

Analysis of gibberellic acid from fruits using HPLC/UV-vis

Kyung Na Ma, Hyun-Woo Cho and Seung-Woon Myung[★]

Department of Chemistry, Kyonggi University San 94-6, Lui-dong, Yeongtong-gu,
Suwon-si, Gyeonggi-do 443-760, Korea

(Received August 23, 2012; Revised December 10, 2012; Accepted December 19, 2012)

HPLC/UV-vis을 이용한 과일류 중의 지베렐린 산 분석

마경나 · 조현우 · 명승운[★]

경기대학교 화학과

(2012. 8. 23. 접수, 2012. 12. 10. 수정, 2012. 12. 19. 승인)

Abstracts: Gibberellic acid (GA₃) is one of gibberellins (GAs) that are a class of plant growth hormones that exert profound and diverse effects on plant growth and development. GA₃ is essentially non-UV absorbing and is difficult to assay by UV-detector. For effective extraction of gibberellic acid from fruits by using liquid-liquid extraction, optimized pH and extraction solvent were established. The selective and sensitive derivative of GA₃ for HPLC/UV-vis was derivatized using phenacyl bromide, and the experimental factors, including reaction time, reaction temperature and amount of derivatizing reagent and base were investigated for the effective synthesis. The derivatized GA₃ with phenacyl bromide was effectively analyzed by HPLC/UV-vis. The structure of derivatized GA₃ was confirmed by HPLC/ESI-MS. For apple, LOD and LOQ were 0.008 mg/kg and 0.027 mg/kg, respectively. For pear, LOD and LOQ were 0.003 mg/kg, 0.012 mg/kg, respectively. The established method can be applied to more effective analysis of GA₃ from plant and food.

요약: 자외선 흡광도가 거의 없는 농작물의 생장 조절용 농약으로 사용되고 있는 지베렐린(GAs) 중 하나인 지베렐린 산(GA₃)은 발색단이 미약해서 자외선 검출기를 이용하여 분석하기가 어려운 물질이다. 액체-액체 추출법을 이용하여 과일류로부터 지베렐린 산을 효과적으로 추출하기 위하여 시료의 pH와 추출용매에 대한 최적의 추출조건을 확립하고자 하였다. 페나실 브로마이드를 유도체화 시약으로 사용함으로써 자외선 검출기에 선택적이며 감도가 좋은 GA₃-유도체 화합물을 만들었으며, 최적의 유도체화 조건을 확립하기 위해서 반응온도 및 시간, 유도체화 시약의 양, 염기의 양 등을 변화시켜주는 실험이 수행되었다. 유도체화 된 GA₃는 C18 컬럼을 사용하여 방해물질이 없이 HPLC/UV-vis로 효과적으로 분석되었으며, HPLC/ESI-MS를 사용하여 유도체화된 화합물의 구조를 확인하였다. 사과와 배의 경우, 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.008 mg/kg, 0.027 mg/kg로, 배의 경우, 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.003 mg/kg, 0.012 mg/kg로 낮은 검출한계와 정량한계를 보였다. 확립된 유도체화 방법은 과일류 중에 존재하는 GA₃의 효과적이고 편리한 분석에 응용될 수 있을 것이다.

Key words: gibberellic acid, plant hormone, HPLC/UV-vis, derivatization

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)31-249-9647 Fax : +82-(0)31-249-9647

E-mail : swmyung@kgu.ac.kr

1. 서 론

지베렐린(Gibberellin)은 대표적인 식물호르몬으로서 고등식물의 신장을 유도하고 발아를 촉진시키는 역할을 한다.¹ 동일한 탄소 고리 모핵의 유사 구조를 갖는 여러 종의 지베렐린이 있으며, 현재 벼의 키다리병균 이외에도 많은 식물에 지베렐린이 존재한다고 알려져 있다.

우리나라에서는 이 지베렐린을 생장 조절용 농약으로 사용하고 있으며, 과수, 원예, 화훼 등에 광범위하게 사용되고 있으며, 과실의 경우 크기를 고르게 성장시켜 품질이 우수한 과일을 생산할 수 있다. 농가에서는 과일류의 수확시기를 앞당기기 위해 지베렐린의 한 종류인 지베렐린 산(Gibberllic acid, GA₃)을 과다하게 사용하고 있는데, 우리나라에는 아직 지베렐린 산에 대한 규제가 없는 실정이다. 반면에 일본의 경우 지베렐린 산에 대한 MRL (Maximum Residue Limit)이 과일 및 채소류에 대해 200 µg/kg으로 규제되어 있고,¹ EU에서도 과일 및 채소류에 대해 500 µg/kg으로 규제되어 있다.

한편, 지베렐린 산은 형광을 띄지 않고 UV 흡수가 매우 낮으며 특별한 화학적 성질이 없어 정량이 매우 어렵기 때문에,² HPLC/UV-vis를 이용한 지베렐린의 분석은 정량이 아닌 단순한 검출에만 국한되어 있다.³⁻⁷ 최근에 GC/MS⁸⁻¹⁰나 LC/MS^{11-19,22}를 이용하여 지베렐린 산을 정량한 사례가 있으며, capillary electrohoresis-MS^{20,21}을 사용해 지베렐린 산을 정량한 보고도 있다. 하지만, 일반적으로 실험실에서 많이 사용되고 있는 HPLC/UV-Vis를 이용한 분석 예는 거의 없는데 이는 지베렐린 산의 최대 흡수 파장이 206 nm로 매우 낮고 자외선 흡광도가 낮기 때문에 UV 검출기로 정량하기에는 어려움이 있기 때문이다.

따라서 본 논문에서는 액체-액체 추출법(Liquid-liquid extraction)을 이용하여 지베렐린 산을 과일류로부터 효과적으로 추출한 뒤, 지방산과 유기산의 최대 흡수파장을 높이기 위한 유도체화 시약으로 사용되는 페나실 브로마이드(Phenacyl bromide)²³⁻²⁶를 사용하여 기존에 연구된 α-bromo-2-acetonaphthone 지베렐린 산의 유도체화 반응²⁷보다 효율적이고 간편하게 지베렐린 산을 유도체화시켜 자외선 흡광도를 증가시킴으로써 HPLC/UV-Vis를 이용해 효과적으로 분석하는 방법을 확립하였다.

2. 실험

2.1. 기구 및 시약

실험에 사용된 모든 유리 기구는 세척액, 메탄올, 아세톤 및 3차 증류수로 세척 후 자연 건조하여 사용하였다. 시료의 진탕 혼합추출을 위해서 EYELA 사(Tokyo, Japan)의 MMS-3010을 사용하였고, 시료 농축을 위한 질소 농축기는 Caliper Lifescience 사(Seattle, WA, USA) Turbo LV 농축기를 사용하였다. 지베렐린 산 표준물질은 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)의 고순도 시약을 사용하였으며, 화학구조는 Fig. 1에 나타내었다. THF (tetrahydrofuran), 메탄올, 에틸아세테이트, 증류수는 J.T.Baker 사(NJ, USA)의 HPLC 등급 시약을 사용하였고, 개미산(formic acid)은 Fluka 사(Seelze, Germany), 페나실 브로마이드는 Sigma-Aldrich사(St Louis, MO, USA)의 시약을 사용하였다.

시료 자동 주입기와 UV-vis 검출기가 장착된 Agilent 사(Palo Alto, CA, USA)의 1100 series HPLC 시스템을 사용하였다. LC/ESI-MS/MS 역시 Agilent 사(Palo Alto, CA, USA)의 1200 series HPLC/6410 Triple Quadruple tandem mass spectrometer 시스템을 사용하였고, 이온화 방식은 전기분무이온화(ESI, Electrospray Ionization) 모드를 사용하였다.

2.2. 시료 선정

실제 시료로는 사과와 배를 선택하였으며 시중에 판매하는 것을 4 °C 이하로 냉장 보관한 후 실험 직전에 균질화기로 균질화하여 사용하였다.

2.3. 시료전처리

균질화기로 균질화한 시료 5 g을 원심 분리관에 취하고 정제수 10 mL를 가한 후 황산:물(1:1, v/v)을 사용하여 pH 3으로 조절해주었다. 에틸아세테이트 20 mL를 가한 뒤 진탕 혼합기로 300 rpm에서 15분간 진

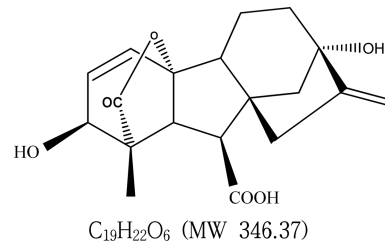


Fig. 1. Chemical structure of gibberellic acid (GA₃).

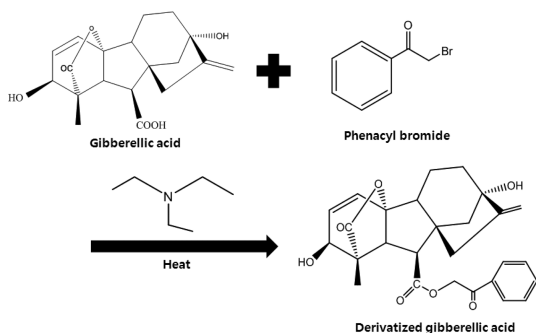


Fig. 2. Scheme for derivatization of GA₃ with phenacyl bromide.

탕시킨 후, 4000 rpm에서 5 분간 원심분리 후 상층액인 에틸아세테이트 층만 취하였으며, 이 과정을 2회 반복하였다. 추출한 에틸아세테이트 층을 혼합한 후 pH 8.0 인산 완충용액(Phosphate buffer) 10 mL를 가하였다. 진탕 혼합기로 300 rpm에서 15 분 동안 진탕시키고, 4000 rpm에서 5 분간 원심분리한 다음, 수용액층을 취하고, 황산:물(1:1, v/v)을 사용하여 pH 3.0으로 조절하였다. 10 mL의 에틸아세테이트를 가하고 진탕혼합기로 300 rpm에서 15 분 동안 진탕시킨 후, 에틸아세테이트 층을 취하여 45 °C에서 질소로 유기용매를 휘발시켜 완전히 건조시킨 후 반응 용매인 THF 300 µL를 가해주었다. 여기에 5 µL의 트리에틸아민을 첨가하고 THF 용매에 풀힌 0.2 M 페나실 브로마이드 40 µL를 첨가하였다. 2분간 vortex mixer로 혼합해 준 뒤, 90 °C에서 1 시간 동안 반응시켰다(Fig. 2). 반응을 완결시킨 후 시험관을 실온에서 냉각시킨 후 질소 농축기를 이용해 40 °C에서 완전히 건조시켰다. 메탄올을 100 µL로 잔사를 녹인 후 바이알에 옮겨 HPLC/UV-Vis에 10 µL를 주입하여 분석하였으며, 시료 전처리 과정을 Fig. 3에 도식화 하였다.

2.4. 기기분석 조건

2.4.1. HPLC/UV-vis 조건

유도체화 된 지베렐린 산의 분석을 위해 HPLC에서 사용된 컬럼은 Waters 사(Milford, Massachusetts, USA)의 SunFire C18이었으며 길이는 150 mm, 내경은 4.6 mm이고 입자크기는 5 µm 이었다. 이동상은 증류수와 메탄올을 사용하였으며 기울기 용리조건으로 유기용매 조성을 초기에 60%에서 15 분까지 70%로 올려주었다가 15.1분에 50%로 감소시켜 30 분까지 유지하였으며, 이동상의 재 평형을 위하여 30.1 분까지 유기용매를 60%로 감소시켜 10분간 유지하였으며, 분석시

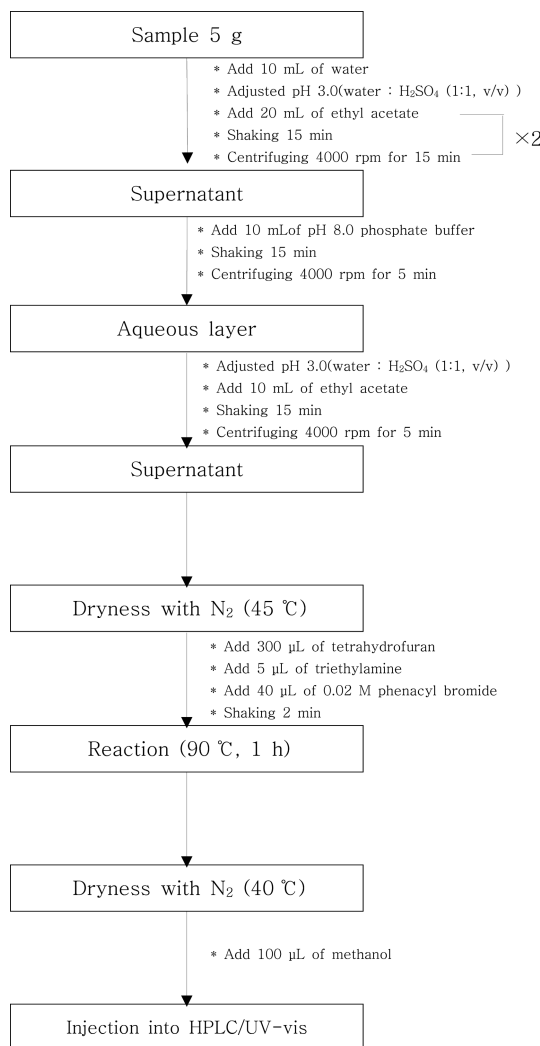


Fig. 3. Sample preparation procedure of Gibberellic acid.

간은 40 분 이었다. 검출 파장은 247 nm 이었으며 이동상의 유속은 0.8 mL/min, 시료 주입량은 10 µL이었다.

2.4.2. HPLC/ESI-MS 조건

유도체화 된 지베렐린 산의 분자량 및 구조 확인을 위해 사용된 HPLC/ESI-MS의 컬럼은 Waters 사(Milford, Massachusetts, USA)의 XBridge C18으로 길이는 100 mm, 내경은 2.1 mm이고 입자크기는 3.5 µm 이었다. 이동상은 물과 메탄올이 사용되었고 등용매 용리조건(50% 유기용매)을 사용하였으며, 유속은 0.3 mL/min, 분석시간은 15분 이었다. HPLC/MS의 이온화 방법은 ESI (Electrospray ionization)이었으며, 음

이온(-) 모드에서 분석이 수행되었다.

2.5. 검출한계, 정량한계, 회수율 및 검정곡선 실험

분석 방법의 유효성 검증을 위해 검출한계(Limit of detection, LOD), 정량한계(Limit of quantitation, LOQ), 회수율 및 검정곡선에 대한 실험은 바탕시료(사과 및 배)가 사용되었다.

먼저, 검출한계와 정량한계 실험을 위해서는 각각의 시료에 표준물질을 첨가하여 전처리과정을 거친 결과에서 신호 대 잡음비(Signal to Noise, S/N)를 통하여 검출한계와 정량한계를 추정 한 후, 추정 한 검출한계의 1~5배 사이의 농도를 가진 시료(n=7)를 준비하였다. HPLC/UV-vis에 주입 후 얻은 결과 값을 통해 측정에 대한 표준편차(σ)를 계산하고, 선형검정곡선을 작성하여 기울기(s)를 구한 후 검출한계는 $3\sigma/s$, 정량한계는 $10\sigma/s$ 로 정했다.

검정곡선은 미지 양에 대한 감응을 해석할 수 있도록 아는 양의 분석물질(표준물질)에 대한 감응으로 평가되었다. 사과 시료의 경우 0.15, 0.3, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg/kg이 되도록 표준물질을 첨가하였고, 배 시료의 경우 0.15, 0.3, 0.45, 1.0, 2.0, 4.0 mg/kg이 되도록 표준물질을 첨가하여 확립된 시료 전처리 과정을 거친 후 HPLC/UV-vis 방법으로 분석하여 피크 면적비로 검정곡선을 작성하고, 직선식과 상관계수(r^2)를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 스펙트럼 및 기기분석

3.1.1. 스펙트럼 분석

유도체화 하지 않은 지베렐린 산 표준물질의 최대 흡수 파장은 206 nm이며, 발색단이 있는 페나실 브로마이드로 유도체화 시킨 유도체화된 GA₃의 최대 흡수 파장은 247 nm로 이동되었으며, 또한 자외선 흡광도도

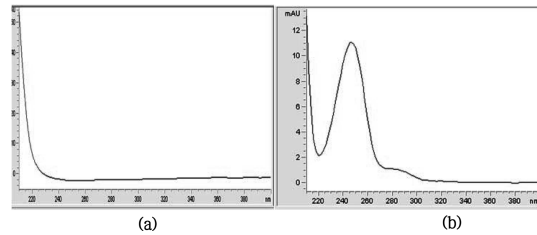


Fig. 4. UV spectra of (a) GA₃ and (b) derivatized GA₃.

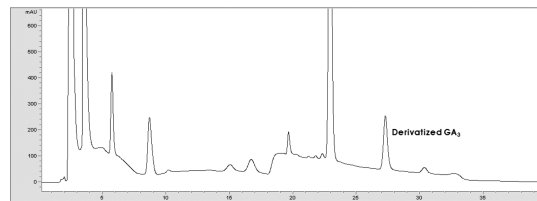


Fig. 5. HPLC/UV-vis chromatogram of derivatized gibberellic acid.

증가되었으며, 그 스펙트럼을 Fig. 4에 나타내었다.

3.1.2. HPLC/UV-Vis 분석

유도체화 된 지베렐린 산은 HPLC/UV-Vis 시스템을 이용하여 분석하였다. 시간에 따라 극성도를 변화시켜 주기위해 유기용매의 조성에 변화를 주는 기울기 용리 조건으로 분석한 결과 유도체화 된 지베렐린 산은 매트릭스에 의한 방해효과 없이 27.26 분에서 검출되었으며 그 크로마토그램을 Fig. 5에 나타내었다.

3.1.3. HPLC/ESI-MS 분석

지베렐린 산의 유도체화 여부를 확인하기 위해 HPLC/ESI-MS를 사용하였다. 유도체화 된 지베렐린 산은 양성자가 1개 떨어진 유사분자이온(Pseudo-molecular ion)인 [M-H]⁻가 m/z 463에서 나타남으로써 유도체화가 되었음을 확인할 수 있었다. 이 질량스펙트럼을 Fig. 6에 나타내었다.

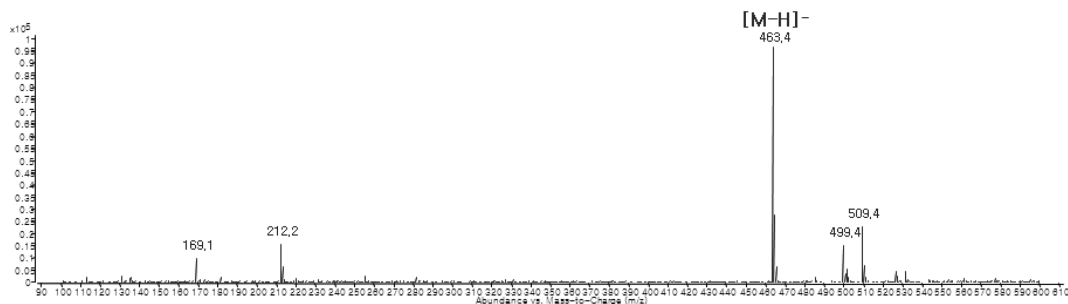


Fig. 6. Mass spectrum of derivatized GA₃ with electrospray ionization.

3.2. 실험 인자들의 최적화

3.2.1. 지베렐린 산 추출의 최적화

액체-액체 추출법을 이용하여 과일류로부터 지베렐린 산을 효과적으로 추출하기 위해 pH와 추출용매를 변화시켜줌으로써 최적의 실험 조건을 찾는 실험이 수행되었다.

1) pH의 영향

분석물질이 유기용매에 효율적으로 추출되기 위해 수용액 시료의 pH에 의한 영향을 살펴보는 실험이 수행되었다. 일반적으로, 산성 또는 염기성 화합물의 중성 형태는 유기용매에 잘 녹고 이온성 형태는 유기용매에 잘 녹는데, Henderson-Hasselbalch 방정식에 의하면 산성 분석물질을 수용액으로부터 유기용매로 추출해 내기 위해서는 수용액의 pH를 낮춰주어야 한다. 따라서 산성물질인 지베렐린 산을 유기용매로 추출시키기 위해 물과 황산을 1:1(v/v)로 섞은 황산용액을 사용해 pH를 조절해 주었다. 그 결과 pH 3에서 가장 높은 회수율을 나타냈으며 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

2) 추출 용매의 영향

액체-액체 추출 시 추출용매에 따른 절대 회수율을 비교하기 위해 에틸아세테이트, 디에틸에테르, 메틸렌클로라이드(MC)를 사용하여 최적의 용매를 선택했다. 그 결과 극성인 지베렐린 산의 추출용매로는 세 가지 용매 중에서 극성도가 가장 높은 에틸아세테이

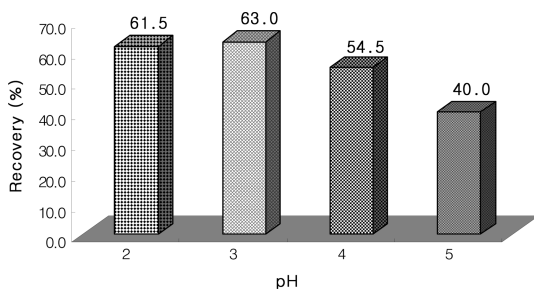


Fig. 7. Comparison of absolute recovery at various PHs.

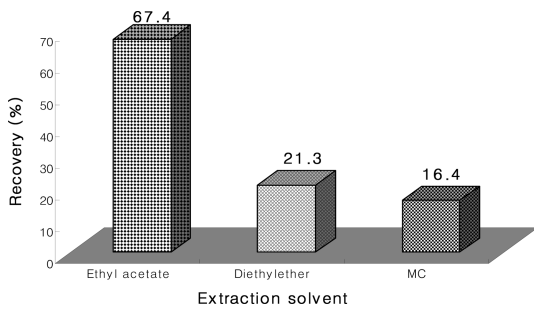


Fig. 8. Comparison of absolute recovery by extraction solvents.

트의 추출효율이 다른 두 용매에 비해서 월등하게 높았다(Fig. 8).

3.2.2. 지베렐린 산 유도체화의 최적화

지베렐린 산의 유도체화 반응 효율을 높이기 위해 반응온도, 반응시간, 반응용매(THF)의 양, 염기(트리에틸아민)의 양, 유도체화 물질(페나실 브로마이드)의 양 등 실험 인자를 변화시켜 가면서 최적의 유도체화 조건을 찾는 실험이 수행되었다.

1) 반응온도 및 반응시간의 영향

유도체화 반응을 진행시킬 때 반응 환경은 반응 속도와 반응 정도에 큰 영향을 미친다. 지베렐린 산과 페나실 브로마이드의 최적의 반응 조건을 확립하기 위해 다른 조건은 유지한 채 반응온도와 반응시간을 조절하였다. 반응온도는 40, 50, 60, 70, 80, 90 °C에서 반응을 시킨 후 HPLC로 분석한 결과 90 °C에서 가장 높은 면적을 얻을 수 있었으며 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다.

한편, 반응 시간은 15 분, 30 분, 1~8 시간으로 변화시켜서 반응시킨 결과 1 시간이 가장 효율적임을 확인할 수 있었다(Fig. 10).

2) THF 양의 영향

지베렐린 산의 유도체화를 위해 사용한 THF 용매

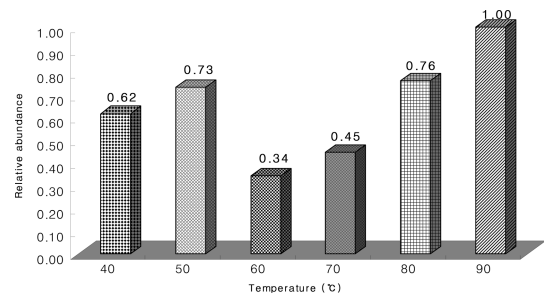


Fig. 9. Comparison of derivatized GA₃ according to reaction temperatures.

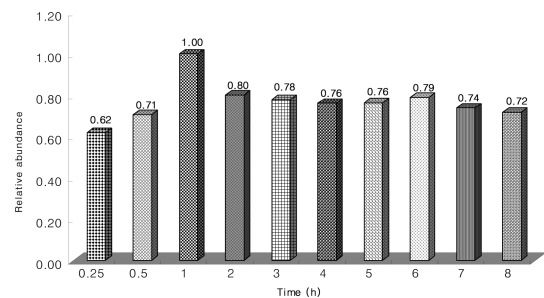


Fig. 10. Comparison of derivatized GA₃ according to reaction times.

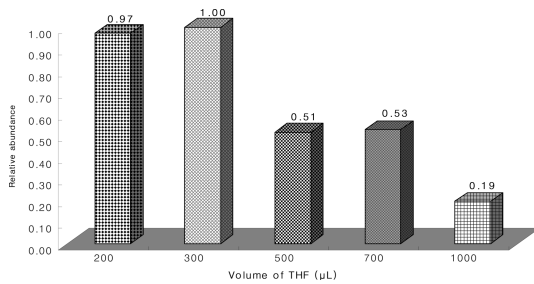


Fig. 11. Effect of according to volume of tetrahydrofuran.

는 반응에는 참여하지 않고, $-\text{COO}^-$ 와 H^+ 의 이온화 상태를 잘 유지하여 반응이 쉽게 일어나도록 작용하는 용매이다. 따라서 다른 반응 조건은 일정하게 유지한 채 반응 용매인 THF의 양을 각각 200, 300, 500, 700, 1000 μL 에서 반응시켜 HPLC에서의 피크 면적을 비교하였으며, 반응용매의 양이 작아질수록 상대면적비가 증가함을 확인할 수 있었으며 반응 용매의 양을 300 μL 로 선택하였다(Fig. 11).

3) 페나실 브로마이드 양의 영향

페나실 브로마이드는 일반적으로 카르복시산 ($-\text{COOH}$) 작용기에 유도체화시킬 때 사용되는 물질이며, 이 페나실 브로마이드의 벤질기가 발색단을 가지고 있어 지베렐린 산의 최대흡수파장을 높여 주면서 HPLC/UV-vis에서 지베렐린 산을 감도 좋게 검출할 수 있도록 해준다. THF 용매에 0.2 M이 되도록 페나실 브로마이드 용액을 제조하였고 각각 10, 20, 30, 40, 50 μL 로 가해준 결과 40 μL 일 때 HPLC에서 피크 면적이 가장 크게 나타났다(Fig. 12).

4) 트리에틸아민 양의 영향

페나실 브로마이드를 사용하여 지베렐린 산을 효과적으로 유도체화 하기 위해 트리에틸아민을 염기로 사용하였다. 다른 조건은 유지한 채 트리에틸아민의 양을 2, 5, 8, 10, 20, 30 μL 로 가해준 결과 30 μL 를

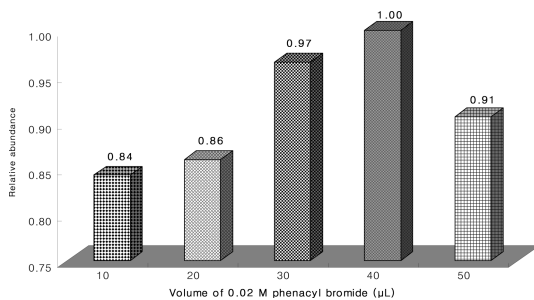


Fig. 12. Effect of according to volume of phenacyl bromide.

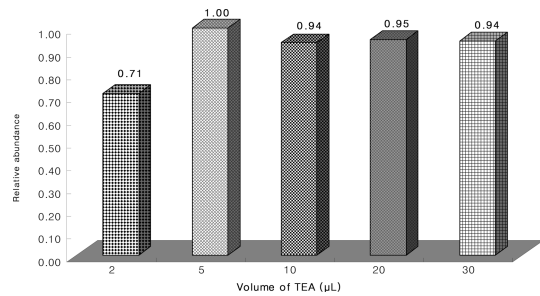


Fig. 13. Effect of according to volume of triethylamine.

가해주었을 때 가장 높은 상대면적비를 얻을 수 있었다(Fig. 13).

3.3. 유효성 검증

3.3.1. 검출한계, 정량한계, 정확도 및 정밀도

지베렐린 산이 잔류하지 않음이 확인 된 각 바탕시료(사과, 배)에 지베렐린 산 표준물질을 소량첨가 (spike)한 후 유효성 검증을 실시하였다. 사과의 경우, 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.008 mg/kg, 0.027 mg/kg로 나타났으며, 0.15 mg/kg~3.2 mg/kg에서 88.1~105.9% 범위의 상대회수율을 나타냄으로써 비교적 좋은 정확도를 보였고, 상대표준편차(RSD%)는 1.0~4.6% 범위로 양호한 정밀한 값을 나타내었다.

배의 경우, 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.003 mg/kg, 0.012 mg/kg로 나타났으며, 0.15 mg/kg~4.0 mg/kg에서 84.4~108.4% 범위의 상대회수율을 나타냄으로써 정확도가 우수했다. 상대표준편차(RSD%)는 1.0~3.8% 범위로 비교적 정밀한 값을 나타내었다 (Table 1).

3.3.2. 검정곡선

사과의 경우 시료 5 g 중 농도가 0.15, 0.3, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg/kg이 되도록 표준물질을 소량첨가한 후 (n=3) HPLC/UV-vis로 분석하여 농도 대 면적 값으로 검정곡선을 작성한 결과 $y=1950.6x+97.286$ ($r^2=0.9973$)의 직선식을 얻었다.

배의 경우, 사과와 마찬가지로 시료 5 g 중 농도가 0.15, 0.3, 0.45, 1.0, 2.0, 4.0 mg/kg이 되도록 표준물질을 소량 첨가한 후 (n=3) HPLC/UV-vis로 분석하여 농도 대 면적 값으로 검정곡선을 작성한 결과 $y=1501.1x + 21.877$ ($r^2=0.9963$)의 직선식을 얻었다.

Table 1. LOD, LOQ, accuracy and precision for gibberellic acid from apple and pear

Compound	Matrices	LOD* (mg/kg)	LOQ** (mg/kg)	Conc. (mg/kg)	RSD*** (%) (n=3)	Accuracy*** (recovery%) (n=3)
Gibberellic acid	Apple	0.008	0.027	0.15	1.8	97.8
				0.3	1.0	88.1
				0.4	4.6	88.9
				0.8	1.4	105.7
				1.6	2.5	105.9
				3.2	4.0	98.4
	Pear	0.003	0.012	0.15	1.5	84.4
				0.3	1.2	86.2
				0.45	3.0	91.1
				1.0	3.8	102.0
				2.0	1.0	108.4
				4.0	1.0	97.9

*LOD(Limit of Detection)=3σ/s

**LOQ(Limit of Quantitation)=10σ/s (σ=standard deviation, s=slop of calibration curve)

***Accuracy(%)=(measured value/spiked value) × 100

4. 결 론

사과나 배 등의 과일류에 농약으로 사용하고 있으며, HPLC에 사용되는 용매들의 cut-off 파장 근처에서 최대 흡수 파장이 나타나서 UV 검출기로는 분석이 힘든 지베렐린 산을 페나실 브로마이드를 사용하여 간편한 유도체화 반응을 통해 유도체화된 화합물을 생성시킴으로써 HPLC/UV-vis를 이용하여 감도있고 효율적으로 분석 할 수 있는 방법을 확립하였다. 또한 LC/ESI-MS를 사용하여 유도체화 된 지베렐린 산의 분자량과 구조를 확인하였다.

사과의 경우, 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.008 mg/kg, 0.027 mg/kg로, 배의 경우, 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)는 각각 0.003 mg/kg, 0.012 mg/kg로 낮은 검출한계와 정량한계를 보였다. 상대회수율을 측정 한 결과 사과에서 88.1~105.9% 범위로, 배에서는 84.4~108.4% 범위로 나타났다. 두 매트릭스에서 모두 상대표준편차(RSD%)가 4.6% 이하를 나타냄으로써 확립된 실험방법은 좋은 정밀도를 나타내었으며, 정량분석을 위한 검정곡선은 작업구간 내에서 $r^2=0.996$ 이상의 좋은 직선성을 나타내었다.

페나실 브로마이드를 이용한 유도체화 방법은 HPLC/UV-vis를 이용한 지방산이나 유기산 분석에 사용되며,²³⁻²⁶ 고온에서 1시간 이내의 반응을 통해 쉽게 유도체화 반응이 진행되었다. 하지만, 본 논문에서 확립된 지베렐린 산의 페나실 브로마이드를 이

용한 HPLC/UV-vis 분석방법은 기존에 α-bromo-2-acetonaphthone를 이용하여 지베렐린 산의 최대흡수 파장을 높여 HPLC/UV-vis로 분석한 분석법²⁷에 비해 간편하고 적은 시간이 소모된다는 장점이 있으며, 과일류 중에서 직접 지베렐린 산 추출을 통해 과일류 중에 존재하는 지베렐린 산을 낮은 농도에서 높은 정확도와 정밀도를 가지고 분석하는데 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. W. Xie, C. Han, Z. Zheng, X. Chen, Y. Qian, H. Ding, L. Shi and C. Lv, *Food Chem.*, **127**, 890-892 (2011).
2. Z. Ma, L. Ge, A. S. Y. Lee, J. W. H. Yong, S. N. Tan and E. S. Ong, *Anal. Chim. Acta.*, **610**, 274-281 (2008).
3. S. W. Johnson and C. R. Coolbaugh, *Plant Physiol.*, **94**, 1696-1701 (1990).
4. P. Tansupo, P. Suwannasom, D. L. Luthria, S. Chanthai and C. Ruangviriyachai, *Phytochem. Anal.*, **21**, 157-162 (2010).
5. G. Castillo and S. Martinez, *J. Chromatogr. A*, **782**, 137-139 (1997).
6. M. Kelen, E. C. Demiralay, S. Sen and G. Ozkan, *Turk J Chem.*, **28**, 603-610 (2004).
7. D. Weiss, A. Luit, E. Knegt, E. Vermeer, J. N. M. Mol and J. M. Kooter, *Plant Physiol.*, **107**, 695-702 (1995).

8. T. Moritz, J. J. Philipson and P. C. Oden, *Plant Physiol.*, **93**, 476-1481 (1990).
9. P. C. Oden, L. Schwenen and J. E. Graebe, *Plant Physiol.*, **84**, 516-519 (1987).
10. C. Birkemeyer, A. Kolasa and J. Kopka, *J. Chromatogr. A*, **993**, 89-102 (2003).
11. X. Pan, R. Welti and X. Wang, *Phytochem.*, **69**, 1773-1781 (2008).
12. M. Stephan, F. Bangerth and G. Schneider, *Plant Growth Regul.*, **28**, 55-58 (1999).
13. S. D. S. Chiwocha, S. R. Abrams, S. J. Ambrose, A. J. Cutler, M. Loewen, A. R. S. Ross and A. R. Kermode, *The Plant J.*, **35**, 405-417 (2003).
14. Y-H Li, F. Wei, X-Y Dong, J-H Peng, S-Y Liu and H Chen, *Phytochem. Anal.*, **22**, 442-449 (2011).
15. M. I. A. Flores, R. Romero-Gonzalez, A. G. Frenich and J. L. M. Vidal, *J. Sep. Sci.*, **34**, 1517-1524 (2011).
16. S. Hou, J. Zhu, M. Ding and G. Lv, *Talanta*, **76**, 798-802 (2008).
17. S. Fan, X. Wang, P. Li, Q. Zhang and W. Zhang, *J. Sep. Sci.*, **34**, 640-650 (2011).
18. A. Kazmierczak, *Acta Physiologiae Plantarum*, **21**, 345-348 (1999).
19. L. Ge, C. Y. C. Peh, J. W. H. Yong, S. N. Tan, L. Hua and E. S. Ong, *J. Chromatogr. A*, **1159**, 242-249 (2007).
20. Y. Izumi, A. Okazawa, T. Bamba, A. Kobayashi and E. Fukusaki, *Anal. Chem. Acta.*, **648**, 215 (2009).
21. K-H Park, *J. Korean Agricultural Chemical Society*, **28**, 2 (1985).
22. S. D. Seeley and L. E. Powell, *Anal. Biochem.*, **58**, 39-46 (1974).
23. T. Stephen, M. Paul E. and H. Charles L., *J. Chromatogr. A*, **299**, 365-376 (1984).
24. C. Federica, G. Carfagnini, C. Antonio Di and S. Roberto, *J. Chromatogr. A*, **362**, 47-53 (1986).
25. E. Metatsi, M. C. Gennaro, C. Baiocchi and M. Savigliano, *J. Chromatogr. A*, **322**, 177-189 (1985).
26. A. Mehta, A. M. Oeser and G. Carlson, *J. Chromatogr. B*, **719**, 9-23 (1998).
27. M-S. Shiao and Y-Y. Hao, *Bot. Bull. Academia Sinica*, **26**, 105-111 (1985).