

α -, γ -Tocopherol과 γ -tocotrienol의 산화 생성물

이 형 옥

한국인삼연초연구소

초록 : 유지의 자동산화과정중의 α -, γ -tocopherol과 γ -tocotrienol에 대한 주요 산화생성물로 quinone이 확인되었으며, 미량의 dimer 혹은 trimer로 추정되는 성분이 검출되었다. 생성된 quinone은 micro column을 사용하여 분취한 후 np-와 rp-HPLC로 분석하였고 MS로 동정하였다(1992년 11월 2일 접수, 1993년 1월 15일 수리).

토코페롤류의 식품영양학적 의의로는 체내에서의 vitamin E로서의 작용과 유지식품에서의 항산화 작용으로 크게 구별된다.¹⁾ 이들 토코페롤류는 천연에 주로 유지종자 및 견과류에 많이 함유되어 있으며, 유지산패에 대한 항산화 작용을 갖는 것으로 알려져 있다.²⁾ 유지산패에 있어서 주요한 원인의 하나인 자동산화시에 토코페롤류는 free-radical inhibitor로서의 특성을 나타내며, 이는 그 분자구조상 aromatic ring의 페놀성 OH-group에 의하는 것으로 설명될 수 있다.³⁾ 유지내 함유되어 있는 토코페롤류는 유지의 산화가 진행됨에 따라 스스로 산화된다. 이들 토코페롤류의 산화물에 대하여는 현재까지 주로 α -tocopherol에 관한 연구가 이루어졌으며, 이는 식품유지 중에서 뿐 아니라 cell membrane의 친유성 부분에서도 고찰되고 있어서 그 분석상의 의의가 있는 것으로 보고되고 있다.^{4,5)} 최근 여러 연구자들에 의해서 주로 α -tocopherol에 대한 여러 친유성 reaction media에서의 산화가 연구되었으며, 생성된 산화생성물로는 quinone,⁶⁻¹³⁾ dimer,^{8,14)} trimer^{6,8,15,16)} 또는 radical¹⁷⁾로 추측되거나 확인 보고된 바 있다. 친수성 reaction media에서의 산화에 대한 최근의 연구로는 α -tocopherol의 산화물로 quinone,¹⁷⁾ dimer,¹⁸⁾ tocopheron¹⁹⁾이 보고되었다. 본 연구에서는 식용유지의 신선도에 대한 한가지 indicator로서의 활용성을 그 목적으로 제시할 수 있으며, 천연 유지에 함유되어 있는 토코페롤류의 식품영양상, 분포상²⁰⁾의 비중이 큰 α -, γ -tocopherol과 γ -tocotrienol (이하 α -T, γ -T, γ -T₃로 표기)의 주요 산화물에 대한 분리 및 동정을 실시하였다.

재료 및 방법

재료

α -, γ -Tocopherol은 Merck社의 tocopherol-isomer 표준품, γ -tocotrienol은 latex로부터 분리²¹⁾하여 사용하였다. Linoleic acid methyl ester(95%)는 Sigma社의 제품을 사용하였고, solvent로 methanol, n-hexane, chloroform, 2-propanol, dichloromethane은 Merck社의 HPLC용 용매를 사용하였다.

산화반응

토코페롤류의 산화안정성과 그 항산화적 특성에 대하여는 보고한 바 있으며,^{22,23)} 본 시험에서는 linoleic acid methyl ester 500 mg에 α -T(α -tocopherol), γ -T(γ -tocopherol)과 γ -T₃(γ -tocotrienol)을 500 ppm 수준으로 첨가시킨 후 유지의 자동산화 범위에 속하는 80°C, 60°C 온도에서 10%, 20% O₂/N₂의 가스를 0.5 ml/sec의 유속으로 공급하면서 6시간 동안 산화반응시킨 후 토코페롤 산화물에 대한 분리용 시료로 사용하였다.

Micro column을 사용한 분획

종래에서는 주로 column chromatography를 분취용으로 이용하여 왔으나,^{7,16,18,19,24,25)} 이는 장시간에 걸친 분리를 요하게 되며, 따라서 요구되는 용매의 소비량도 컸다. 본 실험에서는 np-silicagel(Si)과 rp-C₁₈-material로 충전된 1회용 micro column을 사용하였으며, 이동상(mobile phase)의 극성(polarity)를 단계별로 달리하여 Fig. 1과 같이 분획하였다.

HPLC 및 MS

np-HPLC 분석용으로 Hypersil column, 5 μ m, 500×4

Key words : α -Tocotrienol, γ -tocopherol, γ -tocotrienol, oxidation products, autoxidation, linoleic acid methyl ester

mm i.d.과 n-hexane + chloroform + 2-propanol(95 : 4.5 : 0.5, v/v/v)을 mobile phase로 사용하였고, rp-HPLC 분석용으로는 Hypersil C₁₈ column, 5 µm, 250×4 mm i.d. 과 methanol + H₂O(98 : 2, v/v)을 mobile phase로 사용하였다. MS는 Finnigan MAT 8230과 SS 300 Data system을 이용 electron impact method, 70 eV, direct inlet로 분석하였다.

결과 및 고찰

α-Tocopherol의 산화물

80°C/10% O₂ 조건에서의 F₄(fraction 4, Fig. 1)를 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 그림에서 나타난 바와 같이 A로 표시한 성분은 np-HPLC로 완전히 분리되지 않았으므로, A 분석을 rp-HPLC로 분석하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 2종의 α-T의 반응생성물이 그 주요 생성물로 분리되었으며(A₁, A₂), A₂는 MS로 분석한 결과 α-tocopherylquinone으로 확인되었다(Fig. 3). 또한

A₁는 그 peak의 chromatogram에 나타난 retention time으로 보아 α-tocopherylhydroquinone으로 추정된다.²⁶⁾ 또한 80°C/10% O₂에서의 경우 A₂-피크면적은 80°C/20% O₂에 비하여 3배 크게 나타났으며, 이 두 조건에서 산화되지 않고 남아있는 순수한 α-T는 검출되지 않았다. 60°C/20% O₂에서의 산화시료에서는 F₂(fraction 2, Fig. 1)에서 rp-HPLC 분석결과 295 nm에서 dimer 또는 trimer로 추정되는 peak를 확인할 수 있었으나, 그 양이 극미량이었으므로 동정은 불가능하였다.

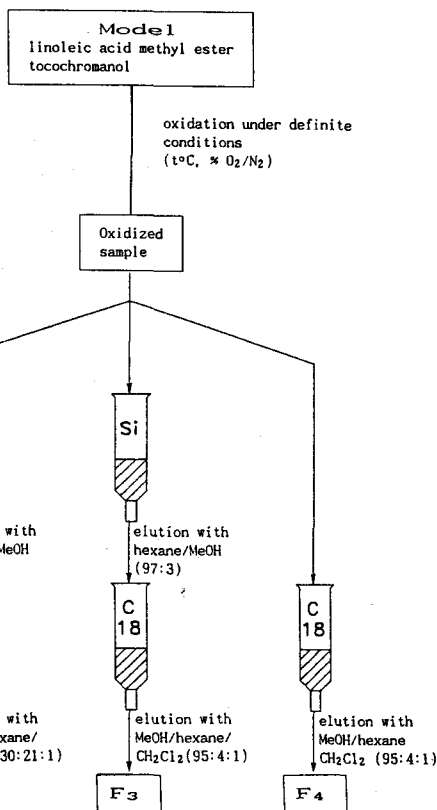


Fig. 1. Schematic process for fractions preparation of oxidations product of α-tocopherol, γ-tocopherol and γ-tocotrienol using micro column.

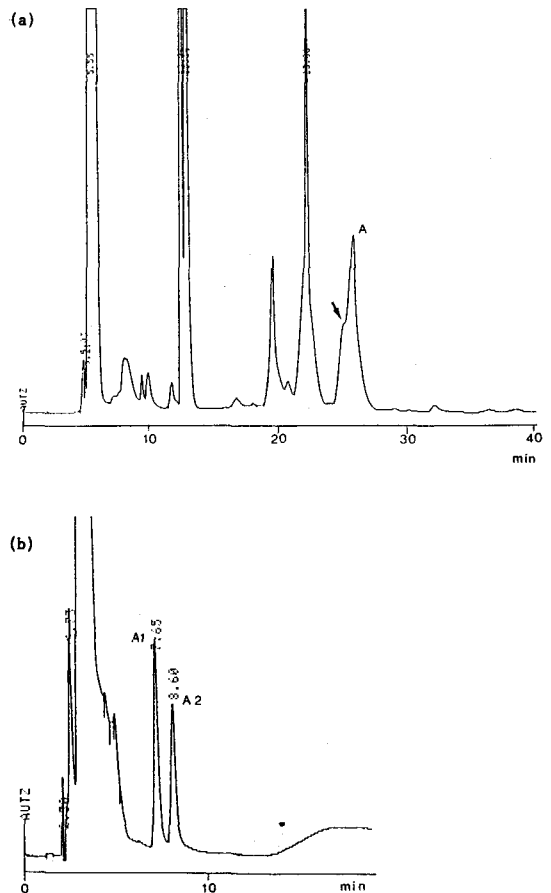


Fig. 2. HPLC chromatogram of reaction product for α-T: α-T(250 µg) with linoleic acid methyl ester (500 mg) at 80°C/10% O₂, 6 hr oxidized. (a) np-HPLC, conditions: column, Hypersil, 5 µm, 500×4 mm i.d.; mobile phase, n-hexane + chloroform + 2-propanol(95 : 4.5 : 0.5, v/v/v); flow rate, 1.0 ml/min; detection, UV 268 nm, 0.05 AUFS; (b) rp-HPLC, conditions: column, Hypersil C₁₈, 15 µm, 250×4 mm i.d.; mobile phase, methanol + H₂O(98 : 2, v/v); flow rate, 1.0 ml/min; detection, UV 265 nm, 0.0001 AUFS.

γ-Tocopherol의 산화물

80°C/20% O₂ 조건에서의 F₄(fraction 4, Fig. 1)에서 α-T의 경우와 동일한 분석조건으로 np-HPLC로 분석하였으며 B 분획을 rp-HPLC로 분석하였다(Fig. 4). B는 MS 분석결과 γ-tocopherylquinone으로 확인되었다(Fig. 5). HPLC peak 면적을 비교하여 볼 때 동일 산화조건에서 (80°C/10% O₂), γ-tocopherylquinone은 α-tocopherylquinone에 비하여 15배 큰 것으로 나타나서 그 생성량이 월등히 높은 것으로 나타났다. 또한 rp-HPLC 295 nm에서 γ-tocopherol의 dimer로 추정되는 성분을 미량 검출하였다.

γ-Tocotrienol의 산화물

80°C/20% O₂ 조건에서의 F₄(fraction 4, Fig. 1)에서 α-T와 동일한 분석조건으로 np-HPLC로 분석하였으며, C 분획을 rp-HPLC로 분석하였다(Fig. 6). C는 MS 분석결과 γ-tocotrienylquinone으로 확인되었다(Fig. 7). 동일 산화 조건에서(80°C/20% O₂), rp-HPLC chromatogram 상에 나타난 peak 면적비를 비교하여 볼 때 γ-tocopherylquinone에 비하여 약 1/2의 적은 양을 나타내어, quinone으로의 산화정도가 약 1/2인 것으로 고찰되었다. 60°C/20% O₂ 조건에서의 F₂(fraction 2, Fig. 1)에서 rp-HPLC 295 nm에서 γ-tocotrienol의 dimer and/or trimer로 추정되는 2개의 성분이 검출되었다.

고찰

본 실험에서 사용한 자동산화과정중의 토코페롤류의

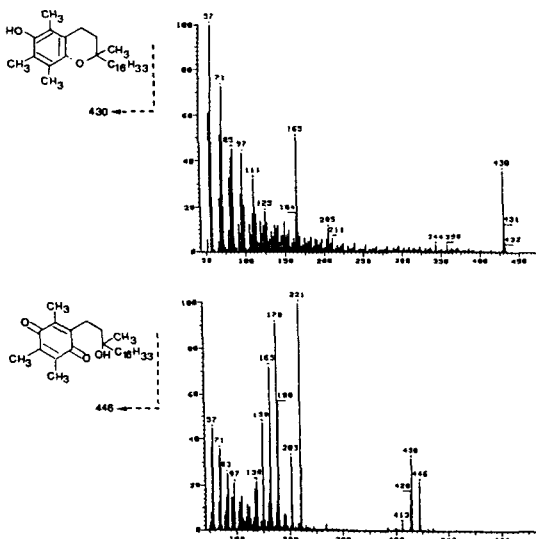


Fig. 3. Mass spectrum of α-T and α-tocopherylquinone (peak A₂) MS-conditions: refer to the text.

농도는 500 ppm으로써 이는 식용유지에 자연상태로 함유되어 있는 토코페롤의 농도에 근사한 값이다.²⁰⁾ MS로

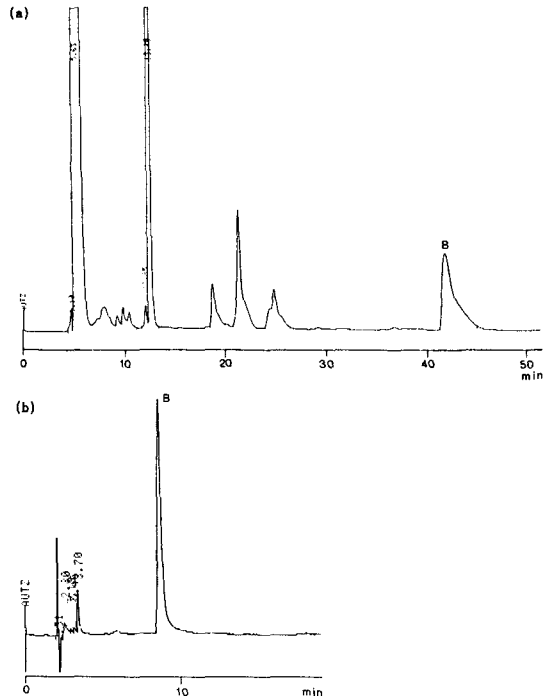


Fig. 4. HPLC chromatogram of reaction product for γ-T: γ-T(250 μg) with linoleic acid methyl ester (500 mg) at 80°C/20% O₂, 6 hr oxidized. (a) np-HPLC, conditions: same as in Fig. 2; (b) rp-HPLC, conditions: same as in Fig. 2.

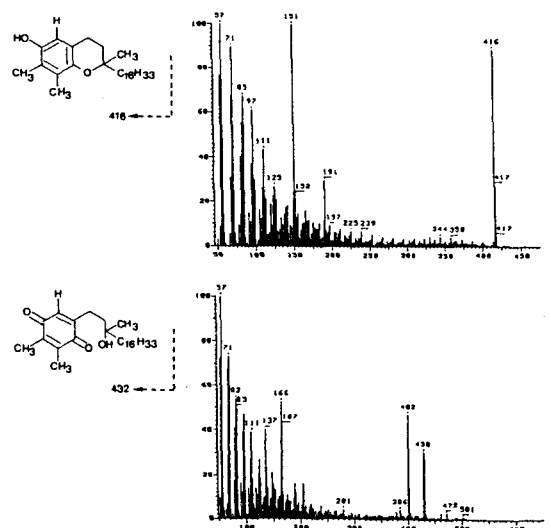


Fig. 5. Mass spectrum of γ-T and γ-tocopherylquinone (peak B) MS-conditions: refer to the text.

미확인된 dimer and/or trimer로 추정되는 성분은 Csallany 등²⁴⁾에 의해서 확인된 바 있는 50%(w-%)의 고농도 α -tocopherol을 유지내에서 산화시켰을 때 검출된 성분과 일치할 것으로 판단된다. 주요 산화생성물로 확인된 qui-

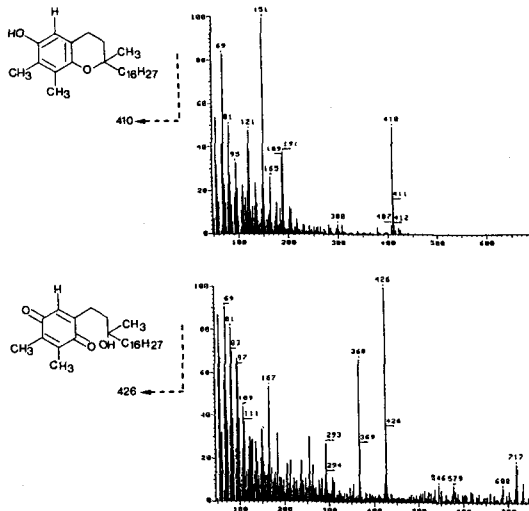


Fig. 6. HPLC chromatogram of reaction product for γ -T: γ -T(250 μ g) with linoleic acid methyl ester (500 mg) at 80°C/20% O₂, 6 hr oxidized. (a) np-HPLC, conditions: same as in Fig. 2; (b) rp-HPLC, conditions: same as in Fig. 2.

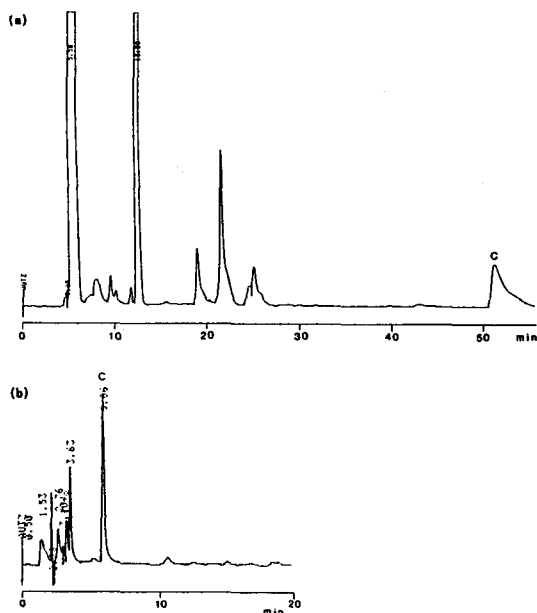


Fig. 7. Mass spectrum of γ -T₃ and γ -tocotrienylquinone (Peak C) MS-conditions: refer to the text.

none은 α -tocopherol을 모델로 하여 Gottstein 등⁶⁾에 의하여 제시된 가설에 따라 Fig. 8과 같은 경로를 거쳐 다음과 같이 생성될 것으로 설명할 수 있을 것이다.

즉 α -T의 OH-group으로부터 1개의 수소원자를 지방산의 peroxy radical에 주고, 생성된 chromanoxyl radical (a)는 개환되어 p-quinone alkyl radical(b)이 되고, 이어 peroxy radical(c)을 거쳐서 hydroperoxide(d)로 산화된다. 이 hydroperoxide의 fragmentation과 H-abstraction으로 α -tocopherylquinone이 형성된다. 이러한 α -tocopherylquinone은 Cillard 등²⁷⁾에 의해서도 α -T의 주요 산화생성물임이 보고된 바 있다. 80°C/20% O₂와 80°C/10% O₂ 조건에서의 peak 면적을 비교해 볼 때, 생성된 α -tocopherylquinone이 계속 산화된 것으로 추정할 수 있다. 80°C/20% O₂ 조건에서의 γ -T와 γ -T₃는 α -T에 비하여 많은 양의 quinone을 생성하였다(peak 면적비 15배). 또한 이 γ -T와 γ -T₃의 경우에 있어서는 상기의 같은 조건에서 생성된 산화물중 산화되지 않고 남아있는 순수한 γ -T와 γ -T₃이 검출되지 않았으나, 이 조건에서도 항산화성이 있음이 확인되었다.²²⁾ 이는 γ -T와 γ -T₃에서 생성된 산화물인 quinone도 항산화성이 있음을 의미한다. Quinone의 OH-group이 갖는 H-donor-activity가 미약함을 비추어 볼 때 이를 쉽게 해석하기는 어려우나, semi quinone radical의 생성을 고려한다면 이 radical을 통해서 자동산화의 연쇄반응이 억제될 수 있는 것으로 설명된다.²⁸⁾ 결론적으로 특히 γ -T의 경우에는 생성된

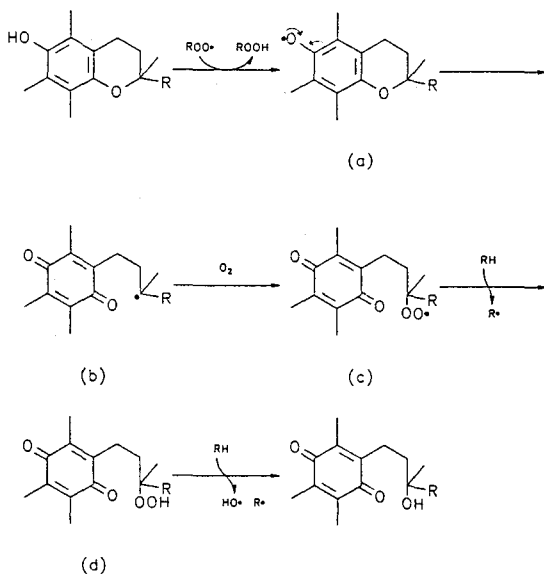


Fig. 8. Hypothesis pathway for production of α -tocopherylquinone at antioxidative reaction of α -tocopherol.⁶⁾

산화물도 항산화성이 있는 것으로 확인되었으므로, 자동산화과정중의 항산화제로써 고려할 가치가 있는 것으로 고찰된다.

참 고 문 헌

1. 김동훈: 식품화학, 495, 탐구당(1990)
2. Belitz, H.-D. and Grosch, W.: In "Lehrbuch der Lebensmittelchemie", p.193, Springer-Verlag, Berlin, 1985
3. Mahoney, L. R.: Ang. Chem., 81 : 555(1969)
4. Urano, S., Yamanoi, S., Hattori, Y., Matsuo, M.: Lipids, 12 : 105(1977)
5. Niki, E., Takahashi, M. and Komuro, E.: Chem. Letters, 1573(1986)
6. Gottstein, T. and Grosch, W.: Fat Sci. Technol., 92 : 139(1990)
7. Csallany, A. S., Draper, H. H. and Shah, S. N.: Arch. Biochem. Biophys., 98 : 142(1962)
8. Suarna, C., Nelson, D. and Southwell-Keely, P.T.: Lipids, 23 : 1129(1988)
9. Bieri, J. G. and Farrel, P. M.: Vitamins and Hormons, 34 : 31(1976)
10. Bieri, J. G. and Tolliver, T. J.: Lipids, 16 : 777(1981)
11. Vatassery, G. T. and Smith, W. E.: Anal. Biochem., 167 : 411(1987)
12. Vatassery, G. T.: Lipids, 24 : 299(1989)
13. Vatassery, G. T., Smith, W. E. and Quach, H. T.: Lipid, 24 : 1043(1989)
14. Csallany, A. S. and Draper, H. H.: Arch. Biochem. Biophys., 100 : 335(1963)
15. Yamauchi, R., Kato, K. and Ueno, Y.: Lipids, 23 : 779(1988)
16. Draper, H. H., Csallany, A. S. and Chiu, M.: Lipids, 2 : 47(1967)
17. Widicus, W. A. and Kirk, J. R.: J. Food Sci., 46 : 818 (1981)
18. Cillard, J., Gobaille, J. and Cillard, P.: J. Chromatogr., 347 : 434(1985)
19. Yamauchi, R., Matsui, T., Satake, Y., Kato, K. and Ueno, Y.: Lipids, 24 : 204(1989)
20. Coors, U.: Fat Sci. Technol., 93 : 519(1991)
21. Lee, H.-O: 미발표
22. Lee, H.-O. and Montag, A.: Fat Sci. Technol., 94 : 213(1992)
23. Lee, H.-O. and Montag, A.: Fat Sci. Technol., 95, in Press
24. Csallany, A. S., Chiu, M. and Draper, H. H.: Lipids, 5 : 63(1970)
25. Ha, Y. L. and Csallany, A. S.: Lipids, 23 : 359(1988)
26. Boyer, P.: J. Amer. Chem. Soc., 73 : 733(1951)
27. Cillard, J., Cillard, P., Cormier, M. and Girre, L.: JAOCS, 57 : 252(1980)
28. Täufel, K., Kretzschmann, F. and Franzke, C.: Fette Seifen Anstrichmittel, 62 : 1061(1960)

Oxidations product of α -, γ -tocopherol and γ -tocotrienol

Hyung-Ok Lee (Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Taejeon 305-345, Korea)

Abstract : Oxidations products of α -tocopherol, γ -tocopherol and γ -tocotrienol in lipophilic reaction media were studied. α -Tocopherylquinone, γ -tocopherylquinone and γ -tocotrienylquinone were fractionated using micro column, isolated and identified by HPLC and MS.