

## 천연 latex로부터 $\alpha$ -, $\gamma$ -, $\delta$ -tocotrienol의 분리

### 이 형 옥

한국인삼연구소

**초록** : Latex(*Hevea Brasiliensis*)로부터 3종의  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol을 각각 분리하고, oil 상태의 각 성분을 얻었다. Tocotrienol을 분리하기 위하여, latex에서 추출한 조지방 성분의 비비누 화분획으로 부터 semipreparative HPLC에 의한 분리방법을 사용하여 tocotrienol을 분리하였다. 이와 같은 분리방법을 이용하였을 때 latex에 함유된 tocotrienol의 함량은 약 400 ppm이었으며, 순도는  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol 각각 98.3, 99.3, 96.2%로 나타났다(1992년 11월 2일 접수, 1993년 1월 15일 수리).

토코페롤류는 천연에서 주로 지방질성분과 함께 발견되는 성분으로서 그 화학구조상 유사한  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol과  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol을 포함한다.<sup>1,2)</sup> 이들 토코페롤류는 그 영양학적인 비타민 E로서의 작용 뿐 아니라 식품학적인 측면에서는 천연 항산화제로서의 중요성이 인지되고 있다.<sup>3-6)</sup> 이들 토코페롤류의 조성성분 및 비율은 식물성 및 동물성 유지에 있어서 특이하게 나타나며, 이들 분포상의 특성은 이를 함유하고 있는 유지의 종류 및 확인에 그 이용가능성을 제공하고 있다.<sup>7)</sup> 1936년 Evans 등에 의해 비타민 E가 발견된 이래 14년후 최초로 밀배유에서  $\alpha$ -tocopherol을 분리하였다.<sup>8)</sup> 11년후 Stern 등에 의해 대두유에서  $\delta$ -tocopherol이 분리되었으며,<sup>9)</sup> 그 이후 많은 분리방법상의 발전이 있었다. 이전의 연구들에 있어서는 주로 column chromatography를 이용하여 천연 토코페롤을 분리하였는데, Bro-Rasmussen과 Hjarde는  $\alpha$ -, ( $\beta$ + $\gamma$ )-,  $\delta$ -tocopherol을 대두유에서 분리하였으며,<sup>10)</sup> Thompson 등은 4개의 토코페롤 이성체를 HAPS(hydroxy alcoxy propyl sepalex)를 이용하여 분리하였다.<sup>11)</sup> Tiebach와 Schramm은 HPLC를 이용하여  $\beta$ -,  $\gamma$ -tocopherol의 분리에 성공하였으며,<sup>12)</sup> Müller-Mulot 등<sup>13,14)</sup>과 최근 Schulz 등<sup>15)</sup>은 preparative HPLC를 이용하여 dry ice와 acetone을 사용 -40°C에서 수차례 냉각분리한 유지로부터 천연 토코페롤 농축물 제조에 성공하였다. 한편 천연 tocopherols에 비하여 tocotrienols에 대하여는 현재까지 그 영양학적, 식품학적 연구에 있어서 잘 알려져 있지 않고 있다. 천연 tocopherols가 주로 식물성 유지에 많이 분포되어 있는 반면, tocotrienols는

palm oil과 coconut oil 등에  $\alpha$ -tocotrienol과  $\gamma$ -tocotrienol이 미량 함유되어 있음이 보고되고 있어서,<sup>21)</sup> 그 분포되어 있는 유지의 종류도 많지 않을 뿐 아니라, 그 함량면에 있어서도 tocopherols에 비하여 훨씬 미량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 한편 1965년 Dunphy 등에 의해서 특이하게 천연 latex에 극미량의  $\alpha$ -tocopherol과 함께  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol이 상당량 함유되어 있음이 보고된 바 있다.<sup>18)</sup> Whittle 등은 1966년 latex로부터  $\delta$ -tocotrienol을 TLC를 이용하여 분석하였으며,<sup>20)</sup> 1979년 Thompson 등은 preparative HPLC를 이용하여 latex의 lipid 분획으로 부터  $\alpha$ -tocotrienol과  $\gamma$ -tocotrienol을 분리하였으며 MS로 확인하였다.<sup>22)</sup> 따라서 본 연구에 있어서는 천연 항산화제로서의 특성에 대한 연구를 수행하기 위하여 천연 latex로부터, 냉각분리에 의한 전처리 과정없이 보다 간단한 분리 방법으로 semipreparative HPLC를 이용하여, 고순도의  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol을 각각 분리하여 그 농축물을 제조하였기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 재료

본 실험에 사용한 재료는 latex(*Hevea brasiliensis*)로서 Handelslabor Wiertz, Eggert and Järissen(Germany)으로부터 공급받은 유액상태의 원료를 사용하였다.

#### 표준품 및 시약

토코페롤 표준품은 Merck社 제품의 tocopherol-iso-

Key words :  $\alpha$ -Tocotrienol,  $\gamma$ -tocotrienol,  $\delta$ -tocotrienol, latex, semipreparative HPLC

mer를 사용하였고, 추출용 용매로 chloroform과 methanol, ethanol, diethylether와 HPLC 분석용 용매로 i-octane과 2-propanol은 Merck社. 제품을 사용하였다.

추출

Latex 유액(조지방질 함량 약 1%)으로부터 Folch 등<sup>16,17)</sup>과 Dunphy 등,<sup>18)</sup> Müller-Mulot<sup>19)</sup>의 방법을 변형하여 조지방성분을 다음과 같이 추출하였다.

즉, 균질화된 latex 유액 각 20 g을 갈색 플라스크에 취하여 400 ml의 chloroform/methanol(v/v, 2:1) 혼합 용액으로 2~3시간 동안 진탕 추출한 후 여과하였다. 여과된 고무질의 잔류물을 동일용매로 세척하여 여액을 갈색 분액여두에 합하였다. 이어서 각 100 ml의 증류수로 4~6회 세척하고, chloroform층에 sodium sulfate를 첨가하여 하룻밤 방치한 후 hydrophobic filterpaper를 이용하여 여과, rotary evaporator에서 감압 농축후 질소 가스로 건조시켜 조추출물(raw extract)로 사용하였다.

가수분해

지방산과 ester 형태의 가능성이 있는 분획<sup>18,20)</sup>을 분

리하기 위하여 다음과 같이 가수분해하였다. 조추출물을 20 ml ethanol에 녹여 ascorbic acid 소량 첨가시킨 후 질소 가스 下, 55~65°C에서 10분간 가열처리한 후, 2 ml 수성 KOH(50%, w/w)을 가하여 10분간 가수분해하였다. 비누화된 시료를 흐르는 물에서 냉각하고, 갈색 분액여두에 옮겨 3회 각 50 ml diethylether로 추출하였다. 이 추출물을 증류수로 중성이 될 때까지 세척한 후 sodium sulfate 일정량을 가하여 약 15분간 방치하였다. Hydrophobic filter paper를 이용하여 여과하고, 이 여액을 rotary evaporator에서 감압 농축후 질소 가스로 건조하여 n-hexane에 용해시켜 preparative HPLC 분리용 시료로 냉장 보관하였다.

Semipreparative HPLC

n-Hexane에 용해되어 있는 비비누화 분획을 감압下에서 건조상태까지 농축시킨 후 i-octane에 용해(약 2% 농도)시켰다. 이 시료 1,000 μl를 LiChrosorb Si 60, 7 μm, 250×8 m i.d. column과 i-octane/2-propanol(99.5:0.5, v/v)을 mobile phase(flow rate 4.2 ml/min)로 사용하여 30분간 용리시켰다.

분석용 HPLC 및 MS

이 분취된 분획물을 분석용 HPLC, LiChrosorb Si 60, 5 μm, 250×4 mm i.d. column을 사용하여 분석하고, 피크면적비를 기준으로 그 순도를 %로 계산하였다. MS

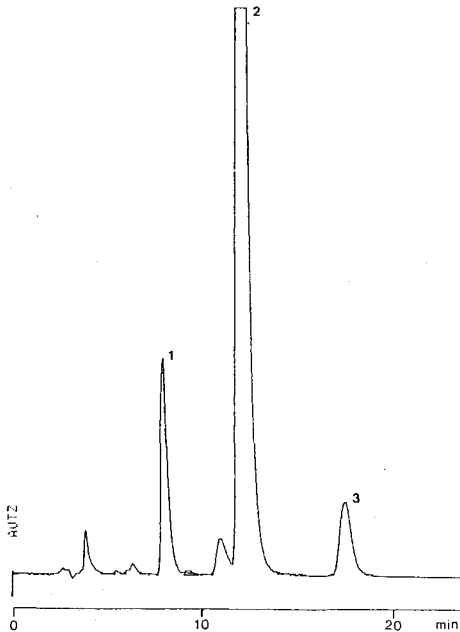


Fig. 1. HPLC chromatogram of tocotrienols in unsaponifiable from latex. Peaks: 1=α-tocotrienol, 2=γ-tocotrienol, 3=δ-tocotrienol. HPLC-conditions: column, LiChrosorb Si 60, 5 μm, 250×4 mm i.d.; mobile phase, 1,4-dioxane+n-hexane(6:94, v/v); flow rate, 1.0 ml/min; detection, fluorescence 295/330 nm; injection volume, 20 μl.

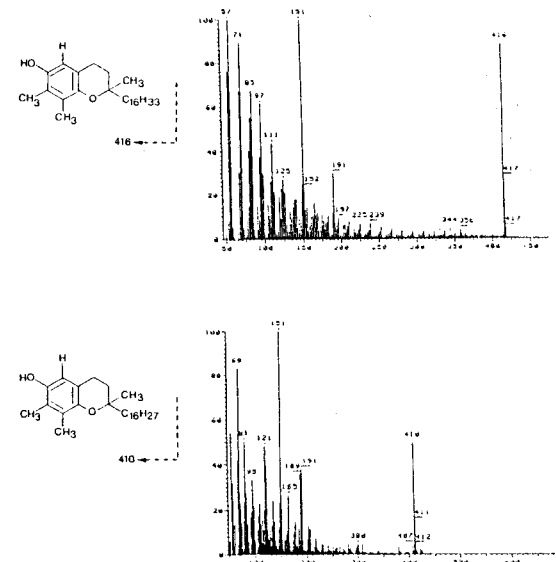


Fig. 2. Mass spectrum of γ-tocopherol as standard and γ-tocotrienol fractionated from latex. MS-conditions: refer to the text.

Table 1. Retention time and purity for fractionated tocotrienols by semipreparative HPLC

Substance	Retention time (min)	Purity (%)
$\alpha$ -Tocotrienol	0~7	98.3
$\gamma$ -Tocotrienol	14~17	99.3
$\delta$ -Tocotrienol	21~25	96.2

분석에 있어서는 semipreparative HPLC로 분취한  $\gamma$ -tocotrienol을 사용하여 Finnigan MAT 8230과 SS 300 Data System을 이용 electron impact method, 70 eV, direct inlet로 분석하였다.

### 결과 및 고찰

본 연구에서 실행된 분리방법은 최근 Schulz 등<sup>15)</sup>에 의하여 천연 tocopherol 분리시에 사용된 전처리 방법인 유지성분을 dry ice와 acetone을 이용하여  $-40^{\circ}\text{C}$ 에서 수차례 걸쳐 냉각 분리하는 전처리 과정없이 보다 간편한 분리 방법으로서, latex에서 조지방 성분을 추출한 후 tocotrienol의 함량을 높이기 위하여 지방산과 ester 형태로 분포되어 있을 분획을 가수분해한 후 그 비비누화분획을 추출하였다. 이 분획에 함유된 3종의 tocotrienol의 조성은 Fig. 1에 나타내었다. 이 비비누화 분획을 semipreparative HPLC를 이용하여 3종의  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol을 분리하였고, oil 상태의 농축물을 제조하였다. 분리된  $\gamma$ -tocotrienol을 MS를 통하여 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 분석용 HPLC와 비교물질로 tocopherol 표준품을 사용하여 분석한 결과 각각의 순도는  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol 각각 98.3, 99.3, 96.2%로 나타났다(Table 1). 그 양적인 면에 있어서도 원료물질인 latex에 함유된 총 tocotrienol 함량이 약 400 ppm으로 분석되었으며, 이는 Dunphy 등<sup>18)</sup>에 의하여 보고된 함량과 비교할 때 91.7%로 분리된 결과였다.

결론적으로 latex의 비비누화 분획으로부터 semipreparative HPLC를 이용한 분리방법은 분리된 tocotrienol의 양적인 면과 순도를 고려할 때 천연 tocotrienol을 분리하는 적합한 방법일 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. 김동훈: 식품화학, 495, 탐구당, 1990
2. Belitz, H.-D. and Grosch, W.: Food Chemistry, 188, Springer-Verlag, Berlin, 1985
3. Bendich, A., Gabriel, E. and Machelin, L. J.: J. Nutr., 116 : 675(1986)
4. Elmadfa, I. and Bosse, W.: Vitamin E., Wiss. Verlag., 21 Stuttgart, 1985
5. Ames, S. R.: Lipids, 6 : 281(1971)
6. Eskew, M. L.: Immunology, 54 : 173(1985)
7. Coors, U.: Fat Sci. Technol., 93 : 519(1991)
8. Evans, H. M., Emerson, O. H. and Emerson, G. A.: J. Biol. Chem., 113 : 319(1936)
9. Stern, M. H., Robeson, C. D., Weisler, L. and Baxter, J. G.: J. Amer. Oil Chem. Soc., 69 : 869(1947)
10. Bro-Rasmussen, F. and Hjarde, W.: Acta Chem. Scand., 11 : 44(1957)
11. Thompson, J. N., Erdody, P. and Maxwell, W. B.: Anal. Biochem., 50 : 267(1972)
12. Tiebach, R. K. D. and Schramm, M.: Chromatographia, 13 : 403(1980)
13. Müller-Mulot, W., Rohrer, G. and Medweth, R.: Fette Seifen Anstrichmittel, 78 : 257(1976)
14. Müller-Mulot, W., Oesterhelt, G., Schmidt, K., Allemann, L. and Maurer, R.: Fette Seifen Anstrichmittel, 85 : 66(1983)
15. Schulz, K., Katerber, R. and Feldheim, W.: Lebensm. -Wiss. u. -Technol., 18 : 252(1985)
16. Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A. and LeBaron, F. N.: J. Biol. Chem., 191 : 833(1951)
17. Folch, J., Lees, M. and Sloanestanley, G. H.: J. Biol. Chem., 226 : 497(1957)
18. Dunphy, P. J., Whittle, K. J., Pennock, J. F. and Morton, R. A.: Nature, 207 : 521(1965)
19. Müller-Mulot, W.: Personal Communication
20. Whittle, K. J., Dunphy, P. J. and Pennock, J. F.: Biochem. J., 100 : 138(1966)
21. Friedrich, W.: Vitamins, 251, Walter de Gruyter, Berlin · New York, 1988
22. Thompson, J. N. and Hatina, G.: J. Liq. Chromatogr., 2 : 327(1979)

**Separation of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienol from latex**

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

**Abstract :** 3 Tocotrienol- $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienol-from latex(*Hevea Brasiliensis*) were isolated and the oily tocotrienol concentrates obtained. To isolate tocotrienols, the fractionation by semipreparative HPLC of the unsaponifiable fraction in the raw lipid extract from latex was carried out. By this method, the total content of tocotrienols in latex was ca. 400 ppm, and the purities of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienol were 98.3, 99.3 and 96.2%, respectively.