



サポニンの比色定量法

岸原, 士郎
清水, 俊秀

(Citation)

兵庫農科大学・神戸大学農学部研究報告, 8(1):31-34

(Issue Date)

1967

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00171256>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00171256>



サポニンの比色定量法

岸原士郎・清水俊秀

Determination Method of Saponin by Colorimetry

Siro KISHIHARA and Toshihide SIMIZU

緒 言

液体アンモニアによるビート成分の抽出実験を行なっている際に、サポニンの定量法を確立する必要を生じた。

サポニンの定量法には重量法、溶血法、ハイアミン法、五塩化アンチモン法等がある。重量法¹⁾は塩酸酸性溶液で沈殿した柔毛状物質をエーテル抽出し、エーテル抽出物からエーテルを蒸発除去する。この乾燥物をさらに石油エーテルで抽出し、抽出残渣を乾燥秤量する。従って定量に多くの試料と時間が必要である。溶血法^{1),5)}はサポニンの溶血作用を利用したもので新鮮血液を必要とし、定量時間も長くなる。それらに対し、サポニンとハイアミンの呈色反応を利用したハイアミン法^{2),4),5)}およびサポニンと五塩化アンチモンの呈色反応を利用した五塩化アンチモン法^{3),4),5)}は他の定量法より比較的簡単に短時間で測定でき、再現性もよい。

そこで著者はサポニン酢酸溶液 1 ml に10%五塩化アンチモンクロロホルム溶液 7 ml を加えて室温に放置し、10分後に 535m μ で吸光度を測定し、あらかじめ調製した検量線よりサポニン量を求める五塩化アンチモン比色定量を試みたが、室温が低いときその発色度が不安定なことに気づき、この方法を追試して発色の条件を決定した。

実 験 方 法

0.02~0.25mg/ml のサポニン氷酢酸溶液 1ml に10%五塩化アンチモンクロロホルム溶液 7mlを加えて一定温度の水浴中で発色させた後、その溶液を1cmキューベットに入れ、対照液に蒸留水を用いて 535m μ で吸光度を測定する。その際、温度および時間が吸光度におよぼす影響を調べ最適発色温度および時間を求めた。

なお吸光度の測定には伊藤超短波株式会社の分光光電比色計 SPECTRO-5を使用した。

10% (V/V) 五塩化アンチモンクロロホルム溶液の調製³⁾

五塩化アンチモン 40ml (94.0 g) および三塩化アン

チモン 7.8 g (10mole% になる量) をクロロホルム360 ml (533 g) に溶解する。

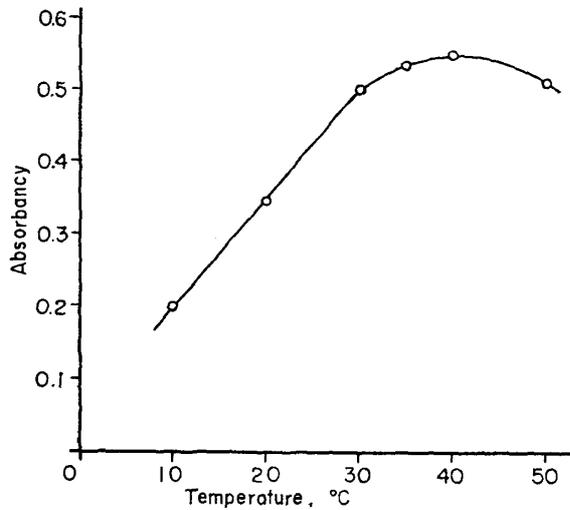
標準ビートサポニンの調製¹⁾

市販のサポニンには過剰の糖類を含有して五塩化アンチモンによる呈色が不規則なので次のようにして標準サポニンを調製した。

保存乾燥ビートコセット100 g を1 ℓ の水により、90°C で2時間浸漬する。コセットを分別し、分別したコセットについては前記の条件で再び浸出を繰返し先の浸漬液と合する。この浸漬液を濃塩酸で pH 1.5 にして90°C で1時間加熱しサポニンを沈殿させる。そのまま室温で一夜放置した後遠心分離し、沈殿物を pH 1.5 の塩酸で糖が消失するまで洗浄する。残渣を真空デシケータで乾燥した後熱エタノールに溶解し、不溶物を遠心分離して除去する。そのエタノール溶液を 50ml 以下に濃縮して 3 ℓ の pH 1.5 の塩酸中に注ぐ。生じた沈殿物をそのまま一夜放置した後遠心分離して集める。その沈殿物を真空デシケータ中で乾燥した後再び熱エタノールに溶解して濾過する。濾液を蒸発皿に移してエタノールを蒸発し、残渣を粉砕してここにビートトリテルペンを得る。このトリテルペンをソックスレー抽出器に採り、エーテルで十分に抽出する。抽出液を蒸発皿にとり溶媒を完全に蒸発除去した後、残渣を粉砕し再びソックスレー抽出器に採り、石油エーテルで十分に洗浄する。この石油エーテル不溶物を乾燥して標準ビートサポニンとする。

実験結果および考察

0.154mg/ml のサポニン酢酸溶液 1 ml に10%五塩化アンチモンクロロホルム溶液 7 ml を加えて10°Cおよび20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 50°Cの水浴中に放置し、10分後に 535m μ で吸光度を測定した結果を第1図に示した。吸光度は温度が低いとき小さく、40°Cで最高になり、さらに温度が高くなると低下している。すなわち40°C以下のとき10分間で発色が十分でなく、40°Cを越すと最高の発色より褪色していることがわかる。H. HÖRNING²⁾が

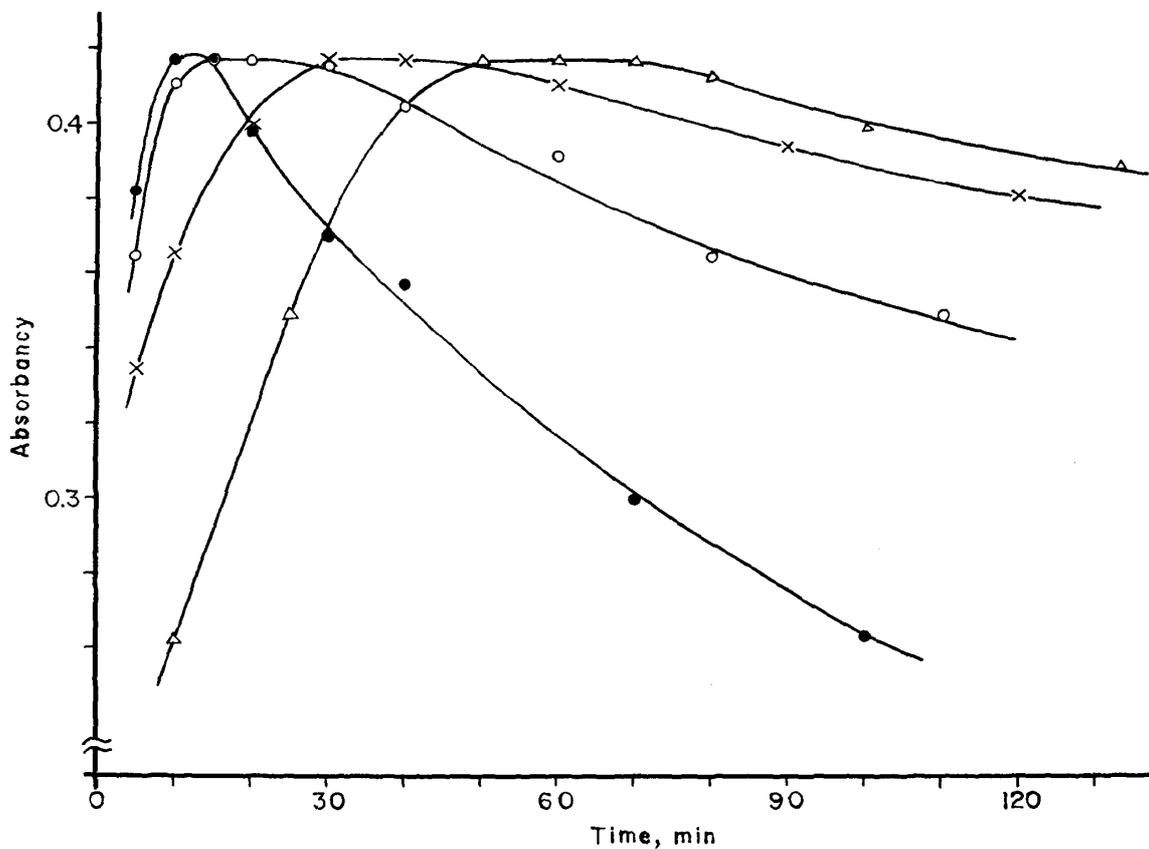


第1図 発色温度と吸光度の関係
(10分間発色)

検量線は毎日調製する必要があると報告しているが、これは温度により吸光度が異なるためと思われる。

0.124mg/ml のサポニン酢酸溶液を用いて、各温度における吸光度の経時変化を調べた結果を第2図に示した。吸光度の最高値は反応温度20°Cから40°Cの間で常に一定であるが最高値に達する時間は20°Cおよび30°C、35°C、40°Cにおいてそれぞれ、50分および30分、15分、10分である。その最高吸光度を持続する時間は20°Cおよび30°C、35°C、40°Cにおいてそれぞれ30分および20分、15分、5分である。褪色過程は20°Cおよび30°Cの場合ゆるやかであるが、40°Cの場合は急激である。全体的にみて温度が高いほど最高吸光度に達する時間が速かで褪色も早い。35°Cで発色させたとき最高吸光度に達する時間は比較的短かく、その褪色はゆるやかであるので、定量に際しては35°Cで15分間発色させるのが最も適当であることを認めた。

発色後の吸光度の安定性を増すために、各温度で最高の吸光度になった溶液（すなわち、20°Cで50分、30°Cで30分、35°Cで15分、40°Cで10分発色させた溶液）を20°C



第2図 発色時間と吸光度の関係

●—40°Cで発色, ○—35°Cで発色, ×—30°Cで発色, △—20°Cで発色

水浴および氷を浮べた水浴中に放置して、その吸光度と放置時間の関係を点綴すると第3図および第4図のようになった。20°C水浴中に放置したとき、その吸光度は30分間変化しない。氷浴中に放置したとき、その吸光度は非常に安定で2時間以上全く変化しない。故に発色後直ちに吸光度を測定できないときは呈色反応した溶液を氷浴中に放置するのが望ましい。

35°Cで15分間発色させたとき、サポニン濃度と吸光度の関係は第5図のようになった。濃度の極く薄い場合を除いて濃度と吸光度の間に直線関係が得られた。この曲線を検量曲線として未知濃度のサポニンを定量することができる。この検量曲線にもとづいて、吸光度(D)からサポニン濃度(Cmg/ml)を求める式を導くと、

サポニン濃度が 0.10mg/ml~0.25mg/ml (吸光度が 0.3~1.0) のとき

$$C = 0.217 D + 0.033$$

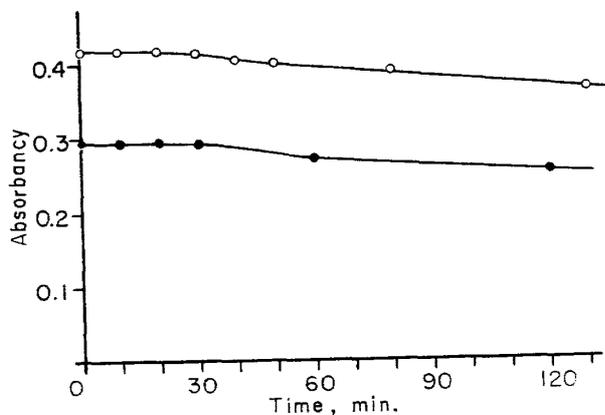
サポニン濃度が 0.10mg/ml以下 (吸光度が0.3以下) のとき

$$C = \frac{D - 0.025}{1.7 + 3.7D}$$

が得られた。

要 約

H. G. WALKER³⁾ の五塩化アンチモンによるサポニンの比色定量法を20°Cおよび30°C, 35°C, 40°C水浴中で発色後、その呈色溶液を 1cm キュベットに入れ、対照液に蒸留水を用いて 535m μ で吸光度を測定した結果、それぞれの最高吸光度に変化はないが最高吸光度に達する時間はそれぞれ50分、および30分、15分、10分であり、その最高吸光度を保っている時間はそれぞれ30分および20分、15分、5分であった。故にこの方法でサポニンを



第3図 発色後の吸光度の安定度 (20°C水浴中に放置したとき)
 ○ サポニン濃度 0.125mg/ml
 ● サポニン濃度 0.095mg/ml

定量するときには色形成は比較的早く、褪色過程のゆるやかな35°C水浴中で15分間発色させるのが適当である。また発色後氷を浮べた水浴中に放置すると色相は非常に安定で2時間以上吸光度は変化しないことを認めた。さらに F. G. Eis 等¹⁾の方法で調製したビートサポニンを用いて得られた検量曲線にもとづいて吸光度(D)とサポニン濃度(C mg/ml)の関係式

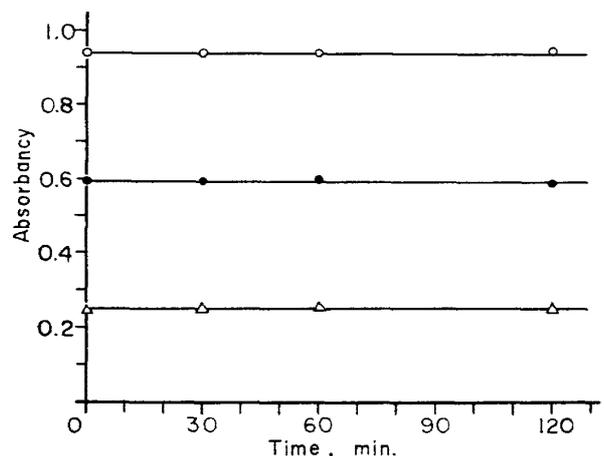
$$C = 0.217D + 0.033 \quad (D = 0.3 \sim 1.0)$$

$$C = \frac{D - 0.025}{1.7 + 3.7D} \quad (D < 0.3)$$

を導いた。

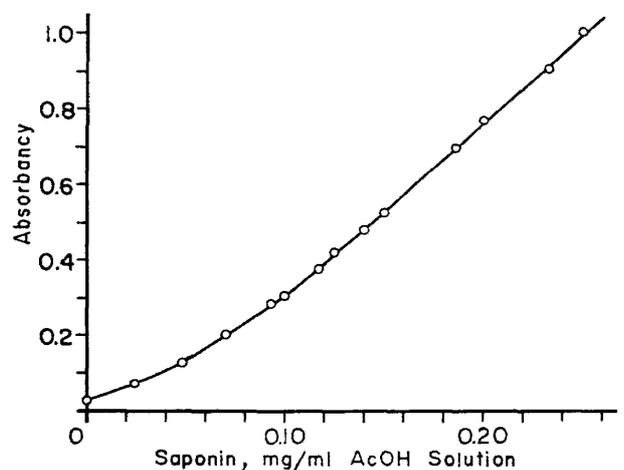
終りに臨み、本研究を行なうにさいし、試料のビートを提供していただいた台糖株式会社道南製糖所に深甚の謝意を表します。

(農産化学機械学講座 昭和42.8.31受理)



第4図 発色後の吸光度の安定度 (氷浴中に放置したとき)

○ サポニン濃度 0.24 mg/ml
 ● サポニン濃度 0.165mg/ml
 △ サポニン濃度 0.083mg/ml



第5図 検量曲線

参 考 文 献

- 1) F. G. EIS, L. W. CLARK, R. A. MCGINNIS and P. W. ALSTON : Ind. Eng. Chem., **44**, 2844~2848 (1952)
 2) J. R. JOHNSON and M. R. DIEHL : J. Am. Soc.

Sugar Beet Technol., **9**, 221~225 (1956)

- 3) H. G. WALKER, JR. : J. Am. Soc. Sugar Beet Technol., **9**, 233~237 (1956)
 4) H. HORNING : Z. Zuckerind., **7**, 179~180 (1957)
 5) 精糖技術研究会 : 製糖便覧, 256 (1962) (朝倉)

Summary

Various methods to determine saponin have been proposed by many authors up to the present. The antimony pentachloride method developed by H. G. Walker³⁾ is one of these quantitative determination methods and may be accomplished briefly by colorimetry.

It was found that in the Walker's method the color development was not sufficient sometimes by 10 minutes according to the original, especially when the room temperature was low. When the color reactions were carried out dipping in water bath at the temperature of 20°C, 30°C, 35°C and 40°C, the time lengths needed to reach the maximum absorbancy were 50 minutes, 30 minutes, 15 minutes and 10 minutes, respectively, and the maximum absorbancy gave same value and it maintained unchangeably for 30 minutes, 20 minutes, 15 minutes and 5 minutes, respectively. The color formed at 20°C, 30°C, 35°C and 40°C was practically unchanged 30 minutes at 20°C and over 2 hours in ice bath.

As a result, we proposed the modified method of Walker as follows:

"1 ml of saponin solution in glacial acetic acid is pipetted into a test tube and 7 ml of 10% (V/V) antimony pentachloride solution in chloroform is added. After the tube is dipped in 35°C water bath for 15 minutes, the solution is transferred to the cuvette of 1cm layer and its absorbancy is read at 535 m μ on a colorimeter, using distilled water as the reference liquid. Using standard sugar beet saponin prepared by the method according to F. G. Eis, etc¹⁾, the standard curve was obtained and the following equations were derived from the standard curve.

$$C = 0.217 D + 0.033 \quad (D = 0.3 \sim 1.0)$$

$$C = \frac{D - 0.025}{1.7 + 3.7D} \quad (D < 0.3)$$

C = saponin content in a sample solution, mg/ml

D = absorbancy of color development at 535 m μ

Saponin content in a glacial acetic acid solution can be calculated by the equations."

(Laboratory of Agricultural Chemical Engineering, Received Aug. 31, 1967)