pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 31, No. 5, pp. 327~334 (2016)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2016.31.5.327

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

LC-MS/MS를 이용한 조제유류 중 비오틴 함량 분석법 연구

신용운 · 이화정 · 함현숙 · 신성철[1] · 강윤정 · 황경미 · 권용관 · 서일원 · 오재명 · 구용의*
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀,
[1]부산지방식품의약품안전청 수입식품분석과

Establishment of Biotin Analysis by LC-MS/MS Method in Infant Milk Formulas

Yong Woon Shin, Hwa Jung Lee, Hyeon Suk Ham, Sung Cheol Shin[1], Yoon Jung Kang, Kyung Mi Hwang, Yong Kwan Kwon, Il Won Seo, Jae Myoung Oh, and Yong Eui Koo*
Nutrition and Functional Food Research Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
[1]Imported Food Analysis Division, Center for Food and Drug analysis, Busan Regional Ministry of Food and Drug Safety, Busan 48562, Korea
(Received July 25, 2016/Revised August 13, 2016/Accepted September 20, 2016)

ABSTRACT - This study was conducted to establish the standard method for the contents of biotin in milk formulas. To optimize the method, we compared several conditions for liquid extraction, purification and instrumental measurement using spiked samples and certified reference material (NIST SRM 1849a) as test materials. LC-MS/MS method for biotin was established using C_{18} column and binary gradient 0.1% formic acid/acetonitrile, 0.1% formic acid/water mobile phase is applied for biotin. Product-ion traces at m/z 245.1 → 227.1, 166.1 are used for quantitative analysis of biotin. The linearity was over R^2 = 0.999 in range of 5~60 μg/L. For purification, chloroform was used as a solvent for eliminating lipids in milk formula. The linearity was over 0.999 in range of 5~60 ng/mL. The detection limit and quantification limit were 0.10, 0.31 ng/mL. The accuracy and precision of LC-MS/MS method using CRM were 103%, 2.5% respectively. Optimized methods were applied in sample analysis to verify the reliability. All the tested milk formulas were acceptable contents of biotin compared with component specification and standards for nutrition labeling. The standard operating procedures were prepared for biotin to provide experimental information and to strengthen the management of nutrient in milk formula.

Key words : biotin, LC-MS/MS, milk formula, method validation

비오틴은 황을 함유한 수용성비타민으로 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[1)].

비오틴의 결핍은 영아나 성장기 아동에서는 성장 저하, 성인의 경우 피부염, 결막염, 탈모증, 무기력증, 우울증 등을 가져오기도 하지만[2)] 체내 비오틴 회로를 통해서 재사용될 수 있기 때문에 단순 결핍 증상은 거의 나타나지 않는다[3)].

비오틴은 한국인을 대상으로 한 연구 자료가 부족하여 미국, 캐나다의 충분섭취량 설정방법을 토대로 모유영양아의 자료로부터 충분섭취량을 추정하여 제시하고 있으며, 2015년 한국인의 1일 비오틴 섭취기준은 0~5개월 영아는

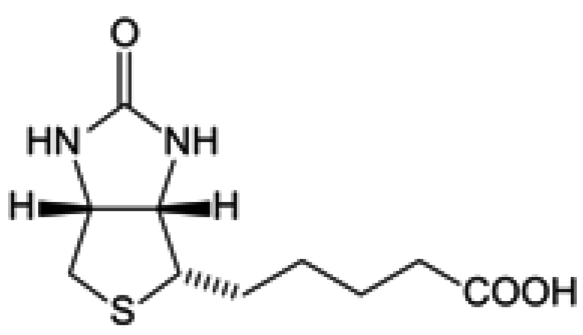

Fig. 1. Structure of biotin.

*Correspondence to: Yong Eui Koo, Nutrition and Functional Food Research Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety
Tel: 82-43-719-4401, Fax: 82-43-719-4400
E-mail: kye2020@korea.kr

Table 1. Dietary Reference Intakes (DRIs) in Korean : Biotin

Age		Adequate intake (μg/day)
Infant	0~5 (months)	5
	6~11	7
child	1~2 (years)	9
	3~5	11
6~8		15
9~11		20
12~14		25
15~18		30
19~29		30
30~49		30
50~64		30
65~74		30
≥ 75		30
Pregnancy		+0
Breast feeding		+5

모유 중 비오틴의 양에 근거하여 5 μg, 6~11개월의 영아 및 1~2세 유아, 3~5세의 어린이는 0~5개월 영아의 충분섭취량에 각 연령의 체중으로 보정하여 각각 7, 9, 11 μg으로 설정하고 있다. 15세 이상의 청소년과 성인의 경우는 1일 30 μg을 충분섭취량으로 설정하고 있으며 수유부의 경우 5 μg을 부가하여 설정하고 있다[4](Table 1).

영유아를 제외한 대부분의 연령층은 난황, 간, 땅콩, 치즈와 같은 다양한 식품 및 건강기능식품 등을 통하여 비오틴을 섭취하고 있으나 영유아의 경우 모유 또는 조제유류만을 통하여 비오틴을 섭취하고 있어 조제유류에 대한 철저한 품질관리가 요구되고 있다. 조제유류는 원유 또는 유가공품을 원료로 하여 모유의 성분과 유사하게 가공한 모유대용품을 말하며, 조제분유, 조제우유, 성장기용조제분유, 성장기용조제우유, 기타조제분유, 기타조제우유 등 6개 유형으로 나뉘어 「축산물의 가공기준 및 성분규격」에 의해 관리되고 있다.

CODEX 및 미국, 영국, 호주 등에서는 영유아식을 대상의 개월 수에 따라 infant formula와 follow-up formula로 구분지어 규격을 설정하고 있으며, 원료에 따라 milk base와 soy base로 구분 되어 관리되고 있으나 우리나라의 경우 미국, 호주 등과는 달리 조제유류에 대한 비오틴 규격이 설정되어 있지 않아 규격 신설을 위한 분석법 마련이 필요한 실정이다[5].

조제분유와 달리 영아용조제식과 성장기용 조제식은 분리대두단백 또는 기타의 식품에서 분리한 단백질을 단백원으로 하여 모유 또는 조제유의 대용으로 가공한 것을 말하는데[6] 식품공전에서 비오틴의 경우 1.5 μg/100 kcal 이상으로 규격이 설정되어 관리되고 있다.

비오틴 함량 분석을 위한 국내 공인 분석법으로 식품공전과 건강기능식품공전에 미생물에 의한 분석법과 육방전환밸브시스템을 이용한 HPLC 정량분석법이 수록되어 있으며. EN (European Norm) 등 국제공인 분석법에는 비오틴을 효소 처리하여 추출한 후 fluorescein 5-isothiocyanate와 post-column binding 시켜 형광검출기를 이용한 HPLC 정량분석법이 채택되어 사용되고 있다[7]. 공인 분석법 이외 시료 중의 비오틴을 Br-MDMC (4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin)를 이용하여 유도체화 후 HPLC-FLD로 정량하는 분석법[8-9]과 ammonium acetate 수용액으로 추출하여 UPLC-MS/MS로 정량하는 분석법[10], 바이오센서를 이용한 생물학적 분석법[11-12], 2-NPH·HCl (2-nitrophenylhydrazine hydrochloride)을 이용한 유도체화 후 HPLC-UV 및 LC-MS-ESI를 이용한 분석법[13], LC-ELSD를 이용한 분석법[14] 및 HPLC/avidin binding을 이용한 분석법[15] 들이 보고되고 있다.

식품공전에서 비오틴 분석법으로 사용하고 있는 육방전환밸브시스템 분석법을 조제분유에 적용하는데 있어 10 μg/

Table 2. Domestic and international standard milk formulas

Nutrients		Korea[1]		CODEX[2]			U.S.A[3]		EU[4]		Australia & New Zealand[5]		
		Min.	Max.	Min.	Max.	GUL	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	GUL
		(/100 Kcal)		(/100 Kcal)			(/100 Kcal)		(/100 Kcal)		(/100 Kcal)		
Biotin (μg)	infant formula	-	-	1.5	-	10	1.5[6]	-	1.5	-	1.5	-	11.3
	follow-up formula	-	-	1.5	-	-	1.5[6]	-	1.5	-	1.5	-	11.3

[1]Processing standards and ingredient specifications for livestock products. 2014
[2]CODEX Stan 72-1981_Infant formula, CODEX Stan 156-1987_follow up formula
[3]21 CFR 107.100. 2014
[4]91/321/EEC. 199
[5]Standard 2.9.1. 2003.
[6]Required only for non-milk based infant formulas

L의 농도에서 정량에 필요한 S/N비 확보가 어렵고 건강기능식품공전의 미생물학적 분석법은 분석시간에 많은 시간이 소요되는 어려움이 있었다. 따라서 본 연구를 통해 보다 선택성과 분리능이 뛰어난 LC-MS/MS를 이용한 조제유류의 비오틴 공인 분석법을 마련하고자 식품공전 및 논문 등을 참고하여 분석법을 확립하고 AOAC에서 제시하는 시험법 검증 가이드라인을 참고하여 밸리데이션을 수행한 후 시중에 유통 중인 조제유류에 대한 적용성을 확인하여 분석법을 검증하였다.

Materials and Methods

실험재료

분석법 적용성 확인을 위해 조제유류의 품목제조보고서(1997년~2015년)와 수입신고서(2013년~2015년)를 확인하였다. 국내에 품목제조 보고된 제품은 총 309건이었으며 수입 신고된 제품은 총 59건으로 조사되었다. 이중 생산중단된 제품 및 수출용 제품, 품목제조 보고가 중복된 것을 제외한 나머지 제품에 대해서 국내 유가공업체 홈페이지 및 인터넷 판매 사이트를 통하여 조제분유(39건), 조제우유(3건), 성장기용조제분유(23건) 등 조제유류 65건을 구매하였다. 시료는 전처리 후 24시간 이내에 분석을 실시함을 원칙으로 하였다.

표준품 및 시약

비오틴 표준품은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다. 시료의 전처리에 사용된 potassium dihydrogen phosphate, formic acid는 Sigma-Aldrich사 (St, Louis, Mo, USA), chloroform, acetonitrile은 Merck사 (White house Station, NJ, USA)로부터 HPLC 급으로 구입하여 사용하였다.

표준용액 및 시액의 조제

비오틴 표준품 10 mg을 100 mL 갈색정용플라스크에 정밀하게 취하여 100 μg/mL의 용액이 되도록 증류수로 표선까지 정용하여 이를 표준원액으로 하였다. 비오틴 표준원액은 4°C이하의 암소에 보관하였으며, 검량곡선을 위한 비오틴 표준용액은 5~60 ng/mL가 되도록 0.01 M 인산이수소칼륨용액(pH 4.8)으로 희석하여 사용하였다.

시험용액의 조제

균질화한 시료를 약 5 g (액상은 10 g)을 정밀히 칭량하여 0.01 M 인산이수소칼륨용액(pH 4.8)을 넣어 50 mL로 정용하였다. 초음파로 30분 간 추출 후, 원심분리관으로 옮겨 10분 간 격렬히 흔들어주었다. 새 원심분리관에 추출액 10 mL을 취하고 동량의 클로로포름을 첨가 후 10분 간 격렬히 흔들어 잘 섞은 용액을 0°C, 9,000 rpm에서 30분 간 원심분리한 후 상층액을 취하여 0.2 μm 나일론 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

Table 3. LC-MS/MS operation conditions for the biotin

Instrument	Parameter	Condition		
UPLC	Column	UPLC BEH C_{18}(2.1 × 100 mm, 1.7 μm)		
	Mobile phase	A : 0.1% formic acid in water B : 0.1% formic acid in acetonitrile		
	Gradient program	Time	A(%)	B(%)
		0	100	0
		5.0	80	20
		5.2	0	100
		6.2	0	100
		7.0	100	0
		11.0	100	0
	Flow rate	0.2 mL/min		
	Column temp.	40°C		
	Inj. vol.	2 μl		
MS/MS	Ionization mode	ESI positive		
	Capillary voltage	3.80 kV		
	Cone voltage	30 V		
	Desolvation Temp.	500°C		
	Desolvation gas flow	1000 L/h		
	Cone gas flow	150 L/h		
MRM	Parent ion	245.15		
	Daughter ion (Collision energy)	227.1 (20 V) 166.1 (13 V)		

LC-MS/MS 분석조건

비오틴 분석을 위한 액체크로마토그래프-질량분석기(Liquid Chromatograph-Tandem Mass Spectrometer, LC-MS/MS)는 Waters Xevo TQ-S (USA)를 사용하였다. 분석칼럼으로는 ACQUITY UPLC BEH C_{18}(2.1 × 100 mm, 1.7 μm, Waters, USA)를 사용하여 0.1% 포름산 수용액과 0.1% 포름산 포함 아세토니트릴을 이동상으로 하는 기울기 용리 방식을 선택하여 분석하였다. 각 대상 성분의 이온화법으로는 electro-spray ionization (ESI)법의 positive-ion mode를 사용하였으며 LC-MS/MS 분석조건을 Table 3에 상세하게 제시하였다.

분석법 유효성 검증

LC-MS/MS를 이용한 비오틴 분석법에 대한 유효성을 검증하기 위하여 AOAC 시험법 검증 가이드라인에서 제시하는 방법을 참고하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계(limit of

detection)와 정량한계(limit of quantification)를 구하였다. 직선성을 확인하기 위하여 5, 15, 30, 45, 60 ng/mL의 비오틴 표준용액을 LC-MS/MS로 측정하여 얻은 각각의 피크 면적으로부터 검량선을 작성하였다. 정확성은 표준인증시료(NIST SRM 1849a)와 표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 구하여 확인하였고, 정밀성 확인을 위해 실험일자와 시료량을 달리하여 실험하였다.

유통 제품 중 적용성 확인

분석법 검증을 통하여 확립된 방법으로 시중에 유통 중인 조제유류 65건에 대한 비오틴 함량을 확인하였다. LC-MS/MS에 주입하여 얻어진 크로마토그램에서 검출된 피크 면적을 구하고, 미리 작성한 표준 검량곡선의 회귀방정식에 대입하여 비오틴 함량을 구하였다.

Results and Discussion

분석법 검증

특이성

비오틴 표준용액과 시험용액에서 얻은 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 비오틴은 2개의 product ion (227.1, 166.1 m/z)에서 검출되었으며, 동일한 시간에서 단일 피크가 형성됨을 확인할 수 있었다. 또한 표준품과 시료에서 MS 이온의 비가 Table 4와 같은 허용기준을 만족하는 것으로 확인 되었다.

Table 4. Maximum permitted tolerances for ion intensities

Relative intensity* (% of base peak)	Relative maximum tolerance (%)
> 50	± 20
20~50	± 25
10~20	± 30
≤ 10	± 50

*{Target Area(second ion) / Primary Area(first ion)} × 100

Table 5. Linearity of biotin.

Standard	biotin	
	Conc.(μg/L)	Area (*u*s*min)
STD 1	5.2	8290.855
STD 2	15.6	25046.760
STD 3	31.2	49799.262
STD 4	46.8	76045.609
STD 5	62.4	101129.367

직선성

비오틴 표준원액(100 μg/mL)을 0.01 M 인산이수소칼륨 용액(pH 4.8)으로 희석하여 5~60 ng/mL의 농도 범위에서 직선성을 검토하였다. R^2값이 0.999 이상으로 우수한 직선성을 확인할 수 있었다.

검출한계 및 정량한계

LC-MS/MS의 분석조건에 따라 검량선의 기울기 및 표준편차를 이용하여 검출한계 및 정량한계를 구하였다. 검출한계와 정량한계는 각각 0.10, 0.31 ng/mL로 나타났다 (Table 6).

정확성

표준인증시료 및 표준물질 첨가법을 이용하여 정확성을

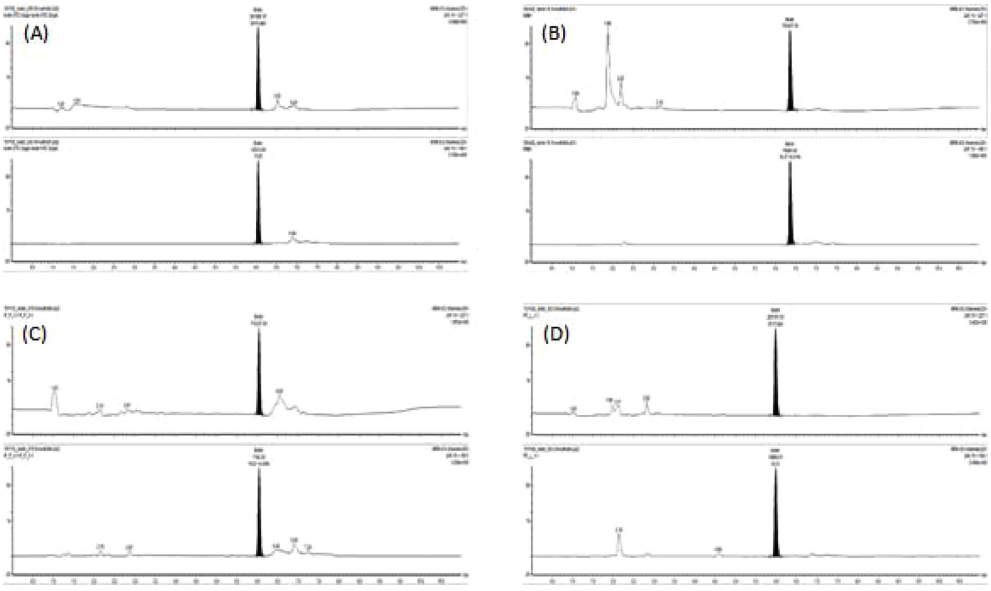

Fig. 2. Chromatograms of biotin standard (A), CRM (B), Infant milk formula powder (C) and Infant milk formula liquid (D).

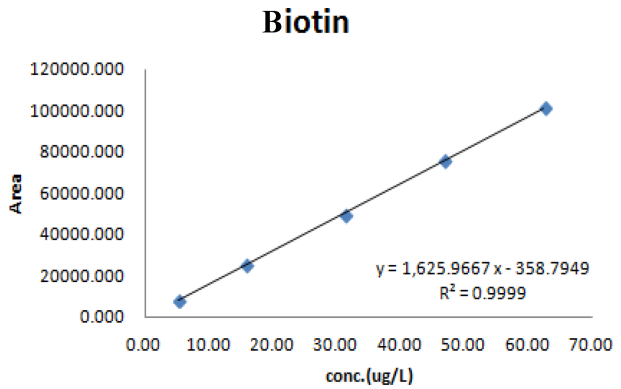

Fig. 3. Calibration curve of biotin.

확인하였다. 표준인증시료인 NIST사 Infant/Adult Nutritional Formula 1849a를 이용하여 비오틴의 정확성을 확인한 결과, 103%의 회수율을 나타냈다(Table 7). 조제분유와 조제우유 시료에 각기 다른 3개 농도의 표준물질을 첨가하여 분석 후 회수율을 확인하였다. 그 결과, 조제분유 시료에서 101~104%, 조제우유 시료에서 99~101% 수준의 회수율을 나타냈다(Table 8).

정밀성

검체량에 따른 반복성과 실험일자에 따른 재현성으로 정밀성을 확인하였다. 시료량을 달리 취하여 각 시료량에 따른 5회 반복 분석 결과에서 측정값에 대한 상대표준편차를 이용하여 반복성을 확인하였다. 고체 시료로써 조제분유를 5.0, 7.5, 10.0 g을 취하여 실험하였으며, 액상 시료로써 조제우유를 10, 15, 20 mL 취하여 실험한 결과 조제분유와 조제우유에서 시료 채취량에 따른 상대표준편차가 각각 0.4~0.9, 1.4~1.6%로 확인되었다(Table 9).

재현성은 3일간의 다른 일자에서 5회 반복 실험하였을 때 얻어진 결과로부터 측정값에 대한 상대표준편차를 이용하여 확인하였다. 조제분유와 조제우유에서 각각 1.3%와 1.2%로 일간 재현성을 확인하였다(Table 10).

Table 8. Accuracy of LC-MS/MS for the biotin in milk formula samples (n = 3)

Sample type	Spiked Standard Contents (μg/g)	Mean ± SD Recovery (%)	RSD (%)
Infant milk formula (powder)	0.05	104 ± 0.5	0.4
	0.1	102 ± 0.9	0.9
	0.2	101 ± 1.8	1.8
Infant milk formula (liquid)	0.005	101 ± 1.3	1.3
	0.01	99 ± 0.4	0.4
	0.02	99 ± 1.5	1.6

Table 9. Repeatability of LC-MS/MS for the biotin in Infant milk formula samples (n = 5)

Sample type	Sample Amount (g or mL)	Mean	S.D.	RSD (%)
Infant milk formula (powder)	5.0	0.3	0.0	0.5
	7.5	0.3	0.0	0.9
	10.0	0.3	0.0	0.4
Infant milk formula (liquid)	10	0.05	0.0	1.6
	15	0.05	0.0	1.4
	20	0.05	0.0	1.6

Table 10. Reproducibility of LC-MS/MS for the biotin in Infant milk formula samples (n = 5)

Sample type	Sample Amount (g or mL)	Mean	S.D.	RSD (%)
Infant milk formula (powder)	5.0	0.3	0.0	1.3
Infant milk formula (liquid)	10	0.03	0.0	1.2

실험실간 교차검증

조제유류 분석법의 유효성 확인을 위해 CRM을 이용하여 실험실간 교차검증을 실시하였다. Table 11과 같이 기관별 회수율은 각각 A 기관 103%, B 기관 89%로 만족

Table 6. The detection limits and quantitative limits of LC-MS/MS analysis for the biotin

Compound	Concentration range (ng/mL)	y = ax + b		R^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
		slope (a)	intercept (b)			
biotin	5-60	1,626.0	−358.8	0.9999	0.10	0.31

LOD: 3.3*σ/S
LOQ: 10*σ/S
(σ: the standard deviation of the response, S: the slope of the calibration curve)

Table 7. Accuracy of LC-MS/MS for the biotin in CRM (n = 3)

CRM Certification		Mean ± SD (μg/g)	Mean ± SD Recovery (%)	RSD (%)
Infant/Adult Nutritional Formula 1849a	1.99 ± 0.13 mg/kg	2.05 ± 0.1	103 ± 2.6	2.5

Table 11. Inter-lab test of LC-MS/MS for the biotin in CRM (n = 3)

Sample	Laboratory	Mean (μg/g)	Recovery (%)	RSD (%)
CRM	A	2.05	103	2.5
	B	1.77	89	0.9

할 만한 결과를 나타내었으며 분석법의 일관성을 확인할 수 있었다.

분석법 적용성 검토

분석법 적용성 검토를 위해 국내 유통 중인 조제유류 65건(조제분유 39건, 조제우유 3건, 성장기용조제분유 23건)에 대해 본 연구를 통해 확립한 비오틴 분석법을 적용하여 함량을 확인하였다(Table 12).

조제유류에 대한 비오틴의 기준·규격은 따로 설정되어있지 않아 제품의 표시값과 비교하여 함량을 확인하였다. 조제유류 제품의 영양성분 함량은 100 mL에 함유된 값으로 표시되어 있어 이를 분석 결과값과 비교하기 위하여 각각의 제품에 표시된 사용법 및 사용량에 따라 조제하였을 때의 함량값으로 환산하여 비교하였다. 그 결과 조제분유의 비오틴 함량은 표시량의 118~253%, 조제우유는 201~235%, 성장기용조제분유는 102~230% 함유되어 있어, 시중 제품 모두 '표시값의 80%이상 함유되어야 한다'는 표시 기준에 적합하게 관리되고 있었으며, 대체적으로 제품에 표기된 양보다 많은 양이 함유되어 있음을 확인하였다. CODEX 등에서는 infant formula의 비오틴 규격을 '1.5 μg/100 kcal 이상'으로 정하고 있어 조제유류 비오틴 함량을 100 kcal당 함량으로도 환산하여 비교한 결과 조제분유는 2.74~8.32, 조제우유 6.30~7.26, 성장기용조제분유 4.05~10.29 μg/100 kcal로 함유되어 있어 모두 제외국의 기준·규격과 비교하였을 경우에도 충분한 양을 함유하고 있음을 확인하였다.

본 연구를 통하여 확립된 LC-MS/MS를 이용한 조제유류 중 비오틴 분석법은 향후 신설 예정인 비오틴의 기준·규격을 관리하기 위한 분석법으로 적합함을 확인하였으며 국내 조제유류 영양성분의 관리 기반을 강화하는데 기여할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2015년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(15161축산물646)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 「축산물의 가공기준 및 성분규격」에 기준

Table 12. Determination of biotin in milk formulas (n = 3)

sample		labeled (μg/100 ml)	contents (μg/100 ml)	Result (%)	contents (μg/100 Kcal)
Infant milk formula (powder)	INF_P_1	2.5	4.16 ± 0.05	166	6.03 ± 0.08
	INF_P_2	2.5	4.86 ± 0.04	194	7.04 ± 0.06
	INF_P_3	2.5	4.17 ± 0.12	167	6.05 ± 0.17
	INF_P_4	2.5	4.10 ± 0.03	164	5.93 ± 0.04
	INF_P_5	2.5	4.25 ± 0.17	170	6.16 ± 0.24
	INF_P_6	2.5	4.29 ± 0.04	172	6.22 ± 0.06
	INF_P_7	2.5	4.55 ± 0.09	182	6.59 ± 0.13
	INF_P_8	2.5	4.77 ± 0.07	191	6.91 ± 0.11
	INF_P_9	2.8	4.83 ± 0.10	172	7.00 ± 0.14
	INF_P_10	2.8	4.23 ± 0.06	151	5.88 ± 0.08
	INF_P_11	2.8	4.17 ± 0.10	149	5.88 ± 0.14
	INF_P_12	2.8	4.47 ± 0.25	160	6.39 ± 0.36
	INF_P_13	2.8	4.79 ± 0.13	171	6.94 ± 0.18
	INF_P_14	1.56	2.15 ± 0.12	138	3.21 ± 0.18
	INF_P_15	1.56	1.95 ± 0.01	125	2.90 ± 0.02
	INF_P_16	1.56	2.03 ± 0.03	130	3.02 ± 0.04
	INF_P_17	1.56	1.84 ± 0.02	118	2.74 ± 0.03
	INF_P_18	2.08	2.86 ± 0.01	138	4.26 ± 0.01
	INF_P_19	2.8	4.47 ± 0.09	160	6.21 ± 0.12
	INF_P_20	2.8	5.31 ± 0.02	190	7.48 ± 0.03
	INF_P_21	2.8	5.00 ± 0.07	179	7.14 ± 0.10
	INF_P_22	2.8	5.00 ± 0.01	179	7.14 ± 0.02
	INF_P_23	2.8	4.89 ± 0.03	175	6.99 ± 0.05
	INF_P_24	2.8	4.69 ± 0.04	168	6.70 ± 0.06
	INF_P_25	2.8	4.67 ± 0.05	167	6.67 ± 0.08
	INF_P_26	2.8	5.25 ± 0.24	188	7.29 ± 0.33
	INF_P_27	2.8	5.91 ± 0.02	211	8.32 ± 0.03
	INF_P_28	2.6	4.85 ± 0.00	187	7.00 ± 0.01
	INF_P_29	1.7	3.13 ± 0.02	184	4.73 ± 0.03
	INF_P_30	1.7	3.00 ± 0.05	176	4.50 ± 0.07
	INF_P_31	2.15	3.34 ± 0.06	155	4.99 ± 0.09
	INF_P_32	2.1	3.22 ± 0.04	153	4.91 ± 0.05
	INF_P_33	2.32	3.26 ± 0.03	141	4.59 ± 0.05
	INF_P_34	2.41	3.45 ± 0.21	143	4.94 ± 0.30
	INF_P_35	2	5.07 ± 0.81	253	7.88 ± 1.26
	INF_P_36	2	2.38 ± 0.07	119	3.63 ± 0.10
	INF_P_37	2	4.32 ± 0.28	216	6.67 ± 0.43
	INF_P_38	1.6	2.10 ± 0.05	131	3.12 ± 0.08
	INF_P_39	3.47	4.35 ± 0.30	125	6.49 ± 0.45
Infant milk formula (liquid)	INF_L_1	2.0	4.70 ± 0.04	235	6.81 ± 0.06
	INF_L_2	2.0	4.35 ± 0.03	217	6.30 ± 0.04
	INF_L_3	2.5	5.03 ± 0.05	201	7.26 ± 0.08

Table 12. (Continued) Determination of biotin in milk formulas (n = 3)

sample		labeled (μg/ 100 ml)	contents (μg/100 ml)	Result (%)	contents (μg/ 100 Kcal)
Follow up milk formula	FUF_P_1	2.5	4.80 ± 0.08	192	7.17 ± 0.12
	FUF_P_2	2.5	4.89 ± 0.17	195	7.40 ± 0.25
	FUF_P_3	2.8	5.12 ± 0.08	183	7.53 ± 0.12
	FUF_P_4	2.8	5.06 ± 0.44	181	7.45 ± 0.64
	FUF_P_5	2.10	2.84 ± 0.03	135	4.05 ± 0.05
	FUF_P_6	2.1	3.38 ± 0.07	161	4.83 ± 0.10
	FUF_P_7	2.52	4.46 ± 0.09	177	6.18 ± 0.12
	FUF_P_8	2.80	4.81 ± 0.03	172	6.77 ± 0.05
	FUF_P_9	2.8	4.96 ± 0.07	177	7.18 ± 0.09
	FUF_P_10	2.8	5.51 ± 0.12	197	7.98 ± 0.17
	FUF_P_11	2.8	4.99 ± 0.14	178	7.23 ± 0.20
	FUF_P_12	2.8	4.27 ± 0.08	152	6.19 ± 0.11
	FUF_P_13	2.8	4.55 ± 0.04	162	6.49 ± 0.05
	FUF_P_14	2.8	3.53 ± 0.09	126	5.12 ± 0.13
	FUF_P_15	2.8	4.12 ± 0.01	147	5.89 ± 0.02
	FUF_P_16	2.8	4.45 ± 0.07	159	6.45 ± 0.10
	FUF_P_17	3.4	5.53 ± 0.15	163	8.03 ± 0.21
	FUF_P_18	3.4	4.87 ± 0.45	143	7.07 ± 0.66
	FUF_P_19	2	3.18 ± 0.01	159	4.97 ± 0.02
	FUF_P_20	2.0	4.59 ± 0.06	230	6.81 ± 0.09
	FUF_P_21	2.1	4.59 ± 0.15	219	6.77 ± 0.22
	FUF_P_22	5.04	6.59 ± 0.45	131	10.29 ± 0.71
	FUF_P_23	6.41	6.54 ± 0.58	102	8.28 ± 0.73

규격은 설정되어 있지 않으나, 국제 기준과의 조화를 위해 규격 신설 검토 대상 성분인 비오틴의 분석법을 마련하고자 수행하였다. 조제유류에 미량으로 함유된 비오틴 함량 분석을 위해 선택성과 정밀성이 뛰어난 LC-MS/MS를 이용한 분석법을 확립하고 시중에 유통중인 제품을 대상으로 적용성을 검토하였다. 비오틴 표준품을 이용하여 LC-MS/MS를 이용한 기기분석조건을 확립하고, 식품의 기준 및 규격 분석법을 참고로 0.01 M 인산이수소칼륨(pH 4.8) 용액을 이용하여 시료중의 비오틴을 추출하여 분석하였다. 분석법 검증은 특이성, 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정확성, 정밀성에 대해 수행되었다. 5~60 ng/mL의 농도범위에서 $R^2 = 0.999$ 이상의 우수한 직선성을 확인할 수 있었으며, LOD와 LOQ는 각각 0.10, 0.31 ng/mL 이었다. CRM (NIST SRM 1849a) 및 표준물질 첨가법을 이용하여 정확성을 검토하였으며, CRM에서 103%, 조제분유에서 101~104%, 조제우유에서 99~101%의 회수율을 확인할 수 있었다. 정밀성을 검토한 결과 시료 채취량에 따른 상대표준편차가 조제분유 0.4~0.9%, 조제우유1.4~1.6%로 확인하였으며, 실험일자에 따른 재현성은 조제분유에서 1.3%, 조제우유에서 1.2%로 확인하였다.

본 연구에서 확립된 분석법을 적용하여 조제분유 39건, 조제우유 3건, 성장기용조제분유 23건 등 국내 유통중인 조제유류 65건에 대해 적용성 검토를 실시한 결과 전체 시료에서 분석이 용이하였으며, 모두 표시기준에 적합함을 확인하였다.

References

1. Wood, H.G., and Barden, R.E.: Biotin enzymes. *Annual review of biochemistry*, **46**(1), 385-413 (1977).
2. Zempleni, J., and Mock, D.: Biotin biochemistry and human requirements. *J. nutr. biochem*, **10**(3), 128-138 (1999).
3. Pacheco-Alvarez, D., Solorzano-Vargas, R.S. and Del Rio, A.L.: Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Archives of medical research*, **33**(5), 439-447 (2002).
4. The Korean Nutrition Society: 2015 Dietary reference intakes for koreans, *The Korean Nutrition Society*, Seoul, Korea (2015).
5. Standard for livestock products. *Ministry of Food and Drug Safety*, Cheongju, Korea (2015).
6. Korea Food Code. *Ministry of Food and Drug Safety*, Cheongju, Korea (2015).
7. Foodstuffs-Determination of d-biotin by HPLC, *European standard*, BS EN 15607:2009 (2009).
8. Kim D.S., Lee Y,J, Jeong D.Y., Lee D.Y., Ahn M.K.: Determination of biotin by HPLC, *J. Analytical Science & Technology*, **16**, 499-503 (2003).
9. Study on instrumental analysis of biotin and choline in foods, *Korea Food and Drug Administration*, Korea (2003).
10. Baiyi L., Yiping R., Baifen H., Wenqun L., Zengxuan C., and Xiaowei T.: Simultaneous determination of four water-soluble vitamins in fortified infant foods by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, *J. Chrmatographic science,* **46**, 225-232 (2008).
11. Yanling G., Fei G., Sumangala G., Andrew C., Qinghai S., and Mingruo G.: Quantification of water-soluble vitamins in milk-based infant formulae using biosensor-based assays. *Food Chemistry*, **110**, 769-776 (2008).
12. Evangelia L., Danae C., Irene V., Leondios L., John O.N., Dionyssis S.I. and Gregory P.E.: Analytical techniques for determining biotin. *Journal of chromatography A*, **881**, 331-343 (2000).
13. Chikako Y., Yukiko O.: Determination of biotin following derivatization with 2-nitrophenylhydrazine by high-performance liquid chromatography with on-line UV detection and electrospray-ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1142**, 231-235 (2007).
14. Bryant C.N., Katherine E.S., and Lane C.S.: Improved liquid chromatography methods for the separation and quantification of biotin in NIST standard reference material 3280:

Multivitamin/Multielement Tablets. *J. Argic. Food Chem*., **54**, 8710-8716 (2006).
15. Staggs, C.G., Sealey, W.M., McCabe, B.J., Teagure, A.M., Mock, D.M.: Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding, *Journal of Food Composition and Analysis*, **17**, 767-776 (2004).