

# 薄層クロマトグラフィー(TLC)による *Allium* 属植物中のサポニンの分析

望月恵美子 山本敬男

Thin Layer Chromatography of Saponin in Selected *Allium* Plants

Emiko MOCHIZUKI and Takao YAMAMOTO

サポニンとは古くより知られている植物中の生理活性成分であるが、界面活性作用(起泡性)、溶血活性、魚毒活性、抗真菌活性等が知られている。構造的には、アグリコンの炭素数30個を基本とするトリテルペンサポニンと炭素数27個を基本とするステロイドサポニンに分類される。

近年、数種のアリウム属植物にガン予防効果があることが実験的に確かめられ、有効成分の一つとしてステロイドサポゲニンである Laxogenin (ラッキョウに含まれるサポニンのアグリコン) が同定されている<sup>1)</sup>。一方、ニンニクは古来より、滋養強壮、香辛料として使用されてきたが、動脈硬化や抗ガン効果が報告され、近年では、植物エストロゲンを含む植物としても知られている<sup>2)</sup>。ニンニク中のサポニンとしては、Proto-eruboside B, Eruboside B, Sativoside B, Sativoside R1, Sativoside R2, Sativoside C などの構造が明らかにされており<sup>3~5)</sup>、なかでも Proto-eruboside B はニンニクを代表するステロイドサポニンである。

ニンニク中のサポニンとその酸加水分解物であるサポゲニンの分析法については、薄層クロマトグラフィー(TLC) (以下、部会法)<sup>6)</sup>がある。しかし、その前処理方法は、煩雑で、迅速性、再現性に難があり、習熟を必要とする。そこで、今回ミニカートリッジを用いた簡易なクリーンアップと、簡便なサポゲニンの分解法について検討を行い、その結果を数種のアリウム属植物に適用し、分析法としての有用性を試みたので報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

アリウム属植物は、ニンニク (*Allium sativum* L.), ムシュウニンニク (俗称, *Allium ampeloprasum* L.), ギョウジャニンニク (*Allium victorialis* L.), タマネギ (*Allium cepa* L.), ラッキョウ (*Allium chinense* G. Don) の5種類を選択した。植物は山梨県内の農家より購入あるいは供与されたものを凍結乾燥して使用した。

### 2. 試薬

前処理用カートリッジカラム: Sep-Pak Plus C18, Sep-Pak Plus PS2 および Sep-Pak Vag (2g) C18 カートリッジ (Waters 社製)。あらかじめメタノールおよび水(あるいは30%メタノール)で順次洗浄して用いた。

薄層クロマトグラフィー(TLC)用プレート(20cm×20cm): キーゼルゲル60 (HPTLC アルミプレート) (メルク社製)。

展開溶媒: クロロホルム/メタノール/水 (6:4:1) (サポニン用), クロロホルム/メタノール (15:2) (サポゲニン用), 用時調製して用いた。

発色試液: p-アニスアルデヒド-硫酸 (p-アニスアルデヒド5ml, 硫酸5ml, 酢酸1ml, エタノール90ml)。10%硫酸。

試薬は、すべて市販特級品を使用した。

### 3. 装置

凍結乾燥機: 東京理化器械(株) FREEZE DRYER FD-5。

小型粉碎器: (株)白磁社 スリーベットカッター。

遠心分離機: 久保田製作所(株) KN-45。

超音波抽出装置: Branson 5510。

超音波発生装置付きホモジナイザー: ヤマト(株) Ultra-disperser LK-21。

Heating block: ヤマト(株) HEATING BLOCK Model HF-21。

### 4. 試験溶液の調製

#### サポニンの抽出

凍結乾燥した植物は小型粉碎器で粉末とし、15gを200-300mlなす型フラスコに秤量し、メタノール80mlを加え60℃で30分間還流抽出した。この操作を再度繰り返した後、全メタノール抽出液を合わせて減圧濃縮した。残留物に30%メタノールを加え、ろ過(ガラス繊維ろ紙, 1μm)後、Sep-Pak Vag (2g) C18 カートリッジに負荷し、30%メタノール200mlで洗浄後、メタノール

ル 10ml で溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残留物にメタノールを加えて定容して 2ml とした。その 1ml をとり減圧乾固した後、残留物にメタノール 0.5ml を加えて溶解し、サポニン用 TLC 試料溶液とした。残りの 1ml はサポゲニン用試料溶液とした。

### 希酸による加水分解

メタノール 1ml に溶かした試料を 5ml のリアクティブバイアルに移し、8% 硫酸を 1ml 加えた。Heating block 中で 100°C、3.5 時間加熱加水分解し、放冷後、水 20ml を入れたフラスコに移した。フィルターを通過後、Sep-Pak Plus PS2 カートリッジに負荷した。水 20ml、60%メタノール 10ml で順次洗浄後、メタノール 4ml でサポゲニンを溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残留物をメタノール 0.5ml に溶解してサポゲニン用 TLC 試料溶液とした。

## 5. サポニンとサポゲニンの TLC

試験溶液 3μl を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルプレートに塗布した。展開液で展開し、発色試薬を噴霧した後、120 °C のオーブンに 5 分間放置後、TLC プロフィールを比較した。10%硫酸を噴霧した場合は、紫外線照射灯で照射した。

## 結果及び考察

### 1. サポニンの抽出とクリーンアップ

サポニンの抽出とクリーンアップは、部会法<sup>6)</sup>をもとに Matsuura ら<sup>3,4)</sup>のニンニク、吉川ら<sup>7)</sup>の薬用人参、北川ら<sup>8)</sup>のダイズサポニンに関する報告を参考に検討した。

サポニンの抽出方法としては、これまで還流抽出法が多用されてきたが、室温でのホモジナイザー、振とう機、超音波発生装置を用いた抽出は、簡便で、短時間で処理

が可能であることから近頃繁用されている。そこで、還流抽出法、超音波発生装置付きホモジナイザーを用いた抽出法と超音波発生装置を用いた抽出法の 3 者の抽出率を比較した。凍結乾燥ニンニク粉末 5g にメタノール 80ml を加えて前日より攪拌放置したものを、それぞれ一回、以下のように抽出した。すなわち、還流抽出は沸騰後 30 分間還流し、超音波発生装置付きホモジナイザーを用いた場合は、10 分間抽出した。また、超音波発生装置を用いた抽出は 30 分間超音波抽出した。各々のメタノール抽出液を濃縮して試料量に対する残留物の重量 % で抽出率を比較したところ、抽出率は還流抽出 > 超音波発生装置付きホモジナイザー抽出 > 超音波発生装置抽出の順に低くなった (図 1)。還流抽出では、高温で長時間還流すると、抽出液が黄色く着色し、その後の操作の妨害となった。超音波発生装置付きホモジナイザーを用いた抽出法は簡便ではあるが、同時に試料を多数処理する場合には煩雑である。超音波発生装置付きホモジナイザーおよび超音波発生装置を用いた抽出は、簡便で操作性も良いが、遠心分離機を必要とする。そこで、今回は、抽出率、操作性、汎用性を考慮して、還流抽出法を採用した。

サポニンのメタノール抽出液は、目的物質以外に多くの筈雑物質を含んでいる。部会法<sup>6)</sup>および Matsuura ら<sup>3,4)</sup>はカラム精製法を採用し、充填剤として MCI-GEL CHP-20P を用いて筈雑物質を除去しているが、この方法はカラム調製が容易ではなく、煩雑である。そこで操作が簡便なクリーンアップ手段として、固相抽出カートリッジによるクリーンアップ操作を検討した。

ラッキョウ (生)、ニンニク (生) では炭水化物の含有量がそれぞれ、29.3%、26.3%と比較的多い (5 訂日本

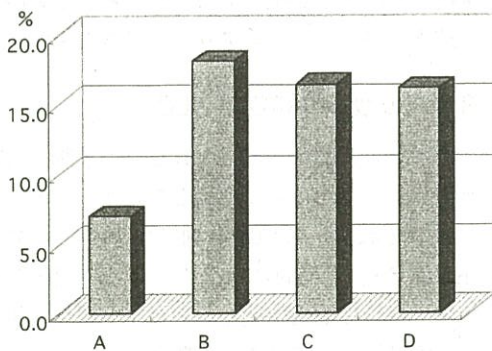


図 1 各種抽出法による抽出率の比較

- A: 常温攪拌放置 (16 時間)
- B: A + 還流抽出 30 分間
- C: A + 超音波発生装置付きホモジナイザー抽出 10 分間
- D: A + 超音波発生装置抽出 30 分間

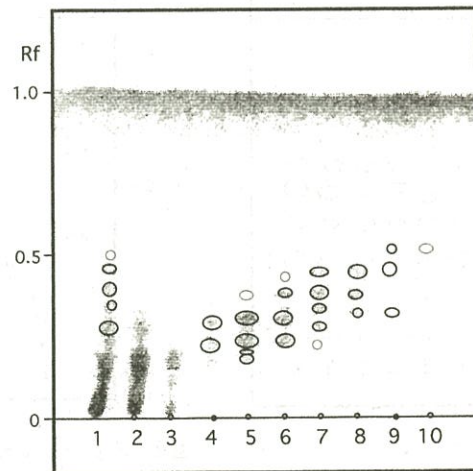


図 2 Sep-Pak C18 カートリッジからのサポニン (ムジュウニンニク) の溶出

- 1: 無処理 2: 水 3: 30%メタノール 4: 40%メタノール
- 5: 50%メタノール 6: 60%メタノール 7: 70%メタノール
- 8: 80%メタノール 9: 90%メタノール 10: 100%メタノール

標準食品成分表, 科学技術庁資源調査会編)。そこで, C18 カートリッジによる糖質と有色ビタミンの除去を検討した。Sep-Pak Plus C18 カートリッジに glucose 水溶液を負荷して水で溶出したところ, glucose は C18 カートリッジには全く吸着されなかった (負荷量: 4g)。また, ニンニク加工食品にしばしば配合されているビタミン B2 リン酸エステルも同様に検討したところ, 30%メタノールによる溶出が可能であった (負荷量: 0.5mg)。そこで, 今後加工食品を分析することも考慮して, glucose とビタミン B2 リン酸エステル双方の除去が可能な 30%メタノールによるクリーンアップを選択した。

次にメタノール濃度によるサポニンの溶出挙動を検討した。試料としては TLC プロフィールがニンニクより複雑なムシウニンニクを用いた。凍結乾燥ムシウニンニクのメタノール抽出液 1ml (粉末 5g に相当) を Sep-Pak Plus C18 カートリッジに負荷し, 水 15ml およびメタノール (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%) 各 10ml で順次溶出し, TLC で比較した。サポニンは水および 30%メタノールでは溶出されなかったが, 40%以上のメタノール濃度で徐々に溶出された (図 2)。サポニンはメタノール 2ml で 100% 溶出された。なお実際の試料のサポニン抽出液のクリーンアップには, 吸引装置を必要としない Vag カートリッジを用いることとした。

また, 試料によっては, サポニン抽出液を直接カートリッジに負荷したとき目詰まりを生じるものもあり, この場合には抽出液を適宜 30%メタノールで希釈し, メンブランフィルターを用いてろ過した後, カートリッジに負荷すれば, 目詰まり無くクリーンアップができることが判明した。

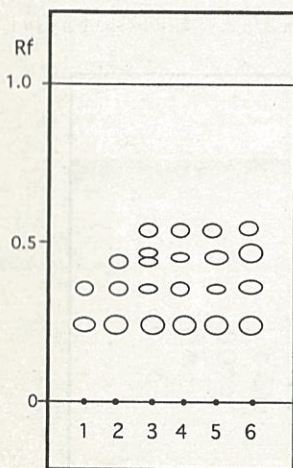


図 3 サポニンからサポゲニン(ムシウニンニク)への分解と分解時間

1: 2 時間 2: 2.5 時間  
3: 3 時間 4: 3.5 時間  
5: 4 時間 6: 4.5 時間

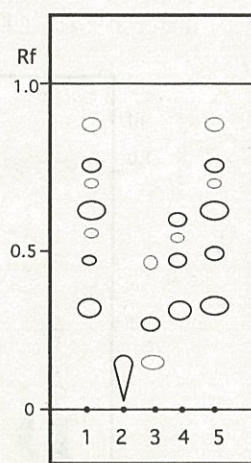


図 4 Sep-Pak PS2 カートリッジからのサポゲニン(ムシウニンニク)の溶出

1: ムシウニンニク(60%メタノール洗浄後, 100%メタノール溶出) 2: 60%メタノール  
3: 70%メタノール 4: 80%メタノール  
5: 90%メタノール

## 2. サポゲニンの加水分解条件と精製

サポゲニン分解については, 部会法<sup>9)</sup>, Smith degradation<sup>9~12)</sup> をもとに, Matsuura ら<sup>3,4)</sup>, 坂本ら<sup>13)</sup>, Morita ら<sup>14)</sup>, Mimaki ら<sup>15)</sup> の報告を参考に検討した。

サポニンからサポゲニンへの加水分解は, 還流分解法が多用されているが, 本法では, 厚手のホウケイ酸ガラス製の容量が小さいリアクティブバイアル(5 ml 容量)と Heating block を用いて加熱加水分解を行った。装置, 操作法が簡便でルーチン分析に向いていると考えられた。

サポゲニンの加水分解条件については, ムシウニンニクを試料として用いた。サポゲニンは, サポニンのメタノール溶液 1ml (凍結乾燥ムシウニンニク粉末 5g に相当) に等量の 8%硫酸を加え, リアクティブバイアル中で加熱, 加水分解を行って得た。分解温度については, 70°C から 100°C まで 5°C ずつ変化させて 16 時間放置して検討したところ, 85°C 以上であれば良好に分解することが判明した。また, 最適分解時間については, 100°C で, 2 時間から 6 時間まで 30 分ごとに加水分解の程度を調べたところ, 加水分解は 3 時間以上で, ほとんど終了することが確認されたことから, 100°C で 3.5 時間加水分解を行うこととした (図 3)。

サポゲニンのクリーンアップ手段としては, 酸アルカリ耐性の PS-2 カートリッジによるクリーンアップ操作を検討した。希酸で加水分解した液 (凍結乾燥ムシウニンニク粉末 5g に相当) に水 10ml を加えた溶液を PS-2 カートリッジに負荷し, メタノール (60, 70, 80, 90, 100%) 各 10ml で順次溶出した。サポゲニンは 60%メタノールでは溶出されなかったが, 70%以上のメタノール濃度で徐々に溶出された (図 4)。サポゲニンはメタノール 3ml で溶出することにより 100% 溶出された。なお試料によっては, サポゲニン抽出液を直接カートリッジに負荷したとき目詰まりを生じるものもあり, この場合には抽出液を適宜水で希釈し, デイスポーザブルの前処理フィルターを用いてろ過した後, カートリッジに負荷すれば, 目詰まり無くクリーンアップができた。

## 3. アリウム属植物の TLC

アリウム属植物からはそれぞれの植物に特有なサポニン, サポゲニンの TLC プロフィールが得られ, それぞれの植物を同定することができた (図 5, 6)。感度的にはサポニンに比較すると, サポゲニンは全般に低く, スポット量をサポニンの 2 倍量程度に増量する必要がある。

発色には, p-アニスアルデヒド-硫酸試液と 10%硫酸試液を用いた。p-アニスアルデヒド-硫酸試液の場合, アリウム属サポニンやサポゲニンは

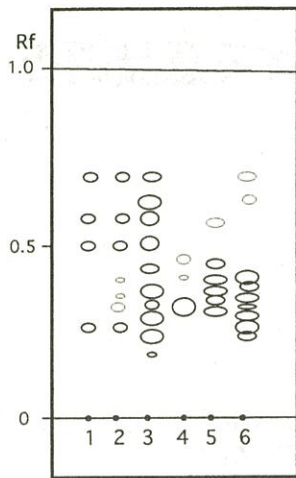


図5 *Allium* 属植物サポニンの TLC クロマトグラム

1: ニンニク(日本産) 2: ニンニク(中国産) 3: ムシュウニンニク 4: タマネギ 5: ラッキョウ 6: ギョウジャニンニク  
発色試薬: P-アニスアルデヒド- 硫酸

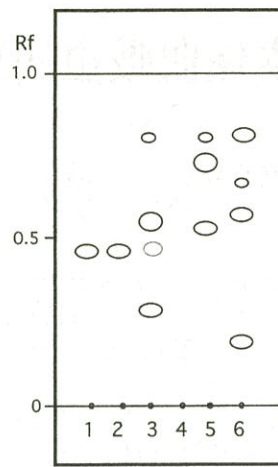


図6 *Allium* 属植物サポゲニンの TLC クロマトグラム

1: ニンニク(日本産) 2: ニンニク(中国産) 3: ムシュウニンニク 4: タマネギ 5: ラッキョウ 6: ギョウジャニンニク  
発色試薬: P-アニスアルデヒド- 硫酸

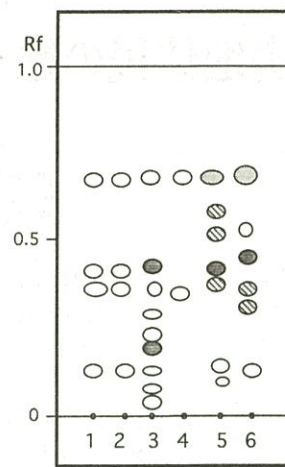


図7 *Allium* 属植物サポゲニンの TLC クロマトグラム

1: ニンニク(日本産) 2: ニンニク(中国産) 3: ムシュウニンニク 4: タマネギ 5: ラッキョウ 6: ギョウジャニンニク  
発色試薬: 10%硫酸(UV 照射)

加熱前は黄色、加熱後は緑色の色調のスポットが得られた。また、溶媒先端に溶出する $\beta$ -シトステロールのスポットは紫色(加熱後)を呈した。一方、10%硫酸試液を用いた場合は、10%硫酸噴霧後、UV 照射すると、種々の色調の蛍光スポットが得られ(図7)、両試液を併用して発色すると同定が容易であると考えられた。

以上、アリウム属サポニンの分析法として、サポニンと、サポニンの加水分解物であるサポゲニンに TLC を適用した。本法は、簡易な同定法として有用な手法であると考えられた。

今日、自然食品や健康食品に対する関心が高まり、各種ビタミンを含有する栄養補助食品や植物中の生理活性成分の作用を期待した健康食品の需要が年々増加し、クロレラ、ローヤルゼリー、アロエ、生薬含有製剤など多種多様な健康食品が市場に氾濫している。アリウム属植物を使用した健康食品のうち、ニンニクを素材とするニンニク健康食品の中には、ニンニク類似種の植物を原料として使用しながら、ニンニクの効能効果を謳っている場合があり、原料植物の判別が求められている。今後この分析法を市販製品に適用し、同定されたステロイドサポニンの種類から使用されているアリウム属植物を推定し、使用実態を調査する予定である。

## ま と め

アリウム属植物中の TLC によるサポニンとサポゲニンの分析法について検討した。

植物中からのサポニンの抽出には、還流抽出法を採用した。サポニンの精製には、C18 カートリッジによる方法が操作の迅速性と簡便性の点で有用であった。

サポゲニン分析は、リアクティブバイアルと Heating

block を用いることにより、分解時間を短縮できた。また、サポゲニンの精製には、酸アルカリ耐性の PS2 カートリッジを使用する方法が有用であった。

以上、本法は操作が簡便で、迅速な前処理が可能であることから、実用上十分使用できる方法であると考えられる。

## 文 献

- 1) Nishino, H. et al.: J. Kyoto Pref. Univ. Med., **99**, 1159~1164 (1990).
- 2) 山崎和雄: 食衛誌 **40**, J433~J439 (1999).
- 3) Matsuura, H. et al.: Chem. Pharm. Bull., **36**, 3659~3663 (1988).
- 4) Matsuura, H. et al.: Chem. Pharm. Bull., **37**, 2741~2743 (1989).
- 5) Koch, H. P.: Dtsch. Apoth. Ztg., **133**, 63~75 (1993).
- 6) 日本健康・栄養食品協会にんにく加工食品部会資料 (1997)
- 7) 吉川雅之ら: 薬学雑誌 **113**, 460~467 (1993).
- 8) 北川勲ら: 薬学雑誌, **104**, 275~179 (1984).
- 9) Abdel-Akher, M. et al.: J. Am. Chem. Soc., **74**, 4970~4971 (1952).
- 10) Hamilton, J. K. and Smith, F.: J. Am. Chem. Soc., **78**, 5907~5909 (1956).
- 11) Hamilton, J. K. and Smith, F.: J. Am. Chem. Soc., **78**, 5910~5912 (1956).
- 12) Smith, F. and Van-Cleve, J. W.: J. Am. Chem. Soc., **77**, 3091~3096 (1955).
- 13) 坂本征則, 森本一義, 田中治: 薬学雑誌, **95**, 1456~1461 (1975).
- 14) Morita, T. et al.: Chem. Pharm. Bull., **36**, 3480~3486 (1988).
- 15) Mimaki, Y., Kuroda, M. and Sashida, Y.: Nat. Med., **53**, 134~137 (1999).