

Error factors and uncertainty measurement for determinations of amino acid in beef bone extract

Young-Jun Kim^{1,2}, Ji-Young Kim³, Min-Yu Jung¹ and Young-Jae Shin⁴★

¹Department of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

²Ottogi Food Safety Center, Anyang, Gyeonggi 431-070, Korea

³Department of Agro-Food safety, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

⁴Department of Environmental Horticulture, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

(Received August 24, 2012; Revised February 4, 2013; Accepted March 5, 2013)

사골농축액 시료 중에 함유된 아미노산 정량분석에 대한 오차 요인 및 측정불확도 추정

김영준^{1,2} · 김지영³ · 정민유¹ · 신영재⁴★

¹서울대학교 농생명공학부, ²오뚜기 식품안전센터,
³국립농업과학원 농산물안전성부, ⁴단국대학교 환경원예학과
(2012. 8. 24. 접수, 2013. 2. 4. 수정, 2013. 3. 5. 승인)

Abstracts: This study was demonstrated to estimate the measurement uncertainty of 23 multiple-component amino acids from beef bone extract by high performance liquid chromatography (HPLC). The sources of measurement uncertainty (i.e. sample weight, final volume, standard weight, purity, standard solution, calibration curve, recovery and repeatability) in associated with the analysis of amino acids were evaluated. The estimation of uncertainty obtained on the GUM (Guide to the expression of uncertainty in measurement) and EURACHEM document with mathematical calculation and statistical analysis. The content of total amino acids from beef bone extract was 36.18 g/100 g and the expanded uncertainty by multiplying coverage factor (k, 2.05~2.36) was 3.81 g/100 g at a 95% confidence level. The major contributors to the measurement uncertainty were identified in the order of recovery and repeatability (25.2%), sample pretreatment (24.5%), calibration-curve (24.0%) and weight of the reference material (10.4%). Therefore, more careful experiments are required in these steps to reduce uncertainties of amino acids analysis with a better personal proficiency improvement.

요약: 본 연구는 액체크로마토그래피를 이용하여 사골농축액 시료 중에 23종의 아미노산 정량분석 시 발생할 수 있는 측정불확도를 평가하였다. 아미노산 분석에 관여하는 측정불확도 인자로 시료량, 최종 무게, 표준품 무게, 표준품 순도, 검정곡선, 회수율 및 재현성 등을 확인하였다. GUM (Guide to the expression of uncertainty in measurement)과 EURACHEM에 근거하여 측정불확도에 대한 수학적 계산 및 통계분석을 수행하였다. 사골농축액 시료 중 총 아미노산 함량은 36.18 g/100 g이었으며, 95% 신뢰수준(k, 2.05~2.36)

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)41-550-3648 Fax : +82-(0)41-559-7881

E-mail : ys234@dankook.ac.kr

에서 확장불확도는 3.81 g/100 g이었다. 측정불확도의 주요 요인은 분석시의 회수율과 반복성(25.2%) > 시료전처리(24.5%) > 검정곡선(24.0%) 순으로 나타났다. 따라서 아미노산 분석 시 불확도를 줄이기 위해서는 실험자들의 주의와 개인적인 숙련도의 향상이 요구된다.

Key words: uncertainty, measurement, amino acid

1. 서 론

육제품의 독특한 향과 풍미는 여러 효소작용 뿐만 아니라 화학적인 반응에 의해 생성되며, 품질을 결정하는 주요한 요소로 아미노산의 함량이 지표로 사용되고 있다.^{1,3} 아미노산 조성 및 분석은 식품의 중요한 영양학적 품질성분이므로 이에 대한 정확한 분석정보가 필요하다. 식품 중에 아미노산에 대한 함량을 분석하는 방법에는 단백질을 가수분해시켜 전개하는 박막 크로마토그래피법(Thin Layer Chromatography), 기체 크로마토그래피법(Gas Chromatography), 고속액체크로마토그래피법(High Performance Liquid Chromatography) 등이 있다.⁴ 이 중 가장 널리 사용되는 방법은 고속액체 크로마토그래피법이다. 그러나 식품에 함유된 아미노산을 공인된 방법으로 분석할 경우, 숙련된 연구자가 비록 정확하게 실험을 수행함에도 불구하고 일관된 분석결과를 얻을 수 없다.⁵ 게다가 미량 성분의 경우, 분석 시 여러 가지 간섭 요인에 따른 오차로 인하여 분석결과에 차이가 있을 수 있으므로 측정 결과에 대한 신뢰도는 무엇보다도 중요하다. 참값에 가까운 값을 얻기 위하여 시료 전처리나 기기분석 조작의 일관성은 물론 결과 해석 시 오차 요인을 도출하고 이를 최소화하려는 노력이 필요하다. 분석의 불확도를 추정하는 방법으로는 GUM(Guide to the expression of Uncertainty in Measurement)과 EURACHEM에 근거하여 수학적 처리 및 통계방법을⁶⁻⁷ 그리고 미국 NIST(National Institute of Standards and Technology, NIST, USA)의 지침 등이 널리 이용된다.⁸ 이들은 불확도 계산절차, 즉, 측정량의 함수표현, 입력량의 표준불확도 계산, 합성표준불확도의 계산, 확장불확도의 계산 방법 등 측정불확도에 대한 수학적, 통계적 이론 및 예시를 수록하고 있어 불확도 산정 및 표현에 사용되고 있다.⁹ 또한, ISO 17025에서도 국가간의 무역장벽을 없애기 위해 수출 시 중요한 영향을 줄 수 있는 성분에 대해서는 기본적으로 측정불확도를 추정할 수 있도록 기술하고 있으며,¹⁰ 품질체계에서는 시험분석의 결과에 영향을 미치는 요인에 대하여 측정불확

도 산출을 의무화하고 있다.¹¹ 그러므로 불확도가 표시되어 있지 않는 분석결과는 신뢰도에 관한 정량적인 지표가 없으므로 측정의 의미를 상실할 수도 있다.¹² 국내 연구로는 야채음료 중 비타민 C 불확도 산출,⁵ HS-GC에 의한 생체 시료 내 툴루엔 분석 방법의 유효화와 불확도 추정,¹³ 돼지고기 중 항생제 일종인 flubendazole의 측정불확도 추정,¹⁴ 조제분유 중 비타민 A분석의 측정불확도 비교산정,¹⁵ 면류에서 HPLC를 이용한 데옥시니발레놀(Deoxynivalenol) 분석법의 검증과 불확도 산정,¹² 토마토 페이스트 중 ICP/MS를 이용한 카드뮴 및 납의 측정불확도 추정¹⁶ 등 다양한 분야의 연구가 수행되었다. 그러나 국내에서 아미노산을 포함한 시료의 경우에는 불확도 인자의 선정이나 오차 발생의 규명에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 특히, HPLC 분석은 기기의 정밀도와 반복성 측정의 정확성 등이 중요하게 작용하며, 시료 영향에 따라 미량 성분의 경우 정량이 어려울 수도 있다.^{17,18} 따라서, 여러 성분을 한번에 분석하는 경우에는 전체의 과정을 고려하여 불확도를 평가하도록 하여야 한다.¹⁹ 본 연구에서는 사골농축액 분석 시 아미노산 분석결과와의 오차 요인을 감소시키고자 분석에 영향을 미치는 여러 가지 불확도 요인을 알아보고 요인별 측정값으로부터 표준불확도(Standard uncertainty), 합성불확도(combined standard uncertainty), 확장불확도(Expanded uncertainty)를 산출함으로써 각 단계별 오차에 원인을 주는 요소를 제어할 수 있도록 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에서 사용된 아미노산 분석용 시료는 설탕, 인공색소 및 보존료가 무첨가된 뉴질랜드산 사골농축액으로 일반성분은 탄수화물 6.2%, 단백질 36.2%, 지방 1.3%, 열량 180 kcal인 제품을 시료로 하였다. 아미노산 표준품 23종은 Aspartic acid (Asp), Glycine (Gly), Isoleucine (Iso), Proline (Pro), Cystine (Cy2), Alanine (Ala), Serine (Ser), Arginine (Arg), Phenylalanine (Phe),

Valine (Val), Threonine (Thr), Histidine (His), Lysine (Lys), Leucine (Leu), Tyrosine (Tyr), Glutamic acid (Glu), Methionine (Met), Hydroxyproline (Hyd), Sarcosine (Sar), L-Norvaline (Nva), Asparagine (Asn), Glutamine (Gln), Tryptophan (Try)로 선정하였다. Agilent (No. 5061-3331 및 No. 5062-2478, Swiss)에서 구입하여 사용하였으며, 유도체화 시약은 OPA (*o*-phthalaldehyde, No. 5061-3335, Agilent, Swiss)와 FMOC (9-fluorenylmethyl carbonyl chloride, No. 5061-3337, Agilent, Swiss)를 사용하였다. HPLC 이동상인 acetonitrile 및 methanol은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입한 HPLC 등급을 이용하였다. 초순수는 water purification System (Millipore, Bedford, MA, USA)에 의해 18.0 MΩ 수준으로 정제된 물을 사용하였으며, 실험에 사용된 초자, 저울, 피펫은 교정기관에서 교정하여 불확도 자료로 사용하였다.

2.2. 시료 전처리 및 분석조건

아미노산 분석은 기존에 발표된 논문을 참고하여 HPLC (1100 series, Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다.^{4,20-21} 사골농축액 약 0.3 g을 취한 후 6 N HCl 15 mL를 가하고 시료를 잘 섞이게 한 후, 질소로 충전하고 105 °C heating block에서 24시간 가수분해를 실시하였다. 가수분해액은 100 mL 물로 정용하였으며, 이중 0.2 mL를 김블튜브에 옮긴 후 농축을 실시하고, 0.1 N HCl 용액을 0.2 mL가하여 0.45 μm 필터로 여과

후 HPLC로 분석하였다. 컬럼은 Zorbax Eclipse AAA (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)을 사용하였고, 이동상 A=40 mM NaH₂PO₄ (pH 7.8), B=acetonitrile:methanol: water (45:45:10, v/v/v)를 이용하여 40 °C에서 분리하였으며, Multi Wavelength Detector로 338/262 nm에서 검출하였다. 정량은 표준품을 이용하여 검정곡선을 작성하고 외부표준법으로 계산하였다.

2.3. 불확도 추정방법

GUM⁷과 EURACHEM⁶에 근거하여 모델 관계식을 설정하고, 각각의 불확도 요인들로부터 불확도를 추정하였다.

2.4. 모델 관계식 설정

검정선에서 분석된 시험용액의 아미노산 농도는 식 (1)과 같이 산출하였으며, 이로부터 사골농축액의 농도(C_{spl})를 전체적으로 불확도가 전파될 수 있도록 수학적 모델관계식 (2)을 설정하였다. 전체적인 불확도 요인 및 인자들에 대한 세부 내용은 Fig. 1과 같이 도식화하였다.

$$C_{spl} = \frac{(A_j - B_0)}{B_1} \tag{1}$$

A_j : jth measurement of the area of the ith calibration standard

B₁ : Slope of the calibration curve

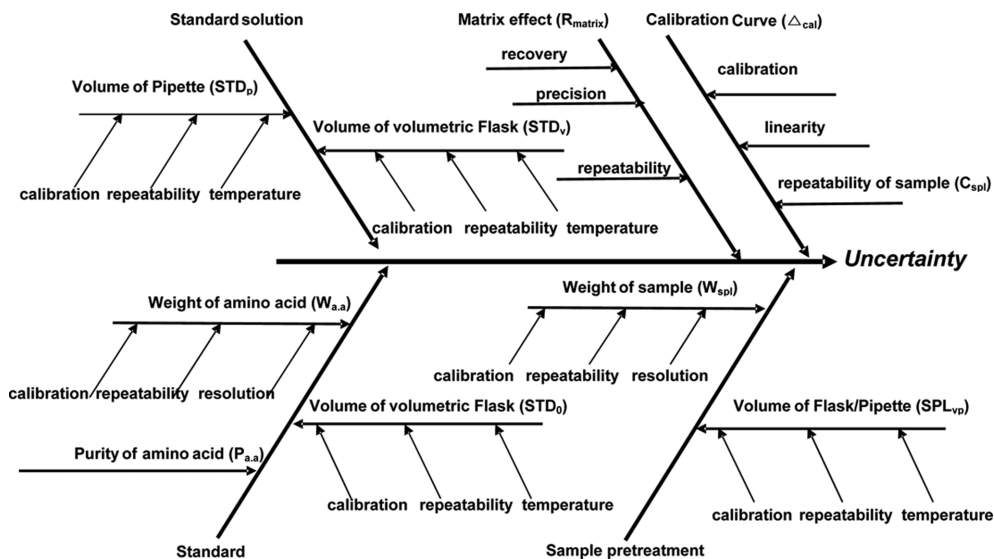


Fig. 1. Cause and effect diagram of uncertainty sources in amino acids determination.

B_0 : Intercept of the calibration curve

$$C_s = \frac{C_{spl} \times F W_{spl}}{W_{spl}} \times 100 = \frac{(A_j - B_0) \times F W_{spl}}{W_{spl} \times B_1} \times 100 \quad (2)$$

C_s : Concentration of sample (mg/100g)

C_{spl} : Concentration of sample in the extraction solution (mg/g)

FW_{spl} : Final weight of sample (g)

W_{spl} : Weight of sample (g)

2.5. 요인별 측정값과 표준불확도 (Standard uncertainty, $u(x_i)$)

반복 측정하여 산출된 평균값을 해당 요인의 측정값으로 사용할 경우, 평균값의 표준편차를 A type 표준불확도로 평가하였으며, 저울과 플라스크, 피펫 등의 교정시험검사결과를 사용하는 경우에는 B type 표준불확도로 평가하였다.²² A type 표준불확도로 평가하는 경우는 반복 측정된 결과를 사용하는 경우 적용하는 불확도이며, B type 표준불확도는 기존의 측정 데이터, 교정 등과 같은 결과를 사용할 경우 사용하는 방법이다. 또한, 자유도는 KOLAS (Korea Laboratory Accreditation Scheme, 한국교정시험기관 인정기구)에서 발간한 측정결과의 불확도 산정 및 표현을 위한 지침²²에 따라 산출하였으며, 반복측정실험의 경우는 $n-1$, 최소제공방법에 의해 직선의 기울기와 절편을 결정할 때는 자유도를 $n-2$ 로 계산하였다.

2.6. 검정선의 불확도 (Uncertainty of calibration curve)

각각의 아미노산의 농도를 구하기 위하여 표준 용액을 여러 농도로 희석하여 검정선을 작성한 후 분석하였다. 검정선은 linear least square fitting을 이용하여 1차 선형 회귀식 (3)을 이용하였으며, 이때 상대표준불확도는 식 (4-6)을 이용하여 산출하였다.

$$A_j = C_i \times B_1 + B_0 \quad (3)$$

A_j : j^{th} measurement of the area of the i^{th} calibration standard

C_i : Concentration of the i^{th} calibration standard

B_1 : Slope of the calibration curve

B_0 : Intercept of the calibration curve

$$u(C_0) = \frac{S}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (4)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 C_j)]^2}{n-2}} \quad (5)$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2 \quad (6)$$

p : Number of measurements to determine C_0

n : Number of measurements for the calibration

C_0 : Concentration of amino acid in the extraction solution

\bar{C} : Mean value of the different calibration standards (n number of measurements)

i : Index for the number of calibration standards

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

2.7. 감응계수 (Sensitive coefficient)

각각의 측정량의 불확도 인자가 전체 결과값에 미치는 영향을 표현하는 감응계수는 식 (7)과 같이 구하였다.

$$c_i \equiv \frac{\partial f}{\partial x_i} \approx \frac{(\Delta y)_i}{\Delta x_i} \quad (7)$$

2.8. 합성표준불확도 (Combined standard uncertainty, $u_c(y)$)

측정결과가 여러 개의 다른 입력량으로부터 산출될 때 이 측정결과의 표준불확도를 합성표준불확도라고 하며 합성은 불확도 전파의 법칙 (law of propagation of uncertainty) (8)을 이용하여 구하였다.

$$u_c(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)} \quad (8)$$

2.9. 유효자유도와 포함인자 (Coverage factor, k)

포함인자 k 를 구하기 위해서는 합성표준불확도의 유효자유도를 산출하여야 하는데, 이 유효자유도 (ν_{eff})는 Welch-Satterthwaite 식 (9)을 이용하여 추정하였다.

$$\nu_{\text{eff}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{[c_i u(x_i)]^4}{\nu_i}} \quad (9)$$

2.10. 확장불확도 (Expanded uncertainty, U)

산출된 합성표준불확도에 유효자유도로부터 신뢰수준 95%에 해당하는 포함인자 k 값을 곱하여 식 (10)과

같이 확장불확도를 산출하였다.

$$U = k u_c(y) \quad (10)$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 표준품 무게 측정의 불확도

아미노산 표준품의 무게 (W_{aa})를 측정 시 저울에 대한 교정성적서 상의 불확도, 측정반복성, 저울의 분해능이 불확도 요인으로 고려되어야 한다. 저울에 대한 교정 성적서상의 불확도는 95% 신뢰수준에서 ± 0.00050 g의 불확도를 가지고 있으므로 이 값을 2로 나누어 줌으로써 표준불확도는 0.00025 g이 된다. 측정의 반복성은 표준물질의 질량과 동량의 무게를 가진 분동을 이용하여 10회 측정 한 값의 표준편차 0.00024 g을 반복성에 대한 불확도로 사용하였다. 또

한, 저울 (Mettler Toledo AX-504, Swiss)의 분해능은 0.0001 g이며, 분해능에 대한 불확도는 0.00003 g이었다. 저울의 합성 표준불확도($u(W_{aa})$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 나타내었다. 따라서, 각각 아미노산 표준품 $0.0188\sim 0.0601$ g의 무게측정시 상대 표준불확도($u(W_{aa})/W_{aa}$)의 범위는 $0.00580\sim 0.01858$ g이며, 평균 0.01076 g이 된다. 이때 자유도는 측정횟수가 10이므로 각각 9이며, 불확도 요인별 각각의 상대 표준불확도는 Table 1에 나타내었다.

3.2. 표준품 순도의 불확도

표준품의 순도 (P_{aa})에 대한 불확도를 산출하기 위해서 시약 제조사의 규격에서 아미노산은 99%로 표시되어 있으므로 0.99 ± 0.01 로 추정하고, 신뢰구간이 정해져 있지 않으므로 직사각형분포로 간주하여 $\sqrt{3}$ 으로 나누면 순도에 대한 표준불확도 ($u(P_{aa})$)는

Table 1. Relative standard uncertainties for determinations of each amino acid in the bone extract

Amino acid ¹⁾	$u(W_{aa})/W_{aa}$	$u(P_{aa})/P_{aa}$	$u(STD)/STD$	$u(W_{spl})/W_{spl}$	$u(SPL_{vp})/SPL_{vp}$	$u(\Delta cal)/\Delta cal$	$u(C_{spl})/C_{spl}$	$u(R_{matrix})/R_{matrix}$
Asp	0.01048	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01619	0.00289	0.02409
Glu	0.00948	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01944	0.00154	0.02428
Asn	0.01056	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	N/A ²⁾	N/A	N/A
Ser	0.01327	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01713	0.00657	0.02805
Gln	0.00954	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	N/A	N/A	N/A
His	0.00899	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.06809	0.01034	0.04748
Gly	0.01858	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01388	0.00286	0.01801
Thr	0.01171	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01841	0.00633	0.02670
Arg	0.00801	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.02323	0.00549	0.01310
Ala	0.01565	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01508	0.00288	0.02487
Tyr	0.00770	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.04167	0.00681	0.02361
Cy2	0.00580	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	N/A	N/A	N/A
Val	0.01190	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.00940	0.00592	0.02159
Met	0.00935	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.04719	0.01346	0.02025
Nva	0.01190	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	N/A	N/A	N/A
Try	0.00683	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	N/A	N/A	N/A
Phe	0.00844	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.02920	0.00537	0.02696
Ile	0.01063	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.02938	0.00727	0.03334
Leu	0.01063	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01581	0.00378	0.02440
Lys	0.00954	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.08347	0.00176	0.09744
Hyp	0.01064	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01777	0.00355	0.01573
Sar	0.01565	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	N/A	N/A	N/A
Pro	0.01211	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.01905	0.00744	0.02319
Average	0.01076	0.00583	0.00133	0.00085	0.00861	0.02849	0.00554	0.02901

¹⁾For amino acids abbreviation, Asp; L-Aspartic acid, Glu; L-Glutamic acid, Asn; L-Asparagine, Ser; L-Serine, Gln; L-Glutamine, His; L-Histidine, Gly; Glycine, Thr; L-Threonine, Arg; L-Arginine, Ala; L-Alanine, Tyr; L-Tyrosine, Cy2; L-Cystine, Val; L-Valine, Met; L-Methionine, Nva; L-Norvaline, Try; L-Tryptophan, Phe; L-Phenylalanine, Ile; L-Isoleucine, Leu; L-Leucine, Lys; L-Lysine, Hyp; L-4-Hydroxyproline, Sar; Sarcosine, Pro; Proline

²⁾Not applicable (samples which did not contained amino acids cannot be applied)

0.00577이고, 상대 표준불확도 ($u(P_{a,a})/P_{a,a}$)는 0.00583 (0.00577/0.99) g으로 산출되었다.

3.3. 표준용액 제조과정의 불확도

250 pmol/ μ L의 모표준용액 (STD_0) 제조 시, 표준품을 1 L 플라스크에 옮긴 후 용해시 부피 측정에 대한 불확도는 플라스크의 교정성적서 상에 나타난 불확도, 눈금읽기에 대한 시험원의 측정반복성에 의한 불확도, 온도에 따른 물의 변화에 대한 불확도 등이 불확도 요인으로 고려되어야 한다. 즉, 1 L 플라스크의 교정 성적서 상의 불확도는 95% 신뢰수준에서 ± 0.064 mL의 불확도를 가지고 있으므로, 이 값을 2로 나누어 줌으로써 표준불확도는 0.032 mL가 된다. 1 L 플라스크의 눈금 맞추기에 따른 시험원의 불확도는 플라스크에 대한 10회 반복실험으로 측정하였다. 이에 대한 부피 측정시 표준편차 0.11203 mL을 불확도로 사용하였다. 또한, 실험실의 온도변화가 $\pm 4^\circ\text{C}$ 이고, 물의 부피팽창계수는 0.00021/ $^\circ\text{C}$ 이다. 따라서, 온도변화에 따른 부피의 불확도는 $\pm V \times 4 \times 0.00021$ 이며, 신뢰구간이 주어지지 않으므로 직사각형 분포로 간주하여 이에 대한 불확도는 0.84 mL이고 표준불확도는 0.4850 mL이 된다. 플라스크의 합성 표준불확도($u(STD_0)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.4987 mL이 된다. 따라서, 아미노산 모표준용액 제조에 사용된 1 L 플라스크에 대한 상대 표준불확도($u(STD_0)/STD_0$)는 0.0005 (0.4987/1000) mL이 된다. 모표준용액으로부터 100 mL 플라스크에 2배 희석하여 125 pmol/ μ L (STD_1)를 제조하고, 다시 10 mL 피펫을 이용하여 50 mL 플라스크에 5배씩 희석하여 25 pmol/ μ L (STD_2) 표준용액을 제조하였다. 모표준용액과 같은 방법으로 피펫과 플라스크에 대한 합성 표준불확도($u(STD_1 \sim STD_2)$)를 산출하면 100 mL 플라스크는 0.0557 mL, 10 mL 피펫은 0.0070 mL이다. 또한, 상대 표준불확도 ($u(STD_1)/STD_1$) 및 ($u(STD_2)/STD_2$)는 각각 0.00079 mL, 0.00095 mL가 된다. 따라서, 표준품 제조 및 희석시 합성상대표준불확도($u(STD)/STD$)는 제곱합의 제곱근으로 0.00133 mL이 되며, 이때 측정횟수가 10이므로 자유도는 각각 9이다.

3.4. 시료 무게 측정의 불확도

사골농축액 약 0.3 g의 무게 (W_{sp}) 측정 시 불확도는 표준품 무게 측정시와 동일하게, 저울에 대한 교정 성적서 상의 불확도, 측정반복성, 저울의 분해능이 불확도 요인으로 고려하였다. 이때 합성 표준불확도

($u(W_{sp})$)는 0.00026 g이었으며, 시료의 무게측정시 상대 표준불확도 ($u(W_{sp})/W_{sp}$)는 0.00085 (0.00026/0.3) g으로 산출되었다. 이때 자유도는 측정횟수가 10이므로 각각 9이다.

3.5. 시료 전처리의 불확도

전처리시 시료를 6 N HCl로 가수분해 후 100 mL volumetric flask에 옮긴 후 물로 옮기는 과정에서 용해 시 부피 측정에 대한 불확도 (SPL_v)는 표준품 희석시와 동일하게, 플라스크의 교정 성적서 상에 나타난 불확도, 눈금읽기에 대한 시험원의 측정반복성에 의한 불확도, 온도에 따른 물의 변화에 대한 불확도 등이 불확도 요인으로 고려하였다. 이때 100 mL volumetric flask의 합성 표준불확도 ($u(SPL_v)$)는 0.05569 mL이었으며, 시료 전처리시 사용된 100 mL volumetric flask에 대한 상대 표준불확도($u(SPL_v)/SPL_v$)는 0.0006 (0.05569/100) mL이 된다. 또한, 가수분해액에서 0.2 mL을 자동피펫을 이용하여 김블튜브에 취하는 과정에 대한 자동피펫의 상대 표준불확도($u(SPL_{p1})/SPL_{p1}$) 및 이를 건조 농축 후 다시 0.1 N HCl 0.2 mL을 자동피펫을 이용하여 HPLC분석용 시료로 제조하는 과정에 대한 상대 표준불확도 ($u(SPL_{p2})/SPL_{p2}$)도 동일하게 산출하였다. 그 결과, 상대 표준불확도 ($u(SPL_p)/SPL_p$)는 0.0060 mL이 되며, 자유도는 측정횟수가 10이므로 9이다. 따라서, 시료 전처리의 합성상대표준불확도($u(SPL_{vp})/STD_{vp}$)는 제곱합의 제곱근으로 0.00861 mL이 되며, 이때 측정횟수가 10이므로 자유도는 각각 9이다.

3.6. 검정곡선의 불확도

본 연구에서는 검정곡선의 불확도 측정을 위해 3개의 표준용액 농도 (25 pmol/ μ L, 125 pmol/ μ L, 250 pmol/ μ L)를 제조하여 3회 반복 측정하였으며, 각각의 아미노산 모두 직선성은 0.9이상으로 높은 상관성을 나타내었다. 검정곡선의 표준불확도 ($u(\Delta_{cal})$)는 식 (3)~(6)을 이용하여 계산하면, 0.00939~0.07821 g (평균 0.02810 g)이었다. 따라서, 아미노산 검정곡선의 상대 표준불확도 ($u(\Delta_{cal})/\Delta_{cal}$)의 범위는 0.00940~0.08347 g으로 평균 0.02849 g으로 산출되었다. 이때 자유도는 측정횟수 9회이며, 2를 빼므로 7로 적용하였다.

3.7. 시료 분석의 불확도

HPLC를 이용하여 시료를 10 회 반복 분석한 결과의 표준오차를 이용하여 각각의 아미노산의 표준불확도 ($u(C_{sp})$)를 산출하였으며, 그 결과 0.00802~0.01639

g (평균 0.01220 g) 이었다. 또한, 표준오차를 평균값 (C_{spl})으로 나누어 줌으로서 상대 표준불확도를 산출하였으며, 시료 분석의 상대 표준불확도 ($u(C_{spl})/C_{spl}$) 범위는 0.00154~0.01346 g으로 평균 0.00554 g으로 산출되었다. 이때 측정횟수가 10이므로 자유도는 9이며, 평균 함량이 높은 Gly, Glu의 경우 상대 표준불확도가 낮게 산출되었다. 이는 HPLC 분석성분의 함량이 높을수록 정밀도가 높아짐에 따라, 시료 분석의 불확도가 낮게 산출된다는 결과와 유사하였다.¹⁷

3.8. 회수율 및 정밀성의 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복 측정과 회수율 불확도의 상대 불확도를 합성하여 구하였다. 회수율 시험이 10회 행해졌을 때 평균 (R_{matrix})을 산출하고 이에 대한 표준불확도 ($u(R_{matrix})$)는 표준편차를 적용하였다. 각각의 아미노산에 대한 회수율 및 정밀성의 상대 표

Table 2. Recovery rate and peak area RSD (%) of individual amino acids analysis in beef bone extract

Amino acid	Recovery rate (%)	Peak area RSD (%)		
		Recovery	Standard	Sample
Asp	102.28 ± 5.25	5.14	1.31	3.33
Glu	102.43 ± 5.07	4.95	1.57	3.63
Asn	98.38 ± 4.65	4.72	0.68	N/A ¹⁾
Ser	101.33 ± 5.05	4.98	0.44	3.34
Gln	86.45 ± 5.92	6.85	0.64	N/A
His	81.39 ± 11.00	13.51	2.68	13.40
Gly	103.25 ± 4.68	4.54	1.08	2.86
Thr	101.11 ± 5.04	4.98	1.51	3.46
Arg	100.92 ± 5.21	5.16	1.34	3.72
Ala	102.25 ± 4.96	4.85	1.14	2.47
Tyr	96.23 ± 4.75	4.93	1.79	2.69
Cy2	91.86 ± 7.87	8.57	2.40	N/A
Val	100.88 ± 5.18	5.14	2.16	3.32
Met	99.95 ± 5.45	5.45	1.44	3.47
Nva	104.41 ± 6.05	5.80	1.07	N/A
Try	91.01 ± 5.20	5.72	0.74	N/A
Phe	105.37 ± 6.69	6.35	1.13	2.53
Ile	99.58 ± 4.91	4.93	1.08	3.50
Leu	100.83 ± 5.94	5.89	0.76	3.87
Lys	81.00 ± 10.86	13.40	6.66	10.03
Hyp	107.49 ± 2.90	2.70	3.11	2.99
Sar	105.00 ± 9.00	8.57	3.84	N/A
Pro	109.54 ± 2.98	2.72	1.96	5.19
Average	98.82 ± 5.85	6.08	1.76	4.34

¹⁾Not applicable (samples which did not contained amino acids cannot be applied)

준불확도 ($u(R_{matrix})/R_{matrix}$)의 범위는 0.01310~0.09744 g으로 평균 0.02901 g으로 계산되었으며, 이때 자유도는 측정횟수가 10이므로 9로 산출되었다. 또한, 각각의 아미노산은 Table 2와 같이 회수율 평균은 98.82%이었으며, 회수율의 정밀성은 평균 6.08%의 RSD (%)를 나타냈다. 또한, 표준품 측정 시 및 샘플 측정시의 정밀성은 각각 1.76% 및 4.34%으로, FDA에서 요구하는 기준인 회수율의 경우 80~120%, 정확성과 정밀도를 나타내는 RSD (%)는 15%이하로 모두 기준에 적합하였다.²³

3.9. 합성 표준불확도 및 확장불확도

사골농축액 분석결과, Asn, Gln, Cy2, Nva, Try, Sar는 불검출이었으며, 주요한 아미노산은 Glu (5.98 g/100 g) 및 Lys (4.84 g/100 g) 이었다. Table 3에서는 각각의 분석결과, 합성불확도, 유효자유도, 포함인자, 확장불확도, 상대 불확도를 나타내었다. 즉, 각 불확도 인자들의 상대 표준불확도 값을 불확도 전파의 법칙식 (8)에 따라 제곱합의 제곱근으로 합성하여 합성 표준불확도를 산출하였으며, 각각의 아미노산의 범위는 0.0383~0.6253 g/100 g으로 평균 0.1046 g/100 g으로 산출되었다. 확장불확도 산출을 위해 요인별 입력 표준편차의 자유도와 감응계수 식 (7)로부터 유효자유도 (ν_{eff})를 산출하여 적용하였으며, 이에 따른 95% 신뢰수준에서의 $t_{0.95}$ 값으로부터 포함인자 (k)를 산출하였다. 확장불확도는 합성표준불확도 값에 포함인자 (k)를 곱하여 계산하므로, Welch-Satterthwaite식 (9)를 이용하여 유효자유도를 계산하였다. 즉, 각각의 아미노산의 유효자유도는 7.15~27.84의 범위를 나타냈으며, 평균 17.30로 산출되었고, 이에 따른 포함인자 (k)는 2.05에서 2.36으로 평균 2.15로 산출되었다. 따라서, 확장불확도(U)는 식(10)을 이용하여 계산하면, Table 3과 같이 0.08~1.35 g/100 g으로 평균 0.2243 g/100 g으로 산출되었다. 즉, 개별 아미노산의 분석결과 값과 확장불확도 값의 비율을 산출한 결과, 평균 9.86%의 상대 불확도 (%)를 나타냈다. 측정불확도의 비율이 낮게 산출된 아미노산은 Hyp (5.95%) > Val (6.00%) > Gly (6.44%) > Arg (6.76%) > Asp (6.84%) 순으로서 분석결과와 정확도가 우수하였다. 반면, Lys (27.89%)이 가장 높은 측정불확도를 나타냈으며, His (19.56%) > Met (12.99%) > Tyr (11.86%) > Ile (10.1%) 순으로서 값이 높았다. 측정불확도가 높게 산출된 Lys, His, Met, Tyr, Ile에 대해서는 분석 단계별로 높게 산출된 분야에 대해서 샘플 반복 실험, 전처리 및 검정곡선 등에서 더욱더

Table 3. Intermediate values and uncertainties for individual amino acids determination in beef bone extract

Parameter	Concentration (g/100 g)	Combined uncertainty (g/100 g)	Effective degree of freedom	A coverage factor	Expanded uncertainty (g/100 g)	Relative uncertainty (%)
Amino acid	C_{spi}	$u(Cs)$	V_{eff}	k	$u(Cs) \times k$	$u(Cs) \times k / C_{spi}$
Asp	2.9152	0.0956	20.41	2.09	0.1993	6.84
Glu	5.9775	0.2048	18.12	2.10	0.4302	7.20
Asn	N.D. ¹⁾	N/A ²⁾	N/A	N/A	N/A	N/A
Ser	1.3487	0.0507	21.15	2.08	0.1055	7.82
Gln	N.D.	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
His	1.0459	0.0887	8.71	2.31	0.2045	19.56
Gly	2.5912	0.0813	27.84	2.05	0.1668	6.44
Thr	1.4016	0.0514	20.48	2.09	0.1071	7.64
Arg	1.7538	0.0532	10.87	2.23	0.1185	6.76
Ala	2.1861	0.0762	23.46	2.07	0.1575	7.21
Tyr	1.0481	0.0525	7.92	2.36	0.1243	11.86
Cy2	N.D.	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Val	1.4071	0.0409	24.77	2.06	0.0844	6.00
Met	0.6965	0.0383	7.15	2.36	0.0905	12.99
Nva	N.D.	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Try	N.D.	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Phe	1.2421	0.0526	13.21	2.16	0.1136	9.15
Ile	1.2744	0.0605	15.54	2.13	0.1290	10.12
Leu	2.6260	0.0866	20.69	2.09	0.1806	6.88
Lys	4.8430	0.6253	13.16	2.16	1.3508	27.89
Hyp	2.0906	0.0592	18.99	2.10	0.1245	5.95
Sar	N.D.	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Pro	1.7290	0.0603	21.63	2.08	0.1254	7.25
Average \pm S.D	2.13 \pm 1.39	0.10 \pm 0.14	17.30 \pm 6.21	2.15 \pm 0.10	0.22 \pm 0.30	9.86 \pm 5.77

¹⁾Not detected, ²⁾Not applicable (samples which did not contained amino acids cannot be applied)

세심한 주의가 요구된다.

3.10. 시험 결과 및 불확도 인자의 상대기여도

사골농축액 중 총아미노산의 전체 함량은 36.18 \pm 3.81 g/100 g (95% 신뢰도 구간)와 같았으며, 분석결과 값과 비교할 때 10.5% (=3.81/36.18 \times 100)가 불확도인 것으로 산출되었다. 또한, 각각의 불확도 인자들이 전체 불확도에 미치는 영향을 상대 표준불확도의 총합에 대한 각 불확도 인자의 %값으로 산출 하였다 (Table 4). 전체 아미노산의 평균으로 산출한 결과, 분석시의 회수율과 반복성에 따른 불확도 (25.2%)가 가장 크게 나타났으며, 시료 전처리 (24.5%), 검정곡선 (24.0%), 표준품 무게 (10.4%), 표준품 순도 (5.7%) 순이었으며, 표준품 회석시와 시료의 무게 측정 시에는 영향이 적은 것으로 산출되었다(Fig. 2). 일반적으로 측정불확도 추정 시 불확도 인자의 기여도가 높은 인자는 회수율 및

매질의 반복측정 등으로 나타났으며, 이들의 결과는 본 연구결과와 유사한 결과로 나타났다.^{13,24-26} 따라서, 분석과정 중 불확도가 높게 산출된 실험과정인 회수율과 반복성 실험 시에 보다더 정확성 높일 수 있도록 연구가 수행되어야 할 것이며, 시험자의 재현성 있는 결과가 산출될 수 있도록 숙련도를 높일 필요가 있다. 또한, 불확도가 표시된 순도가 높은 표준품, 교정된 volumetric flask와 피펫, 재현성이 높으며 불확도가 우수한 저울, 정기적으로 유효화된 분석기기 유지관리 등의 적절한 실험 환경이 수반되어야 측정불확도를 최소화 할 수 있을 것으로 판단된다.

결론

본 연구에서는 사골농축액 중 품질지표인 아미노산을 분석함에 있어 발생될 수 있는 측정불확도를 추정

Table 4. Contributions to the uncertainty of the individual amino acids determination in beef bone extract (%)

Parameter	W_{aa}	P_{aa}	STD	W_{spi}	SPL_{vp}	Δcal	C_{spi}	R_{matrix}
Asp	11.72	6.52	3.37	2.25	27.82	18.12	3.23	26.95
Glu	10.48	6.45	3.33	2.22	27.49	21.49	1.70	26.83
Asn	N/A ¹⁾	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Ser	13.17	5.79	2.99	2.00	24.68	17.00	6.52	27.84
Gln	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
His	5.27	3.42	1.76	1.18	14.57	39.90	6.06	27.82
Gly	11.85	7.29	3.77	2.52	31.10	17.36	3.58	22.52
Thr	11.81	5.88	3.04	2.03	25.09	18.57	6.62	26.94
Arg	9.36	6.82	3.52	2.35	29.07	27.15	6.42	15.31
Ala	16.70	6.22	3.21	2.15	26.54	16.09	3.07	26.00
Tyr	6.66	5.05	2.61	1.74	21.53	36.06	5.90	20.44
Cy2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Val	14.08	6.90	3.56	2.38	29.42	11.12	7.00	25.54
Met	7.42	4.63	2.39	1.60	19.74	37.46	10.68	16.08
Nva	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Try	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Phe	7.99	5.52	2.85	1.90	23.53	27.62	5.08	25.50
Ile	9.14	5.01	2.59	1.73	21.37	25.25	6.24	28.65
Leu	11.77	6.45	3.33	2.23	27.52	17.49	4.19	27.00
Lys	4.18	2.56	1.32	0.88	10.91	36.62	0.77	42.74
Hyp	12.75	6.99	3.61	2.41	29.81	21.30	4.26	18.86
Sar	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Pro	12.42	5.98	3.09	2.06	25.50	19.53	7.63	23.78
Average \pm S.D	10.40 \pm 3.30	5.73 \pm 1.28	2.96 \pm 0.66	1.98 \pm 0.44	24.45 \pm 5.46	24.01 \pm 8.75	5.23 \pm 2.39	25.22 \pm 6.12

W_{aa} ; weight of amino acid, P_{aa} ; purity of amino acid, STD ; dilution of standard solution, W_{spi} ; weight of sample, SPL_{vp} ; Volumetric flask and pipette of sample pretreatment, Δcal ; linearity of calibration curve, C_{spi} ; concentration of sample in the final solution, R_{matrix} ; recovery and repeatability of matrix,

¹⁾Not applicable (samples which did not contained amino acids cannot be applied)

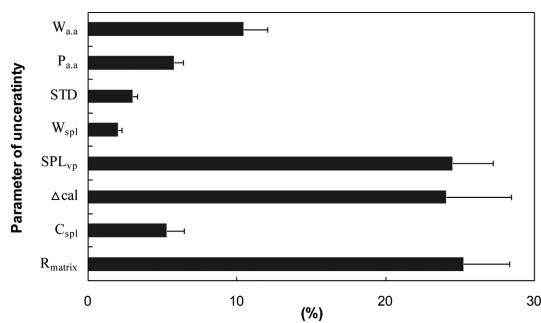


Fig. 2. Average uncertainty contributions of the amino acids determination in beef bone extract. W_{aa} ; weight of amino acid, P_{aa} ; purity of amino acid, STD ; dilution of standard solution, W_{spi} ; weight of sample, SPL_{vp} ; Volumetric flask and pipette of sample pretreatment, Δcal ; linearity of calibration curve, C_{spi} ; concentration of sample in the final solution, R_{matrix} ; recovery and repeatability of matrix.

하여 오차요인을 규명함으로써 이를 최소화하여 신뢰성 있는 결과를 산출하였다. 총 아미노산 분석 시 측정불확도를 산출하기 위하여, 불확도 인자로서 23종의 아미노산 표준품, 측정표준, 시험편차 및 분석값, 분석장비, 분석법, 환경, 표준용액 제조시 원자별, 분자량 등의 요인과 분석 시에는 재현성, 반복성, 검정곡선의 측정불확도 산출 등의 파라미터에 대하여 이를 합성 측정하고 수치화하여 각각의 불확도 인자들이 전체 불확도에 미치는 영향을 산출하였다. 분석결과, Asn, Gln, Cy2, Nva, Try, Sar는 불검출이었으며, 주요한 아미노산은 Glu 및 Lys 이었다. 사골농축액 중 총아미노산의 전체 함량은 36.18 ± 3.81 g/100 g (95% 신뢰도 구간)로서, 분석결과 값과 비교할 때 10.5%가 불확도인 것으로 산출되었다. 이러한 개별 아미노산의 분석결과 값과 확장불확도 값의 비율을 산출한 결과, Lys 이 가장 높은 불확실성을 나타냈으며, 그 다음이 His

> Met > Tyr > Ile 순으로 값이 높았으며, 측정불확도의 비율이 낮게 산출된 아미노산은 Hyp > Val > Gly > Arg > Asp 순으로서 Hyp이 분석 정확도가 가장 높았다. 사골농축액의 아미노산 함량 분석결과, Glu (5.98 g/100 g) > Lys (4.84 g/100 g) > Asp (2.92 g/100 g) > Leu (2.63 g/100 g) > Gly (2.59 g/100 g) 순으로 높게 함유되어 있었고 아미노산 작용기에 따라 화학적 성질이 다르므로 이에 대한 측정불확도 함량도 다르게 나타나므로 해당 아미노산의 실험 시 주의가 요구된다. 본 연구에서 불확도의 주요 요인은 분석시의 회수율과 반복성에 따른 불확도, 시료 전처리, 검정곡선 등이 작용하였다. 따라서 사골 농축액 중 아미노산 분석의 정확도를 높이기 위해서는 회수율과 반복성 실험, 전처리 실험에 주의를 기울이고 검정곡선의 직선성을 높이기 위한 노력을 기울여야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호; PJ008650022013)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. F. Toldrá, M. C. Aristoy, C. Part, C. Crerveró, E. Rico, M. J. Motilva and J. Flores, *J. Food Sci.*, **57**, 816-818 (1992).
2. J. Ventanas, J. J. Cordoba, T. Antequera, C. Garcia, C. Lopez-Bote and A. Asensio, *J. Food Sci.*, **57**, 813-815 (1992).
3. M. A. Dura, M. Flores and F. Toldra, *Food Chem.*, **86**, 385-389 (2004).
4. J. A. White, R. J. Hart and J. C. Fry, *J. Automatic Chem.*, **8**, 170-177(1988).
5. Y. J. Kim and H. W. Kim, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**, 1053-1059 (2003).
6. Ellison, S. L. R., Roesslein, M. I., and Williams, 'A. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements 2nd', EURACHEM, London, UK, 32-94. 2000.
7. ISO, "Guide to the expression of uncertainty in measurements. International Organization for Standardization (GUM), Switzerland". 1995.
8. B. N. Taylor and C. E. Kuyatt, 'Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results, National Institute of standards and technology (NIST)', Gaithersburg, MD, USA (1994).
9. E. Hund, D. L. Massart and J. Smeyers-Verbeke, *Anal. Chim. Acta.*, **480**, 39-52 (2003).
10. L. Alder, W. Korth, A. L. Patey, H. A. Schee and S. Schoeneweiss, *J. AOAC Int.*, **84**, 1569-1578 (2001).
11. M. D. Islam, M. S. Turcu and A. Cannavan, *Food Addit Contam.*, **25**, 1439-1450 (2008).
12. H. E. Ok, H. J. Chang, Y. W. Kang, M. H. Kim and H. S. Chun, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 142-149 (2011).
13. S. C. Heo, J. S. Min, J. S. Park, M. A. Lim and S. W. Park, *Analytical Science & Technology.*, **17**, 443-453 (2004).
14. M. K. Kim, S. J. Park, C. M. Lim, B. H. Cho, H. J. Kwon, D. G. Kim and G. S. Chung, *Korean J. Vet Res.*, **47**, 139-145 (2007).
15. H. M. Lee, B. M. Kwak, J. H. Ahn and T. H. Jeon, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **40**, 152-159 (2008).
16. J. Y. Kim, Y. J. Kim, J. H. Yoo, J. H. Lee, M. J. Kim, D. W. Kang, G. J. Im, M. K. Hong, Y. J. Shin and W. I. Kim, *Korean J. Environ Agric.*, **30**, 179-188 (2011).
17. U. Schepers, J. Ermer, L. Preu and H. Watzig, *J. Chromatogr. B.*, **810**, 111-118 (2004).
18. D. B. Hibbert, J. Jiang and M. I. Mulholland, *Anal. Chim. Acta.*, **443**, 205-214 (2001).
19. E. Soboleva, A. Ambrus and O Jarju, *J. Chromatogr. A.*, **1029**, 161-166 (2004).
20. R. L. Heinrikson and S. C. Meridith, *Anal. Biochem.*, **136**, 65-74 (1984).
21. C. R. Llamas and J. Fontaine, *J. AOAC Int.*, **77**, 1362-1402 (1994).
22. KOLAS, "Guideline for quantifying and expressing the uncertainty in measurement results. Korea Laboratory Accreditation Scheme. Daejeon, Korea", 2000.
23. FDA. Guidance for industry Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Rockville, MD, USA. 2001.
24. J. Y. Jun, B. M. Kwak, J. H. Ahn and U. Y. Kong, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **36**, 701-710 (2004).
25. S. Leito, K. Mölder, A. Künnapas, K. Herodes and I. Leito, *J. Chromatogr. A.*, **1121**, 55-63 (2006).
26. H. E. Ok, H. J. Chang, J. H. Ahn, J. Y. Cho and H. S. Chun, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **41**, 258-264 (2009).