5.3.89 겐타마이신(Gentamicin), 네오마이신(Neomycin)

1) 시험법 적용범위

수산물에 적용한다.

2) 분석원리

검체 중 겐타마이신 및 네오마이신을 인산완충용액으로 추출하고 HLB 카트리지 및 약양이온교환 카트리지로 정제하여 액체크로마토그래프/질량분석기로 분석한다.

3) 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC/MS)를 사용한다.

4) 시약 및 시액

가) 용매 : 액체크로마토그래피용 또는 이와 동등한 것

나) 물 : 3차 증류수

다) 표준원액 : 겐타마이신 및 네오마이신 표준품을 각각 정밀히 달아 표준품 희석용매에 녹여 100 mg/L로 한다.

라) 표준용액 : 표준원액을 표준품 희석용매로 희석하여 겐타마이신은 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/L, 네오마이신은 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 및 1.0 mg/L가 되게 한다.

마) 표준품 희석용매 : 100 mL 아세토니트릴과 10 ml 초산을 넣고 물에 녹여 500 mL가 되게 한다.

바) 5 mM 헵타플로오로뷰티린산(HFBA) 용액: 헵타플로오로뷰티린산(HFBA) 0.65 mL를 물에 녹여 1,000 mL가 되게 한다.

사) 10 mM 인산완충용액(0.4 mM EDTA와 2% 삼염화초산 함유) : 2 L 매스플라스크에 제일인산칼륨(KH_2PO_4) 2.72 g를 넣고 물 1.9 L로 녹인 후 1 N 염산으로 pH 4.0을 맞춘다. 여기에 EDTA-나트륨 이수화물(Na_2EDTA dihydrate) 0.3 g과 삼염화초산(trichloroacetic acid) 40 g을 넣고 용해시킨 후 물로 표시선까지 채운다.

아) 용출용액: 삼염화초산 4.1 g을 넣고 물 100 mL로 녹인 후 아세토니트릴 50 mL를 첨가하고 물로 250 mL가 되게 한다.

자) HLB(Hydrophilic Lipophilic Balance) 카트리지 : divinylbenzene-co-N-vinyl-pyrrolidone 고정상이 충진되어 있는 일회용 카트리지(200 mg, 6 mL)를 사용한다.

차) 약양이온교환(Weak Cation Exchange) 카트리지 : 약양이온교환수지 고정상이 충진되어 있는 일회용 카트리지(150 mg, 6 mL)를 사용한다.

카) 기타시약 : 특급

5) 시험용액의 조제

분쇄한 검체 2 g을 폴리프로필렌(Polypropylene)재질의 원심분리관에 취하고 10 mM 인산완충용액 10 mL를 가하여 1분 동안 균질화한 다음 초음파로 10분간 추출한다. 진탕기를 이용하여 10분간 격렬하게 진탕한 다음 1,200 *G*에서 10분간 원심분리 한다. 상층액을 원심분리관에 옮긴 다음 남은 잔여물에 10 mM 인산완충용액 10 mL를 가하여 교반기로 섞고, 진탕기를 이용하여 10분간 격렬하게 진탕한 다음 1,200 *G*에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 합한다. 30% 수산화나트륨을 약 0.2 mL를 가하여 pH 7.5~8.0으로 맞추어 추출액으로 한다.

메탄올 5 mL와 물 5 mL로 각각 HLB 카트리지와 약양이온교환 카트리지를 활성화한다. HLB 카트리지와 약양이온교환 카트리지를 연속으로 연결하여 추출액을 1~3

mL/min의 속도로 흡착시키고 물 5 mL를 넣어 같은 유속으로 세척한다. 수분을 제거하기 위해 5분 이상 공기를 통과시켜 건조한다. 용출용액 4 mL를 1~3 mL/min의 속도로 용출시켜 0.45 μm 멤브레인필터로 여과하여 시험액을 폴리프로필렌(Polypropylene) 재질의 바이알에 담아 시험용액으로 한다.

6) 시험조작

가) 액체크로마토그래프 측정조건

(1) 칼럼 : C_{18}(2.1 × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것

(2) 이동상

・이동상 A : 5 mM 헵타플로오로뷰티린산(HFBA) 용액

・이동상 B : 아세토니트릴

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	90	10
15.0	60	40
25.0	60	40
30.0	90	10

(3) 유속 : 0.2 mL/min

(4) 주입량 : 10 μL

나) 질량분석기 측정조건

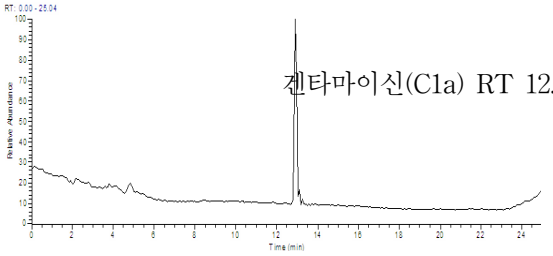
(1) Inoization : ESI(Positive)

(2) Capillary temperature : 200℃

(3) 특이이온 및 Spray voltage

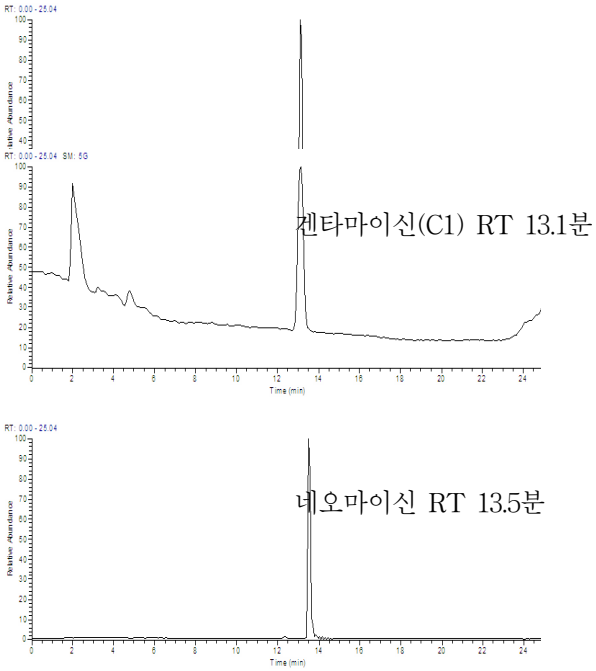
물 질	SIM ion(m/z)	Spray voltage(KV)
겐타마이신(C1a)	450	4.5
겐타마이신(C2, C2a)	464	4.5
겐타마이신(C1)	478	4.5
네오마이신	308	4.5

다) 표준품의 크로마토그램



겐타마이신(C1a) RT 12.9분

겐타마이신(C2, C2a) RT 13.0분



7) 정량시험

가) 표준용액과 시험용액을 각각 질량분석기에 주입하여 특이이온을 확인한다. 이후, 각각에서 얻은 크로마토그램으로부터 머무름시간을 비교하고, 표준용액의 피크의 면적으로 검량선을 작성하여 시험용액중 겐타마이신 및 네오마이신의 함량을 구한다.

나) 정량한계

(1) 겐타마이신 정량한계 : 0.04 mg/kg

(2) 네오마이신 정량한계 : 0.003 mg/kg