

納豆に含まれているメチルピラジン類の HPLC による分析

加沼 緑, 山田千恵, 岡 希太郎*

Chemical Profiles of Methylpyrazines Contained in Commercially Available Natto

Midori KANUMA, Chie YAMADA, and Kitaro OKA*

Department of Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan

(Received September 5, 2003; Accepted November 10, 2003)

Structures and amounts of methylpyrazines contained in commercial *natto*, a fermented soybean food in Japan, were determined using HPLC equipped with an acid-resistant reversed phase column, Capcell Pak C18 ACR (Shiseido). Mobile phase solvent mixtures consisted of acidic phosphate buffer solution (pH 2.0) containing 2% acetonitrile gave satisfactory results with baseline separation of the authentic specimens, such as naked pyrazine, monomethylpyrazine, 2,3-, 2,5-, and 2,6-dimethylpyrazine, trimethylpyrazine, and tetramethylpyrazine. We used the mobile-phase solvent with a flow rate of 1 ml/min at 15.0°C. Before HPLC, commercial *natto* samples were treated with water to prepare diluted suspensions of surface mucous materials. The suspensions were treated on Sep-Pac C18 Cartridges (Waters) with phosphate buffer solutions containing 2–7% acetonitrile. The extracts were then injected into the analytical column to obtain chromatograms that were used to determine the structures and amounts of methylpyrazines. The results showed that a commercially packed *natto* contains a considerable amount of 2,5-dimethylpyrazine instead of the tetramethyl- and trimethylpyrazines in the traditional products. This may be a result of recent efforts of *natto* makers whose interests have been focused on new methods for preparing odorless products.

Key words—methylpyrazines; *natto*; HPLC; 2,5-dimethylpyrazine

はじめに

納豆は大豆を原料とする日本の伝統食品である。納豆は健康食品としても高く評価され、近年の品質改良の結果、風味と栄養機能がともに大きく変わってきた。我々は納豆風味の主要成分である methylpyrazines (MPs) の種類と含量の変化に注目し、6種類の誘導体を定量分析できる HPLC 法を開発した。この方法を市販納豆に応用し、得られた結果を文献値と比較した。

小菅ら¹⁾は、納豆製造に使われていた枯草菌を培養し、その培養液から tetramethylpyrazine (T₄MP) を単離した。T₄MP は西アフリカ産のトウダイグサ科植物²⁾や、中国産薬用植物 (川芎,^{3,4)} 当帰,⁵⁾ 麻黄⁶⁾ など) から単離され、平滑筋弛緩作用^{7–9)} と抗凝固作用^{10–12)} が注目された。菅原ら¹³⁾ は納豆に含まれている MPs を GC/MS 法で分析し、T₄MP

以外にも trimethylpyrazine (T₃MP)、2種の dimethylpyrazines (DMPs)、及び monomethylpyrazine (MMP) の計 4 種類を同定した。納豆に含まれている MPs の含量を Table 1 に、それらの構造式を Fig. 1 に示す。

伝統的製造法による納豆は T₄MP や T₃MP に特

Table 1. Contents of Methylpyrazines (MPs) in Old and Current Natto

MPs	Content of MPs (μg/g)	
	Old ¹³⁾	Current
T ₄ MP	0.14	nd
T ₃ MP	1.09	nd
2,3-DMP	0.15	nd
2,5-DMP	4.41	15.4
2,6-DMP	nd	nd
MMP	0.05	nd
Total	5.84	15.4

nd: not detected.

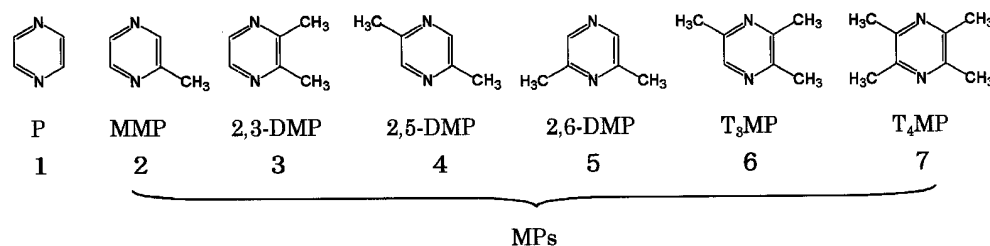


Fig. 1. Chemical Structures of Pyrazine (P) and Methylpyrazines (MPs)

1 P: pyrazine, 2 MMP: monomethylpyrazine, 3 2,3-DMP: 2,3-dimethylpyrazine, 4 2,5-DMP: 2,5-dimethylpyrazine, 5 2,6-DMP: 2,6-dimethylpyrazine, 6 T₃MP: trimethylpyrazine, 7 T₄MP: tetramethylpyrazine.

有の強い香りを有していると言われている。¹³⁾よく知られているように、販路拡大を目指した納豆菌製造業者による菌種改良と、納豆製造業者による製造法の近代化によって、近年の市場製品では納豆特有の香りが弱くなってきている。我々は納豆菌と納豆製造法の変化がMPs組成に及ぼす影響を調べるため、HPLC法を開発することにした。

試薬及び方法

1. HPLC 装置 日本分光製の送液ポンプ (BIP-I) と多波長紫外線吸収検出器 (Multi-320) を主体とし、FLOM社のカラムオープン (Model 502) と資生堂のODSコーティングカラム (Capcell Pak C18 ACR, 粒径 5 μ m, 内径 4.6 mm \times 250 mm) 及びレオダイン社のループ型サンプル注入器 (Model 7125) を装備したシステムを構築した。データ解析にはヒューレットパッカード社のマイクロコンピュータ (Vectra 386/20N) を用いた。

2. 試薬と移動相溶媒 リン酸、リン酸二水素ナトリウム・2水和物、及びアセトニトリルは和光純薬製の試薬特級品を使用した。標準品としてのピラジン誘導体は、和光純薬のほか、アルドリッチ社とシグマ社からも購入した。これらは置換基を有しない pyrazine (P) のほかに、メチル基を有する 6 種類の MPs であり、化学名と略号は Fig. 1 のとおりである。次に移動相溶媒として、まず 0.024 (w/v) % のリン酸二水素ナトリウム水溶液にリン酸を加えて、pH 2.0 に調製した。この溶液に、容積率 2% となるようにアセトニトリルを加えて移動相溶媒とした。また、カラム抽出で使用した溶出溶媒としては、この移動相溶媒にさらにアセトニトリルを追加して、最大 7% のものを調製して用いた。

3. MPs 標準溶液 P と 6 種類の MPs の各々

について、1 mg/ml の水溶液を調製した。このとき、T₄MP のように水に難溶性の化合物は、まず少量のメタノールに溶解してから、精製水を加えて調製した。次に、精製水で各溶液の 10 倍希釈を繰り返し、10 μ g/ml まで希釈し、各濃度の標準溶液として 5°C で保存した。これらの標準溶液を用いて、HPLC 条件の最適化、前処理での回収率の測定、検量線の作成、及び納豆に由来する MPs ピークの同定に使用した。

4. 納豆試料の前処理 市販の納豆に精製水を加えて、粘液質の懸濁液を調製した。実験法の 1 例を示す。市販の納豆 1 パック (50 g 前後) に精製水 100 ml を加えて、大豆の外形が破損しないように、ゆっくりとかき混ぜながら、表面粘液質を懸濁させた。懸濁液をふるいに通してろ過し、ふるい上の大豆はさらに精製水 10 ml ずつに加えて、ろ過した懸濁液の全量が 150 ml となるまで洗浄とろ過を繰り返した。懸濁液の 2 ml を、あらかじめアセトニトリルと精製水の各 2 ml で順次処理したカートリッジ Sep-Pak Plus C18 (WAT020515) に注入した。次に、Sep-Pak を精製水 2 ml で洗浄したのち、目的とする MPs の分子種に応じて、2–7 (v/v) % のアセトニトリルを含む精製水を注入し、溶出液の 100 μ l を HPLC に注入した。

結 果

1. HPLC 条件の最適化 P と 6 種類の MPs を一斉分析できる分析カラムとして、耐酸性 ODS をコーティングした Capcell Pak C18 ACR を選択した。このカラムの実験条件を検討した結果、移動相溶媒として pH 2.0 に調製したリン酸緩衝液に 2 % のアセトニトリルを加えたものを用い、カラム温度 15°C、流速 1 ml/min としたとき、ほぼ満足でき

る標準溶液のクロマトグラム (Fig. 2) が得られた。このとき分析カラムにかかる圧力は 100—110 kg/cm² であった。カラムの耐酸性は十分であり、溶媒を充填したまま 6 ヶ月間使用しても、標準クロマトグラムに有意な変化は見られなかった。Figure 2 から明らかなように保持係数 (k') は最も小さい P で 3.44, 最も大きい 2,5-DMP で 13.2 であり、ピーク形の再現性とピーク高の確保という観点から適切な範囲に納まっていた。また、各々のピークの理論段数は 4000 段以上であり、納豆分析に際して夾雑

ピークとの分離を期待できる数値であった。

2. カラム抽出法の最適化 カラム抽出実験法を最適化するため、納豆粘液の懸濁液 2 ml に、MPs を各 10 μ g となるように添加した。この溶液を注入した Sep-Pak を、まず精製水 3 ml で洗浄した後、2—7(v/v)% のアセトニトリルを含むリン酸緩衝液 (pH 2.0) 3 ml ずつで 3—5 回溶出し、各溶出液を HPLC で分析した。得られたクロマトグラムの 1 例を Fig. 3 に示す。次に、溶出溶媒のアセトニトリル濃度の差が MPs の回収速度に及ぼす影

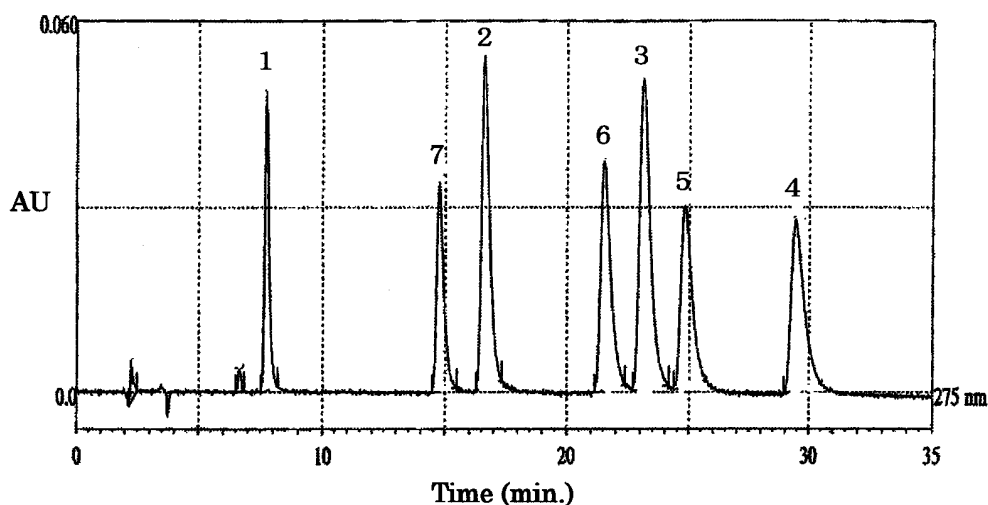


Fig. 2. Optimization of Chromatographic Conditions for Pyrazine (P) and Methylpyrazines (MPs)

Base-line separation of seven pyrazines was achieved by the use of acid resistant ODS column and a phosphate buffer solution at pH 2.0 and 15.0°C. Injected amount of each authentic compound was 5 μ g. Observed k' values of all peaks were within 3.44 (T₁MP) and 13.2 (2,5-DMP). Analytical time was less than 35 min. Theoretical plate numbers were more than 4000 that will allow us to achieve peak separation between pyrazines and other unknown compounds contained in mucous suspension of Natto.

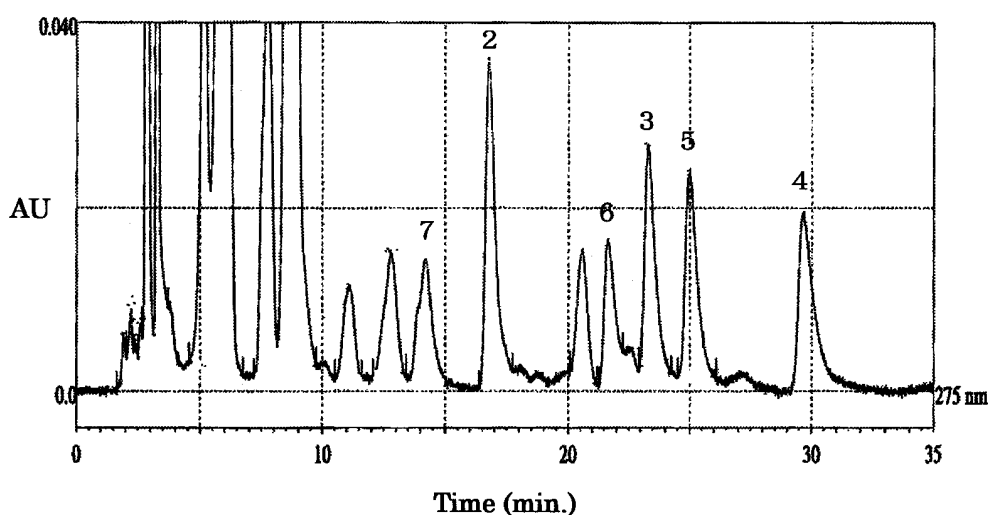


Fig. 3. Typical Chromatogram of the Extracts of Mucous Suspension of Natto Added with Methylpyrazines (MPs)

To a crop of 2 ml of the extracts, was added the authentic mixtures of MPs. Concentration of each MP was 10 μ g/ml. Detection wave length was 275 nm. Other chromatographic conditions were written in the text.

Table 2. Recovery Rates of MPs in Each Effluent Fraction by the Use of Sep-Pack Cartridges and the Phosphate Buffer Solution Containing 7% of Acetonitrile

MPs	Recovery rate (%)		
	1st 3 ml	2nd 3 ml	3rd 3 ml
T ₄ MP	93.9	6.1	0.0
T ₃ MP	85.4	14.6	0.0
2,3-DMP	86.9	13.1	0.0
2,5-DMP	74.7	25.3	0.0
2,6-DMP	82.0	18.0	0.0
MMP	97.4	2.6	0.0

響を検討し、最終的に濃度7%を選択した。この溶媒を用いて6種のMPsの回収速度を調べたところ、MMPでは7%溶出液1回目のピーク高が97.4%に達し、3回目以降にはピークは検出されなかった (Table 2)。T₄MPの回収速度も良好で、1回目のピーク高は93.9%であった。その他のMPsの回収速度は比較的遅く、2,5-DMPの1回目ピーク高は74.7%に留まった。しかし、どのMPについても2回目までの操作によって溶出が終了した。

3. 検量線の作成 MPsを含まない納豆粘液質を入手できないので、検量線の作成には6種のMPsを含む標準水溶液を用いることにした。まず、各濃度の標準水溶液を2mlずつとり、Sep-Pakを用いて第2項に書いた方法に準じ、7%のアセトニトリルを含むリン酸緩衝液6mlで処理した。標準水溶液とSep-Pak処理液のクロマトグラムを比較した結果、両者のMPsピーク高に統計学的有意差はなかった (データ省略)。次に、波長275nmでの検出限界をピーク高/ノイズ (S/N) 比を3として求めると、2,5-DMPでは35ngであり、他の化合物ではより低い数値であった (Fig. 2)。そこで、濃度の異なる標準水溶液 (50—1000ng/ml) のピーク高 (mm) を検出波長275nmで測定し、検量線を作成した (Fig. 4)。

4. 納豆粘液質中のMPsの測定 以上に述べた方法を、市販納豆に含まれているMPsに応用した。得られたクロマトグラムの1例をFig. 5に示す。ここで用いた市販納豆は、納豆の香りを抑制した製品 (金の粒におわなっとう, ミツカン, 愛知) である。この例では、6種のMPsのうち2,5-DMPに相当する保持時間約29minのピークのみが観察

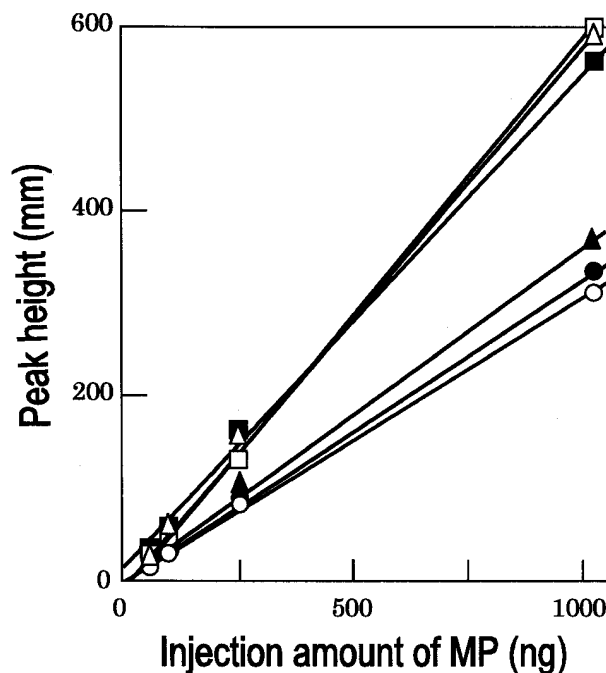


Fig. 4. Calibration Curve of Methylpyrazines (MPs)

Injected amounts of each MP were 50, 100, 250, and 1000 ng. Chromatogram was monitored at 275 nm on multi channel UV-detector. Linear relationships between peak height (y: mm at AU=0.005) and injection amount (x: ng) are as follows. □: 2,6-DMP $y=0.5005x-0.6645$, △: 2,3-DMP $y=0.5837x+1.9552$, ■: MMP $y=0.5547x+12.280$, ▲: 2,5-DMP $y=0.3673x+2.0293$, ●: T₃MP $y=0.3349x-1.1706$, ○: T₄MP $y=0.3030x+0.0848$.

され、他のMP相当ピークは認められなかった。2,5-DMPに相当するピークを化学的に同定するため、粘液質抽出液に2,5-DMP標準化合物を添加してクロマトグラムを観察した。その結果、保持時間約29minのピーク高だけがその他に比べて明らかに増加していた (データ省略)。さらに、このピークのUV吸収スペクトルを、標準化合物のものと比較したところ、両者は完全に一致していた (Fig. 5)。したがって、粘液質抽出液には2,5-DMPが含まれていることが判明した。次に、Fig. 4に示す検量線を用いて計算すると、市販の1パック (50g) 中に含まれる2,5-DMPは0.77mg (15.43mg/kg) であった。以上の結果を文献値と比較してTable 1に示す。

考 察

PとMPsは易揮発性で、抽出液を濃縮することが困難な化合物である。そのため高感度の定量分析法は未開発で、これまではGC/MS法による半定量分析法¹³⁾が主流になっている。ゆいいつ, Oka

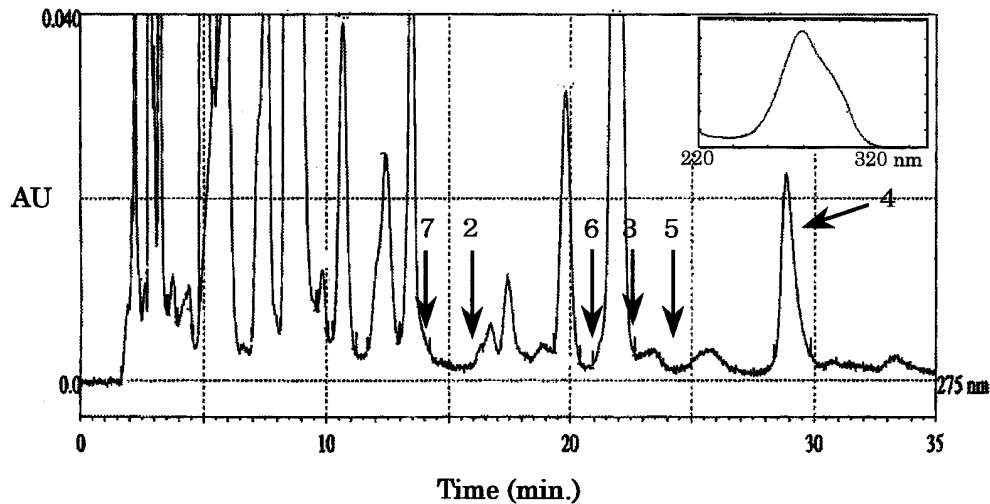


Fig. 5. Typical Chromatogram of the Extract of Mucous Suspension of Commercial Natto

A commercially available packed Natto was analyzed. Peak 4 showed UV absorption spectrum which was superimposed to that of the authentic 2,5-DMP, showing absorption maximum at 278 nm. Amount of 2,5-DMP was calibrated to be 343 ng/injection that was further calculated as to be 0.77 mg/package, or 15.43 mg/kg. At the position marked by arrows we found no peak derived from MPs.

ら¹⁴⁾は MPs の順相 HPLC 法を開発したが、大量投与時のラット薬物動態試験に使われたのみである。その方法と比べて今回の逆相 HPLC 法では、各化合物の回収率はほぼ定量的となり、互いの分離度が格段に改善されピークの重なりが全くなくなっている。一方、納豆に含まれている夾雑ピークとの重なりは製品ごとに違っていた。Figure 3 では T₄MP (ピーク 7) と重なる夾雑ピークが見られたが、UV 吸収スペクトルで容易に識別できた。

納豆に関する過去の報告によれば、納豆には 6 種類中 5 種類の MPs が含まれている (Table 1).¹³⁾ 我々の今回の結果では、市販納豆のごく一部ではあるが、特異的に 2,5-DMP だけが含まれていた。伝統的な納豆の香りは、主として T₃MP に基づいているが、我々が調べた市販納豆ではこの香りが弱まっていた。過去の報告に見られる納豆の MPs としては、T₄MP,¹⁾ T₃MP,¹³⁾ 及び 2,5-DMP¹³⁾ が主成分であった (Table 1)。我々が分析した納豆では、これらの MPs のうち T₄MP と T₃MP が見られなかった。2,3-DMP と MMP もなかったが、これらはもともと微量成分であった。一方、2,5-DMP は約 3.6 倍に増加していた。MPs 全体としても約 2.6 倍であり、文献値と比べて増加していた。したがって、納豆に特有の香りは、MPs の含有量よりもむしろそれらの組成に基づくと考えられる。

近年の納豆は消費者の嗜好にあわせて、納豆独特

の強い香りを弱める方向で改良されてきている。その結果、市場では香りの弱い納豆が主力となってきた。しかし、香りの変化と香り成分の関係についての詳しい研究はなかった。今回の我々の実験によって、納豆の香りと MPs の関係には食品化学的な意味のあることが示された。さらに、これまで納豆に含まれている MPs は香りとしてのみ話題にされてきたが、Table 1 に示す MPs 含有量は納豆を大量に摂取すると何らかの薬理作用が発現する可能性を示唆している。

REFERENCES

- 1) Kosuge T., Kamiya H., *Nature*, **193**, 776 (1962).
- 2) Ojewole J. A. O., Odebiyi O. O., *Planta Medica*, **41**, 281–287 (1981).
- 3) Pekin Seiyaku Kogyo Kenkyusho, *Chuka Igaku Zasshi*, **7**, 420–421 (1977).
- 4) Pekin Seiyaku Kogyo Kenkyusho, *Chuka Igaku Zasshi*, **8**, 467–469 (1977).
- 5) Lu R. M., He L. Y., Fang H. J., Hang X. Q., *Acta Pharm. Sinica*, **15**, 371–374 (1980).
- 6) Yuan-yin J., *J. Zhong Cao Yao (Chinese)*, **21**, 19–21 (1990).
- 7) Tsai C., Lai T., Huang W., Liu I., Cheng J., *Life Sci.*, **71**, 1321–1330 (2002).
- 8) Ni J., Matsumoto K., Watanabe H., *Jpn J.*

- Pharmacol.*, **67**, 137–141 (1995).
- 9) Yamada K., Kobayashi Y., Fujihara H., Ohta A., *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 538–540 (1998).
- 10) Chen S., Yan Y. H., Wang Y., Li J. W., Ma S. X., *Transplant. Proc.*, **28**, 1802–1803 (1996).
- 11) Sheu J., Kan Y., Hung W., Lin C., Yen M., *Life Sci.*, **67**, 937–947 (2000).
- 12) Zhao H., Zhu C., Li X., Dong X., Zhuang F., Wang X., Stoltz J., *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **23**, 145–151 (2000).
- 13) Sugawara E., Ito T., Odagiri S., Kubota K., Kobayashi A., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 311–317 (1985).
- 14) Kanai M., Kouno Y., Homma M., Yamada K., Oka K., Noguchi M., Abe M., Sakakura K., Iwata Y., *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **567**, 415–424 (1991).