

〈原著〉

HPLCによる大豆および大豆加工食品中の イソフラボン量の比較

前河 裕一、熊取 厚志、長村 洋一

Comparison of isoflavone contents in soybean and soybean products by HPLC

Yuichi Maekawa, Atsushi Kumatori and Yoichi Nagamura

Summary We investigated the differences in the content of aglycones and glucosides in commercial soybean food products. Furthermore, we examined the content of aglycones and glucosides to determine whether changes depended on conservation conditions. The isoflavone contents of soybean products were evaluated using high-performance liquid chromatography.

The amounts of isoflavone in soybeans, daidzin, genistin, daidzein and genistein were in the range of 430 to 473, 624 to 717, 48 to 68 and 41 to 58 μ g/g food, respectively. The average levels of total isoflavone in fermented soybeans were relatively high, where the lowest levels were found in tofu and soy milk. The glucosides could not be detected using bean miso samples. However, daidzein and genistein exhibited remarkably high values.

When the samples of miso and fermented soybeans were shaken for 48 hours below 37°C, a decrease in aglycones and an increase in aglycones were evident.

Key words: Isoflavone, Soybean, Soybean products, HPLC

I. 緒言

大豆の消費が多い日本や東南アジア諸国の地域では、乳がんや前立腺がんが欧米に比べて少ないことから、近年、大豆食品の摂取量と疾病との関係に強い関心が集まっている。なかでも大豆に多く含まれるイソフラボンとの関連性について調査研究が進み数多く報告されている¹⁻³⁾。大豆イソフラボンはその構造が女性ホルモンと類似しており、エストロゲン様の作用を有し乳

がん、前立腺がんの予防効果や、それ以外に抗酸化作用、骨粗鬆症の予防、更年期障害の緩和などにも期待されている^{4,8)}。

これまでにイソフラボンとしてダイゼインやゲニステイン、そしてこれらの配糖体であるダイジンやゲニスチンなどの存在が確認されている⁹⁾。また、イソフラボンと同種の食品であっても生産地や製造方法の違いによって含量が変動することや^{10,11)}、大豆に含まれるイソフラボンは主にダイジンやゲニスチンのような配糖体とし

鈴鹿医療科学大学保健衛生学部
〒510-0293 三重県鈴鹿市岸岡町1001-1
受領日 平成24年5月15日
受理日 平成24年5月23日

Faculty of Health Science, Suzuka University of Medical
Science,
1001-1 Kishioka, Suzuka, Mie 510-0293, Japan

て存在するが、ヒトが摂取した場合、腸内細菌などの働きで糖が切り離されて、アグリコンとならなければ体内に吸収されないことも報告されている¹²⁻¹⁴⁾。イソフラボンはヒトの体内で様々な生理作用を発現することが考えられるが、ダイゼインの代謝産物であるエクオールが強いエストロゲン様作用を有していることや、ゲニステイン摂取によって骨密度が増加するなど、アグリコンの強い生理活性が注目されている^{15, 16)}。イソフラボンの摂取量と疾病予防や健康増進作用との関係を明らかにするためにも、大豆および大豆加工食品中のイソフラボン含量、特にアグリコン量を把握することが重要である。

本研究では大豆中の主要なイソフラボンであるダイジンおよびゲニステインとそのアグリコンであるダイゼインとゲニステインの各含量を、大豆および大豆加工食品を対象に比較検討することを目的として実験を行った。また、イソフラボンの分析方法についてもこれまでに報告されている方法より短時間で行えるHPLC条件を検討した。さらに、発酵食品である味噌および納豆中に含有されるイソフラボンの配糖体量とアグリコン量において、温度など保存条件の影響について検討を行った。

II. 方法と材料

1) 試料

市販されている大豆3種 (T社、S社、D社)、大豆加工食品として納豆3種 (N社、M社、H社)、味噌2種 (I社、K社)、豆腐2種 (G社、J社)、豆乳3種 (R社、O社、F社) の合計13品を試料とした。

2) 試薬

イソフラボン標準物質としてダイゼイン (4',7-Dihydroxyisoflavone, 純度97%)、ゲニステイン (4',5-Dihydroxy-isoflavone-7-glucoside, 純度99%) はフジッコ株式会社製の試験研究用試薬を用いた。ダイジン (4'-hydroxyisoflavone-7-glucoside, 純度98%)、ゲニステイン (4',5,7-trihydroxyisoflavone, 純度98%) は和光純薬工業株式会社製の生化学用試薬を用いた。イソフラボン標準溶液は各標準物質1.0 mgを精秤し、エタノールで溶解して1.0 mg/mlの濃度に調整したものを標準溶液とした。

アセトニトリルは和光純薬工業株式会社製のHPLC用試薬、メタノール、エタノールおよびりん酸二水素カリウムは和光純薬工業株式会社製の特級試験研究用試薬を用いた。

3) 装置

高速液体クロマトグラフは株式会社資生堂のNANOSPACE SI-2 HPLC装置：オートサンプラー 3023、デュアルポンプ 3201、カラム恒温槽 3004、脱気装置 3009、紫外可視検出器Spectra System UV6000LP、Ezchrom Elite™を用いた。

4) HPLCの測定条件

分析カラム：CAPCELL PAK C18 MG S5 (2.0 mm I.D.×250 mm、資生堂製)、移動相：A液；アセトニトリル、B液；100 mmol/Lりん酸二水素カリウム溶液 (pH4.0)、グラジエント条件：0→6分：20% A液 (80% B液)、6→15分：20→40% A液 (80→60% B液)、15→25分：40% A液 (60% B液)、25→35分：20% A液 (80% B液)、流速：200 μ l/min、カラム温度：40℃、検出波長：280 nm、注入量：5 μ l

5) 試料溶液の調製

固形試料は粉碎後、液状試料はそのまま1.0gを量り80%メタノールを加え乳鉢で均一化し全量が10 mlとなるように調整した。その溶液を2時間振盪しながら抽出し、3,000回転、5分間遠心分離を行い上清をメンブレンフィルター (0.20 μ m) でろ過したものを試料とした。

6) 添加回収試験

大豆試料1.0gから調整した80%メタノール懸濁液に50 μ g/ml濃度の各標準物質溶液を1.0 ml添加し5)と同じ操作を用いHPLCで分析した。

7) 検量線

各イソフラボン標準溶液をエタノールで0～800 μ g/mlとなるように希釈し、各溶液5 μ lを高速液体クロマトグラフに注入した。得られたクロマトグラムからのピーク面積値から検量線を作成した。各標準物質とも0～800 μ g/mLの範囲で原点を通る良好な直線性 ($R^2=0.99$) を示した。

8) 米味噌および納豆中のイソフラボン量の変化

乳鉢ですり潰した米味噌および納豆の各5gに精製水を加え全量を25gとなるように調製した。調整した各試料を三角フラスコに入れ、通気口をあけたアルミ箔で蓋をし、37℃下で48時間振盪した。振盪開始時から24時間および48時間経過時に、各溶液から1.0gを採取し同様に80%メ

タノールで全量10 mlとして抽出を行い試料とした。各イソフラボン量の測定を行い配糖体量とアグリコン量の変化を観察した。

Ⅲ. 結果

1) HPLC条件の検討

移動相のグラジェント溶離法を用いた結果、アセトニトリル濃度を20~40%に変動することですべての標準物質が22分以内に良好なピーク形状のクロマトグラムとして得られた。各標準物質のクロマトグラムをFig. 1に示す。各標準物質の保持時間はダイジン：5.8分、ゲニスチン：10.4分、ダイゼイン：17.7分、ゲニステイン：21.5分であった。また、大豆試料における標準物質添加回収試験では85.7~103.2%の回収率であった。

2) 各食品中のイソフラボン量

市販されている大豆、納豆、味噌、豆腐、および、豆乳のダイジン、ゲニスチン、ダイゼイン、ゲニステイン含量を測定した。大豆、豆味噌および豆乳のクロマトグラムをFig. 2、各試料の測定結果をTable 1に示した。

3社から得た大豆のイソフラボン含有量は、ダイジン430~473 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニスチン624~717 $\mu\text{g/g}$ 、ダイゼイン48~68 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニステイン41~58 $\mu\text{g/g}$ であった。いずれの大豆も配糖体量に比べアグリコン量は低い値であった。

3社から得た納豆では、ダイジン208~322 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニスチン501~542 $\mu\text{g/g}$ 、ダイゼイン21~58 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニステイン23~53 $\mu\text{g/g}$ であった。アグリコン含量と配糖体含量を比較すると、ダイジンに対するダイゼインの割合は10.2~18.0%、ゲニスチンに対するゲニステインの割合は4.6~10.2%とアグリコン量は低い値を示した。また、大豆中の各イソフラボン量を1として平均値と比較すると、納豆中のダイジン量は0.59、ゲニスチン量は0.79、ダイゼイン量は0.61、ゲニステイン量は0.75であった。

米味噌はダイジン115 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニスチン281 $\mu\text{g/g}$ 、ダイゼイン45 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニステイン70 $\mu\text{g/g}$ であった。豆味噌では配糖体であるダイジン、ゲニスチンを検出できなかったが、アグリコンであるダイゼインとゲニステインの含有量はそ

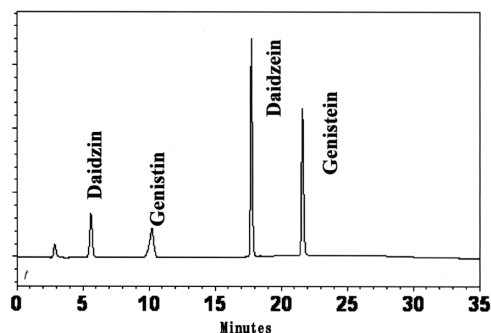


Fig. 1 HPLC chromatogram of isoflavone standard

Table 1 Isoflavone content in foods

	Isoflavone content ($\mu\text{g/g}$)			
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein
soybean (T)	472.7 \pm 37.9	631.9 \pm 56.2	47.9 \pm 4.9	40.8 \pm 6.4
organic soybean (S)	430.1 \pm 26.6	716.3 \pm 61.5	67.9 \pm 5.8	58.2 \pm 7.8
black soybean (D)	466.9 \pm 33.5	623.6 \pm 49.7	63.1 \pm 5.4	51.5 \pm 6.6
fermented soybeans (N)	208.2 \pm 26.0	501.1 \pm 55.3	21.3 \pm 4.1	23.1 \pm 2.7
fermented soybeans (M)	279.2 \pm 27.1	517.2 \pm 44.1	29.6 \pm 5.2	52.7 \pm 5.8
fermented soybeans (H)	321.9 \pm 31.3	541.9 \pm 51.3	57.9 \pm 6.2	35.7 \pm 3.4
rice miso (I)	115.2 \pm 4.2	281.4 \pm 3.4	45.4 \pm 2.3	69.6 \pm 2.7
bean miso (k)	—	—	152.0 \pm 18.8	263.2 \pm 30.9
tohu (G)	28.6 \pm 0.7	48.6 \pm 3.6	3.1 \pm 0.1	3.9 \pm 0.2
tohu (J)	29.8 \pm 1.4	43.7 \pm 3.2	2.9 \pm 0.5	2.8 \pm 0.1
soybean milk (R)*	39.0 \pm 1.8	121.1 \pm 2.1	3.5 \pm 1.2	3.8 \pm 1.8
soybean milk (O)	31.8 \pm 0.7	71.2 \pm 1.2	2.2 \pm 0.2	2.7 \pm 0.1
soybean milk (F)*	64.8 \pm 2.0	177.5 \pm 4.4	3.4 \pm 0.1	4.3 \pm 0.5

* Food for Specified Health Uses

それぞれ152 $\mu\text{g/g}$ 、263 $\mu\text{g/g}$ であった。豆味噌のアグリコン含量はすべての試料中で最も高い値を示した。大豆中の含量を1として比較すると豆味噌中のダイゼイン量は2.6、ゲニステイン量は5.2であった。

2社から得た豆腐ではダイジン29~30 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニスチン44~49 $\mu\text{g/g}$ 、ダイゼイン2.9~3.1 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニステイン2.8~3.9 $\mu\text{g/g}$ の結果となり、アグリコン量は配糖体量より低値を示した。同様に豆腐中の各イソフラボン量を大豆と比較するとダイジン量は0.06、ゲニスチン量は0.07、ダイゼイン量は0.05、ゲニステイン量は0.07と顕著に低い値であった。

3社から得た豆乳ではダイジン32~65 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニスチン71~178 $\mu\text{g/g}$ 、ダイゼイン2.2~3.5 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニステイン2.7~4.3 $\mu\text{g/g}$ であった。豆乳中の配糖体量は豆腐より高い値を示した。

3) 米味噌および納豆中イソフラボン量の変化

食品中のイソフラボン量測定に用いた同じ米味噌および納豆3種を37℃下で48時間振盪保存した。各試料の振盪開始から24および48時間経過時にイソフラボン量を測定した結果をFig. 3に示す。

米味噌の0時間でのダイジン量は28 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニスチンは67 $\mu\text{g/g}$ 、ダイゼインは9.1 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニステインは14 $\mu\text{g/g}$ であった。24時間後の各イソフラボン量に大きな変化は認められなかったが、48時間ではダイジンは6.7 $\mu\text{g/g}$ 、ゲニスチ

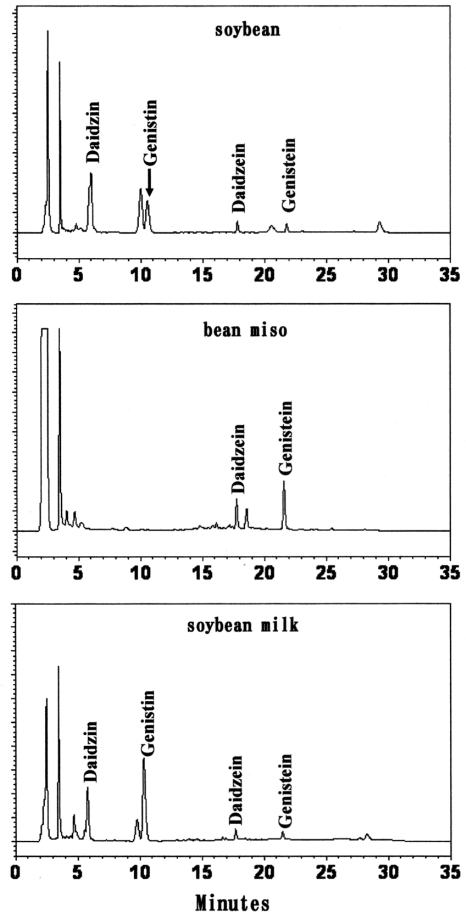


Fig. 2 HPLC chromatogram of soybean, bean miso and soybean milk

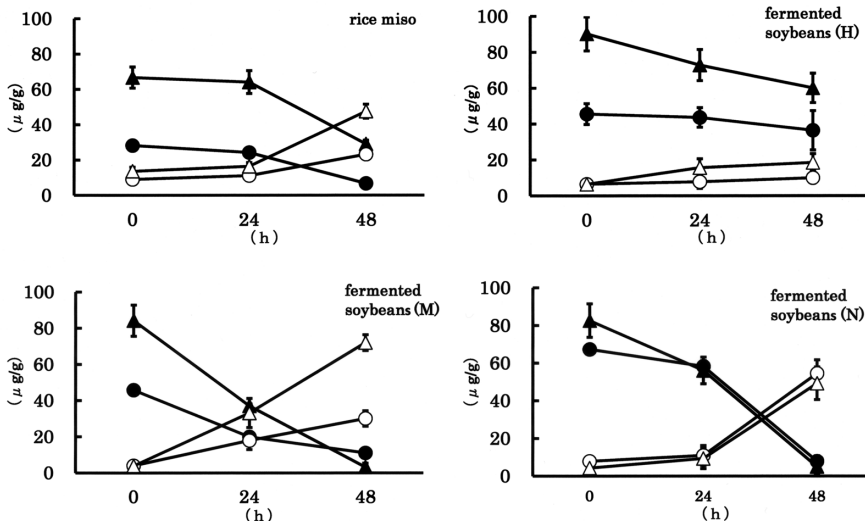


Fig. 3 Change of the amount of isoflavone in rice miso and fermented soybeans.

●; Daidzin, ○; Daidzein, ▲; Genistin, △; Genistein

ンは29 μ g/g、ダイゼインは23 μ g/g、ゲニステインは48 μ g/gの値を示し、配糖体であるダイジン、ゲニスチンは減少し、アグリコンであるダイゼイン、ゲニステインの増加が認められた。納豆では、N社のダイジン量は67から7.9 μ g/g、ゲニスチン量は82から5.1 μ g/gへ減少し、一方、ダイゼイン量は7.9から55 μ g/g、ゲニステイン量は4.3から49 μ g/gと増加が認められた。H、M社の納豆でも増減量に違いはあるが同様に配糖体の減少とアグリコンの増加が認められた。

IV. 考察

HPLCの条件として移動相のグラジエント分離法を用いた。アセトニトリル濃度を20%で分析を開始し、開始6分後から15分後までにアセトニトリル濃度を40%まで徐々に上げ、15分後からこの濃度を10分間維持する測定条件で分析を行った。その結果、ダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン、ゲニステインの各標準物質が22分以内に良好なピーク形状のクロマトグラムとして得られた。これまでイソフラボン含量のHPLC分析では、移動相にメタノールおよびリン酸緩衝液などを用いた方法¹⁷⁻²⁰⁾が報告されているが本実験ではこれらの方法より短時間で分析が行えた。

大豆および大豆加工食品中の各イソフラボン含量の測定結果から、配糖体とアグリコンを比較すると、大豆および納豆試料ではダイジン量に対するダイゼイン量は15%以下、ゲニスチン量に対するゲニステイン量は8%以下とアグリコン量は顕著に低い値であった。豆腐および豆乳試料においても同様であった。豆乳試料中で特定保健用食品表示があるものは表示がないものと比較すると、配糖体量に対してアグリコン量が高い傾向がみられたが今後さらに検討する必要がある。今回測定した試料中で配糖体の含量が最も高い試料は大豆で次で納豆が多く、豆腐および豆乳の含有量は著しく低い値であった。これは豆腐や豆乳では納豆などに比べ原料として使用される大豆量に大きな差があることや製造過程で失われているためと考えられる。一方、アグリコン量が最も高い試料は豆味噌で大豆の2~5倍高い含有量であった。米味噌よりも含有量が多いのは、米や麦を使用する米味噌と異

なり大豆そのものを使用していることや熟成期間が長いこと、その過程で微生物により配糖体から糖が分離されアグリコン量が増加したと思われる。納豆も大豆そのものを使用した発酵食品であるが、豆味噌の製造過程は発酵期間に1年以上要するのに対し、食品によって異なるが納豆の発酵期間は1週間以内であることが多く、そのため配糖体の分解が促進されずアグリコン量は高値を示さなかったと推察する。

次に、米味噌と納豆試料中のイソフラボン量の変化について検討した。この実験ではイソフラボン量が増加する可能性があるものとして発酵食品を試料として選んだ。実験条件は、食品中微生物の活動を増進させるため37℃下で48時間振盪する条件で変化を観察した。その結果、米味噌、納豆とも配糖体が減少し、アグリコンが増加することが認められた。この変化の主な要因の一つとして微生物が有する β -グルコシダーゼ活性によって配糖体の糖が切り離されアグリコンが増加したと考えられる。しかし、試料によって配糖体とアグリコン量の増減量が異なることや増減に時間的な差が認められた。これは使用している大豆の種類や食品製造過程の違い、さらに食品中の微生物の量や種類などの違いがイソフラボン量変化に大きく影響していることが推察される。

今回の結果からも食品中のイソフラボン含量は同種の食品であっても試料間でその値が異なることが多い。また、食品によっては、ある一定条件下では配糖体が減少しアグリコン量が増加する可能性が示唆された。イソフラボンをヒトが摂取した場合、アグリコンとならなければ体内に吸収されないことや、アグリコンとなってはじめて強い生理活性が出ることが良く知られている。我々の開発したHPLCによる短時間で且つ正確に配糖体とアグリコンを分別定量できるこの方法を用いて、今後種々大豆食品中のイソフラボンの変動を測定する予定である。

V. 結語

本研究でのHPLC条件はダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン、ゲニステインの4種のイソフラボンが短時間で分析することができ、様々な食品中のイソフラボン量を測定する方法として

実用的なものと考ええる。各イソフラボンの含量は大豆が最も多く、豆腐および豆乳中の含量は非常に低い値であった。また、豆味噌を除くいずれの試料も配糖体含量が高く、アグリコン含量は低い傾向が認められた。豆味噌中のアグリコン含量は著しく高い値を示したが、同じ発酵食品である納豆試料のアグリコン含量は大豆試料より低い値であった。米味噌と納豆試料では条件によって配糖体量が減少し、アグリコン量が増加する可能性が唆された。

文 献

- 1) Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H: Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr*, 54: 1093-1100, 1991.
- 2) Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S: Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*, 21: 113-131, 1994.
- 3) Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr: Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 68: 1375-1379, 1998.
- 4) Wu J, Oka J, Tabata I, Higuchi M, Toda T, Fuku N, Ezaki J, Sugiyama F, Uchiyama S, Yamada K, Ishimi Y: Effects of isoflavone and exercise on BMD and fat mass in postmenopausal Japanese women: a 1-year randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*, 21: 780-789, 2006.
- 5) Sonoda T, Nagata Y, Mori M, Miyanaga N, Takashima N, Okumura K, Goto K, Naito S, Fujimoto K, Hirao Y, Takahashi A, Tsukamoto T, Fujioka T, Akaza H: A case-control study of diet and prostate cancer in Japan: possible protective effect of traditional Japanese diet. *Cancer Sci*, 95: 238-242, 2004.
- 6) Uesugi S, Watanabe S, Ishiwata N, Uehara M, Ouchi K: Effects of isoflavone supplements on bone metabolic markers and climacteric symptoms in Japanese women. *Biofactors*, 22: 221-228, 2004.
- 7) Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S, Tsugane S: Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst*, 95: 906-913, 2003.
- 8) Adlercreutz CH, Goldin BR, Gorbach SL, Hockerstedt KA, Watanabe S, Hamalainen EK, Markkanen MH, Makela TH, Wahala KT, Adlercreutz T: Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr*, 125: 757-770, 1995.
- 9) Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Ucjida T, Kitamura K, Okubo K: Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max merrill*). *Agric Biol Chem*, 55: 2227-2233, 1991.
- 10) Reinli K, Block G: Phytoestrogen content of foods—a compendium of literature values. *Nutr Cancer*, 26: 123-148, 1996.
- 11) 境 哲文, 菊池彰夫, 島田尚典, 高田吉丈, 河野雄飛, 島田信二: ダイズ遺伝資源の子実中イソフラボン含量およびその組成. 東北農業研究センター研究報告, 104: 83-149, 2005.
- 12) Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE: Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 76: 447-453, 2002.
- 13) Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y: Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett*, 447: 287-291, 1999.
- 14) 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 higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr*, 130: 1695-1699, 2000.
- 15) Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, Lopez D: Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet*, 350: 990-994, 1997.
- 16) Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F: Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res*, 17: 1904-1912, 2002.
- 17) 高橋哲夫, 齊藤明子, 橋本 論, 佐藤千鶴子: 北海道産大豆及び大豆加工食品中のイソフラボン含有量について. 北海道立衛生研究所報, 52: 29-36, 2002.
- 18) 合田幸広, 穂山 浩, 酢山恵美子, 高橋 敏, 金城順英, 野原稔弘, 豊田正武: 遺伝子組換え、非組換えダイズ中のソヤサボンニン及びイソフラボン量の比較. 食品衛生学雑誌, 43: 339-347, 2002.
- 19) 宮崎仁志, 安部政夫, 寺田久屋, 宮部正樹: HPLCによる豆類および豆類加工品中のイソフラボン類の定量. 名古屋市衛生研究所報, 46: 23-27, 2000.
- 20) 菊池洋子, 島村洋洋, 広門雅子, 安田和男, 西嶋基弘: HPLCによる食品中のDaidzin, Daidzein, Genistin, 及びGenisteinの分別定量. 食品衛生学雑誌, 40(6): 444-454, 1999.