

# 미강중 토코페롤 및 토코트리에놀의 정량분석

이영상<sup>†</sup> · 박순량

순천향대학교

## I. 서 언

비타민 E는 인체에 매우 중요한 지용성 비타민으로 혈액, 조직, 세포의 지질 산화를 방지하는 기능이 널리 알려져 있다. 비타민 E는  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol(T)과  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienol(T<sub>3</sub>) 등 8종류의 이성질체를 통칭하는 용어로 이들은 모두 공통적으로 chromanol ring에 isoprenoid side chain이 결합된 구조를 갖고 있다. Tocopherol과 tocotrienol은 side chain의 이중결합 여부에 따라, 그리고  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -는 chromanol ring에의 methyl기 부착에 따라 구별된다(Fig. 1). Tocotrienol은 영양적 가치가 없는 것으로 간주되어왔으나, 1990년대 중반 이후 항산화, 항암, 고지혈증 개선, 혈당 강하, 동맥경화 완화 등 다양한 생리 활성 효과면에서 tocopherol보다 40-60배 이상 월등한 것으로 밝혀진 이래 집중적으로 의약품 및 건강보조식품의 소재로 개발되고 있다. Tocopherol 및 tocotrienol의 분석은 HPLC 및 GC를 이용한 방법이 모두 보고되고 있으나 GC보다는 HPLC를 이용한 방법이 보편적으로 사용되고 있다. HPLC를 사용한 tocopherol 및 tocotrienol 분석에 있어서도 역상(reverse phase) 및 순상(normal phase) 방법이 모두 사용될 수 있으나, 역상을 사용할 경우 tocopherol 및 tocotrienol 공통적으로  $\beta$ 와  $\gamma$  이성질체간 분리가 어려워 8종류의 isomer를 모두 분석하기 위하여는 순상의 방법이 사용되고 있다. 또한 vit E 분석시 HPLC에 부착된 UV 및 Fluorescence 검출기가 모두 사용이 가능하지만, 형광검출기를

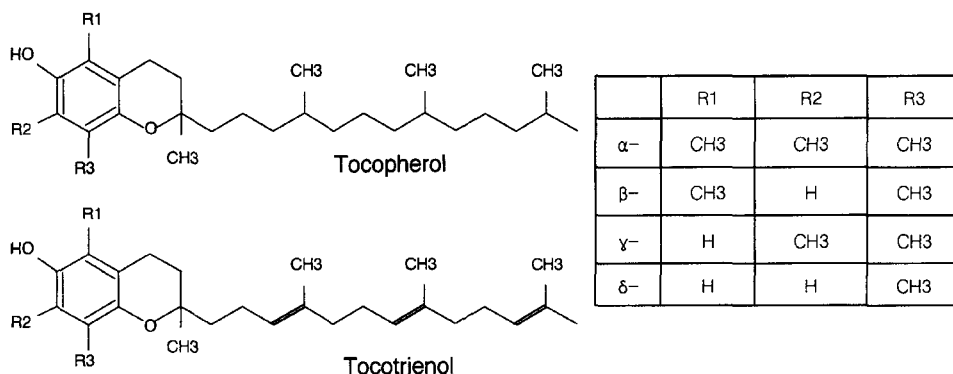


Fig. 1. Chemical structure of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherols and tocotrienols.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-41-530-1287 (E-mail) mariolee@sch.ac.kr

사용시 더욱 안정된 base line 및 미량의 정량 분석이 가능하다. 본 장에서는, 미강(rice bran)을 중심으로 HPLC를 이용한 tocopherol 및 tocotrienol 정량 분석법에 대하여 살펴보겠다.

## II. 분석방법

### 1. 시료의 준비

- 1) Tocopherol 및 tocotrienol은 불안정한 화합물로 빛과 산소에 민감하며, 특히 미강은 도정 이후 급속한 산화가 진행됨을 고려할 때, 가능한한 시료는 분석 직전에 도정하여 준비함을 원칙으로 하되, 분석이 여의치 않을 경우는 도정된 미강 시료를 소량으로 나누어 반드시 가스 투과도가 낮은 진공포장용 필름을 이용하여 진공포장, 혹은 질소(N<sub>2</sub>) 가스로 충전포장한 후, 빛을 차단하고 -80°C에 저장하며 분석에 사용하여야 한다.
- 2) 미강을 대상으로 할 경우 도정 정도에 따라 미강 함유 tocopherol 및 tocotrienol 함량이 다름에 유의하여 시료 조제시 일정한 도정율을 유지함에 주의하여야 한다.
- 3) 미강 이외의 시료를 사용할 경우, 혹은 불가피한 경우 soxhlet을 이용하여 hexane, ether 등 유기용매로 지질성분을 추출하고, 감압 농축 하에 추출 용매를 제거한 후 얻어진 extract를 분석 시료로 사용할 수 있으나, 정확한 정량 분석을 위해서는 extract 전부를 사용하거나, 얻어진 extract의 무게 및 분석에 소요된 무게 등을 정밀하게 측정하는 불편이 수반되며, 또한 지방 추출 과정 중 tocopherol 및 tocotrienol의 파손의 위험이 높으므로 반드시 회수율 시험을 통하여 확인 후 적용함이 필요하다.

### 2. 장치 및 기기

- 1) 고속액체크로마토그래프(HPLC; isocratic)
- 2) 검출기: 형광(Fluorescence) 검출기(Excitation 290 nm, Emission 330 nm)
- 3) Shaking water bath
- 4) 저온 원심분리기
- 5) Ice maker
- 6) Auto pipet(100  $\mu$ L용) 및 pipet tips
- 7) Pasteur pipet
- 8) Vortex
- 9) 100 mL 용 갈색 분액여두(separatory funnel, amber)
- 10) Syringe filter(nylon, 13 mm, 0.2  $\mu$ m)
- 11) 일회용 주사기(3 mL)
- 12) 깔때기
- 13) 여과지(Whatman #2를 지름 1 cm 정도의 원형으로 잘라 사용한다)
- 14) N<sub>2</sub> evaporator 혹은 진공농축기
- 15) Cramp용 sample vial(amber) 및 vial cap(Teflon septum)

### 3. 시약

- 1) Ascorbic acid(GR)
- 2) KOH(GR)
- 3) EtOH(GR)
- 4) n-hexane(GR)
- 5) 증류수(HPLC)
- 6) 얼음
- 7) Isooctane(HPLC)
- 8) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 9) 표준품(standard): CALBIOCHEM(Tocopherol kit, Tocotrienol kit)
- 10) Acetic acid(glacial; HPLC): 낮은 순도의 국산 시약을 사용할 경우 분석이 불안정한 경우가 많으므로 HPLC급을 사용함이 바람직함.
- 11) Ethylacetate(HPLC)
- 12) 2,2-dimethoxypropane(DMP)

### 4. 용액의 제조

#### 1) 44% KOH 용액

- (1) KOH(GR) 80 g을 증류수 100 mL에 녹여 사용한다.
- (2) KOH는 강알칼리이므로 취급 시 주의할 것

#### 2) 이동상(mobile phase) 용액 (1 L 기준)

- (1) 1 L volumetric flask(isooctane으로 세척한 것)에
- (2) isooctane을 1/2 정도 붓고
- (3) acetic acid 7 mL, ethylacetate 7 mL, DMP 1 mL를 넣은 후
- (4) isooctane으로 1 L가 되도록 맞추어 채운다.
- (5) 최종 농도는 isooctane/ethyl acetate/acetic acid/2,2-di-methoxypropane = 98.5 : 0.7 : 0.7 : 0.1임.
- (6) 본 eluent는 흡습성이 강해 상온 보관시 분석 효능이 저하되기 쉬우므로, 가능한 분석 직전에 소요량을 계산하여 제조함이 바람직함.

#### 3) 컬럼 regeneration용 용액(1 L 기준)

약 50-100 여개의 시료 분석시 컬럼의 효능이 저하될 수 있으므로, column regeneration용 용액을 만들어 column을 세척함이 바람직함.

- (7) 1 L volumetric flask 에
- (8) hexane (HPLC)을 1/2 정도 붓고
- (9) acetic acid 25 mL, DMP 25 mL를 넣은 후

(10) hexane 으로 1 L가 되도록 맞추어 채운다.

## 5. HPLC 분석 조건

- 1) 컬럼: Zorbax Silica, 4.6×250 mm(5 μm): 여러 종류의 normal phase 컬럼을 사용하여 tocopherol 및 tocotrienol 분석이 가능하지만, 본 실험에서 Supelco Sil 등 column을 비교한 결과 Zorbax Silica 컬럼이 가장 분리능 및 안전성이 우수한 것으로 판단된다.
- 2) 검출기: 형광검출기(excitation 290 nm, emission 330 nm)
- 3) flow rate: 1.0 mL min<sup>-1</sup> - 1.6 mL min<sup>-1</sup> 범위면 만족할 결과를 얻을 수 있음.
- 4) injection volume: 20 μl

## 6. 조작

- 1) 50 ml 원심분리 tube에 5 ml EtOH(100%)과 산화방지를 위한 ascorbic acid 0.1 g을 넣는다(이때 EtOH은 미리 80°C의 항온수조에 넣어 준비하되, 용기 내부의 압력 상승 방지를 위하여 밀봉하지는 말 것. Polycarbonate 재질의 원심분리 tube는 본 분석에 부적합하며, PP 재질의 일회용 원심분리 tube를 사용함이 편리함).
- 2) 미강시료 0.5 g을 넣는다(이때 원심분리 tube를 흔들어 주되, 벽면에 부착되는 시료에 주의할 것).
- 3) 80°C shaking water bath에서 10분간 방치한다(rpm = 90).
- 4) 10분 경과 후 즉시 44% KOH 150 μl를 넣고
- 5) 다시 80°C shaking water bath에서 18분간 비누화 반응을 진행한다.
- 6) 18분 경과 후 즉시 꺼내서 미리 준비한 얼음에 넣어 냉각 시킨다.
- 7) 냉각 후 반응이 정지된 원심분리 tube에 증류수 5 ml, hexane 5 ml 넣은 후 vortex로 교반한다.
- 8) 원심분리(5°C, 1,000 rpm, 1분)를 수행한다.
- 9) 상층액(핵산층)을 파스테르 pipet으로 취하여 100 ml 분액여두에 옮긴다(1회).
- 10) 하층액이 남아있는 원심분리 tube에 앞에서와 동일한 조건으로 hexane 5 ml을 넣고 vortex, centrifuge, 상층액을 파스테르 pipet으로 취해 100 ml 분액여두에 옮기는 과정(7-9)을 2번 더 수행한다.
- 11) 합쳐진 분액여두에 증류수를 5 ml 넣어 흔든 후 물층을 버리는 과정을 3회 반복한다.
- 12) 깔대기에 준비된 여과지(No.2 filter paper, 지름 1 cm 정도)를 깔고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 적당량(약 4 g)을 넣는다.
- 13) hexane층을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 통과시키면서 시험관에 받는다(분석 대상 물질이 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 잔재할 가능성이 있으므로 hexane 적당량으로 세척하여 모은다).
- 14) N<sub>2</sub> gas를 불어 hexane을 제거한다(이때 질소 가스의 유속을 서서히 증가하여 손실이 없도록 주의한다).
- 15) Isooctane(HPLC) 1 ml를 넣어 완전히 녹인 후

- 16) 일회용 주사기를 이용하여 syringe filtration(nylon, 지름 13 mm, 0.2  $\mu$ m)을 하여 sample vial(amber)에 담고, N<sub>2</sub> 불어넣으며 밀봉한다. 이때 isooctane은 휘발성이 강하므로 가능한 crimper용 vial과 cap을 이용하여 vial을 밀봉함이 바람직하며, tocopherol 및 tocotrienol은 빛, 산소 등에 쉽게 파괴되므로 질소 충전 여부를 불문하고 가능한 빠른 시간 내에 분석을 완료함이 요구된다.
- 17) 상기 용액 20  $\mu$ l를 고속 액체 크로마토그래프(HPLC)에 주입하여 분석한다.

### <참고사항>

- (9) - (11)의 과정은 분액여두 대신, 앞서와 동일한 재질의 일회용 50 mL 원심분리 tube 와 vortex, 원심분리기를 사용하여 대체할 수 있다.
- 또한 (7) - (8)의 과정 역시 분액여두로 대체하여 수행될 수 있다.
- (13) - (14)의 과정은 round bottom flask 및 진공농축기로 대체할 수 있다.

### 7. 표준용액의 조제, 관리 및 검량선의 작성

- 1) 표준품(tocopherol set 및 tocotrienol set는 CALBIOCHEM 및 Meck사에게 구입 가능함)을 isooctane(HPLC Grade)에 녹여 각각의 고농도 stock standard solution을 만들고, 필요에 따라 동일 용매로 희석하여 적절한 표준 용액을 만든다. 냉동고(-20°C)에 적절히 보관될 경우 1년까지는 보관이 가능하다.
- 2) 미강을 대상으로 본 분석법에 준하여 분석할 경우 적절한 표준 용액의 농도 범위는 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 ppm 수준이 실용적이다.
- 3) 단, 실제 미강 시료중의  $\alpha$ -T,  $\alpha$ -T3,  $\gamma$ -T3 함량은 높은 반면  $\beta$ -T,  $\gamma$ -T,  $\delta$ -T,  $\beta$ -T3,  $\delta$ -T3 등의 농도는 매우 낮으므로 8종류의 isomer의 농도가 동일한 혼합표준용액보다는  $\alpha$ -T,  $\alpha$ -T3,  $\delta$ -T3의 농도는 높고, 기타 isomer들의 농도는 낮은(예:  $\alpha$ -T, 100 ppm;  $\alpha$ -T3, 100 ppm;  $\gamma$ -T3, 100 ppm; 기타 isomers, 각 10 ppm) 혼합표준용액을 만들어 사용함이 편리하다.
- 4) HPLC상의 표준품의 농도 및 peak 면적을 이용하여 검량선을 작성하여 사용한다.
- 5) Isooctane에 녹아있는 표준용액도 보관이 진행됨에 따라 쉽게 파손(특히 aT의 파손이 가장 빠르게 진행됨)됨이 관찰되는 바, 표준용액 조제 당시에 소량씩 분주하여 밀봉 보관하고, 개봉된 시료는 저온 보관을 할 경우에도 20-30일 이내에 폐기함이 바람직하다.
- 6) 또한 Isooctane의 높은 휘발성과 표준용액의 낮은 안정성을 고려할 때, 분석에 사용된 표준 용액을 재사용할 경우 injection 즉시 다시 밀봉하여 보관하여야 한다.
- 7) 미강 이외의 시료를 분석할 경우는 예비 실험을 수행하여 HPLC에 주입되는 시료 용액의 개략적인 농도를 확인한 후에, 반응에 소요되는 시료 무게, 최종 HPLC 주입을 위한 isooctane mess up volume, 표준용액의 농도 등을 재검토하여 분석토록 한다.

## 8. 계산

### 1) 검량선

$$Y = aX + b.$$

X : HPLC 크로마토그램 상에서 구한 각 isomer 표준품의 peak 면적

Y : HPLC에 주입된 표준용액의 농도(ppm:  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

### 2) 시료중 tocopherol 및 tocotrienol 함량

$$\text{시료 중 tocopherol 및 tocotrienol 화합물 함량}(\mu\text{g g}^{-1}) = Y' \times \frac{V}{S}$$

Y' : HPLC 크로마토그램 상에서 구한 표준품의 면적을 검량선에 대입하여 얻은 Y 값 (HPLC에 주입된 시료 용액의 각 isomer별 농도, ppm)

V : HPLC 주입을 위한 시료용액 제조 단계에서 사용된 isooctane의 부피(현 분석법은 1 mL 기준임)

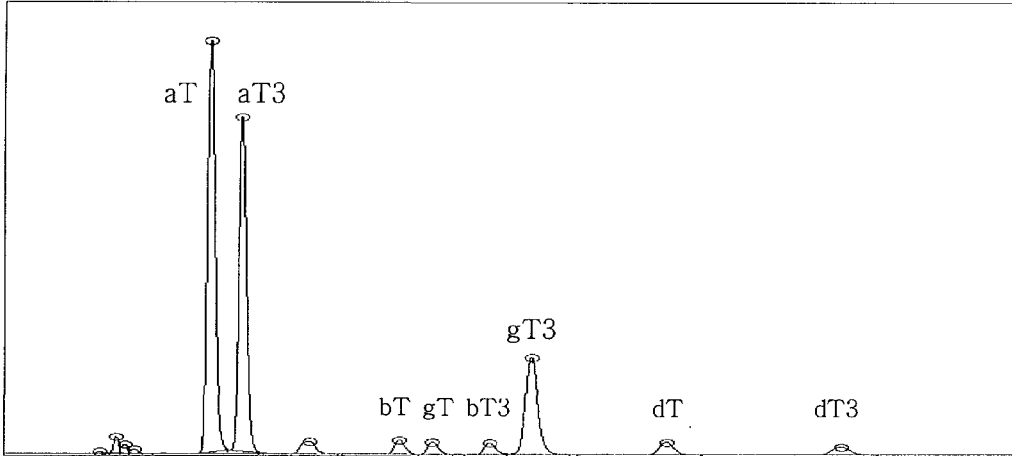
S : 추출 시료의 무게(현 분석법은 0.5 g 기준임)

## 9. 기타 주의 사항

- 1) 역상(reverse phase)으로 사용하던 HPLC system을 순상(normal phase)로 전환 시, 컬럼을 분리한 후 점차 극성이 낮은 용매로 system을 세척하며 서서히 전환하여야 한다. 여기에는 eluent 용기, injector(sample loop 주의), syringe (autosampler 사용시 기기 내부의 syringe와 washing solution 포함), pump, detector (flow cell 주의) 및 이들을 연결하는 tubing 모두가 포함된다. 또한 순상에서 역상으로의 전환할 경우는 그 반대(점차 극성이 높은 용매로 여러 단계를 거쳐 전환)로 system을 세척한 후 역상용 컬럼을 연결하여야 한다.
- 2) Tocopherol 및 tocotrienol은 모두 빛에 민감하므로, 분석의 전 과정에 걸쳐 초자기구 선정(amber 사용 권장) 및 조명 등에 유의하여야 한다.
- 3) Tocopherol 및 tocotrienol은 표준용액의 관리가 까다로운 편이므로 반드시 최초 표준용액 제조 및 검량선 작성시에 chromatogram 상의 각 isomer별 면적 비율을 계산해 두고, 차후 분석이 진행됨에 따라 표준용액의 peak 면적 및 각 isomer별 면적 비율(특히  $\alpha$ -T와  $\alpha$ -T3 간의 peak 면적 비율)의 변화에 유의하여 파손된 표준용액을 사용하는 오류를 사전에 방지하여야 한다.
- 4) 내부표준물질(internal standard)로 tocopherol acetate를 사용함은 8종의 isomer들과의 retention time 상에서는 차이가 있어 가능하나, 비누화 반응 이전부터 사용할 경우 심한 손상 및 alpha tocopherol로의 분리가 관찰되므로 회수율 등 실험에는 권장되지 않는다.

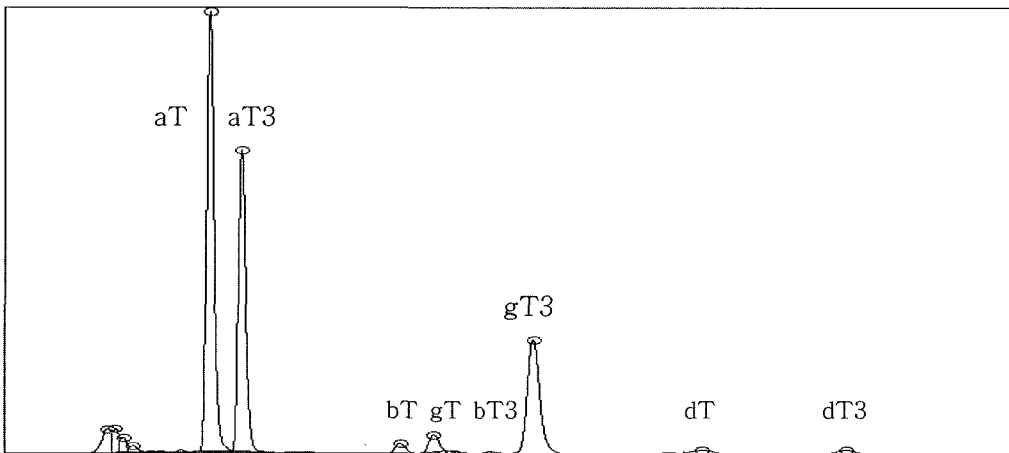
## 10. 분석 결과 예시

### 1) 표준 용액의 HPLC chromatogram



**Fig. 2.** HPLC chromatogram of authentic tocopherol (T) and tocotrienol (T3) standard. The concentration of each vit E isomers in ascending order of its retention time are as following:  $\alpha$ -T, 200 ppm;  $\alpha$ -T3, 200 ppm;  $\beta$ -T, ppm;  $\gamma$ -T, ppm;  $\beta$ -T3, ppm;  $\gamma$ -T3, 200 ppm;  $\delta$ -T, ppm,  $\delta$ -T3 14 ppm.

### 2) 미강 시료의 chromatogram



**Fig. 3.** HPLC chromatogram of tocopherol (T) and tocotrienol (T3) extracted from rice bran. The concentration of each vit E isomers are as following:  $\alpha$ -T, 200 ppm;  $\alpha$ -T3, 200 ppm;  $\beta$ -T, ppm;  $\gamma$ -T, ppm;  $\beta$ -T3, ppm;  $\gamma$ -T3, 200 ppm;  $\delta$ -T, ppm,  $\delta$ -T3 14 ppm.

3) 국내 주요 수도 품종의 미강 함유 tocopherol 및 tocotrienol 함량(Park et al., 2003)

**Table 1.** Content of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\delta$ - tocotrienols and tocopherols in rice bran ( $\text{mg} \cdot 100 \text{g}^{-1}$ ).

Rice variety	Tocopherol				Tocotrienol			
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
Chucheongbyeo	8.96	0.77	3.28	0.05	7.61	0.38	14.11	1.04
Ilpumbyeo	7.62	0.97	3.02	0.09	8.76	0.56	16.50	1.23
Dacanbyeo	7.79	0.74	1.56	0.03	8.53	0.36	18.35	1.10
Hwasungbyeo	8.53	0.77	4.23	0.11	8.02	0.53	16.48	0.79
Daejinbyeo	6.69	0.69	1.71	0.03	9.21	0.55	15.33	0.81
Odaebyeo	6.76	0.57	2.00	0.04	9.19	0.48	15.97	0.91
Joonganbyeo	9.58	0.66	2.56	0.07	9.45	0.49	18.37	0.95
Seojinbyeo	10.59	0.87	3.20	0.10	9.36	0.43	18.28	0.83
Jinpumbyeo	7.50	0.69	1.26	0.04	10.26	0.46	17.52	1.06
Bongkwangbyeo	8.50	0.54	1.66	0.03	10.08	0.44	16.62	0.63
Ansungbyeo	8.91	0.64	1.91	0.04	9.70	0.44	16.28	0.59
Kwanganbyeo	7.19	0.60	2.19	0.06	9.90	0.46	15.69	0.94
Daeripbyeol	6.75	0.56	1.77	0.06	9.97	0.39	18.84	0.60
Heukjinjoobyeo	8.47	0.77	3.14	0.09	7.06	0.10	14.61	0.62
Andabyeo	2.36	0.24	6.67	0.17	2.32	0.37	33.44	0.94
Koshihikari	8.13	0.76	3.09	0.06	8.65	0.45	18.62	0.78
Hitomebore	8.72	0.65	2.37	0.06	10.25	0.47	15.88	0.74
Damakeum	6.84	0.70	1.70	0.07	9.78	0.50	21.70	1.34
Mean	7.77	0.68	2.63	0.07	8.78	0.44	17.92	0.88

**참고문헌**

1. Shin, T.S., J.S. Godber, 1993. Improved high-performance liquid chromatography of vitamin E vitamers on normal-phase columns. *JAOCS*. 70(12) : 1289-1291.
2. 박경열, 강창성, 조영철, 이용선, 이영현, 이영상. 2003. 벼 품종별 미강의 토크페롤 및 토크트리엔올 함량 평가. *한국작물학회지*. 48(6) : 469-472.
3. Lechner, M., B. Reiter, E. Lorbeer, 1999. Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A*. 857 : 231-238.

***Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Rice Bran by using HPLC***

*Young-Sang Lee<sup>†</sup> and Soon-Ryang Park*

*Soonchunhyang University, Div. of Life Sciences, Asan 336-745, Korea  
+82-41-530-1287, mariolee@sch.ac.kr*