

## TLC를 이용한 이소플라본의 신속한 정량 분석

김경선 · 박관화<sup>1</sup> · 백무열 · 강길진<sup>2</sup> · 박천석\*

<sup>1</sup>서울대학교 농생명과학대학 식품공학과, <sup>2</sup>식품의약품안전청 용기포장과, 경희대학교 생명과학대학 식품공학전공

## Rapid Quantitative Analysis of Isoflavones using TLC

Kyung-Seon Kim, Kwan-Hwa Park<sup>1</sup>, Moo-Yeol Baik, Kil-Jin Kang<sup>2</sup>, and Cheon-Seok Park

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University  
<sup>2</sup>Containers and Packaging Division, Korea Food and Drug Administration  
Department of Food Science and Biotechnology, KyungHee University

Conditions for rapid quantification of isoflavones were studied. Rapid and clear separation of isoflavones (genistin and daidzin) was obtained using solvent system of chloroform : methanol : water : acetic acid (60 : 30 : 10 : 0.5, v/v/v). Quantification of each isoflavone separated by TLC was conducted by densitometry analysis. Genistin and daidzin were quantified in 0.15-1.80 µg/µL range with 99% confidence. Concentrations of isoflavones in soybeans and kudzu roots originated from Korea were determined, and validity of TLC method for quantification of isoflavones was confirmed by comparison with HPLC analysis.

**Key words:** thin layer chromatography, isoflavone, high performance liquid chromatography, genistin, daidzin

### 서 론

전세계적으로 콩과 식물들은 일반적인 식생활에 있어서 빠질 수 없는 중요한 식품 원료이다. 특히 최근에 이러한 콩과 식물에 이소플라본(isoflavone)의 함량이 높다는 사실이 알려지면서 동, 서양을 막론하고 많은 관심의 대상이 되고 있다(1,2). Flavonoid 계통 화합물의 한 종류로 알려진 이소플라본은 일반 세포 내에서 estrogen receptor와 결합할 수 있는 능력으로 인하여 phytoestrogen으로도 알려져 있다(3). 이소플라본은 여러 임상학적 실험들을 통해 많은 건강학적으로 유익한 역할을 하는 것으로 밝혀졌는데, 특히 체내에서 여러 암과 심장병 그리고 골다공증의 발생 빈도를 낮추어주며, 여러 갱년기 증상을 완화시켜 주는 것으로 알려졌다(4,9). 최근에는 작물체 내에서 phytoalexin의 전구물질로 작용하여 내병성을 증진시키는데 효과적이라는 연구결과가 발표되면서 이소플라본의 기능성에 대한 관심이 급격하게 증가하고 있다(10,11).

이소플라본은 12개 유도체가 콩류에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 이들 중 3가지 유도체(daidzein, genistein, glycitein)는 aglycone의 형태이고 나머지 9가지 유도체(daidzin, genistin, gly-

citin, 6"-O-acetyldaidzin, 6"-O-acetylgenistin, 6"-O-acetylglycitin, 6"-O-malonyldaidzin, 6"-O-malonylgenistin, 6"-O-malonylglycitin)는 당이 붙어있는 배당체(glycone)의 형태이다(12). 많은 이소플라본 유도체 중 식물체 내에서는 배당체의 이소플라본이 비배당체 보다 많이 존재하는 것으로 알려져 있으나, 체내에서는 주로 비배당체의 형태로 흡수가 되는 것으로 보고되어 있다(13,14).

이소플라본은 분류학적으로 상당히 국한된 콩과식물류(Fabaceae), 즉 대두(soybean), 칩(kudzu root; *Pueraria lobata* L.), 붉은토끼풀(*Trifolium* species) 등에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다(15-17). 특히 대두에 포함되어 있는 이소플라본의 함량에 대한 연구는 많이 보고가 되어 있는데, Wang 등(18)은 8개의 미국산과 3개의 일본산 대두 종류에서의 이소플라본 함량이 총 함량으로 1,176-3,309 µg/g의 범위에서 존재한다고 보고하였으며, 국내산의 경우도 김 등(19)이 38종류의 대두에서 이소플라본의 함량을 측정된 결과 505-2,759 µg/g의 이소플라본이 존재한다고 보고하였다. 최근에는 대두 뿐 아니라 자연계에 많이 존재하는 칩에도 상당량의 이소플라본이 존재한다는 사실이 밝혀졌다(20). Kim 등의 보고에 의하면, 이소플라본 중에서 daidzin의 함량이 5,026-18,547 µg/g로 대두에 포함되어 있는 함량보다 훨씬 많은 것으로 알려졌고, 일반적으로 대두에서 관찰되지 않는 이소플라본 중의 하나인 puerarin이 상당한 양(1-10 g/100 g)으로 존재함이 밝혀져 새로운 이소플라본의 공급원으로써 이용될 수 있음을 확인하여 주었다(20).

현재까지 이소플라본의 분석은 HPLC를 이용한 방법에 의하

\*Corresponding author: Cheon-Seok Park, Department of Food Science and Biotechnology, KyungHee University, Yongin 449-701, Korea  
Tel: 82-31-201-2631  
Fax: 82-31-204-8116  
E-mail: cspark@khu.ac.kr

여 주로 이루어졌다(21,22). HPLC에 의한 분석법은 정확하게 정량적으로 물질을 분석할 수 있다는 장점이 있는 반면, 분석 시간이 오래 걸리며, 컬럼을 포함한 기기의 가격이 비싸고, 분리 전개에 있어서 전문성을 필요로 한다는 단점이 있다. 따라서 본 논문에서는 이러한 단점을 극복하고 빠른 시간 내에 다량의 시료를 분석할 수 있는 thin layer chromatography(TLC) 방법을 이용하여 정성, 정량적으로 이소플라본을 분석할 수 있는 조건을 확립하고, 이 방법의 유효성을 HPLC방법과 비교하여 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 실험에서 사용한 genistin과 daidzin은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 TLC 및 HPLC의 표준 물질로 사용하였다. 이소플라본 함량의 측정에 사용한 콩류는 국내산 콩 6종으로 서목태, 흑태, 강남콩, 콩나물콩, 대두, 녹두를 경동시장으로부터 구입하였고, 칩은 국내 여러 장소에서 수집한 칩을 식품의약품안전청에서 제공 받아 사용하였다(20). 이외에 실험에 사용한 시약들은 Sigma사나 Baker사(Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입한 특급시약을 사용하였다.

### 이소플라본의 추출방법

콩류로부터의 이소플라본 추출은 Kim 등(19)에 의한 방법을 기초로 하였다. Waring blender(51 BL 31, Torrington, CT, USA)로 마쇄한 6종류의 콩 시료(30g)는 0.1% acetic acid가 함유된 70% methanol 100 mL을 첨가하여 상온에서 24시간 추출한 후 12,000×g에서 20분간 원심분리하고 그 상등액을 syringe filter(NYLON 66, 0.45 μm, Whatman, Kent, UK)로 여과 후 분석 시료로 사용하였다. 칩에서의 이소플라본은 Kim(4) 등의 방법을 사용하여 추출하였다. 건조되어 있는 칩을 Waring blender로 분쇄 후 분말의 5배 부피의 80% Methanol을 첨가하여 상온에서 48시간 추출한 후 12,000×g에서 20분간 원심분리하고 얻은 상등액을 syringe filter(NYLON 66, 0.45 μm, Whatman)로 여과하여 시료로 사용하였다.

### TLC를 이용한 이소플라본의 분석

각 시료는 silica gel TLC plate(Silicagel 60F 254, Merck, Darmstadt, Germany)의 하단으로부터 20 mm 되는 위치에 1 μL 씩 점적하였고, 점적 시 각 점적의 직경이 최소가 되도록 주의하였으며 시료 간의 거리는 전개 후 옆 시료에 의해 생성된 spot에 시료가 방해 받지 않도록 1 cm 이상 차이가 나도록 하였다. 시료 분석용 TLC plate는 10×20 cm의 크기로 잘라서

사용하였으며 시료의 전개는 TLC chamber(12×15×25 cm)에서 수행하였고 전개 용매는 여러 실험을 거쳐 가장 효과적인 전개용매를 결정하여 사용하였다. 이소플라본 기준용액은 daidzin과 genistin을 0.15-1.80 μg/μL로 만들어 사용하였다. 전개가 끝난 TLC plate는 건조시킨 후, UV로 확인된 이소플라본 spot의 intensity를 1D main Image Program(Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하여 구하고 기준 시료의 농도와 intensity의 기준곡선과 비교하여 농도를 계산하였다.

### HPLC를 이용한 이소플라본의 분석

각 시료는 TLC 분석방법과 동일하게 준비하였고 HPLC분석을 위한 이소플라본 기준물질인 daidzin과 genistin을 methanol을 이용하여 여러 농도(0.0625-0.250 μg/μL)로 희석하여 사용하였다. 각 시료는 cellulose acetate membrane filter(0.45 μm, Whatman)를 사용하여 여과 후 15 μL의 시료를 injection 시켰다. HPLC(SCL-10Avp, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) 분석을 위한 column은 C<sub>18</sub> 역상 column(Mightysil RP-18 GP, Kanto Chemical Co., Kanagawa, Japan)을 사용하였고, column 온도는 30°C로 유지하면서 분석하였다. 용매조건으로는 0.1% acetic acid를 함유한 acetonitrile과 0.1% acetic acid를 함유한 물을 각각 A, B 용매로 하여 A 용매의 농도를 초기 0%에서 40분 동안 100%로 증가시키는 농도구배 방식으로 분석하였다. 용매의 유속은 1 mL/min으로 하였고 UV detector를 사용하여 254 nm에서 이소플라본을 검출하였다. Daidzin과 genistin의 농도는 HPLC로 분석한 후 LC Workstation Class-VP(Shimadzu Co., Kyoto, Japan, Ver 6.1)을 이용하여 검출된 이소플라본 peak의 면적을 각각 기준물질의 peak 면적에 대한 비율로 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### TLC를 이용한 이소플라본의 분리

현재까지 여러 종류의 시료에 포함되어 있는 이소플라본의 함량을 측정하는 방법으로는 HPLC방법이 가장 보편적으로 많이 사용되었고, capillary electrophoresis(CE)를 이용한 예도 보고가 되어 있다(23). TLC 방법의 경우 상대적으로 다른 분석법에 비하여 간편하고 빠르면서 많은 시료를 분석하는데 유리하여 올리고당과 유기산의 정성 및 정량 분석에 사용한 예가 있다(24,25). 그러나 이소플라본의 분석에 있어서 TLC 방법을 사용한 예는 극히 드물고 최근에 저자가 초고온성균인 *Thermotoga maritima* 유래 효소인 maltosyltransferase를 이용하여 이소플라본인 daidzin에 당전이를 시켜 수용성 당전이 유도체를 합성한 보고에서 사용한 예가 있다(26). 따라서 본 연구에서는 콩과 식물에 많이 포함되어 있는 genistin과 daidzin을 표준 물

Table 1. The solvent systems for isoflavone analysis using TLC

	Solvent system for isoflavone analysis	Composition of solvent	Time required for ascending <sup>1)</sup> (min)	R <sub>f</sub> value	
				Genistin	Daidzin
(I)	Chloroform : methanol : H <sub>2</sub> O : acetic acid (v/v/v/v)	70 : 30 : 10 : 0.5	35	0.67	0.65
		60 : 30 : 10 : 0.5	30	0.70	0.65
		50 : 30 : 10 : 0.5	30	0.65	0.65
(II)	n-Butanol : acetic acid : H <sub>2</sub> O (v/v/v)	5 : 3 : 1	60	0.73	0.71
		4 : 3 : 1	60	0.75	0.73
		3 : 3 : 1	55	0.75	0.74

<sup>1)</sup>TLC plate of 10×20 cm was used.

### Fig. 1. Separation of two isoflavones, genistin and daidzin, using TLC.

Lane 1: Standards (genistin and daidzin), lane 2: genistin, and lane 3: daidzin.

질로 사용하여 TLC상에서 분리 될 수 있는 조건을 확인하였다. 용매 조건은 두 가지로 나누어서 사용하였는데(Table 1), 모두 물과 acetic acid를 기본으로 하면서 여기에 (I) 전개 용매의 경우는 chloroform과 methanol을 첨가하고 소수성의 chloroform의 함량에 변화를 주면서 이소플라본들의 분리정도와 전개시간을 확인하였다. 이와 다르게 (II) 용매의 경우는 *n*-butanol의 함량에 차이를 주면서 이소플라본의 전개를 관찰하였다. 전개시간의 경우 소수성의 chloroform이 용매에 포함된 경우 (I)가 *n*-butanol을 함유한 용매 (II) 보다 빨랐다. (I) 용매가 (II) 용매보다 전개시간이 짧다는 장점과 더불어 genistin과 daidzin의 분리에 있어서도 (II)용매의 경우보다 좀 더 확실하다는 장점이 있었다. (I) 용매 조건에서 genistin과 daidzin의 분리에 있어서 명확한 분리 조건을 찾기는 쉽지 않았으나 chloroform : methanol : water : acetic acid를 각각 60 : 30 : 10 : 0.5의 비율로 하였을 때 최적의 분리를 보였다. 이때 genistin과 daidzin의  $R_f$ 값은 각각 0.70과 0.65를 보였다.

이소플라본의 경우 glycone형태의 유도체가 9종류나 됨으로 일반적으로는 당 분석에 사용되는 발색시약을 이용하여 그 존재를 확인할 수가 있으나 254 nm에서의 UV 흡광도를 측정하면 좀 더 간편하게 glycone과 aglycone을 포함한 모든 이소플라본의 존재를 확인할 수 있다는 장점이 있다. 하지만 전개 용매의 친수도와 소수도 정도에 따라 glycone과 aglycone 형태의 이소플라본의 전개도가 다르게 나타남을 확인하였다. 일반적인 이소플라본 형태인 glycone을 확인하기 위한 전개용매 조건에서는 aglycone 형태의 이소플라본들이 전개용매와 같이 움직임으로  $R_f$ 값이 상당히 높고 분리가 쉽지 않았다. 따라서 aglycone 형태의 이소플라본의 분석 시에는 전개용매의 소수도를 줄임으로써 시료의 존재를 관찰 할 수 있었다. 결론적으로 대표적인 glycone 형태의 이소플라본인 genistin과 daidzin은 특별한 발색과정 없이 간편하게 UV에서 TLC전개 후 흡광도만 측정함으로써 관찰이 가능하였다(Fig. 1).

### Fig. 2. Standard curves for two isoflavones, genistin and daidzin.

A: TLC analysis, B: HPLC analysis.

#### TLC를 이용한 이소플라본의 정량 분석

TLC의 경우는 유기산, 탄수화물등 여러 성분의 분석에 자주 사용되고 있으나 많은 경우 정성적인 분석용으로 사용되고 있다. 최근 TLC분석법이 정량적으로 사용된 예도 보고되고 있다(24,25). 이때 정량적 분석에 있어서 중요한 점은 발색 후 생성된 spot의 밀도 및 크기에 일관성이 있어야 한다는 것이다. 일반적으로 사용되는 발색법의 경우는 발색시약의 종류와 발색 과정에 사용되는 가열과정의 정도에 따라 spot의 밀도와 크기에 차이가 있어 정량적인 분석에 있어서 제약이 되고 있다. 이소플라본의 경우, TLC를 이용하여 분석할 때 별도의 발색시약을 사용하지 않고 UV에서 흡광도를 측정함으로써 일관성 있는 spot의 밀도와 크기를 확인할 수 있었다. 정량적인 측정이 가능함을 확인하기 위하여 표준물질인 genistin과 daidzin을 사용하여 이소플라본과 spot의 intensity 간의 상관관계를 확인하였다(Fig. 2). 각 표준물질의 농도를 0.15-1.80  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 조절하고 TLC분석 후에 생긴 spot의 intensity를 densitometer로 측정하여 표준곡선을 그린 결과,  $R^2$ 값이 모두 0.995를 넘어 이상의 농도 범위에서 정량분석이 가능함을 알 수 있었다(Fig. 2). 하지만 두 이소플라본을 동시에 측정할 경우 농도가 1.80  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  이상을 넘을 경우 daidzin과 genistin의 spot이 명확하게 분리되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 일반적으로 1.80  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  이하의 농도에서 정량적으로 이소플라본인 genistin과 daidzin을 분석할 수 있다는 결론을 도출하였다. 그러나, 미량의 이소플라본(0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  이하)을 분석할 경우 spot의 intensity를 정확하게 측정하는데는 한계가 있었다.

결론적으로 이소플라본의 함량이 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  이상이고 시료의

**Table 2. The content of daidzin and genistin in various soybeans analyzed by TLC and HPLC<sup>1)</sup>**

Varieties	Daidzin ( $\mu\text{g/g}$ )		Genistin ( $\mu\text{g/g}$ )	
	TLC	HPLC	TLC	HPLC
Black bean	412.9 $\pm$ 12.16 <sup>a,2)</sup>	415.0 $\pm$ 6.01 <sup>a</sup>	501.5 $\pm$ 25.10 <sup>a</sup>	517.4 $\pm$ 7.21 <sup>a</sup>
Soybean	384.4 $\pm$ 23.76 <sup>a</sup>	391.4 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	491.8 $\pm$ 14.92 <sup>a</sup>	508.3 $\pm$ 6.22 <sup>a</sup>
Yak-kong	344.2 $\pm$ 31.82 <sup>a</sup>	382.2 $\pm$ 6.93 <sup>a</sup>	491.6 $\pm$ 16.76 <sup>a</sup>	508.6 $\pm$ 3.82 <sup>a</sup>
Sprout bean	306.4 $\pm$ 51.34 <sup>a</sup>	236.7 $\pm$ 9.97 <sup>a</sup>	387.5 $\pm$ 28.00 <sup>a</sup>	480.8 $\pm$ 9.97 <sup>a</sup>
Kindney bean	nd <sup>3)</sup>	nd	nd	nd
Mung bean	nd	nd	nd	nd

<sup>1)</sup>Data were obtained from triplicate experiments.<sup>2)</sup>Means with the same letter in each column are not significantly different ( $p < 0.05$ ).<sup>3)</sup>Not detected.**Table 3. The content of daidzin and genistin in various kudzu roots analyzed by TLC and HPLC<sup>1)</sup>**

Varieties	Daidzin ( $\mu\text{g/g}$ )		Genistin ( $\mu\text{g/g}$ )	
	TLC	HPLC	TLC	HPLC
Chueup MT	498.4 $\pm$ 14.88 <sup>a,2)</sup>	510.8 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	275.2 $\pm$ 6.70 <sup>a</sup>	280.1 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>
Joonmi MT	500.3 $\pm$ 10.18 <sup>a</sup>	511.2 $\pm$ 2.12 <sup>a</sup>	123.2 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	125.3 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
Suanbo MT	511.5 $\pm$ 5.34 <sup>a</sup>	510.0 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>	120.8 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>	125.1 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
Miryang MT	466.1 $\pm$ 8.54 <sup>a</sup>	457.9 $\pm$ 6.49 <sup>a</sup>	256.0 $\pm$ 3.81 <sup>a</sup>	260.1 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
Jeonju MT	441.8 $\pm$ 11.93 <sup>a</sup>	442.8 $\pm$ 7.81 <sup>a</sup>	181.9 $\pm$ 2.11 <sup>a</sup>	185.5 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
Jecheon MT	734.0 $\pm$ 15.16 <sup>a</sup>	740.1 $\pm$ 11.11 <sup>a</sup>	136.4 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	141.8 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>
Gangwondo MT	745.9 $\pm$ 25.66 <sup>a</sup>	777.7 $\pm$ 7.58 <sup>a</sup>	135.3 $\pm$ 5.35 <sup>a</sup>	139.8 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>
Gijang MT	443.1 $\pm$ 15.39 <sup>a</sup>	451.7 $\pm$ 3.45 <sup>a</sup>	149.8 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	149.8 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>
Daegu MT	506.7 $\pm$ 7.88 <sup>a</sup>	513.8 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	120.0 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	119.8 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>
Gochang MT	674.2 $\pm$ 11.91 <sup>a</sup>	710.8 $\pm$ 2.04 <sup>a</sup>	158.6 $\pm$ 3.41 <sup>a</sup>	200.5 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
Daebo MT	561.4 $\pm$ 9.78 <sup>a</sup>	572.7 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>	156.0 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>	156.2 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
Sokri MT	348.0 $\pm$ 6.05 <sup>a</sup>	349.6 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	139.7 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	141.9 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Data were obtained from triplicate experiments.<sup>2)</sup>Means with the same letter in each column are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

간 내에 분석이 가능하다는 점을 고려할 때 TLC를 이용한 정량방법이 유용하게 사용될 수 있다는 점을 확인하였다. 또한 이소플라본의 정량적 측정이 발색과정 없이 단순한 UV에서의 흡광도 측정으로 가능하다는 것 또한 큰 장점이다.

#### TLC 및 HPLC를 이용한 여러 시료에서의 이소플라본의 정량

TLC에 의한 이소플라본의 정량법에 대한 검증을 하기 위하여 콩과 식물에 포함되어 있는 이소플라본의 함량을 TLC와 HPLC로 분석하여 그 안에 포함되어 있는 genistin과 daidzin의 함량을 비교하여 보았다(Table 2, Fig. 3). TLC에 의한 분석의 경우 강낭콩과 녹두에서는 이소플라본의 존재를 확인 할 수 없었으며 이는 HPLC의 경우와 동일하였고 기존의 보고와도 일치하였다(27). 이소플라본의 함량은 흑태의 경우 genistin과 daidzin 모두 가장 높았으며, 대두, 서목태, 콩나물콩의 순으로 그 함량이 적었다. 정량 분석을 실시한 후 얻어진 이소플라본의 함량도 TLC와 HPLC의 경우 상당히 유사한 값을 보여 주었으며, 이는 TLC에 의한 정량 방법이 유효하다는 사실을 증명하는 것이다. TLC를 이용하여 국내에서 채취한 콩에 포함된 이소플라본의 함량을 측정된 결과도 HPLC의 결과와 상당히 유사한 값을 보여 주었다(Table 3). 이상의 결과를 바탕으로 콩과 식물에 많이 포함되어 있는 이소플라본인 genistin과 daidzin은 TLC방법으로 간편하게 정량적인 측정이 가능함을 확인하였다. 물론 낮은 농도에서는 정량적인 측정이 HPLC에 비하여

**Fig. 3. TLC analysis of isoflavones in soybean and kudzu root.**

Lane 1: daidzin, lane 2: extract of soybean, lane 3: extract of kudzu root, and lane 4: genistin.

양이 많은 경우 한 chamber 내에서 동시에 여러 시료를 분석할 수 있고 시료의 전처리 과정이 따로 필요 없으며 빠른 시

부정확하였으며 미량으로 포함되어 있는 다른 이소플라본의 경우 정량적인 측정이 불가능하다는 단점이 있는 것도 간과 할 수는 없다. 따라서 그 환경과 목적에 따라 HPLC방법과 TLC 방법을 서로 보완적으로 활용하면 보다 효율적으로 생리활성 물질로 각광을 받고 있는 이소플라본의 연구를 수행할 수 있을 것이다.

## 요 약

TLC를 이용하여 간편하고 신속하게 정량적인 이소플라본의 분석을 수행할 수 있는 조건을 개발하였다. 전개 용매로는 chloroform : methanol : water : acetic acid를 각각 60 : 30 : 10 : 0.5의 비율로 하였을 때 최적의 분리를 보였으며, 정량적인 분석은 UV에서의 흡광도를 densitometer를 사용하여 spot의 intensity를 계산함으로써 가능하였다. HPLC분석법과의 비교 결과 0.15-1.80 µg/µL의 범위에서 이소플라본을 정량적으로 분석할 수가 있었다. 또한 TLC를 이용한 일반 콩과 식물에 포함되어 있는 이소플라본의 함량 측정 결과 HPLC의 결과와 상당히 근소한 값으로 일치하여 TLC방법으로 간편하고 빠르게 정량적인 측정이 가능함을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 연구사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- Lee MH, Park YH. Isoflavone content in soybean and its processed products. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 365-369 (2002)
- Turner NJ, Thomson BM, Shaw IC. Bioactive isoflavones in functional foods: the importance of gut microflora on bioavailability. Nutr. Rev. 61: 204-213 (2003)
- Dixon RA, Ferreira D. Genistein. Phytochemistry 60: 205-211 (2002)
- Kim CS, Ha HK, Kim HJ, Lee JH, Song KY. *Pueraria lobata* ohwi as an osteoporosis therapeutics. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 710-718(2002)
- Krishnan HB. Identification of genistin, an anticarcinogenic compound, in the edible tubers of the American groundnut (*Apios americana* Medikus). Crop Sci. 38: 1052-1056 (1998)
- Jun M, Fu HY, Hong J, Wan X, Yang CS, Ho CT. Comparison of antioxidant activities of isoflavones from Kudzu root (*Pueraria lobata* Ohwi). J. Food Sci. 68: 2117-2122 (2003)
- Boue SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. J. Agric. Food Chem. 51: 2193-2199 (2003)
- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, Daidzein, and their  $\beta$ -glucoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. J. Agric. Food Chem. 41: 1961-1967(1993)
- Wei HC, Wei LH, Frenkel K, Bowen R, Barnes S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. Nutr. Cancer 20: 1-12 (1993)
- Kosslak RM, Bookland R, Barkei J, Paaren HE, Appelbaum ER. Induction of *Bradirhizobium Japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from Glycine max. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 7428-7432 (1987)
- Morris PF, Savard ME, Ward EWB. Identification and accumulation of isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea. Physiol. Molecular Plant Pathol. 30: 229-244(1991)
- Wang H, Murphy PA. Isoflavone content in commercial soybean foods. J. Agric. Food Chem. 42: 1666-1673 (1994)
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. J. Nutr. 130: 1695-1699 (2000)
- Setchell KDR. Absorption and metabolism of soy isoflavones from food to dietary supplements and adults to infants. J. Nutr. 130: 654S-655S (2000)
- Lee SJ, Ahn JK, Kim SH, Kim JT, Han SJ, Jung MY, Chung IM. Variation in isoflavone of soybean cultivars with location and storage duration. J. Agric. Food Chem. 51: 3382-3389 (2003)
- Prasain JK, Jones K, Kirk M, Wilson L, Smith-Johnson M, Weaver C, Barnes S. Profiling and quantification of isoflavonoids in Kudzu dietary supplements by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 51: 4213-4218 (2003)
- Vetter J. Isoflavones in different parts of common *Trifolium* species. J. Agric. Food Chem. 43: 106-108 (1995)
- Wang H, Murphy PA. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. J. Agric. Food Chem. 42: 1674-1677 (1994)
- Kim YH, Kim SR. Isoflavone content in Korean soybean cultivars. Soonchunyang J. Nat. Sci. 3: 331-337 (1997)
- Kim HY, Hong JH, Kim DS, Kang KJ, Han SB, Lee, EJ, Chung HW, Song KH, Sho KA, Kwack SJ, Kim SS, Park KL, Lee SK, Kim MC, Kim CM, Song IS. Isoflavone content and estrogen activity in arrowroot *Puerariae radix*. Food Sci. Biotechnol. 12: 29-35(2003)
- Wu Q, Wang M, Simon JE. Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. J. Chromatogr. A. 1016: 195-209 (2003)
- Barnes S, Coward L, Kirk M, Sfakianos J. HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 217: 254-262 1998
- Aussenac T, Lacombe S, Dayde J. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: effects of variety and environment. Am. J. Clin. Nutr. 68: 1480S-1485S (1998)
- Robyt JF, Mukerjeab R. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. Carbohydr. Res. 251: 187-202 (1994)
- Choi MH, Cho KS, Kang Hk, Yun JS, Seo ES, Ryu HW, Chang SH, Yoon SH, Kim DM. Simple and quantitative analysis method for lactic acid by TLC. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 18: 70-73 (2003)
- Dan Li, Park JH, Park JT, Park CE, Park KH. Biotechnological production of highly soluble daidzein glycosides using *Thermotoga maritima* maltosyltransferase. J. Agric. Food Chem. 52: 2561-2567 (2004)
- Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala K. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. J. Agric. Food Chem. 42: 1905-1913(1994)

(2004년 6월 15일 접수; 2004년 8월 12일 채택)