

EC	1.5±0.3	1.0 ±0.2	1.2±0.2	1.3±0.3	1.1±0.1
EGCg	1.0±0.1	0.9±0.1	1.0±0.1	1.2±0.3	1.0±0.1
GCg	0.7±0.7	1.1±0.1	1.3±0.1	1.7±0.4	1.7±0.1
Ecg	1.1±0.1	1.0±0.1	1.2±0.1	1.5±0.5	1.1±0.1
Cg	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total</b>	<b>1.0±0.1</b>	<b>0.9±0.1</b>	<b>1.0±0.1</b>	<b>1.3±0.3</b>	<b>1.0±0.1</b>

	P	Q	R	S	T	U
	UV/ECD	UV/ECD	UV/ECD	UV/ECD	UV/ECD	UV/ECD
GC	1.0±0.1	1.0±0.2	0.9±0.1	ND	ND	1.1±0.2
EGC	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.9	1.3±0.1	1.0 ±0.2
C	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EC	1.1±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1	0.9±1.6	ND	1.2±0.2
EGCg	1.1±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.2±0.2
GCg	1.2±0.1	1.3±0.2	1.3±0.2	ND	ND	1.3±0.3
Ecg	1.2±0.1	1.2±0.2	1.2±0.2	ND	ND	1.4±0.3
Cg	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Total</b>	<b>1.1±0.1</b>	<b>1.0±0.1</b>	<b>1.1±0.1</b>	<b>1.2±0.3</b>	<b>0.9±0.0</b>	<b>1.1±0.2</b>

表7 市販サプリメント中のカテキンの表示値と測定値の比

	表示値		測定値			
	表示名	表示値 (g/100g)	UV法 (g/100g)	表示値に 対する割合(%)	ECD法 (g/100g)	表示値に 対する割合(%)
A	カテキン	31.6	39.7±2.0	125.5	40.1±6.3	127.0
B	カテキン	15.0	9.49±0.1	62.6	8.7±0.5	58.2
C	カテキン	8.3	6.3±0.3	76.4	6.2±0.8	74.1
D	カテキン	30.0	29.8±0.6	81.8	27.4±1.6	82.7
	EGCg	14.8	12.1±0.5	84.5	12.2±0.7	81.4
E	カテキン	16.7	14.1±0.7	84.9	13.6±1.8	81.4
F	カテキン	50.0	42.5±0.8	85.0	39.2±4.4	78.4
G	カテキン	50.0	11.0±0.7	22.0	10.7±1.3	21.4
H	—	表示なし	0.8±0.1	—	0.8±0.1	—
I	—	表示なし	4.1±0.4	—	3.7±0.4	—
J	カテキン	8.09	8.8±0.9	108.7	9.6±0.6	118.6
K	カテキン	63.2	51.6±4.2	81.7	50.0±0.4	79.2
L	カテキン	10.0	5.7±0.3	56.8	6.3±0.7	62.6

表示値		測定値					
表示名	表示値 (g/100g)	UV 法		ECD 法			
		(g/100g)	表示値に 対する割合 (%)	(g/100g)	表示値に 対する割合 (%)		
M	—	表示なし	—	6.0±0.3	5.9±1.0	—	—
N	緑茶抽出物 (カテキン含有)	3.5	—	2.1±0.0	1.7±0.4	—	—
O	EGCG	6.9	74.6	5.2±0.2	5.0±0.4	72.8	—
P	カテキン	11.3	91.5	10.3±0.3	9.7±0.6	86.0	—
Q	カテキン	53.3	77.9	41.5±0.9	40.5±5.2	75.9	—
R	緑茶エキスメ	40.0	—	34.1±0.2	31.8±4.4	—	—
	緑茶抽出物	20.0	—	—	—	—	—
S	—	表示なし	—	0.2±0.0	0.1±0.0	—	—
T	—	表示なし	—	0.2±0.0	0.2±0.0	—	—
U	カテキン末	2.0	—	5.1±0.3	4.6±0.7	—	—

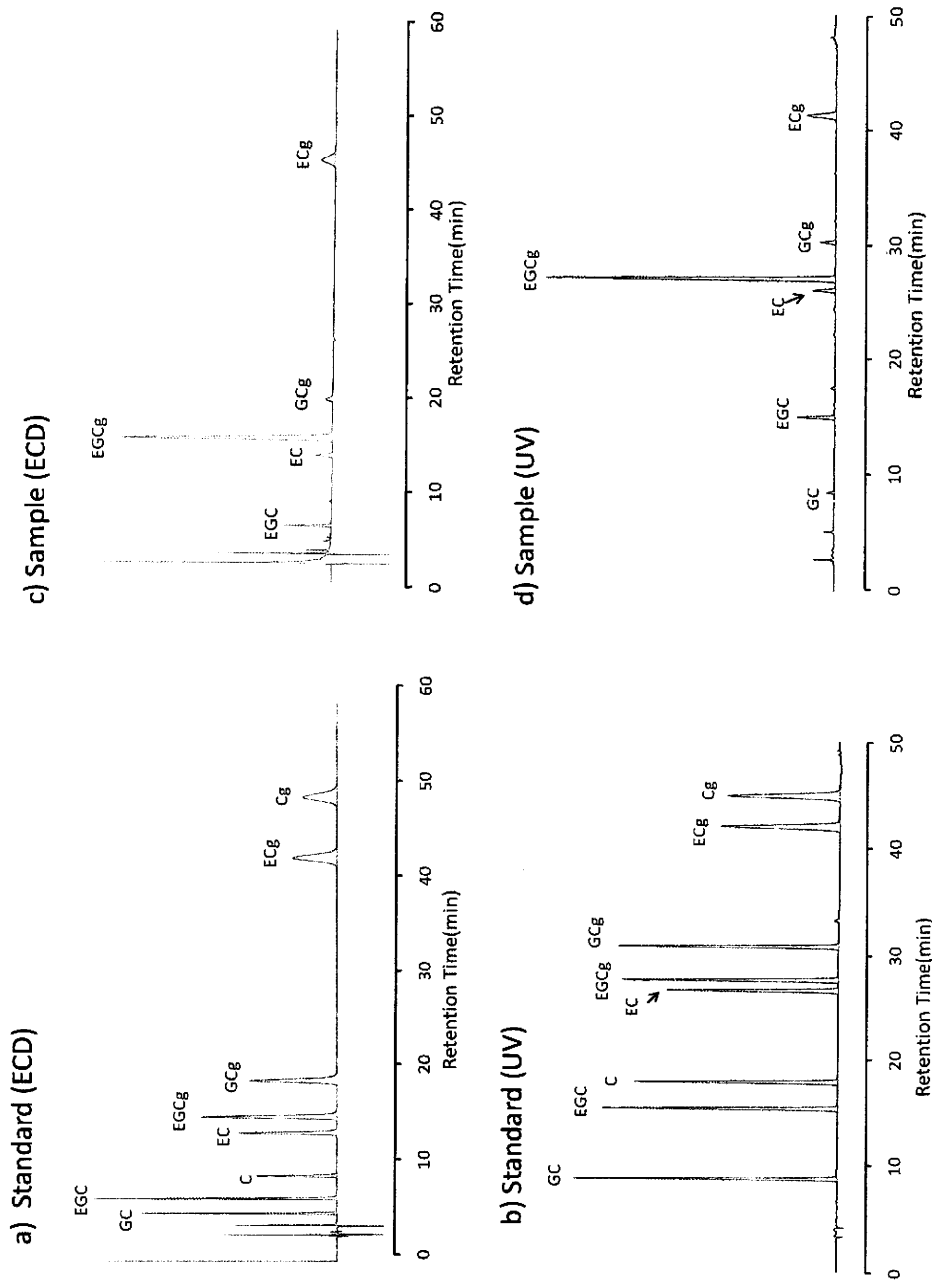


Fig.1 カフェキシン標準品と製品の分析クロマトグラムの例 (HPLC-UV 法と HPLC-ECD 法の比較)

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金(食品安全性確保推進研究事業)分担研究者の報告  
食品中の大豆イソフラボンの室間分析精度管理に関する研究

分担研究者 石見佳子 (独)国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム  
研究協力者 谷中かおる (独)国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム

協力試験機関

(財)日本食品分析センター・(財)日本冷凍食品検査協会  
(財)食品環境検査協会・大阪市立環境検査協会

研究要旨 本研究は、大豆イソフラボンを含む保健機能食品およびいわゆる健康食品(併せて「健康食品」とする)中の大豆イソフラボンを定量し、測定方法及び登録試験機関間精度管理の問題を明らかにするとともに、これらの食品の表示に関する調査を行うことを目的とする。本年度は、平成 18 年 8 月に厚生労働省が通知した「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取り扱いに関する指針」に記載されている大豆イソフラボンの分析方法の妥当性を確認するため、市場に流通する「健康食品」を対象に、5 試験機関での室間精度管理試験を実施した。「健康食品」は、液状食品、粉末状食品、固体状食品と形態の異なる食品を用いて検討した。その結果、併行再現性(RSD<sub>r</sub>, %)および室間再現性(RSD<sub>R</sub>, %)は、いずれの検体においても 5.0%以下であった。また、分析の精度指標を示す HORRAT 値は、(上限)許容範囲の 2.0 未満と、良好な値を示した。これらの結果より、通知の方法について様々な形態の「健康食品」中の大豆イソフラボンの定量方法としての妥当性が確認された。

A. 研究目的

近年、大豆あるいは大豆の機能性成分を含む「健康食品」が数多く市販されるようになった。大豆イソフラボン及び大豆たんぱく質は、特定保健用食品の関与成分として厚生労働省から既に許可されているが、他方、大豆イソフラボンに関しては、その安全性が内閣府食品安全委員会でも再評価され、平成 18 年年 5 月に「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の基本的な考え方」が報告された。

これに伴い、リスク管理機関である厚生労働省は、平成 18 年 8 月「大豆イソフラボンを含む

特定保健用食品等の取扱いに関する指針」(食安発第 0823001 号)を通知した。この中で、大豆イソフラボンを濃縮、強化した「健康食品」については、大豆イソフラボンアグリコンの含有量を表示することとされ、食品中の大豆イソフラボンアグリコンの試験方法も示されている。現在、特定保健用食品の許可時の試験は、(独)国立健康・栄養研究所を含む 6 つの登録試験機関で可能となったが、分析値の信頼性を確保して提示することが、食品分析を行う機関にとっては重要な課題である。昨年度の本

研究において、液状食品および粉末状食品を用いた室間共同試験を行ったところ、液状食品では良好な結果が得られたが、粉末状食品ではややばらついた結果となった。本年度は、通知の分析方法を用い、異なる食品形態の健康食品の分析を登録試験機関で実施し、分析方法の妥当性、精度管理の問題点について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

大豆イソフラボン標準品として、ダイジン、グリシチン、ゲニスチンの配糖体 (3 種類)、マロニル配糖体 (3 種類)、アセチル配糖体 (3 種類)、サクシニル配糖体 (3 種類)、アグリコン (3 種類)、(長良サイエンス株式会社製)の計 15 種類を用いた (Table 1)。定量分析用の標品には、ダイジン(Daidzin)、グリシチン(Glycitin)、ゲニスチン(Genistin)を用い、それぞれ 70 % エタノールに溶解し、濃度が 1 mg/5 mL になるように調製したものを用いた。分析に用いるまでは -30 °C で保存した。また、分析に用いたエタノールは特級を、アセトニトリルは和光純薬工業社製の HPLC グレードのものを使用した。

### 2. 食品サンプル

試験に用いた食品サンプルは、市場に流通している形態の異なる健康食品 3 品目(液状食品、粉末状食品、固体状食品)を用い、非明示にて各試験機関(A~E)に配布した。試験実施の際に用いた健康食品サンプルの表示を Table.2 に示した。

### 3. 試料の調製

液状サンプルは、試料 30 mL を正確に分取

し、70 %エタノール(v/v)で 100 mL に定容した。よく転倒混和し試験溶液とした。粉末状サンプルは、試料、約 1.5 g を精秤し、70 %エタノール 25 mL を加え 30 分間攪拌した。攪拌後、遠心分離(3000 rpm, 4°C, 15 分)し、上澄みを 100 mL 容のフラスコに移した。残渣に 25 mL の 70 %エタノールを加え、同様の操作を 2 回行い、計 3 回分の上澄みを回集し、100 mL に定用して試験溶液とした。固体状食品については、予備検討の結果より、それぞれの粒によってイソフラボン含有量が異なることが明らかとなったため、10 粒を乳鉢等で粉碎し、サンプルを均質化した。その後、粉碎したサンプルを 1 粒分の重さ、約 0.25 g を採取し、粉末状食品と同様の方法で抽出操作を行った。

試料は全て 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルター (ADVANTEC、Cellulose Acetate 0.45  $\mu$ m) で濾過した後、高速液体クロマトグラフ分析に供した。

### 3. 分析条件

高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法の分析条件を以下に示す。

分析機器: 高速液体クロマトグラフィー  
(島津製作所)

カラム: YMC-Pack ODS-AM-303

(size  $\phi$  4.6  $\times$  250 mm)

(ワイエムシイ社、京都)

移動相: A アセトニトリル/水/酢酸混液  
(15:85:0.1 v/v/v)

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 分間行った。移動相 A を 20 分間送液した後、次の分析を開始した。

流 速: 1 mL/min

カラム温度: 35 °C

測定波長: 254 nm

試料注入量: 10 µL

#### 4. 室間共同試験

大豆イソフラボン定量用の標準品、ダイジン、グリシチン、ゲニステインの3種類は1 mg/5 mLになるように70 %エタノールに溶解したもの、その他の12種類の定性用標準品については粉末をそれぞれ茶褐色のバイアルビンに入れ、各試験機関(A~E)に配布した。分析に供する食品(液状食品、粉末状食品、固体状食品)は、それぞれ3検体ずつ(計9検体)を配布した。各検体における分析回数はそれぞれ1回とし、標準品および検体配布後1カ月以内に分析を行った。

#### 5. データの解析

試料中の大豆イソフラボン濃度は、分子量比より全てアグリコン当量として求めた。ダイゼインを例に、アグリコン等量の求め方を以下の式に示す。

$$\text{例) } TDe = TADe \times CD / AD \times 0.611^*$$

TDe :ダイゼイン型大豆イソフラボンの濃度(アグリコン当量) [mg/L]

TADe:ダイゼイン型大豆イソフラボンのピーク面積

CD :大豆イソフラボン標準溶液中のダイジンの濃度 [mg/L]

AD :大豆イソフラボン標準溶液クロマトグラム上のダイジンのピーク面積

※ダイゼイン型のアグリコン換算係数。グリシチン型は0.637、ゲニステイン型は0.625を乗じてそれぞれのアグリコン等量を求めた。

ダイゼイン型、グリシチン型およびゲニステイン型も同様にアグリコン濃度の総和を試料中の総大豆イソフラボン濃度(アグリコン当量)とし、一日または一回摂取目安量における試料中の大豆イソフラボン含有量(アグリコン当量)を下記の式により求めた。

試料中の大豆イソフラボン含量

(アグリコン当量) [mg/g または mg/mL]

= 総大豆イソフラボン濃度(mg/L)

× 100 / 1000 × 1/S (g または mL)

(一日または一回摂取目安量)

S: 試料採取量

#### C. 結果

本年度は、食品形態の違いによる分析精度を検証するため、市場に流通する、形態の異なる健康食品(3品目)を用いて、5つの登録試験機関での室間共同試験を実施した。各試験機関により得られた分析結果より、B試験機関において、液状食品、粉末状食品、固体状食品の何れの分析値が、他の試験機関と比較して高値を示したことから、外れ値検定を行った。その結果、液状食品ではコ克蘭(Chocran)検定で、粉末状食品及び固体状食品では、グラブス(Grubbus)検定において外れ値と検定されたため、本研究ではB機関を除く4試験機関により、精度管理の指標となるHORRAT値を算出した。

Table 3.に、各試験機関より報告された各検体中のイソフラボン含有量(アグリコン当量)分析結果を示した。各試験機関における分析値は、液状食品、42.4~55.7 mg、粉末状食品、

54.3~71.7 mg、固体状食品、25.7~34.8 mg の範囲で、何れの検体における変動係数(以下 CV 値(%))は 5%未満であった。

Table 4~6. には、各検体中に含まれる型別イソフラボン(ダイゼイン型、グリシテイン型、ゲニステイン型)含有量を示した。それぞれの検体中の何れのイソフラボン型においても CV 値(%)は 5%未満と良好であった。また、用いた分析方法の信頼性を確認するため、各試験機関より報告された分析値より、併行再現性を示す相対標準偏差( $RSD_p$ , %)、室間再現性を示す相対標準偏差( $RSD_R$ , %)、および、HORRAT 値を算出した(Table 7.)。液状食品の併行再現性( $RSD_p$ , %)は 1.25、室間再現性( $RSD_R$ , %)は 2.51 であった。粉末状食品の併行再現性( $RSD_p$ , %)及び、室間再現性( $RSD_R$ , %)は、0.99、5.00 であった。固体状食品は、それぞれ 1.39、2.26 であり、何れの検体においても 5%以下と良好な値を示した。分析方法の妥当性の指標となる HORRAT 値は、液状食品 0.35、粉末状食品 1.02、固体状食品 0.80 であった。

#### D. 考察

本年度は、厚生労働省が通知した「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取扱いに関する指針」(食安発第 0823001 号)の分析方法を用いて、食品形態の違いによる分析精度を検証するため、各種健康食品を用いた、室間共同試験を実施した。非明示の健康食品には形態の異なる食品(液状食品、粉末状食品、固体状食品)を用い、精度管理に関する問題点の検討を行った。

##### 1. 室間共同試験

本研究より、液状食品について併行再現性( $RSD_p$ )、室間再現性( $RSD_R$ )、及び HORRAT 値は何れも 5%未満と良好な値を示した。液状食

品における分析精度を示す指標が、昨年度の本研究と同様、良好な値が得られたことから、液状食品における通知の方法により、室間の分析精度も高い事が検証された。粉末状食品について、昨年度の研究では、併行再現性( $RSD_p$ )及び室間再現性( $RSD_R$ )は濃度に拘らず、10 付近を示した。しかし、健康食品を用いた本年度の分析結果では、室間再現性( $RSD_R$ )で 5.00 であったものの、併行再現性( $RSD_p$ )は 0.99 と良好な値を示した。昨年度と今年度の試験で用いた粉末サンプルを比較すると、昨年度の粉末サンプルの含有量が高い。このことより、粉末サンプルはサンプル中の含有量の違いによりばらつくことが考えられる。固体状食品について、試験に用いたサプリメント 1 粒中に含まれるイソフラボン含有量の測定を行ったが、個体間により含有量の差がみられた。そのため、10 粒を粉砕し、パウダー状にして分析に用いたが、HORRAT 値は、0.8 と許容範囲内であった。以上より、液状食品及び固体状食品において、通知の方法は妥当性が確認された。また、粉末状食品については、通知の方法の抽出方法などを改良することにより、分析精度が向上する可能性があると考えられた。

##### 2. 定量用標準品

イソフラボンの定量用標準品(ダイジン、グリシチン、ゲニスチン)は、それぞれいくつかの異なるモル吸光係数が報告されている。本研究で用いた健康食品には、液状食品及び固体状食品には大豆イソフラボンの含有量がアグリコンとして記載されていた。各試験機関より得られた分析値と表示値を比較すると、固体状食品では表示値に近い値 105.4%(4 試験機関の平均)の結果であったのに対し、液状食品では、表示の 166.8%(4 試験機関の平均)の結果



を示した。より真値に近い分析値を得るためには、定量用のイソフラボン試薬および複数報告されているモル吸光係数を用いた、標準品の濃度を検討しておく必要がある。昨年度及び今年度の本研究では、定量用の標準品は一定の濃度に調整したものを各試験機関に配布しており、試験室間において標準品調整の影響による測定誤差を最小限にしている。そのため、各試験機関で用いる標準品及びモル吸光係数を統一しておくことと分析値に誤差が生じる可能性を抑えることが出来ると考えられた。

#### E. 結論

厚生労働省が通知した大豆イソフラボンの分析方法は、形態の異なる「健康食品」においても対応可能であることが確認された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. 谷中かおる、東泉裕子、松本輝樹、竹林純、卓興鋼、山田和彦、石見佳子。「健康食品」中の大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの定量と表示に関する調査研究。栄養学雑誌 68:234-241, 2010
2. Y.Ishimi. Dietary equol and bone metabolism in postmenopausal Japanese women and osteoporotic mice. J Nutr 140(7): 1373S-1376S, 2010

3. Taku K, Melby M, Kurzer MS, Mizuno S, Watanabe S, Ishimi Y. Effect of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Bone 47: 413-423, 2010
4. Taku K, Lin N, Cai D, Hu J, Zhao X, Zhang Y, Wang P, Melby MK, Hooper L, Kurzer MS, Mizuno S, Ishimi Y, Watanabe S. Effects of soy isoflavone extract supplements on blood pressure in adult humans: systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. J Hypertens. 28:1971-82, 2010
5. 石見佳子. イソフラボン New Diet Therapy 26(4): 33-36, 2011

#### G. 健康危険情報

特になし

#### H. 知的所有権の取得状況

特になし

Table 1. 大豆イソフラボンの標準品 (15 種類)

分類	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	ダイジン (D;Daidzin)	グリシチン (Gl;Glycitin)	ゲニステン (G;Genistin)
マロニル配糖体	マロニルダイジン (MD;6"-O-Malonyldaidzin)	マロニルグリシチン (MGl;6"-O-Malonylglycitin)	マロニルゲニステン (MG;6"-O-Malonylgenistin)
アセチル配糖体	アセチルダイジン (AD;6"-O-Acetyldaidzin)	アセチルグリシチン (AGl;6"-O-Acetylglycitin)	アセチルゲニステン (AG;6"-O-Acetylgenistin)
サクシニル配糖体	サクシニルダイジン (SD;6"-O-succinyl-daidzin)	サクシニルグリシチン (SGl;6"-O-succinylglycitin)	サクシニルゲニステン (SG;6"-O-succinylgenistin)
アグリコン	ダイゼイン (De;Daidzein)	グリシテイン (Gle;Glycitein)	ゲニステイン (Ge;Genistein)

Table 2. 室間試験に用いた健康食品の表示

検体の形態	名 称	原 材 料 名	1日または1回 摂取目安量に 関する表示	表 示 量
液状食品	調製豆乳	大豆(※1・2)、水あめ、食塩、ト レハロース、乳酸カルシウム、 糊料(カラギナン)	200mL	イソフラボン 13mg(大豆 イソフラボンアグリコンと して)/100mL 当たり
粉末状食品	大豆たん白食品	大豆分離たん白、レシチン	20g	なし
固体状食品	大豆イソフラボン加工食品	乳糖、大豆イソフラボン抽出物、 セルロース、ショ糖脂肪酸エス テル、酸化ケイ素	0.25g/粒	大豆イソフラボンアグリコ ン25mg/粒 (0.25g)

Table 3. 室間共同試験結果 (イソフラボン含有量:アグリコン等量)

A. 液状食品 (mg/200mL)

	A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
	分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
A-1	42.6	56.1	43.8	42.4	42.6
A-2	43.0	55.8	45.3	42.5	43.4
A-3	43.4	55.3	45.2	42.4	43.8
平均値	43.0	55.7	44.8	42.4	43.2
SD	0.38	0.41	0.84	0.06	0.57
CV(%)	0.88	0.73	1.87	0.14	1.33

B. 粉末状食品 (mg/20g)

	A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
	分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
B-1	59.5	73.2	59.1	56.1	54.9
B-2	59.9	72.9	59.4	54.6	54.0
B-3	60.7	69.0	58.9	55.4	54.1
平均値	60.0	71.7	59.1	55.4	54.3
SD	0.64	2.33	0.25	0.75	0.50
CV(%)	1.06	3.25	0.43	1.36	0.92

C. 固体状食品 (mg/0.25g)

	A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
	分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
C-1	26.7	35.0	26.6	26.7	26.4
C-2	26.0	34.5	26.5	27.1	25.3
C-3	26.3	34.8	26.7	26.8	25.3
平均値	26.3	34.8	26.6	26.9	25.7
SD	0.31	0.27	0.10	0.21	0.62
CV(%)	1.17	0.78	0.38	0.77	2.42

Table 4. 液状食品 (A1-3)中の型別大豆イソフラボン含有量の分析結果

ダイゼイン型		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
液状サンプル:A-1	TDe (mg/200mL)	15.1	25.1	17.1	16.4	15.7
液状サンプル:A-2	TDe (mg/200mL)	15.4	24.9	17.5	16.5	16.0
液状サンプル:A-3	TDe (mg/200mL)	15.4	24.6	17.4	16.4	16.1
	平均値	15.3	24.9	17.3	16.4	15.9
	SD	0.18	0.22	0.20	0.04	0.20
	CV(%)	1.14	0.87	1.17	0.27	1.24

グリシテイン型		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
液状サンプル:A-1	TGle (mg/200mL)	0.86	0.26	0.80	0.23	0.17
液状サンプル:A-2	TGle (mg/200mL)	0.88	0.26	0.84	0.24	0.18
液状サンプル:A-3	TGle (mg/200mL)	0.90	0.26	0.84	0.25	0.18
	平均値	0.88	0.26	0.83	0.24	0.18
	SD	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01
	CV(%)	2.59	0.00	2.57	3.14	4.04

ゲニステイン型		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
液状サンプル:A-1	TGe (mg/200mL)	26.7	30.7	25.9	25.7	26.7
液状サンプル:A-2	TGe (mg/200mL)	26.7	30.7	27.0	25.8	27.2
液状サンプル:A-3	TGe (mg/200mL)	27.0	30.4	26.9	25.7	27.5
	平均値	26.8	30.6	26.6	25.8	27.1
	SD	0.20	0.19	0.63	0.05	0.37
	CV(%)	0.74	0.62	2.35	0.21	1.36

Table 5. 粉末状食品 (B1-3) 中の型別大豆イソフラボン含有量の分析結果

ダイゼイン型		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
粉末サンプル:B-1	TDe (mg/20g)	16.4	25.8	18.7	16.8	15.8
粉末サンプル:B-2	TDe (mg/20g)	16.6	25.6	18.8	16.4	15.2
粉末サンプル:B-3	TDe (mg/20g)	16.8	24.3	18.6	16.6	15.1
	平均値	16.6	25.3	18.7	16.6	15.4
	SD	0.17	0.80	0.08	0.22	0.34
	CV(%)	1.00	3.17	0.45	1.32	2.24

グリシテイン型		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
粉末サンプル:B-1	TGle (mg/20g)	4.87	3.15	3.77	2.80	2.05
粉末サンプル:B-2	TGle (mg/20g)	4.89	2.99	3.78	2.74	1.96
粉末サンプル:B-3	TGle (mg/20g)	4.93	2.81	3.78	2.77	2.00
	平均値	4.90	2.99	3.78	2.77	2.00
	SD	0.03	0.17	0.01	0.03	0.04
	CV(%)	0.64	5.77	0.21	1.08	2.09

ゲニステイン型		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
粉末サンプル:B-1	TGe (mg/20g)	37.4	44.3	36.6	36.5	37.1
粉末サンプル:B-2	TGe (mg/20g)	38.0	44.3	36.8	35.4	36.8
粉末サンプル:B-3	TGe (mg/20g)	39.0	41.9	36.5	36.0	37.0
	平均値	38.1	43.5	36.6	36.0	37.0
	SD	0.85	1.37	0.17	0.52	0.14
	CV(%)	2.22	3.16	0.47	1.44	0.38

Table 6. 固体状食品 (C1-3) 中の型別大豆イソフラボン含有量の分析結果

ダイゼイン型

		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
固体サンプル:C-1	TDe (mg/0.25g)	10.2	16.8	10.2	10.3	9.9
固体サンプル:C-2	TDe (mg/0.25g)	10.0	16.6	10.2	10.5	9.4
固体サンプル:C-3	TDe (mg/0.25g)	10.3	16.8	10.3	10.4	9.5
	平均値	10.1	16.7	10.2	10.4	9.6
	SD	0.15	0.12	0.03	0.07	0.25
	CV(%)	1.44	0.74	0.25	0.67	2.59

グリシテイン型

		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
固体サンプル:C-1	TGle (mg/0.25g)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
固体サンプル:C-2	TGle (mg/0.25g)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
固体サンプル:C-3	TGle (mg/0.25g)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
	平均値	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
	SD	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	CV(%)	—	—	—	—	—

ゲニステイン型

		A 機関	B 機関	C 機関	D 機関	E 機関
		分析値	分析値	分析値	分析値	分析値
固体サンプル:C-1	TGe (mg/0.25g)	16.5	18.2	16.3	16.4	16.5
固体サンプル:C-2	TGe (mg/0.25g)	16.1	17.9	16.3	16.6	15.8
固体サンプル:C-3	TGe (mg/0.25g)	16.5	18.0	16.5	16.5	15.8
	平均値	16.4	18.0	16.4	16.5	16.0
	SD	0.25	0.15	0.08	0.12	0.41
	CV(%)	1.55	0.83	0.50	0.72	2.53

Table 7. 大豆イソフラボン室間共同試験結果

分析方法	n数	形態	平均値±SD (アグリコン等量 mg/ 一回摂取目安量)	CV (%)	併行再現性 (RSD <sub>r</sub> %)	室間再現性 (RSD <sub>R</sub> %)	HORRAT値
通知法	3	液体	43.4±1.0	1.06	1.25	2.51	0.35
	3	粉末	57.2±2.8	0.94	0.99	5.00	1.02
	3	固体	26.4±0.5	1.19	1.39	2.26	0.80

## 別添 5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
谷中かおる、東泉裕子、松本輝樹、竹林純、卓興鋼、山田和彦、石見佳子	「健康食品」中のたんぱく質および大豆イソフラボンの定量と表示に関する研究	栄養学雑誌	68(3)	234-241	2010
Ishimi Y.	Dietary equol and bone metabolism in postmenopausal Japanese women and osteoporotic mice.	J Nutr	140	1373S-1376S	2010
Taku K, Melby M, Kurzer MS, Mizuno S, Watanabe S, Ishimi Y.	Effect of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: systematic review and meta-analysis of randomized controlled	Bone	47(2)	413-423	2010
Taku K, Lin N, Cai D, Hu J, Zhao X, Zhang Y, Wang P, Melby MK, Hooper L, Kurzer MS, Mizuno S, Ishimi Y, Watanabe S.	Effects of soy isoflavone extract supplements on blood pressure in adult humans: systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials.	J Hypertens	28(10)	1971-82	2010
石見佳子.	イソフラボン	New Diet Therapy	26(4)	33-36	2011



## 「健康食品」中の大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの 定量と表示に関する調査研究

谷中かおる<sup>1)</sup>, 東泉 裕子<sup>1)</sup>, 松本 輝樹<sup>1)</sup>  
竹林 純<sup>1)</sup>, 卓 興鋼<sup>2)</sup>, 山田 和彦<sup>3)</sup>  
石見 佳子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> (独)国立健康・栄養研究所食品保健機能プログラム

<sup>2)</sup> (独)国立健康・栄養研究所情報センター

<sup>3)</sup> 女子栄養大学栄養学部生化学研究室

### Food Labeling and Actual Contents of Soy Protein and Soybean Isoflavones in Health Foods

Kaoru Yanaka<sup>1</sup>, Yuko Tousen<sup>1</sup>, Teruki Matsumoto<sup>1</sup>, Jun Takebayashi<sup>1</sup>, Kyokou Taku<sup>2</sup>,  
Kazuhiko Yamada<sup>3</sup> and Yoshiko Ishimi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Food Function and Labeling Program, National Institute of Health and Nutrition

<sup>2</sup>Information Center, National Institute of Health and Nutrition

<sup>3</sup>Laboratory of Biochemistry, Kagawa Nutrition University

Soy bean isoflavones are structurally similar to estrogen, and exhibit weak estrogenic activity. In 2006, Food Safety Commission of the cabinet office set the upper limit of isoflavone (aglycone equivalent) intake from Foods for Specified Health Uses (FOSHU) at 30 mg/day for additional consumption with a normal diet. However, the upper limit for isoflavones was not established in the so-called health foods containing soy protein and isoflavones. We evaluated the respective soy protein and isoflavone contents in 10 health foods including 5 FOSHU by the ELISA and HPLC methods. The soy protein content of eight of these foods was determined to be within 90–118% of that reported on the label, and two protein powders for junior use contained about a half of the soy protein content reported on the label. The isoflavone aglycone content in FOSHU containing soy protein was detected to be 90–122% of the labeled content, while the isoflavone content of two soy protein-fortified foods with no label exceeded 30mg per one serving. It might be necessary to pay attention to junior athletes not excessively consuming these soy protein powder foods.

Jpn. J. Nutr. Diet., 68 (3) 234~241 (2010)

**Key words:** foods for specified health uses (FOSHU), health food, isoflavone, soy protein, upper limit

#### 緒 言

注) 本文でいう「健康食品」は、「保健機能食品」(特定保健用食品および栄養機能食品) および「いわゆる健康食品」をさす。

大豆は古来よりたんぱく質源として利用されてきたが、近年では含有されている大豆たんぱく質および大豆イソフラボン等の機能性成分が注目されている。大豆たんぱく質は血清脂質やコレステロールの濃度を低下させることが多くの研究報告から示されており、米国食品医薬局(FAD)は1999年に大豆たんぱく質を含む食品に対して

「25 g/日の大豆たんぱく質の摂取は虚血性心疾患を予防する」旨のリスク低減表示を許可した。大豆イソフラボンは女性ホルモンと類似した構造を有しており、エストロゲンレセプター(ER)と結合するため、生体内で弱いエストロゲン作用を発揮する<sup>1)</sup>。そのため、閉経期女性におけるホルモン代替療法(HRT, Hormone replacement therapy)にかわる食品成分としての利用が期待されている。

現在我が国では、大豆たんぱく質および大豆イソフラボンはともに特定保健用食品の関与成分であり、その他にも多様な「いわゆる健康食品」に利用されている。大

キーワード：特定保健用食品, 健康食品, 大豆イソフラボン, 大豆たんぱく質, 上限量

(連絡先：石見佳子 〒162-8636 東京都新宿区戸山1-23-1 (独)国立健康・栄養研究所

電話 03-3203-8063 FAX 03-3205-6549 E-mail ishimi@nih.go.jp)

表1 大豆イソフラボン標準品

分類	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	ダイジン (D; Daidzin)	グリシチン (G; Glycitin)	ゲニスチン (G; Genistin)
マロニル配糖体	マロニルダイジン (MD; 6"-O-Malonyldaidzin)	マロニルグリシチン (MGI; 6"-O-Malonylglycitin)	マロニルゲニスチン (MG; 6"-O-Malonylgenistin)
アセチル配糖体	アセチルダイジン (AD; 6"-O-Acetylglycitin)	アセチルグリシチン (AGI; 6"-O-Acetylglycitin)	アセチルゲニスチン (AG; 6"-O-Acetylgenistin)
サクシニル配糖体	サクシニルダイジン (SD; 6"-O-succinyldaidzin)	サクシニルグリシチン (SGI; 6"-O-succinylglycitin)	サクシニルゲニスチン (SG; 6"-O-succinylgenistin)
アグリコン	ダイゼイン (De; Daidzein)	グリシテイン (Gle; Glycitein)	ゲニステイン (Ge; Genistein)

豆イソフラボンについては、内閣府食品安全委員会によりその安全性が検討され、「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品の安全性評価の基本的な考え方」（2006年5月）において<sup>2)</sup>、特定保健用食品における大豆イソフラボンの上乗せ上限摂取量が30 mg/日と定められた。また、これを受け厚生労働省は、大豆イソフラボンの過剰摂取を防止するために、「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取り扱いに関する指針」を通知した（2006年8月）<sup>3)</sup>。この指針では、特定保健用食品および大豆イソフラボンを強化した食品について一日当たりの摂取量が30 mgを超えないように一日摂取目安量を設定するとともに、摂取する上での注意事項を表示することが定められている。しかし、大豆たんぱく質を含む「いわゆる健康食品」に対する記述はない。そのため、大豆たんぱく質を強化した「いわゆる健康食品」には相当量の大豆イソフラボンが含まれていると予想されるものの、現在大豆イソフラボン量の表示がなされていない食品が多数流通している。

そこで本研究では、大豆たんぱく質を強化した「健康食品」について大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの定量を行った。また、大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの表示がなされている健康食品については、実測値と表示値の比較を行った。これらの結果から、大豆たんぱく質を強化した「健康食品」を適切に摂取するための表示の在り方について考察を加えた。

## 方 法

「健康食品」中の大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの定量

食品は大豆たんぱく質を関与成分とする特定保健用食品および大豆あるいは大豆たんぱく質を原材料としたスポーツ選手対象の健康食品を対象とした。液状食品4品目、粉末状食品6品目の計10品目について、大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの定量分析を行った。食品は同ロットのものを3品ずつ分析した。

### 1. 大豆たんぱく質

大豆たんぱく質の分析は、市販の Soya protein Assay Kit (CAT, No.902001T, Tepnel BioSystems) を用い、キットの説明書に記載されている方法に基づいて行った。

#### 1-1 抽出

試料 ( $n=3$ ) を精秤後、試料 12 g (W1) に対して 48.0 g (W2) の割合で 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.6) を添加し、均一な混合液とした。精密に測った試料混合液 2.5 g (W3) に尿素-DTT 緩衝液 7.5 ml を加え、100°C で1時間抽出を行った。抽出フラスコを50°C に移し、同じ温度に保温しておいた renaturation 溶液 20 ml をゆっくりと加えて攪拌後、100 ml のフラスコに移し入れた。室温に戻した後 100 ml に定溶して、よく混合した後 Whatman No1 濾紙で濾過した溶液の、最初の 10 ml を回収して抽出溶液とした。

#### 1-2 定量分析

大豆たんぱく質の定量は、Soya protein Assay Kit (Tepnel BioSystems) を用い、酵素免疫測定法 (ELISA) で行った。表示に記載されている含有量を参考に、濃いサンプルについては適宜希釈して用い実験に供した。吸光度はマイクロプレートリーダー (コロナ電気製, MTP-650FA) を用い、測定波長 450 nm で測定した。

#### 1-3 解析

上記の方法に基づき得られた SOYA PROTEIN STANDARDS の吸光度より検量線を作成し、以下の計算式に従って試料中の大豆たんぱく質含量を算出した。

式)

試料中の大豆たんぱく質量 (%)

$$= (SP \times (W1 + W2) \times W4 \times PV \times 5.71 / SPc \times W3 \times 6.25) \times \text{希釈倍率}$$

SP: 検量線から読み取った希釈された試料溶液中のたんぱく量 ( $\mu\text{g/ml}$ )

SPc: 検量線から読み取った SOYA PROTEIN CON-

TROL の抽出液中のたんぱく量 ( $\mu\text{g/ml}$ )

PV: SOYA PROTEIN CONTROL の Protein Value (0.84)

W1: 精秤した試料量 (g)

W2: トリス-塩酸緩衝液量 (g)

W3: 抽出に供した試料量 (g)

W4: 抽出に供した SOYA PROTEIN CONTROL 量 (mg)

## 2. 大豆イソフラボン

食品中の大豆イソフラボンの定量は、厚生労働省が通知した「大豆イソフラボンを含む特定保健用食品等の取り扱いに関する指針 (食安発第0823001号)」別紙<sup>3)</sup>に記載されている高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法にて行った。

### 2-1 標準品

大豆イソフラボンは、ダイジン、グリシチン、ゲニスチンの配糖体、マロニル配糖体、アセチル配糖体、サクシニル配糖体およびアグリコンの合計15種類の大豆イソフラボン (表1, 長良サイエンス, 岐阜) について定性を行った。定量分析には、標準品としてダイジン、グリシチン、ゲニスチンの3種類を用いた。標品は70%エタノールに溶解し、濃度が  $1 \text{ mg}/5 \text{ ml}$  になるように調製した。分析に用いるまでは  $-30^\circ\text{C}$  で保存した。

### 2-2 試料の調製

液状食品は、大豆イソフラボンとして  $1-10 \text{ mg}$  が含まれる量の食品を  $50 \text{ ml}$  容メスフラスコに正確に分取し、70%エタノール (v/v) で  $50 \text{ ml}$  に定容した。よく転倒混和し試験溶液とした。この方法により抽出されない食品サンプルについては、大豆イソフラボンアグリコンは  $100^\circ\text{C}$  付近では分解されないという報告や<sup>4)</sup>、酸性条件下で特に過熱による分解に対する耐性が増す<sup>5)</sup> という報告から、 $40-50^\circ\text{C}$  で加熱攪拌抽出を行った。

粉末状食品は、大豆イソフラボンとして  $1-10 \text{ mg}$  が含まれる量の食品を  $50 \text{ ml}$  ビーカーに精秤し、70%エタノール  $25 \text{ ml}$  を加えて30分間攪拌した。30分間室温で攪拌抽出した後、遠心分離して上清を  $50 \text{ ml}$  容メスフラスコに移し、残渣についても  $10 \text{ ml}$  の70%エタノールを加え、同様の抽出操作を更に2回行った。計3回分の上清を集め、70%エタノールで  $50 \text{ ml}$  に定容し試験溶液とした。試料は全て  $0.45 \mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (ADVANTEC, Cellulose Acetate  $0.45 \mu\text{m}$ ) で濾過した後、分析に供した。

### 2-3 定量分析

高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法の分析条件を以下に示す。

分析機器: 高速液体クロマトグラフィー (島津製作所)

カラム: YMC-Pack ODS-AM-303 (size  $\phi 4.6 \times 250$

mm) (ワイエムシ社, 京都)

移動相: Aアセトニトリル/水/酢酸混液 (15:85:0.1 v/v/v)

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分間行った。移動相Aを20分間送液した後、次の分析を開始した。

流速:  $1 \text{ ml}/\text{min}$

カラム温度:  $35^\circ\text{C}$

測定波長:  $254 \text{ nm}$

試料注入量:  $10 \mu\text{l}$

### 2-4 食品中の大豆イソフラボン量の解析

試料中の大豆イソフラボン濃度は、分子量の比を用いて全てアグリコン当量として求めた。ダイゼインを例に、アグリコン等量の求め方を以下の式に示す。

例)  $\text{TDe} = \text{TADe} \times \text{CD}/\text{AD} \times 0.611^*$

TDe: ダイゼイン型大豆イソフラボンの濃度 (アグリコン当量) [ $\text{mg}/\text{l}$ ]

TADe: ダイゼイン型大豆イソフラボンのピーク面積

CD: 大豆イソフラボン標準溶液中のダイジンの濃度 [ $\text{mg}/\text{l}$ ]

AD: 大豆イソフラボン標準溶液クロマトグラム上のダイジンのピーク面積

\*ダイゼイン型のアグリコン換算係数。グリシチン型は0.637, ゲニステイン型は0.625を乗じてそれぞれのアグリコン等量を求めた。

ダイゼイン型, グリシチン型およびゲニステイン型も同様にアグリコンの濃度の総和を試料中の総大豆イソフラボン濃度 (アグリコン当量) とし、一日または一回摂取目安量における試料中の大豆イソフラボン含有量 (アグリコン当量) を下記の式により求めた。

試料中の大豆イソフラボン含量 (アグリコン当量)

= 総大豆イソフラボン濃度 ( $\text{mg}/\text{l}$ )  $\times 50/1000 \times 1/$  試料採取量 (g または ml)  $\times$  (一日または一回摂取目安量)

## 結 果

「健康食品」中の大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの分析

### 1. 大豆たんぱく質について

対象とした食品は、大豆たんぱく質を関与成分とする特定保健用食品 (液状食品, 粉末状食品) ならびにスポーツ選手を対象とした大豆たんぱく質強化食品 (粉末

表2 食品の表示と大豆たんぱく質含有量

分類	名称 (食品形態)	原材料名	1日または1回 摂取目安量に 関する表示	たんぱく質 表示値 (g)	大豆たんぱ く質表示量 (g)	分析値 (mg)	表示量に 対する割合 (%)	CV 値 (%)
液 状 食 品	調整豆乳 (液状食品)	大豆 (遺伝子組換えでない)	1本 (200 ml)	8.8	6.7	7.7	114.9	18.9
	調整豆乳 (液状食品)	大豆	1本 (200 ml)	7.6	6.0	6.2	103.3	18.1
	大豆たんぱく飲料 (液状食品)	大豆たんぱく, 大豆	1本 (195 g)	8.4	6.0	7.1	118.3	12.2
	清涼飲料水 (液状食品)	粉末状大豆たんぱく (遺伝 子組み換えでない)	1本 (100 g)	7.1	6.0	6.3	105.0	7.4
粉 末 状 食 品	乾燥スープ (粉末状食品)	分離大豆たんぱく質	1袋 (15 g)	9.0	7.0	7.9	112.9	9.1
	プロテインパウダー (粉末状食品)	大豆たんぱく	1食 (21 g)	16.8	16.8	18.7	111.3	6.9
	大豆たんぱく食品 (粉末状食品)	大豆分離たんぱく	1食 (20 g)	16.9	16.9	15.2	89.9	2.0
	プロテインパウダー (粉末状食品)	大豆たんぱく (遺伝子組換え 大豆は使用していません)	1食 (20 g)	16.6	16.6	15.3	92.2	2.4
	プロテインパウダー (粉末状食品; ジュニア用)	粉末状大豆たんぱく	1食 (20 g)	8.7	(表示なし)	4.7	-	8.3
	たんぱく食品 (粉末状食品; ジュニア用)	大豆分離たんぱく	1食 (20 g)	8.4	(表示なし)	5.5	-	2.5

状食品)である。表2に、食品の大豆たんぱく質に関する表示と分析値を示した。分析値は、平均値および変動係数(CV値(%))で示した。分析した食品中の大豆たんぱく質は、10品目中8品目には大豆たんぱく質量が表示されており、分析値の表示量に対する割合は90-118%であった。スポーツ選手を対象とした大豆たんぱく質強化食品には、1日摂取目安量当り15-18gの大豆たんぱく質が含まれていた。これは、特定保健用食品の1日摂取目安量の約2倍であった。ジュニア選手を対象とした大豆たんぱく質強化食品(2品目)には、表示されている1回摂取目安当りのたんぱく質量のおおよそ半分量である5gの大豆たんぱく質が確認された。変動係数は液状食品で(6.2-7.7%: intra-assay)、粉末状食品で(4.2-18.7%: intra-assay)であった。

## 2. 大豆イソフラボンについて

表3に各食品の大豆イソフラボン(アグリコン等量)の表示と分析値を示した。大豆たんぱく質を関与成分とする特定保健用食品の表示では、大豆イソフラボンの含有量は8-30mg/1日摂取目安量であるが、分析の結果、表示の90-122%の大豆イソフラボンが実測された。スポーツ選手を対象とした大豆たんぱく質強化食品5品目においては、大豆イソフラボン含量の表示はなされていなかったが、分析の結果、アグリコン当量として1食分当たり20-44mgの大豆イソフラボンが含まれていた。ジュニア選手を対象とした大豆たんぱく質強化食品

(2品目)には、1食当たり17-20mgの大豆イソフラボンが含まれていた。変動係数(CV(%))は、液状食品では(2.1-9.6%: intra-assay)、粉末状食品では(0.9-9.1%: intra-assay)であった。

大豆イソフラボンは、ダイゼイン型、グリシテイン型、ゲニステイン型の3種類に大別することができる。また、それぞれにアグリコンおよび配糖体が存在し、合計15種類の大豆イソフラボン化合物がある(表1)。今回対象とした健康食品中にも多種の大豆イソフラボンが確認された。表4に各食品中1日または1回摂取目安量に含まれる15種類の大豆イソフラボンの成分分析の結果を示した。解析の結果、豆乳には配糖体(ダイジン、ゲニスチン)とマロニル配糖体(マロニルダイジン、マロニルゲニスチン)が多く含まれていることが確認され、大豆たんぱく質強化食品には配糖体(ダイジン、ゲニスチン)、マロニル配糖体(マロニルダイジン、マロニルゲニスチン)、あるいはアグリコン(ダイゼイン、ゲニステイン)の多種の成分が混在していた。納豆に多く含まれることが知られるサクシニル配糖体は、少量であるが豆乳やプロテインパウダーに含まれていた。表5に対象とした食品に含まれる大豆イソフラボンの型別の割合を示した。今回対象とした食品にはゲニステイン型が約60%含まれており、次いでダイゼイン型が約30%、グリシチン型の割合は10%以下であった。