

## 食品中の大豆イソフラボンアグリコン(アグリコン当量)の試験方法

### (1) 高速液体クロマトグラフ法

#### ① 機器・試薬

- ・高速液体クロマトグラフ (HPLC) : 紫外部吸収検出器付き
- ・アセトニトリル : 高速液体クロマトグラフ用
- ・酢酸 : 特級
- ・エタノール : 特級
- ・70%エタノール : エタノールと水を 7 : 3 (v/v) で混合する。
- ・イソフラボン標準品(定性用)<sup>注1</sup> : ダイジン(Daidzin)、グリシチン(Glycitin)、ゲニスチン(Genistin)、ダイゼイン(daidzein)、グリシテイン(glycitein)、ゲニステイン(genistein)、マロニルダイジン(6"-O-Malonyldaidzin)、マロニルグリシチン(6"-O-Malonylglycitin)、マロニルゲニスチン(6"-O-Malonylgenistin)、アセチルダイジン(6"-O-Acetyldaidzin)、アセチルグリシチン(6"-O-Acetylglycitin)、アセチルゲニスチン(6"-O-Acetylgenistin)の12種類の標準品を用いる。
- ・イソフラボン標準品(定量用) : ダイジン、グリシチンおよびゲニスチンの3種の標準品(純度99%以上)を用いる。

#### ② 定性用標準溶液の調製

各イソフラボン標準品を70%エタノールに溶解し、濃度が10~20 mg/Lとなるように調製する。

#### ③ 定量用標準溶液の調製

ダイジン、グリシチンおよびゲニスチンをそれぞれ精密に秤量して70%エタノールに溶解し、濃度が10~20 mg/Lとなるよう調製する。

#### ④ 試験溶液の調製

##### 1) 固体状及びペースト状食品の場合

- a. 試料を均一に粉碎もしくは混合した後、イソフラボンとして1~10 mgに相当する量を50 mL容三角フラスコに精密に秤量する。
- b. 70%エタノール 25 mLを加えて溶解させる(溶解し難い試料の場合には、振とうあるいは超音波処理を行って溶解させる)。試料が完全に溶解した後、100 mL容メスフラスコに移し変え、70%エタノールで100 mLに定容して試験溶液とする。
- c. 振とうあるいは超音波処理をしても完全に溶解せず不溶物が認められる場合には、30分間室温で攪拌抽出した後、遠心分離して上清を100 mL容メスフラスコに移す。残査について同様の抽出操作を更に2回行い、計3回分の上清を集め、70%エタノールで100 mLに定容して試験

溶液とする。

2) カプセル状食品の場合

- a. イソフラボンとして1~10 mgに相当する量を50 mL容遠沈管に正確に秤量する。
- b. 水25 mLを加えた後、30分間攪拌または超音波処理を行い、カプセル皮膜を溶解あるいは破壊する。
- c. 遠心分離し、上清を100 mL容メスフラスコに移す（必要に応じて濾過操作を行う）。
- d. 残渣に70%エタノール25 mLを加え、室温で30分間攪拌した後に遠心分離し、上清を上述の100 mL容メスフラスコに移す。同様の操作を再度行って計3回分の上清を集め、70%エタノールで100 mLに定容して試験溶液<sup>注2)</sup>とする。

3) 液状食品の場合

- a. イソフラボンとして1~10 mgに相当する量を100 mL容メスフラスコに正確に分取し、70%エタノールで100 mLに定容して試験溶液とする。
- b. 沈殿物が析出した場合には、必要に応じて振とうあるいは超音波処理を行った後に遠心分離し、上清を試験溶液とする。

⑤ 高速液体クロマトグラフの操作条件

|       |  |
|-------|--|
| カラム   | : ODSカラム <sup>注3)</sup>  |
| 移動相   | : A アセトニトリル/水/酢酸混液 (15 : 85 : 0.1 v/v/v)<br>B アセトニトリル/水/酢酸混液 (35 : 65 : 0.1 v/v/v) |
| 濃度勾配  | : A から B までの直線濃度勾配を50分間行う。   |
| 流速    | : 1.0 mL/分   |
| カラム温度 | : 35°C   |
| 測定波長  | : 254 nm   |
| 注入量   | : 10 μL  |

⑥ 定性試験

試験溶液を0.45 μmのメンブランフィルターで濾過した後、定性用イソフラボン標準溶液とともに同一条件下でHPLCに注入してクロマトグラムを得る。得られた試験溶液のクロマトグラム上のピークと定性用標準溶液のクロマトグラム上のピークのリテンションタイム（保持時間）の同一性によって試験溶液中の各イソフラボンを同定する<sup>注1)</sup>。

⑦ 定量試験

試験溶液を0.45 μmのメンブランフィルターで濾過した後、定量用イソフラボン標準品とともに上記⑤のHPLC条件で処理してクロマトグラムを得る。得られた試験溶液のクロマトグラム上の各イソフラボンのピーク面積を測定する。また、定量用イソフラボン標準品のクロマトグラム上のダイジン、グリシチンおよびゲニスチンそれぞれのピーク面積を測定する。

⑧ 計算

- 1) 定性試験により同定された試料溶液中の全てのイソフラボンについて、それらの試料溶液中の濃度を下記の式-1～式-3によりアグリコン換算して求める<sup>注4～6</sup>。

$$(式-1) \quad T_{De} = TA_{De} \times \frac{C_D}{A_D} \times 0.611$$

$T_{De}$  : ダイゼイン型イソフラボンの濃度 (アグリコン当量) [mg/L]

$TA_{De}$  : ダイゼイン型イソフラボンのピーク面積の総和

$C_D$  : 定量用標準液中のダイジンの濃度 [mg/L]

$A_D$  : 定量用標準液クロマトグラム上のダイジンのピーク面積

$$(式-2) \quad T_{Gle} = TA_{Gle} \times \frac{C_{Gl}}{A_{Gl}} \times 0.637$$

$T_{Gle}$  : グリシテイン型イソフラボンの濃度 (アグリコン当量) [mg/L]

$TA_{Gle}$  : グリシテイン型イソフラボンのピーク面積の総和

$C_{Gl}$  : 定量用標準液中のグリシチンの濃度 [mg/L]

$A_{Gl}$  : 定量用標準液クロマトグラム上のグリシチンのピーク面積

$$(式-3) \quad T_{Ge} = TA_{Ge} \times \frac{C_G}{A_G} \times 0.625$$

$T_{Ge}$  : ゲニステイン型イソフラボンの濃度 (アグリコン当量) [mg/L]

$TA_{Ge}$  : ゲニステイン型イソフラボンのピーク面積の総和

$C_G$  : 定量用標準液中のゲニスチンの濃度 [mg/L]

$A_G$  : 定量用標準液クロマトグラム上のゲニスチンのピーク面積

- 2) ダイゼイン型イソフラボン、グリシテイン型イソフラボン、ゲニステイン型イソフラボンの濃度の和から総イソフラボン濃度  $T$  (アグリコン当量) を求める (式-4)。

$$(式-4) \quad T [\text{mg/L}] = T_{De} + T_{Gle} + T_{Ge}$$

- 3) 試料中のイソフラボン含有量 (アグリコン当量) を下記の式-5により求める。

$$(式-5) \quad \text{試料中のイソフラボン含有量 (アグリコン当量)} [\text{mg/100g または mg/100mL}]$$

$$= T \times \frac{100}{1000} \times \frac{1}{S} \times 100$$

ここで、  $S$  : 試料採取量 [g または mL]

#### 【注】

- 1) 現在、サクシニル配糖体を除く 12 種のイソフラボン標準品が市販されており、定性試験用としては十分な純度 (90%以上) が保証されている。標準品は、原則としてこの 12 種類を用いるが、マロニル配糖体及びアセチル配糖体については、標準品のクロマトグラム例 (図 1) 及び大豆加工品類の典型的なクロマトグラム例 (図 2～図 4) を参照することによって同定する

ことも可能である。なお、標準品の入手が困難な3種のサクシニル配糖体、すなわちサクシニルダイジン（6”-O-succinyldaidzin）、サクシニルグリシチン（6”-O-succinylglycitin）およびサクシニルゲニスチン（6”-O-succinylgenistin）については、納豆の典型的なクロマトグラム例（図4）を参照することによって同定する。

- 2) カプセル当りのイソフラボン量が 10 mg を超える試料については、試験溶液中のイソフラボン濃度が 10~100 mg/L となるように適宜希釈する。
- 3) たとえば、YMC-Pack ODS-AM-303（size φ 4.6×250mm）などが推奨される。
- 4) イソフラボンの化合物名及び略語を表1に示す。

表1 イソフラボンの化合物名及び略語

|          | ダイゼイン型イソフラボン |           | グリシテイン型イソフラボン |            | ゲニステイン型イソフラボン |            |
|----------|--------------|-----------|---------------|------------|---------------|------------|
| 配糖体      | D            | ダイジン      | GI            | グリシチン      | G             | ゲニスチン      |
| マロニル配糖体  | MD           | マロニルダイジン  | MGI           | マロニルグリシチン  | MG            | マロニルゲニスチン  |
| アセチル配糖体  | AD           | アセチルダイジン  | AGI           | アセチルグリシチン  | AG            | アセチルゲニスチン  |
| サクシニル配糖体 | SD           | サクシニルダイジン | SGI           | サクシニルグリシチン | SG            | サクシニルゲニスチン |
| アグリコン    | De           | ダイゼイン     | Gle           | グリシテイン     | Ge            | ゲニステイン     |

- 5) イソフラボンのアグリコン換算係数及び分子量を表2に示す。

表2 イソフラボンのアグリコン換算係数及び分子量

| イソフラボン | 係数    | 分子量    | イソフラボン | 係数    | 分子量    | イソフラボン | 係数    | 分子量    |
|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|
| D      | 1.000 | 416.38 | GI     | 1.000 | 446.4  | G      | 1.000 | 432.38 |
| De     | 0.611 | 254.24 | Gle    | 0.637 | 284.26 | Ge     | 0.625 | 270.24 |

- 6) ダイゼイン型イソフラボンの計算例を以下に示す。

$$\begin{aligned}
 T_{De} &= A_D \times \frac{C_D}{A_D} \times \frac{M_D}{M_D} \times \frac{M_{De}}{M_D} + A_{AD} \times \frac{C_D}{A_D} \times \frac{M_{AD}}{M_D} \times \frac{M_{De}}{M_{AD}} + A_{MD} \times \frac{C_D}{A_D} \times \frac{M_{MD}}{M_D} \times \frac{M_{De}}{M_{MD}} \\
 &\quad + A_{SD} \times \frac{C_D}{A_D} \times \frac{M_{SD}}{M_D} \times \frac{M_{De}}{M_{SD}} + A_{De} \times \frac{C_D}{A_D} \times \frac{M_{De}}{M_D} \times \frac{M_{De}}{M_{De}} \\
 &= (A_D + A_{AD} + A_{MD} + A_{SD} + A_{De}) \times \frac{C_D}{A_D} \times \frac{M_{De}}{M_D} \\
 &= TA_{De} \times \frac{C_D}{A_D} \times 0.611
 \end{aligned}$$

$T_{De}$  : ダイゼイン型イソフラボンの濃度（アグリコン当量）[mg/L]

A : ピーク面積

$C_D$  : 定量用標準液中のダイジンの濃度 [mg/L]

**M** : 分子量

**TA<sub>0</sub>** : ダイゼイン型イソフラボンのピーク面積の総和