

토종콩 및 된장 부산물에 함유된 이소플라본의 추출 및 정제

이광진 · 최두영 · 노경호[†]

인하대학교 화학공학과, 초정밀생물분리기술센터

402-751 인천시 남구 용현동 253

(2003년 3월 10일 접수, 2003년 7월 28일 채택)

Extraction and Purification of Isoflavones from Korean Soybean and Soybean Paste

Kwang Jin Lee, Du Young Choi and Kyung Ho Row[†]

Center for Advanced Bioseparation Technology and Department of Chemical Engineering, Inha University,

253, Yonghyun-dong, Nam-ku, Incheon 402-751, Korea

(Received 10 March 2003; accepted 28 July 2003)

요 약

본 연구에서는 토종콩 추출물과 된장 부산물에서 isoflavones을 얻기 위하여 분석용과 분취용 HPLC를 사용하였다. 전처리 한 추출액에 포함된 isoflavones을 분석하고 분취하기 위하여 최적의 조업조건을 실험적으로 구하였다. 60% ethanol 수용액에서 추출효율이 가장 우수하였고 15 μm 입자가 충진된 분취용 칼럼과 선형적인 구배용매 조성법을 이용하여 토종콩을 추출하였다. 이 조건에서 고형 추출물의 수율은 5%이며, genistin, daidzein, genistein의 함량은 0.2 wt.%이었다. 또한 발효된 된장 부산물에서는 토종콩 추출물에서보다 비배당체 isoflavones의 함량이 매우 높았다.

Abstract – In this work, analytical and preparative HPLC systems were utilized to obtain isoflavones from Korean soybean and byproduct of soybean paste. The optimum operating conditions were experimentally determined to analyze and collect the isoflavones in the pretreated extract. The extraction efficiency was the most favorable at aqueous solution of 60% ethanol. Korean soybean was extracted by preparative column with 15 μm packings and linear gradient elution mode. Under these experimental conditions, the yield of solid extract was 5%, while the weight percentage of genistin, daidzein, and genistein was 0.2 wt.%. The content of non-glucosides isoflavones in the fermented byproduct of soybean paste was remarkably higher than that in the Korean soybean extract.

Key words: Isoflavones, Korean Soybean, Extraction, RP-HPLC

1. 서 론

예전부터 생리활성 물질 중에서 연구자들에게 가장 관심을 모으는 천연물 중의 하나인 콩은 단백질을 함유한 식품으로서 육식을 많이 하는 현대인들에게 기능성 식품의 원료로 널리 알려지고 있으며, 그 유용성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[1-2]. 콩의 유용 성분을 살펴보면 주요 영양분인 단백질, 탄수화물, 지방뿐만 아니라 무기물을 함유하고 있고 생리 활성 물질로 잘 알려진 성분은 isoflavones, sapoin, lecithin, peptides, amino acids 등이 있다. 콩에서 가장 유용한 물질은 항암제인 isoflavones이 약 0.2-0.4% 정도 함유되어 있고[3], 심장 질환, 유방암, 전립선암, 결장암, 골다공증, 폐경기 증상에 탁월한 효과를 갖고 있다[4].

Isoflavones의 구성은 3개의 비배당체 7"-O-glucosides (daidzin, genistin, glycitin), 9개의 배당체 6"-O-acetyl-glucosides (6"-O-acetyl-daidzin, 6"-O-acetyl-genistin, 6"-O-acetyl-glycitin), 6"-O-malonyl-glucosides (6"-O-malonyl-daidzin, 6"-O-malonyl-genistin, 6"-O-malonyl-glycitin)로 이

루어져 있고[5], 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 특성을 갖고 있다[6]. 에스트로겐은 노화 유발, 염증, 당뇨, 동맥경화와 같은 질병에 관련 있는 효과와 세포를 보호하는 특성이 있어 혈관 손상, 혈관 질환 방지, 디아이트에 유용하다[7]. 콩으로부터 다양한 생물학적 활성 물질의 함유는 제품의 제조 방법에 따라 콩의 유용성이 직접 식용으로 사용되어지는 간장, 된장의 이용과, 2차 가공 제품인 두부, 요구르트, 두유의 이용, 고단백 식품 소재로 제품이 매우 다양하다. 비발효식품에서는 배당체 daidzin, genistin, glycitin 등이 많다. 그러나 발효식품에서는 비배당체 daidzein, genistein, glycine 등이 주로 존재하는 이유는 발효에 관계되는 박테리아에 의해 배당체 형태의 isoflavones으로부터 당이 분해되면서 비배당체 형태의 isoflavones이 형성되기 때문이다[9]. 이러한 isoflavones은 콩에서도 특히, 배아에 많이 포함되어서 발효 식품 또는 콩으로부터 isoflavones을 추출하여 사용하고 있다[9].

크로마토그래피는 혼합된 시료성분이 이동상과 고정상 사이를 흐르면서 흡착작용, 분배작용, 이온교환작용, 분자크기, 배제작용 등에 의해 각각의 단일성분으로 분리되는 것으로 성분의 정성 및 정량의 분석 목적과 정제, 분리 등의 분취 목적에 이용되고, 복잡한 물질이나 극성의 차이가 큰 물질을 분리하기 위해서 구배용매조성법을 사용하며, 이동상

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rowkho@inha.ac.kr

의 조성을 시간에 따라 변화시키는 방법으로 일정용매법을 사용하고 이동상의 극성을 변화시킴으로써 물질의 체류 시간을 조절 할 수 있기 때문에 HPLC를 이용하여 혼합물을 분리하는 최적의 조건을 결정하기 위해서 이동상 조성을 변화시킨다[10]. 유용 성분인 isoflavones을 얻기 위한 연구는 HPLC를 이용한 분석 방법이 가장 널리 사용되고, 분석용 크로마토그래피는 충전물의 크기가 작아서 분리도가 아주 우수하지만 압력 강하기 때문에 고압용 장치가 필요하다. 이에 비해서 제조용 크로마토그래피는 원료 혼합 물질을 그램 이상의 규모로 주입하여 다양한 isoflavones을 얻을 수 있다. 최근 isoflavones의 연구는 콩의 배아에서 isoflavones을 역상 HPLC를 이용하여 분리되어지고 이동상 3성분계를 적용하여 서로 다른 4개의 칼럼과 15 μm입자가 충진된 C₁₈ 충진물을 채워서 제조용 칼럼을 사용하였으며 이동상을 구배용매 조성법으로 변화를 주위 몇 개의 isoflavones을 분취하여 LC-MS로 정성분석[11], 콩에 함유되어 있는 daidzein, genistein을 가스크로마토그래피를 이용하여 분석[12], isoflavones의 함량을 HPLC를 이용하여 3성분계 이동상을 구배용매 조성법과 12가지의 표준시료로 정성분석을 하였다 [13]. 본 연구에서는 토종콩 추출물에서의 isoflavones을 분석하고 된장부산물에 포함된 isoflavones을 회수하는 고순도 분리 방법을 실험적으로 구하는 것이 목적이이다.

2. 실험

2-1. 실험 재료

본 실험에 사용된 토종콩 추출물과 된장 부산물은 (주) 메주와 켈리스트로부터 제공받았다. 표준 시료인 daidzein(4,7-Dihydroxyisoflavone, 98%), genistein(4,5,7-Trihydroxyisoflavone, 98%), genistin(4,5,7-Trihydroxyisoflavone-7-glucoside, 99.1%)은 Sigma Co.에서 구입하였다. 모든 시료들은 주입하기 전에 막여과지(PVDF 0.45 μm, Waters Co.)를 이용하여 여과를 하였다. 이동상에 사용한 아세트산은 동양화학, 아세토니트릴은 덕산화학에서 구입하였고 물은 감압 펌프(Waters Co.)와 필터(HA-0.5 μm, Waters Co.)를 이용하여 여과한 3차 중류수를 사용하였다.

2-2. 실험 기기

본 실험에서 분석용 HPLC 장치는 Waters 515 multi-solvent delivery system 486 tunable absorbance analytical detector, Rheodyne injector (50 µl sample loop)를 포함한 Waters model 600S liquid chromatography (Waters Associates, Milford, MA, U.S.A.)를 사용했다. HPLC에서 얻은 chromatography 은 데이터 수집 장치인(Chromate Ver. 3.0, Interface Eng., Korea)을 통해서 얻었다. 입자 크기가 5 µm인 물질이 충진된 분석용(RS-tech OP C₁₈, 0.46×25 cm)과 입자 크기가 15 µm(Lichrosopher 100RP-C₁₈, Merck, U.S.A., 0.46×25 cm)가 충진된 칼럼을 사용하였다. 전처리 단계로서 불순물을 제거하기 위해서 초원심 분리기(Beckman Coulter)를 사용하였다. 추출한 시료를 농축하기 위하여 회전식 증발기 (BÜCHI Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였고, 유출물 isoflavones 을 분취한 후 동결건조기(Model name: SFDSM 12, 삼원냉열 Eng.)을 사용하여 파우더로 만들었다.

2-3. 실험 방법

토종콩 추출물 및 된장 부산물에서 isoflavones을 추출하기 위해 각각 50 g을 물과 80% 메탄올, 80%, 60%, 40% 에탄올로 상온(25 °C), 50 °C에서 300 ml의 양을 넣고 3시간 동안 3,000 rpm으로 교반하였다. 추출된 용액을 여과지에 통과시켜 불순물 및 잔여물을 제거한 후 농축하였다. 토종콩 추출물과 된장 부산물에서 추출된 용액을 초원심 분리기(Beckman Coulter)를 60,000 rpm, 4 °C에서 회전 속도로 1시간 동안 원심분리를 하였다. 0.45 μm 멜브레인 필터를 통과시켜서 얻은 시료를 가

지고 칼럼으로 분석하였고, 15 μm 칼럼에서 분취 하였다. HPLC의 실험 조건은 유속 1 ml/min, 주입부피 20 μl, 검출파장은 260 nm로 고정하여 실험하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 토종콩에 포함된 isoflavones의 함량과 분석조건을 실험적으로 고찰하였고 된장의 숙성된 부산물에서 isoflavones의 종류와 함량을 확인하였다.

3-1. 토종콩 추출물에서 isoflavones의 분석

토종콩에 포함된 isoflavones의 함량을 HPLC를 사용하여 분석하였다. 실험에서 언급한 바와 같이 토종콩을 물에 의해서 추출하였고 추출물을 역상 HPLC 방법에 의해 분석하였다. 분취용 칼럼으로 얻은 시료를 분석용 HPLC를 사용하여 분석하였다. 이동상으로는 물, 아세토니트릴, 아세트산의 3성분계의 이동상을 이용하였다. Fig. 3에서 보이는 바와 같이, 전처리 한 콩 추출물을 분석용 칼럼을 사용하여 유속 1 ml/min, 주입부피 20 μ l의 실험조건에서 분석하였다. 이동상의 조성을 변화시키면서 실험적으로 최적화된 이동상은 두 가지 성분인 A와 B로 구성되었다. 이동상 A는 물/아세토니트릴/아세트산, 94.9/5.0/0.1(vol.%), B는 물/아세토니트릴/아세트산, 5/94.9/0.1(vol.%)이었다. 이동상 조성은 A/B가 100/0-70/30(vol.%)으로 60분 동안 선형적으로 변화시켰다. 표준시료의 체류시간을 비교해서 확인된 isoflavones은 genistin이었고 다른 성분들은 문헌에 보고 된 체류시간을 참조하여 정하였다[11, 13]. Isoflavones 중에서 3가지 비메당체 daidzein, genistein, glycitein의 구조식이 Fig. 1에 보여주고 있으며, Fig. 2에서는 본 연구에서 적용된 추출 및 정제방법의 공정을 나열하였다.

15 μm C₁₈입자가 충진된 분취용 칼럼을 사용하여 실험한 결과를 Fig. 4에서 나타내었다. 분석용 HPLC와 같은 이동상 조성과 주입부피, 유량 조건에서 실험하였고, Fig. 3에서 얻은 결과에 비하여 피크가 넓어졌으며 칼럼 효율이 감소하였다. 크로마토그래피 칼럼에 사용된 충진물 입자의 크기가 커지게 되면서 daidzin과 glycitin, genistin과 6"-o-malonyldaidzin이 각각 분리되지 않은 상태로 거의 동시에 용출되었고 이어서 6"-o-malonylgenistin이 칼럼 밖으로 나왔다. 또한 체류시간을 비교하여 표준 물질에 대해서 정성분석을 수행하였으며, 비배당체인 daidzein, glycistein, genistein은 토종콩 추출물에는 미량이 포함되었다.

토종콩 추출물에 포함된 isoflavones 함량을 실험적으로 측정하기 위해서 토종콩 20 g을 60% 에탄올 수용액 60 ml에 넣고 3,000 rpm에서 15시간 정도 추출 한 뒤 분취용 칼럼을 사용하여 isoflavones의 채류시간(30-65분 기준)동안 포집하여 회전식 증발기로 농축하였다. 이와 같이 얻어진 시료를 20 μ l를 주입하여 분석용 칼럼을 이용하여 추출물을 분석한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 그 결과 토종콩 20 g중에서 고령 추출

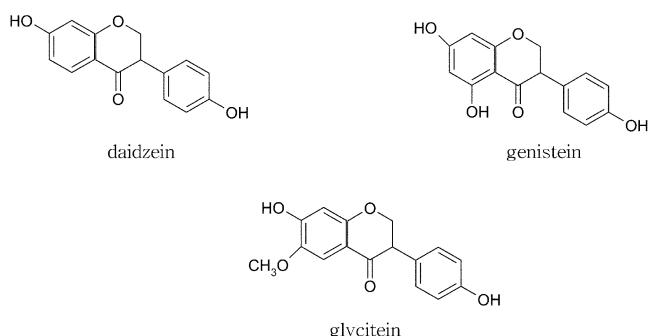


Fig. 1. Chemical structures of isoflavones.

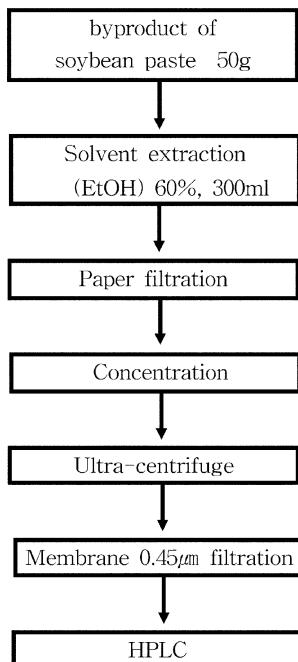


Fig. 2. Extraction and purification procedure from byproduct of soybean paste.

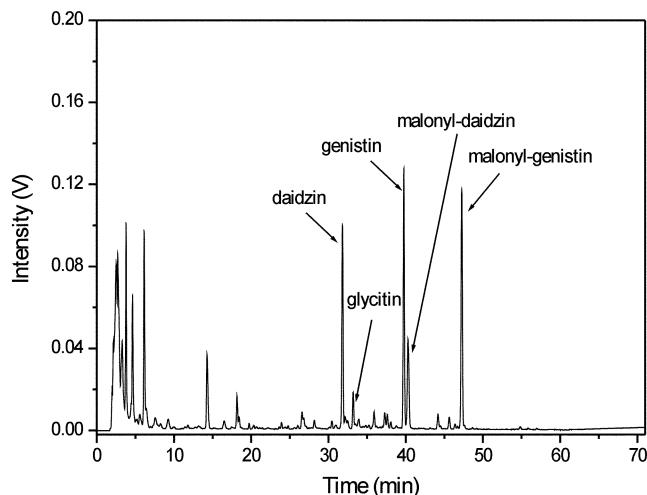


Fig. 3. Chromatogram of isoflavones from Korean soybean by analytical HPLC (Water/ACN/AA 94.9/5.0/1.5/94.9/0.1, 100/0-70/30 vol.%, 1 ml/min, 20 μl).

물의 수율은 5%이며, 이중에서 3가지 isoflavones인 genistin, daidzein, genistein에 함량은 0.2 wt.%를 얻을 수 있었다.

3-2. 된장 부산물에 포함된 isoflavones의 회수

유용한 isoflavones를 회수하기 위하여 된장의 부산물을 추출용매의 종류와 조성(vol.%), 교반조건(rpm) 및 추출온도(°C)에 관한 최적의 조건을 실험적으로 확립하였다. 메주를 일정 기간동안 건조시킨 후, 물, 소금을 넣고 일정시간 발효시키면 바실러스균에 의해 발효되면서 메주 상층부에 부유하는 고체 성분이 생기게 된다. 이는 박테리아에 의해 메주가 발효되는 과정에서 부산물이 생성되고 발효된 메주를 교반하여 된장 제조 후 된장 부산물이 생성된다. 토종콩 추출물에서 실험한 것과 동일한 분석용과 분취용 칼럼으로 실험하였다. 된장 부산물부터 추출물의 상태는 토종콩 추출물에 비해서 색깔이 흑갈색으로 짙었으며, 그것을

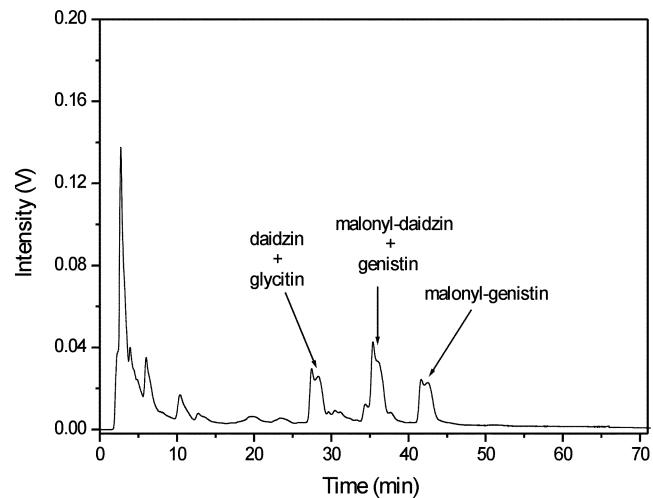


Fig. 4. Chromatogram of isoflavones from Korean soybean by preparative HPLC (15 μm, 1 ml/min, 20 μl)

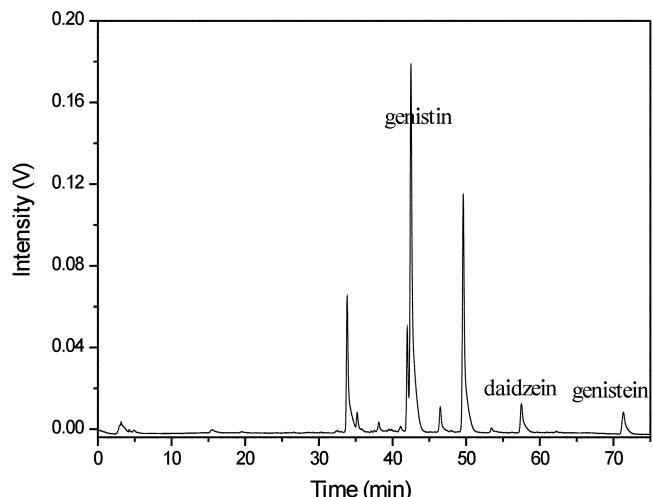


Fig. 5. Chromatogram of fractionated isoflavones from Korean soybean by analytical HPLC (60% EtOH, 25 °C, cutting time 30-65 min).

제거하기 위해 침전 액 중에 있는 단백질을 염화칼슘, 옥, pH 처리, 이온교환수지 및 활성탄으로 isoflavones를 흡착시켜 에탄올로 탈착하여 회수하는 방법이 사용되고 있다[3].

본 연구에서는 추출물을 알코올 또는 알코올 수용액에 넣고, 교반과 여과 단계를 거쳤다. 20-80%의 메탄올 또는 에탄올 수용액을 사용하여 isoflavones를 고 효율적으로 추출하였으며, 추출 용매 조성과 온도에 대한 영향을 고찰하여 실험적으로 분석한 결과를 다음 그림에 표시하였다. 80% 메탄올 수용액과 상온(25 °C)에서 된장 부산물을 추출하였다. Fig. 6에서는 이 추출물을 분취용 HPLC로 분석한 결과이고 daidzein과 genistein의 비배당체 isoflavones과 6'-o-malonylgenistin, daidzin, glycitin, genistin 및 6'-o-acetylgenistin의 배당체 isoflavones 등이 포함되었다. 특히 토종콩 추출물에서는(Fig. 3, 4) 미량 존재하는 비배당체 daidzein과 genistein이 용출되는 것을 확인하였으며, 된장이 발효되는 과정에서 바실러스 균이 콩에 들어 있는 배당체 isoflavones를 분해시킴으로써 비배당체 isoflavones의 함량이 높게 되었다. 바실러스균과 된장제조공정 중에서 발효 및 속성 정도에 따라 배당체의 이소플라본류가 가수분해되거나 당이 끓어져 배당체로 전환되어 비배당체 이소플라본류가 증가되었다(Fig. 1). 이에 비해서 추출용매 80% 에탄올 수용액을 사용한 경우의 실험 결과가 Fig. 7에서 보여주고 있다. 상대적으로 작은 양의 Fig.

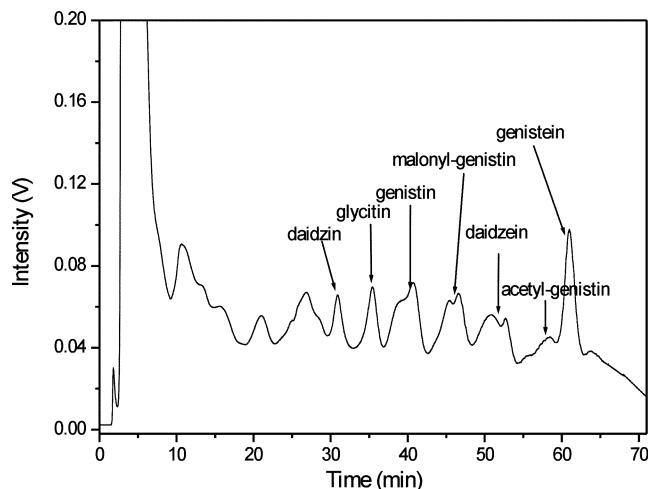


Fig. 6. Chromatogram of isoflavones from byproduct of soybean paste by preparative HPLC (80% MeOH, 25 °C).

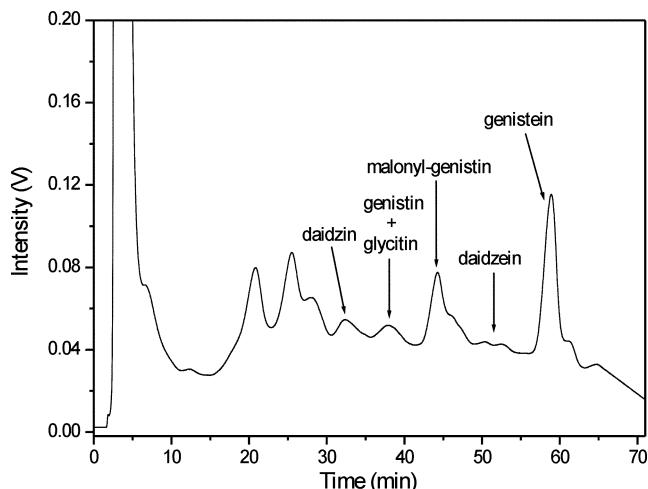


Fig. 7. Chromatogram of isoflavones from byproduct of soybean paste by preparative HPLC (80% EtOH, 25 °C).

6과 비교해 보면, 6"-*o*-acetylgenistin이 포함되어 에탄올 수용액의 농도에 따라서 isoflavones 성분의 추출양이 변하는 것을 알 수 있으며, 그 중에서도 비배당체 isoflavones인 genistein의 용해도가 증가하여 추출물 중의 함량이 증가하였다.

Genistin은 배당체 isoflavones으로 전체 콩 속에 약 50% 정도 함유되어 있으며, isoflavones의 약 97%가 당과 결합되어 있어 발효를 거치면 미생물에 의한 가수분해로 인해서 30% 정도가 당이 분해되어 비배당체가 되고, 분자 구조적 차이에 의하여 90분 정도 가열되면 30% 이상 가수분해된다. 추출용매로서 에탄올을 사용하는 경우 농도에 따른 추출 효과를 확인하였다. 80% 에탄올을 수용액 Fig. 7과 비교하면 60%의 에탄올 수용액 Fig. 8에서는 상대적으로 용매의 극성이 높아졌고 이에 따라서 배당체 isoflavones인 6"-*o*-malonyldaidzin과 6"-*o*-acetylgenistin이 포함되었다. Fig. 9에서는 추출용매의 극성을 더 높여서 40% 에탄올 수용액으로 실험하였다. 추출용매의 극성에 따라 isoflavones의 용해도는 직접적인 영향을 받아서 Fig. 8과는 다르게, 추출된 isoflavones의 양은 감소하였다. 추출용매로서 메탄올이 에탄올보다 추출효율이 좋았지만 독성을 고려하여 에탄올의 사용이 바람직하다. 실험 결과에 의하면 60%의 에탄올 수용액 농도에서 가장 많은 isoflavones이 추출되었다. 이 에탄올 농도와 추출온도 50 °C에서 분석한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 일반적으로 천연물 추출에서는 물질이 분해되지 않도록 상온에서 조업

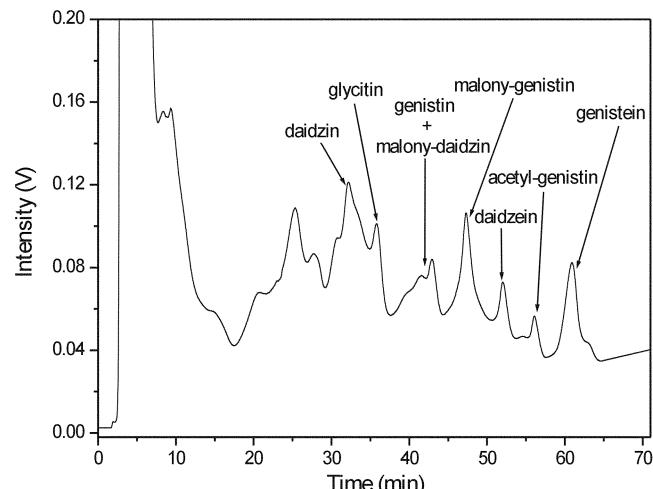


Fig. 8. Chromatogram of isoflavones from byproduct of soybean paste by preparative HPLC (60% EtOH, 25 °C).

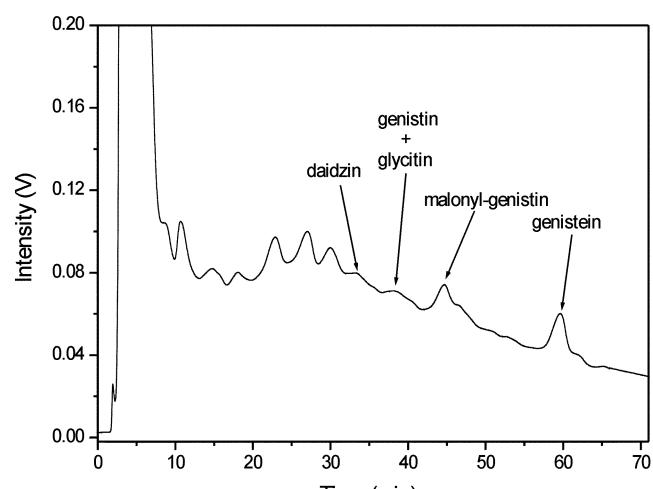


Fig. 9. Chromatogram of isoflavones from byproduct of soybean paste by preparative HPLC (40% EtOH, 25 °C).

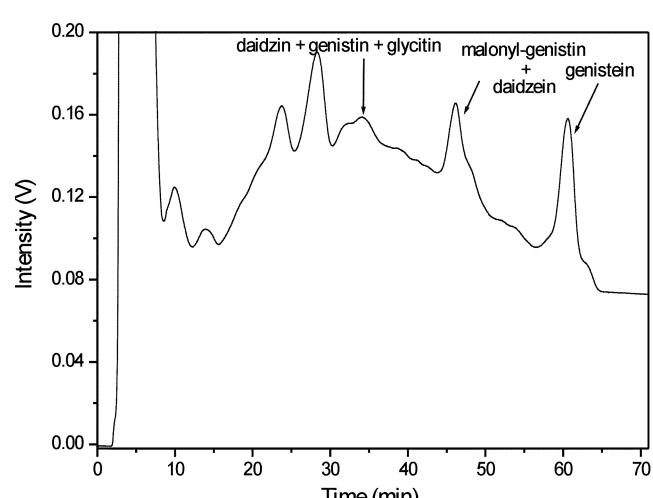


Fig. 10. Chromatogram of isoflavones from byproduct of soybean paste by preparative HPLC (60% EtOH, 50 °C).

을 하지만 isoflavones 용해도를 증가시키도록 추출온도를 높였다. 된장 부산물에서 isoflavones의 가수분해 정도는 온도 50 °C에서 배당체 isoflavones

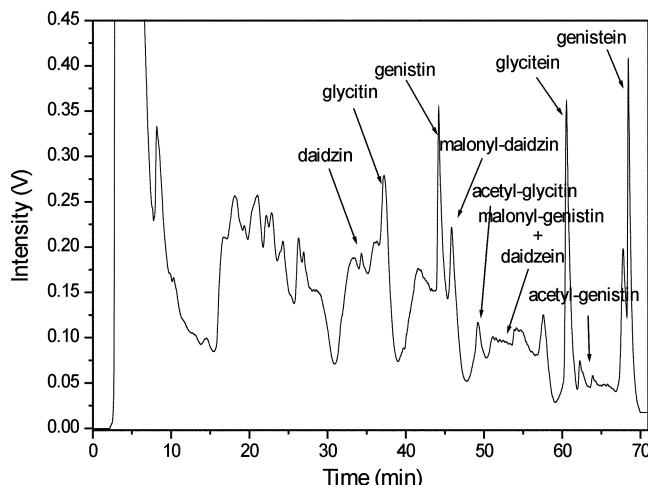


Fig. 11. Chromatogram of isoflavones from byproduct of soybean paste by analytical HPLC (60% EtOH, 25 °C).

은 당시 구조적인 영향을 받게 되고 그 중에서 비배당체인 genistein의 분리 효율은 배당체인 malonyl기 그룹을 포함하는 isoflavones이 열에 불안정하고 된장 발효에 관여하는 미생물의 종류는 aspergillus와 rhizopus와 같은 곰팡이가 당을 기질로 이용하기 때문에 발효과정에서 배당체 isoflavones이 특정 비배당체 isoflavones으로 전환되는 요인이다. 특히 genistein 양이 많이 증가함을 Fig. 8에서 비교하여 알 수 있다. 60% 에탄올 수용액을 상온(25 °C)에서 추출물 분석용 칼럼을 사용한 결과를 Fig. 11에 나타내었다. 동일한 추출용매와 시료에서 분취용 칼럼의 결과를 Fig. 8과 비교하여 보면 5 μm의 충진물 크기가 충진된 분석용 HPLC에서는 칼럼 효율과 분리도가 크게 증가하여 된장 부산물에 포함되는 비배당체 isoflavones인 genistein, daidzein, glycetein이 포함된 것을 정성분석에 의해서 확인할 수 있었다. 토종콩 추출물과 된장 부산물에 포함된 isoflavones을 비교하면 토종콩 추출물에서는 배당체인 daidzin, genistin, glycitin의 농도가 높았으며, 이에 비해서 된장 부산물에서는 비배당체인 daidzein, genistein, glycetein의 농도가 상대적으로 높았다.

4. 결 론

본 연구에서는 토종콩 추출물과 된장 부산물에서 얻어지는 isoflavones을 얻기 위하여 분석용과 분취용 HPLC system에서 사용하였다. 추출액은 역상 C₁₈ 칼럼을 이용하여 부산물에 포함된 isoflavones을 분석 및 분취를 위하여 최적의 실험조건을 구하였다. 실험결과에 의하면 목적물질인 isoflavones을 얻기 위한 추출용매는 60% 에탄올 수용액이고 15 μm 입자가 충진된 분취용 칼럼과 선형적인 구배용매 조성법에서 콩 추출물에서 고령 추출물의 수율은 5%이며, 이중에서 3가지 isoflavones인 genistin, daidzein, genistein에 함량은 0.2 wt.%를 얻을 수 있었다. 또한 발효된 된장 부산물에서는 비배당체 isoflavones의 함량이 매우 높았다.

감 사

본 연구는 인하대학교 고순도 분리연구실에서 수행하였으며, 인하대학교와 초정밀생물분리기술센터의 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Barnes, S., Kirk, M. and Coward, L., "Isoflavones and Their Conjugates in Soy Foods: Extraction Conditions and Analysis by HPLC Mass Spectrometry," *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 2466-2474(1994).
- Xia, X., Huei-Ju, W., Murphy, P. A., Cook, L. and Hendrich, S., "Daidzein is a More Bioavailable Soymilk Isoflavone than is Genistein in Adult Women," *J. Nutr.*, **124**(6), 825-832(1994).
- Gang, C. W. and Chae, B. J., "A to Z on Soybean Meal, American Soybean Association," No. 1774-092001(2000).
- Griffith, A. P. and Collison, M. W., "Improved Methods for the Extraction and Analysis of Isoflavones from Soy-containing Foods and Nutritional Supplements by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-mass Spectrometry," *Journal of Chromatography A*, **913**, 397-413(2001).
- Jackson, J. C., Dini, J. P., Lavandier, C., Rupasinghe, H. P. V., Faulkner, H., Poysa, D., Buzzell, S. and De-Grandis, "Effects of Processing on the Content and Composition of Isoflavones During Manufacturing of Soy Beverage and Tofu," *Biochemistry*, **37**, 1117-1123(2002).
- Kim, J. S. and Kwon, C. S., "Estimated Dietary Isoflavone Intake of Korean Population Based on National Nutrition Survey," *J. Nutr.*, **21**, 947-953(2001).
- Bahram, H., Arjmandi, B. and Smith, J., "Soy Isoflavones Osteoprotective Role in Postmenopausal Women: Mechanism of Action," *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 130-137(2002).
- Row, K. H. and Lee, K. J., "Adsorptive separation of useful components in soybean," *Fine Chemistry*, **67**, 27-34(2003).
- Row, K. H., Lee, K. J., Choi, D. Y. and Do, W. N., "Extraction method of isoflavones from meju," pending to *Korean Patent No. 2119(2003)*.
- Row, K. H., *Principles and Applications of Liquid Chromatography*, Inha Univ., 1st, 283-292(1999).
- Choi, Y. S. and Row, K. H., "Preparative Separation of Isoflavones from Soybean by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography," *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, **23**(11), 1671-1679(2000).
- Mitani, K., Narimatsu, S. and Kataoka, H., "Determination of Daidzein and Genistein in Soybean Foods by Automated on-line in-tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography," *J. of Chromatography A*, **986**, 169-177(2003).
- Korea Food Research Institute., HPLC Chromatogram of Isoflavones, Analysis Result Report, No. S00804-001(2002).
- Kim, C. H., Park, J. S., Sohn, H. S. and Chung, C. W., "Determination of Isoflavone, Total Saponin, Dietary Fiber, Soy Oligosaccharides and Lecithins from Commercial Soy Products Based on the one Serving Size Some Bioactive Compounds from Commercialized Soy Products," *J. Food Sci. Technol.*, **34**(1), 96-102(2002).