

大豆のイソフラボン分析法

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 渡辺 純

【はじめに】

ダイズにはゲニステイン、ダイゼイン、グリシテインをはじめとするイソフラボンアグリコンと、それらの配糖体であるゲニスチン、ダイジン、グリシチンなどが含まれている。日本人の食生活におけるイソフラボンの摂取源の大部分はダイズおよびダイズ食品である。イソフラボンおよびイソフラボンの腸内細菌による代謝産物には種々の機能が報告されており、とりわけエストロゲン受容体に結合して種々の生理機能を発揮することが報告されている¹⁾。一方で、過剰なイソフラボン摂取による安全性への影響を勘案し、食品安全委員会では安全な一日摂取目安量の上限值を大豆イソフラボンアグリコン換算値として 70~75 mg/日と定めている²⁾。本プロトコールは、AOAC 法 (Official Methods of Analysis of AOAC International 2001.10)³⁾を改変し、少量のサンプルでも分析でき、かつ HPLC による分析時間を短縮したものである。本プロトコールによる分析法は室間共同試験により妥当性を確認している⁴⁾。また、添加回収試験により真度の確認をあわせて実施している⁴⁾。

本分析法は、総イソフラボン含有量が 50 µg/g 以上の粉末試料に適用可能である。分析試料をメタノール-水 (80:20) 中で 65°C、2 時間抽出し、抽出液中に含まれるイソフラボンのエステル体をけん化する。中和、ろ過後に、希釈してメタノール-水の比率を 50:50 とする。遠心分離により得られた上清を HPLC で分析する。イソフラボングルコシド類とアグリコン類は、メタノール-水系の移動相を用いて C18 逆相カラムで分離し、検出波長 260 nm として UV 検出器を用いて検出する。イソフラボンアグリコン (ゲニステイン、グリシテイン、ダイゼイン) とアグリコン当量で表したグルコシド (ゲニスチン、グリシチン、ダイジン) を合算し、アグリコン換算量として含有量を表す。

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- HPLC システム：オートサンプラー、2 液グラジエントが可能なポンプ、260 nm に設定可能な UV 検出器、データ処理システムを備えたもの
- HPLC カラム：逆相 C18、250 mm × 内径 4.6 mm あるいは 200 mm × 内径 4.6 mm のもの (例えば、Shiseido Capcell Pak C18 TypeMGII, 4.6 × 200 mm (資生堂; Part No. 92545))
- 電子天秤：0.1 mg 単位で測定可能なもの
- 全量フラスコ：25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL、クラス A
- メスシリンダー：クラス A、抽出溶媒、移動相等の調製に使用する
- セラムバイアル：30 mL、内径 13 mm × 外径 20 mm (例：アズワン バイアル瓶 30 mL, #5-111-06)
- バイアルキャップ：アルミ製シールつきクリンプキャップ、外径 20 mm (上記のバイアル瓶には付属)
- シリコンセプタム：テフロン表面加工、外径 20 mm (例：アズワン バイアル瓶用パッキン, #5-112-05)

- マイクロピペット：200~1000 μL が分注可能なもの
- 実験室用オーブン：65 $^{\circ}\text{C}$ に設定可能なもの
- 温度計：少なくとも 50-100 $^{\circ}\text{C}$ の温度が測定できるもの
- 遠心分離器：1.5 mL のマイクロチューブおよび 15 mL コニカルチューブを 7000 $\times g$ で遠心分離可能なもの
- 超音波洗浄槽：標準的なもの、温調の有無は問わない
- 粉砕機：ダイズ種子を粉末化可能なもの、例えば、Retsch GM-200
- 凍結乾燥機：水分を多く含むダイズ食品を分析する場合
- マイクロチューブ：1.5 mL、ディスポーザブル
- バイアル：ガラス製のオートサンプラー用、テフロン製セプタムのついたもの
- ポジティブディスプレイメント方式プッシュボタン式液体用微量体積計（ピストンマイクロピペッター）：100~1000 μL 用のもの（例えば、ギルソン M-1000, #F148506）

2. 試薬

- イソフラボン標準品：ダイジン、ゲニスチン、グリシチン、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン
- メタノール：高速溶媒クロマトグラフィー用
- アセトニトリル：高速溶媒クロマトグラフィー用
- 酢酸：特級試薬
- 水酸化ナトリウム：特級試薬
- 水：JIS 規格 (JIS K0557:1998) で規定されているクラス A3 以上のもの

3. 調合・調整

- 1) 標準液保存液：標準液保存液は以下の方法により調製する。標準液保存液は室温で保存し、調製 6 ヶ月以内に使用する。
 - 0.1 mg 単位で秤量可能な電子天秤を用いて、ダイジン約 10 mg を薬包紙に秤量し、精確な重量を記録した後、100 mL 全量フラスコに移し、薬包紙をメタノールで洗った洗液も全量フラスコに移す（他のイソフラボンについても同様）。
 - ゲニスチン：約 10 mg を秤量し 100 mL 全量フラスコに移す。
 - グリシチン：約 10 mg を秤量し 250 mL 全量フラスコに移す。
 - ダイゼイン：約 10 mg を秤量し 25 mL 全量フラスコに移す。
 - ゲニステイン：約 20 mg を秤量し 50 mL 全量フラスコに移す。
 - グリシテイン：約 10 mg を秤量し 100 mL 全量フラスコに移す。
 - グリシテイン以外のイソフラボンを添加した全量フラスコにはメタノールを加えて内容物を溶解させ、メタノールでメスアップする。
 - グリシテインを添加した全量フラスコには約 10 mL のジメチルスルホキシドを加えて内容物を溶解させた後、メタノールでメスアップする。
 - 蓋をして転倒混和し、ガラス容器に移す。混和による溶解が困難な場合は超音波処理を行う。

2) イソフラボン標準液

- 標準液保存液を用い、表 1 に示した 5 段階の標準液を全量フラスコを用いて調製する。
- 表 1 に記載された容量の水を加え、メタノール-水 (1:1) で希釈し、よく混合した後にガラス容器に移す。
- 各イソフラボンのおおよその濃度は表 2 に示したとおりとなる。

表 1 イソフラボン標準保存液からの標準液の調製

| 標準液 | 標準液保存液, mL *1 | 水, mL | 最終容量, mL |
|-----|------------------|-------|----------|
| 1 | 1.0 | 6.0 | 200 |
| 2 | 1.0 | 6.0 | 100 |
| 3 | 2.0 | 12.0 | 100 |
| 4 | 4.0 | 24.0 | 100 |
| 5 | 4.0 | 24.0 | 50 |

*1 6 種類のイソフラボン標準液保存液をそれぞれ規定の分量ずつ添加する

表 2 イソフラボン標準液中の各イソフラボンのおおよその濃度

| 標準液 | ダイジン μg/mL | グリシチ ン μg/mL | ゲニスチ ン μg/mL | ダイゼイ ン μg/mL | グリシテ イ ン μg/mL | ゲニス テ イ ン μg/mL |
|-----|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 1 | 0.5 | 0.2 | 0.5 | 2.0 | 0.5 | 2.0 |
| 2 | 1.0 | 0.4 | 1.0 | 4.0 | 1.0 | 4.0 |
| 3 | 2.0 | 0.8 | 2.0 | 8.0 | 2.0 | 8.0 |
| 4 | 4.0 | 1.6 | 4.0 | 16.0 | 4.0 | 16.0 |
| 5 | 8.0 | 3.2 | 8.0 | 32.0 | 8.0 | 32.0 |

正確な各イソフラボンアグリコン・配糖体の濃度は、計り取った各イソフラボンアグリコン・配糖体の重量で補正する

3) 抽出溶媒 メタノール-水 (80:20)。

- 200 mL の抽出溶媒を調製する場合、200 mL 三角フラスコに 160 mL のメタノールを入れる。40 mL の水を加え、攪拌混合する。抽出溶媒は用時調製する。

4) 移動相 A : 水-アセトニトリル-メタノール-酢酸 (865:100:30:5)。

- 1 L の移動相 A を調製する場合、865 mL 水、100 mL アセトニトリル、30 mL メタノール、5 mL 氷酢酸を混合する。
- 超音波洗浄槽を用いて脱気する。
- 移動相 A は用時調製する。

- 5) 移動相 B : 水-アセトニトリル-メタノール-酢酸 (465:500:30:5)。
- 1 L の移動相 B を調製する場合、465 mL 水、500 mL アセトニトリル、30 mL メタノール、5 mL 酢酸を加え、混合する。
 - 超音波洗浄槽を用いて脱気する。
 - 移動相 B は用時調製する。
- 6) 水酸化ナトリウム溶液 : 2 M。
- 200 mL を調製する場合、200 mL 全量フラスコに水酸化ナトリウム 16 g を量り取る。
 - 水で溶解させ、室温まで冷ます。
 - 水で 200 mL に定容する。
 - プラスティック容器中で室温にて保存し、調製 6 ヶ月以内に使用する。
- 7) HPLC 分析条件
- 溶媒 : 表 3 の条件のグラジエントを基本とし、移動相 B の割合あるいはグラジエントの時間は全 6 ピークが分離するように必要に応じて変更する。
- 流速 : 1.5 mL/min
- 検出 : 260 nm

表 3 HPLC のグラジエントパターン

| ステップ | 開始時間 (分) | 終了時間 (分) | 終了時間における溶媒組成 | |
|------|----------|----------|--------------|------|
| | | | %A | %B |
| 初期条件 | | | 87.5 | 12.5 |
| 2 | 0 | 10 | 67.5 | 32.5 |
| 3 | 10 | 12 | 32.5 | 67.5 |
| 4 | 12 | 14 | 0 | 100 |
| 5 | 14 | 16 | 0 | 100 |
| 6 | 16 | 16.5 | 87.5 | 12.5 |
| 7 | 16.5 | 23 | 87.5 | 12.5 |

全てリニアグラジエントとする

【プロトコール】

1. ダイズおよびダイズ食品粉末の調製
 - 試料を必要に応じて凍結乾燥する。新鮮重量あたりのイソフラボン含有量を算出した場合は、乾燥前後の重量を測定して含水量 (%) を求める。
 - 粉砕機を用いて粉末化し、測定まで冷凍保存する。
2. ダイズ粉末からのイソフラボンの抽出およびけん化
 - セラムバイアルに、約 500 mg の試料を精秤する。
 - 抽出溶媒 16 mL を加えてセプタムおよびキャップをした後、ボルテックスミキサーで混合し、さらに超音波洗浄槽で室温 5 分間超音波処理して、試料を抽出溶媒中に均等に分散させる。

- 65 ± 2 °Cとなるように設定した実験室オーブン中（庫内温度を温度計で確認すること）で2時間加熱する（15分程度ごとに容器を振り混ぜて混合する）。
- 室温まで冷まし、2 M 水酸化ナトリウムを 1200 μL 添加する。
- 室温で 10 分間ゆるやかに振とうした後、酢酸 400 μL を加える。
- バイアル瓶を振り混ぜて内容液を懸濁し、25 mL 全量フラスコに移す。バイアル瓶は少量の抽出溶媒で洗い、その洗液も 25 mL 全量フラスコに移す。
- 抽出溶媒を用いて 25 mL となるようにメスアップし、よく混合した後に一部をとって 15 mL コニカルチューブに移す。
- 7000 × g で 5 分間遠心分離し、得られた上清の 250 μL をピストンマイクロピペッターを用いて 1.5 mL マイクロチューブに移す。なお、遠心分離による上清が清澄でない場合は、溶液を直径 15 cm の JIS 定量ろ紙 5 種 B を扇形にしたものでろ過し、清澄にしてから用いる。
- マイクロチューブにメタノール 300 μL と水 450 μL をピストンマイクロピペッターを用いて加えて、ボルテックスミキサーでよく混合する。
- 7000 × g で 5 分間遠心分離し、得られた上清をサンプルバイアルに移す。
- 得られた抽出液は室温で保存し、調製日を含めて 5 日以内に 3. 抽出液中のイソフラボンの定量に示した方法でイソフラボン濃度を測定する。

3. 抽出液中のイソフラボンの定量

- 試料を注入せずに 1 回グラジエント溶出を行い、平衡化する。
- 標準液 3 を 20 μL 注入し、表 3 に示した条件でグラジエント溶出を複数回行い、6 種類のスタンダードのピークが全てベースラインで分離しており、連続した 3 回の分析で得られる保持時間とピーク面積の相対標準偏差（RSD）が 2.5 % 以下となることを確認する。
- 移動相 B の割合あるいはグラジエントの時間は全 6 ピークが分離するように必要に応じて変更する。
- 全ての標準液、および抽出液を 20 μL 注入して分析を行う。各イソフラボンピークの面積を得る。

【プロトコールのポイント・注意点】

1. 計算

- 各イソフラボン標準品について検量線を作成する。5 段階の標準液について濃度 (x 軸) とピーク面積 (y 軸) をプロットして直線近似し、近似直線の傾き (m) と切片 (b) をそれぞれ求める。
- 以下の式により、試料中の各イソフラボン含有量を計算する。

$$\text{Isoflavone, } \mu\text{g/g} = (((A_s - b) / m) \times 25) / (W_s \times 0.25)$$

ただし、 A_s は試料抽出液中のイソフラボンのピーク面積、 m は検量線の傾き、 b は検量線の切片、 W_s は抽出に用いた試料の重量 (g) であり、25 は 2. サイズ粉末からのイソフラボンの抽出およびけん化において定容した容量、0.25 は 2 段階目の希釈で用いた試料の分注量である。

- イソフラボングルコシドであるゲニスチン、グリシチン、ダイジンは以下の式によってアグリコン当量に変換する。

$$C_{ae} = MW_a / MW_g \times C_g$$

ただし、 C_{ae} はイソフラボンアグリコン当量 ($\mu\text{g/g}$)、 MW_a はアグリコンの分子量 (表4に記載)、 MW_g はグルコシドの分子量 (表4に記載)、 C_g はゲニスチン、グリシチンあるいはダイジン濃度 ($\mu\text{g/g}$) である。

- 総イソフラボン ($\mu\text{g/g}$ アグリコン当量/g) は、ダイゼイン、グリシテイン、ゲニステイン濃度、およびアグリコン当量に変換したダイジン、グリシチン、ゲニスチン濃度を全て足しあわせて求める。

$$T_a = C_a (\text{daidzein}) + C_a (\text{glycitein}) + C_a (\text{genistein})$$

$$T_{ae} = C_{ae} (\text{daizin}) + C_{ae} (\text{glycitin}) + C_{ae} (\text{genistin})$$

ただし、 T_a はアグリコン濃度の和、 T_{ae} は各グルコシドのアグリコン当量の和である。

$$\text{総イソフラボン } (\mu\text{g アグリコン当量/g}) = T_a + T_{ae}$$

表 4 アグリコン変換係数

| イソフラボングルコシド | MW _a | MW _g | MW _a /MW _g |
|-------------|-----------------|-----------------|----------------------------------|
| ゲニスチン | 270 | 432 | 0.625 |
| グリシチン | 284 | 446 | 0.637 |
| ダイジン | 254 | 416 | 0.611 |

【おわりに】

本プロトコールでは、分析試料からイソフラボンをメタノール-水で抽出し、抽出液をNaOH存在下でけん化する。さらに、イソフラボンアグリコン（ゲニステイン、グリシテイン、ダイゼイン）とアグリコン当量で表したグルコシド（ゲニスチン、グリシチン、ダイジン）を合算するため、イソフラボン含有量はアグリコン換算量となる点に注意が必要である。

本実験プロトコールは、農林水産省委託プロジェクト「農林水産物・食品の機能性等を解析・評価するための基盤技術の開発」の助成による成果の一部である。

【参考文献】

- 1) M, Messina, Soy and health update: Evaluation of the clinical and epidemiologic literature, *Nutrients*, **8**, 754 (2016).
- 2) https://www.fsc.go.jp/iken-bosyu/pc_isoflavone180309_4.pdf (Jan. 6,2017)
- 3) <http://img.21food.cn/img/biaozhun/20100729/177/11294162.pdf> (Jan. 6,2017)
- 4) T, Ogita, J, Watanabe, M, Wakagi, K, Nakamichi, S, Komiyama, J, Takebayashi, J, Mano, K, Kitta, S, Koyano, and Y, Takano-Ishikawa, Evaluation of a method to quantify isoflavones in soybean by single and multi-laboratory validation studies, *Food Sci. Technol. Res.*, **21**, 473-477 (2015).