

Optimizing analytical method in Health Functional Food code with adjustable chromatographic parameters: A case study of vitamin C

Junghoon Shin¹, Yooseong Jeong¹, Yong Seok Choi², Sang Beom Han¹, and Dong-Kyu Lee¹ ★

¹College of Pharmacy, Chung-Ang University, 84 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul 06974, Korea

²College of Pharmacy, Dankook University, 119 Dandaero, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do 31116, Korea

(Received November 3, 2023; Revised December 29, 2023; Accepted January 1, 2024)

건강기능식품공전 시험법의 크로마토그래프법 조건의 조정 및 비타민C에 대한 적용성 평가 연구

신정훈¹ · 정유성¹ · 최용석² · 한상범¹ · 이동규¹ ★

¹중앙대학교 약학대학, ²단국대학교 약학대학

(2023. 11. 3. 접수, 2023. 12. 29. 수정, 2024. 1. 8. 승인)

Abstract: In this study, we improved the vitamin C test method and reviewed data on the adjustable range of chromatography conditions for quantification. First, we adjusted the mobile phase conditions such as solvent composition, salt concentration, pH and column temperature and in particular, it was confirmed through an improved test method that the peak derived from the buffer solution could be clearly separated from the target component, vitamin C by adjusting the pH. The retention time of vitamin C was partially changed by adjusting the column diameter, length and particle size but the number of theoretical plates indicated similar values and did not affect the separation and quantitative analysis of the target component. The flow rate according to the column specifications was derived from the equation proposed by the U.S. FDA (Food and Drug administration) and the Korean MFDS (Ministry of Food and Drug Safety), and evaluation of the applicability to vitamin complexes showed high selectivity for vitamin C even with altered stationary phase conditions and flow rates. In conclusion, vitamin C can be optimally separated and detected by changing the chromatographic method conditions and it was confirmed that the mobile and stationary phase conditions of liquid chromatography can be slightly adjusted in case the assay method uses an isocratic elution.

요약: 건강기능식품공전은 기능성 원료의 지표(기능)성분에 대해 시험법을 고시하고 있다. 본 연구에서는 공전에서 제공하는 비타민C 시험법을 개선하고 정량을 위한 크로마토그래프법 조건의 조정 가능 범위에 대한 데이터를 검토하였다. 우선적으로 이동상 조건인 용매 조성, 염 농도, pH, 컬럼 온도를 조정해 보았으며, 특히 pH의 조절에 따라 완충용액으로부터 유래한 피크가 목적 성분인 비타민C와 명확히 분리될

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)2-820-5854
E-mail : leedk@cau.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.

수 있음을 개선된 시험법으로 확인하였다. 고정상 규격인 컬럼 내경, 컬럼 길이 및 고정상 입자 크기의 조정에 따라 성분의 머무름시간이 일부 조정되었으나, 이론단수는 유사한 수치를 나타냄으로써 목적 성분의 분리 및 정량적 분석에 영향을 주지 않았다. 변경된 컬럼 규격에 따른 유량 변경식은 USP <621> Chromatography 및 국내 식품의약품안전처의 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]에서 제시하는 공식을 근거로 컬럼 규격(내경, 길이, 입자 크기)을 고려한 새로운 공식을 도출하였으며, 비타민 복합체에 대한 적용성 평가 결과, 변경된 고정상 및 유량에도 비타민C에 대한 높은 선택성을 보였다. 결론적으로, 크로마토그래피 조건 일부의 변경을 통해서 비타민C를 최적으로 분리 및 검출할 수 있음을 확인하였으며, 등용매 용리를 활용하는 시험법에서 액체크로마토그래피의 이동상 및 고정상 조건을 조정 가능함을 확인하였다.

Key words: health functional food code, vitamin C, liquid chromatography

1. 서 론

최근 코로나(COVID-19) 여파로 건강과 면역력에 관한 관심이 높아지면서 건강기능식품 시장이 큰 성장을 이뤄내고 있다.¹ 건강기능식품이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조(가공)한 식품을 의미한다. 국내에서는 100가구 중 79가구가 1년에 한 번 이상 건강기능식품을 구매하며, 가장 인기 있는 제품은 홍삼, 프로바이오틱스, 비타민, 오메가-3 등이다. 이러한 제품들로 형성된 국내 시장 규모는 약 3조 2,117억 원으로 추정된다. 세계적으로는 미국이 약 45조 원의 건강기능식품 시장을 차지하며, 중국은 약 18조 원 규모의 시장을 이루고 있다. 특히 중국은 환경 문제와 소비수준 상승으로 건강기능식품에 대한 수요가 증가하고 있다.

건강기능식품의 “기능성”이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 뜻한다. 현재 국내에는 건강기능식품법에 따라서 모든 건강기능식품은 안정성과 생산과정을 검사받아 등록 후 판매해야 하며, 2020년 기준 약 2만 7천여 종류의 건강기능식품이 등록되어 국내에 유통 중이다. 모든 제품은 식품안전나라에서 그 성분과 기능, 섭취 방법 등을 모두 확인할 수 있다.

건강기능식품은 크게 식품의약품안전처장이 건강기능식품 원료로 사용할 수 있다고 고시한 제품을 뜻하는 “고시형”과 건강기능식품의 원료 또는 성분 인정에 관한 규정에 따라 식품의약품안전처장의 인정을 받아야 하는 제품 즉, 영업자가 개별적으로 인정받은 “개별 인정형”으로 구분된다. “고시형” 원료의 경우 [건강기능식품의 기준 및 규격]에 등재되어 있는 기능

성 원료로, 영양소(비타민, 무기질, 식이섬유 등)의 원료가 등재되어 있으며, 건강기능식품 제조업자가 정해진 제조기준, 규격에 맞게 조제하고, 고시되어 있는 기능성 원료만 표시할 수 있다. “개별 인정형” 원료의 경우 영업자가 원료의 안전성, 기능성, 기준 및 규격 등의 자료를 제출하여 관련 규정에 따른 평가를 통해 기능성 원료로 인정을 받아야 한다. 인정받은 업체만이 원료를 제조 또는 판매할 수 있으며, 별도의 추출, 정제, 발효 등의 제조 또는 가공을 해서는 안 된다.

현재 국내에서 시판되는 건강기능식품은 건강기능식품공전(식품의약품안전처에서 고시하는 [건강기능식품의 기준 및 규격])에서 관리되고 있으며, 건강기능식품공전(Health Functional Food code, HFF)에 제시된 시험법을 활용하여 기능 성분의 함량을 분석하도록 되어 있다. [제4. 건강기능식품 시험법] 항목에서 총 78종의 개별성분에 대한 기능 성분 시험법으로 구성되어 있으며, 이 중 67종의 기능 성분은 정밀기기(액체크로마토그래피:56종, 기체크로마토그래피:11종)를 활용하도록 제안하고 있다.²

다만 다양한 제형 및 원료 구성의 새로운 건강기능식품 제품이 출시되고 있는 만큼, 해당 시험법의 크로마토그래피 조건의 변경 등을 통해 시험법의 조정이 필요할 수 있다. 다양한 공전 등재 개별시험법 성분 중 비타민C의 경우 항산화 및 면역 체계 개선 등 다양한 효능을 갖는 필수영양소로써 그 필요성만큼 다양한 제품이 출시되고 있다.³⁻⁹ 국내 및 해외에서 제조되는 4,987개의 비타민C 함유 제품이 정제, 바, 분말, 젤리, 캡슐, 액상 등 다양한 제형으로 판매되고 있다. 그로 인해, 목적 성분인 비타민C 외의 다른 부성분으로 인한 정량 시험의 어려움이 있을 수 있으며, 그 적용성에 한계가 예상된다. 건강기능식품공전에는 비타

민C의 함량 시험을 위해 분광광도계 및 액체크로마토그래프법을 이용하여 총 4가지 시험법을 제시하고 있으며, 미국 약전의 경우 [Vitamins with Minerals Oral Powder]에서 액체크로마토그래피-자외부흡광광도기(LC-UV)를 이용한 시험법만을 활용하고 있다.¹⁰ 해당 시험법의 활용 시, 다양한 제품에서 적용할 수 있는지에 대한 적용성 평가와 그로부터 발견되는 한계점을 해결할 수 있는 크로마토그래피 파라미터 조정 가능 범위에 대한 검증이 필요하다. 실제로 2020년에 진행되었던 ‘식품공전 및 건강기능식품공전 시험법 개선 연구’ 과제에서 몇 가지 기능 성분을 함유한 복합성분 제품의 피크 분리에 어려움이 있음을 제시하였다. 이는 비타민과 같은 필수 영양성분의 복합성분에서 흔히 나타날 수 있는 현상이기에, 각 제형 또는 구성성분의 차이에 따른 크로마토그래피 조건의 일부 조정이 필요할 수 있다고 판단된다.

크로마토그래프법 조건의 조정과 관련하여 미국 FDA (Food and Drug Administration)에서는 정량적인 시험법의 밸리데이션을 위해 ORA (Office of Regulatory Affair) 매뉴얼 중 [Methods, Method Verification and Validation (document number: ORA-LAB.5.4.5)]를 제공하여 그 가이드라인을 따르도록 한다. 그 중 크로마토그래프 조건의 조정과 관련하여 Attachment A (Food and Feed Modification Criteria)와 Attachment B (Drug Chemistry Modification Criteria)에서 액체크로마토그래피 파라미터 변경의 기준을 제공하고 있다.¹¹ 한국의 경우, 식품의약품안전평가원에서 제공하는 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]에서 크로마토그래프법 조건의 조정 내용을 포함하고 있으나, 두 가지 가이드라인에서 제안하는 이동상 및 고정상의 조정 조건이 일부 상이함을 확인하였다.¹²

따라서 본 연구에서는 현재 건강기능식품공전에 제시된 비타민C 시험법의 적용과 개선이 필요한 파라미터에 대한 변경을 검토하였다. 개선된 시험법에 대한 시험법 밸리데이션 및 실제 시판 제품에 대한 적용성 평가를 수행하였다. 추가적으로, 기존의 미국 FDA ORA 매뉴얼과 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서의 기준을 참고하여, 해당 개선 시험법에 대한 크로마토그래프법 조건을 조정해 보았고, 이에 따라 목적 성분인 비타민C의 분리도 등에 미치는 영향에 대한 데이터를 획득하였다. 최종적으로는 이에 따라 도출된 건강기능식품공전 내 시험법의 크로마토그래프법 조건 조정 가능 범위를 제안한다.

2. 재료와 방법

2.1. 시약 및 기구

아스코르브산(L-Ascorbic acid, Cas No 50-81-7, 제품번호 255564)은 Sigma Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)에서 ACS reagent 등급으로 구입하였다. 메타인산(Metaphosphoric acid, Cas No 37267-86-0, 제품번호 04103)은 Sigma Aldrich사에서 구입하였다. 물 (Water, Cas No 7732-18-5, 제품번호 4218-88), 아세토니트릴(Acetonitrile, Cas No 75-05-8, 제품번호 9017-88)은 J.T Baker사 (Phillipsburg, NJ, USA)에서 HPLC 등급으로 구입하였다. 인산이수소칼륨(Potassium phosphate monobasic, Cas No 7778-77-0, 제품번호 000P1120)은 Samchun chemicals사 (Pyeongtaek, Korea)에서 extra pure 등급으로 구입하였다. 인산(Phosphoric acid, Cas No 7664-38-2, 제품번호 6532-2340)은 Daejung Chemicals사 (Siheung, Korea)에서 HPLC 등급으로 구입하였다.

2.2. 시약의 조제

메타인산(Metaphosphoric acid) 10 g을 물에 녹여 100 mL로 하였다. 이 용액 10 mL에 증류수 10 mL를 첨가한 것을 희석액으로 하였다. 불용물이 생기는 경우 여과하여 사용할 수 있으며, 냉장고에서 일주일까지 보관할 수 있다.

2.3. 표준용액의 조제

100 mL 부피플라스크에 비타민C 표준품(Ascorbic acid) 10 mg을 정확하게 달아 5% 메타인산용액으로 표선하여 표준원액으로 한다(100 µg/mL). 정성 및 정량 분석을 위한 검량선 작성을 위해 표준원액을 5% 메타인산 용액에 희석하여 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL의 농도가 되도록 제조한다.

2.4. 시험용액의 조제

비타민C로서 10 mg이 함유되도록 적당량의 시료를 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣고 5% 메타인산 용액으로 정용한 후 혼합한다. 이 용액 10 mL를 취하여 100 mL 부피플라스크에 옮긴 후 5% 메타인산 용액을 이용하여 표선한다. 이 액을 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

2.5. HPLC 분석조건

액체크로마토그래피 장비는 Waters사(Milford, MA, USA)의 1525 binary pump system을 사용하였고, 자외선

-가시광선 검출기는 Waters사의 2487 dual absorbance detector를 사용하였다. 분석용 컬럼은 Phenomenex사 (Torrance, CA, USA)의 Gemini 5u C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)를 사용하였다. 이동상은 용매 A (0.05 M KH₂PO₄, pH 3.0 by phosphoric acid)와 용매 B (Acetonitrile)를 60:40의 비율로 하여 등용매 용리 조건으로 하였고, 이 두 개의 용매를 분당 1 mL씩 충분한 시간 동안 흘려 기기와 컬럼을 안정화하였다. 용리 속도는 1.0 mL/min으로 하였고 컬럼 온도는 실온으로 유지하였다. 표준용액 및 시험용액의 주입량은 10 μL로 하였다. 검출기의 파장은 254 nm로 하였다.

3. 결과 및 토의

3.1. 비타민C 시험법 개선

건강기능식품공전에서 제시하는 비타민C 시험법(제 3법) 기준으로 분석하였을 때, 메타인산 피크(회색액)와 아스코브산 표준품 피크 사이의 분리능이 저조하다는 문제를 확인하였다(Fig. 1(A), (B)).

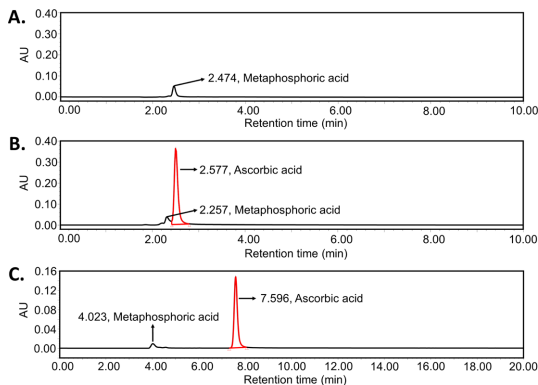


Fig. 1. Chromatogram of (A) blank sample, (B) ascorbic acid standard solution obtained before pH adjustment, (C) ascorbic acid standard solution obtained after adjusting the pH to 3.0.

이러한 피크의 중첩으로 인한 목적 성분의 선택성 문제의 경우, 이동상의 pH에 기인함을 확인하였다. 공전 내 기존 시험법의 경우 이동상의 pH를 별도로 제시하지 않는다. 다만 공전에서 제시하는 절차대로 이동상을 제조할 경우 pH는 4.17이다. 이러한 이동상 조건은 아스코브산의 pK_a인 4.21에 근접하여 아스코브산의 해리형/비해리형의 비율을 증가시킬 수 있으며, 그로 인해 역상 고정상에서의 머무름시간의 현저한 감소를 초래할 수 있다. 따라서, 이동상의 pH를 3.0으로 적용하였을 때 아스코브산 피크의 머무름시간이 2.577 min에서 7.596 min으로 크게 개선되는 것을 확인하였다(Fig. 1(C)). pH가 3.0으로 조정되었을 때 비해리형 아스코브산의 비율이 높아짐으로써 머무름시간이 크게 개선되고, 이로부터 메타인산 피크와 분리가 되는 것을 알 수 있다. 특히 해당 pH 조건은 USP (United States Pharmacopeia)에서 제시하는 비타민C 분석법의 pH 조건과 일치함을 확인하였다.

3.2. 개선된 시험법 유효성 평가

이동상의 pH를 조절하여 분리도를 개선한 시험법에 대한 밸리데이션을 진행하였다. 비타민 B1, B2, B6, D를 함유한 복합제에 비타민C 표준물질을 첨가하여 특이성을 확인하였고, 비타민C 표준액과 검액을 이용하여 정량값 및 머무름시간 등을 확인하였다. 직선성은 8개의 농도 범위(1~50 μg/mL)에 대하여 검량선을 작성하였다. 3회 반복 측정된 결과 상관계수(R²)는 0.9985, 0.9988, 0.9990의 높은 직선성을 보였으며, 검출한계와 정량한계는 각각 0.051, 0.154 μg/mL로 나타났다(Table 1).

정확도와 정밀도 또한 AOAC 가이드라인(10~100 μg/mL 기준으로 회수를 85~110%, 상대표준편차 4% 이내)¹³을 만족하는 결과를 뜻하며, 재현성 있는 결과값을 확인할 수 있었다. 두 파라미터를 측정하기 위하여 1, 20, 50 μg/mL에 대하여 5회 반복 분석하여 92.5~

Table 1. Linearity, limit of detection and limit of quantification of vitamin C analysis

Repetition	Slope	y-Intercept	Regression equation	R ²
1	28883.0	-10428.0	y=28883x - 10428.0	0.9985
2	28883.0	-10275.0	y=28883x - 10275.0	0.9988
3	28599.0	-9592.7	y=28599x - 9592.7	0.9990
Mean	28788.3 (S)	-10098.5	-	0.9987
SD	163.9	444.7 (σ)	-	0.0002
LOD (3.3 × σ/S)		0.051 μg/mL		
LOQ (10 × σ/S)		0.154 μg/mL		

Table 2. Accuracy (%) and repeatability of vitamin C analysis

Repetition	Added concentration of Ascorbic acid		
	1 µg/mL	20 µg/mL	50 µg/mL
1	99.7 %	94.7 %	103.9 %
2	99.0 %	93.8 %	102.9 %
3	98.9 %	94.0 %	103.8 %
4	97.4 %	95.3 %	103.7 %
5	99.2 %	92.5 %	103.6 %
Mean recovery rate	98.8 %	94.1 %	103.6 %
Range of recovery rate		92.5~103.9 %	
SD	0.0077 %	0.0094 %	0.0035%
%RSD	0.0077 %	0.0099 %	0.0033%

Table 3. Quantitative analysis of vitamin C in 14 HFF products using LC-UV

No	Target compound	Matrix	Stated contents (mg/g)	Contents (mg/g)	Recovery (%)
1	Ascorbic acid	Calcium stearate	926.00	849.14	91.70 %
2	Ascorbic acid	Sucrose esters of fatty acids	909.00	914.45	100.60 %
3	Ascorbic acid	Sucrose esters of fatty acids	909.00	876.28	96.40 %
4	Ascorbic acid	Calcium stearate	222.00	244.87	108.30 %
5	Ascorbic acid	Calcium stearate	909.00	888.09	97.70 %
6	Ascorbic acid	-	1000.00	1016.00	101.60 %
7	Ascorbic acid	Calcium stearate, D-Sorbitol	200.00	219.20	109.60 %
8	Ascorbic acid	Vitamin B2, Vitamin B6, D-Sorbitol	250.00	256.25	102.50 %
9	Ascorbic acid	Vitamin B2, Vitamin B6, Niacin	250.00	243.75	97.50 %
10	Ascorbic acid	-	1000.00	1089.00	108.90 %
11	Ascorbic acid	Magnesium stearate, Hesperidin	663.00	736.59	109.10 %
12	Ascorbic acid	-	817.00	846.41	103.60 %
13	Ascorbic acid	Magnesium stearate, α-Tocopherol	806.00	762.48	94.60 %
14	Ascorbic acid	Magnesium stearate, Maltodextrin	155.00	156.55	101.00 %

103.9%의 우수한 회수율을 얻을 수 있었고, 상대표준 편차는 0.0033~0.0099 %이었다(Table 2).

3.3. 개선된 시험법의 적용성 검토

확립된 분석법이 실제로 판매되는 제품들에 적용되는지 확인하기 위하여 제품 14건에 대하여 함량 시험을 진행하였다. 제품들은 다양한 제형에 적용성 평가를 진행하기 위해 정제, 캡슐, 분말 제형에 대해 진행하였다. 그 결과, 함량은 91.7~109.6 %로 모두 기준에 적합하였다(Table 3).

3.4. 크로마토그래프 조건의 조정 범위 검토

위와 같이 개선된 시험법에 대하여, 크로마토그래프 조건의 변동이 미치는 분리도 및 검출에 대한 영향을 확인하고, 이로부터 공전에 표기된 조건에서 어느 정

도의 기준까지 조건 조정이 가능한지를 검토하였다. 크로마토그래프법의 다양한 조작조건은 기본적으로 시스템 적합성 기준에 변동이 없을 때, 그 기준을 만족시키기 위해서 조정될 수 있으며 크로마토그래프법 조건의 조정은 규정된 시스템 적합성 요구조건에 맞추기 위해 필요할 수도 있다. 중요한 파라미터에 대한 조정은 시스템 적합성을 보장하기 위하여 의약품의 시험방법에 명백하게 기술해야 하며, 시스템 성능에 누적된 영향을 줄 수 있는 다중 조정은 피해야 한다. 따라서 본 연구에서는 미국 FDA에서 제공하는 ORA 매뉴얼 중 [Methods, Method Verification and Validation (document number: ORA-LAB.5.4.5)](Table 4)과 식품 의약품안전처에서 제공하는 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서](Table 5)를 참고하여 건강기능식품에 적용 가능한 크로마토그래프법 조건의

Table 4. Criteria for chromatographic method adjustments in the FDA's ORA manual – method, method verification and validation (ORA-LAB. 5.4.5)

Parameter	U.S. FDA	
	Food and feed criteria	Drug chemistry criteria
Sample	Injection volume Possible adjustment when meeting system suitability	
Mobile phase	Composition	- Solvent with lower composition can be adjusted up to $\pm 30\%$ - Maximum variation is $\pm 10\%$ - Minimum composition should be higher than 2%
	Buffer concentration	- Solvent with lower composition can be adjusted up to $\pm 30\%$ - Maximum variation is $\pm 10\%$
	pH	$\pm 10\%$
	Flow rate	$\pm 10\%$
	Column spec. Isocratic	$\pm 50\%$ (Adjustable according to column particle size) Isocratic : L/dp -25~50 %
Stationary phase	Column spec. Gradient	Change not recommended
	Column temperature	Change not allowed $\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$

Table 5. Criteria for chromatographic method adjustments in the Korean MFDS's analytical method validation guidelines for pharmaceuticals

Element	Detail	Korean MFDS guidelines (drug)	
		Isocratic	Gradient
Sample	Injection volume	Possible reduction when meeting system suitability	
Mobile phase	Composition	- Solvent with lower composition can be adjusted up to $\pm 30\%$ - Maximum variation is $\pm 10\%$ - Minimum composition should be higher than 2%	- Possible adjustment when meeting system suitability - Changeable if peak is within $\pm 15\%$ of suggested retention time - Changeable if elution power is stronger than original composition of mobile phase
	Buffer concentration	$\pm 10\%$	Change not allowed
	pH	± 0.2 or ± 1.0 (neutral substance)	Change not allowed
	Flow rate	$\pm 50\%$, Adjustable according to column volume ($L \times dc^2$)	Adjustable according to column volume ($L \times dc^2$)
Stationary phase	Column spec.	Length : $\pm 70\%$, Diameter : $\pm 25\%$, Particle size : -50~0 %	Length : $\pm 70\%$, Diameter : $\pm 25\%$, Particle size : Change not allowed
	Column temperature	$\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$	$\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$

조정에 대한 가이드라인을 제시하고자 한다. 그 내용으로는 이동상의 조성, 염 농도, pH, 컬럼 온도, 컬럼 규격 및 유속에 대하여 조정하고자 한다.

3.5. pH 조건의 조정

비타민C에 대한 특이도(specificity) 개선을 위해 변

경된 pH 조건인 3.0으로부터 크로마토그래프법 조정을 제안하고 있는 두 가지 문헌의 변경 범위를 적용하였을 때의 분리도 변화를 관찰하였다. U.S. FDA의 경우 [Food and Feed Modification Criteria]와 [Drug Chemistry Modification Criteria]에서 pH 조정 범위를 ± 0.2 내에서 허용하고 있다. 국내 식품의약품안전처에

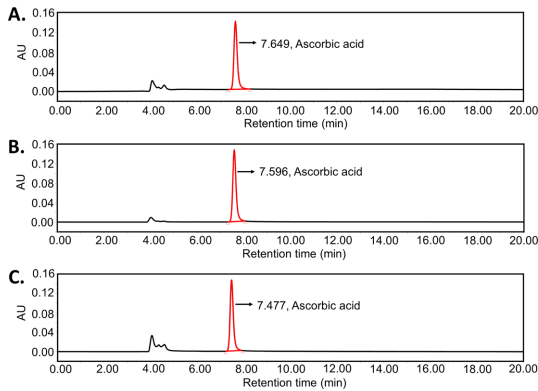


Fig. 2. Chromatograms of ascorbic acid standard solution with modified pH of the mobile phase. (A) pH 2.8, (B) pH 3.0, (C) pH 3.2.

서 제공하는 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]에는 등용매 용리인 경우 ± 0.2 까지 조정 가능하며 이때, 시험대상이 중성물질인 경우에는 ± 1.0 까지 허용하고 있다. 기율기 용리의 경우 조정을 제한하고 있다.

이에 따라, 등용매 용리 허용 범위인 ± 0.2 범위 내에서 조정해 보았다. 개선된 비타민C 시험법의 이동상 조건인 pH 3.0을 포함하여 pH 2.8, 3.2 분석 시, pH가 낮은 순서부터 각각 7.649 min, 7.596 min, 7.477 min으로 유사한 시간에 검출되었다. 또한 피크 간 중첩 현상 없이 단일 피크로 검출되었다(Fig. 2). 이동상의 pH 3.0으로부터 제안하고자 하는 범위 내에서 일부 조정이 되어도, 시험법의 적용에 어려움이 없을 것으로 사료된다. 크로마토그래프법 조건의 일부 조정 허용 범위는 공전에 등재된 모든 항목에 대해 적용 가능한 범위여야 하기에, 개선보다는 분리도의 변경이 크지 않은 범위로 설정하는 것이 적합하다고 판단된다. 특히 pH를 1 이상 조정하여 머무름시간을 크게 변경시킨 비타민C 시험법 개선 사례를 보았을 때, 목적 성분의 pK_a 에 따라 변동된 pH가 유도하는 머무름시간의 변동 범위가 크게 달라질 수 있음을 알 수 있다. 위와 같이 긍정적으로 개선된 사례가 있을 수 있으나, 다른 부성분과의 피크 중첩 등 예기치 않은 문제를 일으킬 수도 있는 점에서 pH 범위를 1 이상 변경할 경우 시험법의 적용에 문제가 발생할 수 있음을 추정할 수 있다.

3.6. 완충액 농도 조건의 조정

U.S. FDA의 경우 [Food and Feed Modification Criteria]와 [Drug Chemistry Modification Criteria]에서

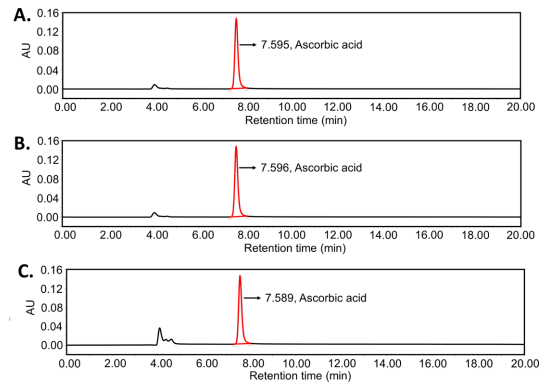


Fig. 3. Chromatograms of ascorbic acid standard solution with modified buffer concentrations. A: 0.045 M KH_2PO_4 , B: 0.050 M KH_2PO_4 , C: 0.055 M KH_2PO_4 .

완충액 농도 조건의 조정 범위를 $\pm 10\%$ 내에서 허용하고 있다. 국내 식약처의 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]에는 등용매 용리인 경우 $\pm 10\%$ 까지 조정 가능하며 기율기 용리의 경우 조정을 제한하고 있다.

공전 내 비타민C 시험법에서 사용되는 0.05 M KH_2PO_4 를 포함하여 0.045 M (90%) 및 0.055 M (110%) 농도로 분석 시, 염 농도가 낮은 순서부터 각각 7.595 min, 7.596 min, 7.589 min으로 유사한 시간에 검출되었다. 희석액으로 사용되는 메타인산 피크와의 중첩 현상은 나타나지 않았으며, 단일 피크로 검출되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이에 따라, 제안하고자 하는 건강기능식품 시험법의 크로마토그래프법 조정 가이드라인에서는 식약처의 의약품 가이드라인 해설서를 참고하여 등용매 용리의 경우 완충액의 농도 $\pm 10\%$ 범위 내에서 조정 가능하다고 판단된다.

3.7. 이동상 조성 조건의 조정

U.S. FDA의 경우 [Food and Feed Modification Criteria]에서는 저조성 용매 기준 상대비 $\pm 30\%$ 까지 조정 가능하며, 그 값은 절대값 $\pm 10\%$ 를 초과할 수 없으며, 최소 절대비 2% 조건 하에 허용 가능하다. [Drug Chemistry Modification Criteria]의 경우, 저조성 용매 기준으로 $\pm 30\%$ 까지 조정 가능하며, 절대비 10%를 초과할 수 없다. 국내 식약처 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]에서는 등용매 용리 기준으로, 저조성 용매 기준 상대비 $\pm 30\%$ 까지 조정 가능하며, 그 값은 절대값 $\pm 10\%$ 를 초과할 수 없으며, 최소 절대비 2% 조건하에 허용 가능하다. 기율기 용리 조건의 경우 시스템 적합성 시험에 적합 및 제시

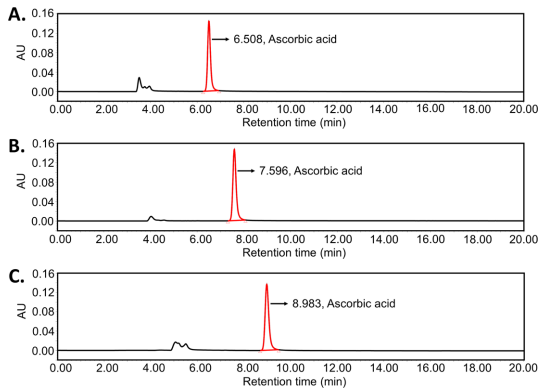


Fig. 4. Chromatograms of ascorbic acid standard solution with modified mobile phase ratio (0.05 M KH_2PO_4 : Acetonitrile). (A) 70:30 (v/v), (B) 60:40 (v/v), (C) 50:50 (v/v).

된 유지 시간의 $\pm 15\%$ 에 피크가 유출되는 경우 이동상의 최종 조성이 기존 조성의 elution power보다 약하지 않을 경우에만 미세한 조정이 허용된다. 공전 내 비타민C 시험법에서는 이동상 A (0.05 M KH_2PO_4)와 이동상 B (아세토니트릴)의 조성 비율을 60:40으로 제안하고 있다. 저조성 용매의 비율인 40%를 기준으로 $\pm 30\%$ 범위 내에서 조정할 경우 최대 12%까지 조정 가능하나, 절대값 $\pm 10\%$ 를 초과할 수 없으므로 최대 변경 가능한 범위는 $\pm 10\%$ 이다.

공전에서 제시하는 60:40의 이동상 비율을 포함하여 70:30, 50:50 분석 시, 각각 6.508 min, 7.596 min, 8.983 min에서 검출되었다. 메타인산 피크와의 중첩 현상은 없었으며, 단일 피크로 검출된 것을 확인하였다(Fig. 4). 이에 따라 제안하고자 하는 크로마토그래프 조건 조정 가이드라인에서는 식약처 의약품 가이드라인 해설서를 참고하여 등용매 용리의 경우, 상대비 $\pm 30\%$ 까지 조정 가능하며, 그 값은 절대값 $\pm 10\%$ 를 초과할 수 없고, 절대비 2%까지 허용 가능함을 원칙으로 하고자 한다.

기울기 용리의 경우, [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]에서는 시스템 적합성 시험에 적합하면서 동시에 이동상의 최종 조성이 기존 조성의 elution power보다 약하지 않을 경우에 조정 가능하다고 제시하고 있으나, 이러한 허용 범위에 대해서는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

3.8. 컬럼 온도 조건의 조정

U.S. FDA의 경우 [Food and Feed Modification Criteria]와 [Drug Chemistry Modification Criteria]에서 컬럼

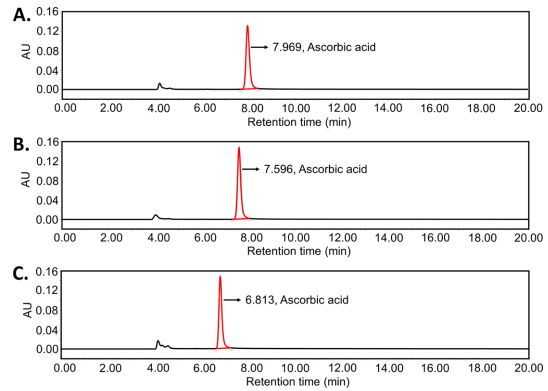


Fig. 5. Chromatograms of ascorbic acid standard solution with modified column temperature of HPLC conditions. (A) 20 °C, (B) 30 °C, (C) 40 °C.

온도 조건을 $\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ 내에서 허용하고 있다. 국내 식약처 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]에는 등용매 용리인 경우 $\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ 까지 조정 가능하며, 기울기 용리의 경우 $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ 범위 내에서 조정 가능하도록 제안하고 있다.

공전 내 비타민C 시험법에서 제시하는 컬럼 온도 30 °C를 포함하여 20 °C 및 40 °C 온도에서 분석 시, 낮은 온도부터 각각 7.969 min, 7.596 min, 6.813 min으로 검출되었다. 메타인산 피크와의 중첩 현상은 발견되지 않았으며, 단일 피크로 검출되었다(Fig. 5). 이에 따라, 제안하고자 하는 크로마토그래프 조건 조정 가이드라인에서는 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]를 참고하여 등용매 용리인 경우, $\pm 10\text{ }^\circ\text{C}$ 범위 내에서 조정 가능하며 기울기 용리인 경우, $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ 범위 내에서 조정 가능함을 원칙으로 하고자 한다.

3.9. 컬럼 규격 및 유량의 조정

$$F_2 = F_1 \times \left[\frac{(L_2 \times d_2^2)}{(L_1 \times d_1^2)} \right] \quad (1)$$

$$F_2 = F_1 \times \left[\frac{(dc_2^2 \times dp_1)}{(dc_1^2 \times dp_2)} \right] \quad (2)$$

$$F_2 = F_1 \times \left[\frac{(dc_2^2 \times L_1 / dp_1)}{(dc_1^2 \times L_2 / dp_2)} \right] \quad (3)$$

여기서, F_1 : 변경 전 유량, F_2 : 변경 후 유량, L_1 : 변경 전 컬럼 길이, L_2 : 변경 후 컬럼 길이, dc_1 : 변경 전 컬럼 내경, dc_2 : 변경 후 컬럼 내경, dp_1 : 변경 전 컬럼

Table 6. Flow rate formulas for changed column specification provided by U.S. FDA, Korean MFDS, and new suggested formula

Flow rate formulas for changed column specification (Initial specification: 4.6 × 250 mm, 5.0 μm and flow rate: 1 mL/min)										
Diameter (mm)	2	2	2	2	2	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
Length (mm)	100	150	200	200	250	100	150	200	200	250
Pore size (μm)	2.5	2.5	2.5	3.5	3.5	2.5	2.5	2.5	3.5	3.5
U.S. FDA flow rate (mL/min)	0.37	0.37	0.37	0.27	0.27	0.42	0.42	0.42	0.30	0.30
U.S. FDA pressure (psi)	2560	3840	#5120	1866	2332	2560	3840	#5120	1866	2332
Korean MFDS flow rate (mL/min)	*0.08	0.11	0.15	0.15	0.19	*0.08	0.13	0.17	0.17	0.21
Korean MFDS pressure (psi)	542	1117	2031	1036	1641	491	1198	2088	1065	1645
Suggested equation flow rate (mL/min)	0.23	0.16	0.12	0.17	0.13	0.26	0.17	0.13	0.18	0.15
Suggested equation pressure (psi)	1557	1625	1625	1175	1123	1597	1566	1597	1128	1175

*Not enough flow rate

#High pressure

Pressure is estimated using HPLC condition calculator

입자 크기, dp_2 : 변경 후 컬럼 입자 크기이다. 식 (1), (2)의 경우 각각 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서], U.S. FDA ORA 매뉴얼에서 제공하는 유량 변경 공식이며, 식 (3)은 이 두 가지 공식을 고려하여 수정된 유량 변경 공식이다.

식 (1)은 국내 식품의약품안전처에서 제시하는 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]의 크로마토그래프법 조건의 조정에서 제시하는 유량 공식이다. 해당 해설서에서는 컬럼의 규격 변경 시, 식 (1)과 같이 유량을 변경하도록 제안하고 있다. 등용매 용리와 기울기 용리에서 컬럼 고정상의 치환기 변경은 불가하며, 컬럼의 길이는 ±70%, 내경은 ±25% 범위 내에서 조정 가능하다. 입자 크기는 등용매 용리인 경우 최대 50%까지 축소 가능하며, 증가는 허용되지 않는다. 기울기 용리의 경우 입자 크기의 조정은 불가하다.

식 (2)는 USP의 General Chapter의 <621> Chromatography에서 제시하는 유량 공식이다. U.S. FDA의 [Food and Feed Modification Criteria] 및 [Drug Chemistry Modification Criteria]에서 동일한 조정 조건을 제안한다. 등용매 용리의 경우 분리능을 고려한 입자크기/길이의 비율이 -25~50%인 경우에만 조정 가능하다. 기울기 용리의 경우 컬럼 길이, 내경, 입자 크기에 대한 조정을 권장하지 않으며, UHPLC를 사용하는 경우 모든 분석 대상 물질의 분리능이 보존되도록 컬럼 내경을 선택해야 한다. FDA는 컬럼의 입자 크기가 변경됨에 따라 유속을 조정해야 하며, 입자 크기가 작은 컬럼은 기존과 동일한 성능을 위해 더 높은 선형 유

속을 필요로 한다. 컬럼 규격이 변경된 경우 입자 크기와 내경을 고려하여 조정할 유량을 구할 수 있다.

컬럼의 규격 변경에 따라 활용 가능한 2가지 매뉴얼의 공식과 더불어, 본 연구팀이 제안하고자 하는 유량 공식이 적용되었을 때 실제 컬럼 규격 변경 시 나타날 수 있는 문제점을 확인하였다(Table 6). 식품의약품안전처에서 제시하는 유량 계산식 (1)에 따라, 기존 건강기능식품공전에서 제시하는 컬럼(4.6 × 250 mm, 5 μm)을 다른 규격의 컬럼으로 변경 시 유량을 계산해보았다. 이때 내경 2.0 mm, 길이 100 mm, 입자 크기 2.5 μm인 컬럼과 내경 2.1 mm, 길이 100 mm, 입자 크기 2.5 μm인 컬럼으로 변경 시, 0.08 mL/min의 낮은 유량값을 구할 수 있다. 이는 피크 broadening 발생의 여지가 크므로 개선이 필요할 것으로 판단된다. 또한 U.S. FDA ORA 매뉴얼에서 제공하는 유량 계산식 (2)에 따라 유량을 계산하였을 때, 내경 2 mm, 길이 200 mm, 입자 크기 2.5 μm인 컬럼과 내경 2.1 mm, 길이 200 mm, 입자 크기 2.5 μm인 컬럼으로 변경 시 5120 psi의 높은 압력이 예상되어 개선이 필요할 것으로 판단된다.

USP <621>에서 제시하는 유량 계산식 (2)에 따라, 기존 건강기능식품공전에서 제시하는 컬럼(4.6 × 250 mm, 5 μm)을 다른 규격의 컬럼으로 변경 시 유량을 계산해보았다. 우선 건강기능식품공전의 비타민C 시험법(제 3법)에서 제시하는 유량 1.0 mL/min으로 분석 시, 800 psi 압력이 확인되었다. 이때 내경 4.6 mm, 길이 200 mm, 입자 크기 2.5 μm인 컬럼으로 변경 시, 2.00 mL/min의 유량값을 구할 수 있으며 이론상 5,120

Table 7. Pressure issue in applying the USP <621> chromatography flow rate formula

Calculation of the flow rate formula for changed column specification from (4.6 × 250 mm, 5.0 μm) to (4.6 × 200 mm, 2.5 μm)	
USP <621> Equation (2)	$F_2 = F_1 \times \left[\frac{(dc_2^2 \times dp_1)}{(dc_1^2 \times dp_2)} \right] = 1 \times \left[\frac{(4.6^2 \times 5.0)}{(4.6^2 \times 2.5)} \right] = 2.00 \text{ mL/min (\#5120 psi)}$
Suggested Equation (3)	$F_2 = F_1 \times \left[\frac{(dc_2^2 \times L_1 / dp_1)}{(dc_1^2 \times L_2 / dp_2)} \right] = 1 \times \left[\frac{(4.6^2 \times 250 / 5.0)}{(4.6^2 \times 200 / 2.5)} \right] = 0.63 \text{ mL/min (1600 psi)}$

#High pressure

psi 압력이 예상된다(Table 7). 이러한 높은 압력은 분석 중 leak 발생 및 장비 고장의 원인을 제공할 수 있으므로 개선이 필요할 것으로 판단된다.

이러한 근거들을 바탕으로 최종적으로는 길이 ±70%, 내경 -60~40%, 입자 크기 -50~0%, 길이/입자 크기 비율 -25~50%를 고려한 새로운 유량 공식인 식 (3)을 제안한다. 각각의 식 (1)과 식 (2)에서 발생한 문제점들은 식 (3)으로 적용 시, 별도의 문제가 발생하지 않을 것으로 판단된다.

3.10. 규격이 다른 컬럼에 대한 적용성 평가

건강기능식품공전의 비타민C 시험법(제 3법)에서 제시하는 컬럼 규격(4.6 × 250 mm, 5.0 μm)에 대해 내경과 길이가 다른 컬럼(2.1 × 100 mm, 2.5 μm)과 길이와 입자 크기가 다른 컬럼(4.6 × 150 mm, 3.0 μm)에 적용성 평가를 진행하였다(Fig. 6).

획득한 데이터 결과처럼 내경 4.6 mm에서 2.1 mm, 길이 250 mm에서 100 mm로 변경 시, 검출 시간이 기존 7.596 min에서 3.060 min으로 변경되어 검출되

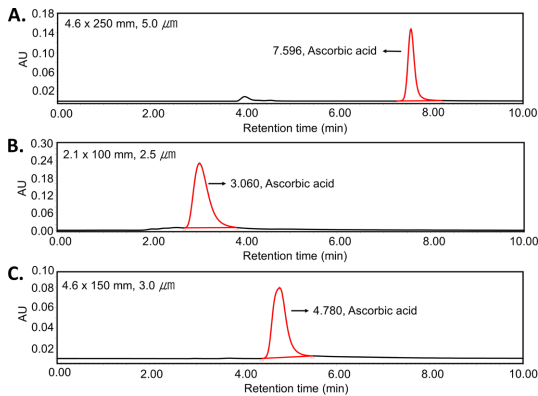


Fig. 6. Chromatograms of ascorbic acid standard solution with modified column details. (A) 4.6 × 250 mm, 5.0 μm (Korean MFDS-provided regulation), (B) 2.1 × 100 mm, 2.5 μm, (C) 4.6 × 150 mm, 3.0 μm.

었다(Fig. 6(A)). 또한, 길이 250 mm에서 150 mm, 입자 크기 5.0 μm에서 3.0 μm으로 변경 시, 검출 시간이 기존 7.596 min에서 4.780 min으로 변경되어 검출되었다(Fig. 6(B)). 컬럼의 길이가 짧아지고, 내경이 좁아질수록 유지 시간은 단축될 것이며, 입자 크기에 따라 분리능이 달라 피크 shape에 영향을 미칠 것으로 판단된다. 다만 피크 분리도가 다소 낮아져 복합체의 분석 시 선택성을 저해할 가능성이 있다. 이에 대해서는 시험법 밸리데이션 및 시스템 적합성 테스트를 통해 검증하는 과정이 반드시 필요하다.

3.11. 건강기능식품 크로마토그래프법 파라미터 조정 안건

최종적으로 미국 FDA에서 제공하는 ORA-LAB.5.4.5 자료와 식품의약품안전처에서 제공하는 [의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 해설서]를 참고하여 건강기능식품에 적용 가능한 크로마토그래프법 조건의 조정 안건을 도출하여 보았다(Table 8). 시료 주입량의 경우, 식약처 가이드라인을 참고하여 시스템 적합성 충족 시 감소 가능성을 원칙으로 하는 것이 적합하다고 판단된다. 등용매 용리 조건의 이동상 조성의 경우, 식약처 가이드라인을 참고하여 저조성 용매의 상대비는 ±30%까지 조정 가능하며, 조정 가능한 최대 절대비는 ±10% 이하, 최소 조성 절대비는 2% 이상을 원칙으로 한다. 완충액 농도의 경우, ±10%까지 조정 가능한 범위로 설정 가능하다. pH의 경우, FDA 자료와 식약처 가이드라인이 허용하는 공통범위인 ±0.2 범위 내에서 조정 가능하도록 한다. 유량의 경우, FDA 자료와 식약처 가이드라인에서 제공한 수식을 변형하였으며, 이를 토대로 컬럼의 길이, 내경, 입자 크기에 따라 변경 가능하며 그 값은 ±60% 범위 내에서 조정 가능하다. 컬럼 규격의 경우 FDA 자료와 식약처 가이드라인을 참고하여 길이: ±70%, 내경: -60~40%, 입자 크기: -50~0%, 길이/입자 크기 비율:

Table 8. Proposal for chromatographic method modification criteria in applying HFF

Element	Detail	Health Functional Food new guideline
Sample	Injection volume	Possible reduction when meeting system suitability Isocratic elution chromatography
	Composition	- Solvent with lower composition can be adjusted up to $\pm 30\%$ - Maximum variation is $\pm 10\%$ - Minimum composition should be higher than 2%
Mobile phase	Buffer concentration	$\pm 10\%$
	pH	± 0.2
	Flow rate	$\pm 60\%$, Adjustable according to column length, diameter, and particle size
Stationary phase	Column spec.	Length : $\pm 70\%$, Diameter : $-60\sim 40\%$ Particle size: $-50\sim 0\%$, L/dp: $-25\sim 50\%$
	Column temperature	$\pm 10^\circ\text{C}$

-25~50 % 범위 내에서 조정 가능하다. 컬럼 온도의 경우, 용매 조건과 더불어 가장 분리도에 영향을 미치는 요인으로써, $\pm 10^\circ\text{C}$ 범위 내에서 조정 가능하도록 한다. 기울기 용리의 경우, 허용 범위의 설정에 있어 추가적인 데이터 확보가 필요할 것으로 여겨지며, 대한민국 식약처에서 제시하는 범위를 기준으로 조정에 대한 시스템 적합성 평가를 거쳐야 할 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 건강기능식품 중 비타민C의 시험법 개선 및 유효성분 정량에 영향을 미칠 수 있는 크로마토그래피 파라미터들을 평가하고, 분석법의 파라미터를 조정하여 분석하였다. 우선 공전 내 기존 비타민 C 시험법에서 나타나는 특이도 문제를 해결하고, 해당 이동상 조건에서 변동 가능한 크로마토그래피 조건의 범위에 대한 데이터를 확보하였다. pH의 경우 기존 시험법의 특이도를 개선한 조건으로써, 각 목적 성분의 pK_a 에 따라 분리도의 변화 및 특이도의 변동에 크게 나타날 것으로 여겨지며, 이로부터 기존 미국 및 대한민국 식약처에서 제공하는 범위보다 더 넓게 설정하는 데에는 무리가 있을 것으로 판단하였다. 또한 이동상 용매 조성, 완충용액의 농도 등 이동상 조건과 컬럼 규격 및 이에 따른 유량 변경, 컬럼 온도 조절의 허용 범위에 대한 비타민C 피크의 분리도를 확인한 결과 범위 내에서 분리도가 적절히 유지됨을 확인하였다. 결과적으로 제안된 파라미터 조정의 조건 내에서는 별도의 시험법 밸리데이션 과정 없이 파라미터를 변경 가능하며, 이에 따라 건강기능식품 시험법의 적용에 효율성을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2023년도 식품의약품안전처의 연구개발비(22192미래식046)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. S.-S. Kim, S. Lim, and S. Kim, *Food Sci. Biotechnol.*, **30**(13), 1667-1674 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00999-5>
2. Regulations concerning recognition of functional ingredients and standards and specifications for Health Functional Foods (Korean MFDS) (2018).
3. M. Khassaf, A. McArdle, C. Esanu, A. Vasilaki, F. McArdle, R. D. Griffiths, D. A. Brodie, and M. J. Jackson, *J. Physiol.*, **549**(2), 645-652 (2003). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040303>
4. T. Bahorun, A. Luximon-Ramma, A. Crozier, and O. Aruoma, *J. Sci. Food Agric.*, **84**(12), 1553-1561 (2004). <https://doi.org/10.1002/jsfa.1820>
5. P. Holford, A. C. Carr, T. H. Jovic, S. R. Ali, I. S. Whitaker, P. E. Marik, and A. D. Smith, *Nutrients*, **12**(12), 3760 (2020). <https://doi.org/10.3390/nu12123760>
6. S. Maggini, E. S. Wintergerst, S. Beveridge, and D. H. Hornig, *Br. J. Nutr.*, **98**, 29-35 (2007). <https://doi.org/10.1017/S0007114507832971>
7. A. L. Webb and E. Villamor, *Nutr. Rev.*, **65**(5), 181-217 (2007). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00298.x>
8. A. Carr and B. Frei, *FASEB J.*, **13**(9), 1007-1024 (1999). <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.9.1007>
9. A. C. Carr and S. Maggini, *Nutrients*, **9**(11), 1211 (2017).

- <https://10.3390/nu9111211>
10. United States Pharmacopeia and National Formulary (2021).
 11. FDA ORA (Office of Regulatory Affairs) laboratory manual volume II (2012).
 12. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics guidance for industry (Korean MFDS) (2015).

Authors' Positions

Junghoon Shin : Graduate Student
Yooseong Jeong : Graduate Student
Yong Seok Choi : Professor
Sang Beom Han : Professor
Dong-Kyu Lee : Professor