

발간등록번호
11-1471057-000505-01

식품공전 시험법 실무 해설서

비타민 K₁, 판토텐산

식품공전 시험법 실무 해설서 비타민 K₁, 판토텐산

2021. 11.



 **【공직자 부조리 및 공익신고안내】** ※ 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 > 공직자 부조리 신고” 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 > 신고센터 > 부패·공익신고 상담” 코너

“청렴한 식약처
국민 안심의 시작”



식품의약품안전처
식품의약품안전평가원

발간등록번호

11-1471057-000505-01

식품공전 시험법 실무 해설서

비타민 K₁, 판토텐산

2021. 11.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

본 해설서는 식품 시험법의 이해를 돕기 위해 실무자의 전문성 향상과 관련 업무에 도움을 드리고자 마련된 참고자료이므로 참고용으로 활용하시기 바라며, 일부 내용이 식품공전과 일치하지 않을 경우 식품공전이 우선시됨을 참고하시기 바랍니다.

※ 본 책자의 내용을 인용할 경우 반드시 출처를 밝혀야 하며 식품의약품안전평가원의 동의를 얻어야 합니다.

목 차

I. 목적 및 배경	1
II. 비타민 K ₁	2
1. 개요	2
1-1. 비타민 K ₁	2
1-2. 비타민 K ₁ 시험법 연구현황	3
2. 실험 과정	4
2-1. 측정 원리	4
2-2. 시약 및 기구	4
2-3. 시약 조제	6
2-4. 표준물질 및 표준용액 조제	7
2-5. 시험용액 조제	7
2-6. 기기분석	10
3. 참고문헌	12

목 차

Ⅲ. 판토텐산	14
1. 개요	14
1-1. 판토텐산	14
1-2. 판토텐산 시험법 연구현황	15
2. 실험 과정	16
2-1. 측정 원리	16
2-2. 시약 및 기구	16
2-3. 표준물질 및 표준용액 조제	17
2-4. 시험용액 조제	17
2-5. 기기분석	19
3. 참고문헌	22



I. 목적 및 배경

1. 목적

식품 시험법 실무 해설서는 현행 식품 시험법에 대한 분석결과의 정확성, 객관성을 확보하기 위해 시험 방법에 대한 해설을 제공하여 분석절차를 표준화하여 실시하고자 한다.

2. 배경

식품공전 시험법의 실무 해설서를 마련하여 식품위생검사기관 및 관련 업체에 제공함으로써 분석업무 담당자의 시험법에 대한 이해를 높이고, 분석기술 및 검사능력을 향상시켜 실험자 및 실험실 간의 분석결과의 편차를 최소화하고자 한다.

II. **비타민 K₁**

1. 개요

1-1. 비타민 K₁

비타민 K는 지용성 비타민의 한 종류로서 정상적인 혈액응고 및 뼈의 구성에 필요한 기능성으로 건강기능식품공전에 영양성분으로 등재되어 있다. 비타민 K 원료는 비타민 K₁(Phylloquinone, Phytonadione) 또는 식품원료를 사용하여 비타민 K를 보충할 수 있도록 제조·가공한 것으로 관리하고 있으며, 일일섭취량은 21~1,000 μg 이다. 식품공전과 건강기능식품공전에 수록되어 있는 비타민 K는 식품공전에는 조제유류와 특수용도식품의 규격 적용을 위한 시험법으로 설정되어 있으며, 건강기능식품공전에는 영양성분 중 한 종류로 설정되어 있다. 식품공전과 건강기능식품공전 시험법은 식품공전과 건강기능식품공전에서 제1법과 제2법 모두 동일하게 규정되어 있다.

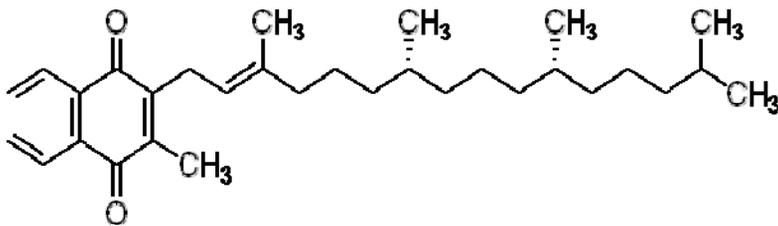


그림 1. 비타민 K₁ 구조

1-2. 비타민 K₁ 시험법 연구현황

비타민 K의 국내·외 공인시험법으로는 국내 식품공전 및 건강기능식품공전에 제1법과 제2법으로 동일한 시험법이 등재되어 있으며 대한약전에도 시험법이 등재되어 있다. 국외 공인시험법으로는 AOAC, JP, USP-FCC에 시험법이 등재되어 있다.

건강기능식품공전과 식품공전에 등재되어 있는 제1법 시험법은 시료에 있는 trans형 비타민 K₁을 유기용매로 용해하여 추출하고 건고한 추출물을 2차 용매에 녹여 실리카겔 오픈칼럼으로 정제하고 순상칼럼을 이용한 액체크로마토그래피에서 자외부검출기로 분석하는 방법이다. 제2법 시험법은 지방을 효소적으로 분해하여 지방산으로 침전시킨 후 헥산으로 비타민 K₁을 추출하여 역상칼럼으로 분리하고 포스트 칼럼으로 환원시켜 형광검출기가 연결된 액체크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법이다.

2. 실험 과정

2-1. 측정 원리

시료 중 지방을 효소적으로 분해하여 지방산으로 침전시킨 후 헥산으로 비타민 K₁을 추출하여 역상칼럼으로 분리하고 포스트 칼럼으로 환원시켜 액체크로마토그래프/형광검출기를 이용하여 정량 분석하는 방법이다.

2-2. 시약 및 기구

가. 시약

- (1) 증류수(Distilled water, HPLC grade)
- (2) 리파아제(Lipase)
- (3) 수산화칼륨(Potassium hydroxide)
- (4) 인산이수소칼륨(Potassium dihydrogen phosphate)
- (5) 에탄올(Ethanol, HPLC grade)
- (6) 메탄올(Methanol, HPLC grade)
- (7) 헥산(Hexane, HPLC grade)
- (8) 디클로로메탄(Dichloromethane, HPLC grade)
- (9) 이소프로판올(Isopropanol, HPLC grade)
- (10) 염화아연(Zinc chloride)
- (11) 무수초산나트륨(Sodium acetate)
- (12) 무수탄산칼륨(Potassium carbonate)
- (13) 초산(Acetic acid)
- (14) 아연분말(Zinc powder)

나. 기구

- (1) 용매용 일회용 실린지
- (2) 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- (3) 갈색부피플라스크(100 mL)
- (4) 원심분리관
- (5) 원심분리기
- (6) 질소농축기
- (7) 항온수조진탕기

다. 분석기기

- (1) 고속액체크로마토그래피/형광검출기(HPLC/FLD)
- (2) C₁₈ 칼럼으로 Carbon loading량이 10% 이상인 것(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전제 Silica gel) 또는 이와 동등한 것
- (3) 포스트 칼럼 : 안지름 4.0 mm, 길이 20 mm 또는 이와 동등한 것
혹은 내경 2.0 ~ 4.0 mm 및 길이 30 ~ 50 mm의 액체크로마토그래피 칼럼관에 아연분말을 채워 제작한 것으로 분석 칼럼과 형광검출기 사이에 장착

Tip. 포스트 칼럼 제작 시 빈공간이 생기지 않도록 주의하여 아연분말을 채우고 장착하기 전 30분간 이동상을 약 0.8 mL/min의 유속으로 흘러 평형이 이루어지는지 확인하고 장착 후 30~60분 이상 시스템을 안정화하여 분석한다.

2-3. 시약 조제

가. 시약 조제

(1) 증류수

3차 증류수로 18 MΩ 이상인 것

(2) Lipase

*Candida rugosa*를 기원으로 하는 것으로서 약 1,000 unit/mg(Type VII)의 활성이 있는 것 또는 동등한 효소 활성을 가진 것으로서 *Pseudomonas*와 *Rhizopus*를 기원으로 하는 것

(3) 40% 수산화칼륨용액

40 g KOH를 증류수로 녹여 100 mL로 하여 조제한다.

(4) 0.8 M 인산완충용액

54.0 g KH₂PO₄를 물 350 mL에 녹여 40% 수산화칼륨용액으로 pH를 7.9 ~ 8.0으로 조정하여 증류수로 희석하여 500 mL로 하여 조제한다.

(5) 알콜혼합용매

에탄올과 메탄올을 95 : 5의 부피비로 혼합하여 조제한다.

(6) 아연분말

입자 60 μm 이하인 것 또는 이와 동등한 것으로 개봉 후 즉시 사용한다.

2-4. 표준물질 및 표준용액 조제

가. 표준물질

Vitamin K₁(95%) 혹은 이와 등등한 것

표준품	분자식	분자량	Cas 번호
Vitamin K ₁	C ₃₁ H ₄₆ O ₂	450.7	84-80-0

나. 표준용액 조제

- (1) 표준원액: 표준품 100 mg을 100 mL 갈색부피플라스크에 정밀히 취하여 이소프로판올로 정용한 것을 표준원액으로 사용한다(1,000 μg/mL).
- (2) 표준용액: 표준원액을 일정량 취하여 메탄올로 적당히 희석하여 표준용액으로 한다.

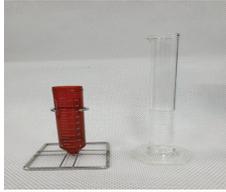
Tip. 표준원액의 경우 냉장 보관을 하며 온도에 따라 부피가 달라질 수 있으므로 표준용액을 조제하기 전 실온상태로 하여 조제한다.

2-5. 시험용액 조제

가. 실험 모식도



고체시료 약 1 g, 액체시료
약 10 g을 칭량



40℃ 이하의 증류수 15 mL
첨가 후 혼합
(액체시료 물 5 mL 첨가)



인산완충용액 5 mL 첨가 후
혼합



Lipase 1 g 첨가 후 혼합



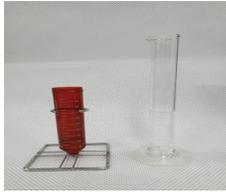
30 ~ 60초간 진탕



37±2℃에서 20분 간격 15초
간 진탕하며 2시간 분해



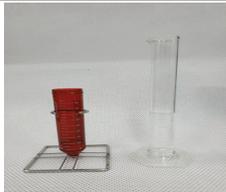
분해 후 수욕상에서 냉각



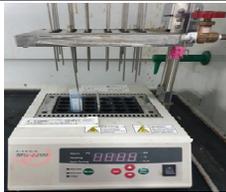
알코올혼합용매 10 mL 첨가 후
혼합



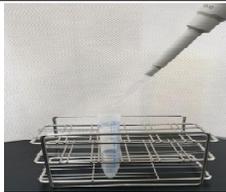
무수탄산칼륨 1 g 첨가 후 혼합



헥산 30 mL 첨가 후 10분간
격렬히 진탕



헥산 상층액 1 ~ 5 mL를
취하여 질소농축



메탄올 1 mL로 용해



고속액체크로마토그래피/
형광검출기 측정

나. 실험 방법

- (1) 고체시료는 약 1 g, 액체시료는 약 10 g을 시험관에 정밀하게 취한다.
- (2) (1)액에 40℃ 이하의 증류수 15 mL를 가한 후 혼합한다.
(액체시료의 경우 미지근한 물 5 mL를 첨가한다)
- (3) (2)액에 인산완충용액 5 mL를 첨가하여 혼합한다.
- (4) (3)액에 1 g의 lipase 분말을 넣고 혼합한다.
- (5) 시험관 마개를 막고 고르게 균질화 될 수 있도록 30 ~ 60초간 진탕한다.
- (6) (5)액을 37±2℃에서 20분 간격으로 15초간 진탕하며 총 2시간 분해한다.
- (7) 분해 후 수욕상에서 냉각한다.
- (8) (7)액에 10 mL 알콜혼합용매를 가한 후 혼합한다.
- (9) (8)액에 1.0 g의 무수탄산칼륨을 첨가하여 혼합한다.
- (10) 분해가 완료된 시험관에 30 mL 헥산을 첨가하여 마개를 막고 10분간 격렬히 진탕한다(냉암소에 보관하여 층이 분리되도록 하며, 층분리가 잘 되지 않을 때에는 약 1,000 rpm (200 G)로 10분간 원심분리한다).
- (11) 헥산 상층액을 시료의 특성에 따라 1 ~ 5 mL 취하여 바이얼로 옮기고 질소 농축한다.
- (12) 농축 후 메탄올 1 mL로 용해하여 시험용액으로 한다.

Tip. 시험용액 조제 시 직접적인 태양광에 노출되지 않도록 실험을 진행한다.

2-6. 기기분석

가. 시험장비

- (1) 기기의 안정화를 위해 미리 이동상을 흘려준다.

나. 이동상

- (1) 메탄올 900 mL에 디클로로메탄 100 mL를 혼합한 용매에 염화아연 1.37 g과 무수초산나트륨 0.41 g 및 초산 0.30 g을 메탄올 5 mL에 녹여 첨가하고 0.45 μm 여지로 여과하고 탈기하여 조제한다.

다. 분석방법

- (1) 기기조건

표 1. 비타민 K₁ HPLC 분석 조건

항목	조건
주입량	10 μL
칼럼 온도	30℃
이동상	Methanol : Dichloromethane (900 : 100)에 ZnCl ₂ 1.37 g, CH ₃ COONa 0.41 g, Glacial acetic acid 0.30 g / Methanol 5 mL를 합하여 이동상으로 함
검출기 파장	여기파장 243 nm, 측정파장 430 nm
유속	0.8 mL/분

- (2) 계산

$$\text{비타민 K}_1 \text{ 함량}(\mu\text{g}/100 \text{ g}) = C \times 30 / (V \times S) \times 100 / 1,000$$

C : 시험용액 중 비타민 K₁의 농도(μg/L)

S : 시료 채취량(g)

V : 시료특성에 따라 취한 hexan의 부피(mL)

100/1,000 : 단위 환산 계수

3. 참고문헌

1. Woollard, D. C., Indyk, H. E., Fong, B. Y., Cook, K. K. Determination of vitamin K₁ isomers in foods by liquid chromatography with C₃₀ bonded-phase column. *J. AOAC International*, **85(3)**, 682-691. (2002)
2. Schurgers, L. J. & Vermeer, C. Determination of Phylloquinone and Menaquinones in Food. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **30**, 298-307. (2001)
3. Gijsbers, B.L.M.G, Jie, K.-S.G., Vermeer, C. Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *Br. J. Nutr.* **76**, 223-229. (2007)
4. Dismore, M.L., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Peterson, J.W., Booth, S.L. Vitamin K content of nuts and fruits in the US diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **103**, 1650-1652. (2003)
5. Tarento, T.D.C., McClure, D.D., Talbot, A.M., Regtop, H.L., Biffin, J.R., Valtchev, P., Dehghani, F., Kavanagh, J.M. A potential biotechnological process for the sustainable production of vitamin K₁. *Crit. Rev. Biotechnol.* **69**, 1-19. (2018)
6. Schurgers, L.J., Teunissen, K.J.F., Hamulyák, K., Knapen, M.H.J., Vik, H., Vermeer, C. Vitamin K-containing dietary supplements: Comparison of synthetic vitamin K₁ and natto-derived menaquinone-7. *Blood* **109**, 3279-3283. (2007)
7. Pierluigi, D., Steven, B., Jeanne, I. R. Modifications of AOAC *Official Method* 999.15 to Improve the Quantitation of Vitamin K₁ in Complex



- Formulated Nutritional Products. *J. AOAC International*, **96**, 91-101. (2013)
8. Karen, J. S., Linda, D., Butler T., Shang, J. P. Determination of *trans* and Total Vitamin K₁ in Infant, Pediatric, and Adult Nutritionals by HPLC with Post Column Reduction and Fluorescence Detection: Multilaboratory Testing Study, AOAC Final Action 2015.09. *J. AOAC International*, **102**, 222-232. (2019)

Ⅲ. 판토텐산

1. 개요

1-1. 판토텐산

판토텐산은 수용성 비타민으로서 비타민 B군에 속하며, 탄수화물·단백질·지방 대사와 에너지 생성에 필요한 영양소이다. 한국인 영양섭취기준에 따르면 1일 권장섭취량은 성인 5 mg, 임산부 6 mg, 수유부 7 mg으로 권장하고 있다. 식품 중 판토텐산의 규격은 영아용 조제유 400 μg/100 kcal 이상, 성장기용 조제유·영아용 및 성장기용 조제식은 300 μg/100 kcal 이상이다. 건강기능식품 제조 시 판토텐산나트륨, 판토텐산칼슘, 식품원료를 사용하여 판토텐산을 보충할 수 있도록 제조·가공한 것을 원료로 하며, 판토텐산의 일일섭취량은 1.5 ~ 200 mg으로 규정되어 있다.

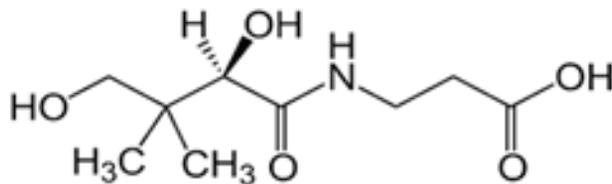


그림 1. 판토텐산 구조

1-2. 판토텐산 시험법 연구현황

판토텐산 국내 공인시험법으로는 식품공전, 건강기능식품공전, 대한약전이 있으며, 국외 공인시험법은 일본약전, AOAC에 시험법이 등재되어 있다.

AOAC와 '19년도 연구사업 시험법은 액체크로마토그래프/질량분석기를 통해 분석하는 방법으로 전처리방법의 경우 AOAC는 0.4 M 초산암모늄용액으로 추출하고, '19년 연구사업 시험법은 1% 초산 함유한 5% 아세토니트릴용액으로 판토텐산을 추출하여 측정한다.

2. 실험 과정

2-1. 측정 원리

시료 중 존재하는 판토텐산을 1% 초산을 함유한 5% 아세토니트릴로 추출하여 역상칼럼으로 판토텐산을 분리하는 방법으로 액체크로마토그래프/질량검출기/질량검출기를 이용하여 정량분석하는 방법이다.

2-2. 시약 및 기구

가. 시약

- (1) 초산(Acetic acid)
- (2) 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- (3) 개미산암모늄(Ammonium formate)

나. 기구

- (1) 용매용 일회용 실린지
- (2) 여과용 멤브레인 필터 및 디스크형 멤브레인 필터
- (3) 부피플라스크(50 mL 및 100 mL)
- (4) 원심분리기

다. 분석기기

- (1) 고속액체크로마토그래피/질량검출기/질량검출기(HPLC/MS/MS)
- (2) UPLC HSS T3 칼럼(안지름 2.1 mm, 길이 100 mm, 충전입자크기 1.8 μ m) 또는 이와 동등한 것

2-3. 표준물질 및 표준용액 조제

가. 표준물질

Calcium D-pantothenate(95%) 혹은 이와 등등한 것

표준품	분자식	분자량	Cas 번호
Calcium D-pantothenate	$C_{16}H_{32}CaN_2O_{10}$	475.5	137-08-6

나. 표준용액 조제

- (1) 표준원액: 표준품 10 mg을 100 mL 부피플라스크에 정밀히 취하여 증류수로 정용한 것을 표준원액으로 사용한다(100 μ g/mL).
- (2) 표준용액: 표준원액을 일정량 취하여 증류수로 적당히 희석하여 표준용액으로 한다.

Tip. 표준원액의 경우 냉장 보관을 하며 온도에 따라 부피가 달라질 수 있으므로 표준용액을 조제하기 전 실온상태로 하여 조제한다.

2-4. 시험용액 조제

가. 시험용액 조제

- (1) 10 mM 개미산암모늄용액
개미산암모늄 0.63 g을 증류수에 녹이고 1 L 정용한다.

나. 실험 모식도

	<p>시료를 0.5 ~ 1.5 g 칭량</p>
	<p>1% 초산을 함유한 5% 아세트 니트릴 30 mL 첨가 및 추출 (65°C, 10분)</p>
	<p>1% 초산을 함유한 5% 아세트니트릴으로 50 mL 정용</p>
	<p>원심분리(3,500 G, 15분)</p>
	<p>여과용 0.45 μm 멤브레인 필터 여과</p>
	<p>고속액체크로마토그래피/ 질량검출기/질량검출기 측정</p>

다. 실험 방법

- (1) 시료 0.5 ~ 1.5 g을 정밀히 취하여 1% 초산을 함유한 5% 아세토니트릴 30 mL를 첨가한다.
- (2) 65°C에서 10분 동안 추출한다.
- (3) 실온으로 충분히 냉각시킨 후 1% 초산을 함유한 5% 아세토니트릴 50 mL 정용한다.
- (4) 3,500 G에서 15분간 원심분리한다.
- (5) 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

2-5. 기기분석

가. 시험장비

- (1) 기기의 안정화를 위해 미리 이동상을 흘려준다.

나. 이동상

- (1) 이동상 A
10 mM 개미산암모늄용액 1 L를 탈기한다.
- (2) 이동상 B
아세토니트릴 1 L를 탈기한다.

다. 분석방법

(1) 기기조건

표 1. 판토텐산 HPLC-MS/MS 분석 조건

항목	조건
주입량	1 μ L
칼럼온도	40 $^{\circ}$ C
이동상	A용액 : 10 mM 개미산암모늄 수용액 B용액 : 아세트니트릴
유속	0.3 mL/분
이온화	ESI, Positive
Monitor ion(m/z)	220 \rightarrow <u>90</u> , 184, 202

표 2. 이동상 조성(예)

시간(분)	이동상(%)	
	A용액	B용액
0	95	5
1	65	35
2	45	55
2.1	5	95
3	5	95
3.1	95	5
5	95	5



(2) 계산

$$\text{판토텐산 함량(mg/100 g)} = C \times (a \times b) / S \times 100 / 1,000 \times 219.23 / 238.27$$

C : 시험용액 중 판토텐산의 농도($\mu\text{g/mL}$)

S : 시료 채취량(g)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 희석배수

100/1,000 : 단위 환산 계수

219.23 : 판토텐산의 분자량

238.27 : 판토텐산 칼슘의 분자량

3. 참고문헌

1. Schellack, G., Harirari, P., & Schellack, N. B-complex vitamin deficiency and supplementation. *SA Pharm. J.* **83**(4), 14-19 (2016)
2. Schellack, G., Harirari, P., & Schellack, N. Vitamin B-complex deficiency, supplementation and management. *SA Pharm. J.* **86**(3), 23-29 (2019)
3. Combs Jr, G. F., & McClung, J. P. The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. *Academic press.* (2016)
4. Mittermayr, R., Kalman, A., Trisconi, M. J., & Heudi, O. Determination of vitamin B₅ in a range of fortified food products by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionisation. *J. Chromatography A.* **1032**(1-2), 1-6 (2004)
5. Martin, F., Campos-Giménez, E., & Collaborators: Aoude-Werner A., Bandhari S., Jaudzems G., Malaviole I., Nixon M., Norloos T., Tanderup L.T., Tennyson S., Tool C., Torres M., van der Burgh P., Vermeulen M., Weihong C., Wu B., Yap L.K. Pantothenic Acid (Vitamin B₅) in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula by Ultra-High Pressure Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method: Collaborative Study, Final Action 2012.16. *J. AOAC International.* **98**(6), 1697-1701 (2015)

본 안내서는 식품의약품안전평가원(www.nifds.go.kr) 또는 식품안전나라(www.foodsafetykorea.go.kr) 홈페이지에서 전문을 내려받으실 수 있습니다.

식품공전 시험법 실무 해설서 - 비타민 K₁, 판토텐산 -

-
- ▶ 발 행 일 : 2021년 11월
 - ▶ 발 행 인 : 식품의약품안전평가원장 서경원
 - ▶ 편집위원장 : 식품위해평가부장 윤혜정
 - ▶ 편 집 위 원 : 이해영, 김종수, 윤태형, 권광일, 오재명, 김규현, 방수진, 서은채, 고경욱, 류은채, 주도영, 이미영, 홍은경, 안정선, 최정호, 정희선, 이세윤
 - ▶ 발 행 처 : 식품의약품안전평가원 영양기능연구과
 - ▶ 주 소 : 28159 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
 - ▶ 연 락 처 : 043-719-4425, 팩스 : 043-719-4420
-