蛍光誘導体化による米一粒の遊離脂肪酸含量の測定法

松倉 潮[§], 金子成延, 門間美千子*

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構作物研究所

* 独立行政法人食品総合研究所

A Method for Measuring Free Fatty Acid Content in a Rice Grain Using Fluorescent Labelling

Ushio Matsukura[§], Shigenobu Kaneko and Michiko Momma*

National Institute of Crop Science, 2-1-18, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8518

* National Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

We developed a method to measure free fatty acids in one rice grain with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin, a fluorescent labelling reagent for monocarboxylic acid. Free fatty acids extracted with acetone from a white rice grain were reacted with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin at 60°C for 2 h and then mixed with 70% methanol. The remaining 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin and the fluorescent fatty acid derivatives in the solution were separated using a solid phase extraction cartridge, Sep-Pak Plus C18, by washing with 70% methanol followed by eluting with ethanol. Fluorescent intensity in the eluate was determined with a fluorescence spectrophotometer using an excitation wavelength at 330 nm and an emission wavelength at 395 nm. We determined free fatty acid content in individual white rice grains stored for various periods at 30°C using the developed method. The averages of free fatty acid content in individual rice grains increased up to 20 weeks storage. The free fatty acid content in individual rice grains before storage was low and distributed within a narrow range, but in rice grains stored for 4 or 12 weeks it distributed within a broad range. The range of rices stored for 20 weeks did not overlap that of unstored rices. These results demonstrate that the developed fluorescent method can determine the difference in free fatty acid content of rice grains at different storage periods.

(Received Jul. 8, 2004 ; Accepted Aug. 30, 2004)

米は、貯蔵、特に常温貯蔵により品質が低下する。すなわち、飯米の硬さの増加、粘りの減少、光沢の減少、風味の劣化（古米臭の発生）など食味の低下がみられ^{1)~5)}、長期保存可能な食品である米においても鮮度は重要である。米の貯蔵中には様々な成分や特性の変化が起こることが報告⁶⁾⁷⁾されており、貯蔵中の変化との対応から、米の鮮度を知る指標として、酸化還元酵素の活性⁸⁾、pH⁹⁾¹⁰⁾、脂肪酸度¹¹⁾¹²⁾が測定されている。特に脂肪酸度、すなわち遊離脂肪酸含量は古米化特に古米臭の発生と深く関わっているため⁷⁾、鮮度の指標としての意味が大きいと考えられる。脂肪酸度の測定方法には滴定法¹¹⁾¹²⁾と比色法³⁾があるが、試料量として滴定法は米粉 10 g、比色法は米粉 1 g を基本としている。流通段階で新鮮な米と古米が混合されている場合への対応を考慮すると、米粒一粒ずつの脂肪酸度（遊離脂肪酸含量）を測定することが必要であるが、従来の脂

肪酸度測定法は米一粒（約 20 mg）という微量試料に対しては感度の面から困難である。高感度な遊離脂肪酸測定法として、脂肪酸を蛍光誘導体化する方法が報告されている¹³⁾。本試験では、この蛍光誘導体化による米一粒を試料とした遊離脂肪酸の測定方法の確立、および貯蔵中の遊離脂肪酸含量変化の測定への適用について検討した。

実 験 方 法

1. 遊離脂肪酸の蛍光誘導体化及び定量法

(1) 脂肪酸蛍光誘導体化試薬¹³⁾

脂肪酸の蛍光誘導体化には、モノカルボン酸とエステル結合を形成して蛍光誘導体化する試薬である 4-ブロモメチル-7-メトキシマリニン（Br-Mmc と略す）（関東化学）を用いた。Br-Mmc はモレキュラーシーブを用いて脱水したアセトンに 0.11%（w/v）濃度で溶解し、遮光保存した。

(2) 米一粒の遊離脂肪酸の蛍光誘導体化（図 1）

白米一粒をマイクロチューブに採り、脱水アセトンで 800 µl 加え、10 分間振とうした。抽出液 700 µl をキャップ

〒305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-18

* 〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12

§ 連絡先（Corresponding author）, mushio@affrc.go.jp

米一粒
 — 脱水アセトン 800 μ l 添加
 — 振とう抽出 10 分間
 抽出液 700 μ l 採取
 — 0.11% Br-Mmc 試薬 (アセトン溶液)
 300 μ l 添加
 — 炭酸カリウム (無水) 約 25 mg 添加
 — 密栓, 遮光, 60°C, 2 時間反応
 600 μ l 採取
 — 70% メタノール 600 μ l 添加
 — 1000 μ l をセップバック C18 に負荷
 — 70% メタノール 3 ml ずつで洗浄 3 回
 — エタノール 5 ml で溶出
 蛍光強度測定 励起波長 330 nm
 蛍光波長 395 nm

図 1 米一粒遊離脂肪酸の蛍光誘導体化測定法
 Br-Mmc, 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin.

付き試験管に採取し, 0.11% Br-Mmc アセトン溶液 300 μ l および炭酸カリウム (無水) 約 25 mg を加えた。密栓し, 遮光条件下, 60°C で 2 時間反応させた。

反応液 600 μ l に 70% メタノールを 600 μ l 混合し, このうちの 1000 μ l をあらかじめ水を通してコンディショニングしたセップバックプラス C18 (ウォーターズ) に負荷した。70% メタノール 3 ml ずつで 3 回未反応試薬を洗浄除去した後, エタノール 5 ml を用いて溶出させた。

(3) 脂肪酸蛍光誘導体の定量

溶出液中の脂肪酸蛍光誘導体量を蛍光光度計を用いて測定した。励起波長は 330 nm, 蛍光波長は 395 nm を用いた。同様の操作で蛍光誘導体化したパルミチン酸相当量に換算し, 米一粒当たりで表示した。

2. 試料米の貯蔵方法

低温 (10°C 前後) に貯蔵しておいた北海道産「きらら 397」の玄米を, 縦型試験用精米器 (山本製作所製 VP-31T 型) を用いて, 歩留まり約 91% に搗精した。得られた白米をチャック付きポリエチレン袋 (厚さ 0.04 mm) に入れ, 30°C の恒温器中で 36 週間まで貯蔵し, 各貯蔵期間後に取り出し, 測定に供した。

実 験 結 果

1. 脂肪酸蛍光誘導体の測定法の検討

Br-Mmc は短鎖から長鎖までの様々なモノカルボン酸と反応し, 生成したエステルは長期間安定であり, 感度は十分に高く, 脂肪酸量と蛍光強度が直線関係を有することが確認されている¹³⁾。そこで, 本研究では, この脂肪酸蛍光誘導体の測定法の米一粒の遊離脂肪酸測定への適応について検討した。

本方法では, 簡便・多点測定の観点から蛍光光度計を用いて測定することを目指したため, 誘導体化反応を行った後に未反応の蛍光標識化試薬と脂肪酸蛍光誘導体を分離しておく必要がある。そこで, セップバック C18 を用いて分

図 2 セップバック C18 の洗浄液および溶出液のクロマトグラム
 A, 70% メタノールによる洗浄液; B, エタノールによる溶出液; C, イソプロパノールによる溶出液。

離することとし, その吸着・溶出条件について検討した。常温で 2 年間貯蔵しておいた白米を試料とし, アセトンを用いて抽出して Br-Mmc 蛍光誘導体化反応を行った。

蛍光誘導体化反応後の溶液 (アセトン溶液) そのままでは, 水を用いてコンディショニングしたセップバック C18 に吸着されなかった。しかし, 蛍光誘導体化反応後の溶液に 70% メタノール溶液を等量混合することによりセップバック C18 に吸着された。

吸着後, 70% メタノールで洗浄し, 続いてエタノールで溶出させ, さらにイソプロパノールで溶出させた。これら洗浄液と溶出液について, C8 カラムを用いて, 90% アセトニトリル/水系の高速液体クロマトグラフィーを行った。70% メタノール洗浄液中 (図 2A) には保持時間 4 分前後に未反応の蛍光標識化試薬のみが検出された。また, 続くエタノール溶出液中 (図 2B) には未反応の標識化試薬の溶出位置には蛍光は検出されず, 保持時間 12 分から 15 分付近に蛍光標識化された脂肪酸のピークのみがみられた。エタノール溶出後にイソプロパノールを用いてさらに溶出させた溶出液中には何も検出されず (図 2C), 蛍光物質はエタノールによる溶出操作によりすべて溶出していることを確認した。以上の結果は, 高速液体クロマトグラフィーで分離することなしに, 蛍光光度計を用いてエタノール溶出液中の蛍光強度を測定することにより脂肪酸が定量できることを示している。よって, 多点試料を短時間で分析するため, 図 1 のような測定スキームを組み立てた。

また, エタノール溶出後のセップバック C18 に蛍光物質が残存していないことはセップバック C18 カートリッジが再使用可能であることを示していた。実際に白米の分析に, エタノールで溶出させた後にアセトン洗浄したセップバック C18 を再使用した場合, 未使用の物と測定値に差が無いことを確認した (データ省略)。

2. 白米の貯蔵中の遊離脂肪酸含量の変化

(1) 平均値の変化

図 3 白米貯蔵中の遊離脂肪酸含量の変化
貯蔵温度, 30°C ; 1 粒ずつ測定した 8 粒の平均値。

30°C で保存した白米について, 各保存期間ごとに 1 粒ずつ 8 粒測定した平均値の変化を図 3 に示した。遊離脂肪酸含量は, 精米直後と比べて貯蔵 1 週間後に約 2 倍に増加した。その後 7 週間後から 20 週間後の間に大きく増加し, それ以降はほぼ一定となった。

(2) 一粒ごとの遊離脂肪酸含量の分布の変化

貯蔵 0, 4, 12, 20 週間後にそれぞれ 25 粒について測定し, その遊離脂肪酸含量の分布状況を図 4 に示した。貯蔵 0 週 (搗精直後) は遊離脂肪酸含量が非常に低いところに集中した。貯蔵 4 週間後には, 含量がやや高いところに分布の中心が移った。12 週間後には分布の中心がより高いところに位置するとともに, 含量が低いものから高いものまで幅広く分布した。20 週間後では, 分布の中心がさらに若干高くなり, 含量のごく低い粒がみられなくなった。この結果, 0 週と 20 週後では分布域が重ならなくなった。

3. 玄米貯蔵後に搗精した白米の遊離脂肪酸含量

白米と同様に 30°C で玄米を貯蔵し, 0 から 12 週までの毎週および 16, 20, 29, 36 週間後に取り出し, 搗精して白米にした試料 (8 粒ずつ) の遊離脂肪酸含量を測定した。いずれの貯蔵期間においても白米の遊離脂肪酸含量は同程度 (0.60~0.99 μg/粒) であり (図省略), 玄米での貯蔵後に白米にした場合には貯蔵期間の違いを識別できなかった。

考 察

米の貯蔵中に遊離脂肪酸の増加・脂肪酸度の上昇が起こることは数多く報告されている^{3)~6)14)~17)}。米の脂質の主要成分であるトリグリセリドはスフェロゾーム中に存在している。貯蔵中にスフェロゾームの崩壊が起こるため, 脂質がリパーゼと接触するようになり, 分解を受け, 遊離脂肪酸が生成する¹⁸⁾。生成した遊離脂肪酸は澱粉と複合体を形成し, 澱粉の糊化膨潤を抑制して米飯の歯ごたえに影響を及ぼすという古米化スキームが出されている⁷⁾。ただし, 澱粉への影響については疑問であるという報告もある¹⁹⁾。また, 遊離不飽和脂肪酸は, リポキシゲナーゼの作用や自

図 4 貯蔵白米一粒の遊離脂肪酸含量の分布

動酸化により酸化され, その後分解してカルボニル化合物が生成し, 古米臭が形成されると考えられている⁷⁾¹⁵⁾¹⁷⁾²⁰⁾²¹⁾。このように, 遊離脂肪酸含量 (脂肪酸度) は, 貯蔵による米の品質劣化に関係の深い指標であるとみなされる。本報告で述べた方法は, その指標を米一粒という微量の試料で測定できる手法であり, モデル系ではあるが貯蔵期間の異なる白米の違いを検出できることを確認した。用いる試料は米粒のままであるため, 抽出されている遊離脂肪酸は米粒表面部分に存在していたもののみであると推定されるが, 違いを区別できる感度を有している。また, 粉碎の必要がないことも利点の一つである。

著者らは, 米一粒の鮮度測定法として, 以前にカタラーゼ活性に基づく方法を報告した²²⁾。本試験と同じ 30°C の貯蔵 (試料は玄米) において, カタラーゼ活性は 10 週間くらいまではほぼ直線的に低下した。これに対し遊離脂肪酸含量は 20 週間くらいまで増加した。すなわち, 遊離脂肪酸含量はゆっくりとした品質変化の指標という意味を持っていると考えられる。

図 4 にみられるように, 貯蔵前の白米 (搗精直後) は遊離脂肪酸含量が低いレベルに集中しているため, 一粒ずつ測定することにより貯蔵米が混入されていないことの確認することは可能と考えられる。貯蔵により各米粒ごとの遊離脂肪酸含量は様々なレベルに分布するようになるため, ある程度貯蔵された米同士の混入割合の推定は十分にはできないと思われる。しかし, 30°C 下 20 週間貯蔵米のよう

に著しく劣化した米と未貯蔵米の遊離脂肪酸含量の分布域は重ならないため、混米を識別する手がかりにはなるのではないかとと思われる。

玄米貯蔵後に搗精して白米になったものについては貯蔵期間の差異を検出することはできなかった。また、無傷の玄米を試料にした場合は遊離脂肪酸が抽出されてこないため、本方法で遊離脂肪酸含量を測定することはできなかった(予備試験データ)。著者らは、玄米一粒をシリカゲルとともに激しく振動させ、皮部を粉碎する方法を報告している²³⁾。このような方法と本蛍光誘導体化を組み合わせることにより、玄米の遊離脂肪酸度を高感度で測定することができるのではないかと考えている。

要 約

(1) 白米一粒のアセトン抽出液に、脂肪酸の蛍光誘導体化試薬 4-ブロモメチル-7-メトキシクマリンを反応させ、遊離脂肪酸を蛍光誘導体化した。セップパック C18 を用いて、未反応の試薬と遊離脂肪酸蛍光誘導体を分離し、蛍光光度計を用いて蛍光を測定することにより、白米一粒の遊離脂肪酸含量を測定する方法を開発した。

(2) 本測定法で、白米の 30℃ 貯蔵中の遊離脂肪酸含量変化を測定できることを明らかにした。貯蔵開始時の各米粒の遊離脂肪酸含量は低い階級に集中していた。貯蔵により粒ごとの遊離脂肪酸含量の変異が大きくなり、貯蔵期間が長くなるにつれて遊離脂肪酸含量の分布範囲は高い階級へシフトした。

遊離脂肪酸の測定にご協力いただきました児玉あけみ氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 竹生新治郎, 4. 米飯の食味, 「米の科学」, 竹生新治郎監修, (朝倉書店), pp. 117-137 (1995).
- 2) 柳瀬 肇, 菊地三千雄, 吉川誠次, 関谷ミツエ, 谷達 雄, ポリエチレンによる小袋包装精米の貯蔵性, 食糧研究所研究報告, **24**, 9-14 (1969).
- 3) 大坪研一, 柳瀬 肇, 石間紀男, 比色法による米の脂肪酸度の測定, 食総研報, **51**, 59-65 (1987).
- 4) Matsue, Y., Mizuta, K. and Yoshida, T., Varietal difference in palatability of stored rice. *Jpn. J. Crop Sci.*, **60**,

- 537-542 (1991).
- 5) 豊島英親, 木村俊範, 吉崎 繁, 藤井幸代, 岡留博司, 塚根保夫, 盛田正樹, 田嶋義三, 大坪研一, 良質米の貯蔵中の品質変化, 食科工, **45**, 683-691 (1998).
- 6) 谷 達雄, 竹生新治郎, 岩崎哲也, 低温貯蔵法における米の化学的品質の変化(その 1), 栄養と食糧, **16**, 436-441 (1964).
- 7) 大坪研一, 3.3 貯蔵・流通条件と品質, 「米の科学」, 竹生新治郎監修, (朝倉書店), pp. 103-116 (1995).
- 8) 食糧庁, 穀類の新鮮度, 「標準計測方法」, 58-61 (1989).
- 9) 食糧庁, 酸性度, 「標準計測方法」, 75-79 (1989).
- 10) 堤一二三, 千葉正丈, 酸性度指示薬による精米の新鮮度判定について, 農産物検査とくほん, **122**, 77-79 (1997).
- 11) 食糧庁, 酸度, 「標準計測方法」, 86-91 (1989).
- 12) 堤一二三, 米の脂肪酸度の測定方法と留意事項, 農産物検査とくほん, **125**, 23-27 (1997).
- 13) Dünge, W., 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin as a new fluorescence label for fatty acids. *Anal. Chem.*, **49**, 442-445 (1977).
- 14) Yasumatsu, K. and Moritaka, S., Fatty acid compositions of rice lipid and their changes during storage. *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 257-264 (1964).
- 15) 渋谷直人, 岩崎哲也, 柳瀬 肇, 竹生新治郎, 古米化に関する研究(第 1 報) 玄米および白米の貯蔵中の変化について, 日食工誌, **21**, 597-603 (1974).
- 16) Sharp, R.N. and Timme, L.K., Effects of storage time, storage temperature, and packaging method on shelf life of brown rice. *Cereal Chem.*, **63**, 247-251 (1986).
- 17) Suzuki, Y., Ise, K., Li, C., Honda, I., Iwai, Y. and Matsukura, U., Volatile components in stored rice [*Oryza sativa* (L.)] of varieties with and without lipoxygenase-3 in seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1119-1124 (1999).
- 18) 高野克己, 米糠脂質の分解機構に関する研究, 日食工誌, **36**, 519-524 (1989).
- 19) 渋谷直人, 岩崎哲也, 竹生新治郎, 古米化に伴う米飯, 糊の物性変化における遊離脂肪酸の役割について, 澱粉科学, **24**, 67-68 (1977).
- 20) Yasumatsu, K., Moritaka, S. and Wada, S., Studies on cereals Part V. Stale flavor of stored rice. *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 483-486 (1966).
- 21) 鈴木保宏, コメの貯蔵性を改良する試み, 農業技術, **56**, 444-448 (2001).
- 22) 松倉 潮, 金子成延, 門間美千子, カタラーゼ呈色による米一粒の鮮度測定法, 食科工, **47**, 523-528 (2000).
- 23) 松倉 潮, 金子成延, 門間美千子, 米一粒の脂肪酸度測定法, 日本食品科学工学会第 47 回大会講演集, p. 83, 東京 (2000).

(平成 16 年 7 月 8 日受付, 平成 16 年 8 月 30 日受理)