<平成18年度>

食品の加熱によるヘテロサイクリックアミン 付加体の生成と調理法によるその制御

片 岡 洋 行 (就実大学薬学部)

1. 研究目的

肉や魚などを加熱調理すると、変異原性・発がん性のヘテロサイクリックアミン(HCA)が生成し $^{1\sim5}$ 、加熱生成する HCA の種類や量は、加熱時間や温度、前駆物質の有無によって影響されることが知られている $^{2.4.6.7}$ 。しかし、ヒトに対する曝露量や発癌リスクは十分解明されていない $^{1\sim5.8.9}$ 。また、焼肉を加水分解すると、低分子の変異原性物質を遊離する高分子成分の存在が認められており 10 、遊離物質として HCA の可能性が示唆されている。このことは、食品の加熱により生成する変異原物質が調理中に変異原性のない付加体となり、その後食事として摂取した際に生体

内分解により再び変異原物質に変化することを示唆している。従って,加熱調理する際にそれらの 生成や分解を制御できれば,安心して食品を摂取 でき,安全で健康的な食生活の増進に繋がると考 えられる。

本研究では、HCAの生体曝露要因として、遊離型だけでなく結合型のHCA-蛋白質付加体にも着目して、HCA及び付加体の加熱生成に対する様々な調理条件や添加物の効果を明らかにすることを目的とした。特に、前駆物質を用いたHCA生成モデル系^{2.4.6}、アミノ酸や蛋白質を用いた付加体生成モデル系に対して、加熱温度や加熱時間、調味料や香辛料の添加効果など、調理方法や調理条件による影響を解析した。Fig. 1 に、

図1 加熱による PhIP 及び Gly-PhIP 付加体の推定生成機構

焼肉や焼魚に特に生成量の多い HCA である PhIP 及び Gly-PhIP 付加体の推定生成機構を示し た。

2. 研究方法

2.1 実験材料

20種のアミノ酸標準品 (アラニン (Ala), シ ステイン (Cys), アスパラギン酸 (Asp), グル タミン酸 (Glu), フェニルアラニン (Phe), グ リシン (Gly), ヒスチジン (His), イソロイシン (Ile), リシン (Lys), ロイシン (Leu), メチオ ニン (Met), アスパラギン (Asn), プロリン (Pro), グルタミン (Gln), アルギニン (Arg), セリン (Ser), トレオニン (Thr), バリン (Val), トリプトファン (Trp), チロシン (Tyr)) は味 の素製を用い,水または希塩酸に溶解し1 mg/ mLとした。MeIQx及びPhIPはフナコシ製, Trp-P-1 は和光純薬製, IQ はトロントリサーチ ケミカル製のものを用い、それぞれをメタノール に溶かして1 mg/mL とし、用時メタノールで希 釈して用いた。クレアチニン(Cre)は、ナカラ イテスク製を水に溶解して1 mg/mL として用い た。牛血清アルブミン及びヘモグロビンは, Sigma 製を用いた。HPLC 移動相には、関東化学 製の LC-MS 用アセトニトリル,メタノール,蒸 留水を、その他の試薬及び有機溶媒はすべて試薬 特級品を用いた。

調味料・香辛料成分(ピペリン,カプサイシン,食塩,砂糖など)は,水,メタノール,クロロホルムのいずれかに溶解し 1 mg/mL とした。粉末調味料(胡椒,唐辛子,カレー粉など)は,試料 100 mg に 1 mL のメタノールを加え,抽出遠心分離して,その上澄み液を試料溶液とした。固体試料 1 g に 10 mL のメタノールを加え,抽出遠心分離して,その上澄み液を試料溶液とした。液

体調味料(ワイン,醤油など)は、原液を蒸留水で10倍希釈して用いた。

2.2 装置及び測定条件

LC-MS 分析装置は、オンラインデガッサ、バ イナリーポンプ、オンラインインジェクト方式の オートサンプラー、カラムコンパートメント(恒 温槽),質量分析計(MS)から構成された Agilent 1100 シリーズのLC-MSシステム (Agilent Technologies 製) を使用した。HCA の LC-MS 分析条件は、Inertsil ODS-3(100×2.1 mm, 3 μm particle size; ジーエルサイエンス 製)カラムを使用し、カラム温度30℃とした。 移動相は 0.2% ギ酸 / メタノール (75:25, v/v) を用い, 流速は 0.2 mL/min とした。 MS 条件は, Ion source mode: ESI Pogitive, Nebulizer pressure: 40 psig, Drying gas temperature: 350℃, Drying gas flow: 12 L/min, Capillary voltage: 3000 V, Fragmentor: 90 V とした。 HCA 付加体の LC-MS 分析条件は、LC-CN (75 × 3.0 mm, 3 µm particle size;スペルコ製) カ ラムを使用し、カラム温度30℃とした。移動相 は5 mM ギ酸アンモニウム/アセトニトリル (75:25, v/v) を用い、流速は0.2 mL/min とし た。MS 条件は, Ion source mode: ESI Pogitive, Nebulizer pressure: 40 psig, Drying gas temperature: 350°C, Drying gas flow: 12 L/ min, Capillary voltage: 3000 V, Fragmentor: 90 V とした。また、すべてのシステムの動作や プログラム, データ処理はケミステーション (Agilent Technologies 製) で行った。

GC-NPD 分析装置は、Hewlett-Packard 社製の、 自動圧力制御(EPC)システムを装備した窒素リ ン選択検出器(NPD)付き HP5890 Series II ガ スクロマトグラフを用いた。分離カラムは、 J&W 社製ヒューズドシリカキャピラリーカラム DB-17ht(10 m × 0.25 mm I.D.、膜厚 0.15 μm) と DB-1 (10 m × 0.25 mm I.D., 膜厚 0.25 μ m) をカラムコネクタで連結して用いた。GC 測定条件は、注入口及び検出器温度を 340℃に設定し、カラム温度は、240℃から 290℃まで毎分 10℃で昇温し、続いて 290℃から 330℃まで毎分 20℃で昇温した後 330℃で 2 分間保ち分析した。ヘリウムキャリアガスヘッド圧は、185 kPa から 205 kPa まで毎分 4 kPa で昇圧し、続いて 205 kPa から 225 kPa まで毎分 10 kPa で昇圧した後、225 kPa で 2 分間保つよう EPC で制御した。また、メイクアップガス流量は 30 mL/min、スプリット比は 10:1 として分析を行った 110。

2.3 PhIP の加熱生成と調味料・香辛料添加に よる影響

Cre $10 \mu g$ と Phe $100 \mu g$ を含む混合溶液を試験管に取り,遠心型エバポレーターで減圧乾固した後,キャップを軽くして 200 $\mathbb C$ で 3 分間加熱し,残留生成物を 1 mL のメタノール/水(1:3)混液に溶解して LC-MS で解析した。なお,不溶物がある場合には,遠心分離して,その上澄み液を試料溶液とした。また,Cre $10 \mu g$ と Phe $100 \mu g$ を含む混合溶液に調味料や香辛料,及びそれらの成分を添加して,上記と同様に加熱処理し,PhIP 生成量を未添加の場合と比較した。

2.4 加熱食品及びモデル蛋白質との加熱による PhIP- 蛋白質付加体生成の確認

加熱食品中に PhIP- 蛋白質付加体が生成しているかどうかを確認するために,加熱食品試料を細切して 5 倍量のジクロロメタンで抽出し,沈殿分画をアセトン洗浄することにより,低分子(遊離型)と高分子画分に分けた。高分子画分は,酸加水分解(6 M HCl,100°C,3 h)後,遊離したHCA をブルーレーヨン抽出し,ジメチルホルムアミドージメチルアセタールを用いて誘導体化,GC-NPD 分析した。一方,高分子画分は透析濃縮後,Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィ

ーにより結合型 HCA 分画を集め、HPLC で精製し、LC-MS-MS 法により構造解析した。また、アルブミン及びヘモグロビンをモデル蛋白として、それぞれ 50 mg に PhIP 0.5 mg を加え、遠心型エバポレーターで減圧乾固した後、キャップを軽くして 200° で 10 分間加熱し、残留生成物を 1 mL のメタノール/水(1:3)混液に溶解してLC-MS で解析した。なお、不溶物がある場合には、遠心分離して、その上澄み液を試料溶液とした。

2.5 ヘテロサイクリックアミン - アミノ酸付加体の加熱生成と調味料・香辛料添加による影響

ヘテロサイクリックアミン 50 μ g とアミノ酸 500 μ g を含む混合溶液を試験管に取り,遠心型エバポレーターで減圧乾固した後,キャップを軽くして 200 $\mathbb C$ で 5 分間加熱し,残留生成物を 1 mLのメタノール/水(1:3)混液に溶解してLC-MS で解析した。また,HCA やアミノ酸だけを加熱したものと加熱していないものについても同様に分析し,付加体の生成を確認した。一方,PhIP 50 μ g と Gly 500 μ g の混合溶液に調味料や香辛料,及びそれらの成分を添加して,同様に加熱処理し,PhIP-Gly 付加体生成量を未添加の場合と比較した。なお,不溶物がある場合には,遠心分離して,その上澄み液を試料溶液とした。

2.6 焼肉におけるヘテロサイクリックアミン 生成と胡椒添加による影響

牛肉約 10 g をフライパンで 200 \mathbb{C} で片面 5 分間ずつ焼き,細切してメタノール/水 (1:3) 混液で抽出し,遠心分離後,その上澄み液を試料溶液として LC-MS で解析した。また,牛肉を焼く際に,胡椒をふりかけて,同様に加熱処理し,PhIP 生成量を未添加の場合と比較した。

3. 結果及び考察

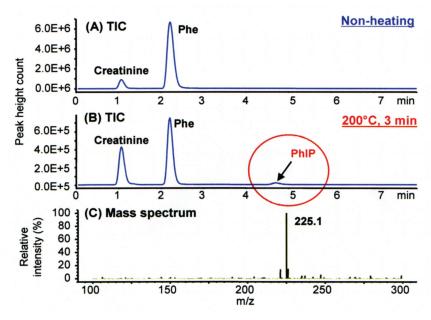


Fig.2 Total ion chromatograms and mass spectrum of PhIP formed by heating of phenylalanine and creatinine. (A) Non-heating, (B) heating at 200°C for 3 min, (C) mass spectrum of PhIP peak of (B).

3.1 PhIP の加熱生成と調味料・香辛料添加に よる影響

HCA 付加体の生成を解析する上で、まずその前駆体となる HCA が調理条件でどの程度できるのか、また調味料や香辛料を添加するとその生成にどのような影響があるのかを調べた。そこで、焼肉や焼魚に最も多く生成する PhIP について、その前駆体である Phe(分子量 165)と Cre(分子量 113)を混合加熱したところ、Fig. 2-B に示すように新たなピークが生じ、そのマススペクトルから PhIP(分子量 224)の 擬分子 イオン(M+H)である m/z=225.1 が検出された(Fig. 2-C)。

PhIP の生成条件を検討したところ、Fig. 3に示すように200℃で3分間加熱するとき、PhIP 生成量は最大となり、それに伴いPhe と Cre が減少することがわかった。そこで、この PhIP 生成モデル系に胡椒を添加して200℃で3分間加熱すると、添加量が少ない場合には PhIP 生成量が増加し、添加量が多くなると生成量が減少した。また、その辛味成分であるピペリンを添加して加熱すると、Fig. 4に示すように濃度依存的に

PhIP 生成量が減少した。これは、胡椒中の他の成分により生成した PhIP の熱分解が抑えられ、添加量が多くなると PhIP 生成が抑えられたのではないかと考えられる。その他、カテキンやカプサイシン、唐辛子やカレー粉のメタノール抽出液など多くの調味料や香辛料の添加で PhIP 生成量が減少した。 (Fig. 5)。これらの結果は、調味料を付けて肉を焼くと変異原性が減少するという報告 12) と一致している。

3.2 加熱食品及びモデル蛋白質との加熱による PhIP- 蛋白質付加体の生成

HCAの生体曝露要因として、遊離型だけでなく結合型 HCA に着目し、加熱によって食品中に HCA-蛋白質付加体が生成しているのかどうかを確認し、モデル蛋白質と HCA の加熱による付加体の生成条件を検討した。

焼魚を2.4の方法で低分子と高分子画分に分離し、高分子画分を酸加水分解したところ、Fig. 6に示すように、PhIPが高濃度で検出され、加水分解前の試料からは全く検出されなかったことにより、調理中に結合型PhIPが形成されていることがわかった。さらにゲルクロマトグラフィーに

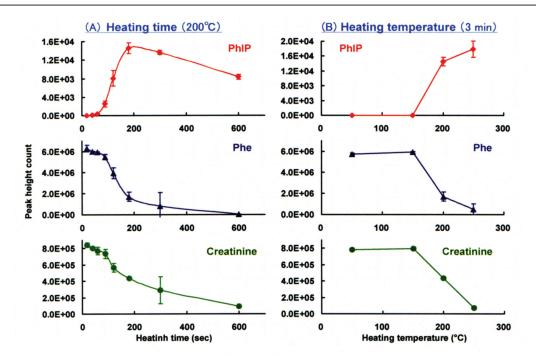


Fig.3 Effects of heating time (A) and temperature (B) on the formation of PhIP. Phenylalanine $(100\mu g)$ and creatinine $(10\mu g)$ were heated in dry model system.

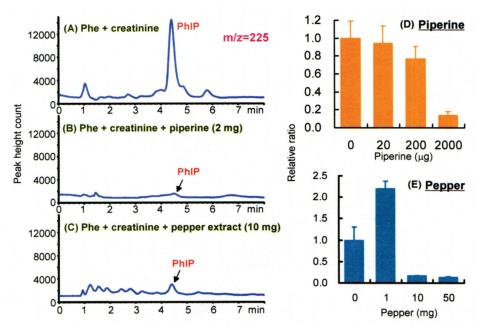


Fig.4 Effects of addition of pepper and piperine on the formation of PhIP by heating. (A) Control, (B) and (D) piperine addition, (C) and (E) pepper addition.

より 280 nm に UV 吸収を持つ 2つの結合型 PhIP が認められ、その内の 1 つを HPLC でシン グルピークとして精製できた。このピークを LC-MS 分析によりデコンボリューション解析を行っ た結果、Fig. 7 に示すように、分子量約 10,622 の蛋白質であることが推定できた。また、結合型 PhIP のピークが 2 つ現れたことより、調理条件 によって結合型 PhIP の生成量も変化するのではないかと考え、焼肉(牛肉)の調理条件を変えて、遊離型及び結合型 HCA の生成について検討した。Fig. 8 に示すように、加熱温度が高くなると遊離型、結合型 PhIP の生成量は増え、初期に結合型PhIP が遊離型よりも多く、次第に遊離型が増えることから、加熱調理する際に、まず PhIP が生

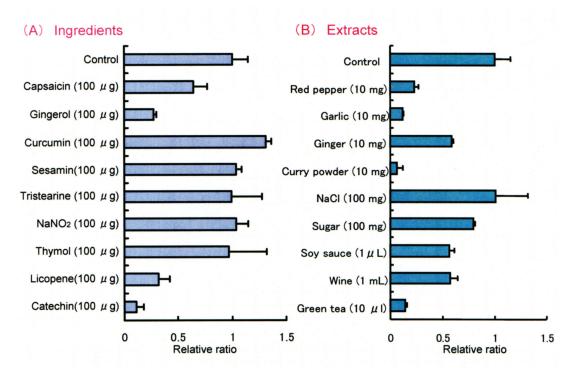


Fig.5 Effects of addition of (A) ingredients and (B) extracts of seasoning and spices on the formation of PhIP by heating.

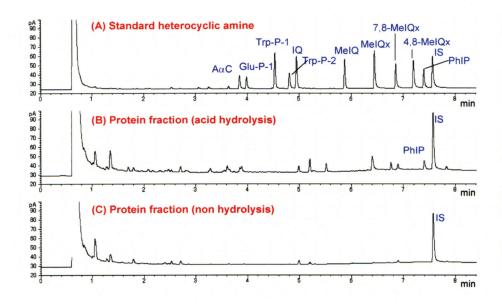


Fig.6 Chromatograms obtained from standard heterocyclic amines (50 ng) and (B) protein fraction of cooked fish (50 g) by GC-NPD.

成し、その後蛋白質に結合する可能性が示唆された。 一方、肉や魚には血液成分が含まれているため、 モデル実験として、血中の主な蛋白質である血清 アルブミンと PhIP の混合物を加熱したところ、 Fig. 9 に示すように、LC-MS 分析から生成物中 に PhIP をフラグメントイオン(M+H=225)と して含む高分子成分の存在が確認された。一方、 へモグロビンと PhIP の加熱では、225のイオンは全く検出されなかった。また、通常の焼き方で調理したいくつかの食品中における PhIP-蛋白質付加体の含量を GC-NPD 法で測定したところ、Table 1 に示すように、焼肉よりも焼魚の方に多く含まれており、白身よりも血液成分を多く含む赤身に比較的多いことがわかった。

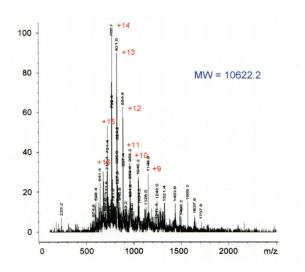


Fig.7 LC-MS spectra of protein peak purified from cooked fish.

3.3 ヘテロサイクリックアミン - アミノ酸付加体の加熱生成と調味料・香辛料添加による影響

3.2 より、加熱食品中に HCA-蛋白質付加体が 生成することが確認されたので、次に蛋白質のど のアミノ酸残基と結合しているかを明らかにする ために、さまざまなアミノ酸と HCA を加熱処理 して LC-MS 及び LC-MS-MS 法で解析し、付加体 の構造及び生成条件について検討した。

PhIP (分子量 224) と Gly (分子量 75) を混合加熱 (200℃, 10 分間) したところ, **Fig. 10**-E

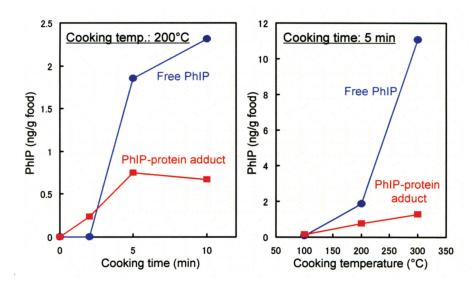


Fig.8 Effects of cooking time and temperature on the formation of free and protein-adduct of PhIP in cooked beef.

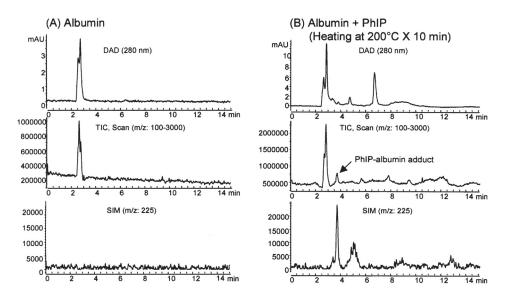


Fig.9 Chromatograms of PhIP-adduct formed by heating of albumin and PhIP.

	PhIP content (ng/g food)												
Saury	9.00	Yellowtail (white flesh)	0.90	Beef	0.75	Egg yolk	0.61						
Cod	8.74	Yellowtail (red flesh)	1.59	Pork	1.37	Egg white	0.65						
Salmom	4.92	Dried cuttlefish	ND*	Chicken	0.65	Bread	ND*						

Table 1 Contents of PhIP bound to protein in several cooled foods.

^{*}ND: not detectable.

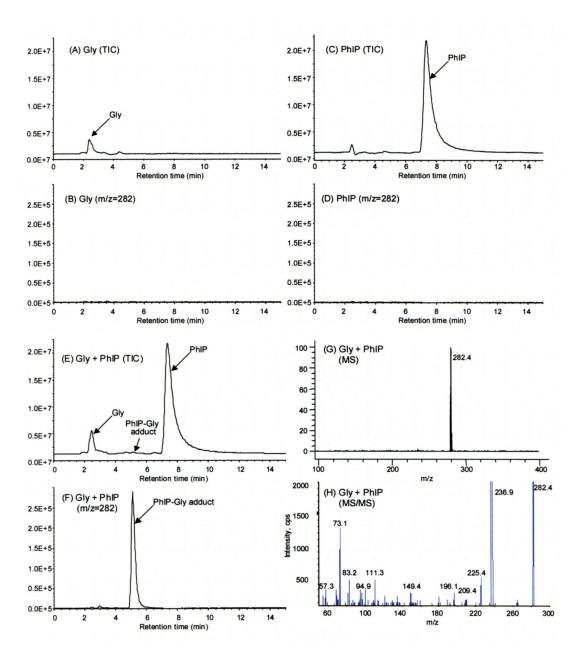


Fig.10 Chromatograms and mass spectra of PhIP-Gly adduct formed by heating. (A), (C) and (E): total ion chromatograms obtained from heated Gly, PhIP and Gly+PhIP; (B), (D) and (F): mass chromatograms (m/z=282) obtained from heated Gly, PhIP and Gly+PhIP; (G): mass spectrum of PhIP-Gly adduct; (H): MS-MS spectrum of PhIP-Gly adduct.

に示すように両者のピークの間に新たなピークが 生じ、そのマススペクトルから m/z=282.4 が検 出された(**Fig. 10**-F, G)。また、**Fig. 10**-A \sim D に示すように、PhIP と Gly を単独で加熱したと きにはこのピークは検出されず、PhIP と Gly を 混合して加熱しないとピークは検出されないこと から、PhIP と Gly の加熱反応により生じたもの と考えられる。m/z=282.4 イオンは PhIP と Gly が脱水縮合した化合物の擬分子イオン(M+H)と考えられ、このピークを LC-MS-MS 解析した結果、PhIP と Gly に由来するイオンが認められた(Fig. 10-H)。フラグメンテーション解析から、m/z=236.9 [M+H -45] は $-CH_3$ と $-CH_2$ NH2が開裂したものであり、m/z=225.4(PhIP+H)やm/z=73.1($-NHCOCH_2NH_2$)が検出されることから、Fig. 11に示すような PhIP-Gly 付加体の構造が推定された。また、PhIP と Gly の混合

Fig.11 Proposed structure and fragmentation of PhIP-Gly adduct.

加熱生成物を HPLC で分画精製して,酸加水分 解した後,LC-MS及びGC-NPD分析したところ, PhIP と Gly の存在が確認できた。そこで、PhIP と Gly を様々な比率で混合し、加熱温度や時間を 変えて PhIP-Gly 付加体の生成条件を検討した結 果, Fig. 12 に示すように, PhIP に対して Gly を 10 倍以上加えるとき付加体生成は一定となり, 加熱温度 200℃で最も生成量が高く, 5 分以内に 生成することがわかった。次に、PhIPと様々な アミノ酸との混合による付加体生成について検討 したところ, Table 2 に示すように, Cys や Lys など一部のアミノ酸を除き, ほとんどのアミノ酸 と付加体を生成することがわかった。なお、付加 体生成度は, 脱水縮合した付加体イオンを選択し, 検出されたピークのカウント数 (× 10³) で評価 した。さらに、Trp-P-1, IQ, MeIQx とアミノ酸 を加熱する時にも付加体生成が認められたが,

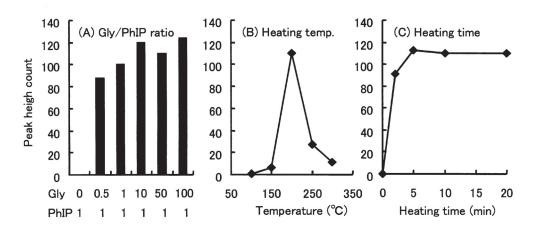
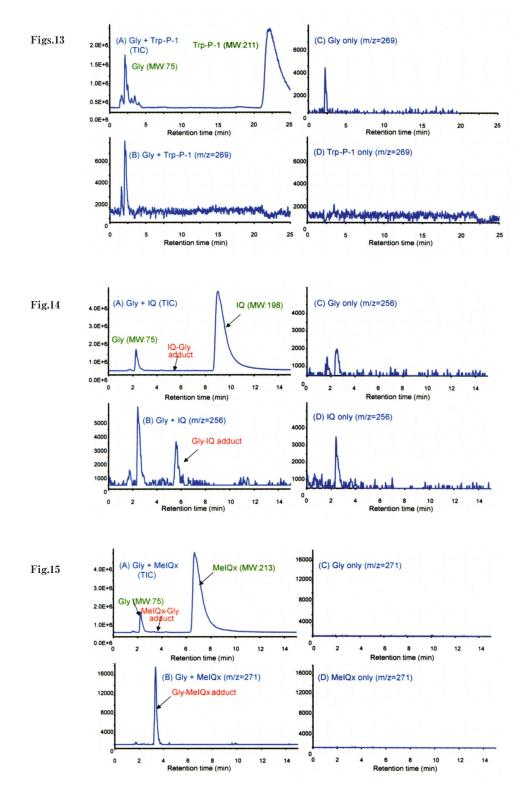


Fig.12 Effects of Gly/PhIP ratio, heating temperature and time on the formation of PhIP-Gly adduct.

Table 2 Formation of adducts from various amino acids and heterocyclic amines by heating.

Compund (MW)	PhIP (224)	Trp-P-1 (211)	IQ (198)	MeIQ (213)	Compund (MW)	PhIP (224)	Trp-P-1 (211)	IQ (198)	MeIQ (213)
Gly (75) Ala (89)	290 485	ND	3	16	Asp (133) Clu (147)	104 73	3	31	28
Val (117) Leu (131)	40 26				Asn (132) Gln (146)	10 175			
Ile (131) Ser (105) Thr (119)	18 43 13	ND	40	45	His (155) Srg (174) Lvs (146)	225 54 ND	ND	ND	7
Cys (121) Met (149)	ND 17	ND	ND	ND	Phe (165) Tvr (181)	170 31	36	19	60
Pro (115)	181	ND	18	290	Trp (204)	29			

Data show peak area counts of the adducts formed from each amino acid and heterocyclic amine.



Figs.13-15 Formation of Gly-Trp-P-1, Gly-IQ and Gly-MeIQx adducts by heating.

PhIP との付加体に比べ生成量は少ないと考えられる。また、各種アミノ酸との付加体形成においては、Gly や Ala との付加体生成量が多かったことから、分子量が小さいもののほうが付加体を作りやすいのではないかと考えられる。Fig. 13~

15 は、Trp-P-1、IQ、MeIQx と Gly の加熱による付加体生成の LC-MS 解析例を示しているが、IQ と MeIQx では脱水縮合した付加体に相当するピークが認められたが、Trp-P-1 では付加体は検出されなかった。従って、遊離型と結合型

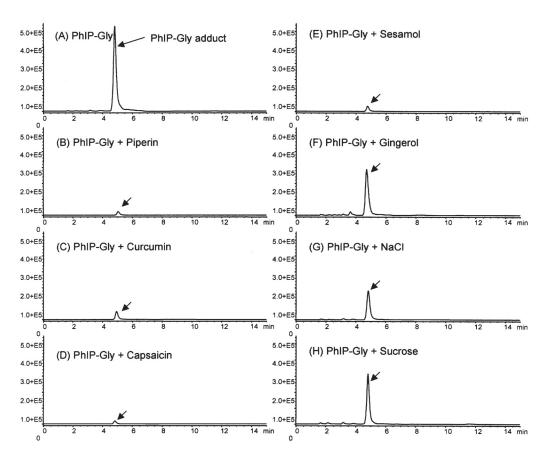


Fig.16 Effects of addition of seasoning and spices on the formation of PhIP by heating.

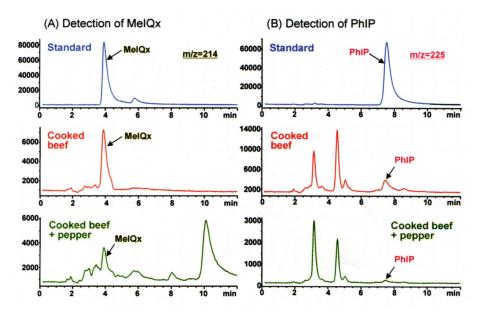


Fig.17 Effects of addition of pepper on the formation of MeIQx and PhIP by heating.

HCA の生成量は調理条件によって左右され、変 異原性にも反映されるものと思われる。

一方,ピペリン,クルクミン,カプサイシン,セサモールなどを添加すると,付加体生成が著しく抑制された(Fig. 16)。砂糖や食塩による抑制

効果は低いことから、これらの化合物が付加体生成に対して相互作用していると考えられる。

3.4 焼肉におけるヘテロサイクリックアミン 生成と胡椒添加による影響

実際に肉や魚を焼く際に、調味料や香辛料を添

加すると、HCAの生成が抑制されるかどうかを確認した。Fig. 17に示すように、牛肉を焼くとPhIPやMeIQxのピークが認められるが、胡椒を添加して焼くと、いずれのピークも減少した。以上のことから、調理の際の胡椒の添加は、HCA生成の抑制に効果があると考えられる。

4. ま と め

本研究により、焼肉や焼魚などの加熱調理した 食品中に、遊離型だけでなく結合型 PhIP が複数 生成していることがわかった。また、モデル蛋白 質を用いた実験から、加熱によって結合型 PhIP が生成することから,加熱食品中に生成した HCA が食品中の蛋白質と反応して付加体を生成 すると考えられる。これらの結合型 HCA を遊離 型とともに摂取すると、体内で消化分解されて遊 離型となり、変異原性の増大につながるものと考 えられる。一方, アミノ酸を用いた実験から, HCA のアミノ基とアミノ酸のカルボキシル基が 反応して脱水縮合した化合物が生成していること がわかった。また、実際の食品から検出された HCA-蛋白質付加体は、PhIPとの付加体であり、 PhIP は他の HCA よりも付加体を作りやすく, アミノ酸の中では Gly や Ala などの分子量の小 さいものが PhIP と付加体を作りやすいと考えら れる。付加体生成条件については、PhIP に対し てアミノ酸過剰の方が良く、温度は PhIP が生成 しやすい200℃付近が良く、温度が高すぎると炭 化して分解しやすいのではないかと考えられる。 また、加熱時間は5分以内で生成することから、 食品中でも容易に生成しているのではないかと考 えられる。従って、遊離型と結合型 HCA の生成 量は調理条件によって左右され、変異原性にも反 映されるものと思われる。

また、食品を加熱調理する際に調味料や香辛料を添加すると、HCA及び付加体の生成や分解に

影響を与え、結果的に食品中の HCA 含量を減らす可能性が示唆された。このことは、調理をする際に、調理方法や、食材及び調味料・香辛料をうまく使うことにより、HCA 生成を制御でき、HCA 曝露による発がんを予防する上で効果的であると考えられる。

概 要

ヘテロサイクリックアミン (HCA) は、加熱 調理した食品中に存在する変異原性・発がん性物 質であるが、加熱生成する HCA の種類や量は、 加熱時間や温度、前駆物質の有無によって影響さ れる。また、加熱時に遊離型の HCA だけでなく、 HCA 付加体の生成が示唆されている。しかし、 ヒトにおける HCA や HCA 付加体の曝露量や発 がんリスクについては充分解明されておらず、食 品中の共存成分や調理の際に添加される調味料や 香辛料が HCA や付加体の生成にどのような影響 を及ぼすかについてもほとんど解明されていない。 本研究では、焼肉や焼魚に特に生成量の多い PhIP に着目し、前駆物質からの加熱生成モデル 系を用いて、PhIP 及びその付加体生成と調味料 及び香辛料の添加効果を LC-MS 分析により解析 した。加熱条件を検討したところ, PhIP は 200℃, 3 分, PhIP-Gly 付加体は 200℃, 5 分以内に容易 に生成し、PhIP-Glv 付加体を加水分解すると PhIP が遊離することから、付加体が PhIP と Glv の脱水縮合物であることがわかった。一方, 胡椒, 唐辛子, ニンニク, 生姜などの調味料や香辛料, それらの含有成分であるピペリン, カプサイシン, ジンゲロールなどを上記のモデル系に添加して同 様に加熱処理し、未添加の場合と比較して添加物 効果を評価した。ピペリンやカテキンなどの添加 では、濃度依存的に PhIP 生成量が減少し、付加 体の生成も抑制されることがわかった。 さらに, 調味料や香辛料添加でも同様の生成抑制が認めら

れ、実際に牛肉を焼く際に胡椒を添加して焼くと、 未添加に比べ PhIP や MeIQx の生成量が減少し た。以上より、調味料や香辛料は、食品を加熱調 理する際に、HCA 及び付加体の生成や分解に影 響を与え、結果的に食品中の HCA 含量を減らす 可能性があり、HCA 曝露による発がんを予防す る上で有効であると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご援助を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団に深く感謝いたします。

文 献

- Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H., Nagao M., Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* 95 (2004) 290-299.
- Murkovic M., Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 802 (2004) 3-10.
- Knize M.G., Felton J.S., Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat. *Nutr. Rev.* 63 (2005) 158-165.
- 4) Cheng K.W., Chen F., Wang M., Heterocyclic amines: chemistry and health. *Mol. Nutr. Food Res.* 50 (2006) 1150-1170.
- 5) Turesky R.J., Formation and biochemistry of

- carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol. Lett.* 168 (2007) 219-227.
- 6) Zochling S., Murkovic M., Pfannhauser W., Effects of industrially produced flavours with pro- and antioxidative properties on the formation of the heterocyclic amine PhIP in a model system. *J. Biochem. Biophys. Methods* 53 (2002) 37-44.
- 7) Lan C.M., Kao T.H. Chen B.H., Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 802 (2004) 27-37.
- 8) Felton J.S., Knize M.G., Wu R.W., Colvin M.E., Hatch F.T., Malfatti M.A., Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. *Mutat. Res.* 616 (2007) 90-94.
- 9) Alaejos M.S., González V., Afonso A.M., Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: a review, Food Addit, Contam. 25 (2008) 2-24.
- 10) Martin F.L., Cole K.J., Phillips D.H., Grover P.L., The proteolytic release of genotoxins from cooked beef. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 1497-1501.
- 11) Kataoka H., Nishioka S., Kobayashi M., Hanaoka T., Tsugane S., Analysis of mutagenic heterocyclic amines in cooked food samples by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69 (2002) 682-689.
- 12) Gu Y.S., Kim I.S., Park J.H., Lee S.H., Park D.C., Yeum D.M., Ji C.I., Kim S.H., Wakabayashi K., Kim S.B., Effects of seasoning and heating device on mutagenicity and heterocyclic amines in cooked beef. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 2284-2287.

Formation of heterocyclic amine adducts by heating and its control under various cooking conditions

Hiroyuki Kataoka

(School of Pharmacy, Shujitsu University)

It is well known that mutagenic heterocyclic amines (HCAs) are formed in cooked meat and fish. Recently, it is suggested that HCAs are released from high molecular weight compounds in cooking foods by acid hydrolysis, and HCA adducts with proteins and amino acids are formed by heating. However, human HCA exposure and carcinogenic risk have not been elucidated in sufficient detail. In this study, we investigated about the formation of HCAs and their adducts, and control under various cooking conditions such as presence of seasoning and spice. HCAs and their adducts were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). PhIP and PhIP-amino acid adducts were easily formed by heating of the mixtures of precursor phenylalanine and creatinine at 200 °C within 3 min and by heating of the mixtures of PhIP and Gly at 200°C within 5 min, respectively. Their formations were suppressed by addition of piperine and catechin during heating. Same suppression was observed by addition of seasoning and spice, and the formation of PhIP and MeIQx also decreased in cooked beefsteak after sprinkling with pepper. These results suggest that addition of seasoning and spice in cooking may influence the formation and degradation of HCAs and their adducts, and provide useful information for prevention carcinogenic risk by HCA exposure.