

Application News

No. SSK-LCMS-2501

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer, LCMS™-8060NX

종합 비타민과 폴산 원료 중 N-니트로소 폴산 불순물 분석법

LC-MS/MS Method for Determination of N-Nitroso Folic acid impurity in multi-vitamin and Folic acid API

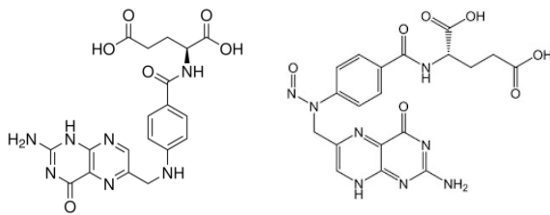
사용자 활용 포인트

- ◆ Nexera XS system과 LCMS™-8060NX를 이용하여 종합 비타민과 폴산 원료 중 N-니트로소 폴산 불순물 분석이 가능하다.
- ◆ N-니트로소 폴산에 대한 밸리데이션(직선성, 검출한계, 정량한계, 반복성, 회수율)을 진행하여 견고한 분석법임을 확인하였다.

■ 서론

비타민은 생명체가 살아가는 데 중요한 역할을 하며, 소량으로 신체 기능을 조절한다는 점에서 호르몬과 비슷하지만 스스로 합성하는 것은 어렵기 때문에 음식과 같이 외부로부터 섭취되어야 한다. 이와 같은 이유로 비타민, 식이 미네랄 및 기타 영양소를 함유한 식이 보충제로 사용하도록 의도되어 만들어진 제제가 종합비타민이다. 이러한 제제는 정제, 캡슐, 분말, 액체, 젤리 또는 주사형 제형의 형태로 만들어져 판매되고 있다. 의학적으로 병원에서 사용 및 투여되는 주사형 제형을 제외하고 종합 비타민은 Codex Alimentarius Commission(유엔 식품 표준 기관)에서 식품 범주로 인정하고 있다. 현재 이러한 종합비타민 제제들이 건강기능식품으로써 식단 불균형 등으로 발생하는 다양한 종류의 비타민 결핍 등을 채워주기 위한 보조제의 역할을 하고, 많은 현대인들이 섭취하고 있다. 따라서 이러한 건강기능식품에도 일반 또는 전문의약품과 같이 관리를 하고 있다. 최근에는 많은 의약품에서 니트로소 구조가 결합한 불순물이 검출되고 있고, 비타민 성분 중 하나인 폴산에서도 니트로소 구조가 결합한 N-니트로소 폴산이 검출되었다. 식품의약품안전처에서 이러한 다양한 의약품에서 검출되는 N-니트로소 계열의 불순물에 대하여 의약품별 일일 허용치에 관한 자료를 배포하였다¹⁾. 자료에 의하면 N-니트로소 폴산의 경우 일일 최대 허용치가 1500 ng/day로 설정 되어 있다.

이 뉴스레터에서는 LC-MS/MS를 이용하여 종합비타민과 원료 중 N-니트로소 폴산 불순물의 분리 분석법 및 불순물에 대한 직선성, 검출한계, 정량한계, 회수율 측정 결과를 소개하고자 한다.



Folic acid
Exact mass : 441.4 g/mol

N-Nitroso Folic acid
Exact mass : 470.4 g/mol

그림 1. 폴산 및 N-니트로소 폴산의 화학 구조

■ 분석방법

표준용액 조제 방법

N-니트로소 폴산 1 mg을 칭량한 뒤에 0.1 % Ammonia 용매 1mL 를 가하여 표준원액으로 사용한다. 0.1 % Ammonia solution : methanol = 90 : 10(v/v) 용매로 희석하여 사용한다.

전처리 방법

원료 의약품 1 mg, 종합 비타민은 2 g²⁾ 을 각각 칭량한 뒤에 0.1 % Ammonia solution : methanol = 90 : 10(v/v) 용매 10 mL을 혼합한 후에 10분간 초음파를 진행하고, 이후 멤브레인 필터로 여과한다.

처음 검액 일부는 버리고 나머지를 취하여 LC-MS/MS에 5 µL를 주입하여 분석한다.

분석조건

Shimadzu Nexera X3 LC 시스템과 LCMS-8060NX 질량분석기를 이용하였다. N-니트로소 폴산 불순물 분석에 대한 기기 분석조건 및 MRM 조건은 표 1에 나타내었다.

표 1. 기기 분석 조건

| Liquid chromatograph Nexera XS | | | |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Flow rate | 0.4 mL/min | | |
| Mobile Phase | A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in methanol | | |
| Gradient | 10 % B (0 - 1 min) - 25 % B(1 - 1.5 min) - 30 % B(1.5 - 8.5 min) - 95 % B(8.5 - 11 min) - 95 % B(11 - 12.5 min) - 10 % B(12.51 - 15 min) | | |
| Diverter valve | 7.8 - 12.0 min (to MS) | | |
| Column | Shim-pack Biphenyl (2.1 mm I.D x 150 mm., 2.7 µm) | | |
| Column Temp. | 40 °C | | |
| Injection Volume | 5 µL | | |
| Detector | SPD-M40 (254 nm) | | |
| Mass spectrometer LCMS-8050RX | | | |
| Ionization method | ESI (Negative) | | |
| Nebulizing Gas Flow | 3 L/min | | |
| Heating Gas Flow | 15 L/min | | |
| Drying Gas Flow | 3 L/min | | |
| Interface Temp. | 400 °C | | |
| DL Temp. | 250 °C | | |
| Heat Block Temp. | 400 °C | | |
| MRM Transition | | | |
| Name | Precursor Ion (m/z) | Product Ion 1 (m/z) | Product Ion 2 (m/z) |
| N-Nitroso Folic acid | 469 | 439 | 175 |

■ 결과 및 토의

폴산 의약품과 N-니트로소 폴산의 분리

표 1의 분석 조건으로 폴산 의약품과 N-니트로소 폴산 분리를 최적화하여 그림 2에 크로마토그램을 나타내었다. 폴산 의약품과 N-니트로소 폴산 피크의 검출 시간을 바탕으로 질량분석기의 오염을 최소화 하기 위해 방향 전환밸브를 이용하여 분석 대상 성분인 N-니트로소 폴산만 질량분석기에 도입되고, 폴산 의약품은 도입되지 않도록 하였다 (그림 2).

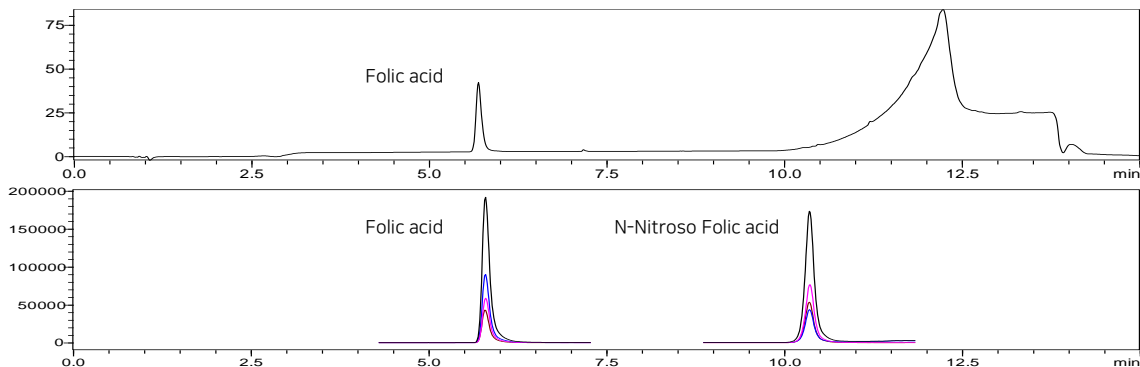


그림 2. 폴산(10 µg/mL)의 UV 크로마토그램(위) 및 폴산(100 ng/mL) 및 N-니트로소 폴산 (100 ng/mL)의 MS 크로마토그램(아래)

직선성

검량선의 범위는 0.2 - 1,000 ng/mL 으로, 검량선의 결정계수 (r^2)는 0.99 이상으로 우수하였다 (그림 3).

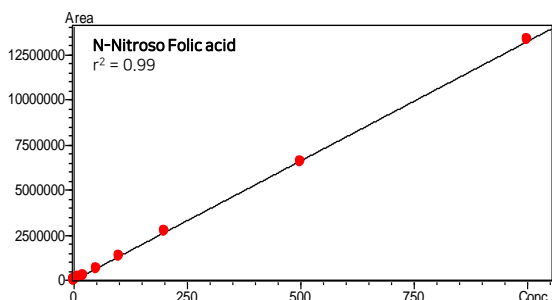


그림 3. N-니트로소 폴산의 검량선

검출한계 및 정량한계

검출한계는 $S/N > 3$, 정량한계는 $S/N > 10$ 기준으로 측정하였다. 검출한계는 0.1 ng/mL, 정량한계는 0.2 ng/mL 으로, 그림 4에 크로마토그램을 나타내었다.

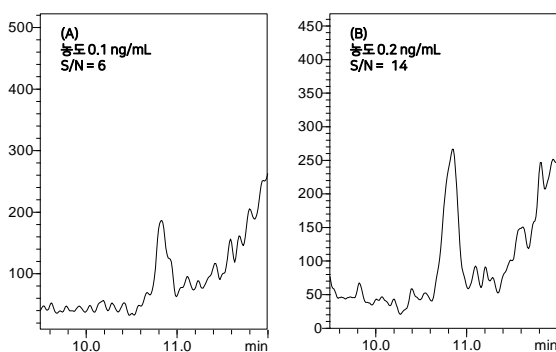


그림 4. N-니트로소 폴산의 MRM 크로마토그램 (A: LOD, B: LOQ)

반복성

검량선의 정량한계 농도인 0.2 ng/mL의 N-니트로소 폴산 표준용액으로 반복성을 평가하였다. 6회 반복 분석 시 피크의 면적과 높이, 정확성을 측정하였고, 농도에 대한 %RSD는 6.1 %, 정확성은 107 % 였다(표 2).

표 2. N-니트로소 폴산 표준용액의 재현성

| | 0.2 ng/mL | | |
|-------------|-----------|--------|-------|
| | Area | Height | Conc. |
| # 1 | 2316 | 239 | 0.22 |
| # 2 | 2303 | 247 | 0.22 |
| # 3 | 1982 | 243 | 0.20 |
| # 4 | 2358 | 246 | 0.23 |
| # 5 | 2201 | 226 | 0.22 |
| # 6 | 1965 | 240 | 0.20 |
| Average | 2188 | 240 | 0.21 |
| %RSD | 7.9 | 3.2 | 6.1 |
| Accuracy(%) | 107 | | |

회수율

검량선 농도 범위 내에서 완제의약품인 종합비타민에 저농도 (5 ng/mL), 중농도 (50 ng/mL), 고농도 (500 ng/mL)가 되도록 N-니트로소 폴산 표준물질을 첨가하여 전처리 후 회수율 측정을 하였다. 저, 중, 고 농도에서 회수율은 89 ~ 104 %, % RSD는 0.7 ~ 1.2 % 의 값을 나타냈다 (표 3).

표 3. N-니트로소 폴산의 회수율 결과

| | 저농도 (5 ng/mL) | 중농도 (50 ng/mL) | 고농도 (500 ng/mL) |
|--------------|---------------|----------------|-----------------|
| # 1 | 4.45 | 52.57 | 516.79 |
| # 2 | 4.50 | 52.32 | 520.35 |
| # 3 | 4.46 | 52.50 | 509.06 |
| # 4 | 4.38 | 51.57 | 517.76 |
| # 5 | 4.50 | 51.96 | 506.30 |
| # 6 | 4.43 | 52.17 | 508.20 |
| Average | 4.45 | 52.18 | 513.08 |
| % RSD | 1.0 | 0.7 | 1.2 |
| Recovery (%) | 89 | 104 | 103 |

결론

Shimadzu LCMS-8060NX을 이용하여 종합비타민 및 폴산 원료에서 N-니트로소 폴산 불순물에 대한 LC-MS/MS 분석법을 확립하였다. 시험 결과 N-니트로소 폴산 검량선의 결정계수(r^2)는 0.99 이상이며, 검출한계는 0.1 ng/mL, 정량한계는 0.2 ng/mL 으로 확인하였다. 반복성의 경우 0.2 ng/mL 농도에 대해 % RSD가 6.1 %, 정확성은 107 % 였다. 회수율은 저, 중, 고 농도에서 89 ~ 104 % 이며, % RSD는 0.7 ~ 1.2 %를 나타냈다.

참고자료

- 1) 식약처 설정 니트로사민류 불순물 1일 섭취 허용량 목록(241204)
- 2) Determination of N-nitroso folic acid in folic acid and multivitamin supplements by LC-MS/MS (Food Additives & Contaminants: Part A, 41:1, 1-8)