

Application News

No. 04-AD-0265-K

Fat-soluble vitamins / LCMS-8045

지지형 액체 추출법(SLE)을 이용한 영아용 분유 중 지용성 비타민 정량 분석법

Quantitative Determination of Fat-Soluble Vitamins in Infant Formula by LC-MS/MS Method with Supported Liquid Extraction (SLE)

사용자 활용 포인트

- ◆ 영아용 분유 중 지용성 비타민(A1, D3, E, K1)의 정량 분석을 위해 지지형 액체 추출(SLE) 컬럼을 사용한 전처리 방법으로 LC-MS/MS 분석법이 확립되었다.
- ◆ 지용성 비타민 분석 방법의 신뢰성은 FAPAS QC 품질 관리 시료의 분석을 통해 검증 및 확인하였다. 비타민 분석 결과는 허용 가능한 정확도 및 정밀도를 나타냈다.

■ 서론

지용성 비타민은 비타민 A, D, E, K의 4가지 범주로 분류된다. 이 성분들은 시력(비타민 A), 칼슘 흡수(비타민 D), 세포막 내 항산화 보호(비타민 E), 혈액 응고(비타민 K)와 같은 인체의 여러 기능에서 중요한 역할을 한다. 영아용 분유는 영아의 주요 영양 공급원으로서 충분한 비타민을 공급할 수 있어야 한다. 지용성 비타민은 추출 중 복잡성과 불안정성으로 인해 정량화는 여전히 어려운 문제가 있다. 따라서 추출은 우유 샘플에서 지용성 비타민을 검출하는 중요한 단계이다.[1] 이 뉴스레터에서는 지지형 액체 추출(SLE)법을 이용한 영아용 분유 중 지용성 비타민 정량 분석법을 소개한다. APCI 인터페이스가 있는 텐덤 LC-MS/MS 시스템인 LCMS-8045을 사용하였다.

*FAPAS: "국제분석능력평가"는 영국 식품환경연구청에서 주관하는 식품 및 수질 시험에 대한 숙련도 평가 제도이다.

■ 분석 방법

시약 및 표준

레티놀(retinol), 피로갈롤(pyrogallol), 수산화 칼륨(potassium hydroxide) 및 부틸화 하이드록시톨루엔(butylated hydroxy toluene)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 비타민 D3, 비타민 E, 비타민 K1을 포함한 지용성 비타민 키트는 AccuStandard에서 구입했다. 알코올 및 헥산은 HPLC 등급으로 사용하였으며, LC/MS 등급의 포름산을 LC/MS 등급의 메탄올과 Milli-Q 물에 첨가하여 이동상으로 사용하였다.

LC-MS/MS 조건

LCMS-8045에 대한 분석 조건은 표 1에 정리하였고, 4가지 화합물의 MRM 조건(정량 이온 및 정성 이온)과 최적화된 충돌 에너지(CE)는 표 2와 같다.

표 1. LCMS-8045 분석 조건

LC conditions	Nexera
Column	Shim-pack™ G18 column (2.1 x 100 mm, 3 μm) P/N: 227-30008-05
Flow rate	0.4 mL/min
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in Milli-Q water B: 0.1% Formic acid in Methanol
LC program	Gradient elution, 15 min
Elution gradient	B%: 80% (0.5min)→ 100% (5min to 12 min)→ 80% (12.01min to 15min)
Oven temp.	40 °C
Injection volume	10 μL
MS Conditions	LCMS-8045
Interface	APCI
Interface Temp.	350 °C
DL temp.	250 °C
Heat Block temp.	200 °C
Nebulizing Gas	3 L/min
Drying Gas Flow	5 L/min
Mode	MRM, Positive mode

표 2. MRM 조건 및 최적화된 CE 조건

Name	Quantifier	CE (V)	Ref.ion	CE (V)
Vitamin A1	239.3>92.9	-24	269.3>107.2	-18
Vitamin D3	385.4>259.1	-14	385.4>367.2	-11
Vitamin E	431.5>165.2	-21	431.5>137.3	-43
Vitamin K1	651.5>187.1	-25	451.5>57.2	-35

시료 준비

시료 전처리는 그림 1와 같은 방법으로 진행하였고, 품질 관리 시료도 같은 절차에 따라 준비하였다.

시료를 로딩하기 전에 SLE 컬럼의 pH 조절은 컬럼에서 지용성 비타민의 머무름에 영향을 미치므로 중요한 부분이다. 실험 결과에서 지용성 비타민의 좋은 회수율을 얻기 위해서는 pH 6~7 정도가 가장 좋은 조건이었다.

■ 결과 및 토의

LC-MS/MS 최적화

비극성인 지용성 비타민 4종의 MRM 최적화는 APCI 양의 모드에서 수행되었다. 지용성 비타민을 분리하기 위해 C18 컬럼을 사용하였고, 총 분석 시간을 단축하고 더 선명한 피크를 얻기 위해 이동상 B의 초기 농도는 80%로 설정하였다. 그림 2는 순수한 용매에서 혼합 표준물질 50 ng/mL의 MRM 크로마토그램을 나타냈다.

비누화
<ul style="list-style-type: none"> 0.1 g의 분유에 Milli-Q 물 1.5 mL을 넣고 초음파 처리를 한다. 알코올에 녹인 2% 피로갈롤 용액 2 mL, 50% KOH 용액 1 mL를 추가한다. 밤새 섞는다.
pH 조정 (pH 6-7)
<ul style="list-style-type: none"> 개미산 250 µL를 넣고 섞는다. 시료 용액의 pH를 약 6-7로 조정한다.
추출
<ul style="list-style-type: none"> 모든 시료 용액을 SLE컬럼에 로드하고 5분 동안 기다린다. 0.1% BHT 핵산 용액 8 mL를 넣고 중력 하에 흐르도록 한다. 핵산 8 mL를 두 번 넣는다. 유리관에 용리액을 모은다. 완전히 용리시키기 위해 10-30초간 진공을 걸어준다. 질소가스를 불어넣어 용리액을 건조 시킨다.
재용해 및 필터
<ul style="list-style-type: none"> 메탄올 0.5 mL로 재용해를 한다. 나일론 멤브레인 필터 0.22 µm로 여과하여 1.5 mL의 앰버 바이알에 담는다. LC-MS/MS로 분석한다.

그림 1. 지지형 액체 추출법(SLE)에 의한 영양분 분유 시료의 전처리 과정

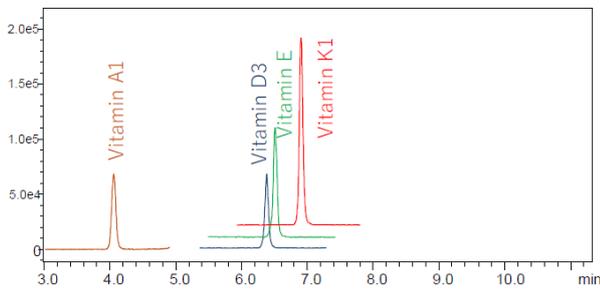


그림 2. 혼합표준용액 50 ng/mL의 MRM 크로마토그램

검량선과 감도

검량선은 10 ng/mL - 400 ng/mL의 순수한 용매에 혼합된 표준용액으로 작성하였다 (그림 3). 모든 비타민 성분의 R² 값이 0.999 이상으로 우수한 직선성을 얻었다. 반복성 평가는 50 ng/mL 농도의 혼합 표준용액을 6회 연속 주입하여 평가하였고, 직선성, LOD, LOQ 및 %RSD 결과는 표 3에 정리하였다.

표 3. 지용성 비타민의 직선성, LOD, LOQ 및 %RSD

Name	RT (min)	R ²	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	%RSD Area (n=6)	%RSD RT (n=6)
Vitamin A1	4.090	0.9998	2.8	8.5	0.44	0.22
Vitamin D3	6.499	0.9997	2.1	6.3	3.41	0.06
Vitamin E	7.025	0.9998	1.6	4.8	0.73	0.03
Vitamin K1	8.561	0.9998	2.5	7.4	2.05	0.02

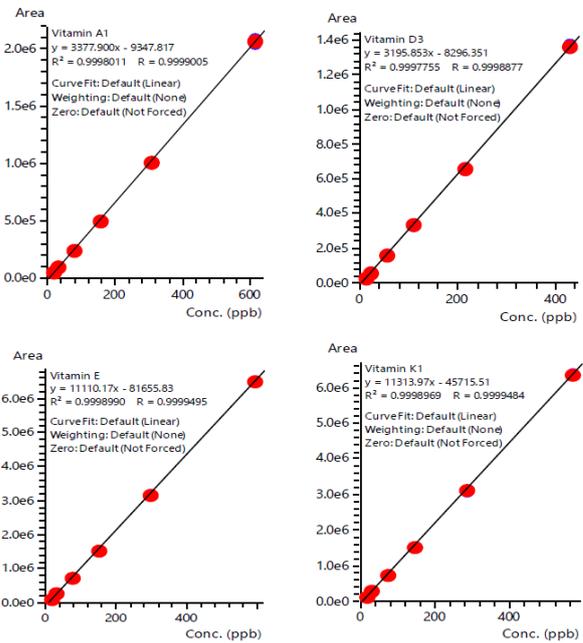


그림 3. 비타민 A1, D3, E, K1의 MRM 검량선 (농도범위: 10-600 ng/mL)

품질관리 시료 분석결과

FAPAS 품질 관리 시료 (T21125QC) [3]를 확립된 방법에 적용하여 분석 방법의 신뢰성을 판단하였다. QC 시료는 6 개의 개별 분석을 수행하였고, 분석 결과는 표 4에 요약하였다. 6 개의 개별 분석 결과의 %RSD는 10% 미만으로 허용 가능한 정확도를 보였다.

표 4. QC 시료 T21125QC에 대한 6 개의 개별 분석 결과

Sample	A1 (µg/100 g)	D3 (µg/100 g)	E (µg/100 g)	K1 (µg/100 g)
QC 1	436.8	10.2	22.1	31.4
QC 2	450.0	9.7	22.1	33.0
QC 3	444.1	9.1	21.3	39.4
QC 4	436.7	8.9	21.6	36.0
QC 5	468.3	9.3	22.6	37.4
QC 6	455.7	8.7	21.9	36.0
%RSD	2.3	4.8	1.7	6.9

6 개의 정량 분석 결과는 QC 시료의 허용 범위 내에 있으며, 분석 결과의 평균 농도, 할당된 값 및 허용 범위는 표 5와 같다.

표 5. QC 시료 T21125QC의 비타민 A, D3, E, K1의 정량 결과, 할당된 값 및 허용 범위 (단위: µg/100g)

Name	Ave.conc. Meas. (n=6)	Assigned value	%Recovery	Acceptable range
Vitamin A1	448.6	443	101.3	355-532
Vitamin D3	9.3	10.6	87.8	7.7-13.5
Vitamin E	22.0	21.6	101.8	17.3-25.9
Vitamin K1	35.5	40.6	87.4	25.7-55.5

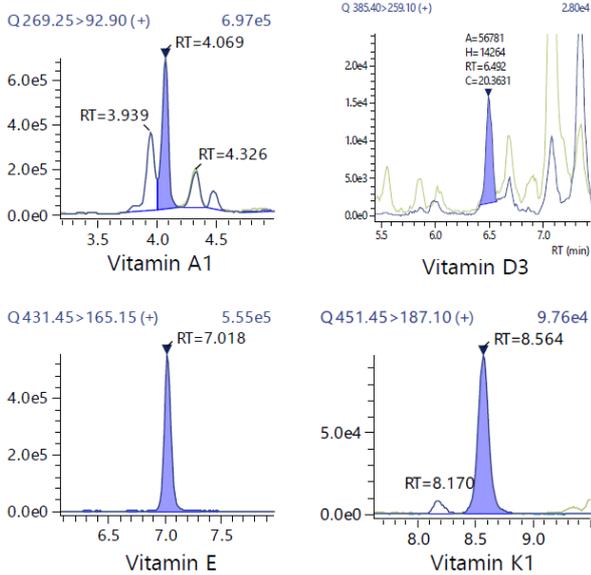


그림 4. QC 시료 중 비타민 A1, D3, E, K의 MRM 피크

분석 방법의 일간 반복성을 평가하여 머무름 시간 및 농도의 %RSD를 표 6에 정리하였다. 일간 반복성 결과, 비타민 A1 및 비타민 E의 경우 10% 미만, 비타민 D3 및 비타민 K1의 경우 15% 미만인 것으로 나타났다.

표 6. QC 시료 T21125QC에서 검출된 비타민 A1, D3, E, K1의 일간 반복성 평가 결과 (n=6 x 2일)

Name	Ave. Con., µg/100g	%RSD, RT	%RSD, Conc.
Vitamin A1	437.9	0.33	3.5
Vitamin D3	10.0	0.09	10.8
Vitamin E	21.8	0.09	3.6
Vitamin K1	38.0	0.11	14.9

■ 결론

영아용 분유에서 비타민 A1, D3, E, K1을 포함한 지용성 비타민의 정량적 분석을 위한 LC-MS/MS 분석법을 확립하였다. 시료는 지지형 액체 추출(SLE) 컬럼을 사용하여 전처리를 하며, 10-400 ng/mL 범위에서 $R^2 > 0.999$ 로 우수한 직선성을 보였다. 확립한 분석방법은 QC 시료(FAPAS) 분석을 통해 내부 표준물질을 사용하지 않고 정확도와 정밀도 면에서 충분히 수용 가능한 것으로 확인되었다.

■ 참고문헌

1. E. Karrar, Isam A.Mohamed Ahmed, M. F. Manzoor, W.W., F.Sarpong, X.Wang, Food Chemistry 373 (2022) 131436
2. Y.L Chew, Shimadzu Appl. News AD-0208
3. FAPAS QC Material Data Sheet (T21125QC)