報 文

HPLC-UVによる穀類中の遊離アスパラギン分析法の開発

(平成29年5月25日受理)

横 関 俊 昭^{1,*} 西 川 佳 子¹ 小 木 曾 基 樹¹ 藤 田 和 弘¹

Development of an HPLC-UV Method for Free Asparagine in Grains

Toshiaki YOKOZEKI^{1,*}, Keiko NISHIKAWA¹, Motoki OGISO¹ and Kazuhiro FUJITA¹¹ Japan Food Research Laboratories:

7-4-41 Saitoasagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan;

*Corresponding author

A novel analytical method was developed for the determination of free asparagine (Asn), which is a precursor of acrylamide, in grains. Asn was extracted from a sample with 5% (w/v) aqueous trichloroacetic acid solution, and the crude extract was cleaned up using a reversed-phase solid-phase cartridge. The cleaned extract was derivatized with dansyl chloride and analyzed by HPLC-UV. HPLC separation was performed by gradient elution on a ODS column using 0.01 mol/L ammonium acetate and acetonitrile mixture as the mobile phase. The calibration curve was linear in the range of 0.5–100 µg/mL. The mean recoveries from potato starch, non-glutinous rice flour and whole wheat flour ranged from 97.7 to 102.6%, the repeatability (RSDs) ranged from 0.8 to 2.0%, and the within-laboratory reproducibility (RSDwr) ranged from 1.4 to 6.2%. Limits of quantitation (LOQs) were 13 mg/kg for potato starch and 4 mg/kg for non-glutinous rice flour. The quantitative values obtained for about 15 kinds of grains using this developed method were approximately equal to those obtained with an automatic amino acid analyzer.

(Received May 25, 2017)

Key words: アクリルアミド acrylamide; アスパラギン asparagine; 還元糖 reducing sugar; アミノカルボニル反応; amino-carbonyl reaction; 穀類 grain; ダンシル誘導体化 dansyl derivatization; 紫外吸収-高速液体クロマトグラフ法 HPLC-UV

緒 言

アミノ酸の一種であるアスパラギン (Asn) は、穀類等の食品が主に低水分下において120℃以上で加熱されることで、グルコースやフルクトースのような還元糖と反応しアクリルアミド (AA) を生成することが知られている^{1)~3)}. AAは、神経毒性および動物実験での遺伝毒性、発がん性が報告されていることから、食品を通じて長期間AAを摂取し続けることでヒトの健康に悪影響を及ぼすことが懸念される⁴⁾. また、穀類原料の遊離Asn濃度と、穀類製品のAA濃度には正の相関が認められている^{5),6)}. したがって、AAの前駆体であるAsn濃度の低い穀類原料の使用の可能性を検討することは、食品中のAAを低減するために重要であると考えられる。

食品中の遊離アミノ酸を分析する装置としては、イオン交換クロマトグラフィーとニンヒドリン反応を組合せたボ

ストカラム誘導体化法によるアミノ酸自動分析計⁷⁾がある。本装置は発表されて以来、周辺機器およびデータ処理の自動化が進み、現在でも広く用いられているが、アミノ酸の測定に特化したものであり、一般的なHPLCと比較すると高価であり、汎用性に劣ると考えられる。一方で、プレカラム誘導体化後にGCで測定する方法⁸⁾やHPLCで測定する方法が報告されている。HPLCでは、多くの誘導体化法が報告されており、代表的なものとしてダンシル誘導体化法^{9),10)}、イソチオシアン酸フェニル誘導体化法¹¹⁾が挙げられ、いずれも誘導体化により紫外吸収もしくは蛍光を持たせる特徴を有している。

しかしながら、穀類中の遊離Asnの分析法として、妥当性が確認された方法は現在のところ報告されていない。また、Asn濃度の低い原料の使用を検討するには、さまざまな食品関連事業者が、製造現場でのモニタリングに使用可能な、汎用的な分析装置で測定できることが望ましい。

そこで著者らは、試料から5% (w/v) トリクロロ酢酸溶液で遊離Asnを抽出し、ポリマー系逆相カートリッジで精製した後、ダンシル誘導体化を行い、汎用的な分析

* 連絡先 yokozekit@jfrl.or.jp

¹ 一般財団法人 日本食品分析センター 〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-4-41

機器であるHPLC-UVを用いて定量する方法を開発した。さらに、単一試験室での妥当性確認を実施したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

試料は大阪府内で市販されていた片栗粉、はったい粉、そば粉、うるち米粉、うるち玄米粉、小麦全粒粉、小麦薄力粉、小麦中力粉、小麦強力粉、ライ麦全粒粉、大豆粉、コーンフラワー、オートミール、大麦およびもち性大麦を使用した。

2. 試薬等

Asn標準品：和光純薬工業製のL-アスパラギン一水和物（試薬特級，純度99.0%以上）を用いた。

標準溶液：Asn標準品1.1363 gを精密に量り，100 mL容全量フラスコに入れ，0.1 mol/L塩酸を加えて溶解（超音波照射）して定容し，標準原液（10 mg/mL）とした。標準原液を0.1 mol/L塩酸で希釈して0.5～100 µg/mLの検量線用標準溶液を調製した。

Oasis HLBカートリッジ（Waters社製，150 mg/6 cc）：カートリッジはあらかじめメタノール10 mL，水10 mL，5%（w/v）トリクロロ酢酸溶液10 mLでコンディショニングした後，使用した。

試薬：ダンシルクロリドは東京化成工業製（純度98.0%以上）を，アセトニトリルはHPLC用を，その他の試薬は試薬特級品を，水はMillipore社製Milli-Q超純水製造装置で精製した水を使用した。

試液は以下のように調製した。

0.1 mol/L塩酸：塩酸9 mLに水を加えて1,000 mLとした。

5%（w/v）トリクロロ酢酸溶液：トリクロロ酢酸150 gを水に溶解して3,000 mLとした。

1%（w/v）ダンシルクロリド-アセトン溶液：ダンシルクロリド10 gにアセトンを加え，超音波照射して溶解した後，1,000 mLに定容して定性ろ紙（東洋濾紙製，No. 1）

でろ過した。

0.75 mol/L炭酸ナトリウム溶液：炭酸ナトリウム7.95 gを水に溶解して100 mLとした。

0.01 mol/L酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム2.31 gを水に溶解して3,000 mLとした。

3. 装置および測定条件

島津製作所社製Prominenceシリーズを用い，Table 1に示した条件で測定した。

4. 定量

試験溶液およびダンシル誘導体化を行った検量線用標準溶液10 µLをHPLCに注入し，得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法により定量した。

5. 試験溶液の調製

試料10.0 gを採取し，5%（w/v）トリクロロ酢酸溶液100 mLを加えて振とう（20分間）した後，遠心分離（1,000×*g*，5分間）し，上澄み液をガラス繊維ろ紙（東洋濾紙製，GA-55）にてろ過した。得られたろ液5 mLを，Oasis HLBカートリッジ（150 mg/6 cc）に負荷し，負荷時より溶出液を10 mL容全量フラスコに回収した。ろ液通過後，さらに5%（w/v）トリクロロ酢酸溶液4 mLを加えて同様に全量フラスコに回収し，5%（w/v）トリクロロ酢酸溶液で定容した。溶出液1 mLを褐色ネジ口試験管に量り取り，0.75 mol/L炭酸ナトリウム溶液0.5 mL，1%（w/v）ダンシルクロリド-アセトン溶液1 mLを加え，ボルテックスミキサーでよく混和し，45℃で30分間誘導体化を行った。反応後，*n*-ヘキサン2 mLを加えてボルテックスミキサーでよく混和し，遠心分離（1,000×*g*，3分間）した。下層（水層）を分取し，メンブランフィルター（親水性PTFE，0.45 µm）でろ過し，試験溶液とした。

6. 分析法の妥当性確認

片栗粉，うるち米粉および小麦全粒粉を用いて，同日2併行，5日間の繰り返しで添加回収実験を実施し，真度（回収率），精度（併行精度，室内再現精度），測定の不確かさ，定量下限および検出限界を評価した。試料中の標準物質の添加濃度は，片栗粉およびうるち米粉については

Table 1. HPLC-UV operating conditions

Pump	LC-20AD (Shimadzu Corporation)						
Detector	SPD-20A (Shimadzu Corporation)						
Column	Hydrosphere C18 (3 µm, 150×4.6 mm i.d., YMC Co., Ltd) Unison UK-C18 (3 µm, 150×4.6 mm i.d., Imtakt Corporation) InertSustain AQ-C18 (3 µm, 150×4.6 mm i.d., GL Sciences Inc.)						
Flow rate	1.0 mL/min						
Oven temp.	40℃						
Autosampler cooler temp.	4℃						
Injection volume	10 µL						
Measurement wavelength	254 nm						
Mobile phase	A; 0.01 mol/L ammonium acetate B; acetonitrile						
	Min	0	24	25	35	36	60
	%B	5	35	90	90	5	5

20, 500 および 1,000 mg/kg 相当量, 小麦全粒粉については 500 および 1,000 mg/kg 相当量で行った. なお, うるち米粉および小麦全粒粉は, Asn が含有されているため無添加区との差引で評価した.

さらに, 本試験法が種々の穀類に対して選択的に測定可能であるかを確認するために, 添加回収実験で用いた片栗粉, うるち米粉および小麦全粒粉に加えて, はったい粉, そば粉, うるち玄米粉, 小麦薄力粉, 小麦中力粉, 小麦強力粉, ライ麦全粒粉, 大豆粉, コーンフラワー, オートミール, 大麦およびもち性大麦の計 15 種類の穀類について, アミノ酸自動分析計 (日立ハイテクノロジーズ社製: L-8900) による定量値と比較を行った.

結果および考察

1. 誘導体化法の検討

本法を開発するに当たり, 汎用的な分析機器である HPLC-UV を用いて測定が可能で, かつ操作性が良いことを目的としたため, 遊離 Asn の UV 検出を可能とするプレカラム誘導体化法として, イソチオシアン酸フェニル誘導体化法, フルオレサミン誘導体化法およびダンシル誘導体化法の 3 法について Asn 標準溶液を用いて検討した.

イソチオシアン酸フェニル誘導体化法は, 試験溶液の調製までに複数回の濃縮乾固の操作を要するため, 自動化装置を用いない場合は操作が煩雑であると考えられた.

フルオレサミン誘導体化法は, 誘導体化後の試験溶液を直接 HPLC に注入できる点で操作性は良いが, 種々の移動相条件, ODS カラムを用いて検討した結果, Asn に近接するグルタミン (Gln) との分離が困難であった.

一方, ダンシル誘導体化法は, ODS カラムとして Hydro-sphere C18 (3 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm i.d., YMC Co., Ltd.) を, 移動相として A 液に 0.01 mol/L 酢酸アンモニウム溶液, B 液にアセトニトリルを用いたグラジエント溶出により, Asn と Gln の分離が確認できたため, 本誘導体化法を採用することにした. また, 他の ODS カラムの適用性について確認したところ, 同サイズの Unison UK-C18 (Imtakt Corporation) および InertSustain AQ-C18 (GL Sciences

Inc.) が同等の分離を示した.

2. 誘導体化条件の検討

ダンシル誘導体化反応には, 誘導体化に最適な pH, 反応温度および反応時間がある. そこで, 誘導体化された Asn のピーク面積が最大になるように, これらの条件について 50 μ g/mL の Asn 標準溶液を用いて条件検討を行った. なお, 誘導体化する際の Asn 標準溶液 1 mL, 炭酸ナトリウム溶液 0.5 mL, 1% (w/v) ダンシルクロリド-アセトン溶液 1 mL の各液量については, 衛生試験法・注解 2015 の不揮発性腐敗アミンの定量法¹²⁾を参考にした.

2.1 炭酸ナトリウム濃度

0.5~1.0 mol/L の炭酸ナトリウム溶液を用いて, 標準溶液について誘導体化反応を行った結果, Fig. 1 に示したように, 0.75 mol/L のとき Asn のピーク面積値が最大となった. したがって, 誘導体化には 0.75 mol/L の炭酸ナトリウム溶液を用いることにした. なお, 誘導体化反応は 45 $^{\circ}$ C で 30 分間行い, 2 試行の平均値により評価した.

2.2 反応温度および時間

反応温度に関しては, 衛生試験法・注解 2015 の不揮発性腐敗アミンの定量法の誘導体化条件である 45 $^{\circ}$ C と, 反応をより促進させる目的で 80 $^{\circ}$ C の条件で, それぞれ 5 分間反応させ Asn のピーク面積値を比較した. その結果, 45 $^{\circ}$ C での反応においてよりピーク面積値が大きかったことから, 反応温度は 45 $^{\circ}$ C とした. 次に, 反応温度を 45 $^{\circ}$ C に固定して 5~60 分間反応させて反応時間を検討したところ, Fig. 2 に示したように, 反応 10 分まではやや反応不十分な傾向が認められたが, 反応 30~60 分ではほぼプラトーであったことから, 反応時間は 30 分とした. なお, 誘導体化反応は 0.75 mol/L 炭酸ナトリウム溶液を用いて行い, 2 試行の平均値により評価した.

3. 前処理法の検討

種々の穀類に適用させることを考慮し, 固相カラムによる前処理法の検討を行った. まず初めに, 標準溶液を用いてポリマー系強陽イオン交換カラムである Oasis MCX とシリカ系強陽イオン交換カラムである Bond Elut SCX を用いて検討した. その結果, Oasis MCX では Asn は保持

Fig. 1. Dependence of the peak area of Asn on concentration of sodium carbonate

Fig. 2. Dependence of the peak area of Asn on reaction time

Table 2. Results of recovery tests of potato starch

Fortified (mg/kg)	Recovery ^a (%)	RSDr ^b (%)	RSDrw ^c (%)	Standard uncertainty	Expanded uncertainty	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
20	102.6	1.4	6.2	1.27	2.54	5	13
500	99.7	2.0	2.3	11.3	22.6	—	—
1,000	98.2	0.8	1.4	14.0	28.1	—	—

^a Mean of 10 replicates^b Relative standard deviation (repeatability)^c Relative standard deviation (within-laboratory reproducibility)

Table 3. Results of recovery tests of non-glutinous rice flour

Fortified (mg/kg)	Recovery ^a (%)	RSDr ^b (%)	RSDrw ^c (%)	Standard uncertainty	Expanded uncertainty	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
20	98.6	1.7	1.7	0.33	0.65	2	4
500	99.3	1.1	1.5	7.35	14.7	—	—
1,000	98.1	1.7	1.7	17.0	33.9	—	—

^a Mean of 10 replicates^b Relative standard deviation (repeatability)^c Relative standard deviation (within-laboratory reproducibility)

Table 4. Results of recovery tests of whole wheat flour

Fortified (mg/kg)	Recovery ^a (%)	RSDr ^b (%)	RSDrw ^c (%)	Standard uncertainty	Expanded uncertainty
500	97.7	1.1	3.2	15.8	31.7
1,000	98.5	1.0	1.5	14.4	28.8

^a Mean of 10 replicates^b Relative standard deviation (repeatability)^c Relative standard deviation (within-laboratory reproducibility)

されなかったが、Bond Elut SCXでは、Asnは酸性条件下で保持され、アンモニア水により溶出することが確認できた。そこで、はったい粉、小麦全粒粉およびライ麦全粒粉を用いて検討を行ったところ、アンモニア水での溶出時に穀類由来の色素成分が同時に溶出し、除去することができなかった。また、溶出液のアンモニア水をそのまま誘導体化反応に用いると、抽出液の5% (w/v) トリクロロ酢酸溶液を誘導体化する場合と比較して、Asnの誘導体化効率

が低いことが判明した。以上の結果から、強陽イオン交換カラムによる精製は有効ではないと判断した。

次に、逆相系カラムによりAsn以外の夾雑物質を保持させて除去する精製法を検討した。固相カラムには、抽出液が低pHであるため、使用可能なpH範囲の広いOasis HLB (150 mg/6 cc)を選択した。メタノール10 mL、水10 mL、5% (w/v) トリクロロ酢酸溶液10 mLでコンディショニングした後、穀類の抽出液5 mLを負荷すると、い

ずれの穀類においても色素成分が吸着除去できることが明らかとなった。また、クロマトグラム上においても未精製の抽出液と比較して、全体的にピーク数が減少していることが確認された。なお、Oasis HLBの充填量が30 mgの製品についても検討したが、このサイズでは色素成分の吸着除去が不十分であった。続いて、通液後にカラム内に残存したAsnを溶出させるために必要な5% (w/v) トリクロロ酢酸溶液の量を確認した。コンディショニングしたカラムに、50 µg/mLのAsn標準溶液5 mLを負荷し、次いで2 mLずつ5% (w/v) トリクロロ酢酸溶液を供した結果、最初の2 mLではほぼすべてのAsnが溶出され、次の画分ではピークの痕跡が認められる程度であった。したがって、余裕をもって、4 mLの5% (w/v) トリクロロ酢酸溶液を供した後、10 mLに定容することにした。

4. 反応液の精製

ダンシル誘導体化法を用いたアミノ酸分析において、Benedito de Barberら⁹⁾は、誘導体化後に一度反応液を乾固させ、移動相に再溶解して試験溶液としているため、煩雑であった。そこで、反応後の検液に*n*-ヘキサンを加えて混和後、遠心分離を行って*n*-ヘキサン層をHPLCに注

入したところ、Asnのピークは確認されず、誘導体化されたAsnはすべて下層に分配されることが明らかになった。よって、本法では、*n*-ヘキサンと分配し、未反応のダンシルクロリドを除去するとともに下層（水層）を直接試験溶液とすることにより、試験操作全体から一切の濃縮乾固の操作を排除することが可能となった。

5. 分析法の妥当性確認

片栗粉、うるち米粉および小麦全粒粉についての添加回収実験の結果をそれぞれTable 2～4に、室内再現精度をHORRATr値で評価した結果をTable 5に示した。平均回収率は97.7～102.6%であり、いずれもコーデックス委員会の手続きマニュアル（手続きマニュアル）¹³⁾の範囲内であった。また、HORRATr値は0.3～1.2であり、いずれも手続きマニュアルの2以下の規定内であった。なお、手続きマニュアルのHORRATr値は室内再現精度の指標とし

Table 6. Quantitative values obtained with the developed method and with an automatic amino acid analyzer

Sample	Amino acid analyzer	Developed method
	Results (mg/kg)	Results (mg/kg)
Potato starch	<10	<13
Parched flour	12	12
Buckwheat flour	94	111
Non-glutinous rice flour	14	15
Non-glutinous brown rice flour	31	31
Whole wheat flour	321	313
Weak flour	92	90
Medium-strength flour	32	32
Strong flour	85	82
Whole rye flour	665	664
Soy flour	185	193
Corn flour	75	74
Oatmeal	475	459
Rolled barley	61	64
Sticky barley	249	237

Table 5. HORRATr value

Sample	Fortified (mg/kg)	HORRATr value*
Potato starch	20	1.2
	500	0.7
	1,000	0.5
Non-glutinous rice flour	20	0.3
	500	0.5
	1,000	0.6
Whole wheat flour	500	1.0
	1,000	0.5

*: Measured value (RSDrw)/Calculated value (PRSDrw)
Calculated value (PRSDrw) was calculated as $C^{-0.1505}$

Fig. 3. Typical HPLC chromatogram of whole wheat flour using Unison UK-C18 (3 µm, 150×4.6 mm i.d., Imtakt Corporation)

て記載されているため、計算値 (PRSDrw) は2で除した数値を用いた。本法による定量下限は、片栗粉で13 mg/kg、うるち米粉で4 mg/kgであった。

さらに、本試験法が種々の穀類に対して選択的に測定可能であるかを確認するために、計15種類の穀類について、アミノ酸自動分析計による定量値と比較を行った結果をTable 6に示した。これらの結果について回帰分析を行ったところ、切片の95%信頼区間が-3.91~7.89、傾きの95%信頼区間が0.959~1.005となり、切片は0を含み、傾きは1を含んだ。したがって、本法による定量値とアミノ酸自動分析計による定量値は同等であることが示され¹⁴⁾、本法は種々の穀類に対して選択的に測定できる方法であると考えられた。また、クロマトグラムの一例として小麦全粒粉のクロマトグラムをFig. 3に示した。小麦全粒粉のクロマトグラムと同様に、他の穀類のクロマトグラムにおいてもAsnのピーク周辺に定量の妨害となるピークは認められなかった。

なお、妥当性確認では、分析カラムとしてUnison UK-C18を使用した。

ま と め

ダンシル誘導体化法を用いた穀類中の遊離アスパラギンの分析を開発し、単一試験室での妥当性確認を行った。本法は、汎用機器であるHPLC-UVを用い、試験溶液の調製工程において濃縮乾固が不要な方法であり、また、妥当性確認を行った結果、コーデックス委員会の手続きマニュアルで規定されている範囲内の性能を有していた。

よって、本法を用いることにより、食品関連事業者は製造現場で遊離Asn濃度の測定を簡便に行うことが可能となり、食品中のAA濃度を低減するための検討が可能となると考えられた。

謝 辞

本研究は、平成28年度安全な農林水産物供給のためのレギュラトリーサイエンス研究「アクリルアミド濃度の目安となる指標等の開発2. 穀類中のアスパラギンの分析法プロトコルの開発」により実施した。

文 献

- 1) Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., Dodson, A. T. Acrylamide is foremed in the Maillard reaction. *Nature*, **419**, 448-449 (2002).
- 2) Robert, F., Vuataz, G., Pollien, P., Saucy, F., Alonso, M. I., Bauwens, I., Blank, I. Acrylamide formation from asparagine under low-moisture Maillard reaction conditions. 1. Physical and chemical aspects in crystalline model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6837-6842 (2004).
- 3) Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Törnqvist, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4998-5006 (2002).
- 4) JECFA. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO food additives series, FAO and WHO, 63 (2011).
- 5) Hamlet, C. G., Sadd, P. A., Liang, L. Correlations between the amounts of free asparagine and saccharides present in commercial cereal flours in the United Kingdom and the generation of acrylamide during cooking. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 6145-6153 (2008).
- 6) Weber, E. A., Graeff, S., Koller, W.-D., Hermann, W., Merkt, N., Claupein, W. Impact of nitrogen amount and timing on the potential of acrylamide formation in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Field Crops Research*, **106**, 44-52 (2008).
- 7) Moore, S., Spackman, D. H., Stein, W. H. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry*, **30**, 1190-1206 (1958).
- 8) Mustafa, A., Åman, P., Andersson, R., Kamal-Eldin, A. Analysis of free amino acids in cereal products. *Food Chemistry*, **105**, 317-324 (2007).
- 9) Benedito de Barber, C., Prieto, J.A., Collar, C. Reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of changes in free amino acids during wheat bread dough fermentation. *Cereal Chem.*, **66**, 283-288 (1989).
- 10) Tuberoso, C. I. G., Congiu, F., Serreli, G., Mameli, S. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry*, **175**, 29-35 (2015).
- 11) Henrikson, R. L., Meredith, S. C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.*, **136**, 65-74 (1984).
- 12) 日本薬学会編. “衛生試験法・注解2015”. 東京, 金原出版, 2015, p. 205-207.
- 13) FAO/WHO. “Working Instructions for the Implementation of the Criteria Approach in Codex”. Codex Alimentarius Commission Procedural Manual 25th ed. 2016, p. 79-81. (ISBN 978-92-5-109362-7)
- 14) Miller, N. J., Miller, C. J. (宗森 信, 佐藤寿邦訳). “データの取り方まとめ方 (第2版)”, 東京, 共立出版, 2004, p. 149-156. (ISBN 978-4-320-04360-2)