高速液体クロマトグラフィーによる梅加工食品中の シアン配糖体、ベンズアルデヒド及び 安息香酸の同時定量法の検討

(平成3年4月8日受理)

寺田 久屋* 山本 勝彦*

Simultaneous Determination of Cyanogenic Glycosides, Benzaldehyde and Benzoic Acid in Processed Japanese Apricot by High Performance Liquid Chromatography

Hisaya TERADA and Katsuhiko YAMAMOTO

(Nagoya City Public Health Research Institute: 1-11,
Hagiyama-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan)

A high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the cyanogenic glycosides, *i.e.*, amygdalin (AM) and prunasin (PR), and their degradation products, *i.e.*, benzaldehyde (BAL) and benzoic acid (BA), in processed foods containing *ume* (Japanese apricot *Prunus mume* Sieb et Zucc.) was developed.

The sample was extracted with 0.05 M citric acid solution and cleaned up by use of a Sep-pak C₁₈ cartridge. The extract was chromatographed on a Capcell Pak C₁₈ SG120 column with acetonitrile-water-0.2 M phosphate buffer, pH 4.0 (16:79:5). Detection was achieved with a UV monitor set at 210 nm. The peaks corresponding to AM and PR were confirmed by examination of the effect of emulsin treatment.

The recoveries from *ume* extract, *umeboshi* (dried and salted *ume*), *umeshu* (Japanese apricot wine) and *ume* jam fortified with AM, PR, BAL and BA at levels of 40~100 µg/g each were 86.9~100.6% (C. V. 3.7~7.7%) for AM, 69.9~105.3% (0.9~4.2%) for PR, 71.9~85.0% (1.8~2.6%) for BAL and 82.7~99.1% (0.8~4.8%) for BA, except for AM in the *ume* extract and the *umeboshi*. AM in *ume* extract and *umeboshi* could not be determined owing to interference by contaminants.

The determination limits were 10 µg/g for AM, 2 µg/g for PR, and 1 µg/g for BAL and BA, respectively.

(Received April 8, 1991)

Key words: 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 梅加工食品 processed Japanese apricot; シアン配糖体 cyanogenic glycosides; アミグダリン amygdalin; プルナシン prunasin; ベンズアルデヒド benzaldehyde; 安息香酸 benzoic acid

緒 言

シアン配糖体を含有する植物は案外多く、その一部はヒトの食用にされている。青梅 (*Prunus mume* Sieb et Zucc.) は、このような植物の代表的なものの一つであり、種子中の仁に、シアン配糖体であるアミグダリン (AM) が高濃度に含まれていることは良く知られてい

る¹⁾。

我が国では古来より、青梅を梅干しや梅酒漬けなどに加工することにより無毒化し食用にしてきた。

食品中に残留したシアン配糖体の定量には、酵素で配糖体を分解し生成するシアン化水素を比色²⁾あるいはガスクロマトグラフィー³⁾により測定する方法が一般的に用いられている。しかしこれらの方法はいずれも間接的にシアン配糖体を定量するため、配糖体の種類を特定で

* 名古屋市衛生研究所: 〒467 名古屋市瑞穂区萩山町 1-11

きないうえ、酵素反応が妨害された場合には大きな測定誤差を生じる恐れがある。この測定誤差を避けるため高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてシアニン配糖体及びその分解物を直接定量する方法が報告されている。梶原ら⁶⁾は杏仁中の AM を、大西ら⁹⁾は同じく杏仁並びにその製剤中の AM 及びその分解物であるプルナシン (PR)、ベンズアルデヒド (BAL) を HPLC により定量している。しかしながら、これらの方法はいずれも杏仁などに特定した方法であり、夾雑物質の多い梅加工食品に適用することは困難であった。著者らは前報⁶⁾において、とくに夾雑物質の多い梅肉エキス中の AM を、アミノプロピルカラムを用いた順相 HPLC により定量する方法を開発し、市販の梅肉エキスから 53~1,207 $\mu\text{g/g}$ の AM を検出したことを報告した。しかし、この方法は、AM に限定した方法であり、その他のシアニン配糖体及びその分解物の同時定量はできなかった。一方、梅加工食品中には、AM のほか AM の分解により生じたシアニン配糖体の PR をはじめ BAL 及び安息香酸 (BA) が含まれていることが知られている⁷⁾。さらに、梅加工品において梅と共に用いられるシンの葉にも PR が含まれているという報告もある⁸⁾。したがって、梅加工食品中のシアニン配糖体及びその分解物の存在を明らかにするためには、これらの物質を含めた測定が必要である。

そこで、梅加工食品中のこれらの物質を簡便な方法で測定する目的で、前報⁶⁾では定量できなかった PR、BAL 及び BA の同時定量法を AM も含め検討したので報告する。

実験方法

1. 試 料

昭和 63 年 1~2 月に名古屋市内のデパートで購入した梅肉エキス、梅干し、梅酒、梅ジャム、ウメの蜂蜜漬け、梅ドリンク、梅ドロップ、仁入り練り梅及びシソ漬けを用いた。

2. 試 薬 類

1) AM 及び PR 標準溶液: AM (Aldrich 社製)、PR (Sigma 社製) を水に溶解して各々 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の標準原液を調製した。

2) BAL 及び BA 標準溶液: BAL 及び BA (和光純薬工業(株)製) をメタノールに溶解して各々 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の標準原液を調製した。

3) 酵素溶液: エムルシン (東京化成工業(株)製、甘扁桃由来) を 4.0 U/ml となるように水に溶解した。

4) Sep-pak C₁₈ (Millipore 社製): 20 ml の注射筒に装着し、使用前にメタノール 20 ml、水 20 ml の順に注入して活性化した。

その他の試薬類はすべて特級あるいは HPLC 用を用

いた。

3. 装 置

1) HPLC: (株)島津製作所製 LC-6A 型ポンプ、日本分光工業(株)製 870UV 型紫外可視分光検出器

2) プレンダー: (株)日本精機製 HB 型ホモジナイザー

4. HPLC 条件

1) カラム: Capcell pak C₁₈ SG120 ((株)資生堂製) 4.6 mm i. d. $\times$ 250 mm

2) 移動相: アセトニトリル-水-0.2 M リン酸緩衝液 pH 4.0 (16:79:5)

3) カラム温度: 30°

4) 流速: 1.0 ml/min

5) 検出波長: 210 nm

6) 試験溶液注入量: 100 μl

5. 試験溶液の調製

細切した試料 2~10 g をステンレス製のホモジナイザーカップ中にひょう量し、0.05 M クエン酸水溶液 70 ml を加え 3 分間ホモジナイズした後、100 ml のメスフラスコに移し、0.05 M クエン酸水溶液を加えて 100 ml とした。この溶液 50 ml を毎分 2,500 回転で 5 分間遠心分離し、上澄 10 ml を Sep-pak C₁₈ に毎分約 2 ml の速度で注入した。続いて、水 5 ml を同じ速度で注入して Sep-pak C₁₈ を洗浄した後、25 v/v% メタノール 10 ml で溶出した。溶出液を 20 ml のメスフラスコ中に捕集し、水を加えて 20 ml とした。この溶液を試験溶液とし、HPLC 分析に供した。

6. AM 及び PR ピークの確認法

試験溶液 5 ml をスクリーキャップ付き試験管にとり、酵素溶液 0.2 ml を加え 50° のふらん器中に 90 分間放置した。室温まで冷却後、再度 HPLC に注入し AM 及び PR に相当するピークが消失することにより確かめた。

7. 検量線の作成

AM、PR、BAL、BA の標準原液を 0.1~5.0 $\mu\text{g/ml}$ の範囲に 12.5 v/v% メタノール水で希釈し、その 100 μl を HPLC に注入しピーク高さによる絶対検量線法により検量線を作成した。

結果及び考察

1. HPLC 測定条件の検討

カラムの担体として、前報⁶⁾で用いた LiChrosorb NH₂ のほか、Capcell pak C₁₈ SG120 及び Nucleosil 100-5 C₁₈ を用いて分離条件を検討した。LiChrosorb NH₂ では、AM 以外の物質の分離が困難であったが、Capcell pak C₁₈ SG120 及び Nucleosil 100-5 C₁₈ では移動相溶媒にアセトニトリル-水-リン酸緩衝液の混合液を用いたところ、いずれも良好な分離を示した。そこで、より高い分離能が得られた Capcell pak C₁₈ SG120 を採用した。

*1 冠 政光、勝木康隆、中沢久美子、二島太一郎: 日本食品衛生学会第 49 回学術講演会要旨集 p. 19 (1985)。

Fig. 1. High performance liquid chromatogram of standard mixture

Peaks: 1; AM, 2; PR, 3; BA, 4; BAL, 5; mandelonitrile

Injection: each 100 ng

Fig. 2. Effect of pH of sodium citrate buffer on emulsin hydrolysis of amygdalin

移動相溶媒は、アセトニトリル、水及びリン酸緩衝液の組成比を検討した結果、アセトニトリル-水-0.2 M リン酸緩衝液 pH 4.0 (16:79:5) を用いた場合、約 30 分で最適分離が得られることが判明した。

検出は、いずれの物質とも紫外部に吸収を有することから UV 検出器を用いた。移動相溶媒中での極大吸収波長は、AM 及び PR が 210 nm、BA が 230 nm、BAL が 250 nm とそれぞれ異なるが、吸光係数が小さい AM 及び PR が最も高感度となる 210 nm を測定波長として選んだ。

以上の条件で得られた標準品のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

破線は、マンデロニトリルを加えた場合のピークの位置を示したものである。マンデロニトリルは、AM 及び PR の分解物の一つであるが非常に不安定な化合物であ

Fig. 3. Effect of pH of sodium citrate buffer on recoveries of AM, PR, BAL and BA from Sep-pak C₁₈ cartridge

—○—: AM; —▲—: PR; —□—: BAL; —●—: BA

り、純粋な標準品が得難いことから今回は分析対象物質から除外した。

2. 抽出条件の検討

青梅には AM 及び PR を分解する酵素が含まれており、操作中におけるこれらの酵素の影響を避けるため AM 及び PR をシアン配糖体として測定する従来の方法ではメタノール^{4),5)}あるいは熱湯⁶⁾を抽出溶媒として採用している。梅加工食品では、すでに酵素は失活していると推定されるが、この影響を考慮にいれたほうが適用範囲の広い定量法とすることができる。しかしながら、メタノール抽出では、目的物質以外に多くの夾雑物質も抽出され煩雑な精製操作が必要となり、熱湯抽出では、揮発性の高い BAL が著しく低い回収率しか得られなかった。

一方、酵素法を用いたシアン配糖体の分析法では、抽出溶媒に 0.05 M クエン酸緩衝液 pH 5.2 を用いている²⁾。

Fig. 2 は、pH 2.5~6.0 の 0.05 M クエン酸緩衝液中の AM に分解酵素であるエムルシンを作用させた場合の pH と遊離するシアン濃度との関係を示したものである。この結果より pH 3.5 以下ではエムルシンはほとんど作用しないことが分かった。そこで、抽出溶媒には 0.05 M クエン酸水溶液 (pH 2.2) を用いることにした。

3. Sep-pak C₁₈ による前処理法の検討

試料の抽出溶液は、クエン酸をはじめ種々の夾雑物質を含んでおり、直接 HPLC に注入した場合、クロマトグラムへの妨害及び分析カラムの早期劣化をきたす恐れがある。そこで、操作が簡便で精製効率の高い Sep-pak C₁₈ による前処理法を検討した。Fig. 3 は、各標準原液 0.5 ml を 0.05 M クエン酸及びクエン酸緩衝液 (pH 2.5~6.5) で希釈し 100 ml とした溶液 10 ml を Sep-pak C₁₈ に注入し、その液性と回収率との関係を示したものである。

Fig. 4. Elution pattern of AM, PR, BAL and BA from Sep-pak C₁₈ cartridge
Eluting solvent: 25 v/v% aq. methanol
—●—: integrated recoveries of fraction

BA は pH 5 以上では、カルボキシル基が解離して極性の低い Sep-pak C₁₈ の担体への保持力が減少し、その結果、急激な回収率の低下が認められた。しかし、抽出溶媒として用いた 0.05 M クエン酸溶液では、いずれの物質とも完全に保持回収された。

Sep-pak C₁₈ からの溶出溶媒には、カートリッジに充てんされている保持剤が、分析カラムと同様な ODS シリカゲルであることに注目して、メタノール-水系の溶媒を用いた。

Fig. 4 は、溶出溶媒として 25 v/v% メタノール水を用いたときの各物質の溶出パターンである。

10 ml の溶出で、AM, PR, BA は約 100%, BAL は 97% 溶出した。そこで、溶出溶媒としては 25 v/v% メタノール水 10 ml を用いることにした。

HPLC への試験溶液の注入は、分析対象物質が、いったん分析カラムの先端で保持され、濃縮されるような溶媒を用いた方が大量注入が可能であり、シャープなクロマトグラムが得られる。Sep-pak C₁₈ の溶出液を直接 HPLC に注入した場合、溶出液中のメタノール濃度が、25 v/v% と高く、HPLC の移動相溶媒よりも分析対象物質を溶離しやすいため分析カラムの先端で拡散が起こり、クロマトグラム上でピークが割れるような現象が認められた。そこで、Sep-pak C₁₈ の溶出液を、水で希釈して全量 20 ml としたものを試験溶液とした。この溶液は、100 μ l 以上 HPLC に注入しても分離能の低下は認められなかった。

Fig. 5 に、以上の方法により得られた各梅加工食品のクロマトグラムを示した。Sep-pak C₁₈ により精製操作を行ったにもかかわらず、AM ピーク付近に多くの妨害ピークが出現した。とくに、梅肉エキス及び梅干しでは AM ピークが妨害ピークと重なり定量ができなかった。しかし、PR, BA 及び BAL のピークにはいずれの製品についても妨害は認められなかった。

4. 検量線

実験方法で示した方法に従い作成した検量線は、いずれの物質についても 0.1~5.0 μ g/ml の範囲で原点を通る直線性を示した。

5. 添加回収実験

梅加工食品の中でも代表的なものであり、比較的定量を妨害する夾雑物質を多く含むと思われる梅肉エキス、梅干し、梅酒及び梅ジャムを用いて添加回収実験を行った。Table 1 は、梅肉エキス 2 g、梅干し 5 g、梅酒 5 g、梅ジャム 5 g に、AM, PR, BAL, BA 各 200 μ g を添加し、5 回の繰り返し定量を行い回収率及び変動係数を求めた結果である。

AM は、夾雑成分による妨害を受けやすく、先に述べたように、梅肉エキス及び梅干しでは定量が困難であった。梅酒及び梅ジャムでは若干の妨害が認められるものの同時定量が可能であり満足できる回収率及び変動係数が得られた。PR 及び BAL は、梅肉エキスが約 70% とほかの製品に比べ若干低い回収率を示した。BA は、いずれの製品についても良好な結果が得られた。

Fig. 5. High performance liquid chromatograms obtained from ume-products by overall procedure

(A) ume-extract; (B) umeboshi

(C) umeshu; (D) ume-jam

Peaks: 1; AM, 2; PR, 3; BA, 4; BAL

Table 1. Recoveries of AM, PR, BAL and BA from Ume Products

Sample	Added ($\mu\text{g/g}$)	AM		PR		BAL		BA	
		Av. (%)	C. V. (%)	Av. (%)	C. V. (%)	Av. (%)	C. V. (%)	Av. (%)	C. V. (%)
Ume-extract	100	—	—	69.9	4.2	71.9	1.8	80.8	4.8
Umeboshi	40	—	—	100.7	3.8	84.8	1.3	82.7	3.1
Umeshu	40	86.9	3.7	90.8	1.6	85.0	2.6	98.0	3.5
Ume-jam	40	100.6	7.7	105.3	0.9	77.9	1.7	99.1	0.8

Av.: Average value ($n=5$)

C. V.: Coefficient of variation

Table 2. Analytical Results of AM, PR, BAL and BA in Ume Products

Sample	AM ($\mu\text{g/g}$)	PR ($\mu\text{g/g}$)	BAL ($\mu\text{g/g}$)	BA ($\mu\text{g/g}$)
Ume-extract	—	256	30	162
Umeboshi	—	59	1	9
Umeshu	nd	34	16	5
Ume-jam	nd	13	3	2
Ume-honey	155	23	7	nd
Ume-fruit-drink	nd	19	nd	5
Ume-drops	161	59	nd	nd
Neriume (contain kernel)	325	55	21	16
Shiso (perilla leaves)-zuke	nd	92	3	9

—: Undetectable; nd: Not detected

6. 酵素反応を利用した AM 及び PR ピークの確認

AM 及び PR はエムルシンなどの酵素によりシアン化水素、BAL 及びグルコースに分解する。大西ら⁵⁾は、この反応を AM ピークの確認法に利用した。すなわち、試料溶液を酵素処理した後、再度 HPLC 分析し AM に相当するピークの消失と BAL ピークの出現を確認する方法である。そこで、この方法を利用し、AM 及び PR の確認を行った。

7. 定量限界

本法の定量限界は、試料採取量を 5 g とした場合、夾雑物質による妨害を受けやすい AM については梅酒及び梅ジャムで 10 $\mu\text{g/g}$ 、PR はいずれの製品についても 2 $\mu\text{g/g}$ 、BAL、BA は 1 $\mu\text{g/g}$ であった。

8. 梅加工食品の測定結果

市販されている数種の梅加工食品について本法を用いて測定した結果を Table 2 に示した。

ま と め

梅加工食品に含まれるシアン配糖体の AM、PR 及びその分解物である BAL、BA の同時定量法を検討し、以下の結果を得た。

1) HPLC の分析カラムに Capcell pak C₁₈ SG120 を用い AM、PR、BAL、BA を約 30 分で同時定量できる測定条件を見出した。

2) 試料からの抽出溶媒に 0.05 M クエン酸溶液を用い、精製に Sep-pak C₁₈ を利用して簡便で迅速な前処理法を開発した。

3) 梅肉エキス、梅干し、梅酒及び梅ジャムにおける添加回収実験の結果、AM が夾雑成分の妨害を受けやすく、特に夾雑物質の多い梅肉エキス及び梅干しでは定量が困難であったが、PR、BAL、BA については、定量を妨害するピークは認められなかった。回収率は AM が 86.9~100.6% (C. V. 3.7~7.7%)、PR が 69.9~105.3% (0.9~4.2%)、BAL が 71.9~85.0% (1.8~2.6%)、BA が 82.7~99.1% (0.8~4.8%) であった。

4) AM 及び PR ピークの確認にこれらの分解酵素を利用し、定量法の信頼性を高めた。

5) 本法の定量限界は、AM が 10 $\mu\text{g/g}$ 、PR が 2 $\mu\text{g/g}$ 、BAL、BA は 1 $\mu\text{g/g}$ であり、これらの物質の梅加工食品中の残留検査に実用的な結果が得られた。

本研究の概要は日本食品衛生学会第 56 回学術講演会 (1988 年 11 月、静岡) で発表した。

文 献

- 1) 下中邦彦編: "世界大百科事典" p. 680 (1964) 平凡社
- 2) 日本薬学会編: "衛生試験法・注解" p. 92~93 (1990) 金原出版
- 3) Kawai, S., Kobayashi, K., Takayama, Y.: J. Chromatogr. 210, 342~345 (1981).
- 4) 梶原直子, 富山智恵子, 二宮隆博, 細貝祐太郎: 食衛誌. 24, 42~46 (1983).
- 5) 大西栄子, 山田俊雄, 山田和雄, 井上 肇, 瀬山義幸, 山下三郎: 分析化学 33, 477~481 (1984).
- 6) 寺田久屋, 坂部美雄: 衛生化学 34, 36~40 (1988).
- 7) 畑中久勝, 金田吉男: 食衛誌. 26, 350~356 (1985).