

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成23年1月26日 受理

産技連四国食品健康産業分科会
食品機能成分分析研究会 編

s-food@m.aist.go.jp

大豆のサポニン

作成者：近畿中国四国農業研究センター

大豆育種研究近中四サブチーム

主任研究員 高田吉丈

1. 大豆について

1. 1 概要

大豆は「畑の肉」と呼ばれ、良質な蛋白質や脂質を豊富に含み、さらにイソフラボンやサポニン等の機能性成分を含んだ優れた食材である。大豆は豆腐、味噌、醤油等の原材料であり、国民の健康に対する関心の高まりから見直されている日本型食生活の中心的な役割を担っている。しかしながら、大豆の自給率は5%で、食用に限ってみても自給率は21%であり、日本の大豆需要量の大部分を輸入に頼っている。

四国4県の大豆作について見ると、2009年の作付面積は845haで、全国(14万5千ha)対比0.6%、収穫量は1,172t、10a当たり収量は131kgであった。栽培されている品種としては約8割が黄大豆で、そのうちの90%を豆腐加工適性に定評のある「フクユタカ」が占めている。それ以外は、黒大豆を中心に各地の在来種等が少量作付されている。

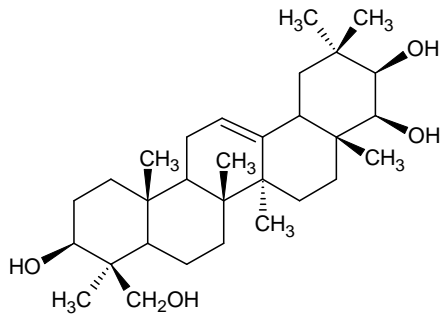
2. 大豆サポニンについての説明

大豆サポニンはトリテルペノイドサポニンに分類され、ソヤサポゲノールA及びBの2種類のアグリコン(非糖部)に糖が付加した配糖体の総称である(図2.1)。付加する糖の種類により多種多様な分子種が存在する¹⁾。ソヤサポゲノールAをアグリコンとするグループAサポニンは不快味の原因物質と報告されているが²⁾、ソヤサポゲノールBをアグリコンとするDDMPサポニンとその分解物類には、抗高脂血症作用³⁾、ヒト大腸ガン細胞増殖抑制作用^{4,5)}等の生理活性が報告されている。

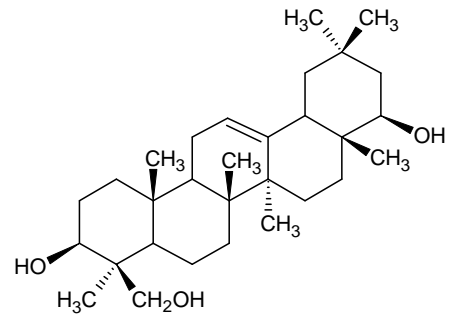
1) 塚本知玄, 大豆のすべて, 喜多村啓介他編, (株)サイエンスフォーラム, 東京, pp.145-149 (2010).

2) Okubo K. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 99-103(1992).

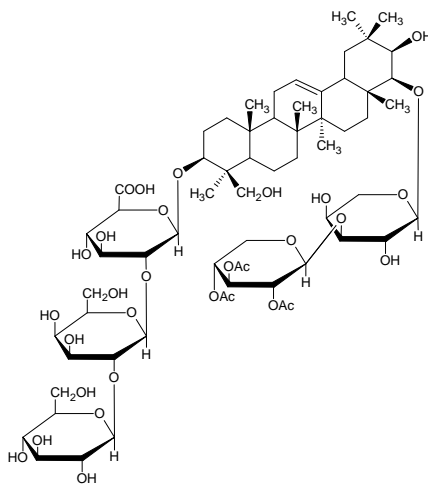
- 3) Murata, M. et al., Soy Protein Research, 8, 81-85 (2005).
- 4) Ellington AA et al., Carcinogenesis, 26, 159-167 (2005).
- 5) Ellington AA et al., Carcinogenesis, 27, 298-306 (2006).



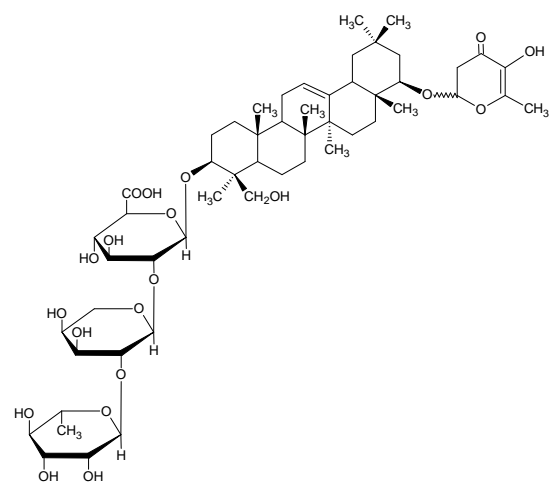
ソヤサポゲノール A



ソヤサポゲノール B



グループ A サポニン : Aa



DDMP サポニン : β a

図 2. 1 大豆サポニンの構造
(グループ A サポニンと DDMP サポニンは一例)

3. 定量分析の方法について

ここでは、大豆子実（全粒）に含まれる大豆サポニンを高速液体クロマトグラフィーにより定量する手順を述べる。なお、分析対象とする大豆サポニンは標準品の入手可能なアグリコン（ソヤサポゲノールA、ソヤサポゲノールB）とする。

3. 1 準備する器具等

1. 粉碎機（メーカー、粉碎方式は問わない）
2. 遠心機（12,000～15,000rpm、1.5ml マイクロチューブ用）
3. ブロックヒーター（80℃定温が可能なもの、サーマルサイクラーで代用可能、0.5ml マイクロチューブ用）
4. 1.5ml マイクロチューブ、0.5ml マイクロチューブ
5. 高速液体クロマトグラフ装置一式（2液グラジエント可能なポンプ、インジェクターまたはオートサンブラ、UV検出器またはPDA検出器、カラムオーブン）
6. ODSカラム（Imtakt Unison UK-C18：3 μ m・150x3mm、インタクト）

[試薬]

1. アセトニトリル(HPLC用)
2. 蒸留水(HPLC用または超純水)
3. エタノール(HPLC用または特級)
4. 酢酸(HPLC用または特級)
5. 塩酸（特級）
6. 流動パラフィン（特級）
7. ソヤサポゲノールA、ソヤサポゲノールB標準品（小城製薬）
標準品約10mgを精秤し、エタノールに溶解して標準原液とし、使用時に最終濃度が10mg/lとなるように70%エタノール（含0.1%酢酸）で希釈する。標準原液は-20℃以下で冷凍保存する。

3. 2 分析用試料の抽出方法

試料の抽出法は多検体を取り扱えるように、Tsukamoto *et al.* (1995)¹⁾の抽出法をスケールダウンしたものに改変した。

1. 大豆粉体試料約60mgを精秤し、1.5ml マイクロチューブに入れる。
2. 70%エタノール（含0.1%酢酸）を0.6ml加え、ボルテックスで攪拌後、遠心機で壁面の水滴等を落とし、25℃で48時間静置する。
3. 抽出終了後は、分析時まで-20℃で保存する。

3. 3 分析用試料の加水分解

1. 「3. 2」の抽出液を12,000～15,000rpmで10分間遠心後、上澄み（必要に応じてフィルター濾過）100 μ lを0.5ml マイクロチューブに分注し、塩酸10 μ l加えてボルテックス。
2. 流動パラフィンを重層する〔蒸発防止のため〕。
3. ブロックヒーターで80℃、6時間加熱。

4. 放冷後、HPLC 分析サンプルとして使用する。

3. 4 HPLC による分析方法

使用した HPLC 装置構成は、ポンプ：日立 L-2130 形（低圧グラジエントユニット、デガッサ装着）、オートサンプラ：日立 L-2200 形、カラムオーブン：L-2300 形、UV 検出器：日立 L-2400 形、データ収集・解析：EZChrom Elite for Hitachi、である。

(1) 移動相の調製

移動相 A 及び移動相 B をアセトニトリル(HPLC 用)、蒸留水 (HPLC 用) または超純水、酢酸 (HPLC 用が望ましいが特級でも可) を用いて以下のように調製する。

【A 液】 水：酢酸(100：0.1、v/v)

【B 液】 アセトニトリル：酢酸(100：0.1、v/v)

(2) 分析条件

① 検出器、恒温槽、溶媒の流量の条件

検出波長： 210nm

カラム温度： 40℃

流量： 毎分 0.44ml

注入量： 5 μ l

② 移動相溶媒の混合比(グラジエント)は以下のように調整する。

1) 初期状態：アセトニトリル濃度 65%の状態を保持する。

2) 0 分から 12.5 分間：アセトニトリル濃度 65→75%になるように直線濃度グラジエントを行う。

3) 12.5 分から 13 分間：アセトニトリル濃度 75%の状態を保持する。

4) 13.1 分から 15.5 分間：アセトニトリル濃度 100%の状態を保持する。

5) 15.6 分から 24 分間：アセトニトリル濃度 65%の状態を保持する。

(3) 定性及び定量

① 分離された物質の定性は標準試料の保持時間との比較により行う。

② 定量は検量線法により行う。検量線は標準試料の濃度と検出出力結果との関係を回帰分析して作成する。検出出力結果にはピーク面積を用いる。

4. 分析例

3. 4 で述べた条件で分析したソヤサポゲノール A 及び B のクロマトグラムを以下に示す。

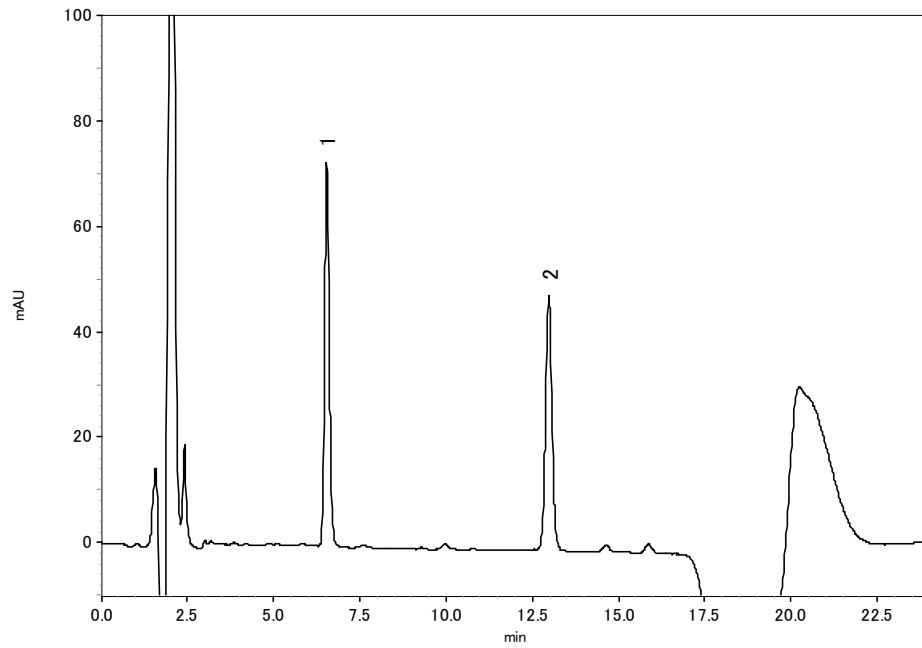


図 4. 1 サポニン標準品のクロマトグラム
1:ソヤサポゲノールA、2:ソヤサポゲノールB

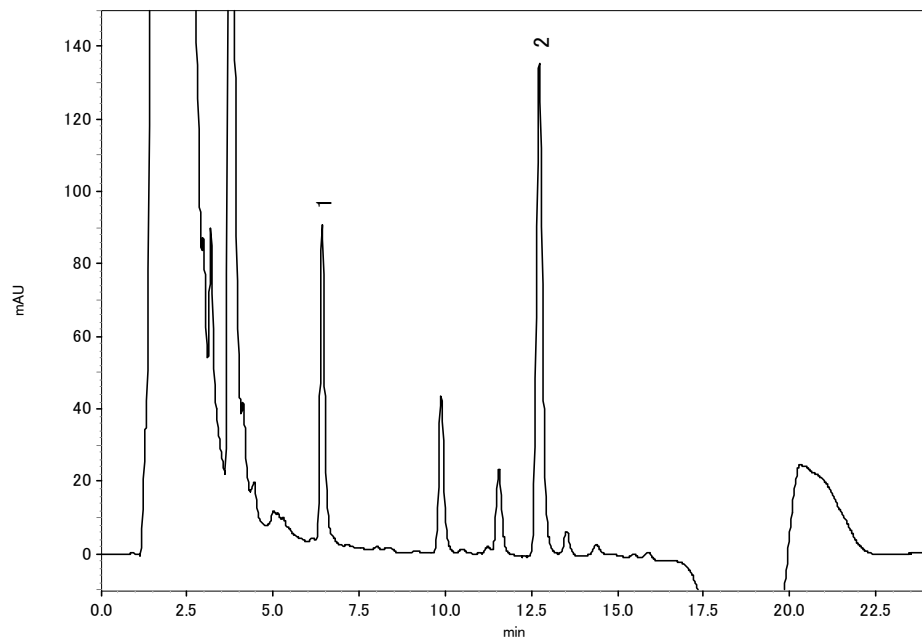


図 4. 2 大豆種子（全粒）のクロマトグラム
1:ソヤサポゲノールA、2:ソヤサポゲノールB

5. 食品の分析結果例

生大豆（大豆種子）及び大豆加工品に含まれるソヤサポゲノールA及びBの分析結果を以下に示す。なお、豆腐、味噌、煮豆からのサポニン抽出は、約1gのサンプルに5mlの70%エタノール（含0.1%酢酸）を加えて、ホモジナイズ後、室温で24時間振とうして行った。その後の操作は「3. 3」に従った。

表5. 1 大豆加工食品中のソヤサポゲノールA及びB含量

| | 含有量 ($\mu\text{g/gFW}$) | |
|-------|---------------------------|-----------|
| | ソヤサポゲノールA | ソヤサポゲノールB |
| 生大豆 | | |
| フクユタカ | 499 | 899 |
| サチユタカ | 870 | 1071 |
| タマホマレ | 983 | 1667 |
| 豆腐 | 60 | 104 |
| 味噌 | 61 | 163 |
| 煮豆 | 62 | 181 |

（*注意）本測定結果は一例であり、大豆及び大豆加工品一般の分析結果ではない。

6. 分析上の留意、注意点

HPLC 注入サンプルに流動パラフィンが入らないように注意する。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1) Tsukamoto, C. et al., J. Agric. Food Chem. 43, 1184-1192 (1995)

— 以上 —