식품에서 비타민 B₂ 분석을 위한 추출법 연구

전아영^{1*} · 김다경^{1*} · 최용민² · 김영화¹

¹경성대학교 식품생명공학과

²농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 식생활영양과

Study on Extraction Method for the Analysis of Vitamin B₂ in Foods

Ahyeong Jeon^{1*}, Dageyeong Kim^{1*}, Youngmin Choi², and Younghwa Kim¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University,

²Functional Food and Nutrition Division, National Institute of Agricultural Sciences,
Rural Development Administration

ABSTRACT This study aimed at evaluating extraction methods of vitamin B₂ based on temperature, enzyme treatment, sonication, and reflux extraction in various types of foods. The highest content of vitamin B₂ was observed when the reflux extraction method was used at 75°C in six food groups. The accuracy and precision of the reflux extraction-high performance liquid chromatography analysis were good with high recovery and low relative standard deviation, which meet the guidelines of the Association of Official Agricultural Chemists. Also, the limits of detection and quantification were 0.004 mg/100 g and 0.013 mg/100 g for riboflavin-5'-adenosyl diphosphate, 0.003 mg/100 g and 0.008 mg/100 g for riboflavin-5'-phosphate and 0.002 mg/100 g and 0.007 mg/100 g for riboflavin, respectively. The content of vitamin B₂ in meat, seafood, and mushrooms was significantly higher using the reflux extraction method at 75°C and pepsin-assisted extraction. The content of vitamin B₂ in legumes and cereals was significantly higher using the reflux extraction method at 75°C and takadiastase-assisted extraction. However, the enzyme treatment did not affect the vitamin B₂ content in vegetables. Thus, enzyme-assisted extraction was effective in extracting vitamin B₂ in high-protein and high-carbohydrate foods, including meat, seafood, legumes, cereals, and mushrooms. These results may be useful for providing reliable data about the vitamin B₂ content in commonly consumed foods in Korea.

Key words: vitamin B₂, pepsin, takadiastase, extraction method, HPLC

서 론

비타민 B₂는 하나의 isoalloxazine 고리에 하나의 ribitol 결사슬이 붙어 있는 구조로 flavin adenine dinucleotide (FAD)와 flavin mononucleotide(FMN) 등의 두 가지 조효소 형태로 생물학적 산화환원반응에 참여한다(Hwang 등, 1991). 비타민 B₂는 체내에서 여러 대사 과정에 관여하는 필수적인 조효소로 체내 에너지 대사뿐만 아니라 단백질 대사에도 관여하여 성장과 조직의 재생에 필수적인 영양소이다. 비타민 B₂는 체내 대사 조절 작용을 통하여 고혈압이나 동맥경화증의 예방, 항암 효과 및 노화 방지 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Powers, 2003). 또한 비타민 B₂는

피부, 눈, 결합 조직, 점막을 포함한 생체 조직 및 면역계·신경계의 정상적인 기능을 위해 필수적으로 섭취하여야 한다고 보고되어 있다(Kim, 2005). 비타민 B₂는 대부분의 식품에 널리 존재하나 특히 동물성 식품에 다량 함유되어 있다. 우유 및 치즈와 같은 유제품, 계란, 육류 및 콩과 식물에서 비타민 B₂가 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Kim과 Na, 2001).

식품 중 비타민은 미량 존재하며 대부분의 수용성 비타민은 전분, 단백질 및 인산 등과 결합한 형태로서 존재한다고 보고되어 있다(Kim 등, 2002). 비타민 B₂의 경우 식품 중에서 유리형(riboflavin) 혹은 탄수화물 및 단백질과 결합한 복합체 상태로 존재하며, 주로 인산 결합형인 FAD(ribo-

Received 13 September 2021; Revised 7 December 2021; Accepted 9 December 2021

Corresponding author: Younghwa Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University, 309, Suyeong-ro, Nam-gu, Busan 48434, Korea, E-mail: younghwakim@ks.ac.kr

Author information: Ahyeong Jeon (Graduate student), Dageyeong Kim (Graduate student), Younghwa Kim (Professor)

*These authors contributed equally to this work.

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

flavin-5'-adenosyl diphosphate) 및 FMN(riboflavin-5'-phosphate) 형태로 발견된다(Kim 등, 2002). 기존 보고에 따르면 비타민 추출 시 탄수화물 및 단백질 복합체에서 비타민을 유리시키기 위한 방법으로는 산 가열 가수분해 및 염기 가수분해 등이 보고되어 있다(Arella 등, 1996). Van Nierkerk(1988)에 의하면 높은 온도 조건에서 산 처리를 하면 단백질과 결합한 비타민 B₂를 분리할 수 있다고 하였다. 그러나 이러한 추출 방법은 낮은 pH에 의해 비타민 B₂가 파괴될 수 있다고 알려져 있다(Kim 등, 2002). 다른 수용성 비타민 분석에서도 식품에서 유리형을 추출하기 위한 연구가 이루어져 있다. 대표적인 예로, 비타민 B₁ 및 B₃의 경우 식품 속에서 다당류 등과 함께 결합한 형태로 존재하여 복합체로부터 유리형의 비타민을 추출하기 위하여 takadiastase를 이용한 연구가 선행된 바 있다(Yoon 등, 2019). Takadiastase는 *Aspergillus oryzae* 유래의 α -amylase이며 α -1,4 결합을 끊어주는 목적으로 주로 사용되는 효소이다(Hossain 등, 2019). 또한 Mun 등(2018)에 의하면 비타민 B₁₂의 경우 pepsin을 이용해 단백질과 결합한 비타민 B₁₂를 유리시켜 총 비타민 B₁₂를 분석한다고 하였다. 이처럼 복잡한 구조를 가지는 식품 매트릭스 중 수용성 비타민을 추출하기 위한 연구가 진행되고 있으나, 식품 매트릭스 특성에 따른 신뢰성 있는 비타민 B₂의 추출을 위한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 비타민 B₂의 효과적인 추출을 위하여 다양한 식품군에서 온도, 추출법, 효소 처리에 따른 추출법을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 실험에서는 국립농업과학원에서 제공한 국가표준식품성분표(RDA, 2016)를 참고하여 비타민 B₂의 함량이 비교적 높은 식품을 선정하였다. 시료는 농촌진흥청에서 2019년과 2020년에 제공받았으며, 일부 시료는 부산광역시 대형마트에서 구매하여 실험에 사용하였다. 구입한 시료는 세척 및 균질화한 후 -20°C에서 냉동 보관하여 분석에 사용하였다. 비타민 B₂ 분석에 사용된 표준시약인 riboflavin-5'-adenosyl diphosphate(FAD), riboflavin-5'-phosphate(FMN), 리보플라빈과 추출 시 사용한 효소인 takadiastase 및 pepsin은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. High performance liquid chromatography(HPLC) 분석의 이동상으로 사용된 초순수 증류수 및 메탄올은 Honeywell Burdick & Jackson(Muskegon, MI, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 분석법 검증을 위해 표준참고물질(standard reference material, SRM)인 SRM 1849a(Infant/adult nutritional formula, NIST, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하였다. 내부 분석품질관리 사용되는 시료는 시판 중인 영아용 분유(Imperial dream XO, Namyang, Seoul, Korea)를 구입하여 -20°C에서 냉동

보관하여 매 분석 시 사용하였다.

효소 처리에 의한 비타민 B₂ 추출

본 실험에 사용한 효소 처리 실험군의 추출 용액 제조는 Jeong 등(2019)의 방법을 참고하였으며, 초순수 증류수를 각 효소의 최적 pH 조건에 따라 pH를 조정하여 실험을 진행하였다. Takadiastase 추출 용액은 초순수 증류수에 HCl을 첨가하여 pH 6.5로 조정된 뒤 takadiastase가 20 U/mL가 되도록 용해하여 사용하였다. 또한 pepsin 추출 용액은 HCl을 이용하여 초순수 증류수를 pH 3.0으로 조정된 뒤 pepsin이 20 U/mL가 되도록 첨가하여 추출 용액으로 사용하였다. 효소 전처리 과정은 균질화한 시료 1 g을 100 mL 제작 용기에 칭량하여 각 추출 용액인 takadiastase 추출 용액 또는 pepsin 추출 용액을 각각 50 mL를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 효소 처리하였다. 효소 처리를 마친 시료는 환류냉각 추출 또는 초음파 추출을 진행하여 비타민 B₂를 추출하였다.

추출 방법에 따른 비타민 B₂ 추출

비타민 B₂의 추출 방법은 Kim 등(2014)과 식품공전의 비타민 분석법(MFDS, 2018)을 일부 변형하여 실시하였다. 본 연구에서는 초음파 추출법(ultrasonification extraction)과 환류냉각추출법(reflux extraction)으로 나누어 추출하였으며, 각각 60°C 또는 75°C 온도 조건으로 나누어 진행하였다. 초음파 추출의 경우 각 온도 조건에 따라 초음파 추출기(SD-350H, Sungdong Ultrasonic Co., Seoul, Korea)로 30분간 추출을 진행하였으며, 환류냉각 추출의 경우 100 mL 제작 용기에 환류냉각관을 장착하고 각 온도 조건에서 shaking water bath(HB-205SW, Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)를 이용하여 100 rpm으로 30분간 추출하였다.

HPLC를 이용한 비타민 B₂ 함량 분석

총 6군(육류, 어패류, 버섯류, 두류, 곡류 및 채소류)의 식품을 약 1 g씩 취하여 효소 처리 및 환류냉각추출법에 따라 추출한 추출액을 원심분리한 후 상등액을 0.45 μ m syringe filter(PVDF, Whatman Inc., Maidstone, UK)로 여과하여 HPLC(Hitachi 5000 Chromaster, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)로 분석하였다. 비타민 B₂ 분석 시 형광검출기를 사용하여 여기파장(excitation) 445 nm 및 방출파장(emission) 530 nm에서 측정하였다. 컬럼 온도는 40°C로 설정하였고, 컬럼은 YMC-Pack Pro RS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m, YMC, Kyoto, Japan)을 사용하였다. 분석에 사용된 이동상은 10 mM NaH₂PO₄(pH 5.5)와 메탄올을 75:25 (v/v) 비율로 하여 사용하였고, 유속은 0.65 mL/min으로 등용매용리 조건으로 분석하였다.

비타민 B₂ 분석법의 분석방법 검증

비타민 B₂ 분석법의 직선성 및 민감성 검증은 AOAC 가이

드라인(2016)에 따라 비타민 B₂의 표준용액을 7개의 농도로 연속 희석한 후 분석한 area 값과 표준용액 농도 간의 상관성을 산출하여 확인하였다. 비타민 B₂ 함량을 분석하기 위한 HPLC 분석법의 민감성 검증을 위하여 분석법의 검출한계(limit of detection, LOD), 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 확인하였다. 비타민 B₂ 분석 조건과 동일하게 바탕 시험액(blank)을 분석하여 크로마토그램의 signal to noise(S/N)의 평균값과 표준편차를 구하여 평균값의 각각 3과 10으로 곱한 값을 더하여 검출한계와 정량한계를 계산하였다. 또한 특이성 검증은 Huber 등(2007)이 제시한 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 비타민 B₂의 표준용액과 QC(quality control) 및 SRM 1849a 시료를 HPLC로 분석 시 각 분석 시료의 흡광 스펙트럼을 수집하여 peak의 area 값을 측정하고, 각 분석 시료의 흡광 스펙트럼을 수집하여 이를 표준용액과 머무름 시간(retention time, RT) 및 스펙트럼 패턴을 비교하였다.

비타민 B₂ 분석법의 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision) 검증은 AOAC 가이드라인(2016)에 따라 검증하였다. 정확성 검증은 분석 품질관리를 위한 인증값이 제시된 표준참고물질 SRM 1849a를 각각의 추출법으로 추출하여 분석하여 미국 국립표준기술소(NIST)에서 제시한 인증값과 비교하여 회수율(%)로 나타내어 확인하였다. 분석법의 정밀성은 내부 품질관리 시료로 이용되는 시판 중인 영아용 분유를 하루에 5회 반복 실험하여 반복 정밀성(repeatability precision)을 평가하였으며, 5일 동안 3회씩 분석하여 재현 정밀성(reproducibility precision)을 확인하여 각각의 추출법을 이용한 분석법의 반복성과 재현성을 확인하였다.

통계 분석

비타민 B₂의 분석값은 2회 이상 반복 실험하여 평균값±표준편차로 표시하였으며, 통계분석은 SAS 9.4(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계 프로그램을 이용하여 실시하였다. 결과값의 유의적 차이는 one-way ANOVA로 분석하였고, 다중비교분석법인 Duncan's multiple range test를 실시하여 $P<0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

추출법에 따른 비타민 B₂의 함량 비교

추출법에 의한 비타민 B₂ 함량을 비교하기 위하여 국내에서 소비되는 다양한 식품을 식품군별로 분류하여 실험을 진행하였다. 식품군별로 국가표준식품성분표(RDA, 2016)를 참고하여 비타민 B₂의 함량이 비교적 높은 시료를 1종씩 선정하여 12가지 추출법을 적용하여 분석을 진행한 결과는 Table 1에 나타내었다. 육류인 갈비(ribs)를 분석한 결과, pepsin을 처리한 실험군이 다른 추출 조건과 상관없이 유의적으로 가장 높은 함량을 보였다. 또한 추출 방법 및 추출 온도에 따른 비타민 B₂ 함량을 비교하였을 때 75°C 환류냉각 추출을 한 실험군에서 유의적으로 높게 검출되었다. 즉, 갈비는 pepsin을 처리하여 75°C 환류냉각 추출을 한 경우 유의적으로 가장 높은 비타민 B₂ 함량(0.515 mg/100 g)을 나타내었다. 어패류인 고등어(mackerel)의 비타민 B₂ 함량도 pepsin 처리를 한 75°C 환류냉각 추출에서 가장 높은 함량(0.431 mg/100 g)이 검출되었다. 버섯류인 표고버섯의 경우에는 pepsin을 75°C 환류냉각 추출을 한 실험군에서

Table 1. Comparison of vitamin B₂ contents with enzyme-treated extractions in foods

Extraction methods		Ultrasonification extraction		Reflux extraction	
Temp.		60°C	75°C	60°C	75°C
Meat_rib	Control	0.319±0.002 ^{Cb1)}	0.286±0.003 ^{Cc}	0.336±0.004 ^{Cb}	0.352±0.001 ^{Ca}
	Takadiastase	0.422±0.003 ^{Bb}	0.430±0.005 ^{Bb}	0.428±0.006 ^{Bb}	0.441±0.003 ^{Ba}
	Pepsin	0.483±0.003 ^{Ab}	0.513±0.006 ^{Aa}	0.474±0.006 ^{Ab}	0.515±0.014 ^{Aa}
Seafoods_mackerel	Control	0.385±0.006 ^{Bb}	0.382±0.007 ^{Bb}	0.365±0.006 ^{Bc}	0.402±0.011 ^{Ba}
	Takadiastase	0.362±0.008 ^{Bb}	0.368±0.005 ^{Cc}	0.377±0.008 ^{Bb}	0.397±0.011 ^{Ba}
	Pepsin	0.399±0.005 ^{Ab}	0.398±0.013 ^{Ab}	0.388±0.004 ^{Ab}	0.431±0.005 ^{Aa}
Cereals and legumes_brown rice	Control	0.103±0.005 ^{Bb}	0.121±0.009 ^{Ba}	0.106±0.008 ^{Bb}	0.124±0.006 ^{Ba}
	Takadiastase	0.123±0.008 ^{Ac}	0.133±0.006 ^{Ab}	0.116±0.010 ^{Ac}	0.149±0.005 ^{Aa}
	Pepsin	0.085±0.009 ^{Bb}	0.091±0.016 ^{Ba}	0.084±0.014 ^{Bb}	0.073±0.006 ^{Ba}
Mushrooms_shiitake	Control	0.162±0.016 ^{Bc}	0.165±0.005 ^{Bb}	0.170±0.006 ^{Bb}	0.183±0.009 ^{Ba}
	Takadiastase	0.154±0.006 ^{Bc}	0.162±0.004 ^{Bb}	0.170±0.002 ^{Bb}	0.168±0.007 ^{Ca}
	Pepsin	0.166±0.012 ^{Ac}	0.176±0.005 ^{Ac}	0.192±0.012 ^{Ab}	0.221±0.004 ^{Aa}
Vegetables_broccoli	Control	0.206±0.006 ^{Bb}	0.242±0.005 ^{Aa}	0.233±0.002 ^{Aa}	0.238±0.010 ^{Aa}
	Takadiastase	0.224±0.010 ^{ABa}	0.235±0.007 ^{ABa}	0.220±0.012 ^{Aa}	0.232±0.003 ^{ABa}
	Pepsin	0.232±0.006 ^{Aa}	0.208±0.014 ^{Ba}	0.218±0.014 ^{Aa}	0.213±0.005 ^{Ba}

¹⁾All values are expressed as the mean±SD of triplicate determinations.

Means with different capital letters (A-C) within the same column of each sample are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Means with different small letters (a-d) within the same row of each sample are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

0.221 mg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 즉, 표고버섯 시료의 경우에는 pepsin을 처리한 실험군이 효소 처리를 하지 않은 실험군 및 takadiastase를 처리한 실험군보다 비타민 B₂의 함량이 유의적으로 높음을 확인하였다. 식품 속 비타민 B₂는 대체로 단백질과 같은 고분자와 결합한 화합물 형태로 존재하는 것으로 알려져 있으며, pepsin은 육류 등의 동물성 식품에 처리하여 단백질과 결합되어 있는 비타민을 효율적으로 추출하는 것으로 보고되어 있다(Kim 등, 2002; Mun 등, 2018). 육류 및 어패류는 양질의 동물성 단백질 및 지질 등이 풍부한 식품으로 알려져 있다(Kim 등, 2001; Kim 등, 2002). 또한 RDA(2016)에 따르면 고등어는 100 g당 20.2 g의 단백질을 함유하고 있는 고단백질 식품이다. 버섯은 수분 외 탄수화물 및 단백질과 같은 영양소를 함유하고 있고 칼륨, 인, 마그네슘 등과 같은 미네랄 및 비타민 등의 미량 영양소를 함유하고 있다(Cha 등, 2007). 즉 갈비, 고등어 및 버섯 시료에서 단백질 가수분해 효소인 pepsin 처리에 의해 식품 내 단백질과 결합해 있던 비타민 B₂가 용출되면서 높은 함량이 검출되는 것으로 사료된다.

곡류 및 두류 시료로는 현미(brown rice)를 선정하여 12 가지 추출법에 따른 비타민 B₂의 함량을 분석하였다. 곡류는 탄수화물, 단백질, 지방질, 비타민 등의 영양소를 함유하고 있고(Lee 등, 2006), 두류는 곡류보다 식물성 단백질의 함량이 높으며 무기질 및 비타민 등의 생체활성 물질의 훌륭한 공급원이다(Magalhães 등, 2017). 곡류 및 두류에서 선정한 현미(brown rice)에서는 takadiastase를 처리한 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었다. 현미 시료에서 다양한 추출 조건에 따른 비타민 B₂ 함량을 비교하였을 때 takadiastase 처리하여 75°C 환류냉각 추출을 한 실험군에서 유의적으로 가장 높은 값(0.149 mg/100 g)을 나타내었다. 곡류 및 두류와 같은 탄수화물이 많은 전분질 식품은 고온에서 호화하여 성상이 끈끈해져 수용성 비타민인 비타민 B₂를 추출하는 데는 어려움이 따른다. 또한, 대부분의 비타민 B₂는 곡류 및 두류에서 탄수화물이나 단백질과 결합한 화합물 형태로 존재하기 때문에(Kim 등, 2002) takadiastase를 이용한 추출법이 비타민 B₂ 함량 분석에 용이할 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 곡류 및 두류에서 비타민 B₂의 추출을 위해서는 takadiastase를 처리한 75°C 환류냉각추출법이 적합한 방법임을 알 수 있었다. 채소류의 시료로는 브로콜리를 선정하여 추출을 진행하였으며 효소 처리를 하지 않은 75°C 환류냉각추출법에서 가장 높은 비타민 B₂ 함량(0.238 mg/100 g)을 나타내었다. 또한 브로콜리 시료를 takadiastase를 처리한 후 75°C에서 환류냉각 추출을 한 경우 비타민 B₂의 함량은 0.232 mg/100 g이었으며, pepsin을 처리한 경우에는 0.213 mg/100 g으로 나타났다. 따라서 브로콜리 시료의 경우에는 효소 처리에 따른 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 일반적으로 섭취되는 채소류는 대부분 식이섬유로 이루어져 있고, 이러한 불용성인 식이섬유는 철분, 구리, 마그네슘 등의 무기질

이나 비타민과 결합한 형태로 존재한다(Garcia-Lopez와 Lee, 1985). Simpson과 Halliday(1941)의 연구에 따르면 채소의 경우 열처리 과정 중에 세포벽이 얇아지고 부서지기 쉬운 상태가 되면서 식이섬유가 분해된다고 보고하였다. 이는 추출 과정 중 온도에 의한 식이섬유의 분해로 인해 비타민 B₂의 용출이 용이해져 효소 처리에 의한 비타민 B₂의 함량에 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다. 따라서 이후 연구에서는 육류, 어패류 및 버섯류 시료의 경우에는 pepsin을 처리하였고, 곡류 및 채소류에는 takadiastase를 처리하여 기존 추출법과 비타민 B₂의 함량을 비교하고자 하였다.

Pepsin 처리를 병행한 비타민 B₂ 추출

본 연구에서는 국내 소비량이 높은 육류, 어패류, 버섯류 중 비타민 B₂의 함량이 높은 시료 5종을 선정하여 75°C 환류냉각추출법으로 추출하되 효소 처리를 하지 않은 실험군과 pepsin 효소를 처리한 실험군으로 실험을 진행하였다(Table 2). 설도(rump)의 경우 효소 처리를 하지 않은 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 0.368 mg/100 g이었고, pepsin 효소를 처리한 실험군에서는 0.401 mg/100 g이었다. 우둔(round) 및 갈비(ribs)는 효소 처리를 하지 않은 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 각각 0.337 mg/100 g 및 0.447 mg/100 g이었으며, pepsin을 처리한 실험군에서는 각각 0.359 mg/100 g 및 0.570 mg/100 g이었다. 또한 안심(tenderloin)의 경우에는 효소 처리를 하지 않은 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 0.487 mg/100 g이었으며, pepsin을 처리한 실험군에서는 0.529 mg/100 g으로 나타났다. 즉, 모든 육류 시료에서 효소 처리를 하지 않은 실험군보다 pepsin 효소를 처리한 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 국가표준식품성분표(RDA, 2016)에 의하면 육류 시료인 한우 앞다리, 설도, 우둔, 갈비 및 안심의 비타민 B₂ 함량은 각각 0.460, 0.440, 0.360, 0.348 및 0.215 mg/100 g으로 보고되어 있다. 이는 본 연구에서 진행한 일반적인 비타민 B₂ 추출법을 이용한 분석 결과와 유사한 결과이며, pepsin을 처리한 실험군의 비타민 B₂의 함량이 기존 보고된 값보다 유의적으로 높은 비타민 B₂ 함량을 나타냄을 확인하였다.

어패류의 경우, 문어(octopus)는 효소 처리를 하지 않은 실험군에서 0.177 mg/100 g의 비타민 B₂ 함량을 나타내었고 pepsin을 처리한 실험군에서 0.242 mg/100 g으로 유의적으로 높은 비타민 B₂ 함량을 나타내었다. 또한, 고등어(mackerel)도 효소 처리를 하지 않은 실험군(0.405 mg/100 g)보다 pepsin을 처리한 실험군(0.499 mg/100 g)에서 유의적으로 높은 비타민 B₂ 함량을 나타내었다. 꽁치(pacific saury), 굴(oyster) 및 꼬막(blood cockle)에서도 마찬가지로 pepsin을 처리한 실험군에서 모두 유의적으로 높은 비타민 B₂ 함량을 나타내었다. 식품 속에서 비타민 B₂는 단백질과 같은 고분자와 결합한 형태로 존재하므로 단백질 분해 효소인 pepsin에 의해 단백질과의 결합이 끊어져 비타

Table 2. Contents of vitamin B₂ by reflux extraction method at 75°C and enzyme-assisted extraction in foods

Samples		Enzyme	Vitamin B ₂ (mg/100 g) ¹⁾	
			Emzyme-untreated extraction	Emzyme-treated extraction
Meats	Blade	Pepsin	0.439±0.004 ^{b1)}	0.443±0.002 ^a
	Rump		0.368±0.002 ^b	0.401±0.004 ^a
	Round		0.337±0.010 ^b	0.359±0.003 ^a
	Rib		0.447±0.014 ^b	0.570±0.006 ^a
	Tenderloin		0.487±0.005 ^b	0.529±0.007 ^a
Seafoods	Octopus		0.177±0.005 ^b	0.242±0.004 ^a
	Mackerel		0.405±0.013 ^b	0.499±0.009 ^a
	Pacific saury		0.244±0.008 ^b	0.283±0.004 ^a
	Oyster		0.126±0.011 ^b	0.148±0.003 ^a
	Blood cockle		0.216±0.008 ^b	0.288±0.003 ^a
Mushrooms	King oyster		0.272±0.006 ^b	0.340±0.002 ^a
	Beech		0.501±0.038 ^b	0.581±0.003 ^a
	White		0.409±0.012 ^b	0.460±0.002 ^a
	Enoki		0.154±0.002 ^a	0.156±0.001 ^a
	Shiitake		0.185±0.007 ^b	0.204±0.001 ^a
Legumes	Black-eyed pea	Takadiastase	0.224±0.016 ^b	0.325±0.002 ^a
	Seoritae		0.367±0.010 ^b	0.486±0.004 ^a
	Lentils		1.799±0.001 ^b	2.068±0.062 ^a
	Soybean		2.032±0.017 ^b	2.602±0.138 ^a
Cereals	Oat		0.126±0.003 ^b	0.168±0.004 ^a
	Brown rice		0.126±0.001 ^b	0.135±0.004 ^a
	Sorghum		0.146±0.001 ^b	0.157±0.003 ^a
Vegetables	Broccoli		2.786±0.065 ^a	2.656±0.002 ^a
	Kale		0.237±0.005 ^a	0.238±0.238 ^a
	Bok choy		0.284±0.015 ^a	0.267±0.005 ^a
	Cabbage		0.124±0.013 ^a	0.124±0.009 ^a
	Rocket salad		0.282±0.028 ^a	0.263±0.010 ^a
	Eggplant		0.154±0.003 ^a	0.156±0.002 ^a
	Red onion		0.127±0.007 ^a	0.122±0.011 ^a
	Squash		0.156±0.011 ^a	0.164±0.005 ^a
	Green bean		0.229±0.014 ^a	0.212±0.012 ^a
	Onion		0.019±1.186 ^a	1.220±0.008 ^a
	Red cabbage		1.457±0.019 ^a	1.504±0.001 ^a
	Brussel sprout		2.345±0.172 ^a	2.211±0.104 ^a

¹⁾All values are expressed as the mean±SD of duplicate determinations.

Means with different letters (a,b) within the same row are significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

민 B₂가 용출되어 높은 함량이 검출된 것으로 생각된다. 특히 어패류는 대체로 단백질로 구성되어 있어 추출 시 pepsin 처리에 의하여 비타민 B₂의 함량이 높게 나타난 것으로 생각된다(Rodriguez-Lozano 등, 2017).

버섯류 중 새송이(king oyster) 버섯의 경우 효소 처리를 하지 않은 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 0.272 mg/100 g이었고, pepsin을 처리한 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 0.340 mg/100 g으로 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 대부분의 버섯 시료에서는 효소 처리를 하지 않은 실험군보다 pepsin을 처리한 실험군에서 유의적으로 높은 비타민 B₂의 함량을 보였다. 그러나 팽이(enoki) 버섯의 경우 효소 처리를 하지 않은 실험군과 pepsin을 처리한 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 버섯은 수분함량이 높고, 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질, 비타민 등의 각종 영양소를 다양하게 함유하고 있다(Seo 등, 1997;

Choi 등, 2010). 또한 버섯은 종류에 따라 식품 매트릭스 및 구성 영양성분이 다르기 때문에 효소 처리 여부에 따른 비타민 B₂ 함량의 차이가 나는 것으로 생각된다.

Takadiastase 처리를 병행한 비타민 B₂ 추출

국내 소비량이 높은 곡류 및 두류와 채소류의 비타민 B₂의 함량이 높은 시료를 각각 7종과 11종을 선정하여 앞선 연구 결과에 따라 효소 처리를 하지 않은 실험군과 takadiastase를 처리한 실험군으로 나누어 분석을 진행하였다. 그 결과는 Table 2와 같다. 동부(black-eyed pea)는 효소를 처리하지 않은 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 0.224 mg/100 g이었으며, takadiastase를 처리한 실험군에서는 0.325 mg/100 g으로 유의적으로 높은 비타민 B₂ 함량을 나타내었다. 서리태(seoritae)의 경우에는 효소 처리를 하지 않은 실험군에서 비타민 B₂ 함량이 0.367 mg/100 g이었

고, takadiastase를 처리한 실험군에서는 0.486 mg/100 g으로 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 또한 귀리(oat)에서도 효소 처리를 하지 않은 실험군(0.126 mg/100 g)보다 takadiastase를 처리한 실험군(0.168 mg/100 g)이 유의적으로 높은 비타민 B₂ 함량을 나타내었다. 그뿐만 아니라 렌틸콩(lentils), 대두(soybean), 흑진미(brown rice, *Heugjinmi*) 및 수수(sorghum)에서도 효소 처리를 하지 않은 실험군보다 takadiastase를 처리한 실험군에서 유의적으로 높은 함량을 나타내었다. 채소류 중 브로콜리(broccoli)는 효소를 처리하지 않은 실험군에서 비타민 B₂의 함량이 2.786 mg/100 g으로 나타났고, takadiastase를 처리한 실험군에서 비타민 함량이 2.656 g/100 g으로 유의적인 차이가 없는 것

로 나타났다. 그리고 케일(kale), 청경채(bok choy) 및 루꼴라(arugula) 등의 채소류에서도 브로콜리와 마찬가지로 효소 처리에 따른 비타민 B₂의 함량이 유의적인 차이를 보이지 않았다. 일반적으로 채소류는 대부분 식이섬유로 이루어져 있고, 이러한 불용성인 식이섬유는 철분, 구리, 마그네슘 등의 무기질이나 비타민과 결합한 형태로 존재한다(Garcia-Lopez와 Lee, 1985). 이전에 서술한 바와 같이 채소는 열에 의해 세포벽이 얇아져 식이섬유가 분해된다고 하였으므로 추출 과정 중 온도에 의한 식이섬유의 분해로 인해 대부분의 비타민 B₂는 추출용매로 용출되기 때문에 효소 처리가 비타민 B₂의 추출에 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다(Simpson과 Halliday, 1941).

Fig. 1. HPLC chromatogram and retention time of vitamin B₂ standards and samples. (A) vitamin B₂ standard, (B) SRM 1849a, (C) infant formula.

Fig. 2. The standard curves of FAD (A), FMN (B) and riboflavin (C). FAD, flavin adenine dinucleotide; FMN, flavin mononucleotide.

비타민 B₂의 분석법 검증

본 연구에서는 75°C 환류냉각추출법을 사용한 비타민 B₂ 함량 분석의 특이성을 검증하기 위해 QC와 SRM 1849a를 분석하여 비타민 B₂ 표준품 peak의 retention time과 비교하였다(Fig. 1). 비타민 B₂의 표준품 peak는 FAD의 경우 7.643분, FMN은 12.737분, 리보플라빈은 23.740분에서 관측되었다. QC의 peak는 FAD의 경우 7.807분, FMN은 12.907분, 리보플라빈은 23.647분에서 관측되었으며, SRM 1849a의 peak는 FAD의 경우 8.157분, FMN은 13.803분, 리보플라빈은 24.827분에서 관측되었다. 즉, 비타민 B₂ 표준품과 QC 및 SRM 1849a의 peak retention time을 비교

했을 때 FAD, FMN 및 리보플라빈 모두 약 0.2분 이내의 차이로 같은 물질임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 사용된 HPLC/FLD 분석법은 비타민 B₂를 특이적으로 분리하여 검출할 수 있음을 확인하였다.

직선성 검증은 비타민 B₂ 표준품 peak의 area 값과 농도의 직선적인 비례관계를 검토하여 확인하였다. 본 연구에서는 식품 중 비타민 B₂의 농도 범위를 고려하여 이를 포괄하는 농도 범위로 각각의 표준용액을 제조하였다. FAD 표준용액의 농도는 0.031~1.000 µg/mL로 제조하였으며, FMN 표준용액은 0.019~0.600 µg/mL 농도로 제조하였다. 리보플라빈 표준용액의 경우 0.039~1.250 µg/mL 농도로 제조하여 분석을 진행하였다. 표준용액별 농도에 대한 크로마토그램의 area 값은 Fig. 1에 나타내었고, 검량선은 Fig. 2와 같다. 검량식의 직선성을 확인한 결과 모두 상관계수인 R²는 0.999 이상으로 나타났다. 본 연구에서도 각 표준품의 상관계수(R²)가 모두 1에 가까운 값을 나타내었고, 이에 따라 비타민 B₂ 표준물질의 직선성이 우수함을 확인할 수 있었다.

본 연구의 분석 결과의 정확성 검증을 위해 표준참고물질인 SRM 1849a의 비타민 B₂ 함량을 분석하였다. 75°C 환류냉각추출법의 정확성을 확인하기 위해 SRM 1849a의 분석을 진행하였고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 75°C 환류냉각추출법에 takadiastase를 처리한 경우, 비타민 B₂의 함량은 2.035 mg/100 g이었다. 이는 99.9%의 정확성을 확인할 수 있었다. 또한 75°C 환류냉각추출법에 pepsin을 처리한 경우, 비타민 B₂는 2.036 mg/100 g의 함량을 나타냈으며 99.9%의 회수율을 나타냈다. AOAC 가이드라인(2016)에서 수용 가능한 회수율의 범위는 1 ppm 수준에서는 75~120%, 10 ppm 수준에서는 80~115%이며 100 ppm에서는 85~110%의 범위로 제시하였다. 본 연구의 SRM 1849a의 비타민 B₂ 함량 분석 결과는 AOAC 가이드라인(2016)에서 제시한 범위에 모두 안정적으로 포함되었다.

본 연구의 추출법의 정밀성을 검증하기 위해 반복 정밀성 및 재현 정밀성을 분석하였다. AOAC 가이드라인(2016)에서는 10 ppm 수준에서 반복 정밀성 6%, 재현 정밀성 11%, 100 ppm 수준에서는 반복 정밀성은 4%, 재현 정밀성은 8%로 규정하고 있다. 본 연구에서 75°C 환류냉각추출법을 사용한 QC 시료의 분석 결과는 Table 4과 같다. 그 결과, 75°C 환류냉각추출법에 takadiastase를 처리한 분석 결과 값의 반복 정밀성의 상대표준편차(RSD)는 0.580%였고 재현 정밀성의 RSD는 0.386%였다. 또한 75°C 환류냉각추출법에

Table 3. Accuracy result of HPLC assay for vitamin B₂ contents by reflux extraction method at 75°C and enzyme-assisted extraction

Sample	Enzyme	Vitamin B ₂ (mg/100 g)		Accuracy (%)
		Reference value ¹⁾	Analysis value ²⁾	
SRM 1849a (Infant/adult nutritional formula)	Taka-diastase	2.037±0.052 ³⁾	2.035±0.020	99.9±0.013
	Pepsin		2.036±0.008	99.9±0.005

¹⁾Reference value is the true value provided by NIST.

²⁾Analysis value is the experimental value obtained by HPLC assay for vitamin B₂.

³⁾All values are expressed as the mean±SD of duplicate determinations.

Table 4. Repeatability and reproducibility of HPLC analysis for vitamin B₂ contents analysis by reflux extraction method at 75°C and enzyme-assisted extraction

Sample	Enzyme	Vitamin B ₂ (mg/100 g)			
		Repeatability ¹⁾		Reproducibility ²⁾	
		Mean±SD	RSD (%)	Mean±SD	RSD (%)
In house quality control	Takadiastase	2.070±0.012 ^{a3)4)}	0.580	2.071±0.008 ^a	0.386
	Pepsin	2.073±0.003 ^a	0.145	2.071±0.010 ^a	0.483

¹⁾Repeatability refers to the results of 5 independent determinations carried out for the same sample on the same day.

²⁾Reproducibility refers to the results of 5 independent determinations carried out on a sample by analyzing 3 replicates of the sample at each day for 5 days.

³⁾All results were expressed as the means±SD of at least triplicate experiments.

⁴⁾Means with the same letter are not significantly different by Duncan's multiple range test at $P<0.05$.

Table 5. LOD and LOQ of vitamin B₂

Component		LOD ¹⁾ (mg/100 g)	LOQ ²⁾ (mg/100 g)
Vitamin B ₂	FAD	0.004	0.013
	FMN	0.003	0.008
	Riboflavin	0.002	0.007

¹⁾LOD: limit of detection.

²⁾LOQ: limit of quantification.

pepsin을 처리한 분석 결과 값의 반복 정밀성의 RSD는 0.145%였고 재현 정밀성의 RSD는 0.483%였다. 이와 같이 본 연구에 사용된 75°C 환류냉각추출법은 AOAC 가이드라인(2016)에서 허용한 상대표준편차보다 낮은 값을 나타내어 본 연구에서 사용된 추출법은 정밀성이 우수함을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 75°C 환류냉각 추출 조건에서의 비타민 B₂ 추출법에 대한 신뢰도를 확인하기 위해 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)를 구하였고, 그 결과 값을 Table 5에 나타내었다. 비타민 B₂의 LOD 및 LOQ는 FAD에서는 각각 0.004 mg/100 g과 0.013 mg/100 g으로 확인하였고, FMN에서는 각각 0.003 mg/100 g과 0.008 mg/100 g으로 확인하였다. 리보플라빈의 경우 LOD 및 LOQ는 각각 0.002 mg/100 g과 0.007 mg/100 g임을 확인하였다. Kim 등(2017)의 연구에서 비타민 B₂의 LOD 및 LOQ는 FAD에서 각각 0.10 mg/100 g 및 0.30 mg/100 g이었고, FMN에서는 각각 0.03 mg/100 g 및 0.09 mg/100 g이었으며, 리보플라빈의 경우 각각 0.02 mg/100 g 및 0.06 mg/100 g이라고 보고하였다. 본 연구에서 비타민 B₂의 LOD 및 LOQ는 이전 보고와 유사한 수준으로 나타남을 확인하였다. 따라서 본 연구의 분석법은 식품의 비타민 B₂ 함량 분석에 있어서 적합한 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 국내 소비량이 높은 식품의 비타민 B₂ 분석법을 개선하기 위하여 추출 방법, 추출 온도 및 효소 등의 추출

조건을 달리하여 비타민 B₂의 추출법을 비교하였다. 여러 가지 추출 조건을 적용하여 실험을 진행한 결과, 6가지 식품군에서 모두 75°C 진탕 추출법이 가장 높은 비타민 B₂ 함량을 나타내었다. 이에 따라 유의적으로 높은 비타민 B₂의 함량이 검출된 75°C 진탕 추출법에 대한 분석법 검증을 실시하였다. 비타민 B₂의 표준품 및 시료 peak의 retention time은 일치하였고, 표준품을 농도별로 희석한 뒤 분석하여 작성한 표준곡선의 R²값은 FAD, FMN 및 리보플라빈에서 0.999 이상으로 1에 가까운 우수한 직선성을 나타내었다. 본 연구에서 사용한 분석법의 정확성 및 정밀성은 AOAC 가이드라인 범위에 충족하였으며, 분석법의 검출한계 및 정량한계는 FAD가 각각 0.004 mg/100 g과 0.013 mg/100 g이었고, FMN은 각각 0.003 mg/100 g과 0.008 mg/100 g이었으며, 리보플라빈은 각각 0.002 mg/100 g과 0.007 mg/100 g으로 높은 감도를 나타내었다. 본 연구에서는 다양한 식품군에 75°C 진탕 추출법을 실시하여 효소 처리 유무에 따른 비타민 B₂의 함량을 비교·분석하였다. 육류, 어패류, 버섯류에서 pepsin 처리에 따라 비타민 B₂ 함량이 유의적으로 높아진 것을 보여 주었다. 또한 콩류 및 곡류의 비타민 B₂ 함량은 takadiastase 처리에 의하여 유의적으로 높아졌다. 특히 콩류 중 서리태는 효소 처리에 의하여 비타민 B₂ 함량이 크게 높아진 것을 확인할 수 있었다. 그러나 채소류의 모든 시료는 비타민 B₂ 함량이 효소 처리에 의한 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 본 연구에서는 고단백 및 고탄수화물 식품에서의 비타민 B₂ 추출 시 효소 처리의 필요성에 대해 알 수 있었다. 보다 정확한 비타민 B₂ 함량 분석을 위해서는 매트릭스의 구조 및 구성 성분이 다른 다양한 식품군에 적용하여 추출법 개선 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 성과는 부산광역시 및 (재)부산인재평생교육진흥원의 BB21플러스 사업에 의하여 지원되었고, 2020년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ013398042020)의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- AOAC. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Association of Official Agricultural Chemists International, Gaithersburg, MD, USA. 2016.
- Arella F, Lahely S, Bourguignon JB, Hasselmann C. Liquid chromatographic determination of vitamins B₁ and B₂ in foods. A collaborative study. *Food Chem.* 1996. 56:81-86.
- Cha WS, Nam HG, Lim IJ. Analysis of mineral, amino acid and vitamin content of *Pleurotus nebrodensis*. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2007. 22:278-281.
- Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Kim JK, Lim SS. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010. 39:1087-1096.
- Garcia-Lopez JS, Lee K. Iron binding by fiber is influenced by competing minerals. *J Food Sci.* 1985. 50:424-428.
- Hossain MF, Rashid M, Sidhu R, Mullins R, Mayhew SL. A simplified, specific HPLC method of assaying thiamine and riboflavin in mushrooms. *Int J Food Sci.* 2019. Article ID 8716986. <https://doi.org/10.1155/2019/8716986>
- Huber L. Validation of analytical methods. In: *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. Informa Healthcare, New York, NY, USA. 2007. p 125-154.
- Hwang GH, Oh SH, Lim HS, Chang YK. A study on the riboflavin intake and EGRAC of young healthy Korean woman. *J Korean Soc Food Nutr.* 1991. 20:103-110.
- Jeong YN, Moon HG, Chun J. Verification of folate and vitamin B₁₂ analyses for Korea key soups and stews prepared according to Standard Korean Recipes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2019. 48:1262-1271.
- Kim BM, Kim SM, Oh JY, Cho YS, Kim SN, Choi Y. Total folate contents of 15 edible plants consumed in Korea using trienzyme extraction method. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2014. 43:1796-1800.
- Kim GP, Hwang YS, Choung MG. Analysis of water soluble vitamin B₁, B₂, and B₃ contents in Korean traditional holiday foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2017. 46:944-951.
- Kim HS, Jang DK, Woo DK, Woo KL. Comparison of preparation methods for water soluble vitamin analysis in foods by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Korean J Food Sci Technol.* 2002. 34:141-150.
- Kim NI. Role of vitamins and minerals on skin care and beauty. *Food Sci Ind.* 2005. 38:16-25.
- Kim Y, Na HJ. Food sources of thiamine, riboflavin and niacin based on food composition table and national annual food supply data in food balance sheet. *J Nutr Health.* 2001. 34:809-820.
- Lee SM, Lee HB, Lee J. Comparison of extraction methods for the determination of vitamin E in some grains. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2006. 35:248-253.
- Magalhães SCQ, Taveira M, Cabrita ARJ, Fonseca AJM, Valentão P, Andrade PB. European marketable grain legume seeds: Further insight into phenolic compounds profiles. *Food Chem.* 2017. 215:177-184.
- MFDS (Ministry of Food and Drug Safety). 2018 Korea Food Code. 2018 [cited 2021 Jun 08]. Available from: https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=316
- Mun G, Choi Y, Chun J. Validation of pepsin-assisted extraction and immunoaffinity-HPLC/DAD analysis for vitamin B₁₂ in seafood. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2018. 47:168-175.
- Powers HJ. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr.* 2003. 77:1352-1360.
- RDA. 9th Revision Korean Food Composition Table. Rural Development Administration, Jeonju, Korea. 2016.
- Rodriguez-Lozano A, Borges P, Robaina L, Betancor-Quintana MB, Hernández-Cruz CM, Romero García J, et al. Effect of different dietary vitamin E levels on growth, fish composition, fillet quality and liver histology of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture.* 2017. 468:175-183.
- Seo JS, Kang SK, Choi BM. Drying characteristics and content change of major components of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). 2. Changes in major components of shiitake mushroom by drying temperature. *J Korean Post-Harvest Sci Technol Agric Products.* 1997. 4:279-286.
- Simpson JI, Halliday EG. Chemical and histological studies of the disintegration of cell-membrane materials in vegetables during cooking. *J Food Sci.* 1941. 6:189-206.
- Van-Niekerk PJ. Determination of vitamins. In: Macrae R, editor. *HPLC in Food Analysis*. Academic Press, London, UK. 1988. p 133-184.
- 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. *J Korean Food Nutr.* 2019. 31:61-68.