pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 3, pp. 252~260 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.3.252

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

면역친화성 컬럼을 이용한 특수용도식품 중 비타민B_{12}와 비오틴 분석 연구

오보영 · 예민지 · 허수정 · 이혜영 · 방수진*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 영양기능연구팀

Determination of Vitamin B_{12} and Biotin in Foods for Special Dietary Uses with Immunoaffinity Column

Bo-Young Oh, Min-Ji Ye, Soo-Jung Hu, Hye-Young Lee, Soo-Jin Bang*
Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea

(Received April 9, 2020/Revised May 4, 2020/Accepted June 12, 2020)

ABSTRACT - This study was conducted to improve the standard method for vitamin B_{12} and biotin contained in foods for special dietary uses to ensure the specificity of the complex matrix properties of foods. For the food code, the test method was improved to determine vitamin B_{12} and biotin by high-performance liquid chromatography (HPLC)-UV using column-switching after concentration using immunoaffinity column. The immunoaffinity columns contain a gel suspension of monoclonal antibody specific to the vitamin of interest so that it can be used to concentrate the vitamin B_{12} and biotin and remove interferences from the food extracts. Moreover, validation of advanced new methods was carried out to support the suitability of the proposed analytical procedure (specificity, linearity, detection limits (LOD), quantitative limits (LOQ), accuracy, and precision). The improved analytical method is being used to monitor relevant food items on sale. The results of this study showed that the new analytical method is suitable and appropriate for managing food intended for special dietary uses.

Key words : Vitamin B_{12}, Biotin, Column-switching HPLC, Foods for special dietary uses, Immunoaffinity column

비타민B_{12}는 사람의 성장과 발달에 필수적인 영양소로서 피롤링과 코발트를 함유하는 코리노이드 화합물이다[1]. 인체에서 비타민B_{12}의 가장 중요한 기능은 메티오닌 합성효소와 메틸말로닐-CoA 뮤테이즈의 조효소로 작용하여 미엘린 수초의 합성과 유지 그리고 지방과 탄수화물의 대사를 돕는 것이다[2]. 또한, 비타민B_{12}는 체내에서 합성되지 않아 반드시 외부에서 공급해야 하는 영양소이다. 일반적으로 비타민B_{12}가 결핍되면 주로 빈혈 증세와 신경계통의 이상이 나타나며, 위염, 위궤양, 식욕부진, 변비 또는 설사 등 위장계통의 이상을 보이는 것으로 알려져 왔는데[3,4], 최근 들어 비타민B_{12}의 영양상태가 노화관련 질병을 예방하고 신체적, 정신적 기능을 유지하는 것과 관련이 있다는 연구결과들이 다수 보고되었다[5-13]. 특히 비타민B_{12}는 동물성 식품에만 존재하고 식물성 식품에는 존재하지 않는 것으로 오랫동안 알려져 왔으나[14] 된장, 청국장과 같은 식물성 발효식품과 김, 파래, 미역과 같은 해조류, 클로렐라에도 비타민B_{12}가 존재한다고 보고된 바 있다[15].

비오틴은 황을 함유한 수용성 비타민으로 생체 내 대사과정 중 카르복실기를 제공하는 카르복실화 효소 및 탈탄산 효소의 조효소로 작용하며 아미노산으로부터 에너지 생성 및 DNA 합성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[16]. 또한, 비오틴의 결핍은 영아나 성장기 아동에서는 성장 저하, 성인의 경우 피부염, 결막염, 탈모증, 무기력증, 우울증 등을 가져올 수 있다[17]. 하지만 체내 비오틴 회로를 통해서 재사용될 수 있기 때문에 단순 결핍 증상은 거의 나타나지 않고, 비오틴 급원식품으로는 영양 밀도가 높은 난황, 간, 땅콩, 대두, 밀, 이스트, 치즈 등이 알려져 있다[18].

식품의 기준 및 규격에서 비타민의 규격은 영아용 조제식 등 특수용도식품 및 농산가공식품류 중 시리얼류에 설정되어 있으며, 식품의 영양학적 품질을 유지하기 위해 제조공정 중 손실되는 영양소를 복원하거나 영양소를 강화시키기 위한 목적으로 사용되고 있다. 그 중 영아용 및 성장기용 조제식 등 비타민 규격이 설정된 식품은 일반식품

*Correspondence to: Soo-Jin Bang, Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
Tel: +82-43-719-4409, Fax: +82-43-719-2500
E-mail: Valentinsj@korea.kr

에 비해서 복잡한 매질 특성을 가지기 때문에 그 속에 함유된 미량영양성분을 분석하기가 매우 까다롭다[19].

비타민B_{12} 및 비오틴의 현행 식품공전 시험법에서는 각각의 추출용매로 비타민을 추출하고 전처리, 농축, 분석 등 3가지 컬럼으로 연속 연결된 육방전환밸브시스템을 이용한 액체크로마토그래프로 분석하고 있다. 반면, AOAC 및 국·내외 연구에서는 균질화한 시료에 각각의 비타민을 선택적으로 결합하고 특이적 항체를 가지고 있는 면역친화성컬럼(immunoaffinity column)을 이용하여 정제과정을 거친 후 농축하여 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기로 분석하고 있다[20-23]. 이에 본 연구에서는 비타민 B_{12} 및 비오틴의 전처리 조건 중 clean-up 단계의 한계를 개선하고 분석조건을 비교 검토하고자 한다. 또한, 시험법 검증 가이드라인을 참고하여 밸리데이션을 수행한 후 국내에서 유통 중인 특수용도식품에 대한 적용성을 확인하고 최적의 분석법을 확립하고자 한다.

Materials and Methods

실험 재료

본 연구에 사용된 시료는 특수용도식품으로 식품의약품안전처에 신고된 품목제조보고서(2017년-2019년)를 확인하여 구입하였다. 먼저 특수용도식품 중 제품유형별로 시료를 구분하였고, 인터넷 판매 사이트를 이용하여 상위 1, 2위 제품을 선정 및 구매하여 실험에 사용하였다. 최종 선정된 시료는 특수용도식품 9 품목(영아용조제식, 성장기용조제식, 영유아용곡류조제식, 기타영유아식, 환자용식품, 선천성대사질환자용, 유단백알레르기영유아용, 영유아용특수조제식품, 임신수유부용식품)이었으며, 시료는 전처리 후 24시간 이내에 분석하였다.

표준품 및 시약

비타민 표준품으로 비타민B_{12}(Cyanocobalamin, purity 99% 이상), 비오틴(biotin, purity 99% 이상), 시약 중 인산이수소칼륨, 초산나트륨, 시안화나트륨, 제일인산나트륨, 제이인산나트륨, 수산화나트륨, PBS, 초산, 포름산은 Sigma사(St. Louis, MO, USA), 물, 메탄올, 아세토니트릴 용액은 Merck사(Whitehouse station, NJ, USA)로부터 HPLC급으로 구입하였고, 분석법 검증에 사용된 표준참고물질(Standards Reference Material, SRM) 1849a (infant formula)는 NIST (National institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

표준용액의 조제

비타민B_{12}는 표준물질 cyanocobalamin 약 10 mg을 정밀히 취해 5 mM 인산이수소칼륨 용액 100 mL에 녹여 100 μg/mL의 농도가 되도록 하여 표준원액으로 하고 위 용액을 증류수로 적절히 희석하여 표준용액으로 하였다.

비오틴은 표준물질 biotin 약 10 mg을 정밀히 취해 0.01 M 인산이수소칼륨 용액 100 mL에 녹여 100 μg/mL의 농도가 되도록 하여 표준원액으로 하고 위 용액을 0.01 M 인산이수소칼륨 용액으로 적절히 희석하여 표준용액으로 하였다.

시험용액의 조제

비타민B_{12}는 균질화한 시료 약 1 g을 갈색원심분리관에 정밀히 취해 0.2 M 초산나트륨 용액(pH 4.0, 초산 이용) 49.5 mL와 1% 시안화나트륨 0.5 mL를 가하여 상온에서 10분간 초음파 추출한 다음 100°C 수욕 상에서 30분간 추출하고 상온으로 냉각하였다. 이어서 여과지(Whatman No.2, GE Healthcare, Amersham Place, UK)로 여과한 것을 추출액으로 하였다. 냉장보관 된 정제용 컬럼(Easi-Extract Vitamin B_{12}, r-Biopharm, Glasgow, UK)은 실온에서 30분 방치한 후 컬럼 내부의 완충용액을 완전히 제거하였다. 증류수 3 mL를 정제용 컬럼에 주입하여 활성화시킨 후 추출액 9 mL를 정제용 컬럼에 주입하여 추출액 중 비타민B_{12}를 정제용 컬럼에 흡착시켰다. 이어서 증류수 3 mL씩 3회 주입하여 불순물을 제거하였고, 정제용 컬럼에 흡착된 비타민B_{12}를 메탄올 3 mL로 시험관에 용출시켰다. 용출액을 70°C에서 질소로 건조시키고 잔류물에 증류수 0.5 mL를 가하여 녹이고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 비타민B_{12}의 시험용액으로 하였다.

비오틴은 균질화한 시료 약 5 g을 갈색원심분리관에 정밀히 취해 0.15 M 인산나트륨 완충액(제일인산나트륨($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) 8.07 g과 제이인산나트륨($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) 18.36 g을 물에 녹인 것을 2 M 수산화나트륨용액을 이용하여 pH 7.0으로 조정한 후 1 L 정용) 25 mL를 넣고 상온에서 5분간 초음파 추출한 다음 100°C 수욕 상에서 30분간 추출하고 상온으로 냉각하였다. 0.15 M 인산나트륨 완충액을 가하여 50 mL로 정용하였고 균질화 후 0°C, 22,000×*g*에서 20분간 원심분리하였다. 이어서 여과지(Whatman No.2, GE Healthcare, Amersham Place, UK)로 여과한 것을 추출액으로 하였다. 냉장보관 된 정제용 컬럼(Easi-Extract Biotin, r-Biopharm, Glasgow, UK)은 실온에서 30분 방치한 후 컬럼 내부의 완충용액을 완전히 제거하였다. 추출액 10 mL를 정제용 컬럼에 주입하여 추출액 중 비오틴을 정제용 컬럼에 흡착시켰다. 이어서 PBS 용액(시판되는 PBS 완충제 정제(tablet) 또는 파우치(pouch) 형태 사용하여 제조) 10 mL와 증류수 10 mL를 주입하여 불순물을 제거하였고, 정제용 컬럼에 흡착된 비오틴을 메탄올 4 mL로 시험관에 용출시켰다. 용출액을 70°C에서 질소로 건조시키고 잔류물에 0.01 M 인산이수소칼륨 용액 1 mL를 가하여 녹이고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 비오틴의 시험용액으로 하였다.

HPLC 분석조건

비타민B_{12}와 비오틴의 분석은 고속액체크로마토그래프(High performance liquid chromatograph) Nanospace SI-2 (Shiseido Co., Osaka, Japan)를 사용하였다. 육방전환밸브시스템(Six-way switching valve)은 model 3011을 이용하였고, 자외부흡광광도검출기(Photo diode array)는 model 3185로 비타민B_{12} 검출파장은 550 nm, 비오틴 검출파장은 200 nm에서 고정하여 검출하였다. 비타민B_{12}와 비오틴의 분석조건은 표준용액 및 시험용액에서 각각의 비타민B_{12}와 비오틴을 1차로 분리하기 위해 Capcell pak MF C_8 (4.6×150 mm, 5 μm) (Shiseido Co.) 전처리 컬럼으로 각각 3.0-4.2분, 4.9-6.3분에서 모두 검출되는 것을 확인하여 switching time으로 설정하였다. 이후 비타민B_{12}는 Capcell pak MG C_{18}(2.0×35 mm, 5 μm) (Shiseido Co.)으로 비오틴은 Capcell pak C_{18} UG120V (2.0×35 mm, 5 μm) (Shiseido Co.)으로 농축 컬럼을 사용하여 각각의 분리된 비타민B_{12}와 비오틴을 농축하였으며 최종적으로 각각의 비타민B_{12}와 비오틴을 분리하기 위한 분석 컬럼으로 각각 Capcell pak UG C_{18} (1.5×250 mm, 5 μm) (Shiseido Co.)과 Capcell pak C_{18} UG120V (1.5×250 mm, 5 μm) (Shiseido Co.)을 사용하였다. 비타민B_{12} 이동상 조건에서 전처리 컬럼 이동상은 5 mM 인산이수소칼륨 용액을 500 μL/min의 유속으로 사용하였고, 분석 컬럼 이동상은 5 mM 인산이수소칼륨 용액:메탄올(80:20, v/v) 혼합 용액을 120 μL/min의 유속으로 사용하였으며, 시료의 주입량은 400 μL, 컬럼 온도는 35°C로 설정하여 분석하였다(Table 1). 또한, 비오틴 이동상 조건에서 전처리 컬럼 이동상은 0.01 M 인산이수소칼륨 용액을 500 μL/min의 유속으로 사용하였고, 분석 컬럼 이동상은 0.01 M 인산이수소칼륨 용액:메탄올(90:10, v/v) 혼합 용액을 100 μL/min의 유속으로 사용하였으며, 시료의 주입량은 200 μL, 컬럼 온도는 40°C로 설정하여 분석하였다(Table 2).

분석법 유효성 검증

비타민B_{12}와 비오틴 분석법에 대한 유효성을 검증하기 위하여 AOAC 시험법 검증 가이드라인에서 제시하는 방법을

Table 1. HPLC analysis condition for vitamin B_{12} analysis

Parameters	Conditions
Column	Pre-separation column: Capcell Pak MF C_8 (Shiseido 4.6×150 mm, 5 μm) Focusing column: Capcell pak MG C_{18} (Shiseido 2.0×35 mm, 5 μm) Analytical column: Capcell pak UG C_{18} (Shiseido 1.5×250 mm, 5 μm)
Oven temperature	Focusing column: room temperature Pre-separation/analytical column: 35°C
Flow rate	Pre-separation column: 500 μL/min Focusing/analytical column: 120 μL/min
Injection volume	400 μL
Mobile phase	Pre-separation column: 5 mM KH_2PO_4 Focusing/analytical column: 5 mM KH_2PO_4:Methanol (80:20, v/v)
Wavelength	550 nm

Table 2. HPLC analysis condition for biotin analysis

Parameters	Conditions
Column	Pre-separation column: Capcell Pak MF C_8 (Shiseido 4.6×150 mm, 5 μm) Focusing column: Capcell pak C_{18} UG120V (Shiseido 2.0×35 mm, 5 μm) Analytical column: Capcell pak C_{18} UG120V (Shiseido 1.5×250 mm, 5 μm)
Oven temperature	Focusing column: room temperature Pre-separation/analytical column: 40°C
Flow rate	Pre-separation column: 500 μL/min Focusing/analytical column: 100 μL/min
Injection volume	200 μL
Mobile phase	Pre-separation column: 0.01 M KH_2PO_4 Focusing/analytical column: 0.01 M KH_2PO_4:Methanol (90:10, v/v)
Wavelength	200 nm

참고하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection)와 정량한계(limit of quantification), 정확성(accuracy), 정밀성(precision)을 구하였다. 특이성을 확인하기 위해 비타민B_{12}와 비오틴 표준용액의 크로마토그램에서 확인된 피크와 스펙트럼을 시험용액과 비교하여 peak purity를 확인하였고, 직선성은 비타민B_{12}와 비오틴의 총 8개 농도 표준용액을 HPLC로 측정하여 얻은 각각의 피크 면적으로부터 검량선을 작성하였다. 정확성은 표준물질을 첨가(spiking)하여 회수율을 구하였으며, 정밀성은 시료량을 달리하여 반복성(repeatability), 실험실간 비교실험을 통한 재현성(reproducibility)을 relative standard deviation(RSD, %)으로 나타내었다.

유통 제품 중 적용성 확인

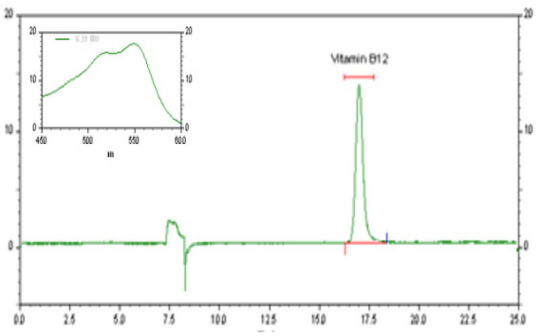
분석법 검증을 통하여 확립된 방법으로 시중에 유통 중인 특수용도식품에 대한 비타민B_{12}(7 품목)와 비오틴 함량(8 품목)을 확인하였다. 고속액체크로마토그래프에 주입하여 얻어진 크로마토그램에서 검출된 피크 면적을 구하여 표준 검량곡선의 회귀방정식에 대입하고 각각의 비타민B_{12}와 비오틴 함량을 구한 다음 제품의 표시함량과 비교 검토하였다.

Results and Discussion

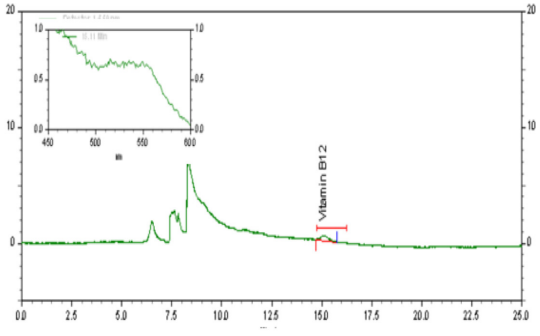
시험법 검토 및 확립

비타민B_{12}와 비오틴의 공인시험법은 각각 5 mM 인산완충용액과 0.01 M 인산이수소칼륨 용액을 가하여 추출한 후 추출액을 육방전환밸브시스템이 설치된 액체크로마토그래프로 분석하는 방법이다. 본 시험법으로 비타민B_{12}와 비오틴을 분석한 결과 표준용액과 시험용액에서 각각의 머무름 시간이 일치하지 않고, 비타민B_{12}의 파장 550 nm와 비오틴의 파장 200 nm 외 다른 스펙트럼의 간섭을 확인하였다. 따라서 비타민B_{12}는 시험용액 내 피크의 분리도를 높이고 550 nm 외 스펙트럼의 간섭을 피하기 위하여 전처리 조건을 검토하였다. AOAC 2011.09 시험법과 Jang 등[21]의 논문에서는 비타민B_{12}의 시아노코발아민에 특이적 결합을 하는 면역친화성컬럼(immunoaffinity column)을 이용하여 정제과정을 거친 후 농축한 비타민B_{12}를 분석하는 방법을 제안하였다[20,21]. 이 제안된 방법에 따라 균질화한 시료에 시안화나트륨 용액과 초산나트륨 완충액을 이용하여 코발아민류를 추출하고 시아노코발아민으로 전환시킨 뒤 추출액을 시아노코발아민과 선택적으로 결합하여 특이적 항체를 가지고 있는 면역친화성컬럼에 통과시켜 시아노코발아민을 컬럼 내에 머무르게 하였다. 이후 메탄올을 이용하여 시아노코발아민을 유출시킨 후 육방전환밸브시스템이 설치된 액체크로마토그래프를 이용하여 분석하였다.

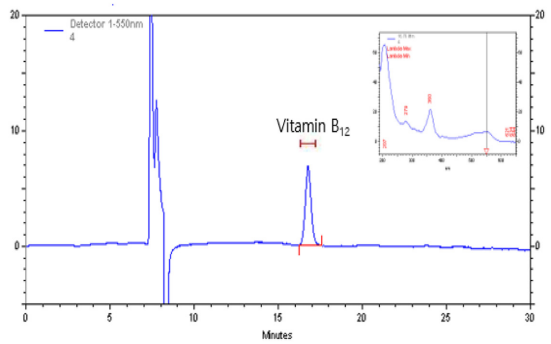
비오틴은 특이성 확보와 피크의 분리도를 향상시킬 수 있도록 전처리와 기기분석 조건을 검토하였다. AOAC 2016.02 시험법과 Chen 등[23]의 논문에서 식품 중 비오틴은 유리된 형태 외에 비오틴-아비딘(biotin-avidin)과 같이 단백질과 결합한 형태로 존재하여 분석시 비오틴의 추출이 까다롭고 일반적인 정제방법으로 사용되는 liquid-liquid extraction(LLE), solid-phase extraction(SPE) 등은 비 특이적 결합에 기반하며 분석대상이 아닌 성분이 추출될 수 있어 면역친화성컬럼의 항체반응을 통해서 분석물질과 특이적으로 결합하여 그 외의 성분들을 효과적으로 제거하고 비오틴을 정제 및 농축하여 분석하는 방법을 제안하였다[22,23]. 이외에 공인시험법 기기분석 조건에서 사용되는 전처리 컬럼은 양이온교환 컬럼으로 식품 중 비오틴을 실제 분석한 결과 분리능이 미흡하였다. 공인시험법 중 비오틴 이외에 육방전환밸브시스템을 이용하여 분석하는 비타민B_{12}와 비타민D의 경우 모두 전처리 컬럼으로 C_8 충진제를 사용하고 있어 이에 따라 비오틴의 전처리 컬럼도 C_8 컬럼으로 개선하였다. 또한, 공인시험법 상의 분석 컬럼 이동상 조건은 0.01 M 인산이수소칼륨 용액과 메탄올의 비율이 80:20으로 분석하였을 때, 비오틴의 피크가 negative peak 형태의 베이스라인과 근접하게 검출되어 이동상 조건은 0.01 M 인산이수소칼륨 용액과 메탄올의 비율을 90:10으로 조절하여 개선하였다. 이와 같이 식품 중 비타민B_{12}와 비오틴의 전처리와 기기분석 조건을 개선하여 각각의 표준용액과 시험용액에서 피크 머무름 시간이 일치하며, 비타민B_{12}의 파장 500 nm, 비오틴의



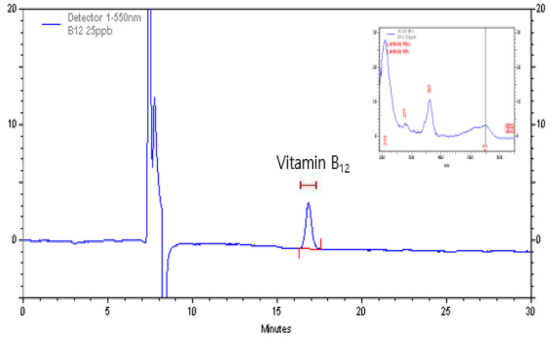
(A) Official method of vitamin B_{12} standard solution



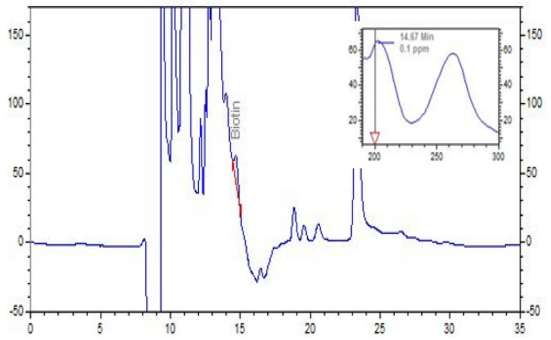
(B) Official method of vitamin B_{12} sample



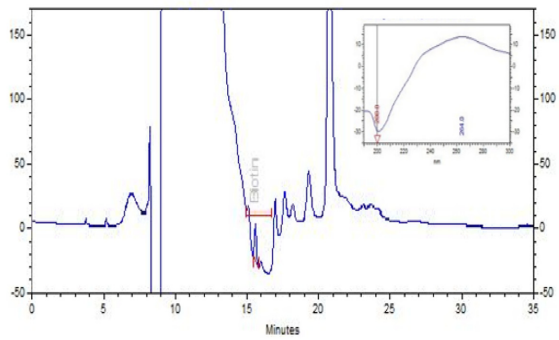
(C) Improvement method of vitamin B_{12} standard solution



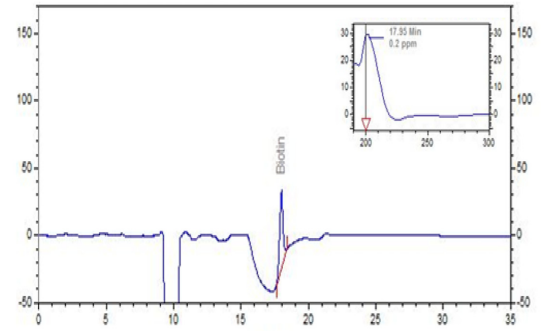
(D) Improvement method of vitamin B_{12} sample



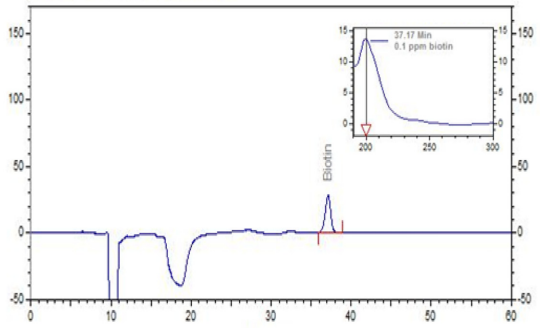
(E) Official method of biotin standard solution (used SCX column, Mobile phase : 0.01 M KH_2PO_4 : Methanol, 80 : 20, v/v)



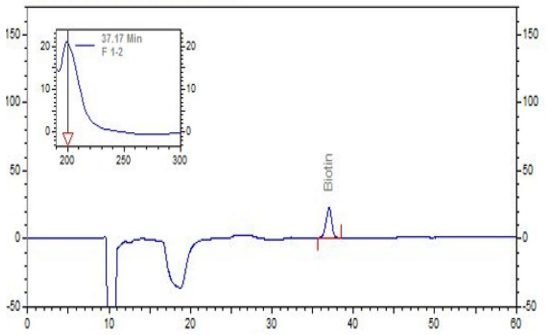
(F) Official method of biotin sample (used SCX column, Mobile phase : 0.01 M KH_2PO_4 : Methanol, 80 : 20, v/v)



(G) Comparison method of biotin standard solution (used C_8 column, Mobile phase : 0.01 M KH_2PO_4 : Methanol, 80 : 20, v/v)



(H) Improvement method of biotin standard solution (used C_8 column, Mobile phase : 0.01 M KH_2PO_4 : Methanol, 90 : 10, v/v)



(I) Improvement method of biotin sample(used C_8 column, Mobile phase : 0.01 M KH_2PO_4 : Methanol, 90 : 10, v/v)

Fig. 1. Comparison of analysis results by pretreatment and column, mobile phase rate. HPLC chromatogram (A) Official method of vitamin B_{12} standard solution, (B) Official method of vitamin B_{12} sample, (C) Improvement method of vitamin B_{12} standard solution, (D) Improvement method of vitamin B_{12} sample, (E) Official method of biotin standard solution(used SCX column, Mobile phase:0.01 M KH_2PO_4:Methanol, 80:20, v/v), (F) Official method of biotin sample (used SCX column, Mobile phase:0.01 M KH_2PO_4:Methanol, 80:20, v/v), (G) Comparison method of biotin standard solution(used C_8 column, Mobile phase:0.01 M KH_2PO_4:Methanol, 80:20, v/v), (H) Improvement method of biotin standard solution(used C_8 column, Mobile phase:0.01 M KH_2PO_4:Methanol, 90:10, v/v), (I) Improvement method of biotin sample(used C_8 column, Mobile phase:0.01 M KH_2PO_4:Methanol, 90:10, v/v).

파장 200 nm 외 다른 스펙트럼 간섭이 없음을 확인하였고, 개선된 시험법을 확립하였다(Fig. 1).

분석법 검증

비타민B_{12}와 비오틴 각각의 표준용액과 시험용액에서 분리도 및 머무름 시간을 확인하였다. 표준용액과 시험용액을 분석한 크로마토그램에서 동일한 시간대로 단일 피크가 형성됨을 확인하였고, PDA 검출파장을 통해 spectrum 패턴이 표준용액과 시험용액에서 일치함으로 특이성을 확인할 수 있었다(Fig. 2, 3). 비타민B_{12} 표준용액(100 μg/mL)을 증류수로 희석하여 총 8개 농도 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ng/mL로, 비오틴 표준용액(100 μg/mL)을 0.01 M 인산이수소칼륨 용액으로 희석하여 총 8개 농도 10, 25. 50, 100, 200, 300, 400, 500 ng/mL로 3반복 실험을 수행하여 직선성을 검토한 결과 상관계수(R^2)값이 0.999 이상으로 확인되었다(Fig. 4). 농도별 표준용액을 3회 분석한 검량선의 기울기 및 표준편차에 근거하여 3.3배를 곱한 값에 기울기 값으로 나눈 것을 검출한계(LOD = 3.3×δ/S), 10배를 곱한 값에 기

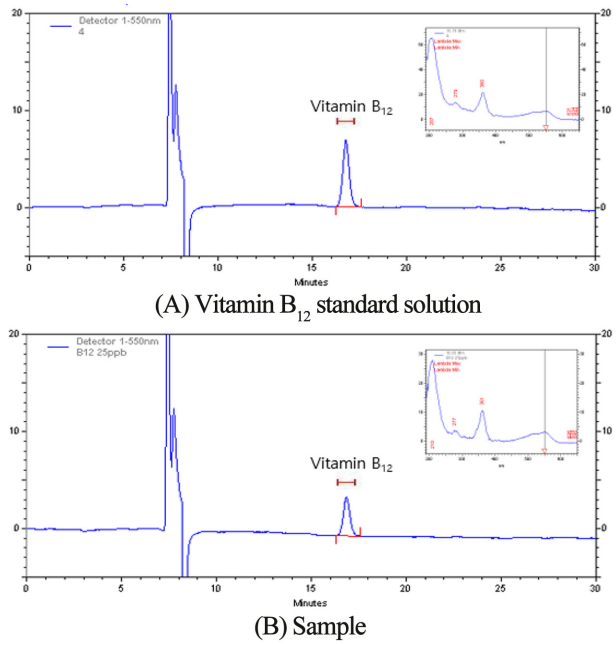


Fig. 2. HPLC chromatogram and spectrum of vitamin B_{12} standard solution(A) and sample (B).

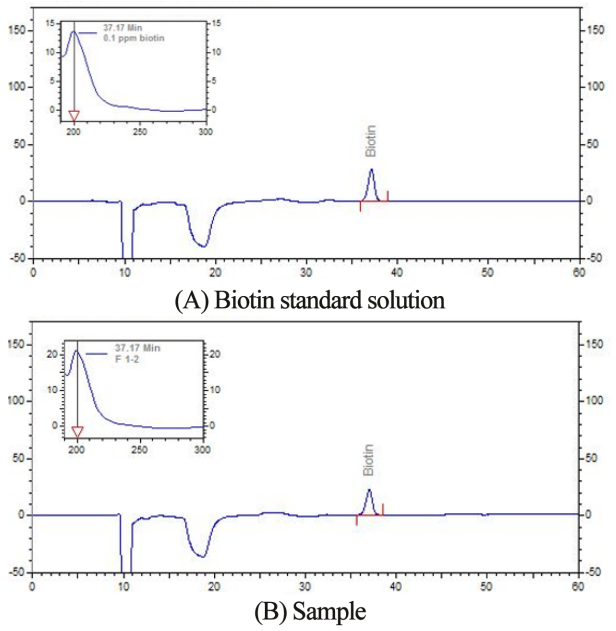


Fig. 3. HPLC chromatogram and spectrum of biotin standard solution(A) and sample (B).

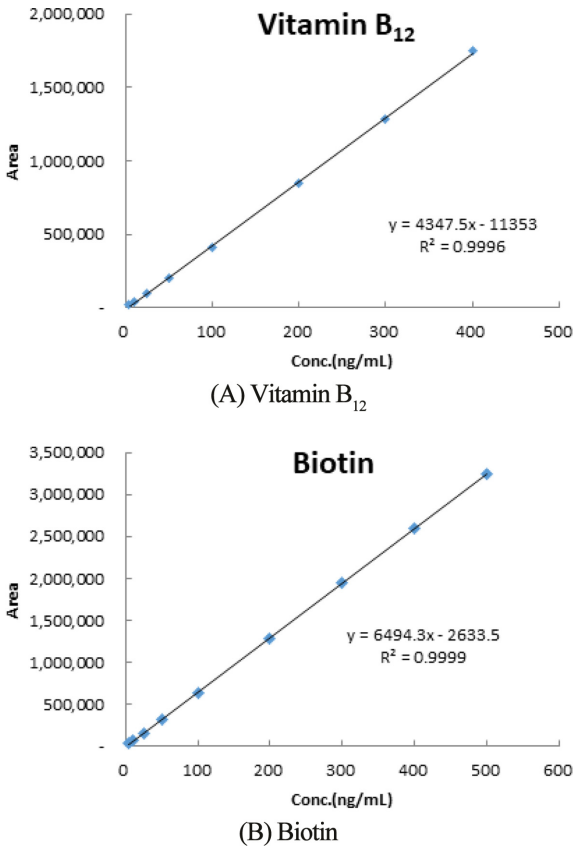


Fig. 4. Calibration curves of vitamin B_{12} and biotin.

Table 3. The detection limits(LOD) and quantitative limits(LOQ) of HPLC analysis for vitamin B_{12} and biotin

Compound	Concentration range (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Vitamin B_{12}	5-400	1	4
Biotin	10-500	2	5

LOD: 3.3×δ/S.
LOQ: 10×δ/S.
(δ: the standard deviation of the response, S: the slope of the calibration curve).

울기 값으로 나눈 것을 정량한계(LOQ=10×δ/S)로 하였으며, 비타민B_{12}의 검출한계는 1 ng/mL, 정량한계는 4 ng/mL이고, 비오틴의 검출한계는 2 ng/mL, 정량한계는 5 ng/mL로 나타났다(Table 3). 국제인증시료 NIST사 표준참고물질(SRM) 1849a (infant formula)를 이용하여 정확성을 확인한 결과, 비타민B_{12}와 비오틴 각각에 대한 회수율은 103.1%, 103.5%, 상대표준편차는 2.7%, 3.8%로 나타났다(Table 4).

정밀도는 시료 채취량에 따른 일내 반복성(repeatability)과 실험실간 재현성(reproducibility)으로 확인하였고, 표본시료로는 국제인증시료 NIST사 표준참고물질(SRM) 1849a (infant formula)를 선정하였다. 반복성은 시료량을 다르게 취하여 각각 5회 반복 분석하고 측정값에 대한 상대표준편차를 이용하여 확인하였다. 비타민B_{12}는 시료량을 각각 0.625 g, 1.25 g, 2.5 g을 취하여 분석한 결과 측정값에 대한 상대표준편차가 2.7-3.7%로 확인하였고, 비오틴은 시료량을 각각 0.025 g, 0.05 g, 0.1 g을 취하여 분석한 결과 측정값에 대한 상대표준편차가 2.5-3.8%로 확인하였다(Table 5). 재현성은 세 실험실에서 각각 5회 반복 분석하고 측정값에 대한 상대표준편차를 이용하여 확인하였다. 비타민B_{12}의 상대표준편차는 8.2%로 확인하였고, 비오틴의 상대표준편차는 10.4%로 확인하였다(Table 6).

분석법 적용성 검토

검토된 시험법으로 비타민B_{12}와 비오틴의 함유량에 대해 국내 유통 중인 특수용도식품 중 영아용조제식, 성장기용조제식, 영유아용곡류조제식, 기타영유아식, 환자용식품, 선천성대사질환자용, 유단백알레르기영유아용, 영유아용특수조제식품, 임신수유부용식품 등 총 9종 제품의 적

Table 4. Accuracy of HPLC analysis for vitamin B_{12} and biotin (n=5)

Compound	Accuracy				
	SRM[1]	Certification	Mean (μg/100 g)	Recovery (%)	RSD (%)
Vitamin B_{12}	1849a	4.8 μg/100 g	4.9	103.1	2.7
Biotin		199.0 μg/100 g	206.0	103.5	3.8

[1] SRM: Standard reference material.

Table 5. Repeatability of HPLC analysis for vitamin B_{12} and biotin (n=5)

Treatment	Vitamin B_{12}			Biotin		
	Sample contents (g)			Sample contents (g)		
	0.625	1.25	2.5	0.025	0.05	0.1
1	5.9	5.4	5.0	218.2	173.8	189.8
2	5.4	5.4	4.8	203.2	176.4	188.6
3	5.5	5.2	5.1	201.9	182.1	190.4
4	5.7	5.0	5.1	208.2	186.6	179.4
5	5.8	5.3	4.9	198.0	187.9	183.5
Measured mean (μg/100 g)	5.7	5.3	5.0	205.9	181.8	186.4
RSD[1] (%)	3.5	3.7	2.7	3.8	3.7	2.5

[1] RSD: Relative standard deviation.

Table 6. Inter-laboratory reproducibility of HPLC analysis for vitamin B_{12} and biotin (n=5)

Treatment	Vitamin B_{12}			Biotin		
	A	B	C	A	B	C
1	5.3	4.4	5.4	257.5	199.7	218.2
2	4.6	4.5	5.4	225.8	195.6	203.2
3	4.8	4.3	5.2	240.4	197.3	201.8
4	4.9	4.6	5.0	243.6	199.7	208.2
5	5.1	4.4	5.3	247.4	187.4	198.0
Measured mean (μg/100 g)		4.9			214.9	
RSD[1] (%)		8.2			10.4	

[1] RSD: Relative standard deviation.

Table 7. Application of HPLC analysis for vitamin B_{12} (n=3)

Sample	Vitamin B_{12}				
	Labeled (μg/100 kcal)	Contents (μg/100 kcal)	RSD[1] (%)	Specifications (μg/100 kcal)	C/L[2] (%)
Infant formulas	0.41	1.21	1.9	More than 0.1	298.5
Follow-up formulas	0.41	1.85	2.0	More than 0.15	458.6
Cereal formulas for infants/young children	0.49	1.88	0.8	-	385.2
Foods for patients	1.20	1.34	0.6	-	111.6
Foods for patients with congenital metabolic disorders	1.20	2.54	0.4	Not less than the indicated amount	210.9
Special formulas for infants/young children	0.41	2.58	1.2	Not less than the indicated amount	631.8
Foods for pregnant/lactating women	1.00	3.66	3.0	-	363.6

[1] RSD: Relative standard deviation.
[2] C/L (Contents/Labeled×100).

Table 8. Application of HPLC analysis for biotin (n=3)

Sample	Biotin				
	Labeled (μg/100 kcal)	Contents (μg/100 kcal)	RSD[1] (%)	Specifications (μg/100 kcal)	C/L[2] (%)
Infant formulas	3.62	3.41	2.1	More than 0.15	94.1
Follow-up formulas	4.06	5.69	0.3	More than 0.15	140.2
Cereal formulas for infants/young children	3.66	7.03	1.3	-	191.9
Other foods for infants/young children	1.56	3.33	0.3	-	213.1
Foods for patients	3.00	2.90	0.5	-	96.5
Foods for patients with congenital metabolic disorders	3.00	4.68	1.2	Not less than the indicated amount	155.6
Formulas for infants/young children with milk protein allergy	3.25	4.81	0.3	Not less than the indicated amount	147.9
Special formulas for infants/young children	5.12	5.87	0.2	Not less than the indicated amount	114.8

[1] RSD: Relative standard deviation.
[2] C/L (Contents/Labeled×100).

용성 검토를 수행하였다. 비타민 B_{12}는 분석 결과 값으로 표시 함량 대비 111.6-631.8%가 함유되어 있고(Table 7), 비오틴은 94.1-213.1%가 함유되어 있었으며(Table 8), 대부분 표시함량보다 충분히 많은 양을 함유하고 표시기준을 모두 충족시키는 값으로 적합함을 확인하였다.

Acknowledgement

본 연구는 2019년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(19161미래안055)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 특수용도식품에 함유되어 있는 비타민B_{12}와 비오틴에 대하여 식품의 복잡한 매질 특성에 특이성을 확보할 수 있도록 현행 식품공전 시험법을 개선하고자 하였다. 식품공전에서 비타민B_{12}와 비오틴의 시험법에 항체반응을 통해서 분석물질과 특이적으로 결합하여 그 외의 성분들을 효과적으로 제거할 수 있는 면역친화성 컬럼을 도입하여 시험용액을 정제 및 농축함으로써 전처리 과정을 개선하였다. 식품 등 시험법 마련 표준절차에 관한 가이드라인에 따라 밸리데이션(특이성, 직선성, 검출한계, 정량

한계, 정확도, 정밀도)을 수행하고 개선된 시험법을 이용하여 유통 중인 특수용도식품의 대상 품목에 대해 시험법 적용여부를 확인하였다. 본 연구사업의 수행으로 시험·검사의 정확성을 증대시켜 특수용도식품 품질관리에 대한 신뢰성을 더 높일 것으로 본다.

References

1. Herbert, V., Vitamin B_{12}: plant sources, requirements, and assay. *Am. J. Clin. Nutr.,* **48**(3 Suppl), 852-858 (1988).
2. Stabler, S.P., Allen, R. H., Vitamin B_{12} deficiency as a worldwide problem. *Annu. Rev. Nutr.,* **24**, 299-326 (2004).
3. Baik, H.W., Russell, R.M., Vitamin B_{12} deficiency in the elderly. *Annu. Rev. Nutr.,* **19**, 357-377 (1999).
4. Houston, D.K., Johnson, M.A., Nozza, R.J., Gunter, E.W., Shea, K.J., Cutler, G.M., Edmonds, J.T., Age-related hearing loss, vitamin B_{12}, and folate in elderly women. *Am. J. Clin. Nutr.,* **69(3)**, 564-571 (1999).
5. Setola, E., Monti, L.D., Galluccio, E., Palloshi, A., Fragasso, G., Paroni, R., Magni, F., Sandoli, E.P., Lucotti, P., Costa, S., Fermo, I., Galli-Kienle, M., Origgi, A., Margonato, A., Piatti, P., Insulin resistance and endothelial function are improved after folate and vitamin B_{12} therapy in patients with metabolic syndrome: relationship between homocysteine levels and hyperinsulinemia. *Eur. J. Endocrinol.,* **151(4)**, 483-489 (2004).
6. He, K., Merchant, A., Rimm, E.B., Rosner, B.A., Stampfer, M.J., Willett, W.C., Ascherio, A., Folate, vitamin B_6, and B_{12} intakes in relation to risk of stroke among men. *Stroke,* **35(1)**, 169-174 (2004).
7. Ng, T.P., Feng, L., Niti, M., Kua, E.H., Yap, K.B., Folate, vitamin B_{12}, homocysteine, and depressive symptoms in a population sample of older Chinese adults. *J. Am. Geriatr. Soc.,* **57(5)**, 871-876 (2009).
8. Bryan, J., Calvaresi, E., Hughes, D., Short-term folate, vitamin B_{12} or vitamin B_6 supplementation slightly affects memory performance but not mood in women of various ages. *J. Nutr.,* **132(6)**, 1345-1356 (2002).
9. Gong, Z., Holly, E.A., Bracci, P.M., Intake of folate, vitamins B_6, B_{12} and methionine and risk of pancreatic cancer in a large population-based case-control study. *Cancer Causes Control,* **20(8)**, 1317-1325 (2009).
10. Engelborghs, S., Vloeberghs, E., Maertens, K., Marien, P., Somers, N., Symons, A., Clement, F., Ketels, V., Saerens, J., Goeman, J., Pickut, B.A., Vandevivere, J., De Deyn, P.P., Correlations between cognitive, behavioural and psychological findings and levels of vitamin B_{12} and folate in patients with dementia. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.,* **19(4)**, 365-370 (2004).
11. Prodan, C.I., Cowan, L.D., Stoner, J.A., Ross, E.D., Cumulative incidence of vitamin B_{12} deficiency in patients with Alzheimer disease. *J. Neurol. Sci.,* **284(1-2)**, 144-148 (2009).
12. Tangney, C.C., Aggarwal, N.T., Li, H., Wilson, R.S., Decarli, C., Evans, D.A., Morris, M.C., Vitamin B_{12}, cognition, and brain MRI measures: a cross-sectional examination. *Neurology,* **77(13)**, 1276-1282 (2011).
13. Edvardsson, B., Persson, S., Chorea associated with vitamin B_{12} deficiency. *Eur. J. Neurol.,* **18(10)**, e138-e139 (2011).
14. Herbert, V., Staging vitamin B_{12} (cobalamin) status in vegetarians. *Am. J. Clin. Nutr.,* **59**(5 Suppl), 1213S-1222S (1994).
15. Kwak, C.S., Hwang, J.Y., Watanabe, F., Park, S.C., Vitamin B_{12} contents in some Korean fermented foods and edible seaweeds. *Korean J. Nutr.,* **41(5)**, 439-447 (2008).
16. Wood, H.G., Barden, R.E., Biotin enzymes. *Annu. Rev. Biochem.,* **46(1)**, 385-413 (1977).
17. Zempleni, J., Mock, D., Biotin biochemistry and human requirements. *J. Nutr. Biochem.,* **10(3)**, 128-138 (1999).
18. Pacheco-Alvarez, D., Solorzano-Vargas, R.S., Del Rio, A.L., Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch. Med. Res.,* **33(5)**, 439-447 (2002).
19. Kwak, B.M., Ahn, J.H., Chang, C.H., Simultaneous determination of vitamin D_3 and K_1 in infant formula by column-switching high performance liquid chromatography with UV detection. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **37(6)**, 1024-1027 (2005).
20. Ursula, K., Katharina, D., Guenther, R., Determination of vitamin B_{12} in infant formula and adult nutritionals using HPLC after purification on an immunoaffinity column: first action 2011.09. *J. AOAC Int.,* **95(4)**, 1-4 (2012).
21. Jang, D.E., Choung, M.G., Chun, J.Y., Immunoaffinity-HPLC/DAD assay and validaion for Vitamin B_{12} in snacks and creals. *J. Agric. Life Sci.,* **48(6)**, 351-364 (2014).
22. George, J., Ranjani, D., Elaine, C.M., David, L., Determination of biotin by liquid chromatography coupled with immunoaffinity column clean up extraction: single-laboratory validation, first action 2016.02. *J. AOAC Int.,* **99(4)**, 1110-1112 (2016).
23. Chen, W.Y., Method validation and analysis of biotin in food by immunoaffinity assay. MS thesis, University of Kyungsung, Busan, Korea (2019).