

신속추출법 및 PDA-HPLC에 의한 조제분유 중 비타민 A, E의 동시분석

곽병만* · 이기웅 · 안장혁 · 공운영
남양유업(주) 중앙연구소

Simultaneous Determination of Vitamin A and E in Infant Formula by Rapid Extraction and HPLC with Photodiode Array Detection

Byung-Man Kwak*, Ki-Woong Lee, Jang-Hyuk Ahn, and Un-Young Kong
Research and Development Center, Namyang Dairy Products Corporation

Rapid and simple method was developed for simultaneous determination of vitamins A and E contents in infant formula. Vitamins 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 results of Food Standards Codex and AOAC method for evaluation of developed method. Vitamins A and E contents in CRM determined by developed method were within certified range of standard values. Developed method has great advantages of simple and rapid sample preparation and simultaneous determination of vitamins A and E by PDA-HPLC using reversed phase column.

Key words: rapid extraction, PDA-HPLC, simultaneous determination of the vitamin A and E

서 론

조제분유는 다양한 영양성분들이 한국인의 영양권장량(1) 기준에 맞추어 조제된 식품이다. 이러한 조제분유 중의 각종 영양성분들을 분석하고 그 적합성을 판단할 수 있도록 각종 실험방법들이 식품공전(2) 및 AOAC(3)에 소개되어 있으며, 그 복잡한 매질특성으로 인한 시험과정 중의 여러 가지 문제점을 해결하기 위해 다양한 실험방법들이 연구되고 있다.

그 중 특히 비타민은 불안정한 화합물로서 산화되기 쉽고 산소, 열 혹은 자외선을 조사하였을 경우 파괴되기 쉽기 때문에 그 함량을 분석하기 위하여 신속한 시료 전처리 과정이 요구되며, 극미량을 다루는 실험이므로 시험결과에 대한 높은 정확성, 재현성 및 안정성을 얻기 위하여 실험방법도 간단하여야 한다(4-18).

조제분유 중의 비타민 함량을 측정하기 위해서는 복잡한 매질로부터 방해물질을 제거한 후 분석하고자 하는 비타민을 분리해야 한다. 비타민 A 와 E의 경우는 식품공전방법(6) 및 AOAC방법(7)에 소개되어 있는 것과 같이 알칼리 가수분해와 액체-액체 추출법을 이용하여 변성된 단백질이나 전분 등의 방해물질을 침전시켜 제거한 후 비타민을 비극성용매로 추출하

여 그 시험용액을 정량하는 방법(8-12)이 보편적으로 사용되고 있다. 또한, 비색측정(13), 산이나 염기대신 효소에 의한 가수분해 방법(14) 등도 보고되어 있으나, 실험방법이 복잡하며 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

Mulry 등(15)은 식품 중에 존재하는 비타민 A 이성질체를 chloroform-ethanol-water 혼합용매로 추출하고 HPLC로 분석하는 방법을 연구하였으며, Qian과 Sheng(16)은 시료 중에 존재하는 비타민 A, D 및 E를 acetone-CHCl₃ 혼합용매로 추출하여 비타민 A와 E를 reversed phase column과 normal phase column을 이용하여 HPLC로 각각 분석하였다. Rushing 등(17)은 동물의 시료를 알칼리 가수분해 및 진탕법을 사용한 16시간의 전처리 과정을 거쳐 비타민 A, E를 추출한 후 normal phase column과 HPLC를 이용하여 비타민 A와 E에 대한 동시분석 방법을 보고하였으며, Barnett와 Fricks(18)는 효소 가수분해를 이용하여 지용성 비타민을 분석하였다. 이러한 연구들은 모두 단일의 최대흡수파장에서 기울기 용리법이나 등용매 용리법으로 정량하였다.

지용성 비타민들은 각기 다른 고유의 최대 흡수파장을 가지고 있기 때문에, HPLC에 의하여 분석시 1회 주입으로 각각의 성분을 개별적으로 검출하게 된다. 앞서 언급한 식품공전방법에 의한 비타민 A의 분석은 isopropyl alcohol로 최종 추출하여 역상컬럼에서 분리한 후 형광검출기로 분석하고, 비타민 E의 분석에는 hexane으로 최종추출하여 순상컬럼에 의해 분리한 후 형광검출기로 분석을 하도록 되어 있다. 반면에 AOAC 방법에 의한 비타민 A와 E의 분석은 hexane-isopropyl alcohol로 최종추출하여 순상컬럼에 의해 분리한 후 spectrophotometer와 UV/VIS 검출기를 사용하여 분석한다.

*Corresponding author : Byung-Man Kwak. Research and Development Center, Namyang Dairy Products Co., Ltd., 160, Bongan-ri, Janggi-myun, Gongju-Si, Chungcheongnam-do, 314-914, Republic of Korea
Tel: 82-41-857-1551
Fax: 82-41-857-7933
E-mail: fivefive@hanmail.net

따라서 비타민 A와 E의 함량을 측정하기 위하여 시료 전처리와 기기분석방법을 각각 구분하여 수행하기 때문에 인력과 시간이 많이 소요된다. 이러한 비타민 A와 E의 분석을 동일한 시료 전처리와 기기분석방법으로 수행한다면 인력과 시간을 단축할 수 있는 이점이 있다.

본 연구에서는 기존에 연구된 대부분의 알칼리 가수분해법에 따른 장시간의 시료 전처리가 아닌 단축방법으로서 비타민 A와 E를 동시에 추출하는 신속한 시료 전처리 방법을 개발하고, 최대흡수파장이 각기 다른 비타민 A와 E를 1회 주입하여 역상 컬럼으로 각각의 비타민을 분리시킨 후 PDA(photodiode array) 검출기로 동시에 검출함으로써 보다 신속하고 효율적인 실험방법을 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

실험 재료로는 실험결과 검증을 위한 인증표준물질(CRM: Certified Reference Material)과 시중에서 판매되는 retinol palmitate가 함유된 국내산 N사의 조제분유 A와 retinol acetate가 함유된 수입산 N사의 조제분유 B등 2종을 구입하여 사용하였다. 인증 표준물질인 CRM은 비타민 A를 trans-retinol로서 5.84±0.68 mg/kg 함유하고 비타민 E를 α-tocopherol로서 271±25 mg/kg, δ-tocopherol로서 20.19±1.69 mg/kg, γ-tocopherol로서 75.01±5.07 mg/kg(β-tocopherol 포함) 함유하고 있는 Infant Formula SRM 1846(National Institute of Standard & Technology, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하였다. 또한, 시료로서 비타민 A를 5.4 mg/kg(retinol palmitate 형태), 비타민 E를 α-tocopherol로서 66 mg/kg 함유되도록 조제된 조제분유 A와 비타민 A를 5.4 mg/kg(retinol acetate 형태), 비타민 E를 α-tocopherol로서 62 mg/kg 함유되도록 조제된 조제분유 B를 사용하였다.

정성 및 정량 분석을 위하여 사용된 비타민 A와 비타민 E의 표준품(RM: Reference Material)으로 all trans-retinol palmitate와 all trans-retinol acetate는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, DL-α-tocopherol, γ-tocopherol, δ-tocopherol은 Supelco사(Bellefonte, PA, U.S.A)에서 구입하여 사용하였다.

그 밖의 시약으로 HPLC용 H₂O, methanol, absolute ethanol, isopropyl alcohol, methylene chloride는 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 HPLC grade를 구입하여 사용하였으며 phenolphthalein, pyrogallol, 85% potassium hydroxide와 anhydrous sodium sulfate는 특급시약을 사용하였다. 초순수는 EASY pure system(Barnstead, Dubuque, IA, USA)에 의하여 18.0 MΩ수준으로 정제된 물을 사용하였다.

첨가회수 실험

첨가회수 실험은 유기용매로 비타민 A와 E를 신속하게 추출한 후 각각의 성분들을 동시에 정성·정량하는 본 연구의 실험 방법과 식품공전방법 및 AOAC 방법을 비교하였다.

첨가회수실험을 위한 시료로는 NIST의 SRM 1846에서 확인된 비타민 A 형태(retinol palmitate)와 비타민 E 형태를 혼합하여 100 mg/L 농도로 조제한 표준용액 1 mL을 첨가한 후 첨가하지 않은 시료와 동일하게 처리하여 정량하였다. 그 결과값을 이용하여 첨가하지 않았을 경우의 결과치를 첨가한 결과치에서 뺀 후 첨가량을 기준으로 회수율을 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$(A1-A2)/A3 \times 100; \text{여기에서 } A1 \text{은 비타민 표준용액을 첨가했}$$

을 때의 결과값, A2는 비타민 표준용액을 첨가하지 않은 경우의 결과값, A3는 비타민 표준용액 첨가량.

신속추출법

시료 무게는 SRM, 조제분유 A 및 B를 각각 약 1 g씩 0.1 mg까지 정밀히 취하여 50 mL screw-capped extraction tube에 각각 넣고 dimethyl-sulfoxide 1 mL 첨가 및 N₂ gas로 충전하여 capping한 후, vortex mixer를 이용하여 1분간 잘 혼합하였다. 혼합후 약 5분간 방치한 후 ethanol 10 mL로 하여 다시 vortex mixer를 이용하여 1분간 잘 혼합하였다. 혼합된 tube를 SORVALL evolution RC centrifuge(Kendro, Newtown, CT, USA)에서 13,000 rpm, 10분간 원심분리한 후 중간층 용액을 취하여 0.2 μm membrane filter로 여과하여 HPLC에 주입하였다. 단, 실험실내의 환경조건은 온도 23±2°C, 습도 50±5%에서 수행하였다.

신속추출법을 위한 표준용액의 조제

HPLC grade의 methanol을 이용하여 all trans-retinol palmitate, all trans-retinol acetate, α-tocopherol, γ-tocopherol, δ-tocopherol이 각각 1 mL 중 1, 5, 10 μg씩 되도록 조제하였다.

알칼리 가수분해법

비타민 A를 분석하기 위한 식품공전법의 시료 전처리는 시료인 SRM 1846, 조제분유 A 및 B를 각각 약 1 g씩 정밀히 달아 각각의 갈색 검화플라스크에 넣었다. 시료 측정용 0.1 mg까지 측정하였다. 에탄올 30 mL 및 10% pyrogallol-ethanol 1 mL를 가하여 잘 섞은 후 수산화칼륨용액(9→10) 3 mL를 가해 환류냉각기에 부착하여 비등수욕(95°C) 중에서 30분간 비누화시켰다. 신속히 냉각하여 실온으로 한 후 물 30 mL를 가해 갈색 분액깔때기에 옮겼다. 플라스크는 물 10 mL로 씻고 이어서 30 mL 석유에테르로 씻은 후 갈색분액깔때기에 넣은 후 잘 흔들어 혼합하여 방치한 후 물층을 별도의 갈색분액깔때기에 옮겼다. 하층인 물층에 석유에테르 30 mL로 2회 추출하였다. 추출하여 모은 에테르층을 모두 합하여 물 10 mL 1회, 이어 50 mL 씩으로 페놀프탈레인 지시약의 붉은 색이 없어질 때까지 반복하여 4-5회 수세하였다. 분액깔때기 중에서 물을 충분히 분리한 석유에테르층을 취하여 무수황산나트륨을 가해 탈수하고 갈색플라스크에 옮겼다. 이어 무수황산나트륨을 석유에테르 10 mL 씩으로 2회 씻고, 씻은 액을 앞의 플라스크에 가하였다. 이 용액을 40°C에서 감압농축하고, 감압건고물에 isopropyl alcohol 10 mL를 가해 용해시킨 후, 0.2 μm membrane 필터로 여과한 용액을 HPLC에 주입하였다. 또한 비타민 E를 분석하기 위한 식품공전법의 시료전처리는 상기의 방법(비타민 A를 분석하기 위한 시료 전처리)과 동일하게 진행하였으나, 감압농축 후 최종용매를 hexane 10 mL를 가해 용해시킨 후, 0.2 μm membrane 필터로 여과한 용액을 HPLC에 주입하였다.

AOAC 방법의 시료전처리는 시료인 SRM 1846, 조제분유 A 및 B를 각각 약 1 g씩 정밀히 달아 각각의 갈색 검화플라스크에 넣었다. 시료 측정용 0.1 mg까지 측정하였다. 표준용액 플라스크에는 H₂O 10 mL, 1% pyrogallol-ethanol 20 mL, 10.5 M KOH 5 mL를 가하고, 시료 플라스크에는 1% pyrogallol-ethanol 30 mL, 10.5 M KOH 5 mL를 가하여 잘 섞은 후 70°C에서 25분간 비누화시켰다. 신속히 냉각하여 갈색 분액깔때기에 옮기고 각각의 플라스크를 물 30 mL로 씻어 합쳤다. 추출용매인 hexane-methylene chloride(3+1, v/v) 30 mL를 가하여 잘 혼합

하여 방치한 후 물층을 버리고 H₂O-ethanol(3+2, v/v) 30 mL를 3회 반복하여 수세하였다. 상등액 20 mL를 취하여 N₂ gas로 농축한 후 비타민 A는 hexane-isopropyl alcohol(100+0.25, v/v) 5 mL, 비타민 E는 hexane-isopropyl alcohol(99.92+0.08, v/v) 5 mL로 희석하여 HPLC에 주입하였다.

알칼리 가수분해법을 위한 표준용액의 조제

시료 중의 비타민 A의 함량분석을 위해 사용된 비타민 A 표준용액은 all trans-retinol palmitate 또는 all trans-retinol acetate를 비누화시켜 retinol로 전환한 후 µg단위로 환산하였다. 이를 메탄올로 희석하여 각각 1 mL 중 각각 1, 5, 10 µg이 함유되도록 희석하여 사용하였다. 또한 비타민 E는 α-tocopherol, γ-tocopherol, δ-tocopherol를 methanol로 희석하여 1 mL 중 각각 1, 5, 10 µg이 함유되도록 준비하였다.

기기분석

본 연구의 실험방법에 의한 비타민 A와 E의 분석은 HPLC (Alliance 2690 Separation Module, Waters, USA)을 사용하였다. 컬럼은 XTerra C18 column(4.6×250 mm, 5 µm, Waters, USA)을 사용하였으며, 이동상은 methanol:H₂O(93:7, v/v, isocratic mode) 혼합액을 이용하여 분리하였다. 검출기는 474 fluorescence detector(형광검출기, Waters, USA)의 excitation과 emission 파장을 각각 340, 460 nm으로 고정하여 분석하였으며, 또한 photodiode array detector 996(Waters, USA)을 사용하여 200-800 nm의 범위에서 scanning하여 분석하였다.

식품공전방법으로 실험한 비타민 A의 분석은 XTerra C18 column(4.6×250 mm, 5 µm, Waters, USA)을 이용하여 methanol:H₂O(95:5, v/v, isocratic mode) 혼합액을 사용하였으며, fluorescence detector를 이용하여 excitation과 emission 파장을 각각 340, 460 nm으로 고정하여 분석하였다. 비타민 E의 분석은 µ-Porasil column(4.6×250 mm, 5 µm, Waters, USA), n-hexane:isopropanol(98:2, v/v), 유속이 0.5 mL/min인 isocratic mode로써 fluorescence detector를 사용하여 excitation과 emission 파장을 각각 298, 325 nm로 고정시킨 후 측정하였다.

AOAC 방법으로 실험한 비타민 A의 분석은 µ-Porasil column(4.6×250 mm, 5 µm, Waters, USA), n-hexane:isopropyl alcohol(100+0.25, v/v, isocratic mode), spectrophotometer의 측정 파장이 325 nm, UV/VIS detector의 측정파장은 336 nm에서 측정하였다. 비타민 E의 분석은 µ-Porasil column(4.6×250 mm, 5 µm, Waters, USA), n-hexane:isopropanol(99.92+0.08, v/v, isocratic mode), UV/VIS detector는 280 nm에서 측정하였다.

HPLC 용매는 4.5 µm membrane으로 여과하고 초음파진탕기로 탈기한 후 사용하였다. 단, 기기실 내의 환경조건은 온도 23 ±2°C, 습도 50±5%에서 수행하였다.

결과 및 고찰

PDA-HPLC를 이용한 첨가회수실험 결과

첨가회수실험에 사용된 NIST SRM 시료는 유기용매로 비타민 A와 E를 신속하게 추출한 후 각각의 성분들을 동시에 정성·정량하는 본 연구의 실험 방법과 식품공전방법 및 AOAC 방법으로 구분하여 Table 1에 분석결과를 나타내었다.

비타민 A 및 E의 함량을 분석함에 있어서 각 시험방법의 회수실험결과는 실험실의 시료 전처리 장비, 분석기기, 환경조건 등의 차이에 따라 다소 차이가 있을 수 있겠으나, 본 연구소의

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

Vitamin	Treatment		
	Direct ¹⁾	Food standards codex ²⁾	AOAC ³⁾
Vitamin A	94.57 ± 4.73 ⁴⁾	94.37 ± 4.52	94.85 ± 5.11
Vitamin E	98.66 ± 5.14	95.47 ± 4.09	95.23 ± 4.96

¹⁾Photodiode array detector

²⁾Florescence detector

³⁾UV/VIS detector

⁴⁾The values are mean ± S.D. of 3 replications.

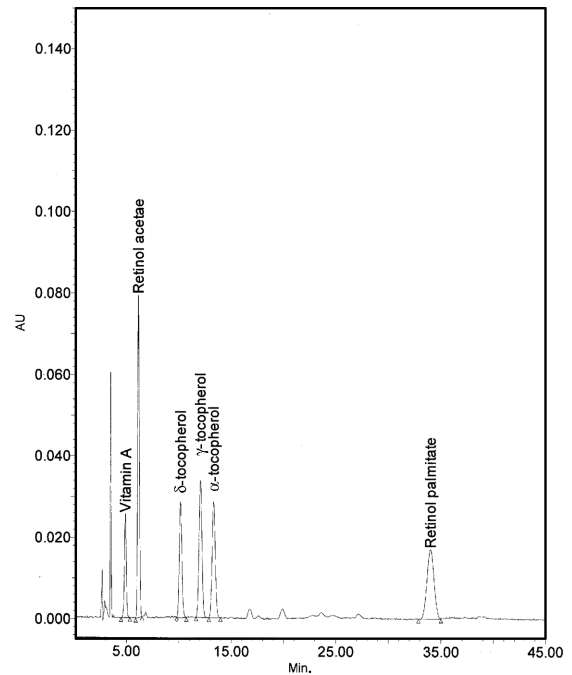


Fig. 1. PDA-HPLC chromatogram of vitamin A and E.

실험실에서 수행한 결과는 Table 1에서 확인 할 수 있는 것과 같이 신속추출/PDA-HPLC분석방법이나 식품공전방법 및 AOAC 방법의 비타민 A와 E의 첨가회수율 실험에서 높은 회수율을 보였다.

한편, 비타민 E의 경우 본 연구의 실험방법이 기존 식품공전방법 및 AOAC방법에 비해 다소 높게 측정되었으나, 3가지 방법 모두 서로 유사한 결과를 나타내었다.

PDA-HPLC를 이용한 비타민 A,E 분리 및 검출

Fig. 1은 본 실험에서 표준품으로 사용된 각기 다른 지용성 비타민을 XTerra C18 역상 column에서 PDA detector를 이용하여 분석한 결과이다. 신속 추출법에 의해 C18 역상 column 및 PDA detector를 이용하여 분석하는 경우 각각의 비타민 존재 형태를 그대로 분석할 수 있었다. PDA detector를 이용하여 분석한 결과 retinol, retinol acetate, δ-tocopherol, γ-tocopherol, DL-α-tocopherol, retinol palmitate의 순으로 모두 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, Fig. 2에서 확인 할 수 있는 것처럼 형광검출기를 사용하는 경우에도 비타민 A는 retinol, retinol acetate와 retinol palmitate의 검출순서로 PDA detector를 이용한 결과와 동일한 검출순서를 확인할 수 있었다.

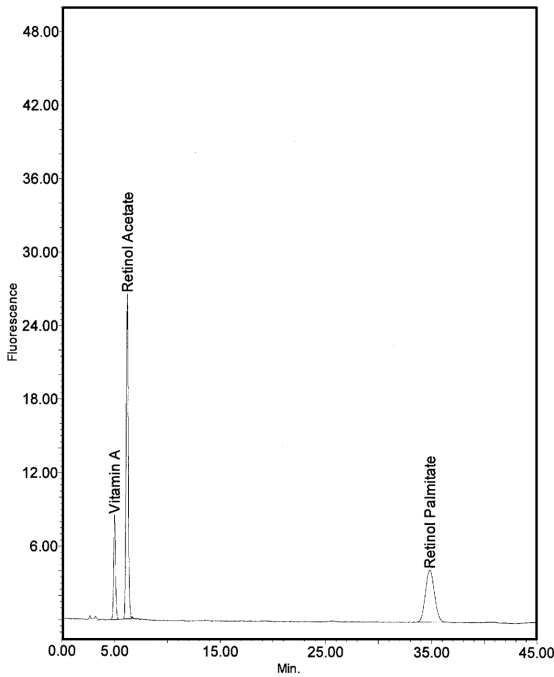


Fig. 2. FLD-HPLC chromatogram of vitamin A.

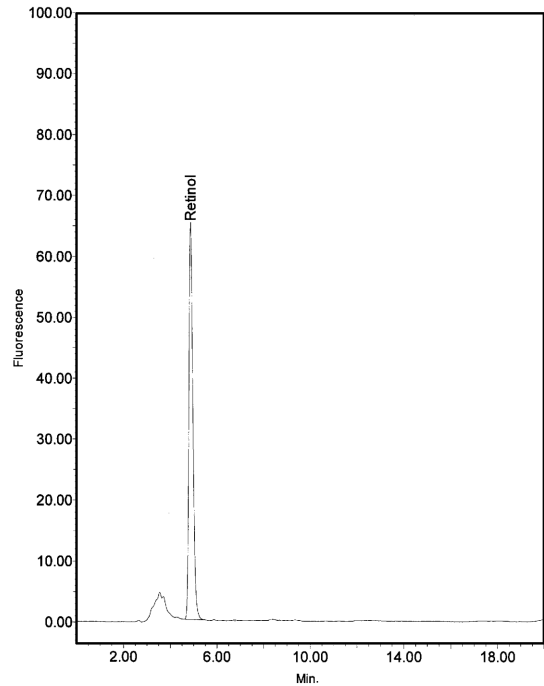


Fig. 3. FLD-HPLC chromatogram for saponificated vitamin A.

그러나, 식품공전방법 및 AOAC방법의 비타민 A 분석은 본 연구의 신속추출법과 달리 시료에 포함된 retinol-acetate 또는 retinol palmitate의 ester 형태를 KOH와 항산화제인 pyrogallol를 첨가하여 비등수욕상에서 비누화시켜 Fig. 3과 같이 retinol 형태로 전환되어 검출이 되기 때문에, 시료에 포함되어 있는 비타민 A의 형태가 어떠한 형태로 존재하는지 알 수 없다는 단점이 있다.

한편, 식품공전방법 및 AOAC방법의 비타민 E 분석방법은

순상컬럼을 사용하여 비타민 E의 이성질체들을 각각의 구성성분으로 분리하여 검출한다. 그 검출순서는 α -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol의 순서로 Fig. 4 (a)와 같은 chromatogram을 보여주었다.

그러나, 본 연구에서는 하나의 역상컬럼으로 비타민 A, E를 동시에 분리하였기 때문에(Fig. 1) Fig. 4 (b)와 같은 순서대로 역순으로 검출이 되는 점이 상이하다. 즉, 식품공전방법 및 AOAC방법의 경우와 달리 비타민 E의 검출 순서가 서로 상반

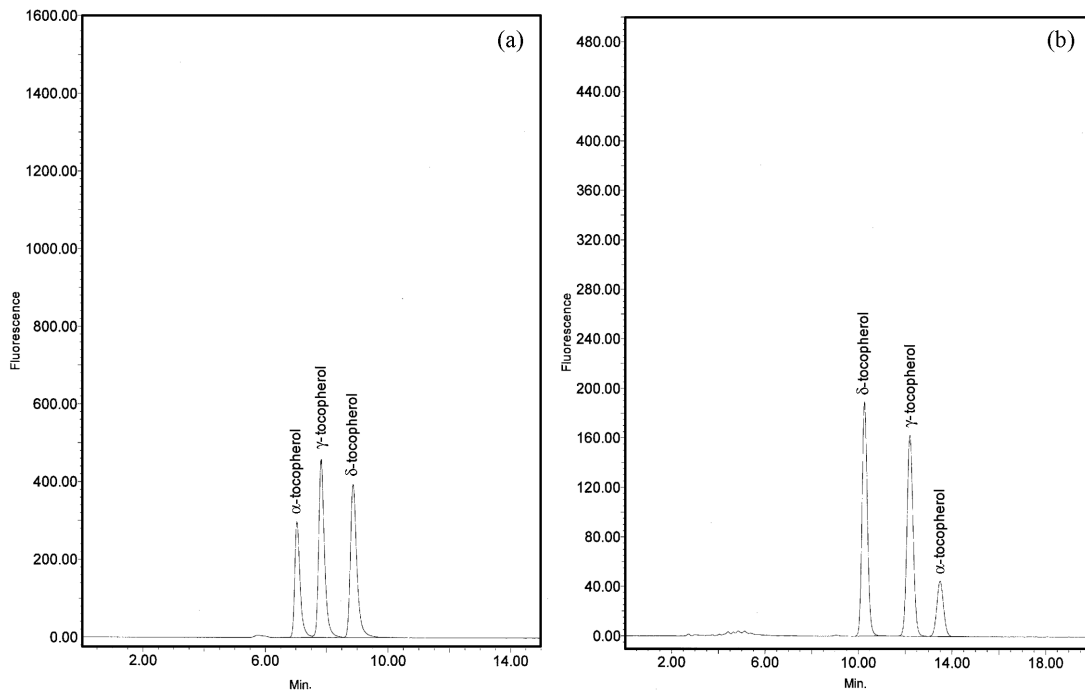


Fig. 4. FLD-HPLC chromatogram of vitamin E by normal-phase column (a) and reversed-phase column (b).

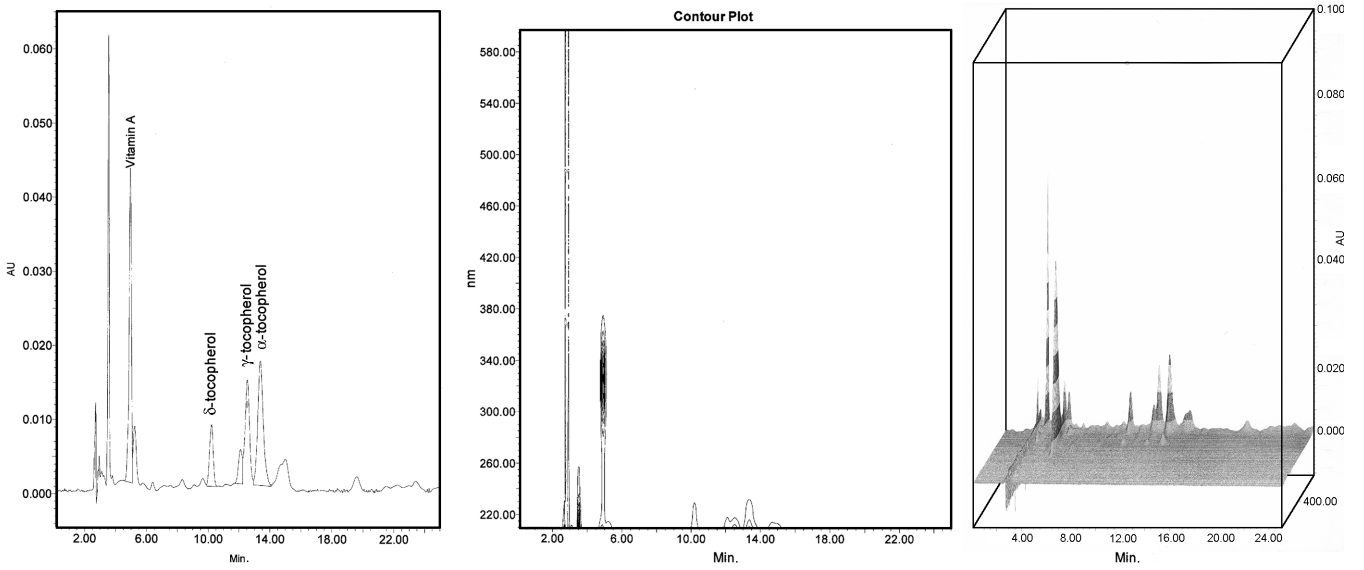


Fig. 5. PDA-HPLC spectra and 3D chromatogram for saponificated of Infant formula SRM 1846.

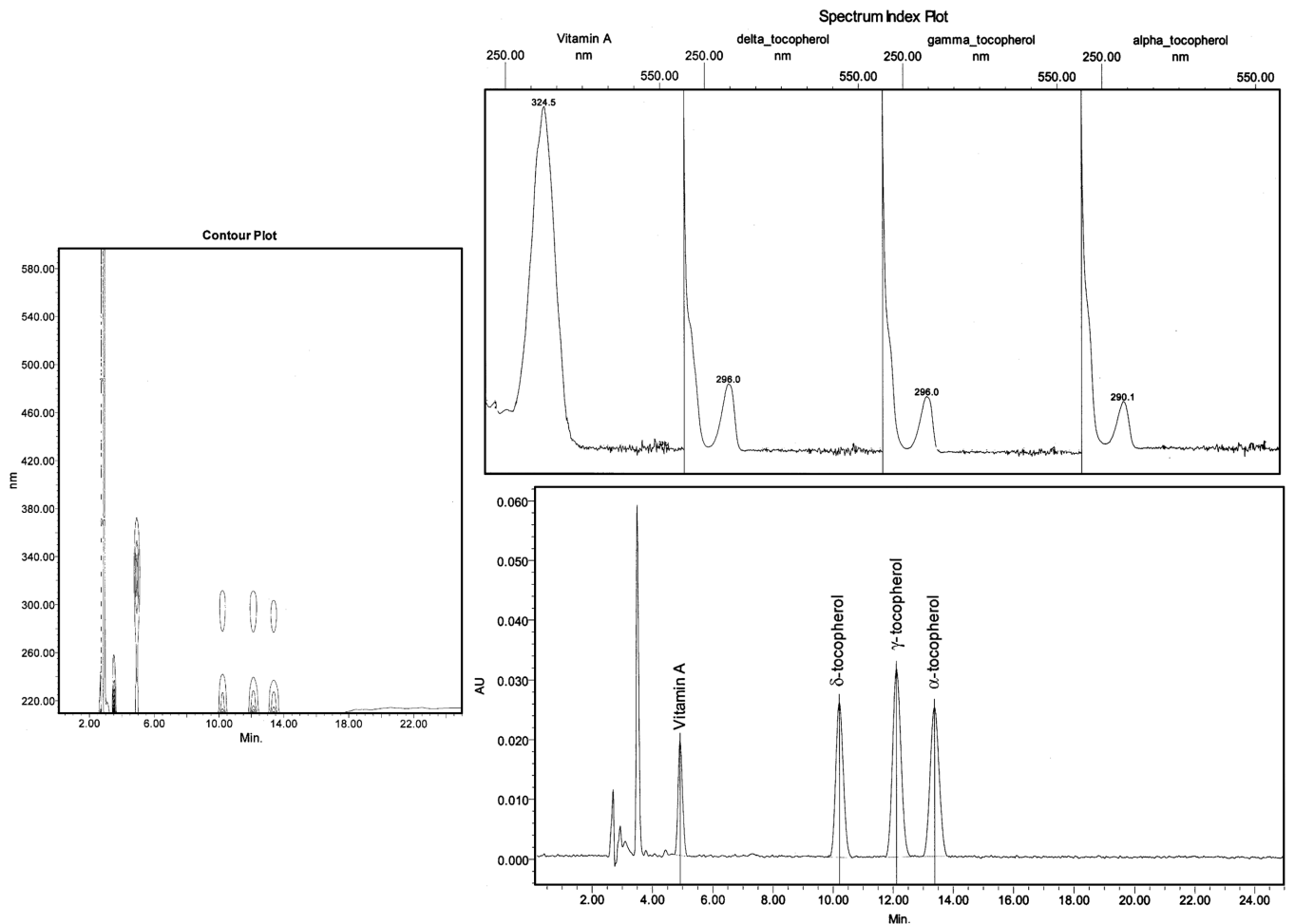


Fig. 6. PDA-HPLC spectrum and chromatogram of vitamin A and E.

되게 분석되는 것을 확인할 수 있었다.

PDA-HPLC를 이용한 측정결과 비교

PDA detector를 이용하여 결과를 분석할 경우 Fig. 5과 같이

분석 대상 peak 주변에 인접한 다수의 peak들이 검출되었다.

Fig. 6은 표준물질의 2D, 3D chromatogram과 분석대상 peak들의 최대파장을 검색한 결과를 보여준다. 따라서 Fig. 5의 각 peak들이 단일물질임을 확인한 후 이를 추출하여 비타민 A

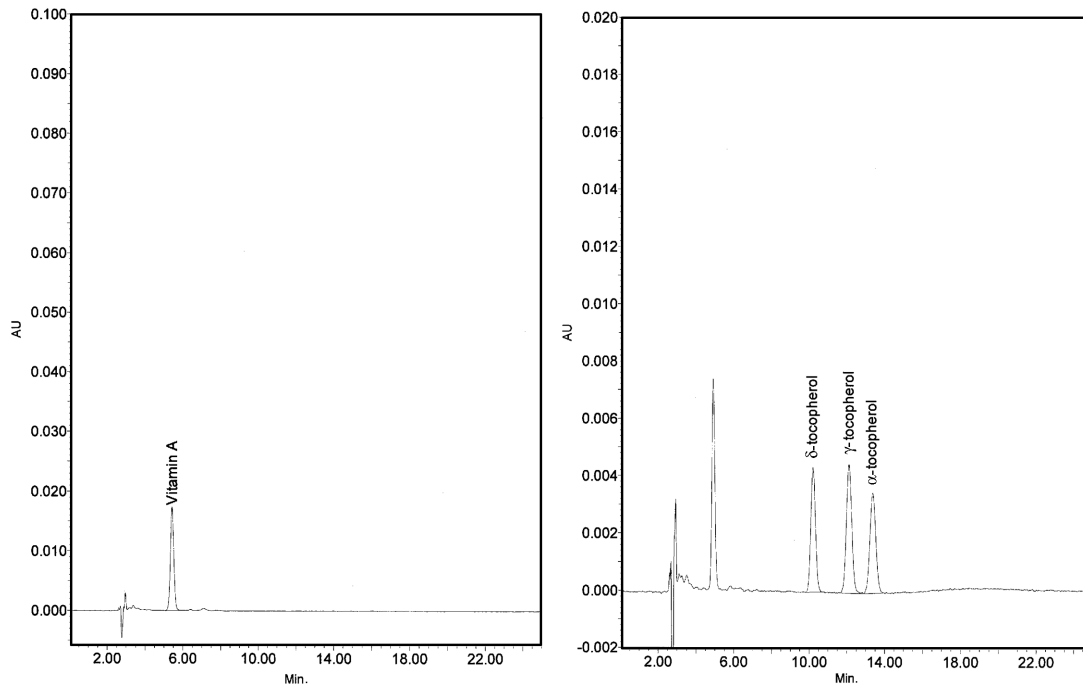


Fig. 7. Extracted chromatogram of vitamin A and E.

Table 2. The values of vitamin A and E in infant formula determined under various analytical method

(unit: mg/kg)

Sample	Vitamins ⁴⁾	Method				
		Direct		Food standards codex		AOAC
		PDA	FLD	FLD	UV/VIS	
Infant formula A	Vitamin A	5.53 ± 0.17 ³⁾	5.49 ± 0.23	5.48 ± 0.19	5.55 ± 0.21	
	Vitamin E ²⁾	121.3 ± 5.64	120.8 ± 9.34	110.3 ± 3.72	113.2 ± 5.76	
Infant formula B	Vitamin A	4.45 ± 0.55	4.55 ± 0.38	4.46 ± 0.56	4.57 ± 0.17	
	Vitamin E ²⁾	113.7 ± 3.44	110.8 ± 3.44	105.2 ± 4.94	103.9 ± 3.75	
SRM 1846 ¹⁾	Vitamin A	5.62 ± 0.26	5.63 ± 0.25	5.69 ± 0.12	5.65 ± 0.12	
	Vitamin E ²⁾	358.8 ± 15.2	356.9 ± 15.5	347.9 ± 35.8	348.4 ± 36.5	

¹⁾Certified concentration values of SRM 1846: vitamin A (5.84 ± 0.68 mg/kg), vitamin E (366.2 ± 31.76 mg/kg)

²⁾Content of vitamin E: total α-, δ-, γ-, β-tocopherol (β-tocopherol was determined as γ-tocopherol)

³⁾The values are mean ± S.D of 3 replications.

⁴⁾Means in the same column with the same superscripts are not significantly different (p < 0.05)

와 E를 분석하였다. 신속 추출법 및 비누화 추출법에서 비타민 A는 325 nm에서, 비타민 E는 290 nm에서 최대 흡수파장을 보였으며, 비타민 A와 E peak들의 추출한 결과를 각각의 chromatogram으로 Fig. 7에 나타내었다.

본 연구의 신속추출법에 의한 PDA-HPLC 방법과 식품공전 및 AOAC 방법을 이용한 분석 결과를 Table 2에 나타내었다. 정량분석을 하기 위한 각각의 실험방법에서 회귀곡선의 상관계수 (correlation coefficient r^2 value)는 1) 신속추출법과 다과장검출기에 의한 실험: $r^2=0.998$, 2) 신속추출법과 형광검출기를 이용한 실험: $r^2=0.997$, 3) 식품공전법과 형광검출기에 의한 실험: $r^2=0.999$, 4) AOAC 추출법과 UV/Vis 검출기에 의한 실험: $r^2=0.999$ 이었다.

Table 2에서 볼 수 있듯이 비타민 A와 E 모두 본 연구의 신속전처리 후 PDA detector에 의한 측정결과와 형광검출기에 의한 측정결과는 유사하여 검출방식에 의한 차이는 거의 없음을 알 수 있다.

비타민 A의 경우에 PDA와 FLD를 비교한 실험에서 조제분유 A의 측정결과는 각각 5.53과 5.49 mg/kg, 조제분유 B의 측정결과는 각각 4.45 과 4.55 mg/kg, NIST SRM 1846의 측정결과는 각각 5.62, 5.63 mg/kg이었다.

비타민 E의 경우에 PDA와 FLD를 비교한 실험에서 조제분유 A의 측정결과는 각각 121.3과 120.8 mg/kg, 조제분유 B의 측정결과는 각각 113.7과 110.8 mg/kg, NIST SRM 1846의 측정결과는 각각 358.8, 356.9 mg/kg 이었다.

시료전처리 방법을 포함한 전체적인 실험방법간의 차이를 비교하기 위한 실험에서는 비타민 A의 경우 각 시험방법간의 차이는 거의 없었으나, 비타민 E의 경우에는 본 연구의 신속추출법에 의한 실험 결과가 식품공전방법 및 AOAC방법에 비해 다소 높게 측정되었다.

비타민 A의 함량을 분석함에 있어서 시험방법간의 비교결과 및 회수실험 결과는 각 실험실의 시료 전처리 장비, 분석기기, 환경조건 등의 차이에 따라 다소 차이가 있을 수 있겠으나, 본

문 헌

연구소의 실험실에서 수행한 실험방법, 식품공전방법 및 AOAC 방법간의 비교결과는 조제분유 A의 경우 각각 5.53, 5.48, 5.55 mg/kg, 조제분유 B의 경우 각각 4.45, 4.46, 4.57 mg/kg, NIST SRM 1846의 경우는 각각 5.62, 5.69, 5.65 mg/kg으로 유사한 결과를 나타내었다.

한편, 비타민 E의 경우에는 본 연구의 실험방법, 식품공전방법 및 AOAC방법간의 차이를 비교한 실험에서 조제분유 A의 측정결과는 각각 121.3, 110.3, 113.2 mg/kg, 조제분유 B의 측정결과는 각각 113.7, 105.2, 103.9 mg/kg, NIST SRM 1846의 측정결과는 각각 358.8, 347.9, 348.4 mg/kg으로 본 연구의 실험방법이 다소 높게 측정되었으나 측정시료에서 보장된 균일성과 실험오차를 고려하면 유사한 결과가 산출되었음을 알 수 있다 ($p < 0.05$).

국제인증표준물질인 NIST SRM 1846을 이용하여 본 연구의 실험방법에 의하여 측정된 결과는 비타민 A가 5.62 mg/kg으로서 인증값인 5.84 ± 0.68 mg/kg의 범위 내로 측정이 되었으며, 비타민 E가 358.8 mg/kg으로서 인증값인 366.2 ± 31.76 mg/kg의 범위 내로 측정이 되었다.

따라서 본 연구의 신속추출법이 식품공전방법 및 AOAC방법과 측정값에 다소 차이가 있기는 하지만 조제분유에 존재하는 비타민 A와 E의 함량을 측정하기 위하여 각기 다른 2가지의 비타민 실험방법을 사용하지 않고 본 연구의 실험방법을 사용하여 보다 신속하고 효율적인 분석을 수행하는데에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 조제분유 중에 영양강화를 위해 첨가하는 비타민 A와 E의 함량측정을 위해 각기 다른 실험방법을 사용하지 않고 2가지 비타민을 동시에 분석하는 신속분석법을 위와 같이 수행하였다. 비타민 A와 E를 유기용매로 동시에 신속하게 추출하고 역상컬럼과 PDA-HPLC를 이용하여 각각의 성분으로 모두 분리한 후 동시에 검출하는 방법을 사용하였다. 국제표준인증물질 및 조제분유를 시료로 사용하여 본 연구의 실험방법에 의해 측정된 값을 식품공전방법 및 AOAC방법에 의한 측정값과 비교한 결과 유사한 측정결과를 얻을 수 있었다. 또한 본 연구의 실험방법에 의하여 수행한 국제인증표준물질 중의 비타민 A와 E의 함량측정 결과는 인증된 표준값내의 결과를 보여주었다. 따라서, 비타민 A 또는 E를 강화한 분유, 이 유식 등의 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 역상컬럼과 PDA-HPLC에 의해 비타민 A와 E를 동시에 분석함으로써 보다 효율적인 분석을 진행 할 수 있을 것으로 사료된다.

1. The Korean Nutrition Society. Recommended dietary allowances for Koreans. 7th rev. The Korea Nutrition Society, Seoul, Korea (2001)
2. Korea Food and Drug Administration. Food Standards Codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea (2003)
3. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersbrug, MD, USA (2000)
4. Wilhelm F. Vitamins. Walter de Gruyter, New York, NY, USA (1988)
5. William Jr. OL, Don MH, Thomas WH, James IM, Edna RY, Ronald RE, Abdel-Gawad MS. Vitamin A and vitamin E content of infant formulas produced in the United States. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68: 509-511 (1985)
6. Korea Food and Drug Administration. Food Code, pp. 894-897, 912-915. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea (2003)
7. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Ch. 50, pp. 1-5. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersbrug, MD, USA (2000)
8. Alphonse FW, Lucia AM. Improved reverse phase liquid chromatographic determination of vitamins A and D in fortified milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 62-64 (1984)
9. Harvey EI. Simplified saponification procedure for the routine determination of total vitamin E in dairy products, foods and tissues by high-performance liquid chromatography. Analyst. 113: 1217-1221 (1988)
10. Søren KJ. Retinol determination in milk by HPLC and fluorescence detection. J. Dairy Res. 61: 233-240 (1994)
11. Soledad AH, Sonia NR, M Teresa VN, Abel MF. Determination of vitamins A and E in infant milk formula by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 778: 243-247 (1997)
12. Jonathan WD, Karlene RS. Determination of Vitamins A (Retinol) and E (alpha-Tocopherol) in Foods by Liquid Chromatography : Collaborative. J. AOAC Int. 85: 424-434 (2002)
13. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Ch. 45. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersbrug, MD, USA (2000)
14. Kim PZ, Kim CH. A study on the simultaneous analysis of fat-soluble vitamins in food stuffs and vitamin products by high performance liquid chromatography. Korean J. Chem. Soc. 33: 46-54 (1989)
15. Mary CM, Ronal HS, James RK. Isomerization of retinyl palmitate using conventional lipid extraction solvents. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66: 746-750 (1983)
16. Qian H, Sheng M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. J. Chromatogr. A 825: 127-133 (1998)
17. Larry GR, Willie MC, Harold Jr. CT. Simultaneous analysis of vitamins A and E in rodent feed by high-pressure liquid chromatography. J. Agric. Food. Chem. 39: 296-299 (1991)
18. Stephen AB, Leroy WF. Simultaneous determination of vitamin A acetate, vitamin D₂ and vitamin E acetate in multivitamin mineral tablets by high performance liquid chromatography with coupled columns. Anal. Chem. 51: 641-645 (1979)

(2003년 10월 8일 접수; 2004년 4월 12일 채택)