

식이보충제로 사용되는 히알루론산의 분석법에 대한 불확도 산정

박상욱¹, 김형범¹, 김광준², 이원재^{1,3*}

Measurement Uncertainty for Analytical Method of Hyaluronic Acid Used as a Dietary Supplement

Sang-Wook Park¹, Hyung Bum Kim¹, Kwang Joon Kim², and Wonjae Lee^{1,3*}

Received: 22 October 2016 / Revised: 20 February 2017 / Accepted: 23 March 2017

© 2017 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: This study aimed to estimate the measurement uncertainty related to determination of hyaluronic acid used as a dietary supplement by high-performance liquid chromatography. According to the guidelines of the Association of Official Analytical Chemists, the analytical processes for determination of hyaluronic acid were performed. And the measurement uncertainty obtained during the analytical processes were expressed in accordance with mathematical/ statistical guidelines of GUM (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement) & EURACHEM (Focus for Analytical Chemistry in Europe) for the analytical operations. For the uncertainty in measurement produced based on this analytical method, the expanded uncertainty was calculated by using the relative standard uncertainty between analytical results and sources of uncertainty in measurement (sample weight, final volume, extraction volume, standard solution, matrix and instrument etc). In the results of 95% confidence interval, it was calculated that the uncertainty in measurement was 57.75 ± 8.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2.0$). Therefore, it showed that the measurement un-

certainty obtained by this analytical method influences on 15.2% of the contents of hyaluronic acid as the analytical results.

Keywords: Uncertainty measurement, Hyaluronic acid, Dietary supplement

1. INTRODUCTION

“히알루론산 (hyaluronic acid)”은 동물의 눈의 유리체로부터 처음으로 분리되었으며, D-글루쿠론산과 N-아세틸글루코사민이 반복적으로 결합되어 구성된 직쇄상의 다당류이다 [1]. 분자량은 보통 $10^6 \sim 10^7$ 이며, 수용액 상태에서는 수소결합에 의해 2차구조를 형성하고 불규칙한 코일이 확장된 형태로 존재한다 [2]. 현재 건강기능성 원료로서의 히알루론산은 나트륨이 결합된 형태로 존재하며 건강한 닭의 벼슬을 효소로 가수분해하여 만들어진다. 히알루론산은 수분 보유능력이 있는 다당체로서, 사람에게는 피부, 눈의 유리체 및 관절의 활액에 존재하지만 나이가 들어감에 따라 감소하게 된다 [2-4]. 그러나 이를 보충섭취하면 그 수치가 증가될 수 있는 것으로 보고되고 있으며, 실제로 섭취한 히알루론산이 동물의 피부에 반영되는 것이 확인되었다. 피부가 건조한 사람을 대상으로 히알루론산의 보충효과를 비교한 연구에서, 히알루론산은 피부의 건조정도와 수분보유량 등을 개선시킬 수 있는 것으로 나타나 피부보습과 관련된 부분이 개선되는 것으로 보고되었다 [3,4]. 그래서 식품의약품안전처 (이하 식약처)에서는 2006년 히알루론산이 “피부 보습에 도움을 줄 수 있음”의 기능성을 처음으로 인정하였고, 기능성 등급은 기반연구와 인체적용연구의 수가 충분하지는 않으나, 그 결과가 일관성

¹조선대학교 대학원 식품의약학과

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

²조선대학교병원 약제부

²Department of Pharmacy, Chosun University Hospital, Gwangju 501-717, Korea

³조선대학교 약학대학 약학과

³College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea

Tel: +82-62-230-6376, Fax: +82-62-222-5414

e-mail: wlee@chosun.ac.kr

이 있으므로 “기타기능 II”에 해당됨을 인정하였다 [5]. 한편, 이러한 기능적 특성을 가지는 히알루론산을 기능성 원료로 사용하고자 할 경우, 건강기능식품공전 제 3개별기준 및 규격에 적합한 원료를 사용하여야 하는데 이때 히알루론산 함량은 원료의 품질을 결정하는 중요한 지표가 된다. 따라서 원료 및 완제품에서 히알루론산의 함량규격 기준치에 발생하는 오차에 대한 적부여부 판정시 불확도는 매우 중요한 사항으로 취급되어야 한다 [6]. 현재, 히알루론산은 시험방법의 적합성 및 타당성 검토를 거쳐 건강기능식품공전에 등재하고 있으나, 시험자, 시험환경, 시험과정 설계 등의 내·외부 요인에서 발생하는 시험방법의 불완전성을 보완하기는 한계가 있다. 즉, 시료의 기질 (matrix), 시험자, 시험기구, 장비, 환경 등 시험전 과정에서의 오차로 인한 결과의 차이가 발생하는 것이 불가피하다. 그래서 국제도량형국 (BIPM)은 1981년 개최된 국제도량형위원회 (CIPM)에서 해결방안을 모색했으며, 10여 년의 논의를 거쳐 1993년에 국제도량형국 (BIPM), 국제전기기술위원회 (IEC), 국제임상화학위원회 (IFCC), 국제표준화기구 (ISO), 국제 순수 및 응용화학연합회 (IUPAC), 국제 순수 및 응용물리연합회 (IUPAP), 국제법정계량기구 (OIML) 등 각 분야를 대표하는 국제기구와 각국 표준기관이 공동으로 “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), ISO”라는 지침서를 발간하였다 [7,8]. 또한 공인시험기관인 Korea Laboratory Accreditation Scheme (KOLAS)에서도 한국표준과학원이 발간한 측정불확도 표현지침을 근거로 불확도 산출 및 결과를 신뢰도 평가의 중요한 요소로 다루고 있다 [9]. 그러한 흐름에 따라, 식품·의약품을 다루는 기관을 대상으로 2013년 7월 「식품·의약품 시험·검사에 관한 법률」을 제정하여 2015년 7월부터 법정 당연지정 검사기관 및 민간검사기관에 불확도 산출을 의무화함으로써 분석시험결과의 신뢰도를 높이기 위해 노력하고 있다. 이러한 분석신뢰도를 높이기 위한 연구의 실례로서, 의약품에서 LC-MS/MS를 이용한 메틸페니데이트 및 대사체 정량분석에서 회귀분석법을 이용한 통계기법을 사용한 연구결과나 식이보충제로 사용되는 달맞이꽃종자 추출물의 지표물질에 대한 HPLC 분석법의 통계적 검증에 대한 연구결과가 보고된 바 있다 [10,11] 따라서 본 연구에서는 기능성 원료인 히알루론산을 이용하여 건강기능식품으로 시판되고 있는 식이보충제를 대상으로 식약처에서 고시하고 있는 건강기능식품공전 히알루론산 시험법에 따라 분석한 결과를 바탕으로 [6], 시험분석의 각 단계에서 발생하는 실험적 오차요인들을 도출한 후 수리통계학적 관계식으로부터 산출된 불확도 값이 최종 시험결과값에 미치는 영향을 산정하여 이 연구결과를 국내에서 시판하는 히알루론산 품질관리의 기초자료로 사용하고자 하였다 [7,8].

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

본 연구를 위한 시험시료로 국내 대형마트에서 시판되고 있

는 히알루론산 식이보충제를 구입하여 사용하였다. 또한 분석을 위한 표준용액 조제를 위해 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 고순도 99±1%의 히알루론산 나트륨과 분해 효소인 콘드로이틴 (chondroitinase) ABC 효소를 함께 구입하여 사용하였다. 트리슘염 (Tris base)과 아세트산나트륨 (sodium acetate) 및 염산은 Merck사 (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 초순수는 EASY pure system (APS Water Services Corp., Van Nuys, CA, USA)에 의해 18.0 MΩ 수준으로 정제된 물을 사용하였다. 또한 본 실험에서 무게측정을 위해 사용한 저울 (Precisa, XT220A, Switzerland)은 교정기관에서 표준계측기를 사용하여 교정하였고, 그 밖의 초자류는 표기된 허용오차와 시험환경 조건을 반영하여 불확도를 추정하였다.

2.2. 표준용액의 조제

식약처에서 고시한 히알루론산 시험법에 따라 표준물질로 사용된 히알루론산 나트륨염 약 1.0 g을 정밀하게 칭량하여 33 mM Tris-HCl 완충용액에 희석하고 60°C 수욕상에서 완전히 녹인 것을 표준원액으로 하였다 [6]. 그리고 표준원액을 33 mM Tris-HCl 완충용액을 이용하여 적절히 희석하고 이액 50 uL에 0.002 unit/uL 콘드로이티나아제 ABC가 혼합된 33 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액 450 uL를 넣고 37°C에서 3시간 반응시켰다. 반응이 완료되면 100°C에서 5분간 가열하고 0.45 μm 멤브레인 (Millipore membrane filter, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 여과하여 표준용액으로 사용하였다.

2.3. 시험용액의 조제

시료를 분쇄 및 균질화한 후 일정량을 50 mL 용량플라스크에 취하고 33 mM Tris-HCl 완충용액으로 정용한 후 잘 섞었다. 그 후 마그네틱 바 (magnetic stirring bar)를 넣고 60°C에서 90분간 강하게 추출한 후 실온에 식힌 다음, 시료추출액 50 uL에 0.002 unit/uL 콘드로이티나아제 ABC가 혼합된 33 mM Tris-HCl (pH 8.0) 450 uL를 넣고 37°C에서 3시간 반응시키고, 반응이 완료되면 100°C에서 5분간 가열한 후 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다 [6].

2.4. 기기 분석조건

기능 (지표)성분을 분석하기 위해 PDA (photodiode array)가 달린 Nanospace SI-2 (Shiseido Co., Japan)를 사용했으며 HPLC 분석조건은 아래와 같다 [6]. 컬럼은 강염기성의 암모늄 음이온교환수지로 코팅된 실리카겔이 충전된 Hypersil GOLD SAX (4.6×250 mm, 5 μm, Thermo Fisher Scientific company, Waltham, MA, USA)을 사용하였다. 이동상은 0.05 M 염화나트륨 용액 (pH 3.5)를 사용하여 분당 1.0 mL의 유속으로 분석하였고 주입부피는 10 uL, 측정파장은 UV 232 nm로 설정하였다.

2.5. 불확도 추정방법

측정불확도 (measurement uncertainty)는 여러 측정들이 서로

비교가능할 수 있는 공통된 이해의 토대 위에서, 측정량에 대한 합리적 추정의 불확정함을 짚 수 있고 표현할 수 있게 하는 척도로 정의된다 [7]. 본 연구에서는 이러한 측정불확도의 산출을 위해 GUM [7]과 EURACHEM [8] 측정모델량을 선정하여 불확도 인자를 검토한 후, 요인별 표준불확도 및 자유도 계산을 통해 합성불확도를 구하였다. 불확도 요인은 크게 시료전처리 (저울의 교정성적서 및 안정성, 분해능, 초자의 허용오차, 반복성, 온도팽창계수), 표준용액조제 (표준물질 인증서, 저울의 교정성적서 및 안정성, 초자의 허용오차, 반복성, 온도팽창계수), 표준검량곡선, 시료 반복측정 및 회수율 측정으로 나뉘어 각각의 상대표준불확도와 자유도를 구하였다. 이렇게 얻은 불확도값에서 합성표준불확도와 포함인자 (k)를 이용하여 확장불확도를 계산하고 측정불확도를 산출하였다 [9,11].

2.6. 모델관계식 설정

시료 중의 기능(지표)성분의 함량을 구하기 위한 식은 식 (1) 과 같으며, 측정값의 불확도를 구하기 위하여 관련될 수 있는 측정값의 불확도 요인을 아래 식 (2)~(4)와 같이 설정하였다.

$$C_s = C_e \times \frac{V_f}{W_s} \times \frac{V_1}{V_2} \quad (1)$$

$$W_s = W_c \times W_{Rp} \times W_{Ra} \quad (2)$$

$$V_f = V_c \times V_{Rp} \times V_{Tp} \quad (3)$$

$$C_e = P_{Fi} \times F_{Fi} \times STD \times L_c \times I_R \times R_M \quad (4)$$

C_s : Concentration of sample (ug/g)

C_e : Concentration of sample extraction solution (ug/mL)

V_f : Final volume of sample (mL)

V_c : Calibration of volumetric flask

V_{Rp} : Repeatability of volumetric flask

V_{Tp} : Variation of temperature

W_s : Weight of sample (g)

W_c : Calibration of sample weight

W_{Rp} : Repeatability of sample weight

W_{Ra} : Readability of sample weight

P_{Fi} : Purity of functional ingredient

F_{Fi} : Formula weight of functional ingredient

STD : Standard stock solution

$STD_{1st...7th...}$: Concentration of standard solution

L_c : Linearity of calibration curve

I_R : Reproducibility of instrument

R_M : Recovery of matrix

2.7. 요인별 측정값과 표준불확도

시료의 반복측정시 평균값을 측정값으로 사용하며 이때 표준불확도는 식 (5)를 적용하여 A type으로 구했다. 또한 무게 측정 시 저울의 안정성 등의 반복시험에 대한 불확도는 공통

(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 (6)과 (7)을 적용하여 A type 불확도를 구했다.

$$u(x_i) = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

$$u(x_i) = \frac{S_p}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

$$S_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^M \nu_i s_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^M \nu_i}} \quad (7)$$

n : Number of measurements

S_p : Pooled standard deviation

s_i : Standard deviation

ν_i : Degree of freedom

2.8. 검량곡선의 불확도

검량곡선은 표준원액을 이용하여 여러 개의 표준용액을 조제하여 작성했다. 검량곡선은 1차 회귀식인 식 (8)을 사용하며, 상대표준불확도는 식 (9)~(11)의 모델을 적용하여 산출하였다.

$$A_j = C_i \times B_l + B_0 \quad (8)$$

$$u(C_0) = \frac{s}{B_1} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad (9)$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_l C_j)]^2}{n - 2}} \quad (10)$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_i - \bar{C})^2 \quad (11)$$

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

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

B_l : Slope of the calibration curve

S : Standard error

B_0 : Intercept of the calibration curve

p : Number of measurement to determination C_0

n : Number of measurement for the calibration

\bar{C} : Mean value of the different calibration standard

C_0 : Concentration of standard for the calibration

S_{xx} : Change value range of calibration standard

2.9. 합성표준불확도

측정결과값의 값이 여러 가지 요인의 결과로부터 구해지며, 감도계수와 표준불확도, 상관계수를 측정불확도 관계식에 대입하여 구하였다. 이때 합성은 불확도 전파법칙 (law of propagation of uncertainty)에 따라 아래 합성표준불확도 관계식을 유도하였다.

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^2 u^2(x_i) \quad (12)$$

2.10. 확장불확도

포함인자 (k)는 합성표준불확도의 유효자유도 (V_{eff})를 추정하고, Welch-Satterth-Waite 공식 식 (13)을 이용하여 산출하였다. 이 때, 유효자유도가 7 이상인 경우, EURACHEM/CITAC 지침에 따라 95% 신뢰수준에서 포함인자 k 를 2로 기준하였다 [8]. 또한 확장불확도는 계산된 합성표준불확도에 포함인자 (k)를 곱하는 공식 식 (14)에 의해 구하였다.

$$V_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^n \frac{[c_i u(x_i)]^4}{\nu_i}} \quad (13)$$

$$U = k u_c(y) \quad (14)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 시험용액 조제시 불확도

시료의 무게를 0.1 mg까지 측정할 수 있는 저울을 이용하여 25 mL 용량플라스크에 0.5 g 정도 취한 후 Tris-HCl 완충용액으로 히알루론산 성분을 추출함으로써 1차 시험용액을 준비했다. 자동피펫을 이용하여 1차 시험용액 0.05 mL와 콘드로이티나아제 ABC 효소가 섞여있는 Tris-HCl 완충용액 0.45 mL를 섞고 효소분해시킨 것을 2차 시험용액으로 하였다 [6]. 이때 1차 시험용액 조제시 발생할 수 있는 요인은 저울 자체의 불확도 (교정성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인 (허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 고려했다. 또한 2차 시험용액 조제 시의

자동피펫의 불확도 (허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도) 요인을 고려했다. 즉, 시료 무게측정 시 저울에 대한 교정성적서상의 불확도는 95% 신뢰수준 ($k=2$)에서 0.0005 g의 불확도를 가지며, 표준불확도 ($u(W_c)$)는 0.00025 g (0.0005/2)이었다. 이때 저울의 분해능은 0.0001 g이며 표준 불확도는 ($u(W_{Ra})$)는 0.000029 g (0.0001/2/√3)이었다. 또한 안정성은 0.5 g의 표준분동을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정 한 값들을 공통실험표준편차 방법에 따라 식 (6)과 (7)을 적용하여 표준불확도 ($u(W_{Rp})$) 0.000058 g을 구했으며 자유도는 16에서 1을 뺀 값인 15가 되었다. 결국 저울의 합성표준 불확도 ($u(W_s)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근이므로 0.00025 g이었으며, 상대표준불확도 ($u(W_s)/W_s$)는 0.00050 (0.00025/0.5022)이었다. 또한 25 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 용량플라스크의 허용오차가 ±0.04 이므로 표준불확도 ($u(V_c)$)는 0.023 mL (0.04/√3)이며, 용량플라스크의 반복성은 25 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로써 표준편차 (σ)를 구하므로, A type의 표준불확도 ($u(V_{Rp})$)는 0.0041 mL가 되었다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ±3°C이고 Tris-HCl 완충용액 팽창계수는 0.00021이며, 신뢰구간이 주어지지 않으므로 직사각형 분포로 간주(√3)하여 표준불확도 ($u(V_{Tp})$)는 0.0091 mL (0.016/√3)이었다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도 ($u(V_f)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.025 mL이었으며, 상대표준불확도 ($u(V_f)/V_f$)는 0.0010 (0.025/25)이었다. 이와 동일한 방법으로 2차 시험용액의 조제과정은 1차 시험용액에서 자동피펫을 이용하여 용량플라스크에 취하고 추출용액으로 표시선에 맞춤으로서 발생하는 불확도를 구하였다. 위와 같은 시험용액 조제시 발생하는 불확도 과정을 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Uncertainty budget for the determination of W_s , V_{Mp} , and V_f

Step	Parameter	Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
	(x_i)	x_i	ν	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum \{u(x_i)/x_i\}^2)}$
1st	W_s	W_c	-	∞	0.0005	0.0011
		W_{Ra}	-	∞	0.000029	
		W_{Rp}	0.5	15	0.000029	
	V_f	V_c	0.04	∞	0.023	
		V_{Ra}	25	9	0.0041	
		V_{Tp}	3	∞	0.0091	
2nd	V_2	V_{Ac}	0.001	∞	0.0006	0.022
		V_{ARp}	0.05	9	0.00053	
		V_{ATp}	3	∞	0.000088	
	V_1	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	
		V_{ARp}	0.45	9	0.00029	
		V_{ATp}	3	∞	0.00079	

V_f (Final volume of sample, mL); V_c (Calibration of volumetric flask); V_{Rp} (Repeatability of volumetric flask); V_{Tp} (Variation of temperature); W_s (Weight of sample, g); W_c (Calibration of sample weight); W_{Rp} (Repeatability of sample weight); W_{Ra} (Readability of sample weight).

3.2. 표준물질의 순도 불확도

표준물질조제를 위해 사용된 히알루론산 나트륨은 제조사로부터 제공된 인정서에 의해 순도가 99%이고 최대농도 오차 범위가 1%이므로 순도에 대한 표준불확도는 ($u(P_{Fi})$) 0.0011 ($0.01/\sqrt{3}$) g/100g이었고 상대표준불확도는 ($u(P_{Fi})/P_{Fi}$) 0.000011 (0.0011/99) 이었다.

3.3. 표준용액 제조과정의 불확도

표준물질 0.9664 g을 50 mL의 용량플라스크에 넣고 Tris-HCl 완충용액으로 희석하여 조제하므로 표준물질 계량에 필요한 계량기의 불확도와 50 mL 용량플라스크 부피에 대한 불확도를 고려했다. 1차 시험용액 조제 시 고려했던 불확도와 동일한 방법을 적용하여 불확도를 산정하면 저울의 표준불확도 ($u(STD_{Wc})$)는 0.00025 g (0.0005/2), 표준불확도 ($u(STD_{WRa})$)는 0.000029 g (0.0001/ $\sqrt{3}$)이었다. 그리고 저울의 안정성의 불확도는 표준분동 1.0 g을 이용하여 4일에 걸쳐 4반복 측정된 값들을 공통 (pooled) 실험표준편차 방법에 따라 식 (6)과 (7)을 적용하여 산출할 경우 표준불확도 ($u(STD_{Rp})$)는 0.000026 g이었다. 결국 저울의 합성불확도 ($u(STD_W)$)는 각 표준불확도에 한 제곱합의 제곱근으로 0.00025 g이며, 상대표준불확도 ($u(STD_W)/STD_W$)는 0.00026 (0.00025/0.9664)이었다. 또한 50 mL 용량플라스크에 완충용액으로 정용 시 기인되는 불확도는 용량플라스크의 허용오차가 ± 0.06 이므로 표준불확도 ($u(STD_{Vc})$)는 0.035 mL ($0.06/\sqrt{3}$)이며, 용량플라스크의 반복성은 50 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로써 표준편차 (σ)를 구하므로 A type의 표준불확도 ($u(STD_{VRp})$)는 0.030 mL ($0.095/\sqrt{10}$)가 되었다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 $\pm 3^\circ\text{C}$

이고 완충용액의 팽창계수는 0.00021이며, 신뢰구간이 주어지지 않으므로 직사각형 분포로 간주 ($\sqrt{3}$)하여 표준불확도 ($u(STD_{VTP})$)는 0.018 mL ($0.032/\sqrt{3}$)이었다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도 ($u(STD_V)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.042 mL이며, 상대표준불확도 ($u(STD_V)/STD_V$)는 0.00083 (0.042/50)이었다. 따라서, 표준원액에 대한 상대합성표준불확도는 표준물질의 순도, 표준품계량, 플라스크의 상대표준불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하며 그 결과 0.00087로 나타났다. 표준용액 조제는 표준원액을 자동피펫을 이용하여 농도별로 9.4 $\mu\text{g/mL}$, 36.4 $\mu\text{g/mL}$, 66.1 $\mu\text{g/mL}$, 100.1 $\mu\text{g/mL}$, 269.1 $\mu\text{g/mL}$, 487.1 $\mu\text{g/mL}$, 908.5 $\mu\text{g/mL}$ 및 1487.2 $\mu\text{g/mL}$ 로 조제한 후 이 용액 0.05 mL와 콘드로이티나 아제 ABC 효소 용액 0.45 mL을 섞어서 효소반응 시켜서 만들었다. 따라서 각 농도별 (1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 8th)의 불확도는 표준원액으로부터 표준용액 조제시 발생하는 불확도 (자동피펫 및 용량플라스크)와 효소반응 과정의 불확도 (자동피펫)를 각 단계별로 합성하였다. Table 2에 단계별 표준용액 조제시 사용되는 자동피펫 용량플라스크에서 발생하는 불확도를 정리하였다.

3.4. 검량곡선의 불확도

검량곡선은 히알루론산의 표준용액 8개의 농도 9.4 $\mu\text{g/mL}$, 36.4 $\mu\text{g/mL}$, 66.1 $\mu\text{g/mL}$, 100.1 $\mu\text{g/mL}$, 269.1 $\mu\text{g/mL}$, 487.1 $\mu\text{g/mL}$, 908.5 $\mu\text{g/mL}$ 및 1487.2 $\mu\text{g/mL}$ 로 3회 조제하여 분석한 결과의 평균값을 이용하여 선형 최소제곱법으로 계산하였다. 검량선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은 식 (8)~(11)이며, 회귀분석 (regression analysis)의 의해 관계식에 적용 계산하였을 때 Table 3에 보여주는 바와 같이 검량곡선의

Table 2. Summary of uncertainty values from standard solutions

Description parameter	value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty	
	(x_i)	x_i	ν	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{(\sum\{u(x_i)/(x_i)\}^2)}$
P_{Fi}		99	∞	0.0011	0.000011	
STD	STD_W	0.9664	134062	0.0011	0.00026	0.00087
	STD_V	50	34	0.042	0.00083	
Auto-pipette 2~200 uL	V_{Ac}	0.0005	∞	0.00029	0.023	
	V_{ARp}	0.0129	9	0.000039		
	V_{ATp}	3	∞	0.000047		
Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023	0.0011	
	V_{Rp}	25	9	0.013		
	V_{Tp}	3	∞	0.0091		
STD_{1st}	Auto-pipette 2~200 uL	V_{Ac} 0.001	∞	0.00058	0.016	
	V_{ARp}	0.05	9	0.00053		
	V_{ATp}	3	∞	0.000088		
Auto-pipette 100~5000 uL	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	0.016	
	V_{ARp}	0.45	9	0.00029		
	V_{ATp}	3	∞	0.00079		

P_{Fi} (Purity of functional ingredient); F_{Fi} (Formula weight of functional ingredient); STD (Standard stock solution); $STD_{1st, \dots, 8th, \dots}$ (Concentration of standard solution); V_c (Calibration of volumetric flask); V_{Rp} (Repeatability of volumetric flask); V_{Tp} (Variation of temperature); W_c (Calibration of sample weight); W_{Rp} (Repeatability of sample weight); W_{Ra} (Readability of weight of sample).

Table 2. Summary of uncertainty values from standard solutions (Continued)

Description parameter	value		Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty	
	(x_i)	x_i	ν	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$		
<i>STD</i> _{2nd}	Auto-pipette	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	0.025	
	2~200 uL	V_{ARp}	0.0499	9	0.000057		0.012
		V_{ATp}	3	∞	0.000018		
		Volumetric flask	V_c	0.04	∞		0.023
	25 mL	V_{Rp}	25	9	0.013		0.0011
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.001	∞		0.00058
	2~200 uL	V_{ARp}	0.05	9	0.00053		0.016
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.012	∞		0.0069
	100~5000 uL	V_{ARp}	0.45	9	0.00029		0.016
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
Auto-pipette		V_{Ac}	0.001	∞	0.00058		
<i>STD</i> _{3rd}	2~200 uL	V_{ARp}	0.0908	9	0.000055	0.0088	
		V_{ATp}	3	∞	0.000033		
		Volumetric flask	V_c	0.04	∞	0.023	
	25 mL	V_{Rp}	25	9	0.013	0.0011	
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	
	2~200 uL	V_{ARp}	0.05	9	0.00053	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	
	100~5000 uL	V_{ARp}	0.45	9	0.00029	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.0012	∞	0.00069	
<i>STD</i> _{4th}	2~200 uL	V_{ARp}	0.1373	9	0.00099	0.0088	
		V_{ATp}	3	∞	0.000050		
		Volumetric flask	V_c	0.04	∞	0.023	
	25 mL	V_{Rp}	25	9	0.013	0.0011	
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	
	2~200 uL	V_{ARp}	0.05	9	0.00053	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	
	100~5000 uL	V_{ARp}	0.45	9	0.00029	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.005	∞	0.0029	
<i>STD</i> _{5th}	50~1000 uL	V_{ARp}	0.3693	9	0.00055	0.0080	
		V_{ATp}	3	∞	0.00013		
		Volumetric flask	V_c	0.04	∞	0.023	
	25 mL	V_{Rp}	25	9	0.013	0.0011	
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058	
	2~200 uL	V_{ARp}	0.05	9	0.00053	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069	
	100~5000 uL	V_{ARp}	0.45	9	0.00029	0.016	
		V_{ATp}	3	∞	0.00079		

P_{Fi} (Purity of functional ingredient); F_{Fi} (Formula weight of functional ingredient); *STD* (Standard stock solution); *STD*_{1st...8th...} (Concentration of standard solution); V_c (Calibration of volumetric flask); V_{Rp} (Repeatability of volumetric flask); V_{Tp} (Variation of temperature); W_c (Calibration of sample weight); W_{Rp} (Repeatability of sample weight); W_{Ru} (Readability of weight of sample).

Table 2. Summary of uncertainty values from standard solutions (Continued)

Description parameter	value		Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty	
	(x_i)	x_i	ν	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$		
<i>STD_{6th}</i>	Auto-pipette	V_{Ac}	0.006	∞	0.0035	0.023	
	50~1000 uL	V_{ARp}	0.6684	9	0.00049		0.0052
		V_{ATp}	3	∞	0.00024		
		Volumetric flask	V_c	0.04	∞		0.023
	25 mL	V_{Rp}	25	9	0.013		0.0011
		V_{Tp}	3	∞	0.0091		
		Auto-pipette	V_{Ac}	0.001	∞		0.00058
	2~200 uL	V_{ARp}	0.05	9	0.00053		0.016
		V_{ATp}	3	∞	0.000088		
Auto-pipette		V_{Ac}	0.012	∞	0.0069		
100~5000 uL	V_{ARp}	0.45	9	0.00029	0.016		
	V_{ATp}	3	∞	0.00079			
	Auto-pipette	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.026	
100~5000 uL	V_{ARp}	1.2467	9	0.00046	0.014		
	V_{ATp}	3	∞	0.00045			
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023		
	V_{Rp}	25	9	0.013	0.0011		
	V_{Tp}	3	∞	0.0091			
	Auto-pipette	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058		
2~200 uL	V_{ARp}	0.05	9	0.00053	0.016		
	V_{ATp}	3	∞	0.000088			
	Auto-pipette	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069		
100~5000 uL	V_{ARp}	0.45	9	0.00029	0.016		
	V_{ATp}	3	∞	0.00079			
	Auto-pipette	V_{Ac}	0.03	∞	0.017	0.024	
100~5000 uL	V_{ARp}	2.0408	9	0.00046	0.0085		
	V_{ATp}	3	∞	0.00074			
	Volumetric flask 25 mL	V_c	0.04	∞	0.023		
	V_{Rp}	25	9	0.013	0.0011		
	V_{Tp}	3	∞	0.0091			
	Auto-pipette	V_{Ac}	0.001	∞	0.00058		
2~200 uL	V_{ARp}	0.05	9	0.00053	0.016		
	V_{ATp}	3	∞	0.000088			
	Auto-pipette	V_{Ac}	0.012	∞	0.0069		
100~5000 uL	V_{ARp}	0.45	9	0.00029	0.016		
	V_{ATp}	3	∞	0.00079			

P_{Fi} (Purity of functional ingredient); F_{Fi} (Formula weight of functional ingredient); *STD* (Standard stock solution); *STD_{1st...8th...}* (Concentration of standard solution); V_c (Calibration of volumetric flask); V_{Rp} (Repeatability of volumetric flask); V_{Tp} (Variation of temperature); W_c (Calibration of sample weight); W_{Rp} (Repeatability of sample weight); W_{Ru} (Readability of weight of sample).

표준불확도 ($u(L_c)$)는 561.63 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 상대표준불확도 ($u(L_c)/L_c$)는 0.0097 (561.63/결과값)으로 나타났다.

3.5. 시료의 반복측정에 따른 불확도

시료를 5회 반복 측정하여 얻은 결과값을 토대로 표준불확도 ($u(I_R)$) 및 상대표준불확도 ($u(I_R)/I_R$) 값을 산출했다. 시험 과정을 반복한 결과의 평균값은 57,747.52이며 표준편차는 2,194.97이었다. 따라서 표준불확도 ($u(I_R)$)는 표준편차를 ($\sqrt{5}$)로 나뉜 값인 981.62 (2,194.97/ $\sqrt{5}$)이며, 상대표준불확도

($u(I_R)/I_R$)는 0.017 (981.62/57,747.52)로 나타났다.

3.6. 회수율 및 정밀성의 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복측정과 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구했다. 회수율 시험을 5회 반복 측정한 결과, 평균 및 표준편차는 94.46 \pm 1.6%이었으며, 이에 대한 표준불확도 ($u(R_M)$)는 표준편차와 같으므로 히알루론산의 표준불확도는 0.016이다. 따라서 회수율 및 정밀성의 상대표준불확도 ($u(R_M)/R_M$)을 산출하면 0.017 (0.016/0.94)이며 자유

Table 3. The results of regression analysis using Excel program

Analyte	S	B_1	p	n	C_0	\bar{C}	S_{xx}	$u(L_c)$	$u(L_c)/L_c$
hyaluronic acid for dietary supplement	50,219.33	2121.12	3	24	57,747.52	420.50	5,844,213.24	561.63	0.0097

S (Standard error); B_1 (Slope of the calibration curve); p (Number of measurement to determination C_0); n (Number of measurement for the calibration); C_0 (Concentration of standard for the calibration); \bar{C} (Mean value of the different calibration standard); S_{xx} (Change value range of calibration standard); $u(L_c)$ (Standard uncertainty); $u(L_c)/L_c$ (Relative standard uncertainty).

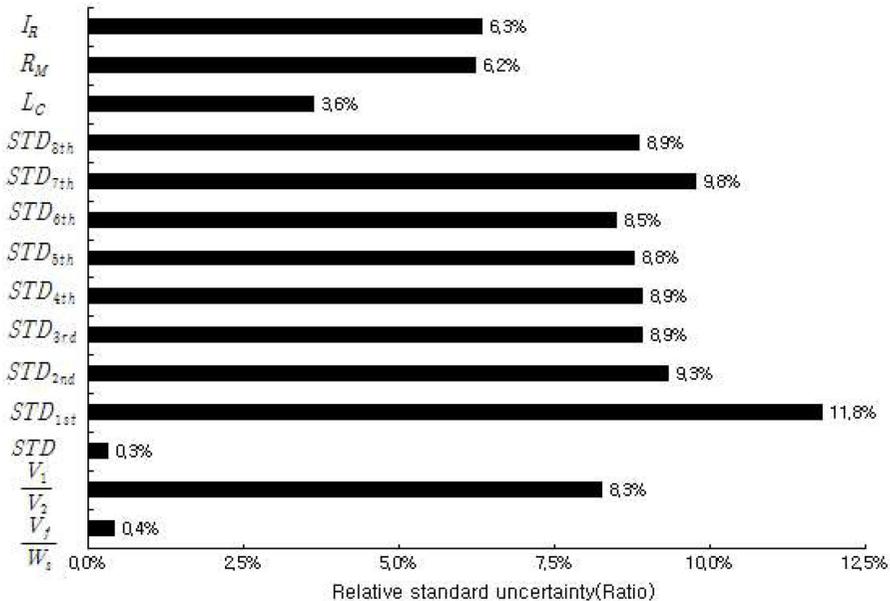


Fig. 1. Contributions of uncertainty factors for analytical method of hyaluronic acid used as a dietary supplement. I_R (Reproducibility of instrument); R_M (Recovery of matrix); L_C (Linearity of calibration curve); STD (Standard stock solution); $STD_{1st...8th...}$ (Concentration of standard solution); V_j (Final volume of sample, mL); W_s (Weight of sample, g).

도는 4이었다.

3.7. 합성표준불확도 및 확장불확도

위에서 산출된 상대표준불확도 값을 불확도 전파의 법칙에 따라 제곱합의 제곱근으로 계산하여 전체 불확도 요인에 대한 합성상대표준불확도 ($u(C_s)/C_s$) 값을 구하면 0.076이었다. 이때 합성상대표준불확도값에서 시료분석 결과치인 57,747.52를 곱하면 합성표준불확도 ($u(C_s)$)값인 4,380.73 $\mu\text{g/g}$ 를 구할 수 있었다. 그리고 확장불확도 (U)는 합성표준불확도값에서 포함인자 (k)를 곱하여 계산했으며, 포함인자는 식 (13)에 의하여 산출할 경우 33로 확인되어 t -분포표를 이용하여 95% 신뢰수준에서 $k = 2.03$ 을 구했다. 그러나 EURACHEM/CITAC 지침 [8]에 따라 유효자유도 ($\nu \geq 7$)일 경우 포함인자 k 를 2.0으로 계산하면, 식 (14)에 의해서 산출된 확장불확도는 8,761.46 $\mu\text{g/g}$ 이며, 결국 히알루론산의 함량은 57,747.52 \pm 8,761.46 $\mu\text{g/g}$ (신뢰수준 약 95%, $k = 2.0$ 일 때)이다 (Table 3).

3.8. 불확도 요인의 상대기여도

불확도 요인의 상대불확도가 최종 결과값에 미치는 기여도

를 Fig. 1에 나타내었다. 각 불확도 요인의 기여도를 %값으로 표현하면 불확도값이 최종 시험결과 값에 미치는 영향은 앞에서 구한 결과에서 15.2%로 산정되었다. 또한 각 불확도 인자의 기여율을 살펴보면 9.4 $\mu\text{g/mL}$ 표준원액 조제시 희석단계에서 발생하는 불확도 기여율은 11.8%로 가장 컸으며, 그 외 요인에서는 10% 미만의 비슷한 수준의 낮은 기여도를 나타남을 확인할 수 있었다.

4. CONCLUSION

본 연구에서 건강기능성 식품으로 국내에서 시판되어 사용되고 있는 히알루론산 식이보충제를 효소로 반응시킨 후, 그 반응물을 HPLC 기기를 이용하여 함량분석하는 분석시험법을 GUM 지침에 따라 불확도를 산정하였다. 불확도 발생의 원인들로는 측정량 계산에 사용되는 시료의 무게, 시험용액 전량, 기기측정값 등이 작용했고, 개별구성요소는 저울의 안정성, 분해능, 재현성, 표준품 순도, 농도, 표준용액 희석, 검량선, 회수율 및 기기 재현성을 고려하였다. 불확도의 산출은

GUM과 EURACHEM/CITAC 방법에 기초하였고, 각 인자들은 A-type으로 산출된 표준불확도와 합성불확도로 계산하였다 [7,8]. 그 결과 식이보충제로써 사용되는 히알루론산의 함량과 시험과정중 발생하는 불확도의 추정값은 $57,747.52 \pm 8,761.46 \mu\text{g/g}$ (신뢰수준 약 95%, $k=2.0$ 일 때)으로 계산되어, 시험 전과정에서 발생하는 불확도 추정은 함량 측정값의 15.2%로 산정되었다. 또한, 각 시험과정에서 발생하는 불확도 요인의 기여도를 확인한 결과, 표준원액을 이용하여 $9.4 \mu\text{g/mL}$ 농도의 표준용액 조제시 11.8%로 가장 컸으며, 그 다음은 표준용액 $908.5 \mu\text{g/mL}$ 농도의 표준용액 조제시 9.8%, 표준용액 $1487.2 \mu\text{g/mL}$ 농도의 표준용액 조제시 8.9%의 기여도를 보였다. 히알루론산의 분석법의 불확도 산정에 대한 본 연구결과는 식이보충제로써 사용되는 국내 히알루론산의 제조 및 유통과정에서 제조사나 시험·검사기관의 품질관리를 위한 기초자료로 유용하게 사용되리라 기대한다.

Acknowledgements

이 논문은 2016학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

REFERENCES

1. Meyer, K. and J. W. Palmer (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chem.* 107: 629-634.
2. Scott, J. E. (1989) Secondary structures in hyaluronan solutions:

- chemical and biological implications. *Ciba. Found. Symp.* 143: 6-15.
3. Laurent, T. C. (1987) Biochemistry of hyaluronan. *Acta. Otolaryngol. Suppl.* 442: 7-24.
 4. Necas, J., L. Bartosikova, P. Brauner, and J. Kolar (2008) Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Vet. Med.* 53: 397-411.
 5. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS), Information for health functional food. <http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/>. (2016).
 6. Ministry of Food and Drug Safety (MFSD), Notice #2014-204, Chungcheongbuk-do, Republic of Korea. <http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=686&seq=8711&cmd=v>. (2016).
 7. ISO/IEC, Uncertainty of measurement Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement. <http://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:guide:98:-3:ed-1:c2:en>. (2016).
 8. EURACHEM/CITAC Guide, Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches, Eurachem, EUROLAB, CITAC, Nordtest and the RSC Analytical Methods Committee. http://eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/UfS_2007.pdf. (2016).
 9. Chwae, J. H. (2009) Study on international accreditation for residue analysis and uncertainty in measurement. *Korean Soc. Environ. Agr.* 1: 105-115.
 10. Kim, J. Y. (2016) Assessment of regression model, linearity and weighting factor for preparation of calibration curve in the quantitative LC-MS/MS measurements of methylphenidate and its metabolite. *Yakkak Hoeji.* 60: 304-311.
 11. Park, S. W., J. S. Bang, and W. Lee (2016) A study on the statistical method for the target component of a glucose-lowering functional material in extracts of evening primrose seeds. *Korean J. Clin. Pharm.* 26: 70-76.