

기체크로마토그래피법에 의한 식물성 유지내 유리 지방산의 신속한 스크리닝

김정한 · 김경례* · 채정영 · 오창환 · 박형국
연세대학교 식품공학과, *성균관대학교 약학대학

Rapid Gas Chromatographic Screening of Vegetable Oils for Free Fatty Acids

Jung-Han Kim, Kyoung-Rae Kim*, Jeong-Young Chai, Chang-Hwan Oh and Hyung-Kook Park

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

*College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract

A rapid gas chromatographic profiling method for the simultaneous analysis of free fatty and other acids was applied to vegetable oils. Oil samples were dissolved in dichloromethane and the free acids were extracted with saturated NaHCO_3 solution. The aqueous extract was acidified and then loaded onto the Chromosorb P column for the extraction. The acids were eluted with diethyl ether selectively from Chromosorb P column and were treated with triethylamine to prevent the losses of volatile acids. Several long chain fatty acids were detected from soybean oil, rice-bran oil, sesame oil and perilla oil. Various organic acids including odd number fatty acids were detected in crude oil, especially sesame oil. Arachidic acid from perilla oil and vanillic acid from sesame oil, which were not reported before were detected. The content ratio of free linoleic acid to oleic acid was 1.02~1.18, which was similar to the reported data. When the GC profile of organic acids were simplified to their corresponding retention index spectra of bar graphical forms, they presented characteristic pattern of each vegetable oil that can be quickly recognized.

Key word: gas chromatographic screening, retention index, fatty acids, vegetable oils, pattern recognition

서 론

식물성 유지내에는 유리지방산들이 착유시 식물체 조직의 파괴로 혼입된 리파제의 작용으로 생성되어 유지 원유 자체에 존재하며 또한 제조과정과 보관 중에도 유지의 구성성분들이 산화, 분해되어 생성되기도 한다⁽¹⁾. 또한 그 조성과 함량은 식물 원료의 종류에 따라 서로 다르다. 이러한 유리지방산들은 알데하이드, 케톤 그리고 다양한 유기산들로 변화되어 유지(식용유)의 맛과 풍미를 변화시키고 품질을 저하시킨다. 열에 의해 유리지방산들이 환상지방산으로 변환 튀김유를 섭취한 인체에서 세포파괴가 촉진되고 암이 발생한다는 최근 보고도 있다⁽¹⁻³⁾.

유리지방산들의 조성과 함량이 식용유의 품질을 결정하는 중요한 지표가 되므로 유지의 종류, 신선도 그리고

제조과정 등을 추정하기 위해서는 유리지방산들을 신속하고 정확하게 분석하는 것이 매우 중요하다. 그러나 식물성 정제유에 존재하는 미량의 유리지방산들에 대한 정성 및 정량분석 연구는 거의 보고된 바 없다. 또한 정제과정을 거치지 않고 식용되는 참기름의 화학적 조성 조사도 거의 이루어져 있지 않다.

일반적으로 식품속의 유리지방산 조성을 조사하기 위해서 용매추출한 후 실리카겔 컬럼을 사용하여 유리지방산 층을 분획 농축하고 methyl ester로 유도체화한 후 기체크로마토그래피(GC)에 의해 분석한다⁽⁴⁻⁶⁾. 이러한 시료 전처리 방법에서는 다량의 용매의 사용으로 시료가 오염될 위험이 높고 전처리 시간이 길기 때문에 유기산의 손실이 크다⁽⁷⁾.

본 연구실에서는 이미 수용성 시료로부터 다양한 휘발성, 비휘발성 유기산을 동시 분석하고 동정하기 위해서 고상추출/*tert.*-butyldimethylsilyl(TBDMS) 유도체화/dual-capillary column GC system의 신속한 분석법을 개발하여 보고한 바 있다^(8, 11).

따라서 본 연구에서는 이 분석법을 지용성 시료들인

Corresponding author : Kyoung-Rae Kim, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

대두유, 미강유, 참기름, 들기름 등에 적용하여 유리상태의 지방산과 유기산들을 신속히 프로파일링하고 스크리닝한 후 참기름에 대해 정량분석을 수행하였다. 또한 유기산 GC 프로파일들을 유기산 retention index(RI) 스펙트럼으로 단순화시켜 각 식물성 유지들의 독특한 패턴 인식을 시도하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 연구에서 분석한 대두유, 미강유, 들기름 그리고 참기름들은 모두 시중에서 구입하여 냉장 보관하면서 사용하였다. 추출용 용매로는 시약급 diethyl ether(Duksan, Korea)를 potassium hydroxide 상에서 연속 증류한 후 과량의 sodium sulfate를 넣어 4°C에 저장하면서 사용하였다. Silylation급의 N-methyl-N-(*tert.*-butyldimethylsilyl)trifluoroacetamide(MTBSTFA)는 Pierce(Rockford, USA)로부터 구입하였다. RI library를 작성하기 위하여 사용한 88개의 표준 유기산들은 Sigma(St. Louis, USA)와 Aldrich(Milwaukee, USA)로부터 구입하였으며 포화탄화수소 표준물질들($C_8 \sim C_{30}$)은 Polyscience(Niles, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 고상추출용 흡착제인 Chromosorb P(AW, 80~100 mesh)는 Supelco 사(Bellefonte, USA)의 시약급이었으며, 황산, 소금, isooctane은 일본의 Junsei사의 것을 사용하였고, sodium bicarbonate는 일본의 Yakuri사의 것을 사용하였다.

기기분석

RI값 비교에 의한 유기산 동정과 정량분석 목적으로 2개의 flame ionization detector(FID)와 split/splitless injection port 그리고 on-column injection port가 장착된 HP-5890A GC(Hewlett-Packard, Avondale, USA)에 HP-5895A GC workstation을 연결하여 사용하였다. 컬럼은 극성이 서로 다른 DB-5와 DB-1701 fused silica capillary column(30 m×0.25 mm I.D., 0.25 μm d_i, J&W Scientific, Rancho, USA)이 Chromfit 'Y' splitter(0.25 mm I.D., Unimetrics, USA)에 의해 deactivated fused silica tubing(1 m×0.25 mm I.D.)에 연결된 dual capillary column system을⁽¹¹⁾ 사용하였다(Fig. 1). 컬럼 온도는 60°C에서 2분간 유지시킨 후 분당 4°C로 상승시켜 280°C에서 30분간 유지하였다. FID의 온도는 300°C였으며 splitless injector의 온도는 220°C였다. Purge delay time은 0.7분으로 고정하였다. RI값을 구하기 위해서는 isooctane에 희석시킨 포화탄화수소 혼합 표준용액($C_8 \sim C_{30}$)을 시료와 함께 주입하였다. 참기름의 지방산 정량분석에 사용한 DB-1701 컬럼의 온도는 80°C에서 2분간 유지시킨 후 분당 4°C로 280°C까지 상승시켰다. GC로 동정된 유기산의 재확인인 HP-5890 series II GC와 HP-35741 MS chemstation data system이 연결된 HP-5970B MSD를 사용하였다. 사용한 HP-1(12 m×0.20 mm I.D., 0.33 μm

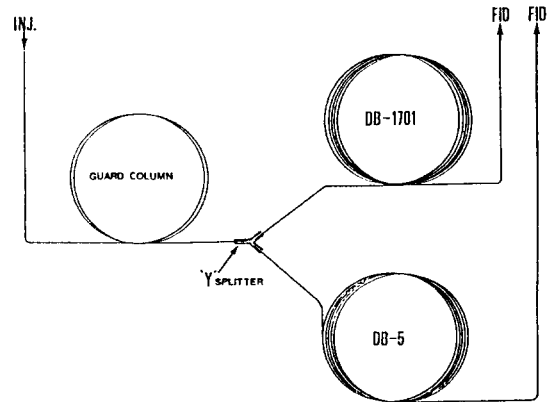


Fig. 1. Schematic diagram of dual capillary column system

d_i, Hewlett-Packard, Avondale, USA) column 온도는 80°C에서 2분간 유지시킨 후 분당 4°C로 280°C까지 상승시켰다. Split injector의 온도는 260°C, split ratio는 30:1이었다. 70 eV의 EI(electron impact) mode로 interface 온도는 280°C로 유지하였다.

식물성 유지의 유기산 분리 농축: 유지 1 ml를 5 ml의 dichloromethane에 용해시킨 후 NaHCO₃ 포화수용액 0.8 ml로 3회 추출하였다. 추출한 수용액층에 진한 황산을 몇 방울씩 떨어뜨려 pH 2 이하로 산성화시키고 NaCl로 포화시킨 후 이미 보고한 고상추출법을 적용하기 위해서 Chromosorb P 컬럼에 loading시켰다. Diethyl ether로 유기산들을 선택적으로 용출시켜 얻은 약 4 ml의 ether 용출액에 triethylamine(TEA) 10 μl를 가하고 ether를 휘발시킨 후 MTBSTFA 10 μl와 isooctane 80 μl를 가하여 60°C에서 1시간 반응시킨 뒤 GC 및 GC-MS로 분석하였다.

유기산 동정 방법: RI값들로 각 유기산들을 확인하기 위해 TBDMS 유도체로서 약 88가지 이상의 유기산 표준물질들을 dual capillary column system에 on-column injection하여 분석한 후 RI library(ACIDO. L)를 작성하였다. 각 식물성 유지 시료들의 GC peak들의 RI값과 RI library값과 비교하여 동정하였다. 동정된 각 peak들은 면적비 비교법으로^(10,11) 재확인하였으며 또한 GC-MS로 분석하여 얻은 mass spectrum들을 미리 작성한 MS library(TBDMS.1)와 비교하여 확인하였다.

유기산 RI spectrum 작성: DB-5 컬럼으로 얻어진 GC chromatogram에서 유기산들의 피크 면적을 팔미트산의 피크 면적에 대한 백분 상대치로 바꾸었다. 각 유기산들의 RI값에 대한 백분 상대치 변화를 막대 그래프 형태로 표시하여 RI 스펙트럼을 작성하였다.

참기름의 지방산 정량분석: 먼저 올레산과 리놀레산 각각 150, 300, 600 μg과 내부표준물질로서 heptadecanoic acid 300 μg을 함유한 dichloromethane 용액을 식물성 유지의 분리 농축방법과 동일한 방법으로 전처리한

후 GC 분석하여 검량곡선을 작성하였다. 3종의 참기름 시료에 각각 내부표준물질 300 µg씩을 첨가한 후 분석하여 미량으로 존재하는 올레산과 리놀레산을 정량하였다.

결과 및 고찰

식물성 유지내 유기산의 분리농축

유기산 시료 matrix가 식물성 유지일 경우에는 Chromosorb P 컬럼으로 고상추출하기 전에 유기용매에 용해시킨 후 유기산들을 물로 추출하는 전처리 과정이 필요하였다. 예비실험결과 유지를 diethyl ether보다는 비중이 물보다 높은 dichloromethane에 용해시킨 후 NaHCO₃ 포화수용액으로 추출할 때 유지로부터 지방산 분리회수가 더 효과적이었다. 한편 유지에는 유기산들이 미량 존재하므로 효율적으로 NaHCO₃ 수용액층으로 회수하기 위해서는 20분 이상의 혼합, 3회에 걸친 추출과정과 층분리를 위해서 2000 rpm에서 10분간 원심분리가 필요하였다. 유리지방산이 미량있는 정제유인 미강유, 대두유는 층분리시 맑은 수용액층을 얻을 수 있었으나 참기름과 들기름의 경우에는 하얀 비누층을 얻었다. 이는 비교적 정제가 덜된 이들 식물성 유지에 다량 존재하는 유리지방산이 비누화하여 생성된 것으로 본다. Chromosorb P 컬럼으로부터 diethyl ether로 용출된 유리지방산과 유기산들은 용매를 휘발시키기 전에 비휘발성 triethylammonium 염으로 만들었다. 이에 따라 농축과정에서 휘발성 유기산들이 손실되지 않으므로 식용유의 제조과정 중 지방산들이 산화분해되어 생성될 수 있는

미량의 휘발성 및 비휘발성 유기산들을 유리지방산들과 함께 동시에 분리 농축할 수 있었다.

식물성 유지의 유리지방산 및 유기산 스크리닝

각 유지로부터 분리농축된 유기산시료를 TBDMS 유도체로서 극성이 서로 다른 DB-5와 DB-1701 dual capillary column GC system에 의해 분석한 후 이미 보고한대로^(10,11) RI library 조사와 면적비 비교에 의해 동정하였을 때 식물성 유리지방산을 포함하여 총 19종의 유기산들이 동정되었다. 동정된 유기산들은 GC-MS에 의해 확인하였으며 Table 1에 비교되어 있다.

탈산과정을 거쳐 유리지방산가를 0.2 이하가 되도록 정제된 대두유와 미강유에서는 팔미트, 올레, 리놀레, 스테아르산의 4종이 공통적으로 발견되었으며 필수지방산인 리놀렌산은 미강유에서만 미량 검출되었다.

착유후 여과과정만을 거쳐서 정제된 참기름 시료에서는 이들 공통적인 4종의 유리지방산과 vanillic acid가 검출되었다. 그러나 vanillic acid는 아직 참기름에서 검출되었다는 보고는 없다. 이는 참기름의 향기성분 중의 하나인 vanillin이⁽¹²⁾ 참기름 제조 및 여과과정에서 vanillic acid로 산화되어 존재하는 것으로 추정된다.

정제 안된 참기름 시료에서는 정제된 참기름보다 많은 종류의 유기산들이 스크리닝되었다. 주요 지방산 외에 탄소수가 적은 라우르산, 미리스트산을 포함하여 6종의 유리지방산이 검출되었으며 천연에는 존재하지 않으나 리놀렌산과 같은 불포화지방산이 산화될 때 생성된다고 보고된⁽¹³⁾ 탄소수가 홀수인 propionic, undecanoic, tridecanoic acid가 발견되었다. 참깨박 껍질에 존재한다고

Table 1. Organic acids in the vegetable oils identified by GC-RI and GC-MS machining

Peak No.	Name of Acids	Retention Index		Oils				
		DB-5	DB-1701	Purified			Crude	
				Soybean	Rice-bran	Sesame	Sesame	Perilla
1	Propionic	1016.5	1065.5				+	+
2	Oxalic	1548.3	1611.5				+	
3	α -Hydroxyisocaproic	1651.7	1692.0				+	
4	Undecanoic	1768.2	1830.7				+	
5	Fumaric	1786.4	1872.3				+	
6	Glutaric	1855.3	1952.3				+	
7	3-Methylglutaric	1870.6	1959.5				+	
8	Lauric	1883.1	1933.8				+	+
9	3,4-Dimethoxybenzoic	1956.8	2156.4				+	+
10	Tridecanoic	1984.1	2043.3				+	
11	Myristic	2085.9	2137.6				+	+
12	α -Hydroxyphenylacetic	2093.4	2208.9				+	
13	Vanillic	2258.4	2345.5				+	+
14	Palmitic	2287.7	2340.6	+	+	+	+	+
15	Oleic	2465.4	2526.6	+	+	+	+	+
16	Linoleic	2465.2	2544.0	+	+	+	+	+
17	Stearic	2489.9	2544.1	+	+	+	+	+
18	Linolenic	2470.1	2556.2		+		+	+
19	Arachidic	2684.7	2742.3				+	+

Table 2. Amounts of free oleic acid and linoleic acid in the purified sesame oil products

Fatty acid	Amount found sesame oil (mg/ml)		
	Oil A	Oil B	Oil C
Oleic	5.36	3.41	3.43
Linoleic	5.58	3.49	4.04
Linoleic/Oleic	1.04	1.02	1.18

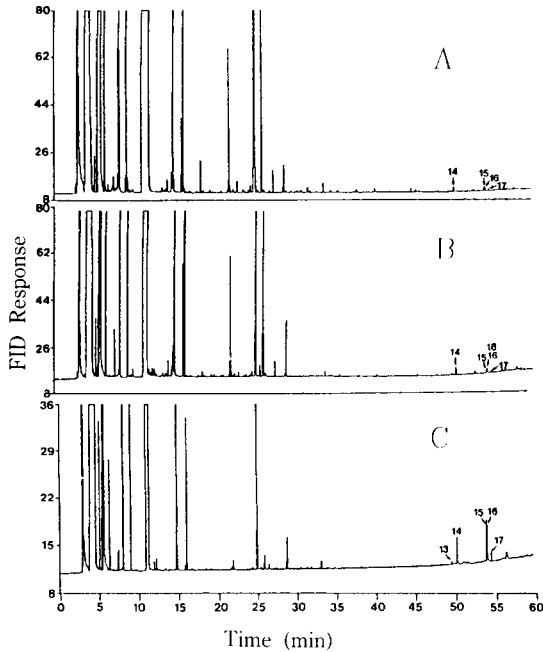


Fig. 2. Gas chromatographic profiles of free acids from purified soybean oil (A), rice bran oil (B) and sesame oil (C)

GC conditions are given in the text. Peak numbers correspond to those in Table 1

알려진⁽⁴⁾ 독성있는 oxalic acid가 검출되었고 정제된 참기름보다 훨씬 많은 양의 vanillic acid가 검출되었다. 또한 α -hydroxy-isocaproic, fumaric, glutaric, methylglutaric, 3,4-dimethoxy benzoic, α -hydroxyphenylacetic acid가 발견되었다. 본 실험실의 RI 및 MS libraries에 들어있는 유기산 중에서 17종만 동정되었고 이외의 많은 유기산 peak들은 동정하지 못하였다.

들기름 시료에서는 리놀레산, 아라키드산을 포함한 8종의 유리지방산과 propionic acid, 3,4-dimethoxybenzoic acid가 스크리닝되었다. 아라키드산이 들기름에 존재하지 않는다는 보고⁽¹⁴⁾와는 달리 본 실험에서는 미량 검출되었다. 참기름 시료에서 발견되지 않은 리놀렌산이 들기름에서는 많은 양으로 검출되었으므로 두 유지를 분별하는 좋은 지표로 사용하기 위해서 또한 정제하지 않은

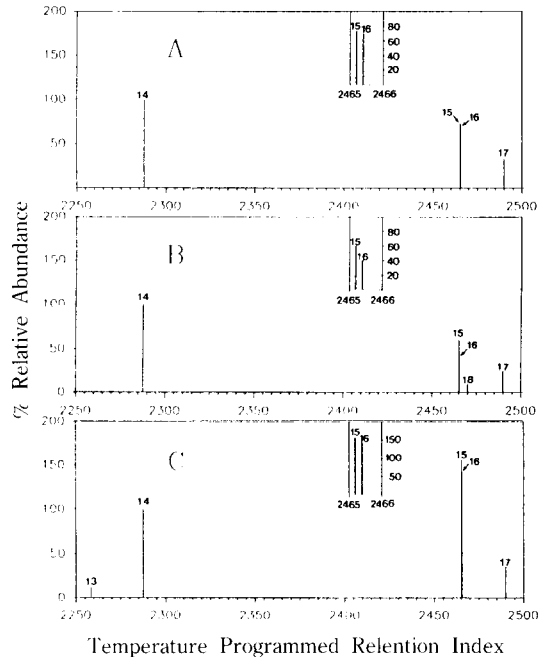


Fig. 3. Temperature programmed Retention index spectra of free acids from purified rice bran oil (A) and soybean oil (B) and sesame oil (C)

Each peak number corresponds to those of Table 1

참기름 혹은 들기름에 대한 규격을 정하는데 본 분석법이 효과적으로 이용될 수 있을 것이다.

참기름 중 유리상태의 올레산 및 리놀레산 정량분석

식물성 유지를 구성하는 트리글리세리드내에 결합되어 있는 올레산과 리놀레산의 함량비율은 유지마다 상이하다. 참기름인 경우에 총 지방산의 38%가 올레산, 45%가 리놀레산으로 구성되어 있다고 보고되었다⁽¹¹⁾. 총 지방산 중의 이러한 함량비와 유리상태로서의 비율과의 상관성을 조사하기 위해서 DB-1701 컬럼을 이용하여 시판되는 참기름 제품 중 유리지방산을 신속히 스크리닝하고 올레산과 리놀레산을 정량하였다.

스크리닝된 유리지방산의 종류는 서로 유사했으나 세 제품의 올레산과 리놀레산의 절대함량은 Table 2에서 보는 바와 같이 시료 1ml당 각각 3.41에서 5.36 mg, 3.49에서 5.58 mg 범위이지만 올레산에 대한 리놀레산의 함량비는 각각 1.02, 1.04, 1.18의 좁은 범위에서 일치하고 있다. 따라서 총 지방산보다 유리지방산의 분석이 좀더 간편하고 신속하므로 본 방법에 의한 함량비는 참기름 순도 및 품질을 평가하는 지표로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

식물성 유지의 유기산 GC 프로파일 및 RI spectra 비교

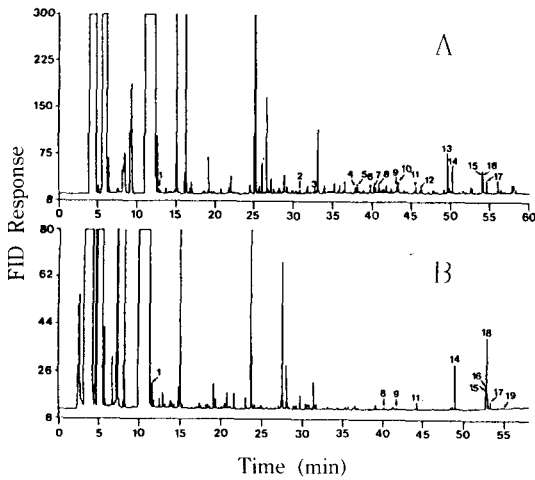


Fig. 4. Gas chromatographic profiles of free acids from crude sesame oil (A) and perilla oil (B)
GC conditions are given in the text. Peak numbers correspond to those in Table 1

각 유지의 유기산 패턴을 비교하여 상이성을 찾기 위하여 DB-5 컬럼에 의해 얻어진 GC 프로파일들을 이용하였다. 또한 동정된 유리지방산과 유기산 피크들만을 선택적으로 확대하여 정성 및 정량적인 패턴을 뚜렷히 보기 위하여 GC 프로파일들을 막대 그래프 형태의 RI spectra로 단순화시켰다. RI값에 차이가 적어서 구별 안되는 피크들은 다시 확대하였다.

정제된 대두유, 미강유 및 참기름의 GC profile들은 Fig. 2에 서로 비교되어 있다. 미강유의 18번 피크(리놀렌산)와 참기름의 13번 피크(vanillic acid)가 각 유지의 차이를 보여주고 있다. 예상한대로 Fig. 3의 RI spectra는 각 유지의 패턴차이를 더 잘 보여주고 있다.

정제 안된 참기름과 들기름의 차이는 Fig. 4의 GC profile에 잘 나타나 있다. 여기에서는 특징적인 13, 18번 피크 이외에 많은 peak들이 유지의 차이를 보여주고 있다. RI spectra(Fig. 5)는 좀더 뚜렷한 정성 정량적인 패턴 차이를 보여주고 있다.

막대 그래프 형태의 RI spectra가 유기산 패턴들의 상이성은 보여주지만 상이한 정도를 구체적으로 제시하지 못한다. 그러므로 유기산 profile들을 기초로하여 match quality와 같은 수식화된 통계적 비교방법이 병행된다면 더욱 효과적인 것으로 사료된다.

요 약

식물성 유지에 존재하는 유리지방산과 유기산들을 고상추출법으로 분리 농축하여 안정하고 휘발성이 큰 TB-DMS 유도체로 전환한 후 GC와 GC-MS로 분석하였다. 고상 추출하기 전 유지를 dichloromethane에 용해시키고

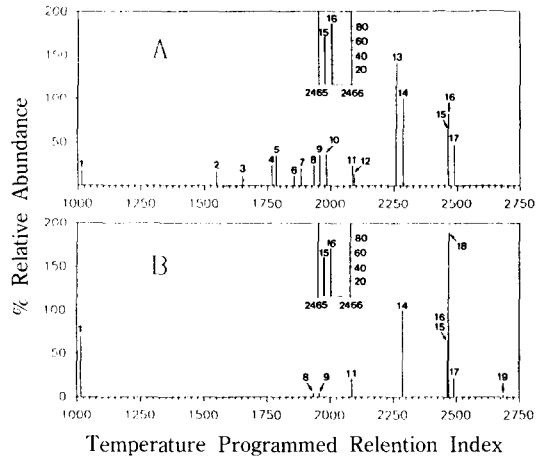


Fig. 5. Temperature programmed retention index spectra of free acids from crude sesame oil (A) and perilla oil (B)
Each peak number corresponds to that of Table 1

NaHCO₃ 포화수용액으로 추출하는 방법이 지방산 회수에 매우 효과적이었으며 TBDMS 유도체화하기 전 유기산들을 triethylammonium 염으로 만들어 줌으로써 미량의 휘발성 유기산의 손실을 막을 수 있었다. 대두유, 미강유, 참기름, 들기름 등을 분석한 결과 탄소수가 많은 유리지방산들이 주로 동정되었으며 정제하지 않은 참기름에서는 탄소수가 흡수인 지방산들을 포함한 다양한 유기산들이 확인되었다. 아직 보고된 바 없는 아라키드산과 vanillic acid를 각각 들기름과 참기름에서 발견하였으며 참기름에 존재하는 유리상태의 올레산에 대한 리놀레산의 양적비율은 1.02~1.18로 문헌에 보고된 전체 지방산 중의 함량비율인 1.19와 상당히 유사했다. 유리상태로서의 올레산과 리놀레산의 함량비는 참기름의 adulteration 여부를 판정하는 지표로 이용될 수 있을 것으로 예상된다. 유지의 유기산 조성을 단순화된 막대 그래프 형태의 RI spectra로 표현한 결과 각 유지의 패턴 분별이 매우 용이했다.

감사의 글

본 연구는 일부 1988년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유공문과제 학술연구조성비 지원으로 수행되었음.

문 헌

1. 김동훈 : 식품화학, 탐구당, p.449-622(1989).
2. 신효선 : 우리나라의 식품유지 산업의 현황과 발전방향. 식품과학과 산업, 23(2), 3(1990)
3. Sebedio, J.L., Kaitaranta, J., Ghrandirard, A. and Malkki, Y.: Quality assessment of chrandirard industrial prefried fre-

- ch fries. *JAACS*, **68**, 299(1991)
4. 박원옥, 이 열, 성난웅 : 참깨박의 특성 효과에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **6**, 147(1974)
 5. Woo, A.H. and Lindsay, R.C.: Rapid method for quantification analysis of individual free fatty acids in cheddar. *J. Dairy Sci.*, **65**, 1102(1982)
 6. Woo, A.H. and Lindsay, R.C.: Concentration of major free fatty acids and flavor development in Italian chees varieties. *J. Dairy Sci.*, **67**, 960(1984)
 7. Harvey, D.J., Tiffany, J.M., Duerden, J.M. Pandher, K. S. and Mengher, L.S.: Identification by combined gas chromatography-mass spectrometry of constituent long-chain fatty acids and alcohols from the meibomian glands of the rat and a comparison with human meibomian lipids. *J. Chromatography*, **414**, 253(1987)
 8. Kim, K.R., Hahn, M.K., Zlaktis, A., Horning, E.C. and Middleditch, B.S.: Simultaneous gas chromatography of volatile and nonvolatile carboxylic acids as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chrom.*, **486**, 289(1989)
 9. Kim, K.R., Hahn, M.K., Kim, J.H. and Park, H.K.: Rapid identification and profiling of organic acids by gas chromatography. *Proceedings of the Third Korea-Japan Joint Symposium on Analytical Chemistry*, 119(1989)
 10. 김경래, 김정환, 박형국 : TROMS 유도체로서 수용액 식료 중의 유기산 미량분석 연구. *대한화학회지*, **34**, 352(1990)
 11. Kim, K.R., Kim, J.H., Park, H.K. and Oh, C.H.: Dual capillary column system for the qualitative gas chromatography: 1. Comparison between split and splitless injection modes. *Bull. Korean Chem.*, **12**, 87(1991)
 12. Nakamura, S., Nishimura, O., Masuda, H. and Mihara, S.: Identification of volatile flavor components of the oil from roasted sesame seeds. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1891(1989)
 13. Taku, M., Toshitaka, N. and Yuhhji, N.: Oxidation of double bonds in unsaturated fatty acids of butterfat. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, **22**, 107(1989)
 14. 이양자 : 유지 영양의 문제점과 개선 방향. *식품과학과 산업*, **23**, 13(1990)

(1992년 6월 19일 접수)