

## 不飽和脂肪酸의 比色定量法

許 麟 洙·張 仁 浩

慶北大學校 農科大學 獸醫學科

Colorimetric Method of Determining Unsaturated Fatty Acids in Animal Tissues

Rhin Sou Huh and In Ho Chang

Dept. of Veterinary Medicine, College of Agriculture Kyungpook National University

### =ABSTRACT =

The present paper describes a colorimetric method of determining the free and total unsaturated fatty acids in animal tissues. The procedure is based in three steps on the following principles: First step is that the tissue homogenates are extracted in chilled acetone in order to eliminate the interfering substances, such as phospholipids, sulfatides and proteins. At next step, after centrifugation acetone layer is decanted and evaporated to dryness. Then the extract is shaken with heptane to solve in the solvent. That the characteristic nature of copper salts of unsaturated fatty acids are freely soluble in heptane and those of saturated acids are not is the bases of separating one from another. Thus unsaturated fatty acids can be isolated in heptane as their salts from saturated acids and other lipid mixture by shaking with copper reagent. Finally the yellowish brown color developed by adding color reagent (0.2% sodium diethyldithiocarbamate in n-butanol solution) which reacts with the copper salts of the acids and produces the color is measured colorimetrically.

### 緒論

脂肪酸은 오래前부터 滴定方法<sup>1)~5)</sup>, 比色方法<sup>6)~12)</sup> 및 Spectrometry<sup>13)</sup> 等 여러 가지 方法에 依하여 定量되어 왔다. Ayers<sup>6)</sup> 는 高級脂肪酸의 Chloroform 溶液에 Copper nitrate 를 作用시켜서 形成된

脂肪酸의 銅鹽의 靑色을 比色定量하였다. 岩山<sup>7)</sup>는 Ayers 的 方法을 發展시켰고, Hlynezak 等<sup>8)</sup> 은 Chromatography로 分離한 脂肪酸을 끓은 黃酸으로 溶出한 다음 Copper acetate로 處理하여 얻은 脂肪酸의 銅鹽을 dithizon 으로 發色시켜 定量하였다. Duncombe<sup>9)</sup> 는 脂肪酸의 Chloroform 溶液에 Copper nitrate 를 作用시켜 形成된 脂肪酸의 銅鹽을 diethyl

dithiocarbamate로 發色시켜 定量하였으며 金等<sup>10)</sup>은 Duncombe의 方法이 磷脂質에 依하여 干涉을 받으므로 이를 除去하기 為하여 doucile를 利用하고 Cargle 및 Wadstrom<sup>11)</sup>은 脂質抽出液을 Silicic acid column을 通過시켜 磷脂質去除시킨 後에 다시 ion交換樹脂層을 通過시켜서 脂肪酸을 分離시키고 hydroxamic acid로 比色測定하였다. 그러나 위의 諸方法은 全體脂肪酸의 定量法이며, 不飽和脂肪酸의 定量方法은 Wiese 및 Hansen의 Spectrometry<sup>12)</sup>에 依한 特殊方法이 고작 처음이고 普通實驗室에서는 不可能하였다. 許와 金<sup>13)</sup>은 처음으로 不飽和脂肪酸의 比色測定方法을 考案하였다. 이 方法은 鮑和脂肪酸의 銅鹽은 heptane에 全혀 녹지 않으나 不飽和脂肪酸의 銅鹽은 잘 녹는 性質을 利用한 것이다. Dole<sup>9)</sup>의 脂肪酸抽出液을 heptane에 移行시키고 Copper nitrate로 銅鹽을 形成시키면 分離되는 不飽和脂肪酸의 銅鹽을 diethyldithiocarbamate로 發色시켜 定量하였다. 그러나 動植物의 組織은 血液內의 條件과 여러가지 面에서 다르므로 上記의 方法을 그대로 動植物의 組織에 擄用할 수 없다. 著者等은 動植物의 組織內에 들어 있는 遊離 및 結合形 不飽和脂肪酸의 定量方法을 發展시켰다.

## 材料 및 方法

### 1. 試 藥

Copper reagent: 6.45g/dl의 Copper nitrate 10容, 1M triethanolamine 9容 및 1M acetic acid의 混液.  
Color reagent: 0.1g/dl의 Sodium diethyldithiocarbamate n- 또는 sec-butanol溶液.

標準溶液: Linoleic acid 250~1,000 μM/L의 n-heptane溶液.

脂質抽出溶媒: 1:3의 ethanol-ether混液, Chilled acetone. 冷凍室에서 贯藏된 acetone.

Redistilled heptane: 硝子器具로 再蒸溜함.

0.5N Alcoholic KOH.

0.15N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 2. 處理方法

a) 標準曲線作成: 4個의 試驗管에 각각 3.5mg/dl, 7mg/dl, 14mg/dl 및 21mg/dl濃度의 linoleic acid heptane溶液 0.1ml씩을 넣고 acetone 3

ml씩을 追加한 後 2分間 쪽 진탕하였다. 끓는 물 중탕에서 蒸發乾燥시키고 다시 heptane 3ml씩을 添加하여 脂肪酸을 녹였다. 뒤이어 2ml의 Copper reagent를 追加하고 Voltex mixer에서 1分間 세게 진탕한 다음 3,000 rpm에서 5分間遠心分離하였다. 上層의 Heptane層을 仔細한 硝子吸入管을 써서 2.5ml씩을 다른 試驗管에 옮기고 Color reagent 0.2ml씩을 添加하여 섞은 다음 發色한 黃褐色을 波長 440 nm에서 吸光度를 測定하여 直線의 標準曲線을 作成하였다. Reagent blank (盲檢)는 Heptane 3ml에 Color reagent 0.2ml를 添加混合하여 使用하였다.

b) 脂肪酸抽出: 硝子製의 組織均質器로써 100mg의 組織에 3ml의 Acetone을 添加하여 均質化하였다. 均質化는 1分內에 끝 마치고 Acetone을 追加하여 總量이 10ml가 되도록 조정하였다. 뒤이어 세게 진탕한 後 1時間 동안 冷藏庫에서 靜置하였다. 그런 다음 3,000 rpm에서 遠心分離하여 上層의 Acetone層을 다른 試驗管에 回收하여 다음 實驗에 使用하였다.

c) 遊離不飽和脂肪酸의 抽出 및 定量: 위에서抽出한 脂肪質의 Acetone溶液 10ml中에서 2ml를 다른 試驗管에 分取하고 끓는 물 중탕에서 溶媒를 蒸發시킨 後에 3ml의 Heptane을 加하여 혼들어 溶解시켰다. 여기에 Copper reagent를 添加하여 1分동안 Voltex mixer로서 세게 진탕시켜 脂肪酸을 銅鹽化시켰다. 이것을 3,000rpm으로 5分동안 遠心分離하면 明確하게 上下層으로 分離된다. 上下層의 分離가 철저하지 못하면 不飽和脂肪酸의 銅鹽과 기타銅鹽이나 銅化合物의 試驗管벽 또는 Heptane溶液에 混入되어 그 만큼의 誤差의 原因이 된다. 上層의 Heptane層에는 Heptane에 可溶性인 不飽和脂肪酸의 銅鹽이 溶解되어 分離된다. 이 Heptane層을 操心하여 微細한 硝子吸取管으로 2.5ml를吸取하여 다른 試驗管에 옮겼다. 여기에 Color reagent 0.2ml를 添加하여 混合하면 黃褐色의 色이 나타나는데 이 色을 440mm의 波長에서 吸光度를 測定하였다.

d) 總不飽和脂肪酸(結合形 및 其他 全體 不飽和脂肪酸)의 加水分解 및 定量: 100mg의 組織을 3ml의 蒸溜水와 함께 均質化하고 다른 試驗管에 옮긴 다음에 脂質抽出溶媒(Ethanol-Ether의 1:3溶液)5ml를 添加하여 세게 진탕하고 遠心分離로 上層의 脂質을 分離, 다른 試驗管에 옮겼다. 여기에 0.5

N Alcoholic KOH 0.5ml 를 加하고 Dose 및 Meintz<sup>3)</sup> 의 방법에 따라서 80°C의 물중탕에서 加水分解를遂行하였다. 加水分解途中에 試驗管內容物이蒸發하여 줄어들면 Ethanol을追加하여 乾燥를 막으면서 2時間 동안 지속시켰다. 加水分解가 完成되면 0.15N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2ml를加하여 中和시키고 Ether를追加하여 總量이 20ml가 되도록 調整하였다.

加水分解液 20ml中에서 20ml (組織 20mg에 該當)만을 分取하여 다른 試驗管에 옮기고 물중탕에서 溶媒를蒸發시켰다.

殘渣物에 Heptane 3ml를添加하고 친탕하여 加水分解產物(脂肪酸)을 Heptane에 移行시켰다. 그런 다음 2ml의 Copper reagent를添加하고 친탕하여 脂肪酸銅化와 同時に 飽和와 不飽和脂肪酸을 分離하였다. 3,000 rpm으로 5分間遠心分離하여 分離된 Heptane層 2.5ml를吸取하고 0.2ml의 Color reagent를添加하였다. 發色된 黃褐色을 위에서와 같이 440nm의 波長에 吸光度를測定하였다. 여기에서 얻어진 吸光度는 試驗 20mg에 들어 있는 量에 該當하는 것임으로 이 값을 標準曲線에 對照하여 mg으로換算하였다. 이 값에 遊離不飽和脂肪酸의 경우는 50倍, 總不飽和脂肪酸의 경우는 100倍를 하여 試驗 1g 내에 들어 있는 不飽和脂肪酸의 mg數를換算하였다.

**3. 實驗動物** 本實驗에 使用한 動物은 市販配合飼料로서 飼育한 200~300g에 達하는 健康한 흰쥐로서 가위로 斷頭하여 急速히 殺害한 後에 即時 開腹하여 肝臟, 腹腔筋, 脾臟, 腎臟等 4 가지 試驗을

分離하여 冷凍保管하였다가 實驗에 使用하였다.

## 結 果

### 1) 回收實驗

本方法에 依하여 分析하였을 때에 不飽和脂肪酸의 抽出되는 程度를 檢正하기 為하여 回收實驗을遂行하였다. 이 實驗에 쓴 試料는 5마리의 試驗을 合同한 것이며, 각 合同組織(pooled tissue)은 3回連續分析으로 正常濃度를 定量한 後에 다음과 같이 Linoleic acid를 添加하여 그回收率을 觀察하였다. 各各 合同組織은 1g에 대하여 다음과 같이 Linoleic acid를 添加하였으며, 分析은 100mg을 單位로 하여遂行하였다. 腎臟에는 試驗 Gram當1mM/L (280.5mg/L)濃度의 Linoleic acid溶液 1ml (28.05 μg/100mg)를, 肝臟에는 2ml (56.1 μg/100mg)를, 筋肉에는 3ml (84.15 μg/100mg)를, 脾臟組織에는 4ml (112.2 μg/100mg)를 添加하였다. 그 結果는 表 1에서 보는 바와 같이 腎臟에서 96.2, 肝臟에서 98.0, 筋肉에서 95.5, 그리고 脾臟에서 98.4%로서 平均 97%의回收率을 보였다.

### 2) 再生實驗

本方法에 對한 正確性과 信憑性을 檢討하기 為하여 再生實驗을遂行하였다. 本再生實驗에서 使用한 試料는 흰쥐 5마리의 肝臟, 肾臟, 筋肉 및 脾臟等各組織을 각각 合同으로 한것이며, 이를 合同組織을 각각 10번씩 反複分析하여 그再生性을 檢討하였다. 그結果는 表 2에서 보는 바와 같이 肾臟에서

Table 1. Recovery rates of unsaturated fatty acids (UFA) in pooled rat tissues

Tissues * Pooled	FUFA Conc. of Tissues ( μg / 100mg )	UFA Source' Added to the Tissues ( μg / 100mg )	Expected FUFA Conc. ( μg / 100mg )	FUFA Conc. Found ( μg / 100mg )	Recovery Rate ( % )
Kidney	225	28.05	253.05	243.5	96.2
Liver	228	56.10	284.10	278.4	98.0
Muscle	98	84.15	182.15	173.9	95.5
Spleen	105	112.20	217.20	213.7	98.4

\* The tissues pooled were homogenates of 5 animals'.

' Concentration of the UFA source was 1mM/L and the amount of the tissue used was one gram of wet weight. UFA source was added 1, 2, 3, and 4ml portions of the solution to each gram of the tissues.

Table 2. Repetitive analysis for free unsaturated fatty acids (FUFA) of pooled rat tissues

Extraction No. the tissues	Kidney (mg/g)	Liver (mg/g)	Muscle (mg/g)	Spleen (mg/g)
1	2.12	2.47	1.03	0.98
2	1.95	2.58	1.09	0.99
3	2.07	1.95	0.92	1.01
4	2.30	1.98	0.97	0.96
5	2.24	2.05	0.95	0.98
6	2.05	2.34	0.93	1.10
7	1.83	2.28	1.02	1.05
8	1.98	1.89	0.98	1.02
9	2.25	2.12	0.96	0.97
10	2.34	2.03	1.02	0.96
Mean	2.11	2.17	0.99	1.00
Standard Deviation	0.167	0.235	0.053	0.045
Coefficient of Variance. (%)	7.92	10.83	5.35	4.5

7.92, 肝臟에서 10.83, 筋肉에서 5.35, 脾臟에서 4.5 %에 平均 7.15 %의 再生性이 있었다.

3) 흰쥐 各組織內 遊離不飽和脂肪酸 및 總不飽和脂肪酸含量 本方法을 써서 實際로 動物組織內 不

飽和脂肪酸의 含量을 分析한 結果는 表 3에서 보는 바와 같다. 本實驗에서 使用한 試料는 13 마리의 成熟한 흰쥐의 肝臟, 腎臟, 筋肉 및 脾臟等 4 가지 組織이 있다.

遊離不飽和脂肪酸은 腎臟에  $2.32 \pm 0.23$  mg/g, 肝臟에  $2.06 \pm 0.26$  mg/g, 筋肉에  $0.91 \pm 0.15$  mg/g, 脾臟에  $1.19 \pm 0.19$  mg/g 의 含量을 보였다. 遊離不飽和脂肪酸은 肝臟과 腎臟에 많이 들어 있었으며 筋肉에는 적게 들어 있었다.

總不飽和脂肪酸은 腎臟에  $19.93 \pm 2.16$  mg/g, 肝臟에  $22.46 \pm 3.32$  mg/g, 筋肉에  $14.14 \pm 1.8$  mg/g, 脾臟에  $19.32 \pm 2.18$  mg/g 의 含量을 보였으며, 肝臟에 가장 많고 亦見 筋肉에 적게 들어 있었다.

### 考 察

本定量方法은 3 가지 過程을 거쳐서 完遂되는 바 첫째 過程은 各種 混合物로 構成된 組織으로부터 燃脂質과 其他 妨害物質을 除去하고 單純脂質만을 抽出하는 過程이고, 둘째 過程은 單純脂質中에서 不飽和脂肪酸만을 分離하고, 同時에 脂肪酸을 銅鹽化

Table 3. Free unsaturated fatty acid (FUFA) and total unsaturated fatty acid (TUFA) concentrations in rat tissues.

Rat No.	Kidney (mg/g)		Liver (mg/g)		Muscle (mg/g)		Spleen (mg/g)	
	FUFA	TUFA	FUFA	TUFA	FUFA	TUFA	TUFA	FUFA
1	—	—	—	18.97	0.46	—	—	10.76
2	3.74	8.42	2.80	—	0.71	16.75	2.83	21.79
3	2.80	16.30	3.86	47.14	0.68	16.93	0.63	31.14
4	1.93	22.99	1.51	—	2.31	—	0.56	20.24
5	2.24	—	1.02	19.28	0.21	5.83	1.14	18.76
6	2.75	24.87	2.98	20.32	—	25.28	1.30	35.54
7	0.78	22.70	2.07	23.00	0.99	15.62	0.69	18.63
8	2.57	11.72	1.72	22.95	1.52	10.45	1.20	7.53
9	3.26	23.71	1.83	20.49	0.47	14.77	1.92	19.68
0	2.21	—	1.73	10.27	—	8.42	1.02	11.70
11	1.81	31.96	2.13	—	0.89	17.91	0.82	18.71
12	1.50	18.48	2.51	19.74	0.75	—	1.34	17.65
13	2.25	18.17	0.53	—	0.79	9.48	0.87	19.08
Mean	2.32	19.93	2.06	22.46	0.91	14.14	1.19	19.32
Standard Error	0.23	2.16	0.26	3.32	0.15	1.80	0.19	2.18

하는 과정이고, 마지막 과정은 形成된 脂肪酸의 銅鹽을 發色시켜 發色濃度를 測定하는 과정이다. 이 3 가지 과정이 모두 滿足하게 違行되어야 信憑性이 있는 定量法이 될 것이다.

Dole<sup>2,3)</sup> 은 脂肪酸의 抽出混液으로 血漿을 抽出하였을 때에 上部의 Heptane 層에 遊離脂肪酸이 抽出되어 나오는바 同一한 抽出液으로 重複抽出하였을 때에 2.6%의 變異係數를 보여서 抽出率이 높다고 하였다. 그러나 이 抽出方法으로 組織均質液을 抽出하면 多量의 燐脂質이 混入되어 干涉作用이 커으며, TLC에서도 燐脂質의 混在가 證明되었다. 그러므로 燐脂質의 濃度가 높은 組織에서는 脂肪酸抽出에 Dole<sup>2,3)</sup>의 方法이 不適當하였다. 그러나 組織에는 冷却한 Acetone을 使用하면 95%以上의 燐脂質이 沈澱되어 單純脂質(Acylglycerol, Sterol, Sterol ester, 炭化水素 및 色素等)로 부터 分離되고<sup>4)</sup> 하므로 本方法에서는 組織의 遊離脂肪酸 抽出에 冷却한 Acetone을 溶媒로 使用하였다.

그러나 總不飽和脂肪酸의 定量에는 冷却된 Acetone을 使用할 必要가 없었다. 總不飽和脂肪酸은 結合形脂肪酸이므로 加水分解하면 모두 脂肪酸이 遊離된다. 또한 燐脂質도 脂肪酸의 Ester이므로 加水分解로 脂肪酸이 遊離될 것이다. 따라서 加水分解만 完全하였다면 干涉作用이 있던 燐脂質이 分解되어 없어졌으므로 Acetone으로 燐脂質除去作業이 必要하지 않다.

本方法에서 使用한 加水分解方法은 Dole 및 Meinertz<sup>3)</sup>의 方法을 따라서 違行한 結果 滿足한 結果였다.

遊離脂肪酸의 混合體에서 飽和와 不飽和를 서로 分離하고 銅鹽化하는 과정이 必要하다. West 및 Todd<sup>15)</sup>는 不飽和脂肪酸의 鉛監이 Ether와 Ethanol에 잘 녹으나 飽和脂肪酸의 鉛監은 이들 溶媒에 녹지 않으므로 서로 분리할 수 있다고 하였다.

그러나 이 鉛監의 水溶液은 發色에 干涉할 뿐만 아니라 溶媒인 Ether 또는 Ethanol이 鉛監의 水溶液과 部分的 또는 大部分이 混合되어 分離에 難點이 있어서 實用性이 없었다. 그러나 許와 金<sup>12)</sup>에 依하면 不飽和脂肪酸의 銅監은 Heptane에 잘 녹으나 饽和脂肪酸의 銅監은 Heptane에 전혀 녹지 않는다고 하였다. 著者等은 이 性質을 利用하여 쉽게 이들을 分離하였으며 TLC所見에서도 不飽和脂肪

酸銅監만이 確認되었다.

Duncombe<sup>9)</sup>의 發色方法은 飽和脂肪酸 뿐만이 아니라 不飽和脂肪酸에서도 똑같이 예민하게 反應하였다. 그는 燐脂質을 除外하고는 Cholesterol, Cholesterol ester, Acylglycerol 等이 共存하여도 發色에 영향이 없다고 하였다. 그러므로 冷却한 Acetone을 使用하여 銅監을 形成할 수 있는 燐脂質과 Sulfatide 等을 脂質系에서 徹底히 除去하면 完全한 定量法이 될 것이다.

## 結論

아직 生物組織의 不飽和脂肪酸의 定量方法이 開發되어 있지 아니하여 著者等은 動物組織內의 遊離形 또는 結合形의 不飽和脂肪酸의 定量方法을 考案하여 發展시켰다.

그 方法은 大體로 3段階의 過程을 거쳐서 이루어지는바, 첫째 단계는 均質化한 組織을 冷却한 Acetone으로 치리하여 不溶性인 燐脂質, Sulfatide等을 써서 不溶性인 飽和脂肪酸을 除去하므로써 不飽和脂肪酸을 分離하는 同時に 銅監하고 마지막 過程은 分離한 不飽和脂肪酸의 銅監을 發色시켜 그濃度를 測定하는 過程이다.

本方法의 回收率은 平均 97%이었고 實驗誤差는 平均 ± 7.15%였다.

## 参考文獻

- 1) Davis, B. D.: *The estimation of small amounts of fatty acids in the presence of polyoxoethylene sorbitan partial fatty acid esters ("Tween") and of serum proteins.* Arch. Biochem. 15: 351-357, 1947.
- 2) Dole, V. P.: *A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose.* J. Clin. Invest. 35: 150-154, 1956.
- 3) Dole, V. P., and Meinertz, H.: *Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues.* J. Biol. Chem. 235: 2595-2599, 1960.

- 4) Gordon, R. S., JR., and Cherkes, A.: *Unesterified fatty acid in human blood plasma*. *J. Clin. Invest.* 35: 206-212, 1956.
  - 5) Goss, J. E., and Lein, A.: *Microtitration of free fatty acids in plasma*. *Clin. Chem.* 13: 36-39, 1967.
  - 6) Ayers, C. W.: *Estimation of the higher fatty acids C17-C18*. *Anal. Chim. Acta* 15: 77-83, 1956.
  - 7) 岩山陽治: 高級脂肪酸の新比色定量法. *日薬誌*. 79: 552-554, 1959.
  - 8) Hlynczak, A. J., Sysa, J., Toczyski, T., and Horbacewicz, A.: *Chromatographische mikromethode der quantitativen colorimetrischen bestimmung hoherer fettsäuren mittels dithizon*. *Biochem. Z.* 334: 357-360, 1961.
  - 9) Duncombe, W. G.: *The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids*.
  - 10) 金漢燮, 房錫運, 李基寧: 血漿遊離脂肪酸의 比色測定法, *서울大논문집*, 19: 1-10, 1968.
  - 11) Carlson, L. A., and Wadstrom, L. B.: *A colorimetric method of determining unesterified fatty acids in plasma*. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 10: 407-414, 1958
  - 12) 許麟珠, 金永洪: 血漿遊離不飽和脂肪酸의 比色定量法, *慶大論文集*, 29: 537-541, 1980.
  - 13) Wiese, H. F., and Hansen, A. E.: *Semimicromethod for unsaturated fatty acids of blood serum*. *J. Biol. Chem.* 202: 417-423, 1953.
  - 14) 日本生化學會: 生化學實驗講座 3, 脂質の化學, 東京化學同人, 東京, p. 20, 1974.
  - 15) West, E. S., and Todd, W. R.: *Textbook of biochemistry*, 3rd Ed., MacMillan Co., New York. p. 132, 1963.