

## Microplate Reader를 이용하여 측정된 혈액의 엽산 농도와 실측량 기록법에 의한 엽산 섭취량\*

현대선<sup>†</sup> · 한영희 · 임은영

충북대학교 식품영양학과

### Blood Folate Level Determined by a Microplate Reader and Folate Intake Measured by a Weighed Food Record

Taisun Hyun,<sup>†</sup> Young-Hee Han, Eun-Young Lim

Department of Food and Nutrition, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

#### ABSTRACT

Microbiological method using a 96-well microplate reader for folate assay was established, and folate intake and blood folate concentrations of 23 female college students were assessed. To evaluate folate intake, dietary data were collected by a 3-day weighed food record, and serum and RBC folate concentrations were measured by the new method. The coefficient of variation for the new method was less than 10%. Mean daily folate intake of the subjects was 126.7 $\mu$ g which is only 50.7% of the RDA. The mean concentrations of serum and RBC folate were 7.46ng/ml and 294.4ng/ml, respectively, which were within the normal range. These results indicate that folate intake seems to be underestimated due to incomplete food composition database. Therefore, folate database should be appropriately constructed in order to assess folate intake accurately. (*Korean J Community Nutrition* 4(4) : 512~520, 1999)

KEY WORDS : folate assay · folate intake · nutritional assessment · 96-well microplate reader.

#### 서 론

엽산은 DNA의 합성과 아미노산 대사에 필수적인 비타민으로 엽산이 결핍되면 세포분열에 이상이 생겨 많은 대사적 변화가 나타나게 된다. 특히 세포분열이 많이 일어나는 유아기, 성장기, 임신기, 수유기에는 그 필요량이 매우 증가하여 엽산의 섭취량이 부족되기 쉽고, 노인에게는 엽산의 섭취량과 이용율이 감소하여 엽산의 영양상태가 나빠지기 쉽다. 실제로 많은 연구에서 이 시기에 엽산의 영양상태가 좋지 않음이 보고되어 왔다(Bailey 등 1980 ; Joosten 등

1993 ; Rosenberg 등 1982 ; Selhub 등 1993 ; Tamura 등 1980 ; Tsui & Nordstrom 1990).

엽산이 결핍되면 거대적아구성 빈혈, 위장장애 등의 증상이 나타나며, 엽산 부족은 노인의 우울증, 치매와도 관련이 있다고 한다(Alpert & Fava 1997). 최근에는 엽산의 영양상태가 좋지 않은 모체로부터 신경관 이상의 기형아 출산율이 높다고 밝혀졌으며(MRC Vitamin Study Research Group 1991), 또한 몇몇 임상연구에서는 사람의 자궁, 기관지, 대장 등에서 발견된 암의 전단계 세포들이 엽산 부족에 의해 암세포로 진행되지 않고 정상세포로 전환되었음이 보고되었다(Butterworth 등 1982 ; Heimbürger 등 1988 ; Leshner 등 1989). 이와 같이 엽산에 관한 연구들은 사람의 일생동안 그 영양상태를 양호하게 유지하는 것이 매우 중요하다는 것을 알려주고 있다.

엽산의 영양상태는 엽산의 섭취량과 혈액에서의 엽산 농도를 측정하여 종합적으로 판정할 수 있다(Bailey 1990). 우리나라 사람의 엽산 섭취량에 관한 연구는 현재까지 임신

\*이 논문은 1998년도 한국과학재단의 국산연구기기 활용사업 연구비에 의하여 지원되었음.

<sup>†</sup>Corresponding author : Taisun Hyun, Department of Food and Nutrition, Chungbuk National University, #48 Gaesin-dong, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea  
Tel : 0431) 261-2790, Fax : 0431) 267-2742  
E-mail : taisun@trut.chungbuk.ac.kr

· 수유부(장남수 등 1993 ; 임현숙 등 1998 ; 임현숙 · 이정아 1998), 가임여성(김기남 등 1997)을 대상으로 한 연구만이 있고, 엽산의 혈액 수준에 관한 연구는 임신 · 수유부(장남수 등 1993 ; 임현숙 등 1998)와 여중생(민혜선 · 김천길 1996)을 대상으로 한 연구가 있다. 엽산의 섭취량을 조사한 연구 결과 식품으로부터의 섭취량은 임신부 80 ~ 186µg, 수유부 159µg, 가임여성 123~140µg으로 나타나 매우 낮은 수준으로 보고되었으나, 혈청 및 적혈구의 평균 엽산 농도는 대체로 정상 수준에 속하였다. 한국영양학회에서는 1995년 한국인 영양권장량을 개정할 때 엽산의 권장량을 처음으로 설정하였는데, 우리나라 사람들을 대상으로 한 연구 결과가 거의 없었으므로 다른 나라의 자료들을 참고하여 성인 남녀 모두 250µg으로 정하였다(한국영양학회 1995). 따라서 앞으로 우리나라 사람들의 다양한 계층에 대한 성별, 연령별 엽산 섭취량 및 혈액 수준을 측정하는 연구가 활발히 진행되어야 할 것이다.

이와 같이 엽산이 매우 중요한 비타민임에도 불구하고 국내에서 연구가 활발히 진행되지 않고 있는 이유는 엽산의 식품영양가표가 미흡하여 정확한 섭취량을 파악하기 어려울 뿐 아니라 혈액 중의 엽산 농도를 측정하는 방법상의 어려움 때문인 것으로 생각된다. 혈액 중의 엽산 농도를 측정하는 데는 미생물적 방법이 가장 적합한데 미생물적 방법은 매우 시간이 오래 걸리고 복잡하다. 뿐만 아니라 현재 국내에서 주로 사용되고 있는 방법은 많은 양의 혈액을 필요로 하기 때문에 다른 기본적 검사와 함께 엽산 농도를 측정할 수 있는 만큼의 혈액을 얻기가 매우 어렵다.

이러한 단점을 보완하여 96-well microplate reader를 이용하는 새로운 방법이 개발되었는데(Tamura 1990) 이 방법에 의한 엽산 분석은 미량의 혈액으로 측정이 가능하고 시간이 적게 소요되어 대규모 인구집단의 엽산 수준을 측정하고자 할 때 쉽게 이용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 기초실험을 통하여 새로운 방법에 의한 엽산 측정 방법을 확립하고자 하며, 이 방법을 이용하여 여대생들의 혈청 및 적혈구 엽산 농도를 측정하고 엽산 섭취량과의 관련성을 살펴보고자 하였다.

## 조사대상 및 방법

### 1. Microplate reader를 이용한 엽산 측정 방법

#### 1) 엽산 표준용액

중류수 10ml에 folic acid(calcium salt, F7878, Sigma) 100mg을 넣어 잘 흔들고, 여기에 0.1N NaOH를 소

량 첨가하여 folic acid를 완전히 녹였다. 0.1N HCl을 이용하여 pH 7로 만든 후 20ml가 되도록 증류수를 가하였다(A용액). 이 용액(A) 0.1ml를 100배 희석한 후 Spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, 영국)로 scanning하여 282nm의 최대흡광도 값을 구하고, molar extinction coefficient 28,200을 이용하여 엽산(A)의 정확한 농도를 계산하였다. A용액을 40µg/ml이 되도록 희석시킨 후 0.22µm filter를 이용하여 여과 멸균하였다(B). 이 용액(B)을 0.5ml씩 취하여 멸균된 freezer tube에 담아 -70℃에 저장하였다. 본 실험에서 사용되는 균주인 *Lactobacillus casei*는 L-form만을 이용하므로 B용액은 실제 20µg/ml과 같다.

#### 2) 배지준비

냉동건조되어 판매되는 folic acid casei medium(#08 22-15, Difco Laboratories) 9.4g을 증류수 100ml에 녹여 2분간 끓인 후 식히고, 0.22µm filter를 이용하여 여과 멸균하였다(배지 C). 이 배지(C)에는 엽산이 함유되어 있지 않으므로 C에 엽산 표준용액(B)를 가하여 1ng/ml의 엽산을 함유한 배지를 만들었다(배지 D).

#### 3) *L. casei* 균주 배양 및 냉동저장

냉동건조된 *Lactobacillus casei*(ATCC 7469, 생명공학연구소)를 5ml의 배지 D에 넣고 37℃에서 26시간 배양하였다. 배양된 *L. casei*에 같은 양의 멸균된 80% glycerol을 첨가하여 잘 섞은 후 0.5ml씩 취하여 멸균된 freezer tube에 넣어 -20℃에서 저장하였다가 엽산 측정 실험 바로 전에 꺼내어 엽산이 함유되어 있지 않은 2배 농축 배지에 20~30배 희석하였다. 희석배수는 엽산 표준곡선의 O.D값이 0.1~1.0사이에 적당히 분포될 수 있도록 결정하였다.

#### 4) 엽산 측정

0.1M phosphate buffer 100ml에 ascorbic acid 0.1g을 첨가하고 여과 멸균하여 phosphate-ascorbate buffer를 만들고, 96-well microplate(Flat bottomed, Falcon)에 12-channel pipetter를 이용하여 다음과 같이 용액을 주입하였다. Fig. 1과 같이 모든 실험은 triplicate로 실시하였다.

H1-H12 : water blank로 멸균된 증류수를 300µl씩 넣었다.

G1-G12 → A1-A12 : 멸균된 phosphate-ascorbate buffer를 150µl씩 넣었다. A1-A12를 균주 blank로 하였다.

G1-G3 : 엽산 표준용액(B)을 5000배 희석(4ng/ml)하여 150µl씩 넣었다.

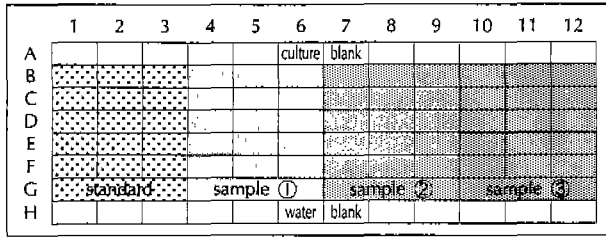


Fig. 1. Preparation of a 96-well microplate.

G4-G12 : sample과 phosphate-ascorbate buffer의 총량이 150µl가 되도록 넣었다. serum의 경우 50µl, 전처리된 전혈의 경우 10µl를 사용하였다.

위와 같이 용액을 넣은 후 A와 H를 제외하고 G1-G12의 well을 12-channel pipetter으로 잘 섞고 150µl씩 취하여 serial dilution을 하였으며, B1-B12에서 취한 150µl는 버렸다. 3)에서 희석한 *L. casei*를 A부터 G까지 H를 제외한 모든 well에 150µl씩 주입하였다. 즉, microplate의 각 well의 마지막 용량은 300µl이다.

위와 같이 준비된 96-well microplate에 뚜껑을 덮고 37°C incubator에서 18~20시간 동안 배양하였다. Incubator안 아래 부분에는 pan에 물을 채워 습도가 유지되도록 하였다. 배양된 96-well microplate를 꺼내어 12-channel pipetter로 각 well을 잘 섞은 후 microplate reader(Emax, Molecular Devices, 미국)를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 자료분석용 software(SOFTmax PRO)를 이용하여 semi-log scale로 표준곡선을 그린 후 농도계산을 하였다.

2. 엽산의 섭취량 조사

1) 실측량기록법에 의한 식이섭취조사

식품영양학과 재학생 23명에게 저울을 제공하고 실측량 기록법에 대한 훈련을 시킨 후 1999년 3월 19일부터 21일까지의 3일 동안 섭취한 모든 식품의 무게를 실측하여 기록하도록 하였다. 식이섭취조사가 끝난 다음 날 아침 학교 내 보건소에서 공복상태의 혈액을 채취하였다.

2) 식이섭취조사 자료의 분석

조사된 식품의 섭취량은 CAN PRO((주)에이펙 인텔리전스)를 이용하여 분석하였다. 그러나 이 프로그램에는 엽산의 database가 없기 때문에 한국인 영양권장량 6차 개정판에 수록된 엽산 함량을 우선적으로 입력하였고 수록되지 않은 것은 김명민(1977a ; 1977b ; 1979)의 자료와 미국의 자료(Shils 등 1994)를 인용하여 Table 1과 같이 엽산 함량에 관한 자료를 첨가하였다. 김치류에 관한 자료는 전혀

없었기 때문에 각 김치에 대한 주재료의 엽산 함량으로 대체하였다.

3. 혈청 및 적혈구의 엽산 분석

1) 채혈 후 전처리

채취한 혈액은 다음과 같이 3종류의 채혈병에 담아 각각 전처리를 하였다. 혈청 엽산을 분석하기 위하여서는 항응고제가 들어 있지 않은 채혈병에 담았고 이를 원심분리한 후 혈청을 300µl씩 freezer tube에 넣어 -70°C에 냉동 보관하였다. 적혈구 엽산을 분석하기 위하여서는 EDTA가 *L. casei*의 성장을 억제한다는 보고가 있어(Tamura 1990) 전혈 500µl을 heparin이 처리된 채혈병에 담았다. 전혈은 phosphate buffer(pH 4.5)에 1%의 ascorbic acid를 첨가한 용액으로 10배 희석하여 용혈시킨 후 300µl씩 취하여 -70°C에 냉동 보관하였다. hematocrit, hemoglobin, 적혈구수 등을 측정하기 위하여서는 EDTA가 처리된 채혈병에 혈액을 담았고, Coulter ONYX(Coulter, 미국)를 이용하여 자동분석하였다.

2) 엽산 분석

엽산 분석 실험을 하기 바로 전에 혈청 및 전혈을 해동시켜 혈청은 그대로 이용하였고, 전혈은 혈장의 conjugase가 작용하도록 37°C에서 30~90분 동안 배양시킨 후 위에 기술한 방법으로 엽산을 분석하였다. 모든 실험은 triplicate로 실시하였고, 매 plate마다 표준곡선을 그렸으며, 실험실 시일에 따른 변이를 통제하기 위하여 매번 같은 시료(pooled sample)를 함께 측정하였다. 실험의 모든 과정은 광선이 최대한 차단된 상태로 실시하였다. 적혈구 엽산 농도는 다음과 같이 계산하였다.

$$*적혈구\ 엽산농도(ng/ml) = \frac{전혈\ 엽산농도 - 혈청\ 엽산농도 \times (1 - Hct/100)}{Hct/100}$$

결과 및 고찰

1. Microplate reader를 이용한 혈액 중의 엽산 농도 측정 방법의 확립

냉동건조된 *L. casei*를 1ng/ml의 엽산을 함유한 배지(배지 D)에 넣고 37°C에서 배양하여 잘 자라는지, 또 성장이 더 이상 일어나지 않는 시간이 언제인지를 확인하기 위하여 24시간, 26시간, 28시간 동안 배양하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 약 26시간 후에는 성장이 거의 일어나지 않음을 알 수 있었다. 이 *L. casei* culture에 동량의

**Table 1.** Folate content of selected common foods\*

Food code	Food	Folate( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	Food code	Food	Folate( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )
3020	Sugar, White sugar	4.6	8078	Apricots, Jam	3.9
3023	Sugar, Yellow sugar	4.5	8082	Korean cherry	3.0
3035	Chocolate	6.0	8088	Orange juice, Canned	19.7
6032	Kimchi, Green onion kimchi	40.3	8095	Melon, Raw	3.7
6033	Kimchi, Ko Dul Bba Gi	40.3	8096	Melon, Raw, Kum Ssa Ra Gi	3.7
6034	Kimchi, Kkakduki	40.3	8097	Melon, Raw, Un Chon	3.7
6035	Kimchi, Na Bak Kimchi	40.3	8118	Grape, Jam	5.3
6036	Kimchi, Dongchimi	40.3	11403	Fried fish	4.7
6037	Kimchi, Radish Green	40.3	13025	Yogurt	10.0
6038	Kimchi, Korean cabbage	46.1	14001	Lard	1.8
6039	Kimchi, Yolmu	46.1	14010	Perilla oil	8.1
6040	Kimchi, Young rape leaves	46.1	14011	Peanut oil	8.1
6041	Kimchi, small radish	40.3	14016	Rice bran oil	8.1
6042	Kimchi, Mustard leaf	40.2	14017	Corn oil	8.1
6081	Korean radish root	40.3	14020	Sesame oil	8.1
6132	Seed sprout, Red pepper seeds sprout	8.1	15004	Cider	1.2
6133	Seed sprout, Perilla seeds sprout	8.1	15014	Coffee, Roasted beans	1.8
6138	Crown daisy, Raw	76.5	15015	Coffee, Regular	1.8
6201	Tomato, Tomato canned	6.9	15016	Coffee, Drypowder, Instant	1.8
6204	Green onion, Large	40.2	15017	Coffee, Instant, Decaffeined, Powder	1.8
6205	Green onion, Medium	40.2	15019	Coffee drink, Canned	1.8
6206	Green onion, Small	40.2	15020	Coffee beverage, Instant	1.8
8001	Persimmon, Hard	2.6	15025	Cola	0.9
8003	Persimmon, Dried	6.8	15030	Korean turbid rice liquor	2.0
8011	Citrus fruit, Kumguats	26.6	15041	So Ju (Distilled liquor)	2.4
8019	Citrus fruit, Jam	18.8	15044	Sake	1.3
8021	Jujube, Raw	2.5	15065	Ssang Hwa tea	1.2
8022	Jujube, Dried	6.0	15066	O Mi Ja tea	0.9
8027	Strawberry, Jam	10.2	16014	Mayonnaise	2.4
8058	Peach, Canned, Yellow	3.7	16028	Vinegar	0.6
8059	Peach, Nectar	3.1	16029	Vinegar, Apple vinegar	0.6
8060	Peach, Jam	3.6	16030	Vinegar, Rice vinegar	0.6
8073	Apple, Jam	4.6	16044	Tomato ketchup	3.9

\*Sources : Kim Young Min(1977a : 1977b : 1979), shils 등(1994)

glycerol을 넣어  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 저장한 후 필요할 때마다 이를 염산이 함유되어 있지 않은 2배 농축 배지에 20~30배 희석하여 사용하면 적당한 표준곡선을 얻을 수 있었다.

*L. casei*는 염산이 함유된 배지에서 배양되었기 때문에 배양액에 염산이 남아있을 가능성이 있으므로 이를 확인하기 위하여 염산이 함유되어 있지 않은 2배 농축배지 150 $\mu\text{l}$ 에 희석한 *L. casei* 균주 150 $\mu\text{l}$ 를 주입하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 20시간 배양한 후 흡광도를 측정하였다. 그 결과 *L. casei*는 전혀 성장하지 않음을 알게 되었고, 따라서 기존의 방법에서처럼 염산을 제거하기 위해 culture를 씻을 필요가 없음을 확인하였다. 이와 같이 본 실험에서는 *L. casei*를 냉동 저장하여 사용함으로써 계대배양을 할 필요가 없게 되어 시간이 절약

되었고 오염 가능성도 낮출 수 있었으며, 염산을 씻어 내지 않아도 되므로 매우 간단하였다.

적혈구의 염산 분석을 위해서는 먼저 conjugase로 적혈구내의 polyglutamate 형태를 mono- 또는 diglutamate 형태로 전환시켜야 하는데, 이를 위하여 혈장의 conjugase를 이용하였다. 즉, 전혈을  $37^{\circ}\text{C}$ 로 유지시켜 혈장의 conjugase가 작용하도록 하는데 연구자에 따라 15~60분으로 다른 보고(이종임 1999 ; Scott 등 1974)들이 있어서 본 실험에서는 30분, 60분, 90분 동안 배양하여 어느 정도가 적합한지를 평가하였다. 5회의 다른 실험 결과 Fig. 2와 같이 60분 배양하였을 때의 농도를 100%로 보았을 때 30분일 때 68%, 90분일 때 109%의 결과를 얻어, 전혈을

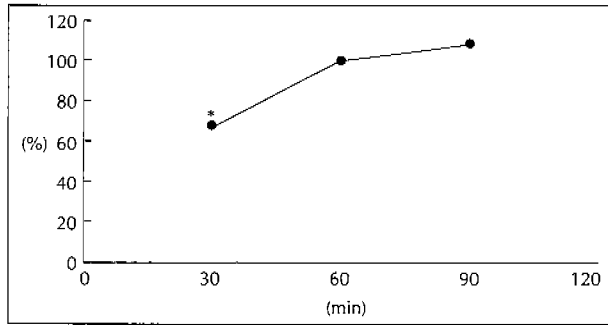


Fig. 2. RBC folate level by incubation time of whole blood.  
\*Each point is a mean of five independent experiments in triplicate.

60분 동안 배양하기로 결정하였다.

채혈시 주로 이용되는 항 응고제인 EDTA는 *L. casei*의 성장을 억제한다는 보고(Tamura 등 1990)가 있어 엽산 분석시에는 heparin을 쓰도록 하고 있는데, 일반적으로 EDTA가 많이 사용되기 때문에 다른 실험과 함께 할 경우 혈액을 따로 heparin 채혈병에 받아야 하는 번거로움이 있다. 그러나 실제 이를 비교 확인해 본 보고가 없어 본 실험에서는 14명에 대하여 채혈 즉시 같은 시료를 각각 EDTA 채혈병과 heparin 채혈병에 담아 전처리한 후 엽산 농도를 측정하였다. 그 결과 Table 2와 같이 EDTA를 이용한 혈액의 경우 엽산 농도가 heparin을 이용한 것보다 약간 낮았지만 paired t-test 결과 유의적인 차이가 없었다. 따라서 본 실험에서는 heparin을 이용하였으나 앞으로 EDTA를 이용하여도 무방하리라고 생각된다.

본 실험에서는 동일한 혈청 및 적혈구에 대하여 triplicate로 6일간 반복실험한 결과 CV는 10% 이내로 미생물을 이용한 실험의 높은 변이도를 고려할 때 매우 만족할 만한 결과이었다. 따라서 본 실험에서는 하나의 시료에 대하여 3회 반복 실험(triplicate)을 하였지만 2회 반복실험(duplicate)으로도 충분하리라고 생각된다. 본 연구에서 확립된 실험 방법은 엽산 농도 분석에 주로 이용되어 왔던 기존의 미생물학적인 방법보다 시료로 사용되는 혈액의 양이 매우 적어, 혈청 50 $\mu$ l, 전혈 1 $\mu$ l를 사용하므로 3회 반복 실험하였더라도 약 1ml의 혈액으로도 실험이 가능하였다. 또한 각 시료의 흡광도를 하나씩 측정하지 않고 computer와 연결된 microplate reader를 이용하여 미시시료의 엽산 농도를 쉽게 계산할 수 있어 흡광도를 읽고 자료를 분석하는 시간이 매우 단축되었다. 국내에서 진행되고 있는 대부분의 엽산 연구는 아직 기존의 방법에 의해 주로 측정되고 있어 본 연구에서는 새로운 방법에서 의문이 생기는 기본적인 실험과정을 확립하여 앞으로 엽산 연구를 하고자 하는 연구자들이 이 방법을 쉽게 이용할 수 있도록 하였다.

Table 2. RBC folate concentrations by the type of anticoagulant

	Heparin(N=14)	EDTA(N=14)
RBC folate(ng/ml)	429.8 $\pm$ 113.4	416.4 $\pm$ 135.9

Table 3. Mean daily nutrient intake of subjects

Nutrient	Intake	(% of RDA)
Energy(kcal)	1,761 $\pm$ 536	( 88.0)
Protein(g)	60.5 $\pm$ 23.5	(100.9)
Fatt(g)	49.9 $\pm$ 24.3	
Carbohydrate(g)	267 $\pm$ 84	
CPF ratio	61 : 14 : 25	
Calcium(mg)	421.5 $\pm$ 213.3	( 60.2)
Phosphorus(mg)	917.2 $\pm$ 307.1	(131.0)
Iron(mg)	12.2 $\pm$ 7.7	( 67.8)
Vitamin A( $\mu$ gRE)	582 $\pm$ 389.6	( 83.1)
Ascorbic acid(mg)	89.0 $\pm$ 125.8	(161.8)
Thiamin(mg)	1.05 $\pm$ 0.53	(105.0)
Riboflavin(mg)	0.93 $\pm$ 0.40	( 77.5)
Niacin(mg)	12.2 $\pm$ 6.1	( 93.8)
Folate( $\mu$ g)	126.7 $\pm$ 101.2	( 50.7)

## 2. 여대생의 엽산 섭취량

조사대상자는 21~26세의 식품영양학과 학생으로 식이 섭취조사 방법 중 가장 정확하다고 생각되어지는 실측량 기록법에 대한 훈련을 받은 후 3일 동안 식이섭취조사를 실시하였다. Table 3에는 이들의 평균 영양소 섭취량에 대한 결과가 제시되어 있는데 이들의 섭취 열량은 1761kcal, 단백질 60.5g으로 권장량의 88.0%, 100.9%를 섭취하고 있었으며, 이는 최근 여대생을 대상으로 실측량 기록법을 이용하여 조사한 다른 연구(김미경·이지연 1994; 김석영 등 1998; 송정자 1997; 유춘희·이양순 1997)에서와 비슷한 결과이었다. 다른 영양소의 경우 칼슘과 철분을 제외하고는 권장량의 75% 이상을 섭취하고 있었다. 칼슘과 철분은 권장량의 각각 60%, 68%로 다른 연구에서와 비슷하게 낮은 섭취 실태를 보여 주었다. 식이섭취조사는 3일간 하였는데 엽산의 섭취량은 첫째날에는 102.9 $\mu$ g, 둘째날 161.7 $\mu$ g, 셋째날 115.5 $\mu$ g으로 3일 평균 126.7 $\mu$ g/day이었으며, 권장량 250 $\mu$ g의 50.7%로 권장량에 비해 섭취수준이 가장 낮은 영양소이었다.

이러한 여대생의 엽산 섭취 결과는 최근 24시간 회상법으로 가임여성을 대상으로 조사한 결과인 123.8 $\mu$ g(김기남 등 1997), 임신부를 대상으로 식품으로부터의 엽산 섭취량을 조사한 연구 결과인 80~135 $\mu$ g(임현숙 등 1998), 식품 섭취빈도조사법으로 조사한 가임여성의 139.5 $\mu$ g, 임신부 147.6 $\mu$ g, 185.7 $\mu$ g, 수유부 159.2 $\mu$ g 등의 결과(강명화·장남수 1993; 임현숙·이정아 1998)와 비슷한 수준을 보였다.

다. 그러나 미국과 영국의 국민영양조사 결과(Gregory 등 1990 ; Subar 등 1989) 발표된 엽산 섭취량은 여자의 경우 약 210 $\mu$ g으로 국내의 일부 집단을 대상으로 한 연구 결과보다 높았다. 하지만 미국이나 영국보다 채소류, 두류의 섭취가 많은 한국인의 엽산 섭취량이 이들 국민의 섭취량보다 낮다는 결과는 그대로 받아들이기 어려우며, 우리나라 엽산식이섭취조사에 문제점이 있다고 생각된다.

우리나라 식품 중의 엽산 함량에 관한 자료는 매우 부족하여 엽산 섭취량 분석을 하기 위해서는 연구자마다 여러 자료를 모아 database를 만들어 사용하고 있는 실정이다. 따라서 통일된 database를 시급히 만들어야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 제 6차 한국인 영양권장량(한국영양학회 1995)에 나와 있는 엽산의 식품영양가표에 Table 1과 같이 엽산 자료를 첨가하여 계산하였다. 한국인 영양권장량에 있는 엽산의 식품영양가표는 미국 자료 414종, 극동 아시아 자료 97종 등 총 511종의 자료 모두가 외국의 자료를 그대로 인용한 것으로서 이 자료만으로는 엽산 섭취량이 매우 낮게 계산된다. 국내에서 식품의 엽산 분석에 관한 연구로는 1977년부터 1979년까지의 김영민(1977a ; 1977b ; 1979)의 자료가 유일하며 그에 뒤따른 연구가 전혀 진행되고 있지 못하다. 특히 한국인에게 섭취 빈도가 가장 높은 김치 종류는 전혀 분석되어 있지 않아 본 연구에서는 배추로 대신하였다. NHANES II의 24시간 회상법에 의한 미국 성인의 평균 엽산 섭취량은 242 $\mu$ g이었으며 orange juice, white bread, dried bean, cereals이 주요 엽산 공급원으로 나타났으며, 이는 총 섭취량의 37%를 차지하였다(Subar 등 1989). 이와 같이 엽산의 섭취량에 영향을 주는 것은 식품 내 총 엽산의 함량과 함께 섭취 빈도가 중요한 요인임을 알 수 있다. 본 연구에서 여대생의 엽산 섭취에 기여한 음식은 시금치된장국, 배추김치, 딸기, 시금치나물, 열무김치, 칼국수, 상추, 쌀밥, 모시조개시금치국, 피자 등의 순이었다. 따라서 우리 나라의 경우도 섭취 빈도가 높은 식품에 대한 엽산 분석은 매우 시급하며 절실하다고 본다. 특히 김치와 같이 한국인에게 섭취빈도가 높은 우리 고유의 전통식품들의 엽산함량 분석은 매우 빨리 이루어져야 하겠고, 이러한 결과들은 한국인의 엽산섭취량을 조사하는 많은 연구와 엽산 권장량 설정에도 큰 영향을 주리라 여겨진다.

또 한 가지의 문제점은 현재의 식품성분표에 제시되어 있는 엽산 분석자료가 실제의 엽산 함량보다 과소평가 되어 있다는 것이다(Christine 등 1997 ; De Souza & Eitenmiller 1990 ; Engelhardt & Gregory 1990 ; Gregory 등 1990 ; Martin 1990 ; Tamura 등 1997). 식품내 엽산은 주로 polyglutamyl형태로 존재하여 사용하는 균주가

이용할 수 있게 하기 위해 folate conjugase를 처리하여 mono-, diglutamate 형태로 분해하여 분석하며, 또한 식품 중의 엽산은 주로 food matrix나 단백질에 결합되어 있기 때문에 이러한 엽산을 추출하기 위해서는 folate conjugase로 처리하기 전에 식품에 열처리를 하는 과정이 필수적이였다. 그러나 이 과정은 오히려 엽산을 파괴시킬 수 있기 때문에 식품의 엽산 함량을 정확히 측정할 수 없었다. 최근의 연구에 의하면 식품에 열처리를 하는 것보다 amylase나 protease를 식품에 반응시켜 식품내의 성분과 결합된 엽산을 먼저 분리시킨 후 분석했을 때 folate conjugase 하나만을 처리했을 때 보다 엽산 함량이 271% 증가되었다(Christine 등 1997 ; Tamura 등 1997). 따라서 본 연구를 비롯하여 국내의 엽산 섭취량이 매우 낮은 결과를 보이는 것은 식품 중의 엽산 분석 방법이 부적절하여 식품 중의 엽산함량이 낮게 측정되었을 가능성이 있고, 그나마 섭취빈도가 높은 식품의 엽산 함량이 분석되어 있지 않기 때문에 나타난 것으로 사료되어 근본적인 문제의 해결 없이는 우리나라 엽산 섭취조사는 만족할 만한 결과를 나타내지 못할 것으로 생각된다. 그러므로 본 연구에서 확립된 방법을 적용하여 우리나라 식품 중의 엽산 함량도 새롭게 측정하여야 할 것이다.

### 3. 여대생의 혈청 및 적혈구 엽산 농도

여대생의 평균 혈청 및 적혈구 엽산 농도는 Table 4에 나타난 바와 같이 각각 7.46ng/ml, 294.4ng/ml으로 정상수준에 속하였다. 이 결과는 가임여성을 대상으로 한 연구 결과인 7.1ng/ml(강명화 · 장남수 1993)와 비슷한 수준이었으며, 청소년기의 여학생을 대상으로 한 결과(민혜선 · 김천길 1996)인 5.56ng/ml보다는 높게 나타났다. 혈청 엽산의 경우 결핍상태인 3ng/ml 미만의 학생은 없었으나 3~5ng/ml의 학생은 30.4%나 되었다. 또한 적혈구 엽산의 수준은 결핍상태인 120ng/ml 미만인 학생이 11.1%이었다. 적혈구 엽산 농도를 측정한 다른 연구(임현숙 등 1998 ; 민혜선 · 김천길 1996)에서는 여중생의 경우 180.3 $\mu$ g으로 매우 낮았으며,

**Table 4.** Blood folate levels and hematological values of the subjects

Parameter(unit)	Normal range	Mean $\pm$ S.D.	(N)
Serum folate(ng/ml)	$\geq 5$	7.46 $\pm$ 3.54	(23)
RBC folate(ng/ml)	$\geq 160$	294.4 $\pm$ 104.9	(18)
Hematocrit(%)	37 - 47	39.8 $\pm$ 2.7	(19)
Hemoglobin(g/dl)	12 - 16	14.1 $\pm$ 1.0	(19)
MCV(fl)	82 - 99	89.3 $\pm$ 4.5	(18)
MCH(pg)	27 - 32	31.7 $\pm$ 1.9	(19)
MCHC(%)	32 - 36	35.4 $\pm$ 0.7	(19)

임신부의 경우 분기별로 372.4, 416.3, 419.9 $\mu$ g으로 높았는데 이는 식품 섭취 이외에 엽산의 보충제를 복용하였기 때문이다. 본 조사대상자의 경우 혈액의 엽산 수준에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려진 엽산 보충제를 복용하거나 흡연을 하는 학생은 없었다. 음주정도는 일주일에 한번 또는 한 달에 2~3번 정도로 마신다고 응답하였다.

Table 4에 나타난 바와 같이 hematocrit, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC의 평균은 모두 정상범위에 속하였는데, hemoglobin은 모두 12g/dl 이상이었으나 hematocrit은 37% 이하인 학생이 1명 있었으며, 그 학생은 혈청의 엽산 농도도 3.5ng/ml로 낮은 수준이었고, 엽산의 섭취량도 3일 평균 59.68 $\mu$ g으로 매우 불량하였다.

엽산의 섭취량과 혈청 및 적혈구의 엽산 수준과의 관계는 Fig. 3과 같다. 혈청의 엽산 농도는 엽산 섭취량과 유의적인 상관관계를 보여 주어( $r=0.5117$ ,  $p<0.05$ ) 최근의 엽산 섭취량을 잘 반영하는 것으로 나타났으며 이는 다른 연구 결과와 일치하는 결과이다(강명화 · 장남수 1993). 그러

나 적혈구의 엽산 농도는 엽산 섭취량(0.1751,  $p=0.4872$ ), 혈청의 엽산 농도( $r=0.4481$ ,  $p=0.0622$ )과 유의적인 상관관계가 없었다.

본 조사대상자의 엽산 섭취량은 권장량의 약 50% 수준으로 매우 불량함에도 불구하고 평균 혈청 및 적혈구 엽산 농도는 정상 수준으로 나타났다. 임현숙 등(1998)의 연구에서도 본 연구에서와 마찬가지로 보충제를 먹기 이전인 1/3 분기 임신부의 경우 엽산의 식이섭취량은 권장량에 매우 못 미치는 80 $\mu$ g이었지만, 혈청 및 적혈구의 엽산 농도는 각각 9.2ng/ml, 372.4ng/ml으로 정상 수준을 나타냈다. 그러나 O'keefe 등(1995)은 200 $\mu$ g의 섭취 수준에서 혈장 및 적혈구 엽산 농도가 감소하였고, plasma homocysteine이 증가한 것을 보고하여 위에서 제기한 바와 같이 우리나라의 식이섭취 조사에 이용되는 엽산의 database에 문제가 있는 것으로 생각된다. 따라서 앞으로 식품 중 엽산의 함량에 관한 자료가 시급히 보완되어야 할 것으로 생각된다.

### 요약 및 결론

Microplate reader를 이용한 새로운 엽산분석 방법을 확립하기 위하여 관련된 기초 실험을 하였으며, 이 방법을 이용하여 여대생 23명을 대상으로 혈청과 적혈구의 엽산 농도를 분석하였다. 또한 엽산의 섭취량과의 관련성을 알아보기 위해 3일 동안의 실측량 기록법을 이용하여 식이섭취조사를 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1) 냉동건조된 *L. casei*를 5ml의 배지에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 26시간 배양하는 것이 가장 적절하였고 이를 냉동보관한 후 엽산 분석 실험 바로 전에 해동, 20~30배 희석하면 적당한 표준곡선을 얻을 수 있었다. 또한 이 *L. casei* culture에는 엽산이 들어 있지 않아 culture를 씻을 필요 없이 사용할 수 있었다. 또한 전혈의 엽산분석시 conjugase활성을 위한 배양시간은 60분이 적합하였고, 채혈시 사용하는 항응고제인 EDTA와 heparin을 비교해 보았을 때 적혈구 엽산 농도에 유의적인 차이는 없었다. 이와 같은 방법에 의해 확립된 엽산 측정법은 CV 10%이하로 신뢰도가 높았고 기존의 방법에 비해 필요한 혈액량이 적고 농도계산이 용이하여 엽산분석과 자료해석에 드는 시간을 단축할 수 있어 매우 유용한 방법이라고 생각된다.

2) 3일 동안 실측량 기록법으로 23명의 식품영양 전공한 여대생을 대상으로 조사한 엽산의 섭취량은 126.7 $\mu$ g/day로 엽산권장량의 50.7%에 불과하여 식이섭취조사 결과에서 얻은 영양소 섭취 결과 중 가장 낮은 섭취 수준을 나타냈다. 엽산의 식이섭취에 기여한 식품으로는 시금치된장국,

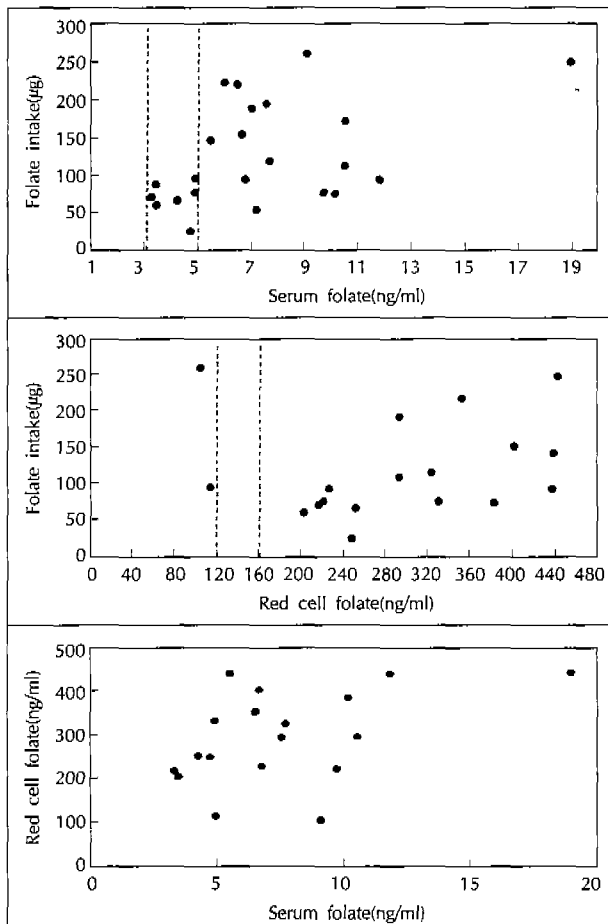


Fig. 3. The relationships between folate intake, serum folate and RBC folate of female college students.

배추김치, 딸기, 시금치나물, 열무김치, 칼국수, 쌀밥, 모시조개시금치국, 피자 등의 순서로 나타났다.

3)식이섭취조사 대상자들의 혈액의 엽산분석결과는 혈청 7.46ng/ml, 적혈구 294.4ng/ml로 정상수준에 속하였다. 엽산의 섭취량이 매우 불량함에도 불구하고 평균 혈청 및 적혈구 엽산 농도는 정상 수준으로 나타났는데 이것은 식품 중 엽산의 함량에 관한 자료가 부족하여 엽산 섭취량이 과소평가된 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합하면 본 연구에 의해 확립된 새로운 엽산 분석법인 96-well microplate reader를 이용하면 실험의 신뢰도도 높고 혈액 채취량도 적을 뿐 아니라 분석시간과 자료의 해석에 시간이 적게 소요되어 앞으로 혈액 중 엽산 분석에 매우 유용하게 이용될 수 있으리라고 생각된다. 본 연구에서 조사된 식이섭취량은 권장량에 매우 못 미치는 수준이었으나 혈청과 적혈구 농도는 정상수준에 속하는 것으로 미루어 엽산의 식품성분표에 문제가 있다고 생각된다. 따라서 적절한 식품중의 엽산 분석방법을 통하여 한국인에게 섭취빈도가 높은 식품부터 엽산 분석을 해 나가고, 다른 나라의 자료를 적절히 도입하여 엽산의 database를 시급히 보완하여야 할 것이다.

■ 감사의 글

엽산 실험에 대한 조언을 해 주신 Dr. Tsunenobu Tamura께 진심으로 감사를 드립니다.

참고 문헌

강명화 · 장남수(1993) : 임신부와 수유부의 엽산섭취량이 혈청엽산 농도에 미치는 영향. *한국영양학회지* 26 : 433-442  
 김기남 · 김연수 · 장남수(1997) : 가입 여성의 엽산 섭취실태. *한국영양학회 춘계학술대회*  
 김미경 · 이지연(1994) : 여대생의 영양섭취 실태 및 주요섭취음식의 1인 1회 분량에 관한 연구. *한국식생활문화학회지* 9 : 401-409  
 김석영 · 차복경 · 박필숙(1998) : 월경주기동안의 여대생의 열량섭취와 열량구성비. *지역사회영양학회지* 3 : 210-217  
 김영민(1977a) : 한국 상용식품의 엽산분석에 관한 연구(제1보). *한국영양학회지* 10 : 84-91  
 김영민(1977b) : 한국 상용식품의 엽산분석에 관한 연구(제1보). *한국영양학회지* 10 : 92-96  
 김영민(1979) : 한국 상용식품의 엽산분석에 관한 연구. *한국영양학회지* 12 : 53-63  
 민혜선 · 김천길(1996) : 사춘기 여학생의 혈액엽산수준에 관한 연구. *한국영양학회지* 29 : 104-111  
 승정자(1997) : 일부 여대생의 식이섭취 섭취와 철분대사에 관한 연구. *한국영양학회지* 30 : 147-154  
 유춘희 · 이양순(1997) : 기록법과 빈도법에 의한 여대생의 식생활 평가에 대한 비교 연구. *가정문화연구* 11 : 33-50 상명대학교

이종임(1999) : 임신기와 수유기 여성의 철, 엽산 및 일부 미량 무기질 영양상태. 전남대학교 대학원 박사학위 청구논문  
 임현숙 · 이정아(1998) : 한국인 임신 여성의 제대혈 엽산 농도와 임신의 결과. *한국영양학회지* 31 : 1263-1269  
 임현숙 · 이종임 · 이정아(1998) : 임신부의 엽산영양과 임신의 결과 - 횡단적 연구 - 대한지역사회영양학회 추계학술대회  
 장남수 · 강명화 · 백희영 · 김익환 · 조용욱 · 박상철 · 신영우(1993) : 임신부, 수유부의 혈청엽산과 철수준에 관한 연구. *한국영양학회지* 26 : 67-75  
 한국영양학회(1995) : 한국인 영양권장량 제6차 개정  
 Alpert JE, Fava M(1997) : Nutrition and depression : The role of folate. *Nutr Rev* 55 : 145-149  
 Bailey LB(1990) : Folate status assessment. *J Nutr* 120 : 1508-1511  
 Bailey LB, Mahan CS, Dimperio D(1980) : Folic acid and iron status in low-income pregnant adolescents and mature women. *Am J Clin Nutr* 33 : 1997-2001  
 Butterworth CE, Hatch KD, Gore H, Mueller H, Krundiek CL(1982) : Improvement in cervical dysplasia associated with folic acid therapy in users of oral contraceptives. *Am J Clin Nutr* 35 : 73-82  
 Christine MP, Risa MR, Jesse FG(1997) : Determination of folate in cereal-grain food products using trienzyme extraction and combined affinity and reversed-phase liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 45 : 407-413  
 De Suza S, Eitenmiller R(1990) : Effects of different enzyme treatments on extraction for total folate from various foods prior to microbiological assay and radioassat. *J Micronutr Anal* 7 : 37-57  
 Engelhardt R, Gregory GF(1990) : Adequacy of enzymatic deconjugation in quantification of folate in foods. *J Agr Food Chem* 38 : 154-158  
 Gregory GF, Engelhardt R, Bhandari SD, Sartain DB, Gustafson SK (1990) : Adequacy of extraction techniques for determination of folate in food and other biological materials. *J Food Comput Anal* 3 : 134-144  
 Gregory J, Foster K, Tyler H, Wiseman M(1990) : The dietary and nutritional survey of British adults. London : HMSO  
 Heimbürger DC, Alexander CB, Birch R, Butterworth CE Jr., Bailey WC, Krundieck CL(1988) : Improvement in bronchial squamous metaplasia in smokers treated with folate and vitamin B-12. *JAMA* 259 : 1525-1530  
 Joosten E, van der Berg A, Riezler R, Naurath HJ, Lindenbaum J, Stabler Sp, Allen RH(1993) : Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12(cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. *Am J Clin Nutr* 58 : 468-476  
 Leshner BA, Heidenreich PA, Su GL, Kane SV, Hanauer SB(1989) : The effect of folate supplementation on the incidence of dysplasia and cancer in chronic ulcerative colitis : a case control study. *Gastroenterology* 97 : 255-259  
 Martin JI, Lenden WO, Jr, Soliman AGM, Eitenmiller RR(1990) : Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods. *J Assoc Off Anal Chem* 73 : 805-808  
 MRC Vitamin Study Research Group(1991) : Prevention of neural tube defects : Results of the Medical Research Council Vita-



- min Group. *Lancet* 338 : 13-37
- O'keefe CA, Bailey LB, Thomas EA, Hofler SA, Davis BA, Cerda JJ, Gregory JF(1995) : Controlled dietary folate affects folate status in nonpregnant women. *J Nutr* 125 : 2717-2725
- Rosenberg IH, Bowman BB, Cooper BA, Halsted CH, Lindenbaum J(1982) : Folate nutrition in the elderly. *Am J Clin Nutr* 36 : 1060-1066
- Scott JM, Ghanta V, Herbert V(1974) : Trouble-free microbiologic serum and red cell folate assays. *Am J Med Tech* 40 : 125-134
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D, Rosenberg IH(1993) : Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 270 : 2693-2698
- Shils ME, Olson JA, Shike M(1994) : Modern Nutrition in health and disease. pp A107-A110, Lea & Febiger, Philadelphia
- Subar AF, Block G, James LD(1989) : Folate intake and food sources in the US population. *Am J Clin Nutr* 50 : 508-516
- Tamura T(1990) : Microbiological assay of folates. In : Picciano MF, Stokstad ELR, Gregory JF, eds. Folic acid metabolism in health and disease. pp 121-137, Wiley-Liss, New York
- Tamura T, Freeberg LE, Cornwell PE(1990) : Inhibition by EDTA of growth of *Lactobacillus casei* in the folate microbiological assay and its reversal by added manganese or iron. *Clin Chem* 36 : 1993
- Tamura T, Mizuno Y, Johnston KE, Jacob RA(1997) : Food folate assay with protase,  $\alpha$ -amylase, and folate conjugase treatments. *J Agric Food Chem* 45 : 135-139
- Tamura T, Yoshimura Y, Arakawa T(1980) : Human milk folate and folate status in lactating mothers and their infants. *Am J Clin Nutr* 33 : 193-197
- Tsui JC, Nordstrom JW(1990) : Folate status of adolescents : Effects of folic acid supplementation. *J Am Diet Assoc* 90 : 1551-1556