

## Headspace 가스크로마토그래피를 이용한 대두유 산화진행도의 객관적 평가방법

전호남 · 김재욱\*

서울보건전문대학 전통조리과, \*서울대학교 식품공학과

**초록 :** Headspace 가스크로마토그래피를 이용한 휘발성 산화생성물 분석으로 대두유의 산화진행도를 객관적으로 평가할 수 있는 방법을 연구하기 위하여, GC 주입부에 들어가는 splitless mode glass liner insert에 Tenax GC를 충전하여 휘발성 산화생성물을 효율적으로 포집 및 용출할 수 있는 장치를 고안하였으며, 시판 대두유를 polyethylene 용기에 담은 후 뚜껑을 닫아 밀봉하여 일정한 조건으로 저장하면서, 저장 기간에 따른 산패취의 변화를 관능검사를 통하여 평가하고 동시에 휘발성 산화생성물을 headspace gas chromatography를 이용하여 분석하였다. 23종의 휘발성 산화생성물이 gas chromatography 및 gas chromatography-mass spectrometry에 의하여 검출되었으며, 저장 기간에 따른 pentanal과 hexanal의 생성을 관능검사 결과와 상관 분석을 실시한 결과 상관 계수가 각각 0.990 및 0.994의 값을 보였다. 따라서 headspace 가스크로마토그래피를 이용하여 polyethylene 용기에 포장된 대두유의 휘발성 산화생성물중 pentanal과 hexanal을 분석하면 대두유의 산화진행도를 객관적으로 평가할 수 있음을 알 수 있었다.

지질이 산화되면 산패취 때문에 식품으로 섭취하기 어려울 뿐만 아니라 shelf life를 단축시키고 독성 물질을 생성하기도 한다. 따라서 지질의 산화생성물의 규명<sup>1)</sup>과 함께, 산화에 영향을 미치는 요인<sup>2)</sup>과 생선 기작<sup>3)</sup>에 관한 많은 연구가 있다.

또한, 지질의 산화는 수많은 반응이 관련되어 있으며, 매우 복잡한 과정으로 생성 산화생성물이 산패를 일으키게 되므로 과학적인 평가 방법에 대하여서도 많은 연구가 진행되었는데, 1940년대에 미국의 Northern Regional Research Center의 Moser 등<sup>4)</sup>이 식용유 flavor에 대한 관능검사에 통계적인 처리방법을 도입하여 탈취 최적 조건을 찾는 연구를 한 이후 40

여년간 사람의 관능 감각에 의한 여러가지 검사 방법<sup>5)</sup>이 연구되어 이것이 객관적인 분석방법으로 인정되기에 이르렀다. 그러나, 이들 관능검사 방법은 재현성이 떨어지고, 시간이 오래 걸리는 등 반복적인 분석에는 적합하지 못하였다. 따라서 peroxide value, thiobarbituric acid, conjugated diene method, oxirane test 등의 물리 화학적인 방법이 개발되었는데, peroxide value는 관능검사와의 상관성이 없으며<sup>6)</sup>, thiobarbituric acid test는 malonaldehyde가 모든 산화기작에서 생성되는 것이 아니며 산화생성물질이 아닌 물질과도 반응하여 red pigment를 생성하는 등의 문제점<sup>7)</sup>이 있으며, conjugated diene method는 carbonyl

Key words : Soybean oil, rancidity, headspace gas chromatography, pentanal and hexanal, flavor score

Corresponding author : H.N. Chun

compounds 때문에 문제점<sup>8)</sup>이 있고, oxirane test는 감도가 떨어지고 특이성이 없는 단점이 있어 정량 분석에는 사용할 수 없는 문제점<sup>9)</sup>이 있고, 그 밖의 방법들도 식품의 산화 단계가 정도에 따라 특수한 경우에만 사용할 수 있는 등의 단점이 있다.

1960년대 후반부터는 GC를 이용한 방법이 식용유에 이용되기 시작하여 GC분석 결과를 관능검사 결과와 상관시키고자 하는 많은 연구<sup>10)</sup>가 이루어졌으며, 휘발성 산화생성물을 동정하기 위하여 분리하는 방법<sup>11)</sup>에 대해서도 많은 연구가 진행되어 왔으나, 대부분의 휘발성 성분이 역치(threshold value)가 낮고, 탄수화물 · 지질 · 단백질 · 수분과 공존하고 있으며, functional기 · 용해도 · 분자량이 다양하고 불안정할 뿐만 아니라 200~1000개의 많은 성분으로 구성되어 있으므로 시료에 따라 적당한 분리방법을 선택하는데 많은 어려움이 있다.

따라서 본 연구실에서는 headspace 가스 크로마토그래피 분석방법으로 식용유의 품질을 평가할 수 있는 방법을 연구하기 위하여 휘발성 산화생성물을 효율적으로 포집할 수 있는 방법을 고안하고, 대두유를 저장하면서 관능검사 및 headspace 가스 크로마토그래피 방법으로 휘발성 산화생성물을 분석한 후 회귀 분석을 실시하여 대두유의 산화진행도를 headspace 가스 크로마토그래피를 이용하여 객관적으로 평가할 수 있는 방법을 연구하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 실험재료

본 실험에 사용한 대두유는 제일제당 주식회사 제품으로 0.9ℓ polyethylene(PE, 산소 투과도 : 100cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> · day · atm) 용기에 담은 후 뚜껑을 닫아 밀봉하고 70% RH의 항온 항습기에서 60℃의 온도로 보관하되 조도 400 lux의 형광등을 설치하고 12시간을 주기로 점멸시켜 보관하면서 분석 시료로 사용하였으며, flame ionization detector(FID)가 부착된 Hewlett Packard 5840A gas chromatograph로 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 1과 같다. 또한 지방산 분석용 methylation 시약은 Tokyo Kasei사의 BF<sub>3</sub>-Methanol을, 휘발성 산화생성물 흡착용 porous polymer는 Alltech사의 Tenax GC(80/100 mesh)를 사용하였으며, 지방산 표준품과 휘발성 산화생성물 표준품중 hexanal과 1-pentanol은 Sigma사의 것을 사용하

였고, n-octane, 1-octen-3-ol, t-2-,4-hexenal, t-2-oc-tenal, t-2-nonenal은 Tokyo Kasei사, pentanal과 hep-tanal은 Wako사, t, t-2, 4-heptadienal과 t, t-2, 4-deca-dienal은 CA Aromatics사, 1-penten-3-ol과 t-2-hepte-nal은 Aldrich사의 것을 사용하였으며 기타 시약은 Merck사의 특급시약을 사용하였다.

Table 1. Fatty acid composition of soybean oil used in the experiments

(Unit = % area)							
Fatty acid	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>
	trace	9.9	0.1	3.6	22.7	55.0	8.7

#### 휘발성 산화생성물의 포집장치

휘발성 산화생성물의 포집장치는 Fig. 1과 같이 hot plate상에서 대두유를 교반가열하면서 carrier gas (He)가 대두유를 통과하여 나오게 하되 가스의 체류시간이 길도록 purge tube를 수기의 바닥까지 내려가도록 하였다. 이때 porous polymer trap으로는 GC주입부에 들어가는 splitless mode glass liner에 Tenax GC 0.07g을 넣고 양쪽을 glass wool로 막은 후 아세톤으로 3회 씻어주고 주입부에 넣어 carrier gas를 흘려주면서 250℃로 4시간 가열후 사용하였다.

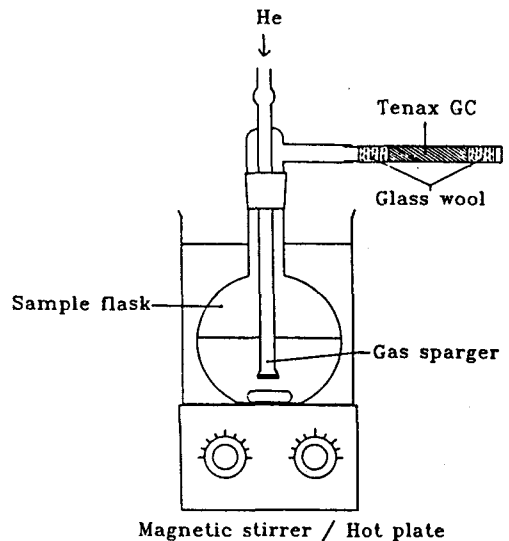


Fig. 1. Headspace trapping apparatus for analysis of soybean oil volatiles.

휘발성 산화생성물의 포집 및 용출

대두유 300g과 내부 표준 물질(dodecane) 2ul를 수기에 넣고 porous polymer trap을 연결한 후 He가스의 유속을 80ml/min로 조절하여 휘발성 산화생성물을 포집하였다. 이때 시료의 온도에 따른 영향을 상온, 40℃, 60℃, 85℃ 및 110℃의 5가지 온도로 각각 1시간씩 포집하여 확인하였고, carrier gas volume이 미치는 영향은 시료로 60℃로 가열하면서 포집시간을 1, 2, 3 및 4시간으로 다르게하여 확인하였다. 또한 porous polymer trap에 포집된 휘발성 산화생성물의 용출은 Fig. 2.와 같은 thermal desorption 방법으로 하였다. 즉, 휘발성 산화생성물이 포집된 porous polymer trap을 상온까지 미리 식힌 GC주입부에 넣고 GC주입부를 닫은후, 주입부의 온도를 250℃까지 상승시켜 용출하였다. 이때 용출된 휘발성 산화생성물은 분리능을 좋게 하기 위하여 capillary column의 앞부분 50cm를 직경이 6cm정도되게 감고 dry ice와 아세톤을 넣은 Dewar flask에 담아 10분간 cold trap하였으며 이때 가스의 유속은 0.9ml/min가 되게 하였다.

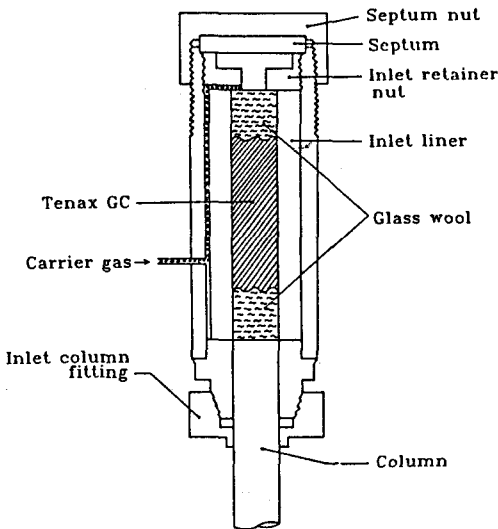


Fig. 2. Cross section of gas chromatography inlet system with inlet liner containing Tenax GC and glass wool.

휘발성 산화생성물의 분리 및 동정

상기와 같이하여 capillary column의 앞부분에 cold trap된 산화생성물은 GC 및 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)로 분리 동정하였다. GC는 FID가 부착된 Hewlett Packard HP 5890A를, Hewlett Packard HP 59887A를 사용하였고, OV-101 fused silica capillary column(50m × 0.2mm)을 사용하여 질소가스의 유속을 30ml/min가 되게 하고, oven의 온도를 36℃에서 5분간 머무른 후 7℃/min로 180℃까지 상승시키고, 그 온도에서 5분간 유지하여 분석하였으며, 주입부 및 검출기의 온도는 각각 250℃, 280℃로 하였다. 검출기의 질소가스 유속은 0.9ml/min, 수소가스의 유속은 40ml/min, 공기의 유속은 300ml/min, auxillary gas의 유속은 12ml/min로 조절하여 splitless mode로 분석하였다.

관능검사에 의한 산패취의 특징

관능검사는 Moser 등<sup>12)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 선정된 8명의 관능검사 요원을 산패취를 갖는 대두유로 훈련을 시킨 후, 시료의 산패취를 산패취가 매우 약하다 2점, 상당히 약하다 2점, 약하다 3점, 조금 약하다 4점, 보통이다 5점, 조금 강하다 6점, 강하다 7점, 상당히 강하다 8점, 매우 강하다 9점으로 구분하여 측정하였다. 이때 시료의 관능검사는 온도 60℃의 시료를 입 안에 넣고, 입을 통하여 숨을 3회 들이마신 후 코와 입을 통하여 느껴지는 산패취를 측정하도록 하였다.

휘발성 산화생성물과 관능검사 결과와의 상관분석

상기의 방법에 의해 측정된 휘발성 산화생성물의 분석 결과와 관능검사에 의한 산패취 측정 결과와의 상관분석은 statistical analysis system(SAS)<sup>13)</sup>을 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

휘발성 산화생성물의 포집 온도와 시간의 결정

60℃에서 10일간 저장한 대두유의 휘발성 산화생성물중 pentanal과 hexanal의 상대적인 농도가 포집 온도에 따라 변화하는 경향은 Fig. 3.과 같으며, 포집 시간이 미치는 영향은 Fig. 4.와 같다. 즉, 가열 온도 60℃까지는 pentanal과 hexanal이 비교적 직선적으로 변화하나 60℃이상에서는 급격히 증가함을 볼 수 있어

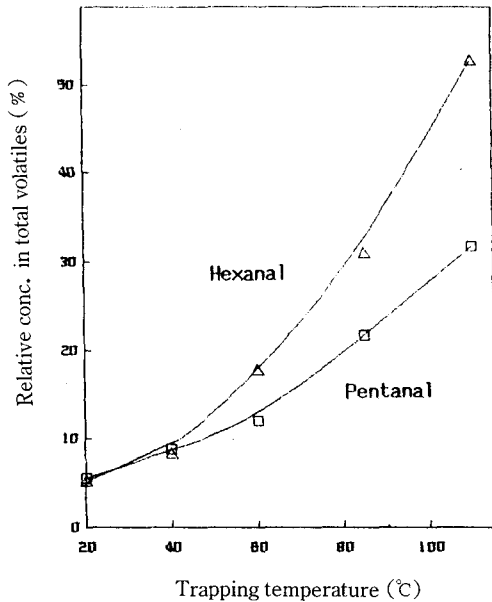


Fig. 3. Effect of trapping temperature on the relative concentration of headspace pentanal and hexanal in soybean oil oxidized at 60°C to peroxide value of 1.45.

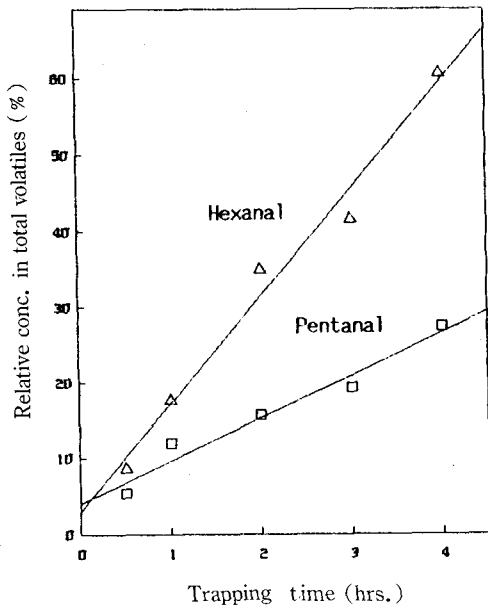


Fig. 4. Effect of trapping time on the relative concentration of headspace pentanal and hexanal in soybean oil oxidized at 60°C to peroxide value of 1.45.

가열 온도 60°C를 넘으면 headspace에 실제로 존재하는 휘발성 성분의 상대적인 비율과 분석결과와는 많은 차이를 나타냄을 알 수 있었다. 이것은 model system을 이용하여 시료의 가열 온도가 분석에 미치는 영향을 연구하여 20~80°C 사이에서는 직선적으로 변화한다는 Werkhoff 등<sup>14)</sup>의 결과와는 약간의 차이를 나타내는 것이다. 그러나, 포집 시간에 의한 영향은 시료를 60°C로 가열한 경우 포집 시간에 따른 휘발성 성분의 상대적인 조성을 연구한 Simpson 등<sup>15)</sup>의 결과와 거의 같은 경향을 보이는 것이다. 따라서 본 실험에서는 관능검사 시료의 제시 온도인 60°C로 가열하여 대두유의 휘발성 산화생성물을 포집하였으며 미량 성분이 가능한 정도의 시간인 1시간으로 포집 시간을 결정하였다.

**대두유 휘발성 산화생성물의 역치(threshold value)**

역치(threshold value)가 낮은 미량 성분의 검출이 가능한가를 알아보기 위하여 휘발성 산화생성물의 최소 자극치(stimulus threshold value)<sup>17)</sup>를 관능검사를 통하여 알아본 결과는 Table 2와 같다. 즉 역치가 가장 낮은 성분은 t-2-nonenal로 0.0009 ppm/water이었으며, pentanal은 0.007 ppm/paraffin, heptanal은 0.08 ppm/paraffin, hexanal은 0.09 ppm/water의 값을 보였다. 또한 2-alkenals중에는 t-2-hexenal이 0.5 ppm/paraffin, t-2-heptenal이 5 ppm/paraffin, t-2-octenal이 0.15 ppm/water의 값을 보였으며, t, t-2, 4-heptenal과 t, t, -2, 4-decadienal이 각각 0.4 ppm/water 및 0.025 ppm/water의 값을 나타냈다. 한편, 이와 같은 역치는 연구 논문보다 많은 차이를 나타내는데 이것은 역치 측정 방법상의 차이점과 검사원의 민감도 차이, 역치의 개념을 검사원이 그 성분을 감지할 수 있는 값(stimulus threshold value)으로 하였는가 아니면 그 성분의 특성을 파악할 수 있는 값(recognition threshold value)<sup>17)</sup>으로 하였는가 등에 기인하는 것으로 판단된다.

**대두유의 휘발성 산화생성물**

60°C에서 100일간 저장한 대두유의 휘발성 산화생성물은 GC로 분석한 chromatogram은 Fig. 5와 같고 각 피크의 성분을 GC-MS로 동정한 결과는 Table 3과 같다. 즉, 여러가지 휘발성 산화생성물중 pentanal과 hexanal의 함량이 비교적 많았는데, 유지가 산화되면 pentanal은 linoleic acid의 13-hydroperoxide

로부터 생성되며 hexanal은 oleic acid의 10-hydroperoxide로부터 생성된다고 보고<sup>3)</sup>되어 있다.

그러나, Dupuy 등<sup>10)</sup>이 2,4-decadienal과 2,4-heptadienal이 검출되었다고 한 반면, 본 연구의 결과에서는 이들 성분이 전혀 나타나지 않은 것은 이들이 휘발성 산화생성물을 포집하는 온도를 180°C 정도의 높은 온도에서 하였기 때문에 headspace에 존재하는 성분 이외에 휘발성이 약한 decadienal과 같은 성분이 검출되었던 것으로 판단되며, 이와같은 결과는 낮은 온도에서의 주요 휘발성 산화생성물은 hexanal이고 열 분해에 의해 2,4-decadienal과 같은 성분이 생성된다고 발표한 Swoboda 등<sup>16)</sup>의 연구 결과에서도 볼 수 있다.

Table 2. Stimulus threshold value of volatile compounds in soybean oil determined by eight trained panels

Volatile compound	Threshold value (ppm)	Solvent
1-Penten-3-ol	0.80	Paraffin
Pentanal	0.007	Paraffin
1-Pentanol	10.00	Paraffin
Hexanal	0.09	Distilled Water
n-Octane	0.04	Paraffin
t-2-Hexenal	0.50	Paraffin
n-Heptanal	0.08	Paraffin
t-2-Heptenal	5.00	Paraffin
1-Octen-3-ol	3.00	Paraffin
t, t, 2, 4-Heptadienal	0.40	Distilled Water
t-2-Octenal	0.15	Distilled Water
t-2-Nonenal	0.0009	Distilled Water
t, t, 2, 4-Decadienal	0.025	Distilled Water

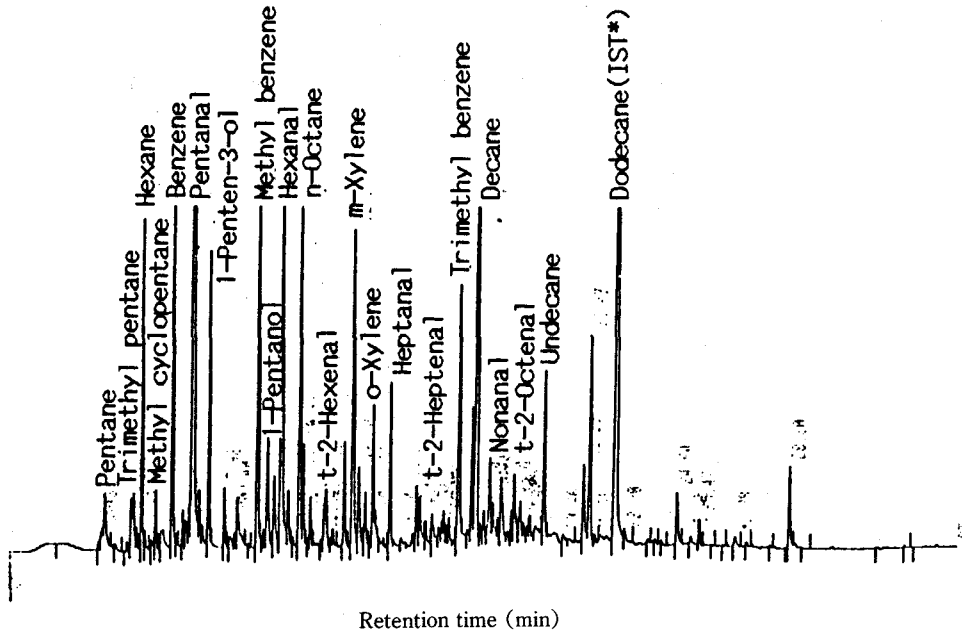


Fig. 5. Gas chromatogram of headspace volatiles in soybean oil packed in polyethylene bottle after 100 days storage at 60°C with daily 12 hours fluorescent light.

Table 3. Identification of volatile compounds in soybean oil packed in polyethylene bottle after 100 days storage at 60°C with daily 12 hours fluorescent light

Retention time(min)	Volatile compound	M. W.	Mass spectrum : 8 highest peaks m/z (% relative intensity)
3.53	Pentane	72	43(100), 42(58), 41(40), 27(35), 29(24), 39(14), 57(12), 72(9)
6.76	Pentane	86	44(100), 58(45), 57(30), 41(24), 43(21), 45(12), 42(8), 55(6)
9.51	1-Pentanol	88	42(100), 55(96), 70(94), 41(59), 57(27), 43(26), 56(19), 69(12)
10.03	Hexanal	100	56(100), 44(90), 57(63), 41(46), 43(42), 72(33), 55(21), 45(19)
10.70	n-Octane	114	43(100), 41(38), 29(35), 57(34), 85(30), 27(29), 71(23), 56(18)
11.69	t-2-Hexenal	98	69(100), 55(88), 41(86), 83(79), 57(57), 42(55), 98(32), 43(22)
14.04	Heptanal	114	70(100), 44(69), 55(55), 43(52), 57(45), 41(42), 71(31), 42(30)
15.01	t-2-Heptenal	112	83(100), 55(93), 41(69), 57(66), 56(61), 70(56), 69(53), 68(45)
17.22	Decane	142	43(100), 57(82), 41(43), 29(38), 71(30), 27(28), 85(21), 56(18)
18.14	t-2-Octenal	126	70(100), 55(75), 83(66), 41(63), 57(75), 69(51), 82(36), 42(27)
19.74	Undecane	156	43(100), 57(85), 41(43), 29(39), 71(36), 27(23), 85(21), 42(16)
22.39	Dodecane(IST*)	170	43(100), 57(92), 41(47), 71(43), 29(41), 27(26), 85(25), 55(16)

\*IST : Internal standard

산화 지표 성분의 선정

대두유의 휘발성 산화생성물중 대두유 산화진행도의 지표 성분을 선정하기 위하여 밀폐 포장한 대두유를 60°C에서 400 lux의 형광등을 12시간 주기로 점멸시켜 100일간 저장하면서 휘발성 산화생성물의 변화를 분석한 결과와 각 성분의 peak area의 변화를 관능검사 결과와 상관분석한 결과는 Table 4와 같다. 즉 pentanal, 1-penten-3ool, hexanal, n-octane의 상관 계수가 0.954-0.994사이의 비교적 높은 값을 보였는데, 그

중 hexanal과 pentanal이 0.990이상의 높은 값을 보였으며 이때의 회귀식은 pentanal과 hexanal이 각각

$$y=0.0085+0.0011(\text{pentanal content})$$

$$y=0.0810+0.0030(\text{hexanal content})\text{이었다.}$$

따라서 headspace 가스크로마토그래피를 이용하여 polyethylene 용기에 포장된 대두유의 휘발성 산화생성물중 pentanal과 hexanal을 분석하면 대두유의 산화진행도를 위한 회귀식을 이용하여 신속하고도 객관적으로 예측할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 4. Change of headspace volatile compounds in soybean oil packed in polyethylene bottle after 100 days storage at 60°C with daily 12 hours fluorescent light and correlation coefficient between actual and predicted sensory score

Storage time	Volatile compound			
	Pentanal	1-Penten-3-ol	Hexanal	n-Octane
— (Integrator area × 10 <sup>-5</sup> ) —				
0	8.60	0	18.12	0
10	28.21	2.51	38.42	0
20	41.22	7.84	66.54	2.32
30	79.24	13.51	131.28	3.95
40	100.12	12.96	158.32	7.46
50	100.98	16.21	167.49	15.87
60	135.32	23.51	252.48	17.30
70	160.21	23.11	288.42	25.65
80	165.89	24.89	301.24	27.82
90	178.91	29.11	362.29	36.28
100	231.21	33.19	394.50	26.64
Correlation coefficient	0.990 <sup>a)</sup>	0.983 <sup>a)</sup>	0.994 <sup>a)</sup>	0.954 <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> Statistically significant at the 99% confidence level

참 고 문 헌

- Selke, E., Moser, H.A. and Rohwedder, W. K. : J. Am. Chem. Soc., 47 : 393 (1970)
- Ministry, B.S. and Min, D.B. : J. Food Sci., 52 : 831 (1987)
- Frankel, E.N., Neff, W.E. and Selke, E. : Lipids, 16 : 279 (1981)
- Moser, H.A., Dutton, H.J., Evans, C.D. and Cowan, J.C. : Food Technol., 4 : 105 (1950)
- Waltking, A.E. and Zmachinski, H. : J. Am. Oil Chem. Soc., 58 : 227 (1981)
- Gray, J.I. : J. Am. Oil Chem. Soc., 55 : 539 (1978)
- Tarladgis, B.G., Pearson, A.M. and Dugan, L.R., Jr. : J. Am. Oil Chem. Soc., 39 : 341 (1962)
- Mizuno, G.R. and Chipault, J.R. : J. Am. Oil Chem. Soc., 42 : 839 (1965)
- Fioriti, J.A., Bentz, A.P. and Sims, R.J. : J. Am. Oil Chem. Soc., 43 : 37 (1966)
- Dupuy, H.P., Rayner, E.T. and Wadsworth, J.I. : J. Am. Oil Chem. Soc., 53 : 628 (1976)
- Heath, H.B. and Reineccius, G. : In 'Flavor Chemistry and Technology', Avi, Connecticut, pp.1~42 (1986)
- Moser, H.A., Jaeger, C.M., Cowan, J.C. and Dutton, H.J. : J. Am. Oil Chem. Soc., 24 : 291 (1947)
- SAS Institute : In 'SAS/STAT Guide for Personal Computers', Cary, North Carolina, pp.1~99 (1985)
- Werkhoff, P. and Bretschneider, W. : J. Chromatogr., 405 : 99 (1987)
- Simpson, R.F. : Chromatographia, 12 : 733 (1979)
- Swoboda, P.A.T. and Lea, C.H. : J. Sci. Food Agric., 16 : 680 (1965)
- Clark, R.G. and Cronin, D.A. : J. Sci. Food Agric., 26 : 1009 (1975)

**Headspace gas chromatographic analysis as an objective method for measuring rancidity in soybean oil**

Ho-Nam Chun and Ze-Uook Kim\* (Department of Traditional Cuisine, Seoul Health Junior College, \*Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

**Abstract** : An objective method for measuring rancidity in soybean oil was developed based on the volatile contents obtained by headspace gas chromatographic analysis. Apparatus for headspace volatile cold trapping-thermal desorption was described, designed to collect and analyze volatiles of soybean oil. Samples of commercially processed soybean oil were stored under controlled condition and then evaluated for flavor by a eight member trained panel and for volatile contents by headspace gas chromatographic analysis. Twenty-three GC peaks were identified on the basis of relative retention time of reference compounds and gas chromatography-mass spectrometry. The volatile compounds identified were autoxidation products of principal unsaturated fatty acids of soybean oil. The simple linear regressions of flavor score with the pentanal or hexanal contents in aged soybean oil gave correlation coefficient of 0.990 and 0.994, respectively. Pentanal and hexanal contents could be used as a potentially useful index for predicting flavor scores of soybean oil.