N-ニトロソジメチルアミン生成に対する L-アスコルビン酸の添加効果^{*1}

河端 俊治・赤築 秀憲・石橋 亨

(1974 年 8 月 20 日受理)

Effect of Ascorbic Acid on the Formation of *N*-Nitrosodimethylamine *in vitro*

Toshiharu KAWABATA^{*2}, Hidenori SHAZUKI^{*3}, and Tohru ISHIBASHI^{*2}

Studies were undertaken to elucidate the effect of added L-ascorbic acid (AH_2) on the formation of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) *in vitro*. Results obtained may be summarized as follows:

1. When AH_2 was added to the reaction mixture (NaNO_2 , 30 mM + DMA, 10 mM) at pH 6.0, the formation of NDMA was markedly blocked by more than 15 mM of AH_2 . It is to be noted that the presence of 1 to 3 mM of AH_2 apparently enhanced the formation of NDMA regardless of reaction temperatures ranging from 0° to 80°C.

2. AH_2 blockage of NDMA formation occurred more conspicuously under acidic conditions (pH 1.1 to 6.0), and the maximum inhibition rate was recorded at pH 3.6 where the highest NDMA formation was observable in the reaction mixture without AH_2 . The higher the AH_2 concentration, the greater was the blockage observed in reaction mixtures at varying pH values.

3. One possible mechanism has been discussed with regard to decreases in NO_2^- , and ionization rates of HNO_2 and DMA to explain the inhibition or enhancement of NDMA formation occurring at pH 6.0 in the presence of varying amounts of AH_2 .

亜硝酸塩とアミン類の反応生成物である *N*-ニトロソ化合物の多くには、実験動物に発ガン性を有するため、最近各国で多大の関心が持たれている。魚介類中には、ジメチルアミン (DMA) が広範に分布しているので、一部の魚卵製品や魚肉ハム・ソーセージのように亜硝酸塩を使用した食品では、*N*-ニトロソジメチルアミン (NDMA)^{*4} の生成の可能性が危惧され、その生成防止法の検討が強く要望されている。われわれは、すでにたらこに対し、L-アスコルビン酸 (AH_2) を用いる NDMA の生成防止法について報告した¹⁾。最近戸沢らも NDMA 生成に対する AH_2 の添加効果について報告している²⁾。試験管内で AH_2 に *N*-ニトロ

^{*1} 食品中における *N*-ニトロソ化合物に関する研究—VIII (Studies on *N*-Nitroso Compounds in Foods—VIII) (今まで *N*-ニトロソ化合物に関する研究を単独またはシリーズで 7 編報告したが、さらに継続して発表する予定なので、今回から標記のようなテーマに整理することにした。なお前報 (VII) は本誌 40(1) 87-96 (1974) である。

^{*2} 国立予防衛生研究所食品衛生部 (Department of Biomedical Research on Food, National Institute of Health, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan).

^{*3} 林兼産業株式会社開発部 (Research Laboratory, Hayashikane Sangyo & Co., Shimonoseki-shi, Yamaguchi-ken, Japan).

^{*4} 前報¹⁾においては *N*-ジメチルニトロサミン (DMNA) と表現したが、1973 年 10 月フランス Lyon において開催された IARC 主催「*N*-ニトロソ化合物の生成と定量に関する国際会議」で *N*-ニトロサミンの表現は、今までの *N*-アルキルニトロサミンというものから *N*-ニトロソアルキルアミンの型に変更すべきであると提案され、承認されたので、今後は、*N*-ニトロソジメチルアミンという表現を使用することにした。

ン化合物生成防止効果のあることを最初に報告したのは Mirvish ら³⁾であるが、彼らの実験は、生体（胃中）における *N*-ニトロソ化合物の生成を考慮したためか、pH 4 以下の酸性における AH_2 の添加効果について検討したものである。しかし、実際亜硝酸塩を使用する水産加工食品の pH は 6 前後のものが多く、われわれは、この pH を中心に NDMA の生成と防止の可能性について、試験管内で種々検討したところ、pH 6 においては、低濃度の AH_2 を添加するとむしろ NDMA の生成が促進されるという現象を見いだした。本報においては、試験管内における NDMA の生成とそれに及ぼす AH_2 の添加効果について検討した結果について報告する。

実験方法

試験液の調製および反応条件 300 mM の亜硝酸ナトリウム溶液（和光純薬製，特級より調製）1 ml，100 mM DMA 塩酸塩溶液（和光純薬製，特級より調製）1 ml，実験結果の項に示した種々の濃度の 10 倍濃度の AH_2 溶液（対照は蒸留水）1 ml をそれぞれ 30 ml 容共栓試験管にとり、pH 6.0 の McILVAINE 緩衝液（ただし pH の影響をみるときは、3.6, 4.0, 5.0, 6.0 の緩衝液を，また pH 1.1 の緩衝液は KCl-HCl を使用）を加え全量を 10 ml とし，密栓後ビニールテープで封をし，恒温水槽中一定温度で所定の時間反応させた。なお，反応温度は別に記載するほかは魚肉ハム・ソーセージの加熱条件を考慮し，80°C で行なつた。反応後は試験液を氷浴中で急冷し，20% NaOH 溶液を 1 ml 加えて反応を停止させた。

亜硝酸根 (NO_2^-) の定量 SHINN 法を改良した河端らの方法によつて測定した*。

DMA の定量 河端らの改良 Cu-dithiocarbamate 比色法によつた⁴⁾。

NDMA の定量 反応を停止させた試験液は小型のシリンドラー型分液ロートに移し，NaCl 2 g および CH_2Cl_2 （和光純薬製，残留農薬測定用）15 ml を加えて振とう器で 5 分間振とうした。なおこの抽出を 2 回行ない， CH_2Cl_2 抽出液を合わせロータリーエバポレーターを用いて 1 ml まで濃縮し，アルカリ熱イオン化検出器 (AFID) を付したガスクロマトグラフ (GLC) で分析した。GLC の分析条件は前報記載のものと同一である⁵⁾。

NDMA の確認 前報⁵⁾同様，島津 LKB-9000 型ガスクロマトグラフー質量分析計 (GC-MS) を用い，m/e 74 の検出をもつて確認した。その分析条件は前報⁵⁾と同じである。

実験結果

pH 3.6 および 6.0 における AH_2 添加量と NDMA 生成量の関係 反応液中の AH_2 の濃度を 0, 7.5, 15, 30, 40 または 60 mM とし，温度 80°C で 100 分間反応させた。

得られた結果を Fig. 1 に示した。pH 6.0 の AH_2 無添加対照では，生成した NDMA の濃度は約 0.05 mM で，これは添加した DMA がすべて NDMA に変化したときの濃度の約 0.5% に相当する。そして AH_2 の添加量の増加とともに NDMA の生成量は減少し， NaNO_2 と等モル以上では 0.01 mM 程度と一定値を示した。しかし，7.5 mM の AH_2 のときには対照に比し約 1.5 倍の高い生成量を示した。今まで AH_2 添加の NDMA などの *N*-ニトロソ化合物の生成促進効果については全く知られていない。なお， AH_2 が低濃度のとき増大した GLC のピークについては，GC-MS により NDMA であることを確認した。

pH 3.6 の AH_2 無添加対照では，生成した NDMA の濃度は約 0.9 mM であったが， AH_2 の添加量の増加とともに NDMA の生成量は減少した。また pH 6.0 で AH_2 が 7.5 mM のとき，NDMA の生成量が増加したが，pH 3.6 ではそのような傾向はみられなかつた。

種々の濃度の AH_2 存在下における NDMA の生成と反応温度 前の実験で AH_2 が低濃度のときは，NDMA の生成がかえつて促進されるという現象を見いだしたので，さらに詳細に NDMA 生成に対する AH_2 の濃度の影響について検討を加えるとともに，反応温度についても検討した。反応液は前の実験と同

* 厚生省環境衛生局通達（環食化第 269 号），“たらか中の亜硝酸根の定量法（第一法）”，昭和 46 年 9 月 22 日。

Fig. 1. Effect of addition of varying amounts of L-ascorbic acid (AH₂) on the formation of *N*-nitroso dimethylamine (NDMA) at pH 3.6 or 6.0.

Reaction conditions:

NaNO₂ (30 mM) + DMA (10 mM) + AH₂ (0 to 60 mM); heated at 80°C for min.

Fig. 2. Formation of NDMA at different reaction temperatures in the presence of AH₂ at pH 6.0.

Reaction conditions:

NaNO₂ (30 mM) + DMA (10 mM) + AH₂ (0 to 30 mM); reacted at 0°, 20°, 60° or 80°C for 150 min.

Fig. 3. Formation of NDMA at different pH values in the presence of AH₂.

Reaction conditions:

NaNO₂ (30 mM) + DMA (10 mM) + AH₂ (0 to 60 mM), at pH 1.1, 3.6, 4.0, 5.0 or 6.0; heated at 60°C for 150 min.

様 NaNO₂ は 30 mM, DMA は 10 mM, pH 6.0 と一定にした。なお AH₂ の濃度は 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 および 30 mM, 反応温度は 80°, 60°, 20° および 0°C とし, 反応時間は 150 分と一定にした。得られた結果を Fig. 2 に示したが, 反応温度により若干の違いがあるが, AH₂ の濃度が 1~3 mM のとき明らかに NDMA の生成促進作用がみられた。また AH₂ の NDMA の生成促進効果は, 20°C でもっとも顕著で, これより温度が高いとむしろ低下することが分かった。なお 0°C においても, AH₂ の生成促進が

みられたことは注目される (対照の AH_2 無添加の場合, 20°C 以下では 150 分の反応で NDMA はほとんど検出されていない)。 AH_2 の濃度を増加すると NDMA の生成は明らかに抑制されたが, この際反応温度が低いほど効果が顕著に現われた。

種々の pH における AH_2 の NDMA 生成に対する影響 前記の実験と同様, NaNO_2 30 mm, DMA 10 mm の反応系の pH を 1.1, 3.6, 4.0, 5.0 および 6.0 に調整し, これに AH_2 を 0~60 mm までの種々の濃度になるように加えた。反応温度は 60°C で 120 分間反応させた。得られた結果を Fig. 3 に示したが, pH 6.0 を除き, pH が低くなるほど AH_2 添加による NDMA の生成抑制が顕著に現われた。NDMA の生成は pH 3.5 付近で最大値を示すことが知られているが⁹⁾, これと同様の結果が本実験でも得

られた。一方, この pH においては AH_2 添加による NDMA 生成に対する抑制率をもっとも大きかった。またこの実験においても pH 6.0 においては, 低濃度の AH_2 の存在下で NDMA の生成量が特異的に増加することが分つた。

pH 6.0 の反応液に AH_2 を添加した際の NO_2^- および DMA 量の変化 これまでの実験と同様に NaNO_2 30 mm, DMA 10 mm とし, pH 6.0 において AH_2 を 0~30 mm まで添加した反応液を 60°C において, 0, 10, 30, 60, 120 分および 240 分まで加熱したときの, 残存 NO_2^- および DMA 量を測定した。Fig. 4 には NO_2^- 量の変化を示したが, AH_2 の濃度が高いほど NO_2^- 量の減少の程度が大きくなった。ことに 15 mm 以上の AH_2 の添加時には, 10 分間の加熱結果でわかるようにその減少は急激である。なお DMA 量は上記条件では AH_2 の添加量に関係なく, ほとんど変化しなかったため図から省略した (この反応条件で NDMA の生成量は最高 1~2% 程度であり, DMA の測定値からみれば誤差範囲にはいる)。

Fig. 4. Relationships between AH_2 concentrations and residual nitrite ions (NO_2^-) in the reaction mixture of pH 6.0.

Reaction conditions:

NaNO_2 (30 mm) + DMA (10 mm) + AH_2 (0 to 30 mm); heated at 60°C for 0 to 240 min.

考 察

NDMA 生成に関する kinetics については Mirvish⁹⁾ が詳細に報告している。つまり,

そして, NDMA ($\text{Me}_2\text{N}\cdot\text{NO}$) の生成率は,

$$\text{Rate} = R_1 \times [\text{Me}_2\text{NH}] \times [\text{HNO}_2]^2 \quad (1)$$

であるとされている。DMA (Me_2NH) の pKa 値は 10.72, HNO_2 は 3.37 で, いずれも非イオンの状態にあるものが NDMA の生成に直接関係する。これらから NDMA の生成の至適 pH が 3.5 付近にあると説明されている。

Mirvish ら⁹⁾が AH_2 の NDMA 生成阻害を初めて報告して以来, その効果に着目し, 生体系や食品中での N-ニトロソ化合物の生成防止に応用した研究がいくつか見られるが^{7,8)}, その抑制機構についてふれたものは現在までに見当たらない。われわれは今回の実験結果から, つぎの 2 面から考察してみた。まず HNO_2 は酸性で AH_2 と直接反応して窒素酸化物を形成する。その結果, HNO_2 -DMA の反応系中の NO_2^-

の減少を招来し NDMA の生成が抑制されることになるものと考えられる。 AH_2 による NO_2^- の減少は酸性ほど顕著に現われるが、pH 6.0 においても Fig. 4 に示したように AH_2 の濃度が高くなるほど NO_2^- の残存量が減少する。 AH_2 による NO_2^- の減少は主として AH_2 の還元力によると考えられるが、この現象はタンニン酸、システイン、グルタチオンなどの還元物質でも同様に認められた。そして、これら物質によつても AH_2 同様 NDMA の生成阻害が認められた*。

第 2 の因子として考えられるのは、 AH_2 は HNO_2 と反応して、ニトロシルアスコルビン酸 (NO-AH) を形成することである⁹⁾。この反応は極めて速やかで、かつ 0°C という低温でも進行することは Fig. 2 からわかる。 NO-AH は容易に分解してニトロシルカチオン (NO^+) と NO_2^- になり、この NO^+ は DMA などのアミンのニトロソ化剤として働く。一方 AH_2 は HNO_2 と反応するとき H^+ を放出する。この H^+ は DMA と働いて DMA のイオン化を促進する。(1) 式に示したようにイオン化 DMA は、 NO^+ と反応しにくいので NDMA の生成に関与しない。つまり AH_2 を DMA-HNO_2 の反応系に添加すると一方では NO_2^- の損失をひき起こし、他方では DMA のイオン化を促進することになり、この両者が NDMA の生成阻害を引き起こすことになると考えられる。しかし、pH 6.0 において HNO_2 -DMA の反応系に低濃度の AH_2 が存在すると、反応温度に関係なく NDMA の生成が促進されることが分かった。この理由については、次のように機構を推定した。pH 値が大きくなるにつれ、非イオン HNO_2 は減少し、一方非イオン DMA 量が増加する。このことが NDMA 生成量の低い理由とされているが⁹⁾、 AH_2 が低濃度のとき、Fig. 4 に示したように NO_2^- の減少は僅少であり、 HNO_2 から由来する NO^+ はもつぱら DMA と反応して NDMA 生成に関与する。反面 H^+ は非イオン DMA が十分にあるので、そのイオン化を行なつても、NDMA 生成量にはほとんど影響を与えないものと思われる。しかし、 AH_2 の濃度がさらに高くなれば NO_2^- の減少が大きく影響して、NDMA の生成阻害という結果として現われるのであろう。

AH_2 が NDMA 生成阻害をすることは、化学反応論的に興味のある現象であるとともに実際の食品や生体中における N-ニトロソ化合物生成防止手段として極めて重要である。

われわれは現在、動物の胃中や魚肉ハムなどについて、 AH_2 添加による NDMA の生成防止法について検討しており、これについては近い将来報告する予定である。

要 約

水産加工食品の pH 値を考慮し、pH 6.0 における反応系 (NaNO_2 30 mm+DMA 10 mm) に AH_2 を添加したときの NDMA 生成に対する影響を調べた。

(1) AH_2 の濃度が 15 mm 以上では、NDMA の生成を顕著に抑制したが、1-3 mm という低濃度では、反応温度に関係なく、NDMA の生成を促進した。

(2) 種々の pH において、 AH_2 添加による NDMA 生成に対する影響をみると、酸性側では顕著な抑制効果がみられ、抑制率でいえば NDMA 生成の至適 pH である pH 3.6 が最大であつた。また AH_2 の添加量が多いほど抑制率は大きくなつた。

低濃度 AH_2 の場合にみられた NDMA の生成促進効果は pH 6.0 においてのみみられた。

(3) pH 6.0 における AH_2 添加による NDMA 生成阻害は、主として NO_2^- の減少によるものと考えられるが、他方 AH_2 の添加時には、その濃度によつて HNO_2 、DMA のイオン化および造塩反応への影響が NDMA の生成量に関係するものと推定した。

本研究は昭和 47 年度厚生省食品衛生調査委託事業費 (研究班長河端俊治) の補助を受けて実施した。

* 河端俊治ら：第 27 回日本食品衛生学会学術講演会，昭和 49 年 5 月 16 日，東京にて発表。

文 献

- 1) 河端俊治・栗原道彦・葛西英一・吉田千恵子: 本誌, **39**, 883-889 (1973).
- 2) 戸沢晴己・佐藤理子: 同誌, **40**, 425-430 (1974).
- 3) S. S. MIRVISH, L. WALLCAVE, M. EAGEN, and P. SHUBIK: *Science*, **177**, 65-68 (1972).
- 4) 河端俊治・石橋 亨・中村昌道: 食衛誌, **14**, 31-36 (1973).
- 5) 河端俊治・中村昌道・松居正巳・石橋 亨: 本誌, **40**, 79-85 (1974).
- 6) S. S. MIRVISH: *J. Nat. Cancer Inst.*, **44**, 633-639 (1970).
- 7) J. J. KAMM, T. DASHMAN, A. H. CONNEY, and J. J. BURNS: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **70**, 747-749 (1973).
- 8) W. FIDDLER, J. W. PENSABENE, E. G. PIOTROWSKI, R. C. DOERR, and A. E. WASSERMAN: *J. Food Sci.*, **38**, 668-670 (1972).
- 9) C. A. BUNTON, H. DAHN, and L. LOEWE: *Nature*, **183**, 163-165 (1959).