

Carotenoid의 생리활성과 함량분석

김정봉*[†] · 하선화* · 이종렬* · 김행훈* · 윤상홍* · 김용환*

*농업생명공학연구원

Biological Activities and Analysis of Carotenoids in Plants

Jung-Bong Kim*[†], Sun-Hwa Ha*, Jong-Yeoul Lee*, Haeng-Hoon Kim*, Sang-Hong Yoon*, and Yong-Hwan Kim*

*National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT: Carotenoids are the major pigment of pepper (*Capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esulentum*) which are very important foods in Korea. However the analysis of carotenoids is quite complicated because of their diversity and the presence of *cis-trans* isomeric forms of these compounds. The objective of this review is to collect the achievements on the field of the chromatographic separation of carotenoids in food and some vegetables, to describe and critically evaluate the techniques, and to compare the benefits and shortcomings of the various chromatographic methods such as adsorption and reversed-phase HPLC and thin-layer chromatography. HPLC equipped with ultra-violet or photodiode array detection is most often employed in routine use for the analysis of carotenoids. Here, the method to analyze carotenoids by HPLC separation after solvent extraction and purification from pepper powder samples done in our laboratory is also mentioned.

Keywords : carotenoids, analysis, HPLC

카로티노이드(Carotenoid)는 그 어원이 당근(carrot)에서 유래하여 공액이중결합 (cojugated double bond)을 뜻하는 “-ene”과의 합성어로서 “carrot + -ene”의 카로틴(carotene)이 되었으며 광의의 화합물군에 붙이는 접미사 “-oid”가 붙어서 carotenoid가 되었다. 실제로 당근의 붉은 색은 α , β , γ 형의 carotene의 혼합물이 나타내는 색깔로서 polyene(-CH=CH-CH=CH-)이 색깔에 결정적인 역할을 한다. 또한 다양한 화학적 구조와 기능성 그리고 자연계에 널리 분포된 점등으로 볼 때 가장 중요한 천연색소이며 동식물 뿐만 아니라 미생물에도 존재한다. Otto wallach의 “isoprene rule”에 따르면 테르페노이드(terpenoid)의 기본구조인 이소프렌(isoprene: C_5)이 여러개 결합하여 사슬 모양의 polyene 구조를 가지고 있어서 polyene색소라고도 하며

합성이 될 때는 geranylgeranyl pyrophosphate(C_{20}) 분자 두개가 결합하여 최종적으로 tetraterpene(C_{40})인 카로티노이드가 된다(Buchanan *et al.*, 2000).

구조적 특성에 따라 카로티노이드는 산화형태인 oxygen을 포함하느냐에 따라서, 크산토펜(xanthophyll)과 카로틴(carotene)의 두가지로 분류되는데 크산토펜에는 zeaxanthin, antheraxanthin, violaxanthin, β -cryptoxanthin, lutein, canthaxanthin, capxanthin 등이 있고 카로틴에는 탄화수소로만 이루어진 lycopene, β -carotene, α -carotene등이 있다.

특히 carotene의 경우 천연에 α -, β -, γ 형태의 3가지 이성체가 있는데 일반적으로는 주로 β 형태가 존재한다. 특히 카로티노이드는 생물체 대부분의 기관에서 특이하면서도 뚜렷한 작용과 기능을 가지고 있는데 대기권에 있는 생물체중에서 광합성을 하는 식물체에는 필수적인 성분이다. 비타민 A의 전구체이기도 한 일부 카로티노이드는 망막질환이나 백내장, 심장병, 암등을 예방하는 의학적 효과가 있으며 erithropoietic protoporphyria등 광노출에 관련한 질환을 치료하는데 성공적으로 사용되어왔다. β -carotene 이나 비타민 A의 전구체에 대한 관심이 높아지고 있는 가운데 일반적으로 식품의 성분조성에서 이들 성분의 함량이나 카로티노이드 전체 함량에 대한 조사 보고가 증가하고 있다(Granado *et al.*, 1992; Hart, 1995; Muller, 1997).

식품이나 작물에서 carotenoid의 조성을 정확하게 정량하는 것은 대단히 의미 있는 일이며 분석법을 확립하는 것은 이들 목표를 달성하는 밑거름이 될 것이다. 지금까지는 일반적으로 chromatography에 의해서 분리하여 카로티노이드를 정량하는 방법이 사용되어져 왔으나 카로티노이드의 물리적, 화학적 그리고 생화학적 특성에 대한 조사방법은 아직 미흡한 수준이다. 예를 들면, 식물에서 크산토펜이나 카로틴을 정량하는 방법으로 AOAC방법은 아직 open column 방법에 의존하고 있는 정도이며 개개의 carotenoid를 분리하는 방법으로는 적당치 않다. 계속된 chromatography의 기술과 장비 발전으로 인하여 넓은 파장에서 동시에 검색이 가능한 photodiode array detection

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-299-1745 (E-mail) jungbkim@rda.go.kr

<Received November 18, 2003>

(PAD)가 일반화되기에 이르렀고 프로그램 역시 chromatogram 상에 있는 모든 peak를 원하는 파장에서 얼마든지 검색이 가능하게 되었다(AOAC, 1998; Van, 1999).

따라서 본 논문에서는 chromatography에 의한 카로티노이드의 정량법을 고찰하고 실례를 들어서 설명하였으며 carotenoid ester 분리법을 조사하였다.

카로티노이드의 생리활성

Lutein, zeaxanthin과 같은 크산토펜은 원형질체나 사람의 눈에 들어 있어 있는 생리활성물질로서 빛이 흡수될 때 활성산소 등으로부터 세포를 보호하는 기능을 하며 안구세포의 분열에 중요한 역할을 담당한다(Seddon, 1994; Olmediller 2002)

lycopene은 토마토와 관련생산물에 많이 들어 있는 생리활성물질로서 특별히 주목 받는 기능은 항산화제 기능이며, 세포가 깨지면서 과일과 lycopene간에 약화된 결합 때문에 lycopene의 활성이 개선되는 특징이 있어서 가공된 제품이 활성이 더 강하다(Shi, 2000)

β -cryptoxanthin은 활성산소로부터 세포를 보호하는 기능을 가진 카로티노이드로서 butter 색깔을 내는데 사용되고 있으며 망고나 파파야 등에 많이 존재하고 비타민 A의 전구체로서 활성이 강하다(Kohlmeier, 1995)

β -, α -carotene은 사람의 간 등에 함유된 카로틴으로서 α -carotene보다 β -carotene이 체내에 6배정도 많이 들어 있으며 항산화제로서의 활성도 강하다(Kontush, 1999)

비타민 A의 결핍시 야맹증, 피부 각질화, 안구건조증, 퇴행성 시력감퇴, 유아 성장저해 등을 유발하므로 영양강화를 위한 식품보조제로 마아가린이나 우유 등에 첨가되는 비타민 A 보조제는 부가가치가 높은 물질로 판매되고 있다. Scott등은 식품에 존재하는 프로비타민 A 카로티노이드 활성을 retinol을 기준으로 하여 retinol equivalent(RE) 지수를 아래와 같이 나타내기도 했다(Scott, 2000).

$$1 \text{ retinol equivalent(RE)}=1 \mu\text{g retinol}=6 \mu\text{g} \\ \beta\text{-carotene}=12 \mu\text{g} \text{비타민 전구체}$$

카로티노이드 생합성 대사

카로티노이드의 성분 및 함량을 변화시킴으로서 식물의 영양학적 가치를 증진을 시키려는 노력은 여러 가지 다양한 접근방법에 의해 시도되어 왔다. 특히 Burkhardt *et al.*(1997)이 광합성 능력이 없는 식물조직에서 프로비타민 A인 β -carotene을 인공적으로 합성하는 연구를 시작하여 같은 실험실에서 벼 종자의 색깔이 황금색으로 변환된 이른바 golden rice를 만들어서 보고한바 있다. 쌀을 주식으로 하는 아시아, 아프리카, 라틴 아메리카 등 최소한 26개국 이상의 나라, 특히 서남아시아의 5세 이하 어린이의 70%가 비타민 A의 결핍증에 의해서

고통을 받고 있다는 점에서 이 연구는 주목을 받았다. 카로티노이드는 종류가 700종 이상이나 존재하고 *cis* 및 *trans*의 이성체가 생화학적으로 각각 다른 효과를 나타내기 때문에 생리·대사적 기능이 아직 정확하게 다 밝혀지지 않고 있다(Neil, 1992). 대사공학적으로는 국내에서도 Ha *et al.* (2003) 고추 과실의 숙성 과정에서 mevalonate pathway에 관여하는 카로티노이드 생합성 효소인 GGPS, PSY, PDS의 대사경로 및 유전자 발현에 대해서 연구하고 있다.

정성·정량분석

추출 및 시료조제

공액이중결합의 구조 때문에 빛, 산소, 열에 매우 불안정한 카로티노이드는 산이나 알칼리적 환경에서도 구조가 불안하여 분석시 많은 어려움이 있다. 구조에 영향을 줄 수 있는 이런 요인들은 시료에 존재하는 카로티노이드를 분해 또는 변형시킬 수 있으며 조성까지도 바꿀 수 있다. 그로 인해 카로티노이드를 분석할 때는 사전에 주의할 점이 많으며 이에 대해서도 개선된 방법들이 언급되어지고 있다. 예를 들면, 실험실에서 항산화제의 사용은 직사광선을 피해 암조건에서 처리하고, 진공상태에서 농축을 한다거나 질소나 아르곤으로 산화를 방지하며 영하 20°C에서 실험을 수행한다. 시료 전처리 과정중에서 산화를 방지하기 위해서 가장 많이 쓰이는 방법으로 항산화제를 이용하는데 특히 시료를 비누화하여 유리 카로티노이드를 분석할 때 많이 이용한다. 주로 쓰이는 항산화제로는 ethoxyquin, pyrogallol, ascorbic acid 그리고 sodium ascorbate가 있으며 특히 butylated hydroxytoluene (BHT)는 가장 많이 사용되고 있는 항산화제로서 0.01-0.1% 정도의 농도로 쓰인다 (Ritter, 1981; Taylor, 1983; Britton, 1991; Britton, 1991).

식품이나 동·식물 등 분석시료의 범위가 광범위하고 카로티노이드 농도와 종류 역시 시료에 따라 차이가 많이 나기 때문에 고정된 추출방법은 없다. 식품에서 카로티노이드를 추출할 때는 MeOH이나 MeOH 혼합액을 주로 사용하는데 Hart와 Scott의 방법을 예로 들면, 가공된 또는 생체상태의 과일이나 야채에서 카로티노이드를 분석할 때 MeOH-THF (1:1, v/v) 용액을 사용하였으며 MeOH-diethyl ether(Weissenberg, 1997), MeOH-chloroform (Oliver, 1998), MeOH-hexane (Schmitz, 1989), MeOH-acetone-hexane (Gregory, 1987; Ferruzzi, 1998) 등을 사용하는 보고가 있다. 일부에서는 acetone(Ittah, 1993)만을 사용하거나 light petroleum과 섞어서 사용하기도 한다 (Mouly, 1999). 당근과 water convolvulus(물매꽃)에서 카로티노이드 분석시 hexane-acetone-MeOH-toluene(10:7:6:7)를 사용하였으며 추출조기에 잔류하는 지질은 염과의 용매분획을 통해서 제거하였다(Chen *et al.*, 1991). 초임계추출(supercritical fluid extraction; SPE) 방법은 신속하고 편리해서 많은 연구가 진행되었다(Modey, 1996). Tonucci & Beecher (1992)는 압력과

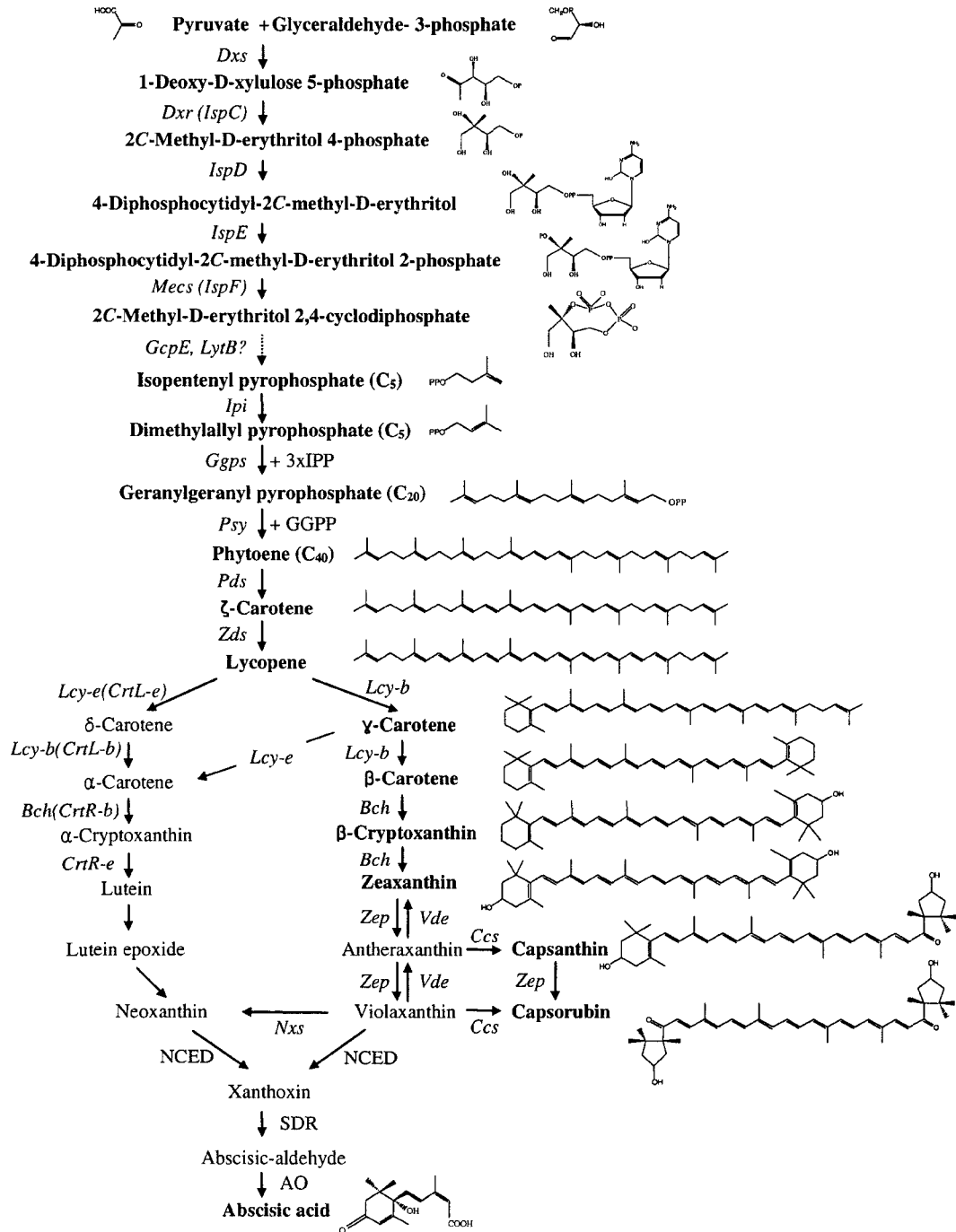


Fig. 1. 식물에서 카로테노이드의 생합성 과정. Abbreviations: AO, aldehyde oxidase; *Bch* (*CrtR-b*), β-ring hydroxylase gene; *CrtR-e*, ε-ring hydroxylase gene; *Ccs*, capsanthin/capsorubin synthase gene; *Dxr*, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene; *Dxs*, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene; GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate; *Ggps*, GGPP synthase gene; *Ipi*, IPP isomerase gene; IPP, isopentenyl pyrophosphate; *Lcy-b* (*CrtL-b*), lycopene-β-cyclase gene; *Lcy-e* (*CrtL-e*), lycopene-ε-cyclase gene; *MecS*, 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase gene; *NCED*, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; *Nxs*, neoxanthin synthase gene; *Pds*, phytoene desaturase gene; *Psy*, phytoene synthase gene; *SDR*, short-chain dehydrogenase/reductase; *Vde*, violaxanthin de-epoxidase gene; *Zds*, ζ-carotene desaturase gene; *Zep*, zeaxanthin epoxidase gene (Ha, 1999).

온도가 다른 조건에서 MeOH과 EtOH 그리고 2-propanol의 농도를 조절하여 CO₂를 이용한 추출방법을 개발하여 지질성 시

료에서 96%의 회수율로 추출하였다. 시료의 수분함량에 따라 회수율이 다르기 때문에 시료의 건조방법이 중요한데 동결건조

방법이 가장 좋은 회수율을 나타냈다(Spanos, 1993).

비누화(saponification) 및 정제

카로티노이드를 정량할 때는 일반적으로 추출과정 다음에 알칼리에 의한 비누화를 실시한다. 과일이나 야채에 있는 카로티노이드는 지방산과의 에스터결합을 하고 있는 경우가 많아서 순수 카로티노이드로 변환시키는 과정이 필요하기 때문이다. 에스터결합의 정도는 xanthophyll에 있는 OH기의 숫자와 기능에 따라서 차이가 많이 난다. 즉 β -cryptoxanthin과 같은 monohydroxy-carotenoid는 하나의 지방산(monoester)과 에스터결합을 하고 있으며 lutein이나 zeaxanthin 같이 두 개의 OH를 갖는 카로티노이드는 하나 (monoester) 또는 두 개 (diester)의 지방산과 결합하여 있다 (Spanos, 1993). 따라서 이들에 대한 peak는 HPLC에서 분리하기 어렵기 때문에 정량시 비누화 과정을 거쳐 붙어 있던 이들 지방산을 제거하고 난 후 정량한다(Chen, 1994). 비누화는 흔히 KOH 용액으로 하는데 물이나 에탄올 또는 메탄올에 포화시킨 용액을 사용한다(Goodwin, 1976). 반응조건은 일반적으로 실온에서 하지만 반응시간을 단축하기 위해서 가열하기도 한다(Tee, 1991). 비누화가 끝난 다음에는 증류수와 diethyl ether 또는 hexane으로 용매분획을 통해서 KOH를 제거한다.

비누화 과정에서 발생하는 각 카로티노이드(Muller, 1997; Oliver, 1998; Ittah, 1993)와 전체 카로티노이드 함량(Deli, 1992) 손실에 대해서 보고가 많이 있지만 반응조건이나 시료의 조성에 따라서 다르게 나타나고 복잡한 과정을 피하기 위해서 비누화를 하지 않고(Oliver, 1998) 유리 및 ester 형태의 카로티노이드를 바로 정량하는 방법들이 일부 사용되어지고 있다. 우유나 기타 유제품에서 카로티노이드를 분석할 때는 지질의 함량(~45%) 이 높거나 카로티노이드가 지질의 matrix에 포함되어 있기도 하기 때문에 비누화과정은 필수적이며 보다 복잡한 문제를 갖고 있다.

카로티노이드 분석시에 가장 큰 문제점중의 하나는 표준물질을 맘대로 사용할 수 없다는데 있다. 즉 원래 자연계에 존재하는 카로티노이드의 종류가 많아서 뿐만 아니라 구조적 불안정성 및 이성체 존재 등으로 특정한 종류를 구하기 힘들고 상업적으로도 유통되어지는 카로티노이드의 종류가 제한적이다. 일반적으로 쉽게 구할 수 있는 카로티노이드로는 β -carotene, α -carotene, lutein, zeaxanthin, lycopene, β -cryptoxanthin 등이 있으며 capsantin, capsorubin 등도 비교적 쉽게 구입 할 수 있기는 하지만 분리용 표준물질로 사용할 수 있을 정도로 순도가 높은 것은 많지 않다. 카로티노이드는 예전부터 실험자가 야채나 과일에서 직접 분리·정제하여 표준물질로 사용한 경우가 많았다. 층분리(phase separation), thin layer chromatography(TLC), liquid chromatography(LC) 방법 등으로 분리하여 사용하였으며 지금은 분획용 HPLC(preparative-LC)에서 보다 간편하고 신속하게 분리정제가 가능해졌다.

표준물질을 분리할 때는 보통 두세 단계의 정제과정을 거치는데 각 카로티노이드별로 사용하는 재료를 보면, neoxanthin-배추, violaxanthin-시금치, antheraxanthin-토마토, α -cryptoxanthin-당근잎, capxanthin과 capsorubin은 paprika를 재료로 많이 사용한다. 카로티노이드는 분광학적인 자료 (spectrum)에 의해서 각각을 동정하거나 정량하기도하며 순도를 가늠하기도 하고 용매별 자료와 각종 문헌(Ritter, 1981; Britton, 1991; Foppen, 1971)을 이용하기도 하고 순도는 분광광도계나 HPLC에 의해서도 측정이 가능하다. 카로틴과 크산토펜을 정량하는데 open column이 사용되어져 오다 지금은 HPLC가 쓰이고 있으나 지금도 AOAC방법으로는 open column이 사용되고 있다(Hollman, 1993).

카로티노이드를 정제할 때 쓰이는 충전제로는 용매별로 다르긴 하지만 alumina, silica gel, MgO, MgCO₃, Ca(OH)₂, CaCO₃, Celite 등이 있고(Van, 1997; Rentel, 1998) silica gel에서 TLC를 사용할 경우에 light petroleum ether, diethyl ether, toluene 및 EtOH 등의 용매가 사용된다(Britton, 1985). Silica gel TLC에 의해서 카로티노이드를 분리할 경우에는 분리된 물질을 모아서 적절한 용매에 다시 녹여 파장별 스펙트럼 자료에 의해서 동정하거나 정량한다.

카로티노이드를 분리하는데 있어서 최근에 역상 TLC를 많이 사용하고 있는데 light petroleum ether-acetonitrile, (MeCN)-MeOH의 다양한 용매조성(Van, 1995)을 사용하면 silica TLC 보다 분리가 잘되는 장점을 가지고 있다. Chen(1992)은 silica gel에서 크산토펜과 β -carotene을 분리하는데 hexane-acetone-chloroform-MeOH(70:25:10:5) 용매조성으로 물때꽃을 분석하였으며 역시 silica gel에서 light petroleum에 5-10%의 acetone을 희석한 용매를 사용하여 전개한 분획용 TLC에 의해서는 과일의 크산토펜을 분리하기도 하였다 (Philip, 1988). 최근에 개발된 high performance TLC(HPTLC)방법은 음료수에서 lycopene을 검출할 때 사용되기도 한다(Anderton, 1996). HPTLC는 silica gel에 dichloromethane-MeOH(1:1, v/v)으로 전개용매로 사용하고 각 물질에 대한 spectra는 densitometer (370-700 nm)로 기록되고 표준물질의 농도별로 최고 흡광파장을 조사해서 표준곡선으로 만든 다음 계산하였다.

HPLC와 같이 분획용 HPLC도 카로티노이드를 분리하는데 유용하게 사용되고 있는데 분석용 HPLC와는 달리 고정상의 입자크기 (7-10 μ m)가 더 크고 유량도 많다. Wingerath(1996)는 C₁₈ 역상칼럼에 MeOH-MeCN-DCM-n-hexane (20:40:20:20) 용매를 4 ml/min. 속도로 조절하여 과일주스에서 carotenol fatty acid ester를 분리하였으며 Yuang & Chen(1998)은 Ultrasphere C18, 5 μ m semi-preparative 칼럼으로 MeOH-water-DCM(90:8.2, v/v) 용매를 3 ml/min 속도로 하여 조류로부터 trans-astaxanthin을 분리하였다. 카로티노이드 표준물질의 조제는 정제된 색소의 이성체화와 분해 때문에 상당한 주의를 요구한다. 일단 저장용으로 조제된 표준물질은 -20°C이

하 암소에, 그리고 질소로 충전 후 항산화물질을 첨가하여 보관한다. 표준물질을 알맞은 농도로 희석하기 위해서는 용매 선택을 잘 해야 하고 용액의 농도는 흡광도를 측정하여 계산하거나 HPLC에 의해서 순도를 점검하여야 한다.

HPLC에 의한 카로티노이드의 정량

Granado *et al.*(1992)은 spheri-5-RP-18과 spheri-5-ODS 컬럼을 장착하여 MeCN-DCM-MeOH(70:20:10, v/v)의 이동상(1.8 ml/min)조건으로 스페인산 야채에서 카로티노이드 조성을 조사하여 조리전과 조리후의 카로티노이드변화를 비교하였다. Lutein과 zeaxanthin을 분리하기 위해서 MeCN-MeOH (85:15, v/v)을 이동상으로 하였고 비프로비타민 A(lutein, zeaxanthin, lycopene)와 프로비타민 A(β -cryptoxanthin, γ -carotene, α -carotene)을 분리하여 보고하였는데 β -apo-8'-carotenal과 canthaxanthin은 함유되어 있지 않았으며 echinenone이나 retinyl palmitate를 내부 표준물질로 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

시료를 비누화하는 과정에서 xanthophyll을 다룰 때는 세심한 주의가 필요하고 그중에서도 lycopene이 가장 불안정하였다. Ben-Amotz와 Fishler (Ben-Amotz, 1998)는 과일이나 야채에서 카로티노이드 조성을 많이 분석하였는데 Vydac 201 TP54 C18 5 μ m 컬럼을 사용하고 30°C에서 MeOH-MeCN (9:1, v/v) 이동상을 이용하여 1 ml/min 조건에서 분석하였으며 내부 표준물질로는 β -apo-8'-carotenal 과 echinenone을 사용하였다. 카로티노이드에 따라서는 이성체로 9-cis- β -carotene을 포함하는 것도 있었다. 올리브에서 클로로필과 카로티노이드를 분리(Rouseff, 1992)하는데는 역상 ion-pair HPLC Spherisorb ODS-2 5 μ m 컬럼을 사용하였는데 non-linear gradient 이동상 A(water-용매 P-MeOH, 1:1:8, v/v/v)와 이동상 B(acetone-MeOH, 1:1, v/v)을 2 ml/min 유속으로 분리하였다. 이때 용매 P 0.05 M tetrabutylammonium acetate와 1 M ammonium acetate을 물에 녹인 용액이다. 클로로필과 카로티노이드를 포함해서 18종의 색소를 분리하는데 30분간 저장된 spectrum 이 이용되었다.

카로티노이드 분석에 있어서 컬럼의 온도별 분리능은 5 μ m spherisorb ODS 2 컬럼을 사용하고 MeCN-MeOH-DCM(75:20:5, v/v, 1% BHT), 1.5 ml/min 조건에서 lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, echinenone, lycopene, α -carotene과 β -carotene을 분리할 때 온도가 1°C 상승할 때마다 머무름 시간이 1분씩 단축되었는데 가장 적절한 온도 조건은 20-22.5°C 인 것으로 나타났다. MeOH 희석용액으로 역상 컬럼을 사용하여 카로티노이드를 분리할 때 monomeric과 polymeric octadecylsilica의 차이점(Epler, 1992; Jinno, 1995)을 조사한 결과 polymeric ODS로 만든 컬럼이 monomeric ODS보다 높은 분리능을 나타냈다. 회수율 측면에서는 MeOH 이동상이 MeCN보다 높게 나타났으며(Epler, 1992), MeCN-THF(90:10, v/v)가장 적절한 이동상으

로 확인되었다(Stahl, 1993). Lutein과 zeaxanthin은 monomeric ODS에서 분리하기가 어려웠다.

최근에는 chromatography에 의한 카로티노이드의 이성체 분리에 관심이 많이 모아지고 있는데(Neil, 1992) 역상컬럼에 의한 기존의 방법은 cis-trans의 이성체 분리가 어려워 polymeric ODS 컬럼을 이용하고 있다(Epler, 1992)

Stahl *et al.*(1993)은 5개의 β -carotene 이성체와 7개의 lycopene 이성체를 분리한 바 있는데, 5 μ m particle size Suplex PKB 100을 MeOH-MeCN-2-propanol(54:44:2, v/v)이나 MeOH-MeCN-2-propanol-water가 β -carotene의 이성체 분리에 좋은 이동상임을 확인하였으며 α -, β -carotene 이성체를 동시에 분리하기에는 MeOH-DCM(99:1, v/v)이 적당한 이동상으로 나타났다. All-trans-나 9-cis-, 13-cis-, 15-cis-astaxanthin은 chiral HPLC에서 분리가 가능하였다(Abulafi, 1997). 최근에 많이 사용되고 있는 polymeric C₃₀ 고정상은 카로티노이드용 역상컬럼을 최적화 한 것으로 lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, lycopene 등의 카로티노이드는 C₁₈에 비해서 월등히 우수한 해상력을 보였다(Sander, 1994; Emenhiser, 1995; Van, 1997).

Sander *et al.*(1994)은 4개 β -carotene 이성체(All-trans-, 9-cis-, 13-cis-, 15-cis-)이성체를 분리하는데 C₃₀ 고정상을 이용하여 MeOH-methyl-tert-butyl ether-water 용매와 81:15:4→6:90:4 gradient 이동상 조건으로 우수한 분리능을 보여줬으나 카로틴과 크산토피를 분리하기에는 적절하지 않았다. Monomeric이나 polymeric C₁₈ 컬럼으로는 β -carotene 이성체를 분리하기에 적절하지 않았으며 MeOH-MTBE(1% 1 mM ammonium acetate포함) 용매로 85:15→10:90 gradient 조건에서 고구마(통조림)를 시료로 분석하였다(Van, 1997). C₁₈에 비해서 강력한 분리능을 가진 C₃₀ 고정상은 각 카로티노이드(β -carotene, α -carotene, lycopene)와 xanthophyll(zeaxanthin, lutein, β -cryptoxanthin)을 분리하는데 이동상으로 MeOH-MTBE을 이용하였다(Emenhiser, 1995; Emenhiser, 1996).

본고에서는 저자 등이 고추를 시료로 정량 실험한 내용을 실례로 들어서, 카로티노이드 추출에서 HPLC에 의한 정량에 이르기까지 과정 전반을 Minguez-Mosquera *et al.*(1993)이 사용한 방법을 일부 수정한 정량법으로 추출·비누화·정량 순으로 설명하고자 한다.

카로티노이드와 카로티노이드 ester를 추출하기 위하여 동결 건조하여 분쇄된 시료 0.5 g에 20 ml methanol/ethyl acetate/light petroleum (1:1:1, v/v/v)용액과 내부표준물질 1 ml (sudan II, 500 ppm)을 함께 넣어서 흔들고 여과하였으며 같은 과정을 세 번 반복하여 추출액을 합하고 10 g의 anhydrous sodium sulfate를 넣어서 습기를 제거하고 다시 여과하여 회전 농축기에서 농축하였다. 농축된 추출물에 50 ml diethyl ether와 30% potassium hydroxide (in methanol) 용액 2.5 ml를 가하여 실온에 방치하여 12시간 동안 비누화를 시켰다. 투여

Table 1. 내부표준물질(sudan II)을 포함한 6종의 카로티노이드 표준물질의 농도 및 용매조성

카로티노이드 성분	무게(mg)	용매	비율	용매량(ml)
lutein	5	MeOH		100
zeaxanthin	1	MeOH-chloroform	1:1	40
β -cryptoxanthin	1	MeOH-chloroform	1:1	40
lycopene	5	chloroform	100	
capxanthin	1	petroleum ether : ethyl acetate : chloroform	1:1:1	20
β -carotene	10	petroleum ether : ethyl acetate	1:1	200
sudan II	100	methanol : ethyl acetate : light petroleum	1:1:1	200

된 알칼리를 제거하기 위해서 100 ml 증류수로 세번 용매분획하고, diethyl ether층에 다시 anhydrous sodium sulfate을 가하여 수분을 제거한 다음 농축하여 1%의 BHT가 함유된 MTBE용액 2ml로 용해시키고 0.45 μ m syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용하였다.

HPLC는 Shimadzu 10 Avp 펌프 및 controller에 PDA (SPD-M10Avp)와 YMC(3 μ m, C₃₀, 250 \times 4.6 mm) 컬럼과 precolumn(Delta-pak C₁₈, 5 μ m)을 장착하여 사용하였다. 이동상 A(methanol-MTBE-water-triethyl amine, 90:6:4:0.1, v/v/v)와 B(methanol-MTBE-water-triethyl amine, 6:90:4:0.1, v/v/v) 용매에 의한 gradient 조건으로서 15분까지 변화 없이 용매 A를 100%로 흘려주다가 40분까지 용매 B가 100% 되게 하였으며 45분까지 용매 A로 바꿔서 50분까지 안정화 시켰다. 파장 450 nm, 유량 1.2 ml/min, 시료주입은 20 μ l로 하였으며 내부표준물질 sudan II을 제외한 6종의 카로티노이드의 chromatogram은 Fig. 2과 같다.

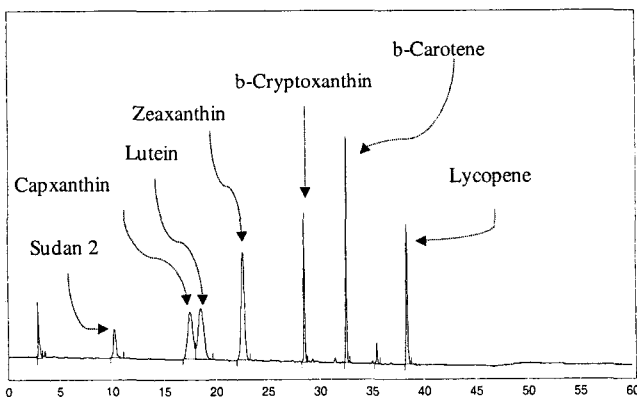


Fig. 1. YMC (3 μ m-C30-reversed phase, 250 \times 4.6 mm) 컬럼과 precolumn (Delta-pak C18 5 μ m 100 \AA , waters)에 의한 카로티노이드 6종의 chromatogram. 용매 A (methanol-MTBE-water-triethyl amine, 90:6:4:0.1, v/v/v)와 용매 B (methanol-MTBE-water-triethyl amine, 6:90:4:0.1, v/v/v)에 의한 gradient 조건(0 \rightarrow 15, 100% A, 15 \rightarrow 40 100% B, 파장 450 nm), 유량 1.2 ml/min, 시료주입 20 μ l.

계산식 (단위: mg/100g)

$$\frac{\text{sample area} \times \text{internal std 사용량 (mg)} \times 100 \times \text{conversion factor}}{\text{Internal std area} \times \text{사용한 시료의 양(g)}}$$

Internal std area \times 사용한 시료의 양(g)

표준물질조제는 먼저 내부표준물질 sudan II와 α -, β -carotene (Sigma사)을 제외하고는 모두 Extrasynthese사에서 구입하였으며 가능한 한 빛이 없는 어두운 곳에서 조제하였고 모든 용매에 1%의 BHT를 가하여 산화를 방지하여 알루미늄으로 잘 막아서 -18 $^{\circ}$ C에 냉동보관 하면서 사용하였다. 순도는 보정하지 않고 사용하였으며 시료 농도 및 용액의 조성비율은 Table 1과 같다

인용문헌

- AbuLafi S. *et al.*, 1997. *Enantiomer* 2 : 17.
 Anderton S.M. *et al.*, 1996. *J. Liq. Chroma-togr. Rel. Technol.* 20 : 101.
 AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry), Arlington, VA, 1998 : method 970.64.
 Ben-Amotz A. *et al.*, 1998. *Food Chem.* 62 : 515.
 Bramley P.M. 1992. *Phytochem. Anal.* 3 : 97.
 Britton G. 1985. *Methods Enzymol.* 111 : 113.
 Britton G. 1991. In: B.V. Charlwood, D.V. Bantorpe (Volume Editors), P.M. Dey, J.B. Harbone (Series Editors), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, San Diego, CA: p. 473.
 Buchanan B.B. *et al.*, 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Am. Soc. Plant Phys.* Chapter 24.
 Burkhardt P.K. *et al.*, 1997. *Plant J.* 11 : 1071.
 Chen B.H. *et al.*, 1991. *J. Chromatogr.* 543 : 147.
 Chen B.H. *et al.*, 1992. *Food Chem.* 45 : 129.
 Chen T.M. *et al.*, 1994. *Chromatographia* 39 : 346.
 Deli J. *et al.*, 1992. *J. Agric. Food Chem.* 40 : 2072.
 Emehiser C. *et al.*, 1995. *J. Chromatogr. A* 707 : 205.
 Emehiser C. *et al.*, 1996. *J. Chromatogr. A* 719 : 333.
 Epler K.S. *et al.*, 1992. *J. Chromatogr.* 595 : 89.
 Ferruzzi G. *et al.*, 1998. *Anal. Biochem.* 256 : 74.
 Foppen F.H. 1971. *Chromatogr. Rev.* 14 : 133.
 Goodwin T.W. 1976. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment*, Academic Press, New York.
 Granado F. *et al.*, 1992. *J. Agric. Food Chem.* 40 : 2135.
 Gregory G.K. *et al.*, 1987. *J. Food Sci.* 52 : 1071.
 Hart D.J. *et al.*, 1995. *Food Chem.* 54 : 101.
 Ha S.H. *et al.*, 2003. *Kor. J. Plant Biotec.* 30(1) : 81.
 Ha S.H. *et al.*, 1999. Expression of genes involved in carotenoid biosynthesis in pepper. *Agric Chem Biotechnol.* 42 : 92.
 Hollman P.C. *et al.*, 1993. *Analyst* 118 : 475.
 Ittah Y. *et al.*, 1993. *J. Agric. Food Chem.* 41 : 899.
 Jinno K. *et al.*, 1995. *Chromatographia* 41 : 311.

- Kohlmeier L. *et al.*, 1995. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 : 1370.
Kontush A. *et al.*, 1999. *Beisiegel, Atherosclerosis* 144 : 117.
Minquez-Mosquera M. Isabel and Damaso Horner-Mendez. 1993. *J. agric. food chem.* 41.: 1616.
Mouly P.P. *et al.*, 1999. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 968.
Modey W.K. *et al.*, 1996. *Phytochem. Anal.* 7 : 1.
Muller H. *et al.*, 1997. *Unters. Forsch. A* 204 : 88.
Neil C.O. *et al.*, 1992. *J. Chromatogr.* 624 : 235.
Oliver J. *et al.*, 1998. *J. Chromatogr. A* 829 : 393.
Olmediller B. *et al.*, 2002. *J. Nutr. Health Aging* 6 : 66.
Philip T. *et al.*, 1988. *J. Chromatogr.* 435 : 113.
Rentel C. *et al.*, 1998. *Anal. Chem.* 70 : 4394.
Ritter E.De *et al.*, 1981. *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*, Academic Press, London, New York: p. 815.
Rouseff R.L. *et al.*, 1992. *J. Agric. Food Chem.* 40 : 47.
Sander L.C. *et al.*, 1994. *Anal. Chem.* 66 : 1667.
Schmitz H.H. *et al.*, 1989. *J. Chromatogr.* 479 : 261.
Scott K.J. *et al.*, 2000. *Food Chem.* 69 : 125.
Seddon J.M. *et al.*, 1994. *J. Am. Med. Assoc.* 272 : 1413.
Shi J. *et al.*, 2000. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40 : 1.
Spanos G.A. *et al.*, 1993. *J. Food Sci.* 58 : 817.
Stahl, A.R. *et al.*, 1993. *Clin. Chem.* 39 : 810.
Taylor R.F. *et al.*, 1983. *Adv. Chromatogr.* 111 : 113.
Tee E.S. *et al.*, 1991. *Food Chem.* 41 : 147.
Tonucci L.H. *et al.*, 1992. In: Proc. 4th Int. Symp. Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. Cincinnati, OH : p. 119.
Van Breemen R.B. *et al.*, 1997. *Pure Appl. Chem.* 69 : 2061.
Van Breemen R.B. 1995. *Anal. Chem.* 67 : 2004.
Van Breemen R.B. 1997. *Pure Appl. Chem.* 69 : 2061.
Van den Berg H. 1999. *Nutr. Rev.* 57 : 1.
Weissenberg M. *et al.*, 1997. *J. Chromatogr. A* 757 : 89.
Wingerath T. *et al.*, 1996. *J. Agric. Food Chem.* 44 : 2006.
Yuan J.P. *et al.*, 1998. *J. Agric. Food Chem.* 46 : 3371.