

# Application News

No. SSK-LCMS-2206

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8060

## 영아용 분유 중 수용성 비타민 B12 정량을 위한 LC-MS/MS 분석법

LC-MS/MS Method for Sensitive Detection and Quantitation of Water-Soluble vitamin B12 in Infant Milk Powder

### ■ 서론

비타민 B는 인체 대사에서 중요한 역할을 수행하는 수용성 비타민으로 체내에 축적되지 않고 배출되므로 주기적이고 지속적인 섭취가 요구된다. 주로 식품이나 비타민 보충제를 통해 섭취하게 되며, 아기의 경우에는 모유 수유와 영아용 분유를 통해 섭취되어 대사활동을 돕는다. 대표적인 비타민 B 성분으로는 그림 1과 같이 9종이 있으며, 해당 성분에 대한 국내 분석법으로는 식품공전에 HPLC를 이용한 단성분 분석법 및 비타민 B 5종 동시분석법이 있다. 일부 성분의 경우, HPLC 방법과 LC-MS/MS 방법이 함께 고시되어 있으나, HPLC법의 경우, 일부 성분만 동시분석이 가능하며 복잡한 시료에 대해서는 매트릭스로 인해 전처리에 많은 시간이 소요된다. 이에 본 뉴스레터에서는 "뉴스레터 ThP191-K; 영아용 분유 중 수용성 비타민 B 8종 정량을 위한 LC-MS/MS 분석법"을 바탕으로 간단한 시료 추출을 통한 비타민 B12의 분석법을 최적화하였다.

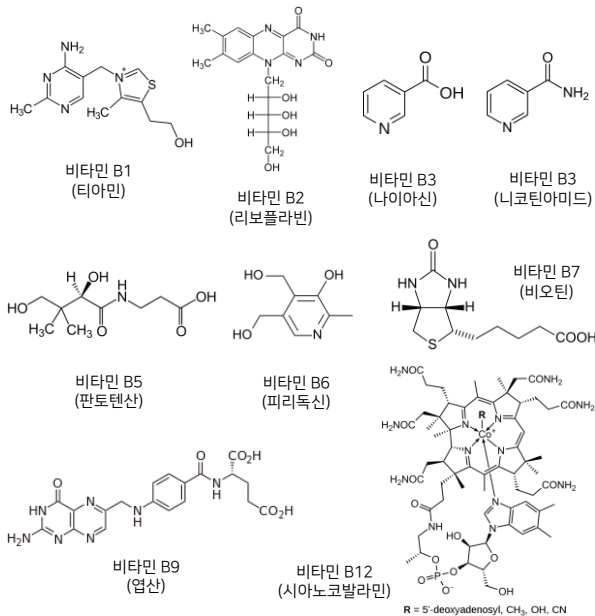


그림 1. 대표적인 비타민 B의 화학구조

### ■ 분석방법

비타민 B12는 물로 희석하여 표준원액 및 표준용액을 조제하였으며, 이를 검량선 작성에 사용하였다. 시료 전처리 과정은 그림 2와 같으며, 기기 분석에는 시마즈 LCMS-8060NX 질량분석기와 Shim-pack GIST C18-AQ (2.1 x 50 mm, 1.9 µm) 컬럼을 사용하였다. 세부 분석조건은 표 1과 같다.

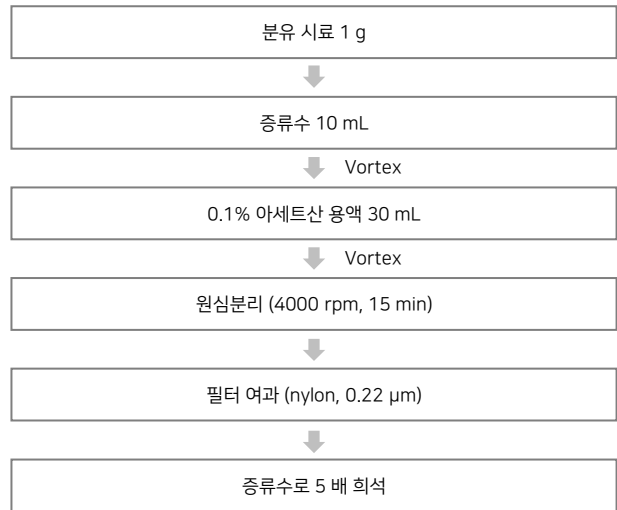


그림 2. 비타민 B12 분석을 위한 영아용 분유의 전처리 방법

표 1. 비타민 B12 분석을 위한 분석조건

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>Liquid chromatograph</b> | <b>Nexera XS</b>  |
| Column                      | : Shim-pack GIST C18-AQ 1.9 µm (2.1 mm I.D. x 100 mm L)   |
| Flow rate                   | : 0.3 mL/min  |
| Mobile phase                | : (A) 5 mM Ammonium Acetate in water<br>0.1% formic acid<br>: (B) MeOH  |
| Oven temp.                  | : 40 °C   |
| Injection volume            | : 5 µL  |
| Elution mode                | : Gradient Elution<br>0 % B (0.0-2.0 min) - 70 % B (7.0 min) -<br>99 % B (7.5-10.0 min) - 0 % B (10.5-14.0 min) |
| <b>Mass spectrometer</b>    | <b>LCMS-8060NX</b>  |
| Interface                   | : ESI (IonFocus)  |
| MS Mode                     | : Positive mode   |
| CID gas                     | : Argon, 230 kPa  |
| Heat block Temp.            | : 400 °C  |
| DL Temp.                    | : 250 °C  |
| Interface temp.             | : 300 °C  |
| 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  |
| <b>MRM Condition</b>        |   |
| B12                         | : Quantifier ion 678>147  |
| Cyanocobalamin              | : Qualifier ion 678>359   |

■ 결과 및 토의

비타민 B12 정량 분석법의 성능 평가

비타민 B12는 0.1 ng/mL - 100 ng/mL 농도 범위로 선형 검량선을 적용했으며, 검량선의 결정계수 ( $r^2$ )는 0.999 이상으로 우수한 직선성을 보였다. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 LabSolutions 소프트웨어에서  $S/N \sim 3$ ,  $S/N \sim 10$ 으로 계산하여 비타민 B12의 LOD는 0.05 ng/mL, LOQ는 0.15 ng/mL 값을 얻었다. 반복성 평가 (n=7)는 표준용액 5 ng/mL 농도로 테스트하였으며, RSD%는 2.4%로 우수하였다 (표 2).

표 2. 비타민 B12 분석법의 성능 평가 결과

| 성분명               | 비타민 B12 |
|-------------------|---------|
| 검량선 농도 범위 (ng/mL) | 0.1-100 |
| $R^2$             | 0.9998  |
| LOQ (ng/mL)       | 0.15    |
| LOD (ng/mL)       | 0.05    |
| RSD% (Area, n=7)  | 2.4     |

영아용 분유 중 비타민 B12 회수율 시험

영아용 분유를 이용한 회수율 테스트를 수행하였다. 분유 분말에 비타민 B12 표준용액을 세개의 다른 농도 (0.2 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg)로 첨가하였으며, 각 크로마토그램은 그림 3과 같다. 회수율 테스트는 각 농도별로 2개 시료를 조제하고, 3번씩 주입하여 결과를 얻었다. 회수율은 평균 농도로 계산하였으며, 93.5 - 102.3%로 우수한 회수율을 얻었다 (표 3).

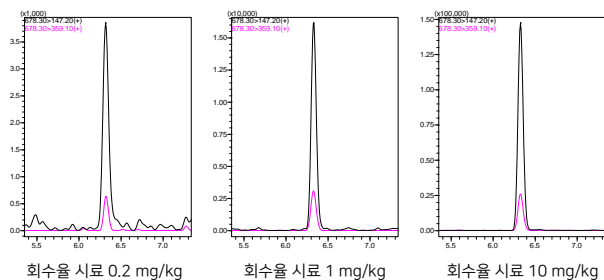


그림 3. 회수율 시험 용액 중 비타민 B12의 크로마토그램

표 3. 영아용 분유 중 비타민 B12의 회수율 (n=2x3)

| 성분명     | 저농도 회수율 (%) (0.2 mg/kg) | 중농도 회수율 (%) (1 mg/kg) | 고농도 회수율 (%) (10 mg/kg) |
|---------|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| 비타민 B12 | 102.3                   | 93.5                  | 96.2                   |

■ 결론

LC-MS/MS를 이용하여 영아용 분유 중 비타민 B12 분석법을 확립하였다. 뉴스레터 ThP191-K “영아용 분유 중 수용성 비타민 B 8종 정량을 위한 LC-MS/MS 분석법”을 기반으로 최적화된 방법으로 비타민 B 복합체 분석이 가능하다. 비타민 B12의 검량선의 직선성 ( $r^2$ )은 0.999 이상이며, LOD는 0.05 ng/mL, LOQ는 0.15 ng/mL 으로 예상되었다. 회수율 시험은 93.5-102.3% 으로 우수한 결과를 얻었다.

■ 참고문헌

- ASMS 2019 ThP 191, LC-MS/MS Method for Sensitive Detection and Quantitation of 8 Water-Soluble vitamins in Infant Milk Powder, Yin Ling Chew.

