

아마인에 함유된 시안배당체의 분석과 저감화

박은령[†] · 홍진환 · 이동하 · 한상배 · 이강봉 · 박재석 · 정형욱 · 홍경현 · 김명철

식품의약품안전청 식품규격평가부

Analysis and Decrease of Cyanogenic Glucosides in Flaxseed

Eun-Ryong Park[†], Jin-Hwan Hong, Dong-Ha Lee, Sang-Bae Han, Kang-Bong Lee, Jae-Seok Park, Hyung-Wook Chung, Kyung-Hyun Hong and Myung-Chul Kim

Center for Food Standard Evaluation, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Abstract

Linustatin and neolinustatin in flaxseed are called cyanogenic glucosides which produce acetone, hydrogen cyanide (HCN) and sugar when hydrolyzed. The HCN is the chemical whose toxin is being issued in food safety. Linustatin and neolinustatin were found in flaxseed by 206.5 and 174.2 mg/100 g, respectively using a RI-HPLC and LC/MSn analysis of 80% methanol extraction. Also, HCN (137.38 mg/kg) was found in flaxseed distillate by autohydrolysis and IC analysis. More than 85% of linustatin, neolinustatin and HCN were removed when flaxseed was heated for more than 2 hours in 200°C. Especially, HCN was decreased to 98% by heating only 30 min in 200°C.

Key words: flaxseed, cyanogenic glucoside, linustatin, neolinustatin, hydrogen cyanide

서 론

아마과 식물인 *Linum usitatissimum* L.의 종자인 아마인(flaxseed 또는 linseed)은 시안배당체의 함유로 인하여 안전성이 문제가 되어 시안배당체가 제거된 경우에만 식품의 원료로 인정되고 있다. 아마에는 monoglucoside 형태의 linamarin(2-β-glucopyranosyloxy-2-methylpropionitrile)과 lotaustralin((R)-2-β-D-glucopyranosyloxy-2-methylbutyronitrile) 그리고 이 두 가지 화합물의 6'-O-glucoside인 linustatin(C₁₆H₂₇NO₁₁; MW 409.39)과 neolinustatin(C₁₇H₂₉NO₁₁; MW 423.42)(Fig. 1) 등 4 가지 형태의 시안배당체가 존재한다고 알려져 있다(1).

아마식물의 줄기와 꽃에 다량 함유된 linamarin과 lotaustralin(2)은 *Linaceae*, *Fabaceae*, *Euphorbiaceae*, *Aster-*

*aceae*에 널리 분포된 valine/isoleucine에서 유래된 시안배당체이며, 주로 종자에서 발견되는 linustatin과 neolinustatin은 아마인에서 처음 발견된 이후 이 두 화합물의 정제(3) 및 분석(2,4,5) 등에 관한 연구가 계속 보고되고 있으며 특히, 발아과정에서 그 함량이 감소하는 것으로 보고되고 있다(6,7). 또한 *Passiflora*의 녹색부위(1)와 *Hevea brasiliensis*의 종자(8,9)에서도 그 존재가 확인되고 있다. 또한 식물에서 linustatin과 neolinustatin의 분석을 위하여 TLC(4,10,11)와 HPLC-RI(2,8,12)에 의한 분석 그리고 배당체의 유도체화 후 유도체물의 GC(5,7)에 의한 분석 등 다양한 분석방법이 보고되고 있다.

시안배당체의 가수분해에 의해 유리되는 시안화수소산(HCN)은 무색의 휘발성 액체로 특유한 냄새가 있으며 인체 및 동물에 독성이 강하여 급성 중독과 만성적 Konzo와 같은 CNS syndrome을 일으킨다(13). 특히, 고미 편도의 경우에 시안화수소산이 amygdalin 100 g 당 250 mg이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(14). 그러므로 시안배당체의 제거에 의한 식물성 원료의 안전성 확보가 중요하며 이를 위하여 아마인 중의 시안배당체 및 시안화수소산을 제거하기 위해 가열, 마이크로파, 고압가열, 미생물, 용매처리 등을 사용한 방법에 대한 연구가 발표되고 있다(10,15,16).

본 연구는 아마인에 함유된 독성물질인 시안배당체 형태의 linustatin과 neolinustatin, 가수분해산물인 시안화수소

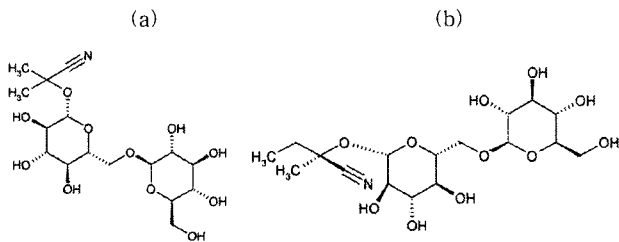


Fig. 1. Structures of linustatin (a) and neolinustatin (b) molecule.

[†]Corresponding author. E-mail: jisein@hanmail.net
Phone: 82-2-380-1665, Fax: 82-2-382-4892

산을 유도체화 등 전처리 과정을 거치지 않은 분석방법을 확립하고 열처리 방법을 이용한 시안배당체의 저감화 방법을 모색하여 식품원료의 안전성을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

아마인에 함유된 시안배당체 화합물인 linustatin과 neolinustatin의 표준물질은 ChromaDex사(Santa Ana, CA, USA)에서 구입하여 테시케이터에 보관 사용하였다. 시안배당체의 가수분해물인 HCN의 분석을 위하여 Fluka사(USA)로부터 ion chromatography용 CN 표준물질(1,000 ppm)을 구입하여 사용하였다. 아마인은 캐나다에서 수입된 3사의 제품을 검체로 사용하였다.

시안배당체 저감화 처리

아마인에 함유된 시안배당체를 저감화시키기 위하여 시료 200 g를 100°C, 150°C, 200°C의 오븐에서 30분~2시간 동안 단계별로 가열처리하였다.

시안배당체 화합물의 분리 및 분석

Spencer 등(17)의 방법을 참고하여 분말 시료 5 g을 정확히 측정하여 80% methanol 100 mL를 넣어 1시간 동안 추출한 후 여과하였다. 잔류물에 다시 80% methanol 100 mL를 넣어 동일한 방법으로 재추출하였다. 여액을 합하여 감압농축기에서 용매를 제거하고 잔류물을 증류수 50 mL로 용해하고 분액깔대기에 n-hexane 50 mL와 함께 넣어 흔들어 n-hexane 층을 버리고 다시 diethylether 50 mL를 넣어 흔들어 diethylether 층을 버리고 수용액 층을 여과하여 정확하게 100 mL로 정용하였다.

시안배당체 화합물의 정성 및 정량 분석

시료 추출물과 시안배당체 표준물질은 Table 1의 분석조건에서 RI 검출기가 장착된 LC 분석기기(ThermoSeparation Products, Staffordshire, UK)를 이용하여 분석하였으며, 아마인에 함유된 시안배당체로 알려진 linustatin과 neolinustatin 표준물질의 검량선을 작성하여 정량분석하였다.

또한 Table 2의 LC/MS 분석기기(Finnigan, San Jose, CA, USA)와 조건을 이용하여 표준물질과 시료 추출물을

Table 1. Operating conditions of HPLC for linustatin and neolinustatin

Item	Conditions
HPLC	ThermoSeparation Products (ThermoSeparation, UK)
Column	C ₁₈ UG120 (4.6×250 mm, 5 μm, Shiseido, Japan)
Oven temp.	50°C
Detector	Shodex RI 71 Detector
Flow rate	1.0 mL/min, 20 μL injection
Mobile phase	5% Acetonitrile

Table 2. Operating conditions of LC/MSn for linustatin and neolinustatin identification

Item	Conditions
LC/MS	LCQ deca ^{XP} LC/MS (Finnigan, USA)
Column	Prevail C18 (150×2.1 mm, 3 μm, Alltech, USA) 50°C
Oven temp.	200 μL/min, 5 μL injection
Flow rate	5% Acetonitrile (containing 0.1% TFA)
Mobile phase	Electrospray interface (ESI), positive mode
Mass spectra analysis	Linustatin m/z 432@35>405@33%>347@35% Neolinustatin m/z 446@12>419@35%>347@35%

Table 3. Operating conditions of IC for hydrogen cyanide

Item	Conditions
IC	Dionex LC20 Chromatography Enclosure (Dionex, USA)
Column	Guard: Ionpac AG7 (40×50 mm, Dionex, USA) Analytical: Ionpac AS7 (40×250 mm, Dionex, USA)
Detector	DC Amperometry
Flow rate	1.0 mL/min, 400 μL injection
Mobile phase	Sodium acetate trihydrate 68.05 g + diethylamine 5 mL + 50% NaOH sol. 5.25 mL / 1 L H ₂ O

LC/MSn 분석하여 각 peak의 분자량을 확인하고 이를 기초로 하여 계속하여 LC/MSⁿ까지의 분석을 수행하여 spectrum을 비교하였다. LC/MSn 분석을 위한 declustering potential(DP)과 collision energy(CE) 등은 각 분획농축물의 ESI probe infusion 실험을 통하여 최적화 되었다. 표준물질은 syringe pump를 사용하여 mass spectrometer 안으로 5 μL/min의 일정한 유속으로 주입하였다. Full-scan data의 수집은 profile mode에서 m/z 100~500의 scan과 3 micro-scan의 scan time의 조건에서 수행하였다.

Hydrogen cyanide의 분리 및 분석

분쇄된 시료 20 g을 정확히 측정하여 증류수 150 mL와 함께 증류 플라스크에 1시간 동안 방치하여 autohydrolysis 시켰다. 플라스크를 증류장치에 설치한 후 냉각관의 끝이 2.5% NaOH 25 mL가 담긴 플라스크에 잠기도록 하여 최종 부피가 500 mL가 되도록 증류하였다.

정량분석을 위한 표준검량선을 작성하기 위하여 1, 2, 3, 5, 10 ppm CN 표준물질 용액을 조제하였고, 증류액과 표준물질은 Table 3의 조건에 의하여 ion chromatography(Dionex, Sunnyvale, CA, USA) 분석하였다.

결과 및 고찰

시안배당체 linustatin, neolinustatin

Linustatin과 neolinustatin의 정성분석: 아마인의 80% methanol 추출물에서 RI-LC 분석에 의해 표준물질과 동일한 retention time에서 분리된 peak가 시안배당체 linu-

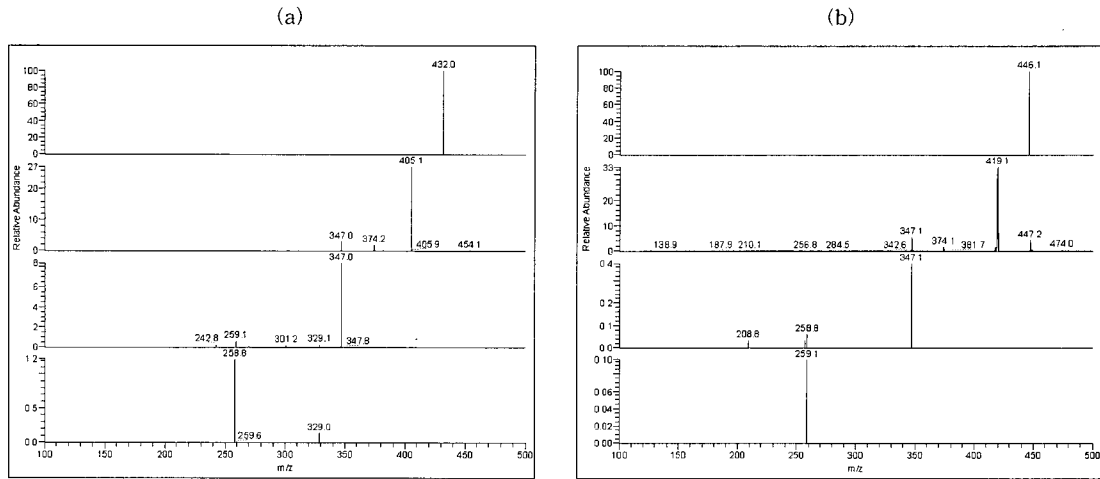


Fig. 2. ESI-LC/MSn respective mass spectrums of linustatin (a: 432@35>405@33>347@35) and neolinustatin (b: 446@12>419@35>347@35) standard solution.

statin과 neolinustatin 화합물임을 확인하기 위하여 LC/MS 분석기기를 이용하여 linustatin과 neolinustatin 표준물질과 시료의 mass spectrum을 비교하였다. Fig. 2에서와 같이, positive ion mode에서 표준물질 linustatin과 neolinustatin은 각각 m/z 432.2와 446.2를 나타내었으며 이는 $[M+Na]^+$ 에 상응하는 spectrum peak이며 두 화합물 사이에 $-CH_2$ 차이를 확인할 수 있었다. Linustatin과 neolinustatin의 이온화 경향을 자세히 분석하기 위해 abundant ion peak(m/z 432.2와 446.2)를 계속하여 MS/MS부터 MS/MS⁴까지(linustatin: 432@35>405@33>347@35, neolinustatin: 446@12>419@35>347@35, m/z@collision energy) 이온화 하였다. MS/MS 분석에 의해서 HCN의 분리를 예상케 하는 $[M+Na-27]^+$ ion peak에 해당하는 m/z 405와 419를 각각 관찰할 수 있었으며, MS/MS³과 MS/MS⁴ 분석에 의해 linustatin과 neolinustatin에서 동일하게 m/z 347과 259로 각각 이온화되었다. Linustatin에서 m/z 405 → 347(58 amu)는 C₄H₁₀을, neolinustatin에서 m/z 419 → 347(72 amu)는 C₅H₁₂의 손실을 의미하고 또한 m/z 347은 diglucoside류인 linustatin과 neolinustatin에서 aglycon이 분리된 [diglucose+Na-H₂O]을 의미한다. 표준물질과 동일한 LC/MS 조건에서 분석한 아마인 추출물로부터 동일한 이온화 경향이 관찰되어 아마인 추출물에서 분리된 peak가 linustatin과 neolinustatin임을 확인할 수 있었다.

Linustatin과 neolinustatin의 정량분석 : 아마인에 함유된 linustatin과 neolinustatin의 정량분석을 위하여 표준물질을 농도별로 조제하여 Fig. 3과 같은 표준검량선과 직선 회귀방정식을 작성하였다.

아마인의 주요 시안배당체 중 diglucoside인 linustatin과 neolinustatin을 RI-LC로 분석한 chromatogram을 Fig. 4에 도식하고 정량하였다. 그 결과, 아마인 추출물에 linustatin과 neolinustatin이 각각 206.5 mg/100 g과 174.2 mg/100 g로

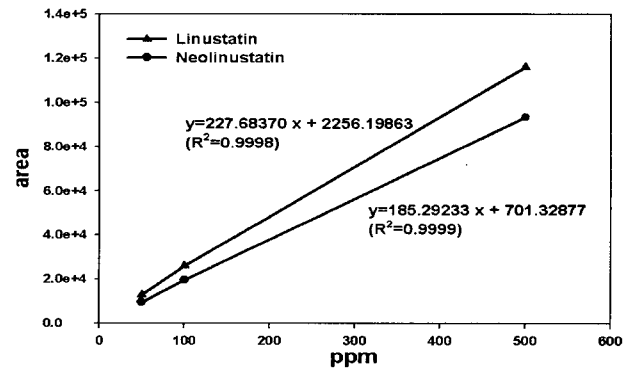


Fig. 3. Calibration curves of linustatin and neolinustatin standard solution.

함유되어 있었다. 이 함량은 품종, 생산년도, 지역에 따른 시안배당체의 함량분석에서 213~352 mg/100 g의 linustatin(전체 시안배당체 중 54~76%), 91~203 mg/100 g의 neolinustatin의 결과(12)에 부합하였으며, Wanasundara 등(6)은 발아단계, Irena(2)는 식물의 부위별로 성장단계에 따라 그 함량에 큰 차이를 보인다고 발표하였다.

아마인에서의 시안배당체의 분석을 위하여 연구된 TLC(4,10,11), HPLC-RI(2,8,12), 유도체물의 GC(5,7)에 의한 분석 등 다양한 분석방법들 중에서 본 연구는 시안배당체의 유도체화와 같은 여러 단계의 전 처리 과정을 거치지 않는 간편한 분석을 위하여 80% methanol 추출과 HPLC-RI에 의한 분석방법을 확립하였으며, Kobaisy 등(5) 또한 HPLC-RI에 의한 분석법이 pyridine-pyrazolone 유도체, barbituric acid-pyridine 유도체 분석법과 비교하여 유의적인 차이는 없다고 보고하였다.

Hydrogen cyanide(HCN)의 분석

아마인에서 autohydrolysis에 의해 유리된 hydrogen cyanide의 정량을 위하여 표준물질을 농도별로 조제하여 Fig.

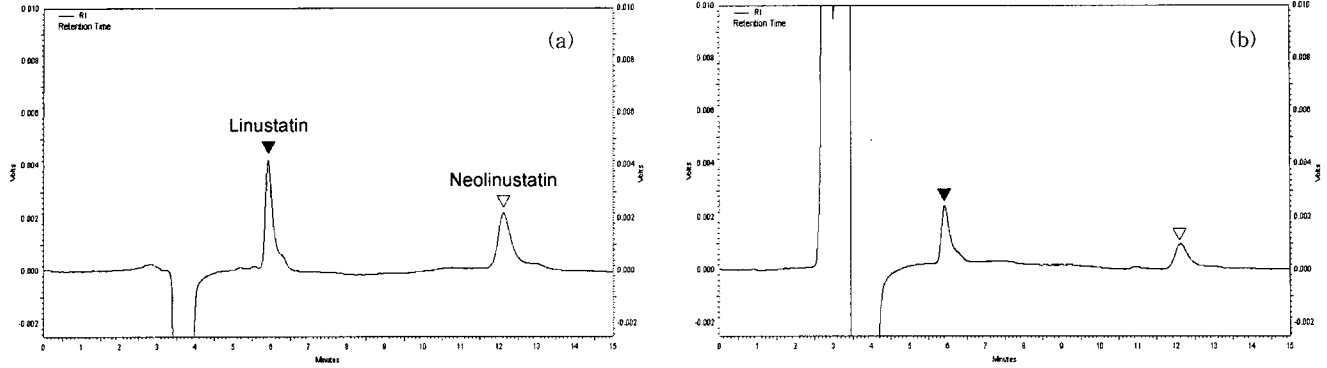


Fig. 4. Representative RI-chromatograms of standard linustatin and neolinustatin mixed solution (a), 80% methanol extract from flaxseed (b).

5의 표준검량선과 직선회귀방정식을 작성하였다.

표준물질과 아마인으로부터 autohydrolysis에 의해 생성된 hydrogen cyanide의 ion chromatography 분석에 의한 chromatogram을 Fig. 6에 나타내었다. 아마인에서 평균 137.38 mg/kg의 hydrogen cyanide가 유리되었으며, 10 품종의 아마인에서 124~196 µg/g을 보고한 Chadha 등(18)의 연구와 일치하였다. Kobaisy 등(5)은 아마인으로부터 효소에 의한 가수분해과정을 거쳐 70.86 mg/100 g의 total cya-

nide를 보고하였다.

시안배당체의 저감화

시안배당체의 함량을 감소화시키기 위해 100°C, 150°C, 200°C의 oven에서 시간별로 가열처리한 아마인으로부터 분리 분석된 시안배당체의 함량을 Table 4에 나타내었다. Linustatin은 대조구와 비교하여 150°C에서 1시간동안 가열처리된 시료에서 최대치를 나타내었으며, 이는 가열에 의한 건부량의 증가에 기인하는 것으로 사료된다. 시안배당체의 함량은 100°C 가열에서는 큰 변화가 발견되지 않았으며, 그 이후 가열시간의 연장과 온도의 상승에 따라 그 함량이 점차적으로 감소하였으며, 두 화합물 모두 200°C에서 2시간 이상의 가열에 의해서만 80% 이상의 감소효과를 관찰할 수 있었다. Hydrogen cyanide의 경우 150°C에서는 2시간 이상, 200°C의 경우는 1시간 이상의 가열에 의해서만 99% 이상의 감소효과를 관찰할 수 있었다.

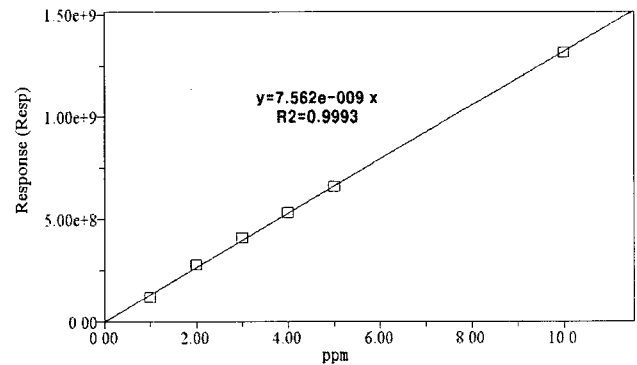


Fig. 5. Calibration curve of hydrogen cyanide standard solution as cyanide.

요 약

아마인의 linustatin과 neolinustatin은 가수분해되어 acetone, hydrogen cyanide(HCN) 그리고 sugar를 생성하는 di-

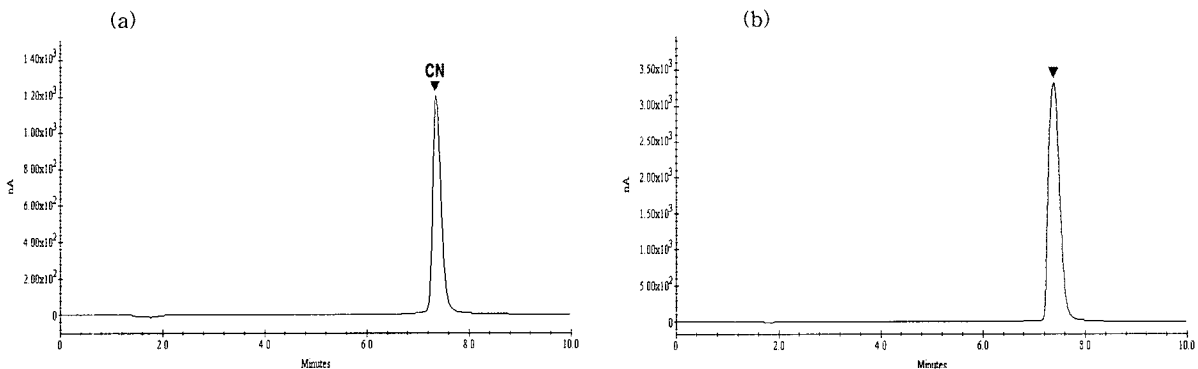


Fig. 6. Representative IC-chromatograms of cyanide standard solution (a) and distillate by autohydrolysis from flaxseed (b).

Table 4. The effect of heat treatment on the degradation of linustatin, neolinustatin and hydrogen cyanide in flaxseed

Temp. (°C)	Hr	Linustatin		Neolinustatin		Hydrogen cyanide	
		Content (mg/kg)	Decrease rate (%)	Content (mg/kg)	Decrease rate (%)	Content (mg/kg)	Decrease rate (%)
100	1	2,492.44	(20.693)	1,621.18	-6.978	105	-23.567
	2	2,285.93	(10.693)	1,624.03	-6.815	150	(9.190)
150	0.5	2,754.54	(33.385)	1,730.87	-0.688	115	-16.288
	1	2,392.05	(15.832)	1,604.98	-7.908	89	-35.214
	2	2,074.49	(0.454)	1,325.24	-23.959	0.5	-99.636
200	0.5	859.60	-58.375	984.18	-43.528	1.99	-98.548
	1	192.81	-90.664	372.40	-78.632	0	-100
	2	88.05	-95.736	255.66	-85.330	0	-100
CON		2,065.11		1,742.78		136.50	

glucoside 시안배당체로서 가수분해물인 HCN의 독성으로 인해 식품의 안전성에 문제가 되고 있다. 80% methanol 추출과 LC/MSn에 의한 정성분석과 RI-LC에 의한 아마인에서 함유된 시안배당체 함량을 조사한 결과, linustatin과 neolinustatin이 각각 평균 206.5 mg/100 g과 174.2 mg/100 g 함유되어 있었다. 또한 autohydrolysis 후 증류액으로부터 IC 분석에 의해 HCN 137.38 mg/kg이 가수분해되어 유리됨을 알 수 있었다. 시안배당체의 저감화를 위하여 가열처리를 수행한 결과, 아마인은 200°C에서 2시간 이상 가열시 85% 이상의 linustatin과 neolinustatin 그리고 HCN의 제거효과를 보였다. 특히 200°C에서 30분 가열시 98%의 HCN이 제거됨을 관찰할 수 있었다.

문 헌

- Spencer KC, Seiglera DS, Nahrstedtb A. 1986. Linamarin, lotaustralin, linustatin and neolinustatin from *Passiflora* species. *Phytochem* 25: 645-647.
- Irena NS. 1998. Cyanogenic glucosides in *Linum usitatissimum*. *Phytochem* 49: 59-63.
- Amarowicz R, Chong X, Shahidi F. 1993. Chromatographic techniques for preparation of linustatin and neolinustatin from flaxseed: Standards for glycoside analyses. *Food Chem* 48: 99-101.
- Smith CR, Weisleder D, Miller RW, Palmer IS, Olson OE. 1980. Linustatin and neolinustatin: Cyanogenic glycosides of linseed meal that protect animals against selenium toxicity. *J Org Chem* 45: 507-510.
- Kobaisy M, Oomah BD, Mazza G. 1996. Determination of cyanogenic glycosides in flaxseed by barbituric acid-pyridine, pyridine-pyrazolone, and high-performance liquid chromatography methods. *J Agric Food Chem* 44: 3178-3181.
- Wanasundara PKJPD, Shahidi F, Brosnan ME. 1999. Changes in flax (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination. *Food Chem* 65: 289-295.
- Selmar D, Liebereia R, Junqueira N, Biehl B. 1991. Changes in cyanogenic glucoside content in seeds and seedlings of *Hevea* species. *Phytochem* 30: 2135-2140.
- Selmar D, Liebereid R, Biehl B, Nahrstedta A, Schmidt-mannb V, Wrayc V. 1987. Occurrence of the cyanogen linustatin in *Hevea brasiliensis*. *Phytochem* 26: 2400-2401.
- Selmar D, Lieberei R, Beehl B. 1988. Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides. The linustatin pathway. *Plant Physiol* 86: 711-716.
- Lei V, Amoa-Awua WKA, Brimer L. 1999. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. *Int J Food Microbiol* 53: 169-184.
- Brimer L, Brøgger Christensen S, Mølgaard P, Nartey F. 1983. Determination of cyanogenic compounds by thin-layer chromatography. 1. A densitometric method for quantification of cyanogenic glycosides, employing enzyme preparations (β -glucuronidase) from *Helix pomatia* and picrate-impregnated ion-exchange sheets. *J Agric Food Chem* 31: 789-793.
- Oomah BD, Mazza G, Kenaschuk EO. 1992. Cyanogenic compounds in flaxseed. *J Agric Food Chem* 40: 1346-1348.
- Tylleskar T, Rosling H, Banea M, Bikangi N, Cooke RD, Poulter NH. 1992. Cassava cyanogens and konzo, an upper motoneuron disease found in Africa. *The Lancet* 339: 208-211.
- Kim DH. 1995. *Food chemistry*. Tamgudang, Seoul. p 726-729.
- Feng D, Shen Y, Chavez ER. 2003. Effectiveness of different processing methods in reducing hydrogen cyanide content of flaxseed. *J Sci Food Agric* 83: 836-841.
- Wanasundara PKJPD, Amarowicz R, Kara MT, Shahidi F. 1993. Removal of cyanogenic glycosides of flaxseed meal. *Food Chem* 48: 263-266.
- Spencer KC, Seiglera DS, Nahrstedtb A. 1986. Linamarin, lotaustralin, linustatin and neolinustatin from *Passiflora* species. *Phytochem* 25: 645-647.
- Chadha RK, Lawrence JF, Ratnayake WMN. 1995. Ion chromatographic determination of cyanide released from flaxseed under autohydrolysis conditions. *Food Addit Contam* 12: 527-533.

(2005년 3월 18일 접수; 2005년 4월 22일 채택)