

Research Article



CrossMark

Open Access

## LC-MS/MS를 이용한 축·수산물 중 $\beta$ -agonist계 시험법 개발 및 검증

이태호, 김유라, 박수정, 김지영\*, 최장덕, 문귀임

식품의약품안전평가원 위해평가부 잔류물질과

### Development and Validation of an Analytical Method for $\beta$ -Agonists in Livestock and Fishery Products Using LC-MS/MS

Tae Ho Lee, Yu Ra Kim, Su Jeong Park, Ji Young Kim\*, Jang Duck Choi, and Gui Im Moon

(Pesticide and Veterinary Drug Residues Division, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety)

Received: 15 June 2022/ Revised: 20 June 2022/ Accepted: 23 June 2022

Copyright © 2022 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Ji Young Kim

<https://orcid.org/0000-0002-6330-6731>

#### Abstract

**BACKGROUND:** The  $\beta$ -agonists known as phenyl ethanolamine derivatives have a conjugated aromatic ring with amino group. They are used as tocolytic agents and bronchodilator to human and animal generally, and some of them are used as growth promoters to livestock.

**METHODS AND RESULTS:**  $\beta$ -agonists in samples were extracted by 0.4 N perchloric acid and ethyl acetate. The target compounds were analyzed by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Validation of method was performed according to CODEX guidelines (CAC/GL-71). The matrix matched calibration gave correlation coefficients >0.98, and the obtained recoveries were in the range of 62.0-109.8%, with relative standard deviation  $\leq$  20.1%. In addition, a survey was performed to inspect any residual  $\beta$ -agonist from 100 samples of livestock and fishery products and ractopamine was detected in one of the 100 samples.

**CONCLUSION(S):** In this study, we established the analytical method for  $\beta$ -agonists through using the expanded target compounds and samples. And we anticipate that the established method would be used for analysis to determine

veterinary drug residues in livestock and fishery products.

**Key words:** Analytical method, LC-MS/MS, Validation, Veterinary drug,  $\beta$ -agonists

#### 서론

축산물과 수산물은 인간의 식생활에 있어 단백질, 무기질 등의 필수영양소 및 식품의 관능성을 제공하는 중요한 공급원들 중 하나로 매년 생산량과 소비량은 전 세계적으로 꾸준히 증가하고 있는 추세이다[1,2]. 이러한 축산물과 수산물의 생산 효율성을 높이기 위해서는 가축과 어류의 질병 예방 및 치료를 위한 동물용의약품의 사용이 필수적이다. 이에 축·수산물의 생산량 증대에 따라 항균제 사용량은 전 세계적으로 증가하고 있는 추세이며, 2030년도 항균제 사용량은 2010년도 사용량인 63,151톤 대비 67% 증가한 105,596톤으로 추정된다[3]. 그러나 이러한 동물용의약품은 가축과 어류의 체내에 잔류할 수 있으며, 축산물과 수산물에 잔류된 동물용의약품을 지속적으로 섭취할 경우 인간의 건강에 악영향을 미칠 수 있다고 보고되고 있다[4,5]. 이에 동물용의약품으로 인한 인간의 건강 보호를 위해 각 국가 및 국제기구에서는 축산물과 수산물 중 동물용의약품 잔류허용기준(maximum residue levels, MRL)을 설정하여 관리하고 있다.

$\beta$ -agonist는 체내  $\beta$ -receptor에 작용하는 페닐에탄올아민 유도체 화합물로 결합되어 있는 방향족 고리와 아미노기의 종류에 따라 구분하며, 호르몬인 norepinephrine과 epinephrine

\* Corresponding author: Ji Young Kim

Phone: +82-43-719-4211, Fax: +82-43-719-4200;

E-mail: jykim98@korea.kr

이 대표적이다. 이외에도 합성  $\beta$ -agonist인 ractopamine, zilpaterol, salbutamol, clenbuterol 등이 있으며, 이러한  $\beta$ -agonist는  $\beta$ -receptor와 결합함으로써  $\beta$ -receptor를 활성화하여 심자극작용, 장관운동억제, 혈관확장 및 평활근 이완 작용 등의 생리활성을 나타낸다.  $\beta$ -receptor는 포유류의 세포 전반에 걸쳐서 존재하지만, 아형인  $\beta_1$ -receptor,  $\beta_2$ -receptor 및  $\beta_3$ -receptor의 분포 비율은 종과 조직에 따라 상이하다. 각각의 아형에 작용하는  $\beta$ -agonist를  $\beta_1$ -agonist,  $\beta_2$ -agonist 및  $\beta_3$ -agonist 등으로 구분하고 있다[6-8]. 이러한  $\beta$ -agonist는 인간이나 가축에게 기관지 확장제 및 분만억제제로써 사용되고 있으며 특히 가축의 경우  $\beta$ -agonist가 가축내 지방의 생합성을 억제하고 근육의 생합성을 촉진하는 것으로 알려져 있으나[9-11], 일부  $\beta$ -agonist를 제외하고 성장보조제로써 사용을 금지하고 있다(WHO, 2018). 특히 ractopamine의 경우, 미국 등의 일부 국가에서는 안전성을 인정받아 성장보조제로써 사용허가가 되었으나(WHO, 2011), 축산물 중에 잔류된 ractopamine으로 인한 심혈관계 기능장애 및 심혈관계 질환 유발 등의 악영향이 우려되어 사용이 금지된 국가도 있다[12,13]. 이 중 현재 우리나라 식품공전 상에 잔류허용기준이 설정되어 관리되고 있는  $\beta$ -agonist는 ractopamine, zilpaterol 및 clenbuterol이며, ractopamine 및 zilpaterol은 성장보조제로써, clenbuterol, salbutamol의 경우 식품 중 검출되어서는 안 되는 물질로 구분하여 관리하고 있다. 그러나 정량시험법의 적용 대상 품목이 축산물에 한해 고시되어 있으며, EU 등에서 cimaterol 및 salbutamol을 사용금지물질로 규정하여 관리하고 있다.

동물용의약품은 축·수산물 내에 동물용의약품 잔류를 일으킬 수 있으며[14,15], 특정 동물용의약품이 잔류된 축·수산물을 장기간 섭취할 경우, 알레르기 반응, 장내 세균총의 불균형, 항생제 내성 증가 및 암 발병 등 건강에 악영향을 미칠 수 있다고 보고되고 있다[16]. 또한, 식품 중 잔류된  $\beta$ -agonist는 심계항진, 두통, 안면 홍반, 빈맥, 호흡곤란, 메스꺼움, 구토 및 경련 등의 증상을 유발할 수 있는 것으로 보고되었다[17]. 동물용의약품의 오남용은 병원균의 항생제 내성을 증가시킨다는 연구결과가 꾸준히 보고되고 있으며[18], 세계보건기구에서도 주요 병원균에 대한 항생제 내성의 위험성을 강조하고 있다[19]. 인간 병원체에 대한 항생제 내성의 발생은 질병 치료에 있어 치료 효과 저하나 치료방법에 대한 제한 등 악영향을 끼칠 수 있을 뿐만 아니라[20,21], 최근 항생제 내성으로 인해 기존의 항생제로는 치료가 되지 않는 슈퍼박테리아의 발생은 전 세계적인 문제로 인식되고 있는 실정이다[22].

그러나, 인간 병원체의 60% 이상이 동물로부터 유래되고 있어 병원체에 감염된 식용 동물의 방치는 공중 보건에 악영향을 미칠 수 있을뿐더러, 질병으로 인한 가축의 생존률 감소에 따른 생산량 감소까지 이어질 수 있다고 보고되고 있다[23]. 이에 축·수산물의 생산량 증대와 동물로부터의 질병 감염 예방을 위한 동물용의약품의 사용은 필수적이라 사료되지만, 그에 따른 동물용의약품 사용의 지속적인 관리와 규제 또

한 필수적임을 알 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 국외에서 잔류허용기준이 설정되어 있는 cimaterol 및 최근 금지물질로 고시된 salbutamol을 기존 시험법의 분석 대상 물질로 추가하고, 시험법 적용 품목을 축·수산물까지 확대하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 표준품 및 시약

본 연구에서 사용한 ractopamine hydrochloride (94%), salbutamol (99.64%), clenbuterol (98.81%) 및 cimaterol (98.65%)은 Dr. Ehrenstorfer (Germany), zilpaterol (96%)은 Toronto Research Chemicals (Canada)에서 구매하였으며, 내부표준물질로 사용한 clenbuterol-d<sub>6</sub> hydrochloride (99.9%)는 HPC Standards GmbH (Germany), ractopamine-d<sub>3</sub> hydrochloride (98.8%)는 CDN Isotopes (Canada), zilpaterol-d<sub>7</sub>은 (99%) TLC Pharmaceutical Standards (Canada)로부터 각각 구매하였다. 기타 실험에 사용한 과염소산, 염산 및 5 M 수산화나트륨 용액은 모두 Sigma Aldrich (USA)로부터 구매하였으며, Teknokroma (Spain)로부터 구매한 0.2  $\mu$ m polytetrafluoroethylene (PTFE) 필터 바이알을 전처리에 사용하였다.

표준물질 및 내부표준물질은 각각 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100  $\mu$ g/mL 농도 수준으로 표준원액을 제조하였으며, 각각의 표준원액은 표준물질과 내부표준물질별로 혼합하고 메탄올로 희석하여 각각 제조하였다. 표준물질 혼합용액의 농도는 품목 및 표준물질의 검증농도 및 검량선 농도에 맞추어 제조하였다. 모든 표준원액 및 혼합용액은 -20°C 이하 암소에 보관하여 사용하였다.

### 시료 준비

본 연구에서는 대표 축산물인 소, 돼지, 닭, 계란 및 우유 등 5종과 대표 해수어, 담수어 및 갑각류인 넙치, 장어 및 새우 등 3종, 총 8종을 대상으로 시험법 검증을 진행하였다. 각각의 시료는 시중에 유통 중인 축산물과 수산물을 수거하였으며, 수거 간에는 품질 및 성분 변화를 최소화하기 위해 장갑을 반드시 착용하였고, 교차 오염을 방지하기 위해 품목별로 개별포장하였다. 수거된 시료의 양은 축산물의 경우 식품공전 제7. 검체의 채취 및 취급방법, 3. 검체채취의 일반원칙 4)의 검체채취결정표에 의거, 수산물의 경우 식품공전 제7. 검체의 채취 및 취급방법, 6. 개별 검체채취 및 취급 방법 1)의 수산물의 검체채취에 의거하여 채취함으로써 검체의 대표성을 나타낼 수 있도록 하였다. 시료의 균질화 과정은 식품공전 제 8. 일반시험법, 8. 식품 중 잔류동물용의약품시험법, 8.1 일반사항에 따라 수거한 시료 중 육류(소, 돼지, 닭), 어류(넙치, 장어) 및 갑각류(새우)의 경우 적당한 크기로 자른 후 믹서기로 마쇄하여 균질화하였고, 알과 유는 적당량을 취한 후 믹서기로 마쇄하여 균질화한 후 각각 시료로 사용하였다. 균질화한 시료는 분석을 진행하기 전까지 -20°C 냉동실에서

보관하였고, 분석을 통해 시료 내에 검증 대상 물질이 잔류하지 않음을 확인한 뒤에 시험법 검증에 사용하였다.

### 추출 및 정제

본 연구에서는 먼저 균질화한 시료 5 g을 50 mL 원심분리관에 취하여 내부표준물질 혼합용액(10 ng/mL) 500  $\mu$ L와 검증농도 및 검량선 농도에 맞춘 표준물질 혼합용액 200  $\mu$ L를 첨가한 다음 15분간 정치하였다. 이후 0.4 N 과염소산 20 mL을 넣고 10분간 진탕 혼합하고 4°C, 4,800 G에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 취한 상층액을 5 M 수산화나트륨용액을 사용하여 pH를 12로 조정한 다음, ①에틸아세테이트 10 mL를 넣고 10분간 진탕 혼합한 후 4°C, 4,800 G에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. ②과정을 추가로 2회 반복하여 에틸아세테이트층을 취한 뒤, 40°C 이하에서 질소농축하고 잔류물을 0.01 N 염산 1 mL에 녹인 후 0.2  $\mu$ m PTFE 필터 바이알로 여과한 것을 시험용액으로 사용하였다.

### 시험법 유효성 검증

본 연구에서 개선된 시험법은 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원의 식품 등 시험법 마린 표준절차에 관한 가이드라인(MFDS, 2016) 및 CODEX 가이드라인(CAC/GL- 71-2009)에 따라 유효성 검증을 진행하였다. 선택성(selectivity)은 무처리 시료(blank sample), 표준용액(standard solution) 및 표준용액 첨가 시료(standard spiked sample)의 크로마토그램을 비교하여 확인하였다. 직선성(linearity)은 매질 효과(matrix effect)를 고려하여 내부표준물질(internal standard, IS)을 이용한 matrix-

matched법을 이용하였다. 검량선 농도는 잔류허용기준이 있는 ractopamine 및 zilpaterol의 경우 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 및 16  $\mu$ g/kg, 사용금지물질인 salbutamol, cimaterol 및 clenbuterol의 경우 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 및 1.6  $\mu$ g/kg이 되도록 표준용액을 시료에 첨가하고, 전처리 과정을 통해 얻은 시험용액의 내부표준물질 정량이온에 대한 분석대상물질 정량이온의 면적비로 검량선을 작성하여 직선성을 평가하였다. Salbutamol 및 cimaterol의 경우 zilpaterol-d<sub>7</sub>, ractopamine-d<sub>3</sub>, 및 clenbuterol-d<sub>9</sub> 등 내부표준물질 3종 각각에 대한 검량선을 작성하고 회수율을 비교하여 최적의 내부표준물질을 확인하고자 하였다. 정량한계(limit of quantitation; LOQ)의 경우 작성된 검량선의 표준오차(standard error)를 기울기(slope)로 나눈 값의 10배를 정량한계로 하였다. 정확성 및 반복성은 물질별로 3개 농도로 시험법 검증을 진행하였으며, 검증농도의 경우 MRL이 설정된 물질 및 품목의 경우 0.5×MRL, 1×MRL 및 2×MRL 농도 수준으로, MRL은 없으나 사용금지물질이 아닌 경우에는 Positive List System (PLS) 도입에 대비하여 MRL을 0.01 mg/kg으로 설정하고 0.5×MRL, 1×MRL 및 2×MRL 농도 수준으로 검증을 진행하였다. 또한, 사용금지물질의 경우 LOQ를 기준으로 1×LOQ, 2×LOQ 및 10×LOQ 농도 수준으로 검증을 진행하였다. 정확성 및 반복성은 농도별로 5회 반복하여 진행하였고 시험법의 재현성은 서울지방식품의약품안전청과 실험실 간(inter-laboratory) 교차검증을 통해 시험법의 재현성을 검증하였다.

### 분석기기

본 연구에서 사용된 기기는 Shimadzu Nexera X2 UHPLC

Table 1. MRM condition of target compounds for analysis using LC-MS/MS

Compounds	Ionization	Retention time (min)	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion ( <i>m/z</i> )	Collision energy (eV)
Ractopamine	[M+H] <sup>+</sup>	4.95	302.2	164.1	16
				284.1	12
				107.0	33
				148.1	18
Salbutamol	[M+H] <sup>+</sup>	4.19	240.2	222.2	10
				166.2	13
				202.1	10
Cimaterol	[M+H] <sup>+</sup>	4.25	220.0	160.1	16
				143.1	21
				244.1	12
Zilpaterol	[M+H] <sup>+</sup>	4.14	262.2	185.1	23
				202.1	18
				203.0	16
Clenbuterol	[M+H] <sup>+</sup>	5.31	277.1	259.0	11
				132.0	27
Ractopamine-d <sub>3</sub> (IS)	[M+H] <sup>+</sup>	4.96	305.2	167.1	16
Zilpaterol-d <sub>7</sub> (IS)	[M+H] <sup>+</sup>	4.14	269.2	251.1	14
Clenbuterol-d <sub>9</sub> (IS)	[M+H] <sup>+</sup>	5.31	286.1	204.0	17

\* The bold expressed a quantitation ion.

system과 LCMS-8060 (Shimadzu, Osaka, Japan)이며, 시험용액의 이온화는 electron spray ionization (ESI) 방법으로 분석을 진행하였다(Table 1). 분석 간 사용한 컬럼은 Waters Xselect<sup>®</sup> HSS C<sub>18</sub> (2.1 mm I.d. × 150 mm, 3.5 μm, Waters, Massachusetts, USA)이었으며, 0.1% formic acid를 함유한 아세트니트릴과 물을 이동상으로 하여 분석하였다(Table 2).

### 잔류실태조사

개선 시험법의 적용성 검토 및 국내 유통 중인 축·수산물 중 β-agonist의 잔류평가를 위해 축·수산물 8개 품목을 대상으로 잔류실태조사를 진행하였다. 잔류실태조사 시료 수거는 위의 시험법 검증 시료 채취와 동일한 방법으로 진행하였다. 잔류실태조사 시료는 온라인으로 소, 닭, 알, 유, 낫치, 장어

및 새우 각각 10건과 돼지 30건으로 총 100건 수거하였다.

## 결과 및 고찰

### 시험법 유효성 검증

먼저 신규 분석대상물질인 salbutamol과 cimaterol에 적합한 내부표준물질을 확인하고자 zilpaterol-d<sub>7</sub>, ractopamine-d<sub>3</sub> 및 clenbuterol-d<sub>9</sub>에 대한 회수율 및 상대표준편차를 비교하였다. 그 결과, salbutamol은 zilpaterol-d<sub>7</sub>, cimaterol은 ractopamine-d<sub>3</sub>을 내부표준물질로 이용하였을 때 8개 품목에 대한 회수율 및 상대표준편차가 가이드 라인에 만족하는 것을 확인하였다(Table 3). 따라서, zilpaterol-d<sub>7</sub> *m/z* 251 생성이온에 대한 zilpaterol *m/z* 244 생성이온과 salbutamol

Table 2. LC analysis conditions

Parameter	Conditions			
Instrument	LC: Shimadzu, Nexera X2/LC-30AD (Shimadzu, Osaka, Japan) MS/MS: LCMS-8060 (Shimadzu, Osaka, Japan)			
Column	Waters Xselect <sup>®</sup> HSS (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 μm)			
Mobile phase conditions	Gradient	Mobile phase A: 0.1% formic acid in water		
		Mobile phase B: 0.1% formic acid in acetonitrile		
		Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
		0	98	2
		1	98	2
		8	5	95
		15	98	2
Column temperature	40°C			
Flow rate	0.3 mL/min			
Injection volume	10 μL			
Capillary temperature	300°C			
Collision gas	Ar			

Table 3. Comparison of recovery rate by internal standards

Sample	Compound	Internal standard	Spiking level (μg/kg)	Average recovery (%)	RSD (%)
Beef	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	86.58	16.29
			0.4	96.77	20.58
			2	85.70	16.94
		Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	100.08	5.61
			0.4	86.44	15.20
			2	91.58	16.35
	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	93.01	14.59	
		0.4	80.87	19.80	
		2	96.25	20.37	

Table 3. (Continued)

Sample	Compound	Internal standard	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Average recovery (%)	RSD (%)
Beef	Cimaterol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	72.88	26.99
			0.4	93.97	31.27
			2	75.07	28.15
	Cimaterol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	83.55	7.30
			0.4	81.73	4.23
			2	78.13	10.04
	Cimaterol	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	77.15	6.30
			0.4	76.26	7.72
			2	81.52	6.30
Pork	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	114.90	4.72
			0.4	96.74	4.74
			2	89.39	5.43
	Salbutamol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	103.69	8.55
			0.4	101.83	4.76
			2	105.70	4.06
	Salbutamol	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	118.88	10.89
			0.4	114.70	9.59
			2	106.05	9.48
	Cimaterol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	96.96	2.31
			0.4	78.64	8.15
			2	75.92	7.52
	Cimaterol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	83.51	14.07
			0.4	79.96	8.68
			2	89.16	6.60
Cimaterol	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	97.10	6.81	
		0.4	91.51	16.19	
		2	89.59	11.06	
Chicken	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	103.42	6.13
			0.4	89.39	8.99
			2	77.29	5.06
	Salbutamol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	94.37	6.25
			0.4	90.30	6.83
			2	92.30	9.06
	Salbutamol	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	106.75	14.25
			0.4	98.15	27.29
			2	86.45	13.16
	Cimaterol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	75.97	18.05
			0.4	74.71	2.79
			2	75.41	3.10
	Cimaterol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	144.64	31.48
			0.4	136.00	15.32
			2	209.97	17.73
Cimaterol	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	74.32	11.57	
		0.4	80.13	17.82	
		2	84.10	7.29	

Table 3. (Continued)

Sample	Compound	Internal standard	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Average recovery (%)	RSD (%)
Egg	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	102.04	4.15
			0.4	84.77	5.63
			2	72.87	3.84
		Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	94.78	3.13
			0.4	96.05	8.28
			2	98.54	2.74
	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	42.20	13.83	
		0.4	68.70	18.66	
		2	78.56	5.90	
	Cimaterol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	109.57	5.15
			0.4	93.56	30.70
			2	70.69	8.66
		Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	102.88	10.17
			0.4	107.64	40.20
			2	95.57	5.83
	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	62.53	16.76	
		0.4	84.72	40.20	
		2	79.11	8.80	
Milk	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	99.45	3.35
			0.4	93.22	5.00
			2	86.76	2.84
		Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	92.02	2.70
			0.4	95.17	1.84
			2	95.37	4.07
	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	84.47	17.13	
		0.4	89.05	7.95	
		2	86.64	8.47	
	Cimaterol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	83.95	7.27
			0.4	75.35	5.56
			2	67.76	1.20
		Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	72.88	9.11
			0.4	73.67	5.15
			2	73.74	3.90
	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	64.56	21.71	
		0.4	67.66	7.04	
		2	66.69	8.09	
Flat fish	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	102.63	7.40
			0.4	87.90	0.73
			2	78.22	2.59
		Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	83.67	4.55
			0.4	86.14	2.56
			2	83.54	2.45
		Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	114.44	20.95
			0.4	97.53	7.21
			2	93.54	2.63

Table 3. (Continued)

Sample	Compound	Internal standard	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Average recovery (%)	RSD (%)	
Flat fish	Cimaterol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	80.70	7.79	
			0.4	80.00	4.79	
			2	68.16	2.66	
	Cimaterol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	58.09	14.78	
			0.4	76.65	6.76	
			2	72.32	3.87	
	Cimaterol	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	86.74	24.81	
			0.4	87.83	3.71	
			2	81.33	2.72	
Eel	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	102.83	11.35	
			0.4	94.41	6.43	
			2	73.56	7.61	
	Salbutamol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	85.68	8.97	
			0.4	92.51	9.82	
			2	96.88	8.51	
	Salbutamol	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	115.04	12.91	
			0.4	103.06	7.52	
			2	89.78	19.58	
	Eel	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	86.98	15.19
				0.4	87.61	11.05
				2	83.77	13.01
		Cimaterol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	66.35	23.23
				0.4	84.07	15.68
				2	111.35	11.30
Cimaterol		Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	103.28	20.94	
			0.4	98.04	7.23	
			2	102.54	13.76	
Shrimp	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	88.31	12.72	
			0.4	99.00	11.78	
			2	87.21	7.58	
	Salbutamol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	83.53	10.85	
			0.4	101.13	7.06	
			2	97.13	4.36	
	Salbutamol	Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	48.86	25.89	
			0.4	106.21	24.23	
			2	100.33	5.02	
	Shrimp	Salbutamol	Ractopamine-d <sub>3</sub>	0.2 <sup>a</sup>	87.79	18.38
				0.4	103.78	36.62
				2	85.33	12.00
		Cimaterol	Zilpaterol-d <sub>7</sub>	0.2 <sup>a</sup>	82.42	19.58
				0.4	105.19	29.28
				2	95.26	9.29
Cimaterol		Clenbuterol-d <sub>9</sub>	0.2 <sup>a</sup>	41.87	45.55	
			0.4	114.95	57.66	
			2	98.08	9.30	

<sup>a</sup> LOQ

*m/z* 148 생성이온, ractopamine-*d*<sub>3</sub> *m/z* 167 생성이온에 대한 ractopamine *m/z* 164 생성이온과 cimaterol *m/z* 202 생성이온 및 clenbuterol-*d*<sub>3</sub> *m/z* 204 생성이온에 대한 clenbuterol *m/z* 203 생성이온 면적비로 각각 검량선을 작성하여 직선성을 평가하였다.

선택성의 경우, 음성시료에서 분석대상물질과 내부표준물질을 포함한 모든 물질의 머무름 시간대에 방해 peak가 관찰되지 않았다. 검량선의 결정계수(*r*<sup>2</sup>)는 소고기에서 0.9991~0.9995, 돼지고기에서 0.9992~0.9999, 닭고기에서 0.9990~0.9999, 알에서 0.9992~0.9999, 유에서 0.9991~0.9999, 낱치에서 0.9991~0.9999, 장어에서 0.9992~0.9999 및 새우에서 0.9990~0.9996 수준으로, 8개 품목에 5개 물질의 결정계수 모두 CODEX 가이드 라인 기준에 만족함을 확인하였다(Fig. 1).

또한, 회수율 평가 결과 소고기의 평균 회수율 및 상대표준편차는 각각 68.99~105.95%, 2.56~27.52%, 돼지고기의 평균 회수율 및 상대표준편차는 각각 69.87~105.70%, 2.31~9.37%, 닭고기의 평균 회수율 및 상대표준편차는 각각 70.87~94.37%, 3.14~20.13%, 알의 평균 회수율 및 상대표준편차는 각각 66.93~98.54%, 0.89~14.41%, 유의 평균 회수율 및 상대표준편차는 각각 68.76~96.81%, 1.21~11.71%로 축산물 5개 품목에 대한 5개 물질의 회수율 모두 CODEX 가이드 라인의 회수율 허용 범위를 만족하였다. 이어, 낱치의 경우 평균회수율 64.40~109.96%, 상대표준편차 1.49~18.33%, 장어의 경우 평균회수율 62.00~96.88%, 상대표준편차 1.89~12.94%, 새우의 경우 평균회수율 76.22~109.82%, 상대표준편차 2.61~19.85% 수준으로 수산물 3개 품목에 대한 5개 물질의

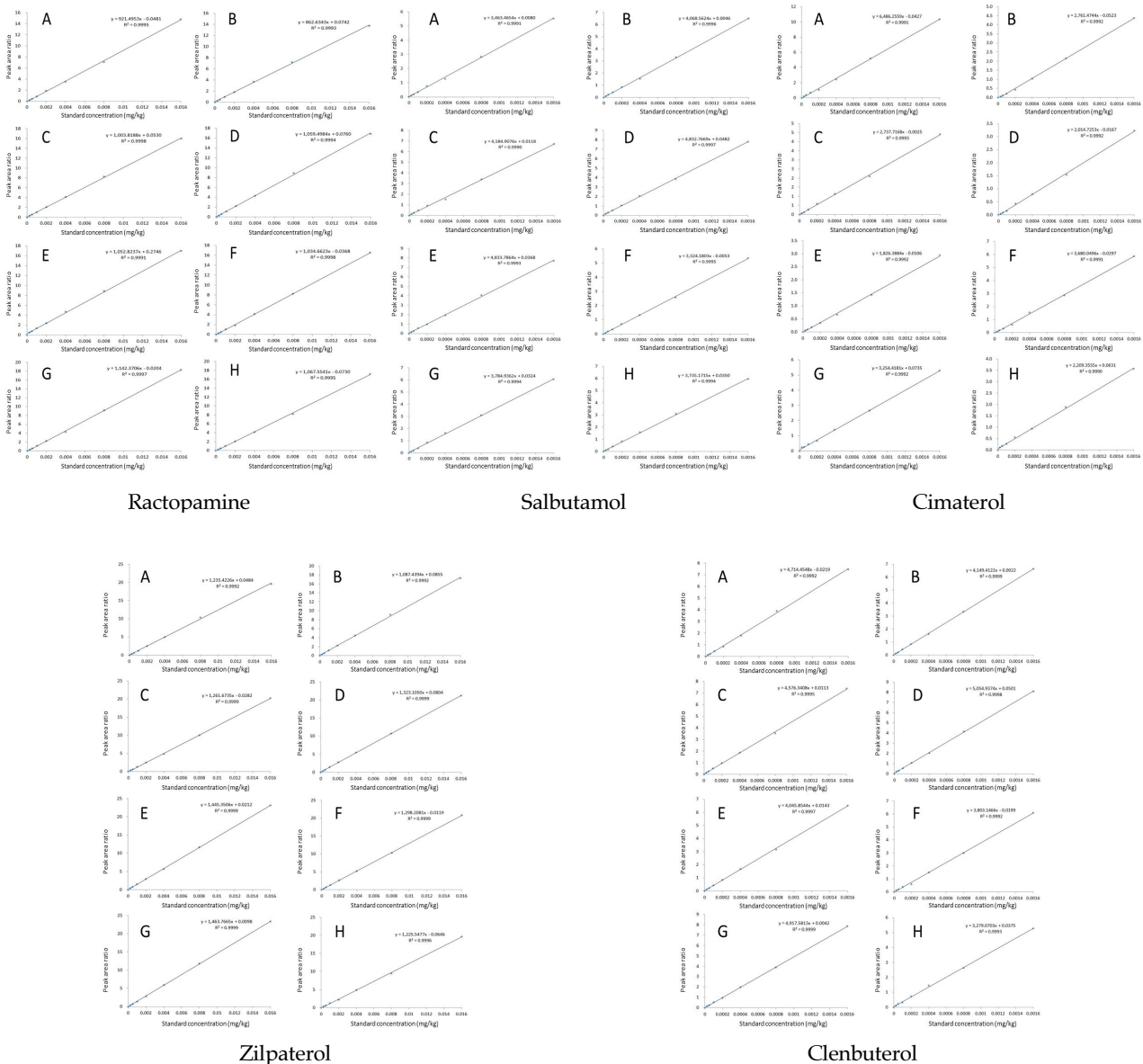


Fig. 1. Calibration curves of target compound in (A) beef, (B) pork, (C) chicken, (D) egg, (E) milk, (F) flat fish, (G) eel and (H) shrimp by matrix-matched method.



회수율 모두 CODEX 가이드 라인에서 제시한 회수율 범위를 만족하는 것을 확인하였다(Table 4). LC-MS/MS 분석 시 매트릭스 효과를 확인하기 위하여 표준물질의 matrix effect를 확인한 결과 축·수산물 시료에서  $> \pm 50\%$ 의 강한 매트릭스 효과를

**Table 4.** Validation results of  $\beta$ -agonists analysis method about 8 kinds of matrix

Sample	Compounds	$r^2$	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Average recovery (%)	RSD (%)
Beef	Ractopamine	0.9995	5	105.95	2.56
			10 <sup>a</sup>	94.98	6.74
			20	85.53	6.46
	Salbutamol	0.9991	0.2 <sup>b</sup>	99.45	5.65
			0.4	86.12	15.25
			2	91.51	16.36
	Cimaterol	0.9991	0.2 <sup>b</sup>	82.03	24.29
			0.4	90.63	12.72
			2	77.00	27.52
	Zilpaterol	0.9992	5	71.19	3.94
			10 <sup>a</sup>	74.09	5.46
			20	68.99	4.46
Clenbuterol	0.9992	0.2 <sup>b</sup>	91.09	5.19	
		0.4	89.46	3.03	
		2	89.84	3.2	
Pork	Ractopamine	0.9993	5	89.03	3.37
			10 <sup>a</sup>	93.74	6.15
			20	94.51	2.37
	Salbutamol	0.9996	0.2 <sup>b</sup>	103.69	8.55
			0.4	101.83	4.76
			2	105.70	4.06
Cimaterol	0.9992	0.2 <sup>b</sup>	96.96	2.31	
		0.4	78.64	8.15	
		2	75.92	7.52	
Zilpaterol	0.9992	5	69.87	3.79	
		10 <sup>a</sup>	74.96	9.47	
		20	75.33	4.17	
Clenbuterol	0.9999	0.2 <sup>b</sup>	102.71	3.19	
		0.4	94.60	4.49	
		2	99.01	5.82	
Ractopamine	0.9998	5	87.95	7.22	
		10 <sup>a</sup>	88.22	7.15	
		20	88.15	3.44	
Chicken	Salbutamol	0.9990	0.2 <sup>b</sup>	94.37	6.25
			0.4	90.30	6.83
			2	92.30	9.06
Cimaterol	0.9993	0.2 <sup>b</sup>	70.87	20.13	
		0.4	73.64	2.95	
		2	77.64	3.14	

**Table 4.** (Continued)

Sample	Compounds	$r^2$	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Average recovery (%)	RSD (%)
Chicken	Zilpaterol	0.9999	5	81.74	3.27
			10 <sup>a</sup>	76.92	7.05
			20	72.20	2.77
	Clenbuterol	0.9995	0.2 <sup>b</sup>	88.98	5.31
			0.4	90.36	11.20
			2	94.30	4.24
Egg	Ractopamine	0.9994	5	83.41	2.92
			10 <sup>a</sup>	86.39	4.07
			20	85.13	1.05
	Salbutamol	0.9997	0.2 <sup>b</sup>	94.78	3.13
			0.4	96.05	8.28
			2	98.54	2.74
Milk	Cimaterol	0.9992	0.2 <sup>b</sup>	89.07	6.82
			0.4	80.06	14.41
			2	73.20	9.00
	Zilpaterol	0.9999	5	65.02	1.36
			10 <sup>a</sup>	69.09	4.38
			20	66.93	2.76
Clenbuterol	0.9998	0.2 <sup>b</sup>	79.58	5.58	
		0.4	78.35	0.89	
		2	83.88	1.97	
Flat fish	Ractopamine	0.9991	5	69.80	11.71
			10 <sup>a</sup>	87.62	6.45
			20	96.81	2.83
	Salbutamol	0.9993	0.2 <sup>b</sup>	92.02	2.70
			0.4	95.17	1.84
			2	95.37	4.07
Chicken	Cimaterol	0.9992	0.2 <sup>b</sup>	82.18	7.58
			0.4	75.13	5.69
			2	68.76	1.21
	Zilpaterol	0.9999	5	70.38	3.53
			10 <sup>a</sup>	69.04	2.97
			20	70.16	3.81
Clenbuterol	0.9997	0.2 <sup>b</sup>	87.83	6.53	
		0.4	84.22	6.42	
		2	84.28	5.00	
Ractopamine	0.9998	5	91.22	2.55	
		10 <sup>a</sup>	89.83	2.98	
		20	85.26	1.49	
Flat fish	Salbutamol	0.9995	0.2 <sup>b</sup>	83.67	4.55
			0.4	86.14	2.56
			2	83.54	2.45
Chicken	Cimaterol	0.9991	0.2 <sup>b</sup>	71.36	9.15
			0.4	76.87	5.18
			2	69.56	2.70

Table 4. (Continued)

Sample	Compounds	r <sup>2</sup>	Spiking level (µg/kg)	Average recovery (%)	RSD (%)
Flat fish	Zilpaterol	0.9999	5	72.69	8.60
			10 <sup>a</sup>	68.84	5.62
			20	64.40	2.96
			0.2 <sup>b</sup>	109.06	18.33
			0.4	99.53	7.35
Clenbuterol	0.9992	2	100.11	4.05	
		5	95.51	2.72	
		10 <sup>a</sup>	89.45	1.89	
Ractopamine	0.9997	20	83.99	3.31	
		0.2 <sup>b</sup>	87.73	7.39	
		0.4	92.51	9.82	
Salbutamol	0.9994	2	96.88	8.51	
		0.2 <sup>b</sup>	95.63	11.90	
		0.4	90.53	10.77	
Eel	Cimaterol	0.9992	2	84.79	12.94
			5	73.05	8.73
			10 <sup>a</sup>	67.95	2.04
Zilpaterol	0.9999	20	62.00	3.84	
		0.2 <sup>b</sup>	86.31	6.23	
		0.4	88.99	3.60	
Clenbuterol	0.9999	2	87.76	5.67	
		5	100.05	2.61	
		10 <sup>a</sup>	94.28	5.97	
Ractopamine	0.9995	20	92.65	3.97	
		0.2 <sup>b</sup>	90.83	9.98	
		0.4	104.79	6.81	
Salbutamol	0.9994	2	97.86	4.33	
		0.2 <sup>b</sup>	95.46	16.28	
		0.4	101.00	19.85	
Shrimp	Cimaterol	0.9990	2	83.29	11.85
			5	90.58	4.60
			10 <sup>a</sup>	76.22	8.09
Zilpaterol	0.9996	20	78.13	3.97	
		0.2 <sup>b</sup>	97.50	13.86	
		0.4	103.06	9.91	
Clenbuterol	0.9993	2	109.82	5.18	

<sup>a</sup> MRL; <sup>b</sup> LOQ

나타내었으므로 본 실험법에서 사용된 바와 같이 β-agonist 와 같은 동물용의약품은 동일 시료의 매질을 사용하여 분석 하는 것이 효과적이다(Table 5).

### 실험실간 검증

본 연구에서 개발한 시험법에 대한 유효성을 검증하기 위

Table 5. Matrix effect of compounds by sample

Sample	Compound	Matrix effect <sup>a</sup> (%)
Beef	Ractopamine	-95.45
	Salbutamol	-58.93
	Cimaterol	-24.36
	Zilpaterol	-55.56
	Clenbuterol	-40.62
Pork	Ractopamine	-90.12
	Salbutamol	-49.03
	Cimaterol	-43.49
	Zilpaterol	-88.61
	Clenbuterol	-50.59
Chicken	Ractopamine	-88.17
	Salbutamol	-54.39
	Cimaterol	-59.46
	Zilpaterol	-86.08
	Clenbuterol	-71.93
Egg	Ractopamine	-88.17
	Salbutamol	-46.78
	Cimaterol	-68.70
	Zilpaterol	-86.24
	Clenbuterol	-63.10
Milk	Ractopamine	-95.35
	Salbutamol	-92.20
	Cimaterol	-88.49
	Zilpaterol	-96.98
	Clenbuterol	-96.64
Flat fish	Ractopamine	-96.03
	Salbutamol	-80.97
	Cimaterol	-72.40
	Zilpaterol	-92.19
	Clenbuterol	-54.56
Eel	Ractopamine	-91.74
	Salbutamol	-82.14
	Cimaterol	-65.57
	Zilpaterol	-88.90
	Clenbuterol	-50.63
Shrimp	Ractopamine	-96.76
	Salbutamol	-92.18
	Cimaterol	-85.38
	Zilpaterol	-96.89
	Clenbuterol	-95.13

<sup>a</sup> Matrix effect (%) = ((Peak area of standard in matrix-peak area of standard in solvent)/peak area of standard in solvent) × 100

해 실험실간 검증을 수행하였다. 개발한 시험법을 타 실험실 에 동일하게 제공한 후 분석한 회수율 및 상대표준편차를 비

교하여 확인하였다. 실험실 간 교차검증 결과 실험실 간 평균 회수율과 상대표준편차(relative standard deviation; RSD) 모두 CODEX 가이드라인에 만족함을 확인하였다(Table 6).

정량한계의 경우, 교차검증 간에 얻은 2개의 정량한계 중 큰

값을 소수점 5번째 자리에서 반올림하여 분석 대상 물질의 품목별 정량한계로 설정하였고, 품목별 분석 대상 물질의 정량한계 중 가장 큰 값을 최종 정량한계로 하였다. 따라서, 본 시험법의 최종 정량한계는 ractopamine 및 zilpaterol 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,

Table 6. Inter-laboratory validation results of  $\beta$ -agonists analysis method about 8 kinds of matrix

Sample	Compound	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%)			RSD (%)	
			Institution A <sup>a</sup> Ave.	Institution B <sup>b</sup> Ave.	Ave.		
Beef	Ractopamine	5	105.95	85.74	95.84	11.53	
		10 <sup>c</sup>	94.98	82.83	88.91	10.06	
		20	85.53	79.64	82.58	8.95	
	Salbutamol	0.2 <sup>d</sup>	99.45	90.70	95.08	10.62	
		0.4	86.12	90.58	88.35	15.26	
		2	91.51	99.63	95.57	17.05	
	Cimaterol	0.2 <sup>d</sup>	82.03	82.31	82.17	18.89	
		0.4	90.63	90.69	90.66	15.61	
		2	77.00	84.37	80.68	25.19	
	Zilpaterol	5	71.19	86.82	79.00	12.20	
		10 <sup>c</sup>	74.09	78.53	76.31	6.69	
		20	68.99	69.94	69.47	5.86	
	Clenbuterol	0.2 <sup>d</sup>	91.09	89.19	90.14	5.75	
		0.4	89.46	85.74	87.60	6.33	
		2	89.84	85.52	87.68	4.36	
	Pork	Ractopamine	5	89.03	101.70	95.37	7.59
			10 <sup>c</sup>	93.74	88.23	90.99	5.78
			20	94.51	78.68	86.60	9.90
Salbutamol		0.2 <sup>d</sup>	103.69	102.64	103.16	8.99	
		0.4	101.83	90.85	96.34	7.36	
		2	105.70	104.12	104.91	4.10	
Cimaterol		0.2 <sup>d</sup>	96.96	87.41	92.18	11.38	
		0.4	78.64	72.19	75.41	11.37	
		2	75.92	89.50	82.71	12.66	
Zilpaterol		5	69.87	107.84	88.86	24.04	
		10 <sup>c</sup>	74.96	87.75	81.35	11.45	
		20	75.33	77.20	76.27	6.58	
Clenbuterol		0.2 <sup>d</sup>	102.71	100.39	101.55	4.91	
		0.4	94.60	87.81	91.20	6.24	
		2	99.01	97.34	98.17	5.11	
Chicken		Ractopamine	5	87.95	108.85	98.40	12.26
			10 <sup>c</sup>	88.22	86.77	87.50	7.05
			20	88.15	76.22	82.19	8.86
	Salbutamol	0.2 <sup>d</sup>	94.37	101.39	97.88	10.84	
		0.4	90.30	98.03	94.16	7.33	
		2	92.30	103.31	97.80	10.44	
	Cimaterol	0.2 <sup>d</sup>	70.87	70.75	70.81	19.77	
		0.4	73.64	76.87	75.26	6.38	
		2	77.64	78.99	78.31	4.88	

Table 6. (Continued)

Sample	Compound	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%)			RSD (%)	
			Institution A <sup>a</sup>	Ave. Institution B <sup>b</sup>	Ave.		
Chicken	Zilpaterol	5	81.74	94.48	88.11	13.14	
		10 <sup>c</sup>	76.92	83.34	80.13	9.80	
		20	72.20	71.68	71.94	7.10	
	Clenbuterol	0.2 <sup>d</sup>	88.98	91.31	90.14	5.68	
		0.4	90.36	79.47	84.91	12.43	
		2	94.30	89.26	91.78	5.41	
Egg	Ractopamine	5	83.41	108.84	96.13	14.10	
		10 <sup>c</sup>	86.39	85.28	85.83	3.15	
		20	85.13	71.30	78.21	9.42	
	Salbutamol	0.2 <sup>d</sup>	94.78	85.59	90.18	8.49	
		0.4	96.05	92.88	94.46	9.19	
		2	98.54	103.70	101.12	4.63	
	Cimaterol	0.2 <sup>d</sup>	89.07	86.93	88.00	11.44	
		0.4	80.06	81.89	80.97	18.06	
		2	73.20	77.00	75.10	9.95	
	Milk	Zilpaterol	5	65.02	71.07	68.04	5.06
			10 <sup>c</sup>	69.09	66.01	67.55	6.20
			20	66.93	64.73	65.83	5.42
Clenbuterol		0.2 <sup>d</sup>	79.58	80.11	79.85	5.49	
		0.4	78.35	71.31	74.83	6.30	
		2	83.88	81.50	82.69	4.54	
Flat fish	Ractopamine	5	69.80	86.54	78.17	13.69	
		10 <sup>c</sup>	87.62	90.29	88.96	5.44	
		20	96.81	89.63	93.22	5.25	
	Salbutamol	0.2 <sup>d</sup>	92.02	80.03	86.03	17.05	
		0.4	95.17	80.32	87.74	15.05	
		2	95.37	85.45	90.41	11.84	
	Cimaterol	0.2 <sup>d</sup>	82.18	75.00	78.59	17.79	
		0.4	75.13	68.98	72.05	10.82	
		2	68.76	71.11	69.94	7.92	
	Flat fish	Zilpaterol	5	70.38	66.03	68.21	8.38
			10 <sup>c</sup>	69.04	83.27	76.16	12.43
			20	70.16	78.47	74.32	7.28
Clenbuterol		0.2 <sup>d</sup>	87.83	76.03	81.93	12.22	
		0.4	84.22	79.87	82.05	10.33	
		2	84.28	89.54	86.91	13.50	
Flat fish	Ractopamine	5	91.22	87.21	89.22	3.18	
		10 <sup>c</sup>	89.83	78.88	84.35	7.30	
		20	85.26	74.35	79.81	7.44	
	Salbutamol	0.2 <sup>d</sup>	83.67	82.78	83.22	6.23	
		0.4	86.14	87.81	86.98	2.67	
		2	83.54	86.36	84.95	9.71	
Flat fish	Cimaterol	0.2 <sup>d</sup>	71.36	74.33	72.84	10.11	
		0.4	76.87	68.84	72.85	11.24	
		2	69.56	66.90	68.23	3.42	

Table 6. (Continued)

Sample	Compound	Spiking level ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%)			RSD (%)
			Institution A <sup>a</sup> Ave.	Institution B <sup>b</sup> Ave.	Ave.	
Flat fish	Zilpaterol	5	72.69	89.41	81.05	13.91
		10 <sup>c</sup>	68.84	77.15	73.00	7.90
		20	64.40	68.64	66.52	7.92
	Clenbuterol	0.2 <sup>d</sup>	109.06	95.61	102.33	18.82
		0.4	99.53	82.82	91.17	13.99
		2	100.11	87.72	93.91	9.29
Eel	Ractopamine	5	95.51	93.83	94.67	1.39
		10 <sup>c</sup>	89.45	86.72	88.08	3.98
		20	83.99	80.56	82.27	3.41
	Salbutamol	0.2 <sup>d</sup>	87.73	88.92	88.32	10.02
		0.4	92.51	87.80	90.15	14.44
		2	96.88	91.51	94.19	10.04
Shrimp	Cimaterol	0.2 <sup>d</sup>	95.63	92.88	94.26	11.75
		0.4	90.53	92.02	91.27	12.14
		2	84.79	82.89	83.84	10.62
	Zilpaterol	5	73.05	96.32	84.69	16.61
		10 <sup>c</sup>	67.95	74.39	71.17	8.70
		20	62.00	65.42	63.71	6.69
Pig	Clenbuterol	0.2 <sup>d</sup>	86.31	99.74	93.02	9.02
		0.4	88.99	111.35	100.17	14.03
		2	87.76	114.78	101.27	14.54
	Ractopamine	5	100.05	88.29	94.17	7.27
		10 <sup>c</sup>	94.28	83.28	88.78	8.63
		20	92.65	85.35	89.00	5.63
Chicken	Salbutamol	0.2 <sup>d</sup>	90.83	97.56	94.20	10.05
		0.4	104.79	95.86	100.32	7.08
		2	97.86	97.43	97.64	4.76
	Cimaterol	0.2 <sup>d</sup>	95.46	88.46	91.96	16.33
		0.4	101.00	92.34	96.67	17.93
		2	83.29	76.68	79.99	10.53
Turkey	Zilpaterol	5	90.58	65.10	77.84	18.87
		10 <sup>c</sup>	76.22	68.95	72.59	7.94
		20	78.13	64.15	71.14	11.35
	Clenbuterol	0.2 <sup>d</sup>	97.50	89.22	93.36	13.97
		0.4	103.06	103.58	103.32	12.18
		2	109.82	109.28	109.55	5.42

<sup>a</sup> Ministry of Food and Drug Safety; <sup>b</sup> Seoul Regional Food and Drug Administration; <sup>c</sup> MRL; <sup>d</sup> LOQ

salbutamol, cimaterol 및 clenbuterol 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 확인되었다(Table 7).

#### 모니터링 결과

개선 시험법의 적용성 검토를 위해 진행한 잔류실태조사 결과,

축수산물 100건의 시료 중 돼지 1건으로부터 ractopamine이 검출되었다. 그러나 잔류량이 돼지 근육 중 ractopamine의 MRL인 0.01 mg/kg 이하인 0.003 mg/kg 수준으로 확인되어 안전한 수준인 것으로 판단하였다(Table 8).

Table 7. LOQ of  $\beta$ -agonists analysis method

(mg/kg)

Compound	Sample	LOQ			Final LOQ
		Institution A <sup>a</sup>	Institution B <sup>b</sup>	Adjusted LOQ	
Ratopamine	Beef	0.00033	0.00046	0.0005	0.0005
	Pork	0.00040	0.00046	0.0005	
	Chicken	0.00023	0.00046	0.0005	
	Egg	0.00023	0.00046	0.0005	
	Milk	0.00044	0.00037	0.0004	
	Flat fish	0.00034	0.00023	0.0003	
	Eel	0.00021	0.00024	0.0002	
	Shrimp	0.00024	0.00024	0.0002	
Salbutamol	Beef	0.00019	0.00016	0.0002	0.0002
	Pork	0.00011	0.00019	0.0002	
	Chicken	0.00019	0.00014	0.0002	
	Egg	0.00010	0.00017	0.0002	
	Milk	0.00016	0.00017	0.0002	
	Flat fish	0.00013	0.00019	0.0002	
	Eel	0.00014	0.00018	0.0002	
	Shrimp	0.00015	0.00010	0.0002	
Cimaterol	Beef	0.00018	0.00015	0.0002	0.0002
	Pork	0.00017	0.00003	0.0002	
	Chicken	0.00016	0.00016	0.0002	
	Egg	0.00017	0.00018	0.0002	
	Milk	0.00017	0.00018	0.0002	
	Flat fish	0.00018	0.00017	0.0002	
	Eel	0.00017	0.00013	0.0002	
	Shrimp	0.00019	0.00010	0.0002	
Zilpaterol	Beef	0.00043	0.00049	0.0005	0.0005
	Pork	0.00043	0.00032	0.0004	
	Chicken	0.00016	0.00045	0.0005	
	Egg	0.00014	0.00041	0.0004	
	Milk	0.00013	0.00023	0.0002	
	Flat fish	0.00030	0.00017	0.0003	
	Eel	0.00012	0.00015	0.0002	
	Shrimp	0.00014	0.00041	0.0004	
Clenbuterol	Beef	0.00017	0.00015	0.0002	0.0002
	Pork	0.00006	0.00015	0.0002	
	Chicken	0.00013	0.00018	0.0002	
	Egg	0.00007	0.00019	0.0002	
	Milk	0.00011	0.00006	0.0001	
	Flat fish	0.00017	0.00018	0.0002	
	Eel	0.00005	0.00010	0.0001	
	Shrimp	0.00015	0.00013	0.0002	

<sup>a</sup> Ministry of Food and Drug Safety; <sup>b</sup> Seoul Regional Food and Drug Administration

Table 8. Results of  $\beta$ -agonist residues monitoring

Sample	Number of samples	Number of detected samples	Detected compounds (Concentration/MRL, mg/kg)
Beef	10	-	
Pork	30	1	Ractopamine (0.003/0.01)
Chicken	10	-	
Egg	10	-	
Milk	10	-	
Flat fish	10	-	
Eel	10	-	
Shrimp	10	-	

### 고찰

본 연구를 통해  $\beta$ -agonist계 시험법은 0.4 N 과염소산 20 mL을 넣고 에틸아세테이트를 이용하여 추출하는 방식으로 LC-MS/MS 시험법을 확립하였다.  $\beta$ -agonist 추출법의 경우, 주로 산 처리 추출법과 효소처리 추출법이 이용되고 있다 [24-27]. 산 처리 추출법의 경우, 강산 사용에 따른 위험성이 있으나, 효소처리 과정이 없어 추출 시간이 짧다는 장점이 있다. 효소를 이용한 추출법의 경우 강산을 사용하지 않아 비교적 안전하다는 장점이 있으나, 효소처리 과정에 의해 추출 시간이 길고 가격이 비싸다는 단점이 있어 시험검사기관 등 여러기관에서  $\beta$ -agonist 실험시 원활히 사용할 수 있도록 본 실험에서는 산 처리 추출법을 이용하였다. 본 시험법 개발과정에서 확인한 회수율을 기존의 선행연구와 비교해보았을 때, 유사하거나 혹은 조금 낮은 수준으로 관찰되었으나 본 시험법의 최저 검출농도가 기존의 선행연구보다 2배 이상 낮았고 [28,29], 기존의 선행연구들과는 다르게 단일 품목의 축산물에 대한 시험법 또는 축산물 및 수산물 개별 시험법이 아니라, 소, 돼지, 닭, 알, 유, 낱치, 장어, 새우 등 총 8종의 대표 축·수산물에 동시 적용이 가능하다는 차별점이 있어 의미한 차이는 아니라 판단된다[24-29]. Ractopamine의 일일섭취허용량(acceptable daily intake, ADI)은 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw이며, 이론적 일일최대섭취량(theoretical maximum daily intake, TMDI)은 50  $\mu\text{g}$ 으로 성인(60 kg) 기준 ADI의 약 84% 수준이다(WHO, 2006). Zilpaterol의 급성 독성참고량(acute reference dose, ARfD)은 0.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw이고, 추정급성식이노출(global estimate of acute dietary exposure, GEADE) 값은 성인 기준 1.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 ARfD의 약 80% 수준이었으며(WHO,2015), clenbuterol의 경우 ADI는 0.004  $\mu\text{g}/\text{kg}$  bw, TMDI는 0.235 $\mu\text{g}$ 으로 성인 기준 ADI의 약 98%으로 보고되었다(WHO,1996). 물질별 TMDI 및 GEADE가 국내 잔류허용기준과 동일한 수준에서 계산되었기에, 본 시험법의 정량한계가 축·수산물 내  $\beta$ -agonist 잔류량 평가에 있어 합당한 수준으로 사료된다. 특히, salbutamol 및 cimaterol의 경우, ADI 및 TMDI 등의 적정섭취량 관련 연구 및 자료는 아직 보고되지 않았으나, 사용금지 물질인 clenbuterol과 동일한 수준의 정량한계를 확보하였기에 잔류량 평가에 있어

합당한 수준으로 판단된다. 본 시험법으로 축산물 및 수산물 중 잔류 되어 있는  $\beta$ -agonist의 검사 및 관리의 효율성이 증가될 것으로 사료되며, 특히 축산물만 적용되었던 기존 시험법은 달리 수산물까지 대상 품목이 확대 적용하였고, 금지물질인 salbutamol 및 국내에서 잔류허용기준이 설정되어있지 않은 cimaterol이 분석 대상 물질에 포함됨으로써, 본 연구를 통해 개선된 시험법이 국내 유통 중인 축·수산물 뿐만 아니라, 수입 축·수산물 중  $\beta$ -agonist 잔류검사에 이용될 것으로 사료된다.

### Note

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgement

This study was carried out with support of National Institute of Food and Drug Safety Evaluation of Republic of Korea (project no. 20161MFDS603).

### References

1. OECD-FAO (2021) OECD-FAO Agricultural outlook 2021-2030, 163-177. <https://doi.org/10.1787/19428846-en>.
2. OECD-FAO (2021) OECD-FAO Agricultural outlook 2021-2030, 190-201. <https://doi.org/10.1787/19428846-en>.
3. Thomas P. Van Boeckel, C. Brower, M. Gilbert *et al.* (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. The Proceedings of the National Academy of Sciences, 112, 5649-5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>.
4. S. A. Tittlemier, J. Van de Riet, G. Burns, R. Potter *et al.* (2006) Analysis of veterinary drug residues in fish and shrimp composites collected during the Canadian total diet study, 1993-2004. Food Additives and Contaminants, 24, 14-20. <https://doi.org/10.1080/>

- 02652030600932937.
5. Franco DA, Webb J, Taylor CE (1990) Antibiotic and sulfonamide residues in meat: Implications for human health. *Journal of Food Protection*, 53(2), 178-185. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.2.178>.
  6. Yoo BS, Lemaire A, Mangmool S, J Wolf M, Curcio A, Mao L, Rockman H A (2009)  $\beta_1$ -Adrenergic receptors stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(4), H1377-H1386. <https://doi:10.1152/ajpheart.00504.2009>.
  7. Johnson M (2005) Molecular mechanisms of  $\beta_2$ -adrenergic receptor function, response, and regulation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(1), 18-24. <https://doi:https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.012>.
  8. Lowell BB, Flier JS (1997) Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annual Review of Medicine*, 48, 307-316. <https://doi:10.1146/annurev.med.48.1.307>.
  9. Rogers KL, Fagan JM (1991) Effect of beta agonists on protein turnover in isolated chick skeletal and atrial muscle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 197(4), 482-485. <https://doi.org/10.3181/00379727-197-4-RC1>.
  10. Mersmann HJ (1998) Overview of the effects of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *Journal of Animal Science*, 76(1), 160-172. <https://doi.org/10.2527/1998.761160x>.
  11. Smith DJ (1998) The pharmacokinetics, metabolism, and tissue residues of  $\beta$ -adrenergic agonists in livestock. *Journal of Animal Science*, 76(1), 173-194. <https://doi.org/10.2527/1998.761173x>.
  12. Alemanno A, Capodiecici G (2012) Testing the limits of global food governance: The case of ractopamine. *European Journal of Risk Regulation*, 3(3), 400 - 407. <https://doi.org/10.1017/S1867299X00002294>.
  13. Zaitseva NV, Shur PZ, Atiskova NG, Kiryanov DA, Kamaltdinov MR (2014) Health risk assessment of exposure to ractopamine through consumption of meat products. *International Journal of Advanced Research*, 2(9), 538-545.
  14. Kang HS, Lee SB, Shin D, Jeong J, Hong JH, Rhee GS (2018) Occurrence of veterinary drug residues in farmed fishery products in South Korea. *Food Control*, 85, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.019>.
  15. Kang JW, Park HC, Gedi V, Park SJ, Kim MA, Kim MK, Kwon HJ, Cho BH, Kim TW et al. (2015) Veterinary drug residues in domestic and imported foods of animal origin in the Republic of Korea. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(2), 106-112. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.1001795>.
  16. Kyuchukova R (2020) Antibiotic residues and human health hazard-review. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(3), 664-668.
  17. Brambilla G, Cenci T, Franconi F, Galarini R, Macri A, Rondoni F, Strozzi M, Loizzo A (2000) Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology Letters*, 114(1-3), 47-53. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00270-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00270-2).
  18. Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ (2009) Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49(8), 1248-1253. <https://doi.org/10.1086/605667>.
  19. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kluytmans J et al. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
  20. Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, Gupta S, Park JY, Crowe SE, Valasek MA (2016) The global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 43(4), 514-533. <https://doi.org/10.1111/apt.13497>.
  21. Choi KD (2015) Current trends of *Helicobacter pylori* eradication in Korea. *The Korean Journal of Helicobacter and Upper Gastrointestinal Research*, 15(3), 147-154. <https://doi.org/10.7704/kjhugr.2015.15.3.147>.
  22. Shin EJ (2017) Antimicrobials and antimicrobial resistant superbacteria. *The Ewha Medical Journal*, 40(3), 99-103. <https://doi.org/10.1186/s40985-018-0099-2>.
  23. Okocha RC, Olatoye IO, Adedjeji OB (2018) Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. *Public Health Reviews*, 39(1), 1-22. <https://doi.org/10.1186/s40985-018-0099-2>.



24. Doerge DR, Churchwell MI, Holder CL, Rowe L, Bajic S (1996) Detection and confirmation of  $\beta$ -agonists in bovine retina using LC/APCI-MS. *Analytical Chemistry*, 68(11), 1918-1923. <https://doi.org/10.1021/ac951174f>.
25. Juan C, Igualada C, Moragues F, León N, Mañes J (2010) Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of  $\beta$ -agonists in animal feed and drinking water. *Journal of Chromatography A*, 1217(39), 6061-6068. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.034>.
26. Xiong L, Gao YQ, Li WH, Yang XL, Shimo SP (2015) Simple and sensitive monitoring of  $\beta_2$ -agonist residues in meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a QuEChERS with pre-concentration as the sample treatment. *Meat Science*, 105, 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.013>.
27. Yan K, Zhang H, Hui W, Zhu H, Li X, Zhong F, Chen C (2016) Rapid screening of toxic salbutamol, ractopamine, and clenbuterol in pork sample by high-performance liquid chromatography-UV method. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(2), 227-283. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.12.002>.
28. Liu R, Tang X, Xiong R, Li L, Du X, He L (2022) Simultaneous determination of fourteen  $\beta_2$ -agonist enantiomers in food animal muscles by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1193, 123169. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123169>.
29. Shao B, Jia X, Zhang J, Meng J, Wu Y, Duan H, Tu X (2009) Multi-residual analysis of 16  $\beta$ -agonists in pig liver, kidney and muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 114(3), 1115-1121. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.063>.