

資料

LC-MS/MSによる食品中のシアン配糖体検査法の検討

Quantitative Method of Cyanogenic Glycosides in Foods by LC-MS/MS

山下 清佳 溝脇 直規¹ 篠崎 陽二

1 はじめに

天然にシアン化合物を含有する食品は、数多く存在しており、中でもよく知られ食用とされてきたものに、青梅、ビターアーモンド、びわの種子及びキャッサバなどがある。これらの食品は、シアン化合物をシアン配糖体として含有している。青梅、ビターアーモンド及びびわの種子のシアン配糖体は「アミグダリン」、キャッサバのシアン配糖体は「リナマリン」である。

2017年に国内でびわの種子を使用した食品から10 μ g/g（急性毒性になる目安）を超えるシアン化合物が検出されたことから、そのまま喫食する食品について、10 μ g/gを超えてシアン化合物が検出された場合、食品衛生法第6条第2号に該当する旨が通知¹された。

また、同年当県では、家庭で調理したキャッサバ芋を喫食した1名の食中毒が発生した。

なお、当県ではキャッサバを商業的に栽培している地域があり、シアン化合物含有量が不明のびわの葉茶も販売されている。

このような経緯から、既報²で水蒸気蒸留-ピリジンカルボン酸・ピラゾロン定量法（以下「蒸留法」とする。）により、食品中のシアン化合物（シアン化水素）を測定する方法を確立したが、さらに迅速に検査するためにLC-MS/MSでの検討を行ったので報告する。

2 方法

2. 1 試料

2. 1. 1 キャッサバ芋

芋は鹿児島大学から提供されたもの及び当センターで栽培したものを使用した。

・キャッサバ芋の外輪部（以下「外」という。）と喫食部分（以下「中」という。）（図1）

・ホワイト（W）とイエロー（Y）の2品種

なお、外はシアン化合物の含有量が高く、通常喫食する習慣はない。

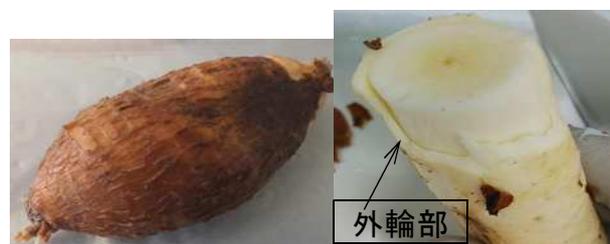


図1 キャッサバ芋

2. 1. 2 その他の試料

- ・市販品のタピオカ粉
- ・市販品のびわの葉茶
- ・青梅の果肉及び仁（仁は種子の胚乳部分）
- ・びわの果肉及び仁（仁は種子の茶色の皮をむいた部分）
- ・ジャガイモ

2. 2 標準品及び試薬等について

標準品のシアン配糖体は、富士フィルム和光純薬（株）製のアミグダリン（以下「AM」という。）標準品とSigma-Aldrich製のリナマリン（以下「LM」という。）標準品を用いた。

その他の試薬として、メタノール（HPLC用及びLC/MS用）、アセトニトリル（HPLC用及びLC/MS用）、ギ酸アンモニウム溶液（HPLC用）及びギ酸（LC/MS用）は、富士フィルム和光純薬（株）製を、酢酸は林純薬（株）製を用いた。

固相抽出カラムは、GLサイエンス（株）製InertSep mini NH-2（500mg/3mL）（以下「NH2カラム」という。）を用いた。

¹ 退職（2023年3月）

2. 3 装置

液体クロマトグラフは、(株)島津製作所製 Prominence LCシリーズを、質量分析装置は、AB Sciex 社製4000QTRAPを使用した。

2. 4 LC/MS/MS測定条件

南谷³⁾らの「植物性自然毒の多成分同時分析法の開発」を参考に当初実施し、富岡⁴⁾ら、加藤⁵⁾ら及び石塚⁶⁾らを参考に改良を行い、表1のとおりとした。

表1 LC-MS/MSの測定条件

LC条件		
分析カラム	RESTED製 Raptor C18 (内径2.1mm, 長さ150mm, 粒径2.7 μ m)	
流速	0.2mL/min	
カラム温度	40°C	
注入量	5 μ L	
移動相	A: 0.01%酢酸水溶液 B: アセトニトリル	
グラジェント条件	B%: 2(0分)→65(5分)→90(11分) 2(11.1分)→2(15分)	
MS/MS条件		
イオン化法	ESI (Negative)	
イオンスプレー電圧	-4.5kv	
イオンソース温度	500°C	
測定イオン	Q1	Q3 (m/z)
リナマリン (定量)	245.867	187.8
(定性)	245.867	160.4
アミグダリン (定量)	456.055	322.8
(定性)	456.055	58.9

2. 5 検量線の作成

AMはメタノールに、LMは精製水に溶解し、2つの標準液を混合しメタノールで希釈し、0.02%酢酸水溶液で混合標準溶液の濃度が各1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 ng/mLとなるよう調製した。

2. 6 試験溶液の調製

加藤⁴⁾ら及び石塚⁵⁾らを参考に抽出及び精製方法の検討を行った。

まず、抽出を検討するにあたって、シアン化合物含有食品は、シアン配糖体とシアン配糖体を分解する加水分解酵素の両方を自ら持つことから、試料細切・粉碎の際にシアン化合物含有量が減少する傾向⁷⁾が見られた。そこで、使用する試料を加熱して加水分解酵素を失活させたものを使用した。

試料はびわの仁及びキャッサバ芋を用い、有機溶媒や水を組み合わせた溶液での抽出及び精製の検討を行った。

これらの検討を行い改良した結果、図2の試験方法のとおり試験溶液の調製を行うこととした。(以下「LC法」という。)

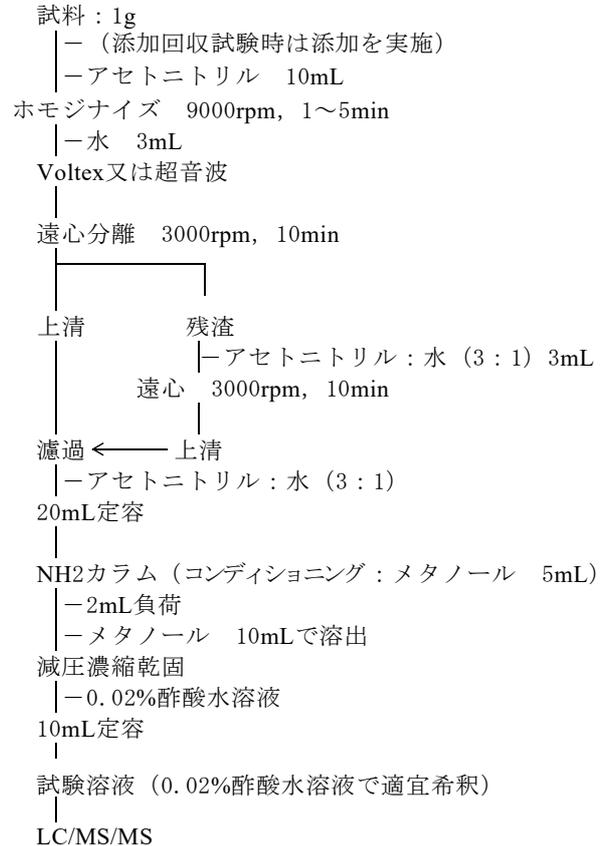


図2 試験方法

2. 7 妥当性評価

試験方法 (図2) について選択性、真度及び精度を評価した。

試料には、AM, LMが含まれていないことを確認したびわの葉茶、びわの果肉及びタピオカ澱粉を使用した。また、キャッサバ芋のLMの完全除去が困難だったため、揚げたジャガイモを使用した。これは、ジャガイモにシアン化合物が含まれていないことと、油調理品には夾雑物が多く含まれていることから選択した。これらに、タピオカ澱粉の基準値であるシアン化水素として10 μ g/g相当になるよう、AMを150 μ g/g, LMを100 μ g/g添加した。この添加量は、加水分解酵素によりAM及びLMからシアン化水素が生成された場合、それぞれ8.9 μ g/g及び10.9

μg/gに相当する。

妥当性評価の方法は、厚生労働省から示された「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(以下「ガイドライン」という。)⁷⁾に準じて行った。検査員1名で2併行、5日間分析し、真度(%), 併行精度(RSD%)及び室内精度(RSD%)を評価した。

2. 8 シアン化合物含有食品を使用した蒸留法とLC法の比較検査

天然にシアン化合物を含有する食品は、試料調製時の均一化工程でシアン配糖体の含有量が減少することが分かっている²⁾、既報²⁾で確立したシアン配糖体を加水分解酵素で分解させ生成したシアン化水素を測定する蒸留法と、直接シアン配糖体を測定する今回確立したLC法で比較を実施した。

また、均一化前の試料全体を密封袋に入れ湯煎する方法やレンジで加熱する方法で、加水分解酵素を失活させた後、細切・粉碎したものを試料とした。

3 結果及び考察

3. 1 LC/MS/MSの測定条件検討について

当初5mMギ酸アンモニウム含有0.1%ギ酸溶液とアセトニトリルの移動相を用いて、ポジティブモードでアンモニウム付加体(以下「[M-NH₄⁺]という。)を測定³⁾したが、繰り返し測定を行うとLMの再現性が低く、イオン化が安定していないと考えられる結果となった。

そこで、インフュージョン法によりAM及びLM標準溶液を直接質量分析装置に導入し、AM及びLMのイオン化を確認した。その際、標準溶液の希釈には移動相を1:1で用いることになっているが、5mMギ酸アンモニウム含有0.1%ギ酸溶液の他に、文献^{4)~6)}を参考に酢酸でも検証した。その結果、5mMギ酸アンモニウム含有0.1%ギ酸溶液とアセトニトリルの組み合わせではポジティブモードで[M-NH₄⁺]が、酢酸とメタノール及びアセトニトリルの組み合わせでは、ネガティブモードでプロトン脱離イオン(以下「[M-H]」という。)が生成し、それぞれ良好な感度が得られた。ただし、LMについては、移動相に酢酸を用いてネガティブモードで[M-H]を測定した場合、再現性が改善したことからポジティブモードよりもネガティブモードのイオン化が安定しているものと考えられた。

これらのことから、移動相に酢酸を用いたネガティブモードでの測定を行った。

移動相の有機溶媒との組み合わせについては、酢酸-メタノールと酢酸-アセトニトリルでカラムを使用して

検証した。その結果、アイソクラティック条件ではメタノール及びアセトニトリルどちらの移動相もピーク形状が悪かったが、酢酸-アセトニトリルでグラジエント条件にしたところピーク形状が改善された。

なお、酢酸濃度については、鈴木⁸⁾らの報告では、AMは0.02~0.05%で最も感度が良好であり、酢酸を含まないと感度が大きく低下したとの結果であった。LMについては、加藤⁹⁾らの報告で0.01%酢酸水溶液を使用していたため、0.01~0.05%濃度で検証した結果、酢酸濃度0.01%を使用した時、AM及びLMの両方で良好な検出感度が得られた。

3. 2 検量線の作成について

検量線用標準液の希釈液についても検討したところ、AMは0.02%酢酸水溶液+有機溶媒と0.02%酢酸水溶液が検出感度が一番高く、続いて0.01%酢酸水溶液、0.01%酢酸水溶液+有機溶媒、水の順で検出感度が良好であった。LMは水の検出感度が一番高く、続いて0.01%酢酸水溶液と0.02%酢酸水溶液は同等位で、0.01%酢酸水溶液+有機溶媒、0.02%酢酸水溶液+有機溶媒の順で検出感度が良好だった。そこで、同時測定を行うことから0.02%酢酸水溶液を用いて検量線用標準液を調製した。その結果、AM及びLMの決定係数(R²)は0.999以上となり、良好な直線性を示した。なお、有機溶媒はアセトニトリルとメタノールを使用した。

3. 3 試験溶液の調製について

3. 3. 1 抽出溶液の検討

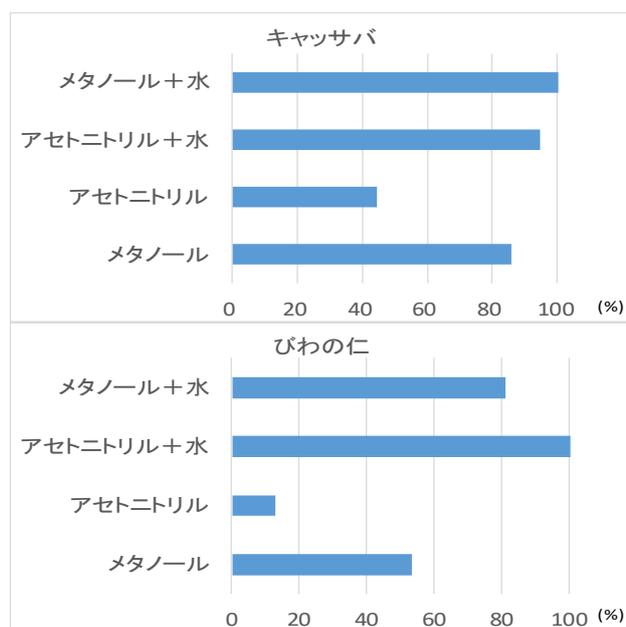


図3 抽出溶液の比較結果

試料に加水分解酵素を失活させたキャッサバとびわの仁を用いて、メタノール+水、アセトニトリル+水、アセトニトリル及びメタノールで抽出溶液の検討をした結果、図3のとおり結果（最も抽出結果が良好だった値を100%として比較した）となり、アセトニトリルと水の混合で抽出を行うこととした。なお、有機溶媒と水の比率は加藤⁵⁾らの報告を参考とした。

なお、一般にシアン配糖体は水溶性であり、加藤⁵⁾らの報告でもLMの抽出には水が必要であるとされている。そこで、加水分解酵素の働きを阻害するために、最初にアセトニトリルのみで抽出し、その後、水も加えて抽出を行うこととした。

3. 3. 2 精製条件の検討

精製カラムを使用しない場合、結果の再現性が低くなったため、精製カラムを使用することにした。

精製カラムは文献^{4)~6)}から、NH2カラムを使用した。しかし、AM、LMの両方同時に精製している例はなかったため、コンディショニング及び溶出液の検討を、アセトニトリルとメタノール及びそれらに水を配合したものをを用いて検討した。

その結果、メタノールでコンディショニング及び溶出を行うと負荷する抽出液がアセトニトリルであっても、両物質ともに溶出されることがわかった。反対にアセトニトリルでコンディショニングを行うとAM及びLMはほとんど溶出しなかったため、NH2カラムのコンディショニング及び溶出溶液はメタノールとした。

3. 4 妥当性評価結果について

結果を表2に示す。全て適合した。

表2 妥当性評価の目標値及び結果

		選択性	真度 (平均)	併行精度	室内精度
目標値		○	70~120 (%)	≤10 (RSD%)	≤15 (RSD%)
AM	びわの葉茶	○	72.6	4.5	4.8
	びわの果肉	○	107.2	6.3	8.3
LM	タピオカ粉	○	91.0	6.5	6.6
	あげ芋	○	89.7	3.7	4.2

3. 5 シアン化合物含有食品を使用した蒸留法とLC法の比較検査

結果は表3のとおりで、全体的にLC法は蒸留法より低い結果となった。ただし、加熱した試料では両法の結果

がほぼ同じであった。

これは、シアン配糖体を酵素溶液で分解させ生成したシアン化水素を測定する蒸留法と、直接シアン配糖体を測定するLC法の違いが要因と考えられた。

そのため、LC法におけるポイントは、試料調製時に加水分解酵素の働きを止めることであると示唆された。

表3 蒸留法とLC法をシアン化水素に換算時の比較

検体名	蒸留法 (A) (µg/g)	LC法 (B) (µg/g)	B/A×100 (%)
キャッサバ芋外W	396.0	150.90	38.1
キャッサバ芋外Y	286.5	138.72	48.4
キャッサバ芋中W	30.9	22.13	71.6
キャッサバ芋中Y	23.2	22.07	95.1
青梅の果肉	1.9	0.00	0.0
青梅の仁	1287.0	165.11	12.8
びわの仁	990.1	205.20	20.7
加熱キャッサバ芋中Y	33.9	33.76	99.6
加熱キャッサバ芋中Y	18.3	19.11	104.4

そこで、試料をある程度の大きさのまま密封袋に入れて湯煎して加熱する方法とラップで密封した後レンジで加熱する方法を試し、その後細切・粉碎を行うこととした。湯煎だと中心部まで加熱するのに時間がかかったが、レンジだと簡単に中心部まで加熱することができた。ただし、レンジによる加熱は、加熱終了後レンジの蓋を開けた時にシアン独特のアーモンド臭がすることもあった。このことは、レンジによる加熱でシアン化水素が揮発したことを示唆しており、シアン配糖体の消失を意味している。

しかし、このレンジで加熱する方法が短時間で効率よく加熱でき、表4のとおり、青梅を除き、先ほどの結果より、ほぼ全ての食品で蒸留法の値に近づく結果となった。

なお、青梅の値に開きがあるのは、他の食品に比べ水分含有量が多く、加熱の際ににじみ出る水分にシアン配糖体が溶出され、加水分解酵素の働きを促進したと考えられた。

これらより、シアン配糖体を直接測定するLC法では、生の試料をあらかじめラップで密封しレンジで加熱した後、細切・粉碎する方法を選択した。しかし、青梅などの水分が多い試料や試料の大きさによっては加熱時間の調整が必要で、これらについてはさらに検討する必要があると考えられた。

表4 蒸留法とレンジ加熱してからLC法を実施した場合のシアニ化水素に換算時の比較

検体名	蒸留法 (A) ($\mu\text{g/g}$)	LC法 (B) ($\mu\text{g/g}$)	B/A \times 100 (%)
キャッサバ芋外W	396.0	321.30	81.1
キャッサバ芋中W	30.9	35.88	116.0
キャッサバ芋中Y	97.4	92.56	95.0
青梅の果肉①	1.9	0.02	1.0
青梅の果肉②	2.2	1.09	49.5
青梅の仁①	1287.0	715.27	55.6
青梅の仁②	2574.0	1610.78	62.6
びわの仁	1578.9	1579.19	100.0

4 まとめ

シアニ配糖体を含有する食品は加水分解酵素も含有するため、試料の細切・粉碎にてそれらが触れあうと、シアニ配糖体が分解されシアニ化水素として揮発して減退してしまう。したがって、シアニ配糖体そのものの含有量を正確に測定することができなかった。

蒸留法では、試料を加熱せずに粉碎するが、その後、酵素溶液を添加し、生成したシアニ化水素を測定することから、加水分解酵素の働きを止める必要がなく、生成したシアニ化水素を揮発させないことが肝要であった。

しかし、今回開発したLC法は、シアニ配糖体そのものを測定することから、加水分解酵素の働きをいかに止めるかが重要になる。

食中毒の原因となった食品の迅速検査を目的に今回の試験法開発を試みたが、試験供与される検体、特に喫食残品は、調理による細切や加熱の状態によって、加水分解酵素が完全に失活しているとは限らず、今回のLC法では、喫食時のシアニ化合物含有量の測定は容易でないことがわかった。しかしながら、加水分解酵素の影響さえ排除できれば、蒸留法と比べて迅速に検査できる方法が確立できた。

謝 辞

キャッサバとその苗を提供していただいた鹿児島大学農学部国際食料資源学特別コースの方々や当センターでキャッサバ栽培に尽力していただいた方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課長通知；シアニ化合物を含有する食品の取扱いについて（薬生食監発0614第2号），平成30年6月14日
- 2) 山下清佳，下堂菌正弘，溝脇直規；食品中のシアニ化合物検査法の検討，鹿児島県環境保健センター所報，**23**，35～39，（2022）
- 3) 平成30年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安全確保推進研究事業植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究研究分担報告書
<https://mhlw-grants.niph.go.jp/project/149239>
（2023/6/6アクセス）
- 4) 富岡華代，北野文理，他；バラ科植物およびその加工食品中の青酸配糖体とその分解物，日本食品化学学会誌，**22**（2），88～93（2015）
- 5) 加藤友香里，寺田久屋；超高速液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析法によるキャッサバ製品および豆類中のリナマリン定量法，食品衛生学雑誌，**55**（3），162～166（2014）
- 6) 石塚（渡辺）麻子，穂山浩，他；LS-MS/MSを用いたキャッサバ澱粉におけるシアニ配糖体，リナマリンの定量，日本食品化学学会誌，**19**（1），38～43（2012）
- 7) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知；食品に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について（食安発1224第1号），平成22年12月24日
- 8) 鈴木詩織，村手未来子，他；HPLC-UV及びLC-MS/MSによる核果類中のアミグダリンの分析，日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集，102（2016）