



## 건강기능식품 등 중 수용성 비타민 B군의 HPLC를 이용한 동시분석법

김선희 · 김재현 · 이화정 · 오재명 · 이성혜 · 반경녀 · 서일원 · 이영주 · 이진희 · 강태석\*

식품의약품안전처 영양기능연구팀

## Simultaneous Determination of Water Soluble Vitamins B Group in Health Functional Foods etc. by HPLC

Seon Hee Kim, Jae-Hyun Kim, Hwa Jung Lee, Jae Myoung Oh, Sung Hye Lee,  
Kyeong Nyeo Bahn, Il Won Seo, Young Joo Lee, Jin Hee Lee, and Tae Seok Kang\*

Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea

(Received December 4, 2014/Revised February 13, 2015/Accepted April 10, 2015)

**ABSTRACT** - This study was conducted to simultaneous analysis methods for water soluble vitamins B group (vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, nicotinic acid, nicotinamide, vitamin B<sub>6</sub>) which is used as health functional foods etc. Analytical methods of water-soluble vitamins B group by HPLC were established through instrumental analytical conditions, and the examination of data such as domestic and foreign reliable methods, and papers of journal. HPLC method analyzing water soluble vitamins B group was established using Capcell Pak C18 UG 120 column in 270 nm through test of columns. The validation has been performed on the method to determine linearity, accuracy, limits of quantification (LOQ) and repeatability for water soluble vitamins B group. An excellent linearity ( $r^2 = 0.999$ ) was observed for vitamin B<sub>1</sub>, vitamin B<sub>2</sub>, nicotinic acid, nicotinamide, vitamin B<sub>6</sub> in the concentration range (0.1~2 µg/mL). Observed recovery of vitamin B<sub>1</sub> was found to be between 100 and 103%, vitamin B<sub>2</sub> was found to be between 104 and 112%, nicotinic acid was found to be between 82 and 85%, nicotinamide was found to be between 121 and 124% and vitamin B<sub>6</sub> was found to be between 95 and 104%. LOQ of vitamin B<sub>1</sub> was found to be 0.04 µg/mL, vitamin B<sub>2</sub> was found to be 0.05 µg/mL, nicotinic acid was found to be 0.15 µg/mL, nicotinamide was found to be 0.08 µg/mL and vitamin B<sub>6</sub> was found to be 0.63 µg/mL. Repeatability precision for vitamin B<sub>1</sub> was found to be 0.4%, vitamin B<sub>2</sub> was found to be 0.4%, nicotinic acid was found to be 0.5%, nicotinamide was found to be 0.7% and vitamin B<sub>6</sub> was found to be 0.4% relative standard deviation (RSD). Also, verify the accuracy of the simultaneous analysis methods, we monitored the labeled contents of the health functional foods and children's preferred foods.

**Key words** : hplc, simultaneous determination, water soluble vitamins B group

건강기능식품은 인체 내 영양소 조절, 혹은 생리학적 작용 개선 등의 건강보조를 목적으로, 인체에 유용한 기능성을 가진 원료 혹은 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 가공된 식품을 의미한다<sup>1)</sup>. 최근에 소비자들이 건강에 대한 관심이 높아져 건강에 도움을 주고 기능성을 강조하는 제품에 대한 수요가 급증하고 있고, 그 중에서도 비타민 정제는 다양한 회사에서 여러 가지 형태로 제조되어 가장 많이 판매되고 있는 건강기능식품 중의 하나이다<sup>2)</sup>. 식품에도 소량만 존재하는 비

타민은 고등동물의 성장과 생명 유지에 필수적인 물질이다. 고등동물의 체내에서는 전혀 합성 되지 않거나 필요한 만큼 합성되지 않아 반드시 식품으로부터 섭취해야 한다<sup>3)</sup>. 수용성 비타민에는 비타민 B<sub>1</sub>(thiamin), 비타민 B<sub>2</sub>(riboflavin), 비타민 B<sub>6</sub>(pyridoxine), 비타민 B<sub>12</sub>(cyanocobalamin), 나이아신(niacin), 비타민 C(ascorbic acid), 비오틴(biotin), 엽산(folic acid) 및 판토텐산(pantothenic acid)의 9종이 속한다. 수용성 비타민은 섭취되어 생체 내에서 활성형으로 변환되는 것이 많다. 비타민 C를 제외한 수용성 비타민은 모두 생체 내에서 조효소의 성분이 된다. 수용성 비타민 부족은 특이한 결핍증을 일으키지만 과잉의 경우는 소변으로 배설되기 때문에 과잉증은 나타나지 않는다.

수용성 비타민은 종류에 따라 식품으로부터 추출하는 방법이 각기 다양하게 개발되어 있고 추출 방법에 따라 많

\*Correspondence to: Tae Seok Kang, Nutrition and Functional Food Research Team, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongwon-gun, Korea  
Tel: 82-43-719-4401, Fax: 82-43-719-4400  
E-mail: taska@korea.kr

은 양의 비타민이 파괴된다<sup>4)</sup>. 식품 및 건강기능식품 중의 각종 영양성분들을 분석하고 그 적합성을 판단할 수 있도록 각종 실험방법들이 식품공전<sup>5)</sup>, 건강기능식품공전<sup>6)</sup> 및 AOAC<sup>7)</sup>에 소개 되어 있으며, 복잡한 물질특성으로 인한 실험과정중의 문제점들을 해결하기 위해 다양한 실험방법들이 연구되고 있다<sup>8-17)</sup>. 현행 비타민의 시험법으로 비타민 B<sub>1</sub>은 티오크롬에 의한 형광법, HPLC, 형광검출기(FLD)에 의한 정량, 비타민 B<sub>2</sub>는 리보플라빈 형광법, 액체크로마토그래프 형광검출기에 의한 정량, 나이아신은 케니히 반응에 의한 비색법, 미생물에 의한 정량 및 HPLC 자외부흡광도 검출기(UV검출기)에 의한 정량, 비타민 B<sub>6</sub>는 미생물에 의한 정량, 액체크로마토그래프 형광검출기에 의한 정량 등 식품공전 및 건강기능식품 공전에 수록 되어있는 개별분석법으로 시료의 전처리 과정이 복잡하고 많은 분석시간이 소요된다. 수용성 비타민에 대한 동시분석법 개발과 관련한 국내외의 연구현황을 살펴보면 비타민 복합식이보충제 혹은 의약품에 대한 연구가 대부분<sup>18-21)</sup>이며 영·유아용 조제식에 대한 적용성을 확인한 연구도 일부 있는 것으로 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 기존의 연구방법에 비해 비타민의 파괴를 최소화하고 비타민의 정량에서 복잡한 시료 전처리 과정을 단순화 시켰으며 시간적 효율성을 높이는 방향으로 개발을 하였다. 이에 PDA를 사용하여 뛰어난 파장의 재현성과 최소화된 외부 산란광의 영향을 받지 않아 시료 부분의 뚜껑이 열린 상태에서 실험을 수행해도 데이터에 영향을 미치지 않도록 하였고 역상칼럼을 사용하여 동시분석을 하였다. 시판되고 있는 어린이 기호식품 8건 및 건강기능식품 24건 내에 함유된 여러 가지 영양성분 중 수용성 비타민 (비타민 B<sub>1</sub>, 비타민 B<sub>2</sub>, 비타민 B<sub>6</sub>, 나이아신)에 대하여 HPLC 동시분석법을 이용하여 수용성 비타민 B군을 동시에 신속하며 재현성 있게 정량하는 방법을 확립함으로써 정확도와 신뢰도를 높이고, 사용자에게 편의성을 제공하고자 하는 목적으로 수행되었다.

## Materials and Methods

### 실험 재료

본 연구에 사용된 시료는 「국민건강영양조사」 원시자료를 분석하여 섭취빈도 3이상의 어린이 기호식품 (8건)과 건강기능식품 (24건)을 선정하였고, 서울시내 대형 백화점과 대형마트, 건강기능식품 판매점과 인터넷 통신판매 등을 이용하여 구입하였다. 시료는 전처리 후 24시간 이내에 분석을 실시함을 원칙으로 하였고, 분석하기 전까지 구입한 건강기능식품은 차광하여 냉동(-18°C)에서 보관하였고, 어린이 기호식품 중 음료류는 냉장(-4°C), 과자류는 균질화 한 후 차광하여 냉동(-18°C)에서 보관하였다. 최적화된 시험법을 시료들 중 비타민이 포함된 어린이 기호식품

은 액상류, 과자류, 건강기능식품은 정제, 젤리의 제품에 대한 적용성 시험을 실시하였다.

### 표준품 및 시약

비타민 B군 표준품으로 비타민 B<sub>1</sub>(thiamine hydrochloride), 비타민 B<sub>2</sub>(riboflavin), 나이아신(nicotinic acid, nicotinamide), 비타민 B<sub>6</sub>(pyridoxine hydrochloride)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료의 전처리에 사용된 sodium hexanesulfonate, acetic acid는 Wako사(Osaka, Japan), methanol은 Merck사(Whitehouse Station, NJ, USA)로부터 HPLC 급을 구입하여 사용하였다.

### 표준용액 및 시액의 조제

비타민 B<sub>1</sub>, 비타민 B<sub>2</sub>, 나이아신, 비타민 B<sub>6</sub> 표준품을 각각 5 mg을 취한 뒤, 50 mL 갈색정용플라스크 100 µg/mL의 용액이 되도록 이동상 A (5 mM hexanesulfonate, 10 mM sodium phosphate monobasic, 1% acetic acid)로 표선까지 정용하여 이를 stock solution으로 하였다. 각각 비타민 표준품의 stock solution과 표준물질 혼합액은 차광용기에 넣어 -4°C에서 보관하였으며, 표준용액은 표준원액을 각각 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 µg/mL이 되도록 이동상 A로 희석하여 사용하였다.

### 시험용액의 조제

균질화한 시료를 0.25~1 g (또는 1 mL) 칭량한 후 이동상 A를 넣어 50 mL로 정용하였다. 초음파로 30분 간 추출하여 9,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 0.2 µm 멤브레인 필터로 여과한 것을 이동상 A로 희석하여 시험용액으로 하였다.

### HPLC 기기 및 분석조건

HPLC 시스템은 SP<sup>^</sup>LC SP3213 detector, 3201 pump, 3004 oven, 3023 auto sampler, 3202 degasser (Nanospace SI-2, Shiseido, Tokyo, Japan)로 구성하였다. Sonicator는 8510E-DTH (Branson, Danbury, USA), Vortex mixer는 REAX top (Heidolph®, Schwabach, Germany), Centrifuse는 MX-300 (Tomy Seiko, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

이동상 A는 5 mM hexanesulfonate, 10 mM sodium phosphate monobasic, 1% acetic acid, B는 이동상 A에 methanol을 가하여 65% 메탄올 수용액 혼합용매로 조제하였고, 이동상은 A : B = 1 : 99으로 하고 A : B = 99 : 1으로 하여 40분간 분석하였다. 분석칼럼으로는 Shiseido capcellpak C18 UG120 (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)칼럼을 사용하였고, 시료 주입량은 10 µL, 칼럼온도는 40°C, 분석시간은 40분으로 하였으며, PDA 파장 범위는 190~400 nm로, 270 nm에서 분석하였다(Table 1).

**Table 1.** HPLC/PDA operation conditions for the B group vitamins

Instrumental condition	Operating condition		
Column	Shiseido Capcellpak C18 UG120 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)		
Mobility phase	A - 5 mM hexanesulfonate, 10 mM sodium phosphate monobasic, 1% acetic acid B - 이동상 A : Methanol = 35 : 65 (v/v)		
Flow rate	0.5 mL/min.		
Column temp.	40°C		
Wave length	270 nm		
Inj. vol.	10 μL		
Gradient program	Time	A (%)	B (%)
	0	99	1
	30	1	99
	35	99	1
	40	99	1

**비타민 대상 시료의 함량 확인**

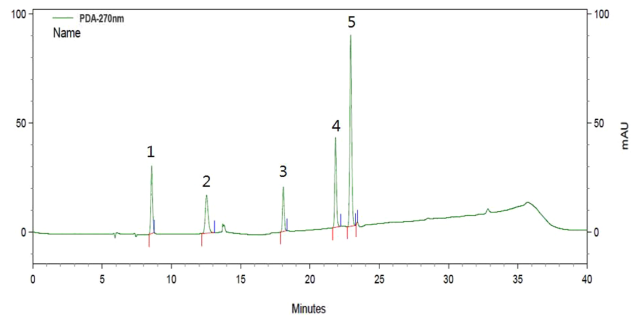
분석법 검증을 통하여 확립된 분석방법으로 시중에 유통 중인 건강기능식품 24종과 어린이 기호식품 8종에서 비타민 B군 성분 (비타민 B<sub>1</sub>, 비타민 B<sub>2</sub>, 나이아신, 비타민 B<sub>6</sub>)의 함량을 조사하였다. 초음파와 원심분리를 이용하여 전처리를 하여 HPLC에 주입하였을 때 얻어진 크로마토그램에서 검출 비타민 성분들의 피크 면적을 구하고, 미리 작성한 표준 정량곡선의 회귀방정식에 대입하여 비타민 B군의 함량을 구하였다.

**Results and Discussion**

**크로마토그램**

수용성 비타민의 표준용액을 C<sub>18</sub> 역상칼럼을 사용한 HPLC 시스템으로 분석하였을 때 Fig. 1에서 보는 바와 같이 수용성 비타민 4종 모두 방해 피크 없이 40분 이내에 모두 분리할 수 있었다.

각각의 수용성 비타민 머무름 시간은 nicotinic acid 8분



**Fig. 1.** HPLC chromatograms of water soluble vitamin standards. Peaks: 1. nicotinic acid, 2. nicotinamide, 3. vitamin B<sub>6</sub>, 4. vitamin B<sub>1</sub>, 5. vitamin B<sub>2</sub>.

대, nicotinamide 12분대, 비타민 B<sub>6</sub> 18분대, 비타민 B<sub>1</sub> 22분대, 비타민 B<sub>2</sub> 23분대에 분리되었다.

**분석법 검증**

**직선성**

시료에서 비타민 B군이 검출되는 농도범위를 중간값으로 설정하여 0.1~2 μg/mL의 농도범위에서 직선성을 검토하였다. 비타민 B군 모두 R<sup>2</sup> 값이 0.999이상으로 확인되었다. 비타민 B<sub>1</sub> R<sup>2</sup>=1.0000, 비타민 B<sub>2</sub> R<sup>2</sup>=0.9998, nicotinic acid R<sup>2</sup>=0.9996, nicotinamide R<sup>2</sup>=1.0000, 비타민 B<sub>6</sub> R<sup>2</sup>=0.9998 이상의 우수한 직선성을 확인할 수 있었다.

**검출한계 및 정량한계**

표본시료를 분석한 검량선의 기울기와 표준편차에 근거하여 3배를 곱한 값을 기울기 값으로 나눈 것을 검출한계, 10배를 곱한 값에 기울기 값으로 나눈 것을 정량한계로 설정하였다. 비타민 B<sub>1</sub>에 대한 LOD (Limit of detection)는 0.011 μg/mL, LOQ (Limit of Quantification)는 0.036 μg/mL로 나타났고, 비타민 B<sub>2</sub>에 대한 LOD는 0.014 μg/mL, LOQ는 0.048 μg/mL, nicotinic acid에 대한 LOD는 0.044 μg/mL, LOQ는 0.148 μg/mL, nicotinamide에 대한 LOD는 0.024 μg/mL, LOQ는 0.081 μg/mL, 비타민 B<sub>6</sub>에 대한 LOD는 0.190 μg/mL, LOQ는 0.633 μg/mL으로 나타났다(Table 2).

**Table 2.** The detection limits and quantitative limits of HPLC analysis for the B group vitamins

Compound	Concentration range (μg/mL)	y = ax + b		R <sup>2</sup>	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
		slope (a)	intercept (b)			
vitamin B <sub>1</sub>	0.10-2.00	159589.6	-2183.62	≥ 1.0000	0.011	0.036
vitamin B <sub>2</sub>	0.10-2.00	312608.9	-2877.91	≥ 0.9998	0.014	0.048
nicotinic acid	0.10-2.00	122352.5	-4121.44	≥ 0.9996	0.044	0.148
nicotinamide	0.10-2.00	100188.0	-1618.34	≥ 1.0000	0.024	0.081
vitamin B <sub>6</sub>	0.10-2.00	74002.9	7520.14	≥ 0.9998	0.19	0.633

**Table 3.** Accuracy of HPLC analysis for the B group vitamins

Compound	Accuracy (n = 3)				
	SRM Certification	Mean ± SD (mg/g)	Mean ± SD Recovery (%)	RSD (%)	
vitamin B <sub>1</sub>	multivitamin 3280	1.06 ± 0.12 mg/g	1.09 ± 0.02	102.8 ± 1.6	0.63
vitamin B <sub>2</sub>		1.32 ± 0.17 mg/g	1.42 ± 0.05	107.7 ± 3.9	0.91
nicotinamide		14.10 ± 0.23 mg/g	17.41 ± 0.20	123.5 ± 1.5	1.10
vitamin B <sub>6</sub>	meat 1546	1.81 ± 0.17 mg/g	1.82 ± 0.09	100.6 ± 4.9	1.26
nicotinic acid		36.30 ± 3.8 mg/kg	30.32 ± 0.61	83.53 ± 1.7	1.99

**정확성**

수용성 비타민 B군의 매트릭스 영향을 파악하고자 recovery 방법으로 정확성을 평가하였다. 국제인증시료인 NIST사 멀티비타민 3280, meat 1546을 이용하여 수용성

비타민 B군에 대한 정확성을 확인한 결과, 모든 성분에서 83~123% 수준의 회수율을 나타냈다(Table 3).

**정밀성**

정밀성을 확인하기 위하여 일내 정밀성과 일간 정밀성 실험을 하였다.

반복시험의 재현성은 분석법의 전 조작을 6회 반복 측정하였으며, 일내 정밀성을 시험한 결과 %RSD(상대표준 편차)가 비타민 B<sub>1</sub>은 0.415%, 비타민 B<sub>2</sub>는 0.425%, nicotinic acid는 0.545%, nicotinamide는 0.720%, 비타민 B<sub>6</sub>는 0.382% 이내로 나타나 높은 일내 정밀성이 확보됨을 확인하였다(Table 4).

분석일자 정밀성을 확인하기 위해 3반복 시료에 대해 3일에 걸쳐 시험한 결과 %RSD(상대표준편차)가 비타민 B<sub>1</sub>은 0.326%, 비타민 B<sub>2</sub>는 0.019%, nicotinic acid는 0.691%, nicotinamide는 0.736%, 비타민 B<sub>6</sub>는 0.131% 이내로 나타나 높은 일간 정밀성이 확보됨을 확인하였다(Table 5).

**Table 4.** Intra-day reproducibility test of HPLC analysis for the B group vitamins

Compound	Intra-day				
	content (µg/mL)	Mean	S.D.	RSD (%)	
vitamin B <sub>1</sub> (1.0 µg/mL)	1	0.99	0.99	0.004	0.415
	2	0.99			
	3	0.99			
	4	0.99			
	5	1.00			
	6	0.99			
vitamin B <sub>2</sub> (1.0 µg/mL)	1	0.90	0.90	0.004	0.425
	2	0.90			
	3	0.90			
	4	0.89			
	5	0.89			
	6	0.89			
nicotinic acid (1.0 µg/mL)	1	0.98	0.99	0.005	0.545
	2	0.99			
	3	0.99			
	4	0.99			
	5	0.99			
	6	0.99			
nicotinamide (1.0 µg/mL)	1	0.93	0.93	0.007	0.720
	2	0.92			
	3	0.93			
	4	0.93			
	5	0.94			
	6	0.93			
vitamin B <sub>6</sub> (1.0 µg/mL)	1	0.87	0.87	0.003	0.382
	2	0.87			
	3	0.87			
	4	0.87			
	5	0.87			
	6	0.87			

**Table 5.** Intra-day reproducibility test of HPLC analysis for the B group vitamins

Compound	Intra-day				
	content (µg/mL)	Mean	S.D.	RSD (%)	
vitamin B <sub>1</sub> (1.0 µg/mL)	1day	1.00	0.99	0.003	0.326
	2day	0.99			
	3day	0.99			
vitamin B <sub>2</sub> (1.0 µg/mL)	1day	1.01	1.01	0.000	0.019
	2day	1.01			
	3day	1.01			
nicotinic acid (1.0 µg/mL)	1day	0.93	0.93	0.006	0.691
	2day	0.94			
	3day	0.94			
nicotinamide (1.0 µg/mL)	1day	0.92	0.92	0.007	0.736
	2day	0.93			
	3day	0.92			
vitamin B <sub>6</sub> (1.0 µg/mL)	1day	0.99	0.99	0.001	0.131
	2day	0.99			
	3day	0.99			

**시료의 분석**

총 32건의 시료 중 건강기능식품 24건, 어린이 기호식품 8건으로 전체 시료에 대해 수용성비타민 B군 시험법을 적용하여 함량을 검토하였다(Table 6, 7).

건강기능식품에 대한 비타민의 기준·규격은 각각 설정

되어 있으며, 식품에 대한 영양소 표시량은 비타민의 경우 실제측정값이 표시량의 80% 이상이어야 한다.

건강기능식품에 대한 비타민 B<sub>1</sub>의 기준·규격은 표시량의 80~180%로 영양성분표시가 되어있는 건강기능식품 21건에 대해 함량을 비교한 결과 표시량에 대해 최저 92%

**Table 6.** Determination of B group vitamins in Health functional foods (n = 3)

Sample	Compound											
	vitamin B <sub>1</sub>			vitamin B <sub>2</sub>			nicotinamide			vitamin B <sub>6</sub>		
	Labeled (mg)	Found (mg)	Result (%)	Labeled (mg)	Found (mg)	Result (%)	Labeled (mg)	Found (mg)	Result (%)	Labeled (mg)	Found (mg)	Result (%)
1	0.48	0.58	117	0.53	0.74	142	7.90	11.59	146	0.78	1.03	130
2	0.75	0.82	109	0.85	0.76	89	6.00	8.41	140	1.00	1.41	141
3	-	-	-	0.01	0.01	106	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	1.20	1.60	132	-	-	-	-	-	-
5	0.81	1.18	145	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0.12	0.20	174	0.14	0.20	174	-	-	-	0.12	0.20	150
7	0.27	0.46	172	0.32	0.41	125	2.00	2.52	125	0.37	0.53	143
8	0.60	0.93	158	0.80	1.16	142	10.00	10.97	109	1.30	1.53	116
9	1.00	1.04	104	1.20	1.20	99	13.00	13.45	103	1.50	1.71	112
10	0.53	0.76	145	0.67	0.73	110	7.33	7.86	107	0.53	0.76	143
11	0.85	1.44	166	1.08	1.34	124	-	-	-	1.40	1.82	129
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.40	0.59	146
13	0.55	0.65	114	0.64	0.71	108	-	-	-	0.94	1.29	135
14	0.25	0.35	134	0.34	0.38	114	3.82	5.28	137	0.51	0.61	118
15	0.33	0.48	151	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1.10	1.54	140	1.30	1.15	88	4.00	4.23	105	1.60	2.12	131
17	0.80	1.43	174	0.40	0.68	175	10.00	13.00	129	0.70	0.91	129
18	0.85	1.19	139	-	-	-	3.90	4.25	109	1.32	1.75	131
19	1.12	1.84	164	1.00	1.14	113	4.57	5.64	123	0.89	1.32	150
20	1.00	0.93	92	1.20	1.09	89	6.50	5.32	81	1.50	1.87	123
21	0.32	0.48	150	0.40	0.48	150	4.60	4.85	105	0.45	0.62	138
22	0.90	1.33	147	1.00	1.18	118	5.34	6.99	130	0.80	1.18	145
23	0.55	0.69	125	0.90	1.03	114	8.50	8.88	104	1.85	2.17	117
24	1.00	1.42	143	1.20	1.24	103	11.00	10.84	98	1.30	1.46	112

**Table 7.** Determination of B group vitamins in Child-favored foods (n = 3)

Sample	Compound											
	vitamin B <sub>1</sub>			vitamin B <sub>2</sub>			nicotinamide			vitamin B <sub>6</sub>		
	Labeled (mg)	Found (mg)	Result (%)	Labeled (mg)	Found (mg)	Result (%)	Labeled (mg)	Found (mg)	Result (%)	Labeled (mg)	Found (mg)	Result (%)
1	0.07	0.08	114	0.08	0.10	125	0.90	0.10	110	0.09	0.14	156
2	0.03	0.05	167	0.04	0.07	190	-	-	-	-	-	-
3	0.32	0.39	123	0.30	0.60	200	-	-	-	0.38	0.45	118
4	0.10	0.10	100	-	-	-	-	-	-	0.15	0.19	127
5	0.60	0.06	100	-	-	-	2.00	2.00	100	-	-	-
6	0.10	0.10	100	0.20	0.20	100	1.70	2.20	129	0.13	0.15	115
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38	0.53	139
8	-	-	-	-	-	-	1.60	2.60	162	0.20	0.30	150

에서 최대 174%의 함량이 나타났고, 영양성분표시가 되어있는 어린이 기호식품 6건에 대해 함량을 비교한 결과 최저 97%에서 최대 185%의 함량이 나타났다. 건강기능식품에 대한 비타민 B<sub>2</sub>의 기준 규격은 표시량의 80~180%로 영양성분표시가 되어있는 건강기능식품 20건에 대해 함량을 비교한 결과 최저 88%에서 최대 175%의 함량이 나타났고, 영양성분표시가 되어있는 어린이 기호식품 4건에 대해 함량을 비교한 결과 최저 104%에서 최대 197%의 함량이 나타났다. 건강기능식품에 대한 나이아신의 기준 규격은 표시량의 80~150%로 영양성분표시가 되어있는 건강기능식품 16건에 대해 함량을 비교한 결과 최저 81%에서 최대 146%의 함량이 나타났고, 영양성분표시가 되어있는 어린이 기호식품 4건에 대해 함량을 비교한 결과 최저 110%에서 최대 146%의 함량이 나타났다. 건강기능식품에 대한 비타민 B<sub>6</sub>의 기준 규격은 표시량의 80~150%로 영양성분표시가 되어있는 건강기능식품 20건에 대해 함량을 비교한 결과 최저 112%에서 최대 150%의 함량이 나타났고, 영양성분표시가 되어있는 어린이 기호식품 6건에 대해 함량을 비교한 결과 최저 113%에서 최대 174%의 함량이 나타났다. 기준 규격에 맞게 함량이 나타났지만, 대체적으로 비타민들은 라벨에 표기된 양보다 실제 함유량이 높았다.

공전시험법에서 개별 비타민 전처리 조건을 살펴보면, 비타민 B<sub>1</sub>은 액체크로마토그래피에 의한 정량에 따라 10% 삼염화초산으로 시료를 균질화, 원심분리, 2% 디카디아스타제 용액을 넣고 반응시켜 인산염을 효소분해하여 시험용액으로 하고, 비타민 B<sub>2</sub>는 수욕상에서 20분간 추출 후 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다. 나이아신, 니코틴아미드는 5 mM hexanesulfonate로 녹인 후 30분간 초음파추출, 30분 원심분리하여 상등액을 HLB카드리를 이용하여 정제 후 시험용액으로 하고, 비타민 B<sub>6</sub>는 30분 초음파 추출, 10분 원심분리 후 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 동시분석을 위한 전처리는 영양성분 분석법 개선연구<sup>22)</sup>의 수용성비타민 개별 시험법 전처리법을 검토하여 수행하였다.

본 연구를 통하여 확립된 HPLC를 이용한 건강기능식품 및 식품 중 수용성 비타민 B군 동시분석법은 일부 비타민의 HPLC 개별정량법과 비교하였을 때, 높은 재현성, 정밀성을 보였고, 비타민의 정량에서 복잡한 시료 전처리 과정을 단순화 시켜 시간적 효율성을 높였다. 본 연구 수행 결과를 활용한 비타민 B군의 동시분석 활용 시, 분석에 소요되는 시간과 인력을 절감할 수 있을 것으로 기대된다.

### Acknowledgement

본 연구는 2013년도 식품의약품안전처 연구개발사업의

연구비지원(13161미래식155)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 국문요약

건강기능식품 등 중 수용성 비타민 B군 (비타민 B<sub>1</sub>, 비타민 B<sub>2</sub>, 나이아신, 비타민 B<sub>6</sub>)의 동시분석 방법을 확립하기 위하여 본 연구를 실시하였다. HPLC에 의한 수용성 비타민 B군의 분석 방법은 기기분석조건을 확립하고, 국내외 시험법 및 논문을 참고하여 시험 데이터를 분석하였다. 수용성 비타민 B군의 HPLC 분석은 270 nm에서 Capcell Pak C18 UG 120 컬럼을 사용하여 진행되었다. 분석법 검증은 수용성 비타민 B군의 직선성, 정확성, 정량한계, 정밀성에 대해 수행되었다. 직선성은 비타민 B<sub>1</sub>, 비타민 B<sub>2</sub>, 나이아신(nicotinic acid, nicotinamide), 비타민 B<sub>6</sub> 모두 0.1~2 µm/mL의 농도범위에서 R<sup>2</sup>=0.999 이상의 우수한 직선성을 확인할 수 있었다. 회수율을 검토한 결과, 비타민 B<sub>1</sub> 100~103%, 비타민 B<sub>2</sub> 104~112%, nicotinic acid 82~85%, nicotinamide 121~124%, 비타민 B<sub>6</sub> 95~104%의 양호한 회수율을 확인할 수 있었다. LOQ는 비타민 B<sub>1</sub> 0.04 µm/mL, 비타민 B<sub>2</sub> 0.05 µm/mL, nicotinic acid 0.15 µm/mL, nicotinamide 0.08 µm/mL, 비타민 B<sub>6</sub> 0.63 µm/mL 이었다. 정밀성을 검토한 결과, B<sub>1</sub> 0.4%, 비타민 B<sub>2</sub> 0.4%, nicotinic acid 0.5%, nicotinamide 0.7%, 비타민 B<sub>6</sub> 0.4% 로 1% 이내로 양호한 재현성을 확인할 수 있었다. 또한 동시분석법의 정확성을 검증하기 위하여 어린이 기호식품 및 건강기능식품의 표시함량 모니터링을 수행한 결과, 모두 표시기준에 적합함을 확인할 수 있었다.

### References

1. Dae Kyung Kim, Jung Ah Shin, Ki Teak Lee : Monitoring of compositions of gamma-linolenic and omega-3 fatty acids in some functional foods consumed in market, *CNU J. Agricultura sci*, **38**(2), 277-284 (2011).
2. Hwa Mi Lee, Ji Eun Shin, Young Mi Jang, Hee Yun Kim, Mee hye Kim : Analytical Method Development and Monitoring of Residual Solvents in Dietary Supplements, I. *Food Sci. Technol*, **42**(4), 390-397 (2010).
3. Jae Hwang Lee, Sae con Kim, Dong un Lee, Seok Jun Park, Jin Hee Lee, Kang Pyo Lee, Dong Seob Kin, Sung Won Choi, and Moo Yeol Baik : Effects of Temperature and Relative humidity on Water Soluble Vitamin Contents in Commercial Vitamin Tablet. *J. Food SCI. Technol*, **37**(6), 1028-1034 (2005).
4. Hyung Soo Kim, Duck kyu Jang, Dong Kyun Woo and Kang Lyung Woo : Comparision of Preparation Methods for Water Soluble Vitamin analysis in Foods by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography, *J. Food Sci. Technol*, **34**(2), 141-150 (2002).

5. Korean Foods Industry Association : Food Standards Codex, *Ministry of Food and Drug Safety, Seoul*. 77-114 (2013).
6. Health Functional Food Code : *Ministry of Food and Drug Safety, Seoul*. 67-113 (2013).
7. AOAC: Official methods of analysis of AOAC international. 17eds. *AOAC, Gaithersbrug, MD, USA*. **942.23** (2000).
8. I Ran Yun, You Jeong Choi, Mis Kwon Lee, Byeong Hun Kim : Development of simultaneous determination of vitamin A and E in infant formula by micro-HPLC, *Korean Vet Serv*, **29**(3), 339-346 (2006).
9. Hee Jae Suh and So Hee Kim : Simultaneous Determination of Water-Soluble Vitamins (Vitamin B1, B2, B3, B6 and C) in Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography. *The Korean J. Food & Nutr*: **24**(3), 414-421 (2011).
10. Joon Hyuk Suh, Dong Hyug Yang, Byung Kyu Lee, Han Young Eom, Unyong Kin, Jung hyun Kim, Hye yeon Lee : Sang Beom Han, Simultaneous Determination of B Group Vitamins in Supplemented Food products by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection, *Bull. Korean Chem. Soc*, **32**(8), 2648-2656 (2011).
11. Kang Min Jung, Shin Jung Hye, Sung Nak Ju : Recovery Effect of Garlic Extract and Vitamin B group Enhanced Diet on Swimming Fatigue, *Journal of Life Science*, **21**(6), 875-883 (2011).
12. R. Ekinci, C. Kadakal : Determination of Seven Water-soluble Vitamins in Tarhana, A Traditional Turkish Cereal food, by High-Performance Liquid Chromatography, *ACTA Chromatographica*, **15**, 289-297 (2005).
13. Hye Jin Bea, Mi Ra Jun, Young Gil Kim : Study on the Vitamin Contents of Commercial Powdered Infant Formula, *Journal of Life Science*, **17**(12), 1689-1694 (2007).
14. Hyun Sook Lee, Ji Hye Han, Sun Hyo Kim : A Survey on the Consumption of Vitamin and Mineral Supplements as Health Functional Foods and Related Factors by Korean Adolescents, *Korean J. Food culture*, **28**(4), 415-423 (2013).
15. R. Ekinci and C. Kadakal : Determination of Seven Water-Soluble Vitamins in Tarhana, a Traditional Turkish Cereal Food, by High-Performance Liquid Chromatography. *ACTA Chromatographica*, **15** (2005).
16. Itoshi Okamoto, Toshiaki Nakajima, Yuji Ito : simultaneous Determination of Water-Soluble Vitamins in a Vitamin-Enriched Drink by an in-Capillary Enzyme Reaction Method. *Journal of Chromatography A*. **986**, 153-161 (2003).
17. Albala Hurtado, S, Veciana Nogues, MT, Izquiedo pulido, M, Marine Font : A Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr A*, **778**, 247-253 (1997).
18. Pei Chen, Renata Atkinson, Wayne R. Wolf : Single-Laboratory Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic-Diode Array Detector-Fluorescence Detector/Mass Spectrometric Method for Simultaneous Determination of Water-Soluble Vitamins in Multivitamin Dietary Tablets. *AOAC International*, **92**(2), 680-687 (2009).
19. S. Ndaw, M. Bergaentzle, D. Aoude Werner, C. Hasselmann : Extraction Procedures for the Liquid Chromatographic Determination of Thiamin, Riboflavin and Vitamin B6 in Foodstuffs. *Food Chemistry*, **71**, 129-138 (2000).
20. Sung Won Park, Deuk Shin Lee, Seong Wan Son, Jae Hoon Kim, Nam In Jo and Ok Kyung Kim : Simultaneous Determination of Water-Soluble Vitamins in Infant Dried Milk Formulations by High Performance Liquid Chromatography with UV Detector. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth*, **25**(1), 41-47 (2001).
21. R. San Jose Rodriguez, V. Fernandez Ruiz, M. Camara, M.C. Sanchez Mata : Simultaneous determination of Vitamin B1 and B2 in complex cereal foods, by Reverse phase Isocratic HPLC-UV. *Cereal Science*, **55**, 293-299 (2012).
22. Kang Tae Seok : A study of advanced analytical method for nutrients - focused on vitamins, omega-3 fatty acids, CLA and phytosterols, *Ministry of Food and Drug Safety, Seoul*. (2012).