

트리글리세리드 분자종의 산화안정성에 관한 연구

윤형식 · 김선봉 · 박영호

부산수산대학 식품공학과

Autoxidative Stability of Triglyceride Molecular Species

Hyeung-Sik Yoon, Seon-Bong Kim, Yeung-Ho Park

Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan, 609-735, Korea

Abstract

The influence of triglyceride molecular species on autoxidation was investigated by determining the residual molecular species after incubating soybean oil triglycerides. The molecular species of soybean oil triglycerides were analyzed by capillary column gas chromatography and electron impact ionization mass spectrometry utilizing selected ion monitoring. The autoxidative stability of each molecular species in soybean oil triglycerides appeared to decrease in proportion to the increase in the number of double bonds present in the acyl residues, and it was affected by degree of unsaturation of fatty acid when the number of double bonds in triglyceride were the same. And it appeared to be enhanced by a decreases in the length of the saturated acyl chain present in the glycerides.

서 론

유지의 산화는 영양가치의 감소, 맛의 변질, 유독한 물질의 생성을 초래한다. 따라서 저장중 유지의 산화안정성을 증대시킨다는 것은 중요한 일이다. 이러한 천연유지의 주성분인 트리글리세리드는 구성지방산의 종류에 따라 많은 종류의 분자종으로 구성되어 있기 때문에¹⁻⁶⁾ 트리글리세리드의 산화기구를 밝히는 데는 트리글리세리드 분자종과 산화안정성과의 관계를 명확히 할 필요가 있다.

그러나 종전에는 트리글리세리드 분자종의 분석상의 제약등으로 인하여 유지의 자동산화현상은 단순히 구성불포화지방산의 산화기구로서 설명되어져 왔을 뿐이다. 그런데 최근에 이르러 분석기술의 향상으로 인하여 트리글리세리드의 산화기구를 분자종레벨에서 검토한 연구결과들이 보고되고 있으나 이들의 결과가 서로 상반된 견해를 나타내고 있어 관심을 끌고 있다.

즉, 트리글리세리드의 산화안정성은 글리세롤에의 불포화지방산의 결합위치에 따라 영향을 받으며 포화지방산의 acyl기의 사슬길이는 아무런 영향을 미치지 않는다는 주장과⁷⁻⁹⁾ 트리글리세리드의 산화안정성은 불포화지방산의 결합위치에 관계없이 트리글리세리드를 구성하는 지방산의 불포화도와 포화지방산의 acyl기의 사슬길이에 영향을 받는다는 주장이¹⁰⁻¹²⁾ 서로 엇갈리고 있는 등, 식물유 트리글리세리드의 자동산화현상에 관해서는 아직도 불명한 점이 많은 실정이다.

그래서 본 연구에서는 식물유 트리글리세리드 분자종의 산화안정성과의 관계를 명확히 밝히기 위하여 산화시킨 대두유 트리글리세리드를 모델 시료로 하여 capillary column GLC와 GCMS를 병용하는 분석방법으로 트리글리세리드 분자종과 산화안정성과의 관계를 조사·검토하였다.

재료 및 방법

트리글리세리드

시판 정제유인 대두유(soybean oil, 日本東京都所在 林市次商店製)를 소량의 hexane에 녹여 규산(silicic acid)과 구조토를 2:1의 비율로 섞어서 채운 유리 컬럼(29mm i.d.×0.5m)에 주입한 다음 용출액으로서 hexane(240ml), 6% ether/hexane(300ml), 10% ether/hexane(300ml)을 차례로 흘려서 15ml씩의 획분을 얻었다. 이들 획분중 TLC(전개용매, petroleum ether:diethylether:acetic acid, 80:20:1, v/v%:발색시약, 2', 7'-dichlorofluorescein)에 의해 동정된 트리글리세리드 획분만을 모아서 -70℃ 동결고에 보관하면서 실험에 공시하였다.

트리글리세리드의 산화

시료 트리글리세리드 5g을 50ml의 유리병에 넣어 60℃의 항온조내에서 자석교반기로 교반하면서 산화실험을 행하였다.

트리글리세리드의 지방산분석

시료 트리글리세리드를 14% BF₃-methanol을 사용하여 지방산 methylester로 만든 다음 GLC(Shimadzu GC-8A)로써 분석하였으며, 분석조건은 컬럼: Supelco Wax 10 fused silica open tubular (FSOT) capillary column(30m×0.25mm i.d., 0.25μm in film thickness), carrier gas: helium 20ml/min, 컬럼온도: 195℃, 검출기온도: 250℃, FID이었다.

트리글리세리드의 분자중 분석

시료 트리글리세리드를 chloroform에 용해시켜 0.02%용액으로 만든 다음 이것의 0.1~0.2μl을 GLC(Shimadzu GC-12A)에 주입하여 분석하였다. 분석 조건은 컬럼: MP65HT FSOT capillary column(65% methylphenylsilicone, 0.1μm in thicknes, 25m×0.25mm i.d.), carrier gas: helium, 30ml/min, 컬럼온도: 345℃, 검출기온도: 370℃, FID이었다. 그리고 위의 capillary column GLC에 의해 분리된 각 peak의 동정은 전보¹³⁾와 같이 GC/MS(Shimadzu QP 100, EI source)의 SIM을 분석하여 행하였는데, 분석조건중 GC부분은 컬럼의 길이(15m×0.25mm i.d.)

를 제외하고는 위의 GLC분석조건과 똑같으며 MS부분의 분석조건은 다음과 같다. 이온源온도: 330℃, 이온화전압: 70eV, 가속전압: 3kV.

산화 대두유 트리글리세리드의 분자중분석

산화된 대두유 트리글리세리드에 내부표준물질로 tripalmitin을 가하여 TLC(전개용매, petroleum ether:diethylether:acetic acid, 80:20:1, V/V%:발색시약, 2', 7'-dichlorofluorescein)에 전개시킨 후 트리글리세리드 획분만을 분취해 capillary column GLC를 이용하여 내부표준법으로 각 트리글리세리드 분자중의 산화에 따른 함량변화를 정량적으로 분석하였다.

과산화물가(peroxide value, POV)의 측정

John등¹⁴⁾의 방법에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 즉 50mg의 시료 트리글리세리드에 chloroform을 가해 50ml로 정용한 다음, 5ml을 cap tube에 취하여 45℃에서 질소gas로 용매를 완전히 제거하였다. 계속하여 질소gas를 흘리면서 5ml의 acetic acid:chloroform (3:2) 용액과 증류수 5ml에 potassium iodide 6g을 녹인 용액 0.25ml을 차례로 가한 다음 잘 흔들어 실온, 암소에서 5분간 방치하였다. 그 후 cadmium acetate 0.5g을 100ml의 증류수에 녹인 용액 15ml을 가하고, 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액의 흡광도를 353nm에서 측정하여 아래 식에 의해서 시료 용액 1l 중의 cumene hydroperoxide의 농도로 환산하여 POV를 산출하였다.

$$POV(\text{mol/l}) = \frac{A \times D}{\epsilon \times b}$$

A: 353nm에서 시료의 흡광도

ε: cumene hydroperoxide의 몰흡광계수,

$$1.73 \times 10^4 \text{M}^{-1}$$

b: 시료용기의 길이 1cm

D: 회석배수

결과 및 고찰

대두유 트리글리세리드의 분자중분석

규산 컬럼크로마토그래피에 의하여 대두유에서 분

확한 트리글리세리드의 지방산조성을 Table 1에 나타내었다. 그 결과 대두유 트리글리세리의 주요 지방산은 C_{18:2}, C_{18:1}, C_{16:0}, C_{18:3}인 것으로 밝혀졌다.

그리고 Fig.1에 대두유 트리글리세리드의 capillary

Table 1. Fatty acid composition of soybean oil triglyceride. (%)

Fatty acid	Mean±S.D.* ^(a)
14:0	0.07±0.00
15:0	0.04±0.00
16:0	10.62±0.42
16:1 n-7	0.08±0.00
17:0	0.11±0.00
17:1 n-8	0.06±0.00
18:0	3.61±0.09
18:1 n-9	21.06±0.29
18:1 n-7	1.26±0.06
18:2 n-6	53.50±0.28
18:2 ^{b)}	0.33±0.01
18:3 n-3	6.85±0.06
18:3 ^{c)}	1.46±0.03
20:0	0.33±0.06
20:1 n-9	0.15±0.04
22:0	0.30±0.04

*a) : Mean value±standard deviation.

*b) : Sum of two kinds of mono-trans geometrical isomers.

*c) : Sum of three kinds of cis-trans geometrical isomers.

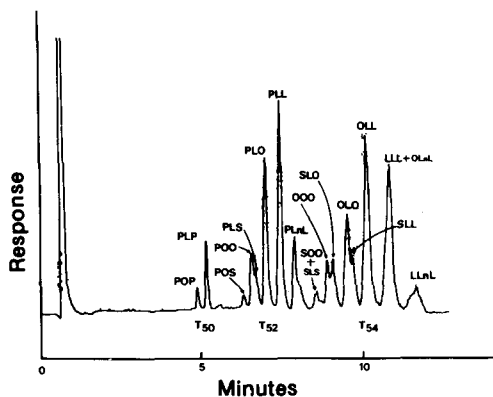


Fig. 1. Capillary gas chromatogram of soybean oil triglyceride.

P, palmitic acid ; S, stearic acid ; O, oleic acid
L, linoleic acid ; Ln, linolenic acid.

column GLC 크로마토그램을 나타내었다. 그 결과 대두유 트리글리세리드는 capillary column GLC상에서 acyl기의 총탄소수에 따라 50, 52, 54의 세 그룹으로 나뉘어 지고, 같은 acyl기의 탄소수내에서는 이중결합수에 따라 POP-PLP(T50), PLO-PLL-PLLn(T52), OLL-LLL-LLnL(T54)의 순으로 이중결합수가 적은 것부터 분리되었다. 또 acyl기의 탄소수와 이중결합수가 같은 경우는 구성지방산의 극성차(Ln)L)0)에 따라 분리되는 특성을 나타내었다. 그러나 본 실험의 분석조건으로서 SOO+SLS와 LLL+OLnL의 peak는 분리할 수가 없었다.

또 capillary column GLC상에서 분리된 대두유 트리글리세리드 각 peak의 재현성과 그 분자종 조성을 Table 2에 나타내었다. 그 결과 재현성은 양호한 것으로 나타났으며, 대두유 트리글리세리드는 capillary column GLC 분석에 의하여 모두 18종류의 분자종으로 구성되어 있으며, 주요 분자종은 LLL (19.6%), OLL(17.4%), PLL(14.2%), OLO(10.2%), PLO(9.4%)인 것으로 밝혀졌다.

한편 대두유 트리글리세리드를 HPLC를 이용하여 분석하는 방법이 여러 연구자들에 의하여 보고되고 있는데¹⁵⁻¹⁸⁾, 이들의 연구결과를 본 연구와 비교해보면 구성분자종의 수에는 다소 차이가 있으나 주요 분자종은 동일한 것으로 나타나 있다. 이러한 HPLC를 이용한 분석방법으로는 다양한 분자종으로 구성되어 있는 천연유지 트리글리세리드의 산화특성을 분자종 레벨에서 밝히는 데는 어려움이 있는 것을 지적되고 있다.¹¹⁾ 그래서 산화에 따른 분자종의 함량변화를 정량적으로 신속히 분석하는 데는 capillary column GLC를 이용한 본연구의 분석방법이 유효한 것으로 생각된다.

트리글리세리드 분자종의 산화안정성

자동산화에 따른 식물유 트리글리세리드의 분자종과 산화안정성과의 관계를 밝히기 위하여, 대두유를 모델 시료로 하여 규산 컬럼으로 트리글리세리드를 분획한 다음 60°C, 암소에서 자석교반기로 교반 저장하면서 실험하였는데 먼저 POV의 경시적인 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 POV는저장 8일째부터 급격히 증가하여 14일째에 최고치인 9.81(-mol / l)에 도달하였고 그 후 감소하였는데 유도

Table 2. The content and reproducibility^{a)} of each triglyceride molecular species from capillary column GLC profile of soybean oil triglycerides (%)

Molecular species ^{b)}	Mean %	Standard deviation	Coefficient of variation
POP	0.76	0.05	6.6
PLP	2.69	0.06	2.2
POS	0.83	0.06	7.2
POO	4.06	0.08	2.0
PLS	0.59	0.06	10.2
PLO	9.44	0.12	1.3
PLL	14.17	0.15	1.1
PLnL	4.07	0.15	3.7
SOO+SLS	1.74	0.07	4.0
OOO	3.46	0.17	4.9
SLO	3.14	0.19	6.1
OLO	10.24	0.14	0.1
SLL	1.57	0.17	10.8
OLL	17.39	0.10	0.6
LLL+OLnL	19.64	0.18	1.0
LLnL	6.21	0.12	1.9

^{a)} : Indicated as results of five injections.

^{b)} : P, palmitic acid ; S, stearic acid ; O, oleic acid ; L, linoleic acid ; Ln, linolenic acid.

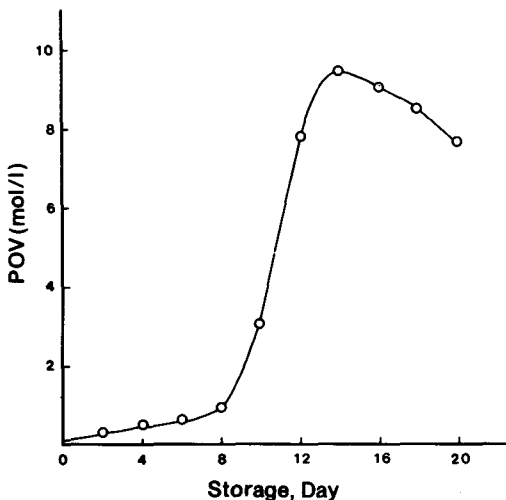


Fig. 2. Changes of peroxide values(POV) of soybean oil triglyceride during storage at 60°C in the dark.

기는 7일 정도이었다.

그리고 산화된 대두유 트리글리세리드를 TLC에 전개(전개용매, petroleum ether : diethyl ether : acetic acid, 80 : 20 : 1, V / V%)시킨 다음, TLC scanner를 사용하여 트리글리세리드 획분과 산화생성물 획분의 면적비를 백분율로 계산해 산화에 따른 트리글리세리드의 잔존량으로 산정하고 그 경시적 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 잔존량은 저장 4일째부터 서서히 감소하여 POV가 가장 높은 14일째에 55%로 원래의 절반으로 줄어들었고, 저장 20일째는 38%로 나타나 산화의 진행과 더불어 트리글리세리드의 함량도 상당히 감소하는 것으로 나타났다.

그리고 대두유 트리글리세리드 각 분자종의 저장 0일째의 함량에 대하여 산화과정을 통하여 산화되지 않고 남은 각 분자종의 잔존량 변화를 Table 3에 나타내었다. 그 결과 트리글리세리드 분자종의 산화안정성은 전반적으로 구성 불포화지방산의 이중결합수가 적을 수록 증가하는 경향을 보였다(POS) PLO)PLnL, OOO)OLL)LLnL).

그런데 SLO와 OOO 또는 PLnL과 OLL의 경우에는 트리글리세리드를 구성하는 불포화지방산의 이중결합수가 각각 같음에도 불구하고 OOO가 SLO보다, OLL가 PLnL의 산화안정성이 높은 것으로 나타났는데, 이것은 결합되어 있는 불포화지방산의 불포화도(Ln)L)O)의 차이 때문인 것으로 생각된다. 이러한 결과는 표준 트리글리세리드를 무작위적으로 에스테르 교환시킨 것을 시료로 하여 산화실험을 한 경우(OOC)LCC, OOO)LOC)¹¹⁾에서와 마찬가지로, 본 연구에서의 실제 천연유지 트리글리세리드의 산화실험에서도 똑같은 경향을 나타냄으로서 분명히 구성지방산의 불포화도는 트리글리세리드 분자종의 산화안정성에 영향을 미치는 한 요인인 것으로 생각되며, 구성지방산이 불포화도가 낮을 수록 산화안정성은 높아지는 것으로 밝혀졌다.

한편 POP와 POS, POO+PLS와 SOO+SLS 및 PLO와 SLO의 경우는 결합되어 있는 불포화지방산의 이중결합수 및 불포화도가 똑같은 분자종임에도 불구하고 60°C 압소에서의 산화안정성에는 차이가 있었다. 즉 공존하고 있는 포화지방산 acyl기의 사슬길이가 짧은 POP, POO+PLS, PLO의 산화안정

성이 높은 것으로 나타나 포화지방산 acyl기의 사슬 길이도 트리글리세리드 분자종의 산화안정성에 영향

을 미치는 요인인 것으로 생각된다. 이와 같은 불포화 트리글리세리드의 산화에 대한 포화지방산 acyl기의 사슬길이의 영향은 불포화지방산의 자동산화가 이중결합이 산소분자에 의해 공격을 받는 것으로 시작된다는 점을 고려한다면 포화지방산의 acyl사슬이 산소분자에 의해서 공격을 받는 이중결합을 보호하는 기능을 가지는 것으로 추측할 수 있다.

이상에서와 같이 트리글리세리드 분자종의 산화안정성은 분자종자체의 구조적인 면과 깊은 관계가 있는 것으로 생각된다. 즉 트리글리세리드 분자종 전체의 불포화도와 아울러 구성지방산의 불포화도 및 공존하고 있는 포화지방산 acyl기의 사슬길이가 트리글리세리드 분자종의 산화안정성에 영향을 미치는 것으로 생각할 수 있다.

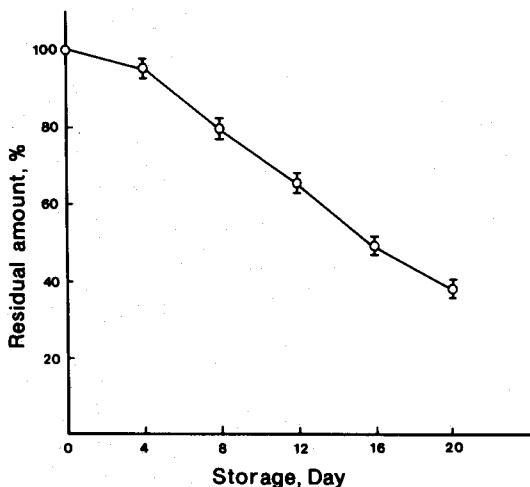


Fig. 3. Changes in residual amounts of soybean oil triglyceride during storage at 60°C in the dark.

요약

Capillary column GLC 및 GCMS를 병용하는 분석방법을 이용하여 식물유 트리글리세리드 분자종과

Table 3. Changes in residual amounts of soybean oil triglyceride during storage at 60°C in the dark.

TC : DB ^{a)}	Molecular ^{b)} species	Residual amounts ^{c)} %					
		Storage time, day					
		0	4	8	12	16	20
50 : 1	POP	100	100	100	95	88	85
50 : 2	PLP	100	95	89	84	78	70
52 : 1	POS	100	100	95	95	86	80
52 : 2	POO+PLS	100	97	95	90	85	75
52 : 3	PLO	100	95	90	83	73	60
52 : 4	PLL	100	95	88	75	58	36
54 : 5	PLnL	100	93	80	63	39	25
54 : 2	SOO+SLS	100	96	91	88	78	69
54 : 3	OOO	100	95	89	85	75	65
	SLO	100	95	90	82	70	56
54 : 4	OLO+SLL	100	96	88	79	64	46
54 : 5	OLL	100	92	85	73	53	33
54 : 6	LLL+OLnL	100	90	83	60	35	20
54 : 7	LLnL	100	81	76	51	28	12

*a) : TC, total acyl carbon number : DB, the number of double bonds

*b) : P, palmitic acid : S, stearic acid : O, oleic acid : L, linoleic acid : Ln, linolenic acid.

*c) : The residual amounts were indicated as relative percentages of each triglyceride molecular species to tripalmitin (internal standard)

산화안정성과의 관계를 밝히기 위해서, 규산 컬럼으로 분획한 대두유 트리글리세리드를 모델 시료로 하여 60°C, 암소에서 저장하면서 산화에 따른 트리글리세리드 각 분자종의 산화안정성을 조사하였다.

대두유 트리글리세리드의 주요 분자종은 LLL(19.6%), OLL(17.4%), PLL(14.2%), OLO(10.2%) 및 PLO(9.4%)이었으며, 트리글리세리드 분자종의 산화안정성은 전반적으로 구성불포화지방산의 이중결합수가 적을 수록 증가하는 경향을 보였다. 그런데 트리글리세리드를 구성하는 불포화지방산들의 이중결합수가 같을 경우는 불포화도가 낮은 지방산이 결합되어 있는 분자종의 산화안정성이 높았고, 또 결합되어 있는 불포화지방산의 이중결합수 및 불포화도가 똑같은 경우에는 공존하고 있는 포화지방산의 acyl기의 사슬길이가 짧은 분자종의 산화안정성이 높은 것으로 밝혀져, 식물유 트리글리세리드 분자종의 산화안정성에는 구성불포화지방산의 이중결합수와 불포화도 및 공존하고 있는 포화지방산의 acyl기의 사슬길이가 중요한 영향을 미치는 인자임을 알 수 있었다.

문 헌

1. 박영호, 和田 俊, 小泉 千秋 : 식물유의 트리글리세리드 조성, 1. 참기름의 트리글리세리드 조성. 한국수산학회지, 14, 1(1981).
2. 최수안, 박영호 : 식물유의 트리글리세리드 조성에 관한 연구, 2. 옥수수유의 트리글리세리드 조성. 한국식품과학회지, 14, 226(1982).
3. 최수안, 박영호 : 식물유의 트리글리세리드 조성에 관한 연구, 3. 올리브유의 트리글리세리드 조성. 한국식품과학회지, 15, 66(1983).
4. 최수안, 박영호 : 식물유의 트리글리세리드 조성에 관한 연구, 4. 쌀겨기름의 트리글리세리드 조성. 한국식품과학회지, 15, 108(1983).
5. 박영호, 김동수, 천석조 : 들깨기름의 트리글리세리드 조성에 관한 연구, 한국식품과학회지, 15, 164(1983).
6. 천석조, 박영호 : 호도기름의 트리글리세리드 분자종에 관한 연구, 한국식품과학회지, 19, 134(1987).
7. Rabhuveer, K.G. and Hammond, E.C. : The influence of glyceride structure on the rate of autoxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 239(1967).
8. Wada, S. and Koizumi, C. : Influence of the position of unsaturated fatty acid esterified glycerol on the oxidation rate of triglyceride. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1105(1983).
9. 和田 俊, 小泉 千秋 : 大豆油トリグリセリドの酸化速度に及ぼすランダムエステル交換の影響. 油化学, 35, 549(1986).
10. Park, D.K., Terao, J. and Matsushita, S. : Influence of the positions of unsaturated acyl groups on autoxidation. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2251(1983).
11. Park, D.K., Terao, J. and Matsushita, S. : Influence of triglyceride molecular species on autoxidation. *Agric. Biol. Chem.* 47, 2243(1983).
12. Park, D.K., Terao, J. and Matsushita, S. : Effect of the chain length of saturated acyl groups on the autoxidation of unsaturated acyl groups of triglyceride. *Yukagaku*, 32, 418(1983).
13. 윤형식 : 식물유 트리글리세리드의 분자종과 그 산화특성. 부산수산대학 박사학위논문(1988).
14. John, A.B. and Steven, D.A. : Microsomal lipid peroxidation. In *Method in Enzymology*, Vol. 52, p.302(1978).
15. Plattner, R.D., Spencer, G.F. and Kleiman, R. : Triglyceride separation by reverse phase high performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 511(1977).
16. Plattner, R.D., Wada, K. and Kleiman, R. : Direct analysis of triglyceride by high performance liquid chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 55, 381(1978).
17. Wada, S., Koizumi, C. and Nonaka, J. : Analysis of triglyceride of soybean oil by high performance liquid chromatography in combination with gas liquid chromatography. *Yukagaku*, 26, 95(1977).
18. Murui, T. and Watanabe, H. : Some application of high performance liquid chromatography to oils and fats analysis. *Yukagaku*, 28, 15(1979).

(Received February 21, 1989)