

LC-MS/MS를 이용한 비타민강화 어린이 기호식품 중 비타민 B₁, B₂ 동시분석 및 표시함량과의 비교

식의약품부 생활보건팀

정소영 · 김나영 · 박상훈 · 황래홍 · 박주성 · 김정현

Simultaneous Analysis of Vitamin B₁, B₂ Using LC-MS/MS in Vitamin Fortified Children's Favorite Foods and Comparison with Labeled Contents

Health Research Team

**So-young Jung, Na-young Kim, Sang-hun Park,
Lae-hwong Hwang, Ju-sung Park and Jung-hun Kim**

Abstract

The validation and application of an LC-MS/MS method were reported for the simultaneous analysis of vitamins B₁ and B₂ in biscuits, candy, powdered flavouring mix, and yoghurt. In order to establish rapid and accurate preparation methods, enzymatic treatment was used without clean-up step. The LOQs of vitamin B₁ and B₂ were 2 µg/kg and 8 µg/kg, respectively. Validation of this method was performed with the Certified Reference Material(CRM, BCR 121), and the resulting range of error values was within 2.6%. We analyzed 35 favorite commercial foods of children to determine their vitamin B₁ and B₂ contents, and compare with the concentration provided on the food labels. Only one sample showed lower contents, and this was below 80%.

Key words : Vitamin B₁ and B₂, LC-MS/MS, children's favorite foods

서 론

비타민은 우리 몸에 필요한 필수영양소이나 고등동물의 체내에서 전혀 합성되지 않거나 필요한 만큼 합성되지 않기 때문에 반드시 식품으로부터 섭취해야 한다. 비타민의 생체 내 필요량은 매우 소량으로도 충분하지만 이것이 공급되지 않을 때 생명현상의 유지에 필요한 체내 영양소의 대사가 지장을 받게 된다. 때문에 비타민은 캡슐형태의 보충제나 또는 다른 식품에 인위적으로 첨가한 제품들이 유통되고 있다(1).

수용성인 비타민 B 그룹 중 비타민 B₁인 thiamine은 곡류의 배아, 콩류 등에 많이 함유되어 있고 부족할 경우 각기병 등을 유발할 수 있다. 비타민 B₂인 riboflavin은 자연계에 널리 분포되어 있으며 강화제로서 쌀, 된장, 비스킷 등에 사용되고 있다(2). 일일 권장량은 비타민 B₁이 성인 1.3 mg, 어린이는 0.6~0.9 mg, 비타민 B₂는 성인의 경우 1.2~1.5 mg, 어린이는 0.7~1.1 mg이다.

식품공전(3)에 설정되어 있는 수용성 비타민 B₁, B₂의 고성능액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 분석 방법은 개별분석법이다. 비타민 B₁은 산성액으로 추출한 뒤 다카디아스타제로 분해한 후 형광 반응시켜 형광검출기(Fluorescence detector, FLD)로 측정하는 효소분해 방법이고, 비타민 B₂의 분석법은 70~80°C 수욕상에서 추출한 후 FLD를 사용하는 분석법이다. 이들 분석법은 각 비타민들의 특성을 고려하여 추출법과 기기분석법을 선택한 것이기는 하나 B₁의 경우 전처리과정에 장시간이 소요되는 단점이 있다. 따라서 수용성비타민의 동시분석을 위한 연구들은 다방면으로 시도되어 왔다. 일반적으로 산 또는 염기로 가수분해 후 상등액으로 정량하는 방법(4)이 사용되었으나 이런 pH처리는 비타민 파괴를 유발하므로 이를 최소화하기 위해 효소에 의한 가수분해방법이 연구되었고(5~7), 최근에는 시료를 물에 녹인 후 초음파 추출과 원심분리 후 LC로 동시분석하는 방법(8,9)도 보고되었다. 최근 수용성비타민의 동시분석법은 초음파 추출법을 이용하여 비타민 B군뿐만 아니라 수용성비타민인 비타민 C까지 분

석하는 연구들이 진행되었다(10~12). 그러나 식품 중의 비타민 B₁은 단백질과 결합하고 있는 형태이므로 이런 동시분석법은 비타민보충제인 캡슐이나 고농도로 첨가한 제품의 경우에서만 응용이 가능할 것으로 생각되고, 식품자체에 존재하는 비타민을 분석하는 경우는 높은 온도에서의 산분해 또는 효소 분해하여 분석하는 방법이 사용되고 있다(13~15).

비타민의 기기분석법으로는 액체크로마토그래피-자외선검출기(Liquid chromatography-Ultraviolet detector, LC-UVD)나 FLD보다 선택성과 감도가 좋은 액체크로마토그래피-텐덤질량분석기(LC-MS/MS)를 이용하여 동시분석하는 방법들이 개발되고 있다(16,17).

본 연구에서는 초음파 추출 후 원심분리하는 방법과 다카디아스타제로 분해한 후 분석하는 두 가지 전처리방법을 비교하여 각각의 회수율과 재현성을 알아보았다. 기기분석법으로는 동시분석이 가능하면서 선택성이 좋은 LC-MS/MS를 사용하였다. 이를 바탕으로 비타민 B₁, B₂를 동시분석할 수 있는 전처리법과 기기분석법을 최적화하고자 하였다.

식품위생법(18) 표시기준에 따르면 비타민의 영양강화 표시에 대해서 “고(또는 풍부)” 용어는 식품 100 g 당 1일 영양소 기준치의 30% 이상, 식품 100 mL 당 1일 영양소 기준치의 15% 이상일 때 또는 식품 100 kcal 당 1일 영양소 기준치의 10% 이상일 때 사용할 수 있으며, “함유(또는 급원)” 용어는 식품 100 g 당 1일 영양소 기준치의 15% 이상, 식품 100 mL 당 1일 영양소 기준치의 7.5% 이상일 때 또는 식품 100 kcal 당 1일 영양소 기준치의 5% 이상일 때 사용할 수 있도록 규정되어 있다. 또한 비타민의 실제 측정값은 ‘표시량의 80% 이상’으로 오차 허용범위가 설정되어 있다.

최근에는 소득의 증가와 더불어 건강에 대한 관심이 증대되면서 어린이들이 즐겨먹는 과자, 음료수, 사탕 등에도 비타민이나 무기질 등의 영양성분을 강화한 제품들이 많이 출시되고 있고 소비자들은 이런 제품들을 더 고급제품으로 인식하여 선호하고 있다. 그러나 이런 어린이 기호식품들의 개별규격에는 이들의 표시량 규격이 따로 설정되

어 있지 않다.

본 연구에서는 시간이 많이 소요되고 따로 분석해야 하는 번거로움이 있는 비타민 B₁과 B₂를 기존의 분석법을 응용하여 동시분석하여 이의 정확성을 검증하고자 하였다. 또한 이 분석법을 이용하여 시중 유통되고 있는 영양강화 어린이 기호식품의 영양성분 모니터링을 신속히 수행하고자 하였다. 이에 서울지역에 유통되는 어린이기호식품인 과자, 사탕 등에 비타민 B₁, B₂가 강화되어 있는 것으로 표시되어 있는 제품 35건을 수거하여 이들의 함량을 조사하여 표시량과 비교하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 시약

서울시내 대형마트에서 판매하는 비타민강화 어린이 기호식품 35건(과자 21건, 캔디류 3건, 발효유 2건, 우유에 타 먹는 기타코코아가공품 및 당류가공품 9건)을 시료로 사용하였다. 실험에 사용

한 시약 중 표준물질인 Thiamine hydrochloride와 Riboflavin은 Wako pure chemical.(Osaka, Japan) 제품을 사용하였다. 전처리과정에 사용된 삼염화초산 및 다카디아스타제는 Sigma-Aldrich. Co.(St.Loues, MO, USA)를 사용하였다. 이동상에 사용된 아세토니트릴은 Fisher Scientific Korea. Ltd.(Seoul, Korea) 제품을 사용하였고, 회수율 검정에 사용된 표준인증물질은 BCR - 121(Institute for Reference Materials and Measurement, IRMM, Brussels, Belgium)이었다.

2. 장비

동시분석에 사용된 HPLC는 Agilent사(Fostercity, USA)의 1200시리즈를 사용하였으며 검출기는 Q-trap 3200(AB SCIEX, Framingham, MA, USA), 추출에 사용된 Ultra sonicator는 BRANSON사(BRANSON Korea. Co. Ltd. Kunpo. Korea)의 8510, 원심분리기는 MX-305 (Tomy Kogyo. Co. LTD, Japan)를 사용하였다. 기기분석 조건은 표 1과 같다.

Table 1. The operation parameters of LC-MS/MS for analysis of Vit. B₁, B₂

Instrument	Parameter	Conditions					
LC	Column	Atlantis T3(2.1 × 100 mm × 3 μm)					
	Mobile phase	A : Water(0.1% formic acid) 80%					
		B : Acetonitrile(0.1% formic acid) 20%					
	Flow rate	0.3 mL/min					
	Injection volume	5 μL					
MS	Curtain gas	30.0 psi					
	Ionspray voltage	5500 V(Positive)					
	Temperature	500 °C					
	Ion Source Gas 1	50 psi					
	Ion Source Gas 2	50 psi					
MRM	Analyte	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
	Vitamin B ₁	265	122	20	4	25	4.0
			144				
	Vitamin B ₂	377	243	41	6.5	29	4.0
198							

3. 표준용액 조제

비타민 표준용액은 전처리법에 따라 두 가지 방법으로 조제하였다.

초음파 추출법에 사용된 비타민 B₁ 표준용액은 티아민클로라이드를 비타민으로써 약 0.1 g을 정확히 취해 이동상 100 mL에 녹여 표준원액으로 하였고 Vitamin액은 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/kg 수준으로 이동상에 희석하여 사용하였다. 다카디아스타제로 분해하여 전처리하는 효소분해법은 표준원액을 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg/kg 수준으로 희석하여 1 mL씩 취하여 시료의 전처리방법과 동일하게 처리하여 표준용액으로 사용하였다.

4. 추출

1) 초음파추출법

시료 약 1 g을 원심분리 용기에 정확히 취해 이동상을 첨가한 후 20 mL 눈금에 맞춘 후 약 1분간 Voltexing하여 균질화 시킨 후 shaker로 15분간 추출하고 15분간 초음파 추출한 후 15,000 rpm (10°C)으로 10분간 원심분리하였다. 원심분리가 끝난 시료의 상층액을 syringe filter(0.2 μm)로 여과하여 시험용액으로 하였다.

2) 효소 분해법

효소분해법의 전처리는 건강식품공전(19)의 비타민 B₁ 분석법의 제 2법을 참고하여 분석하였다. 시료 약 1 g을 정밀하게 취한 후 10% 삼염화초산 용액 20 mL를 첨가한 후 약 1분간 voltexing하여 균질화하였다. 균질화 한 용액을 9,000 rpm에서 약 30분간 원심분리 한 후 상등액 1 mL와 4 M 초산나트륨 용액 150 μL, 2% 다카디아스타제 용액 50 μL를 첨가하여 잘 교반시킨 후 37°C에서 8~10 시간 방치시킨 후 상층액을 syringe filter(0.2 μm)로 여과하여 시험용액으로 하였다.

5. 검출한계 및 정량한계

표 1의 조건으로 3의 표준용액 5 농도를 분석하여 검량선을 작성한 후 ICH Q2B(20)에 따라 검량선의 y절편의 표준편차와 기울기를 이용하여 아래 식에 의해 LODs와 LOQs를 구하였다.

$$\text{LOD} = 3.3(\sigma/S) \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10(\sigma/S) \quad (2)$$

S : 기울기

σ : y절편의 표준편차

6. 회수율 및 재현성

회수율 실험은 비타민 B₁은 wheat powder 표준인증물질인 BCR-121에 표시되어 있는 인증값으로 측정하였으며 B₂는 곡류를 matrix로 하는 표준인증물질을 구하기가 어려워 위의 BCR-121에 비타민 B₂의 잔류량을 확인한 후 표준품을 첨가하여 동시분석법으로 측정하였다. 분석은 5회 반복하여 재현성을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 추출방법에 따른 회수율

본 실험에서는 비타민 분석의 전처리법 중 초음파 추출법과 효소분해법의 두 가지 방법으로 추출하여 회수율을 비교하여 결과를 표 2에 나타냈다. 초음파 추출하여 원심분리를 하는 경우는 시료에 첨가하여 분석한 비타민 B₂는 104%의 양호한 회수율을 보이지만 표준인증물질 값 자체로 회수율을 실험한 비타민 B₁은 37%의 낮은 회수율을 나타냈다. 이는 비타민 B₁이 식품 중에서 단백질과 결합한 형태이므로 BCR-121 중 존재하는 B₁은 초음파 추출법으로는 제대로 추출되지 않는 것으로 보인다. 결과로 보아 다른 연구들에서 보고되고 있는 초음파 추출법을 이용한 동시분석법은 인위적으로 첨가된 비타민 보충제나 캡슐제의 분석에 제한적으로 사용되어야 함을 확인하였다.

다카디아스타제로 효소분해하여 LC-MS/MS로 분석한 결과는 비타민 B₁ 103.3%, B₂ 83.1%의 양호한 회수율을 나타냈으며 표준인증물질의 인증값의 허용오차범위를 만족하였다. 재현성을 알아보기 위해 5회 반복 실험하여 상대표준편차를 구한 결과 각각 2.6%, 2.2%였다.

LC-MS/MS를 이용하여 wheat flour 표준인증

물질 중 비타민 B₁과 B₂를 분석한 크로마토그램을 그림 1에 나타냈다. 분석시간은 3분 이내였으며 별다른 방해물질의 영향 없이 분석할 수 있었다. 비타민 B₁을 형광검출기를 이용하여 분석하는 경우 좋은 감도를 위해서는 티오크롬 등의 형광유도체화 과정이 필요하고 방해물질을 제거하기 위해 대부분 컬럼을 이용한 정제과정 후 분석한다. 본 실험에서는 식품공전에서 개별로 분석되는 비타민 B₁과 B₂를 LC-MS/MS를 이용하여 정제과정 없이 동시 분석함으로써 분석시간과 노력을 절감할 수 있었다.

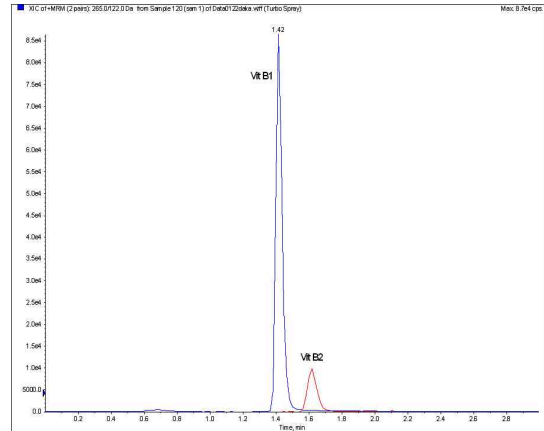


Fig. 1. LC-MS/MS chromatogram of vitamin B₁ and B₂ in the whole meal flour CRM.

2. 검출한계 및 정량한계

효소분해법으로 추출한 표준용액 5구간의 농도로 검량선을 작성하였고 5회 반복측정하여 기기의 검출한계(LODs)와 정량한계(LOQs)를 구하여 표 3에 나타냈다.

분석결과 비타민 B₁과 B₂ 모두 R²값이 0.999 이상의 양호한 직선성을 나타냈으며, 검출한계와 정량한계는 다른 연구들과 비교해보았을 때 LC-UVD를 이용한 분석(10, 11)에 비해 수백 배의 높은 감도를 나타냈고, LC-FLD로 분석한 경우(21) 보다는 약 2~10배 좋은 감도를 보였다. 기존의 비타민 기기분석법으로 가장 좋은 감도를 나타내는 유도체 후 형광분석법(13, 22)과 비교해보았을

때 거의 비슷한 감도를 나타냈다.

3. 유통 제품 중 비타민 B₁, B₂의 함량 모니터링

위의 결과에 따라 다카디아스타제를 이용하여 효소분해한 후 LC-MS/MS로 분석하는 방법으로 시중에 유통되는 어린이기호식품 중 비타민 B₁과 B₂의 함량을 모니터링하였다. 제품의 1회 제공량과 비타민 B₁과 B₂의 함량, 제품 영양성분표의 표시량 대비 값을 표 4에 나타내었다. 주로 우유에

Table 2. Accuracy data obtained from analysis of a certified reference material(BCR-121)

Analyte	Certified value (mg/kg)	Measured(mg/kg) ± SD(Recovery(%) ± RSD(%))	
		Sonication extraction	Takadiastase used extraction
Vitamin B ₁	4.63 ± 0.39	1.70 ± 0.04(36.8 ± 2.5)	4.78 ± 0.12(103.3 ± 2.6)
Vitamin B ₂ ^a	5.00	5.22 ± 0.08(104.5 ± 1.5)	4.16 ± 0.19(83.1 ± 2.2)

a : Spiked(mg/kg)

Table 3. Main performance characteristic of the analytical method

Analyte	Lineaty range(µg/kg)	Coefficient	LOD(µg/kg)	LOQ(µg/kg)
Vitamin B ₁	4.2~416	0.9998	0.7	2
Vitamin B ₂	4.2~416	1.0000	2	8

Table 4. Concentrations of Vit.B₁ and Vit.B₂ in Children's favorite foods and their percent ratio compared to labeled contents

No.	Product	Serving size	Vit.B ₁		Vit.B ₂	
			Conc. (mg/kg)	Conc. Anal / Conc. Label (%)	Conc. (mg/kg)	Conc. Anal / Conc. Label (%)
1	Biscuit	18	1.2	89.3	1.7	101.0
2		50	2.4	186.4	3.1	177.1
3		70	2.5	190.9	2.3	174.8
4		56	2.8	209.7	1.5	91.5
5		60	5.3	332.8	2.6	125.4
6		50	6.6	132.1	4.7	120.8
7		50	8.6	130.3	6.3	206.1
8		28	9.0	361.4	11.3	453.6
9		50	9.3	207.3	7.2	134.8
10		50	12.1	199.0	7.6	117.6
11		38	12.7	792.4	2.8	172.6
12		38	12.7	126.9	16.3	90.7
13		28	16.8	167.6	21.7	120.7
14		23	16.9	316.4	11.2	223.1
15		30	22.2	33.3	12.3	18.5
16		30	22.4	139.8	24.1	150.5
17		36	22.9	229.0	19.5	390.6
18		30	23.4	146.5	24.5	152.9
19		30	24.2	242.1	21.4	428.1
20		30	25.5	153.1	19.6	117.6
21		65	35.0	749.5	29.4	519.5
Average ± SD		41.0	14.0 ± 9.4	244.6	12.0 ± 9.0	194.6
1	Powdered flavouring mix	17	14.8	194.0	10.5	111.8
2		17	25.3	252.5	20.7	175.9
3		17	25.6	255.6	20.7	176.1
4		17	29.1	291.1	20.9	177.8
5		17	31.7	317.2	23.2	197.3
6		17	32.9	328.7	20.7	175.8
7		17	42.4	240.4	49.2	167.3
8		17	52.1	442.5	12.8	108.5
9		17	61.5	522.6	12.2	103.9
Average ± SD		17	35.0 ± 14.5	316.1	21.2 ± 11.5	154.9
1	Candy	9	199.5	179.5	157.4	118.1
2		9	168.6	151.7	136.6	102.5
3		2.6	335.7	623.5	156.8	254.7
Average ± SD		6.9	234.6 ± 88.9	318.3	150.3 ± 11.8	158.4
1	Yogurt	3.9	3.9	552.3	-	-
2		10.6	10.6	180.9	6.3	241.9
Average ± SD		7.2	7.2	366.6	6.3	241.9
Total		37.9	37.9 ± 66.3		26.5 ± 40.5	

타먹는 제품인 당류가공품과 초콜릿가공품은 섭취 용도가 동일하여 한 그룹으로 표시하였다. 시료 포장지에 표시되어 있는 비타민의 양을 참고하여 시료를 0.1~1 g을 정확하게 취한 후 위의 실험방법에 따라 실험하였다. 모니터링 결과 어린이 기호식품 중 함유된 비타민 B₁은 과자 14.0±9.4 mg/kg, 당류가공품 및 초콜릿가공품류는 35.0±14.5 mg/kg, 사탕류가 234.6±88.9 mg/kg이었다. 비타민 B₂의 함유량은 과자 12.0±9.0 mg/kg, 당류가공품 및 초콜릿가공품류는 21.2±11.5 mg/kg, 사탕류가 150.3±1.8 mg/kg이었다. 이는 대상 시료의 평균 1회 제공량을 보면 과자 41.0 g, 당류가공품 및 초콜릿가공품 17.0 g, 사탕류는 6.9 g로 사탕류가 1회 제공량이 적으므로 강화된 비타민의 농도가 높은 것으로 보인다. 대부분의 시료가 표시량 이상의 농도를 나타내었으나 과자 1건에서 함량이 비타민 B₁ 표시량의 33.3%, B₂ 표시량의 18.5%로 표시기준인 80%에 미달하여 표시기준 위반제품에 해당하였다. 시료 중 표시량의 200%를 초과하는 제품은 비타민 B₁이 19건, B₂가 8건이었고 표시량의 792%까지 함유된 경우도 있었다. 이 결과는 비타민은 빛 또는 온도의 영향으로 시간이 지남에 따라 분해되므로 과량으로 첨가하는 경우가 많은 것으로 생각된다.

본 연구에서 모니터링 한 비타민 B₁과 B₂의 함유량과 1회제공량을 평균값을 기준으로 보면 1회 제공량 만큼 먹었을 때 섭취하게 되는 비타민양은 과자가 B₁이 평균 0.57 mg, B₂가 0.49 mg, 당류가공품 및 초콜릿가공품은 B₁이 평균 0.60 mg, B₂가 0.36 mg이었다. 사탕류는 B₁이 1.62 mg, B₂가 1.04 mg, 발효유는 B₁이 0.52 mg, B₂가 0.46 mg이었다. 제품별로 차이는 있으나 평균값을 기준으로 보았을 때 1회 제공량을 먹을 경우 어린이의 1일 권장량에 42~270% 수준이었다.

최근 어린이 기호식품의 경우는 비타민 및 미네랄 등이 '함유' 또는 '강화'되어 있다고 강조하는 제품들이 많이 유통되고 있으나 식품별 규격에 표시량에 대한 규제가 없어 과대광고가 우려된다. 따라서 이들 영양강화 제품에 대한 정확한 분석을 통한 지속적인 모니터링으로 소비자들에게 정확한 정보를 제공하여야 할 것이다.

결 론

신속하고 정확한 비타민 B₁과 B₂의 동시분석을 위해 초음파 추출법과 다카디아스타제를 이용한 효소분해법의 두 가지 전처리법을 비교하여 LC-MS/MS로 분석하였다. LC-MS/MS를 이용한 비타민의 분석 시 정량한계는 각각 2 µg/kg, 8 µg/kg로 다른 기기에 비해 선택성과 감도가 우수하였다. 전처리법을 비교했을 때 효소분해법이 더 적합하였으며 이의 정확성과 재현성을 표준인증물질 BCR-121을 이용해 회수율과 반복시험의 편차로 검증하였다. 결과, 비타민 B₁ 103.3%, B₂ 83.1%의 양호한 회수율을 나타냈으며 인증값의 허용오차범위를 만족하여 일상적으로 수행되는 비타민 B₁과 B₂의 분석에 적합하였다. 이 효소분해-LC-MS/MS법을 이용하여 시중 유통되고 있는 비타민강화 어린이기호식품 35건의 비타민 B₁과 B₂ 함유량을 모니터링하였다. 제품 표시량과 비교한 결과, 과자 1건의 비타민 B₁과 B₂의 함유량이 표시량의 80% 미만이었고 나머지 제품들은 모두 표시량 이상으로 시료 중 표시량의 200%를 초과하는 제품은 비타민 B₁이 19건, B₂가 8건이었고 표시량의 792%까지 과량 함유된 경우도 있었다. 정확한 영양정보가 제품에 표시될 수 있도록 비타민 B₁과 B₂의 빠르고 정확한 분석법 확립과 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 이문석, 조혜영, 이용복 : 복합비타민 유제의 제조와 평가. 대한약학회지, 32(1):13~19, 2002.
2. 한국식품과학회 : 식품과학기술대사전, 광일문화사, 2008.
3. 식품공전 : 식품의약품안전처, 2013.
4. Lambert, WE and Leenheer, AD : Quantitative determination of water soluble vitamins using HPLC. Marcel Dekker Inc, New York, USA, p.341. 1992.
5. Winalasiri, P and Wills, RBH : Simultaneous analysis of thiamin and

- riboflavin in foods by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogra.* 318:412~416, 1985.
6. Fellman, JK, Artz, WE, Tassinari, PD, Cole, CL and Augustin, J : Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high-performance liquid chromatography, *J. Food Sci.*, 47:2048~2067, 1982.
 7. 김형수, 장덕규, 우동균, 우강용 : 역상 고속 액체크로마토그래피에 의한 식품 중 수용성 비타민 분석을 위한 전처리법의 비교. *식품과학회지*, 34:141~150, 2002.
 8. 농림수산물식품부 : 축산물성분규격시험법편람, 2012.
 9. Pilar, Vinas, Carmen, López-Erroz, Nuria, Balsalobre and Manuel, Hernández-Córdoba : Reversed-phase liquid chromatography on an amide stationary phase for the determination of the B group vitamins in baby foods, *J. Chromatogra. A*, 1007:77~84, 2003.
 10. Rita, Engel, Eva, Stefanovits, Banyai and Laszlo, Abranko : LC Simultaneous determination of the free forms of B group vitamins and vitamin C in various fortified food products. *Chromatographia*, 71:1069~1074, 2010.
 11. Pei, Chen, Renata, Atkison and Wayne, R, Wolf : Single-Laboratory validation of a high performance liquid chromatographic diode array detector fluorescence detector/mass spectrometric method for simultaneous determination of water soluble vitamins in multivitamin dietary tablets. *J. AOAC Int.*, 92:680~687, 2009.
 12. Alberto, ZG, Antonio, G, Juan, CM and Luis, EGA : Simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 54:4531~4536, 2006.
 13. Pilar, V, Ignacid, LG, Maria, BB, Marisol, B and Manuel, HC : Dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods. *Anal. Bioanal. Chem.*, 403:1059~1066, 2012.
 14. S, Ndaw, M, Bergaentzle, D, Aoude Werner and C, Hasselmann : Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. *Food chem.*, 71:129~138, 2000.
 15. Xueyan, T, Denis, AC and Nigel, PB : A simplified approach to the determination of thiamine and riboflavin in meats using reverse phase HPLC. *J. Food Com. Anal.*, 19:831~837, 2006.
 16. Pei, C and Wayne, RW : LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387: 2441~2448, 2005.
 17. Nazanin, Z, Babur, ZC, Frank, SP, Martin, JS and John, T : Simultaneous determination of riboflavin and pyridoxine by UHPLC/LC-MS in UK commercial infant meal product. *Food chem.*, 135: 2743~2749, 2012.
 18. 보건복지가족부 : 식품위생법, 대승사, 2009.
 19. 식품의약품안전청 : 건강기능식품공전시험법, 2012.
 20. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH) : Validation of analytical procedures methodology, Geneva, Switzerland, November. 1996.
 21. Regina, PZF and Helena, TG : Vitamins B₁ and B₂ contents in cultivated mushrooms. *Food chem.*, 106:816~819, 2008.

22. Mikihiko, Y, Takashi, H, Masako, O, Koji, F, Mitsuaki, M, Tomoji, I and Makoto, T : A novel method for determining vitamin B₁ in a wide variety of food-stuffs with or without polyphenols, Food chem., 135:2387~2392, 2012.