시킨다.
- 5) 추출액이 흡착된 카트리지를 dichloromethane 2 mL로 씻어주고, 시험관에 다시 methanol : dichloromethane (25 : 75, v/v) 혼합용액 2 mL를 가하고 1분간 초음파 추출한 용액으로 용출한다.
- 6) 용출액을 60 ℃ 이하에서 질소 농축하고 methanol 200 µL와 0.1 % formic acid 400 µL를 가하여 충분히 녹인 후 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

#### 나. 분석조건

##### 1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.8 µm) 또는 동등품

나) 이동상 : (A) 0.1 % formic acid in DW (B) acetonitrile (gradient)

Time (min)	% A	% B	Flow rate (mL)
0.0	95	5	0.2
3.0	95	5	0.2
10.0	30	70	0.2
11.0	95	5	0.2
15.0	95	5	0.2

다) 칼럼온도 : 40℃

라) 주입량 : 10 µL

##### 2) 질량분석기 분석조건

가) Ionization : ESI positive

나) Capillary (V) : 4,000

다) Nebulizer (psi) : 40

라) Gas Temperature : 325 ℃

마) Gas flow (L/min) : 12

물 질 명	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Dwell time(sec)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)
6-phenyl-2-TU	205	188	0.1	110	15
	205	146	0.1	110	15
6-propyl-2-TU	171	154	0.1	110	20
	171	112	0.1	110	20
6-methyl-2-TU	143	126	0.1	110	15
	143	84	0.1	110	15
2-thiouracil	129	112	0.1	90	15
	129	84	0.1	90	25

#### 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

## 6. 시험결과 분석

시험용액 및 표준용액을 각각 질량분석기에 주입하여 물질별 특이이온을 확인한다. 이후, 각각에서 얻은 크로마토그램으로부터 머무름시간을 비교하고 각각의 피크에 대한 평균면적으로 검량선을 작성하여 시험용액 중 2-thiouracil, 6-methyl-2-thiouracil, 6-propyl-2-thiouracil 및 6-phenyl-2-thiouracil의 함량을 각각 구한다. 각각의 함량을 합하여 검체 중 thiouracil의 함량으로 한다.

정량한계 : 0.025 mg/kg

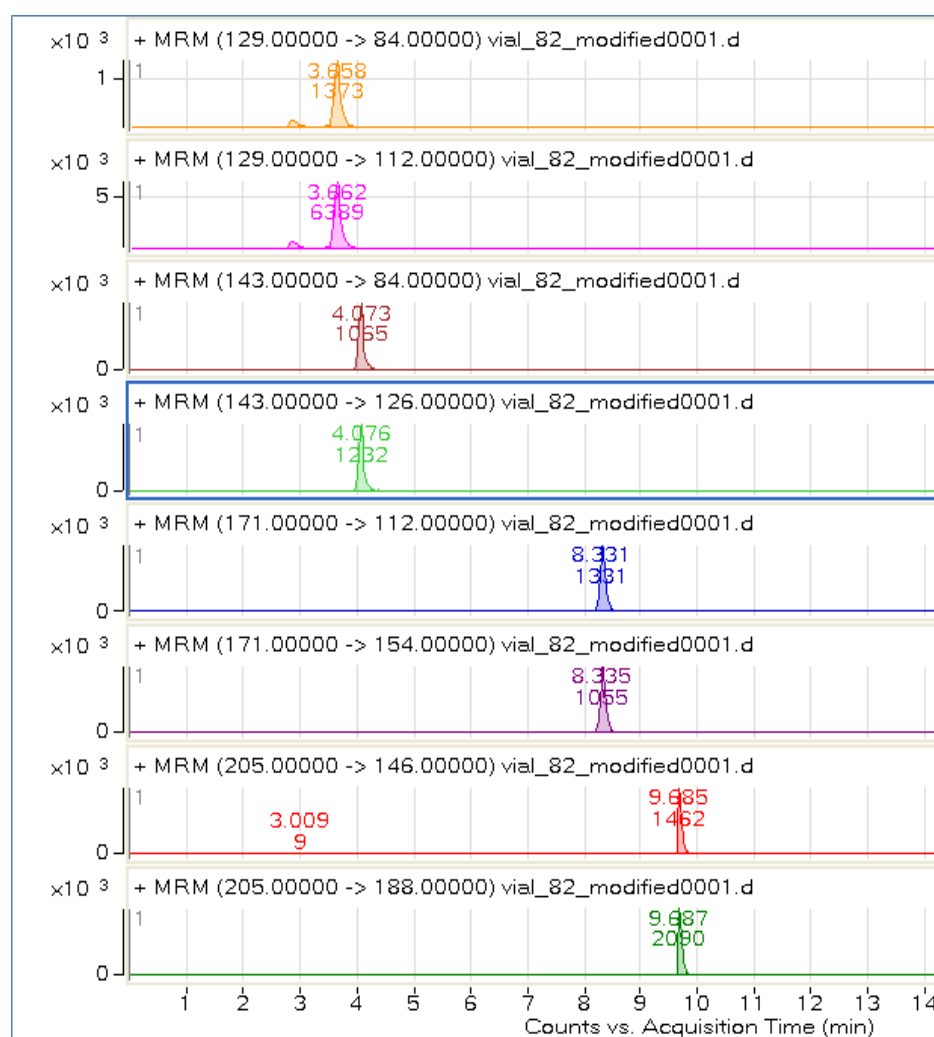


Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms of 4 thiouracil

## IX. 메드록시프로게스테론 아세테이트 잔류시험법

### 1. 원리

시료 중의 medroxyprogesterone acetate를 acetonitrile로 추출하여 LC-MS/MS로 분석한다.

### 2. 측정기기

액체크로마토그래피-질량분석기

LC-MS/MS (Waters<sup>®</sup> Micromass<sup>®</sup> Quattro micro<sup>™</sup> API  
triple-quadrupole mass spectrometer)

### 3. 시험용액 조제

#### 가. 표준용액

1) **표준 원액 (Stock solution)** : 표준물질 10 mg을 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol로 용해한 후 표시선까지 채워 4 °C 냉장 보관한다 (100 µg/mL).

#### 2) **표준 용액 (Working solution)**

가) 1 단계 working solution : Stock solution을 메탄올로 100배 희석하여 사용한다 (1 µg/mL).

나) 2 단계 working solution : 1단계 working solution을 증류수로 10배 희석하여 사용한다(100 ng/mL).

나. **Spike sample 조제** : 균질화한 시료 2g에 100 ng/mL 농도의 표준용액을 100 µl를 첨가하여 5 ng/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

### 4. 검사방법

#### 가. 시료전처리

1) 시료 2 g을 칭량하여 50 mL 원심튜브에 취한 후 DW 1 mL를 가해 약 2분간 균질화하고 10분간 초음파에 방치한 후 다시 2분간 혼합하고 추출액인 acetonitrile을 8 mL 넣고 혼합한 후 5 000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 새 원심튜브에 취한다.

- 2) 남은 잔사에 추출액 5 mL를 넣고 재혼합한 후 원심분리하여 상층액을 합한다.
- 3) 합해진 상층액에 hexane 5 mL를 가하고 약 2분간 vortexing 후, 5,000rpm에서 5분간 원심한 후 hexane층은 버리고 유리튜브에 하층인 추출액만 취하여 50 °C에서 질소하에서 농축건조시킨다.
- 4) 50 % MeOH 1 mL를 가한 뒤 초음파 세척기에서 10분간 방치하여 완전히 용해시킨다.
- 5) 위의 혼합액을 -4°C, 15,000 rpm, 15 min 동안 원심분리하여 맑은 상층만 취하여 0.2 µm nylon filter로 여과한 후 LC-MS/MS로 분석한다.

## 나. 분석조건

### 1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : XBridge C<sub>18</sub> (2.1 × 150 mm, 3.5µm) 또는 동등품

나) 이동상 : 0.1 % formic acid in DW(A), 0.1 % formic acid in ACN (B)

다) 유속 : 0.25 mL/min

- Gradient 조건

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL)
0.00	60	40	0.25
1.00	60	40	0.25
10.00	10	90	0.25
11.0	60	40	0.25
15.0	60	40	0.25

### 2) 질량분석기 분석조건

- Electrospray ionization positive mode

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time(s)	Cone Voltage(V)	Collision Energy(eV)
MPA	387.2	327.15	0.2	20	15
		123.20	0.2	20	22
		285.30	0.2	20	20

## 2) 질량분석기 조건

가) Ionization : ESI (positive)

나) Capillary Temperature : 350 °C

다) Collision gas : Ar

## 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

## 6. 시험결과 분석

표준용액과 시험용액을 각각 질량분석기에 주입하여 아래표의 특이이온을 확인한다. 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 비교하고, m/z 327 이온에 대한 면적을 구하고 검량선을 작성하여 검체 중 medroxyprogesterone acetate의 함량을 구한다.

정량한계 : 5 ng/g

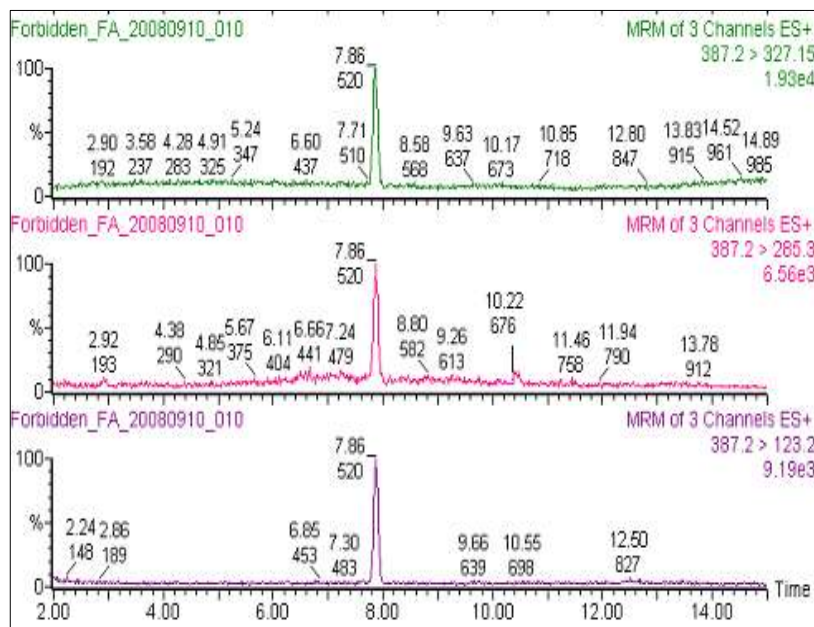


Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms of MPA in spiked pork muscle at 10 ng/g.

## X. 아자페론, 카라졸롤 잔류시험법

### 1. 원리

시료 중의 azaperone, carazolol을 acetonitrile로 추출하여 LC-MS/MS로 분석한다.

### 2. 측정기기

액체크로마토그래피-질량분석기

Agilent, US/6410 triple-quadrupole mass spectrometer

### 3. 시험용액 조제

#### 가. 표준용액

1) 표준 원액 (Stock solution) : 표준물질 10 mg을 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol로 용해한 후 표시선까지 채워 4 °C 냉장 보관한다 (100 µg/mL).

2) 표준 용액 (Working solution)

가) 1 단계 working solution : Stock solution을 메탄올로 100배 희석하여 사용한다 (1 µg/mL).

나) 2 단계 working solution : 1단계 working solution을 증류수로 100배 희석하여 사용한다(10 ng/mL).

나. Spike sample 조제 : 균질화한 시료 2g에 1 µg/mL 농도의 표준용액을 100 µL를 첨가하여 0.05 µg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

### 4. 검사방법

#### 가. 시료전처리

1) 시료 2 g을 칭량하여 50 mL 원심튜브에 취한 후 DW 1 mL를 가해 약 2분간 균질화하고 10분간 초음파에 방치한 후 다시 2분간 혼합하고 추출액인 acetonitrile을 8 mL 넣고 혼합한 후 5 000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 새 원심튜브에 취한다.

2) 남은 잔사에 추출액 5 mL를 넣고 재혼합한 후 원심분리하여 상층액을 합한다.

- 3) 합해진 상층액을 50 °C에서 질소하에서 농축건조시킨다.
- 4) 50 % ACN 1 mL를 가한 뒤 초음파 세척기에서 10분간 방치하여 완전히 용해시킨다.
- 5) 위의 혼합액을 -4°C, 15,000 rpm, 15 min 동안 원심분리하여 맑은 상층만 취하여 0.2 µm nylon filter로 여과한 후 LC-MS/MS로 분석한다.

## 나. 분석조건

### 1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : Agilent Eclipse plus C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.8 µm) 또는 동등품

나) 이동상 A: 5mM Ammonium Formate, B: Acetonitrile (gradient)

Time (min)	% A	% B	Flow rate (mL)
0.00	80	20	0.3
2.50	10	90	0.3
3.50	10	90	0.3
3.60	80	20	0.3
7.00	80	20	0.3

다) 컬럼온도 : 실온

라) 주입량 : 5 µL

### 2) 질량분석기 분석조건

가) Ionization : ESI negative

나) Capillary (V) : 4,000

다) Nebulizer (psi) : 40

라) Gas Temperature : 350 °C

마) Gas flow (L/min) : 10

물질명	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Dwell time(sec)	Fragment Voltage(V)	Collision Energy(eV)
azaperone	327.9	164.8	0.05	140	15
	327.9	120.8	0.05	140	20
carazolol	298.8	116.1	0.05	120	20
	298.8	222.0	0.05	120	18

## 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을



첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준 물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

## 6. 시험결과 분석

표준용액과 시험용액을 각각 질량분석기에 주입하여 아래표의 특이이온을 확인한다. 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 비교하고,  $m/z$  164.8, 116.1 각 이온에 대한 면적을 구하고 검량선을 작성하여 검체 중 azaeprone, carazolol의 함량을 구한다.

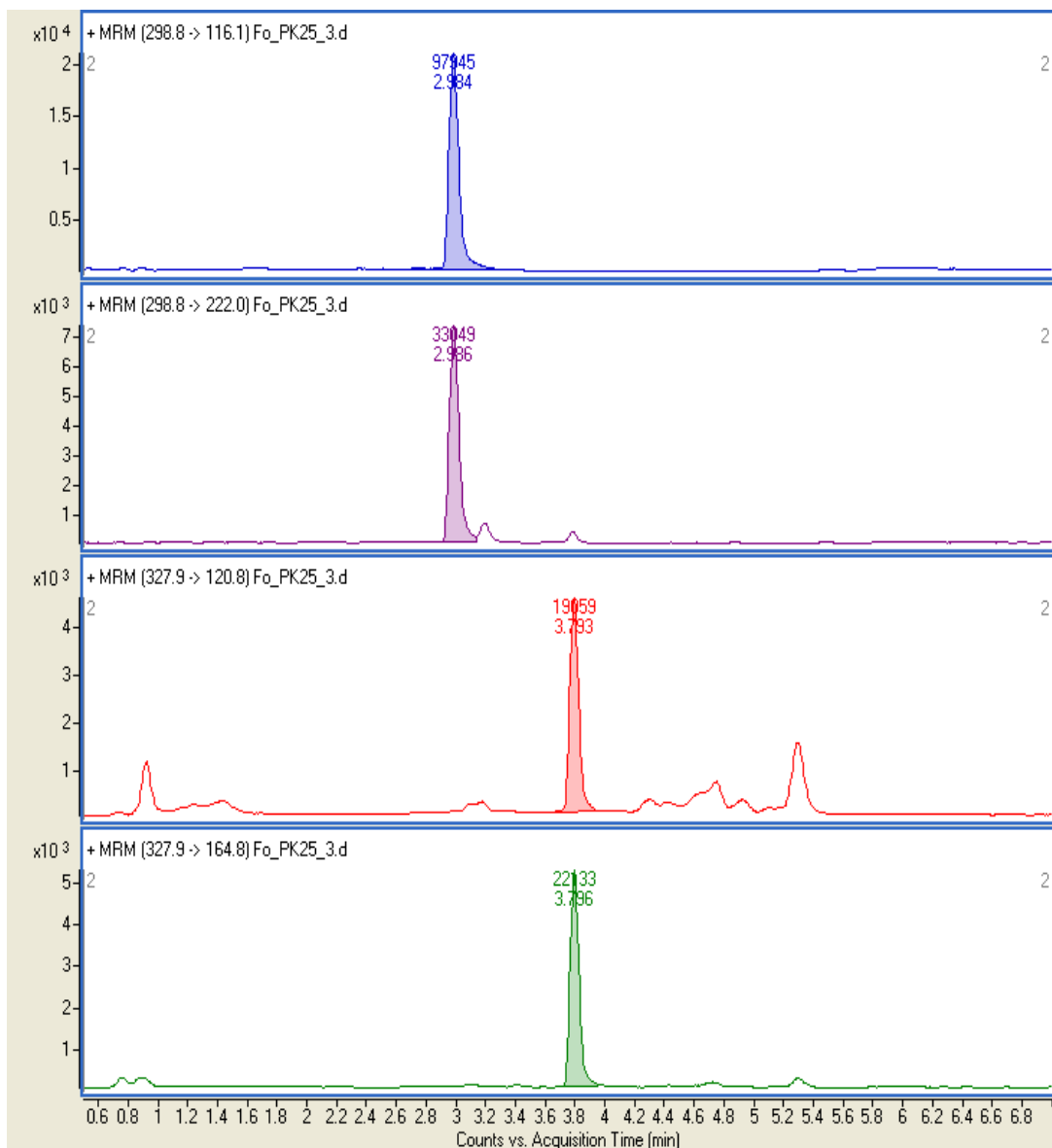


Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms of azaeprone and carazolol in spiked pork kidney at 25 ng g<sup>-1</sup>.

## XI. 페닐부타존 잔류시험법

### 1. 원리

검체 중 페닐부타존을 acetonitrile/methanol(90:10, v/v)로 추출하고 HLB 카트리지로 정제하여 액체크로마토그래프/질량분석기로 분석한다.

### 2. 측정기기

액체크로마토그래피-질량분석기 (LC-MS/MS)

### 3. 시험용액 조제

가. **표준원액**(Stock solution) : 표준물질 10 mg을 칭량하여 100 mL 용량플라스크에 취하고 methanol로 용해한 후 표시선까지 채워 -20 °C 냉동 보관한다(100 µg/mL).

나. **표준용액**(Working solution) : 표준원액을 50 % methanol로 100배 희석하여 사용한다(1 µg/mL).

다. **Spike sample 조제** : 균질화한 시료 2g에 1 µg/mL 농도의 표준용액을 100 µL를 첨가하여 0.05 µg/g 농도로 spike sample을 조제하여 사용한다. 매 실험마다 3개 이상 시험한다.

### 4. 검사방법

#### 가. 시료전처리

- 1) 시료 2 g을 칭량하여 50 mL 원심튜브에 취한 후 acetonitrile/methanol(90:10, v/v) 10 mL를 가해 약 15분간 균질화하고 25 °C, 5000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분취한다. 분취한 상층액에 20 mL ascorbic acid(0.01 M, pH 3.0) 용액과 0.2 mL HCl을 첨가한다.
- 2) Oasis HLB (60mg, 3 cc) 카트리지를 vacuum manifold에 장착하고 3 mL n-Hexane/Diethyl ether(1:1, v/v)과 3 mL methanol과 5 mL ascorbic acid으로 컨디셔닝하고 시료를 적재한다. 여기에 3 mL ascorbic acid과 3 mL DW/methanol(90:10, v/v) 용액으로 씻어준 다음 진공을 이용하여 15분간 카트리지를 건조한다. n-Hexane/Diethyl ether(1:1, v/v)과 3 mL로 용리하여 질소농축기를 이용해 50 °C에서 완전히 증발시킨다.
- 3) Methanol 1 mL를 가한 뒤 초음파세척기를 10분간 작동시켜 완전히 용해시킨다.

- 4) 위의 혼합액을 -4℃, 15,000 rpm, 15 min 동안 원심분리하여 맑은 상층만 취하여 0.2 μm syringe filter로 여과한 후 LC-MS/MS로 분석한다.

## 나. 분석조건

### 1) HPLC 분석조건

가) 컬럼 : ACQUITY UPLC™ BEH C<sub>18</sub> (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) 또는 동등품

나) 이동상 : (A)0.1 % FA in DW, (B) 0.1 % FA in ACN

#### - Mobile phase gradient program

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (mL)
0.0	98	2	0.45
0.50	98	2	0.45
0.51	90	10	0.45
4.50	0	100	0.45
7.00	0	100	0.45
7.50	98	2	0.45
10.0	98	2	0.45

다) 칼럼온도 : 40 ℃

라) 주입량 : 15 μL

### 2) 질량분석기 조건

가) Ionization : ESI positive mode

나) Capillary : 3.5 kV,

Extractor : 0.3 V

다) Temperature : Source Temp 120 ℃,

Desolvation Temp : 400 ℃

라) Gas flow : Desolvation 900 L/hr,

Cone : 50 L/hr

마) Auxiliary Gas : 질소

Collision Gas : 아르곤

#### - Multiple reaction monitoring parameter of phenylbutazone

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time(s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Phenylbutazone	309.00	120.00	0.10	21	19
		188.00	0.10	21	20

## 다. 표준곡선 작성

분석시료와 동일하게 전처리한 6개의 음성대조시료(blank sample)의 잔사를 재용해할 때 각각 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 ng/mL의 농도로 혼합표준용액을 첨가하여 각각 LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성한다.

## 5. 시험결과 분석

표준용액과 시험용액을 각각 LC-MS/MS에 주입하여 특이이온을 확인한다. 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름시간을 비교하고, m/z 120 이온에 대한 면적을 구하고 검량선을 작성한 후 시료전처리시 최종 용매 용해량(mL)과 시료량(g)을 환산하여 검체 중 phenylbutazone의 함량을 구한다.

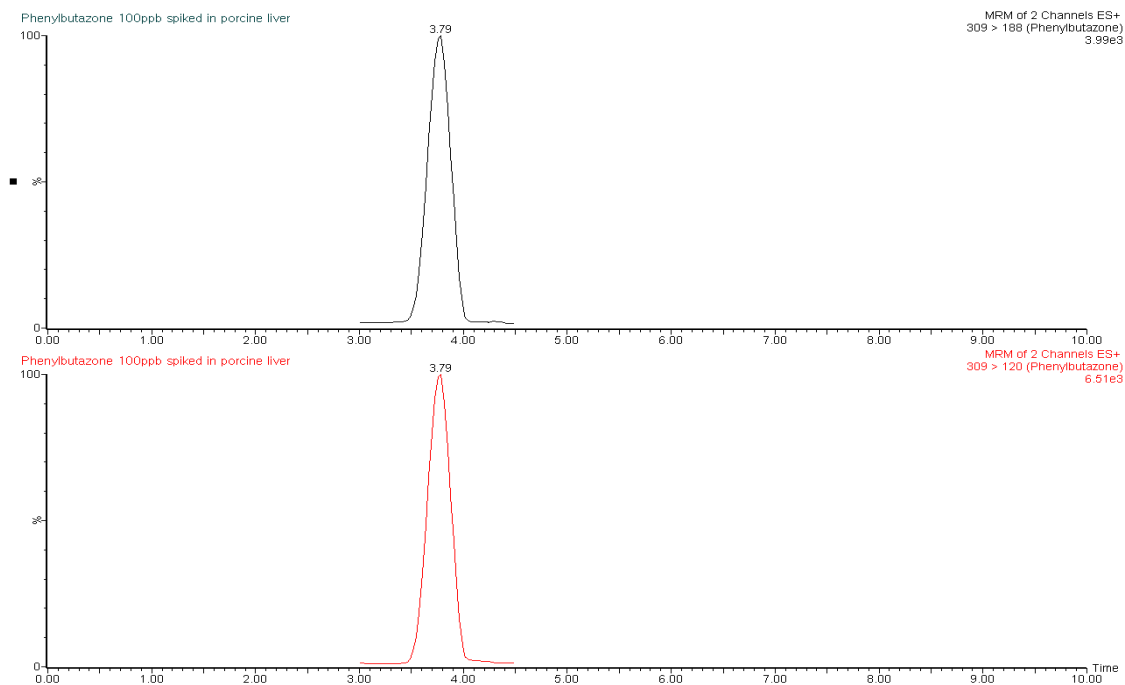


Fig. 1. LC-MS/MS chromatograms of phenylbutazone in spiked swine liver at 100 ng g<sup>-1</sup>.