

ELSD를 이용한 레시틴중의 포스파티딜콜린의 분석

반경녀[†] · 이창희 · 조태용 · 이주연 · 이영자 · 채갑용
부산지방식품의약품안전청

Determination of Phosphatidylcholine in Korea Functional Foods Containing Lecithins using HPLC with Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD)

Kyeong- Nyeo Bahn[†], Chang Hee Lee, Tae-Yong Cho, Ju Yeon Lee, Young Ja Lee, and Gae Yong Chae

Analytical Lab. of Pusan Regional Food & Drug Administration
(Received November 3, 2005; Accepted November 30, 2005)

ABSTRACT – Lecithin is a naturally occurring group of phospholipids found in nearly every living cell and has been widely used as the ingredient of functional foods. Lecithin has high content of phosphatidylcholine(PC), pharmaceutical material which promotes metabolism through the cell membrane. This study was carried out to improve the present inconvenient analytical method of PC in law for health & functional foods. The commodities used in this experiment, were two kinds of egg yolk and eight kinds of soybean lecithin functional foods. PC was separated with isocratic elution with hexane : isopropanol : D.W (30:60:8) through silica column (2.1×150 mm) by HPLC with Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD). The flow rate of the eluent was 0.5 ml/min and inject volume was 10ul. The nebulizer temperature of detector was 60°C, drift tube temperature of that was 75°C and gas flow was 30 psi. Quantification was carried out by external standardization. Limit of quantification was 0.15ppm. Lecithin contents of egg yolk and soybean products were >66% and >81%, respectively. Phosphatidylcholine contents of egg yolk and soybean products were >74% and >18%, respectively.

Key words: phosphatidylcholine, ELSD, soy lecithin, egg yolk lecithin

레시틴은 인지질의 일종으로 인체의 신진대사와 직접적으로 관계된 세포막의 구성물질로 영양의 흡수 및 노폐물의 배설 등 기초대사에 관여하고, 신경전달물질이 되는 아세틸콜린이 만들어져 두뇌활동에 도움되며, 혈중콜레스테롤의 양을 감소시키므로 심근경색에 효과가 있다. 또한 지용성물질의 흡수촉진과 노화예방에 효과가 있는 뛰어난 기능성을 가지고 있기 때문에 인공 혈액의 원료나 각종의약품 및 건강기능식품으로 활용되고 있다¹⁾. 레시틴은 그 원료에 따라 대두 레시틴과 난황레시틴으로 나누어지며, 난황레시틴의 경우 핵심성분인 포스파티딜콜린이 70~80%로 함유되어 있어 높은 기능성을 나타낸다. 이외에도 인지질의 구성성분은 포스파티딜에타놀아민(PE) 10~15%, 스펡고미에린(SPM) 13%, 리소포스파티딜콜린(LPC) 1~2%로 구성되어 있다.²⁾

그러므로 레시틴 건강기능식품은 인지질과 포스파티딜콜린의 함량에 따라 기능성의 차이를 나타낼 수 있기 때문에

인지질과 포스파티딜콜린의 함량의 분석은 제품의 품질을 평가하는데 매우 중요하다. 현 건강기능식품공전에서는 인지질은 주로 아세톤불용물로서 분석되어지며, 포스파티딜콜린은 TLC로 분리하여 분리된 점적을 용매로 추출하여 발색시켜서 UV/VIS spectrophotometer를 사용하여 정량하고 있다.³⁾ 또한, FT/IR⁴⁾, biosensor⁵⁾, NMR 등을^{6,7)} 이용하여 분석하는 방법 등 여러 가지 분석법들이 보고되어 왔으나 가장 일반적인 HPLC 분석법은 HPLC로 포스파티딜콜린을 분리하여 유도체 시약을 반응시켜서 형광검출기로 검출하는 방법⁸⁾과 UV 검출기로 검출하는 방법등⁹⁾ 이용되고 있다. 그러나 포스파티딜콜린은 빛을 흡수하는 chromophoric기를 가지고 있지 못하기 때문에 UV검출은 203-210 nm에서 수행되어진다. 그러나 인지질의 분리를 위해 사용되어지는 많은 용매는 UV cutoff가 210nm이하이기 때문에 이러한 파장 범위를 사용할 수 없거나 용매의 선택을 달리하여도 감도가 낮기 때문에 정량에 어려움이 있다¹⁰⁾.

그러므로 특이한 선택성을 가지고 있지 않으며, 소수성과

[†] Author to whom correspondence should be addressed.

친수성을 같이 존재하는 분자량이 큰 물질의 분리하기 위해서 Evaporative Light-Scattering Detector(ELSD)가 사용되어진다.^{11,12)} ELSD검출기는 컬럼을 통과한 시료가 검출기의 분무장치를 통과하면서 불활성질소가스로 미세한 입자를 형성하면서 분사되어져서 가열된 이동관을 통과하여 용매는 기화되고 시료는 건조된 미세한 입자가 되어 flow cell을 통과할 때 레이저빔과 충돌하면서 발생하는 산란광을 측정할 수 있기 때문에 모든 용매를 사용할 수 있으며, 시료에 대한 선택성도 가지지 않기 때문에 지질이나 당등^{13,14)}의 분석에 많이 이용되고 있다.

본 연구에서는 레시틴 건강기능식품의 기능성분인 인지질과 포스파티딜콜린의 함량을 조사하기 위하여 국내 유통중인 대두레시틴 및 난황레시틴의 제품을 구입하여 제품에 따른 인지질 및 포스파티딜콜린을 정량하고자 하였다.

또한 인지질의 분석은 아세톤불용물법으로 실시하였으며, 건강기능식품공전의 포스파티딜콜린 분석법을 신속,정확한 기기분석법으로 개선하고자 HPLC로 포스파티딜콜린을 분리하고 ELSD검출기로 정량하기 위한 최적 분석조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

시료는 대두레시틴 제품 8종 및 난황레시틴 제품 2종을 시중에서 구입하여 사용하였다.

실험방법

1) 시 약 - 2-propanol, methanol, hexane ,chloroform 등의 시약은 HPLC grade의 Merck 제품을 사용하였다.

2) 표준품 - phosphatidylcholine은 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

3) 인지질 정량분석 (아세톤불용물) - 시료 5g을 정확히 달아 (80°C에서 가온하여 감압하에 탈수 건조한다)(W1) 클로로포름/메탄올 혼합(2:1)로 용해하여 여과한 후 용액을 모두 제거하여 시험용액으로 하였다(W2). 시험용액을 석유에테르 3 ml와 아세톤 15 ml를 가해 잘 혼합하고 얼음물 중에 15분간 방치한 다음 원심분리(3000 rpm, 10 min)하여 상층액을 미리 무게를 구한 플라스크에 취한다. 또 남은 침전물에 아세톤(0-5°C) 50 ml를 가하여 앞에서와 동일하게 원심분리하여 상층액을 먼저 플라스크에 합하여 수욕상에서 증류하고 잔류물은 105°C에서 건조후 항량으로 무게를 달아서(W3) 다음식에 의해서 인지질 함량을 구하였다.³⁾

$$\text{인지질 함량} = (W3-W2) / W1 \times 100$$

4) 포스파티딜콜린의 HPLC를 이용한 정량분석 - 3)에서 추출된 인지질 약 0.5 g씩을 정확히 달아 메탄올에 녹이고 초음파로 5분간 추출하여 100 ml로 정용하였으며, 이 용액 10 ml를 취하여 메탄올로 100 mg가 되게 정용하고 여과하여 시험용액으로 하였다. 표준용액은 포스파티딜콜린 표준품을 메탄올에 녹여 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm으로 검량선을 작성하기 위해 HPLC로 분석하였다.

HPLC는 Waters 600 pump, 717 autosampler와 Evaporative Light-Scattering Detector(Waters 2420 ELSD)를 사용하였으며 분석조건은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Analytical conditions of HPLC for quantitative measurement of phosphatidyl choline.

HPLC condition	
Column	Novapak silica C ₁₈ (2.1×150 mm)
Mobile phase	n-hexane:isopropanol:D.W(30:60:8)
Nebulization Temp.	60°C
Pressure(N ₂ gas)	30 psi
Drift tube Temp.	75°C
Injection volumn	20 ul
Flow rate (min./ml)	0.5

결과 및 고찰

레시틴 제품(건강기능식품)중의 인지질의 함량

레시틴의 인지질 정량은 레시틴중의 수분을 완전히 건조시켜서 클로로포름/메탄올 혼합(2:1)으로 검체를 용해하여 지질이외의 성분이 완전히 제거되도록 하여 순수한 인지질 성분만을 아세톤으로 추출하고 원심분리한 상층액을 건조하고 항량하여 무게를 달아서 인지질 함량을 구하였다. 인지질의 함량은 난황레시틴에서 81.5~83.3%, 대두레시틴에서 66.0~88.0%로 인지질의 원료에 관계없이 레시틴중 인지질의 함량은 높게 나타났다(Table 2).

Table 2. Contents of phospholipids extracted with egg yolk and soybean lecithin products.

Type	phospholipids(%) ± S.D
Egg yolk lecithin 1	81.5 ± 2.3
Egg yolk lecithin 2	83.3 ± 1.8
Soybean lecithin 1	80.8 ± 2.5
Soybean lecithin 2	78.9 ± 3.1
Soybean lecithin 3	66.0 ± 1.2
Soybean lecithin 4	73.7 ± 3.5
Soybean lecithin 5	78.9 ± 3.3
Soybean lecithin 6	78.4 ± 2.2
Soybean lecithin 7	81.0 ± 4.4
Soybean lecithin 8	88.0 ± 2.7

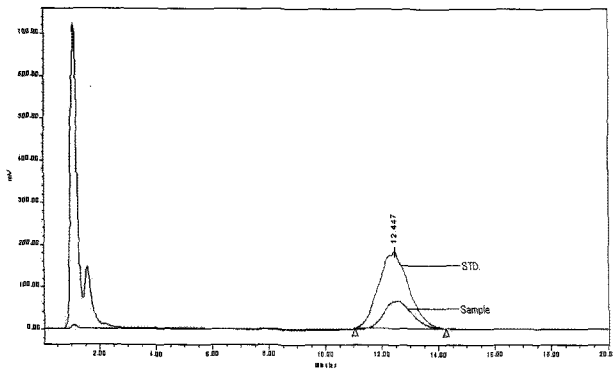


Fig. 1. Comparison of phosphatidylcholine chromatogram in sample (soybean lecithin) and standard (250 ppm).

포스파티딜콜린의 HPLC 분석조건

HPLC에 의해 분리된 포스파티딜콜린은 Evaporative Light-Scattering Detector (ELSD)를 이용하여 검출되었다 (Fig. 1).

ELSD 검출기에서 시료와 용매는 nebulizer를 통과하면서 기화하게 되고 draft tube를 통과하면서는 이동상은 기화되고 시료입자는 건조되어 미세한 입자로 떨어져서 레이저빔과 충돌하면서 산란광이 검출되기 때문에 Nebulization 온도와 Drift tube 온도가 signal response에 영향을 주는 중요한 요인으로 작용된다.^{15,16} 그러므로 본 실험에서 nebulization과 drift tube의 온도를 30°C~80°C로 변화시키면서 최적조건을 설정한 결과, nebulizer온도는 60°C, drift tube 온도는 75°C에서 최적감도로 검출되었으며 carrier gas로 사용되는 질소가스의 압력은 30 psi가 적합하였다. HPLC의 조건은 극성 칼럼인 silica column을 사용하였고, 이동상의 조성은 지질이 잘 분리될 수 있는 헥산: 이소프로판올: 물의 조성비를 40:50:8에서 30:60:8로 변화시켜 표준품의 분석한 결과, 40:50:8 및 36:56:8의 조성에서 peak가 broad하게 나타났으며 회수율 및 분리능이 떨어졌으나, 조성비가 30:60:8에서 retention time이 12.447로 최적조건을 나타내었다(Table 3). 이동상의 조성에 따른 ELSD 검출기의 감도의 차이는 nebulizer를 통과한 용매의 기화와 drift tube에서 형성된 시료 입자의 크기에 의존하기 때문에 이동상의

Table 3. Recovery yield of phosphatidylcholine standard by various composition of mobile phase for HPLC analysis.

Mobile phase	Phosphatidylcholine ± S.D (%) ¹⁾
n-hexane:isopropanol:D.W(30:60:8)	89.2 ± 2.7
n-hexane:isopropanol:D.W(36:56:8)	74.3 ± 3.4
n-hexane:isopropanol:D.W(40:50:8)	52.1 ± 3.8

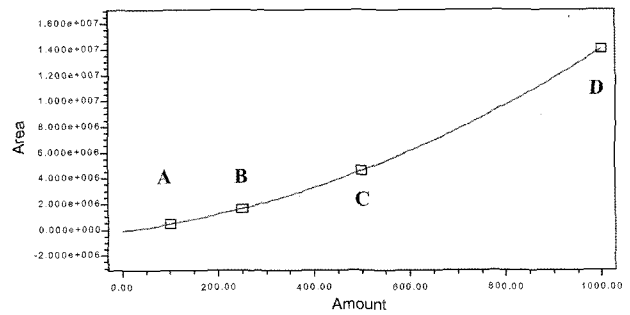


Fig. 2. Calibration curve of phosphatidylcholine standard (A: 100 ppm, B: 250 ppm, C: 500 ppm, D: 1,000 ppm).

조성비에 따른 시료 입자의 형성에 따라 회수율이 크게 차이가 생길 수 있기 때문에 이동상 조건의 설정이 매우 중요하다. 현행 건강기능식품공전의 분석법인 TLC에 의한 UV/VIS spectrophotometer를 이용한 실험법은 시간적, 경제적 으로 손실이 많고 여러 가지 실험을 거치는 동안에 실험오차가 생길 수 있는 가능성도 많기 때문에, 포스파티딜콜린의 분석은 HPLC/ELSD를 이용한 기기분석법이 보다 합리적이다.

검량선 및 회수율

포스파티딜콜린 표준용액 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm을 HPLC/ELSD에 주입하여 농도변화에 따른 검량선을 작성한 결과 1차식에 의한 검량선의 상관성(R²=0.977765)보다 2차식에 의한 상관성(R²=0.999998)이 높게 나타났으므로 2차식에 의한 검량선으로 시료의 포스파티딜콜린의 양을 정량하였다(Fig. 2). 이것은 Andrea에 따르면 ELSD의 특성상 검량선이 1차식보다 2차식이 더 정확하다고 보고되어있다¹⁷⁾. 또한 난황레시틴 및 대두레시틴에 대한 포스파티딜콜린의 회수율을 구하기 위하여 대두레시틴과 난황레시틴에 표준품 250 ppm을 첨가하여 3회 반복 실험한 결과, 모두 80% 이상의 높은 회수율을 나타내었다(Table 4). 또한 정량한계 (S/N=10)는 0.15 ppm으로 비교적 낮게 나타났다.

인지질종의 포스파티딜콜린의 함량

난황레시틴 2종과 대두레시틴 8종의 시료에 대하여 인

Table 4. Recovery yield of phosphatidylcholine spiked in phospholipids extracted with egg yolk and soybean lecithin products.

Type	Phosphatidylcholine ± S.D (%) ¹⁾
Egg yolk lecithin	88.5 ± 2.1
Soybean lecithin	84.6 ± 1.8

1) 250 ppm of Phosphatidylcholine was spiked in phospholipids

Table 5. Contents of phosphatidylcholine in phospholipids extracted with egg yolk and soybean lecithin products.

Type	Phosphatidylcholine(%) ± S.D
Egg yolk lecithin 1	78.6 ± 4.5
Egg yolk lecithin 2	74.8 ± 2.1
Soybean lecithin 1	62.3 ± 3.2
Soybean lecithin 2	56.1 ± 2.8
Soybean lecithin 3	30.1 ± 1.9
Soybean lecithin 4	20.0 ± 0.9
Soybean lecithin 5	23.2 ± 1.5
Soybean lecithin 6	52.0 ± 3.4
Soybean lecithin 7	24.8 ± 2.6
Soybean lecithin 8	18.7 ± 1.1

지질을 추출하여 인지질중의 포스파티딜콜린의 함유량을 구하였다. 난황레시틴은 74.8~78.6%였으며 대두레시틴은 18.7~62.3%로 나타났다. 대두레시틴 및 난황레시틴의 시료중의 인지질 함량은 거의 차이가 없었지만, 포스파티딜콜린의 함량은 난황레시틴에서 훨씬 높게 나타났다. 또한 건강기능식품 공전의 레시틴제품의 규격은 인지질중 포스파티딜콜린의 함량은 대두레시틴제품에서 10.0% 이상, 난황레시틴제품에서 60.0 이상으로 규정되어 있으므로 이에 합당한 결과이며 기능물질인 포스파티딜콜린의 함량이 높게 나타난 제품이 기능성이 높을 것으로 기대된다(Table 5).

국문요약

본 연구는 세포막의 구성성분으로서 인체의 신진대사에 관여하는 물질인 인지질을 정량하기 위하여 인지질의 주요 성분인 포스파티딜콜린에 대해 HPLC/ELSD를 이용한 신속, 정확한 분석법을 확립하였다. HPLC의 조건은 silica column을 사용하고 헥산:이소프로판올:물-30:60:8을 유속 0.5 ml/min으로 포스파티딜콜린을 분리하였고 ELSD 검출기를 사용하여 nebulizer 온도는 60°C, drift tube 온도는 75°C, carrier gas 30 psi로 하여 20 min내에 분리하였으며 검량선은 250 ppm~1,000 ppm으로 하여 정량하였다. 시료의 회수율은 80% 이상으로 높게 나타났으며 정량한계는 0.15 ppm이었다. 또한 이 분석법을 이용하여 실제 유통되고 있는 레시틴제품(난황레시틴 2종, 대두레시틴 8종)에 대해 인지질의 함량과 포스파티딜콜린 함량을 조사한 결과, 인지질의 함량은 각각 81.5~83.3%, 66.0~88.0%로 나타났으며 포스파티딜콜린의 함량은 각각 74.8~8.6% 및 18.7~62.3%로 난황레시틴의 함량이 높게 나타났다.

참고문헌

- 노완섭, 허석현 : 건강보조식품과 기능성 식품, 효 일, 172-178, 2000.
- Kim YS, Yoo IJ, Jeon KH, Kim CJ.: Optimal conditions for ethanol extraction of egg lecithins. *Kor J. Anim. Sci.* 37(3), 186~192 (1995).
- 식품의약품안전청: 건강기능식품공전. 90-94 (2004).
- Israel R.M.: Effect of electric fields on the structure of phosphatidylcholine in a multibilayer system. *Bioelectrochemistry.* 57, 145-148 (2002).
- Campanella L, Pacifici F, Sammartino MP, Tomassetti M.: Analysis of lecithin in pharmaceutical products and diet integrators using a new biosensor operation directly in non aqueous solvent. *J. of Pharm. and Biome. analysis.* 18, 597~604 (1998).
- Gerhard H, Peter K.: Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers. 51, 6645-6651 (2003).
- John YK, David KW, Joseph GT.: General method for the analysis of phosphatidyl cholines by high performance liquid chromatography. *Chromatography.* 639, 398-395 (1981).
- Abidi SL, Mounts TL, Rennick KA.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography of phospholipids with fluorescence detection. *J. of Chromatography* 639, 175-184 (1993).
- Cantafora A, Cardelli M, Masella R.: Separation and determination of molecular species of phosphatidylcholine in biological samples by high performance liquid chromatography. *J. of Chromatography.* 507, 339-349 (1990).
- Yoon TH, Kim IH.: Phosphatidylcholine isolation from egg yolk phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography A,* 949, 209-216 (2002).
- Duk HK, Sueng KL, Kyng HR.: Separation of phospholipids from soybean by NP-HPLC with ELSD. *Kor J. Chem. Eng.* 19(5), 818-820 (2002).
- Lutzke BS, Braughler JM.: An improved method for the

- identification and quantitation of biological lipids by HPLC using laser light-scattering detection. *J. of Lipid Research* **31**: 2127-2130 (1990)
13. Park MK, Park JH, Han SB, Shin YG, Park IH.: High-performance liquid chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light scattering detection. *J. of Chromatography A*. **736**, 77-81 (1996).
 14. Sala A, Castellote-Bargallo A.I, Rodriguez P.S, Lopez S.M.C.: High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipid classes on human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Journal of Chromatography A*, **1008**, 73-80 (2003).
 15. Marcel K, Werner H, The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis. *Trends in analytical chemistry*, **16**(8), 475-484 (1997).
 16. Row KH, Lee JW.: Preparative separation of phospholipids from soybean by NP-HPLC. *Korean J. of Chem. Eng.*, **14**(5), 412-415 (1997).
 17. Andrea Avalli, Giovanna Contarini, CRA-determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *J. Chromatography A*. **1071**, 185-190 (2005).