

식품의약품안전처 공고 제2023-181호

**건강기능식품의 기준 및 규격 일부개정고시(안)
행정예고**

2023. 4. 13.

식품의약품안전처

식품의약품안전처 공고 제2023-181호

「건강기능식품의 기준 및 규격」(식품의약품안전처고시 제2023-14호, 2023.2.17.)을 일부 개정함에 있어 국민에게 미리 알려 의견을 수렴하고자 그 취지, 개정 이유 및 주요 내용을 「행정절차법」 제46조에 따라 다음과 같이 공고합니다.

2023년 4월 13일

식품의약품안전처장

「건강기능식품의 기준 및 규격」 일부개정고시(안) 행정예고

1. 개정 이유

다양한 단백질 제품의 제조가 가능하도록 단백질의 제조방법을 삭제하고, 상황버섯추출물의 원재료 학명 재정립에 따라 학명을 개정하는 한편, 쏘팔메토 열매 추출물의 규격과 관련된 시험법을 추가하고자 함

2. 주요 내용

가. 단백질의 제조방법 삭제(안 제 3. 1. 1-27 1))

- 1) 단백질 제조에 사용되는 원재료는 확대되었으나, 제조방법이 한정되어 있어 다양한 제품 제조에 한계가 있음.
- 2) 단백질의 제조기준 중 제조방법을 삭제하여 제조방법을 확대함.

3) 단백질 제조방법의 확대로 다양한 제품이 출시 될 것으로 기대됨.

나. 기능성 원료 원재료 학명 현행화(안 제 3. 2. 2-65 1))

- 1) 상황버섯추출물의 원재료인 상황버섯의 학명이 재정립되었음
- 2) 상황버섯추출물의 원재료 학명을 재정립된 학명으로 개정함
- 3) 영업자 및 소비자에게 기능성 원료의 원재료에 대한 정확한 정보를 제공함.

다. 개별성분별 시험법 개정 및 신설(안 제 3. 2. 2-28 4), 제 4. 3. 3-32 및 3-38)

- 1) 신설된 규격의 시험을 위한 시험법 개정 및 신설 필요
- 2) 쏘팔메토 열매 추출물 규격 관련 지방산 시험법 개정 및 식물스테롤 시험법 신설
- 3) 시험법 개정 및 신설로 효율적이고 정확한 분석 가능

3. 의견 제출

「건강기능식품의 기준 및 규격」 일부개정고시(안)에 대하여 의견이 있는 단체 또는 개인은 2023년 월 일까지 다음 사항을 기재한 의견서를 식품의약품 안전처장(우편번호 : 28159, 주소 : 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처, 참조 : 식품기준과, (전화) 043-719-2443, (팩스) 043-719-2400)에게 제출하여 주시기 바랍니다.

가. 예고사항에 대한 항목별 의견(찬·반 여부와 그 이유)

나. 성명(단체의 경우 단체명과 그 대표자의 성명), 주소 및 전화번호

다. 기타 참고사항

식품의약품안전처 고시 제2023- 호

「건강기능식품에 관한 법률」 제14조 및 제15조에 따른 「건강기능식품의 기준 및 규격」(식품의약품안전처 고시 제2022-69호, 2022.9.15.)을 다음과 같이 개정 고시합니다.

2023년 월 일

식품의약품안전처장

건강기능식품의 기준 및 규격 일부개정고시(안)

건강기능식품의 기준 및 규격 일부를 다음과 같이 개정한다.

제 3. 1. 1-27 1) (2)를 삭제한다.

제 3. 2. 2-28 4) (5)를 다음과 같이 신설한다.

(5) 지방산 : 제 4. 3-32-2 지방산(제2법)

제 3. 2. 2-28 4) (6)를 다음과 같이 신설한다.

(6) 식물스테롤 : 제 4. 3-38-2 식물스테롤(제2법)

제 3. 2. 2-35 1) (1) 중 “*Avena sterilis*”를 “*Avena sterilis*”로 한다.

제 3. 2. 2-43 1) (1) 중 “*Chicorium*”을 “*Cichorium*”로 한다.

제 3. 2. 2-65 1) (1)과 (4) 중 “*Phellinus linteus*”를 “*Sanghuangporus sanghuang*”으로 한다.

제 4. 3. 3-32-2 4.2.1에 ※을 다음과 같이 신설한다.

※ 쏘팔메토 열매 추출물의 경우 내부표준물질 첨가한 시험용액(A) 및 내부표준물질을 첨가하지 않은 시험용액(B)을 각각 실험하여 비교한다.

제 4. 3. 3-32-2 5.2.1.1에 ※을 다음과 같이 신설한다.

※ 내부표준물질을 첨가하지 않은 시험 용액(B) 에서 내부표준 물질 ($C_{11:0}$) 의 피크가 나타나는 경우, $Pt_{C_{11:0}}$ 은 시험용액 (A)의 피크면적에서 시험용액(B)의 피크면적 값을 감하여 보정한다.

시험용액(A)의 $Pt_{C_{11:0}}$ - [시험용액 (B)의 ($Pt_{C_{11:0}}$ / 시험용액(B)의 W_{spl}) × 시험용액(A)의 W_{spl}]

제 4. 3. 3-38-1을 다음과 같이 신설한다.

3-38-1 식물스테롤(제1법)

제 4. 3. 3-38-2를 다음과 같이 신설한다.

3-38-2 식물스테롤(제2법)

1. 시험방법의 요약

본 시험법은 시료를 검화시킨 후 톨루엔으로 식물스테롤 성분을 추출하고

트리메틸실릴(TMS) 에테르화하여 유도체화 한 다음 가스크로마토그래프 /불꽃이온화검출기를 이용하여 정량하는 방법이다.

2. 장비와 재료

2.1 실험실 장비 및 소모품

2.1.1 감압농축기

2.1.2 자석교반-가열기

2.1.3 교반기(Vortex mixer)

2.1.4 분석저울 : 0.0001 g까지 측정이 가능한 것

2.1.5 초자기구 : 삼각플라스크(250 mL), 환저 플라스크(250 mL), 메스 실린더, 분액여두(500 mL)

2.2 분석장비

2.2.1 가스크로마토그래프

2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)

2.2.3 칼럼오븐

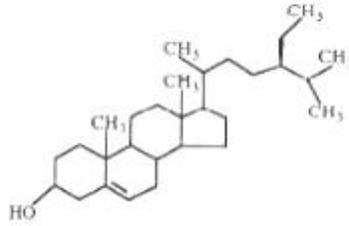
2.2.4 5%-phenyl-methyl polysiloxane(길이 25 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.17 μ m) 또는 이와 동등한 것

3. 표준물질 및 일반시약

3.1 표준물질

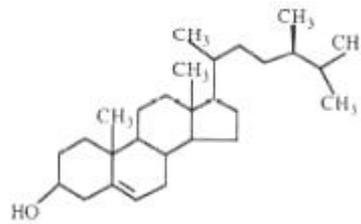
3.1.1 베타-시토스테롤(β -sitosterol)

분자식 : $C_{29}H_{50}O$, 분자량 : 414.71, CAS No. : 83-46-5



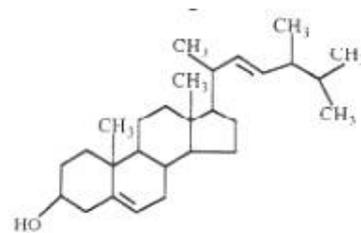
3.1.2 캄페스테롤(campesterol)

분자식 : C₂₈H₄₈O, 분자량 : 400.68, CAS No. : 474-62-4



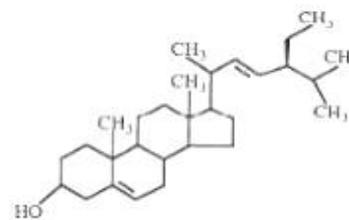
3.1.3 브라시카스테롤(brassicasterol)

분자식 : C₂₈H₄₆O, 분자량 : 398.66, CAS No. : 474-67-9



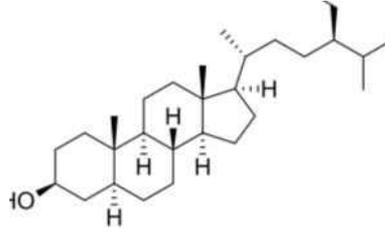
3.1.4 스티그마스테롤(stigmasterol)

분자식 : C₂₉H₄₈O, 분자량 : 412.69, CAS No. : 83-48-7



3.1.5 스티그마스타놀(stigmastanol)

분자식 : C₂₉H₅₂O, 분자량 : 416.72, CAS No. : 19466-47-8



3.2 일반시약

3.2.1 톨루엔(Toluene)

3.2.2 수산화칼륨(Potassium hydroxide)

3.2.3 에탄올(Ethanol)

3.2.4 헵탄(Heptane, GC grade)

3.2.5 디메틸포름아미드(Dimethyl formamide, DMF)

3.2.6 헥사메틸디실라잔(Hexamethyl disilazane, HMDS)

3.2.7 트리메틸클로로실란(Chlorotrimethylsilane, TMCS)

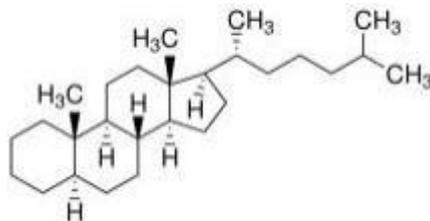
3.2.8 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)

3.2.9 유리솥

3.3 내부표준물질

3.3.1 5 α -콜레스탄(5 α -Cholestane)

분자식 : C₂₇H₄₈, 분자량 : 372.67, CAS No. : 481-21-0



3.4 시액의 제조

3.4.1 내부표준용액

5 α -콜레스탄 20 mg을 톨루엔에 녹여 20 mL로 한다.(1 mg/mL)

3.4.2 수산화칼륨용액

3.4.2.1 50%(w/w) : 수산화칼륨 500 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3.4.2.2 1 M : 수산화칼륨 56 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.

3.4.2.3 0.5 M : 1 M 수산화칼륨 용액을 증류수로 희석한다.

4. 시험과정

4.1 표준용액의 조제

4.1.1 5종의 표준물질을 각각 10 mg을 정밀하게 달아 톨루엔 10 mL에 녹여 만든다.(1 mg/mL)

4.1.2 위의 용액을 톨루엔으로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.(0.5 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

4.1.3 표준용액 1.0 mL와 내부표준물질용액 0.1 mL를 원심분리관에 넣고 질소 건조 후 잔류물을 1 mL DMF로 녹여 유도체화를 위한 표준용액으로 한다.

4.1.4 위의 용액에 HMDS 0.2 mL를 가한 후 TMCS 0.1 mL를 가하여 마개를 닫고 이를 강렬하게 30초간 교반하거나 손으로 흔들어 혼합하고 15분간 정치한다.

4.1.5 각각의 원심분리관에 헵탄 1.0 mL와 증류수 10 mL를 넣은 후 마개를 닫고 30초간 강력하게 교반하고 이를 1,600 \times g에서 2분간 원심분리한다.

4.1.6 상층의 헵탄 층을 취하여 기체크로마토그래프 측정용 표준용액으로 한다. 이 때 유도체화 된 표준용액과 시험용액은 24시간 내에 분석한다.

4.2 시험용액의 조제

4.2.1 비누화 과정

4.2.1.1 시료 0.5 ~ 2 g을 정밀하게 칭량하여 환저 플라스크에 취한다.

4.2.1.2 자석막대를 삼각플라스크에 넣고 내부표준물질 용액 1.2 mL, 95% 에탄올 40 mL과 50% 수산화칼륨용액 8 mL을 가한다 (95% 에탄올 40 mL 중 일정량을 50% 수산화칼륨용액 첨가 후 잔류물 세척에 사용하여 플라스크와 콘덴서가 같이 붙어서 떨어지지 않는 것을 방지할 수 있다.)

4.2.1.3 콘덴서를 설치하고 자석교반-가열기를 이용하여 교반하면서 가열하여 70 ± 10 분간 환류시킨다. 비누화를 위해 시료를 지속적으로 관찰하면서 덩어리가 생길 경우 유리봉으로 분산시키거나 교반하면서 50% 수산화칼륨용액을 추가하여 시험용액을 교반한다.

4.2.1.4 환류가 완료되면 가열기를 끄고 교반 중에 콘덴서의 상부를 통해 95% 에탄올 60 mL을 첨가하고 15분간 방치한다.

4.2.1.5 콘덴서를 플라스크에서 제거하고 플라스크에 마개를 막아 실온으로 냉각시킨 후 시험용액을 안정화한다.

4.2.2 추출

4.2.2.1 비누화가 끝난 시험용액을 교반하면서 톨루엔 100 mL을 첨가하고 마개를 하여 30초 이상 교반한다.

4.2.2.2 이를 세척과정 없이 500 mL 분액여두로 옮기고 1 M 수산화칼륨용액 110 mL을 넣고 10초간 강렬하게 진탕하여 정치 후 분리된 아래층을 버린다.

4.2.2.3 0.5 M 수산화칼륨용액 40 mL을 분액여두에 넣고 분액여두

를 천천히 내용물이 소용돌이가 생기도록 10초간 섞어준 후 정치하여 분리된 아래층을 버린다.

4.2.2.4 톨루엔 층을 증류수 40 mL로 천천히 분액여두를 돌려주며 수세한 후 정치하여 분리된 아래층을 버리고 수세과정을 3회 이상 반복한다. 이 때 수세과정이 반복될수록 더욱 강렬하게 진탕하며, 만약 에멀전이 발생하면 소량의 95% 에탄올을 첨가하여 분액여두의 내용물이 회오리가 생기도록 섞어준 후 정치하여 층을 분리한다. 톨루엔 층이 맑게 보일 때까지 수세과정을 계속한다.

4.2.2.5 유리솜과 약 20 g의 무수황산나트륨이 채워진 유리깔대기를 통해 수세한 톨루엔 층을 약 2 g 무수황산나트륨이 채워진 삼각플라스크로 흘려주어 탈수한다.

4.2.2.6 삼각플라스크에 마개를 막고 15분 이상 정치한다. 이 때 마개의 막음상태가 완벽하더라도 24시간 이상 방치하여서는 안된다.

4.2.2.7 추출한 톨루엔 층 25 mL을 환저 플라스크에 취하고 이를 $50\pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 감압 농축하여 건고한다. 잔류물에 아세톤 약 3 mL을 가한 후 다시 감압 농축하여 완전 건고한다.

4.2.2.8 잔류물을 3 mL DMF에 녹여 시험용액으로 한다. 이 때 시험용액의 농도는 식물스테롤 표준용액의 농도범위 안에 있어야 한다.

4.2.3 유도체화

4.2.3.1 시험용액 1.0 mL를 원심분리관에 취한다.

4.2.3.2 위의 용액에 HMDS 0.2 mL를 가한 후 TMCS 0.1 mL를 가하여 마개를 닫고 이를 강렬하게 30초간 교반하거나 손으로 흔

들어 혼합하고 15분간 정치한다.

4.2.3.3 각각의 원심분리관에 헵탄 1.0 mL와 증류수 10 mL를 넣은 후 마개를 닫고 30초간 강력하게 교반하고 이를 1,600 × g에서 2분간 원심분리한다.

4.2.3.4 상층의 헵탄 층을 취하여 기체크로마토그래프 측정용 시험용액으로 한다. 이 때 유도체화 된 표준용액과 시험용액은 24시간 내에 분석한다.

5. 분석 및 계산

5.1 기기분석

표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입부 온도	250℃
칼럼 온도	190℃(2분)-20℃/분-230℃(3분)-40℃/분-270℃(25분)
검출기 온도	300℃
캐리어 가스 및 유량	헬륨, 0.7 mL/분
Split ratio	10 : 1

5.2 결과 분석

5.2.1 검량선의 작성

유도체화한 5개의 식물스테롤 표준용액을 1 µL 각각 주입하여 얻어진 크로마토그램상의 식물스테롤 피크면적을 5α-콜레스탄 피크면적으로 나눈 값(Y축)과 식물스테롤 농도(mg/mL, X축)로 검량선을 작성한다.

5.2.2 정성시험

위의 조건에서 얻어진 크로마토그램상의 피크는 어느 측정조건

에서도 표준용액 피크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

5.2.3 정량시험

정성시험과 똑같은 조건에서 얻어진 시험결과에 의해 피크면적법에 따라 정량한다.

5.3 계산

$$5.3.1 \text{ 개별 식물스테롤 함량(mg/g)} = C \times (V_1 / S) \times (V_3 / V_2)$$

C : 검량선에서 구한 개별 식물스테롤 시험용액의 농도(mg/mL)

S : 검체량(g)

V₁ : 추출에 사용한 톨루엔의 양(100 mL)

V₂ : 농축에 사용된 톨루엔 추출액의 양(25 mL)

V₃ : 유도체화 전 잔사를 녹이는 데 사용한 DMF의 양(3 mL)

$$5.3.2 \text{ 식물스테롤 함량(mg/g)} = \text{베타-시토스테롤} + \text{캄페스테롤} + \text{브라시카스테롤} + \text{스티그마스테롤} + \text{스티그마스타놀}$$

부 칙

제1조(시행일) 이 고시는 2024년 1월 1일부터 시행한다.

제2조(적용례) 이 고시는 이 고시 시행 이후 최초로 제조·가공 또는 수입 (선적일을 기준으로 한다. 이하 같다)한 건강기능식품(원료를 포함한다. 이하 같다)부터 적용한다. 다만, 제 3. 2. 2-28 4), 제 4. 3. 3-32 및 3-38을 제외하고 이 고시 시행 전에 이미 제조·가공 또는 수입된 건강기능식품이 이 고시를 적용받고자 하는 경우 이 고시를 적용할 수 있다.

제3조(경과조치) ① 이 고시 시행 당시 검사가 접수되어 진행 중인 사항에 대하여는 종전의 규정에 따른다.

② 이 고시 시행 당시 종전의 규정에 따라 제조·가공·수입한 건강기능식품은 그 소비기한까지 판매할 수 있다.

신 · 구조문대비표

현 행	개 정 안
제 1.~ 제 2. (생 략)	제 1.~ 제 2. (현행과 같음)
제 3. 개별 기준 및 규격	제 3. 개별 기준 및 규격
1. 영양성분	1. 영양성분
1-1 ~ 1-26 (생 략)	1-1 ~ 1-26 (현행과 같음)
1-27 단백질	1-27 단백질
1) 제조기준	1) 제조기준
(1) (생 략)	(1) (현행과 같음)
(2) <u>제조방법 : 상기 원재료에서</u>	(2) <u><삭 제></u>
<u>단백질을 분리하여 정제하거나,</u>	
<u>단백분해효소나 자가분해효소로</u>	
<u>분해하여 제조하여야 함</u>	
(3) (생 략)	(3) (현행과 같음)
2) ~ 4) (생 략)	2) ~ 4) (현행과 같음)
1-28 (생 략)	1-28 (현행과 같음)
2. 기능성 원료	2. 기능성 원료
2-1 ~ 2-27 (생 략)	2-1 ~ 2-27 (현행과 같음)
2-28 쏘팔메토 열매 추출물	2-28 쏘팔메토 열매 추출물
1) ~ 3) (생 략)	1) ~ 3) (현행과 같음)
4) 시험법	4) 시험법
(1) ~ (4) (생 략)	(1) ~ (4) (현행과 같음)

현 행	개 정 안
(5) <신 설>	(5) 지방산 : 제 4. 3-32-2 지방
	산(제2법)
(6) <신 설>	(6) 식물스테롤 : 제 4. 3-38-2
	식물스테롤(제2법)
2-29 ~ 2-34 (생 략)	2-29 ~ 2-34 (현행과 같음)
2-35 귀리식이섬유	2-35 귀리식이섬유
1) 제조기준	1) 제조기준
(1) -----	(1) -----
----- <i>Avena sterilisand</i> , -	----- <i>Avena sterilis</i> , -----
-----	-----
(2) ~ (3) (생 략)	(2) ~ (3) (현행과 같음)
2) ~ 4) (생 략)	2) ~ 4) (현행과 같음)
2-36 ~ 2-42 (생 략)	2-36 ~ 2-42 (현행과 같음)
2-43 이눌린/치커리추출물	2-43 이눌린/치커리추출물
1) 제조기준	1) 제조기준
(1) ----- <i>Chicorium intybus</i>	(1) ----- <i>Cichorium intybus</i>
-----	-----
(2) ~ (3) (생 략)	(2) ~ (3) (생 략)
2) ~ 4) (생 략)	2) ~ 4) (생 략)
2-44 ~ 2-64 (생 략)	2-44 ~ 2-64 (현행과 같음)

현 행	개 정 안
2) ~ 4) (생 략)	2) ~ 4) (현행과 같음)
2-66 ~ 2-68 (생 략)	2-66 ~ 2-68 (현행과 같음)
제 4. 건강기능식품 시험법	제 4. 건강기능식품 시험법
1. ~ 2. (생 략)	1. ~ 2. (현행과 같음)
3. 개별 성분별 시험법	3. 개별 성분별 시험법
3-1 ~ 3-31 (생 략)	3-1 ~ 3-31 (현행과 같음)
3-32 지방산	3-32 지방산
3-32-1 (생 략)	3-32-1 (현행과 같음)
3-32-2 지방산(제2법)	3-32-2 지방산(제2법)
1. ~ 3. (생 략)	1. ~ 3. (현행과 같음)
4. 시험과정	4. 시험과정
4.1 표준용액 조제	4.1 표준용액 조제
4.1.1 (생 략)	4.1.1 (현행과 같음)
4.2 시험용액의 조제	4.2 시험용액의 조제
4.2.1 시료 25 mg을 유리튜브에 정밀히 취하고, 3.4.3용액을 1 mL 첨가한다.	4.2.1 시료 25 mg을 유리튜브에 정밀히 취하고, 3.4.3용액을 1 mL 첨가한다.
※ <신 설>	<u>※ 쏘팔메토 열매 추출물의 경우 내부표준물질 첨가한 시험용액(A) 및 내부표준물질을 첨가하지 않은 시험용액(B)을</u>

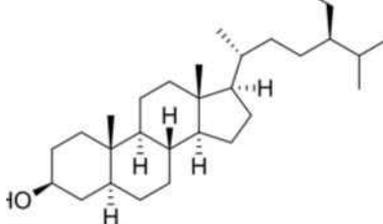
현 행	개 정 안
<p>5. 분석 및 계산</p> <p>5.1 (생 략)</p> <p>5.2 계산</p> <p>5.2.1 (생 략)</p> <p>5.2.1.1 개별 지방산 메틸 에스테르의 함량 계산</p> $W_{FAMEi} = \frac{P_{ti} \times W_{t_{C_{11:0}}} \times 1.0067}{P_{t_{C_{11:0}}} \times R_i}$ <p>W_{FAMEi} : 지방산 i의 메틸 에스테르로서의 양(mg)</p> <p>P_{ti} : 시험용액 중 지방산_i의 피크 면적</p> <p>$W_{t_{C_{11:0}}}$: 시험용액 중 내부표준 물질(C_{11:0} triundecanoin) 첨가량(mg)</p> <p>1.0067 : 내부표준물질(C_{11:0} triundecanoin)의 트리글리세라이드로 부터 지방산 메틸 에스테르로의 전환계수</p>	<p><u>각각 실험하여 비교한다.</u></p> <p>5. 분석 및 계산</p> <p>5.1 (현행과 같음)</p> <p>5.2 계산</p> <p>5.2.1 (현행과 같음)</p> <p>5.2.1.1 개별 지방산 메틸 에스테르의 함량 계산</p> $W_{FAMEi} = \frac{P_{ti} \times W_{t_{C_{11:0}}} \times 1.0067}{P_{t_{C_{11:0}}} \times R_i}$ <p>W_{FAMEi} : 지방산 i의 메틸 에스테르로서의 양(mg)</p> <p>P_{ti} : 시험용액 중 지방산_i의 피크 면적</p> <p>$W_{t_{C_{11:0}}}$: 시험용액 중 내부표준 물질(C_{11:0} triundecanoin) 첨가량(mg)</p> <p>1.0067 : 내부표준물질(C_{11:0} triundecanoin)의 트리글리세라이드로 부터 지방산 메틸 에스테르로의 전환계수</p>

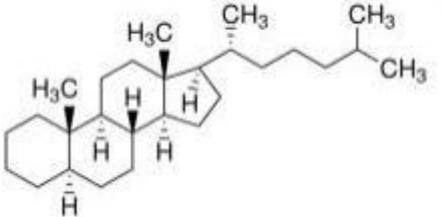
현 행	개 정 안
<p>Pt_{C11:0} : 시험용액 중 내부표준물질 (undecanoic acid methyl ester)의 피크면적</p> <p><u>※ <신 설></u></p> <p>5.2.1.2 ~ 5.2.1.3 (생 략)</p> <p>3-33 ~ 3-37 (생 략)</p> <p>3-38 식물스테롤</p> <p><u><신 설></u></p> <p>1. ~ 5. (생 략)</p>	<p>Pt_{C11:0} : 시험용액 중 내부표준물질 (undecanoic acid methyl ester)의 피크면적</p> <p><u>※ 내부표준물질을 첨가하지 않은 시험 용액(B) 에서 내부표준 물질(C_{11:0}) 의 피크가 나타나는 경우, Pt_{C11:0}은 시험용액 (A)의 피크면적에서 시험용액 (B)의 피크면적 값을 감하여 보정한다.</u></p> <p><u>시험용액(A)의 Pt_{C11:0} - [시험용액 (B)의 (Pt_{C11:0}/ 시험용액(B)의 W_{spl}) × 시험용액(A)의 W_{spl]}</u></p> <p>5.2.1.2 ~ 5.2.1.3 (현행과 같음)</p> <p>3-33 ~ 3-37 (현행과 같음)</p> <p>3-38 식물스테롤</p> <p><u>3-38-1 식물스테롤(제1법)</u></p> <p>1. ~ 5. (현행과 같음)</p>

현 행	개 정 안
<p><u><신 설></u></p>	<p><u>3-38-2 식물스테롤(제2법)</u></p> <p><u>1. 시험방법의 요약</u></p> <p><u>1. 시험방법의 요약</u></p> <p><u>본 시험법은 시료를 검화시킨 후</u> <u>톨루엔으로 식물스테롤 성분을 추출하고</u> <u>트리메틸실릴(TMS) 에 테르화하여</u> <u>유도체화 한 다음 가스크로마토그래프</u> <u>/불꽃이온화 검출기를 이용하여</u> <u>정량하는 방법이다.</u></p> <p><u>2. 장비와 재료</u></p> <p><u>2.1 실험실 장비 및 소모품</u></p> <p><u>2.1.1 감압농축기</u></p> <p><u>2.1.2 자석교반-가열기</u></p> <p><u>2.1.3 교반기(Vortex mixer)</u></p> <p><u>2.1.4 분석저울 : 0.0001 g까지</u> <u>측정이 가능한 것</u></p> <p><u>2.1.5 초자기구 : 삼각플라스크</u> <u>(250 mL), 환저 플라스크</u> <u>(250 mL), 메스실린더, 분액</u></p>

현 행	개 정 안
	<p data-bbox="943 286 1182 324"><u>여두(500 mL)</u></p> <p data-bbox="874 456 1091 495"><u>2.2 분석장비</u></p> <p data-bbox="911 539 1347 577"><u>2.2.1 가스크로마토그래프</u></p> <p data-bbox="911 622 1437 750"><u>2.2.2 불꽃이온화검출기(Flame Ionization Detector)</u></p> <p data-bbox="911 795 1158 833"><u>2.2.3 칼럼오븐</u></p> <p data-bbox="911 878 1437 1182"><u>2.2.4 5%-phenyl-methyl polysiloxane(길이 25 m, 안지름 0.32 mm, 필름두께 0.17 μm) 또는 이와 동등한 것</u></p> <p data-bbox="874 1310 1299 1348"><u>3. 표준물질 및 일반시약</u></p> <p data-bbox="892 1393 1110 1431"><u>3.1 표준물질</u></p> <p data-bbox="911 1476 1430 1514"><u>3.1.1 베타-시토스테롤(β-sitosterol)</u></p> <p data-bbox="820 1559 1437 1686"><u>분자식 : C₂₉H₅₀O, 분자량 : 414.71, CAS No. : 83-46-5</u></p> <div data-bbox="927 1738 1310 1966" data-label="Chemical-Block"> <p>The image shows the chemical structure of beta-sitosterol, a steroid molecule. It features a four-ring steroid nucleus with a hydroxyl group (-OH) at the 3-position. At the 17-position, there is a side chain consisting of an ethyl group (-CH₂-CH₂-) and an isopropyl group (-CH(CH₃)₂).</p> </div>

현 행	개 정 안
	<p data-bbox="874 282 1390 327"><u>3.1.2 캄페스테롤(campesterol)</u></p> <p data-bbox="970 365 1439 409">분자식 : $C_{28}H_{48}O$, 분자량 :</p> <p data-bbox="818 454 1315 499"><u>400.68, CAS No. : 474-62-4</u></p> <div data-bbox="927 544 1310 768" data-label="Chemical-Block"> </div> <p data-bbox="874 813 1439 857"><u>3.1.3 브라시카스테롤(brassicasterol)</u></p> <p data-bbox="970 896 1439 940">분자식 : $C_{28}H_{46}O$, 분자량 :</p> <p data-bbox="818 985 1315 1030"><u>398.66, CAS No. : 474-67-9</u></p> <div data-bbox="927 1075 1310 1299" data-label="Chemical-Block"> </div> <p data-bbox="874 1344 1439 1388"><u>3.1.4 스티그마스테롤(stigmasterol)</u></p> <p data-bbox="970 1426 1439 1471">분자식 : $C_{29}H_{48}O$, 분자량 :</p> <p data-bbox="818 1516 1299 1561"><u>412.69, CAS No. : 83-48-7</u></p> <div data-bbox="927 1606 1310 1830" data-label="Chemical-Block"> </div> <p data-bbox="874 1874 1439 1919"><u>3.1.5 스티그마스타놀(stigmastanol)</u></p> <p data-bbox="970 1957 1439 2002">분자식 : $C_{29}H_{52}O$, 분자량 :</p>

현 행	개 정 안
	<p data-bbox="821 286 1348 324"><u>416.72, CAS No. : 19466-47-8</u></p> <div data-bbox="925 369 1308 593" style="text-align: center;">  </div> <p data-bbox="893 728 1109 772"><u>3.2 일반시약</u></p> <p data-bbox="909 817 1284 862"><u>3.2.1 톨루엔(Toluene)</u></p> <p data-bbox="821 907 1436 1030"><u>3.2.2 수산화칼륨(Potassium hydroxide)</u></p> <p data-bbox="909 1075 1276 1120"><u>3.2.3 에탄올(Ethanol)</u></p> <p data-bbox="909 1164 1428 1209"><u>3.2.4 헵탄(Heptane, GC grade)</u></p> <p data-bbox="909 1254 1436 1377"><u>3.2.5 디메틸포름아미드(Dimethyl form amide, DMF)</u></p> <p data-bbox="909 1422 1436 1545"><u>3.2.6 헥사메틸디실라잔(Hexamethyl disilazane, HMDS)</u></p> <p data-bbox="909 1590 1436 1713"><u>3.2.7 트리메틸클로로실란 (Chlorotrimethylsilane, TMCS)</u></p> <p data-bbox="909 1758 1436 1881"><u>3.2.8 무수황산나트륨(Sodium sulfate anhydrous)</u></p> <p data-bbox="909 1926 1117 1971"><u>3.2.9 유리솜</u></p>

현행	개정안
	<p data-bbox="890 286 1184 324"><u>3.3 내부표준물질</u></p> <p data-bbox="911 369 1433 407"><u>3.3.1 5α-콜레스탄(5α-Cholestane)</u></p> <p data-bbox="970 452 1437 492">분자식 : C₂₇H₄₈, 분자량 :</p> <p data-bbox="820 537 1315 577"><u>372.67, CAS No. : 481-21-0</u></p> <div data-bbox="906 629 1348 846" style="text-align: center;">  </div> <p data-bbox="890 896 1168 934"><u>3.4 시액의 제조</u></p> <p data-bbox="911 978 1232 1016"><u>3.4.1 내부표준용액</u></p> <p data-bbox="932 1061 1437 1279"><u>5α-콜레스탄 20 mg을 톨루엔에 녹여 20 mL로 한다.(1 mg/mL)</u></p> <p data-bbox="911 1323 1270 1361"><u>3.4.2 수산화칼륨용액</u></p> <p data-bbox="948 1406 1437 1624"><u>3.4.2.1 50%(w/w) : 수산화칼륨 500 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.</u></p> <p data-bbox="948 1668 1437 1886"><u>3.4.2.2 1 M : 수산화칼륨 56 g을 증류수에 녹여 1 L로 한다.</u></p> <p data-bbox="948 1930 1437 1968"><u>3.4.2.3 0.5 M : 1 M 수산화</u></p>

현 행	개 정 안
	<p data-bbox="991 286 1437 409"><u>칼륨 용액을 증류수로 희석한다.</u></p> <p data-bbox="855 539 1054 580">4. 시험과정</p> <p data-bbox="874 624 1222 665">4.1 표준용액의 조제</p> <p data-bbox="911 710 1437 1010">4.1.1 5종의 표준물질을 각각 10 mg을 정밀하게 달아 톨루엔 10 mL에 녹여 만든다.(1 mg/mL)</p> <p data-bbox="911 1055 1437 1267">4.1.2 위의 용액을 톨루엔으로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.(0.5 ~ 500 µg/mL)</p> <p data-bbox="911 1312 1437 1783">4.1.3 표준용액 1.0 mL와 내부 표준물질용액 0.1 mL를 원심분리관에 넣고 질소 건조 후 잔류물을 1 mL DMF로 녹여 유도체화를 위한 표준용액으로 한다.</p> <p data-bbox="911 1827 1437 1951">4.1.4 위의 용액에 HMDS 0.2 mL를 가한 후 TMCS 0.1</p>

현 행	개 정 안
	<p><u>mL를 가하여 마개를 닫고</u> <u>이를 강렬하게 30초간 교반</u> <u>하거나 손으로 흔들어 혼합</u> <u>하고 15분간 정치한다.</u></p> <p><u>4.1.5 각각의 원심분리관에 헵탄</u> <u>1.0 mL와 증류수 10 mL를</u> <u>넣은 후 마개를 닫고 30초간</u> <u>강력하게 교반하고 이를</u> <u>1,600 × g에서 2분간 원심분</u> <u>리한다.</u></p> <p><u>4.1.6 상층의 헵탄 층을 취하여</u> <u>기체크로마토그래프 측정용</u> <u>표준용액으로 한다. 이 때 유</u> <u>도체화 된 표준용액과 시험</u> <u>용액은 24시간 내에 분석한다.</u></p> <p><u>4.2 시험용액의 조제</u></p> <p><u>4.2.1 비누화 과정</u></p> <p><u>4.2.1.1 시료 0.5 ~ 2 g을</u> <u>정밀하게 칭량하여 환저</u> <u>플라스크에 취한다.</u></p>

현 행	개 정 안
	<p>4.2.1.2 자석막대를 삼각플라스크에 넣고 내부표준물질 용액 1.2 mL, 95% 에탄올 40 mL과 50% 수산화칼륨 용액 8 mL을 가한다 (95% 에탄올 40 mL 중 일정량을 50% 수산화칼륨 용액 첨가 후 잔류물 세척에 사용하여 플라스크와 콘덴서가 같이 붙어서 떨어지지 않는 것을 방지할 수 있다.)</p> <p>4.2.1.3 콘덴서를 설치하고 자석교반-가열기를 이용하여 교반하면서 가열하여 70±10분간 환류시킨다. 비누화를 위해 시료를 지속적으로 관찰하면서 덩어리가 생길 경우 유리봉으로 분산시키거나 교반</p>

현 행	개 정 안
	<p><u>하면서 50% 수산화칼륨 용액을 추가하여 시험용액을 교반한다.</u></p> <p><u>4.2.1.4 환류가 완료되면 가열기를 끄고 교반 중에 콘덴서의 상부를 통해 95% 에탄올 60 mL을 첨가하고 15분간 방치한다.</u></p> <p><u>4.2.1.5 콘덴서를 플라스크에서 제거하고 플라스크에 마개를 막아 실온으로 냉각시킨 후 시험용액을 안정화한다.</u></p> <p><u>4.2.2 추출</u></p> <p><u>4.2.2.1 비누화가 끝난 시험용액을 교반하면서 톨루엔 100 mL을 첨가하고 마개를 하여 30초 이상 교반한다.</u></p> <p><u>4.2.2.2 이를 세척과정 없이 500 mL 분액여두로 옮기고 1 M 수산화칼륨용액 110</u></p>

현 행	개 정 안
	<p data-bbox="995 286 1437 495"> <u>mL을 넣고 10초간 강렬하게 진탕하여 정치 후 분리된 아래층을 버린다.</u> </p> <p data-bbox="954 539 1437 1010"> <u>4.2.2.3 0.5 M 수산화칼륨용액 40 mL을 분액여두에 넣고 분액여두를 천천히 내용물이 소용돌이가 생기도록 10초간 섞어준 후 정치하여 분리된 아래층을 버린다.</u> </p> <p data-bbox="954 1055 1437 1951"> <u>4.2.2.4 톨루엔 층을 증류수 40 mL로 천천히 분액여두를 돌려주며 수세한 후 정치하여 분리된 아래층을 버리고 수세과정을 3회 이상 반복한다. 이 때 수세과정이 반복될수록 더욱 강렬하게 진탕하며, 만약 에멀전이 발생하면 소량의 95% 에탄올을 첨가하여 분액여두의 내용물이 회오리가 생기</u> </p>

현 행	개 정 안
	<p><u>도록 섞어준 후 정치하여 층을 분리한다. 톨루엔 층이 맑게 보일 때까지 수세과정을 계속한다.</u></p> <p><u>4.2.2.5 유리솥과 약 20 g의 무수황산나트륨이 채워진 유리깔대기를 통해 수세한 톨루엔 층을 약 2 g 무수 황산나트륨이 채워진 삼각 플라스크로 흘려주어 탈수한다.</u></p> <p><u>4.2.2.6 삼각플라스크에 마개를 막고 15분 이상 정치한다. 이 때 마개의 막음상태가 완벽하더라도 24시간 이상 방치하여서는 안된다.</u></p> <p><u>4.2.2.7 추출한 톨루엔 층 25 mL을 환저 플라스크에 취하고 이를 50±3℃에서 감압 농축하여 건고한다.</u></p>

현 행	개 정 안
	<p data-bbox="986 280 1441 495"><u>잔류물에 아세톤 약 3 mL을 가한 후 다시 감압 농축하여 완전 건조한다.</u></p> <p data-bbox="949 539 1441 1010"><u>4.2.2.8 잔류물을 3 mL DMF에 녹여 시험용액으로 한다. 이 때 시험용액의 농도는 식물스테롤 표준 용액의 농도범위 안에 있어야 한다.</u></p> <p data-bbox="911 1055 1158 1093"><u>4.2.3 유도체화</u></p> <p data-bbox="949 1137 1441 1263"><u>4.2.3.1 시험용액 1.0 mL를 원심분리관에 취한다.</u></p> <p data-bbox="949 1308 1441 1778"><u>4.2.3.2 위의 용액에 HMDS 0.2 mL를 가한 후 TMCS 0.1 mL를 가하여 마개를 닫고 이를 강렬하게 30초간 교반하거나 손으로 흔들어 혼합하고 15분간 정치한다.</u></p> <p data-bbox="949 1823 1441 1948"><u>4.2.3.3 각각의 원심분리관에 헵탄 1.0 mL와 증류수 10</u></p>

현 행	개 정 안												
	<p><u>mL를 넣은 후 마개를 닫고</u></p> <p><u>30초간 강력하게 교반하고</u></p> <p><u>이를 1,600 × g에서 2분간</u></p> <p><u>원심분리한다.</u></p> <p><u>4.2.3.4 상층의 헵탄 층을 취</u></p> <p><u>하여 기체크로마토그래프</u></p> <p><u>측정용 시험용액으로 한다.</u></p> <p><u>이 때 유도체화 된 표준</u></p> <p><u>용액과 시험용액은 24시간</u></p> <p><u>내에 분석한다.</u></p> <p><u>5. 분석 및 계산</u></p> <p><u>5.1 기기분석</u></p> <p><u>표 1. 가스크로마토그래프 조건(예)</u></p> <table border="1" data-bbox="826 1489 1417 1859"> <thead> <tr> <th><u>항목</u></th> <th><u>조건</u></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><u>주입부 온도</u></td> <td><u>250℃</u></td> </tr> <tr> <td><u>칼럼 온도</u></td> <td><u>190℃(2분)-20℃/분-230℃</u> <u>(3분)-40℃/분-270℃(25분)</u></td> </tr> <tr> <td><u>검출기 온도</u></td> <td><u>300℃</u></td> </tr> <tr> <td><u>캐리어 가스 및</u> <u>유량</u></td> <td><u>헬륨, 0.7 mL/분</u></td> </tr> <tr> <td><u>Split ratio</u></td> <td><u>10 : 1</u></td> </tr> </tbody> </table>	<u>항목</u>	<u>조건</u>	<u>주입부 온도</u>	<u>250℃</u>	<u>칼럼 온도</u>	<u>190℃(2분)-20℃/분-230℃</u> <u>(3분)-40℃/분-270℃(25분)</u>	<u>검출기 온도</u>	<u>300℃</u>	<u>캐리어 가스 및</u> <u>유량</u>	<u>헬륨, 0.7 mL/분</u>	<u>Split ratio</u>	<u>10 : 1</u>
<u>항목</u>	<u>조건</u>												
<u>주입부 온도</u>	<u>250℃</u>												
<u>칼럼 온도</u>	<u>190℃(2분)-20℃/분-230℃</u> <u>(3분)-40℃/분-270℃(25분)</u>												
<u>검출기 온도</u>	<u>300℃</u>												
<u>캐리어 가스 및</u> <u>유량</u>	<u>헬륨, 0.7 mL/분</u>												
<u>Split ratio</u>	<u>10 : 1</u>												

현 행	개 정 안
	<p data-bbox="874 282 1110 327"><u>5.2 결과 분석</u></p> <p data-bbox="911 367 1251 412"><u>5.2.1 검량선의 작성</u></p> <p data-bbox="932 452 1442 1093"> <u>유도체화한 5개의 식물스테롤</u> <u>표준용액을 1 μL 각각 주입</u> <u>하여 얻어진 크로마토그램상의</u> <u>식물스테롤 피크면적을 5α-</u> <u>콜레스탄 피크면적으로 나눈</u> <u>값(Y축)과 식물스테롤 농도</u> <u>(mg/mL, X축)로 검량선을</u> <u>작성한다.</u> </p> <p data-bbox="911 1137 1155 1182"><u>5.2.2 정성시험</u></p> <p data-bbox="932 1223 1442 1608"> <u>위의 조건에서 얻어진 크</u> <u>로마토그램상의 피크는 어느</u> <u>측정조건에서도 표준용액 피</u> <u>크의 머무름 시간과 일치하</u> <u>여야 한다.</u> </p> <p data-bbox="911 1653 1155 1697"><u>5.2.3 정량시험</u></p> <p data-bbox="932 1738 1442 1953"> <u>정성시험과 똑같은 조건에서</u> <u>얻어진 시험결과에 의해 피</u> <u>크면적법에 따라 정량한다.</u> </p>

현 행	개 정 안
	<p>5.3 계산</p> <p>5.3.1 개별 식물스테롤 함량</p> $(mg/g) = C \times (V_1 / S) \times (V_3 / V_2)$ <p>C : 검량선에서 구한 개별 식물스테롤 시험용액의 농도(mg/mL)</p> <p>S : 검체량(g)</p> <p>V₁ : 추출에 사용한 톨루엔의 양(100 mL)</p> <p>V₂ : 농축에 사용된 톨루엔 추출액의 양(25 mL)</p> <p>V₃ : 유도체화 전 잔사를 녹이는 데 사용한 DMF의 양(3 mL)</p> <p>5.3.2 식물스테롤 함량(mg/g)</p> $= \text{베타-시토스테롤} + \text{캄페스테롤} + \text{브라시카스테롤} + \text{스티그마스테롤} + \text{스티그마스타놀}$

현 행	개 정 안
3-39 ~ 3-79 (생 략)	3-39 ~ 3-79 (현행과 같음)
제 4.~ 제 5. (생 략)	제 4.~ 제 5. (현행과 같음)
[별표 1] ~ [별표 5] (생 략)	[별표 1] ~ [별표 5] (현행과 같음)