

식품 매트릭스에 따른 지방산화 및 유리라디칼 소거 항산화제 메커니즘

Mechanisms of Lipid Oxidation and Free Radical Scavenging Antioxidants in Bulk Oil and Emulsion Systems

이 재 환
JaeHwan Lee

서울과학기술대학교 식품공학과
Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology

I. 서론

1. 유지산화 메커니즘

유지산화는 지질(lipid)과 산소와의 결합이다. 특히 불포화지방산에 일중항산소 혹은 삼중항산소가 결합하며 상대적으로 짧은 지방산과 휘발성을 지닌 물질 혹은 중합체가 생성되어 산패취 등의 이취와 유지의 물리화학적 성상이 변화하게 된다(1,2). 유지산화는 자동산화(autoxidation), 일중항산소에 의한 산화(singlet oxygen oxidation), 효소 특히 리폭시제네이즈(lipoxygenase)에 의한 산화, 고온 가열에 의한 유탕처리(deep-fat frying) 등으로 분류된다. 이중 자동산화가 가장 기본적인 산화 메커니즘의 기본을 제공하며 보통은 다양한 메커니즘이 동시에 복합적으로 발생한다(3).

자동산화는 유리라디칼연쇄반응(free radical chain reaction)이라 불리며 개시(initiation), 전파(propaga-

tion), 종결(termination)과정으로 나뉠 수 있다. 개시 단계는 유리라디칼 생성단계로서 불포화지방산(LH)에서 initiator의 관여하에 수소원자($\cdot H$)가 제거되어 알킬라디칼(alkyl radical, $L\cdot$)이 생성되는 과정이다. 이때 initiator로 활동할 수 있는 빛, 온도, 금속이온 등의 요인이 복합적으로 존재하게 되면 개시단계가 빨라진다. 전파단계는 생성된 알킬라디칼에 삼중항산소가 결합하여 퍼옥실라디칼(peroxyl radical, $LOO\cdot$)이 된 후 주위의 불포화지방산(LH)에서 수소원자를 취하여 하이드로퍼옥사이드(hydroperoxide, $LOOH$)가 생성되면서 새로운 알킬라디칼이 추가로 발생하는 단계이다. 이때 하이드로퍼옥사이드를 일차산화생성물이라 하며 이들이 β -scission에 의해 분해되어 상대적으로 저분자의 휘발성을 갖는 알코올, 알데하이드, 케톤, 하이드로카본 등이 생성될 수 있다. 철이나 구리이온과 같은 transition metal ion이 하이드로퍼옥사이드분해에 중요한 역할을 수행한다. 종결단계는 라디칼끼리 결합하여 비라디칼이 생성되는 단계로 중합

*Corresponding author: JaeHwan Lee
Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology
Gongneung-dong, Nowon gu, Seoul 139-743, Korea
Tel: +82-2-970-6739
Fax: +82-2-970-6760
email: jhlee@snut.ac.kr

감광제 광산화에 의한 1O_2 발생

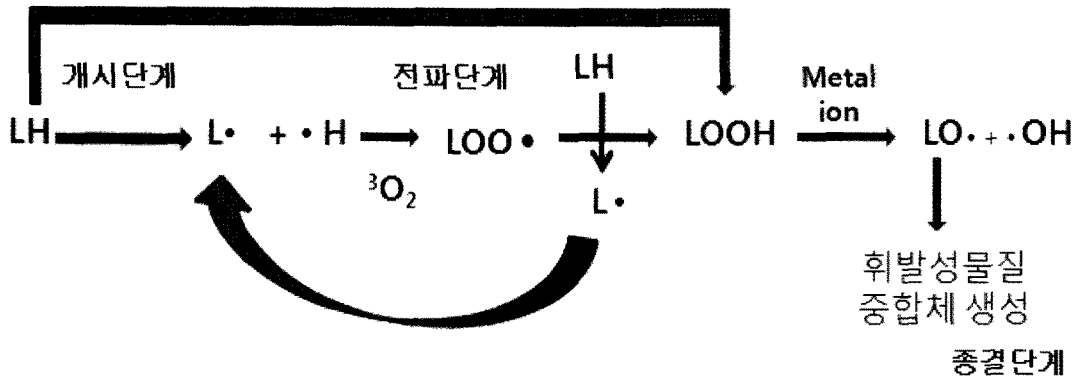


그림 1. 자동산화 및 일중화산소에 의한 지방산화단계

(polymerization)에 의해 고분자를 포함한 다양한 산화생성물이 생성될 수 있다.

일중화산소에 의한 산화는 공기 중의 삼중화산소가 아닌 상대적으로 고에너지를 갖는 일중화산소에 의한 산화로 식품에서는 감광제(photosensitizers)가 가시광선에 조사되었을 때 주로 발생하게 된다. 개시단계 없이 직접 하이드로퍼옥사이드를 생성시킬 수 있어 상대적으로 산화진행속도가 빠르다(그림 1).

효소에 의한 산화는 이중결합이 2개 이상 존재하는 다가불포화지방산을 대상으로 하는 리폭시제네이즈에 의한 산화가 대표적이며 자동산화와 동일한 과정을 겪는다. 유당치리는 고온에 의한 지방산화로 수분에 의한 가수분해(hydrolysis), 산화(oxidation), 중합과정, pyrolysis 등이 동시에 발생하며 지방산화속도가 매우 빠르다(1-4).

2. 향산화메카니즘

향산화제는 산화메카니즘에 따라 구분될 수 있다. 지방 유래 라디칼 중 상대적으로 안정하여 가장 많은 부분을 차지하는 퍼옥시라디칼($LOO\cdot$)에 전자 및 수소 원자를 제공하여 추가적인 산화를 억제하는 유리라디칼 소거제(free radical scavenger, FRS), 일중화산소를 물리적 혹은 화학적으로 제거하는 일중화산소소거제, 지방산화에 주요 산화촉진 역할을 하는 금속이온

을 제거하는 금속이온제거제(metal chelator), 산소를 제거하는 물질, 생체내에서 산화생성물을 제거하는 산화환원효소들 등으로 나눌 수 있다(2,4).

페놀성물질(phenolic compounds)의 벤젠링(benzene ring)에 하나 이상의 hydroxyl group을 갖는 것을 특징으로 하는 FRS는 천연 herb, 과일, 채소 유래 항산화능 함유 물질의 대부분을 차지하고 있다. Epicatechin, quercetin, rutin, luteolin, catechin, catechol 등이 유사한 구조를 갖고 있으며 또한 이들 페놀 구조를 근간으로 *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), trolox (phytol 그룹이 없는 α -tocopherol), ascorbyl palmitate (palmitate가 에스터결합된 ascorbic acid), propyl galate (PG) 등의 합성항산화제가 개발되었다.

대표적인 일중화산소 소거제로서는 이중결합을 다수 함유한 카로티노이드(carotenoid)계 물질이 보고되었으며 이중결합의 수가 많을 수록 더 효율적인 일중화산소 소거능을 보여 주고 있다.

시중 유지에는 금속이온이 함유되어 있다. 올리브유의 경우 구리와 철이온이 각각 9.8 ppb, 730 ppb 함유되어 있고 참기름은 각각 16 ppb, 1160 ppb로 보고되었으며 이들의 존재는 산화촉진과 밀접한 관계가 있다. 대표적인 금속이온제거제는 구연산 및 에스터 유도체, 인산 및 그 유도체, EDTA, 일부 폴리페놀, 아미노



산 및 transferrin, ovotransferrin과 같은 단백질이다.

3. 기존 항산화 메커니즘 이론의 한계

산화메커니즘은 불포화지방산과 산소와의 관계를 기본 구조로 하여 화학적 potential 위주로 설명되어 왔다. FRS의 항산화 효율도 one-electron reduction potential과 산소 혹은 탄소에 결합되어 있는 수소간의 bond dissociation energy(BDE) 차이 등의 화학적 potential로 판단되어 왔다. 예를 들어 다가불포화

표 1. 항산화물질의 표준 전자환원포텐셜(mV) pH 7.0

HO ·, H ⁺ / H ₂ O	2310
RO ·, H ⁺ / ROH	1600
ROO ·, H ⁺ / ROOH	1000
Astaxanthin	970
H ₂ O ₂ / 2H ⁺ , O ₂ · ⁻	940
GS ·/GS ⁻ (Glutathione)	920
beta-carotene	840
Kaempferol	750
Hesperidin	720
Luteolin	600
Rutin	600
PUFA ·, H ⁺ / PUFA	600
Ferulic acid	595
Catechin	570
Chlorogenic acid	550
Caffeic acid	534
Catechol ·, H ⁺ / Catechol	530
-Tocopheroxyl ·, H ⁺ /-Tocopherol	480
Trolox	480
Myricetin	360
Quercetin	330
H ₂ O ₂ , H ⁺ / H ₂ O, HO ·	320
Ascorbate ⁻ ·, H ⁺ / Ascorbate	282
O ₂ / O ₂ ⁻ ·	-330
RSSR/ RSSR ⁻ · (GSH)	-1500
H ₂ O / e ^{-aq}	-2870

표 2. 항산화물질의 bond dissociation energy compounds (kcal/mol)

Ascorbic acid	69, 83
Dehydroascorbic acid	71
alpha-tocopherol	77.1, 78.87, 79.30
beta-tocopherol	80.20
gamma-tocopherol	80.04, 80.10
delta-tocopherol	81.62, 82.20
BHA	77.20
Biacylic hydrogen at C11 in linoleic acid	75-80
Allylic hydrogen at C8 or C14 in linoleic acid	88
Alkyl hydrogen at C17 or C18 in linoleic acid	101
BHT	80
Cafferic acid	81.21
Myricetin	81.48
catecol	81.80, 82.82
Quercetin	81.98
Rutin	82.15
Hesperidin	82.65
Hydroperoxides	87.49
Phenol	90.40
Ethanol	105.40
H ₂ O	118.00

지방산, peroxy radical, alkoxyl radical, superoxide anion, hydroxyl radical의 one-electron reduction potential은 각각 600, 1000, 1600, 940, 2300 mV로, 효율적인 항산화제로 사용되기 위해서는 600mV 보다 낮아야 하며 다가불포화지방산보다 더 빨리 유지유래 라디칼을 소거해야 더 효율적인 항산화제로 간주되어 왔다. tocopherol (480mV), ascorbic acid (282mV)은 대표적인 FRS이다. 하지만 최근 연구에서 일부 효율적인 항산화능을 보이는 phytochemicals의 one-electron reduction potential이 600mV 보다 크다는 보고가 되었다(표 1). 또한 BDE의 경우 polyunsaturated fatty acid 중의 하나인 linoleic acid의 경우 수소원자를 C11 탄소로부터 제거하는 데 75-80kcal/mol의 에너지가 요구되지만 대부분의 phytochemical들은 이보다 높은 산소-수소간 BDE를 보이

고 있음이 알려졌다(5)(표 2).

이와 같은 일련의 보고는 화학적 지표들이 절대적인 항산화효율의 척도가 아닐 가능성이 있다는 것을 의미한다.

Bulk oil과 유화상태 특히 수중유적형 유화액(O/W emulsion)의 산화속도 및 산화에 영향을 미치는 요인들은 매우 다르다고 알려져 있다(6). 또한 소위 antioxidant polar paradox라는 현상이 보고되면서 기존 산화메커니즘 및 항산화메커니즘에 대한 수정을 해야 할 필요가 요구되었다. Antioxidant polar paradox란 극성을 띄는 항산화제가 bulk oil에서 항산화능이 우수하고 비극성을 갖는 항산화제가 수중유적형 유화액에서 항산화능이 우수한 현상을 칭한다(6,7). 실제 식품 및 생체내에서 항산화능을 보이는 물질의 항산화제 효율을 단순히 화학적인 지표인 one-electron reduction oxidation potential과 BDE만으로 설명 될 수 없는 부분이 존재하면서 이를 보완하기 위해 새로운 이론이 필요하게 되었다.

본 원고는 기존 산화메커니즘 및 항산화메커니즘으로 설명할 수 없는 부분을 해소하기 위해 최근 보고된 산화메커니즘과 식품메트릭스 효과 및 항산화 측정방법 소개를 목적으로 한다. 구체적으로 유지, 수중유적형 유화액에서 지방산화 메커니즘 및 항산화메커니즘

에 영향을 미치는 요인들과 항산화측정법을 소개하고자 한다.

II. 식품 매트릭스에 의한 영향

I. Bulk oil에서의 유지산화 메커니즘

정제된 식용유지의 99% 이상은 하나의 글리세롤과 3개의 지방산의 ester결합된 triacylglycerol로 구성되어 있다. 기존의 연구는 중성지질에 붙어 있는 지방산의 이중결합의 구조, 불포화도 등으로 유지의 산화안정성을 설명하고자 하였다. 이중결합의 개수가 증가할수록 산화속도는 기하급수적으로 증가함이 밝혀지고 산화회발성분의 분석, 하이드로퍼옥사이드 분포 등을 통해 지방산화 메커니즘이 규명되기 시작하였다.

보다 정밀한 분석기기가 개발되고 미세한 함량까지 분석 가능한 방법이 보고되면서 일반 식용유지의 성분에 중성지질 이외에 인지질, 파이토스테롤, 토코페롤, 유리지방산, 수분, 금속이온 등이 소량이지만 정제 유지에서 발견됨이 보고되었다(표 3). 수분의 경우 약 200-800 ppm의 free water가 상용 식용유지에서 발견되며 이들함량은 중성지질 이외의 미량성분의 함량과 관계가 있을 수 있음이 예측되었다. 유리지방산은

표 3. 조지방 및 정제유지의 조성(참고문헌 3)

Components	유지 종류									
	대두유		면실유		카놀라유		팜유		해바라기유	
	조지방	정제	조지방	정제	조지방	정제	조지방	정제	조지방	정제
중성지질(%)	95-97	>99	NA	>99	NA	>99	NA	>99	NA	>99
인지질(%)	1.5-2.5	0.003 -0.045	0.7-0.9	NA	2.7-3.5	NA	0.006 -0.013	0.012	0.5-1.0	NA
유리지방산 (%)	0.3-0.7	<0.05	0.9-3.7	<0.05	0.4-1.0	<0.05	2.0-5.0	<0.10	0.8-2.4	<0.05
불검화물 (%)	1.6	0.3	NA	NA	0.5-1.2	NA	NA	NA	<1.3	NA
파이토스테롤	0.33	0.13	0.37	NA	NA	NA	0.036 -0.062	0.011 -0.016	NA	NA
토코페롤	0.15-0.21	0.11-0.18	0.11	0.06	0.06	NA	0.06-0.10	0.04-0.06	0.05	NA
철이온 (ppm)	1-3	0.1-0.3	NA	NA	1.5	<0.1	5-10	0.12	NA	NA
구리이온 (ppm)	0.03-0.05	0.02-0.06	NA	NA	0.1	<0.01	0.05	0.05	NA	NA

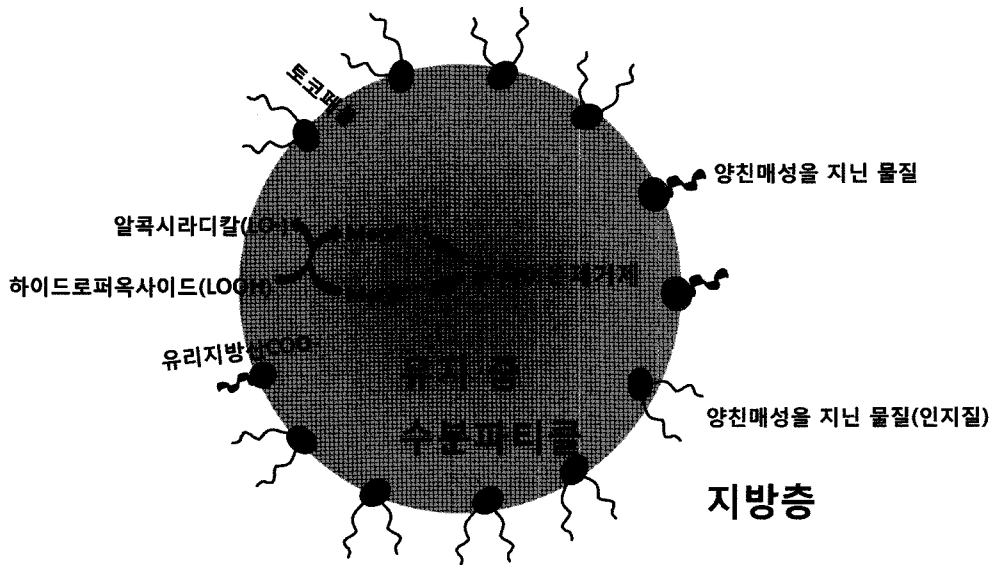


그림 2. Water-oil 표면에서의 지방산화 발생기작

유종에 따라 0.1에서 3.9%까지 검출되며 diacylglycerol 함량은 유채유의 0.8%에서 팜유나 올리브유에서는 5.5% 이상 존재한다. 항산화능을 보이는 물질인 토코페롤은 소량 존재하지만 산화안정성을 증진시키기 위해 인위적으로 첨가하기도 한다.

기존 연구에서는 간과되었던 이들 minor compounds의 산화안정성에 대한 역할이 관심을 끌면서 기존 이론과는 다른 설명이 필요하게 되었다.

서론에서 언급되었 듯이 화학적 지표만으로는 설명할 수 없는 현상이 발견되면서 불포화지방산과 산소와의 결합 뿐 아니라 이들 반응이 발생하는 장소, 이들 reactants들의 반응성에 영향을 미칠 수 있는 환경요인들에 대한 연구가 진행되었다. 산화가 발생하는 장소로 oil-water 혹은 air-oil간의 interface가 주목받으면서 이들 active site에 관여하는 요인들의 물리화학적 현상이 산화안정성에 영향을 미친다는 이론이 제기되었다. 항산화제가 위치한 물리적 현상 및 안정성에 따라 시스템의 산화안정성이 달라지며 기존의 소위 antioxidant polar paradox에 대한 이론적 설명이 가능하게 되었다(8).

Water-oil interface 이론에 의하면 원래 유지에 존

재하고 있던 수분과 amphiphilic compounds인 유리지방산, mono-, di-acylglycerol, 인지질 등이 결합하여 reverse micelle 등의 association colloid가 형성되고 지방산화가 이곳에서 발생한다는 것이다. 유리지방산, mono-, di-acylglycerol, 인지질의 HLB(hydrophilic lipophilic balance)는 각각 1.0, 1.8, 3.4~3.8, 8.0 정도로 보고되었다. 이는 이들 물질이 수분과 결합하여 reverse micelle을 형성할 수 있음을 의미한다. 금속이온은 유지상에서는 거의 분산되지 않으나 수분상에서는 활발히 활동하면서 하이드로퍼옥사이드 분해를 촉진하여 산화를 유발할 수 있다(그림 2).

이 이론을 활용하면 일반유지의 경우 수용성 항산화제가 지용성 항산화제에 비해 더 효과적인 것인 현상인 antioxidant polar paradox를 설명가능하다. 일반유지속의 수분, amphiphilic compounds 등에 의해 reverse micelle 구조가 형성되며 수용성 항산화제는 이들 association colloid로 집중되면서 산화발생 장소에 가깝게 되어 유지라디칼과의 접촉 가능성이 증가된다. 반면에 유지속에 골골루 분포해 있는 지용성 항산화제는 association colloid표면에서 발생하는 peroxy radical과의 접촉가능성이 작아 항산화 효율

이 적게된다.

이 이론은 수분의 안정성이 매우 적은 고온 즉 deep fat frying과 같은 상황에서는 적절하지 않을 수 있으며 주요 반응물인 산소의 역할에 대한 언급이 없는 단점이 있다.

2. 수중유적형 유화액에서의 유지산화 메카니즘

유화상태는 일반유지의 경우보다 수분과 유화제라는 최소 2가지 이상의 추가적 요인이 발생하여 더 복잡한 산화메카니즘을 보이고 있다. 일반유지보다 유지 함량의 적은 수중유적형 유화액이 산화안정성의 속도적인 측면에서 오히려 더 빠르다. 이는 일반유지에서 minor로 존재했던 물질들이 수중유적형 유화액에서는 주요 산화촉진요인으로 활동함을 의미한다. 수중유적형유화액의 산화안정성은 유화액을 구성하는 유지particle의 조성 and 밀접한 관계가 있으며 또한 수용액상의 pH, ionic strength, 처리온도, 사용된 유화제의 성질인 charge, packing parameter 등과 연관이 있다(6,8).

일반유지와 동일하게, 수중유적형 유화시스템에서 주요 지방산화발생장소는 water-oil interface로 인위

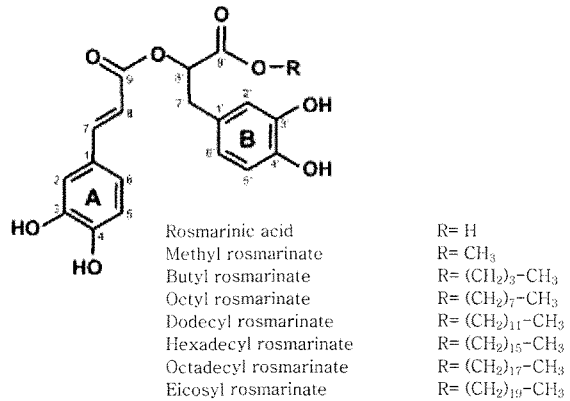


그림 3. 로스마리네이트를 활용한 phenolipid

적으로 첨가한 유화제에 의해 일반유지에서 상당한 시간의 induction period가 걸린 association colloid 생성이 이미 완비된 상태가 된다. 따라서 유화액에서는 상대적으로 산화속도가 bulk oil 보다 빠르게 된다.

최근 phenolipid라 불리는 물질에 의해 유화상태에서의 항산화제 메카니즘연구가 어느정도 가시적인 성과를 보이고 있다. Phenolipid란 phenol group에 non-polar chain의 길이를 달리하여 비극성도를 조절하기

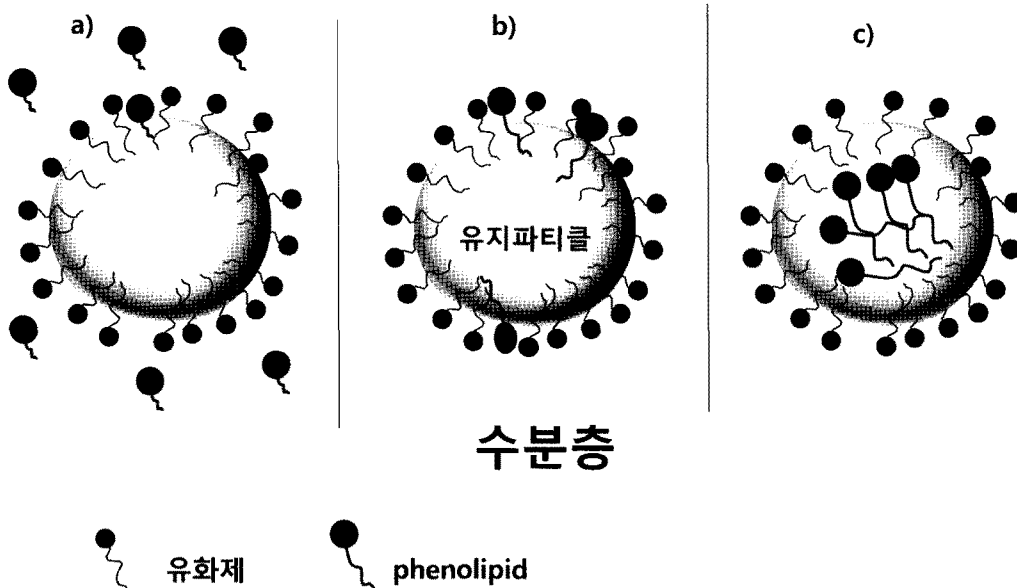


그림 4. 수중유적형 유화액에서 항산화제의 non-polar chain 길이에 따른 산화메카니즘 차이



위해 합성된 물질로 rosmarinic acid, chlorogenic acid, hydroxytyrosol 등이 활용되고 있다(그림 3).

이들을 활용한 일련의 연구성과에 의하면 유희상태에서 항산화제의 non-polar chain의 길이에 따라 항산화 효능이 non-linear하게 나타나며 일정 수준의 적절한 길이를 갖는 항산화제가 최적의 항산화 효능을 보이게 된다(그림 4).

위의 그림 4에서 a)와 같이 항산화제의 non-polar chain 길이가 작은 경우엔 유지파티클 표면에 위치하지 못하며 c)와 같이 길이가 너무 긴 경우에는 유지내에 분포하여 유지표면에서 발생하는 하이드로퍼옥사이드와의 반응성이 감소하게 되며 적절한 길이를 갖는 b)의 경우에 항산화 효과가 최대가 된다는 것이다(9-11).

항산화제의 종류에 따라 최적의 항산화 효율을 보이는 non-polar chain의 길이는 달라지며 hydroxytyrosol의 경우 8개(9), chlorogenate(10)와 rosmarinic acid(11)의 경우에는 12개와 8개의 길이가 최적이었음이 보고되었다. Phenolipid에 의한 연구 결과는 항산화제가 유지파티클에 적절히 위치해야 하며 최적의 항산화효율을 나타내며 파티클의 제조 조건 및 크기에 따라 항산화제의 효율이 달라질 수 있음을 나타낸다. 또한 antioxidant polar paradox 현상을 일률적으로 적용할 수 없으며 적절한 non-polar chain을 갖는 phenolic compound가 상황에 따라 존재함을 의미한다.

III. 항산화성 측정법 비교

기존 항산화제 효율은 hydrogen atom transfer (HAT) 및 electron transfer(ET)을 근간으로 하는 모델시스템을 활용한 방법으로 정의가 되는 경우가 많았다. HAT방법은 항산화물질의 수소공여능을 측정하며 ET법은 항산화물질의 환원능을 측정하는 방법으로 주요 HAT법은 oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, total peroxy radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay, crocin bleaching assay, β -carotene bleaching assay가 있으며 ET법으로는 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)/ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), the ferric reducing/antioxi-

표 4. 항산화측정방법

Assays using lipid as main components

Primary oxidation products

- Hydroperoxide measurement
- Ultraviolet measurement of conjugated dienes

Secondary oxidation products

- p*-Anisidin value
- Thiobarbituric acid (TBA) test
- Oxidized volatile compounds
- Total polar materials

Substrate loss

- Headspace oxygen depletion
- β -Carotene bleaching assay

In vitro assays using model systems

Hydrogen atom transfer (HAT)

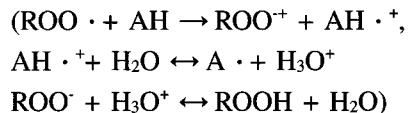
- ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)
- TRAP (Total radical trapping antioxidant parameter)
- Crocin bleaching assay
- β -Carotene bleaching assay

Electron transfer (ET)

- TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)
- FRAP (Ferric ion reducing antioxidant parameter)
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Copper(II) reduction capacity
- Total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent

dant power (FRAP), cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC), Folin-Ciocalteu reagents, 및 DPPH법이 있다(표 4)(12).

HAT assays의 측정원리는 peroxy radical에 대한 항산화제의 수소공여능 측정에 있다($ROO \cdot + AH/ArOH \rightarrow ROOH + A \cdot / ArO \cdot$). 반면 ET assays의 원리는 항산화물질이 전자를 환원물질에 전달시켜 색이나 형광물질의 세의 변화를 측정하는 데 있다.



그러나 다수의 HAT 및 ET법은 실제 유지를 활용하지 않기에 biomolecule의 항산화능 측정에는 효능이 있으나 실제 유지를 포함한 식품에서는 동일한 효

표 5. 합성 및 천연항산화제의 항산화제 효율

항산화효능	시료 매트릭스 및 처리조건	측정방법	참고문헌
Sesamol=TBHQ>BHT> α-tocopherol	Lard oxidized at 180°C for 80 min	- CDA - <i>p</i> -AV - DPPH method	13
Carnosic acid > sesamol	Sunflower oil at 40, 60, 80°C through microwave heating	- Conjugated diene - Hydroperoxides - <i>p</i> -AV	14
Ferulic acid > coumaric acid > PG > gallic acid > ascorbic acid	Phosphate buffer (pH 7.0) model	- ORAC	15
Rosmarinic acid > BHT ≥ TBHQ > α-tocopherol	Methanol model	- DPPH method	15
TBHQ = PG> gallic acid> BHT> rosmarinic acid> α-tocopherol	Cooked beef	- TBARS	15
PG>TBHQ > rosmarinic acid> gallic acid	Corn oil O/W emulsion	- Peroxides - Headspace hexanal	15
PG> BHA> TBHQ> BHT> α-tocophero	Methyl esterated palm oil at the concentration of 250 ppm	- Rancimat	16
TBHQ >carnosic acid> BHT> BHA	Sunflower oil model system at 60°C oxidation	-Peroxides -TBARS	17
Rosmarinate octylesters> rosmarinate hexadecyl> rosmarinic acid> rosmarinate dodecyl, rosmarinate methyl	Tung oil-in-water emulsion at 37°C for 5 hr	- Conjugated autoxidizable triene	11
Gallic acid, catechin and quercetin	Olive oil O/W emulsions at 40 °C	-ABTS assay -Lipid hydroperoxides -TBARS	18
Trolox >α-tocopherol > methyl carnosate, carnosic acid PG와 gallic acid은 산화촉진	O/W emulsion and W/O emulsion at 37 °C	-Peroxides -Headspace hexanal	19
Trolox> methyl carnosate> gallic acid, PG, carnosic acid> carnosic acid >α-tocopherol	Corn oil at 37 °C for 3-6 weeks	-Peroxides	19
Methyl carnosate> Trolox > carnosic acid> PG, gallic acid > α-tocopherol	Corn oil at 37 °C for 2-9 weeks	-Headspace hexanal	19

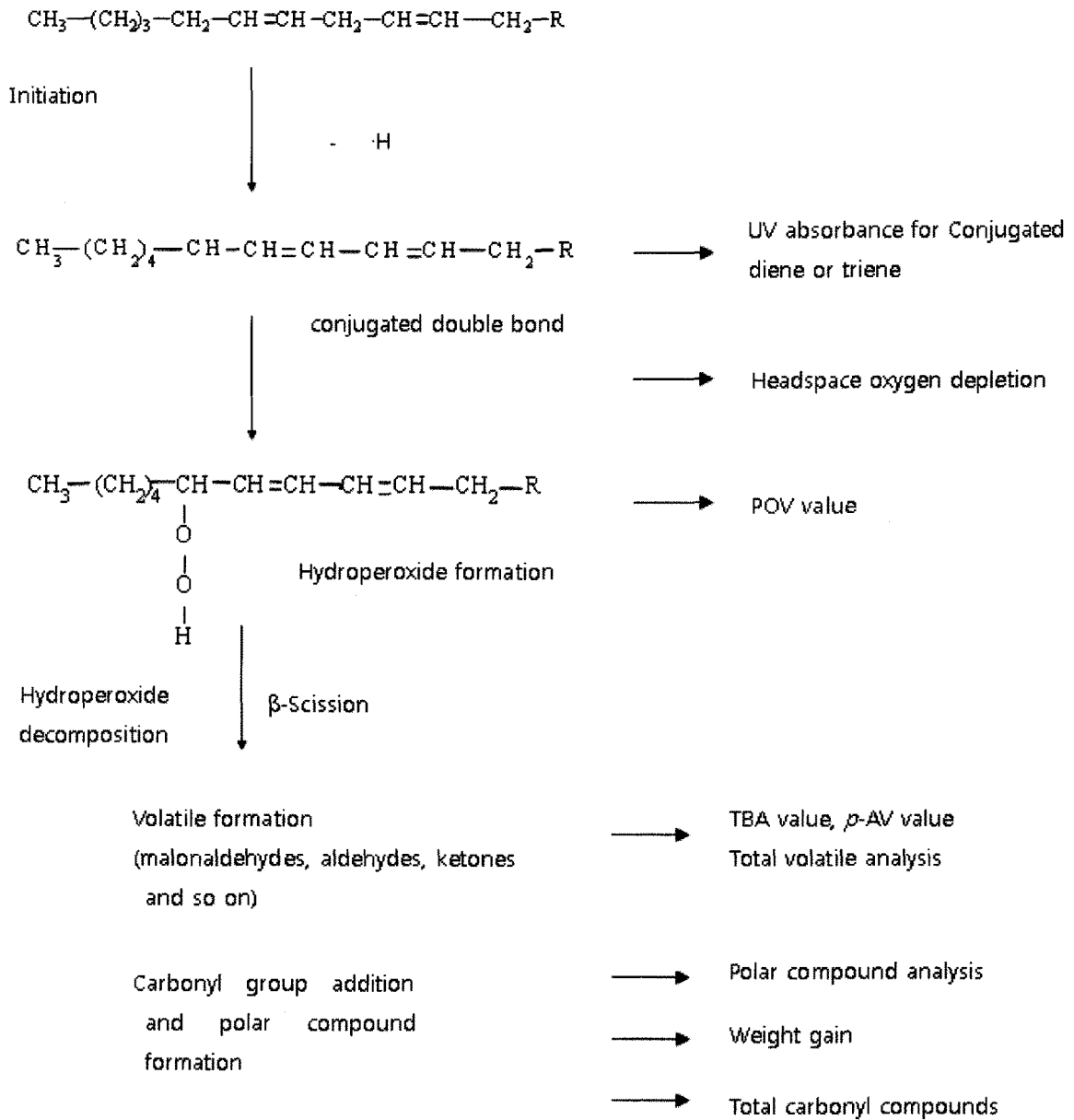


그림 5. 지방산화메커니즘에 따른 항산화 측정법과 측정산화물질

능을 기대할 수 없는 경우가 많은 실정이다. 표 5는 합성 및 천연항산화제의 항산화효율을 보고한 기존의 연구를 정리한 것으로 측정 방법 및 시료의 매트릭스에 따라 결과가 상이함을 알 수 있다. 예를 들어 라드시스템이나 해바라기씨유에서는 TBHQ의 항산화능이 가장 좋았으나 유화상태나 에스터 형태의 팜유에서는

propyl gallate의 항산화능이 더 우수하였다. 일부 유화상태에서는 오히려 산화를 촉진하기도 하였다.

따라서 실제 식품에서 항산화 활성을 측정하기 위해서는 모델시스템을 활용하는 HAT 혹은 ET 방법이 아닌 유지를 직접 활용하는 방법을 이용해야 한다. 대표적인 산화생성물과 이들을 측정하는 방법은 그림 5에

나타내었다.

Headspace 산소소거법, 공액이중결합 측정법(conjugated dienoic acids, CDA), 1차 산화생성물인 peroxide values 측정법(POV), 2차 산화생성물인 alkenal을 측정하는 *p*-anisidine values법(*p*-AV), 산화생성물인 휘발성분 측정법, 산소가 첨가되어 생성되는 극성물질측정법(total polar material, TPM), 2-thio-barbituric acid reactive substances (TBARS)법 등이 실제 산화유지에서 활용되는 방법이다. 이중 Headspace 산소소거법, CDA, POV는 1차 산화생성물 측정에 유용하며 *p*-AV, 휘발성분분석, TPM, TBARS법은 2차 산화생성물을 확인할 때 사용된다(15-19).

유지시료의 경우 위 방법을 모두 사용 가능하나 수증유적형 유화액의 경우 상대적으로 낮은 유지 농도 및 유지산화온도 처리 한계에 의해 위 방법이 다 적용 가능한 것은 아니다. 유화시스템은 온도를 60°C 이상 올리면 유화시스템이 불안정하게 되고 수분이 증발하게 되어 creaming, coalescence, flocculation 등이 발생하기에 고온에서의 처리는 한계가 있다. 유화시스템을 활용하는 경우 lipid hydroperoxide를 측정하거나 headspace volatile을 측정하는 방법이 주로 사용되어 왔다(15, 19). 또한 air-tight인 경우 headspace 산소소거법을 활용할 수 있다.

대다수의 산화측정법은 특정 산화intermediate 생성물의 농도 측정을 목적으로 하기에 실제 발생하는 내부의 radical 변화를 알 수는 없다. 또한 일차산화생성물을 측정하는 CDA, POV 등은 산화가 더 진행된 시료의 경우 감소하게 되어 신뢰있는 결과를 얻을 수 없

다(20).

최근 DPPH를 이용하여 유지내부의 radical변화를 확인하고자 하는 일련의 연구가 보고되었다. DPPH는 상대적으로 안정한 라디칼로 에탄올 혹은 메탄올 용액에서 biomolecules, herb나 spice 추출물의 전자공여능을 측정하는 데 사용되어 왔다.

DPPH법의 결과는 EC₅₀나 T_{EC50}로 표현되며 이들 값은 각각 초기 DPPH 흡광도를 50%로 줄이는 데 필요한 항산화제의 농도와 EC₅₀에 도달하기 위해 소요되는 시간으로 정의된다. DPPH측정법 결과를 활용하여 항산화제 효능을 객관적으로 정의하기 위해 'anti-radical efficacy(AE)' 등이 제안되기도 하였는데 아래 식과 같다(21).

$$AE = \frac{1}{(EC_{50}) \times (T_{EC_{50}})}$$

또한 서로 다른 연구실에서 나온 DPPH 측정법 결과를 비교하기 위해 high-throughput relative DPPH radical scavenging capacity (RDSC) assay법이 개발되었으며(22) 이는 ORAC assays처럼 일정기간동안의 DPPH 흡광도 소거 효과를 더한 값이다.

$$\% \text{ DPPH}^{\bullet} \text{ quenched} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \right) \times 100$$

이때 A_{sample}, A_{blank}, A_{control}는 각각 특정시간 및 농도에서의 항산화제, 블랭크, 대조구에 의한 DPPH 흡광도이다. DPPH의 반응 메커니즘은 비극성용매인 경

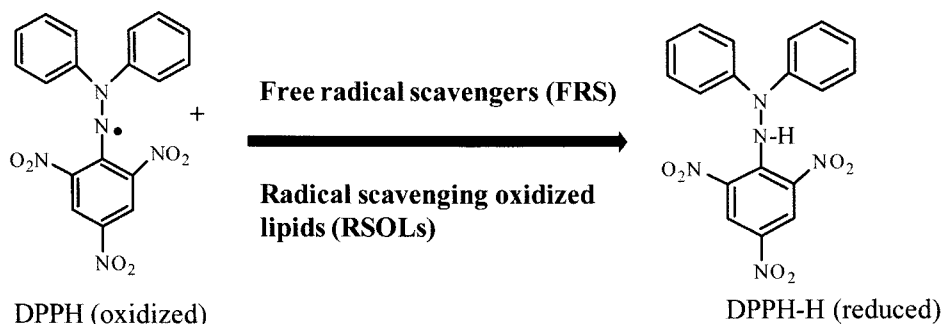


그림 6. DPPH와 유리라디칼 소거제(FRS) 및 라디칼소거유지산화물질(RSOL)의 반응

우 수소공여가 위주이나 에탄올 등 극성용매에서는 전자공여가 먼저 발생한다(23).

DPPH를 이용하여 유지의 산화 및 항산화물질의 효율을 측정하기 위해 DPPH를 통상적인 에탄올, 메탄올이 아닌 아이소옥탄에 용해 시킨 후 산화된 유지를 첨가하면 흡광도의 변화를 확인 할 수 있다. 이 방법을 통해 산화과정 중 DPPH 라디칼을 소거가능한 유지산화물질(radical scavenging oxidized lipids, RSOL)의 존재가 확인되었다(13, 20). RSOL의 존재는 기존 연구나 산화메카니즘에서는 간과되었던 부분으로 향후 산화메카니즘 이해 및 항산화제 효율 연구에 활용될 것으로 기대된다(그림 6).

항산화효율을 측정하기 위해서는 연구의 목적, 사용되는 식품 matrix 즉 유지 혹은 유화상태여부, 산화온도 및 시간, 측정하고자 하는 산화생성물의 종류, 이미 존재하고 있는 항산화제 및 산화촉진제의 성질 등을 고려해야 한다.

VII. 결론

본 원고에서는 화학적지표인 one-electron reduction potential과 bond dissociation energy만으로는 항산화제의 효율을 결정할 수 없으며 산화발생장소에서 역할 등의 물리적위치성 및 안정성을 고려해야 함을 소개하고자 하였다. 특히 water-oil interface를 기존의 수중유적형 유화시스템뿐 아니라 일반유지에서도 적용될 수 있으며 유지 속에 존재하는 수분과 amphiphilic 특성을 갖는 유리지방산, mono-, diacylglycerol, 인지질 등에 의해 reverse micelle 등의 association colloid가 생성되어 유지산화가 촉진된다는 이론을 소개하였다. Phenolipid를 활용한 수중유적형 유화시스템 연구에서는 적절한 non-polar chain이 있어야 최적의 항산화효율을 보이며 이는 유지 파티클에 물리적으로 안정한 접근성을 갖기에 가능하다는 것이다.

HAT 및 ET원리에 근간을 둔 많은 항산화제 측정법은 biomolecules의 경우 적절한 결과를 얻을 수 있으나 실제 유지를 활용하는 식품에서는 활용성이 저하되기에 실제 유지를 활용하여 항산화능을 측정하는

것이 바람직하다. 최근 개발된 modified DPPH법을 활용하여 새로운 산화생성물의 존재(RSOL)가 보고되었으며 항산화제 효율을 측정하는 데 활용될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Choe E, Min DB. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 5:169-186 (2006)
2. Choe E, Min DB. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 8:345-358 (2009)
3. Chaiyasit W, Elias RJ, McClements DJ, Decker EA. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47:299-317 (2007)
4. Lee JH, Koo NS, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *CComp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3:21-33 (2004)
5. Decker EA, Chen B, Panya A, Elias RJ. Understanding antioxidant mechanism in preventing oxidation in foods. pp.225-248. In : *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*. Decker EA, Elias RJ, McClements DJ (Eds). Woodhead publishing, Great Abington, Cambridge, UK (2010)
6. McClements DJ, Decker EA. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J. Food Sci.* 65:1270-1282 (2000)
7. Frankel EN, Huang SW, Kanner J, German JB. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants:bulk oil vs emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 42:1054-1059 (1994)
8. McClements DJ. *Food emulsions: principles, practice and techniques*. 2nd ed, CRC press, Boca Raton, FL, USA p.336. (2004)
9. Lucas R, Comelles F, Maldonado OS, Curcuroze M, Parra JL, Morales JC. Surface-active properties of lipophilic antioxidants tyrosol and hydroxytyrosol fatty acid esters: A potential explanation for the nonlinear hypothesis of the antioxidant activity in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 58:8021-8026 (2010)
10. Laguerre M, Lopez Giraldo LJ, Lecomte J, Figueroa-Espinoza MC, Barea B, Weiss J, Decker EA, Villeneuve P. Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion:The cutoff theory behind the polar paradox. *J. Agric. Food Chem.* 57:11335-11342 (2009)
11. Laguerre M, Lopez Giraldo LJ, Lecomte J, Figueroa-Espinoza

- MC, Barea B, Weiss J, Decker EA, Villeneuve P. Relationship between hydrophobicity and antioxidant ability of "Phenolipids" in emulsion: A parabolic effect of the chain length of rosmarinate esters. *J. Agric. Food Chem.* 58:2869-2876 (2010)
12. Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progr. Lipid Res.* 46:244-282 (2007)
 13. Yeo JD, Jeong MK, Park CU, Lee JH. Comparing antioxidant effectiveness of natural and synthetic free radical scavengers in thermally-oxidized lard using DPPH method. *J. Food Sci.* 75:C258-C262 (2010)
 14. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. A kinetic study of oxidation development in sunflower oil under microwave heating: Effect of natural antioxidants. *Food Res. Intl.* 42:1171-1177 (2009)
 15. Alamed J, Chaiyasit W, McClements DJ, Decker EA. Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *J. Agric. Food Chem.* 57:2969-2976 (2009)
 16. Loh SK, Chew SM, Choo YM. Oxidative stability and storage behavior of fatty acid methyl esters derived from used palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83:947-952 (2006)
 17. Zhang Y, Yang L, Zu Y, Chen X, Wang F, Liu F. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chem.* 118:656-662 (2009)
 18. Di Mattia CD, Sacchetti G, Mastrocola D, Pittia P. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. *Food Res. Intl.* 42:1163-1170 (2009)
 19. Schwarz K, Huang SW, German JB, Tiersch B, Hartmann J, Frankel EN. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. *J. Agric. Food Chem.* 48:4874-4882 (2000)
 20. Lee JM, Chung H, Chang PS, Lee JH. Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chem.* 103:662-669 (2007)
 21. Sánchez-Moreno C, LarrauriJA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.* 76:270-276 (1998)
 22. Cheng Z, Moore J, Yu L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *J. Agric. Food Chem.* 54:7429-7436 (2006)
 23. Ionita P. Is DPPH stable free radical a good scavenger for oxygen active species? *Chem. Pap.* 59: 11-16 (2005)