

Phytosterylferulate 가 米糠油 暗色化에 미치는 影響에 관한 研究

국립 공업 연구소
金 點 植
(1969. 8. 28 接受)

The Darkening Effect of Phytosterylferulate on the Rice Bran Oil

Jum Sik Kim

(Received October 28, 1969)

ABSTRACT

An attempt has been made to investigate the nature of the characteristic darkening reaction occurring in the rice bran oil during the storage.

Several pigments were separated by using column and thin layer chromatography of the pigments was made in the light of the knowledge of absorption spectral behavior. The presence of trace amount of iron and phytosteryl esters of ferulic acid (3-methoxy-4-hydroxy-cinnamic acid) was found to be responsible for the development of the characteristic color in rice bran oil.

The model reactions with the ferulate, iron and fatty acids could be suggested the mechanism.

1. 緒 論

米糠油는 다른 植物油에 比하면 그 着色狀態가 特異하여 暗色을 나타내는데 米糠의 採油工程, 處理過程等에 따라서도 色狀의 變化가 多様하다.

米糠油 色素에 關하여는 綠色을 띠는 chlorophyll 系 化合物과 橙色을 나타내는 carotenoid 系 化合物 및 그 酸化物에 起因하는 것에 對하여는 많은 報告⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾가 發表된바 있고, 處理過程中的 metal soap의 混入으로 着色이 助長됨에 關하여는 竹下⁽⁴⁾ 등이 報告된 바 있으나, 米糠油는 一般 植物油에 比하여 特異하게 螢光을 나타내는 暗綠色이 酸價 上昇에 並行하여 더욱 暗色化되며, 一但 暗色화된 米糠油는 脫色工程에서도 거의 脫色이 不可能하게 되는 點이 있다. 植物油의 普遍的인 精製方法으로 常用되는 酸性 白土 處理는 그 過程에서 着色物質인 carotene, carotenoid 및 chlorophyll 등과 같

이 共軛二重結合系의 π -base 들이 選擇的으로 吸着된다. 이때 tocopherol, phytoquinone 등 其他 酸性 物質은 그대로 溶出된다. 따라서 白土 處理한 米糠油中에는 大部分의 carotenoid 및 chlorophyll이 除去되어 있으므로 이들은 米糠油의 着色 原因 物質로 생각할 수 없다. 이것은 原油의 吸收 spectrum에서도 充分히 뒷받침되고 있다.

따라서 이 着色 原因 物質은 中性乃至 酸性 物質임이 豫想되었다. 著者는 이러한 米糠油中の 着色 物質의 本性을 究明하기 爲하여 不鹼化物中에서 螢光性 暗綠色의 物質을 basic alumina 吸着柱上에서 分離하였다. 이 暗綠色 物質은 中性이나 acidic alumina 吸着柱에서는 吸着되지 않으며 basic alumina 吸着柱에서는 第一 吸着성이 강한 이 物質을 6種의 物質로 다시 分離하였다.

著者는 UV, 可視 및 IR spectrum을 통하여 이들 分離된 物質들이 米糠油 着色의 原因이 되는 物質들임을

알게 되었고 이 중 일부는 일찌기 土屋⁽⁵⁾에 의하여 米糠油中에 그 存在가 알려졌고, 最近 達藤⁽⁶⁾에 의하여 化學構造가 밝혀진 phytoserol의 ferula 酸 ester와 일치 하였으며, 著者は Fe 存在下에서 ferulate가 着色의 原因 物質임을 알게 되었으므로 이에 報告하고자 한다.

2. 實驗方法

2-1 供試用 精製 米糠油

室溫에서 脫蠟한 米糠原油(A.V. 73.2)에 中和量보다 20% 過剩의 NaOH(20°Be') 溶液을 加하여 60°C를 維持시킨 後 放置하여, 生成된 비누分을 沈澱시켜 分離하고, 上層의 脫酸油를 取하여 蒸溜水로 2回 洗滌한 다음 芒硝로 脫水한 것을 90°C로 加熱하여 脫酸油의 1.5% 活性 白土를 加하여 攪拌한 後 濾過하여 白土를 除去하여 使用하였다.

2-2 原料 米糠油

서울特別市 永登浦區 堂山洞 所在 서울油脂工業株式會社에서 2-1에서와 同一한 米糠油에 對하여 精製工程別로 採取하였는데 그 一般性狀은 Table 1과 같다.

Table 1. Characteristics of Rice Bran Oil for Experiments.

No.	Rice bran oil	A. V.	S. V.	I. V.
1	Crude oil	73.2	180	99
2	Deacidified oil	5.1	188	107
3	Water washed oil	5.5	189	110
4	Bleached oil	5.8	188	115
5	Deodorized oil	5.6	188	114
6	Refined oil	1.0	187	115

2-3 試 藥

- 1) Silica gel G: thin layer chromatography 用 (E. Merck 製)
- 2) Basic alumina: chromatography 用 (E. Merck 製)
- 3) n-Hexane: 試藥 1級을 發煙黃酸으로 洗滌하여 分離하고 蒸溜水로 水洗한 後 芒硝로 脫水하고 蒸溜하여 使用하였다.
- 4) Petroleum ether: b. p. 40~60°C
- 5) Liquid paraffin; injection 用, 其他 methanol, ethyl ether, acetic acid, chloroform, oleic acid, stearic acid 등은 試藥 1級品을 使用하였다.

2-4 機 器

可視 및 紫外部 吸收는 Bausch & Lomb 社製 Spectrophotometer 505 로 測定하였고, 赤外部 吸收는 Perkin-Elmer 社製 Infracord Spectrophotometer 를 使用하였다.

2-5 Column chromatography

Basic alumina 60 g 을 column(1.5 cm × 45 cm)에 充填한 다음 2-1의 米糠原油를 5倍의 petroleum ether 에 溶解하여 吸着시키고 petroleum ether 100 ml 로 展開시켰다.

2-6 Thin layer chromatography

Silica gel G 30 g 에 60 ml 의 蒸溜水를 加하고 mortar 에서 均一하게 混合하여 applicator(Toyo HC-20)로 두께가 0.4 mm 되게 塗布한 다음 室溫에서 乾燥하고 105°C 에서 1時間 活性化하여 使用하였다.

展開溶媒는 petroleum ether:ether:acetic acid=80:20:1의 三成分系 溶媒로서 一次元 展開를 하였고 發色 試藥은 diazo 化한 sulfanilic acid 를 8%-Na₂CO₃ 溶液에 0.1% 溶解하여 使用하였다. (每回新調)

2-7 米糠油로부터 ferulate 의 分離 結晶

米糠原油로부터 純粹한 ferulate 를 分離하여 實驗에 供하기 爲하여 Fig. 1과 같은 操作으로서 結晶을 얻었다.

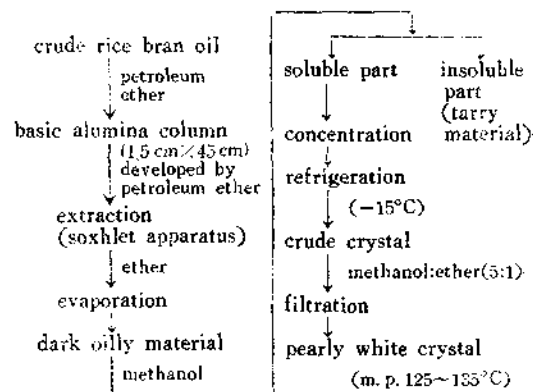


Fig. 1. Crystallization of ferulate from Rice Bran Oil.

3. 實驗 및 結果

3-1 米糠原油의 吸收 spectrum

米糠原油의 可視 및 紫外 吸收 spectrum 은 Fig. 2, Fig. 3과 같으며 原油의 可視部 吸收波長은 420, 435, 450, 510, 605 m μ 이며 精製油에서는 吸收를 일으키지

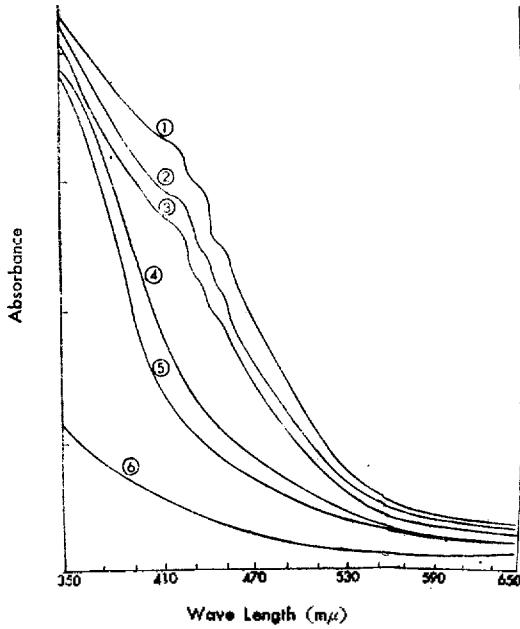


Fig. 2. Visible Absorption Spectra of Rice Bran Oil.

않았다. 原油의 紫外線 吸收 spectrum 은 231 mμ, 291 mμ, 315 mμ 에서 吸收를 일으키고 있으나 精製됨에 따라 漸次 280 mμ 에서는 吸收가 두드러지는 反面에 291 mμ 에서는 減少하고 있으며 精製됨에 따라서 이러한 特性 peak 는 없어지는 傾向이 있었다.

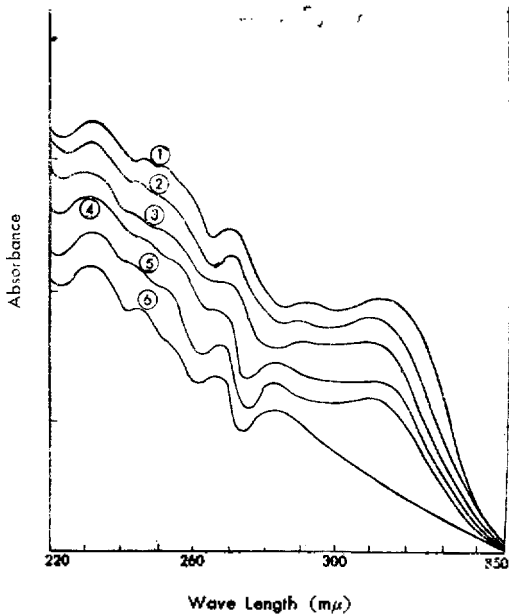


Fig. 3. U V Absorption Spectra of Rice Bran Oil Varying Degree of Refining.

3-2 Column chromatography 에 依한 着色物質의 分離

米糠原油를 2-5의 實驗方法에 따라 分離한 column chromatogram 은 Fig. 4 로서 各 着色層을 ethyl ether 로 抽出하여 ether 을 溜去시킨 後 各 吸着帶에 對하여 可視 spectrum 에 나타난 ④, ⑤의 吸着帶는 400~500 mμ 에서 吸收極大가 일어났고 ③, ①의 吸着帶는 600 mμ 에서 吸收 極大가 일어났다. 이로써 前者는 carotenoid 系 色素로 생각되고, 後者는 chlorophyll 系 色素로 생각된다.

暗綠色의 吸着帶인 ④, ⑤의 抽出物에 methanol 을 加하여 數回 抽出하면 methanol 可溶部와 不溶部인 黑色 tar 狀 物質로 分離된다.

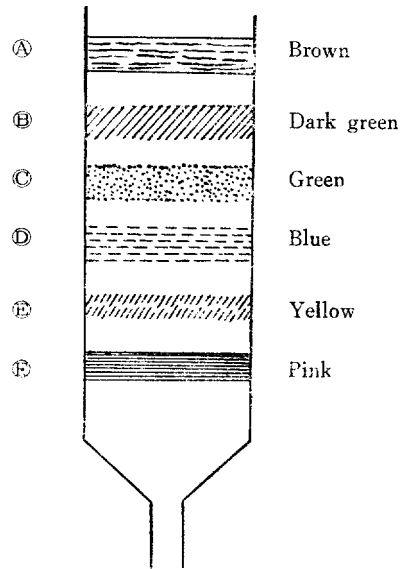


Fig. 4. Column Chromatogram of Crude Rice Bran Oil.

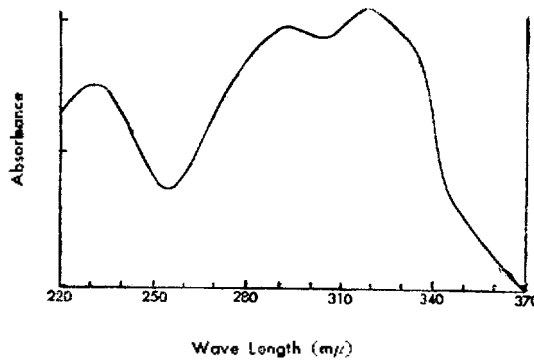


Fig. 5. U V Spectrum of Ferulate.

methanol可溶部를 濃縮하여 -15°C 에서 靜置하면 淡綠色의 粗結晶이 析出되는데, 이 粗結晶을 methanol: ether=5:1의 混合溶媒로 數回 再結晶하여 光澤이 있는 白色의 結晶(m. p. $125\sim 135^{\circ}\text{C}$)이 析出되었다. 이 結晶에 對한 紫外線 吸收 spectrum은 Fig. 5와 같이 米糠原油의 紫外線 吸收極大 波長인 231, 291, 315 $m\mu$ 과 같은 吸收 波長을 나타냈으며 赤外線 吸收 spectrum은 Fig. 6으로서 sterol의 ferula酸 ester의 spectrum과 同一하였다⁽⁶⁾.

暗綠色의 ④, ⑤ 吸着帶로부터 얻은 結晶은 Fig. 5 Fig. 6과 같이 sterol의 ferula酸 ester와 一致하였다. 米糠原油에서 얻은 ferulate 結晶은 UV 315 $m\mu$ 에서 $E 1\%_{1\text{cm}}=370$ 이었으며 原油中の 그 含量은 2.7%였다.

3-3 Tar 狀物質의 分離

暗綠色의 吸着帶인 ④, ⑤로부터 分離한 tar 狀物質을 thin layer chromatography (T. L. C.)로 分離한 結果는 Table 2와 같으며 이들을 各 spot No. 別로 測定하여 얻은 可視 spectrum은 Fig. 8로 Table 2에서 보는 바와 같은 chromatogram과 外觀 및 着色反應을 보여 주고 있다. 이중 原點의 物質은 Fig. 10의 IR spectrum에서 보는 바와 같이 hydrocarbon이며 이것과 R_f 0.3인 spot No. 6의 物質 以外の No. 2, 3, 4 및 No. 5는 다같이 diazonium salt에 依하여 赤色으로 變色된다. 未精製의 米糠原油는 可視部에서 두드러지게 特出한 吸收帶는 갖지 않으나 410, 420, 435, 450, 510 $m\mu$ 및 605 $m\mu$ 近傍에 吸收極大 乃至 shoulder를 가지며, 長

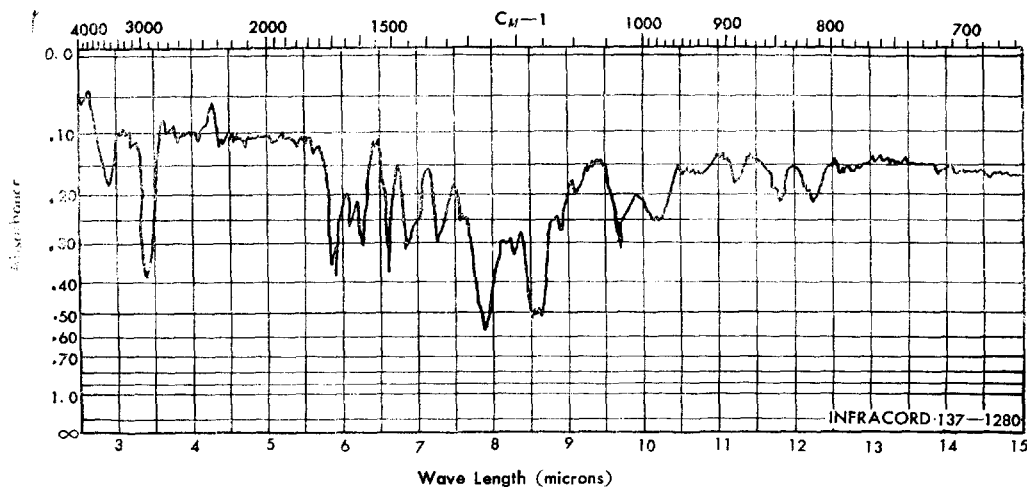


Fig. 6. IR Spectrum of Ferulate.

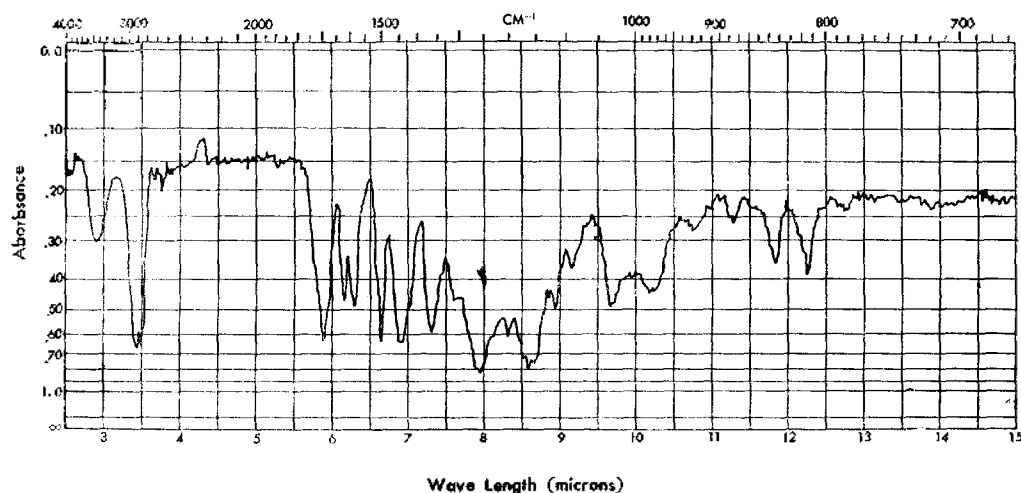


Fig. 7. IR Spectrum of Spot No. 5 of Thin Layer Chromatography.

Table 2. Thin Layer Chromatogram of Tarry Material of Rice Bran Oil.

Spot No.	T. L. C. chromatogram	R _f value	Appearance	Indicator	
				Diazonium salt	50% H ₂ SO ₄
⑥		0.30	colorless	pale	brown
⑤		0.13	dark green	red	brown
④		0.08	blue	red	green
③		0.07	green	red	brown
②		0.05	pale brown	red	green
①			brown	dark	brown

adsorbent: silica gel (G)
thickness: 0.4mm
solvent: petroleum ether: ether: acetic acid=80:20:1

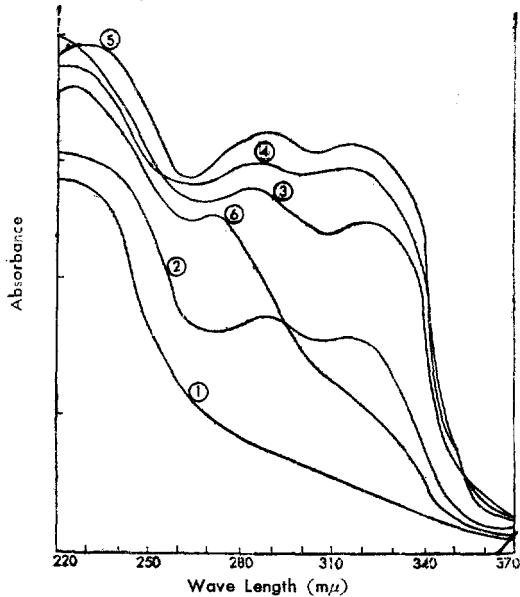


Fig. 8. Visible Spectra of Tarry Fractions by Thin Layer Chromatography.

波長으로 갈수록 그 吸收強度는 弱해지나, 이들 可視部의 吸光度는 色相과 比例하며 精製度에 反比例한다. 玄米로부터 solvent 로 抽出한 餾은 올리브色の 精製

米糠油에서는 이들 吸收가 매우 弱하며 可視部의 弱한 吸收는 아마도 紫外部의 吸收의 tailing 으로 보인다. 한편 紫外部에서는 232 mμ, 285 mμ 및 315 mμ 에 特徵있는 吸收를 가지고 있으며 이 吸光度는 色相이 진한 原油일수록 크다. 이 吸收帶는 米糠油의 不鹼化物中에서 chromatography 로 分離 精製한 stigmasterol 의 ferula 酸 ester 및 sitosterol 의 ferula 酸 ester 의 特徵있는 吸收 spectrum 과 매우 비슷하였으나 色相이 진한 것일수록 315 mμ 의 吸收가 約 5 mμ 長波長部로 bathochromic shift 를 하고 있으며 可視部에 tailing 의 影響을 多少 미치고 있으나, 더 두드러진 現象은 320 mμ 의 吸收는

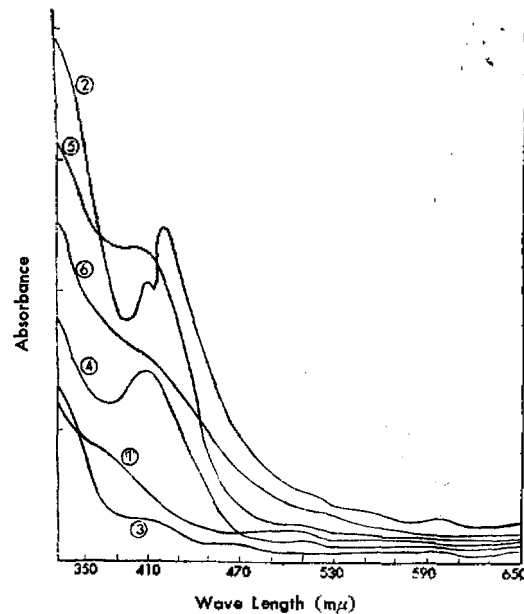


Fig. 9. UV Spectra of Tarry Fractions by Thin Layer Chromatography.

若干 弱化되는데 反하여 285 mμ 의 吸收는 增加하는 傾向을 觀察할 수 있었다.

이들은 Fig. 8 에서 보는 바와 같이 紫外線 吸收 spectrum 은 ferula 酸 ester 와 매우 類似한 吸收를 보여 주고 있으나, diazo 反應 陰性인 spot No. 1, No. 6 의 UV 吸收 spectrum 은 ferulate 의 spectrum 과 다른 것이 對照的이다. 또한 spot No. 1 과 No. 6 이 可視部에 別로 吸收가 없는데 反해서 diazo 反應陽性 物質들은 可視部에서도 粗米糠油들에서 볼 수 있는 吸收極大值 卽, 410 mμ, 420 mμ, 435 mμ, 510 mμ 및 605 mμ 近傍 등에서 吸收를 보여 주고 있다(Fig. 8).

특히 No. 2 는 淡褐色 物質로 410, 435 mμ 에 두드러진 吸收極大와 더불어 603 mμ 에도 微細 吸收가 있다 이 長波長部의 吸收는 410~435 mμ 와 더불어 淡綠褐色

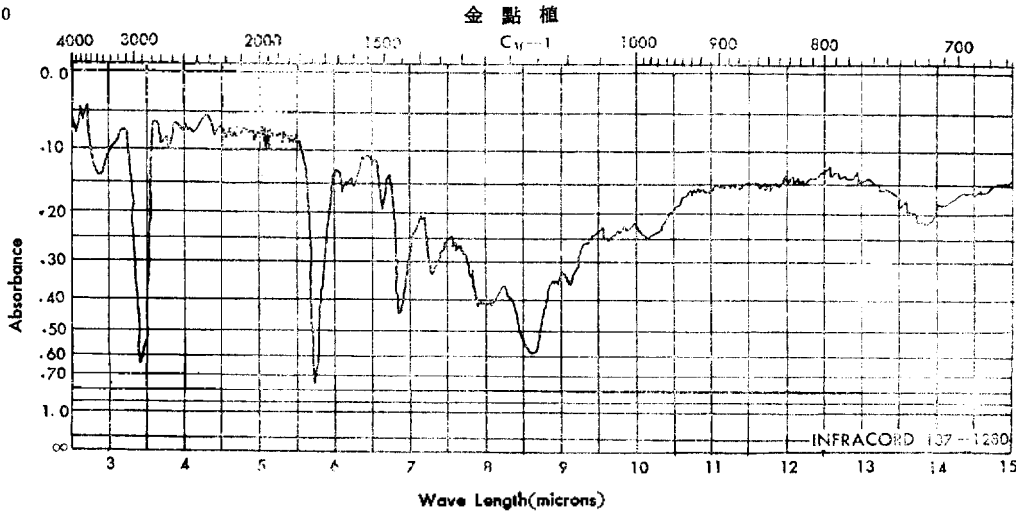


Fig. 10. IR Spectrum of Spot No. 1 of Thin Layer Chromatography.

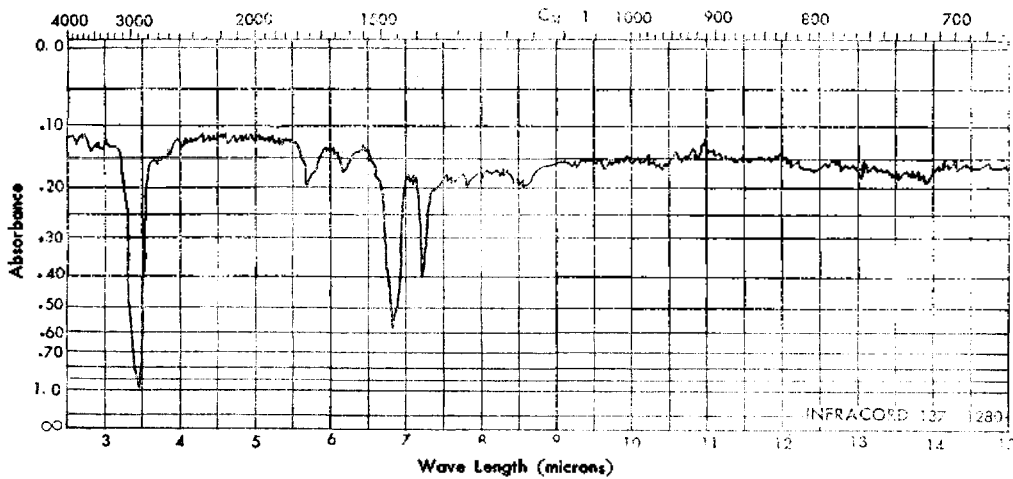


Fig. 11. IR Spectrum of Spot No. 3 of Thin Layer Chromatography.

의 原因이 되어 있는 것으로 생각된다. 이 중 No. 5의 IR spectrum (Fig. 7)은 sitosterol 또는 stigmasterol의 ferula 酸 ester의 그것과 完全히 一致하고 있다. 그러나 spot No. 2, No. 3(Fig. 11) 및 No. 4의 IR spectrum에서는 ferula 酸 ester와 비슷한 pattern을 보여 준다.

한편 이 暗綠色의 tar狀 物質을 methanol로 長時日 接觸시킨 것은 차차 褪色되어 거의 無色으로 되면서 無色の 光澤있는 結晶이 析出한다. 이 結晶은 大部分 phytosterol의 ferula 酸 ester임을 確認할 수 있었다.

3-4 Ferulate와 Fe, oleic acid 및 stearic acid와의 關係

Ferulate에 依한 呈色 現象을 究明하고자 liquid paraffin을 solvent로 하여 Table 3에서 表示된 여러 組成의 溶液을 100°C로 加熱하고 300 ml/min로 酸素를 吹

入시키면서 時間別로, 430 m μ 에서 吸光度를 測定한 結果는 Fig. 12와 같이 ferulate와 Fe 및 oleic acid存在下에서 吸光度의 變化가 甚히 일어남을 알 수 있었다.

Table 3. Combined Component for Color Reaction.

No.	component
1	liquid paraffin
2	liquid paraffin + ferulate (1%)
3	liquid paraffin + Fe (10 ppm)
4	liquid paraffin + oleic acid (10%)
5	liquid paraffin + oleic acid(10%) + ferulate(1%)
6	liquid paraffin + oleic acid(10%) + Fe(10 ppm)
7	liquid paraffin + oleic acid(10%) + Fe(10 ppm)
8	liquid paraffin + ferulate(1%) + Fe(10 ppm)

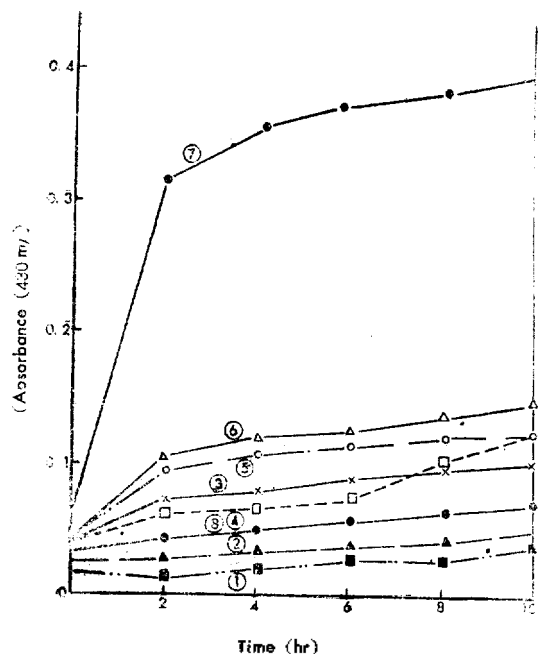


Fig. 12. Effect of Combined Component on the Coloration in Liquid Paraffin.

이는 ferulate 가 脂肪酸 存在下에서 Fe 와 作用하여 發色되는 것으로 생각된다. ferulate 에 對한 Fe 의 影響은 Fig. 13 으로서 Fe 가 增加함에 따라 吸光度가 上昇함을 알 수 있다. ferulate 의 量的 關係는 Fig. 14 에서와 같이 0.5% 以上에서 顯著한 吸收를 일으키고 있다.

ferulate 와 Fe 의 呈色反應은 脂肪酸의 種類에 關係 없이 脂肪酸의 量이 增加함에 따라 높은 吸光度를 보여 주고 있는 것을 Fig. 15 에서 볼 수 있다. 이는 不飽和脂肪酸인 oleic acid 에 對한 反應과 stearic acid 에 對한 反應을 比較하여 보면, ferulate 와의 呈色反應은 脂肪酸의 不飽和度와는 關係가 없는 것을 알 수 있다.

以上の 結果로 보아 ferulate 의 呈色反應은 Fe 와 脂肪酸의 共存이 必要條件임을 알 수 있고, 그 量的 關係에 있어서도 重要한 結果를 찾아볼 수 있었다. 이 反應系에서 Fe 와 脂肪酸이 서로 反應하여 竹下(4)가 發表한 바와 같이 그 一部가 metal soap 를 形成하여 着色을 하고 이 metal soap 가 ferulate 와 Fe 의 反應을 容易하게 하는 것인지는 究明을 要하는 點이라 생각된다.

4. 結 論

- 1) 米糠油 着色物質의 可視 및 紫外線 吸收 spectrum 은 原油의 可視 및 紫外線 吸收 spectrum 과 一致되

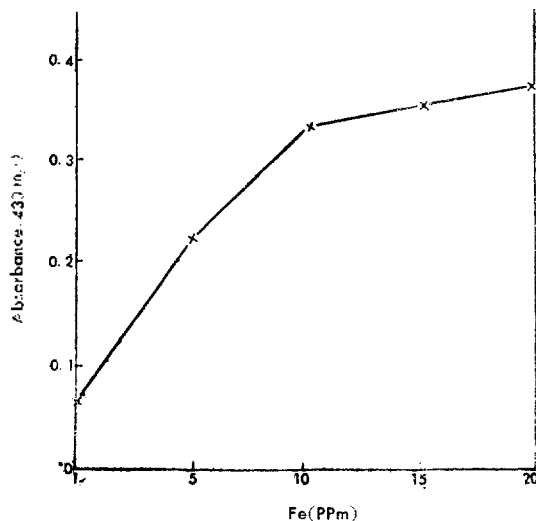


Fig. 13. Effect of Fe on the Coloration in Liquid Paraffin.

10% oleic acid, 1% ferulate
reaction; 6 hrs at 100°C.

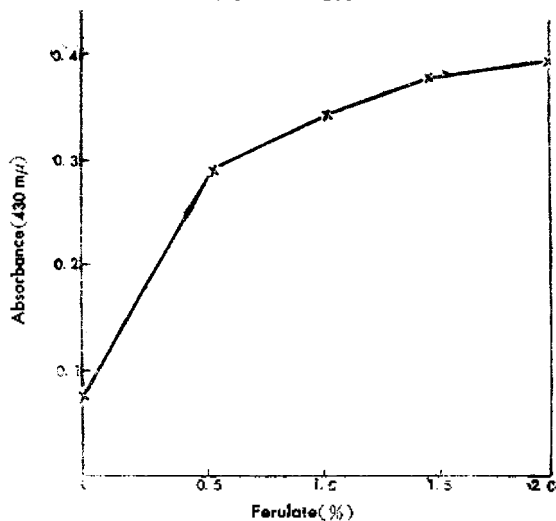


Fig. 14. Effect of Ferulate on the Coloration in Liquid Paraffin.

10% oleic acid, Fe 20 ppm
Reaction; 6 hrs at 100°C.

는 것을 알았고 이 物質을 T. L. C. 로 分離하여 赤外線 吸收 spectrum 에 나타난 結果를 檢討하여 본 結果 ferulate 로 因한 것임을 알았다.

- 2) 分離 精製한 ferulate 는 315 mμ 에서 $E_{1cm}^{1\%} = 370$ 이 있으며 tar 狀 物質의 여러 成分은 大部分 ferulate 와 同一한 紫外 및 赤外線 spectrum 을 나타냈으나, 특

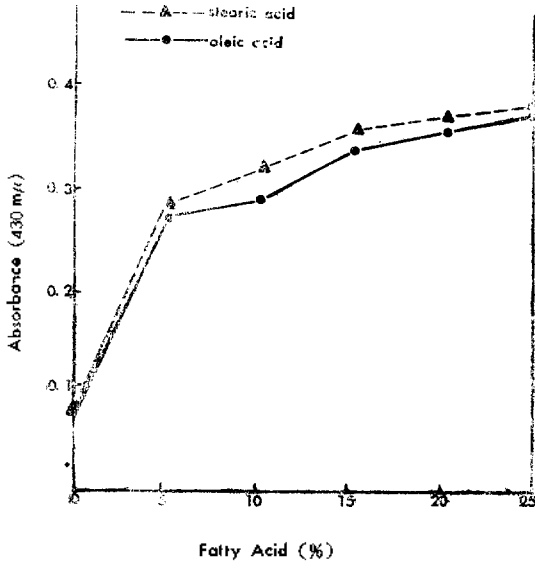


Fig. 15. Effect of Fatty Acids on the Coloration in Liquid Paraffin.

Fe 10 ppm, 1% ferulate
Reaction; 6 hrs at 100°C.

異한 것은 tar 狀 物質의 紫外線 吸收 spectrum의 吸收極大는 315 mμ에서 約 5 mμ bathochromic shift를 하고 285 mμ에서의 absorbance가 若干 增加하였다.

- 3) 酸價의 上昇에 따른 米糠油의 暗色化는 ferulate가 溶存하는 鐵과 脂肪酸의 增加로 因한 呈色이 可能해 지는 結果라 볼 수 있다.
- 4) Ferulate는 liquid paraffin을 solvent로 한 溶液中에서는, Fe나 oleic acid 또는 stearic acid 單獨으로는 呈色反應을 일으키지 않으나, Fe와 脂肪酸의 共存下에서는 呈色反應을 나타내는데, Fe는 10 ppm, ferulate는 1%, 脂肪酸은 10%以上일 때 顯著하게 着色됨을 알 수 있었다.

5. 參考文獻

- 1) R. B. Reddi; *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, 25, 206 (1948)
- 2) R. T. O'Conner, F. G. Dollear *et al*; *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, 26, 710 (1949)
- 3) 土屋, 金子; *東工試*, 45, 252 (1950)
- 4) 竹下; *油化學*, 11, 165 (1962)
- 5) 土屋, 加藤; *東工試*, 51, 359 (1956)
- 6) 遠藤, 三栖, 稻葉; *油化學*, 18, 63 (1969)