

Methyl Linoleate 산화중 중합체 형성에 미치는 온도의 영향

김인환 · 김철진 · 김동훈*
한국식품개발연구원, *고려대학교

Effect of Temperature on Formation of Polymer in Oxidation of Methyl Linoleate

In-Hwan Kim, Chul-Jin Kim and Dong-Hoon Kim*

Korea Food Research Institute

*Department of Food Technology, Korea University

Abstract

To investigate the effect of heating conditions on the polymerization of methyl linoleate, the esters were heated at 60°C, 90°C, 120°C and 150°C, respectively, with sparging oxygen for different periods of time. On the basis of the peroxide curve obtained at each of the four temperatures, four heating times were chosen for the analysis of the polymers and total oxidation products. Significant linear relationships were found between polymer contents and total oxidation product contents. The contents of polymers and their linkage types were analyzed by High Performance Size Exclusion Chromatography. The polymers formed at four temperatures were qualitatively identified as dimers. The dimers with peroxide linkages were detected from methyl linoleate oxidized at 60°C and 90°C but they were not detected from methyl linoleate oxidized at 120°C and 150°C. Therefore, all dimers formed at 120°C and 150°C seemed to be the ones with ether linkage or carbon to carbon linkage. The degradation rate of the dimers with peroxide linkages at 90°C was faster than at 60°C.

Key words: methyl linoleate, polymer, peroxide linkage, ether or carbon to carbon linkage, high performance size exclusion chromatography

서 론

유지의 산화과정 중에는 여러 형태의 산화생성물이 생성된다. 그 예로서 과산화물 형태의 산화생성물, 중합체 형태의 산화생성물 및 산패취의 주요 원인 물질인 여러 종류의 휘발성 산화생성물 등 크게 세 종류의 산화생성물로 구분된다. 이러한 산화생성물들은 식품의 품질을 저하시킬 뿐만 아니라 인체에도 유해한 물질로서, 과거 오랫동안 산화생성물의 생성 메카니즘에 대한 연구는 꾸준히 계속되어 왔다^(1,2). 산화생성물 중 중합체는 유지 또는 유지식품의 화학적 특성을 변화시킬 뿐만 아니라 물리적 특성에도 크게 영향을 끼치는 물질로서 산화초기부터 생성되어 산화가 진행됨에 따라 그 생성량은 급속히 증가되는 것으로 알려져 있다.

Nawar⁽³⁾에 의하면 공기차단 하에 불포화지방산을 튀김 온도 정도의 고온에서 가열할 경우, 지방산의 탄소원자와 다른 지방산의 탄소원자 사이에 직접 결합되는 비함산소 중합체들(non-oxypolymers)이 형성된다고 하였다. 그러나 공기 존재하에 유지가 산화될 경우에는 과산화물이 쉽게 분해되어 반응성이 큰 여러 종류의 라디칼을 형성하며, 이들 라디칼이 연쇄반응에 참여하지 않고 상호결합할 때는 비함산소 중합체(non-oxypolymer) 및 여러 종류의 함산소 중합체(oxypolymer)들이 형성된다는 결과가 보고되어 있다^(4,5). 본 연구에서는 식물성 유지의 구성 지방산 중, 산패에 가장 중요한 영향을 주는 linoleic acid의 중합체 결합 특성을 조사하고자 그 에스터 형태인 methyl linoleate를 기질로 하여 60°C, 90°C, 120°C, 150°C의 온도에서 각 산화 정도에 따른 총 산화생성물의 변화 및 중합체 함량의 변화와 생성된 중합체의 결합특성을 조사해 보고자 하였다.

Corresponding author: In-Hwan Kim, Korea Food Research Institute, P.O. Box 2, Bundang-gu, Seongnam-si, Kyunggi-do 463-420, Korea

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 methyl linoleate는 표준품으로서 순도가 99% 이상인 Sigma사(Sigma No. L-1876, Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) 제품을 사용하였다. 한편 그 이외에 사용한 모든 시약은 특급시약 이상의 것을 사용하였다.

과산화물가(peroxide value)

산화된 methyl linoleate의 과산화물가는 AOCs법⁽¹⁾에 의하여 측정하였다.

Methyl linoleate의 산화과정

공기를 주입할 수 있는 유리관(AOM 반응기)에 methyl linoleate 10 g을 정확히 칭량한 후, 가열교반기(Model No. D-8., Hakke Co., U.S.A.)로 향온이 유지되는 oil bath ($\pm 0.5^\circ\text{C}$)에 유리관을 담근 후 mass flow controller (Matheson, Model No. 8272-0413)를 이용하여 산소를 분당 200 ml/씩 흘리면서 methyl linoleate를 산화시켰다. 먼저 각 온도에서 산화시간에 따른 과산화물가의 변화를 조사한 후, 온도별 최대 과산화물가를 갖는 methyl linoleate와 최대 과산화물가에 약 10%의 과산화물가를 갖는 methyl linoleate 및 최대 과산화물가의 50%의 과산화물가를 갖는 methyl linoleate, 그리고 최대 과산화물가를 갖는 methyl linoleate, 최대 과산화물과로부터 약 20%정도 감소된 과산화물가를 갖는 methyl linoleate 등 각 온도에서 4종류의 산화된 methyl linoleate 시료를 준비하였다.

총산화물 분리

온도 및 산화정도에 따라서 산화되는 methyl linoleate의 총 산화물 함량을 구하기 위해 silica gel column을 사용하였으며, 그 분석과정은 다음과 같다. 먼저 silica gel (Model No. 7734, 70-240 mesh, Merck Co., Germany)을 130°C 에서 3시간 활성화시켜 desiccator에서 냉각시킨 후, 그 중 25 g을 n-hexane과 diethyl ether (95 : 5, v/v)의 혼합용매에 현탁시켜 유리칼럼(내경 2 cm×길이 40 cm)에 충전하였다. 산화된 methyl linoleate 1 g을 정확히 칭량하여 소량의 용매에 녹인 후 칼럼에 주입하고 300 ml의 혼합용매를 흘려 산화되지 않은 methyl linoleate를 분리하였고, 산화된 분획은 메타놀 300 ml를 흘려 분획하였다. 두 분획물을 35°C 에서 진공 농축한 후, 무게정량법에 의해 산화된 methyl linoleate 함량을 구하였으며, 두 분획물은

TLC로 확인하였으며 이때 사용한 TLC plate는 silica gel G60 (Merck No. 5748)이었고 전개용매는 n-hexane : ethyl ether (60 : 40)를 사용하였다.

중합체 함량 및 결합특성 조사

본 연구에서는 산화된 각 시료의 총 중합체 함량 및 중합체 결합특성을 조사하기 위해 Miyashita들⁽²⁾의 방법에 따라 NaBH_4 로 환원시켜 반응 전과 후의 중합체 함량을 HPSEC (High Performance Size Exclusion Chromatography)로 분석하여 총 중합체 함량 및 중합체 결합특성을 조사하였다. 먼저 중합체 결합특성을 조사하기 위해 산화된 시료 0.1 g을 100 ml round flask에 취하고 여기에 methyl alcohol 5 ml를 가하여 -30°C 냉동고에서 1시간 방치한 후, NaBH_4 20 mg을 가하고 20분 후에 꺼내어 실온에서 30분간 방치한 후, 30 ml의 ethyl ether로 3회 추출하였다. 모아진 ether층은 evaporator를 이용하여 40°C 이하의 온도에서 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 시료에 dichloromethane 5 ml를 가하여 잘 용해시킨 후, 유기용매용 GPC 칼럼을 이용하여 분석하였다. 중합체 분석을 위해 사용된 유기용매용 GPC 칼럼은 Ultrastyrigel 100 A^o(내경 7.8×길이 300 mm, Waters Co., Part No. 85500)이었으며 분자량 확인 및 내부표준품으로는 순수 methyl linoleate와 polystyrene (Polymer Laboratories LTD, Essex Road, Church Stretton U.K.) 표준품을 사용하였다. 검출기는 RI 검출기를 사용하였으며, 칼럼 및 RI 검출기 cell 온도는 40°C 로 유지하였다. 한편 이동상인 dichloromethane의 유속은 분당 1 ml가 되도록 하였다.

결과 및 고찰

가열온도 및 시간별 과산화물가의 변화

각 가열온도에서 과산화물가를 기준으로 하여 산화 정도를 규정하기 위해 최대 과산화물가를 갖는 것을 최대단계, 최대 과산화물가에 대하여 10%의 과산화물가를 갖는 것을 초기단계, 최대 과산화물가에 대하여 50%의 과산화물가를 갖는 것을 가속단계, 최대 과산화물가 이후 최대 과산화물가에 대하여 20%의 과산화물가가 감소된 것을 감소단계로 규정하여 각 온도별 4종류, 총 16종류의 산화된 methyl linoleate를 시료로 사용하였으며 3반복 이상의 실험을 통하여 각 단계별 과산화물가의 재현성을 확인하였다. 산화온도 및 산화시간에 따른 과산화물가의 변화는 Table 1과 같았다. 각 온도에서 시간에 따른 과산화물가 변화는 온도

Table 1. Peroxide values of methyl linoleate at different oxidation temperatures

Temperatures (°C)	Time (min.)	POV (meq/kg)
60°C	226.8 ¹⁾	295
	504.0 ²⁾	1476
	840.0 ³⁾	3104
	1410.0 ⁴⁾	2600
90°C	22.0 ¹⁾	232
	68.0 ²⁾	1133
	200.0 ³⁾	2199
	380.0 ⁴⁾	1865
120°C	5.0 ¹⁾	126
	22.0 ²⁾	670
	70.0 ³⁾	1380
	140.0 ³⁾	1080
150°C	1.3 ¹⁾	60
	6.5 ²⁾	310
	30.0 ³⁾	583
	51.0 ⁴⁾	458

¹⁾Initial stage, ²⁾Increasing stage

³⁾Maximum stage, ⁴⁾Decreasing stage

가 증가할수록 전체적인 과산화물가는 감소하는 경향을 나타내었는데, 60°C의 경우 최대 과산화물가가 3104 meq/kg인데 비하여 90°C에서는 2199 meq/kg, 120°C에서는 1380 meq/kg이었고, 150°C에서는 583 meq/kg로 가열온도가 증가함에 따라 전체적인 과산화물가는 반비례하게 감소하는 것으로 나타났으며, 초기단계와 가속단계 그리고 최대 과산화물가 이후의 감소단계 역시 온도 증가에 따라 반비례적인 관계를 나타내었다. Lomanno 등⁽¹²⁾은 ethyl linolenate를 기질로 하여 70°C부터 250°C까지 공기 존재하에 가열시간에 따른 과산화물가의 변화를 조사한 결과, 본 실험의 결과와 유사하게 온도가 증가함에 따라 과산화물가는 반비례적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 과산화물이 높은 온도에서 쉽게 파괴되기 때문인 것으로 생각된다.

총 산화물 함량과 중합체 함량 및 중합체 결합 특성의 변화

앞에서 언급한 바와 같이 각 온도에서 과산화물가를 기준으로 하여 제조한 산화정도별 시료의 총 산화물 함량 및 중합체 함량의 변화를 조사하여 Table 2와 같은 결과를 얻었다. Silica gel column을 이용하여 총 산화물의 변화를 조사한 결과 각 온도에서 산화시간 또는 과산화물가의 증가에 따라 총 산화물 함량 및 중합체 함량은 비례적으로 증가하였다. Fig. 1은 60°C에서

Table 2. Changes of the total oxidation product and dimer content of methyl linoleate oxidized at various temperatures (Unit: wt %)

Temperature	POV (meq/kg)	Total oxidation product (%)	Dimer (%)
60°C	295 ¹⁾	5.6	-
	1476 ²⁾	23.5	5.9
	3104 ³⁾	65.5	33.2
	2600 ⁴⁾	91.8	52.2
90°C	232 ¹⁾	4.1	-
	1133 ²⁾	19.6	6.4
	2199 ³⁾	54.3	26.7
	1865 ⁴⁾	77.8	40.6
120°C	126 ¹⁾	2.4	-
	670 ²⁾	12.9	4.4
	1080 ³⁾	70.5	36.6
	60 ¹⁾	2.2	-
150°C	310 ²⁾	7.3	2.1
	583 ³⁾	30.0	16.7
	458 ⁴⁾	46.3	29.2

^{1),2),3),4)}refer to Table 1

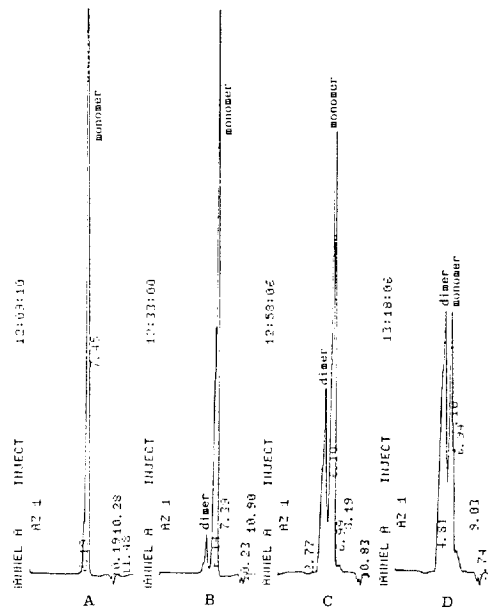


Fig. 1. HPSEC chromatograms of methyl linoleate oxidized at 60°C A: POV=295 meq/kg, B: POV=1476 meq/kg, C: POV=3104 meq/kg, D: POV=2600 meq/kg

산화된 methyl linoleate의 중합체 함량을 조사한 분석 chromatogram으로서 초기단계(POV=295 meq/kg)에서는 중합체를 확인할 수 없었으며, 가속단계(POV=1476 meq/kg)부터 중합체가 활발히 생성됨을 알 수 있었고

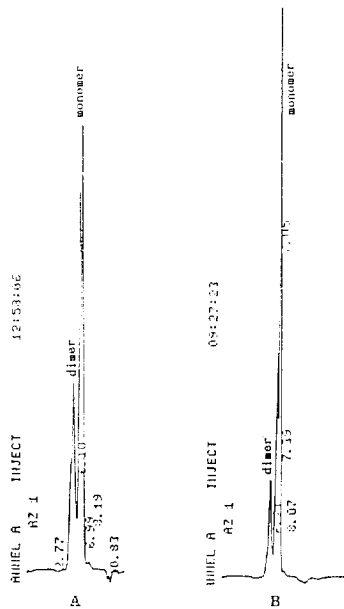


Fig. 2. HPSEC chromatograms of oxidized methyl linoleate before and after NaBH_4 treatment A: sample not treated, B: sample treated

최대단계(POV=3104 meq/kg)부터 중합체 함량이 급속히 증가됨을 알 수 있었다. 한편 polystyrene 표준품을 이용하여 생성된 peak를 확인한 결과 본 실험에서 생성된 중합체는 이중체(dimer) 형태만이 생성되었음을 알 수 있었다. Neff들⁽¹³⁾은 methyl linolenate를 40°C와 150°C에서 산화시킨 후, 생성된 중합체의 종류를 조사해 본 결과, 생성된 중합체가 이중체 형태였다고 보고하였으며, 이러한 결과는 본 실험의 결과와도 일치하는 결과를 보여 주었다. 모든 온도범위에서 이중체 생성은 최대단계 이후부터 활발히 생성되었으며, 과산화물가가 감소하는 감소단계에서는 그 량이 급속히 증가됨을 보여 주어, 산화가 진행됨에 따라 생성된 비휘발성 산화물 중 중합체가 차지하는 비율이 점점 커지는 것을 알 수 있었다. 유지의 산화과정 중에 형성되는 대표적인 비휘발성 산화생성물인 중합체는 활성이 큰 alkyl radical ($\text{R}\cdot$), alkoxy radical ($\text{RO}\cdot$) 또는 peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$)이 서로 결합하여 분자량이 큰 고분자 물질을 형성하며, 이러한 활성이 큰 radical들은 서로 결합하여 C-O-O-C (peroxide linkage) 결합형태와 C-O-C/C-C (ether or carbon to carbon) 결합형태의 중합체를 형성한다^(14,15). 본 연구에서는 가열온도 및 과산화물가의 변화에 따른 중합체의 결합 특성을 조사하기 위해, 산화된 시료를 NaBH_4 로 환원시켜 C-O-O-C 형태의 중합체와 C-O-C/C-C 형태의 중합체의 생성비를 조사하

Table 3. Distribution of dimers with different types of linkage formed during the oxidation of methyl linoleate at 60°C, 90°C, 120°C and 150°C, respectively (Unit: wt %)

Temperature (°C)	POV (meq/kg)	C-O-O-C	C-O-C/C-C
60°C	295 ¹⁾	-	-
	1476 ²⁾	3.5 (59.3)	2.4 (40.7)
	3104 ³⁾	8.9 (26.8)	24.3 (73.2)
	2600 ⁴⁾	7.8 (14.9)	44.4 (85.1)
90°C	232 ¹⁾	-	-
	1133 ²⁾	1.6 (24.8)	4.9 (76.2)
	2199 ³⁾	4.5 (16.9)	22.2 (83.1)
	1865 ⁴⁾	4.3 (10.7)	36.3 (89.3)
120°C	126 ¹⁾	-	-
	670 ²⁾	0 (0)	4.4 (100)
	1380 ³⁾	0 (0)	17.0 (100)
	1080 ⁴⁾	0 (0)	36.6 (100)
150°C	60 ¹⁾	-	-
	310 ²⁾	0 (0)	2.1 (100)
	583 ³⁾	0 (0)	16.7 (100)
	485 ⁴⁾	0 (0)	29.2 (100)

^{1),2),3),4)} refer to Table 1

⁵⁾ ():relative %

여 보았다. Fig. 2는 60°C에서 산화된 methyl linoleate (POV=1476 meq/kg)를 NaBH_4 로 환원시키기 전과 후의 chromatogram으로서 NaBH_4 로 환원시킨 경우, 이중체 형태의 중합체 함량은 감소하는 반면 monomer는 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 생성된 이중체 중 C-O-O-C 결합형태를 갖는 이중체가 분해되어 일중체 (monomer) 형태, 즉 hydroxy fatty ester로 전환되었음을 보여주고 있다. Table 3은 온도변화 및 과산화물가의 변화에 따른 이중체 결합 특성의 변화를 나타낸 결과이다. 모든 온도의 초기단계에서는 이중체 이상의 중합체를 확인할 수 없었으며 따라서 그들의 결합 특성은 파악할 수 없었다. 60°C의 가속단계(POV=1,476 meq/kg)에서는 형성된 이중체 중 C-O-O-C 형태의 이중체가 59.3%를 차지한 반면, 산화가 진행될수록 C-O-O-C 형태의 이중체는 감소하였고, C-O-C/C-C 형태의 이중체가 차지하는 비율이 점점 증가하는 것으로 나타났다. 감소단계(POV=2,600 meq/kg)에서는 생성된 이중체 중 80% 이상이 C-O-C/C-C 형태의 이중체였다. 한편 90°C의 경우, 가속단계(POV=1,133 meq/kg)에서 형성된 이중체 중 24.8%가 C-O-O-C 형태의 이중체로서 60°C와 비교하여 훨씬 낮았다. 이외에 최대단계(POV=2199 meq/kg) 및 감소단계(POV=1865 meq/kg)에서도 60°C와 비교하여 낮은 비율을 나타내었으며,

문 헌

산화가 진행됨에 따라 생성된 중합체 중 C-O-C/C-C 형태의 이중체가 차지하는 비율이 점점 증가하는 것으로 나타났다. Cho들⁽⁷⁾은 25°C에서 ethyl linolenate를 자동산화시켰을 때, 과산화물가가 1,170 meq/kg인 산화된 ethyl linolenate의 중합체 중 C-O-O-C 형태의 이중체가 차지하는 비율이 73.7%였으나, 과산화물가가 3,285 meq/kg로 증가 되었을 때에는 69.8%로 산화가 진행됨에 따라 C-O-O-C 형태의 이중체보다는 C-O-C/C-C 형태의 이중체가 보다 많이 생성된다고 보고하였으며, 이러한 결과는 본 실험의 결과와도 일치하고 있다. 한편 120°C와 150°C의 경우에는 생성된 모든 이중체가 C-O-C/C-C 형태의 이중체로서, C-O-O-C 형태의 이중체는 확인할 수 없었다. Neff들⁽¹²⁾은 40°C와 150°C에서 산화된 methyl linolenate의 이중체 결합특성을 조사해 본 결과, 40°C에서 산화시킨 경우, C-O-O-C 형태의 이중체는 확인할 수 있었으나, 150°C에서 산화시킨 경우, 생성된 모든 이중체가 C-O-C/C-C 형태의 이중체로 확인되었다고 하였다. 따라서 온도 및 산화 정도에 따라 형성된 이중체의 결합 특성을 검토해 본 결과, 60°C와 90°C에서는 C-O-O-C 형태의 이중체가 형성되었고, 산화가 진행됨에 따라 C-O-O-C 형태의 이중체는 감소하는 반면, C-O-C/C-C 형태의 이중체는 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 120°C와 150°C에서는 생성된 모든 이중체는 C-O-C/C-C 형태의 이중체였으며, C-O-O-C 형태의 이중체는 확인하지 못하였다.

요 약

Methyl linoleate의 중합체 형성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 산소를 주입하면서 60°C, 90°C, 120°C, 150°C에서 산화시켰다. 각 온도에서 시간에 따른 과산화물가의 변화 곡선을 기초로하여 각 온도에서 4가지의 산화 시간을 선정하였다. 중합체 함량 및 중합체 결합 특성은 High Performance Size Exclusion Chromatography로 분석하였다. 각 온도에서 산화 시간에 따른 총 산화물 함량과 중합체 함량 사이에는 높은 상관관계를 나타냈다. 모든 온도에서 생성된 중합체는 이중체로 확인되었으며, 60°C와 90°C에서는 C-O-O-C 결합형태인 이중체를 확인할 수 있었으나, 120°C와 150°C에서는 C-O-O-C 결합형태를 갖는 이중체는 확인할 수 없었다. 따라서 120°C와 150°C에서 생성된 이중체는 C-O-C/C-C 결합 형태인 것으로 추정되었다. 또한, C-O-O-C 결합 형태의 이중체는 60°C보다는 90°C에서 보다 쉽게 파괴되는 경향을 나타냈다.

1. Takehiko, O. and Takashi, K.: Characterization of toxic compound in thermally oxidized oil. *Lipids*, **8**, 353 (1973)
2. Frankel, E. N.: Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.*, **19**, 1 (1979)
3. Frankel, E. N.: Recent advanced in lipid oxidation. *J. Sci. Food Agri.*, **54**, 495 (1991)
4. Frankel, E. N. and Gardner, H. W.: Effect of alpha-tocopherol on the volatile thermal decomposition products of methyl linoleate hydroperoxides. *Lipids*, **24**, 603 (1989)
5. Sebedio, J. L., Grandgirard, A. and Prevost, J.: Linoleic acid isomers in heat treated sunflower oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 362 (1988)
6. Nawar, W. W. and Witchwood, A.: Chemistry of thermal oxidation of lipids In *Flavor Chemistry of Fat and Oil*, Min, D. B. and Smouse, T. H. (Ed.), AOCS, Champaign, Illinois, p.39 (1985)
7. Tagagi, T., Wakasa, N. and Miyashita, K.: Formation of conjugated diene and triene products in lipoxigenase oxidation of C18, C20, C22 PUFAs. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 1320 (1987)
8. Morita, M. and Tokita, M.: Methyl linoleate dimer and methyl 8-phenyloctanoate in the copper catalyzed decomposition products of methyl linoleate hydroperoxides. *Agri. Biol. Chem.*, **48**, 2567 (1987)
9. Selke, E., Rohwedder, W. K. and Dutton, H. J.: Volatile components from triolein heated in air. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 62 (1977)
10. A. O. A. S.: *Official Method and Analysis*. 4th ed., Method Cd 8-53., Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C. (1990)
11. Miyashita, K., Fujimoto, K. and Takashi, K.: Structural studies of polar dimers in autoxidized methyl linoleate during the initial stages of autoxidation. *Agri. Biol. Chem.*, **48**, 2511 (1984)
12. Lomanno, S. S and Nawar, W. W.: Effect of heating temperature and time on the volatile oxidative decomposition of linolenate. *J. Food. Sci.*, **47**, 744 (1982)
13. Neff, W. E., Frankel, E. N. and Fujimoto, K.: Autoxidative dimerization of methyl linolenate and its monohydroperoxides, hydroperoxy epidioxides and dihydroperoxides. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 616 (1988)
14. Perkins, E. G.: Formation of non-volatile decomposition products in heated fats and oils. *Food. Tech.*, **21**, 125 (1967)
15. Miyashita, K., Hara, K., Fujimoto, K. and Takashi, K.: Dimers formed in oxygenated methyl linoleate hydroperoxides. *Lipids*, **20**, 578 (1985)
16. Terao, J. and Matsushita, S.: Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 234 (1977)
17. Cho, S. Y., Miyashita, K., Miyazawa, K., Fujimoto, K. and Takashi, K.: Autoxidation of ethyl eicosapentanoate and docosahexanoate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **64**, 876 (1987)