

## 콜레스테롤 흡수저하 기능성소재 개발을 위한 식물성 유지 중의 Sterols 분석 및 Stanol로의 수소첨가반응

인만진<sup>†</sup> · 김동청\* · 채희정\* · 김명희\*\* · 임병순\*\* · 김의용\*\*\*

청운대학교 식품영양학과, \*대상(주) 중앙연구소

\*\*공주대학교 식품영양학과, \*\*\*서울시립대학교 화학공학과

### Analysis of Sterols and Its Hydrogenation to Stanols in Vegetable Oils for the Development of a Cholesterol Absorption-lowering Nutraceutical

Man-Jin In<sup>†</sup>, Dong Chung Kim\*, Hee Jeong Chae\*, Myung Hee Kim\*\*,  
Byoung Soon Im\*\* and Eui Yong Kim\*\*\*

Dept. of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongsung 350-800, Korea

\*R&D Center, Daesang Corp., Ichon 467-810, Korea

\*\*Dept. of Food and Nutrition, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea

\*\*\*Dept. of Chemical Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

#### Abstract

The contents of sterols and stanols in vegetable oils and mist oil were analyzed by gas chromatography using a capillary column. The total sterol contents showed high values of 0.67~0.89g/100g in corn oil, rice bran oil, red pepper seed oil and sesame oil. Mist oil, a byproduct of soybean oil manufacture, was a suitable raw material for the production of stanol since it showed high sterol content (10.2g/100g). In the hydrogenation of sterol contained in mist oil using Pd catalyst, the effects of saponification of oil were examined. The conversion of sterol to stanol was improved by a factor of 4~5 through saponification of oil, compared to the reaction without saponification.

**Key words:** vegetable oil, sterol, stanol, hydrogenation, cholesterol

#### 서 론

유지식품 중에 함유되어 있는 스테롤류(sterols) 중에서 콜레스테롤을 제외한 campesterol, stigmasterol, sitosterol, avenasterol 등과 같은 성분은 영양학적으로 크게 주목 받지 못하였다. 그러나 sitosterol 및 그 유도체가 콜레스테롤보다 수소성이 강하므로 담즙산 존재시 장의 점막에 대한 친화도가 콜레스테롤보다 높아 콜레스테롤의 흡수를 저해하여, 혈액 중 LDL-콜레스테롤의 수준을 20~30% 감소시킨다고 보고(1-4)되면서 초기에는 의약품으로 사용하고자 하였으나 보편적으로 이용되지는 못하였다. 이러한 기능을 하는 phytosterols(plant sterols)로는  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostanol(stigmastanol과 동일) 및 이들의 지방산 유도체가 있으며,  $\beta$ -sitosterol보다는  $\beta$ -sitostanol이 더욱 효과적이며 용해성을 향상시킨 sitostanol의 지방산 에스터가 효과면에서 가장 우수한 것으로 알려져 있다(5).

1992년부터 핀란드의 연구진들은 펄프 폐액으로부터 phytosterols을 추출하고 그 유도체를 제조하여 콜레스테롤 흡수저하 효능을 확인하였으며 식품으로서 제조와 관능학적인 연구를 수행하였다. 임상에서는  $\beta$ -sitostanol을 함유한 마아가린을 사용한 결과  $\beta$ -sitostanol의 섭취는 혈중의 콜레스테롤 및 LDL의 감소를 유발하였으며 상대적으로 변으로 유출되는 콜레스테롤의 양은 증가하였다(5-8). 그러므로 기능이 확인된 sitostanol과 그 유도체는 향후 기능성 식품소재로서 사용될 수 있으므로  $\beta$ -sitostanol의 제조방법에 대한 연구가 필요하다.  $\beta$ -Sitostanol은 phytosterols 중  $\beta$ -sitosterol과 stigmasterol의 이중결합에 수소를 첨가하여 제조할 수 있으며, phytosterols은 유지의 정제과정에서 검화되지 않는 성분으로 식물의 배아에 존재하며 함량이 높은 식물로는 옥수수, 대두, 참깨, 현미, 유채 등이 있다(9,10).

본 연구에서는 다량의  $\beta$ -sitostanol을 생산할 수 있는 원료를 얻기 위하여 시판중인 식물성 유지류와 대두유의

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

제조과정에서 생성되는 부산물의 phytosterols의 함량을 분석하였으며, 수소첨가반응으로 스테롤을 환원시켜 스타놀(stanol)의 생성 가능성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료 및 기기

본 실험에서 식물성 유지류는 시중에서 유통되는 것을 구입하였고, 대두유 제조 부산물은 신동방(주)으로부터 공급받아 시료로 사용하였다. 분석의 표준품으로는 Sigma 사(St. Louis, MO)의 5 $\alpha$ -cholestane, cholesterol, campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostanol을 gas chromatograph(GC-9A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

#### 시료 전처리

유지의 전처리 및 비누화는 Fenton의 방법(11)에 준하여 다음과 같이 수행하였다. Ethanol에 KOH를 1N 되도록 용해한 액 100ml에 식물성 유지 10g을 가하고 85°C에서 1시간 비누화하였다. 냉각 후 10% NaCl 수용액 100ml를 가하고 n-hexane 100 ml씩 4회 추출하여 n-hexane층을 완전히 농축하였다. 농축물에 chloroform을 가하여 10 ml로 채운 후 GC분석시료로 사용하였다.

#### 수소첨가 반응

수소첨가는 Aldrich사(Milwaukee, WI)의 palladium on activated carbon(Pd 5%) 촉매를 0.15%(w/v) 첨가하고, Parr Instrument사(Moline, IL)의 Hydrogenation apparatus를 이용하여 50 psi의 수소압력으로 상온에서 실시하였다.

#### 스테롤과 스타놀의 정량

내부 표준물질(5 $\alpha$ -cholestane)과 표준품 스테롤 및 스

타놀을 이용하여 Fenton과 Sim의 방법(12)으로 전환상수 (conversion factor; K)를 구하였으며, 시료중의 스테롤 및 스타놀의 함량은 Kaneda 등의 방법(13)에 따라 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 분석의 재현성

내부 표준물질에 대한 스테롤과 스타놀의 면적비와 중량비로부터 전환상수 K값을 구하였으며, 분석의 재현성을 확인하기 위하여 표준품을 10회 반복하여 분석한 후 각 성분들의 머무름 시간(retention time; RT)의 평균과 변이계수(coefficient of variation; CV)를 계산하여 비교하였다(Table 2). 성분들의 RT는 12~20분의 범위에 있었으며, CV는 대부분 0.01~0.4%로 양호하였으나  $\beta$ -sitosterol과  $\beta$ -sitostanol의 경우에는 RT의 값이 커지면서 peak broadening의 영향에 의하여 RT값이 약간씩 변하여 0.3~0.4%의 값을 보였지만 정량에는 문제가 되지 않았다. 모세관 컬럼을 사용하여 마요네즈에서 스테롤을 분석한 결과에는 10분 이내에 분석한 것으로 보고(14)하여 본 연구의 결과와는 차이가 있으나 이는 분석에 사용한 컬럼의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

#### 식물성 유지의 스테롤과 스타놀 함량

비누화 후 스테롤을 추출하는 조건으로는 포화 NaCl 용액과 ether를 사용하는 방법(15,16)이 알려져 있으나 추출효율이 낮아서 다량의 유기용매를 사용해야 하고 추출 후 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>으로 ether에 섞인 물을 제거해야 하므로, 본 연구에서는 ether보다 소수성이 강한 n-hexane을 사용하였다. 이 과정에서 추출효율에 영향을 미치는 인자는 NaCl의 농도이다. 추출효율은 NaCl의 농도에 비례하나 35%의 NaCl을 사용하면 많은 불용성 물질이 생성되어 추출이 용이하지 않고, 17% NaCl의 경우는 물층과 n-hexane층 사이에 고농도의 스테롤이 함유된 또 다른 층이 생성되나 스테롤과 함께 다량의 불순물이 공존하여 정량을 방해하였다. 10%의 NaCl를 사용하면 추출효율이 높고(3회 추출로 95% 이상 추출) 추출 후 층 분리가 용이하였다(데이터 제시 생략).

**Table 1. Conditions of GLC for the analysis of sterols and stanol in vegetable oils**

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Column                  | SE-30 capillary column<br>(Alltech Co., Deerfield, IL)<br>30m×0.32mm×0.25 $\mu$ m           |
| Carrier gas (flow rate) | He(25ml/min)  |
| Oven temperature        | 150°C, 3min<br>150°C→250°C(30°C/min)<br>250°C, 1min<br>250°C→280°C(5°C/min)<br>280°C, 10min |
| Detector                | FID   |
| Detector temperature    | 270°C   |
| Injector temperature    | 270°C   |
| Injection volume        | 0.4 $\mu$ l   |

**Table 2. Conversion factor and repeatability of retention time of sterols and stanol on capillary column**

|                        | Conversion factor(K) | Retention time(min) | Coefficient of variation(%) |
|------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| 5 $\alpha$ -Cholestane |                      | 12.89               | 0.06                        |
| Cholesterol            | 2.024                | 15.86               | 0.04                        |
| Campesterol            | 2.607                | 17.13               | 0.01                        |
| Stigmasterol           | 1.826                | 17.94               | 0.01                        |
| $\beta$ -Sitosterol    | 2.309                | 19.01               | 0.40                        |
| $\beta$ -Sitostanol    | 2.764                | 19.34               | 0.30                        |

시판중인 식물성 유지 16종과 대두유 제조 부산물의 일종인 mist oil(탈취 후 지방산)을 비누화한 후 n-hexane으로 추출하여 스테롤과 스타놀의 함량을 측정하였다(Table 3). 식물성 유지에 함유되어 있는 스테롤류 중에서  $\beta$ -sitosterol은 모두 60~70%의 높은 비율이었으며(단, 올리브유는 96%), 총 스테롤의 함량은 옥수수유, 현미유, 고추씨 기름, 참기름이 높은 값(670~890 mg/100g)을 보였다. 또한  $\beta$ -sitostanol의 함량은 고추씨 기름, 현미유, 참기름, 옥수수유의 순이었으며, 고추씨 기름의  $\beta$ -sitostanol의 함량은 현미유, 참기름에 비하여 약 2배 높았다. 스테롤과 스타놀의 총량은 현미유, 고추씨 기름, 옥수수유, 참기름의 순이었으며 그 함량은 800~1030mg/100g의 수준이었다. 또한 mist oil중에는  $\beta$ -sitostanol은 거의 존재하지 않으며 총 스테롤의 함량은 10200mg/100g로 시판되는 유지에 비하여 최소 10배 이상 높은 함량을 보였다. 따라서 스타놀을 제조하기 위한 원료로서 시판되는 식물성 유지 중에서는 생산량을 고려하면 현미유보다 옥수수유가 적합하나 가격이 비싼 단점이 있다. 대두유는 현미유나 옥수수유에 비하여 생산량이 월등히 많고 그 제

조 부산물을 가공하여 부가가치를 높이는 차원에서 대두유 제조 부산물인 mist oil을 스타놀제조의 원료로 사용하는 것이 적합할 것으로 판단되었다.

#### 수소첨가에 의한 스타놀의 제조

촉매 존재하에 액상유를 수소와 반응시켜 불포화 결합(이중결합)의 일부 혹은 대부분을 포화결합으로 변환시키는 수소첨가반응(hydrogenation) 혹은 경화반응은 지방산의 물성, 산화안정성, 가열안정성 등을 개량하기 위한 목적으로 많이 사용되고 있는 방법이다(17). 그러나 본 연구에서는 지방산 대신 stigmasterol과  $\beta$ -sitosterol의 이중결합에 수소를 첨가 시켜  $\beta$ -sitostanol로 전환시키고자 하였다. 일반적으로 수소첨가반응은 반응시간을 단축하기 위하여 니켈촉매를 사용하고 고온(120~250°C), 고압(25 bar) 조건하에서 수행하지만(18), 스타놀의 생성가능성을 확인하는 수준으로 Pd촉매로 실온, 저압(약 3.5 bar)에서 24시간 반응시켰다. 용매인 n-hexane에 옥수수유(10%)와 mist oil(1%)을 희석하여 경화반응시킨 후 분석하였다(Table 4). 반응의 진행정도를 stanol ratio(peak

Table 3. Sterols and stanol contents of vegetable oils

|                          | Campesterol(mg/100g) | Stigmasterol(mg/100g) | $\beta$ -Sitosterol(mg/100g) | $\beta$ -Sitostanol(mg/100g) |
|--------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|
| Corn oil 1 <sup>1)</sup> | 214.1                | 49.6                  | 575.9                        | 127.8                        |
| 2                        | 243.1                | 56.4                  | 585.9                        | 123.6                        |
| Soybean oil 1            | 71.4                 | 43.5                  | 171.4                        | 24.2                         |
| 2                        | 73.2                 | 46.6                  | 184.5                        | 24.8                         |
| Hydrogenated soybean oil | 21.3                 | 11.6                  | 54.8                         | 5.6                          |
| Sesame oil 1             | 178.3                | 52.7                  | 433.0                        | 149.5                        |
| 2                        | 177.4                | 48.5                  | 443.6                        | 147.9                        |
| 3                        | 170.9                | 45.6                  | 433.2                        | 140.4                        |
| 4                        | 180.7                | 55.4                  | 443.2                        | 140.3                        |
| Red pepper seed oil      | 216.0                | 55.3                  | 489.8                        | 264.8                        |
| Rice bran oil            | 178.3                | 79.8                  | 624.1                        | 148.1                        |
| Perilla oil              | 45.7                 | 14.0                  | 331.2                        | 63.0                         |
| Rape seed oil            | 198.8                | 2.8                   | 261.9                        | 12.0                         |
| Palm oil                 | 9.8                  | 3.1                   | 25.5                         | 1.7                          |
| Olive oil                | 1.1                  | 0                     | 28.8                         | 3.8                          |
| Coconut oil              | 5.3                  | 2.2                   | 25.1                         | 7.4                          |
| Mist oil <sup>2)</sup>   | 3762.3               | 1768.9                | 4671.3                       | 0                            |

<sup>1)</sup>Number indicates number of sample(arbitrary order)

<sup>2)</sup>One of by-products produced by deodorizing process during soybean oil refining.

Table 4. Effect of saponification of raw materials on hydrogenation of sterols

| Raw materials          | Stanol ratio <sup>1)</sup> |                     | Reaction conditions |
|------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|
|                        | Before hydrogenation       | After hydrogenation |                     |
| Corn oil               |                            |                     |                     |
| Without saponification | 0.1                        | 0.8                 | 10% in n-hexane     |
| With saponification    | 0.1                        | 3.3                 | 10% in n-hexane     |
| Mist oil               |                            |                     |                     |
| Without saponification | 0.025                      | 0.7                 | 1% in n-hexane      |
| With saponification    | 0.025                      | 3.7                 | 1% in n-hexane      |

<sup>1)</sup>Stanol ratio=peak area( $\beta$ -sitostanol)/[peak area( $\beta$ -sitosterol)+peak area(stigmasterol)]

area( $\beta$ -sitostanol)/[peak area( $\beta$ -sitosterol)+peak area(stigmasterol)]로 비교한 결과 옥수수유와 mist oil 모두 유사하게 스테롤이 스탄올로 전환되었음을 알 수 있었다. 또한 비누화를 실시한 경우가 4~5배 이상 전환이 우수한 것은 비누화반응으로 지방산과 phytosterol의 ester결합을 분해하여 phytosterol을 유리상태로 만들었으며 경화될 수 있는 불포화 지방산을 제거하였기 때문인 것으로 판단되었다. 그러므로 대두유 제조 부산물인 mist oil을 비누화한 후 스탄올의 제조에 사용하면 다량의  $\beta$ -sitostanol을 얻을 수 있을 것이다. 향후 콜레스테롤의 흡수를 저해하는 기능성 식품소재인  $\beta$ -sitostanol을 효과적으로 생산하기 위하여 수소첨가반응의 효율에 영향을 미치는 것으로 알려진(19) 온도, 압력, 수소의 순도, 수소와 유지의 접촉시간, 촉매의 종류, 원료물질의 순도와 물성 등의 조건을 최적화하는 연구가 계속되어야 할 것이다.

## 요 약

모세관 컬럼을 이용한 가스 크로마토그래프법으로 식물성 유지와 대두유 제조 부산물인 mist oil 중에 함유되어 있는 스테롤과 스탄올의 함량을 분석하였다. 식물성 유지 중에서 총 스테롤의 함량은 옥수수유, 현미유, 고추씨 기름, 참기름 등이 0.67~0.89g/100g의 높은 값을 보였다. 대두유 제조 과정에서 탈취 후 얻어지는 부산물인 mist oil에는 10.2g/100g로 다량의 스테롤이 함유되어 있어 스탄올제조에 원료로 적합하였다. Mist oil을 비누화한 후 Pd를 촉매로 실온에서 수소첨가반응시켜 스테롤을 스탄올로 전환시킨 결과, 수율이 4~5배 향상됨을 알 수 있었다.

## 문 헌

- Ikeda, I., Kawasaki, A., Samezima, K. and Sugano, M. : Antihypercholesterolemic activity of  $\beta$ -sitostanol in rabbits. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 243-251(1981)
- Vahouny, G. V., Connor, W. E., Subramaniam, S., Lin, D. S. and Gallo, L. L. : Comparative lymphatic absorption of sitosterol, stigmasterol, and fucosterol and differential inhibition of cholesterol absorption. *Am. J. Clin. Nutr.*, **37**, 805-809(1983)
- Kempen, H. J. M., de Knijff, P., Boomsma, D. I., van der Voort, H. A., Gevers Leuven, J. A. and Havekes, L. : Plasma levels of lathosterol and phytosterols in relation to age, sex, anthropometric parameters, plasma lipids, and apolipoprotein E phenotype, in 160 Dutch families. *Metabolism*, **40**, 604-611(1991)
- Ling, W. H. and Jones, P. J. H. : Minireview dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.*, **57**, 195-206(1995)
- Miettinen, T. A., Puska, P., Gylling, H., Vanhanen, H. and Vartianen, E. : Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *New Engl. J. Med.*, **333**, 1308-1312(1995)
- Gylling, H., Siimes, M. A. and Miettinen, T. A. : Sitostanol ester margarine in dietary treatment of children with familial hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.*, **36**, 1807-1812(1995)
- Ling, W. H. and Jones, P. J. : Enhanced efficacy of sitostanol-containing versus sitostanol-free phytosterol mixtures in altering lipoprotein cholesterol levels and synthesis in rats. *Atherosclerosis*, **118**, 319-331(1995)
- Miettinen, T. A. and Vanhanen, H. : Dietary sitostanol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis*, **105**, 217-226(1994)
- 新谷 勲 : 食品油脂の科學. 幸書房, 東京, p.20(1989)
- Gurr, M. : Plant sterols in the diet. *Lipid Technol.*, **8**, 114-117(1996)
- Fenton, M. : Chromatographic separation of cholesterol in foods. *J. Chromatogr.*, **624**, 369-388(1992)
- Fenton, M. and Sim, J. S. : Determination of egg yolk cholesterol content by on-column capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **540**, 323-329(1991)
- Kaneda, T., Nakajima, A., Fujimoto, K., Kobayashi, T., Kiriya, S., Ebihara, K., Innami, T., Tsuji, E., Kinumaki, T., Shimma, H. and Yoneyama, S. : Quantitative analysis of cholesterol in foods by gas-liquid chromatography. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 497-505(1980)
- Kim, H. W., Jeoung, S. Y., Jeoung, C. K., Yoon, H. S., Park, K. M., Ahn, P. U. and Choi, C. U. : Studies on analysis of sterols in mayonnaise by GLC with packed and capillary column. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **24**, 82-85(1992)
- van Delden, J. R., Cozijnsen, J. L. and Folster, P. : The determination of the cholesterol content in ready-to-serve foods by gas-liquid chromatography. *Food Chem.*, **7**, 117-124(1981)
- Miettinen, T. A. : Gas-liquid chromatographic determination of fecal neutral sterols using a capillary column. *Clin. Chim. Acta*, **124**, 345-348(1982)
- 阿部 芳郎 : 油脂·油糧ハンドブック. 幸書房, 東京, p.13(1988)
- Lawson, H. W. : Processing technology. In "Standards for fats and oils" The L. J. Foodservices Standards Series, Avi Publishing Co., Conn., Vol. 5, p.33(1985)
- Bernardini, E. : Hydrogenation. In "Vegetable oils and fats processing" Interstampa, Rome, Vol. 2, p.296(1983)

(1999년 5월 28일 접수)