

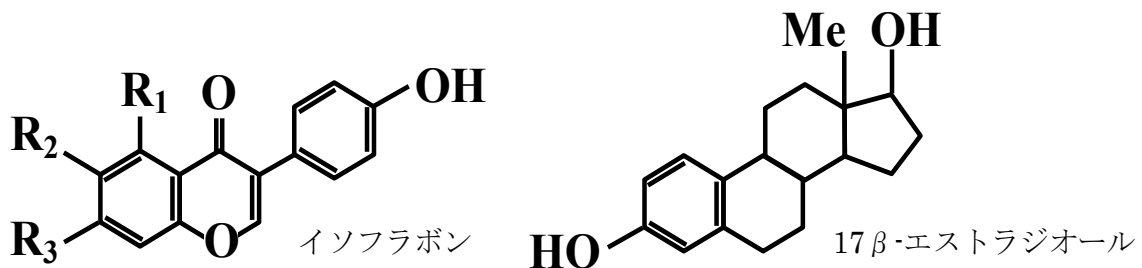
2. 生体内吸収成分の分析技術

1) イソフラボンの分析

(独) 農研機構 食品総合研究所 高橋 陽子

はじめに

イソフラボンはマメ科植物，特に大豆に多く含有されているフラボノイド類の一種である．一般的なフラボノイド類と同様に抗酸化活性を持つことから動脈硬化やがんを予防する効果が期待される一方，その化学構造が女性ホルモンであるエストロゲンと類似していることから弱い女性ホルモン様作用を持つとも考えられ，性ホルモンに関連する臓器のがん抑制効果や骨粗鬆症，更年期障害の緩和作用を有することが報告されている^{1,2)}．大豆にはアグリコンであるダイゼイン，グリシテイン，ゲニステインおよびこれらの配糖体などのイソフラボン誘導体が含まれている(図1)．植物体では大部分のイソフラボンが種々の配糖体の形で存在し，糖鎖を持たないアグリコン型のものは少ない．



イソフラボン	R ₁	R ₂	R ₃
ダイゼイン(daidzein)	H	H	OH
グリシテイン(glycitein)	H	OCH ₃	OH
ゲニステイン(genistein)	OH	H	OH
ダイジン(daidzin)	H	H	O-glucoside
グリシチン(glycitin)	H	OCH ₃	O-glucoside
ゲニスチン(genistin)	OH	H	O-glucoside

図1 各種イソフラボンとエストロゲン(17β-エストラジオール)の構造

大豆中のイソフラボンは食品の製造加工の過程や生体に摂取された後，腸内細菌であるβ-グルコシダーゼにより加水分解され，アグリコンとなり腸管から吸収される．生体内に吸収されたイソフラボンは肝臓でグルクロン酸抱合や硫酸抱合を受け，血液

中では大部分がアグリコンとしての遊離体ではなく抱合体として存在する。また、摂取されたイソフラボン は生体内で別の腸内細菌によりさらなる代謝を受ける。血液中や尿中で検出される主なダイゼイン代謝物は *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA) やエクオール (equol) (図 2^{1,2)}) であり、ゲニステイン代謝物は 6-ヒドロキシ-*O*-DMA やジヒドロゲニステインである。

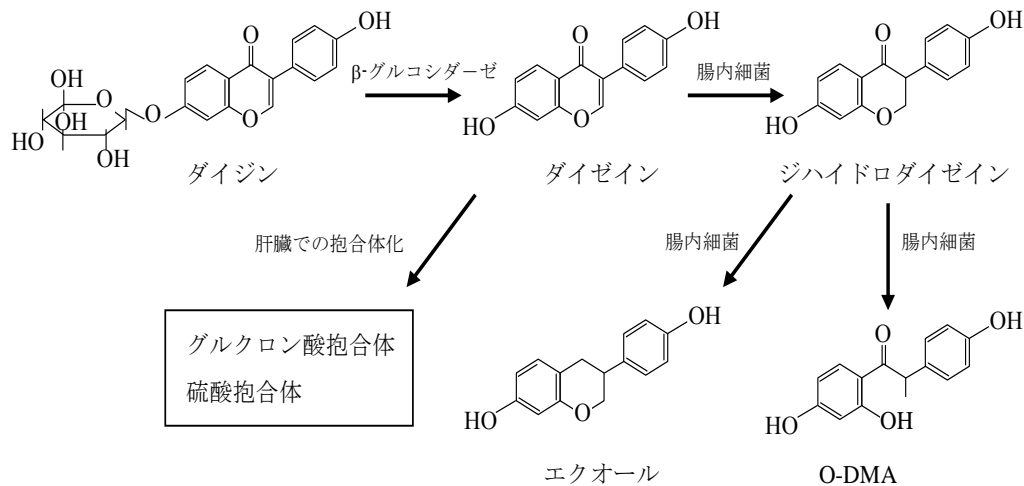


図 2 ダイゼインの生体内代謝

これらイソフラボンの生体内における代謝は、個体差が大きいことが知られている^{1,2)}。また、ダイゼインと比較するとその代謝産物であるエクオールはエストロゲン活性が強く、抗酸化性は他のイソフラボンと比較しても高い²⁾。このことから、食品から摂取されたイソフラボンが吸収および代謝されて生体内で循環するイソフラボンの代謝産物を定量することは、イソフラボンの保健効果を検証する上で重要である。

血液中のイソフラボンを定量するには、これらの抱合体を加水分解によりアグリコン型とした後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析する。本稿ではイソフラボンのうち、大豆に多く含まれるゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインおよび生理活性の強いダイゼイン代謝物であるエクオールの 4 種類について定量法を紹介する。

準備するもの

1. 実験器具・機器

- ・ 恒温水槽およびヒートブロック
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ 固層抽出カラム (Sep-Pak Classic C18 カートリッジ, Waters 社)
- ・ ガラスシリンジ (10ml)

- ・ ガラス試験管
- ・ HPLC 用サンプルバイアル (褐色)
- ・ HPLC 装置：送液ポンプ，カラムオープン，デガッサ，電気化学検出器または UV 検出器，制御装置，データ処理装置，オートサンプラー (冷却機能付き)
- ・ HPLC カラム：CAPCELL PAK C₁₈ AG 4.6×250mm (資生堂) または同等品

2. 試薬

1) 脱抱合体化処理および抽出用試薬

- ・ 0.58M 酢酸
- ・ β-グルクロニダーゼ (*Helix pomatia* 由来) (Type-HP-2, シグマ社:サルファターゼ 活性も含まれる)
- ・ 70mM リン酸二水素ナトリウム溶液 (冷蔵保存)
- ・ メタノール (特級)

2) HPLC 分析用試薬

- ・ アセトニトリル (HPLC 用)
- ・ リン酸 (特級)
- ・ 超純水
- ・ ナリンゲニン (内部標準用, 200μg/ml となるようメタノールに溶解する)
- ・ 混合標準液 (ダイゼイン, ゲニステイン, グリシテイン, エクオール, ナリンゲニン. それぞれ 6μg/ml となるようにメタノールに溶解する)

プロトコール³⁾

1. 脱抱合体化処理および抽出

- 1) 血清 1ml をガラス試験管に取り, 0.58M 酢酸溶液を 100μl, β-グルクロニダーゼを 50μl 加え, ボルテックスミキサーで軽く混合した後, 37°C の恒温水槽で 4 時間以上反応させる. 試験管の口はビー玉またはアルミホイルでカバーする.
- 2) 反応液にナリンゲニン含有メタノール溶液 (200μg/ml) を 25μl 加えてよく混合する.
- 3) 反応液に 70mM リン酸二水素ナトリウム溶液を 4ml 加えて希釈する.
- 4) 固相抽出カラムをガラスシリンジの先に装着し, メタノール 6ml, 70mM リン酸二水素ナトリウム溶液 6ml の順に予めコンディショニングしておく.
- 5) 3) で希釈した反応液を 4) でコンディショニングしたカラムに通し, イソフラボンをカラムに吸着させる. なお, 反応液を吸着させる際にはなるべく圧力をかけずに自然にカラムを通過させる.
- 6) 70mM リン酸二水素ナトリウム溶液を 5ml ずつ 2 回, 超純水を 1ml ずつ 2 回通してカラムを洗浄する.

- 7) カラムに吸着させたイソフラボンを、メタノール 2ml で溶出して新しいガラス試験管に回収する (3 回繰り返す)。
- 8) 窒素ガスを吹き込みながら、45°C のヒートブロック上でメタノールを蒸発させる。
- 9) 1ml のメタノールに溶解し、HPLC サンプルバイアルに移す。すぐに HPLC 分析を行わない場合は、-20°C で保存する。

2. HPLC 分析

1) 分析条件

移動相：0.5%リン酸水溶液／アセトニトリル (83:17, v/v)

流速：1.5ml/min

カラム温度：40°C

オートサンプラー温度：5°C

サンプル注入量：10µl

混合標準液注入量：5-10µl

電気化学検出器条件：ガードセル電位 750mV

E1 電位 300mV, 2µA ; E2 電位 700mV, 2µA

2) イソフラボン量の算出

既知濃度の混合標準液と各サンプルを分析した結果より、ピーク出現時間からサンプル中の各標準物質を同定し、ピーク面積を基にサンプル中のイソフラボン濃度を算出する。なお、上記の条件で混合標準液を分析したときのチャートの一例を示す(図 3, 単位は分)。

また、内部標準として用いたナリングeninを定量することにより、サンプルからのフラボノイド類の回収率をチェックすることができる。

プロトコールのポイント、注意点等

1. 各フラボノイド類のピーク出現時間は移動相の組成、カラム温度、流速の変動に敏感であり、条件によってはピークが重なる場合がある。その場合は移動相中のアセトニトリル量を減らすことでピークを分離させることが可能であるが、カラム内圧力の上昇や分析時間の延長などの不具合が生ずることもあるので注意すること。本分析条件は流速が大きく移動相中の水溶液の割合が高いため、カラム内圧力が高くなりやすい。
2. 電気化学検出器の代わりに UV 検出器でも測定可能であるが感度は劣る。この場合、サンプルを溶解するメタノール量を 200µl に減らし、HPLC への注入量は 10-30µl とする。検出波長については、エクオールは 224nm, ナリングeninは 290nm, ダイゼイン, グリシテイン, ゲニステインは 259nm が適している。

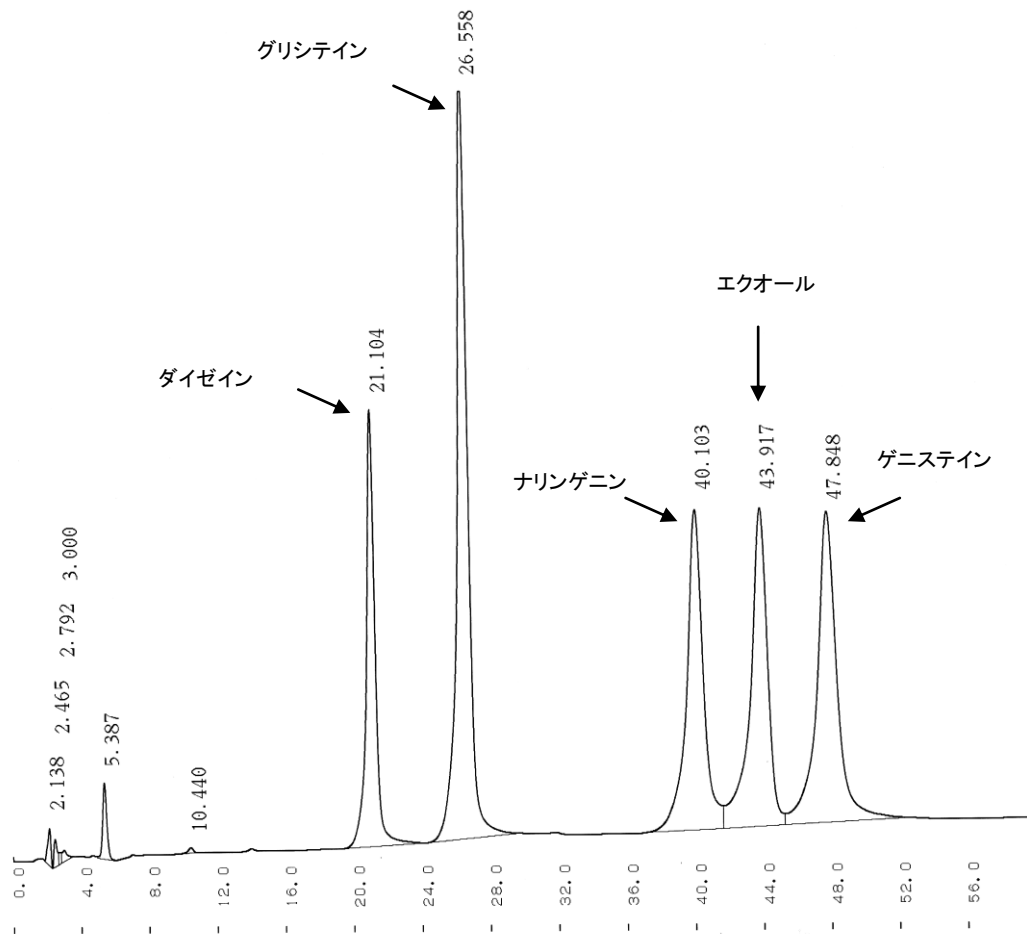


図3 標準混合液の分析例

参考文献

- 1) Yuan, J.P., Wang, J.H. and Liu, X., Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora-implications for health. *Mol. Nutr. Food Res.*, **51**, 765-781 (2007).
- 2) 平山和宏, 大豆イソフラボン類の代謝と腸内細菌フローラ, 腸内細菌学雑誌, **19**, 17-23(2005).
- 3) Takahashi, Y. and Ide, T., Effect of soy protein and isoflavone on hepatic fatty acid synthesis and oxidation and mRNA expression of uncoupling proteins and peroxisomeproliferator-activated receptor γ in adipose tissues of rats. *J. Nutr. Biochem.*, **19**, 682-693 (2008).