

식물유지 지방산 분석법

한상준*[†] · 손종록**

*서울대학교, **작물과학원

I. 서 언

지방은 에너지원으로서 중요한 영양소다. 가장 흔한 지방의 형태는 트리글리세라이드 (triglyceride, three fatty acids esterified to a glycerol molecule backbone) 이며, 스테롤, 왁스 등과 같은 비글리세라이드 형태의 지방도 존재한다. 비글리세라이드 지방은 에너지원으로서 비중은 작지만 대사과정에서의 기능들이 밝혀지며 주목을 받고 있다.

식물 또는 식품등에 유리형태로 존재하는 지방산은 극히 미량이고 글리세롤에 에스테르 결합 형태로 존재되어 있는 것을 가수분해하면 생성된다. 따라서 지방산을 분석하기 위해서는 먼저 추출된 지방으로부터 지방산을 분리하는 단계가 필요하다. 지방산의 분석은 HPLC를 이용한 방법도 있으나, 가장 보편화된 방법은 GC를 이용한 것이다. 검체에 함유된 지방산의 함량 또는 조성을 분석하는 방법은 문헌마다 차이가 있다. 그러나 지방을 추출한 후 에스테르화 반응을 통해 유리지방산으로 분리하고 메틸레이션과정을 거쳐 GC로 분석한다는 점에서는 모두 같다.

김 등(2001)은 Garces and Mancha's 법(1993)을 이용하여 메밀에서의 지방산 함량을 보고 하였는데, 지방산을 분석하는데 거쳐야할 복잡하고 번거로운 절차가 한 번의 과정으로 이루어져 편리하다.

II. 분석방법

1. 지방추출 (Folch 법)

1) 장치, 기구 및 시약

- (1) 분쇄기
- (2) 원심분리기
- (3) 교반기(Vortex)
- (4) 원심분리용 테스트 튜브
- (5) 파스테르피펫

[†]Corresponding author: (Phone) +82-2-740-8931, (E-mail) hsangjun@chollian.net

- (6) 추출용매 - CHCl₃: methanol (2 : 1)
- (7) 0.9% NaCl

2) 조작

- (1) 분석하고자 하는 샘플을 곱게 분쇄한다.
시료를 다루는 방법에 따라 추출된 지방의 함량이 차이가 있으므로 상당한 주의를 요한다. 시료는 수집시 액체질소에 담금 후 냉동 보관하는 것이 좋으며 가급적 빠른 시일 내에 분석을 마치도록 한다.
- (2) 분쇄된 시료 적당량 (1 g)을 테스트 튜브에 넣고 20배에 해당하는 추출용매를 넣은 후 상온에서 20분간 교반시킨다.
- (3) 교반이 끝난 샘플은 약하게 원심분리한 후 용매를 다른 바이알에 옮긴다.
- (4) 0.9% NaCl 용매 4 ml(0.2 volume)을 넣고 수 초간 vortexing 한 후 층분리가 일어나도록 2000 rpm 정도의 속도로 원심분리한다.
- (5) 상등액을 파스테르피펫으로 조심스럽게 제거한다.
- (6) 남은 chloroform 층은 감압농축하거나 질소를 이용하여 2~3 ml 정도로 농축한다.

2. Acid catalyzed esterification

식물체 혹은 식품 등에 함유되어 주요 지방산을 GC로 분리하기 위해서는 강한 극성의 컬럼을 사용하게 되고, 오븐의 온도를 제한범위 이상 올려야 하는 경우가 발생한다. 그래서 GC로 분석하기 위해서 말단을 메틸기로 치환(FAME)하여 휘발성을 보다 좋게 한 후 분석을 하게 되는데 가장 보편적으로 이용되는 방법(Morrison et al, 1964)을 소개한다.

1) 장치 및 기구

- (1) Heating block 혹은 100°C이상 유지되는 항온건조기
- (2) 바이알 혹은 test tube: 열경화성 재질이어야 하며 반응시 기체가 새어나가지 않도록 테프론 재질의 septa가 있어야 한다.
- (3) 원심분리기
- (4) Vortex
- (5) 파스테르피펫

2) 시약

- (1) 14% boron trifluoride in methanol : 제조한 후에는 질소충진 후 냉장 보관하여야 하며, 3개월이 지나거나 바닥에 침전물이 생기면 다시 제조하여 사용하여야 한다.
- (2) Pentane
- (3) Chloroform
- (4) *n*-Hexane

3) 조작

- (1) Screw-capped glass tube에 질소로 건조된 지방추출물 10 mg을 넣고 BF₃/methanol 1 ml를 넣어준다.
만일, 추출된 지방에 triacylglycerol, sterol ester 등이 많을 경우는 CHCl₃/methanol (1/1, v/v)을 0.75 ml 와 BF₃/methanol 0.25 ml를 넣어준다.
- (2) 가능하면 tube 내부를 질소로 치환한 후 뚜껑을 닫은 후 100°C heating block(혹은 sand bath)에서 90분간 반응시킨다. 지방산은 5분정도만 반응해도 충분하나 sterol esters 는 약 45분, glycosphinglipids 는 90분 이상 반응시켜야 한다.
- (3) 반응이 끝나면 상온에서 식힌 후 물 1 ml과 pentane 2 ml을 넣고 약 1분간 vortexing 한다.
- (4) 충분리가 되도록 2000 rpm 정도로 원심분리한 후 파스테르피펫을 이용하여 상층액을 다른 바이알에 옮겨 담는다.
- (5) 질소를 이용하여 pentane을 제거한 후 즉시 n-hexane 50~100 μ를 가해 녹인다.
- (6) GC를 이용하여 FAME를 분석한다.

3. Direct transmethylation without prior extraction (Rafael and Mancha's method)

1) 장치 및 기구

- (1) 가스크로마토그래프
- (2) 분쇄기
- (3) Heating block 혹은 100°C 이상 유지되는 항온건조기
- (4) 바이알 혹은 test tube: 열경화성 재질이어야 하며 반응시 기체가 새어나가지 않도록 테프론 재질의 septa가 있어야 한다.
- (5) 파스테르피펫

2) 시약

(1) 반응시약

methanol : heptane : benzene : 2,2-dimethoxypropane : H₂SO₄ = 37 : 36 : 20 : 5 : 2 (v/v)

3) 조작

- (1) 곱게 분쇄된 콩가루 0.5g을 vial에 담는다.
- (2) 준비된 반응시약 2 ml을 넣는다.
- (3) 80°C로 유지되는 heating block 혹은 dry oven 에서 20분간 반응시킨다.
- (4) 반응이 끝난 샘플은 냉동실에 보관한다.
- (5) 분석하기 바로 전에 바이알을 꺼내어 상등액을 파스테르피펫으로 조심스럽게 취하여 다른 바이알 (자동시료주입기용 바이알)에 옮겨 담는다.
바이알을 통해 반응물을 살펴보면 두 개의 층으로 분리되어 있는 것을 확인할 수 있다. 지방산의 함량이 많을수록 상등액(지방산층)의 양이 많아지며 쌀과 같이 지방산

함량이 낮은 샘플은 상층액이 매우 적다. 자동시료주입기에 사용되는 바이알은 그 용량이 정해져 있으며 insert를 사용한다 하더라도 최소 100 μ l 는 필요하므로 분석에 필요한 만큼의 양을 확보하기 위해서 3개 이상 시료를 처리하여 합한 후에 분석을 수행하기도 한다.

(6) GC를 이용하여 FAMES를 분석한다.

(7) GC를 이용한 FAMES 분석 조건의 예

- GC system : Agilent 6890 series (HP Co., Wilmington, DE, USA)
- 검출기 : 불꽃이온화검출기 (flame ionization detector, FID)
- 컬럼 : HP-Innowax capillary (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m cross-linked polyethylene glycol)
- 오븐 : Initial : 150°C
Final : 280°C
Increasement : 4°C/min
- Carrier gas : Nitrogen
Flow rate : 10 ml/min
- Inlet temperature : 250°C
- Detector temperature : 300°C

4) 결과해석

- (1) 시료를 분석하기 전에 원하는 성분이 포함된 인증된 표준품을 같은 조건으로 미리 분석하여 성분별 머무름 시간을 확인한 후 각 샘플에서 얻은 크로마토그램과 비교하여 성분을 확인한다.
- (2) 크로마토그램 상에 나타난 피크 가운데 용매피크를 제외한 나머지 모든 피크들의 면적의 합에 대한 FAME 각각의 피크면적의 비(상대농도, %)를 구한다.

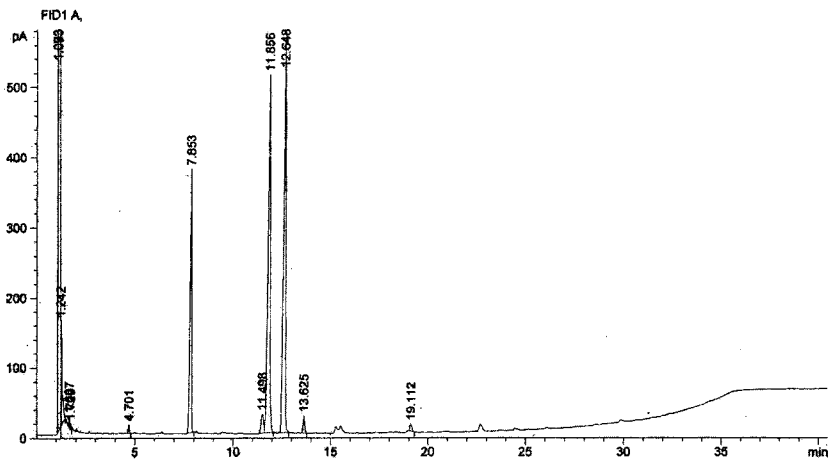


Fig. 1. GC chromatogram of FAMES of total lipids from a rice.

5) 비고

본 실험에서 얻은 결과로는 절대량을 구할 수는 없고 각 성분간의 상대농도 만을 확인할 수 있다. 그러나 용매피크를 제외한 나머지 성분들의 양을 나타내는 피크면적의 합이 100%가 되어야 하나 실제로는 그렇지 못한 경우가 종종 발생한다. 그러한 이유로는 샘플에 따라서 또는 분석조건에 따라 극히 미량인 미확인 성분들이 피크로 나타나거나 분리가 불충분하여 피크의 면적산출이 어려운 경우 등이 해당한다. 그러므로 분석시 주입되는 시료의 농도를 높이기보다는 원하는 성분들이 충분히 검출되는 정도까지 희석한 후 분석하는 것이 바람직하며 무엇보다도 성분들이 충분히 분리되어 간섭하는 일이 없도록 최적의 분석조건을 찾는 것이 중요하다.

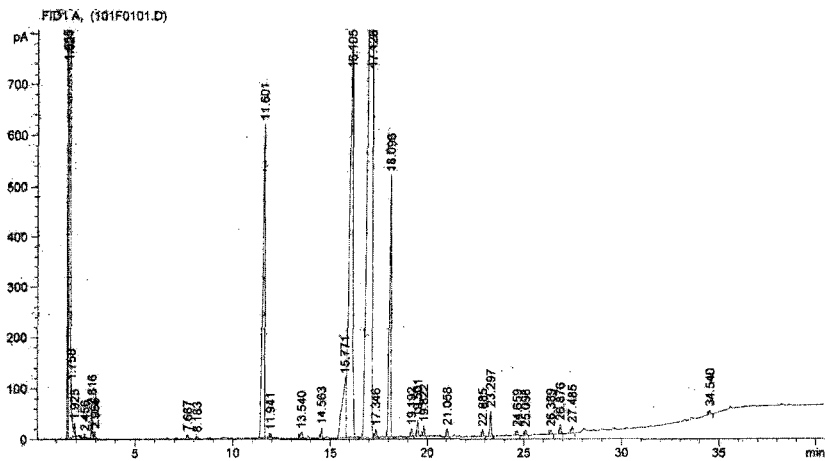


Fig. 2. GC chromatogram of FAMES from a soybean.

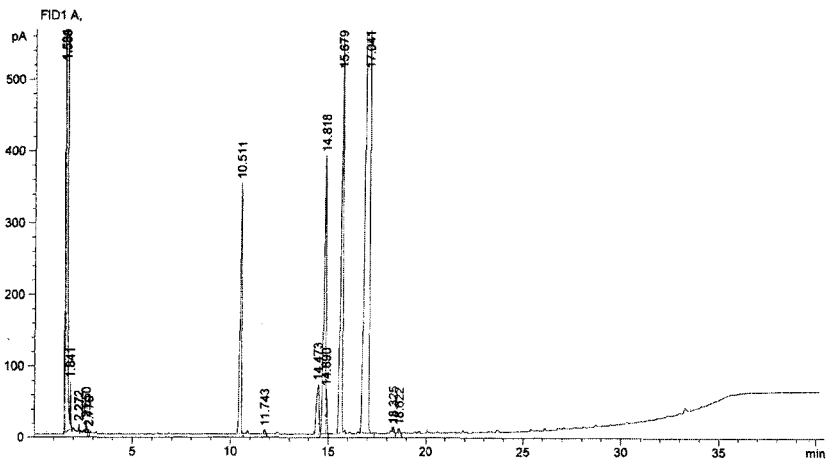


Fig. 3. GC chromatogram of FAMES from a perilla seed.

참고문헌

1. Folch, J., M. Lees, and G. H. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226 : 497-509.
2. Garces, R. and M. Mancha. 1993. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 211 : 139-143.
3. Kim, S. L., S. K. Kim, Y. H. Lee, and C. H. Park. 2001. Varietal differences of fatty acid composition and vitamin E content in buckwheat grains. *The proceeding of the 8th ISB* : 523-531.
4. Morrison, W. R. and L. M. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5 : 600-608.

Analysis of Fatty Acids

Sang-Jun Han[†] and Jong-Rok Son***

**Seoul Nat'l univ. Institute of Natural Products, Seoul 110-460, Korea*

***National Institute of Crop Science, RDA. Suwon 441-857, Korea*

+82-2-740-8931, hsangjun@chollian.net