

GC-MS를 이용한 건강기능식품 중 옥타코사놀 분석법 개발 연구

이진희 · 오미현 · 이경진 · 김양선 · 금은희 · 박지은 · 조미현 · 성민혜 · 김상아 · 김미혜*

경인지방식품의약품안전청 수입식품분석과

Optimization of Analytical Methods for Octacosanol in Related Health-functional Foods with GC-MS

Jin Hee Lee, Mi Hyune Oh, Kyung Jin Lee, Yang Sun Kim, Eun Hee Keum,
Ji Eun Park, Mee Hyun Cho, Min Hye Seong, Sang A Kim, and Mee hye Kim*
*Imported Food Analysis Division, Gyeongin Regional Office of Food and Drug Safety,
Ministry of Food and Drug Safety, Incheon, Korea*

(Received April 3, 2018/Revised May 9, 2018/Accepted June 30, 2018)

ABSTRACT - The Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) is amending its test methods for health-functional foods (dietary food supplements) to establish regulatory standards and specifications in Korea. In this regard, we continue our research on developing analytical methods for the items. Octacosanol is the major component of polyicosanol and is a high-molecular-mass primary fatty alcohol, obtained from sugar cane wax. Previous researchers have shown that octacosanol can lower cholesterol and has antiaggregatory properties, cytoprotective uses, and ergogenic properties for human health. Recently, octacosanol products have been actively introduced into the domestic market because of their functional biological activity. We have developed a sensitive and selective test method for octacosanol that the TMS derivatives by means of gas-chromatographic-tandem mass spectrometry (GC-MS). The trimethylsilyl ether derivative of the target analyte showed excellent chromatographic properties. The procedure was validated in the range of 12.5~200 µg/L. Standard calibration curves presented linearity with the correlation coefficient (r^2) > 0.999, and the limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) were 4.5 µg/L and 13.8 µg/L, respectively. The high recoveries (92.5 to 108.8%) and precision (1.8 to 2.4%) obtained are in accordance with the established validation criteria. Our research can provide scientific evidence to amend the octacosanol test method for the Health-Functional Food Code.

Key words : Octacosanol, GC-MS, Dietary supplement, Method validation

옥타코사놀은 밀의 씨눈, 사탕수수, 참마, 사과껍질, 포도껍질 등에 함유되어 있는 28개의 탄소 사슬 말단에 수산기(OH)를 가진 불용성의 고체밀납물질으로, 지방족 알코올에 속한다(Table 1)¹⁾. 동물실험 등을 통해 연구된 옥타코사놀은 지구력이나 체력 및 활력을 증진시켜 주는 것으로 알려져 있으며^{2,3)} 운동수행능력에 결정적인 역할을 하는 글리코겐을 절약하기 위하여 지방대사를 촉진시키며, 글리코겐 축적량을 증가시키는 효과가 있음을 보고한 바 있다^{4,5)}.

우리나라에서 건강기능식품 원료로 사용하고 있는 ‘옥

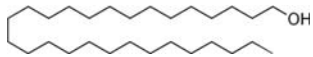
타코사놀 함유 유지’는 ‘지구력 증진에 도움’이라는 기능성으로 2005년 건강기능식품공전에 등재되어 있다. ‘옥타코사놀 함유 유지’는 미강 또는 사탕수수로부터 추출한 왁스를 비누화한 후, 주정 또는 헥산을 사용하여 재결정화 제조과정을 거친다. 이때 미강유래 왁스에서는 옥타코사놀을 100 mg/g 이상, 사탕수수 유래 왁스에서는 옥타코사놀을 540 mg/g 이상 함유하도록 규정하고 있다⁶⁾.

국내 건강기능식품 시장규모는 2016년 기준 1.95조원으로 최근 5년 연평균 9.75%의 성장세를 보이고 있다⁷⁾. 이는 건강에 대한 소비자의 관심과 지식이 늘면서 기존 ‘홍삼’ 제품 뿐만 아니라 다양한 기능성에 대한 요구에 따른 복합제품의 개발과 기존 정제, 캡슐 등 이외의 음료, 즉석밥과 같은 일반식품의 형태로 섭취가능하도록 건강기능식품 시장이 점차 다양하게 확대되고 있기 때문이다.

이러한 추세에 따라 건강기능식품의 표준화된 유통을 위

*Correspondence to: Meehye Kim, Gyeongin Regional office of Food and Drug Safety, 137, Juan-ro Nam-gu Incheon 22133, Korea
Tel: 82-32-450-3336, Fax: 82-32-442-4622
E-mail: meehkim@korea.kr

Table 1. Molecular structure of octacosanol

Structure	Molecular formula	Molecular weight	CAS number
	C ₂₈ H ₅₈ O	410.76	557-61-9

해서는 기능·지표성분을 확인할 수 있는 공인된 방법이나 정밀하다고 판단되는 분석방법이 필요하게 된다.

건강기능식품 중의 옥타코사놀을 분석하고 그 적합성을 판단할 수 있도록 건강기능식품공전에서는 실험방법이 소개 되어있고, 그 외 식품 중 복잡한 물질특성으로 인한 실험과정 중의 문제점들을 해결하기 위하여 여러 실험방법들이 연구되고 있다. 현행 건강기능식품공전의 옥타코사놀의 시험법은 염기성 비누화 반응을 거친 후, 에틸에테르로 추출한 다음 건조 및 재용해 이후 GC-FID로 정성·정량하는 방법이다. 그 외 옥타코사놀의 정성·정량분석을 위한 문헌검토 결과 Daniela 등⁸⁾이 사탕수수에서 추출한 다음 TMS (Trimethylsilyl ester) 유도체화 한 후 GC-MS를 이용한 정량법을, Anna L. 등⁹⁾은 감자 등과 같은 원재료에서 효소 가수분해를 거쳐 클로로포름으로 추출한 다음 TMS 유도체화하여 GC-MS로 분석하였고, Han 등¹⁰⁾은 필름으로 코팅된 정제에서 유도체화 한 후 GC-MS를 이용한 폴리코사놀의 동시분석법을 제안하였다.

본 연구에서는 옥타코사놀의 정량을 위해 현행 건강기능식품공전 시험법보다 특이성 및 감도 등을 개선하고 복잡한 시료 전처리 과정을 단순화 시켰으며 시간적 효율성을 높이는 방향으로 분석법을 개발하였다. 또한 확립된 분석법에 대해 밸리데이션을 수행하여 분석법을 검증하였고, 시중에 유통 중인 제품에 대한 적용성을 검토하였다.

Materials and Methods

시약 및 시료

1-Octacosanol 표준품은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 시료의 전처리에 사용된 ethyl acetate는 HPLC 등급으로 Merck (Darmstadt, Germany)사에서, 유도체 시약 MSFTA (N-Methyl-N-trimethyl silyl) trifluoro acetamide Cat No. 69479, 25 mL)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였다. 시료는 시중에 판매되고 있는 건강기능식품 중 옥타코사놀에 대하여 기능성 원료를 주원료로 사용하면서 그 기능성과 함량을 표시한 제품을 대상으로 선정하였으며 9건을 구매하였고, 단순 부원료로 사용되었거나 그 기능성 및 지표성분의 함량을 표시하지 않은 제품은 대상에서 제외하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

옥타코사놀 표준품 약 10 mg을 ethyl acetate에 용해하

여 1,000 mg/L의 표준원액으로 조제하였다. 검량곡선을 위한 표준용액은 각각 25, 50, 100, 200, 400 µg/L이 되도록 표준원액을 ethyl acetate로 단계별 희석하여 사용하였다. 표준용액의 유도체화를 위하여 농도별 표준용액 100 µL와 N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) 100 µL를 유리튜브에 넣고 밀봉한 다음 80°C 오븐에서 20분 동안 TMS 유도체 반응시킨 것을 표준용액으로 한 다음 GC-MS로 Table 2의 조건에서 분석하였다.

시료의 전처리

균질화한 시료를 옥타코사놀로서 약 10 mg이 되도록 시료 60~250 mg을 정밀히 취한 다음 ethyl acetate 30 mL를 넣고 60°C에서 20분간 수욕조에서 추출하였다. 실온으로 식힌 다음 ethyl acetate를 가하여 최종부피 50 mL가 되게 한 뒤 추출액을 멤브레인 필터(0.45 µm)로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 시험용액의 유도체화는 표준용액 유도체화 과정과 동일한 방법으로 시험용액 100 µL와 N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) 100 µL를 유리튜브에 넣고 밀봉한 다음 80°C 오븐에서 20분 동안 반응시켜 TMS 유도체화하였다.

GC-MS 분석조건

옥타코사놀의 분석을 위하여 DB-5MS (30 m × 0.32 mm

Table 2. Analytical conditions for GC-MS in the analytical method of octacosanol

Instrumental condition		Operating condition
GC	Column	DB-5MS (fused silica capillary column) (30 m × 0.32 mm i. d, 0.25 µm film thickness)
	Oven temp.	Programmed from 180 (1 min) to 250°C, 10°C/min 250 to 300°C (3 min), 5°C/min 300°C to 310 (1min), 5°C/min
	Injector temp.	270°C
	Injection volumn	2 µL (split mode, 10 : 1)
	Carrier gas flow	1 mL/min (Helium)
	Transfer line temp.	280°C
MS	MS source temp.	180°C
	Ionization	EI (70eV)
	SIM ions	m/z 467[M ⁺ -15] ion, m/z 130 ion, m/z 97 ion

i. d, 0.25 μm film thickness, fused silica capillary column)가 장착된 기체크로마토그래프-질량분석기(Gas chromatograph-Mass Spectrometer, GC 7890A, MASS G1710FA, Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하였고, 유속 1.0 mL/min, 주입량은 2 μL 로 하였다. 정성분석은 scan mode, 정량분석에서는 SIM (selected ion monitoring) mode에서 수행하였으며 SIM mode에서는 감도가 크고 안정적으로 쪼개지며 구조적 정보가 연구된 이온으로서 m/z 467[$\text{M}^+ - 15$] ion, m/z 130 ion, m/z 97 ion을 정량이온으로 선정하였고 예비실험을 실시하였다(Table 2).

분석법 유효성 검증

확립된 옥타코사놀 분석법의 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification), 정확도(Accuracy), 정밀도(Precision)에 대해 유효성을 검증하였다. 직선성의 확인을 위하여 옥타코사놀 시험용액의 농도가 각각 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ 이 되도록 한 다음 각 농도 범위에 대한 피크 면적을 이용하여 검량선을 작성하였고, 검량선의 결정계수(coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 또한 정량한계와 검출한계는 검량선의 기울기(S)와 표준편차에 근거하여 3.3배를 곱한 값을 기울기로 나눈 것을 검출한계(검출한계 = $3.3 \times \sigma/S$), 10배를 곱한 것을 정량한계(정량한계 = $10 \times \sigma/S$)로 설정하였다. 건강기능식품은 기능성 원료와 여러 부형제를 이용하여 최종제품이 되는데 정확도(회수율) 평가를 위하여 옥타코사놀을 함유하지 않으며 대두레시틴, 밀납, 셀룰로오스, 색소 등의 부형제가 함유된 완제품을 공시료로 선정하여 정확도(회수율)을 평가하였다. 이때 표준용액을 검량선 범위 내 서로 다른 3개의 농도(50 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$, 150 $\mu\text{g/L}$)로 첨가한 후 분석하여 회수율을 구하였다. 검체량의 변화에 대한 반복 정밀도와 실험실간 정밀도 평가는 옥타코사놀을 함유하고 있는 건강기능식품 중 함량 및 부형제를 고려하여 선정된 대표시료로 시료량을 3가지로 (80 mg, 120 mg, 220 mg) 달리하여 5회 반복 측정하여 평균과 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 계산하여 분석법의 정밀도를 평가하였다. 또한, 실험실간 검증을 위하여 대표시료에 대하여 2개의 실험실에서 실시하여 시험법의 유효성을 확인하였다.

Results and Discussion

특이성 및 직선성

옥타코사놀의 표준용액과 시험용액에서 얻은 크로마토그램과 스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었다. TMS 유도체화된 옥타코사놀은 표준용액과 시험용액에서 동일한 시간에서 단일 피크가 형성됨을 확인할 수 있었으며 옥타코사놀 모분자 이온인 [M^+] m/z 482 ion로부터 딸이온은 메틸기가

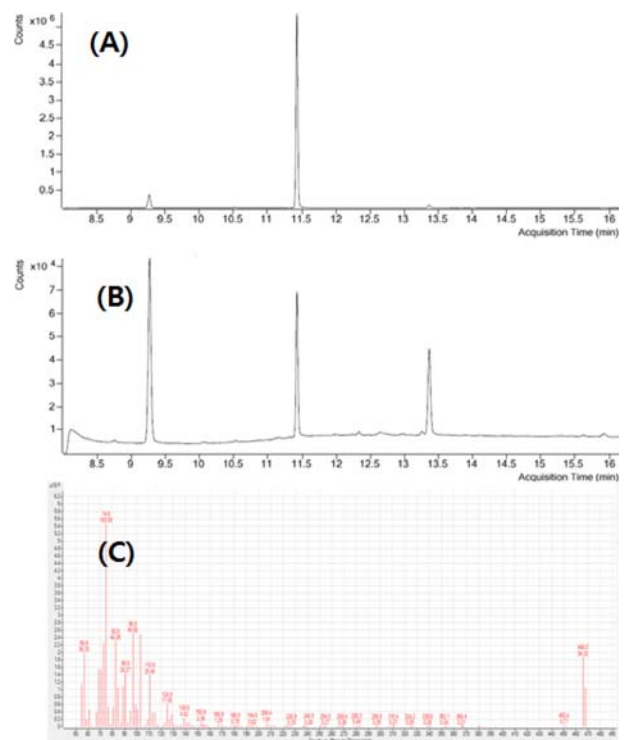


Fig. 1. Chromatogram of octacosanol standard (A), sample (B) and scan spectrum (C).

Table 3. Selected ion of GC-MS for octacosanol

Retention time (min)	M.W.	Fragment monitored (m/z)
11.4	482	467, 130, 97

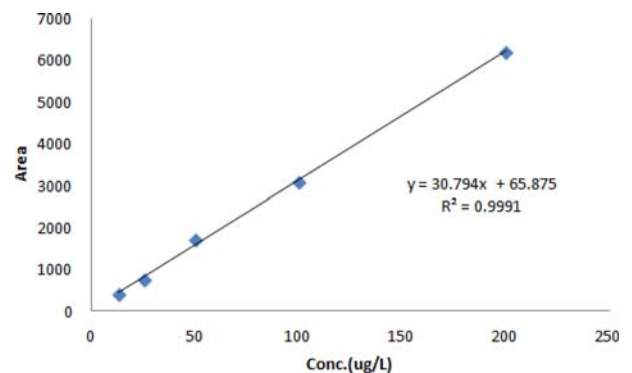


Fig. 2. Calibration curve of octacosanol.

떨어진 m/z 467 ion과 그 외 m/z 103 ion, 97 ion이 검출되었고 이는 시험용액에서도 동일하였다(Table 3). Base peak 면적을 100%로 하였을 때 형성되는 딸이온의 상대비율을 비교한 결과 표준품과 시험용액에서 허용오차 범위 내에 들어가는 것을 확인하였다. 또한 옥타코사놀 포

준용액의 농도가 각각 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/L이 되도록 하여 분석한 결과 상관계수(r^2)가 0.999 이상으로 우수한 직선성을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

검출한계 및 정량한계

GC-MS의 분석조건에 따라 검량선의 기울기(S)와 표준편차에 근거하여 3.3배를 곱한 값을 기율기로 나눈 것을 검출한계 (검출한계 = $3.3 \times \sigma/S$), 10배를 곱한 것을 정량한계 (정량한계 = $10 \times \sigma/S$)로 구한 결과 각각 4.5, 13.8 µg/L로 나타났다.

정확도 및 정밀도

공시료에 표준물질 첨가법을 이용하여 옥타코사놀의 농도가 50, 100, 150 µg/L이 되도록 첨가하고 5회 반복 측정하여 정확성을 검토한 결과 각각 94~109%의 회수율을 나타냈다(Table 4).

시료량의 변화에 대한 반복 정밀도를 확인하기 위하여 시료량을 80 mg, 120 mg, 220 mg으로 각기 달라하여 5회 반복 측정한 결과 상대표준편차는 1.8~2.4%로 확인되었다. 재현성은 3일간 다른 일자에서 5회 반복 실험하였을 때 얻어진 결과로부터 측정값에 대한 상대표준편차를 이용하여 확인하였고 일간 재현성은 80 mg, 120 mg, 220 mg 시료량에서 각각 1.0~2.3%로 나타났다. 정확도 및 정밀도는 AOAC 가이드라인에서 제시하는 기준(분석물 농도 1 µg/g일 때 회수율 범위 75~120%, 상대표준편차 8%)에 모두 부합하는 결과로, 높은 정확도와 정밀도를 확인할 수 있었다(Table 5).

실험실간 교차검증

분석법의 유효성 확인을 위하여 대표검체를 이용하여 실험실간 교차검증을 실시하였다. 각 기관별 5회 반복측정

Table 4. Validation results (accuracy) of analytical method for the determination of octacosanol (n = 5)

Spiked Concentration (µg/L)	Recovery (%) ± SD	RSD (%)
50	94.4 ± 3.4	3.6
100	92.5 ± 2.5	2.6
150	108.8 ± 2.3	2.1

Table 5. Validation results (repeatability) of analytical method for the determination of octacosanol (n = 5)

Sample (mg)	Measured mean (mg/g) ± SD, RSD (%)	(Day to day)
		Measured mean (mg/g) ± SD, RSD (%)
80	20.9 ± 0.5, 2.4	20.4 ± 0.5, 2.3
120	20.5 ± 0.4, 2.0	20.3 ± 0.2, 1.0
220	20.7 ± 0.4, 1.8	20.4 ± 1.3, 1.3

한 함량은 각각 A 기관 107.3 mg/g, B 기관 106.4 mg/g으로 상대표준편차는 2.0%이하로 만족할 만한 결과를 나타내었으며 분석법의 일관성을 확인할 수 있었다(Table 6).

분석법의 적용성 검토

확립된 GC-MS 분석법을 이용하여 옥타코사놀함유 유통제품에 대하여 함량 시험을 실시하였다. 표시된 제품 9건에 대해 함량을 표시량과 비교·분석함으로써 본 연구를 통해 확립된 옥타코사놀 분석법에 대한 적용가능여부를 확인하였다(Table 7). 그 결과 옥타코사놀의 함량은 표시량의 88~108%으로 기준에 적합하게 관리되고 있었으며, 현행 건강기능식품공전 시험법에 따라 분석하였을 때에도 80~107%으로 기준에 적합하였다.

건강기능식품공전 시험법 비교 검토

건강기능식품공전에 등재되어있는 옥타코사놀 시험방법은 비누화, 추출 및 건조 등의 단계를 거쳐 GC/FID 옥타코사놀의 함량을 정성·정량하는 분석방법으로, 본 연구에서는 현행 공전시험법과 새로운 분석방법을 비교·분석하

Table 6. Inter-laboratory validation results (reproducibility) of analytical method for the determination of octacosanol (n = 5)

LAB 1		LAB 2	
Measured mean (mg/g) ± SD, RSD (%)	Measured mean (mg/g) ± SD, RSD (%)	Measured mean (mg/g)	RSD (%)
107.3 ± 2.0, 1.9	106.4 ± 1.4, 1.3	106.8	1.7

Table 7. The contents of silymarin for commercial products by GC-MS (n = 3)

Sample (No)	Octacosanol contents (%)	Sample type
1	87.9	multi-mix (vitamin) complex capsule
2	92.8	single, tablet
3	94.2	multi-mix (vitamin) complex capsule
4	99.8	single, tablet
5	103.6	multi-mix (vitamin) complex capsule
6	98.9	multi-mix (vitamin) complex capsule
7	93.8	multi-mix (vitamin) complex capsule
8	91.1	multi-mix (vitamin) complex capsule
9	107.9	multi-mix (vitamin) complex capsule

였다. 현행 공정시험은 크게 비누화, 추출(3회), 건조, 재용해로 구분할 수 있고 다음과 같이 수행하였다. 시료 적정량과 1N 에탄올성 수산화칼륨을 비누화용 플라스크에 넣고 냉각기가 설치된 수욕상에서 1시간 동안 비누화하였다. 비누화한 액을 실온으로 냉각한 후 분액여두에 옮기고 초산에틸을 넣어 마개를 막은 뒤 심하게 흔들어 층이 완전히 분리될 때까지 정치시켰다. 이 과정을 3회 반복 추출하여 합해진 초산에틸에 증류수를 가하여 페놀프탈레인 시액으로 착색되지 않을 때까지 씻어주었다. 초산에틸층을 무수황산나트륨에 통과시켜 탈수한 다음 감압농축, 건조 후 초산에틸로 재용해하여 최종 이를 시험용액으로 하고 GC/FID로 분석하였다. 현행시험법의 검량선의 범위는 40~310 mg/L로 검출한계는 5.9 mg/L, 정량한계는 17.9 mg/L로 나타났고, 이는 본 연구의 시험결과의 검량선의 범위는 12.5~200 µg/L, 검출한계 및 정량한계가 4.5, 13.8 µg/L로 현행시험법과 비교 시 높은 감도를 나타냄을 확인할 수 있었다. 현행시험법으로 유통제품 9건에 대해 현행시험법으로 분석한 결과 80~107%로 '표시량의 80~120%에 함유되어야 한다'는 표시 기준에 적합하게 관리되고 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 건강기능식품 중 옥타코사놀의 개선된 분석법 제안을 위해 현행 건강기능식품공전의 시험과정을 용매추출로 간소화함으로써 시험과정에 소요되는 분석시간과 유기용매량을 단축하는 등 분석효율을 증대시켰다. 또한 GC-MS spectrum으로 정성분석에 대한 자료를 제공하였으며 감도 등이 개선됨을 확인하였다.

Acknowledgement

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처의 연구개발비(17161미래사057)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 건강기능식품의 복합제품 개발 및 일반식품 형태의 제품개발 확대에 따라 옥타코사놀의 특이성 및 감도 등이 개선된 분석법을 마련하여 향후 공정시험법에 활용할 수 있도록 하였다. 건강기능식품 중 옥타코사놀의 함량분석을 위해 GC-MS를 이용한 분석법을 확립하고 유통 중인 제품을 대상으로 적용성을 검토하였다. 분석법 검증은 특이성, 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정확성, 정밀성에 대해 수행하였다. 12.5~200.0 µg/L의 농도범위에서 $r^2 = 0.999$ 이상의 우수한 직선성을 확인할 수 있었으며, 검출한계와 정량한계는 각각 4.5, 13.8 µg/L이었다. 공시료에 표준물질 첨가법을 이용하여 정확성을 검토하였으며 50, 100, 150 µg/L의 농도에서 각각 94, 93, 109%의 회수율을 확인할 수 있었다. 정밀성 결과에서는 시료 채취량을 80 mg, 120 mg, 220 mg으로 각기 달라하여 측정된 결과 상대표준

편차는 1.8~2.4%로 확인되었다. 실험실간재현성은 1.0~2.3%로 나타났다. 본 연구에서 확립된 분석법을 적용하여 유통제품 9건에 대해 적용성 검토를 실시한 결과 전체 시료에서 분석이 용이하였으며, 모두 표시기준에 적합함을 확인하였다.

본 연구를 통하여 확립된 GC-MS를 이용한 건강기능식품 중 옥타코사놀 분석법은 향후 공정시험법으로 활용할 수 있으며 국내 건강기능식품의 관리 기반을 강화하는데 기여할 것으로 사료된다.

References

1. Kazuko, K., Kumiko, A. Yohel, H.: Free primary alcohols in oils and waxes from germs, kernels and other components of nut, seeds, fruits and cereals. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**(11), 869 (1991).
2. Cureton M et al., Maximal voluntary and functional performance levels needed for independence in adults aged 65 to 97 years. *Phys. Ther.*, **83**(1), 37-48 (1972).
3. Kabir Y et al., Tissue distribution of octacosanol in liver and muscle of rats after serial administration. *Ann. Nutr. Metab.*, **39**(5), 279-284 (1995).
4. Cureton, T.K.: The physiological effects of wheat germ oil on human in exercise, Charles C. Thomas Publisher (1972).
5. Kato, S., Karino, K., Hasegawa, J., Nagasaki, A., Eguchi, M. and Ichinose, T.: Octacosanol affects lipid metabolism in rats fed on a high fat diet. *British J. Nutr.* **73**, 433 (1995).
6. Health Functional Food Code, 100~101, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) Notice 2016-143 (2016).
7. 2017 Food & Drug Statistical Yearbook, 41, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) (2017).
8. Daniela H, Miriam B, Alfonso V, Luis A. V, Trace quantification of 1-octacosanol and 1-triacontanol and their main metabolites in plasma by liquid-liquid extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatog. B.*, **877**, 4154-4158 (2009).
9. Anna L, Romina B, Nicolas S, Tal I, Jan E L, Hanjo H, Jocelyn KC R, Alisdair R F, Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues. *Plant Methods.* **5**(1), 4 (2009).
10. Han Y, Chunmin W, Haibo S, Ruichen G, Quality Evaluation of Policosanol film-coated tablets by Simultaneous determination of Eight Ingredients Using GC-FID and GC-MS. *J. Anal. Sci. Methods and Inst.*, **2**, 24-28 (2012).
11. Shiyi O, Jian Z, Yong W, Ye T, Jiong W, Preparation of octacosanol from filter mud produced after sugarcane juice clarification. *LWT- Food Sci. Technol.*, **45**, 295-298 (2012).
12. Simin F, Zisheng L, Fangfang Z, Songbai L, Zia U. K, Effect of water, metallic ions, fatty acid and temperature on oxidative stability of 1-octacosanol from sugarcane rind. *Food Chem.*, **182**, 171-177 (2015).
13. Sirin, S., Siwarutt B, Suwathchai J, Issara S, Wichchunee P, Kittiwut K, Purification of policosanol from crude sugarcane

wax obtained from supercritical CO₂ extraction. *The 6th International conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6)*. 29-33 (2016).

14. David M. D, Luis G. B, Trace determination of 1-octacosanol

in rat plasma by solid-phase extraction with Tenax GC and capillary gas chromatography. *J. Chromatography B*. **762**, 43-49 (2001).