

상용하는 식물성 기름에서 지질과산화의 독성물질
4-hydroxy-2-alkenals 정량

서정희 · 권훈정*
 서울대학교 식품영양학과

Quantification of 4-Hydroxyalkenals in Oils Consumed in Korea

Jeonghee Surh and Hoonjeong Kwon*

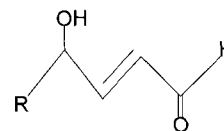
Department of Food and Nutrition, Seoul National University,

4-Hydroxyalkenals are cytotoxic aldehydes generated by the oxidation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. To evaluate the potential risk of 4-hydroxyalkenals on Koreans, quantitative data of various oils are necessary. Simultaneous monitoring of 4-hydroxyhexenal and 4-hydroxynonenal in 39 samples including new and used ones through single ion monitoring mode of GC/MS detected both aldehydes in all samples tested, ranging from 0.21 to 26.9 nmol/g for 4-hydroxy-2-hexenal and 0.06 to 56.6 nmol/g for 4-hydroxy-2-nonenal. Frying oils collected from local markets showed 2.28-7.90 and 8.31-30.5 nmol/g of 4-hydroxyhexenal and 4-hydroxynonenal, respectively. National health and nutrition survey data were employed to determine the exposure effect to these 4-hydroxyalkenals from the four most consumed oils in Korea. Daily exposures to hydroxyalkenals excluding possible exposure from fried food were 1.9 µg from soybean oil, 0.5 µg from sesame oil, 0.2 µg from corn oil, and 0.1 µg from perilla oil. Due to the increasing consumption of polyunsaturated fatty acids in Korea, these data may provide valuable information for evaluating possible physiological effects of 4-hydroxyalkenals from vegetable oils.

Key words: lipid peroxidation, 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), 4-hydroxy-2-hexenal (HHE), vegetable oils

서 론

4-hydroxy-2-alkenals(Fig. 1)는, DHA(22:6, n-3), 아라키돈산(20:4, n-6), 리놀렌산(18:3, n-3), 리놀레산(18:2, n-6) 등의 n-3와 n-6 계열의 지방산이 효소적 혹은 비효소적으로 산화되는 과정 중에 형성되어지는 독성 알데히드로 알려져 있다⁽¹⁻⁸⁾. Turner 등⁽⁹⁾은 1981년 스페인에서 발생한 Toxic Oil Syndrome(TOS)의 원인이었던 유지 시료들에서 검출된 4-hydroxy-2-nonenal(HNE) 함량과 독성과의 상관관계를 보고함으로써 HNE가 TOS의 원인 물질들 중의 하나임을 보여 주었다. 이로써 지질을 포함하는 식품 및 생물학적 수준에서 이 알데히드의 검출방법과 독성에 대한 연구가 진행되어 왔다⁽¹⁰⁻¹⁵⁾. 4-hydroxy-2-alkenals는 단백질, DNA 등의 친핵성 생체 고분자들과 Schiff base 반응 혹은 Michael addition 반응을 통해 adduct를 쉽게 형성함으로써, 약물대사 효소 체계인



R = C₂H₅: 4-hydroxy-2-hexenal, HHE
 R = C₅H₁₁: 4-hydroxy-2-nonenal, HNE

Fig. 1. Structures of 4-hydroxy-2-alkenals.

CytP450을 포함한 세포 내 효소들의 활성억제, 단백질과 DNA 합성억제 및 적혈구 용해를 포함한 넓은 범위의 생물학적 독성을 보이므로, 이 물질을 산화 정도에 대한 표지물질(marker)로 평가하는 것은 중요하다^(2,16-18). 특히, 이러한 알데히드 중에서 4-hydroxy-2-nonenal(HNE)는 n-6 지방산의 산화로부터, 4-hydroxy-2-hexenal(HHE)은 n-3 지방산의 산화로부터 각각 형성되므로, malondialdehyde(MDA)와 달리 각 계열 지방산의 산화 안전성을 평가하는 특이적 지표로 사용될 수 있다^(2,4).

Lang 등⁽¹⁾은 생체 시료와 지질을 포함한 식품 내에서 HNE를 정량적으로 분석하는 방법을 고안하여 상용하는 일부 유지와 튀긴 육류에 적용하여 HNE를 검출하였다. 또한 최근의 일부 연구에서는 HNE 함량과 산화를 측정하는 다른 방

*Corresponding author : Hoonjeong Kwon, Department of Food and Nutrition, Seoul National University, San 56-1, Shillim-dong, Kwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
 Tel: 82-2-880-6835
 Fax: 82-2-884-7555
 E-mail: hjkwon@snu.ac.kr

법들과의 상관성을 보여 줌으로써, HNE를 n-6 지방산이 풍부한 식품의 품질을 평가하는 믿을 만한 지표로 제시하였고, 이를 저장기간동안의 생선과 육류의 산화정도를 평가하는데 적용 하였다⁽¹⁹⁻²¹⁾. 4-hydroxy-2-alkenals는 친핵성 물질과의 반응성으로 생리상태에서는 생체 분자와 결합상태로 존재하므로 단백질 adduct 및 DNA adduct를 산화의 지표물질로 측정하였으나, 식품에서 문제가 되는 것은 유리 상태의 4-hydroxy-2-alkenals이므로 지질을 포함하는 식품에서는 유리 상태의 HNE를 지표물질로 선정하여 산화를 평가하였다^(1,16,18-22).

유지 지방산의 대부분을 구성하는 n-3나 n-6 지방산은 생리활성에도 불구하고 구조적으로 산화에 매우 불안정하므로, 이 계열 지방산 산화에 특이적인 4-hydroxy-2-alkenal을 지표 물질로 선정하여 유지의 산화 안전성을 평가하여야 한다. 따라서, 본 연구에서는 리놀레산과 리놀렌산 등의 고도불포화 지방산을 다량 함유하고 있는 상용 식물성 기름을 수거하여 HHE와 HNE를 정량 함으로써 이 식품군으로부터 한국인의 4-hydroxy-2-alkenals의 노출량을 추정하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

한국인이 상용하는 식물성 기름인, 참기름(n=10), 들기름(n=9), 올리브유(n=3), 옥수수유(n=3), 콩기름(n=2), 고추씨기름(n=2), 해바라기유(n=1), 홍화유(n=1), 채종유(n=1), 현미유(n=1) 등을 슈퍼마켓에서 새로 구입한 것, 가정에서 현재 사용 중인 것 (사용기간은 시료에 따라 참기름은 1개월에서 1년 미만, 들기름은 3개월에서 6개월 미만, 올리브유는 1년과 3년, 옥수수유는 1개월 미만, 콩기름 1개월 미만), 가정에서 사용 중에 있으나 유통기한을 넘긴 것(유통기간으로부터 3개월 경과) 들을 포함하여 수거하였다. 참기름과 들기름의 경우에는 지역적 제조·소비하는 빈도가 높으므로, 이를 고려하여 대규모 공정에 의해 제조·유통되는 다른 유지류에 비해 시료의 수거 범위를 넓혀 슈퍼마켓에서 시판되는 것 뿐만 아니라 재래시장에서 제조한 것들도 포함시켜 수집하였다. 또한 고온으로 가열되는 튀김 기름의 산화 정도를 평가하기 위해, 시장에서 튀김에 직접 사용 중이었던 튀김 기름들을 수거하고, 더 이상의 산화가 진행되는 것을 막기 위해 수거 후 바로 유지 g당 0.01 g의 Butylated Hydroxy Toulene (BHT; Sigma, St. Louis. MO. USA)을 처리하였다.

유지의 지방산 조성 분석

Lepage와 Roy⁽²³⁾의 방법에 따라 유지 지방산을 메틸화 시킨 후, 칼럼 DB-Wax(60 m×0.25 mm I.D., J&W, CA, USA)를 사용하여 GC/MS(Hewlett Packard; GC-5987, MS-6890, DE, USA)로 분석하였다. 오븐 온도는 90°C에서 5분 동안 유지하고 10°C/min의 속도로 180°C까지 올려 3분간 유지 후, 다시 3°C/min의 속도로 230°C까지 올려 3분 동안 유지하였다. 헬륨을 운반기체로 하여 1.0 mL/min으로 유속을 일정하게 유지하였다. 검출기는 Mass Selective Detector(MSD)이고, 이온화법으로는 70 eV의 이온화 에너지를 지닌 가속전자를 시료에 충격 시켜서 이온화를 유도하는 전자충격 이온화법

을 사용하였다. 머무름 시간(retention time)과 질량 스펙트럼을 바탕으로 각각의 지방산을 확인하였다. 농도를 알고 있는 지방산 표준물질 혼합액을 GC/MS에 주입하여 각 지방산에 대한 GC-MSD response를 확인한 후 유지의 지방산 조성을 구하였고, 결과는 2회 반복한 평균치로 나타내었다.

유지로부터 4-hydroxy-2-alkenals의 추출

Lang 등⁽¹⁾은 물과 기름 사이에서 HNE의 분배계수를 3.88-4.47로 보고하였고, 이 결과에 따라 유지를 10배의 물로 2회 연속 추출할 경우에 수율이 90-92%가 될 수 있음을 예측하였다. 그리고 Esterbauer와 Weger⁽²⁴⁾은 4-hydroxy-2-alkenals의 합성과 물리적 특성에 관한 연구에서 HHE와 HNE의 물과 클로로포름 사이에서의 분배계수를 각각 1.0과 0.04로 보고하였다. 따라서 유지로부터 4-hydroxy-2-alkenals를 추출하기 위해 시료를 10배의 물로 2회 추출하고, 얻어진 수용액 층을 다시 동량의 클로로포름으로 3회 연속 추출하게 되면 HHE와 HNE에 대하여 각각 90%와 80% 정도의 수율을 예측할 수 있다. 이러한 이론적 수치에 근거하여 유지로부터 4-hydroxy-2-alkenals의 추출은 다음과 같이 진행되었다. BHT를 처리한 1g의 유지시료에 10배 부피의 증류수를 첨가한 후 진탕 배양기(SI-600R, Jeio Tech, Korea)를 사용하여 150 rpm의 속도로 20분 동안 흔들어 주면서 추출한 후 수용액 층을 취하였다. 2회 반복 추출을 통해 얻어진 수용액 층을 합하여 3000 g에서 20분 동안 원심분리 하였다. 이렇게 하여 얻은 수용액 층을 동일 부피의 chloroform으로 3회 연속 추출하였다.

4-hydroxy-2-alkenals 정량

기체 크로마토그래피 분석을 위해 4-hydroxy-2-alkenals 추출액을 회전식 진공 농축기(EYELA Rotary Vacuum Evaporator N-N Series, Rikakikai Co., Japan)를 이용하여 1 mL로 농축한 후 질소로 용매를 날리고, 여기에 500 µL acetonitrile과 200 µL N,O-bis (Trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA, Sigma, St. Louis. MO. USA)를 첨가하여 70°C에서 15분 동안 가열하여 유도체화를 시켰다⁽²⁵⁾.

4-hydroxy-2-hexenal과 4-hydroxy-2-nonenal을 칼럼 SPB™-5(50 m×0.20 mm I.D., film thickness 0.33 µm, Supelco, PA, USA)를 사용하여 GC/MS(Hewlett Packard; GC-5987, MS-6890, DE, USA)로 분석하였다. 분리를 위한 오븐 온도는 120°C에서 5분 동안 유지하고 5°C/min의 속도로 160°C까지 올린 후, 15°C/min의 속도로 200°C까지 올려 5분 동안 유지하였다. 헬륨을 운반기체로 하여 0.7 mL/min으로 유속을 일정하게 유지하였다. 검출기는 Mass Selective Detector(MSD)이고, 70 eV의 전자충격 이온화법을 사용하였다. 선택적이고 높은 감도로 4-hydroxy-2-alkenals를 정량하기 위해, HHE와 HNE를 BSTFA로 유도체화 시킨 후 각각의 질량스펙트럼에서 동일하게 base peak로 나타난 m/z = 157 조각이온(fragment ion)을 Selective Ion Monitoring(SIM) 사용을 위한 선택 이온으로 정하여 분석을 실시하였다. HHE와 HNE를 외부 표준 물질로 하여 수거한 식물성 유지로부터 4-hydroxy-2-alkenals를 정량하였다.

4-hydroxy-2-hexenal과 4-hydroxy-2-nonenal의 회수율 측정

유지로부터 4-hydroxy-2-alkenal를 추출한 뒤 방법의 회수율을 측정하기 위하여 수거한 참기름에 HHE(Cayman Chemical Co., Michigan, USA)와 HNE(Cayman Chemical Co., Michigan, USA)를 유지 g당 각각 35 nmol과 66 nmol을 첨가한 후, GC/MS/SIM($m/z = 157$)을 사용하여 첨가 전후의 HHE와 HNE를 각각 정량 하였다. 회수율은 HHE, HNE를 첨가하지 않은 참기름에 존재하는 HHE, HNE 함량(A), 첨가된 HHE, HNE 함량(B), 동일 참기름에 HHE, HNE를 첨가한 후 발견된 HHE, HNE 함량(C)들을 가지고 수식(C-A)/B×100을 통해서 구하였다. B의 경우에는 표준물질을 추출 없이 바로 유도체화 하여 GC/MS에 주입하였다. HHE와 HNE에 대한 회수율은 각각 92.6%와 86.0%로 나타났다.

4-hydroxy-2-hexenal과 4-hydroxy-2-nonenal의 노출량 추정

분석된 식물성 유지의 HHE와 HNE 정량 데이터와 1998년도 국민건강 영양조사⁽²⁶⁾에서 보고된 한국인의 식물성 유지 섭취 데이터를 결합하여 식물성 유지 섭취로 인한 한국인의 4-hydroxy-2-alkenals의 노출량을 추정하였다.

결과 및 고찰

사용된 식물성 유지의 지방산 조성

분석에 사용된 식물성 유지의 지방산 조성은 Table 1과 같다. 들기름은 총 지방산의 60% 이상이 리놀렌산(n-3)으로 구성되어 있고, 그 외 대부분의 식물성 유지의 주요 지방산은 리놀레산(n-6)으로 나타났다. 올리브유, 채종유, 현미유는 각각 총 지방산의 75.3%, 59.5%, 37.7%가 올레산(18:1)으로

구성되어 있었다. 한국인이 상용하는 식품군 중에서 식물성 유지는, Table 1의 결과와 같이 n-3 혹은 n-6 계열의 불포화 지방산 함량이 높으므로 유지의 자동 산화에 의해 HHE나 HNE가 생성될 가능성이 있다.

식물성 유지로부터 4-hydroxy-2-hexenal과 4-hydroxy-2-nonenal 정량

n-3와 n-6 지방산 산화의 특이적 지표 물질인 HHE와 HNE를 GC/MS/SIM($m/z = 157$)을 이용하여 분석하였다(Fig. 2). n-3 혹은 n-6 지방산 함량이 높은 식물성 유지류의 산화 안전성 평가를 위하여 HHE와 HNE를 동시 정량 하였다(Table 2). Sakai 등^(19,21)은 육류와 생선의 저장 중 산화 안전성을 평가하기 위하여 각 식품으로부터 HNE를 정량 하였고, 생성된 HNE의 함량과 n-6 지방산 함량간의 양의 상관관계를 보여 줌으로써 n-6 지방산이 풍부한 식품의 품질 평가에 HNE가 지표 물질로 사용될 수 있음을 시사하였다. 그러나 생선과 같이 n-6 지방산 함량이 낮은 식품의 경우에는 산화의 또 다른 지표인 TBARS(Thiobarbituric Acid Reactive Substances)와 HNE 함량과의 상관성이 낮게 나타났으므로, n-3 지방산이 높은 식품은 HHE가 산화 평가의 지표로 더 유용할 것으로 여겨진다. 분석된 유지류의 HHE와 HNE 검출량은 대부분 nmol/g 수준으로 Lang 등⁽¹⁾의 연구에서 보여 준 해바라기유(0.08-1.50 nmol/g)와 올리브유(0.39-7.3 nmol/g)의 HNE함량과 비슷한 결과를 보였다. 리놀렌산(n-3)함량이 높은 들기름에서 HHE의 함량이 HNE 함량보다 높게 나타났고, 대부분의 식물성 유지에서 HHE와 HNE가 모두 검출되었으므로, 고도 불포화 지방산 함량이 높은 식품의 산화 안전성 평가를 위해서는 HHE와 HNE를 동시에 정량 하여 평가하는 것이 더 바람직할 것으로 여겨진다. Sakai 등^(19,20)은 시료들간의 HHE와 HNE의 함량 차이를 지방산 조성, 저장 기간 및

Table 1. Fatty acids composition (%) of various oils consumed in Korea¹⁾

Fatty acid	Sesame	Perilla	Olive	Corn	Soybean	Pepper seed	Sunflower	Safflower	Rapeseed	Rice bran
12:0	nd ²⁾	nd	nd	nd	nd	nd	0.05	nd	nd	nd
14:0	0.03	0.04	0.05	0.03	0.15	0.19	0.10	0.19	0.10	0.58
15:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.00	0.04	0.05	0.04
16:0	8.38	4.87	13.4	14.3	14.5	16.8	7.39	10.1	6.34	26.5
16:1	0.13	0.11	1.19	0.19	0.15	0.44	0.16	0.16	0.44	0.39
17:0	0.06	0.09	0.09	0.08	0.12	0.33	0.11	0.07	0.09	0.06
18:0	5.24	2.37	3.74	2.09	3.82	2.29	3.38	2.49	2.06	2.10
18:1	40.7	17.8	75.3	31.7	23.2	9.58	28.7	14.4	59.5	37.7
18:2	44.1	13.1	4.77	49.7	50.2	68.8	58.7	71.4	20.2	29.6
18:3	0.37	61.3	0.67	0.92	6.59	0.51	0.34	0.17	8.92	1.17
20:0	0.55	0.15	0.34	0.39	0.36	0.27	0.17	0.30	0.57	0.72
20:1	0.17	0.16	0.15	0.18	0.27	0.09	0.11	0.17	1.04	0.38
22:0	0.17	nd	0.15	0.18	0.62	0.31	0.52	0.29	0.35	0.34
22:1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.00	nd	0.18	nd
24:0	0.16	nd	0.18	0.30	0.21	0.34	0.19	0.17	0.18	0.43
Σ n-3	0.37	61.3	0.67	0.92	6.59	0.51	0.34	0.17	8.92	1.17
Σ n-6	44.1	13.1	4.77	49.7	50.2	68.8	58.7	71.4	20.2	29.6

¹⁾The analysis was conducted in duplicate for each sample. Since coefficient of variation (CV)s were less than 10%, only the mean values were shown in this table.

²⁾Not detected.

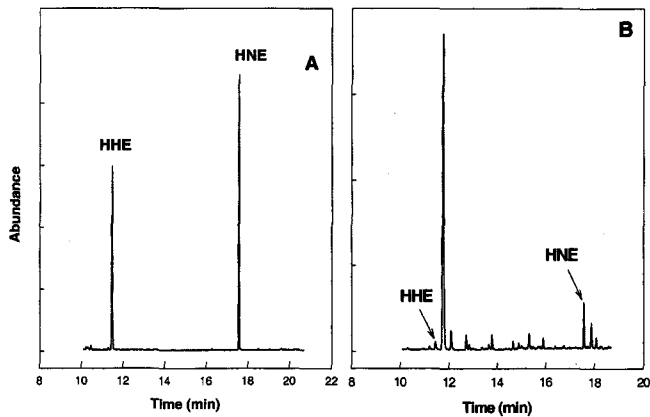


Fig. 2. (A) Selective ion chromatogram for BSTFA derivatives of 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) at $m/z=157$.

$m/z=157$ corresponds to the base peak of BSTFA derivatives of 4-hydroxy-2-alkenals. Each component shows a retention time of 11.50 or 17.61 min. (B) Simultaneous detection of HHE and HNE from sesame oil obtained from consumers using described method. Sesame oil was subjected to serial extraction with distilled water and chloroform, and derivatized with BSTFA. Reaction mixture was subjected to the GC/MS/SIM.

Table 2. 4-Hydroxy-2-hexenal (HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) contents in various vegetable oils

Oil	n ¹⁾	HHE (nmol/g)	HNE (nmol/g)	status ²⁾
Sesame oil	3	0.41-0.81	1.13-2.47	a
	7	0.23-1.35	0.06-1.64	b
Perilla oil	3	1.04-4.16	0.33-0.53	a
	6	0.22-8.56	0.10-0.80	b
Olive oil	2	18.1-26.9	17.8-56.6	a
	1	1.29	0.52	b
Corn oil	2	0.82-0.98	0.29-1.70	a
	1	1.06	0.52	b
Soybean oil	1	10.4	5.28	c
	1	0.57	3.20	a
Pepper seed oil	2	1.56-2.83	1.32	b
Sunflower oil	1	0.32	0.26	b
Safflower oil	1	0.21	0.23	b
Rapeseed oil	1	0.36	0.21	b
Rice bran oil	1	0.23	0.79	b

¹⁾number of samples

²⁾a: being consumed, b: newly purchased, c: passed best in use.

내재하는 항산화 물질의 차이로 설명하였다. 또한, Esterbauer 등⁽²⁷⁾과 Tamura 등⁽⁵⁾은 실험적으로 자동 산화를 유도한 리놀렌산(HNE 15.1 nmol/mg), 리놀렌산(HHE 5.1 nmol/mg), 아라키돈산(HNE 10.3 nmol/mg)으로부터 HHE와 HNE의 생성량을 비교함으로써 동일 조건에서 개별 지방산이 4-hydroxy-2-alkenals 생성에 영향을 미칠 수 있음을 보여 주었다. 올레산의 함량이 높고, n-3와 n-6 지방산 함량이 다른 유지류에 비해 높지 않았던 올리브유에서 높은 양의 4-hydroxy-2-alkenals가 검출된 결과는 n-3, n-6 지방산의 절대적 함량 외의 다른 요인들도 4-hydroxy-2-alkenals의 생성에 영향을 줄 가능성을

Table 3. 4-Hydroxy-2-hexenal (HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) contents in frying oils

Frying oils ¹⁾	HHE (nmol/g)	HNE (nmol/g)
A	4.28 ± 1.34	30.3 ± 5.12
B	2.61 ± 1.31	8.31 ± 3.83
C	2.28 ± 0.41	16.1 ± 2.79
D	5.00 ± 0.40	25.9 ± 2.79
E	4.19 ± 0.22	11.0 ± 0.43
F	7.90 ± 0.29	30.5 ± 0.30

¹⁾Refer to different frying oils obtained from local market vendors.

Table 4. Daily exposure to 4-hydroxyalkenals from vegetable oils

Oil	Food consumption (g/day) ¹⁾	HHE (μg/day)	HNE (μg/day)	HHE+HNE (μg/day)
Sesame oil	1.5	0.1	0.4	0.5
Perilla oil	0.1	0.0	0.0	0.1
Corn oil	0.7	0.1	0.1	0.2
Soybean oil	3.3	0.2	1.7	1.9
Total	5.6	0.4	2.2	2.7

¹⁾Cited from Report on 1998 national health and nutrition survey (1998).

시사하고 있으므로, 이 부분에 대한 연구가 더 필요하다고 사료된다.

튀김 기름으로부터 4-hydroxy-2-hexenal과 4-hydroxy-2-nonenal 정량

Table 3은 시장에서 튀김(deep frying)에 직접 사용 중이었던 기름으로부터 검출된 HHE와 HNE의 함량을 보여 주고 있다. Table 2의 결과와 비교할 때, 튀김에 사용된 기름에서 HHE와 HNE의 생성량이 높은 것은 유지의 자동산화가 튀김이 진행되고 있는 동안 더 가속화 되기 때문으로 해석할 수 있다⁽²⁸⁾. 고온으로 튀기는 동안 유지의 지방이 유리지방산과 글리세롤로 분해되고, 이 과정에서 형성된 불 분자가 증기로 휘발 될 때 휘발성 항산화 물질의 휘발도 함께 일어나게 된다. 게다가 튀김 과정에서선 유지와 공기의 직접 접촉이 늘어나므로 자동산화로 인한 산화 생성물이 더 많이 형성될 수 있다⁽²⁸⁾. Tamura 등⁽⁵⁾이 반응 온도에 따라 리놀렌산으로부터 생성되는 HNE 함량을 비교한 결과, 37°C에서 HNE의 생성량이 가장 높고 50°C 이상으로 반응 온도가 높아지면 HNE는 후속반응에 의해 오히려 감소한다고 보고하였다. Tamura 등⁽⁵⁾의 결과를 고려하면, 고온으로 가열한 튀김 기름은 높은 반응 온도로 인해 상당량의 HHE와 HNE가 다른 물질로 전환되었을 가능성이 크다. 그럼에도 불구하고, 상온에서 보관 중이던 유지에 비해 튀김에 사용했던 기름으로부터의 HHE와 HNE의 함량이 훨씬 높은 것은, 튀김 과정에서 더 과량의 4-hydroxy-2-alkenals가 생성됨을 시사한다.

한국인의 식물성 유지로부터 4-hydroxy-2-alkenals의 노출량 추정

1998년 국민건강 영양조사⁽²⁶⁾와 Table 2의 결과를 바탕으

로, 고도 불포화 지방산을 다량 함유하고 있는 식물성 유지로부터 한국인의 4-hydroxy-2-alkenals에 대한 노출량을 추정하였다(Table 4). 참기름, 들기름, 옥수수유, 콩기름 등이 한국인이 섭취하는 총 식물성 유지의 98%를 차지하고 있으므로⁽²⁶⁾, 이 4가지 식물성 유지들에 대하여 노출량을 평가하였다. 4-hydroxy-2-alkenals에 대한 노출량은 참기름, 들기름, 옥수수유, 콩기름 순으로 각각 0.5 µg/day, 0.1 µg/day, 0.2 µg/day, 1.9 µg/day로, 한국인은 식물성 유지로부터 총 2.7 µg/day의 4-hydroxy-2-alkenals에 노출되는 것으로 나타났다. 이 수치는 성인의 평균 체중을 60 kg으로 하여 체중 당 노출량으로 환산할 경우 45 ng/kg body weight에 해당한다. 튀김 기름에서 검출된 4-hydroxy-2-alkenals의 양은 위의 노출량 추정에서 제외되었다. 그러나 가정에서 유지의 섭취가 대부분 가열과 같은 조리 과정을 거치고 난 후에 이루어진다는 점을 고려하면 실제 노출량은 더 높을 것으로 사료된다. Schauenstein과 Esterbauer⁽²⁹⁾는 HNE의 마우스에 대한 LD₅₀가 68 mg/kg body weight로 독성이 매우 강한 것으로 보고하였고, Segall 등⁽³⁰⁾은 과량의 HHE와 HNE는 랫드에서 간과 신장 독성을 유발할 수 있음을 보고하였다. 4-hydroxy-2-alkenals의 생물학적 독성에도 불구하고, 이 물질에 대한 실질적 안전용량(*de minimus* risk)을 정할 만큼의 충분한 데이터는 없다. 따라서 위의 노출량으로부터 정확한 안전성 평가가 이루어 질 수는 없지만, 스페인의 Toxic Oil Syndrome (TOS)의 원인 물질에서 HNE가 과량 검출된 점과 원인 물질 속의 HNE 함량과 독성간에 양의 상관관계를 보인 점으로 미루어 보아 식품을 통해 4-hydroxy-2-alkenals의 독성에 노출될 수 있음을 시사하고 있다.

고도 불포화 지방산들은 혈중 중성지방과 콜레스테롤 저하, 심근경색과 뇌경색의 예방, 혈소판 응집 예방, 동맥경화증과 혈전증 예방 등의 생리작용을 나타내는 것으로 역학조사와 임상연구에서 보고 되고 있다^(31,32). n-3와 n-6 지방산의 생리활성이 보고됨에 따라 이들 지방산 섭취가 증가하고 있는 추세이므로, 산화에 불안정한 이러한 불포화 지방산을 함유하고 있는 식품들은 4-hydroxy-2-alkenals를 품질 평가 지표로 하여 산화 안전성 평가가 이루어져야 할 것이다.

요 약

한국인이 상용하는 식물성 유지로부터 n-3 지방산과 n-6 지방산 산화의 독성 산물인 4-hydroxy-2-hexenal(HHE)과 4-hydroxy-2-nonenal(HNE)를 높은 감도로 동시 정량 하기 위하여 GC/MS/SIM(m/z = 157)을 이용하여 정량 하고 노출량을 추정하였다. 한국인이 섭취하는 식물성 유지의 98%를 차지하는 4종류의 유지로부터 4-hydroxy-2-alkenals의 총 노출량은 2.7 µg/day로 나타났고, 시장에서 수거한 튀김 기름의 경우에는 상온에서 보관한 유지류에 비해 높은 양의 HHE와 HNE가 검출되었다. 튀김 과정 중에 형성된 4-hydroxy-2-alkenals는 튀김 음식으로 이행될 가능성이 있으므로, 튀김 음식을 자주 섭취하는 집단은 4-hydroxy-2-alkenals에 대한 노출량이 더 높을 것으로 사료된다. n-3와 n-6 지방산의 생리활성에 대한 보고로 인하여 이들 고도 불포화 지방산의 섭취가 증가하고 있으므로, 불포화 지방산을 다량 함유하고 있

는 식품으로부터 n-3와 n-6 지방산의 특이적 산화 지표인 4-hydroxy-2-hexenal과 4-hydroxy-2-nonenal을 동시 정량 하여 식품 품질 및 안전성 평가를 하는 것은 바람직하다고 생각된다. 본 실험에서 보여 준, 상용 식물성 유지의 4-hydroxy-2-alkenals 함량에 관한 데이터는 식품을 통해 노출된 4-hydroxy-2-alkenals가 인체에 미치는 생리적 효과를 평가하기 위한 앞으로의 연구에 중요한 정보를 제공할 것이다.

감사의 글

본 논문은 2002학년도 서울대학교 생활과학연구소의 일부 연구비 지원으로 수행되었음에 이에 감사하는 바입니다.

문 헌

- Lang, J., Celotto, C. and Esterbauer, H. Quantitative determination of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 150: 369-378 (1985)
- Esterbauer, H., Zollner, H. and Schaur, R.J. Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanism of formation, occurrence, and determination, Vol. 1, pp. 239-268. In: *Membrane Lipid Peroxidation*. Carmen Vigo-Pelfrey (ed.). CRC press, Boca Raton, FL, USA (1990)
- Pryor, W.A. and Porter, N.A. Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Rad. Biol. Med.* 8: 541-543 (1990)
- Van Kuijk, F.J.G.M., Holte, L.L. and Dratz, E.A.: 4-hydroxyhexenal: a lipid peroxidation product derived from oxidized docosahexaenoic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 104: 116-118 (1990)
- Tamura, H., Kitta, K. and Shibamoto, T. Formation of reactive aldehydes from fatty acids in a Fe²⁺/H₂O₂ oxidation system. 39: 439-442 (1991)
- Miyake, T. and Shibamoto, T. Simultaneous determination of acrolein, malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal produced from lipids oxidized with fenton's reagent. *Food Chem. Toxicol.* 34: 1009-1011 (1996)
- Mlakar, A. and Spiteller, G. Previously unknown aldehydic lipid peroxidation compounds of arachidonic acid. *Chem. Phys. Lipids* 79: 47-53 (1996)
- Takamura, H. and Gardner, H.W. Oxygenation of (3Z)-alkenal to (2E)-4-hydroxy-2-alkenal in soybean seed. *Biochim. Biophys. Acta.* 1303: 83-91 (1996)
- Turner, W.E., Hill, R.H.Jr., Hannon, W.H., Bernert, J.T.Jr., Killbourne, E.M. and Bayse, D.D. Bioassay screening for toxicants in oil samples from the toxic-oil syndrome outbreak in Spain. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14: 261-271 (1985)
- Van Kuijk, F.J.G.M., Thomas, D.W., Stephens, R.J. and Dratz, E.A. Occurrence of 4-hydroxy-2-alkenals in rat tissues determines as pentafluorobenzyl oxime derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139: 144-149 (1986)
- Selley, M.L., Bartlett, M.R., Mcguinness, J.A., Hapel, A.J. and Ardlie, N.G. Determination of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high-performance liquid chromatography and combined capillary column gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 488: 329-340 (1989)
- Kinter, M., Sullivan, S., Roberts, R.J. and Spitz, D. Trace quantitation of 4-hydroxy-2-nonenal in biological samples as its oxime-bis-tert-butylidimethylsilyl derivative using 3-hydroxynonenal as an internal standard. *J. Chromatogr.* 578: 9-16 (1992)
- Gerard-Monnard, D., Erdelmeier, I., Regnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C. and Chaudiere, J. Reactions of 1-methyl-2-phenylin-

- dole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals; Analytical application to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 11: 1176-1183 (1998)
14. Gioacchini, A.M., Calonghi, N., Boga, C., Cappadone, C., Masotti, L., Roda, A. and Traldi, P. Determination of 4-hydroxy-2-nonenal at cellular levels by means of electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13: 1573-1579 (1999)
 15. Claeson, K., Thorsen, G. and Karlberg, B. Micellar electrokinetic chromatography separation and laser-induced fluorescence detection of the lipid peroxidation product 4-hydroxyalkenal. *J. Chromatogr. B* 763: 133-138 (2001)
 16. Sodum, R.S. and Chung, F.L. 1,N2-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.* 48: 320-323 (1988)
 17. Zollner, H., Schaur, R.J. and Esterbauer, H. Biological activities of 4-hydroxyalkenals, pp. 337-369. In: *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*. Helmut Sies (ed.). Academic Press Inc, San Diego, CA, USA (1991)
 18. Bruenner, B.A., Jones, A.D. and German, J.B. Direct characterization of protein adducts of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal using electrospray mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 8: 552-559 (1995)
 19. Sakai, T., Kuwazuru, S., Yamauchi, K. and Uchida, K. A lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxy-2-nonenal and ω -6 fatty acids contents in meats. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 1379-1380 (1995)
 20. Sakai, T. and Kuwazuru, S. A lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxy-2-nonenal, contents in several fish meats. *Fisheries Sci.* 61: 527-528 (1995)
 21. Sakai, T., Yamauchi, K., Kuwazuru, S. and Gotoh, N. Relationships between 4-hydroxy-2-nonenal, 2-thiobarbituric acid reactive substances and n-6 polyunsaturated fatty acids in refrigerated and frozen pork. *Biosci. Biotech. Biochem.* 62: 2028-2029 (1998)
 22. Bartsch, H. and Nair, J. Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: Markers for lipid peroxidation and oxidative stress. *Toxicol.* 153: 105-114 (2000)
 23. Lepage, G. and Roy, C.C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* 27: 114-120 (1986)
 24. Esterbauer, H. and Weger, W. Über die wirkungen von aldehyden auf gesunde und maligne zellen, 3. mitt: Synthese von homologen 4-hydroxy-2-alkenalen, II. *Monatsh. Chem.* 98: 1884-1897 (1967)
 25. Dutt, M.C. Gas chromatographic identification of common drugs by their multiple peaks and those of their trimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.* 248: 115-124 (1982)
 26. Korea Health Industry Development Institute. Report on 1998 national health and nutrition survey (Dietary intake survey). pp. 76-77. Ministry of Health and Welfare, Seoul (1999)
 27. Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 1: 81-128 (1991)
 28. Deman, J.M. Lipids, pp. 33-110. In: *Principles of Food Chemistry*, 3rd ed. Aspen Publishers Inc, Gaithersburg, MD, USA (1999)
 29. Schauenstein, E. and Esterbauer, H. Formation and properties of reactive aldehydes. *Ciba Found. Ser.* 67: 225-244 (1979)
 30. Segall, H.J., Wilson, D.W., Dallas, J.L. and Haddon, W.F. Trans-4-hydroxy-2-hexenal: A reactive metabolite from the macrocyclic pyrrolizidine alkaloid senecionine. *Science* 299: 472-475 (1985)
 31. Leaf, A. and Weber, P.C. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N. Engl. J. Med.* 318: 549-557 (1988)
 32. Simopoulos, A.P. Summary of NATO advanced research workshop on dietary ω -3 and ω -6 fatty acids: Biological effects and nutritional essentiality. *J. Nutr.* 119: 521-528 (1989)

(2002년 8월 16일 접수; 2002년 10월 9일 채택)