

식물성 스쿠알렌의 분리 및 분석

이재학

한국식물자원연구소

I. 서 론

스쿠알렌은 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,22-tetracosahexaene으로 구성되어있으며 고도의 불포화탄화수소로서 화학구조상 특이하게 이중결합이 여섯 군데나 있는 탄소30개에 수소 50개가 결합된 $C_{30}H_{50}$ 의 물질이다. 스쿠알렌은 심해상어의 간에 함유된 기름의 주성분으로 응고점이 극히 낮은 기름액체이다. 심해상어 중에서도 아이상어가 스쿠알렌이 많은데 아이상어의 간의 무게는 체중의 25%를 차지하며 간의 75%가 간유이다. 식품공전의 스쿠알렌 식품의 유용성 표기부분을 보면 생체기능 조절물질보급, 뇌호흡기능보조, 면역기능강화, 질병 치료를 위한 장기적 약물투여시 약물로 인한 부작용경감이 실려있다. 최근들어 식물성 스쿠알렌에 많은 관심이 있어 아마란스 종실에서 고순도 식물성 스쿠알렌을 대량으로 추출하는 방법이 개발되어 특허출원 되었으며 동시에 아마란스 스쿠알렌은 혈청콜레스테롤을 유의하게 낮추어주는 효과가 저자에 의해 보고 되었고 계속해서 고려대 생명공학원 결과에서는 아마란스 스쿠알렌은 혈청 총콜레스테롤, triglyceride, LDL-C를, 간의 triglyceride와 총콜레스테롤을 낮추어주어 동물성 스쿠알렌의 미미한 효과에 비해 월등한 효과를 보였고, 또한 아마란스 스쿠알렌은 당뇨대조군에 비해 혈당저해효과를 볼 수 있었고, 지단백농도(VLDL, LDL-C)수치가 낮아지고, 당뇨에 의한 간기능손상을 위해 GOT와 GPT의 활성도 측정에서 당뇨대조군에서 모두 높게 나타난 반면 스쿠알렌을 함유한 아마란스유를 섭취한군은 감소하는 양상을 보였다. 점점 관심도가 높아가는 식물성 스쿠알렌의 아직 밝혀지지 않은 기능과 식물성 스쿠알렌이 많이 함유된 식물소재(다양한 식물자원)의 발굴을 위해 실험실내에서 식물로부터 스쿠알렌을 쉽게 분리해내고, 스쿠알렌 함량을 쉽게 측정할 수 있는 간단한 방법을 소개하고자한다.

II. 분리방법

1. 장치 및 기구

- 1) 삼각플라스크(2리터 등)
- 2) 삼각플라스크(50-100ml)

Corresponding author: (Phone) +82-31-919-8107 (E-mail) kprinbf@hanmail.net

- 3) 감압농축기
- 4) 충전물 충전 column
- 5) 충전물[Kieselgel 60(머크사, Art 7734)]
- 6) TLC plate silicagel(60F₂₅₄, layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm)
- 7) Hot plate
- 8) GC-MSD(분리된 스쿠알렌의 동일성분 확인시)

2. 시약 및 시료준비

- 1) 용출용매(n-헥산)
- 2) ethyl ether
- 3) 10% H₂SO₄
- 4) 종실(곱게 분쇄한 분말 혹은 거칠게 분쇄한 분말)

3. 분리

- 1) 거칠게 분쇄한 종자(추후 수분보정) 106 g을 n-hexane(시료양의 8-10배)으로 상온에서 6일씩 침지하여 3회 추출하여 filtering한 후 감압 농축하여 헥산이 없는 추출물 A를 얻는다.
 참조 *초음파 추출일 경우 30분씩 3회 실시
 *조지방 추출하듯 항온수조에서 추출
 *106 g은 단지 적은 양 추출 예
 *양이 적으면 Hood에서 헥산 증발
- 2) 추출물 A를 분획하기 위해 kieselgel 60(머크사, Art7734)을 충전물로 한(A의 50배) 직경 4 cm의 column을 사용한다.
 참조 *추출물 A의 양에 따라 column 크기와 충전물 결정
- 3) 충전물 위에 추출물A를 잘 안착시킨다.
- 4) 용출용매로서는 n-Hexane으로 시작하여 점차 ethyl ether를 첨가하여 극성을 높여준다(그림 1)
- 5) Ethyl ether(99:1, v/v)에서 silicagel column을 실시하여 얻은 단일 물질 B가 1차적으로 squalene인가를 확인하기 위해 Sigma사에서 구입한 동물성 squalene(C₃₀H₅₀)을 standard로 하여 n-hexane을 전개용매로 TLC plate silicagel(60F₂₅₄, layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm)에 전개시켜 10% H₂SO₄을 살포, 95°C에서 발색하여 비교한다(그림 2).
- 6) 1차적으로 TLC발색법으로 확인한 방법으로 식물성 스쿠알렌을 획득할 수있다.
- 7) 2차적으로 자세한 확인과 순도검정을 원할 경우 GC-MS로 순도확인 후 GC-MSD를 사용하여 mass spectrum을 얻은 후 59970C chemstation data system에 의한 computer library searching, 문헌상의 mass spectral data 및 retention index을 비교하여 동정한다(기초 과학지원연구소 서울분소 화학분석실 등 분석가능기관에 협조의뢰).

식물성 스쿠알렌의 분리 및 분석

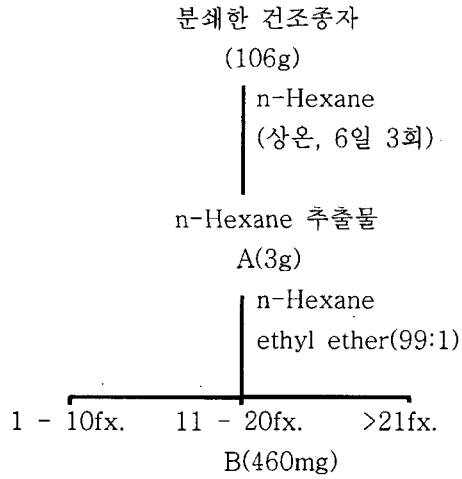


Fig. 1. Schema for the extraction and isolation of the squalene(B) from seeds.

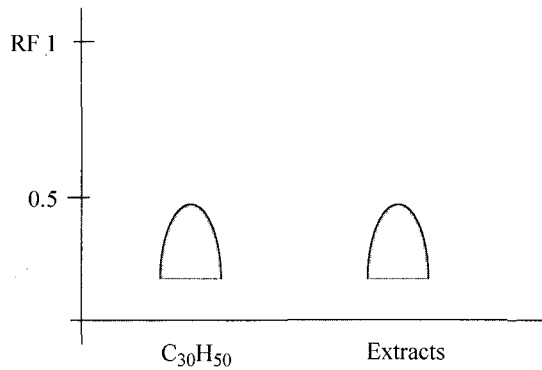


Fig. 2. TLC Chromatogram of plant squalene from seeds and animal squalene from Sigma Co with n-hexane as mobile phase.

III. 분석방법(HPLC 분석방법 소개)

1. 장치 및 기구

- 1) HPLC
- 2) mixer
- 3) 교반기 혹은 초음파추출기
- 4) Hood

2. 시약 및 시료준비

- 1) n-Hexane(추출용, HPLC용)

3. 전처리 및 분석

- 1) 시료를 칭량하기 전에 모든 시료는 mixer에 곱게 갈아서 sample백에 넣어놓는다.
- 2) 각각의 sample을 정확히 5 g씩 칭량한 다음 8배의 hexane(40 ml)을 넣어 24시간 동안 상온에서 교반기를 이용하여 120 rpm으로 교반 시 키면서 추출한다.
참조 *초음파 추출기로 30분씩 3회 추출(sample 양이 100 g이 넘을 때).
*조지방 추출하듯 항온수조에서 추출
*상온에서 3일씩 3회 추출(sample 양이 100 g이 넘을 때)
*시료량은 스쿠알렌 함유량과 시료량에 따라 조절
- 3) 이를 filter paper를 이용하여 거른뒤에 추출액의 용매의 제거를 위해 hood에서 2시간 동안 방치한다(또는 감압농축기 이용 등등).
- 4) 농축 후 동일 용매(10-20 ml, 희석배수 계산)의 HPLC용 n-hexane을 넣어 샘플을 녹인 뒤에 HPLC 분석 샘플로 사용한다.
- 5) 기기 분석전 2 ml syringe pilter로 여과 후 vial에 담아 분석
- 6) HPLC분석조건(표 1)
- 7) 분석후 sample 수분보정

Table 1. Analytical conditions of HPLC for squalene from seeds.

column	silica gel column(packed column)
mobile phase	hexane(100%)
detector	UV 215 nm
flow rate	1.0 ml/min
injector	auto sampler
injection volume	10 μ l

참고문헌

1. C.K.Lyon and R. Becker. 1987. Extraction and Refining of Oil from Amaranth Seed. JAOCS, Vol. 64(2) : 233-236.
2. Davies, N. W. 1990. Gas Chromatographic Retention Indices of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl Silicone and Carbowax 20M Phases. J. Chromatography 503 : 1-24.
3. Hendriks, H. and A. P. Bruins. 1980. Study of Three of Types of Essential Oil of *Valeriana officinalis* L. s. 1. by combined Gas chromatography-Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry. J. Chromatog.1990 : 321-330.

4. Hikino, H., Y. Hikino, H. Kobinata, A. Aizawa, C. Konno and Y. Ohizumi. 1980. Sedative Principles of Valeriana Roots. Shoyakugaku Zasshi 34 : 19-24.
5. Jenning, W. and T. Shibamoto. 1980. Qualitive Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by glass capillary Gsa Chromatography, Academic Press, New York.
6. J. H. Lee, H. I. Moon, J. I. Lee, C. W. Kang and S. T. Lee. 1996. Isolation and Identification of Squalene and Atineoplastic Activity of Its Residue Extract in Amaranth. Korean J. Crop Sci. 41(4) : 450-455.
7. Rekha S. Singhai and P.R. Kulkarni. 1990. Effect of Puffing on Oil Characteristics of Amaranth(Rajgeera)Seeds. JAOCS, Vol. 67(12) : 952- 954.
8. 이재학. 2003. 아마란스 스쿠알렌의 기능과 변이. 월간 식품세계. 2 VOL.4 : 106-109

Isolation and Analsis of Plant Squalene

Jae-Hak, Lee

*Korea Plant Resource Institute, 151-2 Daehwa-dong, Ilsan-gu, Koyang-city, Kyonggi-do,
411-802, Korea
+82-31-919-8107, kprinbf@hanmail.net*