

銀Ion 및 逆相 HPLC를 利用한 立體異性體的 分析에 의한 銀杏種實油의 트리글리세리드의 分子種에 관한 研究

趙鏞桂 · 禹孝經 · 金訓淑

東亞大學校 食品營養學科

The Stereospecific Analysis of the Triacylglycerols of Ginkgo Nut Oils by High-Performace Liquid Chromatography(HPLC) in the Silver Ion and Reversed Phase Modes

Yong-Goe Joh, Hyo-Kyeng Woo and Hoon-Sook Kim

Dept. of Food Science ad Nutrition, Dong-A University

(Received Jan., 10, 1997)

ABSTRACT

Triacylglycerols of the seeds of *Ginkgo biloba* have been resolved by high-performace liquid chromatography(HPLC) in the silver-ion and reverse-phase modes. The fatty acids were identified by a combination of capillary gas chromatography and gas-chromatography/mass spectrometry as the methyl and/or picolinyl ester. The main components are $C_{18:2\omega6}$ (39.0mol%), $C_{18:1\omega7}$ (asclepic acid 21.5mol%), and $C_{18:1\omega9}$ (oleic acid, 13.8mol%). Considerable amounts of unusual acid such as $C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$ (5.7mol%), $C_{18:2\Delta^{5,9}}$ (2.8mol%), and $C_{18:3\Delta^{5,9,12}}$ (1.6mol%), were checked. In addition, an *ant-iso*-branched fatty acid, 14-methylhexadecanoic acid, was also present as a minor component (0.9 mol%). The triacylglycerols were separated into 17 fractions by reverse-phase HPLC, and the fractionation was achieved according to the partition numnber(PN) in which a Δ^5 -non methylene interrupted double bond(Δ^5 -NMDB) showed different behaviour from a methylene interrupted double bond in a molecule with a given cahinlength. Silver-ion HPLC exhibited excellent resolution in which fractions(23 fractions) were resolved on the basis of the number and configuration of double bonds. In this instance, the strength of interaction of a Δ^5 -NMDB system with silver ions seemed to be weaker than a methylene interrupted double bond system. The principal triacylglycerol species are as follows ; $(C_{18:2\omega6})_2/C_{18:1\omega7}$, $C_{18:1\omega9}/C_{18:1\omega7}/C_{18:2\omega6}$, $(C_{18:1\omega7})_2/C_{18:2\omega6}$, $C_{16:1\omega7}/C_{18:1\omega9}/C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$, $C_{16:1\omega7}/C_{18:1\omega7}/C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$, $C_{18:1\omega9}/C_{18:1\omega7}/C_{18:2\omega6}$, $C_{18:1\omega9}/C_{18:2\Delta^{5,9}}/C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$, $(C_{18:1\omega7})_2/C_{18:2\omega6}$ and $(C_{18:1\omega9})_2/C_{18:2\omega6}$, while simple triacylglycerols without $C_{18:2\omega6}$ were not present. Stereospecific analysis showed that fatty acids with Δ^5 -NMDB system and saturated chains were predominantly located at the site of *sn*-3 carbon of glycerol backbones. It is evident that there is asymmetry in the distribution of fatty acids in the TG molecules of Ginkgo nut oils.

I. 序 論

産業적으로 主要한 油脂는 大部分 트리글리세리드 (triacylglycerol, TG)로 構成되어 있으며, TG는 一分子에 三個의 脂肪酸 殘基를 가지고 있고, 그 構成脂肪酸의 數가 增加하면 主體異性體數도 幾何級數적으로 增加한다. 例를 들면 어떤 植物種實油脂의 TG가 五種의 脂肪酸으로 構成되어 있다면, 이 TG는 理論적으로 125개의 分子種을 가질 수 있다. 實際로 相當數의 植物 種實油의 TG는 branched, cyclic chain 또는 non-methylene interrupted conjugate double bond(NMDB)와 같은 特殊한 構造를 가진 脂肪酸을 含有하는 等 보다 多樣한 脂肪酸으로 構成되어 있으므로 그 分子種은 대단히 複雜하여, 따라서 TG를 分子種別로 分離하는 것은 거의 不可能하였으므로, TG分子內에 脂肪酸分布는 어떤 假說(均等分布說, 無作爲分布說, 1,3-無作爲-2-無作爲分布說 等)下에 統計的方法에 따라 計算되어져 왔다¹⁻²⁾.

Gas-liquid chromatography(GC)의 發達로 TG의 定量的인 研究가 始作되어, 非極性 液相컬럼상에서 acyl基의 總炭素數(total carbon number, TC)에 따라 TG를 分離하고자 하는 研究가 많이 이루어져 왔다³⁾. 그러나 이 方法으로는 分子種 level에서 TG를 분획하는 것은 不可能하고 또 高溫이 要求되므로 試料의 異性化 내지는 分解의 可能性이 크다. 最近들어 Plattner⁴⁾에 의하여 octadecylsilane(ODS)를 coating한 컬럼을 裝着한 逆相 HPLC(RP-HPLC)에 의한 TG分子種 分劃法이 報告된 以後, RP-HPLC와 GC를 並行하여 植物油脂, 乳脂 그리고 動物性 油脂의 構成 TG의 分子種 分離에 관한 研究가 活潑히 進行되고 있다.

RP-HPLC에서 分子種의 溶出되는 順序는 partition number(PN, $PN=TC-2 \times DB$, TC: acyl基의 總炭素數, DB: acyl基의 總二重綜合數)로 定義되는 parameter에 따라 決定되므로 構成 脂肪酸 組成이 單純한 植物油 TG는 PN別로 鮮明히 resolution 되나⁴⁾, 脂肪酸 組成이 複雜한 TG의 경우는 溶出되는 分子種의 PN이 重疊되는 境遇가 많으므로 各各의 分子種을 分劃·同定하기가 어렵고, 特히 漁油나 牛乳脂肪의 경우에는 더욱 그러하다.

銀ion chromatography는 固定相에 imbeding되어 있는 銀이온과 試料의 炭素사슬의 二重結合과는 綜合力의 差異에 따라 試料分子를 分劃하는 것이다⁵⁻⁹⁾. 例로서 TG의 相互分離를 보면 脂肪酸 殘基에 存在하는 二重結合의 pi-電子가 銀ion과 可逆的인 complex을 이루어, 二重綜合數가 增加할수록 銀ion과의 綜合力은 더욱 커지므로, retention time이 그만큼 길어진다. 銀ion을 利用한 여러 形態의 chromatography가 있으나, 그 중 TLC가 가장 普遍的으로 使用되고 있다. 이 銀ion-TLC는 適當量의 窒酸銀을 녹인 물 또는 acetonitrile 溶液에 吸着劑를 가하여 slurry를 만들고 이것을 유리板이나 alumina板과 같은 딱딱한 supporter에 塗抹하여 乾燥한 것으로 化合物의 分離·分劃에 一次的인 道具로 利用되고 있다. 그러나 TLC板 製造時 窒酸銀이 손이나 衣服에 묻으면 잘 씻겨지지 않고, 또 金屬製 spreader 表面을 酸化 變色시키므로 製造操作에 細心한 注意가 要求된다. 乾燥 過程중 銀ion이 黑變하거나 하면 TLC板의 分離能이 低下되고, 더욱 바람직하지 못한 것은 TLC板에서 긁어낸 固定相에 吸着되어 있던 化合物을 抽出할때 窒酸銀이 TLC吸着劑에 가했던 添加物과 함께 不純物로 溶出된다는 것이다¹⁰⁾.

Christie는 HPLC의 陽ion 交換樹脂인 NucleosilTM 5SA의 column에 窒酸銀 水溶液을 Rheodyne type의 injector로 loading하여 이 樹脂 column의 sulphone基에 銀ion을 結合시켜, 所謂 銀ion HPLC column을 製作하였다. 그는 이 column을 使用하여, 脂肪酸 methyl ester¹⁴⁻¹⁸⁾, 植物種子油¹⁶⁻¹⁹⁾와 魚油 TG^{20, 21)}의 分析에 利用하여 二重綜合數에 따라 overlap됨이 없이 각 分子種을 純粹하게 分劃하였다.

TG의 stereospecific한 構造를 알고자 하는 試圖는 오래前부터 始作되었으나, 1950年代에 들어와 비로서 Hilditch(1)와 Brockerhoff²⁾에 의하여 刮目할 만한 發展을 가져왔다. 그들이 使用한 方法을 要約하면 대략 이렇다. 즉, Grignard 試藥이나 또는 lipase를 TG에 作用시켜 TG를 部分加水分解하고 이 때 얻어진 1,2-DG와 2,3-DG를 phosphatidylphenol誘導體로 만든 다음 1,2-diacyl-sn-glycerophosphatides에 特異적으로 作用하는 蠍毒(蛇毒)에서 精製한 phospholipase A₂로 1,2-DG의 2-位置의 脂肪酸을 遊離시켜 그 組成을 求한다. 이 때 生成된 1-acyl-lysophosphatides

와 未反應의 2,3-glycerophosphatides를 TLC나 column chromatography로 相互分離하여, 1-acyl-lysophosphatides의 脂肪酸을 알칼리 加水分解하여 그 組成을 求한다. 이렇게 얻어진 data와 總脂肪酸組成을 基礎로 하여 주어진 分式²²⁾에 依據하여 1,2,3-位置에 綜合한 脂肪酸 分子를 計算하여 試料 TG의 分子種을 計算하였다.

極히 最近에 (S, 또는 R)-(+) -1-(1-naphthyl) ethyl isocyanates와 같이 高純度 amine의 enantiomer가 diglyceride 混合物에 作用하여, 1,2-와 2,3-diastereomer를 만들어 adsorption mode의 HPLC column으로 1,2-와 2,3-DG를 相互分離하는 研究가 많이 行하여지고 있다²³⁾.

Christie²⁴⁾는 數種의 油脂에서 얻은 TG를 silver ion-HPLC와 RP-HPLC로 分子種으로 分割하고, 이들의 部分加水分解로 生成된 DG를 (S)-(+) -1-(1-naphthyl)ethyl urethane誘導體로 만들어 1,3-DG, 1,2-DG 및 2,3-DG를 silica gel 컬럼을 裝着한 HPLC로 서로 重疊됨이 없이 分離하여, 이들 TG의 각 分子種들의 立體構造를 明白히 한 바 있다.

銀杏은 銀杏나무科에 屬하는 銀杏나무(*Ginkgo biloba* L.)의 열매에 박혀있는 種子를 指稱하는 것으로 우리나라, 日本과 滿洲를 爲始한 極東地方에서 生産되며, 우리나라에서는 食用과 藥用의 材料로서 널리 利用되고 있다^{25, 26)}. 銀杏의 脂質含量은 높지 않으나 그 構成脂肪酸 組成은 特異하다고 한다²⁷⁾. 즉, 不飽和酸으로 C_{18:206}와 C_{18:109}外에 植物油에 混하지 않은 asclepic acid(C_{18:107})가 많은 量 含有되어 있었다고 하였고, $\Delta^{5,9}-C^{18:2}$, $\Delta^{5,9}-C^{18:3}$ 및 $\Delta^{5,11,14}-C^{20:3}$ 와 같은 Δ^5 -non-methylene interrupted conjugate double bond(NMDB)의 特異한 構造를 한 高度不飽和 脂肪酸을 含有하고 있다.

銀杏 種子油의 多樣한 脂肪酸 組成으로 보아 이로 構成된 TG의 分子種은 매우 複雜할 것으로 생각되어, 本研究에서는 銀ion-및 逆相-HPLC로 銀杏脂質의 TG를 構成하는 分子種을 分割하여 그 構成 脂肪酸을 調査하였다. 또 Grignard試藥으로 總TG를 部分加水分解하여 얻은 DG를 urethane 誘導體로 만들어서 silica column으로 1,3-, 1,2- 및 2,3-DG를 單離하여, 각 DG 分割의 脂肪酸 組成을 調査하여, 여기서 얻어진 材料를 根據로 하여 銀杏 TG의 分子種을 調査하

였다.

II. 材料 및 方法

1. 試料, 試藥 및 reverse-phase HPLC column

試料로 使用하는 銀杏은 1994年 11월에 慶南 咸安 地方에서 收穫한 것을 購入하였고, palm油는 Scotland의 Dundee市에 所在하는 Scottish Crop Research Institute의 Christie 博士로부터 寄贈받아 使用하였다. Diacylglycerol 標準品으로 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol, 1,2-dioleoyl-3-palmitoylglycerol, 1,3-dipalmitoleoyl-2-oleoylglycerol은 Sigma Chemical社(St. Louis, MO, USA)로부터, (S)-(+) -1-(1-naphthyl)ethyl isocyanate는 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI, USA)로부터 購入하였다. 實驗에 使用한 溶媒는 Merck社(Darmstadt, Germany)의 HPLC級이었다. TG의 分離에 使用한 solid-phase extraction column은 IsoluteTM silica column으로 International Sorbent Technology Ltd(Mid Glamorgan, U.K.)에서 購入하였다.

HiChrom社(Theale, Reading, U.K)에서 購入한 Nucleosil 5SA컬럼(3 μ m particles, 25cm \times 4.6mm)에 窒酸銀을 Christie의 方法^{11, 24)}에 따라 注入하여 column bed에 銀이온을 吸着시킨 銀이온 HPLC 컬럼을 自作하였다. 逆相 컬럼은 ChromPack社의 ChromSpherTM C₁₈(4330EA, Middelburg, the Netherlands, 3 μ m particles, 100 \times 4.7mm, i. d.)를 二個 連結하여 使用하였다. 또 DG-誘導體 分離時에 HypersilTM(HiChrom社, Theale, Reading U.K., 3 μ m particles, 25cm \times 4.6mm)를 二個 連結하여 使用하였다¹⁹⁾.

2. 總脂質 抽出 및 TG 精製

試料를 脫殼한 다음 磨碎하여 Bligh & Dyer 方法²⁸⁾으로 總脂質을 抽出하고, 窒素氣流下에서 殘留溶媒를 除去하여 總脂質의 含量을 求하였다. 總脂質을 hexane에 10mg/mL되게 녹여, 試料 1mL를 hexane-acetone(99:1, v/v) 溶媒로 이미 平衡化시킨 IsoluteTM silica column에 吸着시킨 後, hexane 20mL를 흘려 不純物을 除去하고, hexane-acetone

(99:1, v/v, 30mL)로 TG를純粹分離하였다.

3. 銀이온과 HPLC를 이용한 TG의 分割

HPLC는 Hewlett-Packard社(Hewlett-Packard GmbH, Hewlett-Packard-Strasse 8, W-7577 Waldbronn 2, Federal Republic of Germany)의 quaternary solvent delivery system을 裝着한 Model 1050를 使用하였고, detector는 Sedere社(Alfortville, Cedex, France의 Sedex 55의 evaporative light-scattering detector를 使用하였다. Stream-splitter를 컬럼과 detector 사이에 設置하여, 各 分割을 分取하였으며, 이 때 分取比率는 80%로 하였다. TG의 分割은 1,2-dichloroethane-dichloromethane-aceton(50:50:10, by vol.) (A), 100% acetone(B)와 acetone-acetonitrile(9:1, by vol.) (C) 溶媒의 gradient system을 利用하여 行하였다. 즉, 移動相으로 100% 溶媒 A를 5分間 흘린 後, 다시 5分동안 繼續 흘러 溶媒 A와 溶媒 B의 比率이 50:50이 되도록 하였고, 繼續 60分 더 흘러 溶媒 A, B, C의 比率이 50:50이 되도록 하였고, 繼續 60分 더 흘러 溶媒 A, B, C의 比率이 20:50:30(by vol.)되도록 하였다. 그리고 마지막 5分間은 100% 溶媒 C만 으로 展開하였다. 컬럼은 常溫에서 維持시켰고 流速은 1.0mL/min으로 하였다. 試料(1~1.2mg)을 1,2-dichloroethane 1mL에 녹여 그 10 μ L씩을 컬럼에 注入 하였다.

4. 逆相 HPLC를 이용한 TG의 分割

HPLC system과 detector는 前述한 바와 같으며, 溶媒는 dichloromethane/acetonitrile(20:80, by vol.) (A)와 dichloromethane/acetonitrile(30:70, by vol.) (B)의 比率을 linear gradient로 흘리면서 TG를 Chromspher C₁₈컬럼상에서 partition number 別로 分割하였다. 즉, 移動相으로 100% 溶媒 A를 20分 동안 흘린 다음 2 溶媒系의 比率을 變化시켜 60分 後에는 溶媒 B가 100% 되도록 하였고, 繼續하여 溶媒 B만을 20分間 더 흘렸다. 이 때 分取比率는 80%로 하고 column은 20 $^{\circ}$ C로 維持하였다. 流速은 1.0mL/min으로 하고, helium gas로 bubbling시켜 溶媒의 degasing을 行하였다.

5. Grignard試藥에 의한 TG의 部分的 加水分解²²⁾

Diethyl ether(2mL)로 TG를 溶解시킨 後 實驗始作 數時間前에 調劑한 Grignard 試藥인 2M ethyl magnesium bromide 200 μ L를 넣어 1分間 反應시킨 다음, 여기에 氷醋酸 6 μ L를 含有한 pentane 5mL를 가하여 反應을 멈추게 하였다. 이 反應物에 물 2mL를 가하여 溶媒層을 分離回收하였고, 다시 물(2mL)로 두번 씻은 後 Pasteur pipette에 채운 無水芒硝에 通過시켜 乾燥하고, 窒素氣流下에서 溶媒를 除去하여 diacylglycerol을 含有한 加水分解物을 얻었다.

6. Diacylglycerol의 (S)-1-(1-naphthyl)ethyl urethane 誘導體

(DG-NEU) 및 DG-NEU의 回收^{19, 21)}

Diacylglycerol을 含有한 加水分解物(1mg)을 toluene(0.5mL)에 녹이고 여기에 (S)-(+)-1-(1-naphthyl)ethyl isocyanate(12.5 μ L)와 4-pyrrolidino-pyridine(4mg)을 가하여 50 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 反應시킨 後, 殘餘溶媒를 窒素氣流로 除去하고, 여기에 10% taurine 水溶液 100 μ L를 가하여 50 $^{\circ}$ C의 water bath상에서 10分間 加溫하면서 殘留試藥을 中和시켰다. 이 反應生成物에 10mL diethyl ether와 2mL의 물을 가하여 攪拌하여 DG-NEU를 回收하였다. 이 乾燥濃縮된 DG-NEU混合物을 methanol-물 混合溶媒(99:5 by vol.) 6mL에 녹이고, 이것을 미리 10mL methanol-물 混合溶媒(99:5, by vol.)로 水和시킨 Bond ElutTM ODS solid-phase extraction 컬럼에 吸着시켜, 上記 溶媒를 15~30mL 흘러 不純物을 除去한 다음 acetone 10mL로 DG-NEU를 純粹히 溶離시켰다.

7. HPLC에 의한 DG-diastereomer의 分離^{19, 21)}

Diastereomeric diacylglycerol urethane 誘導體의 分離時 Hewlett-Packard社의 HPLC system과 UV-detector(M720, Young-In Scientific Co., Ltd., Seoul, Korea)를 利用하였으며 resolution을 最大로 하기 위해서 silica gel column(HypersilTM 3 μ m, 25cm \times 4.6mm i.d., HiChrom Ltd., Reading, U.K.) 二個를 直列連結(tandem serial)하여 使用하였다. 0.4% n-propanol(2% 물 含有)-hexane 溶媒를 1mL/min로 isocratic하게 흘렸고, 試料를 最少量

의 hexane(50~100 μ L)에 녹여 그 10 μ L씩을 컬럼에 注入하였으며, 이 때 detector의 波長은 280nm로 調整하였다.

8. 脂肪酸의 分析³⁾

試料의 脂肪酸은 sodium methoxide法으로 methyl ester化하였다. 즉, 마개달린 試驗管(100 \times 15 mm)에 約 1~2mg의 TG와 0.05 BHT-hexane 1mL를 옮겨 溶媒를 除去한 後 1mL의 diethyl ether로 試料를 完全히 녹였다. 여기에 1M sodium methoxide-methanol(20 μ L)과 methyl acetate(20 μ L)를 가하여 잘 흔들어서 섞은 뒤 常溫에서 5分間 反應시킨 後(DG-NEU)의 경우는 50 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 放置), 水醋酸 2 μ L을 加하여 反應을 停止시켰다. 餘分의 試藥을 窒素氣流下에서 除去하고 여기에 hexane(3mL)과 물(3mL)를 가하여 vortex mixer로 잘 섞은 뒤 FAME를 hexane層으로 移行시켰으며, 이런 操作을 1~2回 反復하였다. 모든 hexane層을 無水망초로 脫水시킨 後 濃縮하여 Florisil column에 吸着시켜 hexane/acetone(99:1, by volume)의 溶媒로 FAME를 純粹히 分離하였다. 試料의 FAME 分析時에는 Hewlett Packard 5890 II capillary gas chromatograph를 使用하였으며, 이 때 使用한 column은 Carbowax 20M(Hewlett Packard, Orlando, FL, USA)이 coating된 fused silica column(25m \times 0.20mm, i. d., thickness 25 μ m)이었고, 分析溫度를 175 $^{\circ}$ C에 3分間 維持한 後 205 $^{\circ}$ C까지 4 $^{\circ}$ C/min로 昇溫하였고, 205 $^{\circ}$ C에서 30分間 더 머물도록 設定하였다. Injection port와 detector의 溫度는 230 $^{\circ}$ C이었으며, detector는 flame ionization detector(FID)이었고, carrier gas로는 H₂를 使用하였다.

9. 脂肪酸의 picolinyl ester의 調製 및 未知脂肪酸의 構造確認

脂肪酸의 picolinyl ester化는 Balazy의 方法²⁹⁾에 따라 이루어졌고, 使用한 GC-mass spectrometer는 Mega Series gas chromatograph/Kratos 8/90 double focusing magnetic sector 器機(Kratos Analytical, Manchester, U.K.)였으며, cross-linked 5% phenylmethyl silicone을 coating한 DB5-MS(30m \times 0.25mm, film thickness 0.25 μ m)

의 fused-silica capillary column(J & W Scientific, Folsom, CA, USA)을 使用하였다. 試料는 80 $^{\circ}$ C에서 on-column法으로 injection하여 3分間 머물 後, 160 $^{\circ}$ C까지 30 $^{\circ}$ C/min의 比率로 承溫하였고 여기서부터 4 $^{\circ}$ C/min.의 比率로 325 $^{\circ}$ C까지 到達하게 하여 最終溫度에서 15分間 머물도록 programming하였다. 또 ionization chamber의 energy는 70eV였다.

III. 結果 및 考察

1. 銀杏種實 TG의 脂肪酸組成(Table 1, 2)

銀杏脂質에서 分離한 TG의 脂肪酸組成을 GC로 分析한 結果를 보면 約 21個의 脂肪酸이 觀察되었다. (GC chromatogram 省略). 飽和脂肪酸으로는 palmitic acid가 6.6mol%로 가장 많이 含有되어 있었으며, 그 다음으로 stearic acid가 1.0mol%이었다. GC chromatogram上에 未知의 많은 peak가 나타나, 이것을 同定하기 위하여 總 TG의 脂肪酸을 picolinylester化하여 GC-mass spectrometer로 未知脂肪酸의 構造를 確認하였다. 代表的인 例로서, ECL=16.20인 未知의 脂肪酸의 GC-mass spectrum(Fig. 1)에서, m/z 361은 molecular ion이므로 이는 17個의 炭素로 된 飽和脂肪酸을 意味하고, 또 m/z 304와 m/z 332(28amu gap)은 anteiso methyl branch의 diagnostic peak이므로, 이 脂肪酸은 14-methyl palmitic acid(14-met-16:0)로 固定되었고, 그 含量은 0.9mol%이었다.

Methyl branch를 가진 飽和脂肪酸의 存在는 植物界에는 매우 異例的이나 Flacourtiaceae科 植物種子油에는 間或 發見된 바 있다.¹³⁾ 또 myristic acid, arachidic acid과 behenic acid도 少量 檢出되었으며, tetracosanoic acid(C_{24:0})도 微量 存在하고 있었다. Monoene酸 중에 asclepic acid(C_{18:1 ω 7})와 oleic acid(C_{18:1 ω 9})가 各各 21.5mol%와 13.8mol%로 主要成分이었고 C_{16:1 ω 7}도 3.3mol%나 含有되어 있었으며, C_{20:1 ω 9}과 C_{20:1 ω 7}도 少量 含有되어 있었다. Chisholm과 Hopkins³⁰⁾는 *Asclepias syriaca* 種子油에 11-octadecanoic acid(asclepic acid)와 oleic acid가 各各 約 15% 存在한다고 報告하였으며, 그 以後 *Doxantha unguisati*³¹⁾, *Hicksbeachia pinnatifolia*³²⁾와 멀구슬나무科 種子油³³⁾에도 相當量의 asclepic

acid의 存在가 確認되었다. 芝原³⁴⁾는 完熟한 예덕나무 (*Mallotus japonicus*) 種子油의 構成脂肪酸에 9.1% asclepic acid가 存在한다고 하였다. Diene酸으로 $\omega 6$ 系列인 linoleic acid가 39.0mol%로 脂肪酸組成中 제일 많았으며, C_{20:206}이 少量(0.9mol%) 存在하였고, non-methylene interrupted double bond(NMDB) 基를 가진 $\Delta^{5,9}$ -C_{18:2}가 2.8mol%나 含有되어 있었다. 反面에 triene酸에는 $\Delta^{5,11,14}$ -C_{20:3}(5.7mol%)와 $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3}(1.6mol%)와 같이 NMDB基를 가진 脂肪酸만 存在하였다. 이와같이 一般的인 植物種子油에는 흔하지 않은 $\Delta^{5,9}$ -C_{18:2}, $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3}와 $\Delta^{5,11,14}$ -C_{20:3}와 같은 NMDB를 가진 脂肪酸이 約 10%나 檢出된 것은 매우 興味롭다.

Δ^5 -NMDB 脂肪酸은 솔科植物 種子油에 共通적으로 存在한다고 하며,³⁵⁾ 나한송科 植物(*Podocarpus nagi*)³⁶⁾과 측백나무(*Biota orientalis*),³⁷⁾ 천남성科의

산부채(*Caltha plusttris* L.)³⁸⁾와 朱木科의 *Taxusbaccta* 種子油³⁹⁾에서도 $\Delta^{5,11,14}$ -C_{20:3}, $\Delta^{5,11,14,17}$ -C_{20:4}와 같은 Δ^5 -NMDB 脂肪酸이 存在한다고 한다. 또 Davidoff 等⁴⁰⁾은 粘液性 곰팡이의 一種인 *Dictyostelium discoideum*의 總脂質에도 $\Delta^{5,9}$ -C_{16:2}와 $\Delta^{5,11}$ -C_{18:2}의 脂肪酸이 存在를 報告하였다.

銀杏에 oleic acid에 比하여 壓倒的(asclepic acid/oleic acid=1.56)으로 많이 含有되어 있는 asclepic acid의 人體內에서의 代謝 mechanism이나 그 生理的 役割에 관한 研究는 전혀 없다. 다만 asclepic acid의 trans 異性體인 vaccenic acid의 代謝에 관한 研究에서 hepatoma cell을 移植한 쥐의 血漿磷脂質중의 vaccenic/oleic acid의 比가 移植前의 0.82에서 15日 經過後에는 0.36으로 急激히 減少되었다는 Jams⁴¹⁾의 報告가 있을 뿐이다.

Δ^5 -NMDB基를 가진 脂肪酸이 自然界에 널리 存在

Table 1. Fatty Acid Composition(mol% of the Total Fatty Acids) and Proportions of Triacylglycerol Fractions Obtained by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography from the Seed Oil of *Ginkgo biloba*

Fatty acid	Total Check		Fraction																	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
C _{16:0}	6.6	4.5							23.9	26.6				26.7	26.3	10.0			21.6	
C _{16:107}	3.3	3.5	10.5	11.8		2.3	9.4	16.2												
14-met-C _{16:0}	0.9	0.6									36.3						30.2			
C _{18:0}	1.0	0.7												5.0					12.7	
C _{18:109}	13.8	14.1		3.5		1.1	15.3	25.8	4.0			16.1	30.3	5.9	26.4	28.7	32.5	67.8	26.2	
C _{18:107}	21.5	23.6		5.4		33.4	18.6	18.2	1.3			58.2	24.0	24.5	15.9		67.5	32.2	22.8	
C _{18:2} $\Delta^{5,9}$	2.8	3.2		5.8		2.5	3.0	14.8					7.4							
C _{18:206}	39.0	38.4	80.0	40.3	65.5	57.9	37.3	16.0	38.1	50.1	63.6	25.6	28.0	27.7	31.4	31.1			16.7	
C _{18:3} $\Delta^{5,9,12}$	1.6	1.2		9.0					4.7					5.0						
C _{18:303}	1.4	1.2		7.0					6.8					5.1						
C _{20:2}	0.4	0.3							5.1											
C _{20:109}	0.4	0.3							5.0											
C _{20:107}	0.7	0.8					5.5		4.3											
C _{20:206}	0.9	0.9												6.0						
C _{20:3} $\Delta^{5,11,14}$	5.7	5.4	9.5	17.2	34.5	2.8	10.9	9.0	6.9	23.3			4.3							
C _{22:0}	tr.																			
C _{24:0}	tr.																			
mol%			5.7	6.4	0.8	23.3	10.6	3.8	6.1	1.4	0.4	11.0	14.2	4.0	2.4	1.4	4.0	0.9	3.6	
Partition number(PN)			42	42	42	44	44	44	44	45	46	46	46	46	47	48	48	48	48	

Table 2. Fatty Acid Composition(mol%) of the Total Fatty Acids) and Proportions of Triacylglycerol Fractions Obtained by Silver-Ion High-Performance Liquid Chromatography from the Seed Oil of *Ginkgo biloba*

Fatty acid	Fraction																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
C _{16:0}	6.6	3.5	29.0	10.8	27.2			32.7				28.3												
C _{16:1ω7}	3.3	3.2		11.9	9.5	8.9			1.5	7.1	2.1	28.3												
14-met-C _{16:0}	0.9	0.7	31.4		36.9																			
C _{18:0}	1.0	1.0	8.0	4.3	4.6				5.8							38.2								
C _{18:1ω9}	13.8	14.7	25.0	36.6	22.4	14.3	29.6	18.4	25.1	20.2	24.2	14.3	15.4	29.3	35.6				10.0					
C _{18:1ω7}	21.5	21.4	16.2		25.3	14.0	33.3	21.3	30.9	21.1	22.4	24.1	19.7			35.9				26.7				
C _{18:2Δ^{5,9}}	2.8	2.7							19.9				30.4						36.1					
C _{18:2ω6}	39.0	40.6	32.0	30.4	63.1	28.1	39.7	67.3	24.1	40.7	58.0	41.5	40.3	37.8	31.7	36.5	100.0		69.5	61.4				
C _{18:3Δ^{5,9,12}}	1.6	1.6							1.2							6.3				34.2				
C _{18:3ω3}	1.4	1.5						43.9					36.5			25.3								38.5
C _{20:0}	0.4	0.2																						
C _{20:1ω9}	0.4	0.4	9.3																					
C _{20:2ω7}	0.7	0.8	12.5									1.4								35.4				
C _{20:2ω6}	0.9	0.9							3.0			30.1				26.6	26.1			28.5	29.1	30.4		
C _{20:3Δ^{5,11,14}}	5.7	6.3							0.5	5.6														
C _{22:0}	tr.																							
C _{24:0}	tr.																							
mol%	1.6	0.9	3.8	5.3	1.3	14.1	0.7	3.0	1.3	8.9	2.2	25.2	0.7	0.5	1.2	0.9	11.3	1.9	5.6	1.0	1.9	6.3	0.4	
Duble bond number																								
	2	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	7	7	7	7

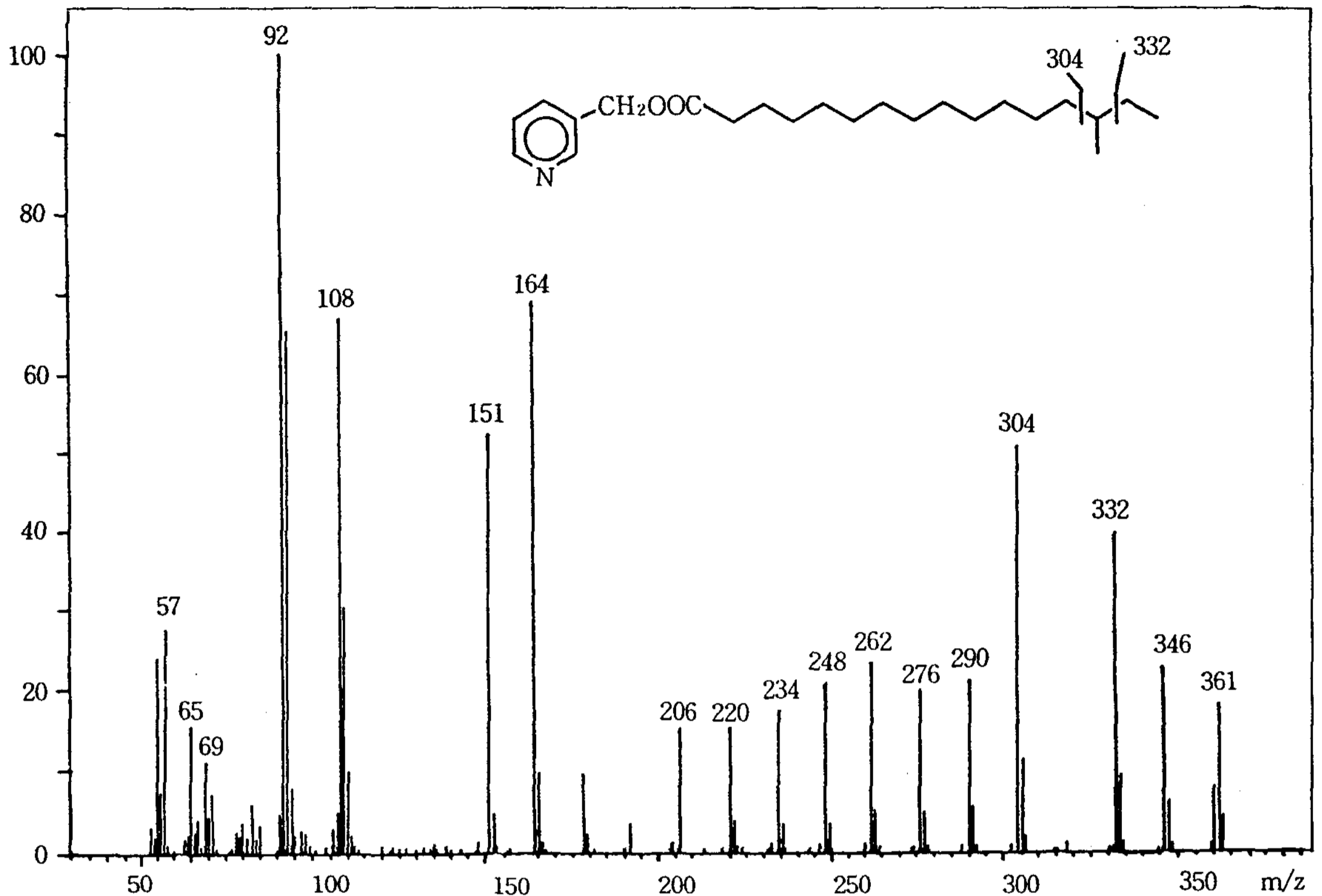


Fig. 1. GLC-Mass Spectrum of Picolinyl Ester of 14-Methyl-C_{16:0} Present in the Oil of *Ginkgo biloba*.

하고 있으나, 그 생성 mechanism에 관한 연구報告도 역시 減少數 있을뿐,⁴²⁾ 이들 脂肪酸의 營養生理學的研究나 食品學的인 研究는 거의 없다. 最近에 Purdy⁴³⁾는 meadow foam 種子油의 요-드價가 높은데도 抗氧化性이 높은 것은 Δ⁵-NMDB 脂肪酸 때문이라고 하였으며, 그 例로서 Δ^{5,13}-C_{22:2} 脂肪酸의 酸化速度가 monoene 脂肪酸의 酸化速度가 같다는 事實을 들고 있다. 또 Kim도²⁷⁾ 잣에 存在하는 Δ⁵-NMDB 脂肪酸이 잣기름의 酸化速度에 크게 干與한다고 報告한 바 있다.

따라서 銀杏에 多量으로 存在하는 asclepic acid나 Δ⁵-NMDB 脂肪酸의 生成 및 代謝 mechanism, 人體에 미치는 營養生理學的 또는 藥理的 效果 그리고 銀杏의 食品學的價値 等에 관한 研究는 매우 흥미로울 것 같다.

2. Reverse-phase HPLC에 의한 트리글리세리드 分割과 그 脂肪酸組成 Fig. 2에서 보는 바와같이 銀

杏種實油의 TG分子種을 逆相컬럼으로 partition number(PN, PN=total carbon number of all the acyl residues in a TG molecule minus 2×double bond number)別로 分割을 試圖하였더니, 17個의 fraction으로 resolution되었으며 이것을 다시 PN別로 調査하였더니 6個의 PN(PN 42, 44, 45, 46, 47과 48)으로 構成되어 있었고 PN 50 以上 42 以下の 分子種 檢出되지 않았다. 또 各分割의 mol 分率과 構成脂肪酸으로 全 分子種의 脂肪酸組成으로 再構成하였더니 分割前 總TG의 脂肪酸組成과 매우 一致하였으나, C_{16:0}의 境遇는 再構成된 組成(4.5mol%)이 總 TG의 境遇(6.6mol%)보다 적었다. 이것은 窒素氣流下에서 溶媒를 除去시킬 때 蒸發消失되었기 때문으로 여겨진다.²¹⁾

Fr.1~4는 어느 것이나 PN=42인 分子種으로 構成되어 있었으며, fr.1은 主로 trilinolein인 (C_{18:2ω6})₃로 構成되어 있었으나, fr.2.에는 (C_{18:2ω6})₂外에 C_{16:1ω7}/C_{18:2ω6} C_{20:3Δ^{5,11,14}}와 같은 分子種이 少量 含有되어

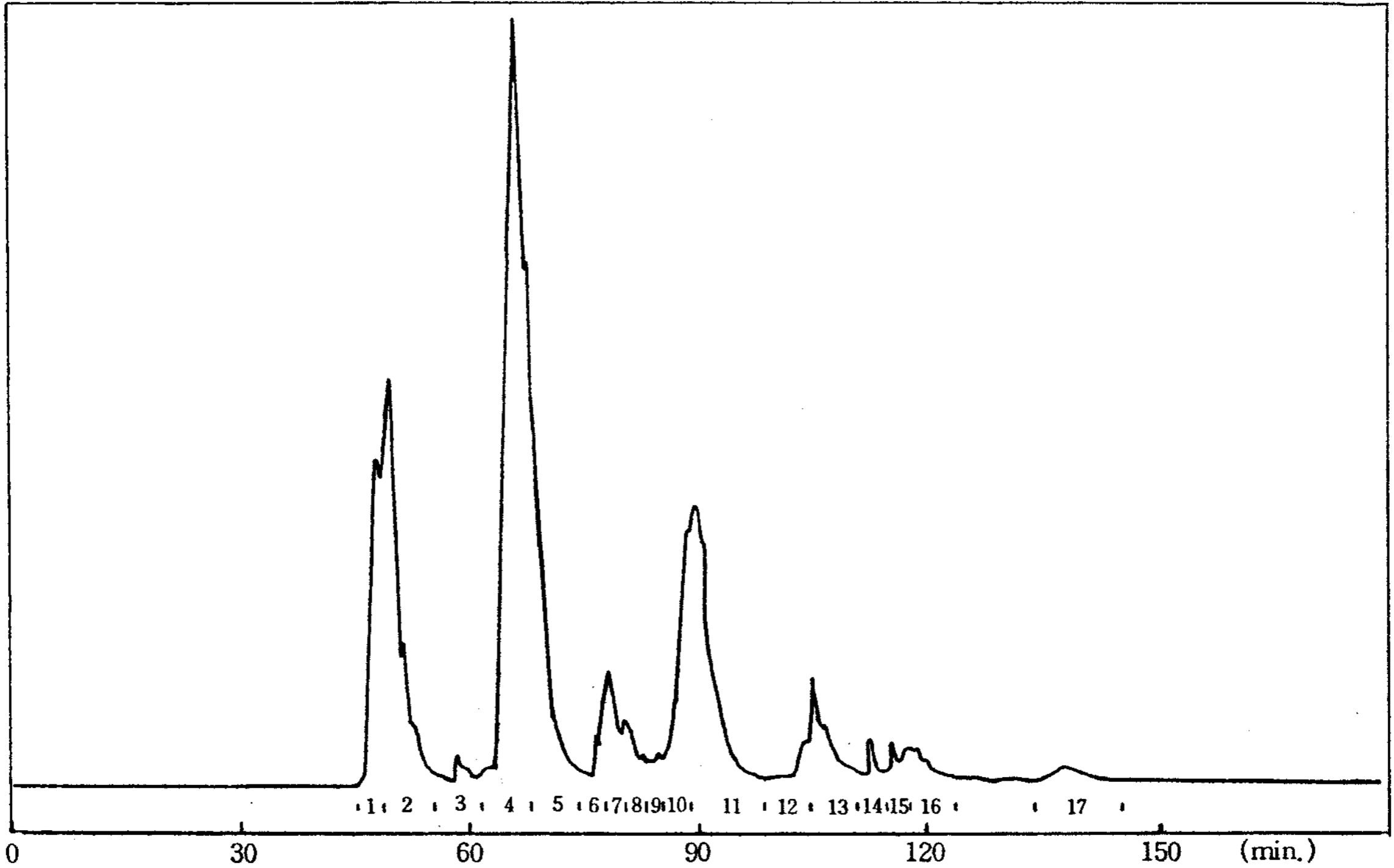


Fig. 2. Fractionation of the Triacylglycerols from the Seed Oil of *Ginkgo biloba* by Reverse-Phase High-Performace Liquid Chromatography.

있었으며 또, fr.3의 分子種은 $(C_{18:2\omega 6})_3 / C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$ $C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$ 이었다. 이와같이 逆相컬럼에서 同一한 PN의 分子種인데도 그 retention time이 相異하게 分離되는 例는 特殊한 構造의 脂肪酸을 가진 TG分子種의 resolution에서 볼 수 있다. 즉, Gresti⁴⁴⁾는 pinolenic acid($C_{18:3\Delta^{5,9,12}}$)를 總脂肪酸의 約 15%를 含有한 것의 TG 分子種의 相互分離에서 PN이 同一할지라도 Δ^5 -NMDB를 含有한 分子種은 retention time이 보다 길었다고 報告한 바 있고, Joh 等⁴⁵⁾은 conjugate trienoic acid인 punicic acid(9c, 11t, 13c- $C_{18:3}$)를 多量으로 含有한 하늘수박 種實油에서 TG를 精製하여, 本實驗에 使用한 同一한 컬럼과 分析條件에서 分割하였을 때, PN 40인 分子種($C_{18:2\omega 6}$)₂/9c, 11t, 13c- $C_{18:3}$ 이 同一한 PN의 分子種인 $C_{18:1\omega 9}$ /(9c, 11t, 13c- $C_{18:3}$)₂ 보다 훨씬 빨리 溶出되었다고 하였다. 이런 事實로 보아 reverse-phase 컬럼에서 적어도 Δ^5 -NMDB이나 conjugate double bond와 같은 特殊構造의 脂肪酸을 含有한 TG의 分子種을 resolution할 때 Plattner⁴⁾가 提案한 PN의 概念을 修正되어야 하

지않을까 思料된다.

Fr.4~7은 PN이 44인 分割으로 fr.4에는 $C_{18:1\omega 7} / (C_{18:2\omega 6})_2$ 이 主要한 分子種이었고, fr.5에는 $C_{18:1\omega 9} / (C_{18:2\omega 6})_2$ 외에 $C_{16:1\omega 7} / C_{18:1\omega 7} / C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$ 도 相當量 存在하였다. Fr.6에는 fr.5에는 分子種이 많이 混入되어 있으나, $C_{18:1\omega 7} / C_{18:2\omega 6} / C_{18:2\Delta^{5,9}}$ 와 $C_{16:1\omega 7} / C_{18:1\omega 7} / C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$ 같은 分子種이 相當量 存在하고 있었다. Fr.7과 fr.8의 主된 分子種은 $C_{16:0} / (C_{18:2\omega 6})_2$ 이었으나, fr.7에는 여러 種類의 脂肪酸이 檢出되어 正確한 構成分子種을 計算하기가 어려웠다.

Fr.9에는 PN 45인 $(C_{18:2\omega 6})_2 / 14\text{-methyl-}C_{16:0}$ 이 0.4% 程度 檢出되었으며, fr.10~13는 모두 PN 46인 分割으로 fr.10과 11는 서로 分離가 잘 되지 않는 나 모두 monoene/monoene/diene으로 表示되는 分子種으로, fr.10에는 $(C_{18:1\omega 7})_2 / C_{18:2\omega 6}$ 가 主成分이고 그 다음으로 $(C_{18:1\omega 9})_2 / C_{18:2\omega 6}$ 가 前者의 1/3.6배 가량 含有되어 있었다. 反面에 fr.11의 主된 分子種은 $C_{18:1\omega 9} / C_{18:1\omega 7} / C_{18:2\omega 6}$ 이었으나 $C_{18:1\omega 9} / C_{18:2\Delta^{5,9}}$ / $C_{20:2\omega 6}$ 내지는 $C_{18:2\Delta^{5,9}} / C_{20:2\omega 6} / C_{20:3\Delta^{5,11,14}}$ 도 少

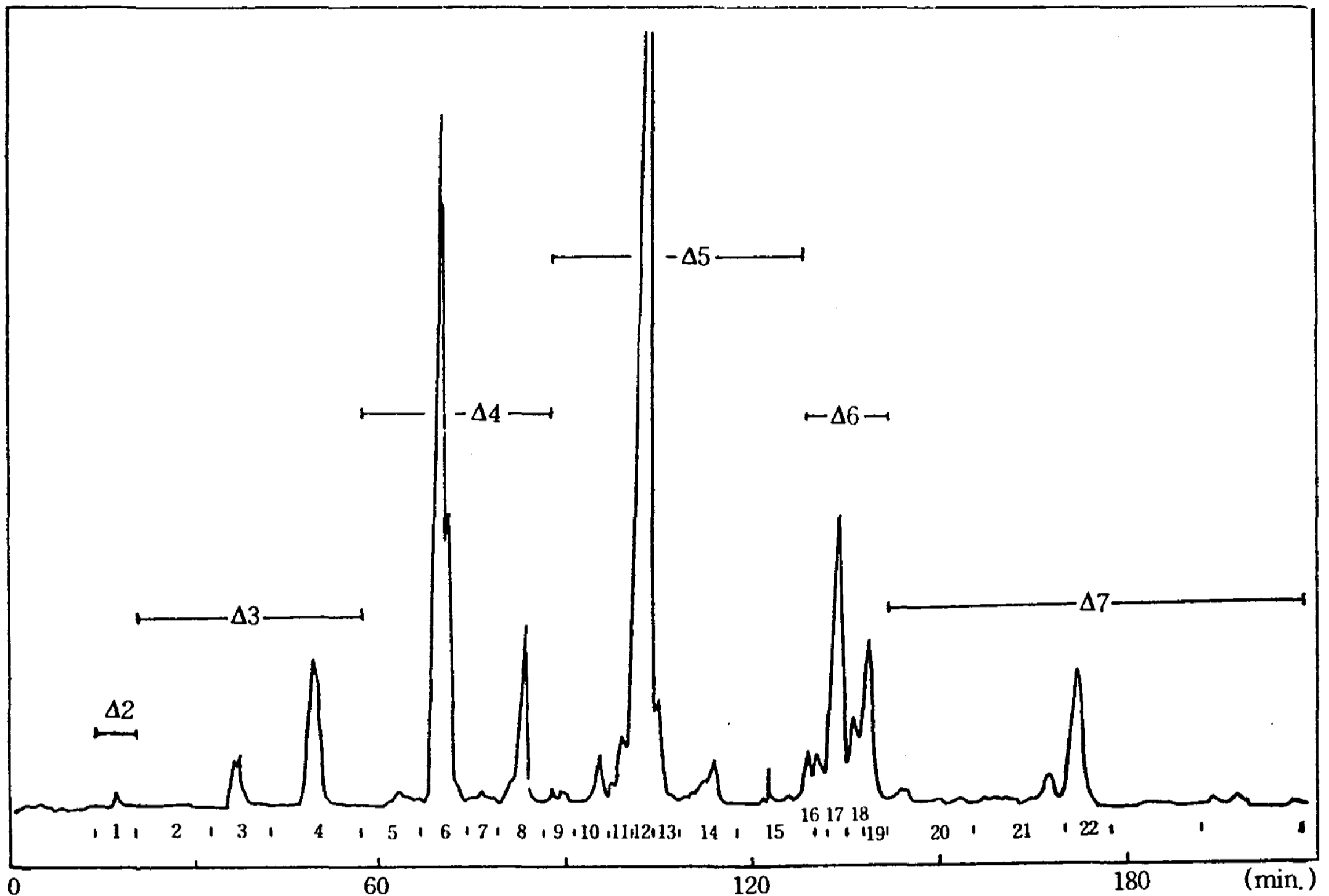


Fig. 3. Fractionation of the Triacylglycerols from the Seed Oil of *Ginkgo biloba* by Silver-Ion High-Performance Liquid Chromatography.

量으로 存在하는 것 같다. Fr. 12에는 $C_{18:0}/C_{18:1\omega 9}/C_{18:3\omega 3}$ 나 $C_{18:0}/C_{18:1\omega 9}/C_{18:3\Delta}^{5,9,12}$ 와 같은 分子種도 存在도 豫見되나 $C_{16:0}/C_{18:1\omega 7}/C_{18:2\omega 6}$ 가 主成分으로 存在하였고, 反面에 分子種 $C_{16:0}/C_{18:1\omega 9}/C_{18:2\omega 6}$ 는 fr.13에 主로 含有되어 있었다. Fr.14에는 PN 47인 奇數脂肪酸을 含有한 分子種인 14-methyl- $C_{16:0}/C_{18:1\omega 9}/C_{18:2\omega 6}$ 만 存在하였고, 그 含量은 1.4 mol%이었다.

PN 48인 fr.15와 16은 모두 $C_{18:1}$ 로 이루어진 分子種이나, 前者에는 $(C_{18:1\omega 7})_2/C_{18:1\omega 9}$ 가, 後者에는 $(C_{18:1\omega 9})_2/C_{18:1\omega 7}$ 가 存在하였다. 이와같은 分離 pattern, 즉, $C_{18:1\omega 7}$ 을 包含한 쪽의 分子種이 $C_{18:1\omega 9}$ 을 含有한쪽 보다 若干 빨리 溶出되는 傾向을 이미 fr.12와 13의 境遇에서도 觀察한 바 있다. Fr.17에는 $C_{16:0}/C_{18:1\omega 7}/C_{18:1\omega 9}$ 가 제일 많았으며 $(C_{18:0})/(C_{18:2\omega 6})$ 로 여겨지는 分子種도 相當量 存在하고 있었다.

3. 銀ion HPLC에 의한 트리글리세리드 分劃과 그

脂肪酸組成

Fig. 3에서 보는 바와같이 銀杏種實油의 TG分子種은 二重結合數에 따라 Δ2, Δ3, Δ4, Δ5, Δ6와 Δ7의 6個群 總 23個의 peak로 나누어져, 逆相칼럼에서 보다 많은 分劃으로 resolution됨을 알 수 있었다.

飽和脂肪酸으로만 이루어진 $(C_{16:0})_3$ 나 $(C_{16:0})_2/C_{18:0}$ 와 같은 飽和글리세리드 그리고 $(C_{16:0})_2/C_{18:1}$ 과 같은 monoene글리세리드는 檢出되지 않았다. 이런 事實은 銀杏의 TG生合成에 關與하는 酸素가 基質에 대하여 대단히 特異的임을 暗示하고 있다.

TG分子種의 acyl殘基의 總 二重結合數가 二個인 된 fr.1의 主된 分子種은 $C_{16:0}/C_{18:1\omega 9}/C_{18:1\omega 7}$ 와 $C_{16:0}/C_{18:1\omega 9}/C_{20:1\omega 7}$ 또는 $C_{16:0}/C_{18:1\omega 7}/C_{20:1\omega 7}$ 이었으나, $C_{18:0}/C_{18:1\omega 9}/C_{20:1\omega 9}$ 또는 $C_{18:0}/C_{18:1\omega 7}/C_{20:1\omega 9}$ 와 같은 分子種도 檢出되었다. Δ3群의 fr.2에는 14-methyl- $C_{16:0}/C_{18:1\omega 9}/C_{18:2\omega 6}$ 의 分子種이 少量 存在하고 있었고, fr.3은 $C_{16:1\omega 7}/C_{18:1\omega 9}/C_{18:1\omega 7}$ 와 $C_{18:1\omega 9}/C_{18:1\omega 7}/C_{20:1\omega 7}$ or $C_{20:1\omega 9}$ 가 主된

Table 3. The Main Molecular Species of Triacylglycerols of the Seed Oil of *Ginkgo biloba* as Resolved by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography(mol%)

Fraction number	Partition number	Species	Amount
1	42	(C _{18:206}) ₃ , C _{16:107} /C _{18:206} /C _{20:3Δ} ^{5,11,14}	5.7
2	42	(C _{18:206}) ₂ /C _{20:3Δ} ^{5,11,14} , (C _{18:206}) ₂ /C _{18:2Δ} ^{5,9} C _{16:107} /C _{18:109} /C _{18:303} , C _{16:107} /C _{18:107} /C _{18:303} , C _{16:107} /C _{18:3Δ} ^{5,9,12} /C _{20:3Δ} ^{5,11,14} , C _{16:109} / C _{18:3Δ} ^{5,9,12} , C _{20:3Δ} ^{5,11,14}	6.4
3	42	(C _{18:206}) ₂ /C _{20:3Δ} ^{5,11,14}	0.8
4	44	(C _{18:206}) ₂ /C _{18:107} /C _{16:107} /C _{18:109} /C _{20:3Δ} ^{5,11,14} , C _{16:107} /C _{18:107} /C _{20:3Δ} ^{5,11,14}	23.3
5	44	(C _{18:206}) ₂ /(C _{18:107} , C _{18:206}) ₂ /C _{18:109} /C _{16:107} / C _{18:109} /C _{20:3Δ} ^{5,11,14} , C _{16:107} /C _{18:107} /C _{20:3Δ} ^{5,11,14} , C _{16:107} /C _{18:2Δ} ^{5,9} , /C _{20:3Δ} ^{5,11,14}	10.6
6	44	C _{18:107} /C _{18:206} /C _{18:2Δ} ^{5,9} , C _{18:109} /C _{18:206} /C _{18:2Δ} ^{5,9} , C _{16:107} /C _{18:109} /C _{20:3Δ} ^{5,11,14}	3.8
7	44	C _{16:0} /(C _{18:206}) ₂ , /C _{16:0} /C _{18:109} /C _{18:3Δ} ^{5,9,12} (?)	6.1
8	44	C _{16:0} /(C _{18:206}) ₂ /C _{16:0} /(C _{20:3Δ} ^{5,11,14}) ₂	1.4
9	45	(C _{18:206}) ₂ /14-met-C _{16:0}	0.4
10	46	(C _{18:107}) ₂ /C _{18:206} , (C _{18:109}) ₂ /C _{18:206}	11.0
11	46	C _{18:109} /C _{18:107} /C _{18:206} , C _{18:109} /C _{18:2Δ} ^{5,9} /C _{20:3Δ} ^{5,11,14}	14.2
12	46	C _{16:0} /C _{18:107} /C _{18:206} , C _{18:0} /C _{18:109} /C _{18:303}	4.0
13	46	C _{16:0} /C _{18:109} /C _{18:206} , C _{16:0} /C _{18:107} /C _{18:206} ,	2.4
14	47	14-met-C _{16:0} /C _{18:109} /C _{18:206}	1.4
15	48	(C _{18:107}) ₂ /C _{18:109}	4.0
16	48	(C _{18:109}) ₂ /C _{18:107}	0.9
17	48	C _{16:0} /C _{18:109} /C _{18:107} , C _{18:0} /(C _{18:206}) ₂	3.6

species이었으나, fr.4에는 分子種 C_{16:0}/C_{18:109} or C_{18:107}/C_{18:206} 외에 C_{16:107}/C_{18:206}도 少量 存在하고 있었다. Δ 4群은 4個의 fraction으로 나누어졌으며, 첫째 fraction(fr.5)의 分子種은 14-methyl-C_{16:0}/(C_{18:206})₂으로 그 含量은 1.3mol%이었으나, 둘째 fraction에는 大部分이 (C_{18:109}/C_{18:107}/C_{18:206}의 分子種으로 總TG의 14.1%로 두번째로 많이 含有되어 있었고, 少量의 C_{16:107}/C_{18:109}/C_{18:206} or C_{16:107}/C_{18:107}/C_{18:206}도 存在하였다. Minor peak인 셋째 fraction(fr.7)의 主된 分子種은 C_{18:109} or C_{18:107}/C_{18:206}/C_{20:109} or C_{20:107}이나 fr.6이 混入되어 있었고, 넷째, fraction(fr.8)은 C_{16:0}(C_{18:206})₂로 그 含量이 3.0mol%이었다. 二重結合數가 同一한데도

14-methyl-C_{16:0}/(C_{18:206})₂이 C_{16:0}/(C_{18:206})₂ 보다 빨리 溶出되는 것은 構成脂肪酸인 14-methyl-C_{16:0}의 側鎖인 methyl基가 C_{18:206}의 二重結合의 π結合과 Ag⁺과의 complexity를 보다 弱화시키기 때문에 弱여겨진다⁴⁶⁾.

Δ 5群은 7個의 fraction으로 分割하였으며, fr.9과 fr.10의 分子種은 各各 C_{18:109}/C_{18:107}/C_{18:303}과 C_{18:109} or C_{18:107}/C_{18:2Δ}^{5,9}/C_{18:206}이었으나, fr.12은 그 分子種의 含量이 25.5mol%로 第一 많았으며 分子種 C_{18:107}/(C_{18:206})₂와 C_{18:107}/(C_{18:206})₂가 主要成分이었고 微量의 C_{16:107}/C_{18:107}/C_{20:206}도 存在하고 있었다. Fr. 11에는 fr.12의 位置異性體와 C_{16:107}/C_{18:109} or C_{18:107}/C_{20:3Δ}^{5,11,14}가 少量 混在되어

Table 4. Fatty Acid Compositions(mol% of the Total) of Triacylglycerol of Ginkgo biloba Seed and Palm Oil, and Positions *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3

Fatty acid	Position				
	TG	<i>sn</i> -1 ^{a)}	<i>sn</i> -2 ^{b)}	<i>sn</i> -3 ^{c)}	<i>sn</i> -2 ^{d)}
C _{16:0}	6.6	2.7	3.4	13.7	5.3
C _{16:1ω7}	3.3	6.5	2.1	1.3	1.0
14-met-C _{16:0}	0.9	0.0	0.0	2.7	0.0
C _{18:0}	1.0	0.5	0.6	1.9	0.8
C _{18:1ω9}	13.8	14.5	18.1	8.8	19.2
C _{18:1ω7}	21.5	27.6	23.2	13.6	22.8
C _{18:2Δ} ^{5,9}	2.8	0.2	0.3	7.9	0.4
C _{18:2ω6}	39.0	41.0	47.4	28.5	44.8
C _{18:3Δ} ^{5,9,12}	1.6	0.2	0.1	4.4	0.2
C _{18:3ω3}	1.4	2.5	1.5	0.2	1.1
C _{20:2}	0.4	0.2	0.0	1.0	0.0
C _{20:1ω9}	0.4	0.5	0.6	0.1	0.7
C _{20:2ω7}	0.7	0.8	1.0	0.3	1.0
C _{20:2ω6}	0.9	0.9	1.4	0.4	2.0
C _{20:3Δ} ^{5,11,14}	5.7	1.5	0.3	15.3	0.4
C _{22:0}	tr.	0.3	0.0		0.1
C _{24:0}	tr.	0.1	0.0		0.1
C _{14:0}	1.4	0.0	1.4	2.8	0.8
C _{16:0}	48.0	60.2	11.2	72.6	31.0
C _{16:1ω7}	0.2	0.4	0.0	0.2	-1.6
C _{18:0}	4.0	1.4	3.6	7.0	0.4
C _{18:1ω9}	35.6	30.6	63.0	13.2	52.2
C _{18:1ω7}	0.8	0.6	1.2	0.6	0.2
C _{18:2ω6}	10.0	0.8	19.6	3.6	17.0

a: 3×TC-2×2,3-DG, b: 3×TC-(a+c), c: 3×TC-2×1,1-DG, d: 3×TC-2×1,3-DG

있었다. Fr. 13과 fr. 14의 分子種은 各各 C_{16:0}/C_{18:1ω9} or C_{18:1ω7}/C_{20:3Δ}^{5,11,14}와 C_{16:1ω7}/C_{18:1ω9} or C_{18:1ω7}/C_{18:3ω3}로 그 含量은 微量 存在하였다.

Δ 6群은 크게 4個의 fraction으로 分割할 수 있었으며, 첫번째인 fr.15에서는 C_{18:1ω9}/C_{18:2Δ}^{5,9}/C_{18:2ω6}이 主成分으로 檢出되었고, fr. 16(0.9mol%)은 fr. 17(11.3mol%)에 比하여 TG의 含量이 매우 적었으나, 二分割 모두에 C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}/C_{20:3Δ}^{5,11,14}와 C_{18:1ω7}/C_{18:2ω6}/C_{20:3Δ}^{5,11,14}의 分子種이 各各 分離되었으며, fr.17에는 C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}/C_{18:3Δ}^{5,9,12}도 少量 混在해 있었다.

이와같이 二重結合 位置가 若干 相異한 脂肪酸으로

構成된 TG分子種이 서로 resolution되는 것은 窒酸銀 컬럼의 特長이 아닌가 思料된다. Fr.18은 C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}/C_{18:3ω3}의 分子種으로 構成되어 있었으나, fr.19에는 simple triacylglycerol인 (C_{18:2ω6})₃로 構成되어 있었고 그 含量은 約 10mol%에 不超過하였다.

Δ 7群도 4個의 分割으로 나누어 졌는데, fr.20과 fr.21에는 各各 C_{18:2Δ}^{5,9}/C_{20:2ω6}/C_{20:3Δ}^{5,11,14}과 C_{18:1ω7} or C_{18:1ω9})₃/C_{18:3Δ}^{5,9,12}/C_{20:3Δ}^{5,11,14}가 主要한 分子種이었다. Fr.22에는 (C_{18:2ω6})₂/C_{20:3Δ}^{5,11,14}가 唯一한 分子種으로 그 含量은 6.3mol%인데 이는 分子種(C_{18:2ω6})₂/C_{20:3Δ}^{5,11,14}의 分布比率(mol比)를 random combination으로 計算한 값(2.6mol%, 39.

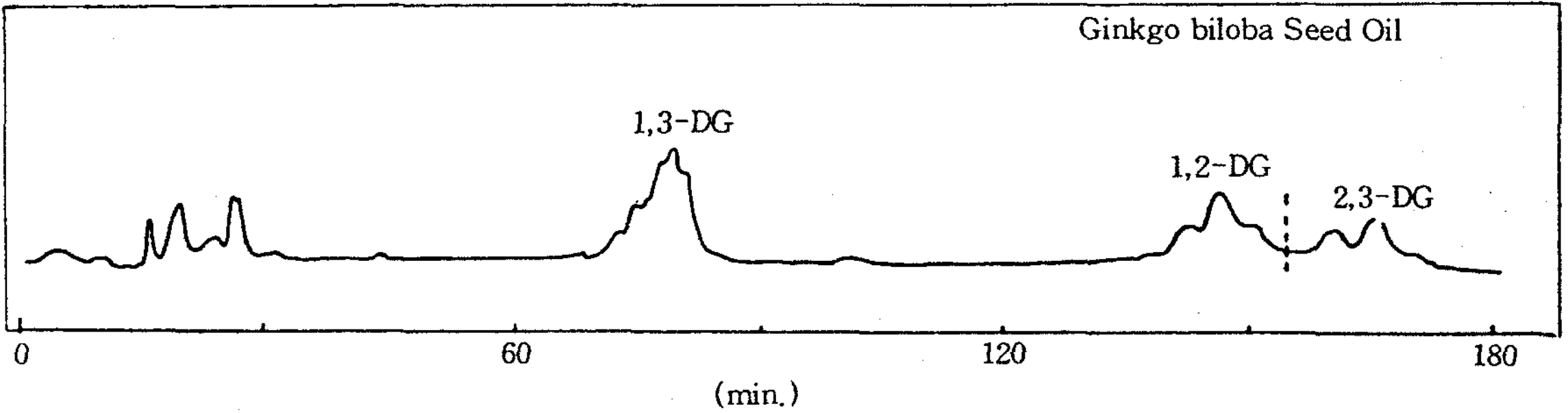


Fig. 4-a. HPLC Resolution of (S)-(+)-1-(1-Naphthyl) Ethyl Urethane Derivatives of Diacyl-*sn*-glycerols Prepared from Total Triacylglycerols in the Seed Oil of *Ginkgo biloba*.

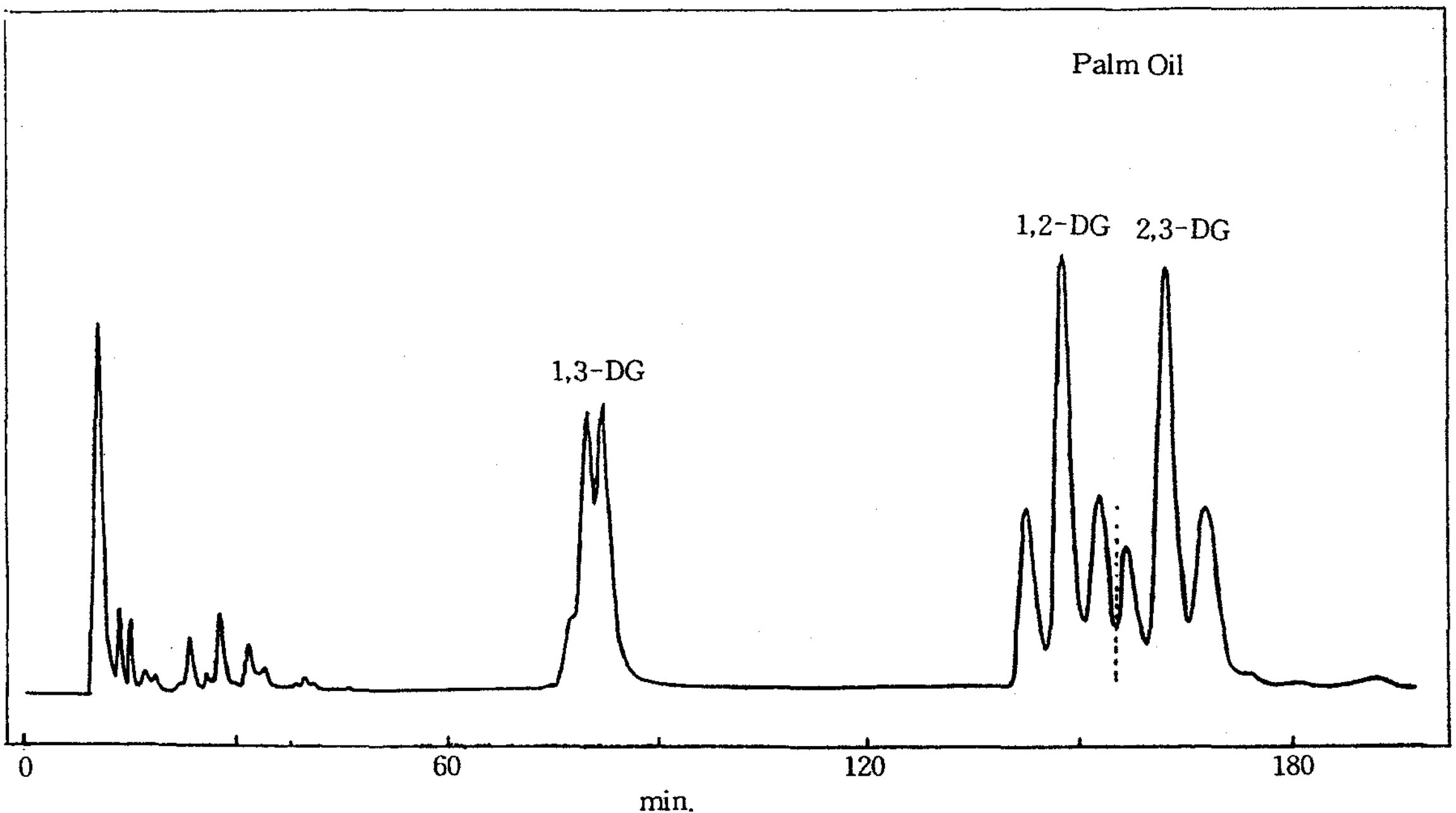


Fig. 4-b. HPLC Resolution of (S)-(+)-1-(1-Naphthyl) Ethyl Urethane Derivatives of Diacyl-*sn*-glycerols Prepared from Total Triacylglycerols from Palm Oil.

$0^2 \times 5.7 \times 3 \times 10^{-4}$)보다 훨씬 많았다⁴⁷⁾. 이런 사실과 앞에서 언급한 飽和글리세리드와 monoene글리세리드가 銀杏種實油에 檢出되지 않고 있다는 사실에서 類推해 볼때 銀杏 TG의 脂肪酸은 random分布를 하고 있지 않음을 알 수 있다. Fr.23에서는 (C_{18:2ω6})₂/C_{18:3ω3}의 分子種이 微量 存在하고 있었으나, 二重結合數 8個 以上の 分子種은 檢出되지 않았다.

4. 트리글리세리드의 位置別 脂肪酸의 分布
逆相 및 銀이온 HPLC에 의한 TG 分子種의 相互

分離에서, 銀杏種實에 含有되어 있는 TG의 分子種에 관한 情報를 어느 程度 얻을 수 있었으나, 그 stereospecific한 構造는 알 수 없었다. 本 研究에서는 우선 總 TG를 使用하여 全體的인 TG의 位置에 따른 脂肪酸分布를 보았다.

Fig. 4는 銀杏(Fig. 4-a)과 palm油(Fig. 4-b)의 總 TG에서 얻은 디글리세리드(diglycerides, DG) 混合物의 urethane 誘導體가 silica 컬럼상에서 分離된 크로마토그램으로, 1,3-, 1,2- 및 2,3-*sn*-DG가 順次的으로 比較的 깨끗하게 resolution되었음을

알 수 있다. 銀杏試料는 各各의 peak가 asymmetric shape를 하고 있으나, palm油의 境遇는 symmetric shape를 하고 있었는데, 그 理由로서 생각되는 것은 前者는 後者에 比하여 그 脂肪酸組成에 있어서 複雜하다는 것이다. Christie²⁴⁾에 의하면 脂肪酸組成이 動物性脂肪중 比較的 脂肪酸組成이 單純한 乳脂肪의 TG의 境遇도 1,2-와 2,3-*sn*-DG diastereomer의 resolution이 어렵다고 하였으며, 이 方法은 아직 動物性油脂의 分析에는 適用할 수 없다고 한 바 있다.

總 TG의 各 位置의 脂肪酸組成을 다음과 같은 方法으로 計算하였다²²⁾. 즉, glycerol 炭素의 1位置와 3位置(*sn*-1와 *sn*-3)에 結合한 脂肪酸의 組成은, *sn*-1位置의 어느 한 脂肪酸의 mol% = 3 × (總TG의 이 脂肪酸의 mol%) - 2 × (2,3-DG중의 이 脂肪酸의 mol%)와 *sn*-3位置의 이 脂肪酸의 mol% = 3 × (總TG중의 脂肪酸의 mol%) - 2 × (1,2-DG중의 이 脂肪酸의 mol%)의 式에 따라 計算하였고, *sn*-2의 脂肪酸組成은 아래의 2가지 方法으로 計算하였다: ① *sn*-2의 이 脂肪酸의 mol% = 3 × (總TG중 이 脂肪酸의 mol%) - (*sn*-1과 *sn*-2의 이 脂肪酸의 mol%의 合), ② *sn*-2位置의 이 脂肪酸의 mol% = 3 × (總TG중의 이 脂肪酸의 mol%) - 2 × (1,3-DG중의 이 脂肪酸의 mol%). Table 4에서 보는 바와같이 palm油의 境遇 위에 言及한 ①과 ②의 方法에 따라 計算한 *sn*-2位置의 脂肪酸組成이 相異한 것은 Grignard試藥에 의하여 1,3-DG 生成時 일어난 acyl基의 migration 때문으로 여겨진다⁴⁸⁾. TG의 各 位置의 脂肪酸分布를 보면 palm油의 不飽和脂肪酸은 *sn*-2位置에 壓倒적으로 많이 存在하고 있었으며, *sn*-1과 *sn*-3位置에 따라서도 甚한 不均衡을 보여 前者에는 不飽和脂肪酸이, 後者에는 飽和脂肪酸이 보다 많이 存在하고 있었다.

한편 銀杏의 境遇도 palm油와 같이 飽和酸이 *sn*-3位置에 치우쳐 있었으며 不飽和脂肪酸도 *sn*-2과 *sn*-1位置에 많이 分布하고 있었으나, *sn*-2과 *sn*-1位置間에는 palm油에서와 같은 甚한 差異를 보이지 않았다. 또 方法①과 ②에 따라 計算한 *sn*-2位置의 脂肪酸組成이 palm油에서와 같이 큰 偏差가 없는 것은 C_{20:3}Δ^{5,11,14}, C_{18:2}Δ^{5,9} 및 C_{18:3}Δ^{5,9,12}와 같은 Δ⁵-NMDB基를 가진 脂肪酸이나 側鎖脂肪酸은 거의 *sn*-3位置에만 分布하여 acyl基의 migration을 저해하였기 때문으로 생각된다. Gunstone^{49, 50)}은 Δ⁵-NMDB基를 가진 脂

肪酸을 含有한 갓기름과 몇 가지 針葉樹 種子油의 TG의 脂肪酸分布를 ¹³C-NMR로 調査하였더니 이 特殊한 脂肪酸이 *sn*-3位置에 偏在하고 있어 TG의 甚한 非對稱性을 나타내고 있었다고 報告한 바 있다.

IV. 結 論

銀杏에서 트리글리세리드를 分離하여 그 構成脂肪酸組成을 調査하였더니, asclepic acid(C_{18:1ω7})가 含量이 21.5mol%에 達하여 oleic acid의 13.8mol% 보다 훨씬 높았고, C_{20:3}Δ^{5,11,14}(5.7mol%), C_{18:2}Δ^{5,9}(2.8mol%)와 C_{18:3}Δ^{5,9,12}(1.6mol%)와 같은 Δ⁵-NMDB基를 가진 脂肪酸의 含量이 全體의 9.9mol%에 達하였다. 또 側鎖脂肪酸인 14-methyl-C_{16:0}이 0.9mol%나 存在하였고, C_{20:0}, C_{22:0}, C_{24:0}과 같은 長鎖脂肪酸도 微量 存在하였다. 逆相 HPLC 컬럼으로 銀杏TG를 分割하였더니 六個의 PN群(PN 42, 44, 45, 46, 47 및 48)으로 나누어졌으며, 同一한 PN群도 TG의 分子種에 따라 細分된 resolution pattern을 보여 計17個의 fraction을 얻을 수 있었다. 銀이온 HPLC로 銀杏TG를 分析하였더니 TG의 分子種과 銀이온과의 結合力(二重結合數)에 따라 六個의 群(Δ2, Δ3, Δ4, Δ5, Δ6 및 Δ7)으로 나누어졌으며, 同一한 二重結合數를 가진 群도 TG分子種의 構成不飽和脂肪酸의 二重結合의 位置나 形態에 따라 細分되어 計23個의 fraction을 resolution되었으므로, 銀이온 HPLC가 TG의 分子種 分析에서 逆相 HPLC보다 優秀하였다는 것을 立證할 수 있었다. 二가지 形의 HPLC에서 얻은 分析date로부터 銀杏種實의 TG分子種은 (C_{18:2ω6})₂/C_{18:1ω7}, C_{18:1ω9}/C_{18:1ω7}/C_{18:2ω6}, (C_{18:1ω7}/2/C_{18:2ω6}, C_{16:1ω7}/C_{18:1ω9}/C_{20:3} Δ^{5,11,14}, C_{16:1ω7}/C_{18:1ω7})/C_{20:3} Δ^{5,11,14}, C_{18:1ω9}/C_{18:1ω7}/C_{18:2ω6}, C_{18:1ω9}/C_{18:2} Δ^{5,9}/C_{20:3} Δ^{5,11,14}, (C_{18:1ω7})₂/C_{18:2ω6}과 (C_{18:1ω9})₂/C_{18:2ω6}를 爲始하여 37個의 以上이라는 것을 알수 있었으며, (C_{18:2ω6})₃ (5.7mol%)외의 單純글리세리드와 (C_{16:0})₃와 같은 飽和글리세리드는 거의 檢出되지 않았다. 總 TG에 脂肪酸殘基의 綜合分布를 보면 飽和酸은 *sn*-3位置에 偏重되어 있었고, 不飽和酸은 *sn*-2位置와 *sn*-1位置에 많이 存在하고 있었다. 또 Δ⁵-NMDB基를 가진 脂肪酸과 側鎖脂肪酸인 14-methyl-C_{16:0}은 *sn*-3位置에 80% 以上 偏在되어 있

어, 銀杏TG의 脂肪酸은 制限的 分布를 하고 있었음을 알 수 있었다.

V. 感謝

본 研究는 1995年度 韓國學術振興財團의 自由公募 課題 研究助成費에 依하여 遂行된 研究 結果의 一部이며, 當財團에 感謝를 드립니다.

文 獻

- Hilditch, T.P. and Williams, P.N., *The Chemical Constitution of Natural Fats* (4th ed.), John Wiley & Sons, New York(1964).
- Brockerhoff, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, 110, 586(1965).
- Christie, W.W., *Gas Chromatography and Lipids*, pp.68~69, Oily Press, Ayr, 1989.
- Plattner R.D., and Spencer, G.F. and Kleiman, R., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 511 (1977).
- Joh, Y-G., Brechany, E. Y., and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 707(1995).
- Takagi, T., Itabashi, Y., Ota, T., and Hayashi, K., *Lipids*, 11, 354(1976).
- Spencer, G.F., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56, 642 (1979).
- Plattner, R.D., and Spencer, G. F., *Lipids*, 18, 68(1983).
- Challinor, C. J., Hamilton, R. J., and Simpson, K., *Chem. Phys. Lipids*, 3, 145(1969).
- Christie, W. W., *Prog. Lipid Res.*, 33, 9(1994)
- Christie, W. W., Brechany, E. Y., and Stefanov, K., *Chem. Phys. Lipids*, 46, 127 (1988).
- Stefanov, K., Konaklieva, M., Brechany, E. Y., and Christie, W.W. *Phytochem.*, 27, 3495 (1988).
- Christie, W.W., Brechany, E. Y., and Shukla, V.K.S., *Lipids*, 24, 116(1989)
- Christie, W.W. and Breckenridge, G.H. M., *J. Chromatogr.*, 469, 261(1989).
- Christie, W.W., Brechany, E. Y., Stefanov, K., and Popov, S., *Lipids*, 27, 640(1992).
- Christie, W.W., *J. Chromatogr.*, 454, 273 (1988).
- Nikolova-Damyanova, B., Christie, W. W., and Herslof, B., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67, 503 (1990).
- Christie, W. W., *Fat Sci. Technol.*, 93, 65 (1991).
- Santinelli, F., Damiani, P., and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 69, 552(1992).
- Laakso, P. and Christie, W. W., *Lipids*, 25, 349(1990).
- Laakso, P. and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 213(1991).
- Christie, W. W., *Lipid Analysis* (2nd ed.), 159~159, Pergamon Press, Oxford, 1982.
- Christie, W. W., *High-Performance Liquid Chromatography and Lipids*, pp. 172~210, Pergamon Press, Oxford (1987).
- Christie, W. W., Nikolova-Damyanova, B., Laakso, P., and Herslof, B., *J. Am Oil Chem. Soc.*, 10, 695(1991).
- 李昌福, 藥用植物圖鑑, 農村振興廳, p.7, 서울, (1971).
- 李昌福, 韓國植物圖鑑, 鄉文社, p.61, 서울(1979).
- Kim, Sung-Jin, Thesis for Master Degree submitted to Dong-A University, 1994.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911(1959).
- Balazy, M. and Nies, A. S., *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.*, 18, 328(1989).
- Chisholm, M. J. and Hopkins, C. Y., *Can. J. Chem.*, 38, 805(1960).
- Chisholm, M. J. and Hopkins, C. Y., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 49(1965).
- Vickery, J. R., *Phytochemistry*, 10, 123(1971).
- Kleiman, R. and Payne-Wahl, K. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61, 1836(1984).
- 芝原 章, 山木公平, 中山孝夫, 梶本五郎, 油化學,

- 34, 38(1985).
35. Jamieson, G. R. and Reid, E. H., *Phytochem.*, 11, 269(1972).
36. Takagi, T., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 41, 516 (1964).
37. Lie Ken Jie, M.S.F., and Choi, C.Y.C., *J. Chromatogr.*, 543, 257(1991).
38. Smith, C.R., Jr., Kleiman, R., and Wolff, I. A., *Lipids*, 3, 37(1967).
39. Madrigal, R. V., and Smith, C. R. Jr., *Lipids*, 10, 502(1975).
40. Davidoff, F., and Korn, E. D., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 9, 54(1962).
41. James, P. M. and Wood, R., *Lipids*, 14, 70 (1979).
42. Pollard, N. R. and Stumpf, P. K., *Plant Physiol.*, 66, 649(1980).
43. Purdy, R.H., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 64, 1493 (1987).
44. Gresti, J., Mignerot, C., Bezard, J. and Wolff, L. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1539 (1996).
45. Joh, Y-G., Kim, S-J., and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72, 1037(1995).
46. Nikolova-Damyanova, B., Herslof, B. and Christie, W. W., *J. Chromatogr.*, 609, 133 (1992).
47. Litchfield, C., *Analysis of Triglycerides*, pp. 248~261, Academic Press, New York(1972).
48. Becker, C. C., *Lipids*, 28, 147(1993).
49. Gunstone, F. D. Seth, S. and Wolff, R. L. *Chem. Phys. Lipids*, 78, 89(1995).
50. Gunstone F. D. and Wolff, R. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73, 1611(1996).