

고성능 액체크로마토그래피를 이용한 식이보충제에서 크레아틴, 디시안디아마이드, 디하이드로트리아진의 동시분석

박상욱¹, 유명상¹, 이원재*

Simultaneous Determination of Creatine, Dicyandiamide and Dihydrotriazine in Dietary Supplements by High Performance Liquid Chromatography

Sang-Wook Park¹, Myung-Sang Yoo¹, and Wonjae Lee*

접수: 2014년 6월 17일 / 게재승인: 2014년 7월 9일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The simultaneous determination of creatine monohydrate (CrM), dicyandiamide and dihydrotriazine in dietary supplements using reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) was developed. Chromatography was performed on a Nuclosil 100-5 SA (4.6×250 mm) column with a mobile phase of 2.3% ammonium phosphate (pH 5.5), and UV detection at 224 nm, 212 nm, and 237 nm, respectively. The performance characteristics of HPLC were determined in terms of selectivity, linearity, precision, recovery, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). The calibration curves were linear within the concentration range of 40.0~500.0 µg/mL for creatine, 0.1~12.8 µg/mL for dicyandiamide, and 0.05~6.4 µg/mL for dihydrotriazine. The detection limits of the method were 1.09, 0.01, and 0.08 µg/mL for creatine, dicyandiamide, and dihydrotriazine, respectively. The recoveries of creatine, dicyandiamide, and dihydrotriazine were 97.2~100.9, 92.3~106.5, and 97.2~105.5%, respectively. It is expected that the chromatographic analytical method developed in this study will be usefully applicable to simultaneous

determination of creatine, dicyandiamide, and dihydrotriazine contained in dietary supplements.

Keywords: Creatine, Dicyandiamide, Dihydrotriazine, High performance liquid chromatography, Simultaneous determination

1. INTRODUCTION

크레아틴 (creatine)은 나트륨 사코시네이트 (sodium sarcosinate)와 시안아미드 (cyanamide)가 화학적으로 합성되어 만들어진 것이다. 크레아틴을 섭취하면 체내에서 인산기 (phosphate)가 붙은 인산 크레아틴 (phospho-creatine)이 되는데 인산 크레아틴은 우리 몸에서 에너지를 내는 ATP의 생성에 사용되어 에너지 생성을 도와준다. 동물실험 및 인체적용연구에서 크레아틴 섭취 후, 혈액과 근육에 인산크레아틴이 증가되는 것이 확인되었으며, 실제로 운동선수를 대상으로 크레아틴의 보충효과를 비교한 연구에서 크레아틴이 숄더프레스 (shoulder press), 인클라인프레스 (incline press) 등의 근력운동 수행능력을 향상시키는 것이 확인되었다. 식품의약품안전처 (이하 식약처)에서는 2007년 “근력 운동 시에 운동수행능력 향상에 도움을 줄 수 있습니다.”의 기능성을 인정하였고, 기능성 등급은 기반연구와 인체적용연구의 수가 충분하지는 않으나, 그 결과가 일관성 있으므로 “기타기능 II”에 해당됨을 인정하였다 [1]. Kreider [2]에 의하면 크레아틴은 사

조선대학교 약학대학 약학과
College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel: +82-62-230-6376, Fax: +82-62-222-5414
e-mail: wlee@chosun.ac.kr

¹조선대학교 대학원 식품의약학과
¹Department of Food and Drug, Chosun University Graduate School, Gwangju 501-759, Korea

람의 근육의 최대 장력을 늘려주며, Lyoo 등 [3]은 크레아틴을 매일 섭취 시 근육 및 근육에 관련된 신경퇴화성 질병에 치료가 가능하다고 보고하였다. 또한 Kley 등 [4]은 크레아틴을 이용하여 근육의 장력을 줄이고 근력의 기능을 향상시켰으며, Rahimi [5]는 DNA의 돌연변이 형성을 줄이는 것과 연관성이 있다고 보고하였다. 그러나 최근에는 크레아틴을 제조하는 과정에 저급 출발물질 (starting materials)을 사용하거나 합성과정에서 최적화되지 않은 상태에서 충분한 수세 과정을 거치지 않은 경우에는 유기오염물질인 크레아티닌 (creatinine), 디시안디아마이드 (dicyandiamide), 디하이드로트리아진 (dihydro-1,3,5-triazine)과 같은 부적절한 유기오염물질이 생성된다고 보고되었다 [6]. 그래서 크레아틴을 기능성 원료 사용·판매하고자 하는 자는 「건강기능식품기능성원료 및 기준·규격인정에 관한 규정」 제12조제1항제5·6호와 제14조제5호 가목과 나목에 해당하는 지표 (기능)성분인 크레아틴과 유기오염물질인 디시안디아마이드, 디하이드로트리아진의 기준 및 규격을 설정하고 시험방법 타당성 검토에 해당하는 자료를 제출한 후 원료 내 기능성분과 오염물질이 기준 설정범위에 적합 여부를 확인하도록 하였다 [7]. 이러한 기준 및 시험방법은 신청 영업자가 인정받은 개별인정형 기능성원료에만 제한되므로 기능성 원료가 고시형으로 전환되기 위해서는 과학적 증거를 확보한 표준화 시험법 마련이 필수적이다. Alekha 등은 시중에 유통 판매중인 크레아틴 제품을 대상으로 내부표준물질 첨가법을 이용하여 고성능액체 크로마토그래피 (HPLC)로 분석하는 방법을 제시했으며 [8], Moret 등은 HPLC를 이용하여 크레아틴과 유기오염물질들을 동시 분석할 수 있는 방법을 개발하였고 만족할 만한 결과 얻었다고 보고하였다[9]. 그러나 이러한 검증은 시험자, 시험환경, 시험과정 설계 등의 내외부 요인에서 발생하는 시험방법의 불완전성을 보완하기는 한계가 있다. 즉, 시험방법의 적합성 및 타당성 검토를 거침에도 불구하고 시료 기질 (matrix), 전처리 및 시험전 과정에서의 오차로 인한 결과의 차이가 발생하는 것이 불가피하다. 또한 지표 (기능)성분과 유기오염물질을 효과적인 분석하기 위해서는 경제적인 측면과 효율성 측면을 고려했을 때 동시분석방법을 개발하여 관리할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 가이드라인 [10]에 따라 크레아틴과 유기오염물질 (디시안디아마이드, 디하이드로트리아진)의 분석방법을 개발하고 분석법에 대하여 타당성을 평가함으로써 개별인정형 원료를 고시형으로 전환시 본 연구결과를 참고자료로 활용하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

표준물질인 크레아틴 모노하이드레이트 (creatine monohydrate, CrM)와 유기오염물질인 디시안디아마이드 (dicyandiamide)는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입했

으며, 디하이드로트리아진 (dihydrotriazine)은 Alz-Chem사 (Troostberg, Germany)로부터 구입하였다. 그 밖에 인산2수소암모늄 (ammonium dihydrogen phosphate)은 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 본 연구에서 사용한 시료는 국내 대형마트에서 직접 구입했으며, 제형과 원산지에 따라 CrM1, CrM2 및 CrM3로 구분하여 사용하였다.

2.2. 표준용액의 조제

지표 (기능)성분인 크레아틴 모노하이드레이트와 유기오염물질인 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진을 정밀하게 달아 증류수에 녹여 표준원액으로 하며, 위 용액을 증류수로 적절히 희석하여 표준용액으로 하였다.

2.3. 시험용액의 조제

크레아틴 보충제의 분말형태는 균질화기로 완전히 균질화시키며, 캡슐제는 캡슐을 모두 제거한 후에 균질화기로 균질화시킨 것을 사용하였다. 그리고 일정량의 시료를 100 mL 용량 플라스크에 취하여 증류수 70 mL를 넣어 마개를 닫은 후 잘 흔들어 섞고 2분 간 초음파 추출하였다 (크레아틴 모노하이드레이트 용해도 1 g 당 물 75 mL). 추출 후 즉시 실온 온도로 식히고 증류수로 정용하고 분석시 증류수로 적절히 희석한 용액을 실린지용 필터 (0.45 μm)로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 유기 오염물질인 디시안디아마이드와 디하이드로트리아진은 균질화 시료 일정량을 10 mL 용량플라스크에 취하고, 증류수 7 mL를 넣어 마개를 닫은 후 강하게 흔들어 녹이고 2분 간 초음파 추출하였다. 추출 후 즉시 실온 온도로 식히고 증류수로 정용하였고 추출액을 실린지용 필터 (0.45 μm)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

2.4. 기기 분석조건

기능 (지표)성분인 크레아틴과 유기 오염물질인 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진을 분석하기 위해 PDA (Photo diode array)가 장착된 Nanospace SI-2 HPLC 기기 (Shiseido Co., Japan)를 사용했으며, 양이온교환 컬럼인 Nucleosil 100-5 SA (4.6 \times 250 mm, 5 μm , Bischoff, Leonberg, Germany)을 이용하여 분리하였다. 이동상은 2.3% 인산2수소암모늄을 1 N 수산화나트륨용액으로 pH 5.5로 맞춘 후 0.5 mL/min의 유속으로 분석했으며, 시료 주입량은 10 μL 로 오븐온도는 35 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였다. 측정파장은 크레아틴은 224 nm, 디시안디아마이드는 212 nm, 디하이드로트리아진은 237 nm로 설정하였다.

2.5. 시험방법의 검증

2.5.1. 적용성 (Applicability)

서로 다른 기질의 표본시료에 대하여 최적의 분리능을 결정하기 위해서 AOAC 가이드라인 [10]의 신뢰도 특성 (reliability characteristics)에서 제안하고 있는 정확성, 반복정밀성, 측정 불확도, 재현정밀성, 중간 정밀성, 정량한계, 검출한계 등을 제시하여 표현하였다.

2.5.2. 선택성 (Selectivity)

선정된 표본시료에서 간존하는 방해물질 (interference)을 제거함과 동시에 지표 (기능)성분을 효과적으로 추출할 수 있는 방법을 제시하며, HPLC을 이용하여 최적의 상태로 정량화 할 수 있는 정도, 즉, 분리능으로 선택성을 평가하였다.

2.5.3. 직선성 (Linearity)

표준용액을 이용하여 표본시료가 포함 될 수 있는 농도 범위를 선정하고 농도와 기기반응 시그널간의 함수 관계를 그래프로 나타내었다. 선형성의 적절성을 판단하기 위해서 결정계수 (coefficient of determination)를 나타내는데 본 연구에서는 AOAC 가이드라인 [10]에서 제안하고 있는 결정계수가 0.99 이상인지 확인하였다.

2.5.4. 정확성 (Accuracy)

시료가 전체 시험법을 거쳐 회수되는 백분율을 보았으며, 표준물질을 시료에 첨가하여 단일 분석용액에 대해 측정하고 같은 수준 및 원래 수준의 2배 또는 3배의 표준분석물을 추가하여 확인하였다.

$$\text{Recovery (\%)} = (C_f - C_u) \times 100 / C_a$$

C_f = Concentration of the fortified in test sample

C_u = Concentration of the unfortified in test sample

C_a = Calculated(not analyzed) concentration of analyte added to the test sample

2.5.5. 검출한계 (Limit of detection, LOD) 및 정량한계 (Limit of quantification, LOQ)

검출한계 및 정량한계는 공시료 (blank)의 측정값에 공시료의 표준편차를 3배를 더한 값을 검출한계로 했으며, 표준편차를 10배를 더한 값을 정량한계로 하고, 그 식은 다음과 같다.

$$\text{LOD} = X_{BI} + 3S_{BI}$$

$$\text{LOQ} = X_{BI} + 10S_{BI}$$

X_{BI} = Blank value

S_{BI} = Standard deviation of the blank

2.5.6 반복정밀성 (Repeatability precision)

짧은 시간 내에 동일한 분석자, 시약, 장비, 기구 등 조건이 동일하게 유지되는 상태에서 서로 다른 매트릭스 (matrix), 농도, 시간에서 동시 반복을 수행하였다. 5번의 반복실험을 통해 얻어진 값으로 다양한 반복 표준 편차를 구하고 허용범위 결정은 질량백분율 (mass fraction, C)을 $RSDr = C^{-0.15}$ 의 식 [10]에 따라 결정하였다. 이로부터 계산된 값을 측정된 반복성의 RSDr값과 HORRATr 공식 [10]에 의해 비교하여 0.5~2.0 사이에 존재할 경우 동일한 조건에서의 반복실험에 문제가 없는

지를 확인하였다.

$$\text{HORRATr} = \text{RSDr (found, \%)} / \text{RSDr (calculated, \%)}$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 적용성

국내 유통·판매 중인 크레아틴 보충제에 대하여 시료를 대표할 수 있는 서로 다른 속성 (제형, 원료특성 등)의 3개 제품 (CrM1, CrM2, CrM3)을 선정, 구매하여 분석법 검증 실험을 수행하였다. 본 연구에서 사용한 시료는 모두 100% 크레아틴 모노하이드레이트로 함유된 제제로 CrM1은 국내에서 제조한 분말형태의 제품이며, CrM2는 독일에서 제조하여 분말형태를 캡슐제로 피포 성형하여 만든 제품이고, CrM3은 국내에서 제조한 분말형태를 캡슐로 성형한 제품을 사용하였다.

3.2. 선택성

분석법 검증실험의 선택성을 확인하기 위하여 표준용액과 시료용액에서의 분리도 및 머무름시간 (retention time)을 확인하였다. Fig. 1은 UV 212 nm에서는 디시안디아마이드, UV 224 nm에서는 크레아틴을, UV 237 nm에서는 디하이드로트리아진을 분석하여 얻은 크로마토그램 결과이다. 그 중에서 A는 앞에서의 분석조건에서 크레아틴과 디시안디아마이드, 디하이드로트리아진 3가지 표준용액을 분석한 크로마토그램이며, B는 CrM1 시료를 분석한 크로마토그램이고 C는 CrM1시료에 3가지의 표준용액을 각각 첨가하여 분석한 크로마토그램이다. Fig. 1에서 표준용액과 시료를 각각의 최적의 파장에서 분석한 결과 지표성분 머무름시간과 UV 스펙트럼 (spectrum)이 서로 일치함을 알 수 있다. 또한 분리능 (resolution, R_c)을 확인하기 위하여 시료용액 중의 두 개의 피크의 머무름시간 t_1 과 t_2 의 분리시간차와 두 개의 피크 폭 W_1 과 W_2 를 조사한 결과 크레아틴은 1.4, 디시안디아마이드는 1.7, 디하이드로트리아진은 3.5로 나타남으로서 AOAC 가이드라인 [10]에서 제시하는 최소 1.0 이상의 분리능을 가짐을 확인하였다.

3.3. 직선성

시료에 함유하거나, 존재할 것으로 예상되는 크레아틴, 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진의 함량이 포함될 수 있는 각각의 성분에 대하여 7개 농도의 직선성을 검토하였다. 그래서 크레아틴의 농도범위는 40.0, 60.0, 80.0, 100.0, 120.0, 250.0, 500.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 했으며, 디시안디아마이드는 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 $\mu\text{g/mL}$ 로 정하였다. 또한 디하이드로트리아진의 농도범위는 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 $\mu\text{g/mL}$ 농도가 되도록 조제하였다. 시험 시 나타날 수 있는 오차범위를 확인하기 위하여 각 농도에 대해서 3회 반복 실험을 수행하였다. 그 결과 결정계수(r^2)가 크레아틴에서는

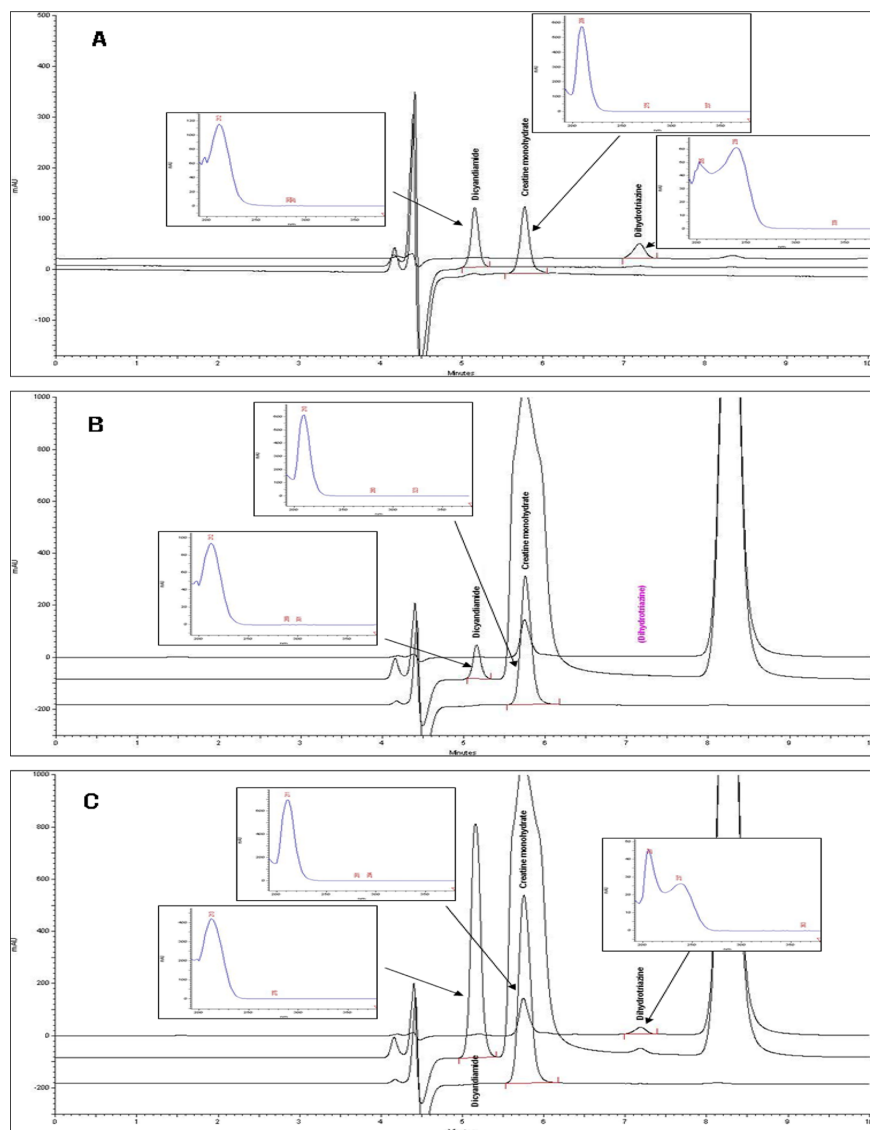


Fig. 1. Overlaid HPLC chromatograms of dicyandiamide, creatine and dihydrotriazine under UV 212 nm (1st), UV 224 nm (2nd) and UV 237 nm (3rd) conditions, respectively [A: 3 standard compounds of dicyandiamide (UV 212 nm), creatine (UV 224 nm) and dihydrotriazine (UV 237 nm)], B: CrM1 sample, C: CrM1 sample spiked with 3 standard compounds].

0.9994, 디시아나미이드는 0.9997, 디하이드로트리아진은 0.9999 이상으로 AOAC 가이드라인 [10]에서 요구하는 결정 계수 0.95 이상을 만족함을 확인하였다 (Fig. 2).

3.4. 정확성

전체 시료를 대표로 하는 표본시료 3개 (CrM1, CrM2, CrM3)에 대하여 spiking/recovery 방법으로 회수되는 백분율을 통해 매트릭스 영향을 검토하였다. AOAC 가이드라인에서 제안하고 있는 대로 표준물질을 시료에 첨가하여 단일 분석용액에 대해 측정하고 같은 수준 및 원래 수준의 2배 및 3배의 표준 분석물을 추가하는 방법을 사용하였다 [10]. 즉, 3개의 표본 시료 (CrM1, CrM2, CrM3) 각각에 대하여 일정량의 시료를 채취하고 표준용액을 첨가하였을 때 최종 농도가 시료

에 존재하는 함량측정값의 근사값이 되도록 첨가하였다. 그래서 Table 1에서 보는 바와 같이 크레아틴의 경우에는 100.0 (1배) $\mu\text{g/mL}$, 200.0 (2배) $\mu\text{g/mL}$ 및 300.0 (3배) $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 했으며, 디시아나미이드의 경우에는 0.7 (1배) $\mu\text{g/mL}$, 1.4 (2배) $\mu\text{g/mL}$ 및 2.1 (3배) $\mu\text{g/mL}$ 가 나올 수 있도록 처리하였다. 또한 시료에서 확인하지 못한 디하이드로트리아진의 경우에는 시료 중 정량한계의 양 (0.1 $\mu\text{g/mL}$)의 1배, 2배, 3배의 표준용액을 첨가하여 0.1 (1배) $\mu\text{g/mL}$, 0.2 (2배) $\mu\text{g/mL}$ 및 0.3 (3배) $\mu\text{g/mL}$ 가 나올 수 있도록 처리하였다. 그 결과 크레아틴의 경우 3개의 표본시료에서의 회수율이 각각 97.2~100.3%, 99.0~100.5% 및 99.2~100.9%로 나왔으며, 상대표준편차는 0.9~1.8%, 0.4~1.2%, 0.3~2.2%로 나타났다 (Table 1의 상단). 디시아나미이드의 경우는 회수율이 각

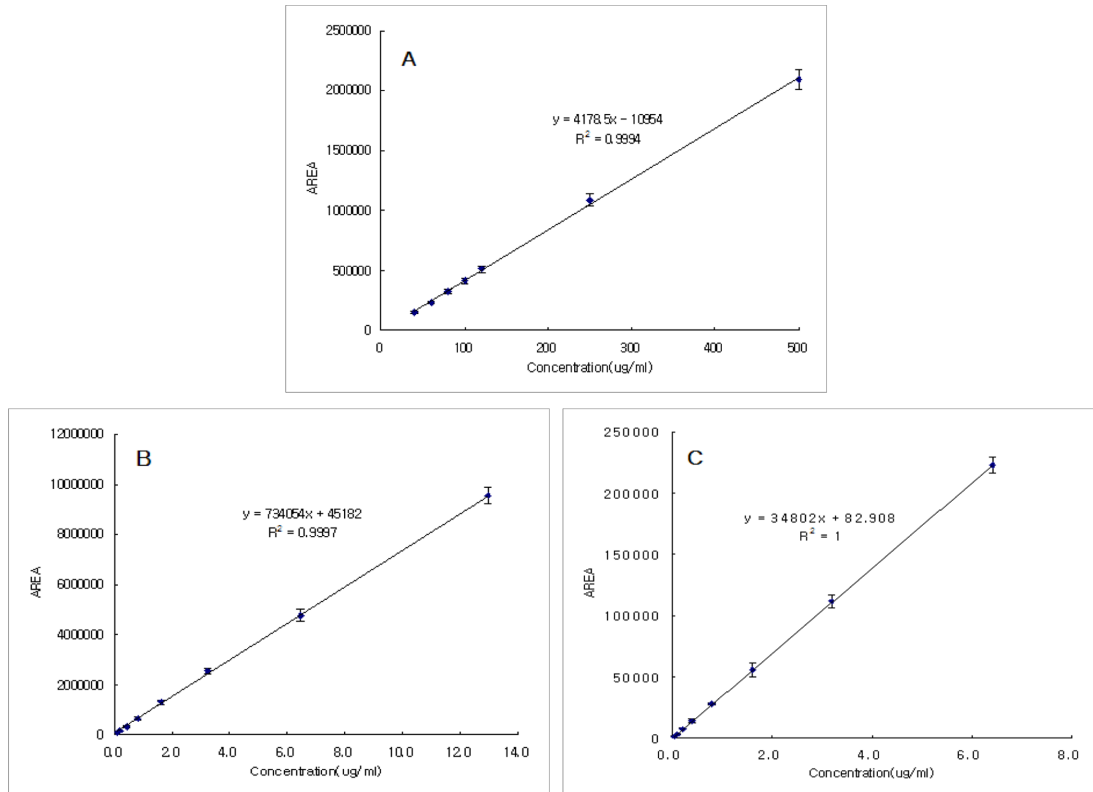


Fig. 2. Standard calibration curve of creatine (A), dicyandiamide (B) and dihydrotriazine (C).

각 99.3~106.5%, 95.6~101.7% 및 92.3~97.8%로 나왔으며, 상대표준편차는 0.9~2.0%, 0.4~0.8% 및 0.4~0.7%로 나타났다 (Table 1의 중간). 또한 디하이드로트리아진의 경우는 회수율이 각각 100.4~105.5%, 98.2~102.9% 및 97.2~102.1%로 나타났으며, 상대표준편차는 각각 0.8~1.4%, 0.3~2.0% 및 1.0%로 확인되었다 (Table 1의 하단). 앞에서 얻은 분석결과들은 모두 높은 신뢰성을 주며 AOAC의 가이드라인에 적합한 것으로 나타났다 [10].

3.5. 반복정밀성

3.5.1. 검체량 변화에 따른 반복정밀성

검체량의 변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 표본 시료 CrM1을 3개의 농도로 검체를 채취하였다. 즉, 검체 채취량을 그레아틴의 경우 962.0 mg/g × 1배, 2배 및 3배로 검체를 취했으며, 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진은 디시안디아마이드 농도로서 0.014 mg/g × 1배, 2배 및 3배를 취하여 5회 반복 수행하였다. Table 2에서 보여주고 있는 바와 같이, 그 결과 크레아틴 1배 채취 시 96.2%, 2배 채취 시 97.0%, 3배 채취 시에는 97.6%로 산출되어 표본시료 중 크레아틴의 평균 함량은 96.6%가 함유되어있는 것을 확인하였다. 또한 디시안디아마이드는 1배 채취 시 0.0014%, 2배 및 3배에서는 0.0013%로 산출되어 평균 0.0014%의 농도로 존재하는 것을 확인했으며, 디하이드로트리아진은 3개의 농도에서 모두 검출되지 않았다. 시료에서 측정된 함량 %를 이용하여, RSDr

= $C^{-0.15}$ 의 공식에 따라 측정값의 1/2~2배를 산출했을 경우 AOAC 가이드라인 [10]에서 제안하고 있는 허용범위는 크레아틴의 경우 0.3~1.0%, 디시안디아마이드는 1.3~5.4%이었다. 산출된 허용범위를 이용하여 각 농도의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과, 크레아틴의 경우 1배 채취 시 0.8%, 2배 채취 시 1.0%로 허용범위에 포함되었으나 3배에서는 상대표준편차 값이 허용범위를 넘는 1.9%가 나왔다. 결국 시료 농도의 변화에 따른 반복정밀성은 960.0 mg/g × 1배와 2배로 검체량을 늘리더라도 동일한 조건에서의 반복정밀실험에 문제가 없다는 것을 확인했으나, 3배로 검체량을 늘렸을 경우에는 동일한 조건에서 반복정밀실험에 문제가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 디시안디아마이드의 경우는 0.014 mg/g × 1배 채취 시 2.4%, 2배 채취 시 1.2%, 3배 채취 시 3.7%로 모두 허용범위에 포함되는 것으로 보아 검체량 변화로 인한 반복정밀성의 영향은 크지 않다는 것을 확인하였다. 그러나 디하이드로트리아진은 모든 시료로부터 검출되지 않아 검체량 변화에 따른 반복정밀성을 확인할 수 없었다.

3.5.2. 시료 기질 변화에 따른 반복정밀성

시료의 기질변화에 대한 반복 정밀성을 확인하기 위하여 다른 기질을 가지고 있는 표본시료 3개 (CrM1, CrM2, CrM3)에 대하여 각각 동일한 양을 채취하고 5회 반복 측정하였다. Table 3에서 보여주고 있는 바와 같이, 그 결과 크레아틴의 경

Table 1. Accuracy data of creatine, dicandiamide and dihydrotriazine (n=5)

Treatment ¹⁾		Fortified concentration CrM1 (µg/mL)			Fortified concentration CrM2 (µg/mL)			Fortified concentration CrM3 (µg/mL)		
		100.0	200.0	300.0	100.0	200.0	300.0	100.0	200.0	300.0
		Creatine	Mean (%)	100.3	100.5	99.6	99.6	99.0	99.2	97.2
	RSD (%)	0.9	0.7	0.3	1.8	0.4	2.2	0.9	1.2	0.5
	Acceptable values (%) ²⁾	98.0~101.0								
Dicyandiamide	Mean (%)	99.3	96.1	92.3	102.9	99.5	95.6	106.5	101.7	97.8
	RSD (%)	0.9	0.7	0.4	2.0	0.8	0.5	1.1	0.4	0.7
	Acceptable values (%) ²⁾	80.0~115.0								
Dihydrotriazine	Mean (%)	100.9	98.2	97.2	100.4	100.2	101.0	105.5	102.9	102.1
	RSD (%)	0.9	0.3	1.0	1.4	2.0	1.0	0.8	0.3	1.0

¹⁾Known amounts (1-3 times) of creatine, dicyandiamide and dihydrotriazine were added in each specimen sample, respectively.

²⁾Acceptable values proposed by AOAC guideline [10].

Table 2. Repeatability precision data at adjusted sample amounts (n=5)

Treatment ¹⁾	Creatine			Dicyandiamide		
	1×	2×	3×	1×	2×	3×
Mean (µg/g)	962,004.0	969,765.7	976,228.1	14.3	13.5	13.2
Mean (%)	96.2	97.0	97.6	0.0014	0.0014	0.0013
RSD (%)	0.8	1.0	1.9	2.4	1.2	3.7
Acceptable values (%) ²⁾	0.3~1.0			1.3~5.4		

¹⁾Known amounts (1-3 times) were added in specimen sample.

²⁾Acceptable values proposed by AOAC guideline [10].

Table 3. Repeatability precision data of three CrMs with different sample matrix (n=5)

Analytes	Creatine			Dicyandiamide		
	CrM1	CrM2	CrM3	CrM1	CrM2	CrM3
Mean (µg/g)	962,004.0	986,274.2	978,559.8	14.3	13.1	13.4
Mean (%)	96.2	98.6	97.9	0.0014	0.0013	0.0013
RSD (%)	0.8	0.6	0.9	2.4	4.8	2.5
Acceptable values (%) ¹⁾	0.3~1.0	0.3~1.0	0.3~1.0	1.3~5.3	1.4~5.4	1.4~5.4

¹⁾Acceptable precision values proposed by AOAC guideline [10].

Table 4. Repeatability precision data at changed analysis time (n=5)

Treatment	Creatine			Dicyandiamide		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
Daily Mean (µg/g)	962,004.0	965,071.0	969,405.0	14.3	14.3	14.5
Mean (%)	96.2	96.5	96.9	0.0014	0.0014	0.0015
Inter-day S.D.	7,838.7	5,747.7	7,816.3	0.3	0.3	0.2
Inter-day RSD (%)	0.8	0.6	0.8	2.4	2.3	1.6
Intra-day RSD (%)		0.4			0.8	
Acceptable values (%) ¹⁾	0.3~1.0			1.3~5.3		

¹⁾Acceptable values proposed by AOAC guideline [10].

우 CrM1 시료에서는 96.2%, CrM2 시료에서는 98.6%, CrM3 시료에서는 97.9%가 산출되었고 이러한 결과 값을 이용하여 3개의 표본시료 허용범위를 확인한 결과 모두 0.3~1.0%이었다. 각 시료의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과, CrM1 시료는 0.8%, CrM2 시료는 0.6%, CrM3 시료는 0.9%로 허용범위에 모두 포함되었다. 디시안디아마이드의 경우는 CrM1 시료에서 0.0014%, CrM2와 CrM3 시료에

서 0.0013%로 나타났으며, 허용범위는 CrM1 시료의 경우 1.3~5.3이며, CrM2와 CrM3 시료는 1.4~5.4이었다. 각 시료의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 CrM1 시료는 2.4%, CrM2 시료는 4.8%, CrM3 시료는 2.5%로 모두 허용범위 내에 포함되었다. 따라서 크레아틴과 디시안디아마이드 분석은 서로 다른 기질을 가지고 있는 시료의 반복정밀성 측정을 했을 때 동일한 조건에서의 반복실험에 문제가 없

다는 것을 확인할 수 있었다.

3.5.3. 분석시간별 반복정밀성

분석시간의 변화에 대한 반복정밀성을 확인하기 위하여 표본시료 CrM1에 대하여 0h, 24h, 48h마다 시험조작 5회 반복 측정하였다. Table 4에서 보여주고 있는 바와 같이, 그 결과 크레아틴은 0h에서는 96.2%, 24h 및 48h에서는 각각 96.5%, 96.9%로 확인했으며, 허용범위는 0.3~1.0%이었다. 각 농도의 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 0h에서는 0.8%, 24h에서는 0.6%이었으며, 48h에서는 0.8%로 모두 포함되며 intra-day RSD%를 확인한 결과 0.4%로 나타났다. 또한 디시안디아마이드는 0h, 24h 및 48h에서 0.0014~0.0015%가 존재하는 것으로 나타났으며, 허용범위는 1.3~5.3%이었다. 상대표준편차가 허용범위에 포함되는지를 확인한 결과 0h~48h에서는 1.6~2.4%로 나타남으로써 모두 허용범위 내에 포함되는 것을 확인하였다.

3.6. 검출한계 및 정량한계

표본시료를 분석한 크로마토그램에서 기능 (지표)성분이 위치하는 곳의 노이즈 (noise)값을 10회 측정값으로부터 표준편차를 구하고 그 값의 3배를 더한 값을 검출한계, 10배를 더한 값을 정량한계로 하였다. 그 결과 크레아틴의 검출한계는 1.09 µg/mL이고, 정량한계는 3.62 µg/mL이었다. 또한 디시안디아마이드의 검출한계는 0.01 µg/mL이며, 정량한계는 0.03 µg/mL이며, 디하이드로트리아진의 경우는 검출한계는 0.08 µg/mL, 정량한계는 0.25 µg/mL로 나타났다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 개별인정형 건강기능식품인 크레아틴 보충제로부터 지표성분인 크레아틴과 유기오염물질인 디시안디아마이드 및 디하이드로트리아진을 HPLC로 분석하는 방법을 마련하였고, 동 시험방법에 대하여 AOAC 가이드라인에서 제안하는 성능특성을 검증하였다 [10]. 그 결과 각각의 검출한계와 정량한계는 크레아틴의 경우 1.09 µg/mL, 3.62 µg/mL이며, 디시안디아마이드는 0.01 µg/mL, 0.03 µg/mL, 디하이드로트리아진은 0.08 µg/mL, 0.25 µg/mL였다. 그리고 검량선 결정계수는 크레아틴의 경우 40.0~500.0 µg/mL의 농도범위에서 0.9994이며, 디시안디아마이드는 0.1~12.8 µg/mL의 농도범위에서 0.9997, 디하이드로트리아진은 0.05~6.4 µg/mL의 범위에서 0.9999 이상의 매우 높은 상관성을 보였다. 정확성을 확인하기 위하여 3개의 표본시료 (CrM1, CrM2, CrM3)를 대상으로 함량 측정된 결과값에 동일 수준 (1배)과 2배, 3배 수준으로 크레아틴과 디시안디아마이드를 첨가하였고, 디하이드로트리아진은 검출한계 수준 (1배)과, 2배, 3배 수준으로 첨가하여 회수율을 측정된 결과 각각 97.2~100.9%, 95.6~106.5% 및 97.2~105.5%로 확인되었다. 또한 시료채취량, 시

료기질 및 분석일의 변경에 따른 반복정밀성을 확인한 결과, AOAC 가이드라인 [10]에서 제안하는 허용범위에 모두 만족하였으나, 크레아틴의 경우 시료 채취량을 960.0 mg/g × 3배로 늘렸을 때 허용범위를 초과함으로써 시험에 사용하는 검체량은 960.0 mg/g × 2배가 넘지 않는 범위에서 시험을 수행할 때 반복정밀성에 문제가 없다는 것을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

1. Korea's Ministry of Food and Drug Safety, Information for health functional food. <http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/>. (2008).
2. Kreider R. B. (2003) Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. *Mol. Cell Biochem.* 244: 89-94.
3. Lyoo, I. K., S. Yoon, T. S Kim, J. Hwang, J. E. Kim, W. Won, S. Bae, and P. F. Renshaw (2012) A Randomized, Double-blind placebo-controlled trial of oral creatine monohydrate augmentation for enhanced response to a selective serotonin reuptake inhibitor in women with major depressive disorder. *J. Psychiatry.* 169: 937-945.
4. Kley, R. A., The cochrane collaboration. <http://www.thecochranelibrary.com>. (2013).
5. Rahimi, R. (2011) Creatine supplementation decreases oxidative DNA damage and lipid peroxidation induced by a single bout of resistance exercise. *J. Strength Condi. Res.* 25: 3448-3455.
6. Benzi, G (2000) Is there a rationale for the use of creatine either as nutritional supplementation or drug administration in humans participating in a sport. *Pharmacol. Res.* 41: 255-263.
7. Legal notification (2013-217) of Korea's Ministry of Food and Drug Safety. <http://www.khso.or.kr/foodInfo/consumer.asp>. (2013).
8. Alekha, K., Dash and S. Angeli (2002) A simple LC method with UV detection for the analysis of creatine and creatinine and its application to several creatine formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 939-945.
9. Moret, S., A. Prevarin, and F. Tubaro (2011) Levels of creatine, organic contaminants and heavy metals in creatine dietary supplements. *Food Chem.* 126: 1232-1238.
10. Association of Official Analytical Chemists, AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. <https://www.yumpu.com/en/document/view/11700995/aoac-guidelines-for-single-laboratory-validation-of-chemical.htm>. (2000).
11. Shao, A. and N. H. John (2006) Risk assessment for creatine monohydrate. *Regul. Toxicol. Pharm.* 45: 242-251.
12. Brudnak, M. A. (2004) Creatine: are the benefits worth the risk? *Toxicol. Lett.* 150: 123-130.
13. Kim, H. J., C. K. Kim, A. Carpentier, and J. R. Poortmans (2011) Studies on the safety of creatine supplementation. *Amino Acids.* 40: 1409-1418.
14. Prieto, J. A., F. Andrade, S. Martin, P. Sanjurjo, J. Elorz, and L. Aldamiz-Echevarria (2009) Determination of creatine and guanidinoacetate by GC-MS study of their stability in urine at different temperatures. *Clin. Biochem.* 42: 125-128.