

< Short Communication >

## 식육에서 베타아고니스트계 약물 잔류 연구

최윤화\* · 김미란 · 김영섭 · 이주형

서울특별시보건환경연구원

### Monitoring for $\beta$ -agonist residues in raw meat in Seoul

Yoon-Hwa Choi\*, Mi-Ran Kim, Young-Seob Kim, Ju-Hyeong Lee

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health & Environment, Gwacheon 13818, Korea

(Received 6 February 2017; revised 20 March 2017; accepted 20 March 2017)

#### Abstract

We investigated the residues of  $\beta$ -agonist (zilpaterol, ractopamine and clenbuterol) using LC-MS/MS in raw meat in Seoul. The recoveries ranged between 76.7~89.9% in beef respectively. The limits of detection were 0.01~0.09  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the limits of quantification were 0.03~0.28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectively. Residues of  $\beta$ -agonist drugs which exceeded maximum residue limits (MRL) were not exceed in any of the 267 samples.

**Key words :**  $\beta$ -agonist, zilpaterol, LC-MS/MS

#### 서 론

$\beta$ -agonist계 성장촉진용 호르몬제제는 아드레날린 수용체를 자극하여 교감신경 흥분효과를 발휘함으로써 이차적으로 성장촉진효과를 유도하는 순수 합성 약물이다. 이들 약물 중 질파테롤(zilpaterol)은 소의 사료 섭취효율 개선 및 체중 증가를 위해 사용되고 잔류허용기준은 한국, 미국 및 일본에서 설정하고 있다. 락토파민(ractopamine) 역시 사료섭취 효율 및 체단백량을 늘리고 체지방을 줄이기 위하여 사료에 5~20 mg/kg feed으로 섞어 돼지에 급여한다. 소의 경우 섭취효율을 개선하고 몸무게 증가를 위해 10~20 mg/kg 을 주입한다. EU 내에서는 식품생산동물에서의 사용을 금지하고 있으나 한국, 미국, 일본, CODEX에서는 사용을 허가하거나 잔류허용기준을 설정하고 있다. 클렌부테롤 염산염은 말에서 기관지 확장제 또는 임신 소에서 분만시기 조절을 위한 자궁이완제로서 EU 와 호주에서는 사용을 허가하고 있지만 우리나라를 포함한 일부 국가에서는 클렌부테롤의 약효상 체지

방저하 및 체단백 증진 효과를 발휘하기 때문에 식용 동물에서 오남용 가능성이 높고 심장독성이 강해 사용을 금지하고 있다(잔류동물용의약품 분석법 실무해설서, 2014).

Table 1에서와 같이 이들 세 가지 약물의 나라별 잔류허용기준(식품의 동물용의약품 잔류허용기준, 2016)이 다르고 국내외적으로 식육에 대한 잔류연구가 거의 이루어지지 않아 수입 및 국내산 식육의 안전성 확인을 위해 잔류여부를 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 공시 시료

서울지역에 유통되고 있는 식육을 수거하였으며 축종별로는 쇠고기 140건(국내산 56건, 수입 84건), 돼지고기 127건(국내산 60건, 수입 67건) 등 총 267건을 공시하였다.

\*Corresponding author: Yoon-Hwa Choi, Tel. +82-2-570-3446, Fax. +82-2-570-3043, E-mail. cyw1215@seoul.go.kr

**Table 1.** Maximum residue limit of  $\beta$ -agonist drug in bovine muscle unit :  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 

Compounds	Codex	EU	USA	Japan	Korea
Zilpaterol	-	-	10	10	1
Ractopamine	10	-	30	10	10
Clenbuterol	0.2	0.1	Not detected	0.2	Not detected

### 표준용액 조제

Zilpaterol (Santacruz biotech, Dallas, USA), Ractopamine (Santacruz biotech, Dallas, USA) 및 Clenbuterol (Dr. Ehrenstofer, Augsburg, Germany) 표준품을 각각 정밀히 달아 메탄올(Merck사, Darmstadt, Germany)에 녹여 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 하여  $-20^\circ\text{C}$ 에 냉동 보관하였다. zilpaterol-d7 (santacruz biotech, Dallas, USA), ractopamine-d3 (CDN ISOPES, Pointe-claire, Canada) 및 clenbuterol-d9 (Sigma-aldrich, St. Louis, USA) 표준품을 각각 정밀히 달아 메탄올에 녹여 zilpaterol-d7 및 ractopamine-d3는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하고 clenbuterol-d9은 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 하여  $-20^\circ\text{C}$ 에 냉동 보관하였다. 표준용액은 표준원액을 메탄올로 희석하여 사용하였다.

### 시험용액의 조제

식품공전(식품의약품안전처, 2014)에 따라, 균질화한 시료 5 g을 50 mL 원심분리관에 취하여 각각 내부표준용액 200  $\mu\text{L}$  넣은 후 0.4 N 과염소산 20 mL를 가해 10분간 진탕혼합한 후,  $4^\circ\text{C}$ , 5,000 rpm/min에서 15분간 원심분리(Beckman Coulter<sup>®</sup>, California, USA) 하여 상층액을 취한다. 상층액을 5M 수산화나트륨용액으로 pH 12로 조정하고 에틸아세테이트 10 mL를 가해 10분간 진탕혼합한 후  $4^\circ\text{C}$ , 5,000 rpm/min에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하고 잔액에 다시 에틸아세테이트 10 mL를 가해 10분간 진탕혼합한 후  $4^\circ\text{C}$ , 5,000 rpm/min에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 앞의 상층액과 합해  $40^\circ\text{C}$  질소농축하여 잔류물을 0.01 N 염산 1 mL에 녹여 0.2  $\mu\text{m}$  멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

### 분석기기 및 분석조건

본 연구에 사용한 분석기기는 Tandem quadrupole mass spectrometer (Water US/XEVO TQS, USA)를, 컬럼은 BEH  $\text{C}_{18}$  (2.1 $\times$ 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , Waters co, USA)

**Table 2.** HPLC and MS conditions

Column	$\text{C}_{18}$ (2.1 $\times$ 100 mm, 1.7 $\mu\text{m}$ )		
Mobile solvent	A: 0.1% Formic acid in water B: 0.1% Formic acid in acetonitrile		
Column temperature	$40^\circ\text{C}$		
Flow rate	0.2 mL/min		
Injection volume	2 $\mu\text{L}$		
Gradient	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	100	0
	2	100	0
	8	0	100
	8.1	0	100
10	100	0	
Ionization	ESI (positive mode)		
Capillary	3.4 kV		
Nebulizer	45 psi		
Gas Temperature	Source temp. $150^\circ\text{C}$		
	Desolvation temp. $400^\circ\text{C}$		
Gas flow	Desolvation 800 L/hr		

을 이용하였다.

이동상 용매는 0.1% formic acid (Kanto Chemical co., Tokyo, Japan)가 함유된 물과 0.1% formic acid가 함유된 acetonitrile (Merck사, Darmstadt, Germany) 이용하였으며 이동상 조성 및 gradient 조건은 Table 2와 같다. 각 물질별 단일 표준물질 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도를 직접 MS/MS에 주입하여 식품공전에서 제공한 항균제 분석물질별 정량이온 EIC (extracted ion chromatogram) 표에 의거 Precursor ion을 선별하였으며, collision energy를 조절하여 물질별로 두 개의 product ion을 선별하였다. 각 물질별 precursor ion 및 product ion에 대한 cone voltage, collision energy 등 물질별 MRM (multiple reaction monitoring) 분석조건은 Table 3과 같으며, 각 물질별 크로마토그램은 Fig. 1과 같다.

## 결과 및 고찰

### 크로마토그램 및 표준곡선

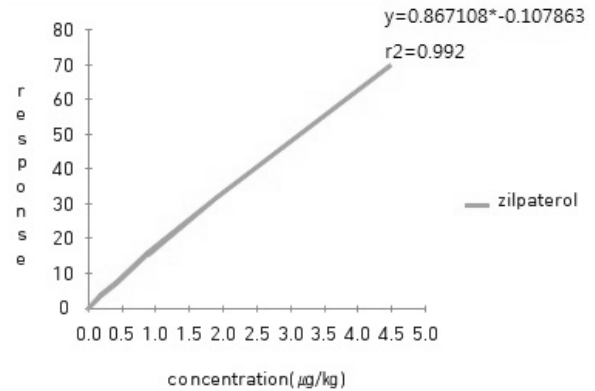
Blank를 포함하여 각 물질별 validation level농도의 0.5 $\times$ , 1 $\times$ , 2 $\times$ , 4 $\times$  8단계로 조직표준곡선(matrix standard curve)을 작성하고, LC-MS/MS로 분석하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 표준물질에 대한 농도별

**Table 3.** MRM parameters for analysis of  $\beta$ -agonist residues

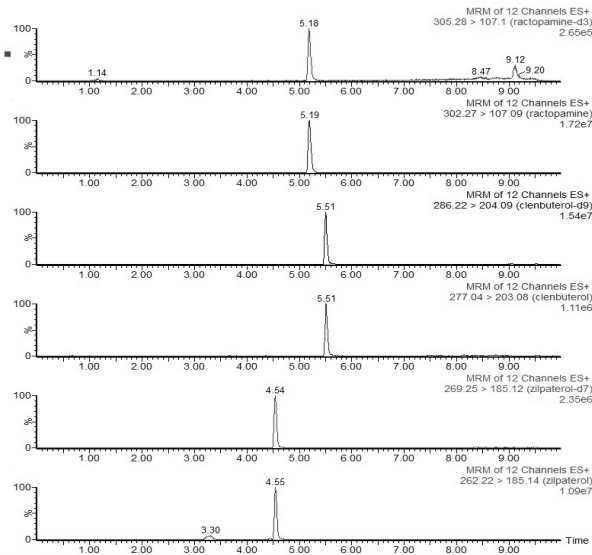
Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Dwell time (s)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Zilpaterol	262.22	185.14	0.024	30	20
		244.23			10
Ractopamine	302.27	107.09	0.024	30	20
		284.24			12
Clenbuterol	277.04	203.08	0.024	30	20
		259.14			10
Zilpaterol-d7 (IS)	269.25	185.12	0.024	30	20
		251.26			15
Ractopamine-d3 (IS)	305.28	107.10	0.024	30	25
		124.13			15
Clenbuterol-d9 (IS)	286.22	204.09	0.024	30	15
		268.22			12

**Table 4.** Recovery of  $\beta$ -agonist

Compounds	Beef		
	Fortified concentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery $\pm$ RSD (% $, n=3$ )	Coefficient of variation (%)
Zilpaterol	1	82.7 $\pm$ 3.1	3.7
Ractopamine	10	89.9 $\pm$ 8.6	9.5
Clenbuterol	0.2	76.7 $\pm$ 5.8	7.5



**Fig. 2.** Example of a standard calibration curve.



**Fig. 1.** Chromatogram of  $\beta$ -agonist drugs (zilpaterol & ractopamine: 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , clenbuterol: 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , zilpaterol-d7: 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ractopamine-d3 : 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , clenbuterol-d9 : 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

평균면적을 구하여 X 축을 농도, Y 축을 면적으로 표준곡선을 작성한 결과 상관계수 값이 모두 0.99 이상의 정의 상관관계( $r^2$ )를 보였다(Fig. 2).

**정확도 및 정밀도**

정확도와 정밀도는 베타아고니스트 약물이 검출되지 않은 쇠고기에 zilpaterol과 ractopamine은 MRL, clenbuterol은 식품공전의 LOQ농도가 되도록 첨가하여 공시시료와 동일한 방법으로 3회 반복 실험하였다. 회수율은 76.7~89.9%이었고, 상대표준편차(RSD%)는 5.8% 이하로 조사되었다(Table 4). 이는 분석법 validation에 관한 Codex guidelines (FDA, 2012) 권장범위가 1~10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서 회수율 60~120%, 변이계수가 30%임을 감안할 때 적절함을 알 수 있었다.

**검출한계 및 정량한계**

3종의 베타아고니스트계 약물이 검출되지 않은 쇠고기 시료 8개에 정량한계 농도를 첨가하여 시험법에 따라 시험한 후, 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 산출한 결

**Table 5.** Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

Compounds	LOD* ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ <sup>†</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Zilpaterol	0.04	0.12
Ractopamine	0.01	0.03
Clenbuterol	0.09	0.28

\*( $\delta/m$ ) $\times 3$ . $\delta$ =standard deviation of the response.

m=slope of the calibration curve.

<sup>†</sup>LOD $\times 3$ .

과, 검출한계는 0.01~0.09  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 정량한계는 0.03~0.28  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 였다(Table 5). 이러한 결과는 식품공전에서 규정한 정량한계와 비교해 볼 때 zilpaterol과 ractopamine은 더 낮았으나 clenbuterol만 조금 높게 나타났다.

### 유통 식육 내 베타아고니스트계 약물 잔류량

식육 267건에서 대해 zilpaterol, ractopamine, clenbuterol 등 3종의 베타아고니스트계 약물 잔류량을 조사한 결과, zilpaterol이 10건, ractopamine이 17건 이내로 검출되었다(Table 6). Zilpaterol은 소에서만, ractopamine은 소와 돼지에서 검출되었고 클렌부테롤은 검출되지 않았다. 잔류량은 zilpaterol은 0.6~0.13  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , ractopamine은 0.6~7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 검사시료 267건 중 국내산은 117건(소고기 56건, 돼지고기 60건) 수입은 152건이었는데, 수입의 경우 소고기는 호주산 58건, 미국산 26건을 돼지고기는 캐나다산 19건, 독일산 16건, 멕시코산 17건, 미국 7건, 오스트리아산 4건, 벨기에 2건, 네덜란드와 핀란드산이 각 1건이었다. 한국 육류유통수출협회의 2014년 우리나라 수입식육 통계(한국육류유통수출협회, 2015)를 보면 소고기는 호주, 미국, 뉴질랜드, 캐나다, 멕시코, 기타 순으로 호주와 미국산이 전체 91%를 차지하였다. 돼지고기는 미국, 독일, 스페인, 칠레, 오스트리아, 캐나다, 프랑스, 벨기에, 네덜란드, 덴마크, 헝가리, 폴란드, 기타 순으로 미국이 34%, 독일이 18%로 나머지 나라들은 각각 10%가 채 안 되는 비중으로 수입하였다. 소고기의 경우 수입 대부분이 호주와 미국산으로 통계적으로 유의한 건수를 검사할 수 있었지만, 돼지고기의 경우는 수입국이 다양함에도 불구하고 수거된 국가별 검사 건수가 너무 적어 통계를 내기엔 부족하였다. 나라별 검출건수는 zilpaterol은 호주가 5건, 우리나라 4건, 미

**Table 6.** The result of monitoring for  $\beta$ -agonist residues in meat

Commodity	Number of test	No. of samples detected	
		Zilpaterol	Ractopamine
Total	267	10	17
Beef	140	10	7
Pork	127	0	10

국 1건이었고, ractopamine은 미국 9건, 멕시코 7건, 우리나라 1건이었다. 나라별 잔류허용기준이 동일하지 않고 본 조사에서 수입산의 검출율이 높게 나타났으므로 유통되는 수입 축산물의 안전성 확보차원에서 지속적인 검사가 필요하다 생각된다.

### 결 론

서울지역에서 유통 중인 식육 267건에 대하여 베타아고니스트계 약물 중 zilpaterol, ractopamine, clenbuterol의 잔류실태를 조사하기 위해 LC-MS/MS로 동시 정량 분석하였다. 검량선의 직선성을 검증한 결과 모두 상관계수 0.99 이상의 양호한 직선성을 보였으며, 평균 회수율은 76.7~89.9%이었다. 검출한계는 0.01~0.09  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 정량한계는 0.03~0.28  $\mu\text{g}/\text{kg}$  범위로 나타났다. 검사결과, 식육 267건 중 zilpaterol이 소고기에서 10건, ractopamine은 소고기에서 7건, 돼지고기에서 10건이 기준이내로 검출되었으나 가축에서 이들 약물의 사용량을 고려할 때, 축산물의 안전성을 확보하기 위해 지속적인 조사가 필요하다고 생각된다.

### REFERENCES

- 식품의약품안전처. 2014. 식품공전. 식품의약품안전처고시 제 2014-194호.
- 식품의약품안전평가원. 2014. 잔류동물용의약품 분석법 실무 해설서. pp. 229-230.
- 식품의약품안전처. 2016. 식품의 동물용의약품 잔류허용기준. 한국육류유통수출협회. 2015. 월간육류유통수출입정보. pp. 50-58.
- FDA. 2012. CODEX Guideline for validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program. Appendix 2. pp. 25-26.