

직접 검화법을 이용한 조제분유의 콜레스테롤 분석법 개발

김진만 · 박정민 · 윤태형¹ · 임동길¹ · 윤창용¹ · 정자영¹ · 정인식² · 곽병만² · 안장혁^{2*}
건국대학교 동물생명과학대학, ¹식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 영양기능연구팀,
²남양유업 중앙연구소 식품안전센터

Development of Analysis Method for Cholesterol in Infant Formula by Direct Saponification

Jin-Man Kim, Jung-Min Park, Taehyung Yoon¹, Donggil Leem¹, Changyong Yoon¹, Jayoung Jeong¹,
In-Seek Jeong², Byung-Man Kwak², and Jang-Hyuk Ahn^{2*}

Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea
¹*Nutrition and Functional Food Research Team, Korea Food and Drug Administration, Chungwon 363-951, Korea*
²*Food Safety Center, Research and Development Institute, Namyang Dairy Co., Ltd., Gongju 314-914, Korea*

Abstract

An improved cholesterol analysis method was developed for powdered infant formula by gas chromatographic separation after liquid-liquid extraction and partition. In the official Korea Food Standard method for cholesterol analysis, the water phase and solvent phase were not well separated in the case of emulsified foods such as powdered infant formulas and baby foods. For the rapid and simple sample preparation method, an optimized direct saponification condition was established for heating temperature, heating time, and KOH concentration. From the results, the optimum conditions were as follows: heating temperature 90°C, heating time 60 min, and 16 M KOH 10 mL for a 2 g infant formula sample; improved separation condition for gas chromatography was as follows: the initial oven condition was 250°C for 25 min, the oven temperature was increased to 290°C by 10°C/min ratio, and finally the oven temperature remained at 290°C for 9 min. The developed method could be implemented for the study of cholesterol, providing the advantages of reduced inspection time and cost in emulsified foods such as infant formula.

Key words: cholesterol, direct saponification, gas chromatography, analysis method, infant formula

서 론

콜레스테롤은 27개의 탄소를 가진 다환 2차 알코올 화합물의 일종으로 생체 내에서 다양한 작용을 하는 물질이다. 콜레스테롤은 인간과 동물의 체세포의 구성 성분으로서 세포막에서 흔히 찾아볼 수 있으며, 비타민 D, 각종 호르몬, 세포막, 뇌조직 등 체내 물질을 생성하는 데에 기여하며 또한 세포막의 유동성, 세포 간 이온교환 및 삼투압 유지 등에 작용하며 담즙의 원료로서 지질 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 콜레스테롤은 육류, 생선, 알, 우유 및 유제품 등 대부분의 동물 유래 식품에서 상당한 양으로 존재하는데, 과량 섭취 시 동맥 내

벽에 콜레스테롤이 축적되어 동맥 경화를 일으키고, 혈중 지질 성분의 농도가 높아져 고지혈증이 발생하는 등 심혈관계 질환의 원인이 될 수 있어 오래 전부터 식품 안전과 관련해 주목을 받아 왔다(Sweeney and Weihrauch, 1976).

국내외적으로 안전성과 관련해 가공식품의 표시사항에 콜레스테롤 함량을 표기하도록 법적으로 관리되고 있으며, 소비자들이 콜레스테롤을 다량 함유하는 계란 노른자, 새우, 버터, 가열 조리된 가공 식품 등을 섭취할 경우에 유의할 수 있도록 제조업체에서 정보를 제공하도록 되어 있다. 현재 공인된 콜레스테롤 분석법으로 국내에서는 식품공전 시험법(Korea Food Code, 2010)이 있으며, 이는 지질함유식품에 대한 콜레스테롤 분석법을 고시하고 있다. 또한 미국 공인분석화학회(Association of Official Analytical Chemists; AOAC)에서는 multicomponent foods에 대하여 콜레스테롤 시험법을 고시하고 있으며(AOAC, 2005a), 유제품에 대한 공신력 있는 국제 기관인 International Dairy

*Corresponding author: Jin-Man Kim, Department of Food Science and Biotechnology of Animal Resources, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-3688, Fax: 82-2-455-1044, E-mail: jinmkim@konkuk.ac.kr

Federation(IDF)에서는 milk fat을 대상으로 한 스테롤 류의 공인 시험법을 고시하고 있다(International standard, 2006).

그러나, 식품공전 시험법과 AOAC 시험법의 경우에는 적용 시료 범위가 광범위하여 특정 식품군에 대한 구체적인 구분이 되어 있지 않아, 특히 유화된 가공식품의 경우 용매를 이용하여 시료로부터 콜레스테롤을 추출 및 분리하는 과정에서 액액분배가 잘 되지 않는 문제로 인하여 정확한 함량 분석에 어려움이 발생하였다. IDF method의 경우에는 milk fat시료에 대한 콜레스테롤 시험법은 잘 정립되어 있으나, 분유중의 콜레스테롤을 분석하기 위해서는 별도의 시험법을 사용하여(International standard, 2001) 지방 추출과 지방 함량 정량을 따로 거쳐야 하는 이중작업이 필요한 불편함이 있다. 이에, 시료 전처리에 장시간을 소요하게 되므로 많은 시료를 신속, 정확하게 분석해야 하는 공인 분석 기관 또는 기업체에서 실질적으로 활용하기에 어려움이 있다.

콜레스테롤의 신속하고도 정확한 시험법 개발을 위한 연구 동향으로 지방 추출 과정을 생략한 전처리 방법이 대두되었다. 신속 분석 방법의 공인 시험법으로 AOAC official methods에는 foods에 대하여 시험법이 설정되어 있다(AOAC, 2005b). 그러나 이 시험법을 유화된 가공 식품에 그대로 적용하기에 몇 가지 문제점이 있다. 우선 추출 용매로 발암 물질인 toluene을 사용하여 안전성에 문제가 있었고, 전처리 과정에 hexamethyldisilane 및 trimethylsilyl ether 등을 이용한 복잡한 유도체화 과정이 있어서 지방 추출 과정을 생략한 신속 분석법임에도 불구하고 전처리 과정에 소요되는 시간이 많이 요구된다. 무엇보다 일반적인 식품에 대한 시험법으로서 조제분유 또는 영·유아용 조제식 등 유화 가공 식품에 대한 적용성이 떨어질 것으로 예상되었는데, 유화 가공 식품의 경우 일반 식품에 비해 복잡하고 유화되어 있는 매질 특성을 가지기 때문에 그 속에 함유된 미량의 지질 성분의 함량을 분석하기는 매우 어렵다. 특히 콜레스테롤을 비롯한 스테롤류는 식물성 및 동물성 지질의 mass fraction의 98%를 차지하고 있는 acylglycerol의 존재 때문에, 측정 시에 방해물질에 대한 효과적인 제거 및 신속한 분석이 이루어지지 못하게 되면 정확한 측정이 불가능하게 된다(Choong *et al.*, 1999).

공인 분석법 외의 분석 방법으로 Fletouris 등(1998)은 우유 및 유제품에서 콜레스테롤을 신속하게 분석할 수 있는 전처리 방법을 소개하였는데, 기존의 지방 추출 과정을 생략하고 우유, 요구르트, 버터, 아이스크림, 치즈 등에 KOH 메탄올 용액을 가해 검화한 후 헥산으로 추출하는 시험법을 개발해 전처리 과정을 기존 분석법에 비하여 획기적으로 단축시키는 내용을 발표한 바가 있다. 또한 Lee 등(1997)은 우유와 크림 제품에서 콜레스테롤을 신속하게 분석할 수 있는 전처리 방법 소개하였는데, 상기 Fletouris 등(1998)의 연구와 같이 기존의 유기 용매를 사용한 지방

추출 과정을 생략하고 우유와 크림에 KOH 메탄올 용액을 가해 검화한 후 hexane을 추출하는 method를 개발하였으며 GC method와 enzymetic method를 비교해 두 가지 방법의 결과에 유의성이 있음을 발표한 바가 있다.

그러나, 조제분유와 같이 매트릭스가 복잡하고 유화 가공된 식품에 대해서는 마땅한 신속 분석법이 개발되어 있지 않다. 조제분유 및 영·유아용 조제식은 모두 섭취가 불가능한 영·유아의 유일한 영양공급원이기 때문에 식품 안전의 위해 요소가 될 수 있는 물질의 정확한 분석은 가장 중요한 요소이며, 따라서 분석이 어려운 유화된 가공 식품에 대한 콜레스테롤의 표준화된 분석법 확립을 통한 분석 효율성 증대가 요구되고 있는 실정이다.

본 연구는 지방 추출 과정을 생략한 직접 검화 방법(direct saponification processing)을 이용하여 조제분유 중의 콜레스테롤 함량을 분석하는데 있어 직접 가열 온도 및 가열 시간을 파악하는 한편, 간섭물질을 효과적으로 제거할 수 있는 검화액 농도를 탐색하여 간단하고 신속하게 콜레스테롤 정량 분석을 수행할 수 있는 전처리 방법을 개발하고자 하였다. 또한 조제분유 시료에 적합한 가스크로마토그래피 기기분석 조건을 확립하여 공인 분석 기관 및 기업체 등에서 널리 이용 가능한 표준화된 분석법의 개발을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 시료는 국내에서 생산 후 시판된 조제분유 1, 2단계 및 성장기용 조제식 3, 4단계 제품을 시중 대형 마트(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 또한 실험 결과의 검증을 위해 인증표준물질(CRM: Certified Reference Material)인 Infant formula SRM 1849(Standard Reference Material 1849, NIST, USA)를 사용하였으며, CRM 중의 콜레스테롤 함량은 12.7 ± 1.5 mg/100 g이다. 시험에 사용된 고체 시약 중 potassium hydroxide(KOH) 및 sodium sulfate anhydrous(NaSO_4)는 Junsei Chemical(Japan)에서 구입하였고 추출 용매 중 chloroform, hexane 및 diethyl ether는 Fisher Scientific(USA)에서 구입하였으며, methanol 및 ethanol은 Burdick & Jackson(USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 모든 실험에 사용된 초순수는 Banstead(USA)의 Diamond TII system에 의해 18.0 M Ω 수준으로 정제된 물을 사용하였다.

표준용액의 조제

콜레스테롤 표준물질 cholesterol 및 내부표준물질인 5 α -cholestane은 Sigma-Aldrich(USA)의 GC analytical grade를 구입하여 사용하였고 순도는 각각 99.0과 99.91%였다. 표준물질과 내부표준물질을 각각 20 mg을 취해 10 mL

volumetric flask에 넣어 2,000 mg/L의 농도로 제조하였으며 표준용액의 조제에는 chloroform을 사용하였다.

시료 전처리

조제분유 시료 약 2 g을 정밀히 취해 250 mL round-bottomed flask에 넣은 후 내부표준물질 용액 5 α -cholestane 2,000 mg/L 1 mL를 넣고 소량의 물로 용해시켰다. 용해시킨 후 flask에 16 M KOH 용액 10 mL와 methanol 30 mL를 가하여 환류냉각기를 붙여 90°C에서 60분 검화시켰다. 검화 후 환류냉각기를 증류수 30 mL로 세척하여 flask에 옮겼다. 이것을 35°C에서 냉각 후 용액을 250 mL 분액깔대기로 옮기고 50 mL water를 사용해 flask의 잔류물을 깨끗이 세척하여 분액깔대기로 옮겼다. 이 후 diethyl ether 30 mL를 분액깔대기에 넣고 격렬히 흔들어서 가스 제거를 하며 층 분리를 시켰다. Diethyl ether 30 mL로 2회 더 추출하여 ether층을 다른 분액깔대기로 옮겼다. 이 후 증류수 50 mL를 첨가해 부드럽게 흔들어 주며 수세하였다(격렬히 흔들 시 emulsion 발생, emulsion 발생 시 ethanol을 소량 첨가함). 수세는 증류수 50 mL로 페놀프탈레인 지시약으로 홍색이 나타나지 않을 때까지 세척하였다. 수세를 마친 후 diethyl ether 층을 5-10 g의 sodium sulfate anhydrous를 넣은 여과 깔대기에 탈수 여과시켜 250 mL round-bottomed flask에 모았다. 마지막으로 진공감압농축기로 40°C 수욕상에서 완전히 농축시킨 후 잔류물을 2 mL hexane에 녹인 후 기기 분석에 사용하였다.

측정 기기 및 기기분석 조건

GC 장비는 Agilent 6890 system과 HP-5 capillary column 30 m \times 0.25 mm i.d.($d_f=0.25$)(Agilent, USA)을 사용하였으며 검출기는 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector: FID)를 사용하였다. Injection volume은 1 μ L이며 이동상은 nitrogen carrier gas를 flow rate 1.0 mL/min으로 흘려주었으며, split ratio는 constant flow로 100:1을 주었다. 주입구와 검출기 온도는 각각 260°C와 280°C로 설정하였다. 시작 오븐 온도는 250°C에서 25분 간 유지하였으며, 이후 290°C까지 10°C/min 승온 후 9분간 더 유지하였다.

크로마토그래피에서 분리된 각 화합물의 정성 분석을 위해 Agilent 6890 system과 결합된 Agilent 5973 질량분석기(mass selective detector: MSD)를 사용하였으며, mass spectrum 확인을 위한 MS ionization voltage는 70 eV였다. 검출기 이외의 모든 조건은 GC-FID의 기기 분석 조건과 동일하였다.

첨가회수 실험

첨가회수 실험을 위한 시료로는 NIST의 SRM 1849를 사용하였으며, certification sheet에서 확인된 콜레스테롤 인증 값을 근거로 시험법의 정확성을 평가하였다. 시료에

2,000 mg/L 농도로 조제한 표준용액 1 mL를 첨가한 후 첨가하지 않은 시료와 동일하게 처리하여 정량 분석하였다. 그 결과값을 이용하여 첨가하지 않았을 경우의 결과값을 첨가한 결과값에서 뺀 후 첨가량을 기준으로 회수율을 다음 계산식을 이용하여 산출하였다.

$$(A_1 - A_2)/A_3 \times 100$$

A₁: 콜레스테롤 표준용액을 첨가했을 때의 결과값

A₂: 콜레스테롤 표준용액을 첨가하지 않았을 때의 결과값

A₃: 콜레스테롤 표준용액의 첨가량

정성 한계(limits of detection; LOD) 및 정량 한계(limits of quantitation; LOQ) 측정

Signal to noise ratio(S/N ratio)가 3/1이 되는 농도를 LOD로, 10/1이 되는 농도를 LOQ로 정하였다. S/N ratio는 Chemstation software(Agilent 6890, USA)를 사용하여 측정하였다.

통계분석

시험 값의 유효성 검증을 위하여 한국기술표준원이 제시한 산업표준(KS A ISO 5725, 2002)에 의거하여 시험 결과의 통계 분석을 실시하였다. 콜레스테롤 분석 결과를 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 통해 조제분유 시료의 콜레스테롤 함량에 대한 통계적 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

추출 용매의 선정

기존 시험법의 추출 효율 적용성 확인을 위해 유화 가공 식품 중 조제분유, 이유식, 치즈에 대한 액액분배 시험을 하였고 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 세 가지 식품 매트릭스 중 치즈의 경우에는 수용액-메탄올 층과 클로로포름 층이 잘 분리되었지만, 조제분유 및 이유식 시료는 두터운 에멀션(emulsion)층이 형성되며 액액분배가 잘 되지 않고 분리층을 육안으로 확인하기가 매우 어려웠다. 유기 용매를 추가로 첨가해 액액분배를 수행한 후 첨가회수실험을 수행한 결과 회수율이 약 30-60% 정도로 80% 이상이 되지 못하고 매우 떨어져, 유화된 가공 식품에 대해 식품공전 및 AOAC 시험법의 클로로포름-메탄올 추출법은 적합하지 않다는 사실을 확인할 수 있었다.

직접 검화 방법에 의한 콜레스테롤 분석 시에는 지방 추출 과정 없이 검화 과정이 선행되며, 유기 용매에 의한 추출 과정은 검화 후에 행해지게 된다. 지질 추출을 위한 유기 용매로서 hexane, ether, chloroform 등 비극성 용매들이 널리 사용되고 있으며, 이 중 ether와 chloroform의 sterol류 추출 효율이 가장 높은 것으로 알려져 있다(Sullivan

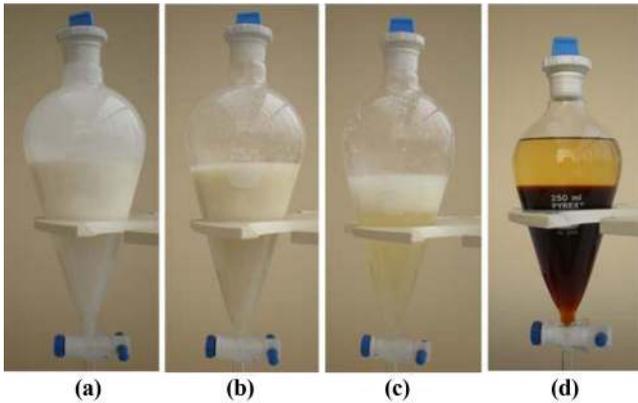


Fig. 1. Improvement of liquid-liquid extraction (LLE) for the emulsified food matrices. (a), Infant formula; (b), Baby food; (c), Cheese extracted by chloroform-methanol (2 : 1) solvents; (d), Infant formula extracted by diethyl ether after the saponification.

and Carpenter, 1993). 본 연구에서는 수용액-메탄올 총 120 mL에 대해 diethyl ether 30 mL씩 3회 이상 추출했을 때 가장 높은 회수율을 나타내는 것으로 관찰되었으며, 육안으로도 Fig. 1과 같이 검화 후 용액과 diethyl ether의 액액분배가 잘 되는 것을 확인하였다. 따라서 신속 분석법을 위한 추출 용매로 diethyl ether를 최종 선정하였다.

가열 온도와 시간에 따른 함량 변화

충분한 검화 시간 및 검화 온도의 설정은 콜레스테롤을 지질에서 완벽하게 유리시키기 위해 필요한 과정이다. 반면 너무 오랜 시간 검화를 시키거나 검화 온도가 높을 경우 콜레스테롤이 파괴되어 콜레스테롤 산화물을 생성할 수 있다는 연구 결과가 있어 적정 검화 시간 및 온도 설정에 대한 탐색이 필수적으로 요구되었다(Guardiola *et al.*,

1994).

콜레스테롤 직접 검화 신속 분석법에 적합한 검화 온도 및 시간을 탐색하기 위해 콜레스테롤 및 내부표준물질 5 α -cholestane에 대한 회수율 시험을 시행하였다. 각 표준물질 2,000 mg/L 용액 1 mL씩을 증류수 20 mL와 2 M KOH methanol 용액 20 mL를 넣은 검화 수기에 넣고 가열 온도와 시간에 변화를 주어 콜레스테롤 함량 변화 여부를 관찰하였다. 가열 온도는 80, 90, 95°C로 환류냉각기 온도를 설정하였고, 가열 시간은 30, 60, 90분 간 가열하였으며 결과를 Fig. 2에 크로마토그램으로 나타내었다.

콜레스테롤의 회수율은 80°C-90분 가열, 90°C-60분 가열 및 90°C-90분 가열했을 시 회수율이 101.3-101.5%로 가장 높았고 콜레스테롤의 파괴로 인한 미지 물질의 생성 또한 관찰되지 않았다. 80°C에서 가열했을 경우 30분 간 가열했을 경우 미지 물질이 소량 생성되어 회수율은 84.9%를 나타내었으나, 60분 간 가열했을 경우 미지 물질 생성량이 많아져 회수율은 53.4%로 떨어짐을 관찰할 수 있었으며 90분 간 가열 시 회수율은 높았으나 내부표준물질 함량 또한 함께 감소해 적절한 온도 조건이라 판단할 수 없었다. 90°C에서 가열했을 경우 30분 간 가열했을 시 미지 물질이 생성되어 회수율은 68.9%를 나타내었으나 60분 이상 가열 시 높은 회수율을 나타냄과 동시에 콜레스테롤과 내부표준물질의 함량 감소가 일어나지 않아 적절한 온도 조건이라 판단할 수 있었다. 95°C에서 가열했을 경우 30분 간 가열했을 경우 미지 물질이 생성되어 회수율은 76.1%를 나타내었고, 60분 이상 가열 시 미지 물질이 생성되지는 않았으나, 회수율이 89.2-89.9%로 떨어져 적절한 온도 조건이 아님을 확인할 수 있었다. 결론적으로 90°C에서 60분 이상 가열하는 것이 콜레스테롤 손실이 없는 검화 조건임을 확인할 수 있었으며 최종적으로

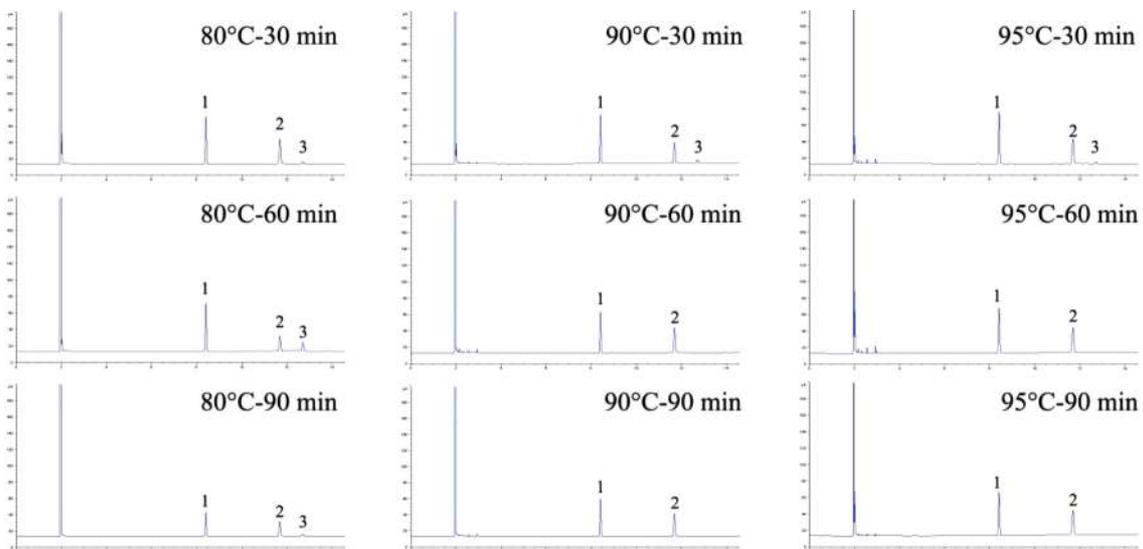


Fig. 2. GC-FID Chromatograms of the various heating temperature and heating time. 1, 5 α -cholestane; 2, cholesterol; 3, unknown peak.

검화 가열 조건을 90°C-60분으로 결정하였다.

검화 용액 농도에 따른 함량 분석 결과

적절하게 설정된 검화 조건에서 콜레스테롤은 lipoprotein complex에서 완벽하게 유리되며 수산화된다. 지질을 함유한 검체에 KOH, NaOH 등의 환원제를 첨가했을 때 지질의 에스터 결합이 파괴되어 스테롤류, 유리 지방산염 등이 생성되며, 액액분배 시 스테롤류와 스테롤 산화물(Sterol Oxidation Product: SOPs)은 유기용매 층에, 유리 지방산염은 수용액 층으로 나뉘어 각각의 성분 분석에 활용할 수 있다(Sullivan and Carpenter, 1993).

검화를 위한 환원제로서 KOH가 선택되었으며, 적절한 검화 용액 농도를 탐색하기 위해 KOH 수용액을 제조해 시험 용액으로 사용하였다. 조제분유 및 성장기용 조제식 등 유화 가공 식품의 직접 검화를 위해 고농도의 KOH 검화 용액의 사용이 필요함을 선행 연구들이 제시하고 있었으며(Kwak *et al.*, 2004; Kwak *et al.*, 2005), 따라서 시료 2 g에 2, 4, 6, 8, 12, 16 M KOH 수용액 10 mL를 투입하여 검화 효율을 관찰하였다.

Fig. 3에 검화 용액 농도 별 콜레스테롤 분석 크로마토그램을 나타내었다. 분석 결과 농도가 낮을수록 베이스라인이 혼탁하고 콜레스테롤 및 내부표준물질 피크 끌림 현상이 나타나며 정량 분석 결과값 또한 낮음을 확인할 수 있었다. 8 M 이상에서부터 피크 끌림 현상은 발생하지 않았으나, 농도가 높아질수록 지방산으로 추정되는 머무름

시간 초반의 피크들이 많이 제거되었고 또한 16 M을 투입했을 때 방해 피크들이 거의 완전히 제거되었다. 따라서 KOH 검화 용액 농도는 16 M이 적합한 것으로 사료되었다.

최적 기기 분석 조건 탐색

상기 확립된 전처리 방법을 이용해, 식품공전 콜레스테롤 분석법(Korea Food Code, 2010)에 고시된 GC 오븐 승온 조건을 활용하여 SRM 1849의 콜레스테롤 정량 분석을 시도 하였으며 분석 시간은 15분이었다. 그 결과 인증값의 약 3배의 함량이 검출되었으며, 따라서 콜레스테롤 피크와 다른 물질의 피크 중첩이 의심되었다. 이에 오븐 초기 온도를 기존 식품공전 분석법의 270°C에서 250°C로 낮추고 분석 시간을 19분부터 5분 단위로 39분까지 늘려 분리능을 향상시켰으며, 결과를 Fig. 4에 크로마토그램으로 나타내었다. 분석 결과 분석 시간 34분 이상일 때 콜레스테롤과 중첩 피크가 완전히 분리가 되었으며, 모든 물질이 완전히 컬럼을 빠져나와 검출되기까지 걸리는 시간 4분을 더해 최종적으로 분석 시간 38분을 최적 조건으로 결정 하였다. 확립된 조건에서 오븐 초기 온도는 250°C이고, 25분 간 유지한 후 분당 10°C씩 290°C까지 승온시켰으며, 이 후 9분 간 유지시켰다. 콜레스테롤은 약 27분에 검출되었으며, 중첩되었던 방해 물질은 약 1분 뒤에 검출되어 간섭 없이 완전한 분리에 성공하였다. 상기와 같은 GC 오븐 조건에서 LOD는 9.85 mg/kg, LOQ는 32.84 mg/

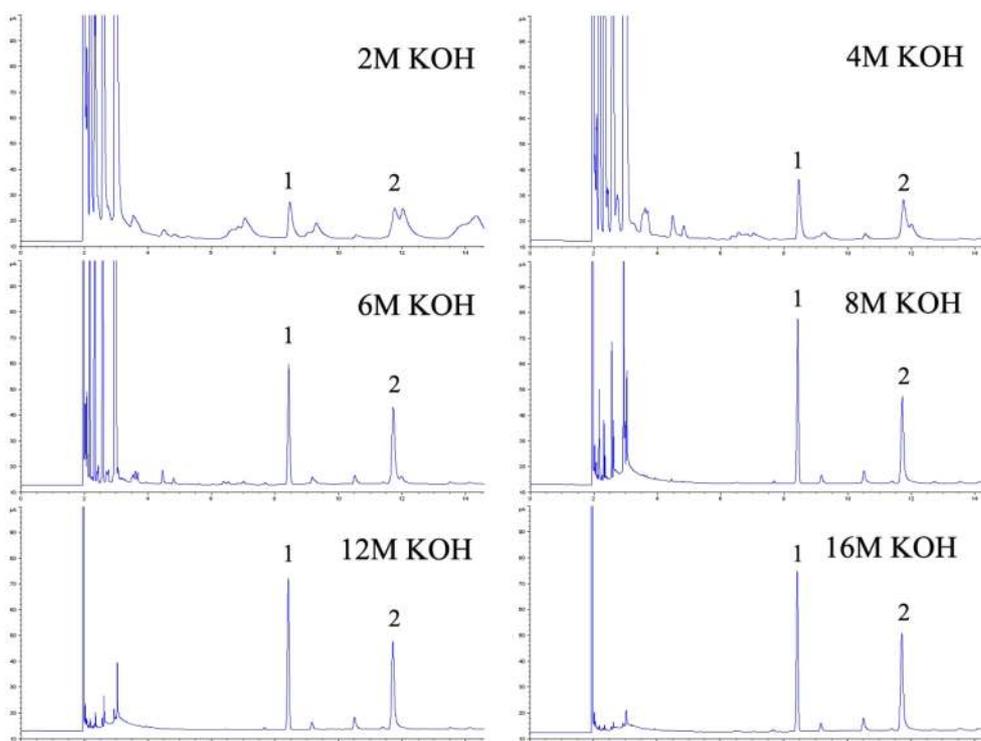


Fig. 3. GC-FID Chromatograms of the various concentration of KOH in water solution. 1, 5 α -cholestane; 2, cholesterol

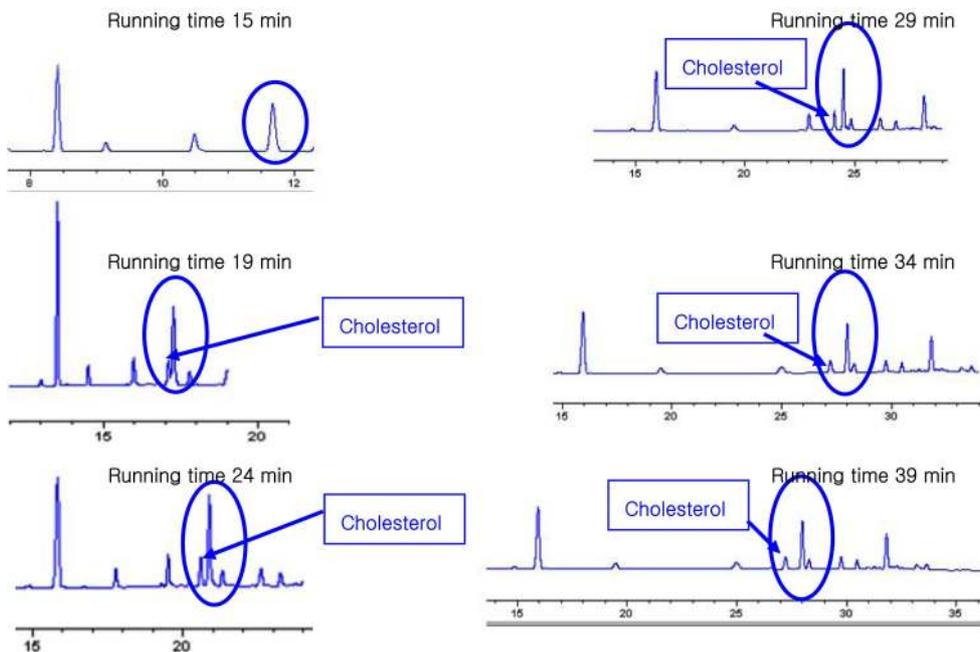


Fig. 4. GC-FID Chromatograms of the various running time for the optimum separation of cholesterol adjusting the oven temperature.

kg로 측정되었으며, 5회 반복 측정 결과 재현성면에서도 우수한 결과를 얻을 수 있었다.

GC-MS 정성 분석

Fig. 5는 확립된 전처리 방법 및 기기 분석 조건을 이용하여 SRM 1849를 분석한 후 검출되는 물질들을 확인하여 나타낸 크로마토그램이다. 분석 시간을 충분히 길게 하

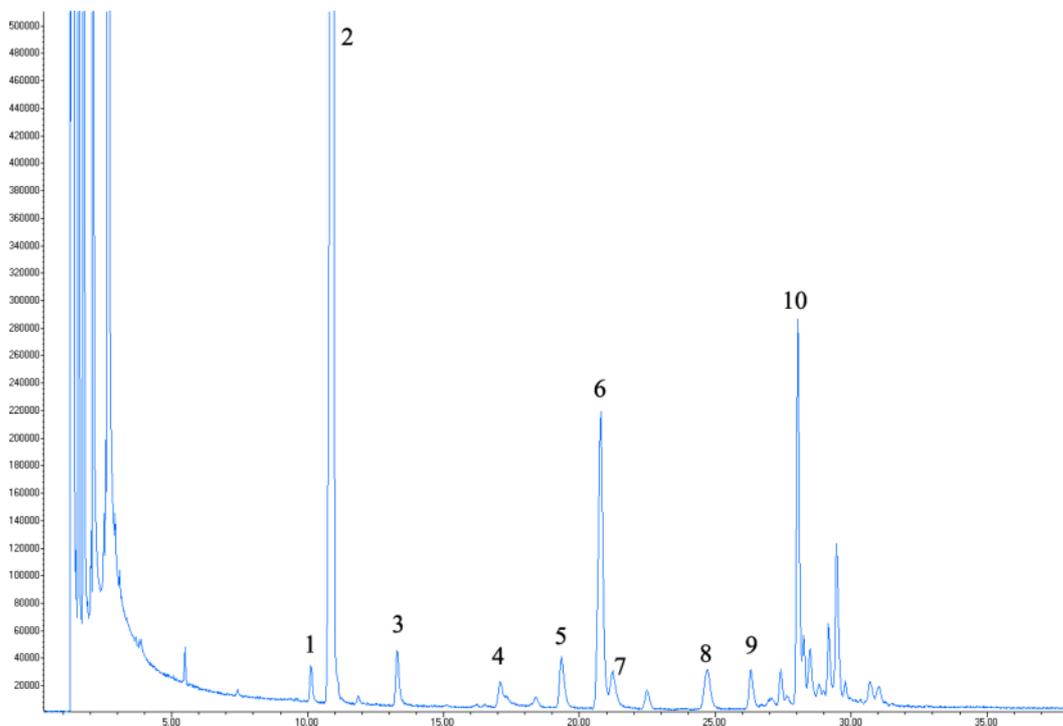


Fig. 5. GC-MS Chromatograms of the SRM 1849 for the determination of cholesterol in the optimized condition. 1, squalene (99); 2, 5α -cholestane (96); 3, δ -tocopherol (99); 4, γ -tocopherol (97); 5, cholesterol (99); 6, α -tocopherol (99); 7, desmosterol (96); 8, campesterol (99); 9, stigmasterol (99); 10, β -sitosterol (99); () = GC-MS library quality (%)

Table 1. Results of the tested value of cholesterol for the SRM 1849 by direct saponification processing method

Sample	Certificated value (mg/100 g)	Tested value ¹⁾ (mg/100 g)	RSD (%)	Recovery (%)
SRM 1849	12.7±1.5	11.64±0.23	1.98	-
SRM 1849+Spiked ²⁾	112.7±1.5	110.30±4.10	3.73	98.80±2.04

¹⁾The values are mean ±SD of 3 replications.

²⁾Spiked level is 100 mg/100 g.

Table 2. Validation information for Cholesterol in infant formulas by direct saponification processing method with GC-FID analysis

Sample name	R ²	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	MDL (mg/kg)	Tested value ¹⁾ (mg/100 mL)	RSD (%)
Infant formula 1 ²⁾					6.09±0.26	4.32
Infant formula 2 ²⁾	0.9999	9.85	32.84	9.85	7.05±0.41	3.64
Infant formula 3 ²⁾					7.05±0.27	3.71
Infant formula 4 ²⁾					8.02±0.27	3.25

¹⁾The values are mean ±SD of 3 replications.

²⁾The labeled values are 7 mg/100 mL.

지 않았을 경우 콜레스테롤과 중첩되는 물질은 α -tocopherol 이었으며, α 외에 γ , δ -form도 함께 검출되었다. 직접 검화 방법으로 콜레스테롤 분석 시 지용성 비타민인 일종인 α -tocopherol은 콜레스테롤과 함께 검출될 수 있으며, 따라서 두 성분이 함께 함유되어 있는 원자재 및 제품 분석에는 본 연구에서 확립된 기기 분석 조건을 활용하는 것이 타당할 것으로 사료되었다.

유효성 검증 및 첨가 회수 실험 결과

본 연구의 실험방법에 의하여 국제인증표준물질인 SRM 1849의 콜레스테롤 분석 결과 값을 Table 1에 나타내었다. 국제인증표준물질의 결과 값은 인증 값 범위 내로 측정되었으며, CRM에서 보장된 균일성과 실험 오차를 고려했을 때 유사한 결과가 산출되었음을 알 수 있었다($p < 0.05$). 첨가 회수 실험을 한 결과 회수율은 98.80±2.04%로 양호한 회수율을 나타냈다. 콜레스테롤 정량 분석을 위한 각각의 유효성 검증 결과를 Table 2에 나타내었다. 회귀곡선의 상관계수(correlation coefficient R² value)는 0.9999으로 측정되었고, 분석기기의 검출한계(limit of detection; LOD)는 9.85 mg/kg, 정량한계(limit of quantitation; LOQ)는 32.84 mg/kg로 측정되었으며, 조제분유 시료에 대한 방법검출한계(method detection limit; MDL)는 기기검출한계와 같은 9.85 mg/kg로 측정되었다. 또한 조제분유 1, 2단계 및 성장기용 조제식 3, 4단계 시료의 콜레스테롤 함량을 분석한 결과 6.09, 7.05, 7.05, 8.02 mg/100 mL가 검출되어 표시 함량인 7 mg/100 mL에 오차 1 mg/100 mL 범위 내의 결과 값을 나타내었고 이는 법적 기준인 80-120% 범위를 충족시키는 결과 값이었다. 각 결과 값의 RSD는 5% 미만을 나타내 분석 결과값에 대한 유의성을 증명하였으며, 본 연구를 통해 개발된 시험법에 의한 정량 분석이 유

효할 것으로 사료되었다. 따라서 본 연구에서 확립한 전처리 방법 및 기기 분석 조건을 활용해 신속 정확하고 효율적인 콜레스테롤 분석을 수행할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구에서는 조제분유 중의 콜레스테롤을 신속하고 정확하게 분석하기 위해 지방 추출 과정을 거치지 않는 직접 검화 방법을 선택하여 분석법 개발을 시도하였다. 조제분유 분말시료를 직접 검화 수기에 취하여 검화 온도, 검화 시간, KOH 농도의 3가지 인자에 대해 콜레스테롤 회수율이 가장 양호하게 나타나는 최적 검화조건을 확립하고, 검화 후 수세과정에서 액액 분배가 용이한 용매 조건도 확립하였다. 또한 콜레스테롤 피크의 완전한 분리를 위한 적정 기기 조건을 확립하였다. 그 결과, 시료 약 2 g에 16 M-KOH 10 mL를 넣고 90°C에서 60분 가열하여 검화한 후 diethyl ether로 3회 추출하고 hexane을 최종시험용액으로 하여 기기분석을 했을 때의 회수율이 98.80%로서 가장 양호하게 나타났다. 본 연구를 통해 개발된 조제분유의 효율적인 액액분배 및 직접가열 검화법은 일원배치 분산법에 의해 유화가공식품의 콜레스테롤 분석법으로 유효성이 검증되었으며, 아울러 개발된 전처리 방법 및 기기 분석 조건을 활용해 다양한 분석 기관에서 신속 정확하고 효율적인 콜레스테롤 분석을 수행할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 산업체의 품질관리 및 검증기관에서 필요 시 모니터링에 적극 활용 가능할 것으로 사료되며, 이를 통해 유화가공식품 류의 함량표시 및 규격관리의 정확성과 효율성 증대에 기여하여 제조업체의 정확하고도 효과적인 품질 및 안전성 확보에 기여할 수 있을 것으로 판단된다. 특히 위해 물질에 대한 정확한 함량 판단이 중요한

조제분유 등의 영·유아용 식품의 안전성 확보에 지대한 공헌을 할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 2011년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문이며, 연구비 지원에 감사의 말씀 드립니다.

참고문헌

1. AOAC (2005a) Official methods of analysis. 18th ed, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 976.26, Cholesterol in multicomponent foods.
2. AOAC (2005b) Official methods of analysis. 18th ed, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, 994.10, Cholesterol in foods, direct saponification-gas chromatographic method.
3. Choong, Y. M., Lini, H. J., Chen, C. W., and Wang, M. L. (1999) A rapid gas chromatographic method for direct determination of free sterols in animal and vegetable fats and oils. *J. Food Drug Anal.* **7**, 279-290.
4. Fletouris, D. J., Botsogloi, N. A., Psomas, I. E., and Mantis, A. I. (1998) Rapid determination of cholesterol in milk and milk products by direct saponification and capillary gas chromatography. *J. Dairy Sci.* **81**, 2833-2840.
5. Guardiola, F., Codony, R., Rafecas, M. and Boatella, J. (1994) Selective gas chromatographic determination of cholesterol in eggs. *JAOCs* **71**, 867-871.
6. International standard (2001) ISO 14156 | IDF 172; Milk and milk products - Extraction methods for lipids and liposoluble compounds. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
7. International standard (2006) ISO 18252 | IDF 200; Anhydrous milk fat - Determination of sterol composition by gas liquid chromatography (Routine method). International Dairy Federation. Brussels, Belgium.
8. Korea Food Code (2010) 10.1.1.5.6, Cholesterol. Korea Food Industry Association, Seoul, Korea, pp. 431-433.
9. KS A ISO 5725 (2002) Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Korean Agency for Technology and Standards, Gwacheon, Korea.
10. Kwak, B. M., Ahn, J. H., and Chang, C. H. (2005) Simultaneous determination of vitamin D3 and K1 in infant formula by column-switching high performance liquid chromatography with UV detection. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 1024-1027.
11. Kwak, B. M., Lee, K. W., Ahn, J. H., and Kong, U. Y. (2004) Simultaneous determination of vitamin A and E in infant formula by rapid extraction and HPLC with photodiode array detection. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**, 189-195.
12. Lee, D. K., Ahn, J. J., and Kwak, H. S. (1997) Comparison of gas chromatographic method with enzymatic method for cholesterol determination in milk and cream. *Foods Biotechnol.* **6**, 322-324.
13. Sullivan, D. M., and Carpenter, D. E. (1993) Methods of analysis for nutrition labeling: Chapter 5 lipid analysis. AOAC International, Arlington, USA, pp. 85-103.
14. Sweeney, J. P. and Weihrauch, J. L. (1976) Summary of available data for cholesterol in foods and methods for its determination. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **8**, 131-159.

(Received 2011.11.28/Accepted 2011.11.29)