高速液体クロマトグラフィーによる 食用キノコの有機酸の分析法

数野千恵子*・西島基弘**・天川映子**・坂井千三**・鴨居郁三*

Determination of Organic Acids in Edible Mushrooms by High Performance Liquid Chromatography

Chieko KAZUNO*, Motohiro NISHIJIMA**, Eiko AMAKAWA**.
Senzo SAKAI** and Ikuzo KAMOI*

* Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture
Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156

** The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health,
Shibazaki-cho, Tachikawa, Tokyo 190

A high performance liquid chromatographic method (HPLC) was developed for the determination of organic acids (oxalic, tartaric, formic, α -ketoglutaric, lactic, acetic, citric, pyroglutamic, succinic and fumaric) in edible mushrooms. Organic acids were extracted with hot water. The solution was applied to a DEAE-sephadex A-25 column (borate type 20 mm i. d. $\times$ 50 mm). The column was washed with 100 ml of water, and organic acids were eluted with 0.1 N hydrochloric acid. Organic acids were separated by HPLC on a column packed with KC-811 (8 mm i. d. $\times$ 300 mm) by using 0.1% phosphoric acid solution as a mobile phase, and on a column packed with ULTRON N-C₁₈ (4.6 mm i. d. $\times$ 50 mm) by using 0.1 M potassium phosphate, monobasic, solution (pH 2.2) as a mobile phase with detection at 210 nm. The recoveries of organic acids on DEAE column chromatography at levels of 75 to 1 000 μ g were in the range from 80% to 110%. By using this method six commercial samples were analyzed. Eleven kinds of organic acids were identified. There were remarkable differences in the distribution patterns of organic acid compositions among the different species of edible mushroom.
(Received May 28, 1986)

食用キノコ類の有機酸は呈味成分としても重要でありすでに 10 種類以上が報告されている。これら有機酸の分析にはカルボン酸分析計¹⁾あるいはガスクロマトグラフィー²⁾³⁾で定量する方法が用いられている。カルボン酸分析計は機器の普及率から、やや特殊であり、ガスクロマトグラフィー (GLC) は試験溶液の調製法が煩雑である。

また食品中の有機酸分析法は、カルボン酸分析計を用いた方法⁴⁾及び GLC^{5)~8)}の他に液体クロマトグラフィー (HPLC)^{9)~28)}等が報告されているが、対象となる有機酸の種類が少ないことから、それらの方法は適用し難

い。そこで著者らは、すでにキノコ類から見出されている²⁾²⁹⁾³⁰⁾ 11 種類の有機酸の HPLC による同時分析を目的として検討した。また本法を用いて、いくつかのキノコ類に含まれる有機酸の分析に適用したので、その結果を報告する。

実 験 方 法

1. 試料

1986 年 1~2 月に東京で市販されていた *Agaricus bisporus* (Tsukuritake), *Grifola frondosa* (Maitake), *Lyophyllum ulmarium* (Shirotamogitake), *Pleurotus*

* 東京農業大学 (〒 156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1)

** 東京都立衛生研究所 (〒 190 東京都立川市柴崎町 3-16-25)

ostreatus (Hiratake), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Pholiota nameko* (Nameko), *Flammulina velutipes* (Enokitake) を購入し、当日ただちに可食部のみを均一化し、分析に供した。

2. 試薬

(1) 有機酸標準溶液の調製

酒石酸, ギ酸 (ギ酸ナトリウムを使用), L-リンゴ酸, 酢酸 (酢酸ナトリウム), クエン酸, コハク酸は 20 mg/ml, ピログルタミン酸, 乳酸 (乳酸ナトリウム) は 3 mg/ml, シュウ酸, α -ケトグルタル酸は 1.5 mg/ml, フマル酸は 0.3 mg/ml の水溶液 となるように調製したものを標準原液とし、適宜希釈したものを、標準溶液とした。

(2) 前処理用充てん剤

DEAE-セフデックス A-25 (Pharmacia Fine Chemicals 社製) を 0.5% アンモニア水に一夜浸漬し、洗液が中性になるまで水洗した。さらに 0.5 N ホウ酸水溶液に一夜浸漬し、洗液が中性になるまで水洗したものをを用いた。

3. 器具及び装置

(1) 前処理用カラム管

内径 20 mm 高さ 300 mm のガラスカラム管

(2) 高速液体クロマトグラフ

日本分光工業 (株) 製 Twinkle, 紫外検出器, 同社 Uvidec 100-III

4. 試験溶液の調製

試料を細切またはホモジナイズ後、その 10 g を秤取し水 50~80 ml を加え、さらに水酸化ナトリウムを加えて微アルカリ性とした後、沸騰水中で時々振り混ぜながら 20~30 分間放置した。冷後、水を加えて 100 ml とした後、遠心分離 (3000 rpm, 10 min) した。上澄液 30 ml をあらかじめ調製した前処理用カラムに注入した。次いで水 100 ml を流し、洗浄した後、0.1 N 塩酸を用いて有機酸を溶出した。溶出液は、初めの 30 ml を捨て、次いで 30 ml を分取し、さらに 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを、HPLC 用試験溶液とした。

5. HPLC 条件

(1) 充てん剤 1: KC-811, 8 mm i.d. $\times$ 300 mm (昭和電工 (株) 製), 移動相: 0.1% リン酸, カラム温度: 60°C (水浴中), 流量: 0.5 ml/min, 検出波長: 210 nm。

(2) 充てん剤 2: ULTRON N-C₁₈ 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm (信和化工 (株) 製), 移動相, 0.1 M リン酸一カリウム, pH 2.2, カラム温度, 20°C (水浴中), 流量 0.6 ml/min, 検出波長, 210 nm。

6. 定量

試験溶液 10 μ l を液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムから、対応する標準物質の同時に作成した検量線により、それぞれの値を定量した。

結果及び考察

1. HPLC 条件

11 種類の有機酸を同時分析する 目的で、HPLC 用充てん剤のうち KC-811, ULTRON N-C₁₈ 及び Unisil QC₁₈ (ガスクロ工業 (株) 製) について比較検討した。なお ULTRON N-C₁₈ は実験方法 5(2) の条件の他に、移動相の pH を 3.2 に調製したものをを使用した。Unisil QC₁₈ は、移動相を 0.05 M リン酸 (pH 2.5) 及び硫酸水素テトラ-*n*-ブテルアンモニウム (TBAHS, pH 2.0) とし、いずれもカラム長さ 4.6 mm i.d. $\times$ 250 nm, カラム温度, 室温, 流量 0.8 ml/min, 検出波長 210 nm, 注入量 10 μ l で分析した。

(1) KC-811

充てん剤として KC-811 を用いた場合、11 種類の有機酸のクロマトグラムは、Fig. 1 に示したとおりいずれも良好な相互分離が得られた。しかし Fig. 1 のように、それぞれのピークが、ほぼ同程度の場合には良好であるが、キノコに適用した場合、当然のことではあるが各ピークに大小がみられる。Fig. 2 にはエノキタケ抽出物のクロマトグラムを示したが、フマル酸の大きなピークが出現しており、このピークの直後に存在するギ酸

Fig. 1 High performance liquid chromatogram of the authentics

1. Oxalic acid, 2. α -Ketoglutaric acid,
3. Citric acid, 4. Tartaric acid, 5. Malic acid, 6. Succinic acid, 7. Lactic acid,
8. Fumaric acid, 9. Formic acid,
10. Acetic acid, 11. Pyroglutamic acid

Conditions; column: KC-811 8.0 mm $\times$ 300 mm, column temperature: 60°C, mobile phase: 0.1% phosphoric acid, UV detector: 210 nm

Fig. 2 High performance liquid chromatogram of *Flammulina velutipes* extract

1. Oxalic acid, 2. α -Ketoglutaric acid,
3. Citric acid, 4. Tartaric acid, 5. Malic acid,
6. Succinic acid, 7. Lactic acid,
8. Fumaric acid, 10. Acetic acid,
11. Pyroglutamic acid

Conditions; column: KC-811 8.0 mm $\times$ 300 mm, column temperature: 60°C, mobile phase: 0.1% phosphoric acid, UV detector: 210 nm

のピークは確認できなかった。その他のキノコの抽出物に適用した場合も、ギ酸はフマル酸のピークと分別できなかった。ギ酸とフマル酸が同一濃度の場合、210 nmにおける吸収がフマル酸の方が約100倍強いことから、この様な現象が生じたものである。しかし、キノコ類のフマル酸とギ酸の含有量からみて、フマル酸の定量値には、ギ酸はほとんど影響を与えないと考える。従ってギ酸を対象としない場合は、この充てん剤で同時分析が可能であったが、ギ酸を目的とする場合は、本条件下では適用できなかった。

(2) ULTRON N-C₁₈

i) 移動相 リン酸一カリウム (pH 2.2): 充てん剤として ULTRON N-C₁₈ を使い、移動相を 0.1 M リン酸一カリウム、その pH を 2.2 とした場合の有機酸混合溶液のクロマトグラムを Fig. 3 に、今回対象としたキノコ類のうちエノキタケ抽出物のクロマトグラムを Fig. 4 に示した。KC-811 では確認不能であったギ酸のピークが出現し、定量可能となった。このギ酸のピークは、その前後の酒石酸やリンゴ酸のピークに比較して、

Fig. 3 High performance liquid chromatogram of the authentics at pH 2.2

1. Oxalic acid, 2. Tartaric acid,
3. Formic acid, 4. Malic acid,
5. α -Ketoglutaric acid, 6. Lactic acid,
7. Acetic acid, 8. Citric acid,
9. Pyroglutamic acid, 10. Succinic acid,
11. Fumaric acid

Conditions; column: ULTRON N-C₁₈ 4.6 mm $\times$ 150 mm, column temperature: 20°C, mobile phase: 0.1 M potassium phosphate, monobasic, UV detector: 210 nm

ややブロードのピークであるが、検量線は直線性を示し定量可能であった。しかし Fig. 3 から分る通り、シュウ酸、酒石酸、ギ酸、リンゴ酸、酢酸はそれぞれ単一のピークを与えるが、 α -ケトグルタル酸と乳酸、クエン酸とピログルタミン酸、フマル酸とコハク酸は分離できなかった。

ii) 移動相 リン酸一カリウム (pH 3.2): 移動相の pH を 2.2, 2.5, 2.7, 2.9, 3.2, 3.9, 4.0, 4.5 と変化させ検討したところ、pH 3.2 を用いると 2.2 ではフマル酸と分離できないコハク酸、ピログルタミン酸と分離できないクエン酸が単一のピークとして確認できた。しかし α -ケトグルタル酸と乳酸、フマル酸とピログルタミン酸が分離できず、かつ各ピークの相互分離も悪かった。しかし、カラム充てん剤として ULTRON N-C₁₈ のみを使用する場合は、移動相を 0.1 M リン酸一カリウムとして pH 2.2 及び 3.2 でクロマトグラフィーを行うことにより、11 種類の有機酸は定量可能であった。

iii) カラム温度: 各 pH につき 15, 20, 30, 40, 50°C とカラム温度を変化させ検討した。15 及び 20°C では各有機酸の相互分離は、ほぼ同様であるが、30°C 以上

Fig. 4 High performance liquid chromatogram of *Flammulina velutipes* extract at pH 2.2

1. Oxalic acid, 2. Tartaric acid,
3. Formic acid, 4. Malic acid,
5. α -Ketoglutaric acid, 6. Lactic acid,
7. Acetic acid, 8. Citric acid,
9. Pyroglutamic acid, 10. Succinic acid,
11. Fumaric acid

Conditions; column: ULTRON N-C₁₈ 4.6 mm $\times$ 150 mm, column temperature: 20°C, mobile phase: 0.1 M potassium phosphate, monobasic, UV detector: 210 nm

は温度の上昇に伴い分離が悪くなった。そこでカラム温度は20°Cで行うことにした。

(3) Unisil QC₁₈

Unisil QC₁₈ は、移動相として用いられるもののうち有機酸に適用できると思われる0.05 M リン酸 (pH 2.5) 及び硫酸水素テトラ-*n*-ブテルアンモニウム (TBAHS, pH 2.0) について検討した。pH, カラム温度等についても種々検討したが、移動相として0.05 M リン酸を用いた場合、シュウ酸、酒石酸、ギ酸、リンゴ酸、酢酸、コハク酸、フマル酸は単一ピークが得られた。しかし α -ケトグルタル酸と乳酸、クエン酸とピログルタミン酸は、分離できなかった。

移動相として TBAHS を用いた場合、シュウ酸、酒石酸、ピログルタミン酸は単一のピークを与えたが、他

の有機酸の相互分離は悪かった。

以上、今回対象とした11種類の有機酸は充てん剤として KC-811 (移動相0.1% リン酸), ULTRON NC₁₈ (移動相0.1 M リン酸-カリウム pH 2.2 及び3.2) を併用すると満足すべきピークが得られることが分った。

2. 試験溶液の調製

すでにキノコ類の有機酸を測定するための試験溶液の調製法として吉田ら²⁾の方法が知られている。この方法は遊離糖、遊離糖アルコールをもカラムで分別するため3回のカラムクロマトグラフィーを行っている。著者らは目的を有機酸のみとし、かつ対象をキノコ類として、簡易な方法を作製すべく検討した。すなわち有機酸は分子内にカルボキシル基を持つことから、クリーンアップはアンバーライト CG 400 や DEAE-セファデックスの様な陽イオン交換能を有するカラムを用い、まず有機酸をカラムに吸着させ、洗浄後、酸で溶離する方法について、妨害物の除去及び回収率に留意しながら、カラムの処理方法、溶離溶媒等の条件を検討した。その結果、DEAE-セファデックス A-25 を用い、実験方法2(2)で述べた方法でホウ酸型にすると良い事がわかった。またカラムは、直径20 mm のカラム管を使用した本法に従った場合、添加回収率及び妨害物の除去の点で、高さは50 mm で十分であった。

なお、キノコ抽出物のクロマトグラム上におけるピークは、Fig. 2 及び Fig. 4 に示したごとく、未知のピークとの分離も良好であった。

3. 回収率

本法の前処理における添加回収率を検討した。イオン交換能を有するカラムであるため抽出液の pH がカラムの吸着能に影響することを考え、pH を4, 7, 10に変化させ、添加回収実験を行ったが、いずれもほぼ同程度であった。シュウ酸がやや低く約80%であった他は、いずれも95~101%の範囲内であった。キノコ類の抽出液の pH は6~7の範囲であったため、以後の実験は特に pH を調整することなく行った。

4. 定量操作及び検量線

検出波長として210 nm を用いたため、各有機酸の感度が著しく異なる。そこでフマル酸については1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、シュウ酸、 α -ケトグルタル酸、ピログルタミン酸については5~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、酢酸、酒石酸については50~400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、コハク酸、ギ酸については、100~800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で検量線を作製したところ、それぞれの範囲で、いずれも良好な直線が得られた。同一条件下では、ほぼ同一のピーク面積が得ら

Table 1 The composition of organic

Nushrooms	Oxalic	Tartaric	Formic	Malic	α -Keto-glutaric
Tsukuritake	22.4 $\pm$ 1.10	122.2 $\pm$ 3.50	129.6 $\pm$ 3.88	141.4 $\pm$ 4.10	10.6 $\pm$ 0.31
Maitake	23.4 $\pm$ 0.95	42.6 $\pm$ 1.27	115.6 $\pm$ 3.41	276.8 $\pm$ 8.02	15.2 $\pm$ 0.51
Shirotamogitake	26.2 $\pm$ 1.05	126.4 $\pm$ 3.66	Tr	583.4 $\pm$ 16.9	16.0 $\pm$ 0.04
Hiratake	25.2 $\pm$ 1.00	73.8 $\pm$ 2.20	131.8 $\pm$ 3.90	86.2 $\pm$ 2.43	10.0 $\pm$ 0.35
Shiitake	17.6 $\pm$ 0.61	22.4 $\pm$ 0.67	Tr	302.0 $\pm$ 9.04	9.2 $\pm$ 0.26
Nameko	14.2 $\pm$ 0.53	12.8 $\pm$ 0.34	Tr	46.0 $\pm$ 1.23	2.2 $\pm$ 0.05
Enokitake	7.8 $\pm$ 0.30	37.2 $\pm$ 1.11	78.0 $\pm$ 2.24	312.1 $\pm$ 9.01	6.3 $\pm$ 0.18

Value is the mean $\pm$ S. D. of 5 determinations.

れるが、できる限り試験溶液と標準品は同じ日に測定することとした。

5. 市販品への応用

本法を市販のキノコ類、7種類に適用した結果を Table 1 に示した。なお、この結果は HPLC 充てん剤は、KC-811 を基本として、ギ酸については ULTRON N-C₁₈、移動相 0.1 M リン酸-カリウム (pH 2.2) で測定した値である。いずれのキノコからも、シュウ酸、酒石酸、ギ酸、リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、乳酸、酢酸、クエン酸、ピログルタミン酸、コハク酸、フマル酸が検出された。また、これらのクロマトグラムから推察して、妨害ピークは特にみられなかった。

キノコ類の有機酸は、その種類により多く含有される有機酸が異なる結果が得られた。これらの差は、キノコによる特有なものなのか、種々の培養方法の違い等に関与するのか、あるいは子実体の成長過程によるものか、詳細な点を今後、本法を用いて調査する予定である。

(3) HPLC の充てん剤 Unisil QC₁₈、移動相として 0.05 M リン酸 (pH 2.5) は、KC-811 と同程度ではあるが、酒石酸、ギ酸、リンゴ酸、酢酸、コハク酸、フマル酸が良好な単一ピークとして得られた。

(4) 試験溶液のクリーンアップは、ホウ酸処理した DEAE-セファデックス A-25 を用いることにより、妨害物の除去も良く、回収率はシュウ酸が 80% である他は 95~101% と良好な結果が得られた。

(5) 本法のうち、HPLC の充てん剤を KC-811 及び ULTRON N-C₁₈ (移動相の pH 2.2) を用い、市販の 7 種類のキノコに適用した。

終わりに、本研究を行うにあたり御指導、御助言を賜りました東京農業大学教授 小原哲二郎博士、並びに実践女子大学教授 三浦 洋博士、実験に御協力下さいました実践女子大学、伊藤友規子氏に深く感謝の意を表します。

要 約

食用キノコ中の 11 種類の有機酸を分析する目的で HPLC 条件及び試験溶液の調製法を検討し、市販キノコ類に応用し次の結果を得た。

(1) HPLC の充てん剤は KC-811、移動相として 0.1 % リン酸を用いると、標準品の場合は 11 種類ともに相互分離が良かった。

(2) HPLC の充てん剤として、ULTRON N-C₁₈、移動相として 0.1 M リン酸-カリウム (pH 2.2) を用いると、KC-811 では分離できないギ酸を単一ピークとして得ることができた。また、移動相の pH を 3.2 とすることにより、全体的な相互分離は悪くなるが、pH 2.2 では確認できなかったコハク酸、クエン酸が単一ピークとして得られた。

文 献

- 1) 村椿孝行・佐山晃司・佐藤吉郎：日食工誌，**33**，181 (1986)。
- 2) 吉田 博・菅原龍幸・林 淳三：日食工誌，**29**，451 (1982)。
- 3) 菅原龍幸：調理科学，**17**，63 (1984)。
- 4) 小宮山美弘・乙黒親男・小沢俊治：日食工誌，**24**，559 (1977)。
- 5) 斎藤祥治・三木 健・伊藤 汎・鴨田 稔：農化，**57**，147 (1983)。
- 6) TUCHMAN, M., BOWERS, L. D., FREGIEN, K. D., CRIPPIN, P. J., KRIVIT, W.: *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 198 (1984)。
- 7) TSUDA, T., NAKANISHI, H., MORITA, T., TAKEBAYASHI, J.: *J. AOAC.*, **68**, 902 (1985)。
- 8) MOLICA, J. N., MORSELLI, M. F.: *J. AOAC.*, **67**, 1125 (1984)。

acids in the various mushrooms

(mg/100 g wet)

Lactic	Acetic	Citric	Pyro-glutamic	Succinic	Fumaric
Tr	33.0±0.99	141.4±3.95	46.4±0.78	Tr	16.2±0.37
64.4±1.93	10.8±0.32	89.8±2.22	20.4±0.40	Tr	23.8±0.71
Tr	42.0±1.26	155.2±4.12	37.2±0.74	Tr	69.2±2.02
Tr	266.4±7.73	127.6±3.27	20.6±0.41	Tr	12.8±0.30
Tr	Tr	104.8±2.93	6.0±0.12	Tr	60.8±1.82
48.2±1.34	27.4±0.82	44.0±1.30	2.8±0.05	44.8±1.34	7.8±0.23
287.5±8.62	116.2±3.48	88.0±2.46	29.8±0.59	53.1±1.59	47.2±1.42

Tr: Trace 10 mg/100 g

- 9) 沢村正義・楠瀬博三：日食工誌，**26**，503 (1979).
- 10) 浜川弘茂・島崎敬一・祐川金次郎・加藤 勲：
Japanese Journal of Dairy and Food Science,
32，139 (1983).
- 11) 横塚弘毅・松土俊秀・榎田忠衛：*J. Inst. Enal. Vitic. Yamanashi Univ.*, **18**，7 (1983).
- 12) 長森義知・古江国昭・榎田宣英：大分県工業試験場業務年報，**60** (1979).
- 13) TURKELSON, V. T., RICHARDS, M. : *Anal. Chem.*, **50**，1420 (1978).
- 14) COPPOLA, E. D., CONRAD, E. C., COTTER, R. : *J. AOAC*, **61**，1490 (1978).
- 15) MARSILI, R. T., OSTAPENKO, H., SIMMONS, R. E., GREEN, D. E. : *J. Food Sci.*, **46**，52 (1981).
- 16) LIBERT, B. : *J. Chromatogr.*, **210**，540 (1981).
- 17) RAJAKYLA, E. : *J. Chromatogr.*, **218**，695 (1981).
- 18) REYES, F. G. R., WROLSTAD, R. E., CORNWELL, C. J. : *J. AOAC*, **65**，126 (1982).
- 19) HADDAD, P. R., ALEXANDER, P. W. : *J. Chromatogr.*, **315**，261 (1984).
- 20) ZHU, A., XU, G. : *J. Chromatogr.*, **314**，421 (1984).
- 21) ASHOOR, S. H., KNOX, M. J. : *J. Chromatogr.*, **299**，288 (1984).
- 22) BLAKE, J. D., CLARKE, M. L. : *J. Chromatogr.*, **312**，211 (1984).
- 23) MCFEETERS, R. F., THOMPSON, R. L., FLEMING, H. P. : *J. AOAC*, **67**，710 (1984).
- 24) ASHOOR, S. H., WELTY, J. : *J. AOAC*, **67**，885 (1984).
- 25) YEH-CHEN, S., HSU, C. : *J. AOAC*, **68**，618 (1985).
- 26) VRÁTNÝ, P., MUDŘÍK, Z. : *J. Chromatogr.*, **322**，352 (1985).
- 27) VRÁTNÝ, P. : *J. Chromatogr.*, **257**，23 (1983).
- 28) TN. KOK, W., GROENENDIJK, G., TN. BRINKMAN, U. A., FREI, R. W. : *J. Chromatogr.*, **315**，271 (1984).
- 29) 数野千恵子・三浦 洋：日食工誌，**31**，649 (1984).
- 30) 数野千恵子・三浦 洋：日食工誌，**32**，338 (1985).

(昭和61年5月28日受理)