Bull. Korean Fish. Soc., 9(3), 203—208, 1976 韓水誌9(3), 203—208, 1976

水產物의 脂質에 關한 硏究(第1報)

淡水産 뱀장어 筋肉油의 脂肪酸 및 Sterol 組成

河 奉 錫*·鄭 泰 明*·梁 敏 錫*

STUDISE ON THE LIPID OF AQUATIC ANIMAL (Part 1)

Fatty Acids and Sterols in the Muscle of Eel

Bong Seuk HA*·Tae Myoung JEONG* and Min Suk YANG*

The composition of fatty acids and sterols in the muscle lipid of eel, *Anguilla japonicus* Temminck & Schlegel was investigated quantitatively by using gas liquid chromatography(GLC) and the sterols separated from unsaponifiable matter by thin-layer chromatography were identified by GLC, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance and GLC-mass spectrometry respectively.

The fatty acids of the muscle lipid consisted of the large amount of C18:1 (40.98%), C16:0(23.71%), C16:1(13.37%) acids, and small amount of C14:0(7.19%), C18:0(5.55%), C20:1(1.83%), C18:2(1.42%) acids, and C18:3(0.92%), C15:0(0.73%), C14:1(0.50%) acids were smaller.

Choleterol(96.58%) was a major component of the sterol fraction and 24-methylene cholesterol (3.42%) was also detected as a minor component.

緖 言

水産動物의 筋肉油의 脂肪酸, 그리고 sterol組成에 關해서는 豊水等(1963), 露木等(1967) 및 宮原等(1971)에 依한 硏究와 新間等(1964)의 各種 洄游性魚類의 背肉中에 含有하는 脂肪酸組成 및 cholesterol의 含量에 關한 硏究 等 많은 報告가 있다.

그러나 塑油性魚族을 代表하여 比較的 節肉中에 많은 脂質을 含有하는 뱀장어에 관하여는 Ikekawa等(1972)이 뱀장어 體油의 triglycerides와 cholesteryl ester를 檢出하여 이 triglycerides는 C_{46}~C_{58}間의 偶數 triglycerides가 그 組成의 大部分이다는 것을 밝힌 것 以外에는 極히 硏究가 不振한 것 같다.

本實驗에서는 뱀장어 筋肉油의 不鹼化物中의 sterol 組成을 硏究하고, 脂肪酸組成을 比較檢討하여 營養的인 基礎資料를 얻기 爲하여 實驗하였음으로 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材 料

1975年 10月 25日 慶南 晋陽郡 琴山面 東砂里, 南江流域에서 漁獲한 뱀장어(*Anguilla japonicus*, 平均体長 56.65*cm*, 平均体重 264.78*g*)를 試料로 하였으며, 生存해 있는 것을 實驗室에 運搬하고 即殺한 것으로부터 頭部 및 脊椎骨을 除外한 모든 肉質을 取하여 Bligh & Dyer(齊藤等1974)으로 採油하였다.

試料油는 다시 基準油脂分析試驗法(日本 化學協會, 1966)으로 鹼化하여 脂肪酸과 不鹼化物을 分離하였으며, 常法으로 測定한 原料肉의 一般成分과 脂質의 一般性狀은 Table 1, Table 2와 같다.

*慶尙大學, Geongsang National University, Jinju, Korea.

Table 1. Content of General Nutritional Components in Fiesh Eel Muscle

Ash(%)	Crude protein(%)	Crude fat(%)	Cellulose(%)	Moisture(%)
1.20	17.11	20.61	—	61.01

Table 2. Muscle lipid content of Fresh Eel and its Properties

Crude fat content (%)*	24.56
Acid value	3.34
Iodine value (wijs)	137.08
Saponipication value	362.86
Unsaponifiable materials (%)	0.92
Phospholipid (%)	5.03

*Extracted by methanol chloroform solvent (by Bligh & Dye method)

2. 脂肪酸 및 不鹼化의 處理

1) 脂肪酸의 methyl ester化 : 調製한 混合脂肪酸을 1% p-toluene sulfonic acid-methanol液으로 esterfication(日本 日清製油會社硏究所, 1964)하여 얻은 混合脂肪酸 methyl ester의 아세톤 溶液을 gas-liguid chromatography(GLC)의 試料로 하였다.

2) sterol의 分離 : thin layer chromatography(TLC)로서 不鹼化物은 3個의 fraction(Fr.)으로 分離되었다. 即 TLC는 wakogel B-10과 蒸溜水를 1.1:1.9의 比率로 混合하여 20×20*cm*의 glass-plate에 두께 0.5*mm*가 되도록 塗布하여 만든 plate를 空氣中에서 乾燥시켰다가 105°C의 乾燥器에서 1時間 活性化시키고, 이것에 調製한 不鹼化物을 클로로포름에 10%液이 되도록 溶解한 것을 plate當 0.3*ml*씩 line-spotting하여 hexane: ether(7:3)로서 1時間 展開하였다. 發色劑는 0.01% rhodamine 6G-ethanol溶液을 噴霧하였으며, UV-light(3,600Å)로 觀察하여 分離된 3個의 Fr.을 에에텔로 分劃 溶出하였다. 에에텔을 溜去하여 남는 殘渣物을 不鹼化物中의 各 Fr.의 收得量으로 하였고, 이때의 TLC 分離狀態는 Fig.1과 같으며 各 Fr.의 回收物의 含有比率은 Fr.3이 43.22%로 不鹼化物의 主成分을 이루고 있었다. 本實驗에서는 Fr.3[4-desmethyl sterol]에 關해서만 實驗하였으며 Fr.3의 回收物一部의 아세톤溶液을 GLC, GLC-masss spectrometry(GLC-MS)의 試料로 使用하였다. 그리고 Fr.3의 回收物의 나머지 部分을 無水酢酸-pyridine (1:1)으로 常法에 依하여 acetylation하여 얻은 粗 acetate를 2의2)와 같은 方法으로 10% argentation TLC를 實施하여 單離된 2個의 物質을 各各 赤外線吸收 spectra(IR), 核磁氣共鳴 spectra(NMR)의 試料로 供試하였다.

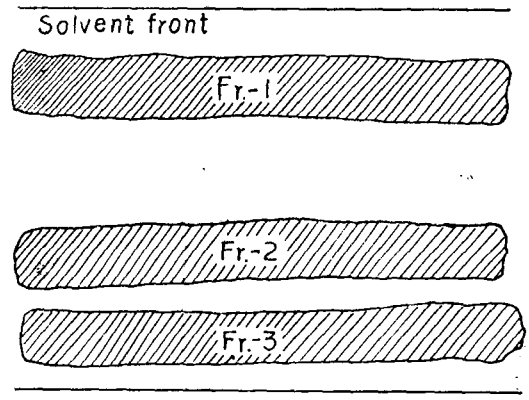

Fig. 1. Separation of the unsaponifiables of the muscle oil of fresh eel by TLC.
Plate; 500μ Wako Gel B-10
Eluent; Hexane-Ether(7:3), Time;60min

3. 測定法 및 測定條件

1) GLC; 使用한 GLC와 GLC의 分析條件은 Table 3과 같으며 GLC分析을 爲한 標準脂肪酸 methyl ester는 日本 東京化學工業社의 標準脂肪酸을 使用하였고 標準脂肪酸과 試料脂肪酸의 各 peak의 relative retention time(RRT)을 比較하여 試料의 脂肪酸을 同定하였다. 그리고 methyl myristate(5.5min)의 RRT를 基準(1.00)으로 하여 各 脂肪酸 methyl ester의 RRT를 換算하였다. 同定된 各 peak는 半値幅法(高木, 1971)으로 面積을 求하고 이들 合計値에 對한

Table 3. Operating Conditions of Gas-Liquid Chromatography

Items	Analytical materials	Fatty acid methyl ester analysis	Sterol analysis
Instrument		GLC(Shimadzu 4BM)	GLC(Shimadzu 4BM)
Column		DEGS(15%)glass 2*m*×3*mm* I. D.	OV-17(1.5%)glass 2*m*×3*mm* I. D.
Column temp		180°C	263°C
Detector		FID	FID
Detector oven temp		205°C	280°C
Carrier-gas		N_2·60*ml*/min	N_2·60*ml*/min
Chart speed		5*mm*/min	5*mm*/min

各 面積比를 %로 表示하여 脂肪酸量으로 하였다. 그리고 GLC分析을 爲한 標準 sterol(cholesterol)은 日本理硏비타민會社製를 使用하였으며, 標準cholesterol (18min)의 RRT를 基準(1.00)으로 各 sterols의 RRT를 換算하여 脂肪酸과 같은 方法으로 同定 및 定量하였다.

2) IR(荒木等, 1972 : 鄭等, 1973) ; Beckman IR-12 spectrophotometer로 KBr 錠劑法으로 測定하였다.

3) NMR(荒木等, 1972 ; 鄭等, 1973); HA-100D, 溶媒 클로로포름을 使用하여, 60MHz, 溫度·室溫, level;50으로 測定하였다. 그리고 內部標準으로 tetramethylsilane(TMS)를 使用하였으며 各 proton의 化學 shift는 TMS;0 ppm으로 하여 溶媒인 클로로포름 7.25ppm으로 하여 求하였다.

4) GLC-MS(荒木等, 1972 ; 鄭等, 1973) ; 島津 LKB-9,000 GLC-MS 裝置를 使用하였고 다음과 같은 條件에서 測定하였다. 充塡劑 1.5% OV-17/gaschrom-z, 80~100 mesh, column; glass column 2*m*×3*mm* φI. D, carrier gas; He, 流速; 30*ml*/min, column溫度; 310°C, ion化電壓; 70eV, trap current; 60μV, 加速電壓; 3,500V.

結果 및 考察

뱀장어 筋肉의 脂質含量은 Table 1에서 처럼 다른 魚種에 比해서 大端히 높았다. 이것은 野中等(1973)의 一般魚貝肉에서 調査한 것과 같은 結果이며, 油脂의 性狀에서도 다른 魚種(野中等, 1973; 宮原, 1971)에 비하여 類似하였으나 鹼化價는 높은 値를 나타냈었다

試料油의 脂肪酸 組成은 Fig. 2와 같으며 標準脂肪酸 peak와 一致되는 것(Table 4)은 各各 容易하게 同定되었으나, peak A(RRT=0.49), G(RRT=2.49), H(RRT=3.24), I(RRT=3.55)의 脂肪酸은 標準脂肪酸의 未備로 同定하지 못했다.

同定된 組成脂肪酸은 그 含量에서 $C_{18:1}$, $C_{16:0}$, $C_{16:1}$酸이 그 大部分을 차지하고 있었고, 다음은 $C_{14:0}$, $C_{18:0}$, $C_{20:1}$, $C_{18:2}$酸이며, $C_{18:3}$, $C_{15:0}$, $C_{14:1}$酸은 제일 적었다. 이 結果를 新間等(1964)이 各種 魚類 特히 연어(*Qcorhynchus keta*), 옥새송어(*Salmo gairdenrii irideus*) 및 미꾸라지(*Misgurnus fossilis*)의 背肉에 含有하는 脂質의 脂肪酸 組成을 調査한 것과 비교하면, 檢出된 脂肪酸의 種類는 그의 一致됨을 볼 수 있었다. 더욱이 各 魚種에 따라 그 脂肪酸組成이 各己 多少 相異하나 大体로 海産魚油에는 $C_{22:5}$, $C_{22:6}$酸의 含量이 淡水魚油에 비해서 많은 反面, 淡水魚 및 滊水産魚油에는 C_{20}, C_{22}酸의 含量이 絕對的으로 적고, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{18:3}$酸의 含量은 海産魚油에 비해서 훨씬 多量으로 含有하는 特徵이있다는 新間等(1964)의 主張과도 同一한 結果를 얻었다.

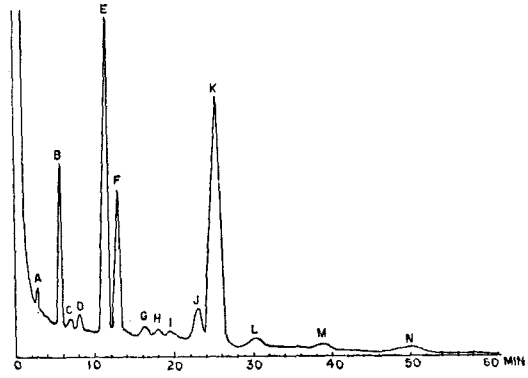

Fig. 2. Gas liquid chromatogram of fatty acid methylesters of the muscle lipid of fresh eel.

그러나 연어, 송어 및 미꾸라지의 背肉油에서 보이지 않는 $C_{15:0}$酸이 뱀장어 筋肉油에서 檢出되었으며, 그리고 뱀장어 筋肉油에서 보이지 않는 $C_{20:5}$, $C_{22:1}$ (or $C_{20:4}$), $C_{22:6}$酸이 연어, 송어 및 미꾸라지의 背肉油에서 檢出되었음을 볼 수 있는 것은 魚種이 서로

Table 4. Relative Retention Time of Standard Fatty Acid Methyl Esters and Fitting in Peak in Chromatogram of the Sample Musle lipid

Standard fatty acid methyl ester		Methyl ester of fatty acid of sample oil and the peak fitted to standard		
Fatty acid	RRT*	RRT*	Peak in Fig 1**	Peak area(%)
$C_{14:0}$	1.00	1.00	B	7.19
$C_{14:1}$	1.24	1.24	C	0.50
$C_{15:0}$	1.44	1.44	D	0.73
$C_{16:0}$	2.04	2.04	E	23.71
$C_{16:1}$	2.33	2.33	F	13.37
$C_{18:0}$	4.15	4.15	J	5.55
$C_{18:1}$	4.54	4.54	K	40.98
$C_{18:2}$	5.47	5.47	L	1.42
$C_{18:3}$	7.07	7.07	M	0.92
$C_{20:1}$	9.09	9.09	N	1.83

*Retention time of methyl myristate(5.5min) is taken as 1.00.
**Identity uncertain are A. G. H. I peaks on chromatogram.

다를 뿐만 아니라 飼料의 相異때문에 体內脂質의 組成脂肪酸이 달라진 結果(豊水等, 1963)라고도 推定된다.

또한 分析된 飽和 및 不飽和脂肪酸의 比率은 Table 4에서, 飽和脂肪酸 37.18%, monolnoic酸 56.68%, polyunsaturated酸 2.34%이었다.

Fig. 2에서 Fr. 3 만을 對象으로 하여 sterols의 組成을 測定한 理由는 다음과 같다. 一般的的으로 植物油脂의 不鹼化物을 TLC로서 分離(鄭等, 1973)하면 展開前端에서 Fr. 1(less polar compound), Fr. 2 (triterpene alcohols), Fr. 3(4-methyl sterols) 및 Fr. 4(sterols=4-desmethyl sterols)로 分離된다. 그러나 本實驗의 TLC條件에서는 Fr. 1, Fr. 2 및 Fr. 3의 3個의 band만으로 나누어졌으며, Fr. 1은 less polar compound(hydrocarbon, aliphatic alcohol)임을 Rf 値로 봐 쉽게 確認할 수 있었으며, Fr. 2는 rhodamine 6-G로서 靑色帶로 觀察되였고 또 acetylation에 依해서 sterol band가 아님을 確認했다. 그러나 Fr. 3은 acetylation한 結果 GLC로서 Δ^RAC 値 (3β-OAC/3β-OH)가 1.33(Itoh等, 1974)으로 나타나 sterol(4-desmethyl sterol)임을 알았다. 따라서 本實驗의 不鹼化物中에는 4-methyl sterol과triterpene alcohol은 存在하지 않거나 또는 TLC band로 나타날 程度以下의 量이라고 할 수 있겠다.

Fr. 3[4-desmethyl sterol]을 GLC로 分析한 sterols 組成은 Fig. 3과 같으며, RRT의 비교에서 peak A (RRT=1.00)는 cholesterol, peak B(RRT=1.33)는 24-methylene cholesterol로 推定되었다(Teshima等 1971).

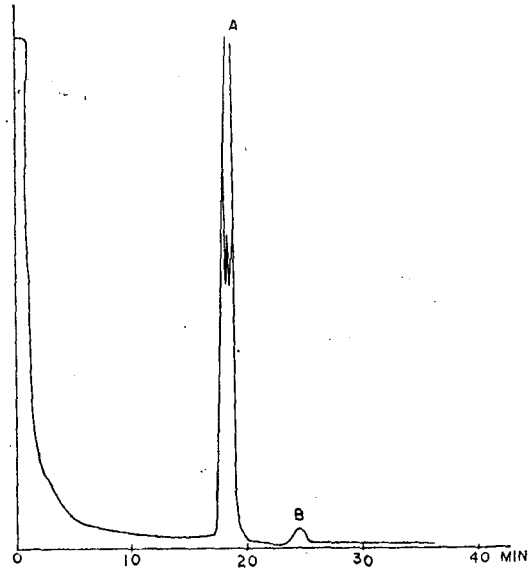

Fig. 3. Gas liquid chromatogram of sterol fraction of the muscle lipid of fresh eel.

그리고 實驗方法의 sterol의 分離에서 言及한 것 처럼 acetylation하여 얻은 Fr. 3의 粗 acetate는 argentation TLC를 되풀이 하여 2個의 sterol 即 sterol-Ⅰ (free의 RRT=1.00, acetate의 RRT=1.33)과 sterol-Ⅱ (free의 RRT=1.33, acetate의 RRT=1.77)를 各各 單離하였고, 또 아세톤 : 메타놀 (1:1)로서 再結晶 시켜 sterol-Ⅰ 399.3*mg*과 sterol-Ⅱ 24.95*mg*을 얻었다.

sterol-Ⅰ의 acetate로 얻은 IR spectrum은 Fig.

와 같으며, 805cm^{-1}에 3置換 olefin(Scallen等, 1968), 1370cm^{-1}에 gem-dimethyl(Scallen等, 1968) 그리고 1745cm^{-1}, 1255cm^{-1} 및 1043cm^{-1}에 acetyl基의 吸收가 各各 나타났다.

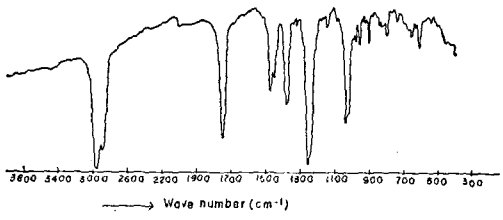

Fig. 4. Infrared spectrum of 4-desmethylsterolacetate-1 of the muscle lipid of fresh eel.

Sterol-Ⅰ의 acetate에 對한 NMP의 spectrum은 Fig. 5와 같으며, 0.7ppm(singlet)는 C-18 methyl, 1.06ppm(singlet)는 C-19 methylene, doublet center 0.89ppm(J=7.2Hz)는 C-26, C-27의 gem-dimethyl, 2.02ppm(singlet)에 acetyl, 그리고 1.23ppm에 multiplet로서 methylene基의 proton signal이 各各 보인다. 以上의 chemical shift의 바탕은 Thompson等(1972)과 Slomp等(1962)의 cholesterol의 그것과 基本的으로 一致하고 있다.

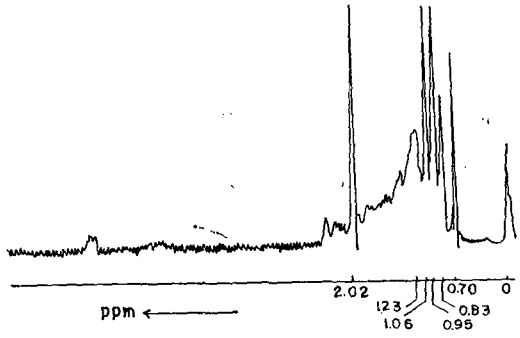

Fig. 5. NMR spectrum of cholesterol of the muscle lipid of fresh eel.

TLC에서 分離된 Fr. 3[4-desmethyl sterol]의 peak A(RRT=1.00)에 對한 GLC-MS spectrum은 Fig. 6과 같으며, 分子 ion은 m/e 386(강도 24%)에 나타났으며 其他 重要한 開裂 ion들은 다음과 같이 나타났다. 即 m/e 371($M-CH_3$)(19%), 368($M-H_2O$)(22%) 353($M-CH_3-H_2O$)(15%), 301($M-H_2O-67$) (29%), 275($M-H_2O-93$)(32%), 273(M-side chain)(23%) 및 247($M-H_2O-121$)(20%)等, 基準 peak는 m/e 55(100%)에 나타났다. 이들 開裂 pattern은 Jeong等(1974)의 고추씨 기름에서 얻은 cholesterol의 MS-spectrum과 完全히 一致된다. 따라서 IR, NMR 및 MS의 諸 論據에 依해서 sterol-Ⅰ은 cholesterol로서 同定되었다.

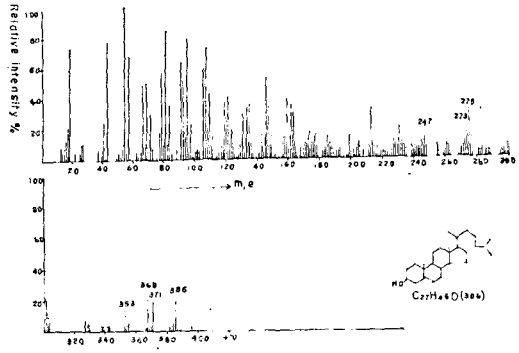

Fig. 6. Mass spectrum of cholesterol of the muscle lipid of fresh eel.

TLC에서 分離된 Fr. 3[4-desmethyl sterol]의 peak B(RRT=1.33)에 對한 GLC-MS spectrum은 Fig. 7과 같으며, 分子 ion m/e 398(강도; 6%)以外에 38.3 ($M-CH_3$)(9%), 380($M-H_2O$)(11%), 365($M-CH_3-H_2O$)(10%), 314[$M-C_6H_{12}$](38%), 296($M-PSC-H_2O$)(18%), 281($M-PSC-H_2O-CH_3$)(22%), 271(M-SC-2H)(35%)等이 나타났으며, 基準 peak는 m/e 55(100%)에 나타났다.

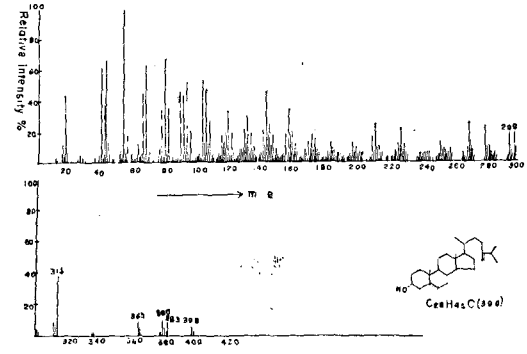

Fig. 7. Mass spectrum of 24-methylene cholesterol of the muscle lipid of fresh eel.

이 中 m/e 314는 C-24位에 末端 methylene基가 있을때 特徵的으로 나타나는 McLaferty轉移(Goad等, 1967)이며, 本 GLC-MS의 開裂 pattern은 Jeong等(1974)이 Akamegashiwa 植物種子油에서 單離한 24-methylen cholesterol의 그것과 잘 一致하고 있어 sterol-Ⅱ는 24-methylene cholesterol로 同定되었다.

이 sterol은 간혹 植物油에서도 檢出되지만 1955年 Idler가 처음으로 굴에서 分離 同定했으며 海産動物에는 比較的 널리 分布되어 있는 것으로 안다.

要　　約

뱀장어 筋肉油의 脂肪質 및 sterol組成을 GLC로 分析하였고 特히 sterols組成을 IR, NMR, GLC-MS로 同定하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 뱀장어 筋肉油의 脂肪酸 組成은 $C_{18:1}$(40.98%), $C_{16:0}$(23.71%), $C_{16:1}$(13.37%)酸이 가장 높은 比率로 含有하며, 다음은 $C_{14:0}$(7.19%), $C_{18:0}$(5.55%), $C_{20:1}$(1.83%), $C_{18:2}$(1.42%)酸이였고, $C_{18:3}$(0.92%), $C_{15:0}$(0.73%), $C_{14:1}$(0.50%)酸은 그 含量이 가장 적었다.

2) sterols組成은 cholesterol(96.58%)이 大部分이였고, 24-methylene cholesterol(3.42%)이 있음을 알았다.

文　　献

荒木峻・益子洋一郎(1972): 有機化合物のスペクトルによる同定法. 第2版, pp. 4—31, 65—113, 115—150, 東京化學同人, 東京.

Goad, L. J. and T. W. Goodwin(1967): Studies on phytosterol biosynthesis; The sterol of *Larix decidua leaves*. European J. Biochem., 1, 357—362.

Ikekawa, N., M. Matsui, T. Yosihda and T. Watanabe(1972): The composition of triglycerides and cholesteryl esters in some fish oils of saet, brackish and fresh water orygins. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish, 38(11), 1267—1274.

Itoh, T., T, Tamura and T. Matsumoto(1974): Gas chromatographic differentiation of 4-desmethyl sterol, 4-monomethylsterol, and 4. 4-dimethylsterol. Steroids, 23(5), 687—698.

鄭泰明・田村利武・伊藤俊博・松本太郎(1973): スカ油中のシクロオイレール・油化學(日本). 22(3), 153—156.

Jeong, T. M., T. Itoh., T. Tamura and T. Matsumoto(1974): Analysis of sterol fractions from twenty vegetable oils. Lipids, 9(11), 921—927.

宮原昭二郎(1971): ネズミザメ筋肉油の脂肪酸組成. 日水誌, 37(7), 648—653.

日本製油會社研究所(1964): ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸の定量分析法. 改訂案, 第701號.

日本油化學協會(1966): 基準油脂分析試驗法. pp. 163—166, 朝倉書店, 東京.

野中順三九・橋本芳郎・高橋豊雄・須山三千三(1973): 水産食品學. 食品加工シリーズ6, pp. 22—25, 恒星社厚生閣, 東京.

齊藤恒行・內山 均・梅本 滋・河端俊治(1974): 水産生物化學. 食品學實驗書, pp. 80—81, 恒星社厚生閣, 東京.

Scallen, T. J. and W. Krueger(1968): Nuclear magnetic resonance and infrared spectra of Δ^{24} and C-24 saturated steroids. J. Lipid Res. 9, 120—127.

新間彌一郎・田口脩子(1964): 魚類背肉中のコレステロール量と脂肪酸組成について. 日水誌, 30(2), 179—188.

Slomp, G. and F. A. Mackellar(1962): Nuclear magnetic resonance studies on some hydrocarbon side chains of steroids. J. Amer. Chem. Soc., 84, 204—206.

高木誠司(1971): 定量分析の實際と計算. 第3卷, 器機分析, pp. 411—425, 共立出版社, 東京.

Teshima, S. and A. Kanazawa(1971): Sterol compositions of marine crustaceans. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 37(1), 63—67.

Thompson, M. J., S. R. Dutky and G. W. Patterson(1972): NMR spectra of C-24 isomeric sterols. Phytochemistry, 11, 1781—1790.

豊水正道・川崎賢治・富安行雄(1963): ニジマス油の脂肪酸組成におよぼす餌料油の影響. 日水誌, 29(10), 957—961.

露木英男・伊藤眞吾(1967): ジュゴン油の脂肪酸組成. 日水誌, 33(11), 1035—1039.