

## HPLC에 의한 조제분유 중 비타민 A 함량 분석의 측정불확도 비교산정

이흥민 · 광병만 · 안장혁\* · 전태홍

남양유업(주) 중앙연구소

### A Comparative Study on Quantifying Uncertainty of Vitamin A Determination in Infant Formula by HPLC

Hong-Min Lee, Byung-Man Kwak, Jang-Hyuk Ahn\*, and Tae-Hong Jeon

Research and Development Center, Namyang Dairy Products Corporation

**Abstract** The purpose of this study was to determine the accurate quantification of vitamin A in infant formula by comparing two different standard stock solutions as well as various sample weights using high performance liquid chromatography. The sources of uncertainty in measurement, such as sample weight, final sample volume, and the instrumental results, were identified and used as parameters to determine the combined standard uncertainty based on GUM(guide to the expression of uncertainty in measurement) and the Draft EURACHEM/CITAC Guide. The uncertainty components in measuring were identified as standard weight, purity, molecular weight, dilution of the standard solution, calibration curve, recovery, reproducibility, sample weight, and final sample volume. Each uncertainty component was evaluated for type A and type B and included to calculate the combined uncertainty. The analytical results and combined standard uncertainties of vitamin A according to the two different methods of stock solution preparation were  $627 \pm 33 \mu\text{g R.E./100 g}$  for 1,000 mg/L of stock solution, and  $627 \pm 49 \mu\text{g R.E./100 g}$  for 100 mg/L of stock solution. The analytical results and combined standard uncertainties of vitamin A according to the various sample weights were  $622 \pm 48 \mu\text{g R.E./100 g}$ ,  $627 \pm 33 \mu\text{g R.E./100 g}$ , and  $491 \pm 23 \mu\text{g R.E./100 g}$  for 1 g, 2 g, and 5 g of sampling, respectively. These data indicate that the preparation method of standard stock solution and the sample amount were main sources of uncertainty in the analysis results for vitamin A. Preparing 1,000 mg/L of stock solution for standard material sampling rather than 100 mg, and sampling not more than 2 g of infant formula, would be effective for reducing differences in the results as well as uncertainty.

**Key words:** uncertainty, vitamin A, retinol, infant formula, HPLC

## 서 론

조제분유는 원유 또는 유가공품을 주원료로 하고 이에 영유아의 성장발육에 필요한 각종 영양소를 첨가하여 모유의 성분과 유사하게 제조한 것이며(1), CODEX규격에서는 조제분유라고 하며 영아의 정상적인 영양소 요구량을 충족시키기 위하여 모유의 대체물로서 사용되는 액상 또는 분말상의 조제식품이라고 정의하고 있다(2). 이러한 목적으로 제조된 조제분유는 설계된 영양소 구성성분으로 적합하게 제조되어야만 영유아의 적절한 영양소 섭취에 도움이 될 수 있으므로, 생산된 조제분유의 각종 영양소 함량의 적합성 검사업무는 매우 중요하다 할 수 있다. 그 중에서도 비타민류는 대부분 100 g 당  $\mu\text{g}$ 단위로 미량이 함유되어 있으므로 그 검사업무는 매우 중요하다 할 수 있다.

그 중에서도 비타민 A는 시각, 성장, 세포분열 및 증식, 생식

그리고 면역체계의 보존에 매우 중요한 역할을 하는 영양소이다(3). 비타민 A는 동물성 식품에서의 레티노이드와 주로 식물성 식품에 존재하는 카로티노이드로서 섭취하며, 최근에는 항산화 및 항암효과에 대한 연구가 진행되고 있지만, 결핍뿐만 아니라 과잉 시에는 독성이 나타날 수 있기 때문에 연령과 남녀 그리고 임신부에 따른 적정량의 섭취가 중요하다 하겠다. 따라서, 이러한 비타민A의 권장량은 미량으로서 영유아들이 먹는 조제분유의 경우에 약  $510\text{-}540 \mu\text{g R.E./100 g}$  이 함유되어 있다.

식품중의 비타민A에 대한 함량을 분석하는 방법에는 삼염화안티몬에 의한 비색정량법(4), 고속액체크로마토그래피에 의한 정량법(5-7) 등이 있다. 이 중 가장 널리 사용되며, 국내에서 법적으로 인정하고 있는 방법은 식품공전법(5)인데, 이러한 공인된 방법들에 의해 조제분유 중의 비타민 A를 분석할 경우라도 시험자가 아무리 정확한 실험을 한다 하더라도 동일한 결과를 산출하기란 불가능하다. 또한, 다른 모든 시험, 측정에 있어서도 시료처리 과정 및 분석기기의 오차로 인하여 반복실험 결과마다 차이가 발생하는 것은 필수불가결하다. 이에 학자들은 시험기관별 또는 시험원별로 상이한 결과의 차이를 최소화하기 위한 많은 노력을 해왔다.

이러한 노력의 일환으로 1970년대 국제도량형위원회(CIPM)를 중심으로 한 측정결과의 평가를 위한 측정불확도 이론을 토대로

\*Corresponding author: Jang-Hyuk Ahn, Research and Development Center, Namyang Dairy Products Co., Ltd., 160, Bongan-ri Janggi-myeon, Gongju-si, Chungcheongnam-do 314-914, Korea  
Tel: 82-41-856-0381  
Fax: 82-41-857-7933  
E-mail: ahn5470@hanmail.net  
Received December 17, 2007; accepted February 15, 2008

1993년에 국제표준화기구(ISO)에서 시험분석 및 교정결과의 품질에 대한 척도로서 측정불확도 표현지침(Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement: GUM)(8)이 제시되었고, (National Institute of Standards and Technology, NIST, USA)에서 Guide-line이 발간되었으며(9), 1995년에는 EURACHEM Uncertainty Working Group에서 CITAC 및 AOAC International과 공동연구를 통해 Draft EURACHEM/CITAC Guide(10)가 발간되어 측정불확도에 대한 이론 정리 및 예시가 제시되었다.

국내에서는 한국표준과학연구원에서 1998년도에 측정불확도 표현지침(11)을 발간한 이후, 2000년도에 KOLAS(Korea Laboratory Accreditation Scheme) 사무국에서 측정결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침(12)을 발간하여 국제공인시험기관의 측정불확도 추정 능력을 의무화하고 있다. 식품중의 성분을 검사함에 있어서 Kim(13) 등이 옥수수유 중 미량 영양 분석 시의 측정불확도를 발표하였고, 또 다른 Kim(14) 등은 야채음료 중의 비타민 C 함량을 분석함에 있어서의 측정불확도 추정 사례를 발표하였다. 2004년도에 Jun(15) 등이 조제분유 중의 칼슘함량 분석시 상대불확도의 간편한 활용을 통한 측정불확도 산정을 발표한 이후, 과산화물가 측정시의 불확도(16), 비타민 C 함량분석 시의 불확도(17) 등에 대하여 발표하였다. 그러나, 적절한 불확도인자 선정이나 합리적인 측정불확도 합성을 위하여 향후에도 많은 의견들이 제시되어야 하며 지속적으로 개선 및 보완이 되어가며 체계적이고 합리적인 정립이 필요한 실정이다.

이에 발표된 논문들에서 과소평가된 인자들 중에서 표준물질을 이용한 표준용액 제조 시의 불확도, 분석실험을 위한 샘플채취량에 따른 불확도 등에 대한 보완을 통하여, 조제분유와 같이 복잡한 매질의 시료에 미량으로 함유되어 있는 비타민A의 함량을 분석함에 있어서 추정되는 불확도 산정뿐만 아니라, 정확한 분석결과값 도출을 위한 비교실험을 합리적으로 수행 하였다. 각각의 불확도 인자가 최종결과에 영향을 주는 정도를 비교 산정하여 시험자가 분석오차를 최소화하기 위하여 어떤 요인들을 검증하고 관리하여야 하는지 제시함으로써, 각 시험기관마다 또는 각 시험자마다 상이하게 도출되는 결과의 차이를 최소화하는 데에 도움이 되고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에서는 실험결과 검증을 위해 시료의 균일성과 실험오차를 고려하여 인증표준물질(Certified Reference Material, CRM)인 조제분유 SRM 1846(표준기준물질 1846, NIST, Gaithersburg, MD, USA)을 시료로 사용하였으며, 정성 및 정량분석을 위해서 사용된 비타민 A(all trans-retinol palmitate) 표준품은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약으로 pyrogallol(Sigma)과 HCl(Shinyo pure chemicals, Osaka, Japan)은 electronic grade를 사용하였고, ethanol은 Fisher사(Pittsburgh, PA, USA)에서 구입하고, petroleum ether는 J.T.Baker사(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입한 HPLC 등급을 사용하였다. 초순수는 EASY pure system(Barnstead, Dubuque, IA, USA)에 의해 18.0 MΩ 수준으로 정제된 물을 사용하였다.

### HPLC 분석을 위한 시료 전처리 및 분석조건

고성능액체크로마토그래피(HPLC)에 의한 비타민 A 분석은 식품공전법(5)의 시험방법을 기준으로 수행하여 HPLC(Alliance 2695, Waters, Milford, MA, USA)로 분석하였다. 시료를 약 1 g, 2 g,

**Table 1. Analytical condition of Vitamin A by HPLC**

Classification	Condition
Mobile Phase	Methalol : H <sub>2</sub> O (95 : 5, v/v)
Flow rate	1 mL / min
Detector	Waters 474 Fluorescence Detector
Detector Wavelength(nm)	Ex. : 340 nm, Em. : 460 nm
Column	Waters Sunfire™ C18(3.5 μm, 4.6×150 mm)

5 g을 0.1 mg까지 정밀히 달아(3반복 진행) 검화 플라스크에 취하고, ethanol 30 mL, 10% pyrogallol 1 mL와 KOH 3 mL를 가하여 섞은 후, 환류냉각기가 설치된 waterbath에서 30분동안 비누화한다. 비누화가 끝난 플라스크를 냉각시킨 후 분리깔데기에 옮겨 다음의 액액분배(partition) 과정을 수행한다. 분리깔데기에 petroleum ether 30 mL를 넣고 섞은 후 정치하여, 분리된 petroleum ether층을 다른 분리깔데기로 옮긴다(3반복). 분리된 petroleum ether를 물로 여러 번 수세하고, 최종으로 phenolphthalein용액으로 중화여부를 확인한다. 분리된 petroleum ether층을 다른 플라스크에 받은 후 용매를 수욕상에서 감압 증발시킨다. 10 mL ethanol을 가한 후, 이를 0.2 μm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

컬럼은 Water사의 SunFire™ C18, 이동상은 95% methanol (Fisher), 검출기는 fluorescence detector(Ex. : 340 nm, Em. : 460 nm)로 측정하였다.

기기분석에 사용된 HPLC의 기기분석조건은 Table 1에 나타나 있다.

### 표준용액의 조제

비타민 A 표준품은 all trans-retinol palmitate로서 0.1 g을 정확하게 취하여 100 mL 메스플라스크에 용해시켜 1,000 mg/L가 되도록 하고, 이를 다시 100 mg/L 농도로 희석하였다. 이중 1 mL를 취하여 검화를 진행하고, 최종농도가 1, 5, 10 mg/L 이 되도록 제조하였다. 표준용액의 제조에는 HPLC 등급용 ethanol을 사용하였다.

### 첨가회수 실험

표준용액을 희석하여 5 mg/L 농도로 조제한 후, 시료(조제분유 SRM 1846) 1g에 표준용액 1 mL를 첨가하여 첨가하지 않은 시료와 동일하게 처리한 후 정량하였다.

### 모델 관계식 설정

시료중의 비타민 A 함량( $C_s$ )을 구하기 위한 식은 식 (1)과 같이 설정하였으며, 측정값의 불확도를 구하기 위하여 식  $W_s$ ,  $C_e$ ,  $V_f$ 와 관계될 수 있는 모든 불확도 요인을 포함하는 식 (2), (3)을 설정하였다. 요인들에 대한 세부내용과 약어는 Table 2에 나타나 있으며, Fig. 1에 도식화 하였다.

$$C_s = C_s \times \frac{V_f}{W_s} \times \frac{100}{1000} \times F \quad (1)$$

$$W_s = W_c \cdot W_{Rp} \cdot W_R \quad (2)$$

$$C_e = P_{RcA} \cdot F_{ReA} \cdot STD \cdot L_C \cdot I_R \cdot R_M \quad (3)$$

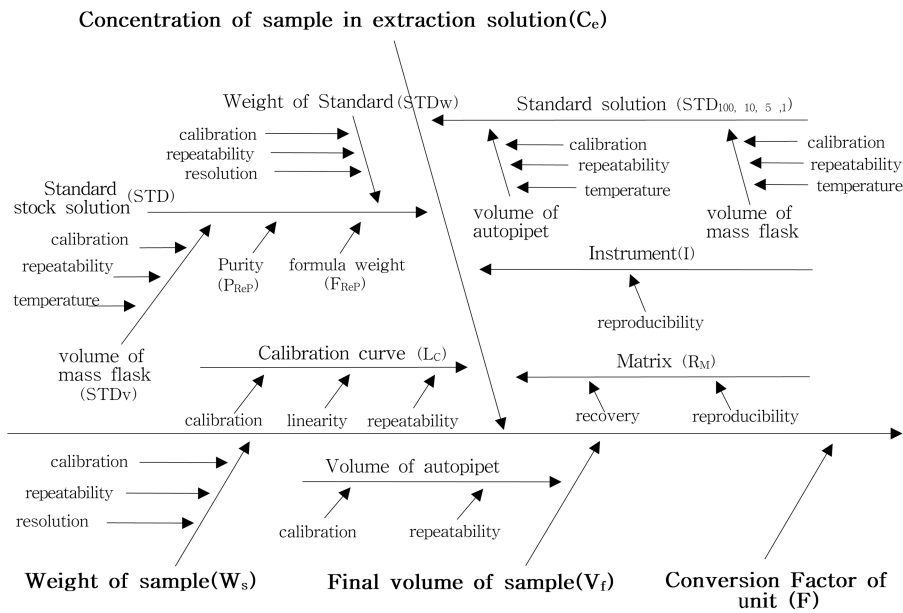
$C_s$  : Concentration of sample (mg/100 g)

$C_e$  : Concentration of sample in extraction solution (mg/L)  
 $V_f$  : Final volume of sample (mL)  
 $W_s$  : Weight of sample (g)  
 $F$  : Conversion Factor of Unit : (1700 x 1/3.33 )R.E.  
 (1000 mg = 1700000 IU), (1 R.E. = 3.33 Retinol IU)  
 $W_{Rs}$  : Resolution of weight of sample  
 $W_{Rp}$  : Repeatability of sample weight  
 $W_c$  : Calibration of sample weight  
 $P_{ReA}$  : Purity of retinol palmitate  
 $F_{ReA}$  : Formula weight of retinol palmitate  
 $STD$  : Standard stock solution

$STD_{100,10,5,1}$ : Standard 100 mg/L solution, 10 mg/L solution, 5 mg/L solution, 1 mg/L solution  
 $L_C$  : Linearity of calibration curve  
 $I_R$  : Reproducibility of instrument  
 $R_M$  : Recovery of matrix

**불확도 요인 및 산출방법**

본 실험에서는 반복 측정의 평균값을 측정값으로 사용할 경우, 표준불확도를 식 (4)를 적용하여 A type으로 구하였다. 무게 측정 시 저울의 안정성 등의 반복시험에 대한 불확도는 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 (5)과 (6)을 적용하여 A type 불확



**Fig. 1. Fish bone diagram of uncertainty sources in Vitamin A analysis.**

**Table 2. Uncertainty components associated with the analysis of Vitamin A by HPLC**

Parameter	Description	Source
$W_s$	$W_c$	Calibration
	$W_{Rp}$	Repeatability
	$W_{Rs}$	Resolution
$STD$	$STD_w$	Weight of standard
	$STD_{wC}$	Calibration
	$STD_{wRp}$	Repeatability
	$STD_{wRs}$	Resolution
$STD_v$	$STD_{vC}$	Calibration
	$STD_{vR}$	Repeatability
	$STD_{vT}$	Temperature
$F_{ReP}$		Formula weight of retinol palmitate
		Molecular weight
$C_e$	$STD_{100}$	Calibration
	$STD_{10}$	Repeatability
	$STD_5$	Temperature
	$STD_1$	Temperature
	$L_C$	Linearity of calibration curve
$I$	$I_R$	Estimation by instrument
		Reproducibility
$R_M$	$R_p$	Recovery of matrix
	$R_R$	Recovery
$V_f$		Calibration
$F$		Repeatability

도를 구하였다. 교정성적상의 표시된 불확도를 사용하는 경우나 반복 측정을 실시하지 않고 불확도를 산출하는 경우에는 표준불확도를 B type으로 구하였다. 자유도는 KOLAS에서 발간한 측정 결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침(12)에 따라 구하였다. 반복측정실험의 경우 불확도의 제한조건식은  $(\sum (x_i - \bar{x})) = 0$  뿐이므로 임의로 결정될 수 있는  $(x_i - \bar{x})$ 는  $n-1$ 개 이므로 자유도를  $n-1$ 로 계산하였고, 최소제곱방법에 의해 직선의 절편과 기울기를 결정하기 위하여  $n$ 개의 독립적인 관측값이 사용된 경우에는 절편 또는 기울기에 대한 표준불확도의 자유도를  $n-2$ 로 계산하였으며, 공통실험표준편차 산출에 따른 불확도 계산 시에는  $n$ 개의 관측값에 대한  $m$ 개의 파라미터가 존재할 경우의 자유도를  $n-m$ 으로 계산하였다.

최종결과의 합성표준불확도는 ISO guide(8,9)에 따라 측정된 각각의 표준불확도를 합성하여 식 (7)을 이용해 구하였으며, 확장 불확도는 포함인자  $k$ 와 계산된 합성표준불확도를 곱하여 식 (8)를 이용하여 구하였다. 이 때, 포함인자  $k$ 의 값은 식 (9)와 식 (10)을 이용하여 감응계수와 유효자유도를 구한 후 신뢰수준을 고려하여  $t$  분포도에서 그 값을 찾을 수도 있으나, 본 논문에서는 보다 신속하고 간단한 불확도 산정을 위해 상기 측정결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침(12) 및 EURACHEM/CITAC Guide(10)의 방법에 따라 95% 신뢰수준에서 포함인자  $k$ 값을 2로 기준하여 확장불확도를 계산하였다. 즉, 확장불확도를 계산하는 경우 측정의 유효자유도가 10이상 충분히 크도록 측정 계획을 수립하여  $k$ 의 값 2를 채택하여 사용하며, 다른  $k$ 값은 요구조건이 이미 설정되어 있거나 문서화되어 있는 경우에 한정하여 사용한 다는 명시를 기준으로 본 실험에서도 95% 신뢰수준에서 포함인자  $k$ 값 2를 기준으로 확장불확도를 계산하였다.

$$u(x_i) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

$$u(x_i) = \frac{s_p}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

$$s_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^M v_i s_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^M v_i}} \quad (6)$$

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) \quad (7)$$

$$U(y) = k u_c(y) \quad (8)$$

$$C_i \equiv \frac{\partial f}{\partial x_i} \approx \frac{\Delta y}{\Delta x_i} \quad (9)$$

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{[c_i u(x_i)]^2}{v_i}} \quad (10)$$

- $n$  : Number of measurements
- $s_p$  : Pooled standard deviation
- $U$  : Expanded uncertainty
- $k$  : Coverage factor
- $V_{eff}$  : Effective degree of freedom
- $v_i$  : Degree of freedom
- $C_i$  : Sensitive coefficient

## 결과 및 고찰

### 시료무게측정시 불확도

HPLC법에 의한 실험은 시료의 무게 약 2 g을 0.1 mg 까지 정밀히 측정하였다. Table 3에 나타낸 바와 같이 시료의 무게 측정 시 불확도는 저울에 대한 교정성적서상의 불확도, 저울 안정성 그리고 저울의 분해능 등이 불확도 요인으로 고려되었다. 즉, 시료의 무게 측정 시 저울에 대한 교정성적서상의 불확도는 95% 신뢰수준에서 0.00027 g의 불확도를 가지고 있으므로 표준불확도( $u(W_C)$ )는 0.000135 g (0.00027/2)가 된다. 저울 안정성은 분동을 2 g 이용하여 5반복으로 5일에 걸쳐 측정한 값들을 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 (5)와 (6)을 적용하여 A type 표준불확도( $u(W_{Rp})$ ) 0.000038 g을 구하였으며, 이때의 자유도는 반복측정 횟수 25회에서 5를 뺀 20이 된다. 또한 저울의 분해능은 0.0001 g이며 분해능에 대한 표준불확도( $u(W_{Rs})$ )는 0.000029 g (0.0001/2/√3)이다. 저울의 합성표준불확도( $u(W_s)$ )는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.000143 g이며, 상대표준불확도( $u(W_s)/W_s$ )는 0.000071 (0.000143 g/2.0154 g)이다.

### 표준용액 불확도

Table 4에 나타낸 것과 같이 제조사로부터 공급되는 표준품의 불확도( $u(STD_s)$ )는 표준품의 순도, 분자량에 의한 불확도를 합성하여 계산하였다. 우선, 표준품 순도의 불확도는 제조사로부터 공급되는 비타민 A 표준시약의 분석인증서에 순도에 대한 언급이 되어있지 않으며, 1 g의 all trans-retinol palmitate가 1,700,000 IU의 활성을 나타낸다고만 되어있어, purity는 100%로 가정하여 표준불확도( $u(P_{Rep})$ )는 0이며, 또한 상대표준불확도( $u(P_{Rep})/P_{Rep}$ )도 0(0/1)이다. 표준품의 분자량에 의한 불확도를 구하면, all trans-retinol palmitate의 분자량은 524.86이고, 분자구조식은  $C_{36}H_{60}O_2$ 로서 IUPAC에서 발표된 C, H, O 원자 1개의 불확도는  $\pm 0.008$ ,  $\pm 0.00007$ ,  $\pm 0.0003$ 이다(18). 따라서, 각 원자 1개에 대한 표준불확

Table 3. Uncertainty budget for the determination of  $W_s$

Parameter	Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Type of uncertainty
$(x_i)$	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	A or B
$W_c$	-	-	0.000135	-	B
$W_{Rp}$	2.0	20	0.000038	-	A
$W_{Rs}$	-	-	0.000029	-	B
$W_s$	2.0154	20	0.000143	0.000071	A

**Table 4. Uncertainty budget for the determination of  $C_e$**

Parameter	Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty	Type of uncertainty	
$(x_i)$	$x_i$	$\nu$	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{\sum \{u(x_i)/x_i\}^2}$	A or B	
STD	$P_{Rep}$	100.0	-	0.0000	0.00000	0.001551	B
	$F_{Rep}$	40.078	9	0.1663	0.00032		A
	$STD_w$	0.1	-	0.0001	0.00144		B
	$STD_v$	100	-	0.0489	0.00049		B
	STD	-	-	-	0.00155		-
$STD_{100}$	1	-	0.0010	0.00100	0.008380	A	
	10	9	0.0817	0.00817		B	
	STD <sub>100</sub>	-	-	-		0.00838	-
$STD_{10}$	1	-	0.0010	0.00100	0.008451	A	
	10	9	0.0042	0.00042		B	
	STD <sub>10</sub>	-	-	-		0.00845	-
$STD_5$	5	-	0.0015	0.00030	0.011761	A	
	10	9	0.0817	0.00817		B	
	STD <sub>5</sub>	-	-	-		0.01176	-
$STD_1$	2	-	0.0028	0.00141	0.014841	A	
	10	9	0.0817	0.00817		B	
$L_C$	2.4762	7	0.0331	0.01338	0.013382	A	
I	$I_R$	814319.83	5	0.0014	0.00000	0.000000	A
	$R_p$	0.9800	9	0.00195	0.00199	0.011949	A
$R_M$	4.9	-	0.05774	0.01178		B	
$C_e$	2.4762				0.026109		

도는 B 형 직사각형 분포를 가정하여  $\sqrt{3}$  으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.00004 g/mol, 0.00017 g/mol이며, 여기에 원자개수를 각각 곱하면 각 원자에 대한 표준불확도는 0.166276 g/mol, 0.002424 g/mol, 0.000346 g/mol이다. 분자량에 대한 표준불확도 ( $u(F_{Rep})$ )는 각 원자에 대한 표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하면 0.166295 g/mol이며, 상대표준불확도( $u(F_{Rep})/F_{Rep}$ )는 0.0003168 (0.166295 g/mol/524.86 g/mol)이 된다.

HPLC법에 의한 비타민 A 분석 시 표준품에서 0.1 g을 정확하게 계량하여 100 mL 메스플라스크에 희석하여 조제하였으므로, 모표준용액 조제 시 불확도는 표준품의 계량에 필요한 계량기의 불확도와 100 mL 메스플라스크 부피 측정에 대한 불확도를 고려해야 한다. Table 3에 나타냈듯이 표준불확도( $u(STD_{WC})$ )는 0.000135 g (0.00027/2), 표준불확도( $u(STD_{WR})$ )는 0.0000289 g이며, 저울 안정성은 분동을 0.1 g 이용하여 5반복으로 5일에 걸쳐 측정된 값들을 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 (5)와 (6)을 적용하여 A type 표준불확도( $u(STD_{WRp})$ ) 0.0000400 g이다. 저울의 합성표준불확도( $u(STD_w)$ )는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.0001437 g이며, 상대표준불확도( $u(STD_{WRp})/STD_{WRp}$ )는 0.0014373 (0.0001437 g/0.1000 g)이다. 100 mL 메스플라스크 부피 측정에 대한 불확도는 플라스크에 표시된 교정성적서상에 대한 불확도, 시험원의 눈금 읽기에 대한 측정반복성에 대한 불확도, 온도에 변화에 따른 물의 변화에 대한 불확도를 요인으로 고려하여 계산하였다. 먼저, 20°C에서 100 mL 메스플라스크의 tolerance의 값은  $\pm 0.08$ 로 B type의 삼각형 분포를 가정하여  $\sqrt{6}$  으로 나누면 표준불확도( $u(STD_{VC})$ )는 0.0326599 mL이다. 시험원의 눈금 읽기에 대한 측정반복성에 대한 불확도는 플라스크에 대한 10회 반복 부피 측정실험으로 측정된 표준편차는 0.0008947이며, 표준불확도( $u(STD_{VR})$ )는 0.0002829 mL(0.0008947/

$\sqrt{10}$ ) 이다. 실험실의 온도변화는  $\pm 3^\circ\text{C}$ 이며, 물의 부피 팽창계수는  $2.1 \times 10^{-4}$  이다. 온도변화에 따른 부피의 불확도는  $\pm V \times 3 \times 0.00021$ 이며, 직사각형 분포로 간주하여 이에 대한 표준불확도는 ( $u(STD_{VT})$ ) 0.0363731 mL이다. 플라스크의 합성표준불확도 ( $u(STD_V)$ )는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.048885 mL이 되며, 플라스크에 대한 상대합성표준불확도( $u(STD_V)/STD_V$ )는 0.0004889 (0.048885 g/100 g)이 된다. 따라서, 모표준용액 (STD)에 대한 상대합성표준불확도는 표준품의 순도, 분자량, 표준품계량, 플라스크에 대한 각각의 상대합성표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.001551이다.

$STD_{100}$ 는 모표준용액에서 1 mL 마이크로피펫을 이용하여 분취하고, 10 mL 메스플라스크에 희석하여 조제한다.  $STD_{100}$  조제시 불확도는 먼저, 모표준용액의 불확도, 모표준용액에서 1 mL 분취 시 불확도, 그리고 플라스크에 대한 불확도를 고려해야 할 것이다. 모표준용액의 상대합성표준불확도는 0.001509이며, 1 mL 마이크로피펫의 교정성적서상의 불확도가 95% 신뢰수준에서 0.002 이므로, 표준불확도는 0.001 mL (0.002/2)이고, 상대표준불확도 또한 0.001 (0.001 mL/1 mL)이다. 10 mL 플라스크에 대한 불확도는 메스플라스크의 tolerance의 값이  $\pm 0.2$ 로 B type의 삼각형 분포를 가정하여  $\sqrt{6}$  으로 나누면 표준불확도( $u(STD_{VC})$ )는 0.081649 mL이다. 시험원의 눈금 읽기에 대한 측정반복성에 대한 불확도는 플라스크에 대한 10회 반복 부피 측정실험으로 측정된 표준편차는 0.0052644이며, 표준불확도( $u(STD_{VR})$ )는 0.0016654 mL (0.0052644/ $\sqrt{10}$ )이며, 자유도는 측정횟수가 10회이므로 9이다. 실험실의 온도변화는  $\pm 3^\circ\text{C}$ 이며, 물의 부피 팽창계수는  $2.1 \times 10^{-4}$  이다. 온도변화에 따른 부피의 불확도는  $\pm V \times 3 \times 0.00021$ 이며, 직사각형 분포로 간주하여 이에 대한 표준불확도는( $u(STD_{VT})$ ) 0.0036373 mL이다. 플라스크의 합성표준불확도( $u(STD_V)$ )는 각 표

준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.0817476 mL이 되며, 플라스크에 대한 상대합성표준불확도( $u(\text{STD}_V)/\text{STD}_V$ )는 0.00817476 (0.0817476 mL/10 mL)이 된다. 따라서  $\text{STD}_{100}$ 의 상대합성표준불확도는 모표준상대합성표준불확도, 1 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도, 그리고 10 mL 플라스크에 대한 상대합성표준불확도의 제곱합의 제곱근으로 0.008380이다.

$\text{STD}_{10}$ 에 대한 불확도는  $\text{STD}_{100}$ 용액에서 1 mL 마이크로피펫을 이용하여 분취하고, 이를 전처리하여 최종부피를 10 mL로 함에 따라,  $\text{STD}_{100}$ 용액의 상대합성표준불확도, 1 mL 마이크로피펫, 10 mL (5 mL  $\times$  2)마이크로 피펫의 불확도를 불확도 요인으로 고려해야 한다. 먼저  $\text{STD}_{100}$ 용액의 상대합성표준불확도는 0.008380447이며, 1 mL 마이크로피펫은  $\text{STD}_{100}$ 용액조제 시 표현했듯이 상대표준불확도가 0.001이다. 최종부피 10 mL는 5 mL 마이크로피펫으로 2번 주입하므로, 5 mL 마이크로피펫의 교정성적서상의 불확도가 95% 신뢰수준에서 0.003이므로, 표준불확도는 0.0015 mL (0.003/2) 이고, 상대표준불확도는 0.0003 (0.0015 mL/5 mL)이다. 상대합성표준불확도는 각각의 5 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근으로 0.0004243이다. 따라서  $\text{STD}_{10}$ 의 상대합성표준불확도는  $\text{STD}_{100}$ 상대합성표준불확도, 1 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도, 그리고 10 mL 마이크로피펫에 대한 상대합성표준불확도의 제곱합의 제곱근으로 0.008451이다.

$\text{STD}_5$ 는  $\text{STD}_{10}$ 용액에서 5 mL 마이크로피펫을 이용하여, 10 mL 메스플라스크에 희석하여 조제한다.  $\text{STD}_5$  조제시 불확도는 먼저,  $\text{STD}_{10}$ 용액의 불확도, 5 mL 분취시 불확도, 그리고 10 mL 플라스크에 대한 불확도를 고려해야 할 것이다.  $\text{STD}_{10}$ 용액의 상대합성표준불확도는 0.00845055이며, 5 mL 상대표준불확도는 위에서 표현했듯이 0.0003이며, 또한 10 mL 플라스크에 대한 상대합성표준불확도는 0.00817476이다. 따라서  $\text{STD}_5$ 의 상대합성표준불확도는  $\text{STD}_{10}$ 용액의 상대합성표준불확도, 5 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도, 그리고 10 mL 플라스크에 대한 상대합성표준불확도의 제곱합의 제곱근으로 0.011761이다.

$\text{STD}_1$ 는  $\text{STD}_5$ 용액에서 2 mL 마이크로피펫을 이용하여, 10 mL 메스플라스크에 희석하여 조제한다.  $\text{STD}_1$  조제 시 불확도는 먼저,  $\text{STD}_5$ 용액의 불확도, 2 mL 분취 시 불확도, 그리고 10 mL 플라스크에 대한 불확도를 고려해야 하며,  $\text{STD}_5$ 용액의 상대합성표준불확도는 0.011761318이며, 2 mL 분취는 1 mL 마이크로피펫으로 2번 분취하므로 2 mL의 상대합성표준불확도는 1 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근으로 0.001414214이다. 10 mL 플라스크의 상대합성표준불확도 0.00817476이 되므로,  $\text{STD}_1$ 의 상대합성표준불확도는  $\text{STD}_5$ 용액의 상대합성표준불확도, 2 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도, 그리고 10 mL 플라스크에 대한 상대합성표준불확도의 제곱합의 제곱근으로 0.014841이다.

### 검량선 불확도

검량선은 희석된 3개의 표준용액 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L를 3회씩 반복 HPLC로 측정하여 작성하였으며, Fig. 2에 나타내었다. 검량선은 linear least square fitting(19)에 의해 식 (11)와 같이 나타낼 수 있으며, 식 (12)-(14)를 이용하여 검량선 작성의 표준불확도를 계산하면 표준불확도( $u(L_C)$ )는 0.0331 mg/L, 상대표준불확도( $u(L_C)/L_C$ )는 0.013382(0.0331 mg/L/2.4762 mg/L)이다. 검량선의 상관계수 0.9999로 나타났다.

$$A_j = B_1 \times C_j + B_0 \quad (11)$$

$$u(C_0) = \frac{s}{B_1} + \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (12)$$

$$s = \frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 \times C_j)]^2}{n-2} \quad (13)$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2 \quad (14)$$

$p$  : Number of measurements to determine

$n$  : Number of measurements for the calibration

$C_0$ : Concentration of retinol palmitate in the extraction solution

$\bar{C}$ : Mean value of the different calibration standards

$i$  : Index for the number of calibration standard

$j$  : Index for the number of measurements to obtain the calibration curve

### 기기측정시 불확도

기기 측정 시 불확도는 기기의 performance qualification의 reproducibility를 불확도 요인으로 고려하여, 검출된 peak의 area 값으로 산출하였다. 6회 반복 측정한 결과 평균 814319.83이며, 상대표준편차가 0.337% 이다. 표준불확도는 표준편차를  $\sqrt{6}$ 으로 나누어준 값 0.001374(0.00337/ $\sqrt{6}$ )이며, 상대표준불확도는 1.686  $\times 10^{-9}$ (0.001374/ 814319.83)이다.

### 매질에 의한 불확도

HPLC에 의한 비타민 A 분석의 경우 매질(matrix)에 의한 불확도는 회수율 재현성 불확도와 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구하였다. 비타민 A 함량이  $5.84 \pm 0.68$  mg/kg(분석인증서 함량)인 시료(조제분유 SRM 1846) 1g에 5 mg/L 농도의 표

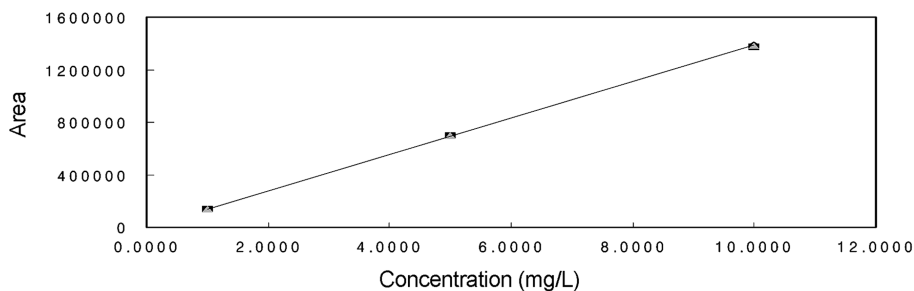


Fig. 2. Calibration curve of standards.

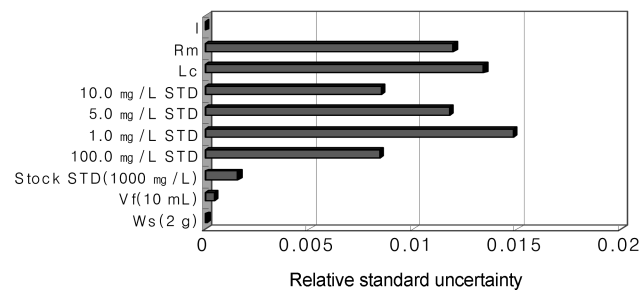
준물질을 1 mL 첨가한 회수율 실험을 10회 실시한 결과값에 시료 1g 의 비타민 A 함량(5.84 ± 0.68 µg/g)을 뺀 결과값이 평균 4.90 mg/L 로서(R<sub>p</sub>) 98.00%의 회수율을 보였다. 이 때 상대표준편차가 0.616%였으며, 따라서 회수율 재현성의 표준불확도(u(R<sub>p</sub>))는 표준편차를 으로 나누어준 값 0.00195 mg/L (0.00616/√10)이며, 상대표준불확도(u(R<sub>p</sub>)/R<sub>p</sub>)는 0.00199(0.00195 mL/0.9800 mL)이다. 회수율의 표준불확도(u(R<sub>R</sub>))는 첨가한 표준용액(5 mg/L)에서 회수율 측정결과와의 차이값인 0.10을 √3 으로 나누어준 값 0.05774 mg/L (0.10/√3)이며, 상대표준불확도(u(R<sub>R</sub>)/R<sub>R</sub>)는 0.01178 (0.05774 mL/4.9 mL)이다. 따라서, HPLC법의 매질(matrix)에 의한 상대합성표준불확도는 각 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근으로 0.011949이다.

**최종시험용액 부피 10 mL 불확도**

최종 시험용액 부피를 10 mL 로 할 때 표준불확도의 계산은 5 mL 마이크로 피펫의 2회 분취 주입에 대한 요인으로 고려되어, 5 mL 마이크로 피펫의 고정성적서상의 불확도가 95% 신뢰수준에서 0.003이므로, 표준불확도는 0.0015 mL(0.003/2)이고, 상대표준불확도는 0.0003(0.0015 mL/5 mL)이다. 상대합성표준불확도는 각각의 5 mL 마이크로피펫의 상대표준불확도의 제곱합의 제곱근으로 0.0004243이다.

**합성표준불확도**

위에서 구한 각 불확도인자의 상대표준불확도들을 합성하여 상대합성표준불확도(u(C<sub>s</sub>)/C<sub>s</sub>)를 계산한 결과 Table 5에 나타낸 것과



**Fig. 3. Contributions of uncertainty factors by HPLC.** I, Uncertainty of instrument; Rm, Uncertainty of matrix; Lc, linearity of calibration curve; Vf, final volume of sample; Ws, weight of sample.

**Table 5. Values and uncertainties for Vitamin A analysis by HPLC**

Parameter	Value	Degree of freedom	Combined standard uncertainty	Relative standard uncertainty
(x <sub>i</sub> )	x <sub>i</sub>	ν	u(x <sub>i</sub> )	u(x <sub>i</sub> )/x <sub>i</sub>
W <sub>s</sub>	2.0154	10	0.003143	0.000071
V <sub>f</sub>	10	9	0.004243	0.000424
C <sub>e</sub>	2.4762	-	-	0.026109
F	1700/3.33	-	-	-
C <sub>s</sub>	627.23	-	16.38	0.026112

**Table 6. Average results and uncertainties of Vitamin A in various weight of samples by HPLC analysis**

Approx. sample weight (g)	Analysis average result (µgR.E. / 100 g)	Expanded uncertainty	Uncertainty / Result (%)
1	622	48	7.7
2	627	33	5.2
5	491	23	4.6

같이 0.02611 (u(C<sub>s</sub>)/C<sub>s</sub>)이었다. 상대합성표준불확도를 시험결과값 627 µg R.E./100 g에 곱하여 합성표준불확도(u(C<sub>s</sub>))를 구한 결과 16.38 µg R.E./100 g으로 산정되었다.

**확장불확도 및 최종결과 표현**

위에서 계산된 불확도인자의 합성표준불확도에 포함인자 k=2 값을 곱하여 확장불확도를 계산한 결과 확장불확도(U(C<sub>s</sub>))는 32.76 µg R.E./100 g으로 산정되어, 최종 결과값은 각각 627 ± 33 µg R.E./100 g으로 표현되었다. 그리고 표준품 10 mg을 계량하여, 100 mg/L 농도로 조제하여 다시 적절한 농도로 희석하여 산출한 결과는 627 ± 49 µg R.E./100 g 이었다.

**불확도인자의 상대기여도**

측정불확도가 최종 시험결과값에 미치는 영향은 5.2%(627 ± 33 µg R.E./100 g)로 산정되었다. 포함된 모든 불확도인자의 상대 불확도가 최종 시험결과값에 미치는 영향은 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 STD<sub>1</sub>(0.014841), 검량선(0.012901), 매질(0.011949), STD<sub>5</sub>(0.011761), STD<sub>10</sub>(0.008451), STD<sub>100</sub>(0.008380), Stock STD(0.001551), 최종전량(0.000424), 기기불확도(0.000000002) 순으로 나타났다. 표준물질 제조 및 검량선 불확도가 결과값에 미치는 영향이 큰 것으로 나타난 것과 같이 표준물질 제조에 각별한 주의를해야 할 것으로 사료된다.

**각 시료량의 시험결과값 및 불확도**

각 시료 3반복 실험에 따른 평균 시험결과값 및 불확도를 Table 6에 정리하였다. 시료량이 증가함에 따라 불확도 값이 줄어들었음 알 수 있었는데, 시료 5 g 에 대한 결과값은 491 ± 23 µg R.E./100 g으로 1 g, 2 g 보다 현저히 낮은 결과값이 도출 되었다. 이는 시료 5 g의 경우에는 전처리 실험 시 식품공전에 명시되어 있는 시료량 즉, 20-30 IU(6-9 µg)에 해당하는 양을 초과하는 수준이어서 retinol palmitate에서 retinol로의 전환과정인 검화가 제대로 이루어지지 않아 낮은 결과값이 도출되었다고 사료된다.

**요 약**

HPLC를 이용하여 조제분유 중 비타민 A 함량을 분석 할 경우 표준품 분취량 및 시료의 샘플 분취량에 따라 달라지는 불확도 크기를 산정하기 위하여, 분석결과에 영향을 주는 여러 가지 불확도 인자를 파악하고 각각의 불확도를 계산하였다. 계산은

GUM과 Draft EURACHEM CITAC Guide에 근거한 수학적 계산 및 통계처리 방법에 의해 처리하였다. 측정 불확도의 원인으로서는 측정량 계산에 사용되는 시료의 무게, 시료의 최종전량, 그리고 기기에 의한 측정결과값 등이 작용하였다. 측정 불확도 원인의 개별구성요소는 저울의 안정성, 분해능, 재현성, 표준액의 순도, 분자량, 농도, 표준액 희석, 검정선, 회수를 그리고 분석기기의 재현성 등이 작용하였으며, 반복측정된 값을 통계적인 방법에 의해 구할 수 있는 불확도는 A type, 그리고 교정성적서, 제조자의 시방서, 공개된 정보 및 상식에서 얻을 수 있는 모든 정보를 이용하여 구할 수 있는 불확도는 B type으로 구분하여 불확도를 산정하였다.

표준품을 100 mg 계량하여 1,000 mg/L 로 제조하고 다시 적절한 농도로 희석하여 산출한 결과는  $627 \pm 33 \mu\text{g R.E./100 g}$  이었고, 10 mg을 계량하여 100 mg/L 로 제조하여 산출한 경우는  $627 \pm 49 \mu\text{g R.E./100 g}$  으로 측정 및 계산되었다. 시료량을 약 1 g, 2 g, 또는 5 g으로 차등을 준 결과 및 불확도는 각각  $622 \pm 48$ ,  $627 \pm 33$ ,  $491 \pm 23 \mu\text{g R.E./100 g}$  으로 나타났다. 시료량이 커짐에 따라 불확도의 값이 적어지나 시료 5 g의 경우에는 결과값에 이상이 있음을 알 수 있듯이, 정확한 분석을 위해 식품공전에 명시되어 있는 시료량을 취하는 것에 주의해야 할 것이다.

비타민 A 함량 분석의 결과값에 영향을 주는 주요인자로 전처리 과정중의 검화와 액액분배 과정으로 파악되었으며, 이는 시험자의 숙련도에 따라 결과값의 편차가 발생할 수 있는 실험단계이다. 본 연구에서는, 회수를 실험의 결과와 인증표준물질의 표기값에 만족하였으므로, 검화와 액액분배에서 발생할 수 있는 오차를 최소화시킨 결과값을 도출 한 것으로 사료된다. 따라서 정확한 결과값을 도출하기위해 분석자의 숙련도 향상에 충분한 고찰이 필요할 것이다. 또한 도출된 결과값이 갖는 불확실성을 나타내는 측정불확도는 시료의 전처리 및 기기분석을 통하여 결과를 도출하는 과정 중 발생할 수 있는 모든 불확도인자를 산출하여 합성하였다.

본 연구의 결과에 의하면, 비타민 A의 정확한 분석결과를 산출하고 불확도를 최소화하기 위해 표준품은 0.1 g을 계량하여 적절한 농도로 희석 사용해야하며, 시료량은 조제분유의 경우 약 2 g 정도 취하여 vitamin A를 검화하고 추출해야함을 알 수 있었다. 즉, 검화 플라스크에서 검화를 할 경우의 시료량은 vitamin A 함량에 따라 그 시료량을 달리하여 분석을 수행하여야 한다. 그리고 USP(retinyl acetate 30 mg/g) 표준품과 같이 농도가 낮은 표준품의 경우에는 최소한 0.1 g 이상을 계량하여 모용액을 제조하여 사용하여야 표준용액 제조 및 검량선에 의한 오차를 최소화할 수 있을 것으로 사료된다.

측정불확도에 대하여 시험자가 시험수행시마다 파악하고 계산하기란 시간적, 인력적 제약과 업무효율적 측면에서 현실적으로 어려운 점이 많으나, 본 연구에서와 같이 시험과정 중의 분석오차 발생인자들을 파악하고 이중 영향이 큰 주요인자들을 집중 관

리하여, 그 인자들을 최소화하는 방법을 끊임없이 모색하여야 최종 시험 결과의 오차를 크게 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

## 문 헌

1. Korea Food and Drug Administration. Food standards codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea (2007)
2. Official CODEX Standards. CODEX standard for infant formula. CODEX STAN 72, CODEX Alimentarius Commission, FAO/WHO, Geneva, Switzerland (1981)
3. The Korea Nutrition Society. Dietary reference intakes for Koreans. The Korea Nutrition Society. Seoul, Korea. pp. 83-91. (2005)
4. Korea Food and Drug Administration. Food standards Codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea. pp. 971-973. (2007)
5. Korea Food and Drug Administration. Food standards codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea. pp. 973-974. (2007)
6. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18<sup>th</sup> ed. Method 992. 04. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersbrug, MD, USA (2005)
7. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18<sup>th</sup> ed. Method 992. 06 Association of Official Analytical Chemists, Gaithersbrug, MD, USA (2005)
8. ISO. Guide to the expression of uncertainty in measurements. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland (1993)
9. NIST. Guideline for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results. NIST Technical Note 1297, NIST, Gaithersbrug, MD, USA (1993)
10. EURACHEM. Quantifying Uncertainty in analytical measurements 2<sup>nd</sup>. EURACHEM, London, UK (1999)
11. KRISS. Guide to the Expression of uncertainty in measurement. KRISS, Daejeon, Korea (1998)
12. Korea Laboratory Accreditation Scheme. Guideline for quantifying and expressing the uncertainty in measurement results. Korea Laboratory Accreditation Scheme, Daejeon, Korea (2000)
13. 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. Korea Chem. Soc. 20: 910-916 (1999)
14. 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)
15. Jun JY, Kwak BM, Ahn JH, Kong UY. Quantifying uncertainty of calcium determination in infant formula by AAS and ICP-AES. Korean. J. Food Sci. Technol. 36: 701-710 (2004)
16. Kim SH, Kwak BM, Ahn JH, Kong UY. Uncertainty of peroxide value determination in fat in follow up formula. Korean. J. Food Sci. Technol. 36: 885-892 (2004)
17. Jun JY, Kwak BM, Ahn JH, Kong UY. Quantifying uncertainty of vitamin C determination in infant formula by indophenol titration method. Korean. J. Food Sci. Technol. 37: 352-359 (2005)
18. IUPAC. IUPAC commission on atomic weight and isotopic abundances. J. Pure Appl. Chem. 69: 2471-2473 (1997)
19. Danzer K, Currie LA. Guidelines for calibration in analytical chemistry. J. Pure Appl. Chem. 70: 993-1014 (1998)