妥当性評価

生あん中のシアン化合物分析法の性能評価と
生あん中のシアン化合物の実態調査

(平成25年3月5日受理)

堤 智 昭* 石 井 利 華 松田りえ子

Evaluation of an Analytical Method for Cyanogenic Compounds in Bean Paste
and Its Application for Surveillance of Real Samples

Tomoaki TSUTSUMI*, Rika ISHII and Rieko MATSUDA

National Institute of Health Sciences: 1-18-1 Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan;

* Corresponding author

In order to ensure compliance of raw bean paste products with the Japanese Food Sanitation Law, we examined the performance characteristics of an analytic procedure based on steam distillation followed by carbonate-pyrazolone assay to determine cyanogenic compounds in raw bean paste. The present method includes a procedure for decomposition cyanogenic glycosides using linamarase due to the possibility that cyanogenic glycoside-hydrolyzing enzymes might be deactivated in raw bean pastes. The performance of the method was evaluated using two types of bean paste spiked with a cyanogenic glycoside (linamarin) corresponding to cyanide ion concentrations of 5 and 10 mg/kg. The trueness of the method was 86–90%, and the repeatability (RSD) was 1.0–2.4%, while the intermediate precision (RSD) was 2.6% to 4.9%. A surveillance of cyanogenic compounds in 28 raw bean pastes manufactured in Japan was then carried out with the validated method. One sample contained 15 mg/kg (as hydrogen cyanide), while the other samples contained less than 5 mg/kg.

(Received March 5, 2013)

Key words: 生あん raw bean paste; リナマラーゼ linamarase; シアン cyanogen; ピリジンカルボン酸-ピラゾロン法 pyridine carbonate-pyrazolone method; 分析法性能 method performance characteristics

緒 言

食品衛生法第11条に基づく「食品、添加物等の規格基準」(昭和34年厚生省告示第370号, 以下「告示」という。)により, 豆類および生あん中のシアン化合物は不検出と定められている。例外として, サルタニ豆, サルタピア豆, バター豆, ペギア豆, ホワイト豆, ライマ豆については, シアン化水素(HCN)として500 ppmまでの含有が認められているが, 生あんの原料だけに使用が限られている。生あんには製造基準が定められており, それを遵守することで原料の豆に含まれているシアン化合物は除去される。

豆および生あん中のシアン化合物を検出するための試験法として, 水蒸気蒸留-硝酸銀滴定法が告示されている。

しかし, 硝酸銀滴定法の終点は液が濁る点とされており, 終点の判定が試験実施者個人の主観に左右されやすい欠点がある。ピリジンカルボン酸・ピラゾロン(PCP)法は測定結果が吸光度として得られるために, 客観的判定が可能であり, 操作性も優れていることから代替法の1つとして適切であると考えられた。そこでわれわれは, 豆類に含まれるシアン化合物を対象に, 水蒸気蒸留-PCP法の性能評価を行い, 豆類中の5 mg/kgのシアン化合物を判定する試験法として適切であることを報告したが¹⁾, 生あんに対する性能は未評価であった。

豆および生あんに含まれるシアン化合物としては, 遊離シアンとシアン配糖体の両方を測定対象にする必要がある。硝酸銀滴定法やPCP法は遊離シアンを検出するため, シアン配糖体については直接検出することができない。そのため, 豆が内在的に有するシアン配糖体分解酵素を利用してシアン配糖体を遊離シアンに分解する前処理が行われる。しかし, 生あんでは製造工程中の加熱処理により, 原

* 連絡先 tutumi@nihs.go.jp

国立医薬品食品衛生研究所: 〒158-8501 東京都世田谷区
上用賀1-18-1

料である豆に内在するシアン配糖体分解酵素が失活している可能性が高く、シアン配糖体が存在しても遊離シアンとして検出できない恐れが指摘されている²⁾。

本研究では、生あんに含まれるシアン化合物の試験法の確立を目的に、既報の水蒸気蒸留—PCP法にシアン配糖体分解酵素としてリナマラーゼを添加する操作を追加した。本法の生あん中のシアン化合物分析の性能を評価し、生あん中のシアン化合物の含有実態調査を実施した。

実験方法

1. 試料

性能評価には国産の小豆および手亡豆を用いて自作した赤あんおよび白あんを用いた。作製方法は告示に記載されている生あんの製造基準に従った。なお、自作した赤あんの水分含量は69%、白あんの水分含量は62%であった。実態調査には日本国内の製あん所より提供された28試料を用いた。試料は分析に供するまで、冷凍(−30℃)で保存した。

2. 試薬および試液

2.1 標準品

シアン化物イオン標準液 (1 mg CN[−]/mL): シグマアルドリッチ社製。

2.2 標準溶液

シアン標準溶液 (25 µg/mL): シアン化物イオン標準液 (1 mg CN[−]/mL) 2.5 mLを正確に採取し、水酸化ナトリウム溶液10 mL (0.5 mol/L)を加え、水を加えて正確に100 mLとした。シアン標準溶液 (25 µg/mL)は5℃以下で保存し、1週間以内に使用した。シアン標準溶液 (1 µg/mL): シアン標準溶液 (25 µg/mL) 8 mLを正確に採り、水酸化ナトリウム溶液25 mLを加え、水約120 mLを加えた後、フェノールフタレイン溶液1滴を加え、酢酸 (1+8) でpHを6.6~7.0とした後、水を加えて正確に200 mLとした。シアン標準溶液 (1 µg/mL)は用時調製とした。

2.3 試薬

クエン酸一水和物、水酸化ナトリウム、リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム (無水)、*p*-トルエンサルホンクロロアミドナトリウム三水和物 (クロラミンT)、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、フェノールフタレインおよび酢酸: 特級品 (和光純薬工業(株)製)。4-ピリジンカルボン酸ナトリウム: シアン定量用 (和光純薬工業(株)製)。リナマラーゼ (バター豆由来): 食品分析用 (和光純薬工業(株)製)。リナマリン: トロントリサーチケミカル社製。シリコンオイル: 湯浴用 (Alfa Aesar社製)。

2.4 試液

クエン酸緩衝液原液: クエン酸一水和物128.1 gおよび水酸化ナトリウム64.4 gを水に溶解して1,000 mLとした。クエン酸緩衝液: クエン酸緩衝液原液を水で10倍希釈し、クエン酸溶液および0.5 mol/L水酸化ナトリウム溶

液でpHを5.9に調整した。クエン酸緩衝液は使用時に調製した。クエン酸溶液: クエン酸一水和物21.9 gを水に溶解し、1,000 mLとした。リン酸緩衝液 (pH 6.8, 0.05 mol/L): リン酸二水素カリウム3.40 gおよびリン酸水素二ナトリウム3.55 gを水に溶解し、1,000 mLとした。クロラミンT溶液: クロラミンT 0.62 gを水に溶解し50 mLとした。クロラミンT溶液は用時調製とした。4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン溶液: 1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン1.5 gを*N,N*-ジメチルホルムアミド100 mLに溶解し、4-ピリジンカルボン酸ナトリウム9.0 gを水約250 mLに溶解し、両溶液を合わせ、水を加えて500 mLとした。4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン溶液は10℃以下の冷暗所に保存し、20日以内に使用した。リナマラーゼ溶液: 酵素100 unitに相当するリナマラーゼをクエン酸緩衝液に溶解して25 mLとした (4 unit/mL)。10℃以下の冷暗所に保存し、2週間以内に使用した。リナマリン溶液: リナマリン15.8 mgをクエン酸緩衝液に溶解して50 mLとした。リナマリン溶液は10℃以下の冷暗所に保存し、10日以内に使用した。

3. 機器

恒温槽: THERMO MINDER SJ-10R (タイテック(株)製)、水蒸気蒸留装置: 間接蒸留方式 (柴田科学(株)製)、化学天びん: CPA623S (ザルトリウス メカトロニクス・ジャパン(株)製)、pHメーター: Twin pH B212 ((株)堀場製作所製)、分光光度計: U-3900H (株)日立ハイテクノロジー製。

4. 分析方法

均一化した生あん試料にリナマラーゼを添加後、既報の水蒸気蒸留—PCP法によりシアン化合物を定量した。

4.1 生あん試料の乾燥重量の測定

分析に供する試料量は水分を除いた乾燥重量として規定される。各生あん試料について試料10.0 gを秤量し、105℃で4時間乾燥を行い、放冷後の重量を乾燥重量と規定した。また、その減量を水分含量として規定した。

4.2 水蒸気蒸留

乾燥重量10.0 gに相当する生あんにクエン酸緩衝液200 mLをおよびリナマラーゼ溶液5 mLを加えて密栓し、混合した後、40℃の水浴中で加温しながら4時間静置した。この間、30分間に1回程度を目安に振り混ぜた。これに水100 mL、シリコンオイル5滴を加え、水蒸気蒸留を行った。留液の受器には、あらかじめ水酸化ナトリウム溶液 (0.5 mol/L) 25 mLを入れた共栓付メスシリンダー (200 mL)を用い、留去されてくる気体を受器中の液体に捕集されるように受器の高さを調整した。留液の流出速度が毎分2~3 mLとなるように蒸留温度等の条件を調節し、150 mLの留液が得られるまで水蒸気蒸留を続けた。得られた留液にフェノールフタレイン溶液1滴を加え、これを指示薬として液の淡赤色が消えるまで酢酸 (1+8)を加え、さらに酢酸 (1+8)を加えてpH 6付近 (pH 5.8~6.2)に調整した。pH調整の際は酢酸を加えた留液を一部

(約100 µL) 採取し、小型のpHメーターで測定した。その後、水を加えて200 mLとして試験溶液とした。

4.3 試験溶液の発色と吸光度測定

試験溶液10 mLを50 mLメスフラスコに分取し、リン酸緩衝液(0.05 mol/L) 10 mLおよびクロラミンT溶液1 mLを加え、密栓して混合した後、室温で5分間静置した。静置後の溶液に4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン溶液10 mLを加え、さらに標線まで水を加えて密栓し、直ちに混和した後、室温で50分間静置した。この溶液の一部を採取し、水を対照として速やかに638 nm付近の吸光度を測定した。

4.4 検量線

シアン標準溶液(1 µg/mL)を水で希釈し、0.05, 0.1, 0.25, 0.5および1 µg/mLの5点の濃度の溶液を調製した。これらの溶液および水(0 µg/mL) 10 mLを採取し、試験溶液と同様に操作して発色させた後に吸光度を測定し、得られた吸光度に基づき検量線を作成した。

4.5 定量計算

試験溶液から得られた吸光度を検量線に内挿して、試験溶液中のシアン化物イオン濃度 A を求めた。さらに A および試料重量 W から、以下の算術式に従って、試料重量当たりのシアン化物イオンおよびシアン化合物(シアン化水素: HCN) 濃度を求めた。

$$\begin{aligned} & \text{試料重量当たりのシアン化物イオン濃度(mg/kg)}^* \\ & = A \times 200 \times (1/W) \end{aligned}$$

A : 試験溶液中のシアン化物イオン濃度(µg/mL)

W : 試料重量(g)

[* 試料中のシアン濃度は、HCN濃度として規定されるので、上記で得られたシアン化物イオン濃度に1.0387(=27.0253/26.0174)を乗じてHCN濃度を算出した。]

4.6 分析法の性能評価

2種の生あん(赤あんおよび白あん)を対象とし、分析法の性能の評価を行った。生あん中のシアン化合物の規格への適合判定が目的であるので、分析法の定量下限はFAO/WHO合同食品規格委員会で設定されたキャッサバ粉中の国際基準(HCNとして10 mg/kg)³⁾以下である必要があると考えられた。そこで、定量下限の目標を5 mg/kg(HCNとして5.2 mg/kg)とし、それに相当するシアン配糖体(リナマリン)を添加した。性能評価のための実験は、リナマリンを添加しない試料(コントロール試料)、およびコントロール試料10.0 gにリナマリン溶液(0.16 mg/mLあるいは0.32 mg/mL) 3.0 mLを添加し、乾燥重量当たりのシアン化物イオン濃度を5 mg/kg および10 mg/kgとした試料(添加試料)を用い、一日当たりコントロール試料1検体および添加試料4検体(5 mg/kgの添加試料2検体および10 mg/kgの添加試料2検体)の計5検体を併行して分析し、これを5日間実施した。

コントロール試料の測定値5個の平均をブランク値とし、各添加試料の測定値とブランク値の差を添加試料の測

定結果とした。各濃度の添加試料の測定結果の平均値と添加濃度の比を百分率として求め、真度(回収率)とした。各濃度の添加試料の測定結果10個を一元配置の分散分析し、算出された分散から、併行精度および室内精度を推定した。

結果および考察

1. リナマラーゼによるシアン配糖体の加水分解条件の検討

生あんの原料に使用されるバター豆やライマ豆などに含まれるシアン配糖体は、リナマリンが主であると報告されている^{4)~6)}。そこで、生あんに残存するシアン配糖体を分解するために添加する酵素はリナマラーゼが適切であると考えられた。本研究で実施するインキュベーション条件により、リナマリンが効率よく遊離シアンへ加水分解されるか検討した。インキュベーション条件は、平成14年11月21日付け食基発第1121002号ならびに食監発第1121002号別添「タピオカでん粉中のシアン化合物試験」に記載の条件(リナマラーゼ20ユニットを使用しクエン酸緩衝液(pH 5.9)中で40℃、4時間)を選択した。ただし、検査の効率化のためインキュベーションを夜間を実施することも想定されたため、インキュベーション時間については16時間についても追加検討した。

クエン酸緩衝液に、リナマリンをシアン化物イオンとして5 mg/kg および10 mg/kgに相当する量を添加し、リナマラーゼとインキュベーションした後、リナマリンより生成したシアン化物イオンを水蒸気蒸留-PCP法により測定した(Table 1)。4時間のインキュベーションにより、リナマリンから92~95%のシアン化物イオンが回収された。リナマリンの添加量による回収率の顕著な違いは認められず、添加した最大濃度のリナマリンを効率よく分解できる条件であると考えられた。一方、リナマラーゼ非存在下ではリナマリンからのシアン化物イオンの生成は認められなかった。また、インキュベーションを16時間に延長しても、シアン化物イオンの回収率は増加しなかった。したがって、生あん中のリナマリンを加水分解するインキュベーション条件として、選択した条件は適切であると考え

Table 1. Recovery of cyanide from linamarin under various incubation conditions

Linamarin spiked ^a (mg CN ⁻ /kg)	Linamarase added (units)	Incubation time (hr)	Recovery of cyanide (%) ^b
5	0	4	0
	20	4	92
10	0	4	0
	20	4	95
	20	16	89

^a Spiked concentrations are expressed as mg CN⁻/kg when a 10 g sample is tested.

^b Values are means of two determinations.

Table 2. Performance characteristics of the method for two types of raw bean paste^a

Sample	Linamarin spiked (CN ⁻ mg/kg) ^b	Average results ^c (mg/kg)	Trueness (%)	Repeatability		Intermediate precision	
				SD (mg/kg)	RSD (%)	SD (mg/kg)	RSD (%)
Red bean paste	5	4.402	88	0.08	1.8	0.12	2.7
	10	8.617	86	0.21	2.4	0.43	4.9
White bean paste	5	4.509	90	0.05	1.0	0.22	4.9
	10	8.938	89	0.17	1.9	0.23	2.6

^a Two sets of each sample spiked with linamarin were analyzed by the method in five different runs on different days ($n=5$).

^b Spiked concentrations are expressed as mg CN⁻/kg when a 10 g sample is tested.

^c Trace concentrations of CN⁻ in non-spiked samples (0.036 mg/kg for red bean paste and 0.052 mg/kg for white bean paste) were found by the method. The results above are shown after subtraction of the trace concentrations from the observed concentrations in each sample.

らえた。なお、リナマラーゼは基質であるシアン配糖体を微量に含む場合があることから、使用したリナマラーゼはロットごとにブランク試験を実施し、シアン化合物濃度はほぼゼロ（吸光度0.001程度）であることを確認している。

2. 分析法の性能評価

分析法の妥当性を確認するため、既知量のリナマリン（シアン化物イオンとして5 mg/kgまたは10 mg/kg）を生あんに添加し、繰り返し分析を実施した。シアン化物イオンの検量線は0～1 µg/mLの濃度範囲において相関係数は0.999であり、良好な直線性を示した。検量線の上限は試料中のシアン化物イオン濃度に換算すると20 mg/kgであり、評価する添加濃度が収まるように上限を設定した。マトリックスが異なると考えられる2種類の生あんに添加した試料より得られた測定値を解析し、推定された真度、併行精度および室内精度をTable 2に示した。シアン化物イオン5 mg/kgおよび10 mg/kgに相当するリナマリンを添加した赤あんの分析結果から推定された真度は88%および86%、併行精度は1.8%および2.4%、室内精度は2.7%および4.9%であった。シアン化物イオン5 mg/kgおよび10 mg/kgに相当するリナマリンを添加した白あんの分析結果から推定された真度は90%および89%、併行精度は1.0%および1.9%、室内精度は4.9%および2.6%であった。真度、併行および室内精度について生あんの種類による顕著な違いは認められなかった。

生あん中のシアン化合物の妥当性を評価する基準は示されていないが、食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン（食安発第0926001号 平成20年9月26日）では、1～10 mg/kgの濃度範囲での真度の目標値は80～110%、併行精度はRSD 10%以下、室内精度はRSD 15%以下と設定されている。上記で得られた真度および精度はこれらの目標値の範囲内であり、本法は生あん中のシアン化物イオンを5 mg/kgの濃度で分析する方法として妥当であった。以上の結果より、本法が生あん中のシアン化合物試験法として採用可能であると考えられた。なお、現行の成分規格では、「生あんは、シアン化合物の検出されるものであってはならない」とされているが、本法では

1 mg/kg程度のシアン化合物を含む場合でも吸光度が得られる。本法を検査法として採用する場合には、成分規格の見直しも今後の検討課題として必要と考えられる。

3. 生あん中のシアン化合物量実態調査

妥当性が確認された分析法により、国内の製あん所で製造された生あん中のシアン化合物を分析した。11製あん所から提供を受けた生あん28試料を本法により分析した結果をTable 3に示す。食品衛生法のシアン化合物としての基準がHCN濃度で規定されていることから、シアン化物イオンの濃度をHCNに換算した結果を示す。1試料（試料4）において妥当性確認した最低濃度である5 mg/kgを超過する15 mg/kgのシアン化合物が認められた。本試料はリナマラーゼ処理から再分析した結果でも、同様に16 mg/kgのシアン化合物が認められた。その他の27試料から得られた結果は、妥当性確認した濃度である5 mg/kg未満であるため、得られた分析値の信頼性を保証することはできないが、シアン化合物濃度の範囲は0.033～2.6 mg/kg（中央値は0.40 mg/kg）であった。

試料4にリナマラーゼを添加しない条件で2回分析した結果、シアン化合物濃度は0.026および0.047 mg/kgであった。シアン化合物濃度がリナマラーゼを添加した場合と比較し著しく低くなった要因としては、本試料に含まれるシアン化合物はそのほとんどがリナマリンであり、かつ原料の豆が有していたシアン配糖体分解酵素が失活していたためと考えられる。本研究で確立した分析法は、リナマラーゼを添加する操作が加えられており、このようなシアン配糖体分解酵素が失活していると考えられる試料に対しても適用が可能となった。すべての生あん試料で、食品衛生法においてHCNが500 ppmまで含有が認められる豆（ライマ、ホワイト、バター豆など）が原料に使用されていた。生あんの製造工程において、浸漬および水さらしの工程が不十分である場合、シアン配糖体が残存しやすくなる傾向がある^{7), 8)}。試料4を製造した製あん所では、告示に示されている生あんの製造基準を十分に順守していない可能性が考えられた。一方、試料4と同一の製あん所で製造されているにもかかわらず、試料1～3のシアン化合物濃度は5 mg/kg未満であり、試料4のシアン化合物濃度と

Table 3. Analytical results of cyanogenic compounds in various raw bean pastes manufactured in Japan^a

Manufacturer	Sample No.	Beans used for raw bean paste (ratio)	Water content (%)	Cyanogenic compounds (mg HCN/kg) ^b
A	1	Lima (63%), Kidney beans (37%)	67	1.2
	2	Lima (75%), White beans (25%)	67	2.6
	3	Lima (62%), Kidney beans (38%)	67	2.0
	4	Butter (75%), White beans (25%)	69	15 (15, 16) ^c
B	5	Lima bean	63	0.22
	6	Lima bean	64	0.39
	7	Lima bean	62	0.29
C	8	Lima bean	64	0.21
D	9	Lima bean	63	0.25
	10	Lima (45%), Kidney beans (55%)	68	0.3
	11	Lima bean	63	0.48
E	12	Lima (59%), White beans (41%)	64	0.7
	13	Lima (59%), White beans (41%)	65	1.6
F	14	Lima (40%), Kidney beans (60%)	62	0.14
	15	Lima (40%), Kidney beans (60%)	62	0.4
	16	Lima (40%), Kidney beans (60%)	62	0.033
G	17	Lima (30%), Kidney beans (70%)	62	0.4
	18	Lima (50%), Kidney beans (50%)	60	0.23
	19	Lima (30%), Kidney beans (70%)	58	0.09
	20	Lima (60%), Kidney beans (40%)	64	0.49
H	21	Lima bean	64	0.42
	22	Lima bean	64	1.1
I	23	Lima bean	62	0.31
	24	Lima bean	61	0.87
J	25	Lima (50%), Kidney beans (50%)	63	0.26
	26	Lima (50%), Kidney beans (50%)	63	0.35
K	27	Lima bean	63	0.58
	28	Butter (66%), Lima beans (34%)	62	0.55

^a All sampled were collected from domestic bean paste manufacturers in 2011.^b Values are expressed on a dry weight basis.^c Value is the average of two determinations.

比較すると低かった。この理由の1つには、生あんの原料に使用された豆の種類の違いが考えられる。試料1〜3ではライマ豆が原料に占める割合が高かったが、試料4ではバター豆の割合が高かった。過去に日本国内の製あん所から収去されたライマ豆とバター豆のシアン化合物の分析結果によると^{9), 10)}, ライマ豆のシアン化合物濃度はバター豆よりも低い傾向がある。

結 論

生あんの規格であるシアン化合物濃度を求め、規格への適合を判定するための試験法として、水蒸気蒸留—PCP法を検討した。リナマラーゼによるシアン配糖体の加水分解条件を検討したうえで、2種類の生あんを対象として妥当性評価を実施した。その結果、本法は生あん中のシアン化合物イオンを5 mg/kgの濃度で分析する方法として妥当であった。また、本法により生あん中のシアン化合物の実態調査を実施した結果、28試料中の1試料で、5 mg/kgを

上回るシアン化合物が検出された。

謝 辞

生あん試料を提供していただいた製あん所の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Tsutsumi, T., Ishii, R., Takatsuki, S., Matsuda, R. Evaluation of an analytical method for cyanogenic compounds in beans and surveillance of cyanogenic compounds in beans. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (Food Hyg. Saf. Sci.), **52**, 370–375 (2011).
- 2) Ariga, T., Kanmuri, M., Nakazato, M., Fujinuma, K., Nishijima, M., Naoi, Y. Analysis and survey of cyanogenic glucoside (as hydrogen cyanide) in bean paste by enzymatic assay. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* (J. Food Hyg. Soc. Japan), **24**, 289–294 (1983).
- 3) Codex standard for edible cassava flour. Codex Stan

- 176—1989 (Rev. 1—1995).
- 4) Dustan, W. R., Henry, T. A. Cyanogenesis in plants. Part III.—On phaseolunatin, the cyanogenetic glucoside of *Phaseolus lunatus*. Proc. R. Soc. (London), Ser. B, **72**, 285–294 (1903).
 - 5) Butler, G. W. The distribution of the cyanoglucosides linamarin and lotaustralin in higher plants. Phytochemistry, **4**, 127–131 (1965).
 - 6) Komiyama, Y., Harakawa, M., Tezuka, Y., Tsuji, M. Cyanogenic glycosides in butter bean (*Phaseolus lunatus* L.). Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, **33**, 67–69 (1986).
 - 7) 有賀孝成, 冠 政光, 中里光男, 藤沼賢司, 直井家壽太. 生あんの製造工程におけるシアン化合物の推移. 東京衛研年報, **32**, 202–206 (1981).
 - 8) Harakawa, M., Tsuji, M., Komiyama, Y. Determination of cyanogenic glycoside in beans (*Phaseolus lunatus* L.) and change of its content during soaking process in “Ann” manufacture and its stability. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, **28**, 412–417 (1981).
 - 9) Chikamoto, T., Maitani, T. Gas chromatographic determination of cyanide in beans. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **25**, 530–533 (1984).
 - 10) Nakamura, Y., Tonogai, Y., Hasegawa, Y., Tanabe, H., Ito, Y. Separative determination of free and combined (glycosides) cyanides in the imported beans by a modified rankine apparatus. Eisei Kagaku, **34**, 139–145 (1988).