Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 37, No. 6, 339-346, 2024
https://doi.org/10.5806/AST.2024.37.6.339

A simple method to determine folic acid in soft-capsule-type dietary supplements using heat and ultrasound-assisted dissolution and liquid chromatography

Young Min Kim[1†], Jun Yeop Kim[1†], Ye Bin Shin[1], Min Kyeong Kwon[1], Jin Hwan Kim[1], Yoon Gyoon Kim[1], Dong-Kyu Lee[2], Sang Beom Han[2], and Yong Seok Choi[1,★]

[1]College of Pharmacy, Dankook University, 119 Dandaero, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, South Korea
[2]College of Pharmacy, Chung-Ang University, 84 Heukseok-ro, Dongjak--gu, Seoul, South Korea

(2024. 7. 18. 접수, 2024. 8. 23. 수정, 2024. 8. 26. 승인)

가온 초음파 용출 및 액체크로마토그래프를 활용한 연질 캡슐 건강기능식품 중 엽산 분석법 개발

김영민[1] · 김준엽[1] · 신예빈[1] · 권민경[1] · 김진환[1] · 김윤균[1] · 이동규[2] · 한상범[2] · 최용석[1,★]

[1]단국대학교 약학대학, [2]중앙대학교 약학대학

(Received July 18, 2024; Revised August 23, 2024; Accepted August 26, 2024)

Abstract: Folic acid, a form of vitamin B9, plays a critical role in producing healthy blood cells, developing the fetal nervous system, and breaking down homocysteine to maintain its optimal blood level. Consequently, a wide variety of dietary supplements containing folic acid are available in the market, including tablets, powders, hard capsules, and soft capsules. However, our research group recently discovered that the folic acid assay (II) specified in the Health Functional Food Code of South Korea is not applicable to soft-capsule-type folic acid dietary supplements. To address this issue, a simple method for determining folic acid content in soft-capsule-type dietary supplements was developed. This approach combines heat and ultrasound-assisted dissolution with liquid chromatography, utilizing a UV absorbance detector. The method underwent validation following the guidelines set by the Ministry of Food and Drug Safety. All validation parameters examined in this study met the acceptable criteria outlined in the guidelines. These parameters include selectivity, linearity ($r^2 \geq 0.999$), a lower limit of quantification (0.820 μg/mL), accuracy (expressed as recovery between 100.36 % and 102.81 %), repeatability (with relative standard deviation (RSD) values for recovery ranging from 0.26 % to 0.45 %), and reproducibility (with an RSD value of 0.09 % for interlaboratory recovery). Furthermore, the practical applicability of the validated method was confirmed by analyzing soft-capsule-type folic acid dietary supplements. The experimental content-to-nominal content ratio ranged from 108.60 to 113.27 %. Therefore, the present method has the potential to enhance the safety management system for dietary supplements in South Korea.

†These authors contributed equally to this work.
★ Corresponding author
Phone : +82-(0)41-550-143
E-mail : 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.

요 약: 엽산은 비타민 B9의 한 형태로 태아 신경관 정상 발달, 적혈구 생성, 혈중의 과도한 호모시스테인 분해에 필수적인 요소로 알려져 있어, 정제, 분말, 경질 캡슐, 연질 캡슐을 포함하는 다양한 제형의 엽산 건강기능식품이 유통되고 있다. 그러나, 본 연구진은 최근 현 건강기능식품공전 중 엽산 제2시험법의 연질 캡슐 건강기능식품 적용에 한계가 있음을 확인하였다. 따라서, 본 논문에 가온 초음파 용출 및 액체크로마토그래프에 기반한 신규 연질 캡슐 건강기능식품 중 엽산 시험법의 개발을 보고하는 바이다. 식품의약품안전평가원 가이드라인에 의거하여 신규 개발 시험법은 밸리데이션 되었으며 모든 항목 결과가 가이드라인 기준을 만족하는 것(직선성 $r^2 \geq 0.999$, 특이성, 정량한계 0.820 μg/mL, 정확도(회수율) 100.36 – 102.81 %, 반복성(회수율의 상대표준편차) 0.26 – 0.45 %, 재현성(실험실 간 회수율의 상대표준편차) 0.09 %)을 확인하였다. 또한 유통 연질 캡슐 엽산 건강기능식품 제품을 활용한 적용성 평가에서도 표시 함량 대비 함량 시험 결과의 비율이 108.60 – 113.27 %로 확인(적합 판정 구간: 80 – 150 %)되어, 성공적인 신규 시험법의 개발을 재확인하였다. 따라서, 신규 개발 시험법은 향후 연질 캡슐 엽산 건강기능식품 관리에 활용하여 국내 건강식품안전관리 발전에 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

Key words: folic acid, heat and ultrasound-assisted dissolution, liquid chromatography, soft capsule, dietary supplements, Health Functional Food Code

1. 서 론

엽산(*Fig.* 1)은 비타민 B군에 포함되는 수용성 비타민으로 아스파라거스, 시금치, 양상추 등의 녹색 잎채소와 동물의 간에서 발견된다.[1-3] 엽산은 구조적으로 프테리딘, 파라아미노벤조산과 하나 이상의 글루탐산 분자로 이어져 구성되어 있고,[4] 이러한 구조는 다양한 형태의 단일 탄소대사를 가능하게 하며 아미노산과 핵산 대사에 필요한 효소의 조효소로 작용하는 특성을 갖는다.[5,6] 엽산은 뇌졸중 위험 감소, 심혈관계 위험인자 저하, 혈액 중 호모시스테인 정상 수준 유지, 태아 신경관 발달 등의 많은 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있어 다양한 형태의 건강기능식품에 사용되고 있다.[7-10] 특히 대한민국 정부는 국내 엽산의 많은 생산 및 유통량을 고려하여 이를 고시형 건강기능식품으로 지정하였고, 엽산의 함량을 미생물학적으로 구하는 방법인 엽산 제1시험법과 용출 및 고속액체크로마토그래프(HPLC)를 활용하는 엽산 제 2, 3 시험법이 포함된 건강기능식품공전을 토대로 이를 관리하고 있다.[11] 참고로 해외의 경우, 엽산 시험법이 미국 약전에 수재되어 있는데, 고상제제와 액상 제제에 상이한 전처리법을 적용하도록 하고 있으며 분석법으로는 HPLC를 활용하도록 하고 있다.[12]

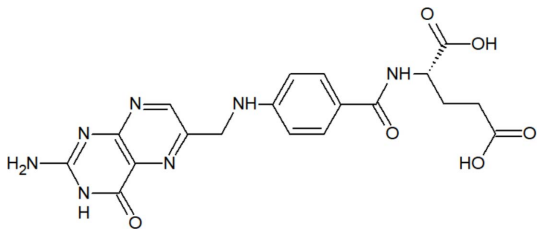

Fig. 1. Chemical structure of folic acid

본 연구진은 최근 현 건강기능식품공전 중 엽산 제2시험법의 연질캡슐 건강기능식품 적용에 한계가 있음을 확인하였고, 이에 대한 해결책을 마련하기 위하여 연관 시험법에 대한 고찰 및 비교를 진행하였다. 그 결과, 가온 초음파 용출 및 HPLC에 기반한 연질 캡슐 건강기능식품 중 엽산 시험법을 신규 개발하였고, 개발 시험법의 효용성 및 적용성도 추가적으로 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

Water (물), acetonitrile (아세토니트릴)은 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)의 HPLC 등급 시약, sodium hydroxide (수산화나트륨), tetrabutylammonium bromide (테트라부틸암모늄 브롬화물)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 reagent 등급 시약, disodium hydrogen phosphate (인산수소이나트륨), sodium dihydrogen phosphate (인산이수소나트륨)은Sigma-Aldrich의 HPLC 등급 시약을 사용하였고, 엽산 표준물질로는 Sigma-Aldrich의 분석용 표준품을 사용하였다.

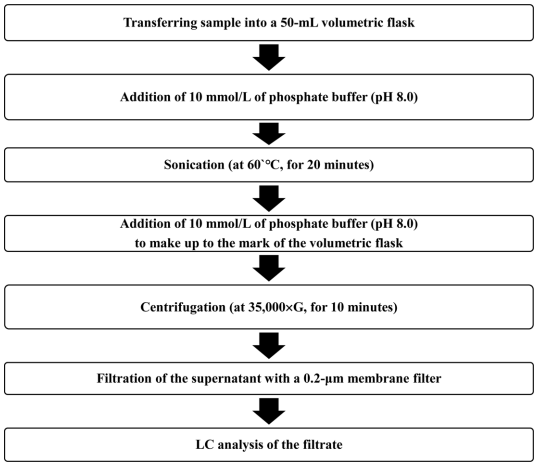

Fig. 2. Schematic diagram of the present method using heated ultrasound extraction and liquid chromatography.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 현행 건강기능식품공전 시험법[11]

1) 표준원액의 조제

엽산 표준물질 100 mg을 100 mL의 용량 플라스크에 취하고 0.1 mol/L 수산화나트륨 수용액으로 초음파를 활용하여 용해하여, 엽산 표준원액(1000 mg/L)을 조제하였다. 제작한 표준원액은 4 ºC이하 암소 보관하였다.

2) 표준용액의 조제

표준원액 1 mL를 100 mL의 용량 플라스크에 취하고 희석액으로 표선까지 맞추어 엽산의 농도가 10 mg/L가 되도록 희석하였다. 단, 희석액은 1 L의 용량 플라스크에 1.6120 g 테트라부틸암모늄 브롬화물을 취하고 10 mM 인산수소이나트륨과 10 mM 인산이수소나트륨을 5.4:4.6의 부피비로 혼합하여pH 7.2로 조정한 인산완충용액을 표선까지 가하여 1 L가 되게 한 뒤 초음파를 활용하여 혼합하고 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하여 조제하였다.

3) 시험용액의 조제

엽산 약 250 μg에 해당하는 시료를 취하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 10 mM인산완충용액(pH 8.0)을 첨가하였다. 이를 30분간 초음파를 가하며 용해시킨 후 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)을 표선까지 맞추어 넣었다. 제조된 용액을 원심분리(조건 35,000 × g, 10 min)하고 취한 상등액을 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였다.

4) 고성능액체크로마토그래프

조제된 표준용액과 시험용액(20 μL)을 HPLC에 주입하여 분석하였다. HPLC는 Waters (Milford, MA, USA)의 2695 Separations module 및 996 Photodiode array detector을 사용하였으며 분석 컬럼은 Phenomenex (Torrance, CA, USA)의 Luna C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μm)을 사용하였다. 이동상 조성 및 유량은 각각 표준용액 조제에 활용한 희석액과 아세토니트릴의 8:2 부피비 혼합용액 및 1.0 mL/min을 사용하였고, 칼럼온도는 40 ºC로 설정하였으며, 280 nm 파장에서 흡광도를 관찰하였다. 검량선 작성 및 엽산 정량은 각각의 크로마토그램 중 엽산 피크의 면적값을 활용하여 수행하였으며 시료 중 엽산 함량(mg/100 g) 계산은 아래의 공식을 활용하였다.

$$\text{엽산(mg/100 g)} = C \times (a \times b) / S \times 100 / 1{,}000$$

C: 시험용액 중의 엽산의 농도 (μg/mL)
a: 시험용액의 전량 (mL)
b: 희석배수
S 시료 채취량 (g)

2.2.2. 신규 개발 시험법

1) 표준원액의 조제

현 건강기능식품공전 시험법의 표준원액 조제 방법을 활용하였다.[11]

2) 표준용액의 조제

현 건강기능식품공전 시험법의 표준용액 조제 방법을 활용하였다.[11]

3) 시험용액의 조제

엽산 약 250 μg에 해당하는 시료를 취하여 50 mL 부피 플라스크에 넣고, 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)을 첨가한 후, 60 ºC 수욕에서 20분 간 초음파를 가하며 용해시켰다. 단, 때때로 고체 덩어리의 응집을 최소화시키기 위하여 부피 플라스크를 흔들어 시료를 용해시켰다. 이후 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)을 가하여 표선까지 맞추고 원심분리(35,000 xg, 10분)하여 얻은 상등액 1 mL를 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다(*Fig.* 2).

4) 고성능액체크로마토그래프

현 건강기능식품공전 시험법의 고성능액체크로마토그래프 방법을 활용하였다.[11]

결과 및 고찰

3.1. 현 건강기능식품공전 시험법 적용성 평가

시장에서 현재 유통 중인 엽산 포함 건강기능식품

Table 1. The practical sample applicability of the current folic acid assay (II) in Health Functional 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 (%)	[a]Pass (P)/ Fail (F)
1	Product 1	Tablet	1.43	1.60	0.13	112.40	P
2	Product 2	Tablet	2.67	2.67	0.68	135.88	P
3	Product 3	Tablet	1.11	0.93	0.13	83.85	P
4	Product 4	Tablet	1.33	1.97	0.45	147.88	P
5	Product 5	Tablet	6.06	5.50	0.33	92.20	P
6	Product 6	Hard capsule	1.24	1.27	0.03	102.95	P
7	Product 7	Hard capsule	2.00	1.64	0.25	82.38	P
8	Product 8	Hard capsule	2.67	2.57	0.07	96.40	P
9	Product 9	Powder	0.20	0.24	0.03	123.26	P
10	Product 10	Powder	0.16	0.14	0.01	86.68	P
11	Product 11	Powder	0.30	0.34	0.03	113.14	P
12	Product 12	Powder	0.20	0.17	0.02	83.03	P
13	Product 13	Powder	0.10	0.13	0.02	133.03	P
14	Product 14	Soft capsule	0.57	0.39	0.13	67.67	F
15	Product 15	Soft capsule	1.60	0.96	0.45	60.14	F

[a]The range of B/A × 100 (%) to satisfy the practical sample applicability is 80-150 %.

15종(정제 5종, 경질 캡슐 3종, 분말 5종, 연질 캡슐 2종)을 구입하여 현재 건강기능식품공전 엽산 제2시험법의 적용성을 평가하였으며(n = 3) 함량 시험 결과의 표시 함량 대비 80~150 % 만족 여부를 적합, 부적합의 기준으로 활용하였다.[11] 시험법 적용성 평가를 위한 시료 구성은 건강기능식품 규제를 담당하고 있는 식품의약품안전평가원 영양기능연구과와 논의를 통하여 다음과 같이 정하였다. 제형 종류는 시중에 많이 유통되고 있는 3개 제형(정제, 분말, 캡슐), 제형 별 제품 수는 5개로 하였고, 캡슐의 경우, 유통 정도를 고려하여 경질 캡슐 3종, 연질 캡슐 2종을 적용성 평가 시료로 정하였다. 그 결과, 연질 캡슐 2종을 제외한 13종 유통 건강기능식품 제품의 결과는 표시 함량 대비 82.38~147.88 %로 해당 시험법 적용에 적합한 것으로 확인되었으나, 연질 캡슐 2종의 결과는 표시 함량 대비 60.14~67.67 %로 적합 기준 범위를 벗어남을 확인하였다(*Table* 1). 따라서, 현 건강기능식품공전의 엽산 제2시험법은 연질 캡슐 제품 적용에 한계가 있는 것으로 판단되었으며 연질 캡슐 중 엽산 분석법 개발의 필요성이 확인되었다.

3.2. 신규 시험법 개발을 위한 시험법 간 비교 및 고찰

연질 캡슐 시료 중 엽산 분석법 개발을 위한 문헌 조사 결과, 미국 약전의 건강기능식품/비타민류 부분에 캡슐 시료 중 엽산 시험법이 포함되어 있음을 확인하였다.[12] 미국 약전 건강기능식품/비타민류 부분의 수용성 비타민 및 미네랄 캡슐 중 엽산 제2 시험법의 경우, 시료를 가온 조건(60 ºC)에서 메탄올, EDTA-2Na, 암모니아 혼합 수용액에 15분 동안 진탕하여 녹이고, 이를 역상 액체크로마토그래프법으로 분석하도록 되어 있어, 시료를 실온에서 인산 완충용액에 30분동안 초음파 용출시키는 시료 전처리법을 갖는 현 공전 시험법과 시험 용액 조제 부분에서 상당한 차이를 보이고 있다.[12] 그러나, 엽산의 logP 값(-0.99)[13]을 고려해 봤을 때, 인산 완충용액의 엽산 용해력에 심각한 문제가 있다 보기는 어렵다고 판단되어, 미국 약전 전처리법의 가온 조건에서의 용출을 참고한 가온 용출 또는 가온 초음파 용출을 현 공전 시험법에 반영하는 형태로 신규 시험법 개발을 진행하였다. 참고로 현 공전 시험법의 30분 초음파 용출 시 추출 용액 온도는 25 ºC에서 36 ºC까지 상승함을 확인하였다.

3.3. 신규 시험법 개발

본 시험법의 개발 목적은 연질 캡슐 중 엽산 분석에 한계를 나타낸 현 건강기능식품공전 중 엽산 제2시험법을 보완 및 확충하는 것이므로, 최대한 시험법 간 조화를 지향하고자 하였다. 따라서, 시험용액 제조

Table 2. Comparisons of various dissolution conditions

No.	Temperature (℃)	Ultrasound assistance	Dissolution duration (minutes)	[a]B/A × 100 (%)	[b]Pass (P)/Fail (F)
1	40	×	30	53	F
2	60	×	30	105	P
3	80	×	30	106	P
4	60	o	10	88	P
5	60	o	20	99	P
6	60	o	30	109	P
7	80	o	10	86	P
8	80	o	20	105	P
9	80	o	30	106	P

[a]B/A × 100 (%) = the experimental content (mg/g) / the nominal content (mg/g) × 100
[b]The range of B/A × 100 (%) to satisfy the practical sample applicability is 80 – 150 %.

Table 3. Comparisons among the developed folic acid assay (A), the current folic acid assay (II) in Health Functional Food Code of South Korea (B), and the assay for folic acid ('Method 2') in 'Water-Soluble Vitamins with Minerals Capsules', Vitamins/Dietary Supplements, United States Pharmacopoeia (C)

Category	A	B	C
Target product form	Soft capsule (also available for tablet, hard capsule, and powder)	NA	Capsules
Dissolution method	Ultrasound-assisted dissolution at 60 ℃ for 20 minutes	Ultrasound-assisted dissolution at room temperature for 30 minutes	Shaking for 15 minutes in a water bath maintained at 60 ℃
Instrumental analysis method	[a]RP-HPLC (w/an absorbance detector) – Column: C18 (4.6 × 250 mm) – Wavelength: 280 nm	[a]RP-HPLC (w/an absorbance detector) – Column: C18 (4.6 × 250 mm) – Wavelength: 280 nm	[a]RP-HPLC (w/an absorbance detector) – Column: C8 (4.6 × 250 mm) – Wavelength: 270 nm

[a]Reversed phase high pressure liquid chromatography

방법 이외의 나머지 부분은 원칙적으로 현재의 공전 시험법을 준용하였다. 시험용액 제조 방법의 경우에도 용매의 종류(10 mM 인산완충용액) 및 시료 용액 최종 부피(50 mL)를 현 공전 시험법과 동일하게 하고, 미국 약전 시험법의 가온 용출 조작을 참고하여 가온 용출 또는 가온 초음파 용출 조건(온도 및 시간)만 최적화하여 추가하는 것을 목표로 하였다. 이를 위하여, 현 공전 시험법 적용이 부적합한 것으로 확인된 연질캡슐 제품 1종을 대상으로 현 공전 시험법의 30분 초음파 용출 시 추출 용액 최고 온도(36 ℃) 보다 높은 3가지 가온 용출 온도 조건(40, 60, 80 ℃)을 설정하여 비교 실험(현 공전 시험법의 용출 시간과 동일한 30분 용출)한 결과, 60, 80 ℃ 실험의 표시 함량 대비 함량 시험 결과 비율(%) 값이 각각 105, 106 %로 적합 판정 기준 범위(80~150 %) 내에서 확인되었다(*Table* 2). 따라서, 추출 시간 단축을 통한 실험 효율성 증대를 위하여, 60, 80 ℃ 가온 조건에서 세가지 시간 조건(10, 20, 30분) 동안 초음파 용출 조작의 영향을 추가로 비교하였다. 그 결과, 모든 표시 함량 대비 함량 시험 결과 비율(%) 값 (86~109 %)이 적합 판정 기준 범위(80~150 %) 내에서 확인되었다. 이는 가온 및 초음파 조작에 의한 용출 효율의 증가에 의한 것으로 예측되고, 실험 결과 중 표시 함량 대비 함량 시험 결과 비율(%) 값이 가장 100 %에 근접(99 %)하면서, 기존의 30분 용출 시간을 단축시킬 수 있는 60 ℃ 및 20분 초음파 용출 조작을 본 시험법에 적용시키기로 하였다(*Table* 2). 신규 개발 시험법, 현 공전 시험법, 미국 약전 시험법 간의 명확한 비교를 위하여 *Table* 3에 개별 시험법들의 특징을 요약 정리하였다.

3.4. 신규 시험법 밸리데이션

신규 개발 시험법의 효용성을 검증하기 위하여 '기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드(식품의약품안전처, 2022)'에 기반한 밸리데이션을 진행하였

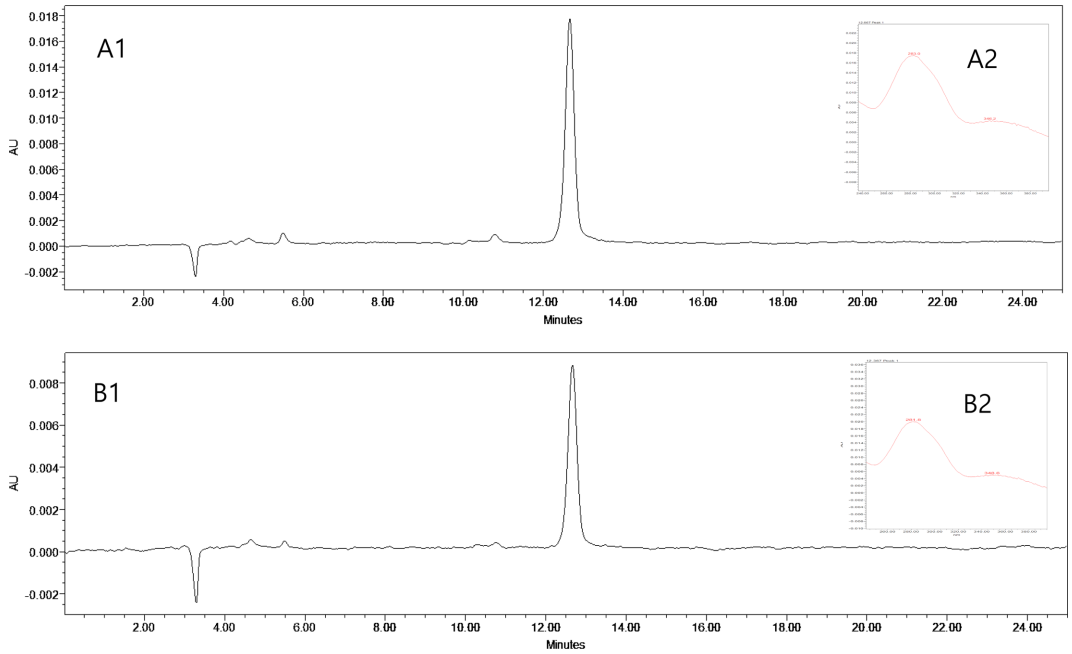

Fig. 3. Chromatograms (1) and absorbance spectra (2) from the application of the developed method to a folic acid standard solution (A) and a soft-capsule-type dietary supplement containing folic acid (B).

Table 4. Linearity and the lower limit of quantitation from liquid chromatography of folic acid standard solutions (n = 3)

Range (μg/mL)	Slope	y-Intercept	r^2	[a]LLOQ (μg/mL)
1.0 – 10.0 (7 Concentrations)	57,028.33±2,153.54	3673.90±4674.53	0.9995±0.0002	0.820

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

고, 밸리데이션 항목으로 특이성, 직선성, 정량한계, 정확성, 반복성, 재현성을 확인하였다.[14] 특이성의 경우, 건강기능식품 크로마토그램과 표준품 크로마토그램을 비교하여 엽산 피크의 유지 시간 및 해당 피크로 얻은 흡광 스펙트럼의 일치를 확인하였다 (*Fig.* 3). 직선성은 시험 용액 중 엽산이 검출될 수 있는 농도 범위를 아우르는 총 7개 농도(1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 7.0, 8.0, 10.0 μg/mL)의 표준 용액을 활용하여 검토되었는데, 3반복 실험 결과, 결정계수(r^2) 0.9995 ± 0.0002의 높은 직선성을 확인하였다(*Table* 4). 정량 한계(the lower limit of quantitation)는 직선성 실험에서 도출된 y절편값의 표준편차와 기울기의 평균값을 활용하여 계산되었고(아래 식 참고), 그 결과값인 0.820 μg/mL은 직선성이 확인된 검량선의 가장 낮은 농도 값인 1.0 μg/mL 보다 하단에 존재하였다. 따라서, 검량선 구간 내에서 얻은 모든 정량 결과는 신뢰할 수 있는 것으로 확인되었다(*Table* 4).[15]

Table 5. Accuracy (recovery, R), repeatability (the relative standard deviation, RSD of R) and reproducibility (the RSD of interlaboratory R) from liquid chromatography of folic acid in soft-capsule-type dietary supplements

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 (%)
Liquid (from soft capsules)	Folic acid	2.5	102.81 ± 0.46	0.45	-	-
		5.0	100.36 ± 0.26	0.26	103.40 ± 0.09	0.09
		7.5	100.37 ± 0.40	0.39	-	-

Table 6. The practical sample applicability of the developed folic acid assay

No.	Product name	Dosage form	Nominal content (A) (ppb)	Mean of experimental content (B) (ppb)	Standard deviation of experimental content (ppb)	B/A × 100 (%)	[a]Pass (P)/ Fail (F)
1	Product 1	Tablet	1.43	1.93	0.35	135.27	P
2	Product 2	Tablet	2.67	3.74	0.76	140.23	P
3	Product 3	Tablet	1.11	1.32	0.15	118.68	P
4	Product 4	Tablet	1.33	1.96	0.44	146.89	P
5	Product 5	Tablet	6.06	8.14	1.47	134.33	P
6	Product 6	Hard capsule	1.24	1.15	0.06	92.62	P
7	Product 7	Hard capsule	2.00	1.82	0.13	90.98	P
8	Product 8	Hard capsule	2.67	2.57	0.07	96.24	P
9	Product 9	Powder	0.20	0.24	0.03	125.55	P
10	Product 10	Powder	0.16	0.14	0.03	126.00	P
11	Product 11	Powder	0.30	0.36	0.05	121.22	P
12	Product 12	Powder	0.20	0.20	0.00	100.27	P
13	Product 13	Powder	0.10	0.09	0.00	89.44	P
14	Product 14	Soft capsule	0.57	0.62	0.03	108.60	P
15	Product 15	Soft capsule	1.60	1.81	0.15	113.27	P

[a]The range of B/A × 100 (%) to satisfy the practical sample applicability is 80 – 150 %.

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

정확성은 엽산을 함유하지 않은 연질 캡슐 형태의 건강기능식품 내용물에 각각 다른 부피의 엽산 표준원액을 spiking하여 만든 회수율 시료(2.5, 5.0, 7.5 mg/g)를 이용하여 확인하였다(n = 5). 그 결과, 회수율은 100.36~102.81 %으로 기준인 92~105 %를 만족하였고, 회수율의 상대표준편차는 0.26~0.45 %로 반복성 기준인 2 % 이하도 만족하였다(*Table* 5). 마지막으로 본 연구진 내 상이한 3개 연구실에서 5.0 mg/g 회수율 시료를 이용하여 진행한 재현성 시험에서는 실험실 별 5 반복 실험, 즉 총 15 반복 실험을 통하여 확인된 회수율의 상대표준편차가 0.09 %로 재현성 기준인 4 % 이하를 만족하였다(*Table* 5). 참고로 3개 연구실에서 활용한 LC system은 각각 Waters 2695 system (with a Waters 996 detector), Waters 1525 system (with a Waters 2487 detector), Aglent 1260 Infinity system (with a Waters 2487 detector)이다. 따라서, 신규 개발된 시험법은 식품의약품안전처 밸리데이션 가이드라인 상 모든 항목 기준을 만족하였으므로, 그 효용성이 성공적으로 확인되었다.

3.5. 신규 개발 시험법 적용성 평가

앞에서 설명된 현 공전 시험법 적용성 평가에 활용했던 동일한 건강기능식품 제품 15종을 신규 개발 시험법을 이용하여 분석하고 적용성을 평가(n = 3) 하였으며 표시 함량 대비 함량 시험 결과의 80~150 % 만족 여부를 적합 또는 부적합의 기준으로 활용하였다.[11] 현 공전 시험법의 적용이 부적합 것으로 확인되었던 2종의 연질 캡슐의 경우, 표시 함량 대비 108.60~113.27 %의 결과를 보여, 신규 개발 시험법의 연질 캡슐에 대한 적용성에 문제가 없음을 확인시켜 주었다(*Table* 6). 다만, 정, 경질 캡슐, 분말 제품 13종의 경우, 표시 함량 대비 89.44~146.89 %의 결과로 적합 기준을 만족시키기는 하나, 해당 제품의 현 시험법 적용성 평가 결과(82.38~147.88 %)와 큰 차이를 보이고 있지는 않다(*Table* 1 및 *Table* 6). 따라서, 신규 개발 시험법은 건강기능식품 업계의 혼란을 최소화하는 차원에서 최초에 의도된 바와 같이 연질 캡슐 건강기능식품을 그 적용 대상으로 한정하고, 현 공전 시험법의 적용 대상은 연질 캡슐을 제외한 건강기능식품으로 한정하는 것이 더욱 합리적일 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구진은 최근 현 건강기능식품공전 중 엽산 제2시험법의 연질 캡슐 건강기능식품 적용에 한계가 있음을 확인하였고, 이를 해결하기 위하여 가온 초음파 용출 및 HPLC에 기반한 연질 캡슐 건강기능식품 중

엽산 시험법을 신규 개발하였다. 개발 시험법은 식품의약품안전처 밸리데이션 가이드라인을 모두 만족하였고, 유통 엽산 건강기능식품을 활용한 신규 시험법의 적용성도 성공적으로 확인되었다. 따라서, 신규 개발 시험법은 향후 국내 유통 연질 캡슐 형태의 건강기능식품 중 엽산 관리에 활용되어 국가 건강식품안전관리에 도움이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

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

References

1. E. E. C. Fager, O. E. Olson, R. H. Burris, and C. A. Elvehjem, *J. Food Sci.,* **14**, 1-8 (1949). https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1949.tb16203.x
2. E. Shuhei, *Congenit. Anom*., **57**, 138-141 (2017). https://doi.org/10.1111/cga.12233
3. Folate, Fact Sheet for Health Professionals, https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional/, Accessed on February 29, 2024.
4. Y. Shulpekova, V. Nechaev, S. Kardasheva, A. Sedova, A. Kurbatova, E. Bueverova, A. Kopylov, K. Malsagova, J. C. Dlamini, and V. Ivashkin, *Molecules*, **26**, 3731 (2021). https://doi.org/10.3390/molecules26123731
5. Y. H. Han and T. Hyun, *J. Nutr. Health*, **55**, 330-347 (2022). https://doi.org/10.4163/jnh.2022.55.3.330
6. M. S. Field and P. J. Stover. *Ann. N. Y. Acad. Sci*., **1414**, 59-71 (2018). https://doi.org/10.1111/nyas.13499
7. X. Wang, X. Qin, H. Demirtas, J. Li, G. Mao, Y. Huo, N. Sun, L. Liu, and X. Xu, *Lancet,* **369**, 1876-1882 (2007). https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60854-X
8. H. T. Yang, M. Lee, K. S. Hong, B. Ovbiagele, and J. L. Saver, *Eur. J. Intern. Med.,* **23**, 745-754 (2012). https://doi.org/10.1016/j.ejim.2012.07.004
9. A. G. James, J. B. Stacey, G. Yong, and Y. H. Yu, *Rev. Obstet. Gynecol.,* **4**, 52-59 (2011). https://doi.org/10.18370/2309-4117.2017.34.57-63
10. L. E. Brattström, B. Israelsson, J-O. Jeppsson, and B. L. Hultberg. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*., **48**, 215-221 (1988). https://doi.org/10.3109/00365518809167487
11. 건강기능식품의 기준 및 규격(식품의약품안전처 고시 제2023-91호, (2023.12.27.).
12. United States Pharmacopeia and National Formulary 2021 (USP 44-NF 39).
13. L. C. López, O. Varea, S. Navarro, J. A. Carrodeguas, N. Sanchez de Groot, S. Ventura, J. Sancho. *Int. J. Mol. Sci*., **17**, 964 (2016). https://doi.org/10.3390/ijms17060964
14. 건강기능식품 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드(식품의약품안전처 안내서-0769-06, 2023.05.23.)
15. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1), https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf, Accessed on February 28, 2024.