

## UPLC를 이용한 색상별 파프리카 유래 카로티노이드의 정량적 평가

황정록 · 황인경 · 김선아<sup>1\*</sup>

서울대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>한국방송통신대학교 자연과학대학 가정학과

### Quantitative Analysis of Various Carotenoids from Different Colored Paprika Using UPLC

Jeong Rok Hwang, In Kyeong Hwang, and Suna Kim<sup>1\*</sup>

Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University

<sup>1</sup>Department of Home Economics, College of Natural Science, Korea National Open University

**Abstract** This study aimed to simultaneously determine various carotenoids from different colored paprika using an ultra performance liquid chromatograph (UPLC) equipped with a HSS T3 column. Analysis was performed at 450 nm using gradient conditions with acetonitrile/methanol/methylene chloride (65/25/10) and distilled water. We improved the peak resolution and performed carotenoid analysis within 30 min. We qualitatively analyzed 11 carotenoids (neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\alpha$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene, and  $\beta$ -carotene). For the validation of UPLC methods, we validated the precision and accuracy of capsanthin. Capsanthin showed good linearity ( $R^2=0.9998$ ) in the concentration range of 1-200  $\mu\text{g/mL}$  with 2.4 and 7.2  $\mu\text{g/mL}$  of limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), respectively. The relative standard deviation (RSD) for intra- and inter-day precision was less than 3.83%. Recovery was in the range of 91.86-99.87%. We quantitatively analyzed carotenoid contents from 8 different colored paprika (red, orange, yellow, and green). The most abundant carotenoids were capsanthin in red paprika, and zeaxanthin in orange, yellow, and green paprika.

**Keywords:** carotenoid, paprika, UPLC, capsanthin, zeaxanthin, lutein

## 서 론

카로티노이드(carotenoids)는 식물과 미생물에 의해 합성되는 붉은색, 주황색, 노란색 계열의 지용성 색소로서 polyisoprenoid 구조를 갖는 물질이다. 인간은 체내에서 카로티노이드를 합성할 수 없으므로 식이를 통해 섭취해야 한다. 카로티노이드는 산소 라디칼과 일중항 산소를 소거하는 항산화 작용을 하며(1,2) 면역 증진 및 암, 심혈관 질환, 백내장, 황반 변성과 같은 퇴행성 질환에 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(3-5). 또한 일부 카로티노이드는 비타민 A의 전구체로서, 비타민 A를 공급하는 역할을 하며, 식물체에서는 성장과 발달 조절 작용과 함께 광합성에 관여하며, abscisic acid와 같은 호르몬의 전구체 역할을 한다(6).

HPLC 분석법은 카로티노이드를 정량적으로 분석하기 위해 많이 사용되는 방법 중의 하나이다. 그러나 카로티노이드는 지용성이고 구조가 매우 유사하여 분리능이 떨어지며, 실제로 노인성 황반변증의 위험을 낮추는 것으로 보고되고 있는 lutein과 zeaxanthin은 HPLC로 완전히 분리되지 않아 정량적으로 평가하기에

어려움이 있어 왔다(7-9). UPLC (ultra performance liquid chromatography)는 HPLC보다 충전 입자의 크기가 1.7-1.8  $\mu\text{m}$ 로 작으며 높은 압력(최대 15000 psi)에서 분석을 하기 때문에 분석 시간을 단축하고 분리능을 높일 수 있다. Liu 등(10)은 HPLC와 UPLC를 이용하여 마리골드로부터 lutein과 zeaxanthin을 분석하는 연구를 통해 UPLC로 분석을 하면 시간을 50% 이상 감소시켰고 두 카로티노이드를 완전히 분리하여 분리능 개선에도 효과적임을 보고하였다. Fu 등(11)은 *Dunaliella salina*로부터 UPLC/MS를 이용하여 19종의 카로티노이드를 동정하였고 이 중에서 lutein이 가장 많이 함유되어 있었으며 검출한계 값과 정밀성을 검증하였다. Chauveau-Duriot 등(12)은 UPLC를 이용하여 xanthophylls의 분리능을 향상시켰으며 lutein과 zeaxanthin,  $\beta$ -carotene의 isomer를 분리하고 그 방법을 검증하였으나 시간을 단축하지는 못하였다. Murillo 등(13)은 C30 컬럼이 장착된 HPLC-DAD-MS를 이용하여 열대 과일로부터 32종의 카로티노이드를 분석하였는데 130분의 분석 시간이 소요되는 결과를 보고하였다.

파프리카는 비타민 C와 E, 토코페롤이 풍부한 과채류로 매운 맛은 약하고 단맛이 강하여 샐러드 및 생과로 이용되고 있다. 파프리카는 색상별로 다양한 카로티노이드가 과량 함유되어 있다. 적색과에서는 capsanthin과 capsorubin, 주황색과에서는  $\beta$ -carotene, 노란색과에서는 zeaxanthin과  $\beta$ -cryptoxanthin, 녹색과에서는 lutein 등이 대표적인 색소로 보고되고 있다(14). Kevrean 등(15)은 *Capsicum* 종으로부터 Zorbax SB C18 컬럼이 장착된 HPLC-DAD를 이용하여 32종의 carotenoids를 동정하였으나 capsorubin, violaxanthin, capsanthin, antheraxanthin의 피크가 분리되지 않아 속성과

\*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 June 11, 2014; revised December 29, 2014;  
accepted December 30, 2014

정에서의 변화추세만을 보고하였다. 따라서 파프리카가 색상별로 다양한 카로티노이드 종류가 함유되어 있는 점을 감안할 때 파프리카 유래 카로티노이드를 동시에 효율적으로 분석할 수 있는 조건의 확립이 필요하다.

본 연구에서는 UPLC를 이용하여 neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\alpha$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene 등의 카로티노이드를 동시 분석할 수 있는 조건을 확립하고, 다양한 색상의 파프리카에 함유되어 있는 카로티노이드를 정량적으로 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 실험에 사용한 시료인 파프리카(*Capsicum annuum* L.)는 적색과 3종(레드마운틴, 바이런, 시로코), 주황색과 1종(오렌지프로), 노란색과 2종(피에스타, 블란테), 녹색과 2종(레드마운틴, 바이런)을 농업회사법인 (주)농산무역(Gimje, Korea)로부터 구입하여 수세한 후 꼭지와 씨를 제거하고 동결 건조한 다음 분말로 만들어 실험에 사용하였다. 추출 및 전처리에 사용한 유기용매는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 여과에 사용한 MILLEX-HV 0.22  $\mu$ m PTFE syringe filter는 Millipore Corp. (Bedford, MA, USA)에서 구입하였다. 표준품으로 사용한 neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\alpha$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene은 Carotenature (Lupsingen, Switzerland)에서 구입하였으며, 내부 표준품으로 사용한  $\beta$ -apo-8-carotenal은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. UPLC용 용매인 acetonitrile, methanol, methylene chloride는 Avantor (Center Valley, PA, USA)의 LC grade를 구입하여 사용하였다. H<sub>2</sub>O는 AquaMAX™ Ultra (YoungLin Instrument Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 18.2 m $\Omega$  수준으로 정제된 증류수를 사용하였다.

### 사용기기

시료의 추출에 가속용매추출장치(ASE, accelerated solvent extraction, ASE 150, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하였고, 추출용액의 농축은 TurboVap LV (Biotage, Uppsala, Sweden)을 이용하였다. 정성적, 정량적 분석은 Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, MA, USA)를 이용하였다. 분석 기기의 구성은 Tunable UV (TUV) 검출기, 컬럼 오븐, sample manager (Flow Through Needle injector, FTN), Quaternary Solvent Manager (QSM) 및 Empower 3 chromatography software로 이루어졌다.

### ASE 추출

모든 시료는 가속용매추출장치를 이용하여 추출하였다. 추출용 cell (22 mL)에 cellulose filter (Dionex)를 끼운 뒤에, thimble (ASE-Non-Stick Thimbles for extraction, Whatman, Schleicher & Schuell, Bioscience, Dassel, Germany)을 넣고, 파프리카 분말 시료 1 g과 규조토(ASE Prep Diatomaceous Earth, Dionex)를 thimble 안에 넣고 잘 섞어서 압착한 뒤에 추출하였다. 기기 조건은 static time 3 min, static cycles 3회, nitrogen purge 60 s, pressure 1500 psi, temperature 80°C이며 acetone으로 추출하였다. 추출 후 collection vial에 수집된 용매를 TurboVap LV를 이용하여 50°C 수욕상에서 질소 가스로 3 mL로 농축하였다.

**Table 1. UPLC condition for carotenoids**

Column	HSS T3 column (2.1×100 mm, 1.8 $\mu$ m)		
Column temperature	35°C		
Run time	30 min		
Flow rate	0.5 mL/min		
Mobile phase	(A) Acetonitrile/methanol/methylene chloride (65/25/10, v/v/v) (B) Distilled water		
Wavelength	450 nm		
Gradient	Time (min)	(A)	(B)
	0	70	30
	6.5	70	30
	7	75	25
	11	75	25
	11.5	70	30
	17	70	30
	17.5	100	0
	27.5	100	0
	28	70	30
	30	70	30

### 시료 전처리

추출액의 검화는 acetone 추출액 3 mL에 methanol 3 mL와 30% KOH/MeOH 1 mL를 혼합한 뒤, 암실에서 2시간 30분을 방치한 뒤, diethyl ether로 추출하였다. Diethyl ether 추출액 중의 수분을 제거하기 위해 증류수, 10% NaCl 용액을 첨가하여 층 분리를 시킨 뒤 상층액만을 분획하였다. 회수한 상층액에 2% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 첨가하여 순수한 diethyl ether 층만을 얻었다. 이를 TurboVap LV를 이용하여 감압 농축한 뒤 acetone 2 mL에 녹이고, 0.2  $\mu$ m PTFE syringe filter로 여과하여 1 mL로 정용한 후 분석 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

### 분석조건 및 검증

UPLC의 분석 조건은 Table 1과 같다. 모든 표준품은 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 stock solution (2 mg/mL)을 제조한 후 1-200  $\mu$ g/mL 범위 안에서 12단계로 희석하여 단순선형회귀곡선을 구해 검량식을 작성한 후 직선성과 상관성(R<sup>2</sup>)를 확인하여 정량에 이용하였다. 이 중에서 capsanthin의 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 검량선에서 y 절편의 표준편차와 기울기를 이용하여 다음과 같이 계산하였다.

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

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

정밀도(precision)는 직선성을 나타내는 범위 중 50, 75, 100  $\mu$ g/mL의 농도에서 하루에 5회 반복 실험하여 일내(intra-day) 정밀도를 구하였으며, 5일간 반복 실험하여 일간(inter-day) 정밀도를 구하였다. 측정값의 RSD (relative standard deviation, %)를 통하여 정밀도를 계산하였다. 정확도(accuracy)는 표준물질의 값에 대한 측정 평균값의 회수율(recovery)을 통하여 계산하였으며, 정밀도와 마찬가지로 일내, 일간 정확도를 계산하였다.

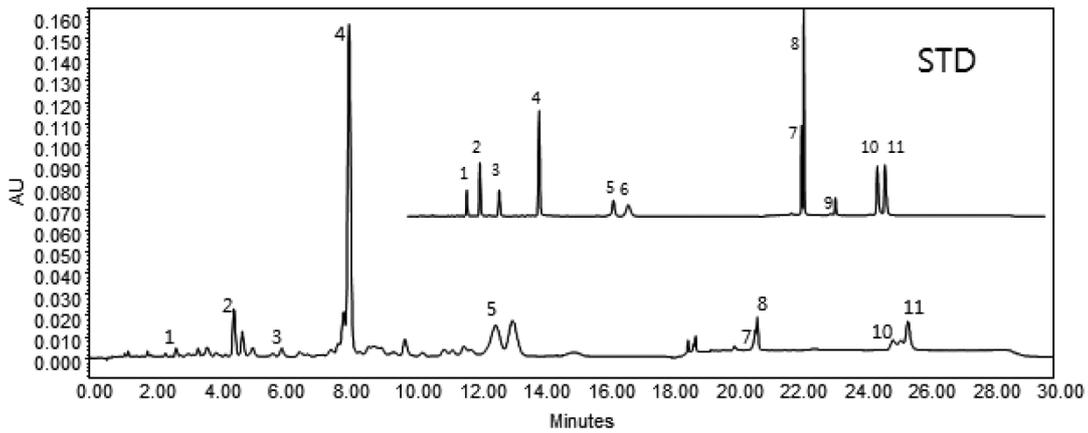


Fig. 1. Carotenoid chromatogram from red paprika 1, neoxanthin; 2, capsorubin; 3, violaxanthin; 4, capsanthin; 5, zeaxanthin; 6, lutein; 7,  $\alpha$ -cryptoxanthin; 8,  $\beta$ -cryptoxanthin; 9, lycopene; 10,  $\alpha$ -carotene; 11,  $\beta$ -carotene.

통계분석

모든 분석은 3회 이상 반복 수행하여 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험 결과는 IBM SPSS 프로그램(PASW Statistics v.18, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)과  $p < 0.05$  수준에서 Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)을 실시하여 비교하였다.

결과 및 고찰

카로티노이드 분석 조건 설정 및 검증

11종 카로티노이드(neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\alpha$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene)를 단시간에 동시 분석할 수 있는 조건을 확립하기 위해 컬럼, 용매 조성, 농도 구배 및 유속을 검토하여 분석법을 확립하였다. 이전의 연구에서 UPLC에 BEH C18 컬럼을 이용하여 엽채류로부터 zeaxanthin (RT=4.38분)과 lutein (RT=4.68)을 정량적으로 분석하였다(16). 그러나 파프리카에는 다양한 잔토필류가 함유되어 있으므로 high strength silica를 충전재로 이용하여 선택성을 향상시킨 HSS T3 컬럼을 이용하였다. 그 결과 본 실험에서는 lutein과 zeaxanthin이 10분 이후에 검출되어 분석시간이 늘어나면서 neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin과 같은 잔토필류의 분리가 간섭없이 깨끗하게 분리되어 잔토필류의 분석에 좀 더 선택적으로 이용할 수 있는 것으로 나타났다. 분석시간 30분 내에 cryptoxanthin과 carotene의  $\alpha$ -,  $\beta$ -isomer도 깨끗하게 분리되는 것으로 나타났다(Fig. 1). Lycopene은 토마토의 주요색소로서 파프리카에서 검출되지 않으나 카로티노이드의 동시분석 조건에 포함하여 타 과채류에 적용할 수 있는 조건이라 판단된다.

UPLC를 이용하여 다양한 종류의 카로티노이드를 분석한 연구를 살펴보면 BEH C18 컬럼을 이용한 Rivera 등(17)은 이동상으로 acetonitrile:methanol (7:3)과 증류수를 이용하여 분석을 하였는데, 비교적 극성이 있는 잔토필류의 경우 너무 이른 시간에 피크가 검출되어 충분히 분리되지 못하였으며, 본 연구와 같이 HSS T3 컬럼을 이용한 Fu 등(11)은 이동상으로 acetonitrile:methanol:methyl tert-butyl ether (7:2:1)와 10 mM ammonium acetate 용액을 이용하여 분석하였으나 zeaxanthin과 lutein을 분리하지 못하였고, Chauveau-Duriot 등(12)은 이동상으로 acetonitrile:methylene chloride:methanol (75:10:15)와 0.05 M acetate ammonium 용액을

Table 2. Measurement of LOD, LOQ and linearity for capsanthin

	Capsanthin ( $\mu\text{g/mL}$ )
LOD <sup>1)</sup>	2.4
LOQ <sup>2)</sup>	7.2
Calibration equation ( $y=Ax+B$ )	
Slope (A)	18040
Intercept (B)	-13796
Correlation coefficient ( $R^2$ )	0.9998

<sup>1)</sup>Limit of detection

<sup>2)</sup>Limit of quantification

이용하여 분석하였는데 분석시간이 50분으로 많은 시료를 분석하기에는 효율성이 다소 떨어지는 조건이었다. 본 연구에서는 Chauveau-Duriot(12)과 같은 종류의 유기 용매를 사용하였으나, 혼합 비율 및 조건을 다르게 하였으며 염을 첨가하지 않고 증류수를 이용하여 총 분석시간을 30분의 더 편리한 분석 조건을 확립하였다.

모든 표준품은 농도별 검량식을 작성하여 직선성을 확인한 결과, 상관계수( $R^2$ )가 0.98 이상으로 매우 높았으며 이 중에서 적색 파프리카의 주요 색소인 capsanthin의 정확성과 정밀성을 비교한 결과는 Table 2와 같다. 1-200  $\mu\text{g/mL}$  범위의 13가지 농도로 제조된 capsanthin의 회귀식은  $y=18040x-13796$ 이고 상관계수( $R^2$ )는 0.9998로 높은 직선성을 나타내었다. 직선성을 나타내는 범위 내에서 capsanthin의 검출한계와 정량한계는 각각 2.4와 7.2  $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

정밀도(precision)는 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값 사이의 근접성(분산정도)을 의미한다(18). 하루에 5회 반복 실험 및 5일간의 반복 실험의 결과(Table 3), capsanthin의 일내 RSD 값은 1.57-3.09%, 일간 RSD 값은 1.98-3.83%를 나타냈으며, 회수율은 일내와 일간에서 각각 91.86-94.98, 98.10-99.87%의 값을 나타내어 분석법의 정밀성과 정확성이 높은 것으로 검증되었다.

파프리카 유래 카로티노이드의 정량적 평가

지용성인 카로티노이드는 파프리카 내에서 주로 지방산과 결합하여 존재하기 때문에 파프리카의 추출물을 분석하면 결합된 지방산의 종류와 수에 따라 수습종으로 나타나며 이는 파프리카

**Table 3. Intra- and inter-day precision and accuracy of developed method**

	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day (n=5)		Inter-day (5 days)	
		Recovery (%)	RSD <sup>1)</sup> (%)	Recovery (%)	RSD (%)
Capsanthin	50	91.86	2.75	98.10	3.83
	75	94.12	3.09	99.87	3.66
	100	94.98	1.57	98.20	1.98

<sup>1)</sup>Relative standard deviation**Table 4. Carotenoid compositions in different colored paprika**

(unit: mg/100 g of dry weight)

	Neoxanthin	Capsorubin	Violaxanthin	Capsanthin	Zeaxanthin	Lutein	$\beta$ -cryptoxanthin	Lycopene	$\alpha$ -carotene	$\beta$ -carotene	Total Carotenoids
Red Paprika (Red Mountain)	0.73 $\pm$ 0.04 <sup>a1,2)</sup>	1.31 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>	14.70 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>	5.43 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	-	0.15 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	-	0.05 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	22.98 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>
Red Paprika (Veyron)	0.59 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	2.15 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.08 <sup>de</sup>	17.23 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	3.87 $\pm$ 0.26 <sup>bc</sup>	-	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	-	-	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>cd</sup>	24.24 $\pm$ 0.88 <sup>bc</sup>
Red Paprika (Scirocco)	0.60 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	2.37 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	18.46 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.85 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>	-	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	-	0.03 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.02	25.79 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
Orange Paprika (Orange pro)	0.63 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.35 $\pm$ 0.04 <sup>bcd</sup>	-	31.37 $\pm$ 2.81 <sup>a</sup>	5.38 $\pm$ 1.38	0.22 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	-	0.11 $\pm$ 0.05	0.14 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	38.31 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>
Yellow Paprika (Fiesta)	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.48 $\pm$ 0.07 <sup>bc</sup>	0.53 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	2.23 $\pm$ 0.04 <sup>cd</sup>	-	-	-	-	0.05 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	3.48 $\pm$ 0.09 <sup>de</sup>
Yellow Paprika (Volante)	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup>	0.23 $\pm$ 0.05 <sup>de</sup>	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>d</sup>	0.81 $\pm$ 0.42 <sup>d</sup>	-	-	-	-	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	1.62 $\pm$ 0.54 <sup>c</sup>
Green Paprika (Red Mountain)	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	-	0.68 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	-	3.87 $\pm$ 0.60 <sup>bc</sup>	-	-	-	-	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>cd</sup>	4.74 $\pm$ 0.67 <sup>d</sup>
Green Paprika (Veyron)	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	-	0.49 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	-	4.40 $\pm$ 1.69 <sup>bc</sup>	-	-	-	-	0.06 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>	5.03 $\pm$ 1.84 <sup>d</sup>

<sup>1)</sup>All results are expressed as mean $\pm$ SD for three replicates.<sup>2)</sup>Different superscripts in the same column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

의 품종 뿐만 아니라 숙성 정도에 따라 카로티노이드의 발현 및 지방산의 결합 형태에도 차이가 있다. 또한 일반적으로 카로티노이드의 추출은 acetone, diethyl ether, hexane, cyclohexane과 같은 유기용매로 완전히 탈색이 될 때까지 지용성 분획을 분리하는 방법을 이용하고 있다(19). 따라서 본 연구에서는 전처리 과정을 단축하기 위해 초고압추출장치를 이용하여 아세톤으로 단시간에 추출하였으며 검화과정을 통해 지방산을 제거하여 분석에 이용하였다.

적색 파프리카 3종, 주황색 파프리카 1종, 노란색 파프리카 2종, 녹색 파프리카 2종의 카로티노이드 정량 결과는 Table 4와 같다. Neoxanthin은 적색 파프리카(레드마운틴)에서 0.73 $\pm$ 0.04 mg/100 g dw로 가장 많이 함유되어 있었으며, capsorubin은 적색 파프리카(시로코)에서 2.37 $\pm$ 0.15 mg/100 g dw, violaxanthin은 녹색 파프리카(레드마운틴)에서 0.68 $\pm$ 0.04 mg/100 g dw, capsanthin은 적색 파프리카(시로코)에서 18.46 $\pm$ 0.01 mg/100 g dw로 가장 많이 함유되어 있었다. Zeaxanthin은 주황색 파프리카(오렌지프로)에서 31.37 $\pm$ 2.81 mg/100 g dw로 다른 색의 파프리카보다 최소 5.77배 이상 많이 함유되어 있었으며, lutein은 주황색 파프리카에만 5.38 $\pm$ 1.38 mg/100 g dw로 함유되어 있었다.  $\beta$ -Cryptoxanthin과  $\alpha$ -carotene은 붉은색과 주황색 파프리카에만 존재하였으며,  $\beta$ -carotene은 적색 파프리카(레드마운틴)에서 0.29 $\pm$ 0.02 mg/100 g dw로 가장 많이 함유되어 있었다. 색상마다 검출되는 카로티노이드의 차이는 파프리카에서 카로티노이드류의 생합성과정에서 발현되는 구조적 변화에서 기인한다. 전구체인 phytoene은 lycopene으로 합성되고

lycopene은 효소에 의해  $\alpha$ -카로틴 또는  $\beta$ -카로틴으로 합성되며 이후에 다양한 색소종으로 합성되어 다양한 색으로 발현된다(20). Jeong 등(21)의 한국산 파프리카의 총 카로티노이드 함량 연구에서는 적색과 프레지던트 품종이 37.46 mg%, 주황색 스페셜 품종이 29.72 mg%, 황색과 피에스타 품종이 17.25 mg%이라고 보고하였으나 분광광도계를 이용한 측정으로 차이가 있다. Kim 등(14)은 색상별 파프리카의 phytochemicals에 관한 연구를 통해 7종이 carotenoids를 분석하였고 적색과 중 쿠프라와 스페셜 품종의 capsanthin 함량이 각각 23.53 $\pm$ 4.27 mg/kg fw와 53.70 $\pm$ 6.23 mg/kg fw로 보고하였다. 본 연구에서는 적색과 3종에서 capsanthin 함량이 건조중량으로 각각 14.70 $\pm$ 0.13 mg/100 g dw, 17.23 $\pm$ 0.57 mg/100 g dw, 18.46 $\pm$ 0.01 mg/100 g dw 으로 나타나 품종에 따라 함량의 차이가 있는 것으로 나타났다. 주황색과에서는 zeaxanthin 함량이 31.37 $\pm$ 2.81 mg/100 g dw로 매우 높게 검출되었다. 이러한 차이는 파프리카의 품종과 숙성정도에 따라 색상의 발현 및 색상의 강도에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 파프리카에서 유래하는 10종의 카로티노이드와 lycopene을 단시간에 동시 분석하는 조건을 확립함으로써 다양한 색상의 파프리카에서 유래하는 색상을 한 번에 분석할 수 있는 방법을 제시하였다. 이러한 결과는 파프리카의 색상 품질 관리를 위해 활용될 수 있을 것이며 나아가 동일한 캡시컴종인 고추와 파프리카의 고색소품종 및 다양한 색상의 품종을 개발하고자 하는 분자유전학적 연구에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구에서는 UPLC를 이용하여 11종 카로티노이드(neoxanthin, capsorubin, violaxanthin, capsanthin, zeaxanthin, lutein,  $\alpha$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene,  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene)를 30분 내에 분석할 수 있는 방법을 확립하였으며, 이를 이용하여 다양한 색과 품종의 파프리카 내의 카로티노이드를 정량 분석하였다. 분석에는 HSS T3 컬럼과 acetonitrile:methanol:methylene chloride 혼합 용매와 증류수의 이동상을 이용하였으며, 개발한 조건 하에서 10종 카로티노이드를 잘 분리할 수 있었다. Capsanthin에 대한 검량선은 1-200  $\mu\text{g/mL}$  농도범위에서 상관계수( $R^2$ ) 0.9998의 높은 직선성을 나타내었고 각각 2.4, 7.2  $\mu\text{g/mL}$ 의 검출한계와 정량한계를 나타내었다. 일내 RSD값은 1.57-3.09%, 일간 RSD값은 1.98-3.83%를 나타냈으며, 회수율은 일내와 일간에서 각각 91.86-94.98, 98.10-99.87%의 값을 나타내어 분석에 적합함을 알 수 있었다. 이후 붉은색 파프리카 3종(레드마운틴, 바이런, 시로코), 주황색 파프리카 1종(오렌지프로), 노란색 파프리카 2종(피에스타, 블란테), 녹색 파프리카 2종(레드마운틴, 바이런)의 카로티노이드 정량 분석을 실시하여 본 연구에서 제시한 카로티노이드의 분석 조건이 다양한 색상의 파프리카를 동시에 분석할 수 있는 방법임을 확인하였다. 본 연구에서의 분석 조건을 이용하여 파프리카 이외에도 다양한 카로티노이드 함유 식품의 정량 분석을 보다 정확하고 신속하게 수행할 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 해양수산부 농촌진흥청 산림청 Golden Seed 프로젝트 사업의 연구비지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

## References

- Elliott R. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. BBA-Mol. Basis Dis. 1740: 147-154 (2005)
- Stahl W, Sies H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochim. Biophys. Acta 1740: 101-107 (2005)
- Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. Mol. Aspects. Med. 26: 459-516 (2005)
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. Biomed. Pharmacother. 58: 100-110 (2004)
- Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. Am. J. Clin. Nutr. 83: 1265-1271 (2006)
- Matthews PD, Luo R, Wurtzel ET. Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. J. Exp. Bot. 54: 2215-2230 (2003)
- Heo JY, Kim S, Kang JH, Moon B. Determination of lutein from green tea and green tea by-products using accelerated solvent extraction and UPLC. J. Food Sci. 79: C816-C821 (2014)
- 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)
- Liu H, Zhang Y, Zheng B, Li Q, Zou Y. Microwave-assisted hydrolysis of lutein and zeaxanthin esters in marigold (*Tagetes erecta* L.). Int. J. Food Sci. Nutr. 62: 851-856 (2011)
- Fu W, Magnsdottir M, Brynjlfson S, Palsson BØ, Paglia G. UPLC-UV-MS(E) analysis for quantification and identification of major carotenoid and chlorophyll species in algae. Anal. Bioanal. Chem. 404: 3145-3154 (2012)
- Chauveau-Duriot B, Doreau M, Nozire P, Graulet B. Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. Anal. Bioanal. Chem. 397: 777-790 (2010)
- Murillo E, Giuffrida D, Menchaca D, Dugo P, Torre G, Melendez-Martinez A, Mondello L. Native carotenoids composition of some tropical fruits. Food Chem. 140: 825-836 (2013)
- Kim JS, Ahn J, Ha TY, Rhee HC, Kim S. Comparison of phytochemical and antioxidant activities in different color stages and varieties of paprika harvested in Korea. Korean J. Food Sci. Technol. 43: 564-569 (2011)
- Kevrean S, Mandi AP, Kuhajda KN, Saka MB. Carotenoid content in fresh and dry pepper (*Capsicum annum* L.) fruits for paprika production. Food Feed Res. 36: 21-27 (2009)
- Kim S, Kim JS. Method validation and quantification of lutein and zeaxanthin from green leafy vegetables using the UPLC system. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 686-691 (2012)
- Rivera S, Vilaro F, Canela R. Determination of carotenoids by liquid chromatography/mass spectrometry: effect of several dopants. Anal. Bioanal. Chem. 400: 1339-1346 (2011)
- KFDA. Analytical method guideline about validation of drugs and etc. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 1-18 (2004)
- Kim JS, Ahn J, Lee SJ, Moon B, Ha TY, Kim S. Phytochemicals and antioxidant activity of fruits and leaves of paprika (*Capsicum Annum* L., var. special) cultivated in Korea. J. Food Sci. 76: C193-C198 (2011)
- Rodriguez-Urbe L, Guzman I, Rajapakse W, Richins RD, O'Connell MA. Carotenoid accumulation in orange-pigmented *Capsicum annum* fruit, regulated at multiple levels. J. Exp. Bot. 63: 517-526 (2012)
- Jeong CH, Ko WH, Cho JR, Ahn CG, Shim KH. Chemical components of Korean paprika according to cultivars. Korean J. Food Preserv. 13: 43-49 (2006)