報 文

電気化学検出 HPLC によるスパイス類及び
豆類中のコリンの測定

(平成 7 年 7 月 25 日受理)

松澤睦子* 川井英雄*

Determination of Choline in Spices and Beans by HPLC
with an Electrochemical Detector

Mutsuko MATSUZAWA and Hideo KAWAI

(Kagawa Nutrition Junior College: 3-24-3, Komagome, Toshima-ku,
Tokyo 170, Japan)

A simple and rapid method was developed for quantitative analysis of choline in food by HPLC with an electrochemical detector. The hydrolysis of combined forms of choline in food into the free form was performed with hydrochloric acid.

The calibration plot for choline was linear in the range of 0.004~2.00 nmol and the detection limit of choline was 4 pmol (0.4 ng) as choline chloride. The recovery of choline added to food was 93~105%. The average concentrations (mean $\pm$ SD) of choline in spices and beans were 0.91 $\pm$ 0.62 mg/g and 1.71 $\pm$ 0.34 mg/g, respectively.

(Received July 25, 1995)

Key words: コリン cholin; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 電気化学検出器 electrochemical detector; スパイス類 spices; 豆類 beans

結 言

コリンは動植物中では結合型であるリン脂質として広く分布し、脂質代謝など重要な生理作用を行っている。また生体細胞ではタンパク質とともに生体膜を構成して特殊な機能をはたしている^{1),2)}。従来コリンの測定法は化学的定量法^{3),4)}、微生物学定量法⁵⁾などあるが操作が大変に煩雑である。また最近酵素法による定量法⁶⁾が開発されている。しかし、HPLCを用いる遊離型コリンの定量法は生体試料⁷⁾などではみられるが食品に応用した例はない。食品中のコリンはほとんどが結合型リン脂質及びコリン塩として存在しているといわれている。今回著者らは食品中の総コリンを検出するため食品の加水分解には前田ら⁸⁾により報告された方法を用いて、次いで電気化学検出高速液体クロマトグラフィー (ECD-HPLC) による定量方法を検討し、簡便で迅速な測定方法を作成した。更にコリン含量の高いといわれている種

子スパイス⁹⁾など数種食品中のコリン含量を測定したので報告する。

実 験 方 法

1. 試 料

スパイス類 23 種、豆類 15 種、その他小麦粉など 8 種の市販品を購入し、合計 46 種を試料に用いた。

2. 試 薬

過塩素酸 (特級) (PCA)、1-デカスルホン酸ナトリウム、塩化テトラメチルアンモニウム (特級) は関東化学 (株) 製、塩酸 (特級)、水酸化ナトリウム (特級)、リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 (特級)、炭酸水素カリウム (特級)、塩化コリン (一級) (Ch) は和光純薬工業 (株) 製、ヨウ化エチルホモコリン (EHC) 標準液は (株) エイコム製、カタラーゼ (Catalase from bovine liver, 1540 units/mg solid) はシグマ社製のものを使用した。

3. 装 置

高速液体クロマトグラフポンプ: (株) 日立製作所製 L-6000

* 女子栄養短期大学: 〒170 東京都豊島区駒込 3-24-3

Scheme 1. Extraction of choline in foods

Fig. 1. Chromatograms of standard and soybean extract

The standard contained 40.0 pmol of choline chloride and 40.0 pmol of ethylhomocholine iodide (EHC). Soybean extract contained 100.0 nmol of EHC as an internal standard.

デガッサー: DG-100 (以下すべて(株)エイコム製)

分析カラム: AC-GEL

酵素カラム: AC-Enzymypak

プレカラム: Prepak Set

カテコールアミントラップ: CA-Trap

電気化学検出器: ECD-100 型

作用電極: 白金電極 WE-PT

参照電極: RE-100

恒温水循環器: CTC-100

4. HPLC の測定条件

カラム温度: 33°

移動相: 1-デカスルホン酸ナトリウム 200 mg/L 及び塩化テトラメチルアンモニウム 65 mg/L 含有の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0)

流速: 1.0 ml/min

Fig. 2. Calibration curves for choline chloride

ECD 設定加電圧: +450 mV (vs. Ag/AgCl)

5. 試験操作

5.1 試験溶液の調製: 前田ら⁶⁾の方法に従い結合型コリンを加水分解し試験溶液とした。すなわち、粉末試料(コリンとして 0.2~2.0 mg)を遠沈管に採取し、蒸留水 6 ml, 塩酸 6 ml を加えて混和後、栓をして沸騰水浴中で 45 分間加熱した。水冷後、100 ml ビーカーに移し、6 N 水酸化ナトリウム溶液を用い pH 6.7~7.3 に調整し、水を加えて総量を 70~80 ml にした。次に 1.35% カタラーゼ溶液 0.8 ml を加え 10 分間室温に放置後、水を加えて正確に 100 ml とし試験溶液とした。浅居らの報告⁹⁾や厚生省の報告¹⁰⁾により、牛乳、プロセスチーズ、ヨーグルトなどには過酸化水素様物質が検出されることからカタラーゼを使用することとした。過酸化水素様物質はカラム中でガス化しコリン測定を妨害する可能性があることから除去した。

5.2 試験溶液の前処理: Scheme 1 の方法に従い PCA を用いて除タンパクを以下のように行った。

総コリンを測定する場合は試験溶液 1 ml を遠沈管に、遊離型コリンを測定する場合は試料(コリンとして 0.2~2.0 mg)を直接遠沈管に採取し、0.2 M PCA 5 ml, EHC (内標) 100 nmol を加え 30 秒混和し、氷冷下で 30 分間放置した。次に 0° 12,000 G で 15 分間遠心分離し、上清液を 2 ml 分取した。これに 0.2 M 炭酸水素カリウム 2 ml を加えて中和した後、氷中に 30 分

Table 1. Recovery of Choline Added to Foods

Samples	Added (mg)		Found (mg)		Recovery (mean $\pm$ SD) (%)
Soybean	0	0.453	0.512	0.447	105.8 $\pm$ 1.5
	1.042	1.541	1.614	1.565	
White rice	0	0.387	0.357	0.449	99.6 $\pm$ 11.3
	0.260	0.627	0.602	0.743	
Mayonnaise	0	0.682	0.620	0.637	96.2 $\pm$ 7.9
	0.521	1.183	1.080	1.179	
Skim milk powder	0	0.673	0.503	0.704	93.2 $\pm$ 9.3
	0.260	0.890	0.747	0.970	

Result of 3 replicate.

2,500 nmol (0.260 mg) of choline were added to white rice and skim milk powder.

5,000 nmol (0.521 mg) of choline were added to mayonnaise.

10,000 nmol (1.042 mg) of choline were added to soybean.

Table 2. Choline Contents in Spices, Beans and Others

Samles	mg/g	Samples	mg/g
Seed spices		Beans	
Ajowan seeds	1.40	Azuki bean	1.04
Allspice seeds	0.26	Concord pole	1.36
Anisu seeds	1.97	Cowpea	2.06
Black pepper seeds	0.13	Dwarf red kidney bean	1.67
Caraway seeds	2.37	Garbanzo	1.87
Cardamon seeds	0.31	Garden pea	1.64
Skin of cardamon fruit	0.61	Green gram	1.94
Celery seeds	1.16	Kidney bean	1.34
Coriander seeds	0.76	Kidney bean 'Murasakihanamame'	1.69
Dill seeds	1.08	Kidney bean 'Ooshirohanamame'	1.58
Egoma seeds	1.07	Mottled kidney bean	1.85
Fennel seeds	1.45	Red seeded field pea	1.42
Fenugreek seeds	2.06	Soybean	2.05
Fruit of lycium	0.89	Soybean 'Kokkoudaizu'	2.45
Fruit of star anis	0.37	Soybean 'Hakutyoudamame'	1.69
Gardenia seeds	0.56	Mean $\pm$ SD	1.71 $\pm$ 0.34
Skin of gardenia fruit	0.41	Others	
Hemp seeds	0.83	Cooked white rice	0.47
Red pepper seeds	0.98	Cow's milk	0.10
Skin of red pepper fruit	0.96	Dry corn	0.68
Sesame seeds	0.81	Egg yolk, fresh	11.04
White pepper seeds	0.03	Flour	1.17
Mean $\pm$ SD	0.93 $\pm$ 0.61	Mayonnaise	1.38
Leaf spice		Skim milk powder	1.15
Bay leaves	0.36	White rice	0.96

間放置した。この上清液を0.45 μ m シリンジフィルター (DISMIC-13CP) に通し、その4 μ l をECD-HPLC システムに注入し、分析を行った。

5.3 標準溶液の調製: 塩化コリンは80°, 24時間減圧乾燥し、 0.5×10^{-1} M 液の標準原液を調製し、順次希

釈して 0.5×10^{-5} M 液までを調製した。EHCは市販の 1.0×10^{-2} M 標準液を希釈して 1.0×10^{-4} M 液を調製し内部標準液とした。EHCに対し塩化コリンの重量比が0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0の検量線用標準溶液を調製した。

Table 3. Comparison of the Choline Contents in Foods by Different Determination

Samples	Proposed method	Enzymatic ⁶⁾ method	Other's ¹¹⁾ method
Cooked white rice	0.47	0.47	
Cow's milk	0.10	0.12~0.19	0.13~0.17
Egg yolk, fresh	11.04	12.20	11~17
Flour	1.17		0.5~1.4
Mayonnaise	1.38	1.90	
Skim milk powder	1.15	1.12~1.53	0.6~1.6
Soybeans	2.05		2.1~3.4
White rice	0.96		0.9

5.4 計算方法: 検量線から得られた塩化コリンの濃度単位 nmol/g をコリンの mg/g に換算し, 試料中のコリン含量を求めた.

結果及び考察

1. 検出限界及び定量性

塩化コリン, EHC 標準品及び試料のクロマトグラムを Fig. 1 に示した.

図のように標準品, 試料ともに塩化コリン, EHC の分離は良好であった. 塩化コリンの検出限界は, 4 pmol (0.4 ng) であった. 内部標準である EHC に対する塩化コリンのピーク面積比と重量比は 0.1~50.0 まで直線性を示し ($r=0.9999$), 定量性は極めて良好であることが確認された (Fig. 2).

2. 添加回収試験

大豆, 精白米, スキムミルク, マヨネーズについてそれぞれ 3 回ずつ添加回収試験を行った. 結果は Table 1 に示すとおりで, それぞれの平均値 (±SD) は大豆 $105.8 \pm 1.5\%$, 精白米 $99.6 \pm 11.3\%$, マヨネーズ $96.2 \pm 7.9\%$, スキムミルク $93.2 \pm 9.3\%$ であった.

3. 試料中のコリン含量

コリン含量の分析結果を Table 2 に示した. 種子スパイスの平均値 (±SD) は 0.93 ± 0.61 mg/g でかなり含量に差がみられた. 種子スパイスについてはキャラウェイ種子が最も含量が高く 2.37 mg/g であり, 最低含量はホワイトペッパー種子の 0.03 mg/g であった. 他に低含量のものはオールスパイス種子, ブラックペッパー種子, カルダモン種子, スターアニスなどであった. これらの低含量の種子スパイスは, すべて完熟前に収穫されるものであるためコリンの含量は収穫時期と関係があるように思われた. 葉スパイスは 1 種類のみであるが, ベイリーフは 0.36 mg/g であった. 豆類については黒光大豆が最も含量が高く 2.45 mg/g で, 最低含量はあずきの 1.04 mg/g であり, すべて 1.00 mg/g 以上であった. 平均値 (±SD) は 1.71 ± 0.34 mg/g であり含量の差は少なかった. 実験に使用した豆類はすべて完熟後に収穫されたものである. 以上のように種子スパイスは低含量のものが多く, 豆類は高含量であった. これは上

Table 4. Concentration of Free Choline in Total Choline on Foods

Samples	Free Ch (mg/g)	Total Ch (mg/g)	Free Ch/Total Ch (%)
Cow's milk	0.03	0.10	30.0
Egg yolk, fresh	0.01	11.04	0.1
Flour	0.05	1.17	4.3
Mayonnaise	0.01	1.38	0.7
Skim milk powder	0.33	1.15	28.7
Soybean	0.35	2.05	17.1
White rice	0.01	0.96	1.0

記のように熟度の違いとも考えられるが, 植物の種類の違いとも考えられるため今後の検討課題としたい. また他の食品についてのコリン含量の結果も Table 2 に示した. また今回報告した著者らの結果は Table 3 に示すとおり, これまでに報告されている測定結果^{6), 11)} とほぼ同レベルであった. 次にミルクなど 7 種食品について遊離コリンと総コリンの含量の比較を行った. Table 4 に示すとおり総コリン中の遊離コリンの示す割合は卵黄, マヨネーズ, 牛乳, スキムミルク, 小麦粉, 精白米, 大豆において 0.1~30.0% と 3 割以下であった.

要 約

食品中の結合型コリンを遊離型コリンに加水分解し, 電気化学検出 HPLC によって分析する方法を検討し, 簡便で迅速なコリンの測定方法を作成した. 本法の検量線は 0.004~2.00 nmol で直線性を示し, 検出限界は 4 pmol (0.4 ng) であった. 大豆など 4 種食品への添加回収率は 93.2~105.8% であった. 測定結果は, スパイス類の平均値 (±SD) が 0.91 ± 0.62 mg/g であり, 豆類の平均値 (±SD) は 1.71 ± 0.34 mg/g であった. 本法の測定値は精白米, 小麦粉, 大豆, スキムミルク, 卵黄などについては従来の報告^{5), 6)} とよく一致した.

文 献

- 1) 菰田 衛: "レシチンその基礎と応用" p. 101~110 (1991) 幸書房.

- 2) 原 健次: “生理活性脂質の生化学と応用” p. 85~119 (1993) 幸書房.
- 3) 小原哲二郎編: “食品分析ハンドブック” p. 366~367 (1982) 建帛社.
- 4) Lim, F., Schall, E. D.: J. Assoc. Off. Agr. Chem. **47**, 501 (1964).
- 5) 日本薬学会編: “衛生試験法・注解 1990” p. 381~382 (1990) 金原出版.
- 6) 前田忠男, 岡野千恵, 三宅 勲, 澤 潤一: 食衛誌. **34**, 32~37 (1993).
- 7) 藤木嘉明, 池田淑夫, 奥山真司, 友田桂子, 大城公恵, 伊藤哲一彦, 山内惟光: 医学のあゆみ **150**, 173~174 (1989).
- 8) Haranath, P. S. R. K., Akther, M. H., Sharif, S. I.: Phytotherapy Research, **1**, 91~92 (1987).
- 9) 浅居良輝, 桑平秀雄, 下田浩三, 佐藤勝也: 食衛誌. **23**, 438~443 (1982).
- 10) 厚生省環境衛生局食品化学課通牒: 食品衛生研究 **31**, 572~585 (1981).
- 11) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顕雄監修: “第六版食品添加物公定書解説書” p. D-392~D-393 (1992) 廣川書店.