

## 고성능 액체 크로마토그래피에 의한 식품 및 비타민 제제중의 지용성 비타민의 동시 분석에 관한 연구

金豊作<sup>†</sup> · 金鍾赫

한국화학연구소 분석실

(1988. 4. 22 접수)

### A Study on the Simultaneous Analysis of Fat-Soluble Vitamins in Food Stuffs and Vitamin Products by High Performance Liquid Chromatography

Poongzag Kim<sup>†</sup> and Chong-Hyeak Kim

Analytical Research and Support Section, Korea Research Institute of Chemical  
Technology, Daejeon 302-343, Korea

(Received April 22, 1988)

**요 약.** 식품 및 비타민 제제중에 존재하는 지용성 비타민의 추출 및 동시 정량법을 검토하였다. 역상 액체크로마토그래피에 의한 지용성 비타민의 동시 분리 및 정량은 메타놀 : 물 = 95 : 5 이동상으로 Novapak C<sub>18</sub> 컬럼하에서 이루어졌다. 비타민의 검출에는 UV검출기를 사용하였으며 검출감도를 증가시키기 위하여 분석중 UV 검출파장을 각각의 비타민 용리시간에 따라 최대흡수 파장인 330, 265, 285 및 290nm로 변경하였다. 지용성 비타민의 분리 및 분석은 40분안에 완료되었다. 시료의 전처리에는 알카리 가수분해법과 효소가수분해법을 이용하였으며, 비타민의 추출은 액체-액체추출법과 액체-고체추출법을 이용하였다. 비타민 A, D, E 분석에는 알카리 가수분해법 및 효소가수분해법이 비타민 K 분석에는 효소가수분해법만이 좋은 결과를 나타냈으며, 비타민 추출에는 액체-액체 추출시 diethyl ether, pentane 및 n-hexane이, 액체-고체 추출시 silica 카트리지가 좋은 추출효과를 나타냈다.

**ABSTRACT.** The extraction method and quantitative analysis for the fat-soluble vitamins present in food stuffs and vitamin products have been investigated. The simultaneous separation and analysis of the vitamins by reverse phase high performance liquid chromatographic method was conducted using an isocratic elution with methanol : water (95 : 5) eluent on a Novapak C<sub>18</sub> column. The detection of vitamins was achieved by a variable wavelength UV detector. To improve the detection sensitivity detection wavelengths were set at the highest absorption bands such as 330, 265, 285, and 290nm for the respective vitamins. The analysis for the fat-soluble vitamins was finished within 40 minutes. Alkaline hydrolysis and enzymatic hydrolysis were investigated for the sample preparation; and liquid-liquid extraction and liquid-solid extraction were attempted for the extraction of vitamins. Both hydrolysis methods were turned out to be appropriate for the analysis for vitamins A, D, and E, while for the analysis of vitamin K the enzymatic hydrolysis method demonstrated better results. Diethyl ether, pentane, and n-hexane were found to give higher recovery for the liquid-liquid extraction and silica cartridge for the liquid-solid extraction.

## 서 론

인간 및 동물이 정상적인 생리기능을 발휘하려면 단백질, 지방, 탄수화물, 무기 염류 및 물 이외에도 소량의 비타민, 효소, 호르몬 등이 필요하다. 이중 비타민은 소량으로 체내 생리작용을 조절한다는 점에서 미량의 무기질과 같으나 무기질이 아닌 유기질이라는 점에서 다르며, 미량으로서 생리작용을 조절하는 유기물질이라는 점에서 호르몬과 같으나 호르몬은 반드시 체내에서 합성되는데 반해 비타민은 체외에서 섭취되어야 한다는 점에서 다르다. 이러한 비타민의 공급은 식품 및 비타민 제제류를 섭취함으로써 해결 될 수 있으며, 식품중에 존재하는 비타민은 보통 100g당  $\mu\text{g}$  정도이고 비타민 제제류에는  $\mu\text{g}$ 에서 mg까지 함유되어 있다.<sup>1</sup> 그러므로 식품 및 비타민 제제중에 존재하는 비타민 함량을 측정하기 위해서는 매질과 방해물질을 제거하여야 함은 물론 분석하고자 하는 비타민을 다른 비타민으로부터 분리시켜야 한다. 또한 비타민은 불안정한 화합물로서 산화되기 쉽고 산소, 열 혹은 자외선을 조사하였을 경우 파괴되기 때문에 시료의 전처리 과정 및 비타민 분석방법이 간단하고 단순해야만 분석결과의 정확도와 정밀도가 좋아지게 된다. 이에 많은 연구자들이 이에 관한 연구를 보고 한 바 있다.<sup>2-15</sup>

Mulry 등<sup>2</sup>은 식품중에 존재하는 비타민 A 이성질체를 chloroform-ethanol-water 혼합용매로 추출하고 HPLC로 분석하였으며, Takeuchi 등<sup>3</sup>은 어간유를 알카리 가수분해 시킨후 벤젠으로 비타민 D를 추출하여 HPLC, UV 및 GC/MS로 확인하였다. Thompson 등<sup>4</sup>은 식품중의 비타민 E와 K를 추출, 분석하였는데 isopropanol에 비타민을 포함한 극성이 낮은 지질성분을 녹여낸 다음 n-hexane으로 추출하여 HPLC로 정량하였다. 또한 Cohen과 Lapointe<sup>5</sup>는 동물사료를 dioxane-isooctane 혼합용매로 처리한 후 tetraethylenepentamine을 첨가하여 아세트니트릴 등의 용매로 비타민을 추출하고 추출한 몇가지 지용성 비타민을 HPLC로 분석하였다. 한편 Barnett와 Frick<sup>6</sup>은 비타민 제제중의 비타민 A

acetate, 비타민 D<sub>2</sub> 및 비타민 E acetate를 n-hexane으로 추출한후  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>과  $\mu$ -Bondapak Phenyl 컬럼상에서 메타놀-물 기울기 용리로 분리 및 정량하였다. Thompson<sup>7</sup>은 식품 및 사료에서의 비타민 A 분석에 관한 review 논문을 발표하였는데 AOAC법과 크로마토그래피법을 상호 비교함과 아울러 시료의 알카리 가수분해법과 비타민의 액체-액체 추출법에 대하여 보고하였다. 또 Parrish<sup>8</sup>은 식품중의 비타민 K 분석에 관한 review 논문에서 비타민 K의 추출법 및 크로마토그래피법에 의한 정량법을 보고하였다. 이상에서 본 바와 같이 지용성 비타민의 추출 및 정량에 관한 연구는 주로 몇가지 지용성 비타민을 추출용매로 추출하고 단일 파장에서 기울기 용리법으로 분리 및 정량하던가 혹은 단일 지용성 비타민을 추출용매로 추출하고 단일 파장에서 등용매 용리법으로 정량하던바 분석감도가 떨어지고 분석 시간이 많이 소요되는 단점이 있었다. 또한 여러가지 지용성 비타민을 동시에 추출하여 동시에 분리 및 정량하는 연구는 잘 되어 있지 않은 상태에 있다.

따라서 본 연구에서는 식품 및 비타민 제제중에 존재하는 여러가지 지용성 비타민을 동시에 추출하여 동시에 분리 및 정량 할 수 있는 분석방법을 개발, 확립하고자 하여 시료의 전처리 방법으로서 알카리 가수분해법과 효소가수분해법을 비타민 추출법으로서 액체-액체 추출법과 액체-고체 추출법을 상호 비교 검토하였다. 아울러 전처리 요인으로서 전처리 시간, 온도 및 전처리 용액에 대한 시료농도비의 영향도 관찰하였다.

## 실 험

기기장치. 본 실험에서 사용한 고성능 액체 크로마토그래프는 미국의 Waters Associates회사 제품으로 고압펌프는 M-510 Solvent Delivery System, 시료주입장치는 M-U6K Universal Injector, 검출기는 M-490 Programmable Multi-wavelength Detector, 기록기는 M-740 Data

Module을 사용하였다.

이동상으로 사용한 메타놀은 Aldrich회사 제 HPLC용을 사용하였으며 증류수는 일차 증류하여 양이온 및 음이온 교환수지에 통과시킨 탈이온수를 사용하였다. 혼합용액은 0.5 $\mu$ m Millipore organic filter로 여과하고 초음파 진동기로 30분간 진동시켜 용존되어 있는 기포를 완전히 제거하여 사용하였다.

정지상으로는 Novapak C<sub>18</sub>컬럼(3.9mm×15cm)으로 충전제의 평균입자의 크기는 4 $\mu$ m로 충전된 것을 사용하였다.

시약 및 용매. 본 실험에 사용한 비타민은 A alcohol, A acetate, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, E, E acetate, K<sub>1</sub> 및 K<sub>3</sub>로 Fluka 회사 제 G.R. 급을 사용하였으며, 추출용매로는 n-hexane, pentane, petroleum ether, diethyl ether, iso-octane 및 chloroform을 1급 혹은 특급으로 정제하지 않고 사용했다. 또한 추출 카트리지로는 Waters Associates사제 Sep-Pak™ silica, alumina A, B, N, florasil 및 C<sub>18</sub>을 사용하였다.

#### 실험 방법.

(1) 비타민 표준용액 : 8가지 지용성 비타민 혼합표준 용액은 20 $\mu$ g/ml 비타민 A alcohol, 30 $\mu$ g/ml 비타민 A acetate, 40 $\mu$ g/ml 비타민 D<sub>2</sub>, 30 $\mu$ g/ml 비타민 D<sub>3</sub>, 200 $\mu$ g/ml 비타민 E, 500 $\mu$ g/ml 비타민 E acetate, 300 $\mu$ g/ml 비타민 K<sub>1</sub> 및 80 $\mu$ g/ml 비타민 K<sub>3</sub>가 되도록 메타놀에 용해하여 제조하였으며 이 용액을 묽혀서 작업용액을 만들었다.

(2) 시료 용액의 제조 : 매질로서 지질성분이 다량 포함되어 있는 식용유를 대상시료로 선정하였으며, 식용유중에 각종 지용성 비타민이 모두 존재하지는 않으므로 10 $\mu$ g/ml 비타민 A alcohol, 20 $\mu$ g/ml 비타민 D<sub>2</sub>, 150 $\mu$ g/ml 비타민 E 및 60 $\mu$ g/ml 비타민 K<sub>3</sub>의 시료용액이 되도록 비타민 표준시약을 메타놀에 용해하여 시료에 첨가하였다. 또한 시료용액의 안정성 및 균일성을 유지하기 위하여 냉장고에 보관하였으며 실험시에는 5분 동안 진탕시킨후 시료로서 사용하였다.

(3) 시료의 가수분해 및 비타민의 추출

알카리 가수분해법 : 시료 10g에 70%에타놀 용액 75ml, 17N 수산화칼륨 용액 25ml 및 ascorbic acid 0.5g을 첨가하고 질소가스로 purging 시킨후 어두운 곳에서 하룻밤 동안 방치하여 시료를 가수분해 시킨다. 추출 용매로 지용성 비타민을 추출해 낸후 추출용액의 pH가 중성이 되도록 물로 세척하고 추출용액을 무수황산나트륨 층에 통과시켜 미량의 수분을 제거하여 증발 건조시킨다. 이 잔유물에 메타놀 10ml를 정확히 가하여 녹인다음 HPLC로 즉시 분석한다. 혹은 가수분해시킨 시료용액의 지용성 비타민을 n-hexane으로 추출해 낸후 Sep-Pak 카트리지에 통과시켜 비타민 성분만을 카트리지에 흡착시키고 흡착된 비타민 성분을 아세토니트릴 용매로 용출하여 정확히 10ml가 되도록 한 다음 즉시 HPLC로 분석한다.

효소 가수분해법 : 시료 10g에 lipase 2.5g과 pH 7.7 인산염 완충용액 20ml를 첨가하고 37±2℃로 유지된 water-bath에서 1시간 동안 항온처리 시킨다. 즉시 10N 수산화나트륨 용액 10ml와 95% 에타놀 200ml를 첨가하여 가수분해시킨후 이하 알카리 가수분해 시와 같은 과정을 거친후 HPLC로 즉시 분석한다.

(4) 전처리 요인의 영향 : 시료의 전처리에 있어서 전처리 시간, 온도 및 전처리 용액에 대한 시료 농도비의 영향을 관찰하기 위하여 시료의 가수분해시 전처리 시간, 온도 및 시료농도를 다음과 같이 변화시키면서 실험한 후 상호 비교하였다. 전처리 시간에 따른 영향을 조사하기 위하여 알카리 가수분해시 가수분해 시간을 1, 4, 8, 16 및 48시간으로 변화시키면서 실험하였고 효소 가수분해시에는 항온처리 시간을 0.5, 1, 2 및 4시간으로 변화시켰다. 전처리 온도에 따른 영향을 보기 위해서 알카리 가수분해법 및 효소가수분해법의 경우 모두 20, 30, 37 및 50℃로 변화시키면서 실험하였고, 시료농도에 따른 영향을 조사하기 위하여 전처리 용액에 대한 시료농도가 5, 10, 20 및 40%가 되도록 하여 실험하였다.

Table 1. Reproducibility of retention times for 8 fat-soluble vitamins

Vitamins	Retention times		
	mean(min)	SD <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup> (%)
Vitamin A alcohol	2.98	± 0.06	2.01
Vitamin A acetate	4.40	± 0.01	0.23
Vitamin D <sub>2</sub>	11.38	± 0.24	2.11
Vitamin D <sub>3</sub>	12.21	± 0.26	2.13
Vitamin E	16.52	± 0.34	2.06
Vitamin E acetate	27.00	± 0.56	2.07
Vitamin K <sub>1</sub>	39.03	± 0.75	1.92
Vitamin K <sub>3</sub>	1.27	± 0.03	2.36

<sup>a</sup>SD: Standard deviation, <sup>b</sup>RSD: Relative standard deviation.

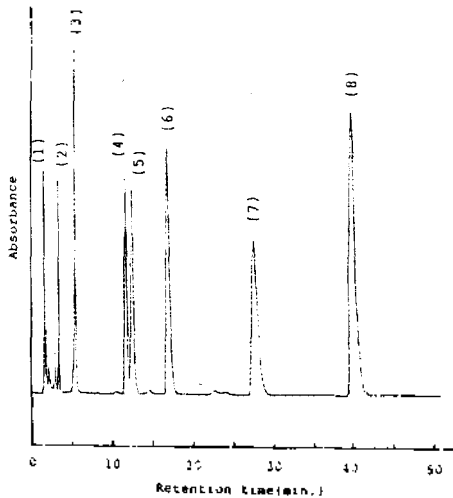


Fig. 1. Liquid chromatogram of 8 fat-soluble vitamins. (1) vitamin K<sub>3</sub>, (2) vitamin A alcohol, (3) vitamin A acetate, (4) vitamin D<sub>2</sub>, (5) vitamin D<sub>3</sub>, (6) vitamin E, (7) vitamin E acetate, (8) vitamin K<sub>1</sub>.

결과 및 고찰

지용성 비타민의 동시 분리. 각 지용성 비타민의 UV 최대 흡수파장을 조사하기 위하여 각 지용성 비타민 표준시약을 메타놀에 용해하여 200nm에서 400nm까지의 UV 흡수 스펙트라를 얻은 결과 각 지용성 비타민의 UV 최대 흡수파장은 비타민 A alcohol 324nm, 비타민 A acetate 324nm, 비타민 D<sub>2</sub> 265nm, 비타민 D<sub>3</sub> 265nm, 비타민 E 291nm, 비타민 E acetate 284

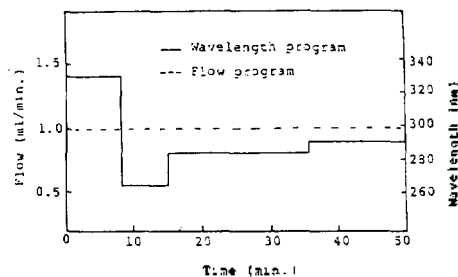


Fig. 2. Profile of wavelength and flow progress.

nm, 비타민 K<sub>1</sub> 292nm, 비타민 K<sub>3</sub> 250nm 및 331nm이었다. 각 지용성 비타민의 UV 최대 흡수파장을 선정하여 각 비타민의 머무름 시간을 이동상에 따라 조사하고 각각의 비타민을 동시에 분리하는 조건을 확립하였다. 혼합 지용성 비타민의 최적 동시분리조건은 다음과 같으며 분리된 크로마토그램 및 각 비타민의 머무름 시간은 Fig. 1 및 Table 1과 같다.

- 분리 조건 -

컬럼 : Novapak C<sub>18</sub>

용리액 : MeOH/H<sub>2</sub>O=95/5

흐름속도 : 1.0ml/min.(1000psig)

검출기 : UVD

이때 비타민의 검출감도를 증가시키기 위하여 분석도중에 UV파장을 각 비타민의 머무름 시간에 따라 Fig. 2와 같이 변경하였다. 본 실험 조건에서 각각의 지용성 비타민이 잘 분리되고 머무름 시간의 재현성도 양호할 뿐만 아니라

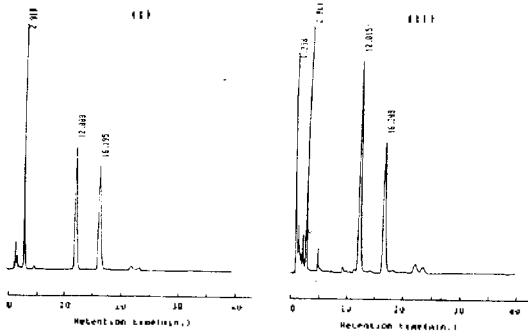


Fig. 3. Chromatograms of fat-soluble vitamins after hydrolysis. (I) alkaline hydrolysis, (II) enzymatic hydrolysis.

분리시간도 40분 안에 완료됨을 알 수 있다. 지금까지 HPLC에 의한 비타민 연구는 주로 기올기 용리 방법 및 단일 파장에서 분석<sup>16-18</sup> 하여 그 방법이 복잡하고 감도가 떨어지는 경향이 있으나, 본 연구에서는 등용매 용리로 분석하여 방법이 간단하고 시간도 단축될 뿐만 아니라 비타민의 종류에 따라 흡수도가 큰 파장으로 UV 파장을 바꿔줌으로써 감도도 향상시킬 수 있었다.

시료의 가수분해 및 비타민의 추출 시료물 알카리 가수분해법 및 효소가수분해법에 따라 처리한 후 비타민을 액체-액체 추출법 및 액체-고체 추출법으로 추출하여 HPLC로 각 지용성 비타민을 정량하였다. 비타민의 정량은 외부 표준화법을 이용하였으며 시료에 첨가된 비타민은 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{recovery}(\%) = \frac{(\text{amount found in spiked sample} - \text{unspiked sample})}{\text{spiked sample}} \times 100$$

알카리 가수분해법 및 효소 가수분해법으로 시료를 가수분해 시킨후 추출한 비타민의 크로마토그램은 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서 알 수 있듯이 효소가수분해법에 따라 가수분해시킨 경우에는 시료중에 첨가한 비타민 A alcohol, D<sub>3</sub>, E 및 K<sub>3</sub>가 모두 잘 검출되고 있으나, 알카리 가수분해법에 따라 가수 분해시킨 경우에는 비타민 A alcohol, D<sub>3</sub>, E만이 잘 검출되고 비타민 K는 잘 나타나지 않고 있다. 즉 알카리 가수분해법으로 전처리 한 경우 비타민 K의 추출율이 극히 저조한데 이는 다른 지용성 비타민과 비교하여 볼때 비타민 K가 알카리에 쉽게 파괴<sup>8</sup> 되기 때문이며, 효소가수분해법에서는 알카리 용액으로의 처리 시간이 상당히 짧기 때문에 비타민 K가 파괴되지 않고 잘 추출된다고 생각된다. 따라서 비타민 A, D, E의 경우에는 알카리 가수분해법 및 효소가수분해법 모두가 양호한 방법이나 비타민 K의 경우에는 효소가수분해법만이 좋은 전처리법이라 사료된다.

액체-액체 추출법에서 추출 용매에 따른 비타민의 추출율은 Table 2와 같다. Table 2에서 알 수 있듯이 알카리 가수분해법과 효소가수분해법에서 비타민 추출에 효과적인 용매는 다른 연구보고<sup>1</sup>에서와 같이 diethyl ether, pentane, n-hexane 등인 반면에, iso-octane과 chloroform의 경우에는 비타민 추출율이 저조한데 이는

Table 2. Recovery(%) of fat-soluble vitamins by liquid-liquid extraction

Solvents	Alkaline hydrolysis				Enzymatic hydrolysis			
	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>
n-Hexane	88.2	90.2	88.1	10.3	90.3	90.1	89.1	88.2
Pentane	92.4	92.3	90.5	12.5	93.5	92.5	93.2	91.6
Petroleum ether	85.8	88.4	90.8	10.1	90.2	90.2	93.7	89.6
Diethyl ether	92.6	95.8	90.6	15.2	95.2	93.1	95.1	90.4
iso-Octane	85.6	84.1	83.4	6.7	86.1	85.2	85.6	82.1
Chloroform	72.4	78.6	76.1	3.5	74.4	73.1	78.1	73.9

Table 3. Recovery(%) of fat-soluble vitamins by liquid-solid extraction

Cartridges	Alkaline hydrolysis				Enzymatic hydrolysis			
	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>
Silica	93.5	95.1	90.1	15.6	93.1	94.2	91.7	90.4
Alumina, A	30.1	86.5	86.3	20.4	57.4	86.0	80.1	51.0
Alumina, B	37.4	57.5	71.5	7.3	49.1	80.4	75.6	54.4
Alumina, N	80.1	80.5	90.3	20.1	82.1	84.2	88.0	80.1
Florisil	60.5	90.5	57.4	12.1	67.1	91.4	38.9	72.4
C <sub>18</sub>	84.4	88.7	87.6	11.7	85.3	89.8	90.0	85.1

Table 4. Recovery(%) of fat-soluble vitamins by pretreatment time in alkaline hydrolysis

Time(hr)	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>
1	78.4	75.2	80.0	40.0
4	85.1	84.1	82.2	35.1
8	88.1	87.1	84.3	30.5
16	88.4	91.1	89.2	27.1
48	80.2	86.2	80.4	20.0

추출과정에서 시료층이 추출 용매층과 잘 분리되지 않고 넓은 범위에 분포되어 있어서 추출율이 상대적으로 낮은 것으로 사료된다. 그러나 비타민 K의 추출에 있어서 효소가수분해법으로 전처리한 경우 diethyl ether, pentane, n-hexane 등의 용매에서 좋은 추출결과를 나타내고 있으나 알칼리 가수분해법으로 전처리 한 경우에는 모든 용매에서 저조한 추출결과를 나타내고 있다. 이는 용매에 기인한 효과라기 보다는 가수분해법에 따른 것이라 사료된다.

액체-고체 추출법에 사용된 Sep-Pak 카트리지는 원하는 성분을 카트리지에 머무르지 않게 하고 그 외의 것을 흡착하도록 하거나 혹은 원하는 성분만을 카트리지에 머무르게 할 수 있다.<sup>19</sup> 분석하고자 하는 성분이 시료속에 고농도로 존재하는 경우에는 전자의 방법을, 저농도이거나 극성이 다른 여러성분을 얻고자 할 때는 후자의 방법을 주로 이용한다. 그러므로 본 연구에서는 극히 저농도의 비타민이 존재하는 식품 및 비타민 제제를 대상시료로 하였으므로

후자의 방법을 사용하였다.

액체-고체 추출법에 사용된 카트리지에 따른 비타민 추출율은 Table 3과 같다. 알칼리 가수분해법 및 효소가수분해법으로 전처리한 용액에서 비타민 추출에 효과적인 카트리지는 silica, C<sub>18</sub> 및 alumina N 이었으나 alumina A는 비타민 D<sub>3</sub>와 E 추출시 alumina B는 비타민 E 추출시 florisil은 비타민 D<sub>3</sub>의 추출에만 효과적이었다. 비타민 K의 추출에 있어서는 액체-액체 추출에서와 같이 액체-고체 추출에서도 효소가수분해법으로 전처리한 경우에만 좋은 추출결과를 나타내고 알칼리 가수분해법으로 전처리시에는 추출율이 저조함을 알 수 있다.

액체-액체 추출법과 액체-고체 추출법을 비교하여 보면 모든 비타민의 추출율이 비슷한 양상을 나타내고 있으나 카트리지를 사용함으로써 추출과정을 단축시킬 수 있고 추출도 신속하게 이루어지므로 알칼리, 열 등에 대한 비타민의 불안정성을 고려한다면 액체-액체 추출법 보다는 액체-고체 추출법이 좋은 추출법이라 사료된다.

Table 5. Recovery(%) of fat-soluble vitamins by pretreatment time in enzymatic hydrolysis

Time(hr)	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>
0.5	86.4	85.1	88.2	84.3
1	90.3	90.1	89.4	88.2
2	90.5	90.4	91.6	90.5
4	91.0	91.7	89.9	88.7

Table 6. Recovery(%) of fat-soluble vitamins by pretreatment temperature

Temperature (°C)	Alkaline hydrolysis				Enzymatic hydrolysis			
	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>
20	88.2	89.9	88.9	27.0	80.2	83.2	80.1	80.1
30	89.1	85.4	85.7	25.0	87.1	85.4	86.1	87.2
37	75.2	76.1	72.1	23.1	91.4	93.7	90.6	89.7
50	67.4	65.1	71.2	19.4	80.1	84.6	82.9	80.4

Table 7. Recovery(%) of fat-soluble vitamins by sample concentration

Concentration (%)	Alkaline hydrolysis				Enzymatic hydrolysis			
	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin K <sub>3</sub>
5	89.4	91.1	93.2	27.5	91.0	90.9	91.9	89.9
10	88.4	90.9	91.4	30.5	90.3	90.1	89.4	89.4
20	85.1	86.2	84.7	25.5	88.2	85.4	83.6	82.1
40	72.4	76.5	75.5	24.3	57.4	60.1	63.2	59.7

다.

전처리 시간, 온도 및 시료 농도의 영향. 알카리 가수분해법 및 효소가수분해법에 따라 시료를 가수분해 시킬 경우 전처리 시간이 비타민 추출에 미치는 영향을 관찰하기 위한 분석 결과는 Table 4 및 5와 같다. Table 4 및 5에서 보는 바와 같이 시료의 전처리 시간이 알카리 가수분해법의 경우 8시간 및 16시간일때 효소가수분해법의 경우 1시간 및 2시간일때 가장 좋은 비타민 추출율을 나타냈다. 효소가수분해법의 전처리 시간이 알카리 가수분해법의 전처리 시간보다 상당히 짧은데 이는 효소를 사용하므로써 효소가 시료의 가수분해를 촉진시키는

역할을 하기 때문이라 사료된다.

Table 6은 전처리 온도에 따른 비타민 추출율을 나타내고 있다. 알카리 가수분해법의 경우 전처리 온도가 상승함에 따라 추출율이 점차 낮아짐을 알 수 있는데 이는 전처리 시간이 16시간 정도로 긴데다 온도가 상승함에 따른 비타민의 알카리 및 열에 대한 불안정성에 기인한다고 생각되며, 효소가수분해법의 경우 37°C 및 50°C의 전처리 온도에서 양호한 비타민 추출율을 나타냈는데 이는 효소의 기능을 발휘하기 알맞은 온도이기 때문이라 사료된다.

전처리 용액에 대한 시료농도비에 따른 비타민 추출율은 Table 7과 같다. 알카리 가수분해

Table 8. Fat-soluble vitamin contents of vitamin products and foods (Value in ppm)

Sample	Vitamins			
	Vitamin A alcohol	Vitamin D <sub>3</sub>	Vitamin E	Vitamin E acetate
Vitamin tablet	75	1	-	9
Vitamin syrup	50	2	-	7
Mayonnaise	8	4	97	-
Margarine	6	7	46	-

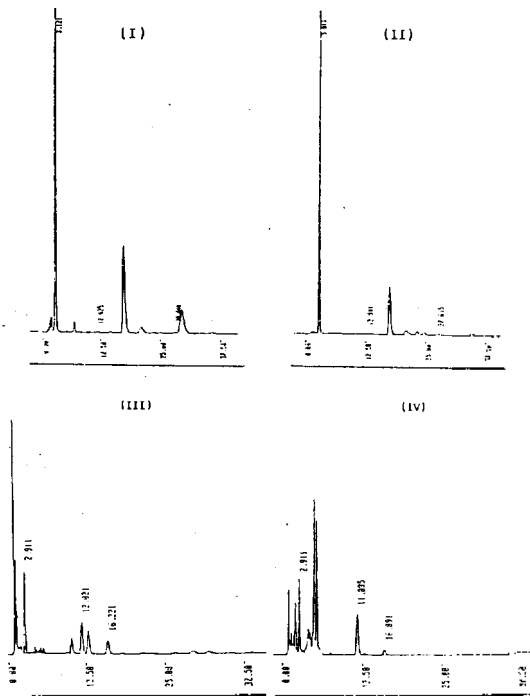


Fig 4. Chromatograms of vitamin products and foods. (I) vitamin tablet, (II) vitamin syrup, (III) mayonnaise, (IV) margarine.

법 및 효소가수분해법 모두 시료농도비가 5% 및 10%일 경우 가장 좋은 추출율을 나타내고 있으며, 시료 농도비가 증가함에 따라서 추출율이 점차 감소하는데 이는 전처리 용액의 capacity<sup>2</sup>에 기인한다고 생각된다.

비타민의 정량, 식품(마요네즈, 마아가린) 및 비타민 제제(정제, 시럽) 중에 존재하는 지용성 비타민의 확인 및 함량 분석은 효소가수분해법에 따라 시료를 전처리한 후 diethyl ether로 비타민을 추출 HPLC로 분석하였다. 분

석결과 및 크로마토그램은 Table 8 및 Fig. 4와 같으며 지용성 비타민 종류 및 함량은 제품에 표시된 값과 일치함을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서의 실험방법으로 식품 및 비타민 제제중에 존재하는 지용성 비타민의 확인 및 함량을 분석하는데 충분할 것으로 생각된다.

결 론

식품 및 비타민 제제중의 지용성 비타민을 동시 분석하기 위한 추출 및 정량법을 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 액체 크로마토그래피에 의한 8가지 지용성 비타민의 동시 분리 및 정량은 Novapak C<sub>18</sub> 컬럼상에서 메탄올:물=95:5 이동상으로 등용매 용리하여 40분안에 모든분석을 완료하였으며 비타민의 종류에 따라 흡수도가 큰 파장으로 검출파장을 바꿔줌으로써 감도를 향상시킬 수 있었다.

(2) 시료의 전처리는 알카리 가수분해법과 효소가수분해법에 의하여 처리하였으며, 비타민 A, D, E 분석에는 알카리 가수분해법 및 효소가수분해법 모두 양호한 결과를 나타냈으나 비타민 K 분석에는 효소가수분해법만이 좋은 결과를 나타냈다.

(3) 비타민 추출은 액체-액체 추출법과 액체-고체 추출법에 의하였으며, 액체-액체 추출시 diethyl ether 및 pentane이 양호한 용매이고 액체-고체 추출에는 silica 카트리지가 좋은 결과를 나타냈다.

(4) 시료 전처리에서 최적 전처리 시간은 알카리 가수분해시 8 시간 및 16시간 이었고 효소



가수분해시에는 1 시간 및 2 시간 이었다. 최적 전처리 온도는 알카리 가수분해시 20°C 이었고 효소가수분해시에는 30°C 및 37°C 이었다. 또한 전처리 용액에 대한 시료 농도비는 알카리 가수분해법 및 효소가수분해법 모두 5%와 10%에서 좋은 결과를 얻었다.

(5) 식품(마요네즈, 마아가린) 및 비타민 제제(정제, 시럽) 중에 존재하는 지용성 비타민의 종류 및 함량을 본 연구 방법에 따라 분석한 결과 제품에 표기된 값과 일치하였다.

#### 인 용 문 헌

1. P. J. Van Niekerk, *HPLC Food Anal.*, 187 (1982).
2. M. C. Mulry, et. al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 746 (1983).
3. T. Kobayashi, et. al., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30, 421 (1984).
4. J. N. Thompson, et. al., *NBS Spec. Publ.*, 519, 279 (1979).
5. H. Cohen and M. Lapointe, *J. Agric. Food Chem.*, 26, 1210 (1978).
6. S. A. Barnett and L. W. Frick, *Anal. Chem.*, 51, 641 (1979).
7. J. N. Thompson, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 69, 727 (1986).
8. D. B. Parrish, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 13, 337 (1980).
9. A. Rougereau, et. al., *Recent Dev. Food Anal., Proc. Eur. Conf. Food Chem.*, 1st, 33 (1981).
10. J. W. Devries, et. al., *Liq. Chromatogr. Anal. Food Beverages*, 2, 477 (1979).
11. S. L. Reynolds and H. J. Judd, *Analyst*, 109, 489 (1984).
12. J. N. Thompson and G. Hatina, *J. Liq. Chromatogr.*, 2, 327 (1979).
13. H. Fukuba and T. Murota, *J. Micronutrient Anal.*, 1, 107 (1985).
14. P. A. Lotfy, et. al., *J. Liq. Chromatogr.*, 4, 155 (1981).
15. H. Cohen, et. al., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 271 (1984).
16. R. C. Williams, et. al., *J. Chromatogr. Sci.*, 10, 494 (1972).
17. J. W. Dolan, et. al., *J. Chromatogr. Sci.*, 16, 616 (1978).
18. F. Zonta and B. Stancher, *J. Chromatogr.*, 246, 105 (1982).
19. C. F. Poole and S. A. Schuette, "Contemporary Practice of Chromatography", P. 448~451, Elsevier Sci., Amsterdam, 1985.