

지방산의 기기 측정 방법에 관한 연구

박 선 미·안 명 수

성신여자대학교 식품영양학과

Methodological Research on the Instruments of Fatty Acids Determination

Seon Mi Park and Myung Soo Anh

Dept. of Food & Nutrition, Sungshin Women's University

Abstract

In this study, several standard fatty acids were analyzed by three analysis instruments. And also, for the two kinds of soybean oils, fatty acids compositions were determined by three instruments. The results were obtained as follows:

1. In the case of Gas Chromatography (GC), standard fatty acids (Myristic, Stearic, Linoleic, Linolenic, Arachidonic acid) were determined with high reproducibility, but oleic acid/elaidic acid were not seperated. By Capillary Gas Chromatography (CGC), most of standard fatty acids were determined with very high reproducibility than saturated fatty acids, and palmitic acid/oleic acid were not seperated.

2. In the analytical ability of cis-trans fatty acids isomer (oleic acid/elaidic acid), CGC was shown better analytical ability of geometrical isomer than HPLC. Oleic acid/elaidic acid were not seperated by packed column (15% DEGS). The rquire time for standard fatty acids analysis was as follows; GC, 7.21 min., CGC, 9.84 min., HPLC, 24.48 min.

3. The major compositions of fatty acids of each soybean oil (CSOY; refined, DSOY; unrefined) by GC and CGC were linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, linolenic acid and stearic acid. But in the case of HPLC, palmitic acid/oleic acid were not seperated. Analytical ability of three instruments on fatty acids composition in each soybean oil was same trend as in the standard fatty acids mixture.

I. 서 론

식용 유지나 지방질 식품은 저장중 품질 저하를 일으키는 산패가 발생하여 색, 맛등의 관능적인 변화와 지방질 성분의 변화로 지방산 함량이 변화한다^{1,2)}. 유지 및 유지식품의 산패를 측정하는 방법으로는 과산화물가, 산가, 카아보닐가, TBA가 측정과 조성 지방산 함량 변화 측정이 실시되고 있다. 지방산 측정은 주로 Gas Chromatography며 Capillary Gas Chromatography가 주로 이용되며 현재에는 High Performance Liquid Chromatography도 이용되고 있다. Behroze등³⁾은 대두유의 산화 안정성에 지방산이 미치는 효과를 Gas chromatography로 측정하였고 Youssef등⁴⁾은 gamma 선이 대두 지방산의 저장 안정성에 미치는 효과를 Gas Liquid Chromatography로 분석한 바 있으며 Netting⁵⁾은 High Performance Liquid Chromatography를 사용해 유지를 구성하고 있는 지방산들의 이중 결합수를 측정하였다.

본 연구에서는 유지의 지방산 분석시 이용되고 있는 크로마토그래피의 분석 특성과 분리 능력을 파악하기 위하여 Gas Chromatography (GC), Capillary Gas Chromatography (CGC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용하여 Myristic, Palmitic, stearic, Oleic, Elaidic, Linoleic, Linolenic, Arachidonic acid 등의 표준지방산 혼합물에 대하여 ppm 농도별 및 2종의 시판 대두유에 대하여 이들 기기를 이용해 분석한 후 재현성(Reproducibility), 분석 소요시간 및 이성체 분리능력을 비교하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료 및 기기

1) 표준지방산 및 측정기기

표준지방산 분석시 GC 및 CGC 분석에 사용된 표준지방산 (Sigma chemical co., U.S.A.)은 Myristic acid methyl ester, Palmitic acid methyl ester, Stearic acid methyl ester, Oleic acid methyl ester Elaidic acid methyl ester, Linoleic acid methyl ester, Linolenic acid methyl ester, Arachidonic acid methyl ester였다. 이들 표준지방산들을 n-heptane에 녹여 50, 100,

The operating conditions for fatty acid analysis by Capillary Gas Chromatography

Instrument	Varian VISTA 401 Capillary GC
Column	SP-2330, 2.5 um x 30m (film thickness 2.0 um)
Temperature programming	170°C(1)–3°C/min–200°C(9)
Injection temperature	250 °C
Detector temperature	270 °C
Detector	FID
Split ratio	30 : 1
Carrier gas	H ₂ . 12psi
Make up gas	N ₂

The operating conditions for fatty acid analysis by High-performance liquid chromatography

Instrument	Varian HPLC (U.S.A.)
Column	Partisil 10, ODS-3, Watman (Japan) 4.7m x 25cm
Mobile Phase	90% Acetonitrile
Flow rate	1.3ml/min
Injection volume	10 microliter
Detector	254nm Fixed type
Integrator	Varian 4270

150, 200, 250 ppm 용액으로 제조하여 GC 및 CGC 분석에 이용하였으며 이때 분석기와 분석조건은 아래와 같다. HPLC 분석에 사용된 표준지방산(Sigma chemical Co., U.S.A.)으로는 Myristic acid, Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acid, Elaidic acid, Linoleic acid, Linolenic acid, Arachidonic acid였다. 이 각각의 표준지방산들을 methyl ethylketone으로 10, 20, 30, 40, 50 ppm 용액으로 제조하여 HPLC 분석에 이용하였으며 이때 분석기와 분석조건은 다음과 같다.

2) 대두유

본 실험에 사용된 대두유는 정제공정을 거친 시판용 대두유(CSOY : 동방유량주식회사)와 압착법으로 추출하여 생산된 미정제 대두유(DSOY : 경동시장에서 구입하였다).

2. 실험 방법

GC 및 CGC에 의한 대두유의 조성 지방산 측정시에는 0.5N NaOH/methanol 용액을 이용해 가수분해시킨

The operating conditions for fatty acid analysis by Gas Chromatography

Instrument	Delsi 700 (France)
Column	15% DEGS on 80-100 mesh chromosorb W 1/8mm x 2m
Detector	FID
Column temperature	210 °C
Detector temperature	250 °C
Injection temperature	240 °C
Carrier gas	N ₂ , 30ml/min
Injection volume	5 microliter
Absorbance range	10
Chart speed	0.5cm/min

후^{6,7)} 14% BF₃-methanol로 반응시켜 지방산을 methyl 화하였으며 기기에 주입시 3 ml ethyl ether에 녹여 사용하였다. HPLC를 사용하는 경우에는 0.5 N KOH/ethanol 용액으로 시료를 검화한 후⁸⁾ IN HCl로 pH3까지 시료를 산성화한 뒤 p-bromophenacyl bromide (P-BPB)로 다음과 같이 유도체를 제조하였다⁹⁾.

p-BPB를 methyl ethylketone (10 mg/ml)에 용해하여 A용액을, triethylamine을 methyl ethylketone (10 μl/ml)에 용해하여 B용액을, 그리고 지방산을 methyl ethylketone (0.2 mg/ml)에 용해하여 C용액을 제조하였다. A, B, C 용액을 각각 1 ml씩 취하여 60~70°C에서 30분간 가열한 다음 10°C로 냉각한 뒤 0.5 μm 유기용매용 filter로 여과한 후 HPLC에 주입하였다.

사용된 모든 기기의 지방산 정량은 자동 면적 계산기

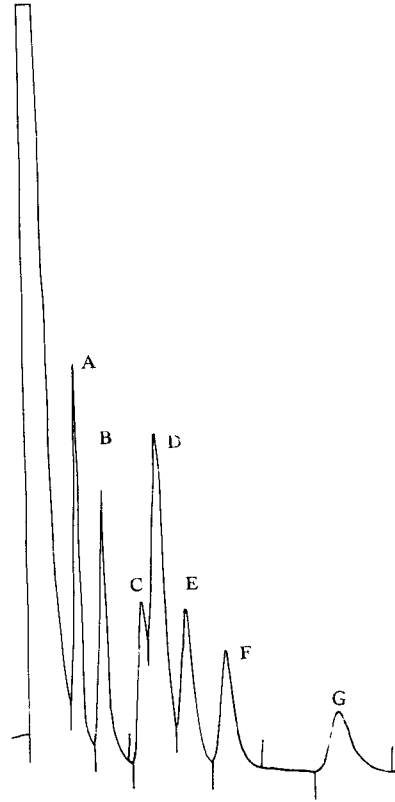


Fig. 1. Chromatogram of standard fatty acids by Gas Chromatography

(A) Methyl myristate, (B) Methyl palmitate, (C) Methyl stearate, (D) Methyl oleate/Methyl elaidate, (E) Methyl linolate, (F) Methyl linolenate, (G) Methyl arachidonate

Table 1. Reproducibility of standard fatty acids determination by Gas Chromatography

area %

Fatty acid	concentration (ppm)					F value
	50	100	150	200	250	
Myristic acid	30.37±0.74	17.57±5.16	15.37±2.11	15.17±2.20	13.74±0.09	21.02**
Palmitic acid	14.56±0.92	14.65±0.23	13.93±0.21	13.73±0.67	13.72±0.19	3.29*
Stearic acid	7.96±1.12	8.79±0.63	9.29±0.59	9.75±0.17	9.53±0.14	4.83*
Oleic, Elaidic acid	27.01±3.48	28.32±2.92	29.41±0.32	27.96±0.91	29.11±0.19	0.87 n. s.
Linoleic acid	11.12±1.23	11.96±1.16	13.20±0.20	12.69±0.37	13.72±0.13	7.05**
Linolenic acid	6.26±1.46	8.60±1.66	9.37±1.35	10.20±0.31	10.16±1.66	6.72**
Arachidonic acid	4.90±1.91	6.94±1.26	7.51±1.38	8.95±0.48	8.58±1.45	6.28**

Mean ± S.D.

* P < 0.05, ** P < 0.01

n.s. : not significant at P < 0.05

로 적분된 peak의 면적을 normalized area% 계산법으로 산출하였다.

3. 통계처리 방법

기기 분석으로 얻은 Data는 통계 분석용 program인 SAS (Statistical Analysis System)로 처리하고 분산 분석(ANOVA) 방법으로 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 표준지방산 혼합물(Standard Fatty acids Mixture)의 분석

1) Gas Chromatography에 의한 지방산 분석

표준지방산 혼합물의 각 농도별(50, 100, 150, 200, 250 ppm) GC 분석 결과는 Fig. 1 및 Table 1과 같다. Fig. 1에서와 같이 Methyl oleate/Methyl elaidate는 Retention time이 거의 동일하여 분리되지 않았으므로 GC는 cis/trans 이성체 분리에는 적절하지 않음을 알 수 있었으며 이는 ottenstein¹⁰⁾의 실험결과와 일치하였다. 1970년대 Cyanosilicone stationary phase 도입으로 이성체 분리가 가능케되면서 Silar 10C (1973)와 SP-2340(1974) Cyanosilicone phase를 사용하여 기하 이성체를 성공적으로 분리시켰다. ottenstein¹⁰⁾은 15% on 100/120 chromosorb P AW/DMCS를 사용할 경우 Oleate/Elidate 분리가 30분 이내에 이루어진다고 하였다. 대체적으로 GC 분석에 소요되는 시간은 column의 길이, 온도 및 유동상의 종류에 따라 달라지는데 본 실험에 있어서 표준지방산 혼합물 분석에 소요된 시간은 평균 7.21분으로 HPLC나 CGC에 비해 짧은 것으로 나타났다. Table 1에 나타나듯이 GC 분석에 있어서는 Oleic acid/Elaidic acid가 단일 peak로 나타나 분리되지 않은 것을 제외하고는 모든 지방산에서 재현성이 높은 것으로 나타났다.

2) Capillary Gas Chromatography에 의한 지방산 분석

표준지방산 혼합물을 각 농도별(50, 100, 150, 200, 250 ppm)로 CGC로 분석한 결과는 Fig. 2 및 Table 2와 같았다.

Chromatogram에서 보는 바와 같이 8가지 지방산 모두가 뚜렷하게 분리되었으며, Peak는 매우 안정되어 있음을 알 수 있었다. CGC를 이용한 이성체 분리는

OV-175 Packed Column의 출현과 더불어 발달되어 왔으며, Stainless steel Capillary Column은 cis/trans 이성체를 만족하게 분리시키지는 못하였다¹¹⁾. 1960년대와 1970년대에는 CGC로 cis/trans 이성체의 분리시 큰 성과를 거두지 못하였던 것은 column의 효율성이 낮고 또한 불활성 column이 없었기 때문이었다¹¹⁾. 그러나 70년대 이후 Glass Capillary Column의 일반화로 인해 이를 이용한 cis/trans 이성체를 성공적으로 분리하였다는 많은 보고가 있었다^{12,13)}. 즉 Fused Silica Capillary Column이 출현되어 cis/trans 이성체를 분리시켰으며 Solver와 Lanza¹³⁾는 100 m SP-2340 Capillary Column을 사용해 경화유에 있어서의 C_{18:1} cis/trans 기하 이성체의 분리를 성공시켰다.

본 실험에서 표준지방산 혼합물의 CGC 분석에 소요

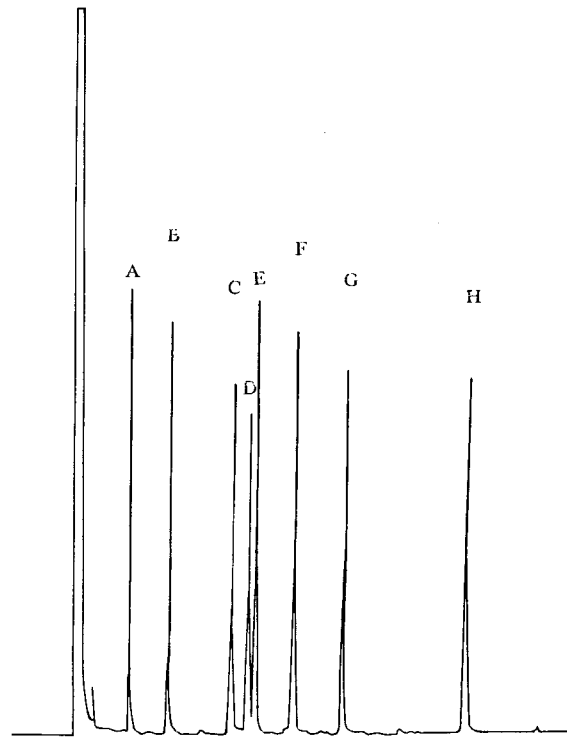


Fig. 2. Chromatogram of standard fatty acids by Capillary Gas Chromatography (A) Methyl myristate, (B) Methyl palmitate, (C) Methyl stearate, (D) Methyl oleate, (E) Methyl elaidate, (F) Methyl linolate, (G) Methyl linoleate, (H) Methyl arachidonate.

Table 2. Reproducibility of standard fatty acids determination by Capillary Gas Chromatography area %

Fatty acid	concentration (ppm)					F value
	50	100	150	200	250	
Myristic acid	13.24±0.25	13.15±0.34	10.90±0.20	10.54±0.20	10.62±0.36	107.24**
Palmitic acid	12.29±0.16	12.24±0.21	11.79±0.13	11.69±0.11	11.75±0.30	10.58**
Stearic acid	12.04±0.09	12.06±0.09	12.51±0.06	12.47±0.07	12.31±0.07	4.89**
Oleic acid	13.06±0.12	12.91±0.14	12.79±0.04	12.87±0.08	13.18±0.05	12.30**
Elaidic acid	11.86±0.06	11.77±0.12	11.83±0.03	11.81±0.04	11.72±0.07	2.67 n. s.
Linoleic acid	12.13±0.13	11.99±0.10	12.56±0.26	13.01±0.17	13.66±0.20	51.50**
Linolenic acid	12.10±0.21	12.24±0.35	13.02±0.08	13.11±0.06	12.62±0.19	21.57**
Arachidonic acid	13.26±0.13	13.67±0.88	14.61±0.34	14.51±0.14	14.13±0.40	5.63**

Mean ± S.D.

* P < 0.05, ** P < 0.01

n.s. : not significant at P < 0.05

된 시간은 9.84분이었으며 재현성은 elaidic acid를 제외하고는 매우 높게 나타나 GC 분석 결과보다 매우 좋은 결과를 보였다.

3) High Performance Liquid Chromatography에 의한 지방산 분석

표준지방산 혼합물의 각 농도별(10, 20, 30, 40, 50 ppm) HPLC 분석 결과는 Fig. 3 및 Table 3과 같았다.

GC 분석에 비해 낮은 농도(10 ppm)에서도 감지가 가능하였으므로 미량의 지방산을 확인코저 할때 HPLC법이 유리할 것으로 사료된다.

Fig. 3에서 나타난 것과 같이 Palmitic acid/Oleic acid의 baseline이 분리되지 않음은 두 지방산의 Retention time이 거의 동일하기 때문이며 이 두 포화 지방산의 분리가 어려운점과 포화지방산들의 재현성이 다소 떨어지는 점으로 보아 유지제품이나 기타 유지류들의 포화지방산을 분석코저할 때는 다소 적절하지 않는 것으로 생각되나, Oleic acid/Elaidic acid가 뚜렷하게 분리된 것으로 보아 이들 이성체의 분리시에는 유용한 것으로 평가되었다^{11,14)}.

LC의 분리 능력은 Column내 물질의 종류 및 크기, Column의 길이, 직경 및 용매에 크게 좌우되며 일반적으로 지방산 분석에는 ODS Column과 이동상으로는 acetonitrile이 주로 사용되고 있다. 본 실험에서는 표준 지방산 혼합물의 분석에 소요된 시간은 평균 24.48분으로 GC에 비해 약 3배 정도 더 소비되었다.

HPLC 분석시의 재현성은 GC나 CGC에 비해 다소 떨

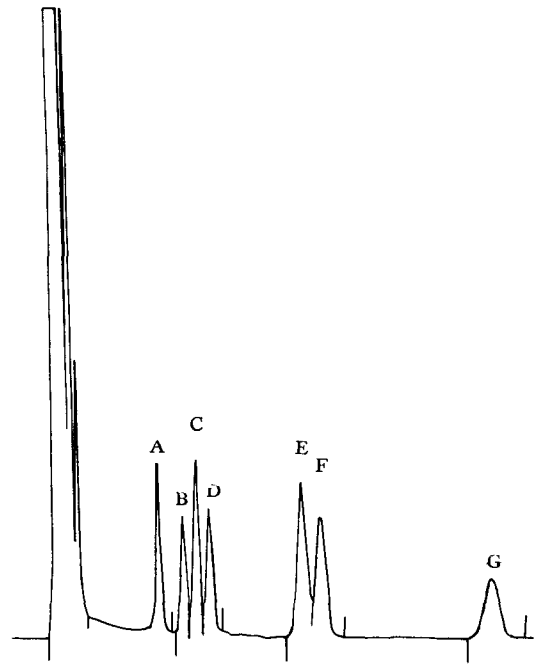


Fig. 3. Chromatogram of standard fatty acids by High Performance Liquid Chromatography (A) Linolate, (B) Arachidonate, (C) Myristate, (D) Linolenate, (E) Palmitate/Oleate, (F) Elaidate, (G) Stearate

어지긴 했으나 Stearic acid, elaidic acid, linoleic acid, arachidonic acid에서는 유의성(p<0.05)이 나타났으며 특히 불포화지방산들이 포화지방산들 보다 재현성

Table 3. Reproducibility of standard fatty acids determination by High Performance Liquid Chromatography area %

Fatty acid	concentration (ppm)					F value
	10	20	30	40	50	
Myristic acid	14.14±1.29	12.80±0.55	12.50±0.58	12.73±0.77	14.56±0.10	2.05 n. s.
Palmitic, Oleic acid	26.17±0.32	23.65±2.68	21.30±1.66	23.86±0.72	21.28±0.29	2.05 n. s.
Stearic acid	11.13±1.37	11.89±1.09	11.63±1.40	12.80±0.34	13.44±0.18	3.93*
Elaidic acid	17.88±2.89	19.16±0.69	15.66±1.30	17.85±0.31	17.96±0.19	3.66*
Linoleic acid	10.86±2.06	12.40±0.76	9.79±0.35	11.69±0.15	11.36±0.29	4.10*
Linolenic acid	10.32±0.38	11.50±0.55	11.22±2.62	11.20±0.13	12.00±0.36	1.20 n. s.
Arachidonic acid	9.49±0.94	8.61±0.93	17.88±0.86	9.87±0.35	9.41±0.08	150.82**

Mean ± S.D.

* P < 0.05, ** P < 0.01

n.s. : not significant at P < 0.05

Table 4. The fatty acid compositions of Commercial Soybean Oil (CSOY) and Domestic Soybean Oil (DSOY) by Cailary Gas Chromatography, Gas Chromatography and High Performance Liquid Chromatography area %

Fatty acid	CSOY			DSOY		
	CGC	PGC	HPLC	CGC	PGC	HPLC
Palmitic acid	10.74	10.51		13.69	13.73	
			34.96			46.54
Oleic acid	23.46	22.81		32.41	31.16	
Stearic acid	3.66	2.82	3.92	2.25	1.61	2.53
Linoleic acid	56.30	54.42	53.80	51.65	52.01	50.13
Linolenic acid	5.84	9.44	7.40	n.d.	1.49	0.87

nd ; no detection

이 높은 것으로 나타났다.

2. 대두유(Soybean Oil)의 지방산 분석

크로마토그래피법에 의한 2종의 대두유(Commercial Soybean oil; CSOY, Domestic Soybean oil; DSOY)의 지방산 조성 분석 결과는 Table 4과 같았다.

GC 분석 결과에 의하면 식용유지(CSDY)의 주요 지방산으로 알려져 있는 Oleic acid, Linoleic acid, Palmitic acid, Stearic acid 함량이 91%로 이는 Tribold와 Aurand¹⁵⁾가 발표한 94%와 유사하였다. 압출법으로 제조하고 정제하지 않은 대두유(DSOY)의 지방산 조성 상태는 CSOY와 동일하나 함량은 다소 차이를 보였다. 특히 Linolenic acid는 CSOY에서 9.44%, DSOY에서는 1.49%로 큰 차이를 보였다. 이는 기름 착유방법이나 가공상의 차이에 의한 것으로 생각된다.

CGC 분석 결과에 의하면 Linolenic acid (GC ;

9.44%, CGC : 5.84%)를 제외한 다른 지방산의 함량은 GC 분석 결과와 유사한 것으로 나타났다. DSOY의 지방산 조성으로는 Palmitic acid, Oleic acid, Stearic acid Linoleic acid 였으며 Linolenic acid는 검출되지 않았다. HPLC에 의한 CSOY와 DSOY의 지방산 조성은 Palmitic acid, Stearic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Linolenic acid였으나 표준지방산 분석결과와 마찬가지로 Palmitic acid/Oleic acid는 분리되지 않았다.

IV. 요 약

1. 유지의 지방산 조성 분석시 GC의 경우 Oleic acid/Elaidic acid를 분리 측정하지 못하였으나 그의 지방산들(Myristic acid, Palmitic acid, Stearic acid, Linoleic acid, Lindenic acid, Arachidonic acid)에

있어서는 재현성이 높았으며 HPLC는 Stearic acid, Elaidic acid, Linoleic acid, Arachidonic acid 검출에 높은 재현성을 나타냈으나 Palmitic acid/Oleic acid를 분리하지 못하였으며 CGC는 Elaidic acid를 제외한 모든 지방산들에 있어서 좋은 측정능력을 보였주었다.

2. 지방산의 cis/trans 기하 이성체의 측정시에는 CGC가 가장 능력이 뛰어났고 HPLC도 양호하였으나 GC는 Oleic acid/Elaidic acid 이성체 측정이 불가능하였다. 또한 각 지방산 분석에 소요된 평균 시간은 GC가 7.21분, CGC가 9.84분, 그리고 HPLC는 24.48분으로서 GC와 CGC의 경우는 비슷하나 HPLC는 다른 기기에 비해 약 2.5~3배의 많은 시간이 소요되었다.

3. 이들 3가지 분석기기로 실제 유지식품인 대두유(CSOY, DSOY)의 지방산 조성을 분석한 결과, 정제된 대두유(CSOY)는 Linoleic acid, Oleic acid, Palmitic acid, Linolenic acid가 주요구성 지방산인 반면 Stearic acid는 소량으로 함유되어 있었으며, 미정제 대두유(DSOY)에서는 Linoleic acid, Oleic acid, Palmitic acid, Stearic acid가 주요 구성 지방산이었고 Linolenic acid는 아주 미량 함유되어 있었다. 이때 3가지 분석기기의 대두유의 지방산 분석능력은 표준지방산 분석의 지방산 분석능력은 표준지방산 분석시에 나타난 결과와 동일하였다.

따라서 GC, CGC 및 HPLC의 분석특징으로 GC의 경우 분석소요시간이 CGC나 HPLC에 비해 짧은 반면 이성체 분리가 불가능 하였으며 HPLC는 분석소요시간이 다른 기기에 비해 다소 긴 반면 이성체 측정이 가능하였고 포화지방산 보다는 불포화지방산 측정에 다소 유리하였다. 그리고 CGC의 분석특성에 있어서 재현성, 분석소요시간 및 이성체 분리능력이 GC나 HPLC에 비해 우수한 것으로 평가되었다.

REFERENCES

- 1) 김동훈, 식품화학, 탐구당 1987.
- 2) Fennema, O.R., Food Chemistry, Second ed., 1985. p. 193.
- 3) Behroze S. Mistry and David B. Min, Effects of Fatty Acids on the Oxidative Stability of Soybean Oil, *J. of Food Science*, 52(3): 831, 1987.
- 4) Youssef S, Hafez, Ali I. Mohamed, Gurbax Singh, and Fawzy M, Hewedy, Effects of Gamma Irradiation on Proteins and Fatty Acids of Soybean, *J. of Food Science*, 50:1271, 1985
- 5) Netting, A.G., Number of Double Bonds in Fatty Acids from fats and oils by HPLC Using Pentafluorobenzyl Ester, *JAOCs*, 63(9):, 1197, 1986.
- 6) Metcalfe, L.D., A., Schmitz and J.R. Pelka, Rapid Preparation of Fatty acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic analysis, *Anal. Chem.*, 38:514, 1966.
- 7) Dicks, G.T. and P.V. Nicholas, Gas Chromatography in Food Analysis, 1978.
- 8) Ast, M., Inadvertent Isomerization of Polyunsaturated Acids During Ester Preparation, *Anal. Chem.*, 35:1539, 1963.
- 9) GINSCO, *Lab. Highlight*, 33:197, 1985.
- 10) Ottenstein, D.M., D.A. Bartley and W.R. Supina, Gas Chromatographic Separation of cis-trans Isomers: Methyl Oleate/Methyl Elaidate, *J. Chromatogr.*, 119:401, 1976.
- 11) Ottenstein, D.M., L.A. Witting, R.H. Silvs, D.J. Hometchko and N. Pelick, Column Types for the Chromatographic Analysis of Oleochemicals, *JAOCs*, 61(2):390, 1984.
- 12) Sebedio, J.L., A. Grandgirard and J. Prevost, Linoleic Acid Isomers in Heat Treated Sunflower Oils, *JAOCs*, 65(3):362, 1988.
- 13) Solver, H.T. and T. Lanza, Quantitative Analysis of Food Fatty Acids by Capillary Gas Chromatography, *JAOCs*, 56:933, 1979.
- 14) Grandgirard, A., F. Julliard, J. Prevost and J.L., Sebedio, Preparation of Geometrical Isomers of Linolenic Acid, *JAOCs*, 64(10):1434, 1987.
- 15) Tribold, H.O. and L.W. Aurand, Food Composition and Analysis, rev. ed., 1963 p.113.