

逆相-HPLC와 Ag⁺-HPLC에 의한 잣기름의 트리아실글리세롤分子種의 相互分離

禹孝京 · 趙鏞桂 · 金成眞

東亞大學校 食品營養學科

Studies on Resolution of the Molecular Species of Triacyl-glycerols in the Seed of
Pinus koraiensis by HPLC in the Reverse-phase and Ag-ion Modes.

Woo, Hyo-Kyeng, Joh, Yong-Goe and Kim, Seung-Jin

Dep. of Food Science & Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

Abstract

The lipids from the seeds of *Pinus koraiensis* are mostly composed of triacylglycerols (TGs), in which linoleic acid (46.2 mol%) and oleic acid (25.6 mol%) are present as main components in the fatty acid composition. Surprisingly, they also have unusual fatty acids with Δ^2 -double bond systems such as $\Delta^{5,9,12}$ -C18:3 (16.0 mol%), $\Delta^{5,9}$ -C18:2 (2.3 mol%) and $\Delta^{5,11,14}$ -C20:3 (0.8 mol%). Saturated fatty acids of palmitic, stearic and arachidic acid were present in less than 8.0 mol%. TG was resolved into 17 fractions by reverse-phase HPLC according to so-called partition number (PN) suggested by Plattner, in which TG molecules with Δ^5 -NMDB acyl chains eluted later than did those with Δ^9 -MDB acyl radicals. Ag⁺-HPLC separated the TG into 14 fractions more clearly than did reverse-phase HPLC, and the complexity of $\Delta^{5,9,12}$ -C18:3 moiety with silver ion impregnated in the column bed was in the level between $\Delta^{9,12,15}$ -C18:3 (C18:3₀₃) and C18:2₀₆ ($\Delta^{9,12}$ -C18:2). In the Ag⁺-HPLC, it was found that the molecular species having a given-numbered double bonds widely spreaded in the acyl chains eluted earlier than those concentrated in one acyl chain. The main molecular species are (C18:2₀₆)₂/ $\Delta^{5,9,12}$ -C18:3 (14.8 mol%), C18:1₀₉/(C18:2₀₆)₂ (12.8 mol%) and C18:1₀₉/C18:2₀₆/ $\Delta^{5,9,12}$ -C18:3 (10.9 mol%).

I. 序論

TG는 1分子에 3개의 脂肪酸 殘基를 가지고 있고, 그 構成脂肪酸의 數가 增加하면 異性體數도 幾何級數적으로 增加한다. 예를 들면, 어떤 植物 種實油脂의 TG가 5種의 脂肪酸으로 構成되어 있다면, 이 TG는 理論적으로 125개의 分子種 (molecular species)을 가질 수 있다. 一般적으로 植物性 油脂는 魚油, 乳脂肪 또는 微生物이 生産한 脂質에 比하여 그 構成脂肪酸의 種類가 簡單하

다고 알려져 있다. 그러나 어떤 種類의 植物 種實 油는 branched, cyclic chain 또는 non-methylene interrupted conjugate double bond (NMDB)와 같은 特殊構造의 脂肪酸을 含有하는 등, 보다 多樣한 脂肪酸으로 構成되어 있으므로 그 分子種도 대단히 複雜하다. 따라서 TG를 分子種別로 分割 내지 分離하는 것은 거의 不可能하였으므로, TG를 構成하는 總脂肪酸 組成을 分析하여 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 등)에 立脚하여 統計의 方法으로 그 構成分

子種을 計算하여 왔다^{1, 2)}. 近來에 分析器機인 가스-液體 크로마토그래피-(gas-liquid chromatography, GLC)의 登場과 毛細管컬럼 (capillary column)의 耐熱성과 分離能의 向上으로, capillary-GLC가 여러 高沸點 化合物 分析에 利用되어 왔으며, Ag⁺-thin layer chromatography와 더불어 二重結合數와 總炭素數 (total carbon number)에 따라 TG를 構成 分子種別로 分離하는데 많이 利用되어 왔다³⁾. 또 極히 最近에는 octadecylsilane (ODS)-컬럼을 裝着한 逆相 HPLC (RP-HPLC)가 TG 分子種의 分離·分析에 利用되고 있는데⁴⁾, 여기에서 分子種이 溶出되는 順序가 partition number (PN, PN = TG의 acyl基의 總炭素數 - 2×acyl基의 總二重結合數)로 定義되는 parameter에 따라 決定되므로 TG의 分子種 分割에 利用되어 왔다. RP-HPLC는 cocoa butter나 palm oil과 같이 構成脂肪酸 組成이 比較的 單純한 TG의 分子種 分割에는 RP-HPLC가 아주 適合하다고 한다⁴⁾. 그러나 脂肪酸 組成이 複雜한 TG 分析에는 分子種의 PN이 重疊되어 分離되는 境遇가 많으므로, 各各의 分子種을 同定 또는 純粹하게 分割하기가 어렵고 特히 脂肪酸 組成이 複雜한 魚油나 牛乳脂肪의 境遇에는 더욱 그러하다고 한다^{5, 6)}. 이에 反하여 Ag⁺-chromatography는 炭素사슬의 二重結合과 Ag⁺과의 結合力的 差異에 따른 簡單한 原理에 따라 分子種을 分割하는 것이다⁷⁻¹¹⁾. 즉, 殘基에 存在하는 二重結合의 pi-電子가 Ag⁺과 可逆的인 極性 complex를 形成함으로써, 二重結合數가 增加하면 Ag⁺과의 complexity는 더욱 增加하여, retention time도 그 만큼 길어진다. Christie는 HPLC의 陽이온 交換樹脂인 NucleosilTM 5SA의 컬럼에 窒酸銀 溶液을 흘려 樹脂의 sulphone基에 Ag⁺을 結合시켜, 所謂 Ag⁺-HPLC 컬럼을 製作하였다. 그는 이 컬럼을 使用하여, 脂肪酸 메칠에스텔¹²⁻¹⁷⁾, 植物種子油¹⁸⁻²¹⁾와 魚油TG^{22, 23)}의 分析에 利用하여 二重結合數에 따라 重複됨이 없이 각 分子種을 純粹하게 分割하였다. 또 最近에 Joh는 이 컬럼을 利用하여 conjugate triene acid를 含有한 TG 分子種을 깨끗하게 分離한 바 있다²⁴⁾. 잣은 소나무과에 屬하는 잣나무 (Pinus koraiensis) 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, 韓國에서는 食用과 藥用的 材料로서 널리 利用되고 있다^{25, 26)}. 잣은 脂質 含量도 높으며 그 構成脂肪酸 組成은 매우 特異하다²⁷⁾. 즉, C_{18:20}6 (14.0%), C_{18:10}9 (26.9%)와 같은 不飽和脂肪酸이 92.6%나 含有되어 있음에도 不拘하고 抗酸化성이 매우 높다고 알려져 있고^{28, 29)}, 特히 注目할 것은 Δ^{5,9}-C_{18:2}, Δ^{5,9,12}-C_{18:3}, Δ^{5,11,14}-C_{20:3}와 같이 一般植物 種子油에서는 存在하지 않는 Δ⁵-non methylene interrupted conjugate double bond (Δ⁵-NMDB)를 가진 不飽和脂肪酸이 總脂肪酸의 17.9%나 含有되어 있다는 事實이다. 本 研究에서는 Δ⁵-NMDB를 含有하여 脂肪酸 組成이 複雜한 잣의 TG를 逆相-HPLC 및 Ag⁺-HPLC로 各 partition number 또는 二重結合數에 따라 分子種을 相互分割하고, 各 分割에서 얻은 TG의 構成脂肪酸을 分析하여 그 分子種을 確認하였다.

II. 材料 및 實驗方法

II-1. 材料, 粗脂質 抽出 및 TG 精製^{7, 30)}

1996년에 收穫한 江原道產 잣을 釜山國際市場에서 購入하여 後에 물로 씻고 잘 磨碎하여 Bligh & Dyer法³⁰⁾으로 粗脂質을 抽出하였고, 窒素 氣流下에서 殘溜溶媒를 除去하였다. 試料 粗脂質을 hexane-acetone (99.5 : 0.5, by vol)溶媒에 10 mg/mL되게 녹여, 그 1 mL를 이미 平衡化시켜둔 IsoluteTMSilica 컬럼에 吸着시키고, 上記 溶媒 20 mL로 不純物을 除去하였고, hexane-acetone (99 : 1, by vol) 30 mL로 TG를 純粹 分離하였다. 殘存 溶媒를 除去한 後 다음 實驗의 試料로 使用하였다.

II-2. 逆相-HPLC에 의한 TG의 分割²¹⁾

HPLC는 Hewlett-Packard의 quaternary solvent delivery system이 裝着된 Model 325를 使用하였으며, 컬럼은 Chromo SpherTMC18 (100 × 4.6 mm, thickness, 3μm, ChromPack, Boerhaaveplein, the Netherlands) 2個를 直列로 (in tandem) 連結하여 使用하였다. 檢出器는 Sedere (Alfortville, Cedex, France)의 Sedex Evaporative Light-Scattering Detector를 使用하였다. Dichloromethane-acetonitrile

(20 : 80, by vol) (A)와 dichloromethane-acetonitrile (30 : 70, by vol) (B)의 溶媒系를 使用하여 TG를 分離하였다. 즉, 처음에는 100% 溶媒 A를 20分 동안 흘렸고, 다음에는 30分에 걸쳐 溶媒 B가 100% 되도록 linearly gradient시켰으며 이 溶媒로 마지막 5分間 더 展開하였다. 이때 Stream-splitter (Supelco社의 3-way valve를 購入하여, 若干 加工하여 使用하였다)를 HPLC의 컬럼 出口과 檢出器 入口 사이에 附着하였으며, 分取比率를 80%로 하여 各 分割을 分取하였다. 컬럼溫度는 18℃로 調節하였고 流速은 1.0 mL/min으로 維持하였다. 試料를 dichloromethane에 10~12 mg/mL의 濃度가 녹여, 그 10 μ L를 試料의 1回 注入量으로 하였다.

II-3. Ag⁺-HPLC에 의한 TG의 分割²¹⁾

HPLC의 運搬系 (delivery system)와 檢出器는 逆相 HPLC 項에 言及한 바와 같았으며, Ag⁺-컬럼으로는 著者가 Nucleosil 100-5SA (HiChrom, Reading, UK)에 直接 銀이온을 吸着시켜 만든 것을 使用하였다. TG를 1, 2-dichloroethane-dichloromethane (1 : 1, by vol) (A), 100% acetone (B)와 acetone-acetonitrile (9 : 1, by vol) (C)의 溶媒系로 linear gradient로 分離하였다. 즉, 移動相으로 100% 溶媒 A를 5分間 흘린 다음에 80分 後에는 溶媒 A, 溶媒 B와 溶媒 C의 比率이 20 : 50 : 30 (by vol)이 되도록 調節하였다. 그 後 5分 동안 더 흘리면서 溶媒 B와 溶媒 C의 마지막 比率이 50 : 50 (by vol)되도록 하였다. 컬럼은 18℃로 維持시켰고 流速은 0.8 mL/min으로 調節하였으며, 試料 (10~12 mg)를 1 mL의 1, 2-dichloroethane에 녹여 1回에 그 10 μ L를 取하여 injector에 注入하였다.

II-4. 脂肪酸의 分析³⁾

試料의 脂肪酸은 sodium methoxide法으로 메칠에 스텔화 하였다. 즉, TG (1~2 mg)를 10 mL용 마개 달린 試驗管에 옮기고, 여기에 0.05% BHT-hexane (100 μ L)를 넣어 試料를 녹인 다음 1M sodium methoxide-methanol (50 μ L)과 methyl acetate (50 μ L)를 加하여 잘 흔들어서 섞은 뒤 常

溫에서 5分間 反應시켰다. 反應液에 氷醋酸 1~2 방울을 加하여 反應을 停止시킨 後 餘分의 試藥을 N₂ 氣流下에서 除去하였다. 여기에 hexane (3 mL)과 H₂O (3 mL)를 加하여 vortex mixer로 잘 섞은 뒤 脂肪酸 메칠에스텔 (methyl ester, FAME)를 hexane層으로 移行시키고, 水層에 다시 hexane (3 mL)을 加하여 殘存하는 FAME를 完全히 hexane層으로 回收하였다. 모은 hexane層에서 溶媒를 除去하여 얻어진 FAME 混合物을 Florisil™ 컬럼에 吸着시켜 hexane:acetone (99 : 1, by vol)으로 純粹한 FAME를 分離시켰다. FAME 分析은 Hewlett Packard 5890 II capillary gas chromatograph로 하였으며, 이때 使用한 컬럼은 Carbowax 20M (Hewlett-Packard, Orlando, FL, USA)가 塗抹 (coating)된 fused silica 컬럼 (25 m \times 0.20 mm, i.d., thickness 25 μ m)이었다. 컬럼溫度를 175℃에 3分間 維持한 後 205℃까지 4℃/min로 昇溫시켰고, 205℃에서 30分間 더 維持하도록 設定하였다. 注入口 (injection port)와 檢出器의 溫度는 230℃이었으며, 使用하는 檢出器는 flame ionization detector (FID)이었고, 移動相인 運搬가스 (carrier gas)로는 H₂를 使用하였다.

III. 結果 및 考察

잣 種子油에서 純粹하게 分離한 TG의 脂肪酸 組成은 Table 1에 나타낸 바와 같으며, 이미 發表된 잣의 總脂質의 脂肪酸 組成^{28, 31-35)}과 매우 비슷하므로 TG가 잣 種子油의 主成分임을 알 수 있었다. 試料의 脂肪酸 組成을 보면 linoleic acid (46.2 mol%)와 oleic acid (25.6 mol%)가 不飽和 脂肪酸이 主된 脂肪酸이었으며, 飽和脂肪酸으로 palmitic acid (4.8 mol%)와 stearic acid (2.0 mol%)가 少量 含有되어 있었다. 特히 興味로운 것은 相當量의

Δ^5 -NMDB 脂肪酸의 存在인데, 그 중 $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3} (pinolenic acid)는 16.0 mol%로 第一 含量이 높았으나, $\Delta^{5,9}$ -C_{18:2} (taxoleic acid)와 $\Delta^{5,11,14}$ -C_{20:3} (sciadonic acid)도 各各 2.3 mol%, 0.8 mol% 含有되어 있었다. 소나무科 種實油³⁶⁾를 爲始하여 銀

(20 : 80, by vol) (A)와 dichloromethane-acetonitrile (30 : 70, by vol) (B)의 溶媒系를 使用하여 TG를 分離하였다. 즉, 처음에는 100% 溶媒 A를 20分 동안 흘렸고, 다음에는 30분에 걸쳐 溶媒 B가 100% 되도록 linearly gradient시켰으며 이 溶媒로 마지막 5分間 더 展開하였다. 이때 Stream-splitter (Supelco社의 3-way valve를 購入하여, 若干 加工하여 使用하였다)를 HPLC의 컬럼 出口과 檢出器 入口 사이에 附着하였으며, 分取比率를 80%로 하여 各 分劃을 分取하였다. 컬럼溫度는 18℃로 調節하였고 流速은 1.0 mL/min으로 維持하였다. 試料를 dichloromethane에 10~12 mg/mL의 濃度가 겨 녹여, 그 10 μ L를 試料의 1回 注入量으로 하였다.

II-3. Ag⁺-HPLC에 의한 TG의 分劃²¹⁾

HPLC의 運搬系 (delivery system)와 檢出器는 逆相 HPLC 項에 言及한 바와 같았으며, Ag⁺-컬럼으로는 著者가 Nucleosil 100-5SA (HiChrom, Reading, UK)에 直接 銀이온을 吸着시켜 만든 것을 使用하였다. TG를 1, 2-dichloroethane-dichloromethane (1 : 1, by vol) (A), 100% acetone (B)와 acetone-acetonitrile (9 : 1, by vol) (C)의 溶媒系로 linear gradient로 分離하였다. 즉, 移動相으로 100% 溶媒 A를 5分間 흘린 다음에 80分 後에는 溶媒 A, 溶媒 B와 溶媒 C의 比率이 20 : 50 : 30 (by vol)이 되도록 調節하였다. 그 後 5分 동안 더 흘리면서 溶媒 B와 溶媒 C의 마지막 比率이 50 : 50 (by vol)되도록 하였다. 컬럼은 18℃로 維持시켰고 流速은 0.8 mL/min으로 調節하였으며, 試料 (10~12 mg)를 1 mL의 1, 2-dichloroethane에 녹여 1회에 그 10 μ L를 取하여 injector에 注入하였다.

II-4. 脂肪酸의 分析³⁾

試料의 脂肪酸는 sodium methoxide法으로 메칠에 스텔화 하였다. 즉, TG (1~2 mg)를 10 mL용 마 개 달린 試驗管에 옮기고, 여기에 0.05% BHT-hexane (100 μ L)를 넣어 試料를 녹인 다음 1M sodium methoxide-methanol (50 μ L)과 methyl acetate (50 μ L)를 加하여 잘 흔들어서 섞은 뒤 常

溫에서 5分間 反應시켰다. 反應液에 冰醋酸 1~2 방울을 加하여 反應을 停止시킨 後 餘分의 試藥을 N₂ 氣流下에서 除去하였다. 여기에 hexane (3 mL)과 H₂O (3 mL)를 加하여 vortex mixer로 잘 섞은 뒤 脂肪酸 메칠에스텔 (methyl ester, FAME)를 hexane層으로 移行시키고, 水層에 다시 hexane (3 mL)을 加하여 殘存하는 FAME를 完全히 hexane層으로 回收하였다. 모은 hexane層에서 溶媒를 除去하여 얻어진 FAME 混合物를 Florisil™ 컬럼에 吸着시켜 hexane:acetone (99 : 1, by vol)으로 純粹한 FAME를 分離시켰다. FAME 分析은 Hewlett Packard 5890 II capillary gas chromatograph로 하였으며, 이때 使用한 컬럼은 Carbowax 20M (Hewlett-Packard, Orlando, FL, USA)가 塗抹 (coating)된 fused silica 컬럼 (25 m \times 0.20 mm, i.d., thickness 25 μ m)이었다. 컬럼溫度를 175℃에 3分間 維持한 後 205℃까지 4℃/min로 昇溫시켰고, 205℃에서 30分間 더 維持하도록 設定하였다. 注入口 (injection port)와 檢出器의 溫度는 230℃이었으며, 使用하는 檢出器는 flame ionization detector (FID)이었고, 移動相인 運搬가스 (carrier gas)로는 H₂를 使用하였다.

III. 結果 및 考察

잣 種子油에서 純粹하게 分離한 TG의 脂肪酸 組成은 Table 1에 나타낸 바와 같으며, 이미 發表된 잣의 總脂質의 脂肪酸 組成^{28, 31~35)}과 매우 비슷하므로 TG가 잣 種子油의 主成分임을 알 수 있었다. 試料의 脂肪酸 組成을 보면 linoleic acid (46.2 mol%)와 oleic acid (25.6 mol%)가 不飽和 脂肪酸이 主된 脂肪酸이었으며, 飽和脂肪酸으로 palmitic acid (4.8 mol%)와 stearic acid (2.0 mol%)가 少量 含有되어 있었다. 特히 興味로운 것은 相當量의

Δ^5 -NMDB 脂肪酸의 存在인데, 그 중 $\Delta^{5,9,12}$ -C_{18:3} (pinolenic acid)는 16.0 mol%로 第一 含量이 높았으나, $\Delta^{5,9}$ -C_{18:2} (taxoleic acid)와 $\Delta^{5,11,14}$ -C_{20:3} (sciadonic acid)도 各各 2.3 mol%, 0.8 mol% 含有되어 있었다. 소나무科 種實油³⁶⁾를 爲始하여 銀

Table 2. Fatty Acid Composition (mol% of the Total Fatty Acid and Proportions of Triacylglycerol Fractions Obtained by Reverse-phase HPLC from the Seed Oil of *P. Koraiensis* by Ag⁺-HPLC

Fatty acid	Total TG(%)	Fraction																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
C _{16:0}	4.8						29.0	27.2	11.1		12.8		19.3		39.1	17.8		20.4
C _{18:0}	2.0							9.3					18.6			16.9		17.0
C _{18:1ω9}	25.6			0.5	26.3	25.2			33.4	35.6	41.3	64.7	17.8	62.0	32.8	20.7	93.5	41.3
Δ ^{5,9,12} -C _{18:2}	2.3					9.0										10.2		3.5
C _{18:2ω6}	46.2	64.3	67.3	95.9	42.2	44.7	33.1	40.2			64.4	28.4		26.5	34.5	28.0	16.9	21.3
Δ ^{5,11,14} -C _{18:3}	16.0	35.2	32.7		21.0	28.6	28.2	32.7	55.6			17.6	35.3	17.9				14.2
C _{18:3ω6}	0.5	0.3	0.1		0.5	0.2												
C _{18:3ω3}	0.2	0.2	0.1		0.3	0.3												
C _{20:0}	0.3																1.6	3.5
C _{20:1ω9}	0.9													3.4				3.0
C _{20:2ω6}	0.5			0.2	0.2	1.0	0.5											1.7
Δ ^{5,11,14} -C _{20:3}	0.8			3.4	0.5													
		3.0	15.0	8.0	6.9	5.3	1.5	2.3	3.9	11.9	9.6	2.7	4.7	7.5	5.1	1.8	6.8	4.0
PN*		40	40	42	42	42	42	42	44	44	44	44	44	46	46	48	48	48

* DB : total double bond number in the acyl chains of a TG molecule

5개의 fraction으로 나누어져 分離되었다. Table 1에서 알 수 있듯이 fraction 1과 2는 모두가 (C_{18:2ω6})₂Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 分子만으로 構成되어 있는데, 이들을 立體特異的 分析(stereospecific analysis)을 한 結果 fraction 1에는 sn-1-C_{18:2ω6}, sn-2-Δ^{5,9,12}-C_{18:3}, sn-3-C_{18:2ω6}의 分子種이, fraction 2에는 sn-1-C_{18:2ω6}, sn-2-C_{18:2ω6}, sn-3-Δ^{5,9,12}-C_{18:3}이 主된 組成임을 알 수 있었다 (data 省略). 이와 같이 逆相 HPLC에서 TG의 位置 異性가 相互分離되는 것은 매우 興味로우며, 뒤에 溶出되는 여러 fraction에서도 이런 現象을 볼 수 있다. Fraction 3의 分子種은 (C_{18:2ω6})₃이 大部分이었으나, (C_{18:2ω6})₂/Δ^{5,11,14}-C_{20:3}의 分子種도 少量 檢出되었다. Fraction 4와 5는 相互分離가 잘 이루어지지 않았으나, 前者의 fraction에는 C_{18:1ω9}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}/C_{18:2ω6}와 少量의 (C_{18:2ω6})₂/Δ^{5,9}-C_{18:2}의 分子種이 包含되어 있었으며, 後者の fraction에는 C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 分子種이 各各 存在하였다. Fraction 6과 7에는 C_{16:0}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}로 構成된 分子種으로 fraction 6에는 C_{18:0}/(Δ^{5,9,12}-C_{18:3})₂의 分子種도 存在하였다. Fraction 8과 9는 分離가 좋지 않아 앞 分割의 正確한 end-point을 알 수 없어 2分割 모두에 서로가

overlap되어 있었다. 前者에는 C_{16:0}/C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}의 分子種이 後者에는 (C_{18:2ω6})₂/C_{18:2ω9}이 主要한 分子種이었다. Fraction 10과 11도 겹쳐져 서로 分離하기가 困難하였으며, fraction 10에는 C_{16:0}/C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}의 分子種 外에 fraction 11의 成分인 (C_{18:1ω9})₂/C_{18:2ω6}의 分子種도 混在하고 있었다. Fraction 12에는 C_{18:0}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}와 C_{16:0}/C_{18:1ω9}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 分子種이 存在하였고, fraction 13에는 主成分인 (C_{18:1ω9})₂/C_{18:2ω6} 外에 微量의 C_{20:1ω9}/(C_{18:2ω6})₂도 檢出되었다. Fraction 14에는 매우 純粹한 分割으로 C_{16:0}/C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}의 分子種을 含有하고 있었으나, fraction 15의 分子種은 매우 複雜하였으며, 脂肪酸 組成으로부터 C_{18:0}/C_{18:1ω9}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}, C_{16:0}/C_{18:1ω9}/Δ^{5,9}-C_{18:2}, (C_{16:0})₂/C_{18:2ω6}, C_{18:0}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9}-C_{18:2}, C_{18:0}/(C_{18:2ω6})₂, C_{18:0}/(Δ^{5,9}-C_{18:2})₂, C_{20:0}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}와 C_{20:2ω6}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}와 같은 分子種이 存在한다고 생각된다. Fraction 16에는 (C_{18:1ω9})₃ 外에 少量의 C_{20:1ω9}/C_{18:1ω9}/Δ^{5,9}-C_{18:2}가 存在하고 있었으나, fraction 17에는 C_{16:0}/(C_{18:1ω9})₂, C_{18:0}/C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}와 C_{20:0}/(C_{18:2ω6})₂가 主要한 分子種이었다. 한편 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 2分割 모두에 서로가

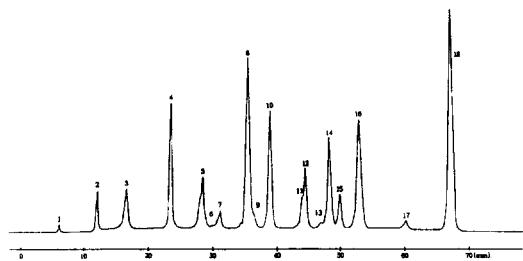


Fig. 2. Fractionation of the TGS form the seed oil of *P. koraiensis* by Ag^+ -HPLC

HPLC로 각 분획間에 overlap됨이 없이 16개의 분획으로 나눌 수 있었다. 각 분획에 内部標準物인 nona-decanoate (C19:0)를 一定量 넣어 메칠에스텔화한 後, 分析한 脂肪酸 組成 (mol%)에 各分획의 mole 分率을 곱하여 算出하여 再構成한 TG (recombined TG)의 脂肪酸 組成이 加水分解 前의 純粹한 (intact) TG의 그것과 대단히 잘 一致하였다 (Table 2). 이와 같이 Ag^+ -HPLC가 Δ^5 -NMDB 脂肪酸을 含有한 TG를 分析할 때 分解 또는 會合 등의 副作用을 일으키지 않고, 逆相-HPLC보다 各分子種의 分離能 (resolution)이 좋으므로 Ag^+ -HPLC는 Δ^5 -NMDB 脂肪酸-TG 分析에 아주 適合하다고 하겠다. Fraction 1에서는 二重結合數가 2개인 C16:0(C18:1ω9)₂가 주된 分子種이며 이 外에 C18:0/(C18:1ω9)₂, C20:0/(C18:1ω9)₂ 및 C16:0/(C20:1ω6)₂와 같은 分子種도 存在하고 있었다. Fraction 2와 3에는 二重結合數가 3개인 分子種이 分離되었는데, 前者에는 simple TG인 (C18:1ω9)₃가 大部分을 차지하고 있었으나 分子種 (C20:1ω9)₃도 少量 檢出되었으며, 後者의 分劃에서는 C16:0/C18:2ω6/C18:1ω9가 主要한 分子種이었고 그 다음으로 分子種 C18:0/C18:2ω6/C18:1ω9도 存在하고 있었다. 여기에서 tri-monoenes (triolein과 trigondoin)이 palmitoyl-oleoyl-linoleate보다 빨리 溶出됨을 알 수 있는데, 이는 一定한 數의 二重結合이 acyl基에 고루 分布되어 있는 TG分子가 어느 特定한 acyl基에 偏重되어 있는TG보다 컬럼내의 Ag^+ 와 結合력이 작으므로, 前者의 TG 分子種이 그 만큼 分離時間이 짧았다는 研究結果와도 잘 一致한다^{5, 44)}. Fraction 4의 主된 分子種은 (C18:1ω9)₂/C18:2ω6이고 또 微量으로 存在하는 (C18:1ω9)₂ $\Delta^{5,9}$ -C18:2는 peak

에 보이지 않지만 分劃 後半部에서 溶出된 것 같다. Fraction 5에는 分子種 C16:0/(C18:2ω6)₂ 外에 C18:0/(C18:2ω6)₂와 C20:0/(C18:2ω6)₂같은 分子種도 少量 存在하였고, C16:0/ $\Delta^{5,9}$ -C18:2/ $\Delta^{5,9,12}$ -C18:3도 微量 檢出되었다. Fraction 6에 存在하는 主要한 分子種은 C16:0/C18:1ω9/ $\Delta^{5,9,12}$ -C18:3이었으며 少量으로 C18:0/(C18:1ω9/ $\Delta^{5,9,12}$ -C18:3)도 存在하였다. Fraction 7과 8을 分劃할 때 正確한 end-point를 決定하기가 대단히 어려웠으며, fraction 7의 分子種은 매우 複雜하였으며 그 TG 分子의 比率은 12.8 mole%로 全體의 2番째로 많은 比率이었다. 그 主要한 分子種은 C18:1ω9/(C18:2ω6)₂이었으며, C20:1ω9/(C18:2ω6)₂, (C18:1ω9)₂/ $\Delta^{5,11,14}$ -C20:3와 $\Delta^{5,9}$ -C18:2/C20:1ω9/C18:2ω6의 分子種도 存在하였으며 後者의 2分子種은 chromatogram의 앞쪽에 나타나는 shoulder部分에 該當하는 것으로 생각된다. Fraction 8에는 여러 分子種이 混在하여 있으며 重要한 分子種은 C16:0/C18:2ω6/C18:3ω3와 (C18:1ω

Table 3. The Main Molecular Species of Triacylglycerols of the Seed Oil of *P. koraiensis* as resolved by Ag^+ -HPLC(mol%)

fraction no.	species	amount
1	PO ₂ , SO ₂	0.5
2	O ₃ , GO ₃	5.1
3	POL, SOL	6.3
4	OL, O ₂ T _n , G _ω L, G _ω T _n	7.8
5	SL ₂ , PL ₂	6.4
6	POP _i , SOP _i	1.7
7	POP _i , SOP _i	1.9
8	OL ₂	12.8
9	OLT _n	1.4
10	O ₂ P _i	8.4
11	SLP _i	4.1
12	PLP _i	4.4
13	L ₃	0.9
14	L ₃	7.9
15	L ₂ T _n	3.5
16	OLP _i	10.9
17	L ₂ S _c	1.1
18	L ₂ P _i	14.8

P : Palmitic acid(C16:0)
 Go : Gondoic acid(C20:1ω9)
 O : Oleic acid(C18:1ω9)
 Ta : Taxoleic acid($\Delta^{5,9}$ -C18:2)
 L : Linoleic acid(C18:2ω6)
 Pi : Pinolenic acid($\Delta^{5,9,12}$ -C18:3)
 S : Stearic acid(C18:0)
 Sc : Sciadonic acid($\Delta^{5,11,14}$ -C20:3)

9)/C_{18:3ω3}이었다. Fraction 9에는 대단히 純粹한 (C_{18:1ω9})₂/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}가 存在하였으며, fraction 10과 11은 分離가 좋지 않았으나, 前者에는 C_{16:0}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}와 C_{18:0}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 分子가 거의 같은 量 存在하였으며, 後者에는 C_{16:0}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}가 主成分임을 推測할 수 있다. Fraction 12에서는 trilinolein인 (C_{18:2ω6})₃이 純粹하게 分離되었으며, fraction 13에는 分子種 Δ^{5,9}-C_{18:2}/(C_{18:2ω6})₂이 分離되었다. Fraction 14의 分子種은 各各 C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}으로 全體 TG의 約 11%나 되었고, fraction 15와 16의 分子種은 (C_{18:2ω6})₂/Δ^{5,11,14}-C_{20:3}와 (C_{18:2ω6})₂/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}으로, 後者は 全體 TG 分子中에 제일 많은 比率를 차지하고 있었다. 앞의 2分割에서 보는 바와 같이 Δ^{5,11,14}-C_{20:3}가 結合한 分子種의 retention time이 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 境遇보다 짧은 것은 다음과 같이 說明할 수 있다. 즉 2 分子種의 (C_{18:2ω6})₂/Δ^{5,11,14}-C_{20:3}와 (C_{18:2ω6})₂/Δ^{5,9,12}-C_{18:3}에서 Δ^{5,11,14}-C_{20:3}의 acyl基 炭素의 6番과 11番 사이에 2개의 ethyl基가 存在하나, Δ^{5,9,12}-C_{18:3}의 境遇에는 炭素의 6番과 9番 사이에 1개의 ethyl基가 存在함으로 二重結合의 π-電子가 前者보다 後者에 더 非分極化(delocalized)되어 있어, 後者인 Δ^{5,9,11}-C_{18:3}가 前者인 Δ^{5,11,14}-C_{20:3}보다 Ag⁺에 대한 親和力(affinity)을 나타내어 그 만큼 머무름 時間(retention time)이 길어 진다고 생각할 수 있다. 各 fraction의 重要한 分子種은 Table 3에 表示한 바와 같다. 上記의 2가지 HPLC의 方法으로 Δ⁵-NMDB 脂肪酸이 存在하는 TG의 分子種을 分析한 結果를 보면, Ag⁺-HPLC의 分離能이 逆相-HPLC에 比하여 比較的 優秀하여 보다 깨끗한 分割을 얻을 수 있었다. 上記의 어느 한 方法과 서로 補充的인 器機分析法이 並行된다면 보다 純粹히 分子種을 分割하여 그 構造를 明確히 確認할 수 있을 것으로 期待된다.

IV. 結論

잣의 脂質은 大部分 트리아실글리세롤로 構成되어

있으며 그 構成脂肪酸을 보면 linoleic acid (C_{18:2ω6})와 oleic acid (C_{18:1ω9})가 各各 46.2 mol% 와 25.6 mol% 含有되어 있었고, 그 다음으로 Δ^{5,9,12}-C_{18:3}가 16.0 mole% 含有되어 있었고, 이 外 Δ⁵-non methylene interrupted conjugate double bond (Δ⁵-NMDB)基를 가진 Δ^{5,9}-C_{18:2} (2.3 mol%)와 Δ^{5,11,14}-C_{20:3} (0.8 mol%)도 檢出되었으며, 飽和脂肪酸으로는 palmitic acid (4.8 mol%) 以外에 stearic acid (2.0 mol%), arachidic acid (0.3 mol%)도 檢出되었으나 그 全含量은 8.0 mol% 以下였다. 잣의 TG의 分子種은 逆相-HPLC上에서 PN 40~48에 該當하는 17個의 分割으로 Plattner의 公式에서 주어지는 PN에 따라 分離되었으나, Δ⁵-NMDB基를 가진 分子種은 그 溶離順序(elution order)에 있어서 Δ⁹-double bond를 가진 脂肪酸으로 構成된 分子種 보다 늦게 溶出되는 等 重複되는 分割이 많았다. 銀이온-HPLC로 分子種을 二重結合數에 따라 14個의 分割으로 나눌 수 있었으나, Δ^{5,9,12}-C_{18:3} 脂肪酸은 銀이온과 結合力에서 Δ^{9,12,15}-C_{18:3}과 C_{18:2ω6} (Δ^{9,12}-C_{18:2})의 脂肪酸의 中間 程度의 크기였다. 또 Ag⁺-HPLC에 있어서 주어진 二重結合數를 가진 分子種에서, 二重結合이 3個의 acyl基에 고루 分散되어 있는 分子種이 한 acyl基에 偏在해 있는 分子種 보다 그 retention time이 훨씬 짧았다. 主要한 分子種은 (C_{18:2ω6})₂/Δ^{5,9,12}-C_{18:3} (14.8 mol%), C_{18:1ω9}/(C_{18:2ω6})₂ (12.8 mol%)와 C_{18:1ω9}/C_{18:2ω6}/Δ^{5,9,12}-C_{18:3} (10.9 mol%)이었다.

謝辭

本 研究는 1997年度 韓國科學財團에서 支援한「核心專門研究」課題(課題番號KOSEF 971-0604-022-1)로 이루어진 것이며, 著者는 韓國科學財團 關係者諸位에게 깊은 謝意를 表하는 바입니다.

引用文獻

1. Hilditch, T. P. and Williams, P. N., *The Chemical Constitution of Natural Fats* (4thed.), John Wiley & Sons, New York, 1964.
2. Brockerhoff, H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 586 (1965).
3. Christie, W. W., *Gas Chromatography and Lipids*, pp. 68-69, the Oily Press, Ayr, 1989.
4. Christie, W. W., *High-Performance Liquid Chromatography and Lipids*, pp. 172-210, Pergamon Press, Oxford, 1987.
5. Christie, W. W., *Prog. Lipid Res.*, **33**, 9 (1994).
6. Christie, W. W., Nikolova-Damyanova, B., Laakso, P., and Herslof, B., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **10**, 695 (1991).
7. Joh, Y.-G., Brechany, E. Y., and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 707 (1995).
8. Takagi, T., Itabashi, Y., Ota, T., and Hayashi, K., *Lipids*, **11**, 354 (1976).
9. Spencer, G. F., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 642 (1979).
10. Plattner, R. D. and Spencer, G. F., *Lipids*, **18**, 68 (1983).
11. Challinor, C. J., Hamilton, R. J., and Simpson, K., *Chem. Phys. Lipids*, **3**, 145 (1969).
12. Christie, W. W., Brechany, E. Y., and Stefanov, K., *Chem. Phys. Lipids*, **46**, 127 (1988).
13. Stefanov, K., Konaklieva, M., Brechany, E. Y., and Christie, W. W., *Phytochem.*, **27**, 3495 (1988).
14. Christie, W. W., Brechany, E. Y., and Shukla, V. K. S., *Lipids*, **24**, 116 (1989).
15. Christie, W. W. and Breckenridge, G. H. M., *J. Chromatogr.*, **469**, 261 (1989).
16. Christie, W. W., Brechany, E. Y., Stefanov, K., and Popov, S., *Lipids*, **27**, 640 (1992).
17. Gunstone, F. D., *Advances in Lipid Methodology-2* (ed. by Christie, W. W.), pp. 1-68, The Oily Press, Dundee, 1993.
18. Christie, W. W., *J. Chromatogr.*, **454**, 273 (1988).
19. Nikolova-Damyanova, B., Christie, W. W., and Herslof, B., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 503 (1990).
20. Christie, W. W., *Fat Sci. Technol.*, **93**, 65 (1991).
21. Santinelli, F., Damiani, P., and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 552 (1992).
22. Laakso, P. and Christie, W. W., *Lipids*, **25**, 349 (1990).
23. Laakso, P. and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 213 (1991).
24. Joh, Y. -G., Kim, S. -J., and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 1037 (1995).
25. 李昌福, *藥用植物圖鑑*, 農村振興廳, p. 7, 서울, 1971.
26. 李昌福, *韓國植物圖鑑*, 鄉文社, p. 61, 서울, 1979.
27. Kim, S. -J., Thesis for Master Degree submitted to Dong-A University,
28. 金成真, 金智修, 李民玉, 趙鏞桂, *韓國油化學會誌*, **9**(2), 149 (1992).
29. Plattner, R. D., Spencer, G. F., and Kleiman, R., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 511 (1977).
30. Bligh, E. G. and Dyer, W. J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959)
31. Takagi, T., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 516 (1964).
32. Wolff, R. L. and Bayard, C. C., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 1043 (1995).
33. Wolff, R. L., Deluc, L. G., and Marpeau, A. M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 765 (1996).
34. Takagi, T. and Itabashi, Y., *Lipids*, **17**, 716 (1982).

35. Gresti, J., Mignerot, C., Bezar, J., and Wolff, R. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 1539 (1996).
36. Jamieson, G. R. and Reid, E. H., *Phytochem.*, **11**, 269 (1972).
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. Becker, C. C., Rosenquist, A., and Hoelmer, G., *Lipids*, **28**, 147 (1993).
40. Davidoff, F. and Korn, E. C., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **9**, 54 (1962).
41. 趙鏞桂, 禹孝京, 金訓淑, *韓國油化學會誌*, **14**(1), 61 (1997).
42. Svensson, L., Sisfontes, L., Nyborg, G., and Blomstrand, R., *Lipids*, **17**, 50 (1982).
43. Joh, Y. G., Woo, H. K., and Kim, S. J., *Abstract, the 89th American OilChemical Societys' Annual Meeting & Expo*, May 10-13, p. 81 (1998).
44. Nikolova-Damyanova, B., Herslof, B., and Christie, W. W., *J. Chromatogr.*, **609**, 133 (1992).