



Research Article

# Determination of vitamin B<sub>12</sub> in seafood products by reverse-phase HPLC/DAD coupled with immunoaffinity purification

## Immunoaffinity 정제 및 RP-HPLC/DAD를 이용한 수산가공품의 비타민 B<sub>12</sub> 분석

Minyoung Je<sup>1</sup>, Seo-Eun Park<sup>1</sup>, Hui Jin Lee<sup>1</sup>, Jiyeon Chun<sup>1,2\*</sup>

제민영<sup>1</sup> · 박서은<sup>1</sup> · 이희진<sup>1</sup> · 천지연<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

<sup>2</sup>Bio-Healthcare Food Research & Analysis Center, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

<sup>1</sup>국립순천대학교 식품공학과, <sup>2</sup>SCNU 바이오헬스케어푸드연구 · 분석센터

**Abstract** This study aimed to quantify vitamin B<sub>12</sub> in 38 seafood products widely consumed in Korea and to generate reliable data for the National Food Composition Database. Vitamin B<sub>12</sub> was analyzed as cyanocobalamin using immunoaffinity purification combined with RP-HPLC/DAD. The method showed excellent linearity (R<sup>2</sup>=1.0000), with LOD and LOQ of 0.01 µg/100 g and 0.03 µg/100 g, respectively. Accuracy was validated using SRM 1549a and SRM 3235, with recovery rates of 103.0% and 106.0%. Precision tests using commercial infant formula showed CVs of 5.35% (repeatability) and 3.51% (reproducibility). Cyanocobalamin levels ranged from 0.13 to 19.75 µg/100 g. High contents were found in cockle canned products (19.75±0.48), salted oyster (13.72±1.17), pollock roe (8.41±0.31), and laver chips (7.69±0.04). Heat-processed items like fish sausage (0.13-0.32) and breaded seafood (0.48-0.65 µg/100 g) showed lower levels, and some samples had no detectable B<sub>12</sub>. These findings indicate that both raw materials and processing influenced B<sub>12</sub> levels. This study provides essential data to enhance national nutritional databases and highlights seafood products, including fermented and seaweed-based varieties, as potential sources of vitamin B<sub>12</sub>, especially valuable for populations with limited intake of animal products.

**Keywords** cyanocobalamin, vitamin B<sub>12</sub>, RP-HPLC, immunoaffinity purification, method verification



OPEN ACCESS

**Citation:** Je M, Park SE, Lee HJ, Chun J. Determination of vitamin B<sub>12</sub> in seafood products by reverse-phase HPLC/DAD coupled with immunoaffinity purification. Food Sci. Preserv., 33(2), 274-282 (2026)

**Received:** October 10, 2025  
**Revised:** November 19, 2025  
**Accepted:** November 24, 2025

**\*Corresponding author**  
Jiyeon Chun  
Tel: +82-61-750-3258  
E-mail: cjiyfall@gmail.com

Copyright © 2026 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://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.

## 1. 서론

비타민 B군에 속하는 비타민 B<sub>12</sub> (cobalamins)는 수용성 비타민으로 인체내에서 합성되지 않거나 필요 수준 이하의 양으로 합성되기 때문에 식이를 통해 필수적으로 공급되어야 하는 필수 미량 영양 성분이다(Ball, 2005). 비타민 B<sub>12</sub>는 수용성 비타민 중 가장 복잡한 구조를 가졌으며, cobalt corrinoid 계열의 화합물 중 코발라민류의 화합물을 총칭한다(Martens 등, 2002). 식품 중에는 주로 어류, 육류, 간, 유제품 등 동물성 식품에서 발견되며(Watanabe 등, 2013), 주로 hydroxocobalamin, methylcobalamin, adenosylcobalamin의 생리활성형으로 존재한다. 반면, cyanocobalamin은 합성형으로, 보충제나 강화식품에 사용된다.

비타민 B<sub>12</sub>는 체내에서 메틸화 반응, DNA 합성, 신경기능 유지, 에너지 대사 등 다양한 생리적 기능에 관여한다. 비타민 B<sub>12</sub>가 결핍되면 호모시스테인 수치 증가로 인해 인슐린 저항성 및 내피 기능에 장애가 발생할 수 있고, 거대아구성 빈혈 및 다양한 신경 정신 질환과 허혈성 뇌졸중 같은 뇌혈관 질환도 유발할 수 있다(He 등, 2004; Oh와 Brown, 2003). 비타민 B<sub>12</sub>는 동물성 식품에 주로 존재하기 때문에 동물성 식품의 섭취 및 소화가 어려운 노인이나 채식주의자들에게 결핍이 빈번하게

발병되며, 이 외에도 동물성 식품 섭취가 제한적인 어린이나 성인에게도 결핍이 나타날 수 있다(Hunt 등, 2014). 최근 건강지향식 식단, 노령화 인구 증가, 식물성 기반 식생활의 확산에 따라 비타민 B<sub>12</sub> 섭취 불균형이 주요한 영양 문제로 대두되고 있으며, 이에 따라 수산가공식품의 비타민 B<sub>12</sub> 함량 정보는 영양 정보 제공 및 개인맞춤 정밀영양 서비스 산업에서 기초 자료로서의 활용 가치가 높아지고 있다.

수산가공식품은 제조 과정에서 열처리, 소금 절임, 건조 및 냉동 등 다양한 물리·화학적 공정을 거치게 되는데, cobalamin은 빛, 산소, 열, 강한 산성 및 알칼리 조건에서 불안정하기 때문에 가공 공정은 cobalamin 안정성에 영향을 미치게 된다(Bito 등, 2018; Nishioka 등, 2011). 특히 가공식품의 소비가 점점 증가하고 있는 바, 원재료의 비타민 B<sub>12</sub> 함량 외에 가공식품류의 비타민 B<sub>12</sub> 함량에 대한 정보가 요구되고 있으나, 현재 한국의 가공식품에 대한 영양표시제에는 비타민 B<sub>12</sub>는 의무 및 선택적 표시 대상이 아니기 때문에, 가공식품류의 비타민 B<sub>12</sub> 함량에 대한 정보는 거의 전무한 수준이다. 비타민 B<sub>12</sub>는 미량영양소로서 정량적 분석이 매우 까다로운 성분으로 정확한 데이터 생산을 위해서는 분석법 검증 및 분석품질관리를 통한 신뢰성 확보 기반의 검증이 병행되어야 한다. 식품 중의 cobalamins는 안정성이 낮지만 cyanocobalamin은 안정성이 높고 분광학적 특성이 우수하기 때문에, 식품 중 존재하는 native B<sub>12</sub> vitamers를 cyanidation으로 전환하여 reverse phase HPLC/DAD 법으로 정량하는 방법은 정확성과 정밀성이 우수하여 수산 원료의 분석 뿐만 아니라 가공 식품산업 현장에서 실용적으로 적용되어 왔다(Park 등, 2020; Wang 등, 2023).

따라서, 본 연구는 수산가공식품 중의 비타민 B<sub>12</sub>의 정확하고 신뢰도 높은 정량을 위해 면역친화성 정제(immunoaffinity purification)와 역상 고성능액체크로마토그래피(RP-HPLC/DAD) 분석법의 유효성을 검증하고, 이를 적용하여 수산 가공식품류의 비타민 B<sub>12</sub> 함량을 분석하였다. 또한, 분석품질관리(quality control, QC)를 병행함으로써 수산가공품 분석에 대한 신뢰성을 확보하고, 이를 기반으로 농촌진흥청 국가표준식품성분표(Korean Food Composition Database) 고도화에 기여할 수 있는 과학적 기초 자료를 제공하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료 및 시약

비타민 B<sub>12</sub> 분석에 사용한 표준품 cyanocobalamin은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, 표준참고물질(standard reference material, SRM) SRM 1549a (whole milk powder) 및 SRM 3235 (soy milk)를 National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 상업용 분유(Imperial Dream XO,

Namyang, Seoul, Korea)를 구매하여 내부 분석품질관리 시료(QC sample)로 사용하였다. Sodium acetate trihydrate 및 sodium cyanide는 Wako (Osaka, Japan)에서 구입하였으며, 이외 기타 시약과 용매는 GR 및 HPLC 등급 이상을 구입하여 사용하였다.

### 2.2. 분석 시료 준비

한국에서 소비되는 수산가공품(총 38종) 시료는 농촌진흥청(Rural Development Administration, Jeonju, Korea)에서 2025년 제11개정판 국가표준식품성분표를 발간하기 위한 연구사업의 일환으로 선정된 시료를 제공받아 분석에 사용하였다. 모든 시료는 균질화한 후, 플라스틱 밀폐용기에 소포장하여 제공받았다. 모든 시료는 -70°C에서 보관하며 분석에 사용하였다.

### 2.3. Vitamin B<sub>12</sub> 추출

비타민 B<sub>12</sub>는 Jang 등(2014)의 방법을 사용하여 추출하였다. 시료 2-5 g을 칭량한 광구 삼각플라스크에 1% sodium cyanide를 0.5 mL 가한 후, 0.2 M sodium acetate trihydrate buffer (pH 4.0)를 이용하여 50 mL로 정용하였다. 이후 10분간 초음파 처리(8893-DHT, Cole-Parmer, Chicago, IL, USA)하여 항온수조(WB-20M, Jeio Tech Co., Daejeon, Korea)에서 100°C로 65분간 cobalamin류를 추출하고, 이들을 cyanocobalamin으로 전환하였다. Cyanocobalamin으로 전환된 추출액은 냉각 후 여과지(Whatman No.1, GE Healthcare, Amersham Place, UK)로 여과하여 사용하였다.

### 2.4. Cyanocobalamin 정제 및 농축

추출된 cyanocobalamin은 전처리 장비(PRESSURE<sup>+</sup>48, Biotage Co., Uppsala, Sweden)에 immunoaffinity column (IAC, EASI-EXTRACT<sup>®</sup> Vitamin B<sub>12</sub>, R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, UK)을 장착하고 일정한 압력을 가하여 농축 및 정제하였다. 냉장보관 상태의 immunoaffinity column (Easi-Extract Vitamin B<sub>12</sub>; r-Biopharm, Glasgow, UK)을 실온 상태로 안정화시킨 후 column 내에 충전된 완충용액을 제거하고 3 mL water를 주입하여 conditioning 하였다. 여과된 시료 추출액을 농도에 따라 3 mL씩 4회까지 주입하여 추출액 중의 비타민 B<sub>12</sub>를 column에 흡착시킨 후 3 mL water를 3회 주입함으로써 불순물을 세척하였다. Syringe를 이용하여 column 내부에 수분을 제거한 후 3 mL methanol을 주입하여 cyanocobalamin을 용출시켰다. 이후 용출액은 질소농축기(TurboVap<sup>®</sup> LV, Biotage Co., Uppsala, Sweden)를 이용하여 70°C에서 농축시킨 후 water를 0.5 mL 가하여 재용해하였다. HPLC 분석을 위해 0.45 µm membrane filter (Futecs Co., Daejeon, Korea)를 이용해 여과한 시료를 갈색병에 담아 분석에 사용하였다.

### 2.5. Immunoaffinity-HPLC/DAD 분석

표준용액은 표준품 cyanocobalamin을 10 mg 칭량하여 water 1 mL에 용해시켜 stock solution을 1 mg/mL의 농도로 제조해 -18°C의 냉암소에 보관하였으며, 시료의 cyanocobalamin 농도에 따라 working solution으로 희석하여 사용하였다.

HPLC는 Agilent 1260 infinity (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, column은 C18 ACE 3 AQ (3 mm×150 mm, ACE, Aberdeen, Scotland)를 사용하였다. 비타민 B<sub>12</sub> 정량 분석에 사용한 이동상은 Table 1의 gradient 조건으로 분석하였다. 이동상 유량은 0.25 mL/min, 주입량은 100 µL, 컬럼 온도는 35°C에서 분석을 진행하였으며, 자외부 검출기를 사용하여 361 nm에서 검출하였다. Cyanocobalamin 분리 검출을 위한 HPLC 분석 조건은 Table 1과 같다.

### 2.6. 분석법 검증

단일실험실(single laboratory) AOAC 가이드라인(AOAC, 2002)에 준하여 분석법 검증을 시행하였으며, 검량선의 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ), 정확성(accuracy) 및 정밀성(precision)의 유효성을 검증하고 평가하였다. 직선성은 표준물질 0.004, 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2 µg/mL의 농도에서 각 농도 별로 3회 반복하여 HPLC로 분석하였다. 검량선은 표준용액의 농도(x축)와 크로마토그램의 피크 면적(y축)을 이용해 작성하

였고, 검량선의 상관계수(R<sup>2</sup>) 값을 계산하여 평가하였다. LOD와 LOQ는 비타민 B<sub>12</sub> 공시험 시료의 크로마토그램에서 얻어진 signal-to-noise (S/N) 값을 기반으로 산출하였다. S/N 값의 평균과 표준편차를 이용하여 통계적으로 추정하였으며, 각각 평균값에 표준편차의 3배 및 10배를 더하여 계산하였다. 본 방법은 반복 측정된 S/N 값의 변동성을 반영한 통계적 접근법으로, 검출한계 및 정량한계를 추정하였다.

$$\text{LOD} = S / N + 3 \times \text{SD}$$

$$\text{LOQ} = S / N + 10 \times \text{SD}$$

where, S/N is the mean signal-to-noise ratio and SD is the standard deviation of the signal-to-noise ratio.

정확성(accuracy)은 표준참고물질 SRM 1549a 및 SRM 3235의 cyanocobalamin 함량을 분석하고 NIST 참고값(reference value)을 이용하여 회수율(recovery)을 산출하고 AOAC 가이드라인(2002) 기준에 준수하여 평가하였다. 상업용 분유인 Imperial dream XO world class 3 (Namyang, Seoul, Korea)을 시료로 사용하여 정밀성(precision)을 측정하였으며, 1일 5회 반복 실험 결과와 5일간 5회 반복 실험 결과의 표준편차를 각각 repeatability (relative standard deviation, RSD<sub>r</sub>)와 reproducibility (RSD<sub>R</sub>)로 나타내었다. 반복적 분석 결과의 허용 범위 평가는 AOAC (2002) 가이드라인에 따라 수행하였으며, 질량 백분율(mass fraction, C)에 따른 이론적 허용 범위는 RSD<sub>r</sub>=C<sup>-0.15</sup>, RSD<sub>R</sub>=2C<sup>-0.15</sup>의 계산식(AOAC 가이드라인, 2002)을 이용하여 계산하였다. HorRat 값은 실측된 RSD<sub>r</sub> (found) 또는 RSD<sub>R</sub> (found)을 각각 이론값과 비교하여 계산하였다. HorRat 값이 0.5-2.0 범위 내에 있을 경우 반복성과 재현성이 허용 범위 내에 있는 것으로 판단하였다.

$$\text{HorRat}_r = \frac{\text{RSD}_r \text{ (found, \%)}}{\text{RSD}_r \text{ (calculated, \%)}}}$$

$$\text{HorRat}_R = \frac{\text{RSD}_R \text{ (found, \%)}}{\text{RSD}_R \text{ (calculated, \%)}}}$$

Table 1. HPLC conditions for cyanocobalamin analysis

Items	HPLC condition																					
HPLC system	Agilent 1260 infinity (Agilent, Santa Clara, CA, USA)																					
Detection	Diode array detector (DAD, 361 nm)																					
Column	ACE 3 AQ (150 mm×3 mm, ACE, Aberdeen, Scotland, UK)																					
Mobile phase	A: Water, B: Acetonitrile																					
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>85</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>19</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>40</td> <td>100</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	A (%)	B (%)	0	100	0	11	85	15	19	75	25	20	90	10	26	100	0	40	100	0
Time (min)	A (%)	B (%)																				
0	100	0																				
11	85	15																				
19	75	25																				
20	90	10																				
26	100	0																				
40	100	0																				
Flow rate	0.25 mL/min																					
Injection volume	100 µL																					
Column oven temperature	35°C																					

### 2.7. 분석품질관리

AOAC 가이드라인(2002)에 준하여 시료 분석 기간동안 분석품질관리도표(quality control [QC] chart)를 작성하여 분석 품질을 관리하였다. 상업용 분유를 반복 분석하여 표준편차 5% 이내에 포함되는 10개의 데이터값을 선택하여 이들의 평균값을 QC chart 작성을 위한 기준값으로 설정하였다. QC chart의 관리상한선(upper control line, UCL), 관리하한선(lower control line, LCL), 조치상한선(upper action line, UAL) 및 조

치하한선(lower action line, LAL)은 다음과 같이 설정하여 사  
용하였다.

$$UCL \text{ and } LCL = \text{Mean of analyte content} \pm 2 \times SD$$

$$UAL \text{ and } LAL = \text{Mean of analyte content} \pm 3 \times SD$$

where, SD = standard deviation

시료 분석 시 QC sample을 함께 분석하여 QC chart의 관리  
선 수준으로 결과가 분석되는지 확인하였다. 조치선 범위에서  
분석값이 벗어나는 경우, 실험 조건과 환경을 점검하고 QC  
sample의 분석값이 관리 범위 내에 들어오는 것을 확인한 후  
시료 분석을 재진행하였다.

## 2.8. 통계 분석

통계 분석은 SPSS 프로그램(Statistics Package for the Social  
Science, ver. 22.0 for Window, SPSS Inc., Chicago, IL,  
USA)을 사용하여 평균과 표준편차를 산출하였다. 시료 간 유  
의성 검증은  $p < 0.05$  수준에서 일원배치분산분석(one-way  
ANOVA)을 실시하였으며, 사후 검정은 Duncan's multiple  
range test를 통해 수행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Immunoaffinity 정제 및 RP-HPLC/DAD의 직선 성, LOD, LOQ 및 특이성

Cyanocobalamin 표준품은 6가지 단계 희석하여 0.004-  
0.200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 수준에서 검량선을 작성한 결과는 Table 2  
과 같다. Cyanocobalamin의 농도(x축)와 HPLC로 분석한 반응  
치(y축)의 상관 관계식은  $y = 1,947.1391x - 1.3662$ 로 나타났으  
며, 상관계수  $R^2 = 1.0000$ 을 얻어 고도의 직선성을 나타내는 분  
석법임을 확인하였다. Immunoaffinity-HPLC 분석법을 이용한  
cyanocobalamin 분석의 LOD와 LOQ는 각각 0.01  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  과  
0.03  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  이었다(Table 2). RP-HPLC/DAD 분석법에서  
LOD 및 LOQ는 크로마토그램의 기준선(baseline)에서의 S/N  
를 기준으로 산정되며, 일반적으로 S/N 값이 낮을수록 해당 물  
질의 검출 가능성이 낮음을 의미한다(ACS, 1980).

International Conference on Harmonisation (ICH, 1994)

guideline 기준에 따라 공시험을 수행하였으며, 측정된 LOD  
및 LOQ는 각각 0.01  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  과 0.03  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  으로 나타났다  
(Table 2). Immunoaffinity column (IAC)을 이용한 분석법은  
추출액을 주입하여 cyanocobalamin을 흡착시킨 후 water를 이용  
하여 나머지 수용성 성분을 제거하였으며, 이는 cyanocobalamin  
성분 이외에 361 nm에서 흡광할 수 있는 수용성 불순물을 제  
거하였다. 이러한 정제(clean-up) 단계는 복잡한 매트릭스를 가  
진 시료의 HPLC 분석 시 기준선(baseline)의 불안정성과 잡음  
(noise)을 감소시켜 미량 성분의 검출 및 정량에 있어 분석의  
정확성과 재현성 확보에 기여한다. Jang 등(2014)의 연구에 따  
르면, IAC나 solid phase extraction (SPE) 등을 적용하여  
HPLC-DAD로 분석하는 경우 LOD가 약 0.02-0.30  $\mu\text{g}/100 \text{ g}$   
의 범위를 얻었다고 보고하였다. 이는 HPLC 분석 전에 IAC나  
SPE와 같이 clean-up 단계를 이용하여 불순물을 효과적으로  
제거하는 방법으로 LOD 검출을 낮추고, 미량 성분 중 하나인  
수용성 비타민 B<sub>12</sub>를 검출하는 데 효과적인 방법인 것을 보여  
준다. 이는 본 연구에서 검증한 분석법이 식품 중 미량 수준의  
비타민 B<sub>12</sub> 정량분석에 적합한 것을 나타낸다.

특이성은 표준참고물질을 분석하여 분리된 cyanocobalamin  
성분을 DAD spectrum (361 nm)으로 확인하는 방법을 이용하였  
다. SRM 3235 추출액과 표준용액에 대한 chromatogram의 peak  
의 범위는 200-600 nm 파장에서 spectrum을 분석하였으며, 결과  
는 Fig. 1과 같다. HPLC 분리는 표준용액의 cyanocobalamin  
peak는 약 28.8분대에 용출되었으며, 시료 chromatogram과의  
머무름 시간(retention time, RT)을 비교하여 cyanocobalamin  
peak를 동정하였다.

### 3.2. Immunoaffinity 정제 및 RP-HPLC/DAD의 정확 성 및 정밀성

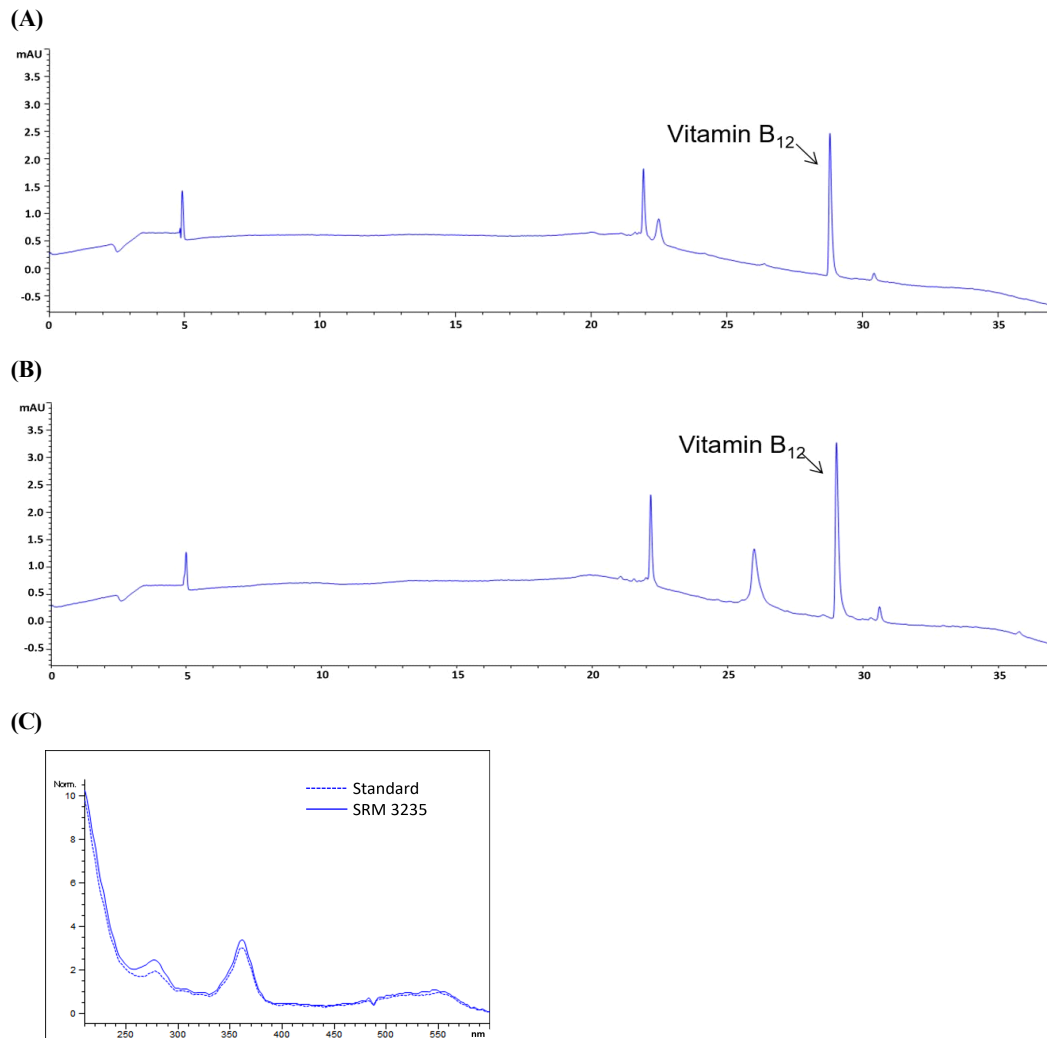
비타민 B<sub>12</sub> 분석을 위한 Immunoaffinity-HPLC/DAD 분석  
법의 정확성은 표준참고물질(Standard Reference Materials,  
SRMs)인 SRM 1549a 및 SRM 3235를 분석하여 검증하였다  
(Table 3). 본 분석법으로 측정된 SRM 1549a 및 SRM 3235의  
비타민 B<sub>12</sub> 함량은 각각  $3.30 \pm 0.09$  및  $1.56 \pm 0.01 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  이었  
으며, 이는 NIST에서 제시한 참고값 대비 각각 103% 및 106%  
의 회수율을 나타내었다. AOAC 가이드라인(2002)에 따르면,  
분석 성분의 농도가 0.01% 이하인 경우 정확성 허용 회수율은  
85-110%로 정의되어 있으며, 본 연구의 결과는 이 기준을 초

**Table 2.** Calibration range, LOD, and LOQ of cyanocobalamin analysis

Component	Concentration range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Correlation coefficient ( $R^2$ )	LOD <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ )	LOQ <sup>2)</sup> ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ )
Cyanocobalamin	0.004-0.2	1.0000	0.01	0.03

<sup>1)</sup>LOD, limit of detection.

<sup>2)</sup>LOQ, limit of quantification.



**Fig. 1.** HPLC chromatograms of vitamin B<sub>12</sub> standard (A) and SRM 3235 sample (B) recorded at 361 nm, along with their corresponding DAD spectra in the range of 200-600 nm (C).

**Table 3.** Accuracy of cyanocobalamin analysis

Component	Sample <sup>1)</sup>	Certified value <sup>2)</sup> (µg/100 g)	Analytical value <sup>3)</sup> (µg/100 g)	Recovery (%)
Cyanocobalamin	SRM 1549a	3.20±0.20	3.30±0.09	103.0±2.8
	SRM 3235	1.47±0.11	1.56±0.01	106.0±0.5

<sup>1)</sup>SRM, standard reference material; SRM 1549a, whole milk powder; SRM 3235, soy milk.

<sup>2)</sup>The certified value for the contents of corresponding analyte in SRM provided by National Institute of Standards and Technology.

<sup>3)</sup>The analytical value obtained in this study.

과하여 분석법의 우수한 정확성을 입증하였다.

정밀성 평가는 상업용 분유 시료를 대상으로 RSD<sub>r</sub> 및 RSD<sub>R</sub>을 분석하여 수행하였다(Table 4). Intra-day 분석 결과 평균값은 5.68±0.30 µg/100 g, CV는 5.35%였으며, inter-day 분석에서는 6.56±0.23 µg/100 g, CV는 3.51%로 나타났다. AOAC 가

이드라인은 비타민 B<sub>12</sub> 농도 1 µg/100 g 수준에서 RSD<sub>r</sub> 8%, RSD<sub>R</sub> 16% 이하를 권고하고 있으며, 본 연구 결과는 이 기준을 충분히 만족하였다. 또한, HorRat 값은 각각 0.27 및 0.18로 매우 낮은 수준을 보였으며, 이는 본 분석법의 정밀도가 우수함을 시사한다.

**Table 4. Precision of cyanocobalamin analysis**

Component	Sample	Repeatability <sup>1)</sup>			Reproducibility <sup>2)</sup>		
		Mean±SD <sup>3)</sup>	CV <sup>4)</sup> (%)	HorRat (r) <sup>5)</sup>	Mean±SD	CV (%)	HorRat (R) <sup>6)</sup>
Cyanocobalamin (µg/100 g)	Commercial infant formula	5.68±0.30	5.35	0.27	6.56±0.23	3.51	0.18

<sup>1)</sup>Repeatability refers to the results of independent 5 determination in triplicates obtained by analyzing a infant formula sample five times on the same day.

<sup>2)</sup>Reproducibility refers to the results of independent 5 determinations in triplicates obtained by analyzing a infant formula sample five times on different days (once a day).

<sup>3)</sup>SD, standard deviation.

<sup>4)</sup>CV, coefficient of variation.

<sup>5)</sup>HorRat ratio for intra day repeatability.

<sup>6)</sup>HorRat ratio for inter day reproducibility.

### 3.3. 수산가공품 38종의 cyanocobalamin 함량 분석 (Immunoaffinity-RP-HPLC/DAD)

본 연구에서는 농촌진흥청에서 선정한 국내 유통 수산가공품 38종을 대상으로, immunoaffinity-HPLC/DAD 분석법을 이용하여 비타민 B<sub>12</sub>의 주요 형태인 cyanocobalamin 함량을 정량 분석하였다(Table 5). 분석 결과, 전복죽, 다슬기(찜 것), 냉동제품, 육수 및 피쉬소스를 제외한 대부분의 시료에서 cyanocobalamin이 검출되었다. 38종의 시료 중 cyanocobalamin 함량은 0.13-19.75 µg/100 g 범위로 나타났으며, 이 중 꼬막 통조림이 19.75±0.48 µg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었다. 또한 어리굴젓(13.72±1.17 µg/100 g)도 높은 수준의 비타민 B<sub>12</sub>를 포함하고 있었으며, 이는 패류류가 비타민 B<sub>12</sub>의 주요 공급원으로 기능할 수 있음을 보여준다.

Park 등(2020)은 국내 수산물 및 가공품 28종을 분석한 결과, 피조개에서 36.13 µg/100 g의 cyanocobalamin이 검출되었으며 이는 전체 시료 중 가장 높은 수치를 기록하였다고 보고하였다. Petrus 등(2009)은 패류를 전개체(내장 포함)로 섭취할 경우, 장내 미생물에 의해 축적된 비타민 B<sub>12</sub>가 그대로 전달될 수 있다고 보고하였으며, Takenaka 등(2003)은 해조류의 경우 공생 박테리아에 의해 합성된 비타민 B<sub>12</sub>가 축적될 수 있음을 제시하였다. 실제로 본 연구에서도 김부각 등 해조류 가공품에서 7.69±0.04 µg/100 g의 높은 cyanocobalamin 함량이 확인되어 이러한 선행 보고와 일치하였다. 수산가공품의 cyanocobalamin 함량은 원료 생물종 특성에 따라 다르게 나타났는데, 패류류는 장내 미생물에 의해 합성 및 축적된 비타민 B<sub>12</sub>를 높은 수준으로 보유하는 반면, 어육소시지와 같이 부원료가 혼합된 제품은 원재료 희석 효과(dilution effect)의 영향으로 낮은 함량(0.13-0.32 µg/100 g)을 보였다. 해조류 가공품에서 검출된 중간 수준의 함량은 해조류 표면의 공생 미생물이 합성한 비타민 B<sub>12</sub>가 조직 내에 잔존하는 특성과 관련된 것으로 해석되며 (Takenaka 등, 2003), 본 연구 결과에서도 동일하게 관찰되었다.

또한, 동일 원료라도 조리 및 가공 방식에 따라 cyanocobalamin 함량은 크게 달라졌다. 새우까스 및 생선까스 등 튀김류의 경우

0.5-0.8 µg/100 g 수준으로 상대적으로 낮은 수치를 나타냈었는데, 이는 Nishioka 등(2011)의 연구와 유사한 결과로, 해당 연구에서는 쥐노래미를 다양한 조리 방식으로 처리한 결과, 대부분의 가열 조리법에서 최대 62%까지 비타민 B<sub>12</sub> 손실이 발생하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 고온 또는 기름 조리 과정에서 비타민 B<sub>12</sub>의 열적 손실이 일부 발생한 것으로 사료된다. 반면 꼬막 통조림이 고농도를 유지한 것은 통조림 공정의 밀폐성으로 인해 산화 손실이 제한되고, 가열 및 조리 과정에서 용출된 비타민이 제품 내부의 국물에 그대로 잔존하기 때문으로 해석된다.

이와 대비되게 전복죽, 다슬기 육수, 피쉬소스에서는 비타민 B<sub>12</sub>가 검출되지 않았는데, 이는 원재료 내 함량이 낮거나 조리 및 가공 과정에서 희석 또는 손실되었기 때문으로 추정된다. 이는 Engler와 Bowers(1976), Molonon 등(1980)의 연구에서 수용성 비타민 B<sub>12</sub>가 특히 습식 조리 시 손실률이 높은 경향이 있다고 보고한 결과와 일치한다.

비타민 B<sub>12</sub>의 일일 권장섭취량(RDA)은 한국인 영양소 섭취 기준(MOH, 2020)과 미국의 식이섭취기준(IOM, 1998) 모두에서 2.4 µg/day로 설정되어 있다. 이는 일반적인 식사를 통해 충족 가능한 수준이지만, 동물성 식품 섭취가 제한되는 채식주의자나 위장 절제 수술 환자, 고령자의 경우 보충이 필요하다. 특히 일부 해조류 기반 가공식품에서 검출된 cyanocobalamin은 이러한 인구집단의 잠재적 공급원으로 활용 가능성을 나타낸다.

삼면이 바다로 둘러싸인 한국의 지리적 특성상, 수산자원은 다양한 가공 형태로 국민 식생활에 폭넓게 활용되고 있다. 본 연구 결과는 수산가공식품을 통한 비타민 B<sub>12</sub>의 섭취 실태를 보다 정확히 파악할 수 있는 기초 자료로 활용될 수 있으며, 향후 국가표준식품성분표의 영양정보 고도화를 위한 과학적 근거를 제공할 것으로 기대된다.

### 3.4. 분석품질관리

본 연구에서는 수산가공품 중 cyanocobalamin 함량 분석의 신뢰성 확보를 위해, 시료 분석과 동시에 QC sample을 포함하여 QC chart를 작성하였다(Fig. 2). 분석된 cyanocobalamin의

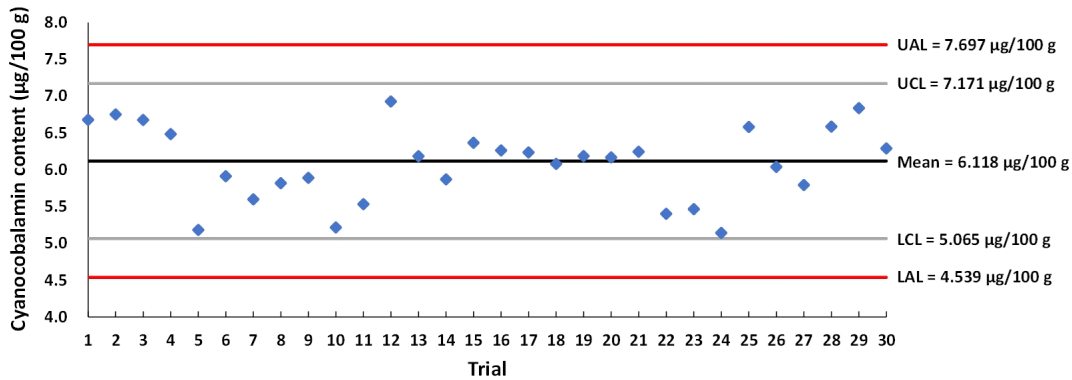
**Table 5. Vitamin B<sub>12</sub> contents of processed marine products frequently consumed in Korea**

Processed products			Cyanocobalamin (µg/100 g) <sup>1)</sup>
Category	Roman name and description	Scientific name	
Fish	Dongtae-jeon, frozen	<i>Theragra chalcogramma</i>	1.56±0.02 <sup>e2)</sup>
	Dongtae-jeon, frozen, cooked	<i>Theragra chalcogramma</i>	1.89±0.14 <sup>c</sup>
	Fish cutlet, frozen	-	0.83±0.04 <sup>f</sup>
	Fish cutlet, deep-fried	-	0.53±0.09 <sup>f</sup>
	Fish cutlet, air-fried	-	0.83±0.14 <sup>f</sup>
	Flying fish roe, frozen	<i>Cheilopogon</i> spp.	4.56±0.18 <sup>c</sup>
	Flying fish roe, steamed	<i>Cheilopogon</i> spp.	4.19±0.24 <sup>c</sup>
	Jwipo strips, raw	<i>Thamnaconus modestus</i>	2.51±0.29 <sup>d</sup>
	Kodari, frozen	<i>Theragra chalcogramma</i>	2.51±0.12 <sup>d</sup>
	Kodari, boiled	<i>Theragra chalcogramma</i>	2.54±0.08 <sup>d</sup>
	Galchi-sokjeot, product A	<i>Trichiurus lepturus</i>	2.40±0.14 <sup>d</sup>
	Galchi-sokjeot, product B	<i>Trichiurus lepturus</i>	2.64±0.30 <sup>d</sup>
	Galchi-sokjeot, product C	<i>Trichiurus lepturus</i>	2.28±0.29 <sup>d</sup>
	Fish sausage, cheese	-	0.32±0.01 <sup>f</sup>
	Fish sausage, original	-	0.13±0.01 <sup>f</sup>
	Fish sauce	-	ND <sup>3)</sup>
	Salted anchovy sauce, product A	<i>Engraulis japonicus</i>	0.79±0.06 <sup>f</sup>
	Salted anchovy sauce, product B	<i>Engraulis japonicus</i>	0.73±0.10 <sup>f</sup>
	Salted anchovy sauce, product C	<i>Engraulis japonicus</i>	0.88±0.08 <sup>f</sup>
	Crustaceans	Shrimp cutlet, frozen	<i>Penaeus</i> spp.
Shrimp cutlet, frozen, deep-fried		<i>Penaeus</i> spp.	0.56±0.08 <sup>f</sup>
Shrimp cutlet, frozen, air-fried		<i>Penaeus</i> spp.	0.52±0.06 <sup>f</sup>
Whiteleg shrimp, boiled		<i>Litopenaeus vannamei</i>	0.70±0.08 <sup>f</sup>
Cephalopods	Hunje ojing-eo (squid)	<i>Todarodes pacificus</i>	4.32±0.34 <sup>c</sup>
	Ojingeo-twigim, freezed	<i>Todarodes pacificus</i>	1.29±0.01 <sup>c</sup>
	Ojingeo-twigim, freezed, fried food	<i>Todarodes pacificus</i>	1.37±0.07 <sup>c</sup>
	Ojingeo-twigim, freezed, air-fried	<i>Todarodes pacificus</i>	0.84±0.07 <sup>c</sup>
Mollusks	Ureong (river snail), boiled	<i>Semisulcospira libertina</i>	1.17±0.04 <sup>c</sup>
	Canned cockle	<i>Tegillarca granosa</i>	19.75±0.48 <sup>a</sup>
	Boiled whelk, frozen	<i>Buccinum undatum</i>	0.33±0.01 <sup>f</sup>
	Boiled whelk, frozen, with broth	<i>Buccinum undatum</i>	ND
	Eoriguljeot, product A	<i>Crassostrea gigas</i>	13.72±1.17 <sup>a</sup>
	Eoriguljeot, product B	<i>Crassostrea gigas</i>	7.89±0.38 <sup>b</sup>
	Eoriguljeot, product C	<i>Crassostrea gigas</i>	11.26±0.32 <sup>a</sup>
	Abalone porridge	<i>Haliotis discus hannai</i>	ND
Seaweeds	Seaweed chips (Gim-bugak)	<i>Porphyra</i> spp.	7.69±0.04 <sup>b</sup>
	Kelp chips (Dasima-bugak)	<i>Laminaria japonica</i>	0.36±0.05 <sup>f</sup>
	Sea mustard chips (Miyeok-bugak)	<i>Undaria pinnatifida</i>	1.28±0.01 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>All values are mean±SD (n=3).

<sup>2)</sup>Mean±SD. Means with different lowercase letters (<sup>a-f</sup>) in the same column are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

<sup>3)</sup>ND, not detected.



**Fig. 2.** A quality control chart of immunoaffinity-HPLC/DAD analysis for cyanocobalamin. UCL, upper control line; LCL, lower control line; UAL, upper action line; LAL, lower action line.

QC chart는 개별 분석값을 시간 순서대로 도식화하여 분석의 정밀성과 일관성을 평가하였다. 모든 분석 결과는 UCL과 LCL 범위 내에 위치하였으며, 이는 분석 기간 동안 검증된 분석 조건 하에서 분석이 재현성 있게 수행되었음을 나타낸다.

분석품질관리에 사용되는 QC chart는 분석 도중 발생할 수 있는 다양한 변동 요인으로부터 데이터를 모니터링하여 결과의 정확성과 정밀성을 유지하는 데 유용한 도구이다(Moon et al., 2019). 특히, 검증된 분석법을 장기적으로 적용하는 경우 독립적인 결과 간 품질을 보장하는 데 한계가 있을 수 있으며, 이러한 문제를 해결하기 위해 균질성과 안정성이 확보된 품질 관리 시료를 반복 분석하고 그 결과를 QC chart로 시각화함으로써 분석의 지속적인 품질관리를 가능하게 한다.

국가표준식품성분표와 같은 공공 데이터베이스 구축에서는 중장기적 분석이 여러 기관에서 병행되는 경우가 많으며, 분석 결과의 시기적 일관성과 데이터 간 호환성 확보가 필수적이다. 따라서 분석 데이터의 품질 보장은 단기간의 검증을 넘어서 지속 가능한 품질관리 체계를 통해 이루어져야 한다. 본 연구에서 수행된 cyanocobalamin 분석은 이러한 조건을 충족하며, 향후 국가표준식품성분표에 활용 가능한 신뢰도 높은 기초 데이터를 제공할 수 있다.

이러한 결과는 immunoaffinity-RP-HPLC/DAD 분석법이 수산가공품 중 비타민 B<sub>12</sub> 분석에서 높은 정확성과 재현성을 갖춘 신뢰도 높은 분석 도구임을 보여주는 것이며, 이를 이용하여 국가 데이터베이스 구축을 위한 과학적 기반 자료로의 활용 가능성을 나타낸다.

#### 4. 요약

본 연구는 국내에서 유통되는 수산가공식품 38종을 대상으로 비타민 B<sub>12</sub> (cyanocobalamin)의 함량을 immunoaffinity-RP-HPLC/PDA 분석법을 통해 분석하였다. 국가표준식품성분

데이터베이스 구축을 위한 자료로 활용하기 위한 데이터의 신뢰도 확보를 위해 비타민 B<sub>12</sub> 분석법의 유효성을 검증하였으며 이와 함께 분석품질관리를 수행하였다. 분석법의 정확성, 정밀성, 특이성, 상관성, 검출한계 및 정량한계를 분석한 결과 모두 AOAC 가이드라인(2002) 기준에 충족되는 결과를 얻었으며, 분석 기간 동안 분석품질관리도표를 작성하여 분석 데이터의 신뢰도를 확보하였다. 수산가공품 38종의 비타민 B<sub>12</sub>를 분석한 결과, 0.13-19.75 µg/100 g의 범위를 나타내었으며, 꼬막 통조림이 19.75±0.48 µg/100 g로 가장 높은 함량을 나타내었다. 어리굴젓(13.72±1.17 µg/100 g)과 같은 젓갈류 및 김부각(7.69±0.04 µg/100 g) 등의 해조류 가공품에서도 비교적 높은 함량이 검출되었다. 반면, 생선까스 및 새우까스(0.5-0.8 µg/100 g), 어육소시지(0.13-0.32 µg/100 g) 등 고온 가열 및 튀김 공정을 거친 제품에서는 비타민 B<sub>12</sub> 함량이 전반적으로 낮은 경향을 나타내었다. 비타민 B<sub>12</sub>는 주로 동물성 식품에 존재하는데 본 연구 결과 김부각과 미역부각과 같은 해조류 가공품은 채식주의자 또는 준채식 식단을 따르는 소비자에게도 잠재적인 급원식품으로 활용될 수 있을 것으로 보인다. 본 연구에서 확보된 분석 데이터는 국가표준식품성분표의 데이터베이스 구축의 자료로 활용되어 보다 정확하고 효율적인 국민건강증진에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

#### Funding

This research was supported by 2023-2024 National Institute of Crop and Food Science (RS-2023-00229794).

#### Acknowledgements

None.

#### Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

## Author contributions

Conceptualization: Chun J. Investigation: Je M, Park SE, Lee HJ. Formal analysis: Je M, Park SE, Lee HJ. Project administration: Chun J. Supervision: Chun J. Writing - original draft: Je M. Writing - review & editing: Chun J.

## Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

## ORCID

Minyoung Je (First author)

<https://orcid.org/0009-0008-0108-277X>

Seo-Eun Park

<https://orcid.org/0009-0002-5603-3664>

Hui Jin Lee

<https://orcid.org/0009-0008-1520-9399>

Jiyeon Chun (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0002-0093-0203>

## References

- ACS (American Chemical Society, Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry). Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem*, 52, 2242-2249 (1980)
- AOAC. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Association of Official Agricultural Chemists, Gaithersburg, MD, USA, p 12-13 (2002)
- Ball GFM. Vitamins in Foods: Analysis, Bioavailability and Stability. Taylor & Francis, London, UK, p 3 (2005)
- Bito T, Tanioka Y, Watanabe F. Characterization of vitamin B<sub>12</sub> compounds from marine foods. *Fish Sci*, 84, 747-755 (2018)
- Engler PP, Bowers JA. B-vitamin retention in meat during storage and preparation. *J Am Diet Assoc*, 69, 253-257 (1976)
- Fera Science Ltd. Fapas<sup>®</sup> proficiency testing. Available from: <https://fapas.com>. Accessed Jul. 15, 2025.
- Haustein M. Horwitz ratio (HorRat). Available from: <https://www.cipac.org/>. Accessed Jul. 15, 2025.
- He K, Merchant A, Rimm EB, Rosner BA, Stampfer MJ, Willett WC, Ascherio A. Folate, vitamin B<sub>6</sub>, and vitamin B<sub>12</sub> intakes in relation to risk of stroke among men. *Stroke*, 35, 169-174 (2004)
- Horwitz W, Albert R. The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *J AOAC Int*, 89, 1095-1109 (2006)
- Hunt A, Harrington D, Robinson S. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency. *BMJ*, 349, g5226 (2014)
- ICH. ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation, Geneva, Switzerland (1994)
- IOM. Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B<sub>6</sub>, Folate, Vitamin B<sub>12</sub>, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline. National Academy Press, Washington, DC, USA. p 306-307 (1998)
- Jang DE, Choung MG, Chun J. Immunoaffinity-HPLC/DAD assay and validation for vitamin B<sub>12</sub> in snacks and cereals. *J Agric Life Sci*, 48, 351-364 (2014)
- Martens JH, Barg H, Warren MJ, Jahn D. Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 275-285 (2002)
- MOHW. Dietary reference intakes for Koreans 2020. Ministry of Health and Welfare, Sejong, Korea (2020)
- Molonon BR, Bowers JA, Dayton AD. Vitamin B<sub>12</sub> and folic acid content of raw and cooked turkey muscle. *Poult Sci*, 59, 303-307 (1980)
- Moon HG, Islam MA, Chun J. Analysis of retinol,  $\beta$ -carotene, vitamin E, and cholesterol contents in steamed and braised dishes of the Korean diet. *Korean J Food Preserv*, 26, 796-807 (2019)
- Nishioka M, Kanosue F, Yabuta Y, Watanabe F. Loss of vitamin B<sub>12</sub> in fish (round herring) meats during various cooking Treatments. *J Nutr Sci Vitaminol*, 57, 432-436 (2011)
- Oh RC, Brown DL. Vitamin B<sub>12</sub> deficiency. *Am Fam Physician*, 67, 979-986 (2003)
- Park YE, Nam KH, Kim YK, Chun J. Validation of immunoaffinity-HPLC/PDA method for microvitamin (biotin and cobalamins) analysis in marine resources and products. *Korean J Food Preserv*, 27, 744-753 (2020)
- Petrus AK, Fairchild TJ, Doyle RP. Traveling the vitamin B<sub>12</sub> pathway: Oral delivery of protein and peptide drugs. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 1022-1028 (2009)
- Takenaka S, Takubo K, Watanabe F, Tanno T, Tsuyama S, Nanano Y, Tamura Y. Occurrence of coenzyme forms of vitamin B<sub>12</sub> in a cultured purple laver (*Porphyra yezoensis*). *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, 2480-2482 (2003)
- Wang M, Schuster K, Asam S, Rychlik M. Challenges in the determination of total vitamin B<sub>12</sub> by cyanidation conversion: Insights from stable isotope dilution assays. *Anal Bioanal Chem*, 415, 5797-5807 (2023)
- Watanabe F, Yabuta Y, Tanioka Y, Bito T. Biologically active vitamin B<sub>12</sub> compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. *J Agric Food Chem*, 61, 6769-6775 (2013)