

연구노트

Column-switching HPLC를 이용한 성장기용 조제식 중 비타민 D₃, K₁의 동시분석

곽병만* · 안장혁 · 장치훈

남양유업(주) 중앙연구소

Simultaneous Determination of Vitamin D₃ and K₁ in Infant Formula by Column-switching High Performance Liquid Chromatography with UV Detection

Byung-Man Kwak*, Jang-Hyuk Ahn, and Chi-Hoon Chang

Research and Development Center, Namyang Dairy Products Corporation

Rapid and simple method was developed for simultaneous determination of vitamins D₃ and K₁ contents in infant formula. Contents of vitamins D₃ and K₁, extracted by column-switching HPLC with reversed phase column using enzymatic hydrolysis and organic solvent, in CRM determined by developed method were within certified ranges of standard values.

Key words: enzymatic hydrolysis extraction, column-switching HPLC, simultaneous determination

서 론

성장기용 조제식은 분리대두단백 등 단백질 함유 식품을 원료로 생후 6개월 이후 영아, 유아의 정상적인 성장·발육에 필요한 무기질, 비타민 등 영양소를 첨가하여 이유식의 섭취시 액상으로 사용할 수 있도록 분말상태 또는 액상으로 제조·가공한 것을 말한다. 이러한 가공식품 중의 각종 영양성분들을 분석하고 그 적합성을 판단할 수 있도록 각종 실험방법들이 식품공전(1) 및 AOAC(2)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. 또한 복잡한 매질로부터 방해물질을 제거한 후 분석하고자 하는 비타민을 분리해야 한다(3-9). 비타민 D₃ 및 K₁은 식품공전방법(4) 및 AOAC방법(5)에 소개되어 있는 것과 같이 알

칼리 가수분해와 액체-액체 추출법을 이용하여 변성된 단백질이나 전분 등의 방해물질을 침전시켜 제거한 후 비타민을 비극성용매로 추출하여 그 시험용액을 정량하는 방법, 효소분해로 지방과 지방산을 침전시킨 후 유기용매로 추출하여 post-column 환원법을 이용하여 분석하는 방법등이 소개되어 있다.

Kim 등(6)은 알칼리 가수분해법과 효소가수분해법 등을 이용하여 지용성 비타민의 분석방법을 연구하였으며, Setphaen 등(7)은 2가지의 컬럼을 연결하여 비타민을 분석하였다. 또한 Hiroshi(8)는 column switching을 이용한 비타민 D₃를 분석하였으며, Blanco 등(9)은 알칼리 가수분해법과 narrow-bore column을 이용하여 지용성 비타민을 분석하였다. 따라서 비타민 D₃와 K₁의 함량을 측정하기 위하여 시료전처리와 기기분석방법을 각각 구분하여 수행하기 때문에 인력과 시간이 많이 소요된다. 이러한 비타민 D₃와 K₁의 분석을 동일한 시료전처리와 기기분석방법으로 수행한다면 인력과 시간을 단축할 수 있는 이점이 있다.

본 연구에서 사용한 switching system은 3단계의 과정을 통해 극미량 영양성분을 분석할 수 있는 유용한 장비다. 이 system을 살펴보면 첫 번째 단계로 전처리 컬럼을 이용하여 1차 분리 과정을 거침으로써 방해물질을 제거하여 분석물질을 분리한다. 두 번째 단계는 1차 분리과정을 거친 성분을 농축 컬럼의 선단에 흡착시켜 농축 효과를 보는 단계이며, 마지막 단계로 농축된 성분을 분석용 컬럼으로 주입하여 각각의 비타민을 분리한 후 UV 검출기로 동시에 검출하는 과정이다. 이러한 과정을 통해 보다 신속하고 효율적인 실험방법을 제공하고자 한다.

*Corresponding author: Byung-Man Kwak, Research and Development Center, Namyang Dairy Products Co., Ltd., 160, Bongam-ri, Janggi-myun, Gongju-Si, Chungcheongnam-do 314-914, Korea
Tel: 82-41-856-0381
Fax: 82-0303-3262-0660
E-mail: fivefive@hanmail.net

재료 및 방법

실험재료

실험 재료로는 실험결과 검증을 위한 인증표준물질(CRM, certified reference material)은 비타민 D₃를 0.117±0.011 mg/kg, 비타민 K₁을 0.93±0.04 mg/kg 함유하고 있는 infant formula SRM 1846(National Institute of Standard & Technology, USA)를 사용하였다. 또한 시중에서 판매되는 국내산 N사의 성장기용 조제식 A는 비타민 D₃를 9.3 µg/100 g, 비타민 K₁을 25 µg/100 g 함유되도록 조제된 제품을 사용하였다.

정성 및 정량 분석을 위하여 사용된 비타민 D₃와 비타민 K₁의 표준품(RM: reference material)과 lipase는 Simga사(St. Louis, Mo, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

그밖의 시약으로 HPLC용 H₂O, methanol, absolute ethanol, isopropyl alcohol는 Merck사(Darmstadt, Germany)에서 HPLC grade를 구입하여 사용하였으며 초순수는 EASY pure system (Barnstead, USA)에 의하여 18.0 MΩ수준으로 정제된 물을 사용하였다.

첨가회수 실험

첨가회수실험을 위한 시료로는 NIST의 SRM 1846에서 확인된 비타민 D₃와 비타민 K₁를 혼합하여 각각 100 µg/L 농도로 조제한 표준용액 1 mL을 첨가한 후 첨가하지 않은 시료와 동일하게 처리하여 정량 분석하였다. 그 결과값을 이용하여 첨가하지 않았을 경우의 결과치를 첨가한 결과치에서 뺀 후 첨가량을 기준으로 회수율을 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$(A_1 - A_2)/A_3 \times 100$; 여기에서 A₁은 비타민 표준용액을 첨가했을 때의 결과값, A₂는 비타민 표준용액을 첨가하지 않은 경우의 결과값, A₃는 비타민 표준용액 첨가량.

신속추출법

시료를 약 1 g씩 0.1 mg까지 정밀히 취하여 50 mL screw-capped extraction tube에 넣고 dimethylsulfoxide 2 mL을 가한 후 N₂ gas로 충전하여 capping한 후, vortex mixer를 이용하여 1분간 잘 혼합하였다. 혼합 후 약 5분간 방치한 후 methanol : isopropanol(8/2, v/v)을 10 mL로 하여 vortex mixer로 다시 1분간 잘 혼합하였다. 이 tube를 10분간 sonication 시킨 후 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 이 용액의 중간층을 취하여 2 µm membrane filter 후 시험용액으로 사용하였다. 단, 실험실 내의 환경조건은 온도 23±2°C, 습도 50±5%에서 수행하였다.

효소가수분해법

시료 약 1 g에 40°C 이하의 물 15 mL을 넣고 잘 섞어준 후 pH 7.7 인산염 완충용액 5 mL과 lipase 2.5 g을 첨가한 후 1분 동안 vortex 시킨다. 이 용액을 37±2°C로 유지된 water-base에 20분마다 15초씩 흔들며 주면서 2시간 동안 항온처리 시키고 반응이 종료되면 물에 정지하여 냉각시킨다. Ethanol : methanol(95/5, v/v) 10 mL를 가하여 10분간 sonication 시키고 30 mL hexane를 첨가한 후 10분간 shaking 한 후 냉장고에 정지한다. 층분리가 일어나면 상층액 5 mL을 취하여 질소 가스로 농축한 후 methanol 1 mL로 용해시켜 HPLC로 즉시 분석하였다. 단, 실험실 내의 환경조건은 온도 23±2°C, 습도 50±5%에서 수행하였다.

기기분석

본 연구의 실험방법에 의한 비타민 D₃와 K₁의 분석은 semi-

micro HPLC(Nano Space SI-2, Shiseido, Japan)를 사용하였다. Switching system은 model 3012(six-way switching valve)를 이용하여 UV-Vis 3002 model로 검출 파장을 270 nm에서 고정하여 검출하였다. 시료에서 비타민을 1차 분리하기 위해 capcell-pak MF C₈(4.6×150 mm) 컬럼으로 비타민 D₃는 5-6.3 min, K₁은 8.1-9.6 min에서 모두 검출되는 것을 확인하여 switching time으로 설정하였다. Capcell-pak UG C₁₈(3.0×35 mm) 컬럼을 사용하여 분리된 비타민을 농축하였으며 최종적으로 비타민을 분리하기 위한 분석컬럼으로 capcell-pak UG 120V C₁₈(1.5×250 mm)을 사용하였다. 전처리 컬럼 이동상은 methanol : isopropyl alcohol : H₂O(64/16/20, v/v/v)을 0.5 mL/min의 유속으로 사용하였다. 농축컬럼 및 분석컬럼의 이동상은 methanol : isopropyl alcohol : H₂O(64/16/20, v/v/v, solvent A)과 methanol : isopropyl alcohol(8/2, v/v, solvent B)의 2가지 용매를 사용하여 0-9.6(switching ending time) min까지 solvent B 20%(10 µL/min), 9.6-19.6 min까지 solvent B 100%(110 µL/min), 19.6-50 min까지 solvent B 100%(110 µL/min), 50-51 min solvent B 20%(10 µL/min), 51-60 min까지 solvent B 20%(10 µL/min)로 program을 작성하여 분석하였다.

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

결과 및 고찰

Semi-micro HPLC를 이용한 첨가회수실험 결과

비타민 D₃ 및 K₁의 함량을 분석함에 있어서 각 시험방법의 회수실험결과는 실험실의 시료전처리 장비, 분석기기, 환경조건등의 차이에 따라 다소 차이가 있을 수 있겠으나, 본 연구소의 실험실에서 수행한 3반복 실험한 결과는 효소가수분해방법에서 vitamin D₃는 94.57%, vitamin K₁는 94.37%로 양호한 회수율을 보여 이 방법을 사용하였다.

Switching system HPLC를 이용한 비타민 D₃, K₁ 분리 및 검출

Fig. 1은 신속추출법으로 비타민 D₃와 K₁을 추출한 후 switching time을 5-9.1 min을 설정하여 HPLC에 주입한 결과로 비타민 D₃와 K₁의 peak 주변에 많은 방해 물질이 존재하여 정확한 비타민 함량을 측정하기 어렵다. 따라서 비타민 D₃와 K₁가 전처리 컬럼에서 분리되는 시간을 측정하여 2번의 switching system을 이용한 분석한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. Fig. 2에서

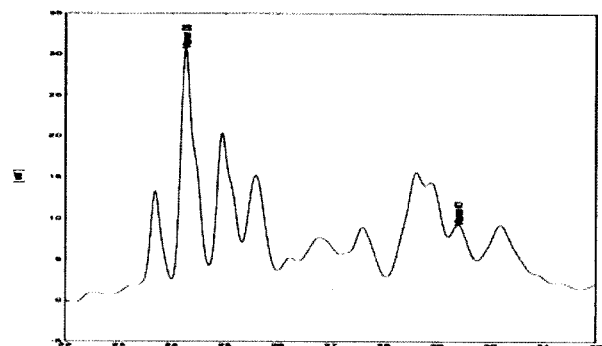


Fig. 1. Total switching system HPLC chromatogram of Vitamin D₃ and K₁.

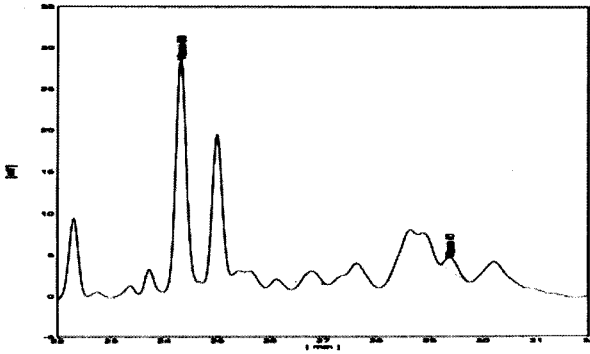


Fig. 2. Individual switching system HPLC chromatogram of Vitamin D₃ and K₁.

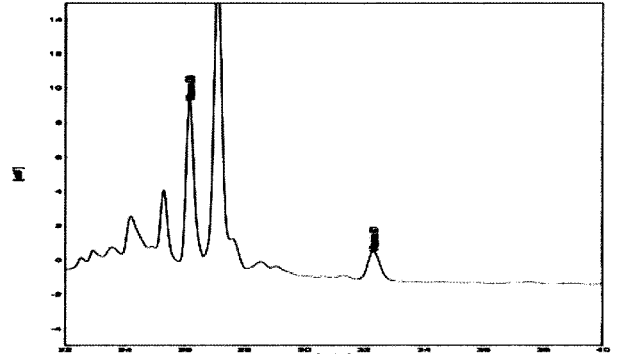


Fig. 5. Individual switching system HPLC chromatogram of Vitamin D₃ and K₁.

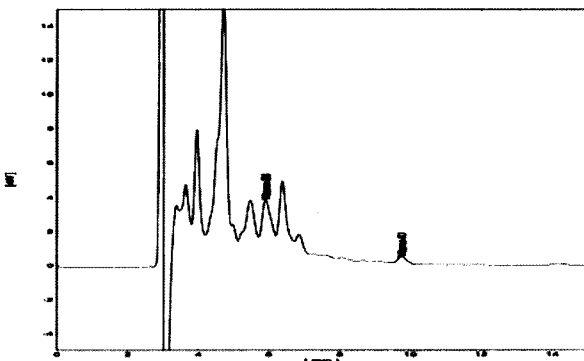


Fig. 3. Non-switching system HPLC chromatogram of Vitamin D₃ and K₁.

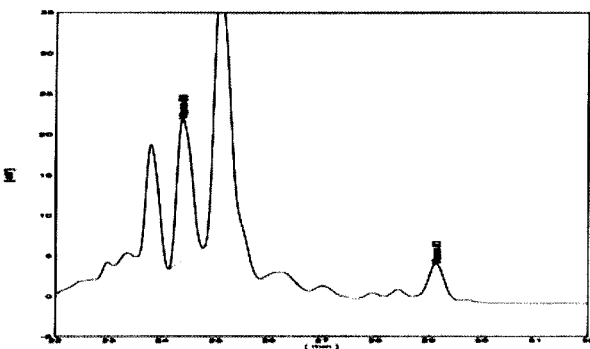


Fig. 4. Total switching system HPLC chromatogram of Vitamin D₃ and K₁.

보듯이 비타민 D₃ peak에 겹치는 물질을 제거하였으나 비타민 K₁의 경우에는 Fig. 1과 같은 결과를 보였다.

Fig. 3은 lipase를 이용하여 지방과 지방산을 침전시키고, 유기용매로 추출한 후 switching system을 적용하지 않은 결과로 비타민 K₁ 경우에는 주변 방해물질이 보이지 않지만 비타민 D₃와 방해물질 peak가 겹치는 결과가 나타났다. 따라서 switching system을 이용하여 전처리 컬럼에서 일부 방해물질을 제거하고자 하였다(Fig. 4). 그러나 한 번의 switching time을 적용시켰을 때 비타민 D₃ peak와 방해물질 peak가 겹치는 현상을 보이므로 비타민 D₃와 K₁가 전처리 컬럼에서 분리되는 시간을 측정하여 2번의 switching time을 적용시켰다. 그 결과 Fig. 5에서 볼 수 있듯이 비타민 D₃와 K₁의 방해물질을 제거하여 정확한 정량분석을 실시할 수 있었다.

본 연구의 효소가수분해법으로 전처리 후 switching system HPLC를 이용하여 비타민 D₃와 K₁의 정량분석을 하기 위한 회귀곡선의 상관계수(correlation coefficient r^2 value)는 1) 비타민 D₃: $r^2 = 0.998$, 2) 비타민 K₁: $r^2 = 0.997$ 이었다.

성장기용 조제식 A의 측정결과 비타민 D₃는 11.7 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 비타민 K₁은 31.8 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 으로 표기함량보다 다소 높게 나타났으나, 본 연구의 실험방법에 의하여 측정된 국제인증표준물질인 NIST SRM 1846의 결과는 비타민 D₃가 0.108 mg/kg으로서 인증값인 $0.117 \pm 0.011\text{ mg/kg}$ 의 범위내로 측정이 되었으며, 비타민 K₁이 0.91 mg/kg으로서 인증값인 $0.93 \pm 0.04\text{ mg/kg}$ 의 범위내로 측정이 되었다. 비타민 D₃와 K₁의 분석 결과 값이 표기함량인 9.3 $\mu\text{g}/100\text{g}$, 25 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 보다 높게 나온 이유는 비타민 D₃의 1-3 $\mu\text{g}/100\text{ kcal}$, 비타민 K₁의 4.0 $\mu\text{g}/100\text{ kcal}$ 이상인 성장기용 조제식의 법적 허용기준 범위에 따른 제품의 특성인 것으로 사료된다.

따라서 본 연구의 성장기용 조제식에 존재하는 비타민 D₃와 K₁의 함량을 측정하기 위하여 효소가수분해법과 switching system을 이용하여 보다 신속하고 효율적인 분석을 수행하는 데에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 성장기용 조제식 중에 영양강화를 위해 첨가하는 비타민 D₃와 K₁의 함량측정을 위해 lipase를 이용하여 효소가수분해 후 유기용매로 비타민을 추출하여 동시에 분석하는 신속분석법을 위와 같이 수행하였다. 추출된 비타민을 전처리 컬럼에서 2번의 switching time을 설정하여 농축컬럼에 흡착시킨 후 gradient mode로 2가지 이동상으로 분석컬럼에서 각각의 성분을 모두 분리하여 동시에 검출하는 방법을 사용하였다. 시료로 사용된 성장기용 조제식은 표기함량보다 다소 높게 분석되었으나, 국제표준인증물질을 시료로 사용하여 본 연구의 실험방법에 의해 측정된 값은 인증된 표준값내의 결과를 보여주었다. 따라서, 비타민 D₃ 또는 K₁을 강화한 분유, 이유식 등의 분말 유제품 중에서 함량을 측정하고자 할 때 한정된 장비와 인력으로 각각의 2가지 실험방법을 수행하기가 어렵거나 시간단축이 필요한 경우, 본 연구에서 수행한 실험방법과 같이 시료전처리를 간단하고 신속하게 수행할 뿐만 아니라 역상컬럼과 column-switching HPLC에 의해 비타민 D₃ 또는 K₁을 동시에 분석함으로써 보다 효율적인 분석을 진행할 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

1. Korea Food and Drug Administration. Korean Food Code. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea (2003)
2. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersbrug, Maryland, USA (2000)
3. Wilhelm F. Vitamins. Walter de Gruyter, New York, USA (1988)
4. Korea Food and Drug Administration. Korean Food Code, pp. 838-841. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea (2004)
5. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. rev 2. Ch. 45, pp. 28-29. Ch. 50, pp. 32-34. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersbrug, Maryland, USA (2003)
6. 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)
7. 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)
8. Hiroshi I. Determination of vitamin D₂ in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and column-switching high-performance liquid chromatography with UV detection. J. Chromatogr. A, 881: 189-196 (2000)
9. Blanco D, Fernández MP, Cutiérez MD. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column. Analyst 125: 427-431 (2000)

(2004년 12월 31일 접수; 2005년 11월 5일 채택)