

## 들깨유로부터 $\alpha$ -Linolenic Acid의 순수분리

정보영<sup>†</sup> · 류수노\* · 허한순\*

경상대학교 식품과학과 및 해양산업연구소  
\*농촌진흥청 작물시험장

### Isolation of Pure $\alpha$ -Linolenic Acid from Perilla Seed Oil

Bo-Young Jeong<sup>†</sup>, Su-Noh Ryu\* and Han-Sun Hur\*

Dept. of Food Science/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,  
Tongyeong 650-160, Korea

\*Corp Experiment Station, Rural Development Administration, Suwon 441-100, Korea

#### Abstract

Low-temperature crystallization method and silver nitrate-impregnated silicic acid column chromatography were applied for the isolation of pure  $\alpha$ -linolenic acid(ALA) from perilla seed oil. ALA of 78% in purity(HALA; yield, 83%) was obtained from the fatty acid mixture(ALA, 65.7%) derived from perilla oil by the low-temperature crystallization method, when the mixture was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 210min. ALA over 90% in purity(yield, 71%) was also obtained from HALA ethyl esters(ALA, 78%) by the silver nitrate-impregnated silicic acid column(100cm $\times$ 10cm, i.d.) chromatography. In addition, the silver nitrate-impregnated silicic acid could be semipermanently used for isolation of ALA, because  $\text{Ag}^+$  ion was not dissociated from the stationary phase.

**Key words:**  $\alpha$ -linolenic acid(ALA), isolation, low-temperature crystallization, silver nitrate-impregnated silicic acid column chromatography

#### 서 론

Alpha-linolenic acid(ALA, 18:3n-3)는 식물유, 특히 들깨유의 대표적인 오메가-3 지방산이자 필수지방산의 하나로서, desaturation 및 chain elongation에 의하여 체내에서 eicosapentaenoic acid(EPA, 20:5n-3) 및 docosahexaenoic acid(DHA, 22:6n-3)로 전환되는 성질을 갖고 있다. 오메가-3 지방산에 관한 연구는 최초 어유에 대한 역학조사(1-3)가 계기가 되어, 오늘날 오메가-3 지방산의 다양한 생리작용이 밝혀지게 되었다(4-12). 하지만 특정성분의 생리효과에 대한 연구를 위해서는 90% 이상의 고순도제품이 요구되지만, 지금까지 대부분의 연구는 특정성분을 비교적 많이 함유하고 있는 원료유 자체를 주로 사용하였기 때문에 오메가-3 지방산의 명확한 생리효과에 대하여 불분명한 점이 많았다(13-15). 이러한 연유로 어유로부터 EPA나 DHA의 순수분리에 대한 연구(16-21)가 크게 진전되어, 이

들 지방산의 생리작용에 관한 연구에 많은 도움이 되고 있을 뿐만 아니라, 캡슐화하여 건강보조식품으로도 시판되기에 이르렀다. 그러나, ALA를 다량 함유하고 있는 들깨유(ALA, 약 65%)로부터 ALA의 순수분리에 관한 연구는 거의 찾아 볼 수 없는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 들깨유의 유효이용의 하나로써, 들깨유로부터 90% 이상의 ALA를 대량분리하기 위하여 저온분별결정법과 질산은 함침(含浸) 실리카 칼럼크로마토그래피법을 적용하여 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 시료 및 시약

안동산 들깨씨로부터 압착법에 의해 추출된 들깨유를 1995년 2월 통영시장에서 구입하여  $\alpha$ -linolenic acid(ALA)의 정제용 시료로 사용하였다. 실험에 사용된 KO-

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

H, AgNO<sub>3</sub>, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ethanol, BF<sub>3</sub>-methanol 등은 시약특급을 사용하였고, ethyl ether, hexane, acetone 등의 용매는 시약 1급을 증류하여 사용하였다. 모든 분석자료는 3~5회 분석의 평균치로 나타냈다.

지방산 및 지방산 유도체의 조제

일정량의 들깨유를 Ackman 등의 방법(22)에 준하여 검화하였다. 즉, 약 500g의 들깨유에 6배량의 1N K-OH-ethanol용액을 가하여 2시간 동안 환류가열한 후, ethyl ether에 의하여 불검화물을 제거하고, 검화물에 conc HCl 약 600ml과 온수 약 600ml을 가하여 지방산으로 만든 다음 ethyl ether에 의해 지방산을 분리하였다. 이 지방산 혼합물은 저온분별결정법의 시료로 사용하였다. 지방산 혼합물은 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-ethanol 1000ml을 가하고 1시간 동안 환류가열하여 지방산 ethyl ester화 하였으며, 지방산 methyl ester의 조제는 BF<sub>3</sub>-methanol을 사용하였다(21).

저온분별결정법

일정량의 지방산에 7배량의 95% acetone을 가하여 -80°C에서 1~3시간 동안 동결시킨 후 생성된 결정(주로 포화지방산)을 여과하여 제거하고, 액상의 불용성 성분(주로 불포화지방산)을 분리하여 ethyl ester 유도체로 만든 다음, 고순도  $\alpha$ -linolenic acid(ALA)의 정제용 시료로 사용하였다(21).

질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피

Silicic acid(70~230mesh, E. Merck, Darmstadt, Germany) 일정량에 대해 10% AgNO<sub>3</sub>-ethanol을 첨가 혼합한 다음, 용매를 제거하고 120°C에서 약 2시간 가열하였다. 이것을 2% acetone-hexane 혼합용매에 분산시켜 대형 glass open column(100×10cm, i.d.)에 채운 다음, 저온분별결정법에 의하여 1차 농축된 일정량의 지방산 ethyl ester를 부가시켰다. 여기에 일정량의 2%, 5%, 7% acetone-hexane 혼합용매를 순차 가하여 얻은 각획분의 용리액을 gas-liquid chromatography(GLC)에 의해 ALA의 순도를 확인하고 내부표준품(tricosanoate; 99%, Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI, USA)에 의해 ALA의 회수율을 측정하였다(21).

Gas-liquid chromatography

지방산 분석에 사용된 GLC는 Supelcowax-10 fused silica capillary column(30m×0.32mm, i.d., SUPEL-

CO, Supelco Park, PA, USA)을 붙인 Shimadzu GC 14A를 이용하였다. Injector 및 detector 온도는 각각 250°C로 하였으며, column온도는 원료 지방산 분석의 경우에는 180~220°C(1°C/min)로, 정제과정 중 ALA 확인의 경우에는 210°C 항온으로 분석하였다. 그리고 carrier gas는 He(1.0kg/cm<sup>2</sup>)를 사용하였다. 지방산의 분석은 동일조건에서 분석한 표준품과 비교하여 등정하였으며 지방산 표준품은 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 22:0, 22:1, 24:0(D-104, Doosan Secondary Research Lab., Yongin, Korea)을 사용하였다.

결과 및 고찰

원료 들깨유의 지방산 조성

Table 1에서 나타낸 바와 같이 분석에 이용된 안동산 들깨유의 주요지방산은 18:3n-3(ALA), 18:2n-6, 18:1n-9 및 16:0이였으며, 이들 지방산 중 ALA는 총 지방산의 약 66%를 차지하였다. 들깨유의 지방산조성에 관한 연구로서 Shin과 Kim(23)은 5품종의 들깨유에서 ALA의 조성비가 약 61~64% 범위였다고 보고하였고, 류 등(24)은 317품종의 들깨씨를 수집하여 ALA 조성비를 분석한 결과 약 51~71%(평균 63.1%)의 범위였다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 안동산 들깨씨는 이전에 보고된 결과들과 비교하였을 때, 평균치 이상의 ALA 조성비를 나타내었다. 또한 이 결과는 한국산 들깨종과 유사한 일본산 shiso油의 ALA 조성비 53.4%보다 약 13%나 더 높아 한국산 들깨는 ALA의 우수한 자원으로 평가되었다.

저온분별결정법에 의한 ALA의 농축

비교적 순도는 낮지만 고도불포화지방산의 대량 분

Table 1. Fatty acid compositions of perilla and SHISO oils (Area %)

Fatty acid	Perilla	SHISO
14:0	tr <sup>1)</sup>	1.17
16:0	4.72	7.43
16:1n-7	tr	1.8
18:0	1.28	1.36
18:1n-9	13.3	19.2
18:1n-7	0.85	tr
18:2n-6	13.5	11.7
18:2n-4	0.18	0.13
18:3n-3	65.7	53.4
20:0	0.12	0.12
20:1n-9	tr	0.3
20:1n-7	0.12	tr
Unknown	0.21	3.39

<sup>1)</sup>trace

**Table 2. Concentration of ALA from perilla oil by low-temperature crystallization with different freezing time and sample weight at  $-80^{\circ}\text{C}$**

Sample content(g)	Freezing time(min)	ALA(%)	
		Purity	Yield
5	60	68.3	73.2
5	90	69.7	81.0
5	120	70.1	65.1
5	150	73.0	97.1
5	180	74.0	97.5
100	210	78.1	83.4
200	210	77.1	83.0

리를 위한 방법으로서 일반적으로 저온분별결정법 또는 요소부가법이 많이 이용되고 있다(16,21). 이들 방법 중 순도 측면에서는 후자가 다소 유리하나, 조작의 간편성 및 산화의 위험성 그리고 경제성 등을 고려하면 전자가 더욱 유리하다(21). 따라서 본 연구에서는 들깨 유로부터 고순도 ALA의 분리정제를 위한 1차 농축물을 제조할 목적으로 저온분별결정법을 채택하였다.

Table 2는 들깨유지방산 혼합물(ALA, 65.7%) 5g에 7배량의 95% acetone을 가하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 60분부터 180분까지 동결시간을 달리하여 농축한 결과를 나타냈다. 최초 60분간 동결하였을 때는 ALA의 순도가 약 68%로써 원료유의 경우와 거의 차이가 없었으나, 동결시간이 길어짐에 따라 ALA의 순도 및 회수율이 점점 높아졌다. 따라서 150분~180분간 동결의 경우 순도가 73.0%, 회수율 97% 이상으로 나타나 최적 동결시간으로 판단되었다. 더욱 대량으로 농축하기 위하여 들깨유지방산 혼합물 100g 및 200g을 각각 사용하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 210분간 동결한 경우 순도 약 78%(회수율, 약 83%)의 ALA를 얻을 수 있었는데, 이 결과는 소량농축의 경우에 비하여 ALA의 순도는 높아졌으나 회수율은 다소 낮게 나타났다. 따라서 이 결과는 소량농축의 경우에 비하여 동결시간의 연장(30~60min)과 대량농축하므로써 조작시 발생하는 손실 등이 복합적으로 작용한 때문으로 생각된다. 한편, Jeong(21)은 저온분별결정법에 의하여 가다랭이 안와유 지방산 혼합물(DHA, 약 24%)을 농축한 결과, 동결온도에 따라 각각 39.3%( $-60^{\circ}\text{C}$ ), 42.4%( $-70^{\circ}\text{C}$ ), 46.4%( $-80^{\circ}\text{C}$ )의 DHA 농축물을 얻었다고 보고하였다. 이와같이 동일한 방법으로 특정성분을 농축하는 경우, 그 농축도는 원료유의 지방산 조성에 따라 상당한 차이를 나타내므로, 특정 지방산의 농축을 위해서는 가능한 한 목적지방산의 조성비가 높은 원료를 선택하는 것이 효율적임을 알 수 있다.

질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피

이 방법은 silicic acid에  $\text{Ag}^+$  이온을 침착시켜, 지방

산과 극성복합체를 형성하게 한 다음, 칼럼크로마토그래피에 의하여 특정지방산을 분리 정제하는 기술로써(21), 이 방법을 들깨유 지방산 methyl(ethyl) ester 혼합물로부터 고순도 ALA의 분리정제에 적용하였다.

소량의 지방산 methyl ester 혼합물로부터 ALA를 분리 정제한 결과, 질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피에 이용된 원료 지방산 중의 ALA 농도에 따라 고순도 ALA의 순수분리도에 상당한 차이가 나타났다. 즉, Table 3에서 보는 바와 같이 농축과정을 거치지 않는 원료 지방산 methyl ester 혼합물(ALA, 65%)을 질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피에 적용한 경우에는 순도 100%의 ALA가 약 16% 회수되었다. 그러나 저온분별결정법에 의하여 1차 농축된 지방산 methyl ester 혼합물(HALA: ALA, 75.8%)을 적용한 경우에는 순수한 ALA가 약 32% 이상 회수되었으며(Table 4). 이때 각 획분의 GC chromatogram을 Fig. 1에 나타냈다. 따라서 이 결과는 질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피에 적용된 지방산 methyl ester 혼합물 중 ALA의 농도가 높은 경우가 고순도 ALA의 분리에 더욱 효과적임을 가리켜 준다. 이와 유사한 연구로서 Jeong(21)은 가다랭이 안와유로부터 DHA를 순수분리하기 위하여 저온분별결정법에 의하여 1차 농축된 지방산 혼합물을 질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피에 적용한 경우가 원료유 지방산 혼합물을 그대로 적용한 경우에 비하여 순도 99% 이상의 DHA 회수율이 약 4배나 높았다고 보고하였다. 그러나 DHA 순수분리의 경우는 칼럼 이동상으로써 극성이 높은 혼합용매(<60% acetone/hexane)가 필요하기 때문에 용리액에  $\text{Ag}^+$  이온이

**Table 3. Isolation of pure ALA from perilla oil by silver nitrate-impregnated silicic acid column chromatography**

Fraction	ALA(%)	
	Purity	Yield
A	17.1	9.8
B	79.4	21.0
C	88.2	32.4
D	99.6	20.4
E	100.0	16.4

**Table 4. Isolation of pure ALA from perilla oil by silver nitrate-impregnated silicic acid column chromatography combined with low-temperature crystallization**

Fraction	ALA(%)	
	Purity	Yield
A	31.1	11.1
B	85.5	34.5
C	95.4	22.9
D	100.0	31.5

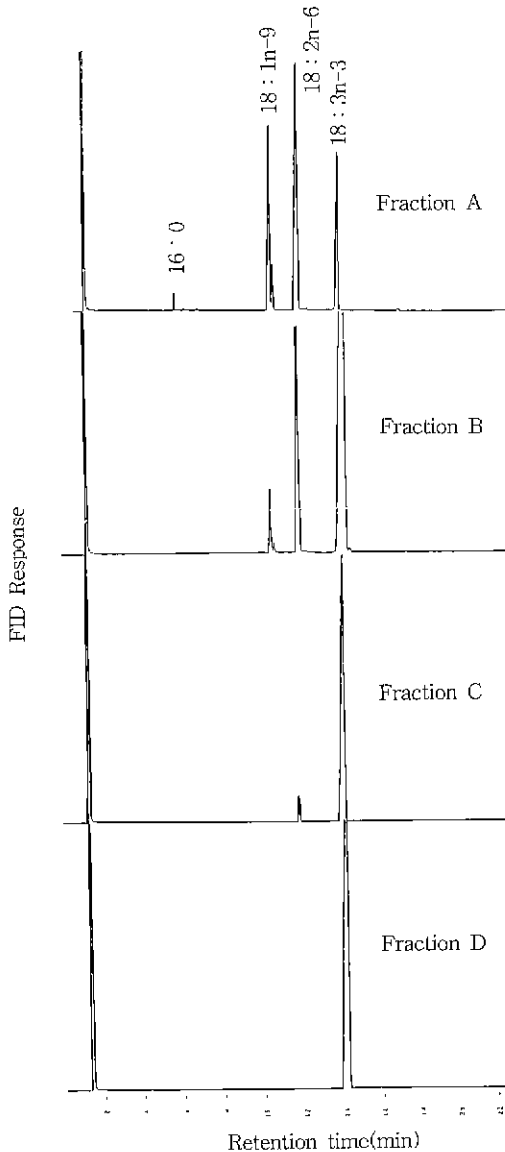


Fig. 1. GC chromatograms of fatty acid methyl esters in each fraction during the isolation of pure ALA from perilla oil by silver nitrate-impregnated silicic acid column chromatography combined with low-temperature crystallization.

유출되므로, 정제시에 이 이온의 제거조작이 필요할 뿐만 아니라 칼럼고정상의  $Ag^+$  이온의 손실이 수반되어 계속 사용의 경우에는  $Ag^+$  이온을 보충해 주어야 한다 (21). 하지만 ALA 순수분리의 경우는 이동상의 극성이 낮아(<7% acetone/hexane),  $Ag^+$  이온이 전혀 유출되지 않았기 때문에 일단 조제된 고정상은 거의 반영구적인 사용이 가능하였다.

Table 5. Isolation of large quantity of pure ALA from perilla oil by silver nitrate-impregnated silicic acid column chromatography combined with low-temperature crystallization

Fraction	ALA(%)	
	Purity	Yield
A	36.1	17.8
B	80.4	10.9
C	93.5	13.9
D	98.9	50.6
E	99.0	6.8

이어서 ALA 순수분리에 대한 소규모 연구결과를 토대로, 고순도 ALA의 대량분리를 시도하였다. 즉, 저온분별결정법에 의하여 1차 농축된 지방산 ethyl ester 혼합물(HALA; ALA 78.1%) 100g을 질산은 함침 실리카겔을 충전한 대형유리칼럼(100cm×10cm, i.d.)에 부가하여 ALA를 순수분리한 결과(Table 5), 생리활성연구에 필요한 순도인 90%이상의 ALA가 C 회분부터 E 회분까지로서, 이들의 회수율이 약 71%에 달하였다. 이 결과는 저온분별결정법에 의하여 1차 농축된 지방산 혼합물을 적용한 소규모의 연구에서 순도 90% 이상의 ALA가 약 54%의 회수율을 보인 것과 비교하면 약 17%의 높은 회수율을 나타냈으나, 순도 99% 이상의 ALA 회수율은 6.8%에 불과하였다. 그러나 이 연구결과는 특정성분의 생리작용 연구에 충분한 순도인 90% 이상의 ALA 대량분리를 위한 기틀을 제공하게 되므로서, 장래 이 분야의 연구에 많은 진전이 기대된다.

요 약

저온분별결정법과 질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피를 이용하여 들깨유 지방산 혼합물로부터 고순도 ALA를 분리 정제할 결과를 보면 다음과 같다. 저온분별결정법에 의하여 순도 78% ALA(HALA) (회수율, 약 83%)의 대량농축이 가능하였으며, 이때의 동결 조건은 -80°C에서 210분이었다. HALA ethyl ester를 대형 유리칼럼(100×10cm, i.d.)를 이용한 질산은 함침 실리카 칼럼크로마토그래피에 적용한 결과, 순도 90% 이상의 ALA ethyl ester(회수율, 71%)를 대량으로 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 농촌진흥청 농업특성연구 개발사업에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다

## 문헌

1. Dyerberg, J., Bang, H. O., Støffensen, E., Moncada, S. and Vane, J. R. : Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*, **ii**, 117(1978)
2. Bang, H. O., Dyerberg, J. and Sinclair, H. M. : The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2657(1980)
3. Hirai, A., Hamazaki, T., Terano, T., Nishikawa, T., Tamura, Y., Kumagai, A. and Sajiki, J. : Eicosapentaenoic acid platelet function in Japanese. *Lancet*, **ii**, 1132(1980)
4. Singer, P., Jaeger, W., Wirth, M., Voigh, S., Naumann, E., Zimontkowski, S., Hajduc, I. and Goedcke, W. : Lipid and blood pressure-lowering effect of mackerel diet in man. *Atherosclerosis*, **49**, 99(1983)
5. Kremer, J. M., Bigauoette, J., Michalek, A. V., Timchalk, M. A., Lininger, L., Ryncs, R. I., Huyck, C., Zieminski, J. and Bartholomew, L. E. : Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestation of rheumatoid arthritis. *Lancet*, **i**, 184(1985)
6. Akpalaba, C. O., Oraedu, A. C. I. and Nwanze, E. A. C. : Biochemical studies on the effects of continuous light on the Albino rat retina. *Exp. Eye Res*, **42**, 1(1986)
7. Suzuki, H. and Wada, S. : Metabolism and function of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Yukagaku*, **37**, 9(1988)
8. de Bravo, M. G., de Antueno, R. J., Toledo, J., De Tomas, M. E., Mercuri, O. F. and Quntans, C. : Effects of an eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids concentrate on a human lung carcinoma grown in nude mice. *Lipids*, **26**, 866(1991)
9. Enslin, M., Milton, M. and Malnoe, A. : Effect of low intake of n-3 fatty acids during development on brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids*, **26**, 203(1991)
10. 磯田好弘, 최춘연.  $\alpha$ -리놀렌산의 생리기능. *식품과학과 산업*, **23**, 58(1990)
11. 成澤富雄, 高橋政弘, 目下尙志, 山崎好日兒.  $\omega$ -3 多價不飽和 脂肪酸  $\alpha$ -리놀렌산의 高度含有 植物油脂, 시소油 による 랫트 大腸發癌抑制. *醫學のあゆみ*, **153**, 103(1990)
12. Hirano, J., Isoda, Y. and Nishizawa, Y. : Utilization of n-3 plant oils, perilla and flaxseed oils. *Yukagaku*, **40**, 942(1991)
13. 정효숙, 김성희, 김한수, 김갑순, 정승용. 어유 및 종자유의 굵이가 흰쥐의 혈청지질성분에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, **20**, 312(1991)
14. 박충실, 최혜미 : 들기름, 옥수수기름의 섭취와 2-acetylaminofluorene 투여가 지질과산화물 및 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> 생성에 미치는 영향. *한국영양학회지*, **25**, 351(1992)
15. 박현서, 서은숙, 송지현, 최춘연. 발암원을 투여한 쥐에서  $\alpha$ -linolenic acid가 풍부한 들기름이 대장암 발생빈도와 혈장 thromboxane B<sub>2</sub> 및 대장 상피세포막의 지방산 조성에 미치는 영향. *한국영양학회지*, **26**, 829(1993)
16. Gunstone, F. D., McLaughlan, J., Scrimgeour, C. M. and Watson, A. P. : Improved procedures for the isolation of pure oleic, linoleic and linolenic acids or their methyl esters from natural sources. *J. Sci. Fd Agric.*, **27**, 675(1976)
17. Haagsma, N., van Gent, C. M., Luten, J. B., de Jong, R. W. and van Doorn, E. : Preparation of an omega-3 fatty acid concentrate from cod liver oil. *JAOCS*, **59**, 117(1982)
18. Teshima, S., Kanazawa, A. and Tokiwa, S. : Separation of polyunsaturated fatty acids by column chromatography on a silver nitrate-impregnated silica gel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **44**, 927(1978)
19. Tokiwa, S., Kanazawa, A. and Teshima, S. : Preparation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by reversed phase high performance liquid chromatography. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **47**, 675(1981)
20. Hayashi, K. and Kishimura, H. : Preparation of n-3 PUFA ethyl ester concentrates from fish oil by column chromatography on silicic acid. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1429(1993)
21. Jeong, B. Y. : Isolation and purification of DHA from skipjack orbital tissue oil. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **26**, 529(1993)
22. Ackman, R. G., Ratnayake, W. M. N. and Olsson, B. : The basic fatty acid composition of Atlantic fish oils; potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation. *JAOCS*, **65**, 136(1988)
23. Shin, H. S. and Kim, S. W. : Lipid composition of perilla seed. *JAOCS*, **71**, 619(1994)
24. 류수노, 이정일, 이효승, 박충범, 성병렬 : 들깨지방 수집종의 기름함량 및 오메가 지방산 조성차이. *한국작물학회지*, **38**, 560(1993)

(1997년 9월 3일 접수)