

페놀물질을 첨가한 Linoleic Acid의 항산화 효과측정

金 貞 淑

계명전문대학 식품영양학과

Antioxidative Effectiveness of Phenolics on Linoleic Acid With Phenolics

Jeong-Sook Kim

Dept. of Food & Nutrition, KeiMyung Junior College

Abstract

Phenolics as antioxidant were added to linoleic acid to prevent lipid oxidation. Antioxidative effectiveness of them was measured by peroxide value at each 24 hour interval in order to compare with 0.02% protocatechuic acid(PRL) and phloroglucinol(PHL) in linoleic acid, contrast tube at 37°C for 96 hours blowing oxygen into specimen. Peroxide values of oxidized linoleic acid, PRL, PHL for 96 hours were 78, 42, 30. From these results, PHL group had a higher antioxidative ability than PRL.

It was found that the effect is more clearly demonstrated by NMR rather than UV and that the effect was dependent on the functional group and geometric molecular structure of phenolics.

서 론

유지 혹은 유지함유 식품중에는 linoleic, linolenic acid와 같은 불포화 지방산의 함량이 높기 때문에^{1, 2)} 가공, 저장시에 산패되어 그 품질에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다^{3, 4)}. 유지의 산화를 방지하기 위하여 항산화제를 첨가하는데 항산화제는 합성항산화제인 BHA, BHT 등⁵⁾과 천연항산화제인 토코페롤과 페놀물질들이 있다^{7, 8)}.

유지를 단독으로 산화시킨 경우와 유지에 페놀물질을 첨가하여 산화시킨 경우간에는 그 산화속도에 큰 차이가 있으며^{8, 9)} 산화정도를 측정하는 방법에는 과산화물가나 TBA가를 측정하는 방법이나¹⁰⁾ DPPH 환성소거법 등이 사용

되어져 왔다¹¹⁾. 그런데 안과 오¹²⁾는 유지를 산화시켜 UV와 IR 및 NMR로 측정된 결과를 보고하였다.

본 실험에서는 linoleic acid에 대한 페놀물질의 항산화 효과를 NMR로 측정하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약은 linoleic acid, protocatechuic acid, phloroglucinol, dimethyl-d6 sulfoxide (DMSO-d6)와 chloroform-d(Sigma사제)이며 기타 시약 및 용매는 특급품을 사용하였다.

사용된 기기는 UV-visible spectrophotometer

(Shimadzu UV-265, Japan), high performance liquid chromatography(Waters Associates, HPLC 440, U. S. A), nuclear magnetic resonance(Bruker AW-80, U. S. A) 이었다.

2. Linoleic acid의 산화 및 항산화력의 측정

Linoleic acid 10g, linoleic acid에 protocatechuic acid(PRL)와 phloroglucinol(PHL)을 0.02% 첨가한 구를 25ml의 시험관에 나누어 37°C에서 저장하면서 산소를 분당 82ml의 속도로 주입하여 96시간 산화시켰다¹³⁾.

항산화력의 측정은 24시간 간격으로 과산화물가를 측정하였으며 Lea의 개량법¹⁴⁾을 사용하였다.

3. UV에 의한 흡광분포도 측정

Linoleic acid의 흡광도 분포를 측정하기 위하여 UV cell에 ethanol을 가한 후 10^{-4} mole 정도의 시료를 녹여 흔들어 scanning은 190nm에서 350nm까지로 하여 측정하였다.

4. HPLC에 의한 지질산화물 측정

Linoleic acid를 96시간 산화시켜 U-bondapak C-18(3.9mm×30cm) reversed-phase column을 사용하여 integrator로 분석하였다.

Mobile phase A는 hexane, mobile phase B는 Isopropyl alcohol로서 용매의 linear gradient는 0%에서 시작하여 40%의 mobile phase B에 도달하는데 30분이 걸리도록 조작하였고 분석시간은 40분으로 하였다.

Detection은 200nm에서 행하였으며 시료는 20 ul씩 주입하였고 flow rate는 4ml/min.로 하였다.

5. NMR에 의한 항산화도 측정

Proton-NMR은 tetramethylsilane(TMS)을 내부표준물질로 사용하여 chemical shift는 ppm으로 표시하였다.

측정시 시료 5mg을 chloroform-d와 DMSO-d6에 5% (w/v) 비율로 용해시켜 측정하였으며 DMSO-d6 용매는 1% TMS가 함유된 것으로 사용하였다.

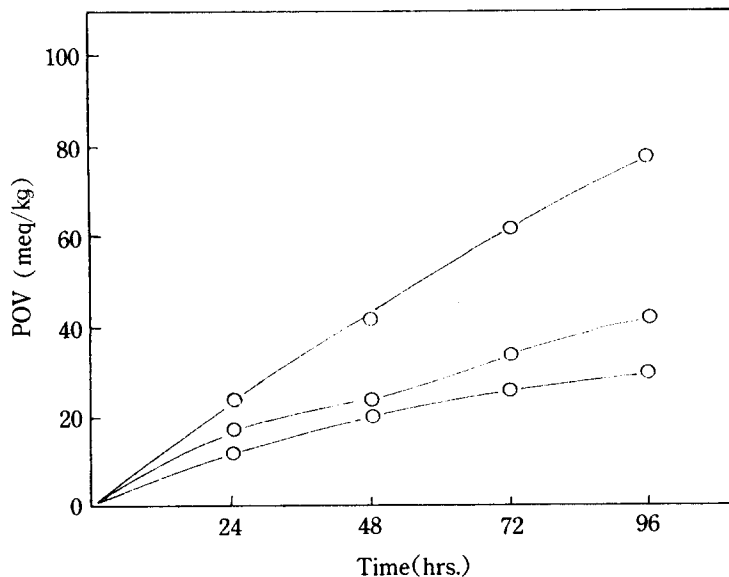


Fig. 1. POV of oxidized linoleic acid, PRL, PHL.

결과 및 고찰

1. 페놀물질의 항산화 효과

Linoleic acid에 대한 protocatechuic acid(PRL), phloroglucinol(PHL)의 항산화 효과를 96시간 후 측정된 결과는 control 78에 비하여 PRL 42, PHL 30으로 나타나서 PHL의 항산화 효과가 우수한 것으로 나타났다.

Hudson과 Ghavami¹⁵⁾는 식물체의 잎으로부터 추출한 천연페놀물질중 OH기가 네개인 quercetin이 가장 항산화 효과가 컸으며, Pratt와 Birac¹⁶⁾은 대두 단백 추출 페놀물질인 genistein이 OH기가 세개로서 두개인 daidzein보다 항산화 효과가 더 크다는 결과를 얻었다.

본 실험에서도 OH기의 증가에 따라 항산화

효과가 증가되는 것으로 나타난 사실로 볼때 페놀물질의 OH기가 유지의 자동산화과정중에 형성되는 free radical을 제거하는 역할을 하는 것으로 추정되고 있다.

2. UV에 의한 흡광분포도

Linoleic acid에 대한 항산화 효과를 UV로 측정하였다.

Fig. 2에서 linoleic acid를 37°C에서 96시간 연속적으로 산화시킨 것과 control을 UV로 측정된 결과 뚜렷한 변화를 볼 수 없었다.

페놀물질을 linoleic acid에 첨가하여 96시간 산화시킨 PRL, PHL과 control을 비교한 결과 근소한 파장의 shift를 볼 수 있었으나 항산화 효과를 측정하기에는 부족하였다.

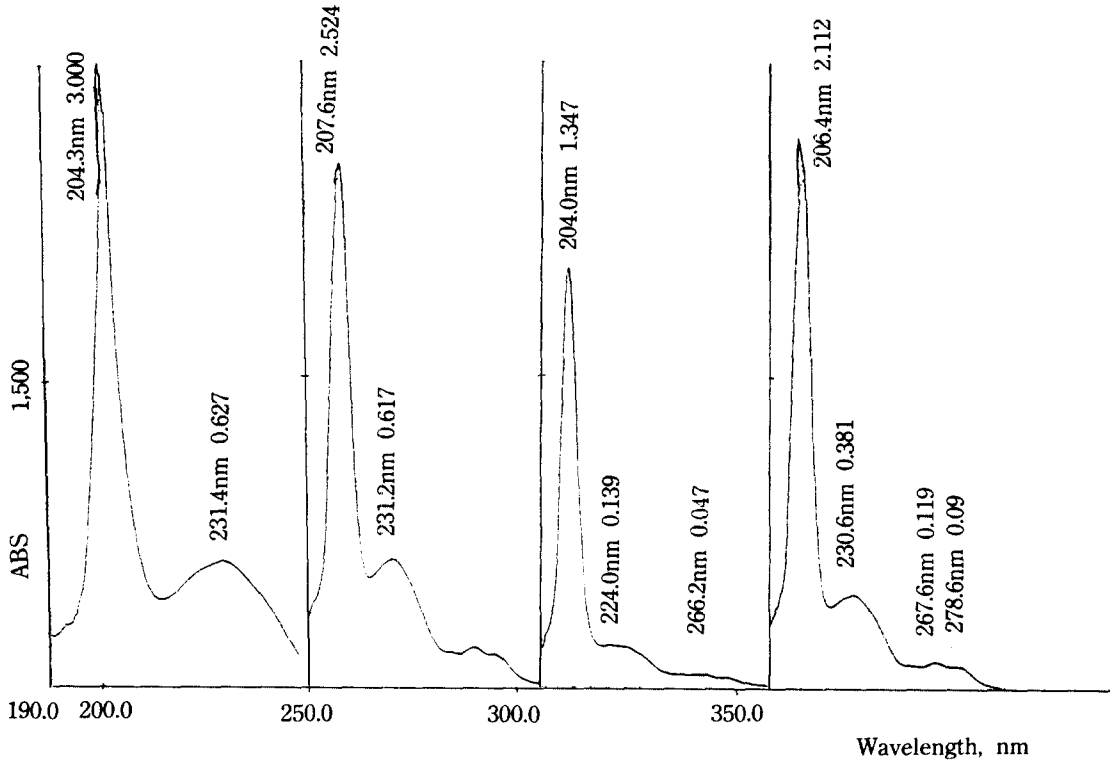


Fig. 2. UV spectra of oxidized linoleic acid, PRL, PHL.

3. HPLC에 의한 linoleic acid 산화물의 측정

Linoleic acid를 37°C에서 96시간 82ml O₂/min.

의 조건으로 산화시킨것을 HPLC로 측정한 결과 linoleic acid외에 몇가지 산화물이 소량 생성된 것을 볼 수 있었다.

* Linoleic acid

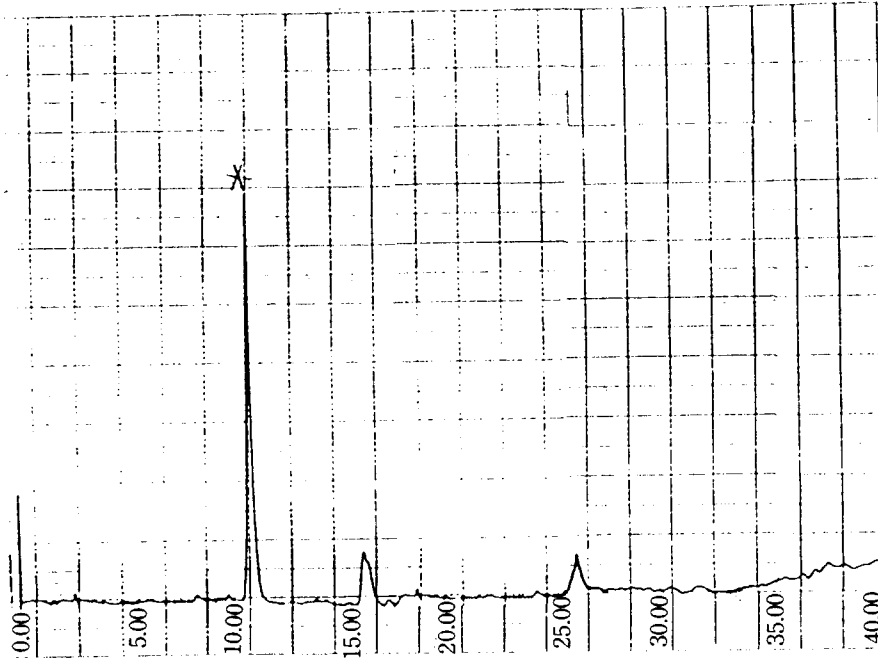


Fig. 3. HPLC chromatogram of oxidized linoleic acid.

4. NMR에 의한 항산화 효과 측정

NMR에 의한 control과 96시간 산화시킨 linoleic acid, PRL, PHL 등을 측정한 결과는 Fig. 4~7과 같다.

Fig. 4에서 control의 chemical shift는 0.90, 1.30, 1.80-2.50(2.15), 2.60-2.90(2.76), 4.00-4.33(4.2), 5.00-5.50(5.3)ppm으로 나타났으며 각각의 assignment는 CH₃-C=C, C-CH₂-C, C-CH₂-C=C 또는 C=C-CH₂-C, C=C-CH₂-C-, O=C-O-CH₂-C, -CH=CH- 이었다.

이와같이 protocatechuic acid와 phloroglucinol의 vinyl proton의 chemical shift가 겹치지 않고 또 이들에 methylene proton이 없는한 linoleic acid의 자동산화는 double bond에서 일어

나며 double bond의 migration과는 관계없이 전체 methylene proton수에는 변화가 없기 때문에 NMR에 의한 항산화 효과 측정이 가능하다고 본다. 실제로 protocatechuic acid는 6.77ppm이상에서, phloroglucinol은 5.72ppm 이상에서만 chemical shift가 나타났다.

안과 오¹⁷⁾는 NMR을 이용하여 대두유의 산화 속도를 측정하여 좋은 결과를 얻었다.

본 실험에서 linoleic acid의 산화가 진행됨에 따라 5.30ppm region의 vinyl proton수가 감소될 것이므로 integration에 의하여 5.30ppm(X)과 1.30ppm(Y)의 ratio를 구하였다.

Control과 96시간 산화시킨 linoleic acid, PRL, PHL의 X/Y ratio는 각각 0.187, 0.174, 0.181, 0.187이었으며 역시 96시간 산화시킨 폐놀물질 첨가

군이 같은 산화시간의 linoleic acid보다 높은 항산화 효과를 나타내었다.

또한 OH기수에 따라 항산화 효과는 증가하는 것으로 나타나서 과산화물가 측정결과와 일치하였다.

이상의 결과로 보아 유지의 항산화 효과를 초기단계에서 측정할때는 UV측정보다는 NMR 분석법에 의한 결과가 더 나은것으로 사료되었다.

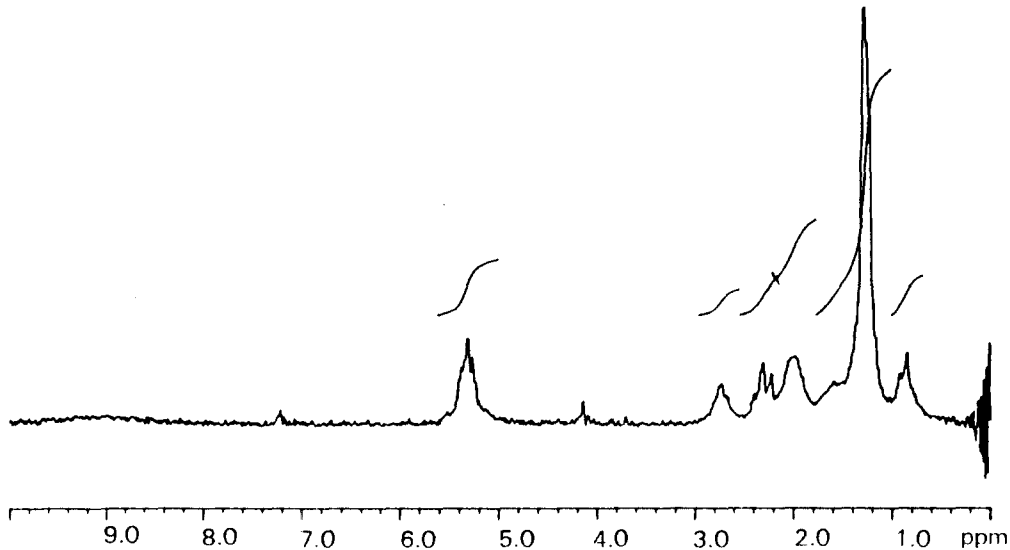


Fig. 4. NMR spectrum of linoleic acid.

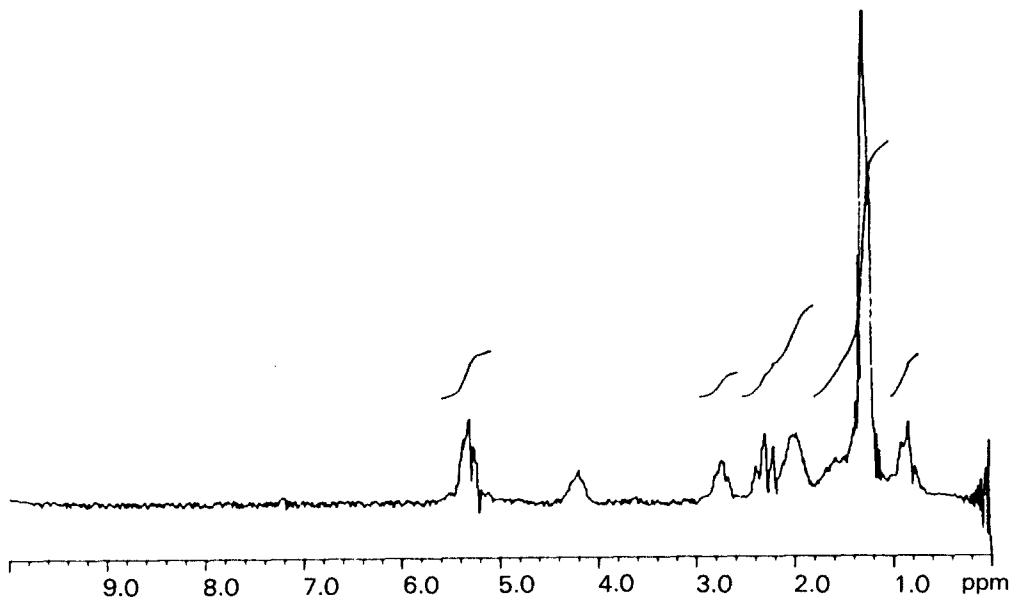


Fig. 5. NMR spectrum of oxidized linoleic acid(96 hours).

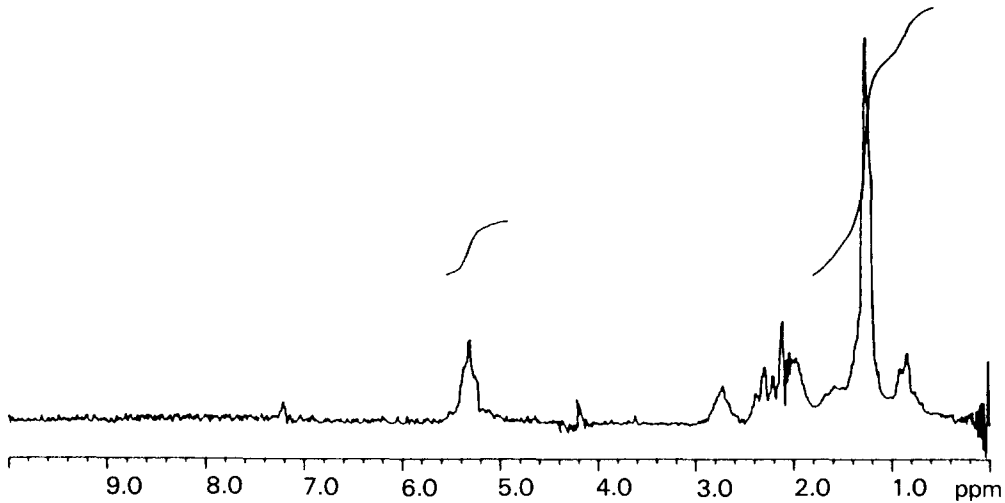


Fig. 6. NMR spectrum of PRL (96 hours).

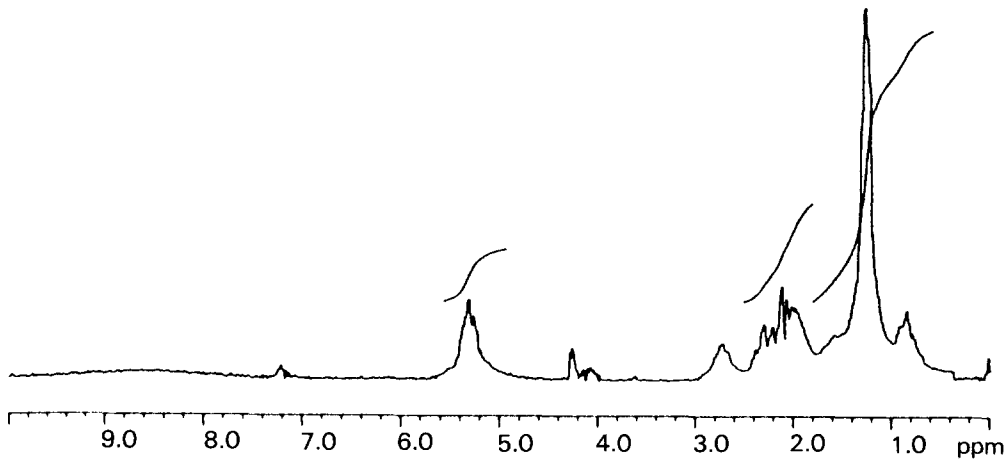


Fig. 7. NMR spectrum of PHL (96 hours).

IV. 요약

Linoleic acid의 산화방지를 위하여 항산화제로서 페놀물질인 protocatechuic acid와 phloroglucinol을 첨가하여 82ml O₂/min., 37°C 96 hrs의

조건에서 POV를 측정하였으며 기기(UV, NMR)에 의한 측정의 결과도 분석하였다.

페놀물질의 항산화 효과는 96시간의 POV가 control 78, PRL 42, PHL 30으로 나타나서 OH기가 세개인 phloroglucinol이 더 높게 나타났다.

본 실험의 조건하에서 UV에서는 근소한 파장의 shift를 볼 수 있었으나 항산화 측정에는 부족하였고 HPLC에서는 linoleic acid 외에 몇가지 지질 산화물이 생성된 것을 알 수 있었으며 NMR분석법을 이용하여 항산화 효과를 측정할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Swern, D., Bailey's industrial oil and fat products, 147, Interscience, N. Y., 1982.
- Franks, J., Geil J. V. and Freaso, R., Automatic determination of oxidation stability of oil and fatty products, *Food Technol.*, 36, 71, 1982.
- Privett, O. S. and Blank, M. L., The Initial stage of autoxidation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 39, 465, 1962.
- Buck, D. F., Antioxidants in soya oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, March, 275, 1981
- Hayes, R. E., Antioxidant activity of soybean flour and derivatives, *J. Food Sci.*, 42(6) : 1527, 1977.
- Hudson, B. J. F. and Lewis, J. I., Polyhydroxy flavonoid antioxidants for edible oils. phospholipid as synergists, *Food Chem.*, 10, 111, 1983.
- Hudson, B. J. F. and Mahgaub, S. E. O., Naturally-occurring Antioxidants in leaf lipids, *J. Sci. Food Agric.*, 31, 646, 1980.
- 김정숙, 윤형식. 산사 및 가자 에테르 추출물의 항산화 효과, 한국 농화학회지, 36(3) : 203, 1993.
- 김정숙, 윤형식. Methyl linoleate에 대한 페놀성 물질의 항산화성과 산화생성물, 한국 식품과학회지, 25(4) : 379, 1993.
- 조미자, 권태봉. 식용 대두유에 대한 Chelating agent의 항산화 효과, 한국 농화학회지, 32(1) : 30, 1989.
- 위재준, 이형주. 인삼으로부터 페놀성 항산화 성분의 분리, 한국 농화학회지, 32(1) : 44, 1989.
- Ahn, J. K. and Oh, S. K., Kinetic study on the autoxidation of methyl linolenate by NMR, Master's thesis, Kyung Hee Univ., 1982.
- DeMan, J. M. and DeMan, L., Automated A. O. M. test for fat stability, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 61(3) : 534, 1984.
- Lea, C. H., Peroxide number-cold method, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 26, 152, 1949
- Hudson, B. J. F. and Ghavami, M., Phospholipids and antioxidant synergists for tocopherols in the autoxidation of edible oils, *Lebensm-Wiss. U. Technol.*, 17(4) : 191, 1984.
- Pratt, D. E. and Birac, P. M., Source of antioxidant activity of soybeans and soy products, *J. Food Sci.*, 44, 1720, 1979.
- Ahn, J. K. and Oh, S. K., Spectroscopic evidence of the autoxidation products derived from methyl linolenate, *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 32(1), 1, 1989.