

[原著]

## ウリ科植物中のククルビタシン類抽出時における分解及び配糖体化の推定

吉岡 直樹<sup>1\*</sup> 友澤 潤子<sup>2</sup> 風見 眞紀子<sup>1</sup>Degradation and Glycosylation of Cucurbitacins during Extraction  
from Cucurbitaceous PlantsNaoki YOSHIOKA<sup>1\*</sup>, Junko TOMOZAWA<sup>2</sup> and Makiko KAZAMI<sup>1</sup><sup>1</sup>*Health Science Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science,  
1819-14 Kanno, Kanno-cho, Kakogawa 675-0003, Japan*<sup>2</sup>*Shiga Prefectural Institute of Public Health*

Cucurbitacins are tetracyclic triterpenes, known as bitter principles of Cucurbitaceae plants. Zucchini homogenates have been reported to have low recoveries of Cucurbitacins in the analysis. In this study, the cause of this low recovery was investigated. Cucurbitacins (Cucurbitacin B, D, E, I, and elaterinide) was added to zucchini samples and the recovery was examined by varying the time of standing after addition. Since the recovery of cucurbitacins improved with the addition of acid or heating, it was assumed that the enzyme was responsible for the low recovery. When cucurbitacin B was added, it was presumed to be converted to cucurbitacin D by the hydrolytic enzyme. Furthermore, when cucurbitacin E was added, a part of cucurbitacin E was converted to cucurbitacin I by hydrolytic enzymes, and a part was converted to elaterinide (cucurbitacin E 2-*O*-glucoside) by glycosyltransferases. The recoveries were improved by cutting the samples into cubes instead of by homogenization.

## I はじめに

ククルビタシン類はウリ科 (*Cucurbitaceae*) 植物に含まれる、苦味を有するトリテルペンの一種である。これらは観賞用のウリ科植物に含まれることが多いが<sup>1,2</sup>, まれに食用のウリ科植物にも含有されることがあり、ズッキーニ<sup>3,4</sup>, ヘチマ<sup>5,6</sup>, ユウガオ<sup>7</sup>等において中毒事例が報告されている。

前報<sup>4</sup>において我々は、ズッキーニにおけるククルビタシン類の一斉分析法を報告した。しかし、添加回収試験時において、試料の均質化の影響で回収率の低下が見られる事例<sup>8</sup>が報告されていることから、今回その原因を調査し、回収率改善を目的として分析法を検討した。

## II 材料と方法

## 1. 試料

ウリ科植物であるズッキーニ、きゅうり、メロン、ゴーヤー、かぼちゃ、対照品として用いたキャベツ (アブラナ科)、なす (ナス科) は兵庫県内の販売店から入手した市販品を用いた。

## 2. 試薬、試液及び器具

## 2.1 標準品及び標準原液

ククルビタシンB, ククルビタシンE, ククルビタシンI及びエラテリニド (ククルビタシンE 2-*O*-グルコシド) 標準品はPhytolab製を用い、ククルビタシンDはChromaDex製を用いた。各構造式をFig.1に示した。これらの標準品をメタノールに溶解して100 µg/mL標準原液を調製し、適宜希釈して使用した。また、各100 µg/mL標準原液1 mLにメタノールを加えて10 mLとし、ククル

<sup>1</sup>兵庫県立健康科学研究所 健康科学部

\* 〒675-0003 兵庫県加古川市神野町神野 1819-14

<sup>2</sup>滋賀県衛生科学センター

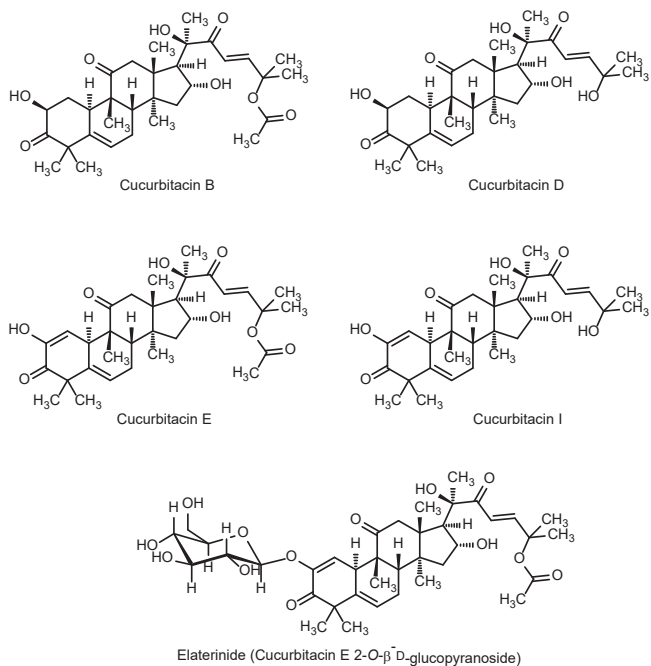


Fig.1 Chemical structures of cucurbitacins and the glycoside

ビタミン類10 µg/mL混合標準溶液を調製した。

## 2.2 その他の試薬等

メタノール及びアセトニトリルは関東化学製LC/MS用を用い、塩酸は富士フィルム和光純薬製の5 mol/L塩酸(容量分析用)、ギ酸アンモニウムは富士フィルム和光純

薬製特級を用いた。シリンジフィルターはCytiva社製Whatman Puradisc 13 (PVDF製, 0.45 µm, φ 13 mm)を用いた。

## 3. 装置及び測定条件

ブレンダーはWaring製7012S, ホモジナイザーはIKA製ULTRA-TURRAX T25を使用し、遠心機は日立工機製CT15RE, 電子レンジはシャープ製RE-T3を使用した。

LC-MS/MSはAB SCIEX製ExionLC及びQTRAP 4500を使用した。

## 4. 試験溶液の調製

前報<sup>4)</sup>と同様の方法を用いて調製した。

### 4.1 均質化

ブレンダーを用いて均質化し、ペースト状にした試料5 gをポリプロピレン製50 mL遠沈管に量り取った。

### 4.2 抽出・分析

遠沈管にメタノール25 mLを加えて、1分間ホモジナイズし抽出した。ホモジナイザーの刃を水で洗い、この洗液と抽出液とを併せて水で50 mLに定容した。この溶液の一部を遠心分離(10000 rpm, 3分間)し、上清をシリンジフィルターでろ過したものをLC-MS/MSで分析した。Table 1に測定条件を示した。

Table 1 LC-MS/MS operating conditions

LC parameters	Column	GL Sciences Inertsil ODS-3 (150 mm×3.0 mm, 3 µm)	
	Mobile phase	A: 10 mmol/L ammonium formate, B: acetonitrile	
	Gradient elution	A:B = 60:40 (0 min) → 60:40 (3 min) → 30:70 (10 min) → 30:70 (20 min) → 60:40 (20.01 min)	
	Flow rate	0.30 mL/min	
	Column temperature	40°C	
	Injection volume	5 µL	
MS parameters	Ionization mode	ESI (Positive)	
	Curtain Gas	40 psi	
	Collision Gas	6 psi	
	IonSpray Voltage	5500 V	
	TurboIonSpray temperature	300°C	
	Ion Source Gas 1	60 psi	
	Ion Source Gas 2	80 psi	
	Ionization parameters of analyte		
	Cucurbitacin B	Quantifier	Q1: 576.33, Q3: 499.30 (DP: 21 V, CE: 19 V, CXP: 14 V)
		Qualifier	Q1: 576.33, Q3: 481.20 (DP: 21 V, CE: 27 V, CXP: 16 V)
	Cucurbitacin D	Quantifier	Q1: 534.35, Q3: 499.20 (DP: 1 V, CE: 19 V, CXP: 14 V)
		Qualifier	Q1: 534.35, Q3: 481.10 (DP: 1 V, CE: 23 V, CXP: 14 V)
Cucurbitacin E	Quantifier	Q1: 574.32, Q3: 497.30 (DP: 56 V, CE: 19 V, CXP: 14 V)	
	Qualifier	Q1: 574.32, Q3: 479.20 (DP: 56 V, CE: 27 V, CXP: 16 V)	
Cucurbitacin I	Quantifier	Q1: 532.33, Q3: 497.20 (DP: 11 V, CE: 19 V, CXP: 14 V)	
	Qualifier	Q1: 532.33, Q3: 479.10 (DP: 11 V, CE: 23 V, CXP: 14 V)	
Elaterinide	Quantifier	Q1: 736.37, Q3: 497.30 (DP: 1 V, CE: 23 V, CXP: 14 V)	
	Qualifier	Q1: 736.37, Q3: 479.10 (DP: 1 V, CE: 33 V, CXP: 14 V)	

## 5. 回収率の検討

サンプル及び試験溶液の調製は、約22°Cの室温に調整した試験室内で行った。

### 5.1 酸添加及び加熱処理による回収率の変化

ズッキーニ果実をブレンダーを用いて均質化し、その5 gを50 mL遠沈管に量り取り、

- ①無処理
- ②0.1 mol/L塩酸を5 mL添加し混合
- ③水5 mLを添加し混合 (②の対照)

④電子レンジ (700W) で10秒間加熱後、室温まで冷却の4グループについて (各3試行)、それぞれククルビタシン類10 µg/mL混合標準溶液を0.5 mLずつ添加した (サンプルあたり1 µg/gに相当)。添加後、60分間放置し (添加直後、30分後及び60分後に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌)、「4.2 抽出・分析」操作に従って試験溶液の調製を行った。また、①にククルビタシン類を添加しないサンプルをブランクとして調製し (1試行)、それぞれLC-MS/MSで分析を行った。

### 5.2 ククルビタシン類溶液の加熱による安定性

電子レンジ処理を行った際のククルビタシン類の加熱による安定性を調べるため、0.1 µg/mL混合標準溶液 (10%メタノール溶液) をククルビタシン類10 µg/mL混合標準溶液より調製した。これを2 mLメスフラスコの標線まで入れ、栓を開けて水浴 (95°C設定) で10分間加熱した (3試行)。室温まで放冷後、10%メタノールで2 mLに定容し、その溶液をLC-MS/MSで分析した。

### 5.3 濃度依存性の検討

ズッキーニ果実をブレンダーを用いて均質化し、その5 gを50 mL遠沈管に量り取り、

- ①ククルビタシン類10 µg/mL混合標準溶液を0.5 mL添加 (サンプルあたり1 µg/gに相当)
- ②同5 µg/mL混合標準溶液を0.5 mL添加 (サンプルあたり0.5 µg/gに相当)
- ③同1 µg/mL混合標準溶液を0.5 mL添加 (サンプルあたり0.1 µg/gに相当)

の3グループについて (各3試行)、溶液添加後60分間放置後 (添加直後、30分後及び60分後に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌)、「4.2 抽出・分析」操作に従って試験溶液の調製を行った。また、ブランクとしてククルビタシン類を添加しないサンプルを調製し (1試行)、それぞれLC-MS/MSで分析を行った。

### 5.4 均質化サンプルの保存日数の違いによる回収率の変化

ズッキーニ果実をブレンダーを用いて均質化した。そして、

#### ①均質化直後

ブレンダーのガラス製容器のまま食品用ラップフィルムで蓋をして冷蔵庫中4°Cで保存し、

#### ②均質化後1日保存

#### ③均質化後3日保存

#### ④均質化後7日保存

の4グループについて (各3試行)、ガラス製容器から均質化サンプル5 gを50 mL遠沈管に量り取り、それぞれククルビタシン類10 µg/mL混合標準溶液を0.5 mLずつ添加した (サンプルあたり1 µg/gに相当)。60分間放置後 (添加直後、30分後及び60分後に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌)、「4.2 抽出・分析」操作に従って試験溶液の調製を行った。また、①にククルビタシン類を添加しないサンプルをブランクとして調製し (1試行)、それぞれLC-MS/MSで分析を行った。

### 5.5 混合標準溶液添加後の放置時間の違いによる回収率の変化

ズッキーニ果実を縦に半分にし、片方をブレンダーを用いて均質化し、その5 gを50 mL遠沈管に入れ、ククルビタシン類10 µg/mL混合標準溶液を0.5 mL添加した (サンプルあたり1 µg/gに相当)、

#### ①添加直後

②添加後10分間放置後 (添加直後及び10分後に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌)

③添加後60分間放置後 (添加直後及び以降30分毎に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌)

④添加後120分間放置後 (添加直後及び以降30分毎にボルテックスミキサーで攪拌)

の4グループについて (各3試行)、以降「4.2 抽出・分析」操作に従って試験溶液の調製を行った。

また対照として、ズッキーニ果実の残りの半分を約1 cm角に切った角切りサンプル5 gも同様に①~④のグループに分けて操作を行った (各3試行)。さらに、均質化したズッキーニについては、ククルビタシン類を添加しないサンプルをブランクとして調製し (1試行)、それぞれLC-MS/MSで分析を行った。

### 5.6 単独標準溶液添加後の放置時間の違いによる回収率の変化

ズッキーニ果実をブレンダーを用いて均質化し、その5 gを50 mL遠沈管に量り取り、ククルビタシンB, D, E,

I及びエラテリニドのそれぞれ10 µg/mL単独標準溶液を0.5 mLずつ別々のサンプルに添加し（サンプルあたり1 µg/gに相当）,

- ①添加直後
- ②添加後10分間放置後（添加直後及び10分後に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌）
- ③添加後60分間放置後（添加直後及び以降30分毎に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌）
- ④添加後120分間放置後（添加直後及び以降30分毎に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌）

の4グループについて（各1試行）,以降「4.2 抽出・分析」操作に従って試験溶液の調製を行った。また、ブランクとしてククルビタシン類を添加しないサンプルを調製し（1試行）,それぞれLC-MS/MSで分析を行った。

### 5.7 加熱処理したサンプルにおけるククルビタシンEの添加回収率

ズッキーニ果実をブレンダーを用いて均質化し,そのうち20 gをビーカーに入れ電子レンジ（500W）で30秒間加熱後,室温まで冷却し,

- ①均質化サンプル（非加熱）
- ②均質化サンプル（電子レンジ加熱）

の2グループについて（各3試行）,各5 gを50 mL遠沈管に入れ,それぞれククルビタシンEの10 µg/mL標準溶液を0.5 mLずつ添加した（サンプルあたり1 µg/gに相当）。添加後,60分間放置し（添加直後,30分後及び60分後に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌）,「4.2 抽出・分析」操作に従って試験溶液の調製を行った。また,①にククルビタシン類を添加しないサンプルをブランクとして調製し（1試行）,それぞれLC-MS/MSで分析を行った。

### 5.8 角切りサンプルにおける添加回収試験

ズッキーニ,きゅうり,メロンについて,各果実を約1 cm角に切った角切りサンプル5 gを50 mL遠沈管に量り取り,それぞれククルビタシン類10 µg/mL混合標準溶液を0.5 mLずつ添加した（サンプルあたり1 µg/gに相当）。添加後すぐにメタノールを加えて,「4.2 抽出・分析」操作に従って試験溶液の調製を行った（各3試行）。また,それぞれククルビタシン類を添加しないサンプルをブランクとして調製し（1試行）,LC-MS/MSで分析を行った。

### 5.9 野菜及び果実種別ごとの検討

きゅうり,メロン（皮及び種子を除去）,ゴーヤー（種子を除去）,かぼちゃ（種子を除去）,キャベツ（芯を除去）及びなす（へたを除去）について,それぞれブレンダーを用いて均質化したサンプル5 gを50 mL遠沈管に

量り取り,ククルビタシン類10 µg/mL混合標準溶液を0.5 mLずつ添加した（サンプルあたり1 µg/gに相当）。添加後60分間放置後（添加直後,30分後及び60分後に10秒間ボルテックスミキサーで攪拌）,「4.2 抽出・分析」操作に従って試験溶液の調製を行った（各3試行）。またブランクとしてククルビタシン類を添加しないサンプルをそれぞれ調製し（1試行）,LC-MS/MSで分析を行った。

## III 結果及び考察

### 1.1 酸添加及び加熱処理による回収率の変化

前報<sup>4)</sup>では分析機器としてLC-MSを用いてククルビタシン類の分析を行ったが,今回はLC-MS/MSを用いて分析を行った。Fig. 2にククルビタシン類標準溶液のLC-MS/MSクロマトグラムを示した。

ククルビタシン類の添加回収試験時における回収率低下の原因として,ズッキーニ中の酵素の関与が推定されることから,酵素活性を抑制する目的でズッキーニの均質化サンプルについて,0.1 mol/L塩酸を5 mL添加したものの<sup>8)</sup>（添加後pH 2.2）,その対照として水5 mLを添加したものの（添加後pH 6.4）を調製し,添加回収試験を行った。また,タマネギ中の残留農薬分析において,酵素反応による妨害成分の生成を防止するために,酵素失活の目的で電子レンジ加熱が用いられることから<sup>9)</sup>,均質化サンプルを電子レンジで加熱処理した（加熱直後のサンプル内部温度は約70°C）。これらのサンプルにククルビタシン標準溶液を添加し,60分間放置した後の回収率をTable 2に示した。

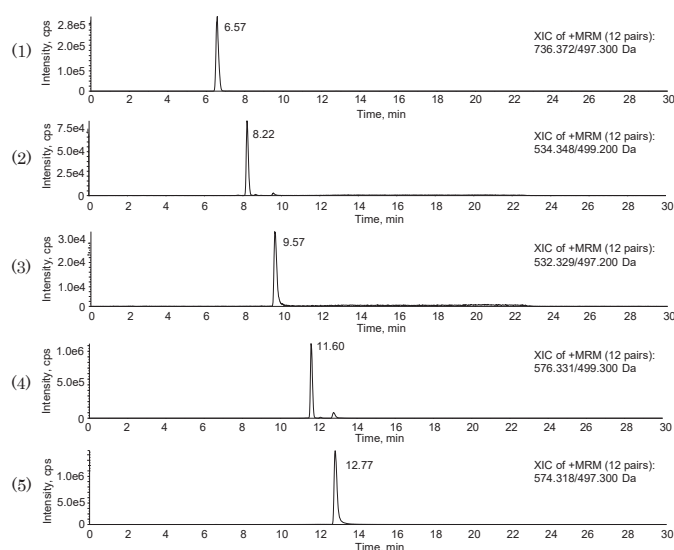


Fig.2 LC-MS/MS chromatograms obtained from 0.1 µg/mL standard solution of elaterinide (1), cucurbitacin D (2), cucurbitacin I (3), cucurbitacin B (4), and cucurbitacin E (5)

Table 2 Recoveries of cucurbitacins in zucchini homogenate

Sample	Recovery (%)				
	Cucurbitacin B	Cucurbitacin D	Cucurbitacin E	Cucurbitacin I	Elaterinide
①Zucchini homogenate	2 ± 0.4	167 ± 0.9	0.1 ± 0.03	152 ± 2	7 ± 0.8
②Zucchini homogenate + HCl	97 ± 3	97 ± 0.5	95 ± 3	100 ± 2	97 ± 2
③Zucchini homogenate + Water	0.5 ± 0.1	168 ± 4	0.03 ± 0.003	172 ± 1	5 ± 0.5
④Zucchini homogenate (Microwaved)	87 ± 1	85 ± 2	77 ± 3	75 ± 1	95 ± 5

(n=3, mean ± SD)

無処理のサンプル①においては、ククルビタシンB、E及びエラテリニドの回収率は10%以下となり、逆にククルビタシンD及びIは150%以上であった。一方②塩酸添加サンプルではすべてにおいて95%~100%であったが、対照とした③水添加サンプルについては①とほぼ同様の傾向であった。また④電子レンジ処理サンプルでは75%~95%の回収率であった。ブランクサンプルからは、ククルビタシン類は検出されなかった (0.01 µg/g未満)。

②及び④の回収率が良好であったことから、ズッキーニ中の酵素の働きにより、添加したククルビタシンB、E及びエラテリニドは減少し、ククルビタシンD及びIが増加すること、また酸添加や電子レンジ加熱により酵素活性を抑制するとこれらの反応も抑制されると推定された。

### 1.2 ククルビタシン類溶液の加熱による安定性

ククルビタシン類混合標準溶液 (10%メタノール溶液) を水浴上95°Cで10分間加熱した結果、加熱していない標準溶液と比較した残存率はククルビタシンB、D、E、I及びエラテリニドについて、それぞれ96%、100%、95%、97%、98% (n=3)であった。ククルビタシン類は10分程度の加熱では分解せず、電子レンジ等による加熱でも安定であると推測された。

### 1.3 濃度依存性の検討

ズッキーニ中のククルビタシン類の減少及び増加が、酵素によるものかを確認するために、ズッキーニ果実にそれぞれククルビタシン類を0.1、0.5及び1 µg/g相当添加し、1 µg/g添加時のそれぞれのピーク面積を1としたものをFig. 3にプロットした。

その結果、0.1、0.5、1 µg/gと添加濃度が増加するにつれてピーク面積も増加し、濃度依存性が見られた (ククルビタシンEについては回収率が0%近くなったため、標準偏差が大きくなっている)。ブランクサンプルからは、ククルビタシン類は検出されなかった (0.01 µg/g未満)。

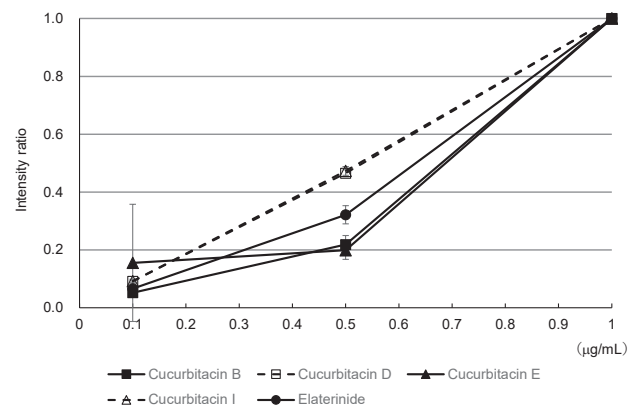


Fig.3 Peak intensity of the zucchini extract fortified with cucurbitacins at 0.1, 0.5 and 1.0 µg/g (n=3)

これらのことから、少なくとも0.1~1 µg/gの添加濃度の範囲で酵素の量は十分に存在し、ククルビタシン類の減少及び増加は、ズッキーニ中の酵素の影響である可能性が支持された。

### 1.4 均質化サンプルの保存日数の違いによる回収率の変化

ズッキーニの均質化サンプルについて、均質化直後、1日、3日間及び7日間冷蔵保存後に標準溶液を添加した回収率の結果をFig. 4に示した。

均質化直後のサンプルに添加した場合、ククルビタシンB、E及びエラテリニドの60分放置後の回収率は2%以下であり、ククルビタシンDで約110%、ククルビタシンIで約40%であった。また1日冷蔵保存後のサンプルに添加した場合、ククルビタシンB、E及びエラテリニドの60分放置後の回収率は5%以下となり、ククルビタシンDで約160%、ククルビタシンIで約190%となった。

さらに3日及び7日間経過するにつれて回収率は改善傾向にあるが、7日間経過しても酵素の活性は保持されると推定された。ブランクサンプルからは、ククルビタシン類は検出されなかった (0.01 µg/g未満)。

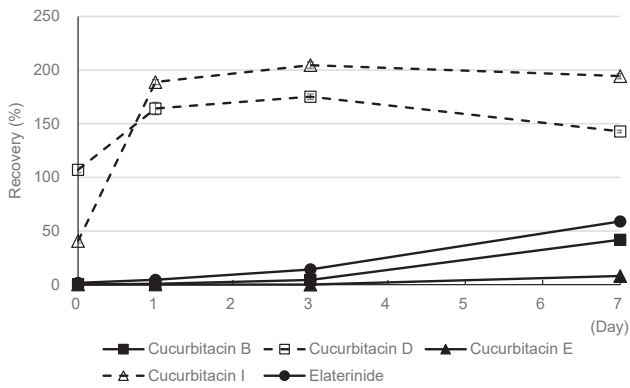


Fig. 4 Recoveries of cucurbitacins in homogenized samples of zucchini stored under refrigeration for different storage periods ( $n=3$ )

### 1.5 混合標準溶液添加後の放置時間の違いによる回収率の変化

ズッキーニの均質化サンプル及び角切りサンプルについての回収率の結果をFig. 5及びFig. 6に示した。均質化サンプルでは添加直後に抽出した場合、ククルビタシン類の回収率は95%~109%であったが、添加後10分間放置後の回収率ではククルビタシンBが67%、Eが30%、エラテリニドが78%であり、ククルビタシンD及びIは100%を超過し、それぞれ128%、172%であった。さらに60分後及び120分後のサンプルでも、ほぼ同様の傾向を示し、ククルビタシンB、E及びエラテリニドは100%以下で減少し続け、ククルビタシンDは増加、ククルビタシンIは10分後以降減少傾向となった。

一方、角切りサンプルでは、添加直後に抽出した場合ククルビタシン類の回収率は91%~103%であったが、添加後10分、60分及び120分間放置後のサンプルの回収率は徐々に減少し、120分放置後で、ククルビタシンB、D、E、I、エラテリニドがそれぞれ26%、82%、7%、58%、57%であった。ククルビタシンD及びIについては、均質化サンプルでは10分以降の回収率は100%を超えていたが、角切りサンプルでは100%以下であった。また角切りサンプルの方が、時間経過に対する回収率の減少の割合は低かった。空白サンプルからは、ククルビタシン類は検出されなかった(0.01 µg/g未満)。

角切りサンプルの方が均質化サンプルよりも回収率の減少及び増加の影響が小さかった理由としては、添加したククルビタシン類標準溶液が酵素の存在するサンプル内部に浸透しにくく酵素反応が穏やかであったこと、もしくは均質化時により多くの酵素が生成し、角切りサンプルの方が生成した酵素量が少なかったことが原因と推測された。

また、抽出時にメタノールを添加した後は、時間を経過しても化合物の変化は見られなかった。前報<sup>4)</sup>におい

て、ズッキーニに添加したククルビタシン類の回収率は96%~102%と良好であったが、この理由として、前回は検体の量が少なかったため、試料を均質化せず、細切りした試料に添加したこと及び添加直後に抽出操作を行ったことが良好な回収率が得られた理由と考えられた。

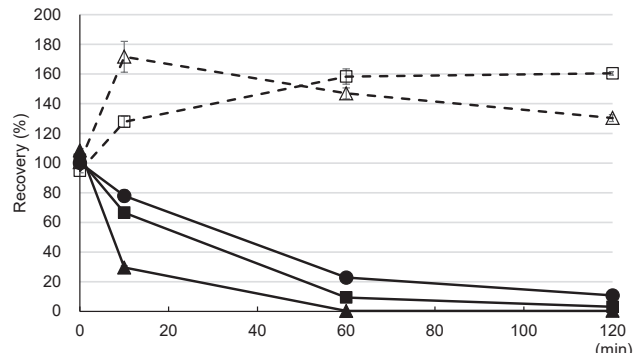


Fig. 5 Recoveries of cucurbitacins in homogenized samples of zucchini for different periods of standing after standard addition ( $n=3$ )

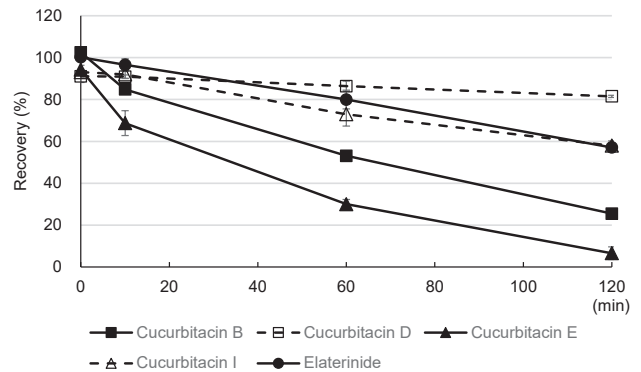


Fig. 6 Recoveries of cucurbitacins in diced samples of zucchini for different periods of standing after standard addition ( $n=3$ )

### 1.6 単独標準溶液添加後の放置時間の違いによる回収率の変化

1.4ではズッキーニ均質化サンプルにククルビタシン混合標準溶液を添加したが、個別の化合物の変化を確認するために、混合溶液ではなく、それぞれの単独標準溶液を別々のサンプルに添加した。回収率の結果をFig. 7~Fig. 11に示した。

ククルビタシンBのみを添加した場合 (Fig. 7)、ククルビタシンBは添加直後から減少した一方、ククルビタシンDが新たに生成し、増加傾向を示した。ククルビタシンDはククルビタシンBのアセチル基部位が加水分解した構造を持ち、ズッキーニ中の加水分解酵素の働きによりククルビタシンBの一部がククルビタシンDに変換したと推測された (Fig. 12)。

次に、ククルビタシンDのみを添加した場合 (Fig. 8), 回収率は10分後で99%でその後わずかに減少し, 60分後, 120分後でそれぞれ87%, 90%となった. その他のククルビタシン類は検出されなかった.

また、ククルビタシンEのみを添加した場合 (Fig. 9), ククルビタシンEの回収率は添加直後から減少した一方, ククルビタシンIが新たに生成し, 増加傾向を示した. ククルビタシンIはククルビタシンEのアセチル基が加水分解した構造を持ち, ズッキーニ中の加水分解酵素によりククルビタシンEの一部がククルビタシンIに変換したと推測された. また, ククルビタシンEの2位に糖が付いた構造のエラテリニドの回収率も10分以降増加したことから, ズッキーニ中には配糖体化酵素も含まれ, ククルビタシンEがその配糖体であるエラテリニドに変換した可能性が考えられた.

最後に、ククルビタシンI及びエラテリニドのみを添加した場合 (Fig. 10及びFig. 11), それぞれの回収率は徐々に低下し, 120分後ではそれぞれ52%, 15%であった. それぞれ徐々に分解あるいは別の化合物へと変換したものと考えられた.

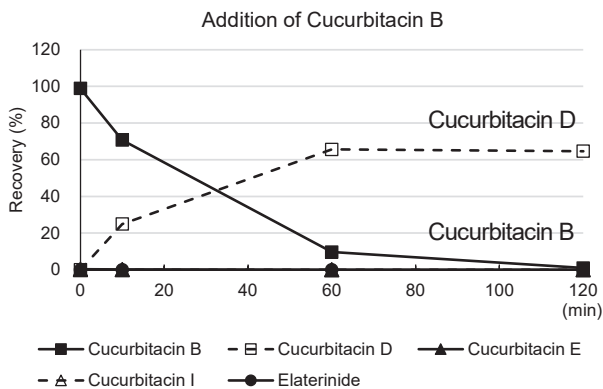


Fig.7 Recoveries of cucurbitacins in homogenized samples of zucchini for different periods of standing after standard addition of cucurbitacin B ( $n=1$ )

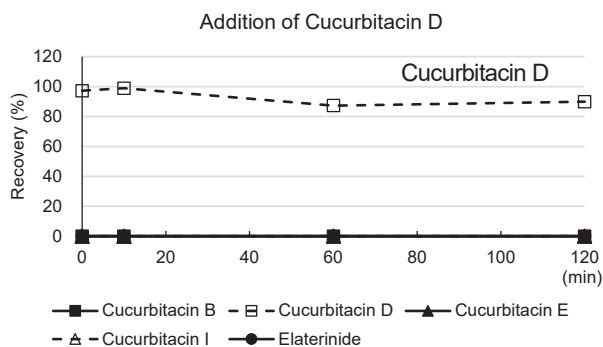


Fig.8 Recoveries of cucurbitacins in homogenized samples of zucchini for different periods of standing after standard addition of cucurbitacin D ( $n=1$ )

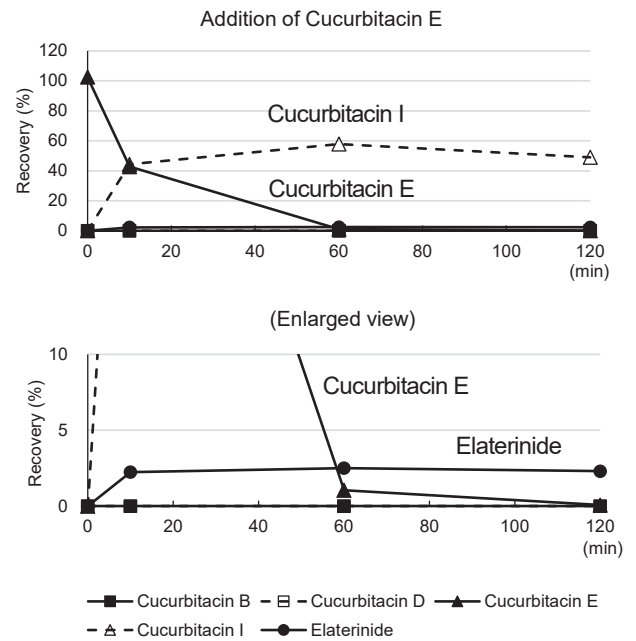


Fig.9 Recoveries of cucurbitacins in homogenized samples of zucchini for different periods of standing after standard addition of cucurbitacin D ( $n=1$ )

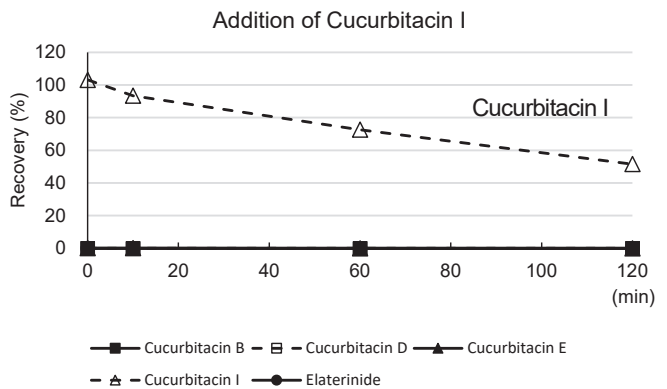


Fig.10 Recoveries of cucurbitacins in homogenized samples of zucchini for different periods of standing after standard addition of cucurbitacin I ( $n=1$ )

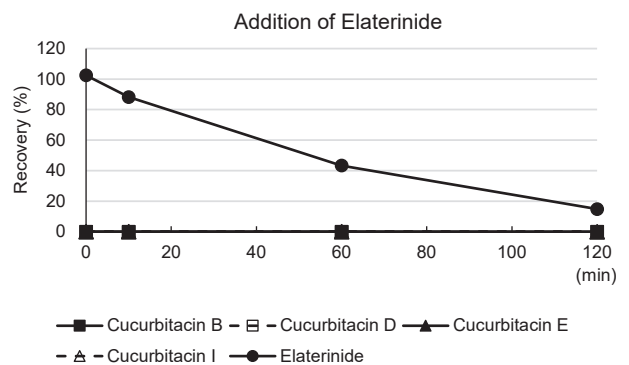


Fig.11 Recoveries of cucurbitacins in homogenized samples of zucchini for different periods of standing after standard addition of elaterinide ( $n=1$ )

これらのことから、ククルビタシンEの場合、一部が加水分解酵素の影響によりククルビタシンIに、そして一部が配糖体化酵素に影響によりエラテリニドに変化して増加する一方、それらがFig.10及びFig.11のように、別の酵素の影響で徐々に減少していくため、量として一定量あるいは減少していくものと推測された (Fig. 12)。

Fig.13及びFig.14にククルビタシンE及びククルビタシンIを添加後120分経過したサンプルのクロマトグラムを示した。ククルビタシンEを添加した場合、ククルビタシンD, I, B及びEの各トランジションのクロマトグラム上には未知ピークが見られ、またククルビタシンIを添加した場合、ククルビタシンD及びIのトランジションのクロマトグラム上に未知ピークが見られたことから、これらの分解によって今回測定したククルビタシン類標準品以外の化合物が生成していることが確認された。

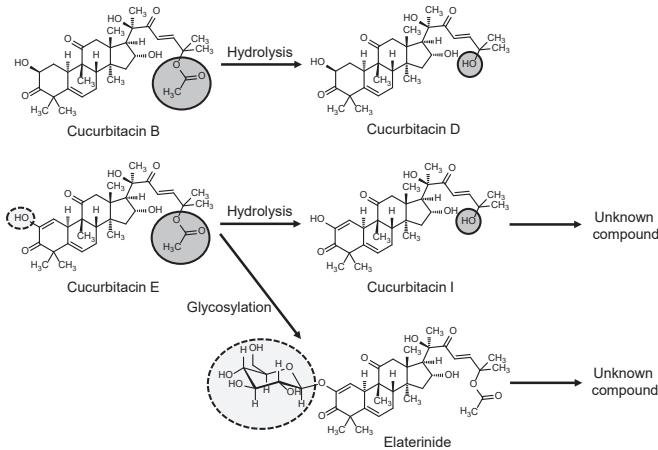


Fig.12 Putative degradation pathways of cucurbitacins

### 1.7 加熱処理したサンプルにおけるククルビタシンEの添加回収率

ズッキーニの非加熱及び電子レンジ加熱サンプルについて、ククルビタシンEのみを添加した時の回収率をTable 3に示した。非加熱のズッキーニの回収率は「1.6 単独標準溶液添加後の放置時間の違いによる回収率の変化」と同様の傾向を示し、ククルビタシンE, ククルビタシンI, エラテリニドでそれぞれ0.18%, 62%, 0.31%であり、ククルビタシンB及びDは検出されなかった。また電子レンジ加熱したサンプルの回収率はククルビタシンEで81%, ククルビタシンIで0.46%でありその他のククルビタシン類は検出されなかった。加熱により酵素活性を抑制するとククルビタシンEからククルビタシンI及びエラテリニドへの変換はほとんど見られなかったことから、これらの現象は加水分解酵素及び配糖体化酵素によるものであると確認された。

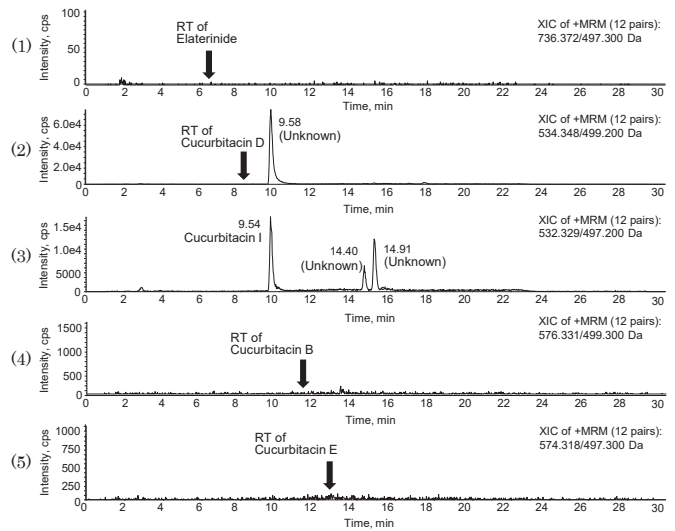


Fig.13 LC-MS/MS chromatograms obtained from zucchini sample fortified with cucurbitacin E at 120 min after addition of standard. Transition of elaterinide (1), cucurbitacin D (2), cucurbitacin I (3), cucurbitacin B (4), and cucurbitacin E (5)

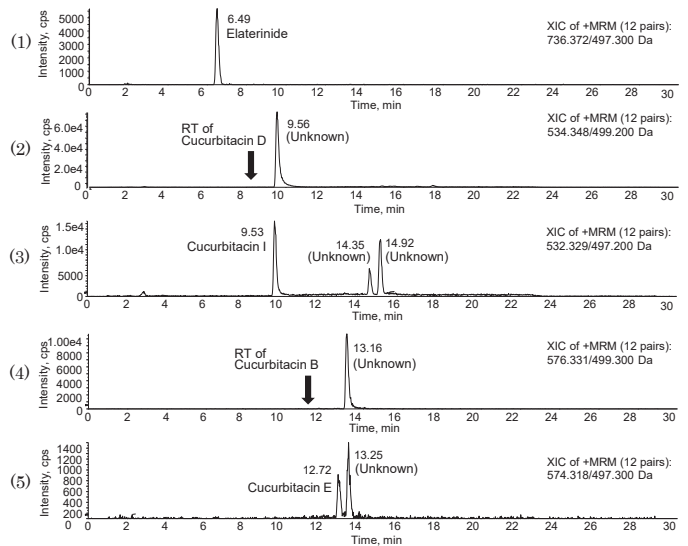


Fig.14 LC-MS/MS chromatograms obtained from zucchini sample fortified with cucurbitacin I at 120 min after addition of standard. Transition of elaterinide (1), cucurbitacin D (2), cucurbitacin I (3), cucurbitacin B (4), and cucurbitacin E (5)

### 1.8 角切りサンプルにおける添加回収試験

ズッキーニ, きゅうり, メロンについて、均質化を行わず角切りにしたサンプルの1 µg/g相当添加時の回収率をTable 4に示した。

ククルビタシン類の回収率は、ズッキーニで89%~98%, きゅうりで90%~95%, メロンで86%~95%であり、それぞれのブランクサンプルからはククルビタシン類は検出されなかった (0.01 µg/g未満)。本法では試料を均質化せず角切りにし、標準溶液の添加直後にメタノールを加えて抽出操作を行ったため、酵素活性が抑制され、



Table 3 Recoveries of cucurbitacins in microwaved zucchini homogenate

Sample	Recovery (%)				
	Cucurbitacin B	Cucurbitacin D	Cucurbitacin E	Cucurbitacin I	Elaterinide
①Zucchini homogenate	0 ± 0	0 ± 0	0.18 ± 0.03	62 ± 0.6	0.31 ± 0.01
②Zucchini homogenate (Microwaved)	0 ± 0	0 ± 0	81 ± 1	0.46 ± 0.06	0 ± 0

(n=3, mean ± SD)

Table 4 Recoveries of cucurbitacins in diced samples of vegetables

Sample	Recovery (%)				
	Cucurbitacin B	Cucurbitacin D	Cucurbitacin E	Cucurbitacin I	Elaterinide
①Zucchini	98 ± 1	89 ± 2	93 ± 3	96 ± 2	95 ± 3
②Cucumber	95 ± 2	90 ± 2	92 ± 3	94 ± 2	93 ± 1
③Melon	95 ± 2	86 ± 0.7	93 ± 1	93 ± 3	94 ± 2

(n=3, mean ± SD)

良好な回収率が得られた。実際のククルビタシン類を含有する試料においても、角切りにすることにより酵素活性が抑制され、分解及び配糖体化等の変化を防ぐことができると考えられた。

#### 1.9 野菜及び果実種別ごとの検討

ズッキーニ以外の果実について調べるために、きゅうり、メロン、ゴーヤー、かぼちゃ、キャベツ及びなすについての添加60分間放置後の回収率の結果をTable 5に示した。

ウリ科植物のうち、かぼちゃは最も回収率が低く、すべて3%未満であった。メロンはククルビタシンB、D、E及びIについては40~60%台であり、ゴーヤーはククルビタシンD及びIが140%以上であった。またウリ科植物のきゅうり及びウリ科以外のキャベツ、なすについては顕著な回収率の減少は見られなかった。今回、1サンプルずつの検討であるが、ウリ科植物においても、種によって酵素の活性に違いがあることが分かった。すべてのブランクサンプルからは、ククルビタシン類は検出されなかった (0.01 µg/g未満)。

## IV 結論

ククルビタシン類分析において、試料の調製時に酸を加えるか、加熱により回収率が改善したことから、ククルビタシン類はズッキーニ中の酵素により分解することが推察された。また、試料を均質化処理した場合も速やかに分解が進むことが明らかになった。さらに、ズッキーニにククルビタシンBを添加した場合、一部が加水分解酵素によりククルビタシンDに、またククルビタシンEを添加した場合、一部が加水分解酵素によりククルビタシンIになり、一部は配糖体化酵素によりエラテリニド (ククルビタシンE 2-O-グルコシド) に変化すると推定された。

一方、抽出時に速やかにメタノールを加えることにより酵素活性が抑制されることが確認され、試料に直ちにメタノールを加えることにより良好な回収率が得られることが明らかになった。

実際にククルビタシン類を含有する試料においては、均質化処理の間にククルビタシン類の分解が生じる可能性がある。また均質化する前に、試料全体に酸添加ある

Table 5 Recoveries of cucurbitacins in vegetable homogenates

Sample	Recovery (%)				
	Cucurbitacin B	Cucurbitacin D	Cucurbitacin E	Cucurbitacin I	Elaterinide
①Cucumber	93 ± 3	92 ± 3	104 ± 3	91 ± 2	98 ± 2
②Melon	61 ± 1	61 ± 3	46 ± 2	50 ± 3	93 ± 0.9
③Goya	101 ± 2	172 ± 6	78 ± 2	148 ± 3	114 ± 3
④Pumpkin	0.4 ± 0.05	3 ± 0.4	0.2 ± 0.04	0.9 ± 0.3	1 ± 0.03
⑤Cabbage	88 ± 1	88 ± 0.9	85 ± 3	82 ± 0.6	100 ± 2
⑥Eggplant	97 ± 2	92 ± 0.9	101 ± 10	97 ± 2	102 ± 0.8

(n=3, mean ± SD)

いは加熱する方法も考えられるが、全試料を処理した場合、再検査等のため試料の一部を保存する必要がある場合には不都合が生じる。

そこで現実的な方法として、試料を均質化せずに一定量を角切りにして、全体を代表するように分取し、直ちに有機溶媒を加えて抽出する方法がより有効であると考えられた。

従って、本法では角切り試料を用いて速やかにメタノールを加えて抽出し、添加回収試験を実施した。その回収率は86%~98%と良好な結果が得られ、容易に酵素分解するククルビタシン類の有効な分析方法であると考えられる。

## 謝 辞

配糖体化酵素についてご助言いただきました、信州大学繊維学部田口悟朗教授に深謝致します。

(令和5年2月27日受理)

## 文 献

- 1) 山口瑞香, 野村千枝, 清田恭平, 梶村計志: ヒョウタンによる食中毒事例について. 大阪府立公衛研所報, **52**, 41-43 (2014)
- 2) 吉岡直樹, 吉田昌史: 観賞用ヒョウタンによる中毒の原因物質と推定される苦味成分ククルビタシン B の分析. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, **8**, 26-29 (2017)
- 3) 吉岡敏行, 赤木正章, 北村雅美, 浅田幸男, 難波順子: 食品と医薬品等に含まれる有害化学物質等の分析技術の開発に関する研究—ウリ科植物に含まれる苦味成分ククルビタシン分析法の検討—. 岡山県環境保健センター年報, **39**, 153-157 (2015)
- 4) 吉岡直樹, 野村素行: ズッキーニによる有症苦情事例の原因物質の解明—苦味成分ククルビタシン類の一斉分析法の検討及び定量分析—. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, **9**, 11-17 (2018)
- 5) 田中佳代子, 秋谷正人, 渡邊和彦, 辻亜由子, 坂田実穂, 山崎匠子: 苦情事例におけるへちま中のククルビタシンの検査について. 杉並衛試年報, **34**, 40-42 (2016)
- 6) 佐久川さつき, 大城聡子, 仲眞弘樹, 當間一晃, 古謝あゆ子: 沖縄県における化学物質と自然毒による食中毒および苦情事例 (2019 年度). 沖縄県衛生環境研究所報, **54**, 141-151 (2020)
- 7) 鎌田光貴, 宮川あし子, 小山和志, 高橋佳代子, 土屋としみ: 苦みを有するユウガオ中のククルビタシンの分析事例と部位による含有量の偏り. 長野県環境保全研究所研究報告, **17**, 55-59 (2021)
- 8) 友澤潤子, 田中博子, 杉木佑輔, 上田宜和, 前田大史郎: LC-MS/MS を用いたククルビタシン類分析法の検討. 滋賀衛科セ所報, **55**, 23-29 (2020)
- 9) 起橋雅浩, 尾花裕孝, 堀伸二郎, 西宗高弘, 佐々木寧: タマネギ等の残留農薬分析における電子レンジの利用. 食衛誌, **37**, 43-47 (1996)