

## 고속액체크로마토그래피를 이용한 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 정량 분석

김기쁨<sup>1</sup> · 황영선<sup>1,2</sup> · 정명근<sup>1</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 생약자원개발학과

<sup>2</sup>텍사스주립대학교 생물학과

### Quantitative Analysis of Vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> Using High Performance Liquid Chromatography

Gi-Ppeum Kim<sup>1</sup>, Young-Sun Hwang<sup>1,2</sup>, and Myoung-Gun Choung<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Texas-Arlington

**ABSTRACT** Recently, many people have demanded reliable nutritional data even for minor-components. On the other hand, an analytical method for the analyses of vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> is lacking. Therefore, this study attempted to validate with accuracy and precision the analysis of vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> using a high-performance liquid chromatography (HPLC) method. The vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> contents were analyzed using an Agilent 1260 series HPLC system. YMC-Pack ODS-AM (250×4.6 mm I.D.) and YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub> (250×4.6 mm I.D.) columns were used for the analyses of vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub>, respectively. In the case of vitamin B<sub>5</sub>, the flow rate was set to 1.0 mL/min by isocratic elution using the 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution (pH 3.5)/acetonitrile (ACN) (95:5, v/v) with monitoring at 200 nm using HPLC/DAD, whereas the flow rate for vitamin B<sub>6</sub> was set to 1.0 mL/min of flow rate by isocratic elution using a 20 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na solution (pH 3.6)/ACN (97:3, v/v) with monitoring by excitation at 290 nm and emission at 396 nm using HPLC/FLD. The column temperature was set to 30°C. The injection volume was 20 µL for each experiment. The specificity of the accuracy and precision for vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> were also validated by HPLC. The results showed high linearity in the calibration curve for vitamin B<sub>5</sub> ( $R^2=0.9998^{**}$ ), the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.4 mg/L and 1.3 mg/L, respectively, In contrast, for the calibration curve of vitamin B<sub>6</sub>, which showed high linearity ( $R^2=0.9999^{**}$ ), the LOD and LOQ were 0.006 mg/L and 0.02 mg/L, respectively.

**Key words:** vitamin B<sub>5</sub>, vitamin B<sub>6</sub>, HPLC/DAD, HPLC/FLD

## 서 론

비타민은 생체를 구성하는 주요 성분은 아니며, 호르몬(hormone) 및 효소와 같이 생체 내에 미량 존재하면서 중요한 생리적 작용을 조절하는 조절요소이나 호르몬 및 효소와는 달리 생체 내에서 합성되지 않거나 미량 합성되므로 식품을 통해 섭취하지 않으면 생리적 조절기작에 이상이 생겨 결핍증상이 나타난다. 이는 비타민들이 생체 내에서 호르몬과 유사한 기능을 하거나 중요한 대사 효소들의 조효소로 작용하기 때문이며(1), 비타민 B<sub>5</sub>가 결핍되었을 때 부신피질호르몬 기능 저하, 빈혈, 저혈당, 빈 호흡과 빈맥, 경련 및 피부 증상 등 다양한 증상이 나타나고, 비타민 B<sub>6</sub>가 결핍되었을 때에는 피부염, 구순증, 구내염, 말초신경염, 소구성

저색소성빈혈이 생기게 되며 우울감 및 혼란 등이 생길 수 있다(2).

식품 중 비타민 B<sub>5</sub>의 정량적 분석은 미생물법(3), 방사면역측정법(4,5), 방사미생물측정법(6), 효소면역측정법(7-9) 및 기체크로마토그래피법(10-12) 등이 사용된 바 있으나 분석법마다 방사선동위원소를 사용하거나 전처리가 매우 복잡한 단점이 있어 널리 이용되지는 못하고 있다(13).

한편 비타민 B<sub>6</sub>의 분석은 효소에 의한 방법(14) 혹은 high performance liquid chromatography(HPLC)를 이용한 분석법이 이용되고 있는데(15), HPLC 분석법에서는 역상칼럼을 사용하거나 이온교환 분리를 거쳐 형광검출법에 의해 정량하는 방법이 사용되고 있으며, 효소 정량법의 경우 먼저 산 가수분해하여 비타민 B<sub>6</sub>를 추출한 후 인산 에스터와 β-글루코사이드(β-glucoside)를 추가로 가수분해할 필요가 있어 과정이 복잡한 단점이 있다(14).

현재까지 전 세계적으로 다양한 종류의 비타민에 대한 분석 연구가 수행된 바 있으며, 그 대표적인 사례를 살펴보면 지용성 비타민 함량 분석의 경우 조제분유 중 비타민 A 함량

Received 24 July 2017; Accepted 1 September 2017

Corresponding author: Myoung-Gun Choung, Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok, Gangwon 25949, Korea  
E-mail: cmg7004@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-540-3321

분석(16), 우유(17) 및 오렌지 주스(18)에 함유된 비타민 D 함량 분석, 식품 중 비타민 E 함량 분석(19) 등이 있고, 수용성 비타민 함량 분석에는 모유에 함유된 비타민 B<sub>12</sub>(20), 시리얼(21) 및 버섯(22)에 함유된 비타민 B<sub>1</sub> 및 B<sub>2</sub>의 함량 분석 연구 등이 있다. 식품 중 HPLC/DAD를 이용한 비타민 B<sub>5</sub>(판토텐산) 및 비타민 B<sub>6</sub>(피리독신)의 함량 분석은 꿀(23)이나 로얄젤리(24)에 대한 분석 결과가 보고된 바 있으며, Corona-Charged Aerosol Detector(CAD)를 이용한 분유 및 건강기능식품 함유 수용성 비타민 분석법도 보고된 바 있다(25). 상기의 분석연구 외에 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>에 대한 분석 자료는 극히 제한적이며, 국내 식품에 대한 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>에 대한 분석 결과 및 객관적 분석법의 검증은 부족한 상태이다.

한편 2009년부터 국내 식품의약품안전처에서는 한국형 식품영양성분 국가 실험실 관리망(National Lab System, NLS)을 구축하고 국내 유통 가공식품 및 외식 전반에 대하여 실제 분석을 통한 영양성분 함량 자료를 구축해오고 있으나, 수용성 비타민 중 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 성분은 포함되어 있지 않다(26).

따라서 본 연구는 국민 건강 증진을 위한 식품성분표 활용도 향상 및 신뢰도 제고를 위해 한국형 식품 매트릭스에 적용 가능한 수용성 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 HPLC 분석법을 확립하고, 이를 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에 사용된 분석시약 중 HPLC용 초순수 및 아세트나이트릴은 J.T. Baker Co.(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입하였고, 비타민 B<sub>5</sub>(D-pantothenic acid hemicalcium salt, purity 99%) 및 B<sub>6</sub>(pyridoxine hydrochloride, purity 98%) 표준품, potassium phosphate monobasic 및 sodium acetate는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 기타 시약은 특급을 사용하였다. 분석법 검증에 사용된 표준참고물질(SRM, Standard Reference Material)인 NIST 3233(fortified breakfast cereal) 및 3234(soy flour)는 미국 NIST(National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였고, 국제 비교속련도 평가프로그램인 FAPAS(Food Analysis Performance Assessment Scheme)에 사용된 시료는 영국 환경식품농림부에서 발송한 FAPAS proficiency test 2181(breakfast cereal) 및 2183(liquid vitamin supplement)을 사용하였다.

### 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 추출 및 전처리

식품 및 분석시료에 함유된 비타민 B<sub>5</sub>의 추출방법은 Woollard 등(27)의 방법을 이용하였다. 즉 균질화된 검체 약 1~10 g을 50 mL cap test tube에 넣고 초순수 20 mL를 가하여 충분히 흔든 후, 40°C 조건의 초음파추출기(JAC

4020, Kodogyeyon, Hwaseong, Korea)에서 10분간 추출하였다. 추출용액에 3% 초산 수용액 2 mL를 첨가하여 다시 충분히 흔들어준 후 재차 40°C 조건의 초음파추출기로 10분간 추출하였다. 이후 추출액에 초순수를 첨가하여 40 mL로 정용한 후 이 추출액을 10분간 원심분리(15,000 rpm, 1730MR, Gyrozen, Daejeon, Korea) 하고, 상징액 2 mL를 덜어내어 0.45 µm 수용매용 syringe filter(Whatman Inc., Maidstone, UK)로 여과한 후 HPLC 분석의 시험 용액으로 사용하였다.

비타민 B<sub>6</sub>의 경우 Kim 등(28)의 추출방법을 이용하였다. 즉 균질화된 검체 약 1~10 g을 50 mL cap test tube에 넣고, 50 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na(pH 4.5) 25 mL 첨가 후 40°C 조건의 초음파추출기로 30분간 추출하였다. 추출용액에 초순수를 첨가하여 40 mL로 정용하고, 추출용액을 1차(Whatman No. 1) 및 2차(0.45 µm 수용성 용매용 syringe filter) 여과 후 HPLC 분석의 시험용액으로 사용하였다.

### 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 HPLC 분석조건 확립

비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 분석조건의 최적화를 위해 사용한 분석기기는 Agilent 1260 Infinity HPLC(Agilent, Wilmington, DE, USA)를 사용하였고, 검출기는 비타민 B<sub>5</sub>의 경우 자외부흡광검출기(DAD, diode array detector)를 사용하였다. 형광검출기(FLD, fluorometric detector)는 대부분 화합물들은 발광하지 않지만 형광성 분자단을 결합시키면 감도가 높은 분석이 가능한 특성이 있으므로(29), 분자의 구조적 특성으로 형광을 띠는 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 형광검출기를 적용하였다. 따라서 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 분석조건의 최적화를 위해 비타민 B<sub>5</sub>의 경우 HPLC/DAD법을, 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 HPLC/FLD 방법을 적용하여 분석법의 최적화를 검토하였다.

일반적으로 HPLC 분석 시 분석능의 평가를 위한 매개변수에는 분리용 칼럼, 분석과장, 이동상의 조성, 비율 및 유속 등이 고려되고 있다. 본 연구에서는 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 분석조건의 최적화를 위해 각 분석 매개변수별로 우수한 분리능 및 감도, 머무름 시간을 고려하면서도 간섭물질의 영향을 받지 않는 분석 조건을 검토하였다.

최적 HPLC 분석 조건의 확립을 위해 사용된 분석용 칼럼은 YMC(Kyoto, Japan)의 역상 C<sub>18</sub> 혹은 C<sub>30</sub> 계열의 칼럼인 YMC Pack ODS-AM(250 mm×4.6 mm, 5 µm, YMC), YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 µm, YMC) 및 YMC-Carotenoid(250 mm×4.6 mm, 5 µm, YMC)를 사용하여 각 이동상의 용매조건별 등용매용리 조건(isocratic elution)과 농도구배 조건(gradient elution)에서 검출피크의 양상을 검토하였다. 한편 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 검출기별로 동일 기종인 서로 다른 2대의 Agilent 1260 HPLC(Agilent)에 각각 다른 검출기를 연결하여 사용하였으며, 검출기별로 가장 높은 감도를 나타내는 칼럼을 사용하여 조건을 검토하였다. 즉 HPLC/DAD 조건 검토 시에는 YMC-Pack ODS-AM(250×4.6 mm I.D.) 칼럼을 사용하였고, HPLC/FLD의

조건 검토 시에는 YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub>(250×4.6 mm I.D.) 칼럼을 사용하였다. 아울러 HPLC/DAD 데이터의 경우에는 농도구배 조건(0 min: 100% A, 5 min: 100% A, 30 min: 50% A, 31 min: 100% A, 38 min: 100% A)으로 분석하였고, HPLC/FLD 데이터의 경우 등용매용리 조건(97% A : 3% B)으로 파장별 데이터를 검토하였다. 이동상에 첨가하여 분석대상 성분의 머무름 향상을 유도하기 위해 사용된 buffer는 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 분석조건인 HPLC/DAD에서는 potassium phosphate monobasic(50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3.5)을, 비타민 B<sub>6</sub>의 분석조건인 HPLC/FLD에서는 sodium acetate(20 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na, pH 3.6)를 사용하였으며, 두 분석법 모두 이동상의 A용매로는 buffer를 용해한 초순수를, B용매는 아세트니트릴을 사용하였고, 유속 1 mL/min, 칼럼 온도 30°C, 시료 주입량 20 µL, 주입 농도는 10 mg/L로 동일하게 적용하여 분석조건을 검토하였다.

### 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 분석법의 검증

확립된 HPLC 분석법의 직선성(linearity) 검증을 위해 각 성분의 희석된 표준용액을 농도별로 일정량 취하여 HPLC에 각각 주입하고 얻어진 크로마토그램상의 피크 면적을 구하여 검량선을 작성하였으며, 시료 주입 농도(X축)와 피크 면적(Y축)을 회귀방정식에 적용하여 직선성을 확인하였다.

HPLC 분석 시 검출한계(LOD, limit of detection)와 정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 signal 대비 noise 비율(S/N ratio)이 각각 3 및 10이 되는 피크의 농도를 LOD 및 LOQ로 각각 설정하였으며, 표준참고물질(SRM, Standard Reference Material)을 사용하여 분석법의 정확성(accuracy)을 확인하였다.

또한, 분석법의 정밀도(precision)를 확인하기 위해 1일

내 10반복 분석한 반복성(intra-day) 및 5일 동안 연속하여 하루 3반복씩 분석한 재현성(inter-day) 검증을 실시하였으며, 각 변수는 평균, 표준편차 및 변이계수에 의해 평가하였다.

한편 분석 결과의 대외적 신뢰성을 확보하기 위해 영국 환경식품농림부에서 주관하는 국제 비교속련도 평가프로그램인 FAPAS(Food Analysis Performance Assessment Scheme)에 참여하였으나 비타민 B<sub>5</sub>의 경우 평가 프로그램이 존재하지 않아 참여하지 못하였고, 반면 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 FAPAS Proficiency Test 2181(breakfast cereal, 고체) 및 Test 2183(liquid vitamin supplement, 액체) 두 가지 matrix 모두에서 분석방법의 국제적 신뢰성을 평가받았다.

## 결과 및 고찰

### 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 분석을 위한 최적 HPLC 검출파장의 선정

식품 함유 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 최적 HPLC 분석파장을 검토하기 위하여 성분별 흡수 분광특성을 검토하였다. 비타민 B<sub>5</sub>는 특이적 발색단이 없기 때문에 200 nm 정도의 낮은 파장에서 분석하는 것이 바람직하다고 보고된 바 있다(30, 31). 실제 비타민 B<sub>5</sub> 표준품의 자외선 흡광 스펙트럼을 확인한 결과 최대 흡수파장이 200 nm 부근인 것으로 확인되었다(Fig. 1). 고감도 분석법의 확립을 위해 200 nm 부근인 205, 210, 220 nm에서 파장별 검출감도 및 분리능을 비교해 본 결과(Table 1), 200 nm에서 가장 우수한 감도 및 분리능을 나타내어 비타민 B<sub>5</sub>의 분석파장은 200 nm로 선정하였다.

한편 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 검출기로 DAD 및 FLD를 모두 검토하였으며, 자외선 흡광 스펙트럼에서는 200 nm 및 290 nm 부근에서 최대 흡광특성을 나타내었다(Fig. 1). 일반적

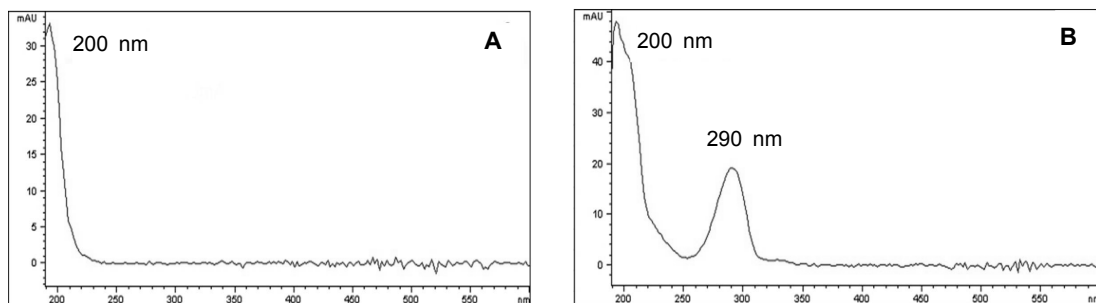


Fig. 1. UV spectra of vitamin B<sub>5</sub> (A) and B<sub>6</sub> (B).

Table 1. Comparison on separation and detection efficiency of vitamin B<sub>5</sub> using HPLC/DAD method with different wavelengths

Wavelength (nm)	Peak Rt. (min)	Peak width	N <sup>1)</sup>	HEPT <sup>2)</sup>	As <sup>3)</sup>
200	11.069	0.1969	50564	0.0049	1.042
205	11.069	0.2024	47854	0.0052	1.035
210	11.069	0.2024	47854	0.0052	1.014
220	11.069	0.2025	47806	0.0052	0.963

<sup>1)</sup>N: No. of theoretical plate. <sup>2)</sup>HEPT: height equivalent to a theoretical plate. <sup>3)</sup>As: peak asymmetric.

으로 UV의 파장영역 중 200 nm 부근은 역상 칼럼에 흔히 사용되는 유기용매들이 흡광력을 일으키는 UV cut-off를 유발할 수 있고, 용매 및 시료의 간섭물질에 의한 분리 간섭이 빈번하게 발생하는 영역이므로 분석 감도면에서 무리가 없다면 검출파장을 장파장 영역으로 이동하는 것이 일반적 양상이므로 200 nm에 비하여 상대적으로 흡광력은 다소 낮으나 분석에 충분한 감도를 나타내는 290 nm를 검출파장으로 선정하였으며, 290 nm 부근의 파장인 270, 280 nm에서도 파장별 검출감도 및 분리능을 상호 비교 평가하였다 (Table 2). 그 결과 290 nm의 파장이 검출감도 및 분리능 면에서 가장 우수함을 확인할 수 있었다. Kim 등(32) 및 Suh와 Kim(33)이 연구한 수용성 비타민 B군의 동시분석법 개발 연구 결과에서는 비타민 B<sub>6</sub>를 HPLC/DAD로 분석 시 본 연구와 달리 270 nm, 254 nm에서 분석하였는데 이는 비타민 B<sub>6</sub>만 단일로 분석하는 것이 아니라 수용성 비타민 B군의 동시분석을 위한 파장 설정으로 본 연구와 상이한 것을 확인할 수 있었다. 한편 형광스펙트럼에서는 여기파장(excitation) 290 nm와 방출파장(emission) 396 nm에서 최대 검출 특성을 나타내었고(Fig. 2), 기타 여기파장 및 방출파장을 변경하여 비교 분석한 결과에서도 여기파장 290 nm, 방출파장 396 nm가 가장 높은 흡광 특성을 나타내었다(Table 2).

**최적 HPLC 이동상 용매비율의 선정**

최적으로 선정된 각 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 분석과장을 적용하고, 등용매용리 조건과 농도구배 조건 모두를 적용하여 식품분석에 적합한 최적의 이동상 용매조건을 검토하였다.

비타민 B<sub>5</sub>는 농도구배 조건에서 sensitivity가 가장 높았으나, 용매 조성이 변경되면서 base line이 심각하게 낮아지는 현상(gradual drop)을 나타내었다. 이 현상은 농도구배 조건으로의 분석 시 이동상 용매로 사용되는 A 및 B 용매에 동일한 농도의 염류가 함유된 버퍼를 사용하면 발생하지 않는 현상일 것이며, 본 연구에서 극성조절을 위해 사용된 B용매인 아세토니트릴은 유기용매로서 버퍼로 사용되는 염류의 용해도가 낮을 가능성을 우려하여 A 용매인 초순수에만 염류를 용해하여 분석을 실시함에 따른 결과로 판단된다 (Fig. 3). 따라서 등용매용리 조건 중 sensitivity 및 피크의 좌우대칭도가 가장 우수한 95% A의 용매비율로 이동상 용매 조건을 최종 선정하였다(Table 3). Choi 등(13)이 보고한 HPLC를 이용한 비타민 B<sub>5</sub> 분석방법의 경우 비타민 B<sub>5</sub>가 약 30분대의 머무름 시간을 갖는 반면, 본 실험에서 선정된 95% A의 등용매용리 조건으로 분석 시에는 약 11분대의 머무름 시간을 나타내므로 분석시간을 단축할 수 있는 장점이 있다.

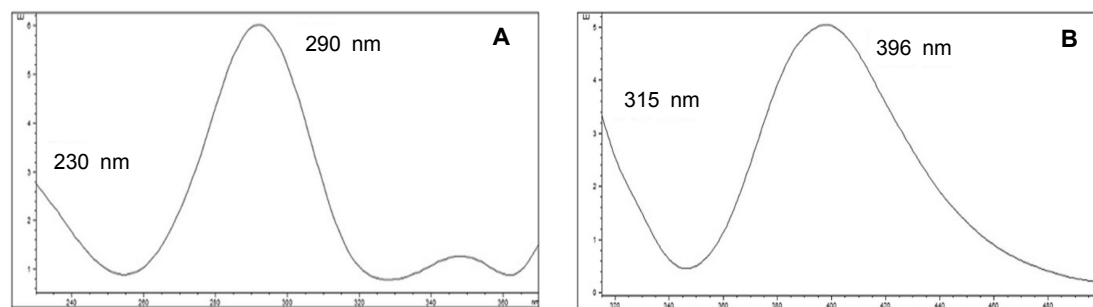
한편 비타민 B<sub>6</sub>의 경우도 마찬가지로 HPLC/DAD 농도구배 조건으로 분석하였을 때 상대적으로 양호하나 비타민 B<sub>5</sub>와 유사하게 base line이 하강하는 현상을 나타내었다(Fig. 4). 따라서 base line의 평형성과 이동상 용매 조제의 편의성, 머무름시간 및 분석의 재현성, 분석시간의 절감 등을 고려하여 농도구배법 대비 효율적인 등용매용리 조건을 채택하고자 하였다. 등용매용리 조건 중 검출감도면에서는 95% A 용매비율이 가장 우수한 양상을 나타내었으나, 머무름시간이 4.3분대로 식품분석 시 극성 matrix의 간섭을 받을 가

**Table 2.** Comparison on separation and detection efficiency of vitamin B<sub>6</sub> using HPLC/DAD and HPLC/FLD method with different wavelengths

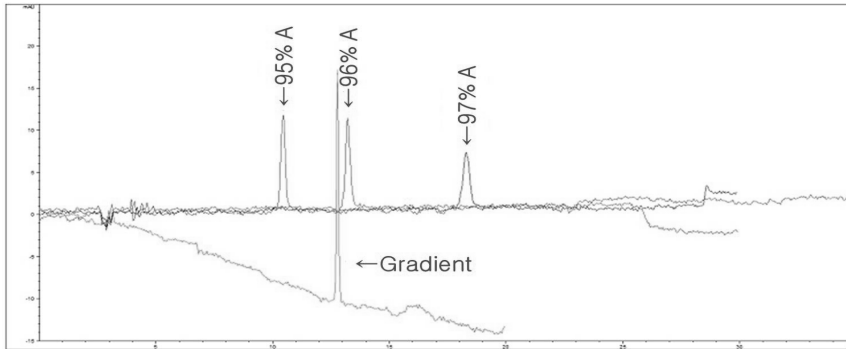
Detector	Wavelength (nm)		Peak Rt. (min)	Peak width	N <sup>1)</sup>	HEPT <sup>2)</sup>	As <sup>3)</sup>
DAD	270		12.750	0.1025	247567	0.0010	0.935
	280		12.752	0.1021	249589	0.0010	0.936
	290		12.753	0.1016	252091	0.0010	0.948
FLD	Ex <sup>4)</sup>	Em <sup>5)</sup>					
	290	396	4.955	0.1569	15957	0.0157	0.857
	290	385	4.986	0.2393	6946	0.0360	0.466
	270	369	4.991	0.2430	6750	0.0370	0.506

<sup>1)</sup>N: No. of theoretical plate. <sup>2)</sup>HEPT: height equivalent to a theoretical plate.

<sup>3)</sup>As: peak asymmetric. <sup>4)</sup>Ex: excitation. <sup>5)</sup>Em: emission.



**Fig. 2.** FL spectra of vitamin B<sub>6</sub> of excitation spectrum (A) and emission spectrum (B).



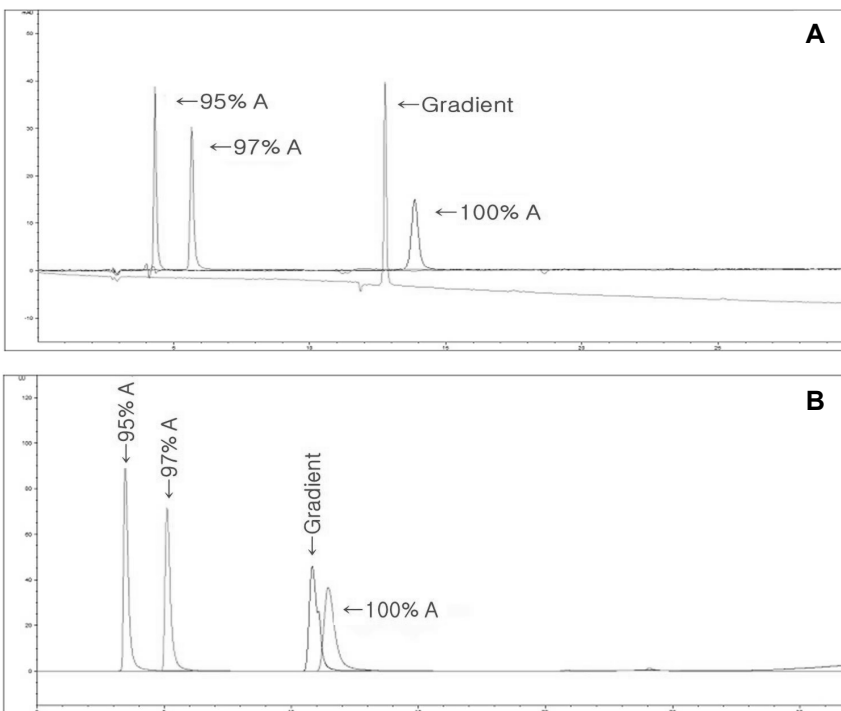
**Fig. 3.** Comparison on HPLC/DAD chromatograms with different mobile phase of vitamin B<sub>5</sub>.

**Table 3.** Comparison on mobile phase ratio for high-efficiency chromatographic separation of vitamin B<sub>5</sub> using HPLC/DAD

Solvent ratio (% A)	Peak Rt.	Peak width	N <sup>1)</sup>	HEPT <sup>2)</sup>	As <sup>3)</sup>
95% Isocratic	11.069	0.1969	50564	0.0049	1.042
96% Isocratic	13.202	0.2369	49690	0.0050	0.865
97% Isocratic	18.279	0.3547	42492	0.0059	0.965
Gradient <sup>4)</sup>	12.771	0.1029	246456	0.0010	1.058

<sup>1)</sup>N: No. of theoretical plate. <sup>2)</sup>HEPT: height equivalent to a theoretical plate.

<sup>3)</sup>As: peak asymmetric. <sup>4)</sup>0 min: 100% A, 20 min: 80% A, 25 min: 65% A, 26~32 min: 100%.



**Fig. 4.** Comparison on HPLC/DAD (A) and HPLC/FLD (B) chromatograms with different mobile phase of vitamin B<sub>6</sub>.

능성이 매우 높다고 판단되어 상대적으로 검출감도는 다소 낮으나 머무름시간이 지연되어 5.7분대에 검출되는 97% A의 용매비율을 이동상 용매 조건을 최종 선정하였다(Table 4).

또한, HPLC/FLD 조건으로 비타민 B<sub>6</sub>를 분석한 결과 HPLC/DAD와는 달리 농도구배 분석 시 base line의 하강 현상은 나타나지 않았으나 상대적으로 검출감도가 낮고 peak의 갈라짐(peak split)이 포착되었다(Fig. 4). 따라서

HPLC/FLD 조건 역시 HPLC/DAD와 마찬가지로 97% A 등 용매용리 조건이 가장 적합한 것으로 조사되었다(Table 4).

**최적 HPLC column의 선정**

비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 분석에 가장 적합한 최적 HPLC column을 선정하기 위하여 극성 및 충전제의 한계 pH가 서로 다른 column 3종을 공시하고 비교 평가하였다. 비타민 B<sub>5</sub>는 3종의 칼럼 중 YMC-Pack ODS-AM(250×4.6 mm I.D.) 칼럼

**Table 4.** Comparison on mobile phase ratio for high-efficiency chromatographic separation of vitamin B<sub>6</sub> using HPLC/DAD and HPLC/FLD

Detector	Solvent ratio (% A)	Peak Rt.	Peak width	N <sup>1)</sup>	HEPT <sup>2)</sup>	As <sup>3)</sup>
DAD	95% Isocratic	4.300	0.1090	24900	0.0100	0.726
	97% Isocratic	5.651	0.1476	23453	0.0107	0.740
	100% Isocratic	13.842	0.2973	34684	0.0072	0.880
	Gradient <sup>4)</sup>	12.752	0.1029	245723	0.0010	0.935
FLD	95% Isocratic	3.461	0.1739	6338	0.0394	0.722
	97% Isocratic	5.106	0.1737	13825	0.0181	0.834
	100% Isocratic	11.447	0.4589	9956	0.0251	0.623
	Gradient <sup>4)</sup>	10.816	0.3989	11763	0.0213	0.507

<sup>1)</sup>N: No. of theoretical plate. <sup>2)</sup>HEPT: height equivalent to a theoretical plate.

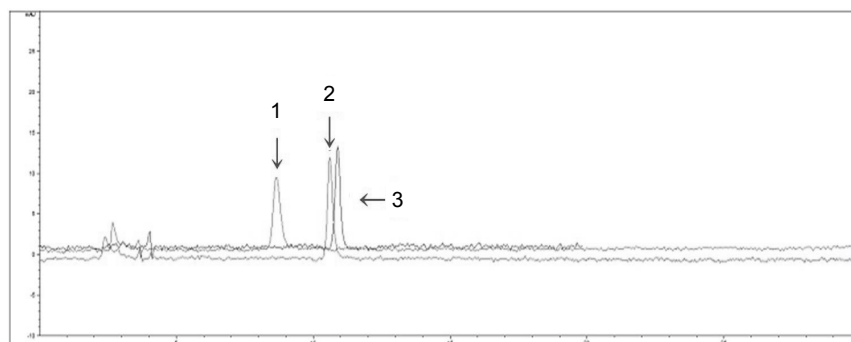
<sup>3)</sup>As: peak asymmetric. <sup>4)</sup>0~5 min: 100% A, 30 min: 75% A, 31~38: 100% A.

**Table 5.** Comparison on separation efficiency of vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> with different 3 kinds of columns using HPLC/DAD method

Component	Column <sup>1)</sup>	Peak Rt.	Peak width	N <sup>2)</sup>	HEPT <sup>3)</sup>	As <sup>4)</sup>
Vitamin B <sub>5</sub>	AM	10.883	0.2242	37700	0.0066	0.946
	RS	10.597	0.2216	36589	0.0068	0.759
	C30	8.647	0.2815	15097	0.0166	0.758
Vitamin B <sub>6</sub>	AM	5.651	0.1483	23232	0.0108	0.736
	RS	5.421	0.1418	23384	0.0107	0.694
	C30	12.919	0.2530	41719	0.0060	0.489

<sup>1)</sup>AM: YMC-Pack ODS-AM (250×4.6 mm I.D.), RS: YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub> (250×4.6 mm I.D.), C30: YMC-Carotenoid (250×4.6 mm I.D.).

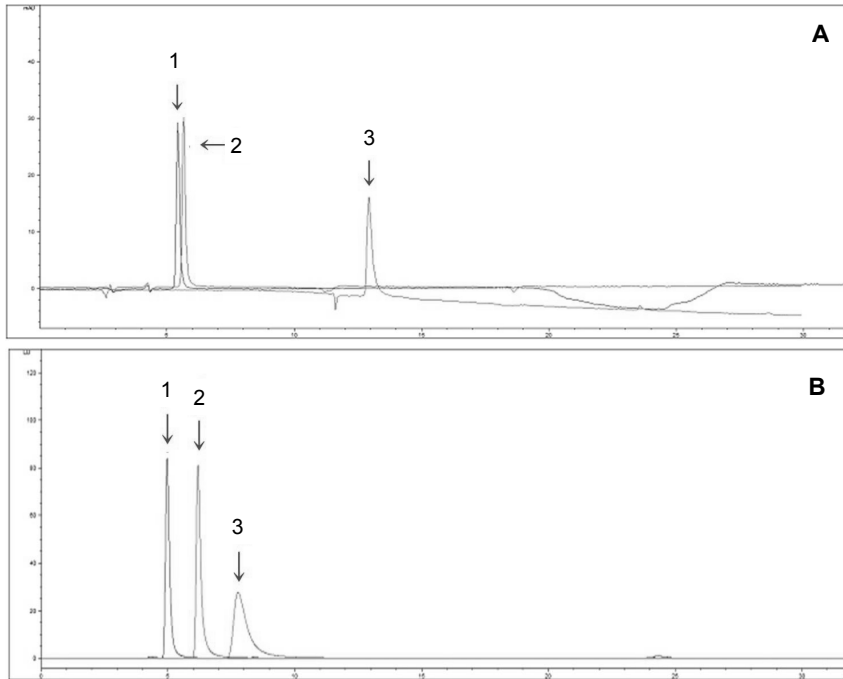
<sup>2)</sup>N: No. of theoretical plate. <sup>3)</sup>HEPT: height equivalent to a theoretical plate. <sup>4)</sup>As: peak asymmetric.

**Fig. 5.** Comparison on HPLC/DAD chromatograms of vitamin B<sub>5</sub> with different 3 kinds of HPLC columns. 1, YMC-Carotenoid (250×4.6 mm I.D.); 2, YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub> (250×4.6 mm I.D.); 3, YMC-Pack ODS-AM (250×4.6 mm I.D.).

으로 분석하였을 때 검출감도, 이론단수(No. of theoretical plate) 및 피크의 좌우대칭도(peak symmetry)가 가장 우수하였다(Table 5 및 Fig. 5). 비타민 B<sub>6</sub>는 HPLC/DAD를 이용하여 3종의 칼럼 중 분리효율에 영향을 미치는 요인들을 상호비교 검토한 결과(Table 5 및 Fig. 6), YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub>(250×4.6 mm I.D.) 및 YMC-Pack ODS-AM(250×4.6 mm I.D.) 두 칼럼이 가장 우수한 것으로 확인되었다. 두 칼럼 간의 감도는 큰 차이가 없었으나 좌우대칭도면에서 YMC-Pack ODS-AM(250×4.6 mm I.D.) 칼럼이 상대적으로 우수한 양상을 보였다. 한편 비타민 B<sub>6</sub> 분석에 HPLC/FLD를 이용하고 3종의 칼럼을 상호 비교하였을 때 HPLC/DAD와 달리 YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub>(250×4.6 mm I.D.) 칼럼이 분석에 가장 적합한 칼럼으로 확인되었다(Table 6 및 Fig. 6).

#### 확립된 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 분석법의 검증

확립된 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 HPLC 분석법(Table 7) 검증을 위하여 외부 표준 검량선의 직선성을 확인한 결과 비타민 B<sub>5</sub>의 경우  $R^2=0.999^{**}$  이상으로 나타났으며, 비타민 B<sub>6</sub> 또한 HPLC/DAD 및 FLD법 모두  $R^2=0.999^{**}$  이상으로 고도의 직선성을 나타내었다(Table 8). 각 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 HPLC 분석 시 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 비타민 B<sub>5</sub>의 경우 0.4 및 1.3 mg/L로 산출되었으며, 비타민 B<sub>6</sub>는 HPLC/DAD 방법의 경우 0.1 및 0.4 mg/L, HPLC/FLD 방법에서는 0.006 및 0.02 mg/L로 산출되어 HPLC/FLD 방법이 HPLC/DAD 대비 최소 15배 이상의 고감도 검출이 가능하여 미량 함유된 시료들에서도 효율적 분석이 가능할 것으로 판단되었다(Table 8). Kim 등(32) 및 Suh 등(33)이 수용성 비타민 B군 중 비타민 B<sub>6</sub>를 HPLC/DAD를 이용하여 분석한 결과 검출한계가 각각 0.19 mg/L 및 0.2 mg/L로 보고된 바 있으



**Fig. 6.** Comparison on HPLC/DAD (A) and HPLC/FLD (B) chromatograms of vitamin B<sub>6</sub> with different 3 kinds of HPLC columns. 1, YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm I.D.); 2, YMC-Pack ODS-AM (250 × 4.6 mm I.D.); 3, YMC-Carotenoid (250 × 4.6 mm I.D.).

**Table 6.** Comparison on separation efficiency of vitamin B<sub>6</sub> with different 3 kinds of columns using HPLC/FLD method

Component	Column	Peak Rt.	Peak width	N <sup>1)</sup>	HEPT <sup>2)</sup>	As <sup>3)</sup>
Vitamin B <sub>6</sub>	AM	6.177	0.2064	14330	0.0174	0.725
	RS	4.955	0.1569	15957	0.0157	0.857
	C30	7.761	0.5869	2798	0.0894	0.514

<sup>1)</sup>N: No. of theoretical plate. <sup>2)</sup>HEPT: height equivalent to a theoretical plate. <sup>3)</sup>As: peak asymmetric.

나, 본 연구에서는 HPLC/DAD 및 FLD 방법 모두 기준에 보고된 분석방법보다 고감도 분석이 가능한 것으로 평가되며, 특히 HPLC/FLD 방법의 경우 기준 보고된 분석방법 대비 약 30배 이상 고감도 검출이 가능한 것을 확인하였다.

따라서 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 분석기관 내 HPLC/FLD 검출기의 부재로 인해 어쩔 수 없이 HPLC/DAD를 선택하여야 하는 경우가 아니라면 선택성 및 감도가 우수한 HPLC/FLD법을 채택하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

**Table 7.** HPLC operating conditions for vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> analysis

Vitamin B <sub>5</sub>	Column	YMC-Pack ODS AM (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)
	Detector	UV detector (200 nm)
	Mobile phase	A: 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3.5), B: acetonitrile 95% A : 5% B (v/v), isocratic elution
	Flow rate	1 mL/min
	Injection volume	20 μL
	Column temperature	30°C
Vitamin B <sub>6</sub>	Column	YMC-Pack Pro RS C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)
	Detector	FL detector (Ex λ=290 nm, Ex λ=396 nm)
	Mobile phase	A: 20 mM CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> Na (pH 3.6), B: acetonitrile 97% A : 3% B (v/v), isocratic elution
	Flow rate	1 mL/min
	Injection volume	20 μL
	Column temperature	30°C

**Table 8.** Comparison on the LOD, LOQ, and calibration curves of vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> with 2 kinds of detectors

Component	Detector	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Calibration curves	R <sup>2</sup>
Vitamin B <sub>5</sub>	DAD	0.4	1.3	y=14.6238x+0.597	0.9998
Vitamin B <sub>6</sub>	DAD	0.1	0.4	y=27.9938x - 1.5075	0.9998
Vitamin B <sub>6</sub>	FLD	0.006	0.02	y=107.5358x+0.4312	0.9999

**Table 9.** Reproduction test with retention time and peak area using HPLC

Parameter		Vitamin B <sub>5</sub> (DAD)	Vitamin B <sub>6</sub> (FLD)
Retention time (Rt.)	Intra-day ( <i>n</i> =10)	Mean	10.639
		SD	0.023
		CV (%)	0.217
	Inter-day ( <i>n</i> =5)	Mean	10.682
		SD	0.149
		CV (%)	1.398
Peak area (mAu)	Intra-day ( <i>n</i> =10)	Mean	177.1
		SD	1.997
		CV (%)	1.128
	Inter-day ( <i>n</i> =5)	Mean	174.1
		SD	1.834
		CV (%)	1.054

**Table 10.** Accuracy of vitamin B<sub>5</sub> and B<sub>6</sub> contents for SRM

Component	SRM	Recovery (%)	Analysis value (mg/100 g)	Reference value (mg/100 g)
Vitamin B <sub>5</sub>	NIST 3234	100.3±0.9 <sup>1)</sup>	1.148±0.010	1.145±0.012
Vitamin B <sub>6</sub>	NIST 3233	99.5±1.1	7.759±0.089	7.80±0.470

<sup>1)</sup>Mean±SD (*n*=3).**Table 11.** Results of FAPAS proficiency test for vitamin B<sub>6</sub> (as pyridoxine)

Component	Material base	Analysis value (mg/100 g)	Reference value (mg/100 g)	z-score
Breakfast cereal	Solid	0.241	0.278	-1.0
Liquid vitamin supplement	Liquid	16.151	15.200	0.8

한편 일상분석 시의 반복성 및 재현성 등의 정밀도 확인을 위한 1일간 10회(intra-day test) 및 1일 3회씩 5일간 연속 분석(inter-day test)을 통해 머무름시간(Rt.) 및 피크면적의 변이계수(CV)를 산출하였으며, 최대 1.784% 미만으로 반복성 및 재현성 모두 우수한 양상임을 확인할 수 있었다(Table 9). 또한, 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub> 분석법의 정확성 확인을 위해 2종의 표준참고물질(SRM)을 이용하여 분석법의 회수율을 검토한 결과 각각 100.3 및 99.5%의 우수한 회수율을 보여 추가적 회수율 향상을 위한 보조적 방법이 필요하지 않은 것으로 확인되었다(Table 10).

한편 비타민 B<sub>6</sub>의 HPLC/FLD 분석법에 대한 대외적 신뢰도를 확보하기 위해 국제 비교속련도 평가인 FAPAS proficiency test 2181(breakfast cereal, 고체) 및 2183(liquid vitamin supplement, 액체) 프로그램에 참여하였으며, 고체 및 액체의 두 가지 matrix 모두에서 FAPAS 평가의 만족기준( $Z \leq \pm 2$ )을 충족하여 분석시료의 matrix 및 성상에 관계없이 분석 결과의 정밀성 및 정확성이 확보된 분석방법임을 재확인하였다(Table 11).

## 요 약

식품 함유 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 최적 HPLC 분석 조건을 검토한 결과 비타민 B<sub>5</sub>의 경우 YMC-Pack ODS-AM(250×4.6

mm I.D.) 칼럼을 이용하고, A용매로 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 3.5)을, B용매는 아세트니트릴을 이동상 용매로 사용하는 A용매 95% 등용매용리 조건에서 200 nm의 파장으로 분석하는 HPLC/DAD법을 최적조건으로 확립하였다. 한편 비타민 B<sub>6</sub>의 최적분석조건은 여기과장(excitation) 290 nm, 방출과장(emission) 396 nm로 분석하는 HPLC/FLD법으로써, 칼럼은 YMC-Pack Pro RS C<sub>18</sub>(250×4.6 mm I.D.), 이동상 용매는 A용매 20 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na(pH 3.6), B용매 아세트니트릴을 A용매 97% 등용매용리 조건으로 사용하였다. 비타민 B<sub>5</sub> 및 B<sub>6</sub>의 표준검량선은 R<sup>2</sup>값이 각각 0.9998 및 0.9999로 고도의 직선성을 나타내었고, 검출한계 및 정량한계는 비타민 B<sub>5</sub>의 경우 각각 0.4 mg/L 및 1.3 mg/L, 비타민 B<sub>6</sub>의 경우 각각 0.006 mg/L 및 0.02 mg/L로 산출되었다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(PJ01083803)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## REFERENCES

1. Woo SJ. 2002. *Vitamins and environmental factor*. Korea



- University Publisher, Seoul, Korea. p 28-30.
2. Youn HS. 2005. New nutritional concepts of vitamins and minerals. *Korean J Pediatr* 48: 1295-1309.
  3. AOAC International. 1995. *Official methods analysis*. 16th ed. AOAC International, Arlington, VA, USA. Vol 2, p 46.
  4. Walsh JH, Wyse BW, Hansen RG. 1979. A comparison of microbiological and radioimmunoassay methods for the determination of pantothenic acid in foods. *J Food Biochem* 3: 175-180.
  5. Walsh JH, Wyse BW, Hansen RG. 1981. Pantothenic acid content of 75 processed and cooked foods. *J Am Diet Assoc* 78: 140-148.
  6. Guilarte TR. 1989. A radiometric microbiological assay for pantothenic acid in biological fluids. *Anal Biochem* 178: 63-66.
  7. Gonthier A, Fayol Y, Viollet J, Hartmann DJ. 1998. Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method. *Food Chem* 63: 287-294.
  8. Finglas PM, Faulks RM, Morris HC, Scott KJ, Morgan MRA. 1988. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of pantothenic acid and analogues, part II -determination of pantothenic acid in foods. *J Micronutr Anal* 4: 47-59.
  9. Shon DH, Park YS, Bae GW. 2000. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pantothenic acid. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1009-1014.
  10. Davidek J, Velisek J, Cerna J, Davidek T. 1985. Gas chromatographic determination of pantothenic acid in foodstuffs. *J Micronutr Anal* 1: 39-46.
  11. Banno K. 1997. Measurement of pantothenic acid and hopantenic acid by gas chromatography-mass spectroscopy. *Methods Enzymol* 279: 213-219.
  12. Banno K, Matsuoka M, Horimoto S, Kato J. 1990. Simultaneous determination of pantothenic acid and hopantenic acid in biological samples and natural products by gas chromatography-mass fragmentography. *J Chromatogr* 525: 255-264.
  13. Choi YJ, Jang JH, Park HK, Park KS, Koo YE, Hwang IK, Kim DB. 2004. Determination of pantothenic acid in fortified foods by HPLC. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 381-385.
  14. Kall MA. 2003. Determination of total vitamin B<sub>6</sub> in foods by isocratic HPLC: A comparison with microbiological analysis. *Food Chem* 82: 315-327.
  15. Ha JW, Lee SC, Bak HD, Park WP. 2007. *Food chemistry*. Dooyangsa, Seoul, Korea. p 230-234.
  16. Lee HM, Kwak BM, Ahn JH, Jeon TH. 2008. A comparative study on quantifying uncertainty of vitamin A determination in infant formula by HPLC. *Korean J Food Sci Technol* 40: 152-159.
  17. Kasalová E, Aurfartová J, Krčmová LK, Solichová D, Solich P. 2015. Recent trends in the analysis of vitamin D and its metabolites in milk: A review. *Food Chem* 171: 177-190.
  18. Byrdwell WC, Exler J, Gebhardt SE, Harnly JM, Holden JM, Horst RL, Patterson KY, Phillips KM, Wolf WR. 2014. Liquid chromatography with ultraviolet and dual parallel mass spectrometric detection for analysis of vitamin D in retail fortified orange juice. *J Food Compos Anal* 24: 299-306.
  19. Lee SM, Lee HB, Lee J. 2005. Analysis of vitamin E in some commonly consumed foods in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1064-1070.
  20. Hampel D, Shahab-Ferdows S, Domek JM, Siddiqua T, Raqib R, Allen LH. 2014. Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for vitamin B<sub>12</sub> analysis in human milk. *Food Chem* 153: 60-65.
  21. San Jose Rodriguez R, Fernández-Ruiz V, Cámara M, Sanchez-Mata MC. 2012. Simultaneous determination of vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in complex cereal foods, by reverse phase isocratic HPLC-UV. *J Cereal Sci* 55: 293-299.
  22. Furlani RPZ, Godoy HT. 2007. Vitamins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> contents in cultivated mushrooms. *Food Chem* 106: 816-819.
  23. León-Ruiz V, Vera S, González-Porto AV, San Andrés MP. 2013. Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. *Food Anal Methods* 6: 488-496.
  24. Ciulu M, Floris I, Nurchi VM, Panzanelli A, Pilo MI, Spano N, Sanna G. 2013. HPLC determination of pantothenic acid in royal jelly. *Anal Methods* 5: 6682-6685.
  25. Márquez-Sillero I, Cárdenas S, Valcárcel M. 2013. Determination of water-soluble vitamins in infant milk and dietary supplement using a liquid chromatography on-line coupled to a corona-charged aerosol detector. *J Chromatogr A* 1313: 253-258.
  26. Kim SH. 2015. *Nutritive components book*. MFDS, Cheongju, Korea. p 18-173.
  27. Woollard DC, Indyk HE, Christiansen SK. 2000. The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. *Food Chem* 69: 201-208.
  28. Kim GP, Lee J, Ahn KG, Hwang YS, Choi Y, Chun J, Chang WS, Choung MG. 2014. Differential responses of B vitamins in black soybean seeds. *Food Chem* 153: 101-108.
  29. Harris DC. 2011. *Quantitative chemical analysis*. W. H. Freeman and Company, New York, NY, USA. p 461-462.
  30. Woollard DC, Indyk HE, Christiansen SK. 2000. The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. *Food Chem* 69: 201-208.
  31. Hudson TJ, Allen RJ. 1984. Determination of pantothenic acid in multivitamin pharmaceutical preparations by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci* 73: 113-115.
  32. Kim SH, Kim JH, Lee HJ, Oh JM, Lee SH, Bahn KN, Seo IW, Lee YJ, Lee JH, Kang TS. 2015. Simultaneous determination of water soluble vitamin B group in health functional foods etc. by HPLC. *J Fd Hyg Safety* 30: 143-149.
  33. Suh HJ, Kim SH. 2011. Simultaneous determination of water-soluble vitamin (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub> and C) in dietary supplements by high-performance liquid chromatography. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 24: 414-421.