

## μ-HPLC의 Column-Switching 기술을 이용한 식품 중 비타민 B<sub>12</sub>의 분석

박성진\* · 김혜경\* · 함태식\* · 김병용

경희대학교 식품가공학과

\*한서대학교 식품생물공학과

### Determination of Vitamin B<sub>12</sub> in Foods Using Column-Switching Technique in μ-HPLC

Sung-Jin Park<sup>†</sup>, Hye-Kyung Kim\*, Tae-Shik Hahm\* and Byung-Yong Kim

Dept. of Food Science & Technology, Kyung-Hee University, Yongin 449-701, Korea

\*Dept. of Food & Biotechnology, Hanseo University, Chungnam 356-820, Korea

#### Abstract

Semi μ-HPLC using a column-switching technique was used to determine the trace content of vitamin B<sub>12</sub> in various foods. Total analytical time required less than 20 mins per sample and the recovery ratio was 99.9, 99.6, 100.1 and 99.8% for 1.0, 10.0, 100.0 and 1,000μg/kg, respectively. The content of vitamin B<sub>12</sub> in various foods obtained using column switching method showed higher levels compared to labels in dried milk(0.5μg/100g) and in grain products(0.51~34.36μg/100g). Thus, this column-switching method was more sensitive, effective and precise than the microbiological analysis currently used to determine the trace compounds like a vitamin B<sub>12</sub>.

**Key words:** HPLC, vitamin B<sub>12</sub>, column-switching, semi-micro bore column

#### 서 론

Microcolumn liquid chromatography는 여러 연구가들에 의해 개발된 이래 많은 분석 기술이 수행되고 있다(1-8). 식품중 비타민 분석법으로 HPLC가 널리 이용되고 있고, 식품성분의 HPLC분석에 있어서는 분석 column의 노화를 예방하기 위해 주입전 시료 중의 단백질 등의 고분자 성분을 제거하는 것이 필요하고, 전처리가 번거로운 문제가 있다. 한편, HPLC system에 전처리 column과 육방절환밸브를 부착하여, on-line으로 시료의 제단백을 행하는 column-switching법은 시료의 전처리가 불필요한 간편성 때문에 현재 의학 및 제약(9-13)의 분석에 널리 사용되고 있으며, 분석물질에 대해 높은 감도와 정확도를 가지고 있지만 식품에의 적용은 전무한 실정이다. 조제분유·조제우유의 비타민 B<sub>12</sub>의 함량은 제품 100g당 0.5~0.75μg 이상으로 규격이 설정되어 있다(14). 이러한 저농도의 비타민 B<sub>12</sub>를 측정할 수 있는 방법은 미생물학적 정량법뿐으로, HPLC법(15-17)은 감도가 나쁘고, 현재 사용불가능하다는 보고가 있다(18). 미생물학적 정량법에 사용되고 있는 미생물은 (1) *Lactobacillus leichmannii*,

(2) *Escherichia coli*, (3) *Euglena gracilis*, (4) *Ochromonas malhamensis* 등 4종이 있지만(19), *L. leichmannii*를 사용하는 방법이 비교적 간단하고, 미국약방국(美國藥局方)(20)에도 채택되고 있으며, 현재 폭넓게 사용되고 있는 방법 중의 하나이다. 하지만 *L. leichmannii*를 사용한 미생물학적 정량법은 보존균주의 계대배양을 매일 실시해야만 하고, 실험에서의 표준선 변동이 심하게 일어나는 등 측정조건에 있어서 검토할 점이 많다고 생각되었다.

따라서, 본 연구에서는 column-switching법에 의한 비타민 B<sub>12</sub>의 측정 적용을 검토하고 분석 column의 micro화에 의한 감도의 향상 및 분석조건을 최적화를 검토하였다. 그 결과 양호한 분석조건을 확립하여 식품 중 비타민 B<sub>12</sub>의 측정에 적용한 것을 보고하고자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

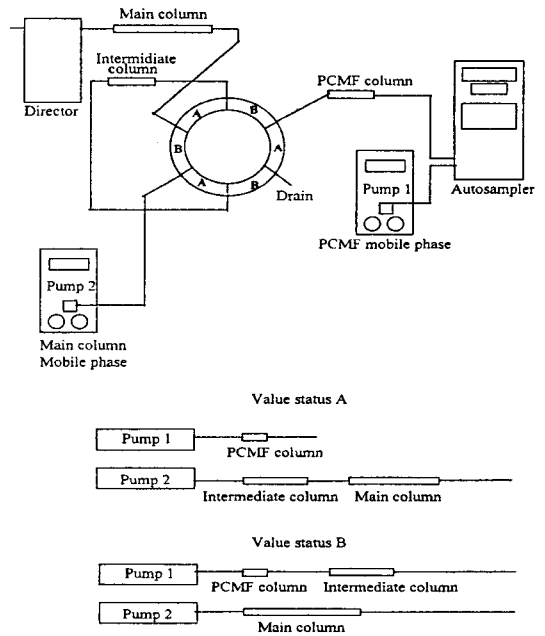
실험에 사용한 식품(분유: 10종, 곡류가공품: 6종)은 서울의 백화점에서 구입하여 구입한 상태로 상온에서 보관하면서 시료로 사용하였다. 표준물질로 사용한 비타민 B<sub>12</sub>

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

(Sigma Chemicals Co., USA)의 농도는 5mM 인산 buffer에 희석하여 1,000, 100, 10, 1.0μg/L의 용액을 제조하였으며, 그 외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

**방법**

비타민 B<sub>12</sub>분석에 이용된 육방절환밸브의 system은 Fig. 1에 나타내었다. Pump 1(Nanospace SI-1/2001, Shisheido, Japan)은 0.5ml/min의 유속으로 5mM 인산 buffer 용액을 PCMF column(Capcellpak MF SG80, 4.6mm φ×150mm, 5μm)으로 이동시키며, Pump 2(Nanospace SI-1/2001, Shisheido, Japan)은 0.1ml/min의 유속으로 23% MeOH용액을 농축 column(Capcellpak C<sub>18</sub> UG120, 2.0mmφ×35mm, 5μm)과 분석 column(Capcellpak C<sub>18</sub> UG120, 1.5mmφ×250mm, 5μm)으로 이동시키게 된다. 검출은 UV detector(Nanospace SI-1/2002, Shisheido, Japan)를 이용하여 361nm에서 실시하였다. 시료 10g을 취하여 5mM 인산 buffer에 희석하여 10% 초산 0.5ml와 1M 초산나트륨 0.5ml를 첨가하여 균질화시킨 후 원심분리(1500×g, 10분)하여 지방과 단백질을 제거한 후 상등액을 취하여 0.20μm filter로 여과한 후 250 μl를 주입시켰으며, 전처리 시료는 주입하기 전 4°C에서 보관하면서 사용하였다. 분석시 시료는 전처리 column에 주입되고, 극성의 물질은 씻겨 drain되면서 비타민 B<sub>12</sub>는 흡착되며, 농축 column과 분석 column은 23% MeOH 용액에 의해 평형을 이루며, column switching 후 5mM 인산 buffer에 의해 비타민 B<sub>12</sub>는 농축 column에 용리, 농축된 후 농축된 비타민 B<sub>12</sub>는 분석 column에서 분리되고, 그동안 다음 주입을 위해 5mM 인산 buffer에 의해 전처리 column은 재평형을 이루게 된다. 시료분석에 걸린 시간은 시료당 20분 정도였다.

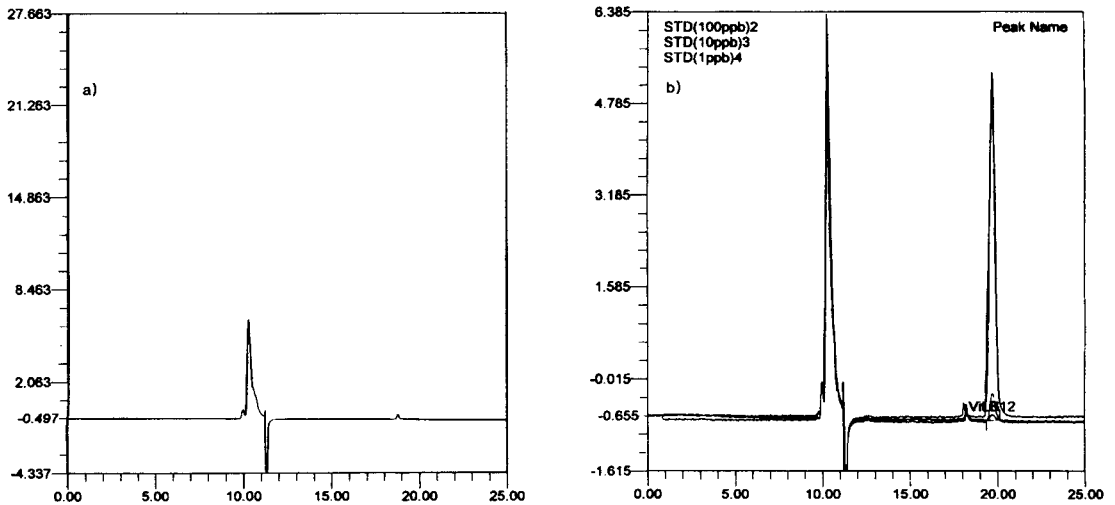


**Fig. 1. Schematic diagram of the triple-column system.** The connections of pumps and columns for each value status are indicated in the lower diagram. Analysis are concentrated in the intermediate column in status B, and then transferred to the main column when it is switched back to status A.

**결과 및 고찰**

**Column-switching 절차와 크로마토그래피**

Column-switching 기술에 의한 비타민 B<sub>12</sub>의 분석크로마토그램은 Fig. 2a에서 보는 바와 같이 blank에서는 머무름 시간에서 분석하고자하는 비타민 B<sub>12</sub>의 방해 peak



**Fig. 2. HPLC Chromatograms of a) blank and b) blank spike with vitamin B<sub>12</sub>.**

**Table 1. Absolute recoveries of vitamin B<sub>12</sub> (n=5)**

| Concentration (µg/kg) | Recovery(%) (R.S.D) |
|-----------------------|---------------------|
| 1.0                   | 99.9(2.5)           |
| 10                    | 99.6(1.6)           |
| 100                   | 100.1(1.0)          |
| 1,000                 | 99.8(1.3)           |

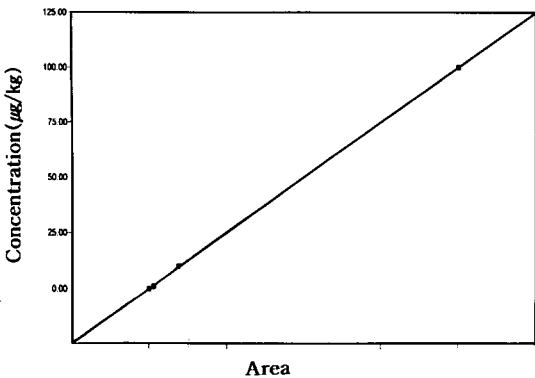
가 나타나지 않았으며, Fig. 2b에서와 같이 머무름 시간은 19.68분이였다. Column-switching기술의 응용에서, 전처리 column의 충전제의 선택, 세척용매, 세척시간은 식품 중에서 비타민 B<sub>12</sub>의 분석을 위해 중요할 뿐만 아니라, 분석 column에서의 분리를 위해서도 중요하다. 고순도의 구상실리카를 기본으로 한 캡슐형 충전제로 소수성기로서 phenyl기와 친수성기를 일정비율로 결합시킨 mixed function 충전제를 충전한 PCMF column은 pH 2.0~7.5에서 안정하며, pH 5 이하에서 비타민 B<sub>12</sub>의 강한 흡착력을 나타내기 때문에 전처리 column 충전제로 적합하였다 (9). 세척용매로서 5mM 인산 buffer(pH4.8)의 사용은 식품 중의 대부분은 머무르지 않는 반면, PCMF column에서는 비타민 B<sub>12</sub>만이 남게 된다. 세척시간은 5mM 인산 buffer(pH 4.8)로 0.5ml/min의 유속으로 전처리 column의 세척에 의해 3분 이내에 완료된다.

**직선성, 검출한계와 회수율 test**

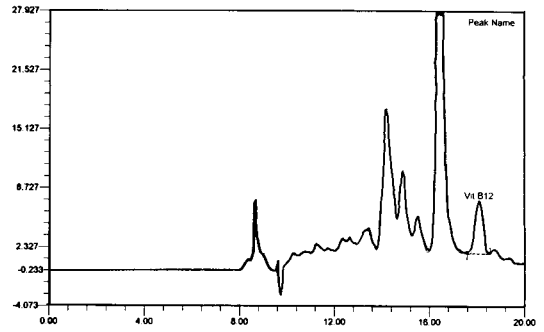
Fig. 3에 나타난 것과 같이 비타민 B<sub>12</sub>의 농도에 대한 피크면적의 비율에 대한 검량선을 작성하였다. 측정을 행한 1.0~100µg/kg의 농도범위에서, 상관계수 0.999의 원점을 통과하는 직선성을 확인할 수 있었다. 또한, 검출한계는 S/N=3에서 0.5µg/kg이였다. 비타민 B<sub>12</sub>에 대한 회수율을 실험한 결과는 Table 1에 나타내었으며, absolute recovery와 R.S.D는 각각 높은 정확도를 나타내었다.

**분석결과**

Kamei 등(18)은 *L. leichmannii*를 이용하여 우유 및 조



**Fig. 3. Standard calibration curve of vitamin B<sub>12</sub>. R<sup>2</sup>=0.999**



**Fig. 4. The HPLC chromatogram of vitamin B<sub>12</sub> of dried milk.**

**Table 2. Analysis of vitamin B<sub>12</sub> in foods**

| Samples        | Contents (µg/100g) |       |
|----------------|--------------------|-------|
| Dried milks    | 1                  | 3.29  |
|                | 2                  | 5.56  |
|                | 3                  | 6.32  |
|                | 4                  | 2.89  |
|                | 5                  | 4.78  |
|                | 6                  | 5.90  |
|                | 7                  | 15.32 |
|                | 8                  | 8.76  |
|                | 9                  | 6.29  |
|                | 10                 | 3.85  |
| Grain products | 1                  | 1.40  |
|                | 2                  | 2.37  |
|                | 3                  | 4.39  |
|                | 4                  | 0.51  |
|                | 5                  | 34.36 |
|                | 6                  | 25.78 |

제 분유 중의 비타민 B<sub>12</sub>를 분석한 결과 2.6~2.8µg/100g의 함량을 나타내는데 30시간의 시간이 걸린 반면 column-switching 기술을 응용하여 식품 중의 비타민 B<sub>12</sub>의 분석 결과는 Table 2와 Fig. 4에 나타내었으며, 분석시간은 20분이였다. 이러한 방법은 식품의 미량영양성분의 분석시 신속하고 정확한 방법으로 기대되며, 식품 중의 미량성분의 분석방법 개발이 계속되어야 할 것으로 생각된다.

**요 약**

기존의 식품 중 비타민 B<sub>12</sub>의 분석은 *Lactobacillus leichmannii*를 이용한 방법으로 균주의 계대배양을 매일 실시해야만 하고, 실험에서의 표준선 변동이 심하며 배양 시간도 약 30시간이 걸린다는 단점이 있어, semi µ-HPLC의 column-switching 기술을 응용하여 식품 중의 미량영양성분인 비타민 B<sub>12</sub>를 분석하였다. 1.0, 10.0, 100.0, 1,000 µg/kg의 회수율을 측정된 결과 99.9, 99.6, 100.1, 99.8%로 좋은 감도와 정확도를 나타내었으며, 분석시간은 시료 당 20분 정도로 미생물을 이용한 방법에 비해 간편성과 정확도를 나타내었다. 한편, 분유 중의 비타민 B<sub>12</sub>를 분석한

결과 제품에 따라 함량의 차이는 있지만, 모두 표시량(0.5 μg/100g) 이상 검출되었으며, 곡류가공품에서도 0.51 ~ 34.36μg/100g이 검출되었다. 이러한 column-switching 방법은 식품의 미량영양성분의 분석시 신속하고 정확한 방법으로 기대되며, 다른 미량 영양성분 분석에 좋은 결과를 나타내게 될 것으로 생각된다.

문 헌

1. Wheeler, L. A., De Meo, M., Kirby, B. D., Jerauld, R. S. and Finegold, S. M. : High performance liquid chromatographic assay for measurement of cefoxitin in serum. *J. Chromatogr.*, **183**, 357-362(1980)
2. Lecaillon, J. B., Rouan, M. C., Souppart, C., Fevre, N. and Juge, F. : Determination of cefsulodin, cephalixin, cefotaxime, desacetylcefotaxim, cefuroxime and cefroxadin in plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **228**, 257-267(1982)
3. Rouan, M. C., Abadie, F., Leclerc, A. and Juge, F. : Systematic approach to the determination of cephalosporins in biological fluids by reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **275**, 133-144(1983)
4. Brisson, A. M. and Fournillan, J. B. : Determination of cephalosporins in biological material by reversed phase liquid cloumn chromatography. *J. Chromatogr.*, **223**, 393-399(1981)
5. Rouan, M. C. : Microbore liquid chromatographic determination of cadralaziné and cephalixin in plasma with large volume injection. *J. Chromatogr.*, **426**, 335-344 (1988)
6. Emm, T. A., Leslie, J., Chai, M., Lesko, L. J. and Perkal, M. B. : High performance liquid chromatographic assay of cephalixin in serum and urine. *J. Chromatogr.*, **427**, 162-165(1988)
7. Gisch, D. J., Hunter, B. T. and Feibush, B. : Shielded hydrophobic phase; a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **433**, 264-268(1988)
8. Wyss, R. and Buchell, F. : Quantative analysis of retinoids in biological fluids by high performance liquid

- chromatography using column switching. I. Determination of isotretinoin and tretinoin and their 4-oxo metabolites in plasma. *J. Chromatogr.*, **424**, 303-314(1988)
9. Lee, Y. J and Lee, H. S. : Simultaneous determination of cefoxitin, cefuroxime, cephalixin and cephaloridine in plasma using HPLC and a column-switching technique. *Chromatographia.*, **30**, 80-84(1990)
10. Nielsen, S. E. and Dragsted, L. O. : Column-switching high performance liquid chromatographic assay for the determination of quercetin in human urine with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr.*, **707**, 81-89 (1998)
11. Lee, H. S., Kim, K., Kim, J. H., Do, D. S. and Lee, S. K. : Simultaneous determination of parathion and metabolites in serum by HPLC column switching. *Chromatographia.*, **44**, 473-476(1997)
12. Shirota, O., Suzuki, A., Kanda, T., Ohtsu, Y. and Yamaguchi, M. : Low concentration drug analysis by semi-microcolumn liquid chromatography with a polymer-coated mixed-function precolumn. *J. Microcol. Sep.*, **7**, 29-35(1995)
13. Asami, S., Takamura, M., Kimura, Y., Suzuki, T., Mugishima, H. and Uchikura, K. : Continuous measurement of retinoic acid isomers and retinol in a plasma by column-switching reversedphase HPLC. *Bunseki Kagaku.*, **46**, 943-950(1997)
14. 보건복지부 : 식품의 기준·규격중 개정, 1997년 8월
15. 近藤春樹, 奥田邦雄 : 비타민學實驗法(II). 東京化學同人, 東京, p.225(1985)
16. Frenkel, E. P., Kitchens, R. L. and Prough, R. : High-performance liquid chromatographic separation of cobalamins. *J. Chromatogr.*, **174**, 393-400(1979)
17. 佐藤一精 : 비타민 B<sub>12</sub>의 定量法. *비타민*, **57**, 609-616 (1983)
18. Kamei, T., Sato, J., Sugimoto, Y., Suzuki, N. and Noda, K. : Study on the microbiological assay for the vitamin B<sub>12</sub> of UHT cow's milk and infant formula using *Lactobacillus leichmannii*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **36**, 409-416(1989)
19. 植木 厚 : 비타민과 補酵素(下). 東京化學同人, 東京, p.448 (1975)
20. The United States Pharmacopeia. 20th ed., United States Pharmacopeia Convention Inc., Rockville, p.903(1980)

(1999년 7월 20일 접수)