

육류 식품중 호르몬 성분의 분석

서 정 주*

한국기초과학지원연구원 유해물질분석연구팀
(2008. 9. 19. 접수, 2008. 11. 19. 승인)

Determination of hormonal active compounds in meat

Jungju Seo*

Hazardous Substance Research Team, Korea Basic Science Institute, Seoul 136-701, Korea
(Received September 19, 2008, Accepted November 19, 2008)

요 약: 가축의 생산성 향상을 위해 투여될 수 있는 천연호르몬과 합성 호르몬제 등의 내분비계장애물질에 대하여 기존의 분석 방법을 개선 및 확립하고, 이를 토대로 국내에 유통 중인 육류 및 내장부위 중 소간에 대해 호르몬 성분의 분포정도를 확인하였다. Estrogens (17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estrone), androgens (17 β -testosterone, 17 α -testosterone), gestagens (progesterone)의 천연호르몬 6종과 합성호르몬 3종 DES, RALs (zeranol, taleranol)을 모니터링 대상 호르몬으로 GC-MS로 분석하였으며, 이로부터 호르몬의 background level을 추정하고, 상대적으로 호르몬제 등이 잔류될 수 있는 간 등의 장기에 대한 분포조사를 실시하였다. 전체 150건의 시료 중 합성 호르몬제는 검출되지 않았으며, 천연호르몬제는 내인성으로 존재하는 progesterone이 일반적인 농도 범위를 보였다.

Abstract: To determine the trace level of synthetic and natural hormones in food, the improvement of official analytical method and new development of simultaneous determination of hormones were established. On the basis of developed analytical method, the background level of natural hormones and distribution of residual hormones were monitored in meat. Target hormones were six natural hormones such as estrogens (17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estrone), androgens (17 β -testosterone, 17 α -testosterone), and gestagens (progesterone) and three synthetic hormones such as DES, zeranol, and taleranol. These hormones were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Newly developed multi-residue analysis method was applied for meat sample which were collected from market in the capital region and monitored the presence of residues of synthetic and natural steroid hormones. No residue of synthetic hormones were detected and endogenous level of progesterone was detected in cattle, pig and liver samples tested.

Key words: Natural hormones, synthetic hormones, GC/MS, meat

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-920-0791 Fax : +82-(0)2-920-0789

E-mail : jjseo@kbsi.re.kr

1. 서 론

성장촉진호르몬제는 생체 내에서 근육단백질 합성 증가, 성장촉진 등의 효과를 발휘하는 생리활성물질로 정상적인 분비과정을 통하여 생성되는 내인성(천연)호르몬과 유사한 작용특성을 갖도록 화학적 합성과정을 거쳐 합성된 외인성(합성)호르몬으로 구분된다. 가축에서 성장촉진 효과를 발휘하는 내인성호르몬은 대부분 성호르몬(sex hormone)이 주류를 이루고 있으며 합성호르몬은 주로 성호르몬의 주축골격인 스테로이드 고리와 유사한 형태로 제조된 화학제제이다. 불법으로 사용되는 대표적인 비육촉진제로는 디에칠stil베스트롤, 트렌볼론아세이트, 클렌부테롤 등이 있다.

물질대사에 있어서 성호르몬의 대사효과는 생체의 성장과 발육에 매우 밀접한 관계가 있으며 인간과 가축의 생리적 분비과정을 통하여 정상적으로 체내에 존재하게 된다. 이러한 일반 내인성호르몬은 식육, 생선, 육류가공품, 오일 등의 식품을 통하여 매우 널리 존재하며,¹ 합성 호르몬제들은 호르몬 수용체와 결합하여 내분비계장애물질이 마치 정상호르몬과 유사하게 작용하는 호르몬 유사작용을 통하여 내분비계 교란 작용을 유발할 수 있다. 이들 잔류호르몬 물질이 있는 육류를 장기간 섭취하면 간장·신장 등 장기의 장애, 발육 저하와 같은 형태로 인체 유해성이 나타난다.^{2,3} 최근 내분비계적, 발생적, 면역부분, 신경생물학, 면역독성, 발암효과 등에 있어 17 β -testosterone, progesterone 등의 몇몇 호르몬이 특히 사춘기 이전의 어린이들에게 이상을 유발할 수 있다는 보고가 있다.⁴ 유럽연합은 “과학자들이 최신 기술을 사용해 지난 99년과 2000년 금지된 6종류의 호르몬에 대해 조사한 결과 성장호르몬을 투여해 키운 소의 고기를 먹으면 건강상 위험 가능성이 높아진다는 결론을 얻었다”고 밝힌바 있다.⁵ 유럽연합에서는 잔류 호르몬과 그 대사체들의 섭취로 인해 가능한 유해한 효과로부터 소비자들을 보호하기위해서 가축류의 성장촉진을 위한 천연 혹은 합성 호르몬의 사용을 금지하고 있다.⁶

지금까지 대부분의 분석방법은 대사 질환 진단 목적의 colorimetry, radioimmunoassay, HPLC 등이 주로 사용되어왔으나, 이들 방법은 낮은 감도를 나타내거나 혹은 구조가 비슷하거나 변형된 대사체들의 구별이 불가능한 단점을 가지고 있다. 면역측정법의 경우 간편하고 감도가 좋으나 cross-reaction 등의 단점을 가지고 있으므로 현재는 여러 화합물을 동시에 정량할 수 있고 감도가 좋으며 간섭물질을 효과적으로 배제할

수 있는 GC-MS 혹은 LC-MS로 전환하고 있다.⁷

우리나라에서는 인체에 심각한 부작용 및 발암원성으로 전 세계적으로 사용이 금지된 디에칠stil베스테롤(DES)과 주요 육류수출국에서 성장촉진용 호르몬제로 널리 사용되고 있는 제라놀(zeranol)에 대하여 축산물중 잔류허용기준을 설정하고 안전성 여부를 엄격하게 검사하고 있다. 식품의약품안전청에서는 2002년부터 식품 중에서 천연호르몬 및 DES와 zeranol의 동시분석법을 확립하고 여러 육류 매체에서 모니터링을 한 바 있다. 여러 식품매체 중 식육시료에서만 천연호르몬인 estradiol, testosterone, progesterone 3종과 DES와 zeranol 2종의 합성 호르몬제 모니터링 연구를 통하여 기초 자료만이 수집된 상태이고,⁸ 냉동건조방법을 사용한 소고기 식품중 호르몬 분석 연구가 있었다.⁹ 육류의 성장촉진을 위해 사용된 신종 합성 호르몬제 등에 대해서는 국내에서는 아직 규제를 하지 않고 있기 때문에 폭넓은 조사 및 분석법 개발이 이루어지지 않고 있다.

본 연구에서는 식품 중 극미량으로 존재하는 천연 및 합성 호르몬의 확인과 정확한 정량을 위하여 동위원소 내부표준법을 적용하고, 간단하고 효율적인 추출 및 정제방법을 확립하여 실제 육류 식품 시료 중 존재할 수 있는 대상 호르몬들을 분석하고자하였다. 따라서 소고기 뿐 아니라 돼지고기나 소간 등의 내장부위에 걸쳐 대부분의 육류식품에서 성장호르몬제의 분포정도를 알아보고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약

표준물질로 사용된 diethylstilbestrol, α, β -estradiol, estrone, epitestosterone, zeranol, taleranol, progesterone은 Sigma (St Louis, MO, USA)에서, testosterone은 Wako pure chemical industries (Japan)에서 구입하여 희석 후 사용하였다. 내부표준물질로는 DES-d₈, testosterone-d₂는 CIL (Andover, MA, USA)을 사용하였으며 estradiol-d₃와 norprogesterone은 Sigma (St Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 각 성분의 표준물질을 메탄올(estrone은 아세톤)에 녹여 1000 mg/L 표준원액을 조제하였다. 표준원액을 조제한 용매로 희석 혼합하여 소정농도(0.1~100 ng/mL)의 혼합표준액을 6단계 이상 조제하였다. 내부표준물질도 표준물질과 같이 메탄올에 녹여 1000 mg/L 표준원액을 조제하고 표준원액을 메탄올로 희석 혼합하여 소정농도(통상 1~10

Table 1. Retention times(RT) and mass spectral characteristic ions(m/z) of hormones

Compounds	Abbreviation	Quantitation ion	RT (min)	Characteristic ions (relative abundance, %)	silylation
Diethylstilbestrol	DES	412	12.62	412(79), 397(11), 398(4), 73(100)	-(OTMS) ₂
Diethylstilbestrol-d ₈	DES-d8	420	12.59	420(100), 405(19), 389(16), 73(42)	
α-Estradiol	E2α	416	14.97	416(44), 401(4), 285(62), 129(36), 73(100)	-(OTMS) ₂
β-Estradiol	E2β	416	15.34	416(61), 401(6), 285(75), 129(36), 73(100)	
Estrone	E1	414	15.12	414(21), 399(14), 231(18), 155(42), 73(100)	-(OTMS) ₂
β-Estradiol-d ₃	E2β,-d3	419	15.34	419(100), 404(10), 285(76), 73(59)	-(OTMS) ₂
Epitestosterone	epiT	432	15.04	432(55), 417(4), 209(14), 208(14), 73(100)	-(OTMS) ₂
Testosterone	T	432	15.52	432(54), 417(7), 209(12), 208(12), 73(100)	
Zeranol	ZAL	433	16.85	538(1), 523(2), 433(15), 307(20), 73(100)	-(OTMS) ₃
Talernol	TAL	433	17.00	538(2), 523(2), 433(15), 307(21), 73(100)	
Testosterone-d ₂	T-d2	434	15.52	434(100), 419(13), 211(11), 210(10), 73(47)	-(OTMS) ₂
Progesterone	P	458	17.68	458(13), 443(10), 247(6), 157(29), 73(100)	-(OTMS) ₂
Norprogesterone	norP	444	17.27	444(33), 429(35), 235(14), 157(32), 73(100)	

mg/L)의 혼합표준액을 조제하였다.

유도체화 시약으로는 PIERCE (Rockford, IL, USA) 제품의 N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA), Merck (Darmstadt, Germany) 제품의 ammonium iodide (NH₄I) 그리고 Sigma (St Louis, MO, USA) 제품의 dithioerythritol (DTE)를 1000:4:2 (v/w/w)로 혼합하여 사용하였다. 분해효소제로 β-glucuronidase-arylsulfatase (Sigma, St Louis, MO, USA)를 사용하였다. 고체상 추출 칼럼은 Phenomenex (Torrance, CA, USA)사의 Strata C₈(1g, 6 mL)와 Strata NH₂(0.5 g, 3 mL)을 사용하였으며 기타 용매는 HPLC용 (J.T. Baker, NJ, U.S.A)을 사용하였다.

2.2. 장비

기체크로마토그래피-질량분석기는 Agilent 6890 plus 기체 크로마토그래피와 Agilent 5973N 사중극자형 질량분석기(Agilent, USA)를 사용하였다. 칼럼은 DB-1MS 용융 실리카 캐피러리 컬럼 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm film thickness)을 이온원과 직접 연결되는 직접연결방식(direct interface)을 사용하였다. 오븐 온도는 초기 120°C에서 2분간 머무른 후 분당 15°C/min의 승온 속도로 250°C까지 올린 후 다시 분당 5°C/min의 승온 속도로 200°C까지 올린 후 5분 동안 머물게 하였다.

시료주입방식은 분할주입법(split, 10:1)으로 1 μL 주입하였으며 주입구 온도는 250°C, 인터페이스온도는

280°C, 그리고 운반기체로 헬륨(99.999%)을 사용하였고 유속은 1 mL/min, 평균 선속도 39 cm/sec이었다.

질량분석기에 사용된 이온화 법은 전자 충격법(electron impact ionization)으로 이온화 에너지 70 eV에서 사용하였으며, 이온원 온도 230°C를 유지하였다. 검출모드로 정량분석을 위하여 선택이온검색(selected ion monitoring, SIM)에서 각각의 정량이온과 확인이온을 선택하였다. 본 실험에서 선택한 정량 이온 및 대상물질의 머무름 시간을 Table 1에 실었다.

2.3. 실험방법

소비량이 큰 식육(소고기, 돼지고기) 및 소의 내장 중 섭취량이 많은 간을 대상 시료로 선정하여 서울 및 수도권 지역의 상점에서 구입하여 분석하였다. 육류시료(소고기, 돼지고기, 소간)는 200 g 이상 분쇄기로 갈아 균질화한 후 냉동고(-20°C)에 보관하였다. 소고기 시료의 경우 기존에 발표했던 분석법을 일부 변형하여 사용하였다.⁹

분쇄한 시료 5 g을 달아 육류 시료의 경우 5 mL의 증류수를 넣은 후 microwave로 30초간 추출하였고, 간의 경우는 증류수 대신 5 mL acetate buffer (0.2M, pH 5.2)를 넣어 흔들어주었다. 여기에 80 μL glucuronidase를 넣고 incubator에 넣어 52°C에서 15시간 이상 반응하였다.¹⁰

추출은 내부 표준물질과 메탈을 30 mL 넣은 후 20분간 초음파 추출 후 -20°C의 냉동고에 30분 이상

넣어두어 지질을 응고시킨 후 상층액을 따라내고 석출된 지방질을 제거하였다. 용기를 메탄올로 씻어낸 후 상층액과 세척액을 합한 후 회전식 감압 농축기로 고체상 추출을 하기위해 농축하였다. 시료의 정제를 위해 5 mL 메탄올과 5 mL 증류수로 C₈ SPE 카트리지를 씻은 후 위의 액을 옮기고 5 mL 증류수로 용기와 카트리지를 세척한 후 세척액은 버리고 4 mL 메탄올로 분석물을 회수용 수기에 용출시킨 후 질소 농축기로 농축하였다.

에틸아세테이트/메탄올(80:20) 2 mL에 녹인 추출물을 포화에틸아세테이트 즉 에틸아세테이트/증류수(25:0.68) 5 mL와 에틸아세테이트/메탄올(80:20) 5 mL로 세척한 NH₂-SPE에 올린 후 에틸아세테이트/메탄

올(80:20) 6 mL로 용출시킨 후 이 용출액을 질소 농축기에 농축시켜 용매를 완전히 날려 보내어 유도체화하였다. 유도체화 방법은 시료를 완전히 건조시킨 시험관에 MSTFA/NH₄I/DTE (1000:4:2, v/w/w) 80 µL와 주사기표준물질 phenanthrene-d₁₀ (1 ppm) 20 µL를 넣고 밀봉한 후 100°C에서 20분간 반응 후 상온에서 식히고, 1 µL를 GC/MS의 시료로 하였다. 전체적인 분석 개요도는 Fig. 1과 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 대상 호르몬제의 결정

기존에 발표된 육류시료 분석에서 여러 다른 연구

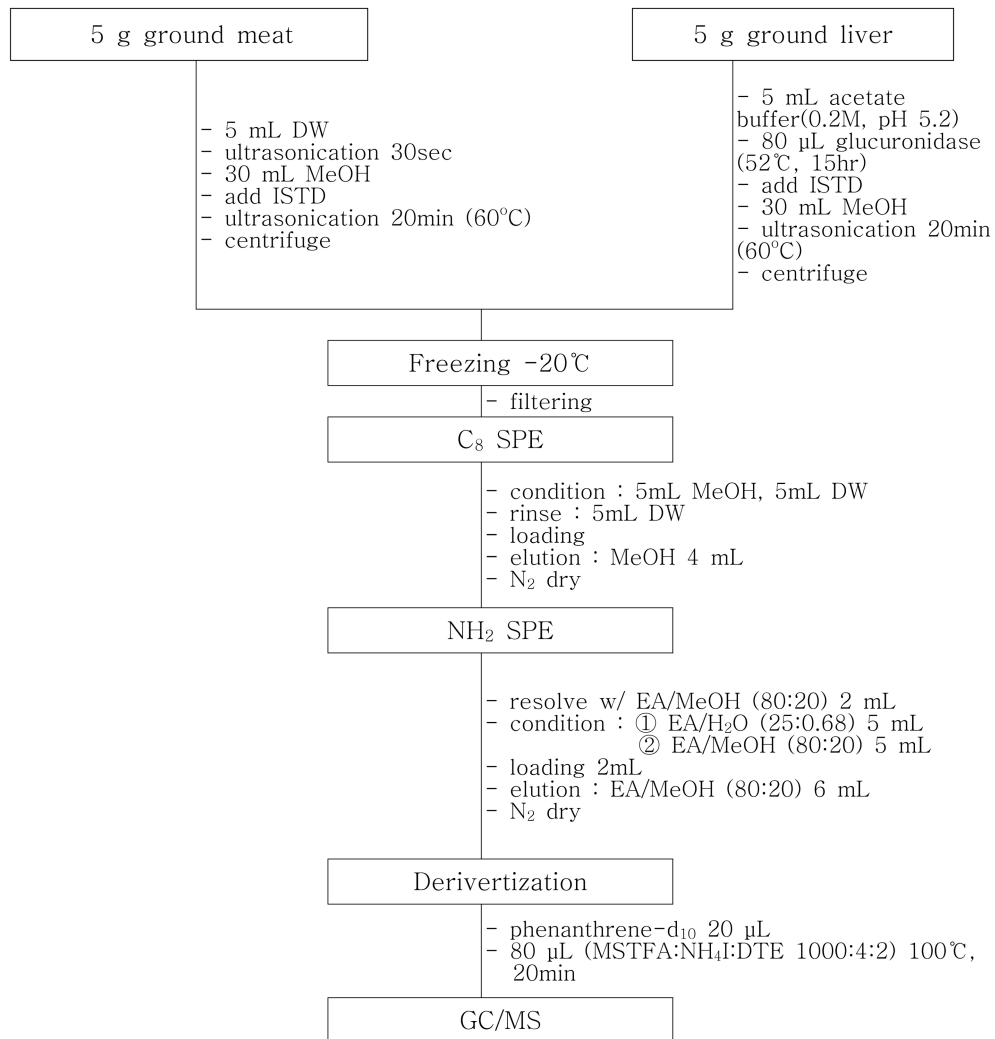


Fig. 1. Analytical procedure of hormones in meat.

에 의하면¹¹ 근육조직이나 지방조직에 있는 천연 스테로이드 호르몬제의 경우 steroid glucuronides 혹은 sulphates를 분리시키기 위한 enzymatic hydrolysis가 필요하지 않다고 보고된 바 있고, 따라서 육류가공식품의 경우 대부분 free steroid만 분석되어졌다. 성장호르몬제중 가장 큰 bioactivity를 가지는 estrogen의 경우 상당한 양의 17 α -estradiol과 estrone이 존재하므로 각각 따로 분석하였다. 나머지 대부분의 성장호르몬제의 경우 각각의 대표적인 이성질체가 가장 높은 비율로 대사된다. 단 testosterone의 epimer인 epitestosterone은 약한 anti-androgen으로 활동한다고 알려져 있다.¹²

Estradiol은 근육에서는 38-70%의 17 α -estradiol과 17-45%의 estrone으로 존재한다. 지방조직에서도 근육 시료와 비슷한 분포를 보이며 따라서 conjugation 형태는 상대적으로 매우 적게 존재한다. 이에 반하여 신장이나 간 조직에서는 17 α -estradiol-glucuronide, 17 β -estradiol등이 존재하는 것으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁴ 또한 수송아지의 간에는 17 α -estradiol, 17 α -estradiol의 β -D-glucopyranoside, 17 α -estradiol의 3-b-D-glucuronate 그리고 다른 estradiol의 17-glycosides가 존재한다고 알려져 있다.¹⁵

추후 실시된 3중수소로 표지된 17 β -estradiol의 주입 실험으로부터도 근육과 지방조직에서 주요 잔류물은 17 β -estradiol와 estrone으로 알려졌으며, 17 α -estradiol은 소량 존재함이 다시 확인되었다.¹⁶ 이에 반하여 신장과 간 조직에서는 free steroid와 glucuronic-과 glycoside conjugates를 통합하여 17 α -estradiol이 주대사체이고 17 β -estradiol은 소량 존재한다. catechol 대사체는 검출되지 않았다.

Progesterone의 경우도 근육조직에는 54%의 free steroid가 존재하며 지방조직에는 69%의 free steroid가 존재한다.¹⁷ 근육에는 그 외에 주요 대사체로 16%의 5 α -pregnane-3, 9%의 20-dione, 8%의 20- β -hydroxy-4-pregnen-3-one, 13%의 3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one과 3%의 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one 등이 존재하는 것으로 알려져 있다. 지방조직에는 약 73%의 conjugation된 형태가 존재하는데 지방조직에서 발견되는 대사체는 약 62% 정도로 알려져 있으며 그 중 약 11%정도가 20- β -hydroxy-4-pregnen-3-one이다.¹⁸ 따라서 progesterone의 경우도 free steroid의 conjugation 형태는 존재하지 않는다. 유럽과 미국의 규제대상 호르몬과 그 대사체등을 참고하여 본 연구에서는 국내 규제대상 성장호르몬 2종(DES, zeranol)과 가장 많이 사용되는 천연형 성장호르몬들, 그리고 그 주대사체를

중심으로 분석대상 9종의 호르몬과 대사체를 결정하였다.

3.2. 추출 및 정제

성장 호르몬제의 추출에는 극성 용매인 증류수/메탄올 용매가 가장 일반적으로 쓰인다. 따라서 일반적으로 성장호르몬제류를 일괄 추출 후 극성에 따라 각각 다른 SPE를 사용하여 분획하여 나누고 계열별로 다른 정제과정을 거친다. 그러나 본 실험에서는 극성 스테로이드 물질인 stilbenes이나 RAL's, estradiol 등의 페놀계 스테로이드 뿐 아니라 androgen이나 gestagen 같은 중성 스테로이드를 동시에 추출하는 방법을 적용하였다.

근육 시료의 경우 추출과 탈단백질화를 동시에 하기위해 시료에 증류수를 넣은 후 300 W에서 30초간 microwave 처리하였고, 그 다음 메탄올을 첨가하여 60°C에서 10분간 초음파 추출 등을 시도하였다. 대사가 일어나는 간 시료의 경우 deconjugation을 위해 glucuronidase/arylsulfatase 처리를 하였으며 이 경우 52°C에서 15시간 반응하는 중에 탈단백질화가 일어나므로 deconjugation 후 초음파추출하였다. 추출물을 바로 고체상 추출 카트리지에 올릴 경우 시료 불순물과 응고단백질에 의해 카트리가 막히게 되어 전체적인 회수율 저하가 일어나므로 시료와 추출용매를 열처리함으로써 탈단백질화(deproteinizing)를 시켜 추출을 용이하게 하고 추출 효율을 높일 수 있다.

추출 중에 조직속의 지방성분이 녹아져 나오므로 메탄올 추출 후에 시료를 4°C에서 원심분리하여 주면 낮은 온도에서 지방성분이 굳어지게 된다. 이때 석출된 지방을 냉동 후 저온 여과에 의해 제거하면 대부분의 지방성분은 제거되고 triacylglycerol 성분만 용액에 남게 된다. 냉동지질제거 실험과 함께 여과 후 남은 육류시료를 헥산 15 mL로 2회 추출하여 용액에 남은 지질을 다시 제거하였다. 따라서 무게분석법으로 확인한 최종적인 지질의 제거율은 평균 97.1%로 확인되었다.

그러나 메탄올 추출액을 헥산으로 추출 시 progesterone이 약 50%정도 헥산 층으로 추출이 되어 성장 호르몬제들의 회수율이 감소하게 되는 문제점이 발생한다. 또한 추출용매인 메탄올은 헥산과 어느 정도 서로 섞이므로 여기에서도 추출효율이 감소하게 된다. 따라서 헥산 추출과정을 생략하여 사용되는 용액의 양을 줄이고 호르몬제의 회수율을 높이며 여과 후 남은 triacylglycerol 성분을 효과적으로 제거하기위

해 C₈ cartridge의한 정제방법을 적용하였다. 9종의 천연 및 합성 호르몬을 분획하여 따로 분리하지 않고 C₈ 카트리지로 한꺼번에 용리시키기 위하여 메탄올로 용리시키는 조건을 사용하였다. 따라서 1차 정제 과정과 지질분리를 위한 C₈ 칼럼의 전체 성장 호르몬제에 대한 동시 분리 및 정제 조건을 확립하였고 이 조건에서 전체 9종의 성장호르몬제들이 모두 분리 용출되었으며 95% 이상의 매우 좋은 회수율을 보였다. 극성 물질제거를 위한 아미노프로필 카트리지(0.5 g, 3 mL) 역시 모든 물질이 에틸아세테이트/메탄올(80:20) 4 mL 이내에서 용출되었고 90% 이상의 회수율을 보였다.

3.3. 분석법 검증

내부표준법을 이용하여 GC/MS로부터 얻어진 분석 대상물질과 내부표준물질과의 각각의 면적비로부터 9종의 호르몬에 대한 검량곡선을 구하였다. 8종의 호르몬에 대한 검량곡선은 DL~5 µg/kg 범위에서 0.99이상의 좋은 직선성을 나타내었고, 다른 호르몬에 비해 실제 검출 농도와 검출빈도가 높은 progesterone은 0.2~20 µg/kg과 1~50 µg/kg의 두 구간으로 나누어 검량곡선을 구하였다.

시료별로 실험 방법에 대한 검출 한계를 구하기 위하여, 소고기 및 소간을 200 g이상 균질화한 후 7개의 시료에 호르몬제를 첨가하여 회수 실험하였다. Progesterone은 1 µg/kg, 그 외 8종의 호르몬은 0.5 µg/kg 농도가 되도록 첨가하여 전처리 과정을 거쳤다. 각 호르몬에 대한 검출한계(DL)는 기기에 대한 검출한계로써 S/N>3 으로 구한 것이고, 분석법검출한계(MDL)는 실험 과정을 거친 육류와 내장, 2종류의 시료 각 7개씩에 대한 호르몬 농도의 표준편차를 이용하여 3.143×σ (99% 신뢰구간)로 구한 값이다. 이 결과를 Table 2에 표시하였다.

Table 2. Method detection limits of hormones in meat (n=7)

Compounds	DL (µg/kg)*	MDL (µg/kg)		National MRPL (µg/kg)**
		beef	bovine liver	
Diethylstilbestrol	0.02	0.04	0.05	2
α-Estradiol	0.05	0.2	0.2	2
β-Estradiol	0.05	0.2	0.2	2
Estrone	0.05	0.4	0.4	-
Epitestosterone	0.05	0.1	0.1	2
Testosterone	0.05	0.1	0.1	2
Zeranol	0.1	0.2	0.2	5
Taleranol	0.1	0.2	0.2	5
Progesterone	0.2	0.3	0.4	10

*Instrumental detection limit S/N >3

**EU national minimum required performance limits

시료별로 개발된 분석법의 회수율을 구하기 위해 호르몬제 표준품 10 µg/kg을 2종류의 육류 및 소간시료에 첨가하여 회수 실험하고 정밀도를 구하였다. 각각의 시료에 대해서 9종의 성장 호르몬제는 66~112%의 회수율을 보였다. 회수율과 표준편차를 Table 3에 나타내었다.

기존의 분석법보다 더 작은 시료량을 사용하여 분석하였으나 유럽의 검출한계기준보다 월등한 결과를 보였고 전체 육류 식품 시료에 적용하여도 적절한 회수율과 표준편차를 보였다.

3.4. 육류식품에서 호르몬제의 분석

우육, 돈육 및 소의 내장(간)에 대해 총 150건의 시료를 서울 및 수도권 지역의 상점에서 구입하여 분석하였다. 평균지방 함량은 국내산 등심은 13%, 국내산 돼지고기는 21%, 간은 5% 이었다.

전체 시료에서 합성호르몬인 DES와 zeranol 그리고

Table 3. Method Recoveries and RSD(%) of hormones from spiked in meat (fortified 10 µg/kg; n=4)

No.	Compounds	Mean Recoveries %(RSD %)		
		bovine liver	beef	pork
1	Diethylstilbestrol	81.1(5.2)	96.3(2.3)	65.6(6.9)
2	α-Estradiol	96.8(4.1)	94.8(4.1)	88.0(2.7)
3	β-Estradiol	94.2(3.4)	96.1(3.0)	90.6(2.1)
4	Estrone	106.4(4.5)	100.7(2.6)	89.1(0.9)
5	Epitestosterone	85.3(5.8)	76.9(4.0)	71.9(2.7)
6	Testosterone	83.0(4.3)	80.4(2.8)	76.7(1.1)
7	Zeranol	106.6(3.7)	88.6(5.9)	88.0(3.8)
8	Taleranol	112.9(6.3)	83.6(6.5)	83.8(5.0)
9	Progesterone	100.9(7.7)	98.6(3.1)	81.1(5.5)

Table 4. Average concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) of steroid hormones in meat ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Samples	DES	E2 α	E2 β	E1	ET	T	ZAL	TAL	P (No. of Postive)
Domestic	beef	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.01 (1/60)	n.d.	n.d.	2.80 (39/60)
	pork	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.79 (8/30)
	bovine liver	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Imported	beef	n.d.	n.d.	0.16	n.d.	n.d.	0.02	n.d.	0.59 (10/40)

*n.d. : not detected (below method detection limits)

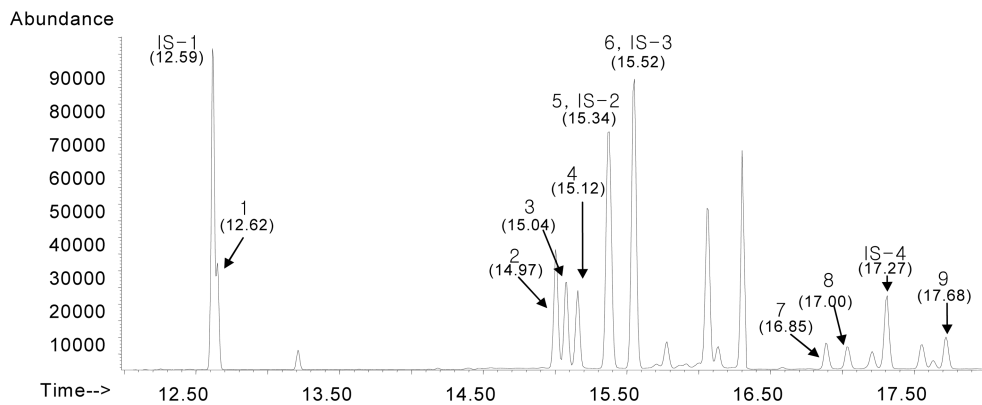


Fig. 2. Total ion chromatogram of growth hormones extracted in spiked pork sample ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$). Peak's identity as follow, 1: DES-(OTMS)₂, 2: α -estradiol-(OTMS)₂, 3: epitestosterone-(OTMS)₂, 4: estrone-(OTMS)₂, 5: β -estradiol-(OTMS)₂, 6: testosterone-(OTMS)₂, 7: zeranol-(OTMS)₃, 8: taleranol-(OTMS)₃, 9: progesterone-(OTMS)₂, IS-1 (12.59 min): DES-d₈-(OTMS)₂, IS-2 (15.34 min): β -estradiol-d₃-(OTMS)₂, IS-3 (15.52 min): testosterone-d₂-(OTMS)₂, IS-4 (17.27 min): norprogesterone-(OTMS)₂.

estrogen류는 전혀 검출되지 않았다. 17 β -Estradiol은 내인성으로 생성되며 일부 동물에서 매우 낮은 수준으로 발견될 수 있다. 육류에서 17 β -estradiol의 주대사체는 estrone과 17 α -estradiol 그리고 glucuronide conjugates이다.¹¹ 17 α -Estradiol의 경우 bioactivity가 매우 적어서 일반적으로 background level을 측정하지 않는다.

국내산 소고기 1건에서 epitestosterone이 검출되었다. Testosterone은 내인성으로 생성되며 일부 동물에서 낮은 농도로 발견된다. Testosterone의 17 α -epimer인 epitestosterone은 수소와 암소 모두에서 0.1~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도로 검출될 수 있다고 보고된 바 있다.¹⁹ 이번 분석에서는 0.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 농도가 검출되었고 이 결과는 일반적으로 소에서 검출될 수 있는 내인성 호르몬 수준의 농도이다.

천연호르몬 중 가장 많이 검출된 호르몬은 proge-

sterone이다. 국내산 소고기에서는 60개의 시료 중 39건, 수입산 소고기는 40건의 시료 중 10건이 검출되었다. 국내산 돼지고기에서는 8건이 검출되었다. 본 연구에서 검출된 progesterone의 평균농도는 국내산 우육 시료에서 검출된 시료만의 경우 4.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 수입우의 경우 2.38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 평균농도를 보였다. 또한 검출량과 검출빈도가 높은 한우 시료에서 측정된 농도 범위는 0.52~31.73 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로써 일반적으로 보고된 내인성으로 존재하는 호르몬의 정도 값을 가진다.²⁰ 소간 시료의 경우 20개 시료 중 양성을 보이는 시료는 없었다. 각 육류시료에 대한 분석 결과를 Table 4에 나타내었다.

스테로이드 호르몬의 생체농도는 가축의 성별, 품종, 성숙기 이전, 성숙 후등의 도축시기, 임신 중, 거세여부 등 다양한 요인에 의해 변할 수 있다. 이러한 특성에 따라 천연형 호르몬의 잔류정도와 분석방법이 정

해져야한다. 또한 본연구의 목적은 일반적으로 섭취하는 식품에 어느 정도의 스테로이드 호르몬이 분포하고 이를 기반으로 노출평가에 필요한 제반 정보를 제공하는 데 있다. 따라서 식품에 대한 이러한 정확한 정보를 얻기 위해서는 돼지고기, 소고기 등 식육 원료에 대한 지속적인 다양한 모니터링이 필요하다.

4. 결 론

본 연구에서 개발된 분석법은 육류 및 간 등의 내장에서 천연 및 합성 호르몬제 뿐 아니라 estrogen 대사체까지 그 성질에 따라 정체를 위한 분석을 나누지 않고 동시에 분석이 가능하다. 또한 액-액 추출법을 고체상추출법으로 대체하여 지질제거 용매인 헥산에 의해 유실되는 지용성 스테로이드인 progesterone 등의 회수율을 증가시킬 수 있었으며, 전체 분석시간도 줄일 수 있었다. 본 연구팀은 기존의 기기분석방법을 사용하면서 전처리 방법으로 냉동지질여과법을 사용하고 최적의 유도체화방법과 동위원소 표지된 내부표준물질을 사용하여 목표검출한계를 낮출 수 있었다. 목표 검출한계 내에서 유럽의 공인 방법보다 사용 시료무게를 줄여서 사용함으로써 새로운 분석방법에 의해 시약과 시간을 절약하였다. 정제과정을 한 단계 줄임으로서 쉽고 빠른 분석조건을 찾았으며 전체적인 실험의 검출한계나 재현성 등에서 매우 우수한 결과를 보였다. 전체적으로 소모되는 유해 시약의 사용량을 줄였으며, 인공인력의 노력과 시간을 절감하여 다량분석의 가능성을 제시하였다. 따라서 소고기이외에 돼지고기, 내장 등 일반적인 가식부위에 대한 전체적인 전처리 방법 및 분석법이 확립되었다.

본 연구에서 확립된 분석법을 이용하여 총 150건에 대한 모니터링 결과 합성호르몬은 한 건도 검출되지 않았고, 천연호르몬으로는 progesterone은 57건이 검출되었고, epitestosterone은 한 건 검출되었다. 검출된 농도를 감안하여 볼 때 내인성으로 존재하는 정도로 판단되어진다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 내분비계장애물질연구사업 “식품중 호르몬 성분의 분석법 개발 및 모니터링”으로 수행된 연구결과이며 지원하여 주신 식품의약품안전청에 감사드립니다.

참고문헌

1. A. Andersson and N. E. Skakkebaek, *European J. of Endocrinology*, **140**, 477-485(1999).
2. A. Daxenberger, D. Ibarreta and H. H. H. Meyer, *Human Reproduction Update*, **7**(3), 340-355(2001).
3. D. Ibarreata, A. Daxenberger and H. H. D. Meyer, *APMIS*, **109**, 161-184(2001).
4. J. G. Liehr *Human Reproduction Update*, **7**(3), 273-281(2001).
5. R. L. Guevel, and F. Pakdel, *Human Reproduction*, **16**(5), 1030-1036(2001).
6. Commission of the European Communities, Council Directive 96/22/EC, Off. J. Eur. Communities: Legis. L125, 3, (1996).
7. JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX COMMITTEE ON RESIDUES OF VETERINARY DRUGS IN FOODS, Twelfth Session Washington, D.C., 28-31 March 2000 “Methods of analysis for veterinary drugs” (Prepared by Canada and the United States of America).
8. 서정주, 김혜영, 홍종기, *분석과학*, **15**(4), 39A-49A (2002).
9. J. J. Seo, H.-Y. Kim, B. C. Chung, and J. K. Hong, *Journal of Chromatography A*, **1067**, 303-309(2005).
10. B. Shao, R. Zhao, J. Meng, Y. Xue, G. Wu, J. Hu and X. Tu, *Analytica Chimica Acta* **548**, 41-50(2005).
11. S. Fritsche, G. Schmidt and H. Steinhart, *Eur. Food Res. Technol.*, **209**, 393-399(1999).
12. L. Starka, M. Bicikova and R. Hample, *J. Steroid Biochem.*, **33**, 1019-1021(1989).
13. JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Food and Nutrition Paper No. 41. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma 1998.
14. T. G. Dunn, C. C. Kaltenbach, D. R. Koritnik, D. L. Turner and G. D. Niswender, *J. Anim. Sci.*, **46**, 659-73 (1979).
15. P. N. Rao, R. H. Purdy, M. C. Williams, P. H. Moore, Jr, J. W. Goldzieher and D. S. Layne, *J. Steroid Biochem.*, **10**, 179-185(1979).
16. L. A. P. Hoogenboom, L. De Haan, D. Hooijerink, G., Bor, A. J. Murk and A. Brouwer, *Acta Pathologica*,

- Microbiologica et Immunologica Scandinavia* **109**, 101-107(2001).
17. M. T. Lin, V. L. Estergreen, G. E. Moss, J. D. Willett and W. Shimoda, *Steroids*, **32**, 547-561(1978).
18. V. L. Estergeen, M. T. Lin, E. L. Martin, G. E. Moss, A. L. Branen, L. O. Luedecke and W. Shimoda, *J Anim Sci.*, **46**, 642-651(1977).
19. G. W. Ivie, R. J. Christopher, C. E. Munger and C. E. Coppock, *J. Anim. Sci.*, **62**, 681-690(1986).
20. S. Fritsche and H. Steinhart, *J. Anim. Sci.*, **76**, 1621-1625(1998).