마른김 중 감미료성분(스테비오사이드, 리바우디오사이드A) 시험법

□ 액체크로마토그래프-질량분석기를 이용한 정성시험

가. 시험법 적용범위

마른김에 적용한다.

나. 분석원리

감미료인 스테비올배당체와 효소처리스테비아에 공통으로 함유된 성분인 스테비오사이드 및 리바우디오사이드A를 물로 추출한 후 액체크로마토그래프로 분리하여 질량분석기로 확인하는 방법이다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)

라. 시약 및 시액

1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
3) 표준원액: 스테비오사이드, 리바우디오사이드A 표준품을 물에 녹여 1,000 mg/L가 되게 한다.
4) 표준용액: 표준원액을 무처리 시료 추출물을 이용하여 적당한 농도로 혼합, 희석한다(무처리 시료 추출물* 90% 이상 포함).
   * 무처리 시료 추출물 : 분석대상 물질을 함유하고 있지 않는 시료와 동일한 종류의 식품을 시험용액과 같은 방법으로 추출, 정제한 것
5) 내부표준물질: 와파린 표준품을 메탄올에 녹여 100 mg/L가 되게 한다.
6) C_{18} 카트리지: C_{18}(500 mg) 고정상이 충전되어 있는 일회용 카트리지(용량 6 mL) 또는 이와 동등한 것(사용전에 메탄올 5 mL, 물 5 mL를 차례로 흘려 보낸 후 사용한다).
7) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

시료를 분쇄하여 균질화한 후 1 g을 정밀히 달아 물 20 mL을 가하여 균질화하고 내부표준물질을 최종 농도 0.1 mg/L가 되도록 가한 다음 물을 가하여 25 mL로 한다. 30분간 초음파 처리한 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 한다. 정제 C_{18} 카트리지에 상층액 5 mL를 가하여 1~2 방울/초의 속도로 통과시키고 메탄올 5 mL을 가하여 1~2방울/초의 속도로 통과시켜 나온 액을 합쳐 메탄올로 정용하여 10 mL로 한 후 0.45 ㎛ Nylon filter로 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

가) 칼럼: C_{18}(2×100 mm, 3㎛) 또는 이와 동등한 것

나) 칼럼 온도: 40℃

다) 이동상

(1) 이동상 A: 10mM 아세트산암모늄을 함유한 물

(2) 이동상 B: 10mM 아세트산암모늄을 함유한 메탄올

(3) 농도구배조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	95	5
3.0	95	5
7.0	5	95
10.0	5	95
10.1	95	5
15.0	95	5

라) 이동상 유속: 0.2 mL/분

바) 주입량: 5 μL

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: ESI negative-ion mode

나) Capillary voltage: 5 kV

다) Collision gas: N_2

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)
스테비오사이드	804.9	804.5	803	641.5[1)]	16
				479.5	65
리바우디오사이드A	967.0	966.6	965	803.0[1)]	28
				641.0	70
와파린 (내부표준물질)	308.3	308.2	307	250.2[1)]	23
				161.2	24

[1)] 정량이온이며, 그 외는 정성이온임.

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

3) 검량선 작성

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

4) 표준용액의 크로마토그램

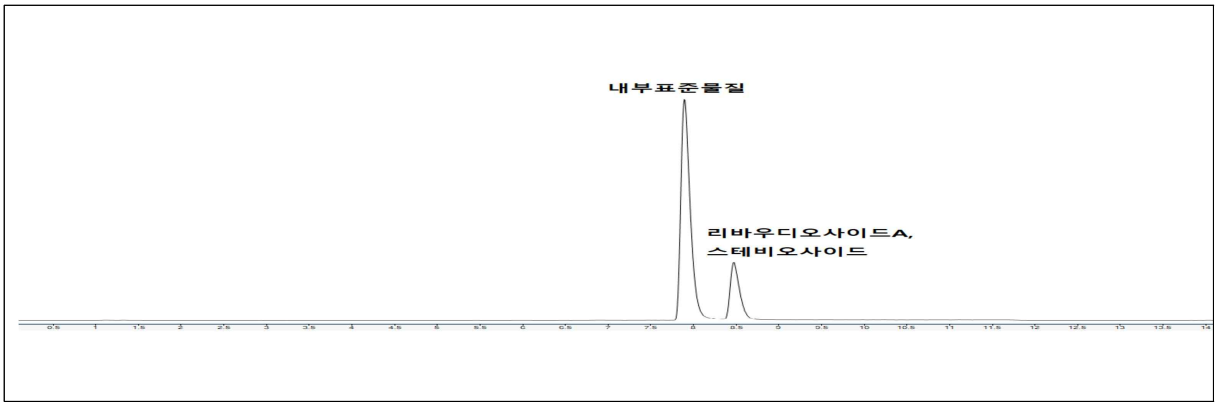
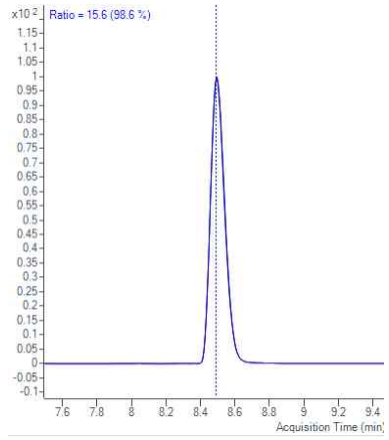
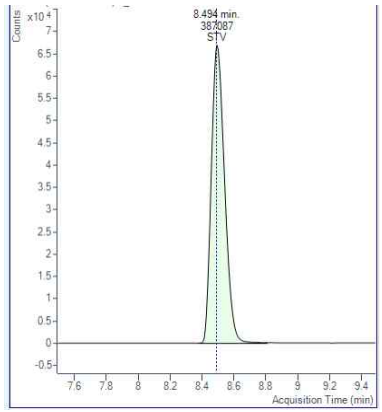
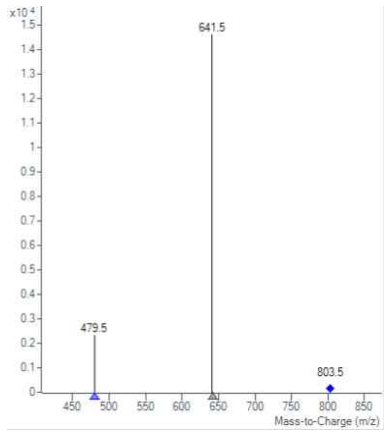
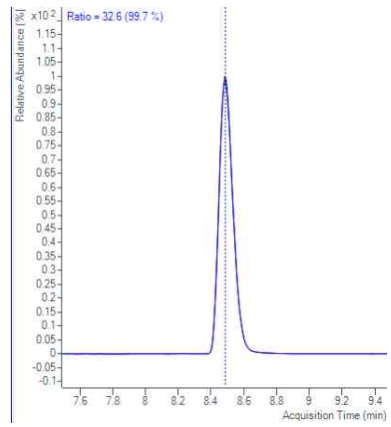
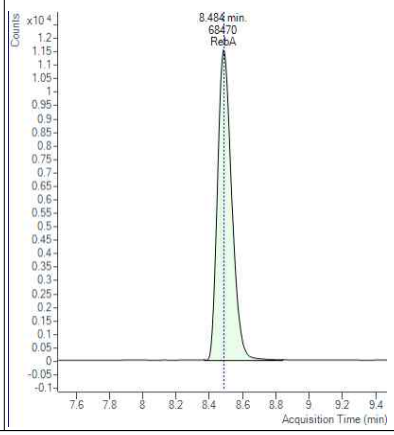
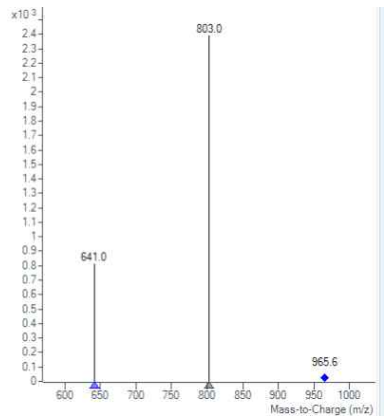


그림1. 액체크로마토그래프-질량분석기 크로마토그램(예시)

내부표준물질(7.9분), 스테비오사이드(8.5분), 리바우디오사이드A(8.5분)

스테비오사이드 이온값 예시		
정량이온(641.5)	정성이온(479.5)	생성이온간 반응세기
		

리바우디오사이드A 이온값 예시		
정량이온(803.0)	정성이온(641.0)	생성이온간 반응세기
		

5) 검출한계: 스테비오사이드(2.5 mg/kg), 리바우디오사이드A(3.5 mg/kg)

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precusor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 반응세기의 비율(response ratio)을 비교하여 그 비율이 허용범위(±20~30%) 이내에서 일치하여야 한다[주1].

주1. 생성이온간 반응세기의 비율 허용 범위

이온간 반응세기의 비율(%)	허용범위(%)
> 50	≤ ±20
> 20 ~ ≤ 50	≤ ±25
> 10 ~ ≤ 20	≤ ±30