

Research Note

Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry를 이용한 조제분유의 9종 무기질 분석법의 유효성 검증

황진봉* · 남궁배 · 오미라 · 김소영 · 심유신 · 김세나¹ · 최용민¹ · 남진식²

한국식품연구원 식품분석센터, ¹농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 기능성 식품과
²수원여자대학교 식품영양과

Method Validation for 9 Types of Minerals in Infant and Adult Nutritional Formulas using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

Jinbong Hwang*, Namgung Bae, Mira Oh, Soyoung Kim, You-Shin Shim,
Se-na Kim¹, Youngmin Choi¹, and Jin-sik Nam²

Department of Food analysis, Korea Food Research Institute

¹*Functional Food & Nutrition Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration*

²*Department of Food & Nutrition and Food Analysis Research Center, Suwon Women's College*

Abstract

The analytical method for the determination of minerals (sodium, calcium, potassium, phosphorus, magnesium, iron, copper, manganese, and zinc) in both infant and adult nutritional formulas, using inductively coupled plasma optical emission spectrometry, was validated in terms of precision, accuracy, and linearity. Certified reference material 1849a, purchased from national institute of standards & technology, was used for the infant and adult nutritional formula. All calibration curves exhibited strong correlation linearity ($r^2=0.9999$) within the tested ranges. The recovery values of mineral compounds ranged from 90.35 to 110.63%, and the limit of detection and of quantification was less than 0.1005 mg/kg and 0.3351 mg/kg, respectively. The inter-day precision (n=12) values ranged from 1.19 to 18.19%, and intra-day precision (n=3) values ranged from 0.09 to 4.80%. Therefore, microwave digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry were useful analytical methods for 9 types of minerals in food. The analytical methods verified in this study may be used to build up a food composition database for national health promotion.

Key words: method validation, analytical method, ICP-OES, microwave digestion

서 론

최근 소득 증대로 인한 국민의 식생활은 경제수준의 향상과 함께 동물성 식품의 섭취량은 크게 증가된 반면, 상대적으로 곡류식품의 섭취량이 감소함에 따라 영양과잉 또는 불균형으로 인한 비만이나 심혈관계와 같은 만성퇴행성 질환의 위험도는 꾸준히 증가하고 있다(Chung 2004; Kim et al., 2004; Jeong et al., 2010; Lee et al., 2013). 그런데 소비자들에게 각종 영양성분에 관한 정확한 정보를 제공하고 영양소 섭취수준 평가를 할 수 있는 근거자료는

매우 부족한 실정이다(Kim et al., 2013; Kim et al., 2013). 특히 식품영양성분 및 기능 정보는 국가의 식량 및 식품영양정책 수립, 국민건강영양조사를 통한 국민의 기초 영양상태 평가, 수산물의 영양성분 평가 등 산업체, 학교, 병원 등과 같은 단체 및 개인 식단 작성 등 급식관리, 의 학분야 및 식품, 영양 학술분야 연구, 각종 영양 교육자료, 농산물 수출입시 품질평가 자료, 개발제품의 영양성분 표시 등 다양하게 이용되고 있으며 식품영양 및 기능정보에 대한 각계각층의 요구는 날이 갈수록 증가하고 있는 실정이다(Kang et al., 2007; Seo et al., 2007; Kim et al., 2010).

식품성분표는 독일, 미국 등 선진국에서는 19 세기부터 시작되었으며, 일본의 경우 문무성에서 제공하는 일본 식품 성분표와 더불어 국립건강영양연구소에서 2006년부터 “기능성식품 인자 DB”를 구축하여 회분 및 무기질의 함량에 대한 정보를 제공하는 것은 물론 폴리페놀류, 카로티노이드

*Corresponding author: Jinbong Hwang, Department of Food analysis, Korea Food Research Institute, Gyeonggi, Korea
Tel: +82-31-780-9128; Fax: +82-31-780-9280
E-mail: hwangjb@kfri.re.kr
Received July 1, 2014; revised August 14, 2014; accepted August 19, 2014

류 및 유허화합물까지 다양한 정보를 제공하고 있다(RDA, 2010). 그리고 캐나다는 연방보건부에서 발간된 2011 년판 캐나다 식품성분표에는 5,807 종의 식품이 포함되어 있으며, 회분 및 무기질 등 약 150 개 영양성분이 수록되어 있다(CNF, 2011). 또한 호주 및 뉴질랜드는 식품기준청에서 2011 년에 발간된 오세아니아 식품성분표에는 19 개 식품 그룹으로 나누어져 있고 약 4,500 종의 식품이 실려 있으며, 회분 및 무기질 등 약 50 개 영양성분이 등록되어 있다(Canadian Food Inspection Agency, 2011).

그리고 우리나라에서는 1970 년 UN의 FAO/WTO에서 지원하는 한국응용영양사업의 일환으로 국내·외 영양정보 식품성분표를 발간하기 시작하였으며, 1970 년 초판 발간 이후 2011 년에 발간된 식품성분표에는 2,757 종으로 수분, 단백질, 지질, 회분 등 약 22 개 성분이 포함되어 있으며, 이중 무기질 영양성분은 칼슘, 인, 철, 나트륨 및 칼륨 등 5 종류가 수록되어 있다(RDA, 2011). 한편 식품공전에는 무기질을 분석하기 위한 시험용액의 전처리에는 건식분해법(Kim et al., 2009; Hwang et al., 2013), 습식분해법(질산-과염산법과 마이크로웨이브법)(Kim et al., 2012; Kim et al., 2013) 이 있으며 그 측정법으로는 적정법(Kim SJ et al., 2011), 비색법(Shin et al., 2006), 기기분석(원자흡광광도법, 유도결합플라즈마법)법(Yang et al., 2001; Yu et al., 2012), 이온-선택 전극법(Ko et al., 2008) 등이 사용되고 있어 단일 원소에 대한 분석법만 있으나(MFDS, 2013), 다량의 무기질(Na, Ca, K, P, Mg)과 미량의 무기질(Fe, Zn, Cu, Mn)의 동시 분석법을 고안하고자 하였다.

본 연구에서는 certified reference material을 구입하여 마이크로웨이브법으로 시료 용액을 전처리 한 후 inductively coupled plasma optical emission spectrometry(ICP-OES)법으로 9 개의 무기성분을 측정하여 식품성분표의 data base를 구축하기 위한 무기질 분석 방법의 유효성을 검증하였다.

실험 방법

재료

무기질 분석 방법의 유효성을 검증하기 위하여 본 연구에 사용한 Certified Reference Material(CRM) 1849a는 National Institute of Standards & Technology(NIST, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. 분석 데이터의 신뢰도와 정확성을 높이고 측정기기 상태를 점검하기 위해 측정값이 확보된 기준시료인 CRM과 in-house quality control(QC) sample을 분석시마다 교차측정 하였다. QC sample은 국내에서 유통되는 P사의 제품의 조제분유를 사용하였으며, 무기질 분석시 시료의 분해에 사용한 70% 질산과 28% 과산화수소는 모두 EP-S 사(Electronic grade, Dongwoo fine chem., Seoul, Korea)을 사용하였다. 사용한 9 종의 무기질 표준품(Na, Ca, K, P, Mg, Fe, Zn, Cu, Mn)

은 모두 AccuStandard 사(AccuStandard, Inc., New Haven, CT, USA)에서 판매하는 1,000 µg/mL 농도의 표준원액을 각각 구매하여 사용하였으며 사용된 초순수는 탈이온수 제조기인 Milli Q system(Millipore, Bedford, MA, USA)으로 여과하여 사용하였다.

시료의 전처리

시험용액의 조제는 식품공전에 등재되어있는 microwave digestion방법에 따라 수행하였다(MFDS, 2013). 즉, 마이크로웨이브(QWAVE 1000, Questron technologies, Corp., Mississauga, Canada) 분해용 테프론 비이커에 시료 약 0.08~1 g을 칭량한 후 질산 8 mL와 과산화수소 2 mL를 가한 다음 테프론 비이커의 뚜껑을 닫고 마이크로웨이브 분해장치에 상온에서 100°C까지 온도를 올린 후 10 분 동안 분해 한 후 다시 100°C에서 180°C까지 온도를 올린 후 30 분 동안 분해한 다음 서서히 온도를 낮춰 70°C가 될 때까지 기다린 후 분해가 완료되면 상온에서 15 분 동안 식힌 다음 이를 소량의 물로 닦아주며 50 mL 정용플라스크로 옮긴 다음 증류수로 50 mL로 정용하였다. 이를 여과지 No. 41(Whatman, Maidstone, UK)로 여과하여 시험용액으로 하였다.

시약 및 장치

표준용액

각각의 표준원액을 2% 질산에 희석하여 식품의 다량 무기질 원소인 Na, Ca, K, P, Mg은 1, 5, 25, 100 µg/g의 농도로 조제하였고, 미량 무기질 원소인 Fe, Zn 등은 0.1, 0.5, 1, 5 µg/g의 농도, 초미량 무기질 원소인 Cu, Mn 등은 0.01, 0.05, 0.1, 1 µg/g의 농도로 조제하여 표준용액으로 사용하였다.

기기 및 측정조건

ICP-OES는 Jobin Yvon사(ACTIVA, Horiba Jobin Yvon, France)를 사용하였고, 측정시 사용한 파장으로는 Na, Ca, K, P, Mg, Fe, Zn, Cu 및 Mn은 각각 589.592 nm, 317.933 nm, 766.490 nm, 213.618 nm, 279.079 nm, 259.940 nm, 213.856 nm, 324.754 nm 및 259.373 nm의 파장으로 측정하였다. 측정조건은 RF Power 1000 W, Nebulizer Ar gas flow 1.17 L/min, Plasma Ar gas flow 12 L/min 이었다.

분석법 유효성 검증

분석법 검증은 ICH Q2B(FDA, 1999) 절차에 따라 수행하였다. 즉 표준용액을 이용하여 검출한계(limits of detection, LOD), 검량한계(limits of quantification, LOQ), 직선성(linearity)을 산출하였다. 정밀성과 정확성은 CRM-1849a를 이용하여 시료량을 각각 0.08, 0.25, 1.0 g씩 달리 취하여 시료 전처리방법에 따라 하루에 3 번 시행하여 일내정밀도

(within-day precision)를 relative standard deviation(RSD, %)로 제시하였으며 4일간 실험을 반복 시행하여 일간정밀도(between-day precision) 정밀성을 산출하였다.

결과 및 고찰

직선성, LOD 및 LOQ

표준물질을 이용하여 ICP-OES으로 분석한 9 개의 원소는 Table 1에 나타난 바와 같이 Na, Ca, K, P, Mg는 1-100 mg/kg의 농도의 범위에서, Fe, Zn은 0.1-5 mg/kg, Cu, Mn은 0.01-1 mg/kg의 농도 범위에서 직선성이 확인되었으며, 4 점의 직선성에 대한 상관계수 R^2 (Correlation coefficient) 이상으로 양호한 직선성을 나타냈다.

한편 LOD는 $3.3s/S$ (s:standard deviation of y-intercepts of regression analysis, S: slope of a calibration curve)의 수식에 의해 산출한 결과, 모든 대상원소에서 0.0378 mg/kg 이하를 나타내었으며 LOQ는 0.1260 mg/kg 이하를 나타내었다. 모든 대상원소의 직선성, LOD 및 LOQ를 Table 1에 나타내었다.

정확성 및 정밀성

정밀도 및 정확도를 확인하기 위하여 Table 2에 나타난 바와 같이 NIST CRM 1849a를 이용하여 각각 0.08, 0.25, 1.0 g를 취하여 microwave로 분해한 다음 탈이온수를 이용, 50 mL로 정용한 후 여과하여 ICP-OES로 intra-day에 3 회 반복, inter-day(4일간)에 12 회 반복하여 측정하였다. 그 결과, intra-day 분석시 RSD(%)은 0.09~4.80%로 만족한 값을 보여 주었고, inter-day의 RSD(%)은 1.19~18.19%로 산출되어 시료에 대한 정밀도 및 정확성의 기준을 모두 만족하는 것으로 나타났다. 한편 NIST CRM 1849a의 농도에 따른 회수율의 측정은 다음과 같은 식으로 산출하였다.

$$\% \text{ Recovery} = (C_i/C_a) \times 100$$

Table 1. The linearity and sensitivity of 9 types of minerals by ICP-OES¹⁾.

Analytes	Linear range (mg/kg)	Correlation coefficient (r)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Sodium	1-100	0.9999	0.0378	0.1260
Calcium	1-100	0.9999	0.0134	0.0448
Potassium	1-100	0.9999	0.1005	0.3351
Phosphorus	1-100	0.9999	0.0745	0.2482
Magesium	1-100	0.9999	0.0122	0.0408
Iron	0.1-5	0.9999	0.0030	0.0101
Zinc	0.1-5	0.9999	0.0027	0.0089
Copper	0.01-1	0.9999	0.0006	0.0019
Manganese	0.01-1	0.9999	0.0011	0.0037

1) All values were calculated using standard solution inter-day (n=12) analyses

Table 2. The precision¹⁾, accuracy²⁾ and recovery for the analysis of 9 types minerals in CRM 1849a.

Compounds	Weight (g/50 ml)	RSD (%)		Recovery (%)
		Intra-day (n=3)	Inter-day (n=12)	
Sodium	0.08	1.67	3.24	93.81±2.44
	0.25	0.84	2.45	95.97±2.22
	1.0	0.48	7.76	96.97±8.11
Calcium	0.08	0.67	3.02	100.07±2.99
	0.25	0.30	1.19	103.44±0.57
	1.0	0.71	1.90	105.51±1.44
Potassium	0.08	1.11	2.34	90.36±1.58
	0.25	0.51	2.01	93.01±1.94
	1.0	0.09	1.64	100.20±1.77
Phosphorus	0.08	1.77	3.00	95.75±2.22
	0.25	0.40	1.43	100.71±0.96
	1.0	0.77	3.23	110.63±3.39
Magesium	0.08	0.75	5.16	93.15±4.85
	0.25	0.66	1.79	96.64±1.42
	1.0	0.97	2.43	98.94±2.13
Iron	0.08	2.74	2.93	101.70±1.28
	0.25	0.37	1.86	97.25±1.89
	1.0	0.59	3.32	103.10±3.63
Zinc	0.08	2.88	3.35	90.76±1.89
	0.25	0.40	1.77	91.12±1.65
	1.0	0.28	2.95	97.34±2.79
Copper	0.08	4.80	10.43	92.76±6.25
	0.25	0.41	5.50	90.35±1.70
	1.0	0.42	2.04	90.39±1.88
Manganese	0.08	3.36	18.19	101.49±9.32
	0.25	0.15	4.41	94.68±3.48
	1.0	0.52	5.95	104.58±6.84

1) Amount of CRM-1849a : values represent the results of the intra-day (n=3) and inter-day (n=12) analyses

2) Values represent the mean of the intra-day (n=3) and inter-day (n=12) analyses±SD

여기서 C_i 는 CRM 실측정치이며, C_a 는 NIST에서 제시하는 참값을 의미한다. 회수율을 측정한 결과, 9 개 무기성분의 회수율은 90.35~110.63%로 양호한 결과를 나타내었는데 이는 FDA에서 제시한 유효성 검증의 가이드라인(FDA, 2001) 모두 적합하였다. 모든 대상원소의 일내정밀도, 일간정밀도 및 회수율은 Table 2에 나타내었다.

그리고 영국의 환경청에서 주관하는 국제 분석 숙련도 프로그램(Food Analysis Performance Assessment Scheme)에 참가하여 ash, sodium, copper 등의 원소에 대해 FAPAS 만족범위($z \leq \pm 2$)를 충족시켜 분석결과의 신뢰도를 확인하였다.

또한 본 연구진의 자체내 분석 데이터의 신뢰도와 정확성을 높이고 측정기기 상태를 점검하기 위해 측정값이 확보된 기준시료, 즉 in-house QC sample(date not shown)을 15일 간격으로 CRM과 교차측정 하였다.

따라서 본 연구진은 상기의 무기질 분석법을 이용하여 식품에 함유되어 있는 Na, Ca, K, P, Mg, Fe, Zn, Cu 및

Mn 등의 9 개 무기질에 대한 분석법의 유효성 검증을 통해 식품성분표의 data base를 구축하기 위한 매우 유용한 분석법임을 확인할 수 있었다.

결 론

식품공전에 제시된 microwave digestion 전처리방법과 ICP-OES 측정법을 이용하여 조제분유 중 9개 무기질원소를 측정하는 방법에 대한 유효성 검증을 통해 본 연구진은 다음과 같은 결론을 얻었다. 유효성을 검증한 결과, 9 개 원소에 대한 직선성과 검출한계, 정량한계, 일내정밀성, 일간정밀성과 정확성 모두 FDA에서 제시한 유효성 검증의 가이드라인에 적합하였다. 그리고 식품공전에 등재되어 있는 microwave digestion으로 전처리한 후 ICP-OES를 사용한 측정법은 식품 중 9 개 무기질 원소 측정에 있어 매우 유용한 분석법임을 확인하였다. 따라서 본 연구결과는 식품공전에 등재되어 있는 공인실험법을 대상으로 체계적인 분석법 유효성 검증을 통해 문제점을 개선하고 신규분석법을 개발하는 분석연구에 기초적인 연구 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 식품공전에 제시되어 있는 microwave digestion 전처리방법과 유도결합 플라즈마 방출분광기를 이용하여 식품 중의 9종의 무기질(Na, Ca, K, P, Mg, Fe, Cu, Mn 및 Zn)을 측정하는 분석법에 대한 직선성, 정밀성 및 정확성 등의 분석법 유효성 검증을 실시하였다. 본 연구에 사용된 표준시료는 Certificated reference material 1849a 조제분유로 미국 national institute of standards & technology에서 구입하였다. 직선성은 표준품을 사용한 표준검정곡선 측정농도범위에서 상관계수 0.9999 이상의 양호한 결과를 나타내었다. 검출한계는 0.1005 mg/kg, 정량한계는 0.3351 mg/kg 으로 각각 나타났다. 또한 정밀도는 상대적표준편차(relative standard deviation)가 일내(within-day, n=3), 반복측정의 경우 0.09~4.80%, 일간(between-day, n=12)의 경우 1.19~18.19%로 양호한 결과를 나타내었으며 정확성은 회수율 90.35~110.63%로 매우 양호한 결과를 나타내었다. 따라서 microwave 전처리방법과 유도결합 플라즈마 방출분광기 측정법은 식품 중 9종의 무기질을 측정하는데 매우 유용할 것으로 사료되며 국민 건강 증진을 위한 식품성분표 데이터베이스 구축, 유통식품의 품질평가 등 공익적 분석사업에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ009592)

의 지원에 의해 이루어진 것임

References

- Chung KH. 2004. A study on Nutrition Plans to Secure Food Safety at the National Level. Korea Health Industry Development Institute, Cheongwon, Korea. pp. 1-24.
- Canadian Food Inspection Agency, <http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/labeti/nutricon/nutriconapple.shtml>, Accessed 2011.
- CNF(Canadian Nutrient File), <http://webprod3.hc-sc.gc.ca/cnf/fce/index-eng.jsp>, Accessed 2011.
- FDA, http://www.ipm-biotech.de/fileadmin/user_upload/pdf/guidelines/12-ICH-Q2B-Guideline.pdf, Accessed 1999.
- FDA, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>, Accessed 2001.
- Hwang SJ, Park SJ, Kim JD. 2013. Component analysis and antioxidant activity of oenanthe javanica extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 45: 227-234.
- Jeong HR, Gwi NC, Kim JH, Kwak JH, Kim YS, Jeong CH, Kim DO, Heo HJ. 2010. Nutritional Components and Their Antioxidative Protection of Neuronal Cells of Litchi (Litchi chinensis Sonn.) Fruit Pericarp. Korean J. Food Technol. 42: 481-487.
- Kang YJ, Jun SJ, Yang JA, Cha YS. 2007. School Dietitians' Perceptions and Intake of Healthy Functional Foods in Jeonbuk Province. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 1172-1181.
- Kim DJ, Lee JY, Eom JH, Eun JH, Bai SC. 2009. Effect of estimated availability of NDF binging major minerals in soybean sprouts depending on cultivation periods and sampling parts. J Korean Soc. Food Sci. Nutr. 38: 486-489.
- Kim HJ, Yoo KM, Lee S, Kim KT, Hwang IK. 2013. Physicochemical characteristics of various ginseng seeds. Korean J. Food Sci. Technol. 45: 274-278.
- Kim JH, Lee KT. 2010. Studies on the Current Status of Nutrition Labeling Recognition and Consumption Pattern of Domestically Processed Meat Products. J Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39: 1056-1063.
- Kim JP, Chin IJ, Cho HK, Ham IH, Whang WK. 2004. The antioxidant and the antidiabetic effects of ethanol extract from biofunctional foods prescriptions. Korean J. Pharmacogn. 35: 98-103.
- Kim KN, Lee AR, Lee HR, Kim KR, Hwang JY. 2013. Need-based development of tailored nutritional education materials about food additives in processed foods for elementary-school students. J. Nutr Health. 46: 357-368.
- Kim SD, Moon HK, Park JS, Yang HR, Yi YJ, Han EJ, Lee YC, Shin GY, Kim JH, Chae YZ. 2012. The content of Macrominerals in beverages, liquid teas, and liquid coffees. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 41: 1134-1143.
- Kim SJ, Na SJ, Kim JH, Lee JL. 2011. Optimum determination method of protein-nitrogen improve mohr method in leaf tobacco. J. Korean Soc. Tobacco Sci. 33: 16-20.
- Kim SN, Lim SH, Kim JB, Cho YS, Choi YM, Park HJ. 2013. National standard food composition tables provide the infrastructure for food and nutrition research according to policy and industry. Korean J. Food Nutr. 26: 886-894.
- Ko JH, Kwak BM, Ahn JH, Jeon TH. 2008. Development of a

- method for detecting Iodide and Chloride ions in infant formula using an ion selectivity electrode. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 28: 301-305.
- Lee JE, Cho SM, Kim J, Kim JH. 2013. Effects Unripe and Ripe *Rubus coreanus* Miquel on Peritoneal Macrophage Gene Expression Using cDNA Microarray Analysis. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1552-1559.
- MFDS. 2013. Korean Food Standards Codex. Ministry of food and drug safety. changwon. Korea. p. 55-59.
- RDA. 2011. 8th Revision Standard Food Composition Table. Rural development administration. Suwon. Korea. p.26-509.
- RDA. 2010. 2010 Tables of Food Funcional Composition MINERAL, FATTY ACID. Rural development administration. Suwon. Korea. p.2-63.
- Shin DH, Kim YS, Jeong DY, Lee YH, Bang JH, Om AS, Shin JW, Lee TS, Jang YM, Hong KH, Park SK, Park SK, Kwon YK. 2006. Comparison of standard and lead limit test of various institutes on lead limit of synthetic and natural food additives. *J. Fd. Hyg. Safety* 21: 82-91.
- Seo YH, Hur WJ, Kim EJ. 2007. Investigation into the Actual Condition and the Demand of Home and Educational Environmet according to the Phenomenon of Social Polarization. *Korean Soc. Child Edu.* 16: 253-276.
- Yang HR, Kim ES, Kim YC, Han SH. 2001. Study on the mineral contents of commercial baby foods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 388-394.
- Yu BK, Lyu MS, Sun YS, Cho KS. 2012. Arsenic speciation analysis in bamboo salts by hydride generation ICP-AES. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 674-680.