

## A simple method to determine lycopene in solid supplementary food preparations using saponification and liquid chromatography

Young Min Kim<sup>1</sup>, Ye Bin Shin<sup>1</sup>, Min Kyeong Kwon<sup>1</sup>, Jin Hwan Kim<sup>1</sup>, Ji Seong Kim<sup>1</sup>,  
Dong-Kyu Lee<sup>2</sup>, Myung Joo Kang<sup>1</sup>, and Yong Seok Choi<sup>1</sup>★

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Dankook University, 119 Dandaero, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Chung-Ang University, 84 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul, Korea

(Received June 3, 2023; Revised June 8, 2023; Accepted June 8, 2023)

## 비누화 및 액체크로마토그래프를 활용한 고상 건강기능식품 중 라이코펜 분석법 개발

김영민<sup>1</sup> · 신예빈<sup>1</sup> · 권민경<sup>1</sup> · 김진환<sup>1</sup> · 김지성<sup>1</sup> · 이동규<sup>2</sup> · 강명주<sup>1</sup> · 최용석<sup>1</sup> ★

<sup>1</sup>단국대학교 약학대학, <sup>2</sup>중앙대학교 약학대학

(2023. 6. 3. 접수, 2023. 6. 8. 수정, 2023. 6. 8. 승인)

**Abstract:** Lycopene, a carotenoid hydrocarbon is known to have effects on reducing cardiovascular risk factors, blood lipids, and blood pressure. Thus, a lot of supplementary foods with lycopene in several dosage forms like soft capsule filled with liquid and hard capsule filled with powder are available in a market. Recently, however, our research group found that the lycopene assay in Supplementary Food Code of South Korea is only valid for oily lycopene preparation. Thus, here, we developed a simple method to determine lycopene in solid preparations for Supplementary Food Code of South Korea using saponification and liquid chromatography with an absorbance detector. The method was validated following Ministry of Food and Drug Safety guidelines. All validation parameters observed in this study were within acceptable criteria of the guidelines (selectivity, linearity of  $r^2 \geq 0.991$ , lower limit of quantification of 0.0149 mg/mL, accuracy as recovery (R) between 92.70 and 97.18 %, repeatability as relative standard deviation (RSD) values of R between 0.85 and 1.59 %, and reproducibility as the RSD value of interlaboratory R of 3.70 %). Additionally, the practical sample applicability of the validated method was confirmed by accuracy between 98.81 and 101.59 % observed from its lycopene certified reference material (CRM) analyses. Therefore, the present method could contribute to fortify the supplementary food safety management system in South Korea.

**요약:** 라이코펜은 카로티노이드의 일종으로 심혈관계 위험인자, 혈중지질, 혈압 등을 낮추는 효과를 가지는 것으로 알려져 있어, 액상 내용물이 충전된 연질캡슐, 고상 내용물이 충전된 경질캡슐을 포함하는 다양한 제형의 라이코펜 건강기능식품이 유통되고 있다. 그러나, 최근 본 연구진은 현 건강기능식품공전

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)41-550-1439 Fax : +82-(0)41-559-7899

E-mail : [analysc@dankook.ac.kr](mailto:analysc@dankook.ac.kr)

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

중 라이코펜 시험법의 고상 건강기능식품 적용에 한계가 있음을 확인하였다. 따라서, 본 논문에 비누화 반응 및 액체크로마토그래프에 기반한 신규 고상 건강기능식품 중 라이코펜 시험법의 개발을 보고하는 바이다. 신규 개발 시험법은 식품의약품안전평가원 가이드라인에 의거하여 밸리데이션 되었고, 모든 항목 결과가 가이드라인 기준을 만족함(특이성, 직선성  $r^2 \geq 0.991$ , 정량한계 0.0149 mg/mL, 정확도(회수율) 92.70~97.18%, 반복성(회수율의 상대표준편차) 0.85~1.59%, 재현성(실험실 간 회수율의 상대표준편차) 3.70%)을 확인하였다. 또한 인증표준물질을 활용한 적용성 평가에서도 높은 정확도(98.81~101.59%)가 관찰되어, 신규 시험법의 개발이 성공적이었음을 재확인하였다. 따라서, 신규 개발 시험법은 향후 고상 라이코펜 건강기능식품 관리에 활용되어 국내 건강식품안전관리에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

**Key words:** lycopene, saponification, liquid chromatography, supplementary food preparation, supplementary food code

## 1. 서 론

라이코펜(Fig. 1)은 카로티노이드 계열의 붉은 색소로 토마토, 당근, 수박 등의 붉은 채소와 과일에서 발견된다.<sup>1,3</sup> 라이코펜은 구조적으로 긴 선형 사슬의 공액 이중 결합으로 구성되어 있어, 특유의 붉은 색을 띠고,<sup>4</sup> 항산화 특성을 갖는다.<sup>5,6</sup> 라이코펜은 심혈관계 위험인자 저하, 혈중 지질 감소, 혈압 강하, 암 예방, 피부 보호 등의 다양한 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있어서 다양한 형태의 건강기능식품에 사용되고 있는데,<sup>7-11</sup> 비극성이 큰 라이코펜의 특성(logP=15.2)으로 인하여 라이코펜을 용해시킨 액상 오일이 충전된 연질캡슐 형태가 주를 이루고 있다.<sup>12</sup> 특히 대한민국 정부는 국내 라이코펜의 많은 생산 및 유통량을 고려하여 이를 고시형 건강기능식품으로 지정하였고, 라이코펜은 유기 용매 추출 및 고속액체크로마토그래프(HPLC) 법을 기반으로 하는 건강기능식품공전 중 라이코펜 시험법을 토대로 관리되어지고 있다.<sup>13</sup> 참고로 해외의 경우, 미국 약전에 라이코펜 시험법이 수제되어 있는데, 액상 제제와 고상 제제에 상이한 전처리법을 적용하도록 하고 있고, 분석법으로는 흡광광도법만을 활용하도록 하고 있다.<sup>14</sup>

최근 본 연구진은 현 건강기능식품공전 중 라이코펜 시험법의 고상 건강기능식품 적용에 한계가 있음을 확인하였고, 이를 해결하기 위하여 연관 시험법에 대한 비교 및 고찰을 진행하였다. 그 결과, 비누화 및

HPLC에 기반한 신규 고상 건강기능식품 중 라이코펜 시험법을 개발하였고, 신규 시험법의 밸리데이션 및 적용성 평가도 성공적으로 완료하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약

Methanol (메탄올), acetonitrile (아세토니트릴), n-hexane (n-헥산), ethanol (에탄올)은 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)의 HPLC 등급 시약, methylene chloride (염화메틸렌), tetrahydrofuran (테트라하이드로푸란), ethanol anhydrous (무수 에탄올), tert-butyl methyl ether (MTBE)는 Samchun Pure Chemical (Pyeongtaek, Korea)의 시약 등급 시약, 2% ammonia water (암모니아수), N,N-diisopropylethylamine (디이소프로필에틸아민)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 시약 등급 시약, butylated hydroxy toluene (부틸히드록시톨루엔)은 Daejung (Siheung, Korea)의 등급 시약을 사용하였고, 라이코펜 표준물질로는 Sigma-Aldrich의 분석용 표준품 및 Supelco (St. Louis, MO, USA)의 인증표준물질 (CRM) PHR1770을 사용 하였다.

### 2.2. 실험 방법

#### 2.2.1. 현행 건강기능식품공전 시험법<sup>13</sup>

##### 1) 표준원액의 조제

표준물질 6~8 mg을 100 mL의 용량플라스크에 취

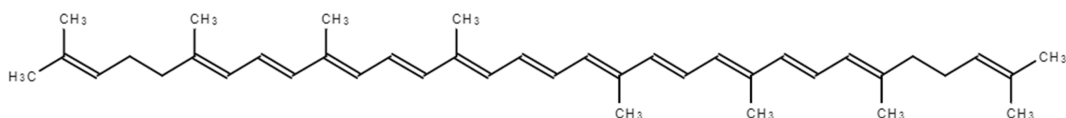


Fig. 1. Chemical structure of lycopene.

하고 염화메틸렌 10 mL를 가하여 초음파를 활용하여 용해한 후, 라이코펜 농도가 0.07 mg/mL이 되도록 희석액으로 희석하여 표준원액을 조제하였다. 단, 희석액은 1 L의 용량플라스크에 아세토니트릴, 메탄올, 염화메틸렌, 헥산 및 부틸히드록시톨루엔 시액(5 mg/mL 부틸히드록시톨루엔 염화메틸렌 용액)을 각 600:150:150:100:0.5 (v/v) 비율로 혼합하고, 디이소프로필에틸아민을 0.05 % (v/v)가 되도록 가한 후, 초음파를 활용하여 혼합하여 조제하였다.

#### 2) 표준용액의 조제

표준원액 2 mL를 100 mL의 용량플라스크에 취하고 에탄올과 부틸히드록시톨루엔 시액 1:1 (v/v)로 섞은 액 20 mL를 가한 후, *n*-헥산으로 정용하였다. 조제한 표준용액의 흡광도를 472 nm에서 3회 측정하고 그 평균값을 아래의 식에 대입하여 표준용액 중 라이코펜 농도를 정하였고, 표준용액을 희석액으로 적절히 희석하여 검량선 작성에 활용하였다.<sup>15</sup>

표준원액의 라이코펜 함량( $\mu\text{g/mL}$ ) =

$$\frac{A_{\lambda} \times B \times 10,000}{3,450}$$

$A_{\lambda}$ : 표준용액의 흡광도

B: 희석배수(표준용액의 최종 부피/표준원액 채취 부피)(50)

10,000: 단위환산계수

3,450: 472 nm에서 1 % (w/v) all-trans-라이코펜 *n*-헥산 용액의 흡광도

#### 3) 시험용액의 조제

시료를 50 °C 수욕에서 데우고, 스파틀라를 이용하여 잘 섞는다. 그 후 시료 약 1 g을 취하여 100 mL 부피 플라스크에 넣고 부틸히드록시톨루엔 시액 10 mL와 염화메틸렌 30 mL를 첨가한 후, 시료를 잘 흔들어 추출한 후 초음파 진탕기로 1분간 더 추출하였다. 이 혼합액 5 mL를 취해 50 mL 용량 플라스크에 넣은 후 희석액을 채워 희석하고, 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE-H 멤브레인 필터(AOC Korea, Seoul, Korea)로 여과한 용액을 시험용액으로 하였다.

#### 4) 고속액체크로마토그래프

조제한 표준용액과 시험용액은 원심분리 후 얻어진 상등액(10  $\mu\text{L}$ )을 HPLC에 주입하여 분석하였다. HPLC와 검출기는 Waters (Milford, MA, USA)의 제품 (2695 Separations module 및 996 Photodiode array detector)을 사용하였고, 칼럼은 Phenomenex (Torrance, CA, USA)의 Luna C18 column (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )을 사용하였

다. 이동상으로는 아세토니트릴, 메탄올, 염화메틸렌, 헥산 및 부틸히드록시톨루엔 시액(5 mg/mL 부틸히드록시톨루엔 염화메틸렌 용액)을 각 600:150:150:100:0.5 (v/v) 사용하였고, 유량은 0.6 mL/min 사용하였으며, 칼럼온도는 40 °C로 설정하였고, 472 nm 파장에서 흡광도를 관찰하였다. 각각의 크로마토그램 중 라이코펜 피크의 면적값을 활용하여 검량선 작성 및 라이코펜 정량을 수행하였는데, 시료 중 라이코펜 함량 (mg/g) 계산은 아래의 공식을 활용하였다.

$$\text{시료 중 all-trans-라이코펜 함량(mg/g)} = \frac{V \times C}{A}$$

V: 시험용액의 전체 부피(100 mL)

C: 검량선으로 확인된 시험용액 중 all-trans-라이코펜 농도(mg/mL)

A: 시료 채취량(g)

### 2.2.2. 신규 개발 시험법

#### 1) 표준원액의 조제

현 건강기능식품공전 시험법의 표준원액 조제 방법을 활용하였다.<sup>13</sup>

#### 2) 표준용액의 조제

현 건강기능식품공전 시험법의 표준용액 조제 방법을 활용하였다.<sup>13</sup>

#### 3) 시험용액의 조제

시료를 50 °C 수욕에서 데우고, 스파틀라를 이용하여 잘 섞는다. 그 후 라이코펜 약 5 mg에 해당하는 시료를 취하여 200 mL 부피 플라스크에 넣고 25 mg 부틸히드록시톨루엔과 2 % (v/v) 암모니아수 2.5 mL를 첨가한 후, 50 °C 수욕에서 10분 간 초음파를 가하며 용해시킨다. 단, 때때로 부피 플라스크를 회전시켜, 고체 덩어리의 응집을 최소화시킨다. 부피 플라스크에 테트라하이드로푸란 5 mL와 무수 에탄올 40 mL를 추가하고 진탕한 뒤, 초음파를 가하며 1분간 더 용해시킨 후 MTBE로 정용하고, 진탕한 것을 시험용액으로 하였다(Fig. 2).

#### 4) 액체크로마토그래프

현 건강기능식품공전 시험법의 액체크로마토그래프 방법을 활용하였다.<sup>13</sup> 단, 유량을 1.0 mL/min으로 변경하였고, 시료 중 라이코펜 함량(mg/g) 계산은 아래의 공식을 활용하였다.

$$\text{시료 중 all-trans-라이코펜 함량(mg/g)} = \frac{V \times C}{A}$$

V: 시험용액의 전체 부피(200 mL)

C: 검량선으로 확인된 시험용액 중 all-trans-라이코

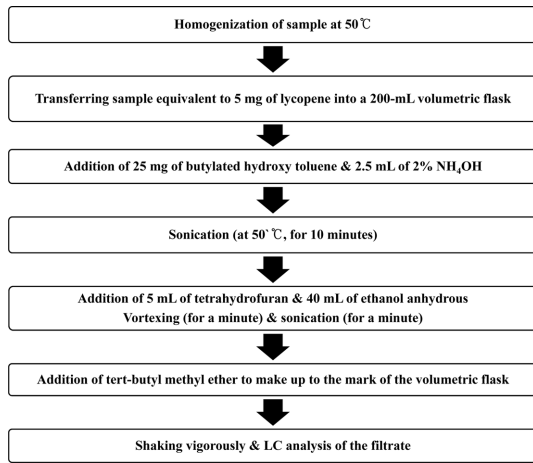


Fig. 2. Schematic diagram of the present method using saponification and LC.

펜 농도(mg/mL)

A : 시료 채취량(g)

## 결과 및 고찰

### 3.1. 현 건강기능식품공전 시험법 적용성 평가

현재 시장에서 유통 중인 건강기능식품 6종과 CRM 1종을 활용하여 현 건강기능식품공전 시험법의 적용성을 평가(n=3)하였고, 건강기능식품공전을 근거로 하여 함량 시험 결과의 표시 함량 대비 80~120% 만족 여부를 적합, 부적합의 기준으로 활용하였다.<sup>13</sup> 그 결과, 모든 6종 유통 건강기능식품 제품의 결과는 표시 함량 대비 81.08~99.22%로 적합한 것으로 확인되었으나, CRM의 결과는 표시 함량 대비 3.61%로 적합 기준과 상당한 차이를 보였다(Table 1). 적용성 평가에

활용한 모든 제품의 경우, 액상(연질캡슐)이었고, CRM은 고상(분말)이었던 점을 고려해 봤을 때, 현 건강기능식품공전 시험법은 고상 제품 적용에 한계가 있는 것으로 판단하였고, 고상 시료 중 라이코펜 분석법 개발의 필요성을 확인하였다.

### 3.2. 신규 시험법 개발을 위한 시험법 간 비교 및 고찰

고상 시료 중 라이코펜 분석법 개발을 위하여 문헌을 조사한 결과, 고상 시료 중 라이코펜 분석에 활용 가능한 시험법으로 Cucu *et al.*의 라이코펜 분석법과 미국 약전의 고상 시료 중 라이코펜 시험법을 확인하였다.<sup>14,16</sup> Cucu *et al.*의 분석법은 유기 용매 추출 및 액체크로마토그래프의 활용이라는 큰 틀에서는 현 공전 시험법과 유사하나, 활용되는 용매의 종류 및 구체적인 크로마토그래프의 조건 등에서만 차이점을 가지고 있다. 그 이유는 대상 고상 식품류가 완전 건조된 고상 건강기능식품류가 아니라 생 과일 및 채소류이기 때문으로 판단되었고, 결과적으로 본 연구에 활용하는 것은 의미가 없다는 결론에 도달하였다.<sup>16</sup> 이에 반하여, 미국 약전 고상 시험법의 경우, 단백질 분해 효소 처리 및 비누화 반응 후 유기 용매 추출로 얻어진 시료 용액을 흡광광도법으로 분석하도록 되어 있어, 현 공전 시험법과 상당한 차이를 보이고 있다.<sup>14</sup> 참고로, 미국 약전에 등재된 액상 시료를 대상으로 하는 라이코펜 시험법은 유기 용매 추출 및 흡광광도법을 활용하도록 되어 있는데, 유기 용매 추출 방법이 현 공전 시험법과 상당한 유사성을 공유하고 있어, 미국 약전 고상 시험법을 기반으로 신규 시험법 개발을 시도할 경우, 그 성공 가능성이 높을 것으로 판단하였다.<sup>14</sup> 그러나, 라이코펜을 포함하는 다양한 건강기능식품 제품

Table 1. The practical sample applicability of the current lycopene assay in Supplementary Food Code of South Korea (n=3)

No.	Product name	Dosage form	Nominal content (A) (mg/g)	Mean of experimental content (B) (mg/g)	Standard deviation of experimental content (mg/g)	B/A×100 (%)	<sup>a</sup> Pass (P) /Fail (F)
1	Product 1	Soft capsule	10.91	10.52	0.21	96.43	P
2	Product 2	Soft capsule	14.00	13.10	0.40	93.56	P
3	Product 3	Soft capsule	30.00	25.87	0.25	86.24	P
4	Product 4	Soft capsule	61.54	56.89	0.61	92.44	P
5	Product 5	Soft capsule	60.80	60.32	0.43	99.22	P
6	Product 6	Soft capsule	14.00	11.35	0.10	81.08	P
7	<sup>b</sup> CRM	Powder	64.00	2.31 ( <sup>c</sup> BLLOQ)	0.14	3.61	F

<sup>a</sup>The range of B/A'100(%) to satisfy the practical sample applicability is 80-120%.

<sup>b</sup>Certified reference material

<sup>c</sup>Below the lower limit of quantitation

이 널리 애용되고 있는 국내 상황을 고려해 봤을 때, 미국 약전 시험법처럼 시료 추출액 분석에 흡광광도법만을 활용하는 것 보다는 현 공전 시험법처럼 액체 크로마토그래프를 활용하여 분리 및 분석을 함께 진행하는 것이 실제 적용에 유리할 것으로 예상하였다. 그 결과, 고상 시료 중 라이코펜 분석법 개발은 현 공전 시험법을 기반으로 하되, 시료 전처리법에 미국 약전 고상 시험법을 변형/이식하는 형태로 진행하게 되었다.

**3.3. 신규 시험법 개발**

본 시험법의 개발 목적은 현 공전 시험법의 적용 범위를 액상 시료로 제한함과 동시에 고상 시료에 적용할 수 있는 시험법을 건강기능식품공전에 추가하여 건강기능식품공전을 보완 및 확충하는 것 이므로, 시험법 간 조화를 최대한 지향하고자 하였다. 따라서, 시험용액 제조 방법을 제외한 나머지 부분은 원칙적으로 현 공전 시험법을 준용하였다. 다만, 현 공전 시험법 중 액체 크로마토그래프의 유량이 0.6 mL/min으로 4.6 mm 내경 칼럼 최적 유량 조건인 1.0 mL/min과 상당한 차이를 보여, 이를 1.0 mL/min으로 변경하였다.<sup>17</sup> 그 결과, 라이코펜 피크의 폭 및 대칭성 등에 대한 악영향 없이 그 유지 시간 및 총 분석 시간을 현 공전 시험법 보다 10분씩 단축시킬 수 있었다. 시험용액 제조 방법의 경우, 가온 조건(50 °C)에서 시료, 부틸 히드록시톨루엔, 암모니아수를 혼합하여 반응시키는 미국 약전 고상 시험법의 비누화 부분을 차용하였는데,<sup>14</sup> 비누화 반응은 알칼리를 활용하여 diglycerides, triglycerides, phosphonates 등을 지방산과 글리세롤 형태로 분해시키는 반응으로 diglycerides, triglycerides, phosphonates 등에 간혀 있어 외부의 용매에 용해되기 어려운 고체 형태의 라이코펜이 비누화 반응으로 diglycerides, triglycerides, phosphonates 등의 외부로

유리되어 용매에 용해될 수 있도록 기여한다고 알려져 있다.<sup>18</sup> 따라서 현 공전 시험법의 CRM 적용 부적합성은 CRM 시료의 고체상태에 기인한 것이라는 가설에 문제가 없었음이 확인되었고, 비누화에 기반한 시료 용액 조제의 방향성 역시 문제가 없는 것으로 판단되었다. 다만, 미국 약전 고상 시험법에 비누화 반응과 함께 활용되는 단백질 분해효소 반응의 경우, 효과 대비 높은 시약 가격 및 조작의 번거로움 등을 고려하여, 비누화 반응만 활용하는 시험 방법에 한계가 확인되는 경우에만 차선택으로 활용하는 전략을 설정하였다.<sup>14</sup> 결과적으로 비누화 반응만을 이용한 시료 전처리법의 효용성이 확인되어 단백질 분해효소 관련 조작은 시료 전처리법에 포함되지 않았다. 시료 전처리와 관련하여 첨언하면, 비누화 과정 중 시료 혼합물을 회전시키는 과정은 고체 덩어리 응집을 최소화 시켜 비누화 효율을 증대 시키는 매우 중요한 조작이다. 신규 개발 시험법과 현 공전 시험법 간의 일목요연한 비교를 위하여 Table 2에 개별 시험법의 특징을 정리하였다.

**3.4. 신규 시험법 밸리데이션**

신규 개발 시험법의 효용성을 검증하기 위하여 ‘기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드(식품의약품안전처, 2022)’에 기반한 밸리데이션을 진행하였고, 밸리데이션 항목으로 특이성, 직선성, 정량한계, 정확성, 반복성, 재현성을 확인하였다.<sup>19</sup> 특이성의 경우, 표준품 크로마토그램과 건강기능식품 크로마토그램 중 라이코펜 피크의 유지 시간 및 해당 피크로 얻은 흡광 스펙트럼의 일치를 관찰하여 확인하였다(Fig. 3). 직선성은 시험 용액 중 라이코펜이 검출될 수 있는 농도 범위를 아우르는 총 5개 농도(0.0171, 0.0343, 0.0514, 0.0686, 0.0857 mg/mL)의 표준 용액을 활용하여 검토되었는데, 3반복 실험 결과, 결정계수(r<sup>2</sup>)

Table 2. Comparisons of the present lycopene assay (A) with the current lycopene assay in Supplementary Food Code of South Korea (B)

Category	A	B
Target product form	Solid form	NA
Sample preparation method	Saponification & organic solvent extraction <sup>a</sup> RP-HPLC (w/ an absorbance detector)	Organic solvent extraction <sup>a</sup> RP-HPLC (w/ an absorbance detector)
Instrumental analysis method	- Column: C18 (4.6 mm ID <sup>b</sup> ) - Flow rate: 1.0 mL/min - Wavelength: 472 nm	- Column: C18 (4.6 mm ID <sup>b</sup> ) - Flow rate: 0.6 mL/min - Wavelength: 472 nm

<sup>a</sup>Reversed phase high pressure liquid chromatography

<sup>b</sup>Internal diameter

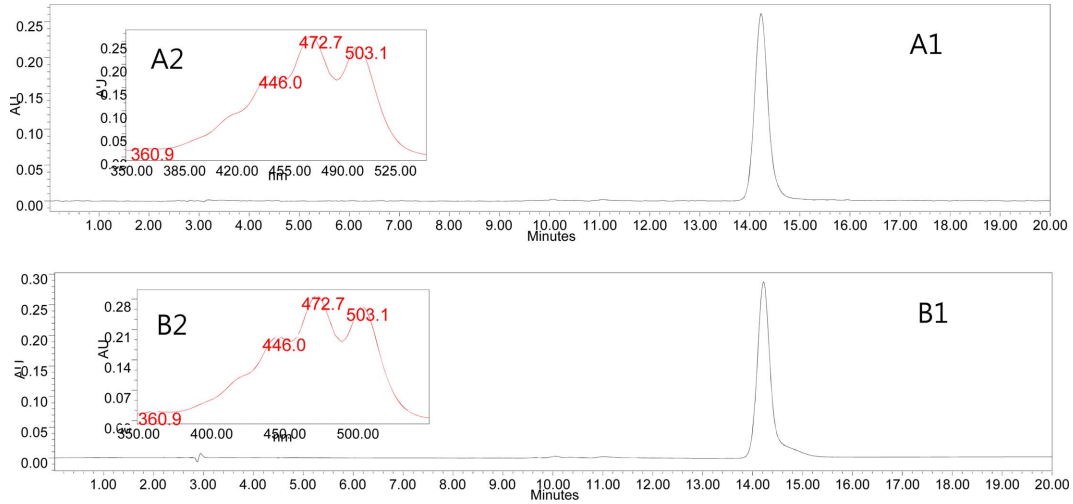


Fig. 3. LC chromatograms (1) and absorbance spectra (2) from LC analyses of a lycopene standard solution (A) and a supplementary food including lycopene (B).

Table 3. Linearity and the lower limit of quantitation from LC of lycopene standard solutions (n=3)

Range (mg/mL)	Slope	y-Intercept	r <sup>2</sup>	<sup>a</sup> LLOQ (mg/mL)
0.0171-0.0857 (5 Concentrations)	125,057,231±3,872,771	101,198±186,099	0.9932±0.0022	0.0149

<sup>a</sup>The lower limit of quantitation (LLOQ) = (10 × standard deviation of y-intercept)/mean of slope

Table 4. Accuracy (recovery, R), repeatability (the relative standard deviation, RSD of R) and reproducibility (the RSD of interlaboratory R) from LC of lycopene in supplementary foods

Dosage Form	Compound	Fortified Conc. (mg/g)	Recovery (Lab 1, n=5)		Recovery (Lab 1-3, n=5×3)	
			Mean±SD (%)	RSD (%)	Mean±SD (%)	RSD (%)
Powder (from hard capsules)	Lycopene	10	96.11±0.83	0.87	-	-
		20	95.61±1.52	1.59	100.26±3.71	3.70
		30	93.42±0.79	0.85	-	-

0.9932±0.0022의 높은 직선성을 확인하였다(Table 3). 직선성 결과는 아래 정량 한계 계산식에도 활용되었는데, 결과 값인 0.0145 mg/mL은 검량선에서 직선성이 확인된 가장 낮은 농도 값인 0.0171 mg/mL 보다 하단에 존재하였다. 따라서, 검량선 구간 내에서 얻은 모든 정량 결과는 신뢰할 수 있는 것으로 확인되었다 (Table 3).<sup>20</sup>

The lower limit of quantitation = (10 × standard deviation of y-intercept)/mean of slope

정확성은 라이코펜을 함유하지 않은 경질 캡슐 형태의 건강기능식품 내용물에 각각 다른 3개 농도의

라이코펜을 spiking하여 만든 회수율 시료(10, 20, 30 mg/g)를 활용하여 회수율의 형태로 확인하였다(n=5). 그 결과, 회수율은 92.70~97.18%으로 기준인 92~105%를 만족하였고, 회수율의 상대표준편차는 0.85~1.59%로 반복성 기준인 2% 이하도 만족하였다(Table 4). 마지막으로 본 연구진 내 상이한 3개 연구실에서 20 mg/g 회수율 시료를 이용하여 진행한 재현성 시험에서는 실험실 별 5 반복 실험, 즉 총 15 반복 실험을 통하여 확인된 회수율의 상대표준편차가 3.70%로 재현성 기준인 4% 이하를 만족하였다(Table 4). 참고로 3개 연구실에서는 LC system을 제외한 모든 실험 방법 및 조건을 동일하게 하여 재현성 실험을 진행하였고,

Table 5. The practical sample applicability of the present lycopene assay

No.	Product name	Dosage form	Nominal content (A) (mg/g)	Mean of experimental content (B) (mg/g)	Standard deviation of experimental content (mg/g)	B/A×100 (%)	<sup>a</sup> Pass (P)/ <sup>a</sup> Fail (F)
1	<sup>b</sup> CRM	Powder	64.00	64.64	0.98	101.00	P
2	Product 1	Soft capsule	10.91	12.88	0.13	118.11	P
3	Product 5	Soft capsule	60.80	71.77	0.54	118.04	P

<sup>a</sup>The range of B/A'100(%) to satisfy the practical sample applicability is 80-120%.

<sup>b</sup>Certified reference material

각 연구실에서 활용한 LC system은 각각 Waters 2695 system (with a Waters 996 detector), Waters 1525 system (with a Waters 2487 detector), Shimadzu LC-20 system (with a Shimadzu SPD-20A detector)이다. 따라서, 신규 개발된 시험법은 모든 밸리데이션 항목에서 식품의약품안전처 가이드라인의 기준을 만족하였으므로, 그 효용성이 성공적으로 확인되었다.

### 3.5. 신규 개발 시험법 적용성 평가

현 공전 시험법 적용성 평가에 활용되었던 건강기능식품 제품 2종 및 CRM을 신규 개발 시험법으로 분석하여 적용성을 평가(n=3)하였고, 건강기능식품공전을 근거로 하여 함량 시험 결과의 표시 함량 대비 80~120% 만족 여부를 적합, 부적합의 기준으로 활용하였다.<sup>13</sup> CRM의 경우, 표시 함량 대비 101.00±1.52%의 우수한 결과를 보여, 신규 개발 시험법의 고체 시료에 대한 적용성에 문제가 없음을 확인시켜 주었다 (Table 5). 유통 건강기능식품 2종의 경우, 표시 함량 대비 118.04~118.11%의 결과로 적합 기준을 만족시키기는 하나, 해당 제품의 현 시험법 적용성 평가 결과(96.43~99.22) 보다는 표시 함량과 다소 차이를 보이고 있다(Table 5). 이는 현재 유통 제품이 현 공전 시험법에 기반한 품질 관리 과정을 거쳤다는 사실과 현 공전 시험법과 신규 개발 시험법 간에 존재하는 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서, 건강기능식품 업계의 혼란을 최소화하는 차원에서 신규 개발 시험법은 최초로 의도된 바와 같이 고상 건강기능식품을 그 적용 대상으로 한정하고, 현 공전 시험법의 적용 대상은 액상 건강기능식품으로 한정하는 것이 보다 합리적인 것으로 판단된다.

## 4. 결 론

최근 본 연구진은 현 건강기능식품공전 중 라이코

펜 시험법의 고상 건강기능식품 적용에 한계가 있음을 확인하였고, 이를 해결하기 위하여 비누화 및 HPLC에 기반한 고상 건강기능식품 중 라이코펜 시험법을 개발하였다. 신규 개발 시험법은 식품의약품안전처 밸리데이션 가이드라인을 모두 만족하였고, 분말 라이코펜 CRM을 활용한 적용성 평가도 성공적으로 통과하였다. 따라서, 신규 개발 시험법은 향후 고상 라이코펜 건강기능식품 관리에 활용되어 국내 건강식품안전관리에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전처(식품의약품안전평가원)의 지원(22192미래식046)을 받아 수행되었다.

## References

1. P. Perkins-Veazie, J. K. Collins, A. R. Davis, and W. Roberts, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 2593-2597 (2006). <https://doi.org/10.1021/jf052066p>
2. J. Clotault, D. Peltier, R. Berruyer, M. Thomas, M. Briard, and E. Geoffriau, *J. Exp. Bot.*, **59**, 3563-3573 (2008). <https://doi.org/10.1093/jxb/ern210>
3. E. N. Story, R. E. Kopec, S. J. Schwartz, and G. K. Harris, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **1**, 189-210 (2010). <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124120>
4. I. R. Bunghez, M. Raduly, S. Doncea, I. Aksahin, and R. M. Ion, *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, **6**, 1349-1356 (2011). <https://aperta.ulakbim.gov.tr/record/92109>
5. A. V. Rao and S. Agarwal, *J. Am. Coll. Nutr.*, **19**, 563-569 (2000). <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718953>
6. M. Kelkel, M. Schumacher, M. Dicato, and M. Diederich, *Free Radic. Res.*, **45**, 925-940 (2011). <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.564168>

7. H. D. Sesso, S. Liu, J. M. Gaziano, and J. E. Buring, *J. Nutr.*, **133**, 2336-2341 (2003). <https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2336>
8. Z. Fazekas, D. Gao, R. N. Saladi, Y. Lu, M. Lebowhl, and H. Wei, *Nutr. Cancer*, **47**, 181-187 (2003). [https://doi.org/10.1207/s15327914nc4702\\_11](https://doi.org/10.1207/s15327914nc4702_11)
9. Y. C. Shen, S. L. Chen, and C. K. Wang, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 6475-6481 (2007). <https://doi.org/10.1021/jf070799z>
10. A. Basu and V. Imrhan, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **61**, 295-303 (2007). <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602510>
11. X. Li and J. Xu, *Nutrients*, **5**, 3696-3712 (2013). <https://doi.org/10.3390/nu5093696>
12. I. F. Strati and V. Oreopoulou, *Int. J. Food Sci.*, **46**, 23-29 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02496.x>
13. 건강기능식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처 고시 제2018-12호, 2018.02.28.)
14. United States Pharmacopeia and National Formulary 2021 (USP 44-NF 39).
15. N. E. Craft, In 'Current Protocols in Food Analytical Chemistry', F2.3.1-F2.3.15, John Wiley & Sons, New York, 2001.
16. T. Cucu, K. Huvaere, M. A. Van Den Bergh, C. Vinkx, and J. Van Loco, *Food Anal. Methods*, **5**, 1221-1228 (2012). <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9354-6>
17. Luna HPLC/UHPLC column tips for care and use, <https://az621941.vo.msecnd.net/documents/bececd8a-92c0-4c2b-98e3-f6418f27a994.pdf>, Accessed 2 June 2023.
18. Process for the isolation and purification of lycopene crystals, <https://patents.google.com/patent/WO1998043620A1/sv>, Accessed 2 June 2023.
19. 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드(식품의약품안전처 안내서-0769-05, 2022.07.18.)
20. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>, Accessed 2 June 2023.

---

### Authors' Positions

Young Min Kim	: Graduate Student
Ye Bin Shin	: Graduate Student
Min Kyeong Kwon	: Graduate Student
Jin Hwan Kim	: Graduate Student
Ji Seong Kim	: Graduate Student
Dong-Kyu Lee	: Professor
Myung Joo Kang	: Professor
Yong Seok Choi	: Professor