

근적외분광분석기를 이용한 검정콩 안토시아닌의 함량 분석

김용호^{*†} · 안형균* · 이은섭** · 김희동**

*순천향대학교 생물자원공학과, **경기도 농업기술원

Development of Prediction Model by NIRS for Anthocyanin Contents in Black Colored Soybean

Yong-Ho Kim^{*†}, Hyung-Kyun Ahn*, Eun-Seop Lee**, and Hee-Dong Kim**

*Dep. of Biological Resources and Technology, Soonchunhyang Univ., Asan, 336-745 Korea

**Gyeonggi-do Agricultural Research and Extension Services, Hwaseong, Gyeonggi, 445-300 Korea

ABSTRACT Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) is a rapid and accurate analytical method for determining the composition of agricultural products and feeds. This study was conducted to measure anthocyanin contents in black colored soybean by using NIRS system. Total 300 seed coat of black colored soybean samples previously analyzed by HPLC were scanned by NIRS and over 250 samples were selected for calibration and validation equation. A calibration equation calculated by MPLS(modified partial least squares) regression technique was developed in which the coefficient of determination for anthocyanin pigment C3G, D3G and Pt3G content was 0.952, 0.936, and 0.833, respectively. Each calibration equation was applied to validation set that was performed with the remaining samples not included in the calibration set, which showed high positive correlation both in C3G and D3G content file. In case Pt3G, the prediction model was needed more accuracy because of low R² value in validation set. This results demonstrate that the developed NIRS equation can be practically used as a rapid screening method for quantification of C3G and D3G contents in black colored soybean.

Keywords : NIRS, anthocyanin, soybean, HPLC, MPLS regression

검정콩은 우리나라, 일본, 중국 동북부 지방에서 재배되고 있으며, 우리나라에서는 밥밑콩, 콩자반, 콩강정, 떡소용 등으로 이용하여 왔다. 특히 우리나라에서는 검정콩이 여러 가지 한방적 약효가 있는 것으로 알려져 있으며, 검정콩의

종피만을 약으로 이용하기도 하였다. 검정콩 종피의 효과는 혈액을 자양하고, 풍을 소통시키며, 시력증진, 뇌를 맑게 하고, 두통치료에 효과가 있다고 하였다. 최근에는 국내에서 콩의 생리활성 부각과 함께 검정콩의 천연색소에 관한 연구가 활기를 띠고 있다(Kim et al., 2006; Kim et al., 1997). 검정콩은 종피에 안토시아닌 색소를 함유하고 있는데, Bae 와 Moon(1997)은 여러 종류 콩의 항산화효과의 차이는 콩 종피의 주요 색소인 안토시아닌 함량과 높은 관련성이 있음을 보고한 바 있다. 따라서 예로부터 약콩으로 이용된 검정콩의 약리적 활성은 종피에 집적된 색소가 중요한 역할을 할 것으로 추정할 수가 있겠다.

안토시아닌은 식물체에서 적색, 자색 및 청색을 내는 수용성 색소로서 자연에 다양한 종류가 존재하며, 천연색소로서 최고의 이용가치가 있다고 알려져 있다(Francis, 1989). 또한 안토시아닌 계통의 색소는 식품착색 물질 뿐만 아니라 생체 내에서 생리활성에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 이를 색소에 대한 연구들도 활발히 진행되고 있다(Choi et al., 1996; Havsteen, 1983). 그러나 안토시아닌 함량 분석은 실험실에서 까다로운 과정을 거쳐 정량적으로 측정된다. 현재 일정 성분을 정량하는 방법은 시료를 목적하는 물질별로 추출 분리하는 것이 대표적 방법(Kim et al., 2000; Martin & Harzdina, 1978; Fuleki & Francis, 1968)인데, 이러한 방법은 과다한 시간과 노력이 필요할 뿐만 아니라 시료 전처리 과정 중의 문제점 등 많은 단점을 가지고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 비파괴적으로 신속 용이하게 물질 분석을 하는 방법의 중요성이 대두되고 있다.

NIRS(근적외선분광분석기)에 의한 방법은 시료를 파괴 없이 있는 그대로 신속하게 정성 및 정량분석을 가능하게

[†]Corresponding author: (Phone) +82-41-530-1281
(E-mail) yohokim@sch.ac.kr <Received June 29, 2007>

할 뿐만 아니라 다량의 시료를 단 시간내에 정확하게 분석 할 수 있어 최근 각 분야에서 다양하게 쓰이고 있는 분석기 기이며(Kwon *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 1996; Daun *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1991), 국내에서도 NIRS를 이용 한 성분 함량 분석에 관한 보고(Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 1998)가 계속해서 발표되고 있다. 본 연구에서는 검정콩에 함유되어 있는 안토시아닌 함량을 NIRS를 이용하여 신속하게 분석할 수 있는 모델을 개발하였기에 그 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법

검정콩 안토시아닌 함량 분석

검정콩 안토시아닌 함량 분석은 검정콩 유전자원 300종을 사용하여 수행하였다. 유전자원은 농촌진흥청 유전자원과로부터 분양받아 2006년 하계에 경기도 농업기술원 작물 연구과 시험포장에서 재배하였으며, 이후 수확된 종실을 안토시아닌 함량 분석시험에 이용하였다.

안토시아닌 함량은 콩 종피 0.1 g에 1%HCl-99%MeOH 용액 5 ml를 이용하여 4°C에서 24시간씩 3회 추출한 후, 여과지(Advantec No. 2, φ55 mm)을 사용하여 여과한 다음 추출용매로 25 ml가 되도록 정용하였다. 여과된 추출용액은 syringe filter(whatman 0.2 μm NYL)를 이용하여 재차 여과한 다음 분석 시험용액으로 사용하였다. 표준물질인 Delphinidin-3-Glucose chloride, Cyanidin-3-Glucose chloride, Petionidin-3-Glucose chloride 등은 Polyphenols (Norway)에서 구입하여 농도구배로 검량선을 구하였다. 분석조건은 표 1과 같았다.

NIRS 검량식 작성

NIRS를 이용한 정량분석 방법은 먼저 수집된 유전자원들의 NIR spectrum을 얻은 후, 검량식을 유도하여야 한다. NIRS spectrum은 가시광선 및 근적외선 대역(400~2,500 nm)

에서 종피를 분말 상태(100 mesh)로 스캐닝하였으며, HPLC로 분석되어진 안토시아닌 함량치와 비교 분석하여 검량식을 작성하였다. 분석에 이용된 기기는 NIRSystem model 6500(FOSS NIRSystem)이었다. 검량식은 우선 spectrum을 4가지 수처리 방법을 통하여 1차적으로 noise와 bias를 줄였다. 수처리(math treatment)는 우선 1차미분법을 이용한 1, 4, 4, 1(1st derivative, 4 nm gap, 4 points smooth, and 1 point second smooth)조건, 1, 10, 10, 1 조건과 2차미분을 이용한 2, 4, 4, 1 조건 및 2, 10, 10, 1 조건을 사용하였다. 수처리된 spectrum은 회귀분석을 통하여 검량식을 작성하였다. 회귀분석은 PLS(Partial Least Squares), MPLS(Modified Partial Least Squares), MLR(Multiple Linear Regression)법을 사용하여 검량식을 산출하였으며, 작성된 검량식을 상호 비교 분석한 후 적정의 검량식을 도출하였다.

결과 및 고찰

유전자원의 안토시아닌 함량 변이

검정콩의 안토시아닌 분리에 대한 연구는 Yoshikura & Hamaguchi(1969)가 검정콩에서 cyanidin-3-glucoside(C3G)와 delphinidin-3-glucoside(D3G)를 처음 분리하였으며, Choung 등(2001)은 검정콩에 함유된 안토시아닌의 개별색소는 D3G, C3G와 Pt3G(petunidin-3-glucoside)라고 하였다. 이밖에 Kim 등(1997)은 검정콩에는 C3G, D3G, Pt3G 외에도 pelagonidin-3-glucoside가 포함되어 있을 가능성을 제시하기도 하였다.

표 2는 검정콩 안토시아닌 표준물질을 HPLC로 농도별로 함량을 분석한 후 얻어진 검량식의 결과이다.

위의 검량식에 근거하여 검정콩 유전자원 300점의 안토시아닌 함량을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 성분함량들의 변이가 크게 나타났으며 이런 점은 NIRS를 이용하여 미강의 성분 분석을 함께 있어 유리하게 작용할 수 있었다. 안토시아닌 색소별로는 C3G가 유전자원간에 3.25~57.01 mg/g

Table 1. HPLC conditions for anthocyanin analysis

Parameter	Condition
Instrument	Acquity TM UPLC
Wavelength UV detector	520 nm
Mobile phase	D. W. : MeOH : TFA = 75.8 : 24.0 : 0.2
Flow rate	0.5 ml/min
Sample injection volume	1 μl
Oven temperature	35°C
Column	Acquity TM BEH SHIELD RP18 1.7 μm × 21 × 100 mm

Table 2. Calibration equations for anthocyanin analysis

Component	Regression	Coefficient of determination
Cyanidin-3-Glucose	$y = 1,960X + 1020$	$R^2 = 0.9999$
Dephinidin-3-Glucose	$y = 3,040X - 4,110$	$R^2 = 0.9994$
Petionidin-3-Glucose	$y = 1,030X + 138$	$R^2 = 0.9996$

의 변이 폭을 나타내었으며 D3G와 Pt3G는 각각 0~11.98 mg/g, 0~10.41 mg/g의 변이를 보였다. 즉 검정콩 안토시아닌은 C3G가 주된 색소임을 알 수 있었으며 그 범위도 상당히 넓었다. 한편, 검정콩 유전자원 간에는 D3G 또는 Pt3G 가 결핍된 것도 있음을 알 수 있었다.

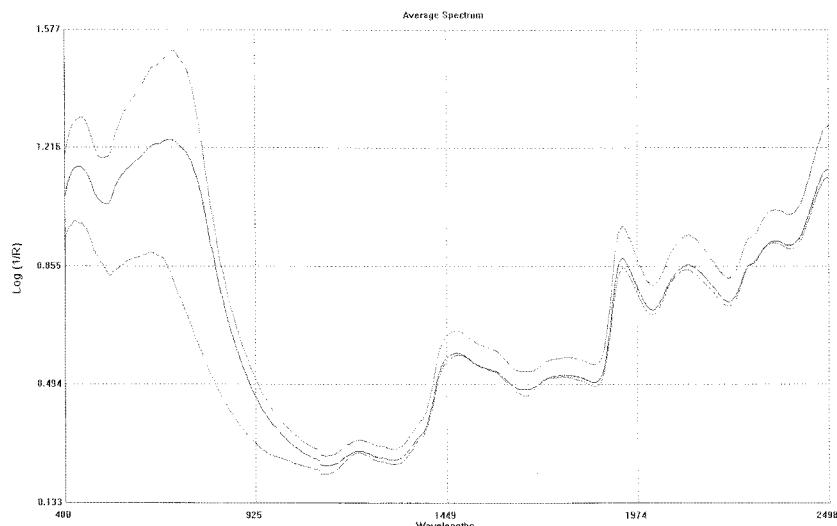
안토시아닌 함량의 NIRS 분석

검정콩 종피를 NIRS를 이용하여 NIR 대역(1,100~2,500 nm)에서 스펙트럼을 구하였다. 그림 1은 NIRS에 나타난 검정콩 종피의 스펙트럼 중에서 최저, 최고 및 평균치를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 변이 폭이 넓게 나타났는데 이것은 각 스펙트럼의 바탕선이 일치하지 않는 것도 한 요인이 될 수 있다. 따라서 바탕선의 일치를 위하여 NIRS 분석에는 수처리를 하게 되며 본 실험에서도 1차 및 2차 미분 등을 통한 수처리를 수행한 후 검량식을 작성하였다.

표 3은 NIRS에 의해 안토시아닌 색소별 함량 분석에 이용된 주된 파장들을 나타내었다. C3G는 8개가 대표적으로 분석에 이용되었으며, D3G와 Pt3G는 6개에 의해 주로 분석되어졌다. 이를 파장은 대부분 NIR(Near Infra Red)대역이었으며 일부 가시광선 대역의 파장들도 분석에 이용되었음을 알 수 있었다.

표 4는 NIRS 분석시 사용되는 수처리 방법 중 gap의 효과를 분석한 결과이다. 회귀분석법은 PLS, MLR 및 MPLS 방법을 이용하였으나 MPLS 방법이 보다 정확하였으므로 (결과 미제시) 본 논문에서는 MPLS법만을 적용하였다. 먼저 scanning 된 spectrum을 모두 1차 미분을 한 후 파장간 gap 처리를 4, 6 및 10 nm로 나누어 비교하였다.

표에서 보는 바와 같이 R^2 및 SEC 값으로 판단할 때 gap의 효과는 C3G의 경우는 4 nm의 처리가 우수하였으나 D3G 와 Pt3G는 10 nm의 gap이 기타 처리보다 우수한 것으로 나

**Fig. 1.** Spectra ($\log 1/R$) of black soybean seed coats scanned by NIRS.**Table 3.** Order of major wavelength used by NIRS for anthocyanin analysis in black soybean.

Anthocyanin pigment	Wave length(nm)
Cyanidin-3-Glucose (C3G)	896, 1660, 1636, 448, 816, 1008, 1524, 1892
Dephinidin-3-Glucose (D3G)	1444, 1636, 784, 824, 920, 976
Petionidin-3-Glucose (Pt3G)	920, 2212, 944, 1132, 1956, 2172

Table 4. Calibration parameters according to wavelength gap for anthocyanin content analysis by NIRS in black soybean

Math treatment	C3G (mg/g)			D3G (mg/g)			Pt3G (mg/g)		
	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC
1, 4, 4, 1	0.952	23.7	2.51	0.895	5.45	0.70	0.778	3.19	0.56
1, 6, 6, 1	0.943	23.9	2.60	0.923	5.47	0.64	0.814	3.34	0.57
1, 10, 10, 1	0.946	23.9	2.69	0.936	5.47	0.56	0.833	3.41	0.60

*Math treatment a, b, c, d: a = derivative function; b = gap; c = smooth; d = second smooth

**R² = squared coefficient of multiple determination in calibration; SEC = standard error of calibration

Table 5. Calibration parameters according to derivative function for anthocyanin content analysis by NIRS in black soybean

Math treatment	C3G (mg/g)			D3G (mg/g)			Pt3G (mg/g)		
	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC	R ²	Mean	SEC
1, 10, 10, 1	0.946	23.9	2.69	0.936	5.47	0.56	0.833	3.41	0.60
2, 10, 10, 1	0.942	24.0	2.77	0.894	5.45	0.70	0.815	3.23	0.53
3, 10, 10, 1	0.883	24.2	3.21	0.818	5.50	0.66	0.782	3.31	0.67

Table 6. Calibration and cross validation parameters by MPLS regression for anthocyanin contents in black soybean

Math treatment	C3G				D3G				Pt3G			
	Calibration		Validation		Calibration		Validation		Calibration		Validation	
	R ²	SEC	r ²	SEP	R ²	SEC	r ²	SEP	R ²	SEC	r ²	SEP
1, 4, 4, 1	0.952	2.51	0.897	3.86	0.895	0.70	0.817	0.99	0.778	0.56	0.503	1.30
1, 10, 10, 1	0.946	2.69	0.905	3.70	0.936	0.56	0.849	0.91	0.833	0.60	0.658	1.06

*SEP: Standard error of prediction in validation

타났다.

표 5는 미분법을 달리하여 다시 검량식을 작성한 결과이다. 표에서 보는 바와 1, 2차 미분간에는 큰 차이가 없었으나 3차 미분시에는 오히려 분석치의 정확도가 떨어지는 경향이었다. 1, 2차 미분 간에도 안토시아닌 세가지 pigments는 모두 1차 미분 수치가 2차 미분보다 우수한 경향이었다. 한편, NIRS의 검량식은 validation file에 calibration file에서 얻어진 검량식을 적용하여 봄으로써 그 유효성을 판단하여야 하는 것이 옳은 방법이다.

표 6은 위에서 얻어진 검량식들을 validation file에 적용시켜 안토시아닌 색소별로 그 유용성을 분석한 결과이다. Validation file은 NIRS의 프로그램인 WinISI에서 calibration file과 스펙트럼에 중복성이 나타나지 않는 시료들을 배제시킨 후, 나머지 시료들을 이용하여 자동적으로 구성되어졌다.

Validation의 parameter를 비교하여 볼 때 C3G, D3G, Pt3G 모두 1, 10, 10, 1의 수처리가 가장 우수하였다. Calibration file과 validation file을 비교하면 C3G의 경우는 cali-

bration set에서는 1, 4, 4, 1의 수처리가 우수하였으나 validation에서는 1, 10, 10, 1의 값이 우수하였다. 그러나 gap 4 nm의 1차 및 2차 미분 처리된 R²의 값이 0.952와 0.897이며 10 nm는 0.946과 0.905이므로 두 처리 간에는 큰 차이가 없는 것으로 판단되었다. D3G와 Pt3G는 calibration과 validation set 모두 1, 10, 10, 1의 수치가 우수하였다. 그런데 C3G와 D3G의 경우에는 대체로 상관계수 값이 0.9에 도달하므로 NIRS에서의 안토시아닌 함량분석이 가능함을 알 수 있었으나 Pt3G의 경우는 validation의 상관계수의 값이 0.658로 정확도가 떨어지므로 추후 좀 더 많은 유전자원들의 함량치가 보완된 NIRS 검량식을 작성하여야 할 것으로 판단된다. 그러나 본 실험에서 도출된 결과로도 검정콩 안토시아닌 Pt3G의 상대적 평가는 가능할 것으로 사료되며, 따라서 본 연구에서 개발된 NIRS 모델들은 검정콩 우량품종 육성의 과정에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

그림 2는 도출된 검량식에 의한 검정콩 안토시아닌 함량의 NIRS와 HPLC value 간의 상관관계를 나타낸 것이다. NIRS가 성분 함량 분석에 유용하게 이용되기 위해서는 분

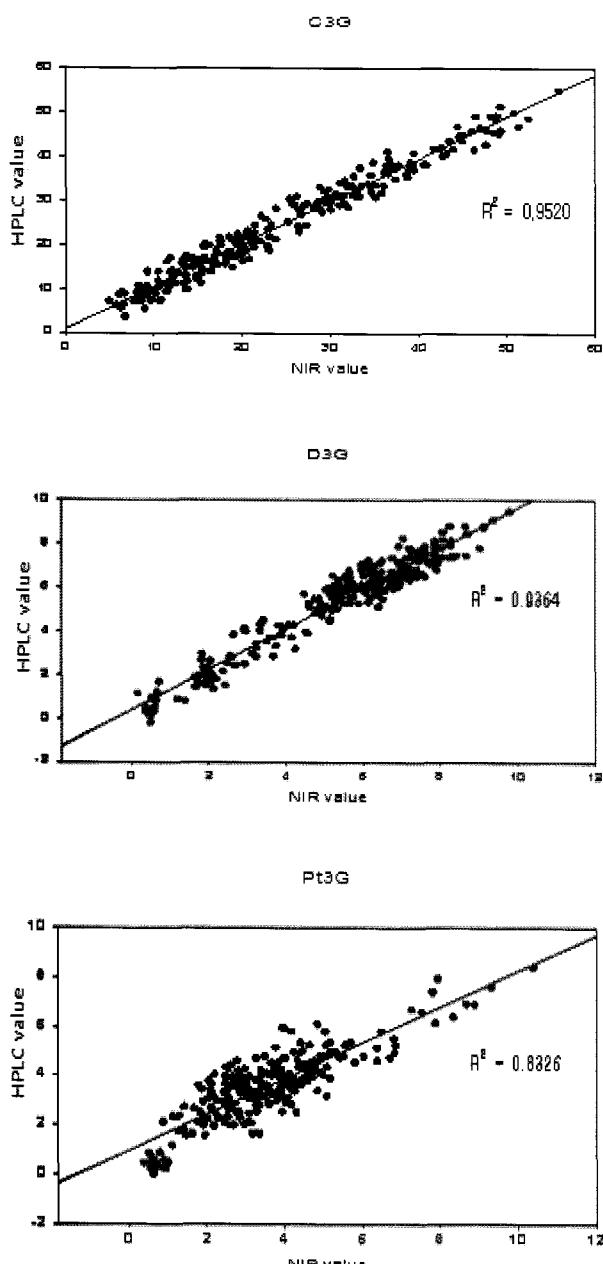


Fig. 2. Correlation plot for anthocyanin pigments contents, NIRS data vs. laboratory data of the calibration set in black soybean. (Unit: mg/g)

석 시료의 성분 함량 폭이 넓은 유전자원들이 고른 분포로 검량식 작성에 사용되어야 한다. 그림에서 보는 바와 같이 본 검량식에 이용된 검정콩 유전자원 안토시아닌의 색소별 함량 분포는 전체 범위에서 고르게 분포되어 있음을 알 수 있으며, 따라서 본 연구에서 도출된 검량식은 미지의 시료를 대상으로 한 검정콩 안토시아닌의 함량 분석에 무리없이 적용될 수 있으리라 판단된다.

적 요

검정콩 종피에 함유된 안토시아닌의 색소별 함량을 비파괴적으로 신속하게 분석하기 위하여 NIRS(근적외선 분광분석기)를 이용한 모델을 개발하였다. 재료는 검정콩 유전자원 300 계통을 사용하였으며, HPLC에서 분석된 종피의 안토시아닌 함량치를 NIRS 스펙트럼에 적용시킨 후 검량식을 작성하였다. NIRS의 검량식을 몇 가지 방법에 의하여 비교 분석한 결과 1차미분된 스펙트럼을 MPLS(Modified Partial Least Squares)를 이용한 회귀식에 이용하는 것이 가장 적합하였다. HPLC를 이용한 유전자원들의 성분 함량과 NIRS에서 도출된 검량식과의 상관계수는 C3G, D3G 및 Pt3G가 각각 0.952, 0.936과 0.833을 나타내었다. 이들 검량식은 validation file에서도 C3G와 D3G는 0.897, 0.849의 높은 상관을 보였으며, 이는 NIRS를 이용하여 검정콩의 안토시아닌 함량을 신속하게 분석할 수 있음을 나타내는 것으로 판단되었다.

사 사

본 연구는 2006년도 농림부 농립기술개발연구과제(106041-03-2-SB010)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Bae E. A. and G. S. Moon. 1997. A study of the antioxidative activities of Korean soybeans. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26 : 203-208.
 Choi, H. C. et al. 1996. Development and industrial utilization of natural pigments from colored rices. G7 final report. NCES, RDA.
 Choung, M. G., I. Y. Baek, S. T. Kang. 2001. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean. *J. Agr. Food Chem.* 49 : 5848-5851.
 Daun, J. K., K. M. Clear, and P. Williams. 1994. Comparison of three whole seed near-infrared analyzers for measuring quality components of canola seed. *JAACS*. 71(10) : 1063-1068.
 Francis, F. J. 1989. Food Colorants: Anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28 : 273-314.
 Fuleki, T. and F. J. Francis. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. I. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *J. Food Sci.* 33 : 254-259.
 Havsteen, B. 1983. Flavonoids: a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 32 :

- 1141-1145.
- Jung, C. S., B. J., Kim, Y. C. Kwon, W. Y. Han, and Y. H. Kwack. 1998. Analysis of protein and moisture contents in pea using near-infrared reflectance spectroscopy. Korean J. Crop Sci. 43(2) : 101-104.
- Kim, K. S., S. H. Park, M. G. Chung, and Y. S. Jung. 2007. Use of near infrared spectroscopy for estimating fatty acid composition in intact seeds of rapeseed. J. Crop Sci. Biot. 10(1) : 15-20.
- Kim, S. L., J. J. Hwang, J. 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, Y. H., J. H. Lee, Y. S. Lee, and H. T. Yun. 2006. Antioxidant activity and extraction efficiency of anthocyanin pigments in black colored soybean. K. Soybean Digest 23(1): 1-9.
- Kim, Y. H., B. R. Choi, H. Y. Baek, and Y. S. Lee. 2002. Quantification of icariin contents in *Epimedium Koreanum* N. by using a near infrared reflectance spectroscopy. K. J. Medicinal Crop Sci. 10(5) : 340-343.
- Kim, Y. H., H. T. Yun, K. Y. Park, and S. D. Kim. 1997. Extraction and separation of anthocyanins in black soybean. RDA. J. Crop. Sci. 39 : 35-38.
- Kwon, Y. R., M. H. Baek, D. C. Choi, J. S. Choi, and Y. G. Choi. 2005. Determination of calibration curve for total nitrogen contents analysis in fresh rice leaves using visible and near infrared spectroscopy. Korean J. Crop Sci. 50(6) : 394-399.
- Lee, H. B., B. R. Choi, C. S. Kang, Y. H. Kim, and Y. J. Choi. 2001. Determination of seed protein and oil concentration in kiddny bean by near infrared spectroscopic analysis. Korean J. Crop Sci. 46(3) : 248-252.
- Martin, W. and G. Harzdina. 1978. High-pressure liquid chromatographic seperation of 3-glucoside, 3,5-diglucosides, 3-(6-O-p-coumaryl)glucosides and 3-(6-O-p-coumarylglucoside)-5-glucosides of anthocyanidins. J. Chromatography 155 : 389-398.
- Velasco, L., J. Fernandez-Martinez, and A. D. Haro. 1996. Screening ethiopian mustard for erucic acid by near infrared reflectance spectroscopy. Crop Sci. 36 : 1068-1071.
- Williams, P. C., H. M. Cordeiro, and M. F. T. Harnden. 1991. Analysis of oat bran products by near infrared reflectance spectroscopy. Cereal Foods World 36(7) : 571-574.
- Yoshikura, K. and Y. Hamaguchi. 1969. Anthocyanins of the black soybean. Eiyo To Shokuryo, 22, 367(CA 72, 63600).