

종자류 식품에 함유된 5종 리그난의 동시 분석법 개발

김윤정 · 편지예 · 백인환* · †김영화**

경성대학교 식품생명공학과 대학원생, *경성대학교 약학과 부교수, **경성대학교 식품생명공학과 부교수

Development of Simultaneous Analytical Method for Five Lignans in Edible Seeds

Yoonjeong Kim, Jiye Pyeon, In-hwan Baek* and †Younghwa Kim**

Graduate Student, Dept. of Food Science & Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

*Associate Professor, College of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

**Associate Professor, Dept. of Food Science & Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

Abstract

There has been increased interest in lignans due to their potential effect in reducing the risk of developing several diseases. To evaluate lignan contents, sensitive and accurate methods should be developed for their quantification in food. The present study aimed to validate a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the quantification of 5 lignans: lariciresinol (Lar), matairesinol (Mat), pinoresinol (Pin), secoisolariciresinol (Seco), and syringaresinol (Syr). The validation included selectivity, linearity, recovery, accuracy, and precision. The method was proved to be specific, with a linear response ($R^2 \geq 0.99$). The limits of detection were 0.040~0.765 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and the limits of quantification were 0.114~1.532 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Recoveries were 90.588~109.053% for black sesame powder. Relative standard deviations of repeatability and reproducibility were below 5%. Total lignan contents of roasted coffee bean, oat, and blacksoy bean were 105.702 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 78.965 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, and 165.521 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectively. These results showed that LC-MS/MS analysis would be effective in producing acceptable sensitivity, accuracy, and precision in five lignan analyses.

Key words: lignan, LC-MS/MS, method validation, edible seed

서 론

리그난(lignans)은 식물에 함유되어 있는 diphenolic 구조의 페놀성 화합물이며, 식물성 에스트로젠(phytoestrogens)으로 작용하여 인체에서 에스트로젠과 유사한 활성을 갖는 것으로 보고되어 있다(Schwartz & Sontag 2011). 현재까지 연구된 내용에 의하면 식품에서 주요하게 발견되는 리그난은 lariciresinol (Lar), matairesinol(Mat), pinoresinol(Pin), secoisolariciresinol(Seco), syringaresinol(Syr), sesamin(Ses), medioresinol, 7'-hydroxmatairesinol 등으로 알려져 있다(Smeds 등 2007). 리그난을 다량 함유하고 있는 대표적인 식품은 아마씨로 Seco의 함량이 가장 많은 것으로 알려져 있고, Pin, Lar 및 Mat의 함량도 상당한 것으로

나타나 있다(Thompson 등 2006). 아마씨 외에도 리그난은 콩, 참깨, 견과류 등과 같은 종실류에 비교적 고농도로 존재하며, 과일, 채소, 차, 곡류 등 다양한 식품에 고루 함유되어 있다(Cederroth 등 2010; Peterson 등 2010).

리그난은 항산화, 항염증, 항암 등의 생리활성을 나타내며, 이러한 효과는 체내 흡수된 리그난이 enterolactone, enterodiol, enterofuran과 같은 enterolignan의 형태로 전환되기 때문인 것으로 알려져 있다(Heinonen 등 2001). 특히, 리그난은 여성호르몬인 에스트로젠과 비슷한 구조로 체내에서 에스트로젠 수용체와 결합해 에스트로젠의 효능을 내는 것으로 알려져 있으며, 여성 갱년기 증상 완화와 심혈관 질환과 같은 만성 질환을 예방한다는 연구결과가 보고되어 있다(Cornwell 등

† Corresponding author: Younghwa Kim, Associate Professor, Dept. of Food Science & Biotechnology, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea. Tel: +82-51-663-4652, Fax: +82-51-663-4709, E-mail: younghwakim@ks.ac.kr

2004; Penttinen 등 2007). 이로 인해, 리그난은 부작용이 적은 여성호르몬 대체제로 대두되고 있어, 이에 대한 관심이 날로 증가하고 있는 실정이다. 뿐만 아니라, 리그난은 심혈관질환의 완화 및 골 질환에 대한 예방 효과 등이 보고되어 있다 (Adlercreutz & Mazur 1997; Setchell KD 1998; Kang 등 1999; Levis 등 2010).

이전에 연구된 식품 중 리그난의 분석은 gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)를 이용하여 Seco 및 Mat를 분석한 방법이 보고되어 있으며, HPLC-MS/MS를 활용한 Seco 및 Mat와 같은 리그난 분석법이 보고되어 있다(Mazur 등 1998). 또한 HPLC를 이용한 음나무발효물의 리그난 배당체 동시분석법에 대한 연구도 보고되어 있으며(Jang 등 2019), 참깨의 sesamol 및 sesamol(Jung 등 2017), 오미자의 gomisin 및 schizandrin 등과 같은 리그난을 분석하기 위한 HPLC 및 LC-MS/MS 분석법이 보고되어 있다(Deng 등 2008). 현재까지 보고된 식품에 함유된 리그난에 대하여는 Lar, Pin, Seco, Syr를 동시분석을 연구하였으나(Milder 등 2004), 커피 및 흑임자에 함유된 주요 리그난인 Lari, Mat, Seco, Syr, Pin에 대한 동시분석법을 실시한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 식물체에 존재하는 주요한 자유형의 리그난 5종을 질량분석법을 통해 동시분석할 수 있는 분석법을 개발하고자 하였고, 개발된 분석법의 검증에 대해 직선성, 정밀성, 정확성, 정량한계 및 검출한계 등을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본 연구에서 사용한 리그난 표준품(Lar, Mat, Pino, Seco, Syr)은 Sigma Aldrich사(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 커피와 흑임자는 볶은 아라비카 커피원두(Hollys F&B, Seoul, Korea)와 볶은 흑임자 분말 스틱(Natural Hill Inc., Yongin, Korea)을 구입하였으며, 귀리와 서리태는 부산광역시 남구의 대형 마트에서 구입하여 분석에 이용하였다. 또한 분석에 사용되는 메탄올과 아세트니트릴은 Merck 사(Whitehouse station, NJ, USA)로부터 구입하였다. 이밖에 사용된 용매 및 시약은 HPLC 등급 및 특급시약을 사용하였다.

2. 리그난 추출 및 전처리

시료의 리그난을 추출하기 위해 분쇄한 시료 0.1 g을 칭량하여 1 mL의 추출용매(acetonitrile:isopropanol:water=3:3:2)를 가해 4°C가 유지되도록 얼음을 채운 초음파 추출기(SD350H, Sungdong Ultrasonic Co., Seoul, Korea)에서 2시간동안 추출을 진행하였다. 그 후, 시료는 4°C에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하였고, 상등액은 0.45 µm syringe filter(PVDF,

Whatman Inc., Maidstone, UK)를 사용하여 LC-MS/MS 분석에 사용하였다.

3. 기기분석 조건

주요 리그난 5종을 분석하기 위하여 AB Sciex Triple Quad 4500 LC-MS/MS(AB Sciex, Framingham, MA, USA)가 장착된 Agilent 1260 infinity II HPLC(Agilent Technologies, California, USA)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 Agilent Poroshell C18 컬럼(1.9 µm, 2.1×50 mm)이었으며, 이동상은 증류수와 아세트니트릴을 사용하여 Table 1의 조건으로 분석하였다. Mass ionization mode는 electrospray ionization(ESI)이며, negative ion을 사용하여 정량하였고 multiple-reaction monitoring(MRM) 조건은 Table 1에 나타내었다.

4. 표준용액 조제 및 검량선 작성

각 리그난 표준품은 메탄올로 용해한 후 1 µg/mL 농도로 제조하여 표준용액으로 사용하였다. 각 표준용액은 5, 10, 50, 100, 500, 800 ng/mL 농도가 되도록 메탄올로 희석하였으며, LC-MS/MS를 이용하여 분석한 후 표준곡선의 작성에 사용하였다.

5. 분석방법검증

본 연구에서는 AOAC(2016)의 single laboratory 가이드라인에 준하여 직선성, 반복성, 재현성 및 정확성을 확인하여 분석방법 검증을 실시하였다. 리그난 성분에 대한 검출한계(LOD, limit of detection)와 정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 signal 대비 noise 비율(S/N ratio)이 각각 3 및 10이 되는 피크의 농도를 LOD 및 LOQ로 각각 설정하였다. 또한, 분석법의 정밀성은 시판 중인 흑임자 분말을 하루에 5회 반복 실험하여 반복정밀성(repeatability precision)을 평가하였으며, 5일 동안 3회씩 분석하여 재현정밀성(reproducibility precision)을 확인하여 리그난 5종의 동시분석법의 반복성과 재현성을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 선택성 및 직선성

주요 리그난 5종의 표준물질을 LC-MS/MS로 동시 분석한 결과, Fig. 1과 같이 머무름시간과 질량 대 전하비(m/z)가 같은 방해물질의 간섭과 분석 물질이 검출되지 않는 것을 확인하였다. 표준물질과 시료의 total ion chromatogram(TIC)를 비교한 결과, 각 peak의 머무름 시간(retention time)이 각각 Lar는 3.39분, Mat는 4.05분, Pin은 3.83분, Seco는 3.25분, Syr는 3.75분대에 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 다른 물질

Table 1. LC-MS/MS condition for lignans analysis

Instrument		AB Sciex Triple quad 4500, Agilent 1260 II HPLC					
Column		Agilent Poroshell C18 column (1.9 μ m, 2.1 \times 50 mm)					
Column oven temperature		30 $^{\circ}$ C					
Injection volume		2 μ L					
Flow rate		0.4 mL/min					
Mobile phase A		Distilled water					
Mobile phase B		Acetonitrile					
HPLC	Time	Mobile phase					
		(min)	A (%)	B (%)			
Gradient	0	85	15				
	2	50	50				
	4	50	50				
	4.1	85	15				
	15	85	15				
Ionization polarity		negative	Source	Turboionspray source			
Curtain gas		30.0	Collision gas	9.0			
Ion source gas 1		80	Ion source gas 2	40			
Ionspray voltage		-4,500 V	Ion source temperature	450 $^{\circ}$ C			
MS/MS parameters							
MS/MS	Analyte	Q1	Q3	DP ¹⁾	EP ²⁾	CE ³⁾	CEP ⁴⁾
	Seco	360.892	164.9	-95	-10	-34	-9
	Mat	356.892	83.0	-70	-10	-50	-7
	Lar	359.100	329.0	-90	-10	-17	-9
	Pin	357.000	150.9	-95	-10	-24	-9
	Syr	416.956	181.0	-80	-10	-26	-9

¹⁾ DP: Declustering potential.

²⁾ EP: Entrance potential.

³⁾ CE: Collision energy.

⁴⁾ CEP: Cell exit potential.

의 간섭없이 분리되었으며 표준용액의 머무름 시간과 시료 인 흑임자 추출물에서의 각 리그난 표준물질의 머무름 시간이 일치하는 것으로 확인되었다.

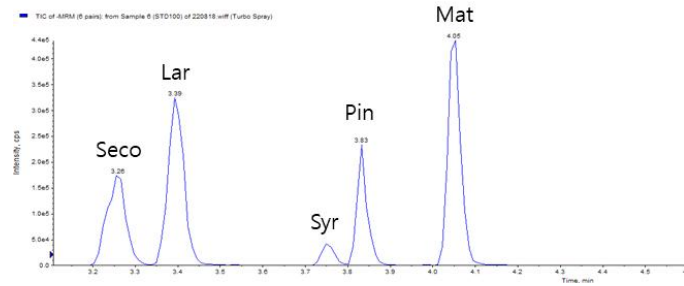
또한, 리그난 표준물질의 직선성은 메탄올에 용해한 리그난 표준물질 용액을 이용하여 검량선을 작성하였다. 6개 검량선의 농도(5, 10, 50, 100, 500, 800 ng/mL)를 메탄올에 희석하여 교정곡선을 작성한 결과, 5가지 리그난 검량선의 상관 계수(R^2)는 모두 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었다 (Fig. 2).

2. 정량한계 및 검출한계

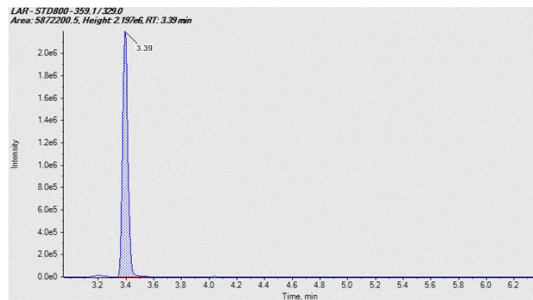
각 리그난의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 값은 Table 2에 나타내었다. LOD와 LOQ는 signal-to-noise를 활용하여 구

하며, 이는 검출되는 신호를 baseline의 noise에 대한 비를 이용하여 계산한 방법으로, 그 수치가 낮을수록 해당 물질이 민감하게 검출되는 것을 의미한다(Saadati 등 2013). 주요 리그난에 대한 검출한계와 정량한계는 Lar의 경우 각각 0.152 μ g/100 g, 0.387 μ g/100 g이었고, Mat는 0.040 μ g/100 g, 0.114 μ g/100 g, Pin은 0.184 μ g/100 g, 0.508 μ g/100 g, Seco는 0.131 μ g/100 g, 0.278 μ g/100 g, Syr는 0.765 μ g/100 g, 1.532 μ g/100 g으로 나타났다. Nørskov & Knudsen(2016)의 연구에서 보고된 Mat의 LOD는 0.12 μ g/100 g, LOQ는 0.61 μ g/100 g이었으며, Seco의 경우 LOD는 0.31 μ g/100 g, LOQ는 1.6 μ g/100 g, Lari는 LOD와 LOQ가 각각 0.43 μ g/100 g 및 2.2 μ g/100 g이었다. 동일한 연구에서 Pin과 Syr의 LOD와 LOQ는 각각 2~5 μ g/100 g과 10~25 μ g/100 g으로 보고하였다. Angeloni 등(2019)의

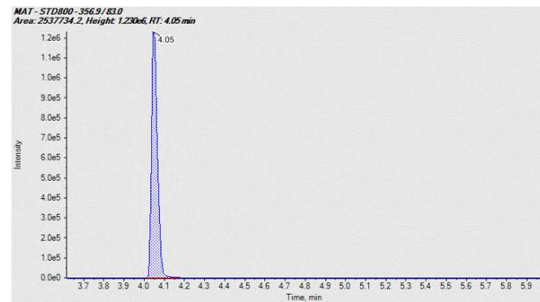
(A) TIC



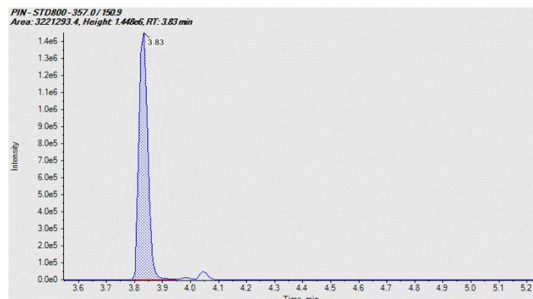
(B) Lar



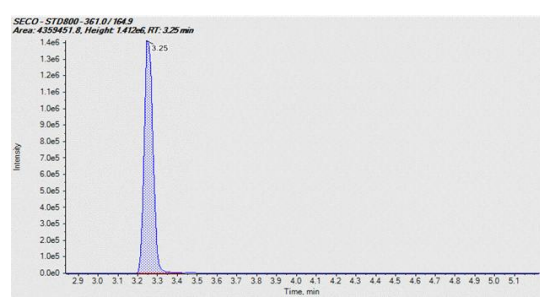
(C) Mat



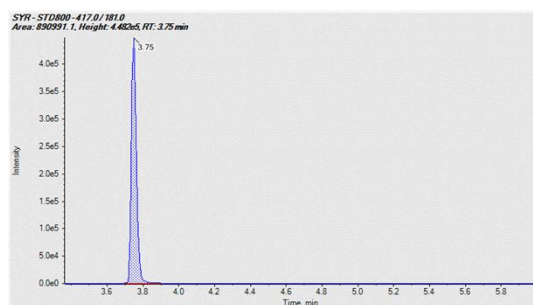
(D) Pin



(E) Seco



(F) Syr



(G) Blank

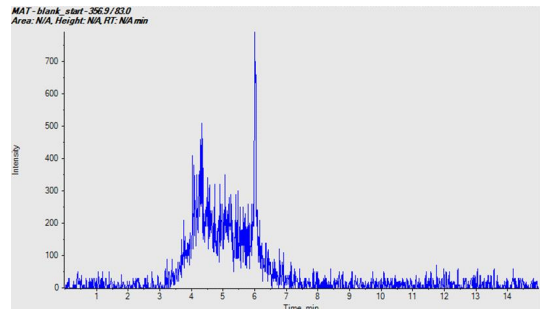


Fig. 1. Total ion chromatogram (TIC) (A) and multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram of lignan standards (B; Lar, C; Mat, D; Pin, E; Seco, F; Syr, G; Blank) with LC-MS/MS.

연구에서 보고된 Seco와 Lari의 LOD와 LOQ는 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 과 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었고, Mat의 경우 LOD는 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ는 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이었다. 따라서 본 연구에서 분석한 리그난 5종의 LOD와 LOQ

값은 기존에 보고된 리그난의 LOD 및 LOQ값보다 우수한 값으로, 본 방법은 식품에 함유된 리그난의 고감도 검출이 가능한 방법임을 확인할 수 있었다.

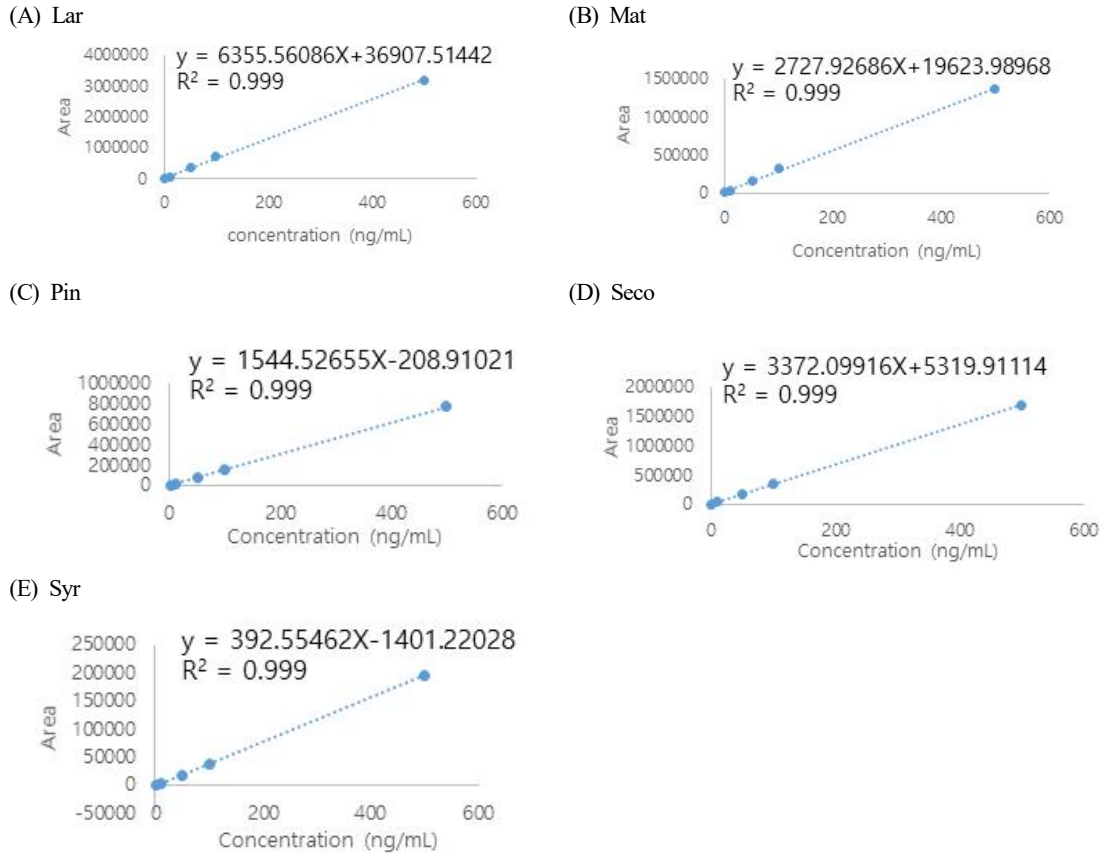


Fig. 2. Calibration curves of lignan standards (A; Lar, B; Mat, C; Pin, D; Seco, E; Syr).

Table 2. LOD and LOQ of lignans

Analytes	LOD ¹⁾ ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	LOQ ²⁾ ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
Seco	0.131	0.278
Mat	0.040	0.114
Lar	0.152	0.387
Pin	0.184	0.508
Syr	0.765	1.532

¹⁾ LOD: Limit of detection.

²⁾ LOQ: Limit of quantitation.

3. 정밀성

본 연구에 사용한 주요 리그난 5종의 동시분석법에 대한 정밀성을 평가하기 위하여 개별포장된 시판 흑임자 가루를 이용하여 반복성 및 재현성을 평가하였다 (Table 3). 반복성을 평가하기 위하여 흑임자 가루를 동일한 날 5회 추출하여 분석을 실시하였다. 그 결과 모든 리그난 성분의 상대표준편차%(relative standard deviation%, RSD%)는 모두 5% 이하로 나타났다. 리그난 성분이 시료 100 g 당 527 μg 인 Pin과 249

μg 인 Mat의 반복성을 측정된 결과 RSD는 각각 0.752% 및 2.913%였다. 또한 86 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 의 함량을 나타낸 Lar의 RSD는 2.255%였으며, 약 4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 의 함량을 나타낸 Seco와 Syr의 RSD는 각각 2.391% 및 4.094%였다. AOAC(2016) 가이드라인에 따르면 1,000 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 의 농도인 성분의 허용 반복성은 6%로 제시하며, 100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 의 농도인 경우는 8%, 10 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 의 농도인 경우는 15%의 RSD를 수용가능한 범위로 제시하고 있다.

Table 3. Repeatability and reproducibility of LC-MS/MS analysis for lignans

Sample	Analytes	Lignans ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$)			
		Repeatability ¹⁾		Reproducibility ²⁾	
		Mean \pm S.D.	RSD (%)	Mean \pm S.D.	RSD (%)
Roasted black sesame	Lar	86.726 \pm 1.956	2.255	87.420 \pm 0.869	0.995
	Mat	249.099 \pm 7.257	2.913	245.767 \pm 3.332	1.356
	Pin	527.138 \pm 3.963	0.752	526.854 \pm 0.369	0.070
	Seco	4.151 \pm 0.099	2.391	4.211 \pm 0.157	3.732
	Syr	4.095 \pm 0.168	4.094	4.173 \pm 0.094	2.254
Total	876.306 \pm 11.097	1.266	868.425 \pm 3.286	0.378	

¹⁾ Repeatability refers to the results of 5 independent determinations carried out for the same sample on the same day.

²⁾ Reproducibility refers to the results of 5 independent determinations carried out on a sample by analyzing 3 replicates of the sample at each day for 5 days.

리그난의 재현성 또한 모든 성분이 5% 이하의 매우 우수한 재현성을 나타내었다. 분석결과 Mat와 Pin에 대한 재현성은 각각의 RSD%가 1.356%와 0.070%였다. 또한 Lar의 RSD%는 0.995%, Seco와 Syr는 각각 3.732% 및 2.254%로 나타났다. AOAC(2016) 가이드라인에서는 재현성이 확보된 RSD%의 수용 범위를 1,000 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 수준에서는 11%, 100 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 의 농도인 경우에는 16%, 10 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 수준에서는 32%로 제시하고 있다. 본 연구의 반복성과 재현성의 결과는 모두 AOAC에서 제시하는 수준보다 낮은 값이었고, 본 분석법의 정밀성은 매우 우수한 것으로 판단되었다.

4. 정확성

본 연구에서 사용된 리그난 분석법에 대한 유효성 검증을 위해 AOAC(2016)의 실험실 분석법 검증 가이드라인을 참고하여 각 리그난의 회수율을 구해 분석법의 정확성을 검증하였다. 회수율을 구하기 위하여 각 리그난 표준품을 흑임자 시료에 소량 첨가하여 리그난 성분의 회수율을 구하였다 (Table 4). 본 연구에서 모든 리그난의 회수율은 90.588~109.053%의 범위로 나타났다. 식품 중 성분의 함량이 100 ng/mL 이상인 Mat와 Pin의 회수율은 각각 94.529%와 104.530%였다. 또한 10~100 ng/mL의 범위의 함량인 Lar의 경우 회수율은 90.588%이었고, 10 ng/mL 미만의 함량인 Seco와 Syr의 회수율은 각각 104.221%와 109.053%로 나타났다. 이는 식품에 함유된 리그난을 추출하는 과정에서 리그난의 손실이 거의 일어나지 않는다는 것을 나타낸다. LC-MS/MS를 이용하여 리그난을 정량분석한 이전 연구에서도 Mat, Seco, Lar와 같은 성분의 경우 곡물에서 표준품을 소량첨가하였을 때 회수율이 83~109%의 범위로 나타나 본 연구의 회수율과 유사하였다(Nørskov & Knudsen 2016). 또한, AOAC(2016) 가이드라인에서는 시료에 함유된 분석 성분의 농도에 따른 허용 범위를

제시하고 있다. 그에 따르면 분석 성분의 농도가 약 1 mg/100 g ($\approx 10 \text{ ng/mL}$)인 경우 정확도가 확보된 회수율의 수용범위는 80~115%로 제시하며, 분석 성분의 농도가 1 $\mu\text{g/g}$ 인 경우에는 75~120%를, 분석 성분의 농도가 약 1 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ($\approx 0.01 \text{ ng/mL}$)인 경우에는 70~125%를 허용 가능한 회수율로 제시하고 있다. 따라서 본 연구 결과는 AOAC(2016) 가이드라인에서 제시하는 수용가능한 회수율 범위를 나타냄을 확인하였다. 그러나 식품을 추출하여 성분을 분석하는 경우, 시료의 기질, 전처리 과정, 분석자 및 분석기기의 오차로 인하여 분석 결과에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 높은 정확성을 요구하는 측정방법일수록 측정불확도에 대한 정보가 제시될 필요가 있다. 측정불확도는 분석법 검증 방법 중 하나로, 측정값에 영향을 미치는 값의 분산 상태를 특성화한 파라미터를 의미하며 측정 결과의 신뢰 수준을 나타내는 정량적인 지표로 이용되고 있다(Ok 등 2009). 그러므로 분석결과와 신뢰성을 높이기 위해서는 본 분석법의 측정불확도에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 판단된다.

5. 종자류 식품에 함유된 리그난 함량

종자류 식품에 함유된 주요 리그난의 함량을 알아본 결과는 Table 5에 나타내었다. 볶은 흑임자 분말에는 Pin의 함량이 526.437 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 으로 가장 많이 함유되어있었으며, Mat의 함량(245.766 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$)이 두 번째로 높았다. 그 다음으로는 Lar가 88.395 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$, Seco와 Syr가 각각 4.390 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$, 4.277 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 으로 가장 낮게 검출되었다. 볶은 원두커피에서는 Syr, Seco, Lar만 검출되었고, Pin과 Mat는 검출되지 않았다. 본 연구에서 알아본 볶은 커피에는 Syr가 94.320 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 으로 가장 많이 함유되어 있었고, Seco와 Lar의 함량은 각각 5.736 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 과 5.647 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 이었다. 또한 귀리에서는 Syr가 68.642 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 으로 가장 많이 함유되어 있었고,

Table 4. Accuracy of LC-MS/MS analysis for lignans

Sample	Analytes	Unspiked conc. (ng/mL)	Spiked conc. (ng/mL)	Observed conc. (ng/mL)	Recovery (%)	RSD ¹⁾ (%)
Roasted black sesame	Lar	89.521±0.688	80	153.123±1.271	90.588	2.626
	Mat	243.336±0.219	200	408.776±8.471	94.529	0.154
	Pin	527.069±19.477	400	893.552±17.684	104.530	0.059
	Seco	4.166±0.279	5	8.865±0.155	104.221	0.467
	Syr	4.013±0.063	5	8.947±0.052	109.053	2.471

¹⁾ RSD: Relative standard deviation.

Table 5. Main lignan contents in selected edible seeds

(µg/100 g)

Lignan	Roasted black sesame	Roasted coffee bean	Oat	Black soy bean
Lar	88.395±0.414	5.647±0.195	4.438±0.223	12.147±0.184
Mat	245.766±5.214	ND ¹⁾	ND	ND
Pin	526.437±10.732	ND	4.845±0.023	58.381±2.986
Seco	4.390±0.111	5.736±0.063	1.041±0.009	3.945±0.043
Syr	4.277±0.072	94.320±3.532	68.642±1.652	92.362±2.946
Total lignan	869.266±10.424	105.702±3.665	78.965±1.889	165.521±3.345

¹⁾ Not detected.

Lar와 Pin의 함량이 각각 4.438 µg/100 g, 4.845 µg/100 g으로 두 번째로 높았다. 그 다음으로 Seco가 1.041 µg/100 g으로 가장 적게 함유되어 있었으며, Mat는 검출되지 않았다. 마지막으로, 서리태의 경우는 Mat를 제외한 나머지 리그난이 모두 검출되었다. 서리태에서는 Syr가 92.362 µg/100 g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, Pin이 58.381 µg/100 g으로 두 번째로 높게 나타났다. 다음으로 Lar와 Seco가 각각 12.147 µg/100 g, 3.945 µg/100 g으로 검출되어 서리태의 총 리그난 함량은 165.521 µg/100 g이었다. 본 연구에서 분석한 볶은 흑임자 분말의 주요 리그난의 총 함량은 869.266 µg/100 g으로 나타났으며, 이는 기존에 보고된 흑임자의 주요 리그난의 함량과는 차이가 나는 것으로 나타났다. Gerstenmeyer 등(2013)은 참깨 및 흑임자의 Lar, Pin, 7-OH-Mat의 함량이 참깨의 경우 Lar는 2,870~4,250 µg/100 g, Pin은 40,550~42,880 µg/100 g, 7-OH-Mat는 검출되지 않는 것으로 보고하였고, 흑임자에 함유된 Lar는 2,990 µg/100 g, Pin은 31,050 µg/100 g, 7-OH-Mat는 7,990 µg/100 g으로 보고하였다. 이전 연구에 따르면 참깨, 흑임자, 호밀 등을 로스팅하는 경우, 로스팅 온도와 시간에 의하여 대부분의 리그난은 그 함량이 매우 감소하는 것으로 알려져 있다. Wu WH(2007)의 연구에서는 참기름에 다량 존재하는 리그난인 sesamol과 sesamol이 200°C 이상의 온도에서 로스팅을 한 경우에는 최대 약 96%까지 그 함량이 감소하는 것으로 나타나 있다. 뿐만 아니라, Gerstenmeyer 등(2013)이

연구한 결과에 따르면 참깨 및 흑임자를 100°C에서 로스팅한 경우 리그난의 분해가 일어나지 않으나, 온도가 200°C 및 250°C로 증가할수록 Seco, Lar, Pin과 같은 형태의 리그난이 상당량 분해되는 것으로 보고되어 있다. 특히, 250°C의 온도에서 10분간 로스팅을 하면 Pin과 함량이 70% 가량 감소하며, 그 이상의 시간에서는 파괴로 인하여 검출되지 않았다(Gerstenmeyer 등 2013). 따라서, 본 연구에서 분석한 볶은 흑임자 가루의 Seco, Lar, Pin과 같은 리그난 함량과 기존에 보고된 흑임자 또는 참깨의 그 함량과 차이가 나는 것은 흑임자를 로스팅하면서 겪는 열처리에 의한 것으로 생각된다. 또한, 이전 연구에 따르면 커피의 품종과 재배 지역에 따른 리그난의 종류와 함량은 매우 차이가 큰 것으로 나타나 있다(Angeloni 등 2020). 이들의 연구에서는 시중에서 판매하는 로스팅 된 원두, 캡슐커피, 원두 가루 등 30종의 커피에 함유된 3종의 리그난(Seco, Mat, Lar)을 분석하였으며, 모든 커피에서 Mat는 검출되지 않았고 Seco와 Lar만 검출되었다. 동일한 연구에서 커피의 총 리그난 함량은 11.77~32.64 µg/100 g으로 나타나 본 연구에서 분석한 커피의 Seco 및 Lar의 총 함량(11.383 µg/100 g)과 유사하였다. 다른 연구에서도 커피의 Seco, Lar, Pin의 함량을 분석한 결과, 리그난 함량을 18.7~31.3 µg/100 g으로 보고하고 있다(Milder 등 2005). 귀리의 경우에도 품종 및 재배지역에 따른 리그난의 조성 및 함량의 차이가 매우 크게 나타나 있다(Durazzo 등 2013). Rothwell

등(2013)의 연구에서도 귀리에 함유된 리그난 중 Syr의 함량이 가장 높은 것으로 나타나 있으며, Lar의 함량이 두 번째로 높은 것으로 나타나 있다. 서리태의 리그난 함량은 이전 연구에서 찾을 수 없었으나, 대두의 리그난을 분석한 결과 (Rothwell 등 2013)에 따르면 대두의 가공 방법과 조리 상태에 따라 함유된 리그난의 종류와 함량이 크게 달라지는 것을 알 수 있었다. 이와 같이 서리태에 함유된 리그난의 종류와 함량도 기존에 보고된 대두에 함유된 리그난의 함량과 차이가 날 것으로 판단된다. 본 연구에서는 종자 식품에 함유된 주요 리그난의 함량을 알아보았으며, 본 연구에서 사용한 방법은 종자류 식품에 존재하는 리그난의 함량을 분석하기에 적합한 방법으로 판단된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 식품 중 함유된 주요 리그난 5종에 대한 동시분석법을 연구하였다. 리그난의 동시분석법을 검증하고자 볶은 흑임자 분말을 이용하여 선택성, 직선성, 정량한계, 검출한계, 정밀성 및 정확성을 확인하였다. LC-MS/MS를 활용하여 5종의 리그난 표준물질을 분석한 결과, 각 물질의 머무름 시간이 Lar는 3.39분, Mat는 4.05분, Pin은 3.83분, Seco는 3.25분, Syr는 3.75분대에 나타나 물질 간의 간섭없이 선택적으로 분리된 것을 확인하였으며, 볶음 흑임자 분말 추출물에서의 표준물질의 머무름 시간과 일치하는 것을 확인하였다. 또한 리그난 표준물질의 직선성을 확인하기 위해 각 표준물질을 혼합하여 검량선을 작성하였고, 모든 물질의 상관계수가 0.999 이상으로 나타나 직선성이 우수한 것을 확인하였다. 리그난 표준물질 5종류의 LOD는 0.040~0.765 µg/100 g, LOQ는 0.114~1.532 µg/100 g 수준으로 나타나, 본 연구의 분석방법은 식품에 미량 수준으로 함유된 리그난의 정량분석이 가능한 것을 확인할 수 있었다. 리그난의 동시분석법에 대한 정밀성 확인을 위해 볶은 흑임자 분말 추출물을 이용하여 반복성 및 재현성을 평가하였다. 그 결과 리그난의 반복성과 재현성은 각각 0.752~4.094%, 0.070~3.732% 수준으로 모든 성분의 상대표준편차%가 5% 이하로 나타났다. 본 연구에서는 리그난 5종의 동시분석법을 이용하여 종자류 식품에 함유된 리그난의 함량을 분석하여, 볶은 흑임자 분말의 총 리그난 함량은 869.266 µg/100 g, 볶은 원두커피는 105.702 µg/100 g, 귀리와 서리태는 각각 78.965 µg/100 g, 165.521 µg/100 g으로 나타났다. 본 연구는 식품에 함유된 5종의 리그난을 동시분석하기 위한 분석법을 연구하였으며 이는 우리나라 농식품 자원에 함유된 리그난 함량정보를 구축하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 정확한 리그난 함량 정보를 구축하기 위하여는 추후 식품의 매트릭스 별 리그난 추출

법에 대한 분석법 연구 및 측정불확도에 대한 연구가 보완되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ0170702022) 및 교육부의 재원으로 한국기초과학지원연구원 국가연구시설장비진흥센터의 지원(201900980004)을 받아 수행되었고, 부산광역시 및 (재)부산인재평생교육진흥원의 BB21플러스 사업에 의하여 지원되었습니다.

References

- Adlercreutz H, Mazur W. 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29:95-120
- Angeloni S, Navarini L, Khamitova G, Sagratini G, Vittori S, Caprioli G. 2020. Quantification of lignans in 30 ground coffee samples and evaluation of their extraction yield in espresso coffee by HPLC-MS/MS triple quadrupole. *Int J Food Sci Nutr* 71:193-200
- AOAC 2016. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Association of Official Analytical Communities International
- Cederroth CR, Auger J, Zimmermann C, Eustache F, Nef S. 2010. Soy, phyto-oestrogens and male reproductive function: A review. *Int J Androl* 33:304-316
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I. 2004. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* 65:995-1016
- Deng X, Chen X, Cheng W, Shen Z, Bi K. 2008. Simultaneous LC-MS quantification of 15 lignans in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. fruit. *Chromatographia* 67:559-566
- Durazzo A, Zaccaria M, Polito A, Maiani G, Carcea M. 2013. Lignan content in cereals, buckwheat and derived foods. *Foods* 2:53-63
- Gerstenmeyer E, Reimer S, Berghofer E, Schwartz H, Sontag G. 2013. Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. *Food Chem* 138:1847-1855
- Heinonen S, Nurmi T, Liukkonen K, Poutanen K, Wähälä K, Deyama T, Nishibe S, Adlercreutz H. 2001. *In vitro* metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J Agric Food Chem* 49:3178-3186
- Jang WH, Lee WY, Lee BJ, Kim JM, Park SJ. 2019. Validation of simultaneous analysis method of standard compounds in

- fermented *Kalopanax pictus* Nakai by bioconversion. *Korean J Food Nutr* 32:148-154
- Jung TD, Kim JM, Choi SI, Choi SH, Cho BY, Lee JH, Lee SJ, Park SJ, Heo IY, Lee OH. 2017. Method validation for determination of lignan content in fermented sesame by bioconversion. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 46:646-652
- Kang MH, Naito M, Sakai K, Uchida K, Osawa T. 1999. Mode of action of sesame lignans in protecting low density lipoprotein against oxidative damage *in vitro*. *Life Sci* 66: 161-171
- Levis S, Strickman-Stein N, Doerge DR, Krischer J. 2010. Design and baseline characteristics of the soy phytoestrogens as replacement estrogen (SPARE) study – A clinical trial of the effects of soy isoflavones in menopausal women. *Contemp Clin Trials* 31:293-302
- Mazur WM, Wähälä K, Rasku S, Salakka A, Hase T, Adlercreutz H. 1998. Lignan and isoflavonoid concentrations in tea and coffee. *Br J Nutr* 79:37-45
- Milder IEJ, Arts ICW, van de Putte B, Venema DP, Hollman PCH. 2005. Lignan contents of Dutch plant foods: A database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr* 93:393-402
- Milder IEJ, Arts ICW, Venema DP, Lasaroms JJP, Wähälä K, Hollman PCH. 2004. Optimization of a liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods. *J Agric Food Chem* 52:4643-4651
- Nørskov NP, Knudsen KEB. 2016. Validated LC-MS/MS method for the quantification of free and bound lignans in cereal-based diets and feces. *J Agric Food Chem* 64:8343-8351
- Ok HE, Chang HJ, Ahn JH, Cho JY, Chun HS. 2009. Estimation of measurement uncertainty for the HPLC analysis of deoxynivalenol in wheat. *Korean J Food Sci Technol* 41: 258-264
- Penttinen P, Jaehrling J, Damdimopoulos AE, Inzunza J, Lemmen JG, van der Saag P, Pettersson K, Gauglitz G, Mäkelä S, Pongratz I. 2007. Diet-derived polyphenol metabolite enterolactone is a tissue-specific estrogen receptor activator. *Endocrinology* 148:4875-4886
- Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P, McCullough ML. 2010. Dietary lignans: Physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr Rev* 68:571-603
- Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remón A, M'hiri N, García-Lobato P, Manach C, Knox K, Eisner R, Wishart DS, Scalbert A. 2013. Phenol-Explorer 3.0: A major update of the phenol-explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database* 2013:bat070
- Saadati N, Abdullah MP, Zakaria Z, Sany SBT, Rezayi M, Hassonizadeh H. 2013. Limit of detection and limit of quantification development procedures for organochlorine pesticides analysis in water and sediment matrices. *Chem Cent J* 7:63
- Schwartz H, Sontag G. 2011. Analysis of lignans in food samples-impact of sample preparation. *Curr Bioact Compd* 7:156-171
- Setchell KD. 1998. Phytoestrogens: The biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 68:1333S-1346S
- Smeds AI, Eklund PC, Sjöholm RE, Willför SM, Nishibe S, Deyama T, Holmbom BR. 2007. Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds, and nuts. *J Agric Food Chem* 55:1337-1346
- Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. 2006. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr Cancer* 54:184-201
- Wu WH. 2007. The contents of lignans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating. *Food Chem* 104:341-344

Received 25 November, 2022

Revised 06 December, 2022

Accepted 13 December, 2022