

## 초임계유체를 이용한 고삼으로부터 Genistein의 추출

한창남 · 강춘형†

전남대학교 응용화학공학과  
500-757 광주광역시 북구 용봉동 300번지  
(2014년 9월 22일 접수, 2014년 10월 21일 수정본 접수, 2014년 10월 26일 채택)

### Extraction of Genistein from *Sophora flavescens* with Supercritical Carbon Dioxide

Chang-Nam Han and Choon-Hyoung Kang†

Department of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju 500-757, Korea  
(Received 22 September 2014; Received in revised form 21 October 2014; accepted 26 October 2014)

#### 요 약

본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 용매로 사용하여 고삼으로부터 genistein을 추출하였다. 공용매와 추출 온도 및 압력 등에 따른 추출효율을 측정하였으며, 공용매로 메탄올과 에탄올을 사용하여 200 bar에서 300 bar의 압력범위와 35 °C와 50 °C의 온도범위에서 연구를 수행하였다. 조건에 따라 서로 다른 genistein의 추출효율을 보였으며, 특히 높은 압력과 높은 온도에서 가장 높은 추출효율이 관찰되었다. 또한 메탄올이 에탄올보다 더욱 효과적인 공용매 특성을 보였으며 농도가 높을수록 추출효율도 증가하였다. DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하여 고삼 추출물의 항산화 활성을 비교하였다.

**Abstract** – This study was directed to finding an optimum extraction condition of genistein from the *S. flavescens* with supercritical carbon dioxide as a solvent. In this effort, effects of the extraction conditions including pressure, temperature and a co-solvent on the extraction efficiency were investigated. The aqueous ethanol and methanol solutions were used as co-solvents while the tested operating pressure and temperature ranges were from 200 bar to 300 bar and from 308.15 K to 323.15 K, respectively. The concentration of genistein was determined by means of HPLC equipped with a UV detector. From the results, it was observed that an increase in pressure led to the higher extraction efficiency. Further, methanol showed better performance as a co-solvent than ethanol. The DPPH radical scavenging activities were measured to compare antioxidant activities of *S. flavescens* extracts.

Key words: Genistein, *S. flavescens*, Supercritical Extraction, Co-solvent, Radical Scavenging Activity

#### 1. 서 론

용매의 물성은 분자의 종류와 분자간 상호작용에 따라 결정되기 때문에 비압축성 액체용매와는 달리, 초임계 상태에 있는 물질은 그 임계점 부근에서 압력의 변화에 따라 그의 밀도, 점도, 확산계수와 극성 등 많은 물성이 기체에 가까운 상태에서부터 액체에 가까운 상태에까지 연속적으로 매우 큰 변화를 보인다[1,2]. 그러므로 미세한 온도나 압력변화에도 민감하게 변하는 밀도를 이용하여 용해력을 쉽게 조절할 수 있으며, 물질이동과 열 이동이 빨라 미세공으로 침투가 매우 빠르다. 또한 용매화 및 clustering 상태를 조절할 수 있다. 따라서 이러한 물성 조절의 용이성을 반응과 분리 등의 공정

에 이용하면 단일 용매로 여러 종류의 액체 용매에 상응하는 용매 특성을 얻을 수 있다[3]. 용매 또한 상온에서 기체 상태인 물질은 초임계 유체로 선정하는 경우에는 잔존 용매의 문제를 해결할 수 있으며 이산화탄소와 같이 인체에 무해하고 환경오염에 미치는 영향이 적은 용매를 사용하게 되면 무독성, 환경친화성 공정개발이 가능하다. 초임계 유체 추출에서는 임계온도가 낮은 기체를 용매로 사용하기 때문에 열에 불안정한 물질을 손상 없이 추출할 수 있으며, 초임계 유체 추출에 사용되는 기체는 대부분 농축된 상태에서 친 지방성을 나타내므로 극성물질이나 고분자 물질을 잘 용해하지 않아 선택성이 좋으며, 적절한 압력과 온도의 선택으로 추출단계와 분리단계를 최적화할 수도 있고, 첨가제를 사용하여 용해도와 선택도를 증가시킬 수도 있다[4].

이산화탄소는 임계온도와 압력이 상대적으로 낮아서( $T_c=31.06\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P_c=7.377\text{ MPa}$ ) 열에 민감한 향료나 의약품, 열에 불안정한 지질과 반응성이 있는 단량체의 추출에 특히 유용하며, 가격이 저렴하고 독성이 없을 뿐 아니라 환경오염의 문제가 없으며 발화되

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: chkang@chonnam.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지 않는 성질과 적절한 압력에서 액화 가능하다는 커다란 장점들을 가지고 있다. 또한 추출용매로 초임계 이산화탄소를 사용할 경우 추출 후 단순히 대기압으로 감압함으로써 용질로부터 용매를 용이하게 분리할 수 있어 매우 경제적인 용매가 된다.

초임계 이산화탄소는 비극성 물질들에 대해서는 높은 용해도를 보이지만 극성물질에 대하여는 충분한 용해력을 갖지 못하므로 극성 물질들을 추출하기에는 상당한 제한이 따르게 된다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 초임계 이산화탄소에 'modifier' 또는 'entrainer' 라고 하는 공용매를 첨가하여 극성 물질들에 대한 용해도를 향상시키는 방법이 Peter 등[5]에 의하여 처음으로 연구되었다. 추출대상 성분과 유사한 solubility parameter 값을 갖는 용매의 선택은 추출량을 증가시키고 추출시간을 단축하는데 직접적인 영향을 미치게 된다. 그러나 식용을 위한 유효성분 추출에 사용되는 용매는 독성이 가장 큰 문제가 되므로 추출대상 성분과 solubility parameter가 유사하고 인체에 영향이 적은 용매 중에서 공용매가 선정되어야 한다.

고삼은 콩과의 다년생 초본인 *Sophora flavescens*의 뿌리를 건조한 것으로, 한약재로 사용하며 강한 쓴맛이 있고 인삼과 같은 효과가 있다는 뜻에서 고삼(苦蔘)이라 한다. 고삼의 유용 성분은 alkaloid 화합물과 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)으로 알려진 diadzein, genistein, formononetin 등의 isoflavones 화합물을 포함하고 있다[6]. 이 중 isoflavone은 여성호르몬인 estrogen과 입체적인 구조가 유사하기 때문에 동물세포의 estrogen receptor와 결합하여 유사한 작용을 한다[7]. Isoflavone은 genistein과 diadzein, glycitein이 주 성분을 이루며, 특히 genistein의 효과에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다[8]. Genistein(5,7-Dihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)chromen-4-one)의 분자 구조식은  $C_{15}H_{10}O_5$ 이고 270.24 g/mol의 분자량을 갖는다. Isoflavone의 대표성분인 genistein은 항암효과를 가지는 것으로 알려져 있는데[9,10], protein tyrosine의 활성을 억제하여 암세포의

성장과 분화를 억제하고 암억제와 관련된 항산화 효과를 보인다[11-15]. 또한 노화된 피부세포의 활성화와 혈전 용해능력[16,17] 등도 가지는 것으로 알려져 있다. 아울러, 여성의 폐경기 증후군을 억제하며 뼈의 재흡수(resorption)를 억제하는 효능을 가진다고 알려져 있다[18]. Genistein은 이처럼 다양한 약리효과를 가지면서 다량을 투약하더라도 부작용이 거의 없다고 알려져 있어 매우 유용한 성분으로 주목받고 있다[19].

본 연구의 목적은 고삼에 함유되어 있는 isoflavones 화합물의 일종인 genistein을 초임계 유체를 이용하여 분리를 위한 최적 운전조건을 제시하고자 한다.

## 2. 실험

### 2-1. 시약 및 재료

실험에 사용된 고삼(苦蔘)은 광주(대인시장) 민간약초상회에서 구입하였으며 물로 세척한 후에 진공동결건조기(SDFSF 24, 삼원냉열엔지니어링)를 이용하여 영하 73 °C, 60  $\mu$ torr에서 10시간 동안 동결 건조하였다. 건조된 시료를 불밀로 세말하고 채 거름(mesh no.18)을 하여 시료로 사용하였다.

초임계 유체 용매로는 이산화탄소(99.99%, 대창가스)를 재순환 냉각장치(MC-11, JEIO TECH)로 -10 °C까지 냉각하여 사용하였다. 대상물질의 추출효율을 위한 공용매 효과분석을 위해서 에탄올(99.9%, 대정화학)과 메탄올(99.9%, 대정화학)을 증류수(덕산화학)와 혼합하여 사용하였다. 검액의 조제에 genistein(98% HPLC grade, SIGMA-ALDRICH Co.)과 chloroform(98%, Junsei Chemical Co., Ltd.), 메탄올(99.9% 대정화학)을 사용하였고 HPLC 이동상 용액으로 acetonitrile(99.9%, 덕산화학)과 증류수를 혼합하여 사용하였다. 항산화 활성 측정에 사용한 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 대정화학에서 구입하여 사용하였다.

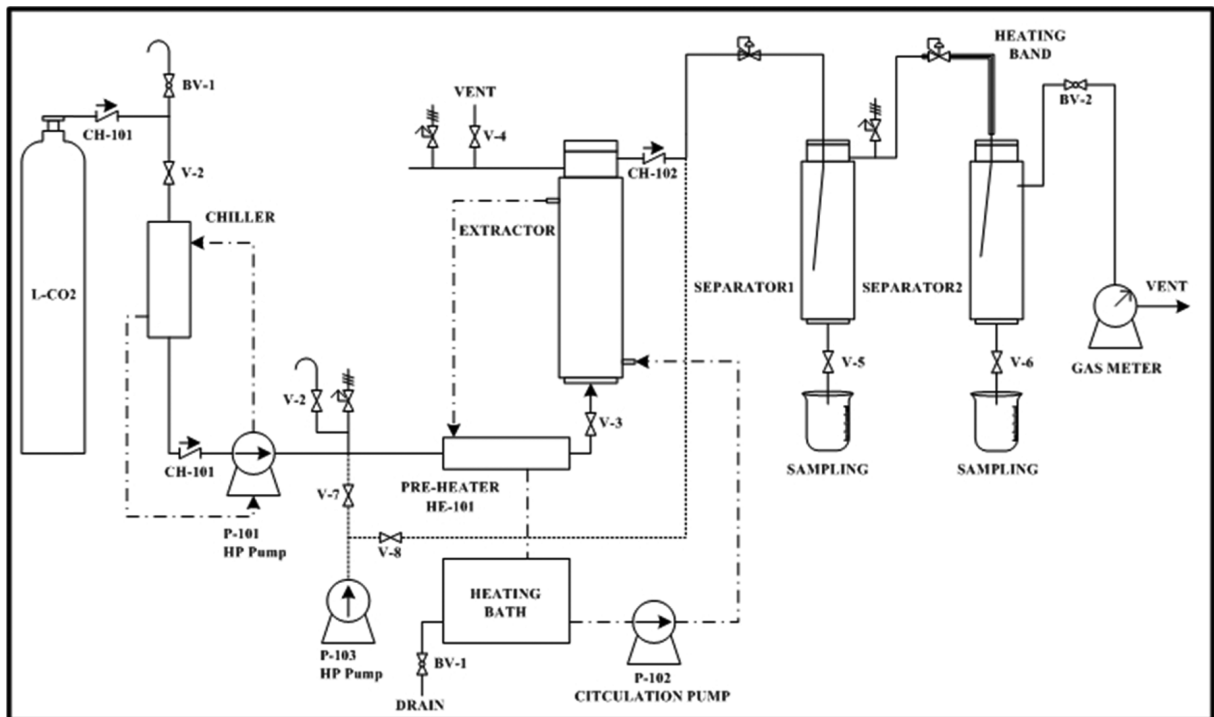


Fig. 1. Schematic diagram of supercritical fluid extraction.

## 2-2. 실험장치

고삼으로부터 genistein를 추출하기 위해 Fig. 1에 제시된 초임계 유체 추출장치(IIShin autoclave Co.)를 사용하였다. 추출장치는 추출기(300 mL), 재순환 냉각장치(MC-11, Jeio Tech), 액체펌프(5,500 psi, 100 mL/min, IIShin autoclave)로 구성되어 있으며, 추출압력은 유압조절밸브(6000 psi, TESCOM)를 사용하여 조절하였다. 이산화탄소의 유량은 Dry Test Gas Meter(DC-5, Shinagawa)를 사용하여 측정하였고, 공용매는 액체펌프(500 kgf/cm<sup>2</sup>G, IIShin autoclave Co.)를 이용하여 주입하였다. 사용한 추출기의 온도와 압력의 정확도는 각각  $\pm 1$  °C,  $\pm 10$  kg/cm<sup>2</sup> 이었다.

## 2-3. 분석

추출된 시료는 회전식 증발기(EYELA, Rotary Evaporator, N-1000)를 사용하여 농축하였으며, 시료의 분석을 위해 Solvent Deliver Pump(M930, 영린기기), Absorbance Detector(M 720, 영린기기), Syringe Loading Sample Injector(7725i, Rheodyne co.)로 구성된 HPLC를 사용하였다. 이동상으로 water/acetonitrile을 70/30(v/v%)의 비율로 사용하였고, 유속은 1.0 ml/min을 최적조건으로 결정하였다. 데이터 저장시스템은 Autochromin 2000(ver 1.0 plus, 영린기기)을 PC에 설치하여 사용하였으며, 분석용 HPLC 컬럼은  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(Merck Co.) 컬럼을 사용하였다. 전자공여능(Electron donating activity, EDA)에 의한 항산화 활성도의 측정에서는 Blois 등[19-21]의 방법을 변형하여 사용하였으며 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 분말을 에탄올 100 mL에 0.2 mM 농도로 용해하여 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 추출시료 1 mL을 DPPH 용액 4 mL에 첨가하여 10분간 반응 후 UV 흡광도 측정장치(UV-2401PC, Shimadzu Co.)를 사용하여 측정 파장 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 데이터 저장시스템은 UVPC(ver. 3.91, Shimadzu Scientific instruments, Inc.)를 PC에 설치하여 사용하였다.

Genistein 5 mg을 5 ml의 chloroform/methanol 50:50(v/v%) 용액에 용해하고 희석하여 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml로 제조하여 검량선용 표준용액으로 하였다. HPLC를 각각의 표준용액을 취하여 HPLC chromatogram을 얻고 이로부터 농도와 peak 간의 검량선을 작성하였다.

실험에서 추출한 고삼의 genistein 함량을 비교하기 위해 검액을 제조하였다. 건조된 고삼 분말 5.0 g을 받드시 저울로 정밀하게 무게를 측정한 다음, 추출용매로 50% 메탄올 200 mL를 사용하여 sonicator(JAC 4020, 고도기연)로 30 °C에서 20분 동안 추출을 수행하였다. 추출된 용액을 필터(Gelman Science, 45  $\mu$ m)를 사용하여 감압 여과한 후, 감압 농축하고 50% 메탄올에 녹여 30 mL로 하였다.

## 2-4. Genistein의 추출

건조된 고삼 분말 40 g을 정량한 후 추출기에 넣고, 액체 이산화탄소(-10 °C)를 40 ml/min의 유속으로 추출기 내부로 유입시킨다. 추출기 내의 압력이 측정압력까지 도달한 후, 압력조절기를 이용하여 압력을 일정하게 유지시킨다. 추출기의 압력과 온도가 실험조건에 도달하면 압력과 온도를 유지시키면서 액체펌프를 사용하여 추출기 내부로 공용매를 일정한 유량(1 ml/min)으로 계속해서 주입한다. 165분간 추출을 수행한 후, 펌프의 작동을 멈추고 천천히 밸브를 열어 추출기 내부의 압력을 제거한다. 추출기 압력이 대기압

로 돌아오면 분리기에 추출된 용액을 밸브를 열어 채취한다. 위의 과정을 측정압력과 온도, 공용매, 공용매의 농도를 변화시키면서 반복적으로 실험을 수행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. Genistein의 추출 효율

고삼의 분말시료 5 g을 50% 메탄올 수용액에 용해하여 30 °C에서 20분간 Sonicator를 이용하여 추출한 genistein의 농도는 0.1188  $\mu$ g/20 $\mu$ l이었으며, 이 값을 기준으로 초임계 유체를 이용하여 genistein의 회수율을 산출하였다. 여러 조건에서 실행한 실험으로부터 얻은 genistein의 회수율을 Table 1에 정리하였다.

### 3-2. 공용매의 영향

온도와 압력을 각각 300 bar와 45 °C로 고정하고 에탄올과 메탄올을 공용매로 사용하여 초임계 유체를 이용한 추출실험을 수행하였다. 각각 순도 70%의 에탄올과 메탄올 수용액을 공용매로 사용한 결과를 공용매를 첨가하지 않은 순수한 이산화탄소만을 용매로 사용하여 추출한 결과와 비교하였다. 공용매의 유량은 1.0 ml/min으로 고정하였으며 용매의 주입시간은 추출시간과 동일한 165분으로 하였다. 순도 70%의 에탄올과 메탄올 수용액을 공용매로 사용하였을 경우에 각각 12.67%와 22.82%의 회수율을 보였으며, 공용매를 사용하지 않고 순수한 초임계 이산화탄소를 용매로 사용하여 추출한 경우에는 추출이 이루어지지 않았다. 공용매의 영향에 의한

Table 1. Recovery of genistein from *Sophora flavescens*

P (bar)	T (°C)	Co-solvent	Concentration ( $\mu$ g/20 $\mu$ l)	Recovery (%)
200	45	Methanol (70%)	0.12	12.34
250	45	Methanol (70%)	0.17	17.42
300	45	Methanol (70%)	0.22	22.82
250	45	Methanol (22%)	0.12	12.34
250	45	Methanol (50%)	0.14	14.25
250	45	Methanol (70%)	0.17	17.42
300	35	Methanol (70%)	0.21	21.76
300	45	Methanol (70%)	0.22	22.82
300	55	Methanol (70%)	0.27	28.32
300	45	Pure CO <sub>2</sub>	0.00	0.00
300	45	Methanol (70%)	0.22	22.82
300	45	Ethanol (70%)	0.12	12.67

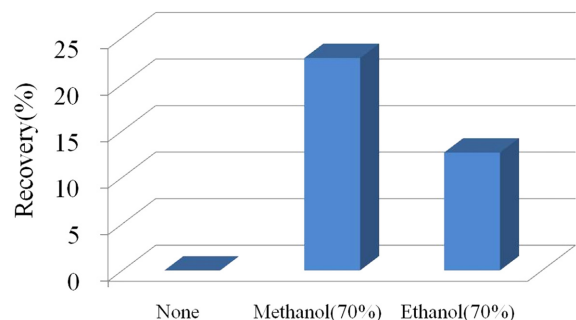


Fig. 2. Effect of the modifier on the recovery of genistein from *S. flavescens* at 45 °C and 300 bar.

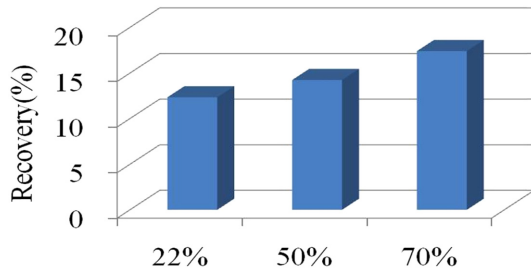


Fig. 3. Effect of modifier (methanol) concentrations on the recovery of genistein from *S. flavescens*. Operating conditions were 45 °C and 250 bar.

회수율의 변화를 Fig. 2에 나타내었다.

### 3-3. 공용매 농도의 영향

온도와 압력을 각각 250 bar와 45 °C로 고정하고 22%, 50%, 70%의 순도를 갖는 메탄올 수용액을 공용매로 사용하여 추출실험을 수행하였다. 공용매의 유량은 1.0 ml/min으로 고정하였으며 용매의 주입시간은 추출시간과 동일한 165분으로 하였다. 22%, 50%, 70% 메탄올을 공용매의 경우 12.34%, 14.25%, 17.42%의 회수율을 보였으며, 순도가 70%인 경우에서 가장 높은 회수율을 보였다. 공용매의 농도에 의한 회수율의 변화를 Fig. 3에 그래프로 나타내었다. 추출대상 성분과 유사한 용해도 계수를 가질수록 추출능이 증가하므로 공용매의 농도가 높을수록 초임계 용매의 용해도 계수가 추출 물질의 용해도 계수와 근접하여 추출효율이 높아졌을 것으로 생각할 수 있다

### 3-4. 압력에 의한 영향

실험온도는 45 °C로 고정하였으며 압력은 각각 200 bar, 250 bar, 300 bar로 변화시켜가며 추출하였다 가장 높은 추출효율을 보인 70% 메탄올을 공용매로 사용하였으며, 공용매의 유량은 1.0 ml/min으로 고정하고 용매의 주입시간은 추출시간과 동일한 165분으로 하였다. 200 bar, 250 bar, 300 bar의 압력에서 추출한 genistein의 회수율은 낮은 압력부터 각각 12.34%, 17.42%, 22.82%의 회수율이 측정되었으며 300 bar에서 가장 높은 회수율을 보였다. 압력에 의한 회수율의 변화를 Fig. 4에 그래프로 나타내었다. 압력의 증가에 따른 초임계 유체의 밀도의 증가가 용해도의 증가를 유발하여 압력이 높을수록 추출효율이 더 높아졌을 것으로 생각할 수 있다.

### 3-5. 온도에 의한 영향

가장 높은 추출효율을 보인 순도 70% 메탄올을 공용매로 하여 일정한 압력에서 온도를 변화시켜 추출하였다. 공용매의 유량은 1.0 ml/min으로 고정하였으며 용매의 주입시간은 추출시간과 동일

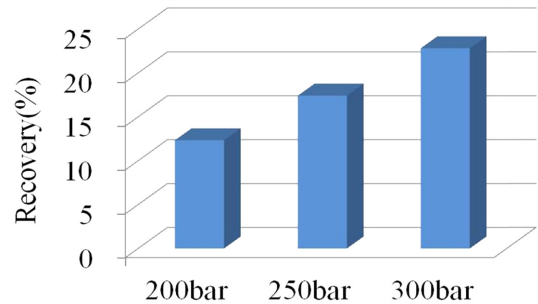


Fig. 4. Effect of pressure on the recovery of genistein from *S. flavescens*. Operating conditions were 45 °C with methanol (70%).

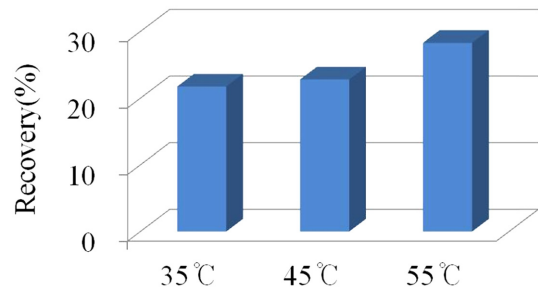


Fig. 5. Effect of temperature on the recovery of genistein from *S. flavescens*. Operating conditions were 300 bar with methanol (70%).

한 165분으로 하였다. 실험압력은 300 bar로 고정하였고 온도는 각각 35 °C, 45 °C, 55 °C로 변화시켜가며 추출하였다. 35 °C, 45 °C, 55 °C의 온도에서 추출한 genistein의 회수율은 낮은 압력부터 각각 21.76%, 22.82%, 28.32%의 회수율이 측정되었으며 55 °C에서 가장 높은 회수율을 보였다. 추출온도의 경우에도 온도증가에 따른 초임계 유체의 용해도의 증가로 인해 추출 효율도 높아졌을 것으로 생각할 수 있다. 온도에 의한 회수율의 변화를 Fig. 5에 그래프로 나타내었다.

### 3-6. Genistein의 항산화 활성

공용매로 70% 메탄올과 70% 에탄올을 사용하여 300 bar에서 추출한 시료와 50% 메탄올을 사용하여 용매 추출한 시료를 대상으로 하여 항산화 활성 실험을 수행하였다. 70% 메탄올을 사용한 시료는 35 °C, 45 °C, 55 °C에서 추출한 시료를 사용하였으며 70% 에탄올을 사용한 시료는 45 °C에서 추출한 시료를 사용하였다. 전자공여능은 대조군으로 시료 무첨가 용액을 사용하였으며 첨가군과 무첨가군의 흡광도 차이를 백분율(%)로 하여 나타내었다. 각각의 조건에서 측정된 EDA를 Table 2에 나타내었으며 전자공여능을 측정된 추출시료에서 모두 전자공여능 활성을 나타내었다. 용매추출과 비교하였을

Table 2. Antioxidative activities of *Sophora flavescens*

Methods	P (bar)	T (°C)	Co-solvent	Recovery (%)	EDA (%)
Supercritical fluid extraction	300	35	Methanol (70%)	21.76	37.46
	300	45	Methanol (70%)	22.82	29.17
	300	55	Methanol (70%)	28.32	41.53
	300	45	Ethanol (70%)	12.67	31.07
Solvent extraction					29.74

때 초임계 유체를 이용한 추출방법을 사용한 시료가 상대적으로 높은 활성을 보이거나 비슷한 활성을 나타내었으며 절대값으로 0~10%의 전자공여능 활성도 차이를 나타내었다. 초임계 유체를 이용하여 추출한 시료에서 70% 메탄올을 공용매로 사용하여 300 bar, 55 °C 조건에서 추출한 시료가 41.53%의 가장 높은 활성을 보였으며, 회수율 또한 가장 높은 28.32%를 나타내는 것으로 나타났다. 이 결과는 초임계 유체를 이용하여 추출한 대상물질이 더 양호한 약리적 특성을 유지하는 것을 나타낸다[22].

#### 4. 결 론

초임계 이산화탄소를 이용하여 고삼으로부터 유용성분인 genistein을 추출하였으며 공용매로는 에탄올과 메탄올 수용액을 사용하였다. 본 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

(1) 순수한 초임계 이산화탄소만을 용매로 사용하여 추출을 하였을 경우에는 추출이 이루어지지 않았다. 그러나, 메탄올과 에탄올을 공용매를 사용한 경우 genistein 회수율은 각각 22.82%와 12.67%로서 메탄올이 에탄올보다 우수한 공용매 효과를 보였다.

(2) 공용매인 메탄올의 순도가 증가함에 따라 높은 회수율을 보였다. 이 결과는 공용매의 농도가 높을수록 초임계 용매의 용해도 계수가 추출물질의 용해도 계수와 근접하여 추출효율이 높아졌기 때문으로 생각할 수 있다.

(3) 추출압력이 높을수록 추출효율도 증가하였으며, 이는 압력의 증가에 따른 초임계 유체의 밀도의 증가로 인하여 용해도가 증가했기 때문으로 생각할 수 있다.

(4) 온도의 경우에도 온도증가에 따른 초임계 유체의 용해도의 증가로 인해 추출 효율도 높아졌을 것으로 생각할 수 있다.

(5) 모든 추출시료에서 전자공여능 활성을 나타내었으며, 특히 순도 70%의 메탄올을 공용매로 사용하여 300 bar, 55 °C 조건에서 추출한 시료가 41.53%의 가장 높은 활성을 보였다. 유기용매를 이용한 추출의 경우에 비해 초임계 유체를 이용한 추출의 경우에 대상물질의 약리적 특성이 더욱 잘 유지하는 것을 나타낸다.

종합하면, 이 연구의 범위에서는 초임계 이산화탄소를 이용한 고삼으로부터 genistein의 추출에 대한 최적 온도와 압력은 각각 55 °C, 300 bar이었으며, 공용매는 순도 70% 메탄올이 가장 높은 추출효율을 보였다.

#### References

- Lee, Y. W., "Supercritical Fluid Technology (I)," *News Inf. Chem. Eng.*, **19**(3), 325-333(2001).
- Lee, Y. W., "Supercritical Fluid Technology (II)," *News Inf. Chem. Eng.*, **19**(4), 457-467(2001).
- Dobbs, J. M., Wong, J. M., Lahiere, R. J. and Johnston, K. P., "Modification of Supercritical Fluid Phase Behavior Using Polar Cosolvents," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **26**, 56-65(1987).
- Lucien, F. P. and Foster, N. R., "Solubilities of Solid Mixtures in Supercritical Carbon Dioxide: A Review," *J. Supercrit. Fluids*, **17**,

- 111-134(2000).
5. Mchugh, M. A. and Krukoni, V. J., *Supercritical Fluid Extraction Principles and Practice*, Butterworth-Heinemann, United States, US(1986).
6. Shin, M. K., "Extract of Sophorae Radix for the Prevention and Treatment of Osteoporosis," K. R. Patent No. 2002-0044746(2000).
7. Kelly, G. E., "Treatment or Prevention of Menopausal Symptoms and Osteoporosis," U.S. Patent No. 2002/0035074A1(2000).
8. Wang, G., Kuan, S. S., Francis, O. J. and Carman, S., "A Simplified HPLC Method for the Determination of Phytoestrogens in Soybean and Its Processed Products," *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 185-190(1990).
9. Peterson, G. and Barnes, S., "Genistein Inhibition of the Growth of Human Breast Cancer Cells: Independence from Estrogen Receptors and the Multi-Drug Resistance Gene," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **179**, 661-667(1991).
10. Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D. R. and Barnes, S., "Genistein, Daidzein and Their  $\beta$ -Glycoside Conjugates: Antitumor Isoflavone in Soybean Foods from American and Asian Diets," *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 661-667(1961).
11. Supko, J. G. and Phillips, L. R., "High Performance Liquid Chromatographic Assay for Genistein in Biological Fluids," *J. Chromatogr.*, **666**, 157-167.
12. Levitzki, A. and Gazit, A., "Tyrosine Kinase Inhibition: An Approach to Drug Development," *Science*, **267**, 1782-1787(1995).
13. Jyong, M. E. and Hwang, I. K., "Functional Components and Antioxidative Activities of Soybean Extracts," *Korean Soybean Digest*, **25**(1), 23-29(2008).
14. So, E. H., Kuh, J. H., Park, K. Y. and Lee, Y. H., "Varietal Difference of Isoflavone Content and Antioxidant Activity in Soybean," *Korean J. Bread*, **33**(1), 35-39(2001).
15. Record, I. R., Dreosti, I. E. and McInerney, J. K., "The Antioxidant Activity of Genistein in vitro," *National Biochem.*, **6**, 481-485(1995).
16. Yang, E. S., Hong, R. H. and Kang, S. M., "The Effects of Genistein on the Proliferation and Type I pN Collagen Synthesis in Aged Normal Human Fibroblasts," *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **35**(4), 316-324(2007).
17. Oh, H. S., Kim, J. H. and Lee, M. H., "Isoflavone Contents, Antioxidative and Fibrinolytic Activities of Red Bean and Mung Bean," *Korean J. Soc. Food Cookery SCI.*, **19**(3), 263-270(2003).
18. Barnes, S. and Blair, H. C., "Genistein for Use in Inhibiting Osteoclasts," U.S. Patent No. 5, 506, 211(1996).
19. Blois, M. S., "Antioxidant Determination by the Use of Stable Free Radical," *Nature*, **181**, 1199-1200(1958).
20. Myung, J. E. and Hwang, I. K., "Functional Components and Antioxidative Activities of Soybean Extracts," *Korean Soybean Digest*, **25**(1), 23-29(2008).
21. Jun, H. I., Denis, P., Wiesenborn and Kim, Y. S., "Antioxidant Activities of Various Solvent Extracts from Canola Meal," *Korean J. Food Preserv.*, **18**(1), 59-64(2011).
22. Jeong, G. T., Lee, K. M. and Park, D. H., "Study of Antimicrobial and Antioxidant activities of Rumex crispus Extract," *Korean Chem. Eng. Res.*, **44**(1), 81-86(2006).