pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 36, No. 1, pp. 34~41 (2021)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2021.36.1.34

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

GC-FID를 이용한 조제유류 중 지방산 분석법 개선 연구

황금희 · 최원희 · 허수정 · 이혜영 · 황경미*
식품의약품안전평가원 영양기능연구과

Improvement of Analysis Methods for Fatty Acids in Infant Formula by Gas Chromatography Flame-Ionization Detector

Keum Hee Hwang, Won Hee Choi, Soo Jung Hu, Hye young Lee, Kyung Mi Hwang*
Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongju, Korea

(Received July 24, 2020/Revised September 24, 2020/Accepted December 31, 2020)

ABSTRACT - The purpose of this research is to improve analysis methods of determining the contents of fatty acids in infant formulas and follow-up formulas. A gas chromatography (GC) method was performed on a GC system coupled to flame ionization detector, with a fused silica capillary column (SP2560, 100 m×0.25 mm, 0.20 μm). The method was validated using standard reference material (SRM, NIST 1849a). Performance parameters for method validation such as specificity, linearity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), accuracy and precision were examined. The linearity of standard solution with correlation coefficient was higher than 0.999 in the range of 0.1-5 mg/mL. The LOD and LOQ were 0.01-0.06 mg/mL and 0.03-0.2 mg/mL, respectively. The recovery using standard reference material was confirmed and the precision was found to be between 0.8% and 2.9% relative standard deviation (RSD). Optimized methods were applied in sample analysis to verify the reliability. All the tested products had acceptable contents of fatty acids compared with component specification for nutrition labeling. The result of this research will provide efficient experimental information and strengthen the management of nutrients in infant formula and follow-up formula.

Key words : Fatty acid, GC analysis method, Infant formula

지질은 식품 및 식품 성분의 물리·화학적 및 관능적, 영양적 측면에 기여하는 다양한 복합체이다. 자연계에서 대부분의 지질은 지방산과 글리세롤 분자가 에스테르 결합한 중성지방(triacylglycerol, TAG) 형태로 존재하며 중성지방을 구성하는 지방산의 종류와 양에 따라 다양한 성질을 나타낸다. 식품 중 지질은 인체에 1 g당 9 kcal의 에너지를 공급할 수 있으며 생체 내에서 지용성 비타민 A, D, E, K의 운반체 역할을 하고 필수지방산을 제공한다[1-3]. 지방산은 중성지방의 96 mol%를 차지하는 주요 구성 물질이며 공통적으로 비극성의 탄화수소 사슬과 하나의 카르복실기 말단을 갖는다. 탄소수 및 이중결합의 수와 위치에 따라 다양한 종류의 지방산이 존재하며 대부분 이중결합의 유무에 따라 포화지방산과 불포화지방산으로 분류한다[4,5].

지방산 분석법은 일반적으로 가스크로마토그래피(gas chromatography, GC)를 이용하는 방법이 널리 알려져 있으며[6-8], AOAC의 분석법에는 식품 유형에 따라 조지방을 추출한 후 지방산 조성에 대해 GC로 분석하는 방법(AOAC 996.06)[8]이 소개되고 있다. 또한 ISO의 분석법에는 유제품 및 치즈 등에 대하여 펜탄, 디에틸에테르를 이용해 지방추출한 뒤 KOH용액을 사용하여 상온 유도체화한 후 GC로 분석하는 방법(ISO/IDF 172, 182, 184)[10-12]이 소개되고 있다. 식품공전 시험법[13]은 우유 및 유제품에 대해 식품 중 지방을 산분해 및 염기분해하여 디에틸에테르, 석유에테르 등을 이용해 추출한 뒤 7% BF_3용액을 사용하여 지방산을 가열 유도체화하고 GC로 분석하는 방법이 제시되어 있다. 식품공전 시험법은 전처리가 복잡하고 시간이 오래 걸리는 요소들이 있어 다양한 식품에 적용될 수 있는 용이한 지방산 분석 방법의 검토가 필요하다.

*Correspondence to: Kyung Mi Hwang, Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongju 28159, Korea
Tel: +82-43-719-4405, Fax: +82-43-719-4420
E-mail: sprite11@korea.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

현재 「식품의 기준 및 규격」 (식품의약품안전처 고시 제2018-98 호)에서는 지방산에 대해 조제유류 중 영아용·성장기용조제식의 경우 linoleic acid를 300 mg/100 kcal 이상 포함하며, 조제유류 중 영아용 조제유와 영아용 조제식의 경우 α-linolenic acid를 50 mg/100 kcal 이상 포함하고 linoleic acid와 α-linolenic acid의 비율이 5:1-15:1이 되도록 설정하고 있다. 한편 시중에서 유통되고 있는 조제유류에는 linoleic acid와 α-linolenic acid 외에도 필수지방산인 arachidonic acid 또는 ω-3 fatty acids 등을 높은 비율로 함유하고 있다[14,15]. 이에 따라 조제유류 중 지방산 함량 관리를 위해서는 기준·규격 신설에 대비하여 시험법의 개선과 검토가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 최신 지방산 분석법을 검토하고 시험법 검증 가이드라인을 참고하여 밸리데이션을 수행한 후 식품에 대한 적용성을 확인하여 분석법을 확립하고자 한다.

Materials and Methods

실험재료

본 연구에 사용된 조제유류 및 조제식 총 12종은 식품의약품안전처에 신고된 품목제조보고서(2018)를 확인하여 선정하였다. 이 중 생산이 중단되거나 품목제조보고가 중복된 제품을 시험대상에서 제외하였다. 먼저 제품유형별로 시료를 구분하고, 생산량 통계자료를 활용하여 제조사별 상위 제품을 선정하였다. 최종적으로 선정된 시료는 영아용 조제유, 성장기용 조제유, 영아용 조제식, 성장기용 조제식 각각 3품목으로 총 12품목이었으며, 국내 인터넷 판매 사이트를 통하여 구매하여 실험에 사용하였다(Fig. 1). 이 중 생산량이 가장 높은 영아용 조제유 1종을 표본으로 하여 시험법 검토 및 유효성 검증을 실험하였으며 이를 포함한 12종에 대해 시험법 적용성 검사를 하였다. 표준인증물질은 NIST사(Gaithersburg, MD, USA)에서 판매하는 SRM 1849a (Infant formula)를 구매하여 분석에 사용하였다.

표준물질 및 시약

지방산의 표준물질 중 fatty acid methyl ester (FAME, 37 Component FAME MIX, CRM47885) 혼합 표준품은 Supelco사(St. Louis, MO, USA), linoleic acid ($C_{18:2}$), α-linolenic acid ($C_{18:3}$)의 표준물질은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 내부표준물질인 triundecanoin ($C_{11:0}$)은 Nu-Check prep사(Elysian, MN, USA)의 것을 사용하였다. 피로갈롤, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 무수황산나트륨, 14% BF_3-MeOH, 디에틸에티르, 무수 석유에테르, 에탄올, 클로로포름, 톨루엔, 헥산, 펜탄은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 분석에 사용되는 증류수는 3차 증류수로 18.0 MΩ 이상인 것을 사용하였다.

내부표준용액의 조제

상대면적비를 통한 지방산 정량을 위해 triundecanoin (C11:0) 0.01 g을 클로로포름 10 mL에 녹여 1 mg/mL의 농도가 되도록 하고 다시 클로로포름으로 0.2 mg/mL의 농도가 되도록 희석하여 내부표준용액으로 사용하였다.

표준용액의 조제

혼합 지방산 메틸 에스테르(FAME mixture 37종)는 용액 제조과정 없이 그대로 사용하였다. Linoleic acid ($C_{18:2}$), α-linolenic acid ($C_{18:3}$)의 경우 각각 0.1 g을 클로로포름 10 mL에 녹여 10 mg/mL의 농도가 되도록 하여 표준원액으로 하고, 다시 클로로포름으로 희석하여 0.1-5 mg/mL의 농도가 되도록 하여 표준용액으로 사용하였다.

전처리 방법

식품공전법에 의한 전처리

지방 추출시 사용되는 시험기구를 마조니어관[13]과 시험관[16,17]으로 하여 비교실험하였다. 표본시료에 대해 균질화된 검체를 약 50-100 mg의 지방을 포함하는 양으로 칭량

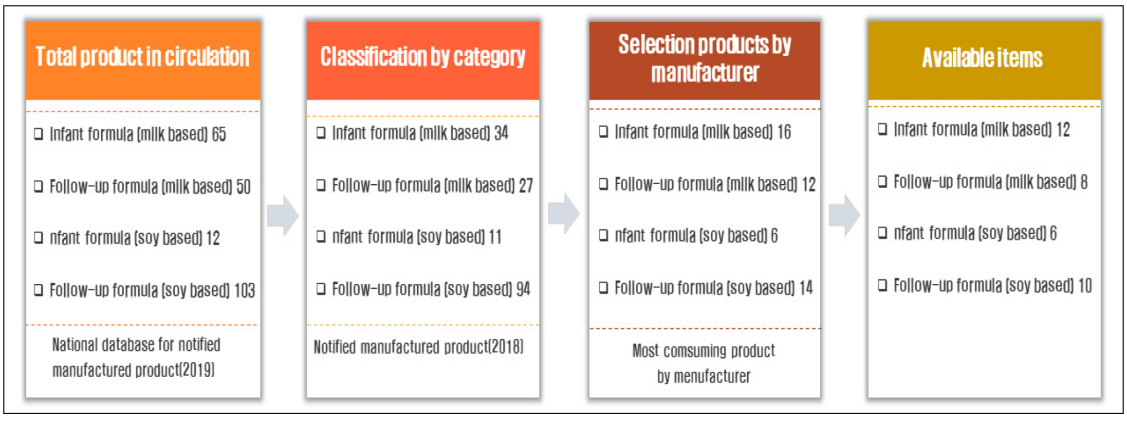

Fig. 1. Sample selection process on the applicability of analytical method for commercial infant and follow-up formula.

하여 마조니어관에 넣고 약 50 mg의 피로갈롤을 첨가한 후, 1 mL의 내부표준용액을 첨가하였다. 마조니어관에 끓임쪽을 넣고 1 mL 에탄올을 첨가하여 혼합하였다. 2 mL의 물, 1 mL의 수산화암모늄을 첨가하여 교반하고 마개를 밀봉한 후, 75°C의 수조에서 10분간 분해하고 5분마다 교반기로 혼합하였다. 분해 후 페놀프탈레인 용액을 몇 방울 넣고 염기성(분홍색)이 유지될 수 있도록 수산화암모늄을 첨가하였다. 에테르 추출 시 분액이 용이하도록 에탄올을 첨가하여 혼합하였다. 이후 분해물에 12.5 mL 디에틸에테르를 첨가하고 5분간 진탕하여 추출하였다. 12.5 mL의 무수 석유에테르를 추가하여 5분간 다시 진탕 추출하고 50 × g에서 5분간 원심분리하였다. 15 mL 시험관에 에테르 층을 분액한 후 질소를 사용하여 35-40°C 수조에서 에테르를 증발시켰다. 이후 기기분석에 용이하도록 methylation을 진행하였다. 앞에서 추출한 지방에 3 mL 클로로포름과 3 mL 디에틸에테르를 첨가해 추출한 지방을 녹인 후 40°C 수조에서 질소 농축하고 2 mL의 7% 트리플루오로보란메탄올 용액과 1 mL의 톨루엔을 첨가하였다. 100°C 오븐에서 45분간 가열한 후 실온으로 냉각하였다. 물 5 mL, 헥산 1 mL 및 무수 황산나트륨 약 1 g을 첨가한 후 진탕하여 정치하고 분리된 상층액을 취하여 약 1 g의 무수 황산나트륨을 담은 다른 바이알(vial)에 넣고 탈수하여 분리하였다. 이와 비교하기 위해 시험관을 이용해 같은 방법으로 실험하였다.

ISO법에 의한 전처리

지방 추출은 표본시료에 대해 검체 1 g을 취해 물에 용해하고 내부표준물질을 첨가하였다. 60°C 수조 상에서 30분간 반응한 후 냉각하였다. 분액깔때기에 10 mL의 시료용액과 8 mL의 에탄올, 1 mL의 수산화암모늄을 첨가한 후 혼합하였다. 10 mL의 디에틸에테르와 펜탄을 차례로 넣고 진탕 추출한 후 감압농축기를 이용하여 용매를 제거하였다. 유도체화는 추출한 지방 100 mg을 시험관에 취해 10 mL의 n-펜탄을 이용해 용해하고 KOH 용액 0.4 mL을 첨가 후 1분간 혼합하였다. 5분간 상온에서 반응시킨 후 1 g의 무수황산나트륨을 첨가하고 혼합하였다. 상온에서 3분간 원심분리 후 상층액을 분리하였다.

Gas choromatography(GC) 분석을 이용한 지방산 조성 분석

지방산 분석에는 Flame Ionization detector (FID)가 장착된 가스크로마토그래프(Gas chromatograph) (7890B Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 분석칼럼으로는 SP2560 (100 m × 0.25 mm, 0.2 μm Film thickness, Supelco, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 주입량은 1 μL로 주입구의 온도는 225°C로 하였고 split mode로써 split ratio는 200:1로 하였다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였으며 flow rate는 0.75 mL/min으로 하였다. 오븐의 온도는 100°C에서 4분간 유지한 후 3°C/min의 비율로 240°C까지 온도를 승온시키고 이후 15분 이상 유지하였다. 검출기의 온도는 285°C로 하였다. 이때 시험법 적용 판별은 식품공전 식품의 기준 및 규격 중 특수용도 식품(조제유류, 영아용 조제식, 성장기용 조제식)에 대한 기준·규격이 있는 linoleic acid 및 α-linolenic acid를 함량 및 비율을 기준으로 하였다 (Table 1). 또한 기준 규격의 단위 mg/kcal에 대하여 함량 비교를 위해 조제유류의 100 mL당 열량(Kcal)과 조유량(g)을 고려하여 g/100 g의 농도수준으로 환산하였다.

분석법 유효성 검증

조제유류 중 지방산 분석법에 대한 유효성을 검증하기 위하여 AOAC 시험법 검증 가이드라인에서 제시하는 방법[18]에 따라 표본시료를 사용하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection)와 정량한계(limit of quantification), 정확성(accuracy), 정밀성(precision)을 구하였다. 이때 식품의 기준 및 규격 중 특수용도 식품(조제유류, 영아용 조제식, 성장기용 조제식)에 대한 기준 규격이 있는 linoleic acid 및 α-linolenic acid를 기준으로 하였다. 직선성을 확인하기 위하여 5개 농도의 지방산 표준용액을 GC로 측정하여 얻은 각각의 피크 면적으로부터 검량선을 작성하였다. 정확성은 표준인증물질인 SRM

Table 1. Linoleic acid and α-linolenic acid requirements in standard for infant and follow-up formula according to Korea Food Code

Type	Linoleic acid ($C_{18:2}$)		α-Linolenic acid ($C_{18:3, n-3}$)		Ratio of linolenic acid and α-linolenic acid
	(mg/100 kcal)	(g/100 g)	(mg/100 kcal)	(g/100 g)	
Infant formula (milk based)	Min. 300 Max. 1400	Min. 1.5 Max. 7	Min. 50	Min. 0.25	5:1-15:1
Follow-up formula (milk based)	Min. 300	Min. 1.5	Min. 50	Min. 0.25	-
Infant formula (soy based)	Min. 300	Min. 1.5	Min. 50	Min. 0.25	5:1-15:1
Follow-up formula (soy based)	Min. 300	Min. 1.5	-	-	-

1849a (Infant formula)를 이용하여 회수율을 구하여 확인하였고, 정밀성은 시료량을 달리하여 반복성(repeatability)을 측정하였으며, 실험실간 비교시험을 통한 재현성(reproducibility)을 relative standard deviation (%RSD)으로 나타내었다. GC분석을 통해 검출된 시험용액 중 각 지방산 메틸 에스테르의 피크는 표준물질과 피크의 retention time을 비교하여 확인하였다. 분석된 데이터는 지방산 메틸 에스테르에 대한 결과이므로 탄소계수를 대상으로 각각의 전환계수를 계산하여 지방산 100 g당 함량으로 전환하였다.

유통 제품 중 적용성 확인

분석법 검증을 통하여 확립된 방법으로 시중에 유통 중인 조제유류 및 조제식 12건에 대한 지방산 함량을 확인하였다. 분석을 통한 linoleic acid 및 α-linolenic acid 함량과 제품의 표시량을 비교하였고 기준·규격에 적합하여 시험법이 유효한지를 판단하였다.

통계처리

분석 결과는 3회 반복하여 얻었으며 평균값과 표준편차, 상대표준편차를 계산하였다. 통계처리는 SPSS[19]를 통해 시험법 비교를 통한 linoleic acid 및 α-linolenic acid 함량에 대해 t-test를 $P<0.05$ 수준에서 수행하였다.

Results and Discussion

시험법 검토

본 실험에 사용된 지방산 시험법은 조제유류 중 지방을 염기 분해하여 에테르로 추출하고 트리플루오로보란메탄올 용액으로 지방산을 메틸 에스테르화하여 가스크로마토그래프를 이용해 분석한 후 개별 지방산의 함량 및 대표적인 지방산의 합을 계산하는 분석법이다. 식품공전에 따르면 지방을 추출할 때 마조니어관을 사용하는 방법이 제시되어 있으나 가열 과정 중 안전상의 문제나 결과의 재현성에 다소 미흡한 점이 있어 지방 추출에 사용되는 시험기구의 변경의 필요성이 대두되어 시험관을 사용하는 시험법과 비교 실험하여 그 결과를 Table 3에 제시하였다. 마조니어관 또는 시험관을 사용한 경우, 검체 중 linoleic acid의 표시량 대비 함량은 각각 111.3%, 113.8%이었으며 상대표준편차(%RSD)는 2.90%, 1.08%로 확인되었다. 또한 α-linolenic acid의 표시량 대비 함량은 각각 119.0%, 119.8%이었으며 상대표준편차(RSD%)는 2.85%, 1.07%로 확인되었다. 그 결과, 마조니어관 또는 시험관을 사용한 전처리 방법에 따른 두 지방산의 함량값에는 유의적인 차이가 없었으나 ($P>0.05$) 상대표준편차가 낮고 보다 간편하고 안전한 시험관을 사용하는 방법을 선정하였다(Table 2). 또한 지방 추출 및 유도체화 과정에서 시약과 가열 여부가 다른 식품공전 시험법과 ISO 시험법을 비교하였다. 그 결과, 유도체화방법에 따른 두 지방산의 함량값에는 유의적인 차이가 없었으나($P>0.05$) 가열 유도체화하는 식품공전 시험법의 경우 시료 중 함량에 대한 상대표준편차가 linoleic acid와 α-linolenic acid 각각 0.87%, 0.47%로 나타났으며 상온 유도체화하는 ISO시험법은 linoleic acid와 α-linolenic acid 각각 8.43%, 7.81%로 확인되었다. 또한 실험에 소요되는 시간도 식품공전 시험법의 경우 2시간 이내, ISO 시험법은 3시간 이내로 보다 효율적인 식품공전 시험법의 가열검화방법을 선정하였다.

시험법 확립

전처리 방법

균질화된 검체를 약 50-100 mg의 지방을 포함하는 양으로 칭량하여 시험관에 넣고 약 50 mg의 피로갈롤을 첨가한 후, 1 mL의 내부표준용액을 첨가한다. 시험관에 끓임쪽을 넣고 1 mL 에탄올을 첨가하여 혼합한다. 2 mL의 물,

Table 2. Comparison of fatty acid content in infant formula extracted using different apparatus for fat extraction (*n=3*)

Apparatus	Analyte	Labeled (g/100 g)	Measured (g/100 g)	Recovery (%)	RSD (%)
Mojonnier	Linoleic acid	3.57	3.97	111.3	2.90
	α-linolenic acid	0.41	0.49	119.0	2.85
Glass tube	Linoleic acid	3.57	4.06	113.8	1.08
	α-linolenic acid	0.41	0.49	119.8	1.07

Table 3. Comparison of the fatty acid content in infant formula saponificated by the two methods (*n=3*)

Method	Analyte	Labeled (g/100 g)	Measured (g/100 g)	Recovery (%)	RSD (%)
MFDS method	Linoleic acid	3.57	4.10	115.0	0.87
	α-linolenic acid	0.41	0.48	117.6	0.47
ISO/IDF method	Linoleic acid	3.57	3.93	110.0	8.43
	α-linolenic acid	0.41	0.47	113.3	7.81

1 mL의 수산화암모늄을 첨가하여 교반하고 마개를 밀봉한 후, 75°C의 수조에서 10분간 분해하고 5분마다 교반기로 혼합한다. 분해 후 페놀프탈레인 용액을 몇 방울 넣고 염기성(분홍색)이 유지될 수 있도록 수산화암모늄을 첨가하였다. 에테르 추출 시 분액이 용이하도록 에탄올을 첨가하여 혼합한다. 이후 분해물에 12.5 mL 디에틸에테르를 첨가하고 5분간 진탕하여 추출한다. 12.5 mL의 무수 석유에테르를 추가하여 5분간 다시 진탕 추출하고 50 × g에서 5분간 원심분리한다. 15 mL 시험관에 에테르 층을 분액한 후 질소를 사용하여 35-40°C 수조에서 에테르를 증발시킨다. 추출한 지방에 3 mL 클로로포름과 3 mL 디에틸에테르를 첨가해 추출한 지방을 녹인 후 40°C 수조에서 질소농축하고 2 mL의 7% 트리플루오로보란메탄올 용액과 1 mL의 톨루엔을 첨가한다. 100°C 오븐에서 45분간 가열한 후 실온으로 냉각한다. 물 5 mL, 헥산 1 mL 및 약 무수 황산나트륨 1 g을 첨가한 후 진탕하여 정치하고 분리된 상층액을 취하여 약 1 g의 무수 황산나트륨을 담은 다른 바이알(vial)에 넣고 탈수하여 분리한다.

Table 4. Gas chromatograph conditions for fatty acids analysis

Parameter	Condition
Column	SP-2560 (100 m × 0.25 mm × 0.2 μm)
Oven temperature	100°C (5 min) - 4°C/min - 240°C (20 min)
Carrier gas, flow rate	He, 0.75 mL/min
Detector temperature	285°C
Injection temperature	225°C
Injection volume	1 μL
Split ratio	200 : 1

Gas choromatography(GC) 분석을 이용한 지방산 조성 분석

지방산 조성 분석은 FID (Flame Ionization detector)가 장착된 가스크로마토그래프(Gas chromatograph)를 사용하며, 기기 조건(Table 4)에 따라 진행한다.

분석법 검증

특이성

GC분석을 통해 검출된 시험용액 중 각 지방산 메틸 에스테르의 피크는 표준물질과 피크의 retention time을 비교하여 확인하였다. 검토한 결과 표준용액과 시험용액에서 동일한 시간대에 피크가 형성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

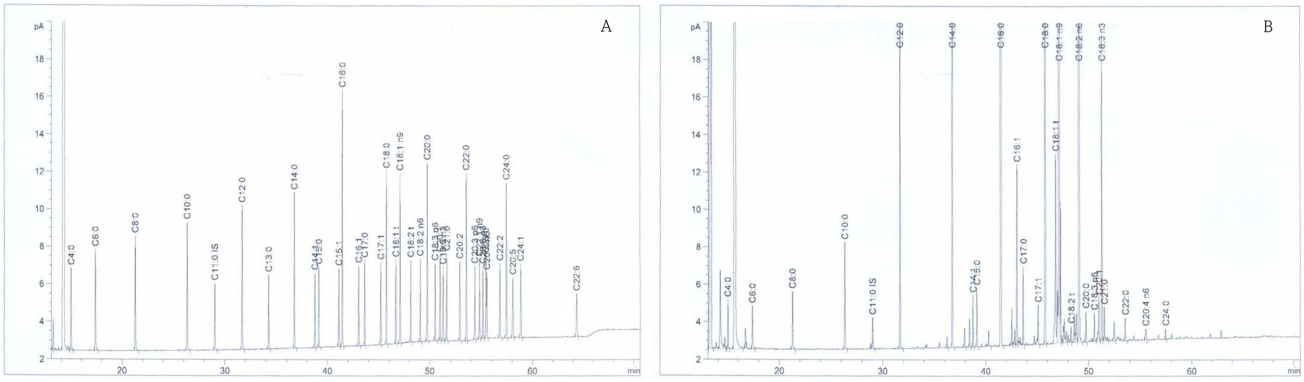

Fig. 2. GC chromatograms of fatty acid of standard solution (A) and infant formula (B).

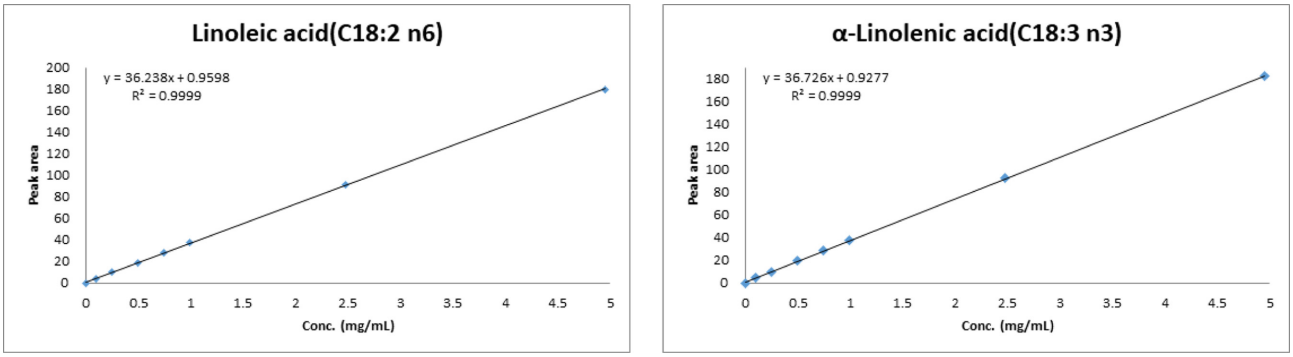

Fig. 3. Linearity of linoleic acid and α-linolenic acid.

직선성

지방산 표준물질(Linoleic acid, α-Linolenic acid)을 클로로포름으로 희석하여 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 1, 2.5, 5 mg/mL의 농도범위에서 피크면적과 표준물질의 농도에 대한 표준그래프의 직선성을 검토한 결과 R^2값이 0.999 이상으로 확인되었다(Fig. 3).

검출한계 및 정량한계

AOAC 시험법 검증 가이드라인에서 제시하는 방법[18]을 참고하여 GC의 분석조건에 따라 linoleic acid 및 α-linolenic acid 표준물질 검량선의 기울기(S) 및 표준편차를 이용하여 표준편차에 3.3배를 곱한 값을 기울기로 나눈 것을 검출한계(검출한계 = 3.3 × δ/S), 10배를 곱한 것을 정량한계(정량한계 = 10 × δ/S)로 하였다. Linoleic acid 및 α-linolenic acid의 검출 한계는 각각 0.06 mg/mL, 0.01 mg/mL이며 정량 한계는 각각 0.16 mg/mL, 0.03 mg/mL로 나타났다(Table 5).

정확성

정확한 함량정보를 알고 있는 표준인증시료(NIST 1849a)를 이용하여 정확도를 확인하였으며, 5회씩 반복 측정하였다. 그 결과, linoleic acid 및 α-linolenic acid의 회수율은 각각100.8%와 101.1%였고, 이때의 RSD값은 각각 0.6%와 0.7%로 확인되었다(Table 6).

정밀성

표본시료를 이용하여 검체량에 따른 반복성과 실험실간 재현성으로 정밀성을 확인하였다. 반복성은 검체량을 달리 취하여 각각 5회 반복한 분석 결과에서 측정값에 대한 상대표준편차(%RSD)를 이용하여 확인하였다. 표본시료 0.5 g, 1.0 g, 1.5 g에 해당하는 검체를 취하여 5회 반복 측정한 결과 결과값의 상대표준편차(%RSD)가 linoleic acid는 각각 0.8-2.9%, α-linolenic acid는 각각 1.1-2.7%로 나타났다(Table 7). 결과적으로 각각의 시료량에 대해 상대표준편차 5% 이내에서 범위가 나타나 정밀성은 유효한 것으로 확인할 수 있었다.

재현성은 실험실간 교차검증을 통해 확인하였으며, 표본시료 1개를 선정하여 5회 반복 측정한 결과 실험실간 교차 검증에 따른 두 지방산의 함량값에는 유의적인 차이는 없었으며($P>0.05$) 상대표준편차(%RSD)를 확인한 결과 linoleic acid는 2.8%, α-linolenic acid는 1.5%로 나타났다(Table 8).

Table 5. Validation of the method concerning the limits of detection and quantification

Analytes	Concentration range (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Linoleic acid	0.1-5.0	0.06	0.16
α-Linolenic acid	0.1-5.0	0.01	0.03

Limit of detection (LOD) : 3.3*σ/S
Limit of quantitation (LOQ) : 10*σ/S
(σ : the standard deviation of the response, S : the slope of the calibration curve).

유통 제품 중 적용성 검토

시료 적용성 검토를 위해 영아용 조제유, 성장기용 조제유, 영아용 조제식, 성장기용 조제식 각각 3품목씩 총 12품목에 대해 본 연구를 통해 확립한 지방산 분석법을 적용하여 함량을 확인하였다(Table 9). 영아용 조제유의 경우 linoleic acid 및 α-linolenic acid 분석값은 각각 3.70-5.33 g/100 g과 0.49-0.65 g/100 g였고, 두 지방산의 비율은 7.5:1-9.5:1로 확인하였다. 성장기용 조제유의 경우에는 분석값은 각각 4.29-5.15 g/100 g과 0.45-0.64 g/100 g로 확인

Table 6. Accuracy for the determination of fatty acids in SRM (*n=5*)

Analytes	Certified value (g/100 g) ± SD	Mesaured Contents (g/100 g) ± SD	RSD (%)	Accuracy (%)
Linoleic acid	5.72 ± 0.58	5.76 ± 0.04	0.6	100.8
α-Linolenic acid	0.59 ± 0.08	0.60 ± 0.00	0.7	101.1

SRM : Infant formula 1849a (National Institute for Standards and Technology, NIST).

Table 7. Repeatability for the determination of fatty acids in infant formula (*n=5*)

Sample type	Analytes	Sample amount (g)	Mesaured Contents (g/100 g) ± SD; RSD(%)	Mean (g/100 g)	RSD (%)
Infant formula	Linoleic acid	0.5	4.05 ± 0.12 ; 2.9	3.84	5.4
		1.0	3.87 ± 0.03 ; 0.8		
		1.5	3.59 ± 0.05 ; 1.4		
	α-Linolenic acid	0.5	0.48 ± 0.01 ; 2.7	0.45	5.6
		1.0	0.46 ± 0.01 ; 1.1		
		1.5	0.42 ± 0.01 ; 1.5		

Table 8. Inter-lab test of fatty acids in infant formula (n=5)

Sample type	Analytes	Laboratory	Measured contents (g/100 g)	Mean (g/100 g)	RSD (%)
Infant formula	Linoleic acid	A	4.01	3.99	2.8
		B	3.95		
		C	4.00		
	α-Linolenic acid	A	0.48	0.48	1.5
		B	0.48		
		C	0.48		

Table 9. Determination of fatty acids in infant formula (n=3)

Sample type	Sample	Linoleic acid (g/100 g)		α-Linolenic acid (g/100 g)		Ratio of linoleic acid : α-linolenic acid
		Labeled	Measured	Labeled	Measured	
Infant formula (milk based)	A	4.50	5.33	0.45	0.56	9.5:1
	B	3.57	4.10	0.41	0.48	8.5:1
	C	3.57	3.70	0.43	0.49	7.5:1
Follow-up formula (milk based)	D	3.79	4.60	0.38	0.50	
	E	4.07	5.15	0.41	0.64	
	F	3.29	4.29	0.33	0.45	
Infant formula (soy based)	G	4.50	5.79	0.45	0.55	10.5:1
	H	3.29	2.99	0.33	0.32	9.4:1
	I	3.57	5.36	0.43	0.63	8.5:1
Follow-up formula (soy based)	J	3.79	4.24	0.38	0.43	
	K	3.57	4.21	0.35	0.48	
	L	4.21	5.27	0.42	0.53	

하였다. 영아용 조제식은 linoleic acid 및 α-linolenic acid 분석값은 각각 2.99-5.79 g/100 g과 0.32-0.63 g/100 g였고, 두 지방산의 비율은 8.5:1-10.5:1로 확인하였다. 성장기용 조제식의 경우에는 분석값은 각각 4.21-5.27 g/100 g과 0.43-0.53 g/100 g의 함량범위를 나타내었다. 실제 전체 분석 결과는 함량에 비해 linoleic acid는 91-150%, α-linolenic acid는 96-146%가 함유되어 있으며, 이는 「식품의 기준 및 규격」 (식품의약품안전처 고시 제2018-98호) 중 조제유류에 대한 기준·규격(Table 1)의 범위를 모두 충족시키는 값이었다. 이상의 결과로 확립된 지방산 분석법으로 직선성, 정확성, 정밀성, 실험실간 교차검증의 값을 검토하였고, 이 결과는 AOAC에서 제시하는 시험법 검증 가이드라인을 만족시켜 실험법으로 사용가능함을 확인하였다[18].

Acknowledgement

본 연구는 2019년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(19161식활안071)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 조제유류 중 지방산에 대해 최신 분석법을 마련하고자 수행하였다. 조제유류 중 지방산 함량 분석을 위해 GC를 이용한 분석법을 확립하고 시중에 유통 중인 제품을 대상으로 적용성을 검토하였다. 분석법 검증은 특이성, 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정확성, 정밀성에 대해 수행되었다. Linoleic acid 및 α-linolenic acid의 0.1-5 mg/mL 농도범위에서 R^2=0.999 이상의 우수한 직선성을 확인할 수 있었다. Linoleic acid 및 α-linolenic acid의 LOD는 각각 0.06 mg/mL, 0.01 mg/mL, LOQ는 각각 0.16 mg/mL, 0.03 mg/mL였다. 표준인증물질 분석을 통해 정확성을 검토하였으며, linoleic acid 및 α-linolenic acid의 회수율은 각각 100.8%와 101.1%로 확인하였다. 정밀성을 검토한 결과 시료 채취량에 따른 반복성은 linoleic acid 1.4-2.9%, α-linolenic acid 1.1-2.7%이었고, 실험실간 재현성은 각각 2.8%, 1.5%임을 확인하였다. 본 연구에서 확립된 분석법을 적용하여 국내 유통 중인 조제유류 및 조제식 제품 12건에 대해 적용성 검토를 실시한 결과 전체 시료에서 분석이 용이하였으며, 모두 기준·규격에 적합함을 확인하였다. 본 결과

로부터 확립된 GC를 이용한 분석법은 조제유류 중 지방산 함량을 확인하기에 적합함을 확인하였으며 국내 식품 영양성분의 관리 기반을 강화하는데 기여할 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Keum Hee Hwang https://orcid.org/0000-0002-1055-9372
Won Hee Choi https://orcid.org/0000-0001-9209-4048
Soo Jung Hu https://orcid.org/0000-0001-6508-0695
Hye young Lee https://orcid.org/0000-0000-0000-0000
Kyung Mi Hwang https://orcid.org/0000-0003-4490-1081

References

1. Mensink, R.P., Ronald P., Metabolic and health effects of isomeric fatty acids. *Curr. Opin. Lipidol.*, **16**, 27-30 (2005).
2. Calder, P.C., Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *J. Parenter Enteral. Nutr.*, **39**, 18-32 (2015).
3. Tapiero, H., Nguyen Ba, G., Couvreur, P., Tew, K.D., Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomed. Pharmacother.,* **56**, 215-222 (2002).
4. Farines, M., Soulier, R., Soulier, J., Analysis of the triglycerides of some vegetable oils. *J. Chem. Educ.,* **65**, 464 (1988).
5. O'brien, R.D., 2008. Fats and oils: formulating and processing for applications, third ed. CRC Press, Boca Raton.
6. Eder, K., Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl*., **671**, 113-131 (1995).
7. Delmonte, P., Rader, J.I., Evaluation of gas chromatographic methods for the determination of trans fat. *Anal. Bioanal. Chem.*, **389**, 77-85 (2007).
8. Tyburczy, C., Mossoba, M.M., Rader, J.I., Determination of trans fat in edible oils: Current official methods and overview of recent developments. *Anal. Bioanal. Chem*., **405**, 5759-5772 (2013).
9. AOAC, official Method 996.06. Fat (total, saturated, and unsaturated) in foods. Hydrolytic extraction gas chromatographic method, in: official Methods of Analysis of AOAC International, 19th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA (2012).
10. ISO 14156:2001 (IDF 172). Milk and milk products. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
11. ISO 15884:2002 (IDF 182). Milk fat, Preparation of fatty acid methyl esters, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
12. ISO 15885:2002 (IDF 184). Milk fat, Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
13. Ministry of Food and Drug Safety, 2019. Food Code of Korea. Cheongju, Korea.
14. Han J.E., Hong Y.H., Chemical quality evaluation of commercial infant formulas. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **21**, 56-63 (2001).
15. Son J.M., Lee J.H., Hong S.T., Lee K.S., Park H.K., Kwon K.I., Lee K.T., Determination of positional fatty acid and triacylglycerol compositions of selected infant formulas. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**, 1256-1264 (2011).
16. Aued-Pimentel, S., Kus-Yamashita, M.M.M., da Silva, S.A., Zenebon, O., Lipids components of Industrialized food for nutritional labelling. *Food Public Health*, **6**, 99-106 (2006).
17. Aued-Pimentel, S., Kus-Yamashita, M.M.M., da Silva, S.A., Zenebon, O., Comparison of gas chromatographic and gravimetric methods for quantization of total fat and fatty acid in food stuffs. *Quim. Nova,* **33**, 76-84 (2010).
18. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 19th Ed., Appendix L. AOAC INTERNATIONAL, Dr. George WL Jr, Recommended Guidelines for SPIFAN Single Laboratory Validation (SLV), (2012).
19. Statistical analysis system version 9.4 software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.