

9. 식품 중 유해물질 시험법

9.1 중금속

9.1.1 일반원칙

가. 검체의 처리

1) 중금속 시험에 사용하는 검체의 사용부위는 아래표와 같다. 다만, 이 표에서 정하지 아니한 품목은 원칙적으로 가식부를 사용부위로 한다.

① 농·임산물

분류	품목	사용부위·처리방법
곡류	귀리, 기장, 보리, 수수, 울무, 조, 쌀(현미 제외)	탈각 후 도정한 것
	쌀(현미), 메밀, 밀	탈각한 것
	옥수수	외피, 수염 및 이삭 속을 제거한 것
서류	감자, 고구마, 마, 토란	흙 등 이물질 제거한 것
두류	강낭콩, 동부, 완두, 녹두, 대두, 팥	깍지를 제거한 것
건과 종실류	밤, 은행, 잣	겉껍질과 속껍질을 제거한 것
	땅콩, 아몬드, 호두, 마카다미아, 캐슈너트, 피스타치오, 피칸	겉껍질을 제거한 것
	검정깨, 들깨, 참깨	중자 그대로의 시료
	해바라기씨, 호박씨	겉껍질을 제거한 것
과일류	감(단감, 홍시), 배, 사과, 복숭아, 자두, 대추, 매실, 살구, 체리	꼭지와 씨(씨방)를 제거한 것
	석류	껍질을 제거한 것(씨 포함)
	레몬, 라임, 오렌지, 유자, 자몽, 망고, 파인애플	겉껍질과 씨(심지)를 제거한 것
	딸기, 무화과, 포도	꼭지를 제거한 것
	키위(참다래), 바나나, 귤	껍질을 제거한 것
엽채류 (결구 엽채류 포함)	배추, 양배추, 브로콜리, 비름나물, 참나물, 신선초(명일엽), 유채, 쑥갓, 쑥, 청경채, 갓, 엇갈이배추(쌈배추, 봄동 등 포함), 근대, 머위, 아욱, 씀바귀, 상추, 쌈추, 시금치, 취나물, 양상추	변질된 부분과 뿌리(심)를 제거한 것
	고춧잎, 당귀잎, 들깻잎, 치커리(잎), 케일, 들나물, 무(잎), 열무, 호박잎, 냉이	변질된 부분을 제거한 것
엽경채류	고구마줄기, 고사리, 마늘쭀, 죽순, 토란줄기, 달래	변질된 부분을 제거한 것
	부추, 미나리, 셀러리, 파, 두릅	변질된 부분과 뿌리를 제거한 것
근채류	당근, 무(뿌리)	흙 등 이물질을 제거한 것
	마늘, 양파, 더덕, 도라지, 생강, 연근, 우엉, 칩뿌리	껍질을 제거한 것
과채류	오이, 애호박, 가지, 고추, 토마토	꼭지를 제거한 것

분류	품목	사용부위·처리방법
	수박, 참외	꼭지와 껍질을 제거한 것
	파프리카, 피망, 서양호박(단호박), 늪은호박	꼭지와 씨를 제거한 것
	멜론, 박	꼭지와 껍질과 씨를 제거한 것
버섯류	느타리버섯, 목이버섯, 양송이, 건조표고버섯	흙 등 이물질을 제거한 것
	새송이버섯, 송이버섯, 표고버섯, 팽이버섯	흙 등 이물질을 제거하고, 대주머니를 자른 것

② 수산물

분류	품목	사용부위·처리방법
어류	가물치, 메기, 끄리, 동자개, 쏘가리, 붕어, 잉어, 이스라엘잉어, 송어, 연어, 갈치, 조기, 고등어, 굴비, 풍치, 삼치, 입연수어, 청어, 농어, 민어, 우럭, 양미리, 다랑어, 독가시치, 뱀어, 불락, 상어, 송어, 전갱이, 전어, 정어리, 대구, (참)돔, 민달고기, 복어, 도다리, 넙치(광어), 쥐치, 가자미, 박대(참서대), 병어, 갯장어, 떡장어(곰장어), 뱀장어(풍천장어), 봉장어(아나고), 홍어, 가오리, 아귀, 북어, 도루묵, 명태, 동태	머리, 꼬리, 내장, 비늘을 제거한 껍질포함 근육부
	미꾸라지, 빙어, 멸치	전체
갑각류	꽃게류	껍질, 아가미 및 모래주머니를 제외한 전체(내장 포함)
	대게, 참게, 홍게, 들게, 민물참게, 민물가재, 바다가재	껍질, 내장, 아가미 및 모래주머니를 제거한 근육부 (몸통 및 각 부위의 흰살 부분)
	새우(민물새우 제외)	머리, 꼬리, 내장, 껍질을 제거한 근육부
	민물새우	전체
연체류	가리비, 새조개, 키조개	껍질, 내장을 제거한 근육부와 관자
	전복, 큰우렁(굴뱅이), 고둥, 논우렁이, (참)소라	껍질, 내장을 제거한 근육부
	꼬막, 기타조개, 맛조개, 활바지락, 백합, 제첩, 피조개, 홍합, 굴	껍질 제거한 전체
	오징어, 갑오징어, 낙지, 문어, 꼴뚜기, 주꾸미	입과 눈, 내장을 제거한 근육부 (낙지의 경우 두부낭 포함)
	해삼, 멧게, 개불 등 기타 연체류	내장을 제거한 근육부
	미더덕	전체

분류	품목	사용부위·처리방법
	성계	알
해조류	파래, 다시마, 미역, 매생이, 톳, 모자반, 김	전체

③ 축산물

분류	사용부위·처리방법
가금류고기	부착된 지방 및 표피를 포함하는 근육조직
돼지고기, 소고기	근육 내 지방 및 피하지방과 같이 부착된 지방조직을 포함하는 근육조직
돼지간, 돼지신장, 소간, 소신장	전체
원유 및 우유류	전체

④ 수분을 원상태로 복원하여 섭취하는 식품

건조 버섯류, 건조 해조류, 조제분유 등 일반적으로 수분을 원상태로 복원하여 섭취하는 제품은 섭취시의 상태(제조사가 제시한 섭취방법)와 동일한 상태가 되도록 처리한 것을 시료로 한다. 다만, 원상태로 복원하지 않고 시험을 실시하는 경우에는 기준을 적용할 때 수분함량을 고려하여 환산 적용 할 수 있다.

나. 표준용액의 조제

이 시험법에서 사용하는 표준용액의 조제는 개별 시험법에서 명시한 방법에 따른다. 다만 명시되어 있지 않은 경우는 표준원액을 적당한 농도로 혼합, 희석한다.

9.1.2 납(Pb)

가. 시험법 적용범위

모든 식품에 적용한다. 다만, 원유 및 우유류, 과일·채소류음료, 조제유류, 특수영양식품, 특수의료용도식품은 질산분해법 또는 마이크로웨이브법으로 시험용액을 조제하여 유도결합플라즈마-질량분석법에 따라 시험한다.

나. 시험용액의 조제

1) 습식분해법

가) 질산분해법

시료¹⁾ 1~20 g(건조물 1~5 g, 생물 20 g)을 플라스크 등에 취해 질산 50~100 mL을 넣고 충분히 습윤되도록 한다. 가열판에서 서서히 가열하면서 격렬한 반응이 끝나고 암색이 되면 내용물이 줄지 않도록 질산 2~3 mL 씩 넣으며 가열을 계속한다. 과산화수소를 5~10 mL 천천히 주입하며 가열을 계속하고 내용물이 미황색~무색이 되었을 때 분해가 끝난 것으로 한다. 분해물을 가열판에서 최소량으로 휘산-농축시킨 후 물을 넣어 적절하게 희석하여 시험용액으로 한다. 이 때, 최종 시험용액의 질산농도는 10% 이하가 되게 한다. 공시험용액에 대해서도 같은 조작을 하여 시험용액을 보정한다.

주1) 액상시료인 음료류 등은 식품공전 제5. 식품별 기준 및 규격 참조하며, 축산물 중 검체의 특성에 따라 필요시 건조물로서 5~20 g 상당한 양이 되도록 취함.

나) 마이크로웨이브법

시료 일정량 (0.1~0.5 g에 한함. 수분함량이 높은 시료의 경우 1~3 g)을 Microwave digestion system에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해한다. 이후 분해물을 Heat block 등을 이용하여 최소량으로 휘산-농축시킨 후 물을 넣어 적절하게 희석하여 시험용액으로 한다. 이 때, 최종 시험용액의 질산농도는 10% 이하가 되게 한다.

2) 건식회화법

시료¹⁾(5~20 g)를 도가니, 백금접시에 취해 건조하여 탄화시킨 다음 450℃에서 회화한다.⁵⁾ 회화가 잘 되지 않으면 일단 식혀 질산(1+1) 또는 50% 질산마그네슘용액 또는 질산알루미늄 40 g 및 질산칼륨 20 g을 물 100 mL에 녹인 액 2~5 mL로 적시고 건조한 다음 회화를 계속한다. 회화가 불충분할 때는 위의 조작을 1회 되풀이하고 필요하다면 마지막으로 질산(1+1) 2~5 mL를 가하여 완전하게 회화를 한다. 회화가 끝나면 회분을 희석된 질산으로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.

주5) 회화보조제는 염산, 산화마그네슘, 탄산나트륨등을 사용하나 시험조작에 영향이 없을 때에만 사용하되 공시험용액에 대해서도 같은 조작을 하여 시험용액을 보정한다.

3) 용매추출법

가) 시약

- 1) MIBK(Methyl Iso-Buthyl Ketone) 또는 클로로포름
- 2) DDTC(Diethyl dithocarbamic acid), silver를 포함하지 않은 것

나) 시험조작

시험용액(습식분해법 또는 건식회화법으로 분해한 시험용액) 및 공시험용액을 분액깔때기에 각각 10~50 mL 취한 후, 각각에 25% 구연산암모늄용액 2~10 mL 및 브롬티몰블루(BTB)시액 2방울을 가한 다음 액의 색이 황색에서 연한 녹색이 될 때까지 암모니아수로 중화하고 이에 40% 황산암모늄시액 2~10 mL 및 물을 가하여 일정량으로 한다. 여기에 10% DDTC 용액 1~5 mL를 넣고 흔들여 준 후 MIBK(또는 클로로포름) 20 mL를 가하여 심하게 진탕하여 정치하고 MIBK(또는 클로로포름)층을 취한다. 다시 MIBK(또는 클로로포름) 20 mL로 위의 과정을 되풀이 한 후 여액을 합한다. 분액액을 열판에서 80℃로 가열하여 용매를 모두 날려버리고 잔류물에 질산 7 mL, 과산화수소 1 mL를 넣고 다시 열판에서 가열하여 완전히 분해·건조시킨다. 잔류물은 1 N 질산용액으로 재용해하여 시험용액으로 한다⁶⁾.

주6) 표준용액에 대해서도 같은 조작을 하여 얻는다.

다. 측정

1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

가) 분석원리

이 방법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 분석원소의 질량값에 대한 분석 강도를 측정하여 시험용액 중의 분석원소의 농도를 구하는 방법이다.

나) 시험조작

표준용액 및 시험용액을 ICP-MS에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다. 다만 납, 카드뮴 분석 시 건미역, 조미김, 식염 등 염을 다량 함유하는 검체는 염에 의한 간섭을 줄이기 위하여 염 농도를 최소화 하도록 희석¹⁾하여 분석한다. 또는 내부표준물질을 이용하여 분석값을 보정²⁾하여야 한다.

주1) 식염 1,000-1,500배, 건미역 500-800배, 조미김 100-200배 권장

주2) 내부표준물질을 이용한 보정

내부표준물질은 납의 경우 비스무트(Bismuth, Bi, 208.98), 카드뮴의 경우 인듐(Indium, In, 114.82)을 사용한다. 내부표준물질의 첨가 방법은 검량선용 표준용액, 공시험용액 및 검체에 내부표준물질의 일정량을 직접 첨가하거나 연동펌프와 혼합코일 등의 다른 채널을 이용하여 주입 전에 용액과 혼합시키는 방법으로 한다.

※ 계산방법

검량선에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 분석강도에 대한 비 $[A_S/A_{IS}]$ 를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 분석강도 비 $[A_{SAM}/A_{SAMIS}]$ 를 Y축에 대입하여 분석원소의 농도를 계산한다.

A_S : 검량선 표준용액의 표준물질 분석강도

A_{IS} : 검량선 표준용액의 내부표준물질 분석강도

A_{SAM} : 시험용액의 분석원소 분석강도

A_{SAMIS} : 시험용액의 내부표준물질 분석강도

2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)

가) 분석원리

이 방법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방진되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 분석원소의 원자선 및 이온선의 발광광도를 측정하여 시험용액 중의 분석원소의 농도를 구하는 방법이다.

나) 시험조작

표준용액과 시험용액 및 공시험용액을 ICP-OES에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)

가) 분석원리

이 방법은 시험용액 중의 금속원소를 적당한 방법으로 해리시켜 원자증기화하여 생성한 기저상태의 원자가 그 원자증기를 통과하는 빛으로부터 측정파장의 빛을 흡수하는 현상을 이용하여 광전측정 등에 따라 목적원소의 특정파장에 있어서 흡광도를 측정하고 시험용액중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다.

나) 시험조작

시료를 원자화하는 일반적인 방법은 화염방식과 무염방식이 있다. 시험용액 및 공시험용액을 그대로, 혹은 희석 또는 농축한 다음 원자흡광광도계에 주입하여 흡광도를 구하고 따로 표준용액 및 이의 공시험용액에 대해서도 각각 시험용액의 경우와 같은 조작을 해서 검량선을 작성하여 시험용액의 농도를 구한다.

9.1.3 카드뮴(Cd)

가. 시험법 적용범위

모든 식품에 적용한다.

나. 시험용액의 조제

1) 습식분해법

가) 질산분해법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 가) 질산분해법에 따른다.

나) 마이크로웨이브법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 나) 마이크로웨이브법에 따른다.

2) 건식회화법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 2) 건식회화법에 따른다.

3) 용매추출법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 3) 용매추출법에 따른다.

다. 측정

1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)에 따른다.

2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)에 따른다. 다만, 수산물 등 비소를 다량 함유한 검체는 비소 파장에 의한 간섭을 줄이기 위해서 비소와 분광간섭이 일어나지 않는 카드뮴 파장을 선택하여 측정한다.

3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)에 따른다.

9.1.4 비소(As)

가. 시험법 적용범위

모든 식품에 적용한다.

나. 시험용액의 조제

1) 습식분해법

가) 질산분해법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 가) 질산분해법에 따른다.

나) 마이크로웨이브법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 나) 마이크로웨이브법에 따른다.

2) 용매추출법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 3) 용매추출법에 따른다.

다. 측정

1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)에 따른다. 다만, 염이 많거나 분석간섭물질이 많은 식품의 목적원소의 질량값을 측정하는 경우, 매질에 의한 양의 오차를 줄이기 위해 활성가스(암모니아, 산소, 메탄, 수소 등)를 통한 화학적 간섭 제거 방식을 이용하거나 비활성 가스(헬륨 등)을 이용한 물리적 간섭제거 방식을 통해 방해요인을 제거한다.

2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)에 따른다.

3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)에 따른다.

4) 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP)에 의한 정량(환원기화법)

가) 분석원리

시험용액을 환원기화장치를 이용하여 흡광도와 발광광도를 측정한다.

나) 시약 및 시액

- 1) 요오드화칼륨(KI)
- 2) 수소화붕소나트륨(NaBH_4)
- 3) 수산화나트륨(NaOH)
- 4) 염산(HCl)
- 5) 비소표준용액: As_2O_3 1.32 g을 5% NaOH 20 mL에 녹이고 질산으로 산성화 하고 물을 가하여 1,000 mL로 한다. 사용시 이 용액을 1% 질산으로 희석하여 표준용액으로 한다.

다) 시험조작

시험용액 희석 시 1% 질산으로 한다. 시험용액 및 공시험용액에 요오드화칼륨 3 g을 넣고 1시간 방치한 후, 시험용액 및 공시험용액, 1:1(v/v) 염산, 0.6~1.0% 수소화붕소나트륨용액, 0.1~0.5% 수산화나트륨용액을 환원기화장치에 주입한 다음 비소의 흡광도와 발광광도를 측정한다.

9.1.5 무기비소(Inorganic arsenic)

가. 시험법 적용범위

무기비소의 기준규격이 설정된 식품에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 1% 질산용액으로 추출하여 액체크로마토그래프로 비소 종을 분리한 후 유도결합플라즈마/질량분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-유도결합플라즈마/질량분석기(LC-ICP/MS)

※ 액체크로마토그래프와 유도결합플라즈마/질량분석기 연결 시 튜브 길이를 40 cm 이내로 한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 표준원액: 아비산나트륨(As(III) , Sodium arsenite, NaAsO_2) 및 비산나트륨(As(V) , Sodium arsenate dibasic heptahydrate, $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 표준품을 3차 정제수에 녹여 각각 As로써 농도가 1,000 mg/L이 되게 한다.
- 2) 혼합표준용액: 각 표준원액을 0.2% 질산용액으로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다. 단, 혼합표준용액은 분석 당일 조제하여 사용한다.

마. 시험용액의 조제

- 1) 쌀, 현미, 가공식품(쌀, 톳 또는 모자반을 사용한 식품), 식용곤충(건조, 분말화한 제품 포함)

균질화한 시료 1 g(해조류 건조물의 경우 0.2 g~1 g, 식용곤충 건조물의 경우 0.2 g~0.5 g)을 정밀히 달아 용기(단, 유리용기는 제외)에 넣고 1% 질산용액 5 mL를 가하여 90°C에서 90분간 열탕 추출한다. 이때 초기 30분 동안 시료와 1% 질산용액이 충분히 섞이도록 5분~10분 간격으로 격렬히 흔들여준다. 추출 후 여기에 물을 넣어 25 mL되게 한 후 잘 혼합하고 10분간 원심분리(3,000 ×g)한다. 원심분리 후 상층액을 적당히 취하여 다시 10분간 원심분리(3,000 ×g)하고 그 상층액을 멤브레인 필터(nylon, 0.45 μm)로 여과하여 시험용액으로 한다.

2) 어유

시료 2.5 g을 원심분리기용 튜브에 정밀히 달아 핵산 5 mL, 메탄올 5 mL, 1% 질산 0.5 mL을 넣고 30분간 진탕기에서 진탕하고 10분간 원심분리(3000 ×g)하여 층 분리된 아래층(1차 추출액)을 완전히 취해 원심분리기용 튜브에 옮긴다. 남은 여액에 클로로포름 5 mL, 메탄올 3.75 mL, 1% 질산 1.25 mL을 넣고 30분간 진탕기에서 다시 진탕하고 10분간 원심분리 하여 층 분리된 상층액(2차 추출액)을 완전히 취해 앞에서 취한 1차 추출액과 합한다. 여기에 0.2% 질산을 넣어 50 mL이 되게 하여 잘 섞은 후 10분간 원심분리(3000 ×g) 한다. 이후 상층액 4 mL을 취하여 0.2% 질산으로 10 mL로 맞추고 멤브레인 필터(nylon, 0.45 μm)로 일부를 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

가) 컬럼: C_{18} MG계 칼럼 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: 0.05%(v/v) 메탄올, 10 mM sodium 1-butane sulfonate, 4 mM malonic acid, 4 mM tetramethyl ammonium hydroxide(TMAH)의 혼합용액을 조제하고, 이때 용액의 pH는 10% 질산용액을 사용하여(약 1.8 mL/L) 정확히 2.7로 맞춘다.

다) 유량: 0.75 mL/분

라) 컬럼 온도: 25°C

마) 주입량: 10~50 μL

2) 유도결합플라즈마/질량분석기 분석조건(예)

가) RF Power: 1300~1500W

나) Nebulizer argon gas: 0.95~1.15 L/분

다) Auxillary argon gas flow: 1.2~1.5 L/분

라) Plasma argon gas flow: 15~20 L/분

마) Lens voltage: 5~10 V

바) Ion monitored: As (m/z 75), 다만, DRC mode 사용시에는 AsO (m/z 91)로 분석한다.

3) 검량선 작성

혼합표준용액을 농도별(1~50 μg/L)로 취하여 분석한 후 크로마토그램상의 As(V)와 As(III) 각 피크 높이 또는 면적 값으로 검량선을 작성한다.

4) 표준품 크로마토그램

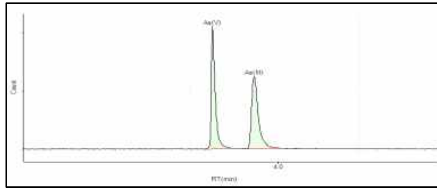


그림 1. 표준품(각 10 ppb)의 크로마토그램 예시.

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 목적원소의 질량값(m/z 75)의 피크들은 혼합표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

위 조건으로 얻어진 시험용액의 피크가 혼합표준용액 피크와 일치할 때 **피크 높이 또는 면적**을 검량선에 대입하여 As(III)와 As(V)를 정량하고 각각의 정량값을 합하여 무기비소의 합량으로 한다.

9.1.6 수은(Hg)

가. 시험법 적용범위

모든 식품에 적용한다.

나. 시험용액의 조제

1) 황산-질산환류법

시료(5~10 g)를 분해플라스크에 취하고, 물 10 mL 및 질산 20 mL를 넣어 혼합하여 잠시 방치한 다음 황산 20 mL를 천천히 넣는다. 환류냉각기를 연결하여 주의하면서 NO₂의 발생이 끝날 때까지 가열한다. 분해액이 담황색으로 투명하게 되지 않을 때에는 식힌 다음 질산 5 mL를 넣어 다시 가열한다. 필요하면 질산 5 mL의 추가를 되풀이 하여 분해액이 담황색으로 투명하게 되고 NO₂의 발생이 끝나면 식힌 다음 물 50 mL 및 10% 요소용액 10 mL를 넣어서 10분간 끓이고 식혀 과망간산칼륨 1 g을 넣고 10분간 때때로 흔들어 섞는다. 자홍색이 없어지면 다시 과망간산칼륨 1 g을 넣고 흔들어 섞는다. 이 조작을 자홍색이 남을 때까지 되풀이 하고 20분간 끓여 액의 자홍색이 없어지면 식힌 다음 과망간산칼륨 1 g을 넣고 다시 20분간 가열한다. 이 때 액의 자홍색이 없어지면 과망간산칼륨의 첨가 및 가열 조작을 다시 2회 되풀이 하고 식혀 용액이 무색투명하게 될 때까지 10% 과산화수소용액을 주의하여 적가한다. 다만, 비색의 경우에는 과산화수소 대신 20% 염산히드록실아민용액을 이용한다. 식힌 다음 장치의 내부 및 연결부분을 황산(1→100) 20 mL로 씻고 플라스크에 합쳐 일정량으로 하여 시험용액으로 한다. 지방분이 많은 시료는 헥산 20 mL 씩으로 3회 추출하여 수용액을 시험용액으로 한다.

다. 측정

1) 원자흡광광도법에 의한 정량(환원기화법)

가) 분석원리

시료 중 분석대상물질을 환원기화장치를 이용하여 흡광도를 측정한다.

나) 시약 및 시액

(가) 염화제일주석(SnCl₂(II))용액: 염화제일주석 100 g을 100 mL 염산에 녹여 물을 가

하여 1,000 mL로 한다.

(나) 수은표준용액: 염화제이수은 0.135 g을 10% 질산 100 mL에 녹이고 물을 가하여 1,000 mL로 한다. 사용시 이 용액을 1% 질산으로 1,000배 희석하여 표준용액으로 한다.

$$\text{수은표준용액 } 1 \text{ mL} = 0.1 \mu\text{L Hg}$$

다) 시험조작

시험용액 및 공시험용액, 염화제일주석용액을 시험용액병에 취하여 환원기화장치에 연결한 다음 다이아프램펌프(diaphragm pump)에 의해 공기를 흡수셀 중에 순환시켜 파장 253.7 nm에서 흡광도를 측정한다. 수은표준용액 0, 5, 10, 15, 20 mL에 물을 가해서 100 mL로 하여 시험용액과 같은 조작을 한 다음 각각의 흡광도를 측정하여 작성한 검량선으로부터 수은(Hg)의 함량을 구한다.

2) 원자흡광광도법에 의한 정량(금아말감법)

가) 분석원리

시료 중 분석대상물질을 금아말감으로 포집하여 냉원자흡광법으로 측정한다.

나) 장치

시료의 연소에서 금아말감에 의한 포집, 냉원자흡광법에 의한 측정까지를 자동화한 수은 측정장치를 쓴다.

다) 시약 및 시액

(가) 수은표준원액: 염화제이수은 135.4 mg을 10% 질산에 녹여 1,000 mL로 한다(어두운 곳에서 1~2개월까지 보존가능). 1 mL = 100 μg Hg

(나) 수은표준용액: 수은표준 원액을 10% 질산으로 희석하여 0~20 μg/mL로 한다(**사용할 때 만든다**).

(다) 첨가제

① 산화알루미늄

② 산산화칼슘 + 탄산나트륨(1 : 1 혼합물)을 쓸 때에 950℃에서 30분간 활성화시킨다.

라) 시험조작

첨가제¹⁾ ㉔ 약 1 g을 도가니에 고르게 펴고 고체 시료는 그 위에 세질 또는 균질화한 시료를 10~300 mg, 액체시료는 0.1~0.5 mL를 첨가제 ㉔에 완전히 스며들게 하고, 그 위에 첨가제 ㉔ 약 0.5 g ㉕ 약 1 g을 차례로 고르게 펴 층을 이루게 한다. 도가니를 연소부에 넣고 공기 또는 산소를 0.521 L/분을 통과하면서 300℃에서 60초간 건조하고 850℃에서 180초간 분해하여 수은을 유지시켜 포집관에 수은을 포집한다. 포집관을 약 700℃로 가열하여 수은증기를 냉원자흡광분석장치에 보내고, 흡광도를 측정하여 A로 한다. 따로 도가니에 첨가제만을 취해 같은 조작을 되풀이하여 흡광도를 측정하여 Ab로 한다. 다음 수은표준용액을 써서 같은 조작을 되풀이하여 얻어진 흡광도에서 검량선을 작성하여 A-Ab 값을 검량선으로부터 시료 중의 수은량을 산출한다.

주1) 장비 사양에 따라 첨가제를 사용하지 않을 수 있으며, 장비 사용설명서를 참고한다.

9.1.7 메틸수은(Methyl mercury)

9.1.7.1 제1법

가. 시험법 적용범위

이 방법은 메틸수은(MeHg)의 기준·규격이 설정된 모든 식품에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 톨루엔으로 추출한 후 기체크로마토그래프-전자포획검출기(GC-ECD)로 분석한다.

다. 장치

기체크로마토그래프: 전자포획검출기(electron capture detector)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: **액체크로마토그래프용** 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: **3차 정제수** 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 염화메틸수은[methylmercury chloride(II)] 0.1252 g을 톨루엔에 녹여 1,000 mg/L로 한다.
- 4) 표준용액: 표준원액을 톨루엔에 녹여 적당한 농도로 희석한다.
- 5) L-시스테인 용액: L-시스테인(L-cysteine hydrochloride monohydrate) 1.0 g, 아세트산나트륨(sodium acetate trihydrate) 0.8 g, 무수황산나트륨(sodium sulfate, anhydrous) 12.5 g을 물 100 mL에 교반하면서 녹여 제조한다(**사용할 때 만든다**).
- 6) 염산용액: 염산과 **3차 정제수**를 3:1(v/v)의 비율로 제조한다.

마. 시험용액의 조제

시료를 균질화한 후 약 2 g을 100 mL 원심분리관에 넣고 25% 염화나트륨 용액 10 mL를 첨가하여 진탕한 후 진한 염산 4 mL, 톨루엔 15 mL 첨가하여 2분간 강하게 흔들어서 추출한다. 3,000 ×g에서 20분간 원심분리한 후 톨루엔층을 125 mL 분액깔때기에 옮긴다(다만, 거품이 발생할 경우에는 1 mL의 이소프로판올을 첨가하여 진탕한 후 다시 원심분리 한다). 여기에 25% 염화나트륨 10 mL를 첨가하여 수세한 후 L-시스테인용액 5 mL를 첨가하여 진탕기로 10분간 강하게 진탕한다. 10분간 방치한 후 L-시스테인층을 15 mL 원심분리관에 분취하고 여기에 염산용액 4 mL, 톨루엔 5 mL를 첨가하여 1분간 강하게 흔들어서 추출한다. 추출액을 원심분리(2,500 ×g, 5분)하고 톨루엔층을 분취하여 탈수한 후 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

- 1) **기체크로마토그래프의 분석조건**
 - 가) 컬럼 : HR-Thermon-HG capillary column 또는 이와 동등한 것
 - 나) 시험용액 주입부 온도 : 150~160℃
 - 다) 검출기 온도 : 150~170℃
 - 라) **컬럼 온도** : 140℃로 유지하거나 80℃에서 3분간 유지하고 분당 20℃씩 130℃까지 온도를 증가시킨다.
 - 마) **이동상 가스 및** 유량 : 질소 및 메틸수은이 약 10분에서 유출되는 **양으로** 조정한다(약 6 mL/분).
 - 바) 주입량: 1 µL

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크높이법 또는 피크면적법에 따라

정량한다.

9.1.7.2 제2법

가. 시험법 적용범위

이 방법은 메틸수은(MeHg)의 기준·규격이 설정된 모든 식품에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 L-시스테인 용액으로 추출한 후 금아말감으로 포집하여 냉원자흡광법으로 측정한다.

다. 장치

시료의 연소에서 금아말감에 의한 포집, 냉원자흡광법에 의한 측정까지를 자동화한 수는 측정장치를 쓴다.

라. 시약 및 시액

- 1) 물: **3차 정제수** 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준원액: 염화메틸수은[methylmercury chloride(II)] 0.1252 g을 L-시스테인 용액 100 mL에 녹여 1,000 mg/L로 한다.
- 3) 표준용액: 표준원액을 L-시스테인 용액에 녹여 적당한 농도로 희석한다.
- 4) L-시스테인 용액: L-시스테인(L-cysteine hydrochloride monohydrate) 1.0 g, 아세트산나트륨(sodium acetate trihydrate) 0.8 g, 무수황산나트륨(sodium sulfate anhydrous) 12.5 g을 **3차 정제수** 100 mL에 교반하면서 녹여 제조한다(**사용할 때 만든다**).
- 5) 기타시약: **특급 또는 이와 동등한 것**

마. 시험용액의 조제

시료를 균질화한 후 약 1 g을 50 mL 원심분리관에 넣고 25% 염화나트륨 용액 10 mL를 첨가하여 2분간 충분히 진탕한다. 이어서 진한 염산 4 mL, 톨루엔 15 mL를 첨가하여 2분간 강하게 흔들어서 추출한다. 3,000 ×g에서 20분간 원심분리한 후 톨루엔층을 125 mL 분액깔때기에 옮긴다. (다만, 거품이 발생할 경우에는 1 mL의 이소프로판올을 첨가하여 진탕한 후 다시 원심분리 한다). 여기에 L-시스테인 용액 5 mL를 첨가하여 진탕기로 10분간 강하게 진탕 후 10분간 방치한다. 하층인 L-시스테인층을 분취하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

도가니에 시험용액 약 0.1mL를 취한 후 도가니를 연소부에 넣고 공기 또는 산소를 0.521 L/분을 통과하면서 300℃에서 60초간 건조하고 850℃에서 180초간 분해하여 메틸수은을 유지시켜 포집관에 메틸수은을 포집한다. 포집관을 약 700℃로 가열하여 메틸수은 증기를 냉원자흡광분석장치에 보내고, 흡광도를 측정하여 A로 한다. 따로 도가니만 같은 조작을 되풀이하여 흡광도를 측정하여 Ab로 한다. 다음 메틸수은 표준용액을 써서 같은 조작을 되풀이하여 얻어진 흡광도에서 검량선을 작성하여 A-Ab 값을 검량선으로부터 시험용액 중의 메틸수은량을 산출한다.

9.1.8 주석(Sn)

가. 시험법 적용범위

모든 식품에 적용한다.

나. 시험용액의 조제

- 1) 습식분해법
 - 가) 질산분해법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 가) 질산분해법에 따른다.

나) 마이크로웨이브법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 나) 마이크로웨이브법에 따른다.

2) 건식회화법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 2) 건식회화법에 따른다.

3) 용매추출법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 3) 용매추출법에 따른다.

주1) 주석 분석시 질산에 의한 침전물이 발생할 수 있으므로, 전처리 마지막 단계에 염산을 수 mL 가하여 침전물 생성을 방지한다.

다. 측정

1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)에 따른다.

2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)에 따른다.

3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)에 따른다.

9.1.9 구리(Cu)

가. 시험법의 적용범위

모든 식품에 적용한다.

나. 시험용액의 조제

1) 습식분해법

가) 질산분해법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 가) 질산분해법에 따른다.

나) 마이크로웨이브법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 나) 마이크로웨이브법에 따른다.

2) 건식회화법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 2) 건식회화법에 따른다.

3) 용매추출법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 3) 용매추출법에 따른다.

다. 측정

1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)에 따른다.

2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma

Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)에 따른다.

3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)에 따른다.

9.1.10 기타금속(Zn, Mn, Ni, Fe, Be, V, Se, Cr, Sb 등)

가. 시험법의 적용범위

모든 식품에 적용한다.

나. 시험용액의 조제

1) 습식분해법

가) 질산분해법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 가) 질산분해법에 따른다.

나) 마이크로웨이브법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 1) 습식분해법 나) 마이크로웨이브법에 따른다.

2) 건식회화법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 2) 건식회화법에 따른다.

3) 용매추출법

9.1.2 납(Pb) 나. 시험용액의 조제 3) 용매추출법에 따른다.

다. 측정

1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 1) 유도결합플라즈마-질량분석법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)에 따른다.

2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 2) 유도결합플라즈마-발광광도법(Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES)에 따른다.

3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)

9.1.2 납(Pb) 다. 측정 3) 원자흡광광도법(Atomic Absorption Spectrometry, AAS)에 따른다.

9.2 곰팡이독소

9.2.1 시험시료

별도의 규정이 없는 경우 9.1 중금속 9.1.1 일반원칙, 가. 검체의 처리에 따라 처리한 것을 시료로 한다.

9.2.2 아플라톡신(B₁, B₂, G₁ 및 G₂)

가. 시험법 적용범위

곡류, 두류, 땅콩, 견과류, 곡류가공품 및 두류가공품, 장류, 고춧가루, 카레분, 육두구, 심황, 건조고추, 건조파프리카, 밀가루, 건조과일류, 조제식료, 영·유아용 이유식

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 70% 메탄올로 추출한 후 면역친화성결림으로 정제하여 트리플루오

로초산(trifluoroacetic acid)으로 유도체화 시킨 것을 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프: 형광검출기(Fluorescence detector)를 사용한다.
- 2) 정제용 컬럼: 아플라톡신용 면역친화성 컬럼(Immunoaffinity column) (회수율 및 재현성 등이 검증된 것)
- 3) 여과지: Whatman No.4 또는 이와 동등한 것
- 4) 유리섬유여과지(glass fiber filter): Whatman GF/A(pore size: 1.6 μm) 또는 이와 동등한 것

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 혼합 표준원액: 아플라톡신 B₁, B₂, G₁ 및 G₂를 아세트니트릴에 녹여 각각 200 μg/mL가 되도록 한다.
- 3) 혼합 표준용액: 아플라톡신 혼합 표준원액을 아세트니트릴로 1, 2, 5, 10, 25, 50 ng/mL의 농도가 되도록 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다.
- 4) 추출용액: 염화나트륨 1 g을 물 30 mL에 녹인 후 메탄올 70 mL을 가하여 혼합한 것을 추출용액으로 한다.
- 5) 1% 트윈 20 용액: 트윈 20(Tween 20) 1 mL에 물을 가하여 100mL로 한다.
- 6) 기타시약: 특급

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체를 분쇄하여 균질화 한 시료 25 g(단, 카레분, 향신료가루품은 10 g)을 정밀히 달아 추출용액 100 mL를 가하고 균질기로 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로 여과한다. 여액 10 mL를 100 mL 플라스크에 취하고 1% 트윈 20 용액 30 mL를 가하여 흔들어 섞은 후 유리섬유여과지(glass fiber filter)로 여과한 것을 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 20 mL를 정제용 컬럼에 주입하여 초당 1 방울 정도의 속도로 통과시킨다. 이어서 물 10 mL를 같은 유속으로 유출시키고 컬럼 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 끝이 뾰족한 시험관 또는 원심 분리관에 아세트니트릴 3 mL로 용출시킨다.

3) 유도체화

용출액을 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 트리플루오로초산 0.2 mL를 가하여 어두운 곳에서 15분간 방치시킨 후 아세트니트릴:물(20:80, v/v) 혼합용액 0.8 mL를 가하여 혼합하고 0.45 μm 멤브레인필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다. 다만, 조제식류, 영·유아용 이유식의 경우, 트리플루오로초산 0.1 mL와 아세트니트릴:물(20:80, v/v) 혼합용액 0.4 mL를 사용한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

- 가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상: 아세트니트릴:물(25:75, v/v)
- 다) 검출과장: 여기과장 360 nm, 형광과장 450 nm
- 라) 이동상 유량: 1 mL/분

마) 주입량: 10 μL(단, 조제식류, 영·유아용 이유식의 경우, 주입량은 50 μL로 한다.)

2) 검량선 작성

아플라톡신 혼합표준용액 1 mL를 각각 취하여 50℃에서 질소로 건조시킨 후 마. 시험용액의 조제 3) 유도체화에 따라 조작한 것을 액체크로마토그래프에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 각 아플라톡신의 피크 높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

1) 계산

$$\text{총 아플라톡신의 함량}(\mu\text{g/kg}) = (C_{\text{AFB1}} + C_{\text{AFB2}} + C_{\text{AFG1}} + C_{\text{AFG2}}) \times V/S \times D$$

C_{AFB1}: 검량선에서 구한 아플라톡신 B₁의 농도(ng/mL)

C_{AFB2}: 검량선에서 구한 아플라톡신 B₂의 농도(ng/mL)

C_{AFG1}: 검량선에서 구한 아플라톡신 G₁의 농도(ng/mL)

C_{AFG2}: 검량선에서 구한 아플라톡신 G₂의 농도(ng/mL)

V: 시험용액의 최종부피(mL)

S: 시료 채취량(g)

D: 시험용액의 희석배수

9.2.3 아플라톡신 M₁

가. 시험법의 적용범위

원유, 우유류, 산양유, 조제유류, 조제식류, 영·유아용 이유식, 영·유아용 특수조제식품

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 면역친화성 컬럼으로 정제하여 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프: 형광검출기(Fluorescence detector)를 사용한다.
- 2) 정제용 컬럼: 아플라톡신 M₁용 면역친화성 컬럼(Immunoaffinity column)
- 3) 여과지: Whatman No.4 또는 이와 동등한 것
- 4) 시린지필터: 0.2 μm

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 아플라톡신 M₁을 아세트니트릴에 녹여 200 μg/mL되게 한다.
- 4) 표준용액: 표준원액을 이동상으로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다.
- 5) 기타시약: 특급

마. 시험 용액의 조제

- 1) 추출
가) 액상식품

시료 100 mL를 취하여 질량을 측정하고 40℃의 항온수조에 30분간 방치한 후 10분 동안 균질화한다. 균질화한 후 4℃에서 10분 동안 10,000 ×g로 원심분리한다. 상층의 지방층을 제거하고 여과한 것을 추출액으로 한다.

나) 고체식품

균질화된 시료 10 g을 정밀히 달아 40℃의 온수 100 mL를 가하고 10분 동안 균질화한다. 균질화한 후 4℃에서 10분 동안 10,000 ×g로 원심분리한다. 상층의 지방층을 제거하고 여과한 것을 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 50 mL를 정제용 **컬럼**에 주입하여 초당 1 방울 정도의 속도로 통과시킨다. 이어서 물 20 mL를 같은 유속으로 유출시키고 **컬럼** 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 아세트니트릴 4 mL로 용출시킨다. 용출액을 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 아세트니트릴·물(25:75, v/v) 0.2 mL를 가하여 녹인 후 시린지필터(0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

- 가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상: 아세트니트릴:물(25:75, v/v)
- 다) 검출파장: 여기파장 365 nm 형광파장 435 nm
- 라) 이동상 유량: 1 mL/분
- 마) 주입량: 50 μL

2) 검량선 작성

표준용액을 액체크로마토그래프에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

3) 표준품 크로마토그램

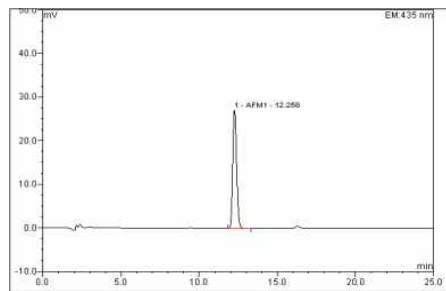


그림 1. 표준품의 크로마토그램 예시.

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 아플라톡신 M₁의 피크높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

1) 계산

$$\text{아플라톡신 } M_1 \text{의 함량}(\mu\text{g/kg}) = C \times V/S \times D$$

C: 검량선에서 구한 아플라톡신 M₁의 농도(ng/mL)

V: 시험용액의 최종부피(mL)

S: 시료 채취량(g)

D: 회석배수

9.2.4 파툴린

가. 시험법 적용범위

사과주스 및 사과주스 농축액 등

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 초산에틸로 추출하고 여기에 무수탄산나트륨(Na₂CO₃) 용액을 넣어 방해물질을 분리·제거한 후 농축한 것을 초산용액에 녹여 자외선흡광검출기가 부착된 액체 크로마토그래프로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프: 자외선흡광검출기(UV photometric detector)를 사용한다.
- 2) 시험관(I): 마개 달린 유리시험관(20 × 150 mm)
- 3) 시험관(II): 마개 달린 유리시험관(16 × 150 mm)
- 4) 시험관(III): 마개 달린 유리시험관(20 × 180 mm)
- 5) 농축용 시험관(IV): 50 mL 용 유리시험관

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 파툴린 표준품 5 mg을 달아 초산에틸에 녹인 후 200 μg/mL 농도가 되도록 조제하여 표준원액으로 사용한다. 조제 후에는 알루미늄호일로 싸서 냉장보관하며 사용한다.
- 4) 표준용액: 표준원액을 질소로 건조시킨 후 최종농도가 100, 200, 500, 1,000 ng/mL 되도록 초산용액으로 각각 희석한 것을 검량선 작성을 위한 표준용액으로 사용한다. 조제후에는 알루미늄호일로 싸서 냉장보관하며 사용한다.
- 5) 5-Hydroxymethylfurfural(HMF) 용액: 5-Hydroxymethylfurfural 5 mg을 달아 초산에틸 25 mL에 녹인 것을 사용한다.
- 6) 파툴린-HMF 혼합용액: 파툴린 표준원액 0.1 mL과 HMF 용액 0.1 mL를 취하여 10 mL 메스플라스크에 넣고 질소로 건조한 후 초산용액을 가하여 10 mL로 한 것을 사용한다.
- 7) 초산용액: 물에 초산을 가하여 pH 4.0으로 조정한다.
- 8) 1.5% 탄산나트륨 용액: 무수탄산나트륨 1.5 g을 증류수에 녹여 100 mL로 만들어 사용한다.
- 9) 기타시약: 특급

마. 시험용액의 조제

시료 5 g을 정밀히 달아 시험관(I)에 취하고 초산에틸 10 mL를 넣어 1분간 심하게 흔들어 섞은 후 정지하여 파스퇴르 피펫으로 상층액을 다른 시험관(II)에 옮긴다. 시험관(I)에 초산에틸 10 mL를 넣고 1분간 심하게 흔들어 섞은 후 정지하여 상층액을 위의 시험관(II)에 합한다. 이 초산에틸 추출액에 1.5% 탄산나트륨 용액 2 mL를 넣고 1분간 심하게 흔들어 섞은 후 정지하여 상층액을 다른 시험관(III)에 옮긴다. 시험관(II)에 초산에틸 5 mL를 넣고 1분간

심하게 흔들어 섞은 후 정지하여 상층액을 위의 시험관(III)에 합한다. 이 초산에틸 추출액에 무수황산나트륨 5 g을 넣고 30초간 심하게 흔들어 섞은 후, 초산에틸 층을 농축용 시험관(IV)에 옮긴다. 시험관(III)에 남은 무수황산나트륨을 5 mL의 초산에틸로 2회 세척하여 시험관(IV)에 모은 다음 40℃에서 질소 건조한 후 초산에틸 5 mL로 시험관 기벽을 잘 씻은 다음 다시 질소로 건조한다. 잔류물에 초산용액 0.5 mL을 가하여 녹인 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

- 가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상: 0.8% 테트라하이드로푸란
- 다) 검출과장: UV 276 nm
- 라) 이동상 유량: 0.5 mL/분
- 마) 주입량: 50 μL
- 바) 시스템 적합성 시험: 파툴린-HMF 혼합용액을 액체크로마토그래프에 50 μL 주입하였을 때 HMF와 파툴린의 피크가 순차적으로 나오며 그 분리도가 1.5 이상이어야 한다.

2) 검량선 작성

표준용액을 액체크로마토그래프에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 파툴린의 피크높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

1) 계산

$$\text{파툴린의 함량}(\mu\text{g}/\text{kg}) = C \times V/S \times D$$

C: 검량선에서 구한 파툴린의 농도(ng/mL)

V: 시험용액의 최종부피(mL)

S: 시료 채취량(g)

D: 시험용액의 희석배수

9.2.5 푸모니신(Fumonisin)

가. 시험법 적용범위

곡류 및 그 단순가공품 등에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 메탄올:아세트니트릴:물(25:25:50, v/v/v) 혼합용액으로 추출, 여과한 것을 면역친화성컬럼으로 정제시키고 OPA(o-phthalaldehyde) 시액으로 유도체화한 후 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프: 형광검출기(Fluorescence detector)를 사용한다.
- 2) 정제용 컬럼: 푸모니신용 면역친화성컬럼(Immunoaffinity column) (희수울 및 재현성 등이 검증된 것)

3) 여과지: Whatman No.2(12.0 cm) 또는 이와 동등한 것

4) 유리섬유여과지(glass fiber filter): Whatman GF/A pore size: 1.6 μm) 또는 이와 동등한 것

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 푸모니신 혼합표준원액: 푸모니신 B₁ 및 B₂를 아세트니트릴:물(50:50, v/v) 혼합용액에 녹여 각각 200 μg/mL가 되도록 한다.
- 4) 푸모니신 혼합표준용액: 푸모니신 혼합표준용액 1 mL를 정확히 취하여 아세트니트릴·물(50:50, v/v) 혼합용액으로 정확히 100 mL로 한다.
- 5) 추출용액
메탄올:아세트니트릴:물(25:25:50, v/v/v)
- 6) OPA(o-phthalaldehyde) 시액
o-phthalaldehyde 40 mg을 1 mL 메탄올에 녹인 것을 0.1 M Na₂B₄O₇ 용액 5 mL로 희석하고 메르kap토에탄올(2-mercaptoethanol) 50 μL를 가하여 혼합한다. 이 시액은 갈색 바이알(Vial)에 넣어 어두운 곳에서 1주간 실온보관 가능하다.
- 7) PBS(Phosphate-buffered saline) 용액
염화나트륨(NaCl) 8.0 g, 무수 제이인산나트륨(Na₂HPO₄) 1.2 g, 제일인산칼륨(KH₂PO₄) 0.2 g 및 염화칼륨(KCl) 0.2 g을 물 990 mL에 녹인 것을 2 M 염산으로 pH 7.0으로 조정 한 후 물로 1 L로 한다.
- 8) 0.1 M 제일인산나트륨(NaH₂PO₄ · 2H₂O) 용액: 제일인산나트륨(NaH₂PO₄ · 2H₂O) 15.6 g 를 물 990 mL에 녹인 것을 인산(H₃PO₄)을 사용하여 pH 3.3으로 조정 한 후 물로 1 L로 한다.

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체를 분쇄하여 균질화한 시료 20 g을 정밀히 달아 추출용액 100 mL를 넣어 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로 여과한다. 여액 10 mL를 100 mL 플라스크에 취하고 PBS 용액 40 mL로 희석시킨다. 희석액을 흔들어 섞은 후 유리섬유여과지(glass fiber filter)로 여과한 것을 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 10 mL를 인산으로 pH 6.8 ~ 7.2로 조정 한 후 정제용 컬럼에 주입하여 초당 1~2 방울의 속도로 통과시킨다. 이어서 PBS 용액 10 mL을 같은 유속으로 유출하여 버린 후 메탄올:물(80:20, v/v) 혼합용액 4 mL로 용출시킨다.

3) 유도체화

용출액을 약 60℃에서 질소로 건조시킨 후 잔류물에 아세트니트릴:물(50:50, v/v) 혼합용액 200 μL를 가하여 녹이고 이 중 50 μL를 취하여 OPA 시액 50 μL과 섞고 30초간 교반한 것을 시험용액으로 한다.

[주의사항] OPA-푸모니신 유도체는 반응 후 시간이 경과함에 따라 형광성이 떨어지므로 신속하게 액체크로마토그래프에 주입하여야 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

- 가) **컬럼**: C₁₈계 컬럼(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상: 메탄올:0.1 M 제일인산나트륨(NaH₂PO₄) 용액(77:23, v/v), 인산을 사용하여 pH 3.3으로 조정
- 다) 검출과장: **여기과장 335 nm 형광과장 440 nm**
- 라) **이동상 유량**: 1 mL/분
- 마) 주입량: 5~20 μL

2) 검량선 작성

푸모니신 혼합표준용액을 아세트니트릴:물(50:50, v/v) 혼합용액으로 희석하여 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 μg/mL가 되도록 하고 각각 1 mL를 취하여 60℃에서 질소로 건조한 후 앞의 마. 시험용액의 조제 3) 유도체화에 따라 조작하여 검량선을 작성한다.

3) 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

4) 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 푸모니신의 피크 높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

사. 계산

$$\text{푸모니신의 함량(mg/kg)} = (C_{FB1} + C_{FB2}) \times 50/g$$

C_{FB1}: 검량선에서 구한 푸모니신 B₁의 농도(μg/mL)
 C_{FB2}: 검량선에서 구한 푸모니신 B₂의 농도(μg/mL)
 50: 희석배수
 g: 시료 채취량(g)

9.2.6 오크라톡신 A(Ochratoxin A)

가. 시험법의 적용범위: 곡류, 메주, 커피류, 고춧가루, 육두구, 심황(강황), 후추, 조미식품(육두구, 심황(강황) 또는 후추를 함유), 포도주스, 포도주스 농축액, 포도주, 건조과일류, 조제식료, 영·유아용 이유식

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 추출용매로 추출, 여과한 것을 면역친화**컬럼**으로 정제시키고 액체크로마토그래프로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프: 형광검출기(Fluorescence detector)를 사용한다.
- 2) 정제용 **컬럼**: 오크라톡신용 면역친화성 **컬럼**(Immunoaffinity column) (회수율 및 재현성 등이 검증된 것)
- 3) 여과지: Whatman No.4(12.0 cm) 또는 이와 동등한 것
- 4) 유리섬유여과지(glass fiber filter): Whatman GF/A(pore size: 1.6 μm) 또는 이와 동등한 것

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 **정제수** 또는 이와 동등한 것
- 3) 오크라톡신 A 표준원액

오크라톡신 A를 톨루엔:초산(99:1, v/v) 혼합용액에 녹여 200 μg/mL가 되도록 한다.

4) 오크라톡신 A 표준용액

오크라톡신 A 표준원액 100 μL를 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 아세트니트릴:물:초산(99:99:2, v/v/v) 혼합용액 1 mL를 가하여 녹인 후, 이를 아세트니트릴:물:초산(99:99:2, v/v/v) 혼합용액으로 0.1~50 ng/mL의 농도가 되도록 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다.

5) PBS(Phosphate-buffered saline) 용액

염화나트륨(NaCl) 8.0 g, 무수 제이인산나트륨(Na₂HPO₄) 1.16 g, 제일인산칼륨 (KH₂PO₄) 0.2 g 및 염화칼륨(KCl) 0.2 g을 물 990 mL에 녹인 것을 0.2 M 수산화나트륨으로 pH 7.4로 조정한 후 물로 1 L로 한다.

6) 3% 탄산수소나트륨 용액

탄산수소나트륨(NaHCO₃) 30 g을 물에 녹여 1 L로 한다.

7) 추출용액 I

아세트니트릴:물(60:40, v/v) 혼합용액

8) 추출용액 II

메탄올:3% 탄산수소나트륨(50:50, v/v) 혼합용액

9) 0.01% 트윈 20 함유 PBS 용액

트윈 20(Tween 20) 0.01 mL를 취하여 PBS 용액으로 100 mL한 것을 사용한다.

10) 5% 탄산수소나트륨(NaHCO₃) 함유 1% PEG(Polyethylene glycol) 용액

10 g의 PEG 8000 (Polyethylene glycol)과 50 g의 탄산수소나트륨(NaHCO₃)을 물 950 mL에 녹이고 pH를 8.3으로 맞춘 후 1 L로 한다.

11) 1 M PBS (Phosphate-buffered saline) 용액

제이인산나트륨(Na₂HPO₄·2H₂O) 2.56 g, 제일인산나트륨(Na₂HPO₄·H₂O) 12.6 g과 염화나트륨(NaCl) 87.9 g을 물 950 mL에 녹인 것을 pH 7.4로 조정한 후 1 L로 한다.

12) 0.1 M PBS (Phosphate-buffered saline) 용액

1 M PBS(Phosphate-buffered saline) 용액을 물로 10배 희석하여 사용한다.

13) 1% 탄산수소나트륨 용액

탄산수소나트륨(NaHCO₃) 10 g을 물에 녹여 1 L로 한다.

14) 2 % 트윈 20: 트윈 20 용액을 물로 50배 희석하여 사용한다.

15) 0.1 % 트윈 20 함유 0.1 M PBS 용액: 트윈 20 0.1 mL를 취하여 0.1 M PBS 용액으로 100 mL로 정용 한 것을 사용한다.

마. 시험용액의 조제

1) 곡류 및 메주

가) 추출

검체를 분쇄하여 균질화한 시료 25 g을 정밀히 달아 추출용액 I 100 mL를 넣어 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로 여과한다. 여액 5 mL를 100 mL 플라스크에 취하고 PBS 용액 55 mL로 희석시킨다. 희석액을 흔들어 섞은 후 유리섬유여과지(glass fiber filter)로 여과한 것을 추출액으로 한다.

나) 정제

추출액 48 mL(검체 1g에 해당)를 정제용 컬럼에 주입하여 초당 1~2 방울의 속도로 통과시킨다.

이어서 물 10 mL를 같은 유속으로 유출시키고 **컬럼** 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 메탄올 1 mL로 용출시킨다. 용출액을 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 아세트니트릴:물:초산(99:99:2, v/v/v) 혼합용액 1 mL를 가하여 녹인 후 시린지 필터(pore size: 0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

2) 커피류, 고춧가루, 육두구, 심황(강황), 후추, 조미식품(육두구, 심황(강황) 또는 후추 함유)

가) 추출

검체를 분쇄하여 균질화한 시료 5 g을 정밀히 달아 추출용액 II 100 mL를 넣어 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로 여과한다. 여액 5 mL를 100 mL 비커에 취하고 0.1 % 트윈 20 함유 0.1 M PBS 용액 55 mL를 가하여 유리섬유여과지로 여과한 것을 추출액으로 한다.

나) 정제

추출액 48 mL를 면역친화성 **컬럼**에 주입하여 초당 1~2 방울의 속도로 통과시킨 후 이어서 2 % 트윈 20 3 mL와 증류수 10 mL를 차례로 흘려 **컬럼**을 세척하고 **컬럼** 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 메탄올 2 mL로 용출시킨다. 용출액을 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 아세트니트릴:물:초산(99:99:2, v/v/v) 혼합용액 1 mL를 가하여 녹인 후 시린지 필터(pore size: 0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

3) 포도주스, 포도주스농축액 및 포도주

가) 추출

검체 10.0 g에 5% 탄산수소나트륨(NaHCO₃) 함유 1% PEG(Polyethylene glycol) 용액을 가하여 20 mL이 되게 한 후 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로 여과하여 추출액으로 한다.

나) 정제

추출액 10 mL를 면역친화성 **컬럼**에 주입하고 2.5% 염화나트륨 0.5% 탄산수소나트륨 용액(25 g의 염화나트륨과 5 g의 탄산수소나트륨을 950 mL의 물에 녹이고 pH를 8.1로 맞춘 후 1 L로 한다.) 5 mL과 물 5 mL를 차례로 흘려 세척하고 **컬럼** 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 메탄올 2 mL로 용출시킨다. 용출액을 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 아세트니트릴:물:초산(99:99:2, v/v/v) 혼합용액 1 mL를 가하여 녹인 후 시린지 필터(pore size: 0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

4) 건조과일류

가) 추출

검체 25 g을 정밀히 달아 1% 탄산수소나트륨(NaHCO₃) 용액 60 mL를 넣어 1분간 고속으로 균질화한 후 메탄올 140 mL를 가하고 1시간 동안 진탕한 후 이를 여과지로 여과한다. 여액 10 mL를 40 mL의 0.1 M PBS 용액으로 희석한 것을 추출액으로 한다.

나) 정제

추출액 40 mL를 면역친화성 **컬럼**에 주입하고 물 5 mL를 흘려 세척하고 **컬럼** 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 메탄올 2.5 mL로 용출시킨다. 용출액을 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 아세트니트릴:물:초산(99:99:2, v/v/v) 혼합용액 1 mL를 가하여 녹인 후 시린지 필터(pore size: 0.2μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5) 조제식품, 영·유아용 이유식

가) 추출

검체를 분쇄하여 균질화한 시료 25 g을 정밀히 달아 추출용액 I 100 mL를 넣어 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 여과지로 여과한다. 여액 15 mL를 100 mL 플라스크에 취하고 0.1 % 트윈 20 in 0.1M PBS 45 mL를 가하여 희석시킨다. 희석액을 흔들어 섞은 후 유리섬유여과지(glass fiber filter)로 여과한 것을 추출액으로 한다.

나) 정제

추출액 50 mL를 정제용 **컬럼**에 주입하여 초당 1~2 방울의 속도로 통과시킨다. 이어서 2 % 트윈 20 3 mL와 물 10 mL를 같은 유속으로 유출시키고 **컬럼** 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 메탄올 3 mL로 용출시킨다. 용출액을 50℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 아세트니트릴:물:초산(99:99:2, v/v/v) 혼합용액 0.5 mL를 가하여 녹인 후 시린지 필터(pore size: 0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

가) **컬럼**: C₁₈계 **컬럼**(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: 메탄올:아세트니트릴:물:초산(29:29:41:1, v/v/v/v) 혼합용액

다) **컬럼** 온도: 20℃

라) 검출파장: 여기파장 333 nm, 형광파장 460 nm

마) 이동상 유량: 1 mL/분

바) 주입량: 5~20 μL(단, 조제식품, 영·유아용 이유식의 경우, 주입량은 50 μL로 한다.)

2) 검량선 작성

표준용액을 액체크로마토그래프에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

3) 표준품 크로마토그램

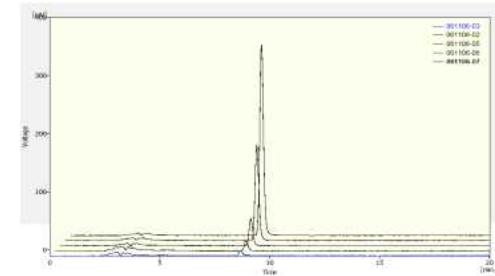


그림 1. 표준품의 농도에 따른 크로마토그램 예시.

4) 정량한계

0.1 μg/kg

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 오크라톡신 A의 피크높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

1) 계산

오크라톡신 A의 함량($\mu\text{g}/\text{kg}$) = $C \times V/M \times D$
 C: 검량선에서 구한 오크라톡신A의 농도(ng/mL)
 V: 최종부피(mL)
 M: 시료 채취량(g)
 D: 희석배수

9.2.7 테옥시니발레놀(Deoxynivalenol)

가. 시험법 적용범위

곡류 및 그 단순가공품 등에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 물로 추출한 후 면역친화성컬럼으로 정제하여 자외선 검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프: 자외선검출기(UV detector)를 사용한다.
- 2) 정제용 컬럼: 테옥시니발레놀용 면역친화성 컬럼(Immunoaffinity column)(회수율 및 재현성이 검증된 것)
- 3) 유리섬유여과지(glass fiber filter): Whatman GF/A(pore size: 1.6 μm) 또는 이와 동등한 것

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 테옥시니발레놀 표준원액: 테옥시니발레놀을 아세트니트릴에 녹여 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 한다.
- 4) 테옥시니발레놀 표준용액: 테옥시니발레놀 표준원액을 이동상으로 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 되도록 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다.
- 5) 기타시약: 특급

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체를 균질하게 분쇄한 후 시료 20 g(단, 식이섬유가 많아 추출이 어려운 곡류는 2 g)을 정밀히 달아 물 100 mL(단, 라면 등 유당면류는 추가로 핵산 50 mL, 식이섬유가 많은 곡류는 1 M 염산 용액 100 mL)를 가하고 균질기로 5분간 고속으로 균질화한 후 이를 원심분리(10,000 $\times\text{g}$, 20분, 다만 영·유아용식품은 10,000 $\times\text{g}$ 이상)하고 상등액을 취하여 유리섬유여과지(glass fiber filter)로 여과한 것을 추출액으로 한다(단, 유당면류는 여과한 것의 상등액(추가한 핵산)을 제거하고 남은 용액을 추출액으로 하고, 1 M 염산 용액으로 추출한 액은 1 M 수산화나트륨 용액으로 pH를 7로 중화한 액을 추출액으로 한다).

2) 정제

추출액 5 mL를 정제용 컬럼에 주입하여 초당 1 방울 정도의 속도로 통과시킨다. 이어서 물 5 mL를 같은 유속으로 유출시키고 컬럼 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 아세트니트릴 3 mL로 용출시킨다. 용출액을 50°C에서 질소로 건조시키고

이동상 0.5 mL을 가하여 녹인 후 0.45 μm 멤브레인필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

- 가) 컬럼: C_{18} 계 컬럼(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상: 아세트니트릴:물(17:83, v/v)
- 다) 검출과장: UV 220 nm
- 라) 이동상 유량: 1 mL/분
- 마) 주입량: 50 μL

2) 검량선 작성

표준용액을 액체크로마토그래프에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

3) 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

4) 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 테옥시니발레놀의 피크높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

사. 계산

테옥시니발레놀의 함량(mg/kg) = $C \times V/S \times D$
 C: 검량선에서 구한 테옥시니발레놀의 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)
 V: 시험용액의 최종부피(mL)
 S: 시료 채취량(g)
 D: 시험용액의 희석배수

9.2.8 제랄레논(Zearalenone)

가. 시험법 적용범위

곡류 및 그 단순가공품 등에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 75% 아세트니트릴로 추출한 후 면역친화성컬럼으로 정제하여 형광검출기가 부착된 액체크로마토그래프로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프: 형광검출기(Fluorescence detector)를 사용한다.
- 2) 정제용 컬럼: 제랄레논용 면역친화성 컬럼(Immunoaffinity column) (회수율 및 재현성이 검증된 것)
- 3) 여과지: Whatman No.4 또는 이와 동등한 것
- 4) 유리섬유여과지(glass fiber filter): Whatman FG/A(pore size: 1.6 μm) 또는 이와 동등한 것

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것

- 3) 제랄레논 표준원액: 제랄레논을 아세트니트릴에 녹여 250 µg/mL이 되도록 한다(냉동 보관하여 사용한다).
- 4) 제랄레논 표준용액: 표준원액을 이동상으로 50, 100, 250 및 500 ng/mL의 농도가 되도록 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다.
- 5) 추출용액: 75% 아세트니트릴
- 6) 기타시약: 특급

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체를 균질하게 분쇄한 후 시료 25 g를 정밀히 달아 염화나트륨 2 g, 트윈 20(Tween 20) 1 mL 및 추출용액 100 mL를 가하고 균질기로 5분간 고속으로 균질화한다. 이를 여과지로 여과하고 여액 10 mL를 50 mL 용량플라스크에 취하여 물로 표시선까지 채운다(액이 현탁할 경우 원심분리(5,000 ×g, 10분)한 다음 상등액을 사용한다). 이를 유리섬유 여과지(glass fiber filter)로 여과한 것을 추출액으로 한다.

2) 정제

정제용 카트리지에 추출액 25 mL를 주입하여 초당 1 방울 정도의 속도로 통과시킨다. 이어서 물 20 mL를 같은 유속으로 유출시키고 컬럼 내에 남아 있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거한 후 메탄올 5 mL로 용출시킨다. 용출액을 40℃에서 질소로 건조시키고 잔류물에 이동상 1 mL를 가하여 녹인 후 0.45 µm 멤브레인필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

- 가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(4.6 mm × 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상: 아세트니트릴:메탄올:물(10:55:35, v/v/v)
- 다) 검출과장: 여기과장 275 nm, 형광과장 450 nm
- 라) 이동상 유량: 1 mL/분
- 마) 주입량: 20 µL

2) 검량선 작성

표준용액을 액체크로마토그래프에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

3) 정성시험

위 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

4) 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 제랄레논의 피크 높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

사. 계산

$$\text{제랄레논의 함량}(\mu\text{g}/\text{kg}) = C \times V/S \times D$$

C: 검량선에서 구한 제랄레논의 농도(ng/mL)
V: 시험용액의 최종부피(mL)
S: 시료 채취량(g)
D: 시험용액의 희석배수

9.2.9 아플라톡신(B₁, B₂, G₁, G₂), 오크라톡신 A, 제랄레논, 푸모니신(B₁, B₂) 동시분석법

가. 시험법 적용범위

식물성 원료, 가공식품(단, 아플라톡신은 조제식류, 영·유아용 이유식 제외)에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질은 0.1% 포름산(formic acid)을 함유한 50% 아세트니트릴용액으로 추출한 후 정제 카트리지를 이용하여 정제한 후 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)
- 2) 정제용 카트리지: 고품이독소 다성분 분석용 SPE
- 3) 유리섬유여과지: GF/A (pore size: 1.6 µm)

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 추출용액: 0.1% 포름산(formic acid)을 함유한 50% 아세트니트릴 용액
- 4) 표준원액: 아플라톡신 B₁, 아플라톡신 B₂, 아플라톡신 G₁, 아플라톡신 G₂, 푸모니신 B₁, 푸모니신 B₂의 표준품 각각은 메탄올로 오크라톡신 A, 제랄레논의 표준품 각각은 아세트니트릴에 용해하여 1,000 µg/mL가 되게 한다.
- 5) 내부표준용액: 탄소동위원소(¹³C)로 치환된 아플라톡신 B₁, 아플라톡신 B₂, 아플라톡신 G₁, 아플라톡신 G₂ 내부표준물질을 0.1% 포름산(formic acid)을 함유한 50% 메탄올 용액을 사용하여 적절한 농도로 조제한다.
- 6) 검량선 작성용 표준용액: 검량선 작성을 위해 0.1% 포름산(formic acid)을 함유한 50% 메탄올 용액을 사용하여 표준원액을 농도별로 희석하고 내부표준용액을 혼합하여 조제한다.
- 7) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

1) 우유류, 발효유를 제외한 식품

가) 추출

검체를 분쇄하여 균질화한 후 2~5 g를 정밀히 달아 내부표준용액을 첨가한 후 추출용액(V₁) 20 mL(액상시료의 경우 최종 20 mL가 되도록 함)를 가하고, 30분간 추출한 후 3,700 ×g에서 10분간 원심분리한다. 원심분리한 액을 유리섬유여과지로 여과한 후 여액(V₂) 3 mL에 물을 가해 15 mL(V₃)가 되게 하여 추출액으로 한다.

나) 정제

초당 1방울의 속도로 정제 카트리지를 아세트니트릴 2 mL, 물 2 mL로 활성화시킨 후 추출액(V₄) 5 mL를 주입하여 통과시킨다. 이어서 물 2 mL, 10% 아세트니트릴 용액 2 mL를 같은 유속으로 통과시킨 후 정제 카트리지 내에 남아 있는 용액을 완전히 제거한다. 0.1% 포름산(formic acid)을 함유한 아세트니트릴 용액 2 mL, 메탄올 4 mL로 용출시킨 후 50℃에서 질소로 건조시킨다. 건조물에 0.1% 포름산(formic acid)을 함유한 50% 메탄올 용액 0.5~1 mL(V₅)를 가하여 용해시킨 후 필터(PTFE, 0.2 µm)로 여과한 액을 최종 시험용액으로 한다.

2) 우유류, 발효유

검체를 균질화한 후 5 g을 정밀히 달아 내부표준용액을 첨가한 후 추출용액(V₁) 20 mL(액상시료의 경우 최종 20 mL가 되도록 함)를 가한다. 아세트니트릴 포화 헥산 10 mL을 가한 후 10분간 진탕하고 3,700 ×g에서 10분간 원심분리한다. 상층액(헥산층)을 제거하고 섬유 여과지로 여과한 후 필터(PTFE, 0.2 μm)로 여과한 액을 최종 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(3 mm × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상

(1) 이동상 A: 0.1%(v/v) 포름산(formic acid)과 5 mM 포름산암모늄(ammonium formate)을 함유한 수용액

(2) 이동상 B: 0.1%(v/v) 포름산(formic acid)과 5 mM 포름산암모늄(ammonium formate)을 함유한 메탄올

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
0.5	95	5
2	60	40
9	0	100
11.5	0	100
12	95	5
15	95	5

다) 이동상 유량: 0.5 mL/분

라) 컬럼 온도: 40℃

마) 주입량: 10 μL

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: ESI(Positive, Negative ion mode)

나) Curtain gas: 30

다) Collision gas: 9

라) Ion spray voltage: 4,500

마) Ion source temperature: 500℃

바) Ion source gas 1: 50

사) Ion source gas 2: 50

야) Collision gas: N₂ 또는 이와 동등한 것

표 1. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, <i>m/z</i>)	생성이온 (Product ion, <i>m/z</i>)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
아플라톡신 B ₁	Positive	312.27	312.97	285.1 ¹⁾ 240.9	35 51

분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, <i>m/z</i>)	생성이온 (Product ion, <i>m/z</i>)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
아플라톡신 B ₂	Positive	314.29	314.97	287.0 ¹⁾ 258.8	37 41
아플라톡신 G ₁	Positive	328.27	328.96	199.9 ¹⁾ 243.1	45 55
아플라톡신 G ₂	Positive	330.29	331.10	189.1 ¹⁾ 245.1	57 57
오크라톡신 A	Positive	403.81	403.97	238.9 ¹⁾ 102.0	35 95
푸모니신 B ₁	Positive	721.83	722.27	334.1 ¹⁾ 352.2	55 51
푸모니신 B ₂	Positive	705.83	706.25	336.2 ¹⁾ 318.2	46 46
제랄레논	Negative	318.36	317.02	174.9 ¹⁾ 131.0	-34 -38

¹⁾ 정량이온

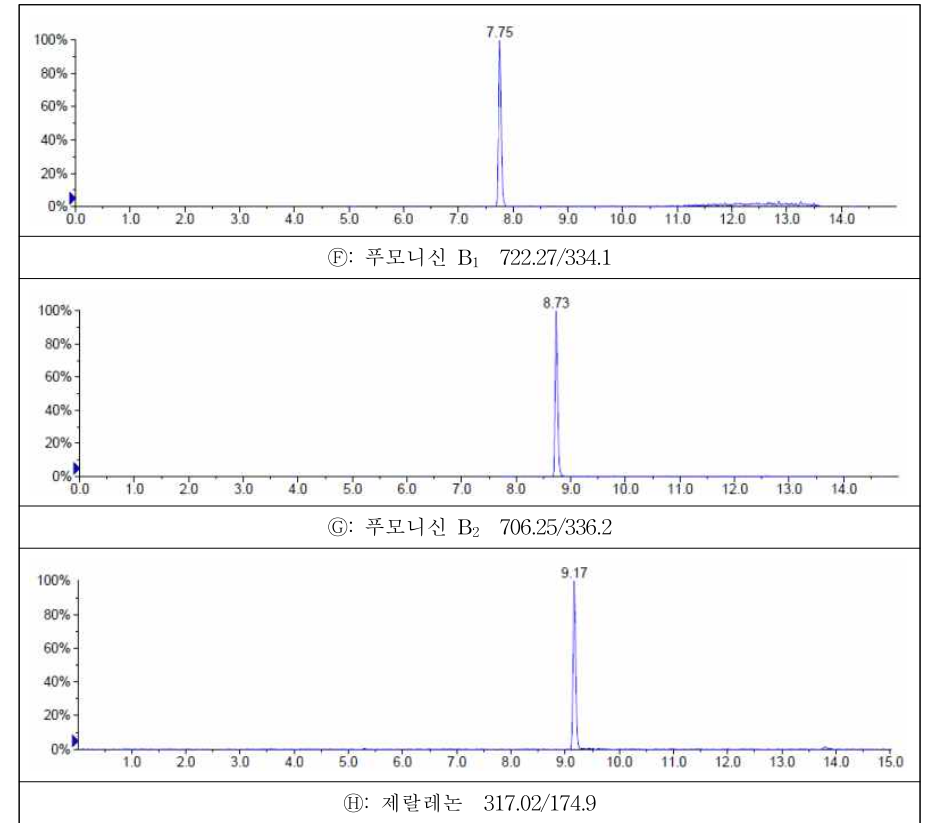
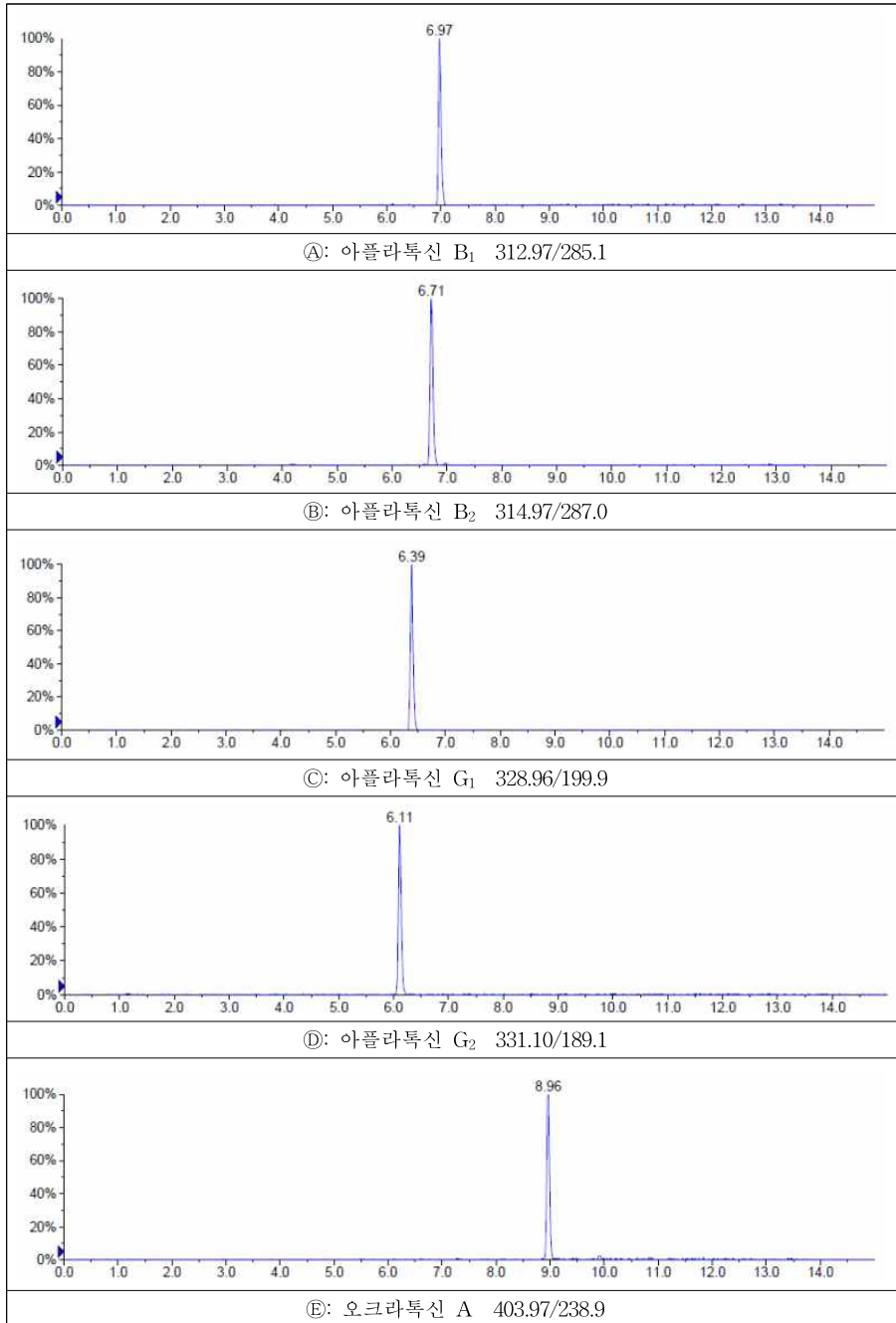
표 2. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온(내부표준물질)

분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, <i>m/z</i>)	생성이온 (Product ion, <i>m/z</i>)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
아플라톡신 B ₁ 내부표준물질	Positive	329.1	330.1	301.0 ¹⁾	33
아플라톡신 B ₂ 내부표준물질	Positive	331.1	332.0	303.2 ¹⁾	38
아플라톡신 G ₁ 내부표준물질	Positive	345.1	346.1	257.1 ¹⁾	38
아플라톡신 G ₂ 내부표준물질	Positive	347.1	348.0	330.0 ¹⁾	37

¹⁾ 정량이온

※ 액체크로마토그래프 분석조건 및 각 생성이온에 대한 질량분석기의 분석조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 생성이온도 적용이 가능함.

3) 표준품 크로마토그램



①: 아플라톡신 B₁, ②: 아플라톡신 B₂, ③: 아플라톡신 G₁, ④: 아플라톡신 G₂,
 ⑤: 오크라톡신 A, ⑥: 푸모니신 B₁, ⑦: 푸모니신 B₂, ⑧: 제랄레논

그림 1. 표준품 크로마토그램 예시.

사. 정성시험

위의 조건으로 얻어진 표준용액 크로마토그램상의 피크 머무름 시간과 특성이온으로 시험용액의 곰팡이독소를 확인한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온간 반응세기의 비율(response ratio)을 비교하여 그 비율이 ± 20~30% 이내에서 일치하여야 한다.

※ 생성이온간 반응세기의 비율 허용 범위

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

아. 정량시험

1) 계산

가) 우유류, 발효유를 제외한 식품

$$\text{곰팡이독소의 함량}(\mu\text{g/kg}) = C \times \frac{V_1}{S} \times \frac{V_3}{V_2} \times \frac{V_5}{V_4}$$

C: 검량선에서 구한 곰팡이독소의 함량(ng/mL)

S: 시료량(g)

V₁: 추출용액의 부피(mL)

V₂: 추출용액에서 취한 여액의 부피(mL)

V₃: 최종 추출액의 부피(mL)

V₄: 추출액의 주입량(mL)

V₅: 건고물 용해용액의 부피(mL)

나) 우유류, 발효유

$$\text{곰팡이독소 함량}(\mu\text{g/kg}) = C \times \frac{V_1}{S}$$

C: 검량선에서 구한 곰팡이독소의 함량(ng/mL)

S: 시료량(g)

V₁: 추출용액의 부피(mL)

9.3 다이옥신

9.3.1 시험시료

별도의 규정이 없는 경우 9.1 증급속 9.1.1 일반원칙, 가. 검체의 처리에 따라 처리한 것을 시료로 한다.

9.3.2 기체크로마토그래프/고분해능 질량분석기(GC/HRMS)에 의한 시험

가. 시험법 적용범위

식육(소고기, 돼지고기, 닭고기)에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중의 4~8염화 dibenzo-p-dioxin(CDDs) 및 dibenzofuran(CDFs)를 측정하기 위해 전자 리과정을 통하여 지방을 추출하고 컬럼크로마토그래프로 정제한 것을 기체크로마토그래프/고분해능 질량분석기(GC/HRMS)로 분석한다.

다. 장치

기체크로마토그래프/고분해능 질량분석기(GC/HRMS): 분해능 10,000 이상을 사용한다.

라. 시약 및 시액

시약 및 시액은 다이옥신 분석에 영향을 미치는 방해성분을 함유하지 않아야 한다.

- 1) 용매 : 특급 또는 이와 동등 이상인 것.
- 2) 검량용 표준물질(Calibration standard) : 다이옥신의 정성 및 정량에 사용하는 검량용 표준 물질은 표 1과 같이 2,3,7,8-치환 동족체 17종과 ¹³C₁₂ 동족체(Labeled) 및 ³⁷Cl₄ 동족체를 사용한다.
- 3) 회수율 측정용 표준물질(Labeled compound standard) : 시료의 추출과정 전에 첨가하는 정

량 및 회수율 측정용 내부표준물질은 ¹³C₁₂ 동족체로 된 다이옥신 중 표 1과 같은 화합물을 사용한다.

- 4) 내부표준물질(Internal standard solution) : 기체크로마토그래프/고분해능 질량분석기에 주입하기 전에 첨가하는 내부표준물질은 ¹³C₁₂-1,2,3,4-TCDD 및 ¹³C₁₂-1,2,3,7,8,9-HxCDD를 사용한다.
- 5) 검량선 작성용 표준물질의 조제 : 정량용 표준물질을 검출한계 부분의 저농도의 것과 예상 검출농도보다 높은 고농도의 것을 적어도 하나 이상 포함시켜 5단계 이상의 농도 범위로 조제한다.
단, 검량선 작성용 표준용액은 직선성을 유지하여야 한다. 검량선 작성용 표준용액은 정량용 표준물질의 ¹³C₁₂ 동족체 및 ³⁷Cl₄ 동족체가 동일 농도로 함유되어야 한다.
- 6) 정밀 회수용 표준물질(Precision and recovery standard) : 다이옥신의 회수율을 측정하기 위해 일정농도의 정밀 회수용 표준물질을 사용하여야 한다(표 1).
- 7) 실리카겔 : 컬럼크로마토그래피용 실리카겔(100~200 mesh)을 디클로로메탄으로 세척하여 180℃에서 1시간 이상 가열한 후 데시케이터에서 식힌다.
- 8) 산성 실리카겔(30%, w/w) : 실리카겔 100 g에 황산 44.0 g을 넣어 잘 흔들어 섞어 사용한다.
- 9) 염기성 실리카겔 : 실리카겔 100 g에 1 N 수산화나트륨 30 g을 넣어 잘 흔들어 섞어 사용한다.
- 10) 염기성 알루미늄 : 600℃에서 24시간 이상 가열한 후 데시케이터에서 식힌다.
- 11) 실리카겔 컬럼 : 안지름 11 mm, 길이 177 mm의 정제용 컬럼(중성실리카겔 1.5 g, 염기성 실리카겔 2 g, 산성실리카겔 4 g의 순서로 충전한 것) 또는 이와 동등 이상의 것.
- 12) 알루미늄 컬럼 : 안지름 11 mm, 길이 177 mm의 정제용 컬럼(염기성알루미늄 12.5 g을 충전한 것) 또는 이와 동등 이상의 것.
- 13) 카본 컬럼 : 안지름 11 mm, 길이 10 mm의 정제용 컬럼[8% 카본/규조토(celite 545-AW 0.275 g을 충전한 것)] 또는 이와 동등 이상의 것.
- 14) 무수황산나트륨 : 특급이상(400℃에서 최소 1시간 이상 구운 것)
- 15) 1 N 수산화나트륨 : 수산화나트륨 45.0 g을 취하여 물로 1 L로 한 것을 사용한다.
- 16) 기타 : 다이옥신 분석에 적합한 것

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체를 분쇄하여 균질화한 시료 약 15~20 g을 막자사발에 취하여 적당량의 무수황산나트륨을 가하여 수분을 제거한 다음 속슬렛 추출장치용 원통여과지로 옮기고 따로 시료를 넣지 않은 원통여과지에 각각 회수율 측정용 표준물질을 첨가 한 다음 *비등성이 첨가된 속슬렛 추출장치에 추출용매(예: 클로로메탄·헥산 = 3:1, v/v) 300 mL를 넣어 18시간 이상 추출한다. 별도로 회수율 측정용 시료에는 정밀 회수용 표준물질을 첨가하여 *이후부터 동일한 방법을 사용한다.

2) 조지방 함량

속슬렛 추출장치의 추출액을 40℃ 이하의 수욕상에서 감압 농축한 후 질소농축기를 이용하여 향량이 될 때까지 농축하여 조지방 함량을 구한다.

$$\text{조지방 함량(g)} = \frac{W_1 - W_0}{S}$$

W_0 : 플라스크의 무게(g)
 W_1 : 조지방을 추출하여 농축한 플라스크의 무게(g)
 S : 시료의 채취량(g)

3) 조지방 제거

유리솜이 들어있는 분액깔때기에 유리깔때기를 이용하여 무수황산나트륨 20 g과 조지방 1 g 당 산성실리카겔 10 g을 첨가한다. 헥산 3 mL로 조지방을 충분히 용해한 다음 분액깔때기에 묻지 않도록 산성실리카겔 표면에 넓게 뿌려서 넣는다. 이러한 조작을 2회 반복한 다음 20분간 반응시킨 후 헥산 130~150 mL로 용출한다. 이 용출액을 40℃ 이하의 수욕상에서 약 3 mL가 되도록 감압 농축한 후 다른 시험관에 옮기고 감압용기를 다시 헥산 3 mL씩 2회 세척하여 용액을 시험관에 합한다.

4) 정제

위의 용액을 헥산으로 활성화된 실리카겔 컬럼에 넣은 후 헥산으로 용출시키고 그 용출액을 알루미늄아 컬럼에 첨가한 다음 2% 디클로로메탄 함유 헥산으로 방해물질을 제거하여 50% 디클로로메탄 함유 헥산으로 다시 용출시킨다. 이 알루미늄아 컬럼에서 용출한 액을 카본 컬럼에 넣고 50% 에틸아세테이트 함유 벤젠으로 용출시킨 다음 다시 헥산으로 방해물질을 제거한 후 톨루엔으로 역 용출한다. 이 용출액을 질소 농축기를 사용하여 농축한 다음 내부표준물질을 첨가하여 이를 시험용액으로 한다.

주1) 컬럼크로마토그래피에서 사용하는 충전제나 용매의 종류 및 양은 표준물질 등으로 분획 실험하여 최적조건을 확립하여야 한다.

바. 시험조작

1) 기체크로마토그래프 분석조건

가) 컬럼 : DB-5 캐필러리 컬럼(길이 60 m, 안지름 0.2~0.32 mm, 두께 0.1~0.25 μm) 또는 이와 동등 이상의 것으로 분석하고자 하는 전 동족체가 양호하게 분리되어야 하며 그 분리 효율을 입증할 수 있는 것이어야 한다.

나) 컬럼 온도 : 각 동족체의 분리가 양호하도록 적절한 온도조건을 설정한다.

단, 2,3,7,8-TCDD와 2,3,7,8-TCDF는 인접한 피크의 분리도가 봉우리 높이 대비 25% 미만이어야 한다.

다) 이동상 가스(carrier gas) 및 유량 : 헬륨, 0.5~5.0 mL/분

라) 주입부 온도 : 약 270℃ 또는 각 동족체의 분리가 양호한 온도

마) 연결부 온도 : 약 290℃ 또는 각 동족체의 분리가 양호한 온도

바) 이온원 온도 : 약 260℃ 또는 각 동족체의 분리가 양호한 온도

2) 고분해능 질량분석기 분석조건

가) 튜닝 표준물질 : PFK(perfluorkerosene) 또는 이와 동등한 것

나) 분해능 : 10,000 이상 (10% valley 기준)

다) 이온화방법 : 전자충격이온화 방식 (EI)

라) 질량 설정 : 측정하고자 하는 이온의 질량은 각 동족체마다 2개 이상의 이온을 선택이온(selected ion), 즉 M^+ , $[M+2]^+$ 또는 $[M+4]^+$ 를 사용한다. 주로 사용하는 각 다이옥신 동족체의 대표적 이온 질량은 표 1과 같다.

마) 질량 검정 : 기체크로마토그래프/고분해능 질량분석기는 시료 분석조건과 동일한 조건에서 분해능 10,000 이상으로 조정한 다음, 4 염화물에서 8 염화물의 선택이온들을 적당한 그룹으로 나누어 튜닝 표준물질에 의한 질량 검정을 하여야 한다.

바) 주기적 점검 : 분석을 지속적으로 수행하는 경우 매 12시간마다 검량용 표준물질 중 중간농도의 표준물질을 선택하여 분석조건을 점검하여야 하며 회수율은 80%~120%에 있어야 한다.

사) 검출한계 : 4, 5염화물 각각의 검출한계는 0.04 pg/g이하이어야 한다.

3) 검량선 작성

검량선 작성용 표준물질을 사, 정성시험과 같은 방법으로 기체크로마토그래프/고분해능 질량분석기에 주입하여 각 선택이온에 대한 크로마토그램을 작성하여 각 표준물질의 피크 면적과 이에 대응하는 $^{13}C_{12}$ 동족체의 피크 면적으로부터 다음 식에 의해 상대감응도(Relative Response : RR)를 구한다. 상대감응도는 5개 농도 이상의 검량선 작성용 표준물질을 사용하며 편차범위는 ±20% 이내이어야 한다.

$$RR = \frac{(A_{1n} + A_{2n})(C_i)}{(A_{11} + A_{21})(C_n)}$$

A_{1n}, A_{2n} : 검량선 작성용 표준물질에 첨가된 다이옥신의 1차 또는 2차 선택 이온의 피크 면적
 A_{11}, A_{21} : 검량선 작성용 표준물질에 첨가된 $^{13}C_{12}$ 동족체의 1차 또는 2차 선택 이온의 피크 면적
 C_n : 검량선 작성용 표준물질의 농도
 C_i : 검량선 작성용 표준물질에 첨가된 $^{13}C_{12}$ 동족체의 농도

4) 감응계수(Response Factor)

감응계수(RF)는 검량선 작성용 표준물질로부터 얻은 크로마토그램으로 내부 표준법에 따라 다음의 식으로부터 구한다. 5개 농도의 검량선 작성용 표준물질을 사용한 감응계수의 편차범위는 ±35% 이내이어야 한다.

$$RF = \frac{(A_{1s} + A_{2s})(C_{is})}{(A_{1is} + A_{2is})(C_s)}$$

A_{1s}, A_{2s} : 검량선 작성용 표준물질의 1차 또는 2차 선택 이온의 피크 면적
 A_{1is}, A_{2is} : 검량선 작성용 표준물질에 첨가된 회수율 측정용 표준물질의 1차 또는 2차 선택이온의 피크 면적
 C_s : 검량선 작성용 표준물질의 농도
 C_{is} : 검량선 작성용 표준물질에 첨가된 회수율 측정용 내부표준물질의 농도

5) 회수율 측정용 표준물질의 농도 및 회수율

시료에 첨가된 회수율 측정용 표준물질의 농도(C_i) 및 회수율은 다음 식에 의해 구한다.

$$C_i \text{ (ng/g)} = \frac{(A_{1is} + A_{2is})(C_{is})}{(A_{1is} + A_{2is}) \times RF}$$

$$\text{회수율(\%)} = \frac{C_i \text{ (ng/g)}}{C_{spk} \text{ (ng/g)}} \times 100$$

- A_{1s}, A_{2s} : 회수율 측정용 표준물질(¹³C₁₂ 동족체)의 1차 또는 2차 선택이온의 피크 면적
- A_{1is}, A_{2is} : 내부표준물질의 1차 또는 2차 선택이온의 피크 면적
- C_{is} : 내부표준물질의 농도
- RF : 반응계수
- C_i : 검량선 작성용 표준물질에 첨가된 ¹³C₁₂ 동족체의 농도
- C_{spk} : 첨가한 회수율 측정용 표준물질의 농도

사. 정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 어떠한 측정조건에서도 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 하며, 측정된 선택이온 2개의 이온세기 비율은 표 2~3에 나타난 이론값에 대하여 ±15% 이내이어야 한다. 단, 모든 신호 대 잡음(S/N)비는 2.5 보다 커야 하며, 정량용 ¹³C₁₂ 및 ³⁷Cl₄의 경우는 10보다 커야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 검출된 각각의 다이옥신에 대해 이에 대응하는 검량용 ¹³C₁₂ 동족체 및 ³⁷Cl₄ 동족체 표준물질로 상대 내부표준법으로 정량한다. 또한 회수율 측정용 표준물질 ³⁷Cl₄-2,3,7,8-TCDD와 ¹³C₁₂-2,3,7,8-TCDD 등 15종의 표준물질에 대한 농도를 절대 내부표준법으로 정량한다. 회수율 측정용 표준물질의 회수율은 17% 이상 185% 이하이어야 하며, 정밀 회수율 표준물질의 회수율은 63% 이상 170% 이하이어야 한다.

1) 다이옥신 농도의 계산

시료 중 다이옥신 농도는 다음 식으로부터 구한다.

$$\text{다이옥신 농도 (pg/g fat)} = \frac{(A_{1n} + A_{2n})(C_i)}{(A_{1i} + A_{2i})(RR)} \times \frac{V_{ex}}{W_s} \times 1,000$$

- A_{1n}, A_{2n} : 시료에 함유된 대상물질의 1차 또는 2차 선택이온의 피크 면적
- A_{1i}, A_{2i} : A_{1n} 와 A_{2n}에 대응하는 시료에 첨가된 ¹³C₁₂ 동족체 화합물의 1차 또는 2차 선택 이온의 피크 면적
- C_i : 시료에 첨가된 ¹³C₁₂ 동족체 표준물질의 농도 (pg/mL)
- RR : 상대감응도
- V_{ex} : 추출량(mL)
- W_s : 조지방 함량(g)

2) 독성등가량(Toxic Equivalents : TEQ)으로 환산

산출한 다이옥신 농도(ng/g fat)의 독성등가량 환산은 각 분석 대상 동족체에 표 4에 해당하는 독성등가계수(Toxic Equivalency Factors: TEFs)를 곱하여 이 합계를 독성등가량 (pgTEQ/g fat)으로 한다.

표 1. 대상물질

PCDDs	대표적 이온 질량	PCDFs	대표적 이온 질량
2,3,7,8- TCDD	319.8965/321.8936	2,3,7,8-TCDF	303.9016/305.8987
1,2,3,7,8- PeCDD	355.8546/357.8517	1,2,3,7,8-PeCDF	339.8597/341.8568
1,2,3,4,7,8- HxCDD	389.8157/391.8127	2,3,4,7,8-PeCDF	339.8597/341.8568
1,2,3,6,7,8- HxCDD	389.8157/391.8127	1,2,3,4,7,8-HxCDF	373.8207/375.8178
1,2,3,7,8,9- HxCDD	389.8157/391.8127	1,2,3,6,7,8-HxCDF	373.8207/375.8178
1,2,3,4,6,7,8- HpCDD	423.7767/425.7737	1,2,3,7,8,9-HxCDF	373.8207/375.8178
1,2,3,4,6,7,8,9- OCDD	457.7377/459.7348	2,3,4,6,7,8-HxCDF	373.8207/375.8178
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	407.7818/409.7788
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	407.7818/409.7788
		1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	441.7428/443.7398

주2) 약어의 펼친 이름은 다음과 같음.

- PCDD = Polychlorodibenzo-*p*-dioxin
- PCDF = Polychlorodibenzofuran
- TCDD = Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin
- TCDF = Tetrachlorodibenzofuran
- PeCDD = Pentachlorodibenzo-*p*-dioxin
- PeCDF = Pentachlorodibenzofuran
- HxCDD = Hexachlorodibenzo-*p*-dioxin
- HxCDF = Hexachlorodibenzofuran
- HpCDD = Heptachlorodibenzo-*p*-dioxin
- HpCDF = Heptachlorodibenzofuran
- OCDD = Octachlorodibenzo-*p*-dioxin
- OCDF = Octachlorodibenzofuran

표 2. 염소 원자수에 의한 동족체 피크의 자연 존재비

	자연 존재비							
	M	M+2	M+4	M+6	M+8	M+10	M+12	M+14
4	76.5	100	48.7	10.5	0.9			
5	61.5	100	65.0	21.1	3.5	0.2		
6	51.2	100	81.2	35.2	8.5	1.1	0.06	
7	43.2	100	97.5	52.8	17.1	3.3	0.36	0.02
8	33.8	87.9	100.0	65.0	26.4	6.8	1.1	0.10

표 3. 염소원자에 따른 선택 이온의 이론적인 이론비

염소원자의 수	전하대 질량(<i>m/z</i>) 생성비	이론비	이론범위	
			최소	최대
4개 ¹⁾	M/(M+2)	0.77	0.65	0.89
5개	(M+2)/(M+4)	1.55	1.32	1.78
6개	(M+2)/(M+4)	1.24	1.05	1.43
6개 ²⁾	M/(M+2)	0.51	0.43	0.59
7개	(M+2)/(M+4)	1.05	0.88	1.20
7개 ³⁾	M/(M+2)	0.44	0.37	0.51
8개	(M+2)/(M+4)	0.89	0.76	1.02

- 1) : ³⁷Cl₄-2,3,7,8-TCDD 제외
- 2) : ¹³C₁₂-HxCDF에만 적용
- 3) : ¹³C₁₂-HpCDF에만 적용

표 4. 독성등가계수(Toxic Equivalency Factors; WHO 2005 TEFs)

다이옥신	WHO - TEF
2,3,7,8-TCDD	1
2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01
OCDD	0.0003
OCDF	0.0003

9.4 폴리염화비페닐(PCBs)

9.4.1 시험시료

별도의 규정이 없는 경우 9.1 중급속 9.1.1 일반원칙, 가. 검체의 처리에 따라 처리한 것을 시료로 한다.

9.4.2 기체크로마토그래프/질량분석기에 의한 시험

가. 시험법 적용범위

어류 중의 폴리염화비페닐 7종 정량에 적용한다.

나. 분석원리

어류의 가식부를 취하여 속슬렛 추출장치에 넣고 조지방을 추출한 후 추출용액을 농축하고 다층 실리카겔 컬럼으로 정제하여 기체크로마토그래프/질량분석기로 폴리염화비페닐 7종을 분석한다.

다. 장치

기체크로마토그래프/질량분석기를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 용매 : 특급 또는 이와 동등 이상인 것.
- 2) 무수황산나트륨 : 특급이상(400℃에서 최소 1시간 이상 구운 것)
- 3) 다층 실리카겔 컬럼 : 안지름 25 mm, 길이 550 mm의 정제용 컬럼에 <그림 1>와 같이 아래부터 무수황산나트륨 1 g, 중성실리카겔 1 g, 염기성실리카겔 3 g, 중성실리카겔 1 g, 산성실리카겔 5 g, 중성실리카겔 2 g, 무수황산나트륨 2 g의 순서로 충전한 것 (또는 이와 동

등 이상의 것)



그림 1. 다층 실리카겔 컬럼

- 무수황산나트륨 2 g
- 중성실리카겔 2 g
- 산성실리카겔 5 g
- 중성실리카겔 1 g
- 염기성실리카겔 3 g
- 중성실리카겔 1 g
- 무수황산나트륨 1 g

- 4) 중성 실리카겔 : 컬럼크로마토그래피용 실리카겔(100~200 mesh)을 유리 컬럼에 채우고 메탄올, 헥산과 디클로로메탄으로 순으로 용리 세척하여 180℃에서 8시간 이상 가열한 후 데시케이터에서 방냉한다.
- 5) 산성 실리카겔(30%, g/g) : 중성 실리카겔 100 g에 진한 황산 44.0 g를 넣고 균일하게 혼합한다.
- 6) 염기성 실리카겔(23%, g/g) : 중성 실리카겔 100 g에 1N 수산화나트륨 30.0 g를 넣고 균일하게 혼합한다.
- 7) 추출용매: 디클로로메탄:헥산(3 : 1, v/v)
※ 사용되는 시약 및 시액은 폴리염화비페닐 분석에 영향을 미치는 방해성분을 함유하지 않아야 하며, 차광용기를 사용한다.
- 8) 표준원액 : 폴리염화비페닐 7종 표준품을 노란에 녹여 1000 µg/mL 가 되게 한다<표 1>.

표 1. 분석대상 폴리염화비페닐(indicator PCBs 7종)의 표준물질

	동족체	BZ 번호*
3염화비페닐	2,4,4'-trichlorobiphenyl	28
4염화비페닐	2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl	52
5염화비페닐	2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl	101
	2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl	118
6염화비페닐	2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl	138
	2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl	153
7염화비페닐	2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl	180

* Ballschmider and Zell 번호: PCBs의 각 페닐 고리의 염소 위치를 나타낸 번호

- 9) 내부표준원액 : ¹³C₁₂ 동족체로 된 폴리염화비페닐 7종의 내부 표준품을 노란에 녹여 50 µg/mL 가 되게 한다.
- 10) 검량선 작성용 표준용액 : 표준원액과 내부표준원액에 노란을 가해 <표 2>와 같이 표준

용액 5단계 이상의 농도 범위(0.01 ~ 0.5 µg/mL)로 조제한 것을 사용한다. 단, 검량선 작성용 표준용액들은 직선성을 유지하여야 한다.

표 2. 폴리염화비페닐의 검량선 작성용 표준용액

(단위: µg/mL)

표준액	BZ 번호	CS* 0.01	CS 0.05	CS 0.1	CS 0.2	CS 0.5
3염화 비페닐	28	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
	28L*	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
4염화 비페닐	52	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
	52L*	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
5염화 비페닐	101	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
	118	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	101L*	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
	118L*	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
6염화 비페닐	138	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
	153	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	138L*	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
	153L*	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
7염화 비페닐	180	0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
	180L*	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

※ CS*: 검량선 작성용 표준용액 (Calibration Standard Solution)

※ L*: 동위원소로 치환된(Labeled Compound, ¹³C₁₂) 내부표준물질

다. 시험용액의 조제

1) 조지방 추출

어류 가식부의 균질화된 시료 약 10 g을 막자사발에 취한다. 무수황산나트륨을 가하여 막자로 저어 수분을 제거한 다음 속슬랫 추출장치용 원통형 여지로 옮긴다. 따로 시료를 넣지 않은 무수황산나트륨을 대조시료로 하여 속슬랫 추출장치용 원통형 여지에 넣고, 각각 동일한 농도의 내부표준첨가용액을 첨가 한 다음 속슬랫 추출장치를 이용하여 추출용매 300 mL로 18~24 시간 동안 시간당 3~4번의 환류속도로 추출한다. 추출액을 35℃ 이하의 수욕상에서 10 mL까지 감압 농축 한 후 질소농축기를 이용하여 농축한다.

2) 정제

유리솜이 들어있는 분액깔때기에 유리깔때기를 이용하여 무수황산나트륨 20 g을 넣은 다음 산성실리카겔 30 g을 넣어준다. 농축된 조지방을 헥산 3 mL로 용해한 다음 분액깔때기에 묻지 않도록 산성실리카겔 표면에 넓게 뿌려서 넣는다. 이러한 조작을 2회 반복한 다음 20분간 정치시킨 후 헥산 150 mL로 용출한다. 따로 미리 제조된 다층 실리카겔 컬럼을 헥산 100 mL로 활성화시킨 후 앞의 용출액을 가하고 헥산 200 mL로 용출한다. 이 용출액을 회전감압농축장치로 5 mL까지 농축하고 질소 농축기로 농축한 다음 최종 부피가 1 mL되도록 하여 이를 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 기체크로마토그래프의 조건

가) 컬럼 : DB-1 (60 m, 0.25 mm ID., 0.25 µm) 또는 이와 동등 이상의 것

나) 주입부온도 : 280℃

다) 컬럼 온도 : 초기 온도 100℃에서 15℃/분의 비율로 200℃까지 온도를 상승시켜 3분간 유지하고 2℃/분의 비율로 250℃까지 상승시켜 5분간 유지한 다음 5℃/분의 비율로 300℃까지 상승시켜 3분간 유지한다.

라) 이동상 가스(carrier gas) 및 유량 : 헬륨(1.0 mL/분)

마) 주입방법: splitless

바) 주 입 량: 1.0 µL

2) 질량분석기의 조건

가) 이온화방법 : EI

나) 이온화전압: 70 eV

다) 특성이온: <표 3> 참조

표 3. 대상물질 및 이온세기의 이론비

동족체	BZ 번호	특성이온			이론비 (M'/(M+2)' 또는 (M+2)/(M+4)'
		M'	(M+2)'	(M+4)'	
3염화비페닐	28	256.0	258.0		1.02
	28L*	268.0	270.0		
4염화비페닐	52	289.9	291.9		0.77
	52L*	301.9	303.9		
5염화비페닐	101	325.9	327.9		1.53
	118	325.9	327.9		
	101L*	337.9	339.9		
	118L*	337.9	339.9		
6염화비페닐	138	359.8	361.8		1.23
	153	359.8	361.8		
	138L*	371.8	373.8		
	153L*	371.8	373.8		
7염화비페닐	180	393.8	395.8		1.02
	180L*	405.8	407.8		

※ L*: 동위원소로 치환된(Labeled Compound, ¹³C₁₂) 내부표준물질

사. 정성시험

위의 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램상의 각 피크를 표준용액의 표준물질 및 내부표준물질의 피크의 머무름 시간과 비교할 때 일치하여야 하며, 측정된 선택 이온 2개의 이온세기 비율(M/M+2 혹은 M+2/M+4)은 <표 2>에 나타난 이론비에 대하여 ±20% 이내이어야 한다.

아. 정량시험

검량선 작성용 표준용액의 각각 표준물질의 피크면적(A_S)과 내부표준물질 피크면적(A_{IS})에 대한 비[A_S/A_{IS}]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고, 시험용액에서 얻어진 폴리염화비페닐의 피크면적과 내부표준물질의 면적비[A_{SAM}/A_{SAMIS}]를 Y축에 대입하여 각각의 폴리염화비페닐 농도를 계산한 후 7종의 폴리염화비페닐 7종의 합을 폴리염화비페닐 7종(indicator PCBs 7종) 농도로 한다.

$$\text{폴리염화비페닐 농도 (C, ng/g)} = P \times \frac{V}{M_s}$$

P :검량선에서 구한 폴리염화비페닐 농도(ng/mL)

V :최종부피(mL)

M_s :시료 채취량(g)

$$\text{폴리염화비페닐 7종 농도 (ng/g)} = \sum C_i$$

C_i : i 동족체의 폴리염화비페닐의 농도

(i = PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180)

9.5 벤조피렌

9.5.1 시험시료

9.1 식품일반 9.1.1 일반원칙 가. 항의 검체의 품목별 사용 부위 및 처리방법을 정해놓은 표에 따른다. 다만, 이 표에서 정하지 아니한 품목은 별도의 규정이 없는 경우 가식부를 사용 부위로 한다.

9.5.2 식용유지 중 벤조피렌

9.5.2.1 제1법

가. 시험법 적용범위

식용유지(크릴유, 쇼트닝, 현미유, 팜유 제외)에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질은 N,N-디메틸포름아마이드-물(9:1, v/v)과 헥산으로 추출한 후 고체상 카트리지(solid phase cartridge)로 정제하여 액체크로마토그래프-형광검출기로 분석한다.

다. 장치

1) 액체크로마토그래프-형광검출기(HPLC-FLD)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 물 : 3차 정제수 또는 이와 동등한 것

3) 플로리실 또는 실리카 카트리지: 플로리실 또는 실리카 1 g을 함유한 SPE용 또는 이와 동등한 것

4) 막 여과지(membrane filter) : 수용성 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE, pore size 0.45 μm 이하) 또는 이와 동등한 것

5) 표준원액 : 벤조피렌 표준품을 아세토니트릴에 녹여 100 μg/mL로 한다.

6) 내부표준원액 : 3-메틸콜란트렌 표준품을 아세토니트릴에 녹여 100 μg/mL로 한다.

주1) 표준원액 및 내부표준원액은 5~15℃에서 차광하여 저장하며 30일 이내에 사용한다.

7) 내부표준용액 : 내부표준원액을 아세토니트릴을 사용하여 10~25 ng/mL 농도로 희석한다.

8) 검량선 작성용 표준용액 : 표준원액과 내부표준원액 적당량을 정확하게 취하여 아세토니트릴로 5개 농도 이상의 벤조피렌(3~50 ng/mL)과 각각 동일한 농도의 내부표준물질이 함유 되도록 희석한다.

9) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체 10 g을 정밀히 달아 내부표준용액 1 mL를 첨가하고 헥산 100 mL에 녹여 분액깔때기(I)에 옮기고 N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v) 50 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정지하여 층을 충분히 분리시킨 후 N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v)층을 분리하여 다른 분액깔때기(II)에 옮긴다. 헥산층에 N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v) 25 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v)층을 분액깔때기(II)에 합친다. 여기에 1% 황산나트륨 용액 100 mL를 넣어 섞고 헥산 50 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정지하여 층을 충분히 분리시킨 후 헥산층을 분액깔때기(III)에 옮긴다. N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v)층에 헥산 35 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 헥산층을 위의 분액깔때기(III)에 합친다. 물 40 mL씩을 넣고 흔들어 섞은 후 정지하여 층을 충분히 분리시킨 후 물층은 버리는 조작을 2회 되풀이한다. 이 헥산층을 무수황산나트륨 약 15 g을 넣은 여과지를 사용하여 탈수여과한 후 40℃ 이하의 수욕상에서 감압(또는 질소)농축하여 약 2 mL로 한다.

주2) 액-액추출시 층분리가 명확히 확인될 때까지 충분한 방치 시간을 유지해야 한다.

2) 정제

카트리지는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 헥산 20 mL를 순서대로 초당 2~3방울의 속도로 유출시킨 후 사용한다. 활성화된 카트리지에 위의 농축액을 넣고 헥산 5 mL와 헥산:디클로로메탄(3:1, v/v) 15 mL로 각각 초당 2~3방울의 속도로 용출시킨 후 이 용출액을 40℃ 이하의 수욕상에서 질소가스로 날려 보낸다. 잔류물을 아세토니트릴에 녹여 전량을 1 mL로 하고 이를 막 여과지(membrane filter)로 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

가) 컬럼 : LC-PAH용 역상 컬럼(4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 컬럼 온도: 35℃

다) 이동상: 아세토니트릴과 물의 혼합용액(8:2, v/v)

라) 이동상 유량: 1.0 mL/분

마) 검출기파장: 여기파장 294 nm, 형광파장 404 nm

바) 주입량: 10 μL

2) 검량선 작성

검량선 작성용 표준용액을 농도별로 일정량 취하여 액체크로마토그래프-형광검출기에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크높이 또는 피크면적을 구하여 검량선을 작성한다.

3) 표준품 크로마토그램

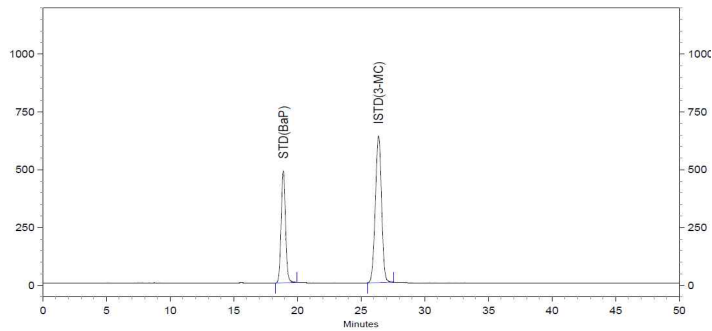


그림 1. 표준품(벤조피렌: BaP)과 내부표준물질(3-메틸콜란트렌: ISTD)크로마토그램 예시.

4) 정량한계: 0.9 µg/kg

사. 정성시험

위의 조건에서 얻어진 크로마토그램상의 피크는 동일한 측정조건에서 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과를 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

1) 계산방법

검량선에서 얻어진 벤조피렌과 내부표준물질의 피크에 대한 면적비[A_S/A_{IS}]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 면적비[A_{SAM}/A_{SAMIS}]를 Y축에 대입하여 벤조피렌의 농도를 계산한다.

A_S : 검량선 작성용 표준용액의 벤조피렌 피크면적

A_{IS} : 검량선 작성용 표준용액의 내부표준물질 피크면적

A_{SAM} : 시험용액의 벤조피렌 피크면적

A_{SAMIS} : 시험용액의 내부표준물질 피크면적

2) 계산식

$$\text{벤조피렌의 함량}(\mu\text{g}/\text{kg}) = C \times V/S$$

C: 검량선에서 계산된 벤조피렌의 농도(ng/mL)

V: 시험용액의 최종부피(mL)

S: 검체 채취량(g)

9.5.2.2 제2법

가. 시험법 적용범위

식용유지(크릴유 제외)에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 N,N-디메틸포름아마이드-물(9:1, v/v)과 헥산으로 추출한 후 고체상 카트리지(solid phase cartridge)로 정제하여 기체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 기체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 플로리실 또는 실리카 카트리지: 플로리실 또는 실리카 1 g을 함유한 SPE용 또는 이와 동등한 것
- 4) 막 여과지(membrane filter): 수용성 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE, pore size 0.45 µm 이하) 또는 이와 동등한 것
- 5) 표준원액: 벤조피렌 표준품을 톨루엔에 녹여 100 µg/mL로 한다.
- 6) 내부표준원액: 벤조피렌-d₁₂ 표준품을 톨루엔에 녹여 100 µg/mL로 한다.
주1) 표준원액 및 내부표준원액은 5~15°C에서 차광하여 저장하며 30일 이내에 사용한다.
- 7) 내부표준용액 : 내부표준원액을 헥산을 사용하여 10~25 ng/mL 농도로 희석한다.
- 8) 검량선 작성용 표준용액: 표준원액과 내부표준원액 적당량을 정확하게 취하여 헥산으로 5개 농도 이상의 벤조피렌(3~50 ng/mL)과 각각 동일한 농도의 내부표준물질이 함유되도록 희석한다.
- 9) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체 2 g을 정밀히 달아 내부표준용액을 0.5 mL첨가하고 헥산 20 mL에 녹여 분액깔대기(I)에 옮기고 N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v) 10 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정지하여 층을 충분히 분리시킨 후 N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v)층을 분리하여 다른 분액깔대기(II)에 옮긴다. 헥산층에 N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v) 5 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v)층을 분액깔대기(II)에 합친다. 여기에 1% 황산나트륨 용액 20 mL를 넣어 섞고 헥산 10 mL를 넣어 흔들어 섞은 후 정지하여 층을 충분히 분리시킨 후 헥산층을 분액깔대기(III)에 옮긴다.

N,N-디메틸포름아마이드:물(9:1, v/v)층에 헥산 10 mL씩을 넣고 위와 같이 2회 되풀이하여 헥산층을 위의 분액깔대기(III)에 합친다. 물 10 mL씩을 넣고 흔들어 섞은 후 정지하여 층을 충분히 분리시킨 후 물층은 버리는 조작을 2회 되풀이한다. 이 헥산층을 무수황산나트륨 약 15 g을 넣은 여과지를 사용하여 탈수여과한 후 40°C 이하의 수욕상에서 감압(또는 질소)농축하여 약 2 mL로 한다.

주2) 액-액추출시 층분리가 명확히 확인될 때까지 충분한 방치 시간을 유지해야 한다.

2) 정제

카트리지는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 헥산 20 mL를 순서대로 초당 2~3방울의 속도로 유출시킨 후 사용한다. 활성화된 카트리지에 위의 농축액을 넣고 헥산 5 mL와 헥산:디클로로메탄(3:1, v/v) 15 mL로 각각 초당 2~3방울의 속도로 유출시킨 후 이 유출액을 40°C 이하의 수욕상에서 질소가스로 날려 보낸다. 잔류물을 헥산에 녹여 전량을 500 µL로 하고 이를 막 여과지(membrane filter)로 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 기체크로마토그래프 분석조건

- 가) 컬럼: HP-5MS(30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 주입부 온도: 320°C
- 다) 컬럼 온도: 초기 온도 100°C에서 10분간 유지하고 60°C/분의 비율로 280°C까지 온도를 상

승시켜 10분간 유지한다(post run: 310°C, 10분).

라) 이동상 가스(carrier gas) 및 유량: 헬륨 (1.5 mL/분)

마) 주입방법: splitless

바) 주입량: 1 μ L

※ 주입부 및 오븐 온도는 사용장비에 따라 적절히 조정가능

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: EI 모드(70eV)

표 1. 기체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

분석성분 (Compound)	특성이온 (m/z)
B(a)P	252 ¹⁾ , 250, 253
B(a)P-d ₁₂	264 ¹⁾ , 260, 265

¹⁾정량이온

3) 검량선 작성

검량선 작성용 표준용액을 농도별로 일정량 취하여 기체크로마토그래프-질량분석기에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크높이 또는 피크면적을 구하여 검량선을 작성한다.

4) 표준품 크로마토그램

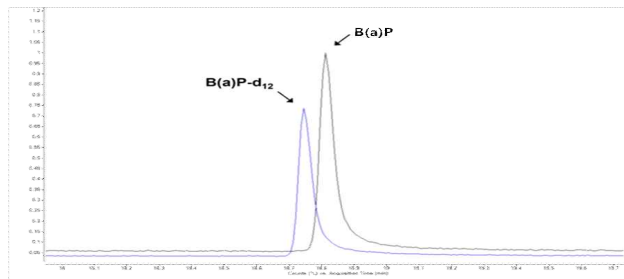


그림 1. 표준품(벤조피렌: B(a)P)과 내부표준물질(벤조피렌-d₁₂: B(a)P-d₁₂)의 크로마토그램 예시.

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 시험용액 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 비교하여 일치 여부를 확인한다. 시험용액의 특성이온이 위 표와 같이 확인되어야 하고 표준용액과 시험용액 이온간 반응세기의 비(정성이온(Qualitative ion)에 대한 각 이온의 백분율, response ratio)를 비교하여 그 비가 $\pm 15\%$ 이내에서 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험 결과를 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

1) 계산방법

검량선에서 얻어진 벤조피렌과 내부표준물질의 피크에 대한 면적비[A_S/A_{IS}]를 Y축으로 하

고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 면적비[A_{SAM}/A_{SAMIS}]를 Y축에 대입하여 벤조피렌의 농도를 계산한다.

A_S : 검량선 작성용 표준용액의 벤조피렌 피크면적

A_{IS} : 검량선 작성용 표준용액의 내부표준물질 피크면적

A_{SAM} : 시험용액의 벤조피렌 피크면적

A_{SAMIS} : 시험용액의 내부표준물질 피크면적

2) 계산식

$$\text{벤조피렌의 함량}(\mu\text{g}/\text{kg}) = C \times V/S$$

C: 검량선에서 계산된 벤조피렌의 농도(ng/mL)

V: 시험용액의 최종부피(mL)

S: 검체 채취량(g)

9.5.3 숙지황 및 건지황, 흑삼 및 흑삼농축액 중 벤조피렌

가. 시험법 적용범위

숙지황(분말포함), 건지황, 흑삼(분말포함) 및 흑삼농축액에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 물과 헥산으로 초음파 추출 후 고체상 카트리지(solid phase cartridge)로 정제하여 액체크로마토그래프-형광검출기로 분석한다.

다. 장치

1) 액체크로마토그래프-형광검출기(HPLC-FLD)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 물 : 3차 정제수 또는 이와 동등한 것

3) 플로리실 또는 실리카 카트리지: 플로리실 또는 실리카 1 g을 함유한 SPE용 또는 이와 동등한 것

4) 막 여과지(membrane filter) : 수용성 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE, pore size 0.45 μ m 이하) 또는 이와 동등한 것

5) 표준원액 : 벤조피렌 표준품을 아세토니트릴에 녹여 100 μ g/mL로 한다.

6) 내부표준원액 : 3-메틸콜란트렌 표준품을 아세토니트릴에 녹여 100 μ g/mL로 한다.

주1) 표준원액 및 내부표준원액은 5~15°C에서 차광하여 저장하며 30일 이내에 사용한다.

7) 내부표준용액 : 내부표준원액을 아세토니트릴을 사용하여 10~25 ng/mL 농도로 희석한다.

8) 검량선 작성용 표준용액 : 표준원액과 내부표준원액 적당량을 정확하게 취하여 아세토니트릴로 5개 농도 이상의 벤조피렌(3~50 ng/mL)과 각각 동일한 농도의 내부표준물질이 함유되도록 희석한다.

9) 기타 시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체 약 500~600 g을 분쇄하거나 잘게 잘라 균질하게 혼합하여 5 g을 정밀하게 달아 물 100 mL를 넣어 90분간 초음파 추출한다. 여기에 헥산 약 100 mL 및 내부표준용액 1 mL

을 넣어 호모게나이저로 5분간 균질하게 섞은 다음 30분간 초음파 추출한다. hexan층을 분액깔때기에 옮기고 다시 물층에 hexan 약 50 mL씩을 넣고 2회 반복하여 진탕 추출한 후 hexan층을 취하여 분액깔때기에 합한다. 합한 hexan층에 물 약 50 mL를 넣어 세척하고, 이 hexan층을 무수황산나트륨 약 15 g을 넣은 여과지를 사용하여 탈수 여과한 후 40℃ 이하의 수욕상에서 감압(또는 질소)농축하여 약 2 mL로 한다.

주2) 액-액추출시 층분리가 명확히 확인될 때까지 충분한 방치 시간을 유지해야 한다.

2) 정제

카트리지는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 hexan 20 mL를 순서대로 초당 2~3 방울의 속도로 유출시켜 활성화시킨 후 사용한다. 활성화된 카트리지에 위의 농축액을 넣고 hexan 5 mL와 hexan:디클로로메탄(3:1, v/v) 15 mL로 각각 초당 2~3방울의 속도로 용출시킨 후 이 용출액을 40℃ 이하의 수욕상에서 질소가스로 날려 보낸다. 잔류물을 아세토니트릴에 녹여 진탕을 1 mL로 하고 이를 막 여과지(membrane filter)로 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

- 가) 컬럼 : LC- PAH용 역상 컬럼(4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 컬럼 온도: 35℃
- 다) 이동상: 아세토니트릴과 물의 혼합용액(8:2, v/v)
- 라) 이동상 유량: 1.0 mL/분
- 마) 검출기파장: 여기파장 294 nm, 형광파장 404 nm
- 바) 주입량: 10 μL

2) 검량선 작성

검량선 작성용 표준용액을 농도별로 일정량을 취하여 액체크로마토그래프-형광검출기에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크높이 또는 피크면적을 구하여 검량선을 작성한다.

3) 표준품 크로마토그램

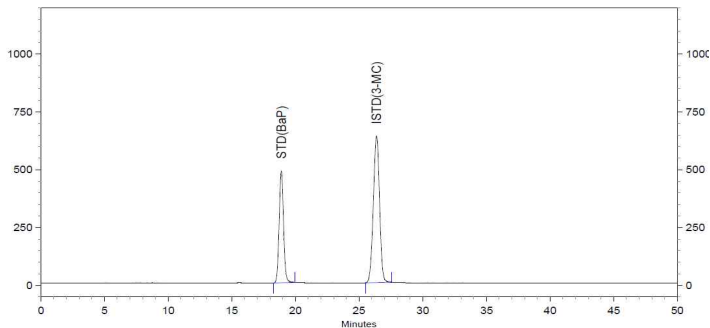


그림 1. 표준품(벤조피렌: BaP)과 내부표준물질(3-메틸콜란트렌: ISTD)크로마토그램 예시.

4) 정량한계: 0.9 μg/kg

사. 정성시험

위의 조건에서 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간과 일치하여야

한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험 결과를 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

1) 계산방법

검량선에서 얻어진 벤조피렌과 내부표준물질의 피크에 대한 면적비[A_S/A_{IS}]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 면적비[A_{SAM}/A_{SAMIS}]를 Y축에 대입하여 벤조피렌의 농도를 계산한다.

A_S : 검량선 작성용 표준용액의 벤조피렌 피크면적

A_{IS} : 검량선 작성용 표준용액의 내부표준물질 피크면적

A_{SAM} : 시험용액의 벤조피렌 피크면적

A_{SAMIS} : 시험용액의 내부표준물질 피크면적

2) 계산식

$$\text{벤조피렌의 함량}(\mu\text{g}/\text{kg}) = C \times V/S$$

C : 검량선에서 계산된 벤조피렌의 농도(ng/mL)

V : 시험용액의 최종부피(mL)

S : 검체 채취량(g)

9.5.4 수산물 및 그 가공품, 혼제식육가공품, 특수영양식품, 특수의료용도식품 및 크릴유 중 벤조피렌

가. 시험법 적용범위

수산물 및 그 가공품, 혼제식육가공품, 특수영양식품, 특수의료용도식품 및 크릴유에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 1M 수산화칼륨·에탄올 용액으로 알칼리 분해하고 hexan으로 추출한 후 고체상 카트리지(solid phase cartridge)로 정제하여 액체크로마토그래프-형광검출기로 분석한다.

다. 장치

1) 액체크로마토그래프-형광검출기(HPLC-FLD)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물 : 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 플로리실 또는 실리카 카트리지: 플로리실 또는 실리카 1 g을 함유한 SPE용 또는 이와 동등한 것
- 4) 막 여과지(membrane filter) : 수용성 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE, pore size 0.45 μm 이하) 또는 이와 동등한 것
- 5) 표준원액 : 벤조피렌 표준물질을 아세토니트릴에 녹여 100 μg/mL로 한다.
- 6) 내부표준원액 : 3-메틸콜란트렌 표준물질을 아세토니트릴에 녹여 100 μg/mL로 한다.
 - 주1) 표준원액 및 내부표준원액은 5~15℃에서 차광하여 저장하며 30일 이내에 사용한다.
 - 주2) 내부표준용액 : 내부표준원액을 아세토니트릴을 사용하여 10~50 ng/mL 농도로 희석한다.

8) 검량선 작성용 표준용액 : 표준원액과 내부표준원액을 적당량을 정확하게 취하여 아세토니트릴로 5개 농도 이상의 벤조피렌(3~100 ng/mL)과 각각 동일한 농도의 내부표준물질이 함유되도록 희석한다.

9) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

다. 시험용액의 조제

1) 추출

균질화한 검체 10 g(건조물의 경우 1~2 g)을 정밀하게 달아 1 M 수산화칼륨·에탄올 용액 100 mL와 함께 등근바닥 플라스크에 넣고 내부표준용액 1 mL를 첨가한 후 환류냉각장치를 부착시킨다. 이를 미리 80℃로 예열된 진열기에서 3시간 동안 가열하여 알칼리분해시키고 신속히 냉각 후 핵산 50 mL를 환류냉각관을 통하여 넣어준다. 등근바닥 플라스크의 알칼리 분해액을 분액깔때기에 옮기고 에탄올:핵산(1:1, v/v)용액 50 mL로 세척하여 분액깔때기에 합친다. 이 액에 50 mL의 물을 넣어 심하게 흔들어 섞은 후 핵산층을 분리하여 다른 분액깔때기에 받아두고 물층에 핵산 50 mL를 넣어 추출하는 과정을 두 번 반복하여 얻은 핵산층을 모두 합친다. 이 핵산층에 물 50 mL를 넣고 흔들어 섞은 후 정지하여 물층은 버리는 조작을 3회 되풀이하고 핵산층을 무수황산나트륨 약 15 g을 넣은 여과지를 사용하여 탈수여과한 후 40℃ 이하의 수욕상에서 감압(또는 질소)농축하여 하여 약 2 mL로 농축한다.

2) 정제

카트리지는 미리 디클로로메탄 10 mL 및 핵산 20 mL를 순서대로 초당 2~3방울의 속도로 유출시킨 후 사용한다. 활성화된 카트리지에 위의 농축액을 넣고 핵산 10 mL와 핵산:디클로로메탄(3:1, v/v) 20 mL로 각각 초당 2~3방울의 속도로 용출시킨 후 이 용출액을 40℃ 이하의 수욕상에서 질소가스로 날려 보낸다. 잔류물을 아세토니트릴에 녹여 전량을 1 mL로 하고 이를 막 여과지(membrane filter)로 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

가) 컬럼 : LC- PAH용 역상 컬럼(4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

* Guard Column으로 SUPELCOSILTM LC-18 또는 이와 동등한 것을 연결한다.

나) 컬럼 온도: 35℃

다) 이동상: 아세토니트릴과 물의 혼합용액(8:2, v/v)

라) 이동상 유량: 1.0 mL/분

마) 검출기파장: 여기파장 294 nm, 형광파장 404 nm

바) 주입량: 10 μL

2) 검량선 작성

검량선 작성용 표준용액을 농도별로 일정량 취하여 액체크로마토그래프-형광검출기에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크높이 또는 피크면적을 구하여 검량선을 작성한다.

3) 표준품 크로마토그램

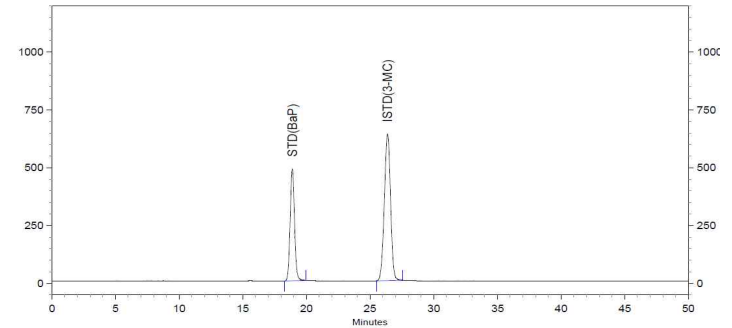


그림 1. 표준품(벤조피렌: BaP)과 내부표준물질(3-메틸콜란트렌: ISTD)크로마토그램 예시.

4) 정량한계: 0.9 μg/kg

사. 정성시험

위의 조건에서 얻어진 크로마토그램상의 피크는 동일한 측정조건에서 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과를 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

1) 계산방법

검량선에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 피크에 대한 면적비[A_S/A_{IS}]를 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 면적비[A_{SAM}/A_{SAMIS}]를 Y축에 대입하여 벤조피렌의 농도를 계산한다.

A_S : 검량선 작성용 표준용액의 벤조피렌 피크면적

A_{IS} : 검량선 작성용 표준용액의 내부표준물질 피크면적

A_{SAM} : 시험용액의 벤조피렌 피크면적

A_{SAMIS} : 시험용액의 내부표준물질 피크면적

2) 계산식

$$\text{벤조피렌의 함량}(\mu\text{g/kg}) = C \times V/S$$

C: 검량선에서 계산된 벤조피렌의 농도(ng/mL)

V: 시험용액의 최종부피(mL)

S: 검체 채취량(g)

9.6 3-MCPD(3-Monochloropropane-1,2-diol)

9.6.1 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS)에 의한 시험

가. 시험법 적용범위

산분해간장, 혼합분해간장(산분해간장 또는 산분해간장 원액을 혼합하여 가공한 것에 한한다) 및

식물성 단백질수분해물(HVP: Hydrolyzed vegetable protein)에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 다공성 규조토 정제컬럼으로 정제하고 디클로로메탄으로 추출하여 HFBA(heptafluorobutyric anhydride)로 유도체화한 후 기체크로마토그래프-질량분석기로 분석하는 방법이다.

다. 장치

1) 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 디클로로메탄: 기체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 유도체시약: HFBA(Heptafluorobutyric anhydride)
- 3) 정제컬럼: 다공성 규조토 정제컬럼(최대 시료부피 3 mL) 또는 이와 동등한 것.
- 4) 표준원액: 3-MCPD 표준품을 초산에틸에 녹여 1,000 µg/mL로 조제한다.
- 5) 표준용액: 위의 표준원액을 초산에틸로 희석하여 5개 이상의 적당한 농도로 조제한다.
- 6) 내부표준원액: 3-MCPD-d₅ 표준품을 초산에틸에 녹여 1,000 µg/mL로 조제한다.
- 7) 내부표준용액: 위의 내부표준원액을 초산에틸로 희석하여 10 µg/mL로 조제한다.
- 8) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것.

마. 시험용액의 조제

1) 추출

균질화한 검체 5 g을 정밀하게 달아 5 M NaCl용액을 가하여 30 mL가 되게 한 뒤 10분간 진탕한 후 원심분리 한다. 정제컬럼 상단에 무수황산나트륨 약 1 g을 가한 뒤 위의 상층액 2 mL과 내부표준용액 50 µL를 적재하고, 약 10분간 정치하여 흡착시킨 후 디클로로메탄 60 mL을 분당 약 2 mL 정도로 용출한다.

용출액을 농축플라스크에 모아 35°C의 항온수조에서 1 mL로 감압농축 한 후 농축액을 파스퇴르 피펫을 이용하여 눈금이 있는 시험관으로 옮긴다. 플라스크에 남아있는 잔류물을 디클로로메탄으로 씻어 시험관에 합친 후, 35°C의 항온수조에서 100 µL가 되도록 질소 농축한다.

주1) 용출액을 감압농축 및 질소농축 시 완전히 건조하지 않도록 주의한다.

2) 유도체화

위의 농축 시험관에 이소옥탄(Isooctane) 900 µL 및 HFBA 150 µL를 첨가하여 마개를 닫고 60°C의 항온수조에서 교반하며 30분간 반응시킨 후 상온에서 10분간 방치한 다음 정제수 5 mL를 가하고 가볍게 흔든 후 정치한다. 상층의 유기용매층을 취하여 소량의 무수황산나트륨이 들어있는 시험관에 넣어 가볍게 흔들어 정치시킨 다음 상층액을 취하여 시험용액으로 한다.

표준시험용액은 마개가 있는 시험관에 농축용액 대신에 이소옥탄(Isooctane) 900 µL와 농도가 다른 5개의 표준용액 50 µL, 내부표준용액 50 µL 및 HFBA 150 µL를 첨가하여 상기와 같은 순서로 유도체화한 용액을 사용한다.

바. 시험조작

1) 기체크로마토그래프 분석조건

- 가) 컬럼: DB-5MS(30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 주입부 온도: 250°C
- 다) 검출기 온도: 230°C

라) 컬럼 온도: 초기의 온도 50°C에서 5분간 유지하고 분당 2°C씩 90°C 까지 승온하여 5분간 유지한 뒤 분당 30°C씩 280°C까지 승온하여 3분간 유지한다.

마) 이동상 가스(carrier gas) 및 유량: 헬륨 (0.8 mL/분)

바) 주입 방법: Splitless

사) 주입량: 1 µL

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: EI mode(70 eV)

표 1. 기체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

분석성분 (Compound)	특성이온 (m/z)
3-MCPD 유도체 화합물	253 ¹⁾ , 275, 289, 291, 453
내부표준물질 유도체 화합물	257 ¹⁾ , 278, 294, 456

¹⁾정량이온

3) 검량선 작성

표준시험용액을 농도별로 일정량 취하여 기체크로마토그래프에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 피크 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

4) 표준품 크로마토그램

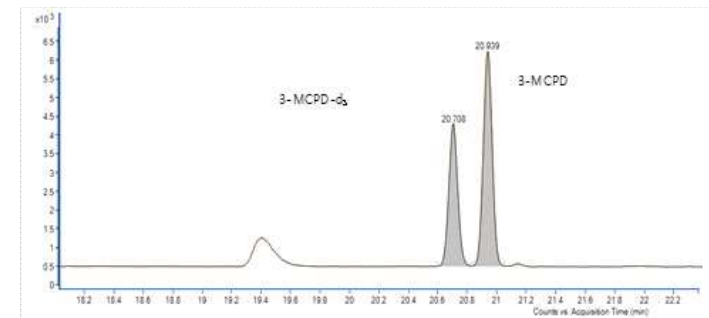


그림 1. 내부표준물질(3-MCPD-d₅)과 표준품(3-MCPD)의 크로마토그램 예시.

5) 표준품 질량스펙트럼

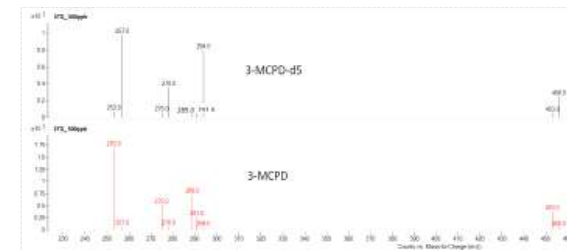


그림 2. 내부표준물질(3-MCPD-d₅, 위)과 표준품(3-MCPD, 아래)의 질량스펙트럼 예시.

6) 정량한계: 0.01 mg/kg

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 시험용액의 크로마토그램상의 각 피크를 표준용액의 표준물질 및 내부 표준물질의 피크 머무름 시간(retention time)과 비교하여 일치 여부를 확인한다. 시험용액의 특성이온 m/z 253, 275, 289, 291 및 453이 확인되어야 하고 특성이온 m/z 253과 275, 289, 291 및 453간 4개의 반응세기의 비(response ratio)를 3-MCPD 표준물질의 특성이온 간 반응세기의 비와 비교하여 2개 이상의 반응세기의 비가 ± 20%이내에서 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과를 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

1) 계산방법

검량선에서 얻어진 3-MCPD의 m/z 253 피크면적(A_S)과 내부표준물질의 m/z 257 피크면적(A_{IS})에 대한 비[A_S/A_{IS}]를 Y축으로 하고 표준물질의 양을 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 면적비[A_{SAM}/A_{SAMIS}]를 Y축에 대입하여 3-MCPD함량을 계산한다.

A_S : 표준시험용액의 3-MCPD 피크면적

A_{IS} : 표준시험용액의 내부표준물질 피크면적

A_{SAM} : 시험용액의 3-MCPD 피크면적

A_{SAMIS} : 시험용액의 내부표준물질 피크면적

2) 계산식

$$3\text{-MCPD함량 (mg/kg)} = M \times D \times \frac{1}{S} \times V \times \frac{1}{1000}$$

M: 검량선에서 계산된 3-MCPD의 농도 (ng/mL)

D: 전체 시험용액양에 대한 분석에 사용한 시험용액양의 비

S: 검체 채취량 (g)

V: 유도체화 과정에서 사용한 시험용액의 부피 (mL)

※ HVP의 경우 수분함량을 측정하여 건조물 기준으로 보정하여 계산한다.

9.7 멜라민

9.7.1 시험시료

9.1 식품일반 9.1.1 일반원칙 가. 항의 검체의 품목별 사용 부위 및 처리 방법을 정해놓은 표에 따른다. 다만, 이 표에서 정하지 아니한 품목은 별도의 규정이 없는 경우 가식부를 사용 부위로 한다.

9.7.2 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)에 의한 시험

가. 시험법 적용범위

불검출 기준 식품에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 아세트니트릴·물(50:50, v/v) 용액으로 추출, 여과하고 이를 양이온 교환수지를 사용하여 정제한 후 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)로 분석한다.

다. 장치

1) 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

2) 정제용 카트리지: 설폰산기(-SO₃H)를 갖는 강산성 양이온교환수지 카트리지로서 Oasis MCX(150 mg 함유, 6 mL용) 또는 이와 동등한 것

라. 시약 및 시액

1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것

3) 표준원액: 멜라민 표준품 10 mg을 취하여 0.1% 포름산(formic acid)·아세트니트릴(5:95, v/v) 혼합용액으로 녹여 정확히 100 mL로 한다.

4) 표준용액: 표준원액을 0.01, 0.02, 0.05, 0.10 및 0.20 µg/mL 농도가 되도록 0.1% 포름산(formic acid)·아세트니트릴(5:95, v/v) 혼합용액으로 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다(사용시 조제한다).

5) 0.1% 포름산(formic acid)용액: 포름산(formic acid) 0.1 mL에 물을 가하여 100 mL로 한다.

6) 4% 포름산(formic acid)용액: 포름산(formic acid) 4 mL에 물을 가하여 100 mL로 한다.

7) 0.1% 포름산(formic acid)·아세트니트릴(5:95, v/v) 혼합용액: 0.1% 포름산(formic acid) 용액 5mL에 아세트니트릴 95 mL를 가하여 100 mL로 한다.

8) 0.2% 디에틸아민 함유 아세트니트릴 용액: 디에틸아민(Diethylamine) 0.2 mL에 아세트니트릴을 가하여 100 mL로 한다.

9) 2% 디에틸아민 함유 아세트니트릴 용액: 디에틸아민 2 mL에 아세트니트릴을 가하여 100 mL로 한다.

10) 20 mM 포름산암모늄(ammonium formate)용액: 포름산암모늄(ammonium formate) 1.26 g을 물에 녹여 1,000 mL로 한다.

11) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체를 분쇄한 후 시료 1 g을 정밀히 달아 폴리프로필렌 원심분리관에 넣는다. 여기에 물 5 mL를 넣어 검체를 습윤시킨 후 아세트니트릴 5 mL를 가하여 강하게 흔들어 섞고 30분간 초음파 진탕한 다음 원심분리(2,600 ×g, 10분)한다. 상등액을 취하여 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 것을 추출액으로 한다(상등액의 층이 분리되어 있을 경우 서로 혼합시킨 후 여과한다).

2) 정제

미리 아세트니트릴 5 mL, 4% 포름산(formic acid)용액 5 mL를 차례로 흘려 활성화시킨 정제용 카트리지에 4% 포름산(formic acid)용액 3 mL 및 추출액 2 mL를 함께 주입하고 이를 중력을 이용하여 유출시킨다. 이어서 아세트니트릴 5 mL, 0.2% 디에틸아민 함유 아세트니트릴용액 5 mL를 차례로 흘린 후 카트리지 내에 남아있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거하고 2% 디에틸아민 함유 아세트니트릴용액 4 mL로 용출시킨다. 카트리지 내에 남아있는 용액은 감압펌프를 이용하여 완전히 용출시켜 용출액에 합한다. 용출액 1 mL를 4 mL 바이알(Vial)에 취하여 50℃에서 질소로 건조한 후 잔류물에 0.1% 포름산(formic acid)·아세트니트릴(5:95, v/v) 혼합용액 1 mL를 가하여 녹인 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

가) 컬럼: HILIC Silica(2.1 × 150 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상은 A 및 B 용액의 농도 구배조건에 따라 사용한다.

이동상 A: 0.1% 포름산(formic acid):아세트니트릴(5:95, v/v)

이동상 B: 20 mM 포름산암모늄(ammonium formate):아세트니트릴(50:50, v/v)

시간(분)	이동상 A	이동상 B
0.0	100	0
5.0	100	0
10.0	25	75
11.0	25	75
13.0	100	0
15.0	100	0

다) 유량: 0.25 mL/분

라) 주입량: 10 μL

마) 컬럼 온도: 35℃

2) 질량분석기(MS/MS)의 조건

가) 이온화 방법: ESI(Positive ion mode)

나) Source voltage: 4.8 kV

다) Capillary Temp.: 350℃

라) Auxiliary gas: 질소

마) Collision gas: 아르곤 또는 질소

바) Source collision energy: 15~30 V

3) 검량선 작성

표준용액을 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)에 주입한 후 얻어진 크로마토그램 상의 m/z 85 이온의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

4) 정량한계: 0.15 mg/kg

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 시험용액의 크로마토그램상의 피크는 표준용액의 멜라민 피크의 머무름 시간(retention time)과 비교하여 일치 여부를 확인한다. 시험용액의 특성이온이 아래 표와 같이 확인되어야 하고 표준용액과 시험용액의 이온간 반응세기의 비(m/z 85 이온에 대한 m/z 68 이온의 백분율, response ratio)를 비교하여 그 비가 ± 10% 이내에서 일치하여야 한다.

분석성분 (Compound)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)
멜라민	127	85 68

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 m/z 85 이온의 피크 높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

1) 계산식

$$\text{멜라민의 함량(mg/kg)} = C \times V/S \times D$$

C: 검량선에서 구한 멜라민의 농도 (μg/mL)

V: 시험용액의 최종 부피 (mL)

S: 시료 채취량 (g)

D: 시험용액의 희석배수

9.7.3 액체크로마토그래프에 의한 시험

가. 시험법 적용범위

불검출 기준 적용대상 이외의 식품

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 아세트니트릴·물(50:50, v/v) 용액으로 추출하고 이를 양이온교환수지를 사용하여 정제한 후 액체크로마토그래프로 분석한다.

다. 장치

1) 액체크로마토그래프-자외흡수검출기(UV detector)를 사용한다.

2) 정제용 카트리지가: 설포산기(-SO₃H)를 갖는 강산성 양이온교환수지 카트리지를로서 Oasis MCX(150 mg 함유, 6 mL용) 또는 이와 동등한 것

라. 시약 및 시액

1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것

3) 표준원액: 멜라민 표준품 100 mg을 취하여 물에 녹여 정확히 200 mL로 한다.

4) 표준용액: 표준원액을 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 및 5.0 μg/mL의 농도가 되도록 물에 녹여 희석하여 검량선 작성용 표준용액으로 한다.

5) 4% 포름산(formic acid)용액: 포름산(formic acid) 4 mL에 물을 가하여 100 mL로 한다.

6) 0.2% 디에틸아민 함유 아세트니트릴용액: 디에틸아민(Diethylamine) 0.2 mL에 아세트니트릴을 가하여 100 mL로 한다.

7) 2% 디에틸아민 함유 아세트니트릴용액: 디에틸아민 2 mL에 아세트니트릴을 가하여 100 mL로 한다.

8) 기타시약: 특급

마. 시험용액의 조제

1) 추출

검체를 분쇄한 후 시료 1 g을 정밀히 달아 폴리프로필렌 원심분리관에 넣는다. 여기에 물 5 mL을 넣어 검체를 습윤시킨 후 아세트니트릴 5 mL을 가하여 심하게 흔들여 섞고 30분간 초음파 진탕한 다음 원심분리(2,600 ×g, 10분)한다. 상등액을 취하여 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 추출액으로 한다(상등액의 층이 분리되어 있을 경우 서로 혼합시킨 후 여과한다).

주1) 동물의 근육이나 조직을 분석할 경우에는 검체를 분쇄한 후 시료 5 g을 정밀히 취한 후 물 10 mL를 가하여 습윤시키고 아세트니트릴 10 mL를 가한 후 상기와 같이 초음파 진탕, 원심분리 및 여과한다.

2) 정제

미리 아세트니트릴 5 mL, 4% 포름산(formic acid)용액 5 mL를 차례로 흘려 활성화시킨 정제용 카트리지에 4% 포름산(formic acid)용액 3 mL 및 추출액 2 mL를 함께 주입하고

이를 중력을 이용하여 유출시킨다. 이어서 아세트니트릴 5 mL, 0.2% 디에틸아민 함유 아세트니트릴용액 5 mL를 차례로 흘린 후 카트리지 내에 남아있는 용액을 감압펌프를 이용하여 제거하고 2% 디에틸아민 함유 아세트니트릴용액 4 mL로 용출시킨다. 카트리지 내에 남아있는 용액은 감압펌프를 이용하여 완전히 용출시켜 용출액에 합한다*. 용출액 2 mL를 4 mL 바이알(Vial)에 취하여 50℃에서 질소로 건조한 후 잔류물에 물 1 mL를 가하여 녹인 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

가) 컬럼: C₁₈계 컬럼 (4.6 mm× 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: 완충용액 · 아세트니트릴(85:15, v/v)

완충용액: 무수구연산 1.92 g과 옥탄설폰산나트륨 [C₈H₁₇O₃SNa] 2.16 g을 950 mL의 물에 녹이고 1 M 수산화나트륨을 사용하여 pH 3.0으로 한 후 물을 가하여 전량을 1 L로 한다.

다) 검출과장: 240 nm

라) 유량: 1.0 mL/분

마) 주입량: 10 μL

2) 검량선 작성

표준용액을 액체크로마토그래프에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 시험용액의 크로마토그램상의 피크는 표준용액의 멜라민 피크의 머무름 시간(retention time)과 비교하여 일치 여부를 확인한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 멜라민의 피크 높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

1) 계산식

$$\text{멜라민의 함량(mg/kg)} = C \times V/S \times D$$

C: 검량선에서 구한 멜라민의 농도 (μg/mL)
V: 시험용액의 최종 부피(mL)
S: 시료 채취량(g)
D: 시험용액의 희석배수

자. 확인시험

9.7.2 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)에 의한 시험 사. 정성시험 또는 9.7.4 기체크로마토그래프-질량분석기에 의한 확인시험 사. 정성시험에 따라 시험할 때 멜라민이 확인되어야 한다.

9.7.4 기체크로마토그래프-질량분석기에 의한 확인시험

가. 시험법 적용범위

불검출 기준 적용대상 이외의 식품

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 아세트니트릴 · 물(50:50, v/v) 용액으로 추출하고 이를 양이온교환수

지를 사용하여 정제한 후 유도체화시켜 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS)로 분석한다.

다. 장치

1) 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS)

라. 시약 및 시액

1) 표준용액

9.7.3 액체크로마토그래프에 의한 시험 라. 시약 및 시액 4) 표준용액을 사용한다.

2) 피리딘: 특급을 사용한다.

3) 유도체시약(BSTFA)

N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (1% trimethyl-chlorosilane 함유)를 사용한다.

마. 시험용액의 조제

1) 추출 및 정제

9.7.3 액체크로마토그래프에 의한 시험 마. 시험용액의 조제 1) 추출 및 2) 정제에 따라 *까지 시험하여 용출액으로 사용한다.

2) 유도체화

표준용액 및 위의 용출액 200 μL를 각각 바이알(Vial)에 넣은 다음 70℃에서 질소로 건조한다. 잔류물에 피리딘 200 μL와 유도체시약(BSTFA) 200 μL를 넣고 마개를 닫은 후 70℃에서 30분간 방치한 것을 확인시험용 표준용액 및 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS)의 분석조건

가) 컬럼: DB-5MS(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 주입부 온도: 250℃

다) 검출기 온도: 250℃

라) 컬럼 온도: 초기 온도 75℃에서 1분간 유지하고 15℃/분의 비율로 300℃까지 온도를 상승시켜 2분간 유지한다.

마) 이동상 가스(carrier gas) 및 유량: 헬륨 (1.0 mL/분)

바) 주입방법: splitless

사) 주입량: 1 μL

아) 이온화 방법: EI mode

자) 이온화 전압: 70 eV

사. 정성시험

위 조건으로 얻어진 시험용액의 크로마토그램상의 피크는 확인시험용 표준용액의 멜라민 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치 여부를 확인한다.

시험용액의 특성이온이 아래 표와 같이 확인되어야 하고 표준용액과 시험용액 이온간 반응 세기의 비(m/z 327 이온에 대한 각 이온의 백분율, response ratio)를 비교하여 그 비가 ± 10% 이내에서 일치하여야 한다.

물 질 (Compound)	특성이온 (m/z)
멜 라 민	342 (M)
	343 (M+1)
	344 (M+2)
	327 (M-15)

9.8 폐독소

9.8.1 시험시료

별도의 규정이 없는 경우 9.1 중급속 9.1.1 일반원칙, 가. 검체의 처리에 따라 처리한 것을 시료로 한다.

9.8.2 마비성 폐독

가. 시험법 적용범위

폐류, 피낭류, 폐류 및 피낭류 통조림, 폐류 및 피낭류 염장품, 폐류 및 피낭류 건조가공품에 적용한다.

나. 분석원리

균질화한 검체를 0.1 N 염산으로 가온 추출한 뒤 상층액을 마우스 복강 내에 주사하여 그 치사시간으로부터 MU(Mouse Unit)*을 구한 후 이를 마비성 폐독으로 환산한다.

* MU(Mouse Unit): 체중이 20 g인 마우스를 15분에 사망에 이르게 하는 독량을 1 MU로 정의한다.

다. 장치

- 1) 정제용 칼럼: 크로마토그래피용 활성탄(100 mesh) 50 mL를 안지름 20 mm의 유리칼럼에 충전하여 사용하거나 또는 이와 동등한 것을 사용할 수 있다.
- 2) pH 측정기: 표준완충액 pH 4.0, pH 7.0, pH 10.0으로 표준화 시킨 것

라. 시약 및 시액

- 1) 물: 2차 정제수 및 이와 동등한 것
- 2) 표준용액: 삭시톡신 표준물질에 3.0 mM 염산을 가하여 1 µg/mL 농도가 되도록 조제한다.
- 3) 1% 초산 함유 20% 에탄올용액: 1 L 베스플라스크에 에탄올 200 mL를 넣고 물 500 mL를 섞은 후 초산 10 mL를 넣고 표시선까지 물로 채운다.
- 4) 5 N 염산: 물 50 mL에 염산 47.5 mL를 가하고 물을 가해 100 mL로 한다
- 5) 0.1 N 염산: 5 N 염산을 물로 50배 용량으로 희석하거나 물 50 mL에 염산 0.95 mL를 가하고 물을 가해 100 mL로 한다.
- 6) 0.01 N 염산: 0.1 N 염산을 물로 10배 용량으로 희석하거나 물 100 mL에 염산 0.475 mL를 가하고 물을 가해 500 mL로 한다.
- 7) 3 mM 염산: 물 50 mL에 0.1 N 염산 3 mL를 가하고 물을 가해 100 mL로 한다.
- 8) 0.1 N 수산화나트륨용액: 수산화나트륨 0.40 g을 물을 가하여 녹인후 100 mL로 한다.
- 9) 기타 시약: 특급

마. 시험용액의 조제

1) 검체의 손질

가) 폐류, 피낭류

폐류 및 피낭류의 외부를 물로 깨끗이 씻고 10개체 이상 또는 껍질을 제거한 육이 200 g 이상이 되도록 손질 한다.(폐류의 경우 폐각을 열고 내부의 모래나 이물질을 제거하기 위해 물로 씻은 후 칼로 폐육을 취한다.) 이때 가열하거나 약품을 사용해서는 아니 된다. 육 전량을 표준체(20 mesh)에 얹어 5분 동안 물을 뺀 후 균질기로 균질화한다.

나) 폐류 및 피낭류 통조림

내용물 전량을 취해 균질화한다(대용량인 경우 표준체(20 mesh)에 얹어 2분간 고형물과 액체를 분리한 후 고형물과 액체의 중량을 측정하고 그 비율에 따라 200 g 이상을 취하여 균질화한다).

다) 폐류 및 피낭류 염장품, 폐류 및 피낭류 건조가공품

검체 일정량을 분말로 만들거나 가늘게 잘라 균질화한다.

2) 추출

가) 폐류, 피낭류, 폐류 및 피낭류 통조림

균질화한 검체 100 g을 비커에 달아 0.1 N 염산 100 mL를 가하고 교반하면서 5 N 염산이나 0.1 N 수산화나트륨용액으로 pH를 3.0으로 조정한다. 강염기성이 되면 독이 파괴되기 때문에 0.1 N 수산화나트륨용액으로 pH를 조정할 때에는 부분적인 파괴를 방지하기 위하여 격렬히 교반하면서 소량씩 적가한다. 혼합액을 5분간 끓이고 실온에서 식힌 후, pH가 3.0이 되도록 조정하고 물을 가하여 200 mL이 되게 한다. 비커에 옮긴 후 교반하고 상층부가 투명해질 때까지 정치하여 상층액을 시험용액으로 한다. 만약, 필요하다면 원심분리(예: 1,200 xg에서 5분간)하여 얻은 상층액을 시험용액으로 사용하여도 된다.

나) 폐류 및 피낭류 염장품, 폐류 및 피낭류 건조가공품

균질화한 검체 20 g을 비커에 달아 0.1 N 염산 100 mL를 가하여 폐류의 추출방법에 따라 추출한다. 추출액 중 상층액 25 mL를 분취하여 pH 4.5~5.5로 조정한다 다음 분당 3 mL 이하의 유량으로 정제용 유리칼럼을 통과시킨다. 물 100 mL로 칼럼을 세척한 후 1% 초산함유 20% 에탄올용액 150 mL로 용출시킨다. 용출액을 감압 농축하고 잔류물을 0.01 N 염산 10 mL에 녹여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작(마우스 시험)

1) 마우스

ICR계의 또는 ddy계 동일계통의 생후 4주된 19~21 g의 건강한 수컷을 사용한다. 시험에 사용한 마우스는 표 2를 이용하여 마우스체중에 대해 보정한다.

2) 시험

시험용액 1 mL을 2마리의 마우스 복강 내에 주사하고 주사 후부터 사망까지의 시간을 초단위로 기록한다. 사망 시에는 3마리 이상의 마우스를 취하여 복강 내에 주사하여 치사시간을 구한다. 다만, 마우스가 5분 이내에 사망한 경우 5~7분 정도에서 사망하도록 희석하여 치사시간을 구한다. 희석시에는 0.1 N 또는 0.01 N 염산으로 pH 2.0~4.0 되게 조정하여 사용한다.

사. 계산

1) CF(Conversion Factor) 산출

표준용액 10 mL에 3.0 mM 염산을 10, 15, 20, 25 및 30 mL를 각각 가하여 희석한 용액(이 액은 pH가 2.0~4.0이어야하며, 4.5를 넘어서는 안된다) 1 mL씩을 각각 3마리 마우스에 복강 내 주사하고 주사 후부터 사망까지의 시간을 초단위로 기록하여 치사시간이 5~7분 사이가 되는 용액의 농도를 선택한다. 선택된 농도에 첨가되는 3.0 mM 염산의 양을 1 mL씩 증감하여 세 농도의 희석표준용액을 제조한다(표준용액 10 mL에 3.0 mM 염산 25 mL로 희석한 액이 선택된 경우, 표준용액 10 mL에 3.0 mM 염산 24 mL, 25 mL 및 26 mL를 각각 가하여 제조한다) 이 세 농도의 희석표준용액 1 mL 씩을 각각 10마리의 마우스 복강 내에 주사하여 치사시간을 구한다. 표 1에 의한 치사시간에 따른 MU와 표 2에 의한 마우스의 체중에 따른 MU를 곱한 보정된 MU들을 구하고, 이 보정된 MU들의 중앙값을 희석표준용액의 MU로 한다.

CF는 각 희석표준용액의 CF를 평균하여 구한다.

$$CF = \frac{\text{회석표준용액의 농도(ug/mL)}}{MU}$$

2) CF를 이용한 마비성 폐독 계산

시험용액 1 mL를 마우스에 주사하고 살아남은 것을 포함한 각 마우스의 치사시간으로부터 표 1에서 1 mL 당 MU를 구하고, 표 2에서 각 마우스체중에 대한 MU를 보정한 후 중앙값을 구한다(중앙값을 구할 때 60분 이상 살아있는 마우스의 치사시간에 대한 MU는 0.875이하로 간주).

CF에 마우스체중을 보정한 1 mL당 MU의 중앙값을 곱하여 1 mL당 μg 의 마비성 폐독으로 환산하고 다음 식에 의해 검체 중의 마비성 폐독을 구한다.

$$\text{마비성 폐독(mg/kg)} = CF \times \text{치사시간 및 체중보정에 의한 MU} \times \text{최종부피(mL)} \times \text{회석배수/검체량(g)}$$

표 1. 마비성 폐독의 치사시간-MU 환산표(Sommer 표)

치사시간 (분:초)	MU	치사시간 (분:초)	MU	치사시간 (분:초)	MU
1:00	100.0	4:00	2.500	5:25	1.770
1:10	66.20	4:05	2.440	5:26	1.764
1:15	38.30	4:10	2.380	5:27	1.758
1:20	26.40	4:15	2.320	5:28	1.752
1:25	20.70	4:20	2.260	5:29	1.746
1:30	16.50	4:25	2.210	5:30	1.740
1:35	13.90	4:30	2.160	5:31	1.735
1:40	11.90	4:35	2.120	5:32	1.730
1:45	10.40	4:40	2.080	5:33	1.725
1:50	9.330	4:45	2.040	5:34	1.720
1:55	8.420	4:50	2.000	5:35	1.715
		4:55	1.960	5:36	1.710
2:00	7.670			5:37	1.705
2:05	7.040	5:00	1.920	5:38	1.700
2:10	6.520	5:01	1.914	5:39	1.695
2:15	6.060	5:02	1.908	5:40	1.690
2:20	5.660	5:03	1.902	5:41	1.686
2:25	5.320	5:04	1.896	5:42	1.682
2:30	5.000	5:05	1.890	5:43	1.678
2:35	4.730	5:06	1.884	5:44	1.674
2:40	4.480	5:07	1.878	5:45	1.670
2:45	4.260	5:08	1.872	5:46	1.664
2:50	4.060	5:09	1.866	5:47	1.658
2:55	3.880	5:10	1.860	5:48	1.652
		5:11	1.854	5:49	1.646
3:00	3.700	5:12	1.848	5:50	1.640
3:05	3.570	5:13	1.842	5:51	1.636
3:10	3.430	5:14	1.836	5:52	1.632
3:15	3.310	5:15	1.830	5:53	1.628
3:20	3.190	5:16	1.824	5:54	1.624
3:25	3.080	5:17	1.818	5:55	1.620
3:30	2.980	5:18	1.812	5:56	1.616
3:35	2.880	5:19	1.806	5:57	1.612

3:40	2.790	5:20	1.800	5:58	1.608
3:45	2.710	5:21	1.794	5:59	1.604
3:50	2.630	5:22	1.788		
3:55	2.560	5:23	1.782	6:00	1.600
		5:24	1.776	6:01	1.596

치사시간 (분:초)	MU	치사시간 (분:초)	MU	치사시간 (분:초)	MU
6:02	1.592	6:39	1.450	11:00	1.075
6:03	1.588	6:40	1.447	11:30	1.060
6:04	1.584	6:41	1.443		
6:05	1.580	6:42	1.440	12:00	1.050
6:06	1.576	6:43	1.437		
6:07	1.572	6:44	1.433	13:00	1.030
6:08	1.568	6:45	1.430		
6:09	1.564	6:46	1.427	14:00	1.015
6:10	1.560	6:47	1.425		
6:11	1.556	6:48	1.422	15:00	1.000
6:12	1.552	6:49	1.419		
6:13	1.548	6:50	1.417	16:00	0.990
6:14	1.544	6:51	1.414		
6:15	1.540	6:52	1.411	17:00	0.980
6:16	1.536	6:53	1.409		
6:17	1.532	6:54	1.406	18:00	0.972
6:18	1.528	6:55	1.403		
6:19	1.524	6:56	1.401	19:00	0.965
6:20	1.520	6:57	1.398		
6:21	1.516	6:58	1.395	20:00	0.960
6:22	1.512	6:59	1.393		
6:23	1.508			21:00	0.954
6:24	1.504	7:00	1.390		
6:25	1.500	7:15	1.350	22:00	0.948
6:26	1.496	7:30	1.310		
6:27	1.492	7:45	1.280	23:00	0.942
6:28	1.488				
6:29	1.484	8:00	1.250	24:00	0.937
6:30	1.480	8:15	1.220		
6:31	1.477	8:30	1.200	25:00	0.934
6:32	1.473	8:45	1.180		
6:33	1.470			30:00	0.917
6:34	1.467	9:00	1.160		
6:35	1.463	9:30	1.130	40:00	0.898
6:36	1.460				
6:37	1.457	10:00	1.110	60:00	0.875
6:38	1.453	10:30	1.090		

표 2. 마우스체중-MU 보정표

마우스 체중(g)	MU	마우스 체중(g)	MU
10.00	0.500	19.10	0.973
11.00	0.560	19.20	0.976
12.00	0.620	19.30	0.979

13.00	0.675	19.40	0.982
14.00	0.730	19.50	0.985
14.50	0.760	19.60	0.988
15.00	0.785	19.70	0.991
15.50	0.810	19.80	0.994
16.00	0.840	19.90	0.997
16.50	0.860	20.00	1.000
17.00	0.880	20.10	1.003
17.10	0.885	20.20	1.006
17.20	0.890	20.30	1.009
17.30	0.895	20.40	1.012
17.40	0.900	20.50	1.015
17.50	0.905	20.60	1.018
17.60	0.910	20.70	1.021
17.70	0.915	20.80	1.024
17.80	0.920	20.90	1.027
17.90	0.925	21.00	1.030
18.00	0.930	21.10	1.032
18.10	0.934	21.20	1.034
18.20	0.938	21.30	1.036
18.30	0.942	21.40	1.038
18.40	0.946	21.50	1.040
18.50	0.950	21.60	1.042
18.60	0.954	21.70	1.044
18.70	0.958	21.80	1.046
18.80	0.962	21.90	1.048
18.90	0.966	22.00	1.050
19.00	0.970	23.00	1.070

주1) 마비성 패독이 함유된 재료를 조작시에는 고무장갑을 사용할 것

9.8.3 설사성 패독

가. 시험법 적용범위

이매패류에 적용한다.

나. 분석원리

이매패류의 패육을 취하여 균질화한 후 메탄올로 추출하고 가수분해하여 Dinophysistoxin-3 (DTX-3)를 Okadaic acid(OA), DTX-1, DTX-2로 전환 시킨 후 정제하여 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)로 분석한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)
- 2) 시린지 필터(Syringe filter): 0.2 μm 또는 이와 동등한 것
- 3) SPE 카트리지: Sep-pak C₁₈(6cc, 500 mg) 또는 이와 동등한 것

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 기타 시약 : 특급 또는 이와 동등한 것
- 4) 표준원액: OA와 DTX-1, DTX-2 표준품을 메탄올로 용해하여 1 μg/mL이 되도록 한다. 표준원액은 영하 20℃ 이하에서 보관한다.

5) 표준용액: 표준원액을 0.0025, 0.0050, 0.010, 0.020 및 0.040 μg/mL 농도가 되도록 메탄올로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다(사용 시 조제한다).

6) 이동상 용액 A (2 mM 포름산암모늄(ammonium formate)과 50 mM 포름산(formic acid)을 함유한 물): 128 mg 포름산암모늄(ammonium formate)을 소량의 물에 녹인 후, 포름산(formic acid)(>98%) 1.88 mL와 물로 1,000 mL 부피플라스크의 표시선까지 채운다.

이동상 용액 B (2 mM 포름산암모늄(ammonium formate)과 50 mM 포름산(formic acid)을 함유한 95% 아세토니트릴 용액): 128 mg 포름산암모늄(ammonium formate)을 물로 녹여 부피플라스크를 이용하여 50 mL으로 맞춘 후, 포름산(formic acid) 1.88 mL와 100% 아세토니트릴로 1,000 mL 부피플라스크의 표시선까지 채운다.

마. 시험용액의 조제

1) 검체의 채취

검체는 폴리에틸렌 용기에 넣고 10℃ 이하로 유지하여 신속하게 운반한다. 단, 껍데기를 제거한 패육이 100 g 이상이 되도록 채취하여야 한다.

2) 시료 조제

물로 패류의 외부의 깨끗이 씻은 후 껍데기를 제거하고, 내부의 모래나 이물질을 제거하기 위해 물로 씻은 후 칼로 패육을 취한다. 이때 가열하거나 약품을 사용해서는 아니 된다. 패육 100~150 g의 시료를 표준체(20 mesh)에 얹어 5분 동안 물을 뺀 후 균질기로 균질화한다.

3) 추출

균질화한 시료 2 g을 50 mL 원심분리관에 넣고 메탄올 9 mL를 가하여 교반기를 이용하여 최고 속도로 3분 동안 추출한 후 원심분리(2,000 ×g, 10분)하여 상등액을 20 mL 부피플라스크에 취한다. 남은 잔사에 메탄올 9 mL를 가하고 위와 같은 방법으로 추출하여 상등액을 이전에 모아둔 상등액과 합한 다음 표시선까지 메탄올로 채운 뒤 균질화한다. 상등액 20 mL 중 2 mL를 취하여 가수분해한다.

4) 가수분해

밀봉이 가능한 바이알에 추출액 2 mL과 2.5 M 수산화나트륨 0.25 mL을 넣고 교반기로 30초간 교반한 후 76℃에서 40분간 가수분해하고 상온에서 방냉 후 2.5 M 염산 0.25 mL을 넣어 Vortex로 30초간 교반하여 중화한다(가수분해 전 추출액 높이를 표시하고, 방냉 후 증발하여 추출액이 줄어든 경우 메탄올을 가하여 높이를 맞춘다).

5) 탈지

가수분해한 용액 2.5 mL에 헥산 2.5 mL을 가하여 30초간 진탕 후 상등액인 헥산층을 제거하고 증류수 2.5 mL을 가하여 희석한다.

6) 정제

탈지한 용액 5 mL을 미리 메탄올 5 mL과 증류수 5 mL 순으로 각각 세척한 C₁₈ 카트리지에 초당 1방울의 속도로 주입한다. 여기에 40% 메탄올 3 mL, 물 3 mL, 40% 메탄올 3 mL 순으로 세척하여 버리고 감압펌프를 이용하여 여액을 제거한 후, 메탄올 6 mL로 용출한다. 용출액은 40℃에서 질소 건조한 다음 메탄올 2 mL로 재용해하여 0.2 μm 시린지 필터(PVDF syringe filter)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 조건

가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상

- (1) 이동상 A: 2 mM 포름산암모늄(ammonium formate)과 50 mM 포름산(formic acid)을 함유한 물
- (2) 이동상 B: 2 mM 포름산암모늄(ammonium formate)과 50 mM 포름산(formic acid)을 함유한 95% 아세토니트릴 용액

시간(분)	이동상 용액 A(%)	이동상 용액 B(%)
0	90	10
1	90	10
10	10	90
13	10	90
15	90	10
19	90	10

- 다) 유량: 0.4 mL/분
- 라) 컬럼 온도: 40℃
- 마) 주입량: 5 μL

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: ESI(Negative ion mode)

나) Source voltage: 4.5 kV

다) Collision gas: 헬륨 또는 질소

라) Capillary Temperature: 650℃

표 1. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

분석성분 (Compound)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
OA	803.5	255 ¹⁾	62
		113	60
		563	46
DTX-1	817.5	255 ¹⁾	62
		113	60
		563	54
DTX-2	803.5	255 ¹⁾	62
		113	60
		563	44

¹⁾ 정량이온

※ 각 생성이온(Product ion)에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 정성이온 이외의 생성이온도 적용 가능함

3) 검량선 작성

표준용액을 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)에 주입한 후 얻어진 크로마토그램 상의 정량이온의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

4) 표준물질의 크로마토그램

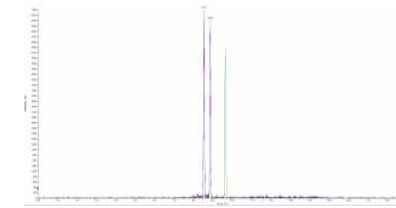


그림 1. 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)의 표준품 크로마토그램 예시.
(OA: 8.58분, DTX-1: 9.68분, DTX-2: 8.89분)

사. 정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온간 반응세기의 비율(response ratio)을 비교하여 그 비율이 ± 20~30% 이내에서 일치하여야 한다.

※ 생성이온간 반응세기의 비율 허용 범위

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

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액 크로마토그램 상의 피크 머무름 시간과 특성이온이 표준용액과 일치할 때 정량이온에 대한 피크 높이 또는 면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

1) 계산

OA, DTX-1, DTX-2의 독소별 함량은 다음 식으로부터 각각 구한다.

$$\text{설사성 폐독(OA)의 함량(mg/kg)} = C_{OA} \times V/S \times D$$

$$\text{설사성 폐독(DTX-1)의 함량(mg/kg)} = C_{DTX-1} \times V/S \times D$$

$$\text{설사성 폐독(DTX-2)의 함량(mg/kg)} = C_{DTX-2} \times V/S \times D$$

C_{OA} : 검량선에서 구한 Okadaic acid의 농도(μg/mL)

C_{DTX-1} : 검량선에서 구한 DTX-1의 농도(μg/mL)

C_{DTX-2} : 검량선에서 구한 DTX-2의 농도(μg/mL)

V: 시험용액의 최종부피(mL)

S: 시료의 채취량(g)

D: 희석배수

2) 오카다익산으로의 당량 계산(Okadaic acid Equivalents)

계산된 OA, DTX-1, DTX-2의 독소별 함량을 각 독소에 해당하는 독성등가계수(Toxic Equivalency Factors: TEFs)로 곱하고, 이들의 합계를 오카다익산 당량(mg OA 당량/kg)로

한다.

실사성패독	WHO-TEFs
Okadaic acid	1
DTX-1	1
DTX-2	0.5

9.8.4 기억상실성 패독

가. 시험법 적용범위

수산물 중 패류, 갑각류에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질 도모익산(Domoic acid, DA) 및 epi-도모익산(epi-DA)을 50% 메탄올 용액으로 추출한 후 액체크로마토그래프로 측정한다.

다. 장치

- 1) 액체크로마토그래프: 자외선흡광검출기(UV photometric detector)를 사용한다.
- 2) 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 아세트니트릴: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 추출용액(50% 메탄올 용액): 물 500 mL에 메탄올 500 mL를 가한다.
- 4) 5% 아세트니트릴 용액: 물이 들어있는 메스플라스크에 아세트니트릴 50 mL를 정밀히 취하여 넣고 물로 최종 1 L가 되게 한다.
- 5) 0.1% 트리플루오로아세트산(Trifluoroacetic acid) 함유 용액: 트리플루오로아세트산 1 mL를 정확히 취하여 물로 최종 1 L가 되게 한다.
- 6) 0.1% 트리플루오로아세트산 함유 아세트니트릴 용액: 트리플루오로아세트산 1 mL를 정확히 취하여 아세트니트릴로 최종 1 L가 되게 한다.
- 7) 표준원액: epi-도모익산이 포함된 도모익산 표준물질을 사용하여 하며, 5% 아세트니트릴 용액에 녹여 50 µg/mL가 되게 한다. 조제한 표준원액은 갈색병에 담아 냉장 보관한다.
- 8) 표준용액: 표준원액을 5% 아세트니트릴 용액으로 희석하여 농도가 0.2~20 µg/mL의 범위가 되도록 하여 검량선 작성용 표준용액으로 하며, 이 용액은 갈색병에 담아 조제 후 즉시(당일) 사용한다.

마. 시험용액의 조제

검체를 세척 및 탈수과정을 거친 후, 껍질을 제거한 가식부 약 100 g을 취하여 균질화하고, 균질화된 검체 4 g를 정밀하게 취하여 추출용액 16 mL를 가한 후 다시 15분간 균질화한다. 시료용액을 원심분리(10,000 ×g, 10분)하고, 상등액을 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하며, 이 용액은 갈색병에 담아 조제 후 즉시(당일) 사용한다. 단, 시험용액의 농도가 높아 검량곡선의 농도범위를 벗어날 경우 농도 범위 내로 희석하여 사용한다.

바. 시험조작

- 1) 액체크로마토그래프의 분석조건
 - 가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(4.6 mm × 150 mm , 5 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: 0.1% 트리플루오로아세트산 함유 용액: 0.1% 트리플루오로아세트산 함유 아세트니트릴 용액(90: 10, v/v)

다) 이동상 유량: 1.0 mL/분

라) 컬럼 온도: 35°C

마) 주입량: 20 µL

바) 검출파장: UV 242 nm

2) 검량선 작성

표준원액을 5% 아세트니트릴 용액으로 희석하여 농도가 0.2~20 µg/mL의 범위가 되도록 하고 검량선은 도모익산과 epi 도모익산의 면적을 합산하여 작성한다.

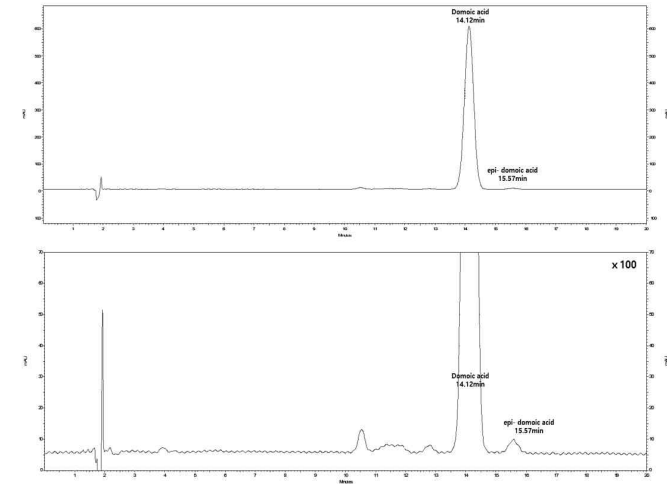


그림 1. 도모익산 및 epi-도모익산 표준품의 크로마토그램 예시.

사. 정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 비교하여 일치하여야 한다.

아. 정량시험

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

1) 계산

$$\text{도모익산(DA + epi-DA)의 함량}(\mu\text{g/g}) = C \times \frac{V}{W} \times D$$

C: 검량곡선에서 구한 도모익산의 농도(µg/mL)

V: 시험용액의 최종부피(mL)

S: 시료량(g)

D: 희석배수

자. 확인시험

액체크로마토그래프-질량분석기상의 머무름 시간과 특성이온으로 도모익산 및 epi-도모익

산을 확인한다.

1) 액체크로마토그래프-질량분석기 분석조건

- 가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(2.1 mm × 150 mm , 3.5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상: 0.1% 트리플루오로아세트산 함유 용액:0.1% 트리플루오로아세트산 함유 아세토니트릴 용액(90:10, v/v)
- 다) 이동상 유량: 0.3 mL/분
- 라) 컬럼 온도: 35°C
- 마) 주입량: 5 μL
- 바) 이온화 방법: ESI(positive ion mode)
- 사) Capillary temperature: 500°C
- 아) Capillary voltage: 5,500 V
- 자) Collision energy: 38 eV
- 차) Scan mode: MS² scan (Precursor ion: m/z 312, Fragment ion: m/z 266, 248)
- 카) 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 생성이온도 적용이 가능하다. 단, 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온간 반응세기의 비율(Response ratio)을 비교하여 그 비율이 ± 20~30% 이내에서 일치하여야 한다.

※ 생성이온간 반응세기의 비율 허용 범위

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

9.9 방사능

9.9.1 시험시료

비가식부(·곡류: 껍질 등, ·채소류: 뿌리, 토사, 고엽 등, ·식육류: 뼈 등, ·패류: 껍질 등)를 제거한 것을 시료로 한다. 다만, 수산물 중 식용 가능한 내장 및 머리, 뼈, 껍질 등은 시료에 포함한다. 또한 물로 세척할 경우에는 물기를 제거한 것을 시료로 한다.
별도의 규정이 없는 경우 9.1 중급속 9.1.1 일반원칙, 가. 검체의 처리에 따라 처리한 것을 시료로 한다.

9.9.2 고순도게르마늄 감마핵종분석기에 의한 시험

가. 시험법 적용범위

식품 중 감마선방출 방사성 핵종 확인 및 방사능 시험에 적용한다.

나. 분석원리

다중과고분석기(multichannel analyzer) 또는 고순도 게르마늄 검출기로 측정된 표준선원(standard radioactive source)의 방사능 에너지피크에 대응하는 동위원소를 검체의 방사능 피크에너지와 대조하여 동위원소표로부터 방사성 핵종을 확인한 후 각 핵종에 대한 방사능

을 측정하는 방법이다.

다. 장치

- 1) 고순도게르마늄 감마핵종분석기

라. 검체조제

1) 직접법

- 가) 시험시료를 분쇄기로 균질화하여 측정용기에 넣고 무게를 정밀히 달아 밀봉하여 측정한다¹⁾.
단, 검체에 거품이 발생하는 경우 에틸알코올을 수 방울 넣어 거품을 제거한 후 측정한다.
- 나) 검체가 분말인 경우 상면이 수평이 되도록 측정용기에 압축하여 충진한 후 측정한다.
- 다) 균질화된 검체에 기포가 있을 경우 기포를 제거하여 체적을 최소화한 후 측정한다.
- 라) 검체가 액체인 경우 그대로 측정용기에 넣은 후 무게를 정밀히 달고 밀봉하여 측정하거나 적당량으로 농축해 측정용기에 넣고 무게를 정밀히 달아 밀봉하여 측정한다.
단, 원유인 경우 측정 중 부패로 인한 유정의 분리를 방지할 필요가 있을 때 포르마린(포름알데하이드 37%용액)을 10 mL/L 비율로 첨가하여 측정한다.
주1) ① 측정 중 부패의 우려가 있는 경우 포르마린(포름알데하이드 37%용액)을 2 mL/kg, L 비율로 첨가하여 측정한다.
② 검체의 무게는 측정용기의 무게를 뺀 값을 사용한다.

2) 건조법

- 가) 수분이 많은 식품은 1~2일간 바람에 건조시키고
- 나) 분쇄하기 쉬운 때까지 105°C의 열풍건조기내에서 건조한다.
- 다) 충분히 건조된 것은 습기가 재흡수되기 전에 분쇄기를 사용하여 분말로 만든다.
- 라) 측정용기에 분말을 넣고 균질한 분포가 되도록 압축하여 체적을 최소화시킨 후 무게를 달고 밀봉하여 측정한다.
- 마) 건조전후의 무게비로 결과를 환산한다.

3) 회화법

- 가) 2)의 가)~나)까지 처리된 검체를 전열기 또는 가스버너로 온도가 너무 높지 않도록 주의하면서 가연성가스가 나오지 않게 될 때까지 탄화한다.
- 나) 탄화된 것을 회화로에 넣고 500°C를 넘지 않는 온도로 회화하여 쉽게 잿가루가 될 수 있는 정도로 만든다.
- 다) 회화된 것을 막자사발에서 충분히 분쇄 혼합하여 측정용기에 압축하여 넣는다.
- 라) 상기 검체의 무게를 달고 밀봉하여 측정한다.
- 마) 회화전후의 무게비로 결과를 환산한다.

마. 시험조작

1) 방사능 핵종시험

- 다중과고분석기(multichannel analyzer)와 고순도 게르마늄 검출기를 사용하여 다음과 같이 시험한다.
- 가) 측정장치의 전원을 가하고 기저방사능을 측정한다.
- 나) 검체의 최소 측정시간은 10,000초로 한다. 측정조건에 따라 측정시간을 증가시킬 수 있다.
- 다) 기저방사능을 검체측정 전후로 측정하여 평균치를 취한다.
- 라) 표준선원(standard radioactive source)의 에너지피크를 구하고 측정에너지 범위가 0~2

MeV가 되도록 증폭기의 게인을 조정한다. 필요한 경우 측정에너지 범위를 확대 또는 축소하여도 좋다.

- 마) 각 채널에 대응하는 에너지를 표준선원(standard radioactive source)을 이용하여 교정한다.
- 바) 차폐용기(radioactivity shielding vessel) 내의 검출기에 검체를 올려놓고 일정시간 방사능을 측정하여 스펙트럼을 얻는다.
- 사) 나타난 피크에너지에 대응하는 동위원소를 동위원소표의 피크에너지와 대조하여 핵종을 찾는다.

2) 방사능시험

가) 마, 1)의 가)~바)을 행한다.

나) 얻어진 스펙트럼을 참조하여

¹³¹I [0.0802(2.6%), 0.284(6.1%), 0.364(81%), 0.637(7.3%) MeV]

¹³⁴Cs [0.569(15%), 0.605(98%), 0.796(85%) MeV]

¹³⁷Cs [0.662(85%) MeV]

에서 각 핵종에 대한 감마선 방출비율이 가장 큰 피크에너지(0.364, 0.605, 0.662 MeV)에서의 기저방사능이 제거된 순피크면적(S)을 구한다.

다) 감마계수효율 ε은 측정할 검체와 같은 형상(가능하면 동일조성의 동일 형상)으로 만들어진 표준선원(standard radioactive source)에 따라 구한다. 이때 5개 이상의 에너지에 대한 효율 ε을 구하여 에너지와 효율과의 관계그래프로부터 각 핵종에 대한 감마선 방출비율이 가장 큰 피크에너지에 대한 계수효율을 구한다.

라) 각 핵종에 대한 방사능은 다음식으로 산출한다.

$$A(\text{Bq/kg, L}) = \frac{S}{\text{ept}} \times \frac{1}{\text{SW}(\text{kg,L})}$$

A: 각 핵종에 대한 방사능

S: 각 핵종에 대한 감마선 방출비율이 가장 큰 피크에너지의 기저방사능이 제거된 순피크면적

ε: 동에너지에서의 감마계수효율

p : 동에너지의 감마방출비율

t : 측정시간(초)

SW: 검체의 무게

9.9.3 알파분광분석기에 의한 플루토늄 시험

가. 시험법 적용범위

식품 중 ²³⁸Pu, ²³⁹Pu, ²⁴⁰Pu 시험에 적용한다.

나. 분석원리

플루토늄을 이온교환 수지 등을 이용하여 선택적으로 분리한 후 전기 전착하여 진공 챔버에서 표면장벽 검출기를 이용하여 알파선 방사능을 측정한다.

다. 장치

알파분광분석기

라. 시약 및 시액

표준선원: ²³⁸Pu, 내부표준선원: ²⁴²Pu

마. 검체 조제

- 1) 항량된 도가니에 검체 100 g을 정확히 취하여 넣고 95°C의 건조기에서 약 3~10시간 건조한다.
- 2) 건조된 것을 회화에 넣고 온도를 단계별로 설정하여 600°C를 넘지 않는 온도로 회화하여 쉽게 잿가루가 될 수 있는 정도로 만들고, 회화 후 도가니와 회분의 무게를 측정한다.
- 3) 회화된 것을 막자사발에서 충분히 분쇄·혼합하여 저장용기에 넣어 상온 보관한다.

바. 시험용액의 조제

1) 시료용액 조제

검체 50 g에 해당하는 건조-회화한 회분을 톨비커에 정확히 취한다. 내부표준선원(²⁴²Pu)을 회분 시료에 넣어준 후 무게를 측정한다. 8 M HNO₃ 25 mL를 첨가 후 95°C에서 최소 12시간 이상 가열한다. 가열된 비커를 식힌 뒤 진한 염산을 4~5방울 첨가한다.

2) 컬럼 정제

플루토늄용 컬럼에 플루토늄용 레진(Anion exchange resin)을 5 cm(9.33 g) 높이까지 충전한다. 8 M HNO₃ 25 mL를 컬럼에 첨가하여 통과 시킨 후 여과지에 시료용액을 첨가하여 컬럼을 통과 시킨다. 8 M HNO₃ 30 mL로 시료액이 담겨있던 비커를 세척 후 컬럼에 첨가하여 통과 시킨다.

3) 추출

가) 플루토늄 동위원소 추출

플루토늄용 컬럼에 3 M HNO₃ 30 mL를 부어준다. 용액이 통과하면 9 M HCl 60 mL를 첨가한다. 용액이 통과하면 0.1 M NH₄I / 9 M HCl 용액 80 mL를 컬럼에 통과시켜 100 mL 비커에 받아낸다. 이 용액을 플루토늄 시험용액으로 한다.

4) 플루토늄 전기전착

가) 플루토늄 시험용액이 담긴 비커를 95°C에서 증발-건조시키고, 용액이 반 정도 증발했을 때 진한 질산 5 mL와 0.3 M Na₂SO₄ 1 mL를 첨가한다.

나) 용액이 완전히 증발하면 진한 황산 0.3 mL를 첨가하여 95°C에서 약 10분 동안 가열한다.

다) 상온에서 약 10분 동안 방냉 후 초순수 4 mL를 첨가하고, 0.4% Thymol blue 지시약을 소량 첨가한다.

※ 초순수: 역침투막 정제 등에 의해 17 MΩ/cm까지 정제한 증류수

라) 암모니아수와 1% H₂SO₄을 이용하여 pH를 2.1~2.4로 조정한다.

마) 시험용액을 스테인리스스틸디스크(SSD)가 장착된 전기전착 셀에 옮기고, 초순수로 비커를 3 mL씩 3회 세척 후 셀에 옮긴다.

바) 백금와이어를 SSD와 3~5 mm 간극이 되도록 전착기에 고정한다.

사) 1 A 전류에서 1시간 30분 동안 전착시킨다.

아) 전착이 끝나기 약 1분 전에 암모니아수를 1 mL 첨가한다.

자) 전착된 SSD는 분리 후 초순수로 세척하여 110°C 가열판 위에서 건조한다.

사. 시험조작

1) 알파선 핵종 시험

알파분광분석기를 사용하여 다음과 같이 시험한다.

가) 측정 장치의 전원을 켜고 진공조건은 40 mTorr 이하로 한다. 검체의 최소 측정시간은 300,000초로 한다. 측정조건에 따라 측정시간을 증가시킬 수 있다.

나) 플루토늄 스펙트럼을 획득한 후 플루토늄 동위원소별 이론적 에너지 및 방출율로 검출기별 에너지영역(region of interest, ROI)을 설정하고, 각 ROI 피크에 해당하는 계측값(integral)을 확인한다.

다) 얻어진 스펙트럼을 각 핵종에 대한 알파선 방출비율이 가장 큰 피크에너지를 기준으로 Peak와 영역대를 확인한다(내부표준선원 플루토늄-242 기준).

※ [예시]

²³⁸Pu [5.46(29%), 5.50(71%) MeV]

²³⁹Pu [5.10(12%), 5.14(15%), 5.16(73%) MeV]

²⁴⁰Pu [5.17(73%), 5.12(27%) MeV]

²⁴²Pu [4.86(23%), 4.90(77%) MeV]

라) 플루토늄에 대한 방사능은 다음 식으로 산출한다.

① 플루토늄의 방사능 산출

검출기별 백그라운드 계측값, 내부표준선원(²⁴²Pu) 계측값, 시료 계측값 등을 이용하여 다음 식에 따라 플루토늄 동위원소별 방사능을 산출한다.

$$A(Bq/kg) = \frac{(r_g - r_o) \times B \times 1000}{(r_{gt} - r_{ot}) \times M}$$

A: 방사능

r_g: Pu 동위원소(²³⁸Pu, ^{239,240}Pu)의 총 계측값

r_{gt}: Pu 내부표준선원(²⁴²Pu)의 총 계측값

r_o: Pu 동위원소(²³⁸Pu, ^{239,240}Pu) ROI의 백그라운드 계측값

r_{ot}: Pu 내부표준선원(²⁴²Pu) ROI의 백그라운드 계측값

B: Pu 내부표준선원(²⁴²Pu)의 방사능(Bq)

M: 검체의 무게(g)

② 플루토늄의 계측효율 산출

혼합 알파표준선원(²³⁸U, ²³⁴U, ²³⁹Pu, ²⁴¹Am) 디스크를 10,000초 동안 측정 후 다음 식에 따라 각 검출기별 플루토늄 계측효율을 산출한다.

$$E(\%) = \frac{r_g}{t \times B} \times 100$$

E: 계측효율

r_g: 혼합 알파표준선원 중 플루토늄(²³⁹Pu)의 총 계측값(counts)

t: 계측시간(sec)

B: 혼합 알파표준선원 중 플루토늄(²³⁹Pu)의 방사능(Bq/disk)

③ 플루토늄의 회수율 산출

검출기별 백그라운드 계측값, 계측효율, 내부표준선원(²⁴²Pu) 계측값 등을 이용하여 다음 식에 따라 플루토늄 회수율을 구한다.

$$R(\%) = \frac{(r_{gt} - r_{ot})}{t \times E \times B} \times 10000$$

R: 회수율

r_{gt}: Pu 내부표준선원(²⁴²Pu)의 총 계측값

r_{ot}: Pu 내부표준선원(²⁴²Pu) ROI의 백그라운드 계측값

t: 계측시간(sec)

E: 계측효율(%)

B: Pu 내부표준선원(²⁴²Pu)의 방사능(Bq)

④ 플루토늄의 정량한계(MDA) 산출

검출기별 백그라운드 계측율, 계측효율, 회수율 등을 이용하여 다음 식에 따라 플루토늄 동위원소별 정량한계(MDA) 농도를 산출한다.

$$MDA(Bq/kg) = \frac{2.71 + 4.65 \times \sqrt{r_{BKG} \times t_{BKG}}}{t} \times \frac{100}{E} \times \frac{100}{R} \times \frac{1000}{M}$$

r_{BKG}: Pu 동위원소(²³⁸Pu, ^{239,240}Pu) ROI의 백그라운드 계측율(counts/sec)

t_{BKG}: 백그라운드의 계측시간(sec)

t: 시료의 계측시간(sec)

E: 계측효율(%)

R: 회수율(%)

M: 검체의 무게(g)

9.9.4 액체섬광계수기에 의한 스트론튬 시험

가. 시험법 적용범위

식품 중 베타선 방출 방사성 핵종 확인 및 방사능 시험에 적용한다.

나. 분석원리

베타선 방출 핵종이 포함된 시료를 화학적 분리과정을 거친 후 방사성 동위원소에서 나오는 에너지준위 차이를 이용하여 베타선 방사능을 측정한다.

다. 장치

액체섬광계수기(LSC), 감마분광분석기

라. 시약 및 시액

표준선원: ⁹⁰Sr, 내부표준선원: ⁸⁵Sr

마. 검체 조제

9.9.3 알파분광분석기에 의한 플루토늄 시험 마. 검체 조제의 1)~3) 방법에 따라 처리한다.

바. 시험용액의 조제

1) 시료용액 조제

검체 50 g에 해당하는 건조-회화한 회분을 톨비커에 정확히 취한다. 내부표준선원(⁸⁵Sr)과 스트론튬 캐리어(Sr(NO₃)₂)를 회분 시료에 넣어준 후 무게를 측정한다. 8 M HNO₃ 25 mL를 첨가 후 95℃에서 최소 12시간 이상 가열한다.

2) 컬럼 정제

스트론튬용 컬럼에 스트론튬용 레진(Sr-resin)을 4 cm(1.6 g) 높이까지 충전한다. 8 M HNO₃ 25 mL를 컬럼에 첨가하여 통과 시킨 후 여과지에 시료용액을 첨가하여 컬럼을 통과 시킨다. 8 M HNO₃ 30 mL로 시료액이 담겨있던 비커를 세척 후 컬럼에 첨가하여 통과 시킨다.

3) 추출

가) 스트론튬 동위원소 추출

스트론튬용 컬럼에 8 M HNO₃ 5 mL를 첨가한다. 용액의 마지막 방울이 떨어지는 날짜와 시간을 기록한다. 이어서 초순수 10 mL를 컬럼에 첨가한 후 통과된 스트론튬 용액을 플라스틱 바이알(LSC용)에 받아낸다. 이 용액을 스트론튬 시험용액으로 한다.

사. 시험조작

1) 방사능 핵종 시험

액체섬광계수기를 사용하여 다음과 같이 시험한다.

가) 측정 장치의 전원을 켜고 검체의 최소 측정시간은 10,800초로 한다.

나) 1차 측정 약 5일 이후 2차 측정을 실시하며, 측정방법은 동일하다.

다) 스트론튬에 대한 방사능은 다음 식으로 산출한다.

① 스트론튬(⁹⁰Sr)의 방사능 산출

백그라운드 계측값(1차, 2차), 시료 계측값(1차, 2차), 내부표준선원(⁸⁵Sr) 회수율 등을 이용하여 다음 식에 따라 스트론튬-90의 방사능을 산출한다.

$$A(Bq/kg) = \frac{CPM_{\infty}}{60} \times \frac{100}{R} \times \frac{1000}{M}$$

A: 방사능

CPM_∞: ⁹⁰Sr이 방사평형에 도달했을 때 ⁹⁰Y의 계측율(counts/min)

R: 감마분광분석기로 측정된 내부표준선원(⁸⁵Sr)의 회수율(%)

M: 검체의 무게(g)

② 스트론튬(⁹⁰Sr)의 LSC 계측효율 산출

백그라운드(초순수) 및 스트론튬-90 표준선원 계측값을 이용하여 다음 식에 따라 계측효율을 산출한다.

$$E(\%) = \frac{(CPM - CPM_{BKG})}{B \times 60} \times 100$$

E: 계측효율

CPM: ⁹⁰Sr 표준선원(방사평형 상태)의 ⁹⁰Y 계측율(counts/min)

CPM_{BKG}: 백그라운드(초순수)의 ⁹⁰Y 계측율(counts/min)

B: ⁹⁰Sr 표준선원(방사평형 상태)의 방사능(Bq)

③ 스트론튬(⁹⁰Sr)의 회수율 산출

1차 측정이 끝난 후 회수율 측정을 위해 ⁸⁵Sr의 방사능을 측정한다(감마분광분석기). 빈 LSC용 바이알에 시료에 첨가한 양과 동일한 스트론튬(⁸⁵Sr)을 첨가 후, 초순수 10 mL를 넣어준다(표준용액). 이 바이알을 감마분광분석기를 이용하여 계측한 결과값으로 시료의 상대적인 회수율을 다음 식에 따라 구한다.

$$R(\%) = \frac{B_{SAM}}{B_{STD}} \times 100$$

R: 회수율

B_{SAM}: 시료의 스트론튬 내부표준선원(⁸⁵Sr) 측정 농도(Bq/kg)

B_{STD}: 표준용액의 스트론튬 내부표준선원(⁸⁵Sr) 측정 농도(Bq/kg)

④ 스트론튬(⁹⁰Sr)의 정량한계(MDA) 산출

검출기별 백그라운드 계측값, 계측효율, 회수율 등을 이용하여 다음 식에 따라 ⁹⁰Sr의 정량한계(MDA) 농도를 산출한다.

$$MDA(Bq/kg) = \frac{2.71 + 4.65 \times \sqrt{CPM_{BKG} \times t_{BKG}}}{t \times 60} \times \frac{100}{E} \times \frac{100}{R} \times \frac{1000}{M} \times \frac{1}{F}$$

CPM_{BKG}: 백그라운드 2차 계측의 ⁹⁰Y 계측율(counts/min)

t_{BKG}: 백그라운드의 계측시간(min)

t: 시료의 계측시간(min)

E: 계측효율(%)

R: 회수율(%)

M: 검체의 무게(g)

F: ⁹⁰Sr의 1차 계측과 2차 계측 사이의 ⁹⁰Y으로의 방사평형 도달 상수(Ingrowth Factor)

9.10 복어독

가. 시험법 적용범위

복어와 복어 염장품 및 건조가공품 등에 적용한다.

나. 분석원리

껍질과 근육을 균질화한 후 검체 일정량을 비커에 취하여 0.1% 초산용액 또는 초산성 메탄올로 추출하여 수욕 중에서 교반 후 냉각하여 여과한다. 이 액을 마우스에 주입하여 치사시간으로부터 독량을 산출한다.

다. 시약 및 시액

1) 물: 3차 정제수 및 이와 동등한 것

2) 초산성 메탄올(pH 3.0): 초산 20 mL에 메탄올 900 mL를 가하여 초산으로 pH 3.0을 맞춘 후 1 L로 한다

3) 0.1% 초산용액: 초산 0.1 mL에 물을 가하여 100 mL로 한다.

4) 기타시약: 특급

라. 시험용액의 조제

1) 추출

가) 초산 추출법 (복어)

검체는 물과 직접 접촉해서는 아니 되며, 동결상태의 시료는 반동결 상태에서 껍질과 근육을 각각 별도로 분쇄기로 균질화한 후 10 g을 비커에 취하여 0.1% 초산용액 약 25 mL를 가한다. 끓는 수욕 중에서 교반하면서 10분간 가열 후 냉각한다. 원심관에 옮겨 원심분리(5,000 rpm, 5분)하여 추출액을 얻는다. 원심관 내의 잔류물을 0.1% 초산용액으로 세정하고 원심분리(5,000 rpm, 5분)하여 상등액을 추출액과 합한다. 이 액을 여과하고, 0.1% 초산용액으로 50 mL 되게 한 것을 각각의 시험용액으로 한다. 1 mL은 검체 0.2 g에 해당한다. 각각의 시험용액은 마우스 시험 전까지 냉장보관한다.

나) 초산성 메탄올 추출법 (복어 염장품 및 건조가공품 등)

껍질과 근육 각각 별도로 잘게 자르고, 분쇄기로 충분히 균질화한 후 검체 약 10 g과

초산성 메탄올 50 mL을 200 mL 둥근바닥플라스크에 넣고 환류냉각장치를 부착시킨다. 이를 미리 70~75℃로 예열된 전열기에서 10분간 가온하여 추출한다. 냉각 후 추출액을 다른 플라스크에 옮기고 초산성 메탄올 50 mL을 가하여 추출하는 과정을 두 번 반복하고 추출액은 모두 합한다. 잔류물을 초산성메탄올 10 mL로 세정하고 이액을 추출액과 합한 후 여과하여 감압 농축한다. 농축 한 것에 물 10 mL을 가하여 녹인 후, 분액깔때기에 옮기고 에틸에테르 10 mL을 넣어 흔들어 섞은 후 층을 분리하고 에테르 층은 버린다. 다시 물 층에 에틸에테르 10 mL을 넣는 과정을 반복한다. 물층을 40℃ 이상의 수욕상에서 감압하여 에테르를 제거한 후 물을 가해 20 mL 되게 한 것을 각각의 시험용액으로 한다. 1 mL는 검체 0.5 g에 해당한다. 각각의 시험용액은 마우스 시험 전까지 냉장보관 한다.

마. 시험조작 (마우스 시험)

1) 마우스

ICR계 또는 ddy계의 동일계통의 생후 4주된 19~21 g의 건강한 수컷을 사용한다. 시험에 사용한 마우스는 표 2를 이용하여 마우스 체중에 대해 보정한다.

2) 시험

시험용액 1 mL을 2마리의 마우스 복강 내에 주사하고 주사 후부터 사망까지의 시간을 초단위로 기록한다. 사망 시에는 3마리 이상의 마우스를 취하여 복강 내에 주사하여 반수치사시간(50% lethal time, LT50)을 구한다. 다만, 마우스가 7분 이내에 사망한 경우 7~13분 정도에서 사망하도록 시험용액을 희석하고 마우스 복강 내에 주사하여 반수치사시간(50% lethal time, LT50)을 구한다. 희석시에는 증류수를 사용한다.

바. 계산

살아남은 것을 포함한 마우스의 반수치사시간(50% lethal time, LT50)으로부터 표 1에 의한 MU를 구한다. 만일 마우스가 19 g이하 혹은 21 g이상이면 표 2에서 각 마우스체중에 대한 MU를 보정한 후 중앙값을 구하여 다음 식에 의해 검체 1 g 당의 MU를 구한다.

$$\text{독력(MU/g)} = \text{치사시간 및 체중보정에 의한 MU} \times \text{희석배수} \times V / S$$

S: 검체의 채취량 (g)

V: 추출(1법) 50 (mL)

추출(2법) 20 (mL)

<표 1> 치사시간 - mouse 단위 환산법

치사시간 (분)	MU	치사시간 (분)	MU	치사시간 (분)	MU	치사시간 (분)	MU
4 : 00	5.62	5 : 45	3.07	9 : 30	1.77	15 : 30	1.28
4 : 05	5.40	5 : 50	3.01	9 : 45	1.74	16 : 00	1.26
4 : 10	5.19	5 : 55	2.95	10 : 00	1.70	16 : 30	1.24
4 : 15	5.00	6 : 00	2.89	10 : 15	1.67	17 : 00	1.23
4 : 20	4.82	6 : 10	2.79	10 : 30	1.64	17 : 30	1.21
4 : 25	4.66	6 : 20	2.70	10 : 45	1.61	18 : 00	1.19
4 : 30	4.50	6 : 30	2.61	11 : 00	1.58	18 : 30	1.18
4 : 35	4.36	6 : 40	2.53	11 : 15	1.56	19 : 00	1.17
4 : 40	4.23	6 : 50	2.46	11 : 30	1.53	19 : 30	1.15
4 : 45	4.10	7 : 00	2.39	11 : 45	1.51	20 : 00	1.14
4 : 50	3.99	7 : 10	2.33	12 : 00	1.49	20 : 30	1.13
4 : 55	3.88	7 : 20	2.27	12 : 15	1.47	21 : 00	1.12
5 : 00	3.77	7 : 30	2.22	12 : 30	1.45	21 : 30	1.11
5 : 05	3.68	7 : 40	2.17	12 : 45	1.43	22 : 00	1.10
5 : 10	3.58	7 : 50	2.12	13 : 00	1.42	22 : 30	1.09
5 : 15	3.50	8 : 00	2.08	13 : 15	1.40	23 : 00	1.08
5 : 20	3.42	8 : 15	2.01	13 : 30	1.38	23 : 30	1.08
5 : 25	3.34	8 : 30	1.96	13 : 45	1.36	24 : 00	1.07
5 : 30	3.26	8 : 45	1.91	14 : 00	1.34	24 : 30	1.06
5 : 35	3.19	9 : 00	1.86	14 : 30	1.33	25 : 00	1.05
5 : 40	3.13	9 : 15	1.81	15 : 00	1.30		

<표 2> Mouse 체중 - mouse 단위보정표

mouse체중(g)	MU	mouse체중(g)	MU	mouse체중(g)	MU
12.0	0.60	15.5	0.78	19.0	0.95
12.5	0.63	16.0	0.80	19.5	0.98
13.0	0.65	16.5	0.83	20.0	1.00
13.5	0.67	17.0	0.85	20.5	1.03
14.0	0.70	17.5	0.88	21.0	1.05
14.5	0.73	18.0	0.90	21.5	1.08
15.0	0.75	18.5	0.93	22.0	1.10

9.11 그레이아노톡신(Grayanotoxin) III

가. 시험법 적용범위

그레이아노톡신 함유여부를 확인하기 위해 식품 중 벌꿀에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질은 메탄올에 녹여 고체상추출카트리지로 정제후 액체크로마토그래프-질량분석기를 이용하여 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 물 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

3) 표준원액 : Grayanotoxin III hemi (ethyl acetate)의 표준품을 메탄올에 녹여 1000 µg/mL로 조제하여 표준원액으로 하고 냉장 저장한다.

4) 표준용액 : 표준원액을 0.020, 0.050, 0.100, 0.250, 0.500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 메탄올로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 사용한다.

5) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

다. 시험용액의 조제

검체 10 g을 메탄올에 녹여 50 mL의 메스플라스크로 옮겨 눈금까지 메탄올로 채운 후, 이 액 25mL를 취하여 5 mL의 메탄올을 미리 통과시킨 후 증류수로 세척한 C₁₈ 카트리지에 주입하고 3 mL의 메탄올로 용출시킨다. 용출액을 증류수와 1:1 희석하여 시험용액으로 사용한다. 벌집 속에 있는 벌꿀은 스테인리스체(850 μm)에서 벌꿀을 분리하여 10 g을 채취한 후 동일한 방법으로 시린지필터(0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)의 분석조건

가) 컬럼 : C₁₈계 컬럼(1.5 mm × 150 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상 A: 1% 포름산(formic acid) 수용액

이동상 B: 1% 포름산(formic acid)을 포함한 메탄올

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	80	20
2.0	10	90
5.0	10	90
8.0	80	20
12.0	80	20

다) 이동상 유량 : 170 $\mu\text{L/분}$

라) 칼럼온도 : 38 $^{\circ}\text{C}$

마) 주입량 : 10 μL

바) 이온화 방법 : ESI(Positive ion mode)

사) Sheath gas : 질소

아) Capillary temperature : 300 $^{\circ}\text{C}$

자) Auxiliary gas : 질소

차) Collision gas : 아르곤

카) Spray voltage : 4500 eV

타) Selected reaction monitoring(SRM) : m/z 335 → m/z 299

2) 검량선 작성

표준용액의 농도별로 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 특성이온(m/z 299)의 피크면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

3) 정량(검출)한계: 25 $\mu\text{g/kg}$

사. 정성시험

위의 조건으로 얻어진 시험용액 크로마토그램상의 특성이온(m/z 299) 피크는 표준용액 특성이온(m/z 299) 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액의 크로마토그램으로부터 특성이온(m/z 299)의 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다.

1) 계산

그레이아노톡신Ⅲ의 함량 ($\mu\text{g/g}$) = $C \times V / S \times D$

C: 검량선에서 구한 그레이아노톡신의 농도($\mu\text{g/ml}$)

V: 시험용액의 최종부피(ml)

S: 검체 채취량(g)

D: 희석배수

9.12 부정물질

가. 시험법 적용범위

모든 식품에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 물과 에탄올로 추출하고 액체크로마토그래프-자외부흡광검출기(LC-UV photometric detector), PDA검출기(photo diode array detector)로 분석한다.

다. 장치

1) 액체크로마토그래프-자외부흡광검출기(LC-UVD), PDA 검출기(LC-PDA), 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것

3) 표준원액: 겐데나필(gendenafil), 글리페리드(glimepiride), 글리벤클라미드(glibenclamide), 글리클라짓(gliclazide), 글리피짓(glipizide), 노르네오바데나필(norneovardenafil), 노르네오실테나필(norneosildenafil), 니트로데나필(nitrodenafil), N-니트로소펜플루라민(N-nitrosufenfluramine) 데메칠타다라필(demethyltadalafil), 데메틸홍데나필(demethylhongdenafil), 데설포닐클로로실테나필(desulfonylchlorosildenafil), 데설포바데나필(desulfovardenafil), 데스메칠피페라지닐프로폭시실테나필(desmethylpiperazinylpropoxysildenafil), 데스메틸시부트라민(desmethylsibutramine), 데스카본실테나필(descarbonsildenafil), 디데스메틸시부트라민(didesmethylsibutramine), 디메틸실테나필(dimethylsildenafil), 디메틸치오실테나필(dimethylthiosildenafil), 디치오프로필카보테나필(dithiopropylcarbodenafil), 디클로로테나필(dichlorodenafil), 레보치록신(T4), 리오치로닌(T3), 메틸하이드록시호모실테나필(methylhydroxyhomosildenafil), 미로테나필(miroadenafil), 바데나필(vardenafil), 벤질실테나필(benzylsildenafil), 사이클로펜틸타다라필-cis(Cyclopentyltadalafil-cis), 사이클로펜틸타다라필-trans(Cyclopentyltadalafil-trans), 센노사이드(sennoside A, B), 슈도바데나필(pseudovardenafil), 시부트라민(sibutramine), 신나밀테나필(cinnamylidenafil), 실테나필(sildenafil), 싸이클로펜타나필(cyclopentynafil), 아미노타다라필(aminotadalafil), 아바나필(avanafil), 아세트아미노타다라필(acetaminotadalafil), 아세틸바데나필(acetylvaridenafil), 아세트산(acetyl acid), 에페드린(ephedrine), 오르리스타트(ormlistat), 옥소홍데나필(oxohongdenafil), N-옥틸노르타다라필(octylnortadalafil), 요힘빈(yohimbine), 유테나필(udenafil), 이미다조사가트리아진은(imidazosagatriazinone), 이소프로필노르타다라필(isopropylnortadalafil), 이카린(icariin), 잔소안트라필(xanthoanthrafil), 치오실테나필(thiosildenafil), 치오퀴나피페리필

(thioquinapiperifil), 치오호모실테나필(thiohomosildenafil), 카보테나필(carbodenafil), 카스카로사이드(cascaroside A, B, C, D), 클로로테나필(chlorodenafil), 클로로시부트라민(chlorosibutramine), 클로로시펜트라민(chlorosipentramine), 클로로프레타다라필(chloropretadalafil), 타다라필(tadalafil), 페놀프탈레인(phenolphthalein), 펜플루라민(fenflura분e), 프로폭시페닐치오실테나필(propoxyphenylthiosildenafil), 프로폭시페닐치오아일테나필(propoxyphenylthioaildenafil), 프로폭시페닐치오호모실테나필(propoxyphenylthiohydroxyhomosildenafil), 프로폭시페닐치오호모실테나필(propoxyphenylthiohomosildenafil), 플루옥세틴(fluxetine), 피페리디노홍테나필(piperidinohongdenafil), 하이드록시바테나필(hydroxyvardenafil), 하이드록시치오호모실테나필(hydroxythiohomosildenafil), 하이드록시클로로테나필(hydroxychlorodenafil), 하이드록시호모실테나필(hydroxyhomosildenafil), 하이드록시홍테나필(hydroxyhongdenafil), 호모실테나필(homosildenafil), 호모타다라필(homotadalafil), 홍테나필(hongdenafil) 각각의 표준품을 메탄올에 녹여 각각 1,000 mg/L이 되게 한다.

- 4) 표준용액: 표준원액을 각각 메탄올에 녹여 1~100 mg/L의 범위가 되도록 적당한 농도로 희석한다.
- 5) 0.5 mM sodium 1-hexane sulfonate를 함유한 0.1% 인산 용액: 1 L 용량 플라스크에 sodium 1-hexanesulfonate (98%) 96.03 mg과 인산 용액 1 mL를 넣고 물로 표시선 까지 채운다.
- 6) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

균질화한 검체 1 g을 정밀하게 달아 50 mL 용량의 메스플라스크에 넣고 물 15 mL를 가하여 습윤화한다. 메스플라스크에 메탄올 25 mL를 가하여 10분간 초음파 추출한 후 메탄올로 눈금을 채우고 0.45 µm 막 여과지(membrane filter)로 여과하여 시험용액으로 사용한다. 단, 시험용액의 농도가 검량선의 농도범위를 벗어날 경우 농도 범위내로 희석하여 사용한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(4.6 mm × 250 mm, 5.0 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상

- (1) 이동상 A: 0.5 mM sodium-1-hexane sulfonate를 함유한 0.1%(v/v) 인산 용액
- (2) 이동상 B: 95% 아세토니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	85	15
6	85	15
15	70	30
30	60	40
32	60	40
42	0	100
50	0	100
52	85	15
60	85	15

다) 이동상 유량: 1.2 mL/분

라) 컬럼 온도: 40℃

마) 주입량: 5 µL

바) UV 검출기과장: 210 nm, 220 nm, 291 nm

사) PDA 검출기과장: 200~400 nm

2) 검량선 작성

표준용액을 농도별로 일정량 취하여 액체크로마토그래프에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

3) 표준품 크로마토그램

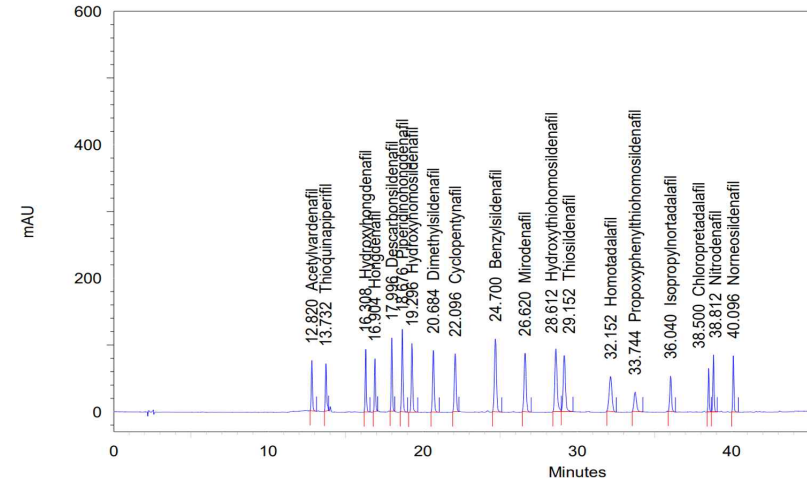


그림 1. 아세틸바테나필(acetylvardenafil), 치오퀴나피페리필(thioquinapiperifil), 하이드록시홍테나필(hydroxyhongdenafil), 홍테나필(hongdenafil), 데스카본실테나필(descarbonsildenafil), 피페리디노홍테나필(piperidinohongdenafil), 하이드록시호모실테나필(hydroxyhomosildenafil), 디메틸실테나필(dimethylsildenafil), 싸이클로펜터나필(cyclopentynafil), 벤질실테나필(benzylsildenafil), 미로테나필(mirodenafil), 하이드록시치오호모실테나필(hydroxythiohomosildenafil), 치오실테나필(thiosildenafil), 호모타다라필(homotadalafil), 프로폭시페닐치오호모실테나필(propoxyphenylthiohomosildenafil), 이소프로필노르타다라필(isopropynortadalafil), 클로로프레타다라필(chloropretadalafil), 니트로테나필(nitrodenafil), 노르네오실테나필(nomeosildenafil) 표준품의 크로마토그램(검출기과장 291 nm) 예시.

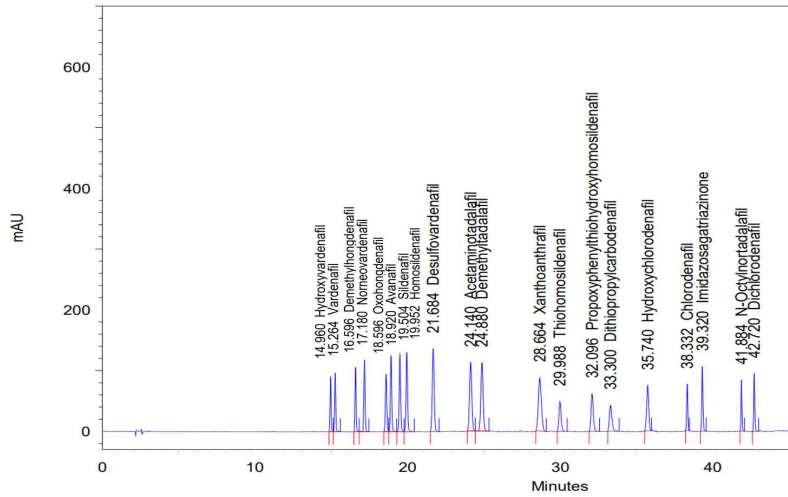


그림 2. 하이드록시바데나필(hydroxyvaridenafil), 바데나필(vardenafil), 데메틸홍데나필(demethylhongdenafil), 노르네오바데나필(nomeovardenafil), 옥소홍데나필(oxohongdenafil), 아바나필(avanafil), 실데나필(sildenafil), 호모실데나필(homosildenafil), 데설펜바데나필(desulfovaridenafil), 아세트아미노타다라필(acetaminotadalafil), 데메틸타다라필(demethyltadalafil), 잔소안트라필(xanthoantrafil), 치오호모실데나필(thiohomosildenafil), 프로폭시페닐치오하이드록시호모실데나필(propoxyphenylthiohydroxyhomosildenafil), 디치오프로필카보데나필(dithiopropylcarbodenafil), 하이드록시클로로데나필(hydroxychlorodenafil), 클로로데나필(chlorodenafil), 이미다조사가트리아지논(imidazosagatriazinone), N-옥틸노르타다라필(N-octylnortadalafil), 디클로로데나필(dichlorodenafil) 표준품의 크로마토그램(검출기파장 291 nm)에시.

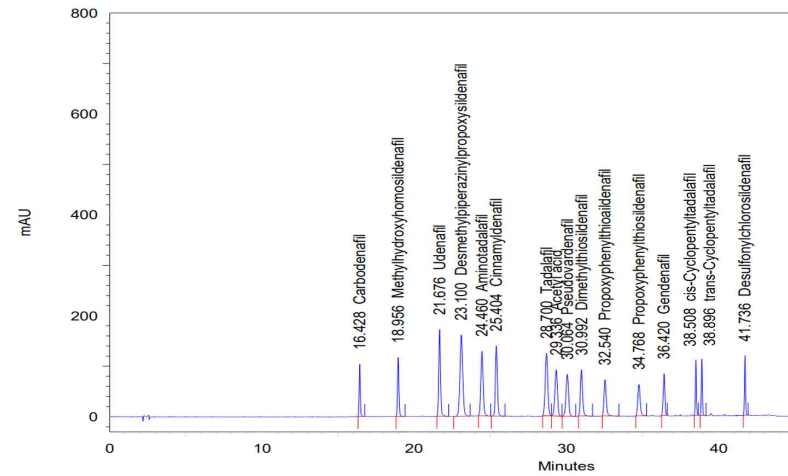


그림 3. 카보데나필(carbodenafil), 메틸하이드록시호모실데나필(methylhydroxyhomosildenafil), 유데나필(udenafil), 데스메틸피페라지닐프로폭시실데나필(desmethylpiperazinylpropoxysildenafil), 아미노타다라필(aminotadalafil), 신나밀데나필(cinnamylidenafil), 타다라필(tadalafil), 아세트산(acetic acid), 슈도바데나필

(pseudovardenafil), 디메틸치오실데나필(dimethylthiosildenafil), 프로폭시페닐치오아일데나필(propoxyphenylthioaildenafil), 프로폭시페닐치오실데나필(propoxyphenylthiosildenafil), 겐데나필(gendenafil), cis-사이클로펜틸타다라필(cis-cyclopentyltadalafil), trans-사이클로펜틸타다라필(trans-cyclopentyltadalafil), 데설펜클로로실데나필(desulfonylchlorosildenafil) 표준품의 크로마토그램(검출기파장 291 nm)에시.

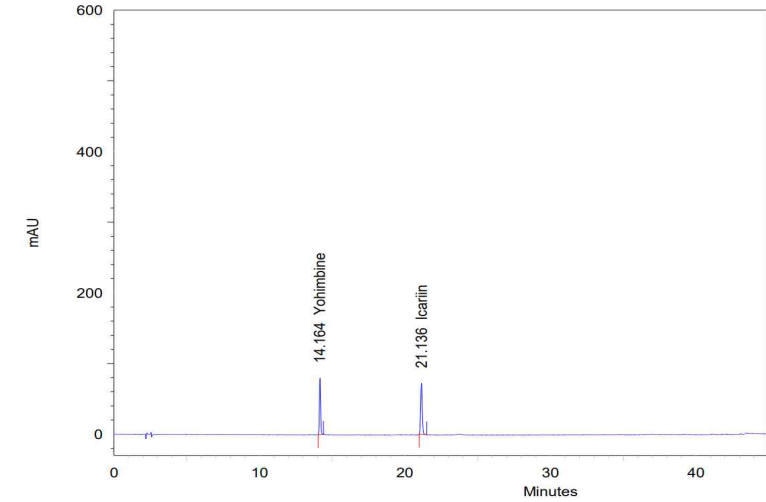


그림 4. 요힘빈(yohimbine), 이카린(icaritin) 표준품의 크로마토그램(검출기파장 291 nm)에시.

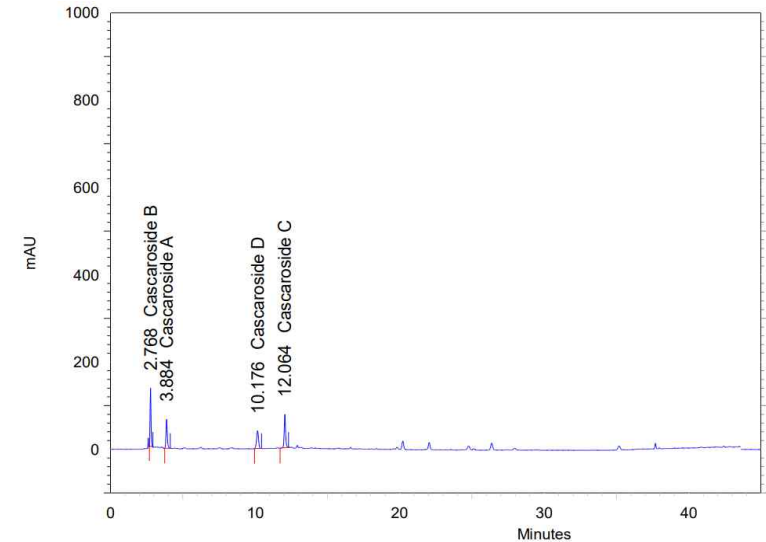


그림 5. 카스카로사이드(cascaroside A, B, C, D) 표준품의 크로마토그램(검출기파장 291 nm)에시.

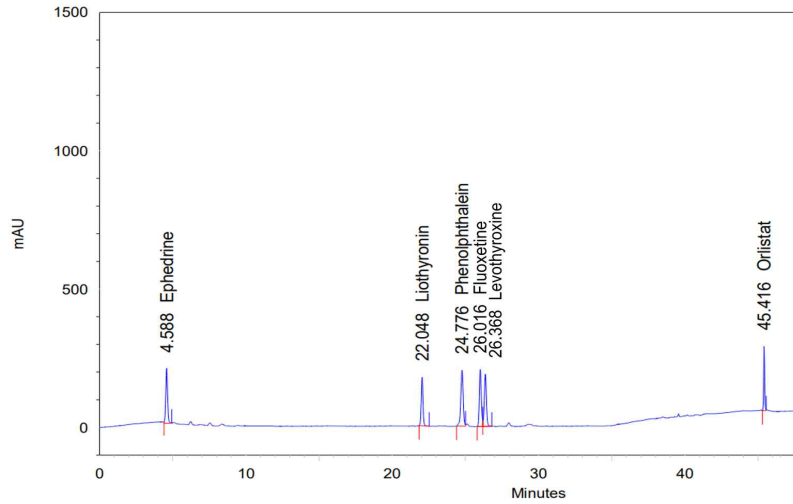


그림 6. 에페드린(ephedrine), 플루옥세틴(flouxetine), 오르리스타트(Orlistat), 리오치로닌(T3), 레보치로닌(T4), 페놀프탈레인(phenolphthalein) 표준품의 크로마토그램 (검출기파장 210 nm) 예시.

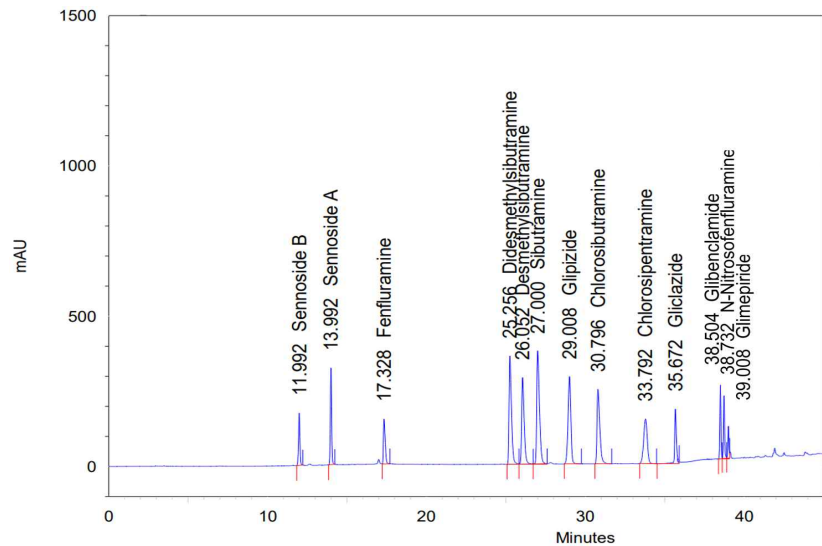


그림 7. 시부트라민(sibutramine), 데스메틸시부트라민(desmethylsibutramine), 디데스메틸시부트라민(didesmethylsibutramine), 클로로시부트라민(chlorosibutramine), 클로로시펜트라민 F(chlorosipentramine), 펜플루라민(fenfluramine), N-니트로소펜플루라민(N-nitrosifenfluramine), 센노사이드(sennoside A, B), 글리벤클라미드(glibenclamide), 글리클라지트(gliclazide), 글리메피리드(glimepiride), 글리피지트(glipizide) 표준품의 크로마토그램(검출기파장 220 nm) 예시.

4) 정량한계: 25 mg/kg

사. 정량시험

위의 조건에서 얻어진 크로마토그램상의 피크는 동일한 측정조건에서 표준용액 피크의 머무름 시간(retention time)과 일치하여야 하며 검출기(UV, PDA)에서 표준용액과 시험용액이 동일한 스펙트럼을 보일 때 정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과를 피크 높이법 또는 피크 면적법에 따라 정량한다. 단, 카스카로사이드(A, B, C, D)는 카스카로사이드 A, B, C, D의 합으로 정량하고, 센노사이드(A, B)는 센노사이드 A와 B의 합으로 정량한다.

1) 계산방법

검량선에서 얻어진 표준물질의 피크 높이 또는 피크 면적을 Y축으로 하고 표준물질의 농도를 X축으로 하여 검량선을 작성하고 시험용액의 높이 또는 면적을 Y축에 대입하여 부정물질의 농도를 계산한다.

$$\text{부정물질의 함량(mg/g)} = C \times \frac{V}{S} \times D$$

C: 검량선에서 계산된 각각의 부정물질의 농도 (mg/L)

V: 시험용액의 최종 부피 (L)

S: 검체 채취량 (g)

D: 희석배수

아. 확인시험

액체크로마토그래프-질량분석기로 분석하였을 때 시험용액 중 표준물질의 m/z 값은 표준용액 중 표준물질의 m/z 값과 일치하여야 한다.

1) 액체크로마토그래프-질량분석기의 분석조건

가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(2.0 mm × 100 mm, 3.0 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상

(1) 이동상 A: 0.1%(v/v) 포름산(formic acid) 함유한 물

(2) 이동상 B: 0.1%(v/v) 포름산(formic acid) 함유한 아세트니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
2	95	5
19	30	70
20	0	100
21.5	0	100
22	95	5
25	95	5

다) 이동상 유량: 0.3 mL/분

라) 컬럼 온도: 40°C

마) 주입량: 5 μL

바) 이온화 방법: ESI(positive, negative ion mode)

사) capillary temperature: 340℃

아) spray voltage: 3.8 kV

자) scan range: 200~800 amu

차) 분석대상물질 조건

분석성분 (Compound)	분자량 (MW)	Ion mode	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
겐테나필 (C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₃)	354.41	Positive	355	327	24
				298	30
				285	30
글리메피리드 (C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S)	490.62	Negative	489	364	28
				350	20
				225	34
글리벤클라미드 (C ₂₃ H ₂₆ ClN ₅ O ₅ S)	494	Negative	492	367	18
				170	32
				127	50
글리클라젯 (C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₃ S)	323.41	Negative	322	170	22
				106	42
				319	20
글리피젯 (C ₂₁ H ₂₇ N ₅ O ₄ S)	445.54	Negative	444	170	34
				154	54
				329	24
노르네오바테나필 (C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄)	356.38	Positive	357	300	30
				151	30
				283	38
노르네오실테나필 (C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S)	459.57	Positive	460	255	46
				136	68
				330	22
니트로테나필 (C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₄)	357.37	Positive	358	284	32
				136	46
				187	12
N-니트로소펜플루라 민 (C ₁₂ H ₁₅ F ₃ N ₂ O)	260.26	Positive	261	159	22
				109	44
				262	32
테메틸타다라필 (C ₂₁ H ₁₇ N ₃ O ₄)	375.38	Positive	376	254	12
				204	52
				297	38
테메틸홍테나필 (C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃)	452.55	Positive	453	97	30
				319	24
				290	32
테실포닐클로로실테나 필 (C ₁₇ H ₁₉ ClN ₄ O ₂)	346.82	Positive	347	256	32

분석성분 (Compound)	분자량 (MW)	Ion mode	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
테실포바테나필 (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₂)	312.37	Positive	313	284	24
				256	30
				151	26
테스메틸피페라지닐프 로폭시실테나필 (C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₅ S)	406.46	Positive	407	365	24
				336	36
				256	34
테스메틸시부트라민 (C ₁₆ H ₂₄ ClN)	265.83	Positive	266	153	12
				139	14
				125	26
테스카본실테나필 (C ₂₁ H ₃₀ N ₆ O ₄ S)	462.57	Positive	463	418	26
				311	30
				283	38
디테스메틸시부트라민 (C ₁₅ H ₂₂ ClN)	251.79	Positive	252	153	10
				139	10
				125	22
디메틸실테나필 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S)	488.61	Positive	489	311	32
				283	42
				113	30
디메틸치오실테나필 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂)	504	Positive	505	327	30
				299	38
				113	28
디치오프로필카보테나 필 (C ₂₅ H ₃₄ N ₆ OS ₂)	498.71	Positive	499	371	24
				343	36
				179	54
디클로로테나필 (C ₁₉ H ₂₀ Cl ₂ N ₄ O ₂)	407.30	Positive	407	379	26
				363	34
				280	42
레보치록신(T4) (C ₁₅ H ₁₁ I ₄ NO ₄)	776.87	Positive	778	605	40
				351	46
				324	54
리오치로닌(T3) (C ₁₅ H ₁₂ I ₃ NO ₄)	650.97	Positive	652	479	34
				225	42
				197	68
메틸하이드록시호모실 테나필 (C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₅ S)	518.00	Positive	519	129	30
				112	30
				99	40
미로테나필 (C ₂₆ H ₃₇ N ₅ O ₅ S)	531.67	Positive	532	312	36
				296	40
				268	50

분석성분 (Compound)	분자량 (MW)	Ion mode	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
바테나필 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S)	488.60	Positive	489	376	34
				312	36
				151	48
벤질실테나필 (C ₂₈ H ₃₄ N ₆ O ₄ S)	550.68	Positive	551	377	30
				134	36
				91	34
사이클로펜틸타다라필 -cis (C ₂₆ H ₂₅ N ₃ O ₄)	443.49	Positive	444	322	14
				169	38
				135	26
사이클로펜틸타다라필 -trans (C ₂₆ H ₂₅ N ₃ O ₄)	443.49	Positive	444	322	16
				169	42
				135	30
센노사이드 A (C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀)	862.75	Negative	861	699	28
				386	36
				224	40
센노사이드 B (C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀)	862.75	Negative	861	699	28
				386	36
				224	40
슈도바테나필 (C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S)	459.57	Positive	460	312	38
				151	42
				110	76
시부트라민 (C ₁₇ H ₂₆ ClN)	279.85	Positive	280	153	14
				139	14
				125	22
신나밀테나필 (C ₃₂ H ₃₈ N ₆ O ₃)	554	Positive	555	437	22
				355	26
				117	34
실테나필 (C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₄ S)	474.58	Positive	475	311	28
				283	40
				100	26
싸이클로펜티나필 (C ₂₆ H ₃₆ N ₆ O ₄ S)	528.68	Positive	529	461	28
				283	42
				98	36
아미노타다라필 (C ₂₁ H ₁₈ N ₄ O ₄)	390.4	Positive	391	269	12
				262	32
				204	58
아바나필 (C ₂₃ H ₂₆ ClN ₇ O ₃)	483.95	Positive	484	375	26
				233	34
				155	48

분석성분 (Compound)	분자량 (MW)	Ion mode	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
아세트아미노타다라필 (C ₂₃ H ₂₀ N ₄ O ₅)	432.43	Positive	433	311	14
				262	32
				204	60
아세틸바테나필 (C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃)	466.59	Positive	467	341	30
				151	50
				127	28
아세틸산 (C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄)	356.38	Positive	357	329	24
				300	32
				256	36
에페드린 (C ₁₀ H ₁₅ NO)	165.24	Positive	166	148	13
				133	20
				117	20
오르리스타트 (C ₂₉ H ₃₃ NO ₅)	495.73	Positive	496	319	14
				160	12
				114	20
옥소홍테나필 (C ₂₅ H ₃₂ N ₆ O ₄)	480.57	Positive	481	410	28
				166	58
				297	44
N-옥틸노르타다라필 (C ₂₉ H ₃₃ N ₃ O ₄)	487.6	Positive	488	366	16
				338	26
				204	72
요힘빈 (C ₂₁ H ₂₅ N ₂ O ₃)	354.45	Positive	355	212	22
				144	32
				117	40
유테나필 (C ₂₅ H ₃₆ N ₆ O ₄ S)	516.66	Positive	517	325	36
				283	42
				112	34
이미다조사가트리아지 논 (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₂)	312.37	Positive	313	285	24
				256	30
				241	36
이소프로필노르타다라 필 (C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₄)	417.47	Positive	418	296	12
				204	64
				135	30
이카린 (C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅)	676.67	Positive	677	531	16
				369	32
				313	58
잔소안트라필 (C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O ₆)	389.41	Positive	390	151	14
				107	50
				341	30
치오실테나필 (C ₂₂ H ₃₀ N ₆ O ₃ S ₂)	490.64	Positive	491	327	30
				299	38

분석성분 (Compound)	분자량 (MW)	Ion mode	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
치오퀴나피페리핀 (C ₂₄ H ₂₈ N ₆ O ₈ S)	448.59	Positive	449	204	26
				186	38
				327	32
치오호모실테나핀 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂)	504.68	Positive	505	299	38
				113	28
				339	22
카보테나핀 (C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃)	452.56	Positive	453	311	34
				147	42
				459	20
카스카로사이드 A (C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄)	580.54	Negative	579	297	38
				268	52
				459	20
카스카로사이드 B (C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄)	580.54	Negative	579	297	38
				268	52
				443	24
카스카로사이드 C (C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃)	564.54	Negative	563	281	40
				251	64
				443	24
카스카로사이드 D (C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃)	564.54	Negative	563	281	40
				251	64
				361	24
클로로테나핀 (C ₁₉ H ₂₁ ClN ₄ O ₃)	388.86	Positive	389	311	30
				285	32
				187	16
클로로시부트라민 (C ₁₇ H ₂₅ Cl ₂ N)	314.29	Positive	314	173	16
				159	30
				187	16
클로로시펜트라민 (C ₁₈ H ₂₇ Cl ₂ N)	328.32	Positive	328	173	16
				159	28
				274	32
클로로프레타다라핀 (C ₂₂ H ₁₉ ClN ₂ O ₃)	426.86	Positive	427	204	64
				135	18
				268	12
타다라핀 (C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₄)	389.4	Positive	390	169	34
				135	24
				225	22
페놀프탈레인 (C ₂₀ H ₁₄ O ₄)	318.32	Positive	319	197	30
				141	42
				187	15
펜플루라민 (C ₁₂ H ₁₆ F ₃ N)	231.26	Positive	232	159	15
				109	35

분석성분 (Compound)	분자량 (MW)	Ion mode	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
프로폭시페닐치오실테나핀 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂)	504.67	Positive	505	329	34
				313	32
				299	36
프로폭시페닐치오아일테나핀 (C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₃ S ₂)	518.7	Positive	519	299	34
				113	30
				299	36
프로폭시페닐치오하이드록시호모실테나핀 (C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₄ S ₂)	534.69	Positive	535	129	32
				99	40
				327	32
프로폭시페닐치오호모실테나핀 (C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₃ S ₂)	518.70	Positive	519	299	36
				113	28
				148	10
플루옥세틴 (C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO)	309.33	Positive	310	117	50
				44	10
				297	36
피레피리디노홍테나핀 (C ₂₄ H ₃₁ N ₅ O ₃)	437.55	Positive	438	166	48
				98	28
				312	40
하이드록시바테나핀 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S)	504.61	Positive	505	299	38
				151	48
				299	38
하이드록시치오호모실테나핀 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S ₂)	520.68	Positive	521	129	30
				99	32
				363	26
하이드록시클로로테나핀 (C ₁₉ H ₂₃ ClN ₄ O ₃)	390.87	Positive	391	313	32
				285	30
				487	24
하이드록시호모실테나핀 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₅ S)	504.61	Positive	505	112	30
				99	40
				297	42
하이드록시홍테나핀 (C ₂₃ H ₃₄ N ₆ O ₄)	482.59	Positive	483	143	28
				127	30
				283	40
호모실테나핀 (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S)	488.61	Positive	489	113	28
				99	32
				282	14
호모타다라핀 (C ₂₃ H ₂₁ N ₃ O ₄)	403.43	Positive	404	204	58
				169	34

분석성분 (Compound)	분자량 (MW)	Ion mode	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
홍데나필 (C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₃)	466.59	Positive	467	166	50
				127	30
				111	32

※ 각 생성이온(product ion)에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 생성이온도 적용이 가능함

2) 정성시험

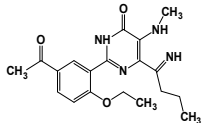
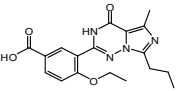
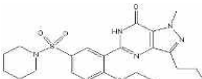
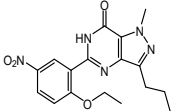
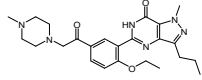
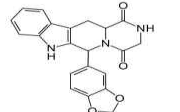
위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온간 반응세기의 비율(Response ratio)을 비교하여 그 비율이 ± 20~30% 이내에서 일치하여야 한다.

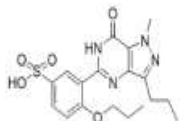
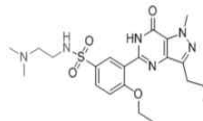
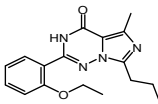
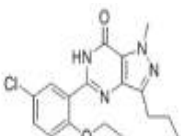
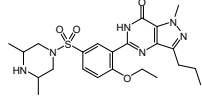
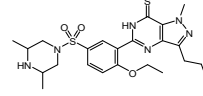
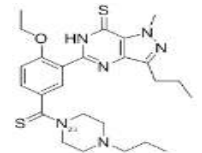
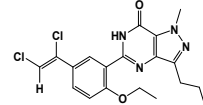
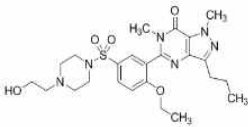
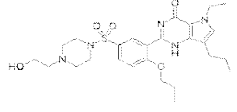
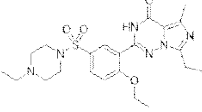
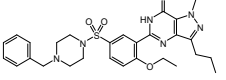
※ 생성이온간 반응세기의 비율 허용 범위

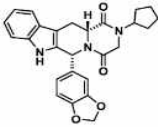
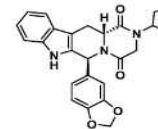
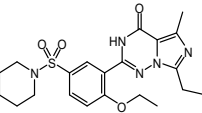
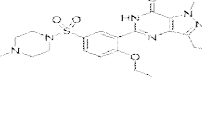
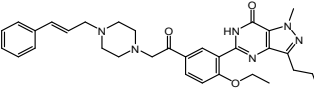
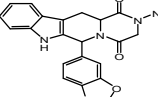
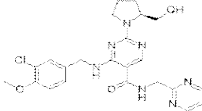
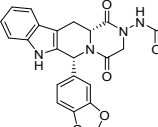
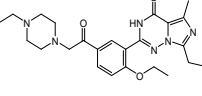
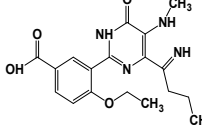
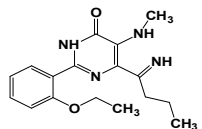
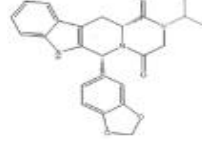
이온간 반응세기의 비율(%)	허용범위(%)
> 50	±20
> 20, ≤50	±25
> 10, ≤20	±30

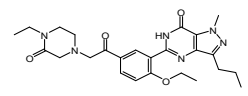
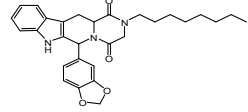
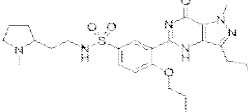
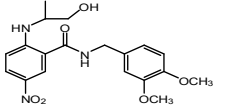
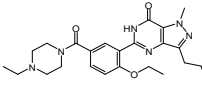
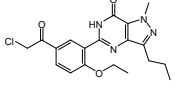
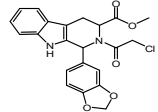
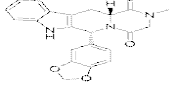
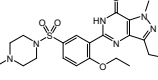
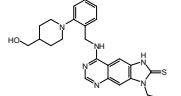
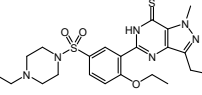
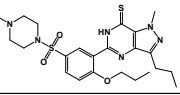
자. 분자량 및 화학구조식

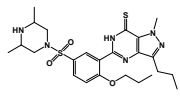
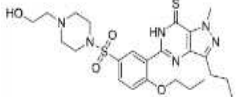
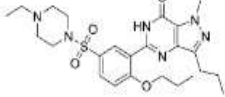
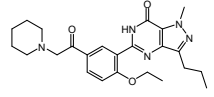
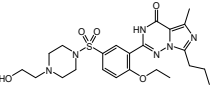
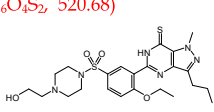
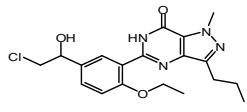
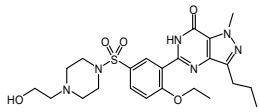
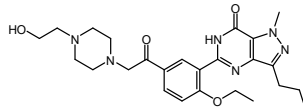
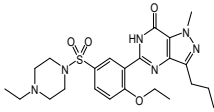
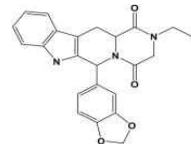
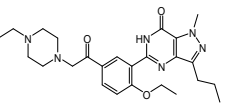
1) 발기부전치료제 및 그 유사물질

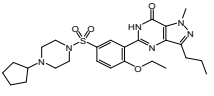
① 겐데나필(Gendenafil) (C ₁₉ H ₂₂ N ₄ O ₃ , 354.41) 	② 노르네오바데나필(Norneovardenafil) (C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₄ , 356.38) 
③ 노르네오실데나필(Norneosildenafil) (C ₂₂ H ₂₉ N ₅ O ₄ S, 459.57) 	④ 니트로데나필(Nitrodenafil) (C ₁₇ H ₁₉ N ₅ O ₄ , 357.37) 
⑤ 데메틸홍데나필(Demethylhongdenafil) (C ₂₄ H ₃₂ N ₆ O ₃ , 452.55) 	⑥ 데메틸타다라필(Demethyltdalafil) (C ₂₁ H ₁₇ N ₃ O ₄ , 375.38) 

⑦ 데스메틸피라지닐프로폭시실데나필 (Desmethylpiprazinylpropoxysildenafil) (C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₅ S, 406.46) 	⑧ 데스카본실데나필(Descarbonsildenafil) (C ₂₁ H ₃₀ N ₆ O ₄ S, 462.57) 
⑨ 데설펠바데나필(Desulfovardenafil) (C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₂ , 312.37) 	⑩ 데설펠클로로실데나필(Desulfonylchlorosildenafil) (C ₁₇ H ₁₉ ClN ₄ SO ₂ , 346.82) 
⑪ 디메틸실데나필(Dimethylsildenafil) (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S, 488.61) 	⑫ 디메틸치오실데나필(Dimethylthiosildenafil) (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₃ S ₂ , 504) 
⑬ 디치오프로필카보데나필(Dithiopropylcarbodenafil) (C ₂₅ H ₃₄ N ₆ O ₅ S ₂ , 498.71) 	⑭ 디클로로데나필(Dichlorodenafil) (C ₁₉ H ₂₀ Cl ₂ N ₄ O ₂ , 407.30) 
⑮ 메틸하이드록시호모실데나필 (Methylhydroxyhomosildenafil) (C ₂₄ H ₃₄ N ₆ O ₅ S, 518.00) 	⑯ 미로데나필(Mirodenafil) (C ₂₆ H ₃₇ N ₅ O ₅ S, 531.67) 
⑰ 바데나필(Vardenafil) (C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₄ S, 488.60) 	⑱ 벤질실데나필(Benzylsildenafil) (C ₂₈ H ₃₄ N ₆ O ₄ S, 550.68) 

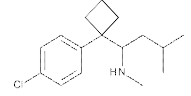
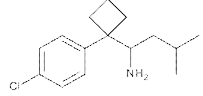
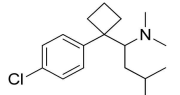
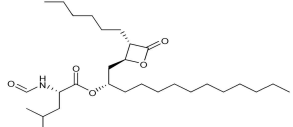
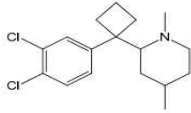
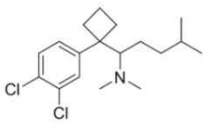
<p>⑱ 사이클로펜틸타다라필-cis (Cyclopentyltadalafil-cis) (C₂₆H₂₅N₃O₄, 443.49)</p> 	<p>⑳ 사이클로펜틸타다라필-trans (Cyclopentyltadalafil-trans) (C₂₆H₂₅N₃O₄, 443.49)</p> 
<p>㉑ 슈도바데나필(Pseudovardenafil) (C₂₂H₂₉N₃O₄S, 459.57)</p> 	<p>㉒ 실데나필(Sildenafil) (C₂₂H₃₀N₆O₄S, 474.58)</p> 
<p>㉓ 신나밀데나필(Cinnamylidenafil) (C₃₂H₃₈N₆O₃, 554)</p> 	<p>㉔ 아미노타다라필(Aminotadalafil) (C₂₁H₁₈N₄O₄, 390.40)</p> 
<p>㉕ 아바나필(Avanafil) (C₂₃H₂₆ClN₇O₃, 483.95)</p> 	<p>㉖ 아세트아미노타다라필(Acetaminotadalafil) (C₂₃H₂₀N₄O₅, 432.43)</p> 
<p>㉗ 아세틸바데나필(Acetylvardenafil) (C₂₅H₃₄N₆O₃, 466.59)</p> 	<p>㉘ 아세틸산(Acetyl acid) (C₁₈H₂₀N₄O₄, 356.38)</p> 
<p>㉙ 이미다조사가트리아진은 (Imidazosagatriazinone) (C₁₇H₂₀N₄O₂, 312.37)</p> 	<p>㉚ 이소프로필노르타다라필(Isopropyltadalafil) (C₂₄H₂₃N₃O₄, 417.47)</p> 

<p>㉛ 옥소홍데나필(Oxohongdenafil) (C₂₅H₃₂N₆O₄, 480.57)</p> 	<p>㉜ 옥틸노르타다라필(N-Octyltadalafil) (C₂₉H₃₃N₃O₄, 487.60)</p> 
<p>㉝ 유데나필(Udenafil) (C₂₅H₃₆N₆O₄S, 516.66)</p> 	<p>㉞ 잔소안트라필(Xanthoanthrafil) (C₁₉H₂₃N₃O₆, 389.41)</p> 
<p>㉟ 카보데나필(Carbodenafil) (C₂₄H₃₂N₆O₃, 452.56)</p> 	<p>㊱ 클로로데나필(Chlorodenafil) (C₁₉H₂₁ClN₄O₃, 388.86)</p> 
<p>㊲ 클로로프레타다라필(Chloropretadalafil) (C₂₂H₁₉ClN₂O₅, 426.86)</p> 	<p>㊳ 타다라필(Tadalafil) (C₂₂H₁₉N₃O₄, 389.40)</p> 
<p>㊴ 치오실데나필(Thiosildenafil) (C₂₂H₃₀N₆O₃S₂, 490.64)</p> 	<p>㊵ 치오퀴나피페리필(Thioquinapiperifil) (C₂₄H₂₈N₆OS, 448.59)</p> 
<p>㊶ 치오호모실데나필(Thiohomosildenafil) (C₂₃H₃₂N₆O₃S₂, 504.68)</p> 	<p>㊷ 프로폭시페닐치오실데나필 (Propoxyphenylthiosildenafil) (C₂₄H₃₂N₆O₃S₂, 504.67)</p> 

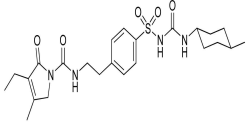
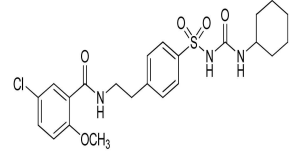
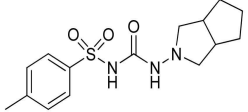
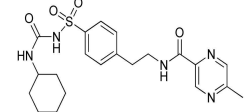
<p>④③ 프로폭시페닐치오아일테나필 (Propoxyphenylthioaildenafilafil) (C₂₄H₃₄N₆O₅S₂, 518.70)</p> 	<p>④④ 프로폭시페닐치오하이드록시호모실테나필 (Propoxyphenylthiohydroxyhomosildenafilafil) (C₂₄H₃₄N₆O₄S₂, 534.69)</p> 
<p>④⑤ 프로폭시페닐치오호모실테나필 (Propoxyphenylthiohomosildenafilafil) (C₂₄H₃₄N₆O₃S₂, 518.70)</p> 	<p>④⑥ 피페리디노홍테나필(Piperidinohongdenafil) (C₂₄H₃₁N₅O₃, 437.55)</p> 
<p>④⑦ 하이드록시바테나필(Hydroxyvardenafil) (C₂₃H₃₂N₆O₅S, 504.61)</p> 	<p>④⑧ 하이드록시치오호모실테나필 (Hydroxythiohomosildenafilafil) (C₂₃H₃₂N₆O₄S₂, 520.68)</p> 
<p>④⑨ 하이드록시클로로테나필(Hydroxychlorodenafil) (C₁₉H₂₃ClN₄O₃, 390.87)</p>  <p>Hydroxychlorodenafil (C₁₉H₂₃ClN₄O₃, 390)</p>	<p>⑤① 하이드록시호모실테나필(Hydroxyhomosildenafilafil) (C₂₃H₃₂N₆O₅S, 504.61)</p> 
<p>⑤② 하이드록시홍테나필(Hydroxyhongdenafil) (C₂₅H₃₄N₆O₄, 482.59)</p> 	<p>⑤② 호모실테나필(Homosildenafilafil) (C₂₃H₃₂N₆O₅S, 488.61)</p> 
<p>⑤③ 호모타다라필(Homotadalafil) (C₂₃H₂₁N₅O₄, 403.43)</p> 	<p>⑤④ 홍테나필(Hongdenafil) (C₂₅H₃₄N₆O₃, 466.59)</p> 

<p>⑤⑤ 싸이클로펜티나필(Cyclopentynafil) (C₂₆H₃₆N₆O₄S, 528.68)</p> 	
---	--

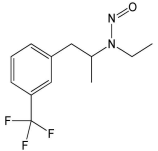
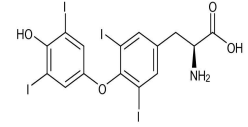
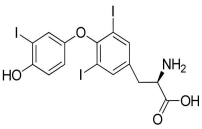
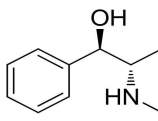
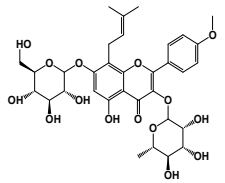
2) 비만치료제 및 그 유사물질

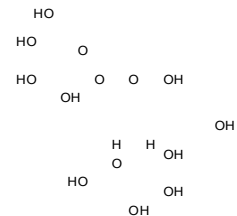
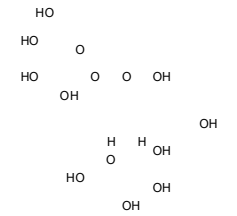
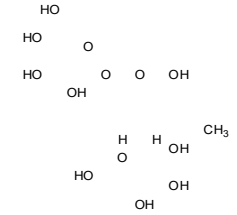
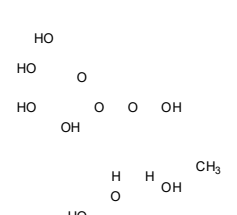
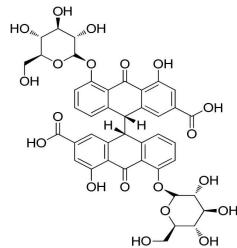
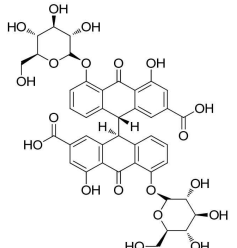
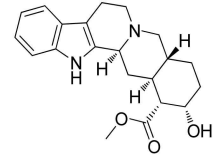
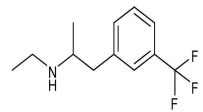
<p>① 데스메틸시부트라민(Desmethylsibutramine) (C₁₆H₂₁ClN, 265.83)</p> 	<p>② 디데스메틸시부트라민(Didesmethylsibutramine) (C₁₅H₂₂ClN, 251.79)</p> 
<p>③ 시부트라민(Sibutramine) (C₁₇H₂₃ClN, 279.85)</p> 	<p>④ 오르리스타트(Orlistat) (C₂₉H₅₃NO₅, 495.73)</p> 
<p>⑤ 클로로시부트라민(Chlorosibutramine) (C₁₇H₂₅Cl₂N, 314.29)</p> 	<p>⑥ 클로로시펜트라민(Chlorosipentramine) (C₁₈H₂₇Cl₂N, 328.32)</p> 

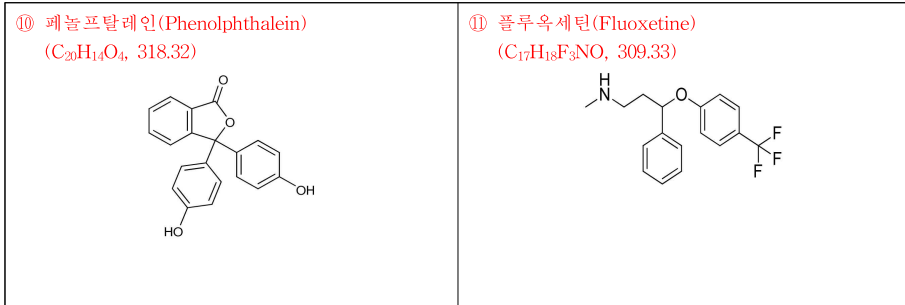
3) 당뇨병치료제 및 그 유사물질

<p>① 글리메피리드(Glimepiride) ($C_{24}H_{34}N_4O_5S$, 490.62)</p> 	<p>② 글리벤클라미드(Glibenclamide) ($C_{22}H_{28}ClN_3O_5S$, 494.00)</p> 
<p>③ 글리클라젯(Gliclazide) ($C_{15}H_{21}N_3O_3S$, 323.41)</p> 	<p>④ 글리피젯(Glipizide) ($C_{21}H_{27}N_5O_4S$, 445.54)</p> 

4) 기타 의약품 성분

<p>① N-니트로소펜플루라민(N-nitrosofenfluramine) ($C_{12}H_{15}F_3N_2O$, 260.26)</p> 	<p>② 레보티록신(Levothyroxine, T4) ($C_{15}H_{11}I_4NO_4$, 776.87)</p> 
<p>③ 리오티로닌(Liothyronine, T3) ($C_{15}H_{12}I_3NO_4$, 650.97)</p> 	<p>④ 에페드린(Ephedrine) ($C_{10}H_{15}NO$, 165.24)</p> 
<p>⑤ 이카린(Icarin) ($C_{33}H_{40}O_{15}$, 676.67)</p> 	

<p>⑥ (1) 카스카로사이드 A(Cascarside A) ($C_{27}H_{32}O_{14}$, 580.54)</p> 	<p>⑥ (2) 카스카로사이드 B(Cascarside B) ($C_{27}H_{32}O_{14}$, 580.54)</p> 
<p>⑥ (3) 카스카로사이드 C(Cascarside C) ($C_{27}H_{32}O_{13}$, 564.54)</p> 	<p>⑥ (4) 카스카로사이드 D(Cascarside D) ($C_{27}H_{32}O_{13}$, 564.54)</p> 
<p>⑦ (1) 센노사이드 A(Sennoside A) ($C_{42}H_{38}O_{20}$, 862.75)</p> 	<p>⑦ (2) 센노사이드 B(Sennoside B) ($C_{42}H_{38}O_{20}$, 862.75)</p> 
<p>⑧ 요힘빈(Yohimbine) ($C_{21}H_{26}N_2O_3$, 354.45)</p> 	<p>⑨ 펜플루라민(Fenfluramine) ($C_{12}H_{16}F_3N$, 231.26)</p> 



9.13 우루시올

가. 시험법 적용범위

웃나무를 원료로 사용한 식품에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 아세토니트릴로 추출한 후 dSPE (dispersive SPE)로 정제하여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

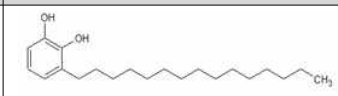

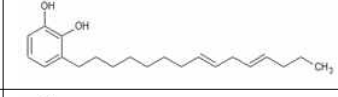
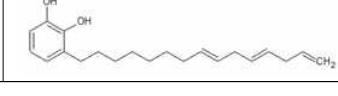
다. 장치

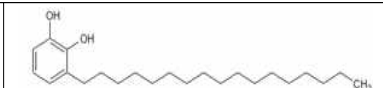
액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 우루시올 표준품을 메탄올에 녹여 1,000 µg/mL가 되게 한 다음 -70°C에서 차광 보관한다.
- 4) 혼합표준용액: 각 표준원액을 메탄올에 적당한 농도로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다. 조제한 용액은 물질의 안정성 문제로 -70°C에서 30일 동안 차광 보관 및 사용한다.

표1. 우루시올 표준품 정보

성분명	CAS No.	분자식	화학구조
우루시올 I (C ₁₅ :0)	492-89-7	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	
우루시올 II (C ₁₅ :1)	35237-02-6	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	
우루시올 III (C ₁₅ :2)	83258-37-1	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	
우루시올 V (C ₁₅ :3)	83543-37-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	

라콜 (C ₁₇ :0)	5862-27-1	C ₂₃ H ₄₀ O ₂	
----------------------------	-----------	--	---

5) 추출용액(50 mM 아세트산 암모늄(ammonium acetate) 버퍼 (pH 4.1) + 0.1 M EDTA): 500 mL 용량플라스크에 아세트산 암모늄 1,927 mg을 적당량의 물에 녹여 표시선을 맞추고 (정용하고) pH가 4 정도 되는지 확인한다. 여기에 EDTA 14.6 g을 넣고 충분히 녹을 때까지 1시간 초음파 처리한다. EDTA가 완전히 녹지 않으므로 상온에서 보관하며 상층액만 사용하고, 필요하다면 원심분리 후 사용한다.

6) 정제용 시약(dSPE 카트리지): QuEChERS 정제용 또는 이와 동등한 것

가) 물추출물 등 액상검체: PSA(Primary secondary amine):C₁₈:황산마그네슘이 1:1:6의 비율(6.25 mg:6.25 mg:37.5 mg)로 혼합된 시약

나) 장류 등 고상검체: PSA:황산마그네슘이 1:6(50 mg:300 mg)의 비율로 혼합된 시약

7) 0.1% (v/v) 포름산(formic acid) 용액: 1,000 mL 용량플라스크에 포름산(formic acid) 1 mL을 넣고 물로 표시선까지 채운다(정용한다).

8) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

1) 추출

균질화된 시료 2g(된장의 경우 1g)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 취하고 추출용액 5 mL를 가한 후 교반기(vortex mixer)로 1분간 혼합한다. 아세토니트릴 5 mL과 염화나트륨 1 g을 가하고, 교반기로 1분간 추출한 다음, 4°C, 2,700 ×g에서 10분간 원심분리한다.

2) 정제

15 mL 원심분리관에 정제용 시약(dSPE 카트리지) 50 mg(액상검체) 또는 350 mg(고상검체)을 취하고 분리된 상층액 전량을 넣는다. 교반기로 1분간 혼합하고, 4°C, 2,700 ×g에서 10분간 원심분리한 뒤, 상층액 전량을 새로운 15 mL 원심분리관에 옮긴다. 40°C 수용액 상에서 질소건고한 후, 메탄올 1 mL를 가하고 교반기로 1분간 혼합한 후 5분간 초음파 처리하여 용해시킨다. 이 액을 4°C, 13,500 ×g에서 3분간 원심분리한 후, 상층액을 최종 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 분석조건

가) 컬럼: C₁₈계 컬럼 (2.0 mm × 150 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상

(1) 이동상 A: 0.1%(v/v) 포름산(formic acid) 함유한 수용액

(2) 이동상 B: 메탄올

시간(분)	이동상A(%)	이동상B(%)
0.0	20	80
1.0	20	80
3.0	0	100
10.0	0	100
10.5	20	80
15	20	80

다) 이동상 유량: 0.25 mL/분

라) 컬럼 온도 40°C

마) 주입량: 10 µL

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: ESI(Negative ion mode)

나) Ion source temperature: 350°C

다) Ion spray voltage: -4.5 kV

라) Curtain gas: 6 psi

마) Collision gas(N₂): 10 psi

바) Ion source gas 1: 10 psi

사) Ion source gas 2: 20 psi

표2. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

연번	성분명 (Compound)	머무름시간 (분)	분자량 (g/mol)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision Energy, eV)
1	Urushiol I	8.98	320.5	319.1	122.2 ¹⁾ 136.1	-48 -46
2	Urushiol II	8.41	318.5	317.1	122.0 ¹⁾ 135.0	-42 -56
3	Urushiol III	8.00	316.5	315.3	122.0 ¹⁾ 135.2	-44 -50
4	Urushiol V	7.65	314.5	313.3	135.1 ¹⁾ 122.0	-48 -44
5	Laccol	9.82	348.6	347.4	121.9 ¹⁾ 135.0	-52 -60

¹⁾ 정량이온

※ 각 생성이온(Product ion)에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 생성이온도 적용이 가능함

3) 검량선 작성

우루시올의 특성(산화반응에 따른 폴리머 형성 등)을 고려하여 다음의 Matrix- matched standard(MMS) 조제법에 따라 처리한 혼합표준용액을 농도별로 취하여 액체크로마토그래프-질량분석기에 주입한다. 얻어진 크로마토그램 상의 정량이온의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선(Matrix-matched calibration curve)을 작성한다.

가) Matrix-matched standard(MMS) 조제법

음성검체(Blank sample) 2 g(원장의 경우 1 g)을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 취하고 추출용액 5 mL를 가한 후 교반기(vortex mixer)로 1분간 혼합한다. 아세트니트릴 5 mL와 염화나트륨 1 g을 첨가하고, 교반기로 1분간 추출한 다음, 4°C, 2,700 ×g에서 10분간 원심분리한다. 15 mL 원심분리관에 정제용 시약(dSPE 카트리지) 50 mg(액상검체) 또는 350 mg(고상검체)을 취하고 분리된 상층액 전량을 넣는다. 교반기로 1분간 혼합하고, 4°C, 2,700 ×g에서 10분간 원심분리한 뒤, 상층액 전량을 새로운 15 mL 원심분리관에 옮긴다. 각 검량선 농도[표 3]에 맞는 혼합표준용액 0.2 mL(원장의 경우 0.1mL)을 가하고, 40°C 수용액상에서 질소건고한다. 메탄올 1 mL를 가하고 교반기로 1분간 혼합한 후 5분간 초음파 처리하여 용해시킨다. 이 액을 4°C, 13,500 ×g에서 3분간 원심분리한 후, 상층액을 최종 표준용액으로 한다.

표3. Matrix-matched standard 조제에 사용한 표준용액 농도 및 부피

검량선 농도	혼합표준용액 농도	첨가 부피
10 ng/mL	100 ng/mL	
20 ng/mL	200 ng/mL	0.2 mL
30 ng/mL	300 ng/mL	(원장의 경우 0.1mL)
40 ng/mL	400 ng/mL	
50 ng/mL	500 ng/mL	

4) 표준품의 크로마토그램

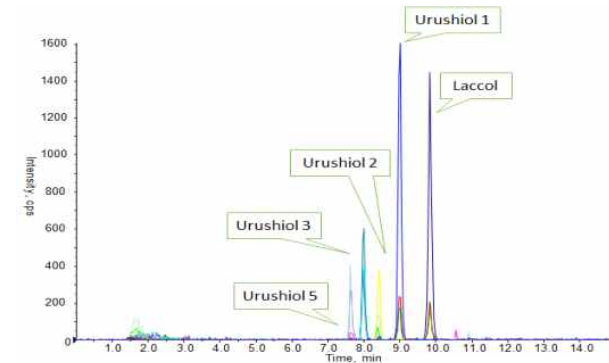


그림 1. 표준품의 크로마토그램 예시.

5) 정량한계는 우루시올 I, II, III, V, 라콜 각각에 대하여 10 µg/kg을 적용한다.

사. 정성시험

위의 조건으로 얻어진 표준용액 크로마토그램 상의 피크 머무름 시간과 특성이온으로 시험용액의 우루시올을 확인한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험용액 크로마토그램 상의 피크 머무름 시간과 특성이온이 표준용액과 일치할 때 정량이온에 대한 피크 높이 또는 면적을 검량선에 대입하여

정량한다. 단, 이때 우루시올 함량은 우루시올 I,II,III,V, 라콜의 합으로 한다.

1) 계산

$$\text{우루시올의 함량}(\mu\text{g/kg}) = C \times D$$

C: 검량선에서 구한 우루시올의 함량($\mu\text{g/kg}$)
D: 회석배수

9.14 테트라하이드로칸나비놀(8-9-Tetrahydrocannabinol) 및 칸나비디올(Cannabidiol) 시험법

가. 시험법 적용범위

대마씨앗, 대마씨유에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 메탄올로 추출하고 여과하여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준원액: CBD(Cannabidiol), THC((-)8-9-Tetrahydrocannabinol) 표준품을 각각 메탄올에 녹여 100 mg/L가 되게 한다.
- 3) 표준용액: 표준원액을 무처리 시료 추출물을 이용하여 적당한 농도로 혼합, 희석한다(무처리 시료 추출물 90% 이상 포함).
- 4) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

검체를 균질화한 후 1 g에 메탄올 20 mL을 가하여 10분간 진탕한 후 10분간 초음파 추출한다. 이를 4°C, 4,000 ×g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 μm)로 여과한 후 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

가) 컬럼: C₁₈계 컬럼 또는 이와 동등한 것

나) 이동상

- (1) 이동상 A: 0.1%(v/v) 포름산(formic acid) 함유한 물
- (2) 이동상 B: 0.1%(v/v) 포름산(formic acid) 함유한 아세트니트릴

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	70	30
0.5	70	30
2.5	30	70
10	30	70
10.1	70	30
11.0	70	30

다) 이동상 유량: 0.4 mL/분

라) 컬럼 온도: 40°C

마) 주입량: 5 μL

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: ESI(Positive ion mode)

나) 분자량 범위: 100 ~ 500 m/z

표1. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

분석성분 (Compound)	평균 분자량 (MW)	관측질량 (Exact mass)	선구이온 (Precursor ion, [M+H] ⁺ , m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
칸나비디올 (Cannabidiol)	314.5	314.20	315	193.1 ¹⁾ 259.2	23 20
테트라하이드로칸나비놀 (Tetrahydrocannabinol)	314.5	314.22	315	193.1 ¹⁾ 259.3	25 14

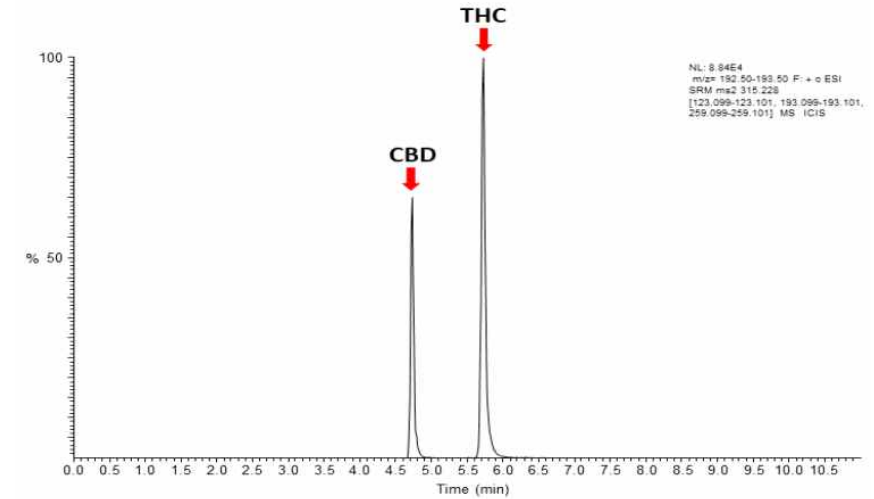
¹⁾정량이온

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

3) 검량선 작성

표준용액을 농도별로 일정량 취하여 액체크로마토그래프-질량분석기에 각각 주입하여 얻은 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

4) 표준품 크로마토그램



CBD(4.7분), THC(5.7분)

그림1. 표준품의 크로마토그램 예시.

5) 정량한계: 0.1 mg/kg

사. 정량시험

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

9.15 포뮬신 A(Phomopsin A) 시험법

가. 시험법 적용범위

루핀콩 및 루핀 가공품에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질을 아세트니트릴:정제수:초산(80:19:1, v/v/v)용액으로 추출하고 원심 분리 한 후 상층액을 증류수로 희석한 다음 막여과지로 여과한 여액을 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 측정기기

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)

라. 시약 및 시액

- 1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 용량플라스크에 표준품을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 500 mg/L가 되게 한다. 조제된 표준원액은 냉동 보관한다.
- 4) 표준용액: 표준원액을 메탄올에 희석하여 적당한 농도가 되게 한다.
- 5) 추출 용액: 아세트니트릴 80 mL, 증류수 19 mL, 초산 1 mL을 넣고 혼합하여 추출 용액으로 사용한다.
- 6) 5 mM 포름산암모늄(ammonium formate) 용액: 1,000 mL 용량플라스크에 포름산암모늄(ammonium formate) 315.3 mg을 넣고 정제수로 표시선까지 채운다.
- 7) 5 mM 포름산암모늄(ammonium formate) 95% 메탄올 용액: 포름산암모늄(ammonium formate) 315.3 mg을 넣고 메탄올 950 mL, 정제수 50 mL을 혼합하여 사용한다.

마. 시험용액의 조제

균질화한 검체 5 g을 50 mL 원심분리관에 취한다. 추출용액(아세트니트릴:증류수:초산(80:19:1, v/v/v)) 20 mL을 가하여 60분간 진탕한 후, 상온에서 3,500 ×g로 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 증류수와 1:1(v/v) 비율로 희석한다. 막여과지(PTFE filter 0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 분석조건

- 가) 컬럼: C₁₈계 컬럼(3 mm x 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상

- (1) 이동상 A: 5 mM 포름산암모늄(ammonium formate) 수용액
- (2) 이동상 B: 5 mM 포름산암모늄(ammonium formate) 95% 메탄올 용액

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	90	10
1	90	10
9	0	100
11	0	100
11.1	90	10
15	90	10

다) 이동상 유량: 0.4 mL/분

라) 컬럼 온도: 35℃

마) 주입량: 10 μL

2) 질량분석기 조건

가) 이온화 방법: ESI(Positive ion mode)

나) Collision gas: N₂(질소) 또는 이와 동등한 것

표 1. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

분석성분 (Compound)	분자량 (M.W.)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
포뮬신 A (Phomopsin A)	789.236	789.2	323.1 ¹⁾	35
			226.1	47

¹⁾ 정량이온

※ 각 생성이온(Product ion)에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 생성이온도 적용이 가능함

3) 표준품 크로마토그램

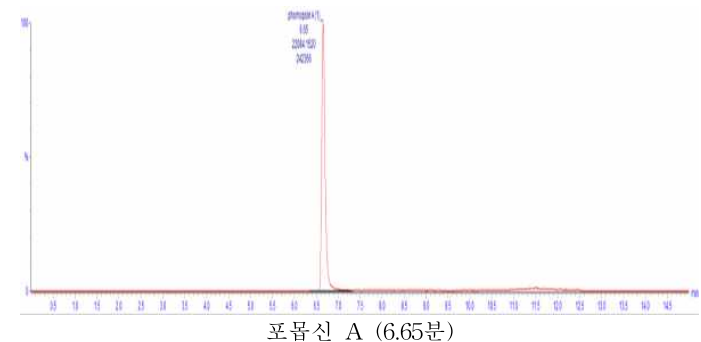


그림 1. 포뮬신 A 표준품(5 ug/L)의 크로마토그램 예시.

4) 정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(precursor ion) 및 생성이온

(product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온간 반응세기의 비율(response ratio)을 비교하여 그 비율이 ± 20~30% 이내에서 일치하여야 한다.

※ 생성이온간 반응세기의 비율 허용 범위

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

5) 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 음성검체(blank sample)에 표준용액을 일정농도로 제조한 후 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시험용액의 크로마토그램으로부터 정량이온(quantitative ion)의 각 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 각각 정량한다.

9.16 루핀알칼로이드 시험법(Lupinine, 13-hydroxylupanine, Lupanine, Sparteine, Angustifoline)

가. 시험법 적용범위

루핀콩 및 루핀 가공품에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중 분석대상물질에 메탄올/물/초산(80:19:1, v/v/v)용액을 첨가한 후 초음파를 사용하여 추출하고 원심분리 한 후 상층액을 막여과지로 여과한 여액을 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 측정기기

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 정제수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 루피닌(Lupinine), 루파닌(Lupanine), 13-하이드록시루파닌(13-hydroxylupanine), 스파테인(Sparteine), 안구스티폴린(Angustifoline)을 각각 정밀히 달아 메탄올에 녹여 1,250 mg/L가 되도록 하며, 조제된 표준원액은 냉동 보관한다.
- 4) 혼합표준용액: 각 표준원액을 메탄올에 희석하여 적당한 농도가 되게 한다.
- 5) 추출 용매: 메탄올, 물, 초산을 각각 80:19:1의 부피 비율로 혼합하여 시료 추출 용액으로 사용한다.
- 6) 0.1% HFBA(heptafluorobutyric acid) 용액: 1,000 mL 용량플라스크에 HFBA 1mL을 넣고 물로 표시선까지 채운다.
- 7) 0.1% HFBA 메탄올용액: 1,000 mL 용량플라스크에 HFBA 1mL을 넣고 메탄올로 표시선까지 채운다.

마. 시험용액의 조제

균질화한 검체 0.5 g을 취한다. 추출용매(메탄올/물/초산(80:19:1, v/v/v)) 50 mL를 가하여 120분간 초음파 추출을 한 후 상온에서 3,500 G로 20분간 원심분리한다. 상층액을 취한 후 추출용매로 5배 희석한 후 막여과지(RC filter 0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조각

1) 액체크로마토그래프 조건

가) 칼럼: C₁₈ (2.1 mm x 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상

- (1) 이동상 A: 0.1% HFBA 용액
- (2) 이동상 B: 0.1% HFBA 메탄올용액

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	95	5
0.5	95	5
4.0	0	100
4.5	0	100
5.0	95	5
10.0	95	5

다) 이동상 유량: 0.5 mL/분

라) 칼럼온도: 35℃

마) 주입량: 5 μL

2) 질량분석기 조건

가) Ionization: ESI (Positive ion mode)

나) Collision gas: N₂(질소) 또는 이와 동등한 것

다) Ion source temperature: 500 ℃

라) Ion source voltage: 5.5 kV

마) Curtain gas: 25 psi

바) Collision gas: 8 psi

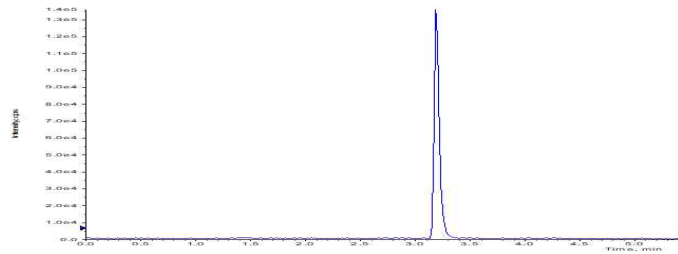
표 1. 액체크로마토그래프-질량분석기 분석을 위한 특성이온

분석성분 (Compound)	분자량 (M.W.)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
루피닌 (Lupinine)	169.268	170.20	124.0 ¹⁾	24
			136.0	28
13-하이드록시루파닌 (13-hydroxylupanine)	264.369	265.30	152.0 ¹⁾	26
			69.9	36
루파닌 (Lupanine)	248.370	249.25	136.0 ¹⁾	25
			69.9	35
안구스티폴린 (Angustifoline)	234.343	235.20	193.0 ¹⁾	18
			112.0	28
스파테인 (Sparteine)	234.387	235.20	134.0 ¹⁾	27
			97.9	33

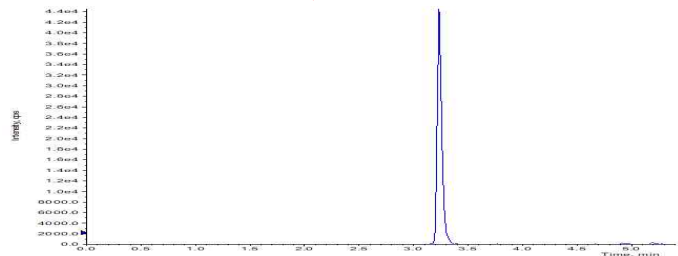
¹⁾ 정량이온

※ 각 생성이온(Product ion)에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이온 이외의 생성이온도 적용이 가능함.

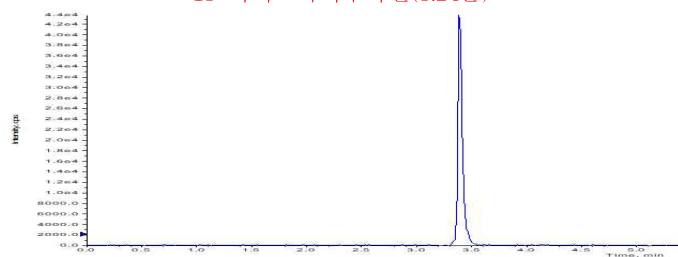
3) 표준품 크로마토그램



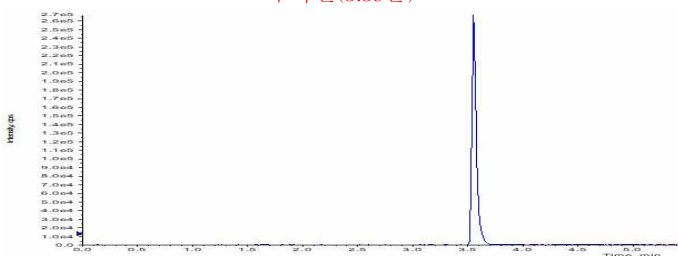
루피닌(3.19분)



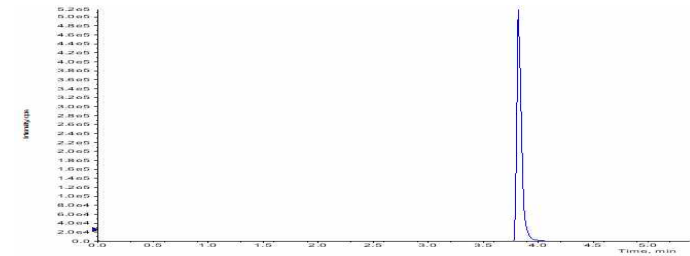
13-하이드록시루파닌(3.24분)



루파닌(3.39분)



안구스티폴린(3.55분)



스파테인(3.82분)

그림 1. 루피닌, 13-하이드록시루파닌, 루파닌, 안구스티폴린, 스파테인 표준품(각 100 µg/L)의 크로마토그램 예시.

4) 정성 및 정량시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(precursor ion) 및 생성이온(product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온간 반응세기의 비율(response ratio)을 비교하여 그 비율이 $\pm 20\sim 30\%$ 이내에서 일치하여야 한다.

※ 생성이온간 반응세기의 비율 허용 범위

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