

국가표준식품성분표 개정을 위한 동물성 식품 비타민 B₁₂ 분석 및 검증

정유나¹ · 박수진¹ · 이상훈² · 최용민² · 최갑성¹ · 천지연^{1,*}
¹순천대학교 식품공학과, ²농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 식생활영양과

Analysis and verification of vitamin B₁₂ in animal foods for update of national standard food composition table

Yon Na Jeong¹, Su-Jin Park¹, Sang Hoon Lee², Youngmin Choi², Kap Seong Choi¹, and Jiyeon Chun^{1,*}

¹Department of Food Science and Technology, Suncheon National University

²Food and Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration

Abstract In order to create the national food nutrient database, a total of 41 animal foods (ham, seafood, edible insects and eggs) were analyzed for their vitamin B₁₂ content and the applied immunoaffinity-HPLC was verified. Ham vitamin B₁₂ contents were 0.30-0.65 µg/100 g. Seafood showed relatively high vitamin B₁₂ level, where the values of fermented clam were the highest (26.80 µg/100 g) followed by fermented pollack roe. Vitamin B₁₂ was not detected in silkworm pupae and beetles, while relatively high levels were found in the two-spotted cricket imago (6.70 µg/100 g). Chicken and quail egg yolk had roughly 100- and 30-times higher vitamin B₁₂ levels as compared to their egg white. Vitamin B₁₂ contents in quail and chicken eggs were significantly enhanced by boiling (p<0.05). Results based on accuracy (97-102% recovery) and precision (<5% RSD) indicate that this study provides reliable vitamin B₁₂ information on animal foods consumed in Korea.

Keywords: vitamin B₁₂, national standard food composition table, animal food

서 론

한국인 영양섭취기준 충족을 위해 제시된 1일 식사 메뉴를 살펴보면 우리나라 식단은 쌀을 주식으로 하고 동물성 반찬을 중심으로 국, 김치, 나물 등을 적절하게 구성하여 영양학적으로 균형적인 식사패턴을 갖는 것으로 보고되어 있다(The Korean nutrition Society, 2015). 특히, 우리나라의 다양한 동물성 자원은 밥이나 국과는 별도로 조리되는 중심 메뉴로 제공되거나, 밥과 국에 더하는 일품요리로 만들어져 섭취되고 있으며 이러한 동물성 식품 섭취량은 매년 증가하고 있는 추세이다(Kim과 Park, 2015; Kim 등, 2016). 최근 식품가공 기술의 발달 및 식생활 변화에 의한 가공식품의 소비 증가로 소비자들은 이전과 다른 다양한 식품을 섭취하고 있다(Kim, 2006). 또한, 비만, 당뇨병, 고혈압 등과 같은 성인 만성질환의 발병율이 식습관과 높은 연관성이 있음이 알려지면서 질병 예방을 위한 식단관리에 대한 관심이 점차 증가하고 있다(Lim 등, 2013). 지금까지 우리나라에서 구축해 오고 있는 이러한 다소비 식품들은 주로 탄수화물, 지방, 단백질 등과 같은 다량영양성분 중심으로 지속적으로 업데이트가 이루어져 온 반면, 인체 내 물질대사와 생리작용 조절에 중요한 역할

을 담당하는 비타민이나 무기질 같은 필수 미량영양성분들에 대한 데이터베이스는 매우 부족한 실정이다(Lee 등, 2015; Lee 등 2018).

비타민 B₁₂는 코발라민(cobalamin)이라고 불리는 수용성 비타민으로 코린 고리(corrin ring) 중앙에 코발트(Co)를 함유하고 있으며 오탄당, 인산, 염기로 구성된 뉴클레오타이드(nucleotide)가 붙어있는 화합물의 통칭이다(Herbert, 1988). 비타민 B₁₂는 미생물에 의해 합성되며 먹이사슬을 통해 동물의 근육이나 내장 등에 축적되고 흡수된 후 세포에서 methionine synthase와 L-methylmalonyl-CoA mutase의 조효소로 작용하여 DNA 합성, 메티오닌 합성, succinyl-CoA 합성 등 많은 생체 내 생화학적 반응에 관여한다(Petrus 등, 2009; Watanabe, 2007). 체내 비타민 B₁₂ 결핍 시 거대적아구성 빈혈과 신경계 이상, 위염, 식욕부진 등의 위장의 이상 증세가 나타날 수 있으며, 최근 노화와 관련된 인지기능 저하, 청력저하, 알츠하이머, 우울증 등에도 관련이 있다고 보고되어 있다(Park과 Johnson, 2006; Smith와 Refsum, 2009). 최근, McCarter 등(2020)은 파킨슨병(Parkinson's disease) 진단에서 혈청 비타민 B₁₂의 수준이 높을수록 미래 치매 발병 위험이 낮았다고 보고하였는데 이는 식습관에 의한 체내 비타민 B₁₂ 수준 관리가 치매 예방에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다 하겠다. 한국인의 일반적인 식사는 비타민 B₁₂ 결핍을 유발하기는 어렵지만 비타민 B₁₂는 동물성 식품군에만 존재하는 특성 때문에 동물성 식품의 섭취를 제한하는 채식주의자들에게는 비타민 B₁₂ 결핍증이 쉽게 나타날 수 있다. 또한, 비타민 B₁₂를 식품으로 섭취 시 체내 흡수 과정에서 위산, R-결합단백질, 내적인자(intrinsic factor), 체장액 등의 역할이 필수적이기 때문에 위산분비가 적은 노인이나 위장절

*Corresponding author: Jiyeon Chun, Department of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea
Tel: +82-61-750-3258
E-mail: cjyfall@sunchon.ac.kr
Received April 8, 2020; revised June 1, 2020;
accepted June 15, 2020

제 수술을 한 환자들에게는 비타민 B₁₂ 결핍이 빈번히 발생할 수 있는 것으로 알려져 있다(Andres 등, 2004). 이렇게 비타민 B₁₂와 같은 미량영양성분의 결핍과 건강과의 상관성 규명은 우리 국민의 일상 식사를 통해 섭취되는 필수미량성분 수준에 대한 정보 구축이 국민건강영양정책 수립을 위한 선행 요건이 됨을 알 수 있으나, 비타민 B₁₂의 경우 국민건강영양정책에 활용할 수 있는 데이터베이스는 거의 전무한 실정이다.

비타민 B₁₂ 분석법은 분광광도계 측정법(Karsilayan, 1996), 미생물학적 분석법(Watanabe, 2007), HPLC 분석법(Heudi 등, 2006) 등으로 비타민 B₁₂와 같은 필수미량성분을 선택적으로 검출할 수 있는 다양한 검출방법이 시도되고 있다. 특히 *Lactobacillus leichmannii*를 이용한 미생물학적 분석법이 주로 이용되어 왔으나 특이성이 부족하고 균주의 보존, 배양 시간 등에 따른 시간과 노동력이 소요될 뿐 아니라 분석 속련도가 부족한 경우 재현성이 낮은 단점이 보고되고 있다(Kwak 등, 2012). 따라서 국가영양성분 데이터베이스 구축과 같이 변화되는 국민 식생활을 빠르게 반영할 수 있으면서도 국제적으로 정확하고 재현성 있으며 신뢰도 있는 데이터를 얻기 위해서는 비교적 신속하고 간편하면서도 분석자가 대체되어도 재현성을 얻을 수 있는 HPLC와 같은 기기분석법이 선호되고 있다. 하지만, HPLC 분석 시 UV 검출기를 사용하는 경우 비교적 비타민 B₁₂ 수준이 높은 비타민이나 보조제와 달리 식품 중에는 미량으로 존재하기 때문에 비타민 B₁₂의 검출 감도와 한계가 낮은 경우 이를 정확하게 정량하기 어렵다. 따라서 이를 극복하기 위해 시료가 식품인 경우 solid phase extraction (SPE)이나 immunoaffinity column을 병행하여 정제(clean-up)와 농축의 단계가 동시에 이루어져야만 식품 중 낮은 수준으로 존재하는 비타민 B₁₂ 분석에서 신뢰도를 확보할 수 있다(Hadjmohammad와 Sharifi, 2007; Campos-Gimenez 등, 2012).

따라서 본 연구에서는 우리나라 국민들이 다소비하고 있는 식품류 중 비타민 B₁₂가 주로 함유된 동물성 식품군들을 중심으로 이들의 비타민 B₁₂ 국가데이터베이스 구축하고자 수행되었으며, 국가 데이터로서의 신뢰도 확보를 위해 비타민 B₁₂ 분석법 검증 및 분석품질관리를 수행 평가하고 이를 적용하여 동물성 식품군의 비타민 B₁₂ 함량을 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

비타민 B₁₂ 표준품(cyanocobalamin, purity 96.0-102.0%)과 sodium cyanide는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA), acetic acid와 sodium acetate trihydrate는 Wako사(Osaka, Japan)에서 구매하여 사용하였다. 기타 사용된 시약과 용매는 모두 HPLC급을 사용하였다. 분석법 검증을 위한 표준참고물질(Standard reference Material, SRM) 1549a (whole milk powder)는 NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였으며, BCR (the Community Bureau of Reference) 487 (pig liver)은 EC사(European Commission)의 IRMM (Institute for Reference Materials and Measurement, Geel, Belgium)에서 구입하였다. 내부 분석품질관리를 위해 사용된 품질관리(Quality Control, QC) 시료는 상업용 분유(Imperial dream XO world class 3step, Namyang, Seoul, Korea)를 구매하여 사용하였다.

시료 준비

본 연구에서 사용된 총 41종의 시료 중 식용곤충 4종을 제외

한 나머지 식품은 국가표준식품성분표 제 10개정판 발간을 위해 국민건강영양조사(2013-2015) 결과를 활용하여 품목을 선정하였다. 37종의 식품은 유통형태에 따라 대형마트와 전통시장으로 구분한 후 총화다단추출법을 각각 적용하여 표본 추출하여 구매하였다(Kim 등, 2020). 식용곤충의 경우 시중 구입이 어려워 국립농업과학원에서 제공받아 사용하였다.

모든 시료는 이물 및 비가식부를 제거하고 균질화 중 영양소 손실을 최소화하기 위하여 액체질소로 급속냉동 한 후 균질기(Robot Coupe Blixer, Robot Coupe USA, Jackson, MS, USA)로 마쇄하여 성분분석 전까지 -70°C에서 보관하였다.

비타민 B₁₂ 추출(extraction)

삼각플라스크에 균질화된 시료를 0.5-5.0 g 칭량하여 0.2 M sodium acetate trihydrate buffer (pH 4.0) 49.5 mL과 1% sodium cyanide 0.5 mL을 가한 후 10분간 초음파기(8893-DTH, Cole-Parmer, Chicago, IL, USA)로 처리한 다음, 100°C 항온수조(WB-20M, Jeio Tech Co., Daejeon, Korea)에서 1시간 동안 비타민 B₁₂를 추출하였다. 추출 시료는 실온으로 냉각한 다음 증류수를 가하여 50 mL로 정용한 후 Whatman No. 1 (GE Healthcare, Amersham Place, UK)으로 여과하여 HPLC 시료로 사용하였다.

비타민 B₁₂ 정제(clean-up) 및 농축(concentration)

냉장 보관되어 있는 immunoaffinity column (Easi-Extract Vitamin B₁₂, r-Biopharm, Glasgow, UK)을 30분간 실온에 방치한 후 column 내부의 완충용액을 제거하고 증류수 3 mL로 column을 활성화시켰다. 여과된 시료 추출액 9 mL을 column에 3회 나누어 주입하여 추출액 중의 비타민 B₁₂를 column에 흡착시킨 뒤 증류수 9 mL로 3회 나누어 불순물을 세척하였다. 공기(약 40 mL)를 주입하여 column 내 수분을 제거한 다음 메탄올 3 mL을 주입하여 흡착된 비타민 B₁₂를 용출시켜 시험관에 수집하였다. 메탄올 추출액은 질소농축기(EYELAMG-2200, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 전량 휘발시킨 다음 증류수 0.5 mL을 가하여 재용해시켰다. 재용해된 시험액은 0.45 µm membrane filter (cellulose acetate, Adventec®, DISMIC®-13CP, Osaka, Japan)로 여과 후 갈색 vial에 담은 뒤 HPLC 분석시료로 사용하였다.

HPLC/DAD 분석

비타민 B₁₂ 분석은 HPLC (Agilent, 1260 infinity, Santa Clara, CA, USA) 시스템을 이용하였으며 분석용 컬럼은 C₁₈ ACE 3 AQ (3 mm×150 mm, 3 µm, ACE, Scotland, UK)를 사용하였다. Table 1과 같은 이동상 gradient 조건에서 분석하였으며, diode array detector (DAD, G4212B, Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 361 nm에서 검출하였다. 이때 이동상 flow rate는 0.25 mL/min, column oven 온도는 35°C, 시료 주입량은 100 µL였다.

Table 1. Gradient condition of HPLC mobile phases for vitamin B₁₂ analysis

Time (min)	Water (%)	Acetonitrile (%)
0	100	0
11	85	15
19	75	25
20	90	10
26	100	0
35	100	0

분석법 검증

본 연구에서 비타민 B₁₂ 분석을 위해 적용한 immunoaffinity-HPLC/DAD 분석은 AOAC (2002)와 ICH (2005)의 single laboratory 검증 가이드라인에 따라 분석법 검증을 수행하였다. 특이성 (specificity)은 표준참고물질 SRM 1549a와 BCR 487의 비타민 B₁₂를 분석하여 크로마토그램의 비타민 B₁₂ peak purity를 확인하고 검출기 200-600 nm 범위에서 spectrum을 수집하여 표준용액인 cyanocobalamin 피크의 머무름 시간(retention time, RT) 및 spectrum과 상호 비교하였다. 분석법의 정확성(accuracy)은 표준참고물질 SRM 1549a와 BCR 487의 비타민 B₁₂ 함량을 분석하고 NIST와 EC에서 제시한 인증값과 비교하여 회수율(%)을 계산하였다. 정밀성(precision)은 QC 시료인 상업용 분유를 하루에 5만 복 실험하여 repeatability (intraday, RSD_i)와, 5일 동안 1회씩 실험하여 reproducibility (interday precision, RSD_R)의 coefficient variation (CV, %)을 계산하여 나타내었다. 직선성(linearity)은 표준용액인 cyanocobalamin을 일반적인 식품 중의 비타민 B₁₂ 농도를 포함하는 4가지 농도(0.025, 0.05, 0.1, 0.2 µg/mL)로 제조하여

측정된 피크의 면적과 농도와의 상관성을 분석하였다. 검출한계 (limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 공시험 시료 크로마토그램의 signal-to-noise (S/N)의 평균 값에 표준편차를 각각 3.3과 10으로 곱한 값을 더하여 구하였다.

분석품질관리(analytical quality control)

분석품질관리는 AOAC(2002) 가이드라인에 준하여 시료를 분석하는 모든 기간 동안 수행하였다. 관리 한계선의 설정은 품질 관리 시료의 비타민 B₁₂ 함량을 10회 이상 반복 분석하고, 상대 표준편차가 5% 안에 들어가는 값을 선택하여 평균값을 기준값으로 하였다. 관리 상한선 및 하한선(upper and lower control line, UCL and LCL)은 평균±(2×표준편차)로 계산하고, 조치 상한선 및 하한선(upper and lower action line, UAL and LAL)은 평균±(3×표준편차)로 계산하여 설정하였다. 본 연구 기간 동안 시료분석 시 QC 시료를 함께 분석하여 품질관리도표(quality control chart, QC chart)를 작성하면서 분석품질관리를 실시하였다.

Table 2. Vitamin B₁₂ contents in ham, edible insect and seafood

Samples	Description	Vitamin B ₁₂ content (µg/100 g)	t/F-value	
Ham	Lean meat	blanched	0.48±0.02	
		roasted	0.65±0.02	
	Mixed meat	square, raw	0.31±0.03 ^{bc2)}	16.281**
		square, roasted	0.47±0.05 ^a	
		slice, raw	0.30±0.01 ^c	
		slice, blanched	0.31±0.01 ^{bc}	
	slice, roasted	0.37±0.00 ^b		
Sea food	Clam	salted, fermented	26.80±1.03	
	Shrimp	salted, fermented	1.76±0.00	
	Anchovy	salted, fermented	0.88±0.00	
	Sand lance	salted, fermented	0.87±0.03	
	Pollack	roe, salted, fermented	10.37±0.68 ^a	141.257**
		tripe, salted, fermented	3.85±0.08 ^c	
		dried, shredded	5.88±0.04 ^b	
	Squid	salted, fermented	3.43±0.02	-42.384***
		dried, shredded	5.46±0.12	
	Pacific saury	canned, whole	7.76±0.42	-4.470*
		canned, solid	10.19±1.26	
	Mackerel	canned, whole	6.02±0.09	-19.053**
canned, solid		8.66±0.33		
Salmon	canned, whole	2.06±0.11 ^b	42.819**	
	canned, solid	2.03±0.07 ^b		
	smoked	2.68±0.02 ^a		
Whelk	canned, solid	4.01±0.07		
Edible insect	Silkworm	pupa, raw	ND ³⁾	
		larva, dried	4.89±0.05	
	Two-spotted cricket	imago, raw	6.70±0.19	
	Rice grasshopper	imago, raw	0.45±0.03	
	Beetle	larva, dried	ND	

¹⁾*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 by t-test or ANOVA.

²⁾Means with different superscript small letters in the same column for the same sample are significantly different at p<0.05.

³⁾Not detected.

통계처리

통계는 SPSS (Statistics Package for the Social Science, Ver. 22.0 for Window, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 분석 결과의 평균과 표준편차를 구하였으며 세 그룹 시료 간의 유의적 차이는 Duncan's multiple range test, 두 그룹간 유의적 차이는 *t*-test를 이용하여 모두 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

햄, 해산물 및 식용곤충의 비타민 B₁₂ 분석

국내에서 섭취되고 있는 햄, 해산물, 식용곤충의 비타민 B₁₂ 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 햄류의 비타민 B₁₂ 함량은 0.30-0.65 µg/100 g의 범위를 나타내었다. 혼합육(mixed meat)의 비타민 B₁₂ 함량(0.30-0.47 µg/100 g)에 비하여 살코기육(lean meat)의 비타민 B₁₂ 함량(0.48-0.65 µg/100 g)이 더 높게 나타나 식육함량이 높은 햄이 비타민 B₁₂ 함량이 보다 높은 것을 알 수 있다. 살코기 햄의 경우 구운 것(0.65 µg/100 g)이 데친 것(0.48 µg/100 g)보다 비타민 B₁₂ 함량이 높았으며, 사각 햄과 슬라이스 햄의 경우 가열처리 시 생것에 비해 비타민 B₁₂ 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 햄류의 경우 조리 중 수분이나 지방질이 빠지면서 중량 감소가 일어날 수 있는 반면 비타민 B₁₂는 햄의 동물성 자원의 근육에 존재하며 열에 안정하기 때문에 굽기와 같은 열처리 조리에 의한 파괴나 손실보다는 중량 손실로 인한 상대적인 함량 증가 현상이 나타나는 것으로 생각된다. 이러한 유사한 현상은 Gille 등(2015)의 비타민 B₁₂는 굽는 것과 같은 건열식 조리 시 오히려 수분이 빠져나가 총 중량 대비 비타민 B₁₂ 함량이 증가하는 경향을 보였다는 연구결과와 일치하였다.

수산 식품류에 함유된 비타민 B₁₂의 함량은 조개젓이 26.80 µg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며 까나리액젓이 0.87 µg/100 g로 가장 낮은 함량을 나타냈다. Kwak 등(2012)은 미생물분석법을 이용하여 수산물의 비타민 B₁₂ 함량을 분석하였으며 새우젓과 명란젓의 비타민 B₁₂ 함량을 각각 1.55, 9.98 µg/100 g으로 보고하였는데, 이는 본 연구에서 immunoaffinity-HPLC로 분석한 새우젓과 명란젓의 함량과 유사한 수준을 나타냈으나, 까나리액젓의 경우 본 연구의 비타민 B₁₂ 함량보다 낮은 수준인 0.22-0.24 µg/100 g으로 보고하였다. 이는 분석방법의 차이뿐만 아니라 수산자원의 특성, 가공 및 보관의 조건 등의 차이로 기인된 것이라 보여진다. 통조림 식품은 위생적으로 안전하면서, 운송이 용이하고 장기저장 및 사용편이성 등의 장점으로 인하여 소비가 꾸준히 증가하고 있는 추세이다(Heu와 Kim, 2004). 수산 통조림류 제품의 경우 비타민 B₁₂ 함량은 2.03-10.19 µg/100 g의 범위를 보였는데, 콩치>고등어>골뱅이>연어 순으로 높게 나타났고 콩치 통조림은 연어 통조림에 비해 약 5배 높은 비타민 B₁₂ 수준을 나타냈다. 본 연구에서 분석한 고등어 통조림의 비타민 B₁₂ 함량(6.02 µg/100 g)은 미국농무부 식품성분표(USDA, 2020)에 나타난 함량(6.94 µg/100 g)과 유사한 수준을 나타냈다. 국가표준식품성분표(RDA, 2017)에 의하면 오징어 생것의 비타민 B₁₂ 함량은 4.37 µg/100 g으로 나타났는데 본 연구에서 분석한 오징어 젓갈과 오징어체의 비타민 B₁₂ 함량은 각각 3.43, 5.46 µg/100 g으로 나타나 원료 가공방법에 따라 비타민 B₁₂ 함유량이 달라질 수 있음을 보여준다. 또한, 명태의 창자로 만든 발효 젓갈(3.85 µg/100 g)과 건조채(5.88 µg/100 g)의 비타민 B₁₂ 함량에 비하여 명태알로 젓갈을 만든 명란젓의 비타민 B₁₂ 함량이 10.37 µg/100 g로 매우 높게 나타났으며 이에 비하여 조개젓은 약 2.6배 높은 26.80 µg/100 g 수

준을 나타내어 해산물 식품군은 비타민 B₁₂ 섭취에 좋은 급원이 될 수 있을 것으로 보인다.

한편, 식용곤충류의 비타민 B₁₂ 함량은 쌍별귀뚜라미(two-spotted cricket) 성충의 비타민 B₁₂ 함량이 6.70 µg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며 누에(silkworm) 번데기(pupae)와 장수풍뎅이(beetle) 유충(larva)은 검출되지 않았다. 건조 누에 유충은 4.89 µg/100 g을 나타내었고 벼메뚜기 성충은 0.45 µg/100 g을 나타내었다. 식용곤충은 생산과정에서 경제적 및 환경적 가치 이외에도 영양학적 가치가 매우 우수한 것으로 보고되어 있어(Kim 등, 2019) 새로운 단백질 식량자원으로 주목받고 있다. 본 연구에서 분석한 곤충류의 비타민 B₁₂ 함량 수준의 경우도 햄류에 비하여 약 10-20배 높은 수준이었으며 연어, 오징어, 골뱅이 가공품보다도 높게 나타나 비타민 B₁₂와 같은 미량영양소 섭취에도 좋은 식량자원으로 보인다. 농진청에서 주기적으로 발간하고 있는 국가표준 식품성분표(RDA, 2017)에 의하면 쇠고기의 비타민 B₁₂ 함량은 부위에 따라 0.95-3.92 µg/100 g, 돼지고기는 0.20-1.74 µg/100 g, 닭고기는 0.26-0.69 µg/100 g의 범위를 나타내는데 쌍별귀뚜라미와 같은 식용곤충은 이러한 육류보다 훨씬 높은 비타민 B₁₂의 좋은 급원식품으로 이용될 수 있을 것으로 보인다.

난류의 비타민 B₁₂ 분석

메추리알, 달걀, 오리알의 각각의 난백과 난황, 그리고 각각의 시료를 생것과 삶은 것으로 구분하여 비타민 B₁₂ 함량을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 국내 마켓에서 소비되는 메추리알, 달걀, 오리알의 난각을 제외한 총 중량은 평균적으로 각각 9, 50, 70 g이며 Kim과 Lee(1985)는 메추리알, 달걀, 오리알의 중량 대비 난황 비율이 각각 40.9, 33.1, 43.0%라고 보고하였다. 본 연구에서 난류의 비타민 B₁₂ 함량을 총 100 g 중량 기준과 난황과 난백의 비율로 각각 환산하여 두 가지 방식으로 제시하였다(Table 3). 조류 3종의 생 난백, 생 난황, 삶은 난백, 삶은 난황을 분석한 결과 0.04-12.45 µg/100 g으로 비타민 B₁₂ 함량이 부위와 조리방법에 따라 넓게 분포되는 것을 확인할 수 있었다. 중량 대비 난황과 난백의 비율을 환산한 알 전체의 비타민 B₁₂ 함량은 생계란과 삶은 메추리알에서 각각 1.35와 5.61 µg/100 g으로 나타났고, 생것에서는 메추리알, 오리알, 계란 순으로 유의적인 차이를 보였으나, 삶은것에서는 메추리알의 비타민 B₁₂ 함량이 가장 높은 함량을 나타내고, 달걀과 오리알의 함량은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한, 삶은 메추리알과 계란의 비타민 B₁₂ 함량은 생 시료에 비하여 유의적으로 높게 나타났으나, 오리알은 삶은 시료와 생 시료간의 비타민 B₁₂ 함량이 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 햄류와 마찬가지로 비타민 B₁₂는 동물성 자원의 근육에 존재하며 열에 안정하기 때문에 조리에 의한 파괴나 손실보다는 중량 손실로 인한 상대적인 함량 증가 현상이 나타나는 것으로 생각된다. 비타민 B₁₂ 함량은 모든 난류에서 난백보다 난황이 유의적으로 높게 나타났다. 특히, 생 계란의 난황은 난백에 비해 약 100배가 높은 비타민 B₁₂ 함량 수준을 보였고, 메추리알도 약 30 배, 오리알은 약 7배 높은 수준을 보여 종에 따라 큰 차이를 나타낼 수 있었다. 한국인의 비타민 B₁₂ 일일 권장 섭취량은 성인 기준 2.4 µg이다(The Korean Nutrition Society, 2015). 본 연구에서 분석한 메추리알, 계란, 그리고 오리알 1개의 평균 무게 중량을 각각 9, 50 g, 그리고 70 g으로 가정하여 계산한 알 1개 중의 비타민 B₁₂ 함량은 메추리알 0.42-0.51 µg, 달걀 0.68-1.11 µg, 오리알 1.38-1.40 µg으로 나타났다. Kwak 등(2008)은 전란의 비타민 B₁₂ 함량을 분석한 결과 0.54 µg/50 g이라고 하여 본 연구에서 분석한 결과와 비슷하였다. 이는 메추리알, 달걀, 오리

Table 3. Vitamin B₁₂ contents in raw and boiled eggs

Samples	Vitamin B ₁₂ content						
	µg/100 g			µg/g weight of one egg ^{1,2)}			
	raw	boiled	t-value ³⁾	raw	boiled	weight (g)/egg	
Egg yolk	Quail	10.98±0.17 ^{a4)}	12.45±0.43 ^a	-7.707	0.41	0.46	4
	Chicken	4.01±0.41 ^b	6.59±0.03 ^b	-15.286*	0.66	1.09	17
	Duck	3.91±0.40 ^b	3.89±0.16 ^c	0.157	1.18	1.17	30
F-value	271.897***	540.469***					
Egg white	Quail	0.37±0.00 ^b	0.86±0.05 ^a	-23.625*	0.02	0.05	5
	Chicken	0.04±0.00 ^c	0.07±0.00 ^c	-13.485***	0.01	0.02	33
	Duck	0.55±0.01 ^a	0.52±0.05 ^b	1.672	0.22	0.21	40
F-value	2916.927***	190.797**					
Whole egg	Quail	4.72±0.07 ^a	5.61±0.15 ^a	-13.536**	0.42	0.51	9
	Chicken	1.35±0.13 ^c	2.22±0.01 ^b	-15.886*	0.68	1.11	50
	Duck	2.00±0.18 ^b	1.97±0.04 ^b	0.453	1.40	1.38	70
F-value	357.968***	1059.597***					

¹⁾Vitamin B₁₂ contents of whole eggs (raw and boiled) were the calculated values based on the analytical values of the yolk and white parts of quail, chicken and duck eggs. Total weight of one egg for quail, chicken and duck was 9, 50 and 70 g, respectively. The weight portion of yolk to the whole egg was 41%, 33% and 43% for quail, chicken and duck eggs, respectively (Kim and Lee, 1985).

²⁾Vitamin B₁₂ contents per weight of one egg for quail, chicken and duck eggs.

³⁾Vitamin B₁₂ contents are significantly different between raw and boiled samples for each part of quail, chicken and duck eggs by t-test (**p*<0.05, ***p*<0.01 and ****p*<0.001).

⁴⁾Vitamin B₁₂ contents in the same column with superscript small letters are significantly different among quail, chicken and duck for the same part by Duncan's test (***p*<0.01 and ****p*<.001).

Table 4. Accuracy of vitamin B₁₂ assay using immunoaffinity-HPLC/DAD

Reference materials ¹⁾	Vitamin B ₁₂ content (µg/100 g)		Recovery (%) ⁴⁾
	Reference value ²⁾	Analysis value ³⁾	
SRM 1549a	3.20±0.20	3.10±0.04	96.9
BCR 487	112.00±9.00	114.60±3.24	102.3

¹⁾SRM: standard reference material 1549a (whole milk powder), BCR 487 (pig liver).

²⁾Reference value indicates of SRM 1549a and BCR 487 provided by NIST and EC, respectively, as the certificate value.

³⁾Analysis value obtained by immunoaffinity-HPLC/DAD assay for vitamin B₁₂ in this study.

⁴⁾Recovery (%)=100×(analysis value/reference value).

Table 5. Precision of vitamin B₁₂ assay using immunoaffinity-HPLC/DAD

Sample	Vitamin B ₁₂ content (µg/100 g)		
	Parameters	Repeatability ¹⁾	Reproducibility ²⁾
Commercial infant formula	Mean±SD	5.72±0.17	5.71±0.21
	CV (%) ³⁾	3.0	3.7

¹⁾Repeatability refers to the results of 5 independent determinations carried out in a sample by analyzing 5 replicates of the same sample in the same day.

²⁾Reproducibility refers to the results of 5 independent determinations carried out in a sample by analyzing 5 replicates of the sample at different assay days.

³⁾Coefficient of variation (%)=100×(SD/mean).

알을 1개 섭취 시 비타민 B₁₂ 일일 권장량의 각각 18-21, 28-46, 57-58%를 충족시킬 수 있어 좋은 급원이 될 것으로 보인다.

분석법 검증

비타민 B₁₂는 일반적으로 식품 중의 농도 수준이 매우 낮고 다양한 형태로 존재하기 때문에 재현성 있는 분석을 위해서는 분석법의 특이성 검증이 필요하다. 분석법의 특이성(specificity)은 비타민 B₁₂ 표준용액인 cyanocobalamin과 표준참고물질 및 시료의 chromatogram에서 확인된 비타민 B₁₂ 피크의 retention time은

30.2분으로 서로 일치하였으며 200-600 nm에서 얻어진 세 피크의 spectrum을 overlapping한 결과 흡광패턴이 상호 일치하는 것이 확인되어 HPLC/DAD 분석 특이성이 우수함을 알 수 있었다(Fig. 1). AOAC분석법의 정확성(accuracy)과 정밀성(precision)은 분석법에 따라서 영향을 받지만 같은 분석법이라도 목적 성분의 농도 수준에 따라 달라지게 되므로 AOAC 가이드라인에서는 시료 중의 분석하고자 목적하는 성분의 농도 수준에 따라 수용할 수 있는 정확성과 정밀성 수용범위를 다르게 제시하고 있다(AOAC 2002). Immnoaffinity-HPLC를 이용한 비타민 B₁₂ 분석법의 정확성

Table 6. LOD, LOQ and linearity of vitamin B₁₂ assay using immunoaffinity-HPLC/DAD

Parameters	Vitamin B ₁₂
Calibration curve equation (y=Ax+B)	y=2099.1x-16.39
Correlation coefficient (R ²)	0.999
LOD ¹⁾ (µg/100 g)	0.008
LOQ ²⁾ (µg/100 g)	0.026

¹⁾Limit of detection.²⁾Limit of quantification.

검증 결과, Table 4와 같이 SRM 1549a와 BCR 487의 비타민 B₁₂ 함량은 각각 3.10±0.04, 114.60±3.24 µg/100 g이었으며 각각의 참값(인증값)과 비교 시 비타민 B₁₂ 회수율이 각각 96.9%와 102.3%임을 확인하였다. 이는 SRM 1549a와 BCR 487의 비타민 B₁₂ 분석값 모두 AOAC 가이드라인에서 제시하는 정확성 수용범위 수준(분석 성분의 농도 1 µg/100 g 기준으로 75-120%)을 충족하여 분석법의 정확성이 우수함을 확인할 수 있었다. 정밀성 검증을 위해 품질관리시료로 사용되는 상업용 분유를 분석하여 얻은 반복성(repeatability)과 재현성(reproducibility)으로 평가한 정밀성 결과는 Table 5와 같다. 비타민 B₁₂ 분석법의 반복성과 재현성은 각각 3.0, 3.7%를 나타내었는데 이는 AOAC 가이드라인에서 제시한 정밀성 수용범위 수준(분석 성분의 농도 1 µg/100 g 기준으로 RSD_w와 RSD_R 각각 8, 16%) 이하의 값으로 본 연구에서 사용한 비타민 B₁₂ 분석법의 정밀성이 매우 우수함을 확인할 수 있었다. 비타민 B₁₂ 분석법의 농도에 따른 직선성(linearity)은 cyanocobalamin 표준용액 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 µg/mL의 농도 범위에서 비타민 B₁₂ 정량은 Table 6과 같은 높은 상관계수 R²=0.999 값을 보이는 y=2099.1x-16.39의 직선식을 얻어 분석법의 직선성이 우수

함을 확인할 수 있었다. GC나 HPLC를 사용하여 성분을 분리 정량하는 기기분석법의 경우 기기의 검출한계와 정량한계의 값이 낮을수록 분석하고자 하는 목적 성분의 검출능이 우수하다고 할 수 있다(MacDougall 등, 1980). 본 연구의 비타민 B₁₂ 분석법의 검출한계와 정량한계는 각각 0.008, 0.026 µg/100 g의 값을 나타내어 동물성 식품군 중의 비타민 B₁₂를 정량하기에 충분한 한계값을 보였으며 Yoon 등(2019)이 보고한 비타민 B₁₂ 분석 검출한계 0.03 µg/100 g과 정량한계 0.08 µg/100 g보다 본 연구에서 적용한 분석법이 낮은 값을 나타내어 보다 미량의 수준으로 존재하는 식품들의 비타민 B₁₂ 정량분석이 가능함을 확인할 수 있었다. 또한, Chamkouri 등(2017)은 solid phase extraction (SPE)을 사용하여 정제 및 농축과정을 거친 다음 UV로 검출하는 방법으로 0.95 µg/100 g 수준의 검출한계를 보고하였다. 이는 HPLC 분석 시스템, 정제 및 농축 방법 등에 따라 분석성분의 검출한계가 달라질 수 있음을 나타내는 것으로 분석하고자 하는 식품 중에 존재하는 성분의 농도 수준에 따라 검출 한계가 적정한지 검토하는 것이 필요하다 하겠다. 본 연구에서 사용된 분석법의 경우 식품에 존재하는 비타민 B₁₂ 검출에 충분한 수준의 검출 및 정량한계를 가지고 있는 것으로 보여진다.

분석품질관리

일반적으로 목적하는 성분을 동일한 분석법으로 분석하는 기간 동안 기기, 실험 용액 및 시약, 실험실 내부적 환경 요인, 분석자 등의 변화는 분석값에 영향을 주는 요인으로 작용할 수 있다. 따라서 분석 수행 시 시료 분석 결과와 함께 분석품질을 관리할 수 있는 품질관리도표(quality control chart, QC chart)를 지속적으로 작성하여 관리하는 것은 장기간의 분석 연구 수행에서 분석결과의 신뢰도를 확보하는데 매우 중요하다. 특히, 농진청에

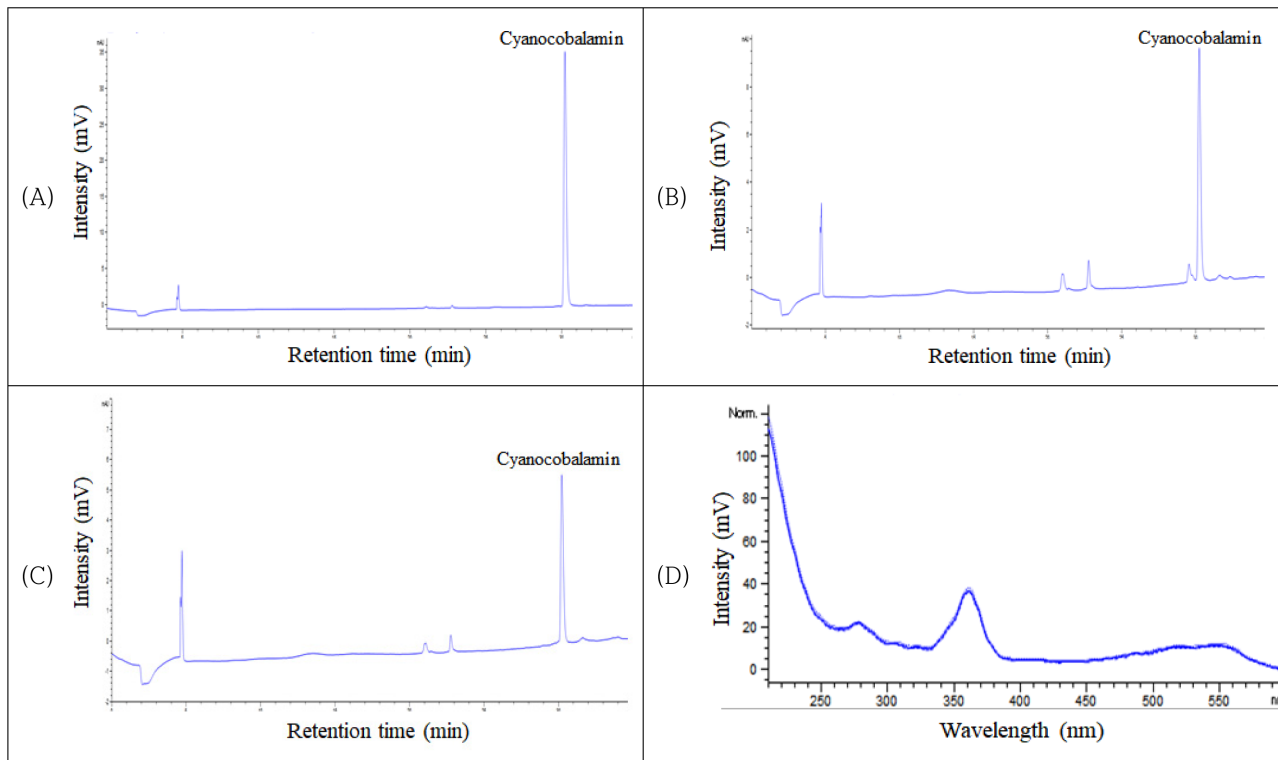


Fig. 1. HPLC chromatograms of cyanocobalamin standard (A), reference material (BCR 487) (B), and sample (clam) (C), and their overlapped DAD spectrums of vitamin B₁₂ at 200-600 nm (D).

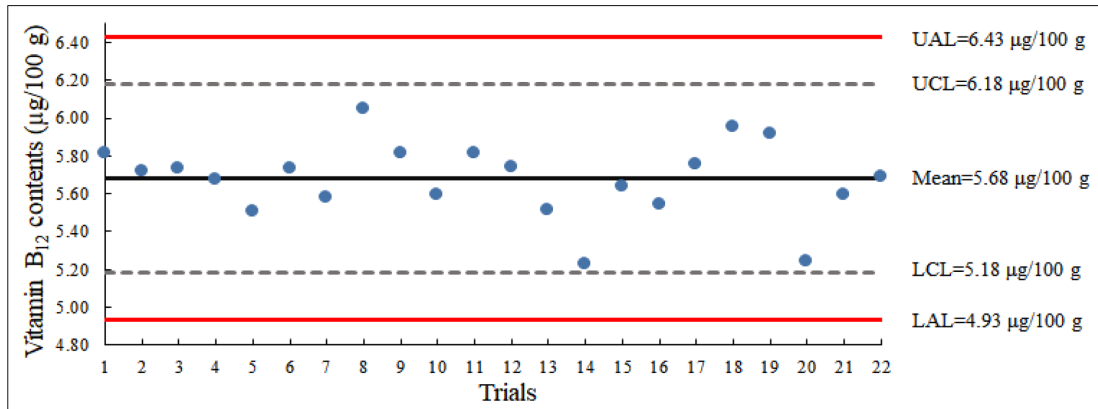


Fig. 2. A quality control chart of vitamin B₁₂ analysis. Upper and lower control lines (UCL and LCL)=mean±(2×SD), upper and lower action lines (UAL and LAL)=mean±(3×SD). SD: standard deviation.

서 발간하는 국가식품성분표와 같이 데이터의 생산 및 업데이트가 수십년간 표준화되어 지속되어야 하는 연구의 경우 정확성과 재현성 있는 분석데이터의 생산을 위해 분석품질관리의 수행은 필수 요소라 하겠다. 특히, 본 연구는 약 2년여 기간 동안 시료의 수집 및 분석이 진행되었기 때문에 연구기간 동안의 분석품질관리도의 관리는 국가식품성분표의 신뢰도 확보에 매우 중요하다 하겠다. Fig. 2은 해당 연구기간동안 분석품질관리 시료를 시료와 함께 동일한 분석법으로 분석하여 작성한 결과다. 비타민 B₁₂ 분석 평균값인 5.68 µg/100 g을 기준값으로 설정하였으며, 관리 상하한선은 각각 5.18, 6.18 µg/100 g, 조치 상하한선은 각각 4.93, 6.43 µg/100 g으로 설정하였다. QC 시료의 분석값이 분석 관리 범위 내에 들어오지 못하는 경우 분석 조건과 환경을 재점검하고 함께 분석했던 시료 데이터는 삭제하였으며 QC 시료를 이용하여 관리 범위 내에 들어오도록 분석환경이 개선된 이후 시료의 분석을 진행하였다. 분석 기간 중 분석한 QC 시료 중 유효한 총 22회 비타민 B₁₂ 분석값은 모두 관리 범위 내에 들어가는 것을 확인하여 해당 기간 동안 분석된 시료의 비타민 B₁₂ 분석값은 높은 신뢰도를 확보하였음을 확인하였다.

요 약

본 연구는 국내에서 소비되는 총 41종의 동물성 식품 중의 비타민 B₁₂ 함량을 immunoaffinity-HPLC방법을 이용하여 분석하였으며, 이를 국가표준식품영양성분표로 활용하기 위한 분석데이터 신뢰성 확보를 위하여 분석법 검증 및 분석품질관리를 수행하였다. 동물성 식품 총 41종의 비타민 B₁₂ 함량은 0.00-12.45 µg/100 g으로 식품군과 조리 및 가공방법에 따라 다양하게 나타났다. 햄류에서는 살코기 햄이 가장 높은 함량을 나타냈으며 그중 구운 살코기 햄(0.65 µg/100 g)이 데친 살코기 햄(0.48 µg/100 g)보다 높은 함량을 나타냈다. 난류에서는 메추리알, 달걀, 오리알 중 메추리알이 0.37-12.45 µg/100 g으로 가장 높은 비타민 B₁₂ 함량을 나타냈으며 난황이 난백보다 최대 100배까지 높은 함량을 나타냈다. 식용곤충에서는 쌍별귀뚜라미 성충이 6.70 µg/100 g으로 가장 높은 함량을 보여 비타민 B₁₂ 섭취의 좋은 급원이 될 수 있을 것으로 보였으나 누에 번데기와 장수풍뎅이 유충에서는 비타민 B₁₂가 검출되지 않았다. 수산식품류에서는 조개젓(26.80 µg/100 g)이 가장 높은 함량을 나타냈으며 이 외 수산식품에서는 0.87-10.37 µg/100 g의 범위를 보였다. 본 연구에서 사용된 비타민 B₁₂ 분석에 대한 분석법의 검출한계, 정량한계, 직선성, 정확성 및 정밀성

을 분석한 결과 모든 지표에서 분석법 검증 가이드라인 기준에 충족하였으며, 분석품질관리를 통하여 전체 분석 기간 동안 모든 분석이 신뢰성 있게 진행되었음이 확인되어 본 연구에서 생산된 동물성 식품류의 비타민 B₁₂ 데이터는 국가표준식품성분표 개정을 위한 데이터로 활용될 수 있을 것이라 평가된다.

감사의 글

본 연구는 2018-2019년도 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01339805)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

Andres E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Blicke JF. Vitamin B₁₂ (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Can. Med. Assoc. J.* 171: 254-259 (2004)

AOAC. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD, USA. pp. 12-27 (2002)

Campos-Gimenez E, Fontannaz P, Trisconi MJ, Kilinc T, Gimenez C, Andrieux P, Nelson M. Determination of vitamin B₁₂ in infant formula and adult nutritional by liquid chromatography/UV detection with immunoaffinity extraction. *J. AOAC Int.* 95: 1-6 (2012)

Chamkouri N, Vafaeizadeh M, Mojaddami A, Hosseini SA, Isfahani TM, Golkhajeh AG, Malaekheh SMA. Determination of Vitamin B₆, B₉ and B₁₂ in Halophytes by Solid Phase Extraction Followed by HPLC-UV. *J. Pharm. Res. Int.* 20: 1-6 (2017)

Gille D, Schmid A. Vitamin B₁₂ in meat and dairy products. *Nutr. Rev.* 73: 106-115 (2015)

Hadjmohammadi MR, Sharifi V. Use of solid phase extraction for sample clean-up and preconcentration of vitamin B₁₂ in multivitamin tablet before HPLC-UV, UV and atomic absorption spectrophotometry. *J. Food Drug Anal.* 15: 285-289 (2007)

Herbert V. Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 852-858 (1988)

Heu MS, Kim JS. Heavy metal contents of canned seafoods packed in oil. *J. Korean Soc. Appl. Bi.* 47: 307-314 (2004)

Heudi O, Kilinc T, Fontannaz P, Marley, E. Determination of vitamin B₁₂ in food products and in premixes by reversed-phase high performance liquid chromatography and immunoaffinity extraction. *J. Chromatogr. A.* 1101: 63-68 (2006)

ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). Complementary guideline on methodology dated 6 November, 1996 incorporated in November 2005. International conference on Harmonization. Geneva, Switzerland. pp. 11-12 (2005)

- Karsilayan H. Quantitation of vitamin B₁₂ by first-derivative absorption spectroscopy. *Spectrochim. Acta. A.* 52: 1163-1168 (1996)
- Kim YS. Consumer ability about nutrition labeling system and strategic framework for improvement of system. *Korea Consumption Cult. Assoc.* 9: 45-66 (2006)
- Kim SM, An CW, Han JA. Characterization and application of the proteins isolated from edible insects. *Korean J. Food Sci. Technol.* 51: 537-542 (2019)
- Kim J, Hwang HW, Cho YJ, Park J. A study on collecting representative food samples for the 10th Korean standard foods composition table. *J Appl. Stat.* 33: 215-228 (2020)
- Kim SA, Jun S, Hong E, Joung H. Estimated macronutrients and antioxidant vitamins intake according to Hansik consumption rate among Korean adults: Based on the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2007-2012. *J. Nutr. Health.* 49: 323-334 (2016)
- Kim YX, Kim HY, Kim SN, Lee JY, Seo D, Choi Y. Comparison of nutritional compositions of green vegetables. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46: 592-599 (2017)
- Kim SY, Park MY. Diversity of main dishes of menus at university faculty cafeterias. *J. Korean Diet Assoc.* 21: 320-332 (2015)
- Kim MJ, Rhee HS. Determination of retinol equivalent and identification of carotenoids in hen, quail and duck eggs. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 14: 391-395 (1985)
- Kwak CS, Hwang JY, Watanabe F, Park SC. Vitamin B₁₂ contents in some Korean fermented foods and edible seaweeds. *Korean J. Nutr.* 41: 439-447 (2008)
- Kwak CS, Park JH, Cho JH. Vitamin B₁₂ content using modified microbioassay in some Korean popular seaweeds, fish, shellfish and its products. *Korean J. Nutr.* 45: 94-102 (2012)
- Lee HS, Chang MJ, Kim HY, Shim JS, Lee JS, Kim KN. Survey on utilization and demand for national food composition database. *J. Nutr. Health* 51: 186-198 (2018)
- Lee GH, Lee HN, Shin JA, Chun JY, Lee J, Lee KT. Content of fat-soluble nutrients (cholesterol, retinol, and α -tocopherol) in different parts of poultry meats according to cooking method. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 44: 234-241 (2015)
- Lim SH, Kim JB, Cho YS, Choi Y, Park HJ, Kim SN. National standard food composition tables provide the infrastructure for food and nutrition research according to policy and industry. *Korean J. Food Nutr.* 26: 886-894 (2013)
- MacDougall D, Crummett WB. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* 52: 2242-2249 (1980)
- McCarter SJ, Stang C, Turcano P, Mielke MM, Ali F, Bower JH, Savica R. Higher vitamin B₁₂ level at Parkinson's disease diagnosis is associated with lower risk of future dementia. *Parkinsonism Relat. D.* 73: 19-22 (2020)
- Park S, Johnson MA. What is an adequate dose of oral vitamin B₁₂ in older people with poor vitamin B₁₂ status? *Nutr. Rev.* 64: 373-378 (2006)
- Petrus AK, Fairchild TJ, Doyle RP. Traveling the vitamin B₁₂ pathway: oral delivery of protein and peptide drugs. *Angew. Chem. Int. Edit.* 48: 1022-1028 (2009)
- Rural Development Administration (RDA). National Standard Nutrient Database. The 9th ed. Jeonju, Korea. pp. 228-256, 361 (2017)
- Smith AD, Refsum H. Vitamin B-12 and cognition in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.* 89: 707S-711S (2009)
- The Korean Nutrition Society. Dietary reference intakes for Koreans. The Korean Nutrition Society, Seoul, Korea. pp. 515, 962-976 (2015)
- US Department of Agricultural Research Service (USDA). USDA Food and Nutrient Database for Dietary Studies 2015-2016. Available from: <http://www.ars.usda.gov/nea/bhnrc/fsrg> Accessed Apr. 01, 2020.
- Watanabe F. Vitamin B₁₂ sources and bioavailability. *Exp. Biol. Med.* 232: 1266-1274 (2007)
- Yoon J, Chung H, Kim Y. Analysis of Selected Water-Soluble Vitamin B₁, B₂, B₃, and B₁₂ Contents in *Namul* (Wild Greens) Consumed in Korea. *Korean J. Food Nutr.* 32: 61-68 (2019)