

## 지방산 메틸에스테르 조제방법이 한국산 식물성 기름 (참깨 기름)의 지방산 조성에 미치는 영향\*

尹泰憲

翰林大學 韓國營養研究所

### Effects of Procedures for Preparing Fatty Acid Methyl Esters on Fatty Acid Composition of Korean Vegetable Oils (Sesame Seed Oils)

Yoon, Tai Heon

Korea Institute of Nutrition, Hallym University, Chunchon

(Received March 1, 1987)

#### ABSTRACT

The effects of procedures for preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatography were investigated. A quantitative comparison of four procedures for the preparation of the fatty acid methyl esters from Korean sesame seed lipids which can be representative of fatty acid ranges of Korean vegetable oils has been made. The procedures employed were  $\text{BF}_3$ -methanol,  $\text{HCl}$ -methanol, sodium methoxide-methanol, and tetramethylammonium hydroxide-methanol.

Twelve fatty acids ranged from 14:0 to 24:0 were identified in the lipids from Korean white and black sesame seeds. All four procedures gave similar results for the fatty acids, 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, and 18:3 present in the range of 1~44% but only in the  $\text{HCl}$ -methanol procedure, the fatty acids, 16:1, 20:0, 22:0, 24:0 present in the range of 0.02~1% showed the lowest values.

When using tetramethylammonium hydroxide-methanol procedure for determination of total fatty acid composition from white and black sesame seed lipids, unsaponifiable matters including sesamol, sesamolin and sesamin present in the seed lipids are not removed from the resulting reaction mixture. Thus the transesterification mixture is used without further treatment for injection into the gas chromatography.

However, the gas chromatographic analysis of the transesterification mixture showed that the unsaponifiable matters had no effect on the fatty acid composition of the seed lipids. From the results, it appears that the  $\text{BF}_3$ -methanol, sodium methoxide-methanol and tetramethylammonium hydroxide-methanol procedures can be used to prepare fatty acid methyl esters from Korean vegetable oils. Among the methods, the tetramethylammonium hydroxide-methanol procedure, which give total fatty acid composition, glyceride fatty acid composition and composition of free fatty acids present, appears to be a simple, convenient and quantitative procedure and applicable to samples containing broad ranges of fatty acids.

\* 본 논문은 1986년도 한림대학 학술연구조성비로 이루어졌음.

## I. 서 론

지방질, 글리세리드, 카르복실산 등의 유기 화합물은 가스 크로마토그래피로 분석하기에 앞서 휘발성인 유도체로 만든 다음 분석에 사용하게 되는데 알킬화 등을 많이 이용한다. 일반적으로 사용되는 알킬 에스테르 형태로는 메틸 에스테르, 프로필 에스테르, 부틸 에스테르, 아밀 에스테르 등으로서 이 중에서 메틸 에스테르 형태를 가장 많이 선호하고 있다. 이 메틸 에스테르 형태는 지방산이나 아미노산, 히드록시산, 슬픈산 등의 유도체에 많이 사용되어 왔다.<sup>1-2)</sup>

지방질의 지방산 메틸 에스테르 조제는 가스 크로마토그래피로 분석하기 직전까지의 단계에서 가장 중요한 과정이기 때문에 조제방법론에 상당한 관심들이 기울어져 많은 메틸 에스테르 조제방법들이 개발되고 개선되었다. 메틸 에스테르 조제방법들로는  $\text{BF}_3$ -메탄올법,<sup>3-7)</sup> 디아조메탄법,<sup>2,8,9)</sup> 염산 또는 황산-메탄올법,<sup>2,10-14)</sup> 과염소산-메탄올법,<sup>15)</sup> 나트륨이나 칼륨 메톡사이드 또는 수산화 칼륨-메탄올법,<sup>2)</sup> trimethylammonium이나 tetramethylammonium hydroxide-메탄올법,<sup>19-21)</sup> dimethoxypropane-메탄올법<sup>22)</sup> 등이 있다.

그런데 이들 방법들은 제각기 장단점을 갖고 있기 때문에 연구 시료 지방질의 지방산 조성을 구조 변화없이 전부 정량적으로 해당 지방산 메틸 에스테르로 전환시킬 수 있음과 동시에 신속 정확히 반응을 끌낼 수 있는 방법을 선택하는 것이 무엇보다도 중요하다고 본다. 이와 같은 조건들에 부합될 수 있는 방법들로는  $\text{BF}_3$ -메탄올법, 나트륨 메톡사이드-메탄올법, tetramethylammonium hydroxide-메탄올법 그리고 시간이 다소 걸려 신속 측면에서는 유리하지 못한 방법이긴 하나 통용되고 있는 염산 또는 황산-메탄올법 등을 들 수 있다. 본 연구에서는 이들 방법들을 한국산 식물성 기름의 지방산 조성 조사에 통상적으로 사용 가능한지의 여부를 확인하기 위하여 한국산 식물성 기름의 지방산 분포를 대표할 수 있을 뿐만 아니라 특이하게 불검화물로 sesamol, sesamolin, sesamin 등을 함유하고 있는 참깨 기름(지방질)을 선택해서 상기 각 방법들이 참깨 지방질의 지방산 조성에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴 보았다.

## II. 재료 및 방법

## 1. 재료

참깨는 통상 흰 참깨와 검은 참깨로 구분되는데 본 연구에서는 2종류 다 시료로 사용하였다. 흰 참깨는 개량종인 수원 21호로 1984년 11월 경상남도 창녕군 영산면에서, 검은 참깨는 재래종으로 1984년 10월 경상북도 예천군 지보면에서 각각 구입하였다.

본 실험에 사용한 시약은 전부 특급시약으로서 석유에테르, 에틸에테르, 클로로포름, 헥산 등은 Tedia사(Ohio, 미국)로부터, 무수메탄올, 15%  $\text{BF}_3$ -메탄올 등은 E. Merck사(Darmstadt, 서독)로부터, 나트리움 메톡사이드-메탄올, 우수의 포화 및 불포화 지방산 표준품 그리고 기타의 시약은 전부 Sigma Chemical사(ST Louis, 미국)로부터 각각 구입하였다.

## 2. 총지방질

유발로 뺨은 각 시료 50g을 칭량하여 1,000 ml 분액여두(Rudolf Brand GMBH사, 서독)에 담고 여기에다 클로로포름과 메탄올(2:1, v/v) 용액을 시료량의 10배량을 가하여 혼합한 다음 실온에서 1시간 방치 후 분액여두 진탕기(모델 07-SK 0647, 동양이화학기계제작소, 한국)로 5시간 동안 진탕, 추출하였다. 이 추출액을 따로 모은 다음 다시 클로로포름과 메탄올 용액을 10배량 가하여 1회, 5배가량 가하여 1회씩 상기와 동일한 조작으로 각각 추출하여 büchner 여과기(여과지: Whatman No. 42)로 여과하였으며, 잔사는 클로로포름과 메탄올 용액 30 ml 씩 3회 세척하였다. 여과액을 전부 모아 회전식 감압 농축기(모델 RE-51, Yamato 사, 일본)로 30°C에서 농축하여 Folch 등<sup>23)</sup>의 방법에 따라 정제한 다음 다시 감압 농축기로 농축한 후 사용할 때까지 냉동고(-20°C)에 보관하였다.

## 3. 지방산 메틸에스테르의 조제

지방산 메틸 에스테르 조제는 추출, 정제한 총지방질을 사용하여  $\text{BF}_3$ -메탄올법<sup>5,7)</sup>, 염산-메탄올법<sup>2)</sup>, 나트리움 메톡사이드-메탄올법<sup>18)</sup>, 그리고 tetramethylammonium hydroxide-메탄올법<sup>21)</sup> 등 4 가지 방법을 다소 변형시켜 아래와 같이 행하였다.

$\text{BF}_3$ -메탄올법: 50 ml 환저(丸底) 플라스크에 정제한 지방질 약 200mg 와 0.5N 수산화 나트리움 메탄올 용액 4.5 ml 를 넣고 리비히 냉각기에 연결한 후 마이크로 퀼달 분해장치에서 10분간 가열하였다. 다음에 15%  $\text{BF}_3$ -메탄올 용액 5 ml 를 리비-

히 냉각기 상부로부터 가하여 2분간 가열하고 헬탄 4 ml 역시 리비히 냉각기 상부로부터 가하여 1분간 더 가열하였다. 가열을 중단한 다음 플라스크를 떼어 내어 포화염화 나트리움 용액 4 ml를 가한 후 헬탄 충을 무수황산 나트륨 100 mg 가량 없어 놓은 Whatman No. 42 여과지(헬탄으로 미리 적셔 놓음)로 여과하여 10 ml cap 시험관에 옮겨 담은 뒤 가스 크로마토그래피 분석용 시료로 하였다(Table 1 참조).

**염산-메탄올법** : 50 ml 환저 플라스크에 지방질 200 mg 을 취하여 넣고 테트라하이드로푸란 4 ml로 녹인 다음, 5% 염산 메탄올(염화 아세틸을 냉메탄올에 가하여 만든) 8 ml를 가하여 리비히 냉각기를 부착시켜 놓은 마이크로 퀄탈 분해장치에서 2시간 동안 가열하였다. 플라스크를 떼어 낸 다음 5% 염화 나트륨 용액 10 ml를 가하고 지방산 메틸에스테르는 혼산 5 ml로 3회 추출하고, 2% 중탄산 칼륨 용액 5 ml로 2회 세척 후 무수황산 나트륨 100 mg 가량 없어 놓은 Whatman No. 42 여과지(혼산으로 미리 적셔 놓음)로 여과한 것을 5 ml로 농축하여 시험관에 담아 가스 크로마토그래피 분석용 시료로 하였다(Table 1 참조).

**나트륨메톡사이드-메탄올법** : 20 ml screw cap 시험관에 지방질 200 mg 을 넣고 석유 에테르 7 ml로 녹인 다음 2N 나트륨 메톡사이드 메탄올 용액 1.4 ml를 가한 후 즉시 시험관 진탕기로 30초간 진탕하여 실온에서 5분간 방지하였다. 다음에 증류수 약 3 ml를 가하여 분리된 상층을 Whatman No. 42 여과지(석유 에테르로 여과지를 미리 적셔 놓음)로 여과하여 시험관에 담아 가스 크로마토그래피 분석용 시료로 하였다(Table 1 참조).

**Tetramethylammonium hydroxide-메탄올법** : 지방질 200 mg 을 20 ml screw cap 시험관에 취하여 넣고 에틸 에테르 3 ml로 녹인 다음 20% tetramethylammonium hydroxide-메탄올 용액 200  $\mu$ l를 가한 직후 시험관 진탕기로 2분간 진탕하여 실온에서 5분간 방지하였다. 여기에다 thymol blue 지시약 한 방울을 가하고 0.2N 염산 메탄올 용액 약 1.4 ml로 반응액의 청색을 황색으로 변화시킨 다음 가스 크로마토그래피 분석용 시료로 사용하였다(Table 1 참조).

#### 4. 가스 크로마토그래피

상기의 방법들에 따라 조제한 지방산 메틸 에스테르는 수소염 이온화 겹출기가 부착된 Hitachi 163 가

Table 1. Conditions for preparing fatty acid methyl esters from Korean white and black sesame seed lipids according to boron trifluoride ( $BF_3$ ) -methanol, hydrochloric acid (HCl)-methanol, sodium methoxide ( $NaOCH_3$ ) -methanol and tetramethylammonium hydroxide (TMAH) -methanol procedures

	Sample (mg)	Heating or leaving time (min.)	Extraction step	Washing step	Filtration step	Evaporation step	Time required (min.)	Volume of extract or reaction mixture (ml)
$BF_3$ -methanol	200	13	Yes	Yes	Yes	No	20	3
HCl-methanol	200	120	Yes	Yes	Yes	Yes	140	5
$NaOCH_3$ -methanol	200	5	No	Yes	Yes	No	10	6
TMAH-methanol	200	5	No	No	No	No	10	5

스 크로마토그래피로 다음과 같은 조건 하에서 분석하였다. 판은 길이가 2m이고, 내경이 3mm인 유리관으로서 충진제로 10% DEGS(담체: 60~80 메쉬의 Shimalite WAW, DMCS)를 사용하였다. 판의 초기온도는 130 °C였으며 이 온도에서 1분동안 기다린 후 판의 최종온도 195 °C까지는 분당 2 °C 상승시켰다. 시료 주입구 및 검출기의 온도는 230 °C, 질소 유량은 분당 44 ml, 수소 유량은 분당 38 ml, 공기 유량은 분당 560 ml, 감도는  $10^2 \times 8$ , 기록지 속도는 분당 5 mm, 그리고 시료 주입량은 2 ~ $3\mu l$ 였다. 분리된 지방산 메틸 에스테르의 피이크 면적과 총피이크 면적에 대한 각 피이크 면적의 백분율은 적분기(모델 TR-2220A, Takeda 理研공업 주식회사, 일본)로 계산하였다. 각 지방산 둘정은 지방산 표준품의 머무름 시간으로 행하였는데 각 지방산 표준품을 단독으로 분석시료에 넣어 분석시 실제로 지방산 표준품이 해당 지방산 피이크와 일치하는지의 여부를 재확인하였다.

### III. 결 과

흰 참깨 지방질의 지방산 메틸 에스테르를  $\text{BF}_3$ -메탄올법, 염산-메탄올법, 나트륨 메톡사이드-메탄올법, tetramethylammonium hydroxide-메탄올법 등 4 가지 방법으로 조제한 것을 가스 크로마토그래피로 분석한 크로마토그램은 Fig. 1에서 Fig. 4 까지에 표시되어 있는 바와 같다. 확인된 지방산은 14 : 0에서 24 : 0까지 12종류였다. 이를 크로마토그램에서 볼 수 있는 바와 같이  $\text{BF}_3$ -메탄올법, 나트륨 메톡사이드-메탄올법, tetramethylammonium hydroxide-메탄올법 등의 크로마토그램은 거의 동일한 패턴을 보여준 반면 염산-메탄올법에서는 불순물 피이크(검은색 피이크)들이 용매 피이크와 14 : 0사이 그리고 17:0과 18:0 사이에 각각 출현하여 상이한 패턴을 보여주고 있다. 검은 참깨에서도 역시 흰 참깨에서와 동일한 경향을 보여주었다.

흰 참깨 지방질의 지방산 조성에 대한 메틸 에스테르 조제방법들의 영향을 검토한 결과가 Table 2에 표시되어 있다. 지방산 중 0.9% 이상의 수준을 보인 지방산 즉 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 등의 지방산은 메틸 에스테르 조제방법에 따른 영향을 받지 않았다. 반면에 0.9% 이하의 수준인 16:1, 20:0, 20:2, 22:0, 24:0 등의 지방산은  $\text{BF}_3$ -메탄올법, 나트륨 메톡사이드-메탄올법 그리고 tetr-

amethylammonium hydroxide-메탄올법 등에서는 거의 동일한 값들을 보여준 반면 염산-메탄올법에서만 가장 낮은 값을 보여 주었다. 14:0의 경우 0.01에서 0.02% 사이로 상당히 미량이어서 메틸 에스테르 조제방법간의 비교는 곤란하다고 본다. 지방산 수준 즉 포화 지방산 총합량, 2중 결합 1개를 가진 지방산 총합량, 고도 불포화 지방산 총합량, 불포화 지방산 총합량, P/S비, U/S비 등에서 모두 지방산 메틸 에스테르 조제방법들에 따른 영향을 찾아 볼 수 없었다.

Table 3은 검은 참깨 지방질의 지방산 조성에 대한 지방산 메틸 에스테르 조제방법들의 영향을 살펴본 결과이다. 역시 흰 참깨 지방질의 지방산 조성에서와 같이 0.9% 이상인 지방산들은 조제방법에 관계없이 거의 동일한 수준들을 보여 주었다. 0.9% 이하의 지방산 중 16:1, 20:0, 22:0, 24:0 등의 지방산이 염산-메탄올법에서 가장 낮은 값을 보여주었으나 기타의 방법들에서는 동일한 수준들이었다. 지방산 수준들간의 비교에서는 흰 참깨에서와 같이 사용한 4 가지 방법들간에 차이가 나타나지 않았다.

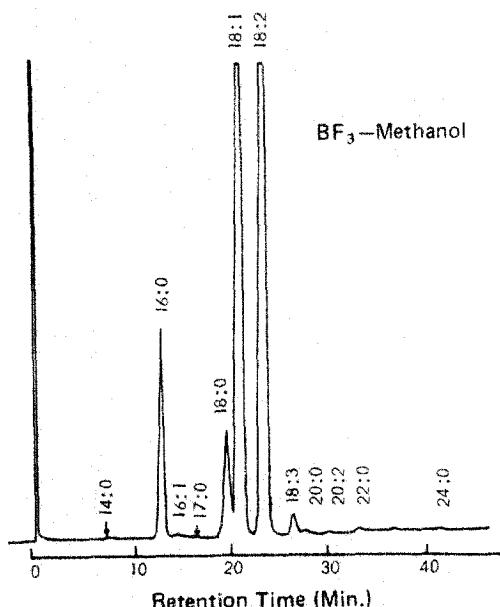


Fig. 1. Typical gaschromatogram of fatty acid methyl esters from white sesame seed lipids prepared by  $\text{BF}_3$ -methanol procedure.

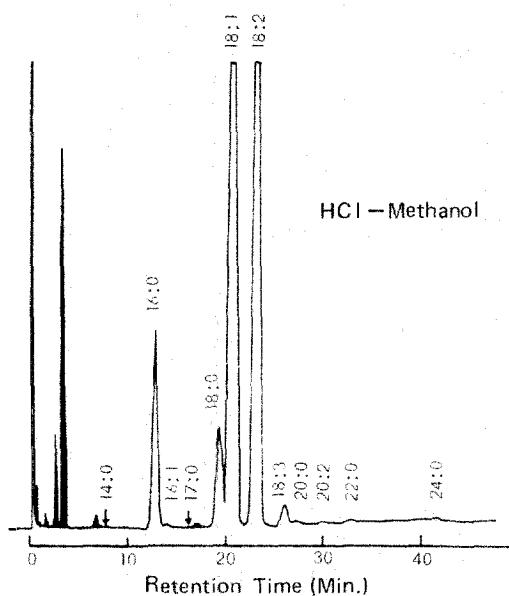


Fig. 2-1. Typical gaschromatogram of fatty acid methyl esters from white sesame seed lipids prepared by HCl-methanol procedure. The black color peaks are by-products and/or artefacts occurred in the procedure.

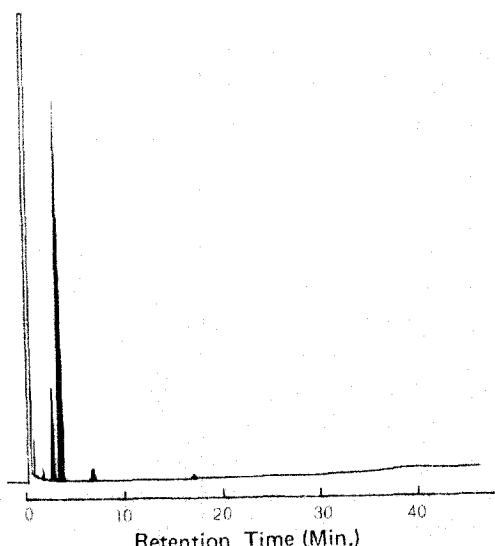


Fig. 2-2. Typical gaschromatogram of blank prepared by HCl-methanol procedure. The black color peaks are by-products and/or artefacts occurred in the procedure.

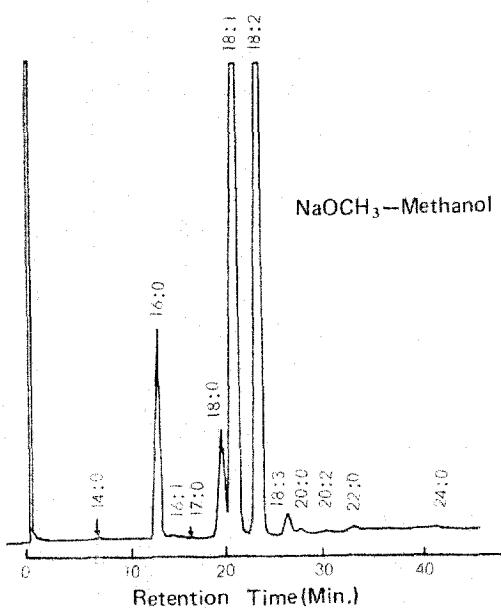


Fig. 3. Typical gaschromatogram of fatty acid methyl esters from white sesame seed lipids prepared by sodium methoxide-methanol procedure.

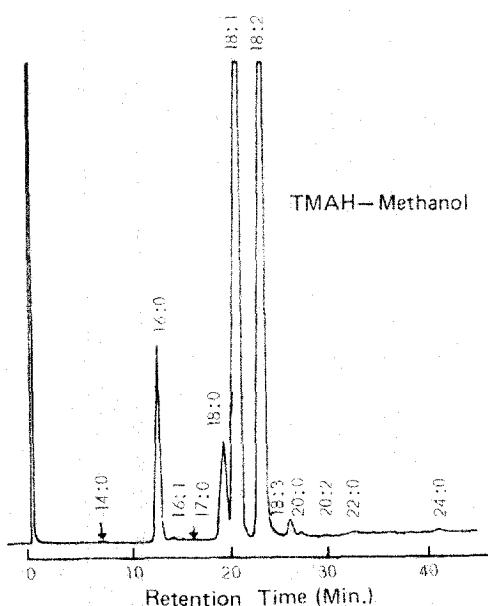


Fig. 4. Typical gaschromatogram of fatty acid methyl esters from white sesame seed lipids prepared by tetramethylammonium hydroxide-methanol procedure.

Table 2. Fatty acid composition (% of total fatty acids) of Korean white sesame seed lipids by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters prepared by four different procedures<sup>a</sup>

Fatty acid	BF <sub>3</sub> —Methanol (n=5)	HCl—Methanol (n=5)	NaOCH <sub>3</sub> —Methanol (n=5)	TMAH—Methanol <sup>b</sup> (n=5)
14:0	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
16:0	8.84±0.07	8.82±0.31	8.24±0.04	8.38±0.10
16:1	0.11±0.02	0.07±0.01	0.12±0.02	0.11±0.00
17:0	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00
18:0	4.20±0.07	4.13±0.28	4.15±0.19	4.08±0.26
18:1	41.73±0.08	41.46±0.99	41.80±0.14	41.32±0.60
18:2	42.83±0.44	43.28±0.54	43.84±0.18	43.80±0.45
18:3	0.97±0.00	0.94±0.03	0.95±0.01	0.89±0.01
20:0	0.17±0.01	0.13±0.01	0.17±0.01	0.16±0.01
20:2	0.07±0.01	0.03±0.00	0.05±0.04	0.07±0.03
22:0	0.31±0.10	0.25±0.19	0.29±0.12	0.37±0.26
24:0	0.08±0.01	0.03±0.03	0.09±0.00	0.08±0.00
Others	0.77±0.44	0.88±1.18	0.39±0.19	0.83±0.98
Saturates	13.59±0.09	13.36±0.14	12.91±0.13	13.06±0.03
Monounsaturates	41.84±0.09	41.53±1.00	41.92±0.12	41.43±0.60
Polyunsaturates	43.80±0.45	44.22±0.56	44.78±0.17	44.68±0.45
Total unsaturates	85.64±0.52	85.75±1.30	86.70±0.27	86.11±1.00
P/S <sup>c</sup>	3.2	3.3	3.5	3.4
U/S <sup>d</sup>	6.3	6.4	6.7	6.6

<sup>a</sup>Expressed as mean ± standard deviation.<sup>c</sup>Polyunsaturated/saturated fatty acid ratio.<sup>b</sup>Tetramethylammonium hydroxide.<sup>d</sup>Total unsaturated/saturated fatty acid ratio.

#### IV. 고 칠

지방질의 지방산 조성을 가스 크로마토그래피로 분석하기 앞서 먼저 지방산을 비교적 휘발성인 메틸 에스테르 유도체로 조제하는 것이 필수적이다. 메틸 에스테르 조제방법에 대하여 여러 사람들<sup>1,2,3,9,20,24~26</sup>이 검토, 고찰하였지만 아직 한 가지의 조제방법으로 모든 연구 시료의 지방질의 지방산 조성 연구 목적을 충족시킬 수가 없으므로 연구자는 항상 연구 시료 지방질의 특성과 그 구성 지방산 조성에 가장 적합한 방법을 선택하도록 주의를 기울여야만 한다. 현재 많이 쓰이고 있는 조제방법들로는 BF<sub>3</sub>—메탄올법, 염산 또는 황산—메탄올법, 나트륨 메톡사이드—메탄올법, tetramethylammonium hydrox-

ide—메탄올법 등을 들 수 있는데 이들 방법을 본 연구에 사용하여 함께 지방질의 지방산 조성에 미치는 영향을 검토하였다.

BF<sub>3</sub>—메탄올법은 1961년 Metcalfe 와 Schmitz<sup>3</sup>가 가스 크로마토그래피 분석용 지방산 메틸 에스테르 조제에 최초로 사용한 이후 계속 개선되어 왔다. 현재는 Firestone 과 Horwitz<sup>6,1</sup>가 발표한 방법을 AOAC<sup>7</sup>에서 채택하여 사용되고 있는데 본 연구에서도 이 방법으로 메틸 에스테로를 조제하여 본 바나트륨 메톡사이드—메탄올이나 tetramethylammonium hydroxide—메탄올법 등과 거의 동일한 지방산 조성을 보여 주었다. 함께 지방질의 지방산에는 BF<sub>3</sub>—메탄올법을 사용할 경우 문제점을 나타내는 지방산인 4:0과 같은 단체 지방산이나 epoxy, hydroperoxy, ketone, cyclopropyl, cyclopropenyl 기

Table 3. Fatty acid composition (% of total fatty acids) of Korean black sesame seed lipids by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters prepared by four different products<sup>a</sup>

Fatty acid	BF <sub>3</sub> —Methanol (n=5)	HCl—Methanol (n=5)	NaOCH <sub>3</sub> —Methanol (n=5)	TMAH—Methanol <sup>b</sup> (n=5)
14:0	0.02±0.00	0.02±0.00	0.03±0.01	0.02±0.01
16:0	9.69±0.07	9.40±0.41	9.50±0.02	9.58±0.19
16:1	0.11±0.01	0.08±0.00	0.12±0.01	0.12±0.02
17:0	0.04±0.01	0.03±0.01	0.03±0.02	0.05±0.03
18:0	4.00±0.08	4.48±0.76	4.54±0.05	4.14±0.42
18:1	39.78±0.27	40.22±0.51	40.19±0.16	39.76±0.71
18:2	43.85±0.45	44.20±0.95	43.20±0.27	44.31±0.92
18:3	0.98±0.01	0.95±0.04	1.02±0.01	0.94±0.01
20:0	0.18±0.00	0.13±0.01	0.17±0.01	0.16±0.01
20:2	0.09±0.02	0.10±0.02	0.07±0.05	0.06±0.04
22:0	0.36±0.14	0.17±0.10	0.57±0.18	0.37±0.17
24:0	0.08±0.01	0.02±0.02	0.08±0.01	0.08±0.00
Others	0.94±0.63	0.36±0.11	0.59±0.23	0.51±0.43
Saturates	14.32±0.10	14.20±0.41	14.88±0.19	14.36±0.58
Monounsaturates	39.89±0.28	40.30±0.52	40.31±0.18	39.88±0.73
Polyunsaturates	44.83±0.46	45.14±0.99	44.22±0.26	45.25±0.91
Total unsaturates	84.72±0.69	85.44±0.50	84.53±0.15	85.13±0.42
P/S <sup>c</sup>	3.1	3.2	3.0	3.2
U/S <sup>d</sup>	5.9	6.0	5.7	5.9

<sup>a</sup>Expressed as mean ± standard deviation.<sup>c</sup>Polyunsaturated/saturated fatty acid ratio.<sup>b</sup>Tetramethylammonium hydroxide.<sup>d</sup>Total unsaturates/saturated fatty acid ratio.

등을 갖고 있는 지방산 등이 없기 때문에<sup>6)</sup> 이 방법의 사용으로 특이한 지방산 조성의 차이가 나타나지 않았다고 보면, 아울러 함께 기름에만 있는 항산화제로 작용하는 sesamol, sesamolin, sesamin 등의 영향도 없는 것 같다. 따라서 함께 지방질의 지방산 분포와 비슷한 식물성 기름에 충분히 사용할 수 있다고 본다. 아울러 동물성 유지나 유리지방산 등에도 적용 가능하다.<sup>6)</sup> BF<sub>3</sub>—메탄올법으로 한국산 함께 기름의 지방산 조성을 조사한 결과<sup>27,28)</sup>에 따르면 14:0, 16:1, 17:0, 20:2, 22:0, 24:0 등의 지방산들이 보고되어 있지 않은데 이는 메틸에스테르 조제 과정 중에 일어난 결과에 의한 것보다는 지방산 분석조건의 불량에 따른 피이크 분리 미비나 분리되어 나온 피이크를 동정하지 못한 경우에 의한 것으로 보인다. 본 연구의 각 지방산과의 함량 비교는 품종의 차이, 수확시기, 재배지 등의 상이로 의

미가 없다고 생각된다.

염산—메탄올법 사용시 가스 크로마토그램에 불순물 피이크가 출현하였는데 이 불순물 피이크는 메틸에스테르 조제에 사용한 5% 염산—메탄올(염화아세틸을 냉메탄올에 가하여 만드는 방법에 따라 조제하여 사용) 용액 조제시 부산물로 생성된 메틸아세테이트와 2시간 동안 반응시키는 동안에 생성되었을지도 모를 artefact 등인 것으로 여겨진다. 지방산 조성 중 16:1, 20:0, 22:0, 24:0 등 0.9% 이하 수준을 나타낸 지방산들이 여타 3 가지 조제방법들에 비하여 낮은 값을 나타내었는데 이는 실제로 염산—메탄올법이 이를 지방산 메틸에스테르 생성에 영향을 미친 것인지 아니면 본 연구에 사용된 촉매의 농도, 반응시간, 반응온도, 회수과정, 세척과정 등의 요인에 의하여 일어난 것인지 확실치 않으므로 앞으로 더 검토해 보아야만 한다고 본다.

나트륨 메톡사이드 - 메탄올법은  $\text{BF}_3$  - 메탄올법이나 tetramethylammonium hydroxide - 메탄올법 등과 거의 동일한 지방산 조성을 나타내었다. 본 연구에 사용한 이 방법은 나트륨 메톡사이드 농도가 2N로 타의 방법들<sup>2,20</sup>보다 4배가 높아 반응온도를 50~80°C에서 실온으로 낮출 수 있을 뿐만 아니라 반응시간을 10~20분에서 5분 이내로 줄일 수 있는 장점을 갖고 있다. 뿐만 아니라 조제된 메틸 에스테르의 추출 과정이나 농축 과정도 없다. 그러나 유리 지방산을 메틸 에스테르로 전환시키지 못하는 단점이 있어서 유리 지방산을 함유한 지방질의 총지방산 조성 분석에 사용될 수 없다. 그러나 존재하는 유리 지방산 함량이 총지방산 조성에 영향을 미치지 않을 정도로 미량이거나 또는 유리 지방산이 없는 지방질의 지방산 조성 조사에는 충분히 사용될 수 있는 방법이다. 이 방법으로 한국산 참깨 기름의 지방산 조성을 조사한 결과<sup>29,30</sup>에 따르면 지방산으로 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 등의 지방산만 보고되어 있어서 본 연구에서 분리해낸 지방산 종류에 훨씬 못 미치는 숫자이다. 이는  $\text{BF}_3$ -메탄올법에서 기술한 동일한 사유에 기인한다고 본다.

무기염기 측매 methanolysis (transesterification)는 유리 지방산에 사용할 수 없고 또 형성된 메틸 에스테르의 비가역 검화를 방지하기 위하여 거의 무수 조건 하에서 행하여야만 하는 단점이 있는데 유기염기인 (m-trifluoromethylphenyl) trimethylammonium hydroxide를 사용하면 글리세리드의 methanolysis 가 실온에서도 신속히 정량적으로 이루어 진다. 동시에 유리 지방산은 (m-trifluoromethylphenyl) trimethylammonium 염으로 전환되어 가스 크로마토그래피의 고온의 주입구에서 열분해되어 메틸 에스테르로 되기 때문에 유리 지방산의 transesterification 에도 사용될 수 있게 되었다.<sup>20</sup> 이 유기염기는 값이 비싼 것이 다소 흠인데 최근 값싼 tetramethylammonium hydroxide를 사용한 방법<sup>21</sup>이 개발되어 이 방법을 사용하여 본 바 염산 - 메탄올법을 제외한 기타의 방법과 잘 일치하는 결과를 보여 주었다. 전술한 3가지 조제방법들과는 달리 본 방법은 sesamol, sesamolin, sesamin 등이 함유되어 있는 불검화물을 제거하지 않은 지방산 메틸 에스테르 조제 최종 반응 혼합물을 취하여 가스 크로마토그래피로 분석하게끔 되어 있는데도 불검화물을 제거한 뒤 분석하는 여타 방법들에 비하여 가스 크로마토그램상에 인지할 만한 패턴 변화가 전연 없었

다. 그렇지만 불검화물과 함께 주입하기 때문에 이 불검화물들은 판(packed column)내의 충진체(주로 시료 주입구와 연결되어 있는 판 앞 부분의 충진체)에 흡착되어 있을 가능성이 크므로 다양한 시료나 장기간 시료를 분석할 시 지방산 분리능을 저하시키는 원인 중의 하나가 될 소지를 갖고 있다. 그리고 capillary glass column으로 이 방법에 의해 조제된 참깨 지방질의 지방산 메틸 에스테르를 분석할 경우 먼저 지방산 메틸 에스테르 혼합물과 함께 주입되는 sesamol, sesamolin, sesamin 등이 함유된 불검화물의 영향 유무를 파악해 볼 필요성이 있다. 본 연구에 사용한 이 방법은 ① 나트륨 메톡사이드 - 메탄올법과 함께 가장 단시간에 과정을 완료할 수 있으며, ② 유리 지방산의 transesterification에도 사용될 수 있고, ③ 추출, 세척, 농축 등의 단계가 생략되어 시료의 오염이나 손실의 염려가 없어서 단체에서 장래에 까지 광범위하게 분포하고 있는 지방산들을 함유하고 있는 시료에도 사용 가능하고, ④ 총지방산 조성, 글리세리드 지방산 조성, 유리 지방산 조성 등을 다 조사할 수 있고, ⑤ 가격이 저렴하며 과정이 단순하여 누구나 쉽게 행할 수 있는 장점을 갖고 있다.

이상 살펴 본 바와 같이 아직 완벽한 메틸 에스테르 조제방법이 개발되어 있지난 않지만 현재 많이 쓰이고 있는 방법들을 요약해 보면 아래와 같다.

$\text{BF}_3$ -메탄올법은 가열과 추출 등의 과정에 있어서 단체 지방산을 함유한 시료보다는 장체 지방산을 함유한 지방산 조성에 사용하는 것이 바람직하다고 생각되는데 탄소수 20개 이상의 장체 고도 불포화 지방산 함량이 많은 시료에 사용하려고 할 경우 지방산의 산화나 artefact 생성 방지에 유의해야 할 것이다. 염산 - 메탄올법은 장체 지방산의 메틸 에스테르 조제에 사용 가능하지만 과정 완료에 시간이 너무 많이 걸려 선호받을 경향이 없을 것 같다. 나트륨 메톡사이드 - 메탄올법은 유리 지방산에는 사용될 수 없는 단점을 갖고 있지만 과정에 소요되는 시간이나 기타 과정이 많이 단순화되어 유리 지방산이 크게 문제시되지 않을 시료나 유리 지방산 이외의 지방질에는 충분히 사용 가능하다. Tetramethylammonium hydroxide - 메탄올법은 최근에 개발된 방법으로 전술한 바와 같은 여러 장점을 갖고 있기 때문에 현재 쓰이고 있는 통상적인 방법( $\text{BF}_3$ -메탄올법, 나트륨 메톡사이드 - 메탄올법, 염산 또는 황산 - 메탄올법 등) 중에서 가장 많이 사용되리라 보여지며 한국산 기름의 지방산 조성뿐만 아니라 단

쇄에서 장쇄의 포화나 불포화 지방산을 막론하고 여러 지방산을 함유한 시료에도 사용될 수 있다고 본다.

## V. 결 론

한국산 각종 식물성 기름의 지방산 조성을 가스 크로마토그래피로 분석할 시 사용할 간단하면서도 신속하고 정확한 지방산 메틸 에스테르 조제방법을 찾고자 현재 많이 쓰이고 있는  $\text{BF}_3$ -메탄올법, 염산-메탄올법, 나트륨 메톡사이드-메탄올법, tetramethylammonium hydroxide-메탄올법 등 4가지 방법을 사용하여 우리나라 식물성 기름의 지방산 분포를 대표할 수 있는 참깨 기름(지방질)의 지방산 조성에 각 조제방법이 어떤 영향을 미치는지 조사, 비교하였다. 흰 참깨 및 검은 참깨 지방질의 구성 지방산으로 14:0에서 24:0까지 12종류를 확인하였다. 참깨 지방질의 지방산 중 0.9% 이상인 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 등의 지방산은 메틸 에스테르 조제방법의 영향을 받지 않았으며 반면에 0.9% 이하의 지방산인 16:1, 20:0, 22:0, 24:0 등의 지방산은 염산-메탄올법에서만 가장 낮은 수준을 보여 주었고 기타의 방법들에서는 동일한 수준이었다. 지방산 지수들에서는 조제방법들에 따른 영향은 없었다. 그리고 sesamol, sesamolin, sesamin 등이 포함된 불검화물이 들어 있는 지방산 메틸 에스테르의 최종 반응 혼합액을 주입하여 분석하는 tetramethylammonium hydroxide-메탄올법은 불검화물을 제거한 뒤 분석하는 방법 중  $\text{BF}_3$ -메탄올법이나 나트륨 메톡사이드-메탄올법 등에 비하여 지방산 조성에 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과로 미루어 보아 우리나라 식물성 기름의 지방산 조성 조사시 사용할 수 있는 메틸 에스테르 조제방법들로는  $\text{BF}_3$ -메탄올법, 나트륨 메톡사이드-메탄올법, tetramethylammonium hydroxide-메탄올법 등을 들 수 있지만 이들 중에서 간단하면서도 신속, 정확하고 보편적으로 널리 사용하기에 알맞은 방법은 tetramethylammonium hydroxide-메탄올법이라고 생각된다.

## 문 헌

- Dickes, G. J. and Nicholas, P. V.: In *Gas Chromatography in Food Analysis*, Butterworth & Co (Publishers) Ltd., London, pp.

- 65-67 (1978)
- Christie, W. W.: In *Lipid Analysis*, 2nd ed., Pergamon Press Ltd., Oxford, pp. 51-56 (1982)
- Metcalfe, L. D. and Schmitz, A. A.: *Anal. Chem.*, **33**, 363 (1961)
- Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R.: *Anal. Chem.*, **38**, 514 (1966)
- van Wijngaarden, D.: *Anal. Chem.*, **39**, 848 (1967)
- Firestone, D. and Horwitz, W.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 709 (1979)
- Association of Official Analytical Chemists: In *Official Methods of Analysis*, 14th edn, Virginia, pp. 513-514, method 28.056(1984)
- Roper, R. and Ma, T. S.: *Microchem. J.*, **1**, 245(1957)
- Vorbeck, M. L., Mattick, L. R., Lee, F. A. and Pederson, C. S.: *Anal. Chem.*, **33**, 1512(1961)
- Stoffel, W., Chu, F. and Ahrens, E. H.: *Anal. Chem.*, **31**, 307(1959)
- Rogozinski, M.: *J. Gas Chromatogr.*, **2**, 136 (1964)
- Guthrie, H. A., Picciano, M. F. and Dennis, S.: *J. Pediatr.*, **90**, 39(1977)
- Supelco, Inc., Bellefonte: Esterification and acylation, *GC Bulletin* **721G**, 1-7(1979)
- Kneebone, G. M., Kneebone, R. and Gibson, R. A.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **41**, 765(1985)
- Maurikos, P. J. and Eliopoulos, G.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 174(1973)
- de Man, J. M.: *J. Dairy Sci.*, **47**, 546(1964)
- Christopherson, S. W. and Glass, R. L.: *J. Dairy Sci.*, **52**, 1289(1969)
- Gibson, R. A. and Kneebone, G. M.: *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 252(1981)
- MacGee, J. and Allen, K. G.: *J. Chromatogr.*, **100**, 35(1974)
- McCreary, D. K., Kossa, W. C., Ramachandran, S. and Kurtz, R. R.: *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 329(1978)
- Metcalfe, L. D. and Wang, C. N.: *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 530(1981)
- Mason, M. E. and Waller, G.: *Anal. Chem.*, **36**, 583(1964)

23. Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H.: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497(1957)
24. Sheppard, A. J. and Iverson, J. L.: *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 448(1975)
25. Ackman, R. G.: In *Methods in Enzymology*. Chapter 49 in Gas-Liquid Chromatography of Fatty Acids and Esters, Vol. 14, Lowenstein, J. M. ed., Academic Press, New York-London, pp. 354-357(1969)
26. Freedman, B., Pryde, E. H. and Mounts, T. L.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1638(1984)
27. 辛孝善: 한국식품과학회지, **5**, 113(1973)
28. 黃敬鐵, 許遇德, 南營重, 閔丙容: 한국농화학회지, **26**, 157(1983)
29. 李正日, 志賀敏夫, 高柳謙治: 농사시험연구보고(작물원), **16**, 53(1974)
30. 李正日, 姜哲煥: 韓國作物學會誌, **25**, 54(1980)