

검정콩 함유 안토시아닌의 동시분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건

정명근[†]

강원대학교 생약자원개발학과

Optimal HPLC Condition for Simultaneous Determination of Anthocyanins in Black Soybean Seed Coats

Myoung-Gun Choung[†]

Dept. of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea

ABSTRACT Black soybean has been widely utilized as foods and oriental medicinal materials. The pigmentation in the seed coat of black soybean is due to accumulate anthocyanins in the epidermis palisade layer. The anthocyanins of black soybean seed coat are considered as a parameter of quality evaluation of black soybean. Therefore, the purpose of this study was to investigate the most suitable HPLC condition for simultaneous determination of anthocyanins in black soybean seed coats extracts. The efficient HPLC analytical condition of D3G, C3G, and Pt3G contained extracts of black soybean seed coats was developed. The gradient elution employed a 250 mm × 4.6 mm i.d. YMC-pak ODS-AM 303 column. The gradient system was used two mobile phases. A gradient elution was performed with mobile phase A, consisting of 5% aqueous formic acid, and mobile phase B, comprising 5% formic acid - acetonitrile, and delivered at a flow rate of 0.7 mL/min as follows: 0~35 min, 90% A ~ 60% A; 36 min, 90% A; 46 min, 90% A. The UV-VIS. detection wavelength was set at 520 nm. The limit of detection (LOD) for D3G, C3G, and Pt3G were under 10 ng/mL.

Keywords : black soybean, anthocyanin, HPLC, simultaneous determination, limit of detection

콩은 예로부터 우리민족의 단백질 보충식품으로 이용되어 왔으며, 전분작물인 쌀에 부족한 필수 아미노산의 보충 및 다양한 영양급원으로 중요한 역할을 하였다(Joo *et al.*, 2004c). 특히 검정콩은 종피에 함유된 특유의 안토시아닌 색소로 인해 시각적 식미감을 증대시켜 밥밀콩, 콩자반, 콩강

정, 떡소용 등으로 이용되어 왔으며(Oh *et al.*, 1992; Choung *et al.*, 2008), 과거에는 대두황권, 향시 등으로 가공되어 고방요법 및 한약재의 원료로도 사용이 빈번하였다(Son *et al.*, 2002). 최근에는 검정콩의 관행적 이용 외에도 기능성을 부각시켜 여러 가지 가공제품을 시판 중이며, 국내·외 검정콩을 이용하는 대부분의 음식은 콩을 껍질까지 포함하여 이용하는 것이 특징이다(Son *et al.*, 2002).

최근 합성색소의 유해성이 끊임없이 제기되면서 천연의 원료로부터 얻어지는 식용색소의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 식용색소 중에서 황색 및 적색색소의 사용이 가장 빈번한데 이들 색소 중 합성색소는 인체 위해성이나 발암성 등의 문제점으로 인해 사용이 규제되거나 금지되고 있으므로 향후 적색의 합성색소를 대체할 수 있는 잠재력이 가장 높은 천연의 적색색소는 안토시아닌 색소일 것이다(Choung *et al.*, 2004).

안토시아닌 색소는 식물의 열매, 꽃, 과일, 줄기, 잎, 뿌리 등에 폭넓게 존재하는 적색, 자색, 청색을 나타내는 수용성 flavonoid계 색소이다(Kim *et al.*, 1997). 안토시아닌은 구조적으로 1번 위치에 존재하는 산소의 비공유 전자쌍 중에서 전자 한 개가 2번 위치의 탄소와 공유결합을 하고 있기 때문에 양이온으로 하전 되어 있는데, 이와 같은 화합물을 oxonium 화합물이라 하며, 안토시아닌의 화학적 불안정성은 바로 이 oxonium구조에 기인한 것이다(Son *et al.*, 2002). 안토시아닌 색소는 중성 또는 알칼리성 용액에서 불안정하며, 산성용액이라도 빛에 노출되면 색이 서서히 탈색되는 현상을 나타내어 구조적으로 가장 불안정한 물질 중 하나로 꼽힌다. 특히 색상의 안정성에 영향을 주는 요인으로는 안토시아닌의 화학적 구조, 색소의 농도, 용액의 pH, 온도, 공존색소의 유무, 금속이온, 효소, 산소, ascorbic acid, 당 등을 들 수 있으며, 이들 요인의 차이에 의해 색도의 유지,

[†]Corresponding author: (Phone) +82-33-570-6491
(E-mail) cmg7004@kangwon.ac.kr

<Received May 18, 2008>

즉 구조적 안전성에 차이를 나타낸다(Choung, 2004).

최근 검정콩 종피 함유 안토시아닌에 관한 연구가 일부 수행된 바 있어 검정콩 종피에는 cyanidin-3-glucoside(C3G), delphinidin-3-glucoside(D3G) 및 petunidin-3-glucoside(Pt3G)가 함유된 것으로 보고된 바 있으나(Fig. 1)(Choung *et al.*, 2001), 검정콩 함유 안토시아닌에 관한 대부분의 연구가 안토시아닌의 정성적 특성평가(Kim *et al.*, 2000; Choung *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2007) 및 검정콩의 재배방법 및 처리에 따른 안토시아닌의 함량평가(Joo *et al.*, 2004a & 2004b & 2004c)에 국한되어 있으며, 실제적으로 검정콩 종피 함유 안토시아닌 정량분석의 기본이 되는 분석조건 확립에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 검정콩 품질평가의 한 기준이 되는 안토시아닌의 함량평가를 위한 분석기술 개발의 일환으로 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 분석조건을 확립하여 검정콩 함유 안토시아닌의 작물학적 연구와 검정콩 안토시아닌의 이용도 증진 및 상업적 활용에 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 검정콩은 농촌진흥청 작물과학원 영남 농업연구소 전작물 재배포장에서 2006년 5월 하순 파종하여 농촌진흥청 콩 표준재배법에 따라 재배 후 10월 상순에 수확된 청자콩을 시료로 사용하였다. 수확된 검정콩은 40°C 조건에서 24시간 건조 후 수작업으로 종피를 벗긴 후 배 부분과 종피를 선별하고, 배 부분이 완전히 제거된 종피만을 분석시료로 사용하였다.

검정콩 종피 함유 안토시아닌의 추출에 사용된 용매로서 초순수 증류수는 초순수 제조기(Milli-Q system, USA)에서

비저항값이 18 MΩ 이상으로 제조된 증류수를 사용하였고, 메탄올은 국산 GR 등급을, 염산용액은 일본 화광순약주식회사의 특급시약을 구입하여 사용하였으며, HPLC 이동상 용매로 사용된 acetonitrile(ACN) 및 formic acid는 Merck Inc.(USA)의 HPLC 등급을 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 안토시아닌의 표준물질로서 C3G, D3G 및 Pt3G는 Choung *et al.*(2001)의 방법에 따라 순수분리 한 후 순도검정 및 화학적 구조가 동정된 분리 표준품을 사용하여 분석시료의 머무름시간(Rt.) 및 흡광특성을 검정하였다.

검정콩 안토시아닌 분석을 위한 최적 HPLC 컬럼 선정 및 분석의 재현성 검정을 위해 사용된 검정콩 종피 안토시아닌 추출액은 Choung *et al.*(2008)에 의해 보고된 최적의 추출방법을 이용하였다. 즉 검정콩 종피 0.1 g에 1%HCl - 20%MeOH 용액 30mL를 첨가한 후 상온(25°C)조건에서 12시간 추출하였으며, 추출 후 Whatman No. 2 여과지로 1차 여과를 수행하였고, HPLC 분석 직전 syringe filter(0.45 μm)로 2차 여과를 실시하고 HPLC분석에 사용하였다.

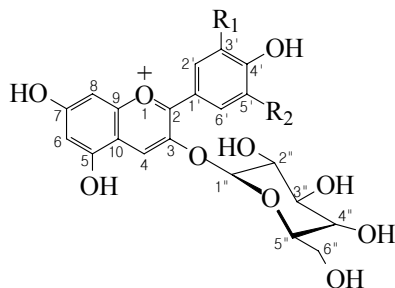
검정콩 종피 함유 안토시아닌 분석에 사용된 HPLC는 Agilent 1200 series(USA)를 사용하였으며, 분석조건 중 유속은 분당 0.7 mL, 컬럼의 온도는 30°C, 시료 주입량을 20 μL로 제한하여 사용하였다. 최적 HPLC 분석 조건 확립을 위해 사용된 분석 컬럼은 Table 1과 같이 C18 및 C8 컬럼 12종을 사용하였고, HPLC 분석에 이용된 이동상 조건은 2상(two phase) 농도구배 조건으로 유기용매로는 5% 포믹산 함유 아세토니트릴을, 수용매는 5% 포믹산 함유 증류수를 사용하여 다양한 선형 농도 구배법으로 분리양상을 검토하였다.

검정콩 종피 함유 안토시아닌 분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건의 최소 검출한계(LOD, Limit of Detection)를 평가하기 위해 검정콩 함유 안토시아닌인 C3G, D3G 및 Pt3G 표준품을 농도별(0.5 ng/mL ~ 1,000 ng/mL)로 조제하여 HPLC 분석을 수행하였다. 최소 검출한계를 확인하기 위한 HPLC 분석조건은 확립된 최적의 HPLC 분석조건과 동일한 조건이었으며, 단지 검출기의 signal 대비 noise 비율(S/N ratio)이 3이 되는 조건에서 농도별 C3G, D3G 및 Pt3G 표준품을 분석하고, 검출되는 peak 양상을 확인하여 최소 검출한계를 조사하였다.

결과 및 고찰

검정콩 함유 안토시아닌 분석을 위한 최적 HPLC 흡광 검출파장 선정

실험에 사용될 검정콩 종피 함유 안토시아닌 색소 3종(D3G, C3G 및 Pt3G)의 표준품을 확보하기 위하여 Choung



Peak	R ₁	R ₂	Anthocyanin
1	OH	OH	D3G (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂)
2	OH	H	C3G (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁)
3	OCH ₃	OH	Pt3G (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂)

Fig. 1. Chemical structures of black soybean anthocyanins.

et al.(2001)의 방법에 따라 C18 open column chromatography를 실시하여 3종의 안토시아닌 색소를 순수하게 분리하였고, 분리된 각 안토시아닌의 구조는 LC-ES/MS로 분자량을 측정하여 구조를 확인하였다(Fig. 2).

검정콩 종피 함유 안토시아닌 색소 3종을 대상으로 각각의 흡광특성을 확인하기 위해 각 30 ppm의 농도를 가진 D3G, C3G 및 Pt3G의 혼합 표준물질을 HPLC를 이용하여 분석하였으며(Fig. 3), 이때 on-line HPLC DAD를 이용하

Table 1. The kinds of HPLC column for establishment of anthocyanin analysis condition in black soybean.

No.	Column	Diameter (mm)	Length (mm)	Particle size (μm)
1	Lichrospher RP-18e	4.6	125	5
2	Waters Nova pak C18	3.9	150	4
3	Zorbax Eclipse XDB C8	4.6	150	5
4	Hamilton PRP-1	4.1	150	5
5	Shiseido Capcell pak C18	4.6	150	5
6	Tosoh ODS-120T	4.6	150	5
7	Zorbax Eclipse XDB C18	4.6	150	3.5
8	Shiseido Capcell pak C18	4.6	250	5
9	Tosoh ODS-120T	4.6	250	5
10	YMC-Pak ODS-AM 303	4.6	250	5
11	Waters Nova pak C18	3.9	300	4
12	Waters μ-Bondapak C18	3.9	300	10

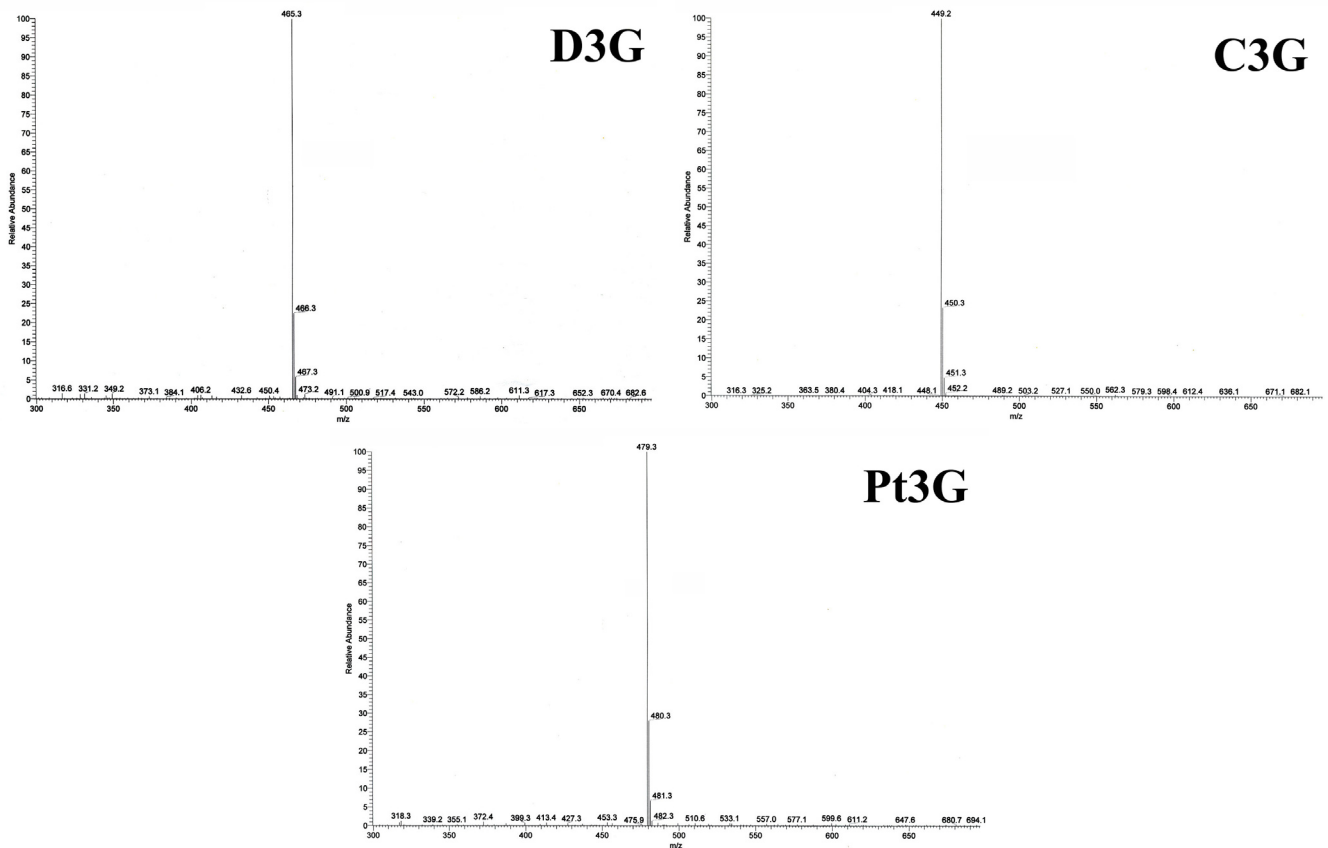


Fig. 2. LC-ES/MS spectra of D3G, C3G, and Pt3G.

여 200~700 nm 범위의 최고 흡광특성을 비교하였다(Fig. 4). 그 결과 각 안토시아닌 별로 서로 다른 파장영역에서 최고의 흡광특성을 나타내어 D3G는 277 nm 및 524 nm를, C3G는 280 nm 및 517 nm, Pt3G는 277 nm 및 527 nm를 나타내었고, 3종의 안토시아닌 모두 자외선 영역에서는 277~

280 nm부근, 가시광선 범위에서는 517~527 nm에서 최고의 흡광영역을 나타내어 각 안토시아닌 별로 서로 다른 파장영역에서 최고의 흡광특성을 나타내는 것으로 조사되었다.

위의 결과에서 검정콩에 함유된 안토시아닌 3종이 모두 서로 다른 흡광영역에서 최고 흡수분광 특성을 나타내므로

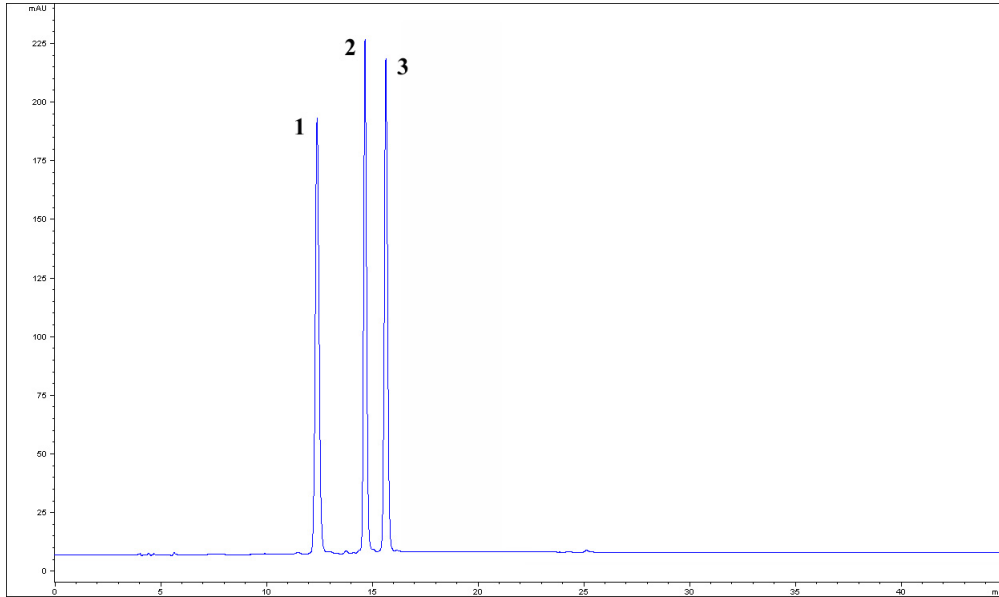


Fig. 3. HPLC chromatogram of 3 anthocyanin standards (peak 1: D3G, peak 2: C3G, and peak 3: Pt3G, each 30 ppm).

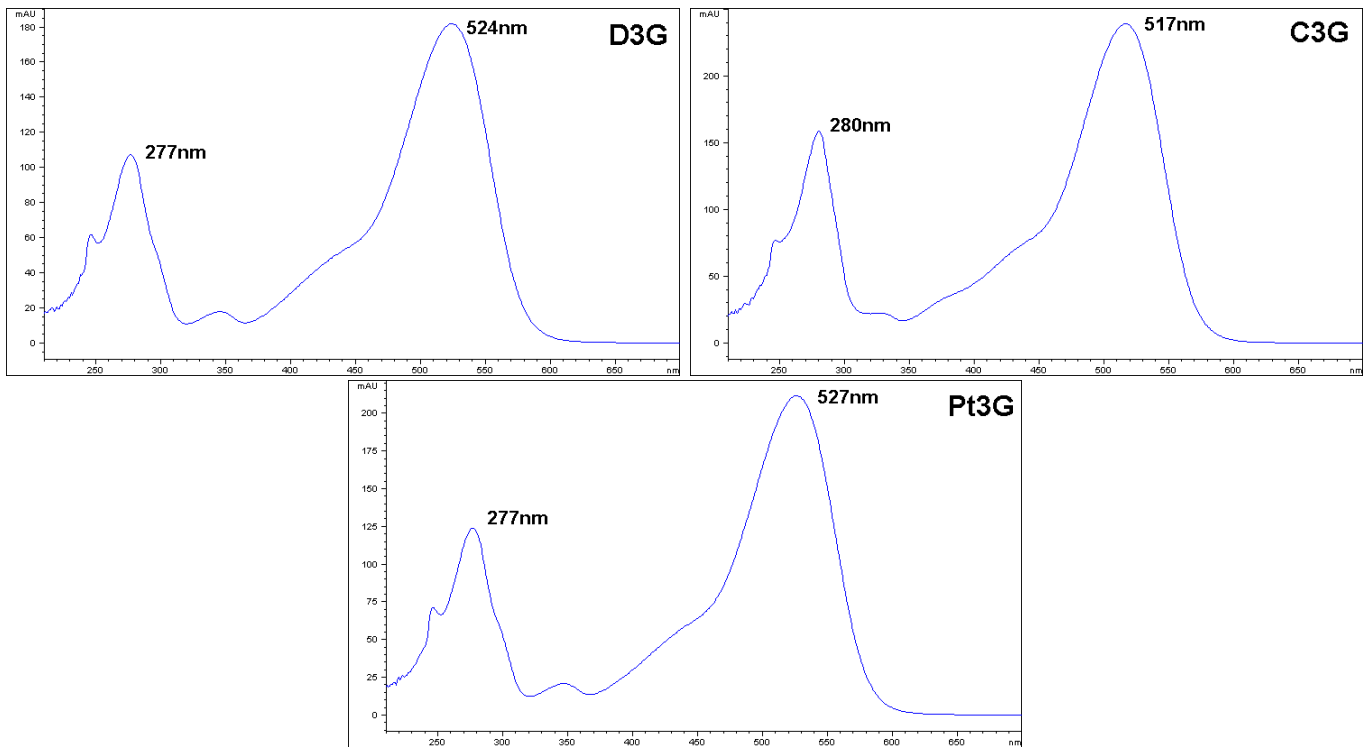


Fig. 4. UV-VIS. spectra of D3G, C3G, and Pt3G.

각 안토시아닌의 검출감도를 동시에 최고로 높일 수 있는 공통된 검출파장을 검토하기 위하여 254 nm의 표준파장 및 500 nm ~ 535 nm까지의 적색영역을 대상으로 각 5 nm범위로 HPLC peak의 감도를 검토하였다. 그 결과 HPLC 크로마토그램상의 비교에서는 차이가 없어 모두 유사한 양상을 나타내지만(Fig. 5), 파장별 상대적 peak height를 비교한 결과 520 nm의 파장이 D3G, C3G 및 Pt3G 모두 상대적

peak 감도가 가장 높은 것으로 조사되어 검정콩 함유 안토시아닌의 HPLC 분석을 위한 최적의 분석파장임을 확인할 수 있었다(Table 2).

검정콩 함유 안토시아닌 동시분석을 위한 최적 HPLC 이동상 선정

검정콩 함유 3종의 안토시아닌을 동시에 정량적으로 분석할 수 있는 최적의 HPLC 분석 이동상 조건을 확립하기 위해 다양한 농도구배 조건으로 분리효율 시험을 실시한 결과 최적의 용매계는 A용매로 5% 포믹산 - 증류수와 B용매로 5% 포믹산 - 아세트니트릴을 사용하는 것이 극성이 높은 D3G부터 상대적으로 극성이 낮은 Pt3G를 포함하여 이들 안토시아닌의 비당체(aglycone)인 안토시아닌(delphinidin, cyanidin 및 petunidin)까지 동시에 분리 할 수 있는 최적의 용매계로 선정되었고, 예비실험에서 분리능이 양호한 것으로 조사된 Tosoh ODS 120T(4.6×250 mm, 5 μm) 컬럼을 대상으로 용매의 농도구배 조건별 분리양상을 검토한 결과 용매 programing 조건을 0분 : 90%A, 35분 : 60%A, 36분 : 90%A, 46분 : 90%A 조건으로 분당 0.7 mL의 유속으로 농도구배 분석(gradient elution)을 실시할 경우 14분 안에 검정콩 함유 3종의 안토시아닌 화합물의 동시분석이 가능하였다(Fig. 6).

Table 2. Comparison on the relative ratio of peak height for D3G, C3G, and Pt3G with different detection wavelength.

Wavelength	Relative ratio of peak height (%)		
	D3G	C3G	Pt3G
254 nm	41	33	34
500 nm	81	89	79
505 nm	74	86	80
510 nm	93	98	92
515 nm	82	92	90
520 nm	100	100	100
525 nm	85	89	95
530 nm	100	92	101
535 nm	81	77	92

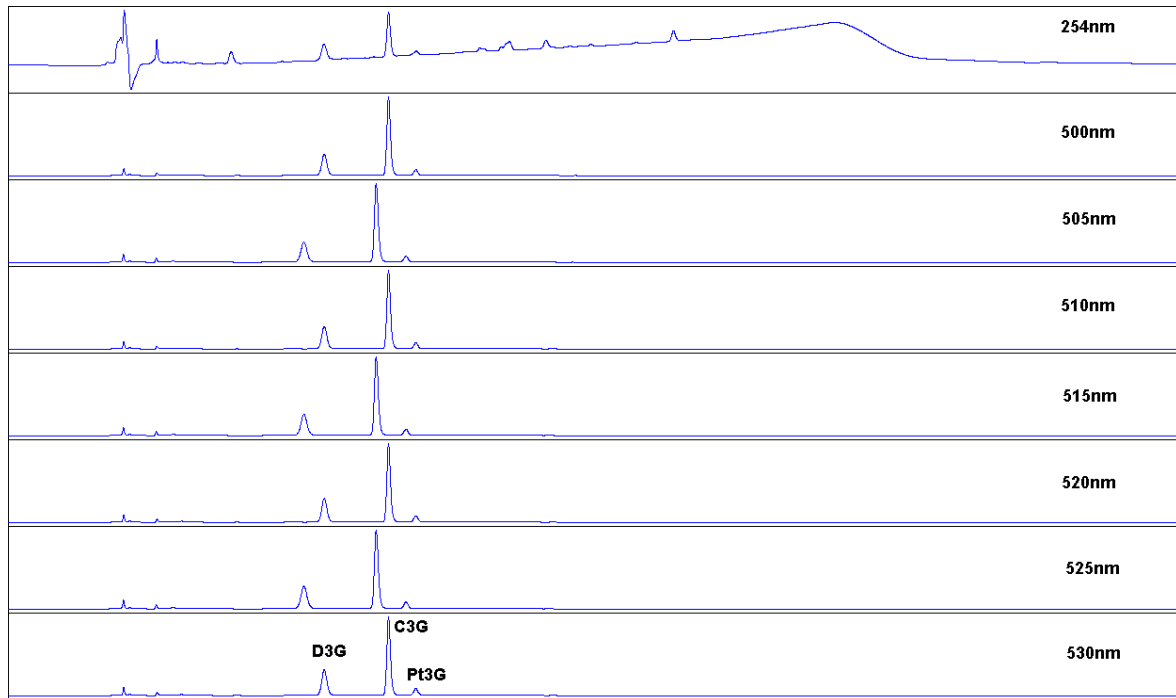


Fig. 5. HPLC chromatograms of anthocyanins in black soybean seed costs with different detection wavelength.

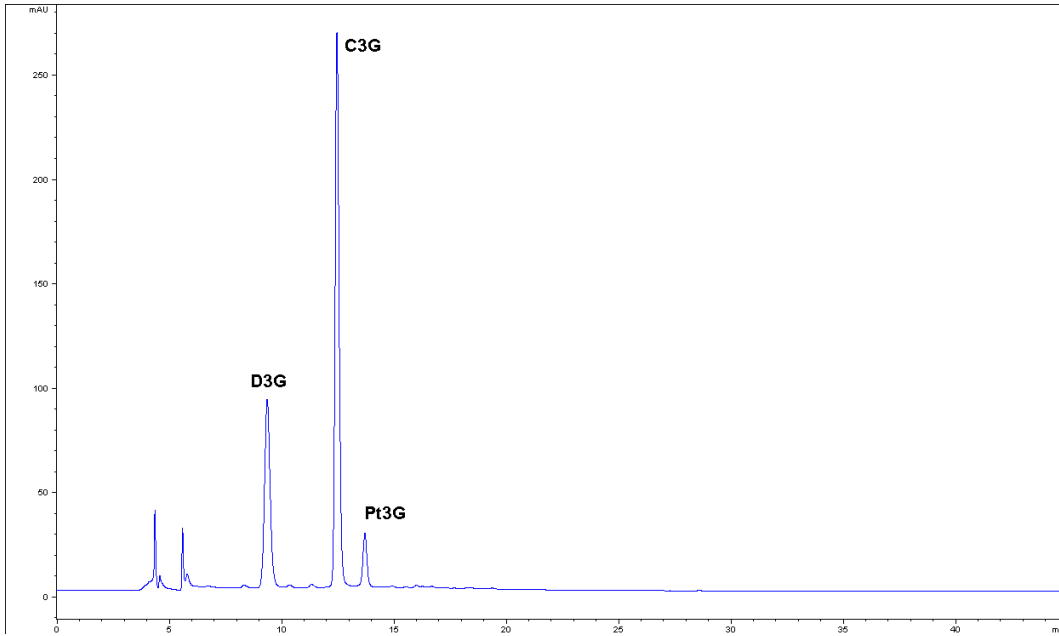


Fig. 6. HPLC chromatogram of black soybean anthocyanin using Tosoh ODS 120T column (4.6×250 mm, 5 μm).

검정콩 함유 안토시아닌 동시분석을 위한 최적 HPLC column 선정

최근 HPLC 분석에 사용빈도가 극히 높은 C18 및 C8 계열의 컬럼 12종을 대상으로 검정콩 함유 3종의 안토시아닌 동시분석을 위해 선발된 최적의 이동상 농도구배 조건을 적용하였을 때, 각 컬럼별 분석 parameter 및 분리효율을 검정

하였다. 그 결과 12종의 컬럼 중 Hamilton PRP-1 및 Zorbax Eclipse XDB C8 컬럼은 3종의 안토시아닌 중 C3G와 Pt3G의 peak가 base line/base line 분리가 되지 않는 양상을 나타내었으며, 또한 Lichrospher RP-18e 및 Waters Nova pak C18을 포함한 몇몇 컬럼은 일부 안토시아닌 peak에서 tailing 현상이 나타나는 것으로 조사되었다(Fig. 7).

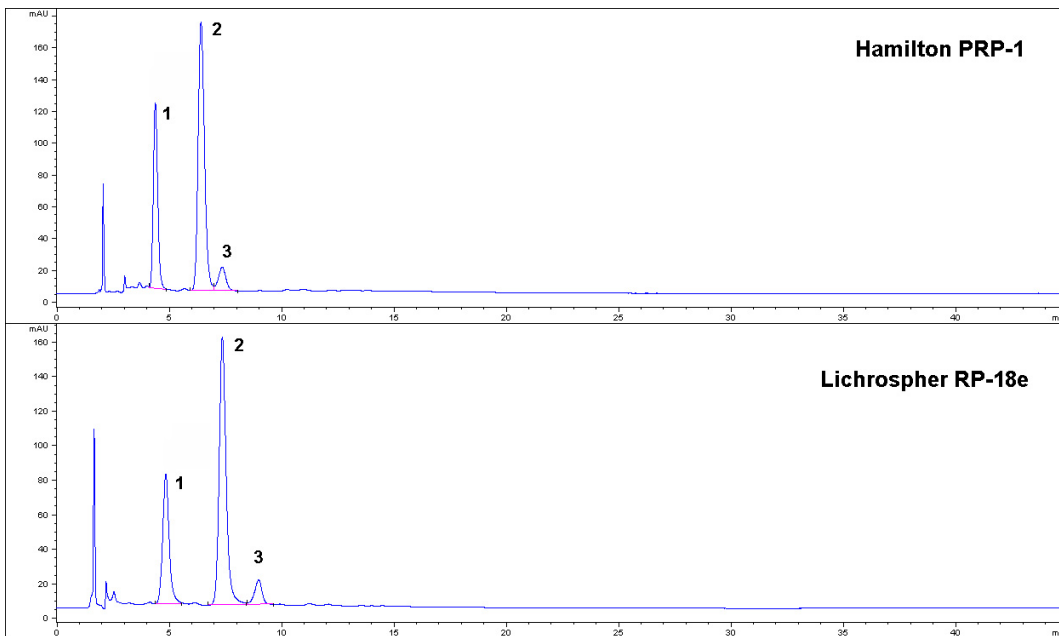


Fig. 7. HPLC chromatogram of black soybean anthocyanin using Hamilton PRP-1 (4.1×150 mm, 5 μm) and Lichrospher RP-18e column (4.6×125 mm, 5 μm).

한편 12종의 컬럼을 이용하여 검정콩 함유 안토시아닌 분석 시 분석이론과 관련된 parameter를 비교한 결과 안토시아닌 peak별 이론단수(No. of theoretical plate), 좌우대칭도(symmetry) 및 분리능(resolution)에는 서로 다른 차이를 나타내었고(Table 3 및 4), 특히 분리 효율에 영향을 미치는 요인들을 상호비교 검토하였을 때 YMC-pak ODS-AM 303 컬럼(4.6×250 mm, 5 μm)이 크로마토그램상의 분리 양상, 분리 parameter의 이론치 비교, C3G 및 Pt3G의 resolution

비교에서도 검정콩 함유 안토시아닌 분석에 가장 우수한 분리능을 나타내는 것으로 조사되었다(Fig. 8).

검정콩 함유 안토시아닌 동시분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건의 재현성 검정 및 최소 검출한계 분석

최적의 분리효율을 나타내었던 YMC-pak ODS-AM 303 컬럼을 이용한 HPLC 분석 조건에서 동일 시료를 10번 계속 반복하여 분석하였을 때, HPLC 분석요인에 대한 재현

Table 3. Comparison on separation efficiency with different HPLC columns based on D3G.

Column	Length (mm)	Rt. (min)	N	HEPT	As	Resolution D3G : C3G
Lichrospher RP-18e	125	4.83	4,091	0.0306	0.872	8
Nova pak C18	150	4.65	6,345	0.0236	0.887	8
Eclipse XDB C8	150	3.69	11,099	0.0135	0.933	8
Hamilton PRP-1	150	4.36	6,916	0.0217	0.811	8
Shiseido Capcell pak C18	150	5.44	10,230	0.0147	0.881	10
Tosoh ODS-120T	150	7.72	8,785	0.0171	1.298	9
Eclipse XDB C18	150	4.36	12,715	0.0118	0.863	11
Shiseido Capcell pak C18	250	8.83	16,970	0.0147	0.940	12
Tosoh ODS-120T	250	9.34	5,059	0.0494	0.872	14
YMC ODS AM 303	250	12.01	54,631	0.0046	0.968	13
Nova pak C18	300	8.29	13,749	0.0218	0.769	11
μ-Bondapak C18	300	10.08	9,707	0.0309	0.876	6

Rt.: Retention time, N: No. of theoretical plate, HEPT: Height equivalent to a theoretical plate, As: Peak asymmetric

Table 4. Comparison on separation efficiency with different HPLC columns based on Pt3G.

Column	Length (mm)	Rt. (min)	N	HEPT	As	Resolution C3G : Pt3G
Lichrospher RP-18e	125	8.96	11,981	0.0104	1.130	5
Nova pak C18	150	8.52	11,355	0.0132	1.107	6
Eclipse XDB C8	150	5.91	7,376	0.0203	1.144	4
Hamilton PRP-1	150	7.34	6,707	0.0224	1.001	3
Shiseido Capcell pak C18	150	9.31	20,263	0.0074	1.097	7
Tosoh ODS-120T	150	11.84	30,267	0.0050	1.370	5
Eclipse XDB C18	150	7.84	13,973	0.0107	1.157	7
Shiseido Capcell pak C18	250	12.96	76,804	0.0038	1.038	8
Tosoh ODS-120T	250	13.69	81,696	0.0031	0.991	7
YMC ODS AM 303	250	15.57	145,952	0.0017	0.967	8
Nova pak C18	300	12.54	45,050	0.0067	0.922	7
μ-Bondapak C18	300	13.83	27,781	0.0108	0.924	5

Rt.: Retention time, N: No. of theoretical plate, HEPT: Height equivalent to a theoretical plate, As: Peak asymmetric

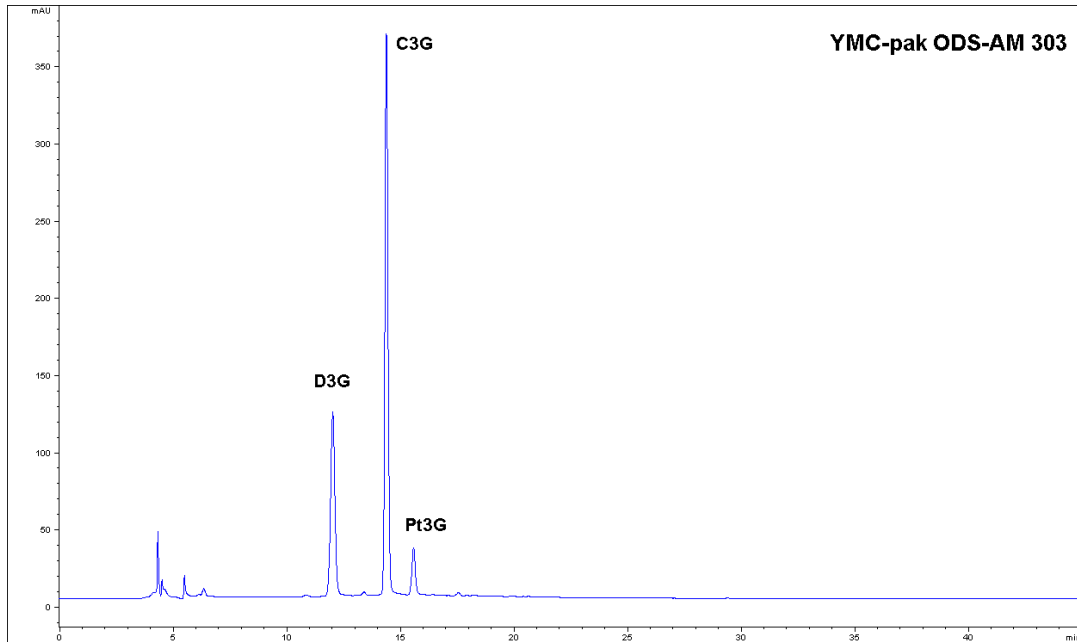


Fig. 8. HPLC chromatogram of black soybean anthocyanin using YMC-pak ODS-AM 303 column (4.6×250 mm, 5 μm).

성을 검정하였다(Table 5 및 Fig. 9). 그 결과 3종의 검정콩 안토시아닌 모두 머무름시간(Rt.)의 변이계수는 최대 1.24%, peak height의 변이계수는 최대 2.04%, peak area의 변이계수는 최대 0.21% 미만을 나타내므로 확립된 검정콩 함유 안토시아닌 동시분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건은 극히

높은 분석 재현성을 나타내었고, 특히 검정콩에 함유된 안토시아닌을 동일조건에서 분석할 때 peak height의 변이계수가 peak area의 변이계수보다 약 10배의 높은 변이율을 나타내므로 검정콩의 안토시아닌 정량분석 시 peak area를 이용하여 함량을 계산하는 것이 더욱 높은 정확도를 나타내

Table 5. Reproduction test of retention time, peak height, and peak area at optimum HPLC condition (n = 10).

No.	Rt. (min)			Peak height			Peak area		
	D3G	C3G	Pt3G	D3G	C3G	Pt3G	D3G	C3G	Pt3G
1	9.754	12.866	14.134	90.90	279.00	25.60	29.934	64.012	6.054
2	9.847	12.986	14.251	89.30	282.40	26.00	30.022	63.924	6.054
3	9.979	13.055	14.368	91.20	287.40	26.30	30.076	63.881	6.042
4	9.830	12.852	14.083	93.30	288.30	26.20	29.972	63.999	6.029
5	9.889	12.985	14.091	91.40	296.00	26.70	30.109	63.828	6.063
6	9.843	12.854	14.078	93.40	288.30	26.40	30.005	63.97	6.026
7	9.966	13.002	14.338	90.80	285.40	26.50	30.061	63.884	6.055
8	10.069	13.216	14.485	93.80	286.70	27.60	30.068	63.873	6.058
9	10.034	13.159	14.392	89.30	292.60	26.20	30.035	63.929	6.037
10	9.722	12.673	14.108	90.70	298.30	26.80	30.029	63.916	6.054
Min.	9.72	12.67	14.08	89.30	279.00	25.60	29.93	63.83	6.03
Max.	10.07	13.22	14.49	93.80	298.30	27.60	30.11	64.01	6.06
Mean	9.89	12.96	14.23	91.41	288.44	26.43	30.03	63.92	6.05
SD	0.12	0.16	0.15	1.61	5.88	0.54	0.05	0.06	0.01
CV	1.17	1.24	1.07	1.76	2.04	2.03	0.17	0.09	0.21

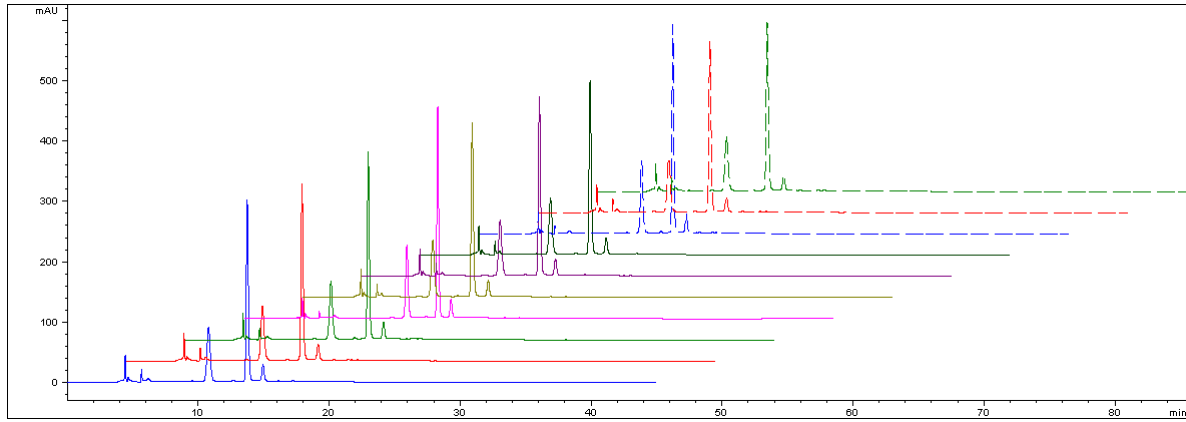


Fig. 9. Comparison on HPLC chromatograms for reproduction test (n = 10).

는 것으로 평가된다.

한편 확립된 최적 HPLC 분석조건에서 검정콩 종피 안토시아닌 색소를 분석하였을 때 분석 가능한 최소검출한계 (LOD, Limit of Detection)를 설정하기 위해 3종의 검정콩 종피 함유 안토시아닌 색소 표준품을 농도별(0.5 ng/mL ~ 1,000 ng/mL)로 가공하고 검출기의 signal/noise ratio = 3인 조건에서 최소 검출한계를 조사한 결과 3종의 검정콩 종피 안토시아닌 색소 모두 최소 10 ppb(0.01 ppm, 10 ng/mL) 이하에서도 완벽하게 검출되는 양상을 나타내므로, 상기 실험에서 확립된 최적의 HPLC 분석조건은 검정콩 함유 안토시아닌의 작물학적 특성 평가용으로 활용하기에 전혀 무리가 없는 분석법으로 판단된다.

적 요

검정콩 품질평가의 한 기준이 되는 안토시아닌의 함량평가를 위한 분석기술 개발의 일환으로 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 최적 HPLC 분석조건을 확립하여 검정콩 함유 안토시아닌의 작물학적 연구와 검정콩 함유 안토시아닌의 이용도 증진 및 상업적 활용에 기초 자료를 제공하고, 검정콩에 함유된 3종의 안토시아닌 성분을 동시에 분석할 수 있고, 재현성 및 검출 감도가 증진된 최적의 HPLC 분석 조건을 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 검정콩에 함유된 3종의 안토시아닌 D3G, C3G 및 Pt3G를 동시에 분석할 수 있는 최적의 HPLC 분석 조건을 검토한 결과 컬럼은 YMC-pak ODS-AM 303(4.6×250 mm, 5 μm) 컬럼을 이용하고, 검출파장은 520 nm, 컬럼온도를 30°C, 분당유속은 0.7 mL, 이동상 용매로는 A용매로 5% 포믹산 - 증류수, B용매로 5% 포믹산 - 아세토니트릴을 사용하여 농

도구배 조건으로 분석하는 것이 가장 분리능이 향상된 효율적 분석법으로 조사되었다.

2. 검정콩에 함유된 3종의 안토시아닌 D3G, C3G 및 Pt3G를 동시에 분석할 수 있는 최적 HPLC 분석 조건의 재현성 검정을 실시한 결과 머무름시간(Rt.)의 변이계수는 최대 1.24%, peak height의 변이계수는 최대 2.04%, peak area의 변이계수는 최대 0.21% 미만을 나타내므로 확립된 검정콩 함유 안토시아닌 동시분석을 위한 최적 HPLC 분석 조건은 극히 높은 분석 재현성을 나타내었다.

3. 확립된 최적 HPLC 분석조건인 최소 검출한계(LOD, Limit of Detection)를 평가하기 위해 검출기의 signal/noise ratio = 3인 조건에서 최소 검출한계를 조사한 결과 3종의 검정콩 종피 함유 안토시아닌 색소의 최소 검출한계는 최소 10 ppb(0.01 ppm, 10 ng/mL) 이하에서도 완벽하게 검출되는 양상을 나타내므로 확립된 최적의 HPLC 분석조건은 검정콩 함유 안토시아닌의 작물학적 특성 평가용으로 활용하기에 전혀 무리가 없는 분석법으로 조사되었다.

사 사

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-331-F00002).

인용문헌

Choung, M. G., I. Y. Baek, S. T. Kang, W. Y. Han, D. C. Shin, H. P. Moon, and K. H. Kang. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J. Agric. Food Chem.* 49 :

- 5848-5851.
- Choung, M. G., W. Y. Han, S. T. Kang, I. Y. Baek, D. C. Shin, S. D. Kim, S. C. Kim, H. P. Moon, and K. H. Kang. 2002. Structural analysis of anthocyanins in black soybean. *Korean Soybean Digest* 19(2) : 68-77.
- Choung, M. G. 2004. Analysis of anthocyanins. *Korean J. Crop Sci.* 49(S) : 55-67.
- Choung, M. G., Y. S. Hwang, H. J. Lee, S. S. N. Choi, J. D. Lim, S. T. Kang, W. Y. Han, I. Y. Baek, and H. K. Kim. 2008. Optimal extraction condition of anthocyanins in soybean (*Glycine max*) with black seed coats. *Korean J. Crop Sci.* 53(1) : 110-117.
- Joo, Y. H., J. H. Park, M. G. Choung, S. G. Yun, and K. W. Chung. 2004a. Variation of contents color difference of anthocyanin by different cultivation year in black soybean seed. *Korean J. Crop Sci.* 49(6) : 507-511.
- Joo, Y. H., J. H. Park, Y. H. Kim, M. G. Choung, and K. W. Chung. 2004b. Changes in anthocyanin contents by cultivation and harvest time in black-seeded soybean. *Korean J. Crop Sci.* 49(6) : 512-515.
- Joo, Y. H., K. W. Chung, and D. J. Lee. 2004c. Content and color difference of anthocyanin by different seed sizes and cotyledon colors in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Korean J. Intl. Agri.* 16(3) : 249-252.
- Kim, S. L., J. J. Hwang, J. Song, J. C. Song, and K. H. Jung. 2000. Extraction, purification, and quantification of anthocyanins in colored rice, black soybean, and black waxy corn. *Korean J. Breed.* 32(2) : 146-152.
- Kim, S. L., H. B. Kim, H. Y. Choi, N. K. Park, J. R. Son, H. T. Yun, and S. J. Kim. 2005. Variation of anthocyanins and isoflavones between yellow-cotyledon and green-cotyledon seeds of black soybean. *Food Sci. Biotechnol.* 14(6) : 778-782.
- Kim, Y. H., H. T. Yun, K. Y. Park, and S. D. Kim. 1997. Extraction and separation of anthocyanins in black soybean. *Korean J. Crop Sci.* 39(1) : 35-38.
- Oh, M. K., S. H. Rhee, and H. S. 1992. Changes of lipid composition of Korean black soybean before and after soaking. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 21(1) : 29-35.
- Shin, S. O., S. H. Shin, S. G. Lim, J. H. Lee, N. S. Kang, D. Y. Suh, K. Y. Park, and T. J. Ha. 2007. Isolation and identification of new anthocyanins from the black seed coat of soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. *Korean Soybean Digest* 24(1) : 23-33.
- Son, J. H., M. G. Choung, H. J. Choi, U. B. Jang, J. H. Bae, H. D. Lee, and C. Choi. 2002. Stability of black soybean pigment extract. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 45(3) : 179-184.