Journal of the Korean Chemical Society
2005, *Vol. 49, No. 4*
Printed in the Republic of Korea

고성능 액체 크로마토그래피에 의한 중국산과 한국산 콩 및 장류에 포함된 이소플라본의 분석

郑金珠 · 金银哲 · 노경호*
인하대학교 화학공학과, 초정밀생물분리기술연구센터
(2005. 5. 9 접수)

Analysis of Isoflavones from Korean and Chinese Soybean and Processed Products by HPLC

Jinzhu Zheng, Yinzhe Jin, and Kyung Ho Row*
Center for Advanced Bioseparation Technology, Department of Chemical Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received May 9, 2005)

요 약. 한국산 및 중국산 콩, 청국장, 그리고 된장에 포함된 네 가지 이소플라본(다이드진, 제니스틴, 다이드제인, 제니스테인)을 추출하고 분석하였다. 60% 수용성 에탄올을 사용하여 콩, 청국장, 된장을 추출하였으며 추출 액은 역상 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 분석하였다. 이동상은 이성분계 A(물/아세트산, 99.9/0.1, vol%)와 B(아세토나이트릴/아세트산, 99.9/0.1, vol%)을 사용하여(85:15-65:35, A:B vol.%)까지 50분 동안 선형 구배용매조성법으로 실험하였다. 분석용 RP-HPLC의 컬럼(4.6×250 mm, 5μm)을 사용하여 분석하였다. 중국산 콩에서 추출한 위의 세가지 이소플라본의 함량은 한국산 콩에서 추출한 함량보다 42.6% 많았다. 한국산 청국장에서 추출된 네 가지 이소플라본의 함량은 콩에서 추출된 이소플라본 함량의 1.6배 이상이 되었고 된장에서는 아주 적은 양의 이소플라본을 추출하였다.

주제어: 이소플라본, HPLC, 콩, 청국장, 된장

ABSTRACT. The four Isoflavones of daidzin, genistin, daidzein and genistein were extracted from Korean and Chinese soybean, fermented soybeans and soybean paste. The extracted samples were analyzed by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The mobile phase was applied to the binary system of A (water/acetic acid, 99.9/0.1, vol%) and B (acetonitrile/acetic acid, 99.9/0.1, vol%) from 85:15 (A: B vol%) to 65:35 (A: B vol%) in a gradient time of 50 min. The amount of isoflavones extracted from the Chinese soybean was extracted 42.6% more than that from the Korean soybean. For the Korean fermented soybean, the contents of the four isoflavones were more than 1.6 times of that from the soybeans. However, a slight amount of isoflavones was found in the soybean paste.

Keywords: Isoflavones, HPLC, Soybean, Fermented Soybeans, Soybean Paste

서 론

콩 뿐만 아니라 콩으로 만든 장류, 즉 청국장, 된장, 고추장 등은 우리나라에서 이미 오래 전부터 사용해 온 전통음식이다. 이들 식품에는 단백질이 많이 함유되어 있고 약리효과를 갖고 있는 색소의 한 종류인 페놀계 화합물인 이소플라본이 많이 함유되어 있다.[1]

이소플라본은 3개의 비배당체 다이드제인, 제니스테인, 글리스테인과 9개의 배당체 다이드진, 제니스틴, 글리시틴, 6″-O-acetyl-glucosides(다이드진, 제니스

틴, 글리시틴), 6″-O-malonyl-glucosides(다이드진, 제니스틴, 글리시틴)로 이루어져 있다.[3] 이소플라본은 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 특성을 가지고 있어 질, 난자, 유선 등에 있는 에스트로겐 수용체를 활성화시키는 능력을 가지고 있다.[5-7] 따라서 유방암이나 전립선 질환 등의 예방에 효과가 있음이 알려져 있고, 항 산화작용을 갖고 있으며, 여성 골다공증을 억제하는데 중요한 역할을 한다. 또한 노화 유발, 염증, 당뇨, 동맥경화와 같은 질병에 관련 있는 효과와 세포를 보호하는 특성이 있으며, 혈관 질환 방지, 성인병에 유용하다.[8,9] 비배당체 다이드제인과 제니스테인은 저밀도 lipoprotein(LDL)의 항 산화활성의 암 억제와 식이요법 요소로서 중요하다.[10] 이소플라본의 항 암작용은 주로 유방암과 전립선암에서 나타나며 대장암에 대한 많은 연구가 있었지만 이에 대한 효과는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 이소플라본이 phytoestrogen으로서 에스트로겐과의 구조적 유사성으로 인해 항 암효과를 나타내기 때문에 호르몬과 직접 관계가 적은 대장암의 경우에는 효과가 크지 않았다.[11]

대두에 이소플라본은 약 0.1~0.4% 정도 함유되어 있으며, 함량과 조성은 대두의 품종과 재배지역, 재배연도와 같은 재배환경에 따라 차이가 있다. 대두에서도 부위에 따라 함량 차이가 있는데 배아에 약 2%가 함유되어 있어 자엽에 비해 많다. 또한 콩과 콩잎에 함유된 이소플라본의 함량도 다르다고 한다.[12,13] 대두 가공식품의 경우에는 가공공정에 따라 함량과 조성이 변하기 때문에 식품의 종류에 따라 차이가 있으며, 발효 대두식품은 발효과정에서 미생물에 의해 이소플라본이 분해되어 총량이 감소하는 경우도 있다.[14] 콩으로 제조한 식품에서는 배당체 다이드진, 제니스틴등이 많고 발효식품에서는 비배당체 다이드제인, 제니스테인 등이 주로 존재하는데 이유는 발효에 관계되는 박테리아에 의해 배당체 형태의 이소플라본으로부터 당이 분해되면서 비 배당체형태의 이소플라본이 형성되기 때문이다.[15,16]

콩은 한국의 주요한 농작물 중의 한가지로써 한국의 많은 연구실에서는 콩과 콩의 부산물인 청국장, 된장, 고추장 등에 포함된 이소플라본을 다양한 추출방법으로 추출하여 분석을 수행하였다.[13,14] 본 연구의 목적은 한국산 및 중국산 콩, 청국장 및 된장에 포함된 비배당체 다이드제인, 제니스테인, 및 그에 해당한 배당체 다이드진, 제니스틴의 종류별 함량을 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 분석하고 비교하는 것이다.

실 험

시약

본 연구에 사용된 한국 토종 콩은 2004년 강원도 정선에서 재배된 것으로서 청국장, 된장과 함께(주)메주와 챌리스트로부터 제공받았다. 중국산 콩은 2004년 중국 길림성 지구에서 재배된 것으로서 연변대학 화학공학과에서부터 제공받았다. 중국산 청국장, 된장은 (주)메주와 챌리스트에서 중국산 콩으로 제조하여 제공받았다. 표준 시료인 다이드제인 98%, 제니스테인 98%, 다이드진 99%와 제니스틴 99%는 Sigma(St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였으며, 모든 시료들은 주입하기 전에 막 여과지(0.2 μm, Waters Co.)를 이용하여 여과를 하였다. 이동상에 사용한 아세트산은 순도 99%로, 동양화학(Incheon Korea), 아세토나이트릴은 HPLC용 용매로 덕산화학(Ansan, Korea)에서 구입하였고, 이동상에 사용된 물은 3차 증류수로서 감압펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(HA-0.45 μm, Division of Millipore, Waters)를 이용하여 여과한 후 헬륨가스를 이용하여 용존산소를 탈기 후 사용하였다. *Fig.* 1에서는 다이드제인, 제니스테인, 다이드진, 제니스틴의 구조식을 나타내었다.

추출

콩, 청국장과 된장 분말 각각 5 g에 60% 수용성 에탄올 100 ml를 넣고 상온에서 2시간동안 교반하여 추출하였다. 추출액을 여과지로 여과한 후 회전식 증발기를 사용하여 10 ml로 농축하였다. 초고속냉동원심분리기를 15000 rpm에서 90분 동안 작용하여 원심분리를 한 후 막 여과지(0.2 μm)로 여과하여 시험용액

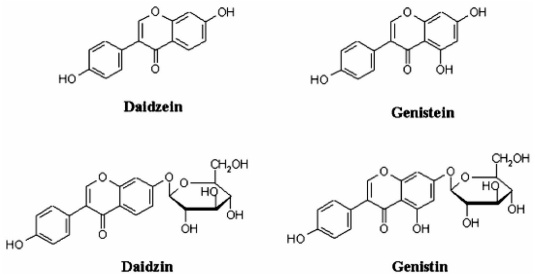

Fig. 1. Chemical structures of daidzein, genistein, daidzin and genistin.

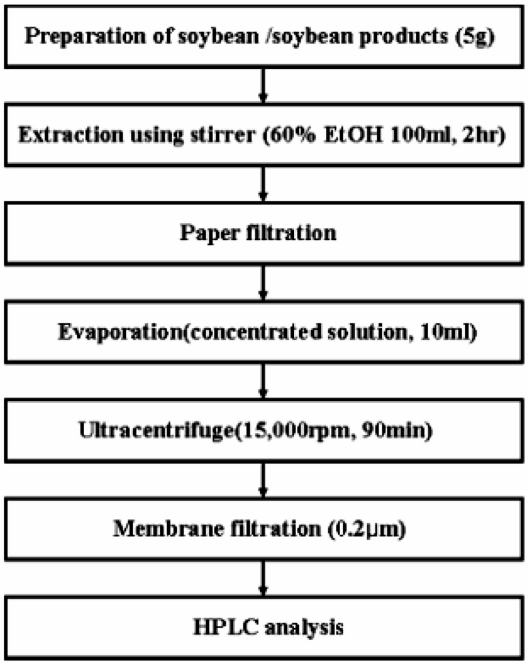

Fig. 2. Extraction and purification procedure.

으로 하였으며, 본 연구에 적용된 추출 및 정제의 전처리 방법을 *Fig.* 2에 나타내었다.

기기 및 HPLC 분석

60% 수용성 에탄올을 이용하여 추출된 시료는 농축을 하기 위해서 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co.)를 사용하였고, 초고속원심분리기는 MICRO 17R+(Hanil Science Industrial Co.)를 사용하였으며, HPLC 시스템으로는 Waters 600s Multisolvent Delivery System이 부착된 Waters 616 liquid chromatography(Waters Associates, Milford, MA, U.S.A.), Rheodyne injector(20 μl sample loop)을 사용하였다. 데이터 저장 시스템은 HP Vectra 500 PC에 설치된 Millennium 3.2, UV 검출기는 2487 UV dual channel detector(Waters, Milford, MA, U.S.A.)을 사용하였다. 사용된 컬럼은 5 μm인 물질이 충진 된 분석용 RP-HPLC의 컬럼(RS-tech OP C_{18}, 4.6×250 mm) 이다. 주입부피는 20 μl로 하였고, 유속은 1.0 ml/min로 고정하였다. UV detector의 wavelength는 254 nm로 고정하였다. 이동상은 이성분계 A: 물/아세트산(99.9/0.1, vol%), B: 아세토나이트릴/아세트산(99.9/0.1, vol%)을 사용하여(85:15-65:35, A:B vol.%)까지 50분 동안 선형 구배용매조성법으로, 실험하였다.

결과 및 고찰

강원도 정선의 콩과 중국 길림의 콩에서 이소플라본을 추출하였다. 두 가지 콩을 동일한 제조방법을 사용하여 청국장, 된장을 만들었다. 추출용매로는 60% 수용성에탄올을 사용하였는데 콩 및 장류에 함유된 이소플라본을 보다 많이 추출할 수 있기 때문이다.[11] 상온, 상압에서 물의 극성보다 낮은 값을 가지는 에탄올 수용액에서 이소플라본의 추출효율이 높았으며, 온도가 증가함에 따라 배당체의 일부 불질이 분해되어 다이드진과 제니스틴으로 변환되어 200 이상에서는 다이드진과 제니스틴이 점차 비배당체인 다이드제인과 제니스테인으로 변환된다.[17] 용기에 잘 분쇄된 시료 5 g을 60% 수용성 에탄올로 추출하고 정량분석을 위해 각 시료의 농도를 0.5 mg/ml로 고정하고 5 μl에서 20 μl로 주입부피를 변화시켜 얻은 피크의 면적과 주입된 양을 통해 검량선을 구하였다. 네 가지 이소플라본의 검량선을 *Table* 1에서 나타내었다. x와 y는 각각 크로마토그램에서 피크의 면적(AU×sec)과 표준용액의 주입부피에 따른 이소플라본의 양(μg)이다. 상관계수(r^2)는 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - y(x_i))^2}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \langle y_i \rangle)^2}, \langle y_i \rangle = \frac{\sum y_i}{N}$$

선형회귀분석에 의하면,다이드제인, 제니스테인, 다이드진, 제니스틴의 r^2는 0.98이상이었다. 본 실험에서는 실험의 재현성과 정확성을 위해서 3번의 반복실험을 거쳐 오차범위를 측정하였으며 또한 오차는 10% 미만이었다.

Fig. 3에서는 한국산, 중국산 콩 추출물에 대한 크로마토그램을 나타냈다. 중국산과 한국산 콩에서 추출되는 네 가지 이소플라본의 체류시간이 잘 일치한

Table 1. Calibration curve equations of the four individual isoflavone standards

Isoflavones	Equations	r^2
Daidzin	$y \times 10^3 = 0.42\ X - 1.00$	0.9990
Genistin	$y \times 10^3 = 0.23\ X - 0.27$	0.9960
Daidzein	$y \times 10^3 = 0.25\ X - 5.00$	0.9940
Genistein	$y \times 10^3 = 0.21\ X - 0.16$	0.9850

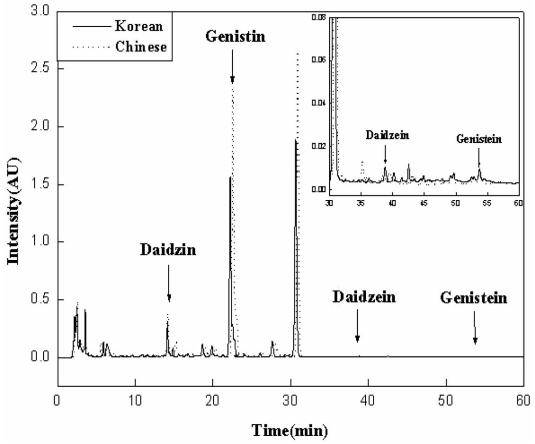

Fig. 3. Chromatogram of Isoflavones from Soybeans (Solvent A/Solvent B=85/15-65/35 vol.% for 50 min, 1 ml/min, 20 μl injection volume).

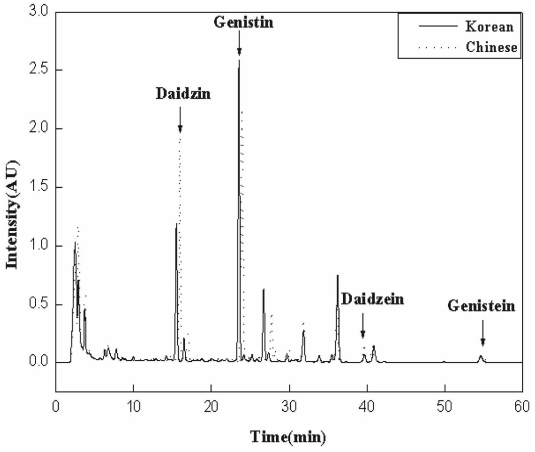

Fig. 4. Chromatogram of isoflavones from Fermented Soybeans (Solvent A/Solvent B=85/15-65/35 vol.% for 50 min, 1 ml/min, 20 μl injection volume).

것을 확인하였다. 네 가지 이소플라본의 추출량을 *Table* 2에서 알 수 있듯이, 다이드진의 양은 각각 151.89와 259.00 μg/g로서 중국산 콩에서 107.11 μg/g 더 추출되었다. 중국산 콩에서 추출된 제니스틴의 양은 905.09 μg/g로서 한국산 콩보다 386.47 μg/g 더 많았다. 배당체인 다이드진과 제니스틴의 경우, 중국산 콩에서 한국산 콩보다 493.58 μg/g 더 많았고, 비배당체인 경우에서는 중국산 콩에서 추출한 다이드제인과 제니스테인은 각각 6.37, 6.79μg/g로서 한국산 콩보다 각각 2.82, 4.68 μg/g 더 많이 추출되었다. 총체적인 추출량을 비교하였을 때, 중국산 콩에서 추출된 네 가지 이소플라본의 양은 1.18 mg/g로서 한국산 콩보다 0.50 mg/g 더 많았다. 콩에서 추출한 이소플라본의 양은 서로 다른 재배환경에 따라 다르며, 2004년도 재배한 중국산 콩의 이소플라본의 함량은 한국산 콩보다 많았다. 콩은 같은 품종이라 할지라도 생산연도와 재배환경에 따라 추출양이 달랐고, 여러 연구자들이 발표한 같은 품종의 콩에서의 이소플라본 추출양은 추출방법과 조건에 따라서 차이가 있었다[7]. 또한, 같은 지역에서 재배된 같은 품종의 콩에서의 이소플라본의 추출량을 생산년도 별로 분석한 결과에 의하면 1.176에서 3.309 mg/g까지의 추출량을 나타냄으로써 2.8배까지 차이를 보였으며, 생산지역보다 생산연도가 이소플라본의 함량에 더 큰 영향을 미친다고 하였다[7].

한국산 콩과 중국산 콩으로, 제조한 청국장의 크로마토그램을 *Fig.* 4로 나타내었다. 청국장은 콩을 삶아서 거기에 볏짚을 군데군데 꽂고 따뜻한 아랫목에 덮어두어서 표면이 회백색이 되고 끈적끈적한 실이 나게 띄워주는 것으로 만들어진다. 한국산과 중국산 콩으로 만든청국장에서 추출된 다이드진의 양은 각각 790.67와 926.19 μg/g로서 중국산 청국장에서 135.52 μg/g 더 추출되었다. 중국산 청국장에서 추출된 제니스틴의 양은 908.30 μg/g로서 한국산 청국장보다 42.33 μg/g 더 많았다. 배당체인 다이드진과 제니스틴의 경

Table 2. Extracted Amount of some isoflavones in soybeans and soybean products

Isoflavones	Soybeans		Fermented soybeans		Soybean pastes	
	Korean	Chinese	Korean	Chinese	Korean	Chinese
Daidzin	151.89±5.10	259.00±14.57	790.67±12.54	926.19±78.56	4.18±0.17	6.20±0.13
Genistin	518.62±18.29	905.09±75.35	865.97±2.52	908.30±32.49	13.49±0.82	12.51±0.09
Daidzein	3.55±0.28	6.37±0.55	38.14±1.49	68.08±6.38	36.81±3.44	1.70±0.08
Genistein	2.11±0.19	6.79±0.67	31.04±2.39	40.73±3.27	0.49±0.03	0.61±0.06
Total	676.17±23.86	1,177.26±91.14	1,725.82±18.94	1,943.30±120.70	54.96±4.46	21.02±0.36

(unit: μg, loading amount = 1 g of samples)

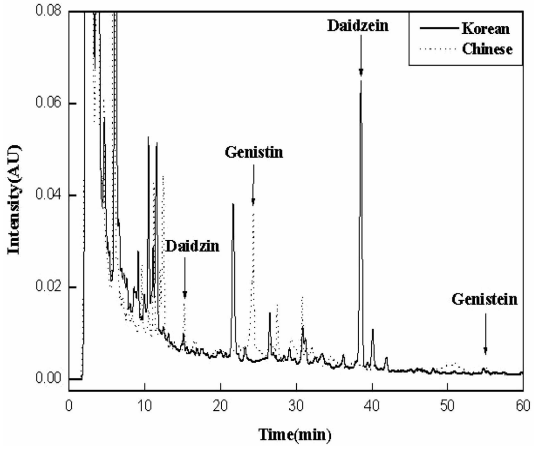

Fig. 5. Chromatogram of isoflavones from soybean pastes (Solvent A/Solvent B=85/15-65/35 vol.% for 50 min, 1 ml/min, 20 μl injection volume).

우, 중국산 청국장에서 한국산보다 177.85 μg/g 더 많다는 것을 알 수 있다. 비배당체인 경우, 한국산 청국장에서 추출한 다이드제인과 제니스테인은 각각 38.14, 31.04 μg/g로서 중국산 청국장보다 29.94, 9.69 μg/g 더 적게 추출되었다. 총체적인 추출량을 비교하였을 때, 중국산 청국장에서 추출된 네 가지 이소플라본의 양은 1.94 mg/g로서 한국산 청국장보다 0.22 mg/g 더 많았다.

한국산 콩과 중국산 콩으로 제조한 된장의 크로마토그램을 *Fig.* 5로 나타냈다. 콩 추출물과 청국장의 추출물과 매우 다르게, 된장에서 포함된 이소플라본의 양이 아주 적었다. 정량분석을 한 결과, 한국산 콩으로 제조한 된장에서 배당체인 다이드진과 제니스틴의 추출양은 각각 4.18, 13.49 μg/g로서 중국산 콩으로 제조한 된장보다 다이드진은 2.02 μg/g 적었지만, 제니스틴은 0.98 μg/g 더 많았다. 비배당체인 다이드제인과 제니스테인을 비교하면, 한국산 콩으로 제조한 된장에서 추출한 두 가지 비배당체의 양은 37.30 μg/g으로서 중국산 콩으로 제조한 된장의 2.6배였다. 한국산 콩으로 제조한 된장은 다이드제인의 양이 많이 추출되었으며 네 가지 이소플라본의 66%를 차지한다. 네 가지 이소플라본의 전체 추출 양을 비교하여 보면, 한국산 콩으로 제조한 된장에서의 양은 중국산 콩으로 제조한 된장에서의 양의 2.61배에 도달하였다.

Table 2에서 네 가지 이소플라본의 추출량을 비교하여 보면, 한국산 청국장에서 추출한 양은 1.73 mg/g로서 한국산 콩에서 추출한 양의 2.55배이었고, 중국산 청국장에서 추출한 양은 1.94 mg/g로서 중국산 콩에서 추출한 양의 1.65배이었다. 배당체가 비배당체로 전환되는 것은 주로 온도, 압력, 발효 등에 기인한다. 콩에서 청국장으로 제조되는 과정에서 배당체와 비배당체는 온도와 발효의 영향을 많이 받게 된다. 발효식품인 청국장이 콩에서보다 이소플라본이 쉽게 추출되기 때문이다. 비배당체는 돌연변이를 방지하는 효능을 갖고 있고, 각종 대두 가공 식품의 추출물을 이용한 항 돌연변이 실험에서 비교해 보았더니 발효식품의 추출물의 효과가 비 발효식품보다 훨씬 높게 나타났는데, 이는 발효를 통해 배당체가 활성을 갖는 비배당체 형태로 전환되었기 때문이다. 또한 식품에 함유된 이소플라본의 비배당체의 양에 비례하여 항 돌연변이 정도가 증가하였다. 따라서 비 발효식품보다는 발효식품을 섭취하는 것이 이소플라본을 더 효과적으로 이용할 수 있는 것이다.[18] 콩이 청국장으로 제조되는 과정에서 배당체와 비배당체가 서로 전환이 되었으며 주요하게 배당체가 비배당체로 전환되었다는 것을 알 수 있었다. 배당체는 온도의 영향을 많이 받으며 약간의 온도 차이도 비배당체로 전환될 수 있다는 것을 알 수 있다. 콩과 청국장에서 추출한 이소플라본의 양보다 된장에서 추출한 이소플라본의 양은 훨씬 적었다. 된장에서 추출한 이소플라본의 양은 청국장에서 추출한 이소플라본의 양의 1~3%밖에 되지 않았다. 된장의 오래 동안의 숙성과정과 저장과정에서 많은 유효성분의 양이 많이 적어졌다고 생각된다. 발효과정을 거친 된장에서 배당체가 비배당체로 많이 전환되었지만 또한 시간의 과정을 거쳐 이소플라본의 양도 적어졌다는 것을 알 수 있다.

결 론

한국산 및 중국산 콩, 청국장, 된장에 포함된 네 가지 이소플라본인 다이드제인, 제니스테인, 다이드진과 제니스틴을 추출하여 분석 비교하였다. 콩, 청국장, 된장을 60% 수용성 에탄올로 추출하였으며 추출 액은 역상 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 분석하였다. 네 가지 이소플라본의 총 추출양은 중국산 콩과 청국장에서 한국산에 비해서 매우 많았지만, 한국산 된장에서 추출된 네 가지 이소플라본의 양은 중

국산 콩으로 만든 된장보다 33.94 μg/g 더 많았다. 청국장에서 추출된 네 가지 이소플라본의 양은 콩에서 추출된 이소플라본 양의 1.6배 이상 많았다. 된장에서의 이소플라본의 양은 아주 적게 추출되었지만, 한국산 콩으로 제조한 된장에서 다이드제인의 추출양이 가장 많았으며, 네 가지 이소플라본의 총 추출량의 66%이상 차지하였다.

본 연구는 인하대학교 고순도분리연구실에서 수행하였으며, 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Choi, Y. S.; Row, K. H.; *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **2000**, *23*, 1671.
2. Lee, K. J.; Choi, D. Y.; Row, K. H.; *HWAHAK KONGHAK* **2003**, *41*, 612.
3. Kim, J. S.; Yoon, S.; *Korean J. Food Sci. Technol.* **1999**, *31*, 1405.
4. Liao, C. H.; Pan, S. L.; Guh, J. H.; Teng, C. M.; *Biochemical Pharmacology* **2004**, *67*, 2031.
5. Teruki, O.; Sowa, Y.; Hirose, T.; Takagaki, N.; Horinaka, M.; Nakanishi, R.; Yasuda, C.; Yoshida, T.; Kanazawa, M.; Satomi, Y.; Nishino, H.; Miki, T.; Sakai, T.; *FEBS Letters* **2004**, *577*, 55.
6. Lee, C. H.; Yang, L.; Jin, Z. X.; Yeung, S. Y. V.; Huang, Y.; Chen, Z. Y.; *Food Chemistry* **2005**, *90*, 735.
7. Lee, M. H.; Park, Y. H.; Oh, H. S.; Kwak, T. S.; *Korean J. Food SCI. Technol.* **2002**, *34*, 3.
8. Boo, S. J.; Byun, S. Y.; *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *16*, 95.
9. Bahram, H.; Arjmandi, B.; Smith, J.; *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 130.
10. Vendula, K.; Jana, P.; Michael, B.; *Theriogenology* **2004**, *61*, 1307.
11. Hwang, I. K.; *Heath Industry Technology Tendency* **2001**, *36*.
12. Lee, S. J.; Yan, W.; Ahn, J. K.; Chung, I. M.; *Field Crops Research* **2003**, *81*, 181.
13. Ho, H. M.; Chen, R. Y.; Leung, L. K.; Chan, F. L.; Huang, Y.; Chen, Z. Y.; *Biomed Pharmacother* **2002**, *6*, 289.
14. Yeon, B. C.; Heon, S. S.; *Korean J. Food SCI. Technol.* **1998**, *30*, 4.
15. Lee, K. J.; Choi, D. Y.; Row, K. H.; *HWAHAK KONGHAK* **2003**, *41*, 5.
16. Row, K. H.; Lee, K. J.; Choi, D. Y.; Do, W. N.; *Pending to Korean Patent* **2003**, No. 2119.
17. Chien, J. T.; Hsieh, H. C.; Kao, T. H.; Chen, B. H.; *Food Chemistry* **2005**, *91*, 425.
18. Choi, Y. B.; Soen, H. S.; *Korean J. Food SCI. Technol.* **1998**, *30*, 745.