

A simple method to determine lutein in powdered dietary supplements using *n*-butanol extraction, spectrophotometry, and liquid chromatography

Yu Rim Ha^{1†}, Woo Jae Lee^{1†}, Young Min Kim¹, Jun Yeop Kim¹, Dong-Kyu Lee²,
Sang Beom Han², Il-Ho Park^{3, ★}, and Yong Seok Choi^{1, ★}

¹College of Pharmacy, Dankook University, 119 Dandaero, Dongnam-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, South Korea

²College of Pharmacy, Chung-Ang University, 84 Heukseok-ro, Dongjak-gu, Seoul, South Korea

³College of Pharmacy, Sahmyook University, 815 Hwarang-ro, Nowon-gu, Seoul, South Korea

(Received April 29, 2026; Revised June 4, 2026; Accepted June 10, 2026)

n-부탄올 추출, 흡광도법 및 액체크로마토그래피를 활용한 분말 제형 건강기능식품 중 루테인 분석법 개발

하유림^{1†} · 이우재^{1†} · 김영민¹ · 김준엽¹ · 이동규² · 한상범² · 박일호^{3, ★} · 최용석^{1, ★}

¹단국대학교 약학대학, ²중앙대학교 약학대학, ³삼육대학교 약학대학

(2026. 4. 29. 접수, 2026. 6. 4. 수정, 2026. 6. 10. 승인)

Abstract: Lutein is a major carotenoid component of macular pigment and is known to contribute to the prevention of age-related macular degeneration through its antioxidant properties and blue light filtering effects. It is widely used in various forms of dietary supplements. However, the current lutein assay method specified in the Health Functional Food Code of South Korea shows limited accuracy and applicability when applied to powdered formulations. In this study, a new analytical method suitable for powdered lutein dietary supplements was developed and its performance was evaluated. The proposed method involves extraction of lutein using *n*-butanol followed by quantification by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC). Method validation was performed according to the Ministry of Food and Drug Safety guidelines, and the method satisfied all required criteria, including linearity ($r^2 = 0.996 \pm 0.0031$), specificity, lower limit of quantification (20.04 $\mu\text{g/mL}$), accuracy (recovery 100.63–103.67 %), repeatability (RSD 0.37–1.68 %), and reproducibility (interlaboratory RSD 2.24 %). The applicability of the method was further evaluated using five commercially available powdered lutein dietary supplements, all of which showed contents within the acceptable range of 80.04–99.70 % of the labeled amounts (acceptable range: 80–120 %). These results indicate that the proposed method provides a reliable and practical alternative to the current assay for powdered formulations and may contribute to improved quality control of lutein-containing dietary supplements.

[†]These authors contributed equally to this work.

★ Corresponding authors

Phone : +82-(0)2-3399-1602; +82-(0)41-550-1439 Fax : +82-(0)41-559-7899

E-mail : parkilho@syu.ac.kr; analyse@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.

요약: 루테인은 황반 색소를 구성하는 주요 카로티노이드로, 항산화 작용과 청색광 차단 효과를 통해 황반변성 예방에 기여하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 제형의 건강기능식품에 활용되고 있다. 그러나 현행 건강기능식품공전의 루테인 시험법은 분말 제형에 적용 시 정량 결과의 정확성과 적용성에 한계가 있는 것으로 확인되었다. 이에 본 연구에서는 분말 제형 루테인 함유 건강기능식품에 적합한 신규 분석법을 개발하고 그 성능을 평가하였다. 본 시험법은 *n*-부탄올을 이용한 추출 후 흡광도법 및 고속액체크로마토그래피 (HPLC)로 정량하는 방법이며, 식품의약품안전처 가이드라인에 따라 밸리데이션을 수행한 결과 직선성($r^2 = 0.996 \pm 0.0031$), 특이성, 정량한계($20.04 \mu\text{g/mL}$), 정확도(회수율 $100.63\text{--}103.67\%$), 반복성(RSD $0.37\text{--}1.68\%$), 재현성(실험실 간 RSD 2.24%) 등 모든 항목에서 기준을 만족하였다. 또한 시중 유통 분말 제형 제품 5종에 적용한 결과, 모든 시료에서 표시 함량 대비 $80.04\text{--}99.70\%$ 범위로 확인되어 적합 기준($80\text{--}120\%$)을 만족하였다. 이상의 결과는 본 시험법이 분말 제형 루테인 제품에 대해 기존 공전 시험법의 한계를 보완할 수 있는 실용적인 대안이 될 수 있음을 시사한다.

Keywords: lutein, powdered dietary supplements, liquid chromatography, *n*-butanol, solvent extraction, Health Functional Food Code

1. 서 론

루테인(Fig. 1)은 카로티노이드 계열의 천연 색소로, 시금치, 케일과 같은 녹색 잎채소뿐 아니라 옥수수, 호박 등 주황색 채소 및 마리골드 꽃 등에 널리 분포한다.¹ 예를 들어 시금치 100 g에는 약 7.45 mg의 루테인이 함유되어 있는 것으로 보고된 바 있다.² 루테인은 C_{40} 이소프레노이드 골격을 가지며, 양쪽 말단에 산소를 포함한 고리 구조를 갖는 특징적인 화학구조를 가진다. 이러한 구조적 특성은 루테인의 색소 활성뿐 아니라 항산화 작용에도 중요한 역할을 한다. 루테인의 주요 생리적 기능은 황반의 망막 색소 상피세포(retinal pigment epithelium, RPE)를 산화 손상으로부터 보호하는 것으로 알려져 있다.³ 루테인과 제아잔틴은 황반 중심부에 고농도로 존재하며 황반 색소를 구성하고, 활성산소 제거 및 청색광 필터링 작용을 통해 광산화 손상으로부터 황반을 보호한다.⁴ 이러한 기전을 바탕으로 루테인 보충제의 섭취는 황반 색소 밀도를 증가시키는 데 기여할 수 있으며, 이는 황반변성 예방과 관련된 효과로 이어질 수 있다.³

이러한 기능성으로 인해 루테인은 정제, 분말, 연질 캡슐 등 다양한 제형의 건강기능식품 원료로 널리 사용

되고 있으며, 국내에서는 고시형 건강기능식품으로 지정되어 관리되고 있다. 또한 루테인 함량 분석을 위해 흡광도법 및 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 기반으로 한 시험법이 「건강기능식품공전」에 수재되어 활용되고 있다.⁵ 한편, 해외의 경우 미국약전(USP)에서는 캡슐 제제와 비캡슐 제제에 따라 전처리 방법을 구분하여 제시하고 있으며, 각각에 적합한 조건에서 흡광도 측정 및 HPLC 분석을 수행하도록 하고 있다.⁶

본 연구진은 다양한 건강기능식품공전 기기분석 시험법 현황 파악 중 현행 루테인 시험법을 분말 제형 건강기능식품에 적용할 경우, 정량 결과의 정확성과 신뢰성이 저하될 수 있음을 확인하였다.^{7,8} 이러한 한계를 개선하기 위해 관련 시험법에 대한 문헌 고찰 및 비교를 수행하였으며, 그 결과 *n*-부탄올 기반 추출 조건을 적용한 신규 흡광도 및 HPLC 시험법을 도출하였다.

따라서 본 연구에서는 분말 제형 루테인 함유 건강기능식품에 적합한 신규 분석법을 개발하고, 밸리데이션 및 실제 시료 적용을 통해 그 성능과 적용 가능성을 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

Ethyl acetate (에틸아세테이트), water (물), *n*-butanol (*n*-부탄올), ethanol (에탄올)은 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였다. *n*-Hexane

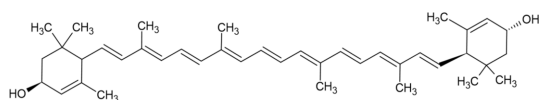


Fig. 1. Chemical structure of lutein.

(*n*-헥산)은 Honeywell Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였으며, *tert*-Butyl methyl ether는 Samchun Chemical Co., Ltd. (Seoul, Republic of Korea)의 HPLC 등급 시약을, Sodium chloride (염화나트륨)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 시약을 사용하였다. 루테인 표준물질은 Sigma-Aldrich의 분석용 표준품을 사용하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 현행 건강기능식품공전 시험법⁵

2.2.1.1. 표준원액의 조제

루테인 표준품(99.9%)를 이동상(*n*-헥산:에틸아세테이트(7:3, v/v))에 용해하여 표준원액을 조제하였다.

2.2.1.2. 표준용액의 조제

표준원액을 이동상(*n*-헥산:에틸아세테이트(7:3, v/v))으로 희석하여 53.28, 88.80, 124.32, 159.84 및 195.36 µg/mL 농도의 표준용액을 조제하였다.

2.2.1.3. 시험용액 조제

루테인 5% 또는 10% 원료는 각각 약 30 mg, 15% 원료는 약 15 mg, 루테인 제품은 약 70 mg을 정밀하게 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 취하였다. 여기에 증류수 15 mL를 첨가한 후 30분간 초음파 처리하여 시료를 용해시켰다. 이후 에틸아세테이트 30 mL와 염화나트륨 3 g을 첨가하여 진탕 추출하고, 900 × g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 시험용액으로 사용하였다.

2.2.1.4. 자외분광광도계

추출용액의 상등액 1 mL를 취하여 에탄올 25 mL가 담긴 50 mL 부피플라스크에 넣고, 에탄올로 표선까지 희석하였다. 이후 20초간 진탕하여 혼합한 후, 에탄올을 대조액으로 하여 446 nm에서 흡광도를 측정하였다. 자외분광광도계는 Thermo Scientific의 BioMate™ 160 UV-Vis spectrophotometer를 사용하였으며, 1 cm 석영 큐벳을 사용하였다.

2.2.1.5. 고속액체크로마토그래프

추출용액의 상등액 250 µL를 취하여 갈색 HPLC 바이알에 옮긴 후 질소 가스로 완전히 건조시켰다. 이후 이동상 1 mL를 첨가하고 30초간 초음파 처리하여 재용해한 것을 시험용액으로 사용하였다. 표준용액 및 시험용액(10 µL)을 HPLC에 주입하여 분석하였다. HPLC 시스템은 Waters Corporation (2695 separations module 및 996 photodiode array detector)을 사용하였으며, 칼럼은 Phenomenex Luna Silica column (4.6 × 250 mm, 5 µm)을 사용하였다. 이동상은 *n*-헥산과 에틸

아세테이트(7:3, v/v)를 사용하였으며, 등용매 조건으로 분석하였다. 유속은 1.5 mL/min, 칼럼 온도는 30 °C로 설정하였다. 검출 파장은 446 nm로 설정하였으며 총 분석 시간은 25분으로 하였다. 루테인 함량은 자외분광광도계로 측정한 총 카로티노이드 함량(%)과 HPLC에서 얻은 루테인 피크 면적(%)을 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{총 카로티노이드 함량(\%)} = (A \times V_d \times V_e \times 100) / (\alpha \times V_a \times l \times m)$$

A : 446 nm에서 측정한 흡광도

V_d : 희석용매의 부피 (mL)

V_e : 추출용매의 부피 (mL)

α : 흡광 계수(255 mL/mg·cm)

※ 1% 루테인 에탄올 용액(10 mg/mL)의 흡광도 : 2550

V_a : 희석 시 사용한 추출용매의 부피(mL)

l : Quartz cuvette의 규격 (1 cm)

m : 검체량 (mg)

루테인 함량(%) = 총 카로티노이드 함량(%) × (루테인 peak 면적(%) / 100)

2.2.2. 신규 개발 시험법

2.2.2.1. 표준원액의 조제

표준원액의 조제는 현행 건강기능식품공전 시험법을 따랐다.⁵

2.2.2.2. 표준용액의 조제

표준용액의 조제는 현행 건강기능식품공전 시험법을 따랐다.⁵

2.2.2.3. 시험용액의 조제

루테인 약 10 mg에 해당하는 시료를 취하여 50 mL 부피플라스크에 넣고, 물 15 mL를 첨가한 후 30분간 초음파 처리하여 용해시켰다. 이후 *n*-부탄올 20 mL와 염화나트륨 3 g을 첨가하고 900 × g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 시험용액으로 사용하였다. 이때 상등액은 주황색을 나타내며, 하층액이 옅은 노란색 또는 무색이 되었는지를 확인하였다. 필요 시 원심분리를 반복하였다(Fig. 2).

2.2.2.4. 자외분광광도계

자외분광광도계 분석 조건은 현행 건강기능식품공전 시험법과 동일하게 적용하였다.⁵

2.2.2.5. 고속액체크로마토그래프

HPLC 분석 조건은 현행 건강기능식품공전 시험법과 동일하게 적용하였다.⁵

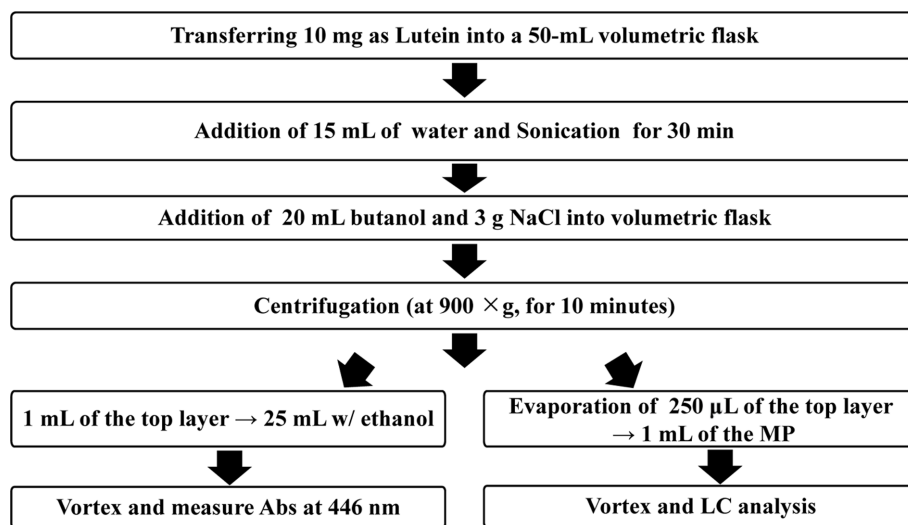


Fig. 2. Schematic diagram of the developed lutein quantification method. The procedure involves ultrasound-assisted extraction, followed by phase separation using *n*-butanol, spectrophotometric determination of total carotenoids, and HPLC-UV analysis of lutein at 446 nm.

3. 결과 및 고찰

3.1. 현 건강기능식품공전 시험법 적용성 평가

시중에서 유통 중인 분말 제형 루테인 함유 건강기능식품 5종을 대상으로, 현행 건강기능식품공전 루테인 시험법의 적용성을 평가하였다($n=3$). 시험 결과는 표시 함량 대비 80–120 % 범위 만족 여부를 기준으로 적합 여부를 판단하였다.⁵ 그 결과, 모든 시료에서 표시 함량 대비 23.77–60.49 % 수준의 함량이 확인되어, 공전에서 제시하는 적합 기준 범위를 충족하지 못하는 것으로 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 현행 건강기능식품공전 시험법이 분말 제형 제품에 적용될 경우, 실제 함량을 적절히 반영하지 못할 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 분말 제형 루테인 제품에 적용 가능한

보다 정확하고 신뢰성 있는 분석법의 개발이 필요함을 확인하였다.

3.2. 신규 시험법 개발을 위한 시험법 간 비교 및 고찰

분말 제형 시료에서 루테인 분석법을 개발하기 위하여 관련 문헌 및 기존 시험법을 비교·검토하였다. 현행 건강기능식품공전 시험법은 제형 구분 없이 동일한 분석법을 적용하는 반면, 미국약전(USP)에서는 캡슐 제제와 비캡슐 제제에 따라 전처리 방법을 구분하여 제시하고 있음을 확인하였다.⁶ 이러한 접근은 제형에 따른 매트릭스 특성 차이를 고려한 것으로 판단되며, 루테인 분석에서도 제형에 따라 적절한 시험 조건을 설정할 필요가 있음을 시사한다. 특히 분말 제형의

Table 1. Applicability of the current lutein assay in the Health Functional Food Code of South Korea to powdered dietary supplements ($n=3$)

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	Powder	10.00	5.97	0.43	59.70	F
2	Product 2	Powder	10.00	6.04	0.23	60.49	F
3	Product 3	Powder	5.00	1.20	0.50	23.77	F
4	Product 4	Powder	8.00	3.08	0.54	38.58	F
5	Product 5	Powder	10.00	3.44	0.66	34.41	F

^aThe acceptable range of B / A × 100(%) is 80–120 %.

경우, 문헌 조사 결과 시료량을 일반적으로 0.5–1.0 g 수준으로 설정하는 사례가 보고되어 있어, 공전 시험법에서 사용되는 시료량(약 70 mg)과 비교할 때 상당한 차이가 있음을 확인하였다.^{9,10} 이러한 차이는 시료 내 루테인 함량의 대표성 및 추출 효율에 영향을 미칠 수 있는 중요한 변수로 판단되었다. 또한 일부 문헌에서는 루테인 분석 시 추출 용매로 *n*-부탄올을 사용하는 방법이 보고되어 있으며, 이는 기존 공전 시험법에서 사용되는 에틸아세테이트 기반 추출과 차별화되는 점근이다.¹⁰ 이에 따라 본 연구에서는 시료량 증가 및 추출 용매 변경을 주요 변수로 설정하여 신규 시험법 개발을 진행하였다.

3.3. 신규 시험법 개발

문헌 조사 결과를 반영하여 기존 공전 시험법에서 사용하던 루테인 제품 약 70 mg 대신, 루테인으로서 약 10 mg을 취하는 조건으로 시료량을 조정하였다.^{9,10} 그러나 해당 조건에서 분석을 수행한 결과, 표시 함량 대비 52.5 % 수준의 결과가 도출되어 적합 기준(80–120 %)을 충족하지 못하였다(Table 2). 이에 따라 시료량 조정만으로는 정량 결과의 적합성을 확보하기 어려운 것으로 판단되어, 시료량과 추출 용매 부피를 동시에 변화시키는 추가 실험을 수행하였다. 구체적으로 루테

인으로서 10 mg 및 20 mg 조건에서, 에틸아세테이트 부피를 각각 15, 20, 25 mL로 변화시켜 비교하였다. 그 결과, 루테인으로서 10 mg 조건에서는 각각 67.53 %, 74.00 %, 77.04 %의 결과를 보였으며, 20 mg 조건에서는 53.00 %, 52.27 %, 54.49 %로 나타났다. 모든 조건에서 여전히 적합 기준을 만족하지 못하는 것으로 확인되었다(Table 3). 또한 에틸아세테이트를 사용한 조건 중 가장 높은 값을 보인 루테인 10 mg, 용매 25 mL 조건은 전처리 과정에서 상분리 및 취급 측면에서 재현성이 다소 저하되는 것으로 관찰되었다. 이에 따라 보다 안정적인 추출 조건을 확보하기 위하여, 루테인 10 mg 및 추출용매 20 mL 조건을 유지한 상태에서 용매를 MTBE 및 *n*-부탄올로 변경하여 추가 실험을 수행하였다. 그 결과, MTBE를 사용한 경우에는 표시 함량 대비 65.4 % 수준으로 나타나 여전히 기준을 만족하지 못한 반면, *n*-부탄올을 사용한 경우에는 98.5 %의 결과를 보여 적합 기준(80–120 %)을 충족하는 것으로 확인되었다(Table 3). *n*-부탄올(polarity index, $P' = 3.9$)은 MTBE($P' = 2.5$)와 에틸아세테이트($P' = 4.4$) 사이의 극성을 가지며, 본 연구에서 평가한 조건 중 가장 우수한 추출 효율을 나타내었다. 다만 본 실험은 단순 용해도 평가가 아닌 복합 매트릭스에서의 액-액 분배 과정을 포함하므로, 이러한 결과를 용매 극성만

Table 2. Applicability of the current lutein assay under increased sample amount conditions

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	Powder	10.00	5.25	0.27	52.50	F

^aThe acceptable range of $B / A \times 100(\%)$ is 80–120 %.

Table 3. Effects of sample amount and extraction solvent conditions on the applicability of the lutein assay in powdered dietary supplements

No.	Amount of lutein (mg)	Extraction solvent	Nominal content (A) (mg/g)	Volume of extraction solvent (mL)	Mean of experimental content (B) (mg/g)	B/A×100 (%)	^a Pass (P) / Fail (F)
1	10	Ethyl acetate	10	25	7.70	77.04	F
2	10	Ethyl acetate	10	20	7.40	74.00	F
3	10	Ethyl acetate	10	15	6.75	67.53	F
4	20	Ethyl acetate	10	25	5.45	54.49	F
5	20	Ethyl acetate	10	20	5.22	52.27	F
6	20	Ethyl acetate	10	15	5.30	53.00	F
7	10	MTBE	10	20	6.54	65.40	F
8	10	<i>n</i> -butanol	10	20	9.85	98.50	P

^aThe acceptable range of $B / A \times 100(\%)$ is 80–120 %.

Table 4. Comparison of analytical conditions among the developed method (A), the current method in the Health Functional Food Code of South Korea (B), the USP method for non-capsule formulations (C), and a literature-reported method for powder formulations (D)

Category	A	B	C	D
Target product form	Powder	NA	Non-capsule formulations	Powder
Extraction method	Ultrasound-assisted extraction in water for 30 min followed by liquid-liquid extraction using <i>n</i> -butanol and sodium chloride	Ultrasound-assisted extraction in water for 30 min followed by liquid-liquid extraction using ethyl acetate and sodium chloride	Dissolved in the mobile phase consisting of hexane and ethyl acetate (75:25, v/v).	Extraction with water-saturated <i>n</i> -butanol followed by centrifugation at 10,000 × <i>g</i> for 5 min and filtration.
Instrumental analysis method for total carotenoid content	Spectrophotometry (446 nm)	Spectrophotometry (446 nm)	Spectrophotometry (446 nm)	Spectrophotometry (450 nm)
Instrumental analysis method for lutein peak %	^a NP-HPLC (w/ an absorbance detector) Column: Silica (4.6 × 250 mm) Wavelength: 446 nm	^a NP-HPLC (w/ an absorbance detector) Column: Silica (4.6 × 250 mm) Wavelength: 446 nm	^a NP-HPLC (w/ an absorbance detector) Column: packing L3 (4.6 × 250 mm) Wavelength: 446 nm	^b RP-HPLC (w/ an absorbance detector) Column: C30 (4.6 × 100 mm) Wavelength: 450 nm

^aNormal phase high pressure liquid chromatography

^bReversed phase high pressure liquid chromatography

^cE.-S. M. Abdel-Aal and I. Rabalski, *J. Agric. Food Chem.*, **63**(44), 9740-9746 (2015).

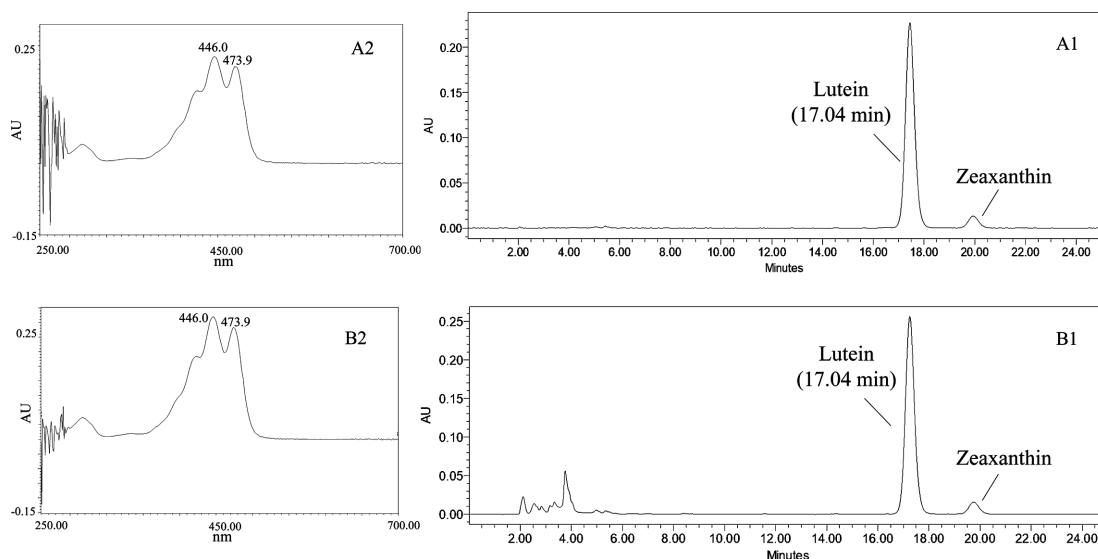


Fig. 3. Specificity of the developed method for lutein analysis. (A1) Chromatogram of the lutein standard. (A2) UV spectrum of the lutein standard peak (17.04 min). (B1) Chromatogram of the sample containing lutein. (B2) UV spectrum of the corresponding sample peak (17.04 min). The retention time and UV absorption spectrum of the sample peak matched those of the lutein standard.

으로 설명하기는 어렵다. 실제 추출 효율은 용질-용매 상호작용뿐 아니라 매트릭스 특성 및 분배 거동에 의해 복합적으로 영향을 받는 것으로 판단된다. 이상의 결과를 바탕으로, 루테인으로서 10 mg을 취하고 *n*-부탄올 20 mL를 추출용매로 사용하는 조건을 최적 조건으로 선정하였다. 최종적으로 신규 시험법과 기존 공전 시

험법, 미국약전 시험법 및 문헌 시험법 간의 비교를 Table 4에 정리하였다.^{5,6,10}

3.4. 신규 시험법 밸리데이션

신규 개발 시험법의 분석적 유효성을 검증하기 위하여 「기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드

드(식품의약품안전처, 2023)」에 따라 밸리데이션을 수행하였다.¹¹ 평가 항목으로는 특이성, 직선성, 정량 한계, 정확도, 반복성 및 재현성을 포함하였다.

특이성은 루테인 표준용액과 시료용액의 크로마토그램 및 UV 흡수 스펙트럼을 비교하여 평가하였다. 루테인 표준품은 17.04분의 유지시간에서 주요 피크를 나타내었으며, 시료에서도 동일한 유지시간에서 피크가 검출되었다(Fig. 3). 또한 표준품 피크와 시료 피크의 UV 흡수 스펙트럼이 일치함을 확인하였고, 표준용액에서 관찰된 부피크는 상용 루테인 표준품에 함유된 제아잔틴에 기인한 것으로 확인되었다.

직선성은 시료 내 루테인이 존재할 수 있는 범위를 포함하는 총 5개 농도(53.28, 88.80, 124.32, 159.84, 195.36 µg/mL)의 표준용액을 이용하여 평가하였다. 각 용액의 흡광도(446 nm)를 측정하여 농도-흡광도 간 직선성을 검토하였으며, 3회 반복 측정을 수행하였다. 그 결과, 검량선의 결정계수(r^2)는 0.996 ± 0.0031 로 나타나 기준($r^2 \geq 0.99$)을 만족하였다(Table 5).

정량한계(the lower limit of quantitation, LLOQ)는 직선성 평가 과정에서 얻어진 y 절편의 표준편차와 기울기의 평균값을 이용하여 산정하였으며, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{LLOQ} = (10 \times \text{standard deviation of y-intercept}) / \text{mean of slope}$$

계산된 LLOQ는 20.04 µg/mL로 나타났으며, 이는 검량선의 최저 농도(53.28 µg/mL) 보다 낮은 수준으로, 본 시험법으로 얻는 모든 정량값이 신뢰 가능한 범위 내에 있음을 의미한다.

참고로 검출한계(the limit of detection, LOD)는 다음 식을 이용하여 산정하였다.

$$\text{LOD} = (3 \times \text{standard deviation of y-intercept}) / \text{mean of slope}$$

계산된 LOD는 6.01 µg/mL로 확인되었다.

정확성은 루테인을 함유하지 않은 분말 시료에 서로 다른 농도(62.16, 124.32, 186.48 mg/g)의 루테인을 첨가한 회수율 시료를 이용하여 평가하였다($n = 5$). 그 결과, 회수율은 100.63–103.67 % 범위로 나타나 가이드라인 기준(92–105 %)을 만족하였다(Table 6).

반복성은 동일한 회수율 시험에서 얻어진 결과의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 통해 평가하였으며, 0.37–1.68 % 범위로 나타나 기준(≤ 2 %)을 충족하였다.

재현성은 서로 다른 3개 실험실에서 중간 농도(124.32 mg/g)의 회수율 시료를 이용하여 각각 5회 반복 분석($n = 15$)을 수행하여 평가하였다. 그 결과, 회수율의 RSD는 2.24 %로 나타나 기준(≤ 4 %)을 만족하였다(Table 6).

이상의 결과를 종합할 때, 본 시험법은 식품의약품안전처 가이드라인에서 요구하는 모든 밸리데이션 항목을 만족하는 것으로 확인되었다.

3.5. 신규 개발 시험법 적용성 평가

신규 개발된 루테인 정량 시험법의 적용 가능성을 평가하기 위하여, 기존 건강기능식품공전 시험법을 적용하였을 때 적합 기준(표시 함량 대비 80–120 %)을 만족하지 못했던 분말 제형 건강기능식품 5종을

Table 5. Linearity and lower limit of quantitation (LLOQ) for lutein determined by HPLC ($n = 3$)

Range (µg/mL)	Slope	y-Intercept	r^2	^a LLOQ (µg/mL)
53.28–195.36 (5 Concentrations)	$28150 \pm 2,841.23$	99344 ± 56408.12	0.996 ± 0.0031	20.04

^aLLOQ = (10 standard deviation of y-intercept) / mean of slope

Table 6. Accuracy, repeatability, and reproducibility of the developed lutein assay in powdered dietary supplements. Accuracy is expressed as recovery (%), repeatability as the relative standard deviation (RSD) of recovery (intra-laboratory), and reproducibility as the RSD of recovery (inter-laboratory)

Dosage Form	Compound	Fortified Conc. (mg/g)	Recovery (Lab 1, $n=5$)		Recovery (Lab 1–3, $n = 5 \times 3$)	
			Mean $\pm$ SD (%)	RSD (%)	Mean $\pm$ SD (%)	RSD (%)
Powder	Lutein	62.16	103.67 ± 0.56	0.54	-	-
		124.32	100.63 ± 1.69	1.68	100.16 ± 2.24	2.24
		186.48	102.50 ± 0.38	0.37	-	-

Table 7. The practical sample applicability of the present lutein assay

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	Powder	10.00	9.85	0.26	98.45	P
2	Product 2	Powder	10.00	9.00	0.27	90.00	P
3	Product 3	Powder	5.00	4.00	0.50	80.04	P
4	Product 4	Powder	8.00	6.68	0.60	83.50	P
5	Product 5	Powder	10.00	9.97	0.20	99.70	P

^aThe acceptable range of B / A × 100(%) is 80–120 %.

대상으로 분석을 수행하였다(n = 3). 분석 결과, 모든 시료에서 루테인 함량이 표시 함량 대비 80.04–99.70 % 범위로 확인되어, 공전 기준을 만족하는 것으로 나타났다(Table 7). 특히 기존 시험법에서 기준을 충족하지 못했던 시료들이 본 시험법에서는 모두 적합 범위 내에 포함된 점은, 분말 제형에 대한 적용 시 본 시험법이 보다 신뢰성 있는 정량 결과를 제공할 수 있음을 시사한다. 따라서 본 시험법은 분말 제형 루테인 함유 건강기능식품에 대해 현행 공전 시험법의 보완적 대안으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 현행 건강기능식품공전 루테인 시험법이 분말 제형에 적용될 경우 정량 결과의 신뢰성이 저하될 수 있는 한계를 확인하고, 이를 개선하기 위한 신규 분석법을 개발하였다. 개발된 시험법은 *n*-부탄올을 이용한 추출과 흡광도 측정 및 HPLC 분석을 기반으로 하며, 식품의약품안전처 가이드라인에 따른 밸리데이션에서 모든 항목을 만족하였다. 또한 실제 시중 유통 제품에 적용한 결과, 기존 시험법에서 기준을 충족하지 못했던 시료들이 모두 적합 범위를 만족하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 본 시험법이 분말 제형 루테인 함유 건강기능식품의 정량 분석에 있어 기존 시험법의 한계를 보완할 수 있는 실용적인 대안이 될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

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

References

1. M. Eggersdorfer and A. Wyss, *Arch. Biochem. Biophys.*, **652**, 18-26 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>
2. Spinach, mature (FoodData Central – Food Details), <https://fdc.nal.usda.gov/food-details/1999633/attributes>, Accessed 1 April 2026.
3. I. Bhat and B. S. Mamatha, *Nutr. Res.*, **91**, 36-43 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2021.04.007>
4. C. M. Mewborn, C. A. Lindbergh, B. R. Hammond, L. M. Renzi-Hammond, and L. S. Miller, *J. Aging Res.*, **2019**, 3709402 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/3709402>
5. Ministry of Food and Drug Safety Notification No. 2024-16(2024.03.20), Republic of Korea.
6. United States Pharmacopeial Convention, ‘United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 44-NF 39)’, United States Pharmacopeial Convention: Rockville, MD, USA, 2021.
7. Y. M. Kim, Y. B. Shin, M. K. Kwon, J. H. Kim, J. S. Kim, D.-K. Lee, M. J. Kang, and Y. S. Choi, *Anal. Sci. Technol.*, **36**(3), 105-112 (2023). <https://doi.org/10.5806/AST.2023.36.3.105>
8. Y. M. Kim, J. Y. Kim, Y. B. Shin, M. K. Kwon, J. H. Kim, Y. G. Kim, D.-K. Lee, S. B. Han, and Y. S. Choi, *Anal. Sci. Technol.*, **37**(6), 339-346 (2024). <https://doi.org/10.5806/AST.2024.37.6.339>
9. B. D. Gill and H. E. Indyk, *Int. Dairy J.*, **18**(9), 894-898 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.02.004>
10. E.-S. M. Abdel-Aal and I. Rabalski, *J. Agric. Food Chem.*, **63**(44), 9740-9746 (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04430>
11. Ministry of Food and Drug Safety Guidance No. 0769-06(2023.05.23), Republic of Korea.