

## 역상 고속 액체 크로마토그래피에 의한 식품 중 수용성 비타민 분석을 위한 전처리법의 비교

김형수<sup>1</sup> · 장덕규 · 우동균 · 우강음\*

<sup>1</sup>한국식품의약품, 경남대학교 생명과학부

### Comparision of Preparation Methods for Water Soluble Vitamin Analysis in Foods by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

Hyung-Soo Kim<sup>1</sup>, Duck-Kyu Jang, Dong-Kyun Woo and Kang-Lyung Woo\*

<sup>1</sup>Korean Food and Drug Administration, Division of Life Science, Kyungnam University

Owing to a need for simple extraction and purification for analysis of water soluble vitamins in food samples by RP-HPLC with UV-detector, the methods of bromelain and protease hydrolysis and C<sub>18</sub> Sep-Pak solid phase extraction were employed. The recoveries of standard water soluble vitamins by the bromelain and protease hydrolysis and C<sub>18</sub> Sep-Pak solid phase extraction were significantly high compared to AOAC methods in most of vitamins. The contents of pyridoxal determined with protease in the pork was similar, but in the bromelain hydrolysis and AOAC method, was high compared to the results of reference. The niacinamide, thiamin and riboflavin determined with bromelain and protease hydrolysis showed similar values to the results of references. In the potato, pyridoxamine was detected in the AOAC method, which was not detected in the bromelain and protease hydrolysis methods. Pyridoxal contents in the protease hydrolysis and AOAC methods were very similar to the results of references. The recoveries of fortified standard vitamins in food samples were significantly high and accurate compared to those of AOAC methods. The extraction and purification with C<sub>18</sub> Sep-Pak solid extractor might be considered superior method for the determination of water soluble vitamins in food samples.

**Key words:** reversed-phase high performance liquid chromatography, water soluble vitamins, C<sub>18</sub> Sep-Pak solid phase extractor

## 서론

식품 중 비타민의 함량은 매우 낮고 대부분의 비타민들이 식품 중 단백질, 전분 또는 인산 등과 결합하고 있다. 수용성 비타민의 분석을 위하여서는 이들로부터 비타민을 분리하여야 하는데 지금까지는 산 또는 염기로 가수분해하여 변성된 단백질이나 전분들을 침전시킨 후 그 상등액으로 정량하는 방법이 보편적으로 행하여져 왔다<sup>(1)</sup>. 그러나 이러한 극단적인 pH에서의 처리는 많은 양의 비타민 파괴가 수반되므로 최근에는 산이나 염기대신 효소에 의한 가수분해방법이 연구되고 있다<sup>(2)</sup>. HPLC에 의한 식품 중 수용성 비타민의 분석 시 시료 전처리과정을 살펴보면 비타민의 종류에 따라 다양한 것을 알

수 있다. Thiamin의 경우 시료를 염산이나 황산 용액으로 균질화한 후 끓이거나 autoclave에서 고압가열하여 비타민과 결합하고 있는 단백질 등을 가수분해하여 thiamin을 추출하고 pH를 4.0-4.5로 조절한 다음 takadiastase,  $\alpha$ -,  $\beta$ -amylase, mylase-100, phosphotase 및 clarase 등으로 가수분해하여 phosphate ester결합을 형성하고 있는 thiamin을 유리시킨다. 유리된 thiamin을 potassium ferricyanide를 이용하여 형광물질인 thiochrome으로 산화 후 시료의 종류에 따라 적당한 정제과정을 거쳐 형광검출기로 분석하는 방법이 주로 행하여 지고있다<sup>(3,4)</sup>. 이외에도 육류 및 육류가공식품에 대한 thiamin의 분석 시 산에 의한 추출대신 papain으로 추출 후 takadiastase 등을 처리하는 방법도 있다<sup>(2,5)</sup>. 효소 처리에 의하여 추출된 thiamin을 정제하는 방법은 대부분의 비타민에서와 마찬가지로 강 양이온 교환 수지<sup>(6)</sup> 또는 역상 충전제 column인 C<sub>18</sub> Sep-Pak solid phase extractor를 이용한다<sup>(3,7,8)</sup>.

Riboflavin의 경우 식품 중에서 riboflavin 5'-phosphate(flavin mononucleotide, FMN)와 flavin adenine dinucleotide (FAD) 형태로 단백질과 결합하고 있으므로 먼저 단백질을 가

\*Corresponding author : Kang-Lyung Woo, Division of Life Science, Kyungnam University, 449, Wolyungdong, Masan 631-701, Korea  
Tel: 82-55-249-2688  
Fax: 82-55-243-8133  
E-mail: klwoo@kyungnam.ac.kr

수분해한 후 thiamin정량에서와 같이 효소를 이용하여 인산 결합을 절단하여 유리 riboflavin으로 하여 정량하는 방법이 개발되어 있다<sup>(9,10)</sup>.

비타민 B<sub>6</sub>의 경우 pyridoxine(PN), pyridoxal(PL) 및 pyridoxamine(PM)의 3가지 형태가 존재하며 이들이 인산과 결합한 phosphate형태도 존재한다. Phosphate ester 결합을 절단하기 위하여 염산이나 황산 용액으로 가열하거나 autoclave에서 고압 가열하는 방법<sup>(11)</sup> 또는 acid phosphatase와 diastase로 가수분해 한 후 유리시키는 방법이 개발되어 있다<sup>(12,13)</sup>. 유리 비타민 B<sub>6</sub>와 인산과 결합한 B<sub>6</sub>를 동시에 모두 검출할 필요가 있을 경우 perchloric acid, metaphosphoric acid 또는 sulphosalicylic acid를 이용한 추출 방법도 이용되고 있다<sup>(14)</sup>. 그러나 이 경우 sulphosalicylic acid가 분석에 방해 물질로 작용하는 결점이 있다. Niacinamide(nicotinamide)의 경우 식품 중에서 유리형태 또는 nucleotide와 결합한 형태로 존재하며 열, 빛, 산, 염기 및 산화에 매우 강한 특성을 갖고 있다. 추출은 주로 산이나 염기에 의한 가수분해 방법이 주로 이용되고 있는 데 염기에 의한 가수분해 방법이 추출시간이 빠른 것으로 알려져 있다. 산 가수분해 후 takadiastase 또는 papain 등의 효소에 의한 추출 방법도 있다<sup>(15)</sup>.

Pteroylglutamic acid라고도 불리는 folic acid는 *p*-aminobenzoic acid에 pteridin ring이 결합한 형태를 이루며 열, 빛과 강산 등에 쉽게 파괴되므로 식품으로부터 추출 정제가 매우 힘들고 분석방법도 매우 제한적이다. Ascorbate<sup>(16,17)</sup> 또는 mercaptoethanol<sup>(18)</sup>과 같은 항 산화제를 사용하여 추출하는 방법이 개발되어 있고 분석을 쉽게 하기 위하여 돼지 신장과 닭의 췌장으로부터 분리한 conjugase효소를 이용하여 polyglutamyl folic acid를 monoglutamic acid 형태로 전환시켜 추출하는 방법들이 개발되어 있다<sup>(19-21)</sup>.

식품으로부터 추출된 수용성 비타민의 정제 방법으로는 주로 이온 교환 수지 column<sup>(6,11,12,22)</sup> 또는 C<sub>18</sub> Sep-Pak solid phase extractor<sup>(3,4,7,8,11,12,22)</sup>에 의하여 행하여지고 있다. 분석에 이용되는 column으로는 silica gel column<sup>(5,15)</sup>, 극성 column<sup>(6,23)</sup>, ion exchange column<sup>(6,11,12,14,24)</sup> 및 역상 column<sup>(3-5,7,13,22,25-27)</sup> 등에 의하여 분석되고 있다.

수용성 비타민은 그 종류에 따라 식품으로부터 추출 방법이 각기 다양하게 개발되어 있고 추출 방법에 따라 많은 량의 비타민이 파괴된다. HPLC를 이용한 분석시에도 각기 다른 화학적 성질 때문에 단일 분석으로 여러 종류의 비타민을 동시에 분석할 수 없는 결점이 있다. 위에서 살펴본 것과 같이 효소적 추출법에서도 비타민의 종류에 따라 각기 사용되는 효소의 종류를 달리하여 분석하고 있고 거의 모든 경우 효소적 처리와 화학적 또는 과도한 물리적 처리를 병행하므로서 추출비타민의 파괴위험성이 높다. 본 연구에서는 지금까지 비타민 추출에 이용된 적이 없는 bovine pancreas로부터 얻은 protease와 파인애플에서 얻은 bromelain과 같은 비교적 온화한 분해능력을 가진 단백질 분해효소를 전분 분해 효소인  $\alpha$ -amylase와 동시에 적용시켜 어떤 다른 화학적, 물리적 처리도 겸용하지 않은 순수한 효소처리법으로 될 수 있는 한 많은 종류의 수용성 비타민을 파괴를 최소화하여 동시에 추출하고자 하였다. 그렇게 하므로서 지금까지 개발된 복잡한 다단계 추출법에 의한 비타민 파괴를 최소화하고 비

타민 정량에서 매우 복잡한 시료 전처리 과정을 최대한 단순화시키고자 하였다. 또한 최근 시료정제에 많이 사용하는 C<sub>18</sub> solid phase extractor column을 사용하여 추출된 비타민을 어느 정도 정제할 수 있는지를 검증하고 한 column상에서 한번에 추출된 수용성 비타민을 모두 검출할 수 있는 역상 HPLC분석방법을 개발하는 데 그 목적이 있다. 검출기로는 UV-Visible 검출기를 사용하였는데 이는 비록 형광검출기에 비하여 검출감도는 낮으나 UV흡광이 있는 수용성 비타민을 한 파장에서 모두 검출이 가능하고 기기의 보편성과 다양성 및 형광이 없는 비타민의 동시분석을 위하여 선택하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

Bromelain(파인애플에서 추출), protease(bovine pancreas, type 1)와 개별 수용성 비타민 표준품(ascorbic acid, *p*-benzoic acid, pyridoxal, pyridoxine, pyridoxamine, niacinamide, thiamin, folic acid, riboflavin)과 시료정제를 위한 C<sub>18</sub> Sep-Pak solid phase extraction column(5×1 cm I.D.)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고  $\alpha$ -amylase(*Bacillus subtilis*)는 동경 화성 공업 주식회사(Japan)에서 구입하였다. HPLC용 methanol은 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 구입하였고 기타시약은 분석등급을 사용하였다. 돼지고기와 감자는 시중에서 구입하여 사용하였다.

### 고속액체 크로마토그래피(HPLC)

HPLC는 Spectra Physics 8800(ternary pump)을 사용하였고 검출기는 Spectra 200 programmable wavelength UV 검출기를 사용하여 270 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검출기 감도는 0.05 a.u.f.s로 설정하였다. Column은 Nova-Pak C<sub>18</sub> column(300×3.9 mm I.D., 4  $\mu$ m dimethyloctadecylsilyl-bonded amorphous silica, Waters)을 사용하였고 column온도는 30°C로 고정하였다. 용매는 He기체 탈기 장치(Spectra-Physics)로 연속적 탈기 하에서 사용하였고 용매조성은 A용매는 NH<sub>4</sub>OH로 pH를 6.7로 조절한 0.5 M potassium phosphate monobasic 용액이었고 B용매는 NH<sub>4</sub>OH로 pH를 6.7로 조절한 0.25 M potassium phosphate monobasic 용액과 methanol을 1:1로 혼합하여 사용하였다. 용매의 흐름속도는 1.0 mL/min로 하였고 용매 구배는 0 min; A 100% B 0%, 6 min: A 100% B 0%, 13 min: A 80% B 20%, 15 min: A 80% B 20%, 17 min; A 20% B 80%, 20 min; A 0% B 100%로 하였다.

### 수용성 비타민 표준용액의 조제

탈 이온화한 증류수로 ascorbic acid; 0.0025 mg/mL, pyridoxal, pyridoxine, pyridoxamine(Vit B<sub>6</sub>); 각각 0.1 mg/mL, *p*-aminobenzoic acid; 0.005 mg/mL, niacinamide; 0.017 mg/mL, thiamin; 0.012 mg/mL, folic acid; 0.01 mg/mL 그리고 riboflavin; 0.002 mg/mL의 농도로 하였다.

### 표준 수용성 비타민의 회수율 측정

표준 수용성 비타민을 bromelain처리법과 protease처리법으

로 구분하여 수행하였고 결과를 개별 비타민 별로 추출 방법을 각기 달리하는 A.O.A.C. 추출법<sup>(28)</sup>에 따라 추출한 결과와 비교하여 회수율을 측정하였다. Bromelain 처리법은 표준 수용성 비타민 용액 1 mL에 증류수를 30 mL 가하여 10분 동안 균질한 후 phosphoric acid로 pH를 4.5로 조절하고 bromelain 50 mg과  $\alpha$ -amylase 50 mg을 첨가한 후 45°C에서 3시간 배양하였다. 온도를 실온으로 한 후 20% metaphosphoric acid를 10 mL 가하여 단백질을 침전시킨 후 10,000 rpm, 5°C에서 30분간 원심분리 하였다. 상등액은 따로 모으고 잔사에 5% metaphosphoric acid 10 mL를 가하여 위와 같은 조건으로 원심 분리하여 상등액을 합하였다. 이 과정을 한번 더 반복하여 상등액을 모두 합하여 100 mL로 정용하였다. 5 mL의 methanol로 미리 세척한 C<sub>18</sub> Sep-Pak column에 시료용액 5 mL를 통과시켜 모으고 1% phosphoric acid 7 mL, 0.1 N NaOH 10 mL와 methanol:증류수(1:1) 용액 3 mL를 각각 통과시켜 앞의 통과액과 합하여 25 mL로 정용하여 0.25  $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 10  $\mu$ L를 HPLC에 주입하였다. 모든 실험과정은 빛을 최대한 차광한 상태에서 수행하였다.

Protease처리법은 표준 수용성 비타민 용액 1 mL에 증류수를 30 mL가하고 10분간 균질 후 0.1 N NaOH로 pH를 6.9로 조절한 다음 protease 50 mg과  $\alpha$ -amylase 50 mg을 첨가한 후 45°C에서 3시간 배양하였다. 그 다음 과정은 bromelain처리법과 동일하였다. 회수율은 표준 비타민 수용액을 아무런 처리를 거치지 않고 그대로 분석한 peak면적과 처리과정을 거쳐 분석한 peak 면적 비로 계산하였다.

**시료에 대한 수용성 비타민 분석**

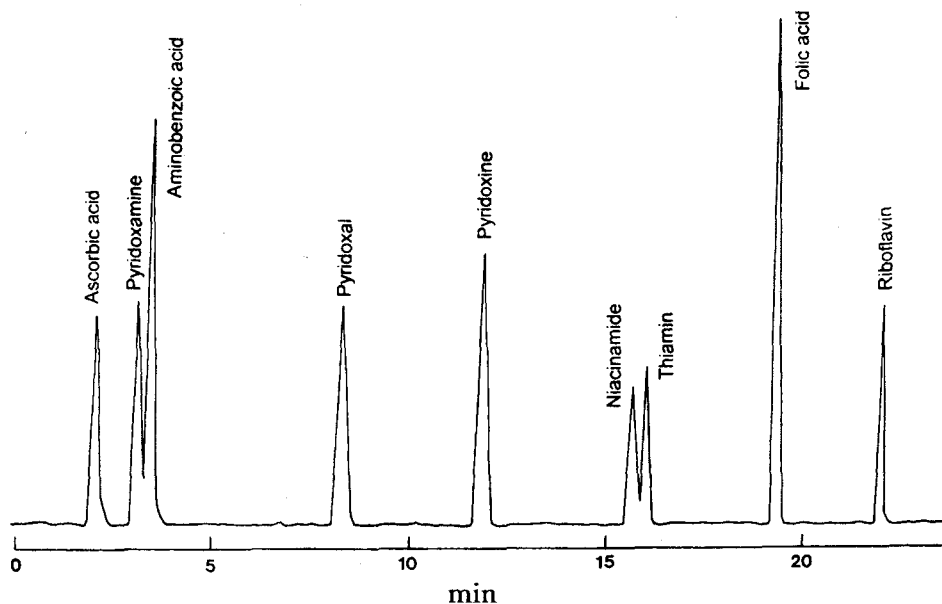
돼지고기와 감자에 대한 수용성 비타민의 분석은 다음과 같이 하였다. 즉 돼지고기 10 g을 취하여 증류수 30 mL를 넣고 10분간 균질화한 후 phosphoric acid를 가하여 pH를 4.5로 조절하였다. Bromelain 추출 법에서는 bromelain 250 mg

과  $\alpha$ -amylase 250 mg, protease추출 법에서는 protease 250 mg과  $\alpha$ -amylase 250 mg을 각각 가하여 45°C에서 3시간 동안 배양하였다. 그 다음 과정은 표준 수용성 비타민 회수율 실험과정과 동일하게 수행하였다.

감자의 경우 감자 100 g을 취하여 증류수 100 mL를 가하여 10분간 균질하여 phosphoric acid로 pH를 4.5로 조절한 후 bromelain 추출 법에서는 bromelain 250 mg과  $\alpha$ -amylase를 2 g을 가하고 protease 추출 법에서는 protease 250 mg과  $\alpha$ -amylase 2 g을 각각 넣어 45°C에서 3시간 배양하였다. 실온으로 식힌 후 20% metaphosphoric acid 50 mL를 가하여 단백질을 침전시키고 10,000 rpm, 5°C에서 30분간 원심 분리하였다. 상등액은 모으고 잔사에 5% metaphosphoric acid를 100 mL를 가하여 위와 같이 다시 원심분리하여 상등액을 합하고 다시 한번 더 5% metaphosphoric acid 50 mL를 가하여 상기 과정을 되풀이하여 상등액을 모두 모아 350 mL로 정용하여 그 중 10 mL를 취하여 C<sub>18</sub> Sep-Pak column을 통과시켰다. 그 이후의 과정은 돼지고기의 경우와 동일하게 수행하였다. 표준 수용성 비타민 회수율 결정 시 수행한 A.O.A.C. 추출방법<sup>(28)</sup>에 따라 돼지고기와 감자에 대하여서도 A.O.A.C. 추출 방법으로 수행하여 분석결과를 본 연구 방법과 비교하였다.

**수용성 비타민 강화 시료에 대한 회수율 결정**

돼지고기와 감자시료에 각 시료에서 검출된 비타민 만 표준 수용성 비타민 용액(농도는 전체 표준 수용성 비타민 용액과 동일)을 따로 만들어 2 mL를 첨가하여 돼지고기와 감자 시료 중 수용성 비타민 분석방법과 동일하게 수행하여 첨가하지 않았을 경우의 결과치를 첨가한 결과치에서 뺀 후 첨가량을 기준으로 회수율을 계산하였다. 단 A.O.A.C.추출법에서는 표준 수용성 비타민을 시료에 직접 첨가한 것은 각 비타민 별 추출방법의 추출 목적 비타민만 첨가하고 나머지 비타민은 추출 정제된 용액에 첨가하여 분석하였다.



**Fig. 1. Chromatogram of standard water soluble vitamins resolved on Nova-Pak (30 × 3.9 cm I.D.) C<sub>18</sub>-column.** Injection amount; ascorbic acid (12.5 ng), pyridoxamine (500 ng), *p*-aminobenzoic acid (25 ng), Pyridoxal (500 ng), pyridoxine (500 ng) niacinamide (85 ng), thiamin (60 ng), folic acid (50ng), riboflavin (10ng).

**Table 1. Recoveries of standard water soluble vitamins determined with the methods of the bromelain and the protease (bovine pancreas) hydrolysis and AOAC extraction method for sample preparation**

Vitamin	Treatment		
	Bromelain	Protease	AOAC method
Ascorbic acid	0	0	-
Aminobenzoic acid	102.28 ± 9.34	94.51 ± 5.78	-
Pyridoxal	92.12 ± 4.85	75.42 ± 4.63	65.28 ± 1.15
Pyridoxine	94.79 ± 6.07	94.08 ± 6.55	86.72 ± 5.69
Pyridoxamine	95.42 ± 4.49	101.36 ± 2.39	65.57 ± 3.21
Niacinamide	89.58 ± 3.05	85.48 ± 8.53	96.69 ± 0.28
Thiamin	105.74 ± 6.55	103.54 ± 7.93	89.31 ± 5.75
Folic acid	37.63 ± 4.17	91.49 ± 5.78	48.18 ± 0.04
Riboflavin	101.75 ± 7.86	91.40 ± 6.04	100.38 ± 1.37

n=3

**결과 및 고찰**

**표준 수용성 비타민의 회수율**

본 연구에서 표준품으로 사용된 9가지 수용성 비타민이 C<sub>18</sub> Nova-Pak 역상 column상에서 모두 분리되었다(Fig. 1).

Table 1에 표준 수용성 비타민을 bromelain과 protease 및 α-amylase효소 처리하여 추출한 방법과 A.O.A.C.추출법으로 처리하여 분석한 회수율 결과치를 나타내었다.

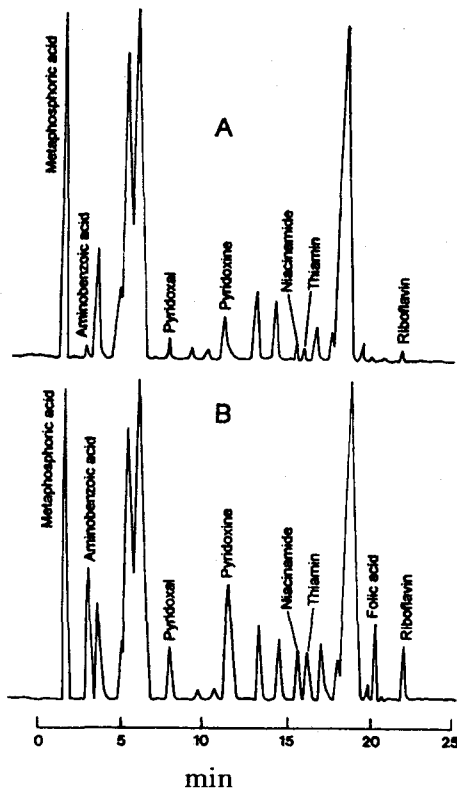
Bromelain처리법에서는 folic acid가 37.63%, A.O.A.C.법에서 48.18%로 protease 91.49%에 비하여 매우 낮은 값을 보였다(p<0.01). Protease처리의 경우 pyridoxal이 75.42%로 가장 낮은 값을 보였으나 A.O.A.C.추출법에서 가장 낮은 65.23% 보다는 높은 회수율을 보였다(p<0.01). Niacinamide를 제외하고는 대부분의 비타민이 A.O.A.C.추출법에 비하여 본 연구 방법이 높은 회수율을 나타내었다.

Ascorbic acid는 bromelain, protease처리법 모두에서 전혀 검출되지 않은 것으로 보아 추출 과정에서 모두 파괴되는 것으로 보인다. 다른 수용성 비타민 정량시 ascorbic acid를 함께 정량하는 것은 불가능 할 것으로 사료된다. Folic acid의 경우 열과 빛 및 강산에 민감한 결점을 갖고 있고 추출시 항산화제를 사용하여야 하는 점<sup>(16-18)</sup>으로 미루어 추출과정에서 상당량이 파괴되는 것으로 사료된다. 그러나 protease처리법에서는 상당히 높은 값을 나타낸 이유는 불분명하다. 대체로 folic acid를 제외하고는 bromelain처리법이 높은 회수율을 보였다.

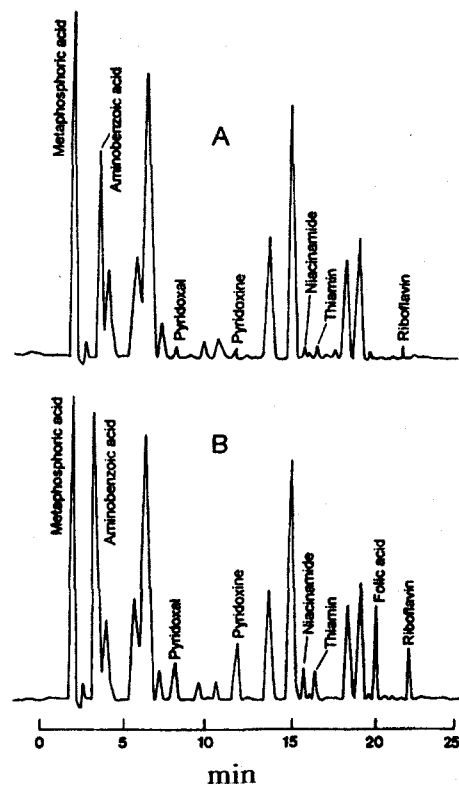
**돼지고기 중의 수용성 비타민의 함량 및 비타민강화 돼지고기중 비타민 회수율**

돼지고기 및 비타민 강화 돼지고기의 수용성 비타민 분석 크로마토그램을 A.O.A.C.방법으로 분석한 크로마토그램과 비교하여 Fig. 2-7에 나타내었다.

Bromelain이나 protease처리의 경우 돼지고기 중 수용성 비타민은 aminobenzoic acid, pyridoxal, pyridoxine, niacina-



**Fig. 2. Chromatograms of water soluble vitamins in pork determined with the method of protease (bovine pancreas) hydrolysis. A; raw sample, B; fortified sample with standard water soluble vitamins.**



**Fig. 3. Chromatograms of water soluble vitamins in pork determined with the method of bromelain hydrolysis. A; raw sample, B; fortified sample with standard water soluble vitamins.**

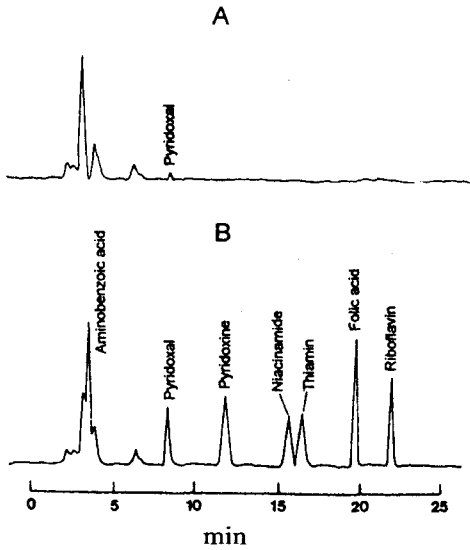


Fig. 4. Chromatograms of pyridoxal in pork determined with AOAC extraction method.

A; raw sample, B; fortified sample with pyridoxal, the other vitamins were added to extracted and purified sample solution.

amide, thiamin 및 riboflavin 등 6가지가 검출되었다. C<sub>18</sub> Sep-Pak column을 거쳐 정제하여도 불순 peak들이 많이 검출되었으나 분석에 방해할 일으키는 peak는 없었다(Fig 2A). 이러한 불순 peak들은 정제과정에서 회수율 증가를 위하여 인산, NaOH, methanol/H<sub>2</sub>O 1:1용액 등으로 씻어 내릴 때 col-

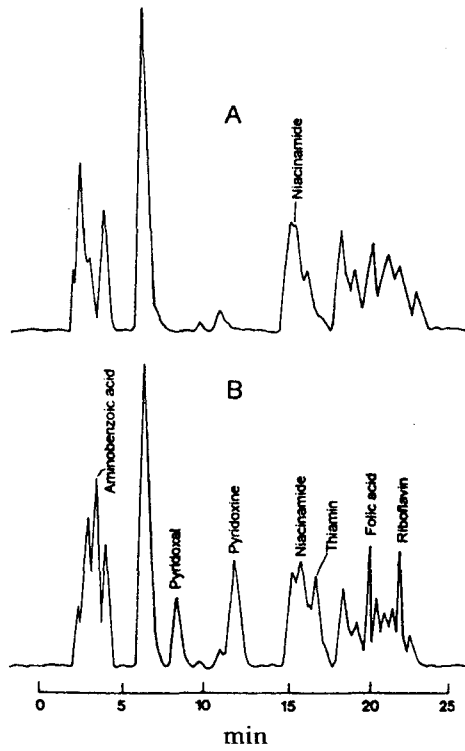


Fig. 5. Chromatograms of niacinamide in pork determined with AOAC extraction method.

A; raw sample, B; fortified with niacin amide, the other vitamins were added to extracted and purified sample solution.

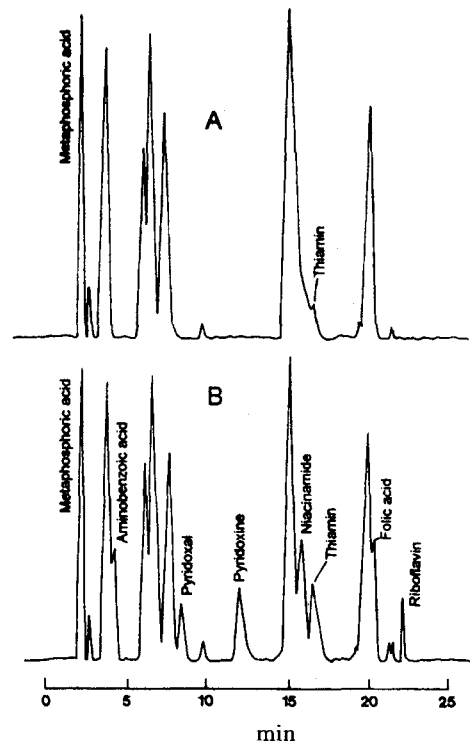


Fig. 6. Chromatograms of thiamin in pork determined with AOAC extraction method.

A; raw sample, B; fortified sample with thiamin, the other vitamins were added to extracted and purified sample solution.

umn에 흡착된 불순물의 일부가 용출된 것으로 보인다. 비타민 강화시료의 분석 크로마토그램과 비교하여 보았을 때 분석된 비타민들이 정확히 정성되었음을 알 수 있었다(Fig. 2B,

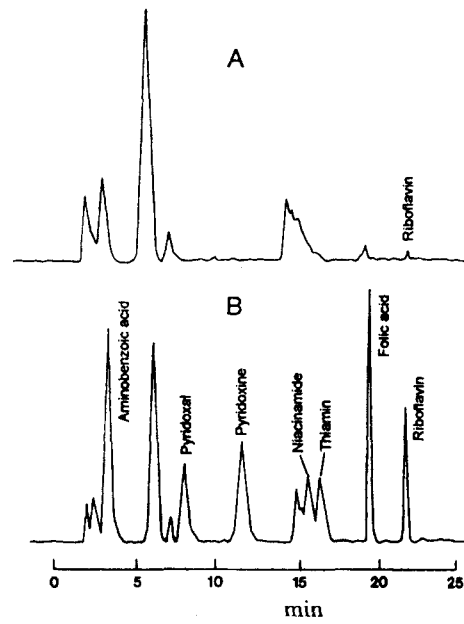


Fig. 7. Chromatograms of riboflavin in pork determined with AOAC extraction method.

A; raw sample, B; fortified sample with riboflavin, the other vitamins were added to extracted and purified sample solution.

**Table 2. Water soluble vitamin contents of pork and recoveries of vitamin in vitamin fortified pork determined with the method of bromelain and protease (bovine pancreas) hydrolysis and AOAC extraction method for sample preparation**

(Unit: mg/100 g edible portion)

Vitamins	Treatment			Reference
	Bromelain	Protease	AOAC	
Pyridoxal	0.71 ± 0.02 (95.35 ± 5.28) <sup>5)</sup>	0.31 ± 0.01 (91.24 ± 3.84)	0.91 ± 0.03 (81.25 ± 3.91)	0.13 <sup>1)</sup> , 0.34-0.43 <sup>2)</sup>
Pyrioxine	4.21 ± 0.45 (99.57 ± 4.21)	6.67 ± 0.57 (102.33 ± 4.59)	-	-
Niacinamide	5.89 ± 0.36 (92.19 ± 8.56)	2.80 ± 0.30 (93.23 ± 7.02)	14.60 ± 2.34 (109.56 ± 10.12)	2.59-6.85 <sup>3)</sup>
Thiamin	1.67 ± 0.18 (101.34 ± 9.59)	1.37 ± 0.16 (108.59 ± 5.45)	0.53 ± 0.03 (95.65 ± 10.26)	1.26-1.27 <sup>4)</sup> , 1.10 <sup>2)</sup>
Riboflavin	0.36 ± 0.01 (98.87 ± 6.89)	0.27 ± 0.01 (97.57 ± 4.74)	0.08 ± 0.02 (98.19 ± 5.63)	0.24 <sup>1)</sup> , 0.19-0.33 <sup>2)</sup>
Aminobenzoic acid	1.93 ± 0.05 (105.12 ± 6.78)	1.22 ± 0.08 (95.86 ± 3.99)	-	-

n=3

<sup>1)</sup>Reference 34

<sup>2)</sup>Reference 32

<sup>3)</sup>Reference 29 (raw pork loin)

<sup>4)</sup>Reference 33

<sup>5)</sup>Values in the parentheses are the recoveries of fortified standard vitamins in the sample.

3B). A.O.A.C.추출법에 의한 chromatogram과 비교하여 보았을 때 A.O.A.C.의 비타민 B<sub>6</sub> 추출 정제법에 따라 분석한 결과 pyridoxal밖에 검출되지 않았고 불순 peak는 본 연구방법에 비하여 상당히 줄어들었다(Fig. 4A). 그러나 niacinamide나 thiamin의 경우는 A.O.A.C.추출법이 오히려 정성에 방해가 되는 불순 peak들이 많이 나와 정확한 정성과 정량이 불가능하였다(Fig. 5A, 6A). 그러나 riboflavin의 경우는 정성에 방해가 되는 불순 peak가 없었다.

Table 2에 돼지고기 중 수용성 비타민 함량을 각 분석 방법 별로 나타내었고 괄호 안에 비타민 강화시료에서 각 첨가 비타민의 회수율을 나타내었다 Pyridoxal의 경우 A.O.A.C. 방법과 bromelain 가수분해 방법에서 문헌에 나타난 값들 보다 높게 나왔다(p<0.01). Niacinamide의 경우 A.O.A.C.추출법이 bromelain 및 protease가수 분해 방법과 문헌에 나타난 값보다 훨씬 높게 나왔다(p<0.01). Thiamin과 riboflavin의 경우는 위와 반대로 A.O.A.C.법에서 매우 낮은 값을 보였다(p<0.01). 이는 A.O.A.C. 추출법이 어느 한가지 비타민만 순수 분리 정제하는 방법으로 매우 복잡한 과정을 거치기 때문에 상당량의 손실이 뒤따르는 것으로 판단된다. Niacinamide의 경우 본 연구 방법과 문헌<sup>(29)</sup>에 나타난 값이 비슷하였으나 A.O.A.C.법에서는 매우 높게 나타난 것은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 A.O.A.C.법에서 niacinamide와 겹치는 불순 peak 때문에 정확한 정량이 되지 않았기 때문으로 생각된다.

본 연구 방법에서 bromelain과 protease법을 비교하면 pyridoxal과 niacinamide가 bromelain법에서 높게 나왔고(p<0.01) pyridoxine의 경우 protease법에서 높게 나왔고(p<0.01). 식품 중 수용성 비타민들은 주로 단백질과 결합하고 있는 데 특히 비타민 B<sub>6</sub>의 경우는 주로 단백질과 공유결합을 하고 있다<sup>(31)</sup>. 효소분해법에 의한 단백질과 비타민간의 결합을 절단할 경우 단백질함량이 높은 시료에서는 단백질 분해 효소의 작용으로 생성되는 단쇄 peptide들이 단백질 침전제에 의하

여 완전히 침전되지 않고 불순 peak로 영향을 줄 수 있는 가능성도 배제 할 수 없다. 식품 중 비타민의 함량은 매우 적고 또한 추출 정제과정에서 많은 손실이 일어나므로 추출과정을 단순화할 필요는 있으나 이 경우 불순물에 의한 영향을 고려하지 않을 수 없고 순수분리를 위하여 A.O.A.C.법에서 처럼 추출 분리과정을 여러 단계로 할 경우 특히 수용성 비타민에서는 많은 손실이 따르기 마련이다. 그러므로 비타민 분석에서 추출 방법에 따라 상당량의 함량차이가 나는 것은 피할 수 없다.

비타민 강화시료에 대한 첨가비타민의 회수율을 보면 대부분의 비타민이 표준비타민의 회수율 경우보다 다소 높은 회수율을 보였다. 특히 표준 수용성 비타민의 회수율에서 상당히 낮은 값을 보였던 bromelain 처리시 folic acid와 protease 처리시 pyridoxal 그리고 A.O.A.C.방법에서 folic acid가 높은 회수율을 보였다. 이는 추출 과정에서 시료 중 고분자 화합물들이 비타민의 파괴를 상당히 방지하는 것이 아닌가 생각된다. 본 방법에서 사용한 효소 처리방법은 식품 중 수용성 비타민의 정량에 매우 적합한 방법인지는 말할 수 없으나 비타민 강화식품에서 비타민 정량에는 상당히 유효한 방법으로 사료된다.

#### 감자 중 수용성 비타민의 함량 및 비타민 강화 감자 중 수용성 비타민의 회수율

Fig. 8-13에 감자와 비타민 강화 감자 시료 중 수용성 비타민의 분석 크로마토그램을 나타내었다. 감자 시료에서 검출된 수용성 비타민은 protease처리의 경우 aminobenzoic acid, pyridoxal, pyridoxine 및 thiamin 등 4가지가 검출되었다(Fig. 8A, 9A). Bromelain 처리의 경우 pyridoxal이 검출되지 않았고 A.O.A.C.방법에서는 aminobenzoic acid는 검출되지 않았고 pyridoxamine이 검출되었다(Fig. 10A). 돼지고기에서와 마찬가지로 비타민 강화 시료에서 peak가 정확히 동정되었음

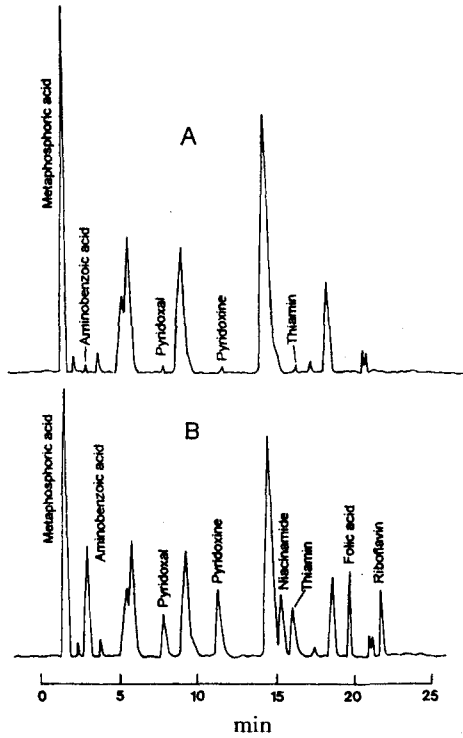


Fig. 8. Chromatogram of water soluble vitamins in potato determined with the method of protease (bovine pancreas) hydrolysis.

A; raw sample, B; fortified sample with standard vitamins.

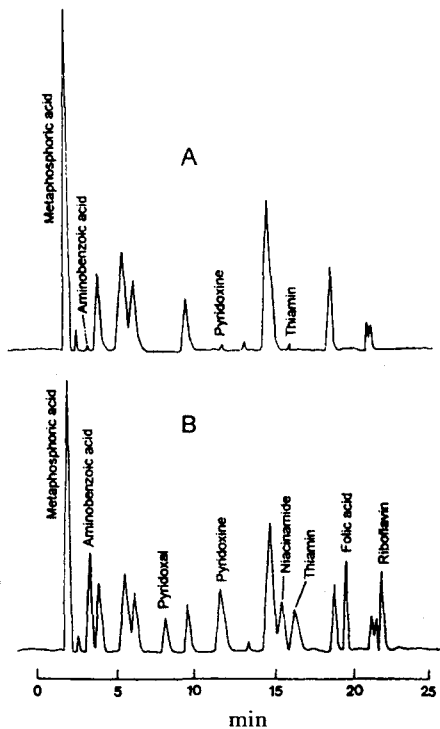


Fig. 9. Chromatograms of water soluble vitamins in potato determined with the method of bromelain hydrolysis.

A; raw sample, B; fortified sample with standard vitamins.

을 알 수 있었다(Fig. 8B, 9B). 본 연구의 효소 추출법에서 돼지고기와 마찬가지로 불순 peak들이 많이 나왔으나 검출

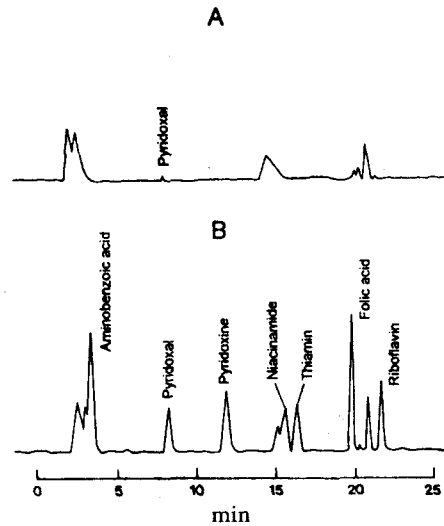


Fig. 10. Chromatograms of pyridoxal in potato determined with AOAC extraction method.

A; raw sample, B; fortified sample with pyridoxal, the other vitamins were added to extracted and purified sample solution.

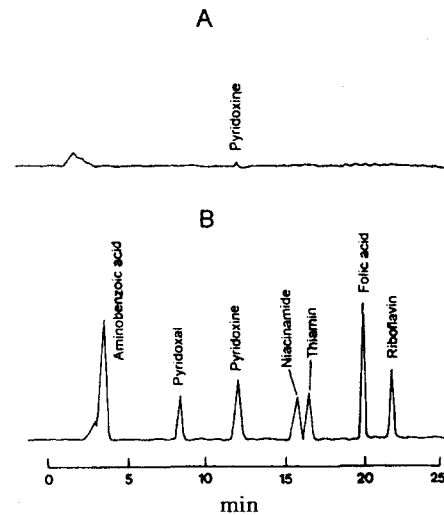


Fig. 11. Chromatograms of pyridoxine in potato determined with AOAC extraction method.

A; raw sample, B; fortified sample with pyridoxine, the other vitamins were added to extracted and purified sample solution.

에 방해되는 peak들은 없었다(Fig. 8, 9). 그러나 A.O.A.C.추출법에서는 pyridoxamine과 thiamin의 경우 불순 peak와 겹쳐 정확한 검출이 불가능하였다(Fig. 12A, 13A) 그러나 pyridoxal과 pyridoxine의 경우 거의 불순 peak들이 나타나지 않았다(Fig. 10A, 11A).

Table 3에 감자 중 비타민 함량과 비타민 강화 감자에서 강화 비타민의 회수율을 각 방법별로 나타내었다. Pyridoxal의 경우 bromelain 가수분해 법에서는 검출되지 않았으나 protease가수분해 및 A.O.A.C.법에서는 문헌에 나타난 값과 매우 비슷한 결과를 나타내었다, A.O.A.C.법에서는 pyridoxamine과 thiamin이 높은 값으로 검출되었는데 이는 불순 peak의 영향 때문으로 생각된다. 돼지고기와는 달리 비타민 B<sub>6</sub> 함량이 문헌에 나타난 값과 큰 차이를 보이지 않았는데

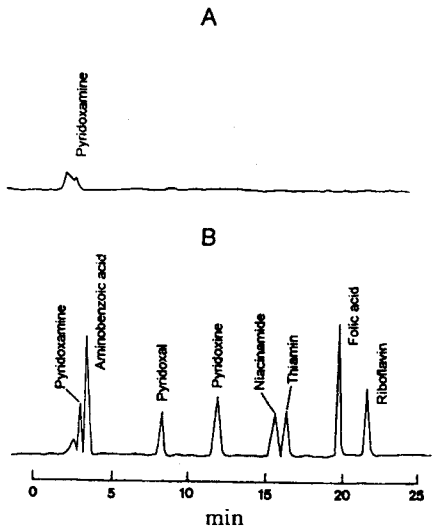


Fig. 12. Chromatograms of pyridoxamine in potato determined with AOAC extraction method.

A; raw sample, B; fortified sample with pyridoxamine, the other vitamins were added to extracted and purified sample solution.

감자 중 단백질 함량이 매우 낮은 것을 감안 할 때 단백질과 주로 공유 결합을 이루고 있는 비타민 B<sub>6</sub>가 단백질 분해 효소에 의하여 생성되는 단백질에 의한 불순 peak의 영향이 거의 없었기 때문이 아닌가 생각된다. 감자에 비하여 단백질 함량이 매우 높은 돼지고기에서 pyridoxal이 bromelain 가수분해와 A.O.A.C.방법에서 상당히 높은 함량을 보였던 것과 감자에서 문헌과 비슷한 값을 보인 점을 감안 할 때 위의 추리가 어느정도 가능성이 있는 것으로 생각된다. 이러한 점을 고려할 때 단백질 함량이 높은 시료의 효소 처리방법에 의한 비타민 추출 정제 시 별도의 정제과정이 추가되어야 할 것으로 사료된다.

강화 비타민의 회수율에서도 돼지고기와 마찬가지로 표준 수용성 비타민 경우의 회수율보다 높게 나왔다. 표준 수용성 비타민 회수율에서 protease처리시 75.42%로 낮은 값을 보였던 pyridoxal이 107.53%로 나타났다.

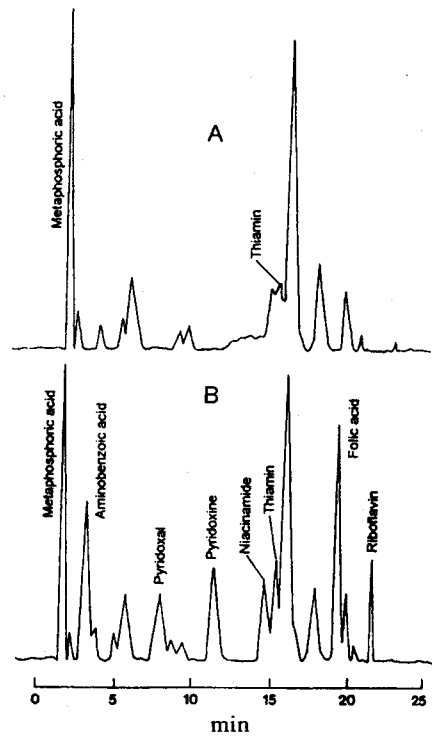


Fig. 13. Chromatograms of thiamin in potato determined with AOAC extraction method.

A; raw sample, B; fortified sample with pyridoxamine, the other vitamins were added to extracted and purified sample solution.

요 약

식품에 함유된 수용성 비타민의 분석을 위하여 식품 중 단백질, 탄수화물 등과 결합하고있는 수용성 비타민을 추출 과정에서 파괴를 최소화하기 위하여 지금까지 통상적으로 행하여온 어떤 화학적 처리도 병용하지 않고 단백질 분해효소인 bromelain과 소의 췌장에서 추출한 protease 및 α-amylase를 이용하여 결합을 절단하는 순수한 효소처리방법만을 이용하여 추출하였다. 추출된 비타민 시료용액을 C<sub>18</sub> Sep-Pak

Table 3. Water soluble vitamin contents of potato and recoveries of vitamin in vitamin fortified potato determined with the methods of bromelain and protease (bovine pancreas) hydrolysis and AOAC extraction method for sample preparation

(Unit: mg/100 g edible portion)

Vitamins	Treatment			Reference
	Bromelain	Protease	AOAC	
Pyridoxal	- (98.77 ± 3.68)	0.20 ± 0.01 (107.53 ± 11.25)	0.21 ± 0.03 (87.53 ± 6.64)	0.14-0.23 <sup>1)</sup>
Pyridoxine	1.00 ± 0.24 (102.41 ± 10.25)	0.37 ± 0.06 (98.57 ± 7.92)	0.18 ± 0.05 (90.22 ± 3.37)	-
Pyridoxamine	- (99.24 ± 8.32)	- (97.55 ± 2.36)	5.04 ± 0.91 (112.53 ± 15.95)	-
Thiamin	0.04 ± 0.004 (103.72 ± 5.97)	0.04 ± 0.002 (99.44 ± 2.34)	0.64 ± 0.01 (82.69 ± 8.97)	0.17 <sup>1)</sup> , 0.079 <sup>2)</sup>
Aminobenzoic acid	0.03 ± 0.008 (105.21 ± 15.47)	0.06 ± 0.01 (100.93 ± 14.24)	-	-

n=3

<sup>1)</sup>Reference 32 (total Vit B<sub>6</sub>).

<sup>2)</sup>Reference 34 (mashed potato).



solid phase extraction column으로 정제하여 추출된 비타민을 한 column상에서 한번에 모두 역상 HPLC로 분석하는 방법을 개발하였다. 이 방법으로 표준 수용성 비타민의 회수율과 돼지고기 및 감자 중의 수용성 비타민분석 결과와 이들 식품에 수용성 비타민을 강화하였을 때 강화 비타민의 회수율을 측정된 결과를 A.O.A.C.방법에 따라 추출 정제하여 분석한 결과와 비교하였다. Bromelain 처리와 A.O.A.C.법에서 표준수용성 비타민 중 folic acid가 가장 낮은 37.63%와 48.18%를 나타내었고 protease 처리에서는 pyridoxal이 가장 낮은 75.45%를 나타내었다. Niacinamide를 제외하고는 효소 처리법이 A.O.A.C.법보다 높은 회수율을 보였다. 돼지고기 중 수용성비타민은 효소 처리방법에서 aminobenzoic acid, pyridoxal, pyridoxine, niacinamide 및 thiamin 등 6가지가 검출되었고 C<sub>18</sub> Sep-Pak column에 의한 정제에도 불구하고 불순 peak들이 많이 나왔으나 정량에 방해되는 불순 peak는 없었고 A.O.A.C.방법에 의한 추출 정제 시 niacinamide와 thiamin정량에 있어서 불순 peak에 의하여 정확한 정량이 불가능하였다. 돼지고기에서 특히 단백질과 공유결합을 형성하고 있는 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 문헌에 보고된 값들 보다 상당히 높은 값으로 정량되어 단백질 함량이 높은 시료에 대하여 별도의 정제과정이 추가로 필요한 것으로 나타났다. 비타민 강화 돼지고기 중의 강화 비타민의 회수율은 표준 비타민 보다 회수율이 높고 정확하였다. 감자의 경우 protease처리에서 aminobenzoic acid, pyridoxal, pyridoxine 및 thiamin 등 4가지가 검출되었고 bromelain 처리에서는 pyridoxal이 검출되지 않았다. 효소처리법에서 돼지고기와 마찬가지로 C<sub>18</sub> Sep-Pak column에 의한 정제로도 불순 peak가 많았으나 정량에 방해되는 불순 peak는 없었다. A.O.A.C.방법에서 pyridoxamine과 thiamin정량에서 불순 peak로 인하여 정확한 정량이 불가능하였다. 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 돼지고기와 달리 문헌에 나타난 값들과 비슷한 결과를 얻었는데 이는 단백질 함량이 낮은 관계로 판단된다. 비타민 강화 감자에서 강화 비타민의 회수율도 돼지고기와 마찬가지로 상당히 정확하였고 A.O.A.C.법보다 높게 나왔다.

## 문 헌

- Lambert, W.E. and Leenheer, A.D. Quantitative determination of water soluble vitamins using HPLC. pp. 341. In: Food Analysis by HPLC. Nollet, L.M.L. (ed.). Marcel Dekker Inc, New York, USA (1992)
- Ang, C.Y. and Mosley, F.A. Determination of thiamin and riboflavin in meat products by high-pressure liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 28: 483-486 (1980)
- Augustin, J. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in foods by liquid chromatography. J. A.O.A.C. 67: 1012-1015 (1984)
- Fellman, J.K., Artz, W.E., Tassinari, P.D., Cole, C.L. and Augustin, J. Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high-performance liquid chromatography. J. Food Sci. 47: 2048-2067 (1982)
- Van de Weerdhof, T., Wiersum, M.L. and Reissenweber, H. Application of liquid chromatography in food analysis. J. Chromatogr. 83: 455-460 (1973)
- Ayi, B.K., Yuhua, D.A., Moffet, K.S., Joyce, D.M. and Deangelis, N.J. Liquid chromatographic determination of thiamin in infant formula products by using ultraviolet detection. J. A.O.A.C. 68(6): 1087-1092 (1985)
- Wimalasiri, P. and Wills, R.B.H. Simultaneous analysis of thiamin and riboflavin in foods by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 318: 412-416 (1985)
- Hilker, D.M. and Clifford, A.J. Thiamin analysis and separation of thiamin phosphate esters by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 231: 433-438 (1982)
- De Leenheer, A.P., Lambert, W.E. and De Ruyter, M.G. Modern Chromatographic Analysis of Vitamins. Marcel Dekker, New York. (1985)
- Van Nieker, P.J. HPLC in food analysis, pp. 133. MacCrae, R. (Ed.), Academic Press, New York (1988)
- Yasumoto, K., Tadera, K., Tsuji, H. and Mitsuda, H. Semi-automated system for analysis of vitamin B6 complex by ion exchange column chromatography. J. Nutr. Sci. Vitamol. 21: 117-127 (1975)
- Wong, F.F. Analysis of vitamin B6 in extractives of food materials by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 26: 1444-1446 (1978)
- Gregory, J.F. and Kirk, J.R. Assessment of storage effects on vitamin B6 stability and bioavailability in dehydrated food systems. J. Food Sci. 43: 1801-1808 (1978)
- Vanderslice, J.T., Brownlee, S.R. and Cortisoz, M.E. Liquid chromatographic determination of vitamin B6 in foods. J. A.O.A.C. 67: 999-1007 (1984)
- Osborne, D.R. and Voegt, P. The Analysis of Nutrients in Food. Academic Press, New York, USA (1978)
- Hoppner, K. and Lampi, B. The determination of folic acid (pteroylmonoglutamic acid) in fortified products by reversed phase high pressure liquid chromatography. J. Liquid Chromatogr. 5: 953-966 (1982)
- Schiefer, G.W., Wheeler, G.P. and Cimino, C.M. Determination of folic acid in commercial diets by anion-exchange solid-phase extraction and subsequent reversed-phase HPLC. J. Liquid Chromatogr. 7: 2659-2669 (1984)
- Clifford, C.K. and Clifford, A.J. High pressure liquid chromatographic analysis of food for folates J. A.O.A.C. 60: 1248-1251 (1977)
- Gregory, J.F., Sartain, D.B. and Day, B.D. Fluorometric determination of folacin in biological materials using high-performance liquid chromatography. J. Nutr. 114: 341-353 (1984)
- Holt, D.L., Wheling, R.L. and Zeece, M.G. Determination of native folates in milk and other diary products by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 449: 271-280 (1988)
- Reingold, R.N. and Picciano, M.F. Two improved high-performance liquid chromatographic separation. J. Chromatogr. 234: 171-179 (1982)
- Tyler, T.A. and Shrago, R.R. Determination of niacin in cereal samples by HPLC. J. Liquid Chromatogr. 3: 269-277(1980)
- Kral, K. Bestimmung von nicotins ure in fruchts ften durch HPLC mit elektrochemischer detektion an einer station ren quecksilbertropfelektrode. Fresenius Z. Anal. Chem. 314: 479-482 (1983)
- Williams, R.C., Baker, D.R. and Schmit, J.A. Analysis of water soluble vitamins by high speed ion exchange chromatography. J. Chromatogr. Sci. 11: 618-624 (1973)
- Defibaugh, P.W. Evaluation of selected enzymes for thiamin determination. J. A.O.A.C. 70(3): 514-517 (1987)
- Kamman, J.K., Labuza, T.P. and Warthesen, J.J. Thiamin and riboflavin analysis by high performance liquid chromatography. J. Food Sci. 45: 1497-1504 (1980).
- Ohta, H., Baba, T. and Suzuki, Y. High-performance liquid chromatographic analysis of thiamin in rice flour with fluorimetric post-column derivatization. J. Chromatogr. 284: 281-284 (1984)
- A.O.A.C. Official Methods of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1995)

29. Freed, M. Method of vitamin analysis. Interscience, New York, USA (1966)
  30. Dickey, L.E. Composition of foods, raw, processed, prepared, supplement, No. 8, p. 330. United States Department of Agriculture, Human nutrition information service, Agriculture Handbook (1990)
  31. Coffen, D.L. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Wiley, New York, USA (1984)
  32. Friedrich, W. Vitamins. Walter de Gruyter, New York, USA (1988)
  33. MacBride, D.E. and Wyatt, C.J. Evaluation of a method AOAC determination for thiamine and riboflavin in foods. J. Food Sci. 48: 748-750 (1983)
- 

(2001년 6월 29일 접수)