

THIN LAYER CHROMATOGRAPHY 에 의한 CAROTENOID의 분석

이 강 호
(부 산 수 산 대 학)

THIN LAYER CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF LEAF XANTHOPHYLLS

by

Kang Ho LEE

(Pusan Fisheries College)

The resolving capacities of xanthophyll pigments on thin-layers of Silica Gel, Hyflo super-Cel, and Micro-Cel C with varying concentrations of acetone in petroleum ether as the developing solvent were compared. The results showed that the resolving capacity of Micro-Cel C thin-layer was superior to others and satisfactory for the separation of leaf carotenoids in clearly separated six bands; carotenes, lutein-zeaxanthin, antheraxanthin, violaxanthin, an unidentified band, and neoxanthin, when it was developed with 13% acetone-petroleum ether solution for 15 to 20 minutes in an unsaturated chamber. Adhesion of Micro-Cel C to glass was adequate without binder. Calcium sulfate used as a binder appeared to inactivate the resolving capacity of Micro-Cel C. Removing an about 0.2cm-wide layer on both side of thin-layer slide helped to prevent "edge effect" which gave tailing and faster solvent ascending along the side than the center. An adequate thickness of thin-layer was obtained when a 3 ml aliquot of the suspension in which 10g powdered Micro-Cel C was suspended in 75 ml distilled water was coated on a 2×20cm glass slide.

1. 서 론

Thin-layer chromatography에 의한 carotenoid의 분리 동정에도 column chromatography에서 이용하는 것과 같은 흡착제와 전개용매가 쓰이고 있는데 이들을 단독 또는 적당히 혼합한것을 사용한다 Davies등과 (1,2) Mercer의 연구진 (3)은 석유에테일을 전개용매로한 Silica Gel G 박층(薄層)에서 squalene, lycopersene, phytoene, phytofluene을 분리하는데 성공하였고 또한 같은 흡착제와 15% methanol-benzene 용매로서 전개하여 xanthophyll을 분리하였다 Alumina 박층에다 benzene 농도를 달리하는 여러가지 석유에테일과의 혼합용매를 씌우므로서, 또는 동일한 전개용매와 MgO-Silica Gel G(50:50 w/w)의 혼합박층으로 carotene을 분리하였다 (4).

혼합흡착제를 맨처음 시도한 Demole(5)은 silicic acid-rice starch의 혼합물을 썼고, Silica Gel G-Ca(OH)₂ (1:6w/w)의 혼합물도 5% benzene-light petroleum의 혼합용매로서 전개할때 carotene을 분리·동정할수 있었다 (2,6). 이에 대하여는 30여제(系)의 흡착제와 용매에 대한 carotenoid의 행동에 대한 Billinger(6)와 Stahl(7)의 종합적인 연구결과가 있다.

Strain(8,9)은 MgO-celite(Hyflo super-Cel, 50:50w/w)의 column과 dichlorethane으로 Allen(10) 등은 sucrose column과 acetone-petroleum ether 용매로서 xanthophyll 색소를 분리 하였다. 또한 Yamamoto(11,12) 등은

이 강 호

xanthophyll 분리에 Micro-Cel C column과 acetone-petroleum ether의 혼합용매를 사용하였다.

이번 실험에서는 市販제품인 silica gel 박층과 Hyflo super-Cel 및 Micro-Cel C 분말로서 自作한 박층을 써서 xanthophyll 색소의 분리능력을 비교 시험하고, binder의 사용과 전개용매의 농도가 분리능력에 미치는 영향, 그리고 박층의 두께와 손질이 band의 형상에 미치는 영향에 대하여 고찰 하였다.

2. 재료와 실험방법

색소용액의 조제

실험농장에서 기본 Newzealand 시금치 (*Tetragonia expansa*)의 생잎을 적당한량 뜯어 증류수로 행진 다음 잎속의 굵은 줄거리를 대충 제거한 다음 5g을 달아 미리 끓여둔 100ml의 무수메타노올에 담겨 효소작용을 불활성화시킨 다음 blender에서 2~3분 동안 갈아서 원심분리 하거나, 잎을 약 1cm²의 크기로 잘라 메타노올과 같이 -18℃의 냉장고속에 하룻밤 두어 색소를 완전히 추출한다. 하룻밤 동안 추출된 메타노올액을 기울여 딸아내고 소량의 메타노올로서 잎의 절편을 씻어 기울린액과 합하고 30g의 KOH를 달아 넣어 차광하에서 magnetic stirrer로 15~20분간 교반하여서 혐화(鹼化)한다. 혐화된 추출액을 분액여두에 옮겨 100ml의 포화식염수와 동량의 ethyl-ether(peroxide free)을 가하여 색소를 에에틸층으로 옮긴 다음 알코올층을 버리고 약 100ml의 증류수로서 4~5회 반복하여 색소액을 씻는다. 물로서 씻은 색소추출액은 건조된 분말 황산소오다로서 탈수·건조시키거나 -18℃ 이하의 냉장고 내에 3~4시간 두어 동결 탈수한다. 건조된 에에틸추출액은 rotary vacuum evaporator에서 농축시켜 잔액을 5~10ml로 정용하여 색소분리시료로서 사용하였다.

Thin-layer Slide의 조제

Silica Gel strip은 市販 20×20cm plate로 된것을 2cm 넓이로 잘라서 사용하였고, Hyflo super-Cel 또는 Micro-Cel C slide는 다음과 같이 조제 하였다.

Micro-Cel C(Johns-Manville Co.) 또는 Hyflo super-Cel 을 10g 달아 75ml의 증류수에 풀어 목자사발에서 잘갈아서 만든 현탁액을 약 3ml 씩 뽑아 미리 세척 건조한 2×20cm의 유리슬라이드에 고무 입혀 파잉의 물이 증발할때 까지 실온에 두었다가, 90~100℃의 건조기에 넣어 하룻동안 활성화시킨 다음 사용한다 박층의 두께를 달리 하고자 할때는 슬라이드에 입히는 현탁액의 량으로 조절하였다.

색소의 분리및 동정

위와같이 조제된 박층 슬라이드에 미량파이렛으로 약 20~50μl의 색소용액을 재어 박층위에다 좁은 band 형으로 흡수시켜 즉시 전개한다.

전개용매는 acetone 농도 10~20% 범위의 acetone-petroleum ether(b. p. 30~60℃) 혼합용액을 사용하여 용매 농도에 따른 분리능력을 비교한다. 전개시간은 불포화용기 (15×30cm 표본병)에서 15~20분 동안 하였다. 전개하는 동안은 흡광지로 만든 통으로 전개실을 차광하였고 한용기안에 5개의 slide를 동시에 전개할수 있었다.

전개가 끝나면 즉시 분리된 각 색소의 band는 미리 3.5ml의 재증유 아세톤을 넣은 원심관에 넣어 넣어 잘 풀어서 흡착되었던 색소를 녹인 다음 생리시험용 원심분리기에서 5분 동안 분리하여 분광광도계(BeckmanDU)에서 흡광도를 재고, 자동기록 분광광도계(Elmer-Perkins)에서 흡광 spectrum을 측정하여 색소를 동정하였다. 흡광도의 측정은 파장 450, 450, 447, 440, 436mμ에서 carotene 혼합물, lutein-zeaxanthin, anteraxanthin, violaxanthin, 및 neoxanthin의 흡광도를 각각 측정하고, 흡광계수($E \frac{1\%}{1\text{cm}}$) 2,500, 2,500, 2,550, 2,500, 2,270을 곱하여 각 색소의 량을 계산하여 정량적인 목적에 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

흡착제에 따른 분리능력

세가지의 흡착제로서 조제한 박층에서 실험한 색소분리의 결과는 Fig. 1 에서 보는바와 같이 Silica Gel과

Thin Layer Chromatography에 의한 Carotenoid 분석

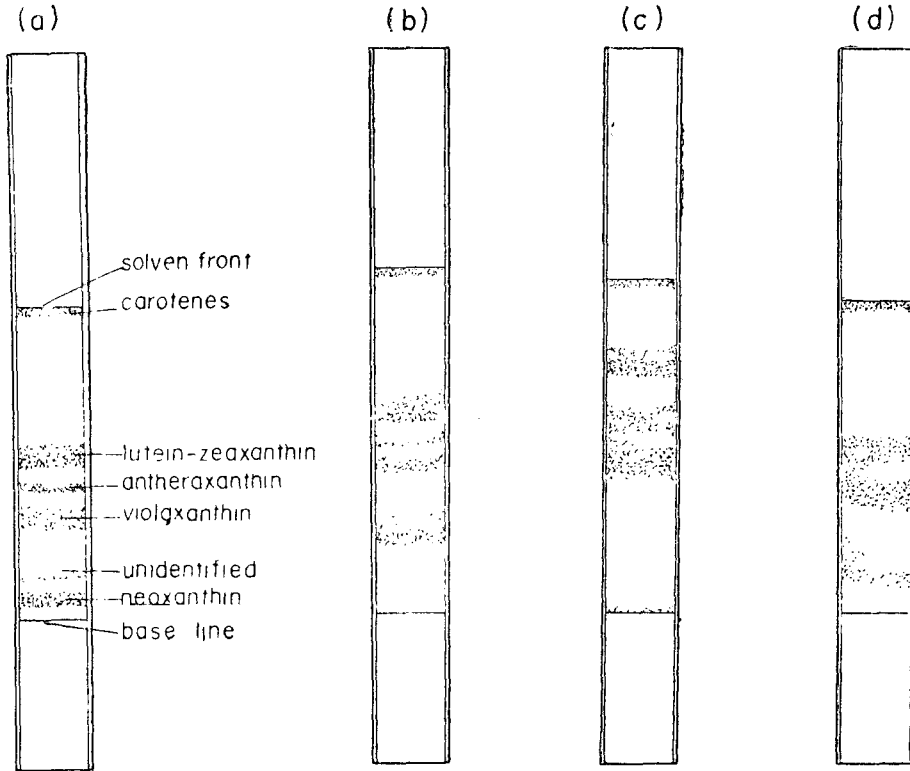


Fig. 1. Chromatograms developed on different adsorbents; (a) on a Micro-Cel C without binder, (b) on a Silica Gel thin-layer, (c) on a Hyflo super-Cel thin-layer, (d) on a Micro-Cel C thin-layer with CaSO_4 as a binder.

Micro-Cel C의 양자가 분리능력이 좋았는데 이들을 비교할때 전자의 경우는 후자보다 전체 band의 R_f 값이 큰듯 하나 각 band 사이의 구분이 후자에서 처럼 명확하지 않았다. 특히 antheraxanthin과 violaxanthin 사이의 경계가 흐렸다. 그뿐만아니라 silica Gel 박층은 넓고 투명한 플라스틱에 도포(塗布)된 것으로 band를 끊어 낼수없어 가위로 잘라야 했는데 그 조작에서 박층이 손실되기 쉬울뿐 아니라 후술하는바와 같이 흡착제 자체가 색소에 영향을 준다.

전개시간은 어느것이나 15~20분이면 충분하였고 전개용기내의 용매증기 포화 여부는 분리에 별 영향이 없었다. 매우 미세한 분말인 Micro-Cel C의 유리판에 대한 접착력과 박층의 유지될 도우기 위하여 CaSO_4 , Ca(OH)_2 , MgO 등의 binder를 사용하여본 결과 이들은 도리어 색소의 분리능력에 영향을 미침을 알수 있었다(Figure 1 (d)). 그런데 위에서 적은바와 같이 조제된 Micro-Cel C 박층은 binder 없이도 전개조작중 아무런 고장도 일으키지 않았다. 그것은 도리어 band를 끊어 내는데 도움이 되었다.

박층의 두께를 조절하여 분리능력을 비교해본결과 분리능력에는 별큰 영향을 미치지 않으나 두꺼울수록 박층의 유지, 양편 가장자리에 있어서의 용매상승 불균칙, 박층표면의 굴곡때문에 일어나는 band 형상의 불균일등의 결과를 나타 내었고 너무 얇은 즉 현탁액 3ml 이하로 도포한 박층에 있어서는 색소의 유리판 부착, 용매의 빠른 표면증발의 영향으로 다소 지장이 있었는데 적당한 박층의 두께는 현탁액 3ml를 도포하였을 때였다.

전개용매농도와 분리능력

색소분리능력은 전개용매의 acetone 농도에 예민하게 좌우 되었다. Fig. 2 에서 알수있는 것과 같이 아세톤의 농도가 증가 함에 따라 전 band의 R_f 값이 상승하나 각 band 사이는 색소 개개의 용매친화성때문에 분리에 영향

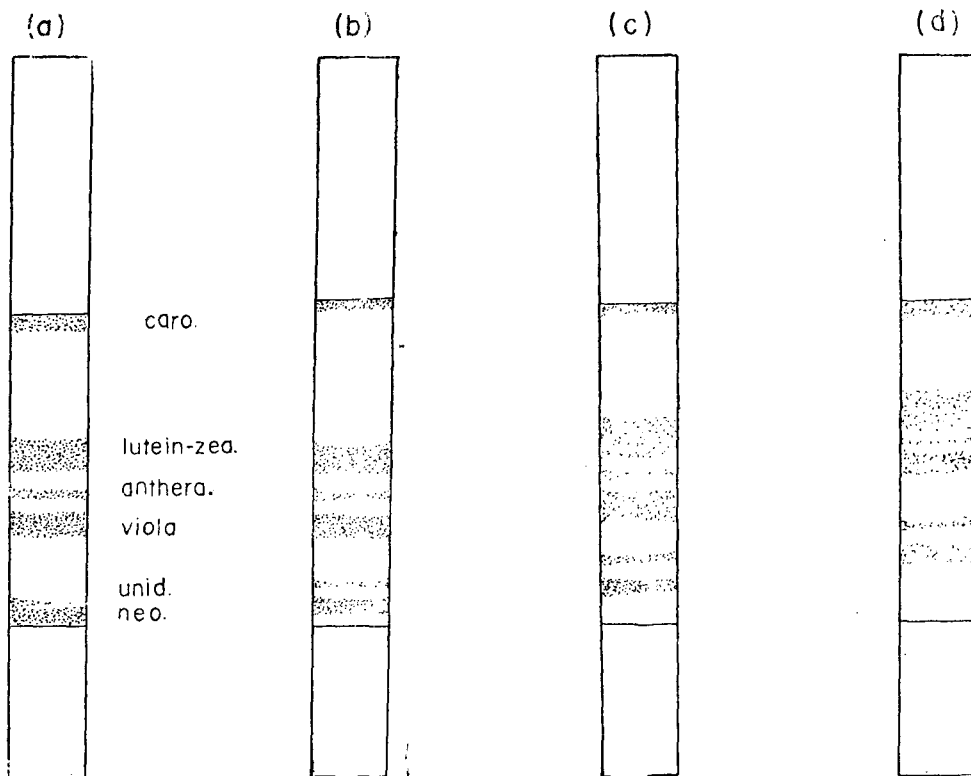


Fig. 2. The effect of solvent concentrations on the resolving capacity of Micro-Cel C thin-layer; (a) with 10% acetone-, (b) with 13% acetone-, (c) with 15% acetone-, (d) with 17% acetone-petroleum ether.

을 미쳤다. 10% 아세톤 농도의것은 base line 부근의 분리가 좋지 못하였고 15% 아세톤의 것은 antheraxanthin, lutein, violaxanthin 사이에 tailing이 심하고 band의 폭도 넓었다. 그러므로 적당한 용매의 농도로서 13% 아세톤의 것을 택하였다.

Column chromatography와 비교한 Thin-layer 법의 이점은 역시 단일 농도의 용매로서 短時間 一回展開로서 carotene과 xanthophyll과의 분리는 물론 거개의 xanthophyll을 동시에 분리할수 있다는 점이다. Micro-Cel C 박층의 분리능력으로서 lutein-zeaxanthin의 이중 band를 제외한 거개의 xanthophyll을 미량의 시료로서 명확히 분리할수 있기 때문이다. Lutein-zeaxanthin의 분리는 Micro-Cel C column(12), paper(13, 14, 15) 및 sucrose column(9)에서도 분리되지 않았다. 이들의 분리는 MgO column(16, 11)에서 간단히 재분리할수 있다.

전개용매는 휘발성이 높고 불포화용기내에서 전개하기 때문에 매회마다 새것으로 전개하였다. 2~3회의 연속 사용은 고농도 아세톤용매를 사용하였을때와 같은 결과가 되었다

Artifacts의 생성

색소는 전개조작중 무기물층을 통과 하므로써 산화와 異性化가 문제시 되고 있다. 이의 방지책으로 Davies (17)는 용매증기의 포화가 유용하다 하였으나 이번실험에서는 위에서 지적한바와 같이 Micro-Cel C 에서 전개할 때는 전개시간이 짧고, band의 제거가 극히 간단하고, 광도가 낮은 실내에서 신속한 조작이 가능하므로 불포화 용 기에서도 목적을 달할수 있었는데 문제되는 것은 흡착제의 색소에 대한 영향이었다.

앞에서 말한바와 같이 Silica Gel 박층에서는 Micro-Cel C 박층에 못지 않은 분리능력을 갖고 있었으나 gel자체의 미산성 때문에 조작중 epoxy xanthophyll은 furanoid epoxide로 변화되는 폐단이 있었다 이것의 식별은 변

Thin Layer Chromatography에 의한 Carotenoid 분석

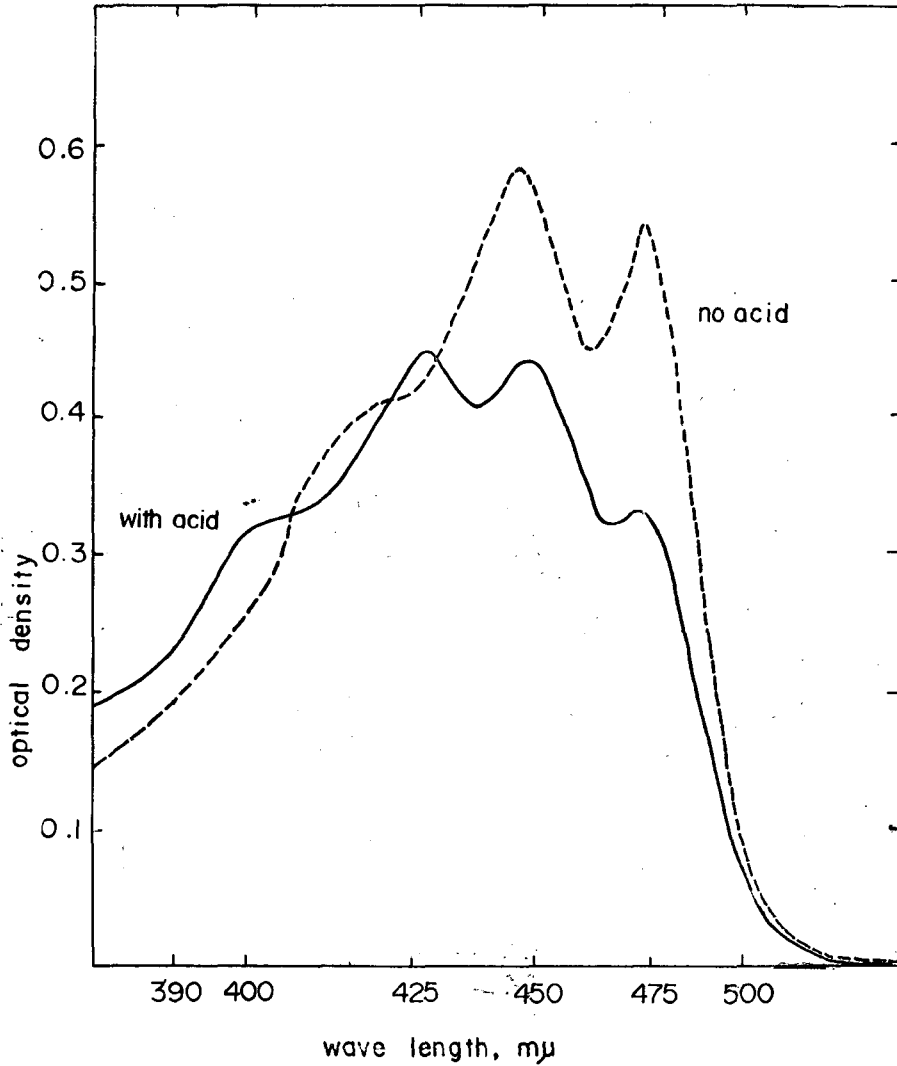
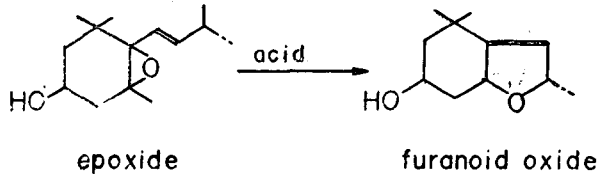


Fig. 3. The conversion of a 5,6-epoxy xanthophyll into the isomeric furanoid 5,8-epoxide results in the hypsochromic displacement of the absorption maxima.

색(연청색)과 Fig. 3 에서와 같은 최대흡광파장의 이동으로 알수있다(18).

이 반응은 예민하여 공기중의 산이나 용매불순물로서의 미량의 산에 의해서도 일어나는데 (19, 20) 재증유 용매의 사용과 신속한 조작으로 Micro-Cel C 박층에서 분리할때는 일어나지 않았다. Silica Gel 박층에 있어서는 전개후 색소가 잠시간의 공기와의 접촉에서 epoxy xanthophyll은 이성화 함을 볼수 있었다.

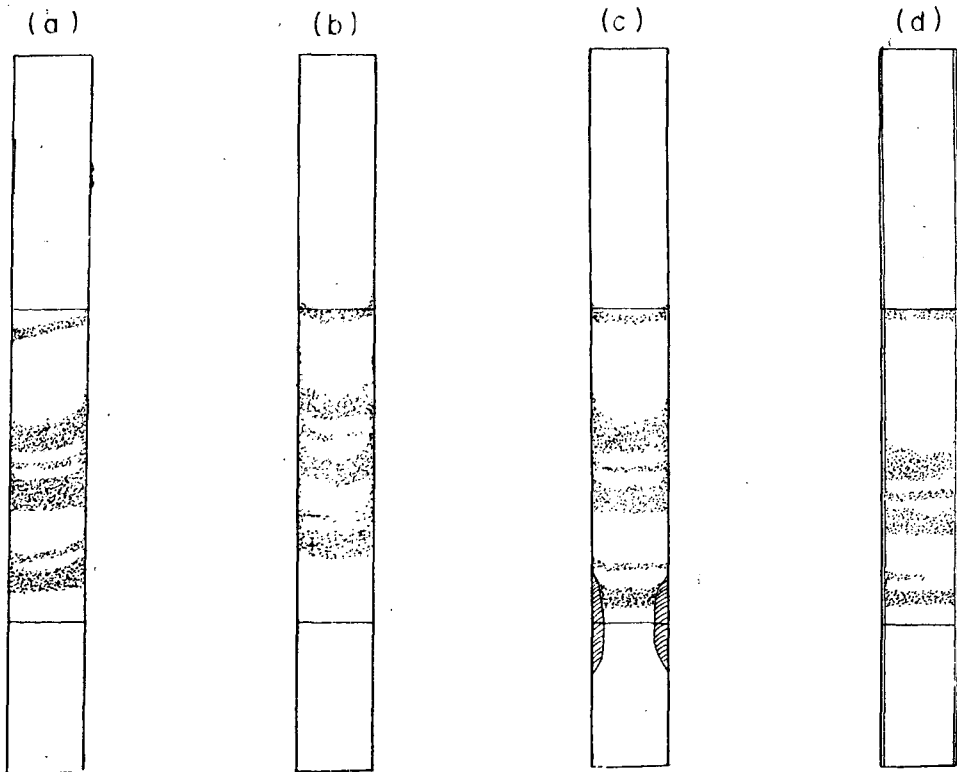


Fig. 4. Examples of irregular band formation with rough-rim slides; (a) on a thin-layer with one side rough-rim, (b) rapid solvent ascending along the side of thin-layer, (c) on a thin-layer scrapped off around the base line, (d) on a thin-layer scrapped off along both side of the slide.

박층의 손질과 Band 형상

흡착제를 밀착시키기 위한 유리슬라이드 표면의 오염(특히 기름), 거치른 양면 가장자리 때문에 용매의 상승이 불규칙하여 band의 모양이 Fig. 4에서와 같이 경사지거나 의곡 되었다. 방지책으로서 Fig. 4(c)와 같이 base line 양편의 박층을 제거하였을때 하부에는 다소 효과가 있었으나 전개됨에 따라 상부에서 다시 나타났기므로 미루어 Fig. 4(d)와 같이 양면 가장자리를 따라 0.2~0.3cm 폭으로 박층을 제거하여 전개하므로써 band의 형상을 수평화하고 tailing으로 인한 분리한계의 희미함도 해소할수 있었다.

4. 요 약

Silica Gel, Hyflo super-Cel, 및 Micro-Cel C 박층을 이용한 xanthophyll 분리를 위한 chromatography의 실험 결과를 요약하면

- 1) 색소분리능력은 Micro-Cel C 박층이 가장 좋고 Silica Gel 박층에서도 만족할만한 하였다. 그러나 Silica Gel 박층은 자체의 산성때문에 조작중 epoxy xanthophyll의 furanoid 異性化를 초래 하였다.
- 2) CaSO₄ 등의 binder는 집착보조효과 보다는 오히려 분리능력을 방해 하였다.
- 3) 전개조건은 차광하의 불포화용기내에서 15~20분간의 전개에 13% acetone-petroleum ether 용매를 쓰는것이 적당하였다.

Thin Layer Chromatography에 의한 Carotenoid 분석

4) Band의 형상 및 trailing을 정상화 하는데는 양편 가장자리의 박층을 0.2~0.3cm 폭으로 제거하는 것이 효과적이었다.

5) 박층의 두께는 10g의 Micro-Cel C 분말을 75ml의 증류수에 현탁시켜 그중 3ml 취하여 한개의 2×20cm glass slide에 도포한 것이 적당 하였다.

7) 이상의 결과에서 Micro-Cel C thin-layer는 미량의 시료로서 단시간내에 빠른 조작으로 artifact 생성없이 xanthophyll을 분리 할수 있고 band는 손쉽게 끊어내어 흡광도법에 의해 정량적인 목적에도 이용할수 있었다.

5. 참고 문헌 (Literature Cited)

- (1) Davies, B.H., Goodwin, T.W., and Mercer, E.I. (1961): *Biochem. J.* 81, 40.
- (2) Davies, B.H., Jones, D., and Goodwin, T.W. (1963): *Biochem. J.* 87, 326.
- (3) Mercer, E.I., Davies, B.H., and Goodwin, T.W. (1963): *Biochem. J.* 87, 317.
- (4) Davies, B.H., Villoutreix, J., Williams, R.J.H., and Goodwin, T.W. (1963): *Biochem. J.* 89, 96.
- (5) Demole, E. (1958): *J. Chromatog.* 1, 24.
- (6) Bollinger, H.R. (1962): According to T.W. Goodwin in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" p. 514, Academic Press, New York (1965). In "Dunnschichtschromatographie" (E. Stahl, ed.) p. 217, Springer, Heidelberg.
- (7) Stahl, E., Bollinger, H.R., and Lehnert, L. (1963): According to T.W. Goodwin in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" p. 515, Academic Press, New York, (1965). In "Carotine und Carotinoide" Vol. 9, p. 129, Steinkopff, Darmstadt.
- (8) Strain, H.H. (1938): *J. Biol. Chem.*, 123, 425.
- (9) Strain, H.H. (1961): In "Chromatography" (E. Heftmann ed.) p. 584, Reinhold Publ. Co., New York.
- (10) Allen, M.B., T.W. Goodwin, and S. Phagpolngarm (1960): *J. Gen. Microbiol.* 23, 93.
- (11) Yamamoto, H.Y., T.O.M. Nakayama, and C.O. Chichester (1962): *Arch. Biochem. Biophys.* 97, 168.
- (12) Yamamoto, H.Y., C.O. Chichester, and T.O.M. Nakayama (1962): *Photochem. and Photobiol.* 1, 53.
- (13) Strain, H.H. (1956): *Biol. Bull.* 129, 366.
- (14) Strain, H.H. (1965): *Biochim. Biophys. Acta* 109, 16.
- (15) Sapozhnikov, D.I., T.A. Krasouskaya, and A.N. Meavskaya (1957): *Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R.* 113, 465.
- (16) Strain, H.H. (1966): In "Biochemistry of Chloroplasts" (T.W. Goodwin ed.) Vol. I, p. 387, Academic Press, London.
- (17) Davies, B.H. (1963): *J. Chromatog.* 10, 518.
- (18) Goodwin, T.W. (1965): In "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" p. 529, Academic Press, New York.
- (19) Karrer, P. (1945); *Helv. Chim. Acta.* 28, 474.
- (20) Krinsky, N.I., and T.H. Goldsmith (1960): *Arch. Biochem. Biophys.* 91, 271.