

## 알카리 및 酸觸媒法에 의한 conjugated triene 脂肪酸 殘基를 含有한 트리글리세리드의 메칠 에스테일의 比較

趙 鏞 桂

東亞大學校 生活科學大學 食品營養學科

### Methyl Ester Preparation from Triacylglycerols Containing Conjugated Trienoic Fatty Acids, by Alkaline and Acid Catalysts

Yong-Goe Joh

Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-A University

(Received March 31, 1995)

#### ABSTRACT

Conventional alkaline catalytic procedures including sodium methoxide-methanol,  $N, N, N', N'$ -tetramethyl guanidine-methanol, and acid-catalytic methods of  $BF_3$ -methanol and HCl-methanol, have been applied for preparing methyl esters from the triacylglycerols of *Trichosanthes kirilowii* seeds containing conjugated trienoic acids. The alkaline catalytic methods produce the methyl esters quantitatively without isomerization of the conjugated trienoic acids, but the acid-catalytic ones destroy almost the molecules of conjugated trienoic acids during transesterification of the triacylglycerols although the molar ratios of monoenoic and dienoic acids (non-conjugated) to saturated acids are in good agreement with those obtained from the alkaline methods.

#### I. 序 論

脂肪酸 메칠에스테일(fatty acid methyl ester, FAME)<sup>1)</sup>는 脂肪酸보다 沸騰點과 極性이 낮아, 이는 脂肪酸를 가스 크로마토그래피-(Gas Chromatography, GC)로 分析할 때 構成 脂肪酸 各各의 分離能(resolution)을 높혀 준다. 또 試料의 混合 FAME를 GC의 FID detector로 分析할 때, 각 脂肪酸 peak의 response比가 相應하는 構成 脂肪酸의 무게比와 거의 一致하므로, FAME化는 脂肪酸 分析을 위한 試料의 前處理 過程에서 거쳐야 할 必須的인 段階이다.

脂肪酸의 FAME은 總脂質 또는 어떤 脂質分割을

加水分解하여 얻어진 遊離 脂肪酸를 diazomethane-diethyl ether<sup>8)</sup> 또는  $BF_3$ -methanol<sup>6)</sup>로 methyl esterification하여 調製되었으나, 이 경우 加水分解 過程에서 不飽和 脂肪酸의 二重結合의 異性化를 가져올 可能性이 매우 크므로, 高度不飽和 脂肪酸를 含有한 試料에는 이 方法이 不適合하다고 한다.<sup>10, 11)</sup> 따라서 現在는 試料를 直接 transesterification하여 FAME를 만드는 方法이 널리 利用되고 있다. 이 方法에는 알칼리 觸媒法과 酸觸媒法이 있는데, 前者에는 sodium methoxide-methanol法,<sup>2)</sup>  $N, N, N', N'$ -tetramethyl guanidine-methanol法<sup>3)</sup>과 trimethylsulphonium hydroxide-methanol法<sup>4)</sup>이 있고, 後者에는 鹽酸(또는 黃酸)-methanol法,<sup>5)</sup>  $BF_3$ -methanol法<sup>6)</sup>(또

는  $\text{BCl}_3$ -methanol<sup>7)</sup>과 같은 것이 있다.

알카리-촉매法으로 脂質을 transesterification할 때 試藥의 濃度가 묽고, 試料脂質의 酸價가 극히 낮아야 하는 制約이 있으며,<sup>9)</sup> 또는 酸-촉매法에도 反應時間이 길고, wax esters나 sterol esters와 같은 悲極性 溶質이 溶媒(methanol)에 잘 녹지 않는 등 缺點이 많다.<sup>2)</sup> 특히  $\text{BF}_3$ -methanol法의 경우 試藥의 濃度가 진하거나 오래되면 artefact가 생기고, 또 高度不飽和 脂肪酸의 損失을 가져올 수도 있다고 한다.<sup>2)</sup> 1分子내 3個의 二重結合이 conjugated된 triene酸이 數量의 植物 種實油로부터 分離되어 그 構造가 밝혀졌고,<sup>12)</sup> 또 이 脂肪酸는 methylene interrupted conjugated double bond基를 가진 脂肪酸보다 光線, 熱, 空氣 그리고 酸과 같은 化學藥品에 아주 敏感하다는 事實도 알려져 있다.<sup>12)</sup> 따라서 이 特殊한 構造를 가진 脂肪酸을 FAME 誘導體化시킬 때 여러가지 副反應이 일어날 可能性이 豫想되므로, 그 方法을 慎重히 檢討해야 한다.

著者<sup>13)</sup>는 하늘수박 種實油에서 conjugated trienoic acid인 punicic acid(9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>)와  $\alpha$ -eleostearic acid(9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>)의 殘基를 包含한 트리글리세리드의 構成 分子種들을 silver ion 및 reversed-phase HPLC로 分割하기에 앞서, 이 트리글리세리드를 몇가지 方法으로 methyl esterification 하였더니, 다음과 같은 結果를 얻었다.

## II. 材料 및 實驗方法

### 1. 材料 및 試藥

하늘수박 열매는 갓 收穫한 것을 1993년 11월에 釜山 龜浦 市場에서 購入하여, 研究室에 運搬한 다음 果肉에서 씨만 精選하여 蒸溜水로 2~3回 洗滌한 後, 陰地에서 自然乾燥하여 實驗에 使用하였다.  $\text{BF}_3$ -methanol, N, N, N', N'-tetramethyl guanidine과 金屬 나트륨은 Aldrich社(Gillingham, U. K.)의 것을 購入하였고, 其他 溶媒는 Fisons社(Poole, U. K.)의 製品으로, HPLC 내지는 Analar-grade이었다. Isolute<sup>TM</sup> silica solid phase extraction column은 International Sorbent Technology社 (Mid-Glamorgan, U. K.)의 것을 使用하였다.

### 2. 總脂質 抽出과 트리글리세리드 分割<sup>13)</sup>

總脂質을 室泰 氣流下에서 Bligh and Dyer法<sup>19)</sup>에 따라 抽出하여 溶媒 除法 後, 그 1-2mg을 hexane/acetone(99:1, by volume)으로 이미 活性化 시켜둔 Isolute<sup>TM</sup> silica column에 吸着시킨 後, 上記 溶媒 30mL을 흘려 純粹한 트리글리세리드를 分割하고, 이 分割物을 室泰 氣流下에서 殘留 溶媒를 除去한 後 分析用 試料로 使用하였다. 또 以上の 모든 操作은 暗室에서 이루어졌다.

### 3. FAME 調製

#### 1) 알카리 觸媒

##### (1) Sodium methoxide-methanol法<sup>2)</sup>

트리글리세리드 2mg 程度를 0.5mL의 dry diethyl ether에 녹이고, 여기에 methyl acetate(20 $\mu$ L), 1M sodium methoxide-methanol(20 $\mu$ L)와 0.01% BHT-hexane(1mL)을 가하여 잘 混和시켜 常溫에서 5分間 放置한 後, acetic acid(2 $\mu$ L)를 가하여 反應을 中止시켰다. 室素 氣流下에서 餘分의 溶媒를 除去하고 hexane(5mL)으로 FAME를 回收하여 濃縮한 後, GC로 分析하였다.

##### (2) N, N, N', N'-tetramethyl guanidine-methanol法<sup>3)</sup>

트리글리세리드 2~3mg을 마개 달린 小型 試驗管에 옮기고 여기에 25% N, N, N', N'-tetramethyl guanidine-methanol 溶液 2 $\mu$ L를 가한 後, 마개를 단단히 하고 50°C에서 하룻밤 동안 反應시켰다. 이 反應溶液에 飽和 食鹽水 1mL와 hexane 1mL를 가하여 잘 흔들어 FAME를 hexane層으로 回收하였다. 이 hexane層을 無水芒硝를 채운 Pasteur pipette에 通過시켜 脫水하고, 室素 氣流下에서 濃縮한 다음 Florisil<sup>TM</sup> column으로 FAME를 純粹 精製하였다.

#### 2) 酸-觸媒

##### (1) $\text{BF}_3$ -methanol법<sup>2, 6, 21)</sup>

트리글리세리드 약 2mg을 마개 달린 小型 試驗管에 옮기고, 1mL의 toluene을 가하여 試料를 完全히 녹인 다음, 1mL의 14%  $\text{BF}_3$ -methanol를 가하여 잘 混和한 後 마개를 하고 50°C에서 하룻밤 동안 反應시켰다. 이 反應液에서 앞에 言及한 方法과 같이 FAME를 回收 精製하였다.

(2) HCl-methanol 法<sup>5)</sup>

트리글레세이드 약 10mg를 還流 冷却器를 附着한 condenser에 옮기고, 여기에 toluene 1mL를 가하여 試料를 完全히 녹이고 1% HCl-methanol을 가한 다음 70°C에서 1~2時間 동안 反應시켰다. 殘留溶媒를 室素氣流로 完全히 除去하고 위의 方法에서와 같이 FAME를 回收 精製하였다.

(3) Gas Liquid Chromatography(GC)의 分析 條件<sup>14)</sup>

FAME分析은 Hewlett Packard 5890 Series II Gas Chromatograph로 實施하였으며, 이때 使用한 column은 Carbowax 20M이 coating된 fused silica column(25m×0.22mm, film thickness, 2 $\mu$ )이었으며, detector는 FID였다. Column溫度는 175°C에서 3分間 維持한 後 205°C까지 4°C/min으로 昇溫하고, 205°C에서 다시 30分間 維持토록 하였으며, detector와 injection port의 溫度는 230°C였다. 1回 試料 注入量은 1 $\mu$ L(試料 5.8mg/25mL hexane)였고, carrier gas로는 H<sub>2</sub>를 사용하였고 split ratio는 1:50이었다. 金<sup>15)</sup>에 의하여 이미 spectroscopic한 方法으로 脂肪酸 組成과 그 構造가 밝혀진 여주(*Momordica charantia* L.) 種實油의 總脂質의 FAME를 co-run하여 本 試料의 未知 脂肪酸를 比較 同定하였다.

## III. 結果 및 考察

알카리 또는 酸觸媒로 試料를 transesterification 하여 얻어진 FAME의 組成을 GC로 分析한 結果는 Table 1과 같고, 알카리 觸媒에 의한 methyl esterification은 完全히 이루어졌음을 TLC로 確認할 수 있었다(data 省略). 金<sup>15)</sup>은 하늘수박 種實油에서 sodium methoxide法으로 調製하여 얻은 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub> methyl ester의 H<sup>1</sup>-NMR spectra에서 炭素 13, 14 位置의 chemical shift인  $\delta$  2.19~2.23 (multiplet)의 相對 intensity의 比率는 esterification 條件에 따라 變化하지 않았다고 하였다. 이 FAME의 H<sup>1</sup>-NMR에서 9c, 11t, 13t-C<sub>18:3</sub>의 炭素 13 (또는 14) 位置에 trans 配置를 한 水素原子의 chemical shift인  $\delta$  2.07~2.09에 共鳴 signal이 없으므로 transesterification 중 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>에서 9

c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>에 異性化가 일어나지 않았다고 하였다. Tulloch<sup>16)</sup>는 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>와 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>를 含有한 *Fevillea trilobata*의 種實油 自體의 <sup>13</sup>C-NMR spectra에서 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>의 炭素 13과 14의 chemical shift인  $\delta$  132.57과 128.82의 각각의 integral(29%)이 sodium methoxide法으로 調製한 總 FAME를 GC로 分析하여 얻은 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>의 含量(30%)과 一致하였고, 또 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>의 炭素 13과 14의 chemical shift인  $\delta$  131.70과 130.66의 relative intensity(9%)가 GC로 分析한 이 脂肪酸의 9% 含有率과 같았다고 하였다. Takagi等<sup>17)</sup>도 하늘수박의 一種인 *Trochosanthes anguina*의 種實油를 反應時間를 바꾸어 가면서 sodium methoxide法으로 transesterification했을 때 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>의 損失이 없었다고 報告한 바 있다.

以上の事實을 미루워 볼 때 本實驗에서와 같이 1M sodium methoxide-methanol로 esterification했을 때 conjugated triene酸의 異性化나 損失이 일어나지 않았다고 生覺된다. 알카리 觸媒의 差異가 試料의 脂肪酸 組成에 有意的인 變化를 미치지 않았으나, N, N, N', N'-tetramethyl guanidine의 경우에 있어서, 飽和脂肪酸에 대한 diene酸과 conjugated triene酸의 組成의 比, 즉  $\Sigma$ diene/ $\Sigma$ saturated과  $\Sigma$ triene/ $\Sigma$ saturated의 값이 4.9와 5.3으로 sodium methoxide 觸媒의 5.1과 5.6보다 약간 낮은 것은 二觸媒의 alkalinity 差異(pKa for sodium methoxide=9.2, pKa for tetramethyl guanidine=13.6)와 濃度 또는 反應溫度와 時間에 起因하기 보다는 GC에 反復注入에 따른 溶媒의 蒸發로 因한 FAME의 溶解度의 減少에 起因하지 않나 思料된다.

Kleiman<sup>18)</sup>은  $\alpha$ -eleostearic acid(9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>)를 大量 含有한 오동기름 (tung oil)을 5%의 BF<sub>3</sub>-methanol로 10分間 加熱하여 methyl esterification하였을 때  $\alpha$ -eleostearic acid의 破壞가 없었으나, 5%의 HCl-methanol로 3時間 동안 還流冷却하였을 때  $\alpha$ -eleostearic acid는 相當量 異性化되었다고 報告한 바 있다. 本實驗에서는 BF<sub>3</sub>-methanol法으로 50°C에서 하룻밤 동안에 完全히 esterification이 이루어졌으나, HCl-methanol法으로 70°C에서 1時間 反應시켰을 때 充分한 transesterification이 이루어 지지 않아, 反應을 1時間 더 延長시켰더니 es-

Table 1. Composition of fatty acid methyl esters prepared from triacylglycerols in the seed oils of *Trichosanthes Kirilowii*, by the different esterification methods

Fatty acid	Composition(mol %)			
	CH <sub>3</sub> ONa-CH <sub>3</sub> OH	TMG-CH <sub>3</sub> OH*	BF <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> OH	HCl-CH <sub>3</sub> OH
16:0	4.5	4.7	7.4	7.9
18:0	3.0	3.1	4.9	5.2
18:1(n-9)	11.5	11.7	18.9	19.4
18:1(n-7)	0.5	0.6	1.0	1.1
18:2(n-6)	38.0	37.8	59.9	63.2
18:2(?)	0.4	0.4	0.7	0.7
18:3 ctc**	39.2	38.8	1.8	—
18:3 ctt	2.2	2.1	1.0	—
18:3 ttc	0.5	0.6	1.2	—
20:1(n-9)	0.2	0.2	0.3	0.4
Unknown			3.0	2.1
Σmonoene/Σsaturated	1.6	1.6	1.6	1.6
Σdiene/Σsaturated	5.1	4.9	4.9	4.9
Σtriene/Σsaturated	5.6	5.3	0.6	—

\* TMG-CH<sub>3</sub>OH : N, N, N', N'-tetramethyl guanidine in methanol. The catalysts are described in details in Material and Experimental.

\*\* 18:3 ctc : 9c, 11t, 13c-C18:3, 18:3 ctt : 9c, 11t, 13t-C18:3, 18:3 ttc : 9t, 11t, 13c-C18:3

terification은 완전히 이루어 졌다(data 省略). 酸觸媒로 試料를 methyl esterification하였을 때 어느 경우에서나 monoene酸(Σmonoene/Σsaturated=1.6)과 diene酸(Σdiene/Σsaturated=4.9)의 組成에 거의 變化가 없었으나, 大部分의 (9c, 11t, 13c-C18:3)는 破壞되었으며, HCl-methanol法の 경우 그 程度가 더욱 심하였다(Table 1 및 Fig. 1).

本實驗에서는 알카리 또는 酸觸媒를 使用했을 때 反應溫度 및 時間이 conjugated triene酸의 conjugated double bond의 미치는 影響을 充分히 檢討하지는 못하였으나, 여기서 얻어진 結果로 判斷할 때 現在 널리 使用되고 있는 酸을 觸媒로 하는 BF<sub>3</sub>-methanol法이나 HCl-methanol法은 conjugated triene酸(적어도 9c, 11t, 13c-C18:3)을 含有한 트리글리세리드의 methyl esterification에는 可及的 避하고 代身에 알카리 觸媒法을 使用하는 것이 바람직 하다고 生覺된다. Christie<sup>20)</sup>도 BF<sub>3</sub>-methanol法은 cyclopropane 環 脂肪酸이 豊富한 微生物의 油脂를 transesterification할 때 大部分의 cyclopropane을 破壞하고, 또 es-

terification 反應時에 添加하는 抗酸化劑인 BHT와 反應하여 생긴 artefact가 GC trace에 나타나 脂肪酸의 同定을 어렵게 한다고 하여, 脂質의 transesterification에 BF<sub>3</sub>-methanol의 使用 中止를 主張하고 있다.

#### IV. 結 論

9c, 11t, 13c-C18:3를 위시한 conjugated triene酸을 약 40%나 含有한 하늘수박 種實油의 트리글리세리드를 알카리 觸媒한 sodium methoxide-methanol法과 N, N, N', N'-tetramethyl guanidine法, 酸觸媒인 BF<sub>3</sub>-methanol法과 HCl-methanol法으로 transesterification하였다. 여기서 얻어진 脂肪酸 methyl ester를 GC로 分析하였더니 알카리 觸媒法으로 試料에는 conjugated triene酸의 異性化 또는 그 構造의 破壞와 같은 變化는 일어나지 않아, 그 脂肪酸 組成도 定量的이었다. 反面에 酸觸媒法으로 만들어진 試料의 경우에는 monoene酸과 diene酸은 異性化없이 完全

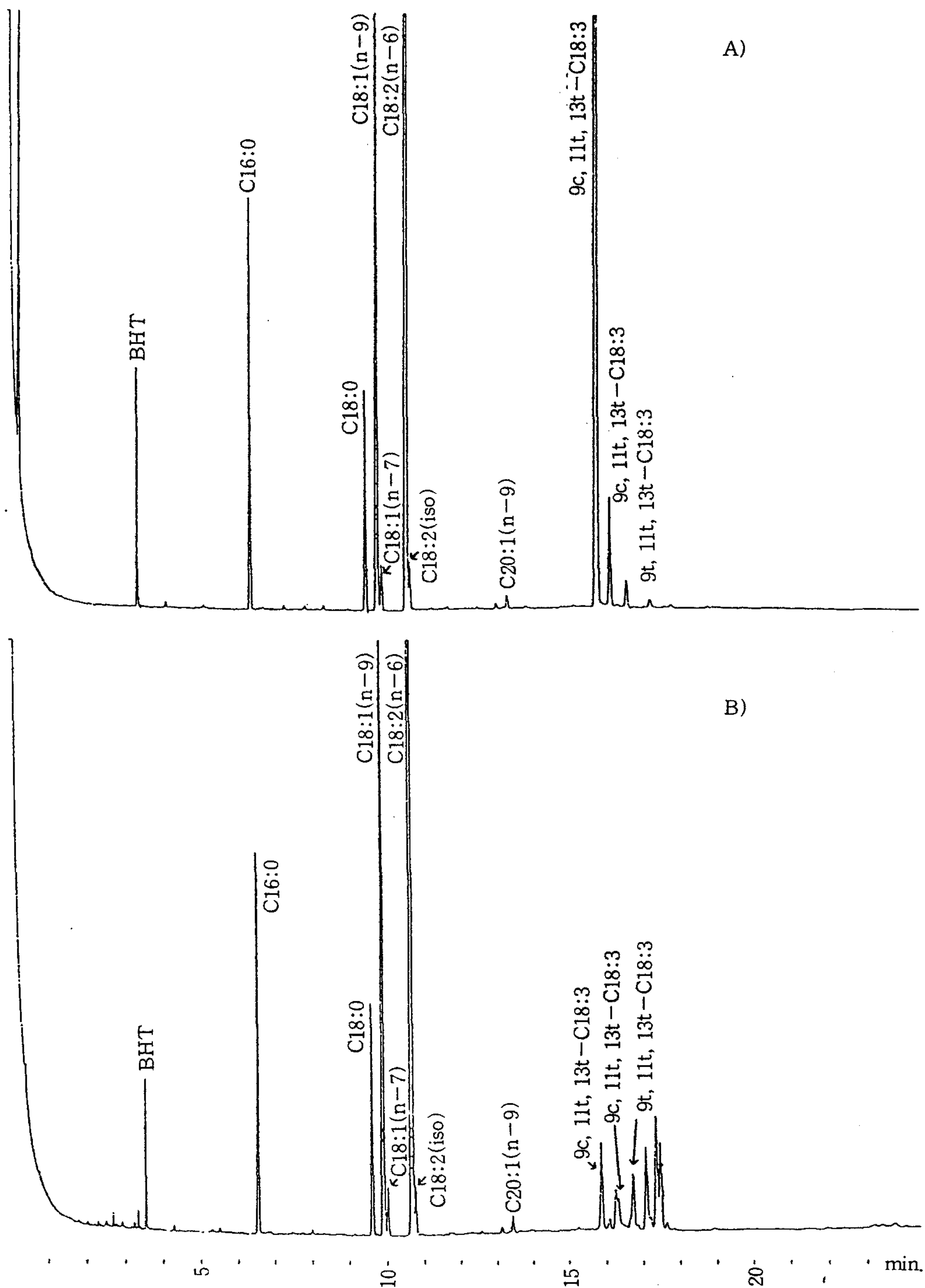


Fig. 1. GC traces of fatty acid methyl esters prepared from triacylglycerols *Trichosanthes Kirilowii* seed oils, by different esterification methods.

A) : by sodium methoxide-methanol

B : by BF<sub>3</sub>-methanol

히 ester化 되었으나, triene酸(모두 conjugated type임)은 大部分 破壞되었다. 따라서 적어도 9c, 11t, 13c-C<sub>18:3</sub>와 같은 conjugated triene酸을 含有한 油脂의 transesterification에는 sodium methoxide-methanol法과 N, N, N', N'-tetramethyl guanidine-methanol法이 매우 바람직하며, 現在 널리 利用되고 있는 BF<sub>3</sub>-methanol法과 HCl-methanol法과 같은 酸觸媒法은 그 使用에 充分한 考慮가 있어야 하겠다.

### 文 獻

1. Metcalfe, L. D., *Fats and Methods*, 2, 1(1961).
2. Christic, W. W., *Gas Chromatography And Lipids*, 1st ed., pp.68~70, The Oily Press, Ayr U. K.(1989).
3. Schuchardt, U. and Lopes, O. C., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1940(1988).
4. El-Hamdy, A. H. and Christic, W. W., *J. Chromatogr.*, 630, 438(1993).
5. Stoffel, w., Chu, F. and Ahrens, E. H., *Anal. Chem.*, 31, 307(1959).
6. Metchafe, L. D. and Schmitz, A. A., *Anal. Chem.*, 33, 363(1961).
7. Brian, B. L., Gracy, R. W. and Scholes, V. E., *J. Chromatogr.*, 66, 138(1972).
8. Schlenk, H. and Gellerman, J. L., *Anal. Chem.*, 32, 1412(1960).
9. Hartman, L. and Lago, R. C. A., *Lab. Practice*, 22, 475(1973).
10. McGinnis, G. W. and Dugan, L. R., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 305(1965).
11. Cown, J. C., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 27, 492(1950).
12. Hopkins, C. Y., *Topics in Lipid Chemistry*, edited by Gunstone, F. D., pp.37~87, Paul Elek, London(1972).
13. Joh, Y. G., Kim, S. J. and Christie, W. W., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 72(in press).
14. 김성진, 이경희, 김연심, 조용계, 한국유화학회지, 10, 57(1993).
15. 金成眞, 東亞大學校 碩士學位 請求論文, pp. 61~76, 釜山(1993).
16. Tulloch, A. P. and Bergter, L., *Lipids*, 14, 996(1979).
17. Takagi, T. and Itabashi, Y., *Lipids*, 16, 546(1981).
18. Kleiman, R., Spencer, G. F. and Earle, F. R., *Lipids*, 4, 118~122(1968).
19. Bligh, E. G. and Dyer, W. J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911(1959).
20. Christie, W. W., *Lipid Technology*, 6(3), 66(1994).
21. Morrison, W. R. and Smith, L. M., *J. Lipid Res.*, 5, 600(1964).