薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (3) 275-279 (1984)

高速液体クロマトグラフィーによる各種大豆および大豆加工食品中の
Soyasaponin 類の定量

北川 勲,^{*,a} 吉川雅之,^a 林 輝明,^b 谷山登志男^b

大阪大学薬学部,^a 小城忠治商店研究所^b

Quantitative Determination of Soyasaponins in Soybeans of Various Origins and
Soybean Products by Means of High Performance Liquid Chromatography

ISAO KITAGAWA,^{*,a} MASAYUKI YOSHIKAWA,^a TERUAKI HAYASHI,^b
and TOSHIO TANIYAMA^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,^a 1-6, Yamada-oka, Suita,
Osaka, 565, Japan and Research Laboratory, C. Koshiro and Co., Ltd.,^b
3-5, Dosho-machi, Higashi-ku, Osaka, 541, Japan

(Received August 29, 1983)

The fluorescent coumarin derivatives of soyasaponin I (1), II (2), III (3), A₁ (4), and A₂ (5) were examined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the quantitative determination method for soyasaponin I (1), II (2)+III (3), A₁ (4), and A₂ (5) by HPLC has been developed. By means of this HPLC method, the respective soyasaponin contents in various kinds of soybeans and soybean products have been clarified.

Keywords—soybean; *Glycine max*; soybean product; triterpene oligoglycoside; soyasaponin; acetyl soyasaponin; soyasaponin quantitative analysis; soyasaponin HPLC

われわれは、大豆 (*Glycine max* MERRILL, 種子) から5種のサポニン (トリテルペンオリゴ配糖体), soyasaponin I (1), II (2), III (3), A₁ (4) および A₂ (5) を単離、構造決定したが、¹⁾ これらの soyasaponin 類には種々の興味ある生物活性が認められている。²⁾ 引きつづいて、われわれは種々の外国産大豆、日本産大豆や黒大豆など産地の異なる各種大豆におけるサポニン成分を検索し、いずれの大豆からでも 1—5 を単離同定するとともに、外国産大豆および日本産黒大豆においては、1—5 が部分的にアセチル化されて含有されていることを明らかにした。³⁾

また、ガスクロマトグラフィー (GLC) による soyasaponin 定量法を開発し、各種大豆および大豆加工食品中の soyasaponin 含量を明らかにした。³⁾ この GLC による soyasaponin 定量法では、全 soyasaponin をメタノリスして得られるサポゲノール (soyasapogenol A および B) を GLC で定量し、soyasapogenol A を soyasaponin A₁ (4) に、soyasapogenol B を soyasaponin I (1) に換算して定量する。そのため、soyasapogenol A をサポゲノールとする2種のサポニン、soyasaponin A₁ (4) および A₂ (5) を soyasaponin A₁ (4) として、また、soyasapogenol B をサポゲノールとする3種のサポニン、soyasaponin I (1), II (2) および III (3) を soyasaponin I (1) として算出することになる。したがって GLC によるこの定量法では、比較的簡単な操作で soyasaponin 含量を定量することができるが、個々の soyasaponin の含量を知ることはできない。

今回、soyasaponin 類の蛍光性クマリン誘導体について、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離を検討した結果、微量成分 soyasaponin III (3) を II (2) から分離定量することには成功しなかったが、soyasaponin I (1), II (2) + III (3), A₁ (4), および A₂ (5) の4つのピークとして分離定量が可能な方法を開発し、各種大豆および大豆加工食品中のこれらの soyasaponin 類の含量を明らかにしたので報告する。⁴⁾

実 験 の 部

標品および試料 Soyasaponin I (1), II (2), III (3), A₁ (4), A₂ (5) は秋田県産大豆 (早生秋田種, 大阪, 赤松種苗店から入手) から単離、構造決定した標品¹⁾を用いた。

Chart

各種大豆および大豆加工食品試料は、GLC による定量法³⁾の場合と同一である(香川県産大豆(晩生玉錦種, 赤松種苗店より入手), 佐賀県産大豆(晩生種, 大阪, 藤田種子店), 米国オハイオ州産大豆(赤松種苗店), カナダ産大豆(信州味噌研究所), 中国産大豆(信州味噌研究所), 兵庫県産黒大豆(藤田種子店), 味噌, 豆腐, 凍豆腐, 納豆, 湯葉, 豆乳, オカラ(いずれも大阪市場品))。

各種大豆, 凍豆腐, 湯葉は粉細機で粉末とし, 味噌, 豆腐, 豆乳は凍結乾燥後, 同様に粉末とし, また, 納豆, オカラは減圧乾燥後, 同様に粉末とした(60 メッシュ 以下)。

乾燥品中の soyasaponin 含量は, 各試料粉末を第 10 改正日本薬局方, 生薬試験法の乾燥減量の項に従い, 乾燥後秤量した値をもとにして算出した。

試料溶液の調整 試料粉末(約 1 g)を精密に秤取し, 酢酸エチル(20 ml)を加え, 1 時間加熱還流する。汙過して酢酸エチルを除き, 残渣を同様に酢酸エチルで脱脂する。脱脂試料粉末にメタノール(20 ml)を加え, 2 時間加熱還流後, 汙過する。残渣を同様にメタノールで計 3 回抽出する。抽出液を合し, 減圧濃縮してメタノール抽出エキスを得る。メタノール抽出エキスを 30% 含水メタノール(5 ml)に溶解し, 5% KOH-メタノール溶液(1 ml)を加え 1 時間加熱還流する。反応液を Dowex 50WX8 (H⁺ 型)で中和後, 樹脂を汙別する。汙液を減圧溶

媒留去後, SEP-PAK C₁₈ (waters, 30% 含水メタノール (10 ml), メタノール (5 ml)) 処理する. メタノール (5 ml) 溶出部を減圧濃縮乾燥後, 1% 4-ブロムメチル-7-メトキシクマリン (同仁化学) のジメチルホルムアミド溶液 (1 ml) に溶解し, フッ化カリウム (5 mg) を加え 1 時間加熱 (90°C) する.⁵⁾ 反応液を SEP-PAK silica (waters, クロロホルム (10 ml), クロロホルム-メタノール (1:1, 10 ml)) 処理する. クロロホルム-メタノール (1:1, 10 ml) 溶出部を減圧濃縮乾燥後, 0.003% アントラセン (半井化学, 内部標準物質) のジメチルホルムアミド溶液 (1 ml) に溶解し, その 5 μ l を HPLC に注入した.

装置および測定条件 装置: 島津高速液体クロマトグラフ LC-2 型 (クロマトパック C-RIA 付属), 検出器: Waters 高速液体クロマトグラフ用蛍光検出器 420 型.

測定条件: カラム, μ Bondapak C₁₈ (waters, 30 cm $\times$ 3.9 mm (i.d.)), 移動相: 30% 含水アセトニトリルから毎分 0.5% ずつアセトニトリル濃度を高め 60% 含水アセトニトリルとする. 次いで, 毎分 10% ずつアセトニトリル濃度を高め, 最終的にアセトニトリルで溶出する. 流量: 1.0 ml/min. カラム温度: 25°C. 検出波長: λ_{ex} ; 360 nm, λ_{em} ; 400 nm.

本 HPLC 条件では, 微量サポニン成分, soyasaponin III (3) のクマリン誘導体は soyasaponin II (2) のクマリン誘導体と分離することができなかったため, soyasaponin III (3) は soyasaponin II (2) として算出した. 一例として, 中国産大豆に適用して得られたクロマトグラムを Fig. 1 に示す.

Fig. 1. HPLC Diagram for the Coumarin Deriv. of Soyasaponins from Soybean (China)

検量線の作成 内部標準物質アントラセンに対して, soyasaponin I (1) 16.60—66.60 倍, soyasaponin II (2) 6.66—26.60 倍, soyasaponin A₁ (4) 8.33—33.30 倍, soyasaponin A₂ (5) 3.33—13.30 倍の重量比の標準サンプルを作成し, 試料溶液の場合と同様にエステル化等を行い, 高速液体クロマトグラフに注入した.

Soyasaponin I (1), II (2), A₁ (4), A₂ (5) のクマリン誘導体と内部標準物質 (アントラセン) との面積強度比から最小二乗法により算出した回帰方程式 (soyasaponin I (1): $y=0.0679x-0.0017$; soyasaponin II (2): $y=0.0701x-0.0021$; soyasaponin A₁ (4): $y=0.0504x-0.0011$; soyasaponin A₂ (5): $y=0.0578x-0.0008$) は, ほぼ, 原点を通る直線関係を示し, 相関係数 r はいずれも 0.99 であった. なお, x は内部標準物質に対する各 soyasaponin の重量比, y は内部標準物質に対する各 soyasaponin のクマリン誘導体の面積比である.

結果および考察

試料調整法の検討

酢酸エチルによる脱脂, メタノール抽出において, 秋田県産大豆, 米国オハイオ州産大豆および加工食品 (豆腐, 味噌) を用いて, 脱脂, 抽出回数について検討した結果, 試料粉末 (1 g, 60 メッシュ以下) を用いた場合, 前述の条件が最も適していることが判明した.

外国 (米国, カナダ, 中国) 産大豆, 日本産黒大豆においては, soyasaponin I (1), II (2), III (3), A₁ (4), A₂ (5) は部分的にアセチル化されて含有されており,⁸⁾ また, 外国産大豆を原料とした加工食品中においても, アセチル化された soyasaponin (acetyl soyasaponin) の存在が認められた. これらの acetyl soyasaponin は非常に変

化し易いため、そのままクマリン誘導体に導き HPLC で定量することができない。そこで、メタノール抽出エキスをアルカリで処理し、メタノール抽出エキス中に存在する acetyl soyaaponin を soyaaponin I (1), II (2), III (3), A₁ (4), A₂ (5) に導いた。Acetyl soyaaponin の脱アセチル化反応について種々検討した結果、5% KOH-メタノール溶液を用いた上述の条件で、1 時間以内に脱アセチル化反応の完結することが判明した。

SEP-PAK C₁₈ 処理では、30% 含水メタノール (10 ml) での溶出によって、糖類や、アミノ酸が除去され、ついでメタノール (5 ml) で溶出することによって soyaaponin 分画が得られる。

4-ブロムメチル-7-メトキシクマリンとフッ化カリウムによる soyaaponin のクマリンエステル化反応について、soyaaponin I (1), II (2), III (3), A₁ (4), A₂ (5) のほか、各種大豆および加工食品から得られる soyaaponin 分画を用いて検討した結果、前述の反応条件によって、いずれの場合も完全にクマリンエステル化されることが判明した。また、SEP-PAK silica 処理において、クロロホルム (10 ml) で溶出することによって、過剰の試薬、大豆の脂溶性成分が除去され、クロロホルム-メタノール (1:1, 10 ml) での溶出によって、soyaaponin のクマリン誘導体を得られる。

HPLC 測定条件の検討

カラム充填剤は ODS 化学結合型の逆相系充填剤 μ Bondapak C₁₈ を用いた。Soyaaponin I (1), II (2)+III (3), A₁ (4), A₂ (5) を同時定量するため、移動相として 30% 含水アセトニトリルから 60% 含水アセトニトリルを経てアセトニトリルまでアセトニトリル濃度を高めるグラジエント法を用いた。

定量精度および標品添加回収実験

定量精度および再現性を確認する目的で、カナダ産大豆を用いて、抽出、クマリンエステル化反応、SEP-PAK silica 処理、HPLC 等定量操作における再現性について検討した。計 5 回繰り返した結果、カナダ産大豆の soyaaponin 含量は $0.225 \pm 0.007\%$ (w/w, C.V. 値, 3.11%) となり、精度、再現性ともに良好であった。

カナダ産大豆および加工食品 (豆腐, 味噌) について、soyaaponin I (1), II (2), III (3), A₁ (4), A₂ (5) を添加して定量操作における回収率を求めたところ、93.2—98.5% と良好な結果を得た。

TABLE I. Soyaaponin Contents (%) in Various Soybeans and Soybean Products

	Soyaaponin A ₁ (4)	Soyaaponin A ₂ (5)	Soyaaponin I (1)	Soyaaponin II+III (2+3)	Total soyaaponin
Soybean (Akita)	0.056 (0.061) ^{a)}	0.033 (0.036)	0.121 (0.133)	0.032 (0.035)	0.242 (0.265)
Soybean (Kagawa)	0.054 (0.060)	0.022 (0.024)	0.148 (0.164)	0.039 (0.043)	0.263 (0.291)
Soybean (Saga)	0.049 (0.055)	0.023 (0.026)	0.116 (0.129)	0.043 (0.048)	0.231 (0.258)
Soybean (U.S.A.)	0.062 (0.068)	0.027 (0.030)	0.125 (0.138)	0.040 (0.044)	0.254 (0.280)
Soybean (Canada)	0.049 (0.054)	0.023 (0.025)	0.119 (0.131)	0.034 (0.037)	0.255 (0.247)
Soybean (China)	0.065 (0.071)	0.032 (0.035)	0.157 (0.172)	0.044 (0.048)	0.298 (0.326)
Black-Soybean (Kuro-daidzu)	0.048 (0.053)	0.017 (0.019)	0.103 (0.115)	0.030 (0.033)	0.198 (0.220)
Miso (bean paste)	0.016 (0.032)	0.008 (0.016)	0.039 (0.078)	0.011 (0.022)	0.074 (0.148)
Tofu (bean curd)	0.011 (0.074)	0.005 (0.037)	0.023 (0.153)	0.006 (0.037)	0.045 (0.301)
Kori-Tofu (freeze-dried bean curd)	0.076 (0.081)	0.031 (0.033)	0.163 (0.175)	0.036 (0.039)	0.306 (0.328)
Natto (fermented soybean)	0.020 (0.054)	0.009 (0.025)	0.047 (0.131)	0.013 (0.036)	0.089 (0.246)
Yuba (dried bean curd)	0.097 (0.104)	0.042 (0.046)	0.196 (0.211)	0.043 (0.046)	0.378 (0.407)
Tonyu (soybean milk)	0.012 (0.102)	0.005 (0.043)	0.023 (0.187)	0.007 (0.059)	0.047 (0.391)
Okara (bean curd refuse)	0.003 (0.023)	0.001 (0.006)	0.008 (0.056)	0.003 (0.018)	0.015 (0.103)

^{a)} The yields (%) calculated from the dried materials are given in the parentheses.

各種大豆および大豆加工食品中の Soyasaponin 含量

各種大豆 7 種〔日本産大豆 3 種 (秋田県産, 香川県産, 佐賀県産), 外国産大豆 3 種 (米国オハイオ州産, カナダ産, 中国産), 黒大豆 (兵庫県産)〕および大豆加工食品 7 種〔味噌, 豆腐, 凍豆腐 (高野豆腐), 納豆, 湯葉, 豆乳, オカラ〕について, 上記 HPLC 定量法を適用し, 各 soyasaponin 含量を求めた。

その結果, Table I に示すように, 各種大豆では中国産大豆の soyasaponin 含量が高く, また, 加工食品では乾燥物換算すると, 豆腐, 凍豆腐, 湯葉, 豆乳において soyasaponin 含量が高いなど GLC 定量法の場合³⁾と同様の傾向が確認された。

このように, HPLC を用いた soyasaponin 定量法は GLC 定量法とは異なり, 各 soyasaponin の分離定量が可能である。しかし, これまでのところ, 微量サポニン成分である soyasaponin II (2) と III (3) の分離には成功していないので, soyasaponin I (1), II (2)+III (3), A₁ (4), A₂ (5) を分離定量することができることになる。

引用文献および注

- 1) a) I. Kitagawa, M. Yoshikawa, I. Yoshioka, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 121 (1976); b) I. Kitagawa, M. Yoshikawa, H. K. Wang, M. Saito, V. Tosirisuk, T. Fujiwara, K. Tomita, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 2294 (1982); c) I. Kitagawa, M. Saito, M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, to be published.
- 2) a) 北川 勲, 吉川雅之, 斉藤雅之, 滝野吉雄, 佐塚泰之, 谷澤久之, 奥田拓道, 大南宏治, 有地 滋, 林 輝明, 第 3 回天然薬物の開発と応用シンポジウム要旨集, 1980, p. 16; b) 大南宏治, 林 輝明, 木村善行, 奥田拓道, 有地 滋, 基礎と臨床, **15**, 209 (1981); c) 大南宏治, 奥田拓道, 吉川雅之, 北川 勲, *Proc. Symp. WAKAN-YAKU*, **14**, 157 (1981); d) 大南宏治, 奥田拓道, 浜井藤次郎, 北川 勲, 吉川雅之, 有地 滋, 林 輝明, 栄養と食糧, **34**, 105 (1981); e) 谷澤久之, 佐塚泰之, 滝野吉雄, 北川 勲, 吉川雅之, 林 輝明, 有地 滋, *Proc. Symp. WAKAN-YAKU*, **15**, 119 (1982); f) 有地 滋, 戸田静男, 基礎と臨床, **16**, 135 (1982); g) 北川 勲, 吉川雅之, 化学と生物, **21**, 224 (1983).
- 3) 北川 勲, 吉川雅之, 林 輝明, 谷山登志男, 薬誌, **104**, 162 (1984).
- 4) 北川 勲, 吉川雅之, 谷山登志男, 林 輝明, 日本薬学会第 102 年会, 大阪, 1982 年 4 月, 要旨 p. 582.
- 5) a) S. G. Zelenski, J. W. Huber III, *Chromatographia*, **11**, 645 (1978); b) E. Grushka, S. Lam, J. Chassin, *Anal. Chem.*, **50**, 561 (1980); c) 中村 洋, ぶんせき, **8**, 561 (1980).