

이온크로마토그래프를 이용한 조제유류 및 영아용·성장기용 조제식 중 콜린 함량 분석법 연구

황경미 · 함현숙 · 이화정 · 강운정 · 윤혜성 · 홍진환¹ · 이현영² · 김천희² · 오금순*

식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 영양기능연구팀, ¹식품위해평가부, ²한국기능식품연구원

Establishment of Choline Analysis in Infant Formulas and Follow-up Formulas by Ion Chromatograph

Kyung Mi Hwang, Hyeon Suk Ham, Hwa Jung Lee, Yoon Jung Kang, Hae Seong Yoon,
Jin Hwan Hong¹, Hyoung Young Lee², Cheon Hoe Kim², and Keum Soon Oh*

*Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea*

¹*Department of Food Safety Risk Assessment, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea*

²*Korea Health Supplements Institute, Seongnam, Korea*

(Received May 30, 2017/Revised June 10, 2017/Accepted September 8, 2017)

ABSTRACT - This study was conducted to establish the analysis method for the contents of choline in infant formulas and follow-up formulas by ion chromatograph (IC). To optimize the method, we compared several conditions for extraction, purification and instrumental measurement using spiked samples and certified reference material (CRM; NIST SRM 1849a) as test materials. IC method for choline was established using Ion Pac CG column and 18 mM H₂SO₄ mobile phase. The parameters of validation were specificity, linearity, LOD, LOQ, recovery, accuracy, precision and repeatability. The specificity was confirmed by the retention time and the linearity, R² was over 0.999 in range of 0.5~10 mg/L. The detection limit and quantification limit were 0.14, 0.43 mg/L. The accuracy and precision of this method using CRM were 95%, 2.1% respectively. Optimized methods were applied in sample analysis to verify the reliability. All the tested products were acceptable contents of choline compared with component specification for nutrition labeling. The standard operating procedures were prepared for choline to provide experimental information and to strengthen the management of nutrient in infant formula and follow-up formula.

Key words : Choline, IC, Infant Formula, Method Validation

콜린은 세포막에서 인지질의 합성, 메틸 그룹 대사, 콜린성 신경전달에 사용되는 수용성의 필수 영양소이다¹⁾. 콜린 자체는 수용성이지만 식품에는 유리형의 수용성 상태뿐 아니라 인지질의 지용성 상태로 다량 들어 있으며²⁾, 화학적 구조는 Fig. 1과 같다. 콜린은 식품에 널리 분포하며, 특히 우유, 간, 계란, 고기 등이 콜린의 주요 급원식품으로 알려져 있다³⁻⁵⁾. 콜린이 결핍되면, 인체에서는 간 손상이 일어나고, 임신기간 중 콜린을 보충 받은 어미 쥐에서

태어난 흰 쥐는 공간기억이 향상된다고 보고되었다⁶⁾. 태아는 출생 후부터 생후 6개월까지의 영양소 섭취를 모유 및 조제유류에 의존하므로 이들 중 콜린의 함량은 매우 중요하다. CODEX나 미국, EU 등의 외국에서는 infant formula에 대해 콜린의 기준을 정하여 관리하고 있으나 (Table 1) 우리나라는 기준규격이 제시되어 있지 않다. 현

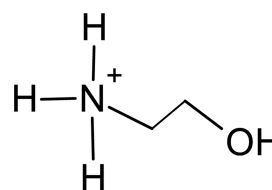


Fig. 1. Chemical structure of choline.

*Correspondence to: Keum Soon Oh, Nutrition and Functional Food Research Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea
Tel: 82-43-719-4401, Fax: 82-43-719-4420
E-mail: gs9705@korea.kr

Table 1. Domestic and international standard milk formulas

Choline (mg/100 kcal)	Korea ¹⁾		CODEX ²⁾			USA ³⁾		EU ⁴⁾		Australia & New Zealand ⁵⁾	
	Min.	Max.	Min.	Max.	GUL	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.
Infant formula	-	-	7	-	50	7	-	7	50	7	30
Follow-up formula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	30

¹⁾Processing standards and ingredient specifications for livestock products. 2014

²⁾CODEX Stan 72-1981_Infant formula, CODEX Stan 156-1987_follow up formula

³⁾21 CFR 107.100. 2014

⁴⁾91/321/EEC. 199

⁵⁾Standard 2.9.1. 2003.

행 「축산물의 가공기준 및 성분규격」⁷⁾에서 조제유류에 대한 콜린의 기준이 없음에도 불구하고 시중 유통 중인 조제유류에는 대부분 콜린이 포함되어 있어 제품의 콜린 함량에 대한 품질관리를 위해서는 시험법의 확립이 필요한 실정이다. 조제유류는 원유 또는 유가공품을 원료로 하여 모유의 성분과 유사하게 가공한 모유대용품을 말하며 조제분유, 조제우유, 성장기용조제분유, 성장기용조제우유, 기타조제분유, 기타조제우유 등 6개 유형으로 나뉘어 「축산물의 가공기준 및 성분규격」에 의해 관리되고 있다. 조제유류와 달리 영아용조제식과 성장기용조제식은 분리대두단백 또는 기타의 식품에서 분리한 단백질을 단백원으로 하여 모유 또는 조제유의 대용으로 가공한 것을 말한다. 우리나라와 달리 CODEX 및 미국, 영국, 호주 등에서는 영유아식으로 대상의 개월 수에 따라 infant formula와 follow-up formula로 구분지어 규격을 설정하고 있으며, 원료에 따라 milk base와 soy base로 구분하여 관리하고 있다. 콜린 함량 분석을 위한 국내 공인 분석법은 식품공전에 영아용 조제식을 대상으로 이온크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법이 제시되어 있다⁸⁾. AOAC 등 국제공인 분석법에는 Enzymatic - colorimetric assay (AOAC 999.14)⁹⁾, LC-MS/MS로 분석하는 방법(AOAC 2015.10)¹⁰⁾ 등이 소개되고 있다. 그 외 미생물학적 측정법⁸⁾, HPLC를 이용한 분석법¹¹⁾ 등이 보고되어 있다. 이 중 식품공전 시험법은 증류수로 시료를 추출하여 유리(free)된 콜린을 이온크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법이다. 그러나 식품 중 콜린은 유리형의 수용성 상태로뿐 아니라 인지질의 지용성 상태로 다량 들어 있어 총 콜린을 추출하기 위해서는 산분해 전처리가 필요하다. 또한 지금까지 외국에서 보고된 콜린에 대한 주요 분석방법을 살펴보면, 식품 내의 유리형 콜린 함량이 kg당 µg 단위로 너무 미량이어서 분석이 용이하지 않았다¹²⁾. 따라서 본 연구에서는 콜린을 산으로 전처리하고 IC를 이용한 조제유류의 콜린 분석법을 확립하고 시험법 검증 가이드라인을 참고하여 밸리데이션을 수행한 후 시중에 유통 중인 조제유류 및 영아용·성장기용 조제식에 대한 적용성을 확인하여 분석법을 검증하였다.

Materials and Methods

실험재료

분석법 확인에 사용할 조제유류 및 조제식을 수거하기 위하여 식품의약품안전처에 신고된 품목제조보고서(2012년~2016년)와 수입신고서(2012년~2016년)를 확인하였다. 국내에 품목제조 보고되거나 수입 신고된 제품은 총 106 품목으로 조사되었다. 이중 생산 중단된 제품 및 수출용 제품, 품목제조 보고가 중복된 것을 제외한 나머지 제품에 대해서 국내 유가공업체 홈페이지 및 인터넷 판매 사이트를 통하여 조제유류 22 품목(조제분유 11, 조제우유 2, 성장기용조제분유 8, 기타조제분유 1), 조제식 10 품목(영아용조제식 2, 성장기용조제식 8) 등 총 32품목을 구매하였다. 시료는 전처리 후 24시간 이내에 분석하였다.

표준품 및 시약

콜린 분석을 위한 표준품 주석산콜린(choline bitartrate) 및 시약 중 염산(hydrochloric acid), 황산(sulfuric acid), 포름산암모늄(ammonium formate), 포름산(formic acid)는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 것을 구매하여 사용하였고, 이동상 제조에 필요한 아세트니트릴 등 용매는 Merck 사(White house Station, NJ, USA)로부터 HPLC 급으로 구입하여 사용하였다. 분석에 사용되는 증류수는 3차 증류수로 18.0 MΩ 이상인 것을 사용하였다. 콜린 분석 시 50 mL 튜브 및 정량플라스크 등 초자는 플라스틱 재질의 것을 사용하였다.

시험용액의 조제

균질화한 시료분말 약 0.5 g(액상은 5 g)을 정밀히 칭량하여 50 mL tube에 넣고 1 M 염산용액 15 mL를 첨가하여 70°C에서 3시간 동안 추출하며, 시료가 충분히 섞일 수 있도록 1시간 간격으로 잘 섞어 주었다. 실온으로 냉각하고 여과지로 여과한 후 여액을 증류수로 씻어 50 mL로 정용한 후 0.2 µm 나일론 실린지 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

Table 2. Ion chromatograph operation conditions for the choline

Parameter	Condition
Column	Ion Pac CG 12A Guard (4 × 50 mm) Ion Pac CG 12A Analytical (4 × 250 mm)
Mobile phase	18 mM sulfuric acid
Flow rate	1 mL/min
Suppressor	CERS 500, 4 mm
Column temp.	40°C
Cell temp.	40°C
Inj. vol.	100 µL

IC 분석조건

콜린 분석을 위한 이온크로마토그래프(Ion Chromatograph)는 Dionex ICS-3000 (Sunnyvale, CA, USA)를 사용하였다. 분석칼럼으로는 Ion Pac CG 12A Guard (4 × 50 mm), Ion Pac CG 12A analytical column (4 × 250 mm) (Thermo scientific, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 18 mM H₂SO₄를 이동상으로 하여 분석하였다. IC 분석조건을 Table 2에 상세하게 제시하였다.

실험실간 교차검증

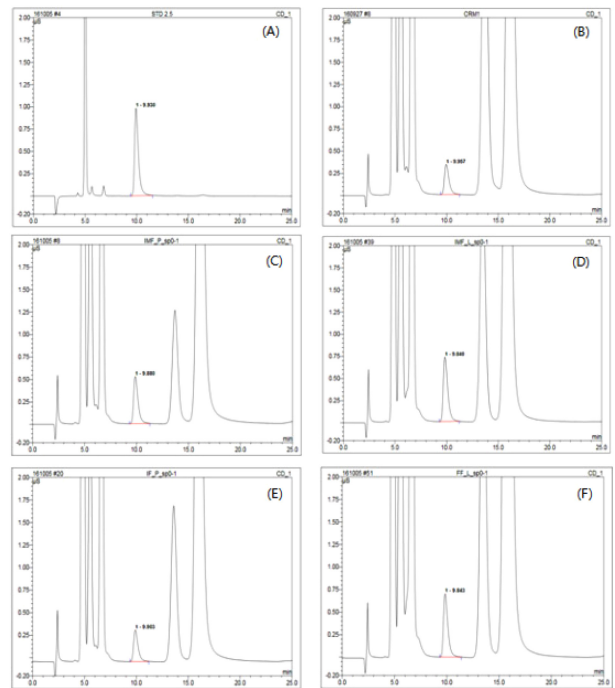
확립된 콜린 시험법을 검증하기 위해 실험실간 밸리데이션을 수행하였다. 검증항목은 선택성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성이었으며, 시험에 사용한 컬럼, 표준품 및 시료는 모두 동일한 것을 사용하였다. 이온크로마토그래프(Ion Chromatograph)는 Dionex ICS-3000 (Sunnyvale, CA, USA)를 사용하였다.

분석법 유효성 검증

IC를 이용한 콜린 분석법에 대한 유효성을 검증하기 위하여 AOAC 시험법 검증 가이드라인에서 제시하는 방법¹³⁾을 참고하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계(limit of detection)와 정량한계(limit of quantification)를 구하였다. 직선성을 확인하기 위하여 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10 mg/L의 콜린 표준용액을 IC로 측정하여 얻은 각각의 피크 면적으로부터 검량선을 작성하였다. 정확성은 표준인증시료(NIST SRM 1849a)와 표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 구하여 확인하였고, 정밀성은 시료량을 달리하여 하루에 3번 실험하여 일내정밀도(within-day precision)를, 실험일자를 달리하여 3일간 실험을 반복 시행하여 일간정밀도(between-day precision)를 relative standard deviation (RSD, %)으로 나타내었다. 또한 실험실간 비교시험을 통하여 분석법 검증을 실시하였다.

유통 제품 중 적용성 확인

분석법 검증을 통하여 확립된 방법으로 시중에 유통 중



(A) Choline STD(2.5 mg/L), (B) CRM(SRM 1849a)(1.1 mg/L), (C) Infant formula, powder, milk based(1.6 mg/L), (D) Infant formula, liquid, milk based(2.1 mg/L), (E) infant formula, powder, soy based(1.2 mg/L), (F) Follow-up formula, liquid, soy based(2.0 mg/L)

Fig. 2. Chromatograms of the choline.

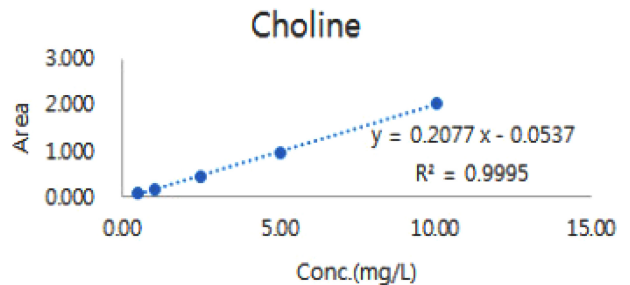


Fig. 3. Calibration curve of choline.

인 조제유류 및 조제식 32건에 대한 콜린 함량을 확인하였다. IC에 주입하여 얻어진 크로마토그램에서 검출된 피크 면적을 구하고, 미리 작성한 표준 검량곡선의 회귀방정식에 대입하여 콜린 함량을 구하고 제품의 표시량과 비교하였다.

Results

분석법 검증

특이성

콜린 표준용액과 시험용액에서 얻은 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 표준용액과 시험용액의 크로마토그램을 통하여 간섭물질에 대한 방해 없이 깨끗하게 분리되는 것을

Table 3. The detection limits and quantitative limits of IC analysis for the choline

Compound	Concentration range (mg/L)	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Choline	0.5~10	0.9995	0.14	0.43

LOD : 3.3*σ/S

LOQ : 10*σ/S

(σ : the standard deviation of the response, S : the slope of the calibration curve)

Table 4. Accuracy of IC for the choline in CRM (n = 5)

CRM Certification (mg/kg)	Mean ± SD (mg/g)	Recovery (%)	RSD (%)	
Infant/Adult Nutritional Formula 1849a	1,090 ± 110	1.04 ± 0.02	95	2.1

Table 5. Accuracy of IC for the choline in samples (n = 3)

Sample type	Amount added (mg/g)	Amount found (mg/g)	RSD (%)	Recovery (%)
Infant formula (powder, milk based)	0.4	0.37	0.7	91
	0.8	0.72	0.4	90
	1.2	1.09	0.8	91
Infant formula (liquid, milk based)	0.04	0.04	0.1	98
	0.08	0.06	1.9	84
	0.12	0.09	1.1	81
Infant formula (powder, soy based)	0.4	0.32	0.8	82
	0.8	0.65	1.0	82
	1.2	0.97	0.1	81
Follow-up formula (liquid, soy based)	0.04	0.03	0.7	85
	0.08	0.07	0.3	86
	0.12	0.11	1.0	87

확인하였고 표준용액, CRM, 조제유류, 조제식의 시험용액에서 동일한 시간대에 단일 피크가 형성됨을 확인할 수 있었다.

직선성

콜린 표준용액(100 mg/L)을 증류수로 희석하여 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 mg/L의 농도범위에서 직선성을 검토한 결과 R²값이 0.999 이상으로 확인되었다(Fig. 3).

검출한계 및 정량한계

IC의 분석조건에 따라 검량선의 기울기 및 표준편차를 이용하여 검출한계 및 정량한계를 구하였다. 검출한계와 정량한계는 각각 0.14, 0.43 mg/L로 나타났다(Table 3).

정확성

표준인증시료 및 표준물질 첨가법을 이용하여 정확성을

Table 6. Within-day repeatability for the determination of choline in samples (n = 5)

Sample type	Sample amount (g)	Choline contents ± SD (mg/g) ; RSD (%)	RSD(%)
Infant formula (powder, milk based)	0.25	1.77 ± 0.01 ; 0.4	7.2
	0.5	1.57 ± 0.03 ; 2.0	
	1	1.51 ± 0.01 ; 0.9	
Infant formula (liquid, milk based)	2.5	0.20 ± 0.00 ; 1.5	3.7
	5	0.19 ± 0.00 ; 0.9	
	7.5	0.19 ± 0.00 ; 0.5	
Infant formula (powder, soy based)	0.25	1.36 ± 0.01 ; 1.0	11.1
	0.5	1.13 ± 0.01 ; 0.7	
	1	1.06 ± 0.01 ; 0.6	
Follow-up formula (liquid, soy based)	2.5	0.21 ± 0.00 ; 0.8	5.9
	5	0.19 ± 0.00 ; 1.4	
	7.5	0.18 ± 0.00 ; 2.7	

Table 7. Between-day repeatability for the determination of choline in samples (n = 5)

Sample type	Day	Choline contents ± SD (mg/g) ; RSD (%)	RSD (%)
Infant formula (powder, milk based)	1	1.57 ± 0.03 ; 2.0	3.1
	2	1.64 ± 0.01 ; 0.5	
	3	1.53 ± 0.01 ; 0.6	
Infant formula (liquid, milk based)	1	0.19 ± 0.00 ; 0.9	2.5
	2	0.20 ± 0.00 ; 1.1	
	3	0.19 ± 0.00 ; 1.0	
Infant formula (powder, soy based)	1	1.13 ± 0.01 ; 0.7	4.8
	2	1.15 ± 0.00 ; 0.4	
	3	1.04 ± 0.01 ; 0.7	
Follow-up formula (liquid, soy based)	1	0.19 ± 0.00 ; 1.4	2.7
	2	0.20 ± 0.00 ; 1.4	
	3	0.19 ± 0.00 ; 1.1	

확인하였다. 표준인증시료인 NIST사 Infant/Adult Nutritional Formula 1849a를 이용하여 콜린의 정확성을 확인한 결과, 5회 반복분석하여 95%의 회수율과 2.1%의 RSD 값을 확인하였다(Table 4). 시료에 각기 다른 3개 농도의 표준물질을 첨가하여 분석 후 회수율을 확인하였다. 그 결과, 조제분유는 90~91%, 조제우유 81~98%, 영아용조제식 및 성장기용조제식의 회수율이 각각 81~82%, 85~87%였다(Table 5).

정밀성

시료에 대해 검체량에 따른 반복성과 실험일자에 따른 재현성으로 정밀성을 확인하였다. 시료량을 달리 취하여 각각 5회 반복한 분석 결과에서 측정값에 대한 상대표준

Table 8. Inter-Lab. test of IC for the choline in CRM (n = 3)

Sample	Laboratory	Mean (mg/g)	Recovery (%)	RSD (%)
CRM	A	1.04	95	2.2
	B	1.03	95	

Table 9. Determination of choline in sample (n = 3)

Sample	Labeled (mg/100 mL)	Cotents		
		(mg/100 mL)	(mg/100 kcal)	
Infant formula (milk based)	1-IMF_P	9.8	10.8 ± 0.4	15.7 ± 0.6
	2-IMF_P	11.0	10.5 ± 0.8	15.2 ± 1.2
	3-IMF_P	11.0	9.5 ± 0.4	13.6 ± 0.6
	4-IMF_P	11.0	9.6 ± 0.6	13.7 ± 0.8
	5-IMF_P	14.0	21.7 ± 4.2	30.1 ± 5.8
	6-IMF_P	9.8	10.4 ± 0.3	14.9 ± 0.4
	7-IMF_P	12.0	13.1 ± 0.5	19.6 ± 0.8
	8-IMF_P	15.6	13.4 ± 0.5	20.0 ± 0.7
	9-IMF_P	7.3	7.7 ± 0.4	11.6 ± 0.5
	10-IMF_P	7.8	6.6 ± 0.3	10.0 ± 0.4
	11-IMF_P	12.0	11.8 ± 0.5	17.5 ± 0.7
	12-IMF_L	6.5	14.9 ± 0.6	21.6 ± 0.9
	13-IMF_L	-	2.4 ± 0.1	3.5 ± 0.2
Follow-up formula (milk based)	14-FMF_P	9.8	7.9 ± 0.1	11.8 ± 0.2
	15-FMF_P	7.0	7.9 ± 0.1	11.6 ± 0.1
	16-FMF_P	14.0	16.6 ± 0.3	24.0 ± 0.5
	17-FMF_P	16.8	15.5 ± 0.3	22.1 ± 0.5
	18-FMF_P	11.0	11.1 ± 0.1	16.2 ± 0.2
	19-FMF_P	7.8	8.5 ± 0.2	13.4 ± 0.3
	20-FMF_P	14.0	13.8 ± 0.4	21.6 ± 0.7
	21-FMF_P	11.0	11.7 ± 0.5	17.3 ± 0.7
	22-MMF_P	-	8.6 ± 0.3	12.0 ± 0.4
	Infant formula (soy based)	23-IF_P	11.0	10.6 ± 0.4
24-IF_P		8.39	9.1 ± 0.1	13.0 ± 0.1
25-FF_P		8.4	8.9 ± 0.1	13.5 ± 0.1
26-FF_P		9.0	8.7 ± 0.2	12.7 ± 0.3
27-FF_P		9.8	11.4 ± 0.6	16.8 ± 0.9
28-FF_L		7.9	11.9 ± 0.2	18.9 ± 0.3
29-FF_P		13.4	13.0 ± 0.4	19.2 ± 0.6
30-FF_P		12.2	11.7 ± 0.1	17.2 ± 0.2
31-FF_P		8.39	9.1 ± 0.1	13.0 ± 0.1
32-FF_P		20.5	20.5 ± 1.6	28.8 ± 2.2

편차를 이용하여 반복성을 확인하였다. 분말형태의 시료는 0.25, 0.5, 1.0 g 취하여 분석하였으며, 액상 시료는 2.5, 5, 7.5 mL 취하여 실험한 결과를 Table 6에 나타내었다.

시료 채취량에 따른 결과값의 상대표준편차가 0.4~2.7%의 범위를 나타냄을 확인하였다.

재현성은 3일간의 다른 일자에서 5회 반복 실험하였을 때 얻어진 결과로부터 측정값에 대한 상대표준편차를 이용하여 확인하였다. 조제분유와 조제우유에서 상대표준편차가 각각 3.1%와 2.5%로 일간 재현성을 보였고, 영아용 조제식은 4.8%, 성장기용조제식은 2.7%의 재현성을 나타내었다(Table 7).

실험실간 교차검증

조제유류 분석법의 유효성 확인을 위해 CRM을 이용하여 실험실간 교차검증을 실시하였다. Table 8과 같이 기관별 회수율은 각각 A 기관 95%, B 기관 95%로 만족할 만한 결과를 나타내었으며 분석법의 일관성을 확인할 수 있었다.

분석법 적용성 검토

분석법 적용성 검토를 위해 국내 유통 중인 조제분유 11건, 조제우유 2건, 성장기용조제분유 9건, 영아용조제식 2건, 성장기용조제식 8건 등 총 32건에 대해 본 연구를 통해 확립한 콜린 분석법을 적용하여 함량을 확인하였다(Table 9). 조제유류에 대한 콜린의 기준·규격은 따로 설정되어있지 않아 제품의 표시값과 비교하여 함량을 확인하였다. 조제유류 제품의 영양성분 함량은 100 mL에 함유된 값으로 표시되어 있어 이를 분석 결과값과 비교하기 위하여 각각의 제품에 표시된 사용법 및 사용량에 따라 조제하였을 때의 함량값으로 환산하여 비교하였다. 그 결과 「식품 등의 표시 기준」에 맞게 영양성분 실제 측정값이 표시량의 80%이상으로 확인되었다.

Discussion

콜린 함량의 국내 공인 기기분석법으로는 식품공전에 영아용 조제식을 대상으로, 증류수로 시료를 추출하여 유리(free)된 콜린을 이온크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법이 제시되어 있고⁸⁾, AOAC 등에서는 시료를 산 가수분해를 한 후 spectrophotometer로 총콜린을 측정하는 Enzymatic-colorimetric assay (AOAC 999.14)⁹⁾, 시료를 증류수로 추출한 후 free choline을 분석하거나, 마이크로웨이브로 분해하여 total choline을 LC-MS/MS로 분석하는 방법(AOAC 2015.10)¹⁰⁾이 제시되어 있다. 콜린은 식품 내에서 유리형태 뿐 아니라 결합상태로도 존재하므로 본 연구에서는 산 가수분해를 통해 총콜린을 추출하였다. 현행 식품공전 시험법은 시료를 증류수로 초음파 추출하는 방법으로, 조제유류에 첨가되는 주석산수소콜린과 염화콜린 등 유리된 형태의 콜린만 분석이 가능하다. 조제유류 중 콜린은 유리콜린 뿐만 아니라 포스포콜린, 포스파티딜콜린, 글리세롤포스포콜린, 스피고미엘린 등의 결합된 형태

로도 존재하므로¹³⁾ 총콜린의 함량을 측정하기 위해 산분해 전처리법을 검토하였으며, 이온크로마토그래피로 함량을 측정하였다. 본 연구에서 확립한 방법으로 직선성, 정확성, 정밀성, 실험실간 교차검증의 값을 검토한 결과 AOAC에서 제시하는 시험법 검증 가이드라인을 만족시켜 실험법으로 사용가능함을 확인하였다¹⁴⁾.

조제유류에 대한 콜린 함량 기준은 축산물의 가공기준 및 성분규격에 별도로 정해져 있지 않지만, 식품공전 중 영아용 조제식에 대해서는 7.0 mg/100 kcal 이상으로 기준을 정해놓고 있다⁸⁾. 또한 CODEX¹⁵⁾, 미국¹⁶⁾ 등에서도 infant formula의 콜린 기준은 7.0 mg/100 kcal 이상이며, 최대권장섭취량은 50 mg/100 kcal로 규격을 설정하고 있다. 조제유류 콜린 함량을 100 kcal당 함량으로도 환산하여 비교한 결과 콜린이 함유되어 있다고 표시된 조제유류의 콜린 함량은 10.0~30.1 mg/100 kcal의 범위로 함유되어 있어 제품에 따라 함량의 차이가 크지만 모두 제외국의 기준·규격과 비교하였을 경우에도 충분한 양을 함유하고 있음을 확인하였다. 콜린함량이 제품 종류에 따라 다양한데 USDA Nutrient database¹⁷⁾에서는 조제분유의 콜린 함량을 식품 100 g으로 환산했을 때 total choline 130 mg으로 제시하고 있으며, 본 연구에서 유통 제품을 확인한 결과는 47~155 mg 범위로 USDA 값보다는 다소 낮거나 유사한 결과를 나타내었다.

본 결과로부터 확립된 IC를 이용한 분석법은 조제유류 중 콜린함량을 확인하기에 적합함을 확인하였으며 국내 조제유류 영양성분의 관리 기반을 강화하는데 기여할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2016년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(16161축산물583)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 「축산물의 가공기준 및 성분규격」에 기준 규격은 설정되어 있지 않으나, 국제 기준과의 조화를 위해 콜린의 분석법을 마련하고자 수행하였다. 조제유류에 함유된 콜린 함량 분석을 위해 IC를 이용한 분석법을 확립하고 시중에 유통 중인 제품을 대상으로 적용성을 검토하였다. 콜린 표준품을 이용하여 IC를 이용한 기기분석조건을 확립하고 시료중의 콜린을 추출하여 분석하였다. 분석법 검증은 특이성, 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정확성, 정밀성에 대해 수행되었다. 0.5~10 mg/L의 농도범위에서 $R^2 = 0.999$ 이상의 우수한 직선성을 확인할 수 있었으며, LOD와 LOQ는 각각 0.14, 0.43 mg/L였다. CRM (NIST

SRM 1849a) 및 표준물질 첨가법을 이용하여 정확성을 검토하였으며, CRM에서 95%, 조제분유에서 90~91%, 조제유류에서 81~98%의 회수율을 확인할 수 있었다. 정밀성을 검토한 결과 시료 채취량에 따른 반복성은 RSD값이 조제분유 0.4~2.0%, 조제유류 0.5~1.5%, 영아용조제식 0.6~1.0%, 성장기용조제식 0.8~2.7%로 확인하였으며, 실험일자에 따른 재현성은 조제분유 3.1%, 조제유류 2.5%, 영아용조제식 4.8%, 성장기용조제식 2.7%로 확인하였다. 본 연구에서 확립된 분석법을 적용하여 조제분유 11건, 조제유류 2건, 성장기용조제분유 9건, 영아용조제식 2건, 성장기용조제식 8건 등 국내 유통 중인 조제유류 및 영아용·성장기용조제식 등 32건에 대해 적용성 검토를 실시한 결과 전체 시료에서 분석이 용이하였으며, 모두 표시기준에 적합함을 확인하였다.

References

1. Zeisel S.H., Blusztajn J.K.: Choline and human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, **14**, 269-296 (1994).
2. Jeong H.O., Suh Y.S., Chung Y.J.: Choline and betaine concentrations in breast milk of Korean lactating women and the choline and betaine intakes of their infants. *Korean J. Nutr.*, **43**(6), 588-596 (1999).
3. Juliette C.H., Juhi R.W., Joanne M.H.: USDA database for the choline content of common food. USDA Nutrient data laboratory, Beltsville, pp. 1-26 (2004).
4. Zeisel S.H.: Choline: An essential nutrient for humans. *Nutrition*, **16**, 669-671 (2000).
5. Zeisel S.H., Mar M.H., Howe J.C., Holden J.M.: Concentration of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J. Nutr.* **133**, 1302-1307 (2003).
6. Meck W.H., Smith R.A., William C.L.: Organizational changes in cholinergic activity and enhanced visuospatial memory as a function of choline administered prenatally or postnatally or birth. *Behav. Neurosci.*, **103**(6), 1234-1241 (1989).
7. Standard for livestock products. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2015).
8. Food Code of Korea. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2015).
9. AOAC official method 999.14., Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 19th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MD (2012).
10. AOAC official method 2015.10., Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20th Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD (2016).
11. Mohammed H., Christopher M.E., Michael L., Sandy S.: A simple HPLC method with fluorescence detection for choline quantification in foods. *Food Anal. Methods*, **8**, 2401-2408 (2015).
12. Cho H.J., Na J.S., Jeong H.O., Chung Y.J.: Choline Contents of Korean Common foods. *Korea J. Nutr.*, **41**(5), 428-438 (2008).

13. Phillips M.M.: Analytical approaches to determination of total choline in foods and dietary supplements. *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 2103-2112 (2012).
14. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 19th Ed., Appendix L. AOAC INTERNATIONAL, Dr. George WL Jr, Recommended Guidelines for SPIFAN Single Laboratory Validation (SLV) (2012).
15. CODEX ALIMENTARIUS: Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants CODEX Stan 72-1981, FAO, WHO (2011).
16. Code of Federal regulation: Title 21 107.100, FDA, USA (2014).
17. USDA database for the choline content of common foods-2004., U.S. Department of agriculture, Washington DC (2004). www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Choline/Choline.html (June 20, 2017).