

## 식용대두유에 대한 Chelating agent의 항산화 효과

조미자\* · 함태식 · 권태봉\*\* · 오성기

경희대학교 식량자원개발연구소, \*경희호텔전문대학 식품영양학과

\*\*한림대학 한국영양연구소

## Antioxidant Effect of some Chelating Agents on Soybean Oil

\*Mi-Za Cho, Tae-Sik Hahn, \*\*Tae-Bong Kwon and Sung-Ki Oh

Institute of Food Development, Kyung Hee University, Suwon, Korea

\* International College of Hotel Administration, Kyung Hee University, Seoul, Korea

\*\* Korea Nutrition Institute, Hallym College, Chunchon, Korea

### Abstract

Some chelating agents are evaluated as an antioxidant for the autoxidation of soybean oil. Soybean oil is autoxidized under a mild condition (the flow rate of 67ml O<sub>2</sub>/min and 50°C). The antioxidant effect is measured by active oxygen method, and the spectral change of autoxidized soybean oil examined. The antioxidant effect of chelating agents is increased in order of diphenic acid, naphthoquinone, pyromellitic acid, quinolinic acid and naphthalic acid, and particularly the effect is low in diphenic acid and naphthoquinone. It is found that the effect is more clearly demonstrated by NMR rather than IR and UV and that the effect is dependent on the functional group and geometric molecular structure of chelating agents.

### 서 론

식용대두유 중에는 oleic, linoleic, linolenic acid 와 같은 고도불포화 지방산의 함량이 높기 때문에 저장 또는 가공중에 산패하기 쉬운 결점을 가지고 있다.<sup>1-4)</sup>

지방의 자동산화 mechanism에 대하여는 이미 잘 알려져 있으며<sup>5,6)</sup> 최근에는 유지의 항산화작용에 대해 새로운 항산화 물질과 그에 대한 상승작용을 갖는 물질에 관한 연구가 활발하여<sup>7,8)</sup> tocopherols<sup>9,10)</sup> 및 phosphatide,<sup>11)</sup> tocopherol과 인지질의 혼합물질,<sup>12)</sup> 유리지방산,<sup>13)</sup> 당알콜,<sup>14)</sup> cellulose,

dextrin 및 glycerol,<sup>15)</sup> nitroxide,<sup>16)</sup> protein hydrolysates,<sup>17)</sup> citric acid,<sup>18)</sup> amine,<sup>19)</sup> 당 또는 아미노산등<sup>20)</sup> 여러 종류의 항산화 물질에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. Marcus<sup>21)</sup>는 glycine, histidine, tryptophan을 linoleic acid에 첨가하였을 때 이들 물질은 항산화력을 나타내며 고농도보다 저농도에서 효과가 크다고 하였다.

Karel 등<sup>22)</sup>은 methyl linoleate에  $\beta$ -amino butyric acid 및 Cysteine을 첨가했을 때 항산화효과를 나타내었으며 초기산화 속도를 감소시켰다고 하였다

Yamaguchi 등<sup>23)</sup>은 linoleic acid에 dipeptides를 첨가한 경우 alanylhistidine, alanylmethionine, alanyltyrosine 및 alanyltryptophan은 이들 구성 아미노산을 혼합한 경우보다 약 2배 가량 유효기간을 연장시켰다고 보고하였다. 또한 이들은<sup>24)</sup> 쿠키나 비스켓을 만들 때 포도당과 아미노산을 첨가하여 유지의 안정성을 조사한 결과 포도당만을 사

1988년 10월 10일 수리

Corresponding author: S.K. Oh

Abstracted in part from the Ph.D. dissertation of Mi-Za Cho, Kyung Hee University, 1986

용하는 경우는 당농도 5%에서 항산화 작용이 컸으나 아미노산과 혼합하였을 때는 포도당 2.5%와 lysine 2%, 포도당 2.5%와 glycine 0.5%가 항산화 효과가 컸으며 환원당과 아미노산의 갈변반응 물질이 항산화 효과를 나타낸다고 하였다. Itoh 등<sup>20)</sup>은 아미노산 중에서도 특히 leucine, isoleucine, valine 과 같은 측쇄 아미노산에서 생성되는 갈변반응 물질이 항산화력이 크다고 보고하였다. Kawashima 등<sup>21)</sup>은 여러 종류의 dipeptides와 당류에 대한 항산화 효과에서 측쇄 아미노산과 Xylose를 혼합한 경우 가장 큰 항산화력을 나타내었으나 xylose의 농도가 0.5mole 이상일 경우에는 별 차이를 나타내지 않으며, 갈변반응이 아미노산에 대해 당농도의 증가에 따라 증진되므로 dipeptide와 xylose와의 반응생성물이 항산화력에는 영향을 주지 않는 것 같다고 하였다. 윤 등<sup>22)</sup>은 대두유의 항미안정성에 있어서 인지질이 대두유중의 금속이온과 chelates를 형성하므로써 상대적으로 산화촉진 효과를 감소시켰다고 하였다.

한편 금속이온은 유지의 자동산화과정에서 산화촉진제로 작용하여 특히 2 가나 또는 그 이상의 산화수를 갖는 Co, Cu, Fe, Mn, Ni 등과 같은 transition metals은 major prooxidant로서 지방의 산화를 촉진시키는 역할을 하며, Cu는 다른 금속이온에 비하여 산화촉진효과가 큰 것으로 알려져 있다 따라서 유지에 citric acid나 EDTA와 같은 금속 chelate 화합물을 항산화제와 같이 첨가하므로써 유지의 산화촉진 효과를 감소시킬 수 있다고 하였다.<sup>18)</sup>

본 실험에서는 이와 같은 금속이온과 chelating agent의 대두유에 있어서 산화촉진 작용의 억제 효과에 대해 연구, 검토하였다.

## 재료 및 방법

본 실험에 사용한 시료는 시판의 정제, 탈취한 식용대두유(동방유량사제)를 사용하였다.

시약은 diphenic acid (0,0'-bibenzoic acid), naphthoquinone (2-methyl-1,4-naphthoquinone), 1,8-naphthalic acid, pyromellitic acid(benzene-1,2,4,5-tetrahydroxy anthraquinone), quinalinic acid(pyridine-2,3-dicarboxylic acid)(이상은 일본, 동경화성 사제), ferrous sulfate(관동화학, 일본), cupric sulfate 등 특급품을 사용하였으며 기타 분석용 시약은 특급내지 일급품을 사용하였다.

기기는 water bath(International, Seoul), flow meter(Dwyer Instruments Inc., Indiana, U.S.A.), gas regulator (Union Carbide, N.Y., U.S.A.), infrared spectrophotometer(5MX-S, Nicolet Instrument Corp., U.S.A.), uv-visible spectrophotometer(220S, Hitachi, Japan), NMR spectrometer (Varian T-60A, 60MHz, Varian, U.S.A.) 및 HP 3000 computer(Hewlett packard, U.S.A.) 등이다.

식용대두유에 대한 chelating agent별 항산화력의 측정은 A.O.M. 변법<sup>23)</sup>으로 하였다. 즉 식용대두유 20.00g을 정확히 평량하여 Plastic용기에 넣고 여기에  $\text{CuSO}_4$  (0.001mole) 또는  $\text{FeSO}_4$  (0.001 mole)과 chelating agent 0.001mole 혼합물을 직접 첨가하여 잘 교반한 후  $50 \pm 0.5^\circ\text{C}$  water bath에서 산화장치를 이용하여 67ml/min의 유속으로  $\text{O}_2$  gas를 주입시켰다. 이 반응물을 KI- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 적정법으로<sup>24)</sup> 24시간마다 적정하여 POV를 계산하였다.

NMR분석법<sup>25)</sup>에 의한 식용대두유의 산화도 측정은 다음과 같다. 시료 용액(10%v/v) 0.5ml를 NMR tube에 정확히 넣고 tetramethyl silane (3% v/v)을 첨가하여 측정하였다. 분석 조건은 Speed offset(Hz), 0; Spectrum amplitude, 1; Integral amplitude, 4; Spining rate(RPS), 20; Sweep time, 250sec.; Sweep width, 500Hz; Filter, 1; RF power level, 0.05; solvent, DMSO- $\text{CDCl}_3$  (1:1)이었다. uv-visible spectrophotometry에는 가급적 최대흡광도를 갖도록 ethanol로 희석하여 190~700nm 부위에서 측정하였으며 IR spectrophotometry 역시 일정량의 시료를 KBr disc에 취하여 액막을 만들어 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Chelating agent의 항산화 효과

정제 식용 대두유에 대한 diphenic acid (DA), naphthoquinone(NQ), naphthalic acid(NA), Pyromellitic acid(PA), Quinalinic acid(QA) 등 chelating agent 5종의 항산화 효과를 active oxygen method로 측정된 결과 (Table 1) DA(109.3%), NQ(111.2%), NA(921.2%), PA(168.6%), QA(183.6%)는 control에 비하여 9.3, 11.2, 821.2, 68.6, 83.6%의 효과를 나타내었으며 그 효과는 DA, NQ, PA, QA, NA 순으로 증가하였다. 특히 NA는 control보다 9.2배 정도의 현저히 높은

Table 1. Antioxidative effect of some chelating agents on the oxidation of soybean oil by active oxygen method (67ml O<sub>2</sub>/min, 50°C)

Additive*	POV**	Index(%)***
SO	186.1	100.0
SO+Cu	142.4	76.5
SO+NQ	206.9	111.2
SO+Cu+NQ	159.2	85.5
SO+NA	1,714.3	921.2
SO+Cu+NA	—	—
SO+PA	313.7	168.6
SO+Cu+PA	536.3	288.2
SO+QA	341.6	183.6
SO+Cu+QA	—	—
SO+DA	388.7	109.3
SO+Cu+DA	419.2	117.9
SO+Fe	168.1	90.3
SO+Fe+NQ	173.6	93.3
SO+Fe+NA	258.1	138.7
SO+Fe+PA	373.5	200.7
SO+Fe+QA	208.2	111.9
SO+Fe+DA	428.6	120.5

\* SO, soybean oil; NQ, naphthoquinone; NA, naphthalic acid; PA, pyromellitic acid; QA, quinolinic acid; DA, diphenic acid.

\*\* Hours to reach the peroxide value of 20.

\*\*\* Soybean oil was used as control.

항산화 효과를 나타내었다. 이들 chelating agent의 금속착화합물의 형성능에 따른 항산화력을 재확인하기 위해 115ppm의 금속을 대두유에 가한 다음 chelating agent의 항산화력을 측정된 결과 동의 경우 NQ(85.5%), DA(117.9%), PA(288.2%), QA(385.0%), NA(409.4%)였으며 Control에 비하여 NQ, DA(17.9%), PA(188.2%), QA(285.0%), NA(309.4%), 순으로 효과가 증가하였다. 이것 역시 NQ와 DA를 제외하고는 상기한 chelating agent만을 첨가했을 때의 항산화 효과의 증가순과 거의 비슷한 경향을 나타내었다. 특히 철을 첨가한 경우와 마찬가지로 naphthoquinone이 산화촉진제로서의 작용을 나타낸 것은 금속 착화합물의 형성능이랄기 보다는 quinone이 산화환원제의 화합물이기 때문에 큰 효과를 기대하기 어렵다고 생각된다. 또 diphenic acid가 naphthoquinone 이외의 다른 chelating agents 특히 naphth-

alic acid보다도 효과가 월등히 낮은 것은 diphenic acid의 두 carboxyl group간의 거리가 다른 화합물의 것보다도 크며 이와같이 불리한 기하학적 분자구조로 인해서 금속이온과의 안정한 complex를 형성하기 어렵기 때문에 metal deactivator로서 효과적으로 금속의 산화촉진 작용을 억제할 수 없기 때문이라고 생각된다.<sup>30)</sup> 한편 철을 첨가했을 경우 DA(120.5%), NQ(93.3%), NA(138.7%), PA(200.7%), QA(111.9%)는 control에 비하여 각각 20.5, -6.7, 38.7, 100.7, 11.9%의 항산화 효과를 보였으며 NQ, QA, DA, NA, PA 순으로 효과가 증가하였다. 이와같이 철은 chelating agent의 항산화 효과와 증가 순서에 있어서 동의 경우와는 양상이 다르게 나타났다. 특히 naphthoquinone이 산화 촉진효과를 나타낸 것은 전술한 동의 경우와같이 기화학적인 분자구조 때문에 안정한 complex를 형성하기 어렵다는 것을 뒷받침해 주는 것이라고 생각된다. 대체적으로 철은 동보다도 항산화효과가 적은 것으로 나타났으며, 특히 naphthalic acid의 경우 철이 동보다도 효과가 적은 것은 이들 금속 이온의 redox potential과 착화합물의 형성능의 차이에 기인하는 것이라고 생각된다.

NMR에 의한 항산화 효과 측정

식용대두유에 대한 chelating agent의 항산화효과를 초기단계에서 UV, IR, NMR로 측정된 결과 96시간 산화시킨 것과 control 간에 아무 변화가 나타나지 않았으며 철을 첨가한 경우 96시간 산화시킨 것과 control 간에 근소한 파장의 shift를 볼 수 있었으나 항산화 효과를 측정하기에는 미흡하였다. 또한 이들 산화물의 IR 측정결과 역시 큰 변화를 발견할 수 없었다. 따라서 UV와 IR 측정법으로 측정하기에는 본 실험조건이 부적당하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1, 2).

Ahn 등<sup>30)</sup>은 NMR을 이용하여 methyl linoleate의 산화속도를 측정하여 좋은 결과를 얻었다. 본 실험에서는 control과 96시간 산화시킨 대두유, 철과 pyromellitic acid를 첨가한 대두유를 NMR로 측정하였다(Fig. 3, 4, 5). control의 chemical shift는 0.90, 1.30, 1.80~2.50, 2.60~2.90, 4.00~4.33, 5.00~5.50ppm으로 나타났으며 각 chemical shift의 assignment는 0.90, CH<sub>3</sub>-C-C=C; 1.30, -C-CH<sub>2</sub>-C-; 1.80~2.50(centered at 2.15), C-CH<sub>2</sub>-C=C, C=C-CH<sub>2</sub>-C-C; 2.60~2.90(centered at 2.76), C=C-CH<sub>2</sub>-C=C; 4.00~4.33

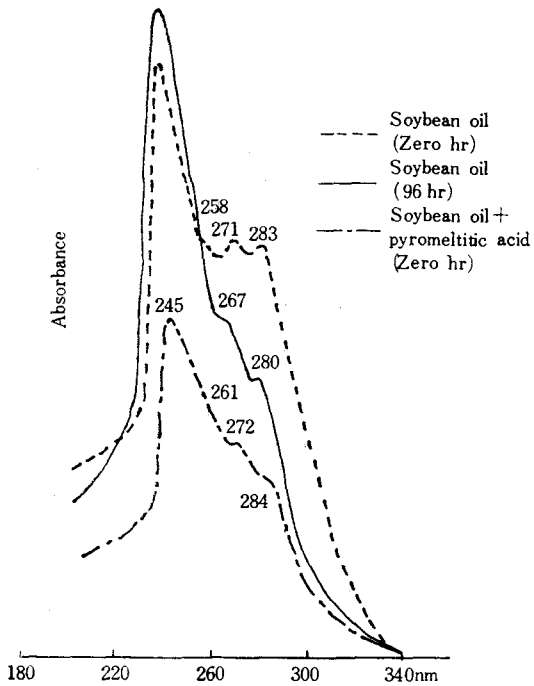


Fig. 1. UV spectra of oxidized soybean oil (67ml O<sub>2</sub>/min, 50°C)

(centered at 4.2),  $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C—O—CH}_2\text{—C}$ ; 5.00~5.50 (centered at 5.3),  $\text{—CH=CH—}$ 이었다.

Pyromellitic acid의 vinyl proton의 chemical shift와 유지의 unsaturated fatty acid moiety의 chemical shift가 겹치지 않고 또 이들 additives에 methylene proton이 없는 한 식용대두유의 자동산화는 double bond에서 일어나며 double bond의 migration과는 관계없이 total methylene proton 수에는 변화가 없기 때문에 NMR에 의한 항산화 효과 측정이 가능하다고 본다. 실제 pyromellitic acid의 chemical shift는 5.65ppm 이상에서만 나타났다. 대두유의 산화가 진행됨에 따라 5.3ppm region의 vinyl proton수가 감소될 것임으로 본 실험에서도 integration에 의하여 5.30ppm(X)와 1.30ppm(Y)의 ratio를 구하였다. Control과 96시간 산화시킨 것, 철과 pyromellitic acid 첨가군의 X/Y ratio는 각각 0.194, 0.173, 0.169이었으며, control에 비하여 각각 19.4, 17.3, 16.9%로서 역시 96시간 산화시킨 chelating agent 첨가군이 같은 산화시간의 대두유보다 항산화 효과를 나타내었다. 이상의 결과에서 mild한 조건하의 유지의 항산화 효과를 초기단계에서 측정할 때에는 UV와 IR법보다는 NMR 분석법을 이용하는 것이 더 바람직하다고 생각한다.

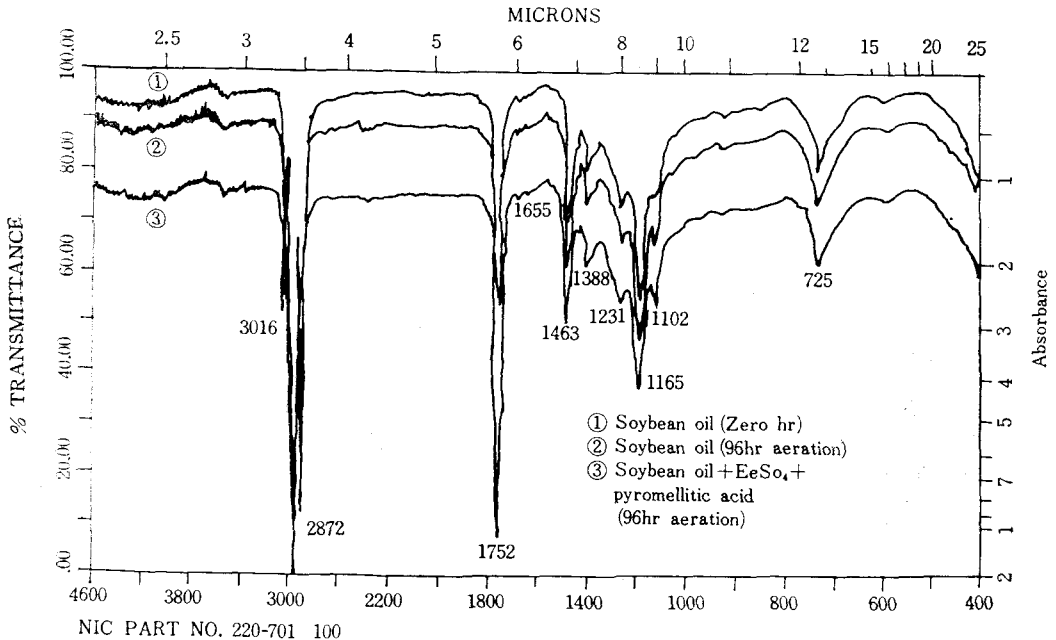


Fig. 2. IR spectra of oxidized soybean oil (67ml O<sub>2</sub>/min, 50°C)

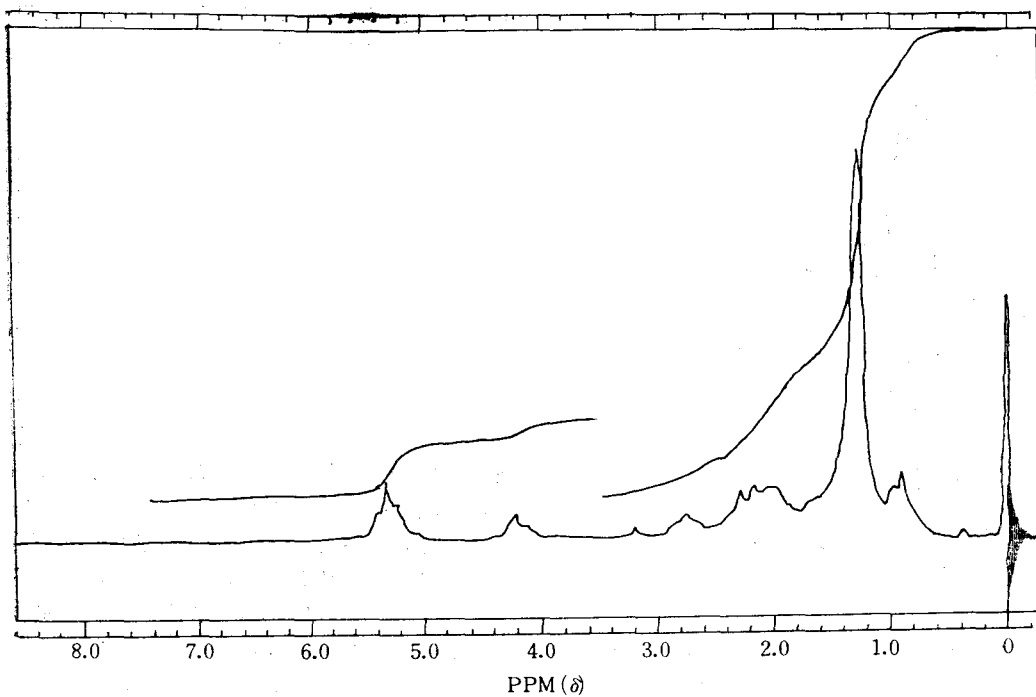


Fig. 3. NMR spectrum of soybean oil (Zero hr)

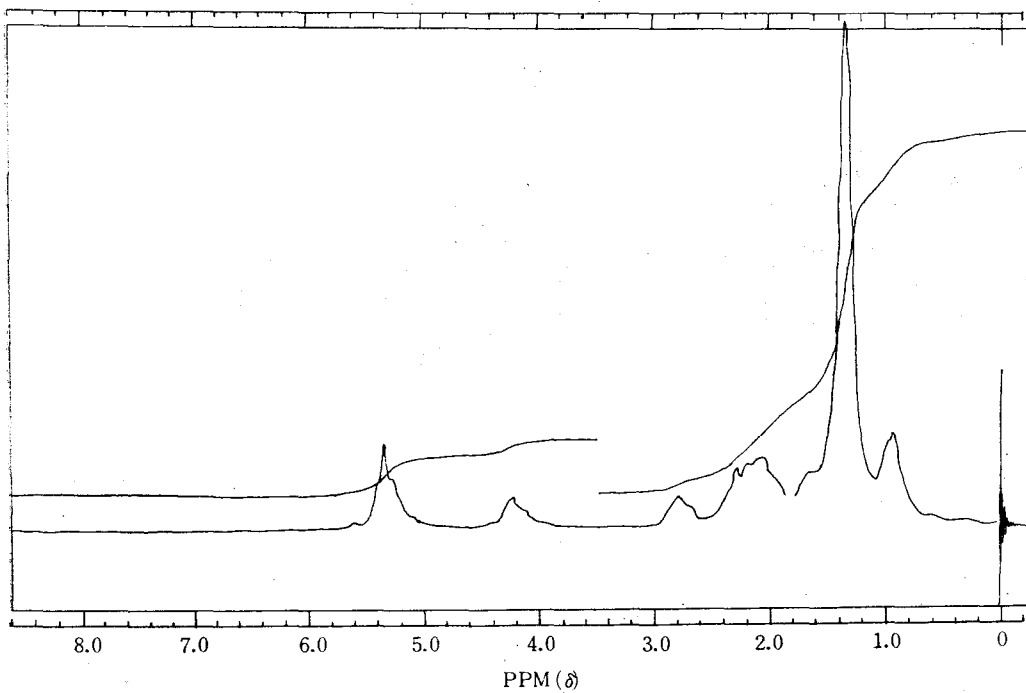


Fig. 4. NMR spectrum of oxidized soybean oil (67ml O<sub>2</sub>/min, 50°C, 96hrs)

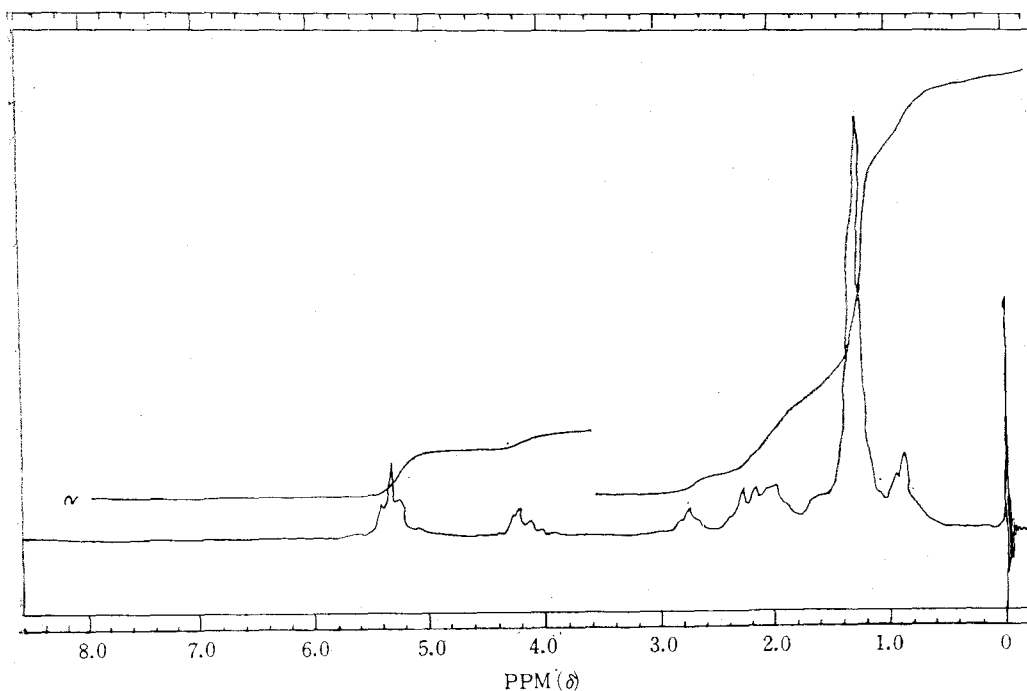


Fig. 5. NMR spectrum of oxidized soybean oil containing Fe and pyromellitic acid (67ml O<sub>2</sub>/min, 50°C, 96hours)

## 초 록

식용대두유의 산화방지를 위하여 항산화제로서 Chelating agents의 항산화효과를 mild한 조건(67 ml O<sub>2</sub>/min, 50°C)하에서 A.O.M.법으로 측정하였으며 기기분석법(UV, IR, NMR)에 의한 측정의 가능여부를 시험한 결과 다음과 같다.

1. Chelating agents의 항산화 효과는 diphenic acid(109.3%), naphthoquinone(111.2%), pyromellitic acid(168.6%), Quinolinic acid(183.6%), naphthalic acid(921.2%) 순으로 증가하였으며, Control에 비하여 각각 9.3, 11.2, 68.6, 83.6, 821.2% 증가하였다.

2. Chelating agents는 항산화 효과를 나타냈으며, 철과 동을 첨가했을 경우에 현저하였다. 또 이들의 항산화 효과는 화합물의 관능기와 분자구조에 따라 다르며 diphenic acid, naphthoquinone 등에서 낮았다.

3. 본 실험과 같이 mild한 조건하에서 NMR 분석법을 이용하여 항산화 효과를 측정할 수 있었으나 UV와 IR은 적당치 않았다.

## 참 고 문 헌

1. Sonntag, N.O.V.: Bailey's Industrial Oil and Fat Product, 4th ed., p.429 by D. Swern, John Wiley and Sons, N.Y., (1979)
2. Erickson, D.R.: Handbook of Soy Oil Processing and Utilization, p.299, Am. Soybean Assoc.
3. Privett, O.S. and Blank, M.L.: The Initial Stage of Autoxidation, JAOCS, 39 : 465(1962)
4. Coleman, J.E., Hampson, J.W. and Sauders, D.H.: Autoxidation of Fatty Materials in Emulsion II. Factors Affecting the Histidine Catalyzed Autoxidation of Emulsified Methyl-Linoleate, JAOCS, 41 : 347(1964)
5. Porter, Ned A., Weber, B.A., Weenen H. and Khan, J.A.: Autoxidation of Polyunsaturated Lipids, Factor Controlling the Stereochemistry of Product Hydroxides, JAOCS, 102 : 5597(1980)
6. Bateman, L., Hughes, H., and Morris, A.L.: Hydroperoxides Decomposition in Relation

- to the Initiation of Radical Chain Reactions, Discussion Faraday Soc., 14 : 190(1953).
7. Hudson, B.J.F. and Mahgoub, S.E.O.: Synergism between phospholipids and naturally occurring antioxidant in leaf lipids, J. Sci. Food Agric., 32 : 208(1981)
  8. Hudson, B.J.F. and Mahgoub, S.E.O.: Naturally occurring Antioxidant in Leaf Lipids, J. Sci. Food Agric., 31 : 646(1980)
  9. Hiromu, K., Minoru, A., Takenori, M., Isao, N., Masato, T., Snigeru, T. and Matsumoto T.: Studies on the Improvement of Antioxidant effect of Tocopherol(1) 油化學, 32 (9) : 475(1983)
  10. Hiromu, K., Minoru, A., Takenori, M., Isao, N., and Matsumoto, T.: Relationship between Antioxidant Effect of Tocopherol and Kind of Substrates, 油化學, 33(4) : 241(1984)
  11. Bhatia, L.S., Kaur, N. and Sukhija, P.S.: Role of Seed Phosphatides as Antioxidants for Ghee (Butter fat), J. Cci. Food Agric., 29 : 747(1978)
  12. Hilderbrand: Phospholipids plus Tocopherols Increase Soybean Oil Stability, JAOCS, 61 (3) : 552(1984)
  13. Olcott, H.S.: The role of Free Fatty Acids on Antioxidant effectiveness in Unsaturated Oils, JAOCS, 35 : 597(1958)
  14. Yamaguchi, N., Oshima, K. and Murase, M.: The Effect of Sugar alcohols on Oxidative Stabilities of Fat and Oil, 日本食品工業學會誌, 21(4) : 131(1974)
  15. Heidelbaugn, N.D. and Karel, M.: Effect of Water-Binding Agents on the Catalyzed Oxidation of Methyl Linoleate, JAOCS, 47 : 539(1970)
  16. Lin, J.S., V. Smith and Olcott, H.S.: Loss of Free Radical Signal during Induction Period of Unsaturated Lipids Containing Nitroxide Antioxidants, J. Agric. Food Chem., 22(4) : 682(1974)
  17. Bishov, S.J. and Henick, A.S.: Antioxidant Effect of Protein Hydrolyzates in Freeze-dried Model Systems, J. Food Sci., 40 : 345 (1975)
  18. Cowan, J.C., Cooney, P.M. and Evans, C.D.: Citric Acid Inactivating Agents for Metals or Acidic Synergist in Edible Fat, JAOCS, 39 : 6(1962)
  19. Olcott, H.S. and Kuta, E.J.: Basic Substances as Synergists for Fat Antioxidants, Nature, 183 : 1812(1959)
  20. Itoh, H., Kawashima, K. and Cibata, I.: Antioxidant Activity of Browning Products of Triose Sugars and Amino Acids, Agric. Biol. Chem., 39(1) : 283(1975)
  21. Marcus, R.: The Effect of Some Amino Acids on the Oxidation of Linoleic Acid and It's Methyl Ester, JAOCS, 39 : 97(1962)
  22. Karel, M.S., Tannenbaum, R. and Wallace D.H.: Autoxidation of Methyl Linoleate in Freeze-dried Model System(III) Effects of added Amino Acids: JAOCS, 31 : 892(1966)
  23. Yamuguchi, N., Yokoo, Y. and Fujmaki, M.: Studies on antioxidative Activities of Amino Compound on Fat and Oils (II), 日本食品工業學會誌, 22(9) : 125(1975)
  24. 山口直彦, 横尾良夫, 小山吉人, 還元糖, とアミ酸との褐變反應物に関する研究, 日本食品工業學會誌, 11(5) : 184(1964)
  25. Kawashima, K., Itoh, H. and Chibata, I.: Antioxidant Effect of Peptide in Combination with Sugar on Autoxidation of Edible Oils, Agric. Biol. Chem., 45(4) : 987(1981)
  26. Yoon, S.H. and Min, D.B.: Kor. J. Food Sci. and Technol., 19(1) : 123(1987)
  27. de Man, J.M. and de Man, L.: Automated A.O.M. test for Fat Stability, JAOCS, 61 (3) : 534(1984)
  28. Williams Sidney,: AOCs Method Cd 8-53, Official Method of Analysis of the AOAC, 14th ed., 507(1984)
  29. Ahn, J.K. and Oh, S.K. Methyl Linoleate by NMR, Master's thesis, Kyung Hee University, Seoul (1982)
  30. Oota, S.Y., Synergists(1), New Food Industry, 27(10) : 74(1985)