J. Fd Hyg. Safety 12(4), 310 - 314(1997)

合成抗酸化劑의 抗Thiamin性에 대한 硏究

한명규†
용인대학교 식품영양학과

Study on the Antithiamin Activities of Synthetic Antioxidants

Myung-Kyu Han†
Department of Food Science and Nutrition, Yongin University, Koungki 449-714, Korea

ABSTRACT — Antithiamin activities of BHA, BHT, PG and TBHQ of synthetic antioxidants on the effect of temperature and pH was determined by means of HPLC. The influence of synthetic antioxidants on the degradation of thiamin was found to be dependent on temperature and pH. The degradation of thiamin was considerably more rapid at pH 7 than pH 4. The influence on the heat of synthetic antioxidants at pH 4 and 38°C was extremely slight, but the degradation of thiamin at pH 7 was much more rapid at 60°C than at 38°C. After 24 hours of incubation both PG and TBHQ at pH 7 and 60°C nearly completely destroyed thiamin. Tests of antithiamin activities showed that TBHQ, which was decomposed completely in 72 hours, was more effective than PG at pH 7 and 38°C, but BHA and BHT hardly had antithiamin activities which was evaluated under various reactions of pH and temperature. Thiamin degradation, at pH 7 and 60°C, was proportional to the concentration of PG. When the ratio of PG to thiamin was increased from 0.15:1 to 2:1, the degradation rate also increased. However, the change between ratio of 1:1 and 2:1 was negligible.

Key words □ Antithiamin activities, synthetic antioxidants, degradation.

탄수화물 대사에 필수적인 thiamin은 식물류에 함유되어 있는 3,4-dihydroxy cinnamic acid와 각종 다류 중에 함유되어 있는 chlorogenic acid 및 pyrocatechin 등의 polyphenol 화합물에 의해 분해되어진다는 여러 연구보고[1-6]가 있다. 특히 Yang 등[7]은 산화방지력을 지닌 천연 phenol화합물인 flavonoid계의 quercetin과 dihydroquercetin 그리고 cinnamic acid인 caffeic acid와 chlorogenic acid는 항 thiamin 활성을 가지고 있다고 밝혔다.

또한 게, 홍합, 잉어과의 물고기 등과 같은 어패류도 thiamin을 분해하는 항thiamin성을 지니고 있다.[8]

Thiamin을 분해하는 항thiamin성을 지닌 화합물은 phenol과 flavonoid화합물임이 확인되었는데, 이들 화합물은 식품에서 좋은 항산화제로 작용하고 있다.[9] 그래서 식용유지 및 그 제품의 산화방지를 위해 사용되는 합성 항산화제도 대부분 phenol화합물이므로 항thiamin성을 지니고 있을 것으로 추측된다. 그러나 현재까지 페놀성 합성 항산화제의 항thiamin성에 대한 연구는 보고된 바 없다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

따라서 본 연구에서는 각종 식용유지제품의 합성 항산화제로 사용하는 BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), PG(propyl gallate) 및 TBHQ(tertiarybutyl hydroxyquinone) 등이 항thiamin성을 가지고 있는지를 구명하기 위하여 온도 및 pH 그리고 합성 항산화제의 농도 등의 반응조건을 달리해서 항thiamin성을 측정하여 어떤 합성 항산화제가 항thiamin성을 지니고 있는지를 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

Thiamin은 thiamin hydrochloride(Waco사, Japan), phenol성 합성 항산화제인 BHT, BHA(Waco사), PG(Fluka사, Switzerland), TBHQ(Sigma사, USA)는 특급 시약을 사용하였다.

시료용액의 조제

Thiamin hydrochloride, 내부표준물질인 caffeine 그리고 항산화제인 BHA, BHT, PG 및 TBHQ를 각각 98% ethanol

Table 1. Analysis condition of HPLC for thiamin determination

Detector	Absorbance detector model 440
Column	μ-Bondapak C (4 mm ID × 300 mm)
Wave length	254 nm
Mobile phase	40% methanol with pic-B_6
Sensitivity	0.02 Aufs
Flow rate	1.5 ml/min
Chart speed	0.5 cm/min
Injection volume	5 μl
Internal standard	Caffeine

에 녹여 최종 농도가 625 μg/ml가 되도록 한 후 차광한 다음 4°C에 보관하여 시험원액으로 하였다.

완충용액 조제는 pH 7의 경우 0.02 M 인산제1칼륨과 0.2 M NaOH를 50:29.54의 비율로 혼합하여 보정하였고, pH 4의 경우는 프탈산수소칼륨으로 조제하였으며, 0.1 N 염산과 0.1 N NaOH로 보정하였다.

항thiamin성 측정

Thiamin hydrochloride 2 ml의 시험원액을 50 ml 메스플라스크에 넣고 각각의 항산화제 시험원액 각 2 ml씩 넣고, 항산화제를 넣지 않은 대조군에는 ethanol 2 ml를 넣은 후 시험원액이 잘 혼합되도록 ethanol 8 ml를 더 넣은 다음 pH 4와 pH 7의 완충용액을 각각 가하여 50 ml로 정용해서 thiamin hydrochloride(1.85×10^{-4} M) 및 항산화제의 각 농도를 50 μg/ml로 하였고, 이들 저장온도를 38°C와 60°C로 하여 그 경과시간에 따른 thiamin의 분해정도를 살펴보기 위해 HPLC(Water사, USA)를 사용해서 thiamin의 잔존량을 정량하여 항thiamin성을 측정하였다.

한편 thiamin 분해능에 대한 pH, 온도 및 농도의 영향을 살펴보기 위해 반응조건을 달리하여 thiamin 분해능을 측정하였다. pH의 영향은 thiamin 2 ml(최종농도 1.85×10^{-4} M)와 PG 2 ml(최종농도 2.4×10^{-4} M)를 pH 4, 5, 6, 7의 각 용액에 넣고 60°C에서 8시간 경과후 그 분해능을 측정하였다. 온도의 영향은 pH 7의 시험용액을 사용해서 25, 38, 60°C 등으로 온도를 달리하여 그 분해능을 측정하였다. 또한 thiamin의 분해능에 대한 PG의 농도의 영향은 thiamin의 농도비를 1로 하고, PG의 농도비를 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2로 증가해서 그 분해능을 측정하였다.

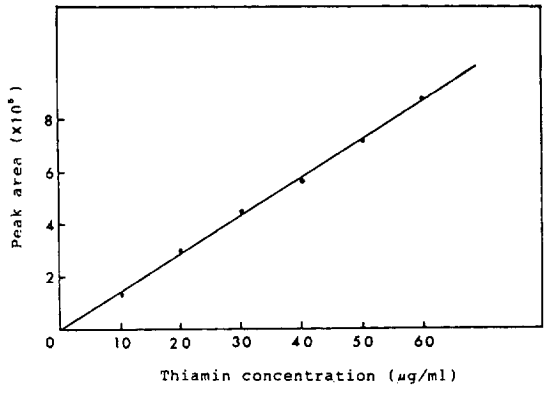

Fig. 1. Calibration curve of thiamin hydrochloride.

HPLC의 분석조건은 Table 1과 같고, data module에 의해 산출한 면적으로부터 작성한 검량선은 Fig. 1과 같다.

결과 및 고찰

합성 항산화제별 thiamin 분해능

합성 항산화제별 항thiamin성에 대한 pH 및 온도의 영향에 대해 저장기간에 따른 thiamin의 분해능을 측정하였다.

Thiamin hydrochloride 용액(50 μg/ml, 1.85×10^{-4} M)에 BHA, BHT, PG, TBHQ 용액(50 μg/ml)을 각각 혼합하고, pH 4와 7로 조정한 후 38°C에서 저장하여 그 경과시간에 따라 항산화제 종류별 thiamin 분해능을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

저장온도 38°C, pH 4의 조건에서는 7일 경과후에도 대조군과 합성 항산화제를 첨가한 모든 시험액에서 thiamin이 거의 분해되지 않았다. 따라서 이와 같은 조건하에서는 합성 항산화제들은 thiamin 분해능을 가지고 있지 않아 항thi-

Table 2. Degradation of thiamin[a] in presence of BHA, BHT, PG and TBHQ at 38°C

Incubation (day)	pH 4					pH 7				
	control	BHA	BHT	PG	TBHQ	control	BHA	BHT	PG	TBHQ
1	50.0	49.5	49.4	49.0	50.0	47.4	46.9	46.7	24.6	19.1
2	49.7	49.1	49.2	48.3	49.7	47.4	42.1	45.9	20.7	3.2
3	49.5	49.2	49.2	48.3	49.0	46.8	42.2	44.1	19.1	0
4	49.4	49.0	49.3	48.2	48.1	45.6	39.3	42.4	17.5	0
5	49.4	49.2	49.5	47.7	48.3	45.1	38.0	40.7	16.4	0
7	49.0	49.2	48.6	47.6	48.4	43.6	35.2	37.2	14.8	0

[a] Conc. of thiamin, μg/ml

Table 3. Degradation of thiamin[a] in presence of BHA, BHT, PG and TBHQ at 60°C

Incubation (day)	pH 4					pH 7				
	control	BHA	BHT	PG	TBHQ	control	BHA	BHT	PG	TBHQ
1	45.7	44.6	44.4	43.8	35.2	33.9	27.8	33.0	0.8	0.5
2	41.1	42.5	40.9	37.2	26.7	20.4	11.4	19.4	0	0
3	37.5	36.9	36.6	32.8	21.0	13.2	8.2	11.2	0	0
4	35.9	34.5	34.7	28.4	17.6	7.9	7.6	8.3	0	0
5	32.4	31.8	31.4	26.2	14.4	7.3	7.3	4.1	0	0
7	27.1	27.1	26.9	22.7	10.8	5.7	6.3	2.7	0	0

[a] Conc. of thiamin, μg/m*l*

amin성이 없음을 확인할 수 있었다. pH 7의 조건에서는 2일 경과후 각 합성 항산화제별 thiamin 분해능을 그 잔존량(μg/m*l*)으로 살펴보면 대조군의 경우 47.4, BHA 42.1, BHT 45.9, PG 20.7, TBHQ 3.2 μg/m*l*이었으며, 대조군과 BHA 및 BHT는 PG와 TBHQ보다 thiamin 분해능이 약하였으며, 그 잔존량도 거의 같았다. 특히 TBHQ가 합성 항산화제중 분해능이 가장 컸다.

한편, 저장온도를 달리한 60°C에서 pH 4와 7에서의 thiamin 분해능은 Table 3과 같다.

pH 4의 조건에서는 합성 항산화제 종류에 따라 다소 차이는 있으나 대조군과 함께 thiamin이 분해되었다. 따라서 BHA와 BHT는 thiamin 분해를 촉진한다기 보다는 60°C의 온도 상승에 따른, 즉 열에 의해 다소 분해되어지는 것으로 이해할 수 있으나, PG와 TBHQ는 thiamin 분해를 촉진하고 있음을 확인할 수 있었다.

pH 7에서는 1일 경과후 thiamin 잔존량(μg/m*l*)이 대조군 33.9, BHT 33.0으로 거의 같았고 BHA는 27.8로 BHT보다 그 분해능이 다소 컸으며, PG는 0.8, TBHQ는 0.5 μg/m*l*로 거의 완전히 분해되었다.

위의 결과에서 산성(pH)에서보다는 중성(pH)에서 더 쉽게 thiamin이 분해되며, 또한 동일한 pH일 경우 온도 상승에 따라 thiamin 분해가 촉진되므로 온도가 thiamin 분해에 영향을 미친다고 할 수 있는데, 이는 thiamin 성질에서 이 등,[9] 이[10] 및 Dwivedi 등[11]의 연구에서 thiamin은 산성에서는 비교적 내열성을 나타내지만 중성 및 알카리성에서는 불안정하여 쉽게 가수분해되어진다고 하는 내용과 일치한다.

본 연구에서 hydroxy기를 1개 가지고 있는 BHA와 BHT는 pH 7, 온도 38°C일 때 극히 약한 thiamin 분해능을 가지고 있는 것이외는 모든 반응조건에서 대체로 대조군과 같은 경향을 나타내고 있으므로 thiamin 분해능을 거의 가지고 있지 않은 반면, hydroxy기를 3개 가지고 있는 PG와 TBHQ는 매우 강한 thiamin 분해능을 가지고 있다. 즉 hydroxy기를 1개 가지고 있는 것보다 3개 가지고 있는 합성 항산화제가 강한 thiamin 분해능을 가지고 있으므로 thiamin 분해능은 hydroxy기의 수에 기인된다고 추측할 수 있다.

반응조건이 thiamin 분해능에 미치는 영향

앞의 실험결과에서 항thiamin성, 즉 thiamin 분해능을 가지고 있는 PG를 선정하여 pH, 온도 및 농도 등의 반응조건이 thiamin 분해에 미치는 영향을 살펴보았다.

Fig. 2는 thiamin hydrochloride 용액(50 μg/m*l*, 1.85×10^{-4} M)에 PG용액(50 μg/m*l*, 2.4×10^{-4} M)을 가하고 pH 4, 5, 6, 7로 각각 조정한 후 60°C에서 8시간 저장한 다음 pH별 thiamin 분해능을 측정한 것이다. 대조군의 경우 pH가 중성의 범위에 가까워질수록 다소 분해가 진행되고 있는 반면,

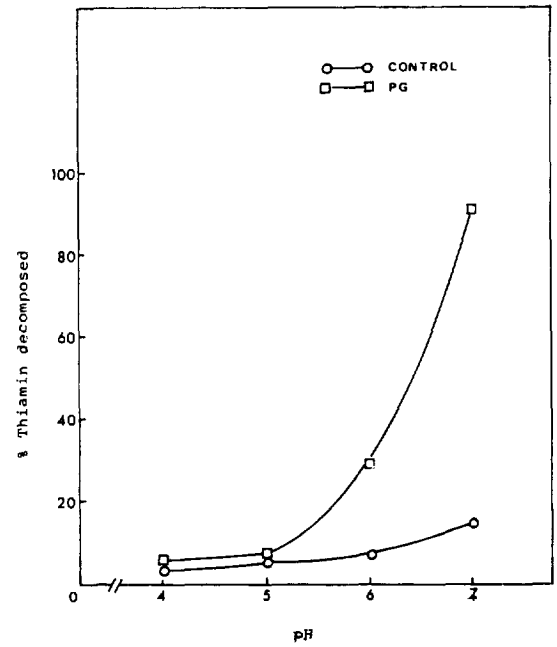

Fig. 2. Effect of pH on the degradation of thiamin in presence of PG incubated for 8 hours at 60°C.

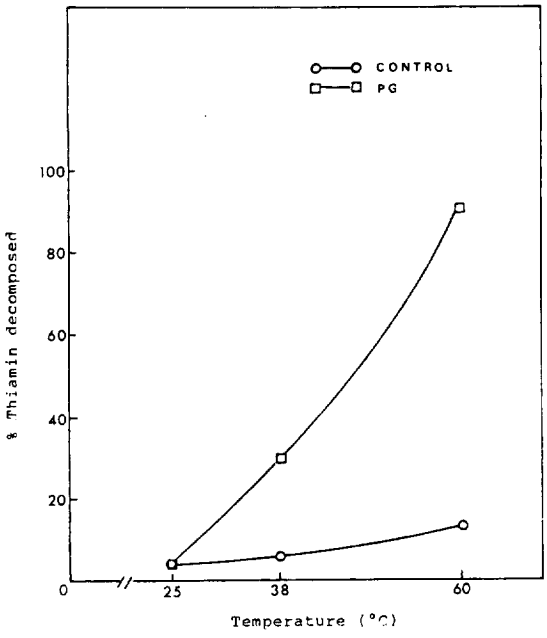

Fig. 3. Effect of temperature on the degradation of thiamin in presence of PG incubated for 8 hours at pH 7.

PG를 첨가한 것은 pH 4에서 pH 5까지는 그 분해능이 5.5%에서 7.5%로 다소 증가하였으나 pH 6에서는 28.6%로 현저하게 thiamin이 분해되었으며, pH 6에서부터 급격하게 분해되어져 pH 7일 때 90.1%로 거의 완전히 분해되었다.

한편, 시험용액의 pH를 7로 조정한 후 온도를 25, 38, 60°C로 각각 달리하여 8시간 저장한 다음 분해능을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다.

대조군의 경우 25°C와 38°C에서는 거의 변화가 없으나 60°C에서는 분해능이 13.4%로 약간 분해된 반면에 PG를 첨가한 것은 25°C, 38°C, 60°C에서 각각 그 분해능이 3.6%, 30.2%, 90.1%로 온도 상승에 따라 급격하게 증가하였다.

Table 4. Effect of concentration of PG on thiamin degradation incubated for 8 hours at pH 7 and 60°C

Con. ratio of PG:Thiamin	0:1	0.15:1	0.25:1	0.5:1	0.75:1	1:1	2:1
% Thiamin decomposed	13.4	65.0	82.1	86.2	88.7	90.0	90.2

Concentration of thiamin: 1.85×10^{-4} M
Concentration of PG: 0.15; 0.36×10^{-4} M, 0.25; 0.6×10^{-4} M, 0.5; 1.2×10^{-4} M, 0.75; 1.8×10^{-4} M, 1; 2.4×10^{-4} M, 2; 4.8×10^{-4} M

Thiamin 분해능에 대한 PG농도의 영향을 살펴보기위해 thiamin의 농도비를 1로 하고 PG의 농도비를 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2로 증가해서 8시간 저장한 다음 각각 그 분해능을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

대체로 PG농도가 증가함에 따라 점증적으로 thiamin 분해능이 증가하였으며, PG와 thiamin의 농도비가 0.15:1에서 0.25:1까지는 thiamin 분해가 현저하였으나 0.25:1에서부터 분해능의 증가 폭이 완만하였다. 특히 농도비가 1:1과 2:1은 차이가 없었다.

위의 실험결과에서 thiamin 분해능을 가지고 있는 합성산화방지제인 PG의 경우 pH 4와 pH 5의 산성범위에서는 거의 thiamin 분해능이 없었으나 pH 7의 중성에서는 강한 분해능을 가지고 있었다.

열에 대한 반응은 온도 상승에 따라 thiamin 분해가 촉진되었다. 그리고 농도에 있어서는 PG와 thiamin의 농도의 비가 1:1 이상부터는 PG의 농도 증가에 따른 분해능의 차이는 없었다.

따라서 thiamin 분해능을 지닌 합성산화방지제의 경우 pH와 온도 그리고 농도 등의 반응조건에 따라 thiamin 분해에 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다.

국문요약

합성 항산화제인 BHA, BHT, PG 그리고 TBHQ 등이 항thiamin성을 지니고 있는지를 구명하기 위하여 온도 및 pH 그리고 합성 항산화제의 농도 등을 달리해서 thiamin의 분해능을 측정하여, 합성 항산화제별 항thiamin성 보유 여부를 연구하였다. pH 4, 온도 38°C의 조건에서는 7일 경과후 항산화제 모두 thiamin이 거의 분해되지 않았다. pH 7의 조건의 경우 온도 38°C에서 2일 경과후부터 thiamin 분해가 관찰되었으며, 60°C에서 BHT는 대조군과 같은 수준이지만 BHA는 분해능을 다소 가지고 있었고, PG와 TBHQ는 거의 완전히 분해되었다. 산성용액에서 보다는 중성용액에서 thiamin의 분해가 더 쉽게 이루어졌으며, 동일한 pH에서는 온도의 상승에 따라 thiamin의 분해가 촉진되는 것이 관찰되었다. 농도에 의한 실험에서는 PG의 농도가 증가함에 따라 점증적으로

thiamin의 분해가 증가하였지만 PG와 thiamin의 비가 1:1 이상부터는 분해능의 차이가 없었다. 따라서 항 thiamin성을 지닌 합성 항산화제의 경우 pH와 온도 그리고 농도 등의 반응조건에 따라 thiamin의 분해에 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Hilker, D.M.: Antithiamin factor in bluberries, *Internat. J. Vit. Res.*, **38**, 337 (1968).
2. Davis, J.S. and Somogyi, J.C.: Reaction mechanism of the inactivation of thiamin by 3,4-dihydroxy cinnamic acid, *Internat. J. Vit. Res.*, **39**, 401 (1969).
3. Hilker, D.M., Chan, K.C., Chen, R. and Smith, R. L.: Antithiamin effects of tea, *Nutrition Reports Internat.*, **4**, 223 (1971).
4. Bender, A.E.: Food processing and nutrition, Academic press, New York, pp. 32-36 (1978).
5. Weswig, P.H., Freen, A.M. and Haang, J.R.: Antithiamin activity of plant materials, *J. Biol. Chem.*, **16**. 737 (1946).
6. Somogyi, J.C. and Bonicke, R.: Connection between chemical structure and antithiamin activity in various phenol derivatives, *J. Vit. Res.*, **39**, 44 (1969).
7. Yang, P.F. and Pratt, D.E.: Antithiamin activity of polyphenolic antidxidants, *J. Food Sci.*, **49**, 489 (1984).
8. Somogyi, J.C.: Antithiamin. In Toxicants Occurring Naturally in Foods, National Academy of Science, 2nd ed., p. 257 (1973).
9. 이서래, 신효선: 최신식품화학, 신광출판사, p. 191 (1993).
10. 이성우: 영양화학, 동명사, p. 210 (1995).
11. Dwivedi, B. K. and Anold, R. G.: Chemistry of thiamin degradation in food products and model systems, *J. Agr. Food Chem.*, **21**, 54 (1973).