

α -Tocopherol이 첨가된 Methyl Linoleate의 산화물 생성 기구

김정숙 · 이기동 · 권중호 · 윤형식

경북대학교 식품공학과

Oxidation Mechanism of Methyl Linoleate with α -Tocopherol

Jeong-Sook Kim, Gee-Dong Lee, Joong-Ho Kwon and Hyung-Sik Yoon

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

Abstract

Oxidation mechanisms of methyl linoleate with α -tocopherol(TML) were investigated by determining oxidized products using GC-MS during oxidation at 37°C for 9 days. Oxidized products of TML were found to be methyl octanoate, methyl-8-(2-furyl)-octanoate, 9,13-trans, cis isomer and 9,13-trans, trans isomer. In previous report, oxidation products of methyl linoleate(ML) were methyl-8-(2-furyl)octanoate, 9,13-trans, cis hydroperoxide isomer, 9,13-trans, trans hydroperoxide isomer, and 9-TMSO-12,13-epoxy-10-octadecenoate. In the case of ML, 9-TMSO-12,13-epoxy-10-octadecenoate was produced instead of methyl octanoate in TML. α -tocopherol quinone, as a major oxidized product of α -tocopherol was formed at the 6th day of oxidation. α -Tocopherol quinone was produced rather quickly in lipid media than aqueous media. In oxidation of methyl linoleate, it was shown that the first oxidized product was methyl-9,13-hydroxy-octadecadienoate. As second products, methyl-8-(2-furyl)-octanoate, 9-TMSO-12,13-epoxy-10-octadecenoate, and methyl octanoate were oxidized from methyl-9-hydroxy-10-trans, 12-trans-octadecadienoate.

Key words: methyl linoleate, α -tocopherol, oxidation products

서 론

식품의 가공 및 저장 중 지방질 성분의 변화는 식품의 품질과 안전성 측면에서 많은 문제점을 야기할 수 있으므로 산패억제를 위한 여러 방법들이 연구되어 왔으며^(1,2), 이 중의 하나는 항산화제를 첨가하는 것이다⁽³⁾. 천연물 중에는 항산화 작용을 가진 물질이 존재하는데, 이러한 천연 항산화제에는 tocopherol⁽⁴⁾을 포함한 수소 공여능이 강한 phenol성 물질들이 알려져 있다^(5,6). Phenol성 물질들은 산소의 존재나 고온 조건하에서 phenol의 OH기가 유지의 자동산화과정 중에 형성되는 free radical을 제거하는 역할을 하여 유도기간을 연장시켜 산패를 억제한다⁽⁷⁾. 특히 α -tocopherol은 이성체 종류에 따라 항산화 효과의 차이가 있는 것으로 밝혀지고 있다^(8,9).

불포화지방산과 그 에스테르 화합물의 자동산화로 생성된 여러 종류의 과산화물들은 식용유지의 품질저하 및 생체에 독성을 끼친다^(10,11). 그 예로서 arachidonic acid로부터 생성된 과산화물은 prostaglandin과 혈소판 기능과

의 작용으로 심장질환을 유발하는 등⁽¹²⁾ 많은 문제가 지적되고 있으며, 따라서 최근에는 천연물 및 식품의 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

지금까지 α -tocopherol의 항산화성에 관한 연구와 이를 지질에 첨가하였을 때의 과산화물 생성을 및 tocopherol 이성체들 간의 반응성에 관한 연구는 있으나⁽⁷⁻⁹⁾ 지질에 α -tocopherol을 첨가하였을 시 과산화물 이외의 산화생성물에 관한 연구는 행해지지 않았으므로, 본 연구에서는 methyl linoleate에 α -tocopherol을 첨가하여 산화시켰을 때 산화 생성물들의 구조 및 생성 기구에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

시약 및 분석 기기

본 실험에 사용된 시약은 methyl linoleate, α -tocopherol(Sigma), N-O-bis trimethylsilyl acetamide(Fluka), pyridine(Aldrich)이며, 기타 시약 및 용매는 특급품이었다. 또한 TLC plate(Merck, silicagel 60 F 254, (No. 5554) 등이 사용되었다. 사용된 기기는 gas chromatograph-mass spectrometer(Shimadzu Qp 1000A, Japan), milli-Q water purification system(Waters Associates, U.S.A.) 등이었다.

Corresponding author: Hyung-Sik Yoon, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Sankyuk-dong, Teagu 702-701, Korea

기질의 조제 및 산화

Methyl linoleate 3g 및 증류수 5 ml에 α-tocopherol을 0.05%(w/w) 농도로 첨가하여 37°C에 저장하면서 산소를 시간당 5l의 속도로 주입하여 3, 6 및 9일 동안 산화시켰다⁽¹³⁾.

산화생성물의 분리

시료에 ethanol 20 ml와 증류수(pH 9.5) 50 ml를 가한 후 sodium borohydride 0.15g을 첨가하여 37°C에서 환원시키고 ether로 5회 추출하였다⁽¹⁴⁾. 그 추출액은 질소가스하에서 농축하고 N-O-bis-trimethylsilyl acetamide와 pyridine으로 trimethylsilylation하여 사용하였다.

TLC에 의한 α-tocopherol 산화물 분석

α-Tocopherol 산화물 분석시 α-tocopherol은 소량의 ethanol로 녹여 증류수를 가하여 산화시킨 뒤 감압농축하여 진공 건조하고 소량의 chloroform에 녹여 spot하였다⁽¹⁵⁾. 용매는 chloroform을 사용하여 전개시켰으며, sulfomolybdic reagent 액을 분무한 후 120°C에서 5분간 가열하였다.

GC-MS에 의한 지질산화물 분석

Shimadzu GC-MS Qp 1000A model을 사용하였다. Column은 fused silica WCOT capillary column(0.2 mm×25m)에 충전 물질은 3% SE-30 chromosorb W.80/100 mesh를 사용하였으며, detector는 FID를 사용하였다. Flow rate는 28 ml/min., carrier gas는 helium, injection volume은 2 μl, splitless mode, oven temperature는 180°C에서 1분, 216°C에서 5분, 250°C에서 10분이었으며, rate는 6°C/min., 9°C/min., ion source pressure는 1.8×10⁻⁵ torr, ionizing voltage는 70 eV, injector temperature는 260°C 및 detector temperature는 270°C였다.

결과 및 고찰

α-Tocopherol 첨가 methyl linoleate의 산화

Methyl linoleate 산화에 미치는 α-tocopherol의 영향: Methyl linoleate에 α-tocopherol을 첨가하여 37°C에서 3, 6 및 9일간 산화시킨 후 TMS화하여 측정된 GC chromatogram은 Fig. 1과 같다. 3일째에 있어서 peak 3은 methyl-9-hydroxy-10 trans, 12 cis-octadecadienoate와 13-hydroxy-9 cis, 11 trans-octadecadienoate의 혼합물로 밝혀졌다. 여기에서 α-tocopherol은 trans, trans hydroperoxide isomer의 생성을 억제하는데 이는 초기단계에서 peroxy radical에 대한 α-tocopherol의 OH기가 유지의 유리기를 수용한 것으로 보여졌다⁽¹⁶⁾. 또 3일째까지는 비교적 낮은 농도의 α-tocopherol도 산화를 지연시켜 산화 초기에는 나타나지 않다가 산화가 다소 진행되면



Fig. 1. GC chromatogram of oxidized TML group (peak 0: methyl octanoate, peak 1: methyl-8-(2-furyl)octanoate, peak 2: methyl linoleate, peak 3: methyl-9-hydroxy cis, trans isomer and methyl-13-hydroxy cis, trans isomer, peak 4: methyl-9-hydroxy trans, trans isomer and methyl-13-hydroxy trans, trans isomer, peak 5: α-tocopherol, peak 6: α-tocopherol quinone)

나타나는 trans, trans isomer의 생성이 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다. Peak 5는 GC-MS로 분석한 결과 α-tocopherol로 밝혀졌다. 6일 째에 가서 peak 1은 methyl-8-(2-furyl)octanoate로 밝혀졌으며, peak 3은 9-hydroxy-trans, cis isomer와 13-hydroxy-cis, trans isomer의 혼합물로, 또 peak 4는 9-hydroxy-trans, trans isomer와 13-hydroxy-trans, trans isomer의 혼합물로 나타나서⁽¹⁷⁾ 6일째부터 trans, trans hydroperoxide isomer의 생성이 급격히 증가함을 알 수 있었다.

Peak 6은 α-tocopherol이 hydroperoxide로부터 분리된 peroxy radical과 반응하여 생성된 α-tocopherol 산화물인 α-tocopherol quinone으로 확인되어 Fig. 2에 나타내었다. 9일째의 trans, trans hydroperoxide isomer의 생성율은 더 높아져서 산화가 더욱 진행된 것을 알 수 있으며, peak 0은 M⁺158, 127(M-CH₃O)⁺, 87(CH₂-COOCH₃)⁺, 74(CH₃-O-C=CH₂)⁺의 ion peak로서 Fig. 3과 같이 methyl octanoate로 밝혀졌다.

산화 9일에서는 6일과 같이 T+ML에서 α-tocopherol이 검색되지 않고, α-tocopherol의 산화물인 α-tocopherol quinone만이 검출되어 다른 연구에서 linoleic acid에 α-tocopherol을 첨가하여 5일을 저장한 결과 α-to-

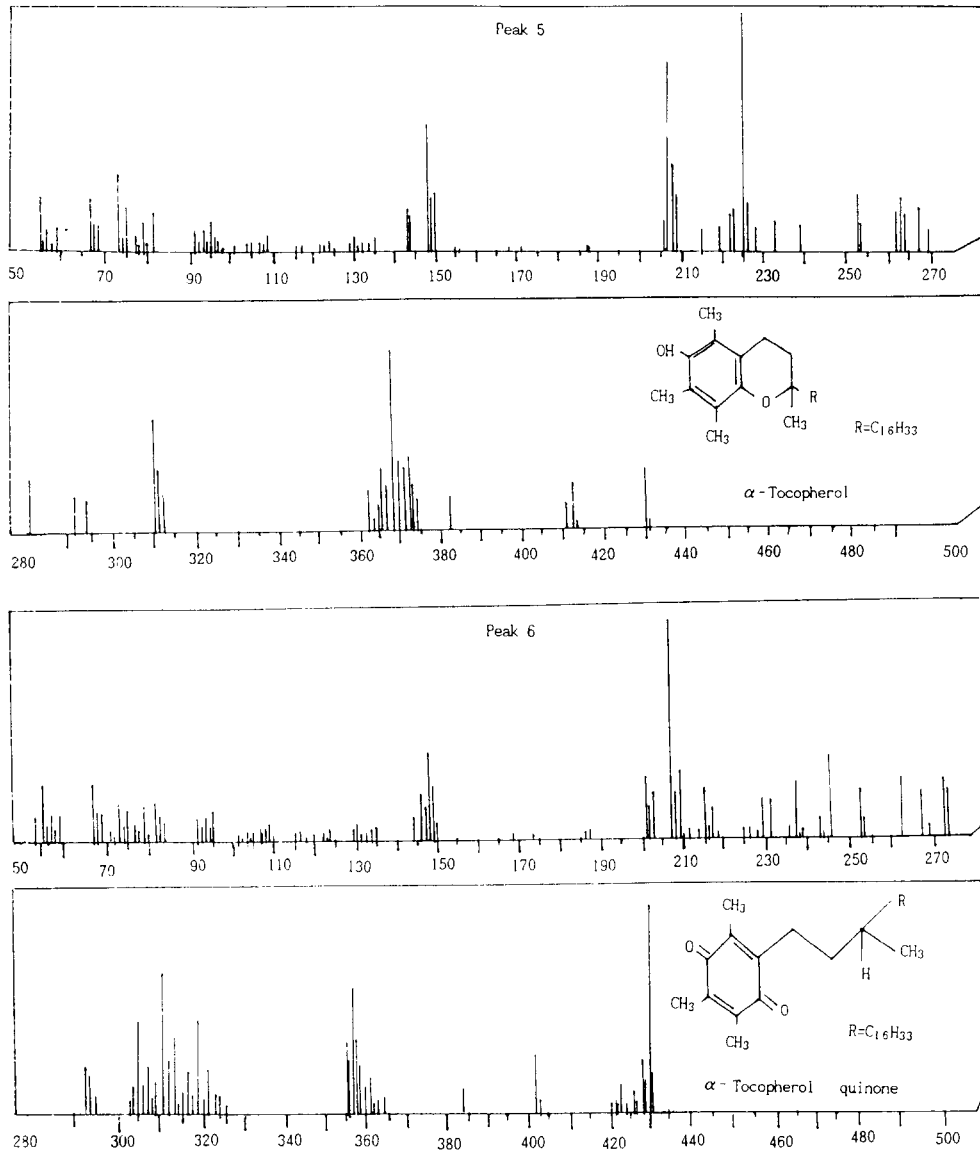


Fig. 2. MS spectrum of α -tocopherol quinone

copherol은 흔적만 남고 거의가 α -tocopherol quinone으로 변화하였다는 보고⁽¹⁶⁾와 유사하였다. 그리고 3일에서는 α -tocopherol의 존재로 인해서 ML보다 과산화치가 낮으나 6일과 9일에서는 POV가 급격히 증가하였는데 이는 α -tocopherol이 너무 빠른 속도로 쉽게 산화하여 prooxidant reaction에 들어갈 수 있는 충분한 양의 perhydroxy radical을 생성하였기 때문으로 사료되었다.

α -Tocopherol의 산화: α -Tocopherol의 산화 생성물이 동정됨에 따라 α -tocopherol을 소량의 ethanol로 녹여 물을 가하여 37°C에서 9일간 산소 주입하에 산화시켜 TLC에 의해 그 산화 생성물을 확인한 결과는 Fig. 5에

나타내었다. 9일 산화시킨 후에는 α -tocopherol quinone이 다량 생성되었으나 α -tocopherol의 존재도 검색되었으므로 α -tocopherol은 aqueous media보다 lipid media에서 더 산화 속도가 빠른 것으로 사료되었다.

산화물 생성 기구

Methyl-9,13-isomer의 생성: Methyl linoleate는 분자상 산소에 의하여 서서히 산화하여 methyl-9-hydroxy-10,12-octadecadienoate와 methyl-13-hydroxy-9,11-octadecadienoate의 cis, trans isomer를 생성한다⁽¹⁷⁾.

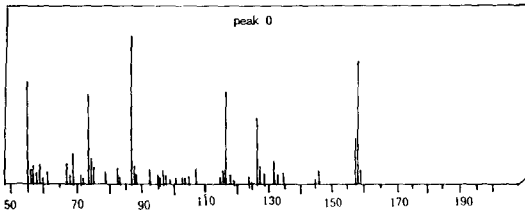


Fig. 3. MS spectrum of methyl octanoate

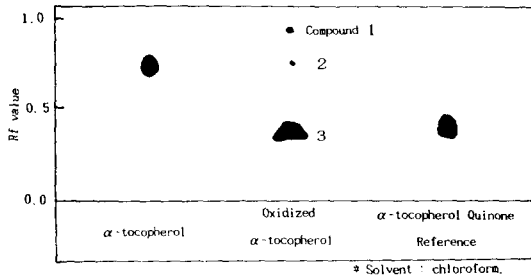
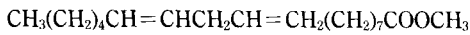


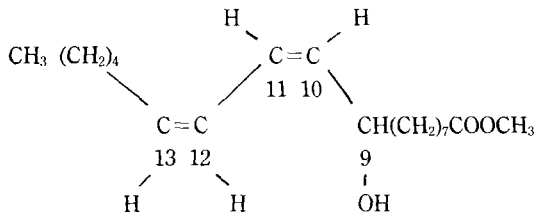
Fig. 4. TLC chromatogram of oxidized α-tocopherol and its oxidized products

(compound 1: α-tocopherol dimer, compound 2: α-tocopherol, compound 3: α-tocopherol quinone)

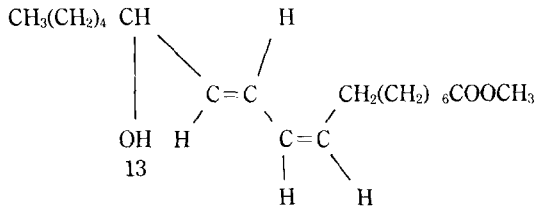
* Methyl linoleate



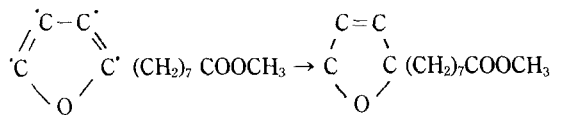
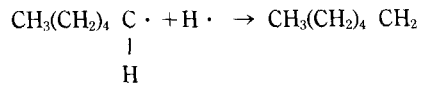
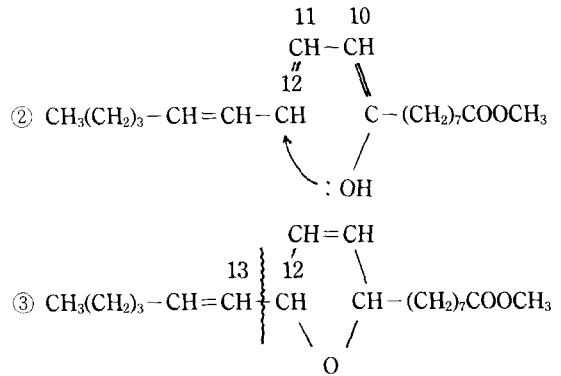
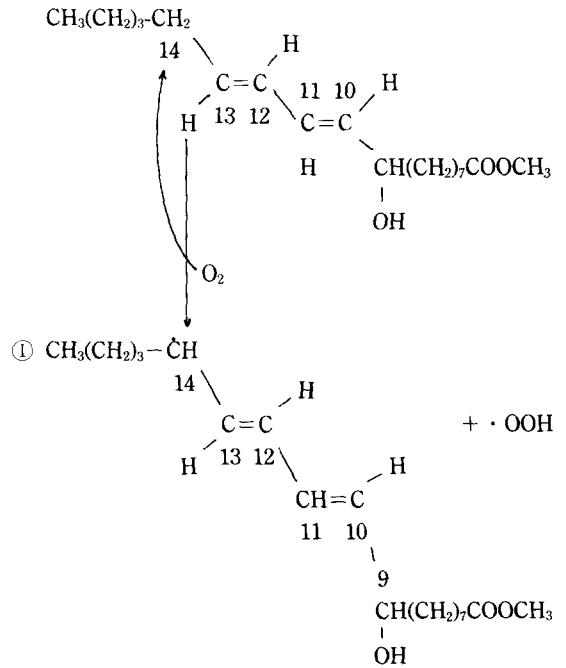
* Methyl 9-hydroxy-10,12-octadecadienoate



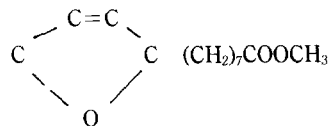
* Methyl 13-hydroxy-9,11-octadecadienoate



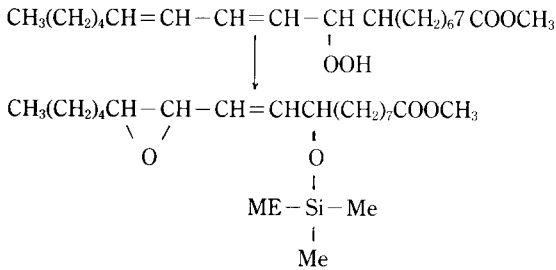
Methyl-8-(2-furyl)-octanoate의 생성 : Methyl-9-hydroxy-10 trans, 12 trans-octadecadienoate에서 12번 위치의 이중결합이 9번 위치의 -OH와 ②번 경우 처럼 변한 후 ③번에서 12번과 13번의 C-C bond가 깨어져서 생성된다.



* Methyl-8-(2-furyl)-octanoate



Methyl-9-TMSO-12,13-epoxy-10-octadecenoate의 생성 : Methyl-9-hydroperoxide isomer에 의해 9-TMSO-12,13-epoxide가 생성되었으며 이 epoxy-hydroperoxy octadecenoate는 13-hydroperoxide isomer에 의해 생성되는 경우도 있는 것으로 밝혀지고 있다⁽¹⁸⁾.



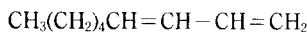
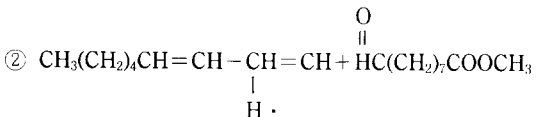
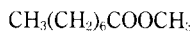
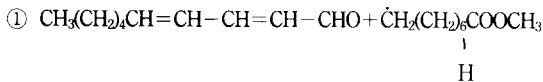
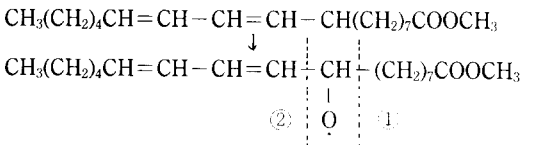
* Methyl-9-TMSO-12,13-epoxy-10-octadecenoate

위에서 이 TMSO는 hydroxyl기에 N-O-bis-trimethylsilyl acetamide가 결합한 trimethylsilylation에 의해 생성된 것으로 사료되었다.

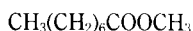
Methyl octanoate의 생성 : 그리고 이 methyl-9-hydroxy isomer가 thermal decomposition에 의해 alkoxy radical의 α-bonding cleavage가 생기면 다음 ①번과 ②번의 경우로 산화하게 된다.

①번의 경우에서 methyl octanoate가 생성된다.

Methyl-9-hydroxy-10,12-octadecadienoate



* Methyl octanoate



요 약

Methyl linoleate에 α-tocopherol을 첨가하여(TML) 37

℃에서 9일간 산화시키면서 산화생성물의 확인 및 생성 기구에 대하여 GC/MS를 사용하여 검토하였다. TML군에서의 산화 생성물들은 methyl octanoate와 methyl-8-(2-furyl)-octanoate 및 9,13-trans, cis isomer와 9,13-trans, trans isomer로 밝혀졌다. 전보의 methyl linoleate (ML)에서의 산화생성물과 비교하여 볼 때 9-TMSO-12,13-epoxy-10-octadecenoate 대신 methyl octanoate가 생성되었다. α-Tocopherol의 주된 산화물인 α-tocopherol quinone은 반응 6일부터 생성되었으며, α-tocopherol은 aqueous media보다 lipid media에서 산화가 빨리 진행되는 것으로 나타났다. Methyl linoleate의 산화에 의한 생성물들의 생성과정 기구를 추정할 결과, 우선 methyl-9,13-hydroxy-octadecadienoate가 생성되고 다시 methyl-9-hydroxy-10 trans, 12 trans-octadecadienoate로부터 methyl-8-(2-furyl)-octanoate와 9-TMSO-12,13-epoxy-10-octadecenoate 및 methyl octanoate가 생성된 것으로 사료되었다.

문 헌

1. Patricia, A. and Pratt, D.E.: Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, **43**, 556(1978)
2. Taylor, M.: Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin. *J. Food Sci.*, **45**, 1223(1980)
3. Mahoney, J.R.: Role of α-tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model systems. *J. Food Sci.*, **51**, 1293(1986)
4. Lin, C.F., Gray, J.I. and Flegal, C.J.: Effects of dietary oils and α-tocopherol supplementation on lipid composition and stability of broiler meat. *J. Food Sci.*, **54**, 1457(1989)
5. Avena, S.L. and Hinoat, L.V.: Ferulic acid and other phenolics in oat seeds. *J. Food Sci.*, **42**, 551(1977)
6. Kozłowska, H. and Zadernowski, R.: Phenolic acids in rapeseed and mustard. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 1119(1983)
7. Cilliers, J.J.L. and Singleton, V.L.: Caffeic acid autoxidation and the effect of thiols. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1789(1990)
8. Cilliers, J.J.L. and Singleton, V.L.: Nonenzymic oxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 890(1989)
9. 鈴木滿夫, 松下雪郎: 食品成分 相互作用. 講談社, 202 (1980)
10. Frankel, E.N.: Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1908(1984)
11. Faustman, C., Buege, D.R. and Scheller, K.K.: Improvement of pigment and lipid stability in holstein steer beef by dietary supplementation with vitamin E. *J. Food Sci.*, **54**, 858(1989)
12. Bruno, B., Cillard, J. and Cillard, P.: Arachidonic acid autoxidation in an aqueous media effect of tocopherol, cysteine and nucleic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1212(1984)