ニトロソジエチルアミン生成に対する野菜汁、果実汁の影響

(昭和 61 年 5 月 28 日受理)

佐藤 恭子* 山田 隆*
義平 邦利* 谷村 顕雄*

The Effects of Vegetable or Fruit Juices on Nitrosodiethylamine Formation

Kyoko SATO, Takashi YAMADA, Kunitoshi YOSHIHARA and Akio TANIMURA

(National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga,
Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

There are several substances in foodstuffs that inhibit or accelerate nitrosamine formation. In this study, vegetable juices and fruit juices were chosen as samples and their effects on nitrosodiethylamine (NDEA) formation were investigated.

NDEA formation was decreased to 10-49%, 15-75%, 44-66% and 52-58% by the addition of juices of spinach, green pepper, komatsuna and orange, respectively, while it was increased to 328-576%, 265-398% and 192-293% by the addition of juices of cucumber, plum and apple, respectively. The effects of some vegetable or fruit juices on NDEA formation varied over a rather wide range from sample to sample. This might suggest that the producing area, the harvesting season and so on influenced the effects on nitrosamine formation. Ascorbic acid is known to inhibit nitrosamine formation, but the ascorbic acid content in the juices had no apparent relation to the effects on NDEA formation.

(Received May 28, 1986)

Key words: ニトロソジエチルアミン nitrosodiethylamine; 野菜汁 vegetable juice; 果実汁 fruit juice; アスコルビン酸 ascorbic acid; ニトロソアミン nitrosamine

まえがき

N-ニトロソ化合物は環境中や食品中に存在し、その多くは代表的な発ガン性物質とされている。N-ニトロソ化合物は第二アミンなどと亜硝酸塩の反応により主として酸性で生成する。食品には第二アミンが含まれ、また、食品中に存在する硝酸塩は摂取後だ液中に分泌され、口腔内細菌などの還元作用により亜硝酸塩となる。従って、生体内でも、特に酸性である胃内において、N-ニトロソ化合物が生成する可能性が考えられる。

これまで、N-ニトロソ化合物の生成に影響を及ぼす物質に関して多くの研究がなされている。ニトロソ化反応に抑制的な作用を持つ物質としては、アスコルビン酸¹⁾や α -トコフェロール²⁾などが報告されている。また、ニトロソ化反応に促進的な作用を持つ物質としては、チオ

シアン酸³⁾やハロゲンイオン⁴⁾などが報告されている。ポリフェノール類は、反応条件によりニトロソ化反応に対する影響が多少異なる。catechin や resorcinol などは、ニトロソ化反応を促進するという報告があり、pyrocatechol, chlorogenic acid 及び pyrogallol などは、抑制するという報告がある^{5)~7)}。食品については、大豆製品によるニトロソ化反応の抑制及び緑茶抽出液による促進が報告されている^{8),9)}。また、食品添加物として利用されている市販のコンドロイチン硫酸中の不純物がニトロソ化反応を促進するという報告があり¹⁰⁾、食品中にはニトロソ化反応に影響を与える未知のものが含まれている可能性が考えられる。

今回、日常摂取する野菜や果実のうちで主に生で喫食するものについて、それらのしぼり汁を加えた場合のジエチルアミンと亜硝酸塩からのニトロソジエチルアミン(NDEA)の生成に対する影響について検討した。また、

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Fig. 1 Effects of vegetable juices or fruit juices on nitrosodiethylamine formation

The reaction mixture (pH 3.5) contained 5.0 mM diethylamine, 5.0 mM nitrite, 0.1 M acetate buffer and 50% vegetable juice or fruit juice; NDEA formed was measured after 30 min of incubation at 37°C.

Results are shown as relative percentage of NDEA formation to the control reaction mixture to which water was added instead of juices. The lines express the range of percentage.

アスコルビン酸は多くの野菜などに含有されている。そこで、野菜汁などのアスコルビン酸含有量とニトロソ化反応への影響との関係についても検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料、試薬

野菜汁及び果実汁は都内食料品店にて購入した野菜または果実を用い、摂取する状態を考慮し、必要に応じて皮及び種などを除いた後、ジュース（(株)日立製作所製 VA-500）で調製した。試薬はすべて試薬特級を用いた。

2. 装置及び分析条件

ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製 GC-6A

ガスクロマトグラフィー用カラム：10% ポリエチレングリコール 20M on Gaschrom P (3 mmφ×1.5 m)
カラム温度：120°
注入口温度：140°
検出器：Thermo Eelectron Co. 製 熱エネルギー検出器 TEA-502

分解炉温度：480°

NDEA は絶対検量線法によるピーク高さにより定量した。

3. 実験方法

1) NDEA の生成及び定量

0.4 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.5) 5 ml, 水 1 ml 及び 50 mM 塩酸ジエチルアミン (DEA) 溶液 2

Fig. 2. Effects of ascorbic acid contents on nitrosodiethylamine formation

Reaction conditions and the definition of percentage of NDEA formation are described in the legend of Fig. 1. Ascorbic acid solutions were added instead of juices in the experiment for the effect of ascorbic acid.

ml の混液に、野菜汁または果実汁 10 ml (終濃度 50%) あるいはアスコルビン酸溶液 10 ml (終濃度 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 mM) を加えた。塩酸または水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 3.5 に調整した後、50 mM 亜硝酸ナトリウム溶液 2 ml を加え、反応を開始した。対照としては野菜汁などの代りに水を用いて反応を行った。37° で 30 分間インキュベートした後、0.6 N スルファミン酸溶液 2 ml を加え、ジクロロメタン 40 ml で 2 回抽出した。ジクロロメタン層を合し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、ロータリーエバポレーター (30°) で約 5 ml まで濃縮し、さらに窒素気流下 2 ml まで濃縮し、定量用検液とした。NDEA の定量はガスクロマトグラフィーで行った。

2) アスコルビン酸の定量

野菜汁及び果実汁中のアスコルビン酸含量は 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた比色法により定量した¹¹⁾。

結 果

1. NDEA 生成に対する野菜汁及び果実汁の影響

野菜汁あるいは果実汁について DEA と亜硝酸塩からの NDEA 生成に対する影響を調べた。野菜汁などを加えない対照の反応液 20 ml 中の NDEA 生成量は、平均 3.73×10^{-9} mol であり、添加回収率は対照及び野菜汁ともに 70% 程度であった。そこで、対照の NDEA 生成量を 100% とし、各野菜汁などについて得られた NDEA 生成量を相対値で表した。1 種類の野菜または果実について異なる 2 検体以上を用い、1 検体につき 2 回以上の繰返し実験を行った。結果は Fig. 1-1, 2 に示した。繰返し実験で得た値の平均値を 1 検体の値とし、各野菜汁などについて最小値から最大値までの実線で示

すとともに検体数を各野菜などの名前の次に () 内に示した。

NDEA 生成量が対照に比べ少なかったものは、ナガネギ、タマネギ、トマト、すいか、セロリ、じゃがいも、なす、シュンギク、オレンジ、コマツナ、ピーマン、ホウレンソウであった。逆に多かったものは、きゅうり、ブラム、りんご、もも、いちご、ぶどう、かぼちゃ、グレープフルーツであった。レタス、みかんでは NDEA 生成量は対照と変わらなかった。さくらんぼ、かき、レモン、パイナップル、キャベツ、にんじんは検体により NDEA 生成に対する作用が異なり、生成量を増加あるいは減少させた。

2. 野菜及び果実汁中のアスコルビン酸含量と NDEA 生成

NDEA 生成量を増加あるいは減少させるいくつかの野菜汁などについてアスコルビン酸含量を測定した。各搾汁のアスコルビン酸含量は、ピーマン 2.5 mM、いちご 2.0 mM、ホウレンソウ 1.9 mM、キャベツ 1.8 mM、オレンジ 1.4 mM、レモン 1.1 mM、グレープフルーツ 1.0 mM、なす、りんご及びにんじん 0.1 mM であった。

これらの試料を加えた場合の NDEA 生成量とアスコルビン酸含有量を Fig. 2 に示した。野菜または果実汁の代りに、アスコルビン酸溶液 (終濃度 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 mM) を加えた場合の結果も同様に Fig. 2 に示した。アスコルビン酸溶液を加えた場合の NDEA 生成量はアスコルビン酸濃度が増加するに従い減少した。なす、にんじん、ピーマン、ホウレンソウは同濃度のアスコルビン酸溶液よりも NDEA 生成量を減少させた。オレンジ、レモンは、同濃度のアスコルビン酸溶液を加えた場合ほど NDEA 生成量を減少させなかった。キャベ

ツ, グレープフルーツ, いちごはアスコルビン酸含量が比較的多く, りんごは少ないが, 共に NDEA 生成量は増加した。

考 察

野菜汁などの NDEA 生成に対する影響を調べる今回の実験において大根及びかぶの搾汁はみかけ上, NDEA 生成量を著しく増加させた (結果には示していない)。しかし, スルファミン酸により亜硝酸イオンが分解されているかどうかを調べた。緩衝液に亜硝酸塩と大根汁あるいはかぶ汁を加えてインキュベートした後, スルファミン酸を加え, その後 DEA を加えたところ, NDEA 生成がみられた。大根汁などの存在下では亜硝酸イオンは大根汁などの成分と結合するなど, スルファミン酸によって完全には分解されず, その後の操作中にも, NDEA が生成すると考えられる。従って, DEA を大根汁と同時に加えた実験における NDEA 量の一部はスルファミン酸を加えた後に生成したものであり, NDEA 生成に対する大根汁などの影響は, 本定量方法では正確に測定されないと考えられる。また, NDEA 生成を著しく増加させたきゅうり, りんご, いちごなどについても野菜汁などと亜硝酸塩をインキュベートし, スルファミン酸を加えた後に, DEA を加える実験を行ったが, NDEA は生成しなかった。従って, 大根及びかぶ以外の野菜汁などについては反応後の NDEA の生成はなく, これらによって得られた NDEA 生成量は真の値であると考えられる。これらのものに含まれている NDEA の生成量を増加させる化合物が何であるかについては現在一部については検討中であるが, これまでの報告からは, ポリフェノール類である可能性が考えられる。ポリフェノール類はその水酸基の位置や数によりニトロソ化を促進あるいは抑制する。また, これらの作用は, 反応液の pH や亜硝酸塩とのモル比によっても異なる。ニトロソ化に対する野菜汁などの影響は, それらが多成分の混合物であるため, さらに複雑である。

NDEA 生成量の増加の程度に関しては検体間のばらつきがみられた。この NDEA 生成に対する影響の差は, 産地, 品種, 収穫時期あるいは鮮度などの違いにより成分の種類や含量が変動するためと考えられる。また, にんじんやキャベツなどは, 検体により NDEA 生成量を減少させたものと増加させたものがあり, これらも成分の種類や含量の変動によるものと考えられる。

また, NDEA 生成量減少作用の大きいなすでは, その遠心分離上清のニトロソ化抑制作用は搾汁そのものに比べ低かった。このことから植物繊維と第二アミン, 亜硝酸塩イオンとの結合などがニトロソ化抑制に影響していることも考えられる。

アスコルビン酸は, 亜硝酸塩と反応することによりニトロソ化を抑制する物質として知られている。野菜, 果実はアスコルビン酸を含有するものが比較的多いので野

菜汁などの中の内容量と NDEA 生成に対する影響について調べた。アスコルビン酸量が増加すると NDEA 生成抑制作用は強まると予想されるが, 野菜汁などの NDEA 生成に対する作用とアスコルビン酸含量とは Fig. 2 に示したように関係がみられず, NDEA 生成の促進及び抑制に対する前述のポリフェノール類など, 他の成分の影響が大きいと考えられる。

ま と め

野菜, 果実の搾汁が DEA と亜硝酸塩の反応による NDEA 生成に与える影響について検討した。NDEA の生成量を減少させたものは, ホウレンソウ, ビーマン, コマツナ, オレンジ, シュンギク, なす, じゃがいも, セロリ, すいか, トマト, タマネギ, ナガネギであり, その程度はホウレンソウ, ビーマンでそれぞれ 10~49%, 15~75% であった。NDEA の生成量を増加させたものは, きゅうり, プラム, りんご, もも, いちご, ぶどう, かぼちゃ, グレープフルーツであり, その程度はきゅうり, プラムでそれぞれ 328~576%, 265~398% であった。レタス, みかんでは NDEA 生成量は変化しなかった。しかし, さくらんぼ, かき, レモン, パイナップル, キャベツ, にんじんは検体により, NDEA 生成量を増加あるいは減少させるなど, 作用の変化がみられた。他の野菜汁などでも結果のばらつきがみられ, ニトロソ化反応に対する影響は産地や品種, 収穫時期, 鮮度などに左右される可能性が考えられる。さらに, 抑制物質として知られているアスコルビン酸の野菜, 果実汁中の含量を調べたが, 野菜, 果実汁のニトロソ化反応に対する作用との関連はみられず, 他の成分の影響が大きいと考えられる。

本研究は厚生省がん研究助成金 59-19 により行った。

文 献

- 1) Fan, T. Y., Tannenbaum, S. R.: J. Food Sci. 38, 1067~1069 (1973).
- 2) Gray, J. I., Dugan, JR. L. R.: *ibid.* 40, 981~984 (1975).
- 3) Yamamoto, M., Yamada, T., Tanimura, A.: J. Food Hyg. Soc. Japan 17, 363~368 (1976).
- 4) Boyland, E., Nice, E., Williams, K.: Food Cosmet. Toxicol. 9, 639~643 (1971).
- 5) Walker, E. A., Pignatelli, B., Friesen, M.: J. Sci. Food Agric. 33, 81~88 (1982).
- 6) Pignatelli, B., Berezat, J. C., Descotes, G., Bartsch, H.: Carcinogenesis 3, 1045~1049 (1982).
- 7) Yamada, T., Yamamoto, M., Tanimura, A.: J. Food Hyg. Soc. Japan 19, 224~227 (1978).
- 8) Kurechi, T., Kikugawa, K., Fukuda, S., Hasunuma, M.: Food Cosmet. Toxicol. 19,

-
- 425～428 (1981).
- 9) Nakamura, M., Kawabata, T.: J. Food Sci. 46, 306～307 (1981).
- 10) Yamada, T., Yamamoto, M., Tanimura, A.: J. Agric. Food Chem. 32, 480～483 (1984).
- 11) 厚生省環境衛生局食品化学課編：“食品中の食品添加物分析法” p. 283～287 (1982) 講談社.