

은 이온 크로마토그래피에 의한 오징어유로부터 eicosapentaenoic acid(EPA) 및 docosahexaenoic acid(DHA)의 분리농축

경영수 · 우영련¹ · 윤정로^{1,*}
강릉대학교 화학과, ¹강릉대학교 식품과학과

Purification of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) Esters from Squid Oil by Silver Ion Chromatography

Young Soo Gyoung, Ying Lian Yu¹, and Jungro Yoon^{1,*}
Department of Chemistry, Kangnung National University
¹Department of Food Science, Kangnung National University

EPA and DHA extracted from methyl esterified squid oil were purified by silver exchanged resin, silver nitrate-impregnated silica gel, silver exchanged zeolite, and silica gel column chromatography, among which column chromatography using mixture of silver exchanged resin and silica gel (10% by weight) showed the best result. By this simple purification method, EPA and DHA were concentrated from 12.5 to 27.9% (yield, 86.0%) and from 21.7 to 49.5% (yield, 87.3%), respectively. Silver exchanged resin had additional advantages of outstanding reusability and simple recovery of silver.

Key words: silver exchanged resin, EPA, DHA, purification

서 론

고도불포화지방산(polyunsaturated fatty acid, PUFA), 특히 eicosapentaenoic acid(EPA, C_{20:5})와 docosahexaenoic acid(DHA, C_{22:6})는 여러 가지 역학조사 및 인체와 동물을 대상으로 한 연구결과 혈관확장작용, 혈소판응집 억제작용, 혈액 중 중성지방 저하작용, 혈압저하작용, 뇌경색방지작용, 혈액 중 HDL 콜레스테롤의 증가작용, 심근경색방지작용 등 순환기 계통의 질병에 예방효과가 있음이 확인되었다(1-5). EPA와 DHA는 바다의 홍조, 갈조 등 해조류와 이를 먹이사슬로 하는 해산동물에 주로 존재한다. 이러한 해산동물로부터 고도불포화지방산을 분리 농축하는 방법으로는 분별증류법, 용매추출법(6), 그리고 초임계 유체 추출법(7) 등이 사용되고 있다. 이러한 농축방법 중에는 은 이온이 이중결합의 π 결합과 착화합물을 형성하는 성질을 이용하여 지방산 중 고도불포화 지방산을 분리 농축하는 방법이 사용되어 왔다(8,9). 기존의 은 이온을 이용한 분리농축방법에는 주로 함침 실리카 칼럼 크로마토그래피법이 사용되어졌다(10). 또한 은 이온을 부착시킨 점토를 사용하여 초임계 유체 크로마토그래피법(11,12)으로 분리농축에 이용하거나 최근에

는 은 이온을 점토에 흡착시키거나(13) 막에 고정시켜 이용한 예(14)도 있다. 그러나 은 이온 함침 silica gel column은 재사용이 어려운 점이 있고 초임계 유체 크로마토그래피법은 정제 비용이 비싸다는 단점이 있다.

본 연구에서는 은 이온이 함유된 매체가 가지는 단점을 보완하고자 은 이온을 치환시킨 양이온교환수지를 이용함으로써 재사용이 손쉬운 고도불포화지방산의 농축방법을 시도하였다. 또한 이와는 별도로 질산은 함침 silica gel, 은 이온 치환 제올라이트, 그리고 silica gel에 대하여 분리농축 실험을 행하고 이들 결과를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에서 사용한 오징어유는 오징어내장을 압착 후 decanter 및 연속식원심분리기를 통과시켜 얻어진 것으로 (주)현대특수사료에서 공급받아 사용하였으며 기타 시약은 특급이상의 것을 사용하였다.

오징어유의 가수분해

오징어유의 가수분해는 Guil-Guerrero와 Belarbi의 방법(15)을 약간 변형하여 사용하였다. 즉 오징어유 1g에 80 mL의 ethanol과 33% KOH 4 mL를 가한 후 80°C에서 90 min간 환류하였다. 반응이 종료된 후 증류수 100 mL를 첨가하고 비누화되지 않은 물질을 hexane(100 mL×3)으로 추출하여 제거하였다. 수층은

*Corresponding author : Jungro Yoon, Department of Food Science, Kangnung National University, Gangwon 210-702, Korea
Tel: 82-33-640-2337
Fax: 82-33-645-5300
E-mail: yoon@kangnung.ac.kr

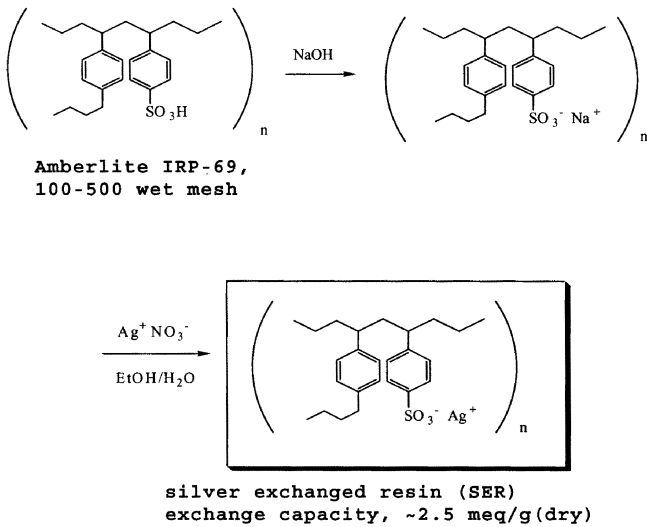


Fig. 1. Preparation of silver exchanged resin (SER).

2.0 N HCl을 이용하여 pH 1로 낮춘 후 hexane(100 mL×3)으로 지방산을 추출하고 증류수로 중성이 될 때까지 세척한 후 무수황산나트륨을 첨가한 후 여과 농축하여 지방산시료를 조제하였다.

지방산의 분석

오징어유의 지방산조성은 계절이나 원료에 따라 다르므로 실험직접 gas-liquid chromatography(GLC)로 분석하였다. 지방산시료를 AOCS(16)의 방법에 따라 methyl ester(ME)화하고 GLC(GC-14B, Shimadzu, Japan)를 사용하여 flame ionization detector(FID)로 분석하였다. 사용한 column은 비극성 capillary column(HP-5ms, Agilent, USA)이었고 carrier gas로 helium을 사용하였으며 유속은 45 mL/min이었다. Injector와 detector의 온도는 모두 300°C이었고 column oven 온도는 100°C에서 5분간 유지한 후 300°C까지 4°C/min의 속도로 승온하였고 최종온도에서 10분간 유지하였다.

은 이온 교환수지의 제조

AgNO₃ 8g을 80% 에탄올 수용액 50 mL에 용해시킨 후, 20 mL 에탄올에 침윤시킨 양이온 교환수지(Amberlite® IRP-69, 100-500 wet mesh, sulfonic acid functionality, sodium form, 4.3 meq/g, Aldrich, USA) 10g과 혼합하여 30분간 교반한 후 수지를 여과하였다(Fig. 1). 여과 후 수지를 30 mL의 에탄올 수용액으로 세척하고 진공 증발기를 이용하여 용매를 제거하였다. 건조된 은 이온 교환수지(silver exchanged resin, SER)는 질소로 충전한 병에 넣어 냉장고에 보관하였다. SER에 2 M NaNO₃ 용액을 통과시켜 용출된 은 이온을 0.5 M NaCl 용액으로 정량하였으며, 이때 SER의 용량은 2.5-3.0 meq/g이었다.

질산은 함침 silica gel의 제조

AgNO₃ 10g을 ethanol에 용해시켜 3% 용액을 만든 후, 여기에 silica gel(230-400 mesh, 60Å, Aldrich, USA) 100g을 첨가 혼합하고 20분간 교반하였다. 회전증발기를 사용하여 용매를 제거하고 120°C에서 5시간 동안 가열하여 질산은 함침(silver nitrate-impregnated) silica gel을 제조하였다.

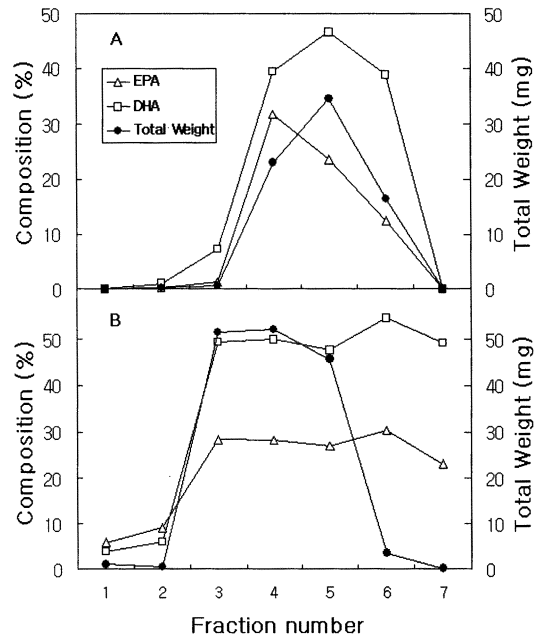


Fig. 2. Separation of EPA and DHA by silver ion exchanger column chromatography (A: SER, B: Mixture of SER and silica gel (10% by weight)).

EPA 및 DHA의 농축

지름 2 cm의 column에 충전물 약 10g을 충전하고 지방산 ME 형태의 시료(EPA: 12.5%, DHA: 21.7%) 200 mg을 2 mL hexane 용액에 용해시켜 충전물에 부가하였다. 여기에 hexane (50 mL)을 가하여 수지에 결합하지 못한 지방산 ME를 용출시키고 이어서 2% ethyl acetate/hexane 용액을 가하여 얻어진 분획물(4 mL)을 용매를 증발시킨 후 총량을 측정하고 GLC로 분석하였다. 충전물로는 SER, SER과 silica gel의 9:1(w/w) 혼합물, silica gel, 질산은 함침 silica gel, 그리고 상품화된 은 이온 제올라이트(+20 mesh, Ag₈Na₂[(AlO₂)₈₆(SiO₂)₁₀₆]·xH₂O, Aldrich, USA)가 본 연구에 사용되었다.

결과 및 고찰

은 이온 교환 수지를 이용한 EPA 및 DHA의 농축

은 이온 교환수지(SER)를 충전물로 사용하여 column chromatography를 행하고 얻어진 분획물을 GLC로 분석하였다(Fig. 2). SER만을 충전물로 사용한 경우 EPA는 fraction 3에서부터 증가하기 시작하여 fraction 4에서 최대 31.8%에 달하였고 DHA는 fraction 5에서 46.6%를 나타내었다(Fig. 2A). EPA보다 DHA가 조금 늦게 최대치를 나타낸 것은 DHA의 불포화도가 EPA보다 높기 때문인 것으로 추정된다. 또한 fraction 3-6을 모아서 용매를 제거한 후 총량을 측정하고 GLC로 분석한 결과 EPA와 DHA는 각각 1.9배로 농축되었고 수율은 각각 70.4%, 72.8%로 나타났다(Table 1).

한편 SER과 silica gel의 9:1(w/w) 혼합물을 사용한 결과 EPA와 DHA는 fraction 3-5에서 거의 용출되었고 fraction 6에서 EPA는 30.2%, DHA는 54.6%로 가장 높은 농도를 나타내었다(Fig. 2B). 또한 fraction 2-6을 모아서 농축하였을 때 EPA와 DHA는 각각 27.9%와 49.5%로 농축되었다. 한편 오징어유에

Table 1. Composition of EPA and DHA in squid oil after concentration procedure¹⁾

Packing material	Component	Composition (%)	Yield ²⁾ (%)
Silver exchanged resin	EPA	23.5 (22.6) ³⁾	70.4 (71.2)
	DHA	42.1 (41.8)	72.8 (72.9)
Silver exchanged resin/silica gel (10%)	EPA	27.9	86.0
	DHA	49.5	87.3
Silica gel	EPA	15.7	53.2
	DHA	22.6	44.0
Silver nitrate impregnated silica gel	EPA	19.4	78.0
	DHA	28.5	66.1
Silver exchanged zeolite	EPA	13.5	44.0
	DHA	23.8	44.4

¹⁾200 mg of squid oil (EPA: 12.5%, DHA: 21.7%) in the form of fatty acid methyl esters was loaded in the column packed with 10 g of various packing material.

²⁾Yields were estimated by GLC.

³⁾Values in parentheses are the results obtained by nine times reused silver exchanged resin.

상당량 함유되어 있던 palmitic acid, oleic acid, eicosenoic acid는 13.8%, 11.7%, 7.9%에서 0.3%, 2.7%, 0.8%로 각각 감소함으로써 고도불포화지방산의 농축에 크게 영향을 끼쳤음을 알 수 있었다(Table 2). 농축분의 EPA와 DHA의 수율은 각각 86.0%와 87.3%로(Table 1) SER 단독 사용 시보다 훨씬 좋은 농축 배수와 수율이었다. 이는 SER 입자보다 상대적으로 크기가 작은 silica gel 입자들이 SER 입자 사이의 공간을 채움으로써 분리 효율이 향상되었던 것으로 판단된다.

Silica gel 등을 이용한 column chromatography에 의한 EPA 및 DHA의 농축

Silica gel column에 의한 불포화 지방산 ME의 농축을 시도한 결과 fraction 2-4에서만 EPA 및 DHA가 용출되었고 농축정도는 다른 농축과정에 비하여 그다지 좋지 않았다(Fig. 3A). Fraction 3에서 EPA는 17.2%, DHA는 24.6%의 가장 높은 농도를 나타내었다. Fraction 3-5를 모아서 분석한 결과 EPA는 15.7%, DHA는 22.6%를 나타내었으며 수율은 EPA 53.2%, DHA 44.0%를 나타내었다(Table 1).

이에 반하여 질산은 함침 silica gel의 경우 EPA와 DHA 간의 농도차가 매우 크게 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 즉 fraction 5에서 EPA가 17%, DHA가 64.1%로 나타났고 fraction 6, 7에서도 높은 농도차를 나타내고 있어 불포화도에 의한 분리에는 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각되었다. 정(10)은 질산은 함침 silica gel column을 이용하여 98% 이상의 순도로 DHA를 농축하였다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 질산은 함침 silica gel column을 사용한 농축에서 fraction 2-5를 모아서 분석한 결과 EPA와 DHA가 각각 19.4%, 28.5%로 나타났고, 수율은 78.0%, 66.1%로 나타났다(Table 1).

한편 은 이온 제올라이트를 충전물로 사용하였을 때, 다른 농축과정과 비교하여 좋은 결과가 얻어지지 않았다(Fig. 3C). Fraction 3-5를 모아서 분석한 결과 EPA, DHA의 농도는 각각 13.3%, 23.8%로 나타났으며 또한 수율도 각각 44.0%, 44.4%로 다른 농축과정에 비하여 낮았다. 또한 은 이온 제올라이트와 silica gel을 9:1(w/w)로 혼합하여 농축을 시도하였으나 결과는 변함이 없었다.

SER column의 재사용과 은 이온의 회수

충전물질에 존재하는 은 이온의 함량을 분석한 결과, 충전물

Table 2. Fatty acid composition (%) of starting material and polyunsaturated acid enriched fraction

Fatty acid	Starting material	Polyunsaturated acid enriched fraction
14:0 ¹⁾	2.8	0.1
15:0	0.4	-
16:0	13.8	0.3
16:1	4.2	0.7
17:0	2.8	-
17:1	0.6	0.1
18:0	2.4	-
18:1	11.7	2.7
18:2	1.9	0.8
18:3	1.6	3.1
18:4	0.2	0.3
20:0	0.5	0.7
20:1	7.9	0.8
20:4	1.3	2.3
20:5	12.5	27.9
22:0	3.7	0.5
22:4	0.2	0.3
22:5	1.1	2.6
22:6	21.7	49.5
unknown	8.7	7.3

¹⁾The number to the left of the colon is the number of carbon atoms and the number to the right is the number of double bonds.

질 10 g당 SER에 2.9 g, 질산은 함침 silica gel에 0.6 g, 그리고 은 이온 제올라이트에 4.4 g이 존재하는 것으로 나타났다. 이는 불포화 지방산의 농축은 은 이온의 함유량에 비례하는 것이 아니라 은 이온이 어떤 형태로 존재하는가에 의하여 보다 큰 영향을 받고 있음을 시사한다.

한편 SER의 반복 사용 가능성을 조사하기 위하여 9번 연속 재사용한 SER을 사용하여 얻어진 분획물을 분석하였다(Table 1). 그 결과 EPA와 DHA는 각각 22.6% 및 41.8%로 농축되었으며 이때 수율은 각각 71.2%와 72.9%이었다. SER을 첫 회 사용하였을 때 EPA와 DHA가 각각 23.5% 및 42.1%로 농축되었고 수율이 각각 70.4%와 72.8%이었음과 비교할 때 그 차이는

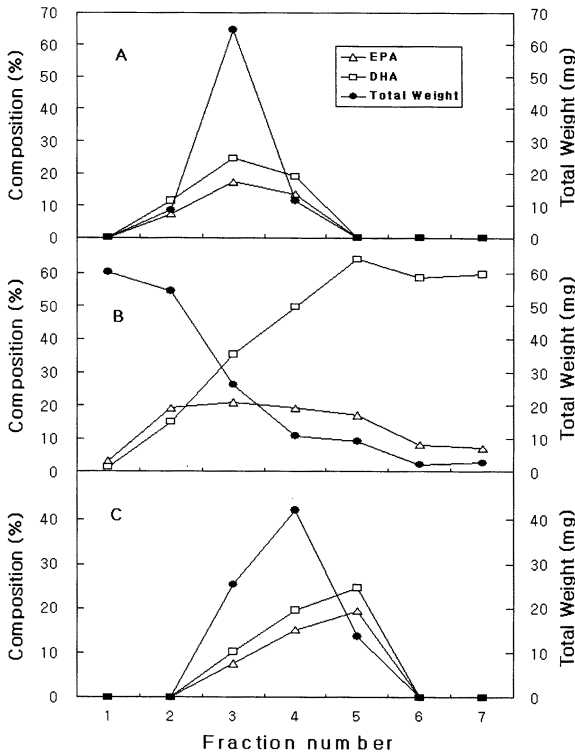


Fig. 3. Separation of EPA and DHA by column chromatography with various packing materials (A: Silica gel, B: Silver nitrate-impregnated silica gel, C: Silver exchanged zeolite).

실험오차의 범주 이내이었으며 따라서 SER의 재사용에 문제가 전혀 없음을 확인할 수 있었다.

요 약

은 이온이 불포화 지방산과의 착화합물을 만든다는 이론에 근거하여 은 이온 교환수지(SER)를 제조하였다. 제조한 SER을 비롯하여 silica gel, 질산은 함침 silica gel, 은 이온 제올라이트를 column 충전물로 사용하여 EPA와 DHA를 분리 농축하고 그 결과를 비교 분석하였다. SER과 silica gel의 9:1(w/w) 혼합물을 충전물로 사용하였을 때 결과가 가장 좋았으며 이 경우 EPA와 DHA는 각각 27.9%와 49.5%로 농축되었고 수율은 각각 86.0%, 87.3%로 나타났다. SER만을 사용한 경우 EPA와 DHA는 각각 23.5%와 42.1%로 농축되었으며 이는 SER과 silica gel의 혼합 충전물 사용 시 보다 다소 낮은 결과이었다. 질산은 함침 silica gel의 경우 다른 충전물과 비교하여 농축율과 수율이 그다지 좋지 않았으나 EPA와 DHA의 분리 측면에서는 가장 우수한 결과를 나타내었다.

SER은 재사용이 가능하고, 사용한 은 이온수지 자체도 쉽게 재생할 수 있을 뿐 아니라 사용한 은 이온도 AgCl 침전이나 AgNO₃로 회수가 용이하다는 점에서 다른 농축과정과 비교하여 훨씬 경제적이라 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Connor W, Neuringer E, Reicks S. Essential fatty acids: The importance of n-3 fatty acids in the retina and brain. *Nutr. Rev.* 50: 21-29 (1992)
2. Yamagata K, Tagami M, Takenaga F, Yanori Y, Nara Y, Itoh S. Polyunsaturated fatty acids induce tight junctions to form in brain capillary endothelial cells. *Neuroscience* 116: 649-656 (2003)
3. Lee RS, Karel M. Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease, Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA. pp. 201-208 (1990)
4. Kamali R. Historical perspective and potential use of n-3 fatty acids in therapy of cancer cachexia. *Nutrition* 12 (suppl. I): S1-S4 (1996)
5. Dyeberg J. Linoleate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutr. Rev.* 44: 125-134 (1986)
6. Nakano K, Kato S, Noritomi H, Nagahama A. Extraction of polyunsaturated fatty acid ethyl esters from sardine oil using Ag⁺ containing o/w/o emulsion liquid membranes. *J. Memb. Sci.* 110: 219-227 (1996)
7. Kadota Y, Tanaka I, Ohtsu Y, Yamaguchi M. Separation of polyunsaturated fatty acids by chromatography using a silver-loaded spherical clay. I. pilot-scale preparation of high-purity docosahexaenoic acid by supercritical fluid chromatography. *Yugakaku* 46: 397-403 (1997)
8. Nicols PL. Coordination of silver ion with methyl esters of oleic and elaidic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 74: 1091-1092 (1952)
9. Nikolova-Damyanova B, Christie WW, Herslöf B. Mechanistic aspects of fatty acid retention in silver ion chromatography. *J. Chromatogr.* 749: 47-54 (1996)
10. Jeong BY. Isolation and purification of DHA from skipjack orbital tissue oil. *Bull. Korean Fish. Soc.* 26: 529-537 (1993)
11. Nieto S, Cordoba AM, Sanhueza J, Valenzuela A. Obtention of highly purified fractions of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from sardine oil by silver-resin chromatography: A semi-preparative procedure. *Grasas y Aceites* 48: 197-199 (1997)
12. Yamamura R, Shimomura Y. High purification of polyunsaturated fatty acids. *Yugakaku* 47: 449-456 (1998)
13. Kadota Y, Tanaka I, Ohtsu Y, Yamaguchi M. Separation of polyunsaturated fatty acids by chromatography using a silver-loaded spherical clay. *Yugakaku* 46: 397-403 (1997)
14. Ozawa I, Kim M, Saito K, Sugita K, Baba T, Moriyama S, Sugo T. Purification of docosahexaenoic acid ethyl ester using a silver-ion-immobilized porous hollow-fiber membrane module. *Biotechnol. Prog.* 17: 893-896 (2001)
15. Guil-Guerrero JL, Belarbi EH. Purification process for cod liver oil polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78(5): 477-484 (2001)
16. AOCS. Official and Tentative Methods. 3rd ed. Method Ce 2-66. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA (1978)

(2003년 9월 17일 접수; 2004년 3월 4일 채택)