creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000264610

2015년 2월
박사학위 논문

건강기능식품 중 달맞이꽃종자추출물, 크레아틴 및 히알루론산 시험법 최적화에 관한 연구

조선대학교 대학원
식품의약학과
박 상 욱

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

건강기능식품 중 달맞이꽃종자추출물, 크레아틴 및 히알루론산 시험법 최적화에 관한 연구

Optimization of analytical methods development for evening primrose extracts, creatine and hyaluronic acid in health functional foods

2015년 2월 25일

조선대학교 대학원
식품의약학과
박 상 욱

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

건강기능식품 중 달맞이꽃종자추출물, 크레아틴 및 히알루론산 시험법 최적화에 관한 연구

지도교수 이 원 재

이 논문을 약학 박사학위신청 논문으로 제출함

2014년 10월

조선대학교 대학원

식품의약학과

박 상 욱

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

박상욱의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 조교수 이 재 준 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이 원 재 (인)

위 원 조선대학교 조교수 기 성 환 (인)

위 원 조선대학교 조교수 황 승 림 (인)

위 원 순천대학교 조교수 백 만 정 (인)

2014년 12월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

List of Tables ····· iii

List of Figures ····· v

ABSTRACT ····· vii

제1장 서 론 ····· 1
제1절 고시형 품목 기능적 특성 ····· 5
1 달맞이꽃종자추출물 ····· 5
제2절 개별인정형 품목 기능적 특성 ····· 7
1 크레아틴모노하이드레이트 ····· 7
2 히알루론산나트륨 ····· 9

제2장 재료 및 방법 ····· 11
제1절 실험재료 및 기기 ····· 11
1 시료 ····· 11
2 시약 및 분석기기 ····· 11
제2절 기능(지표)성분 분석방법 표준화 및 검증방법 ····· 12
1 기능(지표)성분 분석방법 표준화 ····· 12
2 밸리데이션 검증 항목 ····· 12

제3장 결과 및 고찰 ····· 19
제1절 기능(지표)성분 분석방법 표준화 수립 ····· 19
1 달맞이꽃종자추출물 제품 중 Total polyphenol ····· 19
2 달맞이꽃종자추출물 제품 중 Penta-O-galloyl beta-D-glucose ····· 21
3 크레아틴 보충제 중 Creatine, Dicyandiamide, Dihydrotriazine ····· 24
4 히알루론산 보충제 중 Hyaluronic acid ····· 27
제2절 기능(지표)성분 밸리데이션 검증 ····· 30

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1 달맞이꽃종자추출물 중 Total polyphenol ····· 30
2 달맞이꽃종자추출물 중 Penta-O-galloyl beta-D-glucose ····· 54
3 크레아틴 보충제 중 Creatine, Dicyandiamide, Dihydrotriazine ····· 82
4 히알루론산 보충제 중 Hyaluronic acid ····· 124
제3절 유통 중인 건강기능식품 모니터링 결과 ····· 154
1 검체 선정 및 수거 현황 ····· 154
2 모니터링 결과 ····· 156

제4장 요 약 ····· 164

참 고 문 헌 ····· 167

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

LIST OF TABLES

Table 1. HPLC condition for analysis of penta-O-galloyl beta-D-glucos ····· 23
Table 2. HPLC condition for analysis of creatine, dicyandiamide and dihydrotriazine ····· 26
Table 3. HPLC condition for analysis of hyaluronic acid ····· 29
Table 4. Description of the samples ····· 31
Table 5. Accuracy data of total polyphenol (n=5) ····· 35
Table 6. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5) ····· 37
Table 7. Repeatability precision data of three TPPs with different sample matrix (n=5) ····· 39
Table 8. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5) ····· 41
Table 9. Uncertainty budget for the determination of W_s, V_{Mp} and V_f ····· 44
Table 10. Summary of uncertainty values from standard solutions ····· 47
Table 11. The result of regression analysis using Excle program ····· 49
Table 12. Description of the samples ····· 55
Table 13. Selectivity data of PGG ····· 58
Table 14. Accuracy data of PGG (n=5) ····· 62
Table 15. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5) ····· 64
Table 16. Repeatability precision data of three PGGs with different sample matrix (n=5) ····· 66
Table 17. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5) ····· 68
Table 18. Uncertainty budget for the determination of W_s, and V_f ····· 71
Table 19. Summary of uncertainty values from standard solutions ····· 74
Table 20. The result of regression analysis using Excle program ····· 77
Table 21. Description of the samples ····· 82
Table 22. Selectivity data of creatine and organic contaminants ····· 85
Table 23. Accuracy data of creatine, dicyandiamide and dihydrotriazine (n=5) ····· 89

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 24. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5) ····· 91
Table 25. Repeatability precision data of three CrMs with different sample matrix (n=5) ····· 93
Table 26. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5) ····· 95
Table 27. Uncertainty budget for the determination of W_s, V_f, V_1 and V_2 ····· 98
Table 28. Uncertainty values from standard solutions of creatine ····· 103
Table 29. Uncertainty values from standard solutions of dicyandiamide ····· 106
Table 30. Uncertainty values from standard solutions of dihydrotriazin ····· 109
Table 31. Uncertainty budget for the determination of L_C ····· 113
Table 32. Uncertainty budget for the determination of I_R ····· 115
Table 33. Uncertainty budget for the determination of R_M ····· 117
Table 34. Uncertainty budget for the determination of U ····· 119
Table 35. Description of the samples ····· 125
Table 36. Selectivity data of hyaluronic acid ····· 128
Table 37. Accuracy data of hyaluronic acid (n=5) ····· 132
Table 38. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5) ····· 134
Table 39. Repeatability precision data of three HAs with different sample matrix (n=5) ····· 136
Table 40. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5) ····· 138
Table 41. Uncertainty budget for the determination of W_s, V_{Mp} and V_f ····· 141
Table 42. Summary of uncertainty values from standard solutions ····· 144
Table 43. The result of regression analysis using Excle program ····· 149
Table 44. Summary on the kinds and quantity of health/functional foods ····· 155
Table 45. Results of monitoring Health/functional food containing total polyphenol and PGG ····· 157
Table 46. Results of monitoring Health/functional food containing creatine and organic compounds ····· 158
Table 47. Results of monitoring Health/functional food containing hyaluronic acid ····· 161

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Methanolysis of tannic acid to yield PGG under weak acidic condition and other polyphenolic compounds ····· 5
Fig. 2. Chemical synthesis of creatine monohydrate and organic contaminants ····· 7
Fig. 3. Unsaturated saccharide structure obtained after HA's enzymatic digestion by chondroitinase ABC enzyme ····· 9
Fig. 4. Calibration curve of total polyphenol (n=3) ····· 33
Fig. 5. Contributions of uncertainty factors ····· 51
Fig. 6. Variations of the result by total polyphenol method between laboratories ····· 53
Fig. 7. HPLC chromatogram of PGG in Health/Functional food (A : Standard of PGG, B : Sample material, C : Standard spiked in sample material) ····· 57
Fig. 8. Calibration curve of PGG (n=3) ····· 60
Fig. 9. Contributions of uncertainty factors ····· 79
Fig. 10. Variations of the result by PGG method between laboratories ····· 81
Fig. 11. Overlaid HPLC chromatograms of dicyandiamide, creatine and dihydrotriazine under UV 212 nm (1st), UV 224 nm (2nd) and UV 237 nm (3rd) conditions, respectively [A : 3 standard compounds of dicyandiamide (UV 212 nm), creatine (UV 224 nm) and dihydrotriazine (UV 237 nm)], B : CrM1 sample, C : CrM1 sample spiked with 3 standard compounds] ····· 84
Fig. 12. Standard calibration curve of creatine (A), dicyandiamide (B) and dihydrotriazine (C) ····· 87
Fig. 13. Contributions of uncertainty factors ····· 121
Fig. 14. Variations of the result by creatine method between laboratories ····· 123
Fig. 15. HPLC chromatograms of unsaturated saccharide samples obtained after

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

enzymatic digestion of HA used as dietary supplement (A : standard HA, B : HA1 material). See experimental for chromatographic conditions. ··· 127
Fig. 16. Calibration curve of hyaluronic acid (n=3) ····· 130
Fig. 17. Contributions of uncertainty factors ····· 151
Fig. 18. Variations of the result by hyaluronic acid method between laboratories ····· 153

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Optimization of analytical methods development for evening primrose extracts, creatine and hyaluronic acid in health functional foods

Sang Wook Park
Advisor : Prof. Lee, Wonjae, Ph. D.
Department of Food and Drug,
Graduate School of Chosun University

Abstract: As specific and generic health/functional food items have been expanded, this research project has been conducted to prepare a scientific and systematic standardized analytical method of relevant food items, examine the suitability of the analysis method for health/functional foods on sale, and monitor standards and specifications. As for research items, selected was one health/functional food items (Evening primrose extracts), which is announced, but whose analysis method is not determined, and two items (creatine monohydrate, hyaluronic acid) necessary for development and verification of a analysis method in accordance with clause 1 of Article 14 of 「Law for Health Functional Foods」 under which if the same items among generic health/functional food items are recognized a lot, their analysis method should be developed and verified for announcement before health/functional food code registration. Also, in accordance with clause 2 of Article 15 of 「Law for Health Functional Foods」, data related to safety and functionality of raw materials or ingredients were received from a manufacturer, and then the functional

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(index) ingredients found in the health/functional foods' functional raw materials certificate were selected. For the 4 types of functional (index) ingredients of the selected 3 items, AOAC guidelines proposed applicability, selectivity, calibration, accuracy, repeatability precision, measurement uncertainty, reproducibility precision, limit of detection and limit of determination were conducted, and satisfying results were drawn from all types. Therefore, the test method for the research items is considered to be applicable). The standardized test method was used to monitor the standards and requirements of 33 cases in 3 items on sale. The monitoring result showed that the test method was suitable for all cases. Therefore, it is considered that manufacturing and selling of research items are safely managed. With the use of the study results, this researcher tries to propose the standardized analysis method for functional(index) ingredients in health/functional foods to domestic test institutes and other relevant institutes, and thereby secure the capability to perform follow-up management and standardized test on raw material approved products.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제1장 서 론

식품은 인간의 생존과 건강에 직결되는 것으로서 언제나 인류의 강한 관심의 대상이 되어 왔다. 특히, 선진국은 경제수준의 향상과 보건·의료환경의 변화로 평균수명이 늘어나고 노령화사회가 진전되면서 성인병과 같은 질병을 예방하고 수준 높은 삶의 질을 유지하고자 하는 노력과 관심은 그 어느 시기보다도 강해지고 있다. 이러한 시대적 상황에서 신체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 건강에 유용한 효과를 주는 기능성 식품에 대하여 관심과 소비가 증가하는 것은 어쩌면 매우 자연스런 현상이라고 할 수 있다. 식품의 성분이 각종 만성퇴행성질환을 예방할 수 있고, 질병의 개선 및 건강 유지, 증진과 밀접한 관련이 있음이 과학적으로 구명됨에 따라 건강관련 식품에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있다(1).

우리나라에서도 건강 기능식품 산업의 성장은 관련 법률의 제정의 시기와 밀접하게 연관되어 있다. 2000년 11월 건강기능식품의 안전성 확보 및 품질 향상과 건전한 유통 판매를 도모함으로써 국민 건강과 소비자 보호에 이바지한다는 목적으로 국회 보건복지위원회 「건강기능식품에 관한 법률」발의하고 2002년 7월 국민보건과 건강기능식품산업의 발전을 위한 건강기능식품법이 국회 본회의를 통과하면서부터 본격적인 성장기에 도입하게 되었다. 동 법률에 기하여 식품의약품안전처(이하 식약처)에서는 건강기능식품의 안전성 확보, 품질 향상, 건전한 유통 판매를 도모하고 국민의 건강증진에 대한 욕구와 관련 산업계의 지속적인 성장을 유도하기 위하여 건강기능식품공전에 기능성 원료를 고시하였다. 또한 기능성 원료별 기준 및 규격의 추가 등재 원칙을 마련하여 개별인정형 및 고시형 전환 제도를 운영함으로서 시장 산업의 적극 개입을 유도할 수 있는 제도적 장치를 마련하도록 노력하고 있다. 한 예로, 고시형 기능성 원료는 「건강기능식품공전」에 적합하게 제조·가공·생산·수입할 경우 특별한 인정 절차 없이 누구나(영업자) 판매가 가능하나, 개별인정형 기능성 원료를 판매하고자 할 경우는 원료의 안정성과 기능성에 대한 자료를 제출하여 식약처장으로 부터 건강기능식품으로 인정을 받도록 하

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

는 제도이다. 그러나 개별인정형 기능성 원료는 신청한 영업자에게만 허용되어 그 원료를 사용하고자 하는 다른 영업자는 별도의 인정을 받아야 하는 번거러움이 있다. 그래서 식약처에서는 소비자의 욕구와 식품산업을 활성화를 유도하기 위하여 개별인정형 기능성 원료를 고시형으로 전환하는 기간을 2년에서 3년으로 연장하여 기능성 원료 제조자 및 수입자의 권익을 보호하고 시장의 적극적 개입을 유도하여 건강기능식품산업 활성화를 유도하였다. 그 결과 고시형 및 개별인정형 원료 품목수가 매년 증가하고 있으며, 건강기능식품공전 기준 및 규격 Ⅰ.2 공통제조기준에 의해 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말 등과 같이 다양한 형태로 제조 판매되고 있다. 이러한 정부의 적극적 정책지원으로 건강기능식품시장은 2006년 이후 건강지향적 욕구 증가와 소득수준에 따른 시장의 형성 및 발전, 경제성장으로 인한 건강기능식품의 산업의 규모를 한층 성장 시켰다. 2010년 건강기능식품 산업 총생산액은 약 1.1조원으로 국내총생산(1,172.8조원)의 0.09%, 제조업 총생산(323.1조원)의 0.33%를 차지하였으며, 세계시장규모의 0.8%인 25억달러 수준에 이르렀다. 또한 건강기능식품 사업체 수는 2007년부터 2010년 동안 평균 14.5%로 증가했으며, 업태별로는 일반판매업이 70,753개소로 전체의 93.8%를 차지하고, 수입업(2,818개소, 3.7%), 유통전문판매업(1,481개소, 2.0%), 전문제조업(361개소, 0.5%), 벤처제조업(36개소, 0.1%)의 순으로 성장했다(2).

그러나 최근에는 건강기능식품의 확대에 따라 이를 규율하고 있는 「건강기능식품에 관한 법률」이 소비자의 안전과 관련된 기능성 원료의 품질관리를 적절히 하고 있는가 하는 점에 관심을 갖게 되면서 그와 관련된 대책을 마련하기에 이르렀다. 그래서 선진국을 비롯하여 국제기구에서는 건강기능식품의 산업 활성화에 따른 식품안전관리 체계를 효과적으로 구축할 수 있는 방안에 대하여 심도 있게 다루고 있으며, 국가 간 공동연구 및 관리협조체계를 구축하는 등 많은 노력을 기울이고 있다. 그래서 식약처에서는 건강기능식품의 효과적인 관리방안을 모색하기 위하여 안전관리 표준화, 시험지침의 국제화 및 건강기능식품 관리체계 구축 등의 지속적인 연구개발사업을 추진함과 동시에 식품산업의 장기적 발전을 위해서 과학적 증거를 확보한 다양한

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

개별인정형 기능성원료를 고시형 기능성 원료로 생산 및 판매되도록 유도하여 적절한 법적 테두리 안에서 품질관리가 이뤄질 수 있도록 노력하고 있다. 이러한 정책의 일환으로 식약처에서는 공전 등재 및 추가 대상 예정품목을 선정하고 고시 제2014-26호, 별표 1에 따라 시험방법 타당성 검토항목(특이성, 정확성, 정밀성, 정량한계, 직선성, 범위)을 수행 한 후 적합성 검토를 거쳐 해당 품목의 기준·규격 개정 고시(안)을 마련하고 있다. 그러나 분석법 밸리데이션에 대한 지침을 규정·관리하고 있는 의약품과 달리 건강기능식품은 표준시험절차 및 밸리데이션 가이드라인이 마련되어 있지 않아서 시험자, 시험환경, 시험과정 설계 등의 내·외부 요인에서 발생하는 시험방법의 불완전성을 보완하기는 한계가 있다. 즉, 시험방법의 적합성 및 타당성 검토를 거침에도 불구하고 시료를 분석할 경우에는 시료 기질(matrix), 전처리 및 시험전 과정에서의 오차로 인한 결과의 차이가 발생하는 것을 불가피 하다. 결국은 정부의 시험법 재평가 및 심의를 거쳐 제·개정·고시하는 과정이 빈번하게 발생하게 되며, 원료 및 제품의 품질관리 공백기와 더불어 건강기능식품의 제조자, 판매자 및 검사기관의 기준·규격적용에 어려움을 겪을 수밖에 없다. 이를 해결하기 위해서는 개별인정형 기능성 원료를 고시형으로 전환하는 과정에서 명확한 기준에 입각한 품질 평가 항목을 설정하고 검증을 수행함으로서 시험방법에 대한 불완전성을 보완하고 적합성 검토가 선행되어야 한다. 일찍이 국제기구에서는 이러한 문제점을 보완할 수 있는 방안에 대하여 논의되어 왔다. 국제도량형국(BIPM)에서는 1981년 10월에 열린 국제 도량형위원회(International committee of weights and measures, ICWM)으로 하여금 그 해결방안을 모색하도록 했으며, 10여 년의 작업을 통하여 국제도량형위원회는 국제도량형국(Bureau international des poids et measures, BIPM), 국제전기기술위원회(International electronical committee, IEC), 국제국제임상화학위원회(International federation of clinical chemistry, IFCC), 국제표준화기구(International organization for standardization, ISO), 국제순수 및 응용화학연합회(International union of pure and applied chemistry, IUPAC), 국제순수 및 응용물리연합회(International union of pure and appled physics, IUPAP), 국제법정계량기구(International organization of legal metrology,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

OIML) 등 각 분야를 대표하는 국제기구와 각국의 표준기관 공동으로 1993년에 "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISO"라는 지침서를 발간하게 되었다(3). IUPAC 기술보고서에서는 단일 실험실내에서의 밸리데이션 품질평가 방법 및 측정불확도 등을 상세히 기술하고 있으며, 검증 수행 과정을 정밀화 및 세분화함으로서 불완전성을 보완하고 적합성을 유지하도록 권장하고 있다(4). 또한 AOAC 가이드라인에서는 실험실내 시험방법을 평가하기 위한 가이드(정의, 확인, 성능특성, 관리, 보고양식 등)를 제공하며, 그 시험방법에 대한 적합성, 최적성, 안정성 등을 평가하고 실제 시험시료에 적용 가능성 등을 실험실에서 수행할 수 있도록 그 방법을 제시하고 있다(5). 그 밖에도 KOLAS(Korea Laboratory Accreditation Scheme)국제 공인시험기관에서의 경우, 한국표준과학원이 발간한 측정불확도 표현지침(5)을 근거로 불확도 산출 및 표현을 신뢰도 평가의 중요한 요소로 다루고 있으며, 공인시험기관에 의무 적용하고 있다.

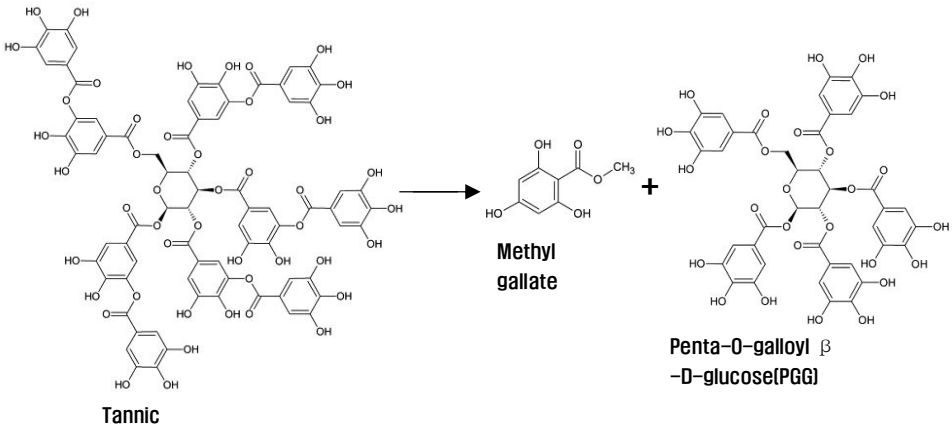
따라서 본 연구에서는 기능성 원료별 기준 및 규격의 추가 등재 원칙에 의거 고시되었거나, 등재 및 추가 예정 품목인 개별인정형 건강기능식품에 대하여 표준 시험법을 마련 후, 식이보충제의 화학적 분석방법에 대한 밸리데이션을 제시하고 있는 AOAC 가이드라인(6)의 검증절차에 따라 지표(기능)성분에 대한 시험방법 설정, 검토 등을 수행하였다. 또한, 검증된 시험법을 토대로 유통 중인 건강기능식품의 기준·규격 등의 모니터링을 수행하여 시험법 적합성 검토 후 표준화 시험법(안)을 마련하고 제·개정 고시에 제안함과 동시에 시험법 개발절차를 제공하고자 수행했다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제1절 고시형 품목 기능적 특성

1. 달맞이꽃종자추출물



Groups	Compounds
Phenolic acids	Gallic acid, Ethyl gallate, Ferulic acid pentoside
Flavanols	Catechin, Catechin gallate
Oligomeric procyanidins	
Flavonols	Quercetin-3-*O*-glucoside, Quercetin-3-*O*-glucuro- nide, Quercetin-3-*O*-pentoside, Quercetin
Gallotannins	Tetragalloyl glucose, Pentagalloyl glucose, Hexaga-lloyl glucose

Fig. 1. Methanolysis of tannic acid to yield PGG under weak acidic condition and other polyphenolic compounds (7).

"달맞이꽃종자추출물"은 달맞이꽃(Oenothera biennis)의 종자를 압착한 후 헥산을 이용하여 지방을 제거하고 60% 주정으로 추출한 다음 농축 및 분무건조과정을 거쳐 만들어진다. 지표성분으로는 폴리페놀과 PGG(penta-O-galloyl beta-D-glucose)으로서 각각의 함량이 60~70%, 2~2.8%가 되도록 표준화되었다(8). 보통 음식으로 섭취한 전분이 α-glucosidase에 의해 포도당으로 분해된 후 흡수되는데 이러한 기능성 물질을 가지는 달맞이꽃종자주정추출물

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

은 α-glucosidase의 효소활성을 저해하여 전분의 소화 흡수를 느리게 함으로서 식후 혈당상승을 완화시킬 수 있는 것으로 동물시험에서 관찰되었다(8). 실제로 혈당이 약간 높은 사람을 대상으로 달맞이꽃종자주정추출물의 보충효과를 비교한 인체적용연구에서도 달맞이꽃종자주정추출물은 식후 혈당의 상승속도를 느리게 하고 공복혈당, 당화혈색소를 개선하는데 도움이 될 수 있음이 확인되었다(8). 특히, 달맞이꽃종자추출물의 기능(지표)성분 중 PGG는 페놀성 화합물로서 산화방지제, 항돌연변, 항암활성, 항당요, 및 혈관형성저해 작용이 있는 것으로 현재까지 보고되었으며, 암세포의 아포토시스(apoptosis)를 유도하고 원발성 간암(hepatocellular carcinoma)의 확산을 막는 역할을 갖는다고 보고하였다(9-10). 그리고 오배자(Rhus chinensis mill)에서 분리한 PGG는 항신생혈관 형성, 항암을 포함한 다양한 생물학적 효능을 지녔으며, 항조직 성장과정에서 발생되는 저산소증에 의한 신생혈관에 효과적 억제제임을 증명하였고(11). 오배자 추출액으로부터 유효물질인 PGG 구조동정(12-13) 후 세포간교통 회복 및 혈관형성 억제작용에 대한 효과를 확인하였다(14). 그리고 작약(Paeonia lactiflora) 추출물에서 PGG가 식후 고혈당증에 미치는 억제효과를 가져오며 이는 새로운 약효식품으로 이용가치가 있음을 증명하였다(15).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2절 개별인정형 품목 기능적 특성

1. 크레아틴 모노하이드레이트

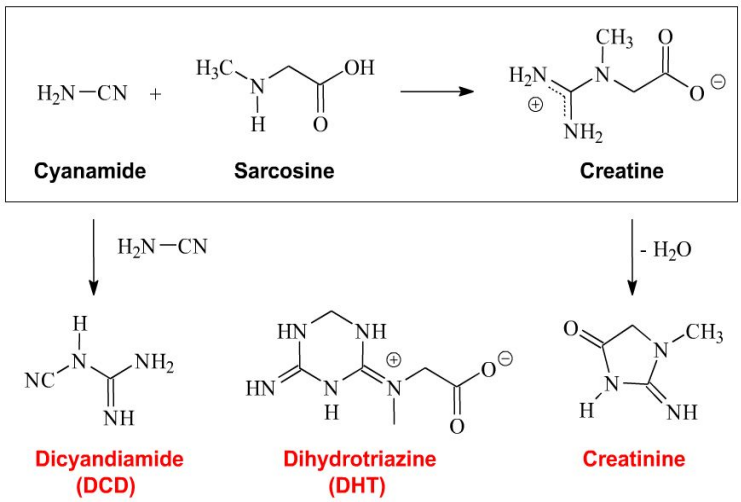


Fig. 2. Chemical synthesis of creatine monohydrate and organic contaminants (16).

크레아틴(creatine)은 나트륨 사코시네이트(sodium sarcosinate)와 시안아미드(cyanamide)가 화학적으로 합성되어 만들어진다. 크레아틴을 섭취하면 체내에서 인산기(phosphate)가 붙은 인산 크레아틴(phospho-creatine)이 되는데 인산 크레아틴은 우리 몸에서 에너지를 내는 ATP의 생성에 사용되어 에너지 생성을 도와준다. 동물실험 및 인체적용연구에서 크레아틴 섭취 후, 혈액과 근육에 인산크레아틴이 증가되는 것이 확인되었으며, 실제로 운동선수를 대상으로 크레아틴의 보충효과를 비교한 연구에서 크레아틴이 숄더프레스(shoulder press), 인클라인프레스(incline press)등의 근력운동 수행능력을 향상시키는 것이 확인되었다. 그래서 식약처에서는 2007년 “근력 운동 시에 운동수행능력 향상에 도움을 줄 수 있습니다.”의 기능성을 인정하였고, 기능성 등급은 기반연구와 인체적용연구의 수가 충분하지는 않으나, 그 결과가 일관

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

성 있으므로 “기타기능 II”에 해당됨을 인정하였다(8). Kreider(17)에 의하면 크레아틴은 사람의 근육의 최대 장력을 늘려주며, Lyoo 등(18)은 크레아틴을 매일 섭취 시 근육 및 근육에 관련된 신경퇴화성 질병에 치료가 가능하다고 보고하였다. Kley 등(19-21)은 크레아틴을 이용하여 근육의 장애를 줄이고 근력의 기능을 향상시켰으며, Rahimi (22)는 DNA의 돌연변이 형성을 줄이는 것과 연관성이 있다고 보고하였다. 그러나 최근에는 크레아틴을 제조하는 과정에 저급 출발물질(starting materials)을 사용하거나 합성과정이 최적화되지 않은 상태에서 충분한 수세 과정을 거치지 않은 경우에는 유기오염물질인 크레아티닌(creatinine), 디시안디아마이드(dicyandiamide), 디하이드로트리아진(dihydro-1,3,5-triazine)과 같은 부적절한 유기오염물질이 생성된다고 보고되었다(23). 또한, Edgar 등(24)은 크레아틴이 산성인 조건에서 쉽게 크레아틴으로 바뀌며, Alekha (25)등은 크레아티닌 분석법을 개발하여 시중에 유통되는 크레아틴의 제품을 분석한 결과 2% 이내의 제품에서 크레아틴닌이 검출되었다고 보고했다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 히알루론산나트륨

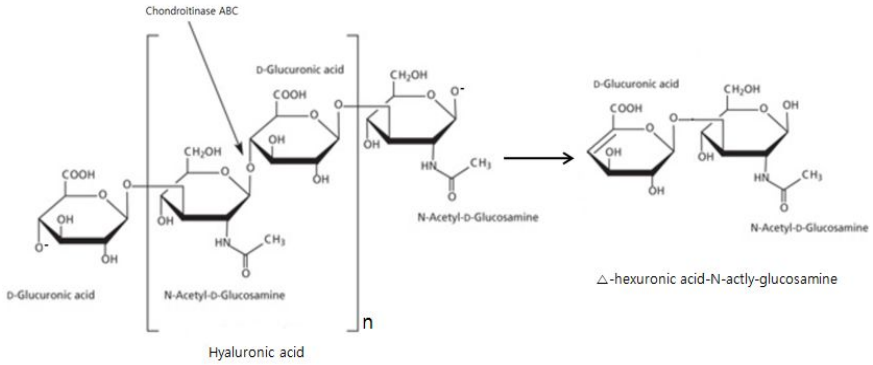


Fig. 3. Unsaturated saccharide structure obtained after HA's enzymatic digestion by chondroitinase ABC enzyme.

"히알루론산 (hyaluronic acid)"은 동물의 눈의 유리체로부터 처음으로 분리되었으며(27), D-글루쿠론산과 N-아세틸글루코사민 단량체가 반복적으로 결합되어 구성된 직쇄상의 다당류이다. 분자량은 보통 10^6-10^7이며(28), 수용액 상태에서는 수소결합에 의해 2차 구조를 형성하고 불규칙한 코일이 확장된 형태로 존재한다(29). 현재 건강기능성 원료로서의 히알루론산은 나트륨이 결합된 형태로 존재하며 건강한 닭의 벼슬을 효소로 가수분해하여 만들어진다. 히알루론산은 수분 보유능력이 있는 다당체로서, 사람에게는 피부, 눈의 유리체 및 관절의 활액에 존재하며, 연골에서는 나이가 들어감에 따라 히알루론산 함량이 증가하면서 분자량은 감소하게 된다(30). 또한, 피부가 건조한 사람을 대상으로 히알루론산의 보충효과를 비교한 연구에서 피부의 건조 정도와 수분보유량 등과 관련한 사항이 개선되는 것으로 확인되었다. 그래서 식약처에서는 2006년 "피부 보습에 도움을 줄 수 있는" 기능성을 처음으로 인정하였고, 기능성 등급은 기반연구와 인체적용연구의 수가 충분하지는 않으나, 그 결과가 일관성이 있으므로 "기타기능 II"에 해당됨을 인정하였다(8). John 등의 연구에 의하면 피부가 거칠어지는 것은 피부조직의 활성산소와 효

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

소분해로 염증이 많아지면서 지속되며 히알루론산은 이러한 염증반응을 완화시키는 기능과 자유라디컬로부터 세포를 보호해주는 역할을 한다고 보고하였다(31). 이러한 자유라디컬을 포집하는 물리화학적 특성을 이용하여 Foschi 등 그룹에서 히알루론산을 이용한 동물실험결과 피부 재생능력을 확인하여 보고하기도 했다(32-33). 그밖에도 사람의 눈주름이나 상처를 제거하는데 사용되며 의료용으로는 각막이식, 백내장, 녹내장 및 망막 박리 수술에도 사용되고 있다고 보고되었으며, 효소분해에 의해 생성된 히알루론산은 라디컬 스캐빈저 능력이 우수하며, 분자량이 작은 히알루론산일수록 분자량이 큰 것보다 생화학적 이용이 더 높다고 보고된 바 있다(34).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2장 재료 및 방법

제1절 실험재료 및 기기

1. 시료

기능성 원료 중 시험법 확립 및 검증을 위한 품목선정은 건강기능식품공전의 고시형으로 전환되었으나 시험법이 마련되지 않아서 본 연구 결과를 통해 시험방법이 새롭게 고시(식약처 2012-108호)된 품목 2-15. 달맞이꽃종자 추출물과「건강기능식품에 관한 법률」제14조 제1항에 따라 개별인정형 건강기능식품 중 공전 등재 이전에 고시화를 위한 시험방법 개발 및 검증이 필요한 2개 품목(크레아틴 모노하이드레이트, 히알루론산 나트륨)을 선정했다. 또한 제품의 선정은 기능성원료를 주원료로 사용하면서 그 기능성과 지표성분의 함량을 「식품등의 표시기준」에 따라 표기한 제품을 대상으로 선정했으며, 단순 부원료로 사용했거나 그 기능성 및 지표성분의 함량을 표기하지 않은 제품은 대상에서 제외하였다.

2. 시약 및 분석기기

본 연구에 사용한 모든 시약은 특급시약을 사용했으며, 추출에 사용한 유기용매는 HPLC 급을 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시험에 사용된 분석장비와 시약은 다음 제2절에 상세히 기술하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2절 기능(지표)성분 분석방법 표준화 및 검증방법

1. 기능(지표)성분 분석방법 표준화

건강기능식품의 지표(기능)성분의 특성 및 국내외 인허가 현황, 사용현황, 국내외 분석법 자료 및 건강기능식품 기능성 원료 인정서 등을 수집하고 시험방법을 설정했다. 그리고 시험검사 및 시험법 검증을 거쳐 도출되는 결과를 토대로 표준화된 시험방법을 제시하였고, 시험검사 관련기관과 협의하여 검사기관간 적용성을 모색하였다. 시험방법 적용성에 참여하는 연구원은 가급적 숙련도가 낮은 사람으로 지정하였으며, 시험 시 발생하는 의견 등을 수렴하여 보완 및 수정했다. 보안 및 수정된 시험방법은 검증작업을 통하여 검증 후 유통 중인 건강기능식품을 수거하여 시험법 적합성 검토 및 시험법 신설(안)을 마련하였다.

2. 밸리데이션 검증 항목

일반적인 화학적 분석방법의 밸리데이션은 신뢰도와 응용가능성 등의 양상을 말하며, 분석방법이 최적화되거나 안정화 된 이후에 수행하였다. 현재, 실험실간 적용성의 문제점으로 인하여 국제적으로 단일실험실 검증(Single Laboratory Validation, SLV)에 의하여 수행하고 있으며,「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」에서도 6개 항목(특이성, 정확성, 정밀성, 정량한계, 직선성, 범위)에 대한 정의를 하고 있다. 그러나 본 연구에서는 AOAC에서 제안하고 있는 식이보충제 및 식물성 제제의 화학적 분석방법의 밸리데이션 가이드라인(6)에 따라 단일실험실 검증을 위한 검증항목(performance characteristics, factor of assessments)을 수행했으며, 실험실간 적용성을 확인하고자 6개 기관(지방식약청 및 공인시험연구기관)을 대상으로 실험실간 정밀성을 함께 수행했다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

가. 적용성(applicability)

서로 다른 기질의 표본시료에 대하여 최적의 분리능을 결정하기 위해서 AOAC 가이드라인(6)의 신뢰도 특성(reliability characteristics)에서 제안하고 있는 정확성, 반복정밀성, 측정불확도, 재현정밀성, 중간 정밀성, 정량한계, 검출한계 등을 제시하여 표현하였다.

나. 선택성(selectivity)

선정된 표본시료에서 잔존하는 방해물질(interference)을 제거함과 동시에 지표(기능)성분을 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 제시하며, HPLC와 UV를 이용하여 최적의 상태로 정량화 할 수 있는 정도, 즉, 분리능으로 선택성을 평가하였다.

다. 직선성(linearity)

표준용액을 이용하여 표본시료가 포함 될 수 있는 농도 범위를 선정하고 농도와 기기반응 시그널간의 함수 관계를 그래프로 나타내었다. 선형성의 적절성을 판단하기 위해서 결정계수(coefficient of determination)를 나타내는데 본 연구에서는 AOAC 가이드라인(6)에서 제안하고 있는 결정계수가 0.99 이상인지 확인하였다.

라. 정확성(accuracy)

시료가 전체 시험법을 거쳐 회수되는 백분율을 보았으며, 표준물질을 시료에 첨가하는 방법에 따라 단일 분석용액에 대해 측정하였고 같은 수준 및 원래 수준의 2배 또는 3배의 표준분석물을 추가하여 확인하였다.

$$\text{Recovery}(\%) = (C_f - C_u) \times 100/C_a$$

C_f = Concentration of the fortified in test sample

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

C_u = Concentration of the unfortified in test sample

C_a = Calculated(not analyzed) concentration of analyte added to the test sample

마. 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ)

검출한계 및 정량한계는 공시료(blank)가 없는 경우 표본시료를 분석한 크로마토그램에서 기능(지표)성분이 위치한 곳의 노이즈 10회 측정값으로부터 표준편차를 구하고 측정값에 표준편차를 3배를 더한 값을 검출한계로 했으며, 표준편차를 10배를 더한 값을 정량한계로 하고, 그 식은 다음과 같다.

$$LOD = X_{BI} + 3S_{BI}$$

$$LOQ = X_{BI} + 10S_{BI}$$

X_{BI} = Blank value

S_{BI} = Standard deviation of the blank

바. 반복정밀성(repeatability precision)

짧은 시간 내에 동일한 분석자, 시약, 장비, 기구 등 조건이 동일하게 유지되는 상태에서 서로 다른 메트릭스(matrix), 농도, 시간에서 동시 반복을 수행하였다. 5번의 반복실험을 통해 얻어진 값으로 다양한 반복 표준 편차를 구하고 허용범위 결정은 질량백분율(mass fraction, C)을 $RSDr=C^{-0.15}$의 식에 따라 계산된 값의 1/2~2배로 결정하였다. 이로부터 계산된 값을 측정된 반복성의 RSDr값과 비교하여, HORRATr 공식(6)에 의해서 0.5~2.0 사이에 존재할 경우 동일한 조건에서의 반복실험에 문제가 없는지를 확인하였다.

$$HORRATr = RSDr\ (found,\ \%)/\ RSDr\ (calculated,\ \%)$$

사. 측정불확도(measurement uncertainty)

측정불확도를 산출하기 위하여 측정 모델량을 선정하여 불확도 인자를 검

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

토한 후, 요인별 표준불확도 및 자유도 계산을 통해 합성불확도를 구하였다. 불확도 요인은 크게 시료전처리(저울의 교정성적서 및 안정성, 분해능, 초자의 허용오차, 반복성, 온도 팽창계수), 표준용액조제(표준물질 인증서, 저울의 교정성적서 및 안정성, 초자의 허용오차, 반복성, 온도 팽창계수), 표준검량곡선, 시료 반복측정 및 회수율 측정으로 나뉘어 각각의 상대표준불확도와 자유도를 구하였다. 이렇게 얻은 불확도값에서 합성표준불확도와 포함인자(k)를 이용하여 확장불확도를 계산하고 측정불확도를 산출하였다.

(1) 모델관계식 설정

시료 중의 기능(지표)성분의 함량을 구하기 위한 식은 [1]과 같으며, 측정값의 불확도를 구하기 위하여 관련될 수 있는 측정값의 불확도 요인은 [2-4]을 설정하였다.

$$C_s = C_e \times \frac{V_f}{W_s} \times \frac{V_1}{V_2} \qquad [1]$$

$$W_s = W_c \times W_{Rp} \times W_{Ra} \qquad [2]$$

$$V_f = V_c \times V_{Rp} \times V_{Tp} \qquad [3]$$

$$C_e = P_{Fi} \times F_{Fi} \times STD \times L_c \times I_R \times R_M \qquad [4]$$

C_s: Concentration of sample(㎍/g)

C_e: Concentration of sample extraction solution(㎍/mL)

V_f: Final volume of sample(mL)

V_c: Calibration of volumetric flask

V_{Rp}: Repeatability of volumetric flask

V_{Tp}: Variation of temperature

W_s: Weight of sample(g)

W_c: Calibration of sample weight

W_{Rp}: Repeatability of sample weight

W_{Ra}: Readability of weight of sample

P_{Fi}: Purity of functional ingredient

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

F_{Fi}: Formula weight of functional ingredient

STD: Standard stock solution

$STD_{1st.....7th...}$: Concentration of standard solution

L_C: Linearity of calibration curve

I_R: Reproducibility of instrument

R_M: Recovery of matrix

(2) 요인별 측정값과 표준불확도

시료의 반복 측정시 평균값을 측정값으로 사용하며 이때 표준불확도는 식 [5]를 적용하여 A type으로 구하였다. 또한 무게 측정시 저울의 안정성 등의 반복시험에 대한 불확도는 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 [6]와 [7]을 적용하여 A type 불확도를 구했다.

$$u(x_i) = \frac{S}{\sqrt{n}} \qquad [5]$$

$$u(x_i) = \frac{S_p}{\sqrt{n}} \qquad [6]$$

$$S_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{M} v_i s_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{M} v_i}} \qquad [7]$$

n: Number of measurements

S_p: Pooled standard deviation

s_i: Standard deviation

v_i: Degree of freedom

(3) 검량곡선의 불확도

검량곡선은 표준원액을 이용하여 여러 개의 표준용액을 조제하여 작성했다. 검량곡선은 1차 회귀식[8]을 사용하며, 상대표준불확도는 식[9-11]의 모델

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

을 적용하여 산출하였다.

$$A_j = C_i \times B_l + B_0 \qquad [8]$$

$$u\ \ (C_0) = \frac{s}{B_1}\sqrt{\frac{1}{p}+\frac{1}{n}+\frac{(C_o-\overline{C})^2}{S_{xx}}} \qquad [9]$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{n}[A_j-(B_0+B_lC_j)]^2}{n-2}} \qquad [10]$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^{n}(C_i-\overline{C})^2 \qquad [11]$$

A_j: J^{th} measurement of the area of the calibration standard

C_i: Concentration of the Ith calibration standard

B_l: Slope of the calibration curve

S: Standard error

B_0: Intercept of the calibration curve

p: Number of measurement to determination C_0

n: Number of measurement for the calibration

$\overline{C}$: Mean value of the different calibration standard

C_0: Concentration of standard for the calibration

S_{xx}: Change value range of calibration standard

(4) 합성표준불확도

측정결과의 값이 여러 가지 다른 요인의 결과로부터 구해지며, 감도계수와 표준불확도, 결정계수를 측정불확도 관계식에 대입하여 구했다. 이때 합성은 불확도 전파법칙(law of propagation of uncertainty)에 따라 합성표준불확도 관계식을 유도하였다.

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^{N}\left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i) \qquad [12]$$

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(5) 확장불확도

포함인자(k)는 합성표준불확도의 유효자유도(V_{eff})를 추정하고, Welch-Satterth-waite공식[13]를 이용하여 산출하였다. 이때, 유효자유도가 7 이상인 경우 EURACHEM/CITAC 지침(35)에 따라 95% 신뢰수준에서 포함인자 k를 2로 기준하였다. 또한 확장불확도는 계산된 합성표준불확도에 포함인자(k)를 곱하는 공식[14]에 의해 구했다.

$$V_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^{n} \frac{[c_i u(x_i)]^4}{v_i}} \qquad [13]$$

$$U = k u_c(y) \qquad [14]$$

아. 재현 정밀성(Reproducibility Precision)

다른 실험실에서 동일 시료 분석 시 그 결과의 표준편자(S_R) 또는 상대표준편차(RSD_R)를 말하며 “실험실 간 정밀도”라고도 한다. 실험실 간 정밀도는 서로 다른 분석장비, 분석자, 분석날짜, 및 실험실에서 얻어진 결과에 대하여 합해진 bias이며, AOAC/IUPAC(32)에서는 5개 물질을 측정 시 최소 8개 이상의 실험실 간 정밀도를 측정하도록 권장하고 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3장 결과 및 고찰

제1절 기능(지표)성분 분석방법 표준화 수립

1. 달맞이꽃종자추출물 중 총폴리페놀

가. 실험재료

표준물질로 사용한 갈산(gallic acid)과 비색정량에 사용되는 페놀시약(folin & ciocalteus's phenol reagent) 그리고 탄산나트륨(sodium carbonate)은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 메탄올(methanol)은 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터 HPLC급을 구입하여 사용하였다. 초순수는 EASY pure system(Barnstead, Dubuque, IA, USA)에 의해 18.0 MΩ 수준으로 정제된 물을 사용했다. 본 연구에서 사용한 시료는 온라인 쇼핑몰과 대형 마트에서 구입했으며, 기질(부원료)에 따라 TPP1, TPP2 및 TPP3으로 구분하여 사용하였다.

나. 시액

페놀시액 조제는 페놀시약을 3차 증류수를 이용하여 두 배로 희석한 후 사용하였다. 또한 탄산나트륨 시액은 분말 35 g을 비이커에 취하고 70~80 ℃로 가열한 증류수 70 mL를 넣은 후 마그네틱 바를 이용하여 용해시켰다. 완전 용해되면 마그네틱 바를 제거하고 100 mL 용량플라스크에 붓은 후 3차 증류수로 정용하였다. 사용 시 온탕에 가온하여 완전 용해시킨 후 실온 온도로 식혀서 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 표준용액의 조제

표준물질 갈산 200 mg을 정밀하게 달아 80% 메탄올 100 mL에 녹여 표준원액으로 하며, 위 용액을 80% 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액로 하였다. 분석 시 표준용액 200 ㎕를 시험관에 취하고 증류수 3.2 mL를 넣어 섞은 후 페놀시액 200 ㎕를 가하여 다시 섞었다. 그리고 탄산나트륨 시액 400 ㎕를 가하여 섞은 후 30분간 실온에 반응시켰다. 따로 공시험은 표준용액 각각의 농도에 대하여 페놀시액 대신 증류수를 넣은 것으로 하였다.

라. 시험용액의 조제

부원료 및 부형제가 다른 3개의 표본시료(TPP1, TPP2, TPP3)의 캡슐을 모두 제거하고 균질화한 후 일정량을 10 mL 용량플라스크에 취했다. 그리고 80% 메탄올 5 mL를 가하고 20분간 강하게 진탕한 후 정용하여 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 맑은 상층액 1 mL을 취하여 50 mL 용량플라스크에 넣고 80% 메탄올로 정용했다. 따로 시험관을 준비하여 시료용액 상층액 및 표준용액 각각 200 ㎕를 취하고 증류수 3.2 mL를 넣어 섞은 후 페놀시액 200 ㎕를 가하여 다시 섞었다. 그리고 탄산나트륨 시액 400 ㎕를 가하여 섞은 후 30분간 실온에 반응시켜서 시험용액으로 하였다. 공시험은 표준용액 및 시료용액 각각 대하여 페놀시액 대신 증류수를 넣은 것으로 하였다.

마. 기기분석

총 폴리페놀 성분을 분석하기 위해 사용한 분광광도계는 Varian사 (Cray 300, USA)로부터 구입하였으며, 측정 파장은 760 nm이었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 달맞이꽃종자추출물 중 Penta-O-galloyl beta-D-glucose(PGG)

가. 실험재료

표준물질인 PGG은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 아세트산은 Kanto Chemical사(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 또한 메탄올(methanol)과 아세토니트릴(acetonitrile)은 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터 HPLC급을 구입하여 사용하였다. 초순수는 EASY pure system(Barnstead, Dubuque, IA, USA)에 의해 18.0 ㎧ 수준으로 정제된 물을 사용했다. 본 연구에서 사용한 시료는 온라인 쇼핑몰과 대형 마트에서 구입했으며, 기질(부원료) 따라 PGG1, PGG2 및 PGG3으로 구분하여 사용하였다.

나. 표준용액의 조제

표준물질 PGG 10 mg을 정밀히 달아 80% 메탄올 100 mL에 녹여 표준원액으로 하고 위 용액을 80% 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액로 하였다.

다. 시험용액의 조제

부원료 및 부형제가 다른 3개의 표본시료(PGG1, PGG2, PGG3)의 캡슐을 모두 제거하고 균진화 한 후 일정량을 50 mL 용량플라스크에 취하였다. 그리고 80% 메탄올 25 mL를 가하여 10분간 초음파 추출 후 실온에 식혀 80% 메탄올로 정용했다. 추출액을 실린지용 필터(0.45 ㎛)로 여과하여 시험용액으로 하였다.

라. 기기분석

기능(지표)성분을 분석하기 위해 PDA(Photo diode array)가 장착된

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Nanospace SI-2(Shiseido Co., Japan)를 사용하였으며, 컬럼은 Capcell Pak C_{18} UG120(4.62×50 mm, 5 ㎛, Shiseido, Japan)을 사용했다. 이동상은 0.3% 아세트산(A)과 0.3% 아세트산이 들어간 아세토니트릴(B)을 분당 1.0 mL의 유속으로 (B)이동상을 15분 동안 17%에서 25%로 증가시킨 후에 20분이 되기까지 다시 50%로 증가시켜 분석했다. 측정파장은 280 nm이며, 오븐온도는 40℃를 유지했다(Table 1).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. HPLC condition for analysis of PGG

Items	Conditions
Solvent	A: Acetic acid : D.W (0.3:99.7, v/v%) B: Acetic acid : D.W : MeCN (0.3:5:94.7, v/v%)

Time(min)	A(%)	B(%)
0.0	83	17
15.0	75	25
20.0	50	50
25.0	50	50
25.1	83	17
30.0	83	17

Column	Capcell pak C_{18} UG120 (4.6 mm ID×250 mm, 5 ㎛)
Flow	1 mL/min
Injection volume	10 ㎕
Detector	UV 280 nm
Temperature	40 ℃

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 크레아틴 보충제 중 크레아틴, 디시안디아미드 및 디하이드로트리아진

가. 실험재료

표준물질인 크레아틴 모노하이드레이트(creatine monohydrate, CrM)와 유기오염물질인 디시안디아마이드(dicyandiamide)는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입했으며, 디하이드로트리아진(dihydrotriazine)은 Alz-Chem사 (Trostberg, Germany)로부터 구입하였다. 그 밖에 인산2수소암모늄(ammonium dihydorgen phosphate)은 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 시료는 국내 쇼핑몰과 대형마트에서 직접 구입했으며, 제형과 원산지에 따라 CrM1, CrM2 및 CrM3로 구분하여 사용하였다.

나. 표준용액의 조제

지표(기능)성분인 크레아틴 모노하이드레이트와 유기오염물질인 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진을 정밀하게 달아 증류수에 녹여 표준원액으로 하며, 위 용액을 증류수로 적절히 희석하여 표준용액으로 하였다.

다. 시험용액의 조제

크레아틴 보충제의 분말형태는 균질화기로 완전히 균질화시키며, 캡슐제는 캡슐을 모두 제거한 후에 균질화기로 균질화시킨 것을 사용하였다. 그리고 일정량의 시료를 100 mL 용량플라스크에 취하여 증류수 70 mL를 넣어 마개를 닫은 후 잘 흔들어 섞고 2분간 초음파 추출하였다(크레아틴 모노하이드레이트 용해도 1g 당 물 75 mL). 추출 후 즉시 실온 온도로 식히고 증류수로 정용하고 분석시 증류수로 적절히 희석한 용액을 실린지용 필터(0.45 ㎛)로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 유기 오염물질인 디시안디아마이드와 디하이드로트리아진은 균질화 시료 일정량을 10 mL 용량플라스크에 취하고,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

증류수 7 mL를 넣어 마개를 닫은 후 강하게 흔들어 녹이고 2분간 초음파 추출하였다. 추출 후 즉시 실온 온도로 식히고 증류수로 정용하였고 추출액을 실린지용 필터(0.45 ㎛)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

라. 기기분석

기능(지표)성분인 크레아틴와 유기 오염물질인 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진을 분석하기 위해 PDA(Photo diode array)가 장착된 Nanospace SI-2 HPLC 기기(Shiseido Co., Japan)를 사용했으며, 양이온교환 컬럼인 Nucleosil 100-5 SA (4.6×250mm, 5 ㎛, Bischoff, Leonberg, Germany)을 이용하여 분리하였다. 이동상은 2.3% 인산2수소암모늄을 1 N 수산화나트륨액으로 pH 5.5로 맞춘 후 0.5 mL/min의 유속으로 분석했으며, 시료 주입량은 10 ㎕로 오븐온도는 35℃로 설정하였다. 측정파장은 크레아틴은 224 nm, 디시안디아마이드는 212 nm, 다이하이드로트리아진은 237 nm로 설정하였다(Table 2).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. HPLC condition for analysis of creatine, dicyandiamide and dihydrotriazine

Items	Conditions
Solvent	2.3% Ammonium phosphate (pH 5.5)
Column	Nucleosil 100-5 SA (4.6 mm ID×250 mm, 5 ㎛)
Flow	0.5 mL/min
Injection volume	10 ㎕
Detector wavelengths	Creatine : 224 nm Dicyandiamide : 212 nm Dihydrotriazine : 237 nm
Temperature	35 ℃

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 히알루론산 보충제 중 히알루론산

가. 실험재료

표준물질인 히알루론산 나트륨염(hyaluronic acid sodium salt, HA)과 분해효소인 콘드로이티나아제(chondroitinase) ABC 효소 및 염화나트륨은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 트리스염(Tris base)과 아세트산나트륨(sodium acetate) 및 염산은 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터 HPLC급을 구입하여 사용하였다. 초순수는 EASY pure system (Barnstead, Dubuque, IA, USA)에 의해 18.0 ㏁ 수준으로 정제된 물을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 시료는 국내 대형 마트에서 구입했으며, 제형과 국내외 원산지에 따라 HA1, HA2 및 HA3로 구분하여 사용하였다.

나. 33 mM Tris-HCl 버퍼 조제

트리스염 3.99 g과 아세트산나트륨 2.7 g을 각각 취하여 900 mL 증류수에 녹인 후 염산을 이용하여 pH 8.0으로 조절한 후 1 L로 하였다.

다. 표준용액의 조제

표준물질 히알루론산 나트륨염을 정밀히 달아 33 mM Tris-HCl 완충용액에 희석하고 60 ℃ 수욕상에서 완전히 녹인 것을 표준원액으로 하였다. 그리고 표준원액을 33 mM Tris-HCl 완충용액을 이용하여 적절히 희석하고 이 액 50 ㎕에 0.002 unit/㎕ 콘드로이티나아제 ABC가 혼합된 33 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액 450 ㎕를 넣고 37℃에서 3시간 반응시켰다. 반응이 완료되면 100℃에서 5분간 가열하고 0.45 ㎛로 멤브레인 필터하여 표준용액으로 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 시험용액의 조제

제형이나 기질이 다른 3개의 표본시료(HA1, HA2, HA3)를 대상으로 캡슐제는 캡슐을 제거한 후 균질화기로 완전히 균질화시켰으며, 정제는 막자사발을 이용하여 완전히 분쇄한 후 균질화기기로 균질화시킨 것을 사용하였다. 시료 일정량을 50 mL 용량플라스크에 취하고 33 mM Tris-HCl 완충용액으로 정용한 후 잘 섞었다. 그 후 마그네틱 바(stirring bar)를 넣고 60 ℃에서 90분간 강하게 추출 후 실온에 식혔다. 시료추출액 50 ㎕에 0.002 unit/㎕ 콘드로이티나아제 ABC가 혼합된 33 mM Tris-HCl (pH 8.0) 450 ㎕를 넣고 37 ℃에서 3시간 반응시키고, 반응이 완료되면 100 ℃에서 5분간 가열한 후 0.45 ㎛로 멤브레인 필터하여 시험용액으로 하였다.

마. 기기분석

기능(지표)성분을 분석하기 위해 PDA (Photo diode array)가 장착된 Nanospace SI-2 HPLC 기기(Shiseido Co., Japan)를 사용하였으며, 컬럼은 강염기성의 암모늄음이온교환수지로 코팅된 실리카겔이 충진된 Hypersil GOLD SAX (4.6×250 mm, 5 ㎛, Thermo, USA)을 사용하였다. 이동상은 0.05 M 염화나트륨액을 인산으로 pH 3.5조절한 후, 분당 1.0 mL의 유속으로 분석했으며, 시료 주입량은 10 ㎕와 오븐온도는 35℃, 측정파장은 232 nm로 설정하였다(Table 3).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. HPLC condition for analysis of hyaluronic acid

Items	Conditions
Solven	0.05 M NaCl (pH 3.5)
Column	Hypersil GOLD SAX (4.6 mm ID×250 mm, 5 ㎛)
Flow	1.0 mL/min
Injection volume	10 ㎕
Detector	UV 232 nm
Temperature	40 ℃

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2절 기능(지표)성분 밸리데이션 검증

1. 달맞이꽃종자추출물 중 총폴리페놀

가. 적용성

유통 중인 건강기능식품에 대하여 전체 시료를 대표할 수 있는 서로 다른 기질(부원료 원료특성 등)의 3개 제품(TPP1, TPP2, TPP3)을 선정하여 분석법 검증을 수행했다(Table 4).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Description of the samples

Sample	Formulation	Dosage form	Provenience
Total polyphenol(TPP)			
TPP1	30% TPP plus other ingredients[1)]	Capsules	Korea
TPP2	32% TPP plus other ingredients[2)]	Capsules	Korea
TPP3	35% TPP plus other ingredients[3)]	Capsules	Korea

[1)]Penta-O-galloyl beta-D-glucose, flexed-seed oil, microcrystalline, fibroin BF-7, lactic acid bacterial containing powder

[2)]Penta-O-galloyl beta-D-glucose, resistant maltodextrin, microcrystalline, cellulose, kelp meal

[3)]Penta-O-galloyl beta-D-glucose, brewer's yeast, microcrystalline cellulose, kelp meal, died yeast, chicory extract

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 선택성

수천가지 이상이 존재하는 폴리페놀 물질을 선택적으로 정량하기 위해서 페놀시약을 이용하였다. 페놀시약은 몰리브덴산나트륨과 텅스텐산나트륨, 인산으로 만들어지며 환원제와 반응하면 복잡한 착제인 인몰리브덴산 블루를 형성함으로서 청색의 변화를 나타낸다. 이러한 색변화를 분광광도계를 이용하여 760 nm 측정하여 총폴리페놀물질을 확인하였다.

다. 직선성

시료에 존재하는 총폴리페놀 함량이 포함될 수 있도록 6개의 농도 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0, 200.0 ㎍/mL에 대한 직선성을 검토했다. 시험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3회 반복 실험을 수행했다. 그 결과 결정계수(r^2)는 0.9996으로 AOAC 가이드라인에서 요구하는 결정계수 0.99 이상을 만족함을 확인했다(Fig. 4).

dCollection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

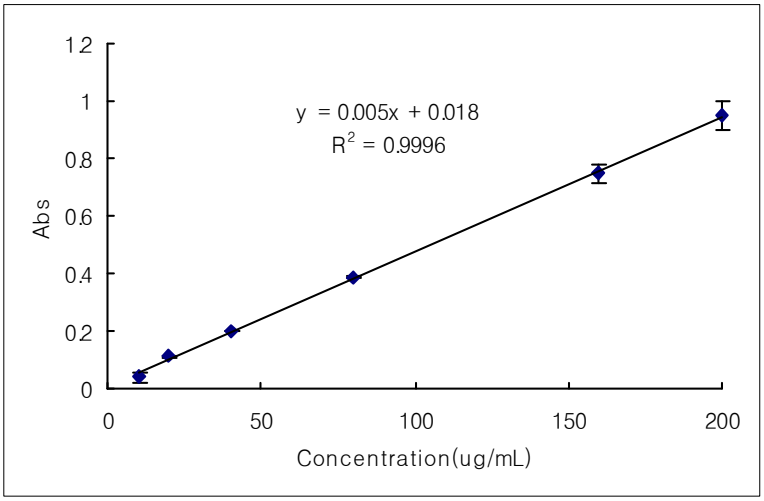


Fig. 4. Calibration curve of total polyphenol (n=3).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 정확성

3개의 표본시료(TPP1, TPP2, TPP3)에 대하여 각각의 함량 측정값의 1배, 2배, 3배가 되도록 표준원액을 첨가하고, 5회 반복실험을 통해 평균 회수되는 백분율을 산출함으로서 매트릭스 영향을 검토하였다. 즉, 3개의 표본시료(TPP1, TPP2, TPP3) 각각에 대해서 함량 측정값의 근사값인 30.0(1배) ㎍/mL, 60.0(2배) ㎍/mL, 90.0(3배) ㎍/mL가 되도록 하였다. 그 결과 30.0(1배) ㎍/mL가 되도록 처리한 시료의 회수율은 95.5~101.1%, 60.0(2배) ㎍/mL에서는 96.3~97.7%, 90.0(3배) ㎍/mL에서는 92.6~98.0%로 확인되었다. 이러한 결과는 AOAC 가이드라인(6)에서 제시하고 허용범위에 모두 포함되는 것으로서 동 시험방법은 서로 다른 기질 특성을 가진 표본시료에 대하여 반복 정확성에 문제가 없다는 것을 알 수 있었다. 또한, 각각의 농도에 대한 상대표준편차는 1.6~3.2%, 1.8~3.0%, 2.5~2.7%로 나타났다(Table 5).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Accuracy data of total polyphenol (n=5)

Treatment[1)]	Fortified concentation TPP1 (μg/mL)			Fortified concentation TPP2 (μg/mL)			Fortified concentation TPP3 (μg/mL)		
	30.0	60.0	90.0	30.0	60.0	90.0	30.0	60.0	90.0
1	101.1	100.6	94.6	98.9	97.9	97.1	94.9	96.8	98.4
2	100.6	100.0	90.6	95.2	98.9	99.6	97.5	97.4	99.4
3	103.5	96.9	91.4	93.3	99.1	97.8	96.6	98.3	96.3
4	99.1	95.6	90.4	99.8	93.2	99.6	96.5	95.1	94.7
5	101.0	94.4	95.8	93.3	93.7	94.4	97.1	94.0	101.1
Mean (%)	101.1	97.5	92.6	96.1	96.6	97.7	96.5	96.3	98.0
S.D.	1.6	2.7	2.5	3.1	2.9	2.2	1.0	1.8	2.5
RSD (%)	1.6	2.8	2.7	3.2	3.0	2.2	1.0	1.8	2.6
Acceptable values (%)[2)]	95.9~101.7			95.8~101.7			96.2~101.6		

[1)]Known amounts (1-3 times) of gallic acid were added in each representative sample, respectively.

[2)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

마. 함량측정과 반복정밀성

(1) 검체량 변화에 대한 반복정밀성

시료량의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 표본시료 TPP1의 검체량을 300 mg/g×1배, 2배, 3배로 늘리고 각각에 대하여 5회 반복실험 하였다. 그 결과, 표본시료에서의 총폴리페놀의 함량은 1배에서는 31.9%, 2배에서는 30.5%, 3배에서는 29.9%로 산출되어 표본시료의 평균 총폴리페놀 함량의 추정치는 30.7%로 확인했다. 이러한 함량 측정값을 토대로 AOAC 가이드라인(6)에서 제안하고 있는 허용 범위를 확인한 결과 0.3~1.2%이였다. 각 농도의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 1배 채취 시 1.2%, 2배 채취 시 1.1%, 3배 채취 시 2.4%로 확인되었다. 이러한 결과는 시료량의 변화에 따른 반복정밀성에 있어서 300 mg/g×1배와 2배로 시료량을 늘리더라도 동일한 조건에서의 반복정밀실험에 문제가 없다는 것을 알 수 있으나, 3배로 증량할 경우에는 동일한 조건에서의 반복정밀실험에 문제가 발생한다는 것을 확인할 수 있었다(Table 6).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5)

Treatment[1)]	Total polyphenol (TPP1)		
	1×	2×	3×
1	312,141.2	303,124.1	299,817.4
2	322,034.5	310,412.3	310,514.8
3	318,321.6	302,741.2	291,745.3
4	319,841.4	305,412.2	295,641.2
5	320,361.9	302,102.4	297,025.7
Mean (㎍/g)	318,540.1	304,758.4	298,948.9
Mean (%)	31.9	30.5	29.9
S.D.	3,815.0	3,398.1	7,089.7
RSD (%)	1.2	1.1	2.4
Acceptable recovery (%)[2)]		0.3~1.2	

[1)]Known amounts (1-3 times) were added in representative sample.
[2)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 시료 기질 변화에 따른 반복정밀성

시료 기질변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 서로 다른 기질을 가지고 있는 표본시료 3개(TPP1, TPP2, TPP3)를 각각 5회 반복 실험하였다. 그 결과 총폴리페놀 함량이 TPP1 시료에서는 30.5%, TPP2 시료에서는 26.8%, TPP3 시료에서는 41.5%가 검출되었다. 이러한 함량 측정값을 이용하여 허용범위를 확인한 결과 TPP1와 TPP2의 경우 0.3~1.2%이며, TPP3의 경우는 0.3~1.1%이였다. 각 시료의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 TPP1 시료는 1.1%, TPP2 시료는 1.0%, TPP3 시료는 0.9%임을 확인됨에 따라, 시료의 기질이 서로 다른 특성을 갖는다 하더라도 시험방법의 반복정밀성은 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다(Table 7).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Repeatability precision data of three TPPs with different sample matrix (n=5)

Analytes	Total polyphenol (TPP)		
	TPP1	TPP2	TPP3
1	303,124.1	266,967.7	419,817.4
2	310,412.3	263,368.1	410,514.8
3	302,741.2	269,180.5	411,745.3
4	305,412.2	270,083.5	415,641.2
5	302,102.4	269,570.0	417,025.7
Mean (㎍/g)	304,758.4	267,834.0	414,948.9
Mean (%)	30.5	26.8	41.5
S.D.	3,398.1	2,765.0	3,821.6
RSD (%)	1.1	1.0	0.9
Acceptable values (%)[1)]	0.3~1.2	0.3~1.2	0.3~1.1

[1)]Acceptable precison values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 분석시간별 반복정밀성

분석 시간의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 균질화시킨 표본 시료 TPP1을 4 ℃ 냉장실에 보관하면서 0 h, 24 h, 48 h마다 시험조작을 5회 반복 실험하였다. 그 결과 총폴리페놀 함량은 0 h에서는 30.5%, 24 h에서는 30.2%, 48 h에서는 30.7%로 나타났으며, 상대표준편차는 각각 1.1%, 1.1%, 1.2%로 확인되어 허용범위에 모두 포함되었다. 따라서 분석시간을 달리하더라도 동일한 조건에서의 시험방법의 반복정밀성은 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 intra-day RSD는 0.7%로 확인되었다(Table 8).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 8. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5)

Treatment	Total polyphenol (TPP1)		
	0 h	24 h	48 h
1	303,124.1	301,514.6	310,614.3
2	310,412.3	306,694.3	305,416.2
3	302,741.2	305,191.2	309,514.8
4	305,412.2	298,762.5	305,591.2
5	302,102.4	299,614.3	301,419.7
Daily Mean (μg/g)	304,758.4	302,355.4	306,511.2
Mean (%)	30.5	30.2	30.7
Inter-day S.D.	3,398.1	3,464.0	3,668.3
Inter-day RSD (%)	1.1	1.1	1.2
Intra-day RSD (%)		0.7	
Acceptable values (%)[1)]		0.3~1.2	

[1)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

dCollection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

바. 검출한계 및 정량한계

본 시험에서는 TPP1의 시험용액에서 페놀시액 대신 증류수를 넣고 동일한 시험과정을 거친 것을 공시료로 사용하였으며, 분광광도계 670 nm에서 10회 반복 측정하였다. 이때 공시료의 측정값에 공시료의 표준편차를 3배를 더한 값을 검출한계로 하고 표준편차를 10배를 더한 값을 정량한계로 하였다. 그 결과 검출한계는 2.53 ㎍/mL이며, 정량한계는 8.45 ㎍/mL로 나타났다.

사. 측정불확도

(1) 시험용액 조제시 불확도

표본시료(TPP1)의 무게를 0.1 mg까지 측정할 수 있는 저울을 이용하여 10 mL 용량플라스크에 0.1 g 정도 채취한 후 추출용액인 80% 메탄올로 총폴리페놀 성분을 추출함으로서 1차 시험용액을 준비하였다. 1차 시험용액을 마이크로피펫을 이용하여 1 mL를 취한 후 50 mL의 용량플라스크에 넣고 추출용액으로 표시선까지 정용한 것을 2차 시험용액으로 하였다. 이때 1차 시험용액 조제 시 발생할 수 있는 요인은 저울 자체의 불확도(교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 고려했다. 또한 2차 시험용액 조제 시의 피펫의 불확도(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 및 용량플라스크의 불확도 요인을 고려했다. 즉, 시료 무게 측정 시 저울에 대한 교정성적서상의 불확도는 95% 신뢰수준(k=2)에서 0.0005 g의 불확도를 가지며 표준불확도($u(W_c)$)는 0.00025 g(0.0005/2)가 되었다. 이때 저울의 분해능은 0.0001 g이며 표준불확도는($u(W_{Ra})$)는 0.000029 g(0.0001/2/$\sqrt{3}$)이였다. 또한 안정성은 0.1 g의 표준분동을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통실험표준편차 방법에 따라 식[6]과 [7]을 적용하여 표준불확도($u(W_{Rp})$) 0.000052 g을 구했으며, 자유도는 16에서 1을 뺀 값인 15가 된다. 결국 저울의 합성표준불확도($u(W_s)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근이므로 0.00026 g이며, 상

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

대표준불확도($u(W_s)/W_s$)는 0.0026 (0.00026/0.1)이였다. 또한 10 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 10 mL 용량플라스크의 허용오차가 ±0.025 이므로 표준불확도($u(V_c)$는 0.014 mL(0.025/$\sqrt{3}$)이며, 용량플라스크의 반복성은 10 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(V_{Rp})$)는 0.0012 mL가 된다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3 ℃이고 80% 메탄올의 팽창계수는 0.001018이며, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(V_{Tp})$는 0.018 mL(0.031/$\sqrt{3}$)이였다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(V_f)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.023 mL이며, 상대표준불확도($u(V_f)/V_f$)는 0.0023(0.023/10)이였다. 이와 동일한 방법으로 2차 시험용액의 조제과정은 1차 시험용액에서 자동피펫을 이용하여 용량플라스크에 취하고 추출용액으로 표시선에 맞춤으로서 발생하는 불확도를 구했다. 위와 같은 시험용액조제 시 발생되는 불확도 과정을 Table 9에 정리했다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 9. Uncertainty budget for the determination of W_s, V_{Mp} and V_f

Step	Parameter		Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
	(x_i)		x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
1st	W_s	W_c	–	∞	0.00025	0.0026	0.0034
		W_{Ra}	–	∞	0.000029		
		W_{Rp}	0.1	15	0.000052		
	V_f	V_c	0.025	∞	0.014	0.0023	
		V_{Rp}	10	9	0.0012		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
2st	V_2	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035	0.0039	0.0044
		V_{ARp}	1.0	9	0.00044		
		V_{ATp}	3	∞	0.0018		
	V_1	V_c	0.06	∞	0.035	0.0044	
		V_{Rp}	10	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.088		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(2) 표준용액 조제 시 불확도

표준물질로 사용하는 갈산의 불확도를 구하기 위해서 제조사로부터 공급되는 표준품의 순도 및 분자량에 의한 불확도를 합성했다. 그리고 표준원액은 저울 자체의 불확도(교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 합성했다. 또한 표준용액은 표준용액 농도 별 희석 시 사용되는 자동피펫의 불확도(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 및 용량플라스크의 불확도 요인을 고려했다. 먼저 표준물질인 갈산은 제조사로부터 제공된 인정서에 95%로 기재되어 최대농도 오차범위가 5%이므로 순도에 대한 표준불확도는($u(P_{Fi})$) 0.0055(0.05/$\sqrt{3}$) g/100g이고 상대표준불확도는($u(P_{Fi})/P_{Fi}$) 0.000058(0.0055/95) 이였다. 또한 갈산의 분자구조식은 $C_{76}H_{52}O_{46}$이고 분자량은 1701.2이므로, IUPAC(33)에서 발표된 C, H, O원자 1개의 불확도는 ± 0.0008, ± 0.00007 및 ± 0.0003 이었고, 표준불확도는 직사각형 분포를 가정하여 $\sqrt{3}$으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.000040 g/mol 및 0.00017 g/mol이며, 여기에 원재개수를 각각 곱하면 각 원자에 대한 표준불확도는 0.035 g/mol, 0.0021 g/mol 및 0.0080 g/mol이였다. 따라서 원자에 대한 합성표준불확도($u(F_{Fi})$)를 제곱합의 제곱근으로 계산하면 0.036 g/mol이며, 상대표준불확도($u(F_{Fi})/F_{Fi}$) 0.000021(0.036/1701.2) 이었다. 이때 표준물질 1.003 g을 100 mL의 용량플라스크에 넣고 추출용액으로 희석하여 조제하므로 표준물질 계량에 필요한 계량기의 불확도와 100 mL 용량플라스크 부피에 대한 불확도를 고려하였다. Table 9에서 1차 시험용액 조제 시 고려했던 불확도와 동일한 방법을 적용하여 불확도를 산정하면 저울의 표준불확도($u(STD_{Wc})$)는 0.00025 g(0.0005/2), 표준불확도($u(STD_{WRa})$)는 0.000029 g(0.0001/$\sqrt{3}$)이였다. 그리고 저울의 안정성의 불확도는 표준분동 1.0 g을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 [6]와 [7]을 적용하여 산출할 경우 표준불확도($u(STD_{WRp})$는 0.000023 g이였다. 결국 저울의 합성불확도($u(STD_W)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.00025 g이며, 상대표준불확도($u(STD_W)/STD_W$)는 0.00025(0.00025/1.0032) 이였다. 또한 100 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 100 mL 용량플

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

라스크의 허용오차가 ± 0.1 이므로 표준불확도($u(STD_{Vc})$는 0.058 mL(0.1/$\sqrt{3}$)이였으며, 용량플라스크의 반복성은 100 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(STD_{VRp})$)는 0.027 mL(0.086/$\sqrt{10}$)가 되었다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3 ℃이고 80% 메탄올의 팽창계수는 0.001018이며, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(STD_{VTp})$)는 0.18 mL(0.31/$\sqrt{3}$)이였다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(STD_V)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.19 mL이며, 상대표준불확도($u(STD_V)/STD_V$)는 0.0019(0.19/100)이였다. 따라서, 표준원액에 대한 상대합성표준불확도는 표준물질의 순도, 분자량, 표준품계량, 플라스크의 상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하며 그 결과 0.0019로 나타났다. 표준용액 조제는 표준원액을 자동피펫을 이용하여 농도별로 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0 및 320.0 ㎍/mL로 조제하였다. 각 농도별(1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th)의 불확도는 표준원액의 불확도를 구하는 방법과 동일 적용했다. 단, 표준물질의 표준불확도 대신 표준원액의 불확도로 합성표준불확도값을 합성하는 것과 자동피펫의 용량과 횟수에 따라 적용되는 값이 차이를 적용하면 된다. 다음 Table 10에서는 표준원액과 표준용액조제 시 고려되는 불확도를 정리했다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 10. Summary of uncertainty values from standard solutions

Description parameter			value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
		(x_i)	x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
	P_{Fi}		95	∞	0.0055	0.000058	0.0019
	F_{Fi}		1701.2	∞	0.036	0.000021	
STD		STD_W	1.0032	225461	0.00025	0.00025	
		STD_V	100	20122	0.19	0.0019	
STD_{1st}	Auto-pipette 2~200 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.0008	∞	0.00046	0.0050	0.0054
		V_{ARp}	0.1	9	0.000083		
		V_{ATp}	3	∞	0.00018		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.0020	
		V_{Rp}	50	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.088		
STD_{2nd}	Auto-pipette 2~200 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.0012	∞	0.00069	0.0039	0.0044
		V_{ARp}	0.2	9	0.00013		
		V_{ATp}	3	∞	0.00035		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.0020	
		V_{Rp}	50	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.088		
STD_{3rd}	Auto-pipette	V_{Ac}	0.005	∞	0.0029	0.0098	0.010

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

	50~1,000 ㎕	V_{ARp}	0.4	9	0.0025		
		V_{ATp}	3	∞	0.00071		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.060	∞	0.035	0.0020	
		V_{Rp}	50	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.088		
STD_{4th}	Auto-pipette 50~1,000 ㎕	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035	0.0047	0.0051
		V_{ARp}	0.8	9	0.00022		
		V_{ATp}	3	∞	0.0014		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.0020	
		V_{Rp}	50	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.088		
STD_{5th}	Auto-pipette 100~5,000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.011	0.011
		V_{ARp}	1.6	9	0.00014		
		V_{ATp}	3	∞	0.0028		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.0020	
		V_{Rp}	50	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.088		
STD_{6th}	Auto-pipette 100~5,000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.0088	0.0091
		V_{ARp}	2.0	9	0.00035		
		V_{ATp}	3	∞	0.0035		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.0020	
		V_{Rp}	50	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.088		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(3) 검량곡선의 불확도

검량곡선은 표준용액 6개의 농도 10.0 ㎍/mL, 20.0 ㎍/mL, 40.0 ㎍/mL, 80.0 ㎍/mL, 160.0 ㎍/mL 및 320.0 ㎍/mL로 3회 조제하여 분석한 결과의 평균값을 이용하여 선형 최소제곱법으로 계산하였다. 검량선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은[8]-[11]이며, 회귀분석(regression analysis)의 의해 관계식에 적용 계산하였을 때 검량곡선의 표준불확도($u(L_c)$)는 8061.41 ㎍/mL이고, 상대표준불확도($u(L_c)/L_c$)는 0.025(8061.41/결과값)으로 나타났다(Table 11).

Table 11. The result of regression analysis using Excle program

Analyt	s	B_1	p	n	C_0	$\overline{C}$	S_{xx}
TPP1	0.045	0.0047	3	21	318,540.12	103.50	144,057

(4) 시료의 반복측정에 따른 불확도

시료를 5회 반복측정으로 얻어진 결과값을 토대로 표준불확도($u(I_R)$) 및 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$) 값을 산출하였다. 시험 과정을 5회 반복 측정한 결과 평균값은 318,540.12이며 표준편차는 3,815.00 이였다. 따라서 표준불확도($u(I_R)$)는 표준편차를 ($\sqrt{5}$)로 나눠준 값인 1,706.12(3,815.00/$\sqrt{5}$)이며, 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$)는 0.0054(1,706.12/318,540.12)로 나타났다.

(5) 회수율 및 정밀성의 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복측정과 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구했다. 회수율 시험을 5회 반복 측정한 결과 평균 및 표준편차는 101.1 ± 1.6%이였으며, 이에 대한 표준불확도($u(R_M)$는 표준편차와 같으므로

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

총폴리페놀의 표준불확도는 0.016이었다. 따라서 회수율 및 정밀성의 상대표준불확도($u(R_M)/R_M$)을 산출하면 0.016(0.016/1.011)이며 자유도는 4이었다.

(6) 합성표준불확도 및 확장불확도

(1)~(5)항에서 산출된 상대표준불확도 값을 불확도 전파의 법칙에 따라 제곱합의 제곱근으로 계산하여 전체 불확도 요인에 대한 합성상대표준불확도($u(C_s)/C_s$) 값을 구하면 0.036이 되었다. 이때 합성상대표준불확도값에서 시료분석 결과치인 318,540.12를 곱하면 합성표준불확도($u(C_s)$)값을 11,610.17 ㎍/g를 구할 수 있었다. 그리고 확장불확도(U)는 합성표준불확도값에서 포함인자(k)를 곱하여 계산했으며, 포함인자는 식[13]에 의하여 산출할 경우 49로 확인되어 t-분포표를 이용하여 95% 신뢰수준에서 k=2.01을 구했다. 그러나 EURACHEM/CITAC 지침(35)에 따라 유효자유도($\upsilon \geq 7$)일 경우 포함인자 k를 2.0으로 계산하면, 식 [14]에 의해서 산출된 확장불확도는 산출된 확장불확도는 23,220.3 ㎍/g이며 결국, 총폴리페놀은 318,540.1 ± 23,220.3 ㎍/g(신뢰수준 약 95%, k=2.0일때)이었다.

(7) 불확도 요인의 상대기여도

불확도 요인의 상대불확도가 최종 결과값에 미치는 기여도를 Fig 5.에 나타냈으며, 불확도값이 최종 시험결과 값에 미치는 영향은 7.3%로 산정되었다. 각 불확도 요인의 기여도는 %값으로 표현한 결과 검량곡선에서 25.0%로 가장 기여도가 컸으며, 그 다음은 회수율 및 정밀성 측정에서 15.5%, 표준용액 40 ㎍/mL 조제 시 11.0%로 높게 나타났다. 그 밖에 요인에서는 10% 미만으로 비슷한 수준으로 나타남을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

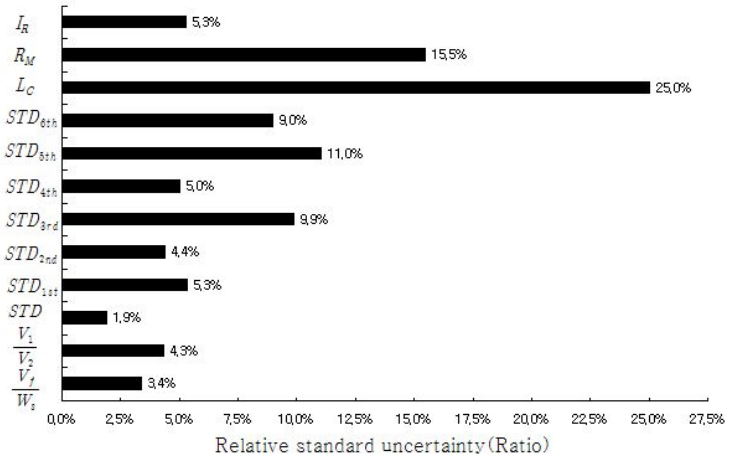


Fig. 5. Contributions of uncertainty factors.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

아. 재현정밀성(Reproducibility Precision)

재현정밀성을 측정하기 위하여 6개 기관(A, B, C, D, E, F)을 대상으로 실험실내에서 균질화 시킨 표본시료(TPP1)를 배포한 후 표준화 시험법에 따라 5반복 시험을 수행하도록 했다. 즉, 실험실 간 정밀도 측정의 요건 중 서로 다른 실험실, 분석자, 분석장비 및 분석일자 등의 환경으로부터 얻어진 결과의 편파성(bias)으로부터 시험방법의 정밀도를 확인하고자 했다(Fig. 6). 그 결과 6개 기관으로부터 산출된 표본시료의 중심값은 30.3%로 나타났으며, 실험실간 상대표준편차는 18.4%로 확인되었다. 또한, 중심값으로부터 가장 작은 차이와 큰 차이를 보이는 곳은 각각 C와 F였으며, 중심값의 0.9%와 24.8%로 다소 큰 차이를 보였다. 그리고 F를 제외한 5개 기관에서 중심값의 ± 20%에 해당하는 함량 측정값을 산출함으로서, 본문에서 제시한 시험방법의 정밀도가 우수함을 알 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

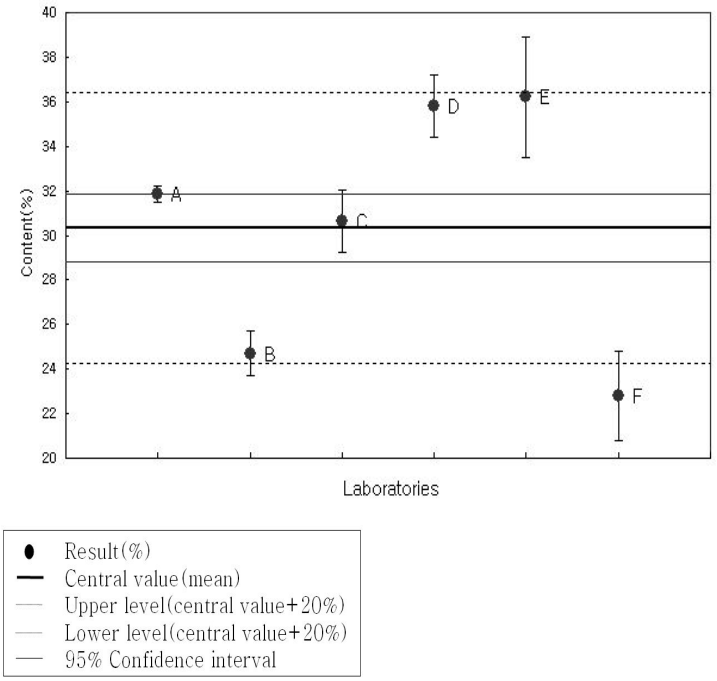


Fig. 6. Variations of the result by total polyphenol method between laboratories.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 달맞이꽃종자추출물 중 Penta-O-galloyl beta-D-glucose, PGG

가. 적용성

유통 중인 건강기능식품에 대하여 전체 시료를 대표할 수 있는 서로 다른 기질(부원료 등)의 3개 제품(PGG1, PGG2, PGG3)을 선정하여 분석법 검증을 수행했다(Table 12).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 12. Description of the samples

Sample	Formulation	Dosage form	Provenience
Penta-O-galloyl beta-D-glucose(PGG)			
PGG1	1.0% PGG plus other ingredients[1)]	Capsules	Korea
PGG2	1.2% PGG plus other ingredients[2)]	Capsules	Korea
PGG3	1.0% PGG plus other ingredients[3)]	Capsules	Korea

[1)]Total polyphenol, flexed-seed oil, microcrystalline, fibroin BF-7, lactic acid bacterial containing powder

[2)]Total polyphenol, resistant maltodextrin, microcrystalline, cellulose, kelp meal

[3)]Total polyphenol, brewer's yeast, microcrystalline cellulose, kelp meal, died yeast, chicory extract

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 선택성

방해물질로부터 효과적인 분리가 이뤄졌는지 확인하기 위하여 표준용액과 표본시료에서 크로마토그램을 확인했다. Fig. 7에서 A는 PGG 표준용액을 분석한 크로마토그램이며, B는 PGG1 시료를 분석한 크로마토그램이고, C는 PGG1 시료에 PGG 표준용액을 첨가하고 분석한 크로마토그램이다. 그 결과 표준용액의 주피크와 시료의 주피크가 동일시간내 일치했으며, 스펙트럼 패턴도 정확히 일치함을 확인할 수 있었다. 또한 분리능(resolution)을 확인하기 위하여 시료용액의 주성분 피크(t_1)의 머무름 시간과 근접 피크의 머무름 시간(t_2) 차이를 두 개의 피크 폭 W_1 과 W_2를 조사한 결과 1.4로 나타남으로서 AOAC 가이드라인(6)에서 제시하는 최소 1.0 이상의 분리능을 가짐을 확인할 수 있었다(Table 13).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

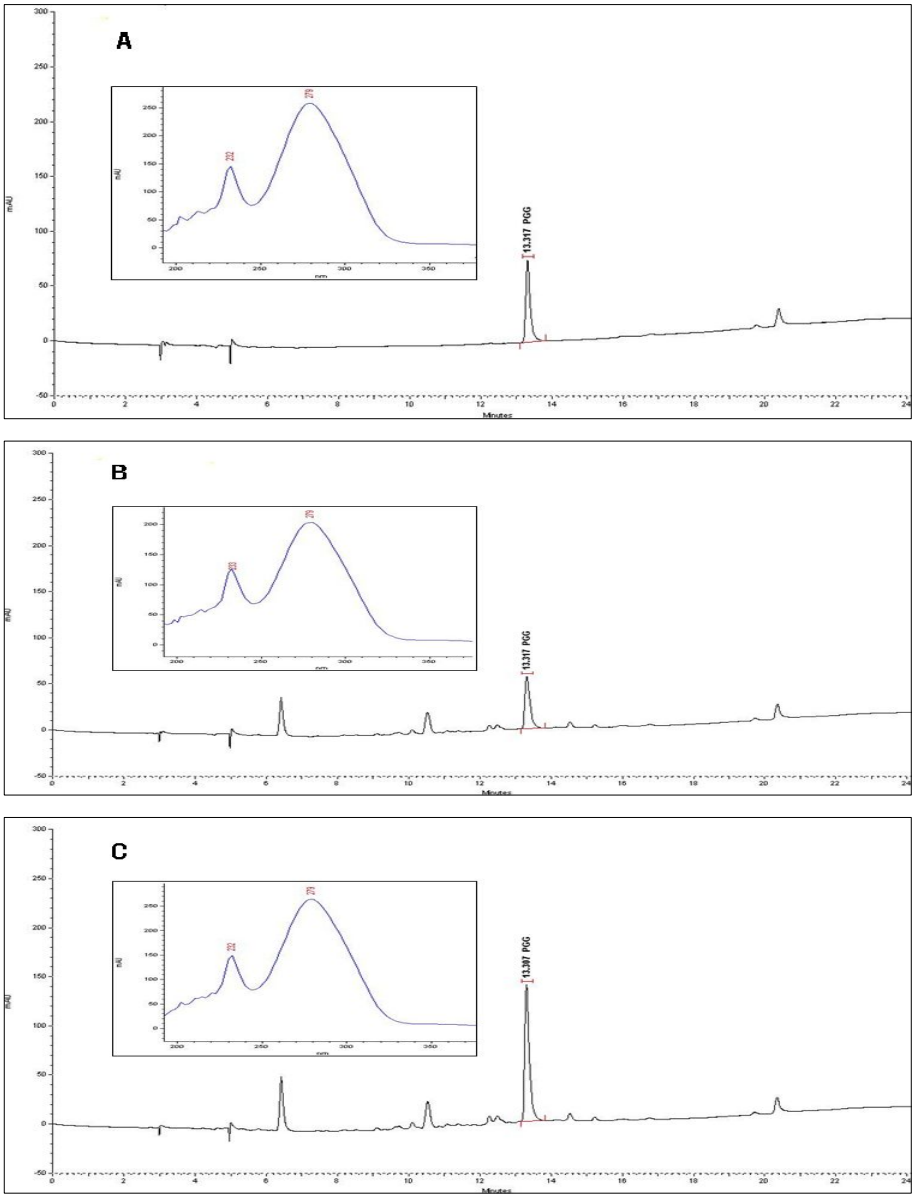


Fig. 7. HPLC chromatogram of PGG in Health/Functional food.(A : Standard of PGG, B : Sample material, C : Standard spiked in sample material).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 13. Selectivity data of PGG

Retention times (minutes)		Baseline widths (minutes)		Resolution
t_1	t_2	W_1	W_2	
12.614	13.317	0.4	0.6	1.4(≥1.0)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 직선성

표준용액을 7개의 농도로 적절히 희석하여 0.42, 0.84, 1.68, 3.36, 6.72, 13.44, 26.88 ㎍/mL에 대한 직선성을 검토했다. 시험 시 나타날 수 있는 오차 범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3회 반복 실험을 수행했다. 그 결과 결정계수(r^2)는 0.9999로 AOAC 가이드라인에서 요구하는 결정계수 0.95 이상을 만족함을 확인했다(Fig. 8).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

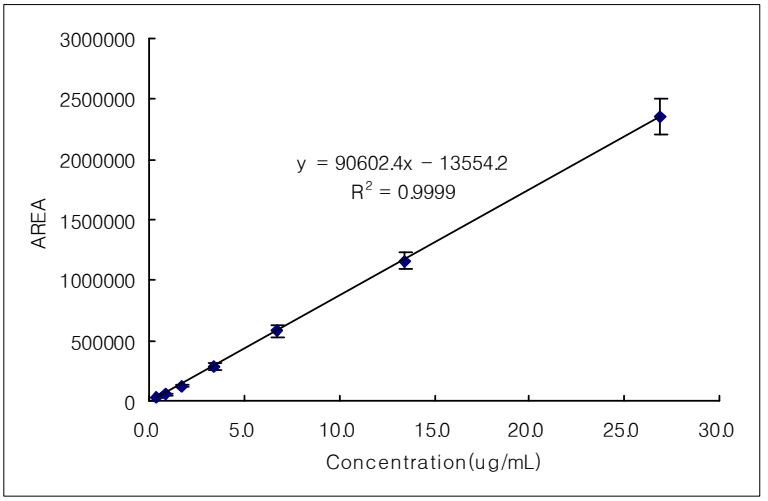


Fig. 8. Calibration curve of PGG (n=3).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 정확성

3개의 표본시료(PGG1, PGG2, PGG3)에 대하여 각각에 함량 측정값의 1배, 2배, 3배가 되도록 일정량의 표준원액을 첨가하였고, 5회 반복실험을 통해 평균 회수되는 백분율을 산출함으로서 매트릭스의 영향을 검토하였다. 즉, 3개의 표본시료(PGG1, PGG2, PGG3) 각각에 대하여 함량 측정값의 근사값인 2.0(1배) μg/mL, 4.0(2배) μg/mL 및 6.0(3배) μg/mL가 되도록 하였다. 그 결과 2.0(1배) μg/mL가 되도록 처리한 시료의 회수율은 96.5~100.6%, 4.0(2배) μg/mL에서는 97.8~104.2%, 6.0(3배) μg/mL에서는 98.3~104.1%로 확인되었다. 이러한 결과는 Table 14에서 보는 바와 같이 허용범위에 모두 포함되는 것으로서 동 시험방법은 서로 다른 기질 특성을 가진 시료에 대하여 반복 정확성에 문제가 없다는 것을 알 수 있었다. 또한, 각각의 농도에 대한 상대표준편차는 2.7~3.1%, 1.5~4.4%, 2.0~3.2%로 나타났다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 14. Accuracy data of PGG (n=5)

Treatment[1)]	Fortified concentation PGG1 (μg/mL)			Fortified concentation PGG2 (μg/mL)			Fortified concentation PGG3 (μg/mL)		
	2.0	4.0	6.0	2.0	4.0	6.0	2.0	4.0	6.0
1	96.4	101.4	102.0	98.9	100.9	96.4	102.1	103.3	104.7
2	95.3	95.2	104.8	97.1	101.4	99.2	99.8	103.2	106.8
3	101.3	103.1	98.2	93.3	100.4	101.8	96.2	103.1	104.8
4	95.8	99.6	101.6	99.6	92.7	99.6	101.2	104.8	101.2
5	94.7	98.8	96.6	93.5	93.6	94.5	103.5	106.8	103.1
Mean (%)	96.7	99.6	100.6	96.5	97.8	98.3	100.6	104.2	104.1
S.D.	2.6	3.0	3.3	3.0	4.3	2.9	2.8	1.6	2.1
RSD (%)	2.7	3.0	3.2	3.1	4.4	2.9	2.8	1.5	2.0
Acceptable values (%)[2)]	92.5~104.6			92.6~104.4			92.5~104.5		

[1)]Known amounts (1-3 times) were added in representative sample.

[2)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

마. 함량측정과 반복정밀성

(1) 검체량 변화에 대한 반복정밀성

검체량의 변화에 대한 반복정밀성을 확인하기 위하여 표본시료 PGG1의 검체량을 10 mg/g×1배, 2배, 3배로 늘리고 각각에 대하여 5회 반복실험 하였다. 그 결과, 표본시료에서의 PGG의 함량이 1배에서는 1.0%, 2배에서는 1.2%, 3배에서는 1.1%로 산출함으로서 표본시료의 PGG의 함량의 추정치는 1.1%로 확인되었다. 이러한 함량 측정값을 이용하여 허용범위를 산출한 후, 각 농도의 상대표준편차가 허용범위를 만족하는지 확인한 결과, 1배 채취 시 1.8%, 2배 채취 시 1.9%, 3배 채취 시 2.0%로 허용범위를 만족함을 알 수 있었다. 따라서, 동 시험방법은 검체를 증량 하더라도 반복정밀성에 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다(Table 15).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 15. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5)

Treatment[1)]	PGG1		
	1×[b]	2×	3×
1	10,361.7	11,513.4	11,141.1
2	10,131.1	11,480.4	11,618.8
3	10,516.8	11,848.9	11,656.3
4	10,068.6	11,789.3	11,535.2
5	10,188.5	12,016.2	11,251.7
Mean (㎍/g)	10,253.3	11,729.6	11,440.6
Mean (%)	1.0	1.2	1.1
S.D.	183.3	228.5	230.6
RSD (%)	1.8	1.9	2.0
Acceptable values (%)[2)]		0.5~2.0	

[1)]Known amounts (1-3 times) were added in representative sample.

[2)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 시료 기질 변화에 따른 반복정밀성

시료 기질변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 서로 다른 기질을 가지고 있는 표본시료 3개(PGG1, PGG2, PGG3)를 각각 5회 반복실험 하였다. Table 16에서 보여주고 있는 바와 같이 PGG 함량이 PGG1 시료에서는 1.0%, PGG2 시료에서는 1.3%, PGG3 시료에서는 1.1%로 검출되었다. 이러한 함량 측정값을 이용하여 허용범위를 확인한 결과 PGG1와 PGG3은 0.5~2.0%, PGG2는 0.5~1.9%이였다. 각 시료의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 PGG1은 1.8%, PGG2는 1.7%, PGG3은 2.0%로 확인되어, 3개의 표본시료 모두 허용범위에 포함되었다. 따라서, 동 시험방법은 시료의 기질이 다른 특성을 갖는다 하더라도 반복정밀성은 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다(Table 16).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 16. Repeatability precision data of three PGGs with different sample matrix (n=5)

Treatment	PGG		
	PGG1	PGG2	PGG3
1	10,361.7	13,141.3	11,098.7
2	10,131.1	12,945.1	11,099.4
3	10,516.8	13,362.7	11,535.5
4	10,068.6	13,519.4	10,944.5
5	10,188.5	13,421.5	11,255.8
Mean (㎍/g)	10,253.3	13,278.0	11,186.8
Mean (%)	1.0	1.3	1.1
S.D.	183.3	232.1	223.9
RSD (%)	1.8	1.7	2.0
Acceptable values (%)[1)]	0.5~2.0	0.5~1.9	0.5~2.0

[1)] Acceptable precision values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 분석시간별 반복정밀성

분석 시간의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 균질화시킨 표본 시료 PGG1을 4 ℃ 냉장실에 보관하면서 0 h, 24 h, 48 h마다 시험조작 5회 반복 실험하였다. 그 결과 PGG 함량이 0 h, 24 h 48 h에서 모두 1.0%로 확인되었으며, 허용범위는 0.5~2.0%로 확인되었다. 각 기간별 상대표준편차를 확인한 결과 0 h의 경우 1.8%, 24 h은 2.0%, 48 h은 1.9%로 모두 허용범위를 만족함으로서, 분석시간별 반복정밀성은 동일한 분석조건에서의 반복실험에 문제가 없다는 것을 확인했다. 또한 intra-day RSD를 확인한 결과 1.0%로 나타났다(Table 17).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 17. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5)

Treatment	PGG1		
	0h	24h	48h
1	10,361.7	10,063.0	10,203.6
2	10,131.1	10,035.9	10,191.2
3	10,516.8	10,267.4	10,601.8
4	10,068.6	10,402.6	10,198.3
5	10,188.5	9,901.9	10,494.5
Daily Mean (μg/g)	10,253.3	10,134.2	10,337.9
Mean (%)	1.0	1.0	1.0
Inter-day S.D.	183.3	199.0	195.7
Inter-day RSD (%)	1.8	2.0	1.9
Intra-day RSD (%)		1.0	
Acceptable values (%)[1)]		0.5~2.0	

[1)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

dCollection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

바. 검출한계 및 정량한계

표본시료 PGG1을 분석한 크로마토그램에서 기능(지표)성분이 위치하는 곳의 노이즈 10회 측정값으로부터 표준편차를 구하고 3배를 더한 값을 검출한계, 10배를 더한 값을 정량한계로 하였다. 그 결과 검출한계는 0.04 ㎍/mL이며, 정량한계는 0.13 ㎍/mL로 나타났다.

사. 측정불확도

(1) 시험용액 조제시 불확도

시료의 무게를 0.1 mg까지 측정할 수 있는 저울을 이용하여 50 mL 용량플라스크에 0.01 g 정도 채취한 후 추출용액인 80% 메탄올로 PGG 성분을 추출함으로서 시험용액을 준비했다. 이때 시험용액 조제 시 발생할 수 있는 요인인 저울 자체의 불확도(교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 고려했다. 즉, 시료 무게 측정 시 저울에 대한 교정성적서상의 불확도는 95% 신뢰수준(k=2)에서 0.0005 g의 불확도를 가지며 표준불확도($u(W_c)$)는 0.00025 g(0.0005/2)가 된다. 이때 저울의 분해능은 0.0001 g이며 표준불확도는 ($u(W_{Ra})$)는 0.000029 g(0.0001/2/$\sqrt{3}$)이었다. 또한 안정성은 0.01 g의 표준분동을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통실험표준편차 방법에 따라 식[6]과 [7]을 적용하여 표준불확도($u(W_{Rp})$) 0.000024 g을 구했으며 자유도는 16에서 1을 뺀 값인 15가 된다. 결국 저울의 합성표준불확도($u(W_s)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근이므로 0.00025 g이며, 상대표준불확도($u(W_s)/W_s$)는 0.0025 (0.00025/0.01)이였다. 또한 50 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 50 mL 용량플라스크의 허용오차가 ± 0.06 이므로 표준불확도($u(V_c)$)는 0.035 mL(0.06/$\sqrt{3}$)이며, 용량플라스크의 반복성은 50 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(V_{Rp})$)는

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

0.00086 mL가 된다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3 ℃이고 80% 메탄올의 팽창계수는 0.001018이며, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(V_{Tp})$는 0.088 mL(0.15/$\sqrt{3}$)이었다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(V_f)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.095 mL이며, 상대표준불확도($u(V_f)/V_f$)는 0.0019(0.095/50)이였다. 위와 같은 시험용액조제 시 발생되는 불확도 과정을 Table 18에 정리했다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 18. Uncertainty budget for the determination of W_s, and V_f

Parameter		Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
(x_i)		x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
W_s	W_c	–	∞	0.00025	0.025	0.025
	W_{Ra}	–	∞	0.000029		
	W_{Rp}	0.01	15	0.000024		
V_f	V_c	0.06	∞	0.035	0.0019	
	V_{Rp}	10	9	0.00086		
	V_{Tp}	3	∞	0.088		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(2) 표준용액 조제 시 불확도

표준물질로 사용하는 PGG의 불확도를 구하기 위해서 제조사로부터 공급되는 표준품의 순도 및 분자량에 의한 불확도를 합성했다. 그리고 표준원액은 저울 자체의 불확도(교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 합성했다. 또한 표준용액은 표준용액 농도 별 희석 시 사용되는 자동피펫의 불확도(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 및 용량플라스크의 불확도 요인을 고려했다. 먼저 표준물질인 PGG는 제조사로부터 제공된 인정서에 95%로 기재되어 최대농도 오차범위가 5%이므로 순도에 대한 표준불확도는($u(P_{Fi})$) 0.0055(0.05/$\sqrt{3}$) g/100g이었고 상대표준불확도는($u(P_{Fi})/P_{Fi}$) 0.000058(0.0055/95) 이었다. 또한 PGG의 분자구조식은 $C_{41}H_{32}O_{26}\cdot xH_2O$이고 분자량은 940.68이므로, IUPAC(33)에서 발표된 C, H, O원자 1개의 불확도는 ± 0.0008, ± 0.00007 및 ± 0.0003이었고, 표준불확도는 직사각형 분포를 가정하여 $\sqrt{3}$으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.000040 g/mol 및 0.00017 g/mol이었으며, 여기에 원자개수를 각각 곱하면 각 원자에 대한 표준불확도는 0.019 g/mol, 0.0013 g/mol 및 0.0045 g/mol이였다. 따라서 원자에 대한 합성표준불확도($u(F_{Fi})$)를 제곱합의 제곱근으로 계산하면 0.020 g/mol이며, 상대표준불확도($u(F_{Fi})/F_{Fi}$) 0.000021(0.020/940.7) 이었다. 이때 표준물질 0.0042 g을 50 mL의 용량플라스크에 넣고 추출용액으로 희석하여 조제하므로 표준물질 계량에 필요한 계량기의 불확도와 50 mL 용량플라스크 부피에 대한 불확도를 고려했다. 시험용액 조제 시 고려했던 불확도와 동일한 방법을 적용하여 불확도를 산정하면 저울의 표준불확도($u(STD_{Wc})$)는 0.00025 g(0.0005/2), 표준불확도($u(STD_{WRa})$)는 0.000029 g(0.0001/$\sqrt{3}$)이었다. 그리고 저울의 안정성의 불확도는 표준분동 0.005 g을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 [6]와 [7]을 적용하여 산출할 경우 표준불확도($u(STD_{WRp})$는 0.000025 g이었다. 결국 저울의 합성불확도($u(STD_W)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.00025 g이었으며, 상대표준불확도($u(STD_W)/STD_W$)는 0.060(0.00025/0.0042) 이었다. 또한 50

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 50 mL 용량플라스크의 허용오차가 ± 0.06 이므로 표준불확도($u(STD_{Vc})$는 0.035 mL(0.06/$\sqrt{3}$)이며, 용량플라스크의 반복성은 50 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(STD_{VRp})$)는 0.0012 mL(0.0037/$\sqrt{10}$)가 되었다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3 ℃이고 80% 메탄올의 팽창계수는 0.001018이며, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(STD_{VTp})$)는 0.088 mL(0.15/$\sqrt{3}$)이었다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(STD_V)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.095 mL이었으며, 상대표준불확도($u(STD_V)/STD_V$)는 0.0019(0.095/50)이였다. 따라서, 표준원액에 대한 상대합성표준불확도는 표준물질의 순도, 분자량, 표준품계량, 플라스크의 상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하며 그 결과 0.060로 나타났다. 표준용액 조제는 표준원액을 자동피펫을 이용하여 농도별로 0.42, 0.84, 1.68, 3.36, 6.72, 13.44 및 26.88 μg/mL로 조제하였다. 각 농도별(1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th)의 불확도는 표준원액의 불확도를 구하는 방법과 동일 적용했다. 단, 표준물질의 표준불확도 대신 표준원액의 불확도로 합성표준불확도값을 합성하는 것과 자동피펫의 용량과 횟수에 따라 적용되는 값이 차이를 적용하면 된다. 다음 Table 19에서는 표준원액과 표준용액조제 시 고려되는 불확도를 정리했다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 19. Summary of uncertainty values from standard solutions

Description parameter			value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
		(x_i)	x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
	P_{Fi}		95	∞	0.0055	0.000058	0.060
	F_{Fi}		940.68	∞	0.020	0.000021	
	STD	STD_W	0.0042	157081	0.00025	0.060	
		STD_V	50	383649212	0.095	0.0019	
STD_{1st}	Auto-pipette 10~100 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.0005	∞	0.00029	0.0084	0.0087
		V_{ARp}	0.05	9	0.00030		
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Volumetric flask 10 mL	V_c	0.025	∞	0.014	0.0023	
		V_{Rp}	10	9	0.0012		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{2nd}	Auto-pipette 10~100 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.0008	∞	0.00046	0.0050	0.0055
		V_{ARp}	0.1	9	0.000083		
		V_{ATp}	3	∞	0.00018		
	Volumetric flask 10 mL	V_c	0.025	∞	0.014	0.0029	
		V_{Rp}	10	9	0.0012		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
	Auto-pipette	V_{Ac}	0.0012	∞	0.0007	0.0041	0.0047

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

STD_{3rd}	20~200 ㎕	V_{ARp}	0.2	9	0.00025		
		V_{ATp}	3	∞	0.00035		
	Volumetric flask 10 mL	V_c	0.025	∞	0.014	0.0023	
		V_{Rp}	10	9	0.0012		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{4th}	Auto-pipette 100~1,000 ㎕	V_{Ac}	0.005	∞	0.0029	0.0074	0.0078
		V_{ARp}	0.4	9	0.00015		
		V_{ATp}	3	∞	0.00071		
	Volumetric flask 10 mL	V_c	0.025	∞	0.014	0.0023	
		V_{Rp}	10	9	0.0012		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{5th}	Auto-pipette 100~1,000 ㎕	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035	0.0047	0.0052
		V_{ARp}	0.8	9	0.00024		
		V_{ATp}	3	∞	0.0014		
	Volumetric flask 10 mL	V_c	0.025	∞	0.014	0.0023	
		V_{Rp}	10	9	0.0012		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{6th}	Auto-pipette 500~5,000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.011	0.011
		V_{ARp}	1.6	9	0.00034		
		V_{ATp}	3	∞	0.0028		
	Volumetric flask 10 mL	V_c	0.025	∞	0.014	0.0023	
		V_{Rp}	10	9	0.0012		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

STD_{7th}	Auto-pipette 500~5,000 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.0057	0.0061
		V_{ARp}	3.2	9	0.00039		
		V_{ATp}	3	∞	0.0056		
	Volumetric flask 10 mL	V_c	0.025	∞	0.014	0.0023	
		V_{Rp}	10	9	0.0012		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(3) 검량곡선의 불확도

검량곡선은 표준용액 7개의 농도 0.42, 0.84, 1.68, 3.36, 6.72, 13.44, 26.88 ㎍/mL로 3회 조제하여 분석한 결과의 평균값을 이용하여 선형 최소제곱법으로 계산했다. 검량선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은[8]-[11]이며, 회귀분석(regression analysis)의 의해 관계식에 적용 계산하였을 때 검량곡선의 표준불확도($u(L_c)$)는 525.41 ㎍/mL이고, 상대표준불확도($u(L_c)/L_c$)는 0.051(525.41/결과값)으로 나타났다(Table 20).

Table 20. The result of regression analysis using Excle program

Analyte	s	B_1	p	n	C_0	$\overline{C}$	S_{xx}	$u(L_c)$	$u(L_c)/L_c$
PGG1	18122.89	90602.42	3	21	15293.34	7.62	15.21	525.41	0.051

(4) 시료의 반복측정에 따른 불확도

시료를 5회 반복측정으로 얻어진 결과값을 토대로 표준불확도($u(I_R)$) 및 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$) 값을 산출했다. 시험 과정을 5회 반복 측정한 결과 평균값은 10,253.34이며 표준편차는 183.32 이였다. 따라서 표준불확도($u(I_R)$)는 표준편차를 ($\sqrt{5}$)로 나눠준 값인 81.98(183.32/$\sqrt{5}$)이며, 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$)는 0.0054(81.98/10,253.34)로 나타났다.

(5) 회수율 및 정밀성의 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복측정과 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구했다. 회수율 시험을 5회 반복 측정한 결과 평균 및 표준편차는 96.7 ± 2.6%이였으며, 이에 대한 표준불확도($u(R_M)$는 표준편차와 같으므로 PGG의 표준불확도는 0.026이였다. 따라서 회수율 및 정밀성의 상대표준불확

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

도($u(R_M)/R_M$)을 산출하면 0.027(0.026/0.96)이며 자유도는 4이였다.

(6) 합성표준불확도 및 확장불확도

(1)~(5)항에서 산출된 상대표준불확도 값을 불확도 전파의 법칙에 따라 제곱합의 제곱근으로 계산하여 전체 불확도 요인에 대한 합성상대표준불확도($u(C_s)/C_s$) 값을 구하면 0.090이 된다. 이때 합성상대표준불확도값에서 시료분석 결과치인 10,253.34를 곱하면 합성표준불확도($u(C_s)$)값을 922.25 ㎍/g를 구할 수 있다. 그리고 확장불확도(U)는 합성표준불확도값에서 포함인자(k)를 곱하여 계산했으며, 포함인자는 식[13]에 의하여 산출할 경우 179로 확인되어 EURACHEM/CITAC 지침(35)에 따라 유효자유도($\upsilon \geq 7$)일 경우 95% 신뢰수준에서 포함인자 k를 2.0으로 계산하면, 식 [14]에 의해서 산출된 확장불확도는 산출된 확장불확도는 1,844.50 ㎍/g이며 결국, PGG은 10,253.34 ± 1,844.50 ㎍/g(신뢰수준 약 95%, k=2.0일때)이었다.

(7) 불확도 요인의 상대기여도

불확도 요인의 상대불확도가 최종 결과값에 미치는 기여도를 Fig. 9에 나타냈으며, 불확도값이 최종 시험결과 값에 미치는 영향은 18.0%로 산정되었다. 각 불확도 요인의 기여도를 %값으로 표현한 결과 표준원액 조제에서 27.2%로 가장 기여도가 컸으며, 그 다음은 검량곡선에서 23.1%, 기기 재현성에서 12.4%, 시험용액 조제 시 11.4% 순으로 높게 나타났다. 그러나 그 밖에 요인에서는 5%이하의 비슷한 수준의 낮은 기여도를 나타남을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

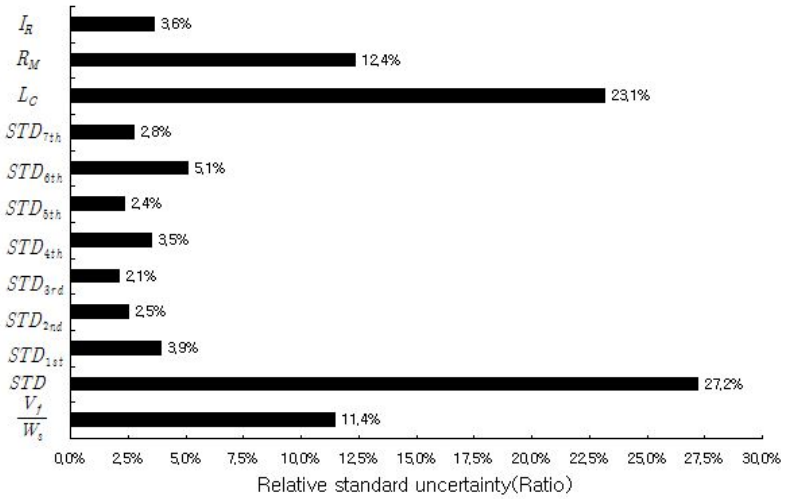


Fig. 9. Contributions of uncertainty factors.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

아. 재현정밀성(Reproducibility Precision)

재현정밀성을 측정하기 위하여 6개 기관(A, B, C, D, E, F)을 대상으로 실험실내에서 균질화 시킨 표본시료(PGG1)를 배포한 후 표준화 시험법에 따라 5반복 시험을 수행하도록 했다. 즉 실험실 간 정밀도 측정의 요건 중 서로 다른 실험실, 분석자, 분석장비 및 분석일자 등의 환경으로부터 얻어진 결과의 편파성을 확인하였다(Fig. 10). 그 결과 6개의 실험실간 시험결과의 중심값은 1.19%로 나타났으며, 실험실간 상대표준편차는 17.0%로 확인되었다. 또한 중심값으로부터 가장 작은 차이와 큰 차이를 보이는 곳은 각각 B와 C였으며, 중심값의 27.4% 및 14.3% 차이가 나타났다. 그리고 B의 결과를 제외한 모든 기관에서 중심값의 ± 20%에 존재하는 것으로 보아 정밀도가 우수함을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

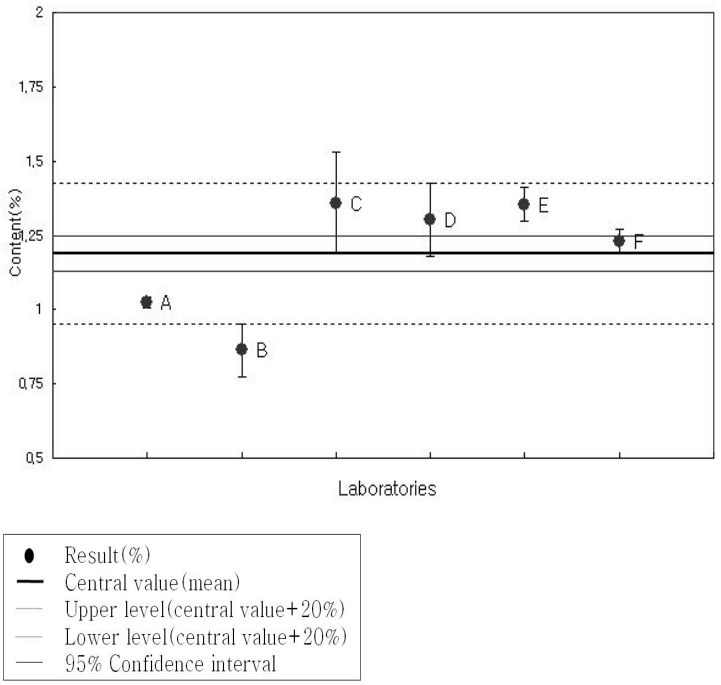


Fig. 10. Variations of the result by PGG method between laboratories.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

3. 크레아틴 보충제 중 크레아틴, 디시안디아미드 및 디하이드로트리아진

가. 적용성

유통 중인 건강기능식품에 대하여 전체 시료를 대표할 수 있는 서로 다른 속성(제형, 원료 생산지 등)의 3개 제품(CrM1, CrM2, CrM3)을 선정하여 분석법 검증을 수행했다(Table 21).

Table 21. Description of the samples

Sample	Formulation	Dosage form	Provenience
Creatine monohydrate(CrM)			
CrM1	100% CrM	Powder	Korea
CrM2	100% CrM	Capsules	Germany
CrM3	100% CrM	Capsules	Korea

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 선택성

분석법 검증실험의 선택성을 확인하기 위하여 표준용액과 시료용액에서의 분리도 및 머무름시간(retention time)을 확인하였다. Fig. 11은 UV 212 nm 에서는 디시안디아마이드, UV 224 nm에서는 크레아틴을, UV 237 nm 에서는 디하이드로트리아진을 분석하여 얻은 크로마토그램 결과이다. A는 앞에서 제시한 분석조건으로 크레아틴과 디시안디아마이드, 디하이드로트리아진 3가지 표준용액을 분석한 크로마토그램이고, B는 CrM1 시료를 분석한 크로마토그램이며, C는 CrM1시료에 3가지의 표준용액을 각각 첨가하여 분석한 크로마토그램이다. 표준용액과 시료를 각각의 최적의 파장에서 분석한 결과 지표성분 머무름시간과 UV 스펙트럼(spectrum)이 서로 일치함을 알 수 있었다. 또한 분리능(Resolution, R_s)을 확인하기 위하여 시료용액 중의 두 개의 피크의 머무름시간 t_1과 t_2의 분리 시간적 거리와 두 개의 피크 폭 W_1 과 W_2를 조사한 결과 1.4~3.5로 나타남으로서 AOAC 가이드라인(6)에서 제시하는 최소 1.0 이상의 분리능을 가짐을 확인 할 수 있었다(Table 22).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

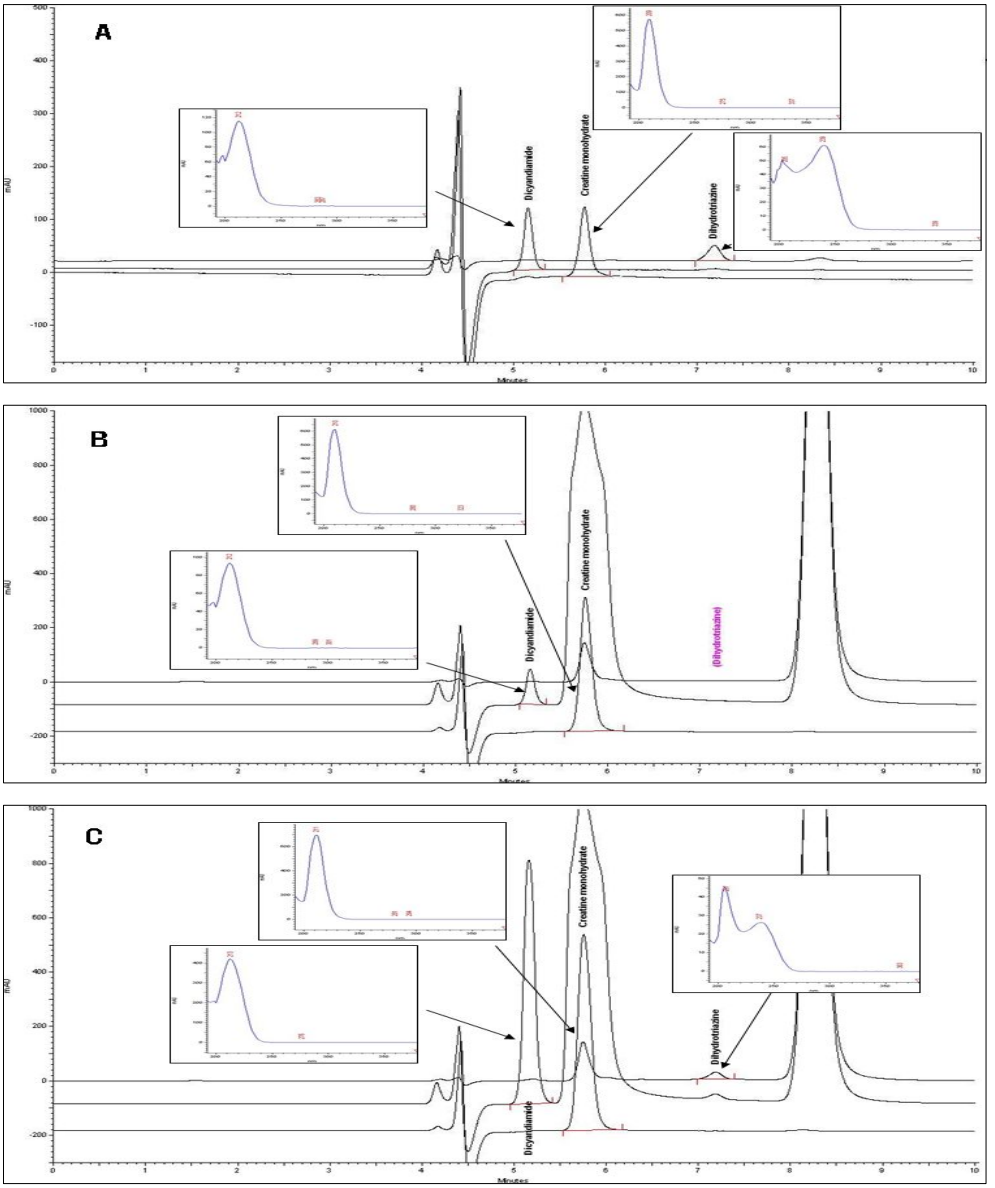


Fig. 11. Overlaid HPLC chromatograms of dicyandiamide, creatine and dihydrotriazine under UV 212 nm (1st), UV 224 nm (2nd) and UV 237 nm (3rd) conditions, respectively [A : 3 standard compounds of dicyandiamide (UV 212 nm), creatine (UV 224 nm) and dihydrotriazine (UV 237 nm)], B : CrM1 sample, C : CrM1 sample spiked with 3 standard compounds].

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 22. Selectivity data of creatine and organic contaminants

Analyte	Retention times (minutes)		Baseline widths (minutes)		Resolution
	t_1	t_2	W_1	W_2	
Creatine	5.133	5.757	0.3	0.6	1.4(≥1.0)
Dicyandiamide	4.531	5.133	0.4	0.3	1.7(≥1.0)
Dihydrotriazine	5.757	7.505	0.6	0.4	3.5(≥1.0)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 직선성

시료에 함유하거나, 존재할 것으로 예상되는 크레아틴, 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진의 함량이 포함될 수 있는 각각의 성분에 대하여 7개 농도의 직선성을 검토하였다. 그래서 크레아틴의 농도 범위는 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 120.0, 250.0, 500.0 ㎍/mL로 했으며, 디시안디아마이드는 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 ㎍/mL로 정하였다. 또한 디하이드로트리아진의 농도범위는 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 ㎍/mL 농도가 되도록 조제하였다. 시험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3회 반복 실험을 수행하였다. 그 결과 결정계수(r^2)가 크레아틴에서는 0.9994, 디시안디아마이드는 0.9997, 디하이드로트라아진은 0.9999이상으로 AOAC 가이드라인(6)에서 요구하는 결정계수 0.95 이상을 만족함을 확인하였다(Fig. 12).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

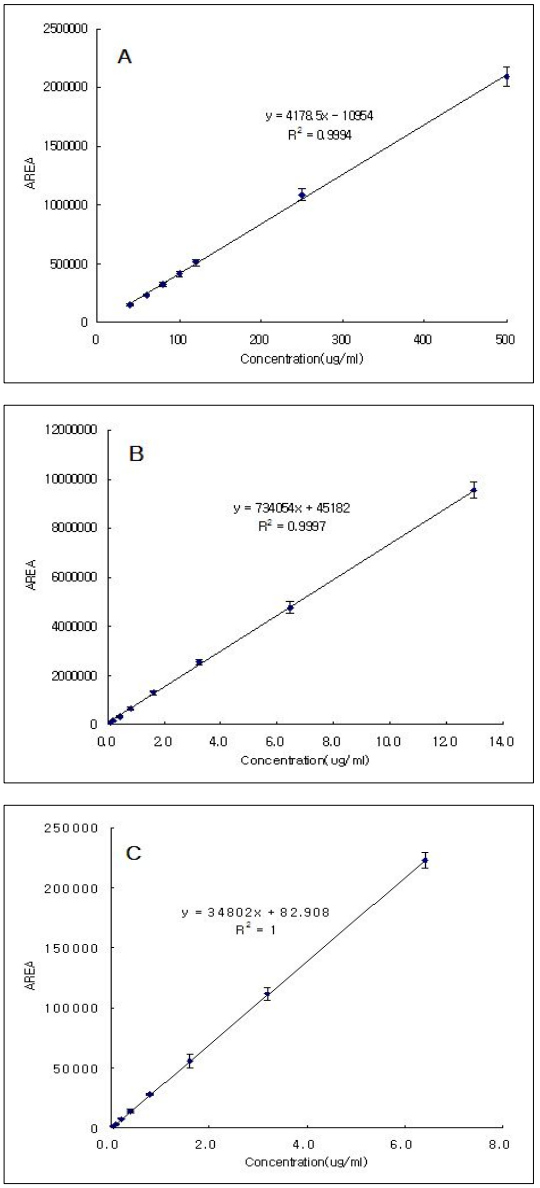


Fig. 12. Standard calibration curve of creatine (A), dicyandiamide (B) and dihydrotriazine (C).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 정확성

전체 시료를 대표로하는 표본시료 3개 (CrM1, CrM2, CrM3)에 대하여 spiking/recovery 방법으로 회수되는 백분율을 통해 매트릭스 영향을 검토하였다. 즉, 3개의 표본시료 각각에 대하여 일정량의 시료를 채취하고 일정량의 표준용액을 첨가하였을 때 최종 농도가 시료에 존재하는 함량 측정값의 근사값이 되도록 첨가하였다. 그래서 Table 23에서 보는 바와 같이 크레아틴의 경우에는 100.0(1배) ㎍/mL, 200.0(2배) ㎍/mL 및 300.0(3배) ㎍/mL가 되도록 했으며, 디시안디아마이드의 경우에는 0.7(1배) ㎍/mL, 1.4(2배) ㎍/mL 및 2.1(3배) ㎍/mL가 나올 수 있도록 처리하였다. 또한 시료에서 확인하지 못한 디하이드로트리아진의 경우에는 시료 중 정량한계의 양(0.1 ㎍/mL) 의 1배, 2배, 3배의 표준용액을 첨가하여 0.1(1배) ㎍/mL, 0.2(2배) ㎍/mL 및 0.3(3배) ㎍/mL가 나올 수 있도록 처리하였다. 그 결과 크레아틴의 경우 3개의 표본시료에서의 회수율이 각각 97.2~100.3%, 99.0~100.5% 및 99.2~100.9%로 나왔으며, 상대표준편차는 0.9~1.8%, 0.4~1.2%, 0.3~2.2%로 나타났다 (Table 23의 상단). 디시안디아마이드의 경우는 회수율이 각각 99.3~106.5%, 95.6~101.7% 및 92.3~97.8%로 나왔으며, 상대표준편차는 0.9~2.0%, 0.4~0.8% 및 0.4~0.7%로 나타났다 (Table 21의 중간). 또한 디하이드로트리아진의 경우는 회수율이 각각 100.4~105.5%, 98.2~102.9% 및 97.2~102.1%로 나타났으며, 상대표준편차는 각각 0.8~1.4%, 0.3~2.0% 및 1.0%로 확인되었다 (Table 23의 하단). 앞에서 얻은 분석결과들은 모두 높은 신뢰성을 주며 AOAC의 가이드라인(6)에 적합한 것으로 나타났다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 23. Accuracy data of creatine, dicyandiamide and dihydrotriazine (n=5)

Treatment[1)]		Fortified concentation CrM1 (μg/mL)			Fortified concentation CrM2 (μg/mL)			Fortified concentation CrM3 (μg/mL)		
		100.0	200.0	300.0	100.0	200.0	300.0	100.0	200.0	300.0
Creatine	mean (%)	100.3	100.5	99.6	99.6	99.0	99.2	97.2	99.9	100.9
	RSD (%)	0.9	0.7	0.3	1.8	0.4	2.2	0.9	1.2	0.5
	Acceptable values (%)[2)]	98.0~101.0								
Treatment[1)]		0.7	1.4	2.1	0.7	1.4	2.1	0.7	1.4	2.1
Dicyandiamide	mean (%)	99.3	96.1	92.3	102.9	99.5	95.6	106.5	101.7	97.8
	RSD (%)	0.9	0.7	0.4	2.0	0.8	0.5	1.1	0.4	0.7
	Acceptable values (%)[2)]	80.0~115.0								
Treatment[1)]		0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3
Dihydrotriazine	mean (%)	100.9	98.2	97.2	100.4	100.2	101.0	105.5	102.9	102.1
	RSD (%)	0.9	0.3	1.0	1.4	2.0	1.0	0.8	0.3	1.0

[1)]Known amounts (1-3 times) of creatine, dicyandiamide and dihydrotriazine were added in each representative sample, respectively.

[2)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

마. 함량측정과 반복정밀성

(1) 검체량 변화에 대한 반복정밀성

검체량의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 표본시료 CrM1을 3개의 농도로 검체를 채취하였다. 즉, 검체 채취량을 그레아틴의 경우 962.0 ㎎/g×1배, 2배 및 3배로 검체를 취했으며, 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진은 디시안디아마이드 농도로서 0.014 mg/g×1배, 2배 및 3배를 취하여 5회 반복 수행하였다. Table 24에서 보여주고 있는 바와 같이, 그 결과 크레아틴 1배 채취 시 96.2%, 2배 채취 시 97.0%, 3배 채취 시에는 97.6%로 산출되어 표본시료 중 크레아틴의 평균 함량은 96.6%가 함유되어있는 것을 확인하였다. 또한 디시안아미드는 1배 채취 시 0.0014%, 2배 및 3배에서는 0.0013%로 산출되어 평균 0.0014%의 농도로 존재하는 것을 확인했으며, 디하이드로트리아진은 3개의 농도에서 모두 검출되지 않았다. 시료에서 측정한 함량 %를 이용하여, $RSDr=C^{-0.15}$의 공식에 따라 측정값의 1/2~2배를 산출했을 경우 AOAC 가이드라인(6)에서 제안하고 있는 허용 범위는 크레아틴의 경우 0.3~1.0%, 디시안아미드는 1.3~5.4%이였다. 산출된 허용 범위를 이용하여 각 농도의 상대표준편차가 허용 범위에 포함되는지를 확인한 결과, 크레아틴의 경우 1배 채취 시 0.8%, 2배 채취 시 1.0%로 허용 범위에 포함되었으나 3배에서는 상대표준편차 값이 허용 범위를 넘는 1.9%가 나왔다. 결국 검체량의 변화에 따른 반복정밀성은 960.0 ㎎/g×1배와 2배로 시료량을 늘리더라도 동일한 조건에서의 반복정밀실험에 문제가 없다는 것을 확인했으나, 3배로 검체량을 늘렸을 경우에는 동일한 조건에서 반복정밀실험에 문제가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 디시안디아마이드의 경우는 0.014 mg/g×1배 채취 시 2.4%, 2배 채취 시 1.2%, 3배 채취 시 3.7%로 모두 허용 범위에 포함되는 것으로 보아 검체량 변화로 인한 반복정밀성의 영향은 크지 않다는 것을 확인하였다. 그러나 디하이드로트리아진은 표본시료로부터 검출되지 않아 농도변화에 따른 반복정밀성을 확인할 수 없었다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 24. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5)

Treatment[1)]	Creatine			Dicyandiamide		
	1×	2×	3×	1×	2×	3×
1	960,259.0	972,890.1	964,486.7	14.6	13.3	12.9
2	963,133.0	960,851.8	965,884.9	14.2	13.7	13.8
3	963,851.9	958,835.5	971,223.5	14.1	13.6	13.6
4	950,495.8	973,599.5	970,913.8	13.8	13.4	12.8
5	972,280.4	982,651.8	1,008,631.7	14.6	13.7	12.7
Mean (㎍/g)	962,004.0	969,765.7	976,228.1	14.3	13.5	13.2
Mean (%)	96.2	97.0	97.6	0.00143	0.00135	0.00132
S.D.	7,838.7	9,867.1	18,358.4	0.3	0.2	0.5
RSD (%)	0.8	1.0	1.9	2.4	1.3	3.7
Acceptable values (%)[2)]		0.3~1.0			1.3~5.4	

[1)]Known amounts (1-3 times) were added in representative sample.

[2)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 시료 기질 변화에 대한 반복정밀성

시료의 기질변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 다른 기질을 가지고 있는 표본시료 3개(CrM1, CrM2, CrM3)에 대하여 각각 동일한 양을 채취하고 5회 반복 측정하였다. Table 25에서 보여주고 있는 바와 같이, 그 결과 크레아틴의 경우 CrM1 시료에서는 96.2%, CrM2 시료에서는 98.6%, CrM3 시료에서는 97.9%가 산출되었고 이러한 결과 값을 이용하여 3개의 표본시료 허용범위를 확인한 결과 모두 0.3~1.0%이였다. 각 시료의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과, CrM1 시료는 0.8%, CrM2 시료는 0.6%, CrM3 시료는 0.9%로 허용범위에 모두 포함되었다. 디시안디아마이드의 경우는 CrM1 시료에서 0.0014%, CrM2와 CrM3 시료에서 0.0013%로 나타났으며, 허용범위는 CrM1 시료의 경우 1.3~5.3이며, CrM2와 CrM3 시료는 1.4~5.4이였다. 각 시료의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 CrM1 시료는 2.4%, CrM2 시료는 4.8%, CrM3 시료는 2.5%로 모두 허용범위 내에 포함되었다. 따라서 크레아틴와 디시안디아마이드분석은 서로 다른 기질을 가지고 있는 시료의 반복정밀성 측정을 했을 때 동일한 조건에서의 반복실험에 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 25. Repeatability precision data of three CrMs with different sample matrix (n=5)

Analytes	Creatine			Dicyandiamide		
	CrM1	CrM2	CrM3	CrM1	CrM2	CrM3
1	960,259.0	983,362.6	990,911.2	14.6	13.3	13.9
2	963,133.0	977,534.8	974,876.4	14.2	13.8	13.5
3	963,851.9	987,385.0	980,939.4	14.1	13.5	13.4
4	950,495.8	993,733.6	967,966.6	13.8	12.5	13.0
5	972,280.4	989,355.1	978,105.2	14.6	12.4	13.2
Mean (㎍/g)	962,004.0	986,274.2	978,559.8	14.3	13.1	13.4
Mean (%)	96.2	98.6	97.9	0.0014	0.0013	0.0013
RSD (%)	0.8	0.6	0.9	2.4	4.8	2.5
Acceptable values (%)[1)]	0.3~1.0	0.3~1.0	0.3~1.0	1.3~5.3	1.4~5.4	1.4~5.4

[1)]Acceptable precision values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 분석시간별 반복정밀성

분석시간의 변화에 대한 반복정밀성을 확인하기 위하여 균질화 시킨 표본 시료 CrM1을 4℃ 냉장실에 보관하면서 0 h, 24 h, 48 h마다 시험조작 5회 반복 실험하였다. Table 26에서 보여주고 있는 바와 같이, 그 결과 크레아틴은 0 h에서는 96.2%, 24 h 및 48 h에서는 각각 96.5%, 96.9%로 확인했으며, 허용범위는 0.3~1.0% 이었다. 각 농도의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 0 h에서는 0.8%, 24 h에서는 0.6% 이었으며, 48 h에서는 0.8%로 모두 포함되며 intra-day RSD%를 확인한 결과 0.4%로 나타났다. 또한 디시안디아마이드는 0 h, 24 h 및 48 h에서 0.0014~0.0015%가 존재하는 것으로 나타났으며, 허용범위는 1.3~5.3%이였다. 상대표준편차가 허용 범위에 포함되는지를 확인한 결과 0 h~48 h에서는 1.6~2.4%로 나타남으로서 모두 허용 범위내에 포함되는 것을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 26. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5)

Treatment	Creatine			Dicyandiamide		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
1	960,259.0	971,405.4	958,405.5	14.6	14.3	14.2
2	963,133.0	970,314.4	970,617.2	14.2	14.2	14.8
3	963,851.9	964,803.1	965,991.5	14.1	14.2	14.6
4	950,495.8	959,914.2	972,604.3	13.8	14.8	14.3
5	972,280.4	958,917.7	979,406.5	14.6	13.9	14.5
Daily Mean (μg/g)	962,004.0	965,071.0	969,405.0	14.3	14.3	14.5
Mean (%)	96.2	96.5	96.9	0.0014	0.0014	0.0015
Inter-day S.D.	7,838.7	5,747.7	7,816.3	0.3	0.3	0.2
Inter-day RSD (%)	0.8	0.6	0.8	2.4	2.3	1.6
Intra-day RSD (%)		0.4			0.8	
Acceptable values (%)[1)]		0.3~1.0			1.3~5.3	

[1)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

바. 검출한계 및 정량한계

표본시료 CrM1을 분석한 크로마토그램에서 기능(지표)성분이 위치하는 곳의 노이즈(nosie)값을 10회 측정값으로부터 표준편차를 구하고 그 값의 3배를 더한 값을 검출한계, 10배를 더한 값을 정량한계로 하였다. 그 결과 크레아틴의 검출한계는 1.09 ㎍/mL이며, 정량한계는 3.62 ㎍/mL이였다. 또한 디시안디아마이드의 검출한계는 0.01 ㎍/mL이며, 정량한계는 0.03 ㎍/mL이고, 디하이드로트리아진의 경우는 검출한계는 0.08 ㎍/mL, 정량한계는 0.25 ㎍/mL로 나타났다.

사. 측정불확도

(1) 시험용액 조제시 불확도

시료의 무게를 0.1 mg까지 측정할 수 있는 저울을 이용하여 크레아틴의 경우 시료 0.1 g 정도를 100 mL 용량플라스크에 취하고 유기오염물질(디시안디아미드 및 디하이드로트리아진)의 경우에는 0.5 g 정도를 10 mL 용량플라스크에 채취한 후 추출용액인 증류수로 지표성분 및 유기오염 물질을 추출함으로서 크레아틴의 경우 1차 시험용액으로 하고 유기오염물질은 시험용액으로 했다. 그리고 크레아틴의 1차 시험용액을 마이크로피펫을 이용하여 1 mL를 취한 후 10 mL의 용량플라스크에 넣고 증류수로 표시선까지 정용한 것을 2차 시험용액으로 했다. 이때 시험용액 및 1차 시험용액 조제 시 발생할 수 있는 요인은 저울 자체의 불확도(교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 고려했다. 또한 2차 시험용액 조제 시의 피펫의 불확도(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 및 용량플라스크의 불확도 요인을 고려했다. 즉, 시료 무게 측정 시 저울에 대한 교정성적서상의 불확도는 95% 신뢰수준(k=2)에서 0.0005 g의 불확도를 가지며 표준불확도($u(W_c)$)는 0.00025 g(0.0005/2)가 된다. 이때 저울의 분해능은 0.0001 g이며 표준불확도는

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

($u(W_{Ra})$)는 0.000029 g(0.0001/2/$\sqrt{3}$)이였다. 또한 안정성은 크레아틴의 경우 0.1 g, 유기오염물질의 경우 0.5 g의 표준분동을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통실험표준편차 방법에 따라 식[6]과 [7]을 적용하여 표준불확도($u(W_{Rp})$)를 구했으며 자유도는 16에서 1을 뺀 값인 15을 적용했다. 결국 각 요인의 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 저울의 합성표준불확도($u(W_s)$)를 구했으며, 실제 검체 채취량으로 합성표준불확도를 나눠줌으로서 상대표준불확도($u(W_s)/W_s$)를 구했다. 또한 희석과정에서 10 mL 및 100 mL의 용량플라스크에 증류수를 정용 시 기인되는 불확도는 10 mL 및 100 mL 용량플라스크의 경우 허용오차가 ± 0.025 및 ± 0.1 이므로 표준불확도($u(V_c)$)는 허용오차를 $\sqrt{3}$으로 나눠 줌으로서 구할 수 있었다. 크기가 다른 용량플라스크의 반복성은 10 mL 및 100 mL의 용량플라스크에 증류수를 표시선까지 채운 무게를 저울에 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하고 반복측정 횟수인 $\sqrt{10}$으로 나눠줌으로서 A type의 표준불확도($u(V_{Rp})$)를 구했다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3℃이고 증류수의 팽창계수는 0.00021이며, 용량플라스크의 용량이 각각 10 mL와 100 mL이므로, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주하여 각 요인들을 곱한 후 $\sqrt{3}$으로 나눠 줌으로서 표준불확도($u(V_{Tp})$)를 구했다. 따라서 10 mL와 100 mL의 용량플라스크의 합성불확도($u(V_f)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 구하며, 용량플라스크에 증류수 희석량으로 나눠 줌으로서 상대표준불확도($u(V_f)/V_f$)를 구했다. 이와 동일한 방법으로 2차 시험용액의 조제과정은 1차 시험용액에서 자동피펫을 이용하여 용량플라스크에 취하고 추출용액으로 표시선에 맞춤으로서 발생하는 불확도를 구했다. 크레아틴과 유기오염물질 시험용액 조제 시 발생되는 불확도 과정을 Table 27에 정리했다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 27. Uncertainty budget for the determination of W_s, V_f, V_1 and V_2

Analyte	Step	Parameter		Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
		(x_i)		x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
Creatine	1st	W_s	W_c	–	∞	0.00025	0.0024	0.0025
			W_{Ra}	–	∞	0.000029		
			W_{Rp}	0.1	15	0.000025		
		V_f	V_c	0.1	∞	0.058	0.00074	
			V_{Rp}	100	9	0.027		
			V_{Tp}	3	∞	0.036		
	2nd	V_2	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035	0.0035	0.0042
			V_{ARp}	1.0	9	0.00039		
			V_{ATp}	3	∞	0.00036		
		V_1	V_c	0.025	∞	0.014	0.0023	
			V_{Rp}	10	9	0.0046		
			V_{Tp}	3	∞	0.0036		
Organic contaminant	1st	W_s	W_c	–	∞	0.00025	0.00050	0.0016
			W_{Ra}	–	∞	0.000029		
			W_{Rp}	0.5	15	0.000029		
		V_f	V_c	0.025	∞	0.014	0.0016	
			V_{Rp}	10	9	0.0050		
			V_{Tp}	3	∞	0.0036		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(2) 표준용액 조제 시 불확도

표준물질로 사용하는 크레아틴 및 유기오염물질의 불확도를 구하기 위해서 제조사로부터 공급되는 표준품의 순도 및 분자량에 의한 불확도를 합성했다. 그리고 표준원액은 저울 자체의 불확도(교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 합성했다. 또한 표준용액은 표준용액 농도 별 희석 시 사용되는 자동피펫의 불확도(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 및 용량플라스크의 불확도 요인을 고려했다. 먼저 표준물질 중 크레아틴은 제조사로부터 제공된 인정서에 99%로 기재되어 최대농도 오차범위가 1%이므로 순도에 대한 표준불확도는($u(P_{Fi})$) 0.0011($0.01/\sqrt{3}$) g/100g이었고 상대표준불확도는 ($u(P_{Fi})/P_{Fi}$) 0.000011(0.0011/99) 이었다. 또한 분자구조식은 $C_4H_9N_3O_2 \cdot H_2O$이고 분자량은 149.15이므로, IUPAC(33)에서 발표된 C, H, N, O원자 1개의 불확도는 ± 0.0008, ± 0.00007, ± 0.00007 및 ± 0.0003[1)] 이었고, 표준불확도는 직사각형 분포를 가정하여 $\sqrt{3}$으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.000040 g/mol, 0.000040 g/mol 및 0.00017 g/mol이며, 여기에 원자 개수를 각각 곱하면 각 원자에 대한 표준불확도는 0.0018 g/mol, 0.00044 g/mol, 0.00012 g/mol 및 0.00052 g/mol이였다. 따라서 원자에 대한 합성표준불확도($u(F_{Fi})$)를 제곱합의 제곱근으로 계산하면 0.0020 g/mol이며, 상대표준불확도($u(F_{Fi})/F_{Fi}$) 0.000013(0.0020/149.15) 이 된다. 디시안디아마이드의 경우에는 제조사로부터 제공된 인정서에 99%로 기재되어 최대농도 오차범위가 1%이므로 순도에 대한 표준불확도는($u(P_{Fi})$) 0.0011($0.01/\sqrt{3}$) g/100g 이었고 상대표준불확도는 ($u(P_{Fi})/P_{Fi}$) 0.000011(0.0011/99) 이었다. 또한 분자구조식은 $C_2H_4N_4$이고 분자량은 84.08이므로, IUPAC(33)에서 발표된 C, H, N원자 1개의 불확도는 ± 0.0008, ± 0.00007 및 ± 0.00007 이었고, 표준불확도는 직사각형 분포를 가정하여 $\sqrt{3}$으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.000040 g/mol 및 0.000040 g/mol이었으며, 여기에 원자 개수를 각각 곱하면 각 원자에 대한 표준불확도는 0.00092 g/mol, 0.00016 g/mol 및 0.00016 g/mol이였다. 따라서 원자에 대한 합성표준불확도($u(F_{Fi})$)를 제곱합의 제곱근으로 계산하면 0.0010 g/mol이며, 상대표준

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

불확도($u(F_{Fi})/F_{Fi}$) 0.000011(0.0010/84.08) 이 된다. 또한 디하이드로트리아진의 경우에는 제조사로부터 제공되는 인정서가 없으므로 순도는 100%로 가정하여 표준불확도($u(P_{Fi})$)는 0이며, 상대표준불확도($u(P_{Fi})/P_{Fi}$)도 0(0/1)이었다. 그리고 분자구조식은 $C_5H_9N_5O_2$이고 분자량은 171.16이므로, IUPAC(33)에서 발표된 C, H, N, O원자 1개의 불확도는 ± 0.0008, ± 0.00007, ± 0.00007 및 ± 0.0003[1)] 이었고, 표준불확도는 직사각형 분포를 가정하여 $\sqrt{3}$으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.000040 g/mol, 0.000040 g/mol 및 0.00017 g/mol이며, 여기에 원자 개수를 각각 곱하면 각 원자에 대한 표준불확도는 0.0023 g/mol, 0.00036 g/mol, 0.00020 g/mol 및 0.00035 g/mol이였다. 따라서 원자에 대한 합성표준불확도($u(F_{Fi})$)를 제곱합의 제곱근으로 계산하면 0.0024 g/mol이며, 상대표준불확도($u(F_{Fi})/F_{Fi}$) 0.000014(0.0024/171.16) 이었다. 표준원액은 크레아틴의 표준물질 13.2907 g을 1000 mL의 용량플라스크에 넣고 유기오염물질인 디시안디아마이드는 0.1012 g을 100 mL의 용량플라스크, 디하이드로트리아진은 0.0065 g을 50 mL의 용량플라스크에 취한 후 증류수로 희석하여 조제했다. 이러한 과정에서 표준물질 계량에 필요한 계량기의 불확도와 50 mL, 100 mL 및 1000 mL 용량플라스크 부피에 대한 불확도를 고려함으로서 저울과 용량플라스크의 표준불확도를 산출했다. 크레아틴의 표준원액 조제시 저울의 표준불확도($u(STD_{Wc})$)는 0.00025 g(0.0005/2), 표준불확도($u(STD_{WRa})$)는 0.000029 g(0.0001/$\sqrt{3}$)이었다. 그리고 저울의 안정성의 불확도는 표준분동 10.0 g을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 [6]와 [7]을 적용하여 산출할 경우 표준불확도($u(STD_{WRp})$는 0.000025 g이었다. 결국 저울의 합성불확도($u(STD_W)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.00025 g이며, 상대표준불확도($u(STD_W)/STD_W$)는 0.000019(0.00025/13.2907) 이었다. 또한 1000 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 1000 mL 용량플라스크의 허용오차가 ± 0.4 이므로 표준불확도($u(STD_{Vc})$는 0.231 mL(0.4/$\sqrt{3}$)이었으며, 용량플라스크의 반복성은 1000 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(STD_{VRp})$)는 0.42 mL(1.34/$\sqrt{10}$)가 되었다. 그리고 실험실 온도

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

변화의 불확도는 온도변화가 ± 3 ℃이고 증류수의 팽창계수는 0.00021이며, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(STD_{VTp})$)는 0.36 mL(0.63/$\sqrt{3}$)이었다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(STD_V)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.56 mL이며, 상대표준불확도($u(STD_V)/STD_V$)는 0.00056(0.56/1000)이었다. 따라서, 표준원액에 대한 상대합성표준불확도는 표준물질의 순도, 분자량, 표준품계량, 플라스크의 상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하며 그 결과 0.00056로 나타났다. 그리고 유기오염물질 중 디시안디아마이드의 표준원액 조제 시 저울의 표준불확도($u(STD_{Wc})$)는 0.00025 g(0.0005/2), 표준불확도($u(STD_{WRa})$)는 0.000029 g(0.0001/$\sqrt{3}$)이었다. 그리고 저울의 안정성의 불확도는 표준분동 0.1 g을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 [6]와 [7]을 적용하여 산출할 경우 표준불확도($u(STD_{WRp})$는 0.000026 g이었다. 결국 저울의 합성불확도($u(STD_W)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.00025 g이며, 상대표준불확도($u(STD_W)/STD_W$)는 0.0025(0.00025/0.1012) 이었다. 또한 100 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 용량플라스크의 허용오차가 ± 0.1 이므로 표준불확도($u(STD_{Vc})$는 0.058 mL(0.1/$\sqrt{3}$)이며, 용량플라스크의 반복성은 100 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(STD_{VRp})$)는 0.027 mL(0.086/$\sqrt{10}$)가 된다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3 ℃이고 증류수의 팽창계수는 0.00021이었으며, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(STD_{VTp})$)는 0.036 mL(0.063/$\sqrt{3}$)이었다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(STD_V)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.051 mL이며, 상대표준불확도($u(STD_V)/STD_V$)는 0.00051(0.051/100)이었다. 따라서, 표준원액에 대한 상대합성표준불확도는 표준물질의 순도, 분자량, 표준품계량, 플라스크의 상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하며 그 결과 0.0026로 나타났다. 또한 디하이드로트리아진의 표준원액 조제 시 고려한 불확도는 저울의 안정성과 용량플라스크의 허용오차 부분을 변화시킨 후 디시안디아미드의 불확도 인자

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

와 동일하게 산출함으로서 구하였다. 그 결과 저울의 합성불확도($u(STD_W)$)는 0.00025 g이며, 상대표준불확도($u(STD_W)/STD_W$)는 0.039(0.00025/0.0065)이였다. 또한 50 mL 용량플라스크의 합성불확도($u(STD_V)$)는 0.036 mL이며, 상대표준불확도($u(STD_V)/STD_V$)는 0.00072(0.036/50)였다. 결국, 표준원액에 대한 상대합성표준불확도는 표준물질의 순도, 분자량, 표준품계량, 플라스크의 상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하며, 그 결과 0.039로 나타났다. 또한, 크레아틴 및 유기오염물질의 표준용액 조제는 표준원액을 자동피펫을 이용하여 농도별로 조제했으며, 그 중 크레아틴의 경우 40.0 ㎍/mL, 60.0 ㎍/mL, 80.0 ㎍/mL, 100.0 ㎍/mL, 120.0 ㎍/mL, 250.0 ㎍/mL 및 500.0 ㎍/mL이며, 디시안디아미드는 0.1 ㎍/mL, 0.2 ㎍/mL, 0.4 ㎍/mL, 0.8 ㎍/mL, 1.6 ㎍/mL, 3.2 ㎍/mL, 6.4 ㎍/mL 및 12.8 ㎍/mL로 했다. 또한 디하이드로트리아진은 0.05 ㎍/mL, 0.1 ㎍/mL, 0.2 ㎍/mL, 0.4 ㎍/mL, 0.8 ㎍/mL, 1.6 ㎍/mL, 3.2 ㎍/mL 및 6.4 ㎍/mL 10.0, 20.0, 40.0, 80.0, 160.0 및 320.0 ㎍/mL로 조제하였다. 각 농도별(1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 8th)의 불확도는 표준원액의 불확도를 구하는 방법과 동일 적용했으나, 표준물질의 표준불확도 대신 표준원액의 불확도로 합성표준불확도값을 합성하는 것과 자동피펫의 용량과 횟수에 따라 적용되는 값이 차이를 적용함으로서 다음 Table 28-30에 고려되는 불확도를 정리했다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 28. Uncertainty values from standard solutions of creatine

Description parameter			value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
		(x_i)	x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
	P_{Fi}		99	∞	0.0011	0.000011	0.00056
	F_{Fi}		149.15	∞	0.0020	0.000013	
STD		STD_W	13.291	157,081	0.00025	0.000019	
		STD_V	1000	27	0.56	0.00056	
STD_{1st}	Auto-pipette 500~5000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.0173	0.0087	0.0087
		V_{ARp}	2.0	9	0.00046		
		V_{ATp}	3	∞	0.00073		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.00072	
		V_{Rp}	50	9	0.021		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{2nd}	Auto-pipette 500~5000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.0173	0.0058	0.0059
		V_{ARp}	3.0	9	0.0014		
		V_{ATp}	3	∞	0.0011		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.00072	
		V_{Rp}	50	9	0.021		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{3rd}	Auto-pipette 500~5,000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.0044	0.0044
		V_{ARp}	4.0	9	0.0012		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

		V_{ATp}	3	∞	0.0015		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.00072	
		V_{Rp}	50	9	0.021		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{4th}	Auto-pipette 500~5,000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.0035	0.0036
		V_{ARp}	5.0	9	0.0014		
		V_{ATp}	3	∞	0.0018		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.00072	
		V_{Rp}	50	9	0.021		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{5th}	Auto-pipette 1~10 mL	V_{Ac}	0.04	∞	0.023	0.0040	0.0040
		V_{ARp}	6.0	9	0.0057		
		V_{ATp}	3	∞	0.0022		
	Volumetric flask 50 mL	V_c	0.06	∞	0.035	0.00072	
		V_{Rp}	50	9	0.021		
		V_{Tp}	3	∞	0.018		
STD_{6th}	Auto-pipette 1~10 mL	V_{Ac}	0.06	∞	0.035	0.0056	0.0057
		V_{ARp}	6.25	9	0.0057		
		V_{ATp}	3	∞	0.0023		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023	0.0011	
		V_{Rp}	25	9	0.0013		
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
STD_{7th}	Auto-pipette	V_{Ac}	0.04	∞	0.023	0.0046	0.0052

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1~10 mL	V_{ARp}	5.0	9	0.0014	
	V_{ATp}	3	∞	0.0018	
Volumetric flask 10 mL	V_c	0.025	∞	0.014	
	V_{Rp}	10	9	0.0049	0.0023
	V_{Tp}	3	∞	0.004	

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 29. Uncertainty values from standard solutions of dicyandiamide

Description parameter			value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
		(x_i)	x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
	P_{Fi}		99	∞	0.0011	0.000011	0.0026
	F_{Fi}		84.08	∞	0.0010	0.000011	
STD		STD_W	0.1012	134,062	0.00025	0.000019	
		STD_V	100	108	0.051	0.00051	
STD_{1si}	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.012	0.012
		V_{ARp}	0.1	9	0.00099		
		V_{ATp}	3	∞	0.000036		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{2ni}	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.0012	∞	0.00069	0.0040	0.0040
		V_{ARp}	0.2	9	0.00037		
		V_{ATp}	3	∞	0.000073		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
	Auto-pipette	V_{Ac}	0.005	∞	0.0029	0.0074	0.0074

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

STD_{3rd}	100~1,000 $\mu\ell$	V_{ARp}	0.4	9	0.00055		
		V_{ATp}	3	∞	0.00015		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058		
		V_{Rp}	100	9	0.027	0.00051	
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{4th}	Auto-pipette 100~1,000 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035		
		V_{ARp}	0.8	9	0.00038	0.0044	
		V_{ATp}	3	∞	0.00029		0.0044
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058		
		V_{Rp}	100	9	0.027	0.00051	
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{5th}	Auto-pipette 500~5,000 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.011	∞	0.0064		
		V_{ARp}	1.6	9	0.0012	0.0041	
		V_{ATp}	3	∞	0.00058		0.0041
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058		
		V_{Rp}	100	9	0.027	0.00051	
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{6th}	Auto-pipette 500~5,000 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.033	∞	0.019		
		V_{ARp}	3.2	9	0.0013	0.0060	
		V_{ATp}	3	∞	0.0012		0.0060
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.10	∞	0.058		
		V_{Rp}	100	9	0.027	0.00051	
		V_{Tp}	3	∞	0.036		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

STD_{7tl}	Auto-pipette 1~10 mL	V_{Ac}	0.041	∞	0.024	0.0037	0.0038
		V_{ARp}	6.4	9	0.0014		
		V_{ATp}	3	∞	0.0023		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{8tl}	Auto-pipette 1~10 mL	V_{Ac}	0.096	∞	0.0554	0.0044	0.0044
		V_{ARp}	12.8	9	0.0065		
		V_{ATp}	3	∞	0.0047		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{Wc}	Auto-pipette 100~1,000 ㎕	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035	0.0035	0.0035
		V_{ARp}	1.0	9	0.00039		
		V_{ATp}	3	∞	0.00036		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 30. Uncertainty values from standard solutions of dihydrotriazine

Description parameter			value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
		(x_i)	x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
P_{Fi}			95	∞	0.0055	0.000058	0.039
F_{Fi}			171.16	∞	0.0024	0.000014	
STD		STD_W	0.0065	78,907	0.00025	0.000019	
		STD_V	50	75	0.036	0.00072	
STD_{1st}	Auto-pipette 10~100 ㎕	V_{Ac}	0.0005	∞	0.00029	0.0080	0.0080
		V_{ARp}	0.38	9	0.00093		
		V_{ATp}	3	∞	0.000010		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{2nd}	Auto-pipette 10~100 ㎕	V_{Ac}	0.0008	∞	0.00046	0.011	0.011
		V_{ARp}	0.1	9	0.00099		
		V_{ATp}	3	∞	0.000036		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{3rd}	Auto-pipette 10~200 ㎕	V_{Ac}	0.0012	∞	0.00069	0.0040	0.0040
		V_{ARp}	0.2	9	0.00037		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

		V_{ATp}	3	∞	0.000073		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{4th}	Auto-pipette 100~1,000 ㎕	V_{Ac}	0.005	∞	0.0029	0.0074	0.0074
		V_{ARp}	0.4	9	0.00055		
		V_{ATp}	3	∞	0.00015		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.10	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{5th}	Auto-pipette 100~1,000 ㎕	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035	0.0044	0.0044
		V_{ARp}	0.8	9	0.00038		
		V_{ATp}	3	∞	0.00029		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{6th}	Auto-pipette 500~5,000 ㎕	V_{Ac}	0.030	∞	0.017	0.011	0.011
		V_{ARp}	1.6	9	0.0012		
		V_{ATp}	3	∞	0.00058		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058	0.00051	
		V_{Rp}	100	9	0.027		
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{7th}	Auto-pipette	V_{Ac}	0.033	∞	0.017	0.0054	0.0055

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

	500~5,000 $\mu\ell$	V_{ARp}	3.2	9	0.0013		
		V_{ATp}	3	∞	0.0012		
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058		
		V_{Rp}	100	9	0.027	0.00051	
		V_{Tp}	3	∞	0.036		
STD_{8th}	Auto-pipette 1~10 mL	V_{Ac}	0.041	∞	0.024		
		V_{ARp}	6.4	9	0.0014	0.0037	
		V_{ATp}	3	∞	0.0023		0.0038
	Volumetric flask 100 mL	V_c	0.1	∞	0.058		
		V_{Rp}	100	9	0.027	0.00051	
		V_{Tp}	3	∞	0.036		

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 검량곡선의 불확도

크레아틴 및 유기오염물질의 검량곡선은 표준용액 7~8개의 농도를 3회 조제하여 분석한 결과의 평균값을 이용하여 선형 최소제곱법으로 계산했다. 검량선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은[8]-[11]이며, 회귀분석(regression analysis)의 의해 관계식에 적용 계산하였을 때 검량곡선의 표준불확도($u(L_c)$)와 상대표준불확도($u(L_c)/L_c$)를 Table 31에 나타냈다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 31. Uncertainty budget for the determination of L_C

Analyte	s	B_1	p	n	C_0	$\overline{C}$	S_{xx}	Results	
								$u(L_c)$	$u(L_c)/L$
Creatine	19,247.0	4,178.5	3	21	962,414.6	167.1	165,043.0	10,910.05	0.011
Dicyandiamide	61,149.5	734,026.9	3	24	14.26	3.2	140.5	0.12	0.0081
Dihydrotriazine	367.8	34,799.7	3	24	0.0	1.8	31.6	0.011	0.38

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(4) 시료의 반복측정에 따른 불확도

크레아틴의 시료를 5회 반복측정함으로서 얻어진 크레아틴 및 유기오염물질의 평균값($\overline{x}$)과 표준편차(S) 결과값을 토대로 표준불확도($u(I_R)$) 및 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$) 값을 산출했다. 즉, 시험 과정을 5회 반복 측정했으므로 표준불확도($u(I_R)$)는 표준편차를 ($\sqrt{5}$)로 나눠준 값이며, 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$)는 표준불확도($u(I_R)$)를 평균값으로 나눠서 구했다(Table 32).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 32. Uncertainty budget for the determination of I_R

Analyte	$\overline{x}$ [1)]	v [2)]	S [3)]	$u(I_R)$	$u(I_R)/I_R$
Creatine	962,004.0		7,838.7	3,505.6	0.0036
Dicyandiamide	14.3	4	0.3	0.2	0.01
Dihydrotriazine	49.7		0.07	-	-

[1)] Average

[2)] Degree of freedom

[3)] Standard deviation

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(5) 회수율 및 정밀성의 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복측정과 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구했다. 표준물질 첨가법에 따라 5개의 시료에 일정량의 표준용액을 첨가하여 시험과정을 거쳐 반복 측정함으로서 평균($\overline{x}$) 및 표준편차(S)를 구했다. 이에 대한 표준불확도($u(R_M)$)는 표준편차와 같으므로 회수율 및 정밀성의 상대표준불확도($u(R_M)/R_M$)을 산출한 결과 Table 33과 같았다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 33. Uncertainty budget for the determination of R_M

Analyte	$\overline{x}$ [1)]	v [2)]	S [3)]	$u(R_M)$	$u(R_M)/R_M$
Creatine	100.3		0.9	0.0092	0.0092
Dicyandiamide	99.3	4	0.9	0.0089	0.0090
Dihydrotriazine	100.9		0.9	0.0095	0.0094

[1)]Average

[2)]Degree of freedom

[3)]Standard deviation

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(6) 합성표준불확도 및 확장불확도

(1)~(5)항에서 산출된 상대표준불확도 값을 불확도 전파의 법칙에 따라 제곱합의 제곱근으로 계산하여 전체 불확도 요인에 대한 합성상대표준불확도 ($u(C_s)/C_s$) 값을 구했다. 이때 합성상대표준불확도값에서 시료분석 결과치를 곱하여 합성표준불확도($u(C_s)$)값을 구했다. 그리고 확장불확도(U)는 합성표준불확도값에서 포함인자(k)를 곱하여 계산했으며, 포함인자는 식[13]에 의하여 산출하고 t-분포표를 이용하여 95% 신뢰수준에서 k값을 구했다. 그러나 EURACHEM/CITAC 지침(35)에 따라 유효자유도($v \geq 7$)일 경우 포함인자 k를 2.0으로 계산하면, 식 [14]에 의해서 확장불확도를 구했다(Table 34).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 34. Uncertainty budget for the determination of U

Analyte	v[1]	k[2]	C_s	$u(C_s)/C_s$	$u(C_s)$	U
Creatine	250	2.0	962,414.63	0.022	20,833.17	41,666.34
Dicyandiamide	4	2.78	14.26	0.024	0.35	0.96
Dihydrotriazine	23	2.0	N.D[3]	0.379	0.011	0.023

[1]Degree of freedom

[2]Coverage factor

[3]Not detected

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(7) 불확도 요인의 상대기여도

불확도 요인의 상대불확도가 최종 결과값에 미치는 기여도를 Fig. 13에 나타냈다. 크레아틴의 경우 불확도값이 최종 시험결과 값에 미치는 영향은 4.3%로 산정되었으며, 그 밖에 요인으로는 검량곡선에서 16.4%, 회수율과정에서 13.3% 순이였다. 그리고 유기오염물질 중 디시안디아마이드의 경우에는 불확도값이 최종 결과값의 미치는 영향은 6.7%로 산정되었으며, 0.1 ㎍/mL의 표준용액 조제에서 14.2%, 반복측정에서 13.3% 순의 기여도를 보였다. 또한 디하이드로트리아진의 경우에는 모든 검체에서 검출되지 않아 불확도 값이 최종 결과값의 미치는 영향을 확인할 수 없었으나, 임으로 시험결과값을 정량한계값으로 대신하여 불확도값을 산출했다, 그 결과 검량곡선에서 78.2%, 표준원액 조제 시 8.1%의 순의 기여도를 확인할 수 있었다. 그 밖에 요인들의 기여도를 확인한 결과 크레아틴과 유기오염물질 모두 10%미만으로 낮은 기여도를 가짐을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

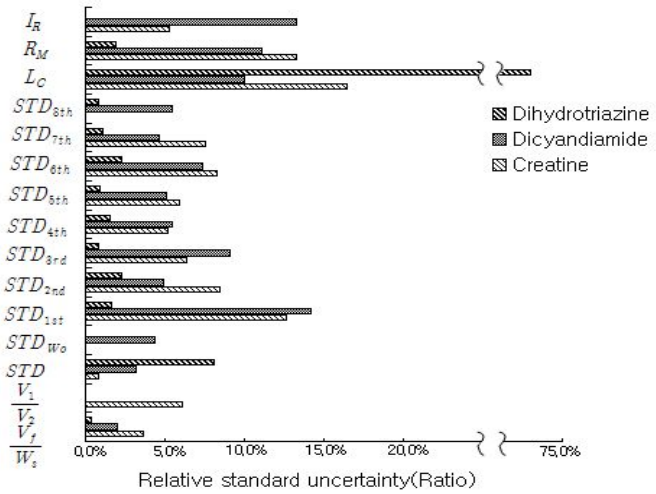


Fig. 13. Contributions of uncertainty factors.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

아. 재현정밀성

재현정밀성을 측정하기 위하여 6개 기관(A, B, C, D, E, F)을 대상으로 실험실내에서 균질화 시킨 표본시료(CrM1)를 배포한 후 표준화 시험법에 따라 5반복 시험을 수행하도록 했다. 단, 유기오염물질인 디시안디아마이드와 디하이드로트리아진의 경우는 표준물질의 수급이 원활하지 않아서 재현정밀성 측정의 대상에서 제외했다. 실험실 간 정밀도 측정의 요건 중 서로 다른 실험실, 분석자, 분석장비 및 분석일자 등의 환경으로부터 얻어진 결과의 편파성(bias)을 확인하였다(Fig. 14). 그 결과 6개의 실험실간 시험결과의 중심값은 94.8%로 나타났으며, 실험실간 상대표준편차는 3.0%로 확인되었다. 또한 중심값으로부터 가장 작은 차이와 큰 차이를 보이는 곳은 각각 B와 E였으며, 중심값의 4.9% 및 2.5% 차이가 나타났다. 그리고 6개관 모두 중심값의로부터 95%의 신뢰수준 범위 내에 존재하는 것으로 보아 표준화 방법의 정밀도가 매우 우수하다고 판단된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

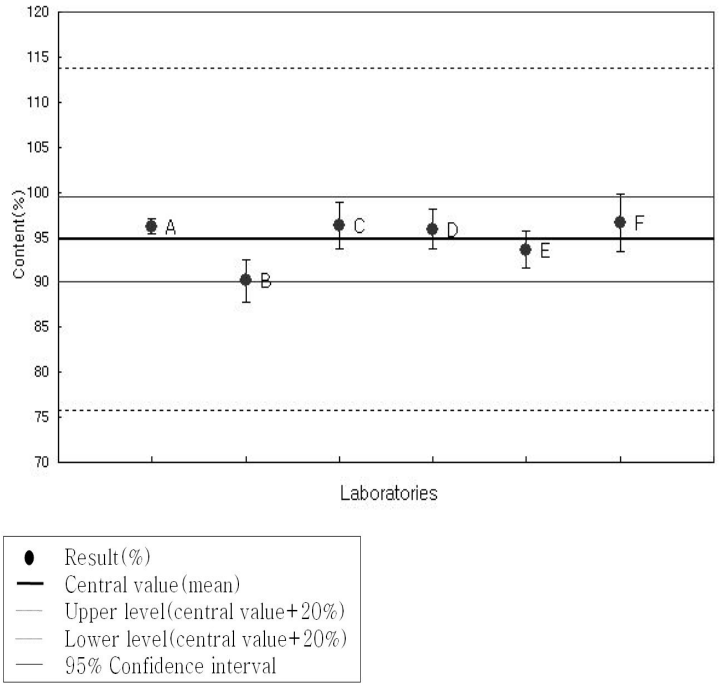


Fig. 14. Variations of the result by creatine method between laboratories.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 히알루론산 보충제 중 히알루론산

가. 적용성

국내 유통·판매 중인 히알루론산 보충제에 대하여 시료를 대표할 수 있는 서로 다른 속성(제형, 원료특성 등)의 3개 제품(HA1, HA2, HA3)을 선정하여 분석법 검증실험을 수행하였다. 본 연구에서 사용한 HA1과 HA2 시료는 각각 4.0%와 12.0%의 히알루론산이 여러 다른 성분과 함께 함유된 정제 형태의 국내에서 제조·판매되고 있는 제품이며, HA3 시료는 12.0%의 히알루론산이 함유된 분말형태를 캡슐 기제로 피포 성형하여 수입·판매하는 제품을 국내에서 구입하여 사용하였다(Table 35).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 35. Description of the samples

Sample	Formulation	Dosage form	Provenience
Hyaluronic acid(HA)			
HA1	4.0% HA plus other ingredients[1)]	Tablets	Korea
HA2	12.0% HA plus other ingredients[2)]	Tablets	Korea
HA3	12.0% HA plus other ingredients[3)]	Capsules	Japane

[1)]Crystalline glucose, xylitol, pomegranate powder, D-sorbitol, malpighia glabra fruit extract, blueberry powder DL-malic acid, stearic acid, fish collagen etc

[2)]Grape seed oil, fish collagen, beeswax, soybean lecithin

[3)]Soybean oil, grape oil, beeswax, evening primrose seeds oil, fish collagen, soybean lecithin, D-α-tocopherol

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 선택성

분석법 검증실험의 선택성을 확인하기 위하여 표준용액과 시료용액에서의 분리도 및 머무름시간(retention time)을 확인하였다. Fig. 15에서 A, B, C, D는 콘드로이티나아제 ABC 효소를 이용하여 히알루론산 표준물질 효소분해한 용액을 분석한 크로마토그램이며, E는 0.002 unit/㎕ 콘드로이티나아제 ABC가 혼합된 33 mM Tris-HCl(pH 8.0) 450 ㎕와 시료를 넣지 않은 33 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액 50㎕를 넣고 시험조작과 동일한 효소분해를 거친 공시험의 크로마토그램이다. F는 HA1 시료를 동일조건으로 효소분해한 분석한 크로마토그램이며, G는 △Di-HA 표준물질을 증류수에 녹여서 분석한 크로마토그램이다. 주피크와 시료의 주피크를 최적의 파장에서 분석한 결과 주피크가 동일시간내 일치했으며, 스펙트럼 패턴도 정확히 일치함을 확인할 수 있었다. 또한, 상대유지시간 3.6분에 나타나는 피크를 확인하기 공시험과 표준용액 농도별 변화경향을 확인한 결과, 알 수 없는(unknown) 피크로 확인되었다. 분리능(Resolution, R_s)을 확인하기 위하여 시료용액 중의 두 개의 피크의 머무름시간 t_1과 t_2의 분리 시간적 거리와 두 개의 피크 폭 W_1 과 W_2를 조사한 결과 3.7로 나타남으로서 AOAC 가이드라인(6)에서 제시하는 권장 분리능 1.5 이상의 조건을 만족함을 확인 할 수 있다(Table 36).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

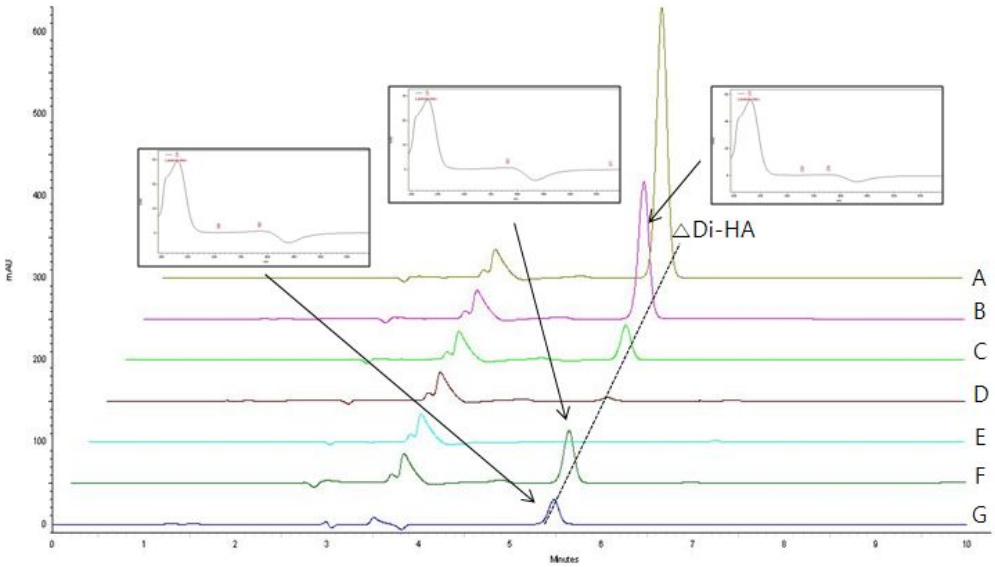


Fig. 15. Typical HPLC chromatograms of unsaturated disaccharide (△Di-HA) analytes obtained after enzymatic digestion of HA and UV spectra of the eluted △Di-HA peak [A: standard HA (800 ㎍/mL), B: standard HA (400 ㎍/mL), C: standard HA (100 ㎍/mL), D: standard HA (10 ㎍/mL), E: blank, F: HA1 dietary supplement, G: standard △Di-HA (85.3ppm)]. See the experimental for chromatographic conditions.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 36. Selectivity data of hyaluronic acid

Retention times (minutes)		Baseline widths (minutes)		Resolution
t_1	t_2	W_1	W_2	
4.512	5.632	0.2	0.4	3.7(≥1.5)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 직선성

표준용액을 8개의 농도로 적절히 희석하여 9.4, 36.4, 66.1, 100.1, 269.1, 487.1, 908.5, 1,487.2 ㎍/mL에 대한 직선성을 검토하였다. 또한, 시험시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3회 반복 실험을 수행하였다. 그 결과 결정계수(r^2)는 0.9979로 AOAC 가이드라인(6)에서 요구하는 결정계수 0.99 이상을 만족함을 확인하였다(Fig. 16).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

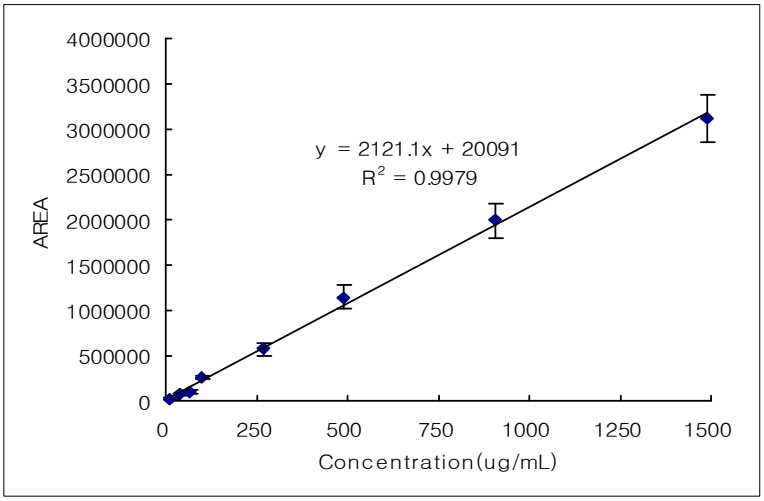


Fig. 16. Calibration curve of hyaluronic acid (n=3).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 정확성

3개의 표본시료(HA1, HA2, HA3)에 대하여 각각의 함량 측정값의 1배, 2배 및 3배가 되도록 일정량의 표준용액을 첨가하였고, 5회 반복실험을 통하여 평균 회수율을 측정하였다. 그 결과 1배[HA1 (64.0), HA2 (193.3), HA3 (193.3), ㎍/mL]가 되도록 처리했을 때의 회수율은 94.4~97.6%, 2배[HA1 (128.0), HA2 (386.6), HA3 (386.6), ㎍/mL]는 93.5~96.2%, 3배[HA1 (192.0), HA2 (579.9), HA3 (579.9), ㎍/mL]는 92.7~97.6%로 나왔다. 또한, 각각의 시료의 농도변화에 대한 상대표준편차를 확인할 결과 0.7~2.6%, 1.2~2.7%, 1.4~3.8%로 확인되었다. 시료에서 측정한 함량 %를 이용하여, $RSDr=C^{-0.15}$의 공식에 따라 측정값을 산출했을 경우 AOAC 가이드라인(6)에서 제안하고 있는 허용범위을 모두 만족하였으나, 함량 측정값의 3배가 되도록 첨가한 HA3 시료에서는 허용범위를 초과한 것으로 보아 원료 특성에 따라 히알루론산이 고농도로 존재할 경우 반복 정확성이 낮아진다는 것을 확인할 수 있었다(Table 37).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 37. Accuracy data of hyaluronic acid(n=5)

Treatment[1)]	Fortified concentation HA1 (μg/mL)			Fortified concentation HA2 (μg/mL)			Fortified concentation HA3 (μg/mL)		
	64.0	128.0	192.0	193.3	386.6	579.9	193.3	386.6	579.9
1	92.4	93.7	95.6	98.6	94.5	96.7	94.6	94.9	92.4
2	96.7	96.5	93.7	97.3	97.8	99.5	96.9	97.9	96.8
3	95.0	91.3	91.5	96.7	96.5	96.1	92.5	92.8	92.5
4	94.2	92.4	88.2	97.8	95.8	97.3	96.7	98.7	89.7
5	93.8	93.6	97.3	97.7	96.2	98.5	99.2	93.6	92.1
Mean (%)	94.4	93.5	93.3	97.6	96.2	97.6	96.0	95.6	92.7
S.D.	1.6	1.9	3.6	0.7	1.2	1.4	2.5	2.6	2.6
RSD (%)	1.7	2.1	3.8	0.7	1.2	1.4	2.6	2.7	2.8
Acceptable recovery (%)[2)]	93.2~103.8			95.6~101.8			95.6~101.8		

[1)]Known amounts (1-3 times) were added in representative sample.

[2)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

마. 함량측정과 반복정밀성

(1) 검체량 변화에 대한 반복정밀성

검체량의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 표본시료 HA1의 검체량을 40 mg/g×1배, 2배 및 3배로 늘리고 각각에 대해서 5회 반복실험 하였다. 그 결과, 표본시료에서의 히알루론산 함량은 1배에서 4.0%, 2배에서 3.9%, 3배에서는 3.8%로 나타남으로서, 평균 히알루론산 함량은 3.9%로 확인되었다. 반복측정값에 대한 상대표준편차는 1배 채취시 1.5%, 2배 채취시 3.5%, 3배 채취시 3.9%로 나타났으며, 함량 측정값을 이용하여 산출된 허용범위에 포함 여부를 확인한 결과 1배로 채취한 경우에는 허용범위에 포함되었으나, 2배 이상의 시료를 채취 시 허용범위를 벗어났다. 이러한 결과는 일정량의 시료를 증량할 경우, 반복정밀성에 문제가 발생한다는 것을 확인할 수 있었다(Table 38).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 38. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5)

Treatment[1)]	Hyaluronic acid(HA1)		
	1×	2×	3×
1	40,121.8	40,453.6	38,564.2
2	39,124.2	38,561.3	39,176.3
3	40,513.6	39,275.5	38,127.4
4	40,327.7	38,664.9	35,336.0
5	39,351.6	36,749.1	37,594.1
Mean (㎍/g)	39,887.8	38,740.9	37,759.6
Mean (%)	4.0	3.9	3.8
S.D.	614.5	1,343.9	1,474.0
RSD (%)	1.5	3.5	3.9
Acceptable recovery (%)[2)]		0.4~1.6	

[1)]Known amounts (1-3 times) were added in representative sample.

[2)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(2) 시료 기질 변화에 대한 반복정밀성

시료 기질변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 서로 다른 기질을 가지고 있는 표본시료 3개(HA1, HA2, HA3)를 각각 5회 반복 실험하였다. 그 결과 히알루론산 함량이 HA1 시료에서는 4.0%, HA2 시료에서는 11.9%, HA3 시료에서는 12.1%로 나타났다. 이러한 결과값을 이용하여 허용범위를 확인한 결과 HA1은 0.4~1.6%이며, HA2와 HA3은 0.3~1.4%로 확인되었다. 각 시료 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 HA1은 1.5%, HA2는 1.3%, HA3은 1.4%로 허용범위에 모두 포함되었다. 이러한 결과는 시료의 기질이 다른 특성을 갖는다 하더라도 시험방법의 반복정밀성은 문제가 없다는 것을 알 수 있었다(Table 39).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 39. Repeatability precision data of three HAs with different sample matrix (n=5)

Analytes	Hyaluronic acid (HA)		
	HA1	HA2	HA3
1	40,121.8	120,145.2	120,457.2
2	39,124.2	119,481.3	119,845.6
3	40,513.6	116,341.5	120,359.4
4	40,327.7	119,022.3	123,942.8
5	39,351.6	119,679.7	120,412.3
Mean (㎍/g)	39,887.8	118,934.0	121,003.5
Mean (%)	4.0	11.9	12.1
S.D.	6,14.5	1,504.3	1,661.6
RSD (%)	1.5	1.3	1.4
Acceptable values (%)[1)]	0.4~1.6	0.3~1.4	0.3~1.4

[1)]Acceptable precision values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(3) 분석시간별 반복정밀성

분석 시간의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 균질화시킨 표본 시료 HA1을 4℃ 냉장실에 보관하면서 0 h, 24 h, 48 h마다 시험조작을 5회 반복 실험하였다. 그 결과 히알루론산 함량은 0 h, 24 h에서 4.0%, 48 h에서는 3.9%로 나타났으며, 상대표준편차는 각각 1.5%, 1.0%, 1.5%로 확인되었다. 또한 분석시간별 상대표준편차는 모두 허용범위에 포함되었으며, intra-day RSD%는 1.8%로 나타났다. 따라서 분석시간을 달리하더라도 동일한 조건에서 시험방법의 반복정밀성은 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다(Table 40).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 40. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5)

Treatment	Hyaluronic acid (HA1)		
	0 h	24 h	48 h
1	40,121.8	39,851.4	39,447.2
2	39,124.2	40,271.2	38,542.6
3	40,513.6	40,684.5	38,994.7
4	40,327.7	39,664.3	38,978.0
5	39,351.6	39,941.8	37,953.6
Daily Mean (μg/g)	39,887.8	40,082.6	38,783.2
Mean (%)	4.0	4.0	3.9
Inter-day S.D.	614.5	401.9	563.4
Inter-day RSD (%)	1.5	1.0	1.5
Intra-day RSD (%)		1.8	
Acceptable values (%)[1)]		0.4~1.7	

[1)]Acceptable values proposed by AOAC guideline (6).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

바. 검출한계 및 정량한계

검출한계 및 정량한계를 구하기 위하여 표본시료(CrM1)를 분석한 크로마토그램에서 기능(지표)성분이 위치하는 곳의 노이즈(nosie)값을 10회 측정값으로부터 표준편차를 구하고 3배를 더한 값을 검출한계, 10배를 더한 값을 정량한계로 하였다. 그 결과 히알루론산의 검출한계는 0.6 ㎍/mL이며, 정량한계는 2.1 ㎍/mL로 나타났다.

사. 측정불확도

(1) 시험용액 조제 시 불확도

시료의 무게를 0.1 mg까지 측정할 수 있는 저울을 이용하여 25 mL 용량플라스크에 0.5 g 정도 채취한 후 Tris-HCl 완충용액으로 히알루론산 성분을 추출함으로서 1차 시험용액을 준비하였다. 자동피펫을 이용하여 1차 시험용액 0.05 mL와 콘드로이티나아제 ABC 효소가 섞여있는 Tris-HCl 완충용액 0.45 mL를 섞고 효소분해 시킨 것을 2차 시험용액으로 하였다. 이때 1차 시험용액 조제 시 발생할 수 있는 요인은 저울 자체의 불확도(교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 고려했다. 또한 2차 시험용액 조제 시의 자동피펫의 불확도(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 요인을 고려했다. 즉, 시료 무게 측정 시 저울에 대한 교정성적서상의 불확도는 95% 신뢰수준(k=2)에서 0.0005 g의 불확도를 가지며 표준불확도($u(W_c)$)는 0.00025 g(0.0005/2)가 된다. 이때 저울의 분해능은 0.0001 g이며 표준불확도는 ($u(W_{Ra})$)는 0.000029 g(0.0001/2/$\sqrt{3}$)이였다. 또한 안정성은 0.5 g의 표준분동을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통실험표준편차 방법에 따라 식[6]과 [7]을 적용하여 표준불확도($u(W_{Rp})$) 0.000058 g을 구했으며 자유도는 16에서 1을 뺀 값인 15가 된다. 결국 저울의 합성표준불확도($u(W_s)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근이므로 0.00025 g이었며, 상대표준불확도

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

($u(W_s)/W_s$)는 0.00050 (0.00025/0.5022)이었다. 또한 25 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 용량플라스크의 허용오차가 ± 0.04 이므로 표준불확도($u(V_c)$는 0.023 mL(0.04/$\sqrt{3}$)이며, 용량플라스크의 반복성은 25 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(V_{Rp})$)는 0.0041 mL가 되었다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3 ℃ 이고 Tris-HCl 완충용액 팽창계수는 0.00021이며, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(V_{Tp})$는 0.0091 mL(0.016/$\sqrt{3}$)이었다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(V_f)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.025 mL이며, 상대표준불확도 ($u(V_f)/V_f$)는 0.0010(0.025/25)이였다. 이와 동일한 방법으로 2차 시험용액의 조제과정은 1차 시험용액에서 자동피펫을 이용하여 용량플라스크에 취하고 추출용액으로 표시선에 맞춤으로서 발생하는 불확도를 구했다. 위와 같은 시험용액조제 시 발생되는 불확도 과정을 Table 41에 정리했다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 41. Uncertainty budget for the determination of W_s, V_{Mp} and V_f

Step	Parameter		Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
	(x_i)		x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
1st	W_s	W_c	–	∞	0.0005	0.00050	0.0011
		W_{Ra}	–	∞	0.000029		
		W_{Rp}	0.5	15	0.000029		
	V_f	V_c	0.04	∞	0.023	0.0010	
		V_{Rp}	25	9	0.0041		
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
2st	V_2	V_{Ac}	0.001	∞	0.0006	0.016	0.022
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053		
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	V_1	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	0.016	
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029		
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(2) 표준원액 및 표준용액 조제 시 불확도

표준용액의 조제과정에서 기여되는 불확도를 구하기 위하여 표준물질의 순도와 표준원액 조제 시 저울 자체의 불확도(교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성) 및 용량플라스크의 불확도(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 요인을 합성했다. 또한 표준용액 농도 별 희석 시 사용되는 자동피펫의 불확도(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 및 용량플라스크의 불확도 요인을 고려했다. 먼저 표준물질인 히알루론산은 제조사로부터 제공된 인정서에 99%로 기재되어 최대농도 오차범위가 1%이므로 순도에 대한 표준불확도는($u(P_{Fi})$) 0.0011($0.01/\sqrt{3}$) g/100g이고 상대표준불확도는 ($u(P_{Fi})/P_{Fi}$) 0.000011(0.0011/99) 이었다. 그리고 표준물질 0.9664 g을 50 mL의 용량플라스크에 넣고 Tris-HCl 완충용액으로 희석하여 조제하므로 표준물질 계량에 필요한 계량기의 불확도와 50 mL 용량플라스크 부피에 대한 불확도를 고려했다. Table 42에서 1차 시험용액 조제 시 고려했던 불확도와 동일한 방법을 적용하여 불확도를 산정하면 저울의 표준불확도($u(STD_{Wc})$)는 0.00025 g(0.0005/2), 표준불확도($u(STD_{WRa})$)는 0.000029 g($0.0001/\sqrt{3}$)이었다. 그리고 저울의 안정성의 불확도는 표준분동 1.0 g을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정한 값들을 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 [6]와 [7]을 적용하여 산출할 경우 표준불확도($u(STD_{WRp}$)는 0.000026 g이었다. 결국 저울의 합성불확도($u(STD_W)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.00025 g이며, 상대표준불확도($u(STD_W)/STD_W$)는 0.00026(0.00025/0.9664)이었다. 또한 50 mL 용량플라스크에 완충용액으로 정용 시 기인되는 불확도는 용량플라스크의 허용오차가 ± 0.06 이므로 표준불확도($u(STD_{Vc}$)는 0.035 mL($0.06/\sqrt{3}$)이었으며, 용량플라스크의 반복성은 50 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로서 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(STD_{VRp})$)는 0.030 mL($0.095/\sqrt{10}$)가 되었다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3℃이고 완충용액의 팽창계수는 0.00021이었으며, 신뢰구간이 주어져 있지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(STD_{VTp})$)는 0.018 mL($0.032/\sqrt{3}$)이었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(STD_V)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.042 mL이었며, 상대표준불확도($u(STD_V)/STD_V$)는 0.00083(0.042/50)이었다. 따라서, 표준원액에 대한 상대합성표준불확도는 표준물질의 순도, 표준품계량, 플라스크의 상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하며 그 결과 0.00087로 나타났다. 표준용액 조제는 표준원액을 자동피펫을 이용하여 농도별로 9.4 ㎍/mL, 36.4 ㎍/mL, 66.1 ㎍/mL, 100.1 ㎍/mL, 269.1 ㎍/mL, 487.1 ㎍/mL, 908.5 ㎍/mL, 1,487.2 ㎍/mL로 조제한 후 이 용액 0.05 mL와 콘드로이티나아제 ABC 효소 용액 0.45 mL을 섞어서 효소반응 시켜서 만들었다. 따라서 각 농도별(1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 8th)의 불확도는 표준원액으로부터 표준용액 조제 시 발생하는 불확도(자동피펫 및 용량플라스크)와 효소반응 과정의 불확도(자동피펫)를 각 단계별로 합성했다. 다음 Table 42에서는 단계별 표준용액 조제 시 사용되는 자동피펫 용량플라스크에서 발생하는 불확도를 정리했다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 42. Summary of uncertainty values from standard solutions

Description parameter			value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
		(x_i)	x_i	v	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/x_i\}^2)}$
P_{Fi}			99	∞	0.0011	0.000011	0.00087
STD		STD_W	0.9664	134062	0.0011	0.00026	
		STD_V	50	34	0.042	0.00083	
STD_{1st}	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.0005	∞	0.00029	0.023	0.032
		V_{ARp}	0.0129	9	0.000039		
		V_{ATp}	3	∞	0.000047		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023	0.0011	
		V_{Rp}	25	9	0.013		
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.016	
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053		
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Auto-pipette 100~5000 ㎕	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	0.016	
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029		
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
STD_{2nd}	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.012	0.025
		V_{ARp}	0.0499	9	0.000057		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

		V_{ATp}	3	∞	0.000018		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023	0.0011	
		V_{Rp}	25	9	0.013		
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.016	
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053		
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Auto-pipette 100~5000 ㎕	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	0.016	
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029		
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
STD_{3rd}	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.0088	0.024
		V_{ARp}	0.0908	9	0.000055		
		V_{ATp}	3	∞	0.000033		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023	0.0011	
		V_{Rp}	25	9	0.013		
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.016	
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053		
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Auto-pipette 100~5000 ㎕	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	0.016	
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029		
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
STD_{4th}	Auto-pipette	V_{Ac}	0.0012	∞	0.00069	0.0088	0.024

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

	2~200 $\mu\ell$	V_{ARp}	0.1373	9	0.00099		
		V_{ATp}	3	∞	0.000050		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023		
		V_{Rp}	25	9	0.013	0.0011	
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
	Auto-pipette 2~200 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058		
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Auto-pipette 100~5000 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069		
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
STD_{5th}	Auto-pipette 50~1000 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.005	∞	0.0029		
		V_{ARp}	0.3693	9	0.00055	0.0080	
		V_{ATp}	3	∞	0.00013		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023		
		V_{Rp}	25	9	0.013	0.0011	
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		0.024
	Auto-pipette 2~200 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058		
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Auto-pipette 100~5000 $\mu\ell$	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069		
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

STD_{6th}	Auto-pipette 50~1000 ㎕	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035	0.0052	0.023
		V_{ARp}	0.6684	9	0.00049		
		V_{ATp}	3	∞	0.00024		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023	0.0011	
		V_{Rp}	25	9	0.013		
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.016	
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053		
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Auto-pipette 100~5000 ㎕	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	0.016	
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029		
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
STD_{7th}	Auto-pipette 100~5000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.014	0.026
		V_{ARp}	1.2467	9	0.00046		
		V_{ATp}	3	∞	0.00045		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023	0.0011	
		V_{Rp}	25	9	0.013		
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.016	
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053		
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Auto-pipette 100~5000 ㎕	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	0.016	
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
STD_{8th}	Auto-pipette 100~5000 ㎕	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.0085	0.024
		V_{ARp}	2.0408	9	0.00046		
		V_{ATp}	3	∞	0.00074		
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023	0.0011	
		V_{Rp}	25	9	0.013		
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
	Auto-pipette 2~200 ㎕	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.016	
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053		
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
	Auto-pipette 100~5000 ㎕	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	0.016	
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029		
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(3) 검량곡선의 불확도

검량곡선은 표준용액 8개의 농도 9.4 ㎍/mL, 36.4 ㎍/mL, 66.1 ㎍/mL, 100.1 ㎍/mL, 269.1 ㎍/mL, 487.1 ㎍/mL, 908.5 ㎍/mL, 1,487.2 ㎍/mL로 3회 조제하여 분석한 결과의 평균값을 이용하여 선형 최소제곱법으로 계산했다. 검량선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은[8]-[11]이며, 회귀분석(regression analysis)의 의해 관계식에 적용 계산하였을 때 검량곡선의 표준불확도($u(L_c)$)는 561.63 ㎍/mL이었고, 상대표준불확도($u(L_c)/L_c$)는 0.0097(561.63/결과값)으로 나타났다(Table 43).

Table 43. The result of regression analysis using Excle program

Analyte	s	B_1	p	n	C_0	$\overline{C}$	S_{xx}
Hyaluronic acid	50,219.33	2,121.12	3	24	57,747.52	420.50	5,844,213.24

(4) 시료의 반복 측정에 따른 불확도

시료를 5회 반복 측정으로 얻어진 결과값을 토대로 표준불확도($u(I_R)$) 및 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$) 값을 산출했다. 시험 과정을 5회 반복 측정한 결과 평균값은 57,747.52이며 표준편차는 2,194.97 이였다. 따라서 표준불확도($u(I_R)$)는 표준편차를 ($\sqrt{5}$)로 나눠준 값인 981.62(2,194.97/$\sqrt{5}$)이며, 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$)는 0.017(981.62/57,747.52)로 나타났다.

(5) 회수율 및 정밀성의 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복측정과 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구했다. 회수율 시험을 5회 반복 측정한 결과 평균 및 표준편차는 94.46 ± 1.6%이였으며, 이에 대한 표준불확도($u(R_M)$)는 표준편차와 같으므로

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

히알루론산의 표준불확도는 0.016이였다. 따라서 회수율 및 정밀성의 상대표준불확도($u(R_M)/R_M$)을 산출하면 0.017(0.016/0.94)이며 자유도는 4이였다.

(6) 합성표준불확도 및 확장불확도

(1)~(5)항에서 산출된 상대표준불확도 값을 불확도 전파의 법칙에 따라 제곱합의 제곱근으로 계산하여 전체 불확도 요인에 대한 합성상대표준불확도($u(C_s)/C_s$) 값을 구하면 0.076이 된다. 이때 합성상대표준불확도값에서 시료분석 결과치인 57,747.52를 곱하면 합성표준불확도($u(C_s)$)값인 4,380.73 ㎍/g를 구할 수 있다. 그리고 확장불확도(U)는 합성표준불확도값에서 포함인자(k)를 곱하여 계산했으며, 포함인자는 식[13]에 의하여 산출할 경우 33로 확인되어 t-분포표를 이용하여 95% 신뢰수준에서 k=2.03을 구했다. 그러나 EURACHEM/CITAC 지침(35)에 따라 유효자유도($\upsilon \geq 7$)일 경우 포함인자 k를 2.0으로 계산하면, 식 [14]에 의해서 산출된 확장불확도는 산출된 확장불확도는 8,761.46 ㎍/g이며 결국, 히알루론산의 함량은 57,747.52 ± 8,761.46 ㎍/g (신뢰수준 약 95%, k=2.0일때)이였다.

(7) 불확도 요인의 상대기여도

불확도 요인의 상대불확도가 최종 결과값에 미치는 기여도를 Fig. 17에 나타냈으며, 불확도값이 최종 시험결과 값에 미치는 영향은 15.2%로 산정되었다. 각 불확도 요인의 기여도는 %값으로 표현한 결과 표준원액을 9.4 ㎍/mL의 농도의 표준용액으로 희석하는 과정에서 불확도 값의 기여도가 11.8%로 가장 컸으며, 표준원액과 1차 시험용액조제에서는 0.4%이하로 가장 낮은 기여도를 보였다. 그 밖에 다른 요인에서는 10%미만으로 비슷한 수준으로 나타남을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

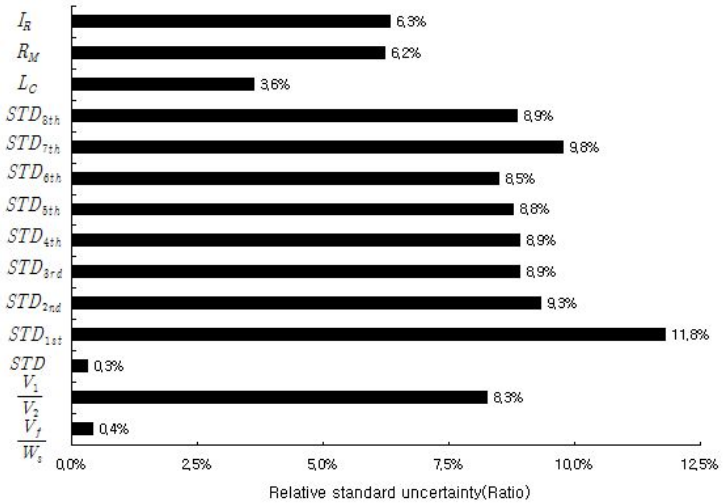


Fig. 17. Contributions of uncertainty factors.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

아. 재현정밀성

재현정밀성을 측정하기 위하여 6개 기관(A, B, C, D, E, F)을 대상으로 실험실내에서 균질화 시킨 표본시료(HA1)를 배포한 후 표준화 시험방법에 따라 크레아틴 분석을 5반복 수행하도록 했다. 즉, 실험실 간 정밀도 측정의 요건 중 서로 다른 실험실, 분석자, 분석장비 및 분석일자 등의 환경으로부터 얻어진 결과의 편파성(bias)을 확인하였다(Fig. 18). 그 결과 6개의 실험실간 시험결과의 중심값은 5.6%로 나타났으며, 실험실간 상대표준편차는 11.1%로 확인되었다. 또한 중심값으로부터 95%에 존재하는 기관은 A와 F기관 2개 기관이며, 중심값의 ± 20% 이외로 벗어난 기관은 없었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

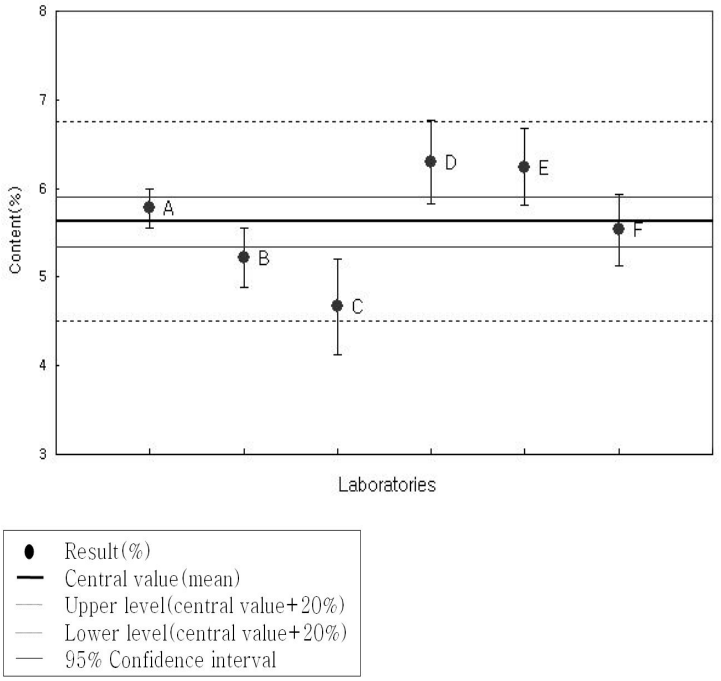


Fig. 18. Variations of the result by hyaluronic acid method between laboratories.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3절 유통 중인 건강기능식품 모니터링 결과

본 연구에서 확립한 시험방법을 이용하여 유통 중인 건강기능식품을 대상으로 기능(지표)성분 및 유기오염물질의 함량을 모니터링 하였다.

1. 검체 선정 및 수거 현황

고시형 건강기능식품 1품목(달맞이꽃 종자추출물) 및 개별인정형 2품목(크레아틴, 히알루론산)은 온라인 쇼핑몰과 대형마트에서 구입했다. 수거 제품은 기능성원료를 주원료로 사용하면서 그 기능성과 지표성분의 함량을「식품등의 표시기준」에 따라 표기한 제품을 대상으로 선정했으며, 단순 부원료로 사용했거나 그 기능성 및 지표성분의 함량을 표기하지 않은 제품은 대상에서 제외하였다. 전체 수거 제품은 총 33건이며, 품목별 수거량은 달맞이꽃종자추출물 제품이 4건, 크레아틴 제품이 12건, 히알루론산 제품이 17건을 수거했다. 수거제품의 제조국은 모두 국내에서 제조한 제품이였으나, 한국, 미국, 일본, 독일 등 다양한 국가들로부터 수입하여 제조・판매되고 있었다(Table 44).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 44. Summary on the kinds and quantity of health/functional foods

	Item	Products	Provenience
Management of health/functional foods (2011-68)	Evening primrose extracts	4	Korea
Specific health/functional foods	Creatine monohydrate	12	Korea Germany USA
	Hyaluronic acid	17	Korea Japan
Sum. Total		33	

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 모니터링 결과

수거한 유통 건강기능식품에 대하여 확립된 시험법을 이용하여 기능(지표) 성분의 함유량 및 유기오염물질(크레아틴 제품만 해당)에 대해 모니터링을 수행했다. 그 결과 33건의 건강기능식품 중에서 기능(지표)성분이 표시량의 80~120%를 초과한 제품은 없었다. 그리고 크레아틴 제품은 수거품 모두에게서 유기오염물질인 디시안디아마이드가 13.1~29.2 mg/kg으로 검출되었으며, 기준치(50.0 mg/kg)의 26.2~58.4%로 잔류하고 있음을 확인하였다. 그러나 디히드로트리아진의 경우에는 모든 제품에서 검출되지 않았다(Table 45-47).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 45. Results of monitoring Health/functional food containing total polyphenol and PGG

Item.	Samples	Formulation	Indicating quantity	Result(%)	Judgement	Dosage form	Provenience
Evening Primrose Extracts	Total polyphenol (TPP)						
	TPP 1	30% TPP plus other ingredients	174 mg/0.58 g		Approved	Capsules	Korea
	TPP 2	32% TPP plus other ingredients	185.6 mg/0.58 g		Approved	Capsules	Korea
	TPP 3	35% TPP plus other ingredients	203.0 mg/0.58 g		Approved	Capsules	Korea
	TPP 4	30% TPP plus other ingredient	174 mg/0.58 g		Approved	Capsules	Korea
	Penta-O-galloyl beta-D-glucose (PGG)						
	PGG 1	1.0% PGG plus other ingredients	5.8 mg/0.58 g	9.2 mg/0.58 g (158.0%)	Approved	Capsules	Korea
	PGG 2	1.2% PGG plus other ingredients	7.0 mg/0.58 g	5.9 mg/0.58 g (54.5%)	Approved	Capsules	Korea
	PGG 3	1.0% PGG plus other ingredients	5.8mg/0.58g	4.6 mg/0.58 g (80.0%)	Approved	Capsules	Korea
	PGG 4	1.0% PGG plus other ingredients	5.8 mg/0.58 g	5.8 mg/0.58 g (106.0%)	Approved	Capsules	Korea

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 46. Results of monitoring Health/functional food containing creatine and organic compounds

Item.	Samples	Formulation		Indicating quantity/Standards and Specifications[1)]	Result(%)	Judgement	Dosage form	Provenience
	Creatine monohydrate (CrM)							
Creatine monohydrate	CrM 1	100% CrM	Cr	2,970 mg/3.0 g	2,886 mg/3.0 g (97.2%)	Approved	Powder	Korea
			Dcd	50.0 mg/kg	14.3 mg/kg			
			Dht	ND	ND			
	CrM 2	100% CrM	Cr	1,500 mg/1.5 g	1,479 mg/1.5 g (98.6%)	Approved	Capsules	Germany
			Dcd	50.0 mg/kg	13.1 mg/kg			
			Dht	ND	ND			
	CrM 3	100% CrM	Cr	1,000 mg/1.0 g	979 mg/1.0 g (97.9%)	Approved	Capsules	Korea
			Dcd	50.0 mg/kg	13.4 mg/kg			
			Dht	ND	ND			
	CrM 4	100% CrM	Cr	1,000 mg/1.01 g	904 mg/1.01 g (90.4%)	Approved	Capsules	USA
			Dcd	50.0 mg/kg	19.7 mg/kg			

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

		Dht	ND	ND			
CrM 5	100% CrM	Cr	2,970 mg/3.0 g	2,738 mg/3.0 g (92.2%)	Approved	Capsules	Korea
		Dcd	50.0 mg/kg	23.9 mg/kg			
		Dht	ND	ND			
CrM 6	100% CrM	Cr	1,500 mg/1.5 g	1,342 mg/1.5 g (89.5%)	Approved	Capsules	Korea
		Dcd	50.0 mg/kg	16.0 mg/kg			
		Dht	ND	ND			
CrM 7	100% CrM	Cr	1,500 mg/1.5 g	1,317 mg/1.5 g (87.8%)	Approved	Capsules	Korea
		Dcd	50.0 mg/kg	13.6 mg/kg			
		Dht	ND	ND			
CrM 8	100% CrM	Cr	1,500 mg/1.5 g	1,313 mg/1.5 g (87.6%)	Approved	Capsules	Korea
		Dcd	50 mg/kg	21.0 mg/kg			
		Dht	ND	ND			
CrM 9	100% CrM	Cr	1,500 mg/1.5 g	1,342 mg/1.5 g (89.5%)	Approved	Capsules	Korea
		Dcd	50.0 mg/kg	20.4 mg/kg			

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

		Dht	ND	ND			
CrM 10	100% CrM	Cr	3,000 mg/3.0 g	2,655 mg/3.0 g (88.5%)	Approved	Powder	Germany
		Dcd	50.0 mg/kg	25.0 mg/kg			
		Dht	ND	ND			
CrM 11	60% CrM	Cr	3,000 mg/5.0 g	3,063 mg/5.0 g (102.1%)	Approved	Powder	Germany
		Dcd	50.0 mg/kg	29.2 mg/kg			
		Dht	ND	ND			
CrM 12	100% CrM	Cr	3,000 mg/3.0 g	2,690 mg/3.0 g (89.7%)	Approved	Powder	Korea
		Dcd	50.0 mg/kg	24.8 mg/kg			
		Dht	ND	ND			

[1)]Standards and specifications of raw material, Cr=creatine, Dcd=dicyandiamide, Dht=dihydro-1,3,5-triazine, ND=not detection.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 47. Results of monitoring Health/functional food containing hyaluronic acid

Item.	Samples	Formulation	Indicating quantity	Result(%)	Judgement	Dosage form	Provenience
	Hyaluronic acid (HA)						
Hyaluronic acid	HA 1	4.0% HA plus other ingredients	120 mg/3.0 g	101 mg/3.0 g (84.5%)	Approved	Tablets	Korea
	HA 2	12.0% HA plus other ingredients	120 mg/1.0 g	121 mg/1.0 g (100.8%)	Approved	Capsules	Korea
	HA 3	20.0% HA plus other ingredients	120 mg/0.6 g	122 mg/0.6 g (101.8%)	Approved	Capsules	Korea
	HA 4	20.0% HA plus other ingredients	120 mg/0.6 g	138 mg/0.6 g (115.2%)	Approved	Capsules	Japan
	HA 5	12.0% HA plus other ingredients	120 mg/1.0 g	137 mg/1.0 g (113.9)	Approved	Capsules	Japan
	HA 6	20.0% HA plus other	120 mg/0.6 g	101 mg/0.6 g (84.3%)	Approved	Capsules	Korea

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

HA 7	ingredients 12.0% HA plus other ingredients	120 mg/1.0 g	107 mg/1.0 g (89.4%)	Approved	Capsules	Korea
HA 8	12.0% HA plus other ingredients	120 mg/1.0 g	112 mg/1.0 g (93.5%)	Approved	Capsules	Japan
HA 9	6.0% HA plus other ingredients	120 mg/2.0 g	115 mg/2.0 g (95.7%)	Approved	Tablets	Korea
HA 10	12.0% HA plus other ingredients	120 mg/1.0 g	104 mg/1.0 g (86.7%)	Approved	Tablets	Korea
HA 11	12.0% HA plus other ingredients	120 mg/1.0 g	110 mg/1.0 g (91.7%)	Approved	Capsules	Korea
HA 12	13.0% HA plus other ingredients	130.5 mg/1.0 g	135 mg/1.0 g (103.5%)	Approved	Capsules	Korea
HA 13	12.0% HA plus other ingredients	120 mg/1.0 g	100 mg/1.0 g (83.5%)	Approved	Capsules	Korea

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

HA 14	24.3% HA plus other ingredients	121.5 mg/0.5 g	100 mg/0.5 g (82.2%)	Approved	Capsules	Korea
HA 15	4.0% HA plus other ingredients	120 mg/3.0 g	101 mg/3.0 g (84.5%)	Approved	Tablets	Korea
HA 16	6.0% HA plus other ingredients	120 mg/2.0g	110 mg/2.0 g (91.7%)	Approved	Capsules	Korea
HA 17	12.0% HA plus other ingredients	120 mg/1.0 g	128 mg/1.0 g (106.4%)	Approved	Capsules	Korea

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제4장 요 약

본 연구에서는 기능성 원료별 기준 및 규격의 추가 등재 원칙에 따라 고시되었으나, 시험법이 미설정된 건강기능식품과 공전등재 및 추가 대상 예정품목인 개별인정형 건강기능식품에 대하여 건강기능식품의 품목확대의 제반 요건인 시험법 개발에 있어서 체계적인 절차를 마련함과 동시에 시험법(안)을 마련하고자 했다. 먼저, 표준시험법을 마련하기 위하여 건강기능식품의 지표(기능)성분의 특성 및 국내외 인허가 현황, 사용현황, 국내외 분석법 자료 및 건강기능식품 기능성 원료 인정서 등을 수집하고 시험방법을 설정하였다. 그리고 유통·판매 중인 표본시료를 수집하여 시험검사 및 시험방법 검증을 거쳐 도출되는 결과를 토대로 표준화된 시험방법을 마련(크레아틴 품목의 경우 유기오염물질 포함)했고, 이에 대한 밸리데이션은 AOAC 가이드라인(6)에서 제시하고 있는 8개 항목(적용성, 선택성, 직선성, 정확성, 검출한계 및 정량한계, 반복정밀성, 측정불확도, 재현정밀성)을 수행했다.

그 결과 달맞이꽃종자추출물의 총폴리페놀물질의 경우 정확성 시험에서 표본시료(TPP1)의 함량 측정값의 3배가 되도록 표준원액을 첨가했을 때 회수율이 92.6%로 허용기준인 95.9~101.7%를 벗어나는 것으로 나타났으며, 반복정밀성 시험에서는 300 mg/g×3배로 증가 시 허용기준 0.3~1.2%를 초과한 2.4%로 확인되었다. 또한, 표본시료(TPP1)의 함량 측정값에 대한 전체 불확도의 기여도는 7.3%로 나타났으며, 각 단계별 기여도는 검량곡선에서 25.0%, 회수율 및 정확성시험에서 15.5%를 가졌다. 그리고 시험방법의 재현정밀성은 6개 기관(A, B, C, D, E, F)의 실간 상대표준편차가 18.4%로 높은 수준을 나타났으며, 중앙값으로부터 ± 20%를 벗어난 기관은 1개 기관이 있었다.

PGG의 경우에는 적용성, 선택성, 직선성, 반복정밀성에서 모두 허용기준을 만족했으며, 함량 측정값에 대한 전체 불확도의 기여도는 18.0%로 다소 높게 나타났다. 또한 시험방법의 정밀도를 확인하기 위하여 재현정밀성을 측정한 결과, 6개 기관의 실간 상대표준편차가 17.0%으로 나타났으며, 중심값으로부

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

터 ± 20%를 벗어난 기관은 1개 기관이었다.

크레아틴의 경우는 적용성, 선택성, 직선성, 정확성 모두 허용기준을 만족했으나, 반복정밀성 시험에서 시료 채취량을 3배로 늘렸을 때 허용기준을 초과했다. 이러한 결과는 시료 채취량을 증량할 경우 반복정밀성이 낮아지므로, 시험방법 설계 시 시료 측정량 범위를 명시함으로서 정밀도를 높일 수 있도록 해야 하겠다. 또한 함량 측정값의 전체 불확도의 기여도를 확인한 결과 크레아틴은 4.3%, 디시안디아마이드는 6.7%로 나타났으나, 디하이드로트리아진은 검출 되지 않아 불확도를 구하지 못했다. 재현정밀성은 기능(지표)성분인 크레아틴에 대해서만 수행했으며, 그 결과 6개 기관의 실간 상대표준편차는 3.0%이였고, 측정 기관 모두 중심값의 95% 이내의 결과를 산출하였다. 이러한 결과는 본문에서 제시한 시험법의 정밀도가 매우 우수하다는 것을 입증한다고 할 수 있겠다.

히알루론산은 적용성, 선택성 직선성, 정확성 모두 허용기준을 만족했으나, 반복정밀성 시험에서 시료 채취량을 3배 이상 증량할 경우 허용기준을 초과하는 것으로 나타났다. 이는 N-아세틸글루코사민과 글루쿠론산으로 이루어진 고분자 화합물인 히알루론산이 추출 과정 중 다량의 물과 결합하여 겔을 형성하게 되며 겔 형성 정도에 따라 추출정도가 달라짐으로서 정밀성 및 재현성이 낮아지는 것으로 판단된다. 함량 측정값의 전체 불확도의 기여도를 확인한 결과 15.2%로 매우 높은 수준이였으며, 재현정밀성은 실간 상대표준편차가 11.4%로 다소 높은 수준이였다. 또한, 재현정밀성 시험에서 6개 기관 모두 중심값의 ± 20% 이내의 결과를 산출했으나, ± 95% 이내의 기관은 2개 기관으로 확인되었다.

본문에서 제시한 표준화된 시험방법을 이용하여 달맞이꽃종자추출물 등 3품목에 대하여 유통 중인 건강기능식품들을 수거하고 기능(지표)성분과 유기오염물질(크레아틴 제품)에 대한 모니터링을 수행한 결과, 부적합 제품은 없었으며, 모든 제품의 기능(지표)성분이 함량 표시량의 80~120% 범위내로 관

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

리되고 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 건강기능식품 원료 제조업체 및 제조·판매업체로 부터의 지속적인 품질관리가 잘 이뤄지고 있는 것으로 판단된다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

참 고 문 헌

1. 하태열 : 건강기능성 식품의 국내외 개발 및 연구동향, 한국식품연구원 . Available at http://kcms.daegu.ac.kr/user/sgpark. (2010).
2. 식품의약품통계연보. 식품의약품안전처, (2013)
3. Choi, J. H. : International recognition and uncertainty estimation of residual analysis. *J. Korean Soc. Environ. Agric.* 105-115 (2009).
4. IUPAC. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. 74, 835-855 (2002).
5. 측정불확도 표현 지침. 한국표준과학연구원 24, 54-63 (2001).
6. AOAC. AOAC Guidelines for Single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. available at https://www.yumpu.com/en/document/view/11700995/aoac-guidelines-for-single-laboratory-validation-of-chemical. (2002)
7. Li, L., Zhang, J., Nhkata, K., Wang, L., Zhang, Y., Xing, C., Kim, S.H. and Lu, J. : Preparationof penta-O-galloyl-β-D-glucose from tannic acid and plasma pharmacokinetic analyses by liquid-liquid extraction and reverse-phase HPLC. *J. pharm Biom Anal.* 54, 545-550 (2011)
8. Korea's Ministry of Food and Drug Safety, Informatin for health functional food. Available at http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/. (2008).
9. Zhao, W.H., Gao, C.C., Ma, X.F., Bai, X.Y. and Zhang, Y.X : The isolation of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-d-glucose from Acer truncatum Bunge by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr.* B. 850, 523-527 (2007).
10. Zhang, J., Li, Li., Kim, S.H., Ann, E. and Hagerman, Lŭ. J. : Anti-Cancer, Anti-Diabetic acid other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharm. Res.* 26, 2066-2080 (2009).
11. Park, K.Y. : '1,2,3,4,6-Penta-O-galloly-beta-D-glucose inhibits hypoxia- induced HIF-1α activation via PI3K/AKT pathway in LNCaP

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

prostate cancer cells′ Ph. D. Dissertation, Kyung Hee University, Korea. (2010).

12. Sano, R., Nonaka, G. and Nishioka, I. : Galic acid esters of bergenm and norbergenm from mallotus japonicus Phytochemistry. 29, 267-270 (1990).
13. Khanbabaee, K. and Lotzerich, K. : Efficient total synthesis of the natural products 2,3,4,6-tetra-O-galloyl-D-glucopyranose, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloly-beta-D-glucose and the unnatural 1,2,3,4,6-Penta-O-galloly-alpha-D-glucopyranose. *Tetrahedron*. 53, 10725-10732 (1997).
14. Huh, J.E., Lee, H.J., Song, G.Y., Cha, B.C., Kim, H.S., Yoo, D.Y., Ryu, S.Y. and Kim, S.H. : Effect of 1,2,3,4,6-Penta-O-galloly-beta-D-glucose isolated form galla rhois on gap junctional intercellular communication and antiangiogenic activity. *J. Orient. Phytol & Pathol.* 16, 452-457 (2002).
15. Lee, S.J., Lee, H.M., Ji, S.T., Lee, S.R., Mar, W. and Gho, Y.S. : 1,2,3,4,6-Penta-O-galloly-beta-D-glucose blocks endothelial cell growth and tube formation through inhibition of VEGF binding to VEGF receptor. *Caner Lett*. 208, 89-94 (2004).
16. Sabrina, M., Annalisa, P. and Franco, T. : Levels of creatine, organic contaminants and heavy metals in creatine dietary supplements. *Food chem*. 126, 1232-1238 (2011).
17. Kreider, R.B. : Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Mol. Cell Biochem.* 244, 89-94 (2003).
18. Lyoo, I.K., Yoon, S., Kim, T.S., Hwang, J., Kim, J.E., Won, W., Bae, S. and Renshaw, P.F. : A Randomized, Double-blind placebo-controlled trial of oral creatine monohydrate augmentation for enhanced response to a selective serotonin reuptake inhibitor in women with major depressive disorder. *J. Psychiatry.* 169, 937-945 (2012).
19. Kley, R.A. : The Cochrane Collaboration, Submission of manuscript. http://www.thecochranelibrary.com. (2013).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

20. Greenhaff, P.L., Casey, A., Short, A.H., Harris, R., Soderlund, K. and Hultman, E. : Influence of oral creatine supplementation on muscle torque during repeated bouts of maximal voluntary exercise in man. *Clin. Sci*. 84: 565. (1993).
21. Earnest, C.P., Snell, P.G., Rodriguez, R., Almada, A.L. and Mitchell, T.L. : The effect of creatine monohydrate ingestion on anaerobic power indices, muscular strength and body composition. *Acta Physiol. Scand.* 153, 207-209 (1995).
22. Rahimi, R. : Creatine supplementation decreases oxidative DNA damage and lipid peroxidation induced by a single bout of resistance exercise. *J. Strength Condi. Res.* 25: 3448-3455 (2011).
23. Benzi, G. : Is there a rationale for the use of creatine either as nutritional supplementation or drug administration in humans participating in a sport. *Pharmacol. Res.* 41, 255-263 (2000).
24. Edgar, G., Shiver, H.E., AM. : The equilibrium between creatine and creatinine, in aqueous solution: the effect of hydrogen ion. *J. Am. Chem. Soc.* 47, 1179-1188 (1925).
25. Alekha, K.D. and Angeli, S. : A simple LC method with UV detection for the analysis of creatine and creatinine and its application to several creatine formulation. *J. Pham. Biomed. Anal.* (2002)
26. Dash, A.K. and Sawhney, A. : A simple LC method with UV detection for the analysis of creatinine and its application th several creatine formulations. *J. Pharm. Biom Anal.* 29, 939-945 (2002).
27. Meyer, K. and Palmer, J.W. : The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 107, 629-634 (1934).
28. Laurent, T.C. : Biochemistry of hyaluronan. *Acta. Otolaryngol. Suppl.* 442, 7-24 (1987)
29. Scott, J.E. : Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. *Ciba Found Symp*. 143, 6-15 (1989).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

30. Holmes, M.W., Bayliss, M.T. and Muir, H. : Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem J.* 250, 435-441 (1988).
31. John, Chen, W.Y. and Abatangelo, G. : Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound. Repair. Regen.* 7, 79-89 (1999).
32. Tammi, R., Ripeilino, J.A., Margolis, R.U. and Tammi, M. : Localization of epidermal hyaluronic acid using the hyaluronate binding region of cartilage proteoglycan as a specific probe. *J. Invest. Derm.* 90, 12-414 (1988).
33. Foschi, D., Castoldi, L., Radaelli, E., Abelki, P., Calderini, G., Rastrelli, A., Mariscotti, C., Marazzi, M. and Trabucchi, E. : Hyaluronic acid prevents oxygen free-radical damage to granulation tissue: a study in rats. *Int. J. Tissue React.* 12, 333-339 (1990).
34. Alkrad, J.A., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S. and Neubert, R. : Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, 545-550 (2003).
35. ISO/IEC. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Available at http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=45315. 98, (1993).
36. AOAC. Harmonised guidelines for the in-house validation of method of analysis. Available at http://old.iupac.org/divisions/V/501/draftoct19.pdf.
37. IUPAC. IUPAC commission on atomic weight and isotopic abundances. *J. Pure Appl. Chem.* 69: 2471-2473 (1997)
38. Oh, G.S., Pae, H.O. and Oh, H. : In vitro anti-proliferative effect of 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose on human hepatocellular carcinoma cell line, SK-HEP-1 cells. *Cancer Lett.* 174, 17-24 (2001).
39. Huh, J.E., Lee, E.O. and Kim, M.S. : Penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses tumor growth via inhibition of angiogenesis and stimulation of apoptosis: roles of cyclooxygenase-2 and mitogen-activated protein

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

kinase pathways. *Carcinogenesis.* 26, 1436-1445 (2005).

40. Yoshida, T., Hatano, T. and Ito, H. : High molecular weight plant polyphenols (tannins): Prospective functions. Recent Advances in Phytochemistry. 39, 163-190 (2005).
41. Frohlich, B. and Niemetz, R. : Gross GG. Gallotannin biosynthesis: two new galloyltransferases from Rhus typhina leaves preferentially acylating hexa-and heptagalloylglucoses. *Planta.* 216, 168-172 (2002).
42. Cavalher-Machado, S.C., Rosas, E.C. and Brito, Fde. A. : The anti-allergic activity of the acetate fraction of Schinus terebinthifolius leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *Int Immunopharmacol.* 8, 1552-1560 (2008).
43. Zhang, F., Luo, S.Y. and Ye, Y.B. : The antibacterial efficacy of an aceraceous plant [Shantung maple (Acer truncatum Bunge)] may be related to inhibition of bacterial beta-oxoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG). *Biotechnol Appl Biochem.* 51(Pt 2), 73-78 (2008).
44. Kuo, P.T., Lin, T.P. and Liu, L.C. : Penta-O-galloyl-beta-D-glucose suppresses prostate cancer bone metastasis by transcriptionally repressing EGF-induced MMP-9 expression. *J. Agric. Food. Chem.* 57, 3331-3339 (2009).
45. Lee, H.H., Ho, C.T. and Lin, J.K. : Theaflavin-3, 3′-digallate and penta-O-galloyl-beta-D-glucose inhibit rat liver microsomal 5alpha-reductase activity and the expression of androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinog.* 25, 1109-1118 (2004).
46. Pan, M.H., Lin, J.H., Lin-Shiau, S.Y. and Lin, J.K. : Induction of apoptosis by penta-O-galloyl-beta-D-glucose through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *J. Pharmacol.* 381, 171-183 (1999).
47. Li, Y., Kim, J. and Li, J. : Natural anti-diabetic compound 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose binds to insulin receptor and activates insulin-mediated glucose transport signaling pathway.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Biochem Biophys Res Commun. 336, 430-437 (2005).

48. Dinkova-Kostova, A.T. and Talalay, P. : Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res*. 52 (Suppl 1), S128-S138 (2008).
49. Pae, H.O., Oh, G.S. and Jeong, S.O. : 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose up-regulates heme oxygenase-1 expression by stimulating Nrf2 nuclear translocation in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner in HepG2 cells. *World. J. Gastroenterol.* 12, 214-221 (2006).
50. Bhimani, R.S., Troll, W., Grunberger, D. and Frenkel, K. : Inhibition of oxidative stress in Hela-cells by chemopreventive agents. *Cancer Research*. 53, 4528-4533 (1993).
51. Lee, S.J. and Lee, I.S. : Mar W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose in murine macrophage cells. *Arch Pharm Res*. 26, 832-839 (2003).
52. Kang, D.G., Moon, M.K., Choi, D.H., Lee, J.K., Kwon, T.O. and Lee, H.S. : Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose (PGG) via a nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 524, 111-119 (2005).
53. Pan, M.H., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.H. and Lin, J.K. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappaB activity by theaflavin-3, 3′-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of IkappaB kinase activity in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 59, 357-367 (2000).
54. Yokozawa, T., Chen, C.P., Tanaka, T. and Kitani, K. : A study on the nitric oxide production-suppressing activity of Sanguisorbae Radix components. *Biol Pharm Bull.* 23, 717-722 (2000).
55. Park, J.K., Cho, H.J., Lim, Y., Cho, Y.H. and Lee, C.H. : Hypocholest- rolemic

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

effect of CJ90002 in hamsters: a potent inhibitor for squalene synthase from Paeonia moutan. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 222-227 (2002).

56. Ono, K., Sawada, T. and Murata, Y. : Pentagalloylglucose, an antisecretory component of Paeoniae radix, inhibits gastric H+, K(+)-ATPase. *Clin Chim Acta.* 290, 159-167 (2000).
57. Goto, H., Shimada, Y., Akechi, Y., Kohta, K., Hattori, M. and Terasawa, K. : Endothelium-dependent vasodilator effect of extract prepared from the roots of Paeonia lactiflora on isolated rat aorta. *Planta Med.* 62, 436-439 (1996).
58. Dong, H., Chen, S.X., Kini, R.M. and Xu, H.X. : Effects of tannins from Geum japonicum on the catalytic activity of thrombin and factor Xa of blood coagulation cascade. *J. Nat Products*. 61, 1356-1360 (1998).
59. Liu, J.C., Hsu, F.L. and Tsai, J.C. : Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiontensin converting enzyme. *Life Sci.* 73, 1543-1555 (2003).
60. Sugaya, A., Suzuki, T., Sugaya, E., Yuyama, N., Yasuda, K. and Tsuda, T. : Inhibitory effect of peony root extract on pentylenetetrazol-induced EEG power spectrum changes and extracellular calcium concentration changes in rat cerebral cortex. *J. Ethnopharmacol.* 33, 159-167 (1991).
61. Lee, J.H., Yehl, M., Ahn, K.S., Kim, S.H. and Lieske, J.C. : 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose attenuates renal cell migration, hyaluronan expression, and crystal adhesion. *Eur. J. Pharmacol.* 606, 32-37 (2009).
62. Benzi, G. : Is there a rationale for the use of creatine either as nutritional supplementation or drug administration in humans participating in a sport Pharmacological Research. 41, 255-263 (2000).
63. Benzi, G. and Ceci A. : Creatine as nutritional supplementation and medicinal product. *J. Sports Med. Phys. Fit.* 41, 1 - 10 (2001)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

64. Bizzarini, E. and De Angelis, L. : Is the use of oral creatine supplementation safe?. *J. Sports Med. Phys. Fit.* 44, 411 - 416 (2004).
65. EFSA. Opinion of the scientific panel on food additives, flavouring, processing aids and materials in contact whit food on a request from the commission related to creatine monohydrate for use in foods of particular nutritional uses. 36, 1-6 (2004).
66. Flisinska-Bojanowska, A. : Effects of oral creatine administration on skeletal muscle protein and creatine levels. *Biol. Sport.* 13, 39-46 (1996).
67. Persky, A. and Brazeau, G.A. : Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacology Review.* 53, 161-176 (2001).

Collection @ chosun