5.3.29 스펙티노마이신(Spectinomycin)

1) 시험법 적용범위

축산물에 적용한다.

2) 정량법의 원리

검체 중 스펙티노마이신을 아세토니트릴 추출하고 SPE 카트리지로 정제하여 액체크로마토그래프/질량분석기로 분석한다.

3) 장치

액체크로마토그래프/질량분석기

4) 시약 및 시액

가) 용매 : 액체크로마토그래피용 및 이와 동등한 것

나) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것

다) 표준원액 : 스펙티노마이신 표준품을 정밀히 달아 20 mM HFBA에 녹여 1,000 mg/L가 되게 한다.

라) 표준용액 : 표준원액을 20 mM HFBA으로 적당한 농도로 희석한다.

마) 20 mM HFBA : 3차 증류수(또는 이와 동등한 것)에 HFBA 표준품 2.14 mL 첨가한 후, 최종 500 mL가 되도록 3차 증류수로 채운다(참고-HFBA 분자량: 214.04 g/mol).

바) 30% NaOH : NaOH 30 g에 3차 증류수(또는 이와 동등한 것)를 가해 최종 100 mL가 되도록 한다.

사) 5% TCA : 3차 증류수(또는 이와 동등한 것)에 TCA 25g 첨가 한 후, 최종 500 mL가 되도록 3차 증류수로 채운다.

아) HLB(Hydrophilic lipophilic balance) 카트리지 (6 cc, 200 mg,) 또는 이와 동등한 것

자) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

5) 시험용액의 조제

균질기로 균질화한 시료 5 g을 원심분리관에 취하고 5% TCA 20 mL를 가하여 진탕혼합기로 20분간 흔들어 추출한다. 원심분리기로 7℃에서 12,000 G으로 10분간 원심분리 후 상층액을 취한 다음 여과지를 이용하여 여과한 후 30% NaOH로 pH 8.5로 조정하여 추출액으로 한다. 미리 메탄올 6 mL와 20 mM HFBA 6 mL로 활성화시킨 HLB 카트리지에 추출액을 흡착시키고 5분간 진공 감압하여 건조한 후 아세토니트릴 : 20 mM HFBA(4 : 1, v/v) 12 mL로 용출하여 40℃에서 질소로 0.3 mL까지 농축시킨 후 1 mL 까지 20 mM HFBA로 조정한다. 이 시료용액을 멤브레인 필터로 여과한 후 2 mL 갈색 바이알에 옮겨 분석 전까지 -4℃이하의 냉장고에 보관하고, 이를 시험용액으로 한다.

6) 시험조작

가) 액체크로마토그래프 측정조건

(1) 칼럼 : C_{18}(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm) 또는 이와 동등한 것

(2) 칼럼온도 : 25 ℃

(3) 이동상

(가) 이동상 A : 20 mM HFBA 용액

(나) 이동상 B : 아세토니트릴

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	90	10
2.0	15	85
10.0	15	85
10.1	90	10
20.0	90	10

(4) 유속 : 0.3 mL/min

(5) 주입량 : 10 μL

나) 질량분석기 측정조건

(1) Ionization : ESI(positive)

(2) Capillary temperature : 350℃

(3) Collision energy : 23 eV

다) 표준품 크로마토그램

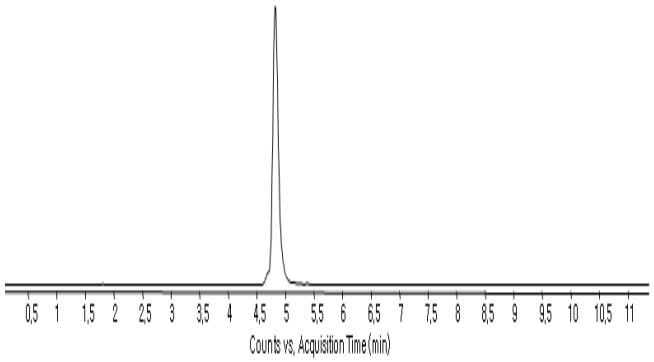


그림 1. 스펙티노마이신(4.9분)의 크로마토그램

7) 정량시험

가) 시험용액 및 표준용액을 각각 질량분석기에 주입하여 아래표의 특이이온을 확인한다. 이후, 각각에서 얻은 크로마토그램으로부터 머무름시간을 비교하고, m/z 207 이온의 면적으로 검량선을 작성하여 시험용액 중 스펙티노마이신의 함량을 구한다.

물질	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)
스펙티노마이신	351	333, 98, 207

나) 정량한계

소 : 0.05 mg/kg, 돼지 : 0.04 mg/kg,

닭 : 0.1 mg/kg, 유 : 0.06 mg/kg, 알 : 0.02 mg/kg