

重水素化, Pentafluorobenzyl화와 GLC-Mass Spectrometry에 의한 Conjugate Trienoic Acid含有 Triacylglycerol 分子種의 立体特異的 分析

禹孝京·金成眞·趙鏞桂

東亞大學校 食品營養學科
(2001년 6월 20일 접수 ; 2001년 7월 4일 채택)

Stereospecific Analysis of the Molecular Species of the Triacylglycerols Containing Conjugate Trienoic Acids by GLC-Mass Spectrometry in Combination with Deuteration and Pentafluorobenzyl Derivatization Techniques

Hyo-Kyeng Woo · Seong-Jin Kim · Yong-Goe Joh

Department of Food Science & Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea
(Received June 20, 2001 ; Accepted July 4, 2001)

Abstract : CTA ester bonds in TG molecules were not attacked by pancreatic lipase and lipases produced by microbes such as *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotricum candidium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus delemar*, *R. arrhizus* and *Mucor miehei*. An aliquot of total TG of all the seed oils and each TG fraction of the oils collected from HPLC runs were deuterated prior to partial hydrolysis with Grignard reagent, because CTA molecule was destroyed with treatment of Grignard reagent. Deuterated TG (dTG) was hydrolyzed partially to a mixture of deuterated diacylglycerols (dDG), which were subsequently reacted with (S)-(+)-1-(1-naphthyl)ethyl isocyanate to derivatize into dDG-NEUs. Purified dDG-NEUs were resolved into 1, 3-, 1, 2- and 2, 3-dDG-NEU on silica columns in tandem of HPLC using a solvent of 0.4% propan-1-ol (containing 2 % water)-hexane. An aliquot of each dDG-NEU fraction was hydrolyzed and free fatty acids thus obtained were converted into pentafluorobenzyl fatty acid esters (fatty acid-PFB ester). These derivatives showed a diagnostic carboxylate ion, (M-1)⁻, as parent peak and a minor peak at m/z 196 (PFB-CH₃)⁻ on NICI mass spectra. In the mass spectra of the fatty acid-PFB esters of dTGs derived from the seed oils of *T. kilirovii* and *M. charantia*, peaks at m/z 285, 287, 289 and 317 were observed, which corresponded to (M-1)⁻ of deuterized oleic acid (d₂-C_{18:0}), linoleic acid (d₄-C_{18:0}), punicic acid (d₆-C_{18:0}) and eicosamonoenoic acid (d₂-C_{20:0}), respectively. Fatty acid compositions of deuterized total TG of each oil measured by relative intensities of (M-1)⁻ ion peaks were

similar with those of intact TG of the oils by GLC. The composition of fatty acid-PFB esters of total dTG derived from the seed oils of *T. kilirowii* are as follows; C_{16:0}, 4.6 mole % (4.8 mole %, intact TG by GLC), C_{18:0}, 3.0 mole % (3.1 mole %), d₂-C_{18:0}, 11.9 mole % (12.5 mole %, sum of C_{18:1ω9} and C_{18:1ω7}), d₄-C_{18:0}, 39.3 mole % (38.9 mole %, sum of C_{18:2ω6} and its isomer), d₆-C_{18:0}, 41.1 mole % (40.5 mole %, sum of C_{18:3 9c,11t,13c}, C_{18:3 9c,11t,13r} and C_{18:3 9c,11t,13c}), d₂-C_{20:0}, 0.1 mole % (0.2 mole % of C_{20:1ω9}). In total dTG derived from the seed oils of *M. charantia*, the fatty acid components are C_{16:0}, 1.5 mole % (1.8 mole %, intact TG by GLC), C_{18:0}, 12.0 mole % (12.3 mole %), d₂-C_{18:0}, 16.9 mole % (17.4 mole %, sum of C_{18:1ω9}), d₄-C_{18:0}, 11.0 mole % (10.6 mole %, sum of C_{18:2ω6}), d₆-C_{18:0}, 58.6 mole % (57.5 mole %, sum of C_{18:3 9c,11t,13r} and C_{18:3 9c,11t,13c}). In the case of *Aleurites fordii*, C_{16:0}; 2.2 mole % (2.4 mole %, intact TG by GLC), C_{18:0}; 1.7 mole % (1.7 mole %), d₂-C_{18:0}; 5.5 mole % (5.4 mole %, sum of C_{18:1ω9}), d₄-C_{18:0}; 8.3 mole % (8.5 mole %, sum of C_{18:2ω6}), d₆-C_{18:0}; 82.0 mole % (81.2 mole %, sum of C_{18:3 9c,11t,13r} and C_{18:3 9c,11t,13c}). In the stereospecific analysis of fatty acid distribution in the TG species of the seed oils of *T. kilirowii*, C_{18:3 9c,11t,13r} and C_{18:2ω6} were mainly located at *sn*-2 and *sn*-3 position, while saturated acids were usually present at *sn*-1 position. And the major molecular species of (C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂ and (C_{18:1ω9})(C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13c}) were predominantly composed of the stereoisomer of *sn*-1-C_{18:2ω6}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13c}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c}, and *sn*-1-C_{18:1ω9}, *sn*-2-C_{18:2ω6}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c}, respectively, and the minor TG species of (C_{18:2ω6})₂(C_{18:3 9c,11t,13c}) and (C_{16:0})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂ mainly comprised the stereoisomer of *sn*-1-C_{18:2ω6}, *sn*-2-C_{18:2ω6}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c} and *sn*-1-C_{16:0}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13c}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c}. The TG of the seed oils of *Momordica charantia* showed that most of CTA, C_{18:3 9c,11t,13r}, occurred at *sn*-3 position, and C_{18:2ω6} was concentrated at *sn*-1 and *sn*-2 compared to *sn*-3. Main TG species of (C_{18:1ω9})(C_{18:3 9c,11t,13r})₂ and (C_{18:0})C_{18:3 9c,11t,13c})₂ were consisted of the stereoisomer of *sn*-1-C_{18:1ω9}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13r}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13r}, respectively, and minor TG species of (C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂ and (C_{18:1ω9})(C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13c}) contained mostly *sn*-1-C_{18:2ω6}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13c}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c} and *sn*-1-C_{18:1ω9}, *sn*-2-C_{18:2ω6}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c}. The TG fraction of the seed oils of *Aleurites fordii* was mostly occupied with simple TG species of (C_{18:3 9c,11t,13r})₃, along with minor species of (C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13r})₂, (C_{18:1ω9})(C_{18:3 9c,11t,13r})₂ and (C_{16:0})(C_{18:3 9c,11t,13r}). The stereospecific species of *sn*-1-C_{18:2ω6}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13r}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13r}, *sn*-1-C_{18:1ω9}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13r}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13r}, and *sn*-1-C_{16:0}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13r}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13r} are the main stereoisomers for the species of (C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13r})₂, (C_{18:1ω9})(C_{18:3 9c,11t,13r})₂ and (C_{16:0})(C_{18:3 9c,11t,13r})₂, respectively.

Key words : stereospecific analysis of triacylglycerols, fatty acid, pentafluorobenzyl ester, *Trichosanthes kilirowii*, *Momordica charantia*, *Aleurites fordii*, negative ion chemical ionization.

1. 序 論

TG 分子種의 脂肪酸 分布를 stereospecific 하게 分析하고자 하는 試圖는 오래전부터 始作 되었으나, 1950年代에 들어와서 Litchfield[1]와 Brockerhoff[2]에 의해 비로서 그 方法이 確立 되었다. 즉, 그들은 Grignard 試藥을 利用한 化學的 方法이나 또는 lipase를 利用한 酵素的 方法으로, TG를 1(2), 2(3)-DG와 1, 3-DG로 部分 加水分解하여 이때 生成된 DG 混合物에서 TLC板으로 1(2), 2(3)-DG部分만을 分離한다. 이 混合物에 phosphatidylphenol을 作用시켜 DG를 1, 2-diacyl-*sn*-glycerophosphatides와 2, 3-diacyl-*sn*-glycerophosphatides로 誘導體하고, 여기에 蠟毒에서 精製한 phospholipase A₂는 1, 2-diacyl-*sn*-glycerophosphatides 誘導體에만 作用하여 2-位置의 脂肪酸를 遊離시킨다. 이때 生成된 遊離脂肪酸를 回收하여 그 組成을 分析 하고 또 이때 生成된 1-acyl-lysophosphatides 를 未反應物인 2, 3-diacyl-*sn*-glycerophosphatides로부터 TLC나 column chromatography로 相互分離하여, 알칼리로 加水分解하여 1-位置의 脂肪酸를 遊離시켜 그 組成을 求한다. 이렇게 얻어진 data와 總脂肪酸組成을 基礎로 하여 주어진 公式[3]에 依據하여 TG 分子種의 3-位置 에 結合한 脂肪酸 組成을 計算한다.

現在 널리 使用되는 TG 分子種의 構成脂肪酸 分布의 立体特異的 分析法은 우선 HPLC로 TG를 分子種別로 相互分離한 後, 各 分子種 分劃을 Grignard 試藥이나 lipase로 部分加水分解 하여, 1, 2 (2, 3)-DG와 1, 3-DG의 混合物을 生成하게 한다 (이 點은 上記 言及한 方法과 同一 함). 다음으로 이 混合物에 高純度の S-(+)-(1-naphthyl) ethyl isocyanate 溶液을 加하여 50°C에서 長時間 反應시켜 diacylglycerol (DG)를 1, 2-DG-, 2, 3-DG- 및 1, 3-DG-naphthylethylurethane (NEU)으로 誘導體 化시키고, 이것을 精製한 다음 silica column 또는 chiral column이 裝着된 HPLC에서 各各의 enantiomer로 分離한다. 各 enantiomer의 脂肪酸를 分析하여 위에 言及한 公式 [3]에 依據하여 各 TG分子種의 脂肪酸 分布를 調査한다. 이 方法으로 Christie[4,5]는 몇 種의 油脂에서 얻은 TG를 silver ion-HPLC와 RP-HPLC로 分子種 으로 分劃하고 各 分劃을 部分加水分解하여 生成된 DG를 (S)-(+)-1-(1-naphthyl)

ethylurethane 誘導體로 만들어, 1, 3-DG, 1, 2-DG 및 2, 3-DG를 silica 칼럼을 裝着한 HPLC 로 서로 重複됨이 없이 分離한 바 있다.

前報[6]에서 言及한 바와 같이 栞科植物인 하늘다리 (一名 하늘수박, *Trichosanthes kirilowii*)와 여주 (*Momordica charantia*) 種子油의 TG에는 conjugate trienoic acid (CTA)의 하나인 punicic acid (C_{18:3} 9c,11t,13c)와 α -eleostearic acid (C_{18:3} 9c,11t,13t)가 相當量 含有되어 있으며, 또 大戟科 植物인 油桐 (*Aleurites fordii*)의 種子油에도 α -eleostearic acid가 多量으로 含有되어 있다. 그런데 CTA를 含有한 TG를 Grignard 試藥으로 部分加水分解하면 punicic acid 또는 α -eleostearic acid의 殘基가 大部分 破壞되거나 異性化된다고 하며[7,8], 또 肝臟 lipase는 TG 分子種의 飽和脂肪酸인 palmitic acid, stearic acid와 不飽和脂肪酸인 oleic acid, linoleic acid를 容易하게 加水分解하나, CTA인 punicic acid와 α -eleostearic acid의 ester bond를 加水分解하지 못한다고 報告한 바 있다[7,8]. 이와 같이 CTA가 結合된 triacylglycerol (TG)의 部分加水分解가 어려움으로, Litchfield[1]와 Brockerhoff[2]의 方法을 爲始하여 現在까지 使用되고 있는 方法으로는 이 TG의 構成脂肪酸의 分布를 立体特異的으로 分析한다는 것은 不可能하다고 생각되어진다.

Ryhage와 Stenhagen[9]에 의하여 mass-spectrometry (MS) 技法이 脂肪酸 分析에 導入된 以來, 이는 現在까지 脂肪酸의 構造決定에 가장 強力하고 效率的인 分析法으로 알려져 있으나, 이 方法으로는 不飽和脂肪酸의 geometric 또는 optical isomer의 相互區別이 어렵고, 또 分析하고자 하는 脂肪酸만을 그 混合物에서 純粹分離하여야 하는 어려운 點이 있다. 따라서 MS 分析에서도 그 技能性을 높이기 위하여 gas-liquid chromatography (GLC), NMR 또는 IR-spectrometry와 같은 相互補完的인 다른 어떤 方法이 玆用되지 않으면 안된다. 그 중 GLC을 mass-spectrometry에 結合시킨 GLC-mass spectrometry (GLC-MS)는 未知脂肪酸를 純粹分離하지 않고도 그 構造를 決定할 수 있어 脂肪酸 構造分析에 必須的인 器機로 널리 使用되고 있다.

GLC-MS의 mode로는 electron impact mode (EI)와 chemical ionization mode (CI)가 있는데 前者는 GLC의 column에서 分離된 有機

분자를 electron beam으로 攻擊하여 fragmentation이 일어나게 하며, 이때 生成된 fragment의 pattern을 보아 이 分子의 構造를 알 수 있는데 反하여, 後者인 CI mode는 Munson과 Field[10, 11]에 의하여 처음으로 導入되었으며, 이 mode에서는 GLC에서 分離된 成分의 特徵적인 ion (diagnostic ion 또는 characteristic ion)이 electron impact 보다는 ion-molecule 反應에 의하여 生成된다. 이 技法에서는 壓力이 1 torr 程度로 높아 ion source에서 먼저 reagent gas (methane, butane, ammonia等)가 electron impact에 의하여 ion化되며, 이 ion은 reagent gas와는 거의 反應하지 않고 試料分子와 反應하여 이를 쉽게 ion化한다. 이 mode의 여러 長點중의 하나는 CI mode의 transfer energy가 EI mode의 그것보다 훨씬 낮으므로 EI mode에서 종종 볼 수 없는 試料의 分子量 情報를 얻을 수 있다는 것이다. 다음으로 重要的 것은 CI에 의하여 生成된 even-electron protonated ion들은 [例로서, M-H⁺]에서 生成된 radical molecular ion (M^{•+})보다 훨씬 安定하다는 것이다. 또 CI에서는 mass spectrum의 pattern이 試料를 ion化한 gas의 性質에 따라 달라지는데, 이 性質을 利用하여 여러 다른 reagent gas를 使用하므로써 그 試料分子의 構造에 관한 情報를 얻을 수 있다는 것이다.

本實驗에서는 새로운 方法으로 CTA를 가진 TG의 分子種을 stereospecific하게 分析하기 위하여 먼저 하늘타리, 여주와 油桐 種子脂質에서 分離하고 이것을 逆相- 또는 銀ion-HPLC로 分子種을 相互分離하였다. 여기서 얻은 각 TG 分子種의 二重結合을 重水素로 飽和시킨 後 Grignard 試藥으로 部分加水分解하여 deuterated DG (dDG) 混合物을 生成하게 하였다. 이 dDG 混合物을 NEU 誘導體化하여 silica 칼럼으로 1, 2-dDG-NEU, 2, 3-dDG-NEU와 1, 3-dDG-NEU로 分割하고, 얻어진 dDG-NEU 劃分의 脂肪酸을 遊離化시켜 pentafluoro-benzylbromide로 脂肪酸-pentafluorobenzyl ester의 誘導體로 만들었다[12]. 이것을 GLC-mass spectrometry의 negative ion chemical ionization (NICI) mode로 構成脂肪酸의 分子量에 該當하는 (M-1)⁻의 intensity를 測定하여 構成脂肪酸의 mole %를 求하여 公式[3] 따라 각 分子種의 脂肪酸의 立体特異의 分布를 調査하였다.

2. 實驗

試料인 하늘타리 種子 및 여주와 油桐의 種子를 1999年 가을에 釜山과 慶南一圓에서 購入하여 使用하였으며, 總脂質抽出, TG의 純粹分離, HPLC에 의한 TG 分子種의 相互分離, 試料의 脂肪酸 methyl ester化 方法은 前報[6] 報告한 바와 같다.

分離한 TG 分子種 脂肪酸의 deuteration 및 立体特異의 分析[13-15,23,24]

1. TG 分子種 脂肪酸의 deuteration ; 各 TG 또는 그 分割 (TG, 1~2 mg)을 teflon gum-lined screw cap을 한 8 mL容 vial에 옮기고, 여기에 小型 magnetic stirrer를 넣고, 1 mL의 1, 4-dioxane을 넣어 TG를 完全히 녹였다. 이 vial을 He gas로 3分間 flush한 後에 Wilkinson 觸媒 5 mg을 넣고 단단히 마개를 하고 vial을 攪拌하였다. 마개에 두 개의 주사바늘을 꽂아 한쪽 바늘 구멍으로는 He gas를 注入시켜 vial 內部를 3分間 purging하고, 다른쪽의 주사바늘 구멍을 통하여 gas가 排出되도록 하였다. 이런 操作을 끝내고 곧 D₂ gas로 switching하여 이 gas를 120分間 注入하면서 攪拌하였다(이때 vial의 溫度를 55°C로 維持하였다). 反應이 끝난 後 殘存溶媒를 窒素氣流下에서 完全히 除去하고 hexane으로 deuterated TG를 回收하여, 1回用 FlorisilTM column에 loading하여 hexane-acetone (96 : 4, v/v) 10 mL을 흘려 deuterated TG (dTG)를 精製하였다.

2. dTG의 部分加水分解

a. Grignard 試藥 調製[16] 0.3 g의 magnesium 부스러기 (turnings)을 250 mL容 round-bottom flask에 넣은 다음, 여기에 dry diethyl ether 25 mL과 極少量의 I₂를 加하여 magnetic stirrer로 攪拌하면서 I₂를 천천히 녹였다. 이 溶液에 0.2 mL의 C₂H₅Br를 10~20分에 걸쳐 少量씩 수차례 加하면서 反應液이 褐色으로 變할 때 까지 攪拌하였고, 다시 6~7分에 걸쳐 C₂H₅Br을 一回 0.2 mL씩 加하여 C₂H₅Br의 總量이 1.0 mL되게 하였으며 마지막 0.2 mL의 C₂H₅Br를 加한 後 30分間 더 攪拌하였다. 이 混合物을 常溫에 放置하여 얻어진 透明한 上層液만을 Grignard 試藥으로 使用하였다.

b. Grignard試藥에 의한 部分加水分解[17]

精製된 上記의 dTG (deuterated TG, 約 1 mg)를 100 mL容 screw-cap 試驗管에 옮기고 pyridine으로 乾燥시킨 dry diethyl ether 10 mL을 加하여 試料를 完全히 녹였다. 여기에 새로이 製造한 0.5M의 Grignard 試藥 (ethyl magnesium bromide in dry diethyl ether) 10 mL를 加하여 正確히 1分間 強力한 攪拌器로 攪拌하면서 應시킨 다음, 蒸溜水 2 mL의 pentane-acetic acid (5 mL : 6 μ L)의 混合液을 加하여 反應을 中止시켰다. 反應液을 充分히 攪拌한 後 遠心分離器로 有機溶媒層을 分離하였으며 이 有機溶媒層을 다시 2~3回 水洗한 다음 溶媒를 除去하고 反應生成物을 無水芒硝로 乾燥시켰다. 生成物이 dDG, dTG와 dMG의 混合物이므로 이것을 hexane-acetone (96 : 4, v/v, 3 mL)로 活性化시켜 둔 Bond ElutTMNH₂ column에 loading하여, hexane-acetone (96 : 4, v/v) 10 mL로 TG를 除去하고, hexane-acetone (80 : 20, v/v) 10 mL로 dDG를 分離하였다.

c. Lipase에 의한 dTG의 加水分解[18-20]

1M의 tris-buffer (pH 8.0) 1 mL, 2.2 % calcium chloride 溶液 0.1 mL과 0.05 % 膽汁酸 0.25 mL을 마개달린 試驗管에 넣어 잘 섞은 後, dTG를 1 mg 넣어 25~30℃의 water bath에 1分間 放置하였다. 여기에 tris-buffer에 녹인 肝臟 lipase를 爲始하여 *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotricum candidium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizophus delemar*, *R. arrhizus*와 *Mucor miehei*의 lipase를 各各 0.1 mL (200 units/1 mL)를 넣어 water bath에서 다시 5分間 攪拌한 後, 에탄올 1 mL와 6N 鹽酸 1 mL를 넣어 反應을 停止시켰다. 여기에 hexane-diethyl ether (1 : 1, v/v) 混合溶媒 10 mL와 蒸溜水 10 mL를 加하여 攪拌한 後, 有機溶媒層을 回收하여 窒素 氣流下에서 溶媒를 除去하였다. 이렇게 얻어진 deuterated TG, DG, MG 및 遊離脂肪酸의 混合物에서 위의 2-b 項에서 言及한 方法으로 dDG를 回收하였다.

3. dDG의 Naphthyl Ethyl Urethane (dDG-NEU) 誘導體化[17]

dDG의 混合物에 25 μ L의 (S)-(+)-1-(1-naphthyl)ethyl isocyanate와 4 mg의

4-pyrrolidinopyridine (1 mL toluene에 녹인 後)을 加하여 50℃에서 하룻밤 反應시켰다. 冷却한 反應液에 10% taurine 水溶液 100 μ L를 加하고 여기에 diethyl ether 10 mL와 물 2 mL를 加하여 잘 混和시켜 反應生成物을 diethyl ether層으로 移行시키고 (2~3回 反復), 모은 diethyl ether層을 無水芒硝로 脫水하여 窒素 氣流下에서 溶媒를 除去하였다. 이렇게 얻어진 固形物을 methanol/H₂O (95 : 5, v/v, 10 mL)로 녹여 이 methanol/H₂O 溶液으로 이미 水和시켜 둔 1回用 Bond ElutTMODS column에 loading하였다. 이 溶媒 15 mL을 흘려 不純物을 完全히 除去한 다음 10 mL의 acetone으로 DG-DEU 誘導體를 純粹히 分離하였다.

4. HPLC에 의한 dDG-NEU 誘導體의 resolution[17]

上記의 acetone液을 窒素 氣流下에서 溶媒를 濃縮하여 얻어진 固形物을 hexane에 녹여 HPLC 分析用 試料로 하였다. 使用한 HPLC는 isocratic solvent delivery system을 갖춘 Waters社의 Model 440이었으며, 分離 column으로 Hypersil (250 × 4.6 mm, 3 μ m, HiChrom Ltd., Reading, UK) 2個를 連結하여 使用하였다. 溶媒는 0.4 % propan-1-ol (2 % H₂O 含有)-hexane system을 使用하였으며 流速을 1.0 mL/min로 하여 isocratic하게 展開하였다. 이때 分離되는 peak를 感知하기 위하여 UV 檢出器 (Model M-720, Young-In Scientific Co., Ltd, Seoul, Korea)를 使用하였으며, 測定波長을 280 nm에 固定하였다. HPLC에서 1, 3-, 1, 2-dDG-NEU 및 2, 3-dDG-NEU 誘導體의 順으로 溶離된 各 peak의 溶出液을 모아 窒素 氣流下에서 溶媒를 除去하고 다음 實驗의 試料로 使用하였다.

5. dDG-NEU 誘導體의 脂肪酸의 methyl ester化[17]

HPLC에서 分離한 dDG-NEU 劃分의 一部을 diethyl ether에 녹여 10 mL容 마개달린 試驗管에 옮겨 殘存溶媒를 完全히 除去하였다. 여기에 dichloromethane 0.5 mL를 加하여 固形物을 完全히 녹인 다음 10% sodium methoxide-methanol과 methyl acetate을 各各 25 μ L를 加하여 50℃에서 1時間 反應시켜 脂肪酸 殘基를 methyl化하였다. 反應後 窒素 氣流下에서 內容物

을 乾固시킨 다음 hexane으로 脂肪酸 methyl ester를 回收하여 이를 1회용 Florisil™ column에 mounting한 後 hexane-acetone (99 : 1, v/v)로 純粹히 精製하여 GLC用 試料로 使用하였다. GLC 分析條件은 前報[6]에 기술한 바와 같다.

GLC-MS에 의한 構成脂肪酸의 同定

1. dDG-NEU 誘導體의 脂肪酸의 遊離化 및 pentafluorobenzyl化[21]

dDG-NEU 劃分の 나머지 部分을 diethyl ether에 녹여 마개달린 試驗管에 옮기고 餘分の 溶媒를 完全히 除去한 다음 여기에 0.1M KOH-ethanol 溶液을 0.25 mL 넣어 常溫에서 하룻밤 放置하여 加水分解시켰다. Acetic acid 한방울을 떨어뜨려 反應을 停止시키고, 이 反應生成物에 dry diethyl ether 3 mL, hexane 3 mL와 蒸溜水 2 mL를 加하여 攪拌하면서 遊離脂肪酸을 有機溶媒層에 옮겨가도록 하였다. 이 試驗管을 遠心分離하여 分離된 diethyl ether層만을 모아 窒素氣流下에서 殘存溶媒를 完全히 除去한 다음 10^{-2} torr의 眞空 desiccator에서 水分을 完全히 除去하였다.

이렇게 얻어진 遊離脂肪酸에 10% pentafluorobenzyl bromide-acetonitrile 溶液과 20% diisopropylethylamine-acetonitrile 溶液을 各各 25 μ L씩 加하여 常溫에서 15分間 放置하여 pentafluorobenzyl 脂肪酸 (PFB-脂肪酸)으로 誘導體하였다. 이 生成物을 殘存溶媒의 除去後 一回용 Florisil™칼럼에 loading하여 8 mL의 hexane-acetone (8 : 2, v/v)을 흘려 脂肪酸-PFB 誘導體를 純粹分離하여 GLC-MS 分析用 試料로 使用하였다.

2. GLC-MS의 分析條件[22]

Hewlett Packard 5890 gas chromatograph에 quadrupole system인 Hewlett-Packard 5989 mass engine을 付着한 GLC-MS를 使用하였다. Column으로 DB-1을 coating한 fused silica column (10 m \times 0.22 mm, film thickness, 2 μ m, J & W Scientific, Folsom, CA)을 使用하였고, column 溫度는 150°C에서 1分間 維持한 後 235°C까지 15°C/min으로 昇溫하였으며 이 溫度에서 260°C까지는 5°C/min으로 programming하였다. Carrier gas는 He으로 50 cm/s의 速度로

흘렸으며 使用한 mode는 NICI (negative ion chemical ionization) mode이었으며, moderating (reagent) gas는 methane gas를 使用하였다. PFB ester의 最大의 signal을 얻기 위하여 mass spectrometer의 壓力을 0.1 torr으로 하고 ion source의 電壓은 50eV으로 하며 selected ion monitoring (SIM)은 m/z 279와 285에서 하였다.

3. 結果 및 考察

前報[6]에 報告한 바와 같이 하늘타리 種子油의 主要한 TG 分子種은 (C_{18:2 ω 6})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂, (C_{18:1 ω 9})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂와 (C_{18:2 ω 6})₂(C_{18:3 9c,11t,13c})₂이고, 여주種子油 TG의 分子種은 그 折半을 차지하고 있는 (C_{18:1 ω 9})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂와 (C_{18:0})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂이었으며, 油桐種子油에는 (C_{18:2 ω 6})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂와 (C_{18:0})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂가 重要 TG 分子種이었다. 이들은 모두 punic acid 또는 α -eleostearic acid를 1分子乃至는 2分子를 含有하고 있었으며, Fig. 1은 CTA인 punic acid를 含有한 하늘타리 種子油 TG를 Grignard 試藥으로 部分加水分解하여 生成된 遊離脂肪酸을 GLC로 分析한 chromatogram이다. 大部分의 CTA가 破壞됨을 볼 수 있었으며, 여주 種子油의 TG를 이 試藥으로 部分加水分解하여도 α -eleostearic acid가 역시 破壞됨을 알 수 있었다(data 省略).

各各의 總TG 및 HPLC에서 分離된 TG의 主要分割을 1, 4-dioxane에 完全히 녹인 다음 Wilkinson 觸媒[23,24]의 存在下에 重水素 (D₂)를 各 分子의 二重結合에 附加시켰다 (deuteratation). 殘存溶媒를 窒素氣流下에서 完全히 除去한 後에 hexane으로 deuterated TG (dTG)를 回收하여 一回용 Florisil™ column에서 hexane-acetone (96 : 4, v/v)로 dTG를 精製하였으며, 그 一部를 濃縮하고 transmethylation하여 GLC로 脂肪酸組成을 分析한 結果 大部分의 二重結合이 重水素에 의하여 附加되었음을 確認할 수 있었다(Fig. 2).

前報[6]에 報告한 바와 같이 intact TG의

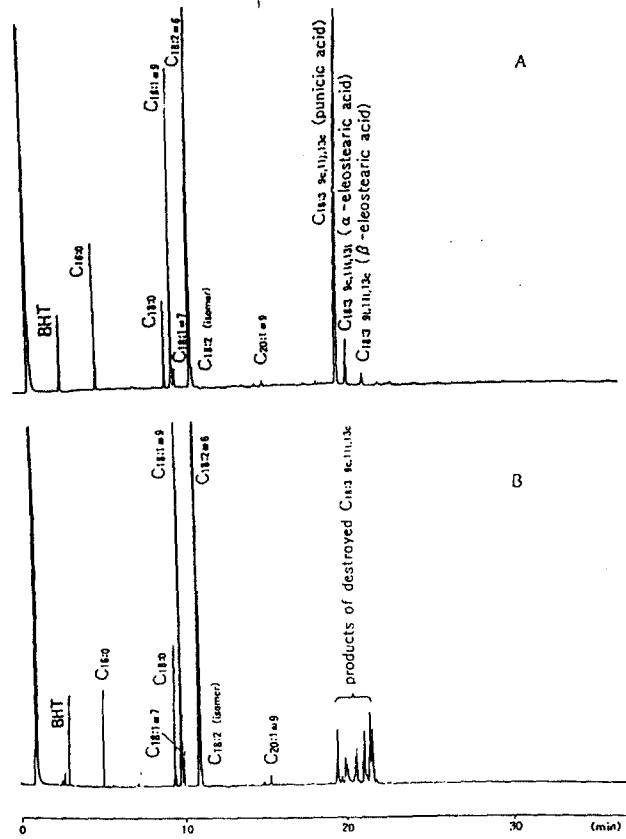


Fig. 1. GLC chromatogram of the fatty acid methyl esters of intact (A) and Grignard reagent-treated triacylglycerols (B) of the seed oils of *T. kirilowii*.

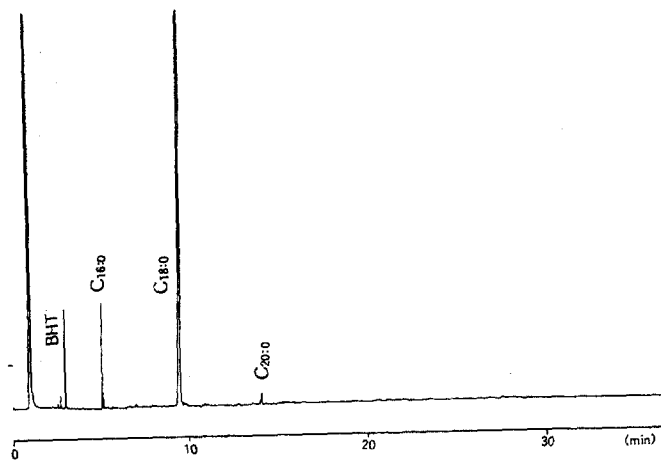


Fig. 2. GLC chromatogram of the fatty acid methyl esters of deuterated triacylglycerols of the seed oils of *T. kirilowii*.

CTA 殘基는 pancreatic lipase와 微生物 *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotricum candidium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizophus delemar*, *R. arrhizus*와 *Mucor miehei*의 lipase에 의하여 加水分解되지 않았으나, deuterated CTA-TG는 이 酵素들에 의하여 部分加水分解되었으며 또 Grignard 試藥에 의하여서도 脂肪酸 分子의 아무런 破壞없이 加水分解되었다(data 省略). 앞으로 繼續되는 實驗에는 以上の 2가지 部分加水分解 方法중 短時間에 實驗을 簡單하게 實施할 수 있는 Grignard 試藥에 의한 部分加水分解法을 選擇하였다.

DG의 diastereomer를 HPLC로 resolution하는 方法에는 DG를 DG-urethane 誘導體로 만들어 silica 칼럼으로 分析하는 方法과 DG를 3, 5-dinitrophenyl urethanes으로 만들어 chiral 칼럼으로 分析하는 方法이 있다[25]. 前者는 칼럼이 低廉하고 DG가 toluene 溶媒에서 알카리 觸媒로 迅速하게 DG-urethanes로 誘導體化되고, 反應중에 racemization이 全然 일어나지 않으며 [26] 또 trichlorosilane에 의하여 本來의 DG를 再生할 수 있는 長點 [27~29]이 있어 後者보다 널리 利用되고 있다.

本 實驗에서도 나머지 精製한 dTG를 Grignard 試藥을 使用하여 dDG의 混合物로 部分加水分解하고 이 dDG를 위에 言及한 前者의 方法에 따라 dDG-urethanes으로 誘導體化하였다. 즉 dDG 混合物에 (S)-(+)-1-(1-naphthyl) ethyl isocyanate와 4-pyrrolidinopyridine을 加하여 50°C에서 하룻밤 反應시켜 dDG-NEU 誘導體를 生成하게 하였다. 이 生成物을 diethyl ether로 回收하여 溶媒를 除去한 後에 methanol/H₂O (95 : 5, v/v)에 녹여 1회用 Bond Elut™ ODS column에 loading하여 acetone으로 dDG-NEU 誘導體를 比較的 純粹히 溶離하였다. 溶媒를 除去後 얻어진 固形物을 hexane에 녹여 Hypersil (250 × 4.6 mm, 3 μm, HiChrom Ltd., Reading, UK) 2個를 連結한 HPLC 칼럼에서 0.4% propan-1-ol (2% H₂O 含有)-hexane의 溶媒 system으로 isocratic하게 resolution하였다.

Christie[4, 5]는 牛乳脂質이나 魚油에서 分離한 TG에서와 같이 그 脂肪酸組成이 複雜한 脂質의 TG를 DG-NEU 誘導體하여 이것을 HPLC의 silica 칼럼에서 1, 3-, 1, 2- 및 2,

3-DG-NEU 誘導體의 相互分離를 試圖하였으나 peak가 너무 複雜하여 이 方法으로 TG를 stereospecific하게 分析하는 것은 不可能하다고 하였으나, 脂肪酸組成이 單純한 植物油脂의 TG를 DG-NEU 誘導體로 만들어 HPLC의 silica 칼럼에서 分離하였더니 1, 3-, 1, 2- 및 2, 3-DG-NEU 誘導體가 明確히 區別되었다고 報告하였다.

本 實驗에서도 脂肪酸組成이 簡單한 palm油의 TG에서 誘導된 DG-NEU (naphthyl ethyl urethane)를 HPLC로 分析하였더니 Fig. 3-A에서 보는 바와 같이 1, 3-, 1, 2- 및 2, 3-dDG-NEU로 分離할 수 있었으며, 또 하늘타리, 여주와 油桐의 種子油 TG의 構成脂肪酸를 重水素로 飽和 (deuteration)시켜 脂肪酸組成이 매우 單純한 deuterated TG (dTG)로 轉換하여 이것을 위에서 言及한 方法으로 部分加水分解하고 dDG-NEU로 誘導體化하였다. 이것을 HPLC로 分析한 結果는 Fig. 3-B (하늘타리)에서 보는 바와 같이 1, 3-, 1, 2- 및 2, 3-dDG-NEU 誘導體가 順次的으로 깨끗하게 溶離되 매우 滿足스러웠다.

脂肪酸의 分子量을 GLC-MS로 分析할 때는 그 脂肪酸를 electron impact(EI) mode 대신에 chemical ionization(CI) mode를 使用하며, 이 CI mode에는 electron spray CI, atmospheric pressure CI 등 여러가지의 形態가 現在 널리 使用되고 있다. 그러나 이들 方法들은 모두 相異한 analytical specificity를 가지고는 있으나, 그 基本原理는 同一하다. 즉, 쉽게 ion化되는 moderating gas (例로서 CH₄ gas, NH₃ gas)을 一次的으로 ion化시키면 이것이 다시 analyte을 mild하게 ion化시켜줌으로 그 分子가 破壞되지 않고 쉽게 ion化하여 (M-1) (M; 分子量)에 該當하는 diagnostic한 parent ion이 發生한다. 그 한 例로서 脂肪酸 또는 그 誘導體의 pentafluorobenzyl ester는 electronegative한 fluorine을 가졌으므로 쉽게 陰으로 charge됨으로 mass spectrometer에서 陰 ion을 捕獲할 수 있는 negative-ion chemical ionization(NICI) mode에서 測定하면 (M-1)에 該當하는 parent peak가 쉽게 觀察된다[21,30].

各試料에서 分離한 TG를 重水素化한 總 dTG와 HPLC에서 分離한 各 dDG-NEU 劃分의 一部을 取하여 0.1M KOH-ethanol 溶液으로 常溫에서 하룻밤 放置하여 加水分解하여 脂肪酸

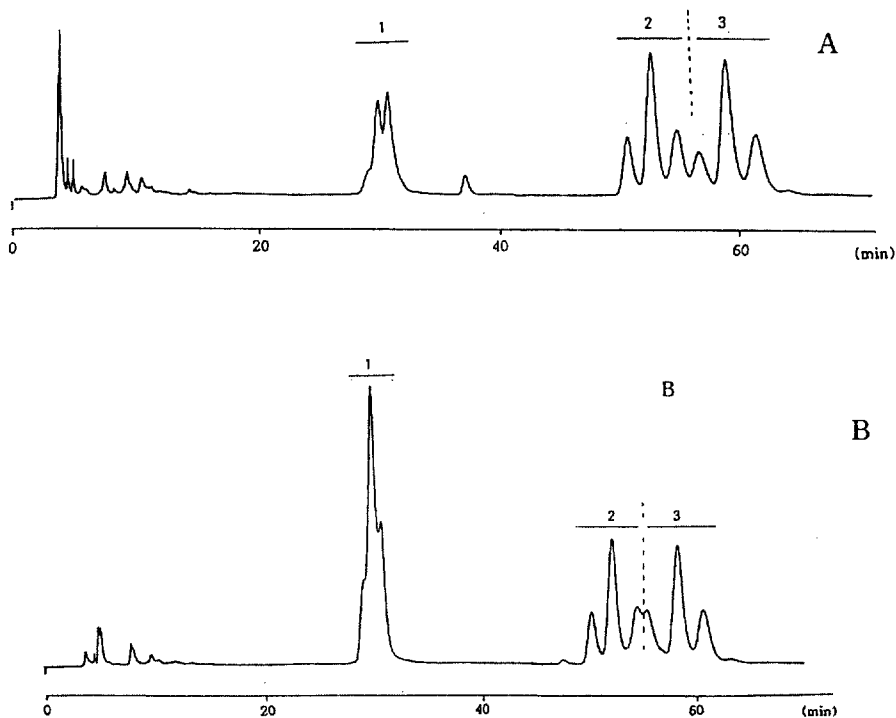


Fig. 3. HPLC resolution of (S)-(+)-1-(1-naphthyl)ethyl urethane derivatives of diacyl-sn-glycerols prepared from TGs of palm oil(A) and deuterated TGs of *T. kirilowii*(B)

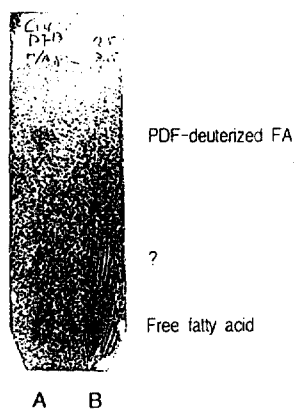


Fig. 4. TLC chromatogram of fatty acid-PFB ester (A) and free fatty acid (B)
 Adsorbent ; kieselgel 60 F₂₅₄
 Developing solvent ; hexane : acetone (98 : 2, v/v)
 Coloring ; sprayed 50% H₂SO₄ and charred at 150°C

을 遊離시켰다. 이 遊離脂肪酸을 回收하여 殘存 溶媒와 水分을 完全히 除去하고, 이것을 10% pentafluorobenzyl bromide-acetonitrile 溶液과 20% diisopropylethylamine-acetonitrile 溶液과 함께 常溫에서 15分間 放置하여 pentafluorobenzyl 脂肪酸 (脂肪酸-PFB ester)으로 誘導體 化하였다 (Fig. 4). 反應生成物을 hexane으로 回收·濃縮하여 Florisil™ 칼럼에서 hexane-acetone (8 : 2, v/v)으로 脂肪酸-PFB ester를 比較的 純粹히 精製하였다.

重水素로 飽和시킨 脂肪酸-PFB ester를 70eV 에서 EI mode의 mass spectrometer에서 分析 하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 分子量을 알 수 있는 (M-1)⁻의 peak가 아주 작고 또 다른 diagnostic peak를 찾기가 무척 어려웠고, 餘他 많은 不必要한 peak들이 觀察되었다. 따라서 이 方法 (EI mode)을 利用한 mass spectrometry로는 脂肪酸組成을 定量的으로 計算하기에는 不可能하였다. 다음에 陰 ion을 捕獲할 수는 NICI mode로 바꾸어 deuterated puniic acid와 deuterated α -eleostearic acid (d_6 -C₁₈₀)의 脂肪酸-PFB ester를 mass-spectrometry로 測定한 結果를 Fig. 6-A와 B에서 나타내었는데, 脂肪酸 carboxylate (M-1)⁻인 peak가 parent peak로 m/z 289에 나타났으나, PFB 殘基는 分子에서 離脫되어 ion化 가스인 methane과 作用하여 m/z 196 [(181 + 15), (PFB + CH₃)⁻]으로 charge되어 mass spectrum 上에 아주 작은 minor peak로 나타났으며 餘他 다른 peak는 觀察되지 않았다. 이처럼 NICI mode에서는 (M-1) peak와 m/z 196의 peak外에는 다른 fragment는 生成되지 않았으므로, 이 mode는 EI mode와는 判異하게 脂肪酸의 分子量 測定에 利用될 수 있는 再現性이 높은 測定 方法임을 알 수 있었다.

脂肪酸-PFB ester를 NICI mode로 分析하면 그 脂肪酸의 分子量 測定은 물론이고 感度가 아주 銳敏하여 이 方法은 微量의 脂肪酸의 代謝產物 測定에 많이 利用되어 왔었다[21,22]. Fig. 7에서 보는 바와 같이 deuterated oleic acid (d_2 -C₁₈₀, A), linoleic acid (d_4 -C₁₈₀, B), puniic acid (d_6 -C₁₈₀, C)와 eicosamonoenoic acid (d_2 -C₂₀₀, D)의 GLC-mass spectra인데 m/z 285, 287, 289과 317에서 各 脂肪酸의 (M-1)⁻이 parent peak로 나타났으며, Fig. 8에서 보는 바와 같이 하늘타리, 여주 및 油桐의 種子油에서

分離한 TG를 deuteration하여 各 試料의 構成 脂肪酸의 parent peak를 同時에 測定할 수 있었다. 이 chromatogram上에 나타난 各 peak의 intensity를 測定하여 그 相對比로 構成脂肪酸 組成 (mole %)의 分析을 試圖하였다. 즉, Table 1에서 보는 바와 같이 하늘타리, 여주 및 油桐의 種子油에서 由來된 總dTG의 脂肪酸을 PFB ester로 轉換여 GLC-MS로 그 組成을 分析한 結果 (mole %, 各 peak의 intensity比)는 各 種子油의 intact TG (重水素化하지 않은 TG)의 脂肪酸 組成을 GLC로 分析한 結果[6]와 거의 一致하였다. 따라서 本 實驗에서는 脂肪酸-PFB ester의 定量時에 各 脂肪酸의 含量 補正을 위한 calibration curve을 別途로 作成하지 않았다.

하늘타리에서 分離한 總TG를 重水素化하여 그 構成脂肪酸을 立體特異적으로 分析한 結果를 Table 2에 나타내었다. Punicic acid와 linoleic acid와 같은 不飽和脂肪酸은 glycerol 殘基의 sn-2와 sn-3에 치우쳐져 있었으며, 飽和脂肪酸은 sn-1에 偏在해 있었다. 하늘타리 TG의 主要 分子種인 (C_{18:2 ω 6})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂에는 sn-1-C_{18:2 ω 6}, sn-2-C_{18:3 9c,11t,13c}, sn-3-C_{18:3 9c,11t,13c}의 立體特異 異性體가 大部分이고(Table 3), (C_{18:1 ω 9})(C_{18:2 ω 6})(C_{18:3 9c,11t,13c})의 境遇에는 sn-1-C_{18:1 ω 9}, sn-2-C_{18:2 ω 6}, sn-3-C_{18:3 9c,11t,13c}의 立體特異 異性體가 제일 많았으며, (C_{18:2 ω 6})₂ (C_{18:3 9c,11t,13c})와 (C_{16:0})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂의 分子種에는 sn-1-C_{18:2 ω 6}, sn-2-C_{18:2 ω 6}, sn-3-C_{18:3 9c,11t,13c}과 sn-1-C_{16:0}, sn-2-C_{18:3 9c,11t,13c}, sn-3-C_{18:3 9c,11t,13c}가 主된 立體特異 異性體이었다. 이런 結果로 부터 大部分의 立體特異 異性體에서 C_{18:3 9c,11t,13c}의 殘基가 sn-3 또는 sn-2의 位置에 偏在하고 있음을 알 수 있었다.

여주의 重水素化한 總TG의 構成脂肪酸을 立體特異적으로 分析한 結果를 Table 4에 나타낸 바와 같이 α -eleostearic acid는 sn-3 位置에 若干 치우쳐져 存在하고 있었으며 linoleic acid는 sn-3보다 sn-1과 sn-2 位置에 偏在하고 있었다. 여주 TG의 主要 分子種인 (C_{18:1 ω 9})(C_{18:3 9c,11t,13t})₂에는 sn-1-C_{18:1 ω 9}, sn-2-C_{18:3 9c,11t,13t}, sn-3-C_{18:3 9c,11t,13t}의 立體特異 異性體가 大部分이고, (C_{18:0})(C_{18:3 9c,11t,13t})₂의 分子種에는 sn-1-C_{18:0}, sn-2-C_{18:2 9c,11t,13t}, sn-3-C_{18:3 9c,11t,13t}의 立體特異 異性體가 제일 많았으며, (C_{18:2 ω 6})(C_{18:3 9c,11t,13t})₂와 (C_{18:1 ω 9})(C_{18:2 ω 6})(C_{18:3 9c,11t,13t})의 分子種에는

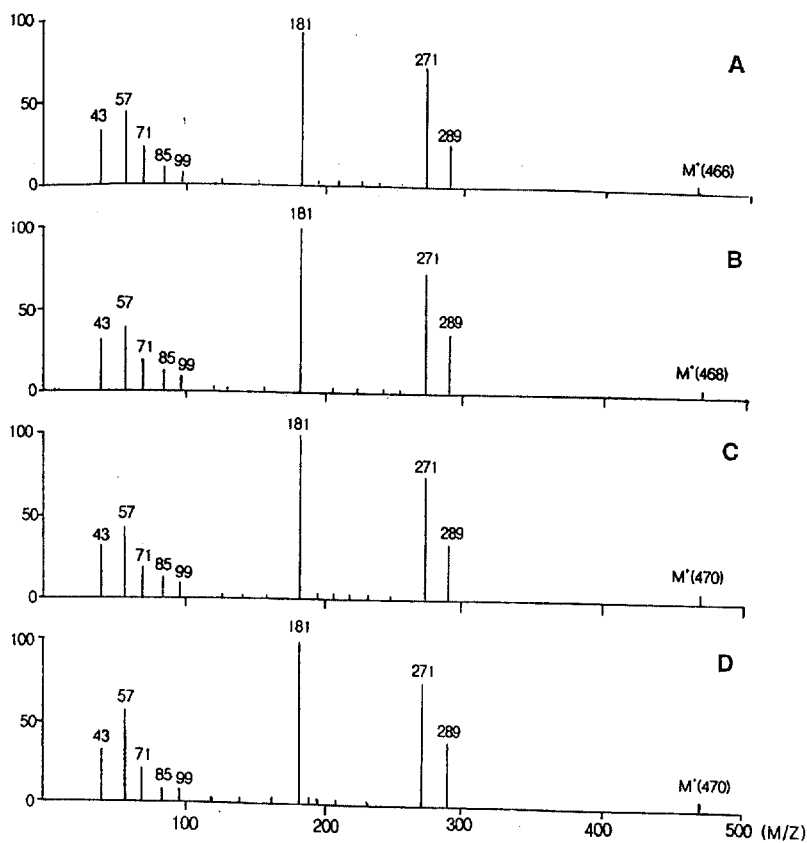


Fig. 5. Positive-ion electron impact (EI, 70eV) mass spectra of deuterated oleic acid (A), linoleic acid (B), punnic acid (C) and α -oleostearic acid-PFB esters (D)

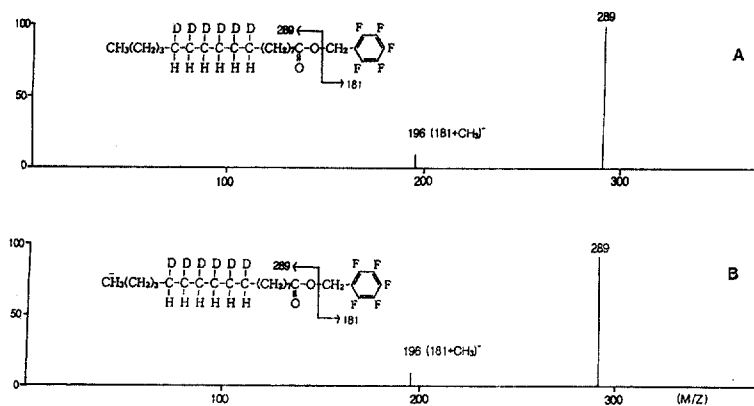


Fig. 6. Negative-Ion CI (CH_4) mass spectra of PFB deuterated punnic acid ($\text{C}_{18:3}^{9c,11t,13c}$) (A) and α -oleostearic acid ($\text{C}_{18:3}^{9c,11t,13t}$) (B)

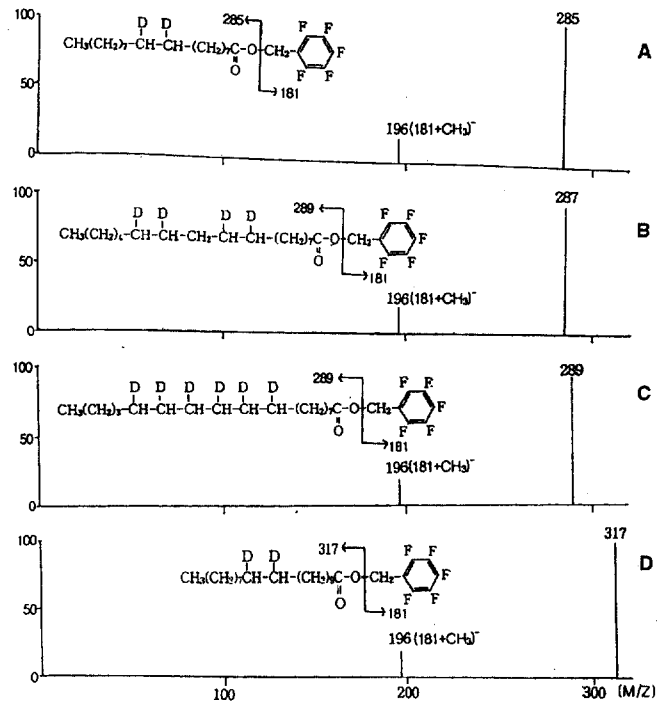


Fig. 7. Negative-ion chemical ionization (NICI) mass spectra of PFB esters of deuterated oleic acid (d₂-C_{18:0}, A), linoleic acid (d₄-C_{18:0}, B), puniic acid (d₆-C_{18:0}, C) and eicosamonoenoic acid (d₂-C_{20:0}, D)

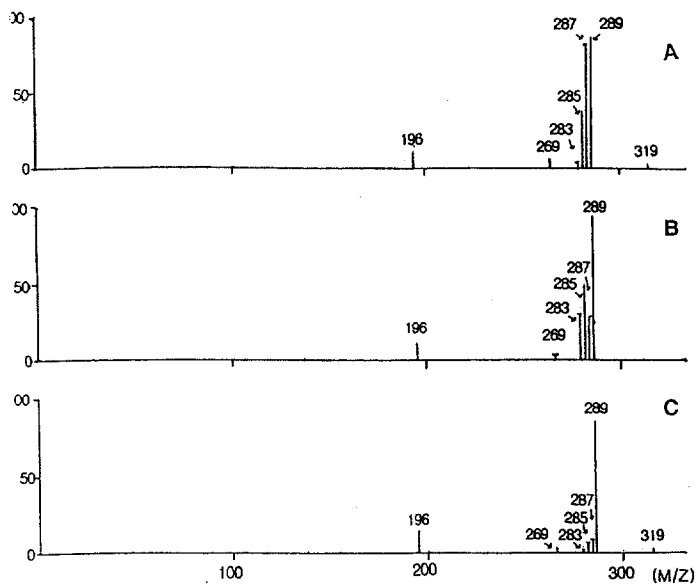


Fig. 8. NICI (CH₄)-mass spectra of PFB esters of deuterated fatty acids of triacylglycerols from the seed oils of *T. kirilowii* (A), *M. charantia* (B) and *A. fordii* (C)

Table 1. Fatty Acid Compositions (mole %) of Total Triacylglycerols from the Seed Oils of *Trichosanthes kirilowii* (A), *Momordica charantia* (B) and *Aleurites fordii* (C), Before and After Their Deuteration

Fatty acid	<i>Trichosanthes kirilowii</i>		<i>Momordica charantia</i>		<i>Aleurites fordii</i>	
	GLC ^{a)}	PFB ^{b)}	GLC ^{a)}	PFB ^{b)}	GLC ^{a)}	PFB ^{b)}
C _{16:0}	4.8	4.6	1.8	1.6	2.4	2.2
C _{18:0}	3.1	3.0	12.3	12.0	1.7	1.7
C _{18:1ω9}	11.8		17.4		5.4	
C _{18:1ω7}	0.7					
d ₂ -C _{18:0}		11.9		17.9		5.5
C _{18:2}	38.2		10.6		8.5	
C _{18:2(iso)}	0.7					
d ₄ -C _{18:0}		39.3		10.8		8.3
C _{18:3 9c,11t,13c}	38.0		0.4		0.3	
C _{18:3 9c,11t,13t}	2.1		57.1		81.2	
C _{18:3 9t,11t,13c}	0.4					
d ₆ -C _{18:0}		41.1		57.7		82.0
C _{20:1ω9}	0.2				0.5	
d ₂ -C _{20:0}		0.1				0.3

a ; ref. 6

b ; relative intensity of each (M-1) ion peak to the sum of intensities of total (M-1) ion peaks, produced from total dTGs of each sample by GLC-MS.

Table 2. Distribution of Fatty Acids in the *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3 Positions of Total Triacylglycerols from the Seed Oils of *Trichosanthes kirilowii*

Intact TG Fatty acid	composition mole %	Deuterated TG								
		deuterated fatty acid	composition ^{a)} mole %	1, 3-dDG ^{b)}	1, 2-dDG ^{b)}	2, 3-dDG ^{b)}	<i>sn</i> -1 ^{c)}	<i>sn</i> -2 ^{d)}	<i>sn</i> -3 ^{e)}	<i>sn</i> -2 ^{f)}
C _{16:0}	4.8	C _{16:0}	4.6	5.3	6.3	2.5	8.8	3.1	1.2	4.5
C _{18:0}	3.1	C _{18:0}	3.0	3.5	3.2	2.3	4.4	2.0	2.6	2.4
C _{18:1ω9}	11.8	d ₂ -C _{18:0}	11.9	12.8	13.2	9.7	16.3	10.2	9.2	12.8
C _{18:1ω7}	0.7									
C _{18:2ω6}	38.2	d ₄ -C _{18:0}	39.3	37.7	38.8	41.4	35.1	42.5	40.3	41.2
C _{18:2(iso)}	0.7									
C _{18:3 9c,11t,13c}	38.0	d ₆ -C _{18:0}	41.1	40.6	38.5	44.2	34.9	42.2	46.4	39.0
C _{18:3 9c,11t,13t}	2.1									
C _{18:3 9t,11t,13c}	0.4									
C _{20:1ω9}	0.2	d ₂ -C _{20:0}	0.1	0.1	0.1	0.1		0.1	0.2	0.1

*a ; relative intensity of each (M-1) ion peak to the sum of intensities of total (M-1) ion peaks of PFB-derivatives of total deuterated fatty acids, by NICI mass spectrometry

b NEU derivatives of 1, 3-, 1, 2- and 2, 3-dDG obtained after hydrolysis of deuterated TG from *Trichosanthes kirilowii* seed oils with Grignard reagent.

c ; (3 × dTG)-(2 × *sn*-2, 3-dDG)

d ; (3 × dTG)-(2 × *sn*-1, 3-dDG)

e ; (3 × dTG)-(2 × *sn*-1, 2-dDG)

f ; fatty acid composition of 2-dMG fraction derived from hydrolysis of deuterated triacylglycerols with Grignard reagent.

Table 3. Distribution of Fatty Acids in the *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3 Positions of the Main Species of Triacylglycerols from the Seed Oils of *Trichosanthes kirilowii*

Intact TG		total dTG		fraction												
fatty acid	mol% ^{a)}	fatty acid	mol% ^{b)}	DT _{c2} ^{d)}			MDT _c			D ₂ T _c			PT _c			
				<i>sn</i> -1 ^{c)}	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	
C _{16:0}	4.8	C _{16:0}	4.6													
C _{18:0}	3.1	C _{18:0}	3.0													
C _{18:1 ω9}	11.8	d ₂ -C _{18:0}	11.9				42.1	20.9	10.1				37.5	10.1	5.2	
C _{18:1 ω7}	0.7															
C _{18:2 ω6}	38.2	d ₄ -C _{18:0}	39.3	60.3	48.5	38.7	29.1	33.1	35.2	54.1	73.1	65.4	28.1	35.3	35.9	
C _{18:2(iso)}	0.7															
C _{18:3 9c,11,13c}	38.0	d ₆ -C _{18:0}	41.1	39.6	51.4	61.3	28.9	46.0	54.7	45.8	26.7	34.5	34.4	54.6	58.9	
C _{18:3 9c,11,13t}	2.1															
C _{18:3 9t,11,13c}	0.4															
C _{20:1 ω9}	0.2	d ₂ -C _{20:0}														

*a) mol % by GLC

b) relative intensity to the sum of intensities of total peaks of PFB-derivatives of total deuterated fatty acids of total TG, by NICI mass spectrometry

c) cf Table 2

d) D ; dienoic acid, P ; palmitic acid, M ; monoenoic acid, T_c ; punicic acid.

Table 4. Distribution of Fatty Acids in the *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3 Positions of Total Triacylglycerols from the Seed Oils of *Momordica charantia*

Intact TG		deuterated TG								
Fatty acid	composition mol%	deuterated fatty acid	composition ^{a)} mol%	1,	1,	2,	<i>sn</i> -1 ^{c)}	<i>sn</i> -2 ^{d)}	<i>sn</i> -3 ^{e)}	<i>sn</i> -2 ^{f)}
				3-dDG ^{b)}	2-dDG ^{b)}	3-dDG ^{b)}				
C _{16:0}	1.8	C _{16:0}	1.6	1.8	1.4	1.6	1.6	1.3	2.0	2.0
C _{18:0}	12.3	C _{18:0}	12.0	13.1	10.5	12.4	11.3	9.7	15.0	10.2
C _{18:1 ω9}	17.4	d ₂ -C _{18:0}	17.9	18.3	17.6	17.8	18.2	17.2	18.5	18.9
C _{18:2 ω6}	10.6	d ₄ -C _{18:0}	10.8	9.4	13.1	9.9	12.5	13.6	6.2	15.0
C _{18:3 9c,11,13c}	0.4	d ₆ -C _{18:0}	57.7	57.4	57.4	58.3	56.4	58.2	58.3	53.9
C _{18:3 9c,11,13t}	57.1									

*a ; relative intensity to the sum of intensities of total peaks of PFB-derivatives of total deuterated fatty acids of total TG, by NICI mass spectrometry

b ; NEU derivatives of 1, 3-, 1, 2- and 2, 3-dDG obtained after hydrolysis of deuterated TG from *Momordica charantia* seed oils with Grignard reagent.

c ; (3 × dTG)-(2 × *sn*-2, 3-dDG)

d ; (3 × dTG)-(2 × *sn*-1, 3-dDG)

e ; (3 × dTG)-(2 × *sn*-1, 2-dDG)

f ; fatty acid composition of 2-dMG fraction derived from hydrolysis of deuterated triacylglycerols with Grignard reagent.

sn-1- $C_{18:2\omega6}$, *sn*-2- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$, *sn*-3- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$ 와 *sn*-1- $C_{18:1\omega9}$, *sn*-2- $C_{18:2\omega6}$, *sn*-3- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$ 가 主된 立体特異 異性体이었다(Table 5). Table 4와 5의 結果가 若干의 差異를 보이나 大部分의 立体特異 異性体에서 $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$ 의 殘基가 *sn*-2 또는 *sn*-3 位置에 偏在하고 있음을 알 수 있었다.

한편 油桐의 境遇를 보면 總 TG의 80% 이상을 차지하고 있는 單純 TG分子種인 ($C_{18:3}$ $9c,11t,13t$)₃에는 $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$ 가 glycerol殘基에 고루 分布하고 있음을 알 수 있으나(Table 6), 그 外의 分子種인 ($C_{18:2\omega6}$)($C_{18:3}$ $9c,11t,13t$)₂, ($C_{18:1\omega9}$)($C_{18:3}$ $9c,11t,13t$)₂와 ($C_{16:0}$)($C_{18:3}$ $9c,11t,13t$)₂에서 分子種에는 *sn*-1- $C_{18:2\omega6}$, *sn*-2- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$, *sn*-3- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$ 와 *sn*-1- $C_{18:1\omega9}$, *sn*-2- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$, *sn*-3- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$ 및 *sn*-1- $C_{16:0}$, *sn*-2- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$, *sn*-3- $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$ 가 主된 立体特異 異性体이었다(Table 7).

天然에 存在하는 植物油脂의 脂肪酸分布를 보면 不飽和脂肪酸이 *sn*-1보다 *sn*-3位置에 若干 치우쳐져 存在한다고 알려져 있다[30]. 以上의 結果에서도 하늘타리와 여주脂質에서 分離한 TG에 存在하는 conjugate trienoic acid는 *sn*-1 位置보다 *sn*-3 位置에 偏在하고 있었다.

一般 脂肪酸의 生合成을 보면 acetate가 滑面小胞體의 fatty acid complex synthetase라는 複合酵素에 의하여 elongate되어 一定한 炭素길이의 飽和脂肪酸으로 合成되며[31], 이 飽和脂肪酸에 desaturase가 作用하여 不飽和脂肪酸이 만들어지고 있다고 알려져 있으나 punicic acid나 α -eleostearic acid와 같은 CTA의 生合成에 관한 研究는 全然 없다. 또 TG의 生合成 mechanism을 보면 phosphatidate가 specific한 phosphatase에 의하여 加水分解되어 1, 2-diacylglycerol (DG)로 轉換되고, 이 1, 2-DG에 diacylglycerol acyl transferase에 의하여 새로운 acyl基가 *sn*-3 位置에 導入되어 비로소 TG가 合成된다고 알려져 있으나[32], 왜 CTA 脂肪酸이 *sn*-2 또는 *sn*-3 位置에 偏在하여 存在하는가를 說明하기에는 本實驗의 結果로는 不可能하다고 여겨진다.

4. 結論

TG의 CTA 殘基는 pancreatic lipase와 微生物

Candida cylindracea, *Chromobacterium viscosum*, *Geotricum candidium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus delemar*, *R. arrhizus*와 *Mucor miehei*의 lipase에 의하여 加水分解되지 않았으며, 또 이 殘基는 Grignard 試藥에 의하여 大部分 破壞됨을 觀察할 수 있었다. 各各의 總TG 및 HPLC에서 分離된 主要 TG分劃을 D_2 gas로 飽和(deuteration)시켜 deuterized TG(dTG)로 만들어 Grignard 試藥으로 部分加水分解하여 dDG 混合物를 生成하게 하였다. 이것을 dDG-naphthyl ethyl urethanes (dDG-NEU)誘導體化하여 HPLC의 silica column에서 0.4% propan-1-ol (2 % H_2O 含有)-hexane의 溶媒로 1, 3-, 1, 2- 및 2, 3-dDG-NEU 誘導體를 順次的으로 resolution할 수 있었다. 各 dDG-NEU 劃分을 加水分解시켜 얻은 遊離脂肪酸을 脂肪酸-PFB ester으로 誘導體化하여, NICI mode의 GLC-mass spectrometry (GLC-MS)로 分析한 結果 各 脂肪酸의 carboxylate인 ($M-1$)⁻이 parent peak로 나타났으며, PFB基는 離脫되어 離子化 가스인 methane과 作用하여 m/z 196 (PFB + CH_3)⁻으로 charge되어 mass spectrum上에 아주 작은 peak로 나타났으며, 그 外의 다른 fragment는 觀察되지 않았다. 하늘수박, 여주 및 油桐의 種子油의 dTG의 GLC-MS에서 deuterized oleic acid (d_2 - $C_{18:0}$), linoleic acid (d_4 - $C_{18:0}$), punicic acid (d_6 - $C_{18:0}$)와 eicosamonoenoic acid (d_2 - $C_{20:0}$)의 parent peak인 ($M-1$)⁻가 m/z 285, 287, 289과 317에서 觀察되었으며, GLC-MS로 測定한 하늘타리 總 dTG의 脂肪酸 組成은 $C_{16:0}$: 4.6 mole % (4.8 mole %, intact TG by GLC), $C_{18:0}$: 3.0 mole % (3.1 mole %), d_2 - $C_{18:0}$: 11.9 mole % (12.5 mole %, sum of $C_{18:1\omega9}$ and $C_{18:1\omega7}$ of intact TG), d_4 - $C_{18:0}$: 39.3 mole % (38.9 mole %, sum of $C_{18:2\omega6}$ and its isomer), d_6 - $C_{18:0}$: 41.1 mole % (40.5 mole %, sum of $C_{18:3}$ $9c,11t,13c$, $C_{18:3}$ $9c,11t,13r$ and $C_{18:3}$ $9c,11t,13t$), d_2 - $C_{20:0}$: 0.1 mole % (0.2 mole % of $C_{20:1\omega9}$)로 하늘수박의 intact TG의 脂肪酸組成 (mole %)과 거의 一致하였다. 여주 種子油의 TG에서도 $C_{16:0}$: 1.5 mole % (1.8 mole %, intact TG by GLC), $C_{18:0}$: 12.0 mole % (12.3 mole %), d_2 - $C_{18:0}$: 16.9 mole % (17.4 mole %, sum of $C_{18:1\omega9}$), d_4 - $C_{18:0}$: 11.0 mole % (10.6 mole %, sum of $C_{18:2\omega6}$), d_6 - $C_{18:0}$: 58.6 mole % (57.5

Table 5. Distribution of Fatty Acids in the *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3 Positions of the Main Species of Triacylglycerols from the Seed Oils of *Momordica charantia*

Intact TG		total dTG		fraction												
fatty acid	mol% ^{a)}	fatty acid	mol% ^{b)}	MT _{ci2} ^{d)}			S _t T _{ci2}			DT _{ci2}			MDT _{ci}			
				<i>sn</i> -1 ^{c)}	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	
C ₁₆₀	1.8	C ₁₆₀	4.6													
C ₁₈₀	12.3	C ₁₈₀	3.0				53.9	12.4	11.2							
C _{18:1 ω9}	17.4	d ₂ -C ₁₈₀	11.9	56.2	18.2	11.3								63.1	22.8	25.0
C _{18:2 ω6}	10.6	d ₄ -C ₁₈₀	39.3							44.3	10.5	11.2		25.6	57.9	25.8
C _{18:3 9c,11t,13c}	0.4	d ₆ -C ₁₈₀	41.1	43.6	81.9	98.9	46.1	87.5	88.7	55.5	99.0	98.5		11.3	19.3	53.2
C _{18:3 9c,11t,13t}	57.1															

* a) mol % by GLC

b) relative intensity to the sum of intensities of total peaks of PFB-derivatives of total deuterated fatty acids of total TG, by NICI mass spectrometry

c) cf Table 3

d) D ; dienoic acid, S_t ; stearic acid, M ; monoenoic acid, T_{ci} ; α-eleostearic acid.

Table 6. Distribution of Fatty Acids in the *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3 Positions of Total Triacylglycerols from the Seed Oils of *Aleurites fordii*

Intact TG		deuterated TG								
Fatty acid	composition mol%	deuterated fatty acid	composition ^{a)} mol%	1,	1,	2,	<i>sn</i> -1 ^{c)}	<i>sn</i> -2 ^{d)}	<i>sn</i> -3 ^{e)}	<i>sn</i> -2 ^{f)}
				3-dDG ^{b)}	2-dDG ^{b)}	3-dDG ^{b)}				
C ₁₆₀	2.4	C ₁₆₀	2.2	2.1	2.4	2.1	2.4	2.4	1.8	2.9
C ₁₈₀	1.7	C ₁₈₀	1.7	1.5	1.9	1.7	1.7	2.0	1.3	1.8
C _{18:1 ω9}	5.4	d ₂ -C ₁₈₀	5.5	5.7	5.7	5.1	5.7	5.0	5.2	5.3
C _{18:2 ω6}	8.5	d ₄ -C ₁₈₀	8.3	8.6	8.0	8.3	8.3	7.6	8.9	7.4
C _{18:3 9c,11t,13c}	0.3	d ₆ -C ₁₈₀	82.0	81.7	81.7	82.6	80.8	83.0	82.5	82.6
C _{18:3 9c,11t,13t}	81.2									
C _{20:1 ω9}	0.5	d ₂ -C ₂₀₀	0.3	0.4	0.3	0.2	0.5		0.3	

* a ; relative intensity to the sum of intensities of total peaks of PFB-derivatives of total deuterated fatty acids of total TG, by NICI mass spectrometry

b ; NEU derivatives of 1, 3-, 1, 2- and 2, 3-dDG obtained after hydrolysis of deuterated TG from *Aleurites fordii* seed oils with Grignard reagent

c ; (3 × dTG) - (2 × *sn*-2, 3-dDG)

d ; (3 × dTG) - (2 × *sn*-1, 3-dDG)

e ; (3 × dTG) - (2 × *sn*-1, 2-dDG)

f ; fatty acid composition of 2-dMG fraction derived from hydrolysis of deuterated triacylglycerols with Grignard reagent.

Table 7. Distribution of Fatty Acids in the *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3 Positions of the Main Species of Triacylglycerols from the Seed Oils of *Aleurites fordii*

Intact TG		total dTG		fraction											
fatty acid	mol% ^{a)}	fatty acid	mol% ^{b)}	T _{ci3} ^{d)}			DT _{ci2}			MT _{ci2}			PT _{ci2}		
				<i>sn</i> -1 ^{c)}	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3	<i>sn</i> -1	<i>sn</i> -2	<i>sn</i> -3
C _{16:0}	2.4	C _{16:0}	2.2										80.1	23.1	16.5
C _{18:0}	1.7	C _{18:0}	1.7												
C _{18:1ω9}	5.4	d ₂ -C _{18:0}	5.5								71.0	55.1	20.2		
C _{18:2ω6}	8.5	d ₄ -C _{18:0}	8.3				79.2	56.7	29.2						
C _{18:3 9c,11t,13c}	0.3	d ₆ -C _{18:0}	82.0	99.5	98.9	99.8	20.5	43.2	70.3	23.4	44.2	89.5	19.7	76.8	83.4
C _{18:3 9c,11t,13t}	81.2														
C _{20:1ω9}	0.5	d ₂ -C _{20:0}	0.3								1.6	0.5	0.1		

a) mol % by GLC

b) relative intensity to the sum of intensities of total peaks of PFB-derivatives of total deuterated fatty acids of total TG, by NICI mass spectrometry

c) of Table 3

d) D ; dienoic acid, P ; palmitic acid, M ; monoenoic acid, T_{ci} ; α -eleostearic acid.

mole %, sum of C_{18:3 9c,11t,13t} and C_{18:3 9c,11t,13c})이며, 이 결과도 여주의 intact TG의 脂肪酸組成 (mole %)과 거의 一致하였다. 油桐 種子油의 TG에서도 C_{16:0}; 2.2 mole % (2.4 mole %, intact TG by GLC), C_{18:0}; 1.7 mole % (1.7 mole %), d₂-C_{18:0}; 5.5 mole % (5.4 mole %, sum of C_{18:1ω9}), d₄-C_{18:0}; 8.3 mole % (8.5 mole %, sum of C_{18:2ω6}), d₆-C_{18:0}; 82.0 mole % (81.2 mole %, sum of C_{18:3 9c,11t,13t} and C_{18:3 9c,11t,13c}) 이므로 intact TG의 脂肪酸組成 (mole %)과 一致하였다. 하늘타리의 TG에는 C_{18:3 9c,11t,13t}와 C_{18:2ω6}와 같은 不飽和脂肪酸은 glycerol 殘基의 *sn*-2와 *sn*-3에 치우쳐져 있었으며, 飽和脂肪酸은 *sn*-1에 偏在해 있었으며, TG의 主要 分子種인 (C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂에는 *sn*-1-C_{18:2ω6}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13c}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c}의 立体特異異性체가 大部分이고, (C_{18:1ω9})(C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13c})의 境遇에는 *sn*-1-C_{18:1ω9}, *sn*-2-C_{18:2ω6}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c}의 立体特異異性체가 제일 많았으며, (C_{18:2ω6})₂(C_{18:3 9c,11t,13c})와 (C_{16:0})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂의 分子種에는 *sn*-1-C_{18:2ω6}, *sn*-2-C_{18:2ω6}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c}과 *sn*-1-C_{16:0}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13c}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13c}가 主된 立体特異異性체이었다. 여주의 重水素化한 總dTG의 構成脂肪酸을 立体特異的으로 分析한 結果는 C_{18:3 9c,11t,13t}는 *sn*-3 位置에 若干 치우쳐져 存在하고

있었으며 C_{18:2ω6}는 *sn*-3보다 *sn*-1과 *sn*-2 位置에 偏在하고 있었고, 主要 分子種인 (C_{18:1ω9})(C_{18:3 9c,11t,13t})₂에는 *sn*-1-C_{18:1ω9}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13t}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13t}의 立体特異異性체가 大部分이고, (C_{18:0})(C_{18:3 9c,11t,13t})₂의 分子種에는 *sn*-1-C_{18:0}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13t}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13t}의 立体特異異性체가 제일 많았으며, (C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13t})₂와 (C_{18:1ω9})(C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13t})의 分子種에는 *sn*-1-C_{18:2ω6}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13t}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13t}와 *sn*-1-C_{18:1ω9}, *sn*-2-C_{18:2ω6}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13t}가 主된 立体特異異性체이었다. 한편 油桐의 TG에는 80% 이상을 차지하고 있는 單純 TG分子種인 (C_{18:3 9c,11t,13t})₃을 除外한 主要 分子種인 (C_{18:2ω6})(C_{18:3 9c,11t,13t})₂, (C_{18:1ω9})(C_{18:3 9c,11t,13t})₂와 (C_{16:0})(C_{18:3 9c,11t,13c})₂에서 分子種에는 *sn*-1-C_{18:2ω6}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13t}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13t}와 *sn*-1-C_{18:1ω9}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13t}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13t} 및 *sn*-1-C_{16:0}, *sn*-2-C_{18:3 9c,11t,13t}, *sn*-3-C_{18:3 9c,11t,13t}가 主된 立体特異異性체이었다.

謝辭

“이 論文은 1999年度 韓國學術振興財團의 研究費에 의하여 研究되었음(KRF-99-G00110)”을

밝혀 두며, 著者들은 研究費受惠의 機會를 베풀어 주신 韓國學術振興財團 當局者 여러분에게 深心한 謝意를 表하는 바이며, 아울러 NICI mode의 GLC-mass spectrometry로 試料를 分析해 주신 Scotland의 Scottish Crop Research Institute에 게시는 W. W. Christie博士님에게 感謝의 말씀을 드리는 바입니다.

參考文獻

1. C. Litchfield, "Analysis of Triglycerides", pp. 248~261, Academic Press, New York (1972).
2. H. Brockerhoff, *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 586 (1965).
3. W. W. Christie, "Lipid Analysis", 2nd edition, pp. 155~166, Pergamon Press, Oxford (1982).
4. W. W. Christie, *J. Chromatogr.*, **454**, 273 (1988).
5. W. W. Christie, B. Nikolova-Damyanova, P. Laakso, and B. Herslof, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **68**, 695 (1991).
6. 金成眞 · 禹孝京 · 趙鏞桂, 韓國油化學會誌, **18**, 31 (2001).
7. Y. -G. Joh, S. -J. Kim and W. W. Christie, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**, 1037 (1995).
8. 禹孝京, 碩士學位請求論文, 東亞大學校 (1998).
9. R. Ryhage and E. Stenhagen, *J. Lipid Res.*, **1**, 361 (1960).
10. M. S. B. Munson and F. H. Field, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2621 (1966).
11. J. R. Chapman, "Practical Organic Mass Spectrometry", 2nd edition, pp. 74~96, John Wiley & Sons, West Sussex, England (1994).
12. E. G. Bligh and W. J. Dyer, *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911 (1959).
13. E. A. Emken, "Proceeding from the Science Conference on Omega-3 Fatty Acid in Nutrition, Vascular Biology, and Medicine", pp. 1~18, American Heart Disease Association, Dallas, Texas (1994).
14. W. K. Rohwedder, E. A. Emken and D. J. Wolf, *Lipids*, **20**, 303 (1985).
15. W. K. Rohwedder, S. M. Duval, D. J. Wolf, and E. A. Emken, *Lipids*, **25**, 401 (1990).
16. F. D. Gunstone, "Lipid Synthesis and Manufacture", pp. 334~335, Sheffield Academic Press Ltd, Sheffield, England (1999).
17. F. Santinelli, P. Damiani, and W. W. Christie, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 552 (1992).
18. P. Villeneuve and T. A. Foglia, *Biotech*, **8**, 640 (1997).
19. F. E. Luddy, R. A. Barford, S. F. Herb, P. Magidman, and R. W. Riemenschneider, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **41**, 693 (1964).
20. R. E. Anderson, N. R. Bottino, and R. Reiser, *Lipids*, **2**, 440 (1967).
21. R. J. Strife and R. C. Murphy, *J. Chromatogr.*, **305**, 3 (1984).
22. J. S. Hadley, A. Fradin, and R. C. Murphy, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **15**, 175 (1988).
23. H. Rakoff and E. A. Emken, *J. Labelled Comp. Radiopharm*, **15**, 223 (1978).
24. Marcel S. F. Lie Ken Jie and Y. C. Choi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 1245 (1992).
25. W. W. Christie, "Advances in Lipid Methodology-One", pp. 121~148, Oily Press, Ayr (1992).
26. P. Michelsen, E. Aronsson, G. Odham, and B. Akesson, *J. Chromatogr.*, **350**, 417 (1985).
27. W. H. Pirkle and J. R. Hauske, *J. Org. Chem.*, **42**, 2781 (1977).
28. W. H. Pirkle and P. E. Adams, *J. Org. Chem.*, **45**, 4111 (1980).
29. E. J. Corey and S. Hashimoto, *Tetrahedron Letts.*, **22**, 299 (1981).
30. B. A. Andersson, *Prog. Chem. Fat Other Lipids*, **16**, 279 (1978).
31. T. G. Toschi, W. W. Christie, and L. S. Conte, *J. High Resol. Chromatogr.*, **18**, 725 (1993).
32. M. I. Gurr and A. T. James, "Lipid

Biochemistry -an introduction-", 3rd edition, pp. 102~104, Science Paperbacks, London (1980).

33. L. Stryer, "Biochemistry", pp. 547~548, W. H. Freeman and Company, New York (1988).