

# オタネニンジン酒のサポニンの簡易定量法の開発

## Development of a simple assay for saponin in ginseng liquor

会津若松技術支援センター 醸造・食品科 菊地伸広 齋藤啓太

オタネニンジン酒を漬けた酒類の仕上がり指標とするため、酒中のサポニンを定量した結果、ギンセノシド Rb<sub>1</sub>、Rc、Re、Rg<sub>1</sub> が検出され、特にギンセノシド Rg<sub>1</sub> が多く含まれていることが分かった。簡易定量法として、サポニンの糖鎖部分を測定するフェノール硫酸法を検討したところ、漬け込み期間や使用原料に影響を受ける可能性があったが、HPLCでの定量と比較し8割程度の値となり、安価・簡便に定量できることが分かった。

**Key words:** オタネニンジン、サポニン、ギンセノシド、フェノール硫酸法

## 1. 緒言

オタネニンジン酒は疲労回復・滋養強壮等の効果があるとされ、古くから珍重されている。江戸時代には会津藩でも養蚕や漆などとともに価値のある農産物に位置づけられており、人参奉行所を置き、専売制とすることで、生産を奨励していた。会津地方は全国でも数少ない産地であり、近年、漢方薬や薬膳料理としての活用が再注目され、福島県立医科大学会津医療センターには漢方内科・外科が設置された他、県内事業者による6次化商品販売や飲食店でのイベントなども活発に行われている。

応募企業においても、オタネニンジン酒を酒類に漬けた商品の開発を行っている。オタネニンジンには薬用効果の主要成分であるギンセノシドと総称されるサポニンが含まれている。

本研究では、サポニンに着目し、漬け込みの仕上がり指標とすることができるか検討した。また、定量には高速液体クロマトグラフ (HPLC) などの機器やそれを取り扱う技術が必要なため、応募企業単独で分析が可能となるよう簡易定量方法についても検討した。

## 2. 実験

### 2. 1. サポニンの定量

#### 2. 1. 1. 試料

原料となる酒類や添加物、オタネニンジン酒の状態(大きさや乾燥などの加工の有無)が異なる9試験区で小仕込みを行い、仕込み1か月後にサンプリングしたもの(応募企業提供、レシピ非公表)を試料とした。

#### 2. 1. 2. 測定方法

アルコール濃度が5[%]以下になるように試料を希釈し、固相抽出カートリッジ(Agilent Technologies製, Bond Elut C18, 500[mg], 6[mL])に2[mL]注入し、サポニンをカートリッジの充填剤に保持させ、2[%]アセ

トニトリル 2[mL]で洗浄して夾雑物を除去した。保持させたサポニンはアセトニトリルを用いて溶出させ、10[mL]に定容して、測定試料とした。

測定は、表1の条件でHPLC(Agilent Technologies製, infinity1260)で分離し、質量分析<sup>1)</sup>により定量した。

サポニンは、オタネニンジンに含まれる主要構成要素とされるギンセノシド Rb<sub>1</sub>、Rc、Re、Rg<sub>1</sub> 及び本条件で同定できた Rd を定量した。Rb<sub>1</sub> と Rg<sub>1</sub> は富士フィルム和光純薬(株)、Rc は関東化学(株)、Rd と Re は東京化成工業(株)の試薬を標品として使用した。

表1 分析条件

HPLC:Agilent 1260 infinity II

使用カラム:Agilent ZORBAX C18 (2.1×50[mm])

カラム温度:40[°C]

溶離液:0.1[%]ギ酸aq/ACN=95/5

25分までにACN 5→60

流速0.3[mL/min]

検出器:Agilent Ultivo LC/TQ

### 2. 2. 簡易定量法の開発

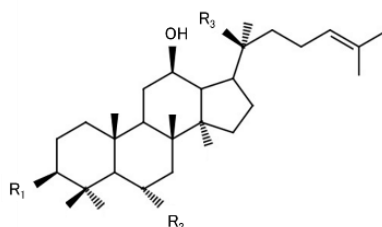
#### 2. 2. 1. 試料の前処理

試料の前処理は2.1.2.と同様に行った。ただし、HPLCで定量した結果から、含まれるサポニン総量を推定し、2.5倍希釈になるよう調整した。

#### 2. 2. 2. フェノール硫酸法

簡易定量法として、フェノール硫酸法を検討した。糖タンパク質などに含まれる糖の定量法として汎用的に用いられる手法であり、フェノール中で硫酸により糖鎖を加水分解し、生じたフルフラールを比色定量する方法である。サポニンは図1のとおり、糖が複数結

合しているため、小仕込みで添加した糖類などの夾雑物を除去することができればフェノール硫酸法を適用できる。測定は向井ら<sup>2)</sup>の方法に準じた。



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Rb <sub>1</sub>	O-Glc(2-1)Glc	H	O-Glc(6-1)Glc
Rc	O-Glc(2-1)Glc	H	O-Glc(6-1)Ara
Rd	O-Glc(2-1)Glc	H	O-Glc
Re	OH	O-Glc(2-1)Rha	O-Glc
Rg <sub>1</sub>	OH	O-Glc	O-Glc

Glc : glucose, Rha : rhamnose, Ara : arabinose

図1 ギンセノシドの構造式

### 3. 結果及び考察

#### 3. 1. サポニンの定量

試料中のギンセノシド構成比を図2に示す(漬け込み途中の試作品であるため定量値は非公表)。仕込んでから1か月後のサポニン総量は20~90[mg/L]で試験区により差があるが、どの試験区もギンセノシド Rg<sub>1</sub>が最も多く含まれていたほか、オタネニンジンサポニンの主要構成要素であるギンセノシド Rb<sub>1</sub>、Rc、Reが漬け込みにより試料中に抽出されていた。なお、日本薬局方<sup>3)</sup>ではオタネニンジンの生薬の規格としてギンセノシド Rg<sub>1</sub>が0.1[%]以上、Rb<sub>1</sub>が0.2[%]以上含むものとしている。

使用した原料によりギンセノシドの構成比が異なることや、漬け込み期間が長くなることで構成比が変化する可能性があるが、最も多いギンセノシド Rg<sub>1</sub>がサポニン総量が仕上がりの指標として有効と考えられた。

#### 3. 2. 簡易定量法の開発

グルコースとギンセノシド Rd のフェノール硫酸法での検量線を図3に示す。精度よく良好な検量線が得られた。また、傾きに大きな差はみられず、フェノール硫酸法による簡易定量法では安価なグルコースを標品として検量線を作成できることが分かった。各ギンセノシドの標品を用いてフェノール硫酸法で検量線を比較したが、傾きに大きな差は見られなかった(データ省略)。

簡易定量法で測定した結果と HPLC を用いて定量した結果の比較を図4に示す。5試験区で80~100[%]の

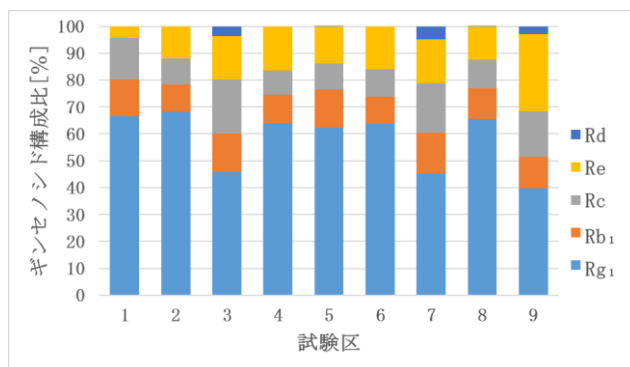


図2 ギンセノシド構成比

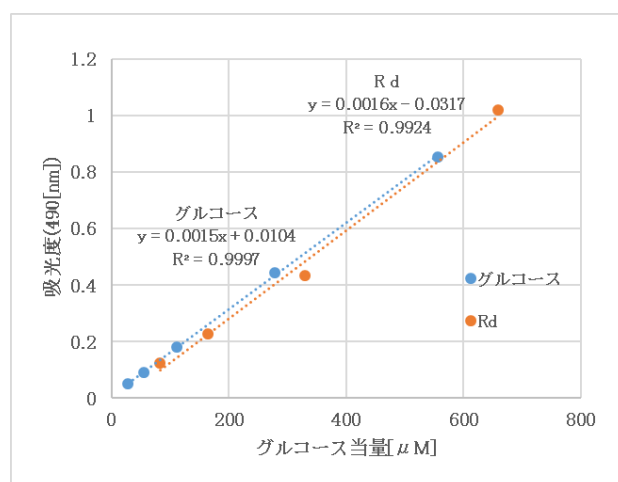


図3 簡易定量法の検量線

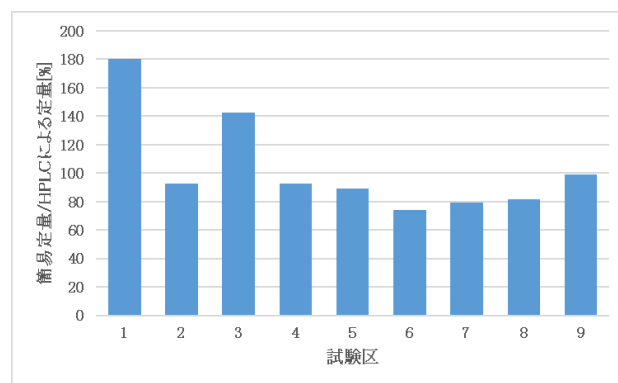


図4 簡易定量法とHPLCによる定量の比較

間になり、今回検討した前処理方法では定量した5種類のギンセノシドをサポニン総量とした場合、試料中のサポニンの8割程度を回収することができた。一方で、2試験区において、簡易定量法での結果がHPLCでの定量値以上の値となった。

簡易定量法はサポニンに結合している糖からサポニン総量を推定する方法のため、5種類のギンセノシドだけを定量したHPLCでの結果と比較して、値が高くなると予想していたが、値が高くなったのは2試験区のみであり、7試験区でHPLCでの値を下回っていた。フ

フェノール硫酸法の測定範囲内に濃度を調節するためには、試料の濃縮が必要となるが、固相抽出カートリッジを用いた簡便な前処理ではアルコールの除去のために希釈が必須であることから、試料の濃縮に限界がある。今回の前処理方法では濃度を確保するために充填剤の十分な洗浄が行えず、サポニンが回収しきれなかった可能性が考えられた。仕込み期間が長くなり抽出されるサポニンが増加すれば、試料の濃縮が行いやすくなり、回収率が改善できる可能性がある。

また、試験区1と3については定量した5種類のギンセノシド以外のサポニンが多く含まれていた可能性が考えられた。サポニンは基本骨格のサポゲニンに糖が結合した構造を持ち、約40種類の類縁化合物が発見されている。今回、同定・定量していないが、ギンセノシド Rg<sub>3</sub>と思われるピークも検出されていたため、原料によってギンセノシドの構成に差がある可能性があった。

#### 4. 結言

オタネニンジン酒類に漬け込んだ試作品のサポニンを定量した結果、ギンセノシド Rg<sub>1</sub> が最も多く含まれていた他、Rb<sub>1</sub>、Rc、Re が含まれていた。使用した原料によりギンセノシドの構成比が異なることや、漬け込み期間が長くなることで構成比が変化する可能性があるが、最も多いギンセノシド Rg<sub>1</sub> かサポニン総量が仕上がりの指標として有効と考えられた。

サポニン総量を測定する簡易定量法としてフェノール硫酸法を検討した。ギンセノシド類と比較してグルコースを使用した検量線でも精度よく検量線を作成することができた。また、試料を簡易定量法で測定した結果、漬け込み期間や使用原料に影響を受ける可能性があったが、HPLCでの定量と比較し8割程度の値となり、簡易定量法として適用できることが分かった。このことから、簡易定量法は、応募企業単独で分析できる安価・簡便な手法と考えられた。

#### 参考文献

- 1) 一般財団法人材料科学技術振興財団. “高麗人参生薬成分の LC/MS/MS 分析”. 分析事例 C0304, 2013-06-28. <https://www.mst.or.jp/casestudy/tabid/1318/pdid/85/Default.aspx>
- 2) 向井俊博. “茶種子サポニンの簡易定量法”. 茶業研究報告. 1992, 第75号. p.29-31.
- 3) 厚生労働省. 第十八回改正日本薬局方. 2020, p.2018-2021.