

ノート

食品中のシアン化合物検査法の検討

Quantitative Method of Cyanide in Foods

山下 清 佳 下堂 菌 正 弘¹ 溝 脇 直 規

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 mg/kg（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、天然にシアン化合物を含有する食品及びその加工品について、10mg/kgを超えてシアン化合物が検出された場合は食品衛生法第6条第2号に該当する旨の通知¹が出された。

また、同じ年、当県ではキャッサバ芋が原因の食中毒が発生した。なお、この食中毒事例は、家庭が原因施設の食中毒であったが、当県ではキャッサバが商業的に栽培されている地域がある。他にもシアン化合物の含有を否定できないびわの葉茶を県の特産品として販売している。

このような経緯から食品中のシアン化合物検査体制を整えるために、その検査法の検討を行ったので報告する。

2 方法

2.1 試料

- ・市販品のタピオカ粉
- ・市販品のびわの葉茶
- ・青梅の仁（種子の胚乳部分）
- ・びわの種子（仁）（種子の茶色の皮をむいた部分）
- ・生キャッサバ芋

なお、生キャッサバ芋については、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、図1の茶色の外皮を取り除き、外輪部と喫食部分に分けて使用した。ただし、外輪部は、シアン化合物の含有量が高いため、通常、喫食する際は取り除かれる。



図1 キャッサバ芋

2.2 標準品及び試薬等

2.2.1 標準品

標準品のシアンには、関東化学(株)製のシアン化カリウムを用いた。

2.2.2 酵素溶液

加水分解酵素は、富士フィルム和光純薬(株)製のリナマラーゼとSigma-Aldrich製のβ-グルコシダーゼ（アーモンド由来）を用いた。これらの加水分解酵素を10倍希釈したクエン酸Bufferで溶解して酵素溶液を作成した。

2.2.3 シアン配糖体

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

2. 2. 4 その他の試薬

水酸化カリウムは和光純薬工業(株)製を、クエン酸一水和物は林純薬工業(株)製を、水酸化ナトリウム、クロラミンT、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾン、4-ピリジンカルボン酸、N-N-ジメチルホルムアルデヒドは関東化学(株)製を用いた。

2. 3 装置

分光光度計は日本分光(株)製V-560を用いた。

2. 4 試験操作方法

厚生労働省通知の「タピオカでん粉中のシアン化合物試験法」²⁾及び食品衛生検査指針の「タピオカでん粉中のシアン化合物試験法(水蒸気蒸留-ピリジンカルボン酸・ピラズロン定量法)」³⁾(以下「公定法」という。)に準じて図2のとおり操作した。ただし、公定法では指示されていないが、留液の捕集の際は、ガラス器具の連結する部分や隙間を全てアルミ箔で覆い固定した。

検量線作成用試験溶液は、10 μ g/mLのシアンイオンを含むシアン標準溶液を0.033%水酸化カリウム溶液で希釈して、0.05~1 μ g/mLに調製した。これを10mL採り、留液と同様に操作し、呈色反応させ検量線を作成し、試料中のシアンイオン濃度を算出し、この値に1.039を乗じて試料中のシアン化水素(以下「HCN」という。)濃度を算出した。

定量上限を超えるシアンイオンが検出されたときは、留液を0.033%水酸化カリウムで適宜希釈して呈色反応を再度行った。

2. 4. 1 キャッサバ芋粉砕によるHCNの挙動調査

キャッサバ芋に含まれるHCNの予備検査を実施した際に、粉砕直後に試験操作した結果と粉砕後1時間放置した後に試験操作した結果を比較したところ、同じ芋にもかかわらず、粉砕後数時間放置した結果の方が著しくHCN量が低下するという現象が見られた。

そこで、以下の検証を行った。

(1) 生のキャッサバ芋

フードプロセッサーで粉砕後、すぐに図2の操作を実施(a)

フードプロセッサーで粉砕後、そのまま常温で1時間放置してから、図2の操作を実施(b)

フードプロセッサーで粉砕後、すぐに冷凍保管してから、翌日に図2の操作を実施(c)

(2) 加熱したキャッサバ芋

フードプロセッサーで粉砕後、すぐに図2の操作を

実施(a)

フードプロセッサーで粉砕後、1晩冷凍保管してから、図2の操作を実施(c)

試料：15g

- (添加回収試験時は添加を実施)
- 10倍希釈クエン酸Buffer 200mL
- 酵素溶液

加温水浴 40°C 4hr 時々振り混ぜる【酵素反応】

- 水 100mL
- シリコーン樹脂 数滴

水蒸気蒸留

- 1%水酸化カリウム溶液 5mL で捕集
- 留液 150mL

留液 10mL 分収

【以下呈色反応】

- リン酸Buffer 5mL
- クロラミンT溶液 1mL

20~25°Cで5min放置

- ピリジンカルボン酸・ピラズロン溶液 5mL

加温水浴40°C 40min

試験溶液

吸光度測定640nm

図2 試験フロー

2. 4. 2 粉砕の影響を抑える試験操作方法の検討

キャッサバ芋を以下の①~③とおりの方法で調製した試料について、図2の操作を実施した。

- ①フードプロセッサーで細かく粉砕し、均一化したもの(Fのみ)
- ②フードプロセッサーで細かく粉砕後、篩いで裏ごしして均一化したもの(F+篩い)
- ③フードプロセッサーで素早くある程度均一化した後に計量を行い、ポリトロンを用いて10倍希釈クエン酸Bufferを加えてホモジナイズし、酵素溶液を加えてから、図2と同様に操作したもの(F+P)

2. 4. 3 シアン配糖体分解に必要な酵素量の検証

公定法は、酵素溶液を20U加えるように記載されているが、1Uは、至適条件下で毎分1 μ molの基質を変化させることができる酵素量と定義されている。4時間酵素反応させている1Uの分解能は240 μ molあるので20Uも必要ないと考えられた。

予備検査の結果、キャッサバに含まれるHCNは、外輪部で最大約500 $\mu\text{g/g}$ であったため、最大1000 $\mu\text{g/g}$ と想定した。HCNが、青梅の仁からは1104 $\mu\text{g/g}$ 、びわの種子(仁)からは1640 $\mu\text{g/g}$ 検出された。また、辻沢⁴⁾によると青梅の仁には、アミグダリンが約20000 $\mu\text{g/g}$ (HCN換算した時、1181 $\mu\text{g/g}$)とあったため、青梅の仁にはアミグダリンが最大35000 $\mu\text{g/g}$ 含有していると想定した。

なお、青梅の仁の大量入手が困難だったため、予備検査で同等程度のHCNを含有しており、大量に入手できたびわの種子(仁)を使用して検証した。

以上のことから、必要酵素量を計算し、酵素溶液量の検証を以下のとおり実施した。

キャッサバ芋の外輪部のみを、フードプロセッサーで粉碎後、すぐに15gはかり取り、10倍希釈クエン酸Bufferを適量加え、ポリトロンでホモジナイズ後、ポリトロンを10倍希釈クエン酸Bufferで洗浄し、加えた10倍希釈クエン酸Bufferの最終量が200mLになるように調製後、以下のとおり酵素溶液を添加し、図2のとおり操作した。

- ①酵素溶液20U (リナマラーゼ10Uと β -グルコシダーゼ10U)
- ②酵素溶液20U (リナマラーゼ20U)
- ③酵素溶液2U (リナマラーゼ2U)

びわの種子(仁)を、80g程度最初にとりわけ、包丁で素早く刻み、15gはかり取り、10倍希釈クエン酸Bufferを適量加え、ポリトロンでホモジナイズ後、ポリトロンを10倍希釈クエン酸Bufferで洗浄し、加えた10倍希釈クエン酸Bufferの最終量が200mLになるように調製後、以下のとおり酵素溶液を添加し、図2のとおり操作した。

- ①酵素溶液20U (リナマラーゼ10Uと β -グルコシダーゼ10U)
- ②酵素溶液20U (β -グルコシダーゼ20U)
- ③酵素溶液5U (β -グルコシダーゼ5U)

2. 5 添加回収試験 (妥当性評価)

公定法は、試料中のシアン配糖体を分解し、HCNを遊離させるために、クエン酸Buffer中の試料に加水分解酵素を加え反応させてから、水蒸気蒸留でHCNを捕集している。今回、水蒸気蒸留によるHCNの捕集が確実に行われていることの確認と酵素反応の確認を実施した。同時に本検査法の妥当性評価を実施した。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。)⁵⁾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. 5. 1 添加回収試験用試料

当センターでキャッサバ芋を粉碎後、常温放置して、シアン化合物がHCN量で0.5 $\mu\text{g/g}$ まで減少した毒抜き加工したもの

- タピオカ粉(シアン化合物が検出しないことを確認済)
- びわの葉茶(シアン化合物が検出しないことを確認済)

2. 5. 2 遊離シアン添加 (HCNの捕集確認)

シアン標準溶液(遊離シアン)をキャッサバ芋、タピオカ粉及びびわの葉茶に添加した。詳細は以下のとおり。試料15gに10 $\mu\text{g/g}$ になるように添加した。10倍希釈クエン酸Buffer200mL, シリコーン樹脂を数滴と水100mLを加え、水蒸気蒸留を行った。水蒸気蒸留より以下の操作は図2のとおり実施した。

2. 5. 3 シアン配糖体添加 (酵素分解の確認)

シアン配糖体(アミグダリン, リナマリン)をびわの葉茶及びタピオカ粉, それぞれ15gに試料中濃度が10 $\mu\text{g/g}$ になるように添加し、図2のとおり試験操作した。

びわの葉茶に添加したアミグダリンをHCN換算すると0.59 $\mu\text{g/g}$ になり、タピオカ粉に添加したリナマリンをHCN換算すると1.09 $\mu\text{g/g}$ になる。

なお、本来ならHCN換算して10 $\mu\text{g/g}$ になるように添加したかったが、シアン配糖体の入手が困難だったため、このような添加量になった。

また、キャッサバ芋にも添加したかったが、完全にシアン配糖体を除去(毒抜き加工)できなかったため実施できなかった。

3 結果及び考察

3. 1 試験操作方法について

3. 1. 1 キャッサバ芋粉碎によるHCNの挙動調査 (1) 生のキャッサバ芋

粉碎直後に試験操作した結果(a), 粉碎後常温で1時間放置した後に試験操作した結果(b)及び粉碎後冷凍で1晩保管した後に試験操作した結果(c)は、表1のとおりであった。

なお、粉碎後の時間経過がHCN含有量に影響を及ぼすが、この公定法の操作には手間がかかる上に蒸留装置が限られており、複数検体を同時に作業することが難しいため、①, ②, ③で使用した芋はそれぞれ別個体であり、n=1で実施した。そのため、粉碎直後のHCN含有量に個体差等がある。

安溪⁶⁾によると生のキャッサバ芋の組織内では、シアン配糖体は細胞内に、加水分解酵素は液胞内に互い

に触れあわないよう別々に保存されているが、組織が壊れることで両者が放出され、酵素反応してシアニオンが発生するとのことであった。つまり、均一化のために粉砕することがこの酵素反応を促進し、HCN含有量の低減を招いていた。

また、冷凍することで酵素反応は止まると考えられるが、冷凍に至るまでの時間でも反応が進むことが推察される結果となった。

表1 粉砕後の経時等によるHCN含有量の測定結果

(単位：μg/g)

キャッサバ芋	粉砕直後 (a)	粉砕後1時間 常温放置 (b)	粉砕後1晩 冷凍保管 (c)
生	①	53.8	15.4
	②	78.9	—
	③	55.9	34.3
加熱	43.1	—	47.6

(2) 加熱したキャッサバ芋

粉砕直後に試験操作した結果 (a) と粉砕後冷凍で1晩保存した後に試験操作した結果 (c) は表1に示した。

なお、加熱したキャッサバ芋の (a) の結果より (c) の結果の値が高いのは、希釈したことによる測定誤差であると推察された。

加熱による組織破壊で、シアニ配糖体の流出もおこると考えられるが、それ以上に加水分解酵素が失活するので、粉砕による影響が抑制されていた。

キャッサバ芋だけでなく、他のシアニ配糖体を含む食品等は、加水分解酵素も保有している。そのため、粉砕等を実施するとシアニ配糖体の分解を促進してしまう。しかしながら、固形物の均一化は必要な作業である。

そこで、迅速な作業のために、均一化に時間をかけないように以下のとおり実施することにした。

固形物をフードプロセッサー等である程度均一化した後は、素早く計量を行い、ポリトロンを用いて10倍希釈クエン酸Bufferを加えてホモジナイズすることにした。

3. 1. 2 粉砕の影響を抑える試験操作方法の検討

2回実施した結果は、表2のとおりであった。ただし、篩にかける方法は1回目のみ実施した。

なお、この検討についても粉砕後、時間の経過がHCN含有量に影響するため、1回目の芋と2回目の芋は別個体を使用し、n=1で実施した。

フードプロセッサーで芋を粉砕したのち、均一化のために篩を用いた (F+篩い) 場合は、試料調製に時間がかかるため、シアニ配糖体が減少していることが分かった。

表2 粉砕方法の違いによるHCN含有量の測定結果

(単位：μg/g)

	1回目	2回目
①F* ¹ のみ	55.9	52.9
②F* ¹ +篩い	34.3	-
③F* ¹ +P* ²	77.4	84.1

*1 フードプロセッサー, *2 ポリトロン

ポリトロンによるホモジナイズ (F+P) を実施する方法が、フードプロセッサーのみ (Fのみ) で試料調製する方法より、シアニ化合物が多く定量されるのは、ポリトロンを使用する際、クエン酸Bufferを加えてホモジナイズするため、粉砕によるシアニ化合物の空気中へ拡散が抑制できている上に、細胞内のシアニ配糖体が効率よく抽出されたためと推察される。

3. 1. 3 シアニ配糖体分解に必要な酵素量の検証

キャッサバ芋の外輪部とびわの種子 (仁) にそれぞれ以下のとおり酵素を添加した結果は、表3に示す。(n=1で実施)

①混合酵素溶液20U (リナマラーゼ10Uとβ-グルコシダーゼ10U) 「混合20U」

②酵素溶液20U (リナマラーゼ20U又はβ-グルコシダーゼ20U) 「単独20U」

③計算した酵素溶液量 (リナマラーゼ2U又はβ-グルコシダーゼ5U) 「計算2U又は5U」

表3 各酵素量でのHCN含有量測定結果

(単位：μg/g)

	キャッサバ芋	びわの種子 (仁)
①混合20U	587.5	1653.7
②単独20U	559.9	1640.4
③計算2U又は5U	580.5	1641.5

希釈等の影響により結果に若干の測定誤差があるが、20Uより少ない計算した酵素量 (2U又は5U) でも十分にシアニ配糖体を分解できていることが確認できた。これは、食品等が元来持つ加水分解酵素の影響もあると考えられる。実際には、酵素を全く加えなくても十分にシアニ配糖体を分解できるかもしれないが、酵素の失活等の影

響も考慮して、計算上の最低限の酵素溶液を添加するか、混合20Uの酵素を添加するのが望ましい。

3. 2 添加回収試験（妥当性評価）について

3. 2. 1 遊離シアン添加（HCNの捕集確認）

シアン標準溶液（遊離シアン）をキャッサバ芋、タピオカ粉及びびわの葉茶に、それぞれ試料中濃度が10 μ g/gになるように添加した結果は、表4のとおりであった。全てガイドラインの目標値を満たしていた。

表4 遊離シアン添加の妥当性評価結果

	真度(平均)	併行精度	室内精度
目標値	70~120	≤ 10	≤ 20
使用試料	(%)	(RSD%)	(RSD%)
キャッサバ芋	93.8	5.1	9.3
タピオカ粉	94.3	3.6	14.7
びわの葉茶	83.1	7.1	13.7

3. 2. 2 シアン配糖体添加（酵素分解の確認）

シアン配糖体（アミグダリン、リナマリン）をびわの葉茶及びタピオカ粉にそれぞれ試料中濃度が10 μ g/gになるように添加した結果は、表5のとおりであった。全てガイドラインの目標値を満たしていた。

少量のシアン配糖体を分解して、シアン化水素を確実に捕集していることが確認できた。

表5 シアン配糖体添加の妥当性評価結果

	真度(平均)	併行精度	室内精度
目標値	70~120	≤ 10	≤ 20
使用試料	(%)	(RSD%)	(RSD%)
タピオカ粉	106.4	7.2	12.9
びわの葉茶	101.6	7.7	13.7

4 まとめ

食品に含まれるシアン化合物検査について、遊離シアンとシアン配糖体を用いて、タピオカでん粉中のシアン化合物試験法（水蒸気蒸留-ピリジンカルボン酸・ピラズロン定量法）に準じた検査法で添加回収試験（妥当性評価）を実施し、検査法の確立ができた。

また、使用する酵素量の検討を行ったことで、公定法で指示されている酵素量より少ない量でも十分に定量できることも分かった。

なお、天然にシアン化合物を含有する食品については、試料調製時の均一化の工程（粉碎等により組織を壊すこ

と）が、元来その食品が持つ加水分解酵素によって、シアン配糖体が分解され、シアン化合物の定量値を減少させることが分かった。しかしながら、均一化作業の迅速化、ポリトロンを用いたホモジナイズ処理により、シアン化合物の減少等がある程度、抑制して定量できることが分かった。

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と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；シアン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) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課・監視安全課長連名通知；シアン化合物が検出されたタピオカでん粉の取扱いについて（食基発第1121001号・食監発第1121001号），平成14年11月21日
- 3) (公社)日本食品衛生協会；食品衛生検査指針 理学編2015，873~875
- 4) 辻沢広，山下善樹，他；梅の成分に関する研究（第2報），和歌山衛生公害研年報，32，61~64（1986）
- 5) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知；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の一部改正について（食安発1224第1号），平成22年12月24日
- 6) 安溪貴子；アフリカ大陸におけるキャッサバの毒抜き法，熱帯農業，49（5），333~337（2005）