

# 카로테노이드 분석

김정봉<sup>†</sup> · 이종렬 · 하선화

농업생명공학연구원

## I. 서 언

카로티노이드(carotenoid)는 당근(carrot)과 공액이중결합을 의미하는 “-ene”(cojugated double bond)과의 합성어로서 카로틴(carotene)에서 유래된 말이다. 광의의 화합물군에 붙이는 접미사 “-oid”를 합하여 carotenoid로 하는데 실제로 당근의 붉은 색은  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 형의 carotene 혼합되어 나타내는 색깔이며 그중에서 polyene(-CH=CH-CH=CH-)구조가 색깔을 나타내는 결정적인 역할을 한다. 또한 카로테노이드는 다양한 화학적 구조와 기능성 그리고 자연계에 널리 분포된 점 등으로 볼 때 가장 중요한 천연색소이며 동식물세포 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 polyene 색소라고도 하며 이들이 합성될 때는 geranylgeranyl pyrophosphate( $C_{20}$ ) 분자 두 개가 결합하여 최종적으로 tetraterpene( $C_{40}$ )인 카로티노이드가 된다.<sup>1)</sup>

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

특히 carotene의 경우 천연에  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - 형태의 3가지 이성체가 있는데 일반적으로는 주로  $\beta$  형태가 많이 존재하며 생물체 대부분의 기관에서 특이 하면서도 뚜렷한 작용과 기능을 가지고 있고 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.  $\beta$ -carotene 이나 비타민 A의 전구체에 대한 관심이 높아지고 있는 가운데 일반적으로 식품의 성분조성에서 이들 성분의 함량이나 카로티노이드 전체 함량에 대한 조사 보고가 증가하고 있다.<sup>2-6)</sup>

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-31-299-1737 (E-mail) jungbkim@rda.go.kr

## II. 분석방법

### 1. HPLC(Stahl) 법

자연계에서 대부분의 카로테노이드가 지방산과의 에스터결합을 하고 있기 때문에 정량을 위해서는 xanthophyll이나 carotene 모두 KOH 용액에 의한 비누화과정이 필요하다. 따라서 흡광도에 의한 간접적인 정량방법과 달리 내부표준물질을 사용하기 때문에 각 carotenoid에 대한 정확한 계산치나 하나의 크로마토그램상에서 볼 수 있는 카로테노이드 종류별 조성변화를 한눈에 관찰할 수 있는 방법이다.

#### 1) 장치 및 기구

- (1) 분획여두(250 ml), 삼각플라스크(100 ml)
- (2) blender
- (3) 수조
- (4) 저울
- (5) glass wool
- (6) 농축기
- (7) analytical HPLC
  - column: 3  $\mu\text{m}$ -C<sub>30</sub>-reversed phase, 250×4.6 mm,
  - detector: photo diode array (PDA)
  - degasser
  - precolumn (Delta-pak C<sub>18</sub> 5  $\mu\text{m}$  100 Å)

#### 2) 시약

- (1) 내부표준물질 : SudanII
- (2) 표준물질 : lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene, capxanthin,  $\beta$ -carotene
- (3) 용매 : methyl-tert.-butyl ether, triethyl amine, dichloromethane, acetonitrile, ethyl alcohol, methyl alcohol, ethyl acetate, petroleum ether
- (4) 산화방지제 : Butylated hydroxytoluene (BHT)
- (5) 무수아황산나트륨(sodium sulfate anhydrous)

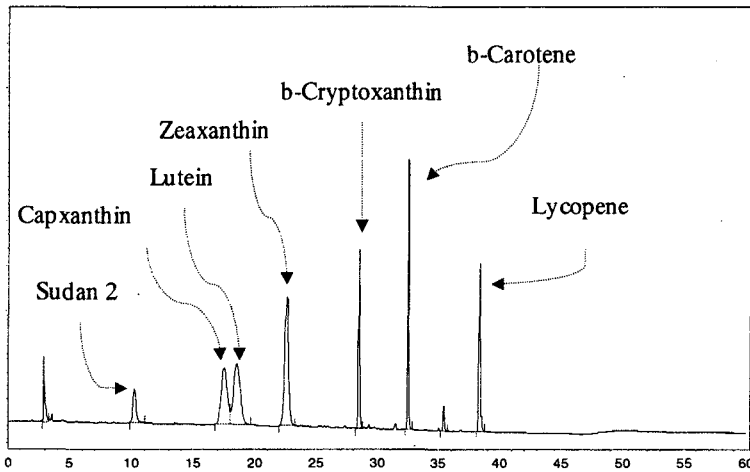
#### 3) 조작

- (1) 동결건조하여 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 흔들어 추출한다.
- (2) 유리솜(glass wool)을 이용하여 여과하고 같은 과정을 세 번 반복하여 추출액을 합하한 다음 10 g의 anhydrous sodium sulfate를 넣어서 습기를 제거한다.
- (3) 시료를 다시 여과하여 농축기에서 농축한 후에 추출물에 50 ml diethyl ether와 30% potassium hydroxide (in methanol) 용액 2.5 ml를 가하여 실온에 방치하여 12시간 동안 방치한다.

- (4) 투여된 알칼리를 제거하기 위해서 100 ml 증류수로 세 번 용매분획하고, 유기용매 (diethyl ether)층에 다시 anhydrous sodium sulfate을 가하여 수분을 제거한다.
- (5) 시료를 다시 농축하여 1%의 BHT가 함유된 MTBE용액 2 ml으로 용해시키고 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과한 후 HPLC 시료로 사용한다.
- (6) HPLC의 이동상은 A(methanol-MTBE-water-triethyl amine, 90:6:4:0.1, v/v/v), B (methanol-MTBE-water-triethyl amine, 6:90:4:0.1, v/v/v)를 이용한다.
- (7) 용매에 의한 gradient 조건으로서 15분까지 변화없이(isocratic) 용매 A를 100%로 흘려 주다가 40분까지 용매 B가 100% 되게 하였으며 45분까지 용매 A로 바뀌어서 50분 까지 안정화 시켰다.
- (8) Mobile phase의 유량은 1.2 ml/min, 주입량은 20 μl로 하였으며 detector의 파장은 450 nm로 하고 시료는 항상 저온(4°C)에서 빛을 피하여 보관한다.

## 2. 결 과

내부표준물질 sudan II을 포함한 7종의 카로테노이드를 분리한 결과 sudan II, capxanthin, lutein, zeaxanthin, β-cryptoxanthin, β-carotene, lycopene의 순으로 분리되었으며 carotene계 화합물은 늦은 시간대에, 그리고 xanthophyll계는 빠른 시간대에 분리되었다(그림 1).



**Fig. 1.** YMC(3 μm-C30-reversed phase, 250×4.6 mm) 컬럼과 precolumn(Delta-pak C18 5 μm, 100 Å, waters)에 의한 카로테노이드 6종의 chromatogram. 용매 A(methanol-MTBE-water-triethyl amine, 90:6:4:0.1, v/v/v); 용매B (methanol-MTBE-water-triethyl amine, 6:90:4:0.1, v/v/v) gradient (0→15, 100% A, 15→40 100% B, 파장 450 nm), 유량 1.2 ml/min, 시료주입 20 μl.

### 1) 계산식

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

단위: mg/100g

## 2) 비교

표준물질조제는 먼저 내부표준물질 sudan II와  $\alpha$ -,  $\beta$ -carotene을 제외하고는 모두 Extrasynthese사에서 구입이 가능하며 가능한 한 빛이 없는 어두운 곳에서 조제하고 모든 용매에 1%의 BHT를 가하여 산화를 방지하고, stock solution은 알미늄막으로 잘 막아서  $-18^{\circ}\text{C}$ 에 냉동보관 하면서 사용한다.

## 참고문헌

1. Bob. B. Buchanan etc. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Am. Soc. Plant Phys. (2000) Chapter 24.
2. Granado, F., B. Olmedilla, I. Blanco, E. Rojas-Hidalgo, J. Agric. Food Chem. 40 (1992) 2135.
3. Tee, E.-S., C.-L. Lim, Food Chem. 41 (1991) 147.
4. Stahl, A.R. Sundquist, M. Hanusch, W. Schwarz, H. Sies, Clin. Chem. 39 (1993) 810.
5. Sander, L. C., K.E. Sharpless, N.E. Craft, S.A. Wise, Anal. Chem. 66 (1994) 1667.
6. Isabel, M., Minquez-Mosquera and Damaso Horner-Mendez, J. agric. food chem. (1993) 41, 1616

### *Nomenclature*

BHT	Butylated hydroxytoluene
DCM	Dichloromethane
EtOH	Ethanol
GC	Gas chromatography
HPLC	High-performance liquid chromatography
HP TLC	High-performance thin-layer chromatography
LC	Liquid chromatography
MeCN	Acetonitrile
MeOH	Methanol
MS	Mass spectrometry
MTBE	Methyl- <i>tert.</i> -butyl ether
ODS	Octadecylsilica
SFE	Supercritical fluid extraction
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin-layer chromatography

## *Analysis of Plant Carotenoids*

***Jung-Bong, Kim<sup>†</sup>, Jong-Yeoul Lee, and Sun-Hwa Ha, Jong-Bum Kim***

*National Institute of agricultural biotechnology, R.D.A., Suwon 441-707, Korea  
+82-31-299-1737, jungbkim@rda.go.kr*