MAILLARD 反応による N-ニトロサミンの生成の可能性について

河 端 俊 治*・赤 築 秀 憲**

Refuting the Formation of N-Nitrosamines by the Maillard Reaction

TOSHIHARU KAWABATA and HIDENORI SHYAZUKI

DEVIK (1967) has reported the formation of N-nitrosamines from the heat induced reactions between D-glucose and several L-amino acids. Studies were undertaken on the possible formation of N-nitrosamines in aqueous model systems consisting of D-glucose or pentoses, and various amino acids or carbonyl compounds. In addition, analyses for N-nitrosamines in such brown colored foods as soy-sauce, Miso, chocolate, coffee, etc. were conducted. Dichloromethane extracts of the heated reaction mixtures or of foods were analysed by thin-layer chromatography with 2 solvent systems, a gas-liquid chromatograph equipped with an alkali thermoionic detector, and a tandem gas-liquid chromatograph-mass spectrometer.

No evidence for the presence of N-nitrosamines was confirmed, while the presence of pyrazines were found in the extracts. It is concluded that DEVIK probably misidentified non-enzymatic browning products such as pyrazines or other substance as N-nitrosamines.

(Received Nov. 1, 1971)

最近、一部の食肉、魚肉製品などに含まれる N-nitrosamines (N-NA) について関心が持たれている。ことに肉、鯨肉、魚肉、魚卵などで発色剤として使用する亜硝酸は食品中の第2級アミンと反応して、nitrosamineを生成するおそれがあり、ことに dimethylnitrosamine (DMNA) には強力な発ガン性があることがわかってきたためである。N-NA がタバコ、魚肉、小麦胚芽にも含まれるという報告^{1,2,3)}もある。ところで DEVIK⁴⁾は、L-alanine と D-glucose を pH 9.6 のアルカリ性で (バレイショデンプンに吸着) 104°C で 16 時間加熱すると、全 N-NA として 80 ppm が生成することを報告した。MAILLARD 反応 (糖・アミノ反応) で nitrosamine が生成することは食品衛生上から看過できない問題である。一般に食品や肉製品の褐変は好ましいものではないが、みそ、しょう油、せんべい、ビスケット、パン、コーヒー、チョコレートなどにみられるような褐変は食品の香味に関係し、食品工業上から重要な褐変現象とされ

ている。最近、SCANLANS⁵⁾、藤巻⁶⁾は、DEVIK の実験の追試を行ない、MAILLARD 反応では N-NA は生成されないという結果を示している。われわれは、多くのアミノ酸、糖その他の還元物質について加熱し、褐変を起させたときの nitrosamine の生成の可能性を追求するとともに、褐変に関係のある食品についても検討したのでここに報告する。

実験方法

1. 実験材料および試験液の調製法

(1) 供試アミノ酸と D-glucose の反応試験液の調製
アミノ酸 (味の素 K K, 特級試薬を用いた)。

DL-alanine, L-glycine, L-serine, L-phenylalanine, L-lysine, DL-methionine, L-proline, L-glutamic acid

最初の実験として、アミノ酸は DL-alanine, 糖は D-glucose を選び、それぞれ 1 M の水溶液を作りその

* 国立予防衛生研究所食品衛生部 (東京都品川区上大崎 2 丁目 10 番 35 号)

** National Institute of Health, Department of Food Research, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.

** 林兼産業株式会社開発一部 (山口県下関市大和町 16 番)

** Research Laboratory, Hayashikane Sangyo & Co., Shimonoseki, Yamaguchi, Japan.

等量混合液の pH を 1 N-NaOH または 1 N-HCl にて一定に調整したのち、30 ml 容耐熱ガラスアンプルに注入して封管、100°C、2 時間水浴中にて反応させた。冷却後反応液を分液漏斗に移し、毎回 30 ml CH_2Cl_2 (和光純薬、特級) にて振盪抽出 3 回反復した。抽出液を合し、減圧にて約 10 ml まで濃縮し、その液に 1 N-NaOH 1 ml、NaCl 1~2 g を添加し、水蒸気蒸留し、留出液 100 ml を捕集した。留出液は CH_2Cl_2 100 ml (和光純薬、残留農薬ガスクロ用) にて 3 回抽出し、抽出液は窒素気流を通して KUDERNA-DANISH 濃縮器にて約 1 ml まで濃縮し、試験液とした。他の種類のアミノ酸については、それぞれの実験で記載したような濃度と、pH の反応液を調整した。加熱および試験液の調製法は上記と同様である。

(2) アミノ酸とアルデヒド、糖の反応液の調製

アルデヒド類: *n*-butylaldehyde, crotonaldehyde, citral, 2-ethylhexylalcohol, methylethylketone, cyclohexanone (以上すべて和光純薬 K K, 特級)。

糖類: D-ribose, L-arabinose, D-xylose (以上すべて和光純薬 K K, 特級), D-glucose (岩井化学薬品 K K, 特級), saccharose (和光純薬 K K, 特級), ascorbic acid (和光純薬 K K, 特級)。

供試したアルデヒド類はエチルアルコールに溶解し、反応後エチルアルコールを蒸発皿で温風にて完全に除去したのち、前記(1)の方法に準じ CH_2Cl_2 にて抽出して試験液とした。

(3) 市販品からの試験液の調製

食品の種類は、みそ 3 銘柄、しょう油 3 銘柄、パン 2 種類、コーヒー 2 種類、ココア 1 種類、ビスケット 1 種類について行なった。上記の食品で、液状のものは 50~100 ml を、粉末状のものは 50~100 g に水に加えて乳濁液とし、それぞれ 50~100 ml の CH_2Cl_2 にて 3 回抽出し、抽出液を合して減圧にて約 10 ml まで濃縮し、その液に 1 N-HCl を加え H_2O 10 ml で 3 回抽出し、抽出液 30 ml に 1 N-NaOH 2 ml、NaCl 2 g を加え、減圧蒸留し留出液 30~40 ml を得た。留出液は 50 ml の CH_2Cl_2 で 3 回抽出し、抽出液を約 1 ml まで濃縮し、これを試験液とした。

2. N-Nitrosamines の定性、定量方法

試験液中の N-NA の定性は薄層クロマトグラフィ (TLC)、定量はアルカリ熱イオン化検出器を付したガスクロマトグラフィ (GLC) によって行なった。また一部の試料についてはガスクロマトグラフ・質量分析計 (GLC-MS) による同定を実施した。

(1) GLC

N-NA の GLC による分別定量を行なうため、予備実験として、下記の充てん剤について検討を行なった。

Chromosorb 101

Chromosorb W-20% Carbowax 1540-KOH

Chromosorb W-20% Carbowax 1540

Chromosorb W-20% PEG 6000

Chromosorb W-20% Versamide 900

ガスクロマトグラフは、島津製作所 GC-5A 型でアルカリ熱イオン化検出器 (FTD) を付した。なお FTD は白金コイルに水ガラス-KCl を塗布したものを使用した。上記充てん剤は 100 cm×3 mmφ のガラスチューブに充てんし、キャリアガスは N_2 、カラム温度 110°C、検出器温度は 190°C で行なった。また、使用した DMNA は和光純薬製ガスクロ用標準品を用い、diethylnitrosamine (DENA), di-*n*-propylnitrosamine (D-*n*-PNA), di-*n*-butylnitrosamine (D-*n*-BNA), di-*iso*-propylnitrosamine (D-*iso*-PNA), d-*iso*-butylnitrosamine (D-*iso*-BNA), N-nitrosopiperidine, N-nitrosopyrrolidine については、それぞれの第 2 級アミン (和光純薬、特級) を用いて合成したものを使用した。また pyrazine は和光純薬の特級、その他の pyrazine の誘導体は、東京薬科大学太田明広氏より分与されたものを使用した。

(2) TLC

展開溶媒 ① *n*-hexane : diethylether : di-chloromethane (4 : 3 : 2) ② 水飽和酢酸エチル

発色剤 ニンヒドリン (2% ビリジノ-エタノール中に 0.3% ニンヒドリンを含む)

Kieselgel G を 0.25 mm の厚さに塗布したものを、100°C、1 時間活性化する。プレート 2 枚を用い、それぞれ標準 100 ppm N-NA を 10 μl 、標準 100 ppm pyrazine(s) を 10 μl 、試料抽出液 20~100 μl をスポットする。2 種類の展開溶媒にて展開して乾燥後、プレートに 30% 酢酸を噴霧して 15 分間紫外線照射を行ない、ついでニンヒドリンを噴霧したのち、5 分間、100°C にて加温する。乾燥後、プレート上の赤紫色のスポットについて N-NA を同定する。

(3) GLC-MS

ガスクロマトグラフ質量分析計は、島津製作所 LKB-900 型で、使用カラムは、Chromosorb 101 を用いた。なお、DMNA ($M/e=74$)、および後述の pyrazine ($M/e=80$) についてはマスフラグメントグラフィにより同定を行なった。

Fig. 1. Gas-liquid chromatograms of the heated reaction products of D-glucose and DL-alanine

- Authentic compounds
 — Reaction products
 1. pyrazine
 2. dimethylnitrosamine (DMNA)
 3. 2,5-dimethylpyrazine
 4. 2,3-dimethylpyrazine
 5. diethylnitrosamine (DENA)

実験結果および考察

1. GLC による N-NA の分析条件の検討

予備実験として、1 M-DL-alanine と 1 M-D-glucose を pH 9.0 で 100°C、2 時間反応し試験液を作成した。試験液の GLC を行なうため、数種類のカラムについて検討を行なった。結果は、Fig. 1 に示してある。まず Chromosorb 101 と Chromosorb W-20% Carbowax 1540-KOH のカラムによる分析結果をみると、標準 DMNA の保持時間 (Rt) と一致する位置にピークがみられた。しかしこれは後述するように、pyrazine やその誘導体と全く一致するので、N-NA の検出を目標とする本実験には適さないことがわかった。Chromosorb W-20% Carbowax 1540 と Chromosorb W-20% Versamide 900 の充てん剤では、N-NA と保持時間の一致するピークは見られなかった。この結果より、試験液中には充てん剤の種類によっては、DMNA と誤認のおそれのある反応生成物が存在するので、今回の実験では、その妨害を受けない Chromosorb W-20% Carbowax 1540、および Chromosorb W-20% Versamide 900 の 2 種の充てん剤を用い、反応液中の N-NA の生成の有無を調べることにした。[われわれの設定した、GLC の測定条件における DMNA の最小検出限界は 10^{-9} g (1 ng) であった]

2. TLC による N-NA の分析

DMNA など 6 種類の N-NA、および、DL-alanine と D-glucose の反応生成物について、n-hexane: diethylether: dichloromethane (4:3:2) を展開溶媒とする TLC のクロマトグラムは、Fig. 3 に示している。DL-alanine と D-glucose の反応生成物のスポットはどの N-NA の R_f 値とも一致しなかった。また、水飽和酢酸エチルを展開溶媒とした場合でも Fig. 4 のように N-NA と一致するものはみられなかった。(しかし、TLC においては、N-NA 検出限界が 0.2 μg なので反応生成物中に、検出限界以下の N-NA が含有されたとすれば、見落される可能性はある。)

3. GLC-MS による DL-alanine と D-glucose 反応生成物中における N-NA の確認

1. および 2. の実験では、DL-alanine と D-glucose の反応生成中の N-NA の存在は GLC および TLC によって否定することができたが、さらに試験液を、GLC-MS にかき N-NA の存在を調べた。充てん剤として Chromosorb 101 を用いたときのガスクロマトグラムは Fig. 5 の上部に示しておいた。図中に付したフ

Fig. 2. Gas-liquid chromatograms of authentic N-nitrosamines and pyrazines

Condition of GLC: Column temperature, 110°C; detector temperature, 190°C Carrier gas, N_2 Detector, alkali thermoionic detector.

Compounds corresponding to the peak number.

1. pyrazine	7. D-n-PNA
2. 2,5-dimethylpyrazine	8. D-iso-BNA
3. 2,3-dimethylpyrazine	9. D-n-BNA
4. DMNA	10. N-nitrosopiperidine
5. DENA	11. N-nitrosopyrrolidine
6. D-iso-PNA	

Fig. 3. Thin-layer chromatograms of N-nitrosamines and the reaction products with D-glucose and DL-alanine (I).

フラクション No. 1, 2, 3, 4 についての GLC-MC の分析結果と同じく Fig. 6 に示してある。フラクション

1~4 では、質量数 ($M/e=74$) つまり DMNA, および質量数 102 の DENA に相当する親ピークは全く見られなかった。フラクション 1 は未同定であるが 2, 3, 4 に共通して $M/e=80$ に親ピークが見られ、これは pyrazine と同定された。(TLC および GLC においても標準 pyrazine と完全に一致した) 次に DMNA の質量数 ($M/e=74$) および pyrazine の質量数 80 について、マスフラグ

Fig. 4. Thin-layer chromatograms of N-nitrosamines and the reaction products with D-glucose and DL-alanine (II).

Fig. 5. Thin-layer chromatograms of pyrazines and the reaction products of DL-alanine and D-glucose

1. pyrazine (authentic)
2. 2,3-dimethylpyrazine (authentic)
3. 2,5-dimethylpyrazine (authentic)
4. the reaction products of heated glucose-alanine mixture

Fig. 6. Gas-liquid chromatograph-mass spectro-metric pattern of the reaction products with D-glucose and DL-alanine

Fig. 7. Mass-fragmentgrams of the reaction products of DL-alanine and D-glucose

メントグラフィーを行なった結果 Fig. 7 に示したように DL-alanine と D-glucose の反応生成物中には DMNA の存在は否定された。(検出感度 1 ppb 以下) 反面, pyrazine の存在が確認できた。

4. N-NA 測定における pyrazine の妨害

今までに, GLC において N-NA とくに DMNA と

類似した挙動を示す化合物の存在することが報告されている。たとえば, SAXBY⁷⁾ は pyrazine やその誘導体が GLC, ボーラログラフィーで似た挙動を示し, また光分解により亜硝酸を生成する点で, N-NA と酷似する点を指摘し, その妨害を除去するためチオシアン第二銅を GLC の充てん剤の導入部に pre-column として使用する方法を提唱した。一方, DEVIK⁴⁾ の結果について追試が行なわれ, 最近, SANLAN⁵⁾ および藤巻⁶⁾ は GLC-MS により糖・アミノ反応生成物中の, N-NA の存在を否定した。糖・アミノ反応における pyrazine(s) の生成は, 中間生成物として生じた α -アミノ・カルボニル化合物の自己縮合により生ずるものといわれている。われわれも実験 1.~3. で示したように, DL-alanine と D-glucose の反応生成物として, pyrazine の存在を確認した。そして Chromosorb 101 のような充てん剤では, pyrazine(s) は, DMNA と同じ Rt を示することをみた。今回使用した 2 種の充てん剤を用いたときの 8 種類の N-NA と, pyrazine, 2,5-dimethylpyrazine, 2,3-dimethylpyrazine に対するガスクロマトグラムは Fig. 2 に示した。これからわかるように Chromosorb W-20% Carbowax 1540 の充てん剤では, 2,3-dimethylpyrazine が DMNA と同じ Rt を示すが, Chromosorb W-20% Versamide 900 の充てん剤では完全に分離できることがわかった。次に TLC について N-NA と pyrazine 誘導体は Fig. 3, 4, 5 に示したようにきわめて近い Rf を示すものであるが, 2 種の溶媒系では一応区別できる。しかし, DL-alanine と D-glucose の反応生成物の GLC-MS による分析結果では, 質量数 80 の pyrazine が検出され, 質量数 74 の DMNA の存在は完全に否定することができた。これらのことより, DEVIK が指摘した, 糖・アミノ反応の生成物中の N-NA と思われる物質は, 実験方法* に問題があって, pyrazine やその誘導体を N-NA と誤認したものと思われる。

5. MAILLARD 反応の条件と N-NA 生成の可能性の検討

今までは, 1 M-DL-alanine と 1 M-D-glucose を pH 9.0 で加熱反応した生成物について検討してきたのであるが, つぎに pH, アミノ酸の種類 MAILLARD 反応の諸条件と N-NA 生成の関係を詳細検討した。まず pH による影響について得た結果は, Table 1 に示してあるが, 一般に褐変現象はアルカリ側になるほど強く現

* DEVIK はボーラログラフィーの還元波だけで nitrosamine を同定している。

われるが、調べた範囲の基質および pH においては、N-NA の生成は全くみられなかった。pyrazine(s) の生成はアルカリが強くなるほど増加するが、これは pH の

Table 1. Identification of N-nitrosamines in the heated reaction mixtures consisting of amino acids and sugars at different pH

Mixture	pH	N-nitrosamines				pyrazine
		DMNA	DENA	DPNA	DBNA	
LD-alanine and D-glucose	5	—*	—*	—	—	—
	6	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	±
	8	—	—	—	—	+(134) ^{PPb}
	9	—	—	—	—	+(417)
LD-alanine alone	9	—	—	—	—	—
L-glycine and D-glucose	5	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	+(214)
	9	—	—	—	—	+(484)
L-glycine alone	9	—	—	—	—	—
L-glycine and xylose	2	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	+
L-glycine and ascorbic acid	2	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	—

Conc. of amino acids, 1M. and sugars, 1M. respectively.
* Not detected

Table 2. Effect of concentration of L-glycine on the possible formation of N-nitrosamines in the heated D-glucose-L-alanine reaction mixture at pH 9.0

Conc. of glycine (M)	N-nitrosamines				pyrazine
	DMNA	DENA	DPNA	DBNA	
0	—*	—	—	—	—
0.5	—	—	—	—	+(184) ^{PPb}
1.0	—	—	—	—	+(250)
1.5	—	—	—	—	+(302)
2.0	—	—	—	—	+(365)

* Not detected

高くなるほど、 α -アミノ・カルボニル化合物が多く生成されるためによるものである。また pyrazine はアミノ酸と糖の反応によって生成するが、アミノ酸とアスコルビン酸との褐変反応では、生成されなかった。

つぎに、D-glucose 濃度を 0.5 M と一定にし、L-glycine の濃度をかえたときの反応生成物をみると、Table 2 に示したように、N-NA の生成はみられなかった。

pyrazine の生成量は、glycine の濃度が高くなるほど増加した。MAILLARD 反応は糖以外のカルボニル化合

Table 3. Identification of N-nitrosamines of the heated L-glycine (0.2 M) and various carbonyl compounds mixture at pH 9.0

Carbonyl compounds	N-nitrosamines				pyrazine
	DMNA	DENA	DPNA	DBNA	
N-buthylaldehyde	—*	—	—	—	—
crotonaldehyde	—	—	—	—	—
citral	—	—	—	—	—
2-ethylhexanol	—	—	—	—	—
methyl ethyl ketone	—	—	—	—	—
cyclohexanone	—	—	—	—	— ^{PPb}
D-ribose	—	—	—	—	+(310)
L-arabinose	—	—	—	—	+(350)
D-xylose	—	—	—	—	+(228)
saccharose	—	—	—	—	±

* Not detected

Table 4. Identification of N-NA from the heated reaction mixtures (pH 9.0) of various amine acids with D-glucose

Amino acids	N-nitrosamines				pyrazine
	DMNA	DENA	DPNA	DBNA	
L-serine	—*	—	—	—	+(430) ^{PPb}
L-phenylalanine	—	—	—	—	+(674)
L-lysine	—	—	—	—	+(4290)
DL-methionine	—	—	—	—	+(314)
L-asparagine	—	—	—	—	+(543)
L-proline	—	—	—	—	—
DL-alanine	—	—	—	—	+(654)
L-glycine	—	—	—	—	+(560)
L-histidine	—	—	—	—	+(75)
L-glutamic acid	—	—	—	—	+(228)

Conc. of D-glucose, 0.5M and amino acids, 0.2M.

* Not detected

Table 5. Identification of N-nitrosamines in the extracts of various brown colored foods

Food	Maker	N-nitrosamines				prazines		
		DMNA	DENA	DPNA	DBNA	pr.	2,5-DMpr.	2,3-DMpr.
Sov-souce	K	—*	—	—	—	++	+	—
	Y	—	—	—	—	+	+	—
	H	—	—	—	—	+	+	—
Miso	S	—	—	—	—	+	+	—
	A	—	—	—	—	+	+	—
	M	—	—	—	—	+	+	—
Bread	O	—	—	—	—	+	+	—
	F	—	—	—	—	+	+	—
Coffee	B	—	—	—	—	+	+	—
	A	—	—	—	—	+	+	—
Biscuit	M	—	—	—	—	+	+	—
Cocoa		—	—	—	—	+	+	—

* Not detected

** Detected

物によっても起るが Table 3 に示したようにアルデヒド類では N-NA は生成されなかった。また pyrazine の生成もみられなかった。

pyrazine は 5 単糖では顕著に生成されたが, saccharose では, こん跡程度しか検出されなかった。これまでの実験で, 糖・アミノ反応に使用したアミノ酸は glycine または alanine を使用してきたが, つぎに糖は D-glucose (0.5 M) と一定にし, Table 4 に示したように, serine をはじめ 10 種類のアミノ酸 (各 0.2 M) を pH 9.0 において加熱反応させたときの生成物について, N-NA の生成を調べた。

この表よりわかるように, N-NA は全く検出されなかった。一方 pyrazine は, L-proline を除いて全て生成した。しかし, 生成量はアミノ酸によって違っていて, L-lysine ではきわめて多く (4290 ppb), L-histidine では微量であった。

6. 食品中の N-NA の検出

MAILLARD 反応による褐変は, しょう油, みそ, パン, コーヒーなどの食品においては, 色調, 香り, 抗酸化性の発現などの好ましい性質をその食品に付与するために重要な役割を果している。実験 1.~5. に示した試験管内の成績では MAILLARD 反応における N-NA 生成の可能性は否定されたが, さらに, ここでは実際の食品について N-NA の分析を行なった。供試した食品は, しょう油 (濃口, 3 銘柄), みそ (3 銘柄), 食パン (2 種類), コーヒー (2 種類), ビスケット (1 種類) の 5 種類の食

品で, その分析結果は Table 5 に示してあるが, いずれの食品からも N-NA は全く検出されなかった。(検出限界 1 ppb) 一方 pyrazine の誘導体については, 手持ちの標準品が少なかったので, 一部のものしか同定できなかったが, すべての食品から共通して pyrazine, 2,5-dimethylpyrazine が検出された。しかし, 他にも 2, 3 の pyrazine 誘導体と推定される物質も認められる。

要 約

(1) DEVIK により MAILLARD 反応において N-NA の生成の可能性が指摘されたので, この追試を行なうとともに, MAILLARD 反応条件と N-NA の生成の可能性についても検討し, この反応においては, N-NA の生成されないことを明らかにした。

(2) 今回の N-NA の定性および定量法は, TLC および GLC で行なったが, さらに一部の材料につき GLC-MS による確認も併用した。

(3) N-NA は pyrazine 誘導体と GLC, TLC あるいはポーログラフイーの還元波で似た挙動を示すので, DEVIK が MAILLARD 反応で N-NA を検出したというのは(ポーログラフイーの還元波のみで同定) pyrazine またはその誘導体と N-NA を誤認したものと思われる。

(4) 市販のしょう油, みそ, パン, コーヒー, について N-NA の検査を行なったが全く検出されなかった。

終りにのぞみ、ガスクロマトグラフ質量分析計による測定に協力された島津製作所中央研究所村田武、高橋誠二両氏に感謝するとともに、本研究に対して種々御協力いただいた島津製作所東京研究所松居正巳氏、および当研究室中村昌道、石橋享両氏に深謝する。また pyrazine を分与された東京薬科大学太田明広氏に謝意を表す。

文 献

- 1) MARQUARDT, P. and HEDLER L.: *Arzneimittelforsch.*, **16**, 778 (1966).
- 2) KRÖLLER E.: *Deut.-Lebensm. Rundschau.*, **63**, 303 (1967).
- 3) SEN N.P.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, **52**, 47 (1969).
- 4) DEVIK O. G.: *Acta. Chem. Scand.*, **21**, 2302 (1970).
- 5) SCANLAN, R. A. and LIBBEY, L. M.: *J. Agr. Food. Chem.*, **19**, 570 (1971).
- 6) 藤巻正生: 食衛誌, **12**, 287 (1971).
- 7) SAXBY M. J.: *Analytical Letters.*, **3**, 397 (1970).

(昭和46年11月1日受理)