

## 콩 함유 사포닌의 종류 및 함량 분석

한상준<sup>†</sup>

한국방송통신대학교 자연과학대학 농학과

### HPLC/MS/MS Method for Determination of Soyasaponins in the Soybean Varieties

Sang-Jun Han<sup>†</sup>

Dept. of Agronomy, Korea National Open University, Seoul 110-791, Korea

**ABSTRACT** A sensitive and rapid high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (HPLC/MS/MS) assay was developed for the determination of soyasaponins in soybean. Among soyasaponins, soyasaponin I was isolated and characterized from methanol extracts of soybean as analytical standards and the development of a new analytical procedure for quantification of its content in various cultivars. The structures of these compound was elucidated by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR experiments and by mass spectrometric analysis. Aqueous ethanol extracts of soybean samples were injected on an Agilent XDB-C18 column (4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm) with a mobile phase consisting of 10 mM ammonium acetate-acetonitrile, a flow rate of 0.3 mL/min and a total run time of 8 min. Detection was performed by mass spectrometer bin the multiple reaction monitoring (MRM) mode with negative electrospray ionization (ESI) m/z at 941 → 615 for soyasaponin I. In the 9 soybean samples, contents of soyasaponin I ranged from 205 to 726 mg/kg, and correlated negatively with seed size.

**Keywords** : soybean, soyasaponin, HPLC/MS/MS, QQQ

우리나라와 만주지방이 원산지인 콩은 주요 식품자원으로 이용되어 왔으며, 용도에 따라 장콩, 기름콩, 나물콩, 밥밀콩, 풋콩 등 많은 품종이 개발되었다. 기능성 식품으로서 콩은 훌륭한 식물성 단백질원이며, 녹말, 식이섬유, 미네랄 및 각종 비타민들의 주요 공급원으로(Ruiz *et al.*, 1996), 콩 함유 식단은 당뇨와 심장질환에 효과적인 것으로 보고되었다(Chung *et al.*, 2008). 콩의 대표적 기능성분인 daidzein과 genistein 등을 모핵으로 하는 다양한 종류의 isoflavone 화

합물들은 유방암, 대장암, 그리고 전립선암 등의 예방 및 치료에 효과가 입증되었고(Lee *et al.*, 1991; Perterson 1995), 특히 구조적으로 estrogen과 유사한 구조와 활성으로 갱년기 관련 제품에 대한 개발이 활발하게 이루어지고 있다(Adlercreutz & Mazur, 1997; Tham *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1999; Lampe, 2003).

콩의 또 다른 기능성 성분으로는 soyasaponin계 화합물들이 알려져 있으며, soyasaponin은 oleanane계 triterpenoid 화합물로 주로 두과에 고루 분포하고 있다(Daveby *et al.* 1998; Ruiz *et al.*, 1996). Soyasaponin들은 개별 aglycone들의 구조에 따라 A그룹과 B그룹으로 분류하며, 그 구조와 종류는 Fig. 1과 같다. 주로 두과작물에서 존재하는 총 사포닌의 함량은 품종에 따라서 다르지만 1.8%에서 4.4% 정도로서 개별 성분의 함량은 극히 미량이며(Yoshiki *et al.*, 1998; Decroos *et al.*, 2007), 특히 물리·화학적 특성이 isoflavonoid 계열의 화합물과 매우 흡사하여 순수 정제분리하기가 쉽지 않아 오랜 동안 기능과 생리활성 등과 관련된 연구가 미진하였다(Zhang *et al.*, 2009). 그러나 최근 생리활성 물질로서 그 기능성이 주목받기 시작하면서 콩사포닌에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Zhang & Popovich, 2008).

그 동안 국내에서도 소비자의 수요에 맞추어 가공적성에 특화된 콩 품종 육성이 이루어져 왔으나 특정 생리활성 성분의 함량을 높이기 위한 연구는 시도되지 못한 실정이다. 국내 콩 유전자원을 대상으로 전통적인 분석방법을 통하여 soyasaponin 등의 함량을 보고한 바는 있으나(Kim, 2003; Kim, 2006; Kang, 2010), 육종의 선발과 같이 많은 수의 계통을 평가하기 위해서는 보다 더 신속하고 정확한 분석방법

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-2-3668-4632 (E-mail) shan@knou.ac.kr

<Received 8 August 2011; Revised 19 August 2011; Accepted 25 August 2011>

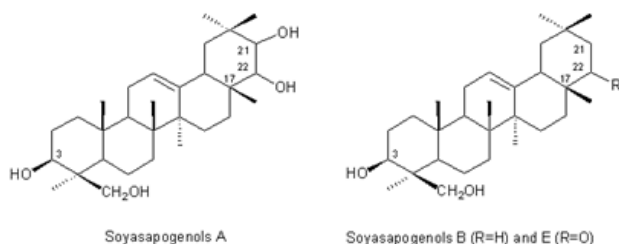


Fig. 1. The chemical structures of soyasapogenols.

이 개발되어야 할 것이다. 따라서 건강기능성 식품 소재로 함량이 높은 콩품종 육성을 위해 콩에 함유된 사포닌의 간단하고 빠른 정량분석 방법을 개발하고자 본 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 8품종의 콩은 강원도 춘천 소재 재배농가에서 2010년도에 재배 및 수확하였다. Methanol, acetonitrile 및 초순수 증류수는 J.T. Baker(Mallinckrodt Baker, Inc., NJ, USA)에서, ammonium acetate는 Sigma-Aldrich(St. Louis, Mo. USA)에서 각각 구입하였다. Reagent급의 Hexane, chloroform, EtOAc, n-BuOH은 삼천(Samchum Pure Chemical co. Ltd., Korea)에서 구입하였다. TLC plate(Kieselgel 60 F<sub>254</sub>)와 column packing용 silica gel(Kieselgel 60(mesh 70~230))은 모두 Merck사로부터 구입하였다.

### Soyasaponin I의 분리

건조한 대두 5 kg을 마쇄한 후 MeOH(20 L × 3)로 24시간 동안 상온에서 냉침하였다. MeOH 추출물은 회전감압농축기(EYELA, N-3000, Japan)을 이용하여 감압 농축한 다음 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, n-BuOH(40g) 순으로 분획한 후, n-BuOH 분획물을 silica gel column 크로마토그래피(10cm×50cm, CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O(65:35:10))를 통하여 sub-fraction을 얻었으며 사포닌은 TLC를 통하여 확인하였다. Soyasaponin I 주요 분획을 Recycle HPLC(Japan Analytical Instrument Co. Ltd., Japan)와 Prep HPLC(Gilson Prep HPLC system, France)를 이용하여 부정형의 흰색 분말을 얻었고, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR의 결과를 문헌과 비교하여 soyasaponin I임을 확인하였다.

### Soyasaponin I 함량분석

공시된 콩 품종 2 g을 TissueLyser(Retsch GmbH & Co.

KG, Haan, Germany)를 이용하여 곱게 마쇄한 후 70% 에탄올 20 ml를 가해 초음파기(Branson Ultrasonics Co., CT, USA)로 30분간 추출하였다. 추출액은 nylon syringe filter (25 mm/0.2 μm, Whatman)로 여과한 후 별도의 전처리 과정 없이 분석에 바로 이용하였다.

콩 함유 soyasaponin I의 함량분석은 HPLC/MS/MS(Agilent 1200 series; quaternary pump, vacuum degasser, autosampler, thermostat column compartment, diode array detector, G6410 triple quadrupole mass spectrometer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하였다. 컬럼은 Agilent XDB-C<sub>18</sub> (4.6 × 50 mm, 1.8 μm), 용매는 10 mM ammonium acetate와 acetonitrile을 기울기모드로 분당 0.3 ml의 속도로 사용하였다. 기울기 조건은 최초 20% B에서 8분 동안 90%로 직선적으로 증가시켰다.

Mass spectra는 electro spray ionization(ESI) source가 장착된 G6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer를 검출기로 사용하였으며, 수집조건은 다음과 같다: dwell time 200 ms; gas flow 6 L/min; nebulizer pressure 15 psi; fragmentor voltage 150V; collision energy 48V; temperature 300°C. Mass spectrometer는 negative ESI에서 m/z 941→615로 이온화된 분자를 MRM 모드로 검출하였다.

## 결과 및 고찰

### Soyasaponin I의 구조동정

Soyasaponin I의 정량분석을 위한 표준품은 대두에서 직접 분리하였다. 대두 분말 n-BuOH 분획은 Silica-gel column chromatography, Recycling HPLC, Preparative HPLC를 연속하여 최종 부정형의 흰색 분말을 얻었다. Preparative HPLC에서 얻어진 분말은 HPLC/MS/MS SIM chromatogram에서 m/z 941.3 [M-H]<sup>-</sup>의 soyasaponin I의 모분자임을 확인 할 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum(pyridine-d<sub>5</sub>)으로부터 일곱 개의 angular methyl singlet signal들을 δ 0.70(25-CH<sub>3</sub>), 0.86(26-CH<sub>3</sub>), 0.96(29-CH<sub>3</sub>), 0.99(28-CH<sub>3</sub>), 1.23(27-CH<sub>3</sub>), 1.30(30-CH<sub>3</sub>), 1.45(23-CH<sub>3</sub>)에서 각각 확인 하였고, <sup>13</sup>C-NMR(150MHz, pyridine-d<sub>5</sub>)는 각각 Table 1와 Table 2와 같다. 이상에서 얻은 분광학적 결과는 문헌의 soyasaponin I과 정확히 일치하였다(Sakamoto *et al.*, 1992; Yoshiki *et al.*, 1994).

### Soyasaponin I의 정량분석

콩에 함유된 사포닌들은 물리·화학적으로 매우 비슷한 구조를 하고 있으며, 분자량이 상대적으로 높아 기존의 HPLC 용 컬럼으로는 baseline separation이 쉽지 않다. 또한 일반

**Table 1.**  $^{13}\text{C}$  chemical shifts assignments and corresponding  $^1\text{H}$  NMR correlation data of the aglycon region of soyasaponin I in pyridine- $d_5$ .

Position	$\delta^{\text{C}}$	$\delta^{\text{H}}$ ( $J$ in Hz)
1 (CH <sub>2</sub> )	38.6	
2 (CH <sub>2</sub> )	26.4	
3 (CH)	91.2	
4 (C)	43.9	
5 (CH)	56.0	
6 (CH <sub>2</sub> )	18.5	
7 (CH <sub>2</sub> )	33.2	
8 (C)	39.9	
9 (CH)	47.8	
10 (C)	36.4	
11 (CH <sub>2</sub> )	23.4	
12 (CH)	122.3	
13 (C)	144.8	
14 (C)	42.3	
15 (CH <sub>2</sub> )	26.6	
16 (CH <sub>2</sub> )	28.6	
17 (C)	37.9	
18 (CH)	45.2	
19 (CH <sub>2</sub> )	46.7	
20 (C)	30.9	
21 (CH)	42.3	
22 (CH)	75.5	
23 (CH <sub>3</sub> )	23.0	1.45 s
24 (CH <sub>2</sub> )	63.6	
25 (CH <sub>3</sub> )	15.8	0.70 s
26 (CH <sub>3</sub> )	16.9	0.86 s
27 (CH <sub>3</sub> )	25.7	1.23 s
28 (CH <sub>3</sub> )	28.6	0.99 s
29 (CH <sub>3</sub> )	33.3	0.96 s
30 (CH <sub>3</sub> )	21.2	1.30 s

적인 triterpenoid 및 steroid 계열의 사포닌은 UV에 대한 흡광반응이 매우 낮기 때문에 기존의 DAD나 UV가 장착된 HPLC로는 정량분석에 필요한 감도를 얻기 위해 고농도의 sample을 주입하거나 복잡한 전처리 과정을 거쳐야 했다 (Kim, 2006). 이러한 문제점은 ELSD의 경우에도 같다 (Kim, 2010). 따라서 분석을 위한 검체를 제조하는 과정에서 보다 순수한 검체를 확보하기 위한 불필요한 전처리 과

**Table 2.**  $^{13}\text{C}$  chemical shifts assignments correlation data of the glycoside region of soyasaponin I in pyridine- $d_5$ .

Position	$\delta^{\text{C}}$
3-O- $\beta$ -D-Glucuronopyranosyl	
C-1	105.5
C-2	78.5
C-3	74.4
C-4	74.4
C-5	77.7
C-6	172.4
2'-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl	
C-1	101.7
C-2	76.7
C-3	76.5
C-4	69.4
C-5	76.6
C-6	61.5
2''-O- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl	
C-1	102.5
C-2	72.4
C-3	72.8
C-4	73.9
C-5	69.4
C-6	19.0

정이 더해져 데이터의 정확성을 떨어뜨리는 원인이 되었다. 그러나 HPLC/MS/MS의 보급은 사포닌의 정량분석 과정의 여러 문제들을 해결할 수 있는 가장 획기적인 방법을 제공할 것으로 기대된다. 따라서 콩 사포닌 함량을 쉽고 빠르게 분석해내기 위하여 콩에 함유된 사포닌 성분 가운데 대표적인 soyasaponin I을 대상으로 HPLC/MS/MS를 이용한 정량분석을 시도하였다.

Triple quadrupole mass spectrometry(QQQ)는 세 개의 quadrupole로 구성되는데, 첫 번째 quadrupole은 negative ESI source에서 생성된 전구이온을 검출하고, 마지막 quadrupole은 collision cell에서 모분자의 불활성 가스와의 충돌로 발생된 조각 이온을 검출한다. 이온화된 물질들은 충돌로 인해 분자마다의 독특한 패턴을 형성하게 되는데, 정확하고 정밀한 이온 선택과 검출을 통하여 물질마다 상이한 패턴들의 패턴을 읽어냄으로써 정밀한 정성 및 정량분석을 신속히 수행할 수 있게 된다(Wang *et al.*, 2011).

콩으로부터 분리한 soyasaponin I의 negative ESI full scan

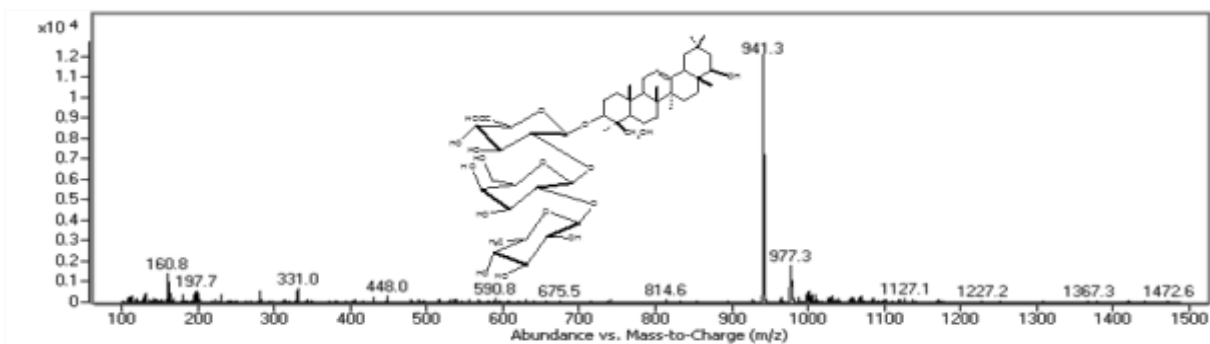


Fig. 2. ESI full scan mass spectrum in negative ionization mode of soyasaponin I (10 ppm).

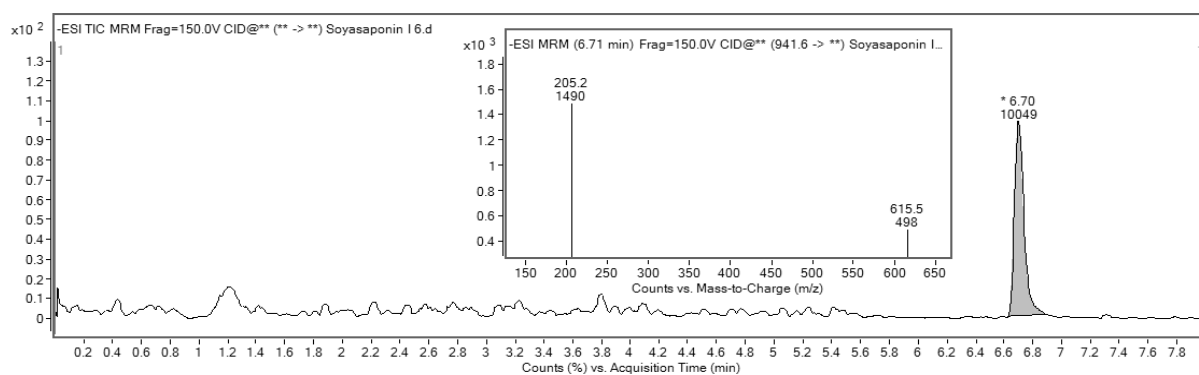


Fig. 3. Representation MRM chromatogram of soybean sample. Soyasaponin I,  $t_R=6.70$  min; the transitions of  $m/z$  941  $\rightarrow$  615 for soyasaponin I.

Table 3. Soyasaponin content in samples of Korean soybeans.

Seed size	Varieties	100-seed wt (g)	soyasaponin I <sup>a</sup> (mg/kg)
Large	Hwangkeumkong	25.8	344.1 $\pm$ 32.3
	Keunolkong	31.0	321.4 $\pm$ 27.5
	Ilpumgeomjeongkong	28.3	365.5 $\pm$ 91.7
	Hwaecomputkong	30.9	205.8 $\pm$ 17.7
	Geomjeongkong 1	39.5	297.7 $\pm$ 43.2
	means	31.1 $\pm$ 5.2	307.0 $\pm$ 62.0
Small	Danbaegkong	13.9	596.5 $\pm$ 87.4
	Pureunkong	13.3	678.6 $\pm$ 10.8
	Iksannamulkong	12.8	433.3 $\pm$ 78.1
	Pulmuheukchae	12.7	726.0 $\pm$ 35.5
		means	13.2 $\pm$ 0.5
<i>P</i>		< 0.001	< 0.001

<sup>a</sup>The data were expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

크로마토그램을 통하여  $m/z$  941 [M-H]<sup>-</sup>의 이온이 만들어지는 것을 확인할 수 있으며(Fig. 2), 이 이온을 전구체로 선별하여 재이온화 시키면 Fig. 3에서와 같이  $m/z$  615에 해당하는 자분자 피크를 얻을 수 있다. 이와 같은 결과를 토대로

각 샘플의 크로마토그램의 용출물들을 이온화 시켜 표준물질인 soyasaponin I과 정확히 일치하는 이온만을 골라 크로마토그램으로 표현할 수 있으며(Fig. 3), 이 때 얻어진 크로마토그램의 결과를 통해 양을 정량화 할 수 있게 된다.

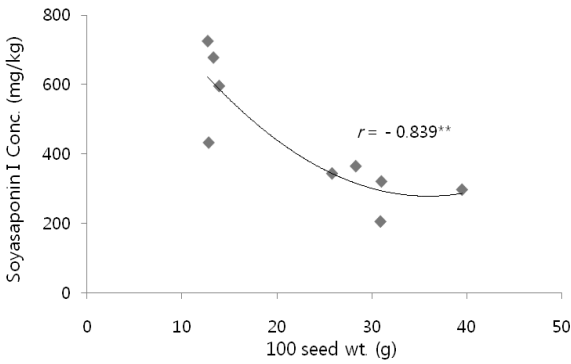


Fig. 4. The relations between 100 seed weight and soya saponin I concentration (mg/kg).

공시된 9개의 품종을 대상으로 soya saponin I의 함량을 조사한 결과 205 mg/kg에서 726 mg/kg 수준으로 나타났다 (Table 3).

Kim *et al.*(2006)은 기존의 DAD를 이용하여 18개 품종의 soya saponin I의 함량을 643 mg/kg에서 1318 mg/kg 수준으로 약 두 배 함량이 높게 나타난 것으로 보고한 바 있다.

Soyasaponin I의 함량은 종실무게와 고도로 유의한 부의 상관관계를 보였는데(Fig. 4), 일반 대두에 비해 소립종인 나물용 콩에서 그 함량이 높게 조사되었다(Kim, 2006). 따라서 콩의 saponin 함량을 높이기 위해서는 종자의 크기를 줄이는 방향으로 선발이 이루어져야 할 것이다.

본 연구에서 다른 soya saponin I은 콩의 주요한 사포닌 성분으로 신품종 선발에 직접 활용될 것으로 기대하며, 또한 유사 성분들에 대한 분석방법 개발이 신속히 이루어져야 할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 콩 함유 사포닌의 함량을 쉽고 빠르게 정량할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 시도하였다. 사포닌 표준 물질인 soya saponin I은 대두에서 직접 분리하여 동정하였고, 분석은 HPLC/MS/MS를 이용하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. DAD 또는 ELSD를 이용하여 분석할 때보다 전처리 과정을 획기적으로 줄일 수 있어 신품종 육성의 선발과 같은 대량의 분석에 적합하였다.
2. Soya saponin I의 함량은 나물콩과 같은 소립종에서 대립종에 비해 함량이 유의하게 높은 것으로 나타났다.

사 사

이 논문은 2009년도 한국방송통신대학교 학술연구비 지원을 받아 작성된 것임.

인용문헌

Adlercreutz, H. and W. Mazur. 1997. Phyto-estrogens and western diseases. *Ann. Med.* 29 : 95-120.

Chung, H. J., Q. Liu, R. Hoover, T. D. Warkentin, B. Vandenberg. 2008. *In vitro* starch digestibility, expected glycemic index, and thermal and pasting properties of flours from pea, lentil and chickpea cultivars. *J. Food Chem.* 118 : 316-321.

Daveby, Y. D., P. Aman, J. M. Betz, and S. M. Musser. 1998. Effect of storage and extraction on ration of soya saponin I to 2,3-Dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4-pyrone-conjugated soya saponin I in dehulled peas (*Pisum sativum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 141-146.

Kang, E. Y., S. H. Kim, S. L. Kim, S. H. Seo, E. H. Kim, H. K. Song, J. K. Ahn, and I. M. Chung. 2010. Comparison of soya saponin A, B concentrations in soybean seeds and sprouts. *Korean J. Crop Sci.* 55(2) : 165-176.

Kim, S. L., M. A. Berhow, J. T. Kim, I. M. Chung, H. Y. Chi, J. Song, N. K. Park, and J. R. Son. 2006. Composition and content of soya saponins and their interaction with chemical components in different seed-size soybeans. *Korean J. Crop Sci.* 51(4) : 340-347.

Kim, Y. H. 2003. Biological activities of soya saponins and their genetic and environmental variations in soybean. *Korean J. Crop Sci.* 48(S) : 49-57.

Lampe, J. W. 2003. isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *J. Nutr.* 133(suppl 3) : 956S-964S.

Lee, H. P., L. Gourley, S. W. Duffy, J. Esteve, and J. Lee. 1991. Day NE: Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet.* 337(8751) : 1197-1200.

Perterson, G. 1995. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J. Nur.* 125(3 Suppl) : 784-789.

Ruiz, R. G., K. R. Price, A. E. Arthur, M. E. Rose, M. J. C. Rhodes, R. G. Fenwick. 1996. Effect of soaking and cooking on the saponin content and composition of chickpeas (*Cicer arietinum*) and lentils (*Lens culinaris*). *J. Agric. Food Chem.* 44 : 1526-1530.

Sakamoto, S., S. Kofuji, M. Kuroyanagi, A. Ueno, and S. Sekita. 1992. Saponins from *Trifolium repens*. *Phytochemistry.* 31(5) : 1773-1777.

Song, T. T., S. Hendrich, and P. A. Murphy. 1999. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. *J. Agric Food Chem.* 47(4) : 1607-1610.

Tham, D. M., C. D. Gardner, and W. L. Haskell. 1998.

- Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 : 2223-2235.
- Wang, X., X. Zhao, B. Yang, H. Dong, D. Liu, and L. Huang. 2011. A combination of ultrasonic-assisted extraction with RRLC-QQQ method for the determination of artemisin in the chinese herb *Artemisia annua* L. *Phytochemical Analysis.* 22(3) : 280-284.
- Yoshiki, Y., J. H. Kim, and K. Okubo. 1994. Saponins conjugated with 2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one from *Phaseolus coccineus*. *Phytochemistry.* 36(4) : 1009-1012.
- Zhang, W., D. G. Popovich. 2008. Effect of soyasapogenol A and soyasapogenol B concentrated extracts on Hep-G2 cell proliferation and apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 56 : 2603-2608.
- Zhang, W., S. P. Teng, D. G. Popovich. 2009. Generation of group B woyasaponins I and III by hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 57 : 3620-3625.