



혈당상승억제 기능성 소재인 달맞이꽃종자 추출물의 지표물질 분석법의 통계적 검증에 대한 연구

박상욱¹ · 방준석² · 이원재^{1,3*}

¹조선대학교 대학원 식품의약학과, ²숙명여자대학교 임상약학대학원, ³조선대학교 약학대학
(2016년 3월 4일 접수 · 2016년 3월 13일 수정 · 2016년 3월 14일 승인)

A Study on the Statistical Method for the Target Component of a Glucose-lowering Functional Material in Extracts of Evening Primrose Seeds

Sang-Wook Park¹, Joon Seok Bang², and Wonjae Lee^{1,3*}

¹Department of Food and Drug, Chosun University Graduate School, Gwangju 61452, Republic of Korea

²Graduate School of Clinical Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 04310, Republic of Korea

³College of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 61452, Republic of Korea

(Received March 4 2016 · Revised March 13, 2016 · Accepted March 14, 2016)

ABSTRACT

Background: The use of the extracts from evening primrose seeds as a health functional food has been gradually increased. Therefore, the monitoring and screening process has been considerably required for its quality control. **Objective:** This study aimed to estimate the measurement uncertainty associated with determination of penta-o-galloyl β -D-glucose (PGG) in extracts from evening primrose seeds by high-performance liquid chromatography. **Methods:** The sources of measurement uncertainty was expressed in accordance with mathematical/statistical theories of GUM & EURACHEM Guide. The expanded uncertainty was calculated by using the relative standard uncertainty between analytical result and sources of uncertainty in measurement (sample weight, final volume, extraction volume, standard solution, matrix and instrument etc). **Results:** In the results of 95% confidence interval, the uncertainty in measurement was $10,253.34 \pm 1,844.50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($k = 2.0$). **Conclusion:** In this study, it showed that the value of uncertainty in measurement for determination of PGG in extracts from evening primrose seeds by HPLC has about 18.0% influence on PGG contents of the analytical results. The results would be very useful for the monitoring and screening of evening primrose seeds marketed in Korea for its quality control as dietary supplement.

KEY WORDS: Evening primrose seeds, quality control, penta-o-galloyl β -D-glucose, uncertainty measurement

“달맞이꽃종자 추출물”은 달맞이꽃(*Oenothera biennis* L.)의 종자를 압착하거나 또는 핵산을 이용해 지방을 제거한 후 60%의 주정으로 추출해서 농축 및 분무건조과정을 통해 제조되며, 지표성분은 폴리페놀과 penta-o-galloyl beta-D-glucose (PGG)로서 각 함량이 60~70%, 2~2.8%가 되도록 표준화되어 있다.¹⁾ 음식물로부터 섭취된 전분은 α -glucosidase에 의해 포도당으로 분해되어 흡수되는데 달맞이꽃종자 추출물은 효소 α -glucosidase의 활성을 저해하여 전분의 소화와 흡수를 낮춰줌으로써 식후 혈당수치의 상승을 완화시켜주는 것이 동물시험에서 관찰되었다.²⁻⁴⁾ 더불어, 혈당수치가 약간 높은 사람을 대상으로 달맞이꽃종자 주정추출물의 효과를 비교한 연구에

서 본 추출물이 식후 혈당수치의 상승속도를 저해하고, 공복 혈당(FPG)과 당화혈색소(Hb_{A1C})의 수치를 개선하는데 유효함이 확인되었다.⁵⁾ 이에, 2012년 식품의약품안전처(이하 식약처)에서는 달맞이꽃종자 추출물에 대해서 “식이유래 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음”이라는 기능성을 인정하였으며, 기반연구와 인체적용연구의 수가 충분하지는 않으나 그 결과에 일관성이 있으므로 “기타기능 II” 등급에 해당한다고 고시하였다.¹⁾

이러한 기능성 원료를 인체가 섭취할 목적으로 제조하는 경우는 건강기능식품공전 제3 개별기준 및 규격에 적합해야 하므로 기능성 원료의 PGG 함량이 제조과정에서 사용가능 원

*Correspondence to: Wonjae Lee, College of Pharmacy, Chosun University 309 Pilmundaero, Dong-gu, Gwangju 61452, Republic of Korea
Tel: +82-62-230-6376, Fax: +82-62-222-5414
E-mail: wlee@chosun.ac.kr

료의 품질을 결정하는 중요한 지표가 된다. 따라서 원료 및 완제품에서 PGG의 함량규격 기준치에 발생하는 오차에 대한 적부여부 판정 시 불확도는 매우 중요한 사항으로 취급되어야 한다. 그러나 시험자, 시험환경, 시험과정설계 등의 내·외부 요인으로부터 발생하는 불완전성을 보완하는 데는 한계가 있다. 즉, 시험방법의 적합성 및 타당성이 검토되더라도 불구하고 시료분석 시 기질(matrix), 전처리 및 시험전 과정에서의 오차로 인해 결과의 차이가 발생하는 것은 불가피 하다. 그래서 국제도량형국(BIPM)은 1981년 10월에 개최된 국제도량형위원회(CIPM)에서 해결방안을 모색했으며, 10여 년의 논의를 거쳐 국제도량형국(BIPM), 국제전기기술위원회(IEC), 국제임상화학위원회(IFCC), 국제표준화기구(ISO), 국제순수및응용화학연합회(IUPAC), 국제순수및응용물리연합회(IUPAP), 국제법정계량기구(OIML) 등 각 분야를 대표하는 국제기구와 각국 표준기관이 공동으로 1993년에 Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM), ISO"라는 지침서를 발간하였다.^{6,7)} IUPAC 기술보고서에서는 단일 실험실내에서의 밸리데이션 품질평가 방법 및 측정불확도 등을 상세히 기술하였으며, 검증과정을 정밀화 및 세분화함으로써 불완전성을 보완하고 적합성을 유지하도록 권장한다.⁸⁾ 또한, Korea Laboratory Accreditation Scheme (KOLAS)인증 국제공인시험기관의 경우, 한국표준과학원이 발간한 측정불확도 표현지침을 근거로 불확도 산출 및 표현을 신뢰도 평가의 중요한 요소로 다루고 있으며 시험기관이 의무적으로 적용중이다.

따라서 본 연구에서는 기능성 원료인 달맞이꽃종자 추출물을 이용하여 건강기능식품으로 시판되고 있는 식이보충제를 대상으로 식약처에서 고시⁹⁾하고 있는 건강기능식품공전 2-15. 달맞이꽃종자 추출물 4)시험법에 따라 분석했으며, 각 단계에서 발생하는 실험적 오차요인들을 도출한 후 수리통계학적 관계식으로부터 산출된 불확도 값이 최종 시험결과값에 미치는 영향을 산정하고자 하였다.

연구 방법

실험재료

본 연구를 위한 시료로 인증값을 가지는 인증표준시료(certified reference material, CRM)는 시판되지 아니하므로 이를 대신하여 국내 대형마트에서 판매 중인 달맞이꽃종자 추출물 식이보충제를 구입하여 사용하였다. 표준물질 PGG는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고, 아세트산은 Kanto Chemical사(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 또한 메탄올과 아세트니트릴은 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터 HPLC급을 구입하여 사용했으며, 초순수는 EASY pure system (Barnstead, Dubuque, IA, USA)에 의해 18.0 MΩ 수준으로 정제된 것을 사용했다. 또한 본 실험에서 무게측정을 위

해 사용한 저울(Precisa, XT220A, Swiss)은 교정기관에서 표준계측기를 사용하여 교정하였고, 그 밖의 초자류는 표기된 허용오차와 시험환경 조건을 반영하여 불확도를 추정하였다.

표준용액의 조제

표준물질 PGG 10 mg을 정밀히 칭량하여 80% 메탄올 100 mL에 용해시켜 표준원액으로 하고 위 용액을 80% 메탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 하였다.

시험용액의 조제

시료를 분쇄 및 균질화한 후 일정량을 50 mL 용량플라스크에 취하고 80% 메탄올 25 mL를 가하여 10분간 초음파 추출 후 실온에 식혀 80% 메탄올로 정용한다. 추출액을 0.45 μm 시린지용 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다.

기기분석 조건

기능(지표)성분을 분석하기 위해 PDA (Photo diode array)가 달린 Nanospace SI-2 (Shiseido Co., Japan)를 사용하였으며, 컬럼은 Capcellpak C₁₈ UG120 (4.62 × 50 mm, 5 μm, Shiseido, Japan)을 사용하였다. PGG의 분리분석조건으로 0.3% 아세트산 수용액(A)과 0.3% 아세트산이 첨가된 아세트니트릴 수용액(B)을 이동상으로 사용하였고, 분당 1.0 mL의 유속과 측정파장 UV 280 nm로 설정하였으며, 기타 gradient 용리조건을 포함한 HPLC 분석조건은 Table 1과 같다.

불확도 추정방법

측정불확도의 산출을 위해 GUM⁷⁾과 EURACHEM¹⁰⁾ 측정모델링을 선정하여 불확도 인자를 검토한 후, 요인별 표준불

Table 1. HPLC condition for analysis of PGG in extract of evening-primrose seeds.

Items	Conditions		
	Time (min)	A (%)	B (%)
Solvent	0.0	83	17
	15.0	75	25
	20.0	50	50
	25.0	50	50
	25.1	83	17
	30.0	83	17
Column	Capcell pak C ₁₈ UG120 (4.6 mm ID × 250 mm, 5 μm)		
Flow	1 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Detector	UV 280 nm		
Temperature	40°C		

A: Acetic acid : DW (0.3 : 99.7, v/v)

B: Acetic acid : DW : MeCN (0.3 : 5 : 94.7, v/v)

확도 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 나누어 각각의 상대표준불확도와 자유도를 구하였다. 이렇게 얻은 불확도값에서 합성표준불확도와 포함인자(k)를 이용하여 확장불확도를 계산하고 측정불확도를 산출하였다.

모델관계식 설정

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

$$C_s = C_e \times \frac{V_f}{W_s} \times \frac{V_1}{V_2} \tag{1}$$

$$W_s = W_c \times W_{Rp} \times W_{Ra} \tag{2}$$

$$V_f = V_c \times V_{Rp} \times V_{Tp} \tag{3}$$

$$C_e = P_{Fi} \times F_{Fi} \times STD \times L_c \times I_R \times R_M \tag{4}$$

- 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

요인별 측정값과 표준불확도

시료의 반복측정 시 평균값을 측정값으로 사용하며 이때 표준불확도는 (5)식을 적용하여 A type으로 구했다. 또한 무게측정 시 저울의 안정성 등의 반복시험에 대한 불확도는 공통(pooled) 실험표준편차 방법에 따라 (6)식과 (7)식을 적용하여 A type 불확도를 구했다.

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

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

$$S_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^M v_i s_i^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^M v_i}} \tag{7}$$

- n : Number of measurements
- S_p : Pooled standard deviation
- s_i : Standard deviation
- v_i : Degree of freedom

검량곡선의 불확도

검량곡선은 표준원액을 이용하여 여러 개의 표준용액을 조제하여 작성했다. 검량곡선은 1차 회귀식인 (8)식을 사용하며, 상대표준불확도는 (9)~(11)식의 모델을 적용하여 산출했다.

$$A_j = C_i \times B_l + B_0 \tag{8}$$

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

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

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

- 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

합성표준불확도

측정결과의 값이 여러 가지 요인의 결과로부터 구해지며, 감도계수와 표준불확도, 상관계수를 측정불확도 관계식에 대입하여 구했다. 이때 합성은 불확도 전파법칙(law of propagation

of uncertainty)에 따라 합성표준불확도 관계식을 유도했다.

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

확장불확도

포함인자(k)는 합성표준불확도의 유효자유도(V_{eff})를 추정하고, Welch-Satterth-Waite 공식(13)식을 이용하여 산출했다. 이때, 유효자유도가 7 이상인 경우, EURACHEM/CITAC 지침¹⁰⁾에 따라 95% 신뢰수준에서 포함인자 k를 2로 기준하였다. 또한 확장불확도는 계산된 합성표준불확도에 포함인자(k)를 곱하는 (14)식에 의해 구하였다.

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

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

연구 결과

시험용액 조제 시 불확도

시료의 무게를 0.1 mg까지 측정할 수 있는 저울을 이용하여 50 mL 용량플라스크에 0.01 g 정도 채취한 후 80% 메탄올로 PGG 성분을 추출함으로써 시험용액을 준비했다. 이때 시험용액 조제 시 발생할 수 있는 요인인 저울 자체의 불확도(교정 성적서상의 불확도, 분해능 및 안정성)와 용량플라스크의 불확도 요인(허용오차, 반복성, 실험실 온도에 따른 불확도)을 고려했다. 즉, 시료무게 측정 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)였다. 이때 저울의 분해능은 0.0001 g이며 표준불확도는($u(W_{Ra})$)는 0.000029 g(0.0001/2/√3)이고, 안정성은 0.01 g의 표준분동을 이용하여 4일에 걸쳐 4회 반복 측정된 값들을 공통실험표준편차방법에

따라 (6)식과 (7)식을 적용하여 표준불확도($u(W_{Rp})$) 0.000024 g을 구했으며, 자유도는 16에서 1을 뺀 값인 15였다. 결국 저울의 합성표준불확도($u(W_s)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근이므로 0.00025 g이며, 상대표준불확도($u(W_s)/W_s$)는 0.0025 (0.00025/0.01)였다. 또한 50 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 50 mL 용량플라스크의 허용오차가 ± 0.06 이므로 표준불확도($u(V_c)$)는 0.035 mL(0.06/√3)이며, 용량플라스크의 반복성은 50 mL의 용량플라스크에 추출용액을 표시선까지 채운 무게를 10회 반복 측정함으로써 표준편차(σ)를 구하므로 A type의 표준불확도($u(V_{Rp})$)는 0.00086 mL였다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 ± 3°C이고 80% 메탄올의 팽창계수는 0.001018이며, 신뢰구간이 주어지지 않으므로 직사각형 분포로 간주(√3)하여 표준불확도($u(V_{Tp})$)는 0.088 mL(0.15/√3)였다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(V_f)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.095 mL이며, 상대표준불확도($u(V_f)/V_f$)는 0.0019(0.095/50)이다. 위와 같은 시험용액조제 시 발생하는 불확도 과정을 Table 2에 정리하였다.

표준용액의 순도 및 분자량의 불확도

표준물질인 PGG는 제조사가 제공한 인정서에 95%로 기재되어 최대농도 오차범위가 5%이므로 순도에 대한 표준불확도는($u(P_{Fi})$) 0.0055(0.05/√3) g/100 g이고 상대표준불확도는($u(P_{Fi})/P_{Fi}$) 0.000058(0.0055/95)이었다. 또한 PGG의 분자식은 C₄₁H₃₂O₂₆·xH₂O이고 분자량은 940.68이므로, IUPAC¹¹⁾에서 발표된 C, H, O원자 1개의 불확도는 ± 0.0008, ± 0.00007 및 ± 0.0003 이었고, 표준불확도는 직사각형 분포를 가정하여 √3으로 나누면 0.00046 g/mol, 0.000040 g/mol 및 0.00017 g/mol이며, 여기에 원자개수를 각각 곱하면 각 원자에 대한 표준 불확도는 0.019 g/mol, 0.0013 g/mol 및 0.0045 g/mol 이었다. 따라서 원자에 대한 합성표준불확도($u(F_{Fi})$)를 제곱합의 제곱근으로 계산하면 0.020 g/mol이며, 상대표준불확도($u(F_{Fi})/F_{Fi}$) 0.000021(0.020/940.7) 이었다.

Table 2. Uncertainty budget for the determination of W_s , and V_f .

Parameter	Value	Degree of freedom	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty	Combined relative standard uncertainty
(x_i)	x_i	ν	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$	$\sqrt{\sum \{u(x_i)/x_i\}^2}$
W_s	W_c	-	0.00025		
	W_{Ra}	-	0.000029	0.025	
	W_{Rp}	0.01	0.000024		0.025
V_f	V_c	0.06	0.035		
	V_{Rp}	10	0.00086	0.0019	
	V_{Tp}	3	0.088		

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)

Table 3. 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}		95	∞	0.0055	0.000058	0.060
F_{Fi}		940.68	∞	0.020	0.000021	
STD	STD _W	0.0042	157081	0.00025	0.060	0.060
	STD _V	50	383,649,212	0.095	0.0019	
STD _{1st}	Auto-pipette 10~100 μ L	V _{AC}	∞	0.00029	0.0084	0.0087
		V _{ARD}	9	0.00030		
		V _{ATD}	∞	0.000088		
	Volumetric flask 10 mL	V _C	∞	0.014	0.0023	
		V _{RP}	9	0.0012		
		V _{TP}	∞	0.018		
STD _{2nd}	Auto-pipette 10~100 μ L	V _{AC}	∞	0.00046	0.0050	0.0055
		V _{ARD}	9	0.000083		
		V _{ATD}	∞	0.00018		
	Volumetric flask 10 mL	V _C	∞	0.014	0.0029	
		V _{RP}	9	0.0012		
		V _{TP}	∞	0.018		
STD _{3rd}	Auto-pipette 20~200 μ L	V _{AC}	∞	0.0007	0.0041	0.0047
		V _{ARD}	9	0.00025		
		V _{ATD}	∞	0.00035		
	Volumetric flask 10 mL	V _C	∞	0.014	0.0023	
		V _{RP}	9	0.0012		
		V _{TP}	∞	0.018		
STD _{4th}	Auto-pipette 100~1,000 μ L	V _{AC}	∞	0.0029	0.0074	0.0078
		V _{ARD}	9	0.00015		
		V _{ATD}	∞	0.00071		
	Volumetric flask 10 mL	V _C	∞	0.014	0.0023	
		V _{RP}	9	0.0012		
		V _{TP}	∞	0.018		
STD _{5th}	Auto-pipette 100~1,000 μ L	V _{AC}	∞	0.0035	0.0047	0.0052
		V _{ARD}	9	0.00024		
		V _{ATD}	∞	0.0014		
	Volumetric flask 10 mL	V _C	∞	0.014	0.0023	
		V _{RP}	9	0.0012		
		V _{TP}	∞	0.018		
STD _{6th}	Auto-pipette 500~5,000 μ L	V _{AC}	∞	0.017	0.011	0.011
		V _{ARD}	9	0.00034		
		V _{ATD}	∞	0.0028		
	Volumetric flask 10 mL	V _C	∞	0.014	0.0023	
		V _{RP}	9	0.0012		
		V _{TP}	∞	0.018		
STD _{7th}	Auto-pipette 500~5,000 μ L	V _{AC}	∞	0.017	0.0057	0.0061
		V _{ARD}	9	0.00039		
		V _{ATD}	∞	0.0056		
	Volumetric flask 10 mL	V _C	∞	0.014	0.0023	
		V _{RP}	9	0.0012		
		V _{TP}	∞	0.018		

P_{Fi} (Purity of functional ingredient); F_{Fi} (Formula weight of functional ingredient); STD (Standard stock solution); STD_{1st}...7th... (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)

표준용액 제조과정의 불확도

표준물질 0.0042 g을 50 mL의 용량플라스크에 넣고 추출용액으로 희석하여 조제하므로 표준물질 계량에 필요한 계량의 불확도와 50 mL 용량플라스크 부피에 대한 불확도를 고려하였다. 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/ $\sqrt{3}$)이다. 그리고 저울의 안정성의 불확도는 표준분동 0.005 g을 이용하여 4일에 걸쳐 4회 반복 측정된 값들을 공통 (pooled) 실험표준편차 방법에 따라 (6)식과 (7)식을 적용하여 산출할 경우, 표준불확도($u(STD_{WRp})$)는 0.000025 g이었다. 결국 저울의 합성불확도($u(STD_W)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로 0.00025 g이며, 상대표준불확도($u(STD_W)/STD_W$)는 0.060(0.00025/0.0042)이었다. 또한 50 mL 용량플라스크에 추출용액을 정용 시 기인되는 불확도는 50 mL 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 0.0012 mL (0.0037/ $\sqrt{10}$)가 되었다. 그리고 실험실 온도변화의 불확도는 온도변화가 $\pm 3^\circ\text{C}$ 이고 80% 메탄올의 팽창계수는 0.001018이며, 신뢰구간이 주어지지 않으므로 직사각형 분포로 간주($\sqrt{3}$)하여 표준불확도($u(STD_{VTP})$)는 0.088 mL(0.15/ $\sqrt{3}$)이다. 따라서 용량플라스크의 합성불확도($u(STD_V)$)는 각 표준불확도에 대한 제곱합의 제곱근으로서 0.095 mL이며, 상대표준불확도($u(STD_V)/STD_V$)는 0.0019(0.095/50)이었다. 그러므로 표준원액에 대한 상대합성표준불확도는 표준물질의 순도, 분자량, 표준품 계량, 플라스크의 상대표준 불확도를 제곱합의 제곱근으로 계산하며 그 결과가 0.060로 얻어졌다. 표준용액 조제는 표준원액을 자동피펫을 이용하여 농도별로 0.42, 0.84, 1.68, 3.36, 6.72, 13.44 및 26.88 ug/mL로 조제하였다. 각 농도별(1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th)의 불확도는 표준원액의 불확도를 구하는 방법과 동일하게 적용하였다. 단, 표준물질의 표준불확도 대신 표준원액의 불확도로 합성표준불확도값을 합성하는 것과 자동피펫의 용량과 횟수에 따라 적용되는 값이 차이를 적용하였다. 다음 Table 3은 표준원액과 표준용액조제 시 고려되는 불확도를 정리한 것이다.

검량곡선의 불확도

검량곡선은 표준용액 7개의 농도 0.42, 0.84, 1.68, 3.36, 6.72, 13.44 및 26.88 ug/mL로 3회 조제하여 분석한 결과의 평균값을 이용하여 선형최소제곱법을 적용하여 계산하였다. 검량선의 불확도 평가를 위한 수학적 관계 모델식은 (8)~(11)식이며, 회귀분석(regression analysis)에 의해 관계식에 적용하였을 때 검량곡선의 표준불확도($u(L_c)$)는 525.41 $\mu\text{g/mL}$ 이고, 상대표준불확도($u(L_c)/L_c$)는 0.051 (525.41/결과값)으로 나타났다(Table 4).

시료의 반복측정에 따른 불확도

시료를 5회 반복 측정하여 얻은 결과값을 토대로 표준불확도($u(I_R)$) 및 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$)값을 산출했다. 시험과정을 5회 반복한 결과의 평균값은 10,253.34이며 표준편차는 183.32이었다. 따라서 표준불확도($u(I_R)$)는 표준편차($\sqrt{5}$)로 나뉜 값인 81.98 (183.32/ $\sqrt{5}$)이며, 상대표준불확도($u(I_R)/I_R$)는 0.0054 (81.98/10,253.34)로 나타났다.

회수율 및 정밀성의 불확도

시료의 기질에 대한 불확도는 반복측정과 회수율 불확도의 상대불확도를 합성하여 구했다. 회수율 시험을 5회 반복 측정 한 결과, 평균 및 표준편차는 $96.7 \pm 2.6\%$ 이었으며, 이에 대한 표준불확도($u(R_M)$)는 표준편차와 같으므로 PGG의 표준불확도는 0.026이다. 따라서 회수율 및 정밀성의 상대표준불확도($u(R_M)/R_M$)를 산출하면 0.027(0.026/0.96)이며 자유도는 4이었다.

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 0.090 이었다. 이때 합성상대표준불확도값에서 시료분석 결과치인 10,253.34를 곱하면 합성표준불확도($u(C_s)$)값인 922.25 ug/g를 구할 수 있었다. 그리고 확장불확도(U)는 합성표준불확도값에서 포함인자(k)를 곱하여 계산했으며, 포함인자는 (13)식에 의하여 산출할 경우 179로 확인되어 EURACHEM/CITAC 지침¹⁰⁾에 따라 유효자유도($\nu \geq 7$)일 경우 95% 신뢰수준에서 포함인자 k를 2.0으로 계산하면, (14)식에 의해서 산출된 확장불확도는 산출

Table 4. The result 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
PGG	18,122.89	90,602.42	3	21	15,293.34	7.62	15.21	525.41	0.051

PGG (penta-O-galloyl beta-D-glucose); S (Standard error); B₁ (Slope of the calibration curve); p (Number of measurement to determination C₀); n (Number of measurement for the calibration); C₀ (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)

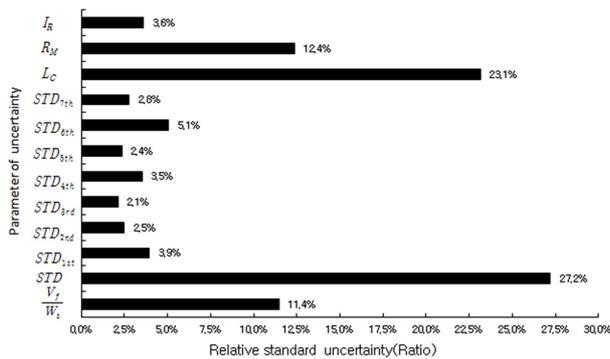


Fig. 1. Contributions of uncertainty factors.

I_R (Reproducibility of instrument); R_M (Recovery of matrix); L_C (Linearity of calibration curve); STD (Standard stock solution); $STD_{1st} \dots 7th \dots$ (Concentration of standard solution); V_f (Final volume of sample, mL); W_s (Weight of sample, g).

된 확장불확도는 1,844.50 $\mu\text{g/g}$ 이며 결국, PGG은 $10,253.34 \pm 1,844.50 \mu\text{g/g}$ (신뢰수준 약 95%, $k = 2.0$ 일 때)이다.

불확도 요인의 상대기여도

불확도 요인의 상대불확도가 최종 결과값에 미치는 기여도를 Fig. 1에 나타냈다. 각 불확도 요인의 기여도를 %값으로 표현하면 불확도 값이 최종 시험결과 값에 미치는 영향은 18.0%로 산정되었다. 또한 각 불확도 인자의 기여율은 표준원액 조제에서 27.2%로 가장 컸으며, 그 다음은 선형성 23.1%, 기기 재현성 12.4%, 시험용액의 조제 시 11.4% 순으로 높게 나타났다. 그러나 그 밖에 요인에서는 5%이하의 비슷한 수준의 낮은 기여도가 나타남을 확인할 수 있었다.

고찰 및 결론

본 연구에서는 달맞이꽃종자 추출물의 지표성분인 PGG를 HPLC로 분석하는 방법을 GUM 지침¹¹⁾에 따라 불확도를 추정했다. 불확도 발생의 원인들로는 측정량 계산에 사용되는 시료의 무게, 시험용액 전량, 기기측정값 등이 작용했고, 개별 구성요소는 저울의 안정성, 분해능, 재현성, 표준품 순도, 분자량, 농도, 표준용액 희석, 검량선, 회수율 및 기기의 재현성을 고려했다. 불확도의 산출은 GUM⁷⁾과 EURACHEM/CITAC¹⁰⁾에 근거하였고, 각 인자들은 A-type으로 산출된 표준불확도와 합성불확도를 산출했다. 그 결과 시료 중의 PGG의 함량과 시험과정 중에 발생하는 불확도의 추정값은 $10,253.34 \pm 1,844.50 \mu\text{g/g}$ (신뢰수준 약 95%, $k = 2.0$ 일 때)로서 시험 전과정에서 발생하는 불확도 추정은 함량 측정값의 18.0%로 산정되었다. 또한, 각 시험과정에서 발생하는 불확도 요인의 기여도를 확

인한 결과, 표준물질을 이용하여 표준용액 조제 시 27.2%로써 가장 컸으며, 그 다음은 직선성에서 23.1%, 기기재현성에서 12.4%, 시험용액 조제 시 11.4%의 기여도를 보였다. 불확도 산정에 대한 본 연구결과가 국내 식이보충제로 시판되고 있는 달맞이꽃종자 추출물의 분석 모니터링을 통한 품질관리의 기초적 자료로 유용하게 사용되리라 기대한다.

결론적으로, 현대사회에서 인구 고령화에 따른 당뇨병과 같은 만성질환 보유자가 크게 증가함에 따라 건강기능식품류의 효용성이 주목받고 있다. 그 일환으로 본 연구에서와 같이 식이유래 혈당상승 억제에 도움이 될 수 있는 기능성 원료인 달맞이꽃종자 추출물 유래 식이보충제의 임상적 사용 활성화가 요청되고 있다. 식이보충제 제품의 품질관리를 향상시키기 위해, 본 연구의 달맞이꽃종자 추출물 중 주요 지표물질인 PGG 분석방법의 정밀성을 높이기 위해 표준물질을 이용한 표준원액의 조제와 검량선의 작성 및 기기의 재현성 등 주요 인자들을 집중 관리함으로써 오차를 최소화 할 수 있는 방안이 적극적으로 모색되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). A notice from 2012-108, Chungcheongbuk-do, Republic of Korea, 2012.
2. Michio AK, Hiroyuki A, Yasuhiro S, *et al.* Effect of an extract from evening-primrose seeds on postprandial blood glucose level and its active components. *Jpn Soc food Sci Tech J* 2003;50:180-7.
3. Dwek RA, Butters TD, Platt FM, *et al.* Targeting glycosylation as a therapeutic approach. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:65-75.
4. Sancheti S, Lee H, Lee JE, *et al.* Screenign of korean medicinal plant extracts for α -glucosidase inhibitory activities. *Iran J Pharm Res* 2011;10:261-4.
5. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). Information for health functional food 2008. Submission of manuscript. Available at <http://www.foodnara.go.kr/hfoodi/>. Accessed December 20, 2015.
6. Chwae, JH. Study on international accreditation for residue analysis and uncertainty in measurement. *Korean Soc Environ Agri* 2009; 1:105-15.
7. ISO/IEC Guide 2008. Guide to the expression of uncertainty in measurement. Submission of manuscript. Available at <http://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:guide:98:-3:ed-1:v2:en>. Accessed December 20, 2015.
8. Michael T, Ellison LRS, Roger W. International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *J Pure Appl Chem* 2002;4:835-55.
9. Ministry of Food and Drug Safety (MFDS). A notice from 2014-204, Chungcheongbuk-do, Republic of Korea, 2014.
10. EURACHEM/CITAC Guide 2007. Measurement uncertainty arising from sampling. Submission of manuscript. Available at http://eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/Ufs_2007. Accessed December 20, 2015.
11. International Union of Pure and Applied Chemistry. Commission on atomic weight an isotopic abundances. *J Phys Chem Ref* 1993;22: 1571-84.