

## 인도페놀 적정법에 의한 성장기용조제식 중 비타민 C 함량분석의 측정불확도 산정

전장영 · 광병만\* · 안장혁 · 공운영  
남양유업(주) 중앙연구소

### Quantifying Uncertainty of Vitamin C Determination in Infant Formula by Indophenol Titration Method

Jang-young Jun, Byung-Man Kwak\*, Jang-Hyuk Ahn, and Un-Young Kong  
Research and Development Center, Namyang Dairy Products Corporation

Uncertainty involved during determination of vitamin C content in infant formula was quantified by indophenol titration method. Uncertainty sources in measurand, such as purity, weight, final volume of standard, volume of standard solution used for titration, sample weight, final volume of sample, extraction solution used for titration, titration of extraction solution and standard solution by indophenol solution were identified and used as parameters for combined standard uncertainty based on Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM) and Draft EURACHEM/CITAC Guide. Uncertainty parameters of each source in measurand were identified as resolution, reproducibility and stability of chemical balance, standard material purity, repeatability, reproducibility, end point of titration, 1 mL pipet, 5 mL autopipet, and 100 mL mass flask. Each uncertainty component was evaluated by types A and B and included to calculate combined uncertainty. Analytical test result for traceability under laboratorial conditions using Certified Reference Material (CRM) test was certified as  $108.4 \pm 1.7$  mg/100 g, which was within CRM certification range of  $114.6 \pm 6.6$  mg/100 g. Uncertainty test result of vitamin C content of 5 g sampling was  $56.7 \pm 2.44$  mg/100 g. Uncertainty could be reduced by identification of uncertainty sources and components related with vitamin C determination by indophenol titration method and by decreasing uncertainty sources and components.

**Key words:** uncertainty, infant formula, vitamin C, indophenol

### 서 론

성장기용 조제식은 분리대두단백 등 단백질함유식품을 원료로 생후 6개월 이후 영아, 유아의 정상적인 성장·발육에 필요한 무기질, 비타민 등 영양소를 첨가하여 이유식의 섭취시 액상으로 사용할 수 있도록 분말상 또는 액상으로 제조·가공한 것을 말한다(1). 이러한 성장기용 조제식에 함유되어 있는 많은 종류의 영양소 중 비타민 C는 정상적인 collagen을 합성하는데 필수적인 prolyl hydroxylase 활성화에 관여하고, 생물학적 산화방지제로서도 중요한 역할을 하며, 카르니틴의 합성, 도파민의 수산화 반응, 펩티드의 아미드 형성 반응, 면역기능에도 관여하는 필수적인 영양소 중의 하나이다.

이러한 비타민 C를 분석하는 방법에는 2,4-디니트로페닐하이

드라진(DNP)에 의한 정량법(2), 인도페놀적정법에 의한 정량법(2), 고속액체크로마토그래피에 의한 정량법(2) 등이 있다. 이렇게 공인된 시험방법 중 인도페놀 적정법은 시료 전처리 과정이 비교적 간단하며, 시험에 소요되는 시간도 짧아 신속하게 시료 중의 비타민 C 함량을 분석하기 위한 시험방법으로 널리 이용되고 있다. 이 방법에 의하면 비타민 C는 식품 중에 환원형(ascorbic acid)과 산화형(dehydroascorbic acid)의 두 가지 형태로 존재하는데(Fig. 1), ascorbic acid는 환원력이 강하며, dehydroascorbic acid는 산화력이 강하다. Ascorbic acid는 indophenol(산성-적색, 알칼리성-청색)을 환원시켜 무색으로 변화시키므로 용액의 색이 적색을 나타내는 점을 종말점으로 하여 미지 농도의 ascorbic acid 시험용액을 일정량의 indophenol액으로 적정하면 적정량으로부터 시료 중 ascorbic acid를 정량할 수가 있다.

이렇게 인도페놀 적정법에 의해 시료 중 비타민 C 함량을 분석할 경우에는 적정법이라는 시험방법상의 특성에 의해 시험원 또는 시험기관에 따라 측정결과 값이 상이하게 도출되는 경우가 많다. 이는 시료 전처리 과정 중 시험원의 숙련도와 적정에 사용되는 초차, 시약 및 파괴가 잘 일어나는 비타민 C 자

\*Corresponding author: Byung-Man Kwak, Department of R&D Center, Namyang Dairy Products Co. Ltd., 160, Bongan-ri, Janggi-myun, Gongju-City 314-914, Chungcheong nam-do, Korea  
Tel: 82-41-857-1551  
Fax: 82-41-857-7933  
E-mail: fivefive@hanmail.net

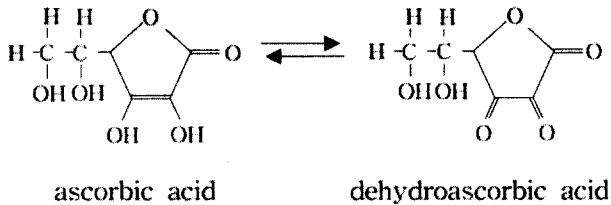


Fig. 1. Structure of ascorbic acid and dehydroascorbic acid.

체의 취급상 주의와도 밀접한 관계가 있다. 이러한 주의를 고려하지 않고 실험을 하는 경우에는 영유아들에게 매우 중요한 영양소 중의 하나인 비타민 C에 대한 실험결과에 있어서 각 시험기관마다 상이한 결과를 도출해냄으로써 제조업체의 피해를 유발하거나, 소비자에게 정확한 정보를 제공하는 데에 실패할 수 있다. 또한 식품공전에 의한 시험방법의 경우 환원형 비타민 C로서 1-5 mg 함유되도록 시료량을 취하도록 되어 있어 비타민 C 함량을 알 수 없는 미지시료의 경우 시료량을 선정하기가 어렵고, 성장기용조제식과 같이 제품에 비타민 C 함량이 표기되어 있는 경우는 시료량이 2-10 g으로 비교적 넓은 범위에 해당되어 시료채취량의 차이에 따른 분석오차도 상당할 것으로 사료될 뿐만 아니라, 비타민 C가 적게 함유되어 있는 경우에 시료를 수 십 g 이상 많이 취하기 곤란한 경우도 있다.

이에 본 연구에서는 대표적인 영유아용 식품 중의 한 분류인 성장기용 조제식에 대하여 비타민 C 함량을 분석할 경우, 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 요인을 파악하고 합리적인 통계처리를 가시화하기 위해 측정불확도 이론을 도입하여 시험방법 과정 중의 불확도 요인들을 설정하고 이에 대한 합리적인 이론에 의한 계산을 통해 측정불확도가 최종결과에 미치는 정도를 산출하고자 한다.

측정불확도에 대한 연구를 살펴보면 국제표준화기구(ISO)에서 시험분석 및 교정결과의 품질에 대한 척도로서 측정불확도 표현지침(GUM: Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement)(3)을 1993년에 발표하였으며, 1995년에는 EURACHEM Uncertainty Working Group에서 Draft EURACHEM/CITAC Guide(4)가 발간되어 측정불확도에 대한 수학적, 통계적 이론 및 화학실험에 있어서의 예시가 제시되었다. 또한 1998년 한국 표준과학연구원에서 측정불확도 표현지침(5)을 발간하였으며, 2000년에는 KOLAS(Korea Laboratory Accreditation Scheme) 사무국에서 측정결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침(6)을 발간하였다. 그 외에 Kuselman 등(7)이 야채 오일 중 과산화물 가 분석에 대한 측정불확도를 발표하였고, Kim 등(8)은 옥수수 유 중 미량의 농약 분석에 대한 측정불확도를 또 다른 Kim 등(9)은 야채음료 중 비타민 C 분석에 있어서의 측정불확도 추정 사례를 발표하였으며, Choi 등(10-11)은 반복측정에 대한 측정 불확도 평가에 대해서 발표하였다.

본 연구에서는 시료량에 차이를 두어 서로 상이한 시료들의 결과값 분석 및 측정불확도 산정을 통해 시료 중에 비타민 C 함량이 적은 경우에 발생하는 분석오차를 측정불확도의 변화로서 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서는 시중에 유통되고 있는 제품 중 비타민 C 함량이 50 mg/100 g으로 표시되어 있는 성장기용조제식을 시료로

서 사용하였다. 소급성 유지 시험을 위해 비타민 C 함량이 114.6±6.6 mg/100 g으로 알려져 있는 인증표준물질(CRM: Certified Reference Material)인 Infant Formula SRM 1846(Standard Reference Material 1846, NIST, USA)을 사용하였으며, 비타민 C 표준품은 Chemservice사(PO Box 599, West Chester, PA 19381-0599, USA)에서 순도가 99.0% 이상인 표준품을 구입하여 사용하였다. Sodium 2,6-dichlorophenol indophenol은 특급시약을 사용하였으며, metaphosphoric acid, acetic acid 등은 electronic grade를 사용하였다. 초순수는 EASY pure system (Barnstead, Dubuque, IA, USA)에 의해 18.0 MΩ 수준으로 정제된 물을 사용하였다.

### 시약의 조제

메타인산-초산용액은 메타인산 15 g을 초산 40 mL 및 물 200 mL로 진탕 혼합한 후 물을 가해 250 mL로 하였으며, 묽은 메타인산-초산용액은 사용시 같은 양의 물로 희석하여 사용하였다.

인도페놀용액은 탄산수소나트륨 50 mg을 더운물 150 mL에 용해한 후 sodium 2,6-dichlorophenol indophenol 50 mg을 용해시키고 냉각 후 물로 200 mL로 하여 사용하였다.

### 표준용액의 조제

Ascorbic acid 표준품 20 mg을 1 mg 단위까지 정밀히 취하여 100 mL 메스플라스크에 옮기고, 묽은 메타인산-초산용액으로 100 mL( $V_{std}$ )로 하여 조제하였다. 이 표준용액은 식품공전 상의 인도페놀 적정법에 지시가 되어 있는 대로 신속하게 조제 즉시 적정하였다.

### 시험용액의 조제

시료량의 차이에 따른 불확도를 산정하여 분석오차를 최소화하기 위한 시료채취량 선정 실험을 위해 제품 중 비타민 C 함량이 50 mg/100 g으로 표시되어 있는 성장기용조제식 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 g을 1 mg 단위까지 정밀히 취하여 100 mL 메스플라스크에 옮기고, 정확히 같은 양의 메타인산-초산용액을 잘 혼합한 후 묽은 메타인산-초산용액으로 100 mL( $V_{fp}$ )로 하였다. 이 용액을 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 조제한 시험용액은 조제 즉시 신속히 적정하였다.

### 시험 방법

Ascorbic acid 표준액의 표정은 앞서 조제한 표준용액 5 mL ( $V_{std}$ )를 취해 묽은 메타인산-초산용액으로 10 mL로 하여, 인도페놀용액으로 용액이 5초간 지속될 때까지 적정하였으며, 이때의 적정량( $T_{std}$ )을 기록하였다.

시험용액의 적정은 앞서 조제한 시험용액 10 mL( $V_{csp}$ )를 삼각플라스크에 정확히 취한 후 인도페놀용액으로 액이 적어도 5초간 적색이 지속될 때까지 적정하였으며, 그 때의 적정량( $T_{sp}$ )을 기록하였다.

### 모델 관계식 설정

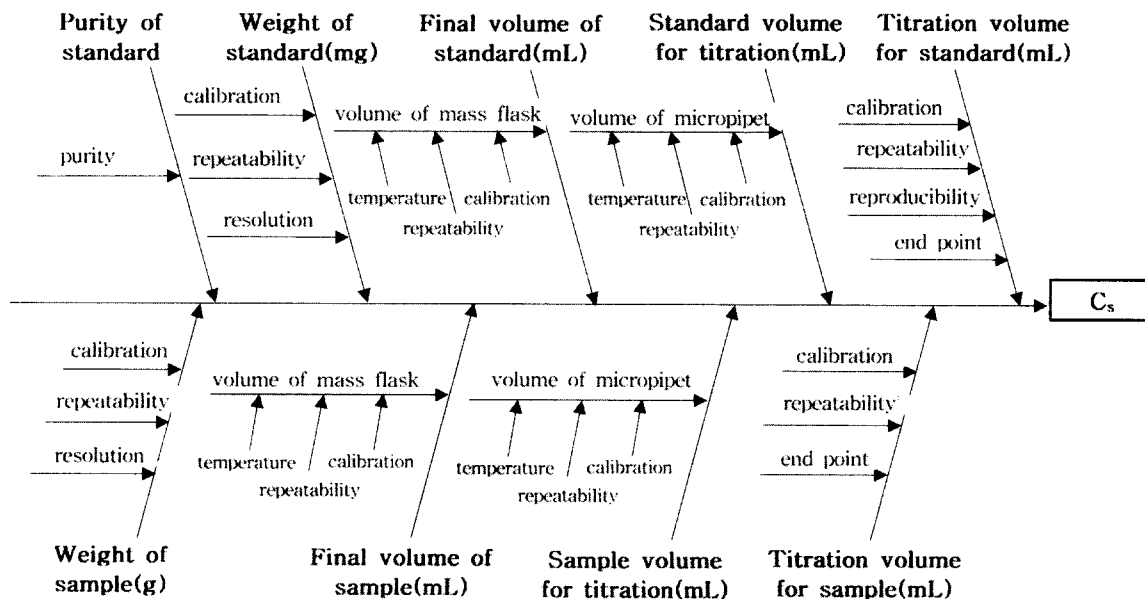
시료중의 비타민 C 함량을 구하기 위한 식은 식 (1)과 같이 설정하였다.  $W_{std}$ ,  $V_{std}$ ,  $V_{cstd}$ ,  $T_{sp}$ ,  $T_{std}$ ,  $V_{csp}$ ,  $V_{fst}$ ,  $W_{sp}$ 와 관계될 수 있는 불확도 요인들에 대한 세부내용과 약어는 Table 1에 나타내었으며, Fig. 2에 도식화 하였다.

$$C_s = P_{vitc} \times \frac{W_{std}}{V_{fst}} \times V_{cstd} \times \frac{T_{sp}}{T_{std}} \times \frac{1}{V_{csp}} \times \frac{V_{fst}}{W_{sp}} \times 100 \quad (1)$$

**Table 1. Uncertainty sources and parameters associated with the analysis of ascorbic acid by indophenol titration method**

Uncertainty source	Description	Process for relative combined standard uncertainty calculation
$P_{vitc}$	Purity of ascorbic acid	$u(P_{vitc})/P_{vitc} = \{(1-P_{vitc})/\sqrt{3}\}/P_{vitc}$
$W_{std}$	$W_c$ Calibration of the balance	$u(W_{std})/W_{std} = [\{u(W_c)/W_c\}^2 + \{u(W_{Rp})/W_{Rp}\}^2 + \{u(W_{Rs})/W_{Rs}\}^2]^{1/2}$
	$W_{Rp}$ Repeatability of the balance	
	$W_{Rs}$ Resolution of the balance	
$V_{fstd}$	$G_{100v}$ Difference of scale reading of 100 mL mass flask	$u(V_{fstd})/V_{fstd} = [u(G_{100v})/G_{100v}]^2 + \{u(R_{100i})/R_{100i}\}^2]^{1/2}$
	$R_{100i}$ Internal calibration of 100 mL mass flask	
$V_{cstd}$	$A_{vitc5}$ Delivering of standard solution by micropipet	$u(V_{cstd})/V_{cstd} = (A_{vitc5}/k)/5, k = 2$
$T_{sp}$	$A_{p1}$ Calibration of 1 mL pipet	$u(T_{sp})/T_{sp} = [u(A_{p1})^2 + \{u(E_{sp})/E_{sp}\}^2 + \{u(N_p)/N_p\}^2]^{1/2}$
	$E_{sp}$ Titration volume	
	$N_p$ Determination of end-point in standrad solution titration	
$T_{std}$	$A_{p1}$ Calibration of 1 mL pipet	$u(T_{std})/T_{std} = [u(A_{p1})^2 + \{u(E_{Re})/E_{Rs}\}^2 + \{u(E_{Rp})/E_{Rp}\}^2 + \{u(N_p)/N_p\}^2]^{1/2}$
	$E_{Re}$ Repeatability of standard solution titration	
	$E_{Rp}$ Reproducibility of standard solution titration	
	$N_p$ Determination of end-point in standard solution titration	
$V_{csp}$	$A_{sp5}$ Delivering of extract solution by micropipet	$u(V_{cstd})/V_{cstd} = (A_{sp5}/k)/5, k = 2$
$V_{fsp}$	$G_{100v}$ Difference of scale reading of 100 mL mass flask	$u(V_{fstd})/V_{fstd} = [u(G_{100v})/G_{100v}]^2 + \{u(R_{100i})/R_{100i}\}^2]^{1/2}$
	$R_{100i}$ Internal calibration of 100 mL mass flask	
$W_{sp}$	$W_c$ Calibration of the balance	$u(W_{sp})/W_{sp} = [\{u(W_c)/W_c\}^2 + \{u(W_{Rp})/W_{Rp}\}^2 + \{u(W_{Rs})/W_{Rs}\}^2]^{1/2}$
	$W_{Rp}$ Repeatability of the balance	
	$W_{Rs}$ Resolution of the balance	

$P_{vitc}$ : purity of ascorbic acid,  $W_{std}$ : weight of standard (mg),  $V_{fstd}$ : final volume of standard solution (mL),  $V_{cstd}$ : volume of standard solution used for titration (mL),  $T_{sp}$ : volume of indophenol solution used for extraction solution titration (mL),  $T_{std}$ : volume of indophenol solution used for standard solution titration (mL),  $V_{csp}$ : volume of extraction solution used for titration (mL),  $V_{fsp}$ : final volume of sample (mL),  $W_{sp}$ : weight of sample (g).



**Fig. 2. Fish bone diagram of uncertainty sources in vitamin C analysis end point.**

$C_s$ : concentration of ascorbic acid in sample (mg/100 g)  
 $P_{vitc}$ : purity of ascorbic acid  
 $W_{std}$ : weight of standard (mg)  
 $V_{fstd}$ : final volume of standard solution (mL)  
 $V_{cstd}$ : volume of standard solution used for titration (mL)  
 $T_{sp}$ : volume of indophenol solution used for extraction solu-

tion titration (mL)  
 $T_{std}$ : volume of indophenol solution used for standard solu-  
 tion titration (mL)  
 $V_{csp}$ : volume of extraction solution used for titration (mL)  
 $V_{fsp}$ : final volume of sample (mL)  
 $W_{sp}$ : weight of sample (g)

## 결과 및 고찰

### 불확도 요인 및 산출방법

본 실험에서는 반복 측정의 평균값을 측정값으로 사용할 경우, 표준불확도를 식 (2)을 적용하여 A type으로 구하였으며, 무게 측정시 저울의 안정성 등과 같은 불확도는 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 (3)과 (4)를 적용하여 A type 불확도를 구하였다. 교정성적상의 불확도값을 사용하는 불확도를 구하는 경우나 반복 측정을 실시하지 않고 불확도를 산출하는 경우에는 표준불확도를 B type으로 구하였다. 최종결과의 합성 표준불확도는 ISO guide에 따라 측정된 각각의 표준불확도를 합성하여 식 (5)을 이용해 구하였으며, 확장불확도의 계산은 식 (7)를 이용하여 포함인자 k와 계산된 합성표준불확도를 곱하여 구하였다. 본 실험에서는 보다 신속하고 간단한 불확도 산정을 위해 확장불확도를 계산하는 경우 측정의 유효자유도가 10 이상 충분히 크도록 측정 계획을 수립하여 k의 값 2를 채택하여 사용하며, 다른 k값은 요구조건이 이미 설정되어 있거나 문서화되어 있는 경우에 한정하여 사용한다고 명시되어 있는 EURACHEM/CITAC Guide에 따라 전체 불확도에 큰 영향을 미치는 불확도 요소의 유효자유도를 계산하여 충분히 크다는 것을 확인한 후 95% 신뢰수준에서 포함인자 k값 2를 기준으로 확장불확도를 계산하였다.

결과 및 고찰 부분의 측정불확도 추정 과정에 대한 설명은 시료 5g을 취하여 분석한 결과를 기준으로 기술하였으며, 시료 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 g을 취하여 실험을 진행했을 경우의 측정불확도 추정 방법도 이와 동일하게 수행하였다.

$$u(x_i) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (2)$$

$$u(x_i) = \frac{s_p}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

$$s_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^M v_i s_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^M v_i}} \quad (4)$$

$$\left\{ \frac{u_c(y)}{y} \right\}^2 = \sum_{i=1}^N \left\{ \frac{u(x_i)}{x_i} \right\}^2 \quad (5)$$

$$v_{\text{eff}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{[c_i u(x_i)]^4}{v_i}} \quad (6)$$

$$U(y) = k u_c(y) \quad (7)$$

- n: number of measurements
- s<sub>p</sub>: pooled standard deviation
- M: number of measurements
- v<sub>i</sub>: degree of freedom
- v<sub>eff</sub>: effective degree of freedom
- c<sub>i</sub>: sensitive coefficient
- U: expanded uncertainty
- k: coverage factor

### 시험결과의 소급성

시험결과의 소급성 유지를 위해 인증표준물질(CRM, Certified Reference Material)인 Infant Formula SRM 1846(Standard Reference Material 1846, NIST, USA)으로 실험을 실시하였으며, 비타민 C 분석 결과값은 Table 2와 같다.

### 표준용액 조제시 불확도

Ascorbic acid 표준품의 무게는 20 mg을 1 mg까지 정밀히 측정하였으며, 표준품무게 측정시 불확도는 제조사로부터 공급되는 표준품의 순도에서 기인하는 불확도(u(P<sub>VITC</sub>)), 저울에 대한 교정성적서 상의 불확도(u(W<sub>C</sub>)), 저울의 안정성(u(W<sub>Rp</sub>)) 및 저울의 분해능(u(W<sub>Rn</sub>)) 불확도 등을 불확도 요인으로 고려하였다.

표준액 순도에 대한 불확도는 시약의 순도가 99%로 표시되어 있으므로 0.99±0.01, 그리고 B형 직사각형 분포로 가정하면, 표준편차를 √3으로 나누어준 표준품 순도에 대한 표준불확도(u(P<sub>VITC</sub>))는 0.005774이고, 상대표준불확도(u(P<sub>VITC</sub>)/P<sub>VITC</sub>)는 0.005832(0.005774/0.99)이다. 저울의 교정성적서 상의 불확도는 95% 신뢰수준에서 0.00033 g이므로 표준불확도(u(W<sub>C</sub>))는 0.000165(0.00033/2)가 된다. 저울의 안정성은 3반복으로 5일간 5주에 걸쳐 분동을 이용해 측정하였다. 공통 실험표준편차 방법에 따라 식(3)과 (4)을 적용하여 계산한 표준불확도(u(W<sub>Rp</sub>))는 0.163299이며, 자유도는 10이다. 저울의 분해능은 0.0001 g이고, 따라서 저울의 분해능에 대한 표준불확도(u(W<sub>Rn</sub>))는 0.00003이다. 따라서 표준품 무게측정시 합성불확도를 식 (5)을 이용하여 구하면 0.163299이며, 상대표준불확도는 0.008165(0.163299/20)이다.

Ascorbic acid 표준품을 최종전량 100 mL로 할 때의 불확도는 눈금읽기에 대한 시험원의 불확도, 100 mL 메스플라스크의 내부교정 불확도를 불확도 요인으로 고려하였다. 100 mL 메스플라스크의 눈금읽기에 따른 시험원의 불확도는 15회 반복하여 플라스크의 표시까지 물을 가득 채우고 질량을 측정하였다. 이에 대한 표준편차가 0.00387이므로, 표준불확도는 0.00387이며, 자유도는 측정횟수가 15회이므로 14이다. 또한 플라스크 무게 15회 반복 측정시 저울의 표준불확도는 0.00017이므로 100 mL 메스플라스크 눈금읽기에 대한 시험원의 표준불확도(u(G<sub>100v</sub>))는 위의 두 불확도를 합성한 0.00388이며, 상대표준불확도는 0.000039(0.00388/100)이다.

100 mL 메스플라스크의 내부 교정 불확도는 부피계의 표준 교정 절차를 기준으로 하여 빈 플라스크의 질량측정불확도, 물을 채운 후 플라스크의 질량측정시 불확도, 물의 밀도측정시

Table 2. Values for vitamin C measurement in infant formula SRM 1846 by indophenol titration method

Vitamin	Unit	Certified value	Analysis value	
			Mean ± S.D. <sup>1)</sup>	Recovery (%)
Vitamin C	mg/kg	114.6 ± 6.6	108.4 ± 1.7	94.6

<sup>1)</sup>The values are mean ± S.D. of 3 replications.

**Table 3. Uncertainty budget for the determination of  $P_{vitc}$ ,  $W_{std}$ , and  $V_{fstd}$**

Uncertainty source	Value	Degree of freedom	Relative standard uncertainty	Combined standard uncertainty	Type of uncertainty
$(x_i)$	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{\{\sum(u(x_i)/x_i)^2\}}$	A or B
$P_{vitc}$	0.99	$\infty$	0.005832	0.005832	B
$W_{std}$	20	-	-	0.008165	combined <sup>1)</sup>
$V_{fstd}$	$G_{100v}$	14	0.000039	0.000383	A
	$R_{100i}$	-	0.000381		combined

<sup>1)</sup>Combined standard uncertainty.

불확도, 부피팽창계수 적용 불확도의 합성불확도와 100 mL 메스플라스크 표준기, 측정 플라스크의 불확도, 그리고 저울에 의한 무게측정시 불확도 등을 고려하여 계산하였다. 이 때 공기의 밀도와 표준분동의 밀도는 각각 0.0012 g/cm<sup>3</sup>, 8.0 g/cm<sup>3</sup>이고, 물의 온도측정 결과는 21°C이다. 빈 플라스크의 무게측정의 평균값( $M_1$ )은 55.8311 g, 표준불확도( $u_{M1}$ )는 0.00029였으며, 물을 채운 플라스크의 무게( $M_2$ )는 155.3578 g, 표준불확도( $u_{M2}$ )는 0.00393으로 산출되었다. 물의 밀도는 0.99799로 계산되었으며, 측정 불확도는 0으로 산출되었다. 또한 일반 실험용부피계의 부피팽창계수( $\beta$ )는 0.000025/K이므로 이의 오차를 0.000005/K로 가정하고 이 값이 100% 이내에 존재하는 직각확률분포를 하고 있다면 이의 표준불확도( $u_\beta$ )는 0.0000029/K가 된다. 따라서, 빈 플라스크의 질량 측정불확도와 물을 채운 후 플라스크의 질량측정불확도, 물의 밀도측정 불확도 그리고 부피팽창계수 적용 불확도를 식 (8)-(11)를 이용하여 불확도를 산출하면 각각 0.00029, 0.00393, 0, 0.00029이며 이를 합성한 합성불확도는 0.00395이다. 또한 표준플라스크의 교정성적서 상의 불확도가 95% 신뢰수준에서 0.06이므로 표준불확도는 0.03이며, 측정 플라스크의 허용공차가 0.08이므로 표준불확도는 0.02309(0.08/(2 $\sqrt{3}$ ))가 된다. 저울에 의한 무게측정시 표준불확도는 표준품 무게측정시 불확도와 같은 방법으로 구하면 0.00017이다. 앞서 산출한 불확도들을 합성하여 100 mL 메스플라스크의 내부교정 불확도를 산출하면 0.03807이며, 상대표준불확도는 0.000381(0.03807/100)이다. 따라서 눈금읽기에 대한 시험원의 불확도, 100 mL 메스플라스크의 내부교정 불확도를 합성하여 산출한 ascorbic acid 표준품을 최종전량 100 mL로 할 때의 합성불확도 ( $u(V_{fstd})/V_{fstd}$ )는 0.000383이며, Table 3에 그 결과를 나타내었다.

$$\frac{(M_2 - M_1)(8.0 - 0.0012)}{8.0(\rho_w - 0.0012)} \cdot (1 + \beta(20 - t)) \cdot u_{M1} \quad (8)$$

$$\frac{(M_2 - M_1)(8.0 - 0.0012)}{8.0(\rho_w - 0.0012)} \cdot (1 + \beta(20 - t)) \cdot u_{M2} \quad (9)$$

$$\frac{(M_2 - M_1)(8.0 - 0.0012)}{8.0(\rho_w - 0.0012)^2} \cdot (1 + \beta(20 - t)) \cdot u_{\rho_w} \quad (10)$$

$$\frac{(M_2 - M_1)(8.0 - 0.0012)}{8.0(\rho_w - 0.0012)} \cdot (20 - t) \cdot u_\beta \quad (11)$$

- $M_1$ : measured mass of the empty flask (g)
- $M_2$ : measured mass of water with flask (g)
- $\rho_w$ : density of water (g/cm<sup>3</sup>)
- $\beta$ : cubic expansion coefficient
- $t$ : temperature of sample (°C)

- $u_{M1}$ : measured mass uncertainty of the empty flask
- $u_{M2}$ : measured mass uncertainty of water with flask
- $u_{\rho_w}$ : uncertainty of water density
- $u_\beta$ : uncertainty of cubic expansion coefficient

**표준용액 표정시 불확도**

표준용액의 표정은 앞서 조제한 표준용액 5 mL를 취해 동량의 묽은 메타인산-초산용액으로 희석하여 인도페놀 용액으로 적정하였다. 이 때 고려해야 할 불확도 요인은 표준용액 5 mL를 취해 동량의 묽은메타인산-초산용액으로 희석할 때의 피펫 불확도와 인도페놀용액에 의한 적정시 불확도 등이 있다. 5 mL 마이크로피펫을 이용한 표준용액 분취시 불확도는 교정성적서 상의 불확도가 95% 신뢰수준에서 0.009이므로, 표준불확도 ( $u(A_{std})/A_{std}$ )는 0.0045(0.009/2)이다. 묽은메타인산-초산용액 5 mL 첨가시 피펫 불확도의 계산은 5 mL 마이크로피펫을 이용한 표준용액 분취시 불확도와 동일하며, 표준불확도( $u(A_{ms})$ )는 0.0045이다. 따라서, 적정에 사용된 표준용액 부피의 합성불확도( $u(V_{csd})$ )는 0.00636, 상대표준불확도는 0.000636( $u(V_{csd})/V_{csd}$ )으로 산출된다. 인도페놀용액에 의한 적정시 불확도는 1 mL 피펫 불확도와 인도페놀용액에 의한 표준용액 적정시 반복성 그리고 재현성 불확도를 불확도 요인으로 고려하였다. 1 mL 피펫 불확도는 교정성적서 상의 불확도, 적정량을 읽을 때 시험원의 1 mL 눈금읽기에 대한 불확도를 불확도 요인으로 고려하였으며, 1 mL 피펫의 교정성적서 상의 불확도는 0.001이고 95.45% 신뢰 구간에서  $k$ 값이 2이므로, 표준불확도는 0.0005이다. 시험원의 1 mL 피펫 눈금읽기에 대한 불확도는 10회 반복하여 1 mL 피펫의 표선까지 물을 채우고 질량을 측정하였다. 이에 대한 표준편차가 0.00056이므로, 표준불확도는 0.00056이며 자유도는 측정횟수가 15회이므로 14이다. 또한 플라스크 10회 반복 무게 측정시 저울의 불확도는 0.00017이므로 1 mL 피펫의 눈금읽기에 대한 시험원의 표준불확도는 위의 두 불확도를 합성한 0.000582이다. 적정시 1 mL 피펫의 합성불확도는 0.000768으로 산출되며, 피펫사용횟수 8회를 고려한 합성불확도( $u(A_{pi})$ )는 0.002171이다.

인도페놀용액에 의한 표준용액 적정시 반복성 불확도는 조제한 1개의 표준용액을 5회 반복하여 적정하였을 때의 표준편차 0.062209이므로 표준불확도( $u(E_{R5})$ )는 0.027821(0.062209/ $\sqrt{5}$ )로 계산된다. 표준용액 적정시 재현성 불확도는 조제한 10개의 표준용액을 적정하였을 때의 표준편차가 0.254244이므로 표준 불확도( $u(E_{R10})$ )는 0.080399(0.254244/ $\sqrt{10}$ )로 산출되었다. 시험원의 종말점 결정시 불확도는 숙련된 시험자의 경우 적정액 1방울의 차이에서 기인하는 것으로 판단하였으며, 적정액 1방울의 부피를 10회 반복 측정하여 구한 평균값 0.0433 mL로부터 표준 불확도( $u(N_p)$ )는 0.024999(0.0433/ $\sqrt{3}$ )으로 산출된다.

**Table 4. Uncertainty budget for the determination of  $V_{std}$  and  $T_{std}$**

Uncertainty source	Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Combined uncertainty	Relative standard uncertainty	Type of uncertainty		
$(x_i)$	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)$	$\sqrt{\{\Sigma(u(x_i))^2\}}$	$\sqrt{\{\Sigma(u(x_i))^2\}}/x_i$	A or B		
$V_{std}$	$A_{vit5}$	5	$\infty$	0.004500	0.004500	0.000900	B	
	$A_{pl}$	$G_{pl}$	1	14			0.000582	0.000768
$T_{std}$		$R_{pl}$	1	$\infty$	0.000500	(0.002171) <sup>1)</sup>	B	
		$E_{Re}$	7.53	4	0.027821	0.088700	0.011776	A
		$E_{Rp}$	7.53	9	0.080399			A
		$N_p$	0.04	$\infty$	0.024999			B

<sup>1)</sup>Combined uncertainty of 1 mL pipet used for standard titration by 8 times.

**Table 5. Uncertainty budget for the determination of  $W_{sp}$  and  $V_{fsp}$**

Uncertainty source	Value	Degree of freedom	Relative standard uncertainty	Combined standard uncertainty	Type of uncertainty
$(x_i)$	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{\{\Sigma(u(x_i)/x_i)^2\}}$	A or B
$W_{sp}$	5.0000	-	-	0.000034	combined <sup>1)</sup>
$V_{fsp}$	$G_{100v}$	100	14	0.000039	A
	$R_{100i}$	100	-	0.000381	combined

<sup>1)</sup>Combined standard uncertainty.

**Table 6. Uncertainty budget for the determination of  $V_{csp}$  and  $T_{sp}$**

Uncertainty source	Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Combined standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Type of uncertainty		
$(x_i)$	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)$	$\sqrt{\{\Sigma(u(x_i))^2\}}$	$\sqrt{\{\Sigma(u(x_i))^2\}}/x_i$	A or B		
$V_{csp}$	$A_{sp5}$	5	$\infty$	0.0045	0.00636	0.000636	B	
	$A_{sp5}$	5	$\infty$	0.0045			B	
$T_{sp}$	$A_{pl}$	$G_{pl}$	1.0000	14	0.000582	0.000768	A	
		$R_{pl}$	1.0000	$\infty$	0.000500	(0.001329) <sup>1)</sup>	B	
		$E_{sp}$	0.81	4	0.017493	0.030541	0.014311	A
		$N_p$	0.04	$\infty$	0.024999			B

<sup>1)</sup>Combined uncertainty of 1 mL pipet used for standard titration by 3 times.

따라서, 인도페놀용액에 의한 표준용액 적정시 합성표준불확도( $u(T_{std})$ )는 0.088700, 상대표준불확도( $u(T_{std})/T_{std}$ )는 0.011776 (0.088700/7.53)이며, Table 4에 그 결과를 나타내었다.

**시험용액 조제시 불확도**

시료의 무게 5g을 1mg까지 정밀히 측정하여 검체로 하였으며, 측정시 불확도는 저울에 대한 교정성적서 상의 불확도, 저울의 안정성 및 저울의 분해능 불확도 등을 불확도 요인으로 고려하였다. 계산 방법은 표준품 무게측정시 불확도의 경우와 동일하게 수행하였다. 시료 5g 무게 측정시 불확도는 교정성적서 상의 표준불확도가 0.000165, 저울의 분해능 불확도가 0.00003 그리고 저울의 안정성 불확도가 0.000020이므로 시료 무게 측정시 합성표준불확도는 0.00017, 상대표준불확도는 0.000034(0.00017/5)이며, 그 추정결과를 Table 5에 표현하였다.

시험용액의 부피를 100 mL로 할 때의 표준불확도의 계산은 표준용액 조제시 100 mL 메스플라스크 부피 측정에 대한 불확도의 경우와 동일한 방법으로 계산하였으며, 눈금읽기에 대한 시험원의 측정반복성에 의한 불확도, 100 mL 메스플라스크의 내부교정 불확도를 불확도 요인으로 고려하였다. 그 결과 시험

용액 최종부피를 100 mL로 할 때의 상대표준불확도( $u(V_i)/V_i$ )는 0.000383으로 산출되었다. 시료 검체량이 다른 경우의 무게 측정시 불확도 계산 역시 위와 동일한 방법으로 수행하였고, 자세한 계산과정은 생략하였다.

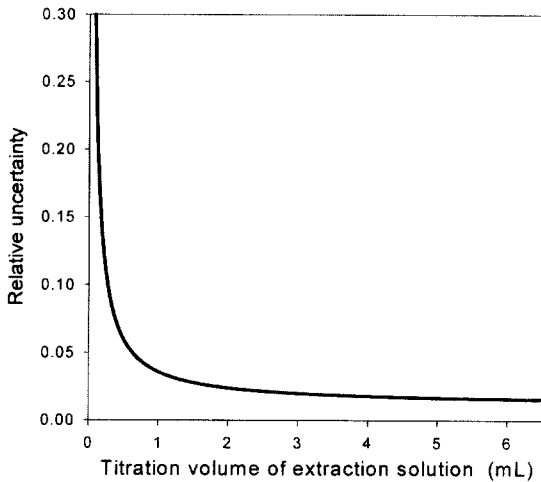
**시험용액 적정시 불확도**

앞서 조제한 시험용액 중 10 mL를 정확히 취하여 인도페놀 용액으로 적정하였다. 이 때 고려해야할 불확도 요인은 시험용액 분취시 불확도, 인도페놀용액에 의한 시험용액 적정시 불확도 등이 있다. 시료를 5g 검체로 한 경우 시험용액 10 mL 분취시 불확도는 5 mL 피펫의 표준불확도가 0.0045이고, 시험용액을 5 mL 피펫으로 두 번 분취하여 사용하였으므로 합성불확도는 0.00636이며 상대표준불확도는 0.000636이다. 시험용액은 각각 5회씩 반복측정하였다. 인도페놀 용액에 의한 시험용액 적정시 불확도는 표준용액 적정시와 동일한 방법으로 계산하였으며 그 결과를 Table 6에 나타내었다. 시료의 무게가 다르게 하여 조제한 시험용액의 적정시 불확도 역시 위와 같은 방법으로 산출하였다.

**Table 7. Values and uncertainties for the determination of vitamin C contents**

Sample weight	Analytical results <sup>2)</sup>	Relative uncertainty of $W_{sp}$	Relative uncertainty of $T_{sp}$	Combined uncertainty ( $u_c(x_i)$ )	Expanded uncertainty ( $U_c(x_i)$ )	Analytical result $\pm$ expanded uncertainty
$x_i$ <sup>1)</sup>	$A_i$ <sup>3)</sup>	$u(W_{sp})$	$u(T_{sp})$	$\sqrt{\{\sum(u(x_i)/x_i)^2\}}$	$u_c(x_i)*k*A_i$	$A_i \pm U_c(x_i)$
0.2	69.0	0.000843	0.251025	0.251544	34.7	69.0 $\pm$ 34.7
0.4	65.0	0.000422	0.140797	0.141719	18.4	65.0 $\pm$ 18.4
0.6	62.0	0.000281	0.100099	0.101391	12.6	62.0 $\pm$ 12.6
0.8	58.7	0.000211	0.078972	0.080604	9.47	58.7 $\pm$ 9.47
1.0	56.8	0.000169	0.067699	0.069595	7.91	56.8 $\pm$ 7.91
1.5	57.5	0.000112	0.045523	0.048297	5.56	57.5 $\pm$ 5.56
2.5	56.2	0.000067	0.029883	0.033975	3.82	56.2 $\pm$ 3.82
5.0	56.7	0.000034	0.014307	0.021567	2.44	56.7 $\pm$ 2.44
10.0	56.9	0.000017	0.007203	0.017670	2.01	56.9 $\pm$ 2.01
20.0	56.9	0.000008	0.003602	0.016532	1.88	56.9 $\pm$ 1.88

<sup>1)</sup>unit: g.  
<sup>2)</sup>final volume: 100 mL.  
<sup>3)</sup>unit: mg/100 g.



**Fig. 3. Dependence of the relative standard uncertainties on the measured difference of titration volume.**

**합성표준불확도**

모델관계식에 표현된 각 불확도인자의 상대표준불확도들을 합성하여 합성불확도( $u(C_s)/C_s$ )를 계산하면, 시료 5g 검체한 경우 0.021567이며, 시험결과값 56.7 mg/100 g을 곱하여 인도페놀 적정법에 의한 ascorbic acid의 합성표준불확도( $u(C_{s,k})$ )를 계산하면 1.22 mg/100 g이다. 시료의 검체량이 다른 경우의 합성표준 불확도의 계산도 위와 동일한 방법으로 수행하였으며 Table 7에 산출 결과를 나타내었다.

**확장불확도 및 최종결과 표현**

Table 3-6 그리고 Fig. 4에서 알 수 있듯이 인도페놀 적정법에 의한 비타민 C 분석시 전체 불확도에 가장 큰 영향을 미치는 불확도는 시험용액 적정 시 불확도와 표준용액 적정시 불확도이다. 식 (6)을 이용하여 이 두 불확도들의 유효자유도를 계산하여 보면 시험용액 적정 시 유효자유도는 65, 표준용액 적정시 유효자유도는 200으로 산출된다. 따라서 유효자유도가 충분이 크기 때문에 산출된 합성표준불확도에 포함인자(k) 값 2를 곱하여 확장불확도를 계산하였다. 산출된 확장불확도는 2.44

mg/100 g이었으며, 최종결과는 56.7  $\pm$  2.44 mg/100 g으로 표현하였다. 시료의 검체량이 다른 경우의 확장불확도의 계산도 위와 동일한 방법으로 수행하였으며 Table 7에 산출 결과를 나타내었다.

시험용액 적정시 불확도는 적정량과 불확도의 상관관계를 나타낸 Fig. 3에서 알 수 있듯이 적정량이 감소함에 따라 측정 불확도가 증가하는 것을 알 수 있다.

Fig. 4에는 Table 7에 나타난 (1)식의 모델관계식 중의 불확도인자(uncertainty sources)들이 측정불확도에 미치는 영향을 세부적으로 나타내었는데, 시험용액 적정시 불확도가 가장 크다는 것과 시료 중 비타민 C 함량이 낮을수록 시험용액 적정시 불확도가 증가하여 전체불확도가 커지는 것을 알 수 있다.

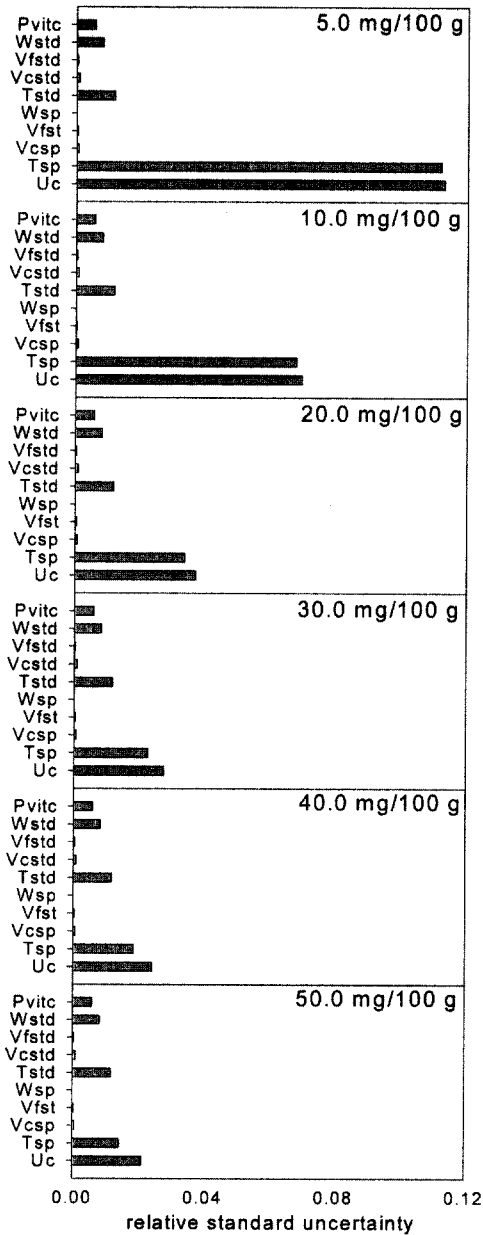
불확도 인자로는 시험용액 적정시 불확도 이외에 비타민 표준품 무게측정시 불확도, 표준품의 불확도, 표준용액 적정시 불확도 등도 전체불확도에 많은 영향을 미치는 것으로 산출되었다.

**요 약**

인도페놀 적정법을 이용하여 성장기용 조제식 중 비타민 C 함량을 측정하는 과정 중의 측정불확도를 추정하기 위하여 분석결과에 영향을 주는 인자들을 파악하고 각각의 불확도를 산출하였으며, 불확도의 계산은 GUM(Guide to the expression of Uncertainty in Measurement)과 Draft EURACHEM CITAC Guide에 근거한 수학적 계산 및 통계처리 방법에 의해 처리하였다.

인도페놀 적정법에 의한 비타민 C 함량 측정시 measurand상의 uncertainty source로서 표준품 순도, 표준품 무게, 표준품 최종전량, 적정에 사용된 표준용액 부피, 인도페놀 용액에 의한 표준용액 적정, 시료의 무게, 시료의 최종전량, 적정에 사용된 시험용액, 인도페놀 용액에 의한 시험용액 적정 등이 작용하였으며, uncertainty source에 영향을 주는 세부인자인 uncertainty parameter로서는 저울의 안정성, 분해능, 재현성, 1 mL 피펫, 5 mL 마이크로피펫, 100 mL 메스플라스크의 눈금읽기, 내부교정 등이 작용하였다.

소금성 유지를 위해 비타민 C 함량과 측정불확도가 보장된 인증표준물질인 Infant Formula SRM 1846을 사용하여 비타민 C 함량을 측정한 결과값은 108.4  $\pm$  1.7 mg/100 g로 인증값인 비



**Fig. 4. Contributions of uncertainty sources by different vitamin C contents.**

$P_{vitc}$ : purity of standard,  $W_{std}$ : weight of standard,  $V_{fstd}$ : final volume of standard,  $V_{cstd}$ : volume of standard solution used for titration,  $T_{sp}$ : volume of indophenol solution used for extraction solution titration,  $T_{std}$ : volume of indophenol solution used for standard solution titration,  $V_{csp}$ : volume of extraction solution used for titration,  $V_{rsp}$ : final volume of sample,  $W_{sp}$ : weight of sample.

비타민 C 함량  $114.6 \pm 6.6 \text{ mg/100 g}$ 의 범위내로 측정되었으며, CRM에서 보장된 균일성과 실험오차를 고려하면 유사한 결과가 산출되었음을 알 수 있다( $p < 0.05$ ). 이와 같은 소급성 검증 후 시중에 유통 중인 성장기용조제식의 비타민 C 함량을 분석하기 위하여 시료량을 달리 하여 측정불확도를 계산한 결과, 본 연구에서는 시료를 최소한 5g은 취해야 결과값 및 측정불확도가  $56.7 \pm 2.44 \text{ mg/100 g}$ 으로서 5%이하로 측정불확도를 유지할 수 있었다.

이와 같이 측정불확도를 고려하여 서로 상이한 분석방법간의 신뢰성을 비교 검증하여야 하며, 확일적으로 단순히 적정법과 HPLC법을 비교해서는 다소 무리가 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서와 같이 측정불확도를 고려하여 분석에 영향을 줄 수 있는 요인들을 최소화한다면 HPLC와 같은 고가의 정밀분석기기를 구비하지 못한 실험실에서도 인도페놀 적정법에 의한 비타민 C 분석방법을 이용하여 신뢰성있는 측정결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

1. Korea Food and Drug Administration. Food Standards Codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea pp. 287-290 (2004)
2. Korea Food and Drug Administration. Food Standards Codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea pp. 904-907 (2004)
3. International Organization for Standardization. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements. ISO, Switzerland (1993)
4. EURACHEM. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements 2nd. EURACHEM, England, UK (1999)
5. KRISS. Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement. KRISS, Korea (1998)
6. Korea Laboratory Accreditation Scheme (KOLAS). Guideline for Quantifying and Expressing the Uncertainty in Measurement Results. KOLAS, Korea (2000)
7. Ilya K, Elena KS, Yakov IT. Uncertainty and other metrological parameters of peroxide value determination in vegetable oils. Accred. Qual. Assur. 7: 13-18 (2002)
8. Kim BJ, Kim DH, Choi JO, So HY. Quantitative analysis of trace pp'-dde in corn oil by isotope dilution mass spectrometry: uncertainty evaluations. Bull. Korean Chem. Soc. 20: 910-916 (1999)
9. Kim YJ, Kim HW. Estimation of measurement uncertainty in vitamin C analysis from vegetable and fruit juice. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 1053-1059 (2003)
10. Choi JO, Hwang WJ, So HY, Kim BJ. An uncertainty evaluation for multiple measurements by GUM. Accred. Qual. Assur. 8: 13-15 (2003)
11. Choi JO, Kim DH, Hwang WJ, So HY. An uncertainty evaluation for multiple measurements by GUM, II. Accred. Qual. Assur. 8: 205-207 (2003)
12. IUPAC. Commission on atomic weight and isotopic abundances. J. Pure Appl. Chem. 69: 2471-2473 (1997)

(2004년 10월 4일 접수; 2005년 4월 29일 채택)