

## 시판 영양강화식품중 판토텐산의 분석

최윤주<sup>1†</sup> · 장재희<sup>1</sup> · 박혜경<sup>1</sup> · 박건상<sup>1</sup> · 구용의<sup>1</sup> · 황인경<sup>2</sup> · 김대병<sup>1</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전청 식품평가부

<sup>2</sup>서울대학교 식품영양학과

## Determination of Pantothenic acid in Fortified Foods by HPLC

Youn Ju Choi<sup>1†</sup>, Jae Hee Jang<sup>1</sup>, Hye Kyung Park<sup>1</sup>, Kun Sang Park<sup>1</sup>,  
Yong Eui Koo<sup>1</sup>, In Kyung Hwang<sup>2</sup> and Dai Byung Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Food Evaluation Department, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

<sup>2</sup>Dept. Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

### Abstract

This study was conducted to develop an HPLC method for determining pantothenic acid in fortified foods which has typically been determined by microbiological assay (MBA) according to AOAC and Korean Food Code approved methods. Pantothenic acid was determined by reversed-phase ion-pair HPLC using UV absorption (200 nm) after extraction with 20 mM potassium phosphate solution by sonication. The recovery of spiked samples and detection limit (LOD) by HPLC were 83.5~109.6% and 0.5 ppm (mg/kg), respectively. The LOD of the microbiological assay (MBA) was much lower than that of HPLC. The concentrations of pantothenic acid analyzed in all tested samples (n=13) confirmed compliance with declared label claims. The range of recovery ratio by the HPLC method when compared to the microbiological assay was 91.9~117.6%. There was no significant difference ( $p<0.01$ ) between the HPLC and MBA methods and the equation of the regression curve was  $y=1.1428x-0.2269$  ( $r=0.9842$ ). This proposed HPLC method for determining pantothenic acid appears to be suitable for determining pantothenic acid concentrations above 0.25 mg/100 g in fortified foods.

**Key words:** pantothenic acid, HPLC method, microbiological assay

### 서 론

판토텐산은 coenzyme A와 acyl carrier protein(ACP)의 구성성분으로 체내에서 아실기를 활성화하고 전이하는 기능을 수행하며, 지방산의 합성과 대사, pyruvate 및  $\alpha$ -keto-glutarate 산화 등 많은 반응에 관여하므로 거의 모든 생명체의 생존에 필수적이다(1-3).

판토텐산은 정상적인 식사를 하는 성인에게는 거의 결핍증이 발생하지 않지만(1-3) 모유를 수유하지 않는 영·유아의 경우 영·유아용 가공식품이 유일한 영양공급원이기 때문에 영아용 조제식, 성장기용 조제식에 판토텐산의 규격(300  $\mu$ g/100 kcal)(4)이 설정되어 있다.

판토텐산은 모든 식품속에 존재하며 특히 동물성 식품, 전곡류, 두류 속에 많이 함유되어 있고, 우유, 야채, 과일 속에는 소량이 들어있다(1-3). 식품에는 주로 칼슘염의 형태, 즉 판토텐산칼슘으로 첨가되고 있는데, 이는 판토텐산 자체가 불안정하기 때문이다(5).

식품 중 판토텐산의 분석은 미생물법(microbiological as-

say: MBA)(5-8), 방사면역측정법(radioimmunoassay; RIA)(9,10)이 사용되다가 최근 방사미생물측정법(radiometric-microbiological assay; RMA)(11), 효소면역측정법(indirect enzyme immunoassay)(12-14), 기체크로마토그래피(15-17) 등이 사용되기도 하나, 각 방법마다 방사선동위원소를 사용한다든지, 항체를 구하는게 어렵다든지, 전처리가 오래 걸리고, 방법이 까다롭다든지 하는 단점이 있어 널리 이용되지 못하고 있는 실정이다.

현행 식품공전(5) 및 AOAC(6)에서는 판토텐산을 미생물학적 시험법(*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014)으로 분석하도록 규정하고 있는데, 미생물학적 분석법은 분석감도가 좋으며, 식품 중에 존재하는 비타민의 형태와 관계없이 그 함량을 측정할 수 있다는 장점이 있는 반면, 균주의 보존 및 활성유지에 인력과 시간이 많이 소모되고, 숙련된 기술이 필요하며, 분석에 오랜 시간이 소요되고, 비타민 이외의 다른 물질이 미생물의 성장에 영향을 줄 수 있다는 단점이 있다. 따라서 최근 이러한 미생물학적 분석법을 대신하여 HPLC 등의 기기를 사용하려 분석하려는 시도가 이루어지고 있다.

\*Corresponding author. E-mail: yjchoi@kfda.go.kr  
Phone: 82-2-380-1678, Fax: 82-2-380-1358

(18-21).

비타민은 식품의 제조·가공·보존 중 손실이 발생할 수 있고, 가공식품 중 그 함량을 표시하는 경우가 많기 때문에 식품 중 비타민의 함량분석은 영양강화식품의 품질 및 기준·규격 관리를 위해서는 필수적이므로 본 연구에서는 판토텐산의 미생물학적 분석법의 단점을 보완할 수 있는 신속·정확한 HPLC 분석법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용한 시료는 판토텐산이 강화된 가공식품을 서울의 백화점 등에서 구입하여 사용하였으며, 각각의 식품 유형은 조제분유 2종, 성장기용조제식 2종, 영·유아용 곡류 조제식 5종, 환자용식품 1종, 영양보충용식품 3종이었다. 제품의 유형 및 형태, 영양성분표시는 Table 1과 같다.

### HPLC에 의한 분석

시료를 균질화 한 후 판토텐산으로서 약 60 µg에 해당하는 양을 취하여 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 가하고 30분간 초음파 진탕기(Branson 8210, USA)로 추출한 후 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 가하여 50 mL로 정용하였다. 시료용액을 1,000×g에서 10분간 원심분리(VS-5500, Hitachi, Japan)한 후, 상등액을 0.45 µm membrane으로 여과하여 HPLC(Nanospace SI-2, Shiseido, Japan)으로 분석하였다.

판토텐산(D-pantothenic acid, hemicalcium salt) 표준품은 Sigma(St. Louis, USA)에서 제조한 것을 사용하였고, acetonitrile 등의 HPLC용 용매는 Merck(Poole, UK) 및 J.T Baker(New Jersey, USA)에서 제조한 HPLC급을, 기타 시약은 특급을 사용하였다.

David 등(18), Tomas와 Rebecca(19)는 판토텐산은 특이적인 발색단이 없기 때문에 비특이적인 200 nm 정도의 낮은 파장에서 분석하는 것이 필요하다고 보고하였다. 실제로 PDA spectrum 결과 200 nm에서 최대 흡광도를 나타내었고, 따라서 200 nm에서 분석하였다.

칼럼은 Capcellpak UG 120 C<sub>18</sub>(1.5 mm×250 mm, 5 µm)을 사용하였고, 분석 후 칼럼에 흡착되는 물질을 제거하기 위하여 두 가지의 용매를 사용하였는데 A 용매는 20 mM potassium phosphate(pH 2.1)를, B 용매는 20 mM potassium phosphate/acetonitrile 80/20이었으며, flow rate는 120 µL/min이었다. 이동상 용매 A:B의 비율은 37.0분까지 96:4, 37.1분부터 47.0분까지 0:100이었고, 그 이후 96:4의 용매로 셋어주었다. 시료 분석에 걸린 시간은 시료당 약 50분이었다.

### 미생물법에 의한 분석

식품공전의 판토텐산(pantothenic acid)의 미생물학적 분석법(5)에 따라 시험하였다. 표준용액은 판토텐산칼슘 표준 품 50 mg을 취하여 약 500 mL의 물을 넣어 용해한 후 0.2 N 초산 10 mL, 2% 초산나트륨 100 mL 및 물을 가해서 1 L로 만들어 제조하였고, 분석시에 회석하여 1 mL당 판토텐산이 0.006 µg 함유되도록 하였다. 흡광도는 UV spectrophotometer(Biochrom 4060, USA)를 사용하여 측정하였다.

## 결과 및 고찰

식품에 첨가하는 판토텐산(pantothenic acid)은 수용성이면서 유리된 형태(8)이고 Gonthier 등(12)도 영유아용 식품 등 대부분의 영양강화식품에 판토텐산은 판토텐산칼슘으로서 첨가되기 때문에 효소적 전처리가 불필요하다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 시료중의 판토텐산(pantothenic acid)을 별도의 분리과정 없이 20 mM Potassium phosphate 용액에 녹여 쉽게 추출하였다. 판토텐산의 추출시 추출시간에 따른 회수율을 비교한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 30분과 60분에서 비슷한 결과를 얻을 수 있어 시간이 적게 소모되는 30분을 채택하였다.

Fig. 2(a)는 1~20 ppm에서의 standard chromatogram을 겹쳐 나타낸 것이고, (b)는 sample 중 No. 6(영·유아용 곡류 조제식 B)의 크로마토그램이다. 20 mM potassium phosphate/0.8% acetonitrile 이동상에서 peak는 대부분 분리가 되었으나 몇 가지 시료에서 방해 피크가 나타났고, 여러번 분석을 했을 때 칼럼에 흡착된 물질로 인한 방해 peak가 생

Table 1. Selected samples for analysis

Sample	Food group	Product type	Label claims (µg/100 g)
1	Infant formula A	powder	3.0
2	Infant formula B	powder	3.0
3	Follow up formula A	powder	3.0
4	Follow up formula B	powder	5.5
5	Cereal based infant formula A	powder	3.0
6	Cereal based infant formula B	powder	3.0
7	Cereal based infant formula C	powder	3.0
8	Cereal based infant formula D	powder	3.0
9	Cereal based infant formula E	powder	3.0
10	Medical food	powder	2.3
11	Nutritional supplement product A	tablet	256.0 (1.54 mg/tablet)
12	Nutritional supplement product B	tablet	675.7 (10 mg/tablet)
13	Nutritional supplement product C	tablet	1833.3 (11 mg/tablet)

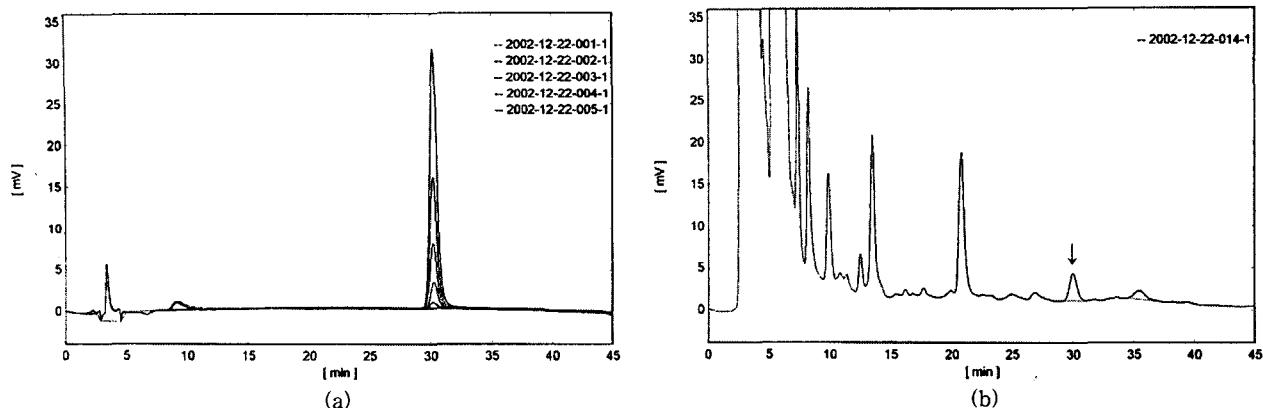


Fig. 1. HPLC chromatograms of pantothenic acid standard (1~20 ppm) (a) and sample No. 6 (b) (UV detection at 200 nm) obtained with C<sub>18</sub> column.

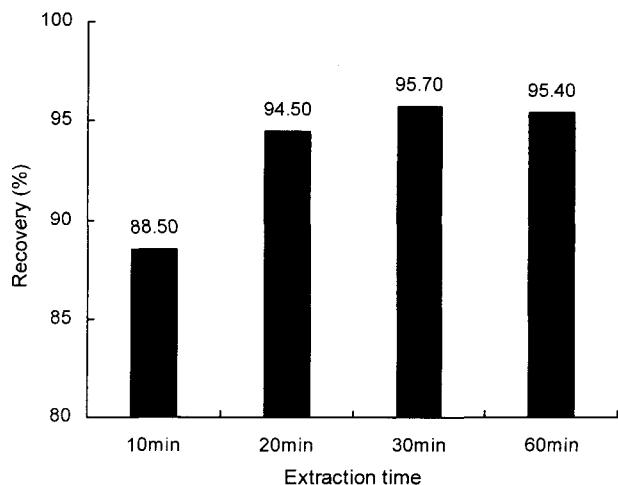


Fig. 2. Effect of extraction time on recovery of pantothenic acid.

거 재현성이 떨어졌다. 따라서 두 개의 펌프를 사용하여 20%의 acetonitrile 용액과의 gradient 조건으로 분석하고, 칼럼

에 흡착된 물질을 세척하였다. 이때 판토텐산의 retention time은 30분대로 나타났으며(Fig. 2), 판토텐산 표준용액 1.0~100 ppm를 주입하여 검량선을 작성한 결과 매우 양호한 직선성( $r = 0.9999$ )을 나타내었다.

HPLC 분석에 의한 회수율은 각 시료의 판토텐산 함량에 따라 시료에 판토텐산 표준용액 적당량(50~1700 µg)을 첨가하여 측정하였으며, 평균 회수율은 83.5~109.6%이었다. 검출한계는 signal to noise(S/N) = 3일 때 시료의 종류에 관계없이 0.5 ppm(mg/kg)로 동일하였다(Table 2). 이것을 시료의 정량한계로 계산한 결과 0.25 mg/100 g이어서 분석대상인 모든 가공식품에서 분석가능하였다.

미생물학적 분석법 역시 모든 시료의 판토텐산 분석이 가능하였으며, 시료에 표준품 30 ng을 첨가하여 회수율을 측정한 결과 평균회수율은 87.0~118.3%이었다. 미생물학적 분석법에서 표준용액의 검량선은 0.000375~0.003 ppm(mg/kg)의 농도 범위에서 직선성을 나타내었다( $r = 0.9998$ ). 검출감도면에서 HPLC 분석보다는 미생물학적 분석법이 감도가

Table 2. Recoveries and detection limits for analysis of pantothenic acid

Sample	Microbiological assay			HPLC		
	Added amount (µg)	Recovery <sup>1)</sup> (%)	LOD <sup>2)</sup> (mg/kg)	Added amount (µg)	Recovery (%)	LOD (mg/kg)
1	75	100.4±5.4	0.000375	100	109.6±3.5	0.5
2	75	104.3±3.3	0.000375	100	89.4±5.6	0.5
3	75	103.1±8.8	0.000375	100	84.4±13.3	0.5
4	138	109.9±11.3	0.000375	100	93.0±0.8	0.5
5	20	101.1±5.3	0.000375	100	105.1±5.0	0.5
6	75	118.3±7.0	0.000375	100	95.1±4.8	0.5
7	75	114.5±6.0	0.000375	100	98.1±3.7	0.5
8	75	111.0±3.2	0.000375	100	100.5±1.7	0.5
9	75	114.3±3.9	0.000375	100	86.1±1.7	0.5
10	63	102.9±2.6	0.000375	50	102.1±6.8	0.5
11	500	102.2±6.6	0.000375	250	99.7±1.6	0.5
12	500	87.0±3.4	0.000375	444	94.8±3.4	0.5
13	500	99.7±9.2	0.000375	1700	83.5±6.0	0.5

<sup>1)</sup>Recovery: mean±SD, results for three replicates.

<sup>2)</sup>LOD: The limit of detection for S/N = 3.

좋았으나 미생물학적 분석법은 흡광도가 1.0 미만으로 적선성을 보이는 농도범위가 좁고 시료에 함유된 양에 비하여 희석을 많이 해야 하므로 오차발생의 요인이 될 것으로 사료된다.

Table 3에는 HPLC 분석 및 미생물학적 분석법에 의한 각 시료의 측정치가 제시되었는데, 이는 시료당 3회 내지 5회의 측정값을 평균한 값이다. HPLC 분석에 의한 검출한계 및 시료 분석치를 미생물학적 분석법에 의한 것과 비교하였을 때(Table 3 & Fig. 3), 미생물학적 분석법(MBA)에 대한 HPLC 분석 회수율의 경우 91.9~117.6%이었고(Table 3), paired t-test 결과 두 방법은 유의적인 차이( $P<0.01$ ,  $t$  value: 1.37)가 없었으며, 회귀분석결과 상관관계( $r=0.9842$ ,  $y=1.1428x - 0.2269$ )가 양호하였다(Fig. 3).

결론적으로 영양강화식품의 판토텐산 분석에 HPLC 방법이 활용가능하며, 미생물학적 분석법보다는 분석시간 단축 및 수행의 편리성 때문에 분석의 효율성을 증대시킬 수 있으리라 기대된다. 또한 향후 식품공전에 HPLC 분석법이 공식적인 방법으로 추가된다면 식품위생검사기관 등에서 영양

Table 3. Comparison of pantothenic acid values between microbiological assay (MBA) and HPLC method in some foods

Sample	MBA (mg/100 g)	HPLC (mg/100 g)	HPLC/MBA (%)
1	4.3±0.2	4.8±0.1	111.6
2	4.5±0.1	5.2±0.4	115.6
3	3.3±0.3	3.1±0.2	93.9
4	5.9±0.4	6.7±0.2	113.6
5	3.4±0.2	4.0±0.0	117.6
6	2.8±0.3	3.0±0.4	107.1
7	3.3±0.5	3.5±0.1	106.1
8	3.7±0.1	3.4±0.2	91.9
9	3.4±0.5	4.0±0.6	117.6
10	2.9±0.3	3.0±0.0	103.4
11	336.2±74.0	384.0±8.6	114.2
12	757.8±58.0	784.0±62.3	103.5
13	2878.1±43.4	3087.8±55.5	107.3

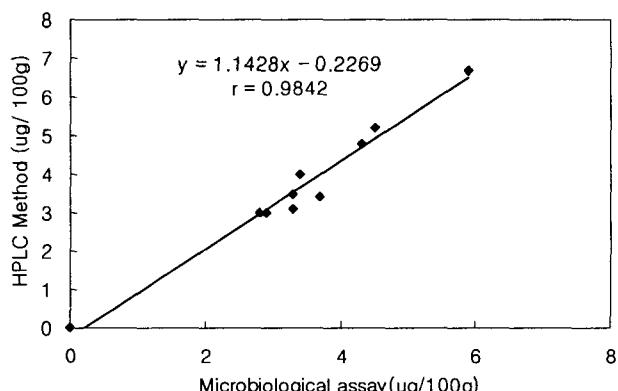


Fig. 3. The correlation between microbiological assay (MBA) and HPLC method.

The values of sample No. 11~13 were excluded in this regression curve for their high concentrations.

보충용식품 및 영·유아용식품의 검정 및 모니터링 등에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요약

기존의 미생물학적 분석법의 많은 단점을 보완하고자 식품중 판토텐산의 HPLC 분석법을 시도하였다. 추출용매는 20 mM potassium phosphate를 사용하였고, PDA spectrum 결과 최대 흡광도를 200 nm에서 분석하였다. HPLC 방법에 의한 판토텐산의 평균 회수율은 83.5~109.6%이었으며 검출한계는 0.5 ppm이었다. 또한 HPLC 분석법의 신뢰성을 검증하고자 미생물학적 분석법도 병행했는데 그 결과 회수율은 87.0~118.3%이었고 검출한계는 0.000375 ppm으로서 미생물학적 분석법이 검출한계는 훨씬 낮았다. HPLC법이나 미생물학적 분석법(MBA)에서 대상식품중 판토텐산의 측정값은 13건의 시료에서 모두 표시값보다 높았다. 미생물학적 분석법(MBA)에 대한 HPLC 분석 회수율은 91.9~117.6%이었고, paired t-test 및 회귀분석결과, 두 방법 사이에는 유의적인 차이( $p<0.01$ )가 없었으며, 상관관계( $r = 0.9842$ ,  $y = 1.1428x - 0.2269$ )가 양호하였다. 본 연구에 의해 개발된 HPLC 분석법은 기존의 미생물학적 분석법에 비하여 간단하면서 정확하여 분석의 효율성을 증대시킬 수 있으리라 기대된다.

## 문헌

1. The Korean Nutrition Society. 1999. *RDA for Koreans*. Seoul. p 611-625, 632-646.
2. Choi HM. 1998. *21st Century Nutrition*. Kyomoonsa, Seoul. p 226-240.
3. Chae BS. 1990. *Advanced Nutrition- present knowledge of nutrition*. Academy press, Seoul. p 220-224.
4. Korea food & drug administration. 2002. *Korean food code*. p 277-281.
5. Korea food & drug administration. 2002. *Korean food code (attend.)*. p 342-344.
6. AOAC International, 1995. *Official Methods Analysis*. 16th ed. AOAC International, Arlington, VA. Vol 2, Cha 45, p 46.
7. Tom B. 1994. *Nutritional Biochemistry*. Academic Press, San Diego. p 447-450.
8. Eitenmiller RR, Landen WO Jr. 1999. *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*. CRC Press, Boca Raton. p 487-450.
9. 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.
10. Walsh JH, Wyse BW, Hansen RG. 1981. Pantothenic acid content of 75 processed and cooked foods. *J Am Diet Assoc* 78: 140-148.
11. Guilarte TR. 1989. A radiometric microbiological assay for pantothenic acid in biological fluids. *Anal biochem* 178: 63-66.
12. Gonthier A, Fayol Y, Viollet J, Harmann DJ. 1998. Determination of pantothenic acid in foods: Influence of the extraction method. *Food Chemistry* 63: 287-294.
13. Finglas PM, Faulks RM, Morris HC, Scott KJ, Morgan

- MRA. 1998. 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 Micronutrient Analysis* 4: 47-59.
14. Shon DH, Park YS, Bae GW. 2000. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pantothenic acid. *Korean J Food Sci Technol* 5: 1009-1014.
15. Davidek J, Velisek J, Cerna J, Davidek T. 1985. Gas chromatographic determination of pantothenic acid in foodstuffs. *J Micronutrient Analysis* 1: 39-46.
16. Banno K. 1997. Measurement of pantothenic acid and hopantemic acid by gas chromatography-mass spectroscopy. *Methods in Enzymology* 279: 213-219.
17. Kiyoshi B, Masayuki M, Shingo H, Jyoji K. 1990. Simultaneous determination of pantothenic acid and hopantemic acid in biological samples and natural products by gas chromatography-mass fragmentography. *J Chromatogr* 525: 255-264.
18. David CW, Harvey EI, Scott K. 2000. Christiansen, The analysis of pantothenic acid in milk and infant formulas by HPLC. *Food Chemistry* 69: 201-208.
19. Thomas SH, Rebecca JA. 1984. Determination of pantothenic acid in multivitamin pharmaceutical preparations by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharma Sci* 73: 113-115.
20. Romera JM, Ramirez M, Gil A. 1996. Determination of pantothenic acid in infant milk formulas by high performance liquid chromatography. *J Dairy Sci* 79: 523-527.
21. Thomas SH, Shyamala S, Rebecca A. 1984. Determination of pantothenic acid, biotin, and vitamin B<sub>12</sub> in nutritional products, instrumental method for the analysis of vitamins. *J AOAC International* 67: 994-998.

(2003년 9월 25일 접수; 2004년 1월 14일 채택)