

## Cartridge에 의한 지질과 페놀물질 혼합산화물의 분리

김 정 숙

계명전문대학 식품영양과

### Separation in Oxidized Mixture of Lipids and Phenolics by Cartridge

Jeong-Sook Kim

Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College

#### Abstract

The oxidized mixture of lipid(methyl linoleate) and phenolics(phloroglucinol) at 37°C, 82ml O<sub>2</sub>/min., for 9 days were separated each by C<sub>18</sub> cartridge and silica cartridge making use of different eluting solvent.

And the oxidation products were analyzed by HPLC.

In conclusion, the oxidized mixture were separated into methyl linoleate and phloroglucinol by cartridge on HPLC.

And also in this experiment, separated methyl linoleate and phloroglucinol could be analyzed in the common eluant, water and acetonitrile on HPLC.

SEP-PAK cartridges were used almost sample purification until now, but under the various eluting solvents and conditions, cartridge will be expected to mini columns which can separate different polarity materials.

Key words : oxidized mixture, methyl linoleate, phloroglucinol, cartridge.

#### 서 론

식품의 저장, 가공에서 지질의 산화로 생성된 분해산물들이 식품의 열화에 미치는 영향이 다수 보고되고 있으며<sup>1,2)</sup> 산화를 방지하기 위한 항산화제의 종류 및 항산화 효과<sup>3,4)</sup>, 그리고 그 유해성이나 산화물 생성<sup>5,6)</sup>에 관한 연구도 활발하다.

지질에 첨가되는 항산화제는 합성 항산화제로서 BHA, BHT 등이 있는데 이들은 인체에 나쁜

영향을 준다는 사실이 알려져<sup>7,8)</sup> 근래에는 식물계에 존재하는 페놀계의 천연 항산화물질을 첨가하여 그 항산화효과를 측정하는 연구가 다수 행해지고 있다<sup>9,10)</sup>.

지질을 기질로 하여 항산화제인 페놀물질을 첨가하여 산화시키면 두물질은 상호작용을 하며 각각의 산화 생성물들을 형성할 것이므로 우선 두 물질을 혼합하여 산화시킨 후 산화후는 지질 및 지질 분해 산물과 페놀물질 및 페놀 물질의 분해 산물로 각각 분리하여 분석해 볼 필요가

있다고 사료되었다. 지금까지의 연구들을 보면 지질은 지질 단독으로<sup>11,12)</sup> 페놀 물질은 페놀 물질 단독으로 산화를 시켜<sup>13)</sup> 그 반응 생성물들의 종류와 구조 및 생성 기구를 분석하고 있다.

지질과 페놀 물질을 각각 산화시킨 경우보다 지질에 천연 항산화물질을 첨가하여 산화시켜 다시 각각을 분리한 경우에 있어서의 분해산물들의 확인이 더 필요하므로 보다 신속하고 간단한 분리를 실제 행할 필요성을 느끼게 되었다.

이에 본 연구에서는 methyl linoleate에 항산화성을 가진 페놀물질로서 phloroglucinol을 혼합하여 산화시킨 후 이 혼합물을 시료정제용으로 대부분 사용되는 cartridge를 mini column으로 이용하여 각각 분리시켜 HPLC로서 지질 분해산물과 페놀물질 분해산물의 종류를 확인하는 실험을 시도하였다

## 재료 및 방법

### 1) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약은 methyl linoleate(Sigma, 99% purity), phloroglucinol(Sigma)이며 ethanol, acetonitrile, hexane, isopropyl alcohol 등의 용매는 HPLC grade로서 Fisher Scientific 사제를 사용하였다. 그 밖에 Cartridge는 SEP-PAK plus silica cartridge와 C<sub>18</sub> cartridge(Waters Associates, Inc. U.S.A.)를 사용하였다.

사용된 기기는 UV-visible spectrophotometer (Shimadzu UV-265, Japan), milli-Q water purification system(Waters Associates, U.S.A.), high performance liquid chromatography(Waters Associates, HPLC, 440, U.S.A.), gas chromatography-mass spectrometer(Shimadzu Qp 1000A, Japan) 이었다.

### 2) Methyl linoleate와 phloroglucinol 및 두 물질 혼합물의 산화<sup>14)</sup>

25ml 시험관에 methyl linoleate 10g, 초순수 10 ml에 녹인 phloroglucinol 0.2g, 혼합물로서 methyl linoleate 10g과 0.2%량(w/w)의 phloroglucinol을

첨가하여 37°C에서 산소를 시간당 5ℓ의 속도로 주입하면서 9일간 산화시켰다.

### 3) Methyl linoleate와 phloroglucinol 혼합산화물의 분리

Methyl linoleate 및 그 분해물을 취하기 위해 SEP-PAK plus C<sub>18</sub> cartridge 2개를 연결하여 시료 2ml를 얹고 초순수 30ml를 syringe로 조심스럽게 가해 우선 phloroglucinol을 미리 흘려버린 다음 isopropyl alcohol과 acetonitrile을 각각 5ml씩 가한 후 마지막으로 hexane 5ml를 가해 얻은 층을 감압 농축하고 질소가스 주입하에서 완전히 농축시켜 시료로 하였다.

Phloroglucinol 및 그 분해물의 분취를 위하여 SEP-PAK plus silica cartridge 2개를 연결하여 시료 3ml를 얹고 syringe로 hexane 30ml를 조심스럽게 가해 methyl linoleate를 내려 보낸 다음 acetonitrile을 20ml 흘려 보낸 후 마지막으로 초순수 5ml를 사용하여 얻은 층을 감압 농축하고 질소가스 주입하에서 완전히 농축시켜 시료로 하였다.

### 4) UV에 의한 흡광분포도 측정

Methyl linoleate와 phloroglucinol의 흡광도 분포를 측정하기 위하여 UV cell에 ethanol을 가한 후 10<sup>-4</sup> mole 정도의 시료를 넣고 흔들어서 녹인 후 scanning은 190nm에서 250nm까지로 하여 측정하였다.

### 5) HPLC 에 의한 Methyl linoleate와 phloroglucinol 및 그 산화물 분석

HPLC 측정에서 U-bondapak C-18(3.9mm×30 cm) reversed phase column을 사용하여 integrator로 분석하였다.

Mobile Phase A는 acetonitrile, B는 초순수로서 용매의 linear gradient는 initial time 10분, 50% B에 도달하는데 30분, 50% B에서 5분간 지속 되도록 조작하였고 시료당 분석 시간은 45분으로 하였다. Detection은 200nm에서 행하였으며 시

료는 20 $\mu$ g씩 주입하였고, flow rate는 4ml/min.로 하였다.

### 6) MS에 의한 산화물의 확인

지질산화물을 peak 별로 반복 분취하여 ethanol 20ml를 가하고 0.1N NaOH로 PH 9.5로 조절한 초순수 50ml를 가한 후 sodium borohydride 0.15g을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 저장 후 ether로 5회 추출하여 그 추출액을 질소가스를 주입하면서 농축하여 시료로 하였다. Shimadzu GC-MS Qp 1000 A model에 의한 MS 측정은 direct probe 방식으로 농축시료 전량을 가열, 기화시켜 측정하였고 250~300 $^{\circ}$ C에서 질량분석을 하였으며 ion source pressure는  $1.8 \times 10^{-5}$  torr, ionizing voltage는 70eV로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1) UV에 의한 methyl linoleate와 phloroglucinol의 흡광도 조사

Methyl linoleate와 페놀물질인 phloroglucinol의 UV 최대 흡광도를 측정한 결과 methyl linoleate는 208nm에서 phloroglucinol은 206nm에서 최대 흡광 spectrum을 나타내었으므로 200nm 정도의 파장에서 두 물질이 같이 검색될 수 있다는 것을 확인하였다.

그러므로 HPLC 상에서도 동일한 column으로 두 물질이 모두 분리될 수 있을 것으로 나타났다.

### 2) 단독산화시킨 methyl linoleate의 분석

지질에 페놀물질은 혼합하지 않고 methyl linoleate만 9일간 산화시킨 후 HPLC로 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

Methyl linoleate 외에 여러 종류의 분해산물이 생성되었으며 Fig. 1에서 peak 1은 methyl-8-(2-furyl)-octanoate, peak 2는 methyl-9, 13-hydroxycis, trans isomer, peak 3은 methyl-9, 13-hydroxytrans, trans isomer, peak 4는 9-TMSO-12, 13-epoxy-10-octadecenoate로 확인되었다.

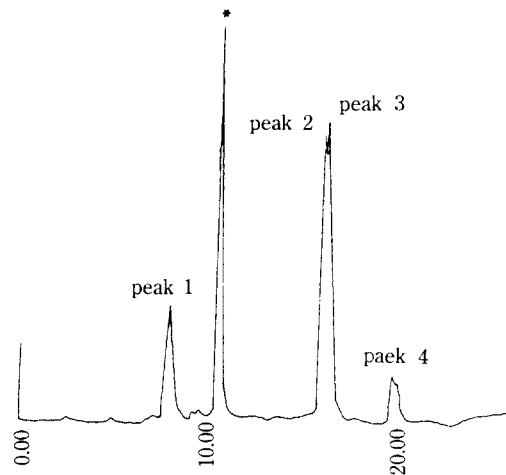


Fig. 1. HPLC chromatogram of oxidized methyl linoleate.  
\* : methyl linoleate.

### 3) 단독 산화시킨 phloroglucinol의 분석

Phloroglucinol을 9일간 산소주입하에 산화시킨 후의 HPLC chromatogram은 Fig. 2와 같다.

페놀물질은 caffeic acid를 유사한 조건에서 산화시킨 결과 caffeic quinone류와 diphenic acid 및 그 methyl ester 등의 산화 생성물들이 생성되었다는 보고가 있으며  $\alpha$ -tocopherol도 산화에 의해  $\alpha$ -tocopherol quinone과 tocopherol dimer 등을 생성하였다는 보고가 있다<sup>15)</sup>.

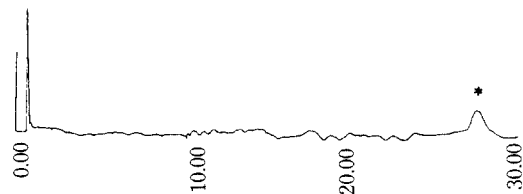


Fig. 2. HPLC chromatogram of oxidized phloroglucinol.  
\* : Phloroglucinol.

그러나 phloroglucinol은 9일간의 산화조건에 의해서 다른 분해산물을 생성하지 않았는데 그 이유는 다른 페놀물질들에 비해 phloroglucinol의

산소흡수 속도가 느리기 때문으로<sup>15)</sup> 사료된다.

4) 산화 전과 산화후의 methyl linoleate와 phloroglucinol 혼합물의 분석

Methyl linoleate와 phloroglucinol을 혼합하여 산화시키기 전의 분석 결과를 Fig. 3에 나타내고 산화시킨 후의 측정 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 3을 살펴보면 methyl linoleate와 phloroglucinol이 확인되어 Fig. 4에서도 동일한 시간대에 두 물질이 존재하는 것을 알 수 있다.

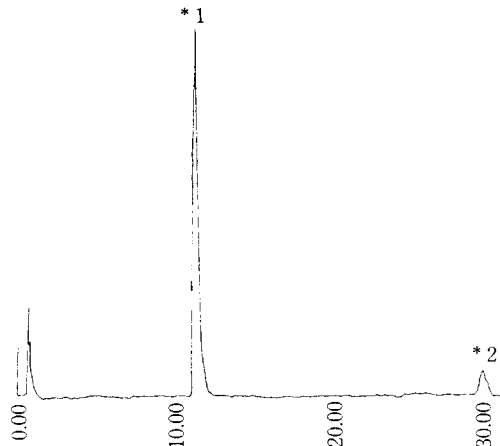


Fig. 3. HPLC chromatogram of methyl linoleate and phloroglucinol mixture before oxidation.  
\* 1 : methyl linoleate.  
\* 2 : Phloroglucinol.

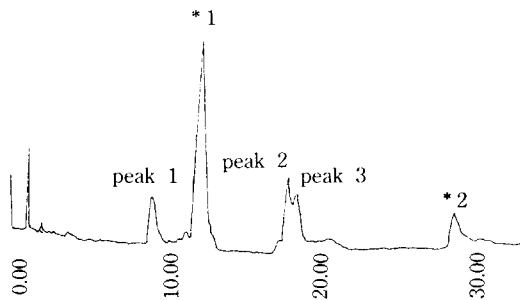


Fig. 4. HPLC chromatogram of methyl linoleate and phloroglucinol mixture after oxidation.  
\* 1 : methyl linoleate.  
\* 2 : phloroglucinol.

Fig. 4에서도 methyl linoleate의 분해 산물로서 peak 1은 methyl-8-(2-furyl)-octanoate, peak 2는 methyl-9, 13-hydroxy-cis, trans isomer, peak 3은 methyl-9, 13-hydroxy-trans, trans isomer로 확인되어 methyl linoleate만을 산화시킨 경우와 비교할 때 phloroglucinol이 항산화 효과를 가진 것으로 나타났다.

5) C<sub>18</sub> cartridge에 의해 분리된 methyl linoleate의 분석

C<sub>18</sub> cartridge를 사용하여 페놀물질을 미리 용출시킨 다음 methyl linoleate층만을 취하여 농축한 것을 분석한 결과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 1과 비교해 보면 페놀물질을 가해 산화시켰다가 지질부만을 분리했기 때문에 peak 4의 9-TMSO-12, 13-epoxy-10-decenoate는 나타나지 않았다.

Fig. 4의 경우와 같이 phloroglucinol을 제외하고 동일 시간대에 peak 1의 methyl octanoate, methyl linoleate, peak 2의 methyl-9, 13-hydroxy-cis, trans-isomer와 peak 3의 methyl-9, 13-hydroxy-trans, trans-isomer로 분석하였다.

지질층 분리의 측면에서는 분리도중에 또 다른 분해산물의 생성이 일어나지 않고 효과적인 분리가 행해진 것을 알 수 있었다.

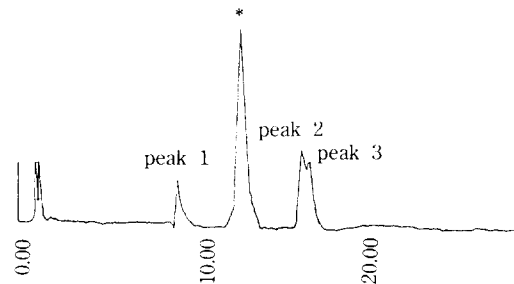


Fig. 5. HPLC chromatogram of oxidized methyl linoleate separated by C<sub>18</sub> cartridge.  
\* : methyl linoleate.

6) Silica cartridge에 의해 분리된 phloroglucinol의 분석

Silica cartridge를 사용하여 지질을 미리 용출

시킨 다음 phloroglucinol층만을 취하여 농축한 것을 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

Fig. 2 및 Fig. 4의 경우와 동일하여 phloroglucinol은 산화물을 생성하지 않았으며 동일한 시간대에 phloroglucinol의 존재가 확인되었다.

페놀물질 분리의 면에서도 잔존하고 있던 지질 분해물의 검출 등의 부작용이 없이 페놀물질이 단독으로 분석된 것을 확인하였다.

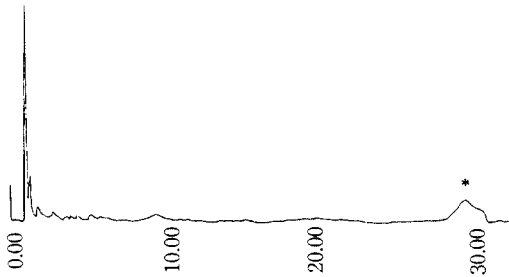


Fig. 6. HPLC chromatogram of oxidized phloroglucinol separated by silica cartridge.  
\* : phloroglucinol.

## 요 약

Methyl linoleate 기질에 항산화성을 가지는 페놀물질인 phloroglucinol을 혼합하여 산화시킨 후 cartridge를 사용하여 다시 분리하여 각각 분석하고자 하였다.

그 방법으로서 methyl linoleate 10g에 0.2%량 (w/w)의 phloroglucinol을 첨가하여 37°C에서 9일간 산소를 주입하면서 산화시켜 C<sub>18</sub> cartridge, silica cartridge로서 용매 조건을 달리하여 용출시킨 후 methyl linoleate층과 phloroglucinol층을 분리하여 HPLC로 분석하였다.

지질과 페놀물질 혼합 산화물은 C<sub>18</sub> cartridge와 silica cartridge에 의해 분리가 가능하였으며 지질은 methyl linoleate 외에 methyl octanoate, methyl-9, 13-hydroxy-cis, trans-isomer, methyl-9, 13-hydroxy-trans, trans-isomer 등 3개의 분해산물을 형성하였고 페놀물질인 phloroglucinol은 분해산물을 형성하지 않았다.

HPLC 분석에서 지질과 페놀물질은 각기 다른 용매가 사용되어져 왔으나 본 실험에서는 두

물질 공히 물과 acetonitrile을 사용하여 분석하여도 각각 확인 되었다.

SEP-PAK cartridge는 기기 분석에서 시료 정제용으로 대부분 쓰여 왔으나 용매와 용출 조건을 다양하게 변화시키면 극성과 이화학적 성질이 다른 물질들을 분리하는 mini column으로서 이용될 수 있는 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

1. Privett, O.S. and Blank, M.L., The initial stage of autoxidation, *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 39, 465, 1962.
2. Kazuo, M. and Toru, T., Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids, *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 63, 1380, 1986.
3. Avena, S.L. and Hinoat, L.V., Ferulic acid and other phenolics in oat seed, *J.Food Sci.*, 42, 551, 1977.
4. Patricia, A. and Pratt, D.E., Phenolic antioxidants of dried soybeans, *J.Food Sci.*, 43, 556, 1978.
5. Mahoney, J.R., Role of  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid, citric acid and EDTA as antioxidants in model systems, *J.Food Sci.*, 51, 1293, 1986.
6. Cilliers, J.J.L. and Singleton, V.L., Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system, *J. Agric. Food Chem.*, 37, 89, 1989.
7. Choe, N.Y. and Yang, Y.H., Toxicological studies of antioxidant, BHT and BHA, *Korean J. Food Sci. Tech.*, 14, 283, 1982.
8. Branen, A.L., Toxicology and biochemistry of BHA and BHT, *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 59, 1975.
9. Kozłowska, H. and Zadernowski, R., Phenolic acids in rapeseed and mustard, *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1119, 1983.
10. Yasuk., F., Toshihiko, O., and Mitsuo, N., Studies on antioxidative substances sesame seed, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 301, 1985.

11. Junji, T. and Setsuro, M., Geometrical isomers of monohydroperoxides formed by autoxidation of methyl linoleate, *Agric. Biol. Chem.*, 41(12), 2401, 1977.
12. Kazuo, M., Kenshiro, F, and Takashi, K., Formation of dimer during the initial stage of autoxidation in methyl linoleate, *Agric. Biol. Chem.*, 46(3), 751, 1982.
13. Cilliers, J.J.L. and Singleton, V.L., Caffeic acid autoxidation and the effect of thiols, *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1789, 1990.
14. Kazuki, K., Genichi, D. and Masato, N., Some analytical observations of autoxidation products of linoleic acid and their thiobarbituric acid reactive substances, *Agric. Biol. Chem.*, 47(9), 2035, 1983.
15. Singleton, V.L. and Lea, A.G.H., The phenolic cinnamates of white grapes and wine, *J.Sci. Food Agric.*, 29, 403, 1978.