

콩 Isoflavone의 정량분석

김성란[†] · 김지선 · 안지윤 · 하태열

한국식품개발연구원

I. 서 언

콩의 isoflavone은 항산화, 항암활성 및 에스트로겐 유사활성을 지니며 골다공증, 심혈관질환 예방 등에 효과를 갖는 기능성 성분으로 주목받고 있다.^{1,2)}

Isoflavone 정량은 주로 HPLC를 이용하고 있으며 용매 조성을 변화시키면서 12종의 isoflavone을 용리시키는 방법^{3,4)}과 전처리로서 산이나 효소로 당을 가수분해시켜 해당 aglycon 형태로 변환시킨 후 총량을 정량하는 방법이 이용되고 있다.^{5,6)} 최근에는 GC, ELISA, CE를 이용한 정량 분석법도⁷⁻⁹⁾ 보고되기는 하였으나 산이나 효소로 가수분해 후 HPLC로 정량하는 방법은 각종 유도체 형태로 존재하는 isoflavone을 기본 aglycone으로 변화시켜 빠르고 간편하게 정량할 수 있다는 장점이 있다.

Haytowitz 등은¹⁰⁾ 시판 콩제품 전체에 대한 isoflavone분석을 실시하고 기존에 발표된 30여 논문의 결과를 종합하여 isoflavone의 database를 구축하였는데 통일된 data 종합을 위하여 이미 발표된 논문의 배당체 분석치를 분자량비로 환산하여 각 isoflavone의 total aglycone value로 표시하였다. Aglycone 형태로 isoflavone을 정량하는 방법은 가공 중 isoflavone의 mass balance나 대두 제품간 함량 비교 시 isoflavone 유도체들의 분자량의 차이에서 발생되는 혼란을 배제시킬 수 있다는 장점도 있다. 또한 isoflavone 배당체보다 aglycone형태가 흡수 및 생체 이용성이 더 높다는 결과¹¹⁾들이 최근 보고됨에 따라 체내에서 이용되는 형태인 aglycone으로 정량적으로 변환시킨 후 총량을 정량하는 방법의 유용성은 더욱 커지게 되었다.

그러나 배당체가 완전히 aglycone으로 가수분해되지 않거나 이미 가수분해된 aglycone이 과도하게 분해될 경우 정확한 정량에 장애요인이 되고 있어 정확한 가수분해 및 정량법을 확립하고자 그동안 산 가수분해 농도와 시간, 추출조건에 대한 연구가 진행되었다.^{5,12,13)}

현재 콩의 isoflavone 분석법으로는 (I) HPLC를 이용하여 용매 조성을 변화시키면서 12종의 isoflavone을 용리시키는 방법과 (II) isoflavone isomer 들을 해당 aglycone으로 정량적으로 변환시킨 후 총량을 정량하는 방법이 주로 사용되고 있다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-780-9066 (E-mail) ran@kfri.re.kr

II. 분석방법

1. 이소플라본 유도체의 함량 및 정량분석

1) 장치 및 기구

- (1) HPLC system - gradient system이 가능하고 UV detector가 부착된 HPLC
- (2) Column - C18 계열 reverse phase column(예 YMC AM303(4.6×250 mm))

2) 시약

- (1) 추출용액: 0.1% 초산을 함유하는 70% 메탄올 (메탄올 70 ml에 탈이온수 30 ml와 초산 0.1 ml 첨가 후 혼합)
- (2) Acetonitrile: HPLC 용
- (3) Deionized water: HPLC 용
- (4) Isoflavone 표준물질: daidzein, genistein, genistin(이상 Sigma Co.), glycitein, daidzin, glycitin, malonyldaidzin, malonylgenistin, malonylglycitin, acetyldaidzin, acetylgenistin, acetylglycitin(이상 Fujicco. Co.)

3) 조작

- (1) 분쇄하거나 동결건조한 시료 0.1-0.5 g을 정확히 칭량하여 추출용액(0.1% 초산을 함유하는 70% 메탄올) 10-50 ml를 첨가하여 진탕한다.
- (2) 추출동안 malonyl, acetyl 유도체의 탈탄산반응이 일어나지 않도록 추출용액에 0.1% 초산이 함유되어 있어야 하며 추출용기는 뚜껑이 있는 시험관이나 corning tube를 이용한다.
- (3) 상온에서 4-12시간 추출 후 추출액을 원심분리하거나 여과한다. 이때 시료에 따라 원심분리 잔사를 대상으로 2회 이상 반복추출이 필요한 경우가 있다.
- (4) 상등액 또는 여액을 50 ml로 정용하고 그 일부를 취하여 syringe filter로 여과한 후 여액을 HPLC로 분석한다.
- (5) HPLC 이동상은 0.1% acetic acid를 함유한 water(A용매)와 0.1% acetic acid를 함유한 acetonitrile(B 용매)를 이용하며 용리 프로그램은 다음과 같다.

시간(분)	A용매	B 용매
0	85	15
50	65	35
60	0	100
65	85	15

- (6) 유속은 1.0 ml/min으로 조절하고, volumn은 20 µl injection한다. UV detector의 파장은 254 nm으로, 감도는 0.32로 분석한다.

- (7) Isoflavone 표준물질을 80% methanol에 용해시켜 5-150 µg/ml 범위로 표준용액을 조제한다. 이 Isoflavone 표준용액으로 HPLC 분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하고 시료중의 isoflavone 함량을 산출한다.

2. 이소플라본 배당체의 가수분해 및 총 이소플라본 함량 분석

1) 장치 및 기구

- (1) HPLC system - UV detector가 부착된 HPLC
- (2) Column - C18 계열 reverse phase column(예 YMC AM303(4.6×250 mm))
- (3) 가수분해용 heating 기구(예 heating block, water bath, or heating mentle)

2) 시약

- (1) 염산(hydrochloric acid) - 1N HCl
- (2) 메탄올(methanol)
- (2) Acetonitrile: HPLC용
- (3) Deionized water: HPLC용
- (4) Isoflavone 표준물질: daidzein, genistein(Sigma Co.), glycitein(Fujicco. Co.)

3) 조작

- (1) 분쇄하거나 동결건조한 시료 0.1-0.5 g에 각각 1N HCl 15 ml를 첨가한다.
- (2) 120°C heating 기구에서 90분 동안 산 가수분해시켜 aglycone으로 전환시킨다. 이때 염산 대신 β-glucosidase 등 효소가수분해를 이용할 수 있다.
- (3) 가수분해 시킨 시료는 상온으로 냉각시킨 후 메탄올 35 ml를 첨가하여 교반하면서 1-2시간 isoflavone을 추출한다.
- (4) 추출액을 원심분리하거나 여과한다. 이때 시료에 따라 원심분리 잔사를 대상으로 2회 이상 반복추출이 필요한 경우가 있다.
- (4) 상등액 또는 여액을 50 ml로 정용하고 그 일부를 취하여 syringe filter로 여과한 후 여액을 HPLC로 분석한다.
- (5) 이동상은 0.1% acetic acid를 함유한 acetonitrile과 0.1% acetic acid를 함유한 water를 30:70 비로 혼합한 용매를 사용한다.
- (6) 유속은 1.0 ml/min으로 조절하고, volumn은 20 µl injection한다. UV detector의 파장은 254 nm으로, 감도는 0.32로 분석한다.
- (7) Isoflavone 표준물질을 80% methanol에 용해시켜 5-150 µg/ml 범위로 표준용액을 조제한다. 이 Isoflavone 표준용액으로 HPLC 분석을 실시하고 peak area로부터 검량선을 작성하고 시료중의 isoflavone 함량을 산출한다.

III. 결 과

콩 종실의 isoflavone 배당체의 종류별 분포는 malonylgenistin과 malonyldaidzin이 70% 이상 대부분을 차지하며 acetyl 배당체와 aglycone 형태는 미량 존재한다고 보고되었다. Fig. 1은 위의 분석조건에 따른 isoflavone aglycone과 배당체 12종의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

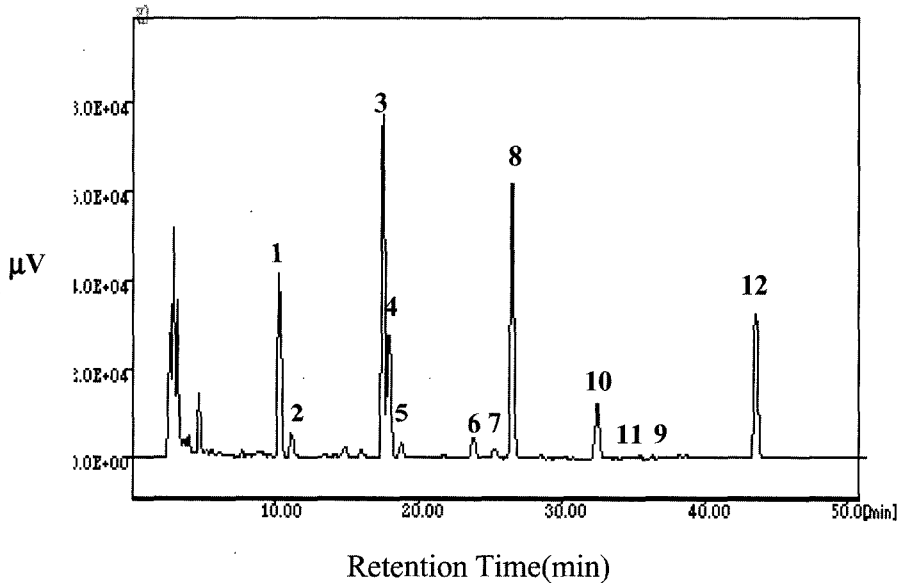


Fig. 1. HPLC chromatogram of isoflavone glucoside and aglycones from soybean .

(1, daidzein; 2, glycitein; 3, genistin; 4, malonyldaidzin; 5, malonylglycitin; 6, acetyldaidzin; 7, acetylglycitin; 8, malonylgenistin; 9, acetylgenistin; 10, daidzein; 11, glycitein; 12, genistein) Conditions: column YMC C₁₈, solvent A(water with 0.1% acetic acid) and B(acetonitrile with 0.1% acetic acid), linear gradient of solvent B from 15 to 35% over 40 min, flow rate 1 ml/min, detection UV@254 nm.

국내의 시판 isoflavone 제제 중의 isoflavone 함량과 유도체 분포를 분석한 결과는 Table 1과 같다. Isoflavone을 추출한 원료에 따라 이소플라본 유도체 분포가 차이가 났다. Product E는 농축 콩단백 제조사의 부산물인 시럽으로부터 이소플라본을 제조하고 있어 일반 콩에서와 유사한 분포를 나타내었다. Product F는 이소플라본 함량이 높은 콩 배축(hypocotyl)으로부터 이소플라본을 추출하여 제품화하여 glycitin계 isoflavone의 함량이 매우 높은 특징이 있었다. 국내 isoflavone 제제 중 Product C는 미생물 유래의 효소로 aglycone 비율을 높인 제품인데 glycitin계 배당체에 대한 선택성은 낮아 glycitin계 배당체는 전환율이 낮았다. 한편 국내 제품인 Product D는 aglycone으로만 구성된 순도 40%의 제품으로 나타났다.

콩 이외에 칩(*Pueraria thunbergiana*)로부터 isoflavone을 분석할 경우 위의 분석법이 통용되며 Fig. 2와 같이 Puerarin 함량이 가장 높고 daidzin peak 앞에 분리되는 것으로 나타났다.

Table 1. Isoflavone contents (%) and isomer profile in commercial isoflavone supplements .

	Domestic product				Imported product			
	A	B	C	D	E	F	G	H
Daidzin	1.59	1.71	-	-	13.91	16.25	0.55	5.44
Glycitin	0.33	0.06	0.97	-	3.75	10.32	1.81	1.18
Genistin	4.61	5.85	-	-	19.86	4.59	0.31	3.89
Malonyldaidzin	0.37	-	-	-	0.18	0.69	-	2.33
Malonylglycitin	-	-	-	-	-	0.13	-	0.20
Acetyldaidzin	1.26	0.87	-	-	0.94	0.50	0.78	0.26
Acetylglycitin	0.36	0.38	0.20	-	0.36	0.35	-	0.88
Malonylgenistin	0.48	0.32	-	-	0.54	0.34	-	2.53
Daidzein	6.86	6.47	7.99	18.44	0.28	0.24	9.07	11.69
Glycitein	1.40	0.87	9.14	3.59	0.16	0.10	4.07	2.21
Acetylgenistin	1.56	1.84	-	-	1.34	0.20	-	0.24
Genistein	5.18	10.62	3.83	17.04	0.29	0.21	3.43	9.73
SUM	24.00	28.99	22.13	39.07	41.61	33.92	20.02	40.58

Table 2는 국내산 대두 중 장류 및 두부콩(황금콩, 진품콩), 콩나물콩(단엽콩, 은하콩), 대립 검정콩(검정콩1호), 소립 검정콩(다원콩)과 isoflavone 함량이 높다고 보고된 신팔달콩 2호와 쥐눈이콩을 선정하여 total aglycone value로 isoflavone 함량을 정량한 결과이다. 신팔달콩 2호의 함량이 2,399 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았으며 단엽콩과 쥐눈이콩 순이었다. 콩 종실을 배축(hypocotyl), 자엽(cotyledon) 및 종피로 나누어 isoflavone 함량을 분석한 결과, 배축에서의 함량이 자엽보다 높았으며 isoflavone 함량이 낮은 콩일수록 배축과 자엽의 함량 차이가 컸다. 콩 품종간 isoflavone 함량 차이는 주로 자엽 내 isoflavone 함량에 크게 좌우되는 것으로 나타났다. glycitein은 배축에서만 검출되었다. 배축과 자엽에 존재하는 isoflavone은 다른 기작 및 다른 유전요인에 의하여 축적될 것이라는 보고¹⁴⁾와 같이, 배축의 경우 자엽보다 환경의 영향을 적게 받으면서 고농도로 isoflavone을 축적하는 기작이 존재하리라 판단된다. Eldridge 등¹⁵⁾은 몇 품종의 콩 isoflavone 함량을 분석한 결과, 품종간에 116-309 mg%의 함량 차이를 보였으며 같은 품종이라도 재배지역에 따라 46-195 mg%의 함량변이를 나타내었다고 보고한 바 있다. 국내산 콩 품종을 대상으로 한 isoflavone 함량은 최 등¹²⁾과 김 등¹⁶⁾에 의해 보고되었는데 각각 46-232 mg%, 46-418 mg% 범위였으며, 함량과 조성이 품종 및 재배환경에 따라 큰 차이가 있다고 보고하였다.

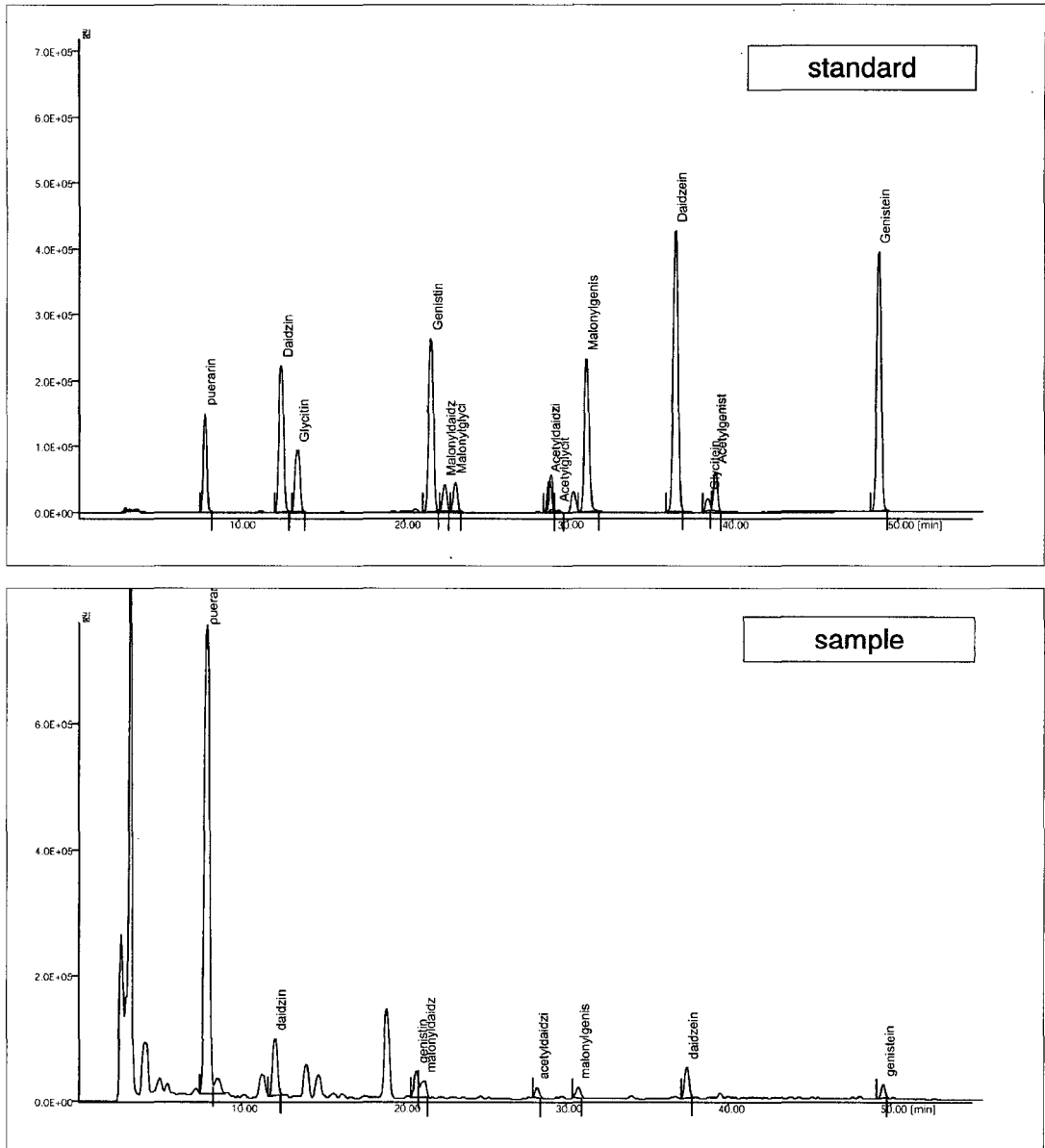


Fig. 2. HPLC chromatogram of extract of *Pueraria thunbergiana*. Conditions: column YMC C₁₈, solvent A(water with 0.1% acetic acid) and B(acetonitrile with 0.1% acetic acid) , linear gradient of solvent B from 15 to 35% over 50 min, flow rate 1 ml/min, detection UV@254 nm.

Table 2. Isoflavone contents of whole seeds, hypocotyl and cotyledon in Korean soybean cultivars as total aglycone value.

Soybean		Isoflavone ($\mu\text{g/g}$, d.b.)			
		Daidzein	Genistein	Glycitein	Total
Whole seed	Hwanggumkong	158.7	390.1	67.4	616.1
	Jinpumkong	507.8	652.9	111.1	1,271.9
	Sinpaldal 2	834.6	1,278.5	285.8	2,398.9
	Danyupkong	720.8	854.7	204.0	1,779.5
	Eunhakong	408.8	599.1	258.9	1,266.0
	Geomjongkong 1	213.2	336.6	78.6	628.4
	Dawonkong	98.5	216.6	56.8	371.9
	Juinunikong	614.9	854.5	186.2	1,655.6
Hypocotyl	Hwanggumkong	4,313.5	1,311.3	3,974.2	9,599.0
	Jinpumkong	3,964.6	1,574.2	11,382.4	16,921.2
	Sinpaldal 2	3,619.0	1,269.7	8,858.9	13,747.6
	Danyupkong	3,339.9	1,416.9	9,988.6	14,745.4
	Eunhakong	2,418.9	1,472.1	8,339.6	12,230.6
	Geomjongkong 1	5,246.0	859.9	6,776.6	12,882.5
	Dawonkong	2,334.7	1,316.2	2,469.3	6,120.1
	Juinunikong	4,595.6	1,208.1	4,003.9	9,807.6
Cotyledon	Hwanggumkong	182.4	531.8	-	714.2
	Jinpumkong	456.0	566.4	-	1,022.4
	Sinpaldal 2	894.3	1,498.8	-	2,393.1
	Danyupkong	679.2	782.7	-	1,461.9
	Eunhakong	609.0	790.9	-	1,399.9
	Geomjongkong 1	163.8	377.5	-	541.3
	Dawonkong	74.5	300.7	-	375.2
	Juinunikong	523.8	1,038.7	-	1,562.5

참고문헌

1. Messina, M., V. Persky, K. D. R. Setchell, and S. Branes. 1994. Soy intake and cancer risk: A review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer* 21 : 113-131.
2. Kweon, T. W., Y. S. Song, J. S. Kim, G. S. Moon, J. I. Kim, and J. H. Hong. 1998. Current research on the bioactive functions of soyfoods in Korea. *Korea Soybean Digest* 15 : 1-12.
3. Wang, H. and P. A. Murphy. 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 42 : 1674-1677.

4. Barnes, S., M. Kirk, and Coward, L. 1994. Isoflavones and their conjugates in soy foods : Extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 42 : 2466-2474.
5. Wang, G., S. S. Kuan, J. Francis, G. M. Ware, and A. S. Carman. 1990. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its products. *J. Agric. Food Chem.* 38 : 185-190.
6. Setchell, K. D. R. and M. B. Welsh. 1987. High-performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. *J. Chromatog.* 386 : 315-323.
7. Fortis, T. and H. Adlercreutz. 1987. The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS. 1. Quantitation of estrogens after initial hydrolysis of conjugates. *J. Steroid Biochem.* 28 : 203-213.
8. Creeke, P. I., A. P. Wilkinson, H. A. Lee, M. R. A. Morgan, K. R. Price, and M. J. C. Rhodes. 1998. Development of ELISAs for the measurement of the dietary phytoestrogens daidzein and equol in human plasma. *Food Agric. Immunology* 10 : 325-337.
9. Mellenthin, O. and R. Galensa. 1999. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC : detection of soy, lupin and pea protein in meat products. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 594-602.
10. Haytowitz, D. B., G. R. Beecher, S. Bhagwat, J. M. Holden, and P. A. Murphy. 1999. Development of a database on the isoflavone content of foods. IFT Annual Meeting p. 106.
11. Hutchins, A. M., J. L. Slavin, and J. W. Lampe. 1995. Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Diet. Assoc.* 95 : 545-551.
12. Choi, J. S., T. W. Kweon, and J. S. Kim. 1996. Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Foods and Biotechnology* 5 : 91-93.
13. Franke, A. A., L. J. Custer, C. M. Cerna, and K. K. Narala. 1994. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 42 : 1905-1913.
14. Tsukamoto, C., S. Shimada, K. Ijita, S. Kudou, M. Kokubun, K. Okubo, and K. Kitamura. 1995. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: Changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 1184-1192.
15. Eldridge, A. C. and W. F. Kwolek. 1983. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.* 31 : 394-396.
16. Kim, S. R., H. D. Hong, and S. S. Kim. 1999. Some properties and contents of isoflavone in soybean and soybean foods. *Korea Soybean Digest* 16 : 35-46.

Quantitative Analysis of Soybean Isoflavones

Sung-Ran Kim[†], Ji-Sun Kim, Ji-Yoon Ahn and Tae-Youl Ha

*Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea
+82-31-780-9066, ran@kfri.re.kr*