

## 血清中に存在する遊離型および硫酸抱合型植物エストロゲン測定法の検討

宮川秀則<sup>1)</sup>、権藤一美<sup>1)</sup>、太刀野寿志<sup>1)</sup>、榎佐和子<sup>1)</sup>、原田修一<sup>2)</sup>、木村良夫<sup>2)</sup>、櫻井健一<sup>3)</sup>、森千里<sup>3)</sup>、久保野勝男<sup>1)</sup>

1)株式会社エスアールエル 医科学分析センター 2)林純薬工業株式会社 3)千葉大学大学院 SRL 環境保健講座

植物エストロゲンは、女性ホルモン様作用をもつとされる食物由来の成分で、大豆イソフラボンとしてダイゼインやゲニステインなどが良く知られている。ダイゼイン、ゲニステインは、大豆中では主に配糖体 (ダイジン、ゲニスチン等) として存在し、生体内においては遊離型と肝臓での代謝により生成された硫酸抱合型およびグルクロン酸抱合型が存在する。今回、我々はエストロゲン様作用を示すとされる、ゲニステインの遊離型および硫酸抱合型について、血清中の濃度測定法について LC-MS/MS および HPLC を用いて検討した。その結果、血清中の遊離型ゲニステインは検出されず (0.5 ng/mL 以下)、硫酸抱合型が 4'-O-および 7-O-硫酸抱合型ゲニステインが検出された。

**【方法】遊離型ゲニステイン測定：**ゲニステイン標準品はフナコシより市販品を購入して使用した。前処理方法は、血清 0.2 mL にジエチルエーテルを加えて抽出した。分析条件は、アセトニトリル/メタノールおよび酢酸を移動相とし、PEGASIL ODS (2×150mm、センシユー科学) を分析カラムとして用い、LC-MS/MS (Quattro Ultima、Micromass) のエレクトロスプレーイオン化 (ESI-) にて MRM 測定とした。**硫酸抱合型ゲニステイン測定：**硫酸抱合型の標準品は、4'-O-および 7-O-硫酸抱合型ゲニステインの 2 種類を林純薬工業にて合成し、構造解析したものを使用した。前処理方法は血清 0.5 mL にアセトニトリルを加えて除タンパクした。分析条件は、アセトニトリル/メタノールおよび酢酸ナトリウムを用いた移動相を使用し、プレカラムに PEGASIL ODS (4.6×50mm、センシユー科学)、メインカラムにイナートシル ODS-3V (4.6×250mm、ジーエルサイエンス) を用いてカラムスイッチングを施した後、HPLC (LC10A、島津製作所) にて 258nm の UV 吸収を検出した。

**【結果】**血清中での遊離型ゲニステインは、定量限界の 0.5 ng/mL を超える試料は存在しなかった。硫酸抱合型は、4-O-硫酸抱合型ゲニステインが ND~10.1 ng/mL (ND: 1 ng/mL 未満)、7-O-硫酸抱合型ゲニステインが ND~8.7ng/mL (ND: 1 ng/mL 未満) であった。

血清中のゲニステインは、その総量 (酵素で加水分解後に測定) と比較して硫酸抱合型が 15%程度、遊離型が極めて少量である可能性が示唆された。

### Examination of the Method of Measuring Phytoestrogen and Phytoestrogen-Sulfates in Human Serum

Hidenori Miyagawa<sup>1)</sup>, Kazumi Gondo<sup>1)</sup>, Hisashi Tachino<sup>1)</sup>, sawako Enoki<sup>1)</sup>, shuichi Harada<sup>2)</sup>, Yoshio Kimura<sup>2)</sup>, Kenichi Sakurai<sup>3)</sup>, Chisato Mori<sup>3)</sup>, Katsuo Kubono<sup>1)</sup>

1) SRL Inc, 2) HAYASI PURE CHEMICAL IND., LTD. 3) Chiba University School of Medicine

Daidzein and genistein are found mainly as glycosides (genistin, daidzin) in soybean, and they exist as aglucones, the sulfate ester and the glucuronide which are produced after metabolism by liver in human serum.

ALC-MS/MS and HPLC procedure for the measurement of the genistein and the sulfate esters of genistein in human serum has been developed. For the measurement of genistein, plasma 0.2 mL was extracted by diethylether, and MRM was measured by electron spray ionization (ESI-) of LC-MS/MS (Quattro Ultima, Micromass). For the measurement of the 4'-O- and 7-O-genistein sulfate, plasma 0.5 mL was treated to remove protein by acetonitrile, and the UV absorption of 280 nm was detected with HPLC (LC10A Shimadzu corp.)

The genistein wasn't detected (less than 0.5 ng/mL) in human serum. The genistein 4'-O-sulfate and genistein 7-O-sulfate were detected ND~10.1 ng/mL, ND~8.7 ng/mL (ND: under 1 ng/mL) in human serum. It was suggested that the genisteine sulfate existed in about 15%, and the aglucon was a small quantity in human serum.