

## Sweep Co-Distillation법에 의한 산화방지제의 추출법

김재관 · 황혜정\* · 오문헌\*\* · 도영숙 · 윤미혜

경기도보건환경연구원, \*중앙대학교 식품공학과, \*\*충청대학 식품공학과

### Extraction Method of Antioxidants in Soybean Oil

Jae-Kwan Kim, Hea-Jeung Whang\*, Moon-Hun Oh\*\*,  
Young-Sook Do and Mi-Hye Yoon

Gyunggido Institute of Health and Environment, Suwon 440-290, Korea, \*Dept. of Food Sci. and Technol.,  
Chung-Ang University, Ansong 456-830, Korea, \*\*Dept. of Food Sci. and Technol., Chungcheong College,  
Cheongju 363-890, Korea

#### Abstract

This study was conducted to evaluate the extraction methods for the determination of antioxidants in soybean oil. Recovery rates of various antioxidants in soybean oil showed similar rates as 80.4~102.1% by solvent /solvent extraction method and 89.8~106.4% by sweep co-distillation method except 46.6~61.2% of PG at corresponding spiked concentrations. The maximum recovery rates of antioxidants were obtained when extraction time and extraction temperature used in UNITREX were 20min and 210°C respectively. In the recovery rates with the activation of florisil, when 2% of water was added to florisil, the highest recovery rates for TBHQ, BHA, BHT were obtained by sweep co-distillation method. Therefore, sweep co-distillation method showed less solvent, simple operation and high recovery rate compared with solvent /solvent extraction method.

Key words : soybean oil, antioxidants, solvent /solvent extraction, sweep co-distillation.

#### 서 론

가공식품의 종류와 형태가 다양해지면서 사용되는 식품첨가물의 양과 종류도 다양해지고 있다. 식품재료와 가공품은 광선, 산소, 효소, 온도, 수분 등에 의하여 이화학적 변화를 일으키기 쉽다. 특히 유지는 공기 중의 산소에 의하여 aldehyde, carbonyl compound 등을 생성하여 불쾌한 맛과 산패취를 내는 등 식품의 품질을 저하시키기 때문에 산화방지제가 첨가되고 있다<sup>1)</sup>.

식품에는 propyl gallate(PG), tertbutyl hydroquinone(TBHQ), dibutyl hydroxy anisol(BHA), dibutyl hydroxy toluene(BHT) 등의 페놀계 인공항산화제가 많이 사용되고 있다. 이러한 산화방지제들은 독성이 낮은 것으로 알려졌으나 동물에

따라서 발암성이 나타난다고 한다<sup>2-3)</sup>. 그리고 과량 섭취시 간암 유발 가능성이 있는 것<sup>2-3)</sup>으로 알려져서 첨가량이 제한되어 있다<sup>4)</sup>. 그러므로 식품 중의 산화방지제 분석은 매우 중요하다.

산화방지제 분석방법으로는 GC-FID<sup>5)</sup>, GC-MSD<sup>4)</sup>, HPLC<sup>6-9)</sup> 등이 이용되고 있다. 추출에는 용매추출법<sup>4-8)</sup>이 널리 알려졌으나 휘발성 물질을 추출하는 방법으로 Sweep Co-distillation(SCD)법<sup>9)</sup>이 보고된 바 있다. SCD방법은 재료를 증류하여 florisil 등의 흡착제를 채운 trap에 목적성분을 흡착시키고 용매로 용출시켜 trap을 직접 기기에 주입하여 측정하는 추출장치로, 동물성 유지의 잔류농약을 추출하는 방법이 이용되어 왔다<sup>10)</sup>.

본 연구는 식물성 유지의 산화방지제를 SCD방법으로 추출하고 효율적인 정량법을 확립하려 한 결과

Corresponding author : Jae-Kwan Kim

이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

식물성 유지는 1998년 5월에 경기도 수원에 있는 수퍼마켓에서 제품화된 콩기름을 구입하여 시료로 사용하였다.

산화방지제는 propyl gallate(PG), tertbutyl hydroquinone(TBHQ), dibutyl hydroxy anisol(BHA), dibutyl hydroxy toluene(BHT)을 Sigma사(USA)에서 표준품을 구입하여 사용하였다.

HPLC 및 추출용매로는 acetonitrile(HPLC grade, Baker, USA), water(HPLC grade, Baker, USA), n-hexane 300(Wako, Japan), acetic acid(Sigma, USA), isopropanol(Aldrich, USA)을 사용하였다. 컬럼충전제로는 florisil(activated magnesium silicate, Sigma, USA)을 사용하였다.

산화방지제 표준용액은 PG, TBHQ, BHA, BHT를 각각 100mg씩 acetonitrile : isopropanol(1:1)에 녹여 100ml로 정용한 다음 희석하여 사용하였다.

### 2. 기기 및 분석조건

시료의 산화방지제를 추출하기 위한 장치로는 rotary evaporator (EYELA, Japan), dry block bath(Torika, Japan), vaccum pump와 sweep co-distillation 장치는 Fig. 1과 같이 universal trace residue extractor(UNITREX, Australia)를 사용하였으며, trap에 florisil을 채워서 사용하였다.

산화방지제의 분석에 사용된 기기는 Waters 510 pump, Waters 746 data module, Waters™ 717 plus autosampler로 구성된 HPLC system을 사용하였다. HPLC컬럼은 symmetry C<sub>18</sub> column(4.6×250mm, Waters, USA)을 사용하였다. 또한 이동상은 water:acetonitrile:acetic acid(35:60:5)를 사용하였고, 시료 일회 주입량은 20μl이었다. 그리고 검출은 UV 280nm에서 하였다.

### 3. 시료 추출법에 따른 회수율 측정

산화방지제가 잔류되어 있지 않는 식용유에 표준용액을 첨가하여 각각 10, 50, 100mg/kg으로 제조한 다음 용매-용매추출법과 SCD법으로 회수율을 측정

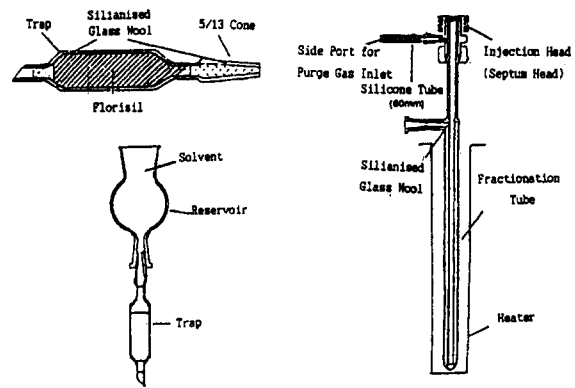


Fig. 1. Sweep co-distillation(UNITREX) apparatus for the extraction of antioxidants.

하였다.

용매-용매추출법은 식품공전<sup>5)</sup>을 응용하여 다음과 같이 전처리하였다. 시료 5g을 비이커에 측정하여 5ml hexan이 들어 있는 분액깔대기에 옮기고 15ml hexan으로 여러번 비이커를 씻어 시료를 담은 분액깔대기에 다시 넣었다. 분액깔대기에 hexan포화 아세트니트릴 50ml씩 3회에 걸쳐 추출하였다. 추출액(hexan포화 아세트니트릴층)은 모아서 농축수기에 옮긴 다음 40℃ 이하의 수욕상에서 3~4ml가 될 때까지 감압, 농축하였다. 농축액은 hexan포화 아세트니트릴 5ml로 정용한 다음 이소프로판 5ml를 첨가하여 10ml 시험용액으로 제조하였다.

Sweep co-distillation(SCD)법은 Storherr와 Watts<sup>10)</sup>의 방법을 응용하여 다음과 같이 전처리하였다. 시료 1ml를 UNITREX의 fraction tube에 주입한 후 210℃에서 20분 동안 추출하였다. Florisil trap을 fraction tube에서 분리하여 acetonitril:isopropanol(1:1) 1ml로 용해시켜 HPLC에 주입하였다.

### 4. Florisil의 활성화에 따른 회수율 측정

Florisil을 600℃ 회화로에서 3시간 가열 후 회화 방냉하고 탈이온수를 0%, 1%, 2%, 5%, 8%로 첨가하여 탈활성화시켰고, trap에 florisil을 충전하여 UNITREX에 장착시키고 산화방지제가 잔류하지 않은 표준용액을 100mg/kg으로 첨가하여 sweep co-distillation법으로 전처리하여 acetonitrile 12ml로 용출시켜 질소농축하여 HPLC로 florisil활성도에 따른 산화방지제의 회수율을 측정하였다.

### 5. UNITREX의 온도 및 추출시간에 따른 회수율 측정

Florisil을 600℃ 회화로에서 3시간 회화한 다음 방냉하고 탈이온수를 2% 수준으로 첨가하여 탈활성화시켜 UNITREX의 온도 및 추출시간에 따라 회수율을 측정하였다.

온도에 따른 회수율은 시료 1ml를 UNITREX의 fraction tube에 주입한 후 carrier gas(N<sub>2</sub>)를 600ml/min의 속도로 흘리면서 190℃에서 230℃까지 10℃단위로 온도를 높이면서 20분간 추출하였다. Trap을 fraction tube에서 분리한 후 acetonitrile 12ml를 증류를 이용하여 용출시킨 후 40℃에서 질소를 가하여 농축하고 acetonitrile: isopropanol (1:1)용액 1ml로 용해시켜 HPLC에 주입하여 회수율을 측정하여 비교하였다.

추출시간에 따른 회수율은 시료 1ml를 UNITREX의 fraction tube에 주입한 후 carrier gas(N<sub>2</sub>)를 600ml/min의 속도로 흘리면서 210℃에서 15분에서 30분까지 5분단위씩 시간을 늘려서 추출하였다. Trap에 흡착시킨 산화방지제를 acetonitrile 12ml로 증류를 이용하여 용출시킨 다음 40℃에서 질소농축하여 acetonitrile: isopropanol(1:1)용액 1ml로 용해한 다음 HPLC에 주입하여 회수율을 측정하였다.

### 6. 통계처리

모든 분석은 3회 이상 반복 측정하였으며 평균값으로 표기하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 용매추출법과 SCD추출법의 비교

식용유에 산화방지제 표준용액을 10, 50, 100mg/kg 되게 첨가한 다음 용매추출법과 SCD법으로 전처리하여 회수율을 측정한 결과 Table 1과 Table 2와 같았으며 크로마토그램은 Fig. 2와 같다.

용매추출에 따른 회수율은 PG 80.9~97.2%, BHA 89.9~101.4%, BHT 89.8~102.1%이었으며, SCD법은 PG 38.1~56.9%, TBHQ 94.3~106.4%, BHA 96.3~104.3%, BHT 89.8~98.0%로서 PG를 제외하고 회수율은 비슷하였다.

이 등<sup>6)</sup>은 시판식품에서 식품공전법으로 하였을 때 BHA 89.1%, BHT 87.2% 라고 보고하였으며, 이 등<sup>4)</sup>은 핵산/펜탄포화 아세토니트릴 용액으로 추출

**Table 1. Recovery of antioxidants in soybean oil by solvent-solvent extraction (unit : %)**

Antioxidants	Spiked level (mg/kg)		
	10	50	100
PG	86.2±5.3 <sup>1)</sup>	88.6±5.5	88.9±3.8
TBHQ	85.3±4.6	87.6±5.1	87.8±4.8
BHA	94.8±4.9	96.7±4.4	96.8±4.6
BHT	95.1±5.3	97.3±4.8	97.7±3.9

<sup>1)</sup> Mean±S.D.

**Table 2. Recovery of antioxidants in soybean oil by sweep co-distillation extraction (unit : %)**

Antioxidants	Spiked level (mg/kg)		
	10	50	100
PG	45.2±7.1 <sup>1)</sup>	46.6±6.3	49.0±7.9
TBHQ	98.8±3.9	98.9±4.6	101.1±5.3
BHA	98.9±2.6	101.2±3.1	100.6±2.1
BHT	94.1±3.8	94.2±3.8	93.9±4.1

<sup>1)</sup> Mean±S.D.

하였을 때 BHA 92.1±0.5%, BHT 70.6±0.5%, TBHQ 82.1±7.1%, PG 76.3±10.4%라고 보고한 바 있다. Page<sup>8)</sup>는 butter oil에서 핵산포화 아세토니트릴 용매로 추출하였을 때 BHA 97.4%, BHT 79%, TBHQ 103.4%, PG 100.9% 회수율을 보고한 바 있는데 본 연구의 80.9~102.1%와 유사한 것으로 나타났다. 또한 용매추출법으로 전처리하였을 경우 170ml의 용매가 사용되었으나 SCD법에서는 florisil에 흡착된 산화방지제를 용출시키는데 필요한 용매의 양이 12ml만이 사용되므로 93%의 용매를 절약하는 효과가 있었다.

### 2. Florisil의 활성화 비교

정제과정에서 사용되는 흡착제는 alumina, florisil, silica gel, 활성탄 등이 있다<sup>11)</sup>. SCD방법으로 유지의 산화방지제를 추출할 때 고온에서 휘발된 산화방지제 성분을 흡착시키는 florisil의 흡착력은 중간 정도이고 흡착용량이 큰 편이다. 또한 산화방지제에 대한 흡착력이 다소 강하기 때문에 탈이온수를 첨가하여 흡착력을 약화시켜 deactivated florisil을 사용하는데 본 실험에서는 0%, 1%, 2%, 5%, 8%의 deactivated florisil을 trap에 채워서 식용유에 표준용액을 100mg/kg되게 첨가하여 회수율을 실험한 결과 Table 3과 같았다. Florisil에 1~2%의 수분을 첨가하였을 때 가장 회수율이 높았으며, PG

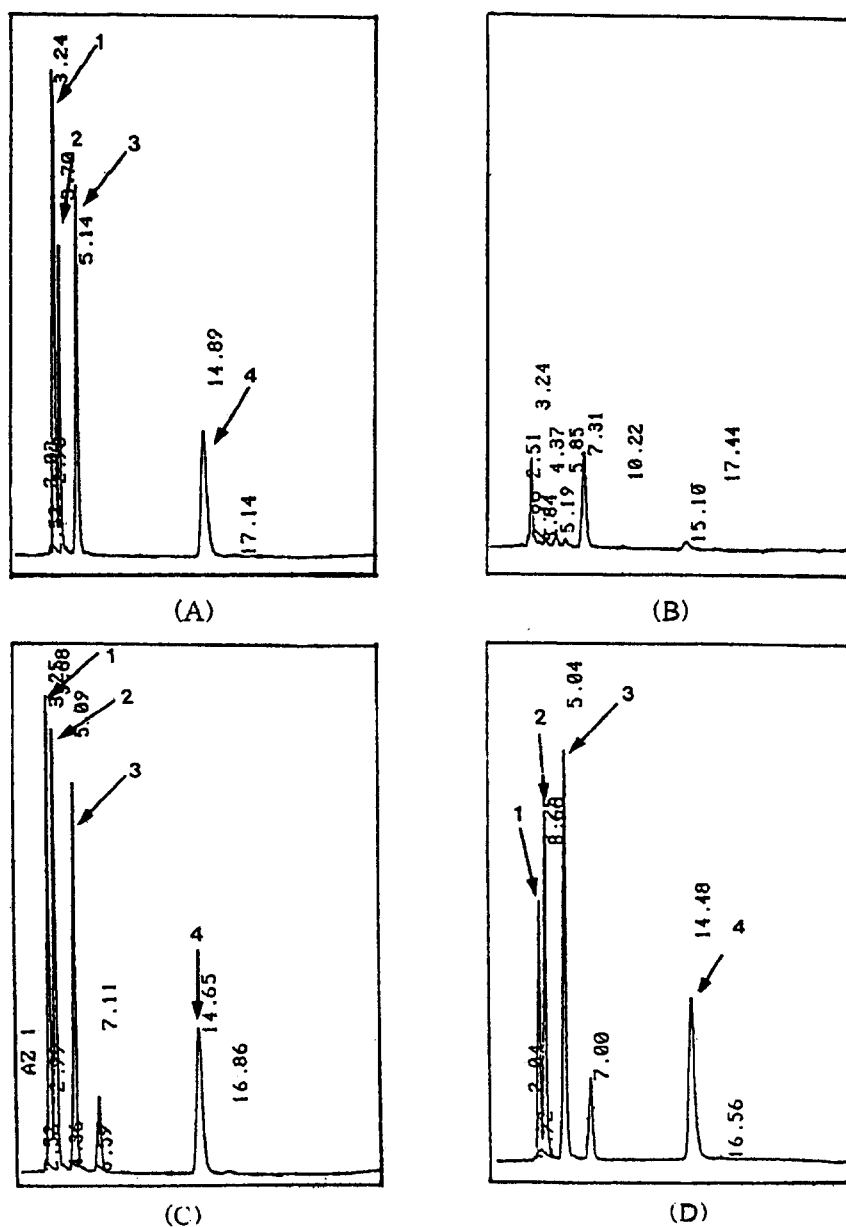


Fig. 2. HPLC chromatograms of (A) standards, (B) blank, (C) solvent-solvent extraction, (D) sweep co-distillation(SCD) soybean oil spiked with 100mg/kg antioxidants. 1. PG, 2. TBHQ, 3. BHA, 4. BHT.

Table 3. Recovery of antioxidants in soybean oil extracted with deactivated florisils used in UNIT-REX (unit : %)

Water added (%)	0	1	2	5	8
Antioxidants					
PG	16.5±6.2 <sup>1)</sup>	20.6±4.8	49.0±7.9	53.9±7.3	16.2±5.1
TBHQ	89.8±2.9	93.9±5.3	101.1±5.3	90.1±3.2	81.6±4.8
BHA	94.6±3.8	99.2±2.1	100.6±2.1	93.1±6.1	87.5±5.2
BHT	87.8±3.5	89.2±3.3	93.9±4.1	85.5±5.3	50.4±6.3

<sup>1)</sup> Mean±S.D.

**Table 4. Recovery of antioxidants in soybean oil extracted at different temperatures used in UNITREX** (unit : %)

Temp. (°C)	190	200	210	220	230
Antioxidants					
PG	41.2±7.1 <sup>1)</sup>	44.6±6.9	49.0±7.9	45.4±6.3	39.6±6.2
TBHQ	90.2±4.9	95.6±4.6	101.1±5.3	94.7±4.8	89.6±4.1
BHA	91.2±3.6	95.6±4.1	100.6±2.1	95.2±3.8	91.2±3.8
BHT	86.6±3.1	90.4±3.8	93.9±4.1	91.1±3.9	88.6±3.7

<sup>1)</sup> Mean±S.D.**Table 5. Recovery of antioxidants in soybean oil extracted for different times used in UNITREX** (unit : %)

Time (min)	15	20	25	30
Antioxidants				
PG	39.1±6.2 <sup>1)</sup>	49.0±7.9	40.6±5.1	36.9±5.9
TBHQ	90.2±6.3	95.1±7.3	92.4±7.3	91.3±5.8
BHA	92.3±3.5	99.4±4.8	98.8±2.9	96.1±1.5
BHT	85.4±4.1	92.4±4.8	87.9±3.6	87.6±2.2

<sup>1)</sup> Mean±S.D.

는 5% 수분을 첨가하였을 때 회수율이 가장 높았으며 8% 이상에서는 회수율이 급격히 감소하였다.

### 3. UNITREX의 온도 및 추출시간 비교

페놀계 산화방지제는 비교적 열에 강하고 BHA는 70°C, BHT는 100°C 이상으로 가열하면 급격히 승화하는 등<sup>11)</sup> 휘발성이 강하고 쉽게 수증기로 증류되기 때문에 SCD법을 이용하면 고온에서 휘발된 산화방지제를 쉽게 florisol 등의 흡착제로 포집하여 추출할 수 있다<sup>9)</sup>. 본 연구에서는 190°C에서 230°C까지 10°C 씩 단계적으로 올려서 가열하여 각각 20분 동안 추출하여 회수율을 측정 한 결과 Table 4에서 보는 바와 같았다. 추출온도가 210°C이었을 때 회수율이 가장 높았으며 그 이상 온도가 증가될수록 회수율은 낮았다.

추출시간을 15분에서 30분까지 5분 단위로 추출시간을 증가시켜 210°C에서 회수율을 측정 한 결과 Table 5와 같았다. 추출시간은 20분이었을 때 회수율이 가장 높았으며 15분 이하 또는 25분 이상에서 회수율이 감소하였다. 15분 이하에서 회수율이 감소하는 것은 산화방지제가 휘발되지 못하여 florisol에 흡착되지 못한 것으로 생각되며 25분 이상에서는 질소 가스에 의해 휘발되므로 영향을 받은 것으로 생각된다.

SCD방법은 Storherr와 Watts<sup>10)</sup>는 식육 중에 잔류된 농약을 검출하기 위한 전처리법으로 고안되었으

나, 식물성 유지 중의 산화방지제를 추출하는데 용매 추출법보다 소량의 용매로 실험방법이 간편하고 회수율을 또한 높은 방법임을 알 수 있었다. 그리고 여러개 시료를 동시에 전처리할 수 있는 장점이 있으며 trap 충전제와 추출용매의 선택에 따라 유지의 휘발성이 강한 산화방지제를 쉽게 추출할 수 있으므로 향후 연구에 더욱 활용되리라 생각된다.

## 요 약

식용유지 중의 산화방지제를 효율적으로 분석하기 위하여 일반적인 용매추출법과 SCD법으로 전처리하여 HPLC법으로 비교 분석하였다. SCD법의 최적조건은 florisol의 활성도와 UNITREX의 온도와 추출시간에 따른 회수율로 분석하였다. 식용유지에 산화방지제를 농도별로 가하여 용매추출법과 SCD법의 회수율을 비교한 결과 용매추출법은 80.4~102.1%, SCD법은 89.8~106.4%로 나타났다. Florisol의 활성화에 따르면 2% 수분 첨가시 TBHQ, BHA, BHT는 89.8~106.4%로 회수율이 가장 높았고, PG는 5% 수분 첨가시 53.9±7.3%의 회수율을 보였다. 회수율은 UNITREX의 210°C에서 20분간 추출하였을 때 가장 높았다.

## 참고문헌

1. 이서래, 신호선:식품화학, 신평출판사, 서울, p.143~175(1998).
2. Lok, E., Metta, R., Jee, P., Laver, G., Nera, A., McMullen, E. and Clayson, D.B. : The effect of butylated hydroxytoluene on the growth of enzyme-altered foci in male Fischer 344 rat liver tissue, *Carcinogenesis*, **16**, 1071~1078(1995).
3. Kashfi, K., Yang, E.K., Chowdhury, J.R., Chowdury, N.R. and Dannenberg, A.J. : Regulation of Uridine diphosphate glucuronosyltransferase expression by phenolic antioxidants, *Cancer Res.*, **54**, 5856~5859(1994).
4. 이정애, 노동식 : 식품 중의 Gas chromatography / Massspectrometry를 이용한 산화방지제의 분석에 관한 연구, *한국식품위생안전성학회지*, **12**, 210~216 (1997).
5. 한국식품공업협회 : 제7일반시험법-산화방지제, 식품공전, 서울, p.752~756(1999).
6. 이철원, 이달수, 문범수 : 한국인의 식품첨가물 섭취량 조사, *한국식품위생안전성학회지*, **4**, 1~10(1989).
7. Page, D.B. : Liquid chromatographic method for the determination of nine phenolic antioxidants in butter oil, *J. AOAC International*, **76**, 765~779 (1993).
8. Page, D.B. : High performance liquid chromatographic determination of seven antioxidants in oil and lard, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 727~745 (1983).
9. Page, D.B. : High performance liquid chromatographic determination of nine phenolic antioxidants in oil and lard, and shortenings, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 1239~1246(1979).
10. Storherr, R.W. and Watts, R.R. : Cleanup fats by sweep co-distillation organochlorine residue, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **48**, 1154~ 1157(1965).
11. 지성규 : 식품첨가물, 도서출판 밝음, 서울, p.343~360(1989).

---

(1999년 7월 29일 접수)