Korean J. Food & Nutr. Vol. 14. No. 4. 360~366 (2001)

THE KOREAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION
한국식품영양학회지

<총 설>

Carotenoids 화학의 연구방법

김 재 웅
유한대학 식품영양과

Methodology of Carotenoids Chemistry

Jae-Woong Kim
Dept. of Food & Nutrition, Yuhan College

Abstract

This brief review is organized to integrate methodology of carotenoids chemistry from the author's experimental conceps. The majors include classification of carotenoids, extraction · phase separation, purification, crystalyzation, identification, quantitation, spectroscopic properties, organic reactions, and analytical methods of carotenoproteins. The goal is not write a important conceps of carotenoid but to provide a technical methods that may be useful to researchers of natural products chemistry.

Carotenoids의 분류

Carotenoids는 C_{40}인 tetraterpenoid 구조로써 천연자원에 널리 분포되어 있는 황등색의 지용성 물질이다. Carotenoids를 유기화학적으로 분류할 때 크게 불포화탄화수소(carotenes)와 그 산소 유도체(xanthophylls)로 나눈다.

Carotenes 중에서 가장 잘 알려진 것이 lycopene이고; conjugated polyene의 한쪽 끝이 ionone 고리화된 것을 γ-carotene; 양쪽 끝이 모두 고리화된 것을 β-carotene이라 하는데; α-carotene과 δ-, ε-carotene은 ionone 고리 속의 이중결합 위치만 서로 다를 뿐이다. Xanthophylls에는 conjugated polyene의 한쪽 ionone 고리에만 hydroxyl group 혹은 keto group이 있거나, 양쪽 고리 모두에 hydroxyl group뿐 아니라 keto group들도 존재하며; polyene 사슬에는 hydroxyl, carbonyl, acetylenic 및 allenic group이 있는 것도 있으며; polyene 사슬을 사이에 두고 ionone 고리, 벤젠고리, 및 5-membered 탄소 고리를 이루는 것도 있다.

그 밖에 isoprenoid(C_5) 단위가 더 많이 연결된 C_{45}, C_{50}-carotenoids도 알려져 있다. Xanthophylls는 유리상태가 아니라 지방산($C_{16:0}$, $C_{18:1}$ 등)과 ester 결합을 한 것이 많으며, 배당체 형태도 있다. 특히 해산물에서 발견된 xanthophylls는 단백질과 회합되어 화학양론적으로 carotenoid-protein complexes를 이루어 존재하므로 자색, 청색, 초록색 등 여러 가지 색상을 띠고 보조성분으로 지방질, 당질이 포함되므로 생리적으로 중요한 기능을 할 것으로 믿어지나 아직도 그 본성을 잘 모르고 있다.

이와 같이 다양한 carotenoids는 현재까지 광학 이성질체를 포함해서 약 600여 종류가 알려졌다.

Carotenoids의 추출 · 상분리

Carotenoids는 열, 자외선, 산소 및 산에 대하여 아주 불안정한 물질이다. 따라서 분리 정제를 위한 TLC 과정에서도 공기 중에서 쉽게 산화되거나 퇴색, cis-trans 이성질화가 일어남으로 반드시 냉암소에서 질소 기류하에 실험이 진행되어야 한다.

† Corresponding author : Jae-Woong Kim

Carotenoids를 추출·상분리 할 때 추천할 수 있는 방법은 먼저 acetone으로 색소를 추출한 뒤 Et_2O와 H_2O로 분배하여 Et_2O 층으로 carotenoids를 이행시키고 Et_2O 추출물은 질소 기류 중에서 감압 건조시킨다.

Ester 형의 carotenoids는 추출물을 최소량의 EtOH에 녹이고 50% KOH(w/v)를 EtOH 용액 10ml 당 1ml 정도 첨가하고 흔들어 5~10분간 가열하거나, 5℃ 또는 실온에서 하룻밤(12시간) 방치한 후 H_2O로 희석한 다음 유리된 carotenoids를 Et_2O로 추출한다. 그러나 비누화 후 carotenoids가 Et_2O 층으로 이행되지 않을 때는 차가운 상태에서 6N-HCl를 소량씩 첨가하여 산성으로 하면 Et_2O 층으로 즉시 이행된다. Et_2O 층으로 이행된 carotenoids는 H_2O로 충분히 세척하여 KOH를 모두 제거하고 무수 Na_2SO_4로 건조한 다음 농축한다. 이때 sterols이 공존하면 농축물을 석유 ether에 녹이고 −10℃에 하룻밤 방치하면 바닥에 sterols이 석출되므로 원심분리하면 쉽게 제거할 수 있다.

Carotenoids를 분리 정제하기 전에 carotenes와 xanthophylls를 상분리 할 수 있다. 즉, 농축된 추출물에 동량의 석유 ether와 90% MeOH를 넣어 흔들면 dihydroxy-carotenes는 MeOH 층으로 이행되고, monohydroxy-carotenes과 carotenes는 석유 ether 층에 남는다. 이때 윗층인 석유 ether 층을 다시 한번 90% MeOH로 처리하면 monohydroxy-carotenoids들은 모두 MeOH 층으로 이행된다. MeOH 층으로 이행된 carotenoids들은 다시 Et_2O에 이행시키고 각각 농축하면 carotenes와 xanthophyls를 간단히 상분리 할 수 있다.

Carotenoids의 분리 정제

Carotenoids를 분리 정제하는 방법으로 paper chromatography(PC), column chromatography(CC), thin-layer chromatography(TLC), high performance liquid chromatography(HPLC) 방법이 이용되고 있다.

PC법에서 사용되는 여지는 Whatman No. 1 여지가 좋고, 다량 분리할 목적으로는 CC 법이 적당하다. CC에 사용되는 충진제는 컬럼용 silicagel, silisic acid, Al_2O_3, cellite, MgO, $MgCO_3$, CaO, $CaCO_3$, $Ca_3(PO_4)_2$, starch, sucrose, cellulose 등이 있으나 absorbents의 선택에 따라 용출 용매는 달라질 수 있으므로 전문 핸드북을 참고해야 한다. 일반적으로 극성 용매 일수록, 석유 ether < $CHCl_3$ < acetone < EtOH < H_2O 순서로 용리력이 크다. HPLC 방법에서는 Zorbax ODS나 Microsorb C_1 컬럼을 장착하고, 용출 용매로 MeOH/acetonitrile/dichloromethane(10:85:5, v/v)를 사용하면 분리능이 좋다고 알려졌다.

간편한 방법으로는 silicagel을 입힌 TLC법이 가장 좋으며 전개 용매도 여러 가지 있을 수 있겠으나 저자의 경험에 따르면 1차로 10~40% acetone/n-hexane 또는 benzene, acetone/P.E, 2차로 benzene/ethylacetate/MeOH(15:4:1, v/v) 혼합용매를 사용하면 carotenoids 분리에 효과적이다.

Carotenoids의 결정화

Carotenoids의 crystalization 조작에는 시료의 량이 최소한 1 mg 이상은 되어야 한다. 먼저 carotenes를 결정화하려면 최소 용량의 따뜻한 석유 ether(또는 벤젠)에 carotenoids를 녹이고, 용액이 혼탁하게 될 때까지 한 방울씩의 EtOH를 첨가한 다음, 따뜻하게 가열하거나 석유 ether를 한 방울 가하면 다시 투명해 진다. 이때 냉암소(−20℃)에 방치하면 24시간 후에 결정화가 일어난다.

Xanthophylls인 경우 최소량의 따뜻한 MeOH나 EtOH에 carotenoids를 녹인 다음 석유 ether를 혼탁해질 때까지 한 방울씩 첨가하고, 다시 MeOH를 한 방울 첨가할 때 투명해지면 −20℃에 방치한다.

Carotenoid 결정의 미세구조를 관찰하기 위하여는 scanning electron microscope(SEM)을 이용한다. 즉, ion coater 기로 4mA에서 5분간 gold coating 시킨 후 SEM으로 19KV에서 최적 조건의 배율을 찾아 관찰하고 polaroid NO. 665 필름으로 촬영한다. 이것은 유기 반도체 개발에 이용하는 수단이 된다.

Carotenoids의 동정

TLC상에서 carotenoids의 흡착특성은 분자 내의 double bond 수, end groups의 형태, 분자의 크기(eq. C_{30}, C_{40}, C_{45} 등)에 따라 다르다. 흡착제나 전개용매에도 영향을 받기 때문에 Rf 치는 carotenoids를 동정하는데 있어서 중요하다.

일반적으로 carotenes < xanthophylls의 순서로, C-C-C < C=C-C < C≡C-C < C=C=C 순서, ε- < β- < α- < Ψ-carotene 순서, -OR < > C=O < 2 > C = O < -OH < -COOH 순서, β-carotene < 5,6-epoxide < 5,6,5′, 6′-diepepoxides < 5, 8-epoxide < 5,6,5′, 8′-diepoxides < 5,8,5′, 8′-diepoxides 순서로 각각 흡착력이 증가된다.

Carotenoids의 정량법

Carotenoids를 분광학적으로 정량할 때는 TLC로 carotenoids를 분리 전개한 다음 긁어서 용출·정용하고 흡광도를 각각 측정한 후 다음의 수식을 이용한다.

mg(carotenoids) / tissue 100g당 = O.D(λ_{max}) × Vol × 10^3 / $E^{1\%}_{1cm}$ × g(tissue weight), % = O.D(λ_{max}) for each 1ml × Vol × 100/ Σ [O.D(λ_{max})for each band × Vol].

여기서 $E^{1\%}_{1cm}$ = specific extinction coefficient로써 1cm light-path의 cuvette 중에 들어있는 1% carotenoid 용액을 나타내지만, 실제로는 n-hexane, EtOH 또는 석유 ether 용액에서 carotenoids의 $E^{1\%}_{1cm}$ = 2,500 at 450nm 값을 사용해도 좋다.

그러나 더욱 간편한 방법을 소개하면, 유리 TLC 판에서 carotenoids를 분리 전개한 다음 TLC scanner로 λ_{max} 450nm에서 개별 정량하는 방법이 신속·정확하다.

Carotenoids의 분광학적 특성

Carotenoids의 구조 결정에 사용되는 분광기는 UV, IR, NMR, MS들이다. Carotenoids의 UV 흡수 곡선은 λ_{max} 400~500nm에서 매우 특징적인데, 작용기의 유무와 사용되는 용매에 따라 조금씩 다르다. 대체로 λ_{max} 450nm 근처에서 큰 흡수띠가 하나 있고 그 양쪽으로 두 개의 작은 soret band 혹은 subsidiary 흡수띠가 관찰될 수 있으므로 이 세가지의 흡수띠를 용매 별로 조사하면 carotenoids 분자를 추정하는데 도움이 된다.

IR data는 carotenoids 분자 속에 있는 hydroxyl group, keto group, acetylenic group, allenic group의 특징적인 작용기를 확인하는데 자주 이용된다. 즉 -OH(ν_{max} 3500 cm^{-1}), ester 결합의 >C=O(ν_{max} 1760 cm^{-1}), polyene 사슬 위에 conjugated >C=O(ν_{max} 1660 cm^{-1}), -C≡C-(ν_{max} 2165cm^{-1}), all trans conj. -C=C-(ν_{max} 960 cm^{-1}), -C=C=C-(ν_{max} 1930 cm^{-1})의 작용기는 분자 구조를 확인하는데 있어 결정적인 역할을 한다.

NMR과 MS data는 새로운 물질의 구조를 탐색하는데 있어서는 필수적으로 사용된다.

UV 흡광도를 특정할 때 carotenoids 농도는 수 μg으로 가능하고, IR data를 얻으려면 0.2mg(KBr), NMR은 10mg, MS는 50 μg이 필요하다.

Carotenoids의 유기반응

Carotenoids 분자는 polyene 사슬을 사이에 두고 양쪽에 ionone 고리 혹은 벤젠 고리를 이루고 있다. 고리 내의 작용기들로서 hydroxyl group, carbonyl group, epoxide group, ester group, allenic-OH group 및 glycoside group이 있거나: 사슬 위에 acetylenic, allenic group들이 존재한다면 이들이 유기반응의 연구 대상이 된다.

1. Hydroxyl group의 확인

분자 내의 hydroxyl 기는 acetylation이나 methylation 반응으로 확인된다. 즉, pyridine에 녹인 carotenoids 용액 1ml에 acetic anhydride 1ml 넣고 실온에서 4시간 acetylation 반응을 시킨 다음, 차가운 증류수를 첨가하여 반응을 중지시키고 Et_2O로 색소를 추출, 질소 gas로 농축한 후 TLC로 전개하면 esterification 반응을 확인할 수 있고, pyridine 용액에서 UV 흡광도를 관찰할 때 5nm 정도 red shift가 일어나면 분자 내에 1차 또는 2차 hydroxyl group의 존재 여부를 알 수 있다. IR data에서는 esterification 반응으로 인하여 ν_{max} 3300 cm^{-1}(-OH)의 흡수 띠가 소실된다.

2. Carbonyl group의 확인

분자 내의 carbonyl 기는 $NaBH_4$에 의한 환원반응으로 확인된다. 즉, carotenoids의 EtOH 용액을 $NaBH_4$로 실온에서 반응시킬 때 1시간 이내에 색깔의 변화로 환원반응의 진행을 알 수 있으며, 반응이 끝나면 소량의 증류수를 첨가하고 Et_2O로 색소를 추출·농축한 다음 TLC 법으로 반응전·후의 Rf 치 거동을 조사하거나 EtOH 용액에서 흡광도 변화를 관찰한다. 즉, UV 흡수띠에서 나타나는 >C=O의 둔탁한 single 흡수띠가 $NaBH_4$에 의한 환원반응으로 주 흡수띠 외에 subsidiary 띠를 가지며: 고리외(polyene) 공액 >C=O기가 -OH 기로 변화하는 과정에서는 23nm 정도 blue shift가 일어나고: 고리내 공액 >C=O기는 -OH 기로 변화될 때 9nm 정도 blue shift가 있게 된다.

IR data에서는 ν_{max} 1660 cm^{-1}(사슬위 conj. >C=O) 또는 ν_{max} 1760 cm^{-1}(ester 결합의 >C=O) 띠가 없어지고, ν_{max} 3500 cm^{-1}(-OH) 흡수띠가 폭넓게 나타난다.

3. Epoxide group의 확인

Carotendoids의 EtOH 용액에 0.1N HCl을 첨가할

때 분자 내에 epoxide 기가 존재하면, 3분 이내에 청색으로 변하며, epoxide 고리의 파괴로 인하여 TLC 상에서 Rf 치는 흡착력이 증가된다. 또한 UV 최대 흡수파장은 epoxide 기의 증가에 따라 18~40nm 범위에서 단파장 쪽으로 흡수극대가 일어난다.

4. Acetylenic group의 확인

Carotenoids의 석유 ester 용액에 0.1% I_2/petroleum ether 용액을 수 μl 첨가하고 실온에서 반응시킬 때 polyene 사슬에 -C≡C- 혹은 고리내 공액 > C=O 기가 존재하면 이성 질화반응으로 색깔의 소실 현상을 관찰할 수 있고, UV 흡수파장은 8~11 nm의 blue shift가 있게 된다.

IR data에서는 ν_{max} 2165 cm^{-1}에서 -C≡C-의 미약한 흡수띠를 관찰할 수 있다.

5. Allylic -OH group의 확인

Xanthophylls의 C'-3 위치에 allylic-OH의 존재 여부는 0.01N-HCl/MeOH로 실온에서 2시간 methylation 반응으로 확인할 수 있다. 즉, zeaxanthin과 lutein은 모두 2개의 -OH기를 가지고 있으며 분자식도 같으나 ionone 고리 내의 이중결합 위치만 서로 다를 뿐이다.

그러나 lutein은 zeaxanthin과는 달리 lutein의 C'-3 위치에 allylic-OH기를 구성하고 있기 때문에 그 지점에서 methylation 반응이 쉽게 일어난다. 그러므로 반응결과에 따라 lutein ester의 Rf 치는 TLC 상에서 증가된다. IR data에서도 ν_{max} 3300cm^{-1} 흡수띠는 소실된다.

6. Allenic group의 확인

Carotenoids의 polyene 사슬 위에 존재하는 allenic 구조(-C= ● =C-)는 IR data에서 ν_{max} 1930 cm^{-1}에 약한 흡수띠로 관찰된다.

7. Saponification

일정 농도의 carotenoid ester 용액 10ml에 50% 알코올성 KOH 1ml를 첨가하여 실온·암소에서 12시간 비누화 반응 후, 추출·상분리 과정에서 이미 소개된 바와 같은 방법으로 Et_2O로 추출하여 질소 gas로 농축시킨 다음 TLC, UV, IR data에서 반응전·후의 spectral 특성을 관찰한다.

Carotenoprotein의 분리 정제

Xanthophylls의 일부는 단백질과 회합되어 carotenoprotein의 복합체로 존재한다. 이 복합체는 화학양론적으로 단백질, carotenoids, 지방질 및 당질을 포함하고 있다. 단백질들을 분리 정제하기 위해서는 50mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 추출, 50% $(NH_4)_2SO_4$ 분별 침전, 투석, DEAE-cellulose, CM-cellulose, 및 sephadex G 컬럼으로 젤 여과 하든가, 또는 6M urea를 포함하는 starch(11~12%) gel, 0.1% SDS-PAGE(5~12% gel) 및 HPLC를 사용하여 구성 단백질의 특성과 분자량, 소단위체가 결정되면, 아미노산 서열 분석기로 단백질의 일차구조를 추론할 수 있을 것이며: clonal antibody 생산, 유전자 조작법을 통하여 DNA 염기서열이나 RNA 분석, 돌연변이 연구 등 의약·생리적인 특수 조절기능을 밝히게 되는 것이 현대의 첨단 과학 수준이다.

1. 총 지방질, 당류, 단백질의 정량

시료의 전처리 방법으로 carotenoprotein 복합체의 buffer 용액(10%, w/v)에 동일 부피의 MeOH를 첨가하고 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거한 상층액에 $CHCl_3$/MeOH/H_2O(1:1:0.9, v/v)을 첨가한 다음 상층인 MeOH/H_2O 층은 총 탄수화물 정량에 사용하고, 하층인 $CHCl_3$ 층은(활성탄으로 탈색하면 좋다) 총 지방질 정량에 사용한다.

총 지방질을 정량할 때, 전처리 시료 용액($CHCl_3$ 층)을 농축한 후 일정 부피의 $CHCl_3$ 용액을 만든 다음 그 0.1ml를 취하여 c-H_2SO_4 5ml에 넣고 끓는 물 중탕에서 10분간 방치한 뒤 냉각한다. 그 중 0.3ml를 취하여 phosphovanillin 시약(vanillin 0.6g, EtOH 10ml, H_2O 100ml, H_3PO_4 400ml) 6ml를 넣고 섞은 후 암소에 45분 방치하였다가 525nm에서 흡광도를 측정한다. 이 방법을 사용하면 미량의 지방질도 정량할 수 있다.

총 단백질을 정량할 때, Biuret 법, Lowry 법, 등 여러 방법이 있겠으나, 100mg의 coomassie brilliant blue G-250을 EtOH에 녹여 50ml를 만든 다음 85% H_3PO_4 100ml와 H_2O를 가하여 최종 부피 1L로 만든다. 이 용액 5ml에 carotenoprotein 용액 0.1ml을 넣고 섞은 후 2분간 방치하였다가 595nm에서 흡광도를 측정한다. 이 방법을 Bradford 법이라 하는데 단백질을 정량하는데 있어서 간편하면서도 안정성이 높다고 알려졌다.

2. 중성지방질, 인산지방질 성분의 분석

Carotenoprotein 복합체 50mg을 매회 $CHCl_3$/MeOH (2:1, v/v) 5ml씩 가하여 총 지방질을 추출·농축하여 분석시료로 한다. 한편 silisic acid(70~230mesh)

를 증류수, MeOH 순서로 충분히 세척하면서 미립자는 따라 버린다. 세척된 silisic acid는 110℃ 건조기에서 활성화시킨 후 $CHCl_3$로 평형시킨 다음 스포이드형 작은 유리 컬럼에 채우고 그 위에 분석시료를 흡착시킨 후 1분당 30ml 이하의 적당한 유출속도로 조절하면서 10배 량의 $CHCl_3$로 중성지방질을; 20배의 acetone으로 당지질을; 10배의 MeOH로 용출하면 인산지방질을 분리할 수 있다.

그러나 저자의 경험으로는 TLC를 이용하는 방법이 훨씬 간편하고 극미량의 시료라 할지라도 충분히 정량할 수 있었다. 즉, 지방질을 $CHCl_3$/MeOH(2:1, v/v) 용매로 추출·농축한 다음 최소 량의 Et_2O 용액을 만들고, petroleum ether/acetone(7:3, v/v) 또는 P.E/Et_2O/acetic acid(60:40:1, v/v)으로 silicagel G를 입힌 TLC 판 상에서 전개하면 원점에서는 인산지방질을; 전개 부분에서는 중성지방질을 얻을 수 있다. 분리된 지방질을 따로 긁어 모아서 인산지방질은 MeOH로; 중성지방질은 $CHCl_3$로 각각 용출·농축시킨다. 각 지방질의 성분을 분석하기 위하여 silicagel G의 유리 TLC 판에 일정량의 지방질을 spotting한 후에, 전개용매로서 중성지방질의 경우 P.E/Et_2O/acetic acid(90:10:1, v/v); 인산지방질인 경우 $CHCl_3$/acetone/MeOH/acetic acid/H_2O (65:20:10:10:3, v/v)을 사용하고; 전개가 끝나면 40% H_2SO_4를 분무하여 130℃에서 탄화시킨 다음 표준 지방질과 Rf 치를 비교하면 정성 확인할 수 있고; 즉시 TLC scanner(흡수파장, 540nm; 대조파장, 750nm; silt, 1.25nm; scan speed, 12nm/min)를 사용하면 흔적량의 지방질까지 모두 정량할 수 있다.

그러나 인산지방질의 경우 1차 전개용매로 $CHCl_3$/MeOH/7N-NH_4OH(130:60:8, v/v), 2차 전개용매로 $CHCl_3$/MeOH/acetic acid/H_2O(170:25:25:4, v/v)를 사용하여 이차원 전개법을 이용하면 더욱 정확하다.

3. 지방산 성분의 분석

각 지방질의 MeOH 용액 2ml에 10% 알코올성 KOH 용액 1ml씩 넣고 섞어서 실온, 암소에 24시간 방치한 다음 증류수 20ml와 Et_2O 10ml를 첨가하여 비비누화 물질(sterols 등)을 제거한다. 비누화된 H_2O층의 지방산 염은 6N-HCl로 산성화하고 10ml씩의 Et_2O로 유리 지방산을 추출, 질소 gas로 농축한 다음, 100℃에서 12.5% BF_3-MeOH 용액과 10분 동안 반응시켜 지방산 methyl ester를 얻은 후, gas chromatography GC(FID: 10% DEGS, 100~120mesh chromosorb WAW: column, 6ft×2nm I.D)로 지방산 에스테르를 분석하게 되는데 관의 온도는 190℃로 유지하면서 질소를 운반 기체로 하여 매 분당 40ml 이내의 속도로 용출시킨다. 시료 주입구와 검출기(FID)의 온도는 각각 230℃, 250℃로 하면 총 지방산에 대한 백분율이 적분계에서 얻어진다.

4. 당질 성분의 분석

당질의 분광학적 분석법으로써 총 당류는 anthrone 법; 총 환원당류는 3,5-diniro salicylic acid 법이나 Somogyi-Nelson 법; hexose는 orcinol-sulfuric acid 법; pentose는 orcinol법; hexosamine은 Elson-Morgan 법; 그리고 sialic acid는 thiobarbituric acid 법이 옛날부터 이용되어 왔다.

그러나 poly당일 경우 시료 50mg에 1ml의 1N-HCl와 함께 100℃에서 1시간 이상 가수분해하여 glycoside 결합을 파괴하고 1N-NaOH로 중화시킨 다음 원심분리, 0.45 μmillipore filter로 syringe 여과하고 일정 용량으로 하여 TLC(전개용매, BuOH/pyridine/H_2O, 8:1:1, v/v; 발색시약, EtOH/c-H_2SO_4, 9:1, v/v) 또는 당 분석용 컬럼(이동상, acetonitrile/H_2O, 85:15, v/v); 유출속도, 1ml/min; RI detector를 장착한 LC (liquid chromatography)를 사용하면 정확히 개별 정량할 수 있다. 유리당 시료인 경우는 환류 냉각기를 부착한 80% EtOH로 80℃에서 1시간 추출한 다음 원심분리하여 시료로 한다.

5. 아미노산 성분의 분석

Carotenoprotein의 아미노산을 분석하기 위하여 정제된 carotenoprotein 50mg을 특수하게 고안된 분석용 반응 유리병에 취하고 1ml의 6N-HCl과 함께 150℃에서 1시간 가수분해한 다음 실온으로 식히고 총 부피가 25ml 되도록 증류수를 첨가한 다음 30분간 초음파 처리한다. 주사여과기(0.45 μm filter)로 여과한 후 여액 50 μl를 시료 튜브에 취하고 진공감압으로 완전히 건조시킨 다음, 재건조 시약(MeOH/H_2O/trimethylamine, 2:2:1, v/v) 10ml를 첨가하여 가볍게 흔들고 다시 건조시킨다. 건조된 시료에 아미노산 유도체 시약(MeOH/H_2O/trimethylamine/phenylisothiocyanate, 7:1:1:1, v/v) 20 μl를 가하고 섞은 다음 아미노산의 phenylthiocarbamyl 유도체가 생성하도록 실온에 20분간 방치하였다가 6% acetonitrile/140mM sodium acetate로 평형시킨 Pico-Tag column(3.9×150mm, 4 μm, 50℃)를 장착한 HPLC(이동상, 60% acetonitile 수용액; OPA)로 최적 분석조건 하에서 아미노산을 정량한다.

총 유리 아미노산을 정량할 때는 시료를 80% 열 EtOH로 추출한 다음 원심분리, 여과하고 진공 감압으로 EtOH를 제거한 후, 증류수를 가하여 정용하고 그 일정량을 취하여 ninhydrin 시약과 함께 물 중탕 후 570nm에서 흡광도를 측정하면 간단히 정량 할 수 있지만, 개별 정량할 때는 일정량을 0.45 μm filter로 여과한 다음 표준품과 함께 TLC(전개용매, benzene/pyridine/acetic acid, 80:20:2, v/v; 발색시약, 0.2% ninhydrin/물포화 n-BuOH)하거나 HPLC로 UV-254 nm에서 아미노산을 정량한다.

6. 아미노산 서열의 분석

Carotenoprotein의 일차 아미노산 서열을 분석할 때는 다양한 기법들이 반복적으로 이용되고 있다. 즉, 단백질의 순수분리 정제, 전체 아미노산의 조성비, endopeptidases(특히 trypsin, chymotrypsin)와 CNBr 처리로 단백질의 선택적 분해, 단편 peptides 혼합물을 전기영동이나 HPLC로 분리, N-말단 아미노산의 결정(sanger 시약 처리), 단편들의 N-말단 잔기만을 선택적으로 제거한 다음 나머지 부분들은 Edman 분해과정(phenylisothiocyanate 시약 처리)를 되풀이하는 아미노산 서열 자동분석기를 사용하면 peptide 단편들의 일차 아미노산 서열을 결정할 수 있다.

최근에는 임상병리 검사를 비롯하여 각종 생화학 연구를 위한 관련 kit 상품들이 여러 분야별로 많이 개발되어 공급되므로 그 manual을 따라 protocol들을 적용하면 전통적인 기법보다 신속하고 간편하게 결과를 얻을 수 있다.

요 약

Carotenoids는 현재까지 약 600여 종류가 알려졌고 그들의 생리적인 특성은 비타민 A의 전구물질[1], 식품 착색제[2], 광합성에서 보조색소[3], 광보호 작용[4], 레디칼의 퀜칭효과[5], 항산화 작용[6], 항암작용[7], 치료 의약품[8], 그리고 면역활성[9]에 대하여 분야별로 수많은 논문들이 발표되었고 또 그 중요성도 널리 인정되어 왔다[10~12].

본 총설에서는 carotenoids의 분류와 정제, 결정화 방법, 동정 및 정량법, 분광학적 특성, 작용기의 유기반응, 그리고 carotenoprotein의 분리 정제와 구성 성분의 분석 방법에 대하여 저자가 체험한 실험연구 결과들을[13~26] 바탕으로 핵심 기술만을 서술하였다. 그러므로 이 분야를 연구하거나 천연물 화학 연구에 관심있는 독자들에게는 분자구조 결정이나 분석기술을 종합적으로 이해하는데 도움이 될 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Isler, O.: Carotenoids, Birkhauser, Basel (1971).
2. Goodwin, T. W. : Chemistry and biochemistry of plant pigments, Academic press, London (1976).
3. Geissbuhler, H.: 5th International symposium on carotenoids, *Pure Appl. Chem.*, 51, 438~680 (1979).
4. Britton, G. and Goodwin, T. W. : Carotenoid chemistry and biochemistry, Pergamon press, Oxford (1982).
5. Goodwin, T. W.: The Biochemistry of the carotenoids, Vol. I, 2nd ed. plants, 1-377, London Chapman & Hall. (1984).
6. Goodwin, T. W. : The Biochemistry of the carotenoids, Vol. II, 2nd ed. animals, 1-224, London Chapman & Hall. (1984).
7. Davis, B. H. and Rau, W.: 7th International symposium on carotenoids, *Pure Appl. Chem.*, 57, 639~821 (1985).
8. Krinsky, N. I., Mathrews-Roth, M. M. and Taylor, R. F.: Carotenoids(chemistry and biochemistry), Plenum press, New York (1990).
9. Britton, G.: 9th International symposium on carotenoids, *Pure Appl. Chem.*, 63, 1~176(1991).
10. Packer, L.: Carotenoids, part A, Methods Enzymol. Academic press, San Diego(1992).
11. Krinsky, N. I.: Action of carotenoids in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.* 13, 561(1993).
12. Canfield, L. M. Krinsky, N. I., and Olson, J. A.: Carotenoids in human health, *Ann. NY. Ac. Aci.* 691, 1~290(1993).
13. 김재웅, 이태녕 : 굴 중의 Carotenoids 성분에 관한 연구, 서울대학원(1975).
14. 김재웅: 홍합으로부터 추출한 Fucoxanthin에 대한 연구, 유한대학 논문집(1980).
15. 김재웅: Caracterization of carboxypeptidase B and astaxanthin ester from the eggs of wild salmon(*Salmo salar*), *대한화학회지*, 29, 295(1985).
16. 김재웅, 이정복: Analytical studies on the lipid in carotenoproein purified from Salmo Salar eggs, *Kor. J. Food. Nutr.*, 1, 18(1988).
17. 김재웅, 민태진, 이태녕: 연어알에서 분리한 Carotenoprotein의 구조적 특성, *대한화학회지*, 32, 377(1988).
18. 김재웅, 김동희, 이정복, 이서구: 사철 느타리버섯중 G418-sensitive 미토콘드리아성 ATPase/ATPsynthase의 특성, *분석과학회지*, 5, 477(1992).
19. 김재웅 : Carotenoids의 의약적인 응용, *한국식품영양학회지*, 6, 231(1993).
20. 이서구, 김재웅: 대하 껍질 중 Carotenoprotein의 특성,

동국대학원(1993).
21. 김재웅, 이서구: *P. oreintalis*로부터 분리정제한 Carotenoprotein의 특성에 관한 연구, *대한화학회지*, 38, 608 (1994).
22. 김재웅: 항산화성 비타민류의 생리적 특성, *유한대학 논문집* (1995).
23. 김재웅: LDL 수식에 따른 동맥경화와 방어인자, 유한대학, 산업과학기술연구소(1995).
24. 김재웅, 김동희, 이서구: Structural elucidation of carotenoids in *P. orientalis* shell, *Kor. J. Food. Nutr.*, 13, 269 (2000).
25. 김재웅, 민태진 : 표고버섯 중 F1-ATPase의 분자 구조적 특성, 유한대학, 산업과학기술연구소 (2001).
26. 김재웅, 김동희, 이정복, 이서구 : 자기소화법에 의한 효모 Extract중 불용성 물질의 분석화학적 특성, *한국식품영양학회지*, 8, 280 (1995).

(2001년 6월 21일 접수)