

## HPLC를 이용한 조제유류 중 베타카로틴 함량 분석 연구

황경미<sup>1</sup> · 배지원<sup>1</sup> · 허수정<sup>1</sup> · 오금순<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>식품의약품안전평가원 영양기능연구팀, <sup>2</sup>식품의약품안전처 첨가물 기준과

### Determination of $\beta$ -Carotene in Infant Formulas by High-Performance Liquid Chromatography

Kyung Mi Hwang<sup>1</sup>, Ji Won Bae<sup>1</sup>, Soo Jung Hu<sup>1</sup>, Keum Soon Oh<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Nutrition and Functional Food Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Cheongju, Korea

<sup>2</sup>Food Additives Standard division, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea

(Received June 25, 2019/Revised July 12, 2019/Accepted July 18, 2019)

**ABSTRACT** - A procedure based on high-performance liquid chromatography (HPLC) is described to determine  $\beta$ -carotene in infant formulas. The method for  $\beta$ -carotene analysis was performed on a C18 reversed-phase column using acetonitrile/methanol/dichloromethane (6:1:3, v/v/v) as a mobile phase.  $\beta$ -Carotene was determined in HPLC with photo diode array (PDA) detector. The parameters of validation were specificity, linearity, LOD, LOQ, accuracy, precision and repeatability. The specificity was confirmed by the retention time and the linearity ( $R^2$ ), which was over 0.999 in the range of 0.125~2 mg/L. The detection and quantification limits were 0.064 and 0.193 mg/L, respectively. The accuracy and precision of this method using an STD spiked sample were 80~119% and 1.02~2.05% respectively. The method was applied to the analysis of various infant formula and follow-up formulas products containing  $\beta$ -carotene, and all the products contained acceptable levels of  $\beta$ -carotene for nutrition labeling.

**Key words** :  $\beta$ -Carotene, HPLC, Infant formula

베타카로틴은 생체 내에서 시각 기능, 세포 증식과 세포 분화를 조절하고 면역기능 등에 관여하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 베타카로틴은 자연계에 존재하는 600여종의 카로티노이드 중에서 알파카로틴, 베타크립토잔틴과 함께 비타민 A의 전구체로 작용하며<sup>2)</sup>, 화학적 구조는 Fig. 1과 같다. 베타카로틴은 비타민 A의 활성을 가지는데, 비타민 A는 체내의 생리작용에 필수적인 지용성 비타민으로 주로 배아 발생과 성장에 관여하며, 특히 태아의 폐 형성에 필수적이어서 폐의 완전한 성숙과 유지를 돕는다<sup>3)</sup>.

영유아는 주로 모유 또는 조제유류를 통해 성장, 발달에 필요한 영양소를 제공받으며, 이 시기는 일생 중 성장 발달이 가장 빠르게 진행되는 시기로 적절한 영양공급이 매우 중요하다<sup>4,5)</sup>. 이 중 비타민은 미량이지만 유아의 모

든 신체대사 및 생리적 기능에 반드시 필요한 성분이다. 따라서 모유 외에 조제유류를 유일한 영양공급원으로 하는 영유아의 성장발달을 위해서는 조제유류의 영양성분 관리가 매우 중요하다. 따라서 CODEX<sup>6)</sup> 및 「식품의 기준 및 규격」<sup>7)</sup>에서 조제유류 중 열량, 비타민 등의 영양성분에 대해 엄격한 성분규격 및 기준을 설정하고 있다. 현재 「식품의 기준 및 규격」에 조제유류 중 베타카로틴의 기준규격은 정해져 있지 않지만, 시중에서 유통되고 있는 조제유류는 높은 비율로 베타카로틴을 함유하고 있다. 조제유류 중 베타카로틴 함량 관리를 위한 기준·규격 신설에 대비하여 베타카로틴 시험법을 검토하였다. 베타카로틴 분석법은 일반적으로 HPLC를 이용하는 방법이 널리 알려져 있으며<sup>8-10)</sup>, AOAC의 최근 분석법에는 infant formula에 대해 ultra high performance liquid chromatography로 분석하는 방법(AOAC 2016.13)<sup>11)</sup>이 소개되고 있어 베타카로틴 함량 분석을 위한 국내 공인 분석법은 건강기능식품 공전<sup>12)</sup>에 제시되어 있으나, 조제유류는 건강기능식품과는 달리 베타카로틴 성분만 고농도로 함유되어 있지 않다. 또한 다양한 식품성분 중에 미량으로 포함되어 있어 분석이 쉽

\*Correspondence to: Keum Soon Oh  
Food Additives Standard division, Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju 28159, Korea  
Tel: 82-43-719-2501, Fax: 82-43-719-2500  
E-mail: gs9705@korea.kr

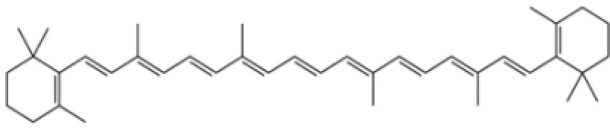


Fig. 1. Chemical structure of  $\beta$ -carotene.

지 않아 조제유류와 같은 식품에 적용될 수 있는 베타카로틴 분석방법의 확립이 필요하다.

본 연구에서는 조제유류에 적용가능한 베타카로틴 분석법을 검토하고 시험법 검증 가이드라인을 참고하여 밸리데이션을 수행한 후 국내에서 유통 중인 조제유류 및 조제식에 대한 적용성을 확인하여 분석법을 확립하고자 한다.

## Materials and Methods

### 실험재료

본 연구에 사용된 조제유류 및 조제식은 식품의약품안전처에 신고된 품목제조보고서(2013년~2017년)와 수입신고서(2013년~2017년)를 확인하여 구입하였다. 국내에 품목제조보고 되거나 수입 신고된 제품은 총 82 품목으로 조사되었으며, 이 중 생산 중단된 제품 및 수출용 제품, 품목제조보고가 중복된 것은 시험대상에서 제외하였다. 먼저 제품유형별로 시료를 구분하고, 생산량 통계자료를 활용하여 제조사별 상위 1, 2위 제품을 선정하고, 제품명이 동일하고 유형 또는 단계만 다른 제품에 대해서는 분석 항목의 표시함량이 낮은 제품으로 선정하였다. 최종 선정된 시료는 조제유류 13 품목(영아용조제유 8, 성장기용조제유 5), 성장기용조제식 7 품목 등 총 20품목이었으며, 국내 유가공업체 홈페이지 및 인터넷 판매 사이트를 통하여 구매하여 실험에 사용하였다. 시료는 전처리 후 24시간 이내에 분석하였다.

### 표준품 및 시약

베타카로틴의 표준품은 Honeywell Fluka사(Munich, Germany), 시약 중 수산화칼륨, 염화나트륨, 피로갈롤은 Sigma사(St. Louis, MO, USA), 아세토니트릴, 메탄올, 디클로로메탄, 에탄올, 사이클로헥산, 헥산, 초산에틸 용액은 Merck사(Whitehouse station, NJ, USA)로부터 HPLC급으로 구입하여 사용하였다. 분석에 사용되는 증류수는 3차 증류수로 18.0 M $\Omega$  이상인 것을 사용하였다.

### 표준용액의 조제

표준물질 약 5 mg을 정밀히 달아 소량의 butylated hydroxy toluene (BHT)를 첨가한 사이클로헥산 50 mL에 녹여 100  $\mu$ g/mL의 농도가 되도록 하여 표준원액으로 하고 위 용액을 에탄올로 적절히 희석하여 표준용액으로 하였다.

Table 1. High performance liquid chromatograph conditions for  $\beta$ -carotene analysis

Parameter	Condition
Column	Capcell pak C18 UG120 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 $\mu$ m)
Mobile phase	Acetonitrile : Methanol : Dichloromethane = 6 : 1 : 3
Flow rate	0.6 mL/min
Column temp.	40°C
Wavelength	450 nm
Injection volume	20 $\mu$ L

### 시험용액의 조제

균질화한 시료 약 1 g(베타카로틴으로서 1~2  $\mu$ g 에 해당하는 양)을 정밀히 칭량하여 50 mL 추출관에 넣고 3% 피로갈롤 에탄올 용액 10 mL와 60% 수산화칼륨 용액 1 mL를 가하여 70°C 수욕 중에 30분간 진탕하며 비누화하였다. 이것을 흐르는 물에 냉각하고 2.25% 염화나트륨 용액 10 mL, 헥산·초산에틸(9 : 1)혼합용액 15 mL를 첨가하여 진탕기에서 10분간 진탕한 후, 720xg에서 5분간 원심분리하였다. 하층에 헥산·초산에틸(9 : 1) 혼합용액 15 mL를 가하여 2회 반복 추출하고 상층액을 합하여 감압농축한 후, 0.45  $\mu$ m 나일론 실린지 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

### HPLC 분석조건

베타카로틴 분석을 위한 고속액체크로마토그래프(High performance liquid chromatograph)는 PDA (Photo diode array)가 장착된 Nanospace SI-2(Shiseido Co., Osaka, Japan)를 사용하였다. 분석칼럼으로는 Capcell Pak C<sub>18</sub> UG120 (4.6  $\times$  150 mm, 5  $\mu$ m) (Shiseido Co.)을 사용하여 아세토니트릴/메탄올/디클로로메탄(6:1:3, v/v/v)을 혼합한 용액을 이동상으로 사용하였으며, 0.6 mL/min 유속으로 측정파장은 450 nm로 하여 분석하였다. 기기분석조건을 Table 1에 상세하게 제시하였다.

### 분석법 유효성 검증

베타카로틴 분석법에 대한 유효성을 검증하기 위하여 AOAC 시험법 검증 가이드라인에서 제시하는 방법<sup>13)</sup>을 참고하여 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection)와 정량한계(limit of quantification), 정확성(accuracy), 정밀성(precision)을 구하였다. 직선성을 확인하기 위하여 5개 농도의 베타카로틴 표준용액을 HPLC로 측정하여 얻은 각각의 피크 면적으로부터 검량선을 작성하였다. 정확성은 표준물질 첨가법을 이용하여 회수율을 구하여 확인하였고, 정밀성은 시료량을 달리하여 반복성(repeatability), 실험실간 비교시험을 통한 재현성(reproducibility)을 relative standard deviation(RSD, %)으로 나타내었다.

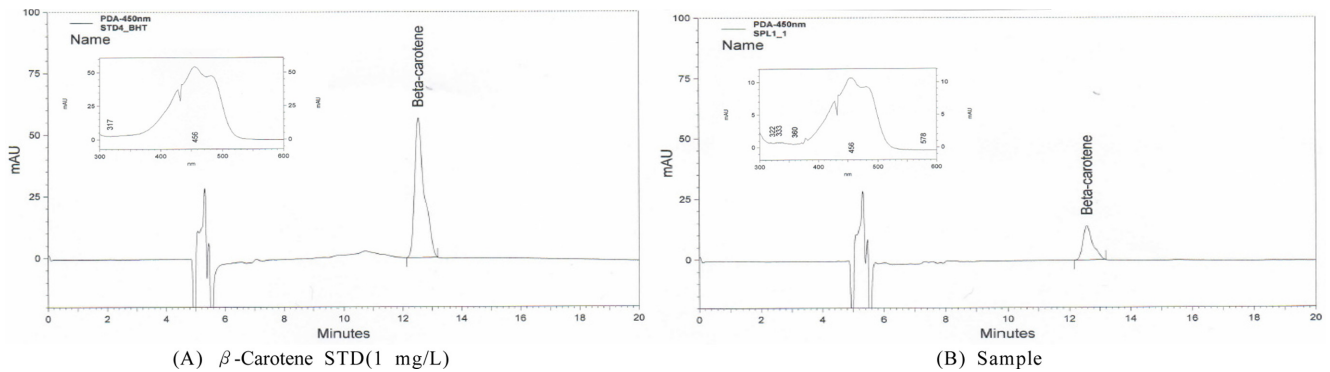


Fig. 2. HPLC chromatogram and spectrum of  $\beta$ -carotene standard solution (A) and sample (B).

**유통 제품 중 적용성 확인**

분석법 검증을 통하여 확립된 방법으로 시중에 유통 중인 조제유류 및 조제식 20건에 대한 베타카로틴 함량을 확인하였다. HPLC에 주입하여 얻어진 크로마토그램에서 검출된 피크 면적을 구하고, 미리 작성한 표준 검량곡선의 회귀방정식에 대입하여 베타카로틴 함량을 구하고 제품의 표시량과 비교하였다.

**Results**

**시험법 검토 및 확립**

본 실험에 사용된 베타카로틴 시험법은 피로갈롤에탄올 용액, 수산화칼륨 용액을 가하여 비누화한 후, 추출하여 역상분배형 칼럼으로 액체크로마토그래프를 이용하는 분석법이다. 실험에 사용한 베타카로틴 표준용액은 분석시간이 지남에 따라 함량이 낮아졌다. 이에 표준용액 조제 시 산화방지제 BHT를 소량 첨가하여 시간에 따른 표준용액 농도의 변화를 살펴 본 결과, BHT를 첨가한 경우 베타카로틴의 농도변화가 적음을 확인하였다. 분석과장의 경우, 건강기능식품공전에서 450 nm, Rodeney의 논문<sup>(1)</sup> 등에서 470 nm로 제시하고 있었으며, 최적의 스펙트럼을 확인한 결과 최대흡수파장으로 450 nm를 선택하였다. 또 이 동상을 아세트니트릴/메탄올(85:15) 용액 70%와 디클로로메탄 30%를 컬럼내에서 혼합하여 사용할 경우 베이스라인의 안정도가 떨어져 아세트니트릴/메탄올/디클로로메탄을 6:1:3의 비율로 혼합하여 사용하였다.

**분석법 검증**

**특이성**

베타카로틴 표준용액과 시험용액의 크로마토그램을 통하여 분리도와 머무름 시간을 확인하였고 표준용액, 시험용액에서 표준용액에서와 동일한 시간대에 단일 피크가 형성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

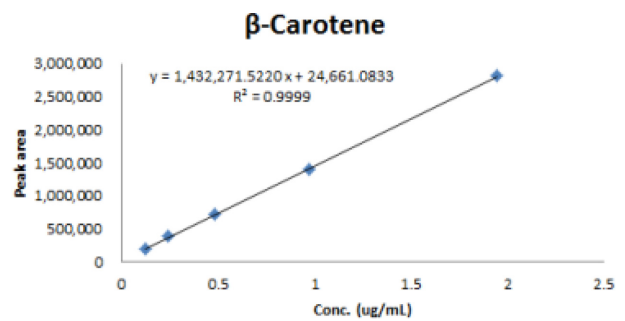


Fig. 3. Calibration curve for  $\beta$ -carotene.

**직선성**

베타카로틴 표준용액(100  $\mu$ g/mL)을 에탄올로 희석하여 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L의 농도범위에서 직선성을 검토한 결과 R<sup>2</sup>값이 0.999 이상으로 확인되었다(Fig. 3).

**검출한계 및 정량한계**

HPLC의 분석조건에 따라 검량선의 기울기(S) 및 표준편차를 이용하여 표준편차에 3.3배를 곱한 값을 기울기로 나눈 것을 검출한계 (검출한계 =  $3.3 \times \delta/S$ ), 10배를 곱한 것을 정량한계 (정량한계 =  $10 \times \delta/S$ )로 하였으며, 각각 0.1, 0.3 mg/L로 나타났다(Table 2).

**정확성**

공시료에 표준물질 첨가법을 이용하여 정확성을 확인하였다. 베타카로틴을 함유하지 않은 조제유류에 대하여 각기 다른 3개 농도의 표준물질을 첨가(spiking)하여 첨가하기 전과 후의 값을 5회 반복 측정하여 회수율을 확인하였다. 그 결과, 각각의 농도에서 회수율은 119.6%, 80.7%, 82.6%, 상대표준편차는 1.0%, 2.1%, 1.0%로 나타났다(Table 3).

**정밀성**

시료에 대해 검체량에 따른 반복성과 실험실간 재현

**Table 2.** Validation of the method concerning the limits of detection and quantification

Analyte	Concentration range (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
$\beta$ -Carotene	0.125 ~ 2.0	0.1	0.3

LOD :  $3.3 \cdot \sigma/S$ LOQ :  $10 \cdot \sigma/S$ ( $\sigma$  : the standard deviation of the response, S : the slope of the calibration curve)**Table 3.** Accuracy of analytical method for  $\beta$ -carotene in infant formula (n=5)

Analyte	Amount added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Amount found ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD (%)	Recovery (%)
$\beta$ -Carotene	0.175	0.21	1.0	119.6
	0.35	0.28	2.1	80.7
	0.7	0.58	1.0	82.6

**Table 4.** Repeatability for the determination of  $\beta$ -carotene in sample (n=5)

Sample amount (g)	Analyte contents mean $\pm$ SD ( $\mu\text{g/g}$ ) ; RSD (%)	Mean ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)
1	1.94 $\pm$ 0.09 ; 4.9		
2	1.91 $\pm$ 0.04 ; 2.3	1.88	4.5
3	1.81 $\pm$ 0.04 ; 2.1		

**Table 5.** Inter-laboratory reproducibility for the determination of  $\beta$ -carotene in sample (n=5)

Laboratory	Analyte contents mean ( $\mu\text{g/g}$ )	Mean ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)
A	1.94	1.93	4.0
B	1.91		

성으로 정밀성을 확인하였다. 반복성은 시료량을 달리 취하여 각각 5회 반복한 분석 결과에서 측정값에 대한 상대표준편차를 이용하여 확인하였다. 표본시료 1개를 선정하여 각각 1, 2, 3 g 취하여 분석한 결과 시료 채취량에 따른 결과값의 상대표준편차가 2.1~4.9% 였다 (Table 4).

재현성은 실험실간 교차검증을 통해 확인하였으며, 표본시료 1개를 선정하여 5회 반복측정하고 상대표준편차를 확인한 결과 4.0%로 나타났다(Table 5).

#### 분석법 적용성 검토

검토된 시험법의 시료 적용성 검토를 위해 국내 유통 중인 영아용조제유 8종, 성장기용조제유 5종, 성장기용조제식 7종 등 총 20종에 대해 본 연구를 통해 확립한 베타카로틴 분석법을 적용하여 함량을 확인하였다(Table 6). 조제유류 및 조제식에 대한 베타카로틴의 기준·규격은 따로 설정되어있지 않아 제품의 표시값과 비교하여 함량을 확인하였다. 그 결과 본 시험법은 모든 시료에 적용이 가능하였다. 제품 중 베타카로틴 함량은 0.09~1.0  $\mu\text{g/g}$  농도로 함유되어 있다고 표시되어 있었으나 실제 분석결과는 함량에 비해 82~284%가 함유되어 있으며, 대부분 표시함량보다 충분히 많은 양을 함유하고 표시기준인 '표시량의 80% 이상'을 모두 충족시키는 값이었다.

## Discussion

베타카로틴 함량의 국내 공인분석법으로는 건강기능식품공전에 수산화칼륨 용액을 이용하여 비누화 전처리 후 추출하여 고속액체크로마토그래프를 이용하여 분석하는 방법이 제시되어 있고<sup>12)</sup>, AOAC에서는 내부표준물질을 첨가한 후 수산화칼륨 용액으로 전처리하여 추출하고 UHPLC로 분석하는 방법(AOAC 2016.13)<sup>11)</sup>이 제시되어 있다. 현행 식품공전에는 조제유류 중 베타카로틴의 기준·규격 및 시험법이 등재되어 있지 않으나, 유통되고 있는 조제유류 및 영아용·성장기용조제식 82개 제품 중에서 54개가 베타카로틴이 함유되어 있다고 표시하고 있었다. 표시된 영양성분은 주로 100 mL 기준으로 표시되어 있었으며 이 값을 다른 영양성분의 기준·규격의 단위와 비교하기 위하여 제품별 표시된 조유농도 및 열량을 확인하여 100 kcal 당 함량으로 환산값을 산출하여 표시함량을 확인하였다. 영양표시로 확인한 조제유류의 베타카로틴 함량은 7.8~20.2  $\mu\text{g}/100$  kcal의 범위로 조사되었으며, 유형별 평균값은 조제유류 9.9  $\mu\text{g}/100$  kcal, 성장기용조제식 9.8  $\mu\text{g}/100$  kcal로 유형에 상관없이 거의 유사하였다. 다만 베타카로틴 표시함량이 다양하더라도 같은 제조회사의 제품인 경우 제품의 종류에 상관없이 비슷한 경향을 보였다. 시중에 유통 중인 조제유류 및 성장기용조제식을 실제로 분석한 결과는 82%를 함유한 한 개의 제품을 제외하고는 121~284%가 함유되어 있어 대부분 표시함량보다 충분히 많은 양을 함유하고 있었다. 확립된 베타카로틴 분석법으로 직선성, 정확성,

**Table 6.** The contents of  $\beta$ -carotene in sample (n=3)

Sample type	Sample No.	Labeled ( $\mu\text{g/g}$ )	Contents ( $\mu\text{g/g}$ )	RSD (%)	표시량 대비 함량 (%)
Infant formula (milk based)	1-IMF_L	0.09	0.21	1.5	227.8
	2-IMF_P	1.00	0.82	0.6	81.8
	3-IMF_P	0.60	0.74	1.0	124.0
	4-IMF_P	0.60	1.09	2.0	182.2
	5-IMF_P	0.60	0.92	4.6	163.5
	6-IMF_P	1.00	1.84	0.3	183.9
	7-IMF_P	0.60	1.68	1.4	279.8
	8-IMF_P	0.60	1.55	3.2	237.5
Follow-up formula (milk based)	9-FMF_P	1.00	1.21	2.1	121.3
	10-FMF_P	0.60	1.02	2.2	170.3
	11-FMF_P	0.60	1.70	0.8	283.8
	12-FMF_P	0.60	1.51	3.0	255.0
	13-FMF_P	0.60	1.66	4.6	183.6
Follow-up formula (soy based)	14-FF_L	0.08	0.17	1.4	200.7
	15-FF_P	0.60	0.85	1.5	142.5
	16-FF_P	1.00	1.38	0.6	138.2
	17-FF_P	0.60	1.60	2.2	266.8
	18-FF_P	0.60	1.48	2.9	246.4
	19-FF_P	1.00	2.41	0.4	232.9
	20-FF_P	0.60	1.58	4.9	133.8

정밀성, 실험실간 교차검증의 값을 검토하였고, 이 결과는 AOAC에서 제시하는 시험법 검증 가이드라인을 만족시켜 실험법으로 사용가능함을 확인하였다<sup>14)</sup>.

본 결과로부터 확립된 분석법은 조제유류 중 베타카로틴 함량을 확인하기에 적합함을 확인하였으며 국내 조제유류 영양성분의 관리 기반을 강화하는데 기여할 것으로 사료된다.

### Acknowledgement

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처 연구개발사업의 연구비지원(17161축산안604)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 국문요약

본 연구는 조제유류 중 「식품의 기준 및 성분규격」에 기준 규격이 설정되어 있지 않으나 제품에 함유되어 있는 베타카로틴에 대해 분석법을 마련하고자 수행하였다. 조제유류에 함유된 베타카로틴 함량 분석을 위해 HPLC를 이용한 분석법을 확립하고 시중에 유통 중인 제품을 대상으로 적용성을 검토하였다. 베타카로틴 표준품을 이용하

여 HPLC를 이용한 기기분석조건을 확립하고 시료 중의 베타카로틴을 추출하여 분석하였다. 분석법 검증은 특이성, 직선성, 검출한계 및 정량한계, 정확성, 정밀성에 대해 수행되었다. 0.125~2 mg/L의 농도범위에서  $R^2=0.999$  이상의 우수한 직선성을 확인할 수 있었으며, LOD와 LOQ는 각각 0.1, 0.2 mg/L였다. 표준물질 첨가법을 이용하여 정확성을 검토하였으며, 81~120%의 회수율을 확인할 수 있었다. 정밀성을 검토한 결과 시료 채취량에 따른 반복성은 RSD값이 2.1~4.9%, 실험실간 교차검증을 통한 실험일자에 따른 재현성은 4.0 RSD(%)로 확인되었다. 본 연구에서 확립된 분석법을 적용하여 조제유류 13건, 성장기용 조제식 7건 등 국내 유통 중인 제품 20건에 대해 적용성 검토를 실시한 결과 전체 시료에서 분석이 용이하였으며, 모두 표시기준에 적합함을 확인하였다.

### References

- Holick, C.N., Michaud, D.S., Stolzenberg-Solomon, R., Mayne S.T., Pietinen, P., Taylor, P.R., Virtamo, J., Albanes, D.: Dietary carotenoids, serum  $\beta$ -carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study. *Am. J. Epidemiol.* **156**(6), 536-547 (2002).
- Noel W.S.Olson J.A. 2012. Chapter 11 Vitamin A. Present

- knowledge in nutrition. Tenth ed. Wiley Press, Washington D.C.
3. Chytil, F.: Retinoids in lung development. *FASEB J.*, **9**, 986-992 (1996).
  4. Thompson, D.K., Kharb, S.: Aspects of infant food formulation. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Safety*, **6**, 79-102 (2007).
  5. Ok, K.H., Kim, K.S., Seo, J.S., Choi, Y.S., Shin, S.M.: A study on the nutrient intakes and supplemental food of infants in relation to the method of feeding practice. *Kor. J. Nutr.* **29**(2), 143-152 (1996).
  6. CODEX ALIMENTARIUS: Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants CODEX Stan 72-1981, FAO, WHO (2011).
  7. Food Code of Korea. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2018).
  8. AOAC official method 2005.07., Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20<sup>th</sup> Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD (2016).
  9. Thomas, J.B., Kline, M.C., Gill, L.M. Yen, J.H., Diewer, D.L., Sniegowski, L.T., Sharpless, K.E.: Preparation and value assignment of standard reference material 968c fat-soluble vitamins, carotenoids, and cholesterol in human serum. *Clin. Chim. Acta*, **305**, 141-155 (2001).
  10. David, C.W., Anja, B., Harvey, I., Adrienne, M.: Determination of vitamin A and vitamin E esters in infant formulae and fortified milk powders by HPLC : Use of internal standardisation. *Food Chem. Acta*, **197**, 457-465 (2016).
  11. AOAC official method 2016.13., Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 20<sup>th</sup> Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD (2016).
  12. Standards for health functional food of Korea. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea (2018).
  13. Rodeney, J.B. : Determination of  $\alpha$ -and  $\beta$ -carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **34**(3), 409-412 (1986).
  14. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL 19<sup>th</sup> Ed., Appendix L. AOAC INTERNATIONAL, Dr. George WL Jr, Recommended Guidelines for SPIFAN Single Laboratory Validation (SLV) (2012).