

Application News

No. ThP191-K

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8060

영아용 분유 중 수용성 비타민 B 8종 정량을 위한 LC-MS/MS 분석법

LC-MS/MS Method for Sensitive Detection and Quantitation of 8 Water-Soluble vitamins in Infant Milk Powder

■ 서론

수용성 비타민 B는 인체가 제기능을 발휘하기 위해 필요한 필수 영양소이다. 비타민 B는 인체에서 적절한 양이 생성되지 않기 때문에 식품 공급원에서 얻는 것이 중요하다. 모유 수유 중인 엄마들의 비타민 B 수치가 낮으면 아기의 성장이 느려질 수 있다. 따라서, 영아용 분유에는 비타민 B를 비롯한 적절한 양의 영양소가 포함되어야 한다. 영양 섭취 기준(DRI) 및 식품 첨가물 기준(Food Additive)은 영아용 분유에서 영아의 1일 비타민 B 요구량의 기준치를 발표했다. HPLC 및 LC-MS/MS 방법은 비타민 B 및 첨가제 분석에 사용된다. 그러나, HPLC 방법에서 일부 화합물로 제한되거나 영아용 분유의 복잡한 매트릭스로 인해 시간이 많이 소요되는 전처리 방법을 요구한다. 이 뉴스레터에서는 간단한 시료의 추출 절차와 5개의 동위원소로 표시된 내부 표준물질을 사용하여 영아용 분유에서 8개의 수용성 비타민 B를 동시에 측정할 수 있는 LC-MS/MS 방법을 제시한다.

■ 분석방법

수용성 비타민 표준품 8종 - 티아민(B1), 리보플라빈(B2), 니코틴산 (B3), 니코틴아미드 (B3), 판토텐산 (B5), 피리독신 (B6), 비오틴(B7) 및 엽산 (B9)은 시그마알드리치(Sigma Aldrich)에서 구입하였다. 동위원소 내부표준물질 5종 - ¹³C₄-티아민 (IS B1), ¹³C₄, ¹⁵N₂-리보플라빈 (IS B2), ²H₄-니코틴아미드 (IS B3), ¹³C₆, ¹⁵N₂-판토텐산 (IS B5), 및 ²H₂-biotin (IS B7)는 이소사이언시스 (Isosciences)에서 구입하였다. 비타민 B1, B3, B5 및 B6은 물로 희석하였고, 비타민 B2, B7 및 B9는 0.01M NaOH로 희석하여 개별 표준원액을 조제하였다. 모든 비타민 표준물질과 내부 표준물질은 working solution으로 희석하여 검량선 작성에 사용하였다. 시료 전처리 방법은 다음과 같다. 영아용 분유 1g을 칭량하여 50 mL의 폴리프로필렌 튜브에 넣는다. 증류수 10 mL를 넣고 볼텍스 믹서를 이용하여 잘 섞어준 후, 1% 아세트산 용액 30 mL를 넣고 볼텍스 믹서를 이용하여 섞은 다음, 원심분리를 한다. 상층액을 0.22 µm 나일론 필터로 필터링을 하고, 증류수로 5 배 희석한다. 이 분석에서는 Heated-ESI가 장착된 시마즈 LCMS-8060 질량분석기와 Shim-pack GIST C18-AQ (2.1 x 50 mm; 1.9 µm) 컬럼을 사용하였으며, 세부 분석조건은 표 1과 같다.

표 1. 수용성 비타민 B 8종 분석을 위한 LCMS-8060 분석조건

Liquid Chromatograph	Shim-pack GIST C18-AQ 1.9 µm (2.1 mm I.D. x 50 mm L)	Mass spectrometer	
Column	Shim-pack GIST C18-AQ 1.9 µm (2.1 mm I.D. x 50 mm L)	Interface	: ESI
Flow rate	: 0.3 mL/min	MS Mode	: Positive mode
Mobile phase	: (A) 5 mM Ammonium Acetate in MilliQ water 0.1% formic acid : (B) Methanol	CID gas	: Argon, 230 kPa
Oven temp.	: 40 °C	Heat block Temp.	: 400 °C
Injection volume	: 2 µL	DL Temp.	: 250 °C
Elution mode	: Gradient Elution	Interface temp.	: 300 °C
	0 % B (0.0-2.0 min) - 30 % B (2.5 min) - 50 % B (5.0 min) - 99 % B (5.5-7.0 min) - 0 % B (7.1-12.0 min)	Nebulizing Gas Flow	: Nitrogen, 3.0 L/min
		Drying Gas Flow	: Nitrogen, 10.0 L/min
		Heating Gas Flow	: Zero Air, 10.0 L/min

■ 결과 및 토의

수용성 비타민 B 8종 및 내부 표준물질의 MRM 분석방법

수용성 비타민 B 8종 및 내부 표준물질 5종은 LabSolutions를 이용하여 자동으로 MRM 최적화를 수행하였다. 전구체 이온은 양성자 이온이 붙은 [M+H]⁺ 형태이며, 각 물질에 대해 2개의 MRM 조건으로 하나는 정량이온, 다른 하나는 정성이온으로 선택하였다(표2). 해당 분석법으로 그림 1의 MS 크로마토그램과 같이 분리하여 12분 이내에 분석하였다. 수용성 비타민 B 8종 모두에 대해 선형 검량선을 얻었으며, 10 ng/mL - 750 ng/mL 농도 범위에서 검량선의 결정계수 (r²)는 0.999 이상으로 우수한 직선성을 보였다. 비타민 B2, B3 및 B5의 검량선은 그림 2와 같다.

표 2. 수용성 비타민 B 8종 및 내부표준물질 5종의 MRM 조건

성분명	정량이온	정성이온	내부표준물질	정량이온	정성이온
B1	265.00>81.10	265.00>144.10	IS B1	269.00>122.10	269.00>148.10
B2	377.00>243.15	377.00>172.20	IS B2	383.00>249.15	383.00>175.15
B3 (Nicotinic acid)	124.00>53.10	124.00>78.10	IS B3	127.00>84.10	127.00>81.10
B3 (Nicotinamide)	123.00>53.10	123.00>78.05			
B6	170.00>77.10	170.00>152.10			
B5	220.10>90.10	220.10>202.25	IS B5	224.00>206.10	224.00>188.10
B7	245.00>227.10	245.00>97.10	IS B7	247.00>229.10	247.00>99.10
B9	442.10>295.10	442.10>176.10			

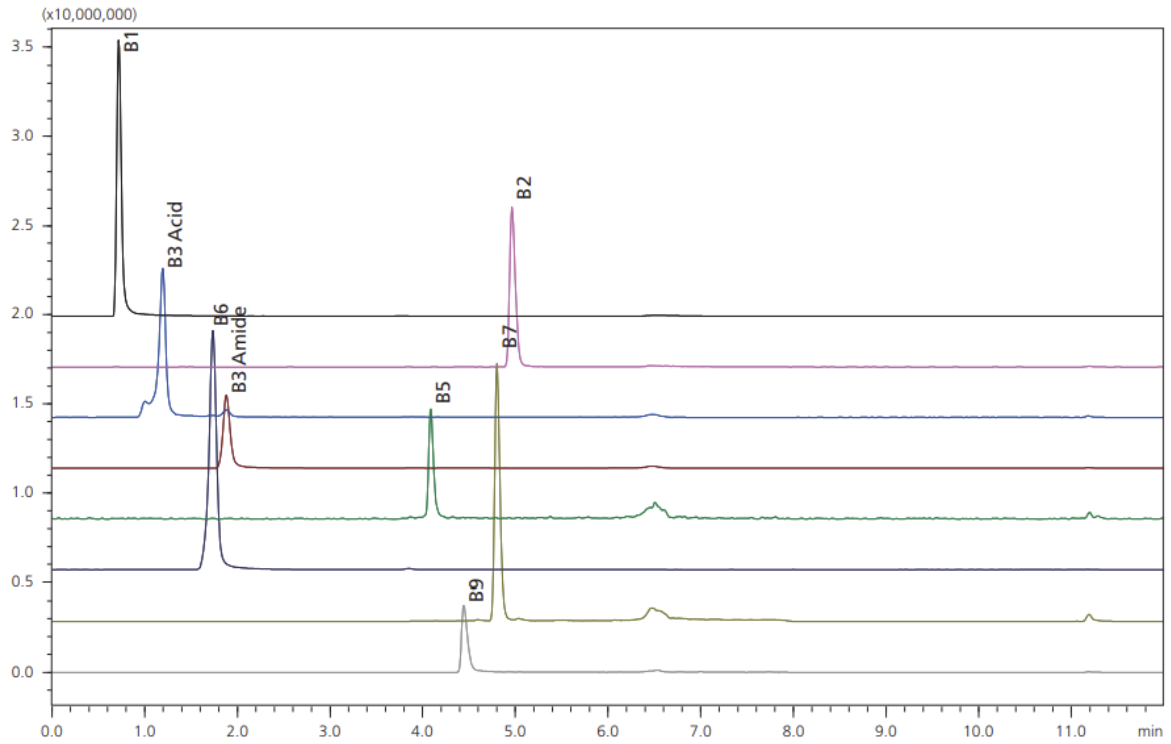


그림 1. 수용성 비타민 B 표준용액(농도: 50 ng/mL)의 크로마토그램 (TIC, Total Ion Chromatogram)

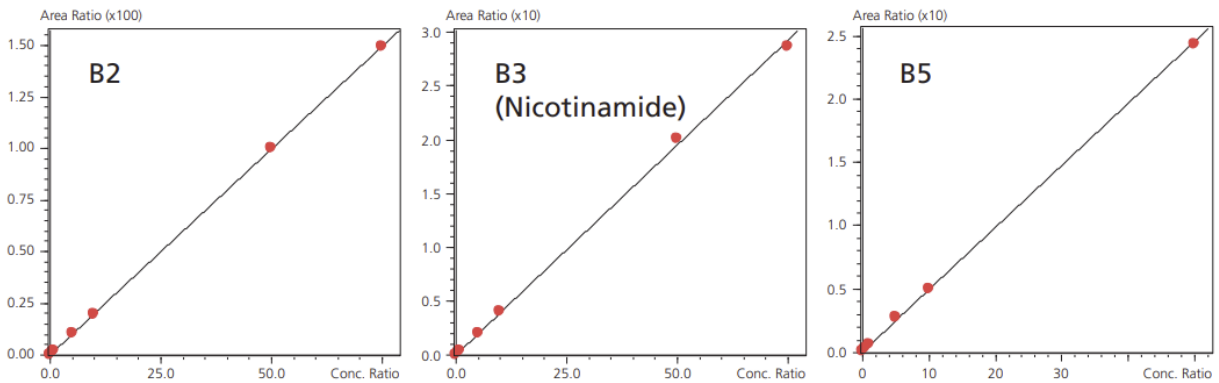


그림 2. 내부표준물질을 이용한 수용성 비타민 B2, B3 및 B5의 검량선

정량 분석법의 성능 평가

검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 LabSolutions 소프트웨어에서 S/N~3, S/N~10으로 산출하였다. 수용성 비타민 B 8종의 LOD는 0.08-1.36 ng/mL, LOQ는 0.23-4.13 ng/mL 범위로 나타났다. 반복성 평가 (n=6)는 각 비타민 표준용액 10 ng/mL 농도로 수행하였으며, 결과는 표 3에 나타내었다.

표 3. 비타민 B 8종 분석법의 성능 평가 결과

성분명	검량선 농도 범위 (ng/mL)	R ²	LOQ (ng/mL)	LOD (ng/mL)	RSD% (n=6)
B1	1-500	0.9994	0.52	0.17	2.80
B2	1-750	0.9999	0.23	0.08	3.67
B3 (Nicotinic acid)	1-750	0.9993	0.97	0.32	3.20
B3 (Nicotinamide)	1-750	0.9994	0.52	0.17	2.36
B5	5-500	0.9990	4.13	1.36	1.91
B6	1-750	0.9999	0.51	0.17	3.94
B7	1-100	0.9991	0.32	0.11	2.07
B9	1-100	0.9992	1.00	0.33	2.87

영아용 분유 중 비타민 B 8종 회수율 시험

영아용 분유를 이용하여 회수율 시험을 수행하였다. 영아용 분유 분말에 8가지 수용성 비타민 B를 다른 농도로 첨가하였다. 비타민 B3(nicotinic acid, nicotinamide)와 비타민 B5의 경우, 25 mg/kg, 비타민 B1, B2 및 B6은 5 mg/kg, 비타민 B7 및 B9은 0.5 mg/kg 으로 첨가하였다. 회수율 시험은 신뢰할 수 있는 결과를 얻기 위해 2개 시료를 조제하여 3번씩 주입하여 진행하였으며, 각 결과의 평균 농도로 회수율을 산출하였다. 수용성 비타민 8종에 대한 회수율은 표 4에서 보는 것과 같이 90.1-113.6 %로 우수한 것으로 나타났다.

표 4. 영아용 분유 중 수용성 비타민의 평균 회수율 (n=2x3)

성분명	회수율 (%)
B1	113.6
B2	105.2
B3 (Nicotinic acid)	101.6
B3 (Nicotinamide)	109.8
B5	104.9
B6	108.0
B7	90.1
B9	90.1

NIST 1849a 중 수용성 비타민 B의 정량 분석

확립된 분석 방법은 영아/성인 영양 포물라인 NIST 1849a 표준 물질(SRM, Standard Reference material)을 이용하여 평가하였다. NIST 1849a 분유 3 세트를 추출하여 분석법의 정확성을 보장하기 위해 각각 3 회 반복 분석하였다. 분석 결과는 함량 범위 내로 확인되었으며, 표 5에 나타내었다. 또, NIST 1849a 시료 중 대표적인 수용성 비타민 B의 MRM 크로마토그램을 그림 3에 나타내었다.

표 5. NIST 1849a 중 8종의 비타민 B 정량 결과 (회색배수 = 200)

성분명	함량 (mg/kg)	분석 결과 (mg/kg) (n=3)		
		1st	2nd	3rd
B1 - Thiamine	12.57 ± 0.98	13.14	13.23	12.89
B2 - Riboflavin	20.37 ± 0.52	20.59	20.80	20.77
B3 - Nicotinamide	108 ± 10	100.92	101.31	100.53
B5 - Pantothenic acid	68.2 ± 1.9	69.02	67.99	67.34
B6 - Pyridoxine	13.46 ± 0.93	13.58	14.03	13.82
B7 - Biotin	1.99 ± 0.13	2.06	2.09	2.09
B9 - Folic acid	2.293 ± 0.062	2.253	2.285	2.277

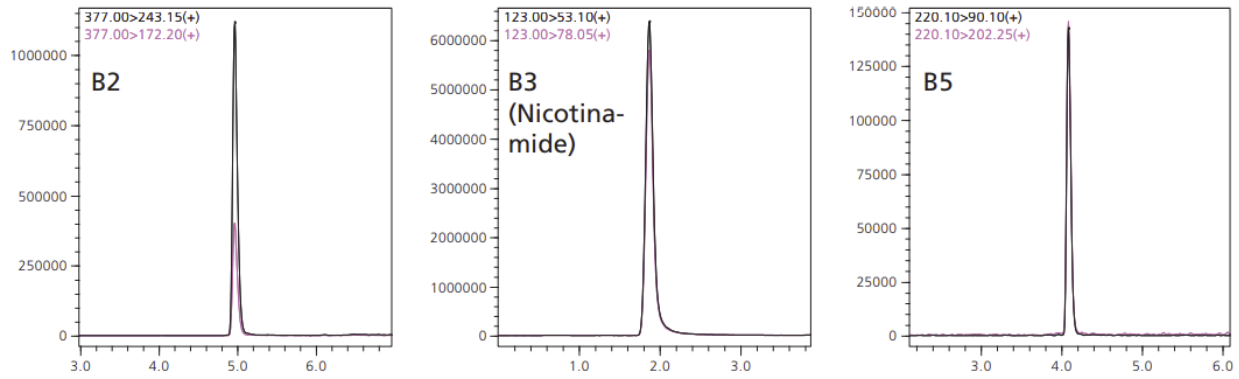


그림 3. NIST 1849a 시료의 MRM 크로마토그램

■ 결론

수용성 비타민 B 8종 분석을 위해 5개의 내부 표준물질 및 간단한 추출 과정을 이용하여 민감하고 선택적인 LC-MS/MS 분석법을 확립하였다. 분석법 검증에 대해 성능평가 및 시료 전처리 과정을 평가하였다. 수용성 비타민 B 8종 전성분에 대해 직선성 (r^2)은 0.999 이상으로 나타났으며, LOD는 0.08-1.36 ng/mL, LOQ는 0.23-4.13 ng/mL 범위로 나타났다. 이 분석법을 사용하여 표준 물질 NIST 1849a를 정량 분석하였으며, 정량 결과는 주어진 함량 범위 내 인 것으로 확인되었다.

■ 참고문헌

1. Cellar, N. A.; McClure, S. C.; Salvati, L. M.; Reddy, T. M. *Anal. Chim. Acta.* 2016, 934, 180-185.
2. Goldschmidt, R. J.; Wolf, W. R. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 397 (2), 471-481.