加工食品中における 2-チオヒダントイン化合物の存在

高橋朝歌[§], 松岡寛樹*, 宇田 靖**

長野県短期大学

* 高崎健康福祉大学

** 宇都宮大学農学部

Presence of 2-Thiohydantoin in Processed Foods

Asaka Takahashi[§], Hiroki Matsuoka*
and Yasushi Uda**

Nagano Prefectural College, 8-49-7 Miwa,
Nagano 380-8525

* Department of Health and Nutrition, Takasaki
University of Health and Welfare, 37-1 Nakaorui-
cho, Takasaki-shi, Gunma 370-0033

** Department of Bioproduktive Sciences, Faculty of
Agriculture, Utsunomiya University, 350 Mine-machi,
Utsunomiya-shi, Tochigi 321-8505

Isothiocyanates can react with amino acids to form 2-thiohydantoins. Among isothiocyanates, allyl isothiocyanate (AITC), the pungent component of wasabi and mustard, is often used as a *wasabi*-flavoring additive. In foods containing AITC (*wasabi-fumi-pickles* and *wasabi-fumi-noritsukudani*), 3-allyl-2-thio-5-hydantoinpropionic acid (ATH-Glu), formed by reaction of AITC and glutamic acid, was identified using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS). 3-Allyl-5-isobutyl-2-thiohydantoin (ATH-Leu), 3-allyl-5-benzyl-2-thiohydantoin (ATH-Phe), and 3-allyl-5-isopropyl-2-thiohydantoin (ATH-Val), the reaction products of AITC with leucine, phenylalanine, and valine, were also identified in *wasabi-fumi-noritsukudani*. This is the first report demonstrating the formation of 2-thiohydantoins in commercially processed foods.

(Received Jul. 13, 2005; Accepted Sep. 15, 2005)

わが国の食生活に広く利用されているアブラナ科野菜は、特有成分としてグルコシノレート含有し、細胞が破壊されると酵素ミロシナーゼによって分解され辛味成分であるイソチオシアナートを生成する。イソチオシアナートは抗菌性や発癌抑制効果などの様々な生理機能を持つことが明らかになっており、従来のフレーバー物質としての利用に加え、機能性成分としての利用が注目されている。

しかし、イソチオシアナートは分子内に-NCS基をもっており、それ自身が不安定な化合物であるとともに、

強い求電子性のため水やアミノ化合物と容易に反応して付加化合物をつくることも知られている¹⁾²⁾。アミノ酸の共存下において、イソチオシアナートは2-チオヒダントイン化合物に変換されるが、われわれは以前に、ワサビやカラシの主要な辛味成分であるアリルイソチオシアナート(AITC)を様々なアミノ酸と反応させるモデル実験を行い、中性から弱酸性領域においてもチオヒダントイン化合物(3-Allyl-5-substituted 2-thiohydantoin, ATH-アミノ酸)が生成すること、チオヒダントイン化合物が食品中に見いだされる変異原物質に対して抑制作用を持つことを明らかにした^{3)~5)}。このような化学的特性から、実際の食品中においてもイソチオシアナートとアミノ酸の反応が起こることが推察されるが、これまでこの点について検討した例は見られなかった。AITCは香料として加工食品にも広く利用されていることから、本研究ではAITCを添加した市販の加工食品を試料としてATH-アミノ酸の生成について検討した。

1. 実験方法

(1) 試料

刻んだ野沢菜とキャベツの調味浅漬(ワサビ風味)、わさび漬(酒粕漬)、のり佃煮(ワサビ風味)は、すべて市販のものを購入した。

(2) アミノ酸分析

調味浅漬は調味液を0.02 M塩酸で100倍希釈したものを試料とした。わさび漬、のり佃煮は80%エタノールで抽出し(80℃)、遠心分離して上清を集めた。残渣に対し同様の操作を2回繰り返し、上清を合わせて濃縮乾固し、0.02 Mの塩酸で定容した。

遊離アミノ酸は、1級アミノ酸を3-メルカプトプロピオン酸共存化でo-フタルアルデヒド(OPA)、2級アミノ酸を9-フルオレニルメチルクロロフォルメート(FMOC)で誘導体化するプレカラム誘導体化法によりHPLCで分析した。フォトダイオードアレイ検出器(G1315A型)を備えたAgilent 1100システム(Agilent Technologies)およびZorbax Eclipse-AAAカラム(ϕ 4.6 $\times$ 150 mm, Agilent Technologies)を用いて、カラム温度を40℃、流速を2 ml/minとし、OPA-アミノ酸を338 nm, FMOC-アミノ酸を262 nmで検出した。移動相は、40 mMリン酸二水素ナトリウム緩衝液(pH 7.8)を溶媒A、アセトニトリル/メタノール/水(45/45/10, v/v/v)を溶媒Bとし、溶媒B濃度を0~1.9分は0%, 1.9~18.1分で57%に上昇、18.1~18.6分で100%に上昇と設定してグラジエント分析した。

(3) AITC分析

調味浅漬は調味液をそのまま分析用試料とした。のり佃煮、わさび漬はそれぞれ1 gをとり、90%アセトニトリル10 mlで抽出し、ろ過したものを分析に用いた。HPLC分析は、(2)と同じ装置と検出器およびMightysil RP-18

〒380-8525 長野市三輪 8-49-7

* 〒370-0033 高崎市中大類町 37-1

** 〒321-8505 宇都宮市峰町 350

[§] 連絡先 (Corresponding author), asaka@nagano-kentan.ac.jp

Fig. 1 Structures of 3-allyl-5-substituted 2-thiohydantoin : a), 3-allyl-2-thio-5-hydantoinpropionic acid (ATH-Glu) ; b), 3-allyl-5-isopropyl-2-thiohydantoin (ATH-Val) ; c), 3-allyl-5-benzyl-2-thiohydantoin (ATH-Phe) ; d), 3-allyl-5-isobutyl-2-thiohydantoin (ATH-Leu)

カラム ($\phi 3 \times 150$ mm, 関東化学) を使用し, 60% アセトニトリルを移動相として (流速 0.8 ml/min), 40°C, 244 nm で検出した。

(4) ATH-アミノ酸の分析

調味浅漬は調味液を等量の酢酸エチルで抽出し, 酢酸エチル相を濃縮した。わさび漬け, のり佃煮は試料の 10 倍量の 80% メタノールで抽出し, セライト 545 (関東化学) を用いてブフナー漏斗で吸引ろ過した。残渣に対して同様の操作を 2 回繰り返す, ろ液を濃縮した。メタノールを留去後, 酢酸エチル抽出し, 酢酸エチル相を濃縮した。

酢酸エチル濃縮物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し, ヘキサン, クロロホルム, クロロホルム/メタノール (98 : 2 ~ 75 : 25) の順に溶出させた。各画分を濃縮乾固後アセトニトリル 0.5 ~ 1 ml に溶解し, 既報³⁾ により AITC と各種アミノ酸から合成した ATH-アミノ酸を標品として LC-MS 分析を行った。(2) と同じ HPLC 装置および Agilent LC/MSD Trap (Agilent Technologies) を使用し, HPLC 条件はカラム温度 40°C, 検出波長 270 nm として流速 0.6 ml/min で分析した。なお, カラムは(3)と同じものを使用した。移動相はアセトニトリル/酢酸アンモニウム緩衝液 (25 mM, pH 5.85) を用い, アセトニトリル濃度を 0 ~ 2 分は 15%, 2 ~ 10 分で 60% に上昇, 10 ~ 15 分まで 60% と設定してグラジエント分析した。MS 分析は, ESI 法 (正イオンモード) にてイオン化し, キャピラリー電圧 3.5 kV, 乾燥ガス流量 10 L/min (N_2), 乾燥ガス温度 350°C, ネブライザ圧 60 psi (N_2) で行った。また, トラップへの一回のイオンの取り込み量を 50 000 (最大蓄積時間 50 ms) に設定した。

2. 実験結果及び考察

試料として用いた加工食品の pH, AITC 分析および遊離アミノ酸分析の結果を Table 1 に示した。pH は 4.8 ~

5.2, アミノ酸分析ではいずれもグルタミン酸ナトリウムが調味料として添加されていることから, グルタミン酸の値が 18.8 ~ 66.1 $\mu\text{mol/g}$ (あるいは $\mu\text{mol/ml}$) ともっとも多かった。このほか, アラニンやグリシンが多く検出された。

AITC を分析した結果, 調味浅漬では 0.14 ~ 1.03 $\mu\text{mol/ml}$, のり佃煮では 0 ~ 1.15 $\mu\text{mol/g}$, わさび漬けでは 3.03 ~ 5.21 $\mu\text{mol/g}$ であった。これらの分析値は小さかったが, AITC は水の存在下で分解しやすいことから, 今回分析した食品が製造された時点においてはもっと多くの AITC が存在していたものと推測された。のり佃煮で AITC が検出されなかったサンプルは, 製造時の加熱工程あるいは分析までの時間経過の中ですべて分解したものと推測された。

続いてこれらの食品中における ATH-アミノ酸の分析を行った。各食品の酢酸エチル抽出物を調製し, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画後, HPLC で分析した。その結果, すべての調味浅漬と のり佃煮のクロロホルム/メタノール (90 : 10 ~ 75 : 25) 画分中に, AITC とグルタミン酸に由来する ATH-Glu (Fig. 1) と一致するピークが検出された。そこで次にこの画分の MS 分析を行った。ATH-Glu は, ESI 法によって m/z 229 に $[M+H]^+$ のピークを与える (Fig. 2A)。調味浅漬およびのり佃煮抽出物においても, t_R 3.8 分付近に ATH-Glu 標品と同じ m/z 229 ($[M+H]^+$) のピークが観測された (Fig. 2B, 2C)。さらにこのピークのマススペクトルには, 標品と同じく m/z 211, 182, 84 に特有のフラグメントイオンピークが観測されたことから, このピークが ATH-Glu であることが確認され, 調味浅漬およびのり佃煮中に AITC とグルタミン酸に由来する ATH-Glu が生成していることを確認した。合成標品との比較から, 含量は調味浅漬で 0.3 ~ 1 nmol/ml 調味液, のり佃煮で 1.9 ~ 8.9 nmol/g であった (Table 2)。また, Fig. 3 に示したように, のり佃煮のクロロホル

Table 1 Amounts of free amino acids and AITC of the sample foods

	<i>pickles-1*</i>	<i>pickles-2*</i>	<i>pickles-3*</i>	<i>nori-tsukudani-1</i>	<i>nori-tsukudani-2</i>	<i>nori-tsukudani-3</i>	<i>wasabi-zuke-1</i>	<i>wasabi-zuke-2</i>
pH	5.0	5.2	5.0	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
AITC ($\mu\text{mol/g}$)	1.03	0.14	0.16	1.15	n.d.	0.29	5.21	3.03
Amino acids ($\mu\text{mol/g}$)								
Asp	n.d.	3.6	3.5	9.6	9.4	4.0	8.1	9.9
Glu	60.8	61.6	59.7	53.6	40.6	66.1	23.0	18.8
Ser	0.7	4.1	2.3	9.0	10.8	3.3	8.6	11.2
His	n.d.	0.8	1.0	2.5	2.3	1.0	1.6	1.7
Gly	49.5	3.9	4.1	9.2	8.9	3.4	10.6	13.7
Thr	n.d.	2.0	2.5	6.4	8.0	2.4	5.6	6.7
Arg	n.d.	1.9	2.1	4.4	3.8	1.6	6.4	7.9
Ala	23.9	9.6	9.9	23.2	18.2	11.5	16.3	31.1
Tyr	n.d.	0.1	0.4	1.2	1.3	0.4	3.8	4.3
Val	n.d.	2.3	3.1	7.5	11.0	2.8	8.7	10.8
Met	n.d.	0.4	0.7	1.1	1.6	0.5	1.8	2.0
Phe	0.1	0.8	1.1	4.5	6.3	1.5	4.8	5.6
Ile	n.d.	1.1	1.8	5.0	8.9	1.6	6.2	7.2
Leu	0.7	3.2	4.5	8.2	13.8	2.9	9.6	12.1
Lys	4.0	2.6	5.6	3.3	4.5	1.2	6.6	5.9
Pro	n.d.	9.0	9.2	8.9	13.4	5.8	5.3	7.1

*The amounts of AITC and amino acids were expressed in $\mu\text{mol/ml}$ seasoning liquid.

Pickles are made of chopped *nozawana* and cabbage in seasoning liquid.

AITC, allyl isothiocyanate ; n.d., not detected.

Fig. 2 LC-MS profiles for authentic ATH-Glu (A) and chloroform/methanol (80 : 20)-eluted fractions obtained from the sample foods by silicagel column chromatography (B, C) : (1), LC chromatogram ; (2), total ion chromatogram ; (3), mass chromatogram of m/z 229

ム画分中には ATH-Val, ATH-Phe, ATH-Leu (Fig. 1) が検出され、それらの含量は 0.3~3.1 nmol/g であった (Table 2). AITC の水存在下における分解には、温度や pH が影響を与えることが Ohta らの研究で報告されているが⁶⁾、アミノ酸の共存も AITC 分解に影響を与え、アミノ酸の種類や濃度によって差異が生じることが知られている⁷⁾。加工食品では、調味料として添加されているグルタ

ミン酸ナトリウムをはじめ多くのアミノ酸が含まれていることに加え、加熱なども行われていることから、AITC の分解は促進されやすい条件になっていると考えられる。調味液漬では加熱殺菌は行われていないが、調味液資材の溶解性を高めるために加熱している場合がある。AITC は食品製造段階における水の共存や加熱などの製造条件あるいは製品流通中の時間経過や温度条件の変動などを考慮して比較的多めに使用されているものと推測されるが、その一部が反応しチオヒダントイン化合物に変換されるものと考えられた。今回の食品試料のうち、わさび漬けからはいずれのチオヒダントイン化合物も検出されなかったが、他の食品と比較して糖やアルコールの濃度が高いことから、これらがアミノ酸との反応に影響を与えることが推察された。また、製造時に加熱工程がないこともイソチオシアナートとの反応性に影響しているものと考えられる。

以上、本研究において、加工食品中でイソチオシアナートとアミノ酸が反応しチオヒダントイン化合物が生成することが初めて明らかになった。今回食品から検出されたチオヒダントイン化合物の量は当該食品の摂取量からみて、以前検討した抗変異原作用^{3)~5)}を示すには微量すぎると考えられるが、チオヒダントイン化合物が加工食品中に生成する事実は、食品中あるいは摂取後の体内におけるイソチオシアナートの動態を解析するうえで有用であると考えられる。

3. 要 約

アリルイソチオシアナートを含む市販の加工食品（調味液漬、わさび漬け、のり佃煮）を用いて、2-チオヒダントイン化合物の検索を行った。その結果、調味液漬とのり佃煮からグルタミン酸との反応物である ATH-Glu が生成していることを確認した。また、のり佃煮中には ATH-Val, ATH-Phe, ATH-Leu の存在も確認された。

本研究の一部は、笹川科学研究助成により行われたものである。また、LC-MS 分析にご協力いただいた長野県工業技術総合センター食品技術部門唐沢秀行研究員に感謝いたします。

Fig. 3 LC-MS profiles of chloroform-eluted fraction obtained from *wasabi-fumi-noritsukudani-2* by silicagel column chromatography : (A), LC chromatogram ; (B), MS spectra

The peaks a, b, and c were identified with ATH-Val, ATH-Phe, and ATH-Leu, respectively, because these data were identical to those of authentic 3-allyl-5-substituted 2-thiohydantoins.

Table 2 Amounts of 3-allyl-5-substituted 2-thiohydantoins of the sample foods

	MW	Amounts (nmol/g)							
		<i>pickles-1*</i>	<i>pickles-2*</i>	<i>pickles-3*</i>	<i>nori-tsukudani-1</i>	<i>nori-tsukudani-2</i>	<i>nori-tsukudani-3</i>	<i>wasabi-zuke-1</i>	<i>wasabi-zuke-2</i>
ATH-Glu	228	0.3	1.0	0.5	8.9	5.0	1.9	n.d.	n.d.
ATH-Val	198	n.d.	n.d.	n.d.	1.2	2.8	0.3	n.d.	n.d.
ATH-Phe	246	n.d.	n.d.	n.d.	1.4	3.1	0.4	n.d.	n.d.
ATH-Leu	212	n.d.	n.d.	n.d.	1.2	1.5	0.4	n.d.	n.d.

* The amounts of 3-allyl-5-substituted 2-thiohydantoins were expressed in nmol/ml seasoning liquid.

ATH-Glu, 3-allyl-2-thio-5-hydantoinpropionic acid ; ATH-Val, 3-allyl-5-isopropyl-2-thiohydantoin ; ATH-Phe, 3-allyl-5-benzyl-2-thiohydantoin ; ATH-Leu, 3-allyl-5-isobutyl-2-thiohydantoin ; MW, molecular weight ; n.d., not detected.

文 献

- 1) Kawakishi, S. and Namiki, M., Decomposition of allyl isothiocyanate in aqueous solution. *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 452-459 (1969).
- 2) Chen, C.-W. and Ho, C.-T., Thermal degradation of allyl isothiocyanate in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 220-223 (1998).
- 3) Takahashi, A., Matsuoka, H., Ozawa, Y. and Uda, Y., Antimutagenic properties of 3,5-disubstituted 2-thiohydantoin. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 5037-5042 (1998).
- 4) Takahashi, A., Matsuoka, H. and Uda, Y., Antimutagenicity of 3-allyl-5-substituted 2-thiohydantoin derived from allyl isothiocyanate and amino acids in *Salmonella* assay. *Environ. Mutagen Res.*, **26**, 1-8 (2004).
- 5) Takahashi, A., Matsuoka, H., Yamada, K. and Uda, Y., Characterization of antimutagenic mechanism of 3-allyl-5-substituted 2-thiohydantoin against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline. *Food Chem. Toxicol.*, **43**, 521-528 (2005).
- 6) Ohta, Y., Takatani, K. and Kawakishi, S., Decomposition rate of allyl isothiocyanate in aqueous solution. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **59**, 102-103 (1995).
- 7) 太田義雄, 川岸舜朗, アリルイソチオシアナートの分解に及ぼすアミノ酸の影響. 食科工, **45**, 744-747 (1998).

(平成 17 年 7 月 13 日受付, 平成 17 年 9 月 15 日受理)