

Quantitative analysis of cholesterol in infant formula by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Eun Jeong Ahn¹, Hwa Shim Lee² ★, Byung Joo Kim² and Gae Ho Lee¹

¹Department of chemistry, Choongnam National University, 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea

²Center for bioanalysis, Division of Metrology for Quality of Life, Korea Research Institute of Standards and Science, 267 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34113, Korea

(Received December 11, 2015; Revised December 15, 2015; Accepted December 15, 2015)

동위원소희석 액체크로마토그래피 질량분석법에 의한 분유 내 콜레스테롤의 정량

안은정¹ · 이화심² ★ · 김병주² · 이계호¹

¹충남대학교 대학원 화학과

²한국표준과학연구원, 삶의질측정표준본부, 바이오임상표준센터

(2015. 12. 11. 접수, 2015. 12. 15. 수정, 2015. 12. 15. 승인)

Abstract An isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed as a primary method for the quantitative analysis of cholesterol in infant formula. Cholesterol-d₄ was used as an internal standard and spiked into the infant formula sample. In order to release cholesterol out of cholesteryl ester, which is cholesterol bound to fatty acids in infant formula, saponification was carried out. Saponification conditions were optimized with heating temperature, reaction time and the concentration of KOH. The optimum conditions were as follows; heating temperature was 70 °C, reaction time was 180 min and the concentration of KOH was 0.8 mL of 8 M KOH for about 0.1 g infant formula sample. Extraction of cholesterol out of sample solution was carried out with hexane using liquid-liquid extraction. Chromatographic analysis was carried out using Phenomenex Kinetex C₁₈ column. Mobile phase was 0.1% acetic acid in methanol/water (v/v, 99/1) and flow rate was 0.3 mL/min. Cholesterol and cholesterol-d₄ were monitored at mass transfer m/z 369/259 and 373/263 respectively. Reproducibility of the method was evaluated to be 0.23% of the measurement result. The expanded uncertainty of the measurement result of cholesterol in infant formula was approximately 1.9% at a 95% confidence level. NIST standard reference material having certified values of cholesterol in infant formula, was analyzed in order to verify this method. The ID-LC/MS/MS results were well agreed with the certified values of NIST SRM within the uncertainty.

요약: 분유 내 콜레스테롤을 정량분석하기 위한 일차분석법으로 동위원소희석 질량분석법을 개발하였다. 내부표준물질로 콜레스테롤-d₄를 사용하여 분유에 첨가하였다. 분유에 지방산과 에스테르형태로 결

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-868-5348 Fax : +82-(0)42-868-5801

E-mail : eclhs@kriss.re.kr

This is an open access article 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.

합되어 있는 콜레스테롤을 자유 콜레스테롤로 바꾸어주기 위해 비누화과정을 수행하였다. 비누화과정은 반응온도, 반응시간, 사용한 KOH의 농도에 따라서 최적화하였으며, 그 결과로 분유시료 0.1 g에 대해 70 °C에서 180 분 동안 8 M의 KOH 0.8 mL를 첨가하여 반응을 진행시키는 최적화조건을 확립하였다. 이와 같은 조건으로 실험을 진행하여 재현성은 0.23%, 확장불확도는 95%의 신뢰범위에서 1.9%로 추정되었다. 확립된 동위원소희석 질량분석법의 유효화를 위해 분유내에서 콜레스테롤의 인증값을 가지는 NIST SRM을 측정하였고 이 결과가 인증값과 불확도 범위내에서 일치하는 것을 확인하였다.

Key words: Cholesterol, Saponification, Infant formula, ID LC-MS/MS, Primary method

1. 서 론

콜레스테롤은 스테롤(스테로이드와 알코올의 조합)의 하나로서 모든 동물 세포의 세포막에서 발견되는 지질이며 식물 세포의 세포막에서도 적은 양이긴 하지만 발견된다. 주로 간, 척수, 뇌와 같이 세포막이 많은 기관에서 높은 농도로 발견된다. 또한 체내에서 담즙산, 스테로이드 호르몬, 비타민 D 등의 합성 원료로서 지질 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹ 이러한 콜레스테롤은 육류, 생선, 알, 우유 및 유제품 등 대부분의 동물 유래 식품에서 다량으로 존재하는데, 과량으로 섭취했을 시에는 동맥 내벽에 콜레스테롤이 축적되어 동맥경화를 유발하고, 혈중 지질 성분의 농도가 높아져 고지혈증을 일으키는 등 심혈관계 질환과 밀접한 관련이 있다. 이러한 이유로 오래 전부터 콜레스테롤은 식품 안전과 관련해서 주목을 받아왔다.²

본 연구에서는 식품 안전 및 영양성분과 관련하여 분유 속 콜레스테롤 측정에 관한 연구를 수행하였다. 분유는 영유아의 주식으로 분유 속 콜레스테롤의 양은 영유아의 신체 건강에 영향을 미치므로 이에 대한 정확한 측정은 매우 중요한 의미를 가진다.³ 이에 더하여 국내외적으로 가공 식품의 안전성과 관련해 표시사항에 콜레스테롤 함량을 표기하도록 법적으로 관리되고 있으므로 콜레스테롤의 정량분석에 관한 여러 연구가 수행되어 왔다. 현재 공인된 콜레스테롤 분석법으로 국내에서는 식품공전 시험법(Korea Food Code, 2010)이 있으며, 이는 지질함유식품에 대한 콜레스테롤 분석법을 고시하고 있다.⁴ 또한 미국 공인분석화학회 (Association of Official Analytical Chemists; AOAC)에서는 다성분 식품에 있는 콜레스테롤 시험법을 고시하고 있으며 (AOAC, 2005a), 유제품에 대한 공신력 있는 국제 기관인 International Dairy Federation (IDF)에서는 유지방을 대상으로 한 스테롤류의 공인 시험

법을 고시하고 있다 (International standard, 2006). 이 방법은 식품 속 콜레스테롤을 비누화하여 톨루엔으로 추출한 다음 유도체화하여 기체크로마토그래피로 분석하는 방법을 기술하고 있다.⁵⁻¹¹ 본 연구에서는 이러한 공인 시험법에 대한 측정의 소급성을 확립하기 위한 일환으로 분유 속 콜레스테롤 측정의 일차분석법으로 동위원소희석 액체크로마토그래피 질량분석법 개발에 관한 연구를 수행하였다.¹²⁻¹³ 일차분석법은 SI 단위에 소급성을 둘 수 있는 가장 작은 측정불확도를 포함하는 분석법으로 측정의 계통도에서 최정점에 해당하는 방법이다. 매질이 있는 유기물 분석에서 동위원소희석 질량분석법은 일차분석법으로 인정되고 있는데 이는 내부표준물질로 측정 대상과 동일한 물리화학적 성질을 가지는 동위원소화합물을 사용하므로 회수율, 반응성, 기기변이 등 측정 과정에서 일어날 수 있는 근원적 오차를 해결할 수 있기 때문이다.² 본 연구에서는 분유 속 콜레스테롤을 측정하는 일차분석법으로 동위원소희석 액체크로마토그래피 질량분석법 개발에 관한 연구를 수행하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 재료

일차표준용액 제조에 쓰인 콜레스테롤 고 순도 표준물질은 National Institute of Standards and Technology (NIST) Standard Reference Material (SRM) 911c를 사용하였다. 동위원소표지물질 표준용액을 제조하기 위한 동위원소표지 표준물질은 cholesterol-d₄ (C/D/N Isotopes Inc, 99.4%)를 사용하였다.

본 실험의 분석법 개발에 사용된 시료는 남양유업에서 인증표준물질 용도로 특별히 제조된 균질화된 분유시료와 NIST에서 제공하는 분유 표준물질 SRM 1849a를 사용하였다. 에탄올과 메탄올은 HPLC 등급으로 Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)에서

구입하였고, 헥산(ACS grade)과 수산화칼륨(ACS grade)은 Sigma-Aldrich 회사에서 구입하였다. 이동상인 메탄올과 증류수는 사용하기 전에 0.22 μm PVF (Polyvinylidene fluoride) membrane filter (Milipore, USA)로 여과하여서 사용하였다. 증류수는 reverse osmosis system과 Milipore Alpha Q purification system을 차례로 통과하여 유기, 무기 불순물을 제거한 초순수를 사용하였다.

2.2. 기기 및 실험조건

무게측정 시 사용하는 화학저울은 0.01 mg에서 200 g까지 측정할 수 있는 analytical balance (AT201, Mettler Toledo)와 0.1 μg 에서 2.1 g까지 측정 가능한 microbalance (UMX, Mettler Toledo)를 사용하였다. 표준용액 제조 시 미량의 시료를 측정하기 위해 온도에 의한 열팽창계수가 적은 백금 팬(Pt pan)을 사용하여 무게를 측정하였다. 시료를 측정하기 위한 분석 장비로 고성능 액체크로마토그래피는 Agilent Technologies의 1100 series (Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 액체크로마토그래피 컬럼으로는 Phenomenex사의

Table 1. HPLC Conditions for the analysis of cholesterol in infant formula

HPLC operating conditions	
Instrument :	Agilent 1100 series
Analytical column :	Phenomenex Kinetex C ₁₈ (2.6 μm , 2.1 \times 50 mm)
Guard column :	Phenomenex SecurityGuard ULTRA C ₁₈ (2 μm , 2.1 \times 2 mm)
Mobile phase A :	0.1% Acetic acid in Methanol (99%)
Mobile phase B :	0.1% Acetic acid in Water (1%)
Flow rate :	0.3 mL/min
Injection volume :	5 L

Table 2. Optimized mass spectrometer conditions for the analysis of cholesterol in infant formula

Mass Spectrometer Conditions	
Source temperature ($^{\circ}\text{C}$)	500
Curtain gas (psi)	10
Collision gas (psi)	4
Ion source gas (psi)	35
Nebulizer current (μA)	1.5
Declustering potential (V)	69
Entrance potential (V)	14
Collision energy (V)	34
Collision cell exit potential (V)	21

Kinetex C₁₈ (2.6 μm , 2.1 \times 50 mm) 컬럼을 사용하였고 보호 컬럼으로는 Phenomenex사의 SecurityGuard ULTRA C₁₈ (2 μm , 2.1 \times 2 mm)을 사용하였다. 질량분석기는 대기압 화학 이온화 장치(Atmospheric pressure chemical ionization interface)를 장착한 ABSciex의 API 4000 triple quadrupole mass spectrometer를 사용하였다. 자세한 기기 조건은 아래 Table 1과 Table 2에 나타내었다.

2.3. Exact signal matching method

일반적으로 동위원소희석 질량분석법의 교정방법에는 Graphical method, Bracketing method, Single point calibration, Exact signal matching method 등이 있는데 본 연구에서는 Exact signal matching method를 사용하였다. 이 방법은 시간이 많이 소모되나 매우 정확하며 계통오차를 상쇄시킬 수 있으므로 불확도 값을 줄일 수 있으며, 유기물, 무기물 측정 모두에 사용될 수 있다.¹⁴ 이 방법의 순서도를 Fig. 1에 그림으로 나타내었다. 이 방법은 먼저 시료 속에 들어있는 분석대상물의 농도 추정이 이루어져야 한다. 다음 추정된 농도에 해당하는 무게의 동위원소 화합물을 시료에 첨가한 다음 시료의 전처리 과정을 실시한다. 다음 시료의 분석대상물 농도에 해당하는 분석대상물과 동위원소 화

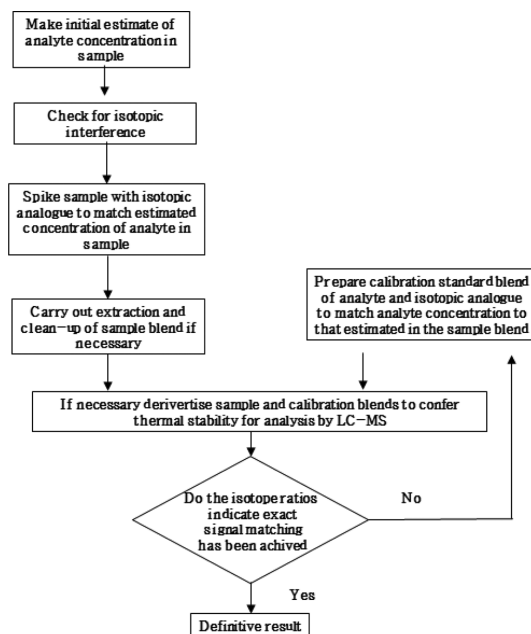


Fig. 1. Schematic representation of the 'exact signal matching' IDMS procedure as applied to organic analysis.

합물의 혼합표준용액을 제조한다. 혼합표준용액과 함께 동위원소 화합물이 첨가된 시료의 동위원소화합물 비를 구하여 시료의 분석대상물 농도를 계산한다. 이때 사용된 농도 계산식은 아래 식 (1)에 나타내었으며 측정된 농도값이 일정한 값에 수렴할 때까지 반복하여 결정한다.

$$C = \frac{M_{is-sol,spiked} \cdot AR_{sample} \cdot M_{s-sol,std} \cdot C_{s-sol}}{W_s \cdot AR_{std} \cdot M_{is,sol,std}} \quad (1)$$

$M_{is-sol,spiked}$ - 시료에 첨가된 동위원소표지물질 표준용액의 무게

$M_{s-sol,std}$ - 혼합표준용액에 투입한 동위원소표지물질 표준용액의 무게

$M_{is-sol,std}$ - 혼합표준용액에 투입한 대상성분 고순도 시약 표준용액의 무게

AR_{sample} - 시료 속 두 물질의 정량이온 크로마토그램 피이크의 면적비

AR_{std} - 표준용액 속 두 물질의 정량이온 크로마토그램 피이크의 면적비

W_s - 시료 양

C_{s-sol} - 고순도 시약의 표준용액 농도이다

불확도 평가는 ISO guide에 따라서 하였으며 본 연구에서는 혼합 표준용액의 불확도, 순도의 불확도, 반복 측정의 불확도를 합성하여 최종 불확도를 산출하였다.¹⁵⁻¹⁶

2.4. 일차표준용액(Calibration Standard Solution) 제조

일차표준용액 제조는 콜레스테롤을 200 mg/kg 수준이 되도록 제조한다. 콜레스테롤 고순도 시약을 백금 팬에 약 4 mg을 취하여 그 무게를 정확히 측정 후 갈색병에 옮긴다. 시약이 들어있는 갈색병에 95% 에탄올 20 mL을 넣어, 에탄올을 첨가하기 전과 첨가한 후의 무게를 정확히 측정하고 시약을 완전히 용해시켜 표준용액을 제조한다.

2.5. 동위원소표지물질 표준용액 (Isotope Labeled Standard Solution) 제조

동위원소표지물질 표준용액 제조는 콜레스테롤- d_4 을 200 mg/kg 수준이 되도록 일차표준용액 제조와 같은 방법으로 제조한다. 즉, 콜레스테롤 동위원소표지물질 표준물(isotope labeled standard) 시약을 백금 팬에 약 4 mg을 취하여 그 무게를 정확히 측정 후 갈색병에 옮긴다. 시약이 들어있는 갈색병에 95% 에탄

올 20 mL을 넣어, 에탄올을 첨가하기 전과 첨가한 후의 무게를 정확히 측정하고 시약을 완전히 용해시켜서 표준용액을 제조한다.

2.6. 동위원소비 표준용액 (Isotope Ratio Standard Solution) 제조

일반적으로 동위원소비 표준용액은 분석대상물질 표준용액과 그것의 동위원소표지물질 표준용액의 비가 1:1에 가깝게 제조된 용액을 말한다. 앞서 제조한 일차표준용액과 동위원소표지물질 표준용액을 1:1로 중량법적으로 혼합하여서 제조하였다.

2.7. 시료 전처리

분유 분말시료 0.1 g을 무게를 측정한 갈색병에 담아 시료의 무게를 측정하고 분석대상성분과 그들의 동위원소표지물질의 비가 1:1이 되도록 동위원소표지물질 표준용액 일정량을 첨가한 후에 다시 무게를 측정한다. 8 M 수산화칼륨 수용액 0.8 mL와 무수에탄올 4 mL를 첨가하여 70 °C 상태에서 3 시간 동안 반응시킨 후에, 실온에서 충분히 식혀준다. 핵산 10 mL를 넣어 강하게 교반한 후에 상이 분리될 때까지 방치하여 상층액(핵산층)을 취한 후에, 35 °C 상태에서 질소가스를 이용해서 핵산을 완전히 휘발시킨다. 잔류물에 에탄올 1 mL를 가하여 시료를 완전히 용해시킨다. 0.22 μm membrane filter로 여과시킨 후에 에탄올로 희석하여 액체크로마토그래피의 자동분석기에 투입하여 분석을 수행한다. 만약, 전처리가 완료된 후에 시료를 바로 분석하지 않는 경우, 4 °C 냉장고에서 직사광선을 차단한 상태로 보관한다.

2.8. 측정 과정

자동분석기에 넣은 시료는 1:1 혼합표준용액, 시료의 순으로 4 번 정도를 반복하여 측정한다. 측정 결과는 피이크의 면적값으로부터 계산된다. 그러므로 면적의 계산은 대단히 중요하다. 일반적으로 얻어진 크로마토그램의 면적은 사용 software에 의해 자동으로 계산되어지나 이 때의 바탕선이 항상 일정한 상태를 유지하는 것이 아니므로 반드시 확인이 필요하다. 자동으로 계산되어진 면적 비의 재현성이 0.5% 이상일 경우는 수동으로 확인하는 과정이 필요하다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 시료 전처리의 최적화

분유는 콜레스테롤 이외의 지질류와 단백질, 탄수화물, 비타민 등과 같이 여러 가지 영양소들로 이루어져 있다. 이 속에서 콜레스테롤을 분석하기 위해서는 시료의 추출과 정제 과정이 필요하다. 콜레스테롤은 유리형 콜레스테롤과 에스테르형 콜레스테롤이 존재하는데 분유속에 존재하는 에스테르형 콜레스테롤을 분석하기 위해서는 유리형 콜레스테롤로 바꿔주는 반응이 꼭 필요하다. 에스테르형 콜레스테롤을 유리형 콜레스테롤로 바꿔주는 반응을 비누화 반응이라고 한다. 지방산이 결합되어 있는 에스테르형 콜레스테롤에 수산화칼륨과 같은 강염기를 첨가하면 비누화 반응이 일어나 알코올이 생성되어 유리형 콜레스테롤로 변환된다. 우선 분유 시료를 전처리하는 과정에서의 비누화 반응의 유무에 따른 콜레스테롤 함량을 비교하였다. 비누화 반응을 하지 않은 시료의 결과와 비누화 반응으로 처리한 시료의 결과가 차이가 있음을 알 수 있었다. 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2의 결과를 통해서 분유 시료의 콜레스테롤 함량을 분석할 때에 비누화 반응이 꼭 필요하다는 것을 확인하였다. 비누화 반응에 영향을 주는 요인은 크게 온도, 반응시간, 수산화칼륨 용액의 농도가 있다.

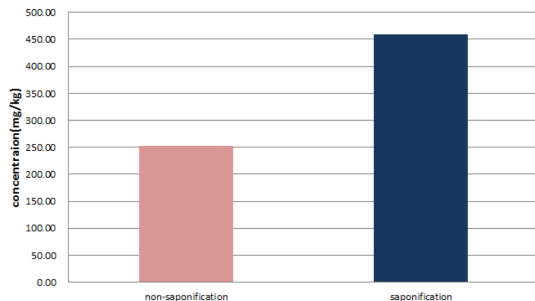


Fig. 2. Comparison between saponification and non-saponification in pretreatment process for the analysis of cholesterol in infant formula.

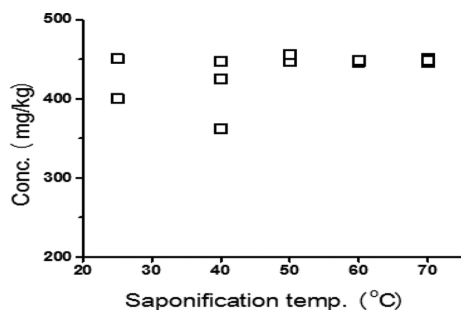


Fig. 3. Concentration of cholesterol in infant formula according to saponification temperature.

우선 비누화 반응의 최적 온도를 알기 위해 상온에서부터 70 °C 까지 각각 3 개씩의 시료를 취하여 실험을 진행하였고 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 50 °C 이하의 온도에서는 안정성 있는 결과를 보이지 않았고 60 °C 이후의 온도에서 반응이 일어났을 때 콜레스테롤의 농도에 안정성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 보다 안정된 결과를 위하여 70 °C 를 최적 온도로 결정하였다.

다음은 비누화 반응시간의 최적화를 위한 실험을 진행하였다. 시작점, 0.5, 1, 2, 3 시간의 간격에 따른 비누화 반응의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 비누화 반응은 비교적 쉽게 일어나는 반응이라 1 시간 후에 반응의 평지점에 이르고 측정 결과 간에도 반복성이 있음을 확인할 수 있었다. 이를 근거로 안정된 반응 조건을 주기 위해 본 연구에서는 3 시간의 반응시간을 최적 시간으로 결정하였다.

수산화칼륨의 농도에 따른 비누화 반응의 최적화 실험을 진행하였다. 동일한 시료에 대해 수산화칼륨의 농도만 달리하고 반응 온도와 시간은 동일하게 실험하였다. 첨가된 8 M KOH 용액의 양을 분유 시료의 양에 대해 normalize하여 측정 결과를 Fig. 5에 나타

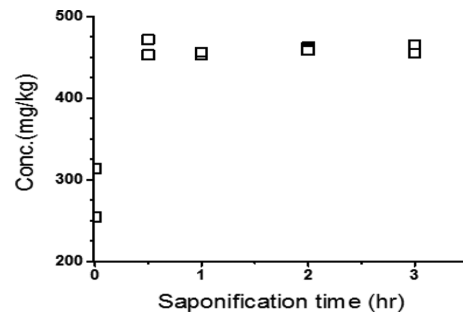


Fig. 4. Concentration of cholesterol in infant formula according to saponification time.

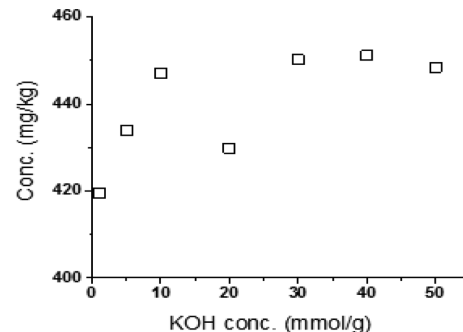


Fig. 5. Concentration of cholesterol in infant formula according to KOH concentration.

Table 3. Relative response factors of cholesterol calibration standard mixtures

Calibration blend	Isotope ratio ^a	Peak area ratio ^b	Response factor ^c
1	0.9889	1.128	1.140
2	0.9830	1.123	1.142
3	1.0062	1.151	1.144
4	0.9901	1.130	1.142
Average			1.142
SD			0.002
RSD (%)			0.13%

내었다. Fig. 5의 결과를 확인해보면 분유 시료 1 g당 KOH mol수가 40 mmol 이상일 때가 가장 적합한 것을 확인할 수 있었다. 이는 분유시료 0.1 g에 대해 8 M KOH 용액 약 0.4 mL에 해당하는 양으로 본 연구에서는 안정된 반응조건을 제공하기 위해 0.8 mL를 최적 조건으로 확인하였다.

3.2. 혼합표준용액의 검증

혼합표준용액의 정확성을 검증하기 위해 4 개의 혼합표준용액을 제조하여 LC-MS/MS 실험을 5 회 반복한 후 콜레스테롤/콜레스테롤-d₄ 피이크 면적비를 무게비로 나눈 response factor를 서로 비교하였다. 각 혼합표준용액의 면적비를 무게비로 나눈 값을 얻음으로써 측정기기의 반복성 뿐 만 아니라 제조 과정의 우발오차도 알 수 있다. 이를 Table 3에서 나타내었으며 상대표준편차가 0.13%로 반복성이 좋았으므로 혼합표준용액 제조과정에서 실수가 없었고, 실험 기간동안 기기의 장기적 감도변화도 없었음을 알 수 있었다. 이 혼합표준용액 가운데 가장 평균값에 근접하고 표준편차가 작은 용액을 선택하여 콜레스테롤 정량을 위한 표준용액으로 사용하였다.

3.3. 분유 속 콜레스테롤 측정결과

분유 속 콜레스테롤 분석의 일차분석법으로 개발된 동위원소희석 액체크로마토그래피 질량분석법의 유효화는 NIST SRM 1849a의 분석을 통해 검증되었으며, 분유시료의 측정결과의 반복성 및 재현성에 대한 검증을 통하여 분유 속 콜레스테롤에 대한 인증값을 결정하였다.

3.3.1. 측정방법의 유효화

본 연구에서 개발된 분석법의 유효성을 확인하기 위하여 NIST SRM 1849a를 동일한 방법으로 측정하

Table 4. Comparison between the measured values and the certified value of NIST SRM 1849a

Sample	Certified Value (mg/kg) ^a	Measured values (mg/kg) ^{a,b}
NIST SRM 1849a	(137.4 ± 2.9)	(138.3 ± 2.8) (138.9 ± 3.2) (136.9 ± 3.4)
Average		138.0
RSD (%)		0.75
Expanded Uncertainty		3.0

^aThe expanded uncertainty is at the 95 % level of confidence.

^bMeasurement was carried out with multiple subsamples (n=3).

였다. NIST에서 제공하는 분유 속 콜레스테롤의 인증값은 (137.4±2.9) mg/kg이다. NIST의 인증값과 본 연구에서 개발한 ID LC-MS/MS 분석법을 이용하여 측정된 결과를 Table 4에 나타내었다. 동위원소희석 액체크로마토그래피 질량분석법을 이용한 측정값은 (138.0±3.0) mg/kg으로 인증값과 서로의 불확도 범위 내에서 일치하는 것을 확인할 수 있으며, 이로써 분석법의 유효성을 확인할 수 있었다.

3.3.2. 반복성과 재현성

본 실험에서 반복성을 알기 위해 한 배치내에서 3 개씩의 시료를 취하여 동위원소표지물질 표준용액 일정량을 첨가한 후 동일한 전처리 과정을 거쳐서 LC-MS/MS의 선택반응분석법(MRM) 모드에서 4회 반복 측정하여 분석하였다. 또한 이 방법의 재현성을 검증하기 위해서 동일한 반복성 실험을 서로 각각 다른 날짜에 3 회 수행하였고 그 결과를 Table 5에 나타내

Table 5. Repeatability and reproducibility of cholesterol measurement by the developed ID-LC/MS/MS method applying to homogenized infant formula

Period	Measured values (mg/kg)			Average (mg/kg)	RSD (%)
	Sample 1	Sample 2	Sample 3		
1	459.9	458.6	460.8	459.7	0.3
2	457.3	461	461.5	459.9	0.5
3	457.5	457.5	460.7	458.0	0.6
Average (mg/kg)				459.4	
Standard uncertainty (%)				0.7	
Combined standard uncertainty (%)				0.8	
Expanded uncertainty ^a (%)				1.9	
Expanded uncertainty (mg/kg)				8.9	

^aThe expanded uncertainty is at the 95 % level of confidence.

었다.

분석 결과 첫 번째 시기부터 세 번째 시기까지의 상대표준편차는 0.3%, 0.5%, 0.6%로 1% 이내의 반복성을 보였으며, 3 회를 반복하여 독립적으로 측정된 측정값의 상대표준편차는 0.23%로 높은 재현성을 보였다. 이로써 본 연구에서 개발한 방법의 유효성과 정확성을 확인할 수 있었으며 분유 속에 들어 있는 콜레스테롤 함량은 (459.4±8.9) mg/kg의 결과를 보였다.

4. 결 론

본 연구에서는 분유 속 콜레스테롤을 정확하게 정량분석하기 위한 최상위 분석법으로 동위원소희석 액체크로마토그래피 질량분석법을 개발하였다. 분유 속 콜레스테롤 정량 분석을 위한 동위원소희석 액체크로마토그래피 질량분석법은 내부표준물질로써 분석물질과 물리 화학적 성질이 동일한 동위원소표지 표준물질을 사용하기 때문에, 시료 전처리 과정에서 분석물질의 손실에 따른 회수율 및 기기의 감도 변화를 보정할 수 있었다. 또한 선행연구에서 사용되던 기체크로마토그래피 분석법과 비교하여서 전처리 과정에서 유도체화 과정이 필요하지 않기 때문에 시료 전처리 시간이 감소되고 그 비용 또한 절감할 수 있다. 시료 전처리 과정에서는 분유 시료에 적합한 비누화 반응의 온도, 시간, 수산화칼륨의 농도를 최적화하여 실험을 진행하였다.

본 연구에서의 동위원소희석 액체크로마토그래피 질량분석법을 이용해서 KRISS 분유 CRM의 콜레스테롤을 반복 측정된 결과 높은 반복성과 재현성을 보였다. 또한, 이 방법의 유효성을 확인하기 위해 NIST에서 제공하는 표준물질인 SRM 1849a을 ID-LC/MS/MS 방법으로 측정된 결과, 인증값과 측정값은 서로 불확도 범위 내에서 일치함을 보여 유효성을 확인할 수 있었다.

References

1. K. Michihiroshi and I. Katsumi, Cholesterol, Shinkwang

Press, Seoul (1990).

2. J. P. Sweeney and J. L. Weihrauch, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **8**, 131-159 (1976).
3. B. H. Ryu, *Cholesterol and Atherosclerosis*, Shinji Press, Busan (1998).
4. *Korea Food Code*, 10.1.1.5.6, Cholesterol, Korea Food Industry Association, Seoul, Korea, 431-433 (2010).
5. J. M. Kim, J. M. park, T. H. Yun, D. G. Lim, C. Y. Yun, J. Y. Jung, I. S. Jung, B. M. Kwak and J. H. Ahn, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **31**(6), 944-951 (2011).
6. D. J. Fletouris, N. A. Botsogloi, L. E. Psomas and A. I. Mantis, *J. Dairy Sci.*, **81**, 2833-2840 (1998).
7. I. S. Jeong, B. M. Kwak, J. H. Ahn, D. G. Leem, T. H. Yoon, C. Y. Yoon and J. Y. Jeong, *J. Food Sci.*, **77**(10), C1042-1046 (2012).
8. D. K. Lee, J. H. Ahn and H. S. Kwak, *Food Biotechnol.*, **6**, 322-324 (1997).
9. M. Fenton, *J. Chrom.*, **624**, 369-388 (1992).
10. B. Zhonging, X. Rongnian, Z. Jinhua, *China dairy industry*, **27**, 1 (1999).
11. M. Marlier, G. Lognay, J. Wagstaffe, P. Dreze and M. Severin, *Fresenius J Anal Chem.*, **338**, 419-422 (1990).
12. P. Ellerbe, S. Meiselman, L. T. Sniegowski, M. J. Welch and E. White, *Anal. Chem.*, **61**, 1718-1723 (1989).
13. M. Rychlik and S. Asam, *Anal Bioanal. Chem.*, **390**, 617-628 (2008).
14. H. S. Lee, Quantifications of amino acids in human serum by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Chungnam National University, Graduate school, TITB4, 007-8 (2007).
15. KRISS Publication, "Improvement of Measurement Accuracy for Amount of Substance" (1999).
16. ISO guide 98-3, "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM: 1995)" (2010).