

菜種中のグルコシノレイトの簡易定量法

鈴木 伸治*, 霞上 仁一*, 古田 幹男*, 片岡 憲治**

Rapid Determination of Glucosinolates in Rapeseed

Shinji SUZUKI*, Jin-ichi KASUKAMI*, Mikio FURUTA * and Kenji KATAOKA**

*Nagoya Customs Laboratory

2-3-12, Irifune, Minato-ku, Nagoya, Aichi 455-0032 Japan

**Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5,Kashiwanoha,Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

A quantitative analysis of glucosinolates in rapeseed is now required for the 2002 version HS(Harmonized System) classification. The HPLC method in accordance with ISO 9167-1 has been widely used for the analysis. However, the HPLC method is cumbersome and is not suitable for a rapid analysis. Then we developed the rapid method, in which glucosinolates in rapeseed were hydrolyzed by myrosinase, and then the resultant glucose was determined enzymatically with Glucose C II-Test WAKO. The analytical data thus obtained were identical with those obtained by the HPLC method. The result suggests that the new analytical process could become one of the most useful screening method for HS classification.

1. 緒 言

2002年HS（商品の名称及び分類についての統一システムに関する国際条約）改正に伴い、第12類号注1『第1205.10号において「菜種（低エルカ酸のもの）」とは、不揮発性油（エルカ酸がその重量の2%未満のものに限る。）及び1グラムあたり30マイクロモル未満のグルコシノレイトの固形分が得られる菜種をいう。』が新設され、税関分析において、①エルカ酸の定量、②グルコシノレイトの定量の2つの定量が必要になった。菜種に含まれているグルコシノレイトは搾油後の菜種粕に残存し、水分が十分に存在すると酵素ミロシナーゼの作用で加水分解され、家畜の甲状腺肥大などを誘引する物質へ変化することから、グルコシノレイト含有量を低減化する品種改良（例えば、キャノーラ種）が行われてきている。このような背景もあり、菜種が「菜種（低エルカ酸のもの）」と「その他のもの」に分割されたと考えられる。税関においては、エルカ酸の定量は、脂肪酸（エステル化及び遊離の脂肪酸）をメチルエステル化したのちGCで定量する方法（税関分析法No.123）で、グルコシノレイトの定量は、ISO9167-1によるHPLC法で行うこととしている。しかしながら、グルコシノレイトの定量に関しては、そ

の操作が煩雑で長時間を要することから、迅速な通関を阻害しないように、より簡便で迅速性の高い簡易分析法の開発が望まれている。

グルコシノレイトの簡易定量法については、石田¹⁾が「発芽した子葉」に含まれているグルコシノレイトを内性の酵素ミロシナーゼで加水分解し、遊離したグルコースを酵素法で定量している。グルコシノレイトは含硫配糖体の総称であり、グルコシノレイト1分子にはグルコース1分子が結合しているため、我々が必要とする単位（マイクロモル）への換算も容易といえる。しかしながら、この方法を菜種そのものに応用したとの報告はない。そこで、この方法を菜種そのものに応用するための諸条件の検討及びISO9167-1によるHPLC法の定量値と比較・検討することとした。

2. 実 験

2. 1 試料及び試薬

菜種 [輸入菜種3種（試料No.1,2）、農林16号（試料No.3）] 及び菜種粕 [2種（試料No.4,5）]

Thioglucosidase (myrosinase) (Sigma製)

* 名古屋税関業務部 〒455-0032 愛知県名古屋市港区入船2-3-12
** 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-5

(-) -Sinigrin monohydrate (Aldrich製)

グルコースC II-テストワロー (和光純薬製)

2. 2 装 置

分光光度計: JASCO V-520 (日本分光製)

高速液体クロマトグラフ: HP1100 (Agilent製)

2. 3 実験方法

2. 3. 1 HPLC法

ISO9167-1に従って定量した。なお、カラムはCOSMOSIL 5C18 4.6×150mm (nacalai tesque) を使用した。

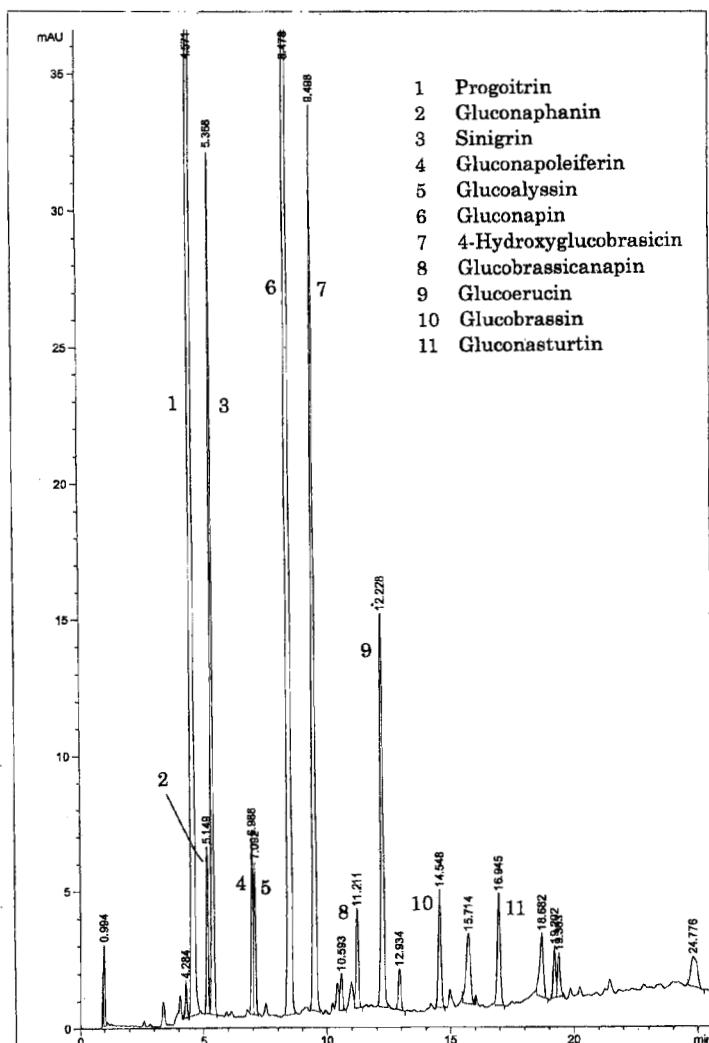
2. 3. 2 簡易定量法

菜種中のグルコシノレイトを水で抽出したものを酵素ミロシナーゼで加水分解し、生じたグルコースをグルコースC II-テストワローで発色させ、505nmにおける吸光度を測定した。同様にして得られた検量線からグルコース濃度を求め、グルコシノレイト量 ($\mu\text{mol/g}$) を算出した。

3. 結果及び考察

3. 1 HPLC法

Fig. 1に農林16号（試料No.3）のクロマトグラムを示す。各ピークの同定は、石田らの報告²⁾ 及びISO9167-1に記載されて



column: COSMOSIL 5C18 4.6×150mm(nacalai tesque)

eluant(A): water

eluant(B): 20% acetonitrile

f l o w: 1.5(ml/min)

o v e n: 30°C

U V: 229nm

injection: 20 μl

gradient:

time	A(%)	B(%)	curve
0	99	1	linear
1	99	1	linear
21	1	99	linear
24	1	99	linear
29	99	1	linear
39	99	1	linear

Fig. 1 HPLC chromatogram of desulphoglucosinolates of Norin 16

Table 1 The content of glucosinolates in sample No.1~5

sample	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
glucosinolates (μ mol/g)	7	7	46	12	7

Determined in accordance with ISO 9167-1

Table 2 Comparison of the analysis results

sample	glucosinolates content (μ mol/g)				
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
condition 1	4	5	38	1	0
condition 2	8	6	46	12	5
condition 3	9	5	47	12	5

The glucosinolates were hydrolyzed by myrosinase and the generated glucose were determined

condition 1: The defatted sample were used

condition 2: The defatted sample were used. After hydrolysis, the deproteinizing agents were added

condition 3: The nondefatted sample were used. After hydrolysis, the deproteinizing agents were added

いるクロマトグラム例を参考にした。また、その他の試料については、このクロマトグラムの保持時間をもとに各グルコシノレイトを同定した。各成分の相対質量相対感度比はISO9167-1に記載されている値とし、ピーク面積からグルコシノレイト量を計算した。Table 1にグルコシノレイトの定量結果を示す。

3. 2 簡易定量法

3. 2. 1 抽出法の検討

試料の前処理方法（試料の乾燥等）はISO9167-1に従って行った。ISOでは試料200mgからグルコシノレイトを抽出する溶媒は、70%熱メタノールであるが、簡易定量法では、抽出後そのまま酵素ミロシナーゼで加水分解させること、及びグルコシノレイトが水に可溶であることから、水による抽出（3回抽出）とし、その結果をTable 2に示す。HPLCの定量値（Table 1）と比較して明らかに低い値であった。この原因として、グルコシノレイトと共に水で抽出されたたんぱく質が、定量値に影響を与えていたものと考えた。そこで、加水分解操作の後に除たんぱく操作を追加した。除たんぱく操作は、2.0%硫酸亜鉛水溶液と1.8%水酸化バリウム水溶液を等量加える手法とした。除たんぱく操作を加えた場合の定量値をTable 2に示す。この値は、HPLCの定量値（Table 1）とほぼ一致している。

水による抽出回数としてISOが定める3回が適当かどうか検討したところ、Fig. 2に示すように、3回以上において最終的な505nmにおける吸光度に変化がなかったので、3回抽出が適

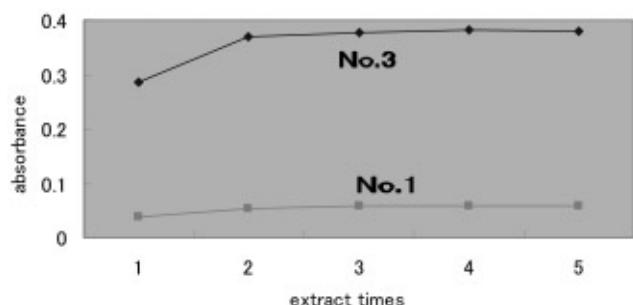


Fig. 2 Relationship between extract times and absorbance.

当と判断された。

また、試料を脱脂処理した場合としない場合を比較したところ、Table 2に示すように定量値に明らかな差異がなかったので、本簡易定量法において、ISOで行われる脱脂処理は不要なことがわかった。

3. 2. 2 ミロシナーゼ失活の必要性の検討

菜種中に含まれる内性のミロシナーゼを熱失活させた試料において、ミロシナーゼを加えないものをプランクとして測定したところ、505nmにおける吸光度はゼロであり、菜種そのものに含まれているグルコース量は、ゼロ（あるいは検出限界以下）

であることが判明した。したがって、理論的に内性のミロシナーゼを失活させる必要性はないといえる。また、実際に輸入される菜種において内性のミロシナーゼが失活しているか否か不明であるので、税関分析としては意図的にミロシナーゼを加える操作法が適当と考えられる。

3. 2. 3 実験操作方法の検討

水により3回抽出を行い、メスフラスコに移し変える方法は、煩雑で、かつ、移し変えによる誤差を生じると考えられる。試料をメスフラスコに直接量り取り、水を加えてよく振り混ぜた後、ミロシナーゼを加えて加水分解を行い、除たんぱく操作をして定容する手法を検討した。Table 3に結果を示す。これらの値は、3.2.1で検討した最終的な操作法である結果（Table 2, condition 3）と同じであるので、操作法の簡便性の観点から、

Table 3 Comparison of the extract method

sample	glucosinolates content ($\mu\text{mol/g}$)	
	No.1	No.3
method A	9	47
method B	9	47

Extract method A: Add 2ml of water and mix well.
Transfer the supernatant liquid
to another flask
(extract times: 3 times)

Extract method B: Add 6ml of water and mix well,
without transferring.

Another conditions were the same as in Table 2
(condition 3)

この方法が望ましいと考えられる。

3. 2. 4 試料採取量の検討

ISOが定める試料量は200mgであるが、試料量1gの場合と比較した結果をTable 4に示す。5回測定の平均値に有意の差は認められなかつたが、変動係数は試料採取量を1gとした場合の方が低い値を示した。これは、サンプリング時における試料の不均一性が原因と考えられるため、簡易定量法では試料採取量

は1gが適當と判断された。

3. 3 ISOと簡易定量法の比較

ここで検討した5種の試料について、ISO法と簡易定量法による結果をグラフにプロットした図をFig. 3に示す。ISO法と簡易定量法による結果が完全に一致した場合の理論的な直線は $y=x$ であるが、Fig. 3に示した相関直線は、 $y=1.056x - 0.9452$ ($R^2=0.9865$)となる。この直線において、分類基準値である30 μmol における差異は0.7 μmol となる。最も理論値と差異があった場合（試料No. 1）では、定量値に約2 μmol の違いがあった。また、試料No.1～No.3について、簡易法による標準偏差（ σ ）はそれぞれ、0.013, 0.003, 0.002であり、各試料の平均値±3 σ を結んだ直線から計算した30 $\mu\text{mol/g}$ におけるデータのバラツキは±2 $\mu\text{mol/g}$ であった。この差異は、各々1回のみの測定において取り得る値である。このことから理論的に、30 $\mu\text{mol/g}$ のグルコシノレイトを含有するサンプルが取り得る値はほぼ全て30±2 μmol の範囲に収まる。今回実験に用いたサンプルを簡易法で1回測定した場合、分類基準値における理論値と測定結果の差異（±0.7 μmol ）及び測定上のバラツキ（±2 μmol ）の両方を考慮しても、30±3 μmol の範囲外であれば、

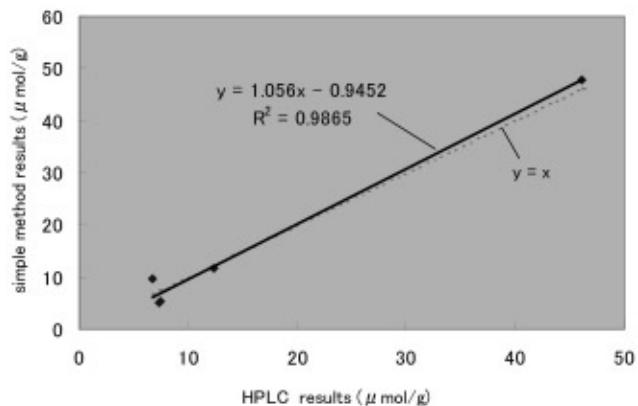


Fig. 3 Relationship between HPLC results and simple method results.

Table 4 Comparison of analytical results

sample amount	sample No.1		sample No.3	
	200mg	1g	200mg	1g
glucosinolates ($\mu\text{mol/g}$)	9	9	47	48
coefficient of variation (%)	4.5%	1.7%	3.5%	1.4%

Analytical method was the same as in Table 3

その値でHS分類を決定できると考えられる。

4. 要 約

菜種中のグルコシノレイトの簡易定量法について検討した。本法は菜種中に含まれるグルコシノレイトを酵素ミロシナーゼで加水分解し、生じたグルコースを酵素法で定量するものである。この簡易定量法による定量結果は、ISO9167-1のHPLC法に

よる結果と遜色なく、この簡易法がグルコシノレイト含有量のスクリーニング分析法として、十分有効なものといえる。

(謝辞)

本研究に関して、独立行政法人農業技術研究機構（東北農業研究センター）の石田氏をはじめ、（社）日本植物油協会及び（財）日本穀物検定協会（九州支部）の方々から助言・指導を得た。ここに関係した方々に深く謝意を表する。

文 献

- 1) 石田正彦：総合農業の新技術, 11,129 (1998)
- 2) 石田正彦, 奥山善直, 高畠義人, 海妻矩彦：育種学雑誌, 45,357 (1995)