

한우의 혈중 레티놀 농도 정량 분석법에 관한 연구

도한울, 강성식, 손준규, 원정일, 진실
농촌진흥청 국립축산과학원 축산자원개발부 한우연구센터
e-mail: hanwool91@korea.kr

Studies on analytical methods to quantify blood retinol levels in Hanwoo

Hanwool Do, Sung-Sik Kang, Jun-Kyu Son, Jeong-Il Won, Shil Jin
Hanwoo Research Center, NIAS, RDA, Korea

요약

본 연구는 한우의 혈중 레티놀 농도를 간단하고 정확하게 정량할 수 있는 HPLC 기반 분석법을 확립하기 위해 수행되었다. 표준품 분석에서는 뚜렷한 레티놀 피크가 확인되었고, 검량선의 직선성($R^2=0.9999$)도 매우 높게 나타났다. 그러나 혈장 시료에서는 특이적인 레티놀 피크가 검출되지 않았으며, 이는 낮은 농도나 매트릭스 간섭 때문으로 판단되었다. 향후에는 질소 농축을 포함한 전처리 개선과 함께 일내·일간 변동 및 첨가 회수율 검증을 통해 분석의 신뢰성과 정확성을 높이고자 한다.

1. 서론

한우의 육질 평가는 주로 근내지방도에 크게 의존하며, 이는 품종, 연령, 급여 사료, 비육 기간 등 다양한 요인의 영향을 받는다. 한우와 사양 환경이 유사한 일본에서는 근내지방도 향상을 목적으로 비타민 A 급여 수준을 조절하는 사양 전략이 일찍부터 도입되어 널리 활용되고 있다. 선행 연구들에 따르면, 혈중 비타민 A 농도와 근내지방도 간에는 유의한 부의 상관관계가 존재하며, 이는 비타민 A가 지방세포의 증식 및 분화에 영향을 미치기 때문으로 보고되었다 [1–7]. 근내지방은 지방세포 수의 증가, 세포 크기의 확대 또는 이 둘의 복합 작용에 의해 형성되며, 비육우에서 비타민 A는 근육 내 지방 전구세포의 분화를 억제하는 역할을 한다. 따라서 비타민 A가 결핍되면 이러한 억제 효과가 해제되어 지방세포 분화가 촉진되고, 결과적으로 근내지방 침착이 증가한다 [1]. 또한 혈중 β -카로틴 농도가 낮은 번식 암소에서는 수태율 저하가 보고된 바 있어 [8], 혈중 비타민 A를 정확히 분석하는 것은 번식 및 생산성 연구에도 중요한 의미를 가진다. 일본에서는 이미 각 현 단위에서 혈중 레티놀 분석법이 확립되어 있으며, 시험장마다 사용하는 분석 방법도 서로 차이를 보인다. 반면 한국의 경우, 해외 연구를 바탕으로 한 레티놀 분석 연구가 일부 수행되었으나, 분석에는 고도의 숙련이 필요하고 이를 수행할 수

있는 전문 기관도 제한적이다. 이러한 점에서 일본의 방법을 참고하여, 보다 간단하면서도 재현성이 높은 방법을 확립한다면, 국내에서도 혈중 레티놀 농도의 정량 분석을 보다 용이하게 수행할 수 있을 것이다. 이에 본 연구에서는 한우의 혈중 레티놀 농도를 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 간단하고 정확하게 측정할 수 있는 방법을 검토하였다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1 혈액 샘플 수집

오전 9시 30분에서 11시 사이에 한우연구센터의 번식우로부터 경정맥을 통해 약 10 mL의 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 EDTA 튜브 (BD Vacutainer®, K2EDTA tube, BD, USA)에 담아 실험실로 운반하였으며, 원심분리기에서 3000 rpm으로 20분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻어진 혈장은 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

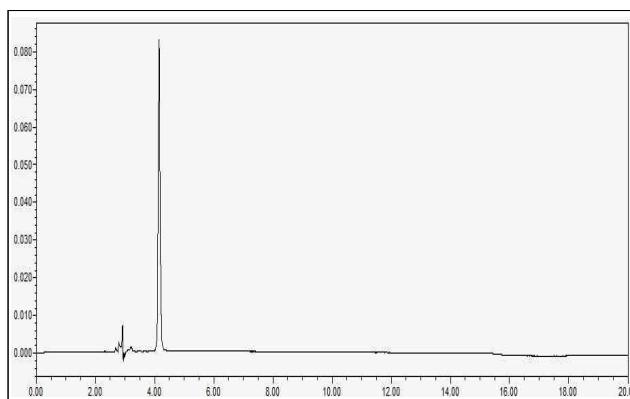
2.2 레티놀 분석법 확립

혈장 시료 및 표준 용액은 동일한 방법으로 전처리하였다. 모든 과정은 광산화를 최소화하기 위하여 어두운 방에서 적색광 조건 하에 차광 튜브를 사용하여 수행되었다. 시료(200 μL)에 0.04% butylated hydroxytoluene (BHT)-에탄올 용액(200 μL)과 0.2 N NaOH(100 μL)를 첨가한 후 볼테징하여 혼합하였다. 이어서

50 °C에서 30분간 교반한 뒤 얼음물에서 5분간 방치하였다. 반응 혼합물에 아세트산 10 μL를 첨가하여 pH를 중성으로 조정하고, 아세토니트릴(800 μL)을 첨가하여 30초간 볼텍싱하였다. 이후 4 °C에서 10,000 × g로 5분간 원심분리하였으며, 원심분리 후 얻어진 상층액 800 μL를 회수하여 메탄올:물 (70:30, v/v) 용액 400 μL와 혼합하여 분석에 사용하였다. 분석은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 수행하였다. 이동상은 메탄올을 사용하였으며, 칼럼은 Kromasil® C18 HPLC column (25 cm × 4.6 mm I.D., 5 μm particle size; Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. 칼럼 오븐 온도는 40 °C로 유지하였다. 주입 시료량은 20 μL였으며, 분석 시간은 20분으로 설정하였다. 검출은 자외선(UV) 검출기를 이용하여 파장 320–330 nm에서 수행하였다. 표준품으로는 Retinyl palmitate (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다.

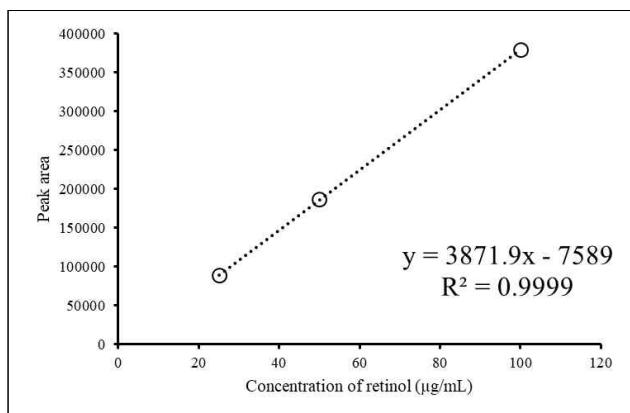
3. 결과

표준품 분석에서 레티놀 피크가 명확하게 확인되었으며, 리텐션 타임은 4.150 min으로 나타났다.

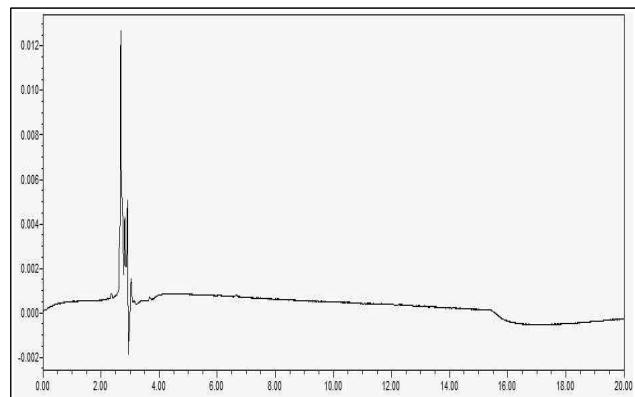


[그림 1] 표준액의 피크

표준용액에서 얻어진 피크는 날카롭고 균일한 형태를 보였으며, 검량선의 결정계수(R^2)는 0.9999로 매우 높은 직선성을 확인할 수 있었다.



[그림 2] 레티놀 검량선



[그림 3] 혈장의 피크

그러나 혈장 시료 분석에서는 레티놀 피크의 리텐션 타임이 2.674 min으로 표준용액과 차이를 보였으며, 피크 형태 또한 균일하지 않고 변동성이 관찰되었다. 이러한 결과는 혈장 시료에서 검출된 신호가 실제 레티놀 피크가 아니라 노이즈 또는 다른 공존 물질의 간섭에 기인한 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구에서 표준품 분석에서는 명확한 레티놀 피크를 확인할 수 있었으며, 검량선의 직선성($R^2 = 0.9999$)은 매우 높게 나타났다. 그러나 혈장 시료에서는 레티놀의 특이적인 피크를 확인하지 못하였다. 이는 혈장 내 레티놀 농도가 미량이어서 검출 한계 이하였거나, 매트릭스 내 다른 성분에 의한 간섭으로 인해 분석이 어려웠을 가능성이 있다. 향후 연구에서는 전처리 과정을 보완하여 질소 농축 단계를 포함시키고, 일내 변동(intra-day variation), 일간 변동(inter-day variation), 및 첨가 회수율(recovery test)을 검증함으로써 분석의 신뢰성과 재현성을 높이고자 한다.

참고문헌

- [1] Torii, S., T. Matsui, and H. Yano. "Development of intramuscular fat in Wagyu beef cattle depends on adipogenic or antiadipogenic substances present in serum." Animal Science 63.(1), 73–78, 1996.
- [2] Berry, D. C., DeSantis, D., Soltanian, H., Croniger, C. M., & Noy, N. "Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity". Diabetes, 61(5), 1112–1121, 2012.
- [3] Bonet, M. L., Ribot, J., Felipe, F., & Palou, A. "Vitamin A and the regulation of fat reserves". Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 60(7), 1311–1321, 2003.
- [4] Kawada, T., Kamei, Y., Fujita, A., Hida, Y.,

- Takahashi, N., Sugimoto, E., & Fushiki, T. "Carotenoids and retinoids as suppressors on adipocyte differentiation via nuclear receptors". *Biofactors*, 13(1-4), 103–109, 2000.
- [5] Ohyama, M., Matsuda, K., Torii, S., Matsui, T., Yano, H., Kawada, T., & Ishihara, T. "The interaction between vitamin A and thiazolidinedione on bovine adipocyte differentiation in primary culture". *Journal of Animal Science*, 76(1), 61–65, 1998.
- [6] Wang, B., Yang, Q., Harris, C. L., Nelson, M. L., Busboom, J. R., Zhu, M. J., & Du, M. "Nutrigenomic regulation of adipose tissue development—role of retinoic acid: a review". *Meat science*, 120, 100–106, 2016.
- [7] Xue, J. C., Schwarz, E. J., Chawla, A., & Lazar, M. A. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPAR γ . *Molecular and cellular biology*, 16(4), 1567–1575, 1996.
- [8] S.H. Lee, Y.R. Yang, H.Y. Cheon, N.H. Shin, J.W. Lee, S.H. Bong, S. Hwangbo, I.K. Kong, M.K. Shin. "Effects of hydrogenated fat—spray—coated β -carotene supplement on plasma β -carotene concentration and conception rate after embryo transfer in Hanwoo beef cows". *Animal* 15.12 : 100407, 2021.