# 과일류 중 나타마이신 시험법

가. 시험법 적용범위

과일류 등 식품에 적용한다.

나. 분석원리

시료를 메탄올로 추출한 후 HLB 카트리지로 정제하여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

1) 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)

라. 시약 및 시액

1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 특급
2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
3) 표준원액: Natamycin 표준품을 메탄올에 녹여 1,000 mg/L가 되게 한다.
4) 표준용액: 표준원액을 무처리 시료 추출물을 이용하여 적당한 농도로 혼합, 희석한다(무처리 시료 추출물 90% 이상 포함).
5) HLB 카트리지(Hydrophilic-lipophilic balance cartridge): Divinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone copolymer(500 mg) 고정상이 충전되어있는 일회용 카트리지 또는 이와 동등한 것
6) 기타시약: 잔류농약 시험용 또는 특급

마. 시험용액의 조제

1) 추출

시료 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 담고 메탄올 10 mL를 넣어 10분간 강하게 흔들어 추출한 후 4,000 *G*에서 10분간 원심분리하고 상층액 전량을 취하여 별도의 용기에 옮긴다. 추가로 메탄올 10 mL를 넣어 위의 과정을 되풀이하여 상층액을 모은 후 메탄올을 이용하여

부피를 25 mL로 맞춘다.

2) 정제

HLB 카트리지에 메탄올 3 mL와 물 3 mL를 차례로 넣고 2~3 방울/초의 속도로 유출시켜 활성화한다. 고정상 상단이 노출되기 전에 '1)추출'로부터 얻은 용액 5 mL를 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출시켜 받고, 고정상 상단이 노출되기 전에 메탄올 5 mL를 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출시켜 앞서 받은 액과 합쳐 부피를 10 mL로 맞춘다. 용출액 중 5 mL를 취하여 40℃ 이하에서 농축한 뒤 잔류물을 메탄올 1 mL로 녹인 후 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 μm)로 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

가) 컬럼: $C_{18}$계 컬럼 또는 이와 등등한 것

나) 컬럼 온도: 40℃

다) 이동상

(1) 이동상 A: 0.1% 포름산을 함유한 물 또는 이와 동등한 것

(2) 이동상 B: 0.1% 포름산을 함유한 아세토니트릴 또는 이와 동등한 것

(3) 농도구배조건

| 시간(분) | A(%) | B(%) |
|---|---|---|
| 0.0 | 80 | 20 |
| 1.0 | 80 | 20 |
| 6.0 | 10 | 90 |
| 8.0 | 10 | 90 |
| 8.1 | 80 | 20 |
| 12.0 | 80 | 20 |

라) 이동상 유속: 0.2 mL/min

바) 주입량: 5 μL

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: ESI positive-ion mode

나) Capillary voltage: 5.5 kV

다) Collision gas: 아르곤(Ar)

라) 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

| 분석성분 (Compound) | 분자량 (MW) | 관측질량 (Exact mass) | 선구이온 (Precursor ion, *m/z*) | 생성이온 (Product ion, *m/z*) | 충돌에너지 (Collision energy, eV) |
|---|---|---|---|---|---|
| 나타마이신 (Natamycin) | 665.7 | 665.3 | 666 | 503[1)] | 17 |
| | | | | 485 | 21 |
| | | | | 467 | 23 |

[1)] 정량이온

※ 각 선구이온 및 생성이온에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 적용이 가능하다.

※ 생성이온간 반응세기의 비율 허용 범위

| 이온간 반응세기의 비율(%) | 허용범위(%) |
|---|---|
| 〉50 | ±20 |
| 〉20, ≤50 | ±25 |
| 〉10, ≤20 | ±30 |

3) 검량선 작성

표준용액을 농도별로 일정량 취하여 액체크로마토그래프-질량분석기에 각각 주입하여 얻은 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적 값으로 검량선을 작성한다.

4) 표준용액의 크로마토그램

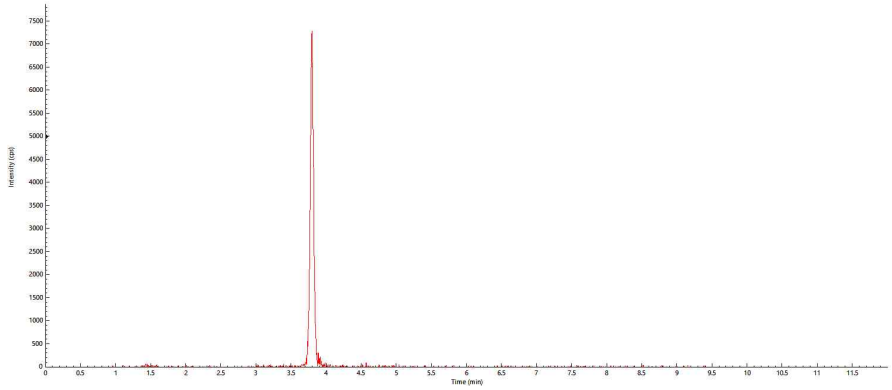



그림. 액체크로마토그래프-질량분석기 크로마토그램 예시.

나타마이신 (3.7분)

* 분석기기: LC(PerkinElmer® QSight™ LX50), MS/MS (PerkinElmer® QSight™ 210),

컬럼(Capcell core $C_{18}$ (2.1 mm I.D. × 100 mm L., 2.7 μm)

5) 정량한계

0.01 mg/kg

사. 정량시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크가 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치할 때 피크 높이 또는 면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

아. 확인시험

액체크로마토그래프-질량분석기상의 머무름 시간과 특성이온으로 나타마이신을 확인한다.