

UPLC를 이용한 lutein과 zeaxanthin의 분석법 검증 및 엽채류에서의 정량적 평가

김선아* · 김지선

한국방송통신대학교 자연과학대학 가정학과

Method Validation and Quantification of Lutein and Zeaxanthin from Green Leafy Vegetables using the UPLC System

Suna Kim* and Ji-Sun Kim

Department of Home Economics, College of Natural Science, Korea National Open University

Abstract The objective of this research is to present method development and validation for the simultaneous determination of lutein and zeaxanthin using ultra performance liquid chromatography (UPLC). Also, rapid quantification was performed on six green leafy vegetables (*Allium tuberosum*, *Aster scaber*, *Hemerocallis fulva*, *Pimpinella brachycarpa*, *Sedum sarmentosum* and *Spinacia oleracea*) that are commonly consumed in Korea. Separation and quantification were successfully achieved with a Waters Acquity BEH C18 (50×2.1 mm, 1.7 μm) column by 85% methanol within 5 min. Two compounds showed good linearity ($r^2 > 0.9968$) in 1-150 μg/mL. Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) for lutein and zeaxanthin were 1.7 and 5.1 g/mL and 2.1 and 6.3 g/mL, respectively. The RSD for intra- and inter-day precision of each compound was less than 10.69%. The recovery of each compound was in the range of 91.75-105.13%. *Aster scaber* and *Spinacia oleracea* contained significantly higher amounts of lutein (4.06±0.24 and 3.97±0.10 mg/100 g of fresh weight), respectively.

Keywords: lutein, zeaxanthin, green leafy vegetable, ultra performance liquid chromatography, method validation

서 론

Lutein(β,ε-carotene-3,3'-diol)과 zeaxanthin(β,β-carotene-3,3'-diol)은 체내에서 혈액을 통해 안구조직의 수정체와 황반에 침착(1)되며 항산화능(2) 및 자외선 흡수능(3)을 가지고 있어 눈 건강에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 여러 역학연구를 통하여 lutein과 zeaxanthin을 지속적으로 섭취하거나 혈중 함량이 높으면 심혈관 질환과 암(4), 백내장 및 노인성 황반변증(age-related macular degeneration, AMD)(5,6)의 발생위험을 낮추는데 도움을 준다고 보고되고 있다. Lutein과 zeaxanthin은 사람의 몸에서 생성되지 않으므로 식이를 통해 섭취해야만 하며(2), 짙은 녹색 엽채류인 시금치, 브로콜리, 케일, 양상추 등이 주요 공급식품으로 알려져 있다(4,7). Hart와 Scott(7)은 영국에서 소비되는 다양한 채소와 과일의 carotenoid 함량을 보고하였으며, Murillo 등(8)은 파나마 지역에서 생산되는 채소와 과일의 lutein과 zeaxanthin 함량을 연구 보고하였다. 하지만, 한국인은 다양한 엽채류를 소비하고 있음에도 불구하고 아직까지 식이를 통한 lutein과 zeaxanthin 섭취 현황 및 주요 공급원에 관한 연구가 이루어지지 않고 있다.

현재 lutein과 zeaxanthin을 분석하는 방법은 마리골드(*Tagetes erecta* L.) 추출물로부터 HPLC를 이용한 분석법이 건강기능식품 기준규격에 개정 및 고시 되어 있다(9). 일반적으로 carotenoids는 HPLC로 분석 시 유사구조간의 성분분석이 명확하게 이루어지지 않는 문제점(10)이 있으며, 분리 분석을 위해 대부분 HPLC를 이용하고 있다. 시금치의 색소를 연구한 논문에서 Kromasil C18 컬럼(250×4.6 mm)을 이용하여 분석한 결과 lutein과 zeaxanthin을 분리하지 못하였고(11), 혈액 중 lutein과 zeaxanthin의 함량을 연구한 논문에서도 Spherisorb ODS-2 컬럼(250×4.6 mm)을 이용하여 분석한 결과 두 물질이 분리되지 않아 합으로 정량하였다(12). 또한 Huck 등(13)은 채소 중 lutein과 zeaxanthin 함량을 연구하기 위해 HPLC-MS-MS를 이용하였으며, Sander 등(14)은 C30 컬럼을 이용하여 carotenoid 분석 연구를 보고하였다.

Ultra performance liquid chromatography(UPLC)는 HPLC보다 충전 입자의 직경이 작은 칼럼을 장착하여 고압 조건에서 분석을 수행하기 때문에 분석시간이 단축되고 분리능과 감도가 높은 장점이 있다(15). 대항 중 anthraquinone 성분 분석을 HPLC와 UPLC 방법으로 비교한 연구에 따르면 UPLC를 사용하였을 때 분석시간이 8시간 감소하였을 뿐 아니라 분석 효율 및 감도가 더 좋다고 보고하였으며(16), 엽산을 HPLC와 UPLC를 이용하여 분석 방법을 비교한 연구에 의하면 UPLC를 이용한 경우 분리도에 영향을 미치지 않으면서도 분석시간이 4배 짧아졌을 뿐 아니라 신호대잡음비(signal-to-noise ratio, S/N)가 좋아졌다고 보고하였다(17).

본 연구에서는 UPLC를 이용하여 lutein과 zeaxanthin을 분석하는 조건을 설정하고 그 방법의 정확성을 검증하고자 한다. 또한 한국인이 일상적으로 섭취하는 엽채류를 수집하여 UPLC를 활용

*Corresponding author: Suna Kim, Department of Home Economics, College of Natural Science, Korea National Open University, Seoul 110-791, Korea
Tel: 82-2-3668-4771
Fax: 82-2-3668-4188
E-mail: ksuna7@kno.ac.kr
Received July 25, 2012; revised October 17, 2012;
accepted October 30, 2012

한 분석법을 적용하여 lutein과 zeaxanthin을 정량적으로 평가하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 시료는 녹색 엽채류는 부추(*Allium tuberosum*), 취나물(*Aster scaber*), 원추리(*Hermerocallis fulva*), 참나물(*Pimpinella brachycarpa*), 돌나물(*Sedum sarmentosum*), 시금치(*Spinacia oleracea*)이며, 2011년 4월에 가락시장에서 구입하였다. 분석을 위하여 모든 시료는 수세한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

Lutein과 zeaxanthin은 Carotenature GmbH(Lupsingen, Switzerland)에서 구입하였으며, 내부 표준품으로 사용된 β -apo-8'-carotenal은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 분석용 용매인 methanol(MeOH)은 Burdick & Jackson(SK Chemicals, Ulsan, Korea)의 LC grade를 사용하였으며, 추출용 용매인 acetone, diethylether, sodium chloride, sodium sulfate는 Junsei Chemical(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. H₂O는 AquaMAX™-Ultra(YoungLin Instrument Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 18.2 m Ω 수준으로 정제된 증류수를 사용하였다.

전처리 방법

각 시료는 가속용매추출장치(ASE, accelerated solvent extraction, ASE 150, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 추출용 cell(22 mL)에 cellulose filter(ASE-NON-Stick Thimbles for extraction, Whatman, Schleicher & Schuell, Bioscience, Dassel, Germany), ASE Prep Diatomaceous Earth(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 차례로 넣고 압착한 후 여기에 균질화 된 각 시료를 각 1 g씩 넣어 추출하였다. 기기조건은 static time 5 min, static cycles 4회, solvent flush% 60 vol, nitrogen purge 60 s, pressure 1,500 psi, temperature 100°C이며, 추출용매는 acetone을 이용하였다(18). 추출이 끝난 후 collection vial에 수집된 용매를 TurboVap LV(Biotage, Uppsala, Sweden)를 이용하여 25°C 수욕상에서 N₂ 가스로 농축하여 3 mL로 정용한 후 검화하였다. 검화는 아세톤 추출액 3 mL에 30% KOH/MeOH 1 mL과 methanol 3 mL을 혼합하여 빛을 차단한 채 2시간 30분 동안 검화한 후 그 검화물을 diethylether로 3회 이상 추출하였다. 추출액 중 수분을 제거하기 위해 증류수 20 mL로 3회 반복 첨가 후 10% NaCl 10 mL을 첨가하여 충분히 방치하여 층 분리를 시켜 하층액을 회수하였다. 회수된 하층액에 2% Na₂SO₄ 10 mL를 3회 이상 반복 첨가하여 순수 diethylether층을 회수하였다. 회수된 diethylether는 감압 농축한 후 남은 잔여물을 아세톤 3 mL에 녹여 MILLEX-HV 0.22 μ m PTFE syringe filter(Millipore Corp. Bedford, MA, USA)로 여과한 후 분석에 사용하였다. 또한 시료 분석 중 검량선 작성 시료를 먼저 측정 한 후 시료 분석 시 각 배치의 시료 사이마다 표준품을 측정하여 농도 범위 이내에 들어오는지 확인하며 분석하였다.

기기 및 분석조건

Lutein과 zeaxanthin의 정량을 위하여 Acquity UPLC H-Class(Waters, USA)를 이용하였다. 분석 기기의 구성은 Tunable UV(TUV) 검출기, 컬럼오븐, sample manager(Flow Through Needle injector, FTN), Quaternary Solvent Manager(QSM) 및 Empower 3 chromatography software로 이루어졌으며, 표준물질의 분리를 위해서 역상컬럼인 Acquity UPLC BEH C18(1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm)을 이용하여 분석하였다.

Lutein과 zeaxanthin의 분석 조건은 다음과 같다. 이동상은 methanol과 H₂O를 사용하였으며(85:15, v/v), 유속은 0.5 mL/min, 검출과장은 470 nm, 주입량은 1.0 μ L, 컬럼온도는 40°C를 유지하며 12분 동안 분석하였다.

분석법 검증

Lutein, zeaxanthin, β -apo-8'-carotenal은 각각 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 stock solution을 만든 후 사용하였다. Lutein과 zeaxanthin은 0.1-150 μ g/mL 범위 내에서 12가지 농도로 혼합표준 용액을 만들었으며, 내부표준물질로는 β -apo-8'-carotenal을 50 μ g/mL로 이 되게 첨가하여 검량선용 표준시료를 만들어 UPLC로 분석하였다. 검량식은 농도에 따른 피크의 면적으로 검정곡선 작성을 단순 선형회귀곡선의 형태로 구하여 검량선을 작성하였다. 작성된 검량선은 r²의 값을 통하여 직선성을 판단하였으며, r²의 값이 0.99 이상인 경우 성분의 함량을 평가하는 검량선으로 사용하였다.

각 성분에 대한 검출한계(Limit of Detection, LOD)와 정량한계(Limit of Quantification, LOQ)는 표준용액의 크로마토그램을 사용하여 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 계산하였다.

$$LOD=3.3\times(\text{standard deviation/slope of calibration curve})$$

$$LOQ=10\times(\text{standard deviation/slope of calibration curve})$$

정밀도(precision)및 정확도(accuracy)는 엽채류 시료 추출 용매와 동일한 방법으로 수행하였으며, 직선성의 범위를 나타내는 범위 중 25, 50, 100 μ g/mL의 농도가 되도록 lutein과 zeaxanthin의 혼합표준용액을 제조하여, 하루에 실험을 5회 반복하여 일내(intra-day) 정밀도를 구하였고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간(inter-day) 정밀도를 구하였다. 정밀도는 측정값의 RSD(Relative standard deviation, %)로 계산하였으며, 정확도(accuracy)는 표준물질의 값에 대한 측정 평균값의 회수율(recovery)로 계산하였다.

통계분석

모든 분석은 3회 이상 반복 수행하였고, 결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 기술하였다. 각 실험 결과는 SPSS 프로그램(PASW Statistics v.18; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way ANOVA와 Duncan's multiple-range test($p<0.05$)로 비교하였다.

결과 및 고찰

Lutein과 zeaxanthin의 분석 조건 설정

Lutein 및 zeaxanthin의 동시분석법을 확립하고자 다양한 용매 조성 및 파장에 대하여 분석조건을 검토한 결과 새로운 분석조건을 확립하였다. 확립된 분석법을 이용하여 lutein 및 zeaxanthin과 내부표준물질인 β -apo-8'-carotenal의 UPLC 크로마토그램은 Fig. 1(a)과 같다. 총 분석시간은 12분이며, 표준품을 분석하였을 때 피크의 머무름 시간은 zeaxanthin이 4.38분, lutein이 4.68분이었으며, β -apo-8'-carotenal은 9.57분이었다. 본 연구의 분석조건에서 세 표준물질의 분리 상태는 양호하였으며, 전처리한 엽채류 시료중 하나인 시금치 추출물의 크로마토그램을 비교하여 lutein과 zeaxanthin의 피크가 분리되는지를 확인한 결과 Fig. 1(b)와 같이 각 성분들이 다른 피크와 간섭없이 분리되었으며 표준용액의 피크 유지시간과 시금치 추출물의 피크유지시간이 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 기존의 HPLC를 이용하여 lutein과 zeaxanthin을 분석한 연구들을 살펴보면 Pineau 등(11)은 methanol과 ethyl ace-

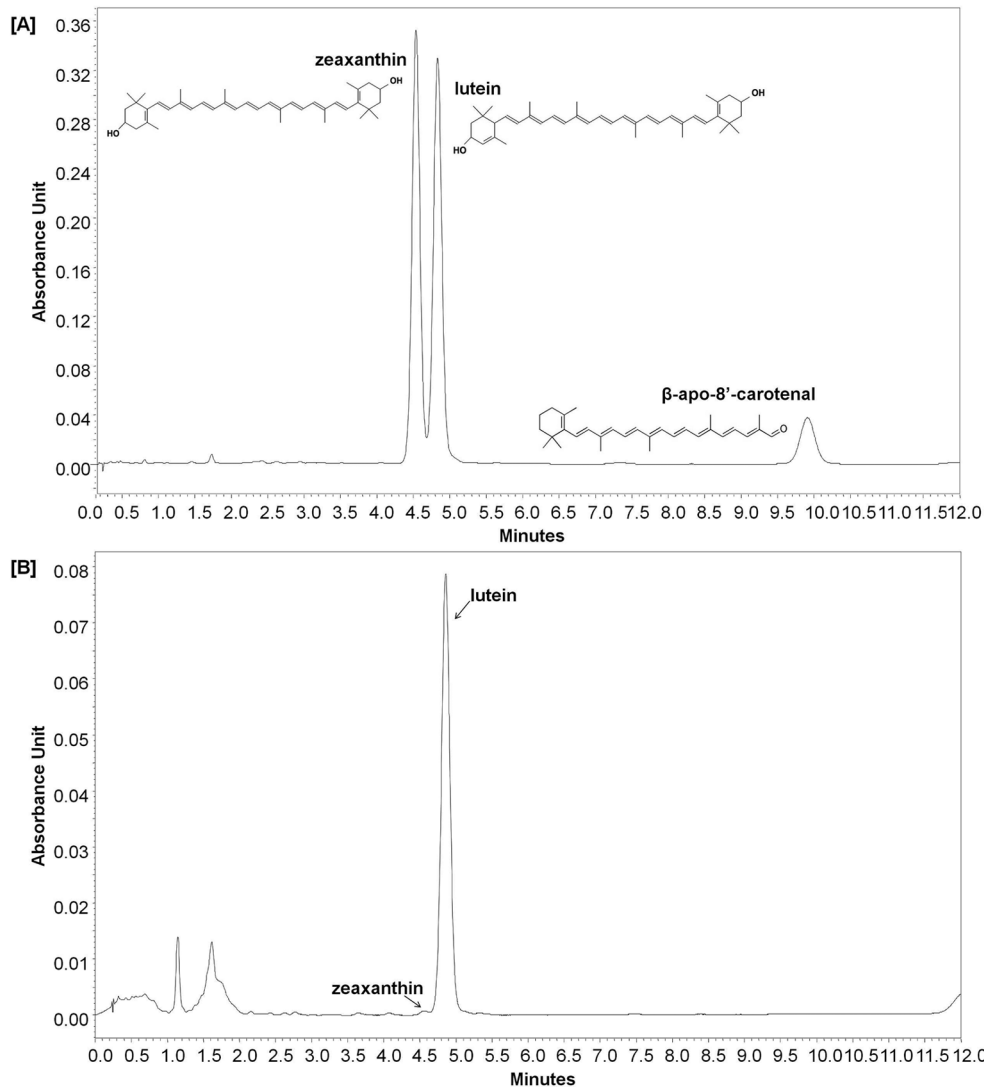


Fig. 1. Chromatogram of zeaxanthin, lutein and β -8'-apo-carotenal (internal standard) (a) and lipophilic extracts of *Spinacia oleracea* (b) in UPLC.

tate의 혼합용매와 2.5 mM tetrabutylammonium phosphate가 함유된 85% methanol 용매를 이용하여 구배용매조성법 (gradient system)으로 분석하였으나, lutein과 zeaxanthin이 분리되지 않은 채 정량하였으며, Su 등(12)의 연구에서도 0.05% ammonium acetate가 함유된 methanol과 0.1% triethylamine이 함유된 acetonitrile과 chloroform 용매를 이용하여 구배용매조성법으로 분석하였음에도 lutein과 zeaxanthin이 분리되지 않은 채 정량을 하였다. HPLC를 이용하여 옥수수 중 xanthophyll류를 분석한 연구에서 C-30 컬럼으로 methanol/MTBE/water(81:15:4)와 methanol/MTBE(9:91)를 이용한 구배용매조성법으로 lutein과 zeaxanthin을 분리 및 정량하였다(19). HPLC를 이용하여 파프리카의 카로티노이드 색소를 분석한 이전 연구에서도 C18 컬럼을 이용하여 85% methanol과 acetone/methanol(50:50)을 이용한 구배용매조성법으로 lutein과 zeaxanthin 분리 분석하였다(20). 본 연구에서 확립된 분석방법은 비교적 간단한 용매 시스템인 85% methanol을 사용하여 일정용매조성법 (isocratic system)으로 UPLC용 C18 컬럼을 이용하여 피크간의 간섭없이 5분 내에 lutein과 zeaxanthin을 분석하였다.

Lutein과 zeaxanthin의 분석법 검증

직선성 검증을 위한 lutein과 zeaxanthin의 표준시료 농도 범위는 0.1-150 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 12개의 농도별 표준품을 만든 후 여기에 내부표준물질인 β -apo-8'-carotenal가 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도가 되게 첨가하여 검량선용 표준시료를 만들어 UPLC로 분석하였다. 이때 얻어진 lutein과 zeaxanthin 검량선의 직선성(linearity)과 검출한계 및 정량한계는 Table 1과 같다. Zeaxanthin의 검량선의 직선성을 위한 회귀식은 $y=25268x-117013$ 이고 상관계수(r^2)는 0.9968이며, lutein의 검량선의 직선성을 위한 회귀식은 $y=21585x-46182$ 이고 상관계수(r^2)는 0.9976으로 두 표준품 모두 본 분석조건 하에서 높은 직선성을 나타내었다. 직선성을 나타내는 범위 내에서 zeaxanthin과 lutein의 LOD값은 각각 2.1과 1.7 $\mu\text{g/mL}$ 이며, LOQ값은 각각 6.3과 5.1 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 이는 시료로부터 zeaxanthin과 lutein의 분석에 적용할 경우 검출은 각각 2.1 $\mu\text{g/mL}$ 과 1.7 $\mu\text{g/mL}$, 정량은 각각 6.3 $\mu\text{g/mL}$ 과 5.1 $\mu\text{g/mL}$ 수준까지임을 의미한다. 검출한계와 정량한계를 계산하는데 이용되는 신호대잡음비는 baseline에 대한 noise와 peak의 상대비로 그 값이 낮을수록 해당 표준물질

Table 1. Measurement of LOD, LOQ and linearity for zeaxanthin and lutein

	Zeaxanthin	Lutein
LOD ($\mu\text{g/mL}$) ¹⁾	2.1	1.7
LOQ ($\mu\text{g/mL}$) ²⁾	6.3	5.1
Calibration equation ($y=Ax+B$)		
Slope (A)	25268	21585
Intercept (B)	-117013	-46182
Correlation coefficient (r^2)	0.9968	0.9976

¹⁾LOD, limit of detection²⁾LOQ, limit of quantification

질이 주어진 조건에서 잘 검출된다는 의미를 나타낸다(21). Guilarme 등(22)은 마취제인 rapidocane의 성분 분석 방법을 비교한 연구에서 UPLC법이 HPLC법에 비해 3-8배 더 빠른 분석시간과 높은 감도를 가진다고 보고하였다. 본 연구에서 확립한 분석방법은 lutein과 zeaxanthin의 분석을 위한 검출한계와 정량한계를 검증한 것으로 충분히 활용이 가능할 것으로 사료된다.

정밀도(precision)는 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 말한다(23). UPLC를 이용한 분석법의 검증 결과(Table 2), zeaxanthin의 일내 RSD값은 5.41-7.31%, 일간 RSD값은 3.79-9.82%이었으며, lutein의 일내 RSD값은 4.65-7.33%, 일간 RSD값은 4.04-10.69%이었다. 또한, zeaxanthin과 lutein 표준품의 회수율을 구해본 결과 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 3가지 농도 범위에서 각각 91.75-103.24%와 95.76-105.13%이었다. 이러한 결과는 개발된 분석방법이 lutein과 zeaxanthin의 정량분석이 가능한 재현성(reproducibility)을 가지고 있다는 것을 나타낸다. 즉, 본 연구에서 개발된 분석방법은 유효성검증을 통하여 zeaxanthin과 lutein을 동시 분석할 수 있는 충분한 감도와 직선성 및 정밀도와 정

확도를 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

엽채류 중 lutein과 zeaxanthin의 함량

엽채류 시료들의 전처리법 Kim 등(20)의 방법을 변형하여 수행되었으며, 전처리 과정 중 acetone으로 시료를 추출하는 과정은 가속용매추출장치(ASE)를 이용하여 추출하였다. ASE는 추출 시 온도와 압력을 조절하여 용매와 시간이 적게 소요되며 좋은 추출 효율을 나타내는 장점이 있다(24). Richter 등(25)의 연구에서 ASE로 추출한 회수율이 전통적 추출방법보다 뛰어나다는 연구결과를 보고하기도 하였다. 본 연구에서 색이 다 빠질 때까지 교반하여 추출하는 기존 방법에 비하여 ASE를 이용하여 추출하였을 때 추출용매와 시간이 훨씬 감소되었다. 일반적으로 과일과 채소의 carotenoids는 carotenol acyl ester 형태로 존재한다. 이는 lauric acid, myristic acid, palmitic acid와 같은 직쇄지방산과 에스테르화 되어 있는 형태이며, 검화 과정을 거쳐야 함유된 carotenoid 성분들을 분리 및 정량할 수 있다(26). 이러한 이유로 ASE를 이용한 엽채류 시료들의 acetone 추출물들은 검화 과정을 거쳐 분획법을 이용하여 분석 시 단일 carotenoid들만 잘 분리될 수 있도록 하였다.

일상적으로 섭취하는 lutein과 zeaxanthin을 분석하기 위해 한국인의 대표적인 엽채류인 부추, 취나물, 원추리, 참나물, 돌나물, 시금치를 선정하여 lutein과 zeaxanthin을 분석하였으며, 그 함량은 Table 3과 같다. Lutein은 시금치에서 $49.64 \pm 1.28 \text{ mg/100 g dry weight(dw)}$ 로 가장 많이 함유되어 있었으며, 그 다음으로는 부추에서 $35.05 \pm 0.52 \text{ mg/100 g dw}$, 취나물 $30.45 \pm 1.78 \text{ mg/100 g dw}$, 참나물 $29.79 \pm 3.80 \text{ mg/100 g dw}$, 원추리 $25.42 \pm 1.12 \text{ mg/100 g dw}$ 순이었으며, 돌나물은 $1.84 \pm 1.28 \text{ mg/100 g dw}$ 로 lutein 함량이 가장 적었다. Zeaxanthin은 시금치, 참나물, 원추리, 취나물이 각각 $7.13 \pm 0.13 \text{ mg/100 g dw}$, $7.08 \pm 0.03 \text{ mg/100 g dw}$, $7.17 \pm 0.06 \text{ mg/100 g dw}$, $7.16 \pm 0.04 \text{ mg/100 g dw}$ 로 비슷한 수준을 나타내었으며, 부추가 $6.88 \pm 0.02 \text{ mg/100 g dw}$ 로 시금치, 참나물, 원추리, 취나물

Table 2. Inter- and intra-day accuracy and precision, and recovery of the newly developed method

Analyte	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inter-day (n=5)		Intra-day (5 days)	
		Recovery (%)	RSD (%) ¹⁾	Recovery (%)	RSD (%)
Zeaxanthin	25	98.71	3.82	95.02	6.34
	50	94.25	9.82	91.75	7.31
	100	101.67	3.79	103.24	5.41
Lutein	25	96.35	10.69	101.07	7.33
	50	95.76	6.81	97.32	7.02
	100	101.37	4.04	105.13	4.65

¹⁾RSD, relative standard deviation**Table 3. Zeaxanthin and lutein contents in leafy vegetables cultivated in Korea**

Scientific name	Korean name	Content, mg/100g of dry weight ^{1,2)}	
		Zeaxanthin	Lutein
<i>Allium tuberosum</i>	<i>buchu</i>	6.88 ± 0.02^b	35.05 ± 0.52^b
<i>Aster scaber</i>	<i>chuinamul</i>	7.16 ± 0.04^a	30.45 ± 1.78^c
<i>Hemerocallis fulva</i>	<i>wonchuri</i>	7.17 ± 0.06^a	25.42 ± 1.12^d
<i>Pimpinella brachycarpa</i>	<i>chamnamul</i>	7.08 ± 0.03^a	29.79 ± 3.80^c
<i>Sedum sarmentosum</i>	<i>dolnamul</i>	1.54 ± 0.03^c	1.84 ± 0.11^e
<i>Spinacia oleracea</i>	<i>sigumchi</i>	7.13 ± 0.13^a	49.64 ± 1.28^a

¹⁾Each value is the mean (mg/100 g of dry weight) of four replications \pm standard deviation.²⁾Means in each column with sonic letters are not significantly different ($p < 0.05$).

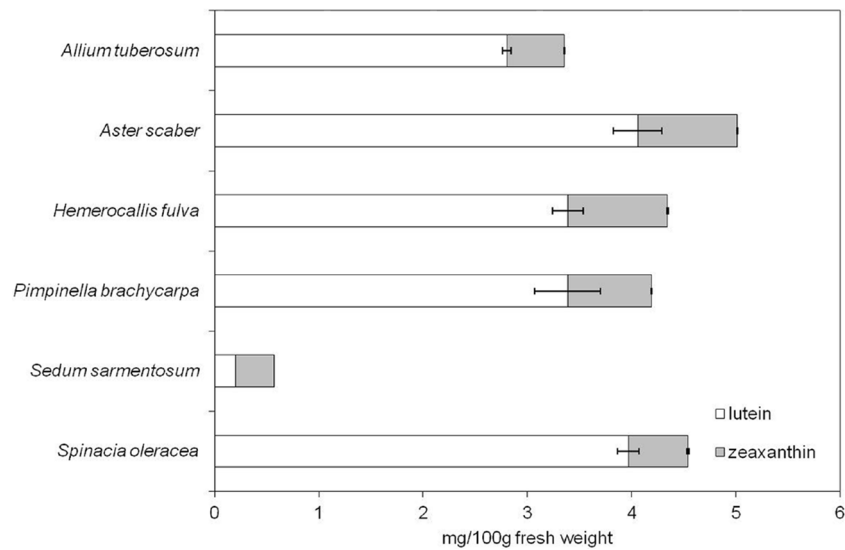


Fig. 2. Comparison of lutein and zeaxanthin contents between selected leafy vegetables cultivated in Korea.

보다는 적은 함량을 나타내었다. 돌나물의 경우 1.54 ± 0.03 mg/100 g dw로 zeaxanthin의 함량이 시료 중 가장 적었다. Lee와 Kim(27)의 녹색잎 채소류에서 lutein 함량을 분석한 연구에서 시금치와 취나물의 lutein 함량이 각각 10.115 mg/100 g과 11.989 mg/100 g로 본 연구 결과가 훨씬 높은 수준으로 나타난 것을 확인할 수 있었다. Lim(28)은 시금치의 조리방법에 따른 carotenoids 함량 변화를 관찰한 연구에서 원재료 시금치에서 lutein 함량은 153.1 ± 1.3 μ g/g이라 하였으며, steam과 microwave 처리한 경우 약 2-7% 정도 약간 감소하는 경향을 보이거나 통계상 유의한 차이는 없다고 보고하였다. 본 연구에서 사용된 엽채류의 수분함량은 부추 92.00%, 취나물 86.67%, 원추리 88.67%, 참나물 88.63%, 돌나물 94.67%, 시금치 92.00%임을 고려하여 건조중량과 습부중량을 비교해보면 건조중량 단위에서는 시금치의 lutein 함량이 가장 높았으나, 습부중량 단위일 때, 시금치와 취나물의 lutein 함량은 각각 3.97 ± 1.01 mg/100 g fresh weight(fw)와 4.06 ± 0.24 mg/100 g fw로 취나물의 lutein 함량이 다소 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 2). Zeaxanthin 역시 습부중량 단위로 함량을 계산하였을 때, 취나물과 원추리가 각각 0.95 ± 0.00 mg/100 g fw와 0.96 ± 0.01 mg/100 g fw로 다른 시료들 보다 유의하게 높았다. Kim 등(29)은 조리된 시금치에서의 lutein 함량이 3.27 mg/100 g wet weight라고 하였으며, 생 깻잎의 lutein 함량은 4.45 mg/100 g wet weight라고 보고하여 본 연구결과에서의 취나물의 lutein 함량과 비슷한 수치를 나타내었다. Chanan-Taber 등(6)은 12년 동안 미국 여성들을 대상으로 carotenoid 섭취와 백내장에 관련된 연구를 수행한 결과 lutein과 zeaxanthin 섭취에서 상대위험도(relative risk, RR)가 0.78(95% 신뢰구간 0.63-0.95)로 백내장 발생 위험을 22% 낮출 수 있다고 하였으며, 특히 lutein과 zeaxanthin을 6,047 μ g을 섭취한 265명에게 상대위험도가 0.81(95% 신뢰구간 0.69-0.96)로 다른 섭취 정도에 비해 더 효과적이라고 보고하였다. 또한 Seddon 등(5)은 lutein과 zeaxanthin이 풍부한 과일 및 채소류의 섭취와 노인성 황반변증 발생과의 상관관계를 조사한 결과, 하루에 6 mg 이상의 lutein을 섭취하면 삼출성 노인성 황반변증의 위험을 43% 낮춘다고 보고 하였다. 한국인이 자주 섭취하는 엽채류의 lutein과 zeaxanthin 함량을 정량하고 안다는 것은 식이 중 lutein과 zeaxanthin의 공급량을 이해하기 위하여 중요하다. 본 연구 결과, 취나물 100 g을 섭취하면 lutein과 zeaxanthin을 거

의 5 mg 정도 공급받을 수 있으며, 시금치와 참나물, 원추리의 경우 대략 4.5 mg 정도 공급받을 수 있다(Fig. 2). Ju 등(30)은 2010년 개정된 식품교환표에는 돌나물, 원추리, 취나물이 채소류에 추가품목으로 지정되었다고 보고하였다. 이것은 한국인의 이들 엽채류 섭취 빈도 및 함량이 높다는 것을 의미한다. 또한 돌나물의 경우 소량의 당질을 함유하고 있지만 1 단위 열량이 낮고 식이섬유소가 많아 섭취를 권장한다고 보고하였다. 식품교환표에서 채소류 1 교환단위가 70g임을 감안할 때, 이들 엽채류의 꾸준한 섭취는 눈 건강에 도움이 될 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 UPLC를 이용하여 lutein과 zeaxanthin을 단시간에 동시 분석할 수 있는 새로운 방법을 개발한 후 분석법에 대한 평가를 수행하였으며, 확립된 방법으로 6종의 엽채류에서 lutein과 zeaxanthin을 정량 분석하였다. 분석 컬럼은 Acquity UPLC BEH C18(1.7 μ m, 2.1 \times 50 mm), 이동상 용매는 85% methanol을 사용하였으며, 검출파장은 450 nm, 이동상의 유속은 0.5 mL/min, 분석온도는 40°C, 시료주입량은 1.0 μ L로 설정하여 분석하였다. 확립된 분석조건에서 lutein과 zeaxanthin의 피크머무름시간(RT)은 각각 4.35분과 4.56분이며, 표준용액의 피크머무름시간과 엽채류 시료들의 피크머무름시간은 일치하였다. lutein과 zeaxanthin에 대한 표준검정곡선은 1-150 μ g/mL 농도범위에서 상관계수(r^2)는 0.9968 이상의 양호한 직선성을 나타내어 분석에 적합함을 알 수 있었으며, 검출한계는 lutein과 zeaxanthin이 각각 1.7 μ g/mL과 2.1 μ g/mL, 정량한계는 lutein과 zeaxanthin이 각각 5.1 μ g/mL과 6.3 μ g/mL로 설정되었다. Lutein과 zeaxanthin의 회수율은 각각 95.76-105.13%와 91.75-103.24% 범위를 보였다. Lutein의 일내 RSD값은 4.65-7.33%, 일간 RSD값은 4.04-10.69%이었으며, zeaxanthin의 일내 RSD값은 5.41-7.31%, 일간 RSD값은 3.79-9.82%이었다. 확립된 분석법으로 한국인이 많이 섭취하는 녹색과 엽채류인 부추, 취나물, 원추리, 참나물, 돌나물 시금치에서 lutein과 zeaxanthin을 분석한 결과 lutein 함량은 시금치와 취나물이 3.97 ± 0.10 mg/100 g fw, 4.06 ± 0.24 mg/100 g fw로 가장 높았으며, 참나물과 원추리가 3.39 ± 0.43 mg/100 g fw, 3.39 ± 0.15 mg/100 g fw로 높았다. Zeaxanthin의 경우 취나물과 원추리가 각각 0.95 ± 0.00 mg/

100 g fw와 0.96 ± 0.01 mg/100 g fw로 가장 높았다. 본 연구에서 확립된 UPLC 분석법은 lutein과 zeaxanthin을 신속하고 효과적으로 동시 분석하는데 이용될 수 있을 것이며, 한국인이 많이 섭취하는 엽채류 중 시금치와 취나물은 lutein과 zeaxanthin의 좋은 식이 급원일 뿐 아니라, 꾸준히 섭취하면 눈건강에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 한국방송통신대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

문헌

- Chan C, Leung I, Lam KW, Tso MO. The occurrence of retinol and carotenoids in human subretinal fluid. *Curr. Eye Res.* 17: 890-895 (1998)
- Semba RD, Dagnelie G. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? *Med. Hypotheses* 61: 465-472 (2003)
- Krinsky N, Landrum JT, Bone RA. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu. Rev. Nutr.* 23: 171-201 (2003)
- Granado F, Olmedilla B, Blanco I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *Brit. J. Nutr.* 90: 487-502 (2003)
- Seddon JM, Ajani UA, Sperduto FLD, Hiller R, Blair N, Burton TC. Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *J. Am. Med. Assoc.* 272: 1413-1430 (1994)
- Chasan-Taber L, Willett WC, Seddon JM, Stampfer MJ, Rosner B, Colditz GA, Speizer FE, Hankinson SE. A prospective study of carotenoid and vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 509-516 (1999)
- Hart DJ, Scott KJ. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chem.* 54: 101-111 (1995)
- Murillo E, Melendez-Martinez AJ, Portugal F. Screening of vegetables and fruits from panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. *Food Chem.* 122: 167-172 (2010)
- KFDA. Administrative Notice of Partial Revision of the Proposed Criteria and Standards for Functional Foods. Notice No. 211-25 of the Korea Food & Drug Administration, Reference data. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. III.3.5.14-1-III.3.5.14-3 (2011)
- Sander LC, Sharpless KE, Pursch M. C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 880: 189-202 (2000)
- Pineau B, Gerard-Hirne C, Douce R, Joyard J. Identification of the main species of tetrapyrrolic pigments in envelope membranes from spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 102: 821-828 (1993)
- Su Q, Rowley KG, O'Dea K. Stability of individual carotenoids, retinol, and tocopherols in human plasma during exposure to light and after extraction. *J. Chromatogr. B* 729: 191-198 (1999)
- Huck CW, Popp M, Scherz H, Bonn GK. Development and evaluation of the new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 38: 441-449 (2000)
- Sander LC, Sharpless KE, Pursch M. C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 880: 189-202 (2000)
- de Villiers A, Lestremou F, Szucs R, Gilbert S, David F, Sandra P. Evaluation of ultra performance liquid chromatography Part I. Possibilities and limitations. *J. Chromatogr. A* 1127: 60-69 (2006)
- Wang J, Li H, Jin CJ, Qu Y, Xiao X. Development and validation of a UPLC method for quality control of rhubarb-based medicine: Fast simultaneous determination of five anthraquinone derivatives. *J. Pharmaceut Biomed.* 47: 765-770 (2008)
- Jastrebova J, Strandler HS, Patring J, Wiklund T. Comparison of UPLC and HPLC for analysis of dietary folates. *Chromatographia* 73: 219-225 (2011)
- Anonymous. Accelerated solvent extraction techniques for in-line selective removal of interferences. Technical Note 210; LPN 1931. Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA. pp. 1-6 (2007)
- Moros EE, Darmoko D, Cheryan M, Perkins EG, Jerrrell J. Analysis of xanthophylls in corn by HPLC. *J. Agr. Food Chem.* 50: 5787-5790 (2002)
- Kim JS, Ahn JY, Lee SJ, Moon B, Ha TY, Kim S. Phytochemicals and antioxidant activity of fruits and leaves of paprika (*Capsicum Annuum* L., var. Special) cultivated in Korea. *J. Food Sci.* 76: 193-198 (2011)
- Morrison GH. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal. Chem.* 52: 2242-2249 (1980)
- Guillarme D, Nguyen DT-T, Rudaz S, Veuthey JL. Recent developments in liquid chromatography-impact on qualitative and quantitative performance. *J. Chromatogr. A* 1149: 20-29 (2007)
- KFDA. Analytical method guideline about validation of drugs and etc. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 1-18 (2004)
- Lee SW, Seo HY, Han BJ, Jeong YM, Kim JH, No KM, Kim KS. Use of accelerated solvent extraction method for determination of residual pesticides in agriculture products. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 228-237 (2004)
- Richter BE, Jones BA, Ezzel JL, Porter NL. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* 68: 6-15 (1996)
- Khachik F, Beecher GR, Goli MB. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.* 63: 71-80 (1991)
- Lee HS, Kim YN. Beta-carotene and lutein contents in green leafy vegetables. *J. East Asian Dietary Life* 7: 175-180 (1997)
- Lim YI. Changes in the contents of carotenoids and *cis/trans* β -carotenes of fresh and cooked spinach in foodservice operations. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 117-123 (2007)
- Kim YN, Giraud DW, Driskell JA. Tocopherol and carotenoid contents of selected Korean fruits and vegetable. *J. Food Compos. Anal.* 20: 458-465 (2007)
- Ju DL, Jang HC, Cho YY, Cho JW, Yoo HS, Choi KS, Woo MH, Sohn CM, Park YK, Choue R. Korean food exchange lists for diabetes: Revised 2010. *Korean J. Nutr.* 44: 577-591 (2011)