

ワサビからし油配糖体の高速液体クロマトグラフ (HPLC) を利用した定量法

平佐 聡尚*・春木 和久**・山田 員人**

Quantitative Determination of Mustard oil Glucoside in *Wasabia japonica* by HPLC Method.

Toshitaka HIRASA, Kazuhisa HARUKI and Kazuto YAMADA

I 緒 言

ワサビの辛味成分は、アリルからし油を主体とする揮発性の芳香族からし油類であり、組織の破壊に伴う酵素 (Thioglucosidase) の作用によって、からし油配糖体が加水分解を受けることにより生成される (小嶋, 1981)。

ワサビのからし油は、ガスクロマトグラフー質量分析計 (GC-MS) により18種同定されており (伊奈, 1982), そのうちの90%以上がアリルからし油である (小嶋ら, 1987)。アリルからし油の定量法としては、GADAMER法 (Gadamer, 1899), 長島法 (長島・中川, 1957) 及びガスクロマトグラフによる方法 (以下GC法と略記) (古谷ら, 1988; 伊奈ら, 1990; 小嶋, 1977) 等が知られている。しかしながら、からし油は非常に不安定な化合物であり、定量に際しては前処理に長時間を要し、処理中に成分の損失が考えられ、測定値に誤差を生じやすい。

そこで、著者らは、高速液体クロマトグラフを利用したからし油配糖体の定量法 (以下HPLC法と略記) について検討を行い、簡易で、かつ、安定的に定量できる方法を確立したので、その概要を報告する。

II 試験方法

ワサビ組織中に存在するからし油配糖体を測定するためには、Thioglucosidaseの熱処理による変性、熱処理下でのからし油配糖体の安定性、HPLCによる測定条件等について検討する必要がある。そこで、本試験では、アリルからし油のからし油配糖体であるシニグリンの分析条件を明らかにし、更にワサビを用いた定量方法について検討した。

1. シニグリンの紫外外部吸収スペクトルと熱安定性

シニグリン (東京化成工業㈱) を終濃度 1 mg/mL となるように 35mM リン酸緩衝液 (pH6.0) に溶解後、分光光度計 (島津UV160A) にて紫外外部 (200nm~400nm) の吸光度を測定した。また、熱処理は、試料を容器に入れて密封し、高圧蒸気滅菌機 (オートクレーブ) を用いて行った。処理温度は、100, 110, 120°C で、処理時間は各々10分及び30分とした。

2. HPLC法の溶離液組成

10mMのリン酸緩衝液 (pH6.0) とアセトニトリルを、80:20(A), 85:15(B), 90:10(C) に混合した溶液に 2 mM Tetra-n-butylammonium Hydroxideを加えたものを溶離液

として用いた。

3. 試料の調製及び分析条件

供試材料は、ガラス室内で育成した‘島根3号’ (2年生)の葉身、葉柄及び根茎である。秤量した試料 (約5g)を容器に入れて密封し、熱処理による酵素変性後、35mMリン酸緩衝液 (pH6.0)とともにミキサーで粉碎し、遠心分離して残渣を取り除き粗抽出液とした。再度、遠心分離し、HPLC用クロマトディスク (0.45 μm)で濾過してInjection用サンプルとした。分析装置は、Wako製WS 5 C18カラム (4mm×200mm)を装着したWaters LC-Module 1を用いた。カラム温度は35℃、流速は1mL/minとし、226nmで検出を行い、Waters805データステーションで解析を行った。なお、熱処理温度は、90、100、110、120℃で、処理時間は各々10分及び30分とした。

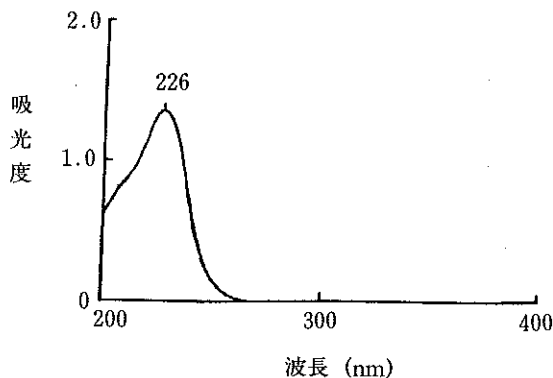
4. GC法との比較

GC法によるアリルからし油の定量は古谷 (1988)らの方法に準じて行った。HPLC法と同様に、‘島根3号’ (2年生)の葉身、葉柄及び根茎を供試材料とした。

III 結 果

1. シニグリンの紫外外部吸収スペクトルと熱安定性

シニグリンの紫外外部吸収スペクトルを第1図に示した。短波長側で吸収を示し、吸収極大は226nmであった。一方、シニグリンの熱安定性について検討した結果を第1表に示した。シニグリンは熱による分解を受け、温度が高く、処理時間が長いほどその傾向が顕著であった。



第1図 シニグリンの紫外外部吸収スペクトル

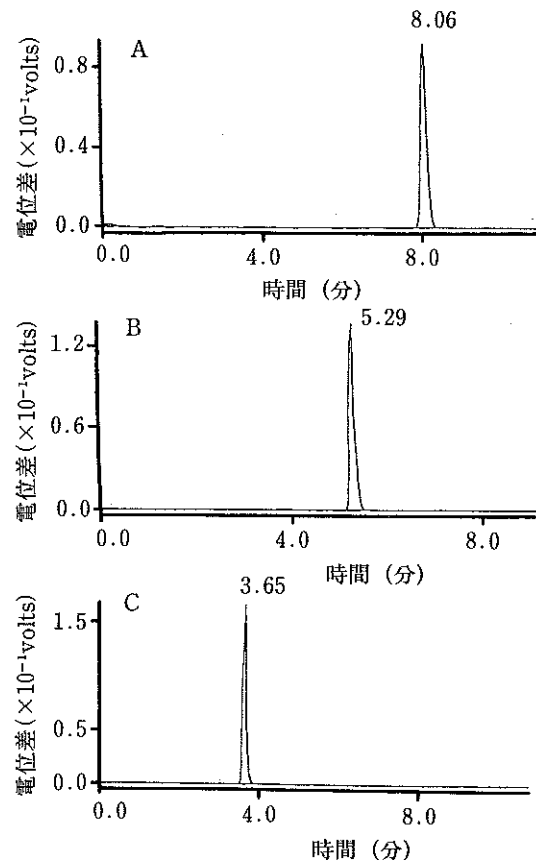
第1表 シニグリンの熱による分解

処理温度 ℃	時 間 min	シニグリン濃度 mg/mL
120	30	0.86
120	10	0.93
110	30	0.93
110	10	0.96
100	30	0.98
100	10	0.99

注) 処理開始前のシニグリン濃度 1 mg/mL

2. 溶離液組成とシニグリンのリテンションタイム

溶離液中のアセトニトリル混合割合がシニグリンのリテンションタイムに及ぼす影響について検討した結果を第2図に示した。シニグリンのリテンションタイムは、アセトニトリル含量によって変化し、溶離液Aで8.06分、溶離液Bで5.29分、溶離液Cで3.65分であった。シニグ



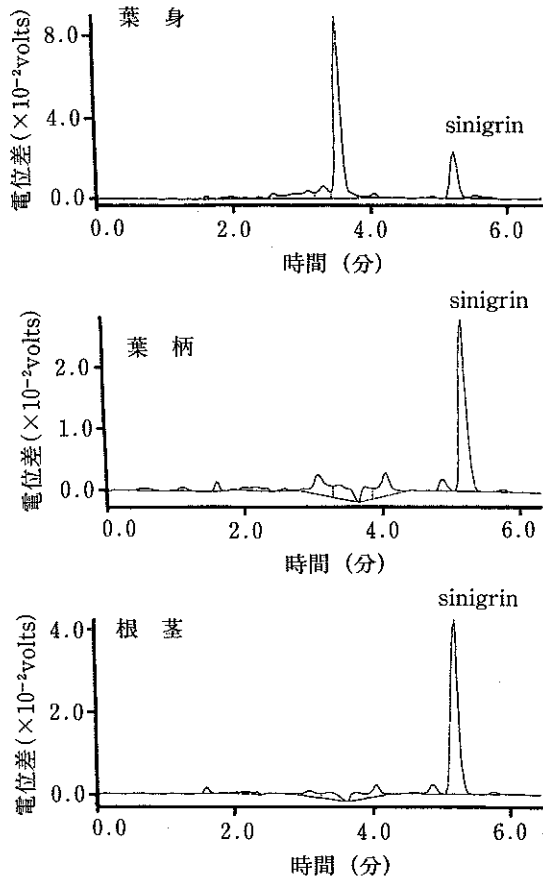
第2図 アセトニトリル混合比とシニグリンのリテンションタイム

10mMリン酸緩衝液：アセトニトリル
= 90 : 10 (A), 85 : 15 (B), 80 : 20 (C)

リンピークの分離状態及び溶出時間から判断して、シニグリンの定量には溶離液Bが適当であると考えられた。

3. ワサビ各器官のシニグリン量

ワサビ各器官のシニグリンは、第3図に示すように、溶離液Bを用いた条件下で5.23分に検



第3図 HPLCによるワサビ各器官のクロマトグラム

シニグリンピークは5.23分である。

第2表 熱処理がワサビ根茎のシニグリン量に与える影響

処理温度 ℃	時間 min	シニグリン量 mg/g f.w.
120	30	5.6
120	10	9.3
110	30	10.3
110	10	10.7
100	30	10.3
100	10	9.2
90	30	9.5
90	10	2.3

出され、この付近に定量を妨げる夾雑物の存在は確認されなかった。

熱処理がワサビ根茎のシニグリン量に与える影響について検討した結果を第2表に示した。ワサビ根茎のシニグリン量は処理温度100~110℃で多い傾向にあり、120℃で30分間処理では市販のシニグリンと同様に熱による分解が示唆された。一方、90℃、10分間処理では明らかにシニグリンの定量値が低く、Thio-glucosidaseによる加水分解が考えられた。

4. GC法との比較

GC法で得られたアリルからし油量とHPLC法で得られたシニグリン量を第3表に示した。

第3表 ワサビ各器官のアリルからし油量とシニグリン量

測定器官	GC法	HPLC法
	アリルからし油量 mg/g f.w.	シニグリン量 mg/g f.w.
葉身	0.22 (0.88)	1.55
葉柄	0.21 (0.84)	1.89
根茎	0.89 (3.56)	7.57

注) () 内はモル比から算出したシニグリン換算値

新鮮重1g当たりの各器官のアリルからし油量は、葉身0.22mg、葉柄0.21mg、根茎0.89mgであり、量比は、葉身：葉柄：根茎=1：1：4であった。一方、HPLC法で得られたシニグリン量は、葉身1.55mg、葉柄1.89mg、根茎7.57mgであり、量比は葉身：葉柄：根茎=1：1.2：4.9であった。このように、ワサビ器官における辛味成分の量比についてはGC法とHPLC法の結果がほぼ一致した。なお、アリルからし油とその前駆物質であるシニグリンとは加水分解の前後でモル比が等しい。そこで、GC法で得られたアリルからし油量をシニグリン量に換算し、HPLC法の測定値と比較した。GC法から求めた換算値は葉身0.88mg、葉柄0.84mg、根茎3.56mgとなり、HPLC法による定量値の1/2程度であった。

IV 考 察

ワサビの辛味成分（主にアリルからし油）は揮発性が強く、水中においても自然分解する不安定な化合物である。したがって、辛味成分を直接測定するGC法は、定量値に誤差を生じやすい。また、アリルからし油から安定な誘導体を合成し、定量値をアリルからし油量に換算するGADAMER法や長島法は、操作が煩雑であり、前処理に長時間を要する欠点を有している。そこで、著者らは、からし油配糖体であるシニグリンが水に易溶で、比較的安定（融点179°C）なことに着目し、HPLCを利用した定量法について検討を行った。

ワサビ組織中に存在するThioglucosidaseは、12のサブユニットから構成される分子量580,000の加水分解酵素であり、熱に対する安定性については、トリス塩酸緩衝液中(pH7.0)において40°C以上で相対活性が急激に低下することが報告されている(Ohtsuruら, 1979)。本試験においてもオートクレーブを利用した熱処理により容易に不可逆的な変性を認めた。ただし、高温で長時間処理(120°C, 30分間)した場合には、シニグリンの熱分解が認められることから、酵素変性処理は、110°Cで10分間程度行うのが望ましいと考えられる。また、シニグリンは、紫外部(226nm)に吸収極大を持っているので、溶離液中の溶媒には、この付近に吸収のあるメタノール及びエタノールの使用は適さず、アセトニトリルを用いるのが良いと判断される。

HPLCを利用した定量法は、定量物質と同時に溶出される夾雑物の有無が問題となる。本試験において、溶離液Bを用いた分析条件下では、非熱処理サンプルをInjectionした場合にシニグリンが溶出される5.23分にピークが検出されなかった。このことは、植物体内に存在し、シニグリンと同様のリテンションタイムで検出される物質がないか、あるいはHPLCによる検出限界以下であると考えられる。また、仮に、他のからし油配糖体が同一のリテンションタイムに存在したとしても、植物体中の含量はシニグリンと比べて極微量であるために無視できるも

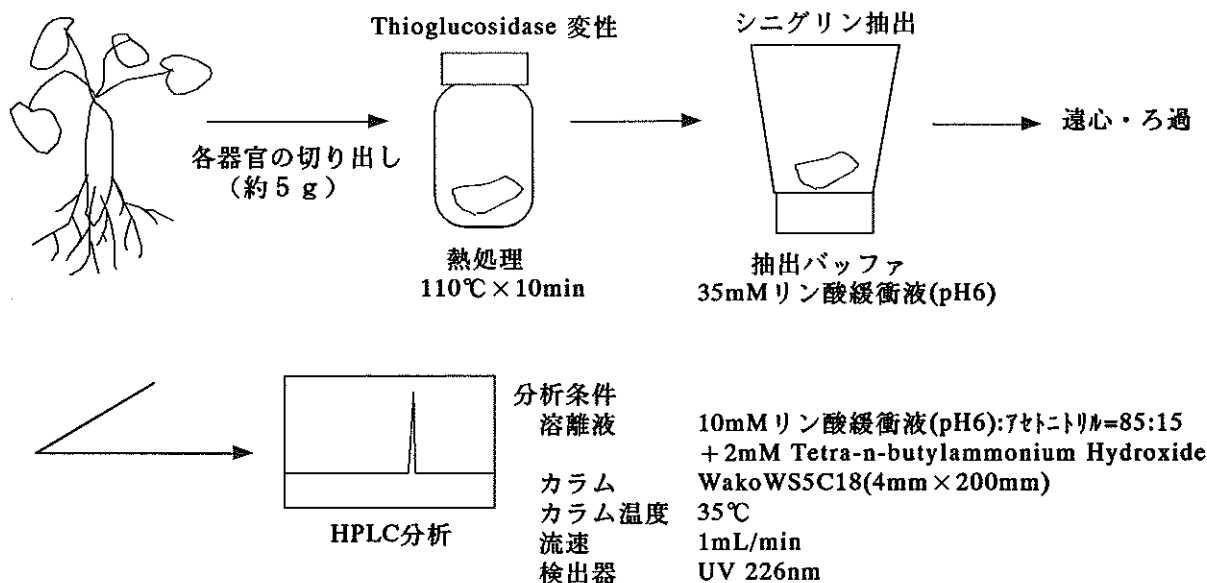
のと考えられる。

HPLCの溶離液に添加したTetra-n-butylammonium Hydroxideは、イオン対クロマトグラフ用試薬であり、一般に、解離して電荷を持った試料を逆相クロマトグラフィーで分析するために利用されている(Krstulovic・Brown, 1985)。本試験においてもイオン性物質であるシニグリンのリテンションタイムが、この試薬を添加すると長くなり、その時間を溶離液中のアセトニトリル含量を変化させることによって調節することができた。また、この試薬の226nmにおける吸収は小さく、シニグリン量を分析するのに障害とはならなかった。したがって、この手法を用いることによってシニグリン量をHPLCによって容易に測定できることが明らかとなった。

新しい分析方法を検討するうえで、従来の分析方法と対比することは重要である。そこで、本試験では、ガスクロマトグラフ法との比較を行い、各器官の定量値の量比がほぼ一致することを認めた。ところで、新鮮重1g当たりのシニグリン量は、HPLC法がGC法より各器官で約2倍高い結果となった。この理由としては、GC法が揮発成分であるアリルからし油を測定対象としていることや、アリルからし油の生成がワサビ組織の破壊程度、Thioglucosidase活性及びL-Ascorbic Acid量等の様々な要因に支配されていることが挙げられる。したがって、GC法とHPLC法の対比においては定量値の絶対値よりもむしろ器官相互の量比の一致が重要な判断基準となる。

長島(1958)らは、Hagedorn-Jensen法(Hagedorn・Jensen, 1923)を用いて沢ワサビ(品種'だるま')のシニグリンを定量し、各器定のシニグリン量比は、葉身：葉柄：根茎=1：0.5：4.6であると報告している。HPLC法で得られたシニグリン量比は葉身：葉柄：根茎=1：1.2：4.9であり、供試品種、材料の違いから葉柄の含量がやや異なるものの、両者の結果がほぼ一致する。したがって、HPLC法を辛味成分の分析方法の一手段として利用することは十分に可能であると考えられる。

本試験で得られたシニグリンの分析法を示すと第4図のようになる。本法は、GADAMER法



第4図 HPLCを利用したシニグリン分析方法

及び長島法等と比較して、前処理時間が短く、操作も簡易である。また、不揮発成分を定量するために定量値に誤差が少なく、ワサビのような辛味含量の多い個体を多量に分析する場合に特に有効である。

しかし、ワサビの辛味は、からし油配糖体量のみで決定されるものではなく、Thioglucosidase活性及びL-Ascorbic Acid量も重要な因子である。Thioglucosidase活性については、非熱処理のサンプルを用いたシニグリンピークの挙動により間接的に判断することが可能であるが、L-Ascorbic Acidについては別途定量を行う必要がある。

V 引用文献

古谷 力・折原 裕・高木さつき・吉田淑子 (1988) ワサビ培養組織の分化と辛味成分。植物組織培養5 (2), 82-86.

Gadamer, J. (1899) Das atherische oel von tropaeolum majus. Archive. Pharm. 273, 111-120.

Hagedorn, H. C. und B. N. Jensen (1923) Zur mikrobestimmung des blutzuckers mittels ferricyanid. Biochem. Z. 135, 46-58.

伊奈和夫 (1982) わさび, からし類の揮発性成

分, 香料136, 45-52.

伊奈和夫・高澤令子・八木昭仁・伊奈郊二・木島 勲 (1990) わさび茎, 葉の芥子油成分について。食品工誌37 (4), 256-260.

小嶋 操 (1977) ヘッドスペースガスクロマトグラフィーによるワサビ辛味成分の簡易定量法。食品工誌24 (2), 90-93.

小嶋 操 (1981) ワサビの科学 (6)。農および園56, 1315-1320.

小嶋 操・浜田 浩・利光典子 (1987) 市販ワサビ, セイヨウワサビおよび黒カラシの加水分解物中の揮発性含硫化合物の比較。食品工誌33 (3), 199-205.

Krstulovic, A. M. and P. R. Broun (1985) 逆相高速液体クロマトグラフィー。東京化学同人, 135-141.

長島善次・中川致之 (1957) わさびに関する研究 (第2報) 辛味成分 (辛子油類) の微量定量法。農化31, 416-420.

長島善次・内山正昭・宇津木 靖 (1958) わさびに関する研究 (第4報) 配糖体Sinigrinの定量法。農化32, 521-525.

Ohtsuru, M. and H. Kawatani (1979) Studies on the myrosinase from *Wasabia japonica*: purification and some properties of wasabi myrosinase. Agric. Biol. Chem. 43, 2249-2255.