高速液体クロマトグラフィーによる杏仁中のアミグダリン の測定とその調理過程における消長

(昭和 57 年 6 月 14 日受理)

梶原直子^{*1} 富山智恵子^{*2} 二宮隆博^{*3}
細貝祐太郎^{*1}

Determination of Amygdalin in Apricot Kernel and Processed Apricot Products by High Performance Liquid Chromatography

Naoko KAJIWARA^{*1}, Chieko TOMIYAMA^{*2}, Takahiro NINOMIYA^{*3}
and Yutaro HOSOGAI^{*1}

(^{*1}Kagawa Nutrition College: 3-24-3, Komagome, Toshima-ku, Tokyo, Japan;

^{*2}Ushigome Public Health Center Establish by Shinjuku Ward Office: 50, Benten-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan; ^{*3}Institute of Food Hygiene, Japan Food Hygiene Association: 6-1, Jingu-mae, 2-chome, Shibuya-ku, Tokyo, Japan)

A method was developed for the determination of amygdalin in apricot kernels by high performance liquid chromatography (HPLC). Amygdalin was extracted from apricot kernels with methanol, and 10 μ l of the filtrate was injected into a high performance liquid chromatograph. HPLC was performed on a stainless steel column packed with Zorbax ODS, with acetonitrile-water (14:86 v/v%) as the mobile phase. The retention time of amygdalin was about 7 min. The average recovery of amygdalin was 97.4% and the lower limit of determination was 50 ng.

This method was also applied for the determination of amygdalin in commercial almond jelly and other apricot products. Almond jelly prepared in this study from apricot kernels contained 5.07 ppm amygdalin. The amygdalin content had decreased to 30.4% in first process of preparing the almond jelly and to 0.3% finally.

No amygdalin was detected in other foods tested.

(Received June 14, 1982)

Key words: アミグダリン amygdalin; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 青酸配糖体 cyanogenic glycoside; シアン cyanide; 杏仁 apricot kernel; 杏仁豆腐 almond jelly

青酸配糖体含有植物は古くから知られており^{1)~5)}, 一部は医薬品や食物として利用されている。そして食用に供されるキャッサバ、ライマピーンなどは水洗などによって青酸配糖体が除去されているが、杏仁についてはそれらを除去することなく用いられている場合もある。

従来 青酸配糖体の測定法としては、それ自体に存在する酵素で配糖体を分解した後、シアンを遊離させて硝酸銀滴定⁶⁾、ピクリン酸⁷⁾、ビリジニルピラゾロン^{8)~10)}及びヘモグロビンなどによる比色法¹¹⁾更にはガスクロマトグラフィーによる方法⁷⁾が知られている。しかし、酵素による青酸配糖体の分解は試料の調製、反応条件更には酵素活性などに影響されることが考えられ未分解の配糖体の存在も予想される¹²⁾。事実、青酸配糖体含有豆より製造した生あん中に未分解の青酸配糖体が残存しているこ

^{*1} 女子栄養大学: 東京都豊島区駒込 3-24-3

^{*2} 新宿区牛込保健所: 東京都新宿区弁天町 50

^{*3} (社)日本食品衛生協会食品衛生研究所: 東京都渋谷区神宮前 2-6-1

とが報告されている^{13)*}. このようなことから青酸配糖体の測定に際しては, 酵素分解により生じたシアンを測定するよりも配糖体そのものを測定することが望ましいと考えられる.

そこで, 杏仁を対象としその青酸配糖体であるアミグダリンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で直接測定することを考え, その分析条件について検討した結果, 分離能・精度など良好な測定法を見いだした. そして, 杏仁豆腐の調理過程におけるアミグダリンの消長を検討し, 更に市販杏仁製品についても測定を行ったので報告する.

実験方法

1. 試料

(1) 杏仁: 苦杏仁は東京都内の生薬店, 甘杏仁は横浜市内の食料品店よりそれぞれ購入した.

(2) 杏仁製品: 市販杏仁豆腐の缶詰 8 種, 杏仁霜 4 種, 杏仁漬 3 種.

2. 杏仁豆腐の作成

杏仁を用い杏仁豆腐を作成しその方法を Scheme 1¹⁴⁾ に示した.

Scheme 1. Flow diagram for almond jelly making

3. 試薬及び標準溶液

アミグダリン: Aldrich 社製

メタノール 及び アセトニトリル: 和光純薬工業 (株) 製, HPLC 用

アミグダリン標準溶液: アミグダリン 100 mg を精秤し, メタノールに溶解して 100 ml とし標準原液 (1 mg/ml) とした. この原液を用時メタノールで希釈し, 標準

Table 1. Operating Conditions of HPLC for Amygdalin

Column	Zorbax ODS (4.6 mmID×250 mm)
Guard column	Wokogel LC ODS-30K (2.1 mmID×50 mm)
Eluent	Acetonitrile-water (14:86 v/v%)
Column temp.	ambient
Flow rate	1.0 ml/min
Detector	UV (210 nm)
Sensitivity	0.08 AUFS
Chart Speed	5 mm/min
Sample size	10 μ l

溶液を調製した.

シアン化ナトリウム標準溶液: 東亜電波工業 (株) 製, (CN⁻ 10 ppm)

クエン酸緩衝液: クエン酸 128.1 g 及び水酸化ナトリウム 64.4 g を水に溶かして 1000 ml とし pH 5.9 に調整し用時 10 倍容に希釈する. その他の試薬は和光純薬工業 (株) 製特級を用いた.

4. 装置, 器具

高速液体クロマトグラフ: (株) 島津製作所製, LC-3A 型

検出器: (株) 島津製作所 SPD-1 型分光光度計

ブレンダー: (株) 日本精機製作所製

ロータリーエバポレーター: (株) 柴田化学器械製

ミリポアフィルター: (株) 東洋濾紙製, 耐溶剤性メソプランフィルター (ポアサイズ 0.45 μ m)

5. HPLC 条件

HPLC 分析条件は Table 1 に示した.

6. 試験溶液の調製

杏仁にあってはその約 1 g, 杏仁製品はその約 10~20 g を精秤し, それぞれメタノール 80 ml を加え, 5 分間ホモジナイズしアミグダリンを抽出した後, 残留物についてはメタノール 10 ml を用い同様の操作を 2 回繰返しここに得た前後の 3 液を合わせメタノールで 100 ml に定容し試験溶液とした. 又, アミグダリン含有量の少ない場合は, 試験溶液をロータリーエバポレーターにより 40° 以下で減圧濃縮しメタノールで正確に 10 ml とし試験溶液とした. 以上の試験溶液をそれぞれ更にミリポアフィルターでろ過した後, その 10 μ l を Table 1 記載のカラムに注入した.

7. 検量線の作成

アミグダリン標準原液を 5~100 μ g/ml の範囲にメタノールで正確に希釈し, その 10 μ l を HPLC に注入し得られたクロマトグラムよりピーク高法から検量線を作成した.

8. シアンの定量

細切試料 1~10 g を 500 ml の二頸丸底フラスコにとりクエン酸緩衝液 200 ml を加え密栓し, 時々振り混

* 有賀孝成, 冠 政光, 中里光男, 藤沼賢司, 直井家壽太, 五十嵐英夫, 潮田 弘, 新垣正夫, 高橋正樹, 坂井千三: 日本食品衛生学会第 38 回学術講演会講演要旨集 p. 28 (1979).

Fig. 1. High performance liquid chromatograms of amygdalin

(A), amygdalin standard; (B), extract of apricot kernel

HPLC conditions are shown in Table 1.

ぜながら 37° で 4 時間放置した後、受器にはあらかじめ 1% 水酸化カリウム溶液 30 ml を用い蒸留装置冷却器の先端を水酸化カリウム溶液の中に入れ内容液が約 90 ml になるまで蒸留した。ここに得られた内容液をフェノールフタレインを指示薬として 10% 酢酸を用い中和し水を加えて正確に 100 ml とし試験溶液とし定量は衛生試験法・注解に記載されているピリジンピラゾロン法⁹⁾によりシアンの定量を行った。

結果及び考察

1. 抽出溶媒の選択

杏仁中のアミグダリンは水の存在でエマルジンにより加水分解されることからメタノール、エタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフランなどの有機溶媒を用い、実験方法 6 に従い抽出溶媒の検討を行った。その結果メタノールを用いた場合がろ過が容易で残留物との分離も良好なことからこれを用いることとした。

2. HPLC 測定条件の検討

カラム充てん剤には、逆相分配カラム μ Bondapak C₁₈, 及び Zorbax ODS¹⁵⁾ について検討した。その結果カラム理論段数が高く分離能のよい Zorbax ODS を用いた。

溶離液に用いたアセトニトリル-水の混合比を容量因子 (capacity factor, k') により検討したところアセト

Fig. 2. Absorption spectrum of amygdalin (100 ppm)

Fig. 3. Calibration curve of amygdalin
HPLC conditions are shown in Table 1.

ニトリルの濃度が 14% の場合 $k'=1.65$ で最も感度が良く約 7 分でアミグダリンの良好なクロマトグラムが得られた。(Fig. 1)

測定波長については、アミグダリン標準溶液 (100 ppm) について波長 200~300 nm の紫外外部吸収スペク

Table 2. Recovery of Added Amygdalin in Almond Powder*

Amygdalin		Recovery (%)	Average (%)
Added (μ g)	Fonud (μ g)		
100.0	95.0	95.0	97.3
100.0	95.8	95.8	
100.0	100.0	100.0	
100.0	97.5	97.5	
100.0	98.0	98.0	
500.0	505.0	101.0	97.5
500.0	475.0	95.0	
500.0	486.0	97.2	
500.0	480.5	96.1	
500.0	492.0	98.4	

Standard deviation, 2.02%

Coefficient of variation, 2.08%

* Almond powder includes no amygdalin.

トルを測定した。その結果 Fig. 2 に示す通り 210 nm 付近に吸収極大を示したことから測定にはこの波長を用いた。

3. 検量線

アミグダリンのピーク高より絶対検量線法で作成した検量線を Fig. 3 に示した。0.05~1 μ g の範囲で直線性を示し定量限界は 50 ng であった。

4. 添加回収実験

杏仁霜 5 g を用いアミグダリン 100 μ g 及び 500 μ g を添加し、全量を 5 ml とし回収実験を行った結果を Table 2 に示した。その結果回収率平均は 97.4%、変動係数は 2.08% と良好な結果が得られた。

5. シアンの定量

シアンの分離には水蒸気蒸留法¹⁰⁾を検討したが、蒸留法と変わらない結果が得られたので本実験では操作の簡単な蒸留法を用いた。この時、杏仁を用いて添加回収実験を行ったところ、シアンの回収率は 91.2% であった。

6. 杏仁豆腐調理過程におけるアミグダリン及びシアンの消長

苦杏仁及び甘杏仁を用い杏仁豆腐の調理過程 (Scheme 1) におけるアミグダリン及びシアンの消長を Table 3 に示した。

なお、杏仁豆腐の作成に使用した砂糖、寒天及び水などの添加による体積の増減を考慮し、原材料に対するアミグダリン、シアン含量に換算し補正值として示した。又、原材料のアミグダリン、シアン含有量に対する各過程での補正值を百分率で表わし、アミグダリン、シアンの残存率とした。

アミグダリンについて皮をむいた段階 (Scheme 1-(3)) で残存率は 81.2%、水を加えすりつぶした段階 (Scheme 1-(4)) で 30.4%、裏ごしの段階 (Scheme 1-(5)) で 14.3%、2 分間煮る段階 (Scheme 1-(6)) で 0.8%、及び室温放置の段階すなわち最終製品 (Scheme 1-(7)) で 0.3% にそれぞれ減少した。(Scheme 1-(4)), (Scheme 1-(5)) での減少は水を加え磨砕することにより杏仁中の酵素エムルジンによってアミグダリンが加水分解されたためと考えられる。

又、同時に測定したシアン含有量はアミグダリンの減少傾向とは比例しなかった。このことを残存率でアミグダリンとシアンを比較すると、2 分間煮る段階 (Scheme 1-(6)), 及び最終製品 (Scheme 1-(7)) では、シアンの

Table 3. Changes of Amygdalin and CN⁻ Contents in Apricot Kernel and Almond Jelly

Sample* ¹⁾ No.	a) Apricot Kernel (bitter almond)						b) Apricot Kernel* ²⁾		
	Amygdalin			CN ⁻			CN ⁻		
	Content (ppm)	Correction value (ppm)	Residual rate (%)	Content (ppm)	Correction value (ppm)	Residual rate (%)	Content (ppm)	Correction value (ppm)	Residual rate (%)
(1)	32,230.88	—	—	2,291.50	—	—	270.15	—	—
(2)	108.85	—	—	1.66	—	—	0.20	—	—
(3)	27,109.33	26,171.47	81.2	2,104.23	2,037.14	88.9	238.45	230.17	85.2
(4)	1,498.24	9,798.19	30.4	194.44	1,138.87	49.7	180.61	108.87	40.3
(5)	703.69	4,609.00	14.3	72.82	428.51	18.7	7.64	54.30	20.1
(6)	16.98	257.84	0.8	36.70	350.60	15.3	3.56	30.85	12.9
(7)	5.07	96.69	0.3	26.36	304.77	13.3	3.50	28.09	10.4

*¹⁾ Sample No. (1)-(7) are shown in Scheme 1.*²⁾ Amygdalin content in b) was 4,579 ppm.

Moisture contents in a) was 4.3% and b) was 5.1%.

残存率が高く、甘杏仁を用い杏仁豆腐を作製した場合も同様であった。これは、加熱によってもシアンが揮散しなかったと考えられる。

7. 市販杏仁豆腐及び杏仁製品について

市販杏仁豆腐缶詰8種についてアミグダリン、シアン含有量を測定したが、いずれも検出されなかった。これは、市販杏仁豆腐缶詰の製品原材料表示や文献^{17)~19)}から牛乳に寒天、杏仁霜更にエッセンスを加え作ったためと考えられる。一部の市販杏仁豆腐缶詰では、アミグダリンの分解物であるベンズアルデヒド臭がかなり強く感じられたが、これもアーモンドエッセンス由来のものと考えられる。又、中華料理店等で経済性、簡便性により杏仁に代る杏仁豆腐の材料として用いられている杏仁霜及び杏仁漬けなどの杏仁製品についても同様に測定したが、アミグダリン、シアンともに検出されなかった。

まとめ

HPLCを用いて杏仁中のアミグダリンの分析法を確立し、その方法を用い伝統的な杏仁豆腐調理工程におけるアミグダリン及びシアンの消長を検討した。

1) HPLC カラムに Zorbax ODS, 溶離液にアセトニトリル-水 (14:86 v/v%), 測定波長 210 nm を用いた場合が精度、分離能ともに良好で、アミグダリンの保持時間は約 7 分であった。

2) 本法によるアミグダリンの平均回収率は 97.4%, 変動係数 2.08%, 定量限界は 50 ng であった。

3) 杏仁豆腐の調理におけるアミグダリンの消長は水を加えすりつぶした段階で原材料杏仁に対し 30.4%, (1498.24 ppm), 最終製品では 0.3% (5.07 ppm) にそれぞれ減少した。

4) 市販の杏仁製品からはアミグダリンは検出されなかった。

謝 辞

本研究にあたって、御指導と御鞭撻を賜った日本食品衛生協会食品衛生研究所副所長岡田太郎博士並びに女子栄養大学助教授川井英雄先生に深謝致します。

文 献

1) 川城 巖, 川田公平: 食品衛生研究 8, 45~52 (1958).

- 2) Eyjolfsson, R.: Fortschritt. Chem. Naturstoffe. 28, 75~108 (1970).
- 3) Uones D. A.: "Cyanogenic Glycosides and Their, Function" Phytochemical Ecology, p. 103~124 (1972) Academic Press, New York and London.
- 4) Siegler, D. S.: Phytochem. 14, 9~29 (1975).
- 5) Siegler, D. S.: "The Naturally Occurring Glycosides" Progress in Phytochemistry 4, 83~102 (1977) Peegamon Press., Oxford.
- 6) 日本食品衛生協会編: "食品衛生検査指針 I" p. 351 (1978).
- 7) 日本薬学編: "衛生試験法注解" p. 450 (1980) 金原出版.
- 8) 日本薬学編: "衛生試験法注解" p. 72 (1980) 金原出版.
- 9) 原川 守, 辻 政雄, 小宮山美弘: 食品工誌. 28, 125~130 (1981).
- 10) 原川 守, 辻 政雄, 小宮山美弘: 同上 28, 412~417 (1981).
- 11) 黒田弘之, 毛利孝明, 広瀬秀雄, 多田御幸: 食衛誌. 14, 558~560 (1973).
- 12) 名取信策, 高石清和, 桑島 博, 石黒 哲, 内山 充: 食品衛生調査研究 "各種食品に存在する青酸化合物に関する調査研究" 報告書, p. 13 (1978).
- 13) 豊島重美, 椎名 治, 木村久一郎, 桑田辰男: 食品衛生研究 30, 663~671 (1981).
- 14) 江上トミ編: "私の料理 江上トミ (中華料理)" p. 167~168 (1956) 柴田書店.
- 15) Thomas Cairns: Anal. Chem. 50, 317 (1978).
- 16) 勝木康隆, 安田和男, 上田 工, 直井家寿太: 都衛研年報. 29, 261~265 (1978).
- 17) 蕭 礼灯編: "専門中国料理" p. 211 (1970) 医歯薬出版.
- 18) 岡本佐一郎編: "中国料理" p. 298 (1969) 柴田書店.
- 19) 王馬熙純編: "中国料理" p. 176 (1958) 柴田書店.