

[별표 25] <신설 2014.12.8., 개정 2015.8.21., 개정 2016.7.1., 개정 2017.4.1., 개정 2019.10.24., 개정 2021.12.29., 개정 2022.3.11., 2023.10.04>

사료표준분석방법(제13조 관련)

사료표준 분석방법(안)

2022. 8.

목 차

1장. 일반성분	1
1.1. 수분(Moisture)	1
1.2. 조단백질(Crude protein)	3
1.3. 조섬유(Crude fiber)	6
1.4. 조지방(Crude fat, ether extract)	8
1.5. 조회분(Crude ash)	9
1.6. 가용무질소물(Nitrogen free extract)	9
2장. 세포막구성물질(Cell wall constituents)	10
2.1. NDF(Neutral detergent fiber)	10
2.2. ADF(Acid detergent fiber)	10
3장. 아미노산(Amino acid)	12
3.1. 역상크로마토그래피법(PITC 유도체화법)	12
3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법)	13
3.3. MHA(Methionine Hydroxy Analogue)의 정량법	15
3.4. 타우린 분석법	16
4장. 무기물(Minerals)	19
4.1. 칼슘(Ca)	19
4.2. 인(P)	20
4.3. 유황(S)	20
4.4. 마그네슘(Mg)	21
4.5. 칼륨(K)	22
4.6. 철(Fe)	22
4.7. 나트륨(Na)	23
4.8. 염분(NaCl)	23
4.9. 염소(Cl)	25
4.10. 망간(Mn)	25
4.11. 아연(Zn)	26
4.12. 구리(Cu)	27
4.13. 코발트(Co)	27
4.14. 몰리브덴(Mo)	28
4.15. 요오드(I)	29
4.16. 산화알루미늄(Al_2O_3)	29
4.17. 셀레늄(Se)	30
4.18. 규산(이산화규소- SiO_2), 규소	31
4.19. ICP 발광분광분석법	33
5장. 중금속	35
5.1. 크롬(Cr)	35

5.2. 불소(F)	35
5.3. 비소(As)	36
5.4. 납(Pb)	37
5.5. 수은(Hg)	38
5.6. 카드뮴(Cd)	38
5.7. 주석(Sn)	38

6장. 비타민 40

6.1. 비타민 A	40
6.2. 프로비타민 A(β -카로틴)	41
6.3. 비타민 B ₁ (Thiochrome 형광법)	42
6.4. 비타민 B ₂	44
6.5. 비타민 B ₆	45
6.6. 비타민 B ₁₂	45
6.7. 비타민 C	46
6.8. 비타민 D	47
6.9. 비타민 E	49
6.10. 비타민 K	50
6.11. 비타민 K ₃ (Menadione)	52
6.12. 비타민 K 화합물(MSB: Menadione Sodium Bisulfite)	52
6.13. 판토텐산	53
6.14. 이노시톨	54
6.15. 엽화콜린	55
6.16. 나이아신(니코틴산 및 니코틴아미드)	56
6.17. 비오틴	57
6.18. 엽산	58
6.19. L-카르니틴	59
6.20. 주석산수소콜린	60
6.21. 수용성 비타민 동시분석법	62
6.22. 비타민 K ₄	62

7장. 곰팡이독소 64

7.1. 아플라톡신 (Aflatoxin B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	64
7.2. 제랄레놀과 제랄레논(Zearalenol, Zearalenone)	66
7.3. 오크라톡신 A (Ochratoxin A)	66
7.4. 푸사리움 곰팡이독소 (Fusarium Mycotoxins)	68
7.5. 푸모니신 (Fumonisin B ₁ , B ₂)	70
7.6. 아플라톡신과 오크라톡신(AO) 동시분석법	71
7.7. 아플라톡신, 오크라톡신, 제랄레논(AOZ) 동시분석법	72
7.8. 아플라톡신(B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂), 오크라톡신 A, 데옥시니발레놀, 푸모니신(B ₁ , B ₂), T-2 독소, HT-2 독소, 제랄레논 동시분석방법	73

8장. 유해미생물 77

8.1. 살모넬라(Salmonella)	77
9장. 잔류농약	81
9.1. 유기인계 및 유기염소계 다성분 분석	81
9.2. 유기인계(Organophosphorus)	83
9.2.1. 다이아지논(Diazinon)	83
9.2.2. 파라치온(Parathion)	84
9.2.3. 페다트로치온(Fenitrothion)	85
9.2.4. 펜토에이트(Phenthoate)	86
9.2.5. 펜치온(Fenthion)	88
9.2.6. 말라치온(Malathion)	89
9.2.7. 클로르피리포스메틸(Chlorpyrifos-methyl)	90
9.2.8. 피리미포스메틸(Pirimiphos-methyl)	91
9.2.9. 디클로르보스(Dichlorvos)	93
9.3. 유기염소계(Organochlorine)	94
9.3.1. 비에치씨(BHC)	94
9.3.2. 디디티(DDT)	95
9.3.3. 알드린(Aldrin)	96
9.3.4. 디엘드린(Dieldrin)	97
9.3.5. 엔드린(Endrin)	98
9.3.6. 헵타크롤(Heptachlor)	99
9.3.7. 헵타크롤에폭사이드(Heptachlor Epoxide)	100
9.4. 카바메이트계(Carbamate)	102
9.4.1. 카바릴(Carbaryl)	102
9.5. 유기인계, 유기염소계 및 카바메이트계 다성분 분석법	103
9.6. 다중농약 다성분 분석법 (Multi class pesticide multiresidue methods)	104
9.7. 기타	126
9.7.1. 에틸렌디브로마이드(EDB)	126
9.7.2. 치아벤다졸(Thiabendazole)	127
9.7.3. 프로피코나졸(Propiconazole)	128
9.7.4. 에토펜프록스(Etofenprox)	129
9.7.5. 포레이트(Phorate)	130
9.7.6. 피레트린 등 8종(2,4-D, bentazone, dicamba, MCPA, phosmet, pyrethrins I, pyrethrins II, cinerins I, cinerins II, jasmolins I, jasmolins II, prothioconazole, spinosyn A, spinosyn D) 다성분 분석법	131
9.7.7. 글리포세이트(Glyphosate), 설펜포세이트(Sulfosate)	135
9.7.8. 다이콧(Diquat), 패러콧(Paraquat)	137
9.7.9. 디티오카바메이트계 농약(Dithiocarbamates)	139
9.7.10. 캡탄(Captan)	141
9.7.11. 아미노피랄리드(Aminopyralid)	144
9.7.12. 벤설택(Bensultap), 카탐(Cartap), 티오사이클람(Thiocyclam)	146
10장. 동물용의약품	149
10.1. 정성분석	149

10.2. 정량분석	150
10.2.1. 베타-락탐계열	150
10.2.2. 테트라싸이클린 계열	151
10.2.3. 설펜아미드계(Sulfonamides)	152
10.2.3.1. 설파메타진(Sulfamethazine), 설파디메톡신(Sulfadimethoxine), 설파퀴녹사린(Sulfaquinoxaline)	152
10.2.3.2. 설파치아졸(Sulfathazole)	153
10.2.4. 설펜아미드계(Sulfonamides), 니트로퓨란계(Nitrofuranes), 에토파베이트(Ethopabate) 동시분석	153
10.2.4.1. 설펜아미드계(Sulfonamides) : 설파메라진(Sulfamerazine), 설파메타진(Sulfamethazine), 설파치아졸(Sulfathiazole), 설파퀴녹살린(Sulfaquinoxaline), 설파디메톡신(Sulfadimethoxine), 설파다리아진(Sulfadiazine), 니트로퓨란(Nitrofuranes) : 퓨라졸리돈(Furazolidone), 나이카바진(Nicarbazine)	153
10.2.5. 마크로라이드 계열	154
10.2.5.1. 에리스로마이신(Erythromycin), 스피라마이신(Spiramycin)	154
10.2.6. 폴리테트라세린 계열	155
10.2.6.1. 라살로시드 나트륨	155
10.2.6.2. 나라신, 살리노마이신, 모넨신나트륨, 샘두라마이신	156
10.2.7. 기타	156
10.2.7.1. 카바독스(Carbadox)	156
10.2.7.2. 암프로리움 (Amprolium)	157
10.2.7.3. 오라퀸독스(Olaquinox)	159
10.2.7.4. 크로피돌(Clopidol)	160
10.2.7.5. 데코퀴네이트(Decoquinat)	161
10.2.7.6. 염산로베니딘(Robenidine)	162
10.2.7.7. 구연산모란텔(Morantelcitrate)	163
10.2.7.8. 할로푸지논 (Halofuginone)	164
10.2.7.9. 조렌(Zoalene), 디니톨마이드(Dinitolmide)	166
10.2.7.10. 오르메토프림(Ormethoprim)	167
10.3. 미생물평판법	167
10.3.1. 아연바시트라신(Bacitracin-Zinc)	167
10.3.2. 황산콜리스틴(Colistin-sulfate)	168
10.3.3. 버지니아 마이신(Virginiamycin)	169
10.3.4. 타이로신(Tylosin)	170
10.3.5. 스피라마이신(Spiramycin)	170
10.3.6. 살리노마이신 나트륨(Salinomycin)	171
10.3.7. 모넨신나트륨(Monensin-Na)	173
10.3.8. 라살로시드나트륨(Lasalocid-Na)	174
10.3.9. 하이그로마이신 B (Hygromycin-B)	175
10.3.10. 데스토마이신 A(Destomycin-A)	177
10.4. 펜벤다졸(Fenbendazole)	178
10.5. 디클라주릴(Diclazuril)	179
10.6. 말라카이트 그린(Malachite Green)	180
10.7. 마두라마이신(Maduramycin)	181
10.8. 설펜아미드계 다성분 분석	183

11장. 생균제(Probiotics)	184
제12장 효소제	187
12.1. α -아밀라아제(전분호정화력)	187
12.1.1. α -아밀라아제(전분호정화력 제1법)	187
12.1.2. α -아밀라아제(전분호정화력 제2법)	188
12.2. 말토게닉아밀라아제	189
12.3. β -아밀라아제(전분당화력시험법)	190
12.4. 셀룰라아제(섬유당화력 시험법)	190
12.4.1. 섬유당화력 시험법 제1법	190
12.4.2. 섬유당화력 시험법 제2법	191
12.5. β -글루카나아제	192
12.6. 글루코아밀라아제(아밀로글루코시다아제)	193
12.7. 헤미셀룰라아제	197
12.8. 펙티나아제(pectinase)	199
12.9. 락타아제[젖당화력(lactase) 시험법]	199
12.10. 키시라나제(키시란당화력)	200
12.11. 키토사나아제	201
12.12. 리파아제(지방소화력)	202
12.13. 피타아제(피틴산분해력)	202
12.14. 산성프로테아제	203
12.15. 중성프로테아제 [단백질소화력(protease) 시험법]	204
12.16. 식물성프로테아제	205
12.17. 브로멜라인	206
12.18. 알칼리성프로테아제	207
13장 향미제	209
13.1. 사카린나트륨	209
13.2. 사카린나트륨 및 아스파탐 동시분석법	210
13.3. 소르비톨, 자일리톨	212
13.4. 멘톨	212
13.5. 과당, 설탕, 포도당, 맥아당	213
13.6. 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘(Neohesperidine Dihydrochalcone)	214
13.7. 감초추출물(글리시리진산)	214
13.8. 원당(자당)	215
13.9. L-글루타민산나트륨	216
13.10. 향미제 동시분석법	216
13.11. 소르비톨	218
13.13. 스테비올배당체	220
13.14. 5'-이노신산이나트륨	221
14장. 보존제	223
14.1. 유기산 다성분 분석법	223
14.2. 소르빈산, 안식향산과 그 염류 정량	223

14.3. 프로피온산 및 그 염류의 정량	227
14.4. 에톡시킨(Ethoxyquin)	229
14.5. 부틸히드록시아니졸(BHA), 디부틸히드록시톨루엔(BHT) 및 몰식자산프로필(PG)	230
14.6. 케르세틴	232
14.7. 레스베라트롤	232
14.8. 몰식자산 및 몰식자산프로필 동시분석법	233
14.9. 인산(H_3PO_4)	234
15장. 사료중 동물성 유래 단백질 혼입검사법	235
15.1. 현미경 검사법	235
15.2. ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) : 효소면역측정검사법	233
15.3. PCR(Polymerase Chain Reaction) : 중합효소연쇄반응검사법	237
15.4. Multiplex PCR, Multiplex real-time PCR : 다중중합효소연쇄반응검사법	241
16장. 올리고당	247
16.1. 갈락토올리고당	247
16.2. 프락토올리고당	248
16.3. 이소말토올리고당	249
16.4. 키토올리고당	252
16.5. 말토올리고당	254
16.6. 자일로올리고당	255
16.7. 겐티오올리고당	256
17장. 유화제	258
17.1. 프로피렌글리콜(Propylene glycol)	258
18장. 완충제	259
18.1. 탄산나트륨(소다회)	259
18.2. 탄산수소나트륨(중조)	259
18.3. 산화마그네슘	259
19장. 착색제	260
19.1. 천연착색제(카로틴, 크산토피 및 카로티노이드)	260
19.2. 아스타키산틴(Astaxanthin)	261
19.3. 칸타산틴(Canthaxanthin)	262
19.4. 아포카로텐산 에스테르(Apocarotenoic Ester)	262
20장. 추출제	263
20.1. 키토산(충글루코사민으로서)	263
20.2. 세포벽추출물(글루칸 혹은 베타글루칸)	263
20.3. 포도종자추출물(프로안토시아닌)	264
20.4. 천연비타민	265
21장. 기타성분	267
21.1. 염기성치환용량(Cation Exchange Capacity)	267
21.2. 요소	267

21.3. 휘발성 염기태질소	268
21.4. 염산불용물질(토사)	269
21.5. 유사단미사료 혼입여부 판정방법	269
21.6. 펩신(Pepsin)소화율	269
21.7. 전분	269
21.8. 열량(Calorie)	272
21.9. 협잡물(이물질시험법)	272
21.10. 산가	272
21.11. 우레아제 역가(Urease Activity)	273
21.12. HCN(청산)	274
21.13. 유리고시폴(Free Gossypol)	275
21.14. 멜라민	276
21.15. 요오드가	280
21.16. 팽윤도	281
21.17. 브릭스(Brix)	282
21.18. 비테인염산염(베타인염산염)	282
21.19. 불용성불순물	283
21.20. 총당(Total sugar)	284
21.21. KOH용해도	285
21.22. 이물 시험법	286
 22장. 동시다성분	 289
22.1. 잔류농약, 동물용의약품, 곰팡이독소 동시 다성분 분석법	289

1장. 일반성분

1.1. 수분(Moisture)

가. 가열 감량법

1) 기구

건조기(drying oven), 데시케이터(desiccator), 알루미늄 칭량병(crucible), 저울 (balance)

2) 가루상태의 시료

미리 건조하여 항량을 구한 알루미늄제 칭량병에 시료 2~5 g을 정확히 칭량하여 항온건조기로 135±2℃로 정확히 2시간 또는 105~110℃에서 항량이 될 때까지 건조시켜 데시케이터내에서 30분간 방냉한 다음 무게를 달아 감량을 수분함량으로 한다. 단, 요소제는 75℃에서 4시간 건조한다. (어즙 흡착사료, 당 흡착사료, 글루텐피드는 105±2℃에서 3시간 건조)(다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다).

$$\text{수분(\%)} = \frac{\text{건조전 중량(칭량병+시료)} - \text{건조후 중량(칭량병+시료)}}{\text{시료중량}} \times 100$$

3) 수분이 높은 시료

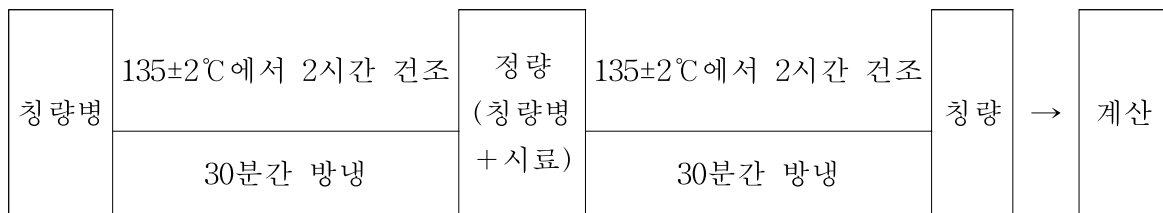
미리 항량으로 한 대형 칭량병에 일정량의 시료를 달아 60~80℃의 건조기내에서 48시간 예비 건조한 다음 실험실내 상온에서 24시간 방치하여 원물(풍건물)의 수분함량을 구한 후 분쇄하여 다시 이 분쇄된 시료를 상기 2) 가루상태의 시료와 동일한 방법으로 수분을 정량한 후 다음방식에 따라 수분함량을 구한다.

$$W = W1 + \frac{(100 - W1) \times W2}{100}$$

W : 원물의 수분함량(%)

W1 : 예비건조시의 감량(%)

W2 : 풍건물 공시품의 수분함량(%)



나. 증류법(톨루엔 증류법)

휘발성 성분이나 지질이 많고 수분이 많아서 건조하면 피막이 생기는 시료에 대한 수분 정량법이다.

1) 기구 및 시약

증류식 수분측정장치, 톨루엔, 해사(건조된 것)

2) 시약조제

톨루엔 또는 톨루엔과 자일렌 혼합액(2:1) 일반품도 사용가능 하나 물을 함유하지 않아야 하며 미리 무수황산나트륨 소량과 혼합, 진탕하여 탈수시켜 놓는다.

3) 장치

증류식 수분 정량장치(A.O.A.C.형)

4) 방법

일정량의 시료(수분량이 3~4 mL 정도 되게 시료를 취함)를 정확하게 달아 증류식 수분 정량장치의 증류 플라스크(세척하여 건조시킨 증류 flask)에 넣고(점성시료일 경우는 유산지나 알미늄박에 싸서 넣어도 좋음), 톨루엔을 시료가 잠길 만큼 부어주고(이때 튀는 것을 막기 위해 해사를 넣어줌), 환류냉각관과 수분측정관을 연결한다. 냉각관 상부로부터 톨루엔을 주입하여 수분측정관을 완전히 채운 다음 냉각수를 흐르게 하고 가열을 시작한다.

처음에는 1초당 2방울씩 떨어지게 하다가 4방울 정도 떨어지게 가열온도를 조절한다. 냉각된 유출액은 두 종류의 액으로 분리되며 하층의 물은 눈금관에 모이고 상층의 톨루엔은 측관에서 플라스크로 되넘어 갔다가 다시 물과 함께 유출되어 넘어온다. 물이 거의 다 유출되면 유출액은 투명하게 되는데 이 때 점적병의 스포이드를 써서 냉각관 상부에서부터 톨루엔을 부어넣어 냉각관 내벽에 묻어있는 물방울을 씻어 내린다. 물의 유출이 끝날 때까지 세정과 증류를 계속하여 15분 간격으로 물의 유출 상태를 조사하여 더 이상 눈금의 변화가 없으면 물의 유출이 끝난 것으로 간주한다. (수분이 더 이상 유출되지 않을 때 다시 톨루엔을 냉각관 상부로부터 주입하고 얼마간 더 증류한다) 가열이 끝난 뒤 냉각관 내부나 수분 측정관에 붙어있는 수분을 수분 측정관(눈금부위)으로 떨어뜨린다. 물의 유출이 끝나면 눈금관 부분이 따뜻하게 되므로 실온까지 냉각시켜 분리된 물의 양을 판독하여 아래의 공식에 의거 수분함량을 구한다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{\text{눈금관의 물의양(mL)}}{\text{시료채취량(g)}} \times 100$$

다. 칼피셔법

1) 기구

적정장치 : 자동뷰렛 2개, 적정플라스크, 교반기 및 정전압 전류적정장치로 되어 있다. 칼피셔시액은 흡수성이 매우 강하므로 장치는 외부로부터 흡수되지 않도록 만들어져야 한다. 방습제는 실리카겔 또는 염화칼슘(수분측정용)등을 사용한다.

2) 시약 및 시액

가) 칼피셔용 메탄올

메탄올 1 L에 마그네슘가루 5 g을 넣어 염화칼슘관을 붙인 환류냉각관으로 1시간 동안 환류하고 필요하면 염화제이수은 0.1 g을 넣어 반응을 촉진시킨다. 가스발생이 멈춘 다음 습기를 피하면서 메탄올을 증류하여 습기가 들어가지 않도록 보존한다. 이 액 1 mL중의 수분은 0.5 mg이하이어야 한다.

나) 칼피셔용 피리딘

피리딘에 수산화칼륨 또는 산화바륨을 넣고 마개를 꼭 막고 수일간 방치한 후, 그대로 습기를 피하면서 증류하여 습기가 들어가지 않도록 저장한다. 이 액 1 mL중의 수분은 1 mg이하이어야 한다.

다) 칼피셔시액

(1) 조제

요오드 63 g을 칼피셔용 피리딘 100 mL에 녹이고 방냉한다. 다음에 건조 아황산가스를 통하여 증가한 양이 32.3 g에 이르렀을 때 아황산가스를 통하는 것을 멈추고 칼피셔용 메탄올을 넣어 500 mL로 하고 24시간 이상 방치한 다음에 사용한다. 이 시액은 경과함에 따라 변화하므로 쓸 때마다 표정한다. 차광하여 습기를 피하고 찬 곳에 저장한다.

(2) 표정

조작법에 따라 칼피셔용 메탄올 25 mL를 적정플라스크에 취하고 미리 칼피셔시액으로 종말점까지 적정하여 플라스크안을 무수상태로 한다. 다음에 물 50 mg을 정밀히 달아 적정 플라스크에 빨리 넣고 세계 흔들어 섞으면서 칼피셔시액으로 종말점까지 적정한다.

칼피셔시액 1 mL에 해당하는 물(H₂O)의 mg수 f를 다음과 같이 구한다.

$$f = \text{물(H}_2\text{O)의 채취량/물(H}_2\text{O)의 적정에 소비된 칼피셔시액의 양(mL)}$$

라) 물 · 메탄올 표준액

(1) 조제

칼피셔용 메탄올 500 mL를 1 L의 건조된 메스플라스크에 취하여 물 2.5 mL를 넣고 칼피셔용 메탄올을 넣어 1 L로 한다. 이 표준액의 표정을 칼피셔시액의 표정이 끝난 다음 곧 한다. 이 용액은 차광하여 습기를 피하여 찬곳에 저장한다.

(2) 표정

조작법에 따라 칼피셔용 메탄올 25 mL를 건조적정 플라스크에 취하고 이것을 미리 칼피셔시액으로 종말점까지 적정하여 플라스크안을 무수상태로 한다. 다음에 칼피셔시액 10 mL를 정확하게 넣고 조제한 물·메탄올표준액으로 종말점까지 적정한다.

$$f' = f \times 10 / \text{적정에 소비된 물·메탄올표준용액의 양(mL)}$$

3) 시험조작

칼피셔시액에 의한 적정은 습기를 피해야 하며 원칙적으로 이것을 표정했을 때의 온도와 같은 온도에서 적정하여야 한다. 적정플라스크중의 용액에 2개의 백금전극을 담그고 가변저항기를 적당히 조절하여 일정한 전류(5~10마이크로암페어)를 통하여 두고 칼피셔시액을 적가하면 적정이 진행됨에 따라 회로중의 마이크로암미터의 바늘이 크게 흔들려 수초내에 다시 원위치로 돌아온다. 적정의 종말점에 이르면 마이크로암미터의 흔들림(50~150마이크로암페어)이 30초간 또는 그 이상 지속된다. 이 상태가 되었을 때를 적정의 종말점으로 한다.

그러나 역적정일 때에는 칼피셔시액이 과량으로 존재하는 경우 마이크로암미터의 바늘의 흔들림이 끊기고 종말점에 이르면 급히 원위치로 돌아온다. 마이크로암미터 대신 매직 아이(Magic eye)가 달린 전원차계를 쓸 수도 있다.

칼피셔시액에 의한 적정은 따로 규정이 없는 한 다음의 어느 방법에 따라도 무방하다. 적정의 종말점은 보통 역적정을 할 때 명확하게 판별할 수 있다.

가) 직접적정

칼피셔용 메탄올 25 mL를 건조 적정플라스크에 취하여 미리 칼피셔시액으로 종말점까지 적정하여 플라스크 안을 무수상태로 한다. 다음에 수분 10~50 mg에 해당하는 검체를 정밀하게 달아 빨리 적정플라스크에 옮겨 넣고 세게 흔들어 섞으면서 칼피셔시액으로 종말점까지 적정한다.

검체가 용매에 녹지 않을 경우에는 재빨리 가루로 하여 무게를 정밀하게 달아 신속하게 적정플라스크에 옮겨 습기를 피하면서 30분간 저온 다음 세게 흔들어 섞으면서 적정한다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{\text{검체의 적정에 소비된 칼피셔시액의 양(mL)} \times f}{\text{검체의 양(mg)}} \times 100$$

f : 시액의 역가

나) 역적정

칼피셔용 메탄올 20 mL를 건조적정플라스크에 취하여 미리 칼피셔시액으로 종말점까지 적정하여 플라스크안을 무수상태로 한다. 다음에 수분 10~50 mg에 해당하는 검체(S mg)를 정밀하게 달아 빨리 적정플라스크에 넣고 과량의 칼피셔시액 일정량(d mL)을 넣은 다음 세게 흔들어 섞으면서 물·메탄올표준액으로 종말점까지 적정한다(소비량 e mL).

검체가 용매에 녹지 않을 경우에는 재빨리 가루로 하고 무게를 정밀하게 달아 신속하게 적정플라스크에 옮겨 과량의 칼피셔시액 일정량을 넣고 습기를 피하면서 30분간 저온 다음 세게 흔들어 섞으면서 적정한다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{df - ef'}{S} \times 100$$

f, f' : 시액의 역가

1.2. 조단백질(Crude protein)

가. 켈달(Kjeldahl) 법

1) 기구

분해 및 증류장치(Kjeldahl nitrogen digestion & distillation apparatus), 켈달 플라스크(Kjeldahl flask), 메스 실린더, 삼각 플라스크, 저울, 자석 교반기, 피펫

2) 시약의 조제

가) 0.1 N 염산용액(HCl) : 농염산(비중 1.18) 8.7 mL를 1000 mL 메스플라스크에 넣고 증류수로 표선까지 채우고 혼합하여 만든다.

※ 염산농도가 35.5%, 비중 1.18 인 것으로 1N 염산을 만들려면 아래의 계산식에 의하여 소요량을 구할 수 있다

$$1N \text{ 염산용액} = \frac{36.465(\text{염산분자량}) \times 100}{35.5(\text{염산\%농도}) \times 1.18(\text{염산비중})} = 87.05 \text{ mL}/1000 \text{ mL}$$

※ 0.1 N 염산용액의 표정(標定) : 표준 탄산나트륨을 260~270℃에서 약 1시간 가열한 다음 데시케이터에서 30분간 방냉한다. 이 중에서 1.5 g을 정확히 무게를 단 다음 250 mL 메스플라스크의 표선까지 증류수를 가해 혼합한다. 이 중 25 mL(x)를 삼각플라스크에 취하여 메틸오렌지 두 방울을 가하고 0.1 N 염산용액으로 적정한다. 황색으로 변하면 담홍색이 될 때까지 일단 2~3분간 끓이고 냉각한 다음 다시 담홍색이 될 때까지 적정하여 이때 소비된 0.1 N 염산용액의 소비 mL(b)로부터 다음과 같이 0.1 N 염산용액의 factor를 구한다.

$$\text{Factor}(F) = 188.67 \times \frac{x}{b}$$

x : 25 mL 중 탄산나트륨의 무게(g)

b : 적정에 사용된 0.1 N 염산 용액 소비량(mL)

나) 분해촉진제 : 황산칼륨(Potassium sulfate) 9 g에 황산동(Copper sulfate) 1 g의 비율로 유발(乳鉢)에서 완전히 혼합한다

다) 수산화나트륨(Sodium hydroxide) 혼합액 : 수산화나트륨 500 g과 치오황산나트륨(Sodium thiosulfate) 100 g을 증류수 1000 mL에 녹인다

라) 지시약 : 브로모크레졸그린(Bromocresol green) 0.5 g과 메틸레드(Methyl red) 0.1 g을 95%이상의 에탄올(Ethanol) 300 mL에 용해하여 만든다.

마) 4% 붕산(Boric acid)용액 : 붕산 40 g을 증류수에 용해하여 1,000 mL로 만든 후 라)의 지시약 4 mL를 가하여 혼합한다.

3) 시료액의 조제(분해)

시료 0.5~1 g을 500 mL 분해 플라스크에 취하고 분해촉진제 7~8 g(10 g)을 가하여 잘 혼합한 후 H₂SO₄ 10 mL를 서서히 가해서 잘 혼합한다. 이를 처음에는 거품이 넘치지 않도록 서서히 가열하다가 거품이 나지 않으면 투명하게 될 때까지 강하게 가열하여 분해시킨다.(분해시간 50~90분)

4) 증류

300 mL 삼각플라스크에 4%붕산용액 25~75 mL(21~63% 조단백질에 해당)를 취하고 지시약 2~3 방울을 가하여 냉각기의 관 끝이 붕산용액에 잠기도록 받쳐 놓는다. 그 후 냉각된 분해액에 증류수 200 mL와 아연립(亞鉛粒) 2~3개를 넣고 수산화나트륨 혼합액 45 mL를 가한 다음 즉시 증류 장치에 연결하고 서서히 가열하여 증류하는데 분해액의 양이 약 2/3로 줄어들거나 증류액이 120~150 mL 될 때까지 증류한다.

5) 적정

증류하여 받은 액을 0.1 N-염산용액으로 적정하면 종말점(end point)부근에서 무색으로 변하며 1~2방울 더 가하여 적갈색으로 변할 때의 0.1 N 염산용액 소비 mL수를 읽는다.

6) 계산

0.1 N 염산용액 1 mL는 질소(N)0.00140067 g에 상당하므로 조단백질 함량은 다음과 같이 계산한다.

$$\text{조단백질}(\%) = 0.00140067 \times T \times F \times 6.25 \times 100/W$$

T : 0.1 N 염산용액 적정치(mL) - Blank 적정치

F : 0.1 N 염산용액의 Factor

W : 시료무게(g)

나. 자동분석법(Kjeltec Method)

1) 기구 및 시약

분해장치, 시료주입 및 증류장치, 화학천평, 자석교반기, 메스플라스크, 메스실린더, 분해병, 분해병 스탠드, 시약 분주기, 황산(시약 1급)

2) 시약의 조제

0.1 N 염산 : 농염산(비중 1.18) 87 mL를 증류수로 희석 10 L로 하고 factor를 구하였다.

* factor 구하는 방법 : 표준탄산나트륨(Sodium carbonate)을 260~270℃에서 약 1시간 동안 가열한 다음 데시케이터 내에서 30분간 방냉하여 이 중에서 1.5 g을 정확히 칭량하고 증류수로 용해 후 250 mL 메스 플라스크의 표선을 맞추고 혼합한 후 이 중 25 mL(x)를 취하여 메틸 오렌지(Methyl orange) 두 방울을 가하고 0.1 N 염산을 서서히 떨어뜨려 황색에서 담홍색이 될 때 일단 2~3분간 끓이고 냉각 후 다시 담홍색이 될 때까지 적정한다. 이 때 소비된 0.1 N 염산용액의 소비 mL(b)로부터 다음과 같이 0.1 N 염산용액의 factor를 구한다.

$$\text{Factor}(F) = 188.67 \times \frac{x}{b}$$

x : 25 mL 중 탄산나트륨의 중량(g)

b : 적정에 사용된 0.1 N HCl 용량(mL)

가) 분해촉진제 : 황산칼륨(Potassium sulfate : K_2SO_4) 10 g에 황산동(Copper sulfate : $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 1 g의 비율로 유발(乳鉢)에서 완전히 혼합하여 사용하거나 Kjeltab을 이용한다.

나) 40% 수산화나트륨용액 : 수산화나트륨(Sodium hydroxide : NaOH) 4 kg을 증류수에 녹여 10 L로 한다.

다) 1% 붕산용액 : 붕산(Boric acid : H_3BO_3) 100 g을 증류수에 용해하여 10 L로 하고 여기에 브로모크레졸 그린과 메틸레드 용액(Bromocresol green 100 mg과 Methyl red 100 mg을 각각 Methanol 100 mL에 용해) 각각 100 mL와 70 mL를 가한다.

3) 시료액의 조제(분해)

시료 0.7~1 g을 분해병에 취하고 분해촉진제 7~8 g을 가하여 잘 혼합한 황산(Sulfuric acid, H_2SO_4) 10 mL를 서서히 가해서 잘 혼합한다. 이를 처음에는 거품이 넘치지 않도록 서서히 가열하다가 거품이 나지 않으면 투명하게 될 때까지 강하게 가열하여 분해시킨다. (시료를 칭량하여 분해튜브에 넣고 여기에 분해촉진제와 농황산 12 mL를 가한 다음 미리 예열시킨 분해장치에서 가열·분해시킨다.)

4) 분석방법(기기 작동방법)

자동분석기의 작동방법에 따라 측정한다.

다. 자동분석법(Dumas method)

1) 기구 및 시약

고온 연소장치, 질소수집장치(측정장치를 갖추고 있어야 하며 기기 장치에 적합한 약세사리 및 시약), 저울

2) 시료의 준비

30 sieve체를 통과한 시료로서 뚜껑이 있는 시료병에 보관한다.

3) 방법

가) 기기의 조작법에 따라서 기기를 가동시킨다.

- 나) 연소로가 온도평형을 유지한 다음 시작하여 정상가동 여부를 확인한다. 이때 연소로의 온도는 권장 적정온도 범위(850~1050℃) 이내에 있어야 한다.
- 다) 연소로 아래 부분에는 stainless steel screen과 glass wool을 삽입한 다음 연소관을 준비한다.
- 라) 적정량의 시료를 시료용기(tin foil 또는 boat)에 취한다.
- 마) 무게를 달 때는 무게변화를 방지하기 위해 가급적 1분 이내에 완료한다.
- 바) 시료를 취한 시료 용기를 시료 주입장치를 이용하여 기기 분석을 한다.
- 사) 표준시약을 이용하여 표준곡선을 구한 다음 시료의 농도를 구한다.
- 아) 질소 함량에 단백질 환산계수를 곱하여 조단백질 함량을 구한다.

1.3. 조섬유(Crude fiber)

가. 헨네베르크 · 스토오만 개량법에 의한 정량법

1) 기구

정온건조기, 전기로(Muffle furnace), 톨비이커(tall besker, 200 mL눈금), 유리여과기(1G2), 스텐레스금망(0.044 mm), 세척병, 여과대, 진공펌프 또는 수류펌프, 데시케이터

2) 시약의 제조

가) 5% 황산액(H_2SO_4 , w/v) : 농황산(비중1.84) 27.2 mL를 증류수에 희석하여 1,000 mL로 한다.

나) 5% 수산화나트륨액(NaOH, w/v) : 수산화나트륨 50 g을 증류수에 용해하여 1,000 mL로 한다.

3) 정량법

시료 1~2 g(지방함량이 많은 것은 탈지하거나 조지방을 정량한 후 남은 찌꺼기 시료 잔사를 사용)을 500 mL 톨비이커에 취하고 5% 황산액 50 mL와 증류수 150 mL를 가하고 거품방지제 2~3방울 떨어뜨린 다음 30분간 끓인 후 스텐레스 금망(0.044 mm)으로 여과하여 잔사(殘渣)를 산성이 완전히 없어질 때까지 뜨거운 증류수로 여러 번 세척한다.

산 불용해물은 증류수 130~140 mL로 톨비이커에 씻어 넣고 5% 수산화나트륨용액 50 mL를 가한 다음 200 mL 표선까지 증류수로 채운다. 다시 30분간 끓이고 No.5A 여과지 또는 유리여과기 1G2(135℃에서 2시간 건조하여 항량을 구한 것)로 여과하는데 알칼리성이 없어질 때까지 뜨거운 증류수로 세척한 다음 다시 95% 에틸알콜로 3회, 에틸에테르로 2회 세척하고 95~100℃에서 2시간 예비 건조한 다음 135±2℃에서 2시간 건조 후 데시케이터내에서 30분간 방냉한 다음 칭량 후 5A 여과지에 사용시에는 자제크루시블(600℃ 전기로에서 2시간 태워 항량을 구한 것)에 넣고, 유리여과기의 경우 직접 전기로에 넣어 600℃에서 2시간 회화하고 40분간 데시케이터내에서 방냉한 후 무게를 측정한다. (다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다.)

4) 계산

$$\text{조섬유(\%)} = \frac{d - a}{s} \times 100$$

* d : 분해후 여과한 잔사의 건조중량(g)

a : 잔사를 회화한후 남은 회분량(g)

s : 공시료의 중량(g)

나. 자동분석법(여과포 분석법)

1) 기구

여과포(Filter Bag)를 사용하는 자동 조섬유 분석장치, 건조기(102± 2° C), 전기회화로(600° C± 15° C), 여과포, 열 밀봉기, 방랭파우치

2) 시약의 제조

가) 1.25% 황산용액(H_2SO_4)

나) 1.25% 수산화나트륨액(NaOH)

3) 분석방법

가) 용제 내에서 내산성인 마커펜을 이용하여 여과포 표면에 식별번호를 표기한다. 저울천칭의 영점을 맞추고 빈 여과포의 무게(W1)를 재어 기록한다.

* 주의 : 여과포를 미리 건조시키지 말 것

나) 각각의 여과포에 0.95-1.00 g의 시료를 넣고 무게(W2)를 측정한다.

다) 바탕값 보정(C)을 위해 적어도 하나의 빈 여과포를 실험에 같이 진행한다.

라) 열 밀봉기를 사용하여 여과포의 윗부분을 완벽하게 밀봉한다(윗부분에서 4-5 mm 아래 부분)

* 주의 : 밀봉한 후 열 밀봉기에서 여과포를 분리하기 전 냉각 시간을 충분히 준다.

마) 비커(250 mL)에 여과포를 넣고 석유에테르(petroleum ether)를 잠길 정도로 붓고 30분간 탈지한다. 면실, 대두박, 코코넛, 애완동물 사료 같이 지방이 많은 시료는 시료특성에 따라 1~3시간 혹은 24시간 탈지해서 지방을 완전히 제거해야한다.

* 주의 : 석유에테르는 가연성이 크므로 정전기 발생을 피한다. 탈지가 끝나면 용제를 버린 후 여과포를 가볍게 눌러 용제를 최대한 많이 뺀 후 그물망에 평평하게 겹치지 않게 놓은 후에 용제를 완전히 증발시킨다. 완전히 마르면 여과포를 흔들거나 탁탁 쳐서 여과포 안의 시료가 고르게 분산되고 뭉치지 않도록 한다.

바) 잘 건조된 여과포를 여과포걸이(suspender tray)에 층층이 쌓아 기계 안에 넣고 기기를 작동한다.

사) 조섬유 추출과 행균 처리가 끝나면 뚜껑을 열고 여과포를 꺼낸다. 여과포에서 과도한 수분을 부드럽게 눌러 짜낸다. 여과포를 비커에 넣은 다음 아세톤(또는 에테르)을 여과포가 잠길 만큼 붓는다.

아) 아세톤에서 여과포를 꺼내 철망그물 위에 놓고 아세톤을 증발시킨다. 아세톤을 증발시킨 여과포를 102± 2°C 건조기에서 완전히 건조시킨다.

* 주의 : 아세톤이 완전히 증발될 때까지 건조기에 여과포를 넣지 않도록 한다.

자) 건조기에서 여과포를 꺼내어 방랭 파우치에 곧바로 넣은 다음 손으로 눌러 평평하게 하여 공기를 빼낸다. 실온이 될 때까지 냉각하여 여과포의 무게를 측정한다. 여과포를 담을 도가니(crucible)의 무게를 잰 후, 각각의 여과포를 도가니에 넣고 도가니 + 여과포의 무게(Wa)를 계산한다.

차) 600± 15°C의 회화로에서 2시간 동안 회화시킨다. 회화가 끝나면 도가니를 어느 정도 식힌 후 (150°C정도까지) 데시케이터에 넣고 실온까지 식힌다. 충분히 식으면 데시케이터에서 도가니를 하나씩 빼내어 도가니 + 회화된 여과포의 무게(Wb)를 측정해 손실된 유기물질(loss of organic matter, W3)을 계산한다.

4) 계산

$$\text{조섬유}(\%) = \frac{(W3 - (W1 \times C))}{W2} \times 100$$

* W1 : 여과포의 자체 무게

W2 : 시료의 무게

W3 : 유기물질 무게(여과포와 섬유 연소로 인한 무게 손실)

W3 = Wa - Wb

Wa = 도가니 + 건조 후 여과포의 무게

Wb = 회화 후 도가니 + 여과포의 무게

C : 빈 여과포의 회분(ASH) 보정 값

$$C = \frac{(C2 - C3)}{C1} =$$

C1 = 빈 여과포의 무게

C2 = 도가니 + 건조 후 빈 여과포의 무게

C3 = 회화 후 도가니 + 빈 여과포의 무게

1.4. 조지방(Crude fat, ether extract)

가. 에테르 추출법(Ether extract)

1) 기구 및 시약

지방 추출장치(soxhlet extractor), 건조기, 데시케이터, No. 2 여과지, 에틸에테르

2) 추출

지방 정량병을 95~100℃에서 2시간정도 건조하고 데시케이터 내에서 30분간 방냉 후 칭량(秤量)하고 시료 2~3 g을 No.2여과지에 싸서 95~100℃에서 2시간 건조시킨 다음 지방추출장치에 넣고 에테르를 부어 80℃로 가열하여 8시간 지방을 추출한 다음 에테르를 회수하고 지방 정량병을 95~100℃에서 3시간 건조 후 데시케이터 내에서 40분간 방냉 후 칭량하여 지방 정량병의 중량을 감(減)한 것을 시료량에 대한 백분율을 구하여 조지방 함량으로 한다. (다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다.)

3) 계산

$$\text{조지방(\%)} = \frac{\text{추출후 지방 정량병중량} - \text{추출전 지방 정량병중량}}{\text{시료 중량}} \times 100$$

나. 산분해 에테르추출법 <팽화사료(extrusion) 및 보호지방의 정량>

1) 기구 및 시약

비이커, 수조, 분액깔대기, 데시케이터, 지방추출장치(soxhlet extractor), 에틸알콜, 에틸에테르, 염산

2) 추출

분석시료 2 g을 300 mL 비이커에 정확히 취하고 에틸알콜 2 mL가하여 혼합하고 염산용액(4+1) 20 mL를 넣고 시계접시를 덮어 70~80℃ 수욕상(water bath)에서 60분간 가끔 흔들어주면서 가온한다. 방냉 후 내용물을 250 mL 분액깔대기에 옮기고 비이커에 에틸알콜 10 mL, 에틸에테르 25 mL 순으로 씻어 분액깔대기에 넣고 다시 에틸에테르 75 mL를 가하여 3분간 진탕한다. 정치 후 하층(수층)의 액을 다른 분액깔대기에 옮기고 상층의 에테르 층은 탈지면으로 여과하여 지방병에 받고 에테르를 회수한다. 이와 같이 에테르 추출은 3회 이상 반복하여 지방을 모은 후 지방병을 95~100℃에서 3시간 동안 건조하고 데시케이터 내에서 40분간 방냉 후 칭량(秤量)하여 지방병의 중량을 감한 것을 시료량에 대한 백분율을 구하여 조지방 함량으로 한다. (다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다.)

다. 황혈염 추출법 <유지방(乳脂肪)정량법>

1) 기구 및 시약

삼각 플라스크, 수조, 유발, 그 외 에테르 추출법과 동일, 해사(sea sand), 염산용액 (2+1), 황혈염용액(황혈염(Potassium ferrocyanide) 15 g을 증류수에 녹여 1,000 mL로 한다), 초산아연 용액(초산 아연(Zinc acetate) 320 g 증류수에 녹여 1,000 mL로 한다)

2) 추출

시료 5 g을 200 mL 삼각flask 에 취하고 증류수 50 mL를 가한 후 중탕으로 용해 후 염산용액(2:1) 1 mL를 가하고 15분간 서서히 끓인다. 냉각 후 황혈염 용액 5 mL, 초산아연용액 5 mL를 넣어 잘 혼합하고 침전물을 Whatman No 2 여과지로 여과 후 증류수로 2~3회 씻어주고 여과지의 침전물에 해사 5 g을 가하여 잘 혼합시켜 98~100℃에서 건조시키고 유발에 옮겨 균등히 갈아서 분말로 하여 내용물을 원통여과지에 옮기고 유발에 부착된 분말은 에테르로 축여서 탈지면으로 닦아 원통여과지에 넣고 속시렛 장치에 연결하여 에테르 추출법과 동일한 방법으로 추출한다.

라. 필터백 분석법

1) 기구 및 시약

조지방분석기, 건조기(102± 2℃), 여과포(Filter Bag), 열 밀봉기, 방냉파우치, 마킹펜(용제와 산성에

건달 것), 석유 에테르(Petroleum Ether) 또는 디에틸에테르(Diethyl Ether)

2) 방법

가) 마커펜을 이용하여 여과포 표면에 식별번호를 표기한다.

나) 각각의 여과포에 0.95-1.00 g의 시료를 넣고 무게(W1)를 측정한다.

다) 열 밀봉기를 사용하여 여과포의 윗부분을 완벽하게 밀봉한다.

라) 봉합된 여과포를 102±2℃ 건조기에서 2-3시간동안 건조시킨 다음 방냉파우치에 넣고 방냉 후 각각의 여과포 무게(W2)를 잰다.

마) 여과포를 필터백홀더에 꽂은 후 추출용기에 넣고 추출한다.

바) 여과포를 추출용기에서 꺼내어 102±2℃ 건조기에서 30분 정도 건조한 다음 건조파우치에 넣어 방냉 후 무게(W3)를 잰다.

3) 계산

$$\text{조지방(\%)} = \frac{W2 - W3}{W1} \times 100$$

W1 : 시료무게

W2 : 처음 건조 후 시료무게(시료+필터백), 수분을 제거한 무게

W3 : 추출 후 건조무게(시료+필터백), 지방을 제거한 무게

1.5. 조회분(Crude ash)

가. 기구

전기로, 자재 크루시블, 데시케이터, 저울

나. 정량법

600℃ 전기로에서 1~2시간 태운 크루시블을 데시케이터내에서 40분간 방냉 후 칭량한 다음 시료 2~3 g을 취하여 전기로 또는 가스버너로 열을 가하여 예비 회화시킨 후 600℃ 전기로에 넣어 2시간 태운 다음 데시케이터내에서 40분간 방냉 후 칭량하여 이 중량으로부터 크루시블의 중량을 감(減)한 것을 조회분 함량으로 한다. (다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다.)

다. 계산

$$\text{조회분(\%)} = \frac{\text{회화 후 무게(시료+크루시블)} - \text{크루시블 무게}}{\text{시료중량(g)}} \times 100$$

1.6. 가용무질소물(Nitrogen free extract)

시료를 100으로 하여 여기에서 수분, 조단백질, 조지방, 조섬유, 조회분 함량(%)을 감해서 구한다.

$$\text{NFE} = 100 - [\text{수분(\%)} + \text{조단백질(\%)} + \text{조지방(\%)} + \text{조섬유(\%)} + \text{조회분(\%)}]$$

NFE의 주성분은 가용성 당과 전분이고 일부 cellulose와 hemi cellulose 및 lignin이 포함된다. 특히 조사료 분석시 NFE 중에는 농후사료보다 상당량의 cellulose, hemicellulose 및 lignin이 포함되어 있다.

2장. 세포막구성물질(Cell wall constituents)

2.1. NDF(Neutral detergent fiber)

가. 기구

조섬유자비기, 건조기, 전기로, 진탕기, 여과병, 초자여과기(IG2), 진탕배양기

나. 시약의 조제

- 1) 중성 Detergent-용액 : Sodium Lauryl Sulfate[CH₃(CH₂)OSO₃Na : 288.38]150 g, EDTA Disodium Salt [{CH₂N(CH₂COOH)CH₂COONa}₂·2H₂O : 372.25] 93.05 g, Sodium Borate (Na₂B₄O·10H₂O : 381.37) 34.05 g, Sodium Phosphate, dibasic (NaHPO₄·12H₂O) 22.8 g, Ethylene Glycol Monoethyl Ether (C₂H₅OCH₂CH₂OH : 90.12) 50 mL를 H₂O 5 L에 용해 후 pH가 6.9~7.1 되게 Sodium Carbonate 용액과 묽은 염산을 사용하여 조정한다. 이 액은 겨울철에는 굳어지므로 가온하여 용해 후 사용한다.
- 2) 소포제(消泡劑) : Decalin
- 3) 아세톤 : 시약 1급
- 4) α-amylase용 인산완충액 : 인산1칼륨(KH₂PO₄) 60 g과 인산2나트륨(Na₂HPO₄·12H₂O) 19.9 g을 H₂O에 용해하여 5 L로 한다.(pH 5.8)
- 5) α-amylase용액 : pH 5.8 인산완충액 20 mL에 α-amylase 1 mg의 비율로 용해한다. 이 용액은 사용직전에 만드는데 현탁액이다.
- 6) 무수황산나트륨 : 시약특급

다. 방법

1) 조사료

풍건사료(風乾飼料) 1 g을 500 mL 툴비커에 취하고 중성 Detergent 용액 100 mL와 Decalin 2 mL, Sodium Sulfite 0.5 g을 가해 조섬유 정량용 자비기에서 1시간 끓인 다음 유리여과기(1G2)를 사용하여 흡인여과하고 뜨거운 물과 아세톤으로 씻어주고 풍건 후 105℃ 건조기내에서 4시간 건조하여 무게를 달고 계산한다. (다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다.)

$$\text{NDF}(\%) = \frac{\text{건조 후 무게} - \text{유리여과기 무게}}{\text{시료중량}} \times 100$$

2) 전분을 함유한 시료

시료 0.5~1 g을 100 mL 삼각 후라스크에 취하고 H₂O 20 mL를 가한다. 이것을 가열판 위에 올려 놓고 가열하여 전분을 호화(糊化) 시키는데 끓는 상태가 되면 조작을 중지하고 냉각 후 20 mL의 α-amylase 용액을 가하여 40℃ 진탕 배양기에서 16시간 전분을 가수분해한다. 그 후 잔사를 No. 5A 여과지에 여과하고 H₂O로 3~4회 세척한 다음에 세척병에 중성 Detergent 용액을 넣어 여지에 남아 있는 잔사를 500 mL 툴비커에 씻어 넣고 전체량을 100 mL로 한 후 Decalin을 3~5 방울을 가하고 조섬유 자비기에서 1시간 끓이고 미리 함량을 구한 유리여과기(1G2)로 여과하고 H₂O로 6~7회 세척하여 잔존 계면활성제를 씻어 내린 후 Acetone으로 3~4회 세척한다. 그 후 135℃ 건조기에서 2시간 건조하고 냉각 후 칭량하여 세포막 물질(CW)을 구하고 세포내용물(CC)의 함량은 100에서 CW의 건물 중 함량(%)을 제하여 구한다. (다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다.)

2.2. ADF(Acid detergent fiber)

가. 기구

조섬유자비기, 건조기, 여과병, 유리여과기(1G2)

나. 시약의 조제

- 1) 산성 Detergent 용액 : Cetyltrimethylammonium Bromide (CETAB) 20g을 1ℓ의 1N H₂SO₄에 가열 녹인다. 겨울철에는 보관중에 시약이 굳어지므로 가온 용해하여 사용한다.
- 2) 소포제 : Decalin
- 3) Acetone : 시약 1급

다. 방법

시료 2 g을 500 mL 톨비커에 취하고 100 mL 산성 Detergent 용액과 2 mL Decalin을 가해 조섬유 자비기에서 1시간 끓이고 유리여과기(1G2)로 흡인여과하고 뜨거운 물로 2회 씻어 주고 남은용액이 무색이 될 때까지 Acetone으로 씻어주고 풍건 후 105℃의 건조기내에서 4시간 건조 후 무게를 단다. (다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다.)

$$\text{ADF}(\%) = \frac{\text{건조 후 무게} - \text{유리여과기 무게}}{\text{시료중량}} \times 100$$

3장. 아미노산(Amino acid)

3.1. 역상크로마토그래피법(PITC 유도체화법)

가. 시약의 조제

- 1) 6N 염산용액
- 2) 유도체시약(PITC, Phenylisothiocyanate)
- 3) 초산나트륨, 2-프로판올 : 특급품
- 4) 트리에틸아민(TEA) : 원액
- 5) 아세토니트릴, 에탄올, 증류수 : HPLC용
- 6) 인산용액 : 원액사용
- 7) 재건조시약 : [에탄올 : 증류수 : TEA(2 : 2 : 1, V/V)]
- 8) 유도체시약 : [에탄올 : 증류수 : TEA : PITC(7 : 1 : 1 : 1, V/V)]
- 9) 표준용액 : 표준시료 적당량을 취하여 시료액의 조제와 같은 방법으로 처리하여 최종농도가 2~4 μ mol/mL가 되도록 한다.

나. 방법

시료 40~100 mg을 시험관에 취한다. 이 시료를 충분히 가수분해시킬 수 있는 6 N 염산을 가하여 질소가스로 통기시킨 후 마개를 막고 105℃에서 24시간 가수분해시킨다. 가수분해된 시액을 냉각시킨 뒤 No. 6 여과지를 사용하여 50 mL 메스플라스크에 여과한다. 여과액 중 일정량을 0.45 μ m 여과막으로 여과한 후 시액 일정량(50~100 μ L)을 작은 유리시험관에 취하여 진공 건조시킨다. 건조된 시료를 다시 재 건조 시약 16~20 μ L를 넣고 재 건조시킨 후 유도체 시약을 25 μ L를 넣고 20~25분간 충분히 반응시킨 뒤 다시 진공건조 시킨 후 액체크로마토그래피의 이동상 A용매로 희석하여 HPLC에 주입 측정한다.

다. 기기조건(HPLC)

- 1) 이동상 A : 20 g 초산나트륨, 600 μ L TEA를 HPLC용 증류수로 녹여 1 L로 한다. 이용액 940 mL에 아세토니트릴 60 mL를 혼합한 뒤 인산으로 pH 6.30~6.40으로 맞춘 후 0.45 μ m 수용성 여과지로 여과한다.
- 2) 이동상 B : 60 mL 아세토니트릴에 증류수를 채워 1 L로 한 후 0.5 μ m 지용성 여과지를 메탄올로 적셔 활성화시킨 후 여과한다.
- 3) 파장 : 254 nm
- 4) 고정상 : C18 Column
- 5) 칼럼온도 : 45~50℃
- 6) 이동상의 양 및 조성비(gradient)

Time	Flow	%A	% B	%C
Initial	1.0	100	0	0
10.0	1.0	54	46	0
10.5	1.0	0	100	0
11.0	1.5	0	100	0
14.0	1.5	0	100	0
14.5	1.5	100	0	0
20.5	1.5	100	0	0
21.5	1.0	100	0	0

라. 계산

$$\text{시료중의 각 아미노산(\%)} = A \times \frac{B}{C} \times \frac{D}{W} \times \text{회석배수} \times 100$$

A : 각 아미노산 표준용액의 농도(μ mol/mL)

- B : 시료용액의 각 아미노산의 피크면적이나 높이
 C : 표준용액의 각 아미노산 피크면적이나 높이
 D : 각 아미노산의 분자량
 W : 시료의 중량(μg)

3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법)

가. Stable 계열(Lys. 등)

1) 기구 및 시약

아미노산분석기, 로타리증발기, 열풍순환식 건조기, 수류펌프, pH미터, oil bath, 분해병, 메스실린더, 자석교반기, 홀피펫, 메스플라스크, 세척병, 질소가스

2) 시약조제

가) 6N-염산용액 : 농염산(35%, 비중 1.18)과 증류수를 1:1로 혼합한다

나) 아미노산 표준액 : pH 2.2 희석완충액을 이용하여 아미노산 표준물질이나 시판 표준원액을 0.01 ~ 0.2 $\mu\text{mol/mL}$ 의 농도로 단계별 희석한다.

다) 시료희석용 완충액(pH 2.2) : 구연산소다(Sodium citrate dihydrate) 19.7 g을 증류수 400 mL에 용해하고 여기에 염산(비중 1.18) 16.5 mL와 caprylic acid 0.1 mL, β -Thiodiglycol 20 mL, Brij35(30% w/v) 2.0 mL 가한 후 증류수로 1 L 되게 한다.

라) 완충액(Buffer) : 기기조건에 적합한 용액으로 조제하여 사용

마) 발색제(Ninhydrin 시약) : 기기조건에 적합한 용액으로 조제하여 사용

3) 시료액의 조제

시료는 50~300 mg(조단백질로 30 mg 정도)을 취해서 분해병에 넣은 후 6N-HCl 40 mL를 가하고 질소가스를 주입한 후 마개를 막고 110°C에서 24시간 가수분해시킨 후 농축증발 플라스크에 옮기어 로타리 증발기에 연결 50°C에서 염산을 제거시키는데 증발이 다되면 증류수로 분해병을 씻어 증발 플라스크에 옮기어 다시 증발시키는 것을 3회 반복하여 증발 건고시키는 데 최종적으로 증발건고 되어 있는 증발플라스크에 시료희석 완충액(pH 2.2)이나 증류수를 소량씩 가하여 아미노산을 용해시켜 No. 5B 여과지로 여과하여 50 mL로 만든다.

4) 시험방법

가) 아미노산 자동분석기 조건

완충액, 발색시약의 유무, 칼럼오븐의 온도를 점검하고, 자동완충액 전환기구 및 정유량 펌프, 유량을 소정의 조건에 따라 설정하고 측정을 실시한다.

5) 정량시험

미리 구해 놓은 농도의 아미노산표준용액의 피크 면적과 함량으로부터 검량 곡선을 작성한 다음 시험용액으로부터 얻어진 아미노산 농도를 이용하여 아미노산 함량을 계산한다.

6) 계산

$$\text{아미노산 함량(\%)} = C \times \frac{SA}{ST} \times D \times \frac{M}{W} \times 100$$

C : 표준아미노산의 농도($\mu\text{mol/mL}$)

SA : 시료액의 아미노산 Peak 면적

ST : 표준액의 아미노산 Peak 면적

D : 희석량(mL)

M : 아미노산의 분자량

W : 시료의 중량(μg)

나. 황함유계열(Met. 등)

1) 기구 및 시약

3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법) 가. Stable 계열(Lys. 등) 1) 기구 및 시약에 따른다.

2) 시약조제

가) 6N-염산용액 : 농염산(35%, 비중 1.18)과 증류수를 1:1로 혼합한다

나) 과개미산액 : 85% 개미산(formic acid) 45 mL와 30% 과산화수소(H_2O_2) 5 mL를 500 mL 삼각 플라스크에 취하여 혼합하고 실온에서 1시간 방치하여 과개미산을 생성시킨 다음 얼음속이나 냉동실에 플라스크를 30분 이상 넣어 생성된 과개미산을 고정시킨다.

다) 아미노산 표준액 : 표준물질 Cysteic acid와 Methionine sulfone으로 3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법) 가. Stable 계열(Lys. 등) 2) 시약조제 나) 아미노산 표준액에 따른다.

라) 시료희석용 완충액(pH 2.2)

3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법) 가. Stable 계열(Lys. 등) 2) 시약조제 다) 시료희석용 완충액(pH 2.2)에 따른다.

마) 완충액(Buffer) : 기기조건에 적합한 용액으로 조제하여 사용

바) 발색제(Ninhydrin 시약) : 기기조건에 적합한 용액으로 조제하여 사용

3) 시료액의 조제

Cystine과 Methionine은 6N-HCl로 가수분해시키면 파괴되므로 산가수분해전에 과개미산 처리로 일단 안정상태인 Cysteic acid와 Methionine sulfone으로 변화시킨 후 6N-HCl로 가수분해시킨다. 분해병에 시료 50~300 mg(조단백질로 30 mg 정도)을 취하고 과개미산 20 mL를 가하고 5°C이하의 냉장고에 넣고 이튿날 아침 분해병을 로타리증발기에 연결시켜 50°C에서 시료 이외의 휘발성물질을 모두 날려보낸 후 6N-HCl(20 mg당 5 mL정도)을 가하고 다른 아미노산 분석시와 같이 110°C에서 24시간 가수분해시킨다.

4) 시험방법

가) 아미노산 자동분석기 조건

완충액, 발색시약의 유무, 칼럼오븐의 온도를 점검하고, 자동완충액 전환기구 및 정유량 펌프, 유량을 소정의 조건에 따라 설정하고 측정을 실시한다.

5) 정량시험

미리 구해 놓은 농도의 아미노산표준용액의 피크 면적과 함량으로부터 검량 곡선을 작성한 다음 시험용액으로부터 얻어진 아미노산 농도를 이용하여 아미노산 함량을 계산한다.

6) 계산

3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법) 가. Stable 계열(Lys. 등) 6) 계산에 따른다.

다. 트립토판(Tryptophan)

1) 기구

3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법) 가. Stable 계열(Lys. 등) 1) 기구 및 시약에 따른다.

2) 시약조제

가) 농염산

나) 0.2N-Sodium Citrate buffer (pH 4.2) : 0.2N의 Sodium citrate와 0.2N의 Citric acid를 혼합하여 pH를 4.2가 되게 한다.

다) 4.2N-NaOH용액 : 4.2N-NaOH 10 mL당 0.1 mL의 n-octyl alcohol을 첨가한다.

라) 아미노산 표준액 : 표준물질 트립토판으로 3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법) 가. Stable 계열(Lys. 등) 2) 시약조제 나) 아미노산 표준액에 따른다.

마) 시료희석용 완충액(pH 2.2)

3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법) 가. Stable 계열(Lys. 등) 2) 시약조제 다) 시료희석용 완충액(pH 2.2)에 따른다.

바) 완충액(Buffer) : 기기조건에 적합한 용액으로 조제하여 사용

사) 발색제(Ninhydrin 시약) : 기기조건에 적합한 용액으로 조제하여 사용

3) 시료액의 조제

가) 100 mg의 단백질 함량 정도가 되게 시료를 취해서 분해병에 넣은 후 10 mL의 4.2N-NaOH를 가하고 산소를 제거하기 위해 질소가스를 주입한 후 마개를 막고 110℃에서 20시간 가수분해시킨다. 가수분해 후 시료를 충분히 냉각시킨 후 50 mL의 메스플라스크에 가수분해물을 No.5B 여과지로 거르면서 넣고 0.2N- Sodium citrate buffer(pH 4.2)로 채운다. 여기서 다시 1~5 mL을 비이커에 취하여 70℃가 되는 항온수조에서 수분을 증발 시킨다. 건조가 완결된 후 sodium citrate buffer (pH 4.2)와 HCl을 첨가하여 pH를 4.2로 맞추면서 25 mL이 되게 한다. HCl을 첨가 시 찌꺼기가 형성될 수도 있으나 트립토판의 회수율에 영향을 미치지 않는다. 25 mL의 용액을 분석 전에 여과하여 아미노산 자동 분석기에 200 μ L의 시료를 넣어서 분석한다.

나) 지방이 많이 함유된 시료의 처리 : 시료내 탄수화물, 섬유소 및 회분은 트립토판의 회수율에 영향을 미치지 않지만 지방은 회수율을 감소시킨다. 그래서 지방을 많이 함유하고 있는 어분, 육분 이나 골분과 같은 시료는 탈지과정이 가수분해 전에 요구된다. 약 100 mg의 단백질을 포함하고 있는 시료를 5 mL diethyl ether와 혼합시키고 2000rpm에서 15분동안 원심분리 후 ether층을 분리시킨다. 이 과정을 3번 반복한 후 가수분해 과정을 실행한다.

다) 가수분해물의 보관 : 가수분해물은 항상 가수분해 과정이 끝난 후 바로 분석을 실행하는 것이 좋으나 그렇지 못할 경우 pH 4.2의 상태에서 5℃에서 보관하는 것이 가장 안전하다.

4) 시험방법

가) 아미노산 자동분석기 조건

완충액, 발색시약의 유무, 칼럼오븐의 온도를 점검하고, 자동완충액 전환기구 및 정유량 펌프, 유량을 소정의 조건에 따라 설정하고 측정을 실시한다.

5) 정량시험

미리 구해 놓은 농도의 아미노산표준용액의 피크 면적과 함량으로부터 검량 곡선을 작성한 다음 시험용액으로부터 얻어진 아미노산 농도를 이용하여 아미노산 함량을 계산한다.

6) 계산

3.2. 이온교환크로마토그래피법(Ninhydrin 법) 가. Stable 계열(Lys. 등) 6) 계산에 따른다.

3.3. MHA(Methionine Hydroxy Analogue)의 정량법

가. HPLC법

1) 기구

HPLC(UV검출기를 부착한 것), NH_2 column(reversed - phased column 4.6×150 mm, 5 μ m), 시료분쇄기, 화학천칭(readability : 0.01 mg), 원심분리기, 시험관교반기, ultrasonicator (온도조절가능), hydropilic syringe filter(0.22 μ m), Mili-Q, RiOs/Elix water purification system(Millipore, Bedford, MA, U.S.A.)

2) 시약

가) 표준품 : MHA 표준품 Tokyo Kasei Kogro(Japan)사의 2-hydroxy -4-(methylthio)-butanoic acid(MHA, 71.6%), 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid calcium salt(purity 98.4%)

나) 전처리용 시약 : 85% orthophosphoric acid(analytical reagent grade) (Merck), potassium hydroxide(special grade, 85%), ammonium hydroxide (extrapure reagent, 25~28%), Acetonitrile(HPLC급), 증류수 (Mili-Q, RiOs/ Elix water purification system(Millipore, Bedford, MA, U.S.A.)에 의해 여과하여 사용함)

다) 추출용매 : 10% acetonitrile (acetonitrile : 증류수 v/v)

3) 표준액 조제

MHA 표준품을 전처리시 MHA의 추출용매로 사용되는 10% acetonitrile(90% deionzed water)에 녹여 MHA의 농도가 0.2~10 mg/50 mL가 되도록 희석하여 검량선 작성을 위한 표준액으로 사용한다.

4) 시료에서의 시험용액 추출

가) 사료 시료는 잘 혼합하여 시료분쇄기로 입자의 크기가 600 μm 정도가 되도록 분쇄한다.

나) 삼각플라스크에 정확히 2 g을 칭량한 후 10% acetonitrile (90% deionzed water) 추출용액 50 mL를 넣고 ultrasonicator (45°C)에서 MHA가 추출되도록 20분간 처리한다.

다) 추출액을 50 mL conical tube로 옮겨 원심분리기에서 3000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상등액 5 mL을 15 mL test tube에 피펫팅한다.

라) 여기에 추출액에 존재하는 미량의 MHA oligomer를 monomer로 가수분해하기 위해 50% KOH 100 μL 를 넣고 시험관 교반기에서 10초간 교반한다.

마) 기기 분석시 좋은 분리조건을 위해 pH를 4~5로 낮추기 위해 85% phosphoric acid 100 μL 를 가하여 시험관 교반기에서 10초간 교반한다.

바) 전처리액을 0.22 μm hydrophilic syringe filter로 filtering한 후 기기분석을 위한 시료액으로 한다.

5) 측정

동시에 측정한 표준품의 머무름 시간과 일치하는 것을 정성시험의 판정기준으로 하며, 표준품의 분석농도와 얻어진 피크 면적에 의한 검량선을 작성하여 정량시험에 사용한다.

6) HPLC의 조건

가) Column : NH_2 column (reversed-phased column 4 $\times$ 150 mm, 5 μm)

나) Mobile phase : isocratic mode로 acetonitrile과 NH_4OH 로 pH를 3.2로 맞추는 0.01M H_3PO_4 를 23 : 77(%v/v)

다) Injection volume : 10 μL

라) Flow rate : 1 mL/min

마) Detector : UV 검출기

바) Detection wavelength : UV 214 nm

사) Retention time : 대략 6.7 min

3.4. 타우린 분석법

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료, 배합사료 및 보조사료에 적용한다.

나. 분석원리

균질화한 시료 중에 타우린을 10 mM 아세트산암모늄(ammonium acetate) 수용액으로 추출하여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약

1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것

3) 표준원액: 타우린 표준품을 10 mM 아세트산암모늄에 녹여 표준원액으로 사용

4) 혼합표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.(무처리 시료추출액 90% 이상 포함)

5) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제(추출)

- 1) 0.5 g의 균질화된 시료를 50 mL 원심분리관에 칭량하고, 10 mM 아세트산암모늄 수용액 50 mL을 넣은 후 30분간 초음파 추출한다.
- 2) 4,000 G에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 적절한 농도로 희석한 후 멤브레인 필터(0.2 µm)로 여과하여 시험용액으로 사용한다.
- 3) 정량 분석용 매질보정 검량법(matrix matched calibration)에 따른 농도별 표준물질과 시료액은 아래의 예를 참고하여 만든다.

※ 무처리 시료추출액: 시료구와 동일한 품목이면서 타우린 성분이 검출되지 아니한 시료를 ‘마.’에 따라 추출 및 정제한다. 다만 동일 품목이 없는 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용한다.

○ LC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질							시료액
	수준 1	수준 2	수준 3	수준 4	수준 5	수준 6	수준 7	
목표농도	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	500 µg/L	1000 µg/L	
조제방법	STD 100 µg/L 100 µL	STD 200 µg/L 100 µL	STD 500 µg/L 100 µL	STD 1,000 µg/L 100 µL	STD 2,000 µg/L 100 µL	STD 5,000 µg/L 100 µL	STD 10,000 µg/L 100 µL	무처리 시료추출액 1,000 µL
	무처리 시료추출액 900 µL	무처리 시료추출액 900 µL	무처리 시료추출액 900 µL	무처리 시료추출액 900 µL	무처리 시료추출액 900 µL	무처리 시료추출액 900 µL	무처리 시료추출액 900 µL	

바. 시험조작

- 1) 액체크로마토그래프 · 질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건

가) 컬럼: Hypersil Gold C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구배

- A 이동상: 50 mM 아세트산암모늄 함유한 물
- B 이동상: 0.1% 포름산 함유한 메탄올

다) 농도구배조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	97	3
5.0	97	3
6.0	3	97
7.5	3	97
8.5	97	3
12.0	97	3

라) 이동상 유속: 0.5 mL/분

마) 컬럼 온도: 40℃

바) 주입량: 5 µL

사) 이온화 방식: Electrospray ionization(Negative)

○ LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
1	타우린 (Taurine)	negative	3.55	125.14	124.2	80.5	22.0
						124.2	2.0

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 정량한계 : 10 mg/kg

사. 정성 및 정량시험

1) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용($1/x$) 방식을 활용할 수 있다.

2) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간 (retention time) 과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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
$> 20, \leq 50$	± 25
$> 10, \leq 20$	± 30

3) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

4) 대표 품목의 매질보정검량법으로 분석 후 검출량이 등록치에 미달한 시료에 대해서는 표준 물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

4장. 무기물(Minerals)

4.1. 칼슘(Ca)

가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry)

1) 시약의 조제

- 가) 5 %란타넘 용액 : 산화 란타넘(Lanthanum oxide) 58.65 g에 소량의 증류수를 가한 후에 농염산 250 mL를 서서히 가하면서 용해시키고 냉각한 다음 증류수로 1 L 표선까지 채운다.
- 나) 칼슘표준용액 : 특급 탄산칼슘(CaCO_3) 0.25g을 염산용액(1:1) 5 mL에 녹이고 증류수로 100 mL 되게 표선까지 채운다.(1,000ppm) 또는 시판 칼슘 표준용액(1,000ppm)을 희석 사용한다.

2) 시료액의 조제

가) 유기질시료

시료 2~5 g를 자체 크루시블에 취하고 열판에서 예비회화시킨 후 전기로 600℃에서 2시간 이상(회백색) 회화시킨 뒤 방냉하고 염산용액(1:1) 10 mL를 가하여 하룻밤 방치 용해시킨 다음 No.6 여과지를 이용 뜨거운 물로 여과하여 일정량으로 맞춰 시료액으로 한다.

나) 무기질 시료

시료 0.5~1.0 g를 취하여 100 mL 삼각 플라스크에 넣고 염산용액(1:1)10 mL를 가하여 시계집 시로 덮은 후 서서히 가온하여 분해액이 반으로 줄어 들었을 때 상기의 여과방법으로 여과하여 시료액으로 한다.

다) 마이크로웨이브법

시료 일정량 (0.1~0.5 g; 수분함량이 높은 시료의 경우 1~2 g)을 Microwave digestion system에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해하고 메스플라스크 등에 옮겨 정용(시료채취량에 따라 달라짐)하여 시험용액으로 한다.

3) 측정

시료액 일정량을 50 mL 메스플라스크에 취하고 5% 란타넘용액 10 mL를 넣고(용액중 란타넘 함량이 1% 되도록 한다), 다시 염산용액(1:1) 1 mL를 가하고 증류수로 표선을 맞춘다. 미리 30분간 예열한 원자흡광광도계 파장 422.7 nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 칼슘표준용액을 0, 2, 4, 6, 8, 10 ppm이 되도록 50 mL 메스플라스크에 취한 다음 여기에 란타넘 용액 10 mL를 각각 넣고 증류수로 표선까지 채운 다음 흡광도를 측정, 표준곡선(검량곡선)을 작성한다.

4) 계산

$$\text{칼슘(\%)} = \frac{\text{시료액의 흡광도} / \text{1ppm기준 흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 10^6} \times 100$$

나. EDTA적정법(Ethylene Diamine TetraAcetic acid, disodium salt)

1) 시약의 조제

- 가) 8N-수산화나트륨액 : 특급 수산화나트륨(NaOH) 320 g을 증류수에 녹여 1,000 mL로 한다.
- 나) 10%시안화 칼륨용액 : 시안화칼륨(KCN) 10 g을 증류수에 녹여 100 mL로 한다.
- 다) 트리에탄놀아민(Triethanolamine) 용액(1:1) : 트리에탄놀아민과 증류수를 동량(同量)희석한다.
- 라) N, N 지시약 : 순수 N,N 지시약[2-Hydroxy-1-(2-Hydroxy -4-Sulfa -1- Naphthy -lazol)-3-Naphtic Acid]5 g를 황산칼륨(K_2SO_4) 50 g과 잘 혼합(유발 이용)한다.
- 마) 0.01 M-EDTA 용액 : EDTA-2Na($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 3.7226 g 또는 이의 무수물 3.3622 g을 증류수에 용해하여 1,000 mL로 만든 다음 폴리 에틸렌병에 보관 사용한다.
- ※ 표정 : 0.01 M-탄산칼슘 용액을 300 mL 삼각플라스크에 25 mL를 정확히 취한 후 트리에탄올아민용액 (1:1) 1 mL를 가하고 증류수 약 50 mL로 플라스크 내벽을 잘 씻으면서 채우고 N,N 지시약 0.1 g를 가하고 8 N-수산화나트륨용액 5 mL와 10% 시안화칼륨(KCN)용액 1 mL를 각각 가한 다음 0.01 M-EDTA용액으로 적정하여 몰농도 계수를 계산한다. 적정의 종점은 미색

에서 청색으로 변하는 점인데 이때 EDTA 용액이 떨어지는 순간 그 부위가 무색으로 보인다.

$$\text{Factor}(F) = 25/V \quad (V : 0.01\text{M-EDTA용액 소요 mL수})$$

바) 0.01 M-탄산칼슘용액 : 탄산칼슘을 110℃에서 항량이 될 때까지 건조 후 1.0008 g을 칭량하여 염산용액(1:1)으로 탄산가스를 제거하고 가온하여 용해한 후 증류수를 가하여 1,000 mL로 만든다.

2) 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

3) 측정

시료액 5 mL를 300 mL비커에 정확히 취하고 증류수 10 mL를 가한 후 8N-수산화나트륨용액 5 mL, 10% KCN용액 1 mL, 트리에탄올아민(1:1) 1 mL를 각각 가한 후 혼합한 다음 0.1g의 N.N지시약을 넣고 0.01 M-EDTA용액으로 푸른색이 될 때까지 적정하는데 이때 EDTA용액이 떨어지는 순간 그 부위가 무색으로 보인다.

4) 계산

$$\text{칼슘}(\%) = (0.01 \text{ M-EDTA용액소비량 mL} \times 0.04008 \times \text{희석배수} \times F) / \text{시료의 중량(g)}$$

$$F : 0.01 \text{ M-EDTA 용액의 factor}$$

4.2. 인(P)

가. 시약의 조제

1) 몰리브도 바나데이트(Molybdo vanadate)발색제

가) 암모늄몰리브데이트(Ammonium molybdate) 25g을 증류수에 녹여 400 mL로 한다.

나) 암모늄메타바나데이트(Ammonium metavanadate) 1.25g을 증류수 300 mL에 용해하고 질산 250 mL를 가한 후 냉각하고 상기 가)와 나)의 두 용액을 합하여 1,000 mL까지 증류수로 채워 발색제를 만든다.

2) 인(P)표준용액

105℃에서 1시간 건조 후 데시케이터에서 방냉한 제1인산칼륨(Potassium-phosphate, monobasic) 2.195 g을 1,000 mL의 메스플라스크에 넣고 증류수로 용해하여 이 눈금을 맞춘다. 이 용액은 500 ppm의 표준용액이 된다. 이 표준용액을 10배 희석하여 50 ppm의 표준액을 만든 후 측정시 0, 2, 4, 6, 8, 10 ppm으로 만들어 사용한다.

나. 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

다. 측정

25 mL 메스플라스크에 시료액 1~20 mL(인 함량에 따라)를 취하고 발색제 2.5 mL(용기의1/10)를 가한 다음 증류수로 표선을 맞춘 후 혼합하고 15분간 방치 후 파장 470 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준액도 같은 방법으로 실시한다.

라. 계산

$$\text{인}(\%) = \frac{\text{시료액의흡광도}/1\text{ppm기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.3. 유황(S)

가. 시약의 조제

1) 염산용액(1:1) : 염산과 증류수를 동량부피 혼합한다

2) 10% 염화바륨(Barium chloride)용액 : 염화바륨 10g을 증류수에 용해하여 100 mL로 한다.

나. 시료액의 조제

시료 0.5g을 정확히 취하여 삼각 플라스크에 넣고 염산용액(1:1) 20 mL를 가하여 가열분해(액량이 1/2될 때까지) 한 후 뜨거운 증류수로 용해하여 No.6 여과지로 여과한 후 전량을 250 mL로 하여

시료액으로 한다.

다. 방법

500 mL 비커에 시료액 100 mL를 취하여 끓을 때까지 가열하면서 10% 염화바륨용액 10 mL를 피펫으로 한 방울씩 가한다. 침전이 생긴 용액이 맑아질 때까지 끓인 후 약 3시간동안 수조에서 가열하고 방치한 후 No.6 여과지로 여과하고 뜨거운 증류수로 8~10회 세척한 뒤 침전물을 여과지와 같이 크루시블에 넣고 건조시킨 다음 800℃ 전기로에서 30분간 회화하여 데시케이터에서 냉각 후 칭량한다.

라. 계산

$$\text{유황(\%)} = \frac{\text{침전물의중량} \times 0.1374}{\text{시료무게(g)}} \times \frac{250}{100} \times 100$$

100 : 시료액중 취한량(mL)

0.1374 : 침전 중 유황의 함량

250 : 시료액의 전량(mL)

4.4. 마그네슘(Mg)

가. EDTA 적정법(Volumetric법)

1) 시약의 조제

가) 8 N-수산화나트륨 용액 : 수산화나트륨 320g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

나) 10% 시안화칼륨용액 : 시안화칼륨(KCN) 10g을 증류수에 녹여 100 mL로 한다.

다) 암모니아·염화암모늄완충액(pH 10.7) : 염화암모늄(Ammonium chloride) 67.5 g을 증류수에 용해시킨 후 암모니아수(Ammonium hydroxide) 570 mL를 가한 다음 증류수로 1 L를 만든다.

라) 에리오크롬 블랙 T·염화나트륨 지시약 : 에리오크롬 블랙T(Eriochrome black T) 0.5 g과 염화나트륨(Sodium chloride) 100g을 고르게 분말형태로 혼합한다.

마) 트리에탄올아민(Triethanolamine) : 증류수와 동일한 양(1:1) 부피로 혼합

바) N, N지시약 : 4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 1) 시약의 조제에 따른다.

사) 0.05 M-EDTA용액 : EDTA-2Na 18.613g을 증류수에 용해하여 1 L로 한 다음 폴리에틸렌병에 보관 사용한다.

※ 표정은 0.05 M 탄산칼슘용액으로 4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 1) 시약의 조제에 따른다.

2) 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

3) 측정

시료액 25 mL를 비커에 취하고 증류수 50 mL, 암모니아·염화암모늄 완충액(pH 10.7) 5 mL를 넣고 에리오크롬 블랙 T. 염화나트륨지시약 0.04 g을 넣은 후 0.05 M EDTA 용액으로 적정한다. 이때 종말점은 용액의 적자색이 청색으로 변한 때로 한다. 다시 시료액 25 mL를 비커에 취하고 트리에탄올아민(1: 1) 1 mL를 넣고 N.N지시약 0.1 g을 넣은 다음 0.01 M EDTA 용액으로 적정하여 몰농도 계수를 계산한다. 적정의 종점은 미색에서 청색으로 변하는 점인데 이때 EDTA 용액이 떨어지는 순간 그 부위가 무색으로 보인다.

$$\text{Factor(F)} = 25/V$$

V : 0.01 M-EDTA용액 소요 mL수

4) 계산

$$\text{마그네슘(\%)} = \frac{(A-B) \times 0.0012153 \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)}} \times 100$$

A : 에리오크롬블랙T 지시약사용시 0.05 M-EDTA 용액소비량(mL)

B : N.N지시약 사용시 0.01 M-EDTA 용액소비량(mL)의 1/5값

나. 원자흡광분광광도법

1) 시약 및 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

2) 측정

시료액 중 란타넘 함량이 1%되게 희석하여 미리 예열된 원자흡광분광광도계 파장 285 nm에서 표준액을 측정 검량선을 작성 후 시료액을 측정하여 계산한다.

3) 계산

$$\text{마그네슘(\%)} = \frac{\text{시료액의흡광도}/1\text{ppm기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.5. 칼륨(K)

가. 시약의 조제

1) 칼륨(K)표준원액(1,000ppm) : 특급 염화칼륨(Potassium chloride : KCl)를 500~600℃에서 40~50 분간 가열하고 데시케이터 내에서 방냉 후 0.1907g을 취하여 100 mL 메스 플라스크에 넣고 증류수로 용해하여 전량을 100 mL로 한다. 시판 표준원액 사용 가능

2) 1% NaCl 용액

나. 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

다. 측정

표준용액과 시료액에 Na 농도가 1000~2000 ppm이 되도록 첨가한 다음 미리 예열한 원자흡광분광광도계 파장 766.5 nm에서 측정하는데 먼저 표준원액을 적당히 희석하여 검량선을 작성 분석한다.

라. 계산

$$\text{칼륨(\%)} = \frac{\text{시료액의흡광도}/1\text{ppm기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.6. 철(Fe)

가. 유도결합플라즈마법(Inductively Coupled Plasma, ICP)

1) 시험용액의 조제

가) 습식분해법

시료 0.5~1 g을 분해플라스크에 칭량 후 염산 15~20 mL를 가한 후 혼합하여 열판에서 용해시킨다. 실온으로 방냉 후 증류수로 정용하여 시료액으로 한다.

나) 건식분해법

시료 2~5 g를 자제 크루시블에 취하고 열판에서 예비회화 시킨 후 전기로 600℃에서 2시간 이상 (회백색) 회화시킨 뒤 방냉하고 염산용액(1:1) 10 mL를 가해 하룻밤 방치 용해시킨 다음 여과 후 정용하여 시료액으로 한다.

다) 마이크로웨이브법

시료 일정량 (0.1~0.5 g; 수분함량이 높은 시료의 경우 1~2 g)을 Microwave digestion system에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해하고 메스플라스크 등에 옮겨 정용(시료채취량에 따라 달라짐)하여 시험용액으로 한다.

2) 측정

이 방법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도 또는 질량값을 측정하여 시험용액 중의

목적원소의 농도를 구하는 방법이다. 표준용액과 시험용액 및 공시험용액을 ICP(유도결합플라즈마)에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

나. 원자흡광분광광도법

1) 시약의 조제

철(Fe)표준원액(1,000 ppm) : 전해철(99.9%이상) 100 mg을 10 mL 왕수에 가열 용해하여 증발건고(蒸發乾固)직전에 가열을 중지하고 증류수로 녹여 100 mL로 만든다. 시판 표준원액 사용 가능

2) 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

3) 측정

미리 예열한 원자흡광광도계 파장 248.3 nm에서 측정하는데 먼저 표준원액을 적당히 희석하여 검량선을 작성 분석한다.

4) 계산

$$\text{철(\%)} = \frac{\text{시료액의흡광도}/1\text{ppm기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.7. 나트륨(Na)

가. 시약의 조제

1) 나트륨(Na) 표준원액(1,000 ppm) : 특급염화나트륨(Sodium chloride: NaCl)을 500~600℃에서 40~50분간 가열하고 데시케이터내에서 방냉한 후 0.254 g을 취하여 증류수로 용해 전량을 100 mL로 하여 폴리에틸렌병에 보관한다. 시판 표준원액 사용가능

2) 1% 칼륨용액 : 특급 KCl 19.07 g을 증류수에 녹여 1000 mL로 만든다.

나. 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

다. 측정

표준용액과 시료액의 나트륨농도가 1000 ppm이 되도록하여 원자흡광분광광도계 588.9 nm에서 표준용액으로 검량선을 구한 다음 시료액의 흡광도를 구한다.

라. 계산

$$\text{나트륨(\%)} = \frac{\text{시료액의흡광도}/1\text{ppm기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.8. 염분(NaCl)

가. 적정법

1) 시약의 조제

가) 활성탄(Activated charcoal)

나) 에틸에테르(Diethyl ether)

다) 질산(Nitric acid)

라) 황산철 암모늄(Ammonium ferric sulfate) 포화용액

마) Carrez 용액 I : 증류수에 2수염의 초산아연(Zinc acetate dihydrate) 21.9 g을 녹이고 여기에 빙초산(Glacial acetic acid) 3 mL를 가하고 증류수로 100 mL까지 희석하여 만든다.

바) Carrez 용액 II : 황혈염(Potassium ferrocyanide) 10.6 g을 증류수에 녹여 100 mL로 만든다.

사) 0.1 N-치오시안산 암모늄용액(Ammonium thiocyanate) 또는 0.1 N-치오시안산칼륨용액(Potassium thiocyanate) (0.1 N-용액은 순수한 K_{SCN} 약 9.7 g을 증류수에 녹여 1,000 mL로 만든다)

* 표정: 이미 표정한 0.1 N-질산은 용액 20 mL를 삼각플라스크에 취하고 진한 질산 0.5 mL와 황산철

암모늄(Ammonium ferric sulfate) 포화용액을 1 mL 가한 다음 뷰렛으로부터 치오시아칼륨(K_{SCN}) 표준용액을 적하한다. 액이 백색에서 미홍색으로 되는 점에서 적정을 끝낸다. 적정에 소요된 치오시아칼륨용액의 mL수가 V mL 이라면 0.1 N-치오시아산 칼륨용액의 $F_{SCN} = 20.0 \times F_{Ag} / V$ 이다.

아) 0.1 N-질산은 용액 : 특급질산은 17.0 g을 증류수에 녹여 1,000 mL로 만든다.

* 표정: 특급염화칼륨을 100~120℃에서 2시간 건조하여 데시케이터에서 방냉하여 3.7 g을 정확히 취하여 증류수에 녹여 500 mL로 만든다. 염화칼륨의 양을 a g이라고 하면 0.1N - 염화칼륨 용액의 역가는 $F_{Cl} = a/3.728$ 이다.

삼각플라스크에 0.1 N-염화칼륨 기준용액을 정확히 20 mL 취하여 1% 옥살산칼륨용액 5방울을 가하고 뷰렛에서 질산은 표준용액을 적하하여 염화은의 침전을 함유한 황백색액이 오렌지색으로 되는 점을 종말점으로 한다.

적정에 소요된 표준용액을 a mL, 사용한 염화칼륨 기준액을 b mL, 그 역가를 F_{Cl} 로 하면 0.1 N-질산은 표준액의 역가는 $F_{Ag} = F_{Cl} \times b/a$ (여기에서 b = 20이다)

2) 시료액의 조제

가) 유기물이 전혀 없는 시료

10 g미만(Cl 함량이 3 g미만)의 시료를 500 mL 메스플라스크에 넣고 증류수(약 20℃) 400 mL를 가하고 믹서(Mixer)에서 30분간 혼합한 다음 증류수로 표선까지 채우고 혼합한 다음 여과한다.

나) 유기물이 포함된 시료

(1) 시료 5g을 250 mL 메스플라스크에 넣고 활성탄(Activated charcoal) 1g을 넣는다.

(2) 약 20℃의 증류수 200 mL까지 채우고 여과한다.

(3) Carrez용액 I 5 mL를 넣어 잘 혼합하고 다시 Carrez용액 II 5 mL를 넣는다.

(4) 30분간 믹서에서 혼합한 다음 250 mL까지 증류수로 채우고 여과한다.

3) 방법

가) 앞에서 얻은 용액 25~100 mL(Cl 함량이 150 mg이하)에 질산 (Nitric acid) 5 mL와 포화 황산 철암모늄(Ammonium ferric sulfate)용액 5 mL를 넣는다.

나) 여기에 과잉의 질산은을 넣는다.

다) 에테르 5 mL를 넣고 침전물이 응고되도록 강하게 흔들어 준다.

라) 남아있는 질산은 용액(10 mL)을 0.1 N-치오시아(Thiocyanate) 용액으로 적갈색이 약 1분간 지속될 때까지 적정한다.

4) 계산

$$\text{염분}(\%) = W/\text{시료무게}(g) \times 1/1000 \times 100$$

$$W : 5.844 \times (V_1 \times F_{Ag} - V_2 \times F_{scn})$$

W : 염화나트륨 mg

V_1 : 0.1 N-질산은 용액 mL

V_2 : 0.1 N-치오시아산 암모늄 용액, 또는 0.1 N-치오시아산 칼륨용액 mL

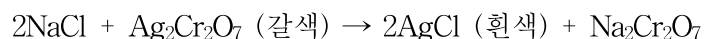
F_{Ag} : 0.1 N-질산은 용액의 역가

F_{scn} : 0.1 N-치오시아산 칼륨 용액의 역가

나. 퀀타법(Quantab chloride Titrator)

1) 원리

Quantab chloride titrator의 T자형 모세관 수직부에 충전된 Silver dichormate와 추출액 중의 염소 이온이 다음과 같이 반응하여, 흰색의 염화은($AgCl$)이 생긴다.



2) 기구 : 삼각 플라스크, 비커, 깔대기

3) 시약 : 퀀타법

4) 시료액의 조제

시료 5g을 300 mL 삼각플라스크에 취하고 뜨거운 증류수 45 mL를 가하여 잘 흔들면서 염분을

용해시킨 후 비커에 No.5A여과지로 여과하여 시료액으로 한다.

5) 측정

가) 여과한 시료액 1 mL를 깨끗한 시험관에 옮겨 혼합한 후 퀴타 스트립을 담근다. (회색이 필요할 경우 증류수로 희석한다.)

나) 모세관 현상에 의해 시료액이 상부로 올라가면서 갈색이 흰색으로 변한다.

다) 상단의 수평 완성 밴드의 색상이 노란색에서 검은색으로 바뀔 때까지 기다린 다음 시험관에서 퀴타 스트립을 꺼낸다.

라) 흰색과 갈색의 경계에서 가장 높은 흰색 끝 부분의 위치를 찾아 눈금을 읽는다.

6) 계산

눈금을 읽은 수치를 표에서 찾아 그때의 함량에 희석배수를 곱한다.

4.9. 염소(Cl)

가. 시약, 시료액의 조제 및 측정법 : 4.8. 염분(NaCl) 가. 적정법의 1)시약의 조제, 2) 시료액의 조제 및 3) 방법에 따른다

나. 계산

$$\text{염소(\%)} = W/\text{시료무게(g)} \times 1/1000 \times 100$$

$$W : 3.545 \times (V_1 \times F_{\text{Ag}} - V_2 \times F_{\text{scn}})$$

$$W : \text{염소(Cl)} \text{ mg}$$

$$V_1 : 0.1 \text{ N-질산은 용액 mL}$$

$$V_2 : 0.1 \text{ N-치오시안산 암모늄용액 또는 0.1 N-치오시안산 칼륨용액 mL}$$

$$F_{\text{Ag}} : 0.1 \text{ N-질산은 용액의 역가}$$

$$F_{\text{scn}} : 0.1 \text{ N-치오시안산 칼륨 용액의 역가}$$

4.10. 망간(Mn)

가. 원자흡광분광광도법

1) 시약의 조제

망간(Mn)표준원액 : 금속망간(99.9%) 100 mg을 취하여 황수(염산 3 : 질산 1) 5 mL를 가하여 황색연기가 없어질 때까지 가열 용해한 후 방냉하여 증류수로 100 mL가 되게 한다. 시판표준원액 사용가능

2) 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

3) 측정

미리 예열한 원자흡광분광광도계 파장 279.5 nm에서 측정하는데 먼저 표준원액을 적당히 희석하여 검량선을 작성하고 시료액의 흡광도를 구한다.

4) 계산

$$\text{망간(\%)} = \frac{\text{시료액의 흡광도} / \text{1ppm기준 흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)} \times 10^6} \times 100$$

나. 분광광도법(과요오드산 칼륨법)

1) 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

2) 방법

가) 전처리한 시료를 100 mL 비커에 넣고 황산용액(1+1) 10 mL 넣어 가열 증발시켜 황산의 흰 연기를 발생시킨다.

나) 냉각한 다음 물 30 mL와 인산 1 mL를 넣어 가열하면서 녹이고 불용성 물질에 석출되면 여과

하고 침전을 씻어 준 다음 여액과 씻은 액을 합하여 가열 농축하여 약 30 mL로 한다. 과요오드산 칼륨 0.5 g을 넣어 끓는 수욕 중에서 30분간 끓인다.

- ※ 과요오드산칼륨으로 산화할 때 장시간 끓여 주면 생성된 과망간산이 분해되므로 주의하여야 함
- 다) 냉각시킨 다음 50 mL용량 플라스크에 옮겨 증류수를 표선까지 채워 흔들어 섞는다. 이 용액의 일부를 10 mm 흡수셀에 넣어 분광광도계로 525 nm에서 흡광도를 측정하고, 미리 작성한 검량선으로부터 망간의 양을 구하고 농도(mg/L)를 산출한다.

3) 계산

$$\text{망간(\%)} = \frac{\text{시료액흡광도} / 1\text{ppm 기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료무게(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.11. 아연(Zn)

가. 분광광도법(진콘법)

1) 시약의 조제

가) 5% 수산화나트륨 용액

나) 1% 시안화칼륨 용액 : 시안화칼륨 10g을 물에 녹여 1,000 mL로 한다. 이 용액을 강염기성 음이온 교환수지인 R-OH형에 유출시키고 수지가 R-CN형으로 변화한 다음의 유출액을 취한다.

다) 10% 포수클로랄용액 : 포수클로랄(1수화물) 10 g을 물에 녹여 100 mL로 한다.

라) 시료액의 조제 : 4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

2) 방법

가) 시료 적당량을 100 mL 비커에 취하여 5% 수산화나트륨 용액을 한 방울씩 떨어뜨려 약 pH 7로 중화한다.

나) 아스코르빈산나트륨 0.5 g, 1% 시안화칼륨용액 1 mL를 넣고 잘 흔들어 섞는다. 다음에 염화칼륨·수산화나트륨 완충액(pH 9.0) 5 mL, 진콘용액 3 mL, 10% 포수클로랄 용액 3 mL를 넣어 흔들어 섞고 2~5분간 방치하여 층상 10mm 흡수셀에 옮겨 검액으로 한다. 따로 아연을 함유하지 않은 물을 취하여 대조액으로 한다.

다) 분광광도계로 620 nm에서 검액의 흡광도를 측정하고 미리 작성한 검량선으로부터 아연의 양을 구하고 농도(mg/ L)를 산출한다.

3) 계산

$$\text{아연(\%)} = \frac{\text{시료액흡광도} / 1\text{ppm 기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료무게(g)} \times 10^6} \times 100$$

나. 원자흡광분광광도법

1) 시약의 조제

아연(Zn) 표준원액(1,000ppm) : 금속아연(99.9%이상) 100 mg을 염산용액(1+3) 5 mL로 가열 용해하여 증류수로 100 mL가 되게 한다. 시판 표준액 사용 가능

2) 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

3) 측정

미리 예열한 원자흡광분광광도계 파장 213.9 nm에서 측정하는데 먼저 표준 원액을 적당히 희석하여 검량선을 작성하고 시료액의 흡광도를 구한다.

4) 계산

$$\text{아연(\%)} = \frac{\text{시료액흡광도} / 1\text{ppm 기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료무게(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.12. 구리(Cu)

가. 분광광도법(디에틸디티오카바민산법)

1) 시약의조제

가) 0.1% 메타크레졸퍼플에틸알콜 용액

나) 구연산 2암모늄 용액, 에틸렌디아민테트라초산나트륨 용액, 초산부틸 : 동시험용

다) 암모니아수(1:1)

라) 1% 디에틸디티오카바민산나트륨 용액 : 디에틸디티오카바민산나트륨(3수화물) 1.3g을 물에 녹여 100 mL로 한다. 착색용기에 보관하여 14일 이내에 사용한다.

2) 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

3) 방법

가) 전 처리한 시료 적당량을 분액깔대기에 넣어 0.1% 메타크레졸퍼플에틸알콜 용액 2~3방울 넣고 구연산2암모늄 용액 2 mL, 에틸렌디아민테트라초산나트륨 용액 1 mL를 넣고 암모니아수로 옅은 자색을 나타낼 때까지 중화하고 물을 넣어 50 mL로 한다.

나) 1% 디에틸디티오카바민산나트륨 용액 2 mL를 넣고 초산부틸 10 mL를 정확히 넣어 약 2분간 세게 흔들어 섞고 정치한다.

다) 초산부틸층을 분리하고 건조한 여지로 여과하고 용액의 일부를 층장 10 mm 흡수셀에 넣어 분광광도계로 440 nm에서 흡광도를 측정하고, 미리 작성한 검량선으로 부터 동의 양을 구하고 농도를 산출한다.

4) 계산

$$\text{구리(\%)} = \frac{\text{시료액흡광도} / 1\text{ppm 기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료무게(g)} \times 10^6} \times 100$$

나. 원자흡광분광광도법

1) 시약의 조제

구리(Cu) 표준원액(1,000ppm) : 금속동(99.9%이상) 100 mg을 질산(1+2) 20 mL를 가하여 가열용해하고 증발건고(蒸發乾固)하고 냉각 후 증류수를 가하여 용해 전량을 100 mL로 한다. 시판 표준원액 사용가능

2) 시료액의 조제

4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

3) 측정

미리 예열한 원자흡광광도계 파장 324.7 nm에서 측정하는데 먼저 표준원액을 적당히 희석하여 검량선을 작성하고 시료액의 흡광도를 구한다.

4) 계산

$$\text{구리(\%)} = \frac{\text{시료액흡광도} / 1\text{ppm 기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료무게(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.13. 코발트(Co)

가. 시약의 조제

1) Co 표준용액(1000 ppm)을 10 mL를 취하여 100 mL 메스플라스크에 넣고 증류수로 표선까지 채워 100 ppm으로 희석한다.

2) Spekker acid : 85% H₃PO₄ 150 mL + H₂SO₄ 150 mL + D.W. 700 mL

3) Nitroso-R salt soln. : C₁₀H₄OHNO(SO₃Na)₂ 2 g을 증류수 100 mL에 녹인다.

4) Sodium acetate soln. : NaOAC · 3H₂O(CH₃COONa) 500 g을 증류수 100 mL에 녹인다.

5) 질산(HNO₃)

나. 방법

전 처리한 시료 적당량을 100 mL 메스플라스크에 넣고 1:1 염산 5 mL 정도를 넣어 용해시킨 후 100 mL로 정용하여 이 액을 다시 100 mL 메스플라스크에 1 mL를 뽑아 넣고 코발트 표준용액을 1, 3, 5 ppm 비율로 취하여 Spekker acid를 각각 2 mL씩 뽑아 넣고 Sodium acetate 용액을 각각 10 mL씩 넣는다. Nitroso-R salt 용액을 5 mL 넣은 후 이 액들을 가열교반기에서 끓기 시작하면서 1~2분 사이에 질산 5 mL를 서서히 넣는다. 이 액들을 방냉 시킨 후에 100 mL로 표선을 채운 후 2시간 이내에 비색계에서 측정한다. 이 때 파장은 540 nm이다.

단 blank는 Spekker acid 2 mL, Sodium acetate soln. 10 mL만 넣어 100 mL 메스플라스크에 표선을 채운다. 시료액도 std.와 같이 최종 희석시킨 후 측정한다.

다. 계산

$$\text{코발트(\%)} = \frac{\text{시료액흡광도} / 1\text{ppm 기준흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료무게(g)} \times 10^6} \times 100$$

4.14. 몰리브덴(Mo)

가. 치오시안산나트륨법

1) 시약의 조제

가) 표준몰리브덴액 : 특급3산화몰리브덴(MoO_3 , 황산데시케이터중에서 24시간 이상 건조한 것) 1.5 g을 소량의 물로 적시고, NaOH 5 g을 가하여 녹인 후, 물을 가하여 정확히 1 L로 하여 표준 Mo 원액을 조제하고 착색병에 저장한다. 사용시 이 원액의 일정량을 물로 정확히 100배 희석한다.

나) 치오시안산나트륨 : NaSCN 10 g을 물에 녹혀 100 mL로 한다.

다) 황산철(III) 액 : 황산철(III) 5 g을 물 및 황산(1:1) 약 10 mL에 녹이고 100 mL로 한다.

라) 염화주석(II)액 : 염화주석(II) 100 g을 염산(1:1) 400 mL를 가해 가온하여 녹인 후 물을 가하여 1 L로 하고 소량의 입상주석을 가하여 착색병에 저장한다.

2) 공시액의 조제

시료 2~10 g을 자체증발접시에 취하고 처음은 열판상에서 가열하여 탄화시키고, 다음 약 250°C의 전기로에 넣고 1시간 약 50°C 전후의 승온온도로 가열하여 약 450°C에서 회화시킨다. 방냉후 질산 약 5 mL를 가해 열판상에서 가열하여 분해하고 다시 가열을 계속해 산을 거의 증발시켜 방냉한다. 방냉후 온염산(1 : 5) 약 25 mL를 가해 잠시 가열하여 녹이고 냉각 후 물을 가해 정확히 100 mL로 한 후 즉시 건조 여지로 여과한다.

3) 방법

공시액의 일정량을 100 mL의 메스플라스크에 정확히 취하고 황산(1:1) 5 mL(황산으로 분해한 공시액에서는 함유한 황산량 만큼 감한다) 과염소산 5 mL 및 황산철액 2 mL를 가하여 혼합하고, 다시 치오시안산나트륨액 16 mL 및 염화주석(II)액 10 mL를 공시액을 진탕하면서 서서히 차례로 가한 후 눈금까지 물을 가한다. 철에 의한 적색이 없어진 후 용액이 혼탁한 경우에는(혼탁이 치오시안산동 (1)에 의한 때는 1시간 방치한 후) 원심분리하여 제거하고 공시험의 액을 대조액으로 파장 460 nm 부근에서 흡광도를 측정한다. 따로 표준 Mo을 몇 단계로 정확히 취하고 공시액의 경우와 동일조건에서 조작하여 작성한 검량선에서 Mo의량을 구한다.

나. 원자흡광분광광도법

1) 시약의 조제

가) 표준몰리브덴액 : 4.14. 몰리브덴(Mo) 가. 치오시안산나트륨법 1) 시약의 조제 가)표준몰리브덴액에 따른다.

나) 8-퀴노리놀액 : 8-퀴노리놀(옥신 : $\text{C}_9\text{H}_6\text{N} \cdot \text{OH}$) 20g을 비커에 취하고 빙초산 50 mL를 가하여 수욕상에서 가열하여 녹인 후 물을 가하여 100 mL로 한다.

2) 공시액의 조제

4.14. 몰리브덴(Mo) 가. 치오시안산나트륨법 2) 공시액의 조제에 따른다.

3) 방법

공시액의 일정량을 100 mL의 메스플라스크에 정확히 취하고, 1M 염산 10 mL 8-퀴노리놀 5 mL 및 물을 가하여 약 80 mL로 하고 잘 진탕한 후 잠깐 방치한다. 2-heptanone 또는 4-methyl-2-pentanone 5~10 mL를 가하고 1~2분간 격렬하게 진탕한 후 정치한다. 여기에 물 약 20 mL를 가하고 상층의 유기용매층에 대해 원자흡광분석기로 파장 313.3 nm에서 흡광도를 측정한다. 동시에 표준 몰리브덴액을 몇단계로 정확히 취하고 공시액의 경우와 동일 조건에서 조작하여 작성한 검량선에서 Mo의량을 구한다.

4.15. 요오드(I)

가. 대상시료 : 혼합광물질 사료(유기물이 전혀 포함되지 않은 시료)

나. 방법

200~300 mL의 Ni 접시에 시료 적당량을 칭량하고 약 5 g Na_2CO_3 , 1:1 NaOH 5 mL, 알콜 1 mL를 가하여 시료가 축축히 젖도록 한다. 알콜을 날리기 위해 steam bath에서 가열한다. 가열 후, 시료가 튀는 것을 방지하기 위해 약 100°C에서 건조한다. (약 30분 정도) Ni 접시를 500°C 전기로에서 15분간 방치한다.(500°C에서 태우는 것은 $\text{Br}_2\text{-H}_2\text{O}$ 에 의해서 산화되는 가용성 유기물을 탄화시키기 위해 필요하다. 필요하다면 500°C 이상에서 진행하여도 된다) 방냉 후 25 mL 증류수를 가하여 시계접시를 덮고 서서히 10분간 끓인다. 18 cm 여과지에 여과하고 끓는 물로 씻는다. (600 mL 비커에 여과하고 여과액은 약 300 mL가 되어야 한다) 메틸오렌지를 지시약으로 85% H_3PO_4 를 과잉으로 가하고 5분이상 색이 없어질 때까지 서서히 끓인다. 약간의 salicylic acid 결정을 가하고 약 20°C로 방냉한다. 85% H_3PO_4 1 mL를 가하고 약 0.5 g KI를 가한다. 0.005 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 로 I_2 를 적정한다. 유리된 I_2 의 색깔이 거의 없어지면 starch 용액을 가한다.

다. 계산 : 1 mL 0.005N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ = 0.1058 mg I_2

4.16. 산화알루미늄(Al_2O_3)

가. EDTA법(Volumetric 정량법)

1) 기구

백금크루시블(자제 크루시블), 전기로, 비커, 수조(Water bath), 세척병

2) 시약의 조제

가) 초산암모늄 완충용액 (pH 4.8) : 초산암모늄(Ammonium acetate) 77 g을 증류수 200 mL에 녹이고 빙초산 57 mL를 넣은 다음 증류수로 1 L가 되게 한다.

나) 에리오크롬 블랙 T. 염화나트륨지시약 : 에리오크롬블랙 T(Eriochrome black T) 0.5 g과 염화나트륨(Sodium chloride) 100 g을 분말형태로 고르게 혼합한다.

다) 0.05M-초산아연 용액 : 초산아연(Zinc acetate) 10.975g을 증류수 1 L에 녹인다.

※ 표정 : 0.05 M-EDTA 용액 20 mL를 정확히 비커에 취하여 증류수 50 mL를 가하고 pH 10.7 암모니아, 염화암모늄 완충액 3 mL 및 에리오크롬 블랙 T. 염화나트륨 지시약 약 40 mg을 넣고 0.05 M-초산아연용액으로 적정하여 Mol 농도 계수를 계산한다.

라) 0.05 M-EDTA 용액 : EDTA-2Na 18.613 g을 증류수 1 L에 녹인다.

마) 암모니아. 염화암모늄 완충액(pH 10.7) : 염화암모늄(Sodium chloride) 67.5 g을 증류수에 용해시킨 후 암모니아수(Ammonium hydroxide) 570 mL를 가한 다음 증류수로 1 L를 만든다.

3) 시료액의 조제

시료 2 g을 백금 크루시블(또는 자제 크루시블)에 취하고 탄산나트륨(Sodium carbonate) 4 g을 넣어 완전히 혼합하고 다시 탄산나트륨 1 g으로 표면을 덮고 뚜껑을 덮은 후 온도를 서서히 올려 850°C 이상에서 2시간 용융하고(완전히 용융된 것을 육안으로 점검) 방냉 후 증류수 30 mL로 내용물을 씻어 300 mL 비커에 넣은 후 다시 농염산 30 mL와 과염소산(Perchloric acid) 10 mL로 크루시블을

잘 씻어 비커에 넣고 Water bath에서 백색가루가 될 때까지 증발건고한 후 뜨거운 증류수로 녹여 No.6 여과지로 여과하여 전량을 500 mL로 하여 시료액으로 한다. 이때 여과지에 남아있는 잔사는 0.5% 염산으로 10~12회 씻어주고 다시 증류수로 씻어준 후 중량을 구하여 규산으로 한다.

4) 측정

시료액 20 mL를 300 mL 비커에 정확히 취하고 0.05 M-EDTA 용액 30 mL를 정확히 넣고 초산암모늄 완충용액(pH 4.8) 20 mL를 넣은 다음 5분간 끓인 후 실온에서 방냉한다. 이 액에 에탄올 55 mL를 넣고 암모니아. 염화암모늄지시약 40 mg정도 넣고 0.05M-초산아연 용액으로 적정하는데, 종말점은 옅은 녹색에서 옅은 적색으로 변할 때로 하고 같은 방법으로 공시험을 한다.

5) 계산

$$\text{산화알루미늄(\%)} = \frac{0.00254908 \times f \times \text{희석배수} \times (A-B)}{\text{시료무게(g)}} \times 100$$

나. 중량법

1) 기구

백금크루시블(자제크루시블), 전기로, 비커, 세척병, Water bath, 건조기, 원자흡광광도계, 분광광도계

2) 시약의 조제

- 가) 0.5%(v/v)염산 : 농염산 5 mL를 취하여 증류수 1 L 되게 한다.
- 나) 암모니아수 용액 (1:3) : 암모니아수와 증류수를 1:3 비율로 희석
- 다) 2% 염화암모늄 용액 : 염화 암모늄(Ammonium chloride) 20 g을 증류수로 용해하여 1 L로 한다.

3) 시료액의 조제

4.16. 산화알루미늄(Al_2O_3) 가. EDTA법(Volumetric 정량법) 3) 시료액의 조제에 따른다.

4) 측정

시료액 중에서 200 mL를 취해서 300 mL 비커에 넣고 메칠레드 지시약 2~3 방울을 떨어뜨린 후 서서히 교반하면서 암모니아수(1:3)를 가하여 연노란색을 띤 은백색의 침전이 생기면 멈추고 가열하여 탄산가스와 암모니아를 날려보낸 후 No.6 여과지로 여과하여 침전을 뜨거운 증류수로 충분히 씻어준 후 2% 염화암모늄 용액으로 3회 씻어주고 뜨거운 증류수로 충분히 씻어준 후 건조하여 크루시블에 넣고 뚜껑을 덮은 후 800℃에서 2시간 태우고 데시케이터에서 40분간 방냉 후 무게를 측정한다. 이때 시료액에 대하여 산화철과 5산화인의 함량을 별도로 구한다.

5) 계산

$$\text{산화알미늄(\%)} = \frac{\text{잔사중량} - (\text{산화철} + 5\text{산화인})}{\text{시료무게(g)}} \times 100$$

시료의 중량(g) : $2 \text{ g} \times 250/500$

※ 산화철과 5산화인은 상기 시료중량에 대한 함량임

4.17. 셀레늄(Se)

가. 시약의 조제

1) 셀레늄 표준액

셀레늄 0.5 g을 정확히 칭량하여 툴비이커에 넣는다. 초산 10 mL를 가해 수욕조에서 가열 용해한다. 과연소산 2 mL를 가하고 가열하면서 약 2 mL 정도가 될 때까지 농축하고 염산 5 mL를 가하여 5분간 가열한다. 방냉 후 증류수로 500 mL 메스플라스크에 옮겨 담고, 표선까지 증류수를 가하여 셀레늄 표준원액을 조제한다. 사용시, 표준원액의 일정량을 염산 : 증류수(1:100)으로 정확히 희석하고 1 mL중에 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 μg 을 함유하는 각 셀레늄 표준액을 조제한다.

2) 디아미노나프탈렌액

2,3-디아미노나프탈렌 0.1 g을 200 mL 툴비이커에 넣는다. 염산 : 증류수(1:100)을 가하고 50℃ 수욕조에서 가온하면서 용해한다. 방냉 후 이 액을 분액여두 A에 넣고 시클로헥산 40 mL를 가하

여 진탕한다. 수층(하층)을 분액여두 B에 넣고 시클로헥산 40 mL를 가하여 진탕하고 수층을 No. 2S여과지로 여과한다.

3) EDTA 용액

에틸렌디아민4초산2수소나트륨2수화물 18.6 g을 증류수로 용해하여 500 mL로 한다.

나. 시료용액 조제

분석시료 2 g을 정확히 칭량하여 200 mL의 툴비이커에 넣는다. 질산 20 mL 및 과염소산 5 mL를 가하여 시계접시를 덮고 하룻밤 방치한다. 가열교반기에서 서서히 가열하다 거품이 사라지면 온도를 높여 건고 직전까지 농축한다. 방냉 후, 염산 5 mL를 가하고 5분간 가열하여 환원시킨다. 다시 방냉 후 증류수로 100 mL의 메스플라스크에 옮기고 표선까지 증류수를 가하여 시료액으로 한다. 시료를 넣지 않고 조제하여 blank로 한다.

다. 방법

시료액의 일정량을 100 mL의 툴비이커에 정확히 넣는다. EDTA 용액 5 mL를 가하여 pH를 염산 : 증류수(1:4)로 1.0~1.5로 조정한다. 다음 염산:증류수(1:100)로 100 mL의 분액여두에 옮겨 담는다. 시클로헥산 10 mL를 정확히 가하고 5분간 진탕한다. 방치한 후 수층(하층)을 버리고 잔류액을 염산 : 증류수(1:100) 25 mL씩 2회 진탕 세정한다. 시클로헥산층(상층)을 시험관에 옮겨담고, 적당량의 무수황산나트륨을 가하여 탈수한 후 No.2S여과지로 여과하여 시료액으로 한다. blank용액 및 각 셀레늄 표준액을 동일하게 조제한다. blank용액을 대조액으로 하고 시료용액에 대하여 여기과장 378 nm 및 형광과장 520 nm로 형광광도를 측정한다.

4.18. 규산(이산화규소-SiO₂), 규소

가. 중량분석법

1) 정의

시료를 용융처리하여 수용성으로 만든 것을 증발 건고 한 후 칭량하고 여기에 불산과 황산을 넣어 가열하여 규소를 회산시켜 전후 차이에 의한 규산을 구하는 방법으로 사료 중의 규산(SiO₂) 성분을 산출하는 방법에 대하여 기술한다.

2) 측정기기 및 원리

규산염에 Na₂CO₃과 K₂CO₃을 넣고 가열 용융하면 규산은 Na₂SiO₃ 또는 K₂SiO₃로 Mg는 KMgO 또는 MgCO₃로 되고, Al은 KAlO₂, NaAlO₂ 상태로 되어 수용성이 된다. 규산외의 물질은 용해, 여과 과정을 거쳐 분리되게 하고 규산 잔사를 측정

3) 시약, 초자기구 및 기기

가) 시약

- (1) 용융합제(Na₂CO₃ : K₂CO₃ 5:7)
- (2) Hydrochloric acid(염산) : 36%의 반도체용
- (3) Water : 3차 증류수

나) 초자기구

- (1) Tall beaker(툴 비이커) : 300 mL(Pyrex 재질)
- (2) 백금 도가니 : 50 mL(850℃ 이상에서 견딜 수 있어야 한다)
- (3) Filter paper : Ash free 제품(No. 6)으로 한다.

다) 기기

- (1) 회화로(Muffle Furnace) : 250℃부터 850 ± 10℃까지 정확하게 조절 가능한 것이어야 한다.
- (2) 화학저울(Chemical Balance) : 정확도는 0.0001 g 정도

4) 분석방법

가) 알칼리용융처리

- (1) 백금도가니에 용융합제(Na₂CO₃과 K₂CO₃을 5:7로 혼합) 2 g와 시료0.4 g 정도를 넣고 혼합한 후 용융합제 1 g을 덮고 850℃에서 2시간 이상 용융한다.
- (2) 백금도가니가 식으면 용융상태를 확인하고, tall beaker에 백금도가니를 넣고 염산(1:1)을

백금도가니에 가한 뒤 방치하여 용해시킨다. 백금도가니 바닥에 남은 용융물질을 tall beaker에 여러번 씻어 넣는다.

- (3) tall beaker를 물중탕 97℃에서 완전건고 될 때까지 건고하고, 건고위에 진한염산을 적시고 증발, 건고 시킨다. 이것을 5회 이상 반복한다.
- (4) tall beaker에 1% HCl을 넣어 건고물질을 녹인 다음 No.6 거름종이에 조용히 붓고 tall beaker를 1% HCl로 수차 씻어 넣는다. 1% HCl로 용융물질 거르는 작업을 5회 이상 반복한다. 다시 온수로 5회 이상 씻어 내린다. 여과지에 남아있는 잔사에 0.5%염산으로 10회이상 씻고 다시 증류수로 씻어 건조시킨다.
- (5) 600℃에서 30분간 강열한 후 데시케이터에서 방냉하고 무게를 측정한 백금접시 또는 자기접시에 거름종이를 넣고 온도를 서서히 올려 600℃에서 2시간 회화 후 같은 desiccator에서 방냉한다.

나) 데이터 분석 및 정리

- (1) 함량을 규산(SiO_2)으로 나타낼 경우함량(%)=(5)의 건조전후의 무게차(g)/시료량(g)×100
- (2) 함량을 규소(Si)로 나타낼 경우함량(%)=(5)의 건조전후의 무게차(g)/시료량(g)×0.467×100

나. 알칼리 용융처리 후 ICP분석법

1) 측정 및 분석 원리

규산을 알칼리 용융하면 규산은 수용성이 된다. ($\text{SiO}_2 + \text{Na}_2\text{CO}_3 \xrightarrow{1000^\circ\text{C}} \text{Na}_2\text{SiO}_2 + \text{CO}_2$) 수용상태의 규소를 고주파유도코일에 의하여 형성된 Ar Plasma에 도입하여 6000~8,000 °K에서 원자가 여기상태(excited state)로 되었다가 기저상태(ground state)돌아갈 때 방출하는 발광선 및 발광광도를 측정하여 규산을 분석하여 농도를 산출한다.

2) 기 기

전기로. 백금도가니. ICP-AES. 열판.

3) 시약

탄산나트륨(Na_2CO_3)

4) 시료의 전처리

가) 백금도가니에 시료 0.25 g정도를 채취하여 탄산나트륨 1 g과 충분히 혼합한 다음, 그 위에 탄산나트륨1 g을 덮는다.

나) 이것을 전기로에 넣고, 1000℃에서 30분간 용융한다.

다) 식힌 다음, 증류수를 도가니의 80%정도 넣어 열판위에서 열을 서서히 가열 녹인다. 이 과정을 3차례정도 반복하여 flask(PVC)100 mL에 넣고, 물로 make-up한 후 filter paper (No. 6)로 거른다.

라) 처음 거른 용액은 버리고 거른액 1 mL를 정확히 취하여 flask (PVC)50 mL에 넣고 0.4 N Na_2CO_3 make-up 한다.

※ 화학천칭을 이용하면 정확한 배수 값을 얻을 수 있다.

5) ICP 기기 분석

가) 검정과장 251.611 nm에서 분석한다. 기기의 warming-up은 25분 이상 실시한다.

나) Standard는 분석물질 농도가 검량선 중앙에 올 수 있도록 하고 3~4단계의 표준용액을 조제한다. 표준용액은 실내온도에서 화학천칭을 이용하여 제조하고 matrix는 0.4 N Na_2CO_3 한다. 시료의 matrix와 일치 시킨다.

다) 4.19. ICP 발광분광분석법 다. 방법에 따른다.

6) 데이터 분석 및 정리

가) 함량을 규산(SiO_2)로 나타낼 경우

$$\text{규산함량}(\%) = \text{분석치(ppm)} \times \text{희석량(mL)} / \text{시료량(g)} \times 2.139 \times 10,000$$

나) 함량을 규소(Si)로 나타낼 경우

$$\text{규소함량}(\%) = \text{분석치(ppm)} \times \text{희석량(mL)} / \text{시료량(g)} \times 10,000$$

7) 분석결과 처리

규산의 측정값은 일반적인 등록치의 1/10의 수치까지 기록하되, Data의 값은 소숫점 이하 2자리까지로 보며, 소숫점 이하 3자리에서 반올림한다.

4.19. ICP 발광분광분석법

가. 표준용액의 제조

1) 단일원소표준용액

표준곡선작성을 위해서 표준용액계열을 만드는 보존용액으로서, 아래와 같이 만들어(1000 µg/mL), 적당히 필요한 농도로 희석하여 사용한다.

- Na : NaCl 2.542 g을 정밀히 달아 물에 녹여 1 L로 한다.
- Mg : $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10.550 g을 정밀히 달아 물에 녹여 0.1 N 질산으로 1 L로 한다.
- P : $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4.620 g을 정밀히 달아 물에 녹여 1 L로 한다.
- K : KCl 1.907 g을 정밀히 달아 물에 녹여 1 L로 한다.
- Ca : CaCO_3 2.497 g을 정밀히 달아 소량의 염산을 가하여 녹이고 0.1 N 염산으로 1 L되게 한다.
- Cr : $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 2.829 g을 정밀히 달아 물에 녹이고 0.02 N 질산으로 1 L되게 한다.
- Mn : Mn 1.000 g을 정밀히 달아 물에 녹이고 소량의 8 N 질산을 가하여 가열하여 녹인 다음 0.1 N 질산으로 1 L되게 한다.
- Fe : Fe 1.000 g을 정밀히 달아 소량의 8 N 질산을 가하여 녹인 다음 0.1 N 질산으로 1 L되게 한다.
- Co : Co 1.000 g을 정밀히 달아 소량의 8 N 질산을 가하여 녹인 다음 0.1 N 질산으로 1 L되게 한다.
- Cu : Cu 1.000 g을 정밀히 달아 소량의 8 N 질산을 가하여 녹인 다음 0.1 N 질산으로 1 L되게 한다.
- Zn : Zn 1.000 g을 정밀히 달아 소량의 8 N 질산을 가하여 녹인 다음 0.1 N 질산으로 1 L되게 한다.
- As : As_2O_3 1.320 g을 정밀히 달아 소량의 1 N 질산을 가하여 녹인 다음 0.25 N 염산으로 1 L되게 한다.
- Se : SeO_2 1.405 g을 정밀히 달아 소량의 물로 녹이고 0.5 N 질산으로 1 L 되게 한다.
- Mo : $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.841 g을 정밀히 달아 물에 녹이고 0.5 N NH_4OH 로 1 L 되게 한다.
- Cd : Cd 1.000 g을 정밀히 달아 소량의 8 N 질산을 가하여 녹인 다음 0.5 N NH_4OH 로 1 L되게 한다.
- Hg : HgCl_2 1.354 g을 정밀히 달아 물에 녹인 다음 0.5 N 질산으로 1 L되게 한다.
- Pb : Pb 1.000 g을 정밀히 달아 소량의 8 N 질산을 가하여 가열하여 녹인 다음 0.1 N 질산으로 1 L되게 한다.
- Al : Al 금속 1 g을 6 N 염산에 녹여 물로 희석하여 1 L 되게 한다
- Si : SiO_2 2.140 g을 백금도가니에 넣고 무수탄산나트륨 2 g을 가하여 용융시킨 다음 물로 녹여 1 L가 되게 한다.

2) 혼합표준용액 : 단일원소표준용액을 써서 조제한 다원소분석용 표준곡선 작성을 위한 혼합표준액으로 한다.

3) 단일원소 및 혼합표준용액은 인증표준물질(Certified Reference Material: CRM)을 이용할 수 있다.

나. 시료액의 조제

- 1) 칼슘(Ca), 인(P), 칼륨(K), 유황(S), 마그네슘(Mg), 나트륨(Na), 망간(Mn), 아연(Zn), 구리(Cu), 코발트(Co), 셀레늄(Se), 철(Fe)의 경우 4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

2) 염분(NaCl), 염소(Cl), 알루미늄(Al), 몰리브덴(Mo), 규소(Si)의 경우 개별 시험법의 시료액의 조제에 따른다.

다. 방법

1) 기기조건

가) 고주파출력 : 수용액시료의 경우 0.8~1.4kW, 유기용매의 경우에도 1.5~2.5kW로 설정.

나) 가스유량의 설정 : 냉각가스, 보조가스, 캐리어가스의 3개의 유로를 지닌 플라즈마 토취에서 각각의 가스 유량을 10~18 L/min, 0~2 L/min, 0.5~2 L/min의 범위로 설정. S, P의 진공자외역의 발광측정으로는 진공분광기 혹은 가스 파- 지분광기를 사용하여 다시 플라즈마와 분광기간의 광축을 알곤 또는 질소가스로 치환한다.

다) 시험용액 도입량 : 캐리어가스 유량은 1~2 L/min일 때 빨아 올리는 양은 1~2 mL/min이 표준

라) 플라즈마관측높이 : 유도코일상단에서 15~18 mm인 범위로 한다. 다만, 알칼리 원소의 경우에는 20~25 mm 범위로 한다.

마) 분석선 : 일반적으로 다음의 최고 감도의 분석파장에 설정한다. 다만, 용액중의 분석대상원소 농도가 높아 스케일아웃하는 경우에는 저감도 분석선을 쓴다. 최고감도의 분석선 파장에서 분광간섭을 받을 경우에는 분광간섭을 받지 않는 파장을 선택한다.

As	193.696	Mo	202.030	P	213.618
I	206.160	Fe	259.940	Pb	220.353
K	769.896	Na	588.995	Zn	213.856
Se	196.025	Cd	228.802	Hg	194.227
Ca	393.366	Co	228.616	S	180.6
Mg	279.353	Cr	205.552	Al	396.052
Mn	257.610	Cu	324.754	Si	251.611

2) 표준곡선법

원소농도가 다른 각 혼합표준용액중의 각 원소의 농도를 미리 데이터 처리장치에 기억시킨 다음 각 혼합표준용액을 플라즈마에 도입하여 각 원소의 스펙트럼선 강도를 측정하여 표준곡선을 작성한다. 그 다음 시험용액을 플라즈마에 도입하여 스펙트럼선 강도를 측정하고 다시 백그라운드 보정을 하여 표준곡선으로부터 각 분석대상원소의 농도를 구한다.

3) 내부표준법

혼합표준용액과 시료용액의 양쪽에 내부표준원소로서 Y 또는 Co를 10 ppm 되도록 첨가하여 분석대상원소의 발광광도/내부표준원소의 발광광도의 값을 각각에 대하여 측정한다. 혼합표준용액의 각 분석대상 원소의 발광강도의 값을 써서 내부 표준분석용 표준곡선을 작성하여, 그의 표준곡선으로부터 시험용액의 발광강도의 값에 상당한 각 분석대상원소의 농도를 구한다. 표준곡선법과 동일하게 백그라운드 보정을 한다.

4) 표준첨가법

시험용액을 10 mL씩 4개의 시험관에 분취하여 그 중의 3개에는 혼합표준용액을 시험용액중의 분석대상 원소량의 약 0.5, 1.0, 1.5배로 되도록 첨가한다. 각 시험관의 용액에 대해서 발광강도를 측정하여 4개의 측정점으로 부터 얻은 직선을 외삽하여 각 분석대상원소의 농도를 산출한다. 표준곡선법과 동일하게 백그라운드 보정을 한다.

5장. 중금속

5.1. 크롬(Cr)

가. 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP)

5.4.납(Pb) 가. 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP)에 따라 시험한다.

나. 비색법(Diphenyl Carbazide 법)

1) 기구

분광광도계, 자제 크루시블, 전기로, 메스 플라스크

2) 시약의 조제

가) 크롬 표준용액 : 크롬을 4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 1) 시약의 조제에 따른다.

나) 디페닐 카르바지드(Diphenyl carbazide)용액 : 디페닐 카르바지드 0.5 g을 아세톤 100 mL에 용해한다.

3) 시료액 조제 : 4.1. 칼슘(Ca) 가. 원자 흡광광도법(Atomic absorption spectrophotometry) 2) 시료액의 조제에 따른다.

4) 측정

시료액 20~30 mL(크롬으로 50 µg이하)를 50 mL 메스플라스크에 취하고 황산(1:6) 2 mL, 디페닐 카르바지드 용액 1 mL를 가하고 표선까지 증류수로 채우고 혼합하여 30분간 방치한 후 공시험액을 대조액으로 하여 파장 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 따로 표준용액을 측정하여 검량선을 작성 계산한다.

5) 계산

$$\text{크롬(ppm)} = \frac{\text{시료액의흡광도} / 1\text{ppm 기준 흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)}}$$

5.2. 불소(F)

가. 용량법

1) 기구

삼구플라스크, 리비히냉각관, 전압조절기, 뷰렛, 메스플라스크, 맨틀히터 또는 알콜램프, 삼각 플라스크, 자석교반기,

2) 시약의 조제

가) 0.04 N-질산토리움(Thorium nitrate)용액 : 12수염의 질산토리움 6.9637 g 또는 4수염의 질산토리움 5.5225 g을 증류수에 녹여 1,000 mL로 한다.

나) 0.05% 아리자린레드·에스(Alizarin red·S)지시약 : 아리자린레드·에스 0.1g을 증류수에 용해 시켜 200 mL로 한다.

다) 염산용액 : 농염산 1 mL를 증류수로 희석하여 250 mL로 한다

라) 과염소산

마) 규산

바) 1% 수산화나트륨 용액 : 수산화나트륨 10 g을 증류수로 녹여 1,000 mL로 만든다.

3) 증류

시료 약 2 g(불소로서 2~6 mg정도)를 삼구플라스크에 넣고 규산 0.5 g과 과염소산 20 mL를 가하고 직경 3 mm정도의 초자구(硝子球) 5개를 넣은 다음 리비히(Liebig) 냉각기(90 cm)를 연결하고 135~140℃에서 증류하여 250 mL를 받는다. 단, 유기물이 많은 시료는 10 g 정도를 포화 수산화 칼슘 용액으로 충분히 적시고 500℃이하에서 24시간 회화한 후 삼구플라스크에 옮긴다.

4) 적정

증류액 중에서 50 mL를 삼각 플라스크에 취하여 아리자린레드·에스 지시약 5방울을 넣으면 황색이 되는데 이때 1% 가성소다 용액을 가하여 적색이 되게 하고 다시 염산 용액을 가하여 황색으로

변하게 한 후 2 mL를 더 가하고 0.04 N-질산토리움용액으로 적정하여 적색으로 변할 때를 종말점으로 한다. 이때 공시험(Blank test)도 실시한다.

5) 계산

$$\text{불소(ppm)} = (a-b) \times \frac{\text{전체증류액(mL)}}{\text{사용증류액(mL)}} \times f \times 0.00076 \times \frac{1}{\text{시료중량(g)}} \times 106$$

* a : 0.04 N-질산토리움용액 적정치(mL)

b : 공시험시 0.04 N-질산토리움 용액적정치(mL)0.00076 = 0.04 N-질산토리움용액 1 mL에 해당하는 불소의 량(g)(18.9984×0.04×0.001)f : 0.04 N - 질산토리움용액의 역가

나. 이온메타(Ion meter)법

1) 기구

이온메터, 비이커, 자석교반기

2) 시약의 조제

가) 3M-초산소다(Sodium acetate)용액 : 3수염의 초산소다 408g을 정확히 취하여 증류수로 1,000 mL되게 한다. 단 용액의 pH가 7이 되도록 초산으로 맞춘다.

나) 1.32M-구연산 소다 용액(Sodium citrate) : 2수염의 구연산소다 222g을 정확히 취하여 250 mL 증류수에 녹인 후 과염소산 28 mL를 첨가한 후 1,000 mL로 만든다.

3) 시료액의 조제

가) 200 mL 비이커에 불소농도가 400 µg정도가 되도록 시료를 정확히 취한다

나) 여기에 1N-염산 20 mL를 넣고 60℃정도로 가온 하면서 자석교반기로 20분간 교반 한다.

다) 200 mL 메스플라스크에 50 mL 초산소다용액과 구연산소다용액 50 mL를 가한후 증류수로 표 선까지 취한 용액을 시료액으로 한다.

4) 측정

가) 이온미터에 불소전극과 비교전극을 장치하고 저 농도의 불소용액(100ppm)에 담근 후 실온에서 안정시킨다.

나) 시료액의 불소농도와 비슷한 농도의 표준용액을 100 mL 비이커에 일정량을 취하여 1N-염산 10 mL, 초산소다용액 25 mL와 구연산소다 용액 25 mL를 첨가하고 증류수로 일정량을 만든 후 교반기에서 최저속도로 서서히 저어주면서 전위차를 읽는다.

다) 위와 같은 방법으로 표준용액의 전위값으로 표준방정식을 구한다.

라) 시료액 일정량을 100 mL 비이커에 취하여 교반기로 서서히 저어 주면서 시료액의 전위값을 구한다.

5) 계산

$$\text{불소(ppm)} = \frac{\text{기울기값(ppm)} \times \text{시료액의 전위값} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)}}$$

5.3. 비소(As)

가. 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP)

1) 시험용액의 조제

가) 습식분해법 : 5.4.납(Pb) 가. 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP) 1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법에 따른다.

(1) 황산-질산법

(2) 마이크로웨이브법

나) 용매추출법 : 5.4.납(Pb) 가. 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP) 1) 시험용액의 조제 다) 용매추출법에 따른다.

2) 측정

이 방법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에

시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도를 또는 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다. 표준용액과 시험용액 및 공시험용액을 ICP(유도결합플라즈마)에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

5.4. 납(Pb)

가. 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP)

1) 시험용액의 조제

가) 습식분해법

(1) 황산-질산법

시료(5~20 g)를 분해플라스크에 취해 물 50~70 mL, 질산 10~40 mL를 넣고 혼합하여 방치한다. 다음에 조용히 가열하여 격렬한 반응이 그치면 식힌 다음 황산¹⁾³⁾ 5~20 mL를 넣고 다시 조용히 가열한다. 내용물이 암색이 되기 시작하면 질산 2~3 mL씩을 추가하면서 가열을 계속하여 내용물이 미황색~무색이 되었을 때 분해가 끝난 것으로 한다. 분해액을 식힌 후 물 30~50 mL, 포화수산암모늄용액 10~25 mL를 가해서 황산의 흰 연기가 발생할 때까지 가열하고 식힌 다음 물로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다. 공시험용액에 대해서도 같은 조작을 하여 시험용액을 보정한다.

주1) 분해가 용이한 시료의 경우 황산의 사용을 제한한다.

주2) 난분해성 시료의 분석시 황산을 사용하여 유기물 및 휘발성분을 완전분해한다.

주3) 난분해성 시료 중 납 분석시 황산을 사용하되 포화 수산암모늄을 사용 하여 회수한다.

(2) 마이크로웨이브법

시료 일정량 (0.1~0.5 g에 한함; 수분함량이 높은 시료의 경우 1~2 g)을 Microwave digestion system에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해하고 메스플라스크 등에 옮겨 일정량(시료채취량에 따라 달라짐)으로 하여 시험용액으로 한다.

나) 건식회화법

시료(5~20 g)를 도가니, 백금접시에 취해 건조하여 탄화시킨 다음 450℃에서 회화한다.⁴⁾ 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 필요하면 마지막으로 질산(1+1) 2~5 mL를 가하여 완전하게 회화를 한다. 회화가 끝나면 회분을 회석된 질산으로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.

주4) 회화보조제는 염산, 산화마그네슘, 탄산나트륨등을 사용하나 시험조작에 영향이 없을 때에만 사용하되 공시험용액에 대해서도 같은 조작을 하여 시험용액을 보정한다.

다) 용매추출법

(1) 시약

(가) MIBK(Methyl Iso-Buthyl Ketone) 또는 클로로포름

(가) DDTC(Diethyl dithiocarbamic acid), silver를 포함하지 않은 것

(2) 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 흔들어 준 후 MIBK(또는 클로로포름) 20 mL를 가하여 심하게 진탕하여 정지하고 MIBK(또는 클로로포름)층을 취한다. 다시 MIBK(또는 클로로포름) 20 mL로 위의 과정을 되풀이 한 후 여액을 합한다. 분배액을 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 한다⁵⁾.

주5) 표준용액에 대해서도 같은 조작을 하여 얻는다.

2) 측정

이 방법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도를 또는 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다. 표준용액과 시험용액 및 공시험용액을 ICP(유도결합 플라즈마)에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

5.5. 수은(Hg)

가. 기구

전기로, 직시천칭, 수은자동분석기, 자체크루시블, 마이크로피펫

나. 시약의 조제

- 1) 산화알루미늄 : 750℃ 전기로에서 2시간이상 가열 처리한 다음 데시케이터내에서 공기 중 수은이 오염되지 않도록 하여 방냉시킨다. 이하 "①시약"이라고 한다.
- 2) 수산화칼슘, 탄산나트륨시약(1:1) : 무게비율로 1:1혼합하여 잘 섞고 적당량을 750℃ 전기로에서 2시간이상 가열 처리한 다음 데시케이터내에서 공기중 수은이 오염되지 않도록 방냉한다. 이하 "②시약"이라고 한다.
- 3) 완충용액 : 염소(Cl)가 들어가지 않은 pH 6.86 완충용액을 사용한다.

다. 시료처리

- 1) 고체시료 : 750℃ 전기로에서 위 시약과 동일 처리한 보트에 ②시약을 깔고 그 위에 배합시료는 0.1g, 단미시료는 0.05g 취하여 깔고 ②시약으로 덮고 그 위에 ①시약을 깔고 다시 ②시약으로 덮는다.
- 2) 액체시료 : 상기와 동일 처리한 보트에 ①시약을 깔고 그 위에 액상시료 100~1000 μL를 정확히 취한 다음 다시 ①시약을 덮고 그 위를 ②시약으로 덮는다.

라. 방법

수은전용분석기(Mercury atomizer)의 글라스 캡을 열고, 시료 처리보트를 밀어 넣어 캡을 닫은 다음 작동 스위치를 누르고, 측정량을 ng으로 기록한다. (다만, 동시험법의 원리를 이용한 기타의 장치 또는 자동·반자동기기를 사용할 수 있다).

마. 계산

$$\text{수은량(ppm)} = \text{시료 측정량(ng)} / \text{시료량(mg)}$$

5.6. 카드뮴(Cd)

가. 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP)

5.4.납(Pb) 가. 유도결합플라즈마법(inductively coupled plasma, ICP)에 따라 시험한다.

5.7. 주석(Sn)

가. 시험용액의 조제

1) 습식분해법

가) 황산-질산법시료(건조물로서 5~20 g에 상당하는 양)를 분해플라스크에 취해 물 50~70 mL, 질산 10~40 mL를 넣고 혼합하여 방치한다. 다음에 조용히 가열하여 격렬한 반응이 그치면 식힌 다음 황산 5~20 mL를 넣고 다시 조용히 가열한다. 내용물이 암색이 되기 시작하면 질산 2~3 mL씩을 추가하면서 가열을 계속하여 내용물이 미황색~무색이 되었을 때 분해가 끝난 것으로 한다. 분해액을 식힌 후 물 30~50 mL, 포화수산화암모늄용액 10~25 mL를 가해서 황산의 흰 연기가 발생할 때까지 가열하고 식힌 다음 물로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다. 공 시험용액에 대해서도 같은 조작을 하여 시험용액을 보정한다.

주1) 분해가 용이한 시료의 경우 황산의 사용을 제한한다.

주2) 난분해성 시료의 분석시 황산을 사용하여 유기물 및 휘발성분을 완전 분해 한다.

주3) 난분해성 시료 중 납 분석시 황산을 사용 하되 포화 수산화암모늄을 사용하여 회수한다.

나) 마이크로웨이브법시료 일정량 (0.1~0.5 g에 한함; 수분함량이 높은 시료의 경우 1~2 g)을 Microwave digestion system에 넣고 질산 등으로 처리하여 분해하고 메스플라스크 등에 옮겨 일정량(시료채취량에 따라 달라짐)으로 한다.

2) 건식회화법

시료(건조물로서 5~20 g에 상당하는 양)를 도가니, 백금접시에 취해 건조하여 탄화시킨 다음 450℃에서 회화한다. 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 필요하면 마지막으로 질산(1+1) 2~5 mL를 가하여 완전하게 회화를 한다. 회화가 끝나면 회분을 물로 적시고 염산 2~4 mL를 가하여 수욕상 또는 건조장치에서 건조한 다음 염산 1~2 mL를 가하여 가온해서 녹이고 불용물이 있으면 석면 또는 유리여과기로 여과한 다음 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.

주4) 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 dithiocarbamic acid), silver를 포함하지 않은 것

나) 시험조작시험용액 및 공시험용액을 분액깔대기에 각각 10~50 mL 취한 후, 각각에 25% 구연산 암모늄용액 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 흔들어 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. 분배액을 열판에서 80℃로 가열하여 용매를 모두 날려버리고 잔류물에 질한 7 mL, 과산화수소 1 mL를 넣고 다시 열판에서 가열하여 완전히 분해·건조시킨다. 잔류물은 1 N 질산용액으로 재용해하여 시험용액으로 한다.주6) 표준용액에 대해서도 같은 조작을 하여 얻는다.

주7) 주석 분석시 질산에 의한 침전물이 발생할 수 있으므로, 전처리 마지막 단계에 염산을 수 mL 가하여 침전물 생성을 방지한다.

나. 측정

1) 원자흡광광도법

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

2) 유도결합플라즈마법

이 방법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르곤 플라즈마에 시험용액을 주입하여 목적원소의 원자선 및 이온선의 발광광도를 또는 질량값을 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법이다. 표준용액과 시험용액 및 공시험용액을 ICP(유도결합 플라즈마)에 주입하여 시험용액의 농도를 구한다.

6장. 비타민

6.1. 비타민 A

가. 분광광도계법(Carr Price)

1) 기구

분광광도계, 수조(Water bath), 환류냉각장치, 분액여두, 유리여과기(G_3), 메스실린더, Chromatography tube

2) 시약의 조제

가) 수산화칼륨 용액 : 특급 수산화칼륨 용액(KOH) 50 g을 증류수 50 mL에 용해

나) 에틸에테르 : 특급품

다) 에틸 알콜 : HPLC용

라) 무수 황산나트륨 : 특급 무수 황산나트륨(Na_2SO_4)

마) 석유에테르 : HPLC용

바) 크로로포름 : HPLC용

사) 3염화안티몬 용액 : 특급 삼염화안티몬 용액(SbCl_3) 20 g을 크로로포름 100 mL에 용해하여 하룻밤 방치 후 무수 초산 2 mL를 가하여 콜크마개 또는 폴리에틸렌 마개로 막고 암소에 보관하는데 이 용액은 흡수성이 강하고 변질되기 쉬우므로 조제 후 1주일 이내에 사용해야 한다.

3) 시료액의 조제

시료 2~3 g을 검화 플라스크에 취하고 수산화칼륨용액 4 mL와 에틸알콜 25 mL를 가하고 환류냉각기에 연결하여 30분간 가열하여 검화시킨 후 흐르는 물로 냉각한다. 상등액을 분리하여 분액여두에 넣고 잔사는 유리여과기(G_3)로 흡인 여과하고 다시 검화 플라스크에 에틸에테르 40 mL로 씻어 유리여과기에 넣어 흡인여과 하여 여과액을 분액여두에 넣고 초자 여과기에 에틸에테르 10 mL를 넣고 흡인여과 하여 분액여두에 합하고 다시 분액여두에 증류수 45 mL를 가하여 진탕한 후 수층을 분리하여 다른 분액여두에 분리하고 수층은 에틸에테르 30 mL씩 2회 추출하여 제1분액 여두의 에틸에테르에 합한다.

에틸에테르가 들어있는 분액여두에 증류수 30 mL를 넣어 서서히 흔들어 섞은 다음 수층은 분리하여 제거하고 다시 증류수 40 mL씩 5~6회 씻어 수층을 제거(페놀프탈레인 지시약의 반응이 없을 때까지)하고 에틸에테르층을 갈색 비커에 옮기고 분액여두는 에틸에테르 10 mL로 2회 씻어 넣는다. 무수 황산나트륨 5 g을 가하여 탈수시키고 가지형 플라스크에 에틸에테르층을 옮기고 무수 황산나트륨은 에틸에테르 10 mL씩 2회 씻어 플라스크에 넣은 다음 에틸에테르층을 50°C의 수조에서 증발시키고 소량이 되면 불활성가스로 완전히 증발시킨 후 석유에테르 2~3 mL에 용해시켜 시료액으로 한다. 크로마토그래피용 알루미나(Alumina)를 수세(水洗) 후 샬레에 넣고 150°C로 항량이 될때까지 건조시켜 보관한다.

그 1 g에 대하여 0.15 mL의 증류수를 가해서 잘 흔들어 섞는다. 이 알루미나를 석유에테르로 섞어서 미리 석유 에테르로 세정(洗淨)한 흡착관(chromatography tube)에 따라 넣고 0.5×6.0 cm의 층을 만든 다음 석유에테르 10 mL를 넣고 흘리는데 알루미나층 위에 석유에테르층이 1 cm가 되면 시료액을 천천히 넣는다. 액층이 알루미나층위에 1 cm가 되면 갈색 가지형 플라스크를 받치고 석유에테르 10 mL씩 2회 넣어 카로틴(carotin)을 분리시켜 카로틴 정량용 검액으로 한다. 다음에 수기를 갈아서 10%(V/V)의 에틸에테르를 포함한 석유에테르를 20~30 mL를 유입하여 비타민 A를 용출시킨다. 비타민 A용액을 감압 감온하여 용액을 완전히 휘발시키고 플라스크에 클로르포름 2~3 mL씩 넣어 비타민 A를 용해시켜 메스 플라스크에 받고 클로르포름으로 표선까지 맞추어 검액으로 한다.

4) 발색과 측정

위에서 얻은 검액 0.3 mL를 분광광도계용 cell에 넣고 3염화안티몬용액 3 mL를 신속히 가하고 최대흡광도를 알아낸다. 이 때 파장은 620 nm이며 대조액으로는 증류수를 사용한다. 비타민

A 표준액 5, 10, 15, 20 IU를 만들어 시료와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한다.

5) 계산

$$\text{비타민 A(IU/100 g)} = \frac{\text{시료액의 흡광도}}{\text{표준액 1IU당 흡광도}} \times \frac{V}{W} \times 100$$

V : 검액의 전량

W : 시료무게(g)

나. HPLC 법

1) 시약의 조제

가) 초산레티놀표준액 : 초산레티놀 100만IU를 100 mL 갈색메스플라스크에 2-프로판올로 정확히 희석하여 초산레티놀표준원액을 조제한다.(공기를 질소로 치환하여 보존한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2-프로판올로 정확히 희석한다. 1 mL중에 5, 10, 15, 20 비타민 A IU를 함유하는 초산레티놀표준액을 조제함과 동시에 보정계수를 산출한다.

나) 팔미틴산레티놀표준액 : 팔미틴산레티놀 100만 비타민 A IU를 100 mL의 갈색메스플라스크에 2-프로판올로 정확히 희석하고, 1 mL중에 5, 10, 15, 20 비타민 A IU를 함유하는 각 팔미틴산레티놀표준액을 제조함과 동시에 보정계수를 산출한다.

다) 보정계수 산출 : 1 mL 중에 초산레티놀 또는 팔미틴산레티놀로써 10 비타민 A IU를 함유하는 표준액에 대하여 10 mm셀을 사용하여, 2-프로판올을 대조액으로 326 nm에서의 흡광도를 측정한다. 다음식과 같이 초산레티놀 또는 팔미틴산레티놀표준액의 보정계수를 산출한다.

$$f = A \times 1.9$$

f : 초산레티놀 또는 팔미틴산레티놀표준액의 보정계수

A : 초산레티놀 또는 팔미틴산레티놀표준액의 326 nm에서의 흡광도

2) 방법

가) 추출 : 분석시료 1~2 g을 정확히 칭량하여 50 mL의 갈색공전삼각플라스크에 넣는다. 디메틸설폭사이드 20 mL를 가하여 15분간 진탕한 후, 에탄올 180 mL로 300 mL의 갈색공전삼각플라스크에 옮겨 10분간 진탕하여 추출한다. 추출액을 갈색공전원심분리관에 넣고 3000 rpm으로 5분간 원심분리하고, 상등액을 0.5 µm 멤브레인필터로 여과한 다음 기기 분석용 시료용액으로 한다.

나) 기기분석예(HPLC)

검출기 : 자외선흡광광도검출기

파장: 326 nm

컬럼 : C18(4 × 200 mm, 5 µm) 또는 이와 동일한 것

이동상 : 메탄올

유속 : 1.0 mL/min

다) 계산

측정된 크로마토그램에서 피크의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 초산레티놀 또는 팔미틴산레티놀량을 산출하여 초산레티놀 및 팔미틴산레티놀의 함량을 비타민 A 분말 또는 비타민 A류 함량으로 한다.

6.2. 프로비타민 A(β-카로틴)

가. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 프로비타민A를 아세톤-헥산 혼합용액으로 추출 후 흡광도를 측정하여 정량하는 방법이다.

나. 장치

속시렛 장치, 분광광도계, 유리칼럼, 메스플라스크, 수조, 환류냉각장치, 분액여두, 초자여과기(G3), 메스실린더

다. 시약 및 시액

- 1) 아세톤
- 2) 헥산 : 특급품
- 3) 아세톤 - 헥산(1:9) 혼합액
- 4) 아세톤 - 헥산(3:7) 혼합액
- 5) 무수황산나트륨
- 6) Magnesia - 규조토(1:1) 혼합물
- 7) 수산화칼륨용액 : 특급수산화칼륨(KOH) 50 g을 증류수 50 mL에 용해
- 8) 에틸에테르 : 특급품
- 9) 에틸알콜 : HPLC 급
- 10) 석유에테르 : HPLC 급
- 11) β-카로틴 표준액 : β-카로틴 10 mg을 아세톤-헥산(1:9) 혼합액으로 용해하여 100 mL로 하여 냉암소에 보관한다.

라. 시험용액의 조제 및 방법

시료 1 ~ 4 g을 속시렛 장치에 넣어 아세톤-헥산(1:9)혼합액 200 mL로 3시간 추출하고 실온까지 방냉시킨 후 플라스크에 옮긴다. 유리칼럼(유리여과기가 달린 20 × 400 mm)에 Magnesia-규조토(1:1) 혼합물로 10 cm 채우고 그 위에 무수황산나트륨을 1 cm 채운 다음 추출액을 칼럼에 넣어 흡착시키고 아세톤-헥산(1:9) 혼합액 50 mL를 가하면 색층이 형성되며, 카로틴은 녹고 xanthophyll 과 chlorophyll 등은 칼럼에 남는다. 모든 침출액은 200 mL 메스플라스크에 모아서 아세톤-헥산(1:9) 혼합액으로 200 mL되게 하여 분광광도계 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하거나 비타민A 분석시 분리된 카로틴의 흡광도를 측정하는데 먼저 β-카로틴 용액을 0, 1, 2, 5, 10 µg/mL를 측정하여 검량선을 작성 계산한다.

마. 계산

$$\beta\text{-카로틴}(\mu\text{g/g}) = \frac{C \times a}{S} \times D$$

C : 검량선에 의하여 결정된 카로틴의 양(µg/mL)

a : 최종 침출용액의 양(mL)

D : 희석배수

S : 시료량(g)

6.3. 비타민 B₁(Thiochrome 형광법)

1) 원리

N/10황산으로 시료중의 비타민 B₁을 침출하여 Takadiastase 가수분해로 결합태의 비타민 B₁을 유리태로 한 후에 permutit 흡착 column 으로 분리하여 적혈염으로 B₁을 산화시키면 강한 형광(螢光)을 내는 Thiochrome이 되는데 이것의 형광을 측정하여 B₁을 정량한다.

2) 기구

형광광도계, 항온기, 흡착 Column, 비이커, 메스실린더, 메스피펫, 메스플라스크, 공전 원침관

3) 시약

- 가) Permutit : 시판품을 체로 쳐서 50~80 mesh의 입도를 골라 100 g을 500 mL삼각플라스크에 넣고 물 400 mL를 가해 약 15분간 교반정지 후에 상층은 버리고 상층액이 투명해질 때까지 반복한 뒤 3% 초산용액 약 400 mL를 넣어 15분간 교반 정지후 상층버림 조작을 2회 한다. 25% KCl 용액 300 mL를 넣고 boiling water bath 중에서 교반 하되 약 25분후 수욕에서

꺼내 정치한다. KCl용액을 제거하고 다시 3% 초산 400 mL를 가하여 먼저와 같이 2회 세정하고 물로 염소 이온 반응이 없을 때까지 세정한다. 대형 샤페에 넣어 100°C 이하의 oven에서 건조하여 흡착용으로 한다. Vitachange는 시약 그대로 사용한다.

나) 25% KCl용액 : 특급 KCl 250 g을 0.1 N HCl로 1L로 한다.

다) 3% 초산용액 : 빙초산 30 g을 H₂O로 1L로 한다.

라) 1% 적혈염 용액 : K₃Fe(CN)₆ 3H₂O 1 g을 H₂O로 100 mL로 하여 냉장고 속의 갈색병내에 보관한다.

마) 30% NaOH용액

바) Isobutyl alcohol : 무형광의 시약

사) 무수 황산나트륨 : 무형광의 시약

아) Diastase용액 : 5% Takadiastase 수용액을 만들어 빙초산 2~3방울을 가하고 다시 산성백토 0.2 g을 넣고 3000 rpm으로 15분간 원심분리하여 그 상등액을 사용한다.

자) N/10 H₂SO₄용액

차) 4M NaOAc용액 : 결정초산나트륨 544 g을 H₂O로 1 L로 함

카) Vit B₁ 표준액 : B₁ 염산염의 결정 100 mg을 취하여 물에 녹여 빙초산으로 pH 2로 한 후 1L로 희석한 뒤 용도에 따라 농도를 조절한다.

4) 조작

가) 침출 : 시료 1~10 g(B₁으로서 5~50 µg)을 달고 분쇄를 요하는 것은 N/10 H₂SO₄ 10 mL를 가하여 유발로 마쇄하고 N/10황산 60 mL 써서 100 mL 메스플라스크에 옮겨 잘 흔들어 섞는다. 4 M 초산나트륨 용액을 적하하여 pH 4~5로 하고 5% Takadiastase용액 5 mL를 가한 다음 Toluene 5~6 방울을 넣고 38~40°C의 incubator 내에 하룻밤 방치한다. 물로 100 mL 표선까지 채워 잘 흔들어 섞고 건여과지 (No.2)로 여과한다.

나) 흡착 column준비 : 흡착관에 소량의 물을 유입하고 glass wool을 작고 둥글게 하여 유리봉으로 흡착관에 밀어 넣고 permutit 1.3~1.5 g을 비이커에 넣고 물 20 mL를 가해 교반 후 기포를 제거하고 H₂O와 같이 흡착관에 유입하고 cock를 열어 H₂O를 permutit 상단까지 유출시키고 3% 초산 10 mL를 넣고 3초에 1방울씩 적하시킨다. 액층이 permutit 상단까지 오면 다시 물 20 mL를 붓고 똑같이 세정한다.

다) 흡착 : 흡착관에 침출량 10~25 mL(Vit B₁ 0.2~4.0 mcg)를 정확히 취하여 가만히 주입하고 cock를 열어 3초에 1방울씩 적하하여 B₁을 permutit층에 흡착시킨다. 침출액이 column 상단까지 달했을 때 pH 4.5의 산성수(H₂O 100 mL + 10% HCl 3 방울 정도) 5 mL를 가해 column 내부를 씻는다. 끓는 물을 column 상단 0.5 cm 정도까지 넣고 1초에 1방울씩 적하하되 3회 반복하여 B₁ 이외의 형광물질을 제거하고 cock를 막는다.

라) column 아래 수기를 25 mL flask로 바꾸고 column이 아직 뜨거울 때 비등 25% KCl 용액 10 mL를 가해 1초 1방울씩 적하 한다. 비등 KCl 염산용액 8 mL 다시 7 mL를 주입하고 용출액의 전량이 거의 25 mL가 되면 cock를 막고 실온까지 방냉하여 물로 정확히 25 mL로 한다.

마) 산화 : Vol-flask의 액으로부터 정확히 5 mL씩 마개 있는 시험관에 넣어 각각 A, B, C라 하고 A에는 비타민B₁ 표준용액(µg/mL) 1 mL, B와 C는 물을 1 mL씩 가하여 혼합하고 A와 B에 1% 적혈염 0.3 mL, C에 물 0.3 mL를 가하고 A, B, C에 30% NaOH 3 mL씩 넣고 30초간 흔들어 섞는다. Isobutanol 10 mL씩 가해 마개를 막고 세차게 100회 진탕한 다음 무수황산나트륨 2 g을 넣고 다시 100회 진탕한 뒤 정치한다.

5) 측정과 계산

시험관 내의 액이 투명하게 되면 Isobutanol 층을 형광광도계의 Cell에 옮겨 A(첨가 실험용)를 100%로 하여 B(주검용) C(blank test) 각각의 형광도를 측정한다. (여기과장 365 nm 분석광과장 455 nm)

$$V B_1(\mu/100 \text{ mg}) = \frac{F_B - F_C}{F_A - F_B} \times \frac{25}{5} \times \frac{100}{a} \times \frac{100}{w}$$

F_A : A의 값(보통100)

a : 흡착시킨 검액량

F_B : B의 값

w : 시료채취량(g)

F_C : C의 값

6.4. 비타민 B₂

1) 원리

비타민 B₂는 alkali 상태에서 광을 조사하면 비타민 B₂ 자체의 형광보다 훨씬 강한 형광을 내는 Lumiflavin으로 변한다. 이 광 분해액을 산성으로 하여 Chloroform과 진탕하여 Lumiflavin을 크로로포름층에 이행시켜 형광을 측정하여 B₂를 정량한다. 또한 B₂는 산성에서는 Chloroform에 불용이므로 미리 산성 Chloroform 처리로서 Chloroform 가용성의 다른 형광 물질을 제거 가능하며 B₂와 Lumiflavin은 다같이 산성에 대해 저항성이 강하므로 산성 KMnO₄ 용액에 의한 산화로서 기타 형광물질을 제거할 수 있는 점을 이용한 방법이다.

2) 기구

형광광도계, 항온기, 메스 플라스크, 공전 원침관, 메스 실린더, 메스 피펫, 원심분리기, 광 분해장치

3) 시약의 조제

가) 2 N 황산

나) 1 N NaOH 용액

다) 빙초산(glacial acetic acid)

라) 4% KMnO₄ 용액

마) 3% 과산화수소 : 특급품(30%)를 10배 희석

바) Chloroform(CHCl₃) : 무형광 시판품을 재증류

사) Vit. B₂표준용액 : Vit. B₂표준품 100 mg을 정취하여 초산성수로 갈색 메스플라스크에 넣고 온수 중에서 서서히 가온하여 녹이고 실온까지 방냉한다 초산산성수(0.02 N)로 1 L로 한다 용도에 따라 농도를 조절한다.

4) 조작

가) 침출 : 시료의 일정량을 달아(지질이 많으면 미리 ether로 탈지)소량의 물을 가해(Vit. B₂함량이 50~100 μ g 100 mL정도) 80~90℃ 수욕 중에서 교반하여 15~20분간 침출하고 2 N H₂SO₄를 1/6용 가하여 재차 15분간 침출한다.(전분이 많은 것은 Diastase 가해 37~40℃에 하룻밤 방치) 실온까지 방냉하여 물로 일정용량으로 하고 여과하여 침출액으로 한다 침출액 20~50 mL를 공전원침관에 넣어 Chloroform 20 mL가해 강하게 진탕한 뒤 300 rpm 10분간 원심분리하고 하층의 Chloroform 을 제거하되 이 조작을 3회 반복한다.

나) 광분해 : 원심분리 후 상층용액으로부터 5 mL씩(Vit. B₂로 1 μ g정도) 3개의 마개 있는 시험관에 취하고 각각 A, B, C로 한다. A(첨가실험용)에는 Vit. B₂ 표준용액(1 μ g/mL) 1 mL를 넣고, B(주검용), C(blank)에는 H₂O 1 mL씩 넣어 혼합한다. 3개의 시험관에 1N NaOH용액 3 mL씩 넣고 A, B는 1시간 광을 조사하고 (백색 형광등 20 cm 상방) C는 암실에 방치한다.

다) 산화 : A, B, C를 꺼내 빙초산 0.3 mL씩 넣어 산성으로 하고 4% KMnO₄용액을 청색이 될 때까지 가하고 다음에 3% H₂O₂를 가하여 과잉의 KMnO₄ 환원 탈색한다. 각 시험관에 클로르포름 10 mL씩 넣고 강하게 2분간 흔들어 섞은 후 정치한다. 잘 분리되지 않으면 원심침전 후 위의 수층을 제거한다.

5) 측정 및 계산

클로르포름층을 형광광도계 Cell에 옮겨 여기광 365 nm 분석광에서 A, B, C의 형광도를 측정한다.

$$\text{시료 중 B}_2 \text{ 함량} = \frac{F_B - F_C}{F_A - F_C} \times \frac{100}{5} \times \frac{100}{w}$$

F_A = A의 형광 강도 (보통 100으로 한다)
 F_B = B의 형광 강도 (보통 100으로 한다)
 F_C = C의 형광 강도 (보통 100으로 한다)
 a = 침출액량 (mL)
 w = 시료채취량(g)

6.5. 비타민 B₆

가. 고속액체크로마토그래프에 의한 정량법

1) 시액조제

50 mM 인산나트륨용액 : 인산나트륨 6.0 g을 증류수에 녹이고 염산으로 pH 2.5로 조절한 후 전량을 1 L가 되게 한다.

2) 표준용액의 조제

가) 피리독신염산염 표준물질 5 mg을 정밀히 취해 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

나) 표준원액을 증류수로 적당히 희석하여 표준용액을 만든다.

3) 시험용액의 조제

가) 시료 적당량을 취하여 마쇄기를 이용하여 잘게 부순 후 적당량을 취한다.

나) 테스트튜브에 넣고 증류수 25 mL을 넣는다.

다) 30분 동안 초음파 추출 한다.

라) 원심분리후 상등액을 50 mL 부피플라스크에 넣는다.

마) 나)~라)의 방법을 1회 반복한다.

바) 증류수를 넣어 표선까지 맞춘다.

사) 이 액을 0.45 μ m 멤브레인필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4) 시험조작

가) 고속액체크로마토그래프의 측정 조건(예)

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	35°C
이동상	50 mM 인산나트륨용액(pH 2.5)
검출기 파장	여기파장 : 290 nm , 측정파장 : 396 nm
유량	1.0 mL/분

나) 계산

$$\text{비타민 B}_6 \text{ 함량 (피리독신, mg/100 g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{100}{1000}$$

S : 시험용액중의 비타민 B₆(피리독신)의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

6.6. 비타민 B₁₂

가. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 비타민 B₁₂(Cyanocobalamin)를 인산완충용액으로 추출 후 액체크로마토그래프를 이용하여 정량 분석하는 방법이다.

나. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 5 mM 인산완충용액 : 인산이수소칼륨(KH_2PO_4) 0.68 g을 증류수에 녹이고 전량을 1 L가 되게 한다.
- 3) 클로로포름, 아세토니트릴 : HPLC 급
- 4) 표준용액의 조제
 - 가) 표준원액 : 비타민 B_{12} (Cyanocobalamin)을 5 mM 인산완충용액에 녹여 표준원액 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 조제한다.
 - 나) 표준용액 : 표준원액을 증류수로 적당히 희석하여 표준용액을 만든다.

라. 시험용액의 조제

- 1) 시료 적당량을 취하여 마쇄기를 이용하여 잘게 부순 후 5 mM 인산완충용액을 가하여 10분간 초음파 진탕기로 추출한 후 50 mL로 맞춘다.
- 2) 21,000 rpm에서 원심분리한다.
- 3) 분리 후 중간층을 취해서 21,000 rpm에서 다시 원심분리하고, 중간층을 시험관에 옮겨 클로로포름 3 mL을 첨가하여 지방층을 제거(2,000 rpm)한 물층을 다시 21,000 rpm에서 10분간 원심분리한다.
- 4) 마지막으로 맑은 액층을 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

액체크로마토그래프의 측정 조건

항목	조건
칼럼	C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)
칼럼온도	40℃
이동상	아세토니트릴 · 증류수 (8 : 2)
검출기 파장	450 nm
유속	0.8 mL/분
주입량	10 μL
머무름 시간	13.31분

바. 계산

$$\text{비타민 B}_{12}(\mu\text{g}/100 \text{ g}) = C \times \frac{a \times D}{S} \times 100$$

C : 시험용액중의 비타민 B_{12} 의 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)

a : 추출용매의 양(mL)

D : 희석배수

S : 시료량(g)

6.7. 비타민 C

가. 액체크로마토그래피에 의한 정량

- 1) 장치 액체크로마토그래프 : 자외부검출기를 사용한다.
- 2) 시약 및 시액
 - 가) 10% 메타인산용액 : 메타인산 10 g을 물에 녹여 100 mL로 한다. 불용물이 생기는 경우 여과하여 사용한다. 냉장고에서 일주일까지 보관할 수 있다.
 - 나) 5% 메타인산용액 : 10% 메타인산용액을 물로 2배 희석한다. 사용시 조제한다.
 - 다) 표준용액의 조제 : 아스코르빈산 10.0 mg을 정밀히 달아, 5% 메타인산용액에 녹여 100 mL로 한 것을 표준원액(100ppm)으로 한다. 필요한 경우 표준원액에 5% 메타인산용액을 넣어 원하는 농도로 희석하여 사용한다. 사용시 조제한다.
- 3) 시험용액의 조제
검체 일정량(비타민 C 함량이 50 mg/100 g 이상인 경우 2 g 정도, 10 mg~50 mg/100 g인 경우

5~10 g 정도를 검체로 한다)을 정확히 달아, 동량의 10% 메탄인산용액을 가하여 10분간 현탁시킨 후 적당량의 5% 메탄인산을 넣어 균질화한다. 균질화된 검체를 100 mL 메스플라스크에 옮기고 소량의 5% 메탄인산용액으로 용기를 씻은 후 메스플라스크에 합하여 100mL로 한다. 그 후 3,000 rpm에서 10~15분간 원심분리를 행하여 상등액을 취하고 5% 메탄인산용액으로 적당히 희석하여 시험용액으로 한다.

4) 시험조작

가) 액체크로마토그래프 조건

- (1) 칼럼 : 역상칼럼(Jascopack Fine Sil-NH₂, Lichrosorb NH₂, 조건을 달리하며, Zipax SAX, Vydac SAX, Partisil-10SAX, μ -Bondapak C18, μ -Bondapak/ CN, Pormaphase CPS등을 사용할 수 있다)
- (2) 이동상 : 0.05 M KH₂PO₄/아세트니트릴(60 : 40)
- (3) 유속 : 1.0 mL/분
- (4) 검출기 : 자외부(UV) 검출기(254 nm)

5) 정량시험

시험용액 및 표준용액을 각각 10 μ L씩 주입하여 얻은 피크의 넓이 또는 높이를 구하여 검량선을 작성한 후 시험용액의 비타민C의 농도(μ g/mL)를 구하고, 다음 식에 의해 검체중 아스코르빈산의 함량(mg/100 g)을 산출한다. L-아스코르빈산 나트륨으로 환산하는 경우에는 L-아스코르빈산량에 계수 1.125를 곱한다.

$$\text{비타민 C 함량(mg/100 g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{검체채취량(g)}} \times \frac{100}{1000}$$

S : 시험용액중의 아스코르빈산의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

6.8. 비타민 D

가. 분석원리

시료를 비누화하여 헥산으로 추출하고 그 추출물을 역상칼럼을 이용하여 분취하고 농축하여 액체크로마토그래프를 이용하여 정량 분석하는 방법이다.

나. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 헥산, 에탄올, 메탄올, 아세트니트릴 : HPLC 급
- 3) 수산화칼륨, 페놀프탈레인 : 특급시약 또는 이와 동등한 것
- 4) 무알데히드에탄올 : 에탄올 1 L에 50% 수산화칼륨(KOH)용액 5 mL 및 아연분말 5 g을 가해 약 2시간 환류 후 증류한다. 단, 처음 및 마지막 증류액 각각 10%는 버린다.
- 5) 피로갈롤-에탄올 용액 : 피로갈롤 100 g을 취하여 에탄올에 녹여 1 L로 조제한다. 사용시 제조하며, 암소에 보관한다.

6) 표준용액의 조제

비타민 D₂ 또는 D₃를 무알데히드에탄올에 녹인 후 적절하게 희석하여 표준용액으로 사용한다.

라. 시험용액의 조제

- 1) 시료가 고체인 경우에는 초고속마쇄기로 잘게 마쇄한다.
- 2) 비타민 D를 2 IU(0.05 μ g) 이상 함유한 시료를 증류플라스크에 정밀히 취한다.
- 3) 피로갈롤-에탄올 용액 40 mL를 가하여 약하게 진탕 혼합한다.
- 4) 90% 수산화칼륨 10 mL를 가하고^{주1)} 환류냉각기를 부착하여 수욕중에서 30분간 가열 비누화^{주2)}한다.

※ 주1) 지질함량에 따라 적당히 증감한다. 대개 지질 1 g이 수산화칼륨 1 g에 상당한다.

주2) 비타민 D는 가열 검화시 일부분 가역적으로 열 이성화되어 previtamin D로 전환하는 것으로 알려져 있다. 이러한 열 이성화 반응은 습도에만 의존하는 가역반응으로, 습도가 일정하면 거의 대부분 일정한 비율로 진행한다. 따라서 본법에서는 비타민 D 표준용액에 대해서도 시료와 동일한 조건하에서 가열 검화한다. 이것에 따라 시료, 표준품 모두 같은 비율로 previtamin D로 이성화하기 때문에, 피크높이를 비교하는 것만으로 previtamin D로 이성화된 부분이 상쇄된다.

- 5) 냉각 후 헥산 100 mL를 가하여 15초간 강하게 진탕 혼합한다. 침전이 생기면 이것이 가라앉을 때까지 방치한다.
- 6) 250 mL 분액깔대기에 옮기고 1 N 수산화칼륨 100 mL를 가하여 15초간 강하게 진탕 혼합한다.
- 7) 방치하여 층분리를 한 후 혼탁한 물층을 버린다.
- 8) 헥산 층에 0.5 N 수산화칼륨 40 mL를 넣어 진탕 혼합한다.
- 9) 헥산 층에 적어도 4회 매회 15초씩 물 40 mL로 세척한다. 세척액이 페놀프탈레인시액으로 알칼리반응을 나타내지 않을 때까지 세척한다.
- 10) 분액깔대기를 수 분간 방치하여 최후의 물 한방울까지 분리하여 물층을 제거한다.
- 11) 헥산 용액 80 mL를 농축플라스크에 취하여 40℃ 이하에서 용매를 감압농축 한다.
- 12) 잔류물에 헥산 5 mL를 가하여 녹이고 이 액 4.5 mL를 환저플라스크에 취하여 감압농축 한다.
- 13) 잔류물에 아세토니트릴 : 메탄올(1 : 1)용액 500 μ L를 정확하게 가하여 녹인 것을 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

- 1) 1단계-액체크로마토그래프 측정 조건

항목	조건
칼럼	역상형 칼럼 (7.8 $\times$ 300 mm, 15~20 μ m)
칼럼온도	35℃
이동상	아세토니트릴 · 메탄올 (1 : 1)
검출기 파장	254 nm
유속	2.0 mL/분
머무름 시간	D2 14.10분, D3 15.03분

- 2) 2단계-액체크로마토그래프 측정 조건

항목	조건
칼럼	순상형 칼럼 (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m)
칼럼온도	35℃
이동상	0.4% 이소프로판올 · 헥산용액
검출기 파장	254 nm
유속	1.6 mL/분
머무름 시간	D2 20.20분, D3 12.97분

바. 정량시험

- 1) 1단계-액체크로마토그래프 : 시험용액 200 μ L를 정확히 취해 제1단계 액체크로마토그래프에 주입하여 분획포집기로 비타민 D 획분을 분취한다(비타민 D 표준용액의 크로마토그램으로 비타민D가 검출기에 도달하는 시간을 측정하여 피크가 검출기에 도달하는 전후 30초 동안 분액을 받을 수 있도록 예비실험으로 분석조건을 준비한다).
- 2) 2단계-액체크로마토그래프 : 1단계에서 얻은 비타민 D 획분의 용매를 감압농축하여 잔류물에 0.4% 이소프로판올·헥산 200 μ L를 정확히 가하여 녹인다. 이 용액 100 μ L를 정확히 취하여 2단계 액체크로마토그래프에 주입하여 얻어진 크로마토그램에 나타난 비타민D 피크의 높이 또는 면적을 측정한다.

사. 계산

$$\text{비타민D(IU/100 g)} = \frac{A_s}{A_t} \times \frac{C}{S} \times 100$$

A_t : 표준용액 피크의 높이 또는 면적

A_s : 시료에 대한 피크의 높이 또는 면적

C : 표준용액의 농도(IU/mL)

S : 시료량(g)

※ 비타민D의 함량은 비타민D₂ 또는 비타민D₃를 구분하여 계산

6.9. 비타민 E

가. 액체크로마토그래피에 의한 정량

1) 장치 : 액체크로마토그래프 : 형광검출기를 사용한다.

2) 시약 및 시액

가) 에탄올 : 에탄올(특급) 1 L에 50% 수산화나트륨용액 5mL 및 아연분말 5g을 가해 약 2시간 환류후 증류한다.

나) 헥산 : 스펙트로분석용

다) 무수황산나트륨 : 무수황산나트륨(시약특급)을 120℃에서 2시간이상 가열시킨 후 데시케이터(실리카겔)에서 방냉하고 밀전하여 보존한다.

라) α-, β-, γ-, δ-토코페롤 : d-α-, d-β-, d-γ-, d-δ-토코페롤 순품

마) 표준용액의 조제

(1) 토코페롤동족체 표준용액토코페롤 동족체(α-, β-, γ-, δ-토코페롤)을 각각 100 mg씩 정밀히 달아 헥산을 가해 녹여 100 mL로 한 후, 각각의 5 mL를 취하여 헥산을 가하여 25.0 mL로 한다. 공전 갈색유리병에 넣어 공기를 질소가스로 치환하여 밀전한 후 냉암소에 보존한다(1개월간 사용할 수 있다).

(2) 토코페롤표준용액토코페롤 약 100 mg을 정밀히 달아 헥산을 가해 녹인 후 100 mL로 한다. 이 5 mL를 취해 헥산을 가해 25.0 mL로 한다. 공전 갈색유리병에 넣어 공기를 질소가스로 치환하여 밀전한 후 냉암소에 보존한다(1개월간 사용할 수 있다).

3) 시험용액의 조제

가) 일반검체의 경우토코페롤로서 약 0.2 mg을 함유하는 검체를 검화플라스크에 정밀히 달아(Wg) 에탄올 30 mL 및 10% 피로갈롤·에탄올 용액 1 mL를 가하고 이에 수산화칼륨용액(9→10) 3 mL를 가해 환류냉각관을 부착하여 비등수욕중에서 30분간 비누화한다. 비누화 후 즉시 냉각하여 실온으로 한 후 물 30 mL를 가해 갈색분액여두에 옮긴다. 플라스크는 물 10 mL, 석유에테르 30 mL로 씻어 넣고 잘흔들어 혼합하여 방치한 후 석유에테르층을 분리한다. 물층은 석유에테르 30 mL씩으로 2회 추출하고 석유에테르액을 합하여 물 10 mL로 1회, 이어 물 50 mL로 페놀프탈레인시액이 분홍색이 되지 않을 때까지 씻는다. 분액여두 중에서 물을 충분히 분리한 후 무수황산나트륨을 가해 탈수한 후 석유에테르층을 갈색플라스크에 옮긴다. 잔존하는 황산나트륨은 다시 석유에테르 10 mL씩으로 2회 씻고 씻은 액을 플라스크에 모두 합한 다음 전석유에테르추출액을 40~45℃에서 감압건고한 후 잔류물은 헥산 1.0 mL를 가하여 녹여 이를 시험용액으로 한다.

나) 유지검체의 경우검체가 유지인 경우에는 위의 조작중 비누화조작을 생략하고, 액체크로마토그래프에 직접 주입할 수 있다. 이 경우에는 유지 약 1 g을 정밀히 달아(Wg) n-헥산으로 녹여 50 mL로 한 후, 그 중 일정량(D mL)을 취해 헥산으로 희석한 것을 시험용액으로 한다.

4) 시험조작

가) 액체크로마토그래프 조건

(1) 칼럼 : 순상형 칼럼

(2) 이동상 : 헥산 · 이소프로판올(98 : 2)

(3) 유속 : 0.5 mL/분

(4) 검출기 : 형광검출기(여기파장 298 nm, 측정파장 325 nm)

5) 정량시험

시험용액 1.0 mL에 토코페롤표준용액 1.0 mL를 가해(S) 이의 10 µL를 액체크로마토그래프용 칼럼에 주입하여 얻은 토코페롤동족체의 피크 넓이 또는 높이(P_{toc}) 및 토코페롤의 피크 넓이 또는 높이(P_{int})를 구한다. 또한 토코페롤동족체 각각에 대하여 각 토코페롤 표준용액 1.0 mL를 취해 이에 토코페롤표준용액 1.0 mL를 가해 이의 10 µL를 액체크로마토그래프에 주입하여 얻은 각 토코페롤 동족체의 피크 넓이 또는 높이(P_{st-toc})와 토코페롤의 피크 넓이 또는 높이(P_{st-int})를 구하고, 이들의 중량(mg)에서 토코페롤 동족체의 토코페롤에 대한 환산계수(F)를 구한다. 검체중 토코페롤 동족체의 함량(mg/100 g)은 다음 계산식에서 구한다.

가) 계산

(1) 일반검체의 경우

$$\text{토코페롤동족체의 양(mg/100 g)} = S \times \frac{P_{\text{toc}}}{P_{\text{int}}} \times F \times \frac{100}{W}$$

S : 시험용액에 함유된 토코페롤의 함량(mg)

S = V × C

V : 검체에 첨가한 토코페롤표준용액의 양(mL)

C : 검체에 첨가한 토코페롤표준용액의 농도(mg/mL)

P_{toc} : 시험용액중 토코페롤 동족체 피크의 넓이 또는 높이

P_{int} : 시험용액중 토코페롤 피크의 넓이 또는 높이

F : 환산계수

$$F_{\alpha-\delta} = \frac{C_{\text{st-toc}}}{C_{\text{st-int}}} \times \frac{P_{\text{st-int}}}{P_{\text{st-toc}}}$$

C_{st-toc} : 표준용액중 토코페롤 동족체의 농도

P_{st-toc} : 표준용액중 토코페롤동족체 피크의 넓이 또는 높이

C_{st-int} : 표준용액중 토코페롤의 농도

P_{st-int} : 표준용액중 토코페롤 피크의 넓이 또는 높이

(2) 유지검체의 경우

$$\text{토코페롤 동족체의 양(mg/100 g)} = S \times \frac{50}{D} \times \frac{P_{\text{toc}}}{P_{\text{int}}} \times F \times \frac{100}{W}$$

6.10. 비타민 K

가. 고속액체크로마토그래프에 의한 정량법

1) 시약

가) Conditioning용액 : 이소프로판올을 이소옥탄에 녹여 0.01%가 되게 한다.

나) 용출용매(이동상) : 디클로로메탄과 이소프로판올을 이소옥탄에 녹여 각각 15%, 0.02%가 되게 한다.

다) 정제칼럼 : 60~200 메쉬 실리카 5.0 g (100℃ 오븐에서 하룻밤 동안 활성화시킴)을 정제칼럼(1.0 cm id × 30 cm, 유리 칼럼)에 충전하고 그 위에 무수황산나트륨 2.0 g(100℃ 오븐에서 하룻밤 동안 활성화시킴)을 가한다.

2) 표준용액의 조제

가) 비타민 K₁ 표준물질^{주1)} 이소옥탄에 녹여 5 µg/mL이 되게 한다.

나) 검량선을 작성할 수 있도록 이소옥탄으로 희석하여 사용한다.

3) 시험용액의 조제

가) 시료 일정량^{주2)}(비타민 K₁으로서 3.5 µg함유)을 정확히 취한다.

- 나) 정밀이 취한 시료를 500 mL 분액여두에 넣는다.
- 다) 암모니아수 4 mL를 가한 후 60초간 흔들어 혼합한다.
- 라) 위의 용액에 메탄올 60 mL를 가하여 혼합한 후 디클로로메탄 100 mL과 이소옥탄 50 mL 혼합액을 가하여 잘 흔들어 추출한다.
- 마) 층 분리 후 하층액을 250 mL 증류플라스크에 옮긴다.
- 바) 라)의 과정을 반복하여 하층액을 마)의 용액과 합한다.
- 사) 위의 용액을 75℃ 이하에서 감압농축한다.
- 아) 증류플라스크를 아세톤 20 mL로 씻고 다시 농축시킨다.
- 자) 아)의 과정을 3회 반복 후 질소로 충전하여 차광한 채로 밀봉한다.
- 차) 정제칼럼에 conditioning 용액 20 mL를 주입하고 천천히 용출 시킨다.
- 카) 위의 잔류물에 conditioning 용액 10 mL로 녹인 후 칼럼에 통과시켜 비타민 K₁을 흡착시킨다.
- 타) conditioning 용매를 5 mL씩 2회에 걸쳐 증류플라스크를 씻어 정제칼럼에 통과시킨다.
- 파) 시료의 지방 함량에 따라 용출용매를 칼럼에 통과시킨다. 시료의 지방함량이 0.72~0.80 g 이면 100 mL의 용매를, 0.72 g 이하이면 예비실험을 통해 용출액의 양을 결정한다.
- 하) 용출액을 250 mL 증류플라스크에 받아 75℃ 이하로 감압 농축하고, 농축액을 이소옥탄 1~2 mL로 수 회 나누어 씻어 5 mL로 한다.

4) 시험조작

- 가) 고속액체크로마토그래프의 측정 조건^{주3)}(예)

항목	조건
주입량	20 µL
칼럼온도	35℃
이동상	디클로로메탄과 이소프로판올을 이소옥탄에 녹여 각각 30%, 0.02%가 되게 한다.
검출기 파장	254 nm
유속	0.5mL/분

나) 계산

$$\text{비타민 K}_1 \text{ 함량}(\mu\text{g}/100 \text{ g}) = C_{\text{std}} \times F \times \frac{H_s}{H_{\text{std}}} \times \frac{V}{S} \times 100$$

C_{std} : 표준용액의 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)

F : 비타민K₁ 표준용액에서 각각의 이성체의 비율

H_s : 시료의 비타민K₁ 각각의 이성체의 피크 면적 또는 높이

H_{std} : 비타민K₁ 표준용액 각각의 이성체의 피크 면적 또는 높이

V : 시험용액의 희석배수(mL)

S : 시료 채취량(g)

(비타민 K₁표준품은 trans와 cis 이성체를 함유하므로 각각의 이성체들을 분리하여 전체에 대한 cis형과 trans형의 피크 면적 비를 구한다.)

5) 시험 주의사항

- 주1) 비타민 K₁ 표준품은 trans와 cis 이성체를 함유하므로 각각의 이성체들을 분리하여 전체에 대한 cis형과 trans형의 피크 면적 비를 구한다.(불활성형 cis형을 ≤ 20 %정도 함유함). 암소에서 보관한다.
- 주2) 지방함량이 적은 시료일 경우 지방을 검화할 필요는 없지만, 지방함량이 많은 시료는 검화를 하여 검화물질을 제거해야 한다.
- 주3) column이 이동상에 평형이 되도록 이동상을 column에 흘려 보낸다(보통 column 부피의 50배). 순상컬럼은 역상에 비해 물질의 머무름시간이 이동상에 함유된 미량의 극성용매에

의해 변동폭이 크다. 특히 물이나 Methanol이 HPLC용 용매에도 적은양 함유하고 있는데 이들이 머무름 시간에 미치는 영향은 크므로 항상 같은 용매를 사용해야 하며, 주기적으로 순상 column은 regeneration 해야 한다. 비슷한 시료를 분석할 때는 시료간에 peak의 모양이 비슷하므로 분석하는데 큰 어려움이 없으나 시료간에 peak의 모양이 다를 때는 매번 표준물질을 사용하여 분석한다. 한 시료의 분석이 끝나면 충분히 이동상으로 column을 세척하여 다음의 시료에 전 시료가 오염되지 않도록 한다.

6.11. 비타민 K₃(Menadione)

가. 적용범위

본 분석법은 보조사료로 사용하는 비타민제 비타민K₃의 정량에 이용한다.

나. 시약 및 표준용액의 제조

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준원액: 비타민 K₃ 표준물질을 메탄올에 녹인다(1,000 mg/L, 4℃ 이하 암소 보관)
- 3) 표준용액: 표준원액을 각각 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 ppm이 되도록 메탄올로 희석하고 검량선 작성에 사용한다.
- 4) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

다. 시험용액의 조제

1) 추출

가) 균질화한 시료 약 0.5~1 g을 정밀히 취하여 10 mL 부피플라스크에 넣는다.

나) Biggs-Szjarto* 용액 1 mL를 넣고, 메탄올로 정용하여 잘 섞은 후, 약 10분 간 정치시킨다.

* Biggs-Szjarto: 유제품류 공인시험법에서 사용하는 용액

다) 이 액을 원심분리관에 옮기고 PSA(Primary and Secondary Amine) 0.1 g을 넣고 잘 섞은 뒤 4℃, 14,000 rpm으로 10분 간 원심분리한다.

라) 상등액을 syringe filter(0.2 µm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

라. 계산

$$\text{비타민 K}_3 \text{ (mg/kg)} = \text{시험용액 중의 비타민 K}_3 \text{ 농도 (}\mu\text{g/mL)} \times \frac{\text{총희석량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}}$$

마. 기기 분석 조건

1) 고속액체크로마토그래피 분석 조건

(가) Mobile phase A : 0.01 M 인산이수소칼륨용액

(나) Mobile phase B : 50% 메탄올

(다) Gradient

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	50	50
2.0	50	50
20.0	0	100
24.0	50	50
30.0	50	50

(라) Flow rate: 1.3 mL/min

(마) Column: Capcellpak C18 UG120 (4.6 × 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것

(바) 컬럼온도: 35℃

(사) Injection volume: 10 µL

(아) 검출기 파장: UVD, 260 nm

※ 기기 분석 조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

6.12. 비타민 K 화합물(MSB: Menadione Sodium Bisulfite)

가. 적용범위

본 분석법은 보조사료로 사용하는 비타민제 비타민K 화합물(MSB)의 정량에 이용한다.

나. 시약 및 표준용액의 제조

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준원액: 비타민 K MSB 표준물질을 0.01 M 인산이수소칼륨 용액에 녹인다(1,000 mg/L, 4℃ 이하 암소 보관)
- 3) 표준용액: 표준원액을 각각 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 ppm이 되도록 0.01 M 인산이수소칼륨용액으로 희석하고 검량선 작성에 사용한다.
- 4) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

다. 시험용액의 조제

- 1) 추출
 - 가) 균질화한 시료 약 0.1~1 g을 정밀히 취하여 50 mL 부피플라스크에 넣는다.
 - 나) 0.01 M 인산이수소칼륨 용액 25 mL를 넣어 잘 섞고 30분 간 초음파 추출한다.
 - 다) 이 액을 원심분리관에 옮기고 클로로포름 20 mL를 넣고 잘 섞은 후, 4℃, 4,000 rpm으로 10분 간 원심분리한다.
 - 라) 상등액을 syringe filter(0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

라. 계산

$$\text{비타민 K MSB (mg/kg)} = \text{시험용액 중의 비타민 K MSB 농도}(\mu\text{g/mL}) \times \frac{\text{총희석량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}}$$

마. 기기 분석 조건

- 1) 고속액체크로마토그래피 분석 조건
 - 가) Mobile phase A: 0.01 M 인산이수소칼륨용액
 - 나) Mobile phase B: 50% 메탄올
 - 다) Gradient

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	50	50
2.0	50	50
20.0	0	100
24.0	50	50
30.0	50	50

- 라) Flow rate: 1.3 mL/min
 - 마) Column: Capcellpak C18 UG120 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
 - 바) 컬럼온도: 35℃
 - 사) Injection volume: 10 μL
 - 아) 검출기 파장: UVD, 230 nm
- ※ 기기 분석 조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

6.13. 판토텐산

가. 액체크로마토그래피에 의한 정량

- 1) 장치

액체크로마토그래프 : 자외부검출기를 사용한다.
- 2) 시약 및 시액
 - 가) 20 mM KH₂PO₄ : KH₂PO₄ 2.7 g을 증류수에 녹이고 인산으로 pH 2.1로 조절한 후 전량을 1 L가 되게 한다.
 - 나) 표준용액의 조제 판토텐산((D-pantothenic acid, hemicalcium salt)을 20 mM KH₂PO₄에 녹여 표준원액(100 μg/mL)을 조제하고, 표준원액을 증류수로 적당량 희석하여 표준용액을

만든다.

3) 시험용액의 조제

검체 적당량을 취하여 분쇄기를 이용하여 잘게 부순후 적당량의 20 mM 인산완충용액을 가하여 30분간 초음파장치로 추출한 후 50 mL로 맞추고, 3,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

4) 시험조작

가) 액체크로마토그래프의 조건

(1) 칼럼 : 역상칼럼 (C18 또는 이와 동등한 것, 1.5 ×250 mm, 5 µm)

(2) 이동상

A- 20mM potassium phosphate(pH 2.1)

B- 20mM potassium phosphate/ACN(80/20)

A : B(96 : 4)의 혼합액으로 37분간 흘려보낸 후 B 용액으로 10분간 세척한다.

(3) 유속 : 120 µL/분

(4) 검출기 : 자외부(UV) 검출기(200 nm)

5) 정량시험

시험용액 및 표준용액을 각각 10 µL씩 주입하여 앞의 조건에서 시험한다. 표준용액 피크의 넓이 또는 높이에 의해 구한 검량선을 사용하여 시험용액의 판토텐산의 농도(µg/mL)를 구하고, 다음의 식에 의하여 검체중 판토텐산의 함량(mg/100 g)을 구한다.

가) 계산

$$\text{판토텐산(mg/100 g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{검체량(g)}} \times \frac{100}{1000}$$

S : 시험용액중의 판토텐산의 농도(µg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

6.14. 이노시톨

가. 중량법

이 품목을 105°에서 4시간 건조한 다음 약 0.2 g을 정밀히 달아 250 mL의 비이커에 넣고 묽은황산 1 mL 및 무수초산 50 mL의 혼합액 5 mL를 가하고 비이커를 시계접시로 덮고 수욕상에서 20분간 가열한 다음 얼음으로 식히고 물 100 mL를 가하여 20분간 끓이고 식힌 다음 비이커의 내용물을 250 mL의 분액깔대기에 옮기고 비이커를 소량의 물로 씻고 씻은 액을 분액깔대기에 합친다. 다음에 클로로포름 30, 25, 20, 15, 10 및 5 mL의 순서로 비이커를 씻은 다음 차례로 추출하여 전 클로로포름추출액을 합하여 물 10 mL로 씻고 탈지면으로 여과하여 클로로포름 10 mL로 씻고 여액과 씻은 액을 합하여 수욕상에서 증발건고하고 105°에서 4시간 건조한다. 식힌 다음 무게를 달아 헥사아세틸이노시톨(C₁₈H₂₄O₁₂)의 양을 구하고 다음 식에 따라 이노시톨의 양을 산출한다.

$$\text{이노시톨(C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\text{)의 양(mg)} = \text{헥사아세틸이노시톨(C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{12}\text{)의 양(mg)} \times 0.4167$$

나. HPLC법

1) 적용범위

본 분석법은 보조자료로 사용하는 비타민제 이노시톨의 정량에 이용한다.

2) 시약 및 표준용액의 제조

가) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

나) 표준원액: 이노시톨 표준품 100 mg을 정밀히 달아 100 mL 부피 플라스크에 넣고 물을

가하여 100 mL로 한 것을 표준원액으로 한다(10,000 mg/L).

다) 표준용액: 표준원액을 각각 500, 1000, 2000, 5000, 8000 및 10000 ppm이 되도록 물로 희석하고 검량선 작성에 사용한다.

라) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

3) 시험용액의 조제

가) 균질화한 시료 1 g을 정밀히 달아 100 mL volumetric flask에 넣고 약 15 mL의 물을 첨가하여 시료를 용해한 후 잘 혼합한다.

나) 100 mL volumetric flask의 표시선 까지 물로 정용한 후 잘 혼합하여 여과지 (Whatman, No. 1)를 이용하여 여과한다.

다) 여과액 10 mL를 50 mL 원심분리관에 옮기고 여기에 클로로포름 10 mL를 넣어 잘 섞고, 4℃에서 4,000 rpm으로 10분 간 원심분리한다.

라) 상등액을 syringe filter(0.2 µm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

4) 계산

$$\text{이노시톨(mg/Kg)} = \text{시험용액 중의 이노시톨 농도 (ug/mL)} \times \frac{\text{총희석량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}}$$

5) 고속액체크로마토그래피 분석 조건

가) Mobile phase: 물 : 아세토니트릴(2:8, v/v)

나) Flow rate: 1.0 mL/min

다) Column: Carbohydrate (4.6 × 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것

라) 컬럼온도: 40℃

마) Injection volume: 10 µL

바) 검출기: 시차굴절계(RID)

사) 분석시간: 30분

※ 기기 분석 조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

6.15. 염화콜린

가. 효소분석법

1) 시료중의 염화콜린 정량 : 표준품 및 본 품 콜린으로서 약 150~200 ppm에 해당하는 양을 정밀하게 칭량하여 정제수로 1 L가 되도록 표정하여 녹인 후 여과하여 측정한다.

2) 사용조건

가) 효소분석기(생화학분석기)

나) 표준용액(콜린) : 175ppm(mg/L)

3) 계산

$$\text{염화콜린의 함량(ppm)} = \text{측정치} \times \frac{235 \text{ ppm}}{175 \text{ ppm}} \times \text{희석배수}$$

235ppm : 표준용액 175ppm을 염화콜린으로 환산한 량(ppm)

175ppm : 표준용액

나. HPLC 분석방법

1) 전처리 : 1.0 g에 해당하는 표준품 및 본 품을 정확히 칭량하여 125 mL 둥근 플라스크에 넣고 25 mL H₂O + 25 mL CH₃CN을 가하여 10~15분간 Sonication 한 후 여과하여 20 µL 주입한다.

2) 분석조건

가) 컬럼 : C₁₈ 역상컬럼

나) Injection Volume : 20 µL

다) Flow rate : 0.8 ~ 1.0 mL/min

라) 검출기 : RI detector

마) 이동상 : H₂O 500 mL+CH₃CN 500 mL+Sodium Lauryl Sulfate 2.88 g+Acetic acid 10 mL

6.16. 니아신(니코틴산 및 니코틴아미드)

가. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 니코틴산 및 니코틴아미드를 수용액으로 추출 후 액체크로마토 그래프를 이용하여 정성 및 정량 분석하는 방법이다.

나. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 5 mM 헥산설포산나트륨 용액 : 헥산설포산나트륨(sodium hexanesulfonate) 91.11 mg을 증류수에 녹여 100 mL로 한다.
- 2) 용매 : 메탄올, 헥산 등은 HPLC 급 또는 이와 동등한 것
- 3) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 4) HLB 카트리지 : N-vinylpyrrolidone과 divinylbenzene이 copolymer의 형태로 결합된 고정상이 충전되어 있는 일회용 카트리지(용량 3 mL)또는 이와 동등한 것

라. 시험용액의 조제

- 1) 표준원액 : 니코틴산 및 니코틴아미드를 각각 증류수에 녹여 100 mg/L로 한다.
- 2) 표준용액 : 표준원액을 각각 증류수에 녹여 적당한 농도로 희석, 혼합한다.
- 3) 추출 : 분쇄한 시료 1 g을 정밀히 달아 100 mL 메스플라스크에 넣고 5 mM hexanesulfonate 용액에 녹여 100 mL가 되도록 한다. 이 용액을 60분간 초음파 추출한 후 추출액을 원심분리기를 사용하여 0℃, 9000 rpm에서 30분간 원심분리한다. 상등액을 취해 0.2 µm 시린지 필터로 여과한다.
- 4) 정제 : 여과액의 정제를 위하여 HLB 카트리지를 준비하고 카트리지에 5 mL의 메탄올과 5 mL의 증류수를 연속으로 통과시킨 후 카트리지에 여과액 10 mL를 통과시켜 니코틴산 및 니코틴아미드가 카트리지에 흡착되도록 한다. 카트리지는 5 mL의 n-헥산으로 세척한 후 80% 메탄올용액 5 mL로 용출한다. 용출액은 10 mL 메스플라스크에 모으고 증류수를 가하여 10 mL로 하여 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 측정 조건

가) 칼럼 : 4.6 × 250 mm, 5 µm 또는 이와 동등한 것

나) 칼럼온도 : 40℃

다) 이동상

- A : 5 mM hexanesulfonate / 0.1% acetic acid

- B : 35% 5 mM hexanesulfonate / 0.1% acetic acid / 65% MeOH

시간(분)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
0	95	5
3	95	5
13	65	35
20	65	35
21	95	5
25	95	5

라) 검출기 파장 : 자외부(UV) 검출기(260 nm)

마) 유속 : 1 mL/분

바) 주입량 : 10 µL

사) 머무름 시간 : 니코틴산 6.70분, 니코틴아미드 12.90분

2) 검출한계 : 0.2 mg/kg, 정량한계 : 1.0 mg/kg

바. 정성시험

시험용액 및 표준용액을 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하여 얻어진 피크의 머무름 시간(retention time)을 비교해서 니코틴산 및 니코틴아미드의 성분을 확인한다.

사. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 피크의 면적 또는 높이를 측정하여 작성한 검량선으로부터 니코틴산 및 니코틴아미드의 함량을 정량한다.

아. 계산

$$\text{니코틴산 및 니코틴아미드}(\mu\text{g/g}) = C \times \frac{a \times D}{S}$$

C : 시험용액의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 추출용매의 양(mL)

D : 희석배수

S : 시료량(g)

6.17. 비오틴

가. 고속액체크로마토그래피에 의한 정량

1) 적용범위

본 분석법은 보조자료로 사용하는 비타민제 비오틴의 정량에 이용한다.

2) 시약

가) 0.01 M 인산이수소칼륨 용액 : 인산이수소칼륨 1.35 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3) 표준용액의 조제

가) 비오틴 표준물질^{주1)}을 0.01 M 인산이수소칼륨용액에 녹여 1,000 mg/L가 되도록 조제한다.
(4℃ 이하 암소 보관)

나) 상기 표준원액을 각각 0.5, 1, 5, 10, 20 및 30 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 0.01 M 인산이수소칼륨 용액으로 희석^{주2)}하여 표준용액으로 사용한다.(사용시 제조)

4) 시험용액의 조제

가) 균질화한 시료^{주3)} 약 1~2 g을 정밀히 취한 후, 0.01 M 인산이수소칼륨용액 20 mL를 첨가한다.

나) 이 용액을 잘 섞고 -4℃에서 14,000 rpm으로 15분 간 원심분리한다.

다) 상등액 10 mL를 다른 50 mL 원심분리관에 옮기고 여기에 클로로포름 10 mL를 넣어 잘 섞고, -4℃에서 4,000 rpm으로 10분 간 원심분리한다.

라) 상등액 5 mL를 취해 또다른 15 mL 원심분리관에 넣고 1 M 염산용액 1 mL를 넣는다.

마) 60℃ 수욕 상에서 30분 간 가수분해하며 때때로 흔들어 섞어준다. 30분 후, 흐르는 물로 식혀준 후, 1 N 수산화나트륨 용액 약 1 mL를 넣어 pH를 5-7로 맞춘다.

바) 중화된 시험 용액을 10 mL 부피플라스크에 옮겨 0.01 M 인산이수소칼륨용액으로 정용한다.
이 액을 syringe filter(0.2 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5) 시험조작

가) 고속액체크로마토그래프의 조건(예)

항목	조건		
주입량	10 μL		
Column	Capcellpak C18 UG120 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것		
칼럼온도	40℃		
이동상	Mobile phase A : 0.01 M 인산이수소칼륨용액		
	Mobile phase B: 50% 아세트니트릴		
	시간 (분)	A(%)	B(%)
	0.0	95	5
	3.0	95	5
	20.0	10	90
	25.0	95	5
	31.0	95	5
검출기 파장	UVD, 200 nm		
유속	1.0 mL/min		

※ 기기 분석 조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

나) 계산

$$\text{비오틴(mg/kg)} = \text{시험용액 중의 비오틴 농도}(\mu\text{g/mL}) \times \frac{\text{총회석량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}}$$

5) 시험 주의사항

주1) USP의 reference standard 또는 이에 준하는 것

주2) 표준원액을 희석하여 표준용액 조제 시 조작오차를 방지하기 위하여 반드시 정해진 용량의 피펫과 부피 플라스크를 사용하여야 한다.

주3) 시료는 대부분 용기·포장 등에 담겨 있으므로 채취시에는 분석결과에 영향을 미치지 않는 적절한 기구 및 용기를 준비·사용해야한다.

6.18. 엽산

가. 분석원리

검체에 함유된 엽산을 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)으로 추출하고, 역상 분배형 칼럼을 이용하여 액체크로마토그래프에서 분리하고 UV 280 nm에서 측정한다.

나. 장치

액체크로마토그래프/자외부흡광검출기(UV Detector)

다. 시약 및 시액

- 1) 10 mM 인산완충용액(pH 8.0) : 10 mM 인산수소이나트륨 용액에 10 mM 인산이수소나트륨 용액을 가하여 pH 8.0로 조정하여 제조한다.
- 2) 표준원액 : 엽산 표준품(99.9%)를 0.1 N NaOH 수용액에 녹여 1000 mg/L이 되도록 조제한다. (4 $^{\circ}$ C이하 암소 보관)
- 3) 표준용액 : 표준원액을 이동상A로 희석하여 10 mg/L로 조제한다.(사용 시 제조)
- 4) 이동상 A : Tetrabutyl ammonium bromide 1.6120 g (5 mM)을 pH 7.2로 조정된 인산완충용액을 가하여 1 L가 되게 한 뒤 0.22 μ m 필터로 여과하여 조제한다.
- 5) 검량선표준용액 : 표준용액을 이동상A로 희석하여 정량하기에 적합한 농도로 3개 이상 조제한다.(사용 시 제조)
- 6) 기타시약 : 잔류농약 시험용 또는 HPLC용

라. 시험용액의 조제

균질화한 검체(약 2 g)를 50 mL 갈색 플라스크에 정확히 칭량하고, 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)을 첨가하여 50 mL로 정용하여 10분간 초음파 추출한 후 원심분리관으로 옮겨 20분간 shaker에서 격렬하게 흔들어 준 다음, 5,000 rpm조건에서 10분간 원심분리를 실시하고, 상정액을 0.22 μ m의 membrane filter로 여과한 후 시험용액으로 사용한다.

마. 시험조작

1) 고속액체크로마토그래프의 측정조건

가) 칼럼 : Capcellpak C18 UG120(4.6 ×250 mm, 5 μm) 및 이와 동등한 것

나) 칼럼온도 : 40℃

다) 이동상(Isocratic elution)

이동상 A: 아세트니트릴을 8:2로 혼합하여 사용한다.

라) 이동상 유속 : 1.0 mL/min

마) 주입량 : 20 μL

바) 검출기파장 : 280 nm

2) 검량선 작성

검량곡선표준용액을 액체크로마토그래프에 20 μL씩 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크의 넓이를 구하여 검량선을 작성한다.

바. 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피이크면적법에 따라 정량한다.

사. 계산

$$\text{엽산 함량}(\mu\text{g}/100 \text{ kcal}) = Y' \times \frac{V}{S} \times \frac{100}{\text{검체 } 1\text{g 당 kcal}}$$

Y' = 검량곡선에 대입하여 얻은 시험용액의 농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V = 시료 추출에 사용된 용액의 부피(mL)

S = 추출시료의 무게(g)

6.19. L-카르니틴

가. 적정법

- 1) 이 품목 약 0.1 g을 정밀히 달아 개미산 3 mL 및 빙초산(비수적정용) 50 mL를 가하여 0.1 N 과염소산으로 적정한다(지시약 : 크리스탈바이올렛·빙초산시액). 종말점은 액의 자색이 청색을 지나 녹색으로 변하는 점이다. 따로 같은 방법으로 공시험을 한다.

$$0.1\text{N 과염소산용액 } 1 \text{ mL} = 16.12 \text{ mg } \text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_3$$

나. HPLC법

1) 적용범위

본 분석법은 보조자료로 사용하는 비타민제 L-카르니틴의 정량에 이용한다.

2) 시약 및 표준용액의 제조

가) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

나) 표준원액: L-카르니틴 표준물질을 0.01 M 인산이수소나트륨 용액에 녹인다(10,000 mg/L, 4℃ 이하 암소 보관)

다) 표준용액: 표준원액을 각각 500, 1000, 2000, 4000, 5000 및 8000 μg/ml이 되도록 추출용매로 희석하고 검량선 작성에 사용한다.

라) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

3) 시험용액의 조제

가) 추출

- (1) 균질화한 시료 약 1~2 g을 50 mL 원심분리관에 정밀히 취한 후, 추출용매 20 mL를 첨가한다.
- (2) 위 용액을 잘 섞고 -4℃에서 14,000 rpm으로 15분 간 원심분리한다.
- (3) 상등액 10 mL를 다른 50 mL 원심분리관에 옮기고 여기에 클로로포름 10 mL를 넣어 잘 섞고, -4℃에서 4,000 rpm으로 10분 간 원심분리한다.
- (4) 상등액 5 mL를 취해 또다른 15 mL 원심분리관에 넣고 1 M 염산용액 1 mL를 넣는다.

- (5) 60℃ 수욕 상에서 30분 간 가수분해하며 때때로 흔들어 섞어준다. 30분 후, 흐르는 물로 식혀주고 1 N 수산화나트륨 용액 약 1 mL를 넣어 pH를 5-7로 맞춘다.
- (6) 중화된 시험 용액을 10 mL 부피플라스크에 옮겨 추출용매로 정용한다. 이 액을 syringe filter(0.2 µm)로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

4) 계산

$$\text{L-카르니틴 (mg/kg)} = \text{시험용액 중의 L-카르니틴 농도 (µg/mL)} \times \frac{\text{총회석량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}}$$

5) 기기 분석 조건

가) 고속액체크로마토그래피 분석 조건

- (1) Mobile phase: 0.01 M 인산이수소나트륨(pH 6.0) : 아세토니트릴(3:7, v/v)
- (2) Flow rate: 1.0 mL/min
- (3) Column: Kromasil 100-5-NH₂ (4.6 × 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것
- (4) 컬럼온도: 35℃
- (5) Injection volume: 10 µL
- (6) 검출기 파장: UVD, 225 nm
- (7) 분석시간: 30분

※ 기기 분석 조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

6.20. 주석산수소콜린

6.20.1. 효소분석법-제1법

가. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 콜린을 증류수로 추출, 여과한 후 YSI 2700 효소분석기(생화학 분석기)를 이용하여 정성 및 정량 분석하여 주석산수소콜린으로 환산하는 방법이다.

나. 장치

YSI 2700 효소분석기(생화학분석기)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준용액(콜린) : 175 ppm(mg/L)

라. 시험용액의 조제

표준품 및 시료를 콜린으로서 약 150~200 ppm에 해당하는 양을 정밀하게 칭량하여 증류수로 녹인 후 여과하여 측정한다.

마. 계산

$$\text{주석산수소콜린(ppm)} = C \times \frac{253.25}{104.17} \times D$$

C : 시험용액의 콜린 농도(mg/L)

D : 회석배수

* 253.25 : 주석산수소콜린의 분자량

104.17 : 콜린의분자량

6.20.2. 액체크로마토그래프-질량분석기에 의한 정성 및 정량법-제2법

가. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 주석산수소콜린을 증류수로 추출, 여과한 후 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 이용하여 정성 및 정량 분석하는 방법이다.

나. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 용매 : 아세트니트릴, 10 mM 포름산 암모늄 용액(포름산 용액을 이용하여 pH 3으로 조정)
- 3) 표준원액 : 주석산수소콜린을 증류수에 녹여 1000 mg/L로 한다.
- 4) 표준용액 : 표준원액을 각각 증류수에 녹여 적당한 농도로 희석, 혼합한다.
- 5) 내부표준물질: choline chloride (trimethyl-d9)

라. 시험용액의 조제

조제된 사료의 일정량(100 mg)을 정밀히 달아 100 mL 메스플라스크에 넣고 내부표준물질인 choline chloride (trimethyl-d9) 500 ppm 100 µL를 첨가한 뒤 증류수에 녹여 100 mL가 되도록 한다. 이 용액을 60분간 초음파 추출한 후 추출액을 원심분리기를 사용하여 0℃, 9000 rpm에서 30분간 원심분리한다. 이 상등액을 membrane syringe filter(pore size 0.2 µm , 25 mm)로 여과하고 이를 10배 희석하여 측정한다.

마. 시험조작

- 1) 액체크로마토그래프 측정 조건
 - (가) 칼럼 : HILIC (4.6 150 mm, 2.6 µm) 또는 이와 동등한 것
 - (나) 칼럼온도 : 30℃
 - (다) 이동상(A : B = 14 : 86)
 - (1) A : 아세트니트릴
 - (2) B : 10 mM 포름산 암모늄 용액, pH 3
 - (라) 유속 : 0.5 mL/분
 - (마)주입량 : 10 µL
 - (바)머무름 시간 : 4.13분

분석물질	이온모드	Q1 질량	Q3 질량	DP(V)	EP(V)	CE(eV)	CXP(V)
내부표준물질 (염화 콜린-d9)	+	113.100	<u>69.000</u>	38.510	6.210	25.430	6.810
		113.100	66.000	38.510	6.210	41.430	7.900
주석산수소콜린	+	104.100	<u>60.000</u>	29.980	11.280	23.460	6.710
		104.100	44.900	29.980	11.280	30.270	7.000

* 밑줄 그은 이온은 정량이온이며 그 외 이온들은 정성이온임

** 기기분석 조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

바. 정성시험

시험용액을 위의 조건에 따라 MRM 모드로 측정하여 얻어진 정량 피크와 정성 피크의 비율로 정성분석한다.

사. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 표준물질과 내부표준물질의 피크 면적(또는 높이)의 비로부터 검량선을 작성하고 시료의 주석산수소콜린 함량을 정량한다.

아. 계산

$$\text{주석산수소콜린}(\mu\text{g/g}) = C \times \frac{a \times D}{S}$$

C : 시험용액의 농도(µg/mL)

a : 추출용매의 양(mL)

D : 희석배수

S : 시료량(g)

6.21. 수용성 비타민 동시분석법

가. 적용범위

본 분석법은 보조사료로 사용하는 비타민제 Thiamine(vitamin B₁), Riboflavin(vitamin B₂), Nicotinic acid(niacin), Nicotinamide, Pyridoxine(vitamin B₆), Folic acid의 동시분석에 적용한다.

나. 시약 및 표준용액의 제조

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준원액: 각 비타민의 표준품을 그룹별로 용해하여 표준원액으로 사용한다.

Group	항목	용해 용매
Group 1	Thiamine, Pyridoxine	증류수
Group 2	Riboflavin, Folic acid	0.01 N NaOH, 증류수
Group 3	Nicotinic acid, Nicotinamide	0.1% acetic acid 함유 5 mM hexane sulfonic acid

* Group 2 표준품을 용해할 경우 0.01 N NaOH을 미량 첨가하여 용해여부 판단.

- 3) 표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 4) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

다. 시험용액의 조제

1) 추출

- 가) 고체 시료의 경우: 균질화 된 시료 1.5 g을 원심분리 시험관에 칭량한 후 추출용매(0.1% acetic acid 함유 5 mM hexane sulfonic acid) 10 mL를 첨가한다.
- 나) 액체 시료의 경우: 시료 1 g을 25 mL volumetric flask에 칭량한 후 추출용매(0.1% acetic acid 함유 5 mM hexane sulfonic acid)를 첨가한다.
- 다) 10분간 진탕 후 10분간 초음파세척기로 추출한다.
- 라) 3000 rpm에서 10분 원심분리한다.
- 마) 원심분리 후 상등액을 여과시킨다.

라. 고속액체크로마토그래피 분석 조건

- 1) Column: ODS 또는 이와 동등한 것
- 2) Mobile phase: 0.1% acetic acid 함유 5 mM hexane sulfonic acid
65% MeOH 함유 5 mM hexane sulfonic acid
- 3) Injection volume: 10 µL
- 4) Flow rate: 0.5 mL/min
- 5) 검출기 파장: UVD, 270 nm

※ 기기 분석조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

마. 정성시험

위의 조건에서 시험할 때 시험결과는 어느 측정 조건에서도 표준품과 일치하여야 한다.

바. 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

※ 정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

6.22. 비타민 K₄

가. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 비타민K₄를 에탄올로 추출, 정제한 후 액체크로마토그래프를 이용하여 정성 및 정량 분석하는 방법이다.

나. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다 시약 및 시액

- 1) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 에탄올, 메탄올, 아세토니트릴 : HPLC 급
- 3) HLB 카트리지
- 4) 표준원액 : 비타민 K₄를 에탄올에 녹여 1000 mg/L로 한다.
- 5) 표준용액 : 표준원액을 각각 메탄올에 녹여 적당한 농도로 희석, 혼합한다.

라. 시험용액의 조제

1) 추출

제조된 사료의 일정량 (10 g)을 정밀히 달아 100 mL 메스플라스크에 넣고 에탄올 용액에 녹여 100 mL가 되도록 한다. 이 용액을 60분간 초음파 추출한 후 추출액을 원심분리기를 사용하여 0℃, 9000 rpm에서 30분간 원심분리한다.

2) 정제

상등액 2 mL를 질소농축하고 잔여물을 40% 에탄올 2 mL로 완전히 녹여 시료로딩용액을 제조한다. HLB 카트리지를 준비하고 카트리지에 2 mL의 메탄올과 2 mL의 증류수를 연속으로 통과시킨 후 카트리지에 시료로딩용액 2 mL를 통과시켜 비타민 K₄를 카트리지에 흡착되도록 한다. 카트리지는 1 mL의 5% 에탄올로 세척한 후 100% 에탄올용액 2 mL로 용출한다.

마. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 측정 조건

가) 칼럼 : C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 칼럼온도 : 40℃

다) 이동상

(1) A : 0.1% 포름산 용액

(2) : 0.1% 포름산 아세토니트릴 용액

시간(분)	이동상 A (%)	이동상 B (%)
0	98	2
3	98	2
12	2	98
15	2	98
16	98	2
20	98	2

라) 검출기 파장 : 자외부(UV) 검출기 230 nm

마) 유속 : 1 mL/분

바) 주입량 : 10 µL

사) 머무름 시간 : 14.08분

바. 정성시험

시험용액을 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하여 얻어진 피크의 머무름 시간 (retention time)을 비교해서 비타민K₄의 성분을 확인한다.

사. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 피크의 면적 또는 높이를 측정하여 작성한 검량선으로부터 비타민K₄의 함량을 정량한다.

아. 계산

$$\text{비타민 K}_4(\mu\text{g/g}) = C \times \frac{a \times D}{S}$$

C : 시험용액의 농도(µg/mL), a : 추출용매의 양(mL)

D : 희석배수 S : 시료량(g)

7장. 곰팡이독소

7.1. 아플라톡신 (Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂)

가. HPLC 법

1) 기구

HPLC, 호모게나이저, 진공펌프, 로타리 증발기, 여과병, 깔대기, 분액 여두, Column(22×300 mm), 항온 수조, 바이알(vial), 메스플라스크, 메스 실린더, 홀피펫

2) 시약의 조제

가) 메탄올(Methanol) : 특급품 또는 HPLC등급품 원액을 사용

나) n-헥산(n-Hexane) : 특급품 또는 HPLC등급품 원액을 사용

다) 세라이트(Celite) : 545 또는 이와 동등품

라) 클로르포름(Chloroform) : 특급품 또는 HPLC 등급품 원액을 사용

마) 무수 황산소다(Sodium Sulfate Anhydro, Na₂SO₄) : 1시간 건조후 사용

바) 실리카겔(SilicaGel) : Kiesel Gel 60(Merck사제 Art 7734)또는 이와 동등품을 105℃에서 1시간 건조시킨 후 증류수 1%를 첨가하고 1일 이상 경과 후 사용

사) 클로르포름 메탄올(Chloroform Methanol)액 : 클로르포름과 메탄올(97 : 3)의 비율로 혼합

아) 아플라톡신 표준품 : 아플라톡신표준품 B₁, B₂, G₁, G₂를 벤젠-아세트니트릴(98 : 2)로 용해 희석하여 사용한다.

자) 3불화 초산(Trifluoro acetic acid) : 특급품 또는 HPLC 등급품 원액을 사용

차) 증류수(Distilled water) : HPLC 등급품 원액을 사용

카) 아세트니트릴(Acetonitrile) : HPLC 등급품 원액을 사용

3) 시료액의 조제

가) 시료 50 g을 삼각플라스크에 취하고 메탄올 150 mL와 증류수 100 mL 및 n-헥산 100 mL를 가하고 30분간 진탕 추출한다.

나) No.2여과지에 세라이트 545를 넣은 후 흡인하면서 추출액을 여과하고 메탄올과 증류수가 합쳐진 층(하층) 50 mL를 취하여 250 mL 분액여두(分液瀝斗)에 넣고 n-헥산 100 mL를 가하여 5분간 진탕 후, 액층을 분리시켜 하층을 다른 분액여두에 옮기고 클로르포름 50 mL를 가하고 5분간 진탕 후 액을 분리시켜 클로르포름층 (하층)을 취한다.

다) 메탄올과 증류수가 합쳐진 층에 상기의 조작을 2회 더 반복한 후 클로르포름을 합하여 무수 황산나트륨에 통과시키면서 여과하여 탈수 후 회전식 증발기로 50℃에서 클로르포름을 증발 건조한다.

라) 칼럼(22×300 mm)의 하부에 그라스울(glass wool)로 막고 클로르포름을 넣어 기포를 제거한 후 무수 황산나트륨 5 g, 실리카겔(Art, 7734) 10 g을 넣은 후 다시 기포를 제거하고 30분간 방치한 다음 무수 황산나트륨 15 g을 넣은 후 클로르포름을 칼럼 상층까지 적하한다.

마) 증발건고된 증발 플라스크에 클로르포름 10 mL정도 넣어 용해하여 컬럼에 붓는다. 이와 같은 방법을 3회 반복한다. 이때 클로르포름 양이 실리카겔층 높이와 비슷하게 하는 것이 좋다.

바) 추출액을 적하하고 n-헥산 150 mL 및 에테르 150 mL로 탈지한 후 칼럼 하부에 증발 플라스크를 받치고 칼럼에 흡착된 아플라톡신을 클로르포름+메탄올(97+3) 200 mL로 용출하고 회전식 증발기로 50℃에서 증발 건조한다.

사) 증발건고된 아플라톡신을 클로르포름에 소량씩 3~4회 용해하여 바이알(vial)에 넣고 50℃ 항온수조에서 N₂ gas를 주입시키면서 증발건고 시킨 후 3불화 초산 100 μL를 가하고 마개를 막은 후 1분 후에 증발건고 시킨다.

아) 바이알에 메탄올 희석량의 1/2정도 넣고 완전히 용해한 후 증류수를 메탄올과 동량 가하고 혼합시킨 후 0.45 μm여과지로 여과하여 시료액으로 한다.

4) 측정

고속액체크로마토그래피로 다음 조건에 의하여 측정한다.

- 가) Column : Reverse phase C18 Column(4.6 mm×25 cm)
- 나) Mobile phase : H₂O + Methanol + CH₃CN(66+19+25)
- 다) Detector : Fluorescence Detector
- 라) Excitation Filter 338 nm
- 마) Emission Filter 425 nm
- 바) Flow rate : 0.96 mL/min 또는 2 mL/min

나. T.L.C법(Thin Layer Chromatography)

HPLC방법 과정에서와 같이 증발건고 시킨 후 벤젠+아세토니트릴(CH₃CN) (98+2)용액 200 μ L로 용해하여 시료액으로 하고 TLC판(Merck Art.5553-7)에 점적하여(이 때 표준품도 점적한다) TLC챔버(Chamber)에 전개용매(展開溶媒)[클로르포름(90) : 아세톤(10)]를 100 mL 가하고 TLC판을 넣어 전개 거리가 10 cm정도 되면 TLC판을 꺼내 암소(暗所)에서 5분간 말린 후 UV램프(UV Lamp) 장파장(365 nm)에서 측정한다.

다. 효소면역 측정방법

AOAC에 등재된 분석방법에 따른다.

라. HPLC 법(Immunoaffinity column 정제)

1) 기구

HPLC(형광 분광검출기를 부착한 것), KOBRA CELL 또는 Photochemical reactor, 호모 지나이저 vacuum system, 아플라톡신 면역친화칼럼, 갈색 삼각플라스크, 깔대기, 갈색 바이얼, 피펫, 여과지(Whatman No.4), 클램프 스탠드

2) 시약

- 가) 증류수(HPLC급), 메탄올(HPLC급), NaCl
- 나) 추출용매 : 60% 메탄올(메탄올:증류수 v/v)

3) 표준액 조제

아플라톡신 표준품을 메탄올에 1 μ g/mL의 농도로 녹이고 검량선 작성을 위해 5, 10, 20 및 50 ppb로 희석하여 준비한다.

4) 시료에서의 시험용액 추출

- 가) 분쇄용 시료용기에 시료 50 g을 칭량하고 염화나트륨 4 g과 60% 메탄올 250 mL을 첨가한 후 2분간 고속으로 추출한다.
- 나) 추출액에 250 mL의 증류수를 넣어 혼합하고 10분간 방치하여 상등액을 Whatman No. 4 여과지를 이용하여 갈색플라스크에 여과한다.
- 다) 아플라톡신 면역칼럼은 사용하기 전에 상온이 되도록 하고, vacuum system에 면역칼럼을 장착하여 칼럼에 들어 있는 보존용액을 제거한다.
- 라) 상등액 20 mL(시료 1 g에 대응하는 양)을 취하여 면역 칼럼에 주입한 후 칼럼에 있는 공기를 뺀 후 증력하 또는 시료액이 분당 2~3 mL가 칼럼을 통과하도록 압력을 조정한다.
- 마) 시료액이 면역칼럼을 통과한 후 증류수 20 mL로 분당 5 mL로 칼럼을 통과시켜 면역칼럼을 세척하고, 압력을 가하여 가능한 모두 제거한다.
- 바) 메탄올 1 mL로 칼럼에 결합된 아플라톡신을 용리시키고, 용출하는 동안 용출용액을 3회 정도 백플러싱을 하여 아플라톡신을 완전히 용출하여 갈색 바이얼에 담는다.
- 사) 증류수 1 mL를 가하여 칼럼에 잔존하는 아플라톡신을 용리시키고, 갈색 바이얼에 담아 혼합하여 총 부피가 2 mL이 되게 하여 기기분석을 위한 시료용액으로 한다.

5) 측정

동시에 측정한 표준품의 머무름 시간과 일치하는 것을 정성시험의 판정기준으로 하며,

표준품의 분석농도와 얻어진 피크 면적에 의한 검량선을 작성하여 정량시험에 사용한다.

6) HPLC의 조건

가) Column : C18(4.6 × 150 mm, 3.5 μm 또는 4.6 × 200 mm, 5 μm)

나) Mobile phase : methanol :water (50:50 v/v) with KBr 0.119 mg/L, 4 M nitric acid 350 μL
또는 water : acetonitrile : methanol(60:15:25 v/v/v)

다) Injection volumn : 10 μL

라) Flow rate : 1 mL/min

마) Detector : 형광검출기

=바) Detection wavelength : EX =338 nm, EM=425 nm

7.2. 제랄레놀과 제랄레논(Zearalenol, Zearalenone)

가. HPLC법

1) 기구

HPLC, HPLC 칼럼 (역상 C18, 칼럼 4.6 × 250 mm, 10 μm), 검출기(형광검출기), 분쇄기 (1/8 inch 스크린 부착)

2) 시약의 조제

가) 표준액 : Zearalenol과 Zearalenone 25 μg/mL CH₃CN을 함유한 용액 0.1, 0.2, 0.5 및 1.0과 2.0 mL를 바이알에 옮기고, 질소가스로 증발건조 시킨다. 10 mL 이동상 용매를 각 바이알에 넣고 완전하게 밀봉한다. 표준용액의 농도는 0.25, 0.50, 1.25, 2.50 및 5.0 μg/mL 이다.

나) 이동상 : MeOH, CH₃CN과 H₂O(1.0+1.6+2.0)를 혼합하여 탈기시킨다.

다) 염화나트륨 포화 용액

라) Sodium hydroxide 용액(2%) : 물 1 L에 20 g NaOH를 용해시켜 제조

마) Citric acid 용액 : 물 1 L에 106g citric acid monohydrate를 용해시킨 것

바) Diatomaceous earth - Hyflo super-cel

3) 샘플의 준비

시료를 분쇄하여 표준체 No. 20을 통과한 것을 사용한다.

4) 추출

50 g의 샘플을 500 mL의 추출플라스크에 넣고, 25 g의 규조토와 20 mL의 물을 넣는다. 얼마간 혼합하고 250 mL CHCl₃를 넣는다. 완전히 밀봉하고 15분간 교반한다. 필터로 여과하고 100 mL 메스실린더로 50 mL를 채취한다. 250 mL의 분액여두로 옮기고 10 mL NaCl 용액을 넣고 혼합한다. 2%의 NaOH 용액 50 mL를 넣고, 1분간 충분히 섞는다. 정치하여 완전히 층을 분리하고, 아래층을 버린다. 두 번째 50 mL CHCl₃를 넣고, 1분 동안 충분히 섞는다. 정치하여 층을 분리하고, 아래 CHCl₃층을 버린다. 50 mL citric acid 용액을 분액여두에 넣고, 혼합하며 50 mL CH₂Cl₂로 Zearalenol / Zearalenone을 추출한다. 1분 동안 충분히 혼합하고 정치하여 층을 분리한다. Glass funnel에 glass wool ball과 2인치(40 g) 정도의 무수 Na₂SO₄를 넣고 통과시킨다. 두 번째 50 mL CH₂Cl₂로 재추출한다. 추출액을 Na₂SO₄에 통과시키고 Na₂SO₄를 10~15 mL CH₂Cl₂로 세척한다. CH₂Cl₂ 추출액을 감압 증류장치에서 거의 건조할 정도로 증발시키고 4 mL 테프론 마개가 달린 바이알에 3~4회 CH₂Cl₂로 세척하면서 옮긴 후에 질소가스로 건조시키고 0.5 mL의 이동상에 용해시킨다.

5) 측정

이동상을 2.0 mL/min으로 흐르게 하고, 형광 검출기 파장을 236 nm(여기 파장), 418 nm (형광 파장)로 하여 측정한다.

7.3. 오크라톡신 A (Ochratoxin A)

가. HPLC법

1) 기구

- 가) HPLC : 형광 분광검출기를 부착한 것
- 나) 호모게나이저 : 200 mL 용량
- 다) 원심분리기 : 250 mL
- 라) 회전 농축기
- 마) 진탕기 : 500 mL 용량의 분액여두를 여러개 진탕할 수 있는 것
- 바) 칼럼 : C18(내경 10 mm, 길이 200 mm)

2) 시약

- 가) 메틸화용 메탄올 : 무수 황산나트륨을 적당량 가하고 잘 섞은 다음 12시간 이상 방치하여 사용한다.
- 나) 메탄올-탄산수소나트륨 혼합액 : 메탄올 1 용량에 1% 탄산수소나트륨 용액 1 용량을 혼합한다.
- 다) 칼럼용 실리카겔 : Kieselgel 60을 105℃에서 2시간 활성화시킨 후, 물을 15w/w의 비율로 가하여 잘 혼합한다. 그 밖의 시약류는 전부 특급품을 사용한다.

3) 표준액 조제

오크라톡신 A표준품을 아세토니트릴에 1 µg/ mL의 농도로 녹이고 필요시 희석하여 사용한다. 표정은 TLC시험법에 따른다.

4) 시료에서의 시험용액 추출

분쇄한 시료 25g을 칭량하고 메탄올-탄산수소나트륨 혼합액 120 mL을 가하여 5분간 균질화 시킨다. 마개가 달린 메스 실린더에 옮기고 동일 혼합액을 가하여 200 mL로 한다. 잘 혼합한 다음 원심분리하고 상층액 150 mL를 분액 여두에 옮긴다. 인산 2 mL를 가해 산성화시켜 발생한 탄산가스를 잘 빼내고 디에틸에테르 100 mL로 3회 추출한다. 에테르층을 합치고 에테르를 포화한 물 50 mL로 2회 세척한다. 에테르층을 무수 황산나트륨으로 탈수시킨 후 감압하면서 농축한다. 잔류물에 1% 암모니아수로 포화한 클로르포름 5 mL를 가하여 녹이고 클린업 용액으로 한다.

5) 클린업(정제)

미리 칼럼용 실리카겔 1 g을 클로르포름을 사용하여 충전시키고, 클로르포름 추출액을 가한다. 칼럼 윗면까지 액을 빼고 클로르포름 40 mL로 씻어 낸 후 벤젠-초산(9:1) 50 mL로 오크라톡신을 용출한다. 용출액을 물 30 mL로 2회 진동 세척하고 무수 황산나트륨으로 탈수한다. 글라스 울로 여과한 다음 감압하면서 농축한다. 잔류물에 아세토니트릴 500 µL를 가하여 녹이고 HPLC용 시험용액으로 한다.

6) 측정

동시에 측정한 표준품의 머무름시간과 일치하는 것을 정성시험의 판정기준으로 하며, 표준품의 분석농도와 얻어진 피크 높이에 의한 검량선을 작성하여 정량시험에 사용한다.

7) HPLC의 조건

- 가) 칼럼 : C18(입경 10 µm, 내경 4.6 mm, 길이 250 mm)
- 나) 이동상 : 아세토니트릴-0.1% 인산(1:1)
- 다) 유속 : 0.7 mL/min
- 라) 측정 파장 : 여기파장(Ex) 327 nm, 형광파장(Em) 462 nm
- 마) 주입량 : 10 µL

나. HPLC법(Immunoaffinity column 정제)

1) 기구

HPLC(형광검출기를 부착한 것), 호모게나이저(200 mL 용량), 원심분리기(250 mL), 칼럼 : C18(내경 4.6 mm, 길이 150 mm)

2) 시약

- 가) 증류수, 초산, 메탄올, phosphate buffered saline(PBS) pH 7.4
- 나) 추출용매 : 60% 아세토니트릴(아세토니트릴:증류수 v/v)

다) 유출용매 : 초산:메탄올(2:98 v/v)

3) 표준액 조제

오크라톡신 A 표준품을 아세토니트릴에 1 µg/ mL의 농도로 녹이고 필요시 희석하여 사용한다.

4) 시료에서의 시험용액 추출

가) 시료 50 g을 칭량하여 60%아세토니트릴 200 mL를 첨가한 후 2분간 고속으로 혼합 한다 (과열시키지 말 것).

나) Whatman No. 4 여과지를 이용하여 여과하거나 최소 1,600g에서 원심분리한다.

다) 상등액 4 mL(시료1 g에 대응하는 량)을취하여 44 mL phosphate buffered saline pH 7.4에 희석한다(아세토니트릴의 최종농도가 5% (v/v)이 되게 한다).

라) 희석 시료용액에 침전이 생성 되었다면 원심분리를 하거나 재 여과 한다.

마) 유리주사기를 칼럼에 연결하여 어댑터로 이용한다.

바) 희석 시료용액 전량을 칼럼에 적용시키고 분당 2~3 mL로 칼럼을 통과 시킨다.

사) 20 mL PBS를 분당 약 5 mL로 칼럼을 통과시켜 세척하되 칼럼에서 모든 액체는 제거한다.

아) 1.5 mL 용출용액을 중력에 의해 칼럼을 통과 시켜 바이알에 담는다. 용출하는 동안 용출용액을 3회 정도 backflushing을 하여 오크라톡신 A를 완전히 용출해 낸다. 공기를 불어넣어 마지막 방울까지 용출한다.

자) 1.5 mL 증류수를 칼럼에 통과시켜 용출된 시료액에 혼합하고 최종 3 mL을 만든다.

5) 측정

동시에 측정한 표준품의 머무름시간과 일치하는 것을 정성시험의 판정기준으로 하며, 표준품의 분석농도와 얻어진 피크 면적에 의한 검량선을 작성하여 정량시험에 사용한다.

6) HPLC의 조건

가) Column : C18 (4.6 × 150 mm, 5 µm)

나) 이동상 : acetonitrile:water: acetic acid(51:47:2, v/v/v)

다) Flow rate : 1 mL/min

라) Detector : 형광검출기

마) 검출파장 : EX=333 nm, EM=443 nm

7.4. 푸사리움 곰팡이독소 (Fusarium Mycotoxins)

가. 기구

- 1) 분쇄기 : 100 g 정도의 곡류를 분쇄할 수 있는 것
- 2) 진탕기 : 300 mL 용량의 분액여두 여러 개를 걸 수 있는 것
- 3) 회전 농축기
- 4) 분액 여두
- 5) 칼럼 : 초자 밸브가 달린 것(내경 22 mm, 길이 300 mm)
- 6) 글라스 울
- 7) 가지형 플라스크 : 300 mL 용량의 것
- 8) 테프론 패키징이 된 5 mL 용량의 병

나. 시약

- 1) 아세토니트릴, n-헥산, 클로르포름, 에탄올, 메탄올, 사이클로 헥산 등의 유기용매 : 증류한 것 또는 잔류농약 분석용 시약 특급품, 그 밖의 시약 특급품을 사용한다.
- 2) 칼럼용 플로리실 : 플로리실 PR(60~80mesh)을 130℃에서 2시간 동안 활성화한 후 테시케이터에서 식힌 것
- 3) 추출용매 : 아세토니트릴-증류수(3:1)
- 4) 푸사리움 독소 표준액

다. 표준액 조제

- 1) 곰팡이독소 표준원액(100 µg/ mL)

디옥시니발레놀(deoxynivalenol), 니발레놀(nivalenol) 표준품 각 10 mg을 달아 각각 메탄올 10 mL에 완전히 녹인 다음 클로르포름을 가하여 정확히 100 mL를 만든다. 푸살레논-X(fusalenon-X), 3-아세틸디옥시니발레놀 (3-acetyldeoxy nivalen-ol), 디아세톡시스커페놀 (diacetoxyscirpenol), 네오솔라니올(neosolaniol), T-2 독소, 제랄레논(zearalenone) 표준품 각 10 mg을 정확히 달아, 각각 클로르포름으로 완전히 녹인 다음 정확하게 100 mL를 만든다.

2) GC용 혼합표준용액

디옥시니발레놀, 니발레놀, 푸살레논-X, 3-아세틸디옥시니발레놀 표준원액 각 1 mL, 디아세톡시스커페놀, 네오솔라니올, T-2 독소, 제랄레논 표준원액 각 20 mL를 메스 플라스크에 넣고 클로르포름을 가하여 정확히 100 mL를 만든다.

라. 추출

- 1) 분쇄한 시료 20 g를 300 mL 용량의 분액여두에 넣는다. 추출 용제 200 mL를 가하고 30분간 가볍게 진탕 혼합한다.
- 2) 혼합물을 여지로 여과한다. 여과액 125 mL를 300 mL용량의 분액여두에 넣고 n-헥산 100 mL를 가하여 10초간 가볍게 진탕한다.
- 3) 하층의 아세토니트릴-중류수층을 300 mL 용량의 가지형 플스크에 넣고 에탄올 80 mL를 가하여 회전 농축기로 농축 건고한다.
- 4) 잔류물에 메탄올 5 mL를 넣고 독소를 충분히 용해한다. 이어서 클로르포름 45 mL를 가하고 여지로 여과한다. 여과액 40 mL를 약 10 mL까지 농축하고 추출액으로 한다.

마. 클린업(정제)

- 1) 칼럼에 소량의 글라스 울을 채우고 칼럼의 약 1/3까지 클로르포름을 넣은 다음, 가만히 유출시키면서 무수 황산나트륨 약 5 g을 칼럼의 하부로 내려보낸다.
- 2) 이어서 클로르포름층을 서서히 내려보내면서 플로리실 10 g을 기포가 발생하지 않도록 조용히 교반하면서 가한다. 매분당 5~10 mL의 속도로 클로르포름을 플로리실 윗면에서 수 cm 되는 곳까지 흘려보내 윗면이 편편하게 되도록 한다. 재차 클로르포름을 칼럼의 거의 상단까지 주입한다.
- 3) 코크 밸브를 열고 클로르포름을 흘려보내면서 무수 황산나트륨 약 15 g을 플로리실 윗면에 가만히 부어 넣는다. 쌓은 황산나트륨의 상층에 약간 남을 때까지 클로르포름을 흘려보낸다.
- 4) 이 칼럼에 앞의 추출액을 주입하고 계속하여 클로르포름-메탄올 용액(9:1) 100 mL를 주입하고 분당 5~10 mL의 속도로 흘려보낸다. 300 mL 용량의 가지형 플라스크에 이동상을 모은다. 회전 농축기로 농축 건고한다.(45℃)
- 5) 메탄올을 정확하게 4 mL 가하고 추출액을 완전히 녹인 다음 시험용액으로 한다.

바. GC에 의한 정량

- 1) 장치 : ECD나 FID를 부착한 GC
- 2) 시릴화제 : 초산에틸-트리메틸시릴이미다졸-트리메틸클로로실란(9 : 1 : 0.2)을 사용 바로 전에 만든다.

사. 분석조건

- 1) 칼럼 : 1.5% OV-17/Gas Chrom(60~80mesh)을 글라스 칼럼(내경 3 mm, 길이 300 mm)에 충전시킨다.
- 2) 칼럼 온도 : 235℃
- 3) 주입구 및 검출기 온도 : 250℃
- 4) 주입량 : 1~1.5 µL

아. 시험 방법

시험용액 1 mL(시료 2.5 g에 상당) 및 곰팡이독소 혼합표준용액 1 mL를 각각 테프론 패킹 용기에 넣고, 45℃ 열판에서 질소 가스를 흘려보내면서 건고한다. 시릴화제 0.2 mL 가하고 밀봉한 후, 교반하면서 실온에서 20분간 반응시킨다. 반응 후 3.8 mL 초산에틸을 가하고 GC용 시험용액으로 한다. 시릴화한 표준용액의 GC에서의 피크를 면적법이나 높이법으로 검량선을 작성하고 시험용액의 각 독소 함량을 산출한다. 이 방법의 정량한계는 ECD 및 FID GC를 사용하는 경우에 디옥시니발레놀, 니발레놀, 푸살레논-X, 3-아세틸디옥시니발레

놀은 각각 5 ng/g, 100 ng/g이며, 디아세톡시스스케페놀, 네오솔라니올, T-2독소, 제랄레논은 각각 100 ng/g, 200 ng/g이다.

7.5. 푸모니신 (Fumonisin B₁, B₂)

가. 분석원리

검체 중의 푸모니신을 메탄올·아세토니트릴·물(25:25:50, v/v/v) 혼합용액으로 추출, 여과한 것을 면역친화성컬럼으로 정제시키고 OPA(o-phthaldialdehyde) 용액으로 유도체화한 후 형광검출기가 부착된 고성능 액체크로마토그래프로 분석한다.

나. 장치 및 기구

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

다. 시약 및 용액

- 1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 푸모니신 혼합표준원액 : 푸모니신 B₁ 및 B₂를 아세토니트릴·물(50:50, v/v) 혼합용액에 녹여 각각 200 µg/mL가 되도록 한다.
- 4) 푸모니신 혼합표준용액 : 푸모니신 혼합표준원액 1 mL를 정확히 취하여 아세토니트릴·물(50:50, v/v) 혼합용액으로 정확히 100 mL로 한다.
- 5) 추출용액
메탄올·아세토니트릴·물(25 : 25 : 50, v/v/v)
- 6) OPA(o-phthaldialdehyde) 용액
o-phthaldialdehyde 40 mg을 1 mL 메탄올에 녹인 것을 0.1 M Na₂B₄O₇ 용액 5 mL로 희석하고 메르캅토에탄올(2-mercaptoethanol) 50 µL를 가하여 혼합한다. 이 용액은 갈색 바이알에 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(Na₂HPO₄ · 2H₂O) 용액 : 제일인산나트륨(NaH₂PO₄ · 2H₂O) 15.6 g를 물 990 mL에 녹인 것을 인산(H₃PO₄)을 사용하여 pH 3.3으로 조정 한 후 물로 1 L로 한다.

라. 시험용액의 조제

- 1) 추출
검체를 분쇄하여 균질화 한 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 유리섬유여과지로 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 mL를 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 아세토니트릴·물(50:50, v/v) 혼합용액 200 µL를 가하여 녹이고 이 중 50 µL를 취하여 30℃ 항온조건에서 OPA용액 200 µL과

섞고 2 분간 교반한 것을 시험용액으로 한다.

[주의사항] OPA-푸모니신 유도체는 반응 후 시간이 경과함에 따라 형광성이 떨어지므로 유도체화한 후 4분 안에 신속하게 액체크로마토그래프에 주입하여야 한다.

마. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 측정조건

가) 칼럼 : C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상 : 메탄올 · 0.1 M 제일인산나트륨(NaH₂PO₄) 용액(77 : 23, v/v), 인산을 사용하여 pH 3.3 ~ 3.35로 조정한 후 0.45 μm 막 여과기(membrane filter)로 여과하여 사용

다) 검출과장

(1) 여기과장 : 335 nm

(2) 형광과장 : 440 nm

라) 유속 : 1 mL/분

마) 주입량 : 5~20 μL

2) 검량선 작성

푸모니신 혼합표준용액을 아세토니트릴 · 물(50:50, v/v) 혼합용액으로 희석하여 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 μg/mL가 되도록 하고 각각 1 mL을 취하여 60℃에서 질소로 건조한 후 앞의 라. 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 피크높이 또는 피크면적을 검량선에 대입하여 정량한다. 이 방법의 정량한계는 푸모니신 B₁은 50 ng/g, 푸모니신 B₂은 70 ng/g이며, 검출한계는 푸모니신 B₁은 30 ng/g, 푸모니신 B₂은 50 ng/g이다.

바. 계산

$$\text{푸모니신의 함량(mg/kg)} = (\text{CFB}_1 + \text{CFB}_2) \times 50/\text{g}$$

CFB₁ : 검량선에서 구한 푸모니신 B₁의 농도(μg/mL)

CFB₂ : 검량선에서 구한 푸모니신 B₂의 농도(μg/mL)

50 : 희석배수

g : 시료 채취량(g)

7.6. 아플라톡신과 오크라톡신(AO) 동시분석법

가. 적용범위

본 분석법은 배합사료와 단미사료 중 아플라톡신 (Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂), 오크라톡신 A (Ochratoxin A)의 동시분석에 적용한다.

나. 시약 및 표준용액의 제조

1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 표준원액: 각 곰팡이독소의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다.

3) 표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.

4) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

다. 시험용액의 조제

1) 추출

균질화된 사료 25 g을 tube에 칭량하여 70% 메탄올 100 mL로 30분간 추출하고, 원심 분리한다(3,000 rpm, 4℃, 15 min). Syringe filter(0.2 μm)로 여과하고 여액 10 mL에 0.01~0.1% Tween PBS(phosphate buffer saline) 40 mL를 첨가한다.

2) 정제

가) 시료용액 20 mL를 먼역컬럼에 주입한 후 컬럼에 있는 공기를 뺀 후 중력하 또는 시료액이

분당 2~3 mL가 컬럼을 통과하도록 압력을 조절한다.

나) 시료액이 먼역컬럼을 통과한 후 0.01~0.1% Tween PBS 10 mL와 증류수 10 mL로 컬럼을 통과시켜 먼역 컬럼을 세척한다.

다) 메탄올 1 mL로 결합된 곰팡이독소를 용리시킨 후, 증류수 1 mL로 한번 더 용리시킨다.

* 정제과정 중에는 모든 카트리지의 충전제가 마르지 않도록 주의한다.

라. 고속액체크로마토그래피 분석 조건

1) Column: UG120 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

2) Mobile phase: 아세토니트릴, 메탄올, 증류수 (1:3:6, v/v)

아세토니트릴, 0.1% 포스포린산 (1:1, v/v)

3) Injection volume: 10 μL

4) Flow rate: 1.2 mL/min

5) Detector: 형광검출기, 광화학증폭장치

6) 검출기 파장

성분	Ex	Em
아플라톡신	360 nm	450 nm
오크라톡신	330 nm	460 nm

※ 기기 분석조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

마. 정성시험

위의 조건에서 시험할 때 시험결과는 어느 측정조건에서도 표준품과 일치하여야 한다.

바. 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

※ 정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

7.7. 아플라톡신, 오크라톡신, 제랄레논(AOZ) 동시분석법

가. 적용범위

본 분석법은 배합사료와 단미사료 중 아플라톡신 (Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂), 오크라톡신 A (Ochratoxin A), 제랄레논(Zearalenone)의 동시분석에 적용한다.

나. 시약 및 표준용액의 제조

1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

2) 표준원액: 각 곰팡이독소의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다.

3) 표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.

4) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

다. 시험용액의 조제

1) 추출

균질화된 사료 25 g을 centrifuge tube에 칭량하여 70% 메탄올 100 mL로 30분간 추출하고, 원심 분리한다(3,000 rpm, 4℃, 15 min). 그 상층액 5 mL를 취하여 25 mL 0.01~0.1% Tween PBS (phosphate buffer saline) buffer로 희석한다.

2) 정제

가) 희석액의 상등액 10 mL를 취하여 먼역컬럼에 주입한 후 컬럼에 있는 공기를 뺀 후 증력하 또는 시료액이 분당 2~3 mL가 컬럼을 통과하도록 압력을 조절한다.

나) 시료액이 먼역컬럼을 통과한 후 0.01~0.1% Tween PBS buffer 10mL로 컬럼을 통과시켜 먼역 컬럼을 세척한다.

다) 메탄올 1 mL로 결합된 곰팡이독소를 용리시킨 후, 증류수 1 mL로 한번 더 용리시킨다.

라) 질소농축기로 완전히 증발시킨 뒤 500 μ L의 메탄올과 500 μ L의 0.1% acetic acid를 이용해 재용해 시키고 시료액으로 한다.

* 정제과정 중에는 모든 카트리지의 충전제가 마르지 않도록 주의한다.

* 질소농축은 필요에 따라 선택적으로 적용할 수 있다.

라. 고속액체크로마토그래피 분석 조건

- 1) Column: MG3 (4.6 $\times$ 100 mm, 3 μ m) 또는 이와 동등한 것
- 2) Mobile phase: 0.1% acetic acid, 메탄올 (7:3, v/v) 혼합액과 아세트니트릴
- 3) Injection volume: 10 μ L
- 4) Flow rate: 0.8 mL/min
- 5) Detector: 형광검출기, 광화학증폭장치
- 6) 검출기 파장: EX = 365 nm, EM = 435 nm

Time (min)	Ex	Em	Base
0	365	435	
12	276	460	2 : Hold
16.5	330	460	2 : Hold

※ 기기 분석조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

마. 정성시험

위의 조건에서 시험할 때 시험결과는 어느 측정조건에서도 표준품과 일치하여야 한다.

바. 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

※ 정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

7.8. 아플라톡신(B₁, B₂, G₁, G₂), 오크라톡신 A, 데옥시니발레놀, 푸모니신(B₁, B₂), T-2 독소, HT-2 독소, 제랄레논 동시분석방법

가. 시험법 적용범위

단미사료, 배합사료에 적용한다.

나. 분석원리

검체 중 곰팡이독소(아플라톡신, 데옥시니발레놀, 푸모니신, 오크라톡신 A, T-2 toxin, HT-2 toxin, 제랄레논)를 아세트니트릴로 추출한 후 d-SPE(dispersive-solid phase extraction)로 정제하여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 용매: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 푸모니신 표준품을 메탄올/물(5/5, v/v)에, 이를 제외한 곰팡이독소 표준품을 아세트니트릴에 녹여 표준원액으로 사용한다.
- 4) 혼합표준용액: 혼합표준원액을 아세트니트릴을 이용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하고 최종 용액에 증류수 50%가 포함되게 한다.
- 5) 혼합내부표준용액: 내부표준물질원액을 아세트니트릴을 이용하여 적당한 농도로 혼합, 희석한다.
- 6) d-SPE: PSA(Primary secondary amine), C18(Octadecyl bonded silica)
- 7) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시료 준비

전체 검체 중 4분법 등으로 대표성이 확보된 500 g이상의 검체를 표준체 30 mesh 이상 (체눈크기 600 μ m 이하)의 체를 통과하도록 분쇄한다. 체를 통과한 검체를 다시 혼합해

균질화한다.

바. 시험용액의 조제

1) 추출

균질화한 시료 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고 10% 포름산 함유 수용액 10 mL와 아세토니트릴 10 mL를 가한 뒤 30분간 진탕한다. 진탕 후 추출물에 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g을 추가하여 1분간 강하게 흔들어 섞은 다음 4℃, 4,000 G에서 10분간 원심 분리하여 상층액 1 mL를 취한다.

2) 정제

d-SPE(PSA 25 mg과 C18 25 mg)가 미리 담겨져 있는 2 mL 원심분리관에 추출로부터 얻은 상층액 1 mL를 가하고 1분간 충분히 혼합한 후 이를 4℃, 4,000 G에서 10분간 원심 분리한다. 정제된 상층액 0.4 mL, 3차 증류수 0.5 mL 및 아세토니트릴 0.1 mL를 합하여 교반한 뒤 4℃에서 30분간 방치 후 멤브레인 필터(PTFE, 0.2 µm)로 여과한 후 시험용액으로 한다.

사. 시험조작

1) 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS) 분석조건

가) 컬럼: C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 컬럼 온도: 40℃

다) 유속: 0.35 mL/분

라) 주입량: 2 µL

마) 이동상: A: 5 mM 포름산암모늄 및 0.1% 포름산 수용액

B: 5 mM 포름산암모늄 및 0.1% 포름산 함유 메탄올

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	95	5
1.5	95	5
2.5	70	30
4.0	40	60
5.0	20	80
6.0	1	99
8.5	1	99
8.6	95	5
13.0	95	5

2) 질량분석기 분석조건

가) 이온화 방법: ESI positive-ion 및 negative-ion mode

나) Capillary voltage: 3.5 kV

다) Collision gas: 질소(N₂)

3) 내부표준물질의 첨가 방법은 검량선용 표준용액, 공시험용액 및 검체에 내부표준물질의 일정량을 직접 첨가하거나 자동주입기 프로그램 등을 이용하여 주입 전에 용액과 혼합시키는 방법으로 한다.

- 예시) 내부표준물질 첨가 수준: ¹³C₁₇ Aflatoxins 5 µg/L, ¹³C₁₅ Deoxynivalenol 100 µg/L, ¹³C₃₄ Fumonisin 50 µg/L, ¹³C₂₄ T-2 toxin 10 µg/L, ¹³C₂₂ HT-2 toxin 100 µg/L, Ochratoxin A-d5 5 µg/L, ¹³C₁₈ Zeralenone 30 µg/L

4) 곰팡이독소 11성분 및 내부표준물질 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

분석성분 (Compound)	머무름시간 (Retention time, min)	이온화 (Ionization)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
Aflatoxin B ₁	4.53	[M+H] ⁺	313.0	285.0	25
				241.0	40
Aflatoxin B ₂	4.42	[M+H] ⁺	315.0	259.0	35

분석성분 (Compound)	머무름시간 (Retention time, min)	이온화 (Ionization)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
				287.0	35
Aflatoxin G ₁	4.29	[M+H] ⁺	329.0	<u>243.0</u> 311.0	30 20
Aflatoxin G ₂	4.16	[M+H] ⁺	330.9	<u>313.0</u> 245.0	25 35
Deoxynivalenol	3.04	[M+H] ⁺	297.3	<u>249.1</u> 191.0	10 58
Fumonisin B ₁	5.08	[M+H] ⁺	722.0	<u>352.3</u> 704.2	45 40
Fumonisin B ₂	5.53	[M+H] ⁺	706.4	<u>335.9</u> 354.3	35 30
Ochratoxin A	5.49	[M+H] ⁺	404.1	<u>238.9</u> 192.7	25 50
T-2 toxin	5.31	[M+NH ₄] ⁺	483.8	<u>215.0</u> 263.1	20 10
HT-2 toxin	5.05	[M+NH ₄] ⁺	442.5	<u>263.1</u> 215.1	10 10
Zearalenone	5.55	[M-H] ⁻	317.0	<u>175.1</u> 186.9	25 15
¹³ C ₁₇ Aflatoxin B ₁	4.53	[M+H] ⁺	330.1	<u>301.0</u> 283.9	25 40
¹³ C ₁₇ Aflatoxin B ₂	4.42	[M+H] ⁺	332.0	<u>273.0</u> 257.0	30 35
¹³ C ₁₇ Aflatoxin G ₁	4.29	[M+H] ⁺	346.0	<u>257.0</u> 299.0	30 30
¹³ C ₁₇ Aflatoxin G ₂	4.16	[M+H] ⁺	348.0	<u>330.0</u> 301.2	30 30
¹³ C ₁₅ Deoxynivalenol	3.04	[M+H] ⁺	312.0	<u>215.8</u> 198.0	10 15
¹³ C ₃₄ Fumonisin B ₁	5.08	[M+H] ⁺	756.1	<u>374.3</u> 356.3	40 45
¹³ C ₃₄ Fumonisin B ₂	5.53	[M+H] ⁺	740.0	<u>374.3</u> 356.33	50 40
Ochratoxin A-d5	5.49	[M+H] ⁺	409.1	<u>321.0</u> 239.5	36 20
¹³ C ₂₄ T-2 toxin	5.31	[M+NH ₄] ⁺	508.0	<u>322.1</u> 260.07	10 10
¹³ C ₂₂ HT-2 toxin	5.05	[M+NH ₄] ⁺	464.2	<u>278.1</u> 229.1	10 15
¹³ C ₁₈ Zearalenone	5.55	[M-H] ⁻	335.1	<u>185.0</u> 140.0	40 40

* 밑줄 그은 이온은 정량이온이며, 그 외는 정성이온임.

** 각 생성이온에 대한 질량분석기의 기기조건은 사용기기의 최적 값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 생성이온도 적용이 가능함.

아. 정성 및 정량시험

- 1) 정성 및 정량을 위한 시험은 3회 이상 실시한다.
- 2) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용($1/x$) 방식을 활용할 수 있다.

3) 정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 반응세기의 비율(response ratio)을 비교하여 그 비율이 $\pm 30\%$ 이내에서 일치하여야 한다.

4) 정량시험

가) 정성시험에서 검출된 곰팡이독소는 아래 나)의 방법에 따라 정량한다.

나) 내부표준물질을 이용하여 표준물질과 내부표준물질과의 피크 면적(또는 높이)의 비로부터 표준물질 각각의 검량선을 작성하고 시험용액의 크로마토그램으로부터 정량이온(Quantitative ion)과 내부표준물질의 정량이온과의 각 피크 면적(또는 높이) 비에 따라 각각 정량한다.

다) 정량한계

- (1) Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂: 0.0025 mg/kg
- (2) Deoxynivalenol: 0.05 mg/kg
- (3) Fumonisin B₁, B₂: 0.05 mg/kg
- (4) Ochratoxin A: 0.01 mg/kg
- (5) T-2 toxin: 0.05 mg/kg
- (6) HT-2 toxin: 0.05 mg/kg
- (7) Zearalenone: 0.0125 mg/kg

8장. 유해미생물

8.1. 살모넬라(Salmonella)

가. 증균 배양에 의한 검사법

1) 증균 및 분리

가) 1차증균배양: 시료 25 g을 취하여 225 mL의 펩톤수(Beffered peptone water)에 가한 후 35~37℃ 에서 24±2시간 증균 배양한다.

나) 2차증균배양: 1차증균배양액 0.1 mL를 취하여 10 mL의 Rappaport-Vassiliadis broth에 접종하여 42±1℃에서 24±2시간 배양한다. 또한 1차증균배양액 1 mL를 취하여 10 mL의 Tetrathionate Broth에 접종하여 36±1℃에서 24±2시간 배양한다.

다) 분리배양: 각각의 2차증균배양액 1~2 백금이를 MacConkey agar, SS(Salmonella&Shigella) agar, Desoxycholate Citrate agar, XLD agar, Bismuth Sulfite agar 또는 Brilliant Green Sulfa (BG Sulfa) Agar 중 2개를 선택, 도말하여 35~37℃에서 24±2시간 배양한 후 집락을 관찰한다. 이때 살모넬라 의심 집락은 확인시험을 한다.

2) 확인시험

가) 살모넬라로 의심되는 집락을 보통한천배지에 옮겨 35~37℃에서 18~24시간 배양한 후, TSI 사면배지의 사면과 고층부에 접종하고 35~37℃에서 18~24시간 배양하여 생물학적 성상을 검사한다. 유당, 서당 비분해(사면부 적색), 가스생성(균열 확인) 양성이면 생화학 검사를 실시한다.

나) 생화학 검사

생화학검사는 우선 Urea 반응검사와 Phenylalanine 반응검사를 실시하여 음성을 나타내는 균에 대해 진행하며 살모넬라의 일반적인 생화학적 반응은 다음과 같다.

성상		균	Salmonella	S. typhosa
TSI agar (KIA)	Glucose		+	+
	Lactose		-	-
	Sucrose		-	-
	gas 형성		+	-
	H ₂ S 생성		+	(±)
Indole			-	-
Methyl Red			+	+
Voges Proskauer			-	-
Citrate			(±)	(±)
Urea			-	-
KCN			-	-
운동성			+	+
Phenylalanine			-	-
Gelatin 액화			-	-

※ (±)는 양성 이거나 음성

다) 혈청군(Serogroup)결정 시험

이상의 생화학 검사결과 살모넬라로 판단되는 균들의 혈청학적 검사를 실시하는데 먼저 O항원 다가(Polyvalent) 항혈청(Difco 社)으로 슬라이드 응집반응을 실시하여 Polygroup을 결정한 후 단일(Single) 항혈청(Difco 社) 슬라이드 응집반응을 통해 혈청군(Serogroup)을 결정하여 D group 여부를 확인한다.

□ *Salmonella* D Group의 주요 혈청군

Serotype	Group	Antigenic Formula Somatic(O)
<i>typhi</i>	D1	9, 12,(Vi)
<i>enteritidis</i>	D1	1, 9, 12
<i>dublin</i>	D1	1, 9, 12
<i>pullorum</i>	D1	9, 12
<i>gallinarum</i>	D1	1, 9, 12
<i>ontario</i>	D2	9, 46

나. 키트(Kit)에 의한 간이 검사법

1) 시약 및 기구

- 가) 고압멸균기, 시험관(10 mL, 20 mL용량), Reader기, 삼각플라스크, 배양기 (2대), 탈지면, 멸균기
- 나) Buffered peptone water 용액 : 시약 20 g을 1 L 증류수나 비이온수에 녹이고 멸균하여 사용한다.
- 다) Selenite broth : Selenite broth 2.3 g을 증류수 100 mL에 용해하여 끓을 때 까지 가열한 후 방냉한다.
- 라) Iodine 용액 : 5 g KI를 증류수 20 mL로 녹인 용액에 Iodine Crystal 6g을 넣고 녹인다.
- 마) M-broth(혹은 GN broth) : 시약 3.62 g을 증류수 100 mL에 넣고 1분간 끓여 멸균 및 용해시킨다.

2) 시료액의 배양

- 가) 시료 25 g을 칭량하여 멸균한 300 mL 삼각플라스크에 넣고 멸균한 225 mL Buffered peptone water를 혼합하여 37℃에서 18~24시간 배양한다.
- 나) 배양액 1 mL씩 분취하여 10 mL의 Selenite cystine broth와 Tetrathionate broth에 각각 혼합하여 Selenite cystine broth 시험관은 37℃에서 Tetrathionate broth 시험관은 42℃±0.5에서 18~24시간 배양한다.
- 다) 각각의 선택배양액 1 mL를 분취하여 멸균한 10 mL의 M-broth와 혼합하여 42℃±0.5에서 4~6시간 배양한다.
- 라) 오염이 덜한 시료인 경우에는 상기 나)와 다)의 배양시간을 바꾸어 행한다.

3) 방법

- 가) Salmonella kit를 냉장상태에서 실온으로 방치한다.
- 나) M-broth 배양액을 1 mL씩 시험관에 분취하여 옮겨 멸균하고 실온으로 식힌다.
- 다) 각각의 Well에 양성음성 기준물 100 µL와 시료 100 µL를 취하여 첨가한 후 시료의 위치를 기록하고 실온에서 30분간 배양한다.
- 라) Well buffer로 3회, 증류수로 1회 세척한 후 물기를 제거한다.
- 마) 각각의 Well working conjugate 100 µL씩 첨가한 후 실온에서 30분간 배양한다.
- 바) 각각의 Well에 TMB Substrate 100 µL씩 첨가한 후 실온암실에서 30분간 배양한다.
- 사) 1 N H₂SO₄ 50 µL를 각각의 Well에 첨가한 후 10~15분내에 Reader기로 읽는다.

다. 효소면역기법(Enzyme Immunoassay(EIA) KIT)에 의한 검출법

- 1) 분석원리 : 전자동 효소 형광 면역 분석기의 키트(Kit) 이용하여 살모넬라균 음성 또는 양성임을 추정하고 생화학적시험법과 혈청학적시험법으로 최종 salmonella 혈청형(D)을 판정한다.
- 2) 실험방법
 - 가) 추정시험

- (1) 시료 25 g을 칭량하여 225 mL 펩톤수(Buffered peptone water)에 가한 후 1 mL salmonella supplement(green)를 첨가하여 41.5±1℃에서 18~24시간 증균 배양한다.
- (2) EIA 키트에 증균한 배양액 0.5 mL를 넣고 100℃에서 5분간 Heating한 후 키트를 빼서 10분간 방냉한다.
- (3) 전자동 효소 형광 면역 분석기기에 넣고 결과를 측정한다.
- (4) 음성 : <0.25, 양성 : ≥0.25

나) 분리배양

양성일 경우 증균배양액을 MacConkey 한천배지, Desoxycholate Citrate 한천배지, XLD 한천배지 또는 Bismuth Sulfite 한천배지에 접종하여 35~37℃에서 24±2시간 배양한 후 전형적인 집락이 보이면 보통한천배지에 옮겨 35~37℃에서 18~24시간 배양한 후 확인시험을 실시한다.

다) 확인시험

(1) 미생물 동정기기를 통한 확인시험

초미량의 각종 건조 배지 및 생화학적 반응물이 들어 있는 64개의 마이크로웰이 있는 플라스틱 카드를 사용하여 동정한다. 카드의 마이크로웰 내부에서 균의 증식 및 대사가 이루어지고, 이러한 화학반응의 변화를 매 15분마다 Transmittance/Colorimetry Optics 으로 측정하여 프로그램 상에서 분석 되어진 후 동정결과가 자동으로 출력된다.

(2) 혈청군(Serogroup)결정시험

먼저 O항원 다가(Polyvalent)항혈청으로 슬라이드 응집반응을 실시하여 Polygroup을 결정한 후 단일(Single)혈청 슬라이드 응집반응을 통해 혈청군(Serogroup)을 결정하여 D Group 여부를 확인한다.

라. 분자생물학적 시험법

* 본 방법은 신속분석을 위한 스크리닝분석법으로 활용하기 위한 방법이다.

1) 증균 배양

8.1. 살모넬라(Salmonella) 가. 증균 배양에 의한 검사법 1) 증균 및 분리 가) 1차 증균배양 방법에 따라 실시한다.

2) 주형유전자 준비

증균 배양액(1~2 mL)을 취한 후 10분간 끓여 원심분리하고, 상등액 10~20 µL를 취하여 시료로 사용한다.

※ 상기의 방법과 동등 이상인 유전자 추출키트 및 장비를 사용할 수 있다.

3) Real-time PCR 프라이머 및 프로브 염기서열

유전자	프라이머/프로브	염기서열(5'→3')
invA	invA-F	5'-GAA TCC TCA GTT TTT CAA CGT TTC-3'
	invA-R	5'-CGA ATT GCC CGA ACG TGG CGA-3'
	invA-P	5'-FAM - CTC TTT CGT CTG GCA TTA TCG ATC AGT ACC AG - BHQ1-3'

4) Real-time PCR 반응액 조제

성분	최종농도	Stock용액 농도	1회 용량
Master Mix ¹⁾	1×	2×	10 µL
invA 프라이머(F)	0.5 pmol/µL	10 pmol/µL	1 µL
invA 프라이머(R)	0.5 pmol/µL	10 pmol/µL	1 µL
invA 프로브(P)	0.1 pmol/µL	2 pmol/µL	1 µL
주형 DNA	-	-	5 µL
증류수	-	-	2 µL
총량	-	-	20 µL

1) PowerAmp™ Real-time PCR Master Mix와 동등 이상의 시약을 사용할 수 있다

5) Real-time PCR 반응조건

PCR 반응조건은 50℃에서 2분간 유지 및 95℃에서 10분간 방치하여 최초 변성이 일어나게 한 후, 95℃에서 15초간 변성시키고, 60℃에서 1분간 유전자 결합 및 신장반응이 일어나는 것을 1회로 하여 총 40회의 증폭반응을 한다.

구분	온도	시간	반응회수
	50℃	2분	1회
초기변성(Initial denaturation)	95℃	10분	1회
변성(denaturation)	95℃	15초	40회
결합(annealing)/신장(extension)	60℃	1분	

* 상기 PCR 조건이 최적이지 아닌 경우 변형하여 사용할 수 있다.

6) 결과 확인

- 가) PCR 반응에서 증폭곡선이 확인되지 않는 경우 살모넬라 불검출로 판정할 수 있다. 다만, 음성대조군에서 증폭곡선이 확인되거나 양성대조군에서 증폭곡선이 확인되지 않을 경우 재시험하여야 한다.
- 나) 증폭곡선이 확인되는 경우 분리배양 후 8.1. 살모넬라(Salmonella) 가. 증균 및 배양에 의한 검사법 2) 확인시험에 따라 살모넬라로 동정되면 검출로 판정한다.

7) 혈청군(Serogroup) 결정 시험

- (1) 6)의 검사결과 살모넬라로 판단되는 균들의 혈청학적 검사를 실시하는데 먼저 O항원 다가(Polyvalent) 항혈청으로 슬라이드 응집반응을 실시하여 Polygroup을 결정한 후 단일(Single) 항혈청 슬라이드 응집반응을 통해 혈청군(Serogroup)을 결정하여 D group 여부를 확인한다.

9장. 잔류농약

9.1. 유기인계 및 유기염소계 다성분 분석

가. 유기인계 동시분석

파라치온(Parathion), 펜치온(Fenthion), 페니트로치온(Fenitrothion), 말라치온(Malathion), 디클로르보스(Dichlorvos = DDVP), 클로르피리포스메틸(Chlorpyrifos-methyl), 피리미포스메틸(Pirimiphos-methyl), 펜토에이트(Phenthoate), 다이아지논(Diazinon)

1) 표준용액의 제조

각 표준품을 1000 µg/mL이 되도록 헥산에 녹여 표준원액으로 하고, 적정농도로 희석하여 단일표준용액 또는 혼합표준용액을 조제한다.

2) 시약 및 초자

가) 시약

(1) 아세톤, 디클로르메탄, 헥산, 아세토니트릴(잔류농약분석용 또는 동급), Na₂SO₄, 무수(잔류농약분석용 또는 동급), NaCl(잔류농약분석용 또는 동급), 에틸에테르(잔류농약분석용 또는 동급) 실리카겔(컬럼크로마토그래피용), 규조토,

(2) 용출액 A = 아세토니트릴 : 헥산 : 디클로르메탄 = 0.35 : 49.65 : 50

B = 아세토니트릴 : 헥산 : 디클로르메탄 = 1.5 : 48.5 : 50

C = 헥산 : 에틸에테르 = 50 : 50

나) 초자

삼각플라스크(300 mL), 부크너여두, 농축용플라스크(125 mL, 250 mL), 분액여두(1000 mL), 메스실린더(100 mL), 피펫(3 mL, 5 mL), No. 6 여과지, 유리컬럼(테프론 콕 포함, Φ1 cm×50 cm), 탈지면(아세톤으로 추출한 것), Vial(4 mL, 8 mL)

3) 방법

가) 추출

시료 20 g을 삼각플라스크에 칭량하고, 증류수 30~40 mL를 넣어 1시간 방치한 후, 아세톤 100 mL를 첨가하여 2~3시간 진탕 한다. 진탕 후, 부크너여두에 No. 6 여과지와 규조토(celite 545 또는 Hyflosupercel)를 깔고, 여두 아래 삼각플라스크를 놓고 흡인여과한다. 소량의 아세톤으로 삼각플라스크와 여두내의 잔사를 세척하여 여과액에 합친다.

나) 분배

시료용액을 1000 mL 분액여두로 옮기고, 포화식염수 100 mL, 증류수 400 mL, 디클로르메탄 50 mL를 넣고 약 4분간 진탕시킨다. 진탕 후, 잠시 정치시켜 아래쪽의 디클로르메탄층을 Na₂SO₄(무수)를 통과시켜 수분을 제거한 후, 250 mL 농축용플라스크에 받는다. (1액) 상층액에 다시 디클로르메탄 50 mL를 넣고 진탕시켜 디클로르메탄층을 1액과 합친다. 이를 실온에서 회전증발농축기로 거의 대부분을 농축시킨 다음 질소 가스로 완전히 농축시킨다. 잔사를 헥산 5 mL로 용해시킨다.

다) 정제(컬럼크로마토그래피)

유리컬럼을 아세톤으로 추출한 탈지면으로 막고 실리카겔 5g을 넣은 후, Na₂SO₄(무수) 1스푼 정도(높이 1~2 cm)를 넣는다. 이때 컬럼내로 균일하게 들어가도록 한다. 헥산 50 mL를 흘려버리고 시료액 3 mL를 loading한다. 다시 헥산 50 mL를 흘려버리고 용출액 A, B, C를 차례로 흘려 각각 125 mL 농축용플라스크로 받는다. 실온에서 회전증발농축기로 거의 대부분을 농축시킨 다음 질소 가스로 완전히 농축시킨다. 잔사를 헥산 3 mL로 용해시켜 기기 분석용 시료액으로 한다.

4) 측정조건(Gas chromatograph) (예)

가) 주입부 온도 : 220℃

나) 오븐온도 : 140℃(1분) - 분당 3℃상승 - 210℃(1분)

- 다) 검출기 : 질소인검출기(NPD), 온도 - 250℃, H₂ - 3.0 mL, Air - 60 mL
 라) Column : Capillary HP-5 또는 이와 동등한 것(5% phenyl methyl siloxane, 30.0 m×0.32 mm, 0.25 μm)
 마) Carrier gas : N₂-2.3 mL/min
 바) 주입량 : 1 μL

5) 계산

$$\text{ppm} = \text{검량선}(\text{ng}) \times \{ \text{최종희석량}(\text{mL}) / \text{주입량}(\mu\text{L}) \} \times \{ 1 / \text{시료무게}(\text{g}) \}$$

나. 유기염소계 동시분석

비에치씨(BHC), 디디티(DDT : p,p'-DDT, o,p'-DDT), 헵타크롤(Heptachlor), 헵타크롤 에폭사이드(Heptachlor epoxide), 엔드린(Endrin), 알드린(Aldrin), 디엘드린(Dieldrin)

1) 시약의 조제

가) 표준원액

α-비에치씨(BHC), β-비에치씨(BHC), γ-비에치씨(BHC), δ-비에치씨(BHC), 디디티(DDT : p,p'-DDT, o,p'-DDT), 헵타크롤(Heptachlor), 헵타크롤 에폭사이드(Heptachlor epoxide), 엔드린(Endrin), 알드린(Aldrin), 디엘드린(Dieldrin)을 각각 20 mg씩을 정확히 칭량하여, 각각 100 mL의 메스플라스크에 넣고 아세톤 20 mL로 용해 후 2,2,4-트리메틸 펜탄을 표선까지 채워 표준원액을 만든다. 사용할 때 각각의 표준원액을 2,2,4-트리메틸 펜탄+아세톤(4+1)로 희석하여 0.1 0.2, 0.3, 0.4ppm 혼합표준액으로 만들어 사용한다.

나) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[(입경 149~250 μm(100~60mesh) : 플로리실 PR 미국의 Floridin제)]을 130℃에서 5시간 이상 건조한다.

2) 방법

가) 추출

시료 20 g을 삼각플라스크에 칭량하고 아세토니트릴+증류수(13+7) 150 mL를 첨가하여 진탕기 250rpm에서 2~3시간 진탕 추출한다. Bell-Jar에 부크너여두를 연결하여 No. 6 여과지를 깔고 그 위에 규조토를 깔고, 여두 아래 300 mL 삼각플라스크를 놓고 흡인여과한다. 소량의 아세토니트릴로 삼각플라스크와 여두내의 잔사를 세척하여 여과액에 합친다.

나) 분배

여과액을 1000 mL 분액여두로 옮기고, 포화식염수 100 mL, 증류수 400 mL, 헥산 50 mL를 넣고 진탕기에서 약 10분간 진탕시킨다. 진탕 후, 잠시 정치시켜 헥산층을 분리하고 하층의 혼합액(증류수+아세토니트릴)을 다른 분액여두에 옮기고 여기에 다시 헥산 50 mL를 가하여 진탕추출한다. 250 mL 농축플라스크에 깔대기를 놓고 여과지로 막은 후 Na₂SO₄를 넣고 헥산층을 여과한다. 40℃이하의 회전증발농축기로 거의 대부분을 농축시킨 다음 질소 가스로 완전히 농축시킨다. 잔사를 헥산 5 mL로 용해시킨다.

다) 정제(컬럼크로마토그래피)

유리컬럼을 아세톤으로 추출한 탈지면으로 막고 규산마그네슘 5 g, 셀룰로스 1 g, Na₂SO₄ 4 g을 각각 헥산으로 현탁시켜 컬럼에 순차적으로 넣고 헥산 40 mL를 가하여 액층이 충전제의 상면에서 3 mm 높이가 될 때까지 유출시키고 시료추출액 3 mL를 가하여 분당 2~3 mL 속도로 유출시킨다. 컬럼 밑에 125 mL 농축플라스크를 놓고 40% 헥산 함유 벤젠 100 mL로 용출 후 용출액을 40℃이하의 회전증발농축기에서 증발시키고 2,2,4-트리메틸 펜탄+아세톤(4+1) 3 mL로 용해하여 시료분석용 시료로 한다.

3) 측정조건(Gas chromatograph) (예)

가) 주입부 온도 : 235℃

나) 오븐온도 : 150℃(2분) - 분당 5℃상승 - 275℃(5분)

다) 검출기 : 전자포획검출기(ECD), 온도 - 275℃, Anode purge flow - 6.0 mL/min, makeup flow - 60.0 mL/min

- 라) Column : RTX-1701
- 마) Carrier gas : He-1.0 mL/min
- 바) Make-up gas : N₂ 250mPa

4) 계산

$$\text{ppm} = \text{검량선}(\text{ng}) \times \{ \text{최종희석량}(\text{ mL}) / \text{주입량}(\text{ }\mu\text{L}) \} \times \{ 1 / \text{시료무게}(\text{g}) \}$$

9.2. 유기인계(Organophosphorus)

9.2.1. 다이아지논(Diazinon) [C₁₂H₂₁N₂O₃PS]

가. 시약의 조제

1) 다이아지논 표준액

다이아지논 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄(iso-octane)을 가하여 다이아지논 표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 다이아지논 0.2 mg을 함유한다) 사용시 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1 및 2 μg 을 함유하는 각 다이아지논 표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[입경 149~250 μm (100~60mesh) : 플로리실 PR. 미국의 Floridin Co.제]을 130℃에서 16시간 건조한다.

3) L-시스틴염산용액 : L-시스틴염산염1수화물 4.2 g을 증류수에 용해하여 250 mL로 한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0 g을 칭량하여 300 mL의 분액여두에 넣는다. L-시스틴염산염용액 30 mL를 가하여 30분간 방치한 후, 아세톤 70 mL를 가하고 30분간 진탕한 후 추출한다. 200 mL의 메스플라스크를 부크너여두 아래에 놓고 추출액을 No.5B 여과지로 흡인여과 한다. 아세톤+증류수(7+3)를 메스플라스크의 표선까지 가하여, 정제용 시료용액으로 한다. 용기 및 잔사를 아세톤+증류수(7+3) 50 mL로 세정한다.

2) 분배

시료용액 100 mL를 미리 염화나트륨용액(5W/V%) 250 mL 및 디클로르메탄 50 mL를 넣은 500 mL의 분액여두에 넣고 5분간 진탕한다. 방치한 후, 디클로르메탄층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로르메탄 50 mL를 분액여두에 가하여 진탕한 후 방치하고, 디클로르메탄층을 위의 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 300 mL의 플라스크에 분액여과지로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 디클로르메탄으로 세정하고, 여액을 합한다. 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건조될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건조한다. 잔류물을 200 mL의 분액여두에 헥산 30 mL로 용해한다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 가하고, 5분간 진탕하고 정치한 후, 아세토니트릴(하층)을 300 mL 플라스크에 넣는다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 분액여두에 가하고, 동일하게 조작한다. 아세토니트릴층을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건조될때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건조한다. 헥산+아세톤(19+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 정제(컬럼크로마토그래피)

컬럼관(내경 15 mm)에 황산나트륨(무수) 2 g, 규산마그네슘 5 g 및 황산나트륨(무수) 2 g을 각각 헥산+아세톤(19+1)으로 현탁시킨 것을 순차적으로 주입한다. 액면이 충전제의 상층에서 3 mm의 높이가 될 때까지 주입시켜서 정제용컬럼을 조제한다. 컬럼의 하층에 300 mL의 플라스크에 시료용액을 컬럼에 넣고 용기를 헥산+아세톤(19+1) 5 mL로 5회 세정하여, 세액을 순차적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 다이아지논을 헥산+아세톤(19+1) 70 mL로 유출시킨다. 아세톤+디에틸렌글리

콜(99+1) 2~3방울을 가하고, 유출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압 농축한 다음, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고, 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 염광광도검출기(인검출용필터)
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(5% 페닐, 95% 메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 30 mL/min
- 5) 수소 : 75 mL/min
- 6) 공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부 온도 : 230℃
- 8) 칼럼조 온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 9) 승온 : 10℃/min, 170℃(21분), 10℃/min, 240℃(12분)
- 10) 검출기 온도 : 250℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 다이아지는 함량을 산출한다.

9.2.2. 파라치온(Parathion) [C₁₀H₁₄NO₃PS]

가. 시약의 조제

1) 파라치온 표준액

파라치온 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄을 가하여 파라치온 표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 파라치온 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 μg을 함유하는 각 파라치온 표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[입경 149~250 μm(100~60mesh) : 플로리실 PR. 미국의 Floridin Co.제]을 130℃에서 16시간 건조한다.

3) L-시스틴염산용액 : L-시스틴염산염1수화물 4.2g을 증류수에 용해하여 250 mL로 한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0 g을 칭량하여 300 mL의 분액여두에 넣는다. L-시스틴 염산염용액 30 mL를 가하여 30분간 방치한 후, 아세톤 70 mL를 가하고 30분간 진탕한 후 추출한다. 200 mL의 메스플라스크를 부크너여두 아래에 놓고 추출액을 No.5B 여과지로 흡인여과 한다. 아세톤+증류수(7+3)를 메스플라스크의 표선까지 가하여, 정제용 시료용액으로 한다. 용기 및 잔사를 아세톤+증류수(7+3) 50 mL로 세정한다.

2) 분배

시료용액 100 mL를 미리 염화나트륨용액(5W/V%) 250 mL 및 디클로로메탄 50 mL를 넣은 500 mL의 분액여두에 넣고 5분간 진탕한다. 방치한 후, 디클로로메탄 층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로로메탄 50 mL를 분액여두에 가하여 가볍게 진탕한 후 방치하고, 디클로로메탄 층을 위의 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 300 mL의 플라스크에 분액여과지로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 디클로로메탄으로 세정하고, 여액을 합한다. 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 잔류물을 200 mL의 분액여두에 헥산 30 mL로 용해한다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 가하고, 5분간 진탕하고 정치한 후, 아세토니트릴(하층)을 300 mL 플라스크에 넣는다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를

분액여두에 가하고, 동일하게 조작한다. 아세토니트릴 층을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 헥산+아세톤(19+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 정제(컬럼크로마토그래피)

컬럼관(내경 15 mm)에 황산나트륨(무수) 2 g, 규산마그네슘 5 g 및 황산나트륨(무수) 2 g을 각각 헥산+아세톤(19+1)으로 현탁시킨 것을 순차적으로 주입하고, 액면이 충전제의 상층에서 3 mm의 높이가 될 때까지 주입시켜서 정제용 컬럼을 조제한다. 시료용액을 컬럼에 넣고 용기를 헥산+아세톤(19+1) 5 mL로 5회 세정하여, 세액을 순차적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 파라치온을 헥산+아세톤(19+1) 70 mL로 유출시킨다. 아세톤+디에틸렌글리콜(99+1) 2~3방울을 가하고, 유출액을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 다음, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고, 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 염광광도검출기(인검출용필터)
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(5% 페닐, 95% 메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 30 mL/min
- 5) 수소 : 75 mL/min
- 6) 공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부 온도 : 230℃
- 8) 칼럼조 온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 9) 승온 : 10℃/min, 170℃(21분), 10℃/min, 240℃(12분 유지)
- 10) 검출기 온도 : 250℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 파라치온 함량을 산출한다.

9.2.3. 페나트로치온(Fenitrothion) [C₉H₁₂NO₅PS]

가. 시약의 조제

1) 페니트로치온 표준액

페니트로치온 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄을 가하여 페니트로치온 표준 원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 페니트로치온 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1 및 2 μg을 함유하는 각 페니트로치온표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[입경 149~250 μm(100~60mesh) : 플로리실 PR. 미국의 Floridin Co.제]을 130℃에서 16시간 건조한다.

3) L-시스틴염산용액 : L-시스틴염산염1수화물 4.2g을 증류수에 용해하여 250 mL로 한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0 g을 칭량하여 300 mL의 분액여두에 넣는다. L-시스틴 염산염용액 30 mL를 가하여 30분간 방치한 후, 아세톤 70 mL를 가하고 30분간 진탕한 후 추출한다. 200 mL의 메스플라스크를 부크너여두 아래에 놓고 추출액을 No.5B 여과지로 흡인여과 한다. 아세톤+증류수(7+3)를 메스플라스크의 표선까지 가하여, 정제용 시료용액으로 한다. 용기 및 잔사를 아세톤+증류수(7+3) 50 mL로 세정한다.

2) 분배

시료용액 100 mL를 미리 염화나트륨용액(5W/V%) 250 mL 및 디클로로메탄 50 mL를 넣은 500 mL의 분액여두에 넣고 5분간 진탕한다. 방치한 후, 디클로로메탄층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로로메탄 50 mL를 분액여두에 가하여 가볍게 진탕한 후 방치하고, 디클로로메탄층을 위의 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 300 mL의 플라스크에 분액여과지로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 디클로로메탄으로 세정하고, 여액을 합한다. 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 잔류물을 200 mL의 분액여두에 헥산 30 mL로 용해한다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 가하고, 5분간 진탕하고 정치한 후, 아세토니트릴(하층)을 300 mL 플라스크에 넣는다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 분액여두에 가하고, 동일하게 조작한다. 아세토니트릴층을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 헥산+아세톤(19+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 정제(컬럼크로마토그래피)

컬럼관(내경 15 mm)에 황산나트륨(무수) 2 g, 규산마그네슘 5 g 및 황산나트륨(무수) 2 g을 각각 헥산+아세톤(19+1)으로 현탁시킨 것을 순차적으로 주입하고, 액면이 충전제의 상층에서 3 mm의 높이가 될 때까지 주입시켜서 정제용컬럼을 조제한다. 컬럼의 하층에 300 mL의 플라스크에 시료용액을 컬럼에 넣고 용기를 헥산+아세톤(19+1) 5 mL로 5회 세정하여, 세액을 순차적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 페니트로치온을 헥산+아세톤(19+1) 70 mL로 유출시킨다. 아세톤+디에틸렌글리콜(99+1) 2~3 방울을 가하고, 유출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 다음, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고, 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(예)

- 1) 검출기 : 염광광도검출기(인검출용필터)
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(5% 페닐, 95% 메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 30 mL/min
- 5) 수소 : 75 mL/min
- 6) 건조공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부온도 : 230℃
- 8) 칼럼 온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 9) 승온 : 10℃/min, 170℃(21분), 10℃/min, 240℃(12분 유지)
- 10) 검출기온도 : 250℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 페니트로치온 함량을 산출한다.

9.2.4. 펜토에이트(Phenthoate) [C₁₂H₁₇O₄PS₂]

가. 시약의 조제

1) 펜토에이트 표준액

펜토에이트 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄을 가하여 펜토에이트 표준 원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 펜토에이트 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 μg을 함유하는 각 펜토에이트표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[입경 149~250 μm (100~60mesh) : 플로리실 PR. 미국의 Floridin Co.제]을 130℃에서 16시간 건조한다.

3) L-시스틴염산용액 : L-시스틴염산염1수화물 4.2 g을 증류수에 용해하여 250 mL로 한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0 g을 칭량하여 300 mL의 분액여두에 넣는다. L-시스틴 염산염용액 30 mL를 가하여 30분간 방치한 후, 아세톤 70 mL를 가하고 30분간 진탕한 후 추출한다. 200 mL의 메스플라스크를 부크너여두 아래에 놓고 추출액을 No.5B 여과지로 흡인여과 한다. 아세톤+증류수(7+3)를 메스플라스크의 표선까지 가하여, 정제용 시료용액으로 한다. 용기 및 잔사를 아세톤+증류수(7+3) 50 mL로 세정한다.

2) 분배

시료용액 100 mL를 미리 염화나트륨용액(5%, W/V) 250 mL 및 디클로로메탄 50 mL를 넣은 500 mL의 분액여두에 넣고 5분간 진탕한다. 방치한 후, 디클로로메탄층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로로메탄 50 mL를 분액여두에 가하여 가볍게 진탕한 후 방치하고, 디클로로메탄층을 위의 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 300 mL의 플라스크에 분액여과지로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 디클로로메탄으로 세정하고, 여액을 합한다. 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 잔류물을 200 mL의 분액여두에 헥산 30 mL로 용해한다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 가하고, 5분간 진탕하고 정치한 후, 아세토니트릴(하층)을 300 mL 플라스크에 넣는다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 분액여두에 가하고, 동일하게 조작한다. 아세토니트릴층을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압 농축한 후, 질소가스로 건고한다. 헥산+아세톤(19+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 정제(컬럼크로마토그래피)

컬럼관(내경 15 mm)에 황산나트륨(무수) 2 g, 규산마그네슘 5 g 및 황산나트륨(무수) 2 g을 각각 헥산+아세톤(19+1)으로 현탁시킨 것을 순차적으로 주입하고, 액면이 충전제의 상층에서 3 mm의 높이가 될 때까지 주입시켜서 정제용컬럼을 조제한다. 시료용액을 컬럼에 넣고 용기를 헥산+아세톤(19+1) 5 mL로 5회 세정하여, 세액을 순차적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 펜토에이트를 헥산+아세톤(19+1) 70 mL로 유출시킨다. 아세톤+디에틸렌글리콜(99+1) 2~3방울을 가하고, 유출액을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 다음, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고, 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 염광광도검출기(인검출용필터)
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(5% 페닐, 95% 메틸실리코코팅, 30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 30 mL/min
- 5) 수소 : 75 mL/min
- 6) 건조공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부온도 : 230℃
- 8) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 9) 승온 : 10℃/min, 170℃(21분), 10℃/min, 240℃(12분)
- 10) 검출기온도 : 250℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 펜토에이트 함량을 산출한다.

9.2.5. 펜치온(Fenthion) [C₁₀H₁₅O₃PS₂]

가. 시약의 조제

1) 펜치온 표준액

펜치온 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄을 가하여 펜치온 표준 원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 펜치온 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg을 함유하는 각 펜치온표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[입경 149~250 µm(100~60mesh) : 플로리실 PR. 미국의 Floridin Co.제]을 130℃에서 16시간 건조한다.

3) L-시스틴염산용액 : L-시스틴염산염1수화물 4.2g을 증류수에 용해하여 250 mL로 한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0g을 칭량하여 300 mL의 분액여두에 넣는다. L-시스틴 염산염용액 30 mL를 가하여 30분간 방치한 후, 아세톤 70 mL를 가하고 30분간 진탕한 후 추출한다. 200 mL의 메스플라스크를 부크너여두 아래에 놓고 추출액을 No.5B 여과지로 흡인여과 한다. 아세톤+증류수(7+3)를 메스플라스크의 표선까지 가하여, 정제용 시료용액으로 한다. 용기 및 잔사를 아세톤+증류수(7+3) 50 mL로 세정한다.

2) 분배

시료용액 100 mL를 미리 염화나트륨용액(5W/V%) 250 mL 및 디클로로메탄 50 mL를 넣은 500 mL의 분액여두에 넣고 5분간 진탕한다. 방치한 후, 디클로로메탄층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로로메탄 50 mL를 분액여두에 가하여 가볍게 진탕한 후 방치하고, 디클로로메탄층을 위의 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 300 mL의 플라스크에 분액여과지로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 디클로로메탄으로 세정하고, 여액을 합한다. 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 잔류물을 200 mL의 분액여두에 헥산 30 mL로 용해한다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 가하고, 5분간 진탕하고 정치한 후, 아세토니트릴(하층)을 300 mL 플라스크에 넣는다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 분액여두에 가하고, 동일하게 조작한다. 아세토니트릴층을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 헥산+아세톤(19+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 정제(컬럼크로마토그래피)

컬럼관(내경 15 mm)에 황산나트륨(무수) 2 g, 규산마그네슘 5 g 및 황산나트륨(무수) 2 g을 각각 헥산+아세톤(19+1)으로 현탁시킨 것을 순차적으로 주입하고, 액면이 충전제의 상층에서 3 mm의 높이가 될 때까지 주입시켜서 정제용컬럼을 조제한다. 시료용액을 컬럼에 넣고 용기를 헥산+아세톤(19+1) 5 mL로 5회 세정하여, 세액을 순차적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 펜치온을 헥산+아세톤(19+1) 70 mL로 유출시킨다. 아세톤+디에틸렌글리콜(99+1) 2~3방울을 가하고, 유출액을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압농축한 다음, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고, 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

1) 검출기 : 염광광도검출기(인검출용필터)

2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(5% 페닐, 95% 메틸실리콘코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 µm)

- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 30 mL/min
- 5) 수소 : 75 mL/min
- 6) 건조공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부온도 : 230℃
- 8) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 9) 승온 : 10℃/min, 170℃(21분), 10℃/min, 240℃(12분 유지)
- 1) 검출기온도 : 250℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 펜치온 함량을 산출한다.

9.2.6. 말라치온(Malathion) [C₁₀H₁₉O₆PS₂]

가. 시약의 조제

1) 말라치온 표준액

말라치온 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄을 가하여 말라치온 표준 원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 말라치온 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg을 함유하는 각 말라치온 표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[입경 149~250 µm(100~60mesh) : 플로리실 PR. 미국의 Floridin Co.제]을 130℃에서 16시간 건조한다.

3) L-시스틴염산용액 : L-시스틴염산염1수화물 4.2g을 증류수에 용해하여 250 mL로 한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0g을 칭량하여 300 mL의 분액여두에 넣는다. L-시스틴 염산염용액 30 mL를 가하여 30분간 방치한 후, 아세톤 70 mL를 가하고 30분간 진탕한 후 추출한다. 200 mL의 메스플라스크를 부크너여두 아래에 놓고 추출액을 No.5B 여과지로 흡인여과 한다. 아세톤+증류수(7+3)를 메스플라스크의 표선까지 가하여, 정제용 시료용액으로 한다. 용기 및 잔사를 아세톤+증류수(7+3) 50 mL로 세정한다.

2) 분배

시료용액 100 mL를 미리 염화나트륨용액(5W/V%) 250 mL 및 디클로로메탄 50 mL를 넣은 500 mL의 분액여두에 넣고 5분간 진탕한다. 방치한 후, 디클로로메탄층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로로메탄 50 mL를 분액여두에 가하여 가볍게 진탕한 후 방치하고, 디클로로메탄층을 위의 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 300 mL의 플라스크에 분액여과지로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 디클로로메탄으로 세정하고, 여액을 합한다. 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 잔류물을 200 mL의 분액여두에 헥산 30 mL로 용해한다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 가하고, 5분간 진탕하고 정치한 후, 아세토니트릴(하층)을 300 mL 플라스크에 넣는다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 분액여두에 가하고, 동일하게 조작한다. 아세토니트릴층을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 헥산+아세톤(19+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 정제(컬럼크로마토그래피)

컬럼관(내경 15 mm)에 황산나트륨(무수) 2 g, 규산마그네슘 5 g 및 황산나트륨(무수) 2 g을 각각 헥산+아세톤(19+1)으로 현탁시킨 것을 순차적으로 주입하고, 액면이 충전제의 상층에서 3

mm의 높이가 될 때까지 주입시켜서 정제용컬럼을 조제한다. 시료용액을 컬럼에 넣고 용기를 헥산+아세톤(19+1) 5 mL로 5회 세정하여, 세액을 순차적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 말라치온을 헥산+아세톤(19+1) 70 mL로 유출시킨다. 아세톤+디에틸렌글리콜(99+1) 2~3방울을 가하고, 유출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 다음, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고, 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 염광광도검출기(인검출용필터)
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(5% 페닐, 95% 메틸실리콘코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 30 mL/min
- 5) 수소 : 75 mL/min
- 6) 건조공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부온도 : 230℃
- 8) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 9) 승온 : 10℃/min, 170℃(21분), 10℃/min, 240℃(12분 유지)
- 10) 검출기온도 : 250℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료 중의 말라치온 함량을 산출한다.

9.2.7. 클로르피리포스메틸(Chlorpyrifos-methyl) [C₇H₇Cl₃NO₃PS]

가. 시약의 조제

1) 클로르피리포스메틸 표준액

클로르피리포스메틸 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄을 가하여 클로르피리포스메틸표준 원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 클로르피리포스메틸 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 μg을 함유하는 각 클로르피리포스메틸표준액을 조제한다.

2) 실리카겔

개봉 후 실리카겔 [입경 63~200 μm (230~70mesh) : Silica Gel 60 (Merck제)]을 데시케이터에 보존한다.

3) 응고액 : 염산암모니움 1g을 증류수 1 L로 용해하고, 인산 2 mL를 가한다.

4) 구조토 : 구조토(하이프로슈퍼셀, John-Manville제)를 온수 및 메탄올로 세정한 후 풍건한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0 g을 칭량하여 500 mL의 분액여두에 넣는다. 증류수 60 mL를 가하고, 30분간 방치한 후, 아세톤 140 mL를 가하여, 30분간 흔들여 섞은 후 추출한다. 톨비이커는 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No.5여과지로 흡인여과한 후, 용기 및 잔사를 아세톤+증류수(7+3) 100 mL로 세정하고, 정제용 시료용액으로 한다.

2) 정제

시료용액을 미리 염화나트륨용액(5%,W/V) 400 mL 및 디클로메탄 100 mL를 넣은 1 L의 분액여두에 가한다. 3분간 진탕한 후, 정치하고, 디클로메탄층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로로메탄 100 mL를 분액여두에 가하여 가볍게 진탕하고 정치한 후, 디클로메탄층을 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 500 mL의 플라스크에 글라스섬유여과지(GA-100, 동양여과지)로 여과하고 용기 및 여과지를 소량의 디클로로

메탈로 세정하여, 여액을 합한다. 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 아세톤 30 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 규조토 0.5g 및 응고액 40 mL를 가하여 가볍게 진탕한다. 5분간 방치한 후, 상등액을 300 mL의 분액여두 A에 글라스섬유여과지(GA-100, 동양여과지)로 여과한다. 아세톤 30 mL를 플라스크에 가하여 진탕하고, 응고액 40 mL를 가하여, 동일하게 조작한 후, 용기 및 여과지를 소량의 응고액+아세톤(4+3)으로 세정한다. 헥산 50 mL를 분액여두 A에 가하고, 3분간 진탕한 후, 세정한 다음, 수층(하층)을 300 mL의 분액여두 B에 넣고 헥산층(상층)을 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 50 mL를 분액여두 B에 가하고, 동일하게 조작하여 헥산층(상층)을 위의 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여, 탈수하고 300 mL의 플라스크에 글라스섬유여과지로 여과한다. 용기 및 섬유여과지를 소량의 헥산으로 세정하고, 여액에 합하여, 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 헥산+디에틸에테르(9+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 정제(컬럼크로마토그래피)

황산나트륨(무수) 5 g, 실리카겔 5 g 및 황산나트륨(무수) 5 g을 각각 헥산+디에틸에테르(9+1)에 현탁시켜 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 주입한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 정제용 컬럼을 조제한다. 200 mL의 플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣는다. 용기를 헥산-디에틸에테르(9+1) 5 mL로 4회 세정하여, 세액을 순차적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면으로부터 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시킨 후, 클로르피리포스메틸을 헥산+디에틸에테르(9+1) 75 mL로 유출시킨다. 유출액 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해시키고, 가스 크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 알칼리열이온화검출기
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 4 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 26 mL/min
- 5) 수소 : 4 mL/min
- 6) 건조공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부온도 : 200℃
- 8) 칼럼온도 : 50℃(1분 유지)
- 9) 승온 : 20℃/min, 180℃(1분), 3℃/min, 200℃
- 10) 검출기온도 : 240℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 클로르피리포스메틸량을 산출한다.

9.2.8. 피리미포스메틸(Pirimiphos-methyl) [C₁₁H₂₀N₃O₃PS]

가. 시약의 조제

1) 피리미포스메틸 표준액

피리미포스메틸 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄을 가하여 피리미포스메틸표준 원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 피리미포스메틸 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4 μg을 함유하는 각 피리미포스메틸표준액을 조제한다.

2) 실리카겔

개봉후 실리카겔 [입경 63~200 μm (230~70mesh) : Silica Gel 60 (Merck제)]을 테 시케이타에 보존한다.

3) 응고액 : 염산암모니움 1g을 1 L로 용해하고, 인산 2 mL를 가한다.

4) 규조토 : 규조토[하이프로슈퍼셀(John-Manville제)]를 온수 및 메탄올로 세정한 후 풍건한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0 g을 칭량하여 500 mL의 분액여두에 넣는다. 증류수 60 mL를 가하고, 30 분간 방치한 후, 아세톤 140 mL를 가하여, 30분간 흔들여 섞은 후 추출한다. 톨비이커는 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No.5여과지로 흡인여과한 후, 용기 및 잔사를 아세톤 +증류수(7+3) 100 mL로 세정하고, 정제용 시료용액으로 한다.

2) 정제

시료용액을 미리 염화나트륨용액(5W/V%) 400 mL 및 디클로메탄 100 mL를 넣은 1 L의 분액여두에 가한다. 3분간 진탕한 후, 정치하고, 디클로메탄층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로로메탄 100 mL를 분액여두에 가하여 가볍게 진탕하고 정치한 후, 디클로메탄층을 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 500 mL의 플라스크에 글라스섬유여과지(GA-100, 동양여과지)로 여과하고 용기 및 여과지를 소량의 디클로로메탄으로 세정하여, 여액을 합한다. 여액을 40°C 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 아세톤 30 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 규조토 0.5g 및 응고액 40 mL를 가하여 가볍게 진탕한다. 5분간 방치한 후, 상등액을 300 mL의 분액여두 A에 글라스섬유여과지(GA-100, 동양여과지)로 여과한다. 아세톤 30 mL를 플라스크에 가하여 진탕하고, 응고액 40 mL를 가하여, 동일하게 조작한 후, 용기 및 여과지를 소량의 응고액+아세톤(4+3)으로 세정한다. 헥산 50 mL를 분액여두 A에 가하고, 3분간 진탕한후, 세정한 다음, 수층(하층)을 300 mL의 분액여두 B에 넣고 헥산층(상층)을 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 50 mL를 분액여두 B에 넣고 헥산층(상층)을 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 50 mL를 분액여두 B에 가하여 동일하게 조작하고, 헥산층을 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여, 탈수하고 300 mL의 플라스크에 글라스섬유여과지(GA-100, 동양여과지)로 여과한다. 용기 및 섬유여과지를 소량의 헥산으로 세정하고, 여액에 합하여, 여액을 40°C 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 헥산+디에틸에테르(9+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

황산나트륨(무수) 5 g, 실리카겔 5 g 및 황산나트륨(무수) 5 g을 각각 헥산+디에틸에테르(9+1)에 현탁시켜 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 주입한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 정제용 컬럼을 조제한다. 200 mL의 플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣는다. 용기를 헥산-디에틸에테르(9+1) 5 mL로 4회 세정하여, 세액을 순차적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면으로부터 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시킨 후, 피리미포스메틸을 헥산+디에틸에테르(9+1) 75 mL로 유출시킨다. 유출액 40°C 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해시키고, 가스 크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

1) 검출기 : 알칼리열이온화검출기

2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(메틸실리코코팅, 30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm)

3) 캐리어가스 : He 4 mL/min

4) 보조가스 : N₂ 26 mL/min

5) 수소 : 4 mL/min

- 6) 건조공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부온도 : 200℃
- 8) 칼럼조온도 : 50℃(1분 유지)
- 9) 승온 : 20℃/min, 180℃(1분), 3℃/min, 200℃
- 10) 검출기온도 : 240℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 피리미포스 메틸량을 산출한다.

9.2.9. 디클로르보스(Dichlorvos) [C₄H₇Cl₂O₄P]

가. 시약의 조제

1) 디클로르보스 표준액

디클로르보스 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고 표선까지 2,2,4-트리메틸펜탄을 가하여 디클로르보스 표준 원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 디클로르보스 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 µg을 함유하는 각 디클로르보스표준액을 조제한다.

2) 활성탄혼합물

컬럼크로마토그래피용 활성탄 10 g 및 미결정컬럼크로마토그래피용 셀룰로스(Merck제) 90 g을 혼합한다.

3) L-시스틴염산용액 : L-시스틴염산염1수화물 4.2 g을 증류수에 용해하여 250 mL로 한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~20.0 g을 칭량하여 300 mL의 분액여두에 넣는다. L-시스틴 염산염용액 30 mL를 가하여 30분간 방치한 후, 아세톤 70 mL를 가하고 30분간 진탕한 후 추출한다. 200 mL의 메스플라스크를 부크너여두 아래에 놓고 추출액을 No.5B 여과지로 흡인여과한 후, 용기 및 잔사를 아세톤+증류수(7+3) 50 mL로 세정한다. 아세톤+증류수(7+3)를 메스플라스크의 표선까지 가하여, 정제용 시료용액으로 한다.

2) 정제

시료용액 100 mL를 미리 염화나트륨용액(5%,W/V) 250 mL 및 디클로로메탄 50 mL를 넣은 500 mL의 분액여두에 가한다. 5분간 흔들어 혼합하고 정치한 후, 디클로로메탄층(하층)을 삼각플라스크에 넣는다. 디클로로메탄 50 mL를 분액여두에 가하여 가볍게 진탕하고 정치한 후, 디클로로메탄층을 위의 삼각플라스크에 가한다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 300 mL 농축플라스크에 No.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 디클로로메탄으로 세정하고, 여액을 합한다. 여액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 잔류물을 200 mL의 분액여두에 헥산 30 mL로 용해하고, 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 가하고, 5분간 진탕하고 정치한 후, 아세토니트릴(하층)을 300 mL 농축플라스크에 넣는다. 아세토니트릴+증류수(100+1) 30 mL를 분액여두에 가하고, 동일하게 조작한다. 아세토니트릴층을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 헥산+아세톤 (19+1) 5 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

황산나트륨(무수) 2 g, 활성탄혼합물 5 g 및 황산나트륨(무수) 2 g을 각각 아세톤으로 현탁시켜서 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 흘리고 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜서 정제용컬럼을 조제한다. 300 mL의 농축플라스크를 컬럼의 아래에 놓고 시료용액을 컬럼에 넣는다. 용기를 아세톤 5 mL로 5회 세정하고, 세액을 순차

적으로 컬럼에 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시킨후, 디클로르보스를 아세톤 20 mL로 유출시킨다. 아세톤+디에틸렌글리콜(99+1) 2~3방울을 가하여, 유출액을 40℃이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압농축한 후, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고, 가스 크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 염광광도검출기(인검출용필터)
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(5% 페닐, 95% 메틸실리콘코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 30 mL/min
- 5) 수소 : 75 mL/min
- 6) 건조공기 : 100 mL/min
- 7) 시료도입부온도 : 230℃
- 8) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 9) 승온 10℃/min, 170℃(21분), 10℃/min, 240℃(12분 유지)
- 10) 검출기온도 : 250℃

라. 계산

측정된 크로마토그램에서 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 디클로르보스량을 산출한다.

9.3. 유기염소계(Organochlorine)

9.3.1. 비에치씨(BHC) [C₆H₆Cl₆]

가. 시약의 조제

1) BHC표준액

α-BHC, β-BHC, γ-BHC 및 δ-BHC 각각 20 mg씩을 정확히 칭량하여, 각각 100 mL의 메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고, 2,2,4-트리메틸펜탄을 표선까지 가하여 α-BHC, β-BHC, γ-BHC 및 δ-BHC 표준원액을 조제한다.(이액 1 mL는 각각의 BHC 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하고, 1 mL중에 α-BHC, β-BHC, γ-BHC 및 δ-BHC로써 각각 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 μg을 함유하는 각 BHC표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[(입경 149~250 μm(100~60mesh) : 플로리실PR 미국의 Floridin제)]을 130℃에서 5시간 건조한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~50.0 g을 칭량하여 500 mL 분액여두에 넣고, 아세토니트릴+증류수(13+7) 300 mL를 가한 다음, 30분간 강하게 진탕하여 추출한다. 비이커를 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No.5B 여과지로 흡인 여과하여 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 150 mL를 미리 염화나트륨용액(5W/V%) 600 mL 및 헥산 100 mL를 넣은 1 L의 분액여두A에 가하고, 5분간 강하게 진탕한다. 정치한 후, 수층(하층)을 1 L의 분액여두B에 넣고, 헥산 50 mL를 가하여 가볍게 흔들어 혼합하고 정치한다. 수층을 버리고, 헥산층(상층)을 위의 분액여두A에 가하고 증류수 100 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정치한 후, 수층을 500 mL의 분액여두C에 넣는다. 그리고 증류수 100 mL를 헥산층에 가하여 가볍게 진탕하여 정치한 후, 수층을 분액여두C에 가하고, 가볍게 진탕하고 정치한 후, 수층을 버리고, 헥산층을 위의 삼각플라스크에 넣고, 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수한다. 500 mL

의 농축플라스크에 No.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 헥산으로 세정한다. 여액에 합하여 40℃ 이하의 수욕조에서 5 mL정도가 될때까지 감압농축하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

규산마그네슘 9 g, 황산나트륨(무수) 3 g을 각각 헥산으로 현탁시켜서 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 흘려보내고, 헥산 40 mL를 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시켜 컬럼을 조제한다. 300 mL의 농축플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣어, 용기를 소량의 헥산으로 세정한다. 세액을 컬럼에 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시킨후, BHC를 헥산+디에틸에테르(17+3) 150 mL로 용출시킨다. 용출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고 될때까지 감압 농축하고, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 3 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 전자포획검출기
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(시아노프로필메틸실리코닝, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 60 mL/min
- 5) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 6) 승온 : 20℃/min, 180℃(1분), 2℃/min, 220℃(1분 유지), 1℃/min, 250℃
- 7) 검출기온도 : 250℃

다. 계산

측정된 크로마토그램의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 각 BHC량을 산출한다.

9.3.2. 디디티(DDT) [C₁₄H₉Cl₅]

가. 시약의 조제

1) DDT표준액

p,p'-DDT 및 o,p'-DDT 각각 20 mg씩을 정확히 칭량하여, 각각 100 mL의 메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고, 2,2,4-트리메틸펜탄을 표선까지 가하여 p,p'-DDT 및 o,p'-DDT 표준원액을 조제한다.(이액 1 mL는 p,p'-DDT 및 o,p'-DDT 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하고, 1 mL중에 p,p'-DDT 및 o,p'-DDT 로써 각각 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 μg을 함유하는 각 DDT혼합표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[(입경 149~250 μm(100~60mesh) : 플로리실PR 미국의 Floridin제)]을 130℃에서 5시간 건조한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~50.0 g을 칭량하여 500 mL 분액여두에 넣고, 아세토니트릴+증류수(13+7) 300 mL를 가한 다음, 30분간 강하게 진탕하여 추출한다. 비이커를 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No. 5B 여과지로 흡인 여과하여 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 150 mL를 미리 염화나트륨용액(5%,W/V) 600 mL 및 헥산 100 mL를 넣은 1 L의 분액여두A에 가하고, 5분간 강하게 진탕한다. 정치한 후, 수층(하층)을 1 L의 분액여두B에 넣고, 헥산 50 mL를 가하여 가볍게 흔들어 혼합하고 정치한다. 수층을 버리고, 헥산층(상층)을 위의 분액여두 A에 가하고 증류수 100 mL를 가하여 가볍게 흔들고 정치한 후, 수

층을 500 mL의 분액여두 C에 넣는다. 그리고 증류수 100 mL를 헥산층에 가하여 가볍게 흔들어 정치한 후, 수층을 분액여두 C에 가하고, 헥산층은 500 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 100 mL를 분액여두C에 가하고 가볍게 진탕한 후 정치한다. 수층을 버리고, 헥산층을 위의 삼각플라스크에 넣고, 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수한 다음 500 mL의 농축플라스크에 No.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 헥산으로 세정한다. 여액에 합하여 40℃ 이하의 수욕조에서 5 mL정도가 될때까지 감압 농축하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

규산마그네슘 9 g, 황산나트륨(무수) 3 g을 각각 헥산으로 현탁시켜서 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 흘려보내고, 헥산 40 mL를 가한다. 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시켜 컬럼을 조제한다. 300 mL의 농축플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣어, 용기를 소량의 헥산으로 세정한다. 세액을 컬럼에 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시킨후, DDT를 헥산+디에틸에테르 (17+3) 150 mL로 용출시킨다. 용출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압 농축하고, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 3 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 전자포획검출기
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(시아노프로필메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 60 mL/min
- 5) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지)
- 6) 승온 : 20℃/min, 180℃(1분), 2℃/min, 220℃(1분 유지), 1℃/min, 250℃
- 7) 시료도입부온도 : 250℃
- 8) 검출기온도 : 280℃

라. 계산

측정된 크로마토그램의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 각 DDT량을 산출한다.

9.3.3. 알드린(Aldrin) [C₁₂H₈Cl₆]

가. 시약의 조제

1) 알드린표준액

알드린 20 mg씩을 정확히 칭량하여, 100 mL의 메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고, 2,2,4-트리메틸펜탄을 표선까지 가하여 알드린표준원액을 조제한다.(이액 1 mL는 알드린 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 μg을 함유하는 각 알드린표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[(입경 149~250 μm(100~60mesh) : 플로리실PR 미국의 Floridin제)]을 130℃에서 5시간 건조한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~50.0 g을 칭량하여 500 mL 분액여두에 넣고, 아세토니트릴+증류수(13+7) 300 mL를 가하고, 30분간 강하게 진탕한 다음 추출한다. 비이커를 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No.5B 여과지로 흡인 여과하여 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 150 mL를 미리 염화나트륨용액(5%,W/V) 600 mL 및 헥산 100 mL를 넣은 1 L의

분액여두 A에 가하고, 5분간 강하게 진탕한다. 정치한 후, 수층(하층)을 1 L의 분액여두 B에 넣고, 헥산 50 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정치한다. 수층을 버리고, 헥산층(상층)을 위의 분액여두 A에 가하고 증류수 100 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정치한 후, 수층을 500 mL의 분액여두 C에 넣는다. 그리고 증류수 100 mL를 헥산층에 가하여 가볍게 진탕하고 정치한 후, 수층을 분액여두 C에 가하고, 헥산층은 500 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 100 mL를 분액여두 C에 가하고 가볍게 흔들어 정치한 후 수층을 버리고, 헥산층을 위의 삼각플라스크에 넣고, 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수한다. 500 mL의 농축플라스크에 No.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 헥산으로 세정한다. 여액에 합하여 40℃ 이하의 수욕조에서 5 mL정도가 될때까지 감압 농축하고, 컬럼 크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

규산마그네슘 9 g, 황산나트륨(무수) 3 g을 각각 헥산으로 현탁시켜서 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 흘려보낸다. 헥산 40 mL를 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시켜 컬럼을 조제한다. 300 mL의 농축플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣는다. 용기를 소량의 헥산으로 세정하고 세액을 컬럼에 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시킨후, 알드린을 헥산+디에틸에테르 (17+3) 150 mL로 용출시킨다. 용출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압 농축하고, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 3 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 전자포획검출기
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(시아노프로필메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 60 mL/min
- 5) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지), 승온 20℃/min, 180℃(1분 유지), 승온 2℃/min, 220℃(1분 유지), 승온 1℃/min, 250℃
- 6) 시료도입부온도 : 250℃
- 7) 검출기온도 : 280℃

라. 계산

측정된 크로마토그램의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 각 알드린량을 산출한다.

9.3.4. 디엘드린(Dieldrin) [C₁₂H₈Cl₆O]

가. 시약의 조제

1) 디엘드린표준액

디엘드린 20 mg씩을 정확히 칭량하여, 각각 100 mL의 메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고, 2,2,4-트리메틸펜탄을 표선까지 가하여 디엘드린표준원액을 조제한다.(이액 1 mL는 디엘드린 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 μg을 함유하는 각 디엘드린표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[(입경 149~250 μm(100~60mesh) : 플로리실PR 미국의 Floridin제)]을 130℃에서 5시간 건조한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~50.0 g을 칭량하여 500 mL 분액여두에 넣고, 아세토니트릴+증류수(13+7) 300 mL를

가한 다음, 30분간 강하게 진탕하고 추출한다. 비이커를 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No.5B 여과지로 흡인 여과하여 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 150 mL를 미리 염화나트륨용액(5W/V%) 600 mL 및 헥산 100 mL를 넣은 1 L의 분액여두A에 가하고, 5분간 강하게 진탕한다. 정치한 후, 수층(하층)을 1 L의 분액여두B에 넣고, 헥산 50 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정치한다. 수층을 버리고, 헥산층(상층)을 위의 분액여두A에 가하고 증류수 100 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정치한 후, 수층을 500 mL의 분액여두 C에 넣는다. 그리고 증류수 100 mL를 헥산층에 가하여 가볍게 진탕하고 정치한 후, 수층을 분액여두 C에 가하고, 헥산층은 500 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 100 mL를 분액여두 C에 가하고 가볍게 흔들어 정치한 후 수층을 버리고, 헥산층을 위의 삼각플라스크에 넣는다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고 500 mL의 농축플라스크에 No.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 헥산으로 세정한다. 여액에 합하여 40℃ 이하의 수욕조에서 5 mL정도가 될때까지 감압농축하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

규산마그네슘 9 g, 황산나트륨(무수) 3 g을 각각 헥산으로 현탁시켜서 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 흘려보낸다. 헥산 40 mL를 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시켜 컬럼을 조제한다. 300 mL의 농축플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣는다. 용기를 소량의 헥산으로 세정하고 세액을 컬럼에 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시킨후, 디엘드린을 헥산+디에틸에테르(17+3) 150 mL로 용출시킨다. 용출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압 농축하고, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 3 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 전자포획검출기
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(시아노프로필메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 60 mL/min
- 5) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지), 승온 20℃/min, 180℃(1분 유지), 승온 2℃/min, 220℃(1분 유지), 승온 1℃/min, 250℃
- 6) 시료도입부온도 : 250℃
- 7) 검출기온도 : 280℃

라. 계산

측정된 크로마토그램의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 각 디엘드린량을 산출한다.

9.3.5. 엔드린(Endrin) [C₁₂H₈Cl₆O]

가. 시약의 조제

1) 엔드린표준액

엔드린 20 mg씩을 정확히 칭량하여, 각각 100 mL의 메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고, 2,2,4-트리메틸펜탄을 표선까지 가하여 엔드린표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 엔드린 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 μg을 함유하는 각 엔드린표준액을 조제한다.

1) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[(입경 149~250 μm(100~60mesh) : 플로리실PR 미국의 Floridin제)]을

130℃에서 5시간 건조한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~50.0 g을 칭량하여 500 mL 분액여두에 넣고, 아세토니트릴+증류수(13+7) 300 mL를 가한 다음, 30분간 강하게 진탕하고 추출한다. 비이커를 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No.5B 여과지로 흡인 여과하여 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 150 mL를 미리 염화나트륨용액(5%, W/V) 600 mL 및 헥산 100 mL를 넣은 1 L의 분액여두 A에 가하고, 5분간 강하게 진탕한다. 정지한 후, 수층(하층)을 1 L의 분액여두 B에 넣고, 헥산 50 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정지한다. 수층을 버리고, 헥산층(상층)을 위의 분액여두 A에 가하고 증류수 100 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정지한 후, 수층을 500 mL의 분액여두 C에 넣는다. 그리고 증류수 100 mL를 헥산층에 가하여 가볍게 진탕하고 정지한 후, 수층을 분액여두 C에 가하고, 헥산층은 500 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 100 mL를 분액여두 C에 가하고 가볍게 흔들어 정지한 후 수층을 버리고, 헥산층을 위의 삼각플라스크에 넣는다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고 500 mL의 농축플라스크에 No.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 헥산으로 세정한다. 여액에 합하여 40℃ 이하의 수욕조에서 5 mL정도가 될때까지 감압농축하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

규산마그네슘 9 g, 황산나트륨(무수) 3 g을 각각 헥산으로 현탁시켜서 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 흘려보낸다. 헥산 40 mL를 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시켜 컬럼을 조제한다. 300 mL의 농축플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣는다. 용기를 소량의 헥산으로 세정하고 세액을 컬럼에 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시킨후, 엔드린을 헥산+디에틸에테르(17+3) 150 mL로 용출시킨다. 용출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압농축하고, 질소가스로 건고한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 3 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

- 1) 검출기 : 전자포획검출기
- 2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(시아노프로필메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm)
- 3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min
- 4) 보조가스 : N₂ 60 mL/min
- 5) 칼럼온도 : 초기온도 60℃(1분 유지), 승온 20℃/min, 180℃(1분 유지), 승온 2℃/min, 220℃(1분 유지), 승온 1℃/min, 250℃
- 6) 시료도입부온도 : 250℃
- 7) 검출기온도 : 280℃

라. 계산

측정된 크로마토그램의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 각 엔드린량을 산출한다.

9.3.6. 헵타크롤(Heptachlor) [C₁₀H₅Cl₇]

가. 시약의 조제

1) 헵타크롤표준액

헵타크롤 20 mg씩을 정확히 칭량하여, 각각 100 mL의 메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고, 2,2,4-트리메틸펜탄을 표선까지 가하여 헵타크롤표준원액을 조제한다.(이액 1 mL는 헵타크롤 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메

틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 µg을 함유하는 각 헵타크롤표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[(입경 149~250 µm(100~60mesh) : 플로리실PR 미국의 Floridin제)]을 130℃에서 5시간 건조한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~50.0 g을 칭량하여 500 mL 분액여두에 넣고, 아세토니트릴+증류수(13+7) 300 mL를 가한 다음, 30분간 강하게 진탕하고 추출한다. 비이커를 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No.5B 여과지로 흡인 여과하여 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 150 mL를 미리 염화나트륨용액(5%, W/V) 600 mL 및 헥산 100 mL를 넣은 1 L의 분액여두 A에 가하고, 5분간 강하게 진탕한다. 정지한 후, 수층(하층)을 1 L의 분액여두 B에 넣고, 헥산 50 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정지한다. 수층을 버리고, 헥산층(상층)을 위의 분액여두 A에 가하고 증류수 100 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정지한 후, 수층을 500 mL의 분액여두 C에 넣는다. 그리고 증류수 100 mL를 헥산층에 가하여 가볍게 진탕하고 정지한 후, 수층을 분액여두 C에 가하고, 헥산층은 500 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 100 mL를 분액여두 C에 가하고 가볍게 흔들어 정지한 후 수층을 버리고, 헥산층을 위의 삼각플라스크에 넣는다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고 500 mL의 농축플라스크에 No.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 헥산으로 세정한다. 여액에 합하여 40℃ 이하의 수욕조에서 5 mL정도가 될때까지 감압 농축하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

규산마그네슘 9 g, 황산나트륨(무수) 3 g을 각각 헥산으로 현탁시켜서 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 흘려보낸다. 헥산 40 mL를 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시켜 컬럼을 조제한다. 300 mL의 농축플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣는다. 용기를 소량의 헥산으로 세정하고 세액을 컬럼에 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될때까지 유출시킨후, 헵타크롤을 헥산+디에틸테르(17+3) 150 mL로 용출시킨다. 용출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될때까지 감압 농축하고, 질소가스로 건조한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 3 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

1) 검출기 : 전자포획검출기

2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(시아노프로필메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 µm)

3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min

4) 보조가스 : N₂ 60 mL/min

5) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지), 승온 20℃/min, 180℃(1분 유지), 승온 2℃/min, 220℃(1분 유지), 승온 1℃/min, 250℃

6) 시료도입부온도 : 250℃

7) 검출기온도 : 280℃

라. 계산

측정된 크로마토그램의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 각 헵타크롤량을 산출한다.

9.3.7. 헵타크롤에폭사이드(Heptachlor Epoxide) [C₁₀H₅Cl₇O]

가. 시약의 조제

1) 헵타크롤에폭사이드표준액

헵타크롤에폭사이드 20 mg씩을 정확히 칭량하여, 각각 100 mL의 메스플라스크에 넣는다. 아세톤 20 mL를 가하여 용해하고, 2,2,4-트리메틸펜탄을 표선까지 가하여 헵타크롤에폭사이드표준원액을 조제한다.(이액 1 mL는 헵타크롤에폭사이드 0.2 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1)으로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 µg을 함유하는 각 헵타크롤에폭사이드표준액을 조제한다.

2) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[(입경 149~250 µm(100~60mesh) : 플로리실PR 미국의 Floridin제)]을 130℃에서 5시간 건조한다.

나. 방법

1) 추출

시료 10.0~50.0 g을 칭량하여 500 mL 분액여두에 넣고, 아세토니트릴+증류수(13+7) 300 mL를 가한 다음, 30분간 강하게 진탕하고 추출한다. 비이커를 부크너여두의 아래에 놓고, 추출액을 No.5B 여과지로 흡인 여과하여 추출액으로 한다.

2) 정제

추출액 150 mL를 미리 염화나트륨용액(5%, W/V) 600 mL 및 헥산 100 mL를 넣은 1 L의 분액여두 A에 가하고, 5분간 강하게 진탕한다. 정지한 후, 수층(하층)을 1 L의 분액여두 B에 넣고, 헥산 50 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정지한다. 수층을 버리고, 헥산층(상층)을 위의 분액여두 A에 가하고 증류수 100 mL를 가하여 가볍게 진탕하고 정지한 후, 수층을 500 mL의 분액여두 C에 넣는다. 그리고 증류수 100 mL를 헥산층에 가하여 가볍게 진탕하고 정지한 후, 수층을 분액여두 C에 가하고, 헥산층은 500 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 헥산 100 mL를 분액여두 C에 가하고 가볍게 흔들어 정지한 후 수층을 버리고, 헥산층을 위의 삼각플라스크에 넣는다. 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고 500 mL의 농축플라스크에 No.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과한 후, 용기 및 여과지를 소량의 헥산으로 세정한다. 여액에 합하여 40℃ 이하의 수욕조에서 5 mL정도가 될때까지 감압 농축하고, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 컬럼크로마토그래피

규산마그네슘 9 g, 황산나트륨(무수) 3 g을 각각 헥산으로 현탁시켜서 컬럼관(내경 15 mm)에 순차적으로 흘려보낸다. 헥산 40 mL를 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시켜 컬럼을 조제한다. 300 mL의 농축플라스크를 컬럼의 아래에 놓고, 시료용액을 컬럼에 넣는다. 용기를 소량의 헥산으로 세정하고 세액을 컬럼에 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시킨 후, 헵타크롤에폭사이드를 헥산+디에틸에테르(17+3) 150 mL로 용출시킨다. 용출액을 40℃ 이하의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압농축하고, 질소가스로 건조한다. 2,2,4-트리메틸펜탄+아세톤(4+1) 3 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

다. 측정조건(Gas chromatograph)

1) 검출기 : 전자포획검출기

2) 칼럼 : 용융석영제 캐필러리컬럼(시아노프로필메틸실리코코팅, 30 m × 0.32 mm, 0.25 µm)

3) 캐리어가스 : He 1.5 mL/min

4) 보조가스 : N₂ 60 mL/min

5) 칼럼조온도 : 초기온도 60℃(1분 유지), 승온 20℃/min, 180℃(1분 유지), 승온 2℃/min, 220℃(1분 유지), 승온 1℃/min, 250℃

6) 시료도입부온도 : 250℃

7) 검출기온도 : 280℃

라. 계산

측정된 크로마토그램의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 각 헵타크롤

에폭사이드량을 산출한다.

9.4. 카바메이트계(Carbamate)

9.4.1. 카바릴(Carbaryl) [$C_{12}H_{11}NO_2$]

가. 표준용액의 제조

표준품을 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되도록 메탄올에 녹여 표준원액으로 하고, 적정농도로 희석하여 사용한다.

나. 시약 및 초자

1) 시약

가) 메탄올, 아세토니트릴 - HPLC등급

나) 디클로로메탄, 헥산 - 잔류농약분석용 또는 동급

다) Na_2SO_4 (, (무수), NaCl , o-phthaldialdehyde, NaOH , Sodium tetraborate decahydrate,

라) 2-mercaptoethanol - 특급 이상

마) Florisil - 60~100mesh, 구조토,

바) 용출액 - 헥산 : 아세톤 = 60:40

2) 초자

삼각플라스크(300 mL), 부크너여두, 농축용플라스크(125 mL, 250 mL), 분액여두(1000 mL), 메스실린더(100 mL), 피펫(3 mL, 5 mL), No. 6 여과지, 유리컬럼(테프론코크 포함, $\Phi 1\text{ cm} \times 50\text{ cm}$), 탈지면(아세톤으로 추출한 것), vial(4 mL, 8 mL), 멤브레인필터(pore size : 0.45 μm)

다. 방법

1) 추출

시료 20 g을 삼각플라스크에 칭량하고, 증류수 30~40 mL를 넣어 1시간 방치한 후, 메탄올 100 mL를 첨가하여 12~14시간(over night) 진탕한다. 진탕 후, 부크너여두에 No. 6 여과지와 구조토를 깔고, 여두 아래 삼각플라스크를 놓고 흡인여과한다. 소량의 메탄올로 삼각플라스크와 여두내의 잔사를 세척하여 여과액에 합친다.

2) 분배

시료용액을 1000 mL 분액여두로 옮기고, 포화식염수 100 mL, 증류수 400 mL, 디클로로메탄 100 mL를 넣고 약 4분간 진탕시킨다. 진탕 후, 잠시 정치시켜 아래쪽의 디클로로메탄층을 Na_2SO_4 를 통과시켜 수분을 제거한 후, 250 mL 농축용플라스크에 받는다.(1액), 상층액에 다시 디클로로메탄 100 mL를 넣고 진탕시켜 디클로로메탄층을 1액과 합친다. 이를 실온에서 회전증발농축기로 거의 대부분을 농축시킨 다음 질소가스로 완전히 농축시킨다. 잔사를 헥산 5 mL로 용해시킨다.

3) 정제(컬럼크로마토그래피)

유리컬럼을 아세톤으로 추출한 탈지면으로 막고 Florisil 5g을 넣은 후, Na_2SO_4 (, (무수) 1 스푼 정도 (높이 1~2 cm)를 넣는다. 이때 컬럼내로 균일하게 들어가도록 한다. 헥산 50 mL를 흘려버리고 시료액 3 mL를 loading한다. 다시 헥산 50 mL를 흘려버리고 용출액 50 mL를 흘려 125 mL 농축용플라스크로 받는다. 실온에서 회전증발농축기로 거의 대부분을 농축시킨 다음 질소 가스로 완전히 농축시킨다. 잔사를 메탄올 3 mL로 용해시키고 멤브레인필터(poresize 0.45 μm)로 여과하여 기기분석용 시료액으로 한다.

※ 후컬럼 시약

① 0.05N NaOH : 1g NaOH 를 3차증류수 또는 HPLC용 증류수로 500 mL 정용. 진공 필터법에 의해 여과하고 갈색병에 보관.

② OPA/ME

㉠ 저장용 버퍼(0.05M sodium borate) : 19.1g sodium tetraborate decahydrate를 1 L의 3차증류수나 HPLC용 증류수로 녹인다. 밀봉하여 보관.

㉡ OPA 시약 : 50 mg의 OPA를 500 mL 플라스크에 넣고 5 mL 메탄올을 가하여 녹인 후

0.05M borate 버퍼로 정용한다. 진공필터법으로 여과하고 25 μ L 2-mercaptoethanol을 첨가한다. 2-mercaptoethanol 첨가 후 탈기나 degas 단계를 실시하지 않는다. 갈색병에 밀봉 보관.

라. 측정조건(High Performance liquid chromatograph)

- 1) Column - carbamate analysis column(Waters co.)
- 2) 검출기 - 형광검출기
- 3) 이동상 : H₂O : 메탄올 : 아세토니트릴 = 50 : 45 : 5
- 4) Flow rate - 1.0 mL/min
- 5) PCRS : OPA - 0.5 mL/min, NaOH - 0.5 mL/min
- 6) 주입량 : 10 μ L

마. 계산

$$\text{ppm} = \text{검량선}(\text{ng}) \times \{ \text{최종희석량}(\text{ mL}) / \text{주입량}(\text{ } \mu\text{L}) \} \times \{ 1 / \text{시료무게}(\text{g}) \}$$

9.5. 유기인계, 유기염소계 및 카바메이트계 다성분 분석법

가. 분석성분

다이아지논(Diazinon), 파라치온(Parathion), 페니트로치온(Fenitrothion), 펜치온(Fenthion), 카바릴(Carbaryl), 말라치온(Malathion), 펜토에이트(Phenthoate), 클로르피리포스메칠(Chlorpyrifos-methyl), 피리미포스메칠(Pirimiphos-methyl), 비에이치시(BHC), 디디티(DDT), 디엘드린(알드린포함 ; Dieldrin and Aldrin), 엔드린(Endrin), 헵타크롤(헵타크롤 에폭사이드포함 ; Heptachlor and Heptachlor epoxide), 치아벤다졸(Thiabendazole), EPN, 베노밀(Benomyl), 퍼메쓰린(Permethrin), 에치온(Ethion), 클로르피리포스(Chlorpyrifos), 페노브카브(Fenobucarb), 이소프로카브(Isoprocarb), 펜발러레이트(Fenvalerate), 에디펜포스(Edifenphos), 이소펜포스(Isufenphos)

1) 표준용액의 조제

유기인계 및 유기염소계 20성분은 원제(분말)를 Acetone : Hexane (1 : 9)용액, 카바메이트계등 5성분은 메탄올이나 아세토니트릴을 이용하여 각각 1000ppm으로 만든 후 각각의 성분을 그룹별(유기인계, 유기염소계, 카바메이트계등)로 100 mL mass flask에 1 mL씩 넣고 표선을 맞추어 10ppm의 work solution을 제조하여 아세톤이나 아세토니트릴로 각각 0.1, 0.5, 1.0ppm으로 희석하여 표준물질로 사용한다.

2) 시약 및 초자

가) 시약

아세톤, 디클로로메탄, 헥산, 아세토니트릴, 1,2-프로판디올, NaCl(잔류농약분석용 또는 동급)

나) 초자

폴리에틸렌병(250 mL), 메스실린더(100 mL), 피펫(1 mL, 5 mL), vial(2 mL) 또는 Microvolume insert(0.2 mL)

3) 방법

가) 추출

마쇄된 시료 5 g을 폴리에틸렌병에 칭량하고, 증류수 20 mL를 넣어 1시간 방치한 후, 아세토니트릴 50 mL와 NaCl 10g을 첨가하여 1시간 진탕 한다. 진탕 후 3000rpm에서 3분간 원심분리 시킨다.

나) 정제

디클로로메탄 7 mL와 아세토니트릴 7 mL로 활성화 된 아민 카트리지(NH₂-2g)에 원심 분리 된 상층부(아세토니트릴층)에서 3 mL를 취하여 loading하여 버린다. 이어서 아세토니트릴 4 mL로 용출하고 용출액은 질소가스 또는 공기를 사용하여 용매를 날려 버리고 잔류물을 아세톤 일정량에 녹여 시험용액으로 한다(다만, 카바메이트계 등 5성분은 용출액 4 mL에 Keeper제[1,2-프로판디올(20) : 아세토니트릴(80) = 부피비]1 mL첨가한 후 농축한다. 농축 후 Tube에 0.2 mL 1,2-프로판디올이 남아 있으므로 이를 고려하여 아세

토니트릴 일정량에 녹여 시험용액으로 한다)

4) 측정조건

가) 유기인계(Gas chromatograph/NPD)

- (1) 주입부온도 : 250℃, 1 μ L splitless
- (2) 오븐온도 : 130℃(1분) →분당 7℃ →200℃ →분당 2℃ →220℃(4분) →분당 10℃ →300℃(6분)
- (3) 검출기 : 질소인검출기(NPD), 온도 - 320℃, H₂ : 3.1 mL/min, Air : 60 mL/min
- (4) Column : DB-5 Capillary Column (30 m × 0.32 mm, 0.25 μ m) 또는 이와 동등한 것
- (5) Make up gas(N₂) : 10 mL/min
- (6) 주입량 : 1 μ L

나) 유기염소계(Gas chromatograph/ECD)

- (1) 주입부온도 : 250℃, 1 μ L split ratio 60 : 1
- (2) 오븐온도 : 130℃(1분) →분당 7℃ →200℃ →분당 2℃ →220℃(4분) →분당 10℃ →300℃(6분)
- (3) 검출기 : 전자포획검출기(ECD), 온도 - 320℃
- (4) Column : DB-5 Capillary Column (30m x 0.25mm x 0.25 μ m)또는 이와 동등한 것
- (5) Make up gas(N₂) : 60 mL/min
- (6) 주입량 : 1 μ L

다) 카바메이트계(High Performance liquid chromatograph/UV/FLD)

- (1) 측정기기 : HP-1100 series
- (2) 검출기 : UV : 254, 275nm,
FLD : Excitation - 330nm, Emission - 446nm
- (3) Column : Phenomenox Luna (25 cm, particle size 5 μ m, C₁₈)
- (4) Post-Column Derivatizer : OPA - 0.25 mL/min, NaOH - 0.25 mL/min
- (5) 이동상 : H₂O : 아세트니트릴 = 70 : 30, 1.0 mL/min (0-5min)
H₂O : 아세트니트릴 = 15 : 85, 1.2 mL/min (5-25min)
H₂O : 아세트니트릴 = 15 : 85, 1.2 mL/min (25-40min)
- (6) 주입량 : 10 μ L

5) 계산

$$\text{ppm} = \text{검량선(ng)} \times [\text{최종희석량(mL)}/\text{주입량(} \mu\text{L)}] \times [1/\text{시료무게(g)}]$$

9.6. 다중농약 다성분 분석법 (Multi class pesticide multiresidue methods)

9.6.1. 다중농약 다성분 동시분석-제1법

○ 기체크로마토그래프 분석 대상

1	Acrinathrin	2	Aldrin	3	Allidochlor
4	Ametryn	5	Anilofos	6	Asulam
7	Atraine	8	Azaconazole	9	Azinphos-ethyl
10	Azinphos-methyl	11	BHC	12	Bifenthrin
13	Binapacryl	14	Bromacil	15	Bromobutide
16	Bromophos-methyl	17	Bromopropylate	18	Bromoxynil
19	Bupirimate	20	Butafenacil	21	Cadusafos
22	Captafol	23	Captan	24	Carbophenothion
25	Chinomethionat	26	Chlordane	27	Chlorfenapyr
28	Chloridazon	29	Chlorobenzilate	30	Chlorothalonil
31	Chlorpyrifos	32	Chlorpyrifos-methyl	33	Chlorthal-dimethyl
34	Cinmethylin	35	Clomeprop	36	Cyanazine
37	Cyanophos	38	Cycloate	39	Cycloprothrin
40	Cyflufenamid	41	Cyfluthrin	42	Cyhalothrin
43	Cypermethrin	44	Cyproconazole	45	Cyprodinil
46	DDT	47	Deltamethrin	48	Diallate
49	Diazinon	50	Dichlofluanid	51	Dichlorvos

52	Dicloran	53	Dicofol	54	Dicrotophos
55	Dieldrin	56	Diethofencarb	57	Diiflufenican
58	Dimepiperate	59	Dimethachlor	60	Dimethenamid
61	Dimethoate	62	Dimethylvinphos	63	Diniconazole
64	Diphenamid	65	Diphenylamine	66	Dithiopyr
67	Edifenphos	68	Endosulfan	69	Endrin
70	EPN	71	Esprocarb	72	Ethion
73	Ethoprophos	74	Etioazole	75	Etrifos
76	Fenamidone	77	Fenarimol	78	Fenazaquin
79	Fenbuconazole	80	Fenitrothion	81	Fenobucarb
82	Fenothiocarb	83	Fenoxanil	84	Fenoxycarb
85	Fenpropathrin	86	Fenthion	87	Fenvalerate
88	Fipronil	89	Flonicamid	90	Fluazinam
91	Fludioxonil	92	Flumiclorac-pentyl	93	Flupyrzofos
94	Flusilazole	95	Flusulfamide	96	Fluthiacet-methyl
97	Flutolanil	98	Fluvalinate	99	Folpet
100	Fonofos	101	Fosthiazate	102	Fthalide
103	Furathiocarb	104	Heptachlor epoxide	105	Heptachlor
106	Hexachlorobenzene	107	Imazalil	108	Indanofan
109	Indoxacarb	110	Iprobenfos	111	Iprodione
112	Iprovalicarb	113	Isazofos	114	Isazophos
115	Isofenphos	116	Isofenphos-methyl	117	Isoprothiolane
118	Isoxathion	119	Kresoxim-methyl	120	Lactofen
121	Malathion	122	Mecarbam	123	Mefenacet
124	Mefenpyr-diethyl	125	Mepronil	126	Metconazole
127	Methidathion	128	Methoxychlor	129	Metrafenone
130	Molinate	131	Myclobutanil	132	Nitrapyrin
133	Nitrothal-isopropyl	134	Nonachlor	135	Nuarimol
136	Ofurace	137	Oxadixyl	138	Oxydemeton-methyl
139	Paclobutrazol	140	Parathion	141	Parathion-methyl
142	Pebulate	143	Penconazole	144	Pendimethalin
145	Permethrin	146	Phenthoate	147	Phosalone
148	Phosmet	149	Phosphamidone	150	Picolinafen
151	Picoxystrobin	152	Piperophos	153	Pirimicarb
154	Pirimiphos-ethyl	155	Pirimiphos-methyl	156	Probenazole
157	Prochloraz	158	Procymidone	159	Profenofos
160	Propachlor	161	Propazine	162	Propham
163	Propisochlor	164	Propyzamide	165	Prothiofos
166	Pyraclofos	167	Pyrazophos	168	Pyridaben
169	Pyridalyl	170	Pyrifeno	171	Pyrimidifen
172	Pyriminobac-methyl	173	Quinalphos	174	Quintozone
175	Simeconazole	176	Sulprofos	177	TCMTB
178	Tebufenpyrad	179	Tebupirimfos	180	Tefluthrin
181	Terbufos	182	Terbutylazine	183	Tetrachlorvinphos
184	Tetradifon	185	Thiazopyr	186	Thifluzamide
187	Thiometon	188	Tolclofos-methyl	189	Tolfenpyrad
190	Tolylfluanid	191	Tralomethrin	192	Triadimefon
193	Triazophos	194	Tribuphos	195	Triflumizole
196	Triflumuron	197	Triticonazole	198	Uniconazole
199	Vernolate	200	Vinclozoline	201	Zoxamide

○ 액체크로마토그래프 분석 대상

1	Acetamiprid	2	Aldicarb	3	Amisulbrom
4	Azafenidin	5	Azamethiphos	6	Azoxystrobin
7	Bendiocarb	8	Bensulide	9	Benzoximate
10	Boscalid	11	Butocarboxim	12	Carbaryl
13	Carbofuran	14	Chlorantraniliprole	15	Chlorimuron-ethyl

16	Chlorobenzuron	17	Chlorotoluron	18	Chromafenozide
19	Cinosulfuron	20	Clothianidin	21	Cyazofamid
22	Cyhalofop-butyl	23	Cymoxanil	24	Dimethomorph
25	Ethaboxam	26	Ethametsulfuron-methyl	27	Ethiofencarb
28	Fenhexamid	29	Fenpyroximate	30	Ferimzone
31	Fluacrypyrim	32	Flubendiamide	33	Flufenacet
34	Flufenoxuron	35	Flumioxazine	36	Fluquinconazole
37	Fluridone	38	Forchlorfenuron	39	Hexaflumuron
40	Imazamox	41	Imazapic	42	Imazaquin
43	Imazethapyr	44	Imibenconazole	45	Isoprocarb
46	Isoproturon	47	Lufenuron	48	Mepanipyrim
49	Metamifop	50	Methabenzthiazuron	51	Methiocarb
52	Methomyl	53	Methoxyfenozide	54	Metolcarb
55	Nitenpyram	56	Novaluron	57	Oxamyl
58	Oxaziclomefon	59	Pentoxazone	60	Phenmedipham
61	Promecarb	62	Propoxur	63	Pyraclostrobin
64	Pyrazolate	65	Pyribenzoxim	66	Pyributicarb
67	Pyridate	68	Pyrimethanil	69	Pyriproxyfen
70	Pyroquilon	71	Quinoclamine	72	Rimsulfuron
73	Spirodiclofen	74	Tebufenozide	75	Teflubenzuron
76	Thenychlor	77	Thiacloprid	78	Thiamethoxam
79	Thiodicarb	80	Tiadinil	81	Tribenuron-methyl
82	Tricyclazole	83	Trifloxystrobin	84	Trimethacarb

1) 표준용액의 제조

각 표준품을 1000 µg/ mL이 되도록 유기용매에 녹여 표준원액으로 하고, 적정농도로 희석하여 단일표준용액 또는 혼합표준용액을 조제한다.

2) 시약 및 초자

가) 시약

- (1) 용매 : 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- (2) 일회용 카트리지 : 플로리실(500 mg) 및 아미노-프로필(1 g) 등의 고정상이 충전되어 있는 일회용 카트리지
- (3) 기타 시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

나) 초자

삼각플라스크(300 mL), 부크너여두, 농축용플라스크(125 mL, 250 mL), 분액여두(1000 mL), 메스실린더(100 mL), 피펫(3 mL, 5 mL), No. 6 여과지, 유리컬럼(테프론 콕 포함, Φ1 cm×50 cm), 탈지면(아세톤으로 추출한 것), vial(4 mL, 8 mL)

3) 방법

가) 추출

(1) 아세트니트릴 추출법

시료 5 g을 정밀히 달아 혼합추출분쇄기(Omni mixer)병에 넣고(물 30 mL를 넣어 1시간 방치) 아세트니트릴 100 mL를 넣은 후 혼합추출분쇄기로 2~3분간 균질화한다. 이를 여지가 깔려있는 부호너깔때기로 감압여과한다. 여액을 염화나트륨 10~15 g이 들어있는 500 mL 분액깔때기에 옮기고 마개(Teflon-lined)를 막은 후 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치한다. 아세트니트릴층을 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수한 후 별도의 아세트니트릴을 가하여 최종 부피가 100 mL가 되게 한다. 아세트니트릴층 20 mL를 각각 취하고 40℃ 이하 수욕상에서 감압농축하여 용매를 날려버린다. ★ 잔류물을 기체 크로마토그래프 분석 대상 농약의 경우 20% 아세톤 함유 헥산 4 mL로 용해하고, 액체 크로마토그래프 분석 대상 농약은 1% 메탄올 함유 디클로로메탄 4 mL로 용해한다.

(2) 아세톤 추출법

시료 5 g을 정밀히 달아 혼합추출분쇄기(Omni mixer)병에 넣고(물 30 mL를 넣어 1시간 방치) 아세톤 100 mL를 넣은 후 혼합추출분쇄기로 2~3분간 균질화한다. 이를 여지가 깔려있는 부흐너깔때기로 감압여과한다. 이를 여과지가 깔려있는 부흐너깔때기로 감압여과한다. 여과액을 1 L 분액깔때기로 옮기고 포화염화나트륨 용액 50 mL, 물 100 mL 및 디클로로메탄 50 mL를 가하고 마개(Teflon-lined)를 막은 후 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치하고 디클로로메탄층을 취한다. 다시 디클로로메탄 50 mL로 상기의 과정을 되풀이 하여 여액을 합하고 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수한 후 별도의 디클로로메탄을 가하여 최종 부피가 100 mL가 되게 한다. 디클로로메탄층 20 mL를 각각 취하고 40℃ 이하 수욕상에서 감압농축하여 용매를 날려버린다. ★ 잔류물을 기체 크로마토그래프 분석 대상 농약의 경우 20% 아세톤 함유 헥산 4 mL에 녹이고, 액체크로마토그래프 분석 대상 농약은 1% 메탄올 함유 디클로로메탄 4 mL로 용해한다.

※ 추출은 상기 (1) 또는 (2) 중 선택하여 사용함.

나) 정제

(1) 기체크로마토그래프 측정 농약

미리 플로리실 카트리지에 헥산 5 mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버린다. 이 카트리지에 20% 아세톤 함유 헥산 5 mL를 위와 같은 방법으로 유출하여 버린다. 이어서 20% 아세톤 함유 헥산 4 mL에 녹인 액을 카트리지 상단에 넣고 초당 1~2방울 정도의 속도로 용출시켜 시험관에 받는다. 다시 카트리지에 용매에 젖어 있는 상태에서 20% 아세톤 함유 헥산 5 mL를 용출하여 동일 시험관에 모은다. 용출액은 40℃ 이하 수욕상에서 질소 또는 공기를 낮은 유속으로 통과시키면서 용매를 날려 보낸 후 20% 아세톤 함유 헥산에 녹여서 일정량으로 한 후 멤브레인 필터(PTFE 0.45 µm)로 여과하여 시험용액으로 한다.

※ 정제과정 중에는 모든 카트리지의 충전제가 마르지 않도록 주의한다.

※ 기체크로마토그래프 측정 농약을 전처리할 때 항상 감압농축하기 전에 2% 에틸렌글리콜(Diethylene glycol) 함유 아세톤 0.2 mL를 첨가한다.

(2) 액체크로마토그래프 측정 농약

미리 아미노-프로필 카트리지에 디클로로메탄 5 mL를 2~3 방울/초의 속도로 유출하여 버린다. 이어서 1% 메탄올 함유 디클로로메탄 4 mL에 녹인 액을 카트리지 상단에 넣고 1~2 방울/초의 속도로 용출시켜 시험관에 받는다. 다시 카트리지에 용매에 젖어 있는 상태에서 1% 메탄올 함유 디클로로메탄 7 mL를 유출하여 동일 시험관에 합친다. 유출액은 40℃ 이하 수욕상에서 질소 또는 공기를 낮은 유속으로 통과시키면서 용매를 날려 보낸 후 아세토니트릴에 녹여 일정량으로 한 후 멤브레인 필터(PTFE 0.45 µm)로 여과하여 시험용액으로 한다.

4) 시험조작

가) 기체크로마토그래프의 측정조건

(1) GC-ECD

(가) 칼럼 : DB-5(30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) 및 DB-17(30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) 또는 이와 동등한 것

(나) 캐리어가스 및 유량 : N₂, 1.0 mL/min

(다) 칼럼오븐온도 : 80℃에서 시험용액을 주입하고 2분간 유지한 후 7℃/min의 비율로 250℃까지 온도를 상승시키고 5℃/min의 비율로 280℃까지 상승시켜 20분 이상 유지한다.

(라) 주입부 : split mode(20 : 1)

(마) 검출기온도 : 280℃

(2) GC-NPD

(가) 칼럼 : DB-5(30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) 및 DB-17(30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) 또는 이와

동등한 것

(나) 이동상가스 및 유량 : N₂, 1.0 mL/min

(다) 오븐 온도 : 80℃에서 시험용액을 주입하고 2분간 유지한 후 7℃/min의 비율로 250℃까지 온도를 상승시키고 5℃/min의 비율로 280℃까지 상승시켜 20분 이상 유지한다.

(라) 주입부 : splitless mode

(마) 검출기온도 : 280℃

(3) GC-FPD

(가) 칼럼 : DB-5(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) 및 DB-17(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) 또는 이와 동등한 것

(나) 이동상가스 및 유량 : N₂, 1.0 mL/min

(다) 오븐 온도 : 80℃에서 시험용액을 주입하고 2분간 유지한 후 7℃/min의 비율로 250℃까지 온도를 상승시키고 5℃/min의 비율로 280℃까지 상승시켜 20분 이상 유지한다.

(라) 주입부 : splitless mode

(마) 검출기온도 : 230℃

(4) GC-MS

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

(나) 이동상가스 및 유량 : He, 0.8 mL/min

(다) 오븐 온도 : 70℃에서 시험용액을 주입하고 3분간 유지한 후 20℃/min의 비율로 180℃까지 온도를 상승시키고 5℃/min의 비율로 300℃까지 상승시켜 7분 이상 유지한다.

(라) 주입부 : splitless mode

(마) 인터페이스 온도 : 280℃

(바) Solvent delay time : 4 min

나) 액체크로마토그래프의 측정조건

(1) HPLC-FLD(Post-derivatization 포함)

(가) 칼럼 : C18(3.9 mm × 150 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

(나) 검출기 : Excitation 340 nm, Emission 455 nm

(다) 이동상 : 물 및 메탄올

메탄올 : 물(3 : 7)의 혼합액에서 메탄올 : 물(7 : 3)의 혼합액으로 23분간 농도균배한 후 5분 이상 흘려보낸다.

(라) 이동상 유량 : 0.8 mL/min

(마) Post Reaction Pump 유량 : 0.5 mL/min(NaOH 0.25 mL/min, OPA 0.25 mL/min) 또는 기타 최적조건

(2) HPLC-UV

(가) 칼럼 : C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

(나) 검출기 : 자외부흡광검출기(254 nm)

(다) 이동상 : 물 및 아세트니트릴

- 아세트니트릴/물 혼합액(20/80, v/v)에서 (80/20, v/v)의 혼합액으로 40분간 농도균배한 후 10분 이상 흘려보낸다.

- 메탄올/물(35/65, v/v)에서 (90/10, v/v)의 혼합액으로 40분간 농도균배한 후 10분 이상 흘려보낸다.

※ 이동상의 조건은 상기 두 가지 중 선택하여 사용함

(라) 이동상 유량 : 1.0 mL/min

(4) LC-MS

(가) 칼럼 : C18(2 × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것

(나) 이동상 : A(물 + 0.1% 포름산, 2 mM 아세트산암모늄), B(99% 아세트니트릴 + 0.1% 포름산, 2 mM 아세트산암모늄)

- A/B(90/10, v/v)에서 (10/90, v/v)의 혼합액으로 20분간 농도균배한 후 10분 이상 흘려보낸다.

(다) 이동상 유량 : 0.2 mL/min

(라) 칼럼 온도 : 40℃

(마) 주입량 : 2 µL

(바) 이온화 : ESI positive 또는 negative-ion mode

5) 정성시험

위의 조건에서 시험할 때 시험결과는 어느 측정조건에서도 표준품과 일치하여야 한다.

※ GC-MS 및 LC-MS 상의 머무름 시간 및 질량분석 스펙트럼으로 각 농약의 성분을 확인할 수 있다.

6) 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

※ 정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

※ 이 시험법을 이용하여 사료에서 검출될 경우 정량분석은 사료공정서나 식품공전의 단성분 분석법에 따른다.

9.6.2. 다중농약 다성분 동시분석-제2법

가. 적용범위

본 분석법은 배합사료 및 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류)에 적용한다.

나. 분석대상 성분

1) 기체크로마토그래프 분석 대상

1	Aldrin+Dieldrin	2	Azoxystrobin	3	BHC
4	Bifenthrin	5	Bitertanol	6	Boscalid
7	Chlorobenzilate	8	Chlorfenvinphos	9	Chlorpyrifos
10	Chlorpyrifos-methyl	11	Cyanazine	12	Cyfluthrin
13	Cyhalothrin	14	Cypermethrin	15	Cyproconazole
16	Cyprodinil	17	DDT	18	Diazinon
19	Deltamethrin+Tralomethrin	20	Dichlorvos	21	Difenoconazole
22	Dimethoate	23	Disulfoton	24	Endrin
25	EPN	26	Esfenvalerate	27	Ethylenedibromide
28	Famoxadone	29	Fenpropathrin	30	Fenpropimorph
31	Fenitrothion	32	Fenthion	33	Fenvalerate
34	Fipronil	35	Fludioxonil	36	Flutriafol
37	Heptachlor	38	Imazalil	39	Indoxacarb
40	Isofenphos	41	Kresoxim-methyl	42	Lindane(r-BHC)
43	Pendimethalin	44	Permethrin	45	Phenthoate
46	Pirimiphos-methyl	47	Prochloraz	48	Propargite
49	Propiconazole	50	Pyrimethanil	51	Quintozone
52	Terbufos	53	Triadimefon	54	Trifloxystrobin

2) 액체크로마토그래프 분석 대상

1	Acephate	2	Alachlor	3	Aldicarb
4	Aminopyralid	5	Atrazine	6	Buprofezin
7	Carbaryl	8	Carbendazim	9	Carbofuran
10	Chlorantraniliprole	11	Chlorpropham	12	Clethodim
13	Clothianidin	14	Cyantraniliprole	15	Diazinon
16	Diflubenzuron	17	Dinotefuran	18	Edifenphos
19	Ethion	20	Etofenprox	21	Fenbuconazole
22	Fenobucarb	23	Flubendiamide	24	Fluopicolide
25	Flusilazole	26	Fluxapyroxad	27	Indoxacarb

28	Isoproc carb	29	Isoprothiolane	30	Isopyrazam
31	Malathion	32	Metaflumizone	33	Methiocarb
34	Methomyl	35	Methoprene*	36	Methoxyfenozide
37	Oxamyl	38	Oxydemeton-methyl	39	Parathion
40	Phenthoate	41	Phorate	42	Piperonyl butoxide
43	Pirimicarb	44	Propiconazole	45	Pyraclostrobin
46	Saflufenacil	47	Simazine	48	Spinosad
49	Spirotetramat	50	Sulfoxaflor	51	Tebufenozide
52	Thiabendazole	53	Thiacloprid	54	Tricyclazole

다. 분석원리

균질화하고 습윤화된 사료를 아세토니트릴로 진탕추출한 다음, NaCl을 가하여 액-액분배를 하여 고농도의 극성 방해물질을 포함하는 물층과 분석 대상 성분을 포함하는 유기용매층으로 분리한 후, 유기용매층에 남아있는 비극성 방해물질을 정제하여 기체크로마토그래프 (GC-ECD, GC-FPD, GC-MS/MS)와 액체크로마토그래프(LC-MS/MS)로 측정한다.

라. 시약 및 표준용액의 제조

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 일회용 카트리지: 플로리실(500 mg) 등의 고정상이 충전되어 있는 일회용 카트리지
- 3) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다.
* Methoprene은 분해속도가 매우 빨라 불안정하므로 분석 시 표준원액을 새로 만들어 사용한다.
- 4) 표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 5) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제

1) 추출

시료 약 5 g을 정밀히 달아 혼합추출분쇄기(Omni mixer)병에 넣고 물 20 mL를 넣어 2시간 방치 하고 아세토니트릴 100 mL를 넣은 후 혼합추출분쇄기로 2~3분간 균질화 한다. 이를 여지가 깔려 있는 부흐너깔때기로 감압여과한다. 여액을 염화나트륨 10~15 g이 들어있는 500 mL 분액깔때기에 옮기고 마개를 막은 후 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치한다. 아세토니트릴층을 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수한 후 별도의 아세토니트릴을 가하여 최종 부피가 100 mL가 되게 한다. 아세토니트릴층 20 mL를 각각 취하고 40℃ 이하 수욕상에서 감압농축하여 용매를 날려버린다. 아세토니트릴로 재용해 후 액체크로마토그래프로 분석한다. 기체크로마토그래프 분석 대상 농약의 경우 20% 아세톤 함유 헥산 4 mL로 용해한다.

2) 정제

가) 기체크로마토그래프 측정 농약

미리 플로리실 카트리지(Florisil cartridge)에 헥산 5 mL를 유출하여 버린다. 이 카트리지에 20% 아세톤 함유 헥산 5 mL를 위와 같은 방법으로 유출하여 버린다. 이어서 20% 아세톤 함유 헥산 4 mL에 녹인 액을 카트리지 상단에 넣고 용출시켜 시험관에 받는다. 다시 카트리지가 용매에 젖어 있는 상태에서 20% 아세톤 함유 헥산 5 mL를 용출하여 동일 시험관에 모은다. 용출액은 40℃ 이하 수욕상에서 질소 또는 공기를 낮은 유속으로 통과시키면서 용매를 날려 보낸 후 20% 아세톤 함유 헥산에 녹여서 일정량으로 한 후 syringe filter로 여과하여 시험용액으로 한다(단, 카본 카트리지는 색소 등 방해물질 제거에 필요시에 사용한다).

* 정제과정 중에는 모든 카트리지의 충전제가 마르지 않도록 주의한다.

바. 기기 분석 조건

1) GC-ECD 분석 조건

구분	조건
Column	DB-5 컬럼 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) 또는 이와 동등한 것
Carrier	He, 1.0 mL/min
Injector	250°C, 1 uL, Split 50:1
Oven	130°C (1 min) → 7°C/min → 200°C → 2°C/min → 220°C (4 min) → 10°C/min → 300°C (6 min)
Detector	320°C

2) GC-FPD 분석 조건

구분	조건
Column	DB-5 컬럼 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) 또는 이와 동등한 것
Carrier	He, 1.0 mL/min
Injector	250°C, 1 uL, Splitless
Oven	130°C (1 min) → 7°C/min → 200°C → 2°C/min → 220°C (4 min) → 10°C/min → 300°C (6 min)
Detector	230°C

3) GC-MSMS 분석 조건 및 MRM

구분	조건
Column	DB-5MS 컬럼 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) 또는 이와 동등한 것
Carrier	He, 1.5 mL/min
Injector	280°C, 1 uL, Split 10:1
Oven	90°C (3 min) → 20°C/min → 120°C (0 min) → 8°C/min → 300°C (3 min)
Detector	MRM (Multiple Reaction monitoring) Ionization: Electron Ionization Electron energy: 70 eV Source temperature: 250°C

농약명	RT	Q1 mass		Q3 mass		CE(eV)	
Pyrimethanil	14.905	198	183.1	198	118.1	18	27
Fenpropimorph	17.434	128	110	128	86.1	10	10
Cyprodinil	18.176	224.1	208.1	224.1	197.1	16	22
Chlorfenvinphos	18.54	323	267	323	295	16	6
Flutriafol	19.422	219	123	219	95	20	40
Fludioxonil	19.848	248	127.1	248	154.1	27	21
Cyprocoazole	20.455	139	111	222	125.1	15	24
Propargite	22.201	135	107	135	77.1	15	30
Bitertanol	25.18	170	141.1	170	115.1	24	27

4) LC-MSMS 분석 조건 및 MRM-사료용

구분	조건			
Column	Unison UK-C18(4.6 × 100 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것			
Mobile Phase	A(4 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in Water) B(4 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in MeOH)			
	시간 (분)	A(%)	B(%)	유속(mL)
	0.00	90	10	0.3
	3.00	90	10	0.3
	5.00	10	90	0.3
	7.00	10	90	0.3
	10.00	0	100	0.3
	15.00	0	100	0.3
	16.00	90	10	0.3
	25.00	90	10	0.3
Column Temp.	40℃			
Time	35 min			
Injection Volume	5 uL			
MS/MS	Ion source: ESI Polarity: Positive Nebulizer gas: Nitrogen Nebulizer gas flow: GS1; 50, GS2; 45 Ion spray voltage: 5500 Source temp: 400			

농약명	RT	Exact mass	Q1 mass	Q3 mass	CE	Polarity
Acephate 1 Acephate 2	4.1	183.2	184.1	143.1 125.0	13 25	+
Alachlor 1 Alachlor 2	16.8	269.8	270.0	238.0 162.1	15 27	+
Aldicarb 1 Aldicarb 2	5.9	190.3	208.1	116.0 89.1	13 23	+
Aminopyralid 1 Aminopyralid 2	4.0	207	207.0	106.7 133.9	15 43	+
Atrazine 1 Atrazine 2	9.2	216.7	216.1	174.0 104.1	23 39	+
Carbaryl 1 Carbaryl 2	7.1	201.2	202.1	145.1 127.1	16 39	+
Carbendazim 1 Carbendazim 2	5.1	191.2	192.1	160.1 132.0	29 41	+
Carbofuran 1 Carbofuran 2	6.6	221.3	222.1	123.0 165.1	29 17	+
Chlorantraniliprole 1 Chlorantraniliprole 2	8.8	483.2	481.6	283.9 450.9	23 25	+
Chlorpropham 1 Chlorpropham 2	13.5	213.7	214.2	154.0 172.0	25 13	+
Clethodim 1 Clethodim 2	12.5	359.9	360.1	164.0 77.0	27 99	+
Clothianidin 1 Clothianidin 2	4.7	249.7	250.1	169.1 132.1	17 17	+
Diflubenzuron 1 Diflubenzuron 2	17.6	310.7	311.0	158.1 141.1	19 45	+
Ethion 1 Ethion 2	27.0	384.5	385.0	142.8 96.9	37 45	+
Fenbuconazole 1 Fenbuconazole 2	15.6	336.8	337.2	125.1 70.0	41 35	+
Fenobucarb 1 Fenobucarb 2	10.5	207.3	208.1	95.2 152.0	19 11	+
Flubendiamide 1 Flubendiamide 2	17.7	682.7	683.1	407.9 255.9	27 87	+
Fluopicolide 1	12.3	383.6	383.0	173.0	35	+

농약명	RT	Exact mass	Q1 mass	Q3 mass	CE	Polarity
Fluopicolide 2				109.0	91	
Flusilazole 1 Flusilazole 2	16.8	315.4	316.1	165.2 247.1	39 23	+
Fluxapyroxad 1 Fluxapyroxad 2	11.6	381.3	382.1	362.1 342.1	21 29	+
Isoprocarb 1 Isoprocarb 2	8.3	193.2	194.2	95.2 137.1	19 13	+
Isopyrazam 1 Isopyrazam 2	30.4	359.4	360.2	244.2 320.3	33 29	+
Malathion 1 Malathion 2	12.6	330.4	331.0	127.0 99.0	19 31	+
Methiocarb 1 Methiocarb 2	11.5	225.3	226.2	121.0 196.2	23 13	+
Methomyl 1 Methomyl 2	4.4	162.2	163.1	88.1 106.2	13 13	+
Methoprene 1 Methoprene 2	18.63	310.5	153.0	111.1 83.0	5 15	+
Methoxyfenozide 1 Methoxyfenozide 2	12.2	368.5	369.3	149.2 133.1	21 31	+
Oxamyl 1 Oxamyl 2	4.1	219.3	237.1	72.1 90.1	25 11	+
Oxydemeton-methyl 1 Oxydemeton-methyl 2	4.1	246.3	247.0	108.9 168.9	39 21	+
Parathion 1 Parathion 2	20.1	291.3	292.0	236.1 94.0	21 50	+
Phorate 1 Phorate 2	28.0	260.4	261.1	74.9 199.0	23 13	+
Piperonyl butoxide 1 Piperonyl butoxide 2	17.7	338.4	356.2	177.1 119.2	19 47	+
Pirimicarb 1 Pirimicarb 2	7.7	238.3	239.2	72.1 182.2	34 21	+
Prothioconazole 1 Prothioconazole 2	23.2	344.3	344.1	125.1 326.0	53 17	+
Pyraclostrobin 1 Pyraclostrobin 2	26.0	387.8	388.0	163.0 194.0	29 19	+
Saflufenacil 1 Saflufenacil 2	8.8	500.9	501.1	198.0 349.0	59 35	+
Simazine 1 Simazine 2	7.3	201.7	202.1	104.0 132.1	37 25	+
Spinosad 1 Spinosad 2	24.1	732	732.4	98.2 142.2	93 41	+
Spirotetramat 1 Spirotetramat 2	13.9	373.5	374.1	216.1 302.1	45 23	+
Thiabendazole 1 Thiabendazole 2	5.6	201.3	202.1	175.1 131.1	33 43	+
Tricyclazole 1 Tricyclazole 2	5.7	189.2	190.1	163.1 136.0	31 37	+

5) LC-MSMS 분석 조건 및 MRM-벵짚용

구분	조건			
Column	Intakt, Scherzo SM-C18, (2 × 100 mm, 3 µm 또는 이와 동등한 것)			
Mobile Phase	A(4 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in Water) B(4 mM ammonium formate, 0.1% formic acid in MeOH)			
	시간 (분)	A(%)	B(%)	유속(mL)
	0.00	95	5	0.3
	1.00	95	5	0.3
	12.00	0	100	0.3
	18.00	0	100	0.3
	18.01	95	5	0.3
	20.00	95	5	0.3
Column Temp.	40℃			
Time	20 min			
Injection Volumne	5 uL			
MS/MS	Ion source: ESI Polarity: Positive Nebulizer gas: Nitrogen Nebulizer gas flow: GS1; 50, GS2; 45 Ion spray voltage: 5500 Source temp: 400			

농약명	RT	Exact mass	Q1 mass	Q3 mass	CE	Polarity
Buprofezin 1 Buprofezin 2	13.2	305.1	306.2	201.3 116.2	17 21	+
Carbaryl 1 Carbaryl 2	10.5	201.1	202.1	145.1 127.1	16 39	+
Carbendazim 1 Carbendazim 2	6.4	191.2	192.1	160.1 132.0	27 41	+
Carbofuran 1 Carbofuran 2	10.0	221.1	222.1	123.0 165.1	29 17	+
Chlorantraniliprole 1 Chlorantraniliprole 2	11.3	480.9	481.6	283.9 450.9	23 25	+
Clothianidin 1 Clothianidin 2	8.0	249.0	250.1	169.1 132.1	17 17	+
Cyantraniliprole 1 Cyantraniliprole 2	10.6	472.0	473.0	284.0 112.0	21 85	+
Diazinon 1 Diazinon 2	12.6	304.1	305.2	169.2 153.2	27 29	+
Dinotefuran 1 Dinotefuran 2	5.3	202.1	203.0	129.0 87.0	19 21	+
Edifenphos 1 Edifenphos 2	12.6	310.0	311.1	109.1 111.1	41 29	+
Etofenprox 1 Etofenprox 2	14.2	376.2	394.3	177.2 107.0	21 57	+
Fenbuconazole 1 Fenbuconazole 2	12.3	336.1	337.2	125.1 70.0	41 35	+
Fenobucarb 1 Fenobucarb 2	11.4	207.1	208.1	95.2 152.0	19 11	+
Flubendiamide 1 Flubendiamide 2	12.3	682.0	683.1	407.9 273.9	27 41	+
Indoxacarb 1 Indoxacarb 2	12.9	527.0	528.1	203.0 248.9	51 25	+
Isoprothiolane 1 Isoprothiolane 2	11.9	290.1	291.1	231.1 189.1	15 27	+
Metaflumizone 1 Metaflumizone 2	13.3	506.1	507.1	178.1 287.1	35 37	+
Methoxyfenozide 1 Methoxyfenozide 2	11.9	368.2	369.3	149.2 133.1	21 31	+
Phenthoate 1	12.4	320.0	321.1	79.1	55	+

농약명	RT	Exact mass	Q1 mass	Q3 mass	CE	Polarity
Phenthoate 2				163.1	15	
Phorate 1 Phorate 2	12.8	260.0	261.1	74.9 96.7	23 37	+
Propiconazole 1 Propiconazole 2	12.6	341.0	342.1	159.1 69.0	43 35	+
Sulfoxaflor 1 Sulfoxaflor 2	8.5	277.0	278.0	174.2 154.2	17 37	+
Tebufenozide 1 Tebufenozide 2	12.3	352.2	353.0	133.1 297.1	29 13	+
Thiacloprid 1 Thiacloprid 2	9.2	252.0	253.1	126.1 98.9	27 55	+
Tricyclazole 1 Tricyclazole 2	9.5	189.0	190.1	163.1 136.0	31 37	+

※ 기기 분석 조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

사. 정성시험

위의 조건에서 시험할 때 시험결과는 어느 측정조건에서도 표준품과 일치하여야 한다.

※ GC-MS 및 LC-MS 상의 머무름 시간 및 질량분석 스펙트럼으로 각 농약의 성분을 확인할 수 있다.

아. 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

※ 정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

※ 이 시험법을 이용하여 사료에서 검출될 경우 정량분석은 사료표준분석방법이나 식품 공전의 단성분 분석법에 따른다.

※ 분석결과 0.01 mg/kg 미만은 ‘불검출’로 한다

9.6.3. 다중농약 다성분 동시분석-제3법

가. 적용범위

본 분석법은 배합사료 및 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류)에 적용한다.

나. 분석대상 성분

1) 기체크로마토그래프 분석대상

1	Alachlor	2	Aldrin, Dieldrin	3	Atrazine
4	BHC(alpha,beta,delta)	5	Bifenthrin	6	Chlorantraniliprole
7	Chlorfenapyr	8	Chlorfenvinphos(2 isomer)	9	Chlorobenzilate
10	Chlorpropham	11	Chlorpyrifos-methyl	12	Cyfluthrin(4 isomers)
13	Cyhalothrin	14	Cypermethrin(4 isomers)	15	Cyprodinil
16	DDT(4 isomer)	17	Deltamethrin(tralomethrin)	18	Difenoconazole(2 isomer)
19	Dimethoate	20	Disulfoton	21	Endrin
22	EPN	23	Ethion	24	Fenitrothion
25	Fenpropathrin	26	Fenthion	27	Fenvalerate(2 isomer)
28	Fipronil	29	Flutriafol	30	Heptachlor(2 isomer)
31	Indoxacarb	32	Isofenphos	33	Lindane(gamma-BHC)
34	Methidathion	35	Methoprene	36	Parathion-ethyl, methyl
37	Pendimethalin	38	Permethrin(2 isomer)	39	Phorate
40	Piperonyl butoxide	41	Prochloraz	42	Propiconazole(2 isomer)
43	Quintozene	44	Simazine	45	Terbufos
46	Triadimenol				

2) 액체크로마토그래프 분석대상

1	Abamectin B1	2	Acephate	3	Aldicarb
4	Azinphos-methyl	5	Azoxystrobin	6	Boscalid
7	Carbaryl	8	Carbendazim(Thiophanate, Thiophanate-methyl)	9	Carbofuran (3-Hydroxycarbofuran)
10	Chlorpyrifos	11	Clethodim	12	Clothianidin
13	Cyanazine	14	Cycloxydime	15	Cyproconazole(I, II)
16	Diazinon	17	Dichlorvos(DDVP)	18	Diflubenzuron
19	Dimethenamid	20	Edifenphos	21	Etoxazole
22	Fenarimol	23	Fenbuconazole	24	Fenobucarb
25	Flubendiamide	26	Fludioxonil	27	Flufenoxuron
28	Fluopicolide	29	Flusilazole	30	Fluxapyroxad
31	Haloxfop	32	Imazalil	33	Imidacloprid
34	Isoprocarb	35	Kresoxim-methyl	36	Malathion
37	Methiocarb	38	Methomyl	39	Methoxyfenozide
40	Myclobutanil	41	Oxydemeton-methyl	42	Phenthoate
43	Pirimicarb	44	Pirimiphos-methyl	45	Pyraclostrobin
46	Pyridaben	47	Pyrimethanil	48	Spirotetramat
49	Sulfoxaflor	50	Tebuconazole	51	Tetraconazole
52	Thiabendazole	53	Thiacloprid	54	Triadimefon
55	Tricyclazole	56	Trifloxystrobin		

다. 분석원리

균질화한 시료를 분취하여 염을 함유한 아세트니트릴/분상고체상추출법을 이용하여 추출/정제하고 액체크로마토그래프(LC-MS/MS) 및 기체크로마토그래프(GC-MS/MS)로 분석한다. 시료 매트릭스의 영향을 최소화하기 위하여 매트릭스보정 검량법(matrix matched calibration) 또는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용하여 분석할 수 있다.

라. 장치

기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS/MS) 및 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

마. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 3) 표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 4) 보호제 원액: 솔비톨 500 mg을 아세트니트릴/물 혼합액(5:5, v/v) 10 mL로 녹인다. D-(+)-gluconic acid- δ -lactone 500 mg을 아세트니트릴:물 혼합액(6 : 4, v/v) 10 mL로 녹인다. 시킴산 500 mg을 아세트니트릴:물 혼합액(6:4, v/v) 10 mL로 녹인다. 3-ethoxy-1,2-propanediol은 녹이지 않은 채로 사용한다.
※ 주의: 물에 먼저 녹인 후 유기용매로 희석한다.
- 5) 보호제 혼합용액: 3-ethoxy-1,2-propanediol 0.2 g을 칭량하여 10 mL 부피플라스크에 담는다. D-(+)-gluconic acid- δ -lactone 원액 2 mL, 솔비톨 원액 1 mL, 시킴산(shikimic acid) 원액 1 mL을 부피플라스크에 첨가한다. 아세트니트릴 : 물 혼합액(7:3, v/v)으로 부피플라스크를 10 mL 정용 후 4℃에서 보관한다. 사용 전에 위 보관 용액 : 5% 포름산을 함유한 아세트니트릴(3:1, v/v)로 미리 혼합하여 표준용액과 시료액에 첨가한다.
- 6) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

바. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 시료 5 g를 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣고 물 10 mL를 넣어 1시간동안 방치하고 내부 표준물질(0.1 mg/L triphenylphosphate)을 함유한 아세트니트릴 10 mL를 넣은 후 1~2분간 진탕한다.
- 2) 1)의 원심분리관에 무수황산마그네슘 4.0 g, 염화나트륨 1.0 g, 구연산나트륨 1.0(± 0.05) g, disodium citrate sesquihydrate 0.5 g을 넣고 1분간 상하좌우로 흔들어 혼합한 후, 원심분리

(3,000 rpm, 5분)하여 아세토니트릴층과 물층을 분리 시킨 후 아세토니트릴층을 아래 4) 시료액의 LC-MS/MS 시료추출액으로 사용한다.

※ 무수황산마그네슘은 수분이 있을 경우 열이 발생하면서 응집하므로 신속히 흔들어 냉각된 원심분리기 또는 냉각조에 넣어 식힌다.

3) GC-MS/MS의 경우 PSA 25 mg와 무수황산마그네슘 150 mg (고지방의 시료인 경우 C₁₈ 25 mg을 추가할 수 있다)을 넣어둔 분상고체상추출 튜브에 상등액 1.2 mL을 넣고 1분간 진탕 후 원심분리(10,000 rpm, 2분)한 다음 멤브레인 필터(0.2 µm)로 여과하여 아래 4) 시료액의 GC-MS/MS 시료 추출액으로 사용한다. 이때 보호제 혼합용액을 첨가하여 바이알에 담는다.

4) 정량 분석용 매질보정 검량법(matrix matched calibration) 및 표준물질 첨가(standard addition method)에 따른 농도별 표준물질과 시료액은 아래의 예를 참고하여 만든다.

※ 무농약 시료추출액: 시료구와 동일한 품목이면서 농약성분이 검출되지 아니한 시료를 바. 에 따라 추출 및 정제한다(단, 내부표준물질을 첨가하지 아니함).

가) GC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질						시료액
	1	2	3	4	5	6	
목적 농도	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	250 µg/L	
조제 방법	AP 40 µL	AP 40 µL	AP 40 µL	AP 40 µL	AP 40 µL	AP 40 µL	AP 40 µL
	내부표준물질 1000 µg/L ×100 µL	내부표준물질 1000 µg/L ×100 µL	내부표준물질 1000 µg/L ×100 µL	내부표준물질 1000 µg/L ×100 µL	내부표준물질 1000 µg/L ×100 µL	내부표준물질 1000 µg/L ×100 µL	아세토니트릴 150 µL
	STD 100 µg/L × 50 µL	STD 200 µg/L × 50 µL	STD 500 µg/L × 50 µL	STD 1,000 µg/L × 50 µL	STD 2,000 µg/L × 50 µL	STD 5,000 µg/L × 50 µL	
	무농약 시료추출액 810 µL	무농약 시료추출액 810 µL	무농약 시료추출액 810 µL	무농약 시료추출액 810 µL	무농약 시료추출액 810 µL	무농약 시료추출액 810 µL	시료추출액 810 µL

※ AP : 마. 의 5) 보호제 혼합용액

나) LC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질						시료액
	1	2	3	4	5	6	
목적 농도	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	
조제 방법	완충용액 600 µL + 아세토니트릴 200 µL	완충용액 600 µL + 아세토니트릴 200 µL	완충용액 600 µL + 아세토니트릴 200 µL	완충용액 600 µL + 아세토니트릴 200 µL	완충용액 600 µL + 아세토니트릴 200 µL	완충용액 600 µL + 아세토니트릴 200 µL	완충용액 600 µL + 아세토니트릴 300 µL
	STD 10 µg/L × 100 µL	STD 50 µg/L × 100 µL	STD 100 µg/L × 100 µL	STD 200 µg/L × 100 µL	STD 500 µg/L × 100 µL	STD 1,000 µg/L × 100 µL	
	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	시료추출액 100 µL

※ 완충용액 : 포름산암모늄 100 mM을 함유한 물(포름산 용액을 이용하여 pH 4~4.5로 맞춤)

사. 시험조작

1) 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS/MS)의 분석 조건

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

나) 주입부: Electron ionization(EI) 또는 이와 동등한 방식

다) 주입량: 1 µL

- 라) 온도: 280℃
- 마) Splitless 모드
- 바) 오븐: 80℃에서 시료액을 주입하고 3분간 유지한 후 15℃/min 비율로 160℃까지 상승시키고 7℃/min 비율로 300℃까지 상승시켜 5분간 유지
- 사) 질량분석기: MRM(Multiple reaction monitoring) 모드
- 아) Electron ionization(EI): -70 eV
- 자) Transfer line: 280℃
- 차) Ion source: 280℃

카) GC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

농약명	머무름시간(분)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	토막이온 (Fragmentation, m/z)	충돌에너지 (Collision energy,eV)
Alachlor	16.33	160.1	131.7	10
		188.1	130.0	32
		188.1	Q-160.1	8
Aldrin	17.29	262.7	191.0	30
		262.7	Q-192.9	32
Dieldrin	18.33	262.8	190.9	30
		262.8	Q-192.9	30
		262.8	227.8	16
Atrazine	14.21	200.0	122.1	8
		200.0	132.0	8
		215.1	Q-58.1	12
BHC-alpha	13.69	180.9	144.9	15
		182.8	146.7	12
		218.8	146.6	20
		218.8	Q-183.0	8
BHC-beta	14.34	180.9	145.0	14
		218.7	146.6	18
		218.7	Q-183.0	8
BHC-delta	15.10	182.8	146.7	14
		218.8	146.5	20
		218.8	182.9	8
		219.1	Q-182.9	10
Bifenthrin	23.21	165.1	163.6	24
		181.0	Q-165.9	10
		181.0	179.0	12
Chlorantraniliprole	23.48	243.0	179.0	26
		278.0	215.1	22
		278.0	Q-249.0	20
Chlorfenapyr	20.53	136.9	102.0	12
		248.9	Q-112.0	24
		248.9	137.1	18
Chlorfenvinphos	18.47	266.9	Q-159.0	16
		266.9	203.0	10
		323.0	266.9	14
Chlorobenzilate	20.70	111.0	75.1	14
		139.0	Q-74.9	26
		139.0	111.0	12
Chlorpropham	12.91	171.0	Q-127.0	8
		213.0	127.0	14
		213.0	171.0	6
Chlorpyrifos-methyl	16.13	125.0	Q-47.0	12
		125.0	79.0	6
		285.9	93.0	20

농약명	머무름시간(분)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	토막이온 (Fragmentation, m/z)	충돌에너지 (Collision energy,eV)
Cyfluthrin 1	26.42	163.0	65.1	26
		163.0	91.1	12
		163.0	Q-127.1	6
Cyfluthrin 2	26.54	163.0	91.1	12
		163.0	Q-127.0	6
		206.0	151.1	18
Cyfluthrin 3	26.66	163.0	91.1	12
		163.0	127.0	6
		226.0	Q-206.1	12
Cyfluthrin 4	26.71	163.0	91.1	12
		163.0	127.0	6
		226.0	Q-206.1	10
Cyhalothrin I (lambda)	24.31	180.9	152.0	22
		197.1	141.1	10
		207.9	Q-180.9	8
Cyhalothrin II (gamma)	24.82	180.9	152.0	22
		197.1	141.1	10
		207.9	Q-180.9	8
Cypermethrin -1	26.86	163.0	91.1	12
		163.0	Q-127.1	8
		180.9	152.1	20
Cypermethrin -2	26.98	163.0	91.1	12
		163.0	Q-127.0	6
		180.9	151.9	18
Cypermethrin -3	27.10	163.0	91.0	12
		163.0	Q-127.0	8
		180.9	152.2	20
Cypermethrin -4	27.14	163.0	91.1	12
		163.0	Q-127.1	6
		180.9	152.2	20
Cyprodinil	18.09	224.1	196.9	20
		224.1	Q-208.0	18
		225.1	209.7	16
o,p-DDT	20.95	235.0	Q-165.1	17
		235.0	199.0	14
		236.8	165.0	20
p,p-DDD	21.05	235.0	164.8	15
		235.0	Q-165.1	22
		235.0	199.5	10
		236.8	165.0	22
p,p-DDE	19.87	246.0	Q-176.1	28
		248.0	176.1	30
		317.8	246.0	20
		317.8	248.0	18
p,p-DDT	21.90	235.0	Q-165.1	20
		235.0	199.5	20
		235.0	165.0	10
		236.8	81.0	20
		237.0	97.0	20
Deltamethrin (tralomethrin)-1	28.89	181.0	152.1	22
		252.8	92.9	16
		252.8	Q-172.0	8
Deltamethrin (tralomethrin)-2	29.20	181.0	152.1	22
		252.8	92.9	16
		252.8	Q-172.0	8

농약명	머무름시간(분)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	토막이온 (Fragmentation, m/z)	충돌에너지 (Collision energy,eV)
Difenoconazole-1	28.72	265.0	Q-139.0	36
		265.0	202.1	16
		323.0	265.0	14
Difenoconazole-2	28.82	265.0	Q-139.0	36
		265.0	202.0	18
		323.0	265.0	16
Dimethoate	13.97	87.0	Q-42.1	10
		93.0	63.0	8
		125.0	79.0	8
Disulfoton	15.03	88.0	45.0	18
		88.0	Q-59.8	6
		185.9	96.9	16
Endrin	20.53	245.0	173.0	22
		262.8	Q-192.9	30
		280.8	245.3	8
EPN	23.21	157.0	77.0	22
		169.0	77.0	22
		169.0	Q-141.0	8
Ethion	21.05	153.0	97.0	10
		230.9	Q-128.9	22
		230.9	174.9	12
Fenitrothion	16.84	125.0	79.0	8
		277.0	109.0	16
		277.0	Q-260.0	6
Fenpropathrin	23.39	97.1	55.1	6
		181.0	126.8	28
		181.0	Q-151.9	22
Fenthion	17.34	245.3	125.0	12
		278.0	109.0	18
		278.0	Q-169.0	14
Fenvalerate-1	28.14	125.0	Q-89.0	18
		167.0	89.0	32
		167.0	125.0	10
Fenvalerate-2	28.42	125.0	Q-89.0	18
		167.0	89.0	32
		167.0	125.0	10
Fipronil	18.47	366.9	Q-212.9	28
		366.9	244.9	20
		368.8	214.9	30
Flutriafol	19.40	123.0	Q-75.0	24
		123.0	95.0	12
		219.0	123.0	12
Heptachlor	16.38	99.8	39.0	26
		99.8	Q-65.0	12
		271.8	236.9	12
Heptachlor-epoxide	18.33	262.9	Q-192.9	30
		352.8	262.9	16
		354.7	264.9	12
Indoxacarb	29.09	133.9	106.0	8
		203.0	106.1	22
		203.0	Q-134.0	12
Isofenphos	18.46	185.0	121.0	10
		213.0	Q-121.0	14
		213.0	185.0	6
Lindane(gamma-BHC)	14.52	180.9	109.0	26
		180.9	145.0	14

농약명	머무름시간(분)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	토막이온 (Fragmentation, m/z)	충돌에너지 (Collision energy,eV)
		218.7	Q-183.0	8
Methidathion	18.92	145.0	Q-58.0	14
		145.0	85.0	6
Methoprene	18.63	153.0	83.0	15
		153.0	Q-111.1	5
Parathion-ethyl	17.41	109.0	Q-109.0	10
		124.9	Q-47.0	6
		291.0	79.0	12
Parathion-methyl	16.13	124.9	109.0	12
		124.9	161.0	6
		263.0	Q-162.0	12
Pendimethalin	18.24	252.1	191.3	14
		252.1	134.0	8
		252.1	Q-101.0	8
Permethrin 1	25.61	163.0	168.0	12
		183.1	153.0	12
		183.1	Q-165.1	12
Permethrin 2	25.78	183.0	168.1	14
		183.0	Q-41.1	10
		183.0	79.1	10
Phorate	13.52	75.0	Q-75.0	8
		121.0	65.0	8
		260.0	Q-74.8	8
Piperonyl butoxide	22.45	176.1	Q-131.1	22
		176.1	Q-168.1	18
		176.1	166.1	12
Prochloraz	26.04	69.9	53.0	8
		180.1	67.1	12
Propiconazole 1	21.83	172.9	145.0	38
		172.9	74.0	26
		172.9	Q-109.0	16
Propiconazole 2	21.99	172.9	145.0	38
		172.9	Q-120.1	24
		172.9	144.1	14
Quintozene	14.65	213.8	236.9	28
		213.8	151.1	14
		294.8	Q-181.1	14
Simazine	14.07	172.7	91.0	6
		172.7	74.9	8
		186.0	Q-101.0	8
Terbufos	14.60	230.9	203.0	22
		230.9	68.0	12
		230.9	Q-170.1	8
Triadimenol	18.57	112.0	Q-70.0	8
		128.0	43.3	18
		168.2	Q-183.9	10

※ 기기 분석조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

2) 액체크로마토그래프·질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건

가) 컬럼: C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.6 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구배

(1) A 이동상 : 0.1% 포름산과 5 mM 포름산암모늄 함유 수용액

(2) B 이동상: 0.1% 포름산과 5 mM 포름산암모늄 함유 메탄올 용액

시간(분)	유속(mL/min)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	0.3	95	5
3.0	0.3	95	5
15.0	0.3	2	98
18.0	0.3	2	98
20.0	0.3	95	5
25.0	0.3	95	5

다) 컬럼 온도: 35℃

라) 주입량: 5 µL(기기 감도에 따라 1~50 µL로 조절)

마) 이온화 방식: Electrospray ionization(ESI, positive)

바) LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

농약명	머무름시간 (분)	관측질량 (Exact mass)	이온화 (Ionization)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	토막이온 (Fragmentation, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
Abamectin B1	16.14	872.5	[M+NH4] ⁺	890.6	145.1	30
				890.6	Q-305.2	20
Acephate	2.53	183.0	[M+H] ⁺	184.0	125.1	19
				184.0	Q-142.9	8
Aldicarb	9.77	190.1	[M+NH4] ⁺	208.1	70.1	15
				208.1	89.3	19
				208.1	Q-116.1	10
Azinphos_methyl	12.45	317.0	[M+H] ⁺	318.0	125.0	12
				318.0	Q-132.1	10
				318.0	160.0	10
Azoxystrobin	12.72	403.1	[M+H] ⁺	404.1	344.1	26
				404.1	Q-372.1	16
Boscalid	12.91	342.0	[M+H] ⁺	343.0	140.0	27
				343.0	Q-307.0	27
Carbaryl	11.22	201.1	[M+H] ⁺	202.0	127.0	30
				202.0	Q-145.0	12
Carbendazim	7.09	191.1	[M+H] ⁺	192.0	132.0	33
				192.0	Q-160.0	20
Thiophanate	12.18	370.0	[M+H] ⁺	371.0	Q-151.0	110
				371.0	325.0	110
Thiophanate-methyl	10.78	342.0	[M+H] ⁺	342.9	Q-151.0	110
				342.9	310.9	110
Carbofuran	10.85	221.1	[M+H] ⁺	222.0	123.0	25
				222.0	Q-165.0	14
3-Hydroxycarbofuran	8.79	237.0	[M+H] ⁺	238.2	163.1	78.5
				238.2	Q-181.1	78.5
Chlorpyrifos	15.34	348.9	[M+H] ⁺	350.0	97.0	35
				350.0	Q-198.0	23
Clethodim	14.77	359.1	[M+H] ⁺	360.2	77.0	13
				360.2	Q-164.1	21
Clothianidin	8.18	249.0	[M+H] ⁺	250.0	132.0	18
				250.0	Q-169.0	14
Cyanazine	10.51	240.1	[M+H] ⁺	241.2	104.1	28
				241.2	132.1	23
				241.2	Q-214.1	15
Cycloxydime	14.75	325.2	[M+H] ⁺	326.2	180.1	18
				326.2	Q-280.1	10
Cyproconazole(I)	13.1	291.1	[M+H] ⁺	292.2	Q-70.3	18
				292.2	125.1	26
Cyproconazole(II)	13.32	291.1	[M+H] ⁺	292.2	Q-70.3	18
				292.2	125.1	26

농약명	머무름시간 (분)	관측질량 (Exact mass)	이온화 (Ionization)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	토막이온 (Fragmentation, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
Diazinon	14.15	304.1	[M+H] ⁺	305.1	153.1	23
				305.1	Q-169.1	23
Dichlorvos(DDVP)	10.65	219.9	[M+H] ⁺	221.0	95.0	38
				221.0	Q-109.0	20
				221.0	127.0	15
Diflubenzuron	13.72	310.0	[M+H] ⁺	310.9	Q-141.1	27
				310.9	158.0	25
Dimethenamid	12.79	275.1	[M+H] ⁺	276.1	168.1	26
				276.1	Q-244.1	16
Edifenphos	13.99	310.0	[M+H] ⁺	311.1	109.1	35
				311.1	111.1	35
				311.1	Q-283.0	15
Etoxazole	15.52	359.2	[M+H] ⁺	360.2	63.0	40
				360.2	Q-141.1	33
				360.2	304.1	19
Fenarimol	13.44	330.0	[M+H] ⁺	331.0	81.1	31
				331.0	Q-268.1	25
Fenbuconazole	13.64	336.1	[M+H] ⁺	337.1	70.0	35
				337.1	Q-125.1	41
Fenobucarb	12.6	207.1	[M+H] ⁺	208.2	Q-95.0	16
				208.2	152.0	10
Flubendiamide	13.94	682.0	[M-H] ⁻	680.9	Q-254.1	24
				680.9	274.0	13
Fludioxonil	12.98	248.0	[M+NH4] ⁺	266.0	Q-158.3	28
				266.0	229.0	30
			[M-H] ⁻	247.0	Q-126.2	31
				247.0	152.0	39
				247.0	169.0	33
Flufenoxuron	15.5	488.0	[M+H] ⁺	489.0	141.0	40
				489.0	Q-158.0	20
Fluopicolide	13.09	382.0	[M+H] ⁺	383.0	109.0	59
				383.0	Q-173.0	35
Flusilazole	13.74	315.1	[M+H] ⁺	316.1	165.1	30
				316.1	Q-247.1	19
Fluxapyroxad	13.09	381.1	[M+H] ⁺	382.2	342.1	22
				382.2	Q-362.2	14
Haloxypop	14.85	361.0	[M+H] ⁺	362.0	Q-91.0	33
				362.0	316.0	18
Imazalil	11.56	296.0	[M+H] ⁺	297.0	69.0	35
				297.0	Q-158.9	25
				297.0	254.9	20
Imidacloprid	8.22	255.1	[M+H] ⁺	256.0	175.0	20
				256.0	Q-209.0	18
Isoprocab	11.79	193.1	[M+H] ⁺	194.0	77.0	37
				194.0	Q-95.0	16
Kresoxim_methyl	13.91	313.1	[M+H] ⁺	314.1	222.1	16
				314.1	Q-267.0	7
Malathion	13.11	330.1	[M+H] ⁺	331.1	Q-99.1	25
				331.1	127.0	15
Methiocarb	12.78	225.1	[M+H] ⁺	226.0	121.0	16
				226.0	Q-169.0	10
Methomyl	6.7	162.0	[M+H] ⁺	163.0	88.0	10
				163.0	Q-106.0	10
Methoxyfenozide	13.19	368.2	[M+H] ⁺	369.0	133.1	26
				369.0	Q-149.0	18

농약명	머무름시간 (분)	관측질량 (Exact mass)	이온화 (Ionization)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	토막이온 (Fragmentation, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
				369.0	313.0	10
Myclobutanil	13.18	288.1	[M+H] ⁺	289.1	Q-70.2	22
				289.1	125.0	35
Oxydemeton-methyl	7.02	246.0	[M+H] ⁺	247.0	109.1	24
				247.0	125.1	20
				247.0	Q-169.0	10
Phenthoate	13.89	320.0	[M+H] ⁺	321.1	79.2	43
				321.1	135.2	30
				321.1	Q-247.0	11
Pirimicarb	10.12	238.1	[M+H] ⁺	239.0	72.0	21
				239.0	Q-182.0	16
Pirimiphos-methyl	14.29	305.1	[M+H] ⁺	306.1	108.1	33
				306.1	Q-164.2	24
Pyraclostrobin	14.26	387.1	[M+H] ⁺	388.0	163.0	26
				388.0	Q-194.0	14
Pyridaben	15.93	364.1	[M+H] ⁺	365.1	147.1	27
				365.1	Q-309.1	14
Pyrimethanil	12.31	199.1	[M+H] ⁺	200.1	82.0	30
				200.1	Q-107.0	24
Spirotetramat	13.43	373.2	[M+H] ⁺	374.1	216.1	34
				374.1	Q-302.1	17
Sulfoxaflor	9.13	277.0	[M+H] ⁺	278.0	154.1	24
				278.0	Q-174.1	10
Tebuconazole	13.99	307.1	[M+H] ⁺	308.1	Q-70.1	26
				308.1	125.0	39
Tetraconazole	13.5	371.0	[M+H] ⁺	372.0	70.0	24
				372.0	Q-159.0	39
Thiabendazole	7.98	201.0	[M+H] ⁺	202.0	131.0	35
				202.0	Q-175.0	28
Thiacloprid	9.47	252.0	[M+H] ⁺	253.0	99.1	45
				253.0	Q-126.0	24
				253.0	186.1	17
Triadimefon	13.14	293.1	[M+H] ⁺	294.1	Q-197.1	17
				294.1	225.1	15
Tricyclazole	9.74	189.0	[M+H] ⁺	190.0	136.0	30
				190.0	Q-163.0	24
Trifloxystrobin	14.65	408.1	[M+H] ⁺	409.1	Q-186.0	20
				409.1	206.0	16

아. 정성 및 정량시험

1) 기기분석 순서

가) 안정적인 기기분석 값을 얻기 위해 검량용액이나 시료를 분석하기 전에 프라이밍(priming)한다.

(1) GC-MS/MS: 시료 또는 고농도 표준물질 × 2회

(2) LC-MS/MS: 용매 블랭크 × 3회

나) 기기 오염 여부를 확인하기 위해 무농약 시료를 분석한다.

다) 4수준 이상의 매질보정 검량용액 또는 기타 적정한 검량용액을 분석한다.

라) 데이터 품질 관리용 시료를 분석하며 일반적으로 회수율 실험한 시료를 활용한다.

마) 시료 (S1, S2, S3 ,,, Sn)를 분석한다.

바) 다)의 4수준 이상의 검량용액을 재분석하는 협차 검량법(bracket calibration)을 활용한다.

2) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크

높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 1)의 기기분석 순서에 따른 협차 검량법을 활용한다.

다) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용($1/x$) 방식을 활용할 수 있다.

3) 정성 확인

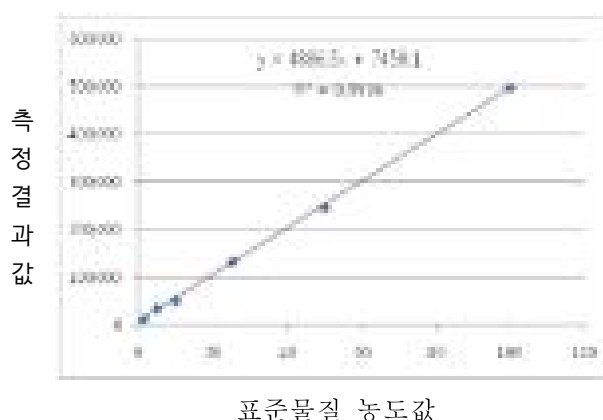
LC-MS/MS 및 GC-MS/MS로 분석하였을 때 시험용액 중 표준물질의 머무름 시간과 측정 질량값(m/z)은 표준용액 중 표준물질의 머무름 시간(± 0.2 분) 및 측정 질량값(m/z)과 일치하여야 한다. 또한 이온쌍의 피크 비율($\pm 30\%$ 이하)을 참고하여 확인하여야 한다.

4) 정량 확인

바.의 4)에서와 같이 시료 추출액을 이용하여 매질보정 검량법에 의한 측정 결과값으로 검량선식($y = ax + b$)을 작성한다.

(예) $y = 4886.5 x + 7450.1$

표준물질 농도값 ($\mu\text{g/L}$)	측정 결과값 Response(Area)
1	13,143
5	34,958
10	52,729
25	132,543
50	246,400
100	498,258



5) 시료액에서의 측정값과 가)에서의 검량선식을 활용하여 시료액에서의 농도를 계산한다.

(예) $y = 48,635$ 일 경우 $x = (48,635 - 7,450) \div 4,886 = 8.43 \mu\text{g/L}$

6) 회석배수를 반영하여 시료에 잔류하는 농약의 검출 농도 값을 산출한다.

검출농도($\mu\text{g/kg}$) = 검량농도($\mu\text{g/L}$) $\times$ 추출용매량(mL)/시료량(g) $\times$ 기기 분석용시액(mL)/분취시료량(mL)

가) 사료 등 건조 섬유질류

검출농도 ($\mu\text{g/kg}$) = 검량농도($\mu\text{g/L}$) $\times 10 \text{ mL}/5 \text{ g} \times 1 \text{ mL}/0.1 \text{ mL}$

나) 내부표준물질을 정량에 활용할 경우(GC-MS/MS)

검출농도 ($\mu\text{g/kg}$) = 검량농도($\mu\text{g/L}$) $\times 10 \text{ mL}/5 \text{ g}$

다) 내부표준물질을 정량에 활용하지 않을 경우(GC-MS/MS)

검출농도 ($\mu\text{g/kg}$) = 검량농도($\mu\text{g/L}$) $\times 10 \text{ mL}/5 \text{ g} \times 1 \text{ mL}/0.81 \text{ mL}$

라) 매질효과(matrix effects)가 최소화된 경우 용매검량법 또는 대표품목의 매질보정검량법 등으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

※ 매질효과: 시료 성분이 정량분석에 미치는 영향

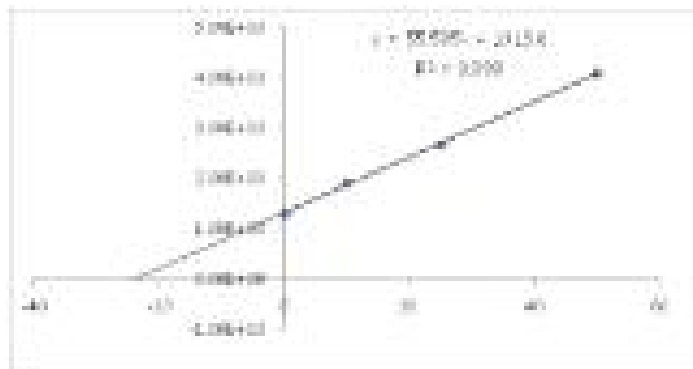
(1) 바. 4)에서와 같이 시료의 예상 농도의 50%, 100%, 150% 수준으로 표준물질을 첨가하여 기기분석용 시료액을 조제한다. 검량선이 직선범위에 들어오도록 희석하고 검량농도 범위가 직선성($R^2 > 0.995$)을 나타내는지 확인한다.

(2) 시료 추출액을 이용하여 표준물질 첨가법에 의한 측정 결과값으로 검량선식 ($y=ax+b$)을 작성한다.

(예) $y = 55.59 x + 1,313.61$

첨가한 표준물질 농도값 (μ g/L)	측정 결과값 Response (Area)
0	1,290
10	1,920
25	2,670
50	4,100

측
정
결
과
값



첨가한 표준물질 농도값

(3) 검량선식을 활용하여 시료액에서의 농도를 계산한다.

시료액 농도: x 축 절편(검량식 $y=ax+b$ 에서 $y=0$ 인 x 값)의 절대값

회석(아세토니트릴 또는 물 x μ L)배수 또는 주입량에 상관없이 실제 시료액 농도(μ g/L) = b / a

(예) $b / a = 1,313.61 \div 55.59 = 23.58 \mu$ L

(4) 아. 6)에 따라 회석배수를 반영하여 시료에 잔류하는 농약의 검출 농도값을 산출한다.

※ 분석결과 0.01 mg/kg 미만은 ‘불검출’로 한다.

9.7. 기타

9.7.1. 에틸렌디브로마이드(EDB) [$C_2H_4Br_2$]

가. 정성법

1) 표준용액 조제

표준품을 아세톤으로 1000 μ g/mL 되게 녹인 후, 적정 농도로 회석하여 사용한다.

2) 시약 및 초자

가) 시약 : 아세톤, $CaCl_2$ - 특급이상

나) 초자 : 원심분리용 conical tube(50 mL)

3) 방법

Conical tube에 분쇄시료 10 g을 칭량한다. 아세톤 30 mL을 첨가하여 진탕기를 이용하여 2~3시간 동안 진탕시킨다.(진탕기 사용이 어려울 경우, 때때로 격렬히 흔들어 주면서 방치한다) 진탕 후, $CaCl_2$ 1~2 스푼을 넣어 격렬히 흔들어 준다. $CaCl_2$ 가 다 용해되었을 경우 1스푼 정도 더 첨가하고 혼합한다. tube를 10분간 원심 분리하거나, 30분간 정치시켜 상층액으로 기기분석을 실시한다.

4) 측정조건(Gas Chromatograph)

가) 주입부 온도 : 220 $^{\circ}$ C

나) 오븐 온도 : 120 $^{\circ}$ C(1분) - 분당 3 $^{\circ}$ C상승 - 190 $^{\circ}$ C(1분)

다) 검출기 : 전자포획검출기(ECD)

(1) 온도 - 250 $^{\circ}$ C,

(2) Anode purge flow - N_2 6.0 mL/min,

(3) makeup flow - N_2 54.0 mL/min

라) Column : capillary HP-FFAP (30 m $\times$ 0.53 mm, 1.0 μ m)

마) Carrier gas : N_2 - 6.0 mL/min

바) 주입량 : 1 μ L

나. 정량법

1) 시약의 조제

가) 에틸렌디브로마이드 표준액

에틸렌디브로마이드 0.1 g을 정확히 칭량하여 100 mL의 메스플라스크에 넣는다. 아세톤을 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 에틸렌디브로마이드표준원액으로 조제한다. (이액 1 mL는 에틸렌디브로마이드 1 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 헥산으로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.1, 0.2 µg을 함유하는 각 에틸렌디브로마이드표준액을 조제한다.

가) 규산마그네슘

합성규산마그네슘[입경 149~250 µm (100~60mesh) : 플로리실 PR. 미국의 Floridin제]

2) 방법

가) 추출

시료 50 g을 칭량하여 1 L의 Dean-Stark 증류장치용 플라스크에 넣는다. 증류수 400 mL, 헥산 15 mL 및 실리콘유 1방울을 가한 후, 플라스크를 증류장치에 연결하고, 맨틀히터로 1시간 가열하여 추출한다. 방냉한 후, 증류장치의 트랩내의 물을 제거하고, 헥산층을 No. 2S 분액여과지(동양여과지)로 20 mL의 메스플라스크에 여과한다. 여과지를 소량의 헥산으로 세정하고, 헥산을 표선까지 가하여, 컬럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

나) 컬럼크로마토그래피

규산마그네슘 2 g을 컬럼관(내경 10 mm)에 건식 충전하고, 정제용 컬럼을 조제한다. 시료용액을 컬럼에 넣은 다음, 처음의 유출액 5 mL를 버리고, 유출액을 가스크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

3) 측정조건(Gas chromatograph)

가) 검출기 : 전자포획검출기

나) 컬럼용관 : 글라스제 내경 3 mm, 길이 2m

다) 컬럼충진제 : FFAP(10%)/가스크롬 Q[입경 177~200 µm(80~60mesh)]

라) 캐리어가스 : N₂ 40 mL/min

마) 컬럼조온도 : 80℃

바)시료도입부온도 : 150℃

사)검출기온도 : 250℃

4) 계산

측정된 크로마토그램의 피크면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 에틸렌디브로마이드량을 산출한다.

9.7.2. 치아벤다졸(Thiabendazole) [C₁₀H₇N₃S]

가. 시약의 조제

1) 치아벤다졸 표준액 : 치아벤다졸 20 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣고 메탄올을 가하여 용해하고 동용매를 표선까지 가하여 표준원액조제(이액 1 mL는 치아벤다졸 0.2 mg 함유) 사용할 때 표준원액을 메탄올로 희석하여 1 mL중 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 µg 함유되게 조제하여 사용한다.

2) Ethyl Acetate : 시약특급

3) Sodium Acetate 완충액 : Sodium Acetate anhyd. (CH₃COONa) 33 g을 증류수에 1 L에 녹인후 염산으로 pH 4.5로 조정하고 NaCl 150 g을 가하여 녹인다.

4) 5N NaOH용액 : 가성 소다 200 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

5) 0.1N HCl 용액 : 농염산 (비중 1.18) 8.7 mL를 증류수로 희석하여 1 L로 한다.

6) Dichloromethane : 시약특급

7) Methanol : HPLC용

8) 0.01M KH₂PO₄ 용액

나. 추출

시료 50 g을 300 mL 삼각플라스크에 정확히 취하고 Ethyl Acetate 100 mL와 Sodium

Acetate 완충액 50 mL를 가하여 진탕기 250rpm에서 1시간 진탕 추출후 Bell-Jar에 Buchner funnel을 연결하여 No. 6 여과지를 깔고 그 위에 Hyflo Super Cel 1 spoon으로 덮은 후 300 mL 삼각플라스크에 흡인여과하고 Ethyl Acetate로 삼각플라스크와 깔대기의 잔사를 씻어준다.

분액 깔대기에 시료액을 넣고, 5 N-NaOH 10 mL를 가하고 1분간 진탕 후 물층(하층)은 버리고 Ethyl Acetate층은 증류수 100 mL를 가하여 진탕하고 하층을 버린 다음 0.1 N-HCl 50 mL로 2회 추출한다.

0.1 N HCl층을 Dichloromethane 50 mL로 씻어주고 5 N-NaOH용액으로 pH 8 이상 조절한 다음 Ethyl Acetate 50 mL로 2회 추출한 후 Ethyl Acetate층을 Na₂SO₄로 탈수한 후 회전식증발기에서 증발 건조한 후 Methanol 4 mL로 용해하여 검액으로 한다.

다. 측정(예)

- 1) 측정기기 : HPLC
- 2) Column : C18 NOVA-PAK 또는 이와 동등한 것(4.6 mm×15 cm)
- 3) Mobile phase : 0.136% KH₂PO₄ : Methanol(4:6)
※ H₃PO₄로 pH 2.5 조정
- 4) Detector : Fluorescence Detector
 - 가) Excitation Filter 300 nm
 - 나) Emission Filter 355 nm
- 5) Flow rate : 1.0 mL/min

라. 계산

측정된 크로마토그램의 면적을 구하여 검량선을 작성하고 시료중의 치아벤다졸의 함량을 산출한다.

9.7.3. 프로피코나졸(Propiconazole) [C₁₅H₁₇C₁₂N₃O₂]

가. 표준용액의 제조

프로피코나졸을 헥산에 녹여 100 mg/L이 되게 하고, 표준원액을 각각 헥산에 녹여 적당한 농도로 혼합, 희석한다.

나. 시약

- 1) 용매 : 잔류농약 시험용
- 2) 물 : 증류수 또는 이와 동등한 물
- 3) 기타시약 : 잔류농약 시험용 또는 특급

다. 방법

1) 추출

균질화한 시료 10 g을 달아 물 20 mL를 넣고 2시간 방치한다. 이를 균질기에 넣고 아세톤 100 mL를 넣어 3분간 균질화한 후 여과보조제를 깔은 흡인여과기로 여과한다. 잔류물은 균질기에 다시 넣고 아세톤 100 mL를 넣고 3분간 균질화한 후 위와같이 되풀이하여 여과한다. 여액을 합쳐 40℃ 이하의 수욕상에서 감압하에 50 mL로 농축한다. 위의 농축액에 인산 1 mL 및 5% 초산아연용액 100 mL를 넣고 때때로 흔들어 섞으면서 15분간 방치한 후 여과보조제를 깔은 흡인여과기로 여과하고 여지상의 잔류물을 물 10 mL로 씻고 여과한다.

2) 분배

여액을 합쳐 1N 수산화나트륨 10 g 및 디클로로메탄 100 mL를 넣고 진탕기로 5분간 심하게 흔들어 섞은 후 정지하여 디클로로메탄층을 삼각플라스크에 취한다. 물층에 디클로로메탄 100 mL를 넣어 위와 같이 되풀이하여 디클로로메탄층을 위의 삼각플라스크에 합친다. 이에 적당량의 무수황산나트륨을 넣고 때때로 흔들어 섞으면서 1시간 방치한 후 여과한다. 다시 디클로로메탄 40 mL로 삼각플라스크를 씻고 이 씻은 액으로 여지상의 잔류물을 씻고 여과한다. 여액을 합쳐 40℃ 이하의 수욕상에서 감압하에 날려보낸다. 잔사를 에틸아세테이트에 녹여

정확히 5 mL로 하여 시험용액으로 한다.

라. 측정조건

캐필러리 칼럼 : 0.25 mm의 안지름을 가지는 30 m의 모세관 유리 칼럼에 50% Phenyl 50% Methyl siloxane을 0.25 μ m의 두께로 화학결합 또는 Cross-link 코팅한 것 또는 이와 동등한 것(4. 식품중 잔류농약 분석법, 4.1.2.1의 6) 시험조작중 「사용이 가능한 동등한 칼럼」 참조)

- 1) 주입부 및 검출기온도 : 모두 280℃
- 2) 칼럼오븐온도 : 60℃에서 2분간 유지하고 10℃/분으로 온도를 상승시켜 270℃에서 7분간 유지한다.
- 3) 캐리어가스 및 유량 : 헬륨(트리아디메놀이 약 22분에서 유출하는 유속으로 조정하고 공기 및 수소의 유량을 최적조건으로 조정한다)
- 4) 검량선의 작성 : 표준용액을 농도별로 일정량 취하여 기체크로마토그래프에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

마. 정성시험

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

바. 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 결과에 의해 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

사. 질량분석법에 의한 확인시험

정성시험과 똑같은 조건으로 기체크로마토그래피 질량분석을 하였을 때 시험결과는 표준품과 일치하여야 한다. 또한 필요하면 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

9.7.4. 에토펜프록스(Etofenprox) [C₂₅H₂₈O₃]

가. 표준용액의 조제

에토펜프록스를 헥산에 녹여 100 mg/kg이 되게 하고, 표준원액 1 mL를 취하여 플라스크에 넣고 실온에서 질소를 통과하면서 증발건고 시킨 후 시험용액의 조제 방법 중 유도체화에 따라 실험하고 헥산으로 적절한 농도로 희석하여 사용한다.

나. 시약 및 시액

- 1) 용매 : 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물 : 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 다공성 Chromosorb 칼럼 : SPE용 또는 이와 동등한 것
- 4) 실리카 카트리지 : SPE용 또는 이와 동등한 것
- 5) 후로리실 카트리지 : SPE용 또는 이와 동등한 것
- 6) 유도체화 시약 : idotrimethylsilane(ITMS)
- 7) 기타 시약 : 잔류농약 시험용 또는 특급

다. 방법

1) 추출

시료를 잘게 썰거나 갈은 후 20 g을 달아 용기에 넣고 아세톤 100 mL를 넣어 5분간 고속으로 균질화하고 이를 부호너깅때기로 감압여과한다. 그 잔사를 아세톤 50 mL로 씻고 씻은 액은 위의 여액에 합하여 40℃이하의 수욕중에서 감압농축하여 용매를 대부분 날려 버리고 잔류물에 물을 넣어 15 mL로 한다. 이를 다공성 Chromosorb 칼럼에 넣고 10분간 방치후 헥산 40 mL로 용출하고 용출액은 40℃이하의 수욕중에서 감압농축하여 헥산 3 mL로 용해한다.

2) 정제(1차)

미리 헥산 5 mL를 유출시켜 활성화한 실리카 카트리지에 위의 헥산 3 mL를 넣고 유출하여 유출액은 버리고 이어서 아세톤 : 헥산(5 : 95) 혼합액 8 mL로 용출하고 용출액을 질소가스 또는 공기를 사용하여 용매를 완전히 날려 버리고 잔류물을 클로로포름 1 mL에 녹인다.

3) 유도체화

위의 클로로포름 1 mL에 iodotrimethylsilane(ITMS) 0.1 mL를 넣어 90분간 실온에서 방치 후 0.03% 티오황산나트륨용액 30 mL를 넣고 분액깔때기로 옮겨 잘 흔들어 섞는다. 이에 hexan 50 mL를 넣어 3분간 심하게 흔들어 섞은 후 방치하여 층을 분리하여 hexan층을 감압 농축기용 플라스크에 옮긴다. 다시 물층에 hexan 30 mL를 넣어 위와 같이 되풀이한 후 hexan층을 위의 플라스크에 합하여 무수황산나트륨으로 탈수, 여과한 후 40℃ 이하의 수욕중에서 감압 농축하여 3 mL로 한다.

4) 정제(2차)

위의 hexan 3 mL를 미리 hexan 5 mL로 활성화한 후로리실 카트리지에 넣고 유출하여 버리고 다시 hexan 3 mL씩으로 2회 유출시킨 후 이어서 에틸에테르 : hexan(2 : 98) 혼합액 10 mL로 용출하고 용출액을 질소가스 또는 공기를 사용하여 용매를 날려 버리고 잔류물을 hexan 일정량에 녹여 시험용액으로 한다.

라. 시험조작

1) 기체크로마토그래프의 측정조건

가) 충전칼럼

(1) 고정상담체 : 기체크로마토그래프용 크로모솔브 W(AW-DMCS), 크로모솔브 G(AW-DMCS) 및 가스크롬 Q 또는 이와 동등한 것

(2) 고정상액체 : 기체크로마토그래프용 5% OV-17(50% 페닐메틸실리콘)

나) 칼럼 : 안지름 2.6 mm, 길이 1 m의 유리관 또는 위와 동등한 캐필러리 칼럼

다) 주입구 및 검출기의 온도 : 280℃

라) 칼럼온도 : 240℃(항온, 필요에 따라 적절히 조절한다)

마) 캐리어가스 및 유량 : 질소를 적절하게 조절한다.

바) 검량선의 작성 : 표준용액을 농도별로 일정량 취하여 기체크로마토그래프에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

마. 정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램 상의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액피크의 머무름시간과 일치하여야 한다.

바. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

9.7.5. 포레이트(Phorate)

가. 표준용액의 조제

포레이트[phorate 모화합물, phorate의 oxygen analog(phoratoxon, phoratoxon sulfoxide, phoratoxon sulfone), phorate sulfoxide, phorate sulfone]를 아세토니트릴에 녹여 100 mg/kg이 되게 하고, 표준원액을 적절한 농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

나. 시약 및 시액

1) 용매 : 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것

2) 물 : 증류수 또는 이와 동등한 것

3) 기타 시약 : 잔류농약 시험용 또는 특급

다. 방법

1) 추출

벧짚 시료를 균질화한 후 10 g을 정확히 칭량하여 50 mL 원심분리관에 넣고 아세토니트릴 20 mL를 넣은 후 shaker에서 1분간 진탕한다. 여기에 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g trisodiumcitrate dihydrate를 첨가한 후 다시 1분간 강하게 진탕한다. 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm으로 5분간 원심분리한다. 여과액 500 µL에 메탄올 500 µL를 넣고 vortexing

하여 기기분석을 실시한다.

라. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 질량분석기(LC-MS/MS)의 측정조건

가) 칼럼 : C18 (2 × 100 mm, 3 μm)

나) 칼럼온도 : 40℃

다) 주입량 : 2 μL

라) 검량선의 작성 : 표준용액을 농도별로 일정량 취하여 액체크로마토그래프 질량분석기 (LC-MS/MS)에 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

마) 이동상 : A - 5 mM ammonium formate, 0.1% in Water

B - 5 mM ammonium formate, 0.1% in 90% Acetonitrile

Time	유속(mL/min)	A (%)	B (%)
Intial	0.4	90	10
0.5	0.4	90	10
6.0	0.4	10	90
8.0	0.4	10	90
15.0	0.4	90	10

마. 정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램 상의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액피크의 머무름시간과 일치하여야 한다.

바. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

9.7.6. 피레트린 등 8종(2,4-D, bentazone, dicamba, MCPA, phosmet, pyrethrins I, pyrethrins II, cinerins I, cinerins II, jasmolins I, jasmolins II, prothioconazole, spinosyn A, spinosyn D) 다성분 분석법

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석대상 성분

이사-디(2,4-D), 벤타존(Bentazone), 디캄바(Dicamba), 엠시피에이(MCPA), 포스멧(Phosmet), 피레트린(Pyrethrins I, II, Cinerins I, II, Jasmolins I, II), 프로티오코나졸(Prothioconazole), 스피노사드(spinosyn A, spinosyn D)

다. 분석원리

균질화한 시료를 1% 포름산 함유 아세토니트릴로 추출하여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

라. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

마. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 4) 혼합표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.

5) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

바. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 2 g의 균질화된 시료를 50 mL 용량의 원심분리관에 칭량하고, 물 10 mL를 넣은 후 1시간 동안 방치한다.
- 2) 1% 포름산 함유 아세트니트릴 10 mL를 넣은 뒤 1분동안 강하게 진탕한다.
- 3) 원심분리관에 무수황산나트륨 4.0 g, 염화나트륨 1.0 g, 구연산이나트륨·1.5수화물 0.5 g, 구연산삼나트륨·2수화물 1 g을 넣고 1분간 강하게 진탕한 후, 4,000 G에서 5분간 원심분리한다.
- 4) 아세트니트릴층 100 µL를, 완충용액 600 µL, 아세트니트릴 300 µL에 희석한 후 멤브레인 필터(0.2 µm)로 여과하여 시험용액으로 사용한다.
- 5) 정량 분석용 매질보정 검량법(matrix matched calibration)에 따른 농도별 표준물질과 시료액은 아래의 예를 참고하여 만든다.

※ 무농약 시료추출액: 시료구와 동일한 품목이면서 농약성분이 검출되지 아니한 시료를 ‘바.’에 따라 추출 및 정제한다

○ LC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질						시료액
	수준 1	수준 2	수준 3	수준 4	수준 5	수준 6	
목표농도	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	
조제방법	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 300 µL
	STD 10 µg/L 100 µL	STD 50 µg/L 100 µL	STD 100 µg/L 100 µL	STD 200 µg/L 100 µL	STD 500 µg/L 100 µL	STD 1000 µg/L 100 µL	
	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	무농약 시료추출액 100 µL	시료추출액 100 µL

※ 완충용액 : 포름산암모늄 100 mM을 함유한 물(포름산 용액을 이용하여 pH 4~4.5로 맞춤)

사. 시험조작

- 1) 액체크로마토그래프·질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건
 - 가) 컬럼: C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.7 µm) 또는 이와 동등한 것
 - 나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구배
 - A 이동상: 0.1% 포름산과 5 mM 포름산암모늄 함유한 물
 - B 이동상: 0.1% 포름산과 5 mM 포름산암모늄 함유한 메탄올
 - 다) 농도구배조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	65	35
2.0	65	35
5.0	10	90
6.0	10	90
7.0	0	100
9.0	0	100
9.01	65	35
10.0	65	35

라) 이동상 유속: 0.3 mL/분

마) 컬럼 온도: 40℃

바) 주입량: 10 µL

사) 이온화 방식: Electrospray ionization(positive, negative)

○ LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
1	이사-디 (2,4-D)	-	5.7	221.0	218	161	12
						125	25
					220	163	15
2	벤타존 (Bentazone)	-	5.1	240.2	239	132	25
						197	19
						175	18
3	디캄바 (Dicamba)	-	4.9	221.0	218	175	7
						145	10
					221	177	7
4	엠시피에이 (MCPA)	-	5.8	200.6	199	141	14
					201	143	15
5	포스멧 (Phosmet)	+	5.6	317.3	317	160	-29
						133	-28
						77	-10
6	피레트린 (Pyrethrin-Cinerin I)	+	7.7	316.4	317	107	-24
						149	-26
7	피레트린 (Pyrethrin-Cinerin II)	+	6.8	360.4	361	107	-29
						149	-26
8	피레트린 (Pyrethrin-Jasmolin I)	+	8.1	330.5	331	163	-26
						107	-16
9	피레트린 (Pyrethrin-Jasmolin II)	+	7.1	374.5	375	163	-29
						107	-28
10	피레트린 (Pyrethrin-pyrethrin I)	+	7.8	328.4	329	161	-27
						133	-29

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
11	피레트린 (Pyrethrin-pyrethrin II)	+	6.8	372.5	373	161	-29
						133	-27
12	프로티오코나졸 (Prothioconazole)	+	6.6	344.2	344	326	-30
						125	-26
13	스피노신 A (Spinosyn A)	+	6.2	732.0	732	142	-20
						98	-20
						99	-20
14	스피노신 D (Spinosyn D)	+	6.3	746.0	746	142	-20
						98	-20
						145	-20

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 정량한계

번호	분석성분 (Compound)	정량한계(mg/kg)
1	이사-디(2,4-D)	0.2
2	벤타존(Bentazone)	0.2
3	디캄바(Dicamba)	0.2
4	엠시피에이(MCPA)	0.2
5	포스멧(Phosmet)	0.025
6	피레트린(Pyrethrins)	0.05
7	프로티오코나졸(Prothioconazole)	2.0
8	스피노사드(Spinosad)	0.05

아. 정성 및 정량시험

1) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하 인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

2) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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

3) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

- 4) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

9.7.7. 글리포세이트(Glyphosate), 설폰세이트(Sulfosate)

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석원리

균질화한 시료를 포름산이 함유된 메탄올로 추출하여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 4) 혼합표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 5) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 2 g의 균질화된 시료를 50 mL 용량의 원심분리관에 칭량하고, 물 10 mL를 넣은 후 1시간 동안 방치한다.
- 2) 1% 포름산 함유 메탄올 10 mL을 넣은 뒤 15분동안 강하게 진탕한다.
- 3) 4,000 G에서 5분간 원심분리 하고 상등액 1mL를 취하여 멤브레인 필터(0.2 µm)로 여과한 후 시험용액으로 사용한다.

※ Glyphosate, Sulfosate는 유리에 흡착하는 성질이 있으므로 모든 시험과정은 폴리프로필렌으로 된 용기를 사용한다.

- 4) 정량 분석용 매질보정 검량법(matrix matched calibration)에 따른 농도별 표준물질과 시료액은 아래의 예를 참고하여 만든다.

※ 무농약 시료추출액: 시료구와 동일한 품목이면서 농약성분이 검출되지 아니한 시료를 ‘마.’에 따라 추출 및 정제한다

○ LC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질					시료액
	수준 1	수준 2	수준 3	수준 4	수준 5	
목적농도	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	
조제방법	STD 100 µg/L 50 µL	STD 200 µg/L 50 µL	STD 500 µg/L 50 µL	STD 1000 µg/L 50 µL	STD 2000 µg/L 50 µL	시료추출액 1000 µL
	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 · 질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건

가) 컬럼: Waters, Anionic polar pesticide (2.1 mm × 100 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구배

- A 이동상: 0.9% 포름산 함유한 물
- B 이동상: 0.9% 포름산 함유한 아세트니트릴

다) 농도구배조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.01	10	90
4.0	85	15
13.0	85	15
18.5	10	90
20.0	10	90

라) 이동상 유속: 0.5 mL/분

마) 컬럼 온도: 40℃

바) 주입량: 50 µL

사) 이온화 방식: Electrospray ionization(positive, negative)

○ LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
1	글리포세이트 (Glyphosate)	-	5.0	169.0	168	63	26
						78	36
2	설포세이트 (Sulfosate)	+	0.4	245.2	77	62	-18
						47	-27
						45	-45

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 정량한계

0.2 mg/kg

사. 정성 및 정량시험

1) 검량선 작성

- 가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.
- 나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

2) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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

3) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

- 4) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

9.7.8. 다이콧(Diquat), 패러콧(Paraquat)

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석원리

균질화한 시료를 포름산이 함유된 메탄올로 추출하고 C18로 정제하여 액체크로마토그래프-질량 분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 4) 혼합표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 5) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 2 g의 균질화된 시료를 50 mL 용량의 원심분리관에 칭량하고, 물 10 mL를 넣은 후 1시간 동안 방치한다.
- 2) 1% 포름산 함유 메탄올 10 mL을 넣은 뒤 15분동안 강하게 진탕한다.
- 3) 4,000 G에서 5분간 원심분리 하고 상층액 1 mL를 취하여 멤브레인 필터(0.2 μ m)로 여과한

후 시험용액으로 사용한다.

- 4) 지방성 시료의 경우 시료추출액 1 mL를 C18 50 mg이 담긴 2 mL 원심분리관에 넣고 1분간 진탕 후 4,000 G로 5분간 원심분리하여 시험액으로 사용한다.

※ Diquat, paraquat는 유리에 흡착하는 성질이 있으므로 모든 시험과정은 폴리프로필렌으로 된 용기를 사용한다.

- 5) 정량 분석용 매질보정 검량법(matrix matched calibration)에 따른 농도별 표준물질과 시료액은 아래의 예를 참고하여 만든다.

※ 무농약 시료추출액: 시료구와 동일한 품목이면서 농약성분이 검출되지 아니한 시료를 ‘마.’에 따라 추출 및 정제한다

○ LC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질					시료액
	수준 1	수준 2	수준 3	수준 4	수준 5	
목적농도	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	
조제방법	STD 100 µg/L 50 µL	STD 200 µg/L 50 µL	STD 500 µg/L 50 µL	STD 1000 µg/L 50 µL	STD 2000 µg/L 50 µL	시료추출액 1000 µL
	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	

바. 시험조작

- 1) 액체크로마토그래프·질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건

가) 컬럼: HILIC (2.1 mm × 100 mm, 2.6 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구매

- A 이동상: 20 mM 포름산암모늄 함유한 물 (포름산으로 pH 3으로 조정)
- B 이동상: 아세트니트릴

다) 농도구매조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.01	20	80
4.0	80	20
4.1	80	20
12.0	80	20
12.1	20	80
20.0	20	80

라) 이동상 유속: 0.3 mL/분

마) 컬럼 온도: 40℃

바) 주입량: 10 µL

사) 이온화 방식: Electrospray ionization(positive)

○ LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
1	다이콧 (Diquat)	+	2.9	184.2	184	128	-40
						156	-23
						155	-32

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
2	패러콧 (Paraquat)	+	3.0	186.2	186	171	-21
						77	-46
						155	-40

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 정량한계

0.01 mg/kg

사. 정성 및 정량시험

1) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

2) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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
$> 20, \leq 50$	± 25
$> 10, \leq 20$	± 30

3) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

4) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

9.7.9. 디티오카바메이트계 농약(Dithiocarbamates)

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석대상 성분

프로피네브(Propineb), 만코제브(mancozeb), 티람(thiram)

다. 분석원리

균질화한 시료를 L-cysteine과 EDTA를 이용하여 추출하고, dimethyl sulfate로 methylation을 진행한 뒤 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

라. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

마. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 4) 혼합표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 5) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

바. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 균질화된 시료 5 g을 정밀히 달아 50 mL 원심분리관에 넣는다.
- 2) 여기에 L-cysteine 0.1 g을 첨가하고, 0.25 M EDTA(0.45M NaOH pH 9.5~9.6) 용액 10 mL를 첨가한다.
- 3) 아세트니트릴 10 mL를 첨가하고, dimethyl sulfate 47.4 μ L 첨가 후 15분간 진탕한다.
- 4) 위 용액에 무수황산마그네슘 4 g, 염화나트륨 1 g을 넣고 10분간 진탕한다.
- 5) 4,000 G에서 5분간 원심분리 하고 상등액 1 mL를 취하여 멤브레인 필터(0.2 μ m)로 여과한 후 시험용액으로 사용한다.

사. 시험조작

- 1) 액체크로마토그래프·질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건
 - 가) 컬럼: C18 (2.1 mm $\times$ 150 mm, 2.7 μ m) 또는 이와 동등한 것
 - 나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구배
 - A 이동상: 5mM 포름산암모늄, 0.1% 포름산 함유한 물
 - B 이동상: 아세트니트릴
 - 다) 농도구배조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.01	60	40
0.5	60	40
4	52	48
4.5	20	80
6.5	60	40
6.7	60	40
10	60	40

라) 이동상 유속: 0.3 mL/분

마) 컬럼 온도: 40℃

바) 주입량: 10 μ L

사) 이온화 방식: Electrospray ionization(positive)

○ LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
1	만코제브 (Mancozeb, EBMe)	+	3.6	239.9	241	134	-15
						117	-15
						193	-15
2	티람 (Thiram, DDMe)	+	3.6	135.0	136	88	-15

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
3	프로피네브 (Propineb, PBMe)	+	3.8	254.0	255	131	-10
						148	-10
						159	-10

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 정량한계

0.5 mg/kg

아. 정성 및 정량시험

1) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

2) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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

3) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

4) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

9.7.10. 캡탄(Captan)

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석원리

균질화한 시료를 아세토니트릴로 추출하고 d-SPE(dispersive-Solid Phase Extraction)로 정제하

여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 4) 혼합표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 5) d-SPE : 무수황산마그네슘(MgSO₄, anhydrous magnesium sulfate), 1차 2차 아민(PSA, Primary Secondary Amine)
- 6) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 2 g의 균질화된 시료를 50 mL 용량의 원심분리관에 칭량하고, 물 10 mL를 넣은 후 1시간 동안 방치한다.
- 2) 1% 포름산 함유 아세토니트릴 10 mL을 넣은 뒤 2분동안 강하게 진탕한다.
- 3) 원심분리관에 무수황산마그네슘 4 g과 염화나트륨 1 g, 구연산이나트륨·1.5수화물 0.5 g, 구연산삼나트륨·2수화물 1 g을 넣고 1분간 강하게 흔들여 섞은 다음 4,000 G에서 5분간 원심분리 하여 상층액 1mL를 취한다.
- 4) 무수황산마그네슘 150 mg과 1차 2차 아민 25 mg이 미리 담겨져 있는 2 mL 원심분리관에 ‘3)’으로부터 얻은 상층액 1 mL를 넣고 1분간 강하게 흔들여 섞은 다음 이를 원심분리한 후 상층액을 멤브레인 필터(0.2 μm)로 여과한 후 시험용액으로 한다.
- 5) 정량 분석용 매질보정 검량법(matrix matched calibration)에 따른 농도별 표준물질과 시료액은 아래의 예를 참고하여 만든다.

※ 무농약 시료추출액: 시료구와 동일한 품목이면서 농약성분이 검출되지 아니한 시료를 ‘마.’에 따라 추출 및 정제한다

○ GC-MS/MS용 매질보정 검량법(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질					시료액
	1	2	3	4	5	
목적농도	10 μg/L	50 μg/L	100 μg/L	200 μg/L	500 μg/L	
조제방법	AP 혼합액 20 μL	AP 혼합액 20 μL	AP 혼합액 20 μL	AP 혼합액 20 μL	AP 혼합액 20 μL	AP 20 μL
	내부표준물질 100 μg/L 50 μL	내부표준물질 100 μg/L 50 μL	내부표준물질 100 μg/L 50 μL	내부표준물질 100 μg/L 50 μL	내부표준물질 100 μg/L 50 μL	Acetonitrile 75 μL
	STD 200 μg/L 25 μL	STD 1,000 μg/L 25 μL	STD 2,000 μg/L 25 μL	STD 4,000 μg/L 25 μL	STD 10,000 μg/L 25 μL	
	무농약 시료추출액 405 μL	무농약 시료추출액 405 μL	무농약 시료추출액 405 μL	무농약 시료추출액 405 μL	무농약 시료추출액 405 μL	시료 추출액 405 μL

※ 완충용액 : 포름산암모늄 100 mM을 함유한 물(포름산 용액을 이용하여 pH 4~4.5로 맞춤)

바. 시험조작

- 1) 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS/MS)의 분석 조건
 - 가) 컬럼: Rxi-5Sil MS(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 주입부: Electron ionization(EI) 또는 이와 동등한 방식

다) 이동상 가스(carrier gas) 및 유속: He, 1.5 mL/분

라) 주입량: 1 µL

마) 온도: 280℃

바) Splitless mode

사) 오븐: 90℃에서 시료액을 주입하고 3분간 유지한 후 20℃/min 비율로 120℃까지 상승시키고 8℃/min 비율로 300℃까지 상승시켜 3분간 유지

아) Ion source: 250℃

○ GC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

분석성분 (Compound)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	관측질량 (Exact mass)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
캡탄 (Captan)	17.6	300.6	299	149	107	5
					79	15
TPP (내부표준물질)	21.0	326.2	326	326	325	25
					169	25

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 정량한계

1.25 mg/kg

사. 정성 및 정량시험

1) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

2) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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
$> 20, \leq 50$	± 25
$> 10, \leq 20$	± 30

3) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

- 4) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

9.7.11. 아미노피랄리드(Aminopyralid)

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석원리

균질화한 시료를 염산이 함유된 아세토니트릴로 추출하고 HLB 카트리지로 정제하여 액체크로마토그래프-질량분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 4) 표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다(무처리 시료 추출물 90% 이상 함유).
- 5) HLB 카트리지(Hydrophilic-Lipophilic Balance cartridge) : divinylbenzene-N-vinylpyrrolidone copolymer(500 mg) 고정상이 충전되어 있는 일회용 카트리지(용량 6 mL) 또는 이와 동등한 것
- 6) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 5 g의 균질화된 시료를 50 mL 용량의 원심분리관에 칭량하고, 물 5 mL를 넣은 후 10분간 방치한다.
- 2) 원심분리관에 아세토니트릴 20 mL와 5 N 수산화나트륨 용액 1 mL를 넣어 40 °C에서 20 분간 추출 및 가수분해한다.
- 3) 가수분해 후 후 추출물에 6N 염산 2 mL를 넣어 15분간 흔들어 섞고, 무수황산나트륨 6 g, 염화나트륨 1.5 g을 넣어 1분간 상하좌우로 흔들어 혼합한 후, 원심분리(4,000 G, 10분)한다.
- 4) 상층액 5 mL를 취하여 40 °C에서 질소 농축한 후 건고물을 메탄올 5 mL에 녹인다.
- 5) HLB 카트리지에 메탄올 3mL와 물 3mL를 차례로 넣어 2~3 방울/초의 속도로 유출시켜 버린다.
- 6) 고정상 상단이 노출되기 전에 '4)'로부터 얻은 메탄올에 녹인 5 mL를 카트리지 상단에 넣어 1~2방울/초의 속도로 용출하여 받고, 고정상 상단이 노출되기 전에 메탄올 5 mL를 추가로 넣어 1~2방울/초의 속도로 용출하여 앞서 받은액과 합쳐 부피를 10 mL로 맞춘다.
- 7) 정제된 용액을 40 °C에서 질소 농축한 뒤 0.5% 포름산 함유 아세토니트릴로 부피를 5 mL로 맞추고 멤브레인 필터(0.2μm)로 여과한 후 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

- 1) 액체크로마토그래프 · 질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건

가) 컬럼: C18 (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm) 또는 이와 동등한 것

- 나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구배
- A 이동상: 0.5% 포름산 함유한 물
 - B 이동상: 0.5% 포름산 함유한 아세트니트릴
- 다) 농도구배조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.01	80	20
1.0	80	20
3.0	0	100
6.0	0	100
6.1	80	20
12.0	80	20

- 라) 이동상 유속: 0.2 mL/분
- 마) 컬럼 온도: 40℃
- 바) 주입량: 5 µL
- 사) 이온화 방식: Electrospray ionization(positive)
- LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
아미노피랄리드 (Aminopyralid)	+	1.6	207.0	207	161	-21
					189	-13
					134	-27

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 정량한계

0.01 mg/kg

사. 정성 및 정량시험

1) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

2) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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

3) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

- 4) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

9.7.12. 벤선탭(Bensultap), 카탐(Cartap), 티오사이클람(Thiocyclam)

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석원리

균질화한 시료를 2% 시스테인 염산용액, 3% 염화니켈 용액 및 암모니아수를 사용하여 네레이스톡신(Nereistoxin)으로 전환시켜 핵산 및 아세트니트릴로 추출한 후 액체크로마토그래프-질량 분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

라. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 네레이스톡신(Nereistoxin oxalate) 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 4) 표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다. 단, 벤선탭은 환산계수 2.9[벤선탭의 분자량(432)/네레이스톡신(Nereistoxin) 분자량(149)], 카탐은 환산계수 1.6[카탐의 분자량(237)/네레이스톡신(Nereistoxin) 분자량(149)], 티오사이클람은 환산계수 1.2[티오사이클람의 분자량(181)/네레이스톡신(Nereistoxin) 분자량(149)]을 곱하여 환산한다.
- 5) 2% 시스테인(Cysteine) 용액 : 무수염산시스테인(L-cysteine-HCl, anhydrous) 20 g을 0.02 N 염산 용액 950 mL에 녹인 후 10 N 수산화나트륨 용액을 넣어 pH 4로 맞춘 다음 0.02 N 염산 용액을 넣어 1,000 mL가 되게 한다.
- 6) 3% 염화니켈(nickel chloride) 용액 : 염화니켈 3 g을 물에 녹여 100 mL가 되게 한다.
- 7) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

마. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 5 g의 균질화된 시료를 50 mL 용량의 원심분리관에 칭량하고, 2% 시스테인 용액 40 mL를 넣고 30분간 흔들어 섞어 추출한다. (단, 추출액의 pH가 4~5 범위를 벗어날 경우, 2 N 염산으로 조절한 후 30분간 다시 흔들어 섞어 추출한다.)
- 2) 3,500 G에서 10분간 원심분리한 후 상층액 20 mL를 별도의 50 mL 원심분리관에 취한다. 여기에 3 % 염화니켈 용액과 진한 암모니아수를 각각 1.5 mL씩 첨가한 다음 5분간 흔들어 섞은 후 70 °C에서 1시간 동안 흔들어 섞어 반응시킨다.
- 3) 반응이 끝난 추출액을 냉각시킨 다음 10 N 황산 용액을 넣으면서 pH 5로 맞춘 후 핵산 10 mL를 넣어 흔들어 섞은 뒤, 원심분리(3,500 G, 10분)하여 상층액을 버린 다음 10 N 수산화나트륨 용액을 넣으면서 pH 9로 맞춘다.
- 4) 여기에 염화나트륨 6 g과 아세트니트릴 20 mL를 가한 후 흔들어 섞고, 다시 원심분리

(3,500 G, 10분) 후, 상층액(아세트니트릴 층)을 멤브레인 필터(0.45 µm)로 여과한 후 시험 용액으로 한다.

○ LC-MS/MS용 매트릭스보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질					시료액
	수준 1	수준 2	수준 3	수준 4	수준 5	
목적농도	2.5 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	
조제방법	STD 50 µg/L 50 µL	STD 100 µg/L 50 µL	STD 200 µg/L 50 µL	STD 500 µg/L 50 µL	STD 1000 µg/L 50 µL	시료추출액 1000 µL
	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	무농약 시료추출액 950 µL	

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프·질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건

가) 컬럼: HILIC(2.1 mm × 100 mm, 2.6 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구배

- A 이동상: 0.1% 포름산 함유한 물

- B 이동상: 0.1% 포름산 함유한 아세트니트릴

다) 농도구배조건

- 이동상 A와 B(90: 10)의 혼합액

라) 이동상 유속: 0.4 mL/분

마) 컬럼 온도: 40℃

바) 주입량: 10 µL

사) 이온화 방식: Electrospray ionization(positive)

○ LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
네레이스톡신 (Nereistoxin)	+	5.8	149.2	150	105	-19
					61	-26
					71	-37

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 정량한계

0.02 mg/kg

사. 정성 및 정량시험

1) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

2) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 반응

세기의 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
$> 20, \leq 50$	± 25
$> 10, \leq 20$	± 30

3) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

- 4) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용 할 수 있다.

10장. 동물용 의약품

10.1. 정성분석

가. Charm II 분석법

1) 추출용액 및 시약조제

가) 정제시약 : 정제시약은 -15°C 이하에서 저장, 6개월 정도 보관이 가능하다. 사용할 때 25°C 에서 12시간 유효하다.

나) 추출용액 : 추출용액은 buffer와 유기용매를 아래와 같이 혼합하여 만든다.

항생물질계열	buffer	용매	혼합비율
베타-락탐(β -lactam)	1% KH_2PO_4 (pH 6.0)	메탄올	1 : 1
마크로라이드(Macrolide)	1% KH_2PO_4 (pH 8.0)	메탄올	1 : 1
설향아미드(Sulfonamide)	0.1M HCl	메탄올	1 : 1
아미노글리코사이드 (Aminoglycoside)	18% NaCl or 20mM CaCl_2	H_2O	1 : 1
테트라사이클린 (Tetracycline)	0.1M HCl	메탄올	1 : 1

다) Buffer M : Dried buffer는 4°C 에서 저장하며 라벨에 표시된 대로 40°C 의 물 100 mL를 넣어 덩어리지지 않도록 녹인다. 사용 전에 4°C 로 냉장시킨다. buffer는 얼음 또는 4°C 로 유지하면 3일간 유효하며 -15°C 로 냉동시키면 3주간 저장할 수 있다.

라) MSU Multi-antimicrobial Standard (stock) : Dried standard는 4°C 에서 저장한다. 10 mL의 증류수를 넣고 잘 혼합하여 15분간 정치시킨 후 사용하고 얼음 또는 4°C 에서 24시간 이내에 사용하여야 한다.

2) 표준용액 조제

가) Negative Control standard(음성대조) : 임의 조제한 무첨가 사료추출액으로 한다. 음성 대조시료액은 3개 준비한다.

나) Positive Control standard(양성대조)

Multi-antimicrobial standard를 지시된 대로 복원시킨 후 적당한 농도로 희석한다. 임의 조제한 무첨가 사료에 첨가하여 추출한 시료액을 사용한다. 이 과정을 6회 반복하여 양성대조 시료액 6개를 준비한다.

3) 추출방법

가) 위에서 지시된 대로 추출용액을 조제한다.

나) 시료를 고운 가루에 가깝게 갈아준 뒤 10g을 칭량하여 50 mL conical tube에 넣는다.

다) 추출용액 20 mL를 가하고 뚜껑을 씌워 잘 흔들어 준 후 15분간 sonication시켜 추출한다.

라) 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 No 5A 여과지로 여과한다.

마) 여액을 Charm test로 분석한다.

4) 각 계열별 분석방법

계 열	분 석 법
① 베타-락탐 (β -lactam)	공시험관에 green시약 첨가→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→5 mL buffer M첨가→시료추출액 200 μ L첨가, 10초간 혼합→55℃ 2분간 반응→yellow시약 첨가, 10초간 혼합→55℃ 2분간 반응→3분간 원심분리→상층액 제거→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→측정액 3 mL첨가→뚜껑 덮고 10초간 혼합→측정
② 마이크로라이드 (Macrolide)	공시험관에 white시약 첨가→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→5 mL buffer M첨가→시료추출액 200 μ L첨가, 10초간 혼합→55℃ 2분간 반응→green시약 첨가, 10초간 혼합→55℃ 2분간 반응→3분간 원심분리→상층액 제거→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→측정액 3 mL첨가→뚜껑 덮고 10초간 혼합→측정
③ 설펜아미드 (Sulfonamide)	공시험관에 white시약 첨가→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→5 mL buffer M첨가→시료추출액 200 μ L첨가, 15초간 혼합→pink시약 첨가, 15초간 혼합→85℃ 3분간 반응→3분간 원심분리→상층액 제거→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→측정액 3 mL첨가→뚜껑 덮고 10초간 혼합→측정
④ 아미노글리코시드 (Aminoglycoside)	공시험관에 white시약 첨가→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→5 mL buffer M첨가→시료추출액 200 μ L첨가, 10초간 혼합→35℃ 2분간 반응→green시약 첨가, 10초간 혼합→35℃ 2분간 반응→3분간 원심분리→상층액 제거→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→측정액 3 mL첨가→뚜껑 덮고 10초간 혼합→측정
⑤ 테트라싸이클린 (Tetracycline)	공시험관에 white시약 첨가→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→5 mL buffer M첨가→시료추출액 200 μ L첨가→orange시약 첨가, 15초간 혼합→35℃ 3분간 반응→5분간 원심분리→상층액 제거→DW 300 μ L첨가, 10초간 혼합→측정액 3 mL첨가→뚜껑 덮고 10초간 혼합→측정

5) Control point와 양성의 결정 : control point는 양성과 음성을 결정하는 표준이 되는 수치이다.

가) 6개의 양성대조 시료액으로 부터 평균 CPM을 구한다.

나) 3개의 음성대조 시료액으로 부터 평균 CPM을 구한다.(이 값은 control point계산에는 영향을 주지 않으나 양성평균 CPM과 비교할 수 있다)

다) 평균양성 CPM에 15%를 더한 값이 control point이다.

라) 만일 시료의 CPM이 control point보다 높다면 그 시료는 음성이다. 시료의 CPM이 control point보다 낮거나 같을 경우는 양성으로 판정하고, 각 계열 성분을 개별 정량분석법으로 재분석한다.

나. 분석 가능한 항생물질 계열

항생물질 계열	성 분
베타-락탐(β -lactam)	페니실린(penicillin)
마크로라이드 (Macrolide)	타이로신(tylosin), 스피라마이신(spiramycin), 린코마이신(lincomycin), 에리스로마이신(erythromycin)
설펜아미드 (Sulfonamide)	설파디메톡신(sulfadimethoxine), 설파메타진(sulfamethazine), 설파퀴녹살린(sulfaquinoxaline), 설파치아졸(sulfathiazole)
아미노글리코시드(Aminoglycoside)	네오마이신(neomycin)
테트라싸이클린 (Tetracycline)	클로르테트라싸이클린(chlortetracycline) 옥시테트라싸이클린(oxytetracycline) 테트라싸이클린(tetracycline)

10.2. 정량분석

10.2.1. 베타-락탐계열

가. 페니실린 지(Penicillin G)

1) 시약

- 가) B-6 buffer : 인산2수소칼륨 (KH_2PO_4) 7.0g / 500 mL 증류수 + 인산수소나트륨 (Na_2HPO_4) 6.0g / 500 mL 증류수(pH : 6.0 ± 0.1)
- 나) STD조제 : 페니실린지(Penicillin G) 표준품을 메탄올(HPLC용)에 용해하여 사용
- 다) 이동상 조제 : 0.01M 인산2수소칼륨 : 아세토니트릴 : 메탄올 = 70 : 19 : 11, pH 7.1

2) 방법

50 mL conical tube에 사료 1~5g을 취하여 매회 메탄올 25 mL, 10 mL씩 넣고 각각 20분씩 초음파처리 한 다음 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 합한다. 상등액을 125 mL 농축용 플라스크에 옮기고 n-부틸알콜 2 mL, 에탄올 20 mL를 넣고 35~40°C 수욕조에서 농축한다. 잔여물에 B-6 완충액 10 mL를 넣고 다시 20분간 sonication한다. 0.45 μm 수용성 멤브레인 필터로 여과하여 HPLC로 측정한다.

3) HPLC 조건 (예)

- 가) Column - C18
- 나) 파장- 225 nm
- 다) 유속 - 1.0 mL/min
- 라)이동상 - 0.01M 인산2수소칼륨(KH_2PO_4) : 아세토니트릴 : 메탄올 = 70 : 19 : 11, pH 7.1

10.2.2. 테트라싸이클린 계열

클로르테트라싸이클린-염산(CTC-HCl), 옥시테트라싸이클린-염산(OTC-HCl), 옥시테트라싸이클린-4급암모늄(OTC- NH_4)

가. HPLC법

1) 방법 A

가) 시약제조

- (1) 추출용매 - 염산 : 아세톤 : 증류수 = 9 : 40 : 51
- (2) 표준액 - 2.0ppm, 4.0ppm, 6.0ppm
- (3) 이동상 - 증류수+메탄올(55+45) 1 L에 PICB-6 시약 1병을 혼합한 후 인산으로 pH를 2.5로 조정

나) 방법

사료 5 g을 갈색공전삼각플라스크에 정확히 넣는다. 추출용매 100 mL를 가한 후, 교반기로 30분간 용해시킨다. No. 5A 여과지로 여과(혹은 원심분리기 3000rpm에서 10분간 원심분리)한 후 여액을 0.45 μm 멤브레인필터로 재여과하여 기기분석용 시료액으로 한다.

다) 기기분석 예(HPLC)

- (1) Column : C18(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)
- (2) 파장 : 369 nm
- (3) 유속 : 1.0 mL/min
- (4) 이동상 : 상등

2) 방법 B

가) 시약제조

- (1) 0.01M 옥살산용액 : 옥살산 1.26 g을 물 1 L에 녹인다.
- (2) hexan, benzene : 특급 이상
- (3) 메탄올성 옥살산 용액 : 0.01M이 되게 옥살산을 메탄올에 녹인다.
- (4) 표준액 조제 : TC, OTC, CTC 표준품을 메탄올에 용해한 후 다시 메탄올로 희석해서 사용

나) 방법

주사기의 아래를 filter paper disk 2장으로 막고 탈지면으로 다시 막은 후, 분쇄시료 0.5~1.0 g을 채우고 그 위에 다시 탈지면으로 막는다. C18 sep-pak cartridge를 연결하고 C18 sep-pak cartridge의 하단부를 막는다. 상부에 hexan 10 mL를 넣고 20분간 sonication 한 후 흘러준다. benzene 10 mL를 넣고 똑같이 조작하여 용출시킨다. benzene 용출

액을 증발 농축시킨 후, 여기에 메탄올성 옥살산 용액 10 mL를 넣는다. 다시 증발 건조시켜 이동상 1 mL로 용해하여 HPLC 분석용 시료로 한다.

다) HPLC 조건예

- (1) Column - C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm)
- (2) 파장 - 360 nm
- (3) 이동상 - 0.01M 옥살산용액 : 아세토니트릴 : 메탄올 = 7 : 2 : 1

나. GC-MSD법(CTC, OTC, Penicillin G)

1) 시약

가) 0.01 M EDTA 2Na-McIlvaine buffer(pH 4.0) : 0.1 M citric acid 272.5 mL+0.2 M Na₂HPO₄ 227.5 mL를 잘 혼합하여 EDTA 73.2 g을 녹인다. 이 액을 1 L 메스실린더로 옮겨 10% 수산화나트륨이나 1 M 염산을 사용하여 pH 4.0으로 조정한 후 증류수로 1 L 눈금을 맞춘다.

나) hex산, 메탄올

다) 0.01 M 메탄올성 옥살산 : HPLC법 참조

라) 유도체 시약 : 에리스로마이신(Erythromycin), 스피라마이신(Spiramycin) 법 참조

2) 방법

가) 추출

사료 1~5g을 칭량하여 0.01M EDTA 2Na-McIlvaine buffer 20 mL를 넣고 20분간씩 초음파처리 및 흔들어주기를 반복한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 플라스크에 넣는다. 다시 10 mL를 넣고 똑같이 조작한 후 플라스크에 합하여 No.5A 여과지로 여과한다.

나) 정제

메탄올 10 mL, 물 20 mL로 conditioning 시켜 놓은 sep-pak C18 cartridge에 여액을 흘려준다. 여기에 0.01M 메탄올성 옥살산 용액 1 mL로 5회 용출시킨 후 용출액을 합해 완전히 증발 건조시킨다.

다) 유도체화

완전히 건조된 잔사에 MSHFB : TMS-Cl : TMS-imidazole(100 : 5 : 2, V : V : V) 혼합용액 50 μL를 넣고 80℃에서 15분간 가열시킨다.

3) 기기 조건(GC-MSD) (예)

가) Column : Fused silica capillary(cross-linked 5% phenylmethyl silicone, 17m×0.2 mm×0.33 μm)

나) 주입부 온도 : 280℃

다) Transfer line 온도 : 300℃

라) Ion source 온도 : 200℃

마) Injection mode : splitless

바) Carrier gas : He (0.7 mL/min)

사) Electron energy : 70eV

야) Oven 온도 : 150℃ - 20℃/min - 270℃(3min) - 5℃/min - 300℃(6min)

※ 내부표준물질은 cholesteryl isobutyrate 500ppm 100 μL를 사용

10.2.3. 설펜아미드계(Sulfonamides)

10.2.3.1. 설파메타진(Sulfamethazine), 설파디메톡신(Sulfadimethoxine), 설파퀴녹살린(Sulfaquinoxaline)

가. 시약의 조제

- 1) 표준원액 : 설파메타진, 설파디메톡신, 설파퀴녹살린 각 10.0 mg을 메스플라스크에 달아 메탄올을 넣어 100 mL로 한다.(냉장보관)
- 2) 표준원액을 이동상 용매로 희석하여 적절한 농도로 혼합, 희석한다.

- 3) n-Hexane : HPLC용
- 4) Dichloromethane : HPLC용

나. 추출

- 1) 10 mL 유리주사기속에 탈지면을 깔고 분석시료(오염방지를 위하여 유발에서 마쇄함) 0.5 g을 취한 후, 탈지면으로 시료위를 덮은 후 주사기아래에 Sep-pak C18을 끼우고 다시 Sep-pak 아래에 주사바늘을 끼우고 용액이 흐르지 않게 주사바늘을 고무마개에 끼운다.
- 2) hexan 8 mL를 가하여 초음파세척기에서 10분간 Sonication 후 hexan을 서서히 유출시키고 다시 dichloromethane 8 mL를 가하여 10분간 Sonication 후 250 mL 증발플라스크에 유출시키고 다시 dichloromethane 4 mL를 가하여 씻어주고 30~40℃ 회전식증발기에서 증발건고 후 이동상용매 5 mL를 넣고 초음파세척기에서 시료액으로 한다.

다. 측정

- 1) 측정기기 : 고속액체크로마토그래프
- 2) 칼럼 : Nova-pak C18 또는 이와 동등한 것
- 3) 칼럼 : 3.9 mm×15 cm
- 4) 이동상용매 - 아세트니트릴 : 0.1% 인산이수소칼륨 (16:84)의 혼합액을 인산용액으로 pH 3.55되게 조절한다.
- 5) 검출기파장 : 268 nm
- 6) 유 속 : 1.0 mL/min
- 7) 주입량 : 10 µL

라. 계산

측정된 크로마토그램의 피이크 높이 또는 피이크 면적을 구하고 검량선을 작성하여 계산한다.

10.2.3.2. 설파치아졸(Sulfathazole)

가. 시약의 조제

- 1) 표준원액 : 설파치아졸 10.0 mg을 메스플라스크에 달아 메탄올을 넣어 100 mL로 한다. (냉장보관)
- 2) 표준원액을 이동상 용매로 희석하여 적절한 농도로 혼합, 희석한다.
- 3) n-Hexane : HPLC용
- 4) Dichloromethane : HPLC용

나. 추출

Sulfa계열 동물의약품 동시분석법과 동일

다. 측정

- 1) 측정기기: 고속액체크로마토그래프
- 2) 칼럼 : C18 (3.9 ×150 mm)
- 3) 이동상용매 : 아세트니트릴 : 0.1% 인산2수소칼륨 (16:84)의 혼합액을 인산용액으로 pH 3.55되게 조절한다.
- 4) 검출기파장 : 287 nm
- 5) 유속 : 1.0 mL/min
- 6) 주입량 : 10 µL

라. 계산

측정된 크로마토그램의 피이크 높이 또는 피이크 면적을 구하고 검량선을 작성하여 계산한다.

10.2.4. 설펜아미드계(Sulfonamides), 니트로퓨란계(Nitrofuranes), 에토파베이트(Ethopabate) 동시분석

- 10.2.4.1. 설펜아미드계(Sulfonamides) : 설파메라진(Sulfamerazine), 설파메타진(Sulfamethazine), 설파치아졸(Sulfathiazole), 설파퀴녹살린(Sulfaquinolaxaline), 설파디메톡신(Sulfadimethoxine), 설파디아진(Sulfadiazine), 니트로퓨란(Nitrofuranes) : 퓨라졸리돈(Furazolidone), 나이

카바진(Nicarbazine)

가. 시약 조제

- 1) 0.01N 초산암모늄 조제
- 2) 산화알루미늄 - activated basic, 70~230mesh, 200g을 증류수 1 L에 교반하여 감압여과 하면서 메탄올 100 mL씩 3회 세척한 후 100℃에서 건조한다. 건조된 Al₂O₃을 증류수에 섞어서 사용한다.
- 3) 설파메타진, 설파치아졸, 설파퀴녹살린, 설파디메톡신, 에토파베이트, 설파다디아진 1000ppm이 되도록 메탄올에 녹여 적정 농도로 희석하여 사용
- 4) 설파메라진 표준품을 아세톤으로 1000ppm으로 녹여 희석하여 사용
- 5) 퓨라졸리돈, 나리카바진을 1000ppm되게 디메틸포름아미드로 녹여 적정 농도로 희석하여 사용

나. 방법

1) 추출

사료 1~5 g을 달아 아세톤 15 mL와 아세토니트릴 10 mL 넣고 20분간 초음파로 처리하는 동안 4~5회 흔들어 준다. 2500rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하고 아세톤 15 mL와 아세토니트릴 10 mL를 똑같이 조작하여 합한다. Whatman No.42 여과지로 여과한다. 이때 1-프로판올 15 mL를 더하고 아세톤 20 mL로 씻어준다. 이 액이 수욕조 45℃에서 약 15 mL정도 남을 때까지 농축한다. 잔여액에 아세톤 20 mL, hexan 30 mL, 3% NaCl 30 mL를 더하여 10분간 진탕한다. 5분간 정치 후, hexan층을 제거하고, 클로르포름 : 아세토니트릴(1:1)-용액 30 mL씩 넣어 3회 추출한 다음 수욕조 45℃에서 농축한다. 이 잔액에 아세토니트릴 2 mL를 녹인 후 정제용 시액으로 한다.

2) 정제

산화 알루미늄 column을 충전하고(1.5 cm) 95% 아세토니트릴, 클로르포름 각 20 mL로 씻어주고 시액을 흘려준다. 아세토니트릴 20 mL, 95% 아세토니트릴 20 mL, 85% 아세토니트릴 20 mL, 1% NaOH 30 mL를 순차적으로 흘려주고 합한다. 최종적으로 클로르포름 10 mL를 흘려주어 더한다. 합한 용출액에 0.8 mL 인산을 넣고 30 mL의 클로르포름으로 3회 추출하고, 디클로로메탄 30 mL로 3회 추출하여 합한다. 무수황산나트륨 5 g으로 탈수시켜 수욕조 45℃에서 농축 후, 아세토니트릴 100 µL에 녹여 HPLC 시액으로 한다.

다. HPLC 조건(예)

- 1) Column : C18(4.6 × 250 mm, 5 µm)
- 2) Column 온도 : 40℃
- 3) 유속 : 0.8 mL/min → 1.0 mL/min(15min)
- 4) 이동상 : A-0.01M 초산암모늄, 0.0005M hexan설포닉산 용액,
B-아세토니트릴
- 5) 파장 : 247 nm, 269 nm, 350 nm
- 6) 주입량 : 10 µL
- 7) Gradient : A 90% 15분 70% 20분 20%
B 10% → 30% → 80%

10.2.5. 마크로라이드 계열

10.2.5.1. 에리스로마이신(Erythromycin), 스피라마이신(Spiramycin)

가. 시약

- 1) 메탄올 : HPLC용
- 2) n-hexan : 잔류농약 분석용
- 3) 수산화나트륨(Sodiumhydroxide, NaOH),
- 4) 클로르포름 (Chloroform), 이산수소나트륨(Na₂HPO₄), 염산 - 특급
- 5) 유도체시약 : [MSHFBA:TMS-CI:TMS-imidazole(100:5:2, V:V:V)]

MSHFBA : N-Methyl-N-trimethylSilylHeptaFluoroButyrAmide - 특급

TMS - Cl(=TMCS) : TriMethylChloroSilane - 특급

TMS-imidazole(=TMSI) : TriMethylSilylImidazole - 특급

나. 방법

1) 추출

사료 1~5 g을 칭량하여 20 mL 메탄올을 첨가하여 30분간 초음파처리 혹은 진탕한다. 2500~3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 n-헥산 20 mL를 첨가한 후 잘 흔들어 정치시켜 메탄올층을 취한다. 1N-수산화나트륨 2 mL와 클로르포름 30 mL를 넣고 약 5분간 흔들어 준다. 클로르포름층을 취한 후 농축시킨 다음 다시 클로르포름 5 mL에 녹여 정제용 시액으로 한다.

2) 정제

클로르포름 30 mL를 흘려준 sep-pak silicagel column에 시료액을 흘려주고 클로르포름 + 메탄올(2+1)로 10 mL씩 3번 용출시킨다. 용출액을 농축시킨 후 0.3N 염산 15 mL를 첨가시켜 50℃에서 1시간동안 산가수분해한다. 다시 냉각시켜 5N 수산화나트륨을 가하여 염기성으로 만들고 20 mL 클로르포름으로 추출한 후, 클로르포름층을 모아 완전히 농축시킨다.

3) 유도체화

증발건조시킨 후 유도체시약 50 µL를 넣고 80℃에서 15분간 가열시킨다.

다. 기기분석 예(GC-MSD)

- 1) Column : Fused silica capillary (cross-linked 5% phenylmethyl silicone, 17m×0.2 mm×0.33 µm)
- 2) 주입부 온도 : 280℃
- 3) Transfer line 온도 : 300℃
- 4) Ion source 온도 : 200℃
- 5) Injection mode : auto sampler
- 6) Carrier gas : He(0.7 mL/min)
- 7) Electron energy : 70eV
- 8) Oven 온도 : 200℃-10℃/min-300℃(3min)

※ 내부표준물질은 cholesteryl isobutyrate m/z 368 ion을 사용

10.2.6. 폴리에틸계열

10.2.6.1. 라살로시드 나트륨

가. 시약 및 시액

- 1) 표준원액 : 상용표준 라살로시드 나트륨 10mg을 정확히 칭량하여 100 mL 메스플라스크에 넣어서 메탄올을 가해서 용해, 표선을 맞추어 라살로시드 나트륨 표준용액을 제조한다. 사용할 때 메탄올로 희석하여 사용한다.
- 2) 인산완충액 : 인산칼륨 2.72g을 물에 녹여 1L로 하고, 인산으로 pH를 3으로 조정한다.
- 3) 기타시약 : HPLC 급

나. 추출

사료 2-10 g을 측량해서 100 mL 삼각플라스크에 넣고, 메탄올 100 mL를 첨가, 진탕 추출하고, 3000rpm에서 10분간 원심분리한다. 상등액을 0.22 µm 멤브레인 필터로 여과하고 그 여과액을 시료액으로 한다.

다. 측정

- 1) 측정기기 : 고속액체크로마토그래피(Agilent 1100 series)
- 2) 검출기 : 형광검출기(FLD, 여기파장: 310 nm, 형광파장: 420 nm)
- 3) 컬럼 : C18(4.6 × 150 mm, 5 µm)
- 4) 이동상 : 메탄올-0.02M 인산완충액(pH3)=9-1
- 5) 유속 : 1.0 mL/min

6) 칼럼온도 : 40℃

10.2.6.2. 나라신, 살리노마이신, 모넨신나트륨, 샘두라마이신

가. 시약 및 시액

- 1) 표준원액 : 각각의 상용표준품 10 mg을 정확히 칭량하여 100 mL 메스플라스크에 넣어서 메탄올을 가해서 용해, 표선을 맞추어 표준용액으로 한다. 사용할 때 메탄올:증류수(9:1)로 희석하여 사용한다.
- 2) 반응액 : 황산 10 mL를 메탄올 475 mL에 저으면서 조금씩 첨가한 후, 바닐린 15 g을 첨가해 녹인다.
- 3) 기타시약 : HPLC 급

나. 추출

시료 10 g을 측량해서 100 mL 삼각플라스크에 넣고, 메탄올:증류수(9:1) 100 mL를 첨가, 20분간 진탕 추출하고, 3000rpm에서 10분간 원심분리한다. 상층액을 0.22 µm 멤브레인 필터로 여과하고 그 여과액을 시료액으로 한다.

다. 기기분석 조건(예)

- 1) 측정기기 : 고속액체크로마토그래피(Agilent 1100 series)
- 2) 포스트칼럼유도체화기(Pickering520X system)
- 3) 검출기 : 자외가시흡광광도 검출기(DAD, 520nm)
- 4) 컬럼 : C18(4.6 × 150 mm, 5 µm)
- 5) 이동상 : 메탄올-DW-초산 = 940-60-1
- 6) 반응액 : 메탄올-황산-바닐린 = 950-20-30
- 7) 반응조 온도 : 95℃
- 8) 유속 : 이동상-0.6 mL/min, 반응액-0.6 mL/min
- 9) 칼럼온도 : 40℃

10.2.7. 기타

10.2.7.1. 카바독스(Carbadox)

가. 시약

- 1) 아세트니트릴, 메탄올 : HPLC용, 헥산 : 잔류농약분석용
- 2) 무수탄산칼륨, 디메틸포름아미드 : 특급
- 3) 표준액 조제 : 100 mg 표준품을 소량 디메틸포름아미드에 녹인 후 메탄올을 가해 100 mL로 한다. 이액 적당량을 취하여 메탄올로 희석하여 사용한다.

나. 방법

시료 10 g을 취하여 아세트니트릴 100 mL를 가하여 20분간 가끔 흔들어 주면서 초음파처리한다. 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 플라스크에 상등액을 취한다. 다시 50 mL 아세트니트릴을 똑같이 조작하여 플라스크에 합한다. 여기에 무수탄산칼륨 20g을 가하여 흔들어 섞은 다음 1분간 정치 후 유리여과기(11G4)로 여과하여 분액여두에 받는다. 헥산 100 mL를 가하여 5분간 진탕한 후 정치하여 아세트니트릴층을 농축용 플라스크에 취해 수욕조 40℃에서 증발농축시킨다. 잔류물을 메탄올 2 mL에 녹여 0.45 µm 멤브레인필터로 여과 후 HPLC 시액으로 한다.

다. HPLC 조건 (예)

- 1) Column : Nucleosil 10 C18(4.6 × 250 mm) 혹은 이와 동등한 것
- 2) 이동상 : [메탄올 : 물(50 : 50)]
- 3) 파장: 380 nm
- 4) 유속 : 1.0 mL/min

10.2.7.2. 암프로리움 (Amprolium)

가. 흡광광도법

1) 시약의 조제

가) 추출용매 : 메탄올+증류수(2+1)

나) 암프로리움표준액 : 암프로리움 25 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 추출용매를 가하여 용해하고 동용매를 표선까지 가하여 암프로리움 표준용액을 조제한다.(이 액 1 mL는 암프로리움 0.25 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 추출용매로 정확히 희석하고, 1 mL중에 25 µg을 함유하는 암프로리움 표준액을 조제한다.

다) 염기성알루미나 : 칼럼크로마토그래프용 염기성 알루미나[입경 63~200 µm(230~70mesh) Aluminiumoxide active basic Art. 1076(Merck제)]를 100℃에서 3시간 건조한다.

라) 수산화나트륨+메탄올액 : 수산화나트륨 용액(1.1W/V%) 15 mL에 메탄올을 가하여 200 mL로 한다.

마) 나프탈린디올메탄올액 : 2,7-나프탈린디올 25 mg을 메탄올에 용해하여 1 L로 한다.

바) 발색시액 : 나프탈린디올메탄올액 90 mL를 250 mL의 메스플라스크에 넣고 페리시안화칼륨용액(0.2%, W/V) 5 mL를 가하여 진탕하고, 시안화칼륨용액(1%, W/V) 5 mL를 가하여 진탕한 후, 30분간 정치하고, 수산화나트륨+메탄올액 100 mL를 가하여 진탕 후 글라스 필터(G2)로 여과한다. 이 발색시액은 사용시 조제하여 75분 이내에 사용한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 15.0g이하 (암프로리움 1.5~2.5 mg 상당량)을 칭량하여 250 mL의 분액여두에 넣고, 추출용매 100 mL를 가하여 1시간동안 진탕하고 추출하여 정치한 후, No.5A 여과지로 여과하여 칼럼크로마토그래프용 시료용액으로 한다.

* 칼럼크로마토그래피 : 염기성 알루미나 5g을 칼럼관(내경 10 mm)에 건식충진하여, 정제용 칼럼을 조제한다. 시료용액 25 mL를 칼럼에 넣고, 처음의 유출액 5 mL를 버린 후의 유출액은 측정용 시료용액으로 한다.

나) 측정 : 시료용액 4 mL를 공전원심침전관에 정확히 넣고, 발색시액 10 mL를 가하여 진탕하고, 20분간 정치한 후, 2,000rpm에서 3분간 원심분리하고, 즉시 상등액을 셀에 넣고 뚜껑을 씌워 공시험용액(추출용매 4 mL에 대하여 시료용액과 동일하게 조작한 액)을 대조액으로 하여 파장 530 nm에서 흡광도를 측정한다. 동시에, 암프로리움 표준액 4 mL를 공전원심침전관에 정확히 넣고, 시료원액의 경우와 동일한 조건에서 흡광도를 측정한다.

다) 계산 : 측정된 흡광도로 시료중의 암프로리움량을 계산한다.

나. 고속액체크로마토그래피법(1)

1) 시약의 조제

가) 추출용매 : 메탄올+증류수(2+1)

나) 암프로리움 표준액 : 암프로리움 25 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 추출용매를 가하여 용해하고 동용매를 표선까지 가하여 암프로리움 표준용액을 조제한다.(이 액 1 mL는 암프로리움 0.25 mg을 함유) 사용시에 표준원액의 일정량을 추출용매로 정확히 희석하고, 1 mL중에 2, 4, 6, 8, 10 µg을 함유하는 암프로리움 표준액을 조제한다.

다) 중성알루미나 : 칼럼크로마토그래프용 중성알루미나[입경 63~200 µm(230~70mesh) : Aluminumoxide 90 active neutral Art.1077(Merck제)] 100℃에서 2시간 건조한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 3~10g(암프로리움 0.4~0.8 mg상당량)을 정확히 칭량하여 200 mL의 갈색공전삼각플라스크에 넣고, 추출용매 100 mL를 가하여 30분간 흔들면서 추출한다. 추출액을 공전원심침전관에 넣고, 2,000rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 칼럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

- * 칼럼크로마토그래피 : 중성알루미나 10g을 칼럼관(내경 10 mm)에 건식충진하고, 정제용 칼럼을 조제한다. 시료용액을 칼럼에 넣고, 처음의 유출액 5 mL를 버린 후, 유출액을 멤브레인필터(공경 0.5 μ m 이하)로 여과하고, 고속액체크로마토그래피용 시료용액으로 한다.
- * 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 각 암프로리움 표준액 각 20 μ L를 고속액체크로마토그래프에 주입하고, 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건 (HPLC)

- 가) 검출기 : 자외흡광광도검출기 (측정과장 : 242 nm)
- 나) 컬럼 : μ Bondapak C18(3.9 $\times$ 300 mm, 10 μ m) 또는 이와 동응한 것
- 다) 이동상 : HPLC용 아세트니트릴+구연산완충액 * (11+9)
- 라) 유속 : 1.0 mL/min
 - * 구연산1수화물 19.2 g을 증류수에 용해하여 1 L로 하고, 수산화나트륨용액(40%, W/V) 으로 pH를 3.5로 조정 한 후, 도데실황산나트륨 22.2 g을 가하여 용해한다.
- 4) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크의 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 암프로리움량을 계산한다.

다. 고속액체크로마토그래프법 (2)

1) 시약의 조제

- 가) 추출용매 : 메탄올+증류수(2+1)
- 나) 암프로리움표준액 : 암프로리움 25 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 추출용매를 가하여 용해하고 동용매를 표선까지 가하여 암프로리움 용액을 조제한다. (이 액 1 mL는 암프로리움 0.25 mg을 함유) 사용시, 표준원액의 일정량을 추출용매로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.1, 0.25, 0.5, 1.2 μ g을 함유하는 암프로리움 표준액을 조제한다.
- 다) 2-메틸-1-프로판올포화수 : 증류수 100 mL에 2-메틸-1-프로판올(형광분석용시약) 10 mL를 가하여 진탕하고, 하룻밤 방치한 후, 수층을 분리한다.
- 라) 중성알루미나 : 칼럼크로마토용 중성알루미나[입경 63~200 μ m(230~70mesh) : Aluminiumoxide 90 active neutral Art. 1077 (Merck제)] 120 $^{\circ}$ C에서 2시간 건조한다.

2) 정량

- 가) 추출 : 분석시료 20.0g을 칭량하여 200 mL의 갈색공전삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 100 mL를 가하여, 30분간 진탕하고 추출한다. 추출액을 갈색공전원심침전관에 넣고, 3,000rpm으로 5분간 원심분리하고, 상등액을 칼럼크로마토그래피에 제공할 시료용액으로 한다.
 - * 칼럼크로마토그래피 : 중성알루미나 10g을 칼럼관(내경 10 mm)에 건식충진하고, 정제용 칼럼을 조제한다. 시료용액을 칼럼에 넣고, 처음의 유출액 5 mL를 버린 후, 유출액을 형광화용 시료용액으로 한다.
- 나) 형광화 : 시료용액 10 mL를 50 mL의 플라스크에 정확히 넣는다. 40~60 $^{\circ}$ C의 수욕조에서 약 1 mL까지 감압 농축한 후, 질소가스로 건조한다. 잔류물을 10 mL의 눈금부착 공전 원심침전관에 증류수로 세척하면서, 증류수를 가하여 5 mL로 한 후, 메탄올 0.5 mL를 정확히 가한다. 그리고, 수산화나트륨용액(30%, W/V) 1 mL 및 페리시안화칼륨용액(2%, W/V) 0.5 mL를 가하여 혼합하고, 10분간 방치한다. 그 다음, 형광분석용 2-메틸-1-프로판올 1 mL를 가하여 5분간 혼든 후, 3,000rpm에서 3분간 원심분리하고, 2-메틸-1-프로판올층(상층)을 별개의 공전원심 침전관 넣고, 2-메틸-1-프로판올포화수 1 mL를 정확히 가하여, 약 5분간 진탕한 후, 3000rpm에서 5분간 원심분리한다. 2-메틸-1-프로판올층을 고속액체크로마토그래피용 시료 용액으로 한다. 동시에 각 암프로리움 표준액 1 mL를 각각 10 mL의 눈금 부착 공전원심 침전관에 넣고, 증류수를 가하여 5 mL로

한후, 시료용액과 동일하게 조작하고, 고속액체크로마토그래피용 각 암프로리움 표준액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 각 암프로리움 표준액 각 20 μ L를 고속액체크로마토그래프에 주입하고, 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건(HPLC)

가) 검출기 : 형광검출기(여기파장 : 400 nm, 형광파장 : 440 nm)

나) 컬럼 : YMC A-312(6 $\times$ 150 mm, 5 μ m) 또는 이것과 동등한 것.

다) 이동상 : HPLC용 인산완충액 * + 증류수 + 아세트니트릴(3+2+1), 인산(1+1,000)으로 pH를 4.0으로 조정한다.

라) 유속 : 0.7 mL/min

마) 칼럼온도 : 40 $^{\circ}$ C

* 인산2수소나트륨용액(인산2수소나트륨2수화물 7.8g을 증류수에 용해하여 1 L로 한다)

인산2수소칼륨용액(인산2수소칼륨 6.8g을 증류수에 용해하여 1 L로 한다) (2+1)

4) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 암프로리움량을 산출한다.

10.2.7.3. 오라퀸독스(Olaquinox)

가. 고속액체크로마토그래프법(1)

1) 시약의 조제

가) 추출용매 : 메탄올 + 증류수(7+3)

나) 오라퀸독스 표준액 : 오라퀸독스 50 mg을 정확히 칭량하여 250 mL 갈색메스플라스크에 넣는다. 추출용매를 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 오라퀸독스 표준액을 조제한다.(이 액 1 mL는 오라퀸독스 0.2 mg을 함유한다)

* 사용시 표준원액의 일정량을 추출용매로 정확히 희석하고 1 mL중에 1, 2, 4, 6 μ g을 함유하는 각 오라퀸독스 표준액을 조제한다.

다) 중성알루미나 : 칼럼크로마토그래프용 중성알루미나[입경 63~200 μ m(230~70 mesh) : Aluminiumoxide 90 active neutral Art. 1077(Merck제)]를 100 $^{\circ}$ C에서 2시간 건조한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 10.0~20.0g을 칭량하여 200 mL의 갈색공전삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 100 mL를 가하여 30분간 진탕하고 추출한다. 추출액을 갈색공전원심침전관에 넣고, 2,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액을 칼럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 칼럼크로마토그래피 : 중성알루미나 5g을 칼럼관(내경 10 mm)에 건식충진 하고, 정제용 칼럼을 조제한다. 시료용액을 칼럼에 넣고, 처음의 유출액 3 mL를 버린 후, 유출액을 멤브레인필터(공경 0.5 μ m이하)로 여과하고, 고속액체크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래프 : 시료용액 및 오라퀸독스표준액 각 20 μ L를 고속액체크로마토그래프에 주입하고, 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건(예)

가) 검출기 : 자외선흡광광도검출기(측정파장 : 380 nm)

나) 컬럼 : Shodex ODS pak F-411(4 $\times$ 150 mm, 5 μ m) 또는 이것과 동등한 것

다) 용리액 : HPLC용 증류수 + HPLC용 메탄올(7+3)

라) 유속 : 0.7 mL/min

4) 계산 : 측정된크로마토그램의 피크높이 또는 면적을 구하는 검량선을 작성하고, 시료중의 오라퀸독스량을 산출한다.

나. 고속액체크로마토그래프법(2)

1) 시약의 조제

가) 추출용매 : 메탄올+증류수(7+3)

나) 오라퀸독스 표준액 : 오라퀸독스 50 mg을 정확히 칭량하여 250 mL 갈색메스플라스크에 넣고, 추출용매를 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 오라퀸독스 표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 오라퀸독스 0.2 mg을 함유) 사용시, 표준원액의 일정량을 추출용매로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 µg을 함유하는 각 오라퀸 표준액을 조제한다.

다) 중성알루미나 : 칼럼크로마토그래프용 중성알루미나[입경 63~200 µm(230~70 mesh) : Aluminiumoxide 90 active neutral Art. 1077]를 100℃로 2시간 건조한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 10~20g을 칭량하여 200 mL의 갈색삼각공전플라스크에 넣는다. 추출용매 100 mL를 가하여 30분간 진탕하고 추출한다. 갈색공전원심침전관에 넣고, 2000rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 칼럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 칼럼크로마토그래피 : 중성알루미나 5g을 칼럼관(내경 10 mm)에 건식충진하고, 정제용 칼럼을 조제한다. 시료용액을 칼럼에 넣고, 처음의 유출액 3 mL를 버린 후, 유출액 2 mL를 멤브레인필터(공경 0.5 mm이하)로 여과하고, 고속액체크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 오라퀸독스표준액 각 20 µL를 고속액체크로마토그래프에 주입하고, 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건 (예)

가) 검출기 : 자외흡광광도검출기(측정파장 : 380 nm)

나) 컬럼 : Shodex ODS pak F-411(4 × 50 mm, 5 µm)또는 이것과 동등한 것

다) 용리액 : HPLC용 증류수+메탄올(7+3)

라) 유속 : 0.7 mL/min

4) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 오라퀸독스량을 산출한다.

10.2.7.4. 크로피돌(Clopidol)

가. 시약의 조제

1) 추출용매 : 메탄올+암모니아수(24+1)

2) 크로피돌 표준액 : 크로피돌 0.1g을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 추출용매를 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 크로피돌 표준원액을 조제한다. (이 액 1 mL는 크로피돌 1 mg을 함유한다) 사용시 표준원액의 일정량을 메탄올로 정확히 희석하고, 1 mL 중에 10, 15, 20, 25 µg을 함유하는 각 크로피돌 표준액을 조제한다.

나. 정량

1) 추출 : 분석시료 10.0~20.0g(크로피돌 1.6~2.5 mg상당량)을 칭량하여 200 mL의 갈색공전삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 100 mL를 가하여 10분간 진탕하고 추출한다. 상등액을 공전원심침전관에 넣고 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 다시 멤브레인필터(공경 0.5 µm이하)로 여과하여 고속액체크로마토그래프용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 크로피돌 표준액 각 20 µL를 고속액체크로마토그래프에 주입하고 크로마토그램을 측정한다.

다. 측정조건(예)

1) 검출기 : 자외선흡광광도검출기(측정파장 : 260 nm)

2) 컬럼 : Lichrosorb NH2(4 × 150 mm, 10 µm)

3) 이동상 : HPLC용 아세트니트릴+증류수(49+1)

4) 유량 : 2 mL/min

라. 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 크로피돌량을 산출한다.

10.2.7.5. 데콰퀴네이트(Decoquinat)

가. 형광광도법

1) 시약의 조제

가)추출용매 : 염화칼슘 10 g을 메탄올에 용해하여 1 L로 한다.

나)데콰퀴네이트 표준액 : 데콰퀴네이트 30 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 추출용매를 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 데콰퀴네이트 표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 데콰퀴네이트 0.3 mg을 함유) 사용시, 표준원액의 일정량을 추출용매로 정확히 희석하고 1 mL중에 6 µg을 함유하는 데콰퀴네이트 표준액을 조제한다.

다)규산마그네슘 : 합성규산마그네슘[입경 74~149 µm(200~100 mesh)]을 120℃에서 3시간 건조한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 10.0 g을 칭량하여 100 mL의 공전삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 50 mL를 가하여, 20분간 진탕하고 추출한 후, 공전원심침전관에 넣고 2,000rpm에서 5분간 원심 분리하고, 상등액을 추출액으로 한다. 추출액 10 mL 및 클로르포름 10 mL를 각각 200 mL의 분액여두에 정확히 넣는다. 염산(1+9) 100 mL를 가하여 진탕한 후, 15분간 정치한 후 클로르포름(하층)을 공전시험관에 넣고, 적당량의 황산나트륨(무수)을 가하여 탈수하고, 칼럼크로마토그래프용 시료용액으로 한다. 동시에 데콰퀴네이트 표준액 10 mL를 200 mL의 분액여두에 정확히 넣고, 추출액의 경우와 동일하게 조작하여 칼럼크로마토그래피용 표준액으로 한다.

* 칼럼크로마토그래피 : 규산마그네슘 각 0.5 g을 3본의 칼럼관(내경 7 mm)에 각각 건식충진하고 황산나트륨(무수) 각 0.2 g을 충전하여 칼럼을 조제한다. 시료용액 5 mL를 제 1의 칼럼에 정확히 넣고, 표준액 5 mL를 제 2의 칼럼에 정확히 넣은 후 클로르포름 5 mL를 제 3의 칼럼에 넣는다. 칼럼의 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시킨 후 각각의 칼럼에 메탄올 각 10 mL를 가하여 동일하게 유출시킨다. 20 mL의 시험관을 칼럼의 아래에 두고 제1 및 제2의 칼럼에 추출용매 각 15 mL를 가하여 데콰퀴네이트를 용출시켜 측정용 시료용액 및 표준액으로 한다. 동시에 제3의 칼럼에 대하여 동일하게 조작하여 공시험 액으로 한다.

나) 측정 : 시료용액, 표준액 및 공시험액에 대해서 여기파장 330 nm 및 형광파장 390 nm에서 형광광도를 측정한다.

다) 계산 : 측정된 형광광도에서 시료중의 데콰퀴네이트량을 산출한다.

나. 고속액체크로마토그래프법(1)

1) 시약의 조제

가) 추출용매 : 메탄올 + 클로르포름(9+1)

나) 데콰퀴네이트 표준액 : 데콰퀴네이트 30 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 추출용매를 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 데콰퀴네이트 표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 데콰퀴네이트 0.3 mg을 함유) 사용시 표준원액의 일정량을 추출용매로 정확히 희석하고 1 mL에 1, 2, 4, 6 µg을 함유하는 데콰퀴네이트 표준액을 조제한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 5.0~20.0 g(데콰퀴네이트 0.2~0.8 mg상당량)을 칭량하여 200 mL의 공전삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 100 mL를 가한다. 40분간 진탕하고 추출한 후 공전원심침전관에 넣고 3,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액을 멤브레인필터(공경 0.5 µm이하)로 여과하여, 고속액체크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 각 테코퀴네이트 표준액 각 20 μ L를 고속액체크로마토그래프에 주입하고, 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건 (예)

가) 검출기 : 형광검출기(여기파장: 326 nm, 형광파장 : 384 nm)

나) 컬럼 : C18 (3.9 $\times$ 300 mm, 10 μ m)

다) 이동상 : HPLC용 염화칼슘 0.1g을 메탄올+증류수(9+1)에 용해하여 1 L로 한다.

라) 유량 : 1.0 mL/min

4) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고 시료 중의 테코퀴네이트량을 산출한다.

다. 고속액체크로마토그래프법(2)

1) 시약의 조제

가) 염화칼슘+메탄올액 : 염화칼슘 10g을 메탄올에 용해하여 1 L로 한다.

나) 테코퀴네이트 표준액 : 테코퀴네이트 40 mg을 정확히 칭량하여 100 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 염화칼슘+메탄올액을 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 테코퀴네이트 표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 테코퀴네이트 0.4 mg을 함유한다) 사용시 표준원액의 일정량을 메탄올로 정확히 희석하고 1 mL중에 0.025, 0.05, 0.2, 0.3, 0.4 μ g을 함유하는 각 테코퀴네이트 표준액을 조제한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 50g을 칭량하여 300 mL 공전삼각플라스크에 넣는다. 클로르포름 200 mL를 가하여 20분간 진탕하고 추출한다. 추출액을 적당량의 황산나트륨(무수)을 넣은 NO.2S 분액여과지(동양여과지)로 여과하고 카트리지칼럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 카트리지칼럼크로마토그래피 : 실리카겔카트리지[SEP-PAK silica cartridge (Waters제)]를 주사기에 연결하고 클로르포름 10 mL로 세정한다. 시료용액 10 mL를 주사기에 정확히 넣고 유속 2~5 mL/min로 압주하여 유출시킨다. 용기를 클로르포름 10 mL로 세정하고, 동일하게 조작한다. 10 mL의 갈색메스플라스크를 실리카겔카트리지의 아래에 두고, 테코퀴네이트를 메탄올 8 mL로 유속 2~5 mL/min로 압주하여 용출시킨다. 메탄올을 갈색메스플라스크의 표선까지 가하고 멤브레인필터(공경 0.5 μ m이하)로 여과하여 고속액체크로마토그래프용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 각 테코퀴네이트 표준액 각 20 μ L를 고속액체크로마토그래프에 주입하고 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건 (예)

가) 검출기 : 형광검출기(여기파장 : 326 nm, 형광파장 : 384 nm)

나) 컬럼 : Wakpsil 5 C18 Hg(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m)또는 이것과 동등한 것.

다) 용리액 : HPLC용 염화칼슘 1.0g을 메탄올+증류수(4+1)에 용해하여 1 L로 한다.

라) 유속 : 1.0 mL/min

마) 칼럼조 온도 : 40 $^{\circ}$ C

4) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고, 시료중의 테코퀴네이트량을 산출한다.

10.2.7.6. 염산로베니딘(Robenidine)

가. 시약의 조제

1) 추출용매 : 염산 8.3 mL에 아세톤을 가하여 1 L로 한다.(사용시 조제한다)

2) 염산로베니딘표준액 : 염산로베니딘 0.1g을 정확히 칭량하여 250 mL의 갈색 메스플라스크에 넣는다. 적당량의 메탄올을 가하여, 50 $^{\circ}$ C의 수욕조에서 가열하면서 용해하여, 방냉한 후, 동용매를 표선까지 가하여 염산로베니딘 표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 염산로베니딘

0.4 mg을 함유) 사용시 표준원액의 일정량을 추출용매로 정확히 희석하여 1 mL에 2, 4, 8, 16 µg을 함유하는 각 염산로베니딘 표준액을 조제한다.

3) 세정용매 : 2-메톡시에탄올 100 mL에 아세토니트릴을 가하여 1 L로 한다.

4) 용출용매 : 암모니아수 40 mL에 세정용매를 가하여 1 L로 한다.

5) 트리클로로초산용액 : 트리클로로초산 2g에 세정용매 4 mL를 가하여 진탕한다.

6) 수산화칼륨시액 : 수산화칼륨 3g에 에탄올 100 mL를 가하여 진탕하고 상등액을 사용한다.

7) 염기성알루미나 : 칼럼크로마토그래프용 염기성알루미나[입경 53~210 µm(270~65mesh): Alumina Welm B Art. 1. 2069(Welm parma제)]를 105℃에서 3시간 건조한다. 사용시 조제한다.

나. 정량

1) 추출 : 분석시료 50g을 칭량하여 1 L의 분액여두에 넣는다. 추출용매 400 mL를 가하여, 1시간 진탕하여 추출하고, 5분간 정치한 후, NO.5A 여과지로 여과하고, 칼럼크로마토그래프용 시료용액으로 한다.

* 칼럼크로마토그래피 : 염기성 알루미나 13g을 칼럼관(내경 13 mm)에 건식충진하고 칼럼을 조제한다. 시료용액 5 mL를 칼럼에 넣고 액면이 충전제의 상면에서 3 mm높이가 될 때까지 유출시킨 후, 세정용매 10 mL 및 5 mL를 순차적으로 칼럼에 가하여 동일하게 유출시킨다. 50 mL의 갈색메스플라스크를 칼럼의 아래에 놓고 용출용매 20 mL를 칼럼에 정확히 가하여, 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이에 도달할 때까지 유출시킨 후, 용출용매 10 mL를 칼럼에 정확히 가하여 염산로베니딘을 용출시켜 시료용액으로 한다.

2) 측정 : 시료용액을 진탕한 후, 수산화칼륨시액 1 mL를 가하여 진탕하고, 즉시 이 액을 셀에 넣고 뚜껑을 씌워, 용출용매를 대조액으로 하여 파장 440 nm 및 550 nm의 흡광도를 측정하고, 440 nm의 흡광도에서 550 nm의 흡광도를 빼서 흡광도(A)를 구한다. 다음에 이 셀에 트리클로로초산용액 3방울을 가하여 뚜껑을 씌워서 흔들어 퇴색시킨 후 동일하게 조작하여 흡광도(B)를 구하고, 흡광도(A)에서 흡광도(B)를 빼서 흡광도(C)를 구한다. 동시에 각 염산로베니딘 표준액 5 mL를 정확히 추출액의 경우와 동일한 조건에서 조작하여 흡광도(D)를 구한다.

다. 계산

측정된 흡광도(D)에서 검량선을 작성하고 시료중의 염산로베니딘량을 산출한다.

10.2.7.7. 구연산모란텔(Morantelcitrate)

가. 고속액체크로마토그래피법(1)

1) 시약의 조제

가) 구연산모란텔 표준액 : 구연산모란텔 25 mg을 정확히 칭량하여 250 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 메탄올을 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 구연산모란텔 표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 구연산모란텔 0.1 mg을 함유한다) 사용시 표준원액의 일정량을 메탄올로 정확히 희석하고, 1 mL중에 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 µg을 함유하는 각 구연산 모란텔 표준액을 조제한다.

나) 염기성 알루미나 : 칼럼크로마토그래프용 염기성 알루미나[입경 63~200 µm(230~70mesh) : Aluminiumoxide 90 active basic Art. 1076 (Merck제)]를 130℃에서 2시간 건조한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 10.0g을 칭량하여 200 mL의 갈색공전플라스크에 넣는다. 메탄올 100 mL를 가하여 30분간 진탕하고 추출한다. 추출액을 갈색공전원심침전관에 넣고, 3,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액을 칼럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 칼럼크로마토그래피 : 염기성알루미나 5g을 칼럼관(내경 100 mm)에 건식충진하고 정제용 칼럼을 조제한다. 시료용액을 칼럼에 넣고, 처음의 유출액 5 mL를 버린 후, 유출액 5 mL를 구연산모란텔의 흡착성이 없는 멤브레인필터(공경 0.5 µm이하)로 여과하고, 고속액체크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 각 구연산모란텔 표준액 각 20 μ L를 고속액체크로마토그래피에 주입하고, 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건 (예)

가) 검출기 : 자외선흡광광도검출기(측정파장 : 300 nm)

나) 칼럼 : Shodex C18-5B(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m)또는 이것과 동등한 것.

다) 용리액 : HPLC용 인산완충액+아세트니트릴(4+1)

라) 유속 : 1.0 mL/min

마) 칼럼조온도 : 40℃

4) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크면적을 구해 검량선을 작성하고, 시료중의 구연산모란텔량을 산출한다.

나. 고속액체크로마토그래프법(2)

1) 시약의 조제

가) 구연산모란텔표준액 : 구연산모란텔 25 mg을 정확히 칭량하여 250 mL의 갈색메스플라스크에 넣는다. 메탄올을 가하여 용해하고, 동용매를 표선까지 가하여 구연산모란텔표준원액을 조제한다.(이 액 1 mL는 구연산모란텔 0.1 mg을 함유) 사용시, 표준원액의 일정량을 메탄올로 정확히 희석하고 1 mL중에 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 μ g을 함유하는 각 구연산 모란텔표준액을 조제한다.

나) 염기성 알루미나 : 칼럼크로마토그래프용 염기성알루미나[입경 63~200 μ m(230~70mesh): Aluminiumoxide 90 active basic Art. 1076(Merck제)]를 130℃에서 2시간 건조한다.

다) 탄산완충액 : 탄산수소나트륨 7.6 g 및 탄산나트륨 0.5g을 증류수에 용해하여 1 L로 하고 수산화나트륨 용액(4.2%, W/V)으로 pH를 9.0으로 조정한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 10.0 g을 칭량하여 200 mL의 갈색공전삼각플라스크에 넣는다. 메탄올 100 mL를 가하여 30분간 진탕하고 추출한다. 추출액을 갈색공전원심침전관에 넣고, 3,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액을 칼럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 칼럼크로마토그래피 : 염기성알루미나 5 g을 칼럼관(내경 10 mm)에 건식 충전하고 정제용 칼럼을 조제한다. 시료용액을 칼럼에 넣고 처음의 5 mL를 버린 후 유출액 10 mL를 50 mL의 증발플라스크에 정확히 넣고 50℃의 수욕조에서 감압 건조한다. 잔류물을 메탄올+탄산완충액(1+1) 5 mL에 용해하고, 카트리지칼럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 카트리지칼럼크로마토그래피 : C18 카트리지[SEP-PAK C18 CARTRIDGE (Waters제)]를 주사통에 연결하고 메탄올 10 mL, 증류수 10 mL 및 탄산완충액 10 mL로 순차적으로 세정한다. 시료용액을 주사통에 넣고 유속 약 2 mL/min로 압주하여 유출시킨 후 용기를 메탄올+탄산완충액(1+1) 5 mL로 세정하고, 동일하게 조작한다. 50 mL의 증발플라스크를 C18 카트리지의 아래에 놓고 구연산모란텔을 메탄올+초산(200+1) 10 mL를 유속 약 2 mL/min로 압주하여 용출시킨다. 용출액을 50℃의 수욕조에서 대부분 건조될 때까지 감압농축한 후 질소가스로 건조한다. 메탄올 2 mL를 증발플라스크에 정확히 가하여 잔류물을 용해한 후 구연산모란텔의 흡착성이 없는 멤브레인필터(공경 0.5 μ m이하)로 여과하여 고속액체크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 각 구연산모란텔 표준액 각 20 μ L를 액체크로마토그래피에 주입하고, 크로마토그램을 측정한다.

3) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크면적을 구해 검량선을 작성하고, 시료중의 구연산모란텔량을 산출한다.

10.2.7.8. 할로푸지논 (Halofuginone)

가. 고속액체크로마토그래프법(1)

1) 시약의 조제

취화수소산할로푸지는 표준액 : 취화수소산할로푸지는 20 mg을 정확히 칭량하여 200 mL의 메스플라스크에 넣는다. 염산(1+100)을 가하여 용해하고 표선까지 동액을 가하여 취화수소산할로푸지는 표준액을 조제한다.(이 액 1 mL는 취화수소산할로푸지는으로써 0.1 mg을 함유한다) 사용시 표준원액의 일정량을 염산(1+100)으로 정확히 희석하여 1 mL중에 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 µg을 함유하는 각 취화수소산할로푸지는 표준액을 조제한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 5g을 칭량하여 50 mL의 공전원심침전관에 넣는다. 초산에틸 20 mL 및 탄산나트륨(1%, W/V)용액 10 mL를 가하여 15분간 진탕한 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 초산에틸층(상층)을 300 mL의 분액여두에 넣는다. 잔류물에 초산에틸 20 mL를 가하여 동일한 조작을 하고 초산에틸층을 그 분액여두에 가한다. 그리고 이 조작을 4회 반복하여 초산에틸층을 그 분액여두에 가하여 정제용 시료용액으로 한다.

나) 정제 : 시료용액에 염산(1+100) 10 mL를 가하여 5분간 진탕하고 정치한 후 염산층(하층)을 200 mL의 플라스크에 넣는다. 잔류액에 염산(1+100) 10 mL를 가하여 동일하게 조작하고, 염산층을 증발플라스크에 가하여 50℃의 수욕조에서 5 mL가 될 때까지 감압 농축한 후, 20 mL의 메스플라스크에 넣고 소량의 염산(1+100)으로 용기를 세정하고, 세정액을 그 메스플라스크에 가하여 표선까지 동액을 가하고 멤브레인필터(공경 0.5 µm이하)로 여과하고 고속액체크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 각 취화수소산할로푸지는 표준액 각 20 µL를 고속액체크로마토그래프에 주입하고, 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건 (예)

가) 검출기 : 자외선흡광광도검출기(측정파장 : 243 nm)

나) 칼럼 : Wakosil 5 C18-200(4.6 × 250 mm, 5 µm) 또는 이것과 동등한 것.

다) 칼럼온도 : 40℃

라) 용리액 : HPLC용 초산완충액 + 메탄올(11+9)

마) 유속 : 1.0 mL/min

4) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크높이 또는 면적을 구하고 다음 식으로 시료 중의 할로푸지는폴리스틸렌설폰산칼슘량을 산출한다.

* 시료중의 할로푸지는폴리스틸렌설폰산칼슘량(g/t) = $A \times 20 / 8.5$

A : 검량선에서 구한 취화수소산할로푸지논의 중량(ng)

나. 고속액체크로마토그래프법(2)

1) 시약의 조제

가) 취화수소산할로푸지는 표준액 : 취화수소산할로푸지는 20 mg을 정확히 칭량하여 200 mL 메스플라스크에 넣는다. 염산(1+100)을 가하여 용해하고, 표선까지 동액을 가하여, 취화수소산할로푸지는 표준액을 조제한다.(이 액 1 mL는 취화수소산할로푸지는 0.1 mg을 함유한다) 사용시, 표준원액의 일정량을 염산(1+100)으로 정확히 희석하고 1 mL중에 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 µg을 함유하는 각 취화수소산할로푸지는 표준액을 조제한다.

나) 초산완충액 : 초산암모늄 4.9g 및 초산 7.5 mL를 증류수로 용해하여 1 L로 하고, 초산으로 pH를 4.3으로 조정한다.

2) 정량

가) 추출 : 분석시료 5g을 정확히 칭량하여 50 mL의 공전원심침전관에 넣는다. 초산에틸 20 mL 및 탄산나트륨(1%, W/V)용액 10 mL를 가하여 15분간 진탕 후, 3,000rpm에서 10분간 원심분리하고 초산에틸층(상층)을 300 mL의 분액여두에 넣는다. 잔류물에 초산에틸 20 mL를 가하여 동일한 조작을 하고 초산에틸층을 그 분액여두에 가한다. 그리고 이 조작을 4회 반복하여 초산에틸층을 분액여두에 가하여 정제용 시료용액으로 한다.

나) 정제 : 시료용액을 넣은 분액여두에 염산용액(1+100) 10 mL를 가하고, 5분간 진탕하고 정지한 후 수층(하층)을 100 mL 증발플라스크에 넣는다. 염산용액(1+100) 10 mL를 분액여두에 가하고 동일하게 조작한다. 수층을 50℃의 수욕조에서 5 mL정도가 될 때까지 감압 농축하고 카트리지 칼럼크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 카트리지칼럼크로마토그래피 : C18 카트리지[메가본드엘드 C18카트리지, 충전량 1g, 리자바 용량 6 mL(Varian Associates제)]를 메탄올 10 mL 및 증류수 10 mL로 순차적으로 세정한다. 시료용액을 칼럼에 넣고, 액면이 충전제의 상면에서 1 mm의 높이가 될 때까지 유출시킨 후, 증류수 5 mL로 용기를 2회 세정하고 동일하게 조작한다. 칼럼을 증류수 5 mL로 1회, 메탄올+증류수(3+2) 각 5 mL로 2회 및 염산(1+100) 각 5 mL로 4회 세정한다. 50 mL의 증발플라스크를 칼럼의 아래에 두고, 할로푸지논을 메탄올+클로르포름(9+1) 10 mL로 용출시킨다. 용출액을 50℃의 수욕조에서 대부분 건고될 때까지 감압 농축한 후 질소가스로 건고한다. 증류수+아세토니트릴+초산완충액(62+23+15) 1 mL를 증발플라스크에 정확히 가하여, 잔류물을 용해한 후 멤브레인필터(공경 0.5 μm 이하)로 여과하고, 고속액체크로마토그래피용 시료용액으로 한다.

* 고속액체크로마토그래피 : 시료용액 및 각 취화수소산할로푸지논표준액 각 20 μL 를 고속액체크로마토그래프에 주입하고 크로마토그램을 측정한다.

3) 측정조건(예)

가) 검출기 : 자외흡광광도검출기(측정파장 : 243 nm)

나) 칼럼 : $\mu\text{Bondapak C18}$ (3.9 $\times$ 300 mm, 10 μm)또는 이것과 동등한 것.

다) 용리액 : 증류수+아세토니트릴+초산완충액 (62+23+15)

라) 유량 : 1.0 mL/min

리) 칼럼조온도 : 40℃

4) 계산 : 측정된 크로마토그램의 피크높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성하고 다음식으로 시료중의 할로푸지논폴리스틸렌설폰산칼슘량을 산출한다.

* 시료중의 할로푸지논폴리스틸렌설폰산칼슘량(g/t) = $A \times 1/8.5$

A : 검량선에서 구한 취화수소산할로푸지논의 중량 (ng)

10.2.7.9. 조렌(Zoalene), 디니톨마이드(Dinitolmide)

가. 시약

1) 아세토니트릴, n-헥산, 아세톤, 클로르포름(Chloroform), 무수황산나트륨(Sodium sulfate, anhydrous) : 이상 특급

2) 5% 염화나트륨 용액

3) Florisil column : 140℃에서 12시간 활성화시킨 10g을 아세톤 30 mL와 잘 혼합시킨다. 이것을 내경 1.5~2.0 cm의 관에 충전한다.

4) 표준품 : 표준품 100 mg을 칭량하여 아세톤에 녹여 100 mL로 하고 다시 아세톤으로 적절히 희석하여 사용한다.

나. 방법

시료 10g을 칭량하여 아세토니트릴 50 mL를 가하고 잘 혼합시켜 sonication, vortexing을 각 5분씩 한다. 3000rpm에서 10분간 원심분리 상등액을 취한다. 이 조작 2회 반복하여 모두 혼합한다. 헥산 20 mL로 세정한다. 아세토니트릴층을 45℃ 수욕조에서 약 10 mL 되게 농축한다. 농축물을 5% 염화나트륨 용액 100 mL로 수회 씻으면서 분액여두에 넣고, 클로르포름 50 mL씩 2회 진탕하여 추출한다. 클로르포름층을 무수황산나트륨으로 탈수한 후 농축시킨다. 농축물을 아세톤 10 mL에 녹여 florisil column에 흘려 넣는다. 클로르포름 150 mL로 세정한 후 아세톤 100 mL로 용출한다. 이 용출액을 재농축하고 아세톤 2 mL에 녹여 기기 분석용 시료액으로 한다.

다. 기기조건(GC) (예)

- 1) 검출기 : ECD
- 2) Column : 액상 OV-17을 1.5% chromosob W에 흡착시켜 2m의 유리컬럼관에 충전
- 3) 컬럼 온도 : 270℃
- 4) 검출기 온도 : 300℃

10.2.7.10. 오르메토프림(Ormethoprim)

가. 시약

- 1) 초산에틸, 메탄올, 염화칼륨, 염화나트륨, 과염소산, 수산화나트륨, 탄산나트륨, 붕산, 무수 황산나트륨, 황산, 클로르포름 이상 특급시약
- 2) Buffer(pH 11) : 0.1 M 탄산나트륨 96.5 mL와 붕산-염화칼륨 용액(붕산 6.2g+염화칼륨 7.45 g/1 L 증류수) 3.5 mL를 혼합하여 조제한다.
- 3) 표준액 조제 : 메탄올(HPLC용)에 희석하여 조제
- 4) 이동상 : 0.5% 과염소산+메탄올(7+3)

나. 방법

사료 5~10 g을 conical tube에 취하여 0.2 N 황산 20 mL 및 클로르포름 15 mL를 가하여 5분씩 초음파 처리한 후 강하게 흔들어준다. 2500~3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 분액여두에 취하고 잔류물은 다시 0.2N 황산 15 mL를 넣고 똑같이 조작하여 상등액을 분액여두에 합한다. 1N 수산화나트륨용액을 가하여 pH 12가 되도록 조정한 후 염화나트륨 5 g 초산에틸 100 mL를 가하여 10분간 진탕 추출한다. 정치하여 두 층이 분리하면 상층을 취하고 하층은 초산에틸 50 mL를 가하여 똑같이 조작한 후 앞의 상층과 합한다. 초산에틸층을 무수황산나트륨 5g으로 탈수시켜 농축용 플라스크에 받는다. 이 액을 농축하여 0.5% 과염소산+메탄올(7+3)용액 1 mL에 녹여 HPLC 시액으로 한다.

다. 기기분석(HPLC) (예)

- 1) Column : Nucleosil 10 C18(250 × 4.6 mm) 혹은 이와 동등한 것.
- 2) 파장: 230 nm
- 3) 이동상 : 0.5% 과염소산+메탄올(7+3)

10.3. 미생물평판법

10.3.1. 아연바시트라신(Bacitracin-Zinc)[C₆₆H₁₀₃N₁₇O₁₆S-Zn]

가. 시약의 조제

1) 완충액

3호 완충액.(pH 6.0) 인산2수소칼륨 7g과 인산수소2나트륨12수 6g을 칭량하여 증류수 750 mL로 용해하고 pH를 5.9~6.1로 조정 한 후, 증류수를 가하여 1000 mL로 한다.

2) 바시트라신 표준액

상용표준 바시트라신 적당량을 60℃, 5 mmHg이하의 감압 조건에서 3시간 건조한 후, 40 mg 이상을 정확히 칭량한다. 3호 완충액을 정확히 가하고 용해하여 100IU/ mL의 표준 원액을 조제한다. 사용할 때, 표준원액을 3호 완충액+메탄올(3+1)로 정확히 희석하여 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025IU/ mL의 각 표준액을 조제하여 사용한다.

3) 배지 : F-1호 배지.

펩톤 10g, 육즙 5g, 염화나트륨 2.5g, 한천 13~20g에 증류수 1000 mL를 넣는다. 121℃에서 15분간 멸균 후, 염산(1+11) 또는 수산화나트륨(4.2%, W/V)으로 pH를 6.4~6.6으로 조정한다.

4) 균액 및 첨가량

시험균 *Micrococcus luteus* ATCC 10240으로 10배 희석한 균액을 적당량 (배지 100 mL 당 0.1 mL정도) 첨가한다.

5) 한천평판

균액을 일단 용해하여 49~51℃로 보온한 배지에 가하여 충분히 혼합한다. 20 mL를 배양접시(내경 90 mm, 높이 20 mm의 합성수지제 또는 경질유리제)에 일시에 번지도록 분주한 후 수평으로 정치하여 응고시킨다. 평판에서 반경 25 mm의 원주상에 인접하도록 각각 90도 간격이 되는 위치에 직경 7.9~8.1 mm의 원통컵을 올려놓는다.

6) 추출용매 : 증류수+메탄올+염산(75+77+2)

나. 시료액의 조제

분석시료의 일정량(아연바시트라신으로써 20 IU 상당량)을 칭량한다. 200 mL의 삼각플라스크에 넣고, 추출용매 100 mL를 가하여 20분간 진탕후 추출한다. 추출액을 100 mL의 원심분리관에 넣고, 3000rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상등액을 No.5A 여과지로 여과한다. 여액 25 mL를 50 mL의 비이커에 정확히 넣고, 암모니아수+증류수(2+3)로 pH 5.9~6.1로 조정한다. 용액전량을 50 mL의 메스플라스크에 옮겨 넣고, 3호 완충액을 표선까지 가한다. NO.5A 여과지로 여과하고, 0.1 IU/ mL의 시료액을 조제한다.

다. 정량 : 표준곡선법

10.3.2. 황산콜리스틴(Colistin-sulfate)[C₅₃H₁₀₀N₁₆O₁₃-H₂SO₄]

가. 시약의 조제

1) 완충액 : 5호 완충액(pH 6.0)

인산2수소칼륨 80g, 인산수소2칼륨 20g을 칭량하여 증류수 750 mL로 용해하고, pH를 5.9~6.1로 조정 한 후, 증류수를 가하여 1000 mL로 한다.

2) 희석용매

가) 황산콜리스틴이 10 g(역가)/t이상의 경우 : 5호 완충액 - 아세톤+피리딘(91+8+1)

나) 황산콜리스틴이 10 g(역가)/t미만의 경우 : 5호 완충액 - 아세톤+피리딘(83+15+2)

3) 콜리스틴 표준액

상용표준 콜리스틴 적당량을 60℃, 5 mmHg 이하의 감압조건에서 3시간 건조한 후, 40 mg 이상을 정확히 칭량한다. 5호 완충액을 정확히 가하여 용해하고, 1 mg(역가)/ mL의 콜리스틴 표준원액을 조제한다. 사용 할 때, 표준원액을 희석용매로 정확히 희석하고, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 µg(역가)/ mL의 각 표준액을 조제한다.

4) 배지 : F-9호 배지

첼소화카제인 17g, 파파인소화대두 3g, 포도당 2.5g, 염화나트륨 5g, 인산2수소칼륨 2.5g, 계면활성제(폴리솔베이트 80) 10g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조제한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균 후, 염산(1+11) 또는 수산화나트륨(4.2%, W/V)으로 pH를 7.2~7.4로 조정한다.

5) 균액 및 첨가량

시험균, Bordetella bronchiseptica ATCC 4617로 100배 희석한 균액을 배지 100 mL당 0.1 mL 정도 가한다.

6) 한천평판 : 아연바시트라신과 동일

7) 추출용매 : 증류수+아세톤+염산(51+40+9)

나. 시료액의 조제

1) 황산콜리스틴이 10g/t 이상인 경우

분석시료의 일정량(콜리스틴으로써 0.1 mg역가 상당량)을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 피리딘 5 mL 및 핵산 5 mL를 가하여 2~3분간 진탕한다.

추출용매 95 mL를 가하고 20분간 진탕하여 추출한다. 추출액을 100 mL의 원심분리관에 넣고, 3000rpm으로 5분간 원심분리한 후 증류수+아세톤층(하층)을 No. 5A 여과지로 여과한다. 여액 20 mL를 50 mL의 비이커에 정확히 넣고, 암모니아수로 pH를 5.9~6.1로 조정한다. 용액전량을 100 mL 메스플라스크에 옮겨 담고, 5호 완충액을 표선까지 가한 후

No. 5A 여과지로 여과하여 0.2 µg역가/ mL의 시료액을 조제한다.

2) 황산콜리스틴이 10g/t미만인 경우

분석시료의 일정량(콜리스틴으로써 50 µg역가상당량)을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 피리딘 5 mL 및 핵산 5 mL를 가하여 2~3분간 진탕한다. 추출용매 95 mL를 가하고 20분간 진탕하여 추출한다. 추출액을 100 mL의 원심분리관에 넣고, 3000rpm으로 5분간 원심분리한 후 증류수 + 아세톤층(하층)을 No.5A 여과지로 여과한다. 여액 20 mL를 50 mL의 비이커에 정확히 넣고, 암모니아수로 pH를 5.9~6.1로 조정한다. 용액전량을 50 mL 메스플라스크에 옮겨담고 표선까지 5호 완충액을 가한 후 No.5A 여과지로 여과하여 0.2 µg역가/ mL의 시료액을 조제한다.

다. 정량 : 표준곡선법

10.3.3. 버지니아 마이신(Virginiamycin) [M Type : $C_{28}H_{35}N_3O_7$, S Type : $C_{43}H_{49}N_7O_{10}$]

가. 시약의 조제

1) 완충액 : 2호 완충액(pH 6.0)

인산2수소칼륨 3.5 g, 인산수소2나트륨12수 6 g을 칭량하여 증류수 750 mL로 용해하고, pH 5.9~6.1로 조정된 후, 증류수를 가하여 1000 mL로 한다.

2) 버지니아마이신 표준액

상용표준 버지니아마이신 40 mg 이상을 정확히 칭량한다. 메탄올로 용해하여 1 mg역가/ mL의 버지니아마이신 표준원액을 조제한다. 사용할 때, 표준원액을 2호 완충액+메탄올(7+3)으로 정확히 희석하고, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 µg역가/ mL의 각 표준원액을 조제한다.

3) 배지 : F-4호 배지

펩톤 6 g, 육즙 1.5 g, 효모 3 g, 포도당 1 g, 한천 13~20 g 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조제한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균 후, 염산+증류수(1+1) 또는 수산화나트륨(4.2%, W/V)으로 pH를 5.9~6.1로 조정한다.

4) 균액 및 첨가량

시험균 *Micrococcus luteus* ATCC 9341로 100배 희석한 균액을 배지 100 mL당 0.2 mL 정도 가한다.

5) 한천평판 : 천공법

나. 시료액의 조제

1) 버지니아마이신이 10g역가/t이상인 경우

분석시료의 일정량(버지니아마이신으로써 0.16 mg역가 상당량)을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 핵산 20 mL를 가하여 10분간 방치한다. 메탄올+2호 완충액(1+1) 100 mL를 가하여 20분간 진탕하여 추출한다. 추출액을 100 mL의 원심분리관에 넣는다. 3000rpm으로 5분간 원심분리한 후 증류수+메탄올층(하층)을 No.6A 여과지로 여과한다. 여액의 일정량을 2호 완충액+메탄올(9+1)로 정확히 희석하고, 0.8 µg역가/ mL의 시료액을 조제한다.

2) 버지니아마이신이 10g역가/t미만인 경우

분석시료의 일정량(버지니아마이신으로써 40 µg역가 상당량)을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 메탄올 100 mL를 가하여 20분간 진탕하고 추출한다. 추출액을 No.6A 여과지로 여과한다. 여액 20 mL를 50 mL 농축플라스크에 정확히 넣고 50℃의 수욕조에서 감압농축하고 핵산 5 mL를 가하여 진탕한다. 메탄올 3 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해한다. 2호 완충액 7 mL를 정확히 가하여 진탕한다. 용액을 50 mL의 원심분리관에 넣고 3000rpm으로 5분간 원심분리하고, 증류수+메탄올(하층)을 0.8 µg역가/ mL의 시료액으로 한다.

다. 정량 : 표준곡선법

10.3.4. 타이로신(Tylosin) [C₄₆H₇₇NO₁₇]

가. 시약의 조제

1) 4호 완충액(pH 8.0)

인산 2수소칼륨 13.3 g을 칭량하여 증류수 750 mL로 용해한다. 수산화칼륨용액(6.6%, W/V) 100 mL정도를 가하여 pH를 7.9~8.1로 조정한다. 증류수를 가하여 1000 mL한다.

2) 타이로신 표준액

상용표준타이로신 적당량을 5 mmHg, 60℃에서 3시간 건조한 후 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 메탄올 소량을 가하여 용해하고, 4호 완충액을 정확히 가하여 1 mg역가/ mL의 타이로신표준액을 조제한다. 사용할 때, 표준원액을 4호 완충액+메탄올(4+1)로 정확히 희석하고, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2 µg역가/ mL의 각 표준액을 조제한다.

3) 배지 : F-7호 배지

팜톤 6 g, 육즙 1.5 g, 효모 3 g, 포도당 1 g, 한천 13~20 g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조제한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균 후, 염산용액(1+11) 또는 염화나트륨(4.2%, W/V)으로 pH를 7.9~8.1로 조정한다.

4) 균액 및 첨가량

시험균, *Micrococcus luteus* ATCC 9341로 100배 희석한 균액을 배지 100 mL당 0.1 mL 정도 가한다.

5) 한천평판 : 아연바시트라신과 동일

나. 시료액의 조제

1) 타이로신이 40g(역가)/t이상인 경우

분석시료 일정량[타이로신으로써 0.4 mg(역가)상당량]을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 증류수 50 mL를 가하여 20분간 진탕한다. 메탄올 50 mL를 가하여 20분간 진탕추출한 후, No. 5A 여과지로 여과한다. 여액의 일정량을 4호 완충액+메탄올(7+1)로 정확히 희석하고, 0.8 µg역가/ mL의 시료액을 조제한다.

2) 타이로신이 10g역가/t이상에서 40g(역가)/t미만인 경우

분석시료 일정량(타이로신으로써 0.2 mg 역가상당량)을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 증류수 50 mL를 가하여 20분간 진탕한다. 메탄올 50 mL를 가하여 20분간 진탕 추출한 후, No. 5A 여과지로 여과한다. 여액의 일정량을 4호 완충액으로 정확히 희석하고, 0.8 µg역가/ mL의 시료액을 조제한다.

다) 타이로신이 10g(역가)/t이하인 경우

분석시료 일정량[타이로신으로써 80 µg(역가)상당량]을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 증류수 50 mL를 가하여 20분간 진탕한다. 메탄올 50 mL를 가하여 20분간 진탕 추출한 후 No. 5A 여과지로 여과한다. 여액 20 mL를 50 mL 증발플라스크에 정확히 넣는다. 50℃ 수욕조에서 감압농축 한 후, 증류수 8 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 4호 완충액 + 메탄올(2+1) 12 mL를 정확히 가하여 진탕하고 0.8 µg(역가)/ mL의 시료액을 조제한다.

다. 정량 : 표준곡선법

10.3.5. 스피라마이신(Spiramycin) [C₄₃H₇₄N₂O₁₄]

가. 시약의 조제

1) 완충액 : 4호 완충액(pH 8.0)

인산2수소칼륨 13.3g을 칭량하여 증류수 750 mL로 용해한다. 수산화칼륨용액(6.6%, W/V) 100 mL를 가하여 pH를 7.9~8.1로 조정한다. 증류수를 가하여 1000 mL한다.

2) 희석용매 : 4호 완충액+메탄올(7+3)

3) 스피라마이신 표준액

상용표준 스피라마이신 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 메탄올 소량을 가하여 용해하고,

4호 완충액을 정확히 가하여 1 µg역가/ mL의 스피라마이신 표준원액을 조제한다. 사용할 때, 표준액을 희석용매로 정확히 희석하고, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 µg/ mL의 각 표준액을 조제한다.

4) 배지 : F-7호 배지

웹톤 6g, 육즙 1.5g, 효모 3g, 포도당 1g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조제한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균 후, 염산+증류수(1+11) 또는 수산화나트륨(4.2W/V%)으로 pH를 5.9~6.1로 조정한다.

5) 균액 및 첨가량

시험균, *Micrococcus luteus* ATCC 9341로 10배 희석한 균액을 배지 100 mL당 0.2 mL정도가한다.

6) 한천평판 : 천공법

나. 시료액의 조제

1) 스피라마이신이 20g역가/t이상으로 모넨신나트륨을 포함하지 않는 경우

분석시료의 일정량[스피라마이신이 50g역가/t이상의 경우에는 스피라마이신으로써 0.5 mg역가 상당량, 20g역가/t이상, 50g역가/t미만의 경우에는 0.2 mg 역가 상당량, 20g역가/t미만의 경우에는 50 µg역가 상당량]을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣고, 아세톤 100 mL를 가하여 20분간 진탕하여 추출한 후, No.6A여과지로 여과한다. 여액 24 mL를 50 mL 증발플라스크에 넣고 40℃의 수욕조에서 감압농축하고 희석용매 15 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해한다. 헥산 5 mL를 가하여 진탕한 후 100 mL의 원심분리관에 넣고 3000rpm에서 5분간 원심분리 한 후 증류수+메탄올층(하층)의 일정량을 희석용매로 정확히 희석하고 0.4 µg역가/ mL의 시료액을 조제한다.

2) 스피라마이신이 20g역가/t이상으로 모넨신나트륨을 포함한 경우

분석시료의 일정량[스피라마이신이 50g역가/t이상의 경우에는 스피라마이신으로써 0.5 mg 역가상당량, 20g역가/t이상 50g역가/t미만의 경우에는 0.2 mg역가 상당량]을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 아세톤 100 mL를 가하여 20분간 진탕하여 추출하고 No. 6A 여과지로 여과한다. 여액 24 mL를 50 mL증발플라스크에 정확히 넣고, 40℃의 수욕조에서 감압농축하고 희석용매 15 mL를 가하여 잔류물을 용해한다. 헥산 5 mL를 가하여 진탕한 후, 100 mL의 공전원심분리관에 넣고 3000rpm에서 5분간 원심분리 한다. 증류수+메탄올층(하층) 10 mL를 20 mL의 비이커에 정확히 넣고, 염산으로 pH를 1.0이하로 조정하여 1시간 방치한 후, 암모니아로 pH를 7.9~8.1로 조정한다. 용액전량을 50 mL의 메스플라스크에 옮겨담고 희석용매를 표선까지 가한다. No. 5A 여과지로 여과한 후, 여액의 일정량을 희석용매로 정확히 희석하고 0.4 µg역가/ mL의 시료액을 조제한다.

3) 스피라마이신이 20g(역가)/t미만이고 모넨신나트륨을 포함할 경우

분석시료의 일정량(스피라마이신으로써 50 µg역가 상당량)을 칭량하여 200 mL 삼각플라스크에 넣는다. 아세톤 100 mL를 가하고 20분간 진탕 추출하고 No. 6A 여과지로 여과한다. 여액 24 mL를 50 mL 증발플라스크에 정확히 넣는다. 40℃ 수욕조에서 감압농축한 후, 희석용매 15 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해한다. 헥산 5 mL를 가하여 진탕한 후, 100 mL의 원심분리관에 넣고 3000rpm에서 5분간 원심분리한다. 증류수+메탄올(하층) 10 mL를 20 mL의 비이커에 적당히 넣는다. 염산으로 pH를 1.0이하로 조정한다. 1시간 방치한 후, 암모니아수로 pH를 7.9~8.1로 조정한다. 용액전량을 20 mL의 메스플라스크에 옮긴다. 표선까지 희석용매를 가하여 진탕한 후 No. 5A 여과지로 여과하고 0.4 µg(역가)/ mL의 시료액을 조제한다.

다. 정량: 표준곡선법

10.3.6. 살리노마이신 나트륨(Salinomycin) [C₄₂H₇₀O₁₁]

가. 적용범위 : 닭사료

1) 시약의 조제

가) 희석용매 : 증류수+메탄올(7+3)

나) 살리노마이신 표준액

상용표준 살리노마이신 적당량을 60℃, 5 mmHg이하의 감압조건하에서 3시간 건조한 후, 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 메탄올을 가하여 용해하고, 1 mg역가/ mL의 살리노마이신 표준원액을 조제한다. 사용할 때, 표준원액을 희석용매로 정확히 희석하고, 3 µg (역가)/ mL의 고농도표준액 및 0.75 µg(역가)/ mL의 저 농도표준액의 각 표준원액을 조제한다.

다) 배지 : F-16호 배지

펩톤 2.0g, 효모 2.5g, 포도당 1.0g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조제한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균 후, 염산+증류수(1+11) 또는 수산화나트륨(4.2%, W/V)으로 pH를 5.9~6.1로 조정한다.

라) 포자액 및 첨가량

시험균, *Bacillus subtilis* ATCC 6633으로 1×10⁷개/ mL의 포자액을 배지 100 mL당 0.1 mL정도 가한다.

마) 한천평판 : 원통법

바) 추출용매 : 메탄올+증류수(9+1)

2) 시료액의 조제

분석시료 일정량[살리노마이신나트륨 0.5 mg(역가) 상당량]을 칭량하여 100 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 50 mL를 가하고, 20분간 진탕하고 추출한 후 No. 5A 여과지로 여과한다. 여액을 칼럼관(내경 14 mm)에 칼럼크로마토그래피용 염기성알루미나[입경 74~177 µm, 200~80mesh, F-20(Alcoa 또는 Merck제)] 12g을 건식으로 충전하고 처음 유출액 5 mL를 버린다. 그 다음 유출액의 일정량을 증류수+메탄올(24+1)로 정확히 희석하여 3 µg(역가)/ mL의 고농도 시료액을 조제하고 희석용매로 정확히 희석하여 0.75 µg (역가)/ mL의 저농도 시료액을 조제한다.

3) 정량 : 2-2 용량법

나. 적용범위 : 소사료

1) 시약의 조제

가) 희석용매 : 증류수+메탄올(7+3)

나) 살리노마이신 표준액

상용표준 살리노마이신 적당량을 60℃, 5 mmHg이하의 감압조건하에서 3시간 건조한 후, 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 메탄올을 가하여 용해하고, 1 mg역가/ mL의 살리노마이신 표준원액을 조제한다. 사용할 때, 표준원액을 희석용매로 정확히 희석하고, 1.2 µg(역가)/ mL의 고농도표준액, 0.3 µg(역가)/ mL의 저농도표준액의 각 표준원액을 조제한다.

다) 배지 : F-22호 배지

효모 2.5g, 포도당 1.0g, 황산나트륨 50g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조성한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균 후, 염산(1+11) 또는 수산화나트륨(4.2%, W/V)으로 pH를 5.9~6.1로 조정한다.

라) 포자액 및 첨가량

시험균, *Bacillus* ATCC 6633으로 1×10⁷개/ mL의 포자액을 배지 100 mL당 0.5 mL정도로 가한다.

마) 한천평판 : 원통법

바) 추출용매 : 메탄올+증류수(9+1)

2) 시료액의 조제

분석시료 일정량(살리노마이신나트륨으로써 0.2 mg(역가) 상당량)을 칭량하여 100 mL의

삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 50 mL를 가하고, 20분간 진탕하고 추출한 후 No. 5A 여과지로 여과한다. 여액을 칼럼관(내경 14 mm)에 칼럼크로마토그래피용 염기성알루미나[입경 74~177 μm , 200~80mesh, F-20(Alcoa 또는 Merk제)] 12g을 건식으로 충전하고 처음 유출액 5 mL를 버린다. 그 후 유출액의 일정량을 증류수+메탄올(24+1)로 정확히 희석하고 1.2(역가)/ mL의 고농도 시료액을 조제하고, 희석용매로 정확히 희석하여 0.8 μg (역가)/ mL의 저농도 시료액을 조제한다.

3) 정량 : 2-2 용량법

10.3.7. 모넨신나트륨(Monensin-Na)[$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_{11}\text{-Na}$]

가. 적용범위 : 닭사료

1) 시약의 조제

가) 모넨신나트륨 표준액

상용표준 모넨신나트륨 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 메탄올을 가하여 용해하고 1 mg 역가/ mL의 모넨신나트륨 표준원액을 조제한다. 사용할 때 표준원액을 증류수+메탄올(7+3)로 정확히 희석하고, 4 μg 역가/ mL의 고농도 표준액 및 1 μg 역가/ mL의 저농도 표준액을 조제한다.

나) 배지 : F-16호 배지

펩톤 2g, 효모 2.5g, 포도당 1g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조제한다. 121°C에서 15분간 고압증기 멸균 후, 염산(1+11) 또는 수산화나트륨(4.2%, W/V)으로 pH를 5.9~6.1로 조정한다.

다) 포자액 및 첨가량

시험균, *Bacillus subtilis* ATCC 6633으로 1×10^7 개/ mL의 포자액을 배지 100 mL당 0.1 mL 정도 가한다.

라) 한천평판 : 원통법

마) 추출용매 : 메탄올 + 증류수 (9+1)

2) 시료액의 조제

분석시료의 일정량 모넨신나트륨으로써 0.5 mg(역가상당량)을 칭량하여 100 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 50 mL를 가하여 20분간 진탕하고, 추출한 후, No. 5A 여과지로 여과한다. 여액을 칼럼(칼럼관내경 14 mm)에 칼럼크로마토그래피용 염기성알루미나[입경 74~177 μm , 200~80 mesh, F-20(Alcoa제 또는 Merck제) 12g을 건식으로 충전한 것]에 넣고 처음의 추출액 5 mL는 버린다. 그 다음 유출액의 일정량을 증류수+메탄올(9+1)로 정확히 희석하고 4 μg 역가/ mL의 고농도시료액을 조제한다. 이것을 증류수+메탄올(7+3)로 정확히 희석하고 1 μg 역가/ mL의 저농도 시료액을 조제한다.

3) 정량 : 2 - 2 용량법

나. 적용범위 : 소사료

1) 시약의 조제

가) 모넨신나트륨 표준액

상용표준 모넨신나트륨 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 메탄올을 가하여 용해하고 1 mg 역가/ mL의 모넨신나트륨 표준원액을 조제한다. 사용할 때 표준원액을 증류수+메탄올(7+3)로 정확히 희석하고, 2 μg 역가/ mL의 고농도 표준액 및 0.5 μg 역가/ mL의 저농도 표준액을 조제한다.

나) 배지 : F-22호 배지

효모 2.5 g, 포도당 10 g, 황산나트륨 50 g, 한천 18~20 g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조제한다. 121°C에서 15분간 고압증기 멸균 후, 염산 + 증류수(1+11) 또는 수산화나트륨(4.2%, W/V)으로 pH를 5.9~6.1로 조정한다.

다) 포자액 및 첨가량

시험균, *Bacillus subtilis* ATCC 6633으로 1×10^7 개/ mL의 포자액을 배지 100 mL당 0.5 mL 정도 가한다.

라) 한천평판 : 원통법

마) 추출용매 : 메탄올 + 증류수(9+1)

2) 시료액의 조제

분석시료의 일정량 모넨신나트륨으로써 0.3 mg(역가 상당량)을 칭량하여 100 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 추출용매 50 mL를 가하여 20분간 진탕하고 추출한 후, No. 5A 여과지로 여과한다. 여액을 칼럼(칼럼관 내경 14 mm)에 칼럼크로마토그래피용 염기성 알루미늄나[입경 74~177 μ m, 200~80 mesh, F-20(Alcoa제 또는 Merck제) 12g을 건식으로 충전한 것]에 넣고 처음 추출액 5 mL는 버린다. 그 다음 추출액의 일정량을 증류수로 정확히 희석하고 2 μ g역가/ mL의 고농도시료액을 조제하고 이것을 증류수 + 메탄올(7+3)로 정확히 희석하여 0.5 μ g역가/ mL의 저농도시료액을 조제한다.

3) 정량 : 2 - 2 용량법

10.3.8. 라살로시드나트륨(Lasalocid-Na) [$C_{34}H_{53}NaO_8$]

가. 적용범위 : 닭사료

1) 시약의 조제

가) 라살로씨드나트륨 표준액

상용표준 라살로씨드 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 메탄올을 정확히 가하여 용해하고, 1 mg(역가)/ mL의 라살로씨드 표준원액을 조제한다. 사용할 때 표준원액을 증류수 + 메탄올(3+1)로 정확히 희석하고, 1 μ g(역가)/ mL의 고농도 표준액과 0.5 μ g(역가)/ mL의 저농도 표준액을 조제한다.

나) 배지 : F-18호 배지

효모즙 2.5g, 포도당 10g, 염화마그네슘 10g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조성한다. 121°C에서 15분간 고압증기 멸균한다.

다) 포자액 및 첨가량

시험균, *Bacillus subtilis* ATCC 6633으로 1×10^7 개/ mL의 포자액을 배지 100 mL당 0.4 mL정도 가한다.

라) 한천평판 : 천공법

마) 실리카겔

칼럼크로마토그래피용 실리카겔[입경 62~210 μ m(250~65mesh) Kieselgel 40 Art 10180 E.Merck제]을 110°C에서 2시간 건조한다.

2) 시료액의 조제

가) 추출

분석시료의 일정량[라살로씨드나트륨으로써 1 mg(역가) 상당량]을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 클로르포름 100 mL를 가하여 20분간 진탕추출한 후, No. 5A 여과지로 여과한다. 여액 25 mL를 실험관에 넣고, 무수황산나트륨을 가하여 탈수한 후, No. 5A 여과지로 여과한 다음 칼럼크로마토그래피용 시료액으로 한다.

나) 칼럼크로마토그래피

칼럼관(내경 10 mm)에 실리카겔 2.5g을 메탄올로 현탁시켜 흘러 보낸다. 메탄올 20 mL 및 클로르포름 50 mL를 순차적으로 세정하여, 칼럼을 조제한다. 시료액 5 mL를 칼럼에 정확히 넣고, 액면이 충전제의 상면에서 3 mm 높이가 될 때까지 유속 2~3 mL/min으로 유출시키고, 클로르포름 30 mL를 가하여, 동일하게 유출시킨다. 50 mL 증발플라스크를 칼럼아래에 두고, 메탄올 15 mL를 칼럼에 가하여 라살로씨드나트륨을 용출시켜 50°C의 농축기에서 감압 농축한 후, 메탄올 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해한다. 용액의 일정량을 증류수 + 메탄올(5+1)로 정확히 희석하고, 1 μ g(역가)/ mL의 고농도 시료액

을 조제한다. 그 다음 증류수+메탄올(3+1)로 정확히 희석하고 0.5 µg(역가)/ mL의 저농도 시료액을 조제한다.

3) 정량 : 2 - 2 용량법

나. 적용범위 : 소사료

1) 시약의 조제

가) 라살로씨드나트륨 표준액

상용표준 라살로씨드나트륨 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 메탄올을 정확히 가하여 용해하고, 1 mg(역가)/ mL의 라살로씨드나트륨 표준원액을 조제한다. 사용할 때 표준원액을 증류수+메탄올(3+1)로 정확히 희석하고, 2 µg(역가)/ mL의 고농도 표준액과 1 µg(역가)/ mL의 저농도 표준액을 조제한다.

나) 배지 : F-18호 배지

효모즙 2.5g, 포도당 10g, 염화마그네슘 10g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조성한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한다.

다) 포자액 및 첨가량 : 시험균, *Bacillus subtilis* ATCC 6633으로 1×10^7 개/ mL의 포자액을 배지 100 mL당 0.4 mL정도 가한다.

라) 한천평판 : 아연바시트라신과 동일

마) 효소용액 : 효소제 4g을 증류수로 용해하여 100 mL로 한다.

2) 시료액의 조제

가) 추출

분석시료 18.2g을 칭량하여 200 mL의 삼각플라스크에 넣는다. 효소용액 15 mL를 가하여 진탕한 후, 10~20분간 실온에 방치한다. 아세토니트릴 85 mL를 가하여 30분간 진탕 추출한다. 그 후 No. 5A여과지로 여과하여 정제용 시료액으로 한다.

나) 정제

시료액 25 mL를 200 mL 분액여두에 정확히 넣는다. 증류수 25 mL를 가하여 헥산 50 mL를 가하여 10분간 진탕한다. 방치한 후, 헥산층(상층)을 200 mL 농축플라스크에 넣는다. 그리고 분액여두에 헥산 50 mL를 가하여 1분간 진탕하고 헥산층을 그 농축플라스크에 넣는다. 동일한 조작을 반복하고, 헥산층을 합하여, 50℃ 농축기에서 감압 농축한다. 헥산 10 mL를 가하여 잔류물을 용해하고, 카트리지칼럼크로마토그래피용 시료액으로 한다.

다) 카트리지칼럼크로마토그래피

실리카겔카트리지(Sep-pak Silica Cartridge, Waters제)를 연결한 주사기에 헥산 10 mL를 넣고 세정한다. 시료액을 주사기에 넣고, 1 mL이하까지 자연 유하시킨다. 그 후, 농축플라스크를 헥산 10 mL로 세정하고, 세액을 주사기에 넣고, 동일한 조작을 2회 반복한다. 그리고, 헥산 20 mL 및 클로르포름 20 mL를 주사기에 넣고 실리카겔카트리지를 순차적으로 세정한다. 50 mL 농축플라스크를 실리카겔카트리지 아래에 두고, 클로르포름+메탄올(4+1) 30 mL를 주사기에 넣고 라살로씨드나트륨을 용출시킨다. 용출액을 50℃ 농축기에서 감압 농축한 후, 메탄올 10 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고 여과한다. 여액의 일정량을 증류수 + 메탄올(45+7)로 정확히 희석하고 2 µg(역가)/ mL의 고농도 시료액을 조제하고, 그것을 증류수+메탄올(3+1)로 정확히 희석하여 1 µg(역가)/ mL의 저농도 시료액을 조제한다.

3) 정량 : 2 - 2 용량법

10.3.9. 하이그로마이신 B (Hygromycin-B)[C₂₀H₃₇N₃O₁₃]

가. 시약의 조제

1) 완충액 : 4호 완충액(pH 8.0)

인산2수소칼륨 13.3g을 칭량하여 증류수 750 mL로 용해한다. 수산화칼륨 용액(6.6%, W/V) 100 mL를 가하여 pH 7.9~8.1로 조정 한 후, 증류수를 가하여 100 mL로 한다.

2) 희석용매

에틸렌디아민 4초간 2수소 2나트륨 2수화물 1g을 칭량하여, 4호 완충액으로 용해하여 1000 mL로 한다.

3) 하이그로마인B 표준액

상용표준 하이그로마이신B 적당량을 5 mmHg이하의 감압하에서 60℃로 3시간 건조한다. 4 mg이상을 정확히 칭량하고, 4호 완충액을 정확히 가하여 용해하고, 1000단위/ mL의 하이그로마이신B 표준원액을 조제한다. 사용할 때, 표준원액을 희석용매로 정확히 희석하고 5, 10, 20, 40, 80단위/ mL의 각 표준액을 조제한다.

4) 배지 : F-3호 배지

펄톤 5g, 육즙 3g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조성한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한다. 멸균 후, 염산(1+1) 또는 염화나트륨용액(4.2%, W/V)으로 pH를 7.9~8.1로 조성한다.

5) 포자액 및 첨가량

시험균, *Bacillus subtilis* ATCC 6633으로 1×10⁷개/ mL의 포자액을 배지 100 mL당 0.2 mL 비율로 가한다.

6) 한천평판 : 아연바시트라신과 동일

7) 칼럼크로마토그래피용 충전제

가) 합성흡착제 : 합성흡착제(스틸렌디비닐벤젠중합체, Ambereit XAD - 2, Rohm & Haas제) 100 g을 칭량하여 1 L용 비이커에 넣는다. 메탄올 500 mL로 세정한 후, 세액을 버리고, 메탄올 500 mL를 가하고 하룻밤 방치한다. 그 다음 증류수로 충분히 세정하고 수중에서 보존한다.

나) 이온교환수지 : 이온교환수지(약산성카치온교환, Ambereit CG-50 Type-1, Rohm & Haas제) 100g을 칭량하여, 1 L용 비이커에 넣는다. 암모니아+증류수(2+23) 500 mL로 세정한다. 세액을 버리고 암모니아+ 증류수(2+23) 500 mL를 가하여 하룻밤 방치한다. 그 다음 증류수로 충분히 세정하여 NH₄⁺ type 수지를 조제한다. 별도로, 이온교환수지 100g을 칭량하여 1 L용 비이커에 넣는다. 염산+증류수(1+11) 500 mL로 세정한 다음, 세액을 버리고 염산+증류수(1+11) 500 mL를 가하여 하룻밤 방치한다. 그 다음 증류수로 충분히 세정하고 H⁺type 수지를 조제한다. NH₄⁺ type 수지 70 mL로 H⁺ type 수지 30 mL를 가하여 충분히 진탕하고, 수중에서 보존한다.

나. 시료액의 조제

1) 추출

분석시료의 일정량(하이그로마이신B로써 200단위 상당량)을 칭량하여 300 mL 삼각플라스크에 넣는다. 황산수소칼륨용액(1%, W/V) 200 mL를 가하여, 20분간 진탕하고 추출한다. 추출액을 200 mL 원심분리관에 넣고, 3000rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액 150 mL를 200 mL 비이커에 넣고, 수산화나트륨 용액(40%, W/V)으로 pH를 7.9~8.1로 조정한다. 그리고 200 mL 원심분리관에 넣고, 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 No. 5A 여과지로 여과하고, 칼럼크로마토그래피용 시료액으로 한다.

2) 칼럼크로마토그래피

제1칼럼관(내경 10 mm)에 합성흡착제를 증류수로 현탁시킨 것을 10 cm 높이까지 흘리고, 제2칼럼관(내경 10 mm)에 이온교환수지를 증류수로 현탁시킨 것을 6cm 높이까지 흘린다. 각각의 칼럼관을 탈지면으로 가볍게 막은 후, 증류수 20 mL를 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm 높이가 될 때까지 유출시켜 칼럼을 조제한다. 그 다음 제1칼럼의 하단과 제 2칼럼의 상단을 공기가 새지 않도록 연결한다. 시료액 100 mL를 제1의 칼럼에 넣는다. 제1의 칼럼의 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유속 2

mL/min로 제2의 칼럼으로 유출시킨 후, 제1의 칼럼에 증류수 40 mL를 가하여, 제2의 칼럼의 액면이 충전제의 상면에서 3 mm의 높이가 될 때까지 유출시킨다. 제1의 칼럼을 분리하고, 제2의 칼럼 하부에 100 mL용 농축플라스크를 두고 암모니아+증류수(1+24) 25 mL를 제2의 칼럼에 가하여 하이그로마이신B를 용출시킨다. 용출액을 70℃의 수욕조에서 감압농축한 후, 희석용매를 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해하고, 20단위/ mL의 시료액을 조제한다.

다. 정량 : 표준곡선법

10.3.10. 데스토마이신 A(Destomycin-A)[C₂₀H₃₇N₃O₁₃]

가. 적용범위 : OTC를 포함하지 않은 사료

나. 시약의 조제

1) 완충액 : 4호 완충액(pH 8.0)

인산2수소칼륨 13.3g을 칭량하여 증류수 750 mL로 용해하고, 수산화칼륨용액(6.6%, W/V) 100 mL를 가하여 pH 7.9~8.1로 조정 한 후, 증류수를 가하여 1000 mL로 한다.

2) 희석용매

에틸렌디아민 4초산 2수소 나트륨 2수화물 1g을 칭량하여, 4호 완충액에 희석하여 1000 mL로 한다.

3) 데이토마이신A 표준액

상용표준 데이토마이신A 적당량을 5 mmHg이하의 감압하에서 60℃에서 3시간 건조한 후 40 mg이상을 정확히 칭량한다. 4호 완충액을 정확히 가하여 용해하고, 1 mg(역가)/ mL의 데이토마이신A 표준액을 조제한다. 사용할 때, 표준원액을 희석용매로 정확히 희석하고, 10, 20, 40, 80 µg(역가)/ mL의 각 표준액을 조제한다.

4) 배지 - F-3호 배지

펩톤 5g, 육즙 3g, 한천 13~20g, 증류수 적당량으로 배지 1000 mL를 조성한다. 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한다. 멸균 후, 염산+증류수(1+1) 또는 염화나트륨용액(4.2%, W/V)으로 pH를 7.9~8.1로 조정한다.

5) 포자액 및 첨가량

시험균, Bacillus subtilis ATCC 6633으로 1×10⁷개/ mL의 포자액을 배지 100 mL당 0.2 mL비율로 가한다.

6) 한천평판 : 아연바시트라신과 동일

7) 이온교환수지

이온교환수지[약산성카치온교환, Ambereit CG-50 Type-1, Rohm & Haas제] 100g을 칭량하여 1 L용 비이커에 넣고, 암모니아수+증류수(2+23) 500 mL로 세정한다. 세액을 버리고 암모니아수+증류수(2+23) 500 mL를 가한 다음 하룻밤 방치한다. 그 다음 증류수로 충분히 세정하고 NH⁴⁺ type 수지를 조제한다. 별도로 이온교환수지 100g을 칭량하여 1 L용 비이커에 넣고 염산+증류수(1+11) 500 mL로 세정한다. 세액을 버리고, 염산+증류수(1+11) 500 mL를 가한 다음 방치한다. 그 다음 증류수로 충분히 세정하고 H+type 수지를 조제한다. NH⁴⁺type 수지 70 mL로 H+type 수지 30 mL를 가한다. 충분히 진탕한 후 수중에 보존한다.

나. 시료액의 조제

1) 추출

분석시료의 일정량[데스토마이신으로써 0.2 µg(역가)상당량]을 칭량하여 300 mL 삼각플라스크에 넣는다. 황산수소칼륨용액(1%,W/V) 200 mL를 가하고, 20분간 진탕 추출한다. 추출액을 200 mL 원심분리관에 넣고, 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액 150 mL를 200 mL 비이커에 정확히 넣고, 암모니아수로 pH를 7.9~8.1로 조정한다. 200 mL 원심분리

관에 넣고 3000rpm에서 10분간 원심분리한 다음, 상등액을 No. 5A여과지로 여과하여, 칼럼크로마토그래피용 시료액으로 한다.

2) 칼럼크로마토그래피

이온교환수지를 증류수에 현탁시킨 것을 내경 10 mm 칼럼관에 높이 6 cm까지 흘리고 상부에 탈지면을 가볍게 채운다. 증류수 20 mL를 가하여 액면이 충전제의 상면에서 3 mm가 될 때까지 유출시켜 칼럼을 조제한다. 시료액 100 mL를 칼럼에 넣고, 칼럼의 액면이 충전제의 상면에서 3 mm가 될 때까지 유속 2 mL/min로 유출시킨다. 칼럼에 증류수 40 mL를 가하고 칼럼의 액면이 충전제의 상면에서 3 mm가 될 때까지 유출시킨다. 100 mL 농축플라스크를 칼럼 아래에 두고, 암모니아수 + 증류수(1+49) 25 mL를 칼럼에 가하여 데스토마이신A를 용출시킨다. 70℃의 수욕조에서 감압농축한 후, 희석용매 5 mL를 정확히 가하여 잔류물을 용해시키고, 20 µg(역가)/ mL의 시료액을 조제한다.

다. 정량 : 표준곡선법

10.4. 펜벤다졸(Fenbendazole)

가. 분석원리

사료 시료 중의 펜벤다졸을 에틸아세테이트, 헥산, 에탄올, 0.2 N 염산으로 추출한 후 양이온교환 카트리지로 정제하여 액체크로마토그래프/질량분석기로 분석한다.

나. 측정기기

액체크로마토그래프/질량분석기

다. 시약 및 시액

- 1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준원액 : 펜벤다졸 표준품을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100 mg/L로 한다. 조제된 표준원액은 냉동보관 한다.
- 3) 표준용액 : 표준원액을 메탄올로 희석하여 펜벤다졸은 0.15, 0.3, 0.45, 0.6 및 0.75 mg/L가 되게 한다. 조제된 표준용액은 냉장보관한다.
- 4) 양이온교환 카트리지 : MCX (Mixed Mode Cation Exchange) 카트리지(60 mg) 또는 이와 동등한 것

라. 시험용액의 제조

균질화 한 검체 3 g을 달아 15 mL 원심관에 넣고 에틸아세테이트 8 mL를 가하여 흔들어 섞는다. 이 용액을 3,000 G에서 5분간 원심분리한다. 상층액을 취하고, 잔류물에 에틸아세테이트 8 mL를 가하여 위와 동일하게 원심분리하여 상층액을 모은다. 상층액을 모은 액은 40℃ 수욕조상에서 감압농축 한다. 잔류물에 헥산 5 mL를 가하여 30초 동안 균질화한 후 에탄올:0.2 N 염산(2:1) 혼합용액 1 mL를 가하여 30초 동안 균질화하고 아래층을 취하여 45℃ 수욕조상에서 감압농축 한다. 잔류물에 5% 개미산 메탄올 용액 3 mL를 가하여 녹인다. 미리 아세토니트릴:초산(95:5) 1 mL와 5% 개미산 메탄올 용액 2 mL로 활성화시킨 양이온교환 카트리지에 위의 5% 개미산 메탄올 용액 3 mL에 녹인 잔류물을 흡착시키고 50% 메탄올 용액 2 mL로 세척한다. 25% 수산화암모늄:아세토니트릴(1:4) 혼합용액 3 mL로 용출시켜 40℃ 이하의 수욕상에서 질소농축하고 잔류물을 0.1% 개미산 용액:메탄올(1:1) 혼합용액 1 mL로 녹인 후 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 조건

가) 칼럼 : C18(2.0 × 150 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 칼럼온도 : 40℃

다) 이동상

(1) 이동상 A : 0.1% 개미산 용액

(2) 이동상 B : 0.1% 개미산 메탄올 용액

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0.0	20	80
1.5	20	80
6.0	95	5
8.0	95	5
9.0	20	80
10.0	20	80

라) 유속 : 0.3 mL/분

마) 주입량 : 2 μ L

바) 질량분석기 조건

(1) Ionization : ESI(positive)

(2) Capillary Temperature : 450°C

(3) Collision gas : 질소(N₂)

바. 정량시험

- 1) 시험용액 및 표준용액을 각각 질량분석기에 주입하여 아래표의 특이이온을 확인한다. 이후 각각에서 얻은 크로마토그램으로부터 머무름 시간을 비교하고, 펜벤다졸은 m/z 268에 대한 면적으로 각각 검량선을 작성하여 시험용액 중 각각의 함량을 구한다.

물질	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)
펜벤다졸	300	268, 159, 131

- 2) 정량한계 : 각각 0.001 mg/kg

10.5. 디클라주릴(Diclazuril)

가. 분석원리

검체에 존재하는 디클라주릴을 에틸아세테이트로 추출하고 추출액을 농축하여 헥산:아세토니트릴 분배로 정제하여 액체크로마토그래프/ 자외부흡광검출기로 정량한다.

나. 장치

액체크로마토그래프/자외부흡광검출기

다. 시약 및 시액

- 1) 표준원액 : 디클라주릴을 메탄올 : 디메틸포름아미드(90 : 10)에 녹여 100 ppm으로 제조하여 사용한다.
- 2) 표준용액 : 표준원액 일정량을 취하여 메탄올로 희석하여 사용한다.
- 3) 기타시약 : 특급

라. 시험용액의 조제

검체 일정량을 취하여 물을 4배 부피로 가하고 균질화한다. 균질액 2.5 mL를 취하여 에틸아세테이트 3 mL씩으로 2회 반복추출한다. 유기용매층을 모아 60°C에서 증발건조시킨 후 잔류물을 50% 아세토니트릴 용액 2 mL에 재용해한다. 헥산 3 mL로 2회 세척한 다음 에틸아세테이트 3 mL로 추출하여 증발건조시킨다. 잔류물을 이동상용액 120 μ L로 재용해하여 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

- 1) 측정조건

가) 칼럼 : ODS-Hypersil(4.6 $\times$ 100 mm, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상 : 0.1 M 초산암모늄(Ammonium acetate):테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran) (69:31)

다) 유속 : 3 mL/분

라) 파장 : UV 278 nm

바. 정량시험

시험용액 및 표준용액 35 μ L를 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입한다. 얻어진 각 피크의 머무름시간을 비교하여 피크의 높이 또는 면적으로 검량선을 작성하여 검체 중 디클로로메탄의 농도를 구한다.

10.6. 말라카이트 그린(Malachite Green)

가. 분석원리

검체를 아세토니트릴과 디클로로메탄으로 추출하고 감압농축한 후, 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논(DDQ)을 이용하여 류코말라카이트 그린을 말라카이트 그린으로 산화시키고 SPE(Solid Phase Extraction) 칼럼으로 정제하여 액체크로마토그래프/가시부흡광검출기로 분석한다.

나. 장치

액체크로마토그래프/가시부흡광검출기

다. 시약 및 시액

- 1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액 : 말라카이트 그린 및 크리스탈 바이올렛 표준품을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100 μ g/mL로 하고 갈색유리병에 보관한다.
- 4) 표준용액 : 표준원액을 이동상 A에 적당한 농도로 희석하여 사용한다.
- 5) 1 mM 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논(2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, DDQ) 용액 : 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논 0.227 g을 100 mL 메스플라스크에 취하고 아세토니트릴로 녹여 표시선까지 채워 10 mM DDQ 용액을 만들어 냉장 보관한다. 사용직전에 10 mM DDQ 용액을 아세토니트릴로 10배 희석하여 사용한다.
- 6) 25% 염산수산화아민 용액(Hydroxylamine hydrochloride, HAH) : 염산수산화아민 25 g을 100 mL 메스플라스크에 취하고 물로 녹여 표시선까지 채운다.
- 7) 1 M p-톨루엔설폰산(p-Toluene sulfonic acid, p-TSA) 용액 : p-톨루엔설폰산 9.5 g을 50 mL 메스플라스크에 취하고 물로 녹여 표시선까지 채운다.
- 8) 5 mM p-톨루엔설폰산/0.1 M 초산암모늄완충용액 : 7.7 g 초산암모늄을 1 L 메스플라스크에 취하고 물로 녹여 표시선까지 채운다. 초산 8 mL와 1 M p-톨루엔설폰산 5 mL를 넣어 pH 4.5로 조정한다. 이 액은 이동상 A 용액 조제 시 사용한다.
- 9) 알루미나(충진제 Alumina, 중성) 카트리지 또는 이와 동등한 것
- 10) 프로필설폰산(충진제 Propylsulfonic acid, PRS) 카트리지 또는 이와 동등한 것
- 11) 기타시약 : 특급

라. 시험용액의 조제

균질화한 검체 5 g을 50 mL 원심분리관에 취하고 5 mM p-톨루엔설폰산/0.1 M 초산암모늄완충용액 5 mL, 25% 염산수산화아민(HAH) 용액 1 mL, 1 M p-톨루엔설폰산(p-TSA) 용액 100 μ L를 넣어 30초간 강하게 균질화한다. 여기에 아세토니트릴 25 mL를 넣어 30초간 강하게 진탕하고 다시 알루미나(80~200메쉬) 10 g을 넣어 15초간 강하게 진탕한 후 0°C, 2,000 G에서 5분간 원심분리하고 상등액은 미리 물 50 mL와 디에틸렌글리콜 2 mL를 넣은 250 mL 분액깔때기에 옮긴다. 다시 아세토니트릴 25 mL를 넣어 1분간 강하게 진탕하고 0°C, 2,000 G에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 앞의 액과 합한다. 디클로로메탄 25 mL를 넣고 분액깔때기를 30초간 흔들어 섞은 후 정치하여 디클로로메탄층(아래층)을 취한다. 다시 디클로로메탄 25 mL를 넣어 이 과정을 한 번 반복하고 40°C 수욕 중에서 감압농축한 후 잔류물을 아세토니트릴 3 mL에 녹이고 1 mM 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논(DDQ) 용액 3 mL를 넣어 30분간 반응시킨다. 알루미나 카트리지(충진제 1 g) 및 프로필설폰산(Propylsulfonic acid, PRS) 카트리지(충진제 500 mg)를 미리 메탄올 5 mL와 아세토니트릴 5 mL로 활성화시키고, 프로필설폰산 카트리지에 아세토니트릴 5 mL를 넣은

후 알루미나 카트리지를 그 위에 연결한다. 검체를 추출한 액과 추출액이 담겨 있던 플라스크를 아세트니트릴 5 mL로 2회 세척한 액을 알루미나 카트리지에 흡착시키고 감압하여 분당 4 mL로 용출하고 알루미나 카트리지를 제거한다. 프로필설폰산 카트리지를 아세트니트릴 5 mL로 세척하고 감압하여 건조시킨 후 15 mL 원심분리관에 이동상 A 용액 4 mL로 용출한 액을 받아 이동상 A 용액으로 5 mL 눈금에 맞춘 후 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

- 1) 측정조건칼럼 : C18(4.6 × 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것
- 2) 이동상
 - 가) 이동상 A(95%) : 5 mM p-톨루엔설폰산/0.1 M 초산암모늄완충용액 : 아세트니트릴(50:50)
 - 나) 이동상 B(5%) : 아세트니트릴
- 3) 유속 : 1.0 mL/분
- 4) 측정과장 : 618 nm

바. 정량시험

- 1) 시험용액 및 표준용액을 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입한다. 얻어진 각 피크의 머무름 시간을 비교하여 피크의 높이 또는 면적으로 검량선을 작성하여 검체 중 말라카이트 그린의 함량을 구한다.
- 2) 정량한계 : 2 µg/kg

사. 확인시험

액체크로마토그래프/질량분석기로 정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이법 또는 피크 면적법에 따라 확인한다.

1) 액체크로마토그래프 조건

- 가) 칼럼 : C18(2.0 × 100 mm, 3 µm) 또는 이와 동등한 것
- 나) 이동상
 - (1) 이동상 A : 0.1% 개미산 수용액
 - (2) 이동상 B : 0.1% 개미산 메탄올용액

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0.0	80	20
1.5	80	20
6.0	0	100
8.0	0	100
8.5	80	20
10.0	80	20

다) 유속 : 0.3 mL/분

2) 질량분석기 조건

- 가) Ionization : ESI(positive)
- 나) Capillary Temperature : 450°C
- 다) Collision gas : 질소

Compound	Precursor Ion (m/z)	Fragment Ion (m/z)	Collision Energy (V)
Malachite green	329	313	51
	329	208	51
	329	165	91

10.7. 마두라마이신(Maduramycin)

가. 시험법 적용범위

사료 등에 적용한다.

나. 분석원리

검체 중 마두라마이신, 샘두라마이신 및 티아몰린을 아세토니트릴로 추출하고 SPE(Solid Phase Extraction) 카트리지로 정제하여 액체크로마토그래프/질량분석기로 분석한다.

다. 장치

액체크로마토그래프/질량분석기

라. 시약 및 시액

- 1) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액 : 마두라마이신 표준품을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100 µg/mL로 한다.
- 4) 표준용액 : 표준원액을 이동상에 적당한 농도로 희석하여 사용한다.
- 5) 후로리실 카트리지(500 mg, 6 mL) 또는 이와 동등한 것
- 6) 기타시약 : 특급

마. 시험용액의 조제

균질화한 검체 2 g에 아세토니트릴 6 mL를 넣어 강하게 진탕한 후 1,000 G에서 5분간 원심분리한다. -20℃에서 30분간 방치한 후 상층액 6 mL를 시험관에 옮기고 50℃에서 질소 농축시킨 후 헥산 3 mL에 녹여 추출액으로 한다. 미리 메탄올 5 mL와 헥산 5 mL로 활성화시킨 후로리실 카트리지에 추출액을 흡착시키고 헥산 5 mL로 4회 세척한 후, 메탄올 6 mL로 용출한다. 용출액은 40℃에서 질소 농축시키고 잔류물은 이동상 0.1 mL에 녹인 후 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 조건

가) 칼럼 : C₁₈(2.1 × 50 mm, 1.9 µm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상

- (1) 이동상 A : 0.1% 개미산, 5% 아세토니트릴 수용액
- (2) 이동상 B : 0.1% 개미산, 95% 아세토니트릴 수용액

시간(분)	A (%)	B (%)
0.0	80	20
15.0	0	100
17.0	0	100
18.0	80	20
25.0	80	20

다) 유속 : 0.2 mL/min

2) 질량분석기 조건

가) 칼럼 Ionization : ESI(positive)

나) Spray voltage : 5 kV

다) Capillary temperature : 210℃

라) Sheath gas : 질소(N₂)(10 psi)

마) Auxiliary gas : 질소(N₂)(10 psi)

바) SIM ion : m/z 934

사. 확인시험

- 1) 시험용액 및 표준용액을 위의 조건에 따라 질량분석기에 주입한다. 얻어진 각 피크의 머무름시간을 비교하고 피크의 면적으로 검량선을 작성하여 검체 중 마두라마이신의 함량을 구한다.
- 2) 정량한계 : 0.002 mg/kg

10.8. 설펜아마이드계 다성분 분석

가. 설펜아마이드계 동시분석

설펜아세트아마이드(sulfacetamide), 설펜파디아진(sulfadiazine), 설펜파티아졸(sulfathiazole), 설펜파피리딘(sulfapyridine), 설펜파메라진(sulfamerazine), 설펜파메티졸(sulfamethizole), 설펜파메타진(sulfamethazine), 설펜파클로로피리다진(sulfachloropyridazine), 설펜파메토사졸(sulfamethoxazole), 설펜파모노메토진(sulfamonomethoxine), 설펜피소사졸(sulfisoxazole), 설펜파디메토신(sulfadimethoxine), 설펜파퀴노살린(sulfaquinoxaline), 설펜파메토시디아진(sulfamethoxydiazine), 설펜피소미딘(sulfisomidine), 설펜파클로로피라진(sulfachloropyrazine)

1) 시약의 조제

- 가) 표준원액 : 각 표준품을 10.0 mg을 메스플라스크에 칭량 후 메탄올로 용해한다. 각 표준품을 혼합하여 냉장고에 보관한다.
- 나) 표준용액을 증류수와 메탄올 (1:1)로 적절한 농도로 혼합 및 희석한다.
- 다) methanol : HPLC용

2) 추출

- 가) 시료 10 g을 원심분리 시험관에 칭량한 후 0.1 M HCl이 첨가된 methanol을 50 mL첨가한다.
- 나) 30분간 진탕 후 30분간 초음파세척기로 추출 한다.
- 다) 3000rpm에서 10분 원심분리 한다.
- 라) 원심분리후 상등액 5 mL을 취한후 물로 50 mL 정용한다.
- 마) 정용된 상등액을 여과지에 여과시킨다.

3) 정제

- 가) 상등액 20 mL을 취하여 먼역컬럼에 주입한 후 컬럼에 있는 공기를 뺀 후 중력하 또는 시료액이 분당 2 ~ 3mL가 컬럼을 통과하도록 압력을 조절한다.
- 나) 시료액이 먼역컬럼을 통과한 후 증류수 10 mL을 분당 5 mL로 컬럼을 통과시켜 먼역컬럼을 세척한다.
- 다) 메탄올 2 mL로 결합된 설펜아마이드계열 항생제를 용리시킨다.
- 라) 질소농축기로 완전히 증발시킨뒤 이동상을 500 µL를 이용해 재용해 시키고 시료액으로 한다.

4) 측정

- 가) 측정기기 : 고속액체크로마토그래피
- 나) 컬럼 : ODS C18 또는 이와 동등한 것
- 다) 이동상용매 : 0.1% acetic acid with phosphate buffer solution(PBS)
0.1% acetic acid with methanol
- 라) 검출기파장 : 270 nm
- 마) 유속 : 0.5 mL/min
- 바) 주입량 : 5 µL

5) 계산

측정된 크로마토그램의 피이크 높이 또는 피이크 면적을 구하고 검량선을 작성하여 계산한다.

11장. 생균제(Probiotics)

1. 분석원리

생균제란 숙주에 유익한 작용을 갖는 미생물제제 또는 미생물의 성분으로 적정 농도로 희석한 시료 일정량을 취하여 균에 적합한 선택배지에 도말하여 균 생장에 적합한 온도로 일정시간 배양하여 발생한 집락수를 계수하여 시료 중에 존재하는 균수를 측정한다.

2. 분석방법

가. 대상균주

<i>Lactobacillus</i> sp.	락토바실러스 락티스, 락토바실러스 루테리, 락토바실러스 불가리쿠스, 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 살리바리우스, 락토바실러스 애시도필러스, 락토바실러스 카제이, 락토바실러스 커바투스, 락토바실러스 퍼멘텀, 락토바실러스 프란타럼, 락토바실러스 헬베티쿠스, 락토바실러스 페롤렌스, 락토바실러스 파라카제, 락토바실러스 크리스파투스
<i>Bacillus</i> sp.	바실러스 렌투스, 바실러스 리체니포미스, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 세레우스(도요이에 한함), 바실러스 코아글란스, 바실러스 폴리프멘티쿠스, 바실러스 푸밀루스
효모 (<i>Saccharomyces</i> sp.)	맥주효모, 토룰라효모, 제빵효모, 양조효모, 조사건조효모, 효모배양물, 잔토필로마이세스 텐드로하우스, 피키아 파리노사
<i>Bifidobacterium</i> sp.	비피도박테리움 롱검, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 서모필럼, 비피도박테리움 인판티스, 비피도박테리움 슈도롱검
<i>Enterococcus</i> sp.	엔테로코커스 락티스, 엔테로코커스 썬모필러스, 엔테로코커스 웨시엄
<i>Pediococcus</i> sp.	페디오코커스 세레비지아, 페디오코커스 애시디락티시, 페디오코커스 펜토사세우스
<i>Aspergillus</i> sp.	아스퍼질러스 니이거, 아스퍼질러스 오리제
<i>Monascus</i> sp.	모나스커스 퍼퓨리어스
<i>Clostridium butyricum</i>	클로스트리듐 브티리컴

나. 기구 및 시약 등

1) 기구

크린벤치, 고압멸균기, 균질기, 광학현미경, 배양기, 교반기, 초순수제조장치

2) 시약

NaCl, L-cystein, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, tween 80, BPB(Bromophenol blue), TTA(Tartaric acid)

3) 배 지

- | | |
|--|-----------------------------------|
| ① DeMan-Rogosa-Sharpe(MRS) | ② Nutrient Agar(NA) |
| ③ KF Streptococcus | ④ Potato Dextrose Agar(PDA) |
| ⑤ Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar(YEGC) | |
| ⑥ Bifidobacterium Selective Agar(BS) | ⑦ Salmonella Shigella Agar(SS) |
| ⑧ Xylose Lysine Desoxycholate(XLD) | ⑨ Clostridium Difficile Agar Base |

다. 용액 제조

1) 시료추출용액 : 0.85% 생리식염수

가) 비이커에 NaCl을 넣고 증류수를 가하여 완전히 녹인다.

나) 250ml 사각광구병에 90ml, 25ml 시험관에 9ml씩 분주한다.

다) 마개를 막고 121℃에서 15분간 고압 멸균하여 방냉한다.

- 2) 다당류코팅제거 완충액 : 시료에 코팅이 되어있어 시료추출용액(생리식염수)으로 균이 추출되지 않을 경우 완충액을 사용한다.

No.	시약	중량	방법
■	L-cystein	0.5g	■~■번까지 섞은 후 증류수를 부어 호일로 덮고 온도를 약간 높여서 섞음(시약량은 증류수 3L제조 기준)
■	KH ₂ PO ₄	2.37g	
■	Na ₂ HPO ₄	2.12g	
■	pH 7.7로 조절		NaOH, HCl 1N시약으로 pH 조절
■	tween 80	0.05%	온도를 약간 높여 완전히 녹여서 섞음

라. 배지 및 배양조건

균종	배지종류		
	배양조건	배양온도	배양시간
<i>Lactobacillus</i> sp.	MRS Agar + 0.002% Bromophenol blue		
	혐기	30 ~ 37℃	48 ~ 72시간
<i>Bacillus</i> sp.	Nutrient Agar 또는 Nutrient broth + Agar		
	호기	35℃	18 ~ 20시간
효모 (<i>Saccharomyces</i> sp.)	Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar		
	호기	25℃	5 ~ 7일
<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bifidobacterium Selective Agar		
	혐기	36±1℃	24 ~ 48시간

<i>Enterococcus</i> sp.	KF streptococcus Agar		
	호기	36±1℃	48시간
<i>Pediococcus</i> sp.	MRS Agar + 0.002% Bromophenol blue		
	혐기	36±1℃	48시간
<i>Aspergillus</i> sp. <i>Monascus</i> sp.	Potato Dextrose Agar + 10% 주석산		
	호기	22 ~ 25℃	5일
<i>Clostridium butyricum</i>	Clostridium Difficile Agar Base		
	혐기	36±1℃	24 ~ 48시간

마. 분석절차

- 1) 시료 10g을 취하여 생리식염수 90ml에 넣고 35℃에서 20분간 진탕하여 균질화한다.
- 2) 희석액을 제조한다.
 - 가) 9ml 생리식염수 시험관에 시료 1ml를 취하여 첫 번째 시험관에 넣고 잘 혼합한다.
 - 나) 혼합액 1ml를 취하여 시험관에 10배 단계희석한다.
- 3) 혼합액 100 μL를 취하여 배지에 주입하여 물기가 없어질 때까지 도말한다.
농도 당 3반복 이상으로 한다.

사. 균 확인시험

- 1) 생화학적 분석 kit
생화학적 분석 kit는 Biochemical test, Assimilation test, Fermentation test를 이용한 동정법으로 Biochemical test는 saline용액에 시험균을 현탁하여 대사유무를 색의 변화로써 판정한다. Assimilation test는 현탁한 시험균을 접종 배양한 후 탁도 변화로 판정한다. Fermentation

test는 당으로부터 산을 생산하여 pH의 변화로 판정한다.

2) 기기분석

초미량의 각종 건조 배지 및 생화학적 반응물이 들어 있는 마이크로웰이 있는 플라스틱 카드를 사용한다. 카드의 마이크로웰 내부에서 균의 증식 및 대사가 이루어지고, 이러한 화학반응의 변화를 매 15분마다 Transmittance/Colorimetry Optics으로 측정하여 프로그램 상에서 분석 되어진 후 결과를 자동으로 출력한다.

제12장 효소제

12.1. α-아밀라아제(전분호정화력)

12.1.1. α-아밀라아제(전분호정화력 제1법)

가. 원리

아밀라아제(α-amylase, 전분분해효소)는 전분의 가수분해에 관여하는 효소로 그 종류도 많고 각기 분해생성물도 다르며 성질의 차이에 따라 여러 가지 분류법이 있다. 아밀라아제에 의한 전분의 분해에는 액화, 호화, 당화의 3단계가 행해지며, 특히 액화, 호화력이 강한 것을 액화형 α-amylase(α-amylase)라 하고, 당화력이 강한 것을 당화형 α-amylase(β-amylase)라고 한다. 전분이 α-amylase의 작용을 받아 호정화되어 가면 전분의 요오드정색이 변화한다. 이것에 의하여 α-amylase의 호정화력을 측정하는 방법이다.

나. 시약의 조제

1) 1% 가용성 전분(soluble starch)용액

2) 0.01 N-요오드용액

가) KI 약 50 g을 소량의 증류수로 용해시키고, 요오드 12.69 g을 가하여 완전히 용해한다.

나) 이것을 1 L로 하여 0.1 N의 용액을 조제하고 다시 10배로 희석한다.

3) 0.1 M- 초산염완충용액

가) 0.1 M 초산(acetic acid)용액과 0.1초산나트륨(sodium acetate)용액을 적당량 혼합해서 그 효소의 최적 pH로 한다.

나) 0.1 M 초산용액을 적당량 혼합해서 그 효소의 최적 pH로 한다.

다) 0.1 M 초산용액은 acetic acid 6.005 mL를 정밀하게 칭량하여 증류수에 용해시켜 1 L로 하고,

라) 0.1 M 초산나트륨(sodium acetate) 용액은 sodium acetate($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 13.61 g을 정밀하게 칭량하여 증류수에 용해시켜 1 L로 하여 각각 조제한다.

4) 2 N 초산(acetic acid)용액

5) 1/300 M-NaCl용액

6) 1/300 M 초산칼슘(calcium acetate)용액

다. 측정

1) 효소액의 조제시료를 1/300 M NaCl, 1/300 M 초산칼슘(calcium acetate) 혼합액에 용해시켜 적당한 농도로 한다.

2) 활성도의 측정

가) 마개가 있는 시험관 여러 개를 준비하고,

나) 효소액을 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, ·····, 0.1 mL씩 취한다.

다) 여기에 0.1 M 초산염완충용액 1 mL씩을 가하여 흔든다.

라) 각 시험관에는 미리 40℃로 가열된 1% 가용성 전분 용액을 5 mL씩 가하여 즉시 흔들고

마) 40℃의 항온수조 내에 넣어 30분간 반응시킨다

바) 반응정지 즉시 2 N 초산용액 2 mL씩을 가하여 흔들어 반응을 정지시킨다

사) 0.01 N요오드용액을 1 mL씩 넣어서 발색시킨다.

라. 계산

아밀라아제(α-amylase)활성도 단위는 반응시킨 시험관 안에서 엷은 자색을 나타내는 시험관을 취하여 여기에 첨가한 희석한 효소액의 양으로부터 효소액 1 mL에 의하여 분해된 1% 가용성 전분의 mL수로서 표시한다. 이 효소의 전분 호정화력은 다음과 같이 표시한다.

$$\text{효소활성도}(D_{40^\circ\text{C}30'}) = 5 \times (1/E) \times F$$

E : 시험관에 가한 희석한 효소액량(mL)

F : 효소액의 희석배수

$D_{40^\circ\text{C}30'}$: D는 diastase의 머리글이며, 숫자는 40℃에서 30분간 반응시켰음을 나타낸다.

12.1.2. α-아밀라아제(전분호정화력 제2법)

가. 분석원리

검체 중 α-아밀라아제의 정량분석 값은 역가(Unit)로 나타내며, 1 역가(Unit)는 시험용액 조제 조건에서 1분간 전분으로부터 포도당 1 μg을 분해해내는데 필요한 α-아밀라아제의 양으로 정의한다. 검량선을 통해 산출된 시험용액 중 포도당의 양을 검체 1 g이 함유하는 α-아밀라아제의 역가(Unit/g)로 환산한다.

나. 장치

분광광도계(Spectrophotometer)

다. 시약 및 시액

- 1) 1% 가용성 전분용액 : 가용성 전분(최순품) 1 g을 증류수에 녹이고 호화하여 100 mL로 한다.
- 2) 맥바인(McIlvaine) 완충액(pH 7.0) : 0.1 N 인산일수소나트륨액 일정량에 0.1 N 구연산액을 넣어 pH 7.0으로 한다.
- 3) 0.1% 염화칼슘용액 : 염화칼슘(순품) 1 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.
- 4) DNS 용액 : 3,5-디니트로살리실산(dinitrosalicylic acid) 5.3 g과 수산화나트륨 9.9 g을 증류수 708 mL에 용해한 후 주석산칼륨나트륨(potassium sodium tartarate) 153 g, 페놀 3.8 mL, 메타중아황산나트륨(sodium metabisulfite) 4.15 g을 넣고 용해한 후 증류수를 이용하여 1 L로 한 뒤 빛을 차단하여 보관한다.
- 5) 포도당용액 : 포도당(최순품)을 증류수에 녹여 2,000 μg/mL로 한다.

라. 시험용액의 조제

- 1) 시료를 적정량 취하여 증류수 또는 맥바인 완충액에 녹여 100 mL로 한 다음 여과한다. (이를 '시료액'이라 한다.)
- 2) 20 mL 시험관에 1% 가용성 전분용액 5 mL, 맥바인완충액(pH 7.0) 13 mL와 0.1% 염화칼슘용액 1 mL를 넣고 37℃로 가온하고 1)항의 시료액 1 mL를 넣은 후 37℃에서 20분간 방치 후 100℃에서 10분간 가열 하고 실온에서 냉각한 뒤 4℃, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 사용한다.
- 3) 무처리(Blank) 처리구는 20 mL 시험관에 1% 가용성 전분용액 5 mL, 맥바인완충액(pH 7.0) 13 mL와 0.1% 염화칼슘용액 1 mL를 넣고 37℃로 가온하고 증류수 1 mL를 넣은 후 37℃에서 20분간 방치 후 100℃에서 10분간 가열 하고 실온에서 냉각한 뒤 4℃, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 사용한다.
- 4) 2)항과 3)항의 상층액 0.4 mL에 DNS 용액 1.2 mL를 각각 넣은 후, 100℃에서 5분간 가열하여 실온에서 냉각한 것을 측정한다.

마. 검량선 작성

- 1) 검량선 작성을 위해 포도당용액을 증류수로 희석하여 직선성이 확보되는 농도로 최소 5 수준이 되도록 한다.
- 2) 희석된 포도당 용액들과 증류수 0.4 mL에 각각 DNS 용액 1.2 mL를 가한다. 100℃에서 5분간 가열하여 실온에서 냉각한 것을 검량선 작성을 위한 시험용액으로 하여 흡광도를 측정한다.
- 3) 검량선은 농도별 포도당 표준용액의 흡광도 값에 증류수 표준용액의 흡광도 값을 빼준 수치를 이용하여 작성한다.

바. 시험조작

증류수를 대조액으로 하여 액층 1 cm, 파장 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 이때 시험용액의 흡광도는 공시험용액의 흡광도보다 커야 한다. 발색의 정도가 지나쳐 측정이 곤란한 경우는 시료액을 희석하여 시험하고 희석배수를 적용한다. 시험용액 중 효소반응에 의해 생성된 포도당의 양은 시험용액의 흡광도 값에 공시험용액 흡광도 값을 뺀 수치를 검량선에 대입하여 산출한다.

사. 효소의 역가 계산

검량선을 통해 산출된 시험용액 중 포도당의 양을 아래 식과 같이 검체 1 g이 함유하는

α-아밀라아제의 역가(Unit/g)로 환산하여 계산한다.

$$\text{역가(Unit/g)} = \frac{A \times 100 \times 50 \times D}{20 \times W}$$

A : 시험용액 중 포도당 양 (μg/0.4 mL)

100 : 100 mL 중 1 mL 효소반응

50 : 20 mL 중 0.4 mL 발색 반응

D : 시험용액 희석배수

20: 효소반응 시간(분)

W : 검체 무게(g)

12.2. 말토게닉아밀라아제

가. 적용 및 원리 : 본 시험방법은 *Bacillus subtilis* 및 그 변종에서 얻어진 효소제의 말토게닉아밀라아제 역가를 측정하는 방법이다. 역가시험은 온도 37℃에서 말토트리오스기질의 가수분해에 근거를 두고 있다. 생성된 포도당은 Glucose dehydrogenase 및 NAD가 함유된 혼합액을 사용하여 측정한다.

나. 시험용액의 조제 : 검체 일정량을 취하여 1 mL당 0.015~0.075 MANU를 함유하도록 물로 희석한다. 다만, 최종희석액은 1%의 1M 염화나트륨용액을 함유하도록 조제한다.

다. 시험조작 : 기질용액 0.5 mL를 시험관에 넣고 37±1°의 수욕조에서 항온시킨다. 시험용액 0.5 mL를 정확히 가하고 흔들어 혼합한 후 수욕조에 방치한다. 정확히 30분 후 시험관을 수욕조에서 꺼내어 0.06N 수산화나트륨용액 1 mL를 가하여 반응을 중지시킨 다음 이액에 GluDH용액 3 mL를 가하여 잘 혼합하고 상온에서 정확히 30분간 유지시킨다. 기질용액 0.5 mL, 0.06N, 수산화나트륨용액 1 mL, 시험용액 0.5 mL의 순으로 가해주고 GluDH용액 3 mL를 가해준 다음 상온에서 30분간 유지시킨 액을 효소공시험용으로 한다. 효소공시험용액을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 340nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 포도당표준용액의 농도(μmol/L)를 구한다.

라. 표준곡선 : 포도당 1.6 g을 정밀히 달아 물을 가하여 1,000 mL로 한다. 이 액을 사용하여 각각 88.8 μmol/L, 177.6 μmol/L, 266.4 μmol/L, 355.2 μmol/L, 444.0 μmol/L, 532.9 μmol/L의 포도당을 함유하도록 포도당 표준용액을 조제한다. 각 표준용액 2 mL를 각각의 시험관에 넣고 GluDH용액 3 mL를 가해준 다음 상온에서 30분간 방치한다. 이들 용액에 대해 물을 대조액으로 하여 액층 1 cm, 파장 340 nm에서 흡광도를 각각 측정하고 포도당표준용액의 농도(μmol/L)에 대한 표준곡선을 작성한다.

다음의 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{MANU/g} = \frac{A \times 4 \times F}{30 \times W \times 1,000}$$

A : 표준곡선에서 얻은 시험용액의 포도당표준용액의 농도(μmol/L)

F : 희석배수

4 : 시험에 사용된 시험용액의 약 0.5 mL와 포도당표준용액의 양 2 mL의 비

30 : 반응시간(분)

W : 검체의 채취량(g)

1,000 : 1를 mL로 전화시키는 계수

마. 역가의 정의 : 1 Maltogenic Amylase Nove Unit(MANU)는 상기시험조건하에서 분당 1μmol/L의 말토트리오스를 분해하는 효소의 양이다.

바. 시액

1) 구연산완충액 : 구연산 0.225 g에 물 20 mL를 가하여 녹인 다음 4 N 또는 1 N 수산화나트륨용액을 가하여 pH 5.0으로 조절한 다음 물을 가하여 250 mL로 한다.

- 2) 기질용액 : 말토트리오스(Maltotriose) 1 g을 구연산완충액에 녹여 50 mL로 한다.
- 3) 1 M 염화나트륨용액 : 염화나트륨 29.22 g에 물을 가하여 500 mL로 한다.
- 4) 0.06 N 수산화나트륨용액 : 1 N 수산화나트륨용액 30 mL를 취한 다음 물을 가하여 500 mL로 한다.
- 5) GluDH용액 : 글루코오스디하이드로게나아제(Glucose dehydrogenase)를 함유한 혼합시액(Merck No. 14853)을 사용한다.

12.3. β-아밀라아제(전분당화력시험법)

가. 분석원리

본 시험방법은 아밀라아제가 전분에 작용할 때 전분의 구조 가운데 글루코사이드 결합이 절단되는 정도에 따라 환원력이 증가되는 것을 이용하여 전분이 소화되는 정도의 차이를 측정하는 방법이다.

나. 시약 및 시액

- 1) 1 M 초산나트륨 완충액: 초산나트륨(sodium acetate trihydrate, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 136.08 g을 증류수 1 L에 용해하여 조제한다.
- 2) 기질(Substrate)
미리 감자전분 약 1 g을 정확히 칭량하여 105°C에서 2시간 건조하여 그 감량을 측정한다. 그 건조물 1 g에 대응하는 감자전분을 정확히 측정하여 삼각플라스크에 넣어 물 20 mL를 넣고 잘 교반하면서 서서히 2 N 수산화나트륨 시액 5 mL를 넣어 죽상태로 만들고 수욕상에서 교반하면서 3분간 가열한 후, 물 25 mL를 넣어 냉각 후 2 N 염산시약으로 정확히 중화하여 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 1 M 초산, 초산나트륨 완충액 10 mL를 넣고 여기에 물을 추가하여 정확히 100 mL를 만든다.

3) 시험용액의 조제

시료 적당량을 정밀하게 측정하여 1 mL당의 농도가 0.4 ~ 0.8 전분당화력단위로 되도록 물 또는 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 0.1 M 황산염 완충액을 넣어 녹인 후, 시료용액으로 한다. 시료가 완전히 녹지 않는 경우에는 이따금씩 교반 하면서 1시간 방치한 후 원심분리하여 그 상등액을 시료 용액으로 한다. 기질 용액 10 mL를 정확히 칭량하여 직경 30 mm의 시험관에 넣어 37±0.5°C에서 10분간 방치한 후, 시료 용액 1 mL를 정확히 측정하여 넣은 후 즉시 교반하여 37±0.5°C에서 정확히 10분간 방치한다. 다음에 페린용액의 동(銅)액 2 mL를 넣어 시험관 입구에 깔때기를 끼우고 수조속에서 정확히 15분간 가열하여 냉각시킨다. 여기에 질은 염화칼륨 시약 2 mL 및 묽은 황산(1→6) 2 mL를 넣고, 유리한 요오드를 즉시 0.05 N 티오황산나트륨액으로 적정한다.(지시약 용성전분시약 1~2방울) 이 경우에 적정 종점은 액의 청색이 없어진 때로 하며 그 적정량을 A mL로 한다. 별도로 기질용액 10 mL 대신 물 10 mL를 취하여 이하 같은 방법으로 조작하여 그 적정량을 B mL로 한다.

다. 계산방법

$$1 \text{ g중의 전분당화력 단위} = (B-A) \times 1.6 \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{S}$$

A : 기질 적정량(g)

B : 기질 공시험 적정량(mL)

S : 시료량(g)

12.4. 셀룰라아제(섬유당화력 시험법)

12.4.1. 섬유당화력 시험법 제1법

가. 기질용액의 조제

미리 카르복시메틸셀룰로소나트륨 약 1g을 정확히 칭량하고, 105°C에서 4시간 건조하여

그 감량을 측정한다. 그 건조물 0.625g에 대응하는 카르복시메틸셀룰로스나트륨을 정확히 취하여 물 50 mL에 휘저어 섞으면서 조금씩 넣은 후 60~70℃에서 가끔씩 저으면서 20분간 가열하여 녹이고 냉각한 후 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 1M 초산, 초산나트륨 완충액 10 mL를 넣어 여기에 물을 넣어 정확히 100 mL로 만든다.

나. 방법

- 1) 시료 적당량을 정밀하게 측정하여 1 mL당의 농도가 0.02~0.08 섬유당화력단위로 되도록 물 또는 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 0.1M 초산, 초산나트륨완충액을 넣어 녹인 후, 시료용액으로 한다. 시료가 완전히 녹지 않는 경우에는 이따금씩 교반하면서 1시간 방치한 후 원심분리하여 그 상등액을 시료 용액으로 한다. 기질 용액 4 mL를 정확히 칭량하여 25 mL의 메스플라스크에 넣어 37±0.5℃에서 10분간 방치한 후, 시료 용액 1 mL를 정확히 측정하여 넣은 후 즉시 흔들어서 섞고 37±0.5℃에서 정확히 30분간 방치한다. 다음에 알칼리성 동궤 시약 B 2 mL를 넣어 흔들어서 섞고 메스플라스크에 뚜껑을 하고 수조속에서 30분간 가열하여 냉각시킨다. 여기에 비소몰리브덴산 시약 2 mL를 넣어 잘 흔든 후, 0.5N 수산화나트륨 시약 3 mL를 넣어 흔든 후 침전을 녹여 20분간 방치한 후 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 1M 초산, 초산나트륨 완충액을 넣어 정확히 25 mL로 한다. 이 용액 1 mL를 정확히 칭량하여 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 1M 초산, 초산나트륨 완충액 9 mL를 넣어 잘 섞은 후 파장 750nm에서의 흡광도 AT를 측정한다. 별도로 시료 용액 1 mL를 정확히 칭량하고 25 mL의 메스플라스크에 넣어 알칼리성 동궤 시약 B 2 mL를 넣어 흔들고 기질 용액 4 mL를 정확히 칭량하여 넣고 교반하여 메스플라스크에 뚜껑을 막고 수조속에서 30분간 가열하여 냉각시킨다. 이하 같은 방법으로 조작하여 흡광도 AT'를 측정한다. AT 및 AT'에 대응하는 포도당의 양(mg)을 검량선에서 구하여 각각 GT 및 GT'로 한다.

$$1\text{g중의 섬유당화력 단위} = \frac{G_T - G_{T'}}{30} \times \frac{1}{0.18} \times \frac{1}{W}$$

W : 시료 용액 1 mL 중의 시료의 양(g)

2) 검량선의 작성

미리 포도당 약 1g을 정밀하게 칭량하여 105℃에서 6시간 건조 후 그 감량을 측정한다. 그 건조물 1g에 대응하는 포도당을 정확하게 칭량하여 물을 넣어 녹인 후 정확히 1000 mL로 한다. 이 액을 1, 2, 3, 4 및 5 mL를 정확히 측정하여 각각에 물을 넣어 정확히 10 mL로 한다. 각각의 액 1 mL 기질용액 4 mL 및 알칼리성 동궤용액 B 2 mL를 정확히 칭량하고 25 mL의 메스플라스크에 넣어 잘 섞은 후 메스플라스크에 뚜껑을 막고 수조상에서 30분간 가열하여 냉각시킨다. 비소몰리브덴산 시약 2 mL를 넣어 잘 섞고, 여기에 0.5N 수산화나트륨시약 3 mL를 넣어 잘 섞어 침전을 녹여 20분간 방치한 후 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 1M 초산, 초산나트륨 완충액을 넣어 각각 정확히 25 mL로 한다. 이들 용액을 파장 750nm에서의 흡광도 A1, A2, A3, A4 및 A5를 측정한다. 별도로 물 1 mL, 기질용액 4 mL 및 알칼리성 동궤용액 B 2 mL를 정확히 칭량하여 이하 같은 방법으로 조작하여 흡광도 A0를 측정한다. 흡광도 차이 (A1-A0), (A2-A0), (A3-A0), (A4-A0) 및 (A5-A0)를 종축으로 포도당의 양(mg)을 횡축으로하여 검량선을 작성한다.

12.4.2. 섬유당화력 시험법 제2법

가. 원리

셀룰라아제(cellulase, 섬유소분해효소)는 glucose의 β-1,4 결합에 의하여 축합된 셀룰로오스(cellulose, 섬유소)의 가수분해에 관여하는 효소이다. 변성 섬유소인 carboxymethyl cellulase(CMC)를 기질로 하여 효소를 작용시켜 기질이 분해되어 생성되는 환원당을 정량하여 cellulase의 활성도를 측정한다.

나. 시약의 조제

- 1) 0.1 M 초산염완충용액(pH 5.5) : 0.1 M 초산(acetic acid)과 0.1 M 초산나트륨(sodium acetate)을 14.8:35.2의 비율로 혼합한다.
- 2) 1 N-NaOH 용액
- 3) 2%(w/v)-CMC 용액
- 4) DNS(dinitrosalicylic acid) 용액

다. 측정

- 1) 효소액의 조제시료를 증류수에 용해시켜 적당한 농도로 사용한다. 최종의 희석액에는 0.1M 초산염완충용액(pH 5.0)을 사용한다.
- 2) 활성도의 측정 2%(w/v) CMC 용액 1 mL를 시험관에 취하고, 여기에 0.1 M 초산염완충용액(acetate buffer, pH 5.5) 1 mL를 가하여 혼돈다. 45℃의 항온수조에서 3분간 예열한 후 효소액(적당하게 희석된 것, 희석배율 F) 0.2 mL를 넣어서 혼돈다. 45℃의 항온수조내에서 60분간 진탕 반응시킨다. 반응직후에 1 N-NaOH 용액 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨다. 100℃의 끓는 물에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켜도 된다. 반응 상층액 0.2 mL를 취해서 DNS(dinitrosalicylic acid) 용액 0.6 mL씩 넣고 100℃의 끓는 물에서 5분간 반응시킨다. 그리고 증류수로 5 mL되게 희석시킨다. 550nm에서 OD값을 측정하여 CMC로부터 유리된 환원당(glucose)의 양을 환산한다. 환원당의 정량은 Somogyi법이나 Bertrand법을 이용해도 무방하다. 측정된 환원당의 양을 G ug이라 한다. 대조로서 2% CMC액 1 mL, 0.1 M 초산염완충용액 1 mL, 1N-NaOH용액 1 mL를 가하여 흔들고, 다시 효소액 1 mL를 가한 혼합액 1 mL의 환원당을 정량하여 glucose로서 표시한다. 이것을 B mg으로 한다.

라. 계산

셀룰라제 활성도 단위는 45℃에서 60분간에 생성되는 환원당(glucose)의 mg수로서 표시한다.

$$\text{셀룰라제 활성도} = (G - B) \times 10 \times F$$

(F는 효소액의 희석배수)

12.5. β-글루카나아제

가. 분석원리

본 시험 방법은 *Aspergillus niger* 및 그 변종, *Bacillus subtilis* 및 그 변종에서 얻어진 효소제의 β-글루카나아제 역가를 측정하는 방법이다.

나. 시약 및 시액

- 1) 0.1 M Sodium acetate buffer (pH 5.0): Sodium Acetate (3수화물, MW 136.08 g/mol) 13.6 g을 정제수에 용해하여 1000 mL로 만들고 1 M 초산용액을 사용하여 pH 5.0으로 조절한다.
- 2) 기질(substrate)
1.0% (w/w) β-glucan : β-Glucan(from barely) 1.00 g을 0.1 M Sodium acetate buffer (pH 5.0) 80 mL에 서서히 가하여 녹인다. β-Glucan이 용해되어 현탁액이 될 때까지 격렬히 저어주면서 계속 끓여준다(중탕). 계속 저어주면서 현탁액을 실온으로 식히고 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0)을 가하여 β-glucan의 농도가 1% (w/w)가 되도록 조정한다. 냉장보관 하여 2일 이내에 사용하여야 한다.
- 3) DNS용액 : 10 g의 3,5-dinitrosalicylic acid를 약 600 mL의 물에 분산시키고 용액이 맑아질 때까지 저어준다. 100 mL의 NaOH용액(16 g의 NaOH를 100 mL의 물에 녹인 것)을 저어주면서 서서히 가하고 용액이 맑아질 때까지 계속 저어준다. 저어주면서 300 g의 sodium potassium tartrate를 서서히 가한다. 필요하면 맑은 용액이 될 때까지 (48℃가 넘지 않도록) 가온한다. 물로 희석하여 1 L가 되게 하고 여과지로 여과하여 사용한다. 이 시약은 갈색병에 담아 실온에서 보관한다. 최대 6개월간 안정하다. 보관 중에 침전물이 생기고 맑지 않으면 새로운 용액을 제조한다.

다. 시험용액의 조제 및 방법

1) 검량선 작성

무수 glucose 100 mg/100 mL의 0.1 M sodium acetate buffer로 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL을 만든다. 그 후 각 표준용액 1 mL와 1 mL의 sodium acetate buffer용액 그리고 2 mL의 DNS시약을 시험관에 넣고 섞어준 다음 10분간 끓여준다. 그 후 찬물로 실온까지 냉각시키고 540 nm(또는 513 nm) 에서 흡광도를 측정한다. 공시료는 표준용액 대신에 buffer용액을 사용한다. Glucose농도와 그 흡광도 값으로부터 선형방정식을 구한다. 새로운 DNS시약을 만들 때마다 반복 실험하여 검량선을 작성해야 한다. 효소역가 계산시는 선형회귀방정식을 작성하여 사용한다.

2) 측정 과정

가) 시료와 기질 용액을 아래와 같이 반응시켜 0.1~0.6 mg/mL의 glucose가 생성될 수 있도록 균질화된 시료를 정밀하게 칭량하여 100 mL 부피 플라스크에 취하고 50 mL에서 60 mL 정도의 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.0)을 가하여 분산시키고 30분 이상 흔들어 준다. Buffer 용액으로 표선을 맞추고 진탕 후 원심분리하여 상등액을 취한다(필요에 따라 추가희석 가능). 50℃에서 평형상태가 되도록 5분간 예열된 이 효소액 1 mL에 1mL의 β -glucan 기질용액을 가한 다음 혼합해 주고 50℃에서 정확히 10분간 반응 시킨다. 반응액에 2 mL의 DNS용액을 가하고 혼합시켜 정확히 10분간 끓여준 뒤, 증류수 10 mL을 가하고 찬물로 실온까지 냉각시킨다. 냉각된 용액의 흡광도를 540 nm(또는 513 nm)에서 측정한다(바탕 보정 시료: 물).

나) 공시료는 50℃에서 정확히 10분간 정치시킨 1 mL의 β -glucan 기질용액에 2 mL의 DNS시약과 추출한 효소액 1 mL를 가하고 혼합시킨 다음 정확히 10분간 끓여준다. 여기에 증류수 10 mL을 가하고 찬물로 실온까지 냉각시킨 후 냉각된 용액의 흡광도를 540 nm(또는 513 nm) 에서 측정한다(바탕 보정시료: 물).

라. 역가의 정의

1 unit의 역가는 기질인 β -glucan으로부터 분당 1 μ mol의 glucose를 유리시키는 효소의 양이다.

마. 계산방법

먼저 glucose 표준용액으로 구한 검량선의 선형회귀방정식으로부터 효소액의 glucose 농도를 구하고 다음 계산식으로 구한다.

$$\text{역가(U/g 또는 U/mL)} = \frac{C \times D}{180.16 \times 10 \times S}$$

C : 검량선을 통해 확인한 glucose의 농도(μ g/mL)

D : 시료와 최종시료 용액간의 희석배수(예: 시료를 녹여 100 mL 용액을 만들고 이를 다시 10배 희석하여 최종시료 용액으로 한 경우, F=1000)

S : 시료량(g)

12.6. 글루코아밀라아제(아밀로글루코시다아제)

가. 분석원리

본 시험방법은 *Aspergillus niger* 및 그 변종에서 얻어진 효소제의 글루코아밀라아제 역가를 측정하는 방법이다. *Aspergillus oryzae* 및 그 변종에서 얻어진 효소제의 역가측정에서도 변형되어 사용될 수 있다. 역가시험은 일정시간, 온도, pH 및 농도 조건하에서 옥수수전분 가수분해용액이 분해되어 생성된 환원당으로서 측정한다.

나. 시약 및 시액

1) 전분가수분해용액(4%) : 포도당 당량(Dextrose equivalent, DE)이 15 ~ 20인 옥수수시럽 고형물을 건조물로 40 g에 상당하는 양을 달아 녹여 1000 mL로 한다. 이 용액은 매일 새로 조제하여 사용한다.

- 2) 초산염완충액 : 빙초산 60g을 달아 물을 가하여 1,000 mL로 한 다음, 초산나트륨($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 136 g을 녹여 1,000 mL로 한 액으로 pH 4.2로 조절한다.(*Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*에 의해 생산된 효소제는 pH 5.0으로 한다)
- 3) 펠링시액 A : 황산동($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 34.66 g을 달아 물을 가하여 500 mL로 한다. 이 용액은 작은 용기에 보관하고 마개를 꼭 하여 보존한다.
- 4) 펠링시액 B : 주석산칼륨나트륨($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 173 g을 물 일정량에 녹이고 수산화나트륨 50 g을 가하여 녹인 후 물을 가하여 500 mL로 한다. 이 용액은 적은 용기에 보관하고 마개를 꼭하여 보존한다. 사용시에는 A액과 B액 동량을 혼합한다. 이론적 공시험적정치는 27.8 mL이나 적정치가 27.5 ~ 29.5 mL이면 적당하다.

다. 시험용액의 조제

하기 실험은 글루코아밀라아제 역가 0.1 ~ 0.2 unit를 함유하는 시료의 사용에 기초를 두고 있다. 이 시료의 양은 동 시험조건하에서 환원당 0.2 ~ 0.4 g을 생성하는 양이 되며 이 범위에서 가장 적합한 값이 얻어진다. 액체시료, 고체시료 및 액체농축액은 다음 도표에 따라 조제되고 표시된 일정량이 사용되어야 한다.

1) 액체시료

시료중의 효소(단위/mL)	희석배율(mL)	취하는 양(mL)	희석배수(F)
0.05 이하	-	5.0	0.2
0.06~0.1	-	2.0	0.5
0.11~0.25	-	0.80	1.25
0.3~0.5	-	0.40	2.5
0.6~1.0	-	0.20	5
1.1~2.0	-	0.10	10
2.1~4.0	5.0→100	1.00	20
4.1~5.0	4.0→100	1.00	25
5.1~7.0	3.0→100	1.00	33.3
7.1~10.0	2.0→100	1.00	50

2) 고체시료 및 액체농축액

시료중의 효소(단위/mL)	시료무게(g)*	희석되는 양(mL)	취하는 양(mL)
4이하	10	1,000	5.0
5~10	4	1,000	5.0
11~25	1.6	1,000	5.0
26~50	1.4	1,000	3.0
51~75	1.25	1,000	2.0
76~100	1.00	1,000	2.0
101~150	1.25	1,000	1.0
151~200	1.00	1,000	1.0
201~250	1.50	2,000	1.0
251~300	1.00	2,000	1.0

* 시료를 정밀히 달아 1,000 mL 메스플라스크에 넣고 물로 2/3정도 채우고 상온에서 30분간 방치한다. 방치하는 동안 격렬히 흔들어 주는 조작을 5회 이상 실시한 다음 물로 채운다. 이 용액을 와트만 No. 12 또는 동종의 여지를 사용하여 여과한 여액을 시험용액으로 하여 지시된 일정량을 취한다.

라. 시험조작

- 1) 환원당의 생성 : 전분가수분해물용액 50 mL와 초산염완충액 5 mL를 100 mL 메스플라스크에 넣어 시험용액용 플라스크로 한다. 대조용으로 다른 메스플라스크를 준비하여 시험용액 대신 물을 취하여 시험용액의 경우와 동일하게 취급한다. 플라스크를 60℃ 수욕조에 넣어 10분간 방치한다.(*Aspergillus oryzae*와 *Rhizopus oryzae*에 의해 생산된 효소는 55℃에서 실시한다) 해당량의 시험용액용 플라스크에 가하고 동시에 시간을 측정한다.(여러 개의

시료를 분석할 경우는 120분간의 반응시간 후 각각 중화시키는 시간을 고려하여 시험용액을 취하는 시간에 간격을 둔다) 내용물을 흔들어 완벽하합하고 수욕조에서 120분간 방치한다. 반응 시간이 115 ~ 118분 지났을 경우 페놀프탈레인시액 3방울을 가하고 정확히 120분이 되면 플라스크를 수욕조에서 꺼내어 빨리 뷰렛을 사용하여 2% 수산화나트륨용액으로 중화(약 3 ~ 7 mL가 소요됨)한 다음 흐르는 물로 상온으로 식히고 물을 가하여 100 mL로 한다. 이 액 10 mL와 대조액 10 mL를 취하여 다음과 같이 환원당량을 측정한다.

- 2) 환원당의 측정(Schoorl Method)^{주1)} : 펠링시액^{주2)} A, B 각 10 mL씩을 취하여 250 mL 삼각플라스크에 넣고 위의 환원당 생성에 따라 얻은 용액 10 mL를 정확히 가한다. 대조액도 동일하게 처리한다. 물을 가하여 50 mL로 하고 조용히 흔들어 내용물을 혼합한다. 유리구 2개를 넣고 조그만 깔때기로 마개를 하고 가열하여 3분 이내에 끓도록 하여 2분간 계속 가열한다. 이어 얼음욕이나 흐르는 냉수에 빨리 식힌 다음 소량의 물로 깔때기를 씻어내린다. 이에 30% 요오드칼륨 10 mL, 28% 황산 10 mL를 가하고 요오드의 색이 거의 없어질 때까지 0.1 N 치오황산나트륨용액으로 재빨리 적정한 다음, 다시 전분시액 1 mL를 가하여 0.1 N 치오황산나트륨용액의 소비 mL수를 S로 하고 대조액에 소비된 mL수를 C로 한다. 시료에 대해 물 30 mL로 대체하여 시약공시험을 두 개 행한다. 그 소비 mL수의 평균치를 B로 한다. B에서 S를 빼서 시료에 대해 0.1 N 치오황산나트륨용액 소비 mL수로서 표시하여 적정차값을 구하여 Ts로 한다. B에서 C를 빼서 대조액에 대한 적정값을 구하고 이를 Tc로 한다.

※ 주1) 본 시험방법은 단백질을 함유하지 않은 용해성물질에서 환원당을 측정하는데 적합한 방법이다. 다만 상당량의 단백질을 함유하는 시료는 단백질 침전제로 처리한 후 실험한다.

주2) 여러 개의 시료를 분석할 경우 시험용액을 일련의 플라스크에 취하여 물을 가하여 30 mL로 희석하여 펠링시액 A를 가하고 펠링시액 B는 가열하기 직전에 가한다.

적정차값의 환원당량 환산표

적정차 (mL)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
환원당량(포도당으로) (mg)										
0.0	0.0	0.3	0.7	1.0	1.3	1.6	1.9	2.2	2.5	2.8
1.0	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0	5.3	5.6	5.9
2.0	6.4	6.66	6.9	7.2	7.5	7.8	8.1	8.5	8.8	9.1
3.0	9.4	9.8	10.1	10.4	10.7	11.0	11.4	11.7	12.0	12.3
4.0	12.6	13.0	13.3	13.6	10.0	14.3	14.6	15.0	15.3	15.6
5.0	15.9	16.3	16.6	16.9	17.2	17.6	17.9	18.2	18.5	18.9
6.0	19.2	19.5	19.8	20.1	20.5	20.8	21.1	21.4	21.8	22.1
7.0	22.4	22.7	23.0	23.3	23.7	24.0	24.3	24.6	24.9	25.2
8.0	25.6	25.9	26.2	26.6	26.9	27.3	27.6	28.0	28.3	28.6
9.0	28.9	29.3	19.6	30.0	30.3	30.6	31.0	31.3	31.6	31.9
10.0	32.3	32.7	33.0	33.3	33.7	34.0	34.3	34.6	35.0	35.3
11.0	35.7	36.0	36.3	36.7	37.0	37.3	37.6	38.0	38.3	38.7
12.0	39.0	39.3	39.6	40.0	40.3	40.6	41.0	41.3	41.7	42.0
13.0	42.4	42.8	43.1	43.4	43.7	44.1	44.4	44.8	45.2	45.5
14.0	45.8	46.2	46.5	46.9	47.2	47.6	47.3	48.3	48.6	48.9
15.0	49.3	49.6	49.9	50.3	50.7	51.1	51.4	51.7	52.1	52.4
16.0	52.8	53.2	53.5	53.9	54.2	54.5	54.9	55.3	55.6	56.0
17.0	56.3	56.7	57.0	57.3	57.7	58.1	58.4	58.8	59.1	59.5
18.0	59.8	60.1	60.5	60.9	61.2	61.5	61.9	62.3	62.6	63.0
19.0	63.3	63.6	64.0	64.3	64.7	65.0	65.4	65.8	66.1	66.5
20.0	66.9	67.2	67.6	68.0	68.4	68.8	69.1	69.5	69.9	70.3
21.0	70.7	71.1	71.5	71.9	72.2	72.6	73.0	73.4	73.7	74.1
22.0	74.5	74.9	75.3	75.7	76.1	76.5	76.9	77.3	77.7	78.1
23.0	78.5	78.9	79.3	79.7	80.1	80.5	80.9	81.3	81.7	82.1
24.0	82.6	83.0	83.4	83.8	84.2	84.6	85.0	85.4	85.8	86.2
25.0	86.6	87.0	87.4	87.8	88.2	88.6	89.0	89.4	89.8	90.2
26.0	90.7	91.1	91.5	91.9	92.3	92.7	93.1	93.5	93.9	94.3
27.0	94.8									

※ 위 도표의 사용은 분석자가 자료가 얻어지는 조건하에 2회의 실험값이 동일하여야 함을 전제로 한다. 오차의 위험은 이미 알고 있는 순수한 포도당의 양(10 ~ 70 mg 범위의 5개 시료)으로 세심한 중복의 표준화에 의해 피할 수 있다. 포도당 mg에 대한 적정차값의 검량선은 원점을 통과하여 약간 굽은 일직선이 된다. 만약 표준화 곡선이 채택될 경우 치오황산나트륨용액은 표정을 구하지 않아도 된다. 0.065 N 치오황산나트륨용액을 사용하므로 공시험 적정값을 44 ~ 45 mL로 증가시켜 더 정확한 결과를 얻을 수 있다.

마. 역가의 정의

1 Glucoamylase unit(GAU)는 상기 시험조건 하에서 1시간에 환원당으로서 포도당 1 g을 생성하는 효소의 양이다.

바. 계산방법

환원당 함량 : 적정값의 환원당량 환산표를 참고로 하여 시료에 대한 적정차값(Ts)에 해당하는 환원당량(mg)을 찾아 그 값을 Ws라 한다. 동일한 방법으로 대조액에 대한 적정차값(Tc)에 대한 환원당량(mg)을 찾아 그 값을 Wc라 한다. 시험용액 취한 양에 의해 생성된 총환원당(포도당)량은 다음 계산식에 따라 구한다.

$$D_s/g = \frac{W_s \times 100}{1,000 \times 10}$$

대조액에 의해 생성된 총환원당(포도당)량은 다음 식에 따라 구한다.

$$D_c/g = \frac{W_c \times 100}{1,000 \times 10}$$

다음 계산식에 따라 분석한 액체시료의 역가를 구한다.

$$\text{Glucoamylase, unit/ mL} = D_s - D_c \times \frac{F}{2h}$$

F: 희석배수

다음 계산식에 따라 분석한 고체시료 및 액체농축액의 역가를 구한다.

$$\text{Glucoamylase, unit/mL} = \frac{(D_s - D_c) \times V}{(S \times A \times 2h)}$$

V : 희석용량(mL)

A : 시험에 사용된 시험용액의 양

(시험용액조제에서 고체시료 및 액체농축액에 대한 표를 참조할 것)

S : 시료량(g)

12.7. 헤미셀룰라아제

가. 적용 및 원리

본 시험방법은 *Aspergillus niger* 그 변종에서 얻어진 효소제의 헤미셀룰라아제역가를 측정하는 방법이다. 역가시험은 pH 4.5, 온도 40℃에서 로커스트콩검기질의 내부 Glycosidic결합의 효소적 가수분해에 근거를 두고 있다. 기질의 점도에 있어서 해당되는 감소는 눈금보정이 된 점도계를 사용하여 측정한다.

나. 시험용액조제

최종희석액 1 mL가 본 시험방법의 제시된 조건하에 5분안에 0.18~0.22사이의 상대유동성 변화를 생성하도록 물로 희석하여 시험용액을 조제한다. 검체 일정량을 유리분쇄기에 취하고 물을 넣어 둔다. 이를 적당한 용량의 메스플라스크에 옮겨 물로 일정량으로 희석하고 사용전에 왓트만 No.1 또는 동종의 여지로 여과한다.

다. 시험조작

눈금보정된 점도계를 미리 충분한 양의 세제에 담근 다음 물을 사용하여 깨끗이 닦은 다음 40±0.1℃의 유리 수욕조에 정확하게 수직으로 장치한다. 기질용액 20 mL와 초산염완충액 4 mL를 50 mL 공전삼각플라스크에 취하고 1 검체당효소시험용 2개, 기질공시험용 1개를 준비한다. 효소시험용 플라스크에 마개를 하고 수욕소에서 15분간 방치하여 온도를 평형시킨 다음 이에 시험용액 1 mL를 정확히 취하여 가해주고 시간을 측정하기 시작하며 용액을 잘 혼합한다. 즉시 이 혼액 10 mL를 취하여 점도계의 큰가지에 가하고 반응용액을 점도계의 가느다란 가지입구에 고무관을 부착하여 상부눈금위까지 빨아올린다. 용액이 상부눈금에 도달할 때까지의 시간(분)을 측정하고 이를 TR이라고 하고, 다시 상부눈금을 통과하여 하부눈금을 통과하는 시간(초)을 측정하여 이를 TT라 한다. 다시 반응용액을 상부눈금위로 빨아 올리고 액의 표면이 상부의 눈금에 도달 할때까지의 시간(분)을 즉시 측정하여 반응시간 TR로 하고 상부눈금에서 하부눈금까지 도달하는 시간(초)을 측정하여 이를 TT로 한다. 15분 이내에서 반응시간(TR)에 대하여 "다시 반응용액을 상부눈금위로 빨아"이하의 조작을 총 4회 반복한다. 기질공시험용에는 기질용액 20 mL와 초산염완충액

4 mL의 혼액에 물 1 mL를 가하여 혼합하고 이 혼액 10 mL를 즉시 취하여 점도계의 큰가지에 넣은 다음 액을 상부눈금에서 하부눈금까지 도달하는 시간 TS(초)를 5회 반복하여 평균한 값을 TS로 한다. 물공시험용에는 미리 40±0.1℃로 평형시킨 물 10 mL를 취하여 점도계의 큰 가지에 넣고 두 눈금사이에 도달하는 시간 TW(초)를 5회 반복 측정하여 평균 한 값을 TW로 한다.

라. 다음 식에 따라 4회의 유출시간(T_T)과 반응시간(T_R) 각각에 대하여 상대유동성(F_R)과 T_N 값을 구한다.

$$F_R = \frac{T_S - T_W}{T_T - T_W}$$

$$T_N = \frac{1}{2}(T_T / 60 \text{ 초} / \text{분}) + T_R = \frac{T_T}{120} + T_R$$

F_R : 각 반응시간에 대한 상대유동성

T_S : 기질공시험에 대한 평균 유출시간(초)

T_W : 물공시험에 대한 평균 유출시간(초)

T_T : 효소반응용액의 유출시간(초)

T_R : 반응의 경과시간(분) (시험용액을 가한 시간에서 유출시간(T_T) 측정시작 시간까지)

T_N : 반응시간(T_R)(분)+ 시험용액 유출시간(T_T)(분)의 1/2

4개의 반응시간(T_N)에 대한 4개의 상대유동성(F_R)을 사용하여 표준곡선을 작성한다. 이때 하나의 직선이 그려져야 한다. 선의 기울기는 분당 상대유동성변화에 대응하며 효소의 양에 비례한다. 일련의 시험점을 통과하는 최선의 선의 기울기는 단독의 상대유동성 값보다는 좋은 효소역가의 기준이 된다. 표준곡선으로부터 10분과 5분에서 F_R 값을 측정한다. 유동성의 차이는 0.18~0.22이어야 한다.

마. 다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$HCU/g = \frac{1,000(F_{R10} - F_{R5})}{W}$$

F_{R10} : 반응시간 10분에서 상대유동성

F_{R5} : 반응시간 5분에서 상대유동성

1,000 : g을 mg으로 환산

W : 시험용액 1 mL에 함유된 검체의 양(mg)

바. 역가의정의

1 Hemicellulase unit(HCU)는 상기시험조건하에서 로커스트콩검기질에서 5분동안에 1 상대유동성변화를 생성하는 역가이다.

사. 장치

- 1) 점도계: 싸이즈-100의 눈금보정이 된 캐논-펜스케형 점도계(Cannon- Fenske Type Viscometer)를 사용하거나 이와 동등한 것을 사용한다.
- 2) 유리수욕조: 40±0.1℃의 유리항온수욕조를 사용한다.

아. 시약 및 시액

- 1) 초산염완충액(pH 4.5) : 0.2N 초산나트륨용액을 0.2N 초산 400 mL에 계속 저으며 가하며 pH를 4.5±0.05로 조절한다.
- 2) 로커스트콩검 : 분말형 로커스트콩검이 기질성분 Lot에 따라 품질이 다르기 때문에 Lot가 바뀔 때는 서로 동질의 것인가를 확인하여야 한다. 서로간의 점도차이가 ±5% 이상이면 동일시험에 적용할 수 없다.
- 3) 기질용액 : 혼합기그릇에 0.2N염산 12.5 mL와 더운 물(70~75℃) 250 mL를 가하고 혼합기를 저속에 맞춘다. 건조물로서 2g의 로커스트콩검을 용액 용기내에서 튀어 나오지 않게

하여 천천히 그릇 내에서 분산시킨다. 고무 폴리스만을 사용하여 더운물로 그릇기벽을 씻어 내린 다음 그릇에 뚜껑을 하고 고속에서 5분간 혼합한다. 이를 1,000 mL 비이커에 옮겨 상온으로 냉각시킨 후 0.2N 수산화나트륨용액으로 pH 6.0으로 조절한다. 이를 1,000 mL 메스플라스크에 옮겨 물을 가하며 1,000 mL로 하고 사용전에 거르로 여과하여 사용한다.

12.8. 펙티나아제(pectinase)

가. 적용 및 원리

본 시험 방법은 *Aspergillus niger*에서 얻어진 효소제의 펙티나아제 역가를 측정하는 방법이다. 역가시험은 pH 5.0 온도 40℃에서 얻어진 Pecticacid의 가수분해로 생성된 Galacturonic acid의 환원당을 측정하는데 근거를 두고 있다.

나. 시험용액의 조제

최종 회석액 1 mL가 20~40 Pectinase units를 함유하도록 물로 회석하여 시험용액을 조제한다.

다. 시험조작

기질용액 20 mL를 100 mL 삼각플라스크에 넣고 40℃의 수욕조에서 미리 10분간 항온시킨다. 항온시킨 기질용액에 시험용액 2 mL를 넣고 60분간 작용시킨다. 별도의 삼각플라스크에 1M 탄산나트륨용액 2.5 mL를 가해주고, 이에 위의 반응액 10 mL를 가하여 반응을 중지시킨 다음 0.1N 요오드용액 5 mL를 가해주고 밀전하여 암소에 20분간 방치한 후 2M 황산 5 mL, 전분시액 4~5방울을 가하여 0.01N 치오황산나트륨용액으로 적정한다. 여기에 소비된 양(mL)을 S라 한다. 따로 공시험용으로 시험용액 대신 10분간 수욕조에서 가열실활시킨 시험용액 2 mL를 사용하여 위의 시험조작에 따라 시험하여 0.01N 치오황산나트륨의 소비 mL수를 B라 한다. 다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{펙티나아제역가(U / g)} = (B - S) \times f \times 3.35 \times \frac{22}{2 \times 10 \times W}$$

3.35 : 0.01N 치오황산나트륨용액 1 mL에 해당하는 galacturonic acid의 μmol 수

f : 0.01N 치오황산나트륨용액의 factor

22 : 최종반응액의 양(mL)

2 : 사용된 시험용액의 양(mL)

10 : 사용된 반응액의 양(mL)

W : 시험용액 1 mL에 함유된 검체의 양(g)

라. 역가의 정의

1 Pectinase units는 상기시험조건 하에서 $1\mu\text{mol}$ 의 galacturonic acid를 생성하는 효소의 양이다.

마. 시액

- 1) 기질용액: 펙틴산(Fluka Co.)을 무수물로서 1g에 해당하는 양을 취한 다음 이에 0.5M 초산완충액 40~50 mL를 가하여 가열용해하고 0.5N 초산완충액을 가하여 100 mL로 한다.
- 2) 0.50 M 초산완충용액(pH 5.0)
 - 가) A액 : 초산 60g을 물에 녹여 1000 mL로 한다.
 - 나) B액 : 무수초산나트륨 82g을 물에 녹여 1000 mL로 한다.
 - 다) A액 148 mL와 B액 352 mL를 혼합하고 A액 또는 B액을 사용하여 pH 5.0으로 조절하여 물을 가하여 전량을 1000 mL로 한다.

12.9. 락타아제[젖틴당화력(lactase) 시험법]

가. 기질용액의 조제

o-니트로페닐- β -D-가락토피라노시드 0.172g을 칭량하여 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH로 조제한 마키르베인완충액을 녹여 정확히 100 mL로 한다.

나. 방법

시료 적당량을 칭량하여 1 mL당 농도가 0.05~0.08 락타아제 단위가 되도록 물을 넣어 녹

여 시료용액으로 한다. 시료가 완전히 녹지 않은 경우에는 가끔씩 교반하면서 1시간 방치한 후, 원심분리하여 그 상등액을 시료용액으로 한다. 기질용액 3.5 mL를 정확히 칭량하여 30℃에서 가온하여 시료용액 0.5 mL를 정확히 넣어 30℃에서 정확히 10분간 방치한 후 탄산나트륨시약 1 mL를 정확히 넣어 교반한 후 이 액으로 파장 420nm에서 흡광도 AT를 측정한다. 별도로 기질용액 3.5 mL를 정확히 칭량하여 30℃로 가열하여 탄산나트륨 시약 1 mL를 정확히 넣어 교반한 후 여기에 시료용액 0.5 mL를 정확히 넣어 30℃에서 정확히 10분간 방치하여 이 액으로 같은 방법으로 흡광도 AT'를 측정한다.

다. 계산

$$1\text{g중의 락타제 단위} = \frac{A_T - A_{T'}}{0.90} \times \frac{1}{10} \times \frac{2}{W}$$

W : 시료용액 1 mL중의 시료량(g)

12.10. 키시라나제(키시란당화력)

가. 기질용액의 조제

키시란 4.0g을 정확히 취하여 수산화나트륨 시액 50 mL에 서서히 가열하면서 격렬하게 흔들어 녹이고, 페놀프탈레인 시약 2방울을 넣어, 1N 염산시약으로 중화시킨 후, 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 0.1M 초산, 초산나트륨 완충액 100 mL를 넣고 여기에 물을 넣어 정확히 200 mL를 만든다.

나. 방법

- 1) 시료적당량을 정밀하게 취하여 1 mL당의 농도가 0.1~0.2 키시란당화력단위로 되도록 물 또는 시료의 최대 효소 활성을 나타내는 pH에 조제한 0.01M 초산, 초산나트륨 완충액을 넣어 녹인 후 시료용액으로 한다. 시료가 완전히 녹지 않은 경우에는 가끔씩 섞으면서 1시간 방치한 후, 원심분리하여 그 상등액을 시료용액으로 한다. 기질 용액 2 mL를 정확히 취해 25×200mm의 시험관에 넣고 40±0.2℃의 수조 속에 5분간 방치한 후 시료용액 1 mL를 정확히 넣어 잘 섞은 후 즉시 40±0.2℃의 수조 속에 30분간 방치한다. 다음에 묶은 황산((6→100) 0.5 mL를 넣고 잘 흔든 후 10분간 방치한 다음 페놀프탈레인 시약 1방울을 넣고 수산화나트륨 시약으로 중화한다.

여기에 물을 넣어 5 mL를 만들고 알칼리성 동(銅) 시약에 A 5 mL를 정확히 넣어 시험관 입구를 알루미늄 호일로 가볍게 덮고 가끔씩 흔들면서 20분간 수조속에서 가열한 후 20~30℃로 냉각한다. 냉각 후 염화칼륨용액(1→40) 2 mL를 넣고 여기에 묶은 황산(6→100) 1.5 mL를 넣어 즉시 강하게 흔들어 섞는다. 액이 투명하게 된 후, 0.005N 티오황산나트륨액으로 적정한다.(전분지시약 1 mL) 이 경우, 적정의 종점은 액의 청색이 없어진 시기로 하고 그 적정량을 A mL로 한다.

별도로 기질용액 2 mL를 정확히 취하여 25×200mm의 시험관에 넣어 묶은 황산(6→100) 0.5 mL를 넣어 잘 흔든 후, 시료용액 1 mL를 정확히 넣어 잘 흔들어 섞는다. 다음에 페놀프탈레인 시약 1방울을 넣어 이하 같은 방법으로 조작하여 그 적정량을 B mL로 한다. 0.005N 티오황산나트륨액의 소비량 차이(B-A) mL에 대응하는 키시로스의 양(g)을 검량선에서 구해 K라 한다.

$$1\text{g중의 키시란당화력 단위} = \frac{K}{150.13 \times 10^{-6} \times 30} \times \frac{1}{W}$$

W : 시료 용액 1 mL 중의 시료의 량(g)

- 2) 검량선의 작성키시로스를 105℃에서 3시간 건조하여 그 0.5g을 정확히 취해 물을 넣어 녹여 정확히 100 mL를 만든다. 이 액을 1 mL, 2 mL, 3 mL 및 4 mL를 정확히 칭량하여 각각에 물을 넣어 정확히 100 mL를 만든다. 각각의 액 5 mL를 정확히 칭량하여 각각을 25×200mm의 시험관에 넣어 알칼리성 동(銅) 시약 A 5 mL를 정확히 넣어, 이하 시료와 같은 방법으로 조작하여 그 적정량을 B' mL로 한다. 0.005N 티오황산나트륨액의 소비량

차이 ($B'-S_1$), ($B'-S_2$), ($B'-S_3$) 및 ($B'-S_4$)를 종축으로 각각에 대응하는 키시로스의 양(g)을 횡축으로하여 검량선을 작성한다.

12.11. 키토사나아제

가. 적용 및 원리

본 시험 방법은 *Aeromonas*속 및 *Bacillus* 속의 배양물에서 얻어진 효소제의 키토사나아제 역가를 측정하는 방법이다. 역가시험은 pH 5.0 온도 48℃에서 Chitosan 기질의 가수분해에 근거를 두고 있다. 가수분해에 의하여 생성된 환원당인 글루코사민을 알칼리성 페리시아나이드 시액과 반응시켜 흡광도측정법으로 측정한다.

나. 시험용액조제

시험조건하에서 최종희석액 1 mL가 효소공시험용액과 흡광도차이가 0.1~0.5의 범위가 되도록 일정량을 취한 다음 0.05M 초산염완충용액에 녹여 시험용액을 조제한다.

다. 시험조작

기질용액 2 mL를 시험관에 넣고 이에 미리 48℃의 수욕조에서 5분간 항온시킨시험용액 1 mL를 정확히 가해주고 흔들어 혼합한 후 수욕조에 방치한다. 정확히 5분후 시험관을 끓는 수욕조에서 3분간 가열하여 효소반응을 중지시킨 다음 상온으로 식혀준다. 따로 효소공시험용액으로 시험용액대신 미리 수욕조에서 3분간 가열실활시킨 시험용액 1 mL를 사용한다. 별도로 2개의 시험관에 물 1.4 mL를 각각 넣고 이에 위의 효소반응액 0.1 mL와 효소공시험반응액 0.1 mL를 각각 가해준 다음 알칼리성페리시아나이드시액 2 mL씩을 가해 주고 끓는 수욕조에서 15분간 가열하고 상온으로 식힌 다음 액층 1 cm, 파장 420 nm에서 효소 시험용액과 효소공시험용액의 흡광도를 각각 측정하여 표준곡선에서 D-글루코사민의 농도 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)를 구한다.

라. 표준곡선

미리 건조 항량시킨 D-글루코사민 염산염 215.6 mg을 정밀히 달아 물을 가하여 100 mL로 한다. 이 액을 사용하여 1 mL당 D-글루코사민을 2.0, 4.0, 6.0, 10.0 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 를 함유하도록 글루코사민표준용액을 각각 조제한다. 각 표준용액 1 mL와 물 2 mL를 각 시험관에 넣고 시험관 모두를 끓는 수욕조에서 3분간 끓여주고 상온으로 식힌 다음 시험조작의 「별도로 2개의 시험관에」 이하와 동일조작을 행한다. 따로, 표준용액 1 mL 대신에 물 1 mL를 사용하여 시험한 것을 대조액으로 하여 액층 1 cm, 파장 420nm에서 각각의 흡광도를 측정하고 글루코사민표준용액의 농도($\mu\text{mol}/\text{mL}$)에 대한 표준곡선을 작성한다. 다음의 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{CU/mL} = \frac{A}{5 \times W}$$

A : 표준곡선에서 얻은 시험용액의 D-글루코사민 표준용액의 농도($\mu\text{mol}/\text{mL}$)

5 : 반응시간(분)

W : 시험용액 1 mL에 함유된 검체의 양(mL)

마. 역가의 정의

1 Chitosanase Unit(CU)는 상기시험조건하에서 분당 1 μmol 의 D-글루코사민에 상당하는 환원당을 유리시키는 효소의 양이다.

바. 시액

- 1) 0.05 M 초산염완충액 : 0.1 M 초산 14.8 mL와 0.1 M 초산나트륨용액 35.2 mL를 혼합하고 물을 가하여 100 mL로 한다. 이 용액의 pH는 5.0이어야 한다.

- 2) 기질용액 : 키토산(Sigma Co.) 0.2 g을 물 40 mL에 현탁시키고 1.0 M 초산 10 mL를 가하여 교반 용해시킨 후 1.0M 초산나트륨용액을 가하여 pH를 5.0으로 조절한 다음 0.05 M 초산염완충액을 가하여 100 mL로 한다. 이 용액은 냉장고에 보관한다.
- 3) 알칼리성페리시아나이드시액 : 페리시아나화칼륨($K_3Fe(CN)_6$) 0.5g을 0.5M 탄산나트륨용액 1,000 mL에 녹인다. 이 액은 갈색병에 넣어 밀봉하여 보존한다.

12.12. 리파아제(지방소화력)

가. 분석원리

리파아제는 esterase의 일종으로 글리세린과 지방산과의 ester인 지방의 가수분해에 관여하는 효소이다. 리파아제의 ester 분해작용을 측정하기 위해서는 가수분해에 의하여 생성되는 유리된 지방산을 정량한다.

나. 시약 및 시액

- 1) 0.1 M 인산염완충액(pH 6.0)
- 2) 기질(Substrate)

폴리비닐알콜 시약, 올리브유혼합액(3 : 1) 200 ~ 300 mL를 취하여 유화기 500 mL 용기에 넣어 10℃ 이하에서 냉각하면서 매분 12,000 ~ 16,000 회전으로 10분간 유화하여 시원한 곳에서 1시간 방치한 후, 유층이 분리되지 않은 것을 확인한 후 사용한다.

다. 시험용액의 조제 및 방법

시료 적당량을 정밀하게 취하여 1 mL당의 농도가 1.0, 5.0 지방소화력 단위가 되도록 차가운 물에 넣어 녹인 후 시료용액으로 한다. 여과 또는 원심분리를 한다. 기질용액 5 mL 및 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH 6.0에서 조제한 0.1 M 인산염완충액 4 mL를 정확히 칭량하여 잘 혼합하고 37 ± 0.5℃에서 정확히 20분간 방치한다. 다음에 아세톤, 에탄올 혼합액(1 : 1) 10 mL를 넣어 잘 흔들어 섞어 0.05 N 수산화나트륨 시약 10 mL를 정확히 추가하고 0.05 N 염산으로 적정한다.(지시약 페놀프탈레인 시약 2 ~ 3방울) 이 경우에 적정의 마지막 점은 액의 적색이 없어지는 때로 하고 그 적정량을 A mL로 한다. 별도로 기질 용액 5 mL 및 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 0.1 M 인산염완충액 4 mL를 정확히 칭량하여 잘 혼합 후, 37±0.5℃에서 30분간 방치한다. 다음에 아세톤, 에탄올 혼합액(1 : 1) 10 mL를 정확히 넣어 섞고 이하는 같은 방법으로 조작하여 그 적정량을 B mL로 한다.

라. 계산방법

$$1 \text{ g중의 지방소화력 단위} = 50 \times (B-A) \times \frac{1}{20} \times \frac{1}{S}$$

S : 시료 용액 1 mL 중의 시료의 량(g)

12.13. 피타아제(피틴산분해력)

1) 시약의 조제

가) 기질용액의 조제 미리 피틴산나트륨을 데시케이터(실리카겔)중에서 24시간 이상 건조하여 0.271g을 정확히 칭량하여 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조정한 0.2M 초산, 초산나트륨완충액 50 mL를 넣고 용해하여 0.2N 초산시약을 넣고 pH 5.5로 조정 후, 동 완충액으로 정확히 100 mL로 만든다.

나) 반응정지 발색액의 조제 0.01M 몰리브덴산 암모늄 시약 1용량에 5N 황산시약 1용량과 아세톤 2용량을 넣어 잘 흔든 후 즉시 수중에서 냉각한다. 반응정지 발색액은 사용할 때 마다 조제한다.

2) 방법

가) 시료 적당량을 정확히 칭량하여 1 mL당 농도가 0.04~0.06 피틴산분해력 단위로 되도록

시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조정한 0.005M 초산, 초산나트륨 완충액을 넣어 녹인 후 필요하다면 여과하여 시료용액으로 한다. 기질용액 0.5 mL를 정확히 칭량하여 10 mL의 등근바닥 원심관 또는 시험관에 넣어 37±0.5℃로 가온한다. 이 기질용액에 별도로 37±0.5℃로 가온한 시료용액 0.5 mL를 정확히 넣어 즉시 교반하여 37±0.5℃에서 정확히 10분간 방치한다. 그 후 얼음속에서 냉각한 반응정지발색액 2 mL를 정확히 넣어 잘 혼합하여 여기에 1M 구연산시약 0.1 mL를 정확히 첨가하여 교반한다. 이 액을 5분 이내에 물을 대조액으로하여 파장 380nm에서 흡광도 OD_T를 측정한다. 별도로 시료용액 0.5 mL를 정확히 측정하여 수중에서 냉각한 반응정지 발색액 2 mL, 기질용액 0.5 mL, 1M 구연산 시약 0.1 mL를 정확히 넣은 후 잘 혼합시킨다. 이하 같은 방법으로 조작하여 흡광도 OD_{TB}를 측정한다.

$$1\text{g중의 피틴산분해력 단위} = (\text{OD}_T - \text{OD}_{TB}) \times F \times 2 \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W} \times Z$$

F : 검량선에서 구한 흡광도차 1에 대응하는 인산이온 농도(μmol/ mL)

W : 시료용액 1 mL중의 시료량(g)

Z : 회석배율

나) 검량선의 작성인산이수소칼륨을 데시케이터(실리카겔)중에서 24시간이상 건조하여 0.680g을 칭량하여 물을 넣고 녹여 1000 mL로 한다. 이 액 1, 2, 3 및 4 mL를 정확히 칭량하여 각각에 물을 넣어 정확히 50 mL로 한다. 각각의 액 1 mL를 얼음 중에서 냉각한 반응정지 발색액 2 mL를 넣어 교반하여 여기에 1M 구연산 시약 0.1 mL를 넣고 교반시킨다. 물을 대조액으로하여 파장 380nm에서 흡광도 OD_{S1}, OD_{S2}, OD_{S3}, OD_{S4}를 측정한다. 별도로 물 1 mL를 취하여 얼음속에서 냉각한 반응정지 발색액 2 mL를 넣고 교반하여 여기에 1 M 구연산시약 0.1 mL를 넣어 교반한다. 물을 대조액으로하여 파장 380nm에서의 흡광도 ODS_B를 측정한다. 인산이온농도를 횡축으로 흡광도차 (OD_{S1}-OD_{SB}), (OD_{S2}-OD_{SB}), (OD_{S3}-OD_{SB}), (OD_{S4}-OD_{SB})를 종축으로하여 검량선을 작성한다.

12.14. 산성프로테아제

가. 분석원리

본 시험방법은 기질 단백질에 생성되는 단백질 분해산물을 정량하는 방법으로 반응액에 trichloroacetic acid를 가하여 미분해의 단백질을 침전시키고 그 여액에 대하여 비교적 쉽게 비색 정량할 수 있는 티로신(tyrosine)의 증가율을 측정한다.

나. 시약 및 시액

- 1) 0.44 M-Trichloroacetic acid 용액 : Trichloroacetic acid 7.1892 g을 물에 녹이고 100 mL로 정용한다.
- 2) 0.1 N-NaOH용액 : 수산화나트륨 4 g을 증류수 100 mL로 용해한다.
- 3) 0.55 M-탄산나트륨용액 : 무수 탄산나트륨 5.83 g을 물 100 mL로 용해한다.
- 4) Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent, 2 N : 이 발색시약을 사용시 3배(시약 1 + 물 2)로 희석하여 사용한다. → 엷은 포린용액
- 5) 기질(Substrate) 0.6% casein 용액 : Casein 0.6 g을 정밀하게 칭량한 다음 0.1 M lactic acid 60 mL를 가하고 끓는 수욕 중에서 용해시켜 즉시 냉각 시킨 다음, 0.1 N-NaOH와 0.1 N lactic acid로 pH 2.6으로 조절한 후 0.1 M 유산염완충용액 (pH 2.6) 20 mL를 넣고 다시 물을 가하여 100 mL로 정용한다.
- 6) 0.1 M 유산염 완충용액 (pH 2.6) : 0.1 M 유산(lactic acid) 과 0.1 M 유산나트륨(sodium lactate)용액을 16 : 1의 비율로 혼합한다.(0.1 M 유산은 유산 9.008 g을 정밀하게 칭량하여 물에 용해시켜 1 L로 하고, 0.1 M 유산나트륨은 유산나트륨 11.206 g을 정밀하게 칭량하고 물에 용해시켜 1 L로 하여 각각 조제한다.)

다. 기구 및 장치

- 1) 항온수조
- 2) 시험관 : Cap test tube (20×150 mm)
- 3) 분광광도계 : 660 nm

라. 시험용액의 조제 및 방법

- 1) 검량선 작성: 건조된 티로신 표준품을 정밀하게 칭량하여 0.1 M Lactic acid으로 용해하여 정확히 100 mL로 한다. 이 액을 1, 2, 3, 4, 5 mL를 정확히 취하여 0.2 M Lactic acid을 넣어 정확히 100 mL로 한다. 각각 액 2 mL를 정확히 취하여 0.55 M 탄산나트륨액 5 mL 및 엷은 포린용액 1 mL를 넣어 교반시켜 30℃에서 30분간 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정한다. 별도로 대조군으로 0.1 M Lactic acid 2 mL에 0.55 M 탄산나트륨용액 5 mL 및 엷은 포린용액 1 mL를 교반시켜 660 nm에서 흡광도를 측정해서 흡광도를 보정한다. 시험용액에서 대조군의 흡광도를 뺀 각각의 흡광도 값을 X축으로 그리고 티로신의 양을 Y축으로 하여 검량선을 작성한다.
- 2) 시료를 적정량 취하여 물로 추출한다. 최종의 희석액은 0.1 M-유산염완충용액(pH 2.6)을 사용한다.
- 3) 효소액 1 mL를 시험관에 취하고 미리 30℃로 예열시킨 0.6% Casein 용액 5 mL를 가하여 잘 흔든 후 정확히 10분간 항온수조 내에서 반응시킨다.
- 4) 10분간 경과 즉시 0.44 M TCA용액 5 mL를 넣고 교반하여 반응을 중지시킨다. 30℃에서 30분간 방치한 후, 정량용 여과지로 여과한다.
- 5) 시험관에 여액 2 mL를 취해 0.55 M 탄산나트륨용액 5 mL 및 엷은 포린용액(1→3) 1 mL를 넣어 잘 교반시켜 30℃에 30분간 방치한 다음 이 용액을 파장 660 nm에서 흡광도(AT)를 측정한다.
- 6) 공시험은 별도로 시료용액 1.0 mL를 캡시험관에 취하고 TCA용액 5 mL를 가한 다음 기질 용액 5 mL를 정확히 넣고 30 ± 0.5℃에 30분간 방치한다. 이하 같은 방법으로 위 4)와 같이 조작하여 흡광도 Ab를 측정한다.

마. 역가의 정의

산성프로테아제 활성도의 역가(unit)는 (기질인 casein으로부터) 1분간에 1 ug의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 표시한다.

바. 계산방법

$$\text{산성프로테아제 활성도(U/g)} = (\text{AT} - \text{Ab}) \times F \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{S}$$

F : 검량선에서 구한 흡광도 1에 대응하는 티로신의 양(μg)

S : 시료용액 1 mL 중의 시료량(g)

12.15. 중성프로테아제 [단백질소화력(protease) 시험법]

가. 기질용액의 조제

미리 우유로 만든 카제인 약 1g을 정확히 측정하여 105℃에서 2시간 건조하여 그 감량을 측정한다. 그 건조물 1.20g에 대응하는 우유로 만든 카제인을 정확히 측정하여 0.05M 인산-수소나트륨 시약 160 mL를 넣어 수욕상에서 가온하여 녹인다. 이 액을 흐르는 물에서 냉각시킨 후 1N 염산시약 또는 수산화나트륨 시약을 첨가하여 시료의 최대효소활성을 나타내는 pH에 조제한 후, 물을 넣어 정확히 200 mL를 만든다.

나. 방법

- 1) 시료 적당량을 정밀하게 측정하여 1 mL당의 농도가 10~30 단백질소화력단위로 되도록 물 또는 0.02M 인산염 완충액을 넣어 녹인 후, 시료용액으로 한다. 시료가 완전히 녹지 않는 경우에는 이따금씩 교반 하면서 1시간 방치한 후 원심분리하여 그 상등액을 시료용액으로 한다. 기질 용액 5 mL를 정확히 칭량하여 25 mL의 메스플라스크에 넣어

37±0.5℃에서 10분간 방치한 후, 시료 용액 1 mL를 정확히 측정하여 넣은 후 즉시 교반하여 37±0.5℃에서 정확히 10분간 방치한다. 다음에 트리클로로초산시약 B 5 mL를 넣어 교반하여 37±0.5℃에서 30분간 방치한다. 여과지에 이 액을 여과시켜 침전물을 완전히 제거한 후, 이 용액 2 mL를 정확히 칭량하여 0.55M 탄산나트륨시약 5 mL 및 엷은 포린시약(1→3) 1 mL를 넣어 잘 교반시켜 37±0.5℃에서 30분간 방치한 후 이 액을 파장 660nm에서 흡광도 AT를 측정한다. 별도로 시료 용액 1 mL를 정확히 칭량하고 25 mL의 메스플라스크에 넣어 트리클로로초산시약 B 2 mL를 교반하고 기질 용액 5 mL를 정확히 넣어 37±0.5℃에서 30분간 방치한다. 이하 같은 방법으로 조작하여 흡광도 AT'를 측정한다.

$$1g \text{ 중의 단백질소화력 단위} = (A_T - A_{T'}) \times F \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{W}$$

W : 시료 용액 1 mL 중의 시료의 량(g)

F : 검량선에 구한 흡수광도 1에 대응하는 티로신의 양(μg)

2) 검량선의 작성

티로신 표준품을 105℃에서 3시간 건조하여 0.5g을 정확히 칭량하고 0.2N 염산시약을 넣어 용해하여 정확히 500 mL로 한다. 이 액을 1, 2, 3, 4 및 5 mL를 정확히 취하여 각각 0.2N 염산시약을 넣어 정확히 100 mL로 한다. 각각의 액 2 mL를 정확히 취하여 0.55M 탄산나트륨시약 5 mL 및 엷은 포린시약(1→3) 1 mL를 넣어 잘 교반시켜 37±0.5℃에서 30분간 방치한 후 이 액을 파장 660nm에서 흡광도 A1, A2, A3, A4를 측정한다. 별도로 0.2N 염산시약 2 mL를 정확히 칭량하여 이하 같은 방법으로 조작하여 흡광도 A0를 측정한다. 흡광도 차이 (A1-A0), (A2-A0), (A3-A0), (A4-A0) 및 (AS-A0)를 종축으로 티로신의 양(mg)을 횡축으로하여 검량선을 작성한다.

12.16. 식물성프로테아제

가. 정의

파파인, 피신, 브로멜라인 등 식물에서 얻어진 효소제이다.

나. 분석원리

본 역가시험은 pH 6.0, 온도 40℃에서 60분간 카제인 기질의 단백질가수분해에 근거를 두고 있다. 가수분해 되지 않은 기질은 삼염화초산으로 침전하여 여과에 의해 제거되고 용해된 카제인을 흡광도 측정법으로 측정한다.

다. 시험용액의 조제

최종희석액 2mL의 흡광도가 0.2~0.5의 범위가 되도록 검체를 정밀히 달아 유발에 취하고 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액을 가하여 분쇄시킨 다음 이를 메스플라스크에 옮겨 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액으로 채운다.

라. 시험조작

25×150 mm 시험관 3개는 효소시험용으로, 6개는 파파인검량선용으로 하여 이들 각각에 카제인기질용액 5mL씩을 넣는다. 이를 40±0.1℃의 수욕조에서 15분간 향온 시킨 후 시험용액 2mL, 표준용액 2mL를 각각 가하여 흔들어 섞고 마개를 하여 다시 수욕조에서 60분간 향온시킨 후 각각의 시험관에 삼염화초산용액 3mL씩을 가하여 흔들어 섞는다. 별도로 효소공시험용 시험관 9개에는 기질용액 5mL, 삼염화초산용액 3mL를 가하여 흔들어 섞고, 이에 시험용액, 해당 표준용액 2mL를 정확히 취하여 각각 가한다. 시험관 모두를 다시 수욕조에서 30분간 향온하여 침전된 단백질을 완전히 응고시킨 다음 왓트만 No. 42 또는 동종의 여지를 사용하여 여과한다. 초류액 3mL는 버리고 완전히 투명한 여액을 사용하여 각각의 공시험용액을 대조액으로 하여 액층 1cm, 파장 280nm에서 흡광도를 측정한다. 표준용액농도(mg/mL)에 대하여 여액의 흡광도로 검량선을 작성한다. 검량선으로부터 시험용액에서 얻은 여액의 농도를 구한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(PU/mg)} = A \times C \times \frac{10}{W}$$

A : USP 파파인표준품의 역가(PU/mg)

C : 검량선에서 구한 효소시험용액에 대응하는 표준품의 농도(mg/mL)

W : 시험용액 2mL에 함유된 검체의 양(mg)

마. 역가의 정의

1 Papain unit(PU)는 상기시험조건 하에서 1시간 동안에 Tyrosine 1μg 상당량을 유리시키는 효소의 양이다.

바. 시액

- 1) 인산나트륨용액(0.05M) : 인산이나트륨(무수) 7.1g을 500mL의 물에 녹이고 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이에 보존료로서 톨루엔 한방울을 가한다.
- 2) 구연산용액(0.05M) : 구연산(1수화물) 10.5g을 500mL의 물에 녹이고 물을 가하여 1,000mL로 한다. 이에 보존료로서 톨루엔 한방울을 가한다.
- 3) 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액 : 인산이나트륨 7.1g을 약 800mL의 물에 녹이고 이에 이.디.티.에이.이나트륨(2수화물) 14.0g과 시스테인염산염(1수화물) 6.1g을 녹인다. 1N 염산 또는 1N 수산화나트륨용액으로 pH 6.0±0.1로 맞추고 물을 가하여 1,000mL로 한다.
- 4) 삼염화초산용액 : 삼염화초산 30g을 물에 녹여 100mL로 한다.
- 5) 기질용액 : 카제인(Hammarsten) 1g(건조물로서)을 인산나트륨용액 50mL에 녹이고 끓는 수욕조에서 30분간 때때로 흔들어 주면서 가열시킨다. 이를 냉각시켜 계속 흔들어 주며 구연산용액으로 pH 6.0±0.1로 맞춘다(※주 : 계속 빨리 흔들어주면 침전이 생기지 않는다). 이에 물을 가하여 정확히 100 mL로 한다.
- 6) 표준원액 : USP파파인표준품 100.0 mg을 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액에 녹여 100mL로 한다.
- 7) 표준용액 : 표준원액 2, 3, 4, 5, 6 및 7mL를 100mL 메스플라스크에 각각 취하고 이에 인산염-시스테인-이.디.티.에이.완충액으로 용량을 맞춘다.

12.17. 브로멜라인

가. 분석원리

본 시험방법은 기질 단백질에 생성되는 단백질 분해산물을 정량하는 방법으로 반응액에 trichloroacetic acid를 가하여 미분해의 단백질을 침전시키고 그 여액에 대하여 비색 정량할 수 있는 티로신(tyrosine)의 증가율을 측정한다.

나. 시약 및 시액

- 1) Buffer solution (for enzyme)
0.03 M L-cystein·HCl·H₂O(5.2689 g/L)과 6 mM EDTA·2Na(2.2335 g/L)을 물에 용해하고 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 4.5로 조절한 후 1,000 mL로 만든다.
- 2) 기질(Substrate) : Casein from bovine milk
Casein 0.6 g에 80 mL의 0.05 M Na₂HPO₄을 가하고 열을 가하면서 녹인다. 투명하게 되면 식히고 나서 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 7.0으로 조정하고 100 mL로 만든다.
- 3) 반응 정지 시액(TCA시액)
Trichloroacetic acid 18 g, Sodium acetate · 3H₂O 29.9 g, 빙초산(CH₃COOH) 19 mL를 물에 용해하여 1,000 mL로 만든다.

다. 시험용액의 조제 및 방법

- 1) 시료의 추출(효소용액 제조)
가) 시료를 100 mL vol.flask에 취하고 Buffer solution을 가하고 1시간 정도 shaking하여 추출한 다음 정용한다.
나) 시험용액의 흡광치가 0.1 ~ 1.0이 되도록 Buffer solution으로 적절히 추가 희석한다.

2) 표준용액의 조제($\mu\text{g/mL}$)

50 mg의 tyrosine을 0.1 N HCl 100 mL에 녹여 표준용액을 준비한 다음 희석하여 3농도 이상, 275 nm에서 흡광도를 측정한다.

3) 측정방법

가) 시험관에 효소용액 1 mL와 기질용액 5 mL를 섞은 후 37°C 항온수조에 10분간 반응시킨다.

나) TCA시액 5 mL를 첨가하고 혼합한다.

다) 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켜 침전된 단백질을 완전히 응고시킨다.

라) 응고물을 정량용여지로 여과 후 275 nm에서 여과액의 흡광도를 측정한다.

마) Blank 처리구는 기질용액 5 mL와 TCA시액 5 mL를 넣고, 효소용액 1mL를 가한 후 소화시키지 않고 바로 37°C 항온수조에 30분간 침전된 단백질을 응고시킨다. 여과 후 275 nm에서 여과액의 흡광도를 측정한다.

라. 역가의 정의

1 브로멜라인 단위(CDU) 는 1분 동안 티로신 1 μg 에 해당하는 반응물을 생성시키는 효소량으로 한다.

마. 계산방법

$$\text{브로멜라인 활성도}(\mu\text{g/mg}) = C \times \frac{11}{10} \times \frac{a}{S}$$

C : 시료용액의 티로신 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 반응액의 양(mL)

S : 시료용액 1 mL 중의 시료량(mg)

12.18. 알칼리성프로테아제

가. 역가(unit)의 정의

알칼리성프로테아제 활성도의 역가(unit)는 1분간에 1 μg 의 티로신(tyrosine)을 생성하는 효소의 양으로 표시한다.

나. 장치 및 기구

- 1) 항온수조
- 2) 시험관 : Cap test tube (20 × 150 mm)
- 3) 분광광도계

다. 시약 및 시액

- 1) 완충용액(Buffer) : Glycine을 증류수에 0.1 M 농도로 녹인 후 NaOH로 pH 11로 보정한다.
- 2) 반응정지 시액(TCA시액) : Trichloroacetic acid 18 g, Sodium Acetate trihydrate 29.9 g, 빙초산(CH_3COOH) 19 mL를 증류수에 용해하여 1,000 mL로 만든다.
- 3) 0.5% casein 기질용액 : Casein 0.5 g에 100 mL 완충용액을 수욕상에서 가온하여 완전히 녹인다.
- 4) 티로신 표준용액 : 0.1 g의 티로신 표준물질을 완충용액 100 mL에 녹여 희석하여 사용한다.

라. 시험용액 조제

- 1) 시료를 적정량 취하여 완충용액에 100배 희석하여 한다.(이를 이하 ‘시료액’이라 한다. 필요시 추가 희석가능하며 4°C에서 보관 후 활성을 측정할 수 있다.)
- 2) 시험관에 기질용액 5 mL를 넣고 60°C에서 10분간 예열한 후 1)항의 시료액을 0.1 mL 첨가하고 혼합한 후 60°C에서 10분간 반응시킨다.
- 3) 반응 후 반응정지 시액(TCA시액)을 5 mL 첨가하고 혼합한 후 4°C에서 10분간 방치한 다음 원심분리(9100 g, 4°C, 15분)하여 침전물을 분리하고 상층액을 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정한다.
- 4) 흡광파장은 티로신 표준용액으로 파장을 스캔한 후 티로신의 최대흡광파장으로 선택하여 측정한다.
- 5) 무처리(Blank) 처리구는 시험관에 기질용액 5 mL와 반응정지 시액(TCA시액) 5 mL를 넣고 1)항의 시료액 0.1 mL를 가한 후 소화시키지 않고 바로 4°C에서 10분간 방치한 다음

원심분리(9100 g, 4℃, 15분)하여 침전물을 분리하고 상층액을 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정한다.

마. 검량선 작성

- 1) 희석된 티로신 표준용액을 가지고 직선성이 확보되는 농도로 최소 5수준이 되도록 완충 용액으로 희석한다.
- 2) 이 표준용액들을 분광광도계를 이용하여 275 nm에서 흡광도를 측정한다.
- 3) 흡광도 값을 횡(X)축으로 하고 티로신의 농도($\mu\text{g/mL}$)를 종축(Y)으로 하여 검량선(회기 방정식)을 작성한다.

바. 계산방법

$$\text{알칼리성 프로테아제 활성도(U/g)} = \frac{C \times 10.1 \times D}{10 \times 1.34 \times 0.1}$$

C : 티로신 농도($\mu\text{g/mL}$)

10.1 : Total volume (mL)

D : 희석배수

10 : 반응시간 (분)

1.34 : tyrosine density

0.1 : 효소용액 (mL)

13장 향미제

13.1. 사카린나트륨

가. 액체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량

1) 분석원리

검체 중의 사카린나트륨을 반투막을 이용하여 투석한 후, 투석외액을 역상계 및 강음이온 교환형 카트리지로 정제한 다음 액체크로마토그래프로 정성 및 정량분석하는 방법이다.

2) 장치

가) 정제용 카트리지

(1) 역상계 카트리지 : Sep-pak C₁₈ 또는 이와 동등한 것(사용전에 메탄올 5 mL 및 물 5 mL를 차례로 흘려 보낸 후 사용한다).

(2) 강음이온교환형 카트리지 : Sep-pak QMA 또는 이와 동등한 것(사용전에 메탄올 5 mL 및 물 5 mL를 차례로 흘려 보낸 후 사용한다).

3) 시약 및 시액

가) 투석내액 : 염화나트륨 100 g 및 인산 7 mL를 물에 녹여 1,000 mL로 한다.

나) 투석외액 : 인산 7 mL를 물에 녹여 1,000 mL로 한다.

다) 0.1 M TPA-Br용액 : TPA-Br(Tetrapropylammonium bromide) 2.66 g을 물에 녹여서 100 mL로 한다.

라) 표준용액 : 사카린나트륨을 120에서 4시간 건조시킨 후 100 mg을 정밀히 달아 물에 녹여 100 mL로 한다. 사용시 이 용액 1~10 mL를 취하고 물을 가하여 100 mL로 한 것을 표준용액으로 한다.

4) 시험용액의 조제

가) 투석액체검체는 10~20 g을 취하고, 고체 또는 반고체검체는 균질화하거나 잘게 썰어 잘 섞은 후 10~20 g 취한 다음 투석내액 약 20 mL를 가하여 혼합한다. 이 혼합액을 투석용 튜브(분자량 12,000~14,000)에 넣고 튜브의 끝을 밀봉한다. 미리 투석외액 약 150 mL를 넣은 눈금이 있는 용기에 튜브를 넣고 투석외액을 가하여 전량을 약 200 mL로 한다. 때때로 흔들여 주면서 실온에서 24~48시간 방치하여 투석한 후 투석용 튜브를 제거하고 투석외액을 가해 200 mL로 하여 투석액으로 한다.

나) 정제투석액 20 mL를 25 mL 메스플라스크에 넣고 0.1M TPA-Br용액 2 mL를 가한 다음 물을 가하여 25 mL로 한다. 이 액 5 mL를 역상계 카트리지에 분당 3~4 mL의 속도로 떨어뜨리고 물 10 mL로 세척한 후 메탄올 : 물 (40 : 60) 혼합액 10 mL로 용출시킨다. 용출액 전량을 강음이온교환형 카트리지에 분당 3~4 mL의 속도로 떨어뜨리고 0.1% 인산 5 mL와 물 5 mL를 사용하여 세척한 후 0.3N 염산 5 mL로 용출시킨 액을 시험용액으로 한다.

5) 시험조작

가) 액체크로마토그래프의 측정조건

(1) 검출기 : 자외부흡광검출기(UV), 210 nm

(2) 칼럼 : Nova-Pak C18 또는 이와 동등한 것

(3) 이동상 : 10% TPA-OH(Tetrapropylammonium hydroxide) 20.3 mL를 메탄올 : 물(30 : 70)의 혼합액 약 900 mL에 녹이고 인산으로 pH를 4.0으로 조정한 다음 메탄올 : 물(30 : 70) 혼합액으로 전량을 1,000 mL로 한다.

(4) 이동상유량 : 1.0 mL/min

(5) 주입량 : 10~20 μ L

6) 정성시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 크로마토그램상의

사카린나트륨의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액과 시험용액의 머무름시간이 일치하여야 한다.

7) 정량시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 피크의 높이 또는 면적으로부터 작성한 검량선을 이용하여 시험용액 중의 사카린나트륨의 함량을 산출한다.

13.2. 사카린나트륨 및 아스파탐 동시분석법

가. 분석원리

검체 중의 사카린나트륨 및 아스파탐을 물로 추출후 여과하거나 반투막을 이용하여 분석한 후, 투석외액을 사카린나트륨은 역상계 및 강음이온교환형 카트리지, 아스파탐은 강양이온교환형 카트리지로 각각 정제한 다음 액체크로마토그래프로 정성 및 정량분석하는 방법이다.

나. 장치

1) 정제용 카트리지

- 가) 역상계 카트리지 : Sep-pak C18 또는 이와 동등한 것(사용전에 메탄올 5 mL 및 물 5 mL를 차례로 흘려 보낸 후 사용한다).
- 나) 강음이온교환형 카트리지 : Sep-pak QMA 또는 이와 동등한 것(사용전에 메탄올 5 mL 및 물 5 mL를 차례로 흘려 보낸 후 사용한다).
- 다) 강양이온교환형 카트리지 : Bond Elut SCX 또는 이와 동등한 것(사용전에 메탄올 5 mL 및 물 5 mL를 차례로 흘려 보낸 후 사용한다).

다. 시약 및 시액

- 1) 투석내액 : 염화나트륨 100 g 및 85% 인산 11.8 g을 물에 녹여 1,000 mL로 한다.
- 2) 투석외액 : 85% 인산 11.8 g을 물에 녹여 1,000 mL로 한다.
- 3) 0.1M TPA-Br용액 : TPA-Br(Tetrapropylammonium bromide) 2.66 g을 물에 녹여 100 mL로 한다.
- 4) 혼합표준용액 : 사카린나트륨을 120℃에서 4시간 건조시킨 후, 아스파탐은 그대로 각각 100 mg을 정밀히 달아 물에 녹여 100 mL로 한다. 사용시 이 용액 1~10 mL를 취하고 물을 가하여 100 mL로 한 것을 표준용액으로 한다.
- 5) 카레스(Carrez)침전제 : 제1액 15%페로시안화칼륨용액, 제2액 30%황산아연용액

라. 시험용액의 조제

1) 제1법

가) 액상검체

검체 약 5 g을 취하고 물을 가해 50 mL로 하여 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험용액으로 한다. 다만, 탄산가스가 있는 경우에는 10분간 초음파 처리하여 탄산가스를 제거하며 알코올을 함유한 경우는 70°의 수욕상에서 15분간 가온하여 알코올을 증발시켜 검체를 취한다.

나) 고체 또는 반고체검체

검체를 미리 균질화하거나 잘게 썰어 잘 섞은 후 약 2~5g을 취하여 물 10~20 mL를 가한 다음 10~20분간 흔들어 완전히 용해시키거나 10분간 초음파 추출한다. 이 액에 물을 가해 50 mL로 하고 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험용액으로 한다.

다) 단백질 함량이 많은 검체

검체를 미리 균질화하거나 잘게 썰어 잘 섞은 후 약 2~5 g을 취하여 물 10~20 mL를 가한다. 이 액에 카레스(Carrez) 침전제 제1액 2 mL를 가해 흔들어 섞은 다음 다시 카레스(Carrez) 침전제 제1액 2 mL를 가해 2분간 흔들어 섞는다. 발생한 거품은 초음파 처리하여 제거한 후 물을 가해 50 mL로 하고 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 다음 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험용액으로 한다.

라) 지방 함량이 많은 검체

검체를 미리 균질화하거나 잘게 썰어 잘 섞은 후 약 2~5g을 취하여 물 10~20 mL를 가한 다음 10~20분간 흔들여 완전히 용해시키거나 10분간 초음파 추출한다. 이 액에 물을 가해 50 mL로 하고 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 분액 깔때기에 옮겨 디에틸에테르 50 mL를 가한 다음 흔들여 정치하고 물층을 취한다. 이 조작을 2회 반복하여 지방성분을 제거한 다음 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험용액으로 한다. 다만, 상기 가)~라)의 조작후에도 정제가 필요한 경우는 2) 제2법 나) 정제에 따라 시험한다.

2) 제2법

가) 투석

액체검체는 10~20 g을 취하고, 고체 또는 반고체검체는 균질화하거나 잘게 썰어 잘 섞은 후 10~20 g 취한 다음 투석내액 약 20 mL를 가하여 혼합한다. 이 혼합액을 투석용 튜브(분자량 12,000~14,000, 미리 수세한 다음에 사용한다)에 넣고 튜브의 끝을 밀봉한다. 미리 투석외액 약 150 mL를 넣은 눈금이 있는 용기에 튜브를 넣고 투석외액을 가하여 전량을 약 200 mL로 한다. 때때로 흔들여 주면서 실온에서 15~48시간 방치하여 투석한 후 투석용 튜브를 제거하고 투석외액을 가해 200 mL로 하여 투석액으로 한다.

나) 정제

(1) 사카린나트륨

투석액 20 mL를 25 mL 메스플라스크에 넣고 0.1M TPA-Br용액 2 mL를 가한 다음 물을 가하여 25 mL로 한다. 이 액 5 mL를 역상계 카트리지에 분당 3~4 mL의 속도로 떨어뜨리고 물 10 mL로 세척한 후 메탄올 : 물 (40 : 60) 혼합액 10 mL로 용출시킨다. 용출액 전량을 강음이온교환형 카트리지에 분당 3~4 mL의 속도로 떨어뜨리고 0.5% 인산 5 mL와 물 5 mL를 사용하여 세척한 후 0.3N 염산 약 5 mL로 분당 3~4 mL의 속도로 용출시켜 전량을 5 mL로 한 액을 시험용액으로 한다.

(2) 아스파탐

투석액 5 mL를 강양이온교환형 카트리지에 분당 3~4 mL의 속도로 떨어뜨리고 물 10 mL를 사용하여 세척한 후 15% 염화나트륨용액 : 메탄올(50:50) 혼합액 5 mL로 분당 3~4 mL의 속도로 용출시켜 전량을 5mL로 한 액을 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 측정조건

가) 검출기 : 자외부흡광검출기(UV), 210 nm

나) 칼럼 : Nova-Pak C18 또는 이와 동등한 것

다) 칼럼온도 : 25~40℃의 일정온도

라) 이동상 : 10% TPA-OH(Tetrapropyl ammonium hydroxide) 20.3 mL를 메탄올 : 물(20 : 80)의 혼합액 약 900 mL에 녹이고 인산으로 pH를 4.0으로 조정한 다음 메탄올 : 물(20 : 80) 혼합액으로 전량을 1,000 mL로 한다.

마) 이동상유량 : 1.0 mL/min

바) 주입량 : 10~20 μ L

사. 정성시험

시험용액 및 혼합표준용액을 앞의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 크로마토그램상의 사카린나트륨 및 아스파탐의 피크는 어느 측정조건에서도 혼합표준용액과 시험용액의 머무름시간이 일치하여야 한다.

아. 정량시험

시험용액 및 혼합표준용액을 앞의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 피크의 높이 또는 면적으로부터 작성한 검량선을 이용하여 시험용액 중의 사카린나트륨 및 아스파탐의 함량을 산출한다.

13.3. 소르비톨, 자일리톨

가. 가스크로마토그래피법

1) 분석방법

검체 5 g을 정밀히 달아 물에 녹여 100 mL로 한 것을 시험원액으로 한다. 따로 자일리톨 표준품 4.9 g, 소르비톨 표준품을 25 mg 정밀히 달아 100 mL 메스플라스크에 넣고 이에 물을 가하여 100 mL로 한것을 표준원액으로 한다. 시험원액 1 mL 및 표준원액 1 mL를 100 mL 환저플라스크에 각각 취한 후 각 플라스크에 내부표준용액(에리스리톨 500 mg을 취하여 물을 가하여 25 mL로 한 액) 1 mL를 가해주고 감압농축기를 사용하여 60℃의 수욕에서 증발건고시킨 다음 각 건조물에 피리딘 1 mL 및 무수초산 1 mL를 가해주고 환류냉각기를 부착시켜 수욕상에서 1시간 동안 끓여 완전히 아세틸화 한 액을 각각 시험용액 및 표준용액으로 한다. 시험용액 1 μ L 및 표준용액 1 μ L를 각각 가스크로마토그래피에 주입하고 다음 계산식에 따라 함량(%)을 구한다.

$$\text{함량(\%)} = 100 \times \frac{W_s \times R_u}{W_u \times R_s}$$

W_s : 표준품의 무게(mg)

W_u : 검체의 무게(mg)(무수물로서)

R_u : 시험용액중의 에리스리톨유도체 피크면적에 대한 자일리톨유도체 피크면적비

R_s : 표준용액중의 에리스리톨유도체 피크면적에 대한 자일리톨유도체 피크면적비

2) 조작조건

가) 칼럼 : 내경 2 mm, 길이 2m의 유리관 또는 스테인레스관

나) 칼럼충전제 : 크로모소브 W-HP에 3% OV-225를 입힌 것

다) 검출기 : 수소염이온화검출기(FID)

라) 주입구온도 : 250℃

마) 칼럼온도 : 200℃

바) 검출기온도 : 250℃

사) 캐리어가스 및 유량 : 질소, 30 mL/min

아) 유지시간(Retention time) : 내부표준물질 에리스리톨의 유지시간은 약 3.3분이며, 에리스리톨의 유지시간을 1.0으로 하였을 때, 각 성분들의 상대적인 유지시간은 자일리톨 약 3.90, 소르비톨 약 8.43이다.

13.4. 멘톨

가. 기체크로마토그래피법

1) 분석방법

검체 5 g을 정밀하게 달아 에탄올에 녹여 정확하게 20 mL로 한다. 이 액 10 mL를 정확하게 취하여 내부표준액 10 mL를 정확하게 넣어 검액으로 한다. 따로 1-멘톨표준품 약 10 g을 정밀하게 달아 에탄올에 녹여 정확하게 100 mL로 한다. 이 액 10 mL를 정확하게 취하여 내부표준액 10 mL를 정확하게 넣어 표준액으로 한다. 검액 및 표준액 1 μ L씩을 가지고 다음 조건으로 기체크로마토그래프법에 따라 시험하여 내부표준물질의 피크면적에 대한 멘톨의 피크면적비 Q_T 및 Q_S 를 구한다.

$$\text{멘톨(C}_{10}\text{H}_{20}\text{O)의 양(mg)} = \text{I-멘톨표준품의 양(mg)} \times \frac{Q_T}{Q_S}$$

내부표준액 n-카프릴산에틸의 에탄올용액(1 $\rightarrow$ 25)

2) 조작조건

가) 검출기 : 불꽃이온화검출기

- 나) 컬럼 : 안지름 약 3 mm, 길이 약 2 m인 관에 기체크로마토그래프용폴리에틸렌글리콜 6000을 산처리한 180 ~ 250 μm 의 기체크로마토그래프용규조토에 25 %의 비율로 피복한 것을 충전한다.
- 다) 칼럼온도 : 150 $^{\circ}\text{C}$ 부근의 일정 온도
- 라) 운반기체 : 질소
- 마) 유량 : 내부표준물질의 유지시간이 약 10 분이 되도록 조정한다.
- 바) 칼럼의 선정 : 표준액 1 μL 를 가지고 위의 조건으로 조작할 때 내부표준물질, 1-멘톨의 순서로 유출하고 분리도가 5 이상이다.

13.5. 과당, 설탕, 포도당, 맥아당

가. 시험법 적용범위

사료의 전반에 적용이 가능하다.

나. 장치

액체크로마토그래프-시차굴절계검출기(RI)

다. 시약 및 시액

1) 당류 혼합 표준용액

각각의 당류 표준품(과당, 포도당, 설탕, 맥아당, 유당)을 60 $^{\circ}\text{C}$ 진공오븐에서 12시간 건조하여 각각을 증류수에 녹여 혼합 조제한다. 이때 검량선용 표준용액의 농도는 시험용액의 피크면적이 각 당류 표준물질의 직선성을 만족할 수 있도록 조정하여 조제한다.

2) 이동상

아세토니트릴과 증류수를 80:20의 부피비율로 혼합하여 조제한다. 이때 이동상은 유리섬유 필터(Whatman GF/F 0.7 μm 또는 이와 동등한 것) 또는 나일론 66필터(Pall 0.45 μm 또는 이와 동등한 것)로 여과한 후, 사용 전에 초음파 처리하여 가스를 제거하고 사용한다.

※ 아세토니트릴 및 증류수를 테프론과 셀룰로오즈 에스테르 멤브레인 필터로 각각 여과하여 사용할 수 있다.

라. 시험용액의 조제

1) 시료 중 지방 제거

시료를 균질화한 후, 50 mL 원심분리관에 균질화된 검체 5 g을 정밀히 달아 넣고 25 mL 석유에테르로 분산시킨다. 이를 2,000 rpm에서 약 10분간 원심분리한 후, 고형분이 제거되지 않도록 조심스럽게 석유에테르를 제거한다. 이를 반복하고 질소를 이용하여 석유에테르를 완전히 증발시킨다. 이때, 지방이 없는 것으로 확인된 시료의 경우 시료 중 지방 제거 과정을 생략한다.

2) 당류의 추출

지방이 제거된 시료에 증류수 25 mL 혹은 50% 에탄올 용액을 가하여 무게를 확인한다. 이를 85 $^{\circ}\text{C}$ 수조에서 25분간 가온하여 당류를 추출하고 실온으로 냉각하여 최초 기록한 추출용매의 무게가 될 수 있도록 추출용매를 첨가한다. 이를 0.45 μm 의 나일론 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다. 이때, 시험용액이 혼탁할 경우, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 여과한다.

마. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 조건

※ 다)이동상 및 라)유속의 조건은 가)컬럼의 용량요인과 분해능을 만족하는 범위에서 조정할 수 있다.

가) 컬럼 : 길이 300 mm, 안지름 4 mm, μ -Bondapak Carbohydrate컬럼 또는 이와 동등한 것

※ 컬럼은 다음의 용량요인과 분해능을 만족해야 한다.

- 과당에 대한 용량요인(Capacity factor, K') = $(t_R - t_0)/t_0 \geq 5$

· t_R : 주입 후 과당의 최대 피크높이까지의 머무름 시간

- t0 : 주입 후 용매의 최대 피크높이까지의 머무름 시간
- 과당과 포도당의 분해능(Resolution, Rs) = $(t_2 - t_1) / 0.5(t_{w1} + t_{w2}) \geq 1$
- t1 : 주입 후 과당의 최대 피크높이까지의 머무름 시간
- t2 : 주입 후 포도당의 최대 피크높이까지의 머무름 시간
- tw1 : 과당의 베이스라인에서의 피크넓이(Width)
- tw2 : 포도당의 베이스라인에서의 피크넓이(Width)

나) 검출기 : 시차굴절계검출기(RI)

다) 이동상 : 아세트니트릴:증류수(80:20, w/w)

라) 유속 : 1.0 mL/분

마) 칼럼온도 : 실온

바. 정량시험

시험용액 및 표준용액을 각각 10 μ L씩 주입하여 얻은 피크의 넓이 또는 높이를 구하여 검량선을 작성한 후 시험용액의 각각의 당류의 농도(μ g/mL)를 구하고, 다음 식에 의해 검체 중 당류의 함량(mg/100 g)을 산출한다. 이때 표준용액 검량선의 농도범위는 시험용액 중 각각의 당류의 농도에 대한 직선성이 만족될 수 있도록 조정한다.

1) 계산방법

$$\text{당함량(mg/100 g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{검체채취량(g)}} \times \frac{100}{1,000}$$

S : 시험용액중의 당질의 농도(μ g/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

13.6. 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘(Neohesperidine Dihydrochalcone)

가. 아래와 같은 조건을 이용하여 액체크로마토그래피법을 이용하여 적량한다.

1) 기구 및 실험조건

Nova Pack RP C18 4 μ m처리된 3.9mm ID $\times$ 150mm 길이의 컬럼을 사용하며 이동상으로 아세트니트릴/초산 0.5%(20:80 V/V)을 이용하여 분당 1 mL의 속도로 실험한다. 컬럼의 온도는 30 $^{\circ}$ C를 유지하여 282nm의 자외선에서 측정한다.

2) 실험과정

50 mL의 DMSO에 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 표준품을 40 mg, 45 mg, 50 mg, 60 mg씩 각각 녹여 플라스크에 담고 위의 실험조건 하에서 실험하여 표준곡선을 얻는다. 본 품 50 mg을 50 mL의 DMSO에 녹여 플라스크에 담고 위의 실험조건 하에서 3차례 실험한 뒤 그 결과를 표준곡선과 비교한다.

실험결과로 산출된 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘의 양을 건조감량된 수분의 양을 고려하여 최종의 함량으로 산출하여 준다.

13.7. 감초추출물(글리시리진산)

가. 정량법

- 1) 이 품목을 글리시리진산으로서 약 20 mg에 상당하는 양을 정밀히 달아 50%에탄올을 가하여 100 mL로 한 액을 시험용액으로 한다. 따로, 글리시리진산표준품 약 20 mg을 정밀히 달아 50% 에탄올을 가하여 100 mL로 한 액을 표준용액으로 한다. 표준용액 및 시험용액 각각 20 μ L씩을 다음의 조작조건으로 액체크로마토그래피에 주입하고, 다음 계산식에 따라 감초 추출물의 함량을 구한다.

$$\text{글리시리진산(\%)} = \frac{\text{TG} \times W_s}{\text{SG} \times W} \times 100$$

SG : 표준용액의 피크면적

TG : 시험용액의 피크면적

W_s : 표준품의 채취량(mg)(무수물로 환산)

W : 검체의 채취량(mg)(무수물로 환산)

2) 조작조건

가) 검출기 : UV 254 nm

나) 칼럼 : μ -Bondapak C₁₈(내경 4~6 mm, 길이 15~30 cm) 또는 이와 동등한 것

다) 칼럼온도 : 40℃

라) 이동상 : 2% 초산 · 아세토니트릴의 혼액 (20 : 11)

마) 유속 : 글리시리진산의 유지시간이 약 10분이 되도록 조정한다.

13.8. 원당(자당)

가. 시험법 적용범위

보조사료에 적용한다.

나. 장 치

액체크로마토그래프-시차굴절계검출기(RI) 또는 증기화 광산란 검출기(ELSD)

다. 시약 및 시액

1) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것

2) 아세토니트릴: HPLC급 또는 이와 동등한 것

3) 표준원액: 자당을 증류수에 녹여 조제한다.

4) 표준용액: 표준원액을 증류수에 녹여 적당한 농도로 희석, 혼합한다. 이때 검량선용 표준용액의 농도는 시험용액의 피크면적이 표준물질의 직선성을 만족할 수 있도록 조정하여 조제한다.

라. 시험용액의 조제

시료 100 mg에 5 mL 증류수를 넣은 뒤 3분간 진탕하여 추출하고 3000 g에서 10분간 원심분리한다.

상층액 1 mL을 취하여 증류수 1 mL로 희석한 후 멤브레인 필터로 여과한다.

마. 시험조작

1) 액체크로마토그래프 조건

가) 검출기: 시차굴절계검출기(RI) 또는 증기화 광산란 검출기(ELSD)

나) 칼럼: Asahipak NH2P-50 4E(4.6 × 250 mm, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것

다) 이동상 : 아세토니트릴:증류수(80:20, v/v)

라) 칼럼온도 : 35℃

마) 유속 : 1.0 mL/분

바) 주입량: 10 μ L

바. 정성시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 크로마토그램상의 자당 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액과 시험용액의 머무름시간(retention time)이 일치하여야 한다.

사. 정량시험

시험용액 및 표준용액을 각각 10 μ L씩 주입하여 얻은 피크의 넓이 또는 높이를 구하여 검량선을 작성한 후 시험용액 각각의 자당 농도(mg/L)를 구하고, 다음 식에 의해 검체 중 자당의 함량(mg/kg)을 산출한다. 이때 표준용액 검량선의 농도범위는 시험용액 중 자당의 농도에 대한 직선성이 만족될 수 있도록 조정한다.

아. 계산

$$\text{자당의 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{S} \times D$$

C : 시험용액의 농도(mg/L)

a : 추출용매의 양(mL)

S : 시료량(g)

D : 희석배수

13.9. L-글루타민산나트륨

가. 정량법

1) 장치

아미노산 분석기 또는 이와 동등한 것

- 2) 시험용액의 조제 : 검체 0.2 g을 정확히 취하여 구연산리튬완충액(Lithium citrate buffer, pH 2.2)을 가해 100 mL로 정용한 후 이 중 1 mL를 취하여 50 mL로 한액을 시험용액으로 한다. 다음의 조작조건에 따라 시험한다.

3) 조작조건

가) 아미노산분석기의 측정조건

(1) 칼럼 : HR Na column(4.6 mm × 200 mm)또는 이와 동등한 것

(2) 칼럼온도 : 78℃

(3) 검출기 및 파장 : 흡광검출기(570 nm)

(4) 이동상 및 이동상 유량

(가) 완충액 : 구연산리튬완충액(Lithium citrate buffer, pH 2.8)을 20 mL/h의 유속으로 흘려줌

(나) 반응액 : 닌히드린(ninhydrin) 시액을 25 mL/h의 유속으로 흘려줌

(다) 반응기 온도 : 135℃

(라) 시료주입량 : 40 µL

4) 시액

가) 완충액 : 구연산리튬완충액(Lithium citrate buffer, pH 2.8)

나) 닌히드린 시액 : 닌히드린(ninhydrin) 18 g과 히드린단틴(hydrindantin) 0.7 g을 정밀히 달아 디메틸설폭시드 675 mL에 녹인다. 이 액에 초산리튬시액(pH 5.2) 225 mL을 가한다.

다) 표준원액 : L-글루타민산나트륨 표준품 0.2 g을 취하고 구연산리튬완충액 (Lithium citrate buffer, pH 2.2)를 가하여 100mL로 한 액을 표준원액으로 한다.

라) 표준용액 : 표준원액을 1mL를 취하여 구연산리튬완충액(Lithium citrate buffer, pH 2.2)를 가하여 50 mL로 한 액을 표준용액으로 한다.

13.10. 향미제 동시분석법

가. 적용범위

본 분석법은 보조사료에 사용되는 천연착향료 및 합성착향료 원료 및 보조사료 제품 중 착향 성분들의 정량에 이용한다.

- 1) 본법으로 검정할 수 있는 물질들은 다음과 같다.

성분명	동의어	영문명
낙산에틸	에틸부틸레이트	Ethyl butyrate
낙산이소아밀		Iso-amyl butyrate
리나롤	리나로울	Linalool
초산벤질	벤질아세테이트	Benzyl acetate
카르본		Carvone
아네톨		Anethole
계피알데히드	신남알데히드	Cinnamaldehyde
티몰		Thymol
유게놀		Eugenol
카바크롤		Carvacrol
바닐린		Vanillin
에틸바닐린		Ethyl vanillin

2) 본법으로 검정할 수 있는 물질들은 다음과 같다.

Chemical Names	CAS Number	Linear Formula	Formula weight
Ethyl butyrate	105-54-4	C ₆ H ₁₂ O ₂	116.16
Iso-amyl butyrate	106-27-4	C ₉ H ₁₈ O ₂	158.23
Linalool	78-70-6	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
Benzyl acetate	140-11-4	C ₉ H ₁₀ O ₂	150.17
Carvone	2244-16-8	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22
t-Anethole	4180-23-8	C ₁₀ H ₁₂ O	148.20
Cinnamaldehyde	14371-10-9	C ₉ H ₈ O	132.16
Thymol	89-83-8	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22
Eugenol	97-53-0	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.20
Carvacrol	499-75-2	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22
Ethyl vanillin	121-32-4	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.17
Vanillin	121-33-5	C ₈ H ₈ O ₃	152.15

나. 시약 및 표준용액의 제조

- 1) 용매: 기체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 표준원액: 위 표에서 정량에 필요한 표준물질을 메탄올을 이용하여 녹인다(1,000 µg/mL~2,000 µg/mL).
- 3) 표준용액: 표준원액을 각각 50, 100, 250, 500 및 1000 ppm이 되도록 메탄올로 희석하고 검량선 작성에 사용한다.
- 4) 기타시약: 특급 또는 이와 동등한 것

다. 시험용액의 조제

1) 추출

가) 시료 적당량을 칭량하여 추출용기에 취한다. 메탄올(MeOH, LC급)을 일정량 가하고 10분간 vortexing 하거나 sonication 한다.

나) 분말시료인 경우 MgSO₄ 1 g을 넣고 다시 5~10분간 vortexing 하거나 sonication 한다.

다) 3000 rpm에서 10분 원심분리 후 그 상등액을 취해 syringe filter(0.2 µm 또는 0.45 µm)로 여과한다.

라) 예상함량에 따라 추가 희석하여 시험용액으로 사용한다.

라. 결과계산방법

$$\text{향미성분(\%)} = \text{시료추정농도(mg/L)} \times \frac{\text{총희석량(mL)}}{\text{시료채취량(g)}} \div 10,000$$

마. 기기 분석 조건

1) 정량시험: GC-FID 기체크로마토그래피 분석 조건

가) Injection volume: 1 µL

- 나) Inlets condition: Heater 250℃, split ratio 1/25
- 다) Column: HP-INNOWAX (60 m × 0.32 mm, 0.5 μm) 또는 이와 동등
- 라) Carrier gas: N₂ or He
- 마) Flow rate: 1.2 mL/min
- 바) Oven program

℃ / min	Next ℃	Hold min
	50	1
10	240	30
Run Time min		50

- 사) Detector: FID condition

Heater ℃	250
H ₂ flow mL/min	35
Air flow mL/min	350
Makeup flow N ₂	30

2) 확인시험: GC-MSD 분석 조건

- 가) Injection volume: 1 μL
- 나) Inlets condition: Heater 300℃, split ratio : 1/20
- 다) Column: DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) 또는 이와 동등
- 라) Carrier gas: He
- 마) Flow rate: 1 mL/min
- 바) Oven program

℃/min	Next ℃	Hold min
	60	2
2.5	135	2
14	280	1
Run Time min		45.36

- 사) Mass analyzer condition: Interface temp 260℃, Ion source temp 200℃
- 아) SIM(Selected Ion Monitoring) mode ion

No.	Compound	RT	MS1	MS2	MS3
1	Ethyl butyrate	4.675	71	88	73
2	Linalool	9.95	71	93	121
3	Anethole	12.867	148	147	117
4	Thymol	12.842	135	150	115
5	Eugenol	13.767	164	149	131
6	Carvacrol	12.975	135	150	91
7	Vanillin	14.808	151	109	152
8	Isoamyl butyrate	9.208	70	71	89
9	Benzyl acetate	10.967	108	91	150
10	Carvon	12.242	82	108	93
11	Cinnamaldehyde	12.708	131	132	103
12	Ethyl vaniline	15.333	137	138	166

※ 기기 분석 조건은 분석실 실정에 맞게 조정할 수 있다.

바. 주의사항

시험시료를 정량하기 전에 먼저 시험시료를 HPLC급 메탄올로 추출하여 얻은 크로마토그램을 보고 나서 표준용액을 제조하는 것이 바람직하다.

13.11. 소르비톨

가. 분석원리

검체 중의 소르비톨을 30% 에탄올로 추출한 후 유도체화 용액(10% p-nitrobenzoyl chloride, PNBC)을 사용하여 유도체화한 다음 정제한 후 액체크로마토그래프-광다이오드 검출기를 이용하여 분석한다.

나. 장치

- 1) 액체크로마토그래프-광다이오드검출기(HPLC-PDA)
- 2) 질소농축기
- 3) 감압건조기
- 4) 정제용 카트리지: Silica Sep-Pak(6 mL 또는 1 g) 또는 이와 동등한 것(사용 전에 n-hexane 10 mL 및 10% 초산에틸/n-hexane 용액 10 mL로 차례로 흘려보낸 후 사용한다.)

다. 시약 및 시액

- 1) p-nitrobenzoyl chloride(PNBC): 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 2) 피리딘(pyridine) 용액: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 3) 10% PNBC 용액: PNBC 10 g을 정밀히 달아 피리딘 용액을 가하여 100 mL로 한다. (열을 적당히 가하면서 교반하여 녹인다)
- 4) 아세토니트릴: 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것
- 5) 초산에틸
- 6) 30% 에탄올
- 7) 표준품: 소르비톨(sorbitol)
- 8) 표준원액: 표준품에 30% 에탄올을 가하여 1,000 mg/L로 한다.
- 9) 표준용액: 표준원액을 적절히 희석하여 최종 농도 1~200 mg/L이 되도록 검량선용 표준 용액을 제조한다. 각 표준용액 1 mL을 취하여 질소농축한 후 시험용액의 조제과정과 동일하게 유도체화 과정을 진행한다.

라. 시험용액의 조제

세절한 검체 2 g을 정밀히 달아 30% 에탄올을 가하여 10분간 초음파 추출한 후 전량을 50 mL로 한다. 이 추출액을 4000 g에서 10분간 원심분리한 다음 상층액 일부를 취하여 30% 에탄올로 적절히 희석한다. 이 액 1mL을 취하여 질소농축한 후 2 mL PNBC 용액을 가하여 잘 녹인 다음 50℃에서 60분간 반응시킨다. 반응 중지를 위해 메탄올 5~6방울을 떨어뜨린 후 다시 질소농축한 다음 5 mL 클로로포름을 가하여 잘 녹인다. 이 액을 미리 활성화시킨 silica Sep-Pak 카트리지에 통과시킨 후 25 mL 초산에틸용액으로 용출시킨다. 용출액을 감압농축한 후 10 mL 아세토니트릴을 가하여 잘 녹인 다음 0.45 µm 멤브레인필터로 여과한 후 필요시 적절히 희석하여 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

- 1) 액체크로마토그래프의 측정조건
 - 가) 검출기: 자외선흡광검출기(PDA), 260 nm
 - 나) 칼럼: Capcell Pak C18(4.6 × 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것
 - 다) 이동상: 아세토니트릴 : 물 (75:25, v/v)
 - 라) 컬럼온도: 37℃
 - 마) 유속: 1 mL/min
 - 바) 주입량: 10 µL

바. 정성시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 크로마토그램상의 소르비톨 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액과 시험용액의 머무름시간(retention time)이 일치하여야 한다.

사. 정량시험

정성시험 결과 얻어진 소르비톨 피크의 높이와 면적으로부터 검량선과 비교하여 시험용액 중의 소르비톨 함량을 산출한다.

$$\text{소르비톨의 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{S} \times D$$

C : 검량선으로부터 얻은 농도(mg/L)

a : 검체에 30% 에탄올을 가하여 얻은 전량(mL)

S : 검체 채취량(g)

D : 회석배수

13.13. 스테비올배당체

가. 시험법 적용범위

보조사료에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 스테비올배당체를 30% 아세토니트릴 용액으로 추출 후 액체 크로마토그래프를 이용하여 정성 및 정량분석하는 방법이다.

다. 장치

액체크로마토그래프-자외부(UV photometric detector)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 아세토니트릴: HPLC 급
- 3) 이동상: 10 mM 인산완충액(pH 2.6): 인산일나트륨 1.1998 g을 물에 녹여 1,000 mL로 한다. 인산(1→10)을 가하여 pH 2.6으로 조정한다.
- 4) 표준원액: 스테비오사이드 및 리바우디오사이드 A 표준품을 105℃에서 2시간 건조한 다음 각각 50 mg을 정밀히 달아 물:아세토니트릴 (7:3) 혼합액으로 용해하여 50 mL로 한 액을 표준원액으로 한다.
- 5) 표준용액: 표준원액을 물:아세토니트릴 (7:3) 혼합액에 녹여 적당한 농도로 희석, 혼합한다. 이때 검량선용 표준용액의 농도는 시험용액의 피크면적이 각 표준물질의 직선성을 만족할 수 있도록 조정하여 조제한다.

마. 시험용액의 조제

시료를 105℃에서 2시간 건조한 후 약 50~100 mg을 정밀히 달아 물:아세토니트릴 (7:3) 혼합액으로 용해하여 50 mL로 한 액을 시험용액으로 한다. 따로 스테비오사이드 및 리바우디오사이드 A 표준품을 105℃에서 2시간 건조한 다음 각각 50 mg을 정밀히 달아 물:아세토니트릴 (7:3) 혼합액으로 용해하여 50 mL로 한 액을 표준용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 측정조건

가) 칼럼: Capcell pak C18 MG II (4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상 및 유속: 1 mL/min

(1) A: 아세토니트릴

(2) B: 10 mM 인산완충액(pH 2.6)

(3) A : B (32 : 68)

다) 주입량: 10 μL

라) 검출기 및 파장: 자외부 UV기(210 nm)

마) 칼럼오븐온도: 40℃

사. 정성시험

시험용액 및 표준용액을 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하여 얻어진 피크의 머무름시간(retention time)을 비교해서 스테비올배당체의 성분을 확인한다.

아. 정량시험

정성시험 결과 얻어진 크로마토그램상의 피크 면적법에 따라 정량한다.

자. 계산

$$\text{각각의 스테비올배당체의 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{S} \times D$$

C : 시험용액의 농도(mg/L)

a : 추출용매의 양(mL)

S : 시료량(g)

D : 회석배수

13.14. 5'-이노신산이나트륨

가. 시험법 적용범위

보조사료에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 5'-이노신산이나트륨을 증류수로 추출 후 액체크로마토그래프를 이용하여 정성 및 정량분석하는 방법이다.

다. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric Detector)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 메탄올: HPLC급 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 5'-이노신산이나트륨(무수물)을 증류수에 녹여 1000 mg/L로 한다.
- 4) 표준용액: 표준원액을 증류수에 녹여 적당한 농도로 희석, 혼합한다.

마. 시험용액의 조제

시료 1 g에 증류수 20 mL를 가하여 20분간 초음파 추출 후 증류수로 50 mL로 정용하고 균질하게 혼합한 후 원심분리(3000 g, 10분)한다. 상층액 1 mL를 취한 후 0.45 µm membrane syringe 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 크로마토그래프의 측정조건

- 가) 검출기: 자외부검출기 (250 nm)
- 나) 칼럼: CAPCELL PAK C18(4.6 × 250 mm, 5 µm) 또는 이와 동등한 것
- 다) 칼럼오븐온도: 35℃
- 라) 이동상: 10% TPA-OH(Tetrapropylammonium hydroxide) 20.3 mL를 메탄올 : 물(30 : 70)의 혼합액 약 900 mL에 녹이고 인산으로 pH를 4.0으로 조정한 다음 메탄올 : 물(30 : 70) 혼합액으로 전량을 1,000 mL로 한다.
- 마) 유속: 1 mL/min
- 바) 주입량: 20 µL
- 사) 머무름 시간: 3.0분
- 아) 정량한계: 50 mg/kg

2) 검량선 작성

5'-이노신산이나트륨 표준용액을 희석하여 일정농도가 되도록 제조한 후 HPLC에 20 µL씩 주입한다. 얻어진 크로마토그램상 각 피크의 넓이를 구하여 검량선을 작성한다.

사. 정성시험

시험용액 및 표준용액을 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하여 얻어진 피이크의 머무름 시간(retention time)을 비교해서 5'-이노신산이나트륨의 성분을 확인한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 피이크의 면적 또는 높이를 측정하여 작성한 검량선

으로부터 5'-이노신산이나트륨의 함량을 산출한 후 수분함량을 고려하여 정량한다.

$$\text{5'-이노신산이나트륨의 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{S} \times D$$

C : 시험용액의 농도(mg/L)

a : 추출용매의 양(mL)

S : 시료량(g)

D : 회석배수

14장. 보존제

14.1. 유기산 다성분 분석법

가. 분석원리

본 방법은 보조사료로 성분 등록된 구연산, 젖산, 사과산, 낙산, 초산, 주석산, 호박산, 개미산, 푸말산, 프로피온산 및 염화물을 0.4% 염산용액으로 추출 후 액체크로마토그래프를 이용하여 정성 및 정량 분석하는 방법이다.

나. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric Detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 0.4% 염산용액

라. 시험용액의 조제

보조사료 약 0.05 ~ 0.1 g을 칭량하여 50 mL 용량병에 취하고 0.4% 염산용액 20 mL를 가한 후 20분간 초음파 수조에서 용해시킨다. 0.4% 염산용액으로 정용하고 균질하게 혼합한 후 상등액을 원심분리(3000 rpm, 10분)하거나 또는 여과한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용한다.

마. 시험조작

- 1) 칼럼 : C18 (4.6 × 250 mm, 3 µm) 또는 이와 동등한 것
- 2) 칼럼온도 : 실온 또는 40℃
- 3) 이동상 : 5 ~ 20 mM H₂SO₄
- 4) 검출기 파장 : 자외부(UV) 검출기, 210 nm
- 5) LC Pump : Isocratic pump
- 6) 유속 : 0.7 ~ 1.0 mL/분
- 7) 주입량 : 20 µL
- 8) 머무름 시간

성분	주석산	개미산	사과산	젖산	초산	구연산	호박산	푸말산	낙산	프로 피온산
머무름 시간(분)	4.06	4.24	4.89	5.89	6.13	8.09	8.99	10.79	12.25	13.91

바. 계산방법

$$\text{유기산(\%)} = C \times \frac{a}{S} \times D \times \frac{1}{10,000}$$

C : 시험용액의 농도(mg/L)

a : 추출용매의 양(mL)

S : 시료량(g)

D : 회석배수

사. 칼슘, 나트륨 등 무기물 염의 정량

무기물의 분석방법 중 AAS 또는 ICP법을 따른다.

14.2. 소르빈산, 안식향산과 그 염류 정량

본 방법은 보조사료 중 소르빈산, 안식향산 및 그 염류에 적용 한다.

가. 기체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량

1) 장치

기체크로마토그래프 : 불꽃이온화검출기(FID)를 사용한다.

2) 시약 및 시액

가) 내부표준물질용액 : 0.1% 아세트아닐라이드의 아세톤용액

나) 표준용액 : 소르빈산, 안식향산을 내부표준물질 용액에 녹여 0.5~1.0 mg/mL의 용액을 만든다.

3) 시험용액의 조제

가) 제1법

(1) 액체검체 : 보존료의 함량에 따라 검체 30~100 g을 비커에 취하여 10% 수산화나트륨 용액 또는 10% 염산으로 중화하고 이를 500 mL~1 L의 둥근바닥플라스크에 옮기고 이에 15% 주석산용액 5 mL, 염화나트륨 약 80 g 및 실리콘수지 한방울을 가한 후, 전량을 물로 150~200 mL로 한다. 이를 수증기 증류기에 연결하여 증류하고 유액은 매분 약 10 mL의 속도로 하여 500 mL를 취한다. 수증기 증류한 유액 일정량(각 보존료 5~10 mg 함량)을 분액깔때기에 넣고 염화나트륨 10 g, 10% 염산 5 mL를 가하여 에테르 40, 30 및 30 mL씩으로 3회 추출한다. 에테르추출액을 합하여 소량의 물로 씻고 에테르층을 분취한다. 무수황산나트륨을 사용하여 수분을 제거하고 쿠데르나다니쉬 농축기 또는 감압농축기를 이용하여 농축한 후 잔류물에 내부표준물질이 1 mL 중에 1.0 mg을 함유하도록 첨가하여 아세톤으로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.

(2) 고체검체 : 검체를 잘게 썰거나 갈아서 보존료의 함량에 따라 30~100 g을 취하여 물 50~100 mL를 가하여 잘 섞은 후 이하 액체검체와 동일하게 처리하여 시험용액으로 한다.

나) 제2법

(1) 수증기 증류기를 이용

(가) 액체검체 : 증류방법은 가) 제1법과 동일하며, 다만 15% 주석산용액은 10 mL를 가하고, 증류액을 받는 수기끝은 1% 수산화나트륨용액 20 mL에 잠기도록 하여 증류한다.

(나) 고체검체 : 검체를 잘게 썰거나 갈아서 보존료의 함량에 따라 검체 30~100 g을 취하여 물 50~100 mL를 가하고 잘 섞은 후 이하 액체검체와 동일하게 처리하여 시험용액으로 한다.

(2) 수증기 자동증류기를 이용

(가) 액체검체 : 보존료의 함량에 따라 검체 30~100 g을 비이커에 취하여 10% 수산화나트륨용액 또는 10% 염산으로 중화하고 이를 500 mL~1 L의 플라스크에 옮기고 이에 15% 주석산용액 10 mL, 염화나트륨 약 80 g 및 실리콘수지 한 방울을 가한 후, 적정량의 물을 추가한다. 이를 수증기 자동증류기에 연결하고 증류액을 받는 수기끝을 1% 수산화나트륨용액 20 mL에 잠기도록 하여 증류하고 유액은 매분 10 mL의 속도로 하여 500 mL를 취한다. 수증기 증류한 유액 일정량(각 보존료 5~10 mg 함량)을 분액깔때기에 넣고 염화나트륨 10 g, 10% 염산 5 mL를 가하여 에테르 40, 30 및 30 mL씩으로 3회 추출한다. 에테르추출액을 합하여 소량의 물로 씻고 에테르층을 분취한다. 무수황산나트륨을 사용하여 수분을 제거하고 쿠데르나다니쉬 농축기 또는 감압농축기를 이용하여 농축한 후 잔류물에 내부표준물질이 1 mL 중에 1.0 mg을 함유되도록 첨가하고 아세톤으로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다.

(나) 고체검체 : 검체를 잘게 썰거나 갈아서 보존료의 함량에 따라 검체 10~100 g을 취하여 물 50~100 mL를 가하고 잘 섞은 후 이하 액체검체와 동일하게 처리하여 시험용액으로 한다.

4) 시험조작

가) 기체크로마토그래프의 측정조건

(1) 칼럼 : HP-5(30m × 0.32mm, 0.25 μm) 또는 이와 동등한 것 (5%-phenyl- methyl -polysiloxane)

(2) 검출기: FID(불꽃이온화 검출기)

(3) 주입부 온도 : 210~230℃

(4) 검출기 온도 : 230~250℃

(5) 칼럼오븐온도 : 140~200℃

(6) 캐리어가스 및 유량 : N₂ 1.0 mL/min(split)

5) 정성시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 기체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 크로마토그램상의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액과 시험용액의 머무름시간이 일치하여야 한다.

6) 정량시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 기체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 표준용액의 피크의 높이 또는 면적으로부터 작성한 검량선을 이용하여 시험용액 중의 각 보존료의 함량을 산출한다.

나. 액체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량(제1법)

1) 분석원리

사료 중의 보존료를 수증기증류한 후, 얻은 유액을 액체크로마토그래프로 정성 및 정량 분석하는 방법이다.

2) 장치

액체크로마토그래프 : 자외부흡광검출기를 사용한다.

3) 시약 및 시액

가) 이동상 0.1% TBA-OH(0.1% 인산) 용액 : 40% TBA-OH(Tetrabutylammonium hydroxide) 2.5 g과 85% 인산 1.2 g을 증류수로 희석하여 1 L로 한 후 용매여과장치로 여과한다.

나) 보존료 표준용액 : 각 보존료 표준품(데히드로초산, 소르빈산, 안식향산 및 각각의 파라옥시 안식향산에스테르류) 0.1 g을 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100 mL씩으로 한 액을 각 표준원액으로 한다. 각 표준원액을 취하여 10~50 mg/L가 되도록 희석한 액을 표준용액으로 한다.

4) 시험용액의 조제

기체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량시험 4) 시험용액의 조제에 따라 수증기 증류한 유액을 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 액을 시험용액으로 한다.

5) 시험조작

가) 액체크로마토그래프의 측정조건

(1) 검출기 : 자외부흡광검출기(UV Detector), 217 nm

(2) 칼럼 : Capcell pak MF-C8(4.6 × 150mm, 4.5 µm) 또는 이와 동등한 것

(3) 이동상

(가) 이동상 A : 0.1% TBA-OH(0.1% 인산) 용액

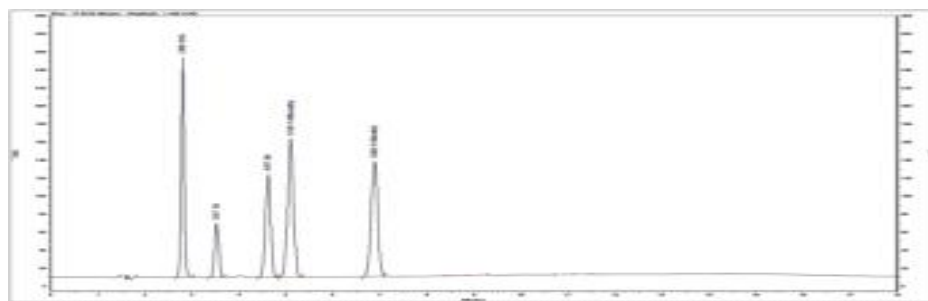
(나) 이동상 B : 아세트니트릴

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0.0	75	25
2.5	75	25
7.0	65	35
12.0	60	40
15.0	70	30

(4) 이동상유량 : 1 mL/분

(5) 주입량 : 10 µL

나) 표준용액의 크로마토그램



데히드로초산(2.8분), 소르빈산(3.5분), 안식향산(4.6분),
파라옥시안식향산메틸(5.1분), 파라옥시안식향산에틸(6.9분)

다) 정량한계: 데히드로초산(0.6 mg/kg), 소르빈산(1.5 mg/kg), 안식향산(1.0 mg/kg),
파라옥시안식향산메틸(1.0 mg/kg), 파라옥시안식향산에틸(1.0 mg/kg)

6) 정성시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 크로마토그램상의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액과 시험용액의 머무름시간이 일치하여야 한다.

7) 정량시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 피크의 높이 또는 면적으로부터 다음 식에 따라 검체중의 각 보존료의 함량을 산출한다.

$$\text{보존료(g/kg)} = \text{각 표준용액의 농도(mg/L)} \times \frac{\text{PA}}{\text{PS}} \times \frac{500}{\text{SA}} \times \frac{1}{1,000}$$

PS :표준용액의 높이 또는 면적

PA:시험용액의 높이 또는 면적

SA:검체의 채취량(g)

다. 액체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량(제2법)

1) 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 소르빈산, 소르빈산칼륨, 안식향산 및 안식향산나트륨을 메탄올로 추출하고 액체크로마토그래프를 이용하여 정성 및 정량분석하는 방법이다.

2) 장치

액체크로마토그래프 : 자외부검출기(UV photometric Detector)를 사용한다.

3) 시약 및 시액

가) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것

나) 용매: 인산, 메탄올, 아세토니트릴 등은 HPLC 급 또는 이와 동등한 것

다) 표준원액: 소르빈산 및 안식향산을 각각 메탄올에 녹여 1000 mg/L로 한다.

라) 표준용액: 표준원액을 각각 메탄올에 녹여 적당한 농도로 희석, 혼합한다.

4) 시험용액의 조제

사료 50 mg을 취하여 5 mL의 메탄올로 3분 동안 진탕하여 추출 후 10분간 원심분리(3000 G, 10 분)하여 상층액 1 mL를 취하여 10 mL의 메탄올로 표선을 맞추어서 0.2 μm membrane syringe filter 여과한 것을 시험용액으로 한다.

5) 시험조작

가) 액체크로마토그래프의 측정조건

(1) 검출기: 자외부흡광검출기, 240 nm

(2) 칼럼: C₈ (4.6 × 150 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

(3) 칼럼오븐온도 : 40℃

(4) 이동상: A: 0.1% TBA-OH(0.1% 인산) 용액

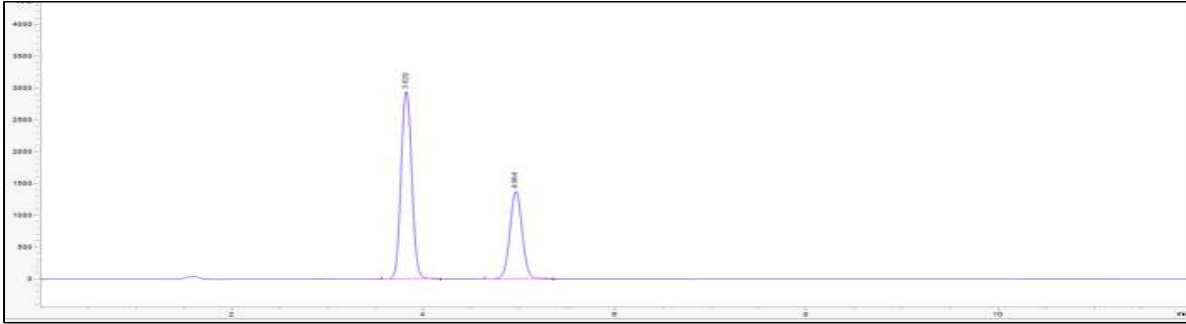
B: 아세토니트릴

시간 (분)	A(%)	B(%)
0.0	75	25
2.5	75	25
7.0	70	30
10	75	25
12	75	25

(5) 유속: 1.0 mL/min

(6) 주입량: 10 µL

나) 표준용액의 크로마토그램



머무름 시간: 소르빈산(3.8분), 안식향산(4.9분)

다) 정량한계: 1000 mg/kg

라) 검량선 작성

소르빈산 및 안식향산 표준용액을 희석하여 일정농도가 되도록 제조한 후 HPLC에 10 µL씩 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상 각 피크의 넓이를 구하여 검량선을 작성한다.

6) 정성시험

시험용액 및 표준용액을 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하여 얻어진 피크의 머무름 시간(retention time)을 비교해서 소르빈산 및 안식향산의 성분을 확인한다.

7) 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 피크의 면적 또는 높이를 측정하여 작성한 검량선으로부터 소르빈산 및 안식향산의 함량을 정량한다.

$$\text{소르빈산 또는 안식향산의 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{S} \times D$$

C: 시험용액의 농도(mg/L)

a: 추출용매의 양(mL)

S: 시료량(g)

D: 희석배수

14.3. 프로피온산 및 그 염류의 정량

가. 기체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량

1) 분석원리

사료 중의 프로피온산 및 그 염류를 수증기증류한 후, 얻은 유액을 용매추출 등을 통하여 정제한 다음, 기체크로마토그래프로 정성 및 정량분석하는 방법이다.

2) 장치

기체크로마토그래프 : 불꽃이온화검출기(FID)를 사용한다.

가) 충전칼럼(Packed column)

고정상담체 : 기체크로마토그래프용 크로모솔브 101(80~100메쉬) 또는 이와 동등한 것
나) 캐필라리칼럼

(1) 고정상액체 : Polyethylene glycol-terephthalic acid 또는 이와 동등한 것

(2) 칼럼 : 0.2~0.32 또는 0.53 mm의 안지름을 가지는 30 m의 모세관 유리칼럼에 적합한 고정상액을 화학적결합시키거나 또는 Cross link 코팅한 것 (HP-FFAP 또는 이와 동등한 것)

다) 이온교환수지칼럼 : 유리관(10 mm×10~15 cm)에 높이 25~30 mm로 강산성 이온교환수지를 충전한다.

3) 시약 및 시액

가) 강산성 이온교환수지 : 100~200메쉬의 도웁스(Dowex) 50X8 또는 암버라이트(Amberlite) CG120을 H형으로 하고 물로 씻는다.

나) 내부표준물질용액 : 트랜스크로톤산 0.1 g을 정밀히 달아 물에 녹이고 100 mL로 한 액을 내부표준물질용액으로 한다(사용시 조제).

다) 프로피온산표준용액 : 프로피온산 0.1 g을 정밀히 달아 아세톤에 녹이고 100 mL로 한 액을 표준원액으로 한다. 프로피온산표준원액 1 mL 및 내부표준용액 1 mL를 취하고 아세톤으로 희석하여 10 mL로 한다(사용시 조제).

$$\text{프로피온산 } 1 \text{ mL} = 100 \text{ } \mu\text{g C}_3\text{H}_6\text{O}_2$$

4) 시험용액의 조제

가) 제1법

잘게 썰은 검체 30~50 g(프로피온산으로서 100~200 mg)을 1 L 증류플라스크에 넣고 물 200 mL, 염화나트륨 80 g, 10%인산용액 10 mL 및 실리콘수지 한 방울을 가한 다음 수증기 증류를 하여 유액 500 mL를 받는다. 이 때 플라스크는 1% NaOH 20 mL를 가해 냉각기 끝이 잠기도록 한다. 유액 25 mL를 정확히 취하여 감압하에서 농축건조한 다음 잔류물을 물 1 mL로 녹여 미리 강산성 이온교환수지를 채워둔 이온교환수지칼럼의 상부에 넣고 유출액은 내부표준물질용액 1.0 mL를 넣은 10 mL메스플라스크에 받는다. 물 1 mL씩으로 잔류물을 녹여서 이 조작을 되풀이 하여 유출액의 전량을 10 mL로 한 다음 인산 1 mL, 에틸에테르 5 mL를 가하여 흔들어 섞어 추출한다. 다시 물층을 에틸에테르로 1~2회 추출하고 에테르추출액을 합한 다음, 무수황산나트륨을 사용하여 수분을 제거하고 쿠데르나다니쉬 농축기 또는 감압농축기를 이용하여 농축한 후 일정량의 아세톤을 가하여 시험용액으로 한다.

나) 제2법

소르빈산, 안식향산 및 그 염류 가.기체크로마토그래피에 의한 정성 및 정량시험 4) 시험용액의 조제 가) 제1법에 따라 얻어진 수증기 증류한 유액 100 mL를 정확히 취하여 분액깔때기에 넣고 염화나트륨 10g, 인산 1 mL 및 내부표준용액 1 mL를 가하여 에테르 50 mL 씩으로 2회 추출하여 에테르층을 모은 뒤, 무수황산나트륨을 사용하여 수분을 제거하고 쿠데르나다니쉬 농축기 또는 감압농축기를 이용하여 농축한 후, 아세톤을 가하여 최종 부피가 10 mL가 되도록 하여 시험용액으로 한다.

5) 시험조작

가) 기체크로마토그래프의 측정조건

(1) 칼럼 : 충전칼럼 또는 캐필라리칼럼

(2) 주입부 온도 : 200~240℃

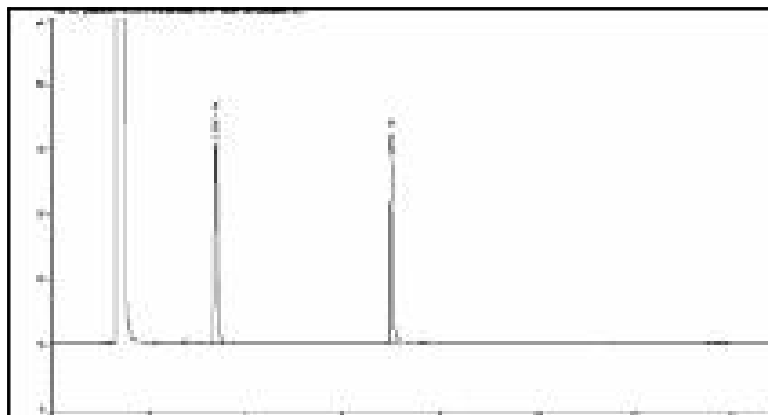
(3) 검출기 온도 : 200~250℃

(4) 칼럼오븐온도 : 120~200℃

(5) 캐리어가스 및 유량 : 질소 또는 헬륨을 적절하게 조절한다.

(6) 검출기의 가스유량 : 수소와 공기를 적절히 조절한다.

나) 표준용액의 크로마토그램



프로피온산(3.4분), 트랜스크로톤산(6.9분)

다) 정량한계

프로피온산(1.0 mg/kg)

6) 정성시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 기체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 크로마토그램상의 피크는 어느 측정조건에서도 표준용액과 시험용액의 머무름시간이 일치하여야 한다.

7) 정량시험

시험용액 및 표준용액을 앞의 조건에 따라 기체크로마토그래프에 주입하고, 얻어진 피크의 높이 또는 면적으로부터 다음 식에 따라 검체중의 프로피온산의 함량을 산출한다.

$$\text{프로피온산(g/kg)} = \text{표준용액의 농도(mg/L)} \times \frac{P_A \times P_{Sis}}{P_S \times P_{Ais}} \times \frac{500}{S_A} \times \frac{1}{C_R} \times \frac{1}{1,000}$$

P_S : 표준용액 중 프로피온산의 피크 높이 또는 면적

P_A : 시험용액 중 프로피온산의 피크 높이 또는 면적

P_{Sis} : 표준용액 중 내부표준물질의 피크 높이 또는 면적

P_{Ais} : 시험용액 중 내부표준물질의 피크 높이 또는 면적

S_A : 검체의 채취량(g)

C_R : 농축배수(= 취한 유액의 양(mL)/최종 시험용액의 양(mL))

14.4. 에톡시퀸(Ethoxyquin)

가. 시험법 적용범위

사료에 적용한다.

나. 분석원리

검체를 아세트니트릴로 추출한 후 액체크로마토그래프로 측정한다.

다. 장치

액체크로마토그래프 : 형광검출기(Fluorescence Detector)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

1) 용매 : 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것

2) 물 : 증류수 또는 이와 동등한 것

3) 표준원액 : 에톡시퀸을 아세트니트릴에 녹여 100 mg/kg이 되게 한다.

4) 표준용액 : 표준원액을 아세트니트릴에 녹여 적당한 농도로 희석한다.

5) 기타시약 : 잔류농약 시험용 또는 특급

마. 시험용액의 조제

시료를 0.85 mm이나 그 이하로 분쇄하고 빛이나 열에 노출되지 않도록 주의한다. 시료 0.1 g을 정밀히 달아 2 mL microcentrifuge에 담고 아세트니트릴 용액을 1.5 mL 넣어 1분 이상 vortex mixer로 혼합 후, 20분간 정치시키고 다시 1분간 vortex mixer로 혼합한다. 또는 시료 무게를 0.5 g 달아 아세트니트릴 7.5 mL과 혼합할 수 있다. 혼합된 시료를 3000 x g에서

원심분리하고 상층액을 취해 0.45 μm 실린지필터로 여과한 후, 갈색 바이알에 담아 시험 용액으로 한다.

바. 시험조작

1) 액체크로마토그래프의 측정조건

- 가) 칼럼충전제 : 옥타데실시릴화한 실리카
- 나) 칼럼 : 안지름 4.5 mm, 길이 250 mm의 스테인리스관 (C18, 5 μm)
- 다) 칼럼온도 : 35 $^{\circ}\text{C}$
- 라) 이동상 : 아세트니트릴 : 0.01 M 암모니아 아세테이트 (70 : 30, v/v)
- 마) 검출기과장 여기과장 360 nm, 형광과장 432 nm
- 바) 유속 : 에톡시퀸이 약 6분에서 유출하는 유속으로 조정한다.

2) 검량선의 작성

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

3) 정량한계

0.05 mg/kg

사. 정성시험

위의 조건에서 시험할 때 시험결과는 표준품과 일치하여야 한다.

아. 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크높이법 또는 피크면적법에 따라 정량한다.

14.5. 부틸히드록시아니솔(BHA), 디부틸히드록시톨루엔(BHT) 및 몰식자산프로필(PG)

14.5.1. 액체크로마토그래프에 의한 BHA, BHT, PG 동시분석법-제1법

가. 분석원리

사료 중의 부틸히드록시아니솔(BHA), 디부틸히드록시톨루엔(BHT), 몰식자산프로필(PG)을 헥산으로 용해·추출하고, 용매추출을 통하여 정제한 다음, 액체크로마토그래프로 정성 및 정량 분석하는 방법이다.

나. 장치

액체크로마토그래프 : 자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 0.01 M TBA-OH용액 : 40% TBA-OH(Tetrabutylammonium hydroxide)용액 6.5 mL에 물 900 mL를 가하고 초산으로 pH 3.0로 조정한 다음 물을 가하여 1,000 mL로 한다.
- 2) 0.01 M 염화제이철용액 : 염화제이철($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.27 g을 0.01N 염산에 녹여 100 mL로 한다.
- 3) 표준용액 : BHA, 50 mg과 PG 25 mg, BHT 100 mg을 이소프로판올 및 아세트니트릴혼액 (1 : 1)에 녹여 50 mL로 한다. 사용시 이액 10 mL를 취하고 이동상으로 희석하여 100 mL로 한다.

라. 시험용액의 조제

- 1) 유지류 : 균질화한 시료 5 g을 비커에 달아, 5 mL 헥산이 들어 있는 125 mL 분액깔때기에 옮기고, 헥산 15 mL로 여러번 나누어서 비커를 씻어 분액깔때기에 합친다. 여기에 헥산 포화아세트니트릴 50 mL 씩으로 3회 추출하고(만약 유탁형태가 일어나면 뜨거운 물에 분액 깔때기를 5~10초 동안 담가서 분리한다), 추출액을 250 mL 분액깔때기에 합한다. 이 액을 농축플라스크에 서서히 옮겨 40 $^{\circ}\text{C}$ 이하의 수욕에서 감압농축기를 사용하여 3 ~ 4 mL로 농축하여 눈금이 있는 용기에 옮기고 씻어 전량을 5 mL로 한 후, 이소프로판올 5 mL로 플라스크를 씻어 전량을 10 mL로 하여 시험용액으로 한다.
- 2) 수산동물유래 사료 등 : 잘게 썬 시료 5 ~ 20 g을 달아 브랜더캡(Blender Cap)에 옮기고 무수황산나트륨 약 15 g, 헥산 100 mL를 가하여 약 2분간 균일하게 섞은 다음 여과한다. 잔사에 헥산 100 mL를 가하여 추출을 되풀이하고, 여액을 합친다. 여액을 농축하여 약

20 mL로 한다. 이하 가) 유지류에 따라 조작한다.

마. 시험조작

- 1) 칼럼 : C18 (4.6 x 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 2) 이동상 : 물 · 아세트니트릴 · 초산 (35 : 60 : 5)
- 3) 검출기 파장 : 자외부(UV) 검출기, 280 nm
- 4) 유속: 1.0~1.5 mL/분
- 5) 주입량: 10~20 μL
- 6) 감도: 0.05 AUFS

바. 계산방법

$$\text{산화방지제 (mg/kg)} = P \times \frac{A_s}{A_t} \times \frac{10}{S}$$

P : 표준용액의 농도(mg/L)

A_t : 표준용액의 높이 또는 면적

A_s : 시험용액의 높이 또는 면적

S : 시료량(g)

14.5.2. 액체크로마토그래프에 의한 BHA, BHT 동시분석법-제2법

가. 분석원리

사료 중의 부틸히드록시아니솔, 디부틸히드록시톨루엔을 아세트니트릴로 추출하고 아세트니트릴 포화 헥산으로 정제한 후 기울기 용리를 이용한 액체크로마토그래프로 정성 및 정량하는 방법이다.

나. 장치

액체크로마토그래프 : 자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 아세트니트릴
- 3) 헥산
- 4) 아세트산

라. 시험용액의 조제

2 g의 사료에서 10 mL의 아세트니트릴로 10분간 진탕하여 추출 후 10분간의 원심분리 후 상층액을 취한다. 상층액을 2 mL의 아세트니트릴 포화 헥산을 가해주고 10분 동안 진탕 후 하층액을 취하여 0.45 μm 실린지필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

마. 시험조작

- 1) 칼럼: C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 2) 검출기 파장 : 자외부(UV) 검출기, 280 nm
- 3) 유속 : 1.0 mL/분
- 4) 주입량 : 10 μL
- 5) 기울기 조건

Time(분)	7% 아세트산(증류수)	4% 아세트산(아세트니트릴)
0	77.5	22.5
2	77.5	22.5
14	4.5	95.5
17	4.5	95.5
25	77.5	22.5
30	77.5	22.5

- 6) 머무름 시간 : BHA 14.50분, BHT 19.50분

바. 계산방법

$$\text{BHA/BHT(\%)} = C \times \frac{a}{S} \times D \times \frac{1}{10,000}$$

C : 시험용액의 농도(mg/L)

S : 시료량(g)

a : 추출용매의 양(mL)

D : 희석배수

14.6. 케르세틴

가. 분석원리

사료 중 케르세틴을 메탄올로 추출한 후 액체크로마토그래프로 정성 및 정량한다.

나. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 물 : 3차중류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 메탄올
- 3) 아세트산

라. 시험용액의 조제

시료 약 50 mg을 정밀히 달아 메탄올을 가하여 50 mL로 한 다음 30분 초음파 추출하고 이를 0.5 μm 여과기로 여과한 액을 시험용액으로 한다. 따로, 케르세틴($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 표준품을 케르세틴으로서 50 mg 함유하도록 정밀히 달아 메탄올을 가하여 50 L로 한 다음 0.5 μm 여과기로 여과한 액을 표준용액으로 한다. 표준용액 및 시험용액 각각 10 μL 씩을 다음의 시험조작 조건으로 액체크로마토그래프에 주입하고 다음 계산식에 따라 케르세틴의 함량을 구한다.

마. 시험조작

- 1) 칼럼 : C18 (3.9 $\times$ 300 mm, 10 μm) 또는 이와 동등한 것
- 2) 칼럼온도 : 실온 또는 40 $^{\circ}\text{C}$
- 3) 이동상 : 메탄올 · 물 · 아세트산 (15 : 3 : 1)
- 4) 검출기 파장 : 자외부(UV) 검출기, 375 nm
- 5) 유속 : 1.0 mL/분
- 6) 머무름 시간 : 3.40분

바. 계산방법

$$\text{케르세틴 함량(\%)} = \frac{P}{S} \times \frac{A_s}{A_t} \times 100$$

P : 표준품(케르세틴으로서)의 양(mg)

S : 건조물로 환산한 시료량(mg)

A_t : 표준용액의 피크 면적

A_s : 시험용액의 피크 면적

14.7. 레스베라트롤

가. 분석원리

사료 중 레스베라트롤을 초산에틸로 추출한 후 액체크로마토그래프로 확인 및 정량한다.

나. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 초산에틸
- 3) 아세토니트릴
- 4) 0.1% 오르토인산용액

라. 시험용액의 조제

시료 약 1.0 g을 정밀하게 달아 부피플라스크에 넣고 10 mL 초산에틸에 녹인다. 30분 동안 초음파추출한 후 추출액을 0.45 μ m 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다. 따로 레스베라트롤($C_{14}H_{12}O_3$) 표준품 0.1 mg을 정밀하게 달아 50% 아세토니트릴 10 mL로 녹인다. 이 액 5 mL를 정확하게 취하여 50% 아세토니트릴을 넣어 100 mL로 하여 표준액으로 한다. 시험액 및 표준액 20 μ L를 가지고 상기 조건에서 액체크로마토그래프법에 따라 시험하고 시험액 및 표준액의 피크 면적 AT 및 AS를 구한다.

마. 시험조작

- 1) 칼럼 : C18 (4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것
- 2) 이동상 : 아세토니트릴·0.1% 오르토인산용액 (20 : 80)
- 3) 검출기 파장 : 자외부(UV) 검출기, 306 nm
- 4) 유속 : 1.0 mL/분
- 5) 머무름 시간 : 39.10분

바. 계산방법

$$\text{레스베라트롤}(C_{14}H_{12}O_3)\text{의 양(mg)} = P \times \frac{A_t}{A_s} \times \frac{1}{40}$$

P : 표준품(레스베라트롤)의 양(mg)

A_t : 표준용액의 피크 면적

A_s : 시험용액의 피크 면적

14.8. 몰식자산 및 몰식자산프로필 동시분석법

가. 분석법 적용범위

보조사료에 적용한다.

나. 분석원리

시료 중에 포함되어 있는 몰식자산 및 몰식자산프로필을 메탄올로 추출하고 액체크로마토그래프를 이용하여 정성 및 정량분석하는 방법이다.

다. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric Detector)를 사용한다.

라. 시약 및 시액

- 1) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 2) 용매: 메탄올, 아세트산 등은 HPLC 급 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 몰식자산 및 몰식자산프로필을 각각 증류수에 녹여 1000 mg/L로 한다.
- 4) 표준용액: 표준원액을 각각 50% 메탄올에 녹여 적당한 농도로 희석, 혼합한다.

마. 시험용액의 조제

사료 0.1 g을 취하여 10 mL의 메탄올로 3분 동안 진탕하여 추출 후 10분간 원심분리(3000 G, 10분)하여 상층액을 취하고, 50% 메탄올로 희석한 후 0.2 μ m membrane syringe filter로 여과하여 시험용액으로 한다.

바. 시험조작

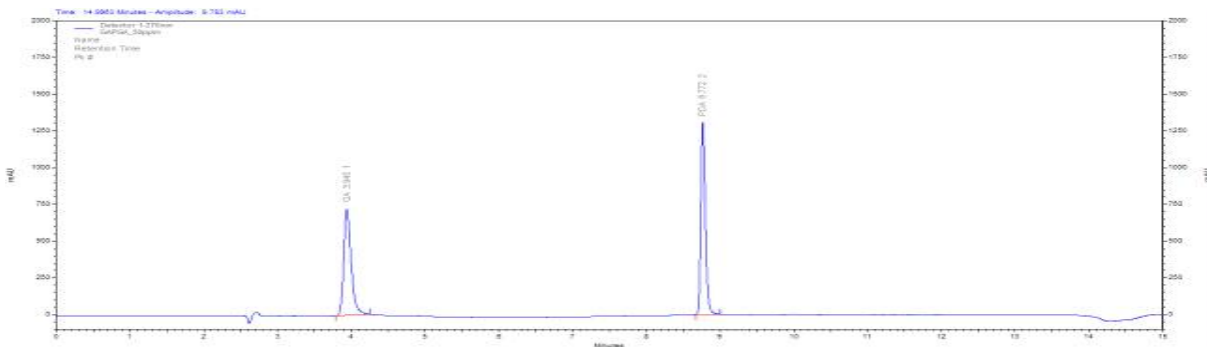
- 1) 크로마토그래프의 측정조건
 - 가) 검출기: 자외부흡광검출기, 270 nm
 - 나) 칼럼: C18 (4.6 $\times$ 250mm, 5 μ m) 또는 이와 동등한 것
 - 다) 칼럼오븐온도 : 40℃
 - 라) 이동상: A: 0.1% 아세트산 수용액
B: 메탄올

시간 (분)	A(%)	B(%)
0	80	20
2	80	20
6	30	70
11	20	80
12	80	20
15	80	20

마) 유속: 1.0 mL/min

바) 주입량: 10 µL

사) 표준용액의 크로마토그램



머무름 시간: 몰식자산(3.9분), 몰식자산프로필(8.7분)

아) 정량한계: 1000 mg/kg

2) 검량선 작성

몰식자산 및 몰식자산프로필 표준용액을 50% 메탄올로 희석하여 일정농도가 되도록 제조한 후 HPLC에 10µL씩 각각 주입한다. 얻어진 크로마토그램상 각 피크의 넓이를 구하여 검량선을 작성한다.

사. 정성시험

시험용액 및 표준용액을 위의 조건에 따라 액체크로마토그래프에 주입하여 얻어진 피크의 머무름 시간(retention time)을 비교해서 몰식자산 및 몰식자산프로필의 성분을 확인한다.

아. 정량시험

정성시험과 동일한 조건에서 얻어진 피크의 면적 또는 높이를 측정하여 작성한 검량선으로부터 몰식자산 및 몰식자산프로필의 함량을 정량한다.

$$\text{몰식자산 또는 몰식자산프로필의 함량(mg/kg)} = C \times \frac{a}{S} \times D$$

C: 시험용액의 농도(mg/L)

a: 추출용매의 양(mL)

S: 시료량(g)

D: 희석배수

14.9. 인산(H₃PO₄)

가. 시약의 조제

4.2. 인(P) 가. 시약의 조제 또는 4.19. ICP 발광분광분석법 가. 표준용액의 제조에 따른다.

나. 시료액의 조제

4.2. 인(P) 나. 시료액의 조제에 따른다.

다. 측정

4.2. 인(P) 다. 측정 또는 4.19. ICP 발광분광분석법의액 다.방법에 따라 인(P)을 분석한 후 인산(H₃PO₄)의 함량을 계산한다.

라. 계산

$$\text{인산 (\%)} = \text{인 (\%)} \times 3.163$$

$$3.163 = \text{인산(H}_3\text{PO}_4\text{)의 분자량/인(P)의 원자량} = 97.995/30.973$$

15장. 사료중 동물성 유래 단백질 혼입검사법

15.1. 현미경 검사법

가. 비중에 의한 현미경 검사법

1) 시료채취 방법

반추동물 배합사료 또는 동물성사료의 최종제품에 대한 시료채취는 사료검사요령(농림부고시)의 규정에 따라 실시한다.

2) 감정방법

시료를 1 mm체로 통과할 수 있도록 분쇄한 후, 분쇄한 시료 1 g을 미리 제조한 비중액에 넣어 비중분리용 여과용기에 넣고, 가는 유리봉을 이용하여 혼합하고, 약 20분간 방치한 다음 시료중의 각 원료를 비중 분리한다.

하층에 분리된 사료원료(육골분 등이 부분적으로 분리) 및 클로로포름을 여지(No 5A)로 여과하고 여지에 부착된 사료원료를 에탄올로 세척하고 여지에 모은다. 여지를 건조한 후 여지에 있는 사료를 100 mL의 톨비이커에 옮겨 5% 수산화나트륨용액 200 mL을 가한 후 30분간 끓이고, 비이커의 상부 까지 물을 채워서 정치하고 상등액을 흡입 제거한다.

물층이 투명하게 될 때까지 세정조작을 반복한다. 비이커내 침전물 전량을 소형 샤프에 옮겨 광학현미경(배율 50~100배) 및 실체현미경(20~30배)에서 각 시료중의 육골분 유래조직단편의 유무를 확인한다.

나. 염색에 의한 현미경 검사법

동물유래물질은 샘플을 체로 치고 침전물도에 따라 구분, 시료(10 g 이상)을 분쇄하여 2개의 대표 샘플로 나누어서 하나는 5 g을 체로 치고, 2 g은 침전시켜, 염색시약에 의해 색깔로 확인, 동물유래물질의 현미경 확인은 특수 염색시약을 이용하여 조사가 가능

1) 시약

Chloral hydrate, gelatin, Paraffin oil, Bradford reagent Iodine/potassium iodide solution, Millon reagent, Cystin reagent

2) 방법

가) 체로 동물유래물질 분리 확인

(1) 5 g의 샘플을 체를 통하여 분리

(2) 0.5 mm이상의 샘플은 실체현미경을 이용하여 다양한 배율에서 조사시 동물유래물질은 체계적으로 나타남

(3) 0.5 mm 동물유래물질을 여러 배율의 복합현미경으로 현경

나) 동물유래물질의 현미경 확인은 특수 염색시약을 이용하여 조사가 가능

(1) Chloral hydrate : 조심스럽게 가열처리하면 세포구조가 분명하게 보임 (전분이 젤라틴화되기 때문, 세포내용물이 제거되어짐)

(2) gelatin : collagen이 구성 단백질(가열과정에서 tryptophane 파괴)

(3) Paraffin oil : 골격성분 물질은 대부분이 lacunae(뼈소강, 뼈기질내 공간, 열공)내 공기가 차 있고, 5~15 μ m 정도의 검은 구멍이 있어 확인되어짐

(4) Bradford reagent : 단백질 검출시 이용(전형적인 푸른 색깔)

(5) Iodine/potassium iodide solution : 전분 검출시 사용(blue-violet colour), 단백질 (yellow-orange colour).

(6) Millon reagent : By carefully heating, 골격 성분원소는 분홍색으로 됨

(7) Cystin reagent : By carefully heating, cystin-containing 성분 원소들은 (머리카락, 깃털들, 등등) black-brown으로 됨

* 견과 양모는 같은 단백질 함유로 비슷한 염색거동을 갖는다. 그러나 견섬유는 양모와 달리 Cystin을 함유하지 않으므로 Disulfide(S-S)에 의한 가교결합이 없다.

다) 침전물로부터 동물유래물질 분리확인

- (1) 샘플 2 g(0.001 g 까지 정확하게)를 시험관이나 분액여두에 넣고 15 mL의 4염화에틸렌으로 처리
- (2) 혼합 후 정치(1~3분)하여 침전물을 분류
- (3) 침전물을 건조한 후 무게를 칭량(0.001 g에 까지)하여, 골은 건조침전물에서 실체현미경 복합 현미경으로 조사

3) 계산과 평가

동물유래물질의 정량평가로 골이 함유된 동물성유래물질이라면 계산이 가능하다. 육상 온혈동물(포유류, 조류)의 골 파편내 골소강을 조사하며, 샘플내 동물유래물질은 침전물내 골로 평가된 부분(무게), 동물유래 물질내 골의 비율(무게)을 고려하여 평가한다. 평가시 3개의 슬라이드와 슬라이드 당 5개의 위치를 조사하여야 한다. 혼합 사료내 침전물은 육상동물의 골과 어골뿐만 아니라 고 중량의 물질이 혼합되어 있다(미네랄, 모래, 목지화된 식물체).

가) 골격파편 비율의 평가치

$$\% \text{ 육상동물 골분 파편} = (S \times c) / W$$

$$\% \text{ 어골과 비늘 파편} = (S \times d) / W$$

$$\ast S = \text{침전물무게(mg)},$$

$$c = \text{침전물내 육상동물 골의 평가를 위한 보정인자(\%)}$$

$$d = \text{침전물내 어골과 비늘의 평가를 위한 보정인자(\%)}$$

$$W = \text{침전되어진 샘플의 무게(mg)}$$

나) 동물유래물질의 평가치

동물생산물의 골격의 비율은 크게 변화할 수 있으며, 골분의 경우에 골의 비율은 50~60%, 육분의 경우 20~30%가 골이며, 어골분과 비늘에 경우에도 어분이 10~20% 함유되어있다. 만일 샘플내 육분의 종류가 알려지면, 함량의 추정이 가능하다.

$$(1) \text{ 육상동물 생산물 유래물질의 함량 추정} = (S \times c) / (W \times f) \times 100$$

$$(2) \text{ 물고기 생산물 유래물질의 함량 추정} = (S \times d) / (W \times f) \times 100$$

$$\ast S = \text{침전물무게(mg)},$$

$$c = \text{침전물내 육상동물 골의 평가를 위한 보정인자(\%)}$$

$$d = \text{침전물내 어골과 비늘의 평가를 위한 보정인자(\%)}$$

$$f = \text{조사 샘플내 동물유래 물질의 골 부분을 위한 보정인자(\%)}$$

$$W = \text{침전되어진 샘플의 무게(mg)}$$

4) 조사결과와 표현

가) 현미경으로 관찰시 동물유래물질이 조사샘플에서 발견되지 않음

현미경으로 관찰시 동물유래물질이 조사샘플에서 발견

나) 이런 경우는 조사결과 보고서는 상세하게 기술

다) 현미경으로 조사결과 조사샘플에서 동물유래물질 소량 발견

라) 조사의 경험에 의존

(1) 어느 한쪽 현미경으로 관찰 시 조사샘플에서 동물유래물질 소량 발견, 골 파편 내용물(물고기/육상동물-육상동물의 골 파편의 경우, 특히 가금류와 포유류로부터 유래된 골 파편)은 동물유래 생산물내(= f 보정인자 사용) 골(%)에 근거하여 계산했을 때 크기순서에 따라 큰 것(%), 동등한 것(%)

(2) 현미경으로 관찰 시 조사샘플에서 측정할 수 있는 양의 동물유래물질 발견

(3) 육상동물유래 골 성분이 확인, 보고서에는 추가기술

- 상기 물질은 포유동물로부터 유래되어진 가능성 있음, 이것은 육상동물로부터 골 파편이 가금류와 포유류로부터 특이성을 가진다면 필요한 사항이 아님

15.2. ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) : 효소면역측정검사법

가. 시약

1) 사용 kits [Ruminant Kit for Meat&Bone Meals and animal feeds kits]

2) kit 내용

가) Antibody Coated Microwell Module

나) Biotinylated anti-species antibody

다) Avidin-peroxidase conjugate

라) TMB substrate solution

마) Stop solution

바) 양성 control 액 / Positive species control

사) 음성 control 액 / Positive species control

아) Wash solution concentrate

자) Extraction additive concentrate

나. 시약의 조제

1) Positive controls, Anti-species botinylates, Avidiin peroxidase conjugate는 buffer조제 공급시약 이용

2) ABTs Concentrate 와 Peroxide Citrate buffer를 1:24의 비율로 희석하여 working ABTs 용액으로 제조하여 사용(희석후 즉시 사용)

3) Wash solution는 1:9의 비율로 증류수와 혼합하여 사용

다. 시료추출방법

1) 측정시료를 막자사발 또는 분쇄기를 이용하여 분쇄한다.

2) 시료 5 g을 250 mL삼각플라스크에 취한다.

3) 추출용매(0.5 M NaCl, 10 mM EDTA) 50 mL을 첨가하여 15~30분간 방치한다.

4) 방치 후, 항온수조에서 95~100℃로 15분간 가열한다.

5) 상온에서 냉각시킨 후 여과지(Whatman 4)를 이용하여 여과하거나 원심분리하여 시료용액으로 사용 한다.

라. 측정방법

1) 측정 kit와 시료추출액은 분석 전 실온에서 측정한다.

2) 정밀한 마이크로피펫을 이용하여 시료액, 양성 control액, 음성 control액 및 Blank를 각각의 well 속에 100 µL씩 첨가한다.

3) 서서히 손으로 혼합한 후 well을 덮은 후 실온에서 20분 정치 배양시킨다.

4) 배양 후 well 속의 내용물을 버리고, 흡착지를 이용해 두드려가면서 잔여물을 제거한 후 wash solution 300 µL를 각각의 well에 채우고, 동일한 방법으로 내용물을 버린다(2회 세정을 반복).

5) Biotinylated anti-species antibody 50 µL을 각각의 well에 넣고, 덮어서 실온에서 20분 정치 배양시킨다. 배양 후 well의 내용물을 버리고 세정을 3회 반복한다.

6) Avidin-peroxidase conjugate 50 µL을 각각의 well에 넣은 후 덮고 실온에서 20분간 정치배양 시킨다. Well의 내용물을 버리고, 6번 세정을 반복한다.

7) TMB substrate solution 50 µL를 각각의 well에 넣고, 차광 실온에서 20분 정치배양 시킨다.

8) 배양후 stop solution 50 µL을 각각의 well에 넣고 발색을 정지시킨다.

9) 15분 이내에 plate reader (450 nm파장)에서 흡광도를 측정한다.

15.3. PCR(Polymerase Chain Reaction) : 중합효소연쇄반응검사법

배합사료, 육골분 및 분쇄중의 포유동물 유래조직, 반추동물유래 조직 및 소, 닭, 돼지 등의 각종 동물유래 조직의 유무를 조직중에 함유되어 있는 미토콘드리아 DNA의 각 동물특이적 배열을 PCR법으로 검출함에 의해 확인한다.

가. 시료 및 검출대상

1) 대상시료 : 배합사료, 육골분 및 어분 등의 사료원료를 대상으로 한다.

2) 검출대상 동물종 : 포유동물, 반추동물, 소, 닭, 양, 산양 등 아래표에 각종 프라이마에 의해 검출 가능한 동물치를 나타낸다.

3) 검출처리 : 본법에 의한 사료중의 소유래 육골분의 검출감도(원물함량 %로서)는 다음과 같다.

가) 포유동물 검출 프라이마 -- 육골분으로서 0.1~0.01%

나) 반추동물 검출 프라이마 -- 육골분으로서 0.1~0.01%

다) 소검출 프라이마 ----- 육골분으로서 0.1~0.01%

육골분의 검출감도는 육골분 원료동물의 사용비율, 제조방법(가열처리조건) 및 골 성분의 함유비율 등에 의해 다른 경우가 있다. 또한 본 법은 동물유래 DNA를 검출하는 것이기 때문에 육골분에 한하지 않고 탈지분유, 혈장단백질 등의 동물유래 DNA를 포함하는 원료에서도 검출된다.

나. 시료의 채취 및 분쇄

1) 시료의 채취

원칙적으로 시료는 공장내 보관시 등에 다른 원료 혹은 환경에서 오염물질이 오염되는 가능성이 없는 제조품에서 채취한다. 수거방법은 미생물채취법에 준해 대상시료 이외의 물질의 오염이 없도록 신중히 채취한다. 채취시는 플라스틱제 장갑을 끼고 멸균된 스푼을 사용하여 약 500 g을 멸균된 채취봉지에 채취한다.

2) 분쇄 등

육골분, 어분은 원칙적으로 분쇄를 하지 않는다(분쇄시 오염의 위험성이 크므로) 입자가 거친 박류 등 큰 육편 등이 포함되는 경우에는 깨끗한 망(1 mm)으로 통과물을 채취한다. 배합사료에서는 1 mm의 망을 통과할 때 까지 분쇄한다. 이 때 시료간의 오염을 방지하기 위하여 시료마다 분쇄반을 세정하거나 교환한다.

3) 시료의 보존

시료는 냉장 보관한다. 또한 미분쇄후의 시료를 장기(1주일 이상)보존하는 경우에는 냉동고(-20℃)에서 보존한다.

다. 시험방법

1) 시약의 조제

물은 특별한 경우를 제외하고 이온교환수 또는 증류수를 사용한다. PCR반응액의 조제에 사용하는 물 및 추출 DNA의 희석에 사용하는 물 및 아래에 특별히 기술한 경우에는 고압증기처리(121℃, 15분간)한 초순수(역삼투압으로 정제한 RO수 또는 증류수를 Milli-Q 등으로 비저항치 17 M/cm까지 정제한 것)을 사용한다.

가) 조직·세포용 미토콘드리아 DNA 추출키트

mtDNA 엑스트라-CT 키트(화광순약) 또는 이것과 같은 것을 사용한다.

나) 0.5 M EDTA 용액

에틸렌디아민4초산-나트륨-수화물 18.6 g을 초순수 80 mL에 넣고 수산화나트륨(가루형태) 약 2 g을 더하여 녹이고, pH 8.0에 용해시킨 후 초순수를 가하여 100 mL을 만들고 121℃에서 15분간 고압증기멸균한다.

다) 1 M 토리스 염산완충액

토리스히드록시메틸아미노메탄 12.1 g을 초순수 80 mL에 넣고 염산 약 4.2 mL을 넣고 녹이고, pH 8.0에 조정된 후 초순수를 넣어 100 mL로 하고 121℃에서 15분간 고압증기멸균한다.

라) 전기영동용 완충액(TAE완충액)

토리스히드록시메틸아미노메탄 4.84 g, 초산 1.14 mL 및 0.5 M EDTA용액 2 mL을 물에 녹여 1000 mL로 한다.

마) TE 완충액

1 M 토리스염산완충액 1 mL 및 0.5 M EDTA용액 0.2 mL을 물에 녹여 100 mL로 하고 121℃에서 15분간 고압증기멸균한다.

바) 아가로스 겔고

순도 아가로스(전기영동용) 또는 이것과 동등의 것 2.5 g을 전기영동용 완충액 100 mL을 넣고 가열하고 녹인후 50~60℃에서 냉각시킨후 겔의 두께가 3~4 mm가 되도록 겔형 성형에 넣고, 겔과 고무의 사이에 기포가 들어가지 않도록 신중하게 고무를 넣고 실온에서 방치하여 고체화시킨다.

사) 영동용 색소용액

프로모페놀블루 25 mg, 키실렌시아놀 25 mg 및 글리세린 3 g을 초순수에 녹여 10 mL로 하고

121℃에서 15분간 고압증기멸균한다.

아) DNA 사이즈마커(50-1000bp) (FMC, 보주조 등)

자) 취화에치지움 용액

취화에치지움 10 mg을 초순수 500 µL에 녹여 취화에치지움 원액을 조제하고 사용시에는 이 원액 25 mL을 전기영동용 완충액 1000 mL에 녹인다.(사용할 때 조제) 또한 취화에치지움 용액은 광분해성이 있으므로 차광 냉장보관한다. 또한 취화에치지움은 독가스가 생기므로 취급시에는 반드시 장갑을 사용하고 시험종료후 흡착제가 들어간 필터 등을 사용하여 처리한 후 폐기한다. 취화에치지움 염색한 아가로스 겔은 5% 차아염산나트륨 용액에 침적후 직사 일광하에 방치하여 광분해시킨후 폐기한다.

차) 지루코르아비스(직경 1.5 mm)

YTZ볼(닛카토) 또는 이것과 같은 동등의 것을 121℃에서 15분간 고압증기멸균한다.

카) 프라이마

(1) 포유동물 검출 프라이마 : 검출반도사이즈 176bp

(2) 반추동물 검출 프라이마 : 104bp

(3) 소 검출 프라이마 : 120bp

(4) 소 검출 프라이마 : 271bp

(5) 닭 검출 프라이마 : 227bp

(6) 양, 산양검출 프라이마 : 331bp

(7) 돼지검출 프라이마 : 126bp

타) PCR 반응용 효소Ampli Taq Gold(applied Biocytateme)

파) PCR 완충액PCR buffer II, PCR Gold buffer 또는 이것과 동등의 물질

하) 2 mM dNTPmix

가) 양성 컨트롤소 미토콘드리아 DNA, 닭 미토콘드리아 DNA, 양 미토콘드리아 DNA 등 소고기 등에서 "(다)"항에 의해 추출한 DNA를 사용한다.

2) 장치 및 기구

가) 사말사이크라

PE9600, PE9700, PCR Thermal Cycler MP 또는 이것과 동등의 물질

나) 크린벤치

다) 비즈파쇄장치

2000rpm 정도의 회전수에, 2mL 튜브에 대응하는 것. BC-20(센트랄과학기구), 마치비즈손카, Fast Prop, FP120(nskzhtl), Mixer Mill MM300(Qlagen) 또는 이것과 동등의 물질

라) Autoclave

마) 전기영동장치 : Mupid-2(코스모바이오) 또는 이것과 동등의 물질

바) 폴라로이드 카메라

사) UV 트랜스일루미네이터

아) 고속냉각원심기

1.5 mL 및 0.2 mL 튜브대응, 4℃냉각, 12000 × g의 원심분리가 가능한 것

자) 마이크로피펫트(1000, 200, 200, 20 및 2 µL용 디지털가변형)

차) 그외 2 mL, 1.5 mL 및 0.2 mL의 각종 플라스틱제 튜브 및 각종 마이크로피펫형 팁등(살균된 것)

3) DNA 추출

시판 조직, 세포용 미토콘드리아 DNA 추출키트 (mtDNA 엑스트라쿠타-CT키트)을 사용한 DNA의 추출법에 대하여 설명한다.

또한 육골분의 DNA 추출방법으로서는 그밖에 페놀크로로포름법, 케아니진치오시아네트 완충액을 사용하는 방법, 키렉스 수지를 사용하는 방법이 있다.

가) 시료 100 mg을 2 mL 플라스틱제 나사형 튜브에 채취하고, 질유니아 비즈를 1.5 g 정도 넣고

추출용완충액(mtDNA 추출키트에 첨부)를 1 mL 넣고 비즈파쇄장치)에 셋트하여 2000 rpm으로 1분간 진동한다. 1분간 정치한 후 다시 2000 rpm으로 1분간 진동하고 수냉 후 1000×g으로 2분간 원심분리(4℃)한다.

※ 주) 통상 호모지나이즈 추출로도 좋으나, 시료간의 오염에 주의를 요한다.

나) 상층부를 1.5 mL 플라스틱제튜브에 채취하여 10000 × g으로 10분간 원심분리(4℃) 한 후 상층을 제거한다.

다) DNA 추출용액(키트 첨부) 50 µL을 가하여 피펫팅에 의해 현탁시키고 여기에 DNA 추출용액 II (키트에 첨부) 100 µL을 가하여 혼합 후 5분간 수냉한다.

라) 여기에 미리 수냉해 놓은 DNA 추출용액(키트에 첨부) 75 µL을 가하여 물루틴스미키사로 혼합후 즉시 수냉한다.

마) 12000 × g으로 5분간 원심분리(4℃)한 후 상층액 200 µL을 채취하고 새로 1.5 mL튜브에 옮긴다.

바) 여기에 요하나트륨액(키트에 첨부) 300 µL을 가하여 혼합후 여기에 500 µL의 이소프로바놀을 가하여 혼합한다.

사) 12000 × g으로 5분간 원심분리(실온화)한 후 상층을 제거한다.

아) 1 mL의 70% 에탄올을 가하여 혼합후 12000 × g으로 5분간 원심분리하고 상층을 제거한다. 다시 1 mL의 70% 에탄올을 가하고 혼합후 12000 × g으로 5분간 원심분리하고 상층을 제거하여 20 µL의 TE 완충액을 가하여 DNA를 용해한다. 이 DNA용액은 냉동 보존한다.

4) PCR 반응

일반적인 PCR법의 조작에 준한다. 포유동물 유래 DNA의 검출에 플라이마셋트 anicon5, anicon3, 반추동물유래 DNA의 추출에는 rumicon 52, rumicon 32, 소유래 DNA의 검출에는 cow52, cow31 또는 I8129, H8357을 사용하여도 좋다.

각 플라스마를 사용할 때의 PCR의 반응조건은 별지 1 (PCR반응조건)에 나타났다. 이하의 조작법은 개략적으로 나타났다.

가) 200 µL의 플라스틱제 튜브에 PCR 반응액 18 µL 및 추출 DNA용액의 10배 희석액 2 µL을 가한 것을 PCR반응용의 시약액으로 한다.

나) 같은 방법으로 PCR 반응액 18 µL 및 소유래 DNA용액의 10배 희석액 2 µL 가한 것을 양성 콘트롤액, PCR 반응액 18 µL 및 물 2 µL을 가한 것을 음성 콘트롤액으로 한다.

다) 시료액, 양성콘트롤액 및 음성콘트롤액을 사마루사이쿠라에 넣고, 별지1의 반응조건에서 PCR반응을 실시한다.

5) 전기영동

가) 아가로스겔을 전기영동용 완충액을 넣은 영동조에 넣고 10분간 100V의 정전압을 넣어 예비 영동한다.

나) DNA 사이즈마커 5 µL에 약 1 µL의 영동용색소용액을 가하고 혼합하여 그 전량을 아가로스겔의 스톱트에 주입한다.

다) PCR 반응이 종료한 시료액, 양성콘트롤 및 음성콘트롤 각각 5 µL에 약 1 µL의 영동용색소용액을 가하고 혼합하여 그 전량을 아가로스겔의 스톱트에 주입한다.

라) 100V 정전압을 걸고 부로모페놀프레가스톱트에서 3-4 cm 이동할때까지 전기영동을 실시한다.

마) 전기영동이 종료한 아가로스겔을 취화에치지움 용액에 약 30분간 적시고 염색한다.

바) 아가로스겔을 UV트랜스일루미네이터에 넣어, 365 nm의 자외선을 조사하고 시료액으로 검출한 DNA밴드위치를 사이즈마커의 밴드위치와 비교하여 DNA단편사이즈를 구한다. 흑백필름을 사용하여 폴라로이드 사진을 활용한다.

6) 판정방법

가) 양성콘트롤로 검출 사이즈의 밴드가 검출되고, 음성 콘트롤로 밴드가 검출되지 않는 경우에서 또한 시료에 있어 양성콘트롤과 동등한 사이즈의 밴드가 검출되지 않는 경우를 양성으로 한다.

나) 양성콘트롤로 밴드가 검출되지 않는 경우, 및 음성콘트롤로 밴드가 검출되지 않는 경우에는 PCR 반응이 정상적으로 행해지지 않을 가능성이 있기 때문에 재시험이 필요하다.

라. 검사할 때의 주의사항 등

1) 시험조작상 주의사항

PCR법은 검출감도가 높고 극미량의 DNA에서도 검출되기 때문에 분석시험중은 목적외의 DNA의 혼입방지에 세심한 주의를 기울일 필요가 있다.

또한 DNA는 미생물이나 사람의 피부 등에 존재하는 DNA 분해효소에 의해 분해되기 때문에 이 효소의 혼입을 방지하기 위하여 멸균등의 적절한 조작을 할 필요가 있다.

가) 마이크로피펫용 칩은 멸균된 것을 사용하고 조작시마다 매회 새로운 것으로 바꾼다. 필터가 붙은 칩을 사용하는 것도 바람직하다.

나) 분석 조작중은 플라스틱제 장갑을 사용하고 장갑위를 알콜로 소독한다.

다) 샘플링 및 분쇄를 실시하는 경우 PCR조작을 실시하는 장소 및 전기 영동을 실시하는 경우는 분리하는 것이 바람직하다. PCR반응액의 조제는 깨끗한 장소에서 실시한다.

2) 검사 정확도 확보상의 주의사항

가) 한 검사체의 시료에서 DNA의 추출은 2점 병행으로 실시하고, 2점의 추출 DNA에 대해 PCR 반응을 각각 2점 병행으로 실시한다.

나) PCR반응을 실시하는 돼지에는 반드시 양성 콘트롤과 양성콘트롤을 동시에 반응시킨다.

다) 더블체크를 위하여 프라이마는 2종류 이상을 사용하는 것이 바람직하다. 예를들면 소, 양 등의 동물종을 감별하는 경우에는 포유동물 검출 프라이마 및 각종 동물검출 프라이마를 사용해도 좋다.

3) 시험결과와 취급

1 검체당 2점의 추출 DNA중 2점 모두 양성의 결과가 나타난 경우에만 양성으로 판정한다.

15.4. Multiplex PCR, Multiplex real-time PCR :다중중합효소연쇄반응검사법

가. Multiplex PCR에 의한 검사법

사료에 척추동물, 갑각류, 연체동물이 포함되어 있는지의 여부를 온도와 압력에 비교적 안정한 미토콘드리아 DNA에 기초한 멀티플렉스 PCR법을 이용하여 동물성 성분을 동시에 검사할 수 있다.

1) 시료 및 검출대상

가) 대상시료 : 반추동물용 배합사료, 반추동물용 섬유질배합사료 등을 대상으로 한다.

나) 검출대상 동물 종 : 척추동물, 갑각류, 연체동물

다) 검출처리 : 본법에 의한 사료 중의 모든 동물성단백질의 검출감도(원료함량 %로서)는 다음과 같다.

라) 모든 동물성단백질 검출 Primer : 육골분으로서 0.1~0.01% 육골분의 검출감도는 육골분 원료동물의 사용비율, 제조방법(가열처리조건) 및 골성분의 함유비율 등에 의해 다른 경우가 있다. 또한 본 법은 동물성 성분을 검사할 수 있는 것이기 때문에 육골분에 한하지 않고 어분, 혈분 등의 동물유래 DNA를 포함하는 원료에서도 검출된다.

2) 시료의 채취 및 분쇄

가) 시료의 채취원칙적으로 시료는 공장내 보관 시 다른 원료 혹은 환경에서 오염물질이 오염되는 가능성이 없는 제조품에서 채취한다. 수거방법은 미생물 채취법에 준해 대상시료 이외의 물질의 오염이 없도록 신중히 채취한다. 채취시는 플라스틱제 장갑을 끼고 멸균된 스푼을 사용하여 약 500 g을 멸균된 채취봉지에 채취한다.

나) 분쇄시료는 입자가 거친 박류 등 큰 육편 등이 포함되는 경우에는 깨끗한 망(1 mm)으로 통과물을 채취한다. 배합사료에서는 1 mm의 망을 통과할때 까지 분쇄한다. 이 때 시료간의 오염을 방지하기 위하여 시료마다 분쇄반을 세정하거나 교환한다.

다) 시료의 보존시료는 냉장 보관한다. 또한 미분쇄 후의 시료를 장기(1주일 이상)보존하는 경우에는 냉동고(-20℃)에서 보존한다.

3) 시험방법

가) 시약

(1) DNA 추출용 Kit [PowerPrep™, DNA Extraction from Food and Feed Kit]

(2) DNA 추출용 Kit 내용

- (가) Lysis Buffer A
- (나) Lysis Buffer B
- (다) Binding Buffer
- (라) DNA Binding Column 이와 동등의 추출 Kit 내용 사용
- (3) All animal PCR Kit [Powercheck™, All animal PCR Kit]
- (4) All animal PCR Kit 내용
 - (가) All animal Detection PCR Primer mix
 - (나) 5×Reaction Buffer
 - (다) DNA loading dye
 - (라) Taq. DNA Polymerase
 - (마) DNA size marker
 - (바) Control DNA 이와 동등의 모든 동물성단백질 PCR Kit내용 사용
- (5) 전기영동용 완충액(1×TAE완충액)

50×TAE완충액 20 mL를 증류수 980 mL에 희석하여 1000 mL로 한다
- (6) TE 완충액

1 M 트리스염산완충액 1 mL 및 0.5 M EDTA용액 0.2 mL을 물에 녹여 100 mL로 하고 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한다.
- (7) 아가로스 겔아가로스(전기영동용)

2.0 g을 전기영동용 완충액(1×TAE Buffer) 100 mL을 넣고 증발에서 끓인 후 50~60℃에서 냉각 시킨 후 약간 식힌 후 EtBr 3 µL를 넣어 준 후 겔의 두께가 3~4 mm가 되도록 겔형 성형에 넣고, 겔과 고무의 사이에 기포가 들어가지 않도록 신중하게 고무를 넣고 실온에서 방치하여 고체화시킨다.
- (8) DNA 사이즈마커(100-1000bp)
- (9) Ethidium bromide 용액

Ethidium bromide 10 mg을 초순수 500 µL에 녹여 ethidium bromide 원액을 조제하고 사용 시에는 이 원액 25 mL을 전기영동용 완충액 1000 mL에 녹인다.(사용할 때 조제) 또한 ethidium bromide 용액은 광분해성이 있으므로 차광 냉장 보관한다. 또한 ethidium bromide는 독가스가 생기므로 취급 시에는 반드시 장갑을 사용하고 실험이 끝난 후 흡착제가 들어간 필터 등을 사용하여 처리한 다음 폐기한다. ethidium bromide로 염색한 아가로스 겔은 5% 차아염산나트륨 용액에 침적 후 직사일광 하에 방치하여 광분해 시킨 후 폐기한다.(아가로스 겔을 제조할 때 ethidium bromide 용액을 사용하지 않고 직접 ethidium bromide를 넣어 제조하는 경우도 가능하다). Ethidium bromide 용액과 혹은 이와 동등한 것도 사용 가능하다.
- (10) Primer모든 동물성 성분 검출 프라이머 : 200~210bp
- 나) 장치 및 기구
 - (1) PCR장치Gene Amp PCR system 9700 또는 이것과 동등의 장치
 - (2) 크린벤치
 - (3) 비즈파쇄장치

2000 rpm 정도의 회전수에, 2 mL 튜브에 대응하는 것. BC-20(센트랄과학기구), 마치비즈손카, Fast Prop, FP120(nskzhtl), Mixer Mill MM300(Qlagen) 또는 이것과 동등의 장치
 - (4) Autoclave
 - (5) 전기영동장치

Mupid-2plus(코스모바이오) 또는 이것과 동등의 장치
 - (6) Gel Doc XR System(전기영동리더기) 또는 이것과 동등의 장치
 - (7) 고속냉각원심기

1.5 mL 및 2 mL 튜브대응, 4℃냉각, 12000 rpm 원심분리가 가능한 것
 - (8) 마이크로피펫(1000, 200, 100, 20 및 10 µL용 디지털가변형)

(9) 멸균된 1000 μ L, 300 μ L, 100 μ L, 20 μ L, 10 μ L 마이크로피펫형 팁

다) DNA 추출

PowerPrep™ DNA Extraction from Food and Feed Kit를 사용하여 Kit 내 매뉴얼 또는 아래와 같은 추출법으로 사료에서 DNA를 추출한다.

- (1) Sample을 곱게 분쇄한 후 50 mL tube에 0.5~2 g 정량하여 담는다.
- (2) Lysis A buffer 4 mL, Lysis B buffer 400 μ L을 첨가하고, vortex한 후, water bath(65℃)에서 1시간 반응시킨다.(Lysis buffer양은 sample에 따라 증가 또는 감소시킨다.)
- (3) Chloroform을 4 mL 넣고 vortex 후, 3,000 rpm 15분 원심분리 한다.
- (4) 2 mL tube에 (3)번 용액의 1 mL, Chloroform 1 mL을 넣고 vortex 후 12,000 rpm에 10분 원심분리 한다.
- (5) 2 mL tube에 (4)번 용액의 상층액 500 μ L, Binding buffer와 Iso-propanol을 500 μ L씩 넣어준다.(Iso-propanol은 Kit 안에 포함되어 있지 않다.)
- (6) (5)번 용액을 DNA binding column tube에 750 μ L을 넣고, 12,000rpm에서 2분 원심분리 한다.
- (7) DNA binding column tube를 통과한 여과액을 버린 후 동일한 DNA binding column tube에 남은 나머지 (5)번 용액 750 μ L을 넣고 12,000 rpm에서 2분 원심분리 한다.
- (8) 75% Ethanol 600 μ L넣고 12,000 rpm에서 2분 원심분리 한다.(두번 반복하며, Ethanol은 Kit 안에 포함되어 있지 않다.)
- (9) 빈 DNA binding column tube를 12,000 rpm에서 2분 원심분리하여 Ethanol을 완전히 제거한다.
- (10) DNA binding column tube를 1.5 mL tube로 옮긴 후 멸균된 증류수 100 μ L 넣고 1분 동안 상온에 방치한다.(추출된 DNA를 오래 보관할 경우 멸균된 증류수 대신 TE 완충액을 사용한다.)
- (11) 8,000 rpm에서 3분 원심분리 하여 DNA를 얻는다.
- (12) 이 DNA용액은 냉동 보존한다.

라) PCR 반응일반적인 PCR법의 조작에 준한다. PCR 반응은 DNA polymerase, dNTPs, Reaction buffer 및 Primer 등 PCR 수행에 필요한 구성 성분을 다음과 같은 비율로 혼합하여 PCR 반응액으로 사용하고, DNA를 첨가하여 mixing한 후 PCR 장비에서 반응시킨다.

- (1) 200 μ L의 플라스틱제 튜브에 PCR Primer mix 4 μ L, 멸균된 증류수 10 μ L, 5×Reaction Buffer 5 μ L, DNA Polymerase 1 μ L을 혼합한 20 μ L는 PCR 반응액으로 PCR tube에 분주한 후 여기에 추출된 DNA 용액 5 μ L을 가한 것을 시료액으로 한다.
- (2) 같은 방법으로 PCR 반응액 20 μ L에 Control DNA용액 5 μ L 가한 것을 양성 콘트롤액, PCR 반응액 20 μ L에 멸균된 물 5 μ L을 가한 것을 음성 콘트롤액으로 한다.
- (3) 시료액, 양성콘트롤액 및 음성콘트롤액을 PCR에 넣고, 아래와 같은 반응조건에서 PCR반응을 실시한다.

Step	Temp(℃)	Time	Cycle
Pre-Denaturation	94	12min	1
Amplification	94	20sec	32
	58	10sec	
	72	30sec	
Final Extension	72	2min	1

마) 전기영동

- (1) 아가로스겔은 전기영동용 완충액을 넣은 영동조에서 10분간 100V의 정전압을 넣어 예비 영동한다.
- (2) 전원을 끈 후 DNA 사이즈마커 100bp 6 μ L를 아가로스겔의 스롯트에 주입한다.
- (3) PCR 반응이 종료한 시료액, 양성콘트롤 및 음성콘트롤 각각 5 μ L에 DNA loading dye(6x) 1 μ L를 가하여 혼합한 후 그 전량을 아가로스겔의 스롯트에 차례대로 주입한다.
- (4) 100V 정전압을 걸고 부로모페놀프레가 스롯트에서 3~4 cm 이동할 때까지 전기영동을 실시한다.
- (5) 전기영동이 종료한 아가로스겔을 전기영동기에 넣어 UV 365 nm의 자외선을 조사하고 시료액으로 검출한 DNA밴드위치를 사이즈마커의 밴드위치와 비교하여 DNA 단편사이즈를 구한다.

(6) 판정방법

- (가) 양성컨트롤의 검출 사이즈 밴드가 검출되고, 음성 컨트롤의 밴드가 검출되지 않는 경우, 시료에 있어서 양성컨트롤과 동일 사이즈의 밴드가 검출되는 경우를 양성으로 한다.
- (나) 양성컨트롤로 밴드가 검출되지 않는 경우나 음성컨트롤로 밴드가 검출될 경우에는 PCR 반응이 정상적으로 행해지지 않을 가능성이 있기 때문에 재시험이 필요하다.

4) 검사할 때의 주의사항 등

가) 시험조작상 주의사항

PCR법은 검출감도가 높고 극미량의 DNA에서도 검출되기 때문에 분석과정 중 오염에 세심한 주의를 기울일 필요가 있다. 또한 DNA는 미생물이나 사람의 피부 등에 존재하는 DNA 분해효소에 의해 분해되기 때문에 이 효소의 혼입을 방지하기 위하여 멸균 등의 적절한 조작을 할 필요가 있다.

- (1) 마이크로피펫용 팁은 멸균된 것을 사용하고 조작 시마다 매회 새로운 것으로 바꾼다. 필터가 붙은 팁을 사용하는 것도 바람직하다.
- (2) 분석 조작 중은 플라스틱제 장갑을 사용하고 장갑 위를 70% 알콜로 소독한다.
- (3) 샘플링을 하거나 시료 분쇄를 할 경우 PCR실이나 전기영동실과는 분리하는 것이 바람직하다. PCR 반응액의 조제는 그린벤치에서 실시한다.

나) 시험결과의 취급

1검체당 2점의 추출 DNA중 2점 모두 양성의 결과가 나타난 경우에만 양성으로 판정한다.

나. Multiplex Real-time PCR에 의한 검사법

사료에 척추동물, 갑각류, 연체동물이 포함되어 있는지의 여부를 온도와 압력에 비교적 안정한 미토콘드리아 DNA에 기초한 멀티플렉스 Real-time PCR법을 이용하여 동물성 성분을 동시에 검사할 수 있다.

1) 시료 및 검출대상

- 가) 대상시료 : 반추동물용 배합사료, 반추동물용 섬유질배합사료 등을 대상으로 한다.
- 나) 검출대상 동물 중 : 척추동물, 갑각류, 연체동물
- 다) 검출처리 : 본법에 의한 사료중의 모든 동물성단백질의 검출감도(원료함량 %로서)는 다음과 같다.
- 라) 모든 동물성단백질 검출 Primer : 육골분으로서 0.1~0.01% 육골분의 검출감도는 육골분 원료동물의 사용비율, 제조방법(가열처리조건) 및 골성분의 함유비율 등에 의해 다른 경우가 있다. 또한 본 법은 동물성 성분을 검사할 수 있는 것이기 때문에 육골분에 한하지 않고 어분, 혈분 등의 동물유래 DNA를 포함하는 원료에서도 검출된다.

2) 시료의 채취 및 분쇄

가) 시료의 채취

원칙적으로 시료는 공장내 보관 시 다른 원료 혹은 환경에서 오염물질이 오염되는 가능성이 없는 제조품에서 채취한다. 수거방법은 미생물 채취법에 준해 대상시료 이외의 물질의 오염이 없도록 신중히 채취한다. 채취 시는 플라스틱제 장갑을 끼고 멸균된 스푼을 사용하여 약 500 g을 멸균된 채취봉지에 채취한다.

나) 분쇄

시료는 입자가 거친 박류 등 큰 육편 등이 포함되는 경우에는 깨끗한 망(1 mm)으로 통과물을 채취한다. 배합사료에서는 1 mm의 망을 통과할때 까지 분쇄한다. 이 때 시료간의 오염을 방지하기 위하여 시료마다 분쇄반을 세정하거나 교환한다.

다) 시료의 보존

시료는 냉장 보관한다. 또한 미분쇄 후의 시료를 장기(1주일 이상)보존하는 경우에는 냉동고(-20℃)에서 보존한다.

3) 시험방법

가) 시약

물은 특별한 경우를 제외하고 이온교환수 또는 증류수를 사용한다. PCR 반응액의 조제에 사용

하는 물이나 추출 DNA의 희석에 사용하는 물 및 아래에 특별히 기술한 경우에는 고압증기처리 (121℃, 15분간)한 초순수(역삼투압으로 정제한 RO수 또는 증류수를 Milli-Q 등으로 비저항치 17M/cm까지 정제한 것)을 사용한다.

(1) DNA 추출용 Kit [PowerPrep™ DNA Extraction from Food and Feed]

(2) DNA 추출용 Kit 내용

(가) Lysis Buffer A

(나) Lysis Buffer B

(다) Binding Buffer

(라) DNA Binding Column 이와 동등의 추출 Kit 내용 사용

(3) All animal Real-time PCR Kit [Powercheck™ All animal Real-time PCR Kit]

(4) All animal Real-time PCR Kit 내용

(가) All animal Primer/Probe Mix

(나) 2×Real-time Master Mix

(다) Control DNA 이와 동등의 All animal PCR Kit 내용 사용

(5) Primer/Probe

(가) Fluorescence dye : FAM

(6) TE 완충액

1 M 트리스염산완충액 1 mL 및 0.5 M EDTA용액 0.2 mL을 물에 녹여 100 mL로 하고 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한다.

나) 장치 및 기구

(1) Real-time PCR장치

7500 Real Time PCR System(Applied Biosystems) 또는 이것과 동등의 장치

(2) 크린벤치

(3) 비즈파쇄장치2000rpm 정도의 회전수에, 2mL 튜브에 대응하는 것. BC-20(센트랄과학기구), 마 치비즈손카, Fast Prop, FP120(nskzhtl), Mixer Mill MM300(Qlagen) 또는 이것과 동등의 장치

(4) Autoclave

(5) 고속냉각원심기1.5 mL 및 2 mL 튜브대응, 4℃냉각, 12000 rpm의 원심분리 가능한 것

(6) 마이크로피펫(1000, 200, 100, 20 및 10 µL용 디지털가변형)

(7) 멸균된 1000 µL, 300 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL 마이크로피펫형 팁

다) DNA 추출

PowerPrep™ DNA Extraction from Food and Feed Kit를 사용하여 Kit 내 매뉴얼 또는 아래와 같은 추출법으로 사료에서 DNA를 추출한다.

(1) Sample을 곱게 분쇄한 후 50 mL tube에 1~2 g 정량하여 담는다.

(2) Lysis A buffer 4 mL, Lysis B buffer 400 µL을 첨가하고, vortex한 후, water bath(65℃)에서 1시간 반응시킨다. (Lysis buffer양은 sample에 따라 증가 또는 감소시킨다.)

(3) chloroform을 4 mL 넣고 vortex후, 3,000 rpm 15분 원심분리 한다.

(4) 2 mL tube에 (3)번 용액의 1 mL, Chloroform 1 mL을 넣고 vortex후, 12,000rpm에 10 분 원심분리 한다.

(5) 2 mL tube에 (4)번 용액의 상층액 500 µL, Binding buffer와 ISO-propanol을 500 µL씩 넣어준다. (ISO-propanol은 Kit 안에 포함되어 있지 않다)

(6) (5)번 용액을 DNA binding column tube에 750 µL을 넣고, 12,000rpm에서 2분 원심분리 한다.

(7) DNA binding column tube를 통과한 여과액을 버린 후 동일한 DNA binding column tube에 남은 나머지 (5)번 용액 750 µL을 넣고 12,000 rpm에서 2분 원심분리 한다.

(8) 75% Ethanol 600 µL넣고 12,000 rpm에서 2분 원심분리 한다.(두번 반복하며, Ethanol은 kit 안에 포함되어 있지 않다)

(9) 빈 DNA binding column tube를 12,000 rpm에서 2분 원심 분리하여 Ethanol을 완전히 제거한다.

- (10) DNA binding column tube를 1.5 mL tube로 옮긴 후 멸균된 증류수 100 μ L 넣고 1분 동안 상온에 방치한다.(추출된 DNA를 오래 보관할 경우 멸균된 증류수 대신 TE 완충액을 사용한다.)
- (11) 8,000 rpm에서 3분 원심분리 하여 DNA를 얻는다.
- (12) 이 DNA용액은 냉동 보존한다.

라) Real-time PCR 반응

일반적인 Real-time PCR법의 조작에 준한다. PCR 반응은 Control DNA, All animal Primer/Probe Mix 및 2×Real-time Master Mix 등 Real-time PCR 수행에 필요한 구성 성분을 다음과 같은 비율로 혼합하여 Real-time PCR 반응액으로 사용하고, DNA를 첨가하여 mixing한 후 Real-time PCR 장비에서 반응시킨다.

- (1) 200 μ L의 플라스틱제 튜브에 All animal Primer/Probe Mix 4 μ L, 2×Real-time Master Mix 10 μ L을 혼합한 14 μ L는 PCR 반응액으로 PCR tube에 분주한 후 여기에 추출된 DNA용액 6 μ L을 가한 것을 시료액으로 한다.
- (2) 같은 방법으로 PCR 반응액 14 μ L에 Control DNA용액 6 μ L 가한 것을 양성 콘트롤액, PCR 반응액 14 μ L에 멸균된 물 6 μ L을 가한 것을 음성콘트롤액으로 한다.
- (3) 시료액, 양성콘트롤액 및 음성콘트롤액을 Real-time PCR에 넣고, 아래와 같은 반응조건에서 Real-time PCR반응을 실시한다.

Temp(℃)	Time	Cycle
50	2min	1
95	10min	1
95	15sec	35
60	1min	

마) 판정방법

- (1) Real time PCR 결과는 확인하고자 하는 Maker을 선택하여 증폭 곡선을 확인한다. 만약 시료에서 15~33 Ct 사이에 PCR 증폭이 일어날 경우 양성으로 판정하고, Ct값이 너무 낮거나 ($15 > Ct$), 너무 높은 경우($33 < Ct$)에는 재시험이 요구된다.

4) 검사할 때의 주의사항 등

가) 시험조작상 주의사항

PCR법은 검출감도가 높고 극미량의 DNA에서도 검출되기 때문에 분석과정 중 오염에 세심한 주의를 기울일 필요가 있다. 또한 DNA는 미생물이나 사람의 피부 등에 존재하는 DNA 분해효소에 의해 분해되기 때문에 이 효소의 혼입을 방지하기 위하여 멸균 등의 적절한 조작을 할 필요가 있다.

- (1) 마이크로피펫용 팁은 멸균된 것을 사용하고 조작 시마다 매회 새로운 것으로 바꾼다. 필터가 있는 팁을 사용하는 것도 바람직하다.
- (2) 분석 조작 중은 플라스틱제 장갑을 사용하고 장갑 위를 70% 알콜로 소독한다.
- (3) 플링을 하거나 시료 분쇄를 할 경우 PCR실이나 전기영동실과는 분리하는 것이 바람직하다. PCR 반응액의 조제는 크린벤치에서 실시한다.

- 나) 시험결과와의 취급1 검체당 2점의 추출 DNA 중 2점 모두 양성의 결과가 나타난 경우에만 양성으로 판정한다.

16장. 올리고당

16.1. 갈락토올리고당

정의 : 당질원료를 이용하여 효소를 작용시켜 얻은 전이갈락토올리고당액 또는 사탕무, 대두 등에서 추출한 라피노스, 스타치오스의 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분말상의 것을 말한다.

16.1.1. 갈락토올리고당(전이갈락토올리고당)

가. 장치

고속액체크로마토그래프

나. 시약

- 1) 20%(w/v) 설포살리실린산용액(Sulfosalicylic acid) : 시약특급의 설포살리실린산 20 g에 물을 넣어 용해시켜 100 mL로 한다.
- 2) Ribose : 시약특급
- 3) Arabinose : 시약특급

다. 표준용액의 조제

갈락토올리고당 2 g을 정확히 달아 물에 녹여 50 mL로 한다.

라. 시험용액 조제

갈락토올리고당이 약 0.1~1 g 포함되도록 검체 적당량을 정확히 달아 물을 가해 용해시킨 후 50 mL로 한다. 이 용액을 0.45 µm의 필터로 여과시켜 이를 시험용액으로 한다.

- (주1) 단백질 제거 조작이 필요한 시료에 대해서는 설포살리실린산을 여러 방울 첨가하여 생긴 불용성 단백질을 원심분리로 제거하든가 Sep pak C18 cartridge를 통과시키든가 한다. 이들의 제작용을 요하는 경우에는 내부표준으로서 Ribose 또는 Arabinose를 사용한다.
- (주2) 유지를 많이 함유한 시료의 경우 시료의 전처리는 프락토올리고당의 분석법의 전처리 방법에 준한다.
- (주3) 시료중에 갈락토올리고당 이외의 3 ~ 6당류인 올리고당이 존재할 경우에는 해당하는 올리고당 분해효소에 의해 단당류, 2당류로 분해하고 나서 분석한다. 그러나 이성화당, 설탕이나 다당류의 존재는 갈락토올리고당의 분석을 방해하지 않는다.

마. 시험조작

1) 고속액체크로마토그래프 조건

- 가) 칼럼 : Shodex Ionpak KS-802 상당품 및 역상 amino column
- 나) 칼럼온도 : 80℃
- 다) 이동상 : 물
- 라) 유속 : 0.4 mL/min
- 마) 검출기 : 시차굴절계(RI)

2) 정량시험

갈락토올리고당 표준용액을 2, 4, 6, 8 및 10 mL를 20 mL용 메스플라스크에 정확하게 취하여 물로 눈금을 맞춘 다음, 각각 10 µL씩 고속액체크로마토그래프에 주입시켜 피크의 면적 또는 높이를 읽어내어 검량선을 작성한다. 검체중의 갈락토올리고당의 함량(%)은 다음 식으로 구한다.

$$\text{갈락토올리고당}(\%) = B \text{ mg/mL} \times \frac{50 \text{ mL}}{A_g} \times \frac{100}{1000}$$

A : 시료채취량(g)

B : 검량선에서 구한 갈락토올리고당의 농도(mg/mL)

16.1.2. 갈락토올리고당(라피노스, 스타치오스)

가. 시약

- 1) 설포살리실린산(Sulfosalicylic acid)
- 2) 갈락토올리고당(Raffinose, Stachyose) 표준용액

각 갈락토올리고당을 각각 0.6 g씩 정확하게 취하여 물에 넣고 용해시켜 20mL로 한다.

가. 시험용액 조제

- 1) 유지를 거의 함유하지 않은 시료인 경우검체 적당량(각 갈락토올리고당 0.07~0.7 g 함유한 양)을 정확히 달아 물을 가하여 용해 혹은 추출하여 50 mL로 한다. 이 용액을 0.45 μm의 필터로 여과한다.
- 2) 유지를 많이 함유한 시료인 경우검체가 액체인 경우에는 그 적당량(위의 가)와 같음)을 정확히 재고, 필요하다면 중화한다. 여기에 규조토를 넣고 잘 혼합한다. 60±2℃에서 2~4 시간 감압 건조한다. 건조후 전량을 원통여과지에 옮겨 넣고 석유에테르를 사용하여 속시렛 지방 추출기로 8~16시간 탈지한다. 탈지 후 원통여과지안의 전량을 꺼내서 이하 상기 1)과 같이 조작한다. 시료가 분말상태인 경우에는 규조토를 넣지 않고 직접 원통여과지에 넣어 이하 똑같이 조작한다.(주1) 시료에 단백질이 함유된 경우 0.2 g/mL 설포살리실린산 수용액을 수방울 가해 단백질을 제거한다. 또한 텍스트린이 검체중에 혼재하는 경우는 글루코아밀라제(Glucoamylase)로 분해한다.

나. 시험조작

- 1) 고속액체크로마토그래피 조건

가) 칼럼 : Shodex Ionpak KS-802 또는 이와 동등한 것

나) 칼럼온도 : 70℃

다) 이동상 : 물

라) 유속 : 1.0 mL/min

마) 검출기 : 시차굴절계(RI)

- 2) 정량시험갈락토올리고당 표준용액을 1, 2, 3, 4 및 5 mL를 10 mL용 메스플라스크에 정확하게 취하여 물로 눈금을 맞춘 다음, 각각 10 μL씩 고속액체크로마토그래프에 주입시켜 피크의 높이 또는 면적을 읽어내어 검량선을 작성한다. 검체중의 갈락토올리고당의 함량(%)은 다음 식으로 구한다.

$$\text{갈락토올리고당}(\%) = (A+B) \times \frac{50}{C} \times \frac{100}{1000}$$

A : 갈락토올리고당의 농도(mg/mL)

B : 시험용액중의 갈락토올리고당의 농도(mg/mL)

C : 시료 채취량(g)

16.2. 프락토올리고당

정의 : 당질원료를 이용하여 1개 이상의 과당분자가 결합되도록 효소를 작용시켜 얻은 당액이나 당질원료를 효소를 이용하여 얻은 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분말상의 것을 말한다.

가. 장치 : 고속액체크로마토그래프

나. 시약

- 1) 아세토니트릴 : HPLC용
- 2) 글리세롤 : 특급
- 3) 에탄올 : 특급(99.5%)
- 4) 규조토 : 여과조제용(정제품)
- 5) 80% 에탄올 : 99.5% 에탄올과 물을 80 : 20(v/v)으로 혼합한다.
- 6) 5% 글리세롤 : 글리세롤 5 g을 취하여 100 mL 메스플라스크에 넣고 에탄올 50 mL를 넣어 용해시킨 후 물로 표선까지 채워 내부표준물질로 사용한다(글리세롤외에 아라비노스

도 내부표준물질로서 사용할 수 있다).

다. 표준용액의 조제

1-kestoz(GF2), 니스토즈(GF3), 1-F 프락토피라노실니스토즈(GF4)를 0.4 g씩 달아 각각 20 mL의 메스플라스크에 넣고 약 10 mL의 물을 넣어 용해시킨 후 증류수로 표선까지 채운 것을 표준원액으로 한다. 표준원액 1, 2, 3, 4, 및 5 mL를 정확히 취하여 각각 10 mL용 메스플라스크에 옮겨 넣고, 이에 5% 글리세롤 1 mL를 넣은 뒤 물로 표선까지 채운 것을 표준용액으로 한다.

라. 시험용액 조제

프락토올리고당으로서 0.2 ~ 2 g이 함유되도록 적당량의 시료를 정밀하게 달아 100mL의 용량플라스크에 넣고 이에 물 20mL를 가하여 용해 또는 추출한다(산성인 채로 실험을 진행할 경우 가수분해의 우려가 있으므로 필요하면 중화하고, 가열하면서 혼합하든지 초음파처리를 한다).

용해되지 않는 물질이 거의 없을 때에는 내부표준용액 20mL를 넣은 후 증류수로 표선까지 채운다. 필요하면 여과(No.5B 또는 10,000 Da cut off 원심분리필터)하여 사용한다. 얻어진 여과액에 동량의 에탄올을 첨가하여 희석한다. 침전 또는 탁한 것이 생겼을 경우에는 여과하고 여과액을 시험용액으로 한다.

(주1) 용해되지 않는 물질이 많을 때에는 추출액을 여과(No. 5B)하면서 100 mL 메스플라스크에 전가용물을 옮겨 넣고 이하 똑같이 처리한다.

마. 시험조작

1) 고속액체크로마토그래피의 측정 조건

가) 칼럼 : 당분석칼럼 또는 이와 동등 이상인 것

나) 이동상 : 아세토니트릴 : 물(65 : 35)

다) 검출기 : 시차굴절계(RI)

라) 유속 : 1.0 mL/min

(주1) 이동상은 칼럼의 종류나 상태에 따라 조성을 달리 할 수 있다. 아세토니트릴과 물의 비율을 65 : 35에서 70 : 30정도의 차이로 조정한다. 소량의 에틸알코올을 넣어 조정할 수도 있다.

2) 정량시험

표준용액과 시험용액을 각각 10 μL씩 주입하여 앞의 조건에서 시험한다. 표준용액 중 각 프락토올리고당과 내부표준물질의 피크의 면적 또는 높이에 의해 구한 검량선을 사용하여 시험용액 중 각 프락토올리고당의 농도(mg/mL)를 구하고, 다음 식에 의하여 시료 중 프락토올리고당 (GF2+GF3+GF4)의 함량(%)을 구한다.

바. 계산

$$\text{프락토올리고당 함량(\%)} = (A+B+C) \times \frac{100 \times b}{\text{시료채취량(g)}} \times \frac{100}{1,000}$$

A : 시험용액 중 GF2의 농도(mg/mL)

B : 시험용액 중 GF3의 농도(mg/mL)

C : 시험용액 중 GF4의 농도(mg/mL)

b : 희석배수

16.3. 이소말토올리고당

정의 : 당질원료를 포도당분자가 분지결합의 기본구조를 갖도록 효소를 작용시켜 얻은 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분말상의 것을 말한다.

가. 장치

고속액체크로마토그래프

나. 시약

- 1) 50% 알코올
- 2) 활성탄 : 청주용 또는 당액 탈색용
- 3) 이온교환수지 : 강 산성형(H형) 및 강 알칼리형(OH형)
- 4) 퍼라이트(Perlite)
- 5) 아세토니트릴 : HPLC용
- 6) 표준당
 - 가) 단당류—Glucose, Fructose
 - 나) 이당류—Maltose, *Isomaltose, Sucrose, *Kojibiose, *Nigerose
 - 다) 삼당류—Maltotriose, *Pannose, *Isomaltotriose
 - 라) 사당류—Maltotetraose, *Isomaltotetraose
 - 마) 오당류—Maltopentaose, *Isomaltopentaose
 - 바) 육당류—Maltohexaose, *Isomaltohexaose
 - 사) 칠당류—Maltoheptaose, *Isomaltoheptaose

(*는 이소말토올리고당의 분기당성분)

다. 표준용제의 조제

- 1) 배제형 이온교환계 : 각 중합도의 직쇄당을 정확하게 50 mg씩 달아 탈기한 증류수 50 mL에 녹이고, 용해되기 어려울 때는 가온하여 녹이고 냉각 후 증류수 100 mL로 채워 표준용액으로 한다.
- 2) 역상분배계 : 각 분기당의 표준액 100 mg을 증류수 1 mL에 용해한 것을 표준용액으로 한다.

라. 시험용액 조제

- 1) 유지를 거의 함유하지 않은 검체인 경우
 이소말토올리고당이 약 500 mg이 되도록 시료를 적당량(0.5~5 g)을 정확히 달아 여기에 물 또는 50% 알코올(단백질을 함유한 경우)을 30 mL 넣어서 가열하여 용해, 혹은 추출한다. 추출액은 약 0.5 g의 활성탄과 이온교환수지(양이온 및 음이온을 1 : 2로 혼합한 것 약 1.5 g)을 사용하여 정제하고, 전량을 500 mL로 하여 시험용액으로 한다.
 - 2) 유지를 많이 함유한 검체인 경우
 이소말토올리고당 적당량(0.5~5 g)을 정확히 달아 분말인 경우에는 그대로 추출기에 넣고, 시료가 액체인 경우에는 필요하다면(pH 4~10 이외) 중화한 후 퍼라이트를 부석부석하게 될 때까지 넣어서 잘 분산시켜 8~16시간 탈지한다. 탈지 후 원통여과지 안의 전량을 꺼내어 위의 ㉠와 같이 추출 이후의 조작을 한다.
- (주1) 중합도 2~5와 거의 같은 분자량인 설탕, 유당, 프락토올리고당, Coupling sugar 및 갈락토올리고당이 혼재할 경우에는 각각의 측정법으로 따로 분석한다. 그러나 이성화당, 포도당, 물엿 등의 전분당이 혼재할 경우에는 이소말토올리고당의 분석을 방해하지 않는다.

마. 시험조작

- 1) 고속액체크로마토그래피 조건
 - 가) 배제형 이온교환계
 - (1) 칼럼 : ϕ 8 mm $\times$ 200 mm MCI GEL CKO 4S 상당품
 - (2) 가드칼럼 : ϕ 8 mm $\times$ 50 mm MCI GEL CKO 8S 상당품
 - (3) 칼럼온도 : 65°C
 - (4) 이동상 : 물
 - (5) 유속 : 0.4 mL/min
 - (6) 검출기 : 시차굴절계(RI)
 - 나) 역상분배계
 - (1) 칼럼 : ϕ 4.6 mm $\times$ 250 mm TSK GEL NH₂ -60 상당품
 - (2) 칼럼온도 : 35°C
 - (3) 이동상 : 아세토니트릴 : 물(63 : 37)
 - (4) 유속 : 0.8 mL/min

(5) 검출기 : 시차굴절(Refractive Index)계

2) 정량시험

가) 검량선의 작성 : 표준용액을 5, 10, 15, 20, 25 mL씩을 넣고 증류수로 각각 50 mL로 (이 농도는 25, 50, 75, 100, 125 mg/50mL가 된다) 한 다음 10 μ L씩 주입한 후 상당하는 직쇄상의 피크에 따라서 면적 또는 높이를 읽어내어 검량선을 작성한다.

나) 계산

(1) 배제형 이온교환계에서 분석한 피크의 면적 또는 높이에 의해 구해진 각 중합도의 검량선에서 각각의 중합도의 함량이 구해지며 그 결과는 다음과 같다.

(가) 중합도 DP1(단당류) : A

(나) 중합도 DP2(이당류) : B

(다) 중합도 DP3(삼당류) : C

(라) 중합도 DP4(사당류) : D

(마) 중합도 DP5(오당류) : E

(바) 중합도 DP6(오당류) : F

(사) 중합도 DP7(오당류) : G

다) 역상분배계에서 시료를 분석한 Data의 각 당분함유율(%)은 다음과 같다.

(1) DP1 Fructose A_1

(2) DP1 Glucose A_2

(3) DP2 Maltose B_1

(4) DP2 Sucrose B_2

(5) DP2 Isomaltose B_3

(6) DP2 Nigerose B_4

(7) DP2 Gोजibiose B_5

(8) DP3 Maltotriose C_1

(9) DP3 Pannose C_2

(10) DP3 Isomaltotriose C_3

(11) DP3 불명(분기당) C_4

(12) DP4 Maltotetraose D_1

(13) DP4 Isomaltotetraose D_2

(14) DP5 Maltopentaose E_1

(15) DP5 Isomaltopentaose E_2

(16) DP6 이상 F

(17) DP6 Isomaltohexaose F_2

(18) DP 7 Maltoheptaose G_1

(19) DP7 Isomaltoheptaose G_2

(20) DP8 이상 H

(주 : 이소말토올리고당에는 DP4이상의 직쇄당 및 DP8 이상의 성분을 포함하지 않는다)

바. 계산

$$\text{DP1 Fructose} \quad A \text{ mg} \times \frac{A_1}{A_1 + A_2} = a_1 \text{ mg}$$

$$\text{DP1 Glucose} \quad A \text{ mg} \times \frac{A_2}{A_1 + A_2} = a_2 \text{ mg}$$

$$\text{DP2 Maltose} \quad B \text{ mg} \times \frac{B_1}{B_1 + B_2 + B_3 + B_4 + B_5} = b_1 \text{ mg}$$

$$\text{DP2 Sucrose} \quad B \text{ mg} \times \frac{B_2}{B_1 + B_2 + B_3 + B_4 + B_5} = b_2 \text{ mg}$$

$$\begin{aligned}
\text{DP2 Isomaltose} \quad B \text{ mg} \times \frac{B_3}{B_1+B_2+B_3+B_4+B_5} &= b_3 \text{ mg}^* \\
\text{DP2 Negerose} \quad B \text{ mg} \times \frac{B_4}{B_1+B_2+B_3+B_4+B_5} &= b_4 \text{ mg}^* \\
\text{DP2 Kojibiose} \quad B \text{ mg} \times \frac{B_5}{B_1+B_2+B_3+B_4+B_5} &= b_5 \text{ mg}^* \\
\text{DP3 Maltotriose} \quad C \text{ mg} \times \frac{C_1}{C_1+C_2+C_3+C_4} &= c_1 \text{ mg} \\
\text{DP3 Pannose} \quad C \text{ mg} \times \frac{C_2}{C_1+C_2+C_3+C_4} &= c_2 \text{ mg}^* \\
\text{DP3 Isomaltotriose} \quad C \text{ mg} \times \frac{C_3}{C_1+C_2+C_3+C_4} &= c_3 \text{ mg}^* \\
\text{DP3 불명(분기당)} \quad C \text{ mg} \times \frac{C_4}{C_1+C_2+C_3+C_4} &= c_4 \text{ mg}^* \\
\text{DP4 Maltotetraose} \quad D \text{ mg} \times \frac{D_1}{D_1+D_2} &= d_1 \text{ mg} \\
\text{DP4 Isomaltotetraose} \quad D \text{ mg} \times \frac{D_2}{D_1+D_2} &= d_2 \text{ mg}^* \\
\text{DP5 Maltopentaose} \quad E \text{ mg} \times \frac{E_1}{E_1+E_2} &= e_1 \text{ mg} \\
\text{DP5 Isomaltopentaose} \quad E \text{ mg} \times \frac{E_2}{E_1+E_2} &= e_2 \text{ mg}^* \\
\text{DP6 이 상} \quad F \text{ mg} &= f \text{ mg} \\
\text{DP6 Maltohexaose} \quad F \text{ mg} \times \frac{F_1}{F_1+F_2} &= f_1 \text{ mg} \\
\text{DP6 Isomaltohexaose} \quad F \text{ mg} \times \frac{F_2}{F_1+F_2} &= f_2 \text{ mg}^* \\
\text{DP7 Maltoheptaose} \quad G \text{ mg} \times \frac{G_1}{G_1+G_2} &= g_1 \text{ mg} \\
\text{DP7 Isomaltoheptaose} \quad G \text{ mg} \times \frac{G_2}{G_1+G_2} &= g_2 \text{ mg}^* \\
\text{DP8 이상} \quad H \text{ mg} &= h \text{ mg}
\end{aligned}$$

결국 시료채취량을 I mg으로 하고 회석배수를 L로 하면, 위의 ※은 모두 분기당이므로 분기당함량(%) = $(b_3+b_4+b_5+c_2+c_3+c_4+d_2+e_2+f_2+g_2) \times L \div I \times 100$ 으로 한다.

16.4. 키토올리고당

가. 총 글루코사민

시료 0.04 g(글루코사민으로)을 정밀히 취하여 필요한 경우 탈지하고 물에 녹여 액성이 산성인 중화(pH 7.0)시켜 물을 가하여 100 mL로 하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 검액으로 한다. 제21장 추출제 1. 키토산(총글루코사민으로서) 다. 시험조작에 따라 시험한다.

나. 유리 D-글루코사민

1) 표준용액의 조제

D-글루코사민 표준품 0.5 g을 10 0mL용 메스플라스크에 정밀히 달아 물 50 mL를 가하여 녹인 후 아세트니트릴로 100mL까지 채운다.

2) 시험용액의 조제

시료 약 5 g을 메스플라스크에 정밀히 달아 물 25mL를 가하여 녹인 후 아세트니트릴로

50 mL까지 채운다. 이를 0.45 μm 의 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

3) 시험조작

가) 고속액체크로마토그래프의 측정 조건

- (1) 칼럼 : 길이 250 mm, 안지름 4.6 mm의 NH₂-60칼럼 또는 이와 동등한 것
- (2) 이동상 물 : 아세토니트릴(25:75)
- (3) 검출기 : 시차굴절계(RI)
- (4) 칼럼온도 : 40℃
- (5) 유속 : 0.8 mL/min

나) 정량시험시 시험용액 및 표준용액을 각각 10 μL 씩 주입하여 얻은 피크의 넓이 또는 높이를 구하여 검량선을 작성한 후 시험용액의 글루코사민의 농도($\mu\text{g/mL}$)를 구하고, 다음의 식에 의해 시료 중 글루코사민의 함량(g/100g)을 산출한다.

다) 계산

S : 시험용액중의 당질의 농도($\mu\text{g/mL}$)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 회석배수

다. 키토올리고당

키토올리고당 = 총 글루코사민 함량 - 유리 D-글루코사민 함량

16.5. 말토올리고당

가. 장치

고속액체크로마토그래프

나. 시약

- 1) 50% 알코올
- 2) 활성탄 : 청주용 또는 당액 탈색용
- 3) 이온교환수지 : 강 산성형(H형) 및 강 알칼리형(OH형)
- 4) 퍼라이트(Perlite)
- 5) 물 : HPLC용
- 6) 표준당
 - 가) 삼당류(DP3) - Maltotriose
 - 나) 사당류(DP4) - Maltotetraose
 - 다) 오당류(DP5) - Maltopentaose
 - 라) 육당류(DP6) - Maltohexaose
 - 마) 칠당류(DP7) - Maltoheptaose

다. 표준용액의 제조

각 중합도의 직쇄당을 정확하게 50 mg씩 달아 탈기한 증류수 50 mL에 녹이고, 용해되기 어려울 때는 가온하여 녹이고 냉각후 증류수로 100 mL로 채워 표준용액으로 한다.

라. 시험용액 조제

- 1) 유지를 거의 함유하지 않은 검체의 경우

시료 4 g을 정확히 달아 여기에 물 또는 50% 알코올(단백질을 함유한 경우)을 30 mL 넣어서 가열하여 용해, 혹은 추출한다. 추출액은 약 0.5 g의 활성탄과 이온교환수지(양이온 및 음이온을 1:2로 혼합한 것 약 1.5 g)을 사용하여 정제하고, 전량을 100 mL로 하여 시험용액으로 한다.

- 2) 유지를 많이 함유한 검체인 경우

시료 4 g을 정확히 달아 분말인 경우에는 그대로 추출기에 넣고, 시료가 액체인 경우에는 필요하다면(pH 4~10이외) 중화하고 나서 퍼라이트를 부석부석하게 될 때까지 넣어서 잘 분산시켜 8~16시간 탈지한다. 탈지후 원통여과지 안의 전량을 꺼내어 위의 1)과 같이 추출이후의 조작을 한다.

(주 1) 중합도 2~5와 거의 같은 분자량인 설탕, 유당, 프락토올리고당, Coupling sugar 및 갈락토올리고당이 혼재할 경우에는 각각의 측정법으로 따로 분석한다. 그러나 이성화당, 포도당, 물엿 등의 전분당이 혼재할 경우에는 말토올리고당의 분석을 방해하지 않는다.

마. 시험조작

- 1) 고속액체크로마토그래피 조건

- 가) 칼럼 : Aminex HP×42A(Bio Rad) 또는 이에 상응하는 배제형 이온교환계
- 나) 칼럼온도 : 85℃
- 다) 이동상 : 물
- 라) 유속 : 0.6 mL/min
- 마) 검출기 : 시차굴절계(RI)

- 2) 검량선 작성

각 농도의 표준용액을 10 µL 씩 주입하여 분석한 뒤 횡축이 말토올리고당량(mg), 종축에 크로마토그램의 면적을 취하여 검량선을 작성한다.

- 3) 계산

시료의 말토올리고당의 면적을 읽어 검량선으로부터 시료의 말토올리고당 함량을 구한다.

$$\text{말토올리고당 함량(\%)} = \frac{(A+B+C+D+E) \text{ mg}}{\text{시료채취량(mg)}} \times \text{희석배수}$$

DP3	Maltotriose	A mg
DP4	Maltotetraose	B mg

DP5	Maltopentaose	C mg
DP6	Maltohexaose	D mg
DP7	Maltoheptaose	E mg

16.6. 자일로올리고당

가. 장치

고속액체크로마토그래프

나. 시약

- 1) 물 : HPLC용
- 2) 아세토니트릴 : HPLC용
- 3) 퍼라이트(Perlite)
- 4) 표준당
 - 가) 이당류 - xylobiose
 - 나) 삼당류 - xylotriose
 - 다) 사당류 - xylotetraose
 - 라) 오당류 - xylopentaose
 - 마) 육당류 - xylohexaose

다. 표준용액의 제조

각 중합도의 자일로올리고당이 약 50 ~ 100 mg 포함되도록 검체 적당량을 정확히 달아 탈기한 물 50 mL에 녹이고 이 용액을 0.45 μ m의 필터로 여과시켜 이를 표준용액으로 한다.

라. 시험용액의 제조

- 1) 유지를 거의 함유하지 않은 시료의 경우
시료 3 g을 정확히 달아 물을 가해 용해하여 30 mL가 되게 한다. 이 용액을 0.45 μ m의 필터로 여과시켜 이를 시험용액으로 한다.
- 2) 유지를 많이 함유한 시료의 경우
시료 3 g을 정확히 달아 분말인 경우에는 그대로 추출기에 넣고, 시료가 액체인 경우에는 필요하면 중화 후 퍼라이트를 부석부석할 때까지 넣고 분산시켜 8~16 시간동안 탈지한다. 탈지 후 원통여과지 내의 전량을 회수하여 ㉠와 같이 이하 똑같이 조작한다.

마. 시험조작

- 1) 고속액체크로마토그래피 조건
 - 가) 칼럼 : Carbohydrate column 4.6×250 mm 또는 이에 상응하는 칼럼
 - 나) 칼럼온도 : 상온
 - 다) 이동상 : 아세토니트릴 : 물 (75 : 25) (칼럼의 종류나 상태에 따라 조성을 달리 할 수 있다)
 - 라) 유속 : 1.2 mL/min
 - 마) 검출기 : 시차굴절계 (RI detector)

2) 정량시험

각 농도의 표준용액을 10 μ L씩 주입하여 분석한 후 검량선의 횡축은 자일로올리고당(mg), 종축은 크로마토그램 피크의 면적을 읽어 검량선을 작성한다. 시료중의 자일로올리고당의 함량(%)은 다음 식으로 구한다.

$$\text{자일로올리고당 함량(\%)} = \frac{(A+B+C+D+E) \text{ mg}}{\text{시료채취량(mg)}} \times \text{회석배수} \times 100$$

xylobiose	A mg
xylotriose	B mg
xylotetraose	C mg
xylopentaose	D mg
xylohexaose	E mg

16.7. 겐티오올리고당

가. 장치

고속액체크로마토그래프

나. 시약

- 1) 물 : HPLC용
- 2) Sodium Hydroxide
- 3) Sodium acetate
- 4) 펄라이트(Perlite)
- 5) 표준당

가) 이당류 Gentiobiose, Cellobiose

다. 표준용액의 조제

Gentiobiose와 Cellobiose가 약 50 ~ 100 mg 포함되도록 검체 적당량을 정확히 달아 탈기한 물 1 L에 녹이고 이용액을 0.45 μ m의 필터로 여과시켜 이를 표준용액으로 한다.

라. 시험용액의 조제

- 1) 유지를 거의 함유하지 않은 검체인 경우

시료 100 mg을 정확히 달아 물을 가해 용해하여 1 L가 되게 한다. 이 용액을 0.45 μ m의 필터로 여과시켜 이를 시험용액으로 한다.

- 2) 유지를 많이 함유한 검체인 경우

시료 100 mg을 정확히 달아 분말인 경우에는 그대로 추출기에 넣고 시료가 액체인 경우에는 필요하다면 중화 후 펄라이트를 부식부식할 때까지 넣고 8~16시간 동안 탈지한다. 탈지 후 원통여과지 내의 잔량을 회수하여 1)과 같이 이하 똑같이 조작한다.

마. 시험조작

- 1) 고속액체크로마토그래피 조건(1)

가) 칼럼 : PA-1 Column 4.6 $\times$ 250 mm 또는 이에 상응하는 칼럼

나) 칼럼온도 : 상온

다) 이동상 :

(1) A : 150 mM Sodium Hydroxide

(2) B : 150 mM Sodium Hydroxide + 600 mM Sodium Acetate

라) 유속 : 1.0 mL/min

마) 검출기 : Pulsed Amperometric Detector

- 2) 고속액체크로마토그래피 조건(2)

가) 칼럼 : Aminex HPX-42A Column 7.8 $\times$ 300 mm 또는 이에 상응하는 배제형 이온교환계

나) 칼럼온도 : 85 $^{\circ}$ C

다) 이동상 : 물

라) 유속 : 0.6 mL/min

마) 검출기 : 시차굴절계(RI)

- 3) 정량시험

가) 검량선 작성

각 농도의 표준용액을 10 μ L씩 주입하여 분석한 후 검량선의 횡축은 겐티오올리고당 (mg), 종축은 크로마토그램 피크의 면적을 읽어 검량선을 작성한다.

나) 계산

배제형 이온교환계에서 분석한 피크의 면적 또는 높이에 의해 구해진 각 중합도의 검량선에서 각각의 중합도의 함유량이 구해지며 그 결과는 다음과 같다.

중합도 DP1(단당류) : A

중합도 DP2(이당류) : B

중합도 DP3 이상(3당류 이상) : C

PA-1 칼럼에서 시료를 분석한 Data의 각 당분함유율(%) 은 다음과 같다.

DP1 Fructose	A ₁	
DP1 Glucose	A ₂	
DP2 Maltose	B ₁	
DP2 Gentiobiose		B ₂
DP2 Cellobiose	B ₃	
DP3 이상	C	

<계산>

$$\text{DP1 Fructose} \quad A \text{ mg} \times \frac{A_1}{A_1 + A_2} = a_1 \text{ mg}$$

$$\text{DP1 Glucose} \quad A \text{ mg} \times \frac{A_2}{A_1 + A_2} = a_2 \text{ mg}$$

$$\text{DP2 Maltose} \quad B \text{ mg} \times \frac{B_1}{B_1 + B_2 + B_3} = b_1 \text{ mg}$$

$$\text{DP2 Gentiobiose} \quad B \text{ mg} \times \frac{B_2}{B_1 + B_2 + B_3} = b_2 \text{ mg}$$

$$\text{DP2 Cellobiose} \quad B \text{ mg} \times \frac{B_3}{B_1 + B_2 + B_3} = b_3 \text{ mg}$$

$$\text{겐티오올리고당의 함량(\%)} = (b_2 + b_3) \text{ mg} \div \text{시료채취량 mg} \times \text{희석배수} \times 100$$

17장. 유화제

17.1. 프로피렌글리콜(Propylene glycol)

가. 적정법

본 품 약 1 g을 정밀히 칭량하여, 물을 넣어 정확히 250 mL로 하고 그 중 10 mL를 취하여 공전 플라스크에 넣는다. 여기에 과요오드산나트륨 시액 10 mL를 정확히 넣고 이어 황산(1→2) 4 mL를 넣고 잘 흔들어 섞어 40분간 방치한다. 여기에 요오드화칼륨 5g을 넣고 즉시 밀봉하여 잘 흔들어 섞은 후, 어두운 곳에 5분간 방치하여 0.1N 티오황산나트륨액으로 적정한다.(지시약 전분시약 1 mL) 별도로 같은 방법으로 공시험한다.

$$0.1N \text{ 티오황산나트륨액 } 1 \text{ mL} = 3.805 \text{ mg } C_3H_8O_2$$

18장. 완충제

18.1. 탄산나트륨(소다회)

가. 분석방법(기기 분석법)

본 품목을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 나트륨(Na) 함량을 분석하고 탄산나트륨(Na_2CO_3)의 함량으로서 계산한다.

나. 적정법

이 품목을 건조한 다음 약 0.6 g을 정밀히 달아 물 50 mL에 녹여 0.5 N 염산으로 적정하여 액의 청색이 노란색으로 변할때까지 적정한다.(지시약: 브로모페놀블루시액 3방울). 다만, 종말점 부근에서 끓여 이산화탄소를 날려 보낸 다음 식혀 적정을 계속한다. 같은 방법으로 공시험을 실시하여 보정한다.

$$0.5\text{N 염산 } 1 \text{ mL} = 26.497 \text{ mg Na}_2\text{CO}_3$$

※ 브로모페놀블루시액: 브로모페놀블루 0.1 g을 에탄올 20 mL에 용해하고 증류수로 100 mL로 채운다.

18.2. 탄산수소나트륨(중조)

가. 중화적정법

본 품을 데시케이터(실리카겔)에서 4시간 건조 후 그 중 약 2.0 g을 정밀히 칭량하여 물 25 mL를 가하여 녹이고, 1N 황산으로 적정하여 액의 청색이 황녹색으로 변할 때 주의하여 끓이고 냉각 후 녹황색을 띠는 때까지 적정한다.(지시약 브롬크레졸그린 시액 2방울) 같은 방법으로 공시험을 실시하여 보정한다.

$$1\text{N 황산 } 1 \text{ mL} = 84.01 \text{ mg NaHCO}_3$$

나. 기기 분석법

본 품목을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 나트륨(Na) 함량을 분석하고 탄산수소나트륨(NaHCO_3)의 함량으로서 계산한다.

18.3. 산화마그네슘

가. 분석방법(기기 분석법)

본 품목을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 마그네슘(Mg) 함량을 분석하고 산화마그네슘(MgO)의 함량으로서 계산한다.

나. 적정법

본 품목을 취하여 4.4. 마그네슘(Mg) 가. EDTA 적정법(Volumetric법)에 따라 마그네슘(Mg) 함량을 분석하고 산화마그네슘(MgO)의 함량으로서 계산한다.

19장. 착색제

19.1. 천연착색제(카로틴, 크산토필 및 카로티노이드)

가. 장치 및 시약

1) 장치

가) 코크달린 유리관 컬럼 : 직경 12.5 mm × 높이 300 mm (with stopper)

나) Reflux Condenser(숙실렛 검화장치)

다) UV/Vis Spectrophotometer ; 카로틴 $\lambda=436\text{nm}$, 크산토필 $\lambda=474\text{nm}$

2) 시약

가) 추출용액 : Hexane + Acetone + Abs.EtOH + Toluene = 10 + 7 + 6 + 7

나) 40% Methanolic KOH

다) 10% Na_2SO_4 용액

라) Florisil (60-100 mesh)

마) 카로틴 용출액(carotene eluent) : Hexane + Acetone = 96 + 4

바) 크산토필 용출액 : Hexane + Acetone + MeOH = 8 + 1 + 1

나. 시료의 전처리 방법

1) 추출

시료를 색소 함량에 따라 0.5 ~ 4 g 칭량하여 100 mL 농축 플라스크에 취한다. 색소추출 용매 30 mL 정확히 가해 1분간 흔든 뒤, 40% methanolic KOH용액 2 mL 첨가한다. (배합 사료는 4 mL) 수분이 낮은 시료는 증류수를 1 mL/2 g 가한다. 56°C의 검화장치에서 30분간 검화 후 냉각시킨 다음, 어두운 곳에서 1시간 방치한다. Hexane 30 mL를 정확히 가하여 1분간 흔들어주고, 10% Na_2SO_4 용액 50 mL를 가하고 1분간 세게 흔들어 준다. 칼럼크로마토그래피를 하기 전까지 냉암소에 방치한다.(상층부는 50 mL이다)

2) 칼럼크로마토그래피 준비

유리관 컬럼에 탈지면을 깔고 Florisil 5 g을 충전하고 상부에 무수 Na_2SO_4 를 2cm정도가 되도록 넣고 콜크를 유리막대에 꽂아 눌러준다.

3) Carotene 과 Xanthophyll의 분리 · 정량

조제된 시료의 상등액 중 5 mL를 취해(낮은 농도인 경우 10 mL) 관컬럼을 넣고 초당 2~3방울 떨어지게 조절한다. Eluent가 마지막으로 adsorbent의 상부에 닿기 전에 먼저 카로틴 용출액(carotene eluent)를 가해주되 carotene band가 25 mL 플라스크에 모아질 때까지 계속한다. 추출 후 carotene eluent로 정용한다 크산토필 용출액(xanthophyll eluent)를 10 mL씩 2회 가하고 25 mL 플라스크에 용출액을 모으고 xanthophyll eluent로 정용한다.

주1) adsorbent는 항상 용매(eluent용액)로 채워져 있어야 한다.

주2) carotene성분이 추출된 후 xanthophyll은 column에 남아 있다.

다. 흡광도 측정

각각의 용출액(eluent)를 공시험 용액으로 하여 카로틴 추출액은 436nm에서 크산토필 추출액은 474 nm에서 흡광도를 측정한다.

주1) 흡광도값은 0.25 ~ 0.75 사이에 들도록 한다.

주2) 크산토필 추출액은 캡산틴의 LC 정량에 사용할 수 있다.

라. 계산방법

다음의 방정식을 사용하여 측정된 수치를 가지고 농도를 계산한다.

: trans- β -carotene과 trans-lutein의 경우에는 a가 각각 196과 236이다.

1) 카로틴 (mg/kg) = [흡광도(at 436 nm) × 454 × f] / (a)196 × d × 0.4536)

2) 크산토필 (mg/kg) = [흡광도(at 474 nm) × 454 × f] / (a)236 × d × 0.4536)

3) (총)카로티노이드의 함량은 1) + 2)

여기서

f : 기계의 deviation factor

a) 카로틴 : 0.460 / A436

b) 크산토펜 : 0.561 / A474

d : 회석비율 : 시료채취량(g) × column에 주입한량(mL) / (50 mL 상등액 × 최종회석액(mL))

19.2. 아스타키산틴(Astaxanthin)

19.2.1. 비색법-제1법

가. 분석원리

아스타키산틴을 클로르포름으로 추출한 후 흡광도를 측정하는 방법이다.

나. 장치

분광광도계를 사용한다.

다. 시약 및 시액 : 클로르포름

라. 시험용액의 조제 및 시험조작

본 품 약 0.035 g을 정밀하게 칭량하여 클로르포름을 가하고 녹여 정확히 200 mL로 한다. 이 액 5 mL를 정확하게 취하여 클로르포름을 가하여 정확히 50 mL로 한다. 여기에 이 액 5 mL를 정확히 취하여 클로르포름을 가하여 정확히 50 mL로 하여 시험용액으로 한다. 이 액으로 클로르포름을 대조로 하여 파장 489 nm 부근의 최대파장에서의 흡광도 A를 측정한다.

$$\text{아스타키산틴(C}_{40}\text{H}_{52}\text{O}_4\text{)의 양(mg) = } \frac{A}{1,975} \times 200,000$$

A : 시험용액의 흡광도

19.2.2. 액체크로마토그래프에 의한 정성 및 정량법-제2법

가. 분석원리

아스타키산틴에 증류수를 가하고 진탕항온수조에서 추출한 후 액체크로마토그래프로 정성 및 정량 분석한다.

나. 장치

액체크로마토그래프-자외부검출기(UV photometric detector)를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 무수알콜
- 2) 클로로포름
- 3) 메탄올

라. 시험용액의 조제

시료를 일정량을 평량하여 50 mL 메스플라스크에 넣고 증류수 10 mL를 가해 60℃ 수욕조에서 1시간 방치하여 완전히 용해시킨다. 방냉 후 클로로포름 4 mL를 가하고 무수알콜로 회석하여 혼합한다. 이 용액을 실린지필터(0.45 μm)로 여과 후 시험용액으로 사용한다. Astaxanthin 표준물질을 적정량 취하여 시험용액과 동일하게 처리한다.

마. 시험조작

- 1) 칼럼 : C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것
- 2) 이동상 : Methanol 100%
- 3) 검출기 파장 : UV 470 nm (trans & Cis isomer ; 2 peak)
- 4) 유속 : 0.8 mL/분
- 5) 머무름 시간 : 5.60분

바. 계산방법

$$\text{아스타키산틴 함량(\%)} = P \times a \times \frac{A_s}{A_t} \times \frac{100}{S}$$

P : 표준품(아스타키산틴)의 농도(mg/mL)

a : 추출용매의 양(mL)

A_t : 표준용액의 피크 면적

A_s : 시험용액의 피크 면적

S : 시료량(mg)

19.3. 칸타산틴(Canthaxanthin)

가. HPLC법

1) 시험방법

본 품 약 1.0g을 증류수 80 mL, 암모니아수(20~30%) 1 mL, 트립신/펩신(1 : 1) 100mg을 가하여 50℃ 초음파 수욕상에서 30분간 방치 한 후, 상온으로 냉각하고 증류수를 가하여 100 mL 되도록 한다. 혼합액 10g에 에탄올 100 mL를 가하여 혼든 뒤 에틸에테르로 250 mL가 되게 한다. n-헥산에 담겨있는 비활성 산화알루미늄을 채운 컬럼에 추출액 25 mL를 넣고 n-헥산 : 에테르(1 : 1) 50~100 mL로 흘려 용리액을 수집하여 용매를 날린 뒤, 건조된 잔류물을 n-헥산 : 아세톤(95 : 5) 5 mL로 용해하여 시료액으로 하고 아래의 조건에서 분석한다. 칸타산틴 함량은 그것과 이성체 피크들의 합으로 계산한다.

2) 고속액체크로마토그래피 분석조건 (예)

가) 컬럼 : 실리카겔 충전 컬럼

나) 이동상 : n-헥산 : 아세톤 (93 : 7)

다) 유속 : 1.5 mL/min

라) 시료주입량 : 10~50 µL

마) 검출기 : 가시광선자외선 검출기, 466 nm

19.4. 아포카로텐산 에스테르(Apocarotenoic Ester)

가. HPLC법

1) 시험방법

본 품 약 1.0g을 증류수 80 mL, 암모니아수(20~30%) 1 mL, 트립신/펩신(1 : 1) 100mg을 가하여 50℃ 초음파 수욕상에서 30분간 방치 한 후, 상온으로 냉각하고 증류수를 가하여 100 mL 되도록 한다. 혼합액 10g에 에탄올 100 mL를 가하여 혼든 뒤 에틸에테르로 250 mL가 되게 한다. n-헥산에 담겨있는 비활성 산화알루미늄을 채운 컬럼에 추출액 25 mL를 넣고 n-헥산 : 에테르(1 : 1) 50~100 mL로 흘려 용리액을 수집하여 용매를 날린 뒤, 건조된 잔류물을 n-헥산 : 아세톤(95 : 5) 5 mL로 용해하여 시료액으로 하고 아래의 조건에서 분석한다. 아포카로텐산 에스테르의 함량은 그것과 이성체 피크들의 합으로 계산한다.

2) 고속액체크로마토그래피 분석조건 (예)

가) 컬럼 : 실리카겔 충전 컬럼

나) 이동상 : n-헥산 : 아세톤 (93 : 7)

다) 유속 : 1.5 mL/min

라) 시료주입량 : 10~50 µL

마) 검출기 : 가시광선자외선 검출기, 466 nm

20장. 추출제

20.1. 키토산(총글루코사민으로서)

가. 시액 조제

- 1) 아세틸아세톤용액 : 증류 정제한 무색 아세틸아세톤(BP 138~140℃) 1.5 mL에 1.2 N 탄산나트륨용액을 가하여 50mL로 한다.
- 2) p-디메틸아미노벤즈알데히드(p-Dimethylaminobenzaldehyde)시액 : p-디메틸아미노벤즈알데히드 1.6 g에 염산 30 mL를 가하여 녹이고 96%(v/v) 에탄올 30 mL를 가하여 혼합한다.

나. 시험용액의 조제

시료 0.04 g(글루코사민으로)을 정밀히 취하여 필요한 경우 탈지하고 물에 녹여 액성이 산성인 경우 중화(pH7.0)시켜 물을 가하여 100 mL로 하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 검액으로 한다.

다. 시험조작

- 1) 검액 10 mL를 취하여 염산 7 mL 및 물을 가하여 20 mL로 하고, 이 액 5 mL를 시험관에 취하고 탈기 밀봉하여 105℃에서 24시간 분해한 후 뚜껑을 열어 감압하에 염산 및 물을 제거한 다음 잔류물을 물 5 mL로 녹이고 불용물이 있으면 여과한다. 이 여액 1 mL를 마개 있는 시험관에 취하고 아세틸 아세톤시액 2 mL를 가하여 혼합한 후 96℃에서 1시간 가열한 후 흐르는 물에서 냉각시키고 이에 96%(v/v) 에탄올 20 mL를 가하고 p-디메틸아미노벤즈알데히드시액 2 mL를 가하여 혼합하고 실온에서 2시간 방치 후 파장 530 nm에서 흡광도를 측정한다.
- 2) 따로, D-글루코사민 또는 N-아세틸 D-글루코사민을 100~500 µg(D-글루코사민으로)/mL 함유한 용액 10 mL를 취하여 앞의 (1)이하에 따라 동일하게 조작하여 다음과 같이 총글루코사민의 함량을 구한다.

라. 계산

$$\text{총글루코사민(\%)} = P \times \frac{S_a}{S_t} \times \frac{10}{S} \times \frac{100}{10^6}$$

P : 표준용액의 농도(글루코사민으로, µg/10 mL)

Sa : 검액의 흡광도

St : 표준용액의 흡광도

S : 검체의 채취량(g)

20.2. 세포벽추출물(글루칸 혹은 베타글루칸)

가. 시약 및 시액조제

- 1) 에탄올용액
- 2) 내열성 α-아밀라아제용액 : Sigma사 Cat. No. A3306 또는 Termamyl 300L, Novo Cat, No. 361-6282 또는 이와 동등한 것
- 3) 셀룰라아제 : Sigma사 Cat. No. C8546 또는 이와 동등한 것
- 4) 프로테아제 : Sigma사 Cat. No. P3910 또는 이와 동등한 것(냉장 (0~5℃)보존) MES/TRIS 완충액으로 50mg/mL되게 조제한다. 사용 시 조제한다.
- 5) 아밀로글루코시다제 용액 : Sigma사 Cat. No. AMG A9913 또는 이와 동등한 것(냉장 (0~5℃)보존)
- 6) 0.1N 수산화나트륨용액
- 7) 0.1N 염산용액
- 8) 5% 페놀용액 : 페놀 5g을 취하여 물을 가하여 100mL로 한다.

나. 시료의 전처리 및 시험용액의 조제

- 1) 시험은 두개의 시료 및 공시험을 동시에 실시한다.
- 2) 시료(지방이 10%이상인 경우 탈지하고, 당을 많이 함유한 경우 85% 에탄올용액으로 시료 1 g당 10 mL씩으로 세척한다) 약 2~10 g을 정밀히 달아 삼각플라스크에 취하고 물 100 mL을 가한다. 여기에 아밀라아제(20unit) 약 40~200 mg을 취하여 넣고 0.1 N NaOH로 pH 6.9로 한 후 20℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시킨다. 이에 0.1 N HCl로 pH 5.0으로 하고 셀룰라아제(50unit)를 넣고 37℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시키고, 프로테아제(10unit) 약 15~80 mg을 넣고 0.1 N NaOH로 pH 7.5로 한 후 37℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시킨다. 이에 아밀로글루코시다제(70unit) 약 20~100mg을 넣고 0.1N HCl로 pH 4.8로 한 후 60℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시킨다. 효소분해물에 95% 에탄올 400mL을 가하여 4℃에서 12시간 동안 침전시킨 후, 원심분리(10,000rpm, 10분)하여 시료의 침전물을 취하고, 다시 80% 에탄올 500mL을 침전물에 가하여 4℃에서 1시간 동안 침전시킨 후, 원심분리(10,000rpm, 10분)를 한다. 원심분리된 침전물에 물 20mL를 가한 후 침전물을 호모게나이저를 이용하여 균질화하고 물로 100mL가 되도록 한다. 이를 적정농도가 되도록 희석한 것을 시험용액으로 한다.

다. 표준용액의 조제

글루코오스표준품을 증류수에 녹여 표준원액을 만들고(1mg/mL) 표준원액을 증류수로 희석하여 글루코오스 표준용액 0, 25, 50, 75, 100(μg/mL)농도별 표준용액을 만든다.

라. 시험조작

각각의 25mL 시험관에 5% 페놀용액 1mL를 넣고 농도별 표준용액은 각각 1mL를 가하고, 시험용액은 0.1mL와 증류수 0.9mL을 가한 후 10초간 잘 흔들어 섞어 황산 5mL씩을 가하여 혼합하고 20분 동안 실온 반응시켜 470nm에서 측정한다.

마. 계산

$$\text{베타클루칸 함량(mg/g)} = P \times \frac{a}{S} \times \frac{10}{1000} \times 0.9$$

P : 시험용액중의 글루코오스 농도(μg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

S : 시료 채취량(g)

0.9 : 베타글루칸 전환계수(162/180)

20.3. 포도종자추출물(프로안토시아닌)

가. 분석원리

이 품목은 포도과 포도(*Vitis labrusca* LINNE, *Vitis vinifera* LINNE)의 종자로부터 얻어지는 것으로서 주성분은 프로안토시아닌이며 함량은 표시량의 90~130%이어야 한다.

나. 장치

분광광도계를 사용한다.

다. 시약 및 시액

- 1) 메탄올
- 2) 바닐린-메탄올용액
- 3) 염산
- 4) 0.1% 오르토인산용액
- 5) 물 : 3차증류수 또는 이와 동등한 것

라. 시험용액의 조제

이 품목을 프로안토시아닌으로서 농도가 10~50 mg 되도록 정밀히 달아 메탄올을 가하여 갈색 부피플라스크 100 mL에 표선을 맞춘 뒤 초음파 추출로 30분간 추출한 것을 시험용액으로

한다. 시험용액 0.5 mL를 갈색시험관에 취하고 바닐린-메탄올용액(4→100) 3.0 mL를 가해준 다음 뚜껑을 덮고 10초간 교반한 후 염산 1.5 mL를 정확하게 가해주고 즉시 뚜껑을 덮고 18~22℃에서 15분간 방치한 다음 물을 대조액으로 하여 500 nm에서 흡광도를 측정하고 검량선으로 부터 시험용액의 (+)카테킨 상당량을 구한 다음 이를 프로안토시아니딘으로 한다. 따로, 시료 중에 존재하는 안토시아니딘을 보정하기 위한 보정시험으로 바닐린-메탄올용액 3 mL 대신에 메탄올 3 mL를 사용하여 이하 시험용액의 시험조작과 동일하게 조작하여 물을 대조액으로 하여 500 nm에서 흡광도를 측정한다.

따로, 시료 중에 존재하는 안토시아니딘을 보정하기 위한 보정시험으로 바닐린-메탄올용액 3 mL 대신에 메탄올 3 mL를 사용하여 이하 시험용액의 시험조작과 동일하게 조작하여 물을 대조액으로 하여 500 nm에서 흡광도를 측정한 값을 시험용액의 흡광도에서 빼준다. 이 때 얻은 흡광도에서 검량선으로부터 시험용액의 (+)카테킨 상당량을 구한 다음 이를 프로안토시아니딘으로 한다.

마. 시험조작

(+)카테킨표준품 100 mg을 정밀히 달아 메탄올을 가하여 갈색 부피플라스크 100 mL에 표전을 맞춘다. 이 액 1, 2, 3, 5 mL를 각각 취한 다음 이에 메탄올을 가하여 10 mL씩으로 한 것을 각 표준용액으로 한다. 각 표준용액 0.5 mL를 갈색시험관에 각각 취하고 바닐린:메탄올용액(4→100) 3 mL를 가해준 다음 뚜껑을 덮고 10초간 교반한 후 염산 1.5 mL를 정확하게 가해주고 즉시 뚜껑을 덮고 18~22℃에서 15분간 방치한 다음 물을 대조액으로 하여 500 nm에서 각각의 흡광도를 측정하여 표준용액의 농도(mg/mL)에 대한 흡광도로 검량선을 작성한다. 따로, 공시험은 카테킨표준용액 대신에 물 0.5 mL를 갈색시험관에 취하고 이하 표준용액의 시험방법과 동일하게 조작한다.

바. 계산방법

$$\text{프로안토시아니딘 함량(\%)} = A \times D \times \frac{100}{S}$$

A : 검량선에서 얻어진 시험용액의 (+)카테킨의 상당량(mg)

D : 희석배수

S : 시료량(mg)

20.4. 천연비타민

가. 시약

- 1) Water : LC grade
- 2) 질산칼슘[Ca(NO₃)₂ · 4H₂O]
- 3) Betaine (mw 117.15, Sigma B2629, 99%, 냉장보관)

나. 분석방법

예상함량에 따라 시료와 표준물질을 적당량 칭량하여 50ml Vol. flask에 취하고 40ml 정도의 물을 가한다. 때때로 흔들어 주면서 30분정도 sonication하고 물로 정용한 다음 고루 흔들어준다. 이 용액을 0.45 µm 실린지필터로 여과시켜 그 여액을 시험용액으로 사용한다.

다. HPLC 분석조건

- 1) 칼럼 : Sugar-pak (6.5 × 300mm)
- 2) 이동상 : 0.004 M Ca(NO₃)₂ · 4H₂O (사용시 제조)
- 3) 검출기 : RID (reflective index detector)
- 4) 칼럼오븐 : 80℃
- 5) 유속 : 1.0 mL/min

라. 계산

$$\text{비타민 함량(\%)} = P \times \frac{A_s}{A_t} \times \frac{50 \text{ mL}}{S} \times 100$$

P : 표준용액의 농도(mg/mL)

A_t : 표준용액의 피크 면적

A_s : 시험용액의 피크 면적

S : 시료량(mg)

21장. 기타성분

21.1. 염기성치환용량(Cation Exchange Capacity)

가. 시약

- 1) 1 N-초산 암모늄 용액 : 암모니아수 68 mL와 초산(Acetic acid) 57 mL를 혼합하고 증류수로 1,000 mL가 되게 만든다. (pH 7로 조정)
- 2) 80% 에탄올(Ethanol)
- 3) 4% 붕산용액(Boric acid) : 조단백질 정량과 동일
- 4) 산화마그네슘(Magnesium Oxide)
- 5) 0.1 N-염산용액

나. 방법

먼저 칼럼(Column)하부를 탈지면으로 막고 No. 5A 여과지(작게 자른 것)를 1 cm 정도 깔고 1 N-초산암모늄 용액을 가하여 기포를 제거한 다음 시료 2 g을 넣고 1 N-초산암모늄 용액 150 mL가 6~12시간에 유출되도록 마개를 조정한다.

이 액의 유출이 끝나면 80% 에탄올 150 mL를 가하고 위와 같은 방법으로 유출시키면서 초산암모늄을 제거하고 시료와 여과지를 증류 플라스크에 씻어 넣은 다음 산화마그네슘 5 g과 증류수 300 mL를 가하고 수기(受器)에 4% 붕산용액 50 mL를 넣고 조단백질 때와 같은 방법으로 증류한 다음 0.1 N-염산용액으로 적정한다. 동시에 공시험도 행한다.

다. 계산

$$\text{염기성치환용량(meq/100 g)} = (T-B)/S \times N \times F \times 100$$

T : 시료 0.1 N - 염산 적정치(mL)

B : 공시험에 대한 0.1 N - 염산 적정치(mL)

N : 염산의 규정농도

F : 0.1 N - 염산의 factor

S : 시료무게(g)

21.2. 요소

가. 증류법

- 1) 시약의 조제 : 조단백질과 동일
- 2) 시료액의 조제

시료(배합사료) 20g을 250 mL 메스플라스크에 취하고 0.1N-염산용액 200 mL를 가하여 30분간 진탕한 다음 0.1N-염산용액으로 표준선을 맞추고 건조 여과지로 여과한다.

3) 방법

시료액 25 mL를 증류플라스크에 취하여 메틸레드 지시약 2~3방울을 가한 다음 0.5% 가성소다 용액으로 중화(pH 5.6~5.8)시키고 우레아제(Urease) 0.1g을 가하여 마개를 막은 다음 40~50℃ 항온수조에서 1시간 작용시키고 냉각한 다음 산화마그네슘 3g과 액체 파라핀 2 mL를 가하고 조단백질 정량법과 같이 증류 및 적정한다. 별도로 공시험을 행한다.

4) 계산

조단백질 분석법에 준하여 질소(N) 함량을 구하고 계수로써 2.14를 곱하여 요소의 양을 산출한다.

$$\text{요소(\%)} = [(0.1\text{N염산적정량} - \text{공시험적정량}) \times F \times 0.140067 \times 2.14 \times 10] / \text{시료무게(g)}$$

F : 0.1 N - 염산의 factor

10 : 회석배수

나. 비색법

- 1) 시약의 조제

가) 파라디메틸아미노벤즈알데히드(P-Dimethylaminobenzaldehyde)용액 : DMAB 16.0g을 에

탄을 1,000 mL에 용해한 다음 염산 100 mL를 가한다. 약 1개월 동안 안정하며 새로운 용액을 이용할 때는 새로운 표준곡선을 작성한다.

나) 초산아연 용액 : 초산아연 22.0g을 증류수에 녹인 다음 초산 3 mL를 가하고 100 mL로 희석하여 만든다.

다) 황혈염(Potassium ferrioxalate)용액 : 황혈염 10.6g을 증류수에 용해하고 100 mL로 희석하여 만든다.

라) 식물성 활성탄(Vegetable charcoal)

마) 인산 완충액(Phosphate buffer solution) : 무수 제1인산칼륨 3.403g과 무수 제2인산칼륨 4.355g을 증류수 100 mL에 각각 용해한 다음 각 용액을 서로 혼합하고 1,000 mL로 희석하여 만든다.(pH 7.0)

바) 요소표준액

(1) 저장액 - 5 mg/ mL : 요소 5.000±0.001g을 증류수에 녹이고 1,000 mL 희석하여 만든다.

(2) 검정액 - 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 및 2.0 mg의 요소가 5 mL에 함유 되도록 다음과 같이 준비한다. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 및 20 mL의 저장액을 250 mL의 메스플라스크에 넣고 인산완충액으로 표선까지 희석하여 만든다.

(3) 표준액 : 1.0 mg요소/5 mL를 함유하는 용액을 표준으로 사용 24℃이하에서 저장해야 하며 1주일간 안정한다.

2) 표준곡선 작성

가) 검정액 5 mL를 25 mL의 시험관에 넣고 각각 DMAB액 5 mL를 넣는다.

나) 여기에 완충액 5 mL와 DMAB액 5 mL를 넣은 공시험액을 만든다.

다) 25℃에서 10분간 방치한 다음 파장 420 nm에서 요소농도에 따른 흡광도를 측정한다. 요소농도에 따라서 흡광도는 직선이 얻어져야 하며 그렇지 않은 경우는 새로운 DMAB액을 이용하며 되풀이한다.

3) 방법

가) 500 mL 메스플라스크에 분쇄한 시료 0.1g과 활성탄 1g, 증류수 250 mL, 초산아연용액 5 mL 및 황혈용액 5 mL를 넣는다.

나) 30분간 흔든 다음 증류수로 표선까지 채우고 침전이 생길 때까지 정치한다.

다) Whatman No. 40 여과하고 여액 5 mL에 DMAB 5 mL를 넣어 잘 흔든다.

라) 25℃에서 10분간 방치한 다음 420 nm에서 흡광도를 읽는다.

4) 계산

$$\text{요소}(\%) = (1.0 \times \text{시료의 흡광도} \times 100) / \text{표준액의 흡광도} \times \text{시료의 무게}(\text{mg}) \times 100$$

$$\ast 1.0 = \text{표준액 중 요소 mg수}$$

$$100(\text{분자}) = \text{희석배수}$$

21.3. 휘발성 염기태질소

가. 시약의 조제 : 조단백질과 동일

나. 시료액의 조제

시료 5~10g을 250 mL 메스플라스크에 정확히 취하고 증류수 200 mL를 가하여 30분간 진탕후 표준선까지 증류수로 채우고 No. 5A 여과지로 여과한다. 여과가 잘 안되면 3000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 시료액으로 한다.

다. 방법

시료액 50 mL를 분해플라스크에 정확히 취하여 산화마그네슘 2 g, 액체파라핀 0.5 g 및 증류수 50 mL를 가하고 조단백질 정량법에 준하여 증류 및 적정을 행하여 질소량을 산출한다.

라. 계산

$$\text{휘발성염기태질소}(\%) = (0.140067 \times A \times 5 \times F) / \text{시료무게}(\text{g})$$

※ A : 0.1 N - 염산용액의 소모량(mL)

F : 0.1 N - 염산용액의 factor

5 : 희석배수

21.4. 염산불용물질(토사)

600℃에서 2시간 회화후 잔류회분을 250~400 mL 비이커에 옮겨 3 N의 염산 75 mL 가하여 최소 1시간 이상 지속적으로 열을 가하여 완전하게 건고시킨다.

방냉한 후 3 N 염산 75 mL를 넣어 서서히 약 15분간 끓여준 다음 여과지(No. 6 Ashless)를 이용하여 여과하되 산기가 완전히 없어지도록 뜨거운 물로 반복하여 씻어준다. 건조 후 함량을 구한 크루시블에 옮겨 600℃에서 2시간 태우고 난 다음 무게를 측정한다.

$$\text{염산불용물질(\%)} = (\text{태운 후 중량} - \text{크루시블 함량}) / \text{시료무게(g)} \times 100$$

21.5. 유사단미사료 혼입여부 판정방법

가. 어분 중 우모분 혼입여부 판정방법

시료 일정량(1~2 g)에 1% NaOH용액 150 mL를 가하고 1분간 끓인 다음 2~3회 물로 씻어주고 방치한 다음 상층에 떠있는 부유물을 슬라이드글라스에 취하고 현미경 100~150배로 관찰하면 우모분은 분해되어 투명하고 교질 상태의 매듭을 갖는 모양을 나타낸다.

나. 어분 중 식물성 단백질 사료 혼합여부 판정방법

시료 일정량(2~3 g)에 5% NaOH용액 150 mL를 가하고 거품 방지제 2~3방울 떨어뜨려 30분간 자비한 다음 3~5회 물로 씻어주고 방치한 후 침전물을 슬라이드글라스에 취하여 커버글라스를 덮은 후 현미경 150배 이상으로 관찰하면 식물성단백질사료는 세포막이 벌집모양의 그물 구조를 선명하게 나타낸다.

21.6. 펩신(Pepsin)소화율

가. 시약의 조제

- 1) 0.2% 펩신염산액 : 농염산용액(HCl) 6.1 mL를 증류수 1,000 mL로 희석하여 0.075N 염산용액을 만들어 여기에 2 g의 펩신을 녹여 만든다.
- 2) 0.1 N - 염산용액(HCl) : 조단백질 정량방법과 동일
- 3) 분해촉진제 : 조단백질 정량방법과 동일
- 4) 가성소다(Sodium Hydroxide)혼합액 : 조단백질 정량방법과 동일
- 5) 지시약 : 조단백질 정량방법과 동일

나. 방법

시료 1 g을 정확히 취하여 탈지한 다음 200 mL 삼각플라스크에 넣고 42~45℃로 미리 가열한 0.2% 펩신염산용액 150 mL를 가하고 45℃ 항온수조에서 흔들어 주면서 16시간 소화시킨 다음 No. 2A 여과지로 여과한다.

불소화물을 온수로 세척하고 불소화물과 여과지를 분해플라스크에 넣고 조단백질 정량법에 준하여 분해, 증류, 적정하여 불소화물의 조단백질 함량을 구한다. 별도로 시료에 대한 조단백질의 함량도 구한다.

다. 계산

$$\text{펩신소화율(\%)} = (A-B)/A \times 100$$

※ A : 사료중 조단백질 함량(%)

B : 불소화물중 조단백질 함량(%)

21.7. 전분

가. 편광계법

- 1) 원리

- 가) 표준화된 조건하에서 약산으로 사료를 가수분해한 후 여과시킨 용액의 광학적 회전도를 편광기를 이용하여 측정하는 방법이다.
- 나) 40% 에탄올에 가용성인 물질(수크로스)도 광학적으로 활성을 띠기 때문에 이 물질의 함량을 제외한 순수한 전분(40% 에탄올에 불용성임)에 의한 광학적 회전도를 측정한다.
- 다) 비트펠프 등과 같이 이눌린을 함유한 물질은 산가수분해 또는 효소적 방법에 의한 측정을 하여야 한다.

2) 기구

- 가) 100 mL 메스후라이크
- 나) 여과지(Whatman No.2)
- 다) 깔대기
- 라) 항온수조
- 마) 20 mL 시험관
- 바) 편광계

3) 시약의 조제

- 가) 40% 에탄올 (V/V) 조제
- 나) 메틸레드 지시약 : 1.0 g의 메틸레드를 96% 에탄올에 녹여 1 L 용액을 만든다.
- 다) 0.31 N(1.13%)염산 : 24.8 mL의 12.5 N염산을 증류수에 녹여 1 L 용액을 만든다. 0.31 N 염산 10 mL은 메틸레드반응에서 0.1N 가성소다 30 mL를 이용하여야 한다. (Strength check)
- 라) Carrez시약 I : 106 g의 Potassium ferrocyanide($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$)를 증류수에 녹여 1 L 용액(0.25 M)을 만든다.
- 마) Carrez시약 II : 220 g의 Zinc acetate($ZnC_2H_3O_2 \cdot 2H_2O$)와 30 g의 빙초산을 증류수에 녹여 1 L 용액(Zinc acetate 1 M)을 만든다.

4) 측정방법

가) 제1단계

- (1) 시료는 0.5 mm체를 완전히 통과하여야 한다.
- (2) 메스후라스크에 2.5 g 시료와 0.31 N 염산 25 mL를 넣고 혼합시킨 후 다시 0.31 N 염산 25 mL를 넣은 즉시 100℃ 항온수조에 정확히 15분 동안 두고(플라스크 투입 30초 이내 다시 100℃로 끓여야함) 처음 3분간은 플라스크를 항온수조 내에서 잘 흔들어 준다.
- (3) 항온수조에서 끄집어낸 후 즉시 30 mL의 증류수를 주입하고 빠른시간 내 상온으로 식힌다.
- (4) 식혀진 플라스크에 Carrez시약 I 5 mL을 넣고 1분간 혼합한 후 Carrez시약 II 5 mL을 넣은 후 다시 혼합한다.
- (5) 증류수로 100 mL 표선을 맞추고 혼합한 후 No. 2 여과지로 여과한다.
- (6) 처음 여과액은 버리고 맑은 여과액을 20 mm길이의 편광기 튜브속에 넣고 광학적 회전도를 측정한다.

나) 제2단계

- (1) 시료 5g을 100 mL의 메스후라이크에 취한다.
- (2) 40% 에탄올 70~80 mL을 넣어 시료와 잘 혼합시킨 후 1시간동안 상온에서 방치한다. 이때 10분 간격으로 가볍게 흔들어 준다.
- (3) 40% 에탄올을 가지고 100 mL로 맞춘 후 혼합한 다음 여과지로 여과한다.
- (4) 여과액 중 50 mL을 취하여 새로운 100 mL 메스후라이크에 담고 25% 염산용액 2.1 mL를 넣은 후 잘 혼합한다.
- (5) 100℃ 항온수조에서 정확히 15분간 흔들지 않고 놓아둔다.
- (6) 항온수조에서 끄집어 낸 후 빠른 시간 내 상온으로 식힌다.
- (7) 제1단계의 (4), (5), (6) 과정을 거쳐 광학적 회전도를 측정한다.

5) 계산방법

전분함량(%) = {5000 × (제1단계 회전도 - 제2단계 회전도)} / α × 시료중량

α값 : 옥수수 전분 = 184.6

보리 전분 = 181.5

감자 전분 = 185.7

밀 전분 = 182.7

쌀 전분 = 185.9

* 대부분의 원료사료는 제 2 단계과정을 생략하고 제 2 단계 회전도 대신 증류수에 의한 블랭크 회전도를 측정하면 됨

** 여과액의 농도가 맑지 않을 때는 Carrez시약의 양을 배가한다.

나. 비색법

1) 기구

가) 100 mL 메스후라이크

나) Voltex

다) 여과지(Whatman No.2)

라) 깔대기

마) 원심분리기

바) 50 mL 원심분리관

사) 항온수조

아) 20 mL 시험관

자) 비색계

2) 시약의 조제

가) 80% 에탄올

나) 52% Perchloric acid : 100 mL 증류수에 270 mL의 72% Perchloric acid 첨가

다) 황산 용액 : 농황산 760 mL을 증류수(약 330 mL)에 녹여 1 L 용액을 만든다.

라) Anthrone 용액 : 황산용액 100 mL에 시약 0.1g을 녹임(0.1% 용액제조)당일 분석용으로 준비, 갈색병으로 4℃에 보관하면 48시간동안 사용가능

마) D-glucose 표준액 : D-glucose 1g을 증류수 1 L에 녹여 1000 µg/ mL 농도를 만든 후 25, 50, 100, 200 µg/ mL로 희석하여 사용한다.

3) 분석 방법

가) 시료 0.2 g(<0.5 mm)을 칭량 후 50 mL 원심분리관에 넣는다.

나) 80% 에탄올 2방울을 떨어뜨려 시료를 적신 다음 증류수 5 mL을 넣고 voltex를 이용하여 완전히 혼합한다.

다) 75℃ 80% 에탄올 25 mL을 첨가하여 완전히 혼합한 후 5분간 방치한 다음 3000rpm에서 원심분리 한다.

라) 상등액은 버리고 원심분리관에는 다시 75℃ 80%에탄올 30 mL을 넣고 2차 원심분리한다.

마) 상등액은 버리고 잔사는 에탄올을 날리기 위해 약 40℃에서 1시간동안 건조한다.

바) 잔사에 증류수 5 mL을 넣고 흔들어 준 후 52% Perchloric acid 6.5 mL을 첨가한 후 20분 동안 매 5분마다 흔들어 준다.

사) 증류수 20 mL을 넣고 3000 rpm에서 원심분리한다.

아) 상등액을 100 mL 메스후라스크에 담고 바), 사) 과정을 반복하여 2차 상등액을 1차 상등액이 들어 있는 flask에 담는다.

자) 아)의 1, 2차 상등액과 2차 원심분리후 남은 잔사를 새로운 100 mL 메스후라스크에 여과하면서 옮겨 100 mL로 정용한다.

차) 포도당 농도가 약 100 µg/ mL가 되게끔 희석하여 분석에 임한다.

카) 유리시험관에 희석용액 1 mL을 넣은 즉시 anthrone용액 5 mL을 첨가한다.

타) 마개를 막은 후 내용물을 잘 혼합하여 100℃의 수조에 정확히 12분간 가열한 다음
얼음 또는 흐르는 물에 급속히 상온으로 냉각시킨다.

파) 용액의 흡광도를 630 nm에서 측정한다.

4) 계산방법

$$\text{전분(\%)} = 0.9 \times (M/10) \times (100/V_1) \times (100/V_0) \times (100/E) \times (100/MS)$$

M = 표준곡선에서의 포도당 농도, $\mu\text{g}/\text{mL}$

V_1 = 회석용 채취량, mL(원액사용시 $V_1 = 100$)

V_0 = 분석용액 채취량, mL

E = 시료무게, g

MS = 시료의 건물함량, %

21.8. 열량(Calorie)

가. 기구 및 시약

- 1) 열량측정기(Bomb calorimeter)
- 2) Balance
- 3) 공기 순환식 건조기
- 4) 안피지(5×5 cm)
- 5) 니켈선
- 6) 산소
- 7) 핀셋
- 8) 안식향산

나. 시료의 조제 및 측정

안피지 무게를 측정 후 시료(사료 1g, 동물성단백질 사료 0.8g, 유지 0.4g)를 취한 다음
시료를 안피지로 싼다. 시료가 들어있는 안피지를 bomb에 연결한 다음 산소를 bomb에
충진한 후 열량을 측정한다.

21.9. 협잡물(이물질시험법)

가. 정의

시료를 규정의 방법에 준하여 석유에테르 용해시킬 경우의 불용해 잔분의 백분율을 말한다.

나. 장치

항온건조기(100±1℃로 온도조절이 가능한 것)

다. 시약

석유에테르(시약 일급)

라. 방법

- 1) 시료 약 20 g을 beaker에 정확히 정량한 후 석유에테르 200 mL 가해 완전히 용해시킨다.
- 2) 미리 건조시켜 항량으로 한 whatman No2 여과지에 여과한 후 석유에테르를 사용해서
완전히 추출 세정한다.
- 3) 잔분의 여지는 100±1℃의 항온 건조기에서 건조한 후 30분간 방냉하여 칭량한다.(건조에
의한 중량변화가 0.3 mg이하가 되면 항량으로 간주한다)

마. 계산

$$\text{협잡물(\%)} = \frac{\text{잔분 중량(g)}}{\text{시료 무게(g)}} \times 100$$

21.10. 산가

가. 원리

산가는 유지 1 g중에 들어있는 유리지방산을 중화하는데 필요한 KOH의 양을 측정하여 유지의 성상을 판단한다.

나. 시약

- 1) 0.1 N KOH-Ethanol, ether-ethanol(1 : 1) 혼합액,
- 2) 1% Phenolphthalein 지시약
- 3) 0.1 N KOH-Ethanol 용액
6.58 g(순도85% 기준)의 KOH를 소량의 증류수에 녹이고 Ethanol로 1 L까지 희석하여 2~3일간 방치한 후 여과하여 역가를 표정한다.
- 4) 0.1 N KOH-Ethanol 용액 역가 표정법
 - 가) Benzoic acid를 100~105℃ 2시간 건조시킨다.
 - 나) 데시케이터에서 30분간 방냉한다
 - 다) 삼각플라스크에 benzoic acid를 0.2~0.3 g 정도 취한다.
 - 라) ether-ethanol 혼합액 10 mL에 용해시킨다.
 - 마) 1% Phenolphthalein 지시약 2~3방울을 가하고 0.1N KOH-Ethanol 용액으로 적정한다.

$$\text{Factor} = \frac{\text{Benzoic acid양(g)} \times 1000}{122 \times \text{적정치(mL)}} \times 10$$

* Ether-Ethanol 혼합액 : Ethyl Ether : Ethanol을 1 : 1로 한다

* 1% Phenolphthalein 지시약 : Phenolphthalein 특급 1 g을 ethanol 100 mL에 녹인다.

다. 분석

시료 2 g을 에테르 : 에탄올(1 : 1) 혼합액 100 mL에 녹이고 여기에 알콜에 녹인 1% Phenolphthalein 지시약을 2~3방울 가하고, 30초간 지속하는 담홍색을 띠 때까지 0.1 N KOH-Ethanol 용액으로 적정한다. 동시에 공시험도 행한다.

라. 계산

$$\text{산가} = \frac{(T_1 - T_0) \times 5.611 \times F}{S}$$

※ T_1 : 시료 0.1N KOH-Ethanol 적정치(mL)

T_0 : 공시험에 대한 0.1N KOH-Ethanol 적정치(mL)

F : 0.1N KOH-Ethanol의 factor

S : 시료무게(g)

5.611 : KOH분자량 × 농도(0.1N)

21.11. 우레아제 역가(Urease Activity)

가. 원리

대두부산물 1g을 요소용액과 혼합하였을 때 30℃에서 1분간 발생하는 암모니아태 질소의 양으로 urease activity를 측정한다

나. 기구

- 1) 30℃±0.5℃ 유지할 수 있는 진탕수조
- 2) 정확한 pH meter(pH 0.02까지 측정 가능한 것)
- 3) 시험관(20×150mm 고무마개)

다. 시약

- 1) phosphate buffer soln. 0.05M : 3.403g의 KH_2PO_4 와 4.355g의 K_2HPO_4 를 각각 100 mL의

신선한 증류수에 녹인 다음 두 가지를 섞어 1 L로 한다. 사용전에 강산 또는 강염기로 pH를 7로 조절한다

- 2) urea-buffer soln : 15g의 urea를 500 mL phosphate buffer용액에 녹인 다음, toluene 5 mL를 넣고 pH 7로 맞춘다.

라. 방법

- 1) 시료를 열 발생 없이 가능한 미세하게 간다.(0.2mm체 통과)
- 2) 0.2g의 준비된 시료를 시험관에 넣고 10 mL의 urea-buffer액을 가한 후, 뚜껑을 닫고 잘 흔들어 30℃ 진탕수조에 넣어 왕복 진탕시킨다. 시간을 기록(test)
- 3) 0.2g의 분비된 시료를 시험관에 넣어 blank를 준비한다. 10 mL의 phosphate buffer를 가하고 뚜껑을 한 후, 잘 흔들어 30℃ 진탕수조에 넣어 왕복진탕 시킨다. 시간을 기록(blank)
- 4) test blank를 준비하는 사이의 시간은 5분간의 차이를 둔다.
- 5) 30분간 왕복진탕 시킨 후 시험관을 꺼내 상등액의 pH를 잰다.
- 6) 진탕수조에서 시험관을 꺼낸 후 정확히 5분이 되었을 때 pH를 읽는다.

마. 계산

test와 blank의 pH차이는 pH증가 또는 urease activity로 표시한다.

21.12. HCN(청산)

가. 적용범위 : 타피오카

나. 측정원리

타피오카 중의 HCN을 증류수로 추출하고 수증기 증류장치를 이용하여 증류 포집한 후 0.01N AgNO₃로 적정하여 계산한다.

다. 시약의 조제

- 1) 0.01N AgNO₃

17g의 AgNO₃을 갈색 flask에 넣고 증류수로 1 L가 되게 한다. NaCl로 표정하여 Factor를 구한 후 10배 희석하여 사용한다.

가) 표정

NaCl (500℃~600℃에서 50분 가열한 후 황산데시케이터에서 방냉) 1.461 g을 증류수에 녹여 250 mL로 한다. 정확히 25 mL를 취하고 약 25 mL의 증류수를 넣고 Dextrin 5 mL, Fluorescein Na 수 방울을 첨가한 후 0.1N AgNO₃로 적정한다.(황록색(형광) → 미적색)

- 2) Dextrin액 : Dextrin 2g을 증류수 100 mL에 용해한다.

- 3) Fluorescein Na액 : Fluorescein Na(C₂₀H₁₀O₅Na₂) 0.2g을 증류수 100 mL에 용해한다

- 4) p-Dimethylaminobenzalrhodanine(CH₃)₂NC₆H₄CH:CCONHSCS=DMABR) : 0.02g을 acetone 100 mL 에 용해한다

라. 측정방법

시료 20g을 500 mL round botton flask에 취하고 증류수 200 mL 첨가한 후 밀봉해서 25~30℃에서 2시간 이상 방치한다. 증류장치에 연결시키고 5% NaOH 20 mL를 넣은 수기로 200 mL이상 될 때까지 받는다.(HCN의 boiling point는 약 26℃) 증류액에 p-dimethylaminobenzalrhodanine 0.5 mL를 넣고 0.01N AgNO₃로 적정한다. (황록색(형광) → 미적색)

$$\text{HCN(ppm)} = \frac{v \times f \times 0.54}{w} \times 1000$$

v : 0.01 N AgNO₃ 소요양(mL)

f : 0.01 N AgNO₃ factor

w : 시료중량(g)

21.13. 유리고시폴(Free Gossypol)

고시폴은 면실박 중 색소로서 유리된 형태로 있을 때 가축에게 독성을 나타내는 유독성 물질이다.

가. 정의

유리고시폴은 aqueous acetone에 녹을 수 있는 gossypol과 gossypol 유도체를 말한다.

나. 적용범위 : 면실박, 면실

다. 시약 및 제조

1) aqueous acetone

700 mL acetone + 300 mL 증류수

2) aqueous iso-propanol

800 mL iso-propanol + 200 mL 증류수

3) Thiourea sol.

10 g thiourea/100 mL 증류수

4) 1.2 N HCl

106 mL HCl(35~37%)/1 L

5) Aniline(Benzeamine)

aniline(ACS reagent)에 zinc powder를 넣고 냉각기에 연결 증류하여 용액의 처음과 마지막 10%를 버린 용액(reagent blank의 흡광도가 0.022를 넘으면 재증류해야 한다. 냉암소 보관 유리마개를 한다)

6) Gossypol 또는 Gossypol acetate 표준용액

가) 순도결정 실험 : 2mg의 gossypol 또는 gossypol acetate를 100 mL 정량플라스크에 넣고 40 mL cyclo-hexane을 첨가한다. 더운물에서 녹이고 cyclo-hexane으로 100 mL까지 채운 후 358nm에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{Absorptivity} = A/C \times l$$

A : absorbance

C : concentration, g/l

l : light path, 1cm

* 순수표준 gossypol의 absorptivity는 39.9 ± 0.2

순수표준 gossypolacetate의 absorptivity는 35.8 ± 0.2

나) 표준용액 조제 : 25 mg gossypol 또는 27.9 mg의 gossypol acetate를 acetone 100 mL에 녹이고 1 mL의 glacial acetic acid와 75 mL의 증류수를 첨가하고 아세톤으로 250 mL로 맞춘다. 50 mL를 취하여 60 mL 증류수를 가하고 acetone으로 200 mL로 맞춘다.(0.025mg/mL) 24시간 안정하며 차광해야 한다.

라. 시료

1mm의 screen을 통과하게 분쇄

마. 시료량

기대치(%)	시료무게(g)	aliquot size(mL)
0.2 ~ 0.4	0.5	2
0.1 ~ 0.2	1.0	2
0.05 ~ 0.1	1.0	5
0.02 ~ 0.05	1.0	10
0.01 ~ 0.02	2.0	10
below 0.01	5.0	10

gossypol의 기대치에 따라 취한다.

바. 실험방법

- 1) 시료를 상기 표에 따라 무게를 달고 초자구를 깔은 공전 삼각플라스크 250 mL 에 넣는다.
- 2) 50 mL aqueous acetone을 넣고 shaker 또는 자석교반기로 1시간 진탕한다.

- 3) 건조여지로 여과(whatman No 2), 처음 약 5 mL는 버리고 작은 부피의 flask에 담는다.
용매의 휘발방지를 위해 여과기를 유리접시로 덮는다.
- 4) 2개의 25 mL 정량플라스크에 표의 aliquot size에 따라 (A, B)액을 취한다
- 5) A에 10% thiourea 2방울 (0.10 mL), 1.2N HCl 1방울(0.05 mL)을 넣고 aqueous iso-propanol로 표선까지 채운다.(25 mL)
- 6) B에 10% thiourea 2방울, 1.2N HCl 1방울을 넣고 2 mL anilline을 즉시 넣는다.
- 7) Reagent blank : 시료와 동량의 aqueous acetone에 2방울의 thiourea와 2 mL의 anilline을 첨가한다.
- 8) B와 Blank를 100℃ 수조에서 30분간 가열한다
- 9) 수조에서 꺼내 aqueous iso-propanol를 약 10 mL 첨가하고 water bath에서 실온으로 냉각한 후 aqueous iso-propanol로 표선까지 채운다.(25 mL)
- 10) 440 nm에서 A용액의 흡광도를 측정한다.(Blank는 aqueous iso-propanol)
- 11) reagent의 흡광도 측정(Blank는 aqueous iso-propanol)
- 12) B용액의 흡광도 측정(Blank는 reagent blank)
- 13) Corrected Absorbance(= B용액의 흡광도 - A용액의 흡광도)
- 14) 0.025 mg ~ 0.25 mg 범위의 검량선을 상기 방법으로 작성하여 gossypol mg을 계산한다.

$$\text{Gossypol(mg)} = \text{Corrected Absorbance} \times \text{factor}$$

사. 계산

$$\text{Free gossypol(\%)} = \frac{\text{gossypol(mg)} \times \text{회석배수}}{\text{sample(mg)}} \times 100$$

21.14. 멜라민

가. 액체크로마토그래피/질량분석기/질량분석기에 의한 시험

1) 분석원리

검체 중의 멜라민을 아세토니트릴·물(50:50, v/v) 용액으로 추출, 여과하고 이를 양이온 교환수지를 사용하여 정제한 후 액체크로마토그래프/질량분석기/질량분석기로 분석한다.

2) 장치

가) 액체크로마토그래프/질량분석기/질량분석기(LC/MS/MS)

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

3) 시약 및 시액

가) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

나) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것

다) 표준원액 : 멜라민 표준품 10 mg을 취하여 0.1% 개미산·아세토니트릴(5:95, v/v) 혼합용액으로 녹여 정확히 100 mL로 한다.

라) 표준용액 : 표준원액을 0.01, 0.02, 0.05, 0.10 및 0.20 µg/mL 농도가 되도록 0.1% 개미산·아세토니트릴(5:95, v/v) 혼합용액으로 희석하여 검량선 작성을 위한 표준용액으로 한다 (사용 시 조제한다).

마) 0.1% 개미산용액 : 개미산(Formic acid) 0.1 mL에 물을 가하여 100 mL로 한다.

바) 4% 개미산용액 : 개미산 4 mL에 물을 가하여 100 mL로 한다.

사) 0.1% 개미산·아세토니트릴(5:95, v/v) 혼합용액 : 0.1% 개미산 용액 5mL에 아세토니트릴 95 mL를 가하여 100 mL로 한다.

아) 0.2% 디에틸아민 함유 아세토니트릴 용액 : 디에틸아민(Diethylamine) 0.2 mL에 아세토니트릴을 가하여 100 mL로 한다.

자) 2% 디에틸아민 함유 아세토니트릴 용액 : 디에틸아민 2 mL에 아세토니트릴을 가하여

100 mL로 한다.

차) 20 mM 개미산암모늄 용액 : 개미산암모늄(Ammonium formate) 1.26 g을 물에 녹여 1,000 mL로 한다.

카) 기타시약 : 특급

4) 시험용액의 조제

가) 추출

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

나) 정제

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

5) 시험조작

가) 액체크로마토그래프의 측정조건

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

(2) 이동상은 A 및 B 용액의 농도 구매조건에 따라 사용한다.

(가) 이동상 A : 0.1% 개미산·아세토니트릴(5:95, v/v)

(나) 이동상 B : 20 mM 개미산암모늄·아세토니트릴(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

(3) 유속 : 0.25 mL/분

(4) 주입량 : 10 µL

(5) 칼럼온도 : 35℃

나) 질량분석기/질량분석기의 조건

(1) Ionization : ESI (Positive)

(2) Source voltage : 4.8 kV

(3) Capillary Temp. : 350℃

(4) Auxiliary gas : 질소

(5) Collision gas : 아르곤 또는 질소

(6) Source collision energy : 15~30 V

다) 검량선

작성표준용액을 액체크로마토그래프/질량분석기/질량분석기에 주입한 후 얻어진 크로마토그램상의 m/z 85 이온의 피크 높이 또는 면적을 이용하여 검량선을 작성한다.

라) 정량한계 : 0.15 mg/kg

6) 정성시험

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

물 질	Precursor ion(m/z)	Fragment ion(m/z)
멜 라 민	127	85
		68

7) 정량시험

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

8) 계산

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

C : 검량선에서 구한 멜라민의 농도 (µg/mL)

V : 시험용액의 최종 부피 (mL)

S : 시료 채취량 (g)

D : 시험용액의 희석배수

나. 액체크로마토그래피에 의한 시험

1) 분석원리

검체 중의 멜라민을 아세트니트릴·물(50:50, v/v) 용액으로 추출하고 이를 양이온교환수지를 사용하여 정제한 후 액체크로마토그래프로 분석한다.

2) 장치

가) 액체크로마토그래프 : 자외부흡수검출기(UV detector)를 사용한다.

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

3) 시약 및 시액

가) 용매 : 액체크로마토그래프용 또는 이와 동등한 것

나) 물 : 3차 증류수 또는 이와 동등한 것

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

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

마) 4% 개미산용액 : 개미산(Formic acid) 4 mL에 물을 가하여 100 mL로 한다.

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

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

아) 기타시약 : 특급

4) 시험용액의 조제

가) 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 흔들어 섞고 30분간 초음파 진탕한 다음 원심분리(2,600 × G, 10분)한다. 상등액을 취하여 0.45 µm

멤브레인필터로 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.

나) 정제

미리 아세트니트릴 5 mL, 4% 개미산용액 5 mL를 차례로 흘려 활성화시킨 정제용 카트리지에 4% 개미산용액 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 바이알에 취하여 50℃에서 질소로 건조한 후 잔류물에 물 1 mL를 가하여 녹인 것을 시험용액으로 한다.

5) 시험조작

가) 액체크로마토그래프의 측정조건

(1) 칼럼 : C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

(2) 이동상 : 완충용액 · 아세트니트릴 (85:15, v/v)

(가) 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.

(3) 검출과장 : 240 nm

(4) 유속 : 1.0 mL/분

(5) 주입량 : 10 μL

나) 검량선 작성

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

6) 정성시험

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

7) 정량시험

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

8) 계산

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

C : 검량선에서 구한 멜라민의 농도 (μg/mL)

V : 시험용액의 최종 부피(mL)

S : 시료 채취량(g)

D : 시험용액의 회석배수

9) 확인시험

"액체크로마토그래피/질량분석기/질량분석기에 의한 멜라민 시험법"의 정성시험 또는 "기체크로마토그래피/질량분석기"의 정성시험에 따라 시험할 때 멜라민이 확인되어야 한다.

다. 기체크로마토그래피/질량분석기에 의한 확인시험

1) 분석원리

검체 중의 멜라민을 아세트니트릴·물(50:50, v/v) 용액으로 추출하고 이를 양이온교환수지를 사용하여 정제한 후 유도체화시켜 기체크로마토그래프/질량분석기로 분석한다.

2) 장치

가) 기체크로마토그래프/질량분석기(GC/MS)

3) 시약 및 시액

가) 표준용액

액체크로마토그래피에 의한 멜라민 시험법의 시약 및 시액 중 표준용액을 사용한다.

나) 피리딘 : 특급을 사용한다.

다) 유도체시약(BSTFA)

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

4) 시험용액의 조제

가) 추출 및 정제

액체크로마토그래피에 의한 멜라민 시험법 5) 시험용액의 조제 가) 추출 및 나) 정제에 따라 *까지 시험하여 용출액으로 사용한다.

나) 유도체화

표준용액 및 위의 용출액 200 μ L를 각각 바이알에 넣은 다음 70℃에서 질소로 건조한다. 잔류물에 피리딘 200 μ L와 유도체시약(BSTFA) 200 μ L를 넣고 마개를 닫은 후 70℃에서 30분간 방치한 것을 확인시험용 표준용액 및 시험용액으로 한다.

5) 시험조작

가) 기체크로마토그래프/질량분석기의 측정조건

(1) 칼럼 : DB-5MS(0.25 mm $\times$ 30 m, 0.25 μ m) 또는 이와 동등한 것

(2) 주입부 온도 : 250℃

(3) 검출기 온도 : 250℃

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

(5) 캐리어가스 및 유량 : 헬륨 (1.0 mL/분)

(6) 주입방법 : splitless

(7) 주입량 : 1 μ L

(8) 이온화 방법 : EI mode

(9) 이온화 전압 : 70 V

6) 정성시험

위 조건으로 얻어진 시험용액 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름 시간과 비교하여 일치 여부를 확인한다. 시험용액의 특성이온이 아래 표와 같이 확인되어야 하고 표준용액과 시험용액 이온간 반응세기의 비(m/z 327 이온에 대한 각 이온의 백분율, response ratio)를 비교하여 그 비가 $\pm 10\%$ 이내에서 일치하여야 한다.

물 질	이 온
멜 라 민	342 (M)
	343 (M+1)
	344 (M+2)
	327 (M-15)

21.15. 요오드가

요오드가라 함은 일정한 측정법으로 측정한 지질 100 g에 흡수되는 할로겐의 양을 요오드의 g수로 나타낸 것이다.

가. 하누스법

1) 시액 및 시약

가) 브롬요오드시액 : 요오드 13.2 g을 초산 1,000 mL에 가온하여 녹이고 이것을 25℃로 식힌 다음 20.0 mL를 취하여 0.1 N 티오황산나트륨액으로 적정한다. 요오드용액의 나머지에 그중에 함유되는 요오드의 양과 당량의 브롬(약 3 mL)을 가한다. 이 액은 차광한 마개 달린병에 보존한다.

2) 시험조작

검체의 요오드가를 감안하여 다음 표에 따라 0.1~0.8 g을 작은 유리용기에 정밀히 달고 250 mL의 마개달린 삼각플라스크 중에 유리용기와 같이 넣는다. 클로로포름 10 mL를 가하여 녹이고 여기에 브롬요오드시액 25 mL를 정확히 가하고 밀전하여 잘 섞고 차광하여 30분간(요오드가 100이상의 것은 1시간) 방치한다. 다음에 1 N 요오드화칼륨액 30 mL를 가하여 흔들어 섞고 다시 물 100 mL를 가하여 유리한 요오드를 0.1 N 티오황산나트륨액으로 적정한다(지시약 전분시액 1 mL). 따로 검체를 사용하지 않고 같은 방법으로 공시험을 한다.

$$\text{요오드가} : 1.269 \times (b-a) \times f / S$$

- a : 본시험에 있어서의 0.1 N 티오황산나트륨액의 소비량(mL)
- b : 공시험에 있어서의 0.1 N 티오황산나트륨액의 소비량(mL)
- S : 검체의 채취량(g)
- f : 0.1 N 티오황산나트륨액의 역가

이 시험에서 만약 브롬요오드시액의 반량 이상이 소비되었을 때에는 검체를 감량하여 그 측정을 되풀이 한다.

요오드가	검체채취량(g)
120이상	0.1~0.2
60~120	0.2~0.4
60이하	0.4~0.8

나. 위이스법

1) 시액 및 시약

가) 일염화요오드시액 : 재승화시킨 요오드 13 g을 초산 1,000 mL에 녹이고 그 일부에 대하여 티오황산나트륨액으로 적정하여 놓고, 이에 씻은 건조염소를 통하여 다시 일부에 대하여 티오황산나트륨액으로 적정하여 그 양이 최초의 적정량의 2배가 되도록 한다. 요오드는 약간 과잉의 정도로 한다. 이 시액은 마개달린갈색유리병에 넣어 파라핀으로 봉하고 사용직전에 연다. 30일 이상 지난 시액은 사용하면 아니된다.

2) 시험조작

검체의 요오드를 감안하여 적당량의 검체를 250 mL의 마개달린 삼각플라스크에 취하고 사염화탄소 또는 클로로포름 15~20 mL를 가하고 일염화요오드시액 25 mL를 피펫으로 일정한 속도로 적가한다. 다음에 암소에 30분간(요오드가 100이상의 것은 1시간) 방치한 다음 1 N 요오드화칼륨액 20 mL 및 물 100 mL를 가하여 흔들어 섞은 다음 유리한 요오드를 0.1 N 티오황산나트륨액으로 적정한다(지시약 전분시액1 mL). 같은 방법으로 공시험을 한다. 계산은 하누스법에 따라 한다.

21.16. 팽윤도

가. 적용범위

본 시험은 Bentonite의 수중에서의 팽윤능력을 실온에서 측정하는 방법이다.

나. 분석방법

- 1) 메스실린더에 증류수를 100 mL 표선까지 채운다.
- 2) 건조된 벤토나이트 분말 2g을 칭량하여 상온에서 2시간에 걸쳐 소량씩 메스실린더에 투입

한다 . 이 때 먼저 넣은 것이 일단 침착한 다음에 다음 것을 넣는다.

3) 24시간 방치하고 벤토나이트 수화물의 팽창된 부피를 벤토나이트의 팽윤도로 한다 (mL/2g). 24시간 방치할 때 그릇 바닥의 덩어리가 팽윤한 용적은 10ml의 눈금 이상이어야 한다.

다. 데이터 분석 및 정리

1) 팽윤도(mL/2g)= 메스실린더 바닥에서 시료가 팽윤한 부피 값.

21.17. 브릭스(Brix)

가. 기구

아베 굴절계 : Abbe Reflectometer, 온도계

나. 분석방법

1) 추출

시료 5 g 을 100 ml 비이커에 칭량하고, 당밀과 동량의 증류수를 비이커에 넣고 잘 혼합한다.

2) 측정

가) 당굴절계의 grinding glass, prism상의 수분을 잘 닦아낸다. 또 굴절계의 보정은 증류수를 검액으로 하여 눈금상의 명암의 경계선이 영점에 오도록 영점조정 나사를 움직여 바르게 보정한다.

나) Grinding glass 위에 시료 1-2방울을 취하여 프리즘위에 합친다.

다) 광선이 채광공으로 들어오게 기우려 주고 접안경으로 관측하면 눈금위에는 명암의 경계선이 나타난다.

라) 접안경을 움직여 초점을 맞추고 경계선상의 눈금의 숫자를 읽는다. 온도보정은 온도 보정표에 따라 한다.

다. 분석결과 처리 : 눈금을 읽은 수치에 희석배수를 곱한다

21.18. 베타인염산염(베타인염산염)

가. 시험용액의 조제

시료를 예상함량에 따라 (0.1g~1g) 적당량을 칭량하여 100mL 정량플라스크(Vol. flask)에 취하고 80mL 정도의 물을 가한다. 완전히 용해하면서 30분간 초음파(Sonication in ultra sonic bath) 처리하고 물로 정용한다. 0.45μm 필터로 여과한 액을 액체크로마토그래피 시험용액으로 사용한다.

나. 표준용액의 조제

Betaine-HCl(분자량 153.61) 또는 Betaine(분자량 117.15)을 일정량 칭량하여 100mL 정량 플라스크(Vol. flask)에 취하고 용해하여 사용한다.

다. 시약

1) Water : LC grade

2) 질산칼슘[Ca(NO₃)₂·4H₂O]

3) Betaine-HCl (mw 153.61)

4) Betaine (mw 117.15)

라. 분석방법

1) 분쇄된 시료를 예상함량에 따라 (0.1g ~ 1g) 적당량을 칭량하여 100mL Vol. flask에 취하고 80mL 정도의 물을 가한다.

2) 완전히 용해하면서 30분 sonication하고 물로 정용한다.

3) syringe filter (0.45μm)로 여과하여 LC시험용액으로 사용한다.

마. 액체크로마토그래프 분석조건

1) 친수성상호작용계

가) 칼럼 : HILIC 칼럼 또는 이와 동등한 것

나) 이동상 : acetonitrile + 30mM ammonium acetate (8:2, 사용 시 제조)

다) 검출기 : 증기화 광산란 검출기(ELSD) 또는 시차굴절계(RID)

라) 칼럼온도 : 실온

마) 유속 : 0.8 mL/min

2) 배제형 이온교환계

가) 칼럼 : Sugar-pak 칼럼 또는 이와 동등한 것

나) 이동상 : 0.004M Ca(NO₃)₂·4H₂O (사용 시 제조)

다) 검출기 : 증기화 광산란 검출기(ELSD) 또는 시차굴절계(RID)

라) 칼럼온도 : 80 °C

마) 유속 : 0.6 mL/min

바. 계산

1) Betaine 또는 Betaine-HCl (mg/kg) = (시료용액의 피크면적/표준용액의 피크면적) × 표준용액의 농도(mg/mL) × 총 회석량(mL) × 회석배수 / 시료무게 (g)

2) Betaine HCl 함량= Betaine 함량 × 153.61 / 117.15

21.19. 불용성불순물

가. 분석개요

1) 반추위 사료에 사용되는 동물성유지의 불순물을 측정하는 방법으로 시료에 석유에테르를 첨가하여 유지를 녹인 후 유리여과기(G3)로 여과하고 유리여과기에 잔류하는 물질을 불순물로 하며 불순물은 유지가 아닌 단백질과 그 외 뼈 등이 될 수 있다. 반추위 사료에 사용하는 유지는 불순물이 0.15% 이내로 규정하고 있다.

2) 축우용(생후 3개월령 이내의 소)대용유용 배합사료는 동물성 유지(식용의 고기에서 채취한 지방만을 원료로 한 것)의 불용성 불순물의 함량은 0.02%이하여야 한다.

나. 적용범위

식물성유지, 동물성유지, 혼합성유지

다. 분석원리

석유에테르를 이용하여 유지류를 용해하여 여과한 후 유지를 생산할때 함유된 단백질 조직, 섬유질, 녹 등의 기타 잡물의 함량을 백분율로 환산한 방법

라. 분석기기 및 시약

1) 분석기기 및 초자 : 250 mL 비이커, 유리여과기(G3), 열풍건조기, 삼각플라스크 500 mL 이상

2) 시약 : Petroleum ether(석유에테르, 특급)

마. 분석방법

1) 시료 전처리

가) 시료 약 20g을 250 mL 비이커에 정확히 칭량한 후 석유에테르 200 mL을 가해 완전히 용해시킨다. 이때 분말 또는 과립으로 된 시료는 항온수조에서 충분히 용해시킨 후 시료로 사용한다.

나) 건조기를 이용하여 105℃ 1시간 건조하여 중량을 측정한 유리여과기(G3)로 용해된 시료를 여과하고 여과기 위의 잔류물을 특급 석유에테르 200 mL로 충분히 세정한다.

다) 잔류물이 들어 있는 유리여과기를 105±1℃에서 1시간 건조하고, 데시케이터에서 30분간 방냉한 후 중량을 측정한다.

바. 계산식

$$\text{불용성불순물(\%)} = [\text{여과 후 유리여과기 중량(g)} - \text{여과 전 유리여과기 중량(g)}] / \text{시료채취량(g)} \times 100$$

21.20. 총당(Total sugar)

가. 레인-에이논(Lane-Eynon) 법

: 당밀 중의 총당 측정에 적용한다

1) 기구

뷰렛, 삼각플라스크, 가열교반기, 여과지

2) 시약의 조제

가) 페링A시액 : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MW. 249.69) 34.63g을 증류수 500ml에 녹인 다음 여과한다.

나) 페링B시액 : 173g Potassium sodium tartrate $\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Rochell염, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ = 282.22)과 50g NaOH를 증류수 500ml에 녹임. 2일간 방치 후 여과 한다.

(1) 페링시액 A,B 혼합용액의 역가 적정

페링시액 A, B를 5ml 씩 취하여 200ml의 삼각플라스크에 넣고 증류수 40ml와 표준 전화당용액을 적정량(황산동의 색이 퇴색)을 가하여 2분간 끓인 후, 메틸렌블루 지시약을 가하고 표준 전화당용액(본 액 10ml는 전화당 0.05g을 함유)을 적하한다. 1% 메틸렌 블루시액을 지시약으로 청색이 사라지고 적색이 나타날 때를 종말점으로 한다. 이 때 표준전화당 용액 소비량이 10ml 일 때 역가가 1.0이다.

$$\text{표준 전화당용액의 역가} = \text{소비 ml} / 10$$

다) 표준전화당 용액 : sucrose 4.75g을 증류수 75ml에 용해하여 염산 10ml를 가하여 20℃이하에서 24시간 방치한 후(25~27℃ 12시간 방치) 염산을 묽은 수산화나트륨(10%)으로 정확히 중화하고 증류수를 가하여 전량을 1,000ml로 한다.

라) 2.5% HCl 용액 : 염산(37%) 6.76ml에 증류수 가해 100ml 희석한다.

마) 10% NaOH 용액

바) 포화초산납 용액 : $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 의 포화수용액

사) 1% 메틸렌블루지시약

3) 시료 전처리

가) 시료를 1~2g정도를 정확히 칭량하여 2.5% HCl 100ml를 넣고 37℃ 수욕조에서 24시간 분해(전화)시킨 후 여과한다.

나) 여액을 10% NaOH로 중화(pH 8~9) 후 여과한 다음 다시 2ml의 포화초산납 첨가 후 20분후 여과한다.(여과기에 NO.5A를 깔고 흡입여과)

다) 여액에 NaOH 0.7g을 가한 후 10~15분간 교반 후 증류수로 250ml로 맞춘 것을 시액으로 사용한다.

라) 페링시액 A, B를 5ml씩 취하여 300ml 삼각플라스크에 넣고 증류수 40ml를 첨가한 후 시액 다) 15ml를 넣는다.

마) 가열기에 올려놓은 후 3분 이내에 끓도록 한다. 끓고 난 후 메틸렌블루 지시약 3~4방울을 넣고 청색이 없어질 때까지 시액(sample solution)으로 적정한다.

※ 주의 : 공기의 역투입으로 인해 반응된 펄링 시액이 다시 환원될 우려가 있으므로 적정 중 계속 끓여 수증기의 발생이 이루어져야 한다.

4) 계산식

$$\text{총당}(\%) = A \times 250 \times f / [1,000 \times \text{시료량}(\text{g})]$$

A : 시액 소비ml에 대한 레인-에이논 정량값

f : 펄링용액의 factor

※ 라인-에이논 정량표

검액의 소요량(ml)	검액 100ml중의 전화당량(mg)	검액의 소요량(ml)	검액 100ml중의 전화당량(mg)	검액의 소요량(ml)	검액 100ml중의 전화당량(mg)
16.0	316.6	19.4	262.0	22.8	224.1
16.1	314.7	19.5	260.7	22.9	223.2
16.2	312.7	19.6	259.5	23.0	222.2
16.3	310.8	19.7	258.2	23.1	221.3
16.4	308.9	19.8	257.0	23.2	220.4
16.5	307.0	19.9	255.7	23.3	219.5
16.6	305.2	20.0	254.5	23.4	218.6
16.7	303.4	20.1	253.3	23.5	217.8
16.8	301.5	20.2	252.2	23.6	216.9
16.9	299.8	20.3	251.0	23.7	216.0
17.0	298.0	20.4	249.9	23.8	215.1
17.1	296.4	20.5	248.7	23.9	214.2
17.2	294.8	20.6	247.5	24.0	213.3
17.3	293.2	20.7	246.5	24.1	212.4
17.4	291.6	20.8	245.2	24.2	211.6
17.5	290.0	20.9	244.1	24.3	210.7
17.6	288.4	21.0	242.9	24.4	209.9
17.7	286.8	21.1	241.8	24.5	209.0
17.8	285.2	21.2	240.7	24.6	208.2
17.9	283.6	21.3	239.6	24.7	207.3
18.0	282.0	21.4	238.5	24.8	206.4
18.1	280.5	21.5	237.4	24.9	205.6
18.2	279.0	21.6	236.2	25.0	204.8
18.3	277.5	21.7	235.1	26.0	197.4
18.4	286.0	21.8	234.0	27.0	190.4
18.5	274.5	21.9	232.9	28.0	183.7
18.6	273.0	22.0	231.8	29.0	177.6
18.7	271.5	22.1	230.8	30.0	171.0
18.8	270.0	22.2	229.9	31.0	166.3
18.9	268.5	22.3	228.9	32.0	161.2
19.0	267.0	22.4	228.0	33.0	156.0
19.1	265.7	22.5	227.0	34.0	152.2
19.2	264.5	22.6	226.0	35.0	147.0
19.3	263.2	22.7	225.1		

21.21. KOH용해도

가. 원리

열처리된 대두박에서 0.2% KOH 용액에 녹는 단백질을 측정하여 원래의 단백질 값에 대한 백분율을 구한다. 이는 단백질의 질을 평가하는 방법으로 적당한 열처리는 소화율을 향상시키지만 지나친 열처리는 필수아미노산을 파괴하여 단백질의 용해도를 저해시킨다.

나. 기구

- 1) 비이커, 메스실린더
- 2) 교반기
- 3) 단백질 분석장치

다. 시약

- 1) 0.2% 수산화칼륨용액 : 85% 수산화칼륨 2.353g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.(이때 용액의 농도는 0.036N이고 이 용액 50 mL는 0.2N 황산 9 mL에 해당된다)
- 2) 조단백질 정량 시 필요한 시약

라. 분석방법

1) 시료준비

- 가) 0.5mm의 screen으로 분쇄한 대두박 시료를 준비한다.
- 나) 2개로 나눈 후 하나는 총단백질 분석에 사용하고, 나머지는 수산화칼륨 처리를 한다.

2) 수산화칼륨처리

- 가) 시료 1.5g에 0.2%의 KOH용액(평균 0.036N, pH 12.5)을 75ml 넣어준다.
- 나) 교반기를 이용하여 20분간 균질화 시킨 후 2,700 rpm에서 15분간 원심 분리한다.
- 다) 상등액을 여과하여 15 mL를 취해 단백질 정량하는 방법과 동일하게 분석을 한다.

마. 계산

$$\text{KOH용해도}(\%) = \frac{\text{KOH에 용해된 단백질}(\%) \times \text{희석배수}}{\text{총단백질}(\%)} \times 100$$

21.22. 이물 시험법

가. 채 분별법

- 1) 시험법 적용범위 : 알곡사료, 펠렛 성형 사료 등
- 2) 분석원리

사료를 체로 쳐서 제품의 일정 크기보다 월등히 작은 이물을 포집하여 육안으로 검사한다.

3) 시험조작

필요에 따라 이물의 종류를 확인하고자 할 때는 현미경으로 약 40배 정도의 저배율로 본다. 이하 이물시험에 있어서는 모두 이와 같다.

나. 여과법

1) 당밀 등

- 가) 시험법 적용범위 : 당밀, 설탕 등

나) 분석원리

검체가 액체일 때 또는 용액으로 할 수 있을 때 그 용액을 신속여과로 여과하여 여과지상의 이물을 검사한다.

다) 시험조작

검체 50 g을 취하여 물 200 mL에 녹여 그 용액을 신속여과로 여과하여 여과지상의 이물을 검사한다. 따로 열탕을 준비하여 여과지에 응고되어 잘 여과되지 아니할 때, 이 열탕으로 완전히 녹여 여과한 후 여과지에 부착된 이물을 검사한다.

2) 유지 등

- 가) 시험법 적용범위 : 동물성유지, 식물성 유지 등

나) 분석원리

검체가 액체일 때 또는 용액으로 할 수 있을 때 그 용액을 신속여과로 여과하여 여과지상의 이물을 검사한다.

다) 시험조작

검체 100 g을 1 L의 비커에 넣고 2% 염산용액 200 mL를 가하여 섞은 후 가열하여 검체가 완전히 녹으면 여과지로 여과한다. 따로 열탕을 준비하여 여과지에 지방이 응고되어 잘 여과되지 아닐 때, 이 열탕으로 완전히 녹여 여과한 후 여과지에 부착된 이물을 검사한다.

3) 대용유 등

가) 시험법 적용범위 : 대용유 등 분말형

나) 분석원리

검체가 액체일 때 또는 용액으로 할 수 있을 때 그 용액을 신속여과로 여과하여 여과지상의 이물을 검사한다.

다) 시험조작

검체 100 g을 1 L의 비커에 넣고 2% EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid)용액 100 mL를 가하여 잘 섞어서 덩어리가 없도록 한 후 저으면서 2% EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid)용액 400 mL를 천천히 가한다.저어 섞는 동안에 차차 황색의 반투명한 액체가 되며 약 30 분 방치하면 완전히 녹는다. 이를 부흐너깔때기 또는 힐슈깔때기로 흡인 여과하여 여과지상의 이물을 검사한다.

다. 와일드만 플라스크법

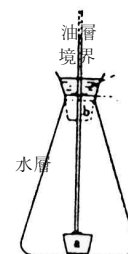
1) 시험법 적용범위

곤충 및 동물의 털과 같이 물에 잘 젖지 아니하는 가벼운 이물검출에 적용한다.

2) 분석방법 사료의 용액에 소량의 휘발유나 피마자유 등 물과 섞이지 않는 포집액을 넣고 세계 교반한 후 방치해 놓으면 물에 잘 젖지 않는 가벼운 이물이 유기용매층에 떠오르는 성질을 이용하여 이물을 분리, 포집 후 검사한다.

3) 시험조작

가) 와일드만플라스크(Wildeman flask) 중에 검체를 물 및 기타 지정액(1 L의 플라스크에서는 600 mL, 2 L에서는 900 mL)과 섞어 다시 휘발유(무색 투명한 고 납을 함유하지 아니하는 것), 피마자유 등 물과 섞이지 않는 포집액을 넣어 플라스크를 약 45℃기울여 교반봉으로 1분에 약 200~250회 저어 섞는다 (이 때 공기의 기포가 들어가지 않도록 주의한다).



나) 그 후 20분간은 수분마다 저어 섞고 약 30분간 방치한 다음 두 액층의 경계가 그림에서와 같은 위치에 올 때까지 물 또는 지정액을 조용히 부어 넣고 고무마개로 플라스크의 기벽을 긁어 부착해 있는 기름방울을 부상시켜 더욱 손잡이를 급속도로 회전시켜 고무마개에 부착된 검체와 기름을 털어내고 마개를 끌어 올려 플라스크의 목에 밀착시키고 이물을 포함한 기름층을 소량의 하층액과 함께 비커에 기울여 취하고 알코올 및 물로 막대기, 고무마개 및 플라스크 내벽을 씻어 그 씻은 액을 비커에 합쳐 그 액을 흡인 여과하여 여과지상에 이물이 있는가를 검사한다.

다) 현미경으로 검사하고자 할 때는 글리세린·알코올혼액(1 : 1) 약 5 mL를 담은 페트리접시에 여과지를 옮겨 잘 적신 후 검사한다. 다시 와일드만플라스크(Wildeman flask)에 포집액 10~20 mL를 넣어 잘 저어 섞고 때때로 하층액을 저으면서 약 10~20분간 방치한 다음 먼저와 같이 조작하여 이물을 검사한다.

라) 기울여 따라 포집한 액이 다량의 식품조직을 함유할 때 또는 여과지에 식물조직이 다량 협잡되어 현미경 검사가 어려울 때는 다시 새로운 와일드만플라스크(Wildeman flask)에 옮겨 물로 잘 혼합시켜 먼저와 같이 포집하고 식물조직을 하층액에 옮겨 포집액을 여별한다. 다만, 이 조작은 이물의 손실을 초래할 염려가 있으므로 처음의 포집조작에서 가급적 검체가 떠오르지 않게 하는 것이 중요하다. 하층액으로서 포화식염수 또는 수성알코올을 사용하면 식물 조직의 떠오름을 어느 정도 방지할 수 있다.

라. 침강법

1) 시험법 적용범위

쥐똥, 토사 등의 비교적 무거운 이물의 검사에 적용한다.

2) 분석원리

검체에 비중이 큰 액체를 가하여 교반한 후 그 액체보다 비중이 큰 것은 바닥에 가라앉고 이보다 비중이 작은 식품의 조직 등은 위에 떠오르므로, 상층액을 버린 후 바닥의 이물을 검사한다.

3) 시험조작

가) 검체에 클로로포름(또는 사염화탄소, 에테르 또는 메탄올 등을 가하여 그 비중을 1.49로 한 것)을 가하여 저어 섞으면 이물은 용기의 밑에 가라앉는다.

나) 바닥의 이물이 떠오르지 않게 조심하여 상층액을 기울여 버리고 바닥에는 클로로포름 소량과 이물만 남게 하고 이를 흡인 여과하여 여과지상에 이물이 있는가를 검사한다. 현미경검사를 하고자 할 때는 글리세린·알코올 혼액(1:1)을 넣은 페트리접시에 여과지를 옮겨 잘 적신 후 검사한다.

마. 금속성 이물(씻가루)

1) 시험법 적용범위

분말, 펠렛, 액상 등

* 분쇄공정을 거친 원료를 사용하거나 분쇄공정을 거친 제품에 한한다. 단, 제조공정 과정에서 혼입된 경우가 아닌 사료에 천연적으로 함유된 자연유래광물질은 제외한다.

2) 기구

건조기, 회화로, 봉자석(10,000가우스 자력), 비닐봉지, 전자저울, 비이커, 표준망체(1.4×1.4mm), 여과지, 유리막대

3) 방법

가) 사료 1kg을 무게를 재어 취한다.(W)

나) 사료를 넓게 펼친 다음 비닐을 씌운 봉자석(10,000가우스 자력)으로 10분간 저어 준다.

다) 봉자석에 달라붙은 물질을 증류수로 씻어 비이커에 모은다.

라) 비이커에 모은 물질이 알갱이가 없도록 유리막대로 잘 풀어준다.

마) 30분 이상 정치 후 여과하여 불용성물질을 600℃ 회화로에서 2시간 회화 한다.

바) 회화한 시료를 물에 용해시킨 후 미리 무게를 재어 놓은 여과지(F1)로 여과한다.

사) 여과지를 135℃ 건조기에서 2시간 건조 후 무게를 잰다.(F2)

아) 실험이 끝난 씻가루를 자력제거장치로 자력을 제거한 후 표준망체(1.4×1.4mm)로 걸러 통과하지 않고 남아 있는 씻가루의 크기를 측정한다.

4) 계산

$$\text{씻가루} = (F2 - F1) / W \times 100$$

* 필요에 따라 반복 실험을 한다.

22장. 동시다성분

22.1. 잔류농약, 동물용의약품, 곰팡이독소 동시 다성분 분석법

I. 잔류농약, 동물용의약품, 곰팡이독소 동시 다성분 분석법-제1그룹

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류 등) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석대상 성분

○ 기체크로마토그래프 분석대상

잔류농약	15	Cyprodinil	30	Indoxacarb
1 Alachlor	16	DDT(4 isomer)	31	Isofenphos
2 Aldrin, Dieldrin	17	Deltamethrin(tralomethrin)	32	Lindane(gamma-BHC)
3 Atrazine	18	Difenoconazole(2 isomer)	33	Methidathion
4 BHC(alpha,beta,delta)	19	Dimethoate	34	Parathion
5 Bifenthrin	20	Disulfoton	35	Pendimethalin
6 Chlorantraniliprole	21	Endrin	36	Permethrin(2 isomer)
7 Chlorfenapyr	22	EPN	37	Phorate
8 Chlorfenvinphos(2 isomer)	23	Ethion	38	Piperonyl butoxide
9 Chlorobenzilate	24	Fenitrothion	39	Prochloraz
10 Chlorpropham	25	Fenpropathrin	40	Propiconazole(2 isomer)
11 Chlorpyrifos-methyl	26	Fenthion	41	Quintozone
12 Cyfluthrin(4 isomers)	27	Fenvalerate(2 isomer)	42	Simazine
13 Cyhalothrin	28	Fipronil	43	Terbufos
14 Cypermethrin(4 isomers)	29	Heptachlor(2 isomer)	44	Triadimenol

○ 액체크로마토그래프 분석대상

잔류농약	54	Thiabendazole	107	Praziquantel
1 Abamectin B1	55	Thiacloprid	108	Pyrimethamine
2 Acephate	56	Triadimefon	109	Ractopamine
3 Aldicarb	57	Tricyclazole	110	Rifaximin
4 Azinphos-methyl	58	Trifloxystrobin	111	Ronidazole
5 Azoxystrobin	동물용의약품		112	Roxithromycin
6 Boscalid	59	Acetanilide	113	Salinomycin
7 Carbaryl	60	Albendazole	114	Scopolamine
8 Carbendazim	61	Altrenogest	115	Spiramycin
9 Carbofuran	62	Antipyrine	116	Sulfabenzamide
10 Chlorpyrifos	63	Berberine	117	Sulfacetamide
11 Clethodim	64	Chloramphenicol	118	Sulfachlorpyridazine
12 Clothianidin	65	Clenbuterol	119	Sulfaclozine
13 Cyanazine	66	Clindamycin	120	Sulfadiazine
14 Cycloxydime	67	Clopidol	121	Sulfadimethoxine
15 Cyproconazole(I, II)	68	Closantel	122	Sulfadoxine
16 Diazinon	69	Cyproheptadine	123	Sulfaethoxypyridazine
17 Dichlorvos(DDVP)	70	Dapsone	124	Sulfaguanidine
18 Diflubenzuron	71	Decoquinat	125	Sulfamerazine
19 Dimethenamid	72	Diclazuril	126	Sulfameter
20 Edifenphos	73	Dicloxacin	127	Sulfamethazine
21 Etoxazole	74	Difloxacin	128	Sulfamethoxazole
22 Fenarimol	75	Dimetridazole	129	Sulfamethoxypyridazine
23 Fenbuconazole	76	Diphenhydramine	130	Sulfamonomethoxine
24 Fenobucarb	77	DL-methylephedrine	131	Sulfamoxole
25 Flubendiamide	78	Emamectin	132	Sulfaphenazole
26 Fludioxonil	79	Erythromycin	133	Sulfapyridine
27 Flufenoxuron	80	Febantel	134	Sulfaquinoxaline
28 Fluopicolide	81	Fenbendazole	135	Sulfasomidine

29	Flusilazole	82	Florfenicol	136	Sulfathiazole
30	Flutriafol	83	Fluazuron	137	Tetramisole
31	Fluxapyroxad	84	Ivermectin	138	Thiamphenicol
32	Haloxypop	85	Josamycin	139	Tiamulin
33	Imazalil	86	Kitasamycin	140	Tildipirosin
34	Imidacloprid	87	Lasalocid	141	Tilmicosin
35	Isoprocarb	88	Levamisole	142	Tinidazole
36	Kresoxim-methyl	89	Loperamide	143	Toltrazuril
37	Malathion	90	Maduramycin	144	Triclabendazole
38	Methiocarb	91	Malachiate green	145	Trimethoprim
39	Methomyl	92	Mebendazole	146	Tripelelennamine
40	Methoprene	93	Metoclopramide	147	Tylosin
41	Methoxyfenozide	94	Metronidazole	148	Valnemulin
42	Myclobutanil	95	Monensin	149	Virginiamycin
43	Oxydemeton-methyl	96	Naloxone	150	Yohimbine
44	Phenthoate	97	Nandrolone	곰팡이독소	
45	Pirimicarb	98	Narasin	151	Aflatoxin(B1,B2,G1,G2)
46	Pirimiphos-methyl	99	Nicarbazine	152	Ochratoxin A
47	Pyraclostrobin	100	Nitrovin	153	Deoxynivalenol
48	Pyridaben	101	Novobiocin	154	Fumonisin(B1,B2)
49	Pyrimethanil	102	Oleandomycin	155	T-2 toxin
50	Spirotetramat	103	Ormetoprim	156	HT-2 toxin
51	Sulfoxaflor	104	Oxacillin	157	Zeralenone
52	Tebuconazole	105	Oxfendazole		
53	Tetraconazole	106	Phenacetin		

다. 분석원리

균질화한 시료를 EDTA와 아세트니트릴로 추출하여 기체크로마토그래프(GC-MS/MS) 및 액체크로마토그래프(LC-MS/MS)로 분석한다. 시료 매트릭스의 영향을 최소화하기 위하여 매트릭스 보정 검량법(matrix matched calibration) 또는 표준물질첨가법 (standard addition method)을 활용하여 분석한다.

라. 장치

기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS/MS) 및 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

마. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다.
- 4) 혼합표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.
- 5) 보호제 원액: 솔비톨 500 mg을 아세트니트릴/물 혼합액(5:5, v/v) 10 mL로 녹인다. D-(+)-gluconic acid- δ -lactone 500 mg을 아세트니트릴:물 혼합액(6 : 4, v/v) 10 mL로 녹인다. 시킴산 500 mg을 아세트니트릴:물 혼합액(6:4, v/v) 10 mL로 녹인다. 3-ethoxy-1,2-propanediol은 녹이지 않은 채로 사용한다.

※ 주의: 물에 먼저 녹인 후 유기용매로 희석한다.

- 6) 보호제 혼합용액: 3-ethoxy-1,2-propanediol 0.2 g을 칭량하여 10 mL 부피플라스크에 담는다. D-(+)-gluconic acid- δ -lactone 원액 2 mL, 솔비톨 원액 1 mL, 시킴산(shikimic acid) 원액 1 mL을 부피플라스크에 첨가한다. 아세트니트릴 : 물 혼합액(7:3, v/v)으로 부피플라스크를 10 mL 정용 후 4℃에서 보관한다. 사용 전에 위 보관 용액 : 5% 포름산을 함유한 아세트니트릴(3:1, v/v)로 미리 혼합하여 표준용액과 시료액에 첨가한다.
- 7) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

바. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 5 g의 균질화된 시료를 50 mL 용량의 원심분리관에 칭량 하고 0.2 M Ethlenediamine – tetraaceticacid (EDTA) 15 mL를 넣고 혼합한 후 1시간 동안 방치한다.
- 2) 아세트니트릴 10 mL을 넣은 뒤 교반기를 사용하여 1분동안 강하게 진탕한다.
- 3) QuEChERS(MgSO₄ 4 g, NaCl 1 g, Na₃C₆H₅O₇ 1 g, Na₂C₆H₆O₇ 0.5 g) 시약을 첨가하여 진탕 후 3,000 G로 5분간 원심분리한 후 아세트니트릴층을 아래 5) 시료액의 LC-MS/MS 시료추출액으로 사용한다.
- 4) GC-MS/MS의 경우 상등액 1 mL을 PSA 25 mg, MgSO₄ 150 mg가 미리 담겨져 있는 2mL 원심분리관에 넣고 1분간 진탕 후 10,000 G에서 2분간 원심분리한 다음 멤브레인 필터(0.2 µm)로 여과하여 아래 5) 시료액의 시료추출액으로 사용한다.
- 5) 정량 분석용 매질보정 검량법(matrix matched calibration)에 따른 농도별 표준물질과 시료액은 아래의 예를 참고하여 만든다.

※ 무처리 시료추출액: 시료구와 동일한 품목이면서 잔류농약, 동물용의약품, 곰팡이독소 성분이 검출되지 아니한 시료를 ‘바.’에 따라 추출 및 정제한다

○ GC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질							시료액
	1	2	3	4	5	6	7	
목적 농도	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	25 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	200 µg/L	
조제 방법	AP 혼합액 40 µL	AP 혼합액 40 µL	AP 혼합액 40 µL	AP 혼합액 40 µL	AP 혼합액 40 µL	AP 혼합액 40 µL	AP 혼합액 40 µL	AP 40 µL
	아세트니트릴 100 µL	아세트니트릴 100 µL	아세트니트릴 100 µL	아세트니트릴 100 µL	아세트니트릴 100 µL	아세트니트릴 100 µL	아세트니트릴 100 µL	아세트니트릴 150 µL
	STD 20 µg/L 50 µL	STD 100 µg/L 50 µL	STD 200 µg/L 50 µL	STD 500 µg/L 50 µL	STD 1000 µg/L 50 µL	STD 2000 µg/L 50 µL	STD 4000 µg/L 50 µL	
	무처리 시료추출액 810 µL	무처리 시료추출액 810 µL	무처리 시료추출액 810 µL	무처리 시료추출액 810 µL	무처리 시료추출액 810 µL	무처리 시료추출액 810 µL	무처리 시료추출액 810 µL	시료 추출액 810 µL

※ AP : 마. 의 6) 보호제 혼합용액

○ LC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질						시료액
	수준 1	수준 2	수준 3	수준 4	수준 5	수준 6	
목표농도	1 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L	50 µg/L	100 µg/L	
조제 방법	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 200 µL	완충용액 600 µL+ 아세트니트릴 300 µL
	STD 10 µg/L 100 µL	STD 50 µg/L 100 µL	STD 100 µg/L 100 µL	STD 200 µg/L 100 µL	STD 500 µg/L 100 µL	STD 1000 µg/L 100 µL	
	무처리 시료추출액 100 µL	무처리 시료추출액 100 µL	무처리 시료추출액 100 µL	무처리 시료추출액 100 µL	무처리 시료추출액 100 µL	무처리 시료추출액 100 µL	시료추출액 100 µL

※ 완충용액 : 포름산암모늄 100 mM을 함유한 물(포름산 용액을 이용하여 pH 4~4.5로 맞춤)

사. 시험조작

- 1) 기체크로마토그래프-질량분석기(GC-MS/MS)의 분석 조건

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

나) 주입부: Electron ionization(EI) 또는 이와 동등한 방식

다) 이동상 가스(carrier gas) 및 유속: He, 2.25 mL/분

라) 주입량: 1 μL

마) 온도: 250℃

바) 주입부: Splitless mode

사) 오븐: 90℃에서 시료액을 주입하고 3분간 유지한 후 20℃/min 비율로 120℃까지 상승시키고 8℃/min 비율로 300℃까지 상승시켜 3분간 유지

아) Ion source: 250℃

○ GC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

번호	분석성분 (Compound)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	관측질량 (Exact mass)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌 에너지 (Collision energy, eV)
1	알라클로르 (Alachlor)	15.4	269.8	269.1	188	131	20
						130	40
2	알드린 (Aldrin)	16.2	364.9	361.8	263	228	35
						192	45
	디엘드린 (Dieldrin)	19.1	380.9	380.9	263	228	25
						193	35
3	아트라진 (Atrazine)	13.4	215.7	215.1	215	58	10
						173	5
4	비에이치씨-알파 (BHC-alpha)	12.8	290.8	287.8	219	183	10
						145	20
	비에이치씨-베타 (BHC-beta)	13.5	290.8	287.8	219	183	10
						145	20
	비에이치씨-델타 (BHC-delta)	14.2	290.8	287.8	219	183	10
						145	20
5	비펜트린 (Bifenthrin)	21.6	422.9	422.1	181	166	20
					166	164	30
6	클로란트라닐리프롤 (Chlorantraniliprole)	21.8	483.2	483.2	278	249	20
						215	30
7	클로르페나피르 (Chlorfenapyr)	19.2	407.6	405.9	249	112	24
					247	227	15
8	클로르펜빈포스-시스 (Chlorfenvinphos-cis)	17.1	359.6	359.6	295	267	5
					267	159	20
	클로르펜빈포스-트랜스 (Chlorfenvinphos-trans)	17.4	359.6	359.6	295	267	5
					267	159	20
9	클로로벤질레이트 (Chlorobenzilate)	19.4	325.2	324.0	251	139	15
						111	35
10	클로르프로팜 (Chlorpropham)	12.1	213.7	213.0	213	171	10
						127	20
11	클로르피리포스-메틸 (Chlorpyrifos-methyl)	15.2	322.5	320.8	286	271	25
						93	25

12	사이플루트린 (Cyfluthrin)	24.5	434.3	433.0	226	206	10
						199	15
13	사이할로트린 (Cyhalothrin)	22.6	449.9	449.1	208	181	5
					197	141	10
14	사이퍼메트린 (Cypermethrin)	24.8	416.3	415.0	165	91	10
					163	127	6
15	사이프로디닐 (Cyprodinil)	17.0	225.3	225.1	224	208	20
						118	40
16	o,p-디디티 (o,p-DDT)	19.6	354.5	354.5	235	199	25
						165	25
	p,p-디디디 (p,p-DDD)	19.6	320.0	320.0	235	199	35
						165	35
	p,p-디디이 (p,p-DDE)	18.6	318.0	318.0	246	211	30
						176	30
	p,p-디디티 (p,p-DDT)	20.4	354.5	354.5	235	199	25
						165	25
17	델타메트린 (Deltamethrin)	26.8	505.2	502.9	253	172	10
						93	20
18	디페노코나졸 (Difenoconazole)	26.4	406.3	405.0	323	265	15
						202	40
19	디메토에이트 (Dimethoate)	13.2	229.3	229.3	125	79	20
						47	20
20	다이설포톤 (Disulfoton)	14.2	274.4	274.4	186	97	15
					142	109	15
21	엔드린 (Endrin)	19.3	380.9	377.8	263	228	20
						193	40
22	이피엔 (EPN)	21.6	323.3	323.0	157	110	20
						77	20
23	에티온 (Ethion)	19.7	384.5	383.9	231	175	15
						157	15
24	페니트로티온 (Fenitrothion)	15.9	277.2	277.0	277	260	10
						109	10
25	펜프로파트린 (Fenpropathrin)	21.8	349.4	349.1	265	210	20
						89	40
26	펜티온 (Fenthion)	16.4	278.3	278.0	278	125	15
						109	15
27	펜발러레이트 (Fenvalerate)	26.0	419.9	419.1	225	149	9
						119	18
28	피프로닐 (Fipronil)	17.5	437.1	435.9	367	255	30
						213	30
29	헵타클로르 (Heptachlor)	15.4	373.3	369.8	272	237	20
						235	20
30	인독사카브 (Indoxacarb)	26.8	527.8	527.0	203	134	12
					167	106	25
31	아이소펜포스 (Isofenphos)	17.4	345.4	345.1	213	185	10
						121	10
32	린단 (Lindane)	13.6	290.8	287.8	219	183	20
						145	20

33	메티다티온 (Methidation)	17.8	302.3	301.9	145	85	5
						58	15
34	파라티온-에틸 (Parathion-ethyl)	16.4	291.3	291.3	291	109	10
						81	30
35	펜디메탈린 (Pendimethalin)	17.2	281.3	281.1	252	209	5
						191	10
36	퍼메트린 (Permethrin)	23.7	391.3	390.0	183	155	10
					163	91	15
37	포레이트 (Phorate)	12.7	260.4	260.4	260	75	10
					121	47	30
38	피페로닐 뷰톡사이드 (Piperonyl butoxide)	21.0	338.4	338.4	176	131	15
						103	25
39	프로클로라즈 (Prochloraz)	24.1	376.7	375.0	308	70	15
					180	138	10
40	프로피코나졸 (Propiconazole)	20.3	342.2	341.0	259	191	10
						69	10
41	퀸토젠 (Quintozene)	13.7	295.3	292.8	295	237	20
					237	119	25
42	시마진 (Simazine)	13.3	201.7	201.7	201	186	15
						173	15
43	터부포스 (Terbufos)	13.8	288.4	288.4	231	175	30
						129	30
44	트리아디메놀 (Triadimenol)	17.5	295.8	295.1	168	70	10
					128	65	20

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

2) 액체크로마토그래프·질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건

가) 컬럼: C18 (3 mm × 150 mm, 3 μm) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구매

- A 이동상 : 0.1% 포름산과 5 mM 포름산암모늄 함유한 물
- B 이동상: 0.1% 포름산과 5 mM 포름산암모늄 함유한 메탄올

다) 농도구매조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	95	5
1.0	95	5
18.0	5	95
22.0	5	95
22.1	95	5
30.0	95	5

라) 이동상 유속: 0.3 mL/분

마) 컬럼 온도: 40℃

바) 주입량: 5 μL

사) 이온화 방식: Electrospray ionization(positive, negative)

○ LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
1	아바멕틴 B1 (Abamectin B1)	+	22.8	873.0	890	305	39
						145	51
2	아세페이트 (Acephate)	+	7.4	183.2	184	143	13
						125	25
3	알디카브 (Aldicarb)	+	14.4	196.2	208	116	13
						89	23
4	아진포스-메틸 (Azinphos-methyl)	+	17.9	317.3	318	132	19
						160	19
5	아зок시스트로빈 (Azoxytobin)	+	17.9	403.3	404	372	19
						344	31
6	보스칼리드 (Boscalid)	+	18.3	343.2	343	307	27
						140	27
7	카바릴 (Carbaryl)	+	16.2	201.2	202	145	16
						127	39
8	카벤다짐 (Carbendazim)	+	10.8	191.1	192	160	27
						132	41
9	카보퓨란 (Carbofuran)	+	15.6	221.2	222	123	29
						165	17
10	클로르피리포스 (Chlorpyrifos)	+	22.1	350.5	350	97	43
						198	43
11	클레토딤 (Clethodim)	+	20.7	359.9	360	164	27
						77	99
12	클로티아니딘 (Clothianidin)	+	12.1	249.6	250	169	17
						132	17
13	사이클록시딤 (Cycloxydim)	+	21.2	325.5	325	280	19
						180	31
14	시아나진 (Cyanazine)	+	15.2	240.6	240	214	25
						68	57
15	사이프로코나졸(I) (Cyproconazole(I))	+	18.7	291.7	292	70	35
						125	39
	사이프로코나졸(II) Cyproconazole(II)	+	18.8	291.7	292	70	35
						125	37
16	다이클로르보스 (Dichlorvos)	+	15.5	220.9	221	109	23
						127	21
17	다이아지논 (Diazinon)	+	20.3	304.3	305	169	27
						153	29
18	디플루벤주론 (Diflubenzuron)	+	19.6	310.6	311	158	19
						141	45
19	디메테나미드 (Dimethenamide)	+	18.4	275.7	276	244	19
						168	31
20	에디펜포스 (Edifenphos)	+	20.0	310.4	311	109	41
						111	29

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
21	에톡사졸 (Etoxazole)	+	22.1	359.4	360	141	43
						63	129
22	페나리몰 (Fenarimol)	+	19.2	331.2	331	268	27
						81	27
23	펜부코나졸 (Fenbuconazole)	+	19.3	336.8	337	125	41
						70	35
24	페노부카브 (Fenobucarb)	+	18.1	207.2	208	95	17
						77	51
25	플로벤디아마이드 (Flubendiamide)	+	19.3	682.3	683	407	27
						255	87
26	플루디옥소닐 (Fludioxonil)	+	18.5	248.1	266	229	21
						158	47
27	플루페녹수론 (Flufenoxuron)	+	21.7	488.8	489	158	27
						141	71
28	플루오피콜라이드 (Fluopicolide)	+	18.6	383.5	383	173	35
						109	91
29	플루실라졸 (Flusilazole)	+	19.5	315.3	316	165	39
						247	23
30	플루트리아폴 (Flutriafol)	+	16.7	301.2	301	70	39
						95	69
31	플록사피록사드 (Fluxapyroxad)	+	18.5	381.2	382	362	21
						342	29
32	할록시포프 (Haloxypop)	+	19.6	361.7	361	91	47
						315	25
33	이마자릴 (Imazalil)	+	16.0	297.1	297	159	33
						69	35
34	이미다클로프리드 (Imidacloprid)	+	11.9	255.6	256	209	21
						175	25
35	아이소프로카브 (Isoprocab)	+	16.9	193.2	194	95	19
						137	13
36	크레속심-메틸 (Kresoxim-methyl)	+	20.1	313.3	314	116	19
						131	27
37	말라티온 (Malathion)	+	18.6	330.3	331	127	17
						284	11
38	메티오카브 (Methiocarb)	+	18.4	225.3	226	121	23
						169	13
39	메소밀 (Methomyl)	+	10.5	162.2	163	87	15
						64	9
40	메소프렌 (Methoprene)	+	23.67	310.4	311	279	9
						191	17
41	메톡시페나자이드 (Methoxyfenozide)	+	18.6	368.5	369	149	21
						133	31

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
42	마이클로부타닐 (Myclobutanil)	+	18.6	288.7	289	70	27
						125	41
43	옥시 데메톤-메틸 (Oxydemeton-methyl)	+	10.0	246.3	246	169	19
						109	37
44	펜토에이트 (Phenthoate)	+	19.9	320.3	321	79	55
						135	25
45	피리미카브 (Pirimicarb)	+	15.5	238.2	239	72	34
						182	21
46	피림포스-메틸 (Pirimiphos-methyl)	+	20.6	305.3	306	108	39
						164	29
47	피라클로스트로빈 (Pyraclostrobin)	+	20.3	387.8	388	163	29
						194	19
48	피리다벤 (Pyridaben)	+	23.0	364.9	365	147	31
						309	31
49	피리메타닐 (Pyrimethanil)	+	18.5	199.2	200	107	31
						82	35
50	스피로테트라멧 (Spirotetramat)	+	18.9	373.4	374	216	45
						302	23
51	설펡사플로르 (Sulfoxafloer)	+	13.1	277.2	278	174	17
						154	37
52	테부코나졸 (Tebuconazole)	+	19.9	307.8	308	70	41
						125	41
53	테트라코나졸 (Tetraconazole)	+	18.9	372.1	372	159	47
						70	37
54	티아벤다졸 (Thiabendazole)	+	12.1	201.2	202	131	47
						175	37
55	티아클로프리드 (Thiacloprid)	+	13.6	252.7	253	126	27
						186	19
56	트리아다이메폰 (Triadimefon)	+	18.6	293.9	294	197	19
						225	19
57	트리사이클라졸 (Tricyclazole)	+	14.3	189.2	190	163	31
						136	37
58	트리플록시스트로빈 (Trifloxystrobin)	+	20.8	408.3	409	186	23
						206	21
59	아세타닐드 (Acetanilide)	+	12.4	135.1	136	76	39
						50	57
						43	47
60	알벤다졸 (Albendazole)	+	18.1	265.3	266	234	29
						191	47
						159	47
61	알트레노게스트 (Altrenogest)	+	19.8	310.4	311	227	25
						159	30
						251	20

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
62	안티피린 (Antipyrine)	+	12.1	188.2	189	104	20
						55	33
						58	30
63	베버린 (Berberine)	+	13.6	336.4	336	278	40
						303	28
						262	46
64	클로라메페니콜 (Chloramphenicol)	-	13.7	323.1	321	257	-15
						152	-24
						194	-17
65	클렌부테롤 (Clenbuterol)	+	11.6	277.2	277	203	23
						168	41
						139	61
66	실린다마이신 (Clindamycin)	+	14.3	424.9	425	126	34
						377	20
						335	29
67	클로피돌 (Clopidol)	+	10.6	192.0	193	51	65
						88	39
						50	99
68	클로산텔 (Closantel)	-	23.0	663.1	660	126	-122
						344	-52
						314	-48
69	사이프로페나파딘 (Cyproheptadine)	+	16.1	287.4	288	96	22
						58	35
						70	30
70	답슨 (Dapsone)	+	10.7	248.4	249	156	19
						92	33
						108	27
71	데토퀴네이트 (Decoquinat)	+	22.9	417.5	418	372	34
						204	57
						232	48
72	디클라주릴 (Diclazuril)	-	19.8	407.6	404	333	-26
						42	-80
						34	-74
73	디클록사실린 (Dicloxacillin)	+	17.4	470.3	469	160	17
						310	21
						114	57
74	디플록사신 (Difloxacin)	+	11.6	399.4	400	299	30
						356	25
						382	20
75	디메트리다졸 (Dimetridazole)	+	9.9	141.1	142	95	31
						81	37
						54	47

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
76	디펜하이드라민 (Diphenhydramine)	+	14.5	255.3	256	167	23
						152	53
						115	79
77	DL-메틸페드린 (DL-methylephedrine)	+	8.8	179.3	180	117	25
						146	20
						162	20
78	엠마멕틴 (Emamectin)	+	20.6	886.1	886	158	43
						126	81
						108	129
79	에리스로마이신 (Erythromycin)	+	16.1	733.9	734	286	29
						83	60
						576	20
80	페반텔 (Febantel)	+	19.6	446.4	447	383	27
						415	19
						45	60
81	펜벤다졸 (Fenbendazole)	+	19.2	299.4	299	268	31
						159	49
						104	75
82	플로르페니콜 (Florfenicol)	-	11.9	357.0	356	336	-18
						185	-28
						119	-50
83	플루아주론 (Fluazuron)	+	21.7	506.2	506	141	81
						158	29
						113	115
84	이벌멕틴 (Ivermectin)	+	24.4	875.1	892	569	21
						307	35
						551	31
85	조사마이신 (Josamycin)	+	16.9	828.0	828	174	41
						109	50
						83	60
86	키타사마이신 (Kitasamycin)	+	15.9	771.8	772	109	38
						174	30
						83	45
87	라살로사이드 (Lasalocid)	+	23.3	612.8	613	377	53
						577	47
						318	19
88	레바미솔 (Levamisole)	+	8.9	204.3	204	178	31
						91	51
						77	75
89	로퍼라마이드 (Loperamide)	+	16.7	477.0	477	266	37
						210	69
						165	127

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
90	마두라마이신 (Maduramycin)	+	24.7	917.4	939	877	39
						895	71
						859	87
91	말라카이트 그린 (Malachiate green)	+	16.6	364.9	329	208	65
						312	67
						163	125
92	메벤다졸 (Mebendazole)	+	17.1	295.3	295	264	31
						77	77
						105	45
93	메토클로프라마이드 (Metoclopramide)	+	11.0	299.4	300	183	26
						140	44
						227	16
94	메트로니다졸 (Metronidazole)	+	8.6	171.2	172	82	35
						110	31
						98	29
95	모넨신 (Monensin)	+	23.3	692.4	693	675	55
						461	73
						479	73
96	날록손 (Naloxone)	+	8.2	327.3	328	212	51
						253	37
						268	37
97	난드로론 (Nandrolone)	+	18.4	274.4	275	109	26
						80	45
						239	20
98	나라신 (Narasin)	+	20.8	765.0	786	431	71
						531	65
						279	73
99	니카바진 (Nicarbazine)	-	19.0	426.4	300	137	-24
						78	-68
						96	-26
100	니트로빈 (Nitrovin)	+	15.0	360.3	361	154	51
						115	77
						153	67
101	노보바이오신 (Novobiocin)	+	20.9	612.6	613	189	41
						133	85
						218	19
102	올렌도마이신 (Oleandomycin)	+	14.8	687.9	688	158	33
						544	25
						116	67
103	오르메토피림 (Ormetoprim)	+	10.4	274.3	275	259	37
						123	33
						115	85

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
104	옥사실린 (Oxacillin)	+	16.4	401.4	402	160	17
						243	19
						113	49
105	옥펜다졸 (Oxfendazole)	+	15.1	315.4	316	159	41
						191	29
						284	20
106	페나세틴 (Phenacetin)	+	14.3	179.2	180	110	20
						92	30
						65	35
107	프라지콰텔 (Praziquantel)	+	18.4	312.4	313	203	19
						83	27
						174	30
108	피리메타민 (Pyrimethamine)	+	13.3	248.0	248	177	41
						128	65
						127	83
109	락토파민 (Ractopamine)	+	10.6	301.2	302	121	31
						107	45
						284	17
110	리파시민 (Rifaximin)	+	19.1	785.9	786	754	33
						95	101
						151	71
111	로니다졸 (Ronidazole)	+	8.5	200.2	201	140	17
						55	29
						110	23
112	록시트로마이신 (Roxithromycin)	+	17.4	837.0	837	158	41
						116	87
						679	31
113	살리노마이신 (Salinomycin)	+	24.7	773.0	773	431	73
						531	65
						265	73
114	스코폴라민 (Scopolamine)	+	9.0	303.4	304	138	30
						156	20
						102	45
115	설파클로피리다진 (Sulfachlorpyridazine)	+	11.4	284.7	285	156	30
						108	25
						92	25
116	스피라마이신 (Spiramycin)	+	12.6	843.0	422	174	37
						101	81
						142	63
117	설파벤다자마이드 (Sulfabenzamide)	+	12.7	276.3	276	156	15
						92	31
						65	51

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
118	설파아세트아미드 (Sulfacetamide)	+	7.9	214.2	214	156	21
						92	35
						65	60
119	설파클로진 (Sulfaclozine)	+	11.6	284.4	284	156	23
						107	35
						92	39
120	설파다이하진 (Sulfadiazine)	+	8.9	250.3	251	156	21
						108	31
						92	37
121	설파아디메톡신 (Sulfadimethoxine)	+	13.5	310.3	311	107	41
						156	27
						91	43
122	설파독신 (Sulfadoxine)	+	12.1	310.3	311	156	25
						92	39
						107	41
123	설파아세트시피리다진 (Sulfaethoxypyridazine)	+	12.9	294.3	294	92	40
						107	35
						156	20
124	설파구아니딘 (Sulfaguanidine)	+	5.0	214.2	215	156	19
						92	31
						65	49
125	설파메라진 (Sulfamerazine)	+	10.0	264.3	265	156	23
						91.9	39
						108	37
126	설파메터 (Sulfameter)	+	10.6	280.3	280	215	41
						65	69
						126	35
127	설파메타진 (Sulfamethazine)	+	10.8	278.4	279	185	25
						92	43
						124	33
128	설파메톡사졸 (Sulfamethoxazole)	+	11.6	253.3	254	155	23
						91	39
						108	33
129	설파메톡사피리다진 (Sulfamethoxypyridazine)	+	10.9	280.3	281	155	23
						108	41
						91	41
130	설파모노메톡사신 (Sulfamonomethoxine)	+	11.8	280.3	281	156	23
						108	35
						91	41
131	설파모솔 (Sulfamoxole)	+	10.4	267.3	267	92	39
						108	35
						65	67

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
132	설파페나졸 (Sulfaphenazole)	+	13.0	314.4	315	158	31
						160	28
						92	40
133	설파피리딘 (Sulfapyridine)	+	9.5	249.2	249	156	23
						108	35
						184	25
134	설파퀴녹살린 (Sulfaquinoxaline)	+	14.1	300.3	301	155	23
						92	41
						108	37
135	설파조미딘 (Sulfasomidine)	+	8.8	278.3	278	124	29
						65	73
						92	43
136	설파티아졸 (Sulfathiazole)	+	9.2	255.3	256	156	21
						92	35
						108	33
137	테트라미솔 (Tetramisole)	+	8.9	204.3	205	177	20
						91	30
						122	24
138	티아메페니콜 (Thiamphenicol)	-	10.2	356.1	354	290	-28
						185	-28
						79	-32
139	티아물린 (Tiamulin)	+	15.5	493.7	494	192	25
						119	50
						73	60
140	틸디피로신 (Tildipirosin)	+	8.3	734.0	734	98	54
						88	85
						174	46
141	틸미코신 (Tilmicosin)	+	14.2	869.0	869	174	55
						696	57
						88	119
142	티니다졸 (Tinidazole)	+	9.7	247.2	247	121	23
						82	49
						128	29
143	톨트라주릴 (Toltrazuril)	-	19.8	425.3	423	42	-58
						281	-32
						194	-58
144	트리클라벤다졸 (Triclabendazole)	+	21.0	359.6	358	274	53
						343	37
						171	71
145	트리메트로피림 (Trimethoprim)	+	9.7	290.3	291	230	31
						261	35
						123	26

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
146	트리페레나민 (Tripeleennamine)	+	13.3	255.4	256.	119	28
						91	28
						72	28
147	티로신 (Tylosin)	+	15.8	916.1	916	174	45
						88	109
						101	85
148	발네물린 (Valnemulin)	+	17.4	564.8	565	263	25
						147	49
						164	43
149	비르기니마이신 (Virginiamycin)	+	17.2	525.6	526	355	27
						109	61
						133	33
150	요힘빈 (Yohimbine)	+	12.0	354.4	355	144	39
						212	33
						143	81
151	아플라톡신 B1 (Aflatoxin B1)	+	15.4	312.2	312	284	35
						241	53
	아플라톡신 B2 (Aflatoxin B2)	+	15.0	314.2	314	287	37
						259	41
	아플라톡신 G1 (Aflatoxin G1)	+	14.4	328.2	328	200	57
						243	39
152	아플라톡신 G2 (Aflatoxin G2)	+	14.0	330.2	330	189	57
						245	43
153	오크라톡신 A (Ochratoxin A)	+	18.8	403.8	404	239	37
						102	97
154	T-2 toxin	+	17.8	466.5	484	305	19.6
						185	29
155	HT-2 toxin	+	16.8	424.5	442	263	18
						215	18
156	데옥시니발레놀 (Deoxynivalenol)	+	9.7	296.3	297	249	17
						115	89
157	푸모니신 B1 (Fumonisin B1)	+	16.5	721.8	722	334	57
						352	51
	푸모니신 B2 (Fumonisin B2)	+	18.1	705.8	706	336	53
						688	39
158	제랄레논 (Zeralenone)	-	19.0	318.3	316	174	-34
						131	-38

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

3) 검출한계
0.015 mg/kg

검출한계 별도 설정 성분	검출한계(mg/kg)
Diclazuril	0.003
Acetanilide, Aflatoxin(B1,B2,G1,G2), Clopidol, Fenbendazole,	0.006
Ivermectin, Lasalocide, Malachite green, Monensin, Ochratoxin A, Oleandomycin, Oxacillin, Spiramycin, Tildipirosin, Tilmicosin	0.03
HT-2, T-2, Zeralenone	0.06
DON, Fumonisin(B1,B2), Narasin	0.12

4) 정량한계

0.05 mg/kg

정량한계 별도 설정 성분	정량한계(mg/kg)
Diclazuril	0.01
Acetanilide, Aflatoxin(B1,B2,G1,G2), Clopidol, Fenbendazole,	0.02
Ivermectin, Lasalocide, Malachite green, Monensin, Ochratoxin A, Oleandomycin, Oxacillin, Spiramycin, Tildipirosin, Tilmicosin	0.1
HT-2, T-2, Zeralenone	0.2
DON, Fumonisin(B1,B2), Narasin	0.4

아. 정성 및 정량시험

1) 기기분석 순서

가) 안정적인 기기분석 값을 얻기 위해 검량용액이나 시료를 분석하기 전에 프라이밍(priming)한다.

- GC-MS/MS: 시료 또는 고농도 표준물질 × 2회
- LC-MS/MS: 용매 블랭크 × 3회

나) 기기 오염 여부를 확인하기 위해 무처리 시료를 분석한다.

다) 5수준 이상의 매질보정 검량용액 또는 기타 적정한 검량용액을 분석한다.

라) 데이터 품질 관리용 시료를 분석하며 일반적으로 회수율 실험한 시료를 활용한다.

마) 시료 (S1, S2, S3 ,,,, Sn)를 분석한다.

바) 다)의 5수준 이상의 검량용액을 재분석하는 협차 검량법(bracket calibration)을 활용한다.

2) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 1)의 기기분석 순서에 따른 협차 검량법을 활용한다.

다) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하 인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

3) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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

4) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

5) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용해야 한다.

※ 단, 곰팡이독소의 부적합 판정은 7장의 곰팡이독소 개별분석법 또는 동시분석방법 등의 정량시험법에 의한 결과를 우선으로 한다.

II. 잔류농약, 동물용의약품, 곰팡이독소 동시 다성분 분석법-제2그룹

가. 적용범위

본 분석법은 단미사료(곡류, 콩류, 섬유질류 등) 및 배합사료에 적용한다.

나. 분석대상 성분

○ 액체크로마토그래프 분석대상

잔류농약		11	Cephapirin	23	Monoacetyl dapsone
1	2,4-D	12	Cloxacillin	24	Nafcillin
2	Prothioconazole	13	Danofloxacin	25	Ofloxacin
동물용의약품		14	Diethylcarbamazine	26	Orbifloxacin
3	Aminopyrine	15	Diminazene	27	Penicillin V
4	Amprolium	16	Doxycycline	28	Phenothiazine
5	Bacitracin	17	Florfenicol amine	29	Phthalylsulfathiazole
6	Cefadroxil	18	Isometamidium	30	Sarafloxacin
7	Cefalexin	19	Lincomycin	31	Succinyl sulfathiazole
8	Cefalonium	20	Marbofloxacin	32	Sulfisoxazole
9	Ceftiofur	21	Metronidazole-OH	33	Tetramethrin
10	Cefuquinome	22	Minocycline	34	Tulathromycin

다. 분석원리

균질화한 시료를 1% 아세트산을 함유한 메탄올로 추출하여 액체크로마토그래프(LC-MS/MS)로 분석한다. 시료 매질의 영향을 최소화하기 위하여 매질보정 검량법(matrix matched calibration) 또는 표준물질첨가법(standard addition method)을 활용하여 분석한다.

라. 수분

분석대상 성분의 검출량 산출시, 시료의 수분함량이 20% 이상일 경우 함수율에 따른 추출용매의 회석효과를 고려해서 최종 검출량을 산출한다.

마. 장치

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 사용한다.

바. 시약

- 1) 용매: 잔류농약 시험용 또는 이와 동등한 것
- 2) 물: 3차 증류수 또는 이와 동등한 것
- 3) 표준원액: 각 농약의 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 사용한다
- 4) 혼합표준용액: 표준원액을 사용하여 적당한 농도로 혼합, 희석하여 사용한다.

5) 기타시약 : 특급 또는 이와 동등한 것

사. 시험용액의 조제(추출 및 정제)

- 1) 2.5 g의 균질화된 시료를 50 mL 용량의 원심분리관에 칭량하고, 1% 아세트산을 함유한 메탄올 10 mL를 넣은 뒤 교반기를 사용하여 10분동안 강하게 진탕한다.
- 2) 3,000 G로 5분간 원심분리한다.
- 3) 상등액을 C18 100 mg 시약이 들어있는 2mL 원심분리관에 넣고 1분간 진탕 후 10,000 G에서 10분간 원심분리한 다음 멤브레인 필터(0.2 μ m)로 여과하여 아래 4) 시료액의 시료추출액으로 사용한다.
- 4) 정량 분석용 매질보정 검량법(matrix matched calibration)에 따른 농도별 표준물질과 시료액은 아래의 예를 참고하여 만든다.

※ 무처리 시료추출액: 시료구와 동일한 품목이면서 잔류농약, 동물용의약품, 곰팡이독소 성분이 검출되지 아니한 시료를 바. 에 따라 추출 및 정제한다

○ LC-MS/MS용 매질보정 검량(matrix matched calibration) 용액의 조제

구분	검량선 작성용 표준물질						시료액
	수준 1	수준 2	수준 3	수준 4	수준 5	수준 6	
목표농도	1 μ g/L	5 μ g/L	10 μ g/L	20 μ g/L	50 μ g/L	100 μ g/L	
조제방법	완충용액 600 μ L+ 아세트니트릴 100 μ L	완충용액 600 μ L+ 아세트니트릴 100 μ L	완충용액 600 μ L+ 아세트니트릴 100 μ L	완충용액 600 μ L+ 아세트니트릴 100 μ L	완충용액 600 μ L+ 아세트니트릴 100 μ L	완충용액 600 μ L+ 아세트니트릴 100 μ L	완충용액 600 μ L+ 아세트니트릴 200 μ L
	STD 10 μ g/L 100 μ L	STD 50 μ g/L 100 μ L	STD 100 μ g/L 100 μ L	STD 200 μ g/L 100 μ L	STD 500 μ g/L 100 μ L	STD 1000 μ g/L 100 μ L	
	무처리 시료추출액 200 μ L	무처리 시료추출액 200 μ L	무처리 시료추출액 200 μ L	무처리 시료추출액 200 μ L	무처리 시료추출액 200 μ L	무처리 시료추출액 200 μ L	시료추출액 200 μ L

※ 완충용액 : 포름산암모늄 100 mM을 함유한 물(포름산 용액을 이용하여 pH 4~4.5로 맞춤)

아. 시험조작

1) 액체크로마토그래프·질량분석기(LC-MS/MS)의 분석 조건

가) 컬럼: C18 (3 mm $\times$ 150 mm, 3 μ m) 또는 이와 동등한 것

나) 이동상: A와 B 이동상의 농도 구배

- A 이동상 : 0.1% 포름산과 5 mM 포름산암모늄 함유한 물

- B 이동상: 0.1% 포름산과 5 mM 포름산암모늄 함유한 메탄올

다) 농도구배조건

시간(분)	A(%)	B(%)
0.0	95	5
1.0	95	5
18.0	5	95
22.0	5	95
22.1	95	5
30.0	95	5

라) 이동상 유속: 0.3 mL/분

마) 컬럼 온도: 40 $^{\circ}$ C

바) 주입량: 5 μ L

사) 이온화 방식: Electrospray ionization(positive, negative)

○ LC-MS/MS의 MRM(Multiple Reaction Monitoring)

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
1	이사-디 (2,4-D)	-	16.8	221.0	218	160	-12
						35	-64
2	프로티오코나졸 (Prothioconazole)	-	20.0	344.3	343	100	-30
						180	-30
3	아미노피린 (Aminopyrine)	+	9.0	231.2	232	113	19
						56	61
						97	45
4	암프로리움 (Amprolium)	+	2.8	278.7	243	150	17
						94	33
						81	51
5	바시트라신 (Bacitracin)	+	15.3	1422.7	474	199	35
						110	77
						227	35
6	세파드록실 (Cefadroxil)	+	9.8	363.3	363	158	21
						140	39
						68	59
7	세팔렉신 (Cefalexin)	+	10.1	347.3	348	158	20
						106	26
						174	14
8	세팔로니움 (Cefalonium)	+	9.7	458.5	459	337	15
						152	25
						158	23
9	세프니오퍼 (Ceftiofur)	+	13.9	523.5	523	125	85
						240	25
						94	87
10	세프퀴놈 (Cefuquinome)	+	9.4	528.6	529	134	21
						167	35
						395	17
11	세파피린 (Cephapirin)	+	8.5	423.4	424	292	21
						151	33
						181	31
12	클록사실린 (Cloxacillin)	+	16.5	435.8	435	178	33
						220	25
						320	25
13	다노플록사신 (Danofloxacin)	+	10.8	357.3	358	340	29
						314	25
						96	31
14	디에틸카바마진 (Diethylcarbamazine)	+	7.5	199.2	200	127	20
						100	25
						72	30

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
15	디미나진 (Diminazene)	+	8.3	281.3	282	119	25
						102	55
						135	27
16	독시사이클린 (Doxycycline)	+	14.8	444.4	445	428	27
						320	43
						267	49
17	플로르페니콜아민 (Florfenicol amine)	+	2.8	247.2	248	230	13
						130	28
						91	60
18	이소메타디움 (Isometamidium)	+	13.1	460.3	461	313	27
						298	33
						269	71
19	린코마이신 (Lincomycin)	+	9.4	406.5	407	359	29
						126	31
						82	117
20	마보플록사신 (Marbofloxacin)	+	9.8	362.3	363	320	21
						72	47
						345	29
21	메트로니다졸-OH (Metronidazole-OH)	+	7.0	187.1	188	126	23
						123	19
						41	47
22	미노사이클린 (Minocycline)	+	12.3	457.4	457	441	27
						283	59
						337	51
23	모노아세틸답손 (Monoacetyl dapsone)	+	12.1	290.3	290	262	17
						134	19
						179	19
24	나프실린 (Nafcillin)	+	17.2	414.4	414	199	21
						171	51
						143	60
25	오픈록사신 (Ofloxacin)	+	10.2	361.3	362	261	40
						318	30
						221	45
26	오비플록사신 (Orbifloxacin)	+	11.1	395.3	396	352	27
						295	33
						254	41
27	페니실린 V (Penicillin V)	+	16.2	350.3	351	114	40
						160	25
						229	25

번호	분석성분 (Compound)	이온화 (Ionization mode)	머무름 시간 (분)	분자량 (MW)	선구이온 (Precursor ion, m/z)	생성이온 (Product ion, m/z)	충돌에너지 (Collision energy, eV)
28	페노티아진 (Phenothiazine)	+	19.6	199.2	199	167	37
						166	51
						139	63
29	프탈릴설파티아졸 (Phthalylsulfathiazole)	+	12.4	403.4	403	156	29
						149	47
						108	43
30	사라플록사신 (Sarafloxacin)	+	11.5	385.3	386	299	35
						322	31
						348	43
31	석시닐-설파티아졸 (Succinyl sulfathiazole)	+	10.6	355.3	355	108	37
						65	81
						73	63
32	설피속사졸 (Sulfisoxazole)	+	11.8	267.3	268	156	20
						113	20
						92	35
33	테트라메트린 (Tetramethrin)	+	21.2	331.4	332	135	35
						107	40
						163	30
34	틀라스로마이신 (Tulathromycin)	+	10.4	806.0	806	577	37
						158	53
						116	81

※ 질량분석기의 분석조건 및 각 생성이온에 대한 기기조건은 사용기기의 최적값으로 변경하여 사용할 수 있으며, 제시된 이외의 선구이온 및 생성이온도 유효성이 확인된 경우 적용이 가능

3) 검출한계

0.015 mg/kg

검출한계 별도 설정 성분	검출한계(mg/kg)
Aminopyrine, Cefotiofur, Cefuquinome, Cephapirin, Doxycycline, Metronidazole-OH, Minocycline, Monoacetyl dapson, Nafcillin, Penicillin V, Phthalylsulfathiazole, Sarafloxacin, Succinylsulfathiazole, Tulathromycin	0.03
2,4-D	0.12
Bacitracin, Cefadroxil, Cefalexin, Cefalonium	0.3

4) 정량한계

0.05 mg/kg

정량한계 별도 설정 성분	정량한계(mg/kg)
Aminopyrine, Ceftiofur, Cefuquinome, Cephapirin, Doxycycline, Metronidazole-OH, Minocycline, Monoacetyl dapson, Nafcillin, Penicillin V, Phthalylsulfathiazole, Sarafloxacin, Succinylsulfathiazole, Tulathromycin	0.1
2,4-D	0.4
Bacitracin, Cefadroxil, Cefalexin, Cefalonium	1

자. 정성 및 정량시험

1) 기기분석 순서

가) 안정적인 기기분석 값을 얻기 위해 검량용액이나 시료를 분석하기 전에 프라이밍(priming)한다.

- LC-MS/MS: 용매 블랭크 × 3회

나) 기기 오염 여부를 확인하기 위해 무처리 시료를 분석한다.

다) 5수준 이상의 매질보정 검량용액 또는 기타 적정한 검량용액을 분석한다.

라) 데이터 품질 관리용 시료를 분석하며 일반적으로 회수율 실험한 시료를 활용한다.

마) 시료 (S1, S2, S3 ,,,, Sn)를 분석한다.

바) 다)의 5수준 이상의 검량용액을 재분석하는 협차 검량법(bracket calibration)을 활용한다.

2) 검량선 작성

가) 표준용액을 농도별로 분석기기에 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 각 피크 높이 또는 면적을 구하여 검량선을 작성한다.

나) 1)의 기기분석 순서에 따른 협차 검량법을 활용한다.

다) 검량선의 적정성을 평가하는데 결정계수뿐만 아니라 각 농도에서의 잔차가 $\pm 20\%$ 이하 인지 확인하고, 잔차가 $\pm 20\%$ 를 넘는 경우 검량선을 작성할 때 가중치 적용(1/x) 방식을 활용할 수 있다.

3) 정성 확인

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램상의 피크는 표준용액 피크의 머무름시간(retention time)과 비교하여 일치하여야 한다. 또한 표준용액과 시험용액의 선구이온(Precursor ion) 및 생성이온(Product ion)이 일치하여야 하고, 표준용액과 시험용액의 생성이온(Product ion)간 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

4) 정량 확인

정량시험은 단일 표준품으로 표준용액을 일정농도로 제조한 후 매질보정 검량선을 작성하여 정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크 높이 또는 피크 면적에 따라 정량한다.

5) 대표품목의 매질보정검량법으로 스크리닝 분석 후 검출량이 허용기준 대비 80%를 초과한 시료에 대해서는 표준물질 첨가법(standard addition method)을 활용해야 한다.