

Micro-HPLC를 이용한 조제분유 중 비타민 A·E 동시분석법 개발

윤이란*, 최유정, 이민권, 정명호, 김병훈

경상남도 축산진흥연구소
(접수 2006. 7. 29, 게재승인 2006. 9. 6)

Development of simultaneous determination of vitamin A and E in infant formula by micro-HPLC

I-Ran Yun, You-Jeong Choi, Min-Kwon Lee, Byeong-Hun Kim

Gyeongnam Livestock Promotion Research Institute, Jinju, 660-985, Korea
(Received 29 July 2005, accepted in revised form 6 September 2006)

Abstract

Semi-micro-HPLC using a column-switching technique was developed for simultaneous determination of vitamin A and E contents in infant formula. Vitamin A and E were extracted by PDA-HPLC with reversed phase column using organic solvent and their contents in Certified Reference Material (CRM) and infant formula were determined and compared with hydrolysis method and rapid extraction. Developed method has many advantages of simple and rapid sample preparation and simultaneous determination of vitamin A and E by micro-HPLC using reversed phase column.

Key words : Rapid extraction, Micro-HPLC, Simultaneous determination, Vitamin A and E

¹Corresponding author

Phone : +82-55-771-6643, Fax : +82-55-771-6619

E-mail : lsubin@hanmail.net

서 론

비타민은 영유아의 정상적인 건강과 발육을 위한 필수적인 요소이기 때문에 유아식품에 함유된 여러 비타민의 함량측정이 필요하다¹⁾. 특히 조제분유의 경우 가공 공정상의 열처리에 의한 비타민의 손실을 보상하고 영유아에 필요한 비타민을 공급하기 위해서 비타민이 첨가되며, 첨가된 비타민은 가공공정 및 저장기간 중 유실될 수 있으므로 최종 생식품에서의 비타민 함량이 규정되어 있다.

식품 중 비타민의 함량은 매우 낮고 대부분의 비타민들이 식품 중 단백질, 전분 또는 인산 등과 결합하고 있다. 비타민은 불안정한 화합물로서 산화되기 쉽고 산소, 열 혹은 자외선을 조사하였을 경우 파괴되기 쉽기 때문에 그 함량을 분석하기 위하여 신속한 전처리 과정이 요구되며, 미량을 다루는 실험이므로 시험결과에 대한 높은 정확성, 재현성 및 안정성을 얻기 위하여 실험방법도 간단하여야 한다.

조제분유는 다양한 영양성분들이 한국인의 영양권장량²⁾ 기준에 맞추어 조제된 식품이다. 이러한 조제분유 중의 각종 영양성분들을 분석하고 그 적합성을 판단할 수 있도록 각종 실험방법들이 식품공전³⁾ 및 AOAC⁴⁾에 소개되어 있으며, 그 복잡한 물질특성으로 인한 실험과정 중의 문제점들을 해결하기 위해 다양한 실험방법들이 연구되고 있다.

조제분유 중의 비타민 함량을 측정하기 위해서는 복잡한 매질로부터 방해물질을 제거한 후 분석하고자 하는 비타민을 분리해야 한다. 비타민 A와 E의 경우는 식품 공전방법⁵⁾ 및 AOAC⁴⁾에 소개되어 있는 것과 같이 알칼리 가수분해와 액체-액체 추출법을 이용하여 변성된 단백질이나 전분 등의 방해물질을 침전시켜 제거한 후 비타민을 비극성용매로 추출하여 그 시험용액을 정량하는 방법⁶⁻⁹⁾이 사용되었다. 또한, 비색측정법⁴⁾도 보고되어 있으나, 실험방법이 복잡하며 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

현행 비타민의 검사법은 비색 측정법, 미생

물학적 검사법 혹은 고성능액체 크로마토그래프(HPLC)를 이용한 개별분석법¹⁰⁾으로 시료전처리 과정이 복잡하고 많은 검사시간이 소요된다. HPLC분석의 시료전처리 과정의 단순화와 검사시간을 단축시키기 위해 HPLC system에 전처리 column과 육방절환 밸브를 부착하여, on-line으로 시료의 제단백을 행하는 column-switching법이 현재 의학 및 제약¹¹⁻¹⁴⁾의 분석에 널리 사용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 알칼리가수분해법에 의한 비타민 파괴를 최소화하고 비타민 정량에서 매우 복잡한 시료 전처리 과정을 최대한 단순화시키고자 하였다. 현행 식품공전 및 축산물의 가공기준 및 성분규격의 방법인 비타민 A와 E의 개별분석법을 신속추출후 column-switching 기술을 적용하여 reversed phase column과 PDA 검출기를 사용하여 동시분석했다. HPLC를 이용하여 조제분유 중 비타민 A, E를 동시에 신속하며 재현성 있게 정량하는 방법을 개발, 확립함으로써 조제분유의 분석시간을 단축하며 정확도와 신뢰도를 높여려는 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용한 재료로는 실험결과 검증을 위한 인증표준물질(certified reference material, CRM)을 구입하여 사용하였다. CRM은 비타민 A를 trans-retinol로서 $5.84 \pm 0.68\text{mg/kg}$ 함유하고 비타민 E를 α -tocopherol로서 $271 \pm 25\text{mg/kg}$, δ -tocopherol로서 $20.19 \pm 1.69\text{mg/kg}$, γ -tocopherol $75.01 \pm 5.07\text{mg/kg}$ (β -tocopherol 포함) 함유하고 있는 Infant Formula SRM 1846 (National Institute of Standard & Technology, Gaithersburg, MD, USA)을 사용하였다. 정성 및 정량 분석을 위하여 사용된 비타민 A와 비타민 E의 표준품(reference material, RM)으로서 all trans-retinol acetate는 Sigma사, α -

tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol은 Supelco사에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약으로 J. T. Baker사의 HPLC급 메탄올과 H₂O를 사용하였으며, phenolphthalein, pyrogallol, 85% potassium hydroxide와 anhydrous sodium sulfate는 특급시약을 사용하였다. 초순수는 Milli-Q (Millipore, France)에 의하여 18.0M Ω 수준으로 정제된 물을 사용하였다.

신속추출법

SRM, 조제분유를 각각 약 1g씩 0.1mg까지 정밀히 취하여 50ml screw-capped extraction tube에 각각 넣고 dimethyl-sulfoxide 1ml 첨가 및 N₂ gas로 충전하여 capping한 후, vortex mixer를 이용하여 1분간 잘 혼합하였다. 혼합후 약 5분간 방치한 후 methanol 10ml로 하여 다시 vortex mixer를 이용하여 1분간 잘 혼합하였다. 혼합된 tube를 micro-12 centrifuge(Hanil, Korea)에서 13,000 rpm, 10분간 원심분리하여 지방과 단백질을 제거한 후 중간층 용액을 취하여 0.2 μ m filter로 여과하여 HPLC에 주입하였다. 전처리 시료는 주입하기 전 4 $^{\circ}$ C에서 보관하면서 사용하였다.

분석기기

HPLC 시스템 (NANOSPACE, Shiseido, Japan)은 SI-1 3001 펌프 2대, PDA 검출기 (SI-2), 자동주입기 (SI-1/3023), 가스제거기 (SI-1/3009)와 스윗칭 밸브 (SI-1/3012)로 구성하였다. 분석칼럼으로는 Capcell pak C18 mg (5 μ m 1.5mm \times 250mm), Capcell pak MF C8 SG 80 Å (5 μ m 4.6mm \times 150mm), Capcell pak C18 mg (5 μ m 2.0mm \times 35mm)을 사용하였다.

표준용액 조제

HPLC grade methanol을 이용하여 all trans-retinol, α -tocopherol, γ -tocopherol,

δ -tocopherol이 각각 1ml 중 1, 5, 10 μ g씩 되도록 조제하였다.

알칼리 가수분해법

비타민 A와 비타민 E를 분석하기 위해 축산물의 가공기준 및 성분규격법의 시료 전처리법을 변형하여 이용하였다. SRM 1846을 약 1g씩 정밀히 달아 각각의 갈색 검화플라스크에 넣었으며, 시료는 0.1mg까지 측정하였다. 에탄올 30ml 및 10% pyrogallol-ethanol 1ml를 가하여 잘 섞은 후 수산화칼륨용액 (9 \rightarrow 10) 3ml를 가해 환류냉각기에 부착하여 비등수욕(95 $^{\circ}$ C) 중에서 30분간 비누화시켰다. 신속히 냉각하여 실온으로 한 후 물 30ml를 가해 갈색분액깔때기에 옮겼다. 플라스크는 물 10ml로 씻고 이어서 30ml 석유에테르로 씻은 후 갈색분액깔때기에 넣은 후 잘 흔들어 혼합하여 방치한 후 물층을 별도의 갈색분액깔때기에 옮겼다. 하층인 물층에 석유에테르 30ml로 2회 추출하였다. 추출하여 모은 에테르층을 모두 합하여 물 10ml 1회, 이어 50ml씩으로 페놀프탈레인 지시약의 붉은 색이 없어질 때까지 반복하여 4-5회 수세하였다. 분액깔때기 중에서 물을 충분히 분리한 석유에테르층을 취하여 무수황산나트륨을 석유에테르 10ml 씩으로 2회 씻고, 씻은 액을 앞의 플라스크에 가하였다. 이 용액을 40 $^{\circ}$ C에서 감압농축하고, 감압건고물에 methanol 10ml를 가해 용해시킨 후, 0.2 μ m membrane 필터로 여과한 용액을 HPLC에 주입하였다.

알칼리 가수분해법을 위한 표준용액의 조제

비타민 A의 함량분석을 위해 사용된 비타민 A 표준용액은 all trans-retinol acetate를 비누화시켜 retinol로 전환한 후 μ g단위로 환산하였다. 이를 메탄올로 희석하여 각각 1ml 중 각각 1, 5, 10 μ g이 함유되도록 희석하여 사용하였다. 또한 비타민 E는 DL- α -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol을 methanol로

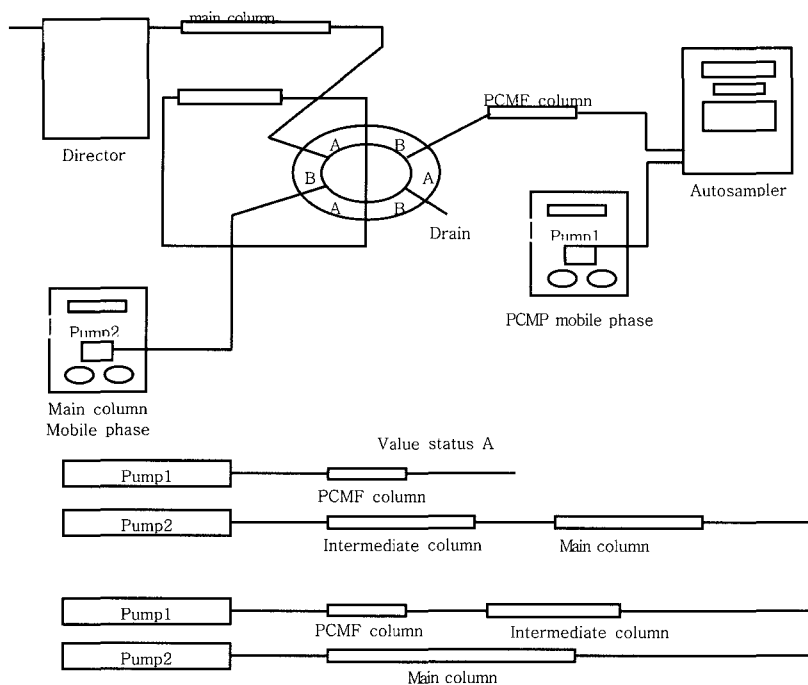


Fig 1. Schematic diagram of the triple-column system.

The connections of pumps and columns for each value status are indicated in the lower diagram. Analysis are concentrated in the intermediate column in status B, and then transferred to the main column when it is switched back to status A.

희석하여 1ml 중 각각 1, 5, 10 μ g이 함유되도록 준비하였다.

기기분석 조건

비타민 A, E 분석조건 : 분석칼럼으로는 Capcell pak C18 mg (5 μ m 1.5mm \times 250mm), Capcell pak MF C8 SG 80 \AA (5 μ m 4.6mm \times 150mm), Capcell pak C18 mg (5 μ m 2.0mm \times 35mm)을 사용하였다. 이동상 A는 92% methanol을 이동상 B는 100% methanol을 각각 500 μ l/min, 100 μ l/min의 유속으로 사용하였다. 검출기로는 PDA검출기를 사용하여 220~680nm 파장에서 분석하였다.

축산물의 가공기준 및 성분규격에 고시된 조제유류 중 비타민 A, E의 기준치는 각각 제품 100g당 1,250~3,750IU, 3.5IU이상으로 설정되어 있다. 비타민 B12나 D3에 비해 높은 수준이나 분석시료의 감도 향상 및 전처리의 간편화를 위하여 본 연구에서는 column-switching법을 적용시켰다.

스위칭 시간은 비타민 A 50 μ g/ml를 이용하여 비타민 표준용액이 전처리 칼럼에서 처음 빠져 나오기 시작하는 시간부터 끝나는 시간까지를 측정하여 그 시간 동안은 스위칭 A모드로 나머지 분석시간동안은 스위칭 B모드로 하여 분석하였다. 장비의 구성은 Fig 1과 같이 설계하였다.

비타민 A, E의 Column-switching 조건 :

결과 및 고찰

비타민 A, E 분리 및 검출

본 실험에서 표준품으로 사용된 비타민 A와 E를 Capcell pak C18 mg(5 μ m 1.5mm \times 250mm), Capcell pak MF C8 SG 80 \AA (5 μ m 4.6mm \times 150mm), Capcell pak C18 mg(5 μ m 2.0mm \times 35mm)를 이용하여 분석한 결과이다.

비타민 A, E를 PDA detector를 이용하여 동시 분석할 경우 325nm에서는 vitamin A가 최대파장을 나타내었으나, δ -tocopherol, γ -tocopherol, DL- α -tocopherol의 감도가 vitamin A에 비해 상대적으로 많이 낮아 동시분석에는 적당하지 않았다. 294nm에서는

vitamin A, E의 확인이 모두 가능하였고, retinol, δ -tocopherol, γ -tocopherol, DL- α -tocopherol의 순으로 모두 분리되었다.

Column-switching 절차와 조건

스위칭 시간은 비타민 A 50 μ g/ml를 제조하여 용액이 전처리 칼럼에서 처음 빠져 나오기 시작하는 시간부터 끝나는 시간까지를 측정하였으며, 스위칭 조건은 시작 시점에서 A밸브를 이용하다가 3.6분에서는 B밸브를 이용하였고, 다시 4.4분에서는 다시 A밸브를 이용하여 분석하였다.

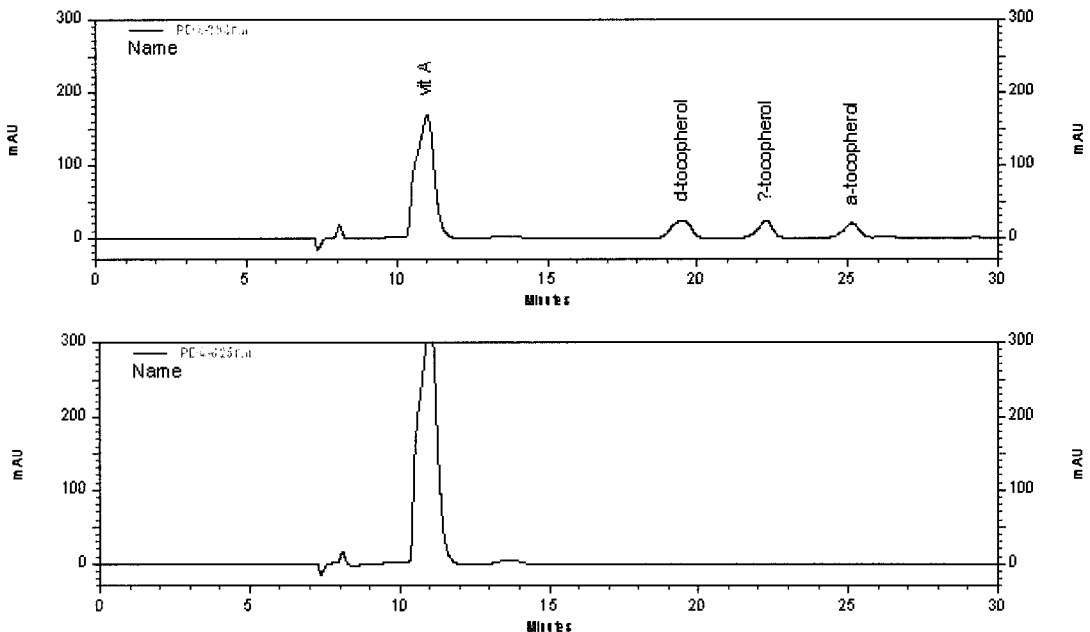


Fig 2. PDA-HPLC chromatogram of vitamin A and E. Upper 294 nm, Under 325 nm

PDA-HPLC를 이용한 첨가회수실험 결과

첨가회수실험에 사용된 NIST SRM 시료는 유기용매로 비타민 A와 E를 신속하게 추출한 후 각각의 성분들을 동시에 정성·정량하

는 본 연구의 실험 방법과 축산물의 가공기준 및 성분규격의 방법인 가수분해법으로 구분하여 Table 1에 분석결과를 나타내었다. 비타민 A 및 E의 함량을 분석함에 있어서 각 시험방법의 회수실험결과는 실험실의 시료 전처리

장비, 분석기기, 환경조건등의 차이에 따라 다소 차이가 있을 수 있겠으나, 본 연구소 실험실에서 수행한 결과는 Table 1과 같다. 신속 추출분석법이나 가수분해법 모두 비타민 A와 E의 첨가회수율 실험에서 높은 회수율을 보였다.

한편, 비타민 E의 경우 본 연구의 실험방법이 기존 가수분해법에 비해 다소 높게 측정되었으나, 2가지 방법 모두 서로 유사한 결과를 나타내었다.

Table 1. Recoveries(%) of each method for the determination of vitamin A and E

Sample	Treatment ^a	
	Direct	Hydrolysis method
Vitamin A	92.62±5.14 ^b	91.12±6.55
Vitamin E	93.37±4.96	92.32±5.78

^a Photodiode array detector.

^b The values are mean±S.D of 3 replications.

Column-switching 후 PDA-HPLC를 이용한 측정결과 비교

SRM 1846의 신속추출 후 Column-switching 기술을 응용한 비타민 A와 E의 분석결과는 Fig 3과 같으며, 분석시간은 30분이다.

본 연구의 신속추출법에 의한 방법과 알칼리 가수분해 후 가수분해법을 이용한 분석결과는 Table 2와 같이 나타났으며, 측정결과는

유사하였다. 비타민 A의 경우에 직접추출법과 알칼리 가수분해법을 비교한 실험에서 NIST SRM 1846의 측정결과는 각각 5.42와 5.48 mg/kg, 조제분유의 측정결과는 각각 4.40, 4.46mg/kg이었으며, 비타민 E의 경우는 NIST SRM 1846의 측정결과는 각각 346.5과 338.5mg/kg, 조제분유의 측정결과는 각각 110.7, 05.4mg/kg 이었다.

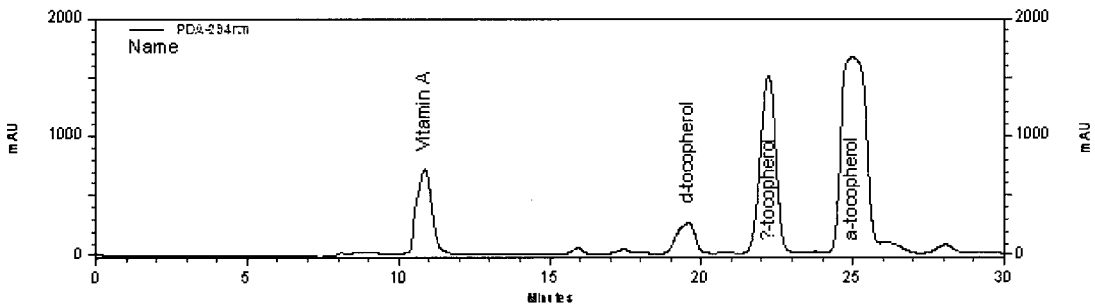


Fig 3. PDA-HPLC chromatogram for directed of Infant formula SRM 1846

시료전처리 방법의 차이를 비교하기 위한 실험에서 비타민 A의 경우 각 시험법간의 차이는 거의 없었으나, 비타민 E의 경우에는 본 연구의 신속추출법에 의한 실험 결과가 알칼리 가수분해법에 비해 다소 높게 측정되었다. 국제인증 표준물질인 NIST SRM 1846을 이용

하여 본 연구의 실험방법에 의하여 측정한 결과는 비타민 A가 5.42mg/kg으로 인증값인 5.84±0.68mg/kg의 범위 내로 측정이 되었으며, 비타민 E가 346.5mg/kg으로서 인증값인 366.2±31.76mg/kg 범위 내로 측정이 되었다.

Table 2. The values of vitamin A and E in infant formula determined under Direct and hydrolysis method. (unit: mg/kg)

Sample	Vitamins	Method	
		Direct	Hydrolysis method
SRM 1846 ^a	Vitamin A	5.42±0.23 ^c	5.48±0.21
	Vitamin E ^b	346.5±7.86	338.5±28.5
Infant formula	Vitamin A	4.40±0.56	4.46±0.48
	Vitamin E	110.7±4.49	105.4±5.75

^a Certified concentration values of SRM 1846: vitamin A (5.84±0.68 mg/kg), vitamin E (366.2±31.76 mg/kg).

^b Content of vitamin E: total α -, δ -, γ -, β -tocopherol (β -tocopherol was determined as γ -, β -tocopherol).

^c The values are mean ± SD of 3 replications.

결론

본 연구에서는 조제분유 중에 영양강화를 위해 첨가하는 비타민 A와 E의 함량측정을 위해 각기 다른 방법을 사용하지 않고 2가지 비타민을 동시에 분석하는 신속분석법을 수행하였다. 비타민 A와 E를 유기용매로 동시에 신속하게 추출하고 Column-switching 후 PDA-HPLC를 이용하여 각각의 성분으로 모두 분리한 후 동시에 검출하는 방법을 사용하였다. 국제표준인증물질 및 조제분유를 시료로 사용하여 본 연구의 실험방법에 의해 측정된 값과 알칼리 가수분해법에 의한 측정값을 비교한 결과 유사한 측정결과를 얻을 수 있었다.

또한 본 연구의 실험방법에 의하여 수행한 국제인증표준물질중의 비타민 A와 E의 함량 측정 결과는 인증된 표준값내의 결과를 보여 주었다. 따라서 비타민 A 또는 E를 강화한 분유등의 분말 유제품 중에서 비타민 A와 E의 함량을 측정하고자 할 때 한정된 장비와 인력으로 각각의 2가지 실험방법을 수행하기가 어렵거나 시간단축이 필요한 경우, 본 연구에서 수행한 실험방법과 같이 시료 전처리를 간단하고 신속하게 수행할 뿐만 아니라 역상 컬럼과 PDA-HPLC에 의한 비타민 A와 E

를 동시에 분석함으로써 보다 효율적인 분석을 진행할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Wills RB, Shaw CG, Day WR. 1977. Analysis of water soluble vitamins by high pressure liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 15: 262-262.
2. The Korean Nutrition Society. 2001. *Recommended dietary allowances for Koreans*. 7 eds. The Korea Nutrition Society, Seoul : 2.
3. Korea Food and Drug Administration. 2005. *Food Standards Codex*. Korean Foods Industry Association, Seoul : 950-965.
4. AOAC. 2000. *Official methods of analysis of AOAC international*. 17 eds. AOAC, Gaithersbrug, MD, USA, 45: 4-5. 50: 1-5.
5. Korea Food and Drug Administration. 2003. *Food Code*. Korean Foods Industry Association, Seoul : 894-897, 912-915.

6. Wickroski AF, McLean LA. 1984. Improved reverse phase liquid chromatographic determination of vitamins A and D in fortified milk. *J Assoc Off Anal Chem* 67(1) : 62-65.
7. Indyk HE. 1988. Simplified saponification procedure for the routine determination of total vitamin E in dairy products, foods and tissues by high-performance liquid chromatography. *Analyst* 113(8) : 1217-1221.
8. Albala-Hurtado S, Novella-Rodriguez S, Veciana-Nogues MT, et al. 1977. Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 778(1-2) : 243-246.
9. De Vries JW, Silvera KR. 2002. Determination of vitamins A (retinol) and E (alpha-tocopherol) in foods by liquid chromatography: collaborative study. *J AOAC Int* 85(2) : 424-34
10. 국립수의과학검역원. 2005: 비타민류 시험법, 축산물의 가공기준 및 성분규격. 국립수의과학검역원, 서울 : 80-115.
11. Wheeler LA, De Meo M, Kirby BD, et al. 1980 High-performance liquid chromatographic assay for measurement of cefoxitin in serum. *J Chromatogr* 183(3) : 357-362
12. Rouan MC, Abadie F, Leclerc A, et al. 1983. Systematic approach to the determination of cephalosporins in biological fluids by reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr* 275(1) : 133-144.
13. Rouan MC. 1988. Microbore liquid chromatographic determination of cadralazine and cephalixin in plasma with large-volume injection. *J Chromatogr* 426(2) : 335-344.
14. Emm TA, Leslie J, Chai M, et al. 1988. High-performance liquid chromatographic assay of cephalixin in serum and urine. *J Chromatogr* 427(1) : 162-165.