

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K12890

研究課題名(和文)食品中のメイラード反応産物の一斉分析

研究課題名(英文) Simultaneous analysis of pyrazines, heterocyclic amines and 5-hydroxymethylfurfural using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

研究代表者

清水 友里 (SHIMIZU, Yuri)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：70758359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品の加熱調理によりメイラード反応が起き、生じる化合物が食品の風味の向上に寄与することが知られているが、中には発がんの原因となる物質も生じる。本研究ではメイラード反応産物であるピラジン類やヘテロサイクリックアミン類の一斉分析法を確立し、食品中に含まれるメイラード反応産物を明らかにすることを目的とした。

ピラジン類及びヘテロサイクリックアミン類を含む9種の化合物について、LC-MS/MSによる一斉分析法を検討した。標準添加法にて定量を行い、Pyrazine、2-methylpyrazineについては安定同位体標識化合物を内部標準物質に用いた結果と比較することとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピラジン類及びヘテロサイクリックアミン類を含む9種の化合物について、LC-MS/MSによる一斉分析法のためのメソッドを確立した。また、確立したメソッドを用いて、緑茶またはコーヒー豆の抽出液を用いて分析を行い、そこに含まれるピラジン類やヘテロサイクリックアミン類のLC-MS/MSによる一斉分析法を確立することができた。メイラード反応産物は食品の嗜好性に大きくかわるだけでなく疾患に関連しているものも多く含まれる。食事由来の摂取に配慮することは非常に重要であり、調理や食材の違いによるメイラード反応産物量の変化を分析する方法の確立は、健康的な食生活への一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the cooking process, the Maillard reaction occurs between carbonyl groups of reducing sugars and amino groups of free or protein-bound amino acids. This non-enzymatic browning reaction gives rise to modifications of thermally processed foods. Maillard reaction products such as pyrazines contribute for the aroma and which is widely designated as flavor in foods. However, among the wide range of compounds formed, there are some, such as heterocyclic amines (HCAs), whose metabolically activated derivatives can form adducts with DNA and can be carcinogenic. These Maillard reaction compounds contribute to the unique character of foods and affect toxicity. Therefore, it is important to evaluate their characteristics of foods, both influence of the Maillard reaction compounds. The aim of this study was to develop a new protocol for the simultaneous analysis of pyrazines and HCAs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

研究分野：食品科学

キーワード：メイラード反応産物一斉分析メソッド確立 LC-MS/MS 大気圧化学イオン化法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

調理加工中の食品では糖とアミノ酸がメイラード反応し、特徴的な色や香気が付与される。メイラード反応産物であるピラジン類などはアメリカ食品医薬品局 (FDA) より食品添加物に与えられる安全基準合格証 Generally Recognized As Safe (GRAS) を取得し、食品の嗜好性を向上させるために広く用いられている [1]。しかしながら、メイラード反応産物の中には、香気成分や着色などの嗜好性の向上に関わるものだけでなく、発がん性が疑われるヘテロサイクリックアミン類なども含まれる。

ヘテロサイクリックアミン類の 1 つである 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) は、食品中の含量が多いこと、雌ラットに乳癌、雄ラットに大腸癌・前立腺癌を誘発することから、国際がん研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer) においてヒトに対する発がん性が疑われるとされる class 2B に分類されている [2]。このように、メイラード反応では非常に多くの中間体が生成され、その効果や影響はさまざまである。さらに、これらの生成物は食材や調理法によって含まれる量が異なることから、食品に含まれる多様なメイラード反応産物を分析することで、それぞれの食品の特性を明らかにできるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

食品の加熱調理によりメイラード反応が起き、様々な化合物 (ピラジン類など) が生じ、食品の風味の向上に寄与するが、中には発がんの原因となる物質 (ヘテロサイクリックアミン類など) も生じる。しかしながら食品中のメイラード反応産物の分析には問題点も多い。そこで本研究ではメイラード反応産物であるピラジン類やヘテロサイクリックアミン類の LC-MS/MS による一斉分析法を確立し、食品中にどのようなメイラード反応産物が存在するかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでに、メイラード反応産物は主として抗体を用いた分析法が取られてきた。しかしながら、Thornalley らは抗体による分析は非特異的反応が大きく、またブロッキングに用いるスキムミルクなどにそもそもメイラード反応産物が含まれているため不正確であり、LC-MS/MS による分析が必要であると、ハイパーカーブカラムを用いた LC-MS 分析を用いて食品中や生体中での分析を行っている [3]。本研究においても LC-MS/MS による分析を行うこととした。

また、食品中に含まれる夾雑物の影響により、イオン化が促進または抑制されるものがあることが考えられるため、一部の標準品には安定同位体を用いることとして検討を行った。

一斉分析するメイラード反応産物はピラジン類 5 種 (pyrazine, 2-methylpyrazine, 2,3-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine, 2,3,5-trimethylpyrazine)、5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF)、ヘテロサイクリックアミン 3 種 (2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinolone (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)) の 9 種である。LC-MS/MS 分析は AB サイエックス社の Qtrap5500 を使い、ODS カラムをおよび Agilent Poroshell 120 HPLC Column を用いて条件を検討した。また、ピラジン類は揮発性物質であり、特に pyrazine や 2-methylpyrazine はエレクトロスプレーイオン化法によるイオン化が難しく、感度が低かったことから、大気圧化学イオン化法を用いた。標準添加法にて定量を行い、Pyrazine、2-methylpyrazine においては安定同位体である pyrazine d-4 および 2-methylpyrazine d-6 を使用した。

試料はコーヒー豆と緑茶の抽出液である。コーヒー豆は焙煎度の違う 2 種を使用した。コーヒー豆 13.0 g を電動コーヒーミル (kalita CM-50) で 8 秒間粉碎した後、沸騰水 120.0 mL で 2 分間抽出した。また、緑茶は産地の異なる 2 種を使用した。茶葉 4.0 g を 80°C の湯 140.0 mL で 40 秒間抽出し、茶葉を漉して使用した。抽出液 5 mL に 6% スルホサリチル酸 5.0 mL を加え、攪拌後 15 分間静置し、遠心した上清を 0.2 μm フィルターで濾過し、除タンパク処理して分析に使用した。

### 4. 研究成果

6 種のピラジン類に 3 種のヘテロサイクリックアミン類を加え、LC-MS/MS による一斉分析法を検討した。LC-MS/MS 分析は AB サイエックス社の Qtrap5500 を使い、当初の計画は ODS カラムを用いて分離を行う予定であったが、ピーク割れやテーリングの問題が発生したため、より分離能が高く、低圧力を維持することが可能である Agilent Poroshell 120 HPLC Column に変更したところ、この問題を改善することができた。

確立したメソッドを用いて、コーヒー豆と緑茶の抽出液の分析を行った。標準添加法にて定量を行った結果を表 1 に示す。コーヒーの製造工程には焙煎があり、およそ 200°C の温度で 10~20 分加熱される。焙煎の浅い coffee 1 と焙煎の深い coffee 2 ではピラジン類は全て coffee

2の値が大きく、HMFではcoffee 1の値が大きかった。どちらもメイラード反応により生成される成分であるが、HMFはメイラード反応の中期段階で生成され、ピラジン類は後期段階で生成されることが知られている。そのため、焙煎が浅いcoffee 1においてHMFが多くなったのではないかと考えている。ヘテロサイクリックアミン類については、IQは検出されなかったが、MeIQxとPhIPはcoffeeにおいて検出された。

緑茶では2,3,5-trimethylpyrazineのみが検出され、他の成分は検出されなかった。緑茶は製造過程において酸化酵素の働きを止めるため蒸熱されるが、その時間は数十秒~2分程度と短い。そのためメイラード反応はほとんど起こっていないと考えられる。

表1 コーヒー及び緑茶に含まれるメイラード反応産物

|                         | Coffee 1 | Coffee 2 | Green tea1 | Green tea2 |
|-------------------------|----------|----------|------------|------------|
| pyrazine                | 0.50     | 1.00     | <0         | <0         |
| 2-methylpyrazine        | 2.98     | 4.20     | <0         | <0         |
| 2,3-dimethylpyrazine    | 0.59     | 0.82     | <0         | <0         |
| 2,6-dimethylpyrazine    | 0.38     | 0.50     | <0         | <0         |
| 2,3,5-trimethylpyrazine | 0.09     | 0.11     | 0.02       | 0.01       |
| HMF                     | 6.29     | 0.17     | <0         | <0         |
| IQ                      | <0       | <0       | <0         | <0         |
| MeIQx                   | 0.08     | 0.08     | <0         | <0         |
| PhIP                    | 0.05     | 0.10     | <0         | <0         |

(mg/L)

Pyrazine、2-methylpyrazineについては安定同位体標識化合物を内部標準物質に用いてコーヒー試料を定量し、その結果を比較することとした。2-methylpyrazineにおいては標準添加法と内部標準法ではほぼ同様な結果となったが、pyrazineではその結果が大きく異なった。この結果の違いが試料中に含まれる夾雑物によるものであるかどうかは今後さらに検討が必要である。

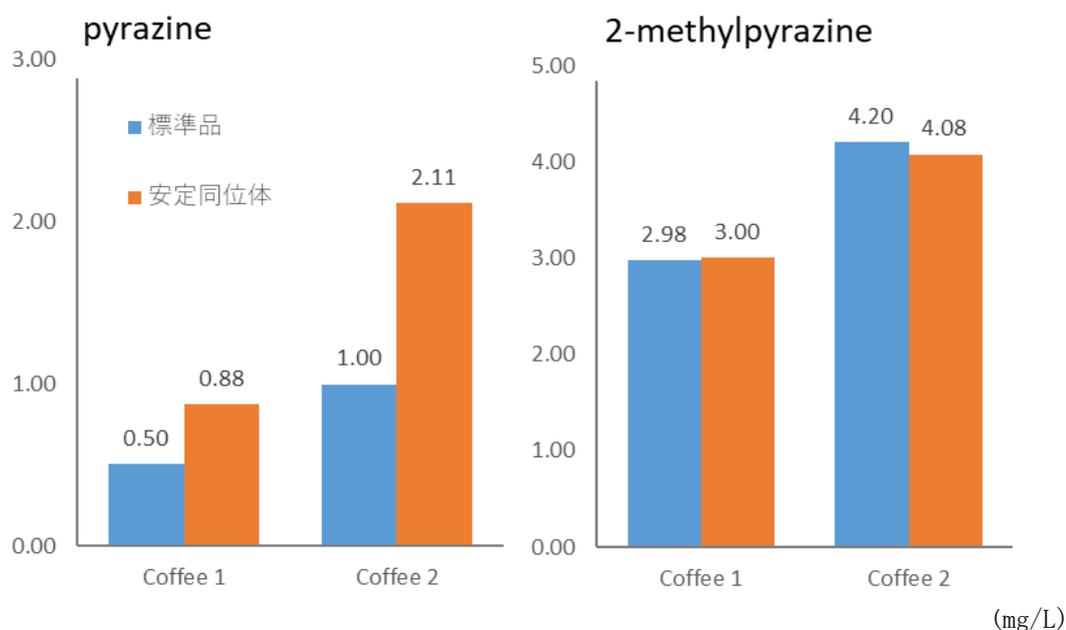


図1 標準添加法と内部標準法による比較

本研究によりピラジン類やヘテロサイクリックアミン類のLC-MS/MSによる一斉分析法を確立することができた。しかしながら、食品中のメイラード反応産物を分析する際にはその夾雑物の影響を考慮することが重要であり、安定同位体を用いた分析についてのさらなる検討が必要だろう。

<引用文献>

[1] T.B. Adams, J. Doull, V.J. Feron, J.I. Goodman, L.J. Marnett, I.C. Munro, P.M. Newberne, P.S. Portoghese, R.L. Smith, W.J. Waddell, B.M. Wagner, The FEMA GRAS assessment of pyrazine derivatives used as flavor ingredients. Flavor and Extract Manufacturers Association, Food Chem Toxicol 40 (2002) 429-451.

[2] International Agency for Research on Cancer (IARC). Some natural occurring substances: food items and constituents. Heterocyclic amines and mycotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 56 (1993) 163- 242.

[3] P.J. Thornalley, N. Rabbani, Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry—a user’s perspective, Biochim Biophys Acta 1840 (2014) 818-829.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

6. 研究組織

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。