Korean J. Food & Nutr. Vol. 25. No. 4, 968～973 (2012)
http://dx.doi.org/10.9799/ksfan.2012.25.4.968

THE KOREAN JOURNAL OF
한국식품영양학회지
FOOD AND NUTRITION

FT-IR과 탄소동위원소 분석을 통한 연어유의 구분에 관한 연구

조은아 · 차윤환 · †이영상*
숭의여자대학교 식품영양과, *서울세관 분석실

A Study of Salmon Oil Type Analysis by FT-IR and Carbon Isotopes Ratio

Eun-Ah Cho, Yun-Hwan Cha and †Young-Sang Lee*
Dept. of Food and Nutrition, SoongEui Women's College, Seoul 100-751, Korea
**Analysis Office, Seoul Main Customs, Seoul 135-702, Korea*

Abstract

This study analyzes the structure types of salmon oil to evaluate the purity of salmon oil products based on the 38 different types of imported salmon oil products distributed in the Republic of Korea. The major types of omega-3 foods in the salmon oil are ethyl ester (EE) and triglyceride (TG). If the salmon oil contained potential contaminants and was processed in order to remove it, EE type omega-3 fatty acids are found in concentration. This provides a good guide in assessing if products were made with EE type ingredients or re-esterified contaminated materials. The results of the FT-IR analysis showed significant difference in the C=O, C-O band positions in TG and EE. There were 19 TG type products and 19 EE type products. The analysis of carbon isotope ratio was performed on the types of TG and EE. There were different properties in the 19 TG type products. In one product, the carbon isotope ratio was －25.15 and the other 18 products showed －22.15～－23.96. The carbon isotope ratio of all 19 EE type products showed －21.91～－23.74. The results of the TLC analysis showed similar results with FR-IR. The re-esterified TG form was not detected in the TG type products, confirming that the TG type products contained natural salmon oil. This study aimed to provide the basic material in classifying the types of natural salmon oil and re-esterified salmon oil, by analyzing the pattern and proportion of FT-IR spectrum, carbon isotope ratio, and TLC.

Key words: salmon oil, FT-IR, carbon isotope ratio, TLC, ethyl ester (EE), triglyceride (TG), re-esterified triglyceride (rTG)

서 론

기능성 지질이란 넓은 의미로 식품에 특정한 물리, 화학기능을 부여하거나 또는 섭취하였을 때 특정한 건강상의 이익을 제공하는 지질을 의미한다. 기능성 지질에는 카로테노이드, 폴리페놀화합물, 토코페롤 및 토코트라이엔올, 파이토스테롤 등의 비비누화물질과 올레산, 감마리놀렌산, 공액리놀레산, 오메가-6계 지방산, 오메가-3계 지방산 등의 지방산을 비롯하여 인지질, 미강유, 참기름, 다이아실글리세롤 등이 포함된다(Choe 2010).

어유에 대한 다각적인 연구가 활발하게 이루어지게 된 것은 생선에 함유된 고도의 불포화 지방산인 eicosapentaenoic acid(EPA $C_{20:5}$ n-3)와 docosahexaenoic acid(DHA $C_{22:6}$ n-3)가 인간의 건강과 질병에 중요한 역할을 하고 있다는 사실이 알려지면서 부터이다(Lee 등 1997). 오메가-3계 지방산은 순환기 계통질환의 위험인자를 제거해 주거나 혈청내 지질구성이나 혈소판 응집기능에 변화를 주어 동맥경화증에 유익한 효과를 나타낸다고 알려져 있다(Schuchardt 등 2011; Kim 등 1994; Murat 등 2003). 오메가-3계 불포화지방산의 하나인 EPA는 혈액 중의 콜레스테롤 및 중성지질의 농도를 현저히 저하시

† Corresponding author: Young-Sang Lee, Analysis Office, Seoul Main Customs, Seoul 135-010, Korea. Tel: +82-2-510-1392, Fax: +82-2-2015-7841, E-mail: happylife203@customs.go.kr

키는 작용이 있어, 혈전증, 동맥경화증 등의 순환기 계통 질환방지 및 특정한 종양의 발육 억제효과가 있다는 것이 확인되고 있다. 또 불포화도가 높은 DHA는 학습 능력향상 및 시력보호 효과가 있다는 것이 동물실험을 통하여 밝혀지고 있어 EPA 및 DHA를 주요성분으로 하는 고도불포화지방산을 다량 함유하고 있는 각종 제품이 건강기능 식품으로 널리 시판되고 있다(Yoon 1993).

오메가-3 건강기능식품 중 어유의 유형은 다양하며, 주요한 유형으로는 ethyl ester(EE)와 triglyceride(TG)의 두 가지 형태가 있다. 이 두 가지 유형이 생성되는 이유는 원료물질의 근본적인 오염 또는 오염원을 가지는 어유의 가공에서 발생한다. 제조 공정 중 오염원을 제거하기 위한 가장 효과적인 방법은 증류공정(distillation process)으로, 원유(crude fish oil)를 에탄올과 반응하여 구조적으로 변화시킨 후 감압 하에서 분자증류(molecular distillation)하여 오염원을 제거하는데, 이 공정의 결과로 EE 유형을 가지는 오메가-3 지방산이 농축되는 것이다. 따라서 EE 유형의 어유 제품은 EE를 함유하는 원료를 직접 제품화 했거나, 오염된 원료로부터 재조합(re-esterified triglyceride, rTG)하여 제품화 했다는 것을 의미한다(Jiankang 등 2010).

이 두 유형 제품에 대한 인체의 안전성, 흡수성 등에 관련한 연구에 따르면 EE 유형의 제품보다는 TG 유형의 제품이 인체에 더 유용하고, 안전성 면에서 장점이 있지만 가격이 비싸다는 단점이 있다(Arne 등 1991; Larry 2011). 또한 논문에서는 고도불포화지방산(high unsaturated fatty acid, HUFA)의 생체 이용율, 생리작용의 지속성과 새로운 기능의 발현은 HUFA의 화학형태나 분자종에 의하여 크게 달라진다는 것이 서서히 밝혀지게 되었다. HUFA의 TG 구조가 EE 구조보다 생체 이용율이 우수하였다. 유리형의 HUFA와의 비교에서는 즉효성은 뒤떨어지지만 산화안정성과 효과의 지속성이라는 점에서는 유리형보다 우수하다고 발표하고 있다(Yasuhiro & Keiichi 2002).

시중에서 유통되고 있는 오메가-3 건강기능식품은 연어유, 멸치유, 정어리유, 물범유 등이며, 이 중 연어유 제품이 약 75%를 차지하고 있다. 본 연구는 시중에서 유통되고 있는 오메가-3 제품의 상당수를 차지하는 연어유를 시료로 다양한 분석법(FT-IR, 탄소안정동위원소, TLC)으로 확인하여, 천연의 오염되지 않은 원료를 가공한 것인지(TG 형태) 또는 오염되거나 부적절한 원료를 제조 공정 과정에서 제거한 제품인지(EE 형태)를 알아보는 기초자료로 사용하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 연어유는 국내에서 건강기능식품으로 수입되어 판매되고 있는 총 38종의 제품으로, 구입한 시료의 원산지는 캐나다산 20종, 미국산 7종, 뉴질랜드 7종, 호주산 4종이었다. 탄소동위원소비 분석에는 연어유를 비롯하여 연어유와 비교하기 위한 몇 종의 어유를 비교시료로 사용하였다. 사용된 제품은 외국에서 수입되는 연어유 2종과 시중에서 판매되고 있는 연어 2종을 구입하여, 직접 용제로 추출한 연어유, 국내에서 제조된 EE 유형과 TG 유형의 어유 각각 1종, 정어리유(외국에서 수입되는 정어리유 3종, 건강기능식품으로 판매되는 정어유 제품 2종) 5종, 멸치유(멸치에서 추출한 멸치유 1종, 건강기능식품으로 판매되는 멸치유 제품 1종) 2종, 정제어유로 표시하여 판매되는 제품(어종이 따로 표시되어 있지 않음) 6종, 물범유 4종을 분석시료와 비교하는 시료로 사용하였다.

2. FT-IR 분광 분석

FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy) 분광 분석은 Nicolet Impact 400D(Madison, WI, USA)를 이용하였으며, 시료는 마이크로 피펫으로 1 ㎕를 취해 KBr 셀에 고르게 도포하고, 측정은 Transmittion법으로 400~4,000 cm^{-1}의 범위에서 분해능 8 cm^{-1}, 스캔 횟수 16번의 조건으로 측정하였다.

3. 탄소안정 동위원소 분석

탄소안정 동위원소 분석은 EA IR-MS(Isoprime-EA)를 사용하였으며, 시료 전처리는 캡슐에 담긴 어유를 취해 보트(boat, 주석 재질)에 약 0.08 ㎎을 달아 시료 당 3회 반복하여 측정하였으며, 비교분석을 위해 reference standard(NIST RM8542 IAEA-CH-6 sucrose)로 보정한 house standard(−12.27±0.16)를 약 0.08 ㎎을 달아 평균값인 12.27‰과의 편차를 보정한 값을 결과값으로 사용하였다(Cho & Lee 2012). 안정동위원소의 측정을 위한 질량분석기의 조건으로 electron voltage는 89.90 eV, trap current는 200 ㎂로 하였고, ion repeller는 −2.73 V, accelerating voltage는 3954.02 V, extration voltage는 74.06 AV로 하였다. 동위원소비율의 측정방법은 표준물질은 PeeDee Belemnite(PDB)의 동위원소비율에 대한 시료의 동위원소비율을 아래와 같은 식에 의해 계산된 값으로 표시하였다(Werner & Brand 2001; Wieser & Brand 1999).

$$\delta_{13}C(‰) = (R_{sample} - R_{standard}) / R_{sample} \times 1000$$

R_{sample}: 시료의 $_{13}C/_{12}C$

$R_{standard}$: 표준물질의 $_{13}C/_{12}C$

4. TLC에 의한 EE와 TG의 정성 분석

분석 시료를 실리카(SiO_2)에 흡착 후 전개용매의 극성에 따른 용해도의 차이를 이용해 전개하여 TG, DG, MG, EE 형

태를 확인하였다. 시료를 TLC(Thin layer chromatography)용 silica gel 판(Merck, Darmstadt, Germany)에 점적한 다음, A 용매[hexane : ethyl ether : acetic acid = 90:10:1(TG, DG의 분리도가 명확함)], B 용매[hexane : ethyl ether : methanol : acetic acid = 85:15:3:2(DG, MG의 분리도가 명확함)]를 1:1로 혼합한 전개용매로 하여 약 10 ㎝ 전개한 후 TLC plate에 10% 황산을 분무하여 100~200℃로 가열하였다. 가열 후 나타난 갈색 또는 흑색의 반점으로 검출된 연어유의 지방 유형을 정성 확인하였다. TG, EE spot의 위치를 확인하기 위해서 멸치어유(Chemport Inc., Korea)를 EE 유형으로 제조한 것과 ethyl ester한 후 리에스테르화 한 것을 표준시료로 사용하여 비교하였다.

결과 및 고찰

1. FT-IR 분광 분석 결과

시중에서 판매되고 있는 오메가-3 제품 38종을 시료로 FT-IR 적외선 분광 분석을 실시하였으며, 스펙트럼을 비교하여 제품의 구조적인 특징을 확인하였다. 결과는 Fig. 1과 같이 두 가지의 유형으로 나타났고, 38종 제품 중 19종은 TG의 패턴을 나타내었으며, 나머지 19종은 EE의 스펙트럼 패턴으로 확인되었다.

스펙트럼을 살펴보면 3,012 cm^{-1} 부근에서 =C-H 피크를, 2,925~2,852 cm^{-1} 부근에서 -C-H 피크를, 1,740 cm^{-1} 부근에

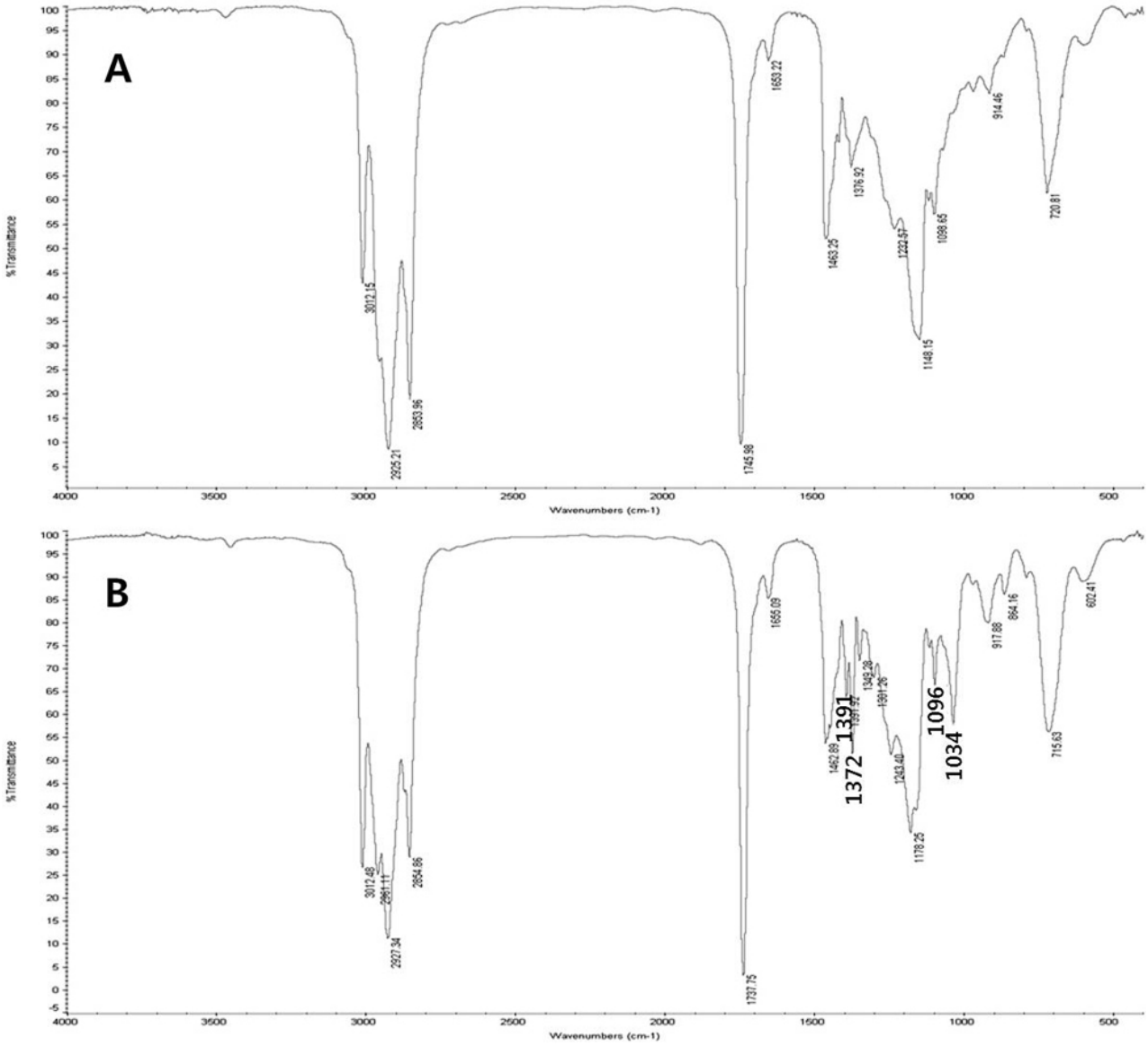

Fig. 1. FT-IR spectrum analysis of 38 different types of salmon oil. The pick of B (1,391 cm^{-1}, 1,372 cm^{-1}, 1,096 cm^{-1}, and 1,034 cm^{-1}) are differ from A spectrum, A is TG-form pattern and B is EE pattern spectrum.

서 에스테르의 C=O 피크를, 1,655 ㎝$^{-1}$ 부근에서 C=C 피크를, 1,460 ㎝$^{-1}$ 부근에서 카르복실레이트 피크를, 1,148～1,178 ㎝$^{-1}$ 부근에서 C-O-C 피크를 보이는 것이 공통적으로 확인되었다. 이러한 공통적인 피크를 볼 때 일반적인 유지류에서 나타나는 스펙트럼임을 알 수 있다. 그러나 Fig. 1의 B에서 보는 것과 같이 1,391, 1,372, 1,096, 1,034 ㎝$^{-1}$ 부근에서 Fig. 1의 A와는 다르게 샤프한 형태의 스펙트럼 피크가 확인되었다. 이것은 일반적인 유지의 TG 스펙트럼과는 다른 화학적인 구조를 나타내는 것이다(William 2000). B 스펙트럼에서 1,391 ㎝$^{-1}$와 1,372 ㎝$^{-1}$은 -C-H(CH_3 sym bending)의 위치를, 1,096 ㎝$^{-1}$와 1,034 ㎝$^{-1}$은 -C-O(streching)의 band position으로, 이들이 강하게 나타나는 것으로 볼 때 EE의 스펙트럼으로 판단되며, 유지의 공통 스펙트럼과 B의 스펙트럼 패턴을 조합해 보면 지방산에틸에스테르에서 주로 확인되는 것으로 확인되었다. 따라서 Fig. 1 A는 TG 형태이며, B는 EE 형태임을 확인할 수 있다. 이는 C=O와 C-O의 스펙트럼 패턴에서도 같은 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 동일한 C=O의 스펙트럼에서 TG 형태는 1,745 ㎝$^{-1}$, EE 형태는 1,736 ㎝$^{-1}$였으며, C-O의 스펙트럼에서 TG는 1,148 ㎝$^{-1}$, EE는 1,178 ㎝$^{-1}$로 서로 다른 패턴 유형을 나타냄을 확인하였다.

FT-IR 분석 결과로, 시중에서 판매되고 있는 오메가-3 연어유 제품의 유형은 트리글리세라이드 형태(TG Form)와 에틸에스테르 형태(EE Form)가 함께 유통되고 있는 것을 확인할 수 있었다.

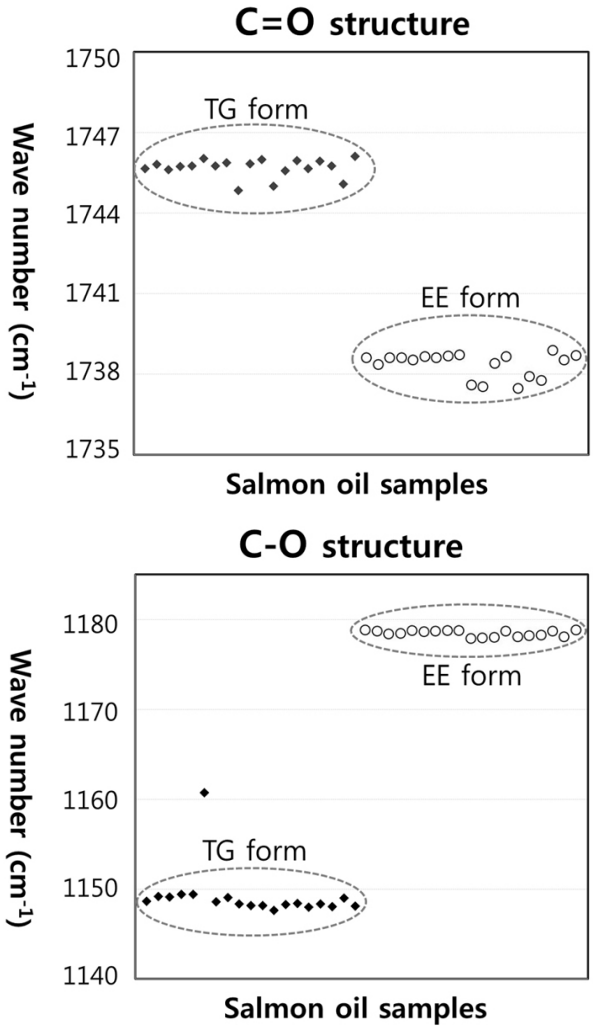

Fig. 2. FT-IR analysis of salmon oil. A: C=O structure's wave number of TG (◆) and EE (○) form, B: C-O structure's wave number of TG (◆) and EE (○) form.

2. 탄소안정동위원소 분석결과

FT-IR 실험 결과로 시중에 판매되고 있는 38종의 연어유는 모두 두 가지 유형인 TG와 EE 유형임을 확인하였으나, 제품에 사용된 것이 100% 연어유인지는 확인이 어려웠다. 따라서 시중에서 오메가-3 제품으로 판매되는 서로 다른 종의 어유 제품과 탄소안정 동위원소를 비교 분석하여 이들의 것과 연어유와의 차이점을 확인하였다. 각 어유별 탄소안정 동위원소비는 연어유의 δ_{13}C(‰)가 −26.35～−26.85, 정제어유 −22.54～−23.11, 멸치유 −23.23, 정어리유 −22.35～−22.56, 하프물범유 −24.43～−24.54로 각 어종간 특징적인 차이가 있음을 알 수 있었다. 연어유 및 멸치유, 정어리, 정제어유, 하프 물범유는 탄소안정 동위원소 값에 따라 Fig. 3에서 보는 것과 같이 그룹으로 분류할 수 있다.

시중에서 판매되고 있는 38종의 연어유간에 탄소안정 동위

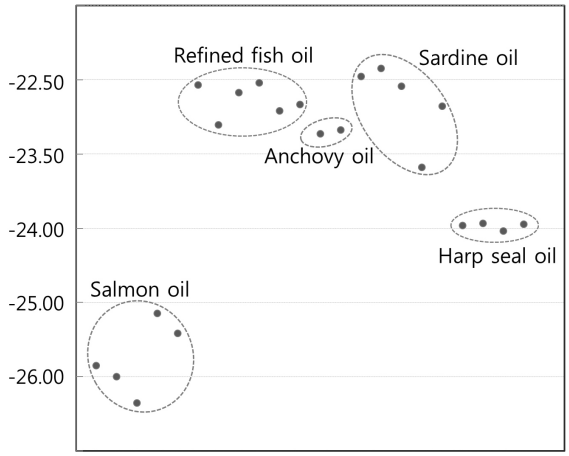

Fig. 3. Comparison of carbon isotopes ratio with salmon oil, refined fish oil, anchovy oil, sardine oil and harp seal oil. δ_{13}C(‰) is salmon oil −26.35~−26.85, refined fish oil, −22.54~−23.11, anchovy oil, −23.23, sardine oil −22.35~−22.56, harp seal oil, −24.43~−24.54.

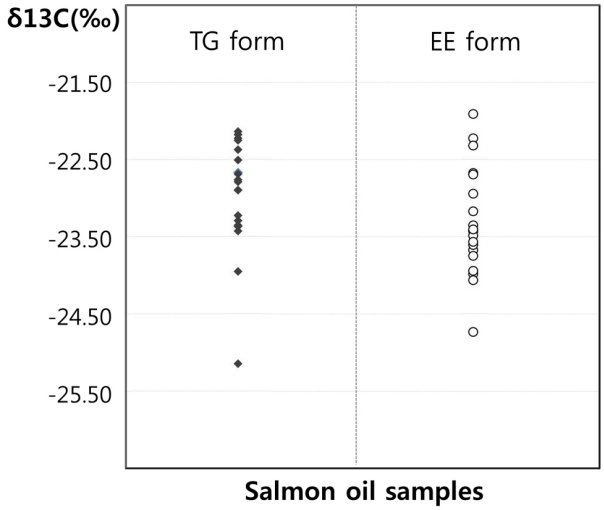

Fig. 4. Comparison of carbon isotopes ratio with total 38 different types of salmon oil. Type of TG (◆) δ_{13}C(‰) is −22.15~−25.15 and EE (○) form is −21.91~−24.74.

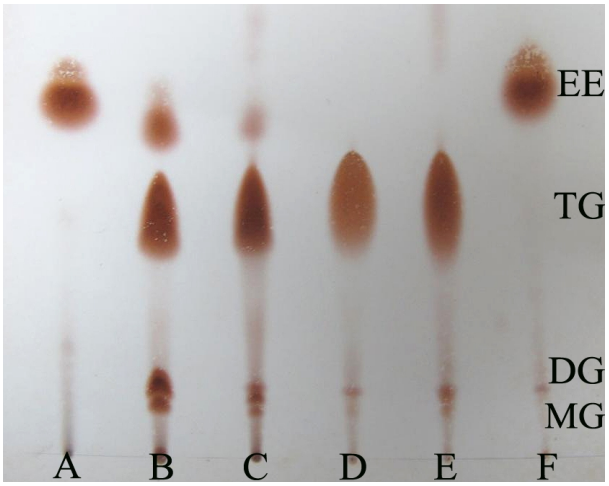

Fig. 5. TLC chromatogram of ethylester, re-esterified oil, and salmon oil. A: fatty acid ethylester, B and C: re-esterified oil, D: salmon oil, E and F: salmon oil sample (A~D: standard reperence, E〜F: salmon oil sample of this study).

원소비는 TG 유형 19종 제품의 δ_{13}C(‰)이 −22.15～−25.15, EE 유형의 19종 제품이 −21.91～−24.74로 TG 유형과 EE 유형은 유사한 탄소동위원소비 값을 갖는 것을 확인하였고, 이들 유형별에 따른 탄소 동위원소비 확인으로는 FT-IR과 같은 큰 차이를 확인하기 어려우므로 TG 및 EE 유형을 구별하는데에 탄소안정 동위원소 검증은 효과가 없는 것을 확인하였다.

3. TLC에 의한 지방산에틸에스테르 정성분석 결과

연어유 TG 그룹의 재-에스테르화(rTG) 유형을 분석하여 가공 여부를 확인하고자 TLC를 이용한 정성분석을 실시하였다. 유지를 에틸에스테르하여 글리세롤과 재-에스테르화한 다면 지방산 구조인 트리글리세라이드로 결합하지 않은 지방산에틸에스테르가 잔류하게 되므로 rTG가 검출될 것이다(Jiankang 등 2010; Dyerberg 등 2010). Fig. 5 A～D의 표준시료 결과에서 EE 부분과 TG 부분이 구분되는 것을 확인할 수 있었다. 유지를 에틸에스테르화한 유지에서는 TG 부분이 확인되지 않았고, rTG의 유지에서는 TG와 EE가 모두 검출되는 것으로 확인되었다. 이것은 재-에스테르화 공정에서 지방산 에틸에스테르가 글리세롤과의 반응에서 TG 구조로 결합되지 않은 EE 형태가 일부 잔류하기 때문이다. 또한 연어에서 직접 추출한 연어유에서는 TG 부분만 확인되었다.

위와 같은 방법으로 38종의 연어유를 분석하였고, TG 유형의 제품 19종에서는 EE 부분이 확인되지 않았으며, EE 유형의 제품 19종에서는 TG 부분이 확인되지 않는 것을 확인하였다(data not shown). 19종의 TG 유형 연어유 제품은 재-에스테르화(rTG) 공정을 거쳐 제조하지 않은 것으로 판단된다. TLC 정성 분석으로도 FT-IR 분광 분석과 동일하게 TG 유형과 EE 유형의 제품으로 연어유를 구분할 수 있었다.

본 연구의 FT-IR 분석 스펙트럼 분석과 탄소동위원소 분석 및 TLC 분석 결과를 바탕으로 연어유 원료 사용에 있어서의 진위 여부와 연어유의 품질 및 가공 여부를 확인할 수 있을 것으로 기대한다.

요약 및 결론

본 연구는 한국에서 수입 유통되고 있는 연어유 38개 제품을 대상으로, 어유의 구조 유형을 분석하여 순수 연어유를 사용하여 만든 제품인지 여부를 확인하고자 하였다. 오메가-3 제품 중 주요한 연어유의 유형은 ethyl ester(EE)와 triglyceride (TG)인데, 연어유가 잠재적인 오염물질을 가지고 있는 경우, 이를 제거하기 위해 가공하게 되면 EE 유형을 가지는 오메가-3 지방산이 생성된다. 이는 EE 유형의 상품을 직접 제품화했거나, 재조합(re-esterified triglyceride)한 제품임을 밝히는 지표가 된다. FT-IR 스펙트럼에서 TG와 EE는 C=O, C-O band position의 유의적인 차이가 있었으며, 38개 제품 중 TG 유형의 제품이 19개, EE 유형의 제품이 19개였다. 탄소동위원소비를 분석한 결과, TG 유형 제품 중 1개 제품이 −25.15로 다른 18개 제품은 −22.15～−23.96과는 차이가 있었다. EE 유형의 19개 제품은 −21.91～−23.74로 TG 유형의 제품과는 큰 차이는 없었다. TLC 분석에서 FT-IR 분석결과와 동일하게 TG 유형과 EE 유형의 제품을 구분할 수 있었다. TG 유형의 제품에서 어유를 에틸에스테르화하여 화학적으로 재결합

시키는 재-에스테르화(rTG) 제품은 확인되지 않았다. 따라서 TG 유형의 제품 모두 천연의 구조를 가지는 연어유인 것으로 판단된다. 본 연구의 분석결과에서 보는 바와 같이, 연어유의 FT-IR 스펙트럼의 특징, 탄소동위원소 비 및 TLC 분석으로 연어유의 유형을 구분하여, 시판되고 있는 연어유의 표기사항이 정확한 제품인지를 구별하는 기초 자료가 될 것으로 기대한다.

참고문헌

Arne N, Louise B, William EC, Lauren H. 1991. Absorption of the n-3 eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids as ethyl esters and triglycerides by humans. *Am J Clin Nutr* 53:1185-1190

Cho EA, Lee YS. 2012. An analysis of phenolic compounds, carbon isotopes, and sugar components of whisky based on the period of maturation. *Korean J Food Nutr* 25:57-63

Choe EO. 2010. Functional lipids and application of omega-3 fatty acids to conventional food. *Food Sci Industry* 43:2-13

Dyerberg J, Madsen P, Moller JM, Aardestrup I, Schmidt EB. 2010. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *PLEFA* 83:137-141

Jiankang W, Erick RS, Jaroslay K, Fereidoon S. 2010. Effect of chemical randomization on positional distribution and stability of omega-3 oil triacylglycerol. *J Agri Food Chem* 58:8842-8847

Kim YK, Joo KJ. 1994. EPA, DHA and tocopherols contents in fish oil products and fishers. *J Korean Sco Food Sci Nutr* 23:68-72

Lee HA, Yoo IJ, Lee BH. 1997. Research and development trends on omega-3 fatty acid fortified foodstuffs. *J Korean Sco Food Sci Nutr* 26:161-174

Murat K, Semra K, Sinem A, Ozge O, Timurhan C, Esin S, Semesttin C. 2003. Comparison of ω-3 fatty acids by GC-MS in frequently consumed fish and fish oil preparations on the turkish market. *FABAD J Pharm Sci* 28:201-205

Schuchardt JP, Schneider I, Meyer H, Neubronner J, Schacky VC, Haha A. 2011. Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations a comparative bioavailability study of fish oil vs krill oil. *Lipids Health Dis* 10:145(22 August 2011)

Werner RA, Brand WA. 2001. Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15:501-519

Wieser ME, Brand WA 1999. A laser extraction combustion technique for in situ δ_{13}C analysis of organic and inorganic materials. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13:1218-1225

William WC. 2000. Isolation Separation Identification and Structural Analysis of Lipids. The Oily Press. pp.108-111

Yasuhiro A, Keiichi N. 2002. Regiospecific distribution of highly unsaturated fatty acids in triacylglycerols of *Artemia nauplii* enriched with marine oils. *J Oleo Sci* 51:615-620

Yoon JG. 1993. Extraction of EPA and DHA from tuna oil using supercritical carbon dioxide. *Korean J Food Sci Technol* 25:288-294

접 수 : 2012년 10월 5일
최종수정 : 2012년 12월 7일
채 택 : 2012년 12월 7일