

HPLCによる米飯中のカルボニル化合物の定量

久延 義弘, 中野 和子, 樋口 香織, 末松 伸一

Determination of Carbonyl Compounds in Boiled Rice by HPLC

Yoshihiro Hisanobu, Kazuko Nakano,
Kaori Higuchi and Shinichi Suematsu

The method for determining quantitatively carbonyl compounds such as aldehydes and ketones in boiled rice in plastic container was examined using hydrazone derivatization by 2,4-dinitrophenylhydrazine and HPLC.

1. The extraction of the carbonyl compounds in boiled rice was simplified and quickened by using the ethyl alcohol with the easy deproteinization.
2. The rate of extraction reached the maximum value by stirring sample and ethyl alcohol mixture for 30 minutes, after homogenization was done twice.
3. Reaction of extracted carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine was necessary for 40 minutes at 45°C.
4. The calibration curve by this method had the linearity within 0.03~4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and recovery rate was 95~100%, and relative standard deviation was 1.5~4.5%.
5. As a result of measuring the commercial boiled rice in plastic container within the term of relishment by this method, for the product in the container without the function of antioxidation, it was considered that the sensory characteristics were slightly changed by the increase in acetone and the off-flavor was caused by the increase in *n*-hexyl aldehyde.

Key words : plastic, container, antioxidation, boiled rice, carbonyl compounds, ethyl alcohol, extraction, 2,4-dinitrophenylhydrazine, reaction temperature, reaction time, HPLC.

アルデヒド・ケトン類などのカルボニル化合物は、米飯の臭いの変化を知るうえで重要な成分であり、脂質の酸化によって生じる異臭の原因ともなる。

従来は米飯を窒素雰囲気中で加熱し、揮発してくるカルボニル化合物を酸性下で 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと反応させ、ヒドラゾン化したものをガスクロマトグラフで直接測定し定量する方法¹⁾を実施していた。

しかし、この方法は米飯からカルボニル化合物を抽出するのに時間を要し、操作も煩雑であるために多数の検体を測定できないことと、トルエンやクロロホルムなどの溶剤を燃焼させて測定することから、健康面や環境衛生上好ましい方法とはいえない。

そこで、米飯からのカルボニル化合物の抽出を簡略化し、簡単な前処理によりカルボニル化合物を誘導体化し、高速液体クロマトグラフで測定する方法を検討した。

ただし、米飯では炭素数 7 以上のカルボニル化合物は痕跡程度しか検出されなかったため、炭

素数 6 までのアルカナールと、その保持時間内に入る 2-アルカノンのみを測定した。

実験方法

1. 試薬

2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH とする) はジーエルサイエンス(株)製・高速液体クロマトグラフ (HPLC とする) 法用誘導体調製試薬を用いた。

カルボニル化合物としてアセトン、プロピオンアルデヒド、メチルエチルケトン (MEK とする)、イソブチルアルデヒド、*n*-ブチルアルデヒド、イソバレルアルデヒド、*n*-バレルアルデヒド、*n*-ヘキシルアルデヒド、メチル *n*-プロピルケトンは和光純薬工業(株)製・試薬特級を、ホルマリン (ホルムアルデヒド)、アセトアルデヒドは AccuStandard Inc 製試薬を用いた。

アセトニトリル、蒸留水は和光純薬工業(株)製・HPLC 用を、その他エチルアルコール、塩酸は和光純薬工業(株)製・試薬特級を用いた。

2. カルボニル化合物標準溶液の調製

各カルボニル化合物を約 10 mg 精秤し、エチルアルコールで 100 ml に定容したものを、適時エチルアルコールで希釈した。

3. ヒドラゾン化カルボニル化合物標準溶液の調製

カルボニル化合物として各 100 µg/ml 含む、ジーエルサイエンス(株)製の 2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体標準溶液を、適時アセトニトリルで希釈した。

4. 反応溶液の調製

松浦らの方法²⁾ に準じて、DNPH 50 mg にエチルアルコール 80 ml、塩酸 2 ml、水 8 ml を加えて溶解し冷却後、エチルアルコールで 100 ml に定容したものを、0.5 µm の親水性 PTFE メンブランフィルター (メンブランフィルターと略す) でろ過した。

5. 試験溶液の調製

試料の米飯 10.0 g に対し、エチルアルコール約 10 ml を加えて 1 分間ホモジナイズする操作を 2 回繰り返し、ペースト状にしたものをエチルアルコールで 50 ml に定容し、密栓後一定時間攪拌したのち、メンブランフィルターでろ過した。

また、抽出濃度が検出限界以下の場合は、ペースト状の試料に一定濃度の各カルボニル化合物標準溶液を添加して、上記と同じ操作を実施した。

6. カルボニル化合物の測定方法

カルボニル化合物標準溶液または試験溶液 1.0 ml に反応溶液 1.0 ml を加え、密栓して振り混ぜた後、45 ± 0.1℃ で一定時間加温して反応させ水冷後、メンブランフィルターでろ過し、その 20 µl を HPLC に注入した。

別途、エチルアルコールを試験溶液として、その都度ブランクテストを実施した。

7. HPLC の条件

装置：島津製作所製 HPLC (LC-10A)、カラム：信和化工製 STR ODS-II (4.6 mm I.D. × 150 mm)、ガードカラム：信和化工製 STR ODS-II (4.6 mm I.D. × 10 mm)、移動相：水／アセトニトリル

(45/55 v/v), 流量: 1.0 ml / 分, カラム温度: 45℃, 試料注入量: 20 μ l, 検出波長: 365 nm.

結果と考察

1. ヒドラゾン化カルボニル化合物標準溶液の標準曲線

カルボニル化合物として0.03, 0.10, 0.30, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 μ g/ml 含む, 各ヒドラゾン化カルボニル化合物標準溶液をHPLC法で測定し, 得られたクロマトグラムのピーク面積から最小自乗法により標準曲線を求め, その標準曲線から各カルボニル化合物の相関係数と一次回帰式を求めた (Table 1).

いずれの成分とも相関性が高く, 0.03~4.00 μ g/ml の範囲内において直線性のあることから, カルボニル化合物の定量法として優れていることを認めた.

ただし, ガスクロマトグラフ (GCとする) 法で分離定量できるイソブチルアルデヒドと *n*-ブチルアルデヒドは, このHPLC法では分離できなかった.

しかし, GC法で分離が不十分なアセトンとプロピオンアルデヒドについては, このHPLC法では分離定量でき, 従来GC法で米飯のプロピオンアルデヒドとしていたピークはアセトンである可能性を認めた.

一例として, ヒドラゾン化カルボニル化合物標準溶液の, HPLC法によるクロマトグラムを Fig. 1 に示す.

2. カルボニル化合物の誘導体生成量

本試験法は, 脂質の酸化やアミノ酸のストレッカー反応で生成したカルボニル化合物をUVラベル化剤であるDNPHと反応させ, 紫外部に吸収をもつ誘導体の吸光度から定量することから, 各カルボニル化合物とDNPHとの反応状態が重要な因子となる.

Table 1. Correlation coefficient and formula of linear regression from calibration curves of carbonyl compounds standard solution.

Carbonyl compounds	$r^{A)}$	$\Sigma^{B)}$
Formaldehyde	0.999997	$Y = 688.591 + 361126 \times X$
Acetaldehyde	0.999985	$Y = -108.898 + 298337 \times X$
Acetone	0.999996	$Y = 726.179 + 210267 \times X$
Propionaldehyde	0.999997	$Y = 699.617 + 221633 \times X$
Methyl ethyl ketone	0.999992	$Y = 342.03 + 91216 \times X$
Isobutyraldehyde (<i>n</i> -Butyraldehyde)	0.999992	$Y = 97.0097 + 184920 \times X$
Isovaleraldehyde	0.999926	$Y = -1534.03 + 156935 \times X$
<i>n</i> -Valeraldehyde	0.999934	$Y = -1572.94 + 153833 \times X$
<i>n</i> -Hexylaldehyde	0.999960	$Y = -845.682 + 128749 \times X$

A) Correlation coefficient ; B) Formula of linear regression.

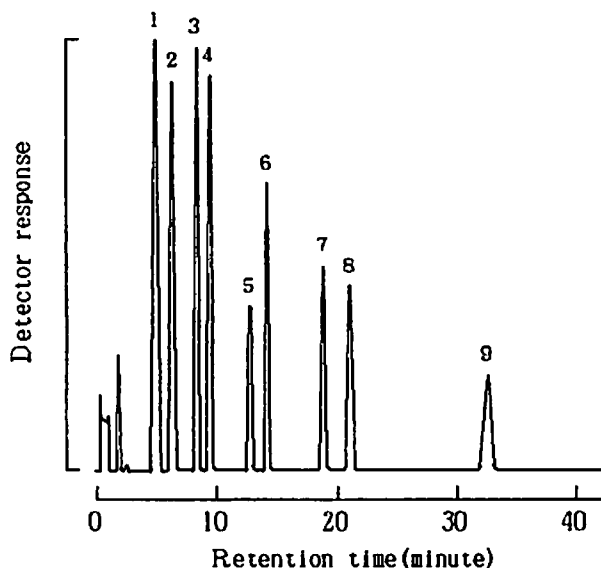


Fig. 1 HPLC chromatgram of carbonyl standard compounds mixture labeled using 2,4-dinitrophenylhydrazine.

- 1, Formaldehyde ; 2, Acetaldehyde ; 3, Acetone ;
- 4, Propionaldehyde ; 5, Metyl ethyl ketone ;
- 6, Isobutyraldehyde (*n*-Butyraldehyde) ;
- 7, Isovaleraldehyde ; 8, *n*-Valeraldehyde ;
- 9, *n*-Hexylaldehyde.

この反応条件については、松浦らが炭素数4以上のアルカナルについて詳しく検討しているが、米飯の場合炭素数2のアルカナルであるアセトアルデヒドと、炭素数3の2-アルカノンであるアセトンが米飯の臭いの質の変化に大きく寄与していると考えられるので、松浦らが検討していないホルムアルデヒドとアセトアルデヒドおよびアセトンと、炭素数6の*n*-ヘキシルアルデヒドの保持時間内までに検出されるMEKを精秤して、約4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした標準溶液に反応溶液を混合し、45℃で0～80分間反応させ、冷却後ろ過したものをHPLC法で定量して、誘導体の生成量と反応時間との関係を調べた (Fig. 2)。

この場合、ホルムアルデヒドなど沸点の低い成分があるため、開放系では試料を採取できないので、内面テフロンシリコンセプタムを取り付けた密封型採取管に、あらかじめ一定量のエチルアルコールを採取しておき、マイクロシリンジで各カルボニル化合物を直接エチルアルコールに注入し精秤した後、マイクロシリンジでエチルアルコールを注入し、標線まで定容した。

また、希釈する場合もこの方法に準じて行った。

反応時間はホルムアルデヒドで30分、アセトアルデヒドで20分、アセトンとMEKは10分で誘導体生成量が一定となったが、ホルムアルデヒドの30分は反応が終了した直後と考えられるので、確実に反応させるために反応時間は40分とした。

また、45℃・40分の反応条件において、各カルボニル化合物の濃度別の検出量、すなわち回収率をヒドラゾン化カルボニル化合物標準溶液の検量線から求めた (Table 2)。

いずれの成分も回収率は95～101%の範囲内にあり、濃度の違いによる回収率の差はほとんどなく、各カルボニル化合物が定量的にヒドラゾン化することを認めた。

さらに、繰り返し試験3回における相対標準偏差も1.1～3.9%の範囲内にあった。

また、炭素数6までの他の

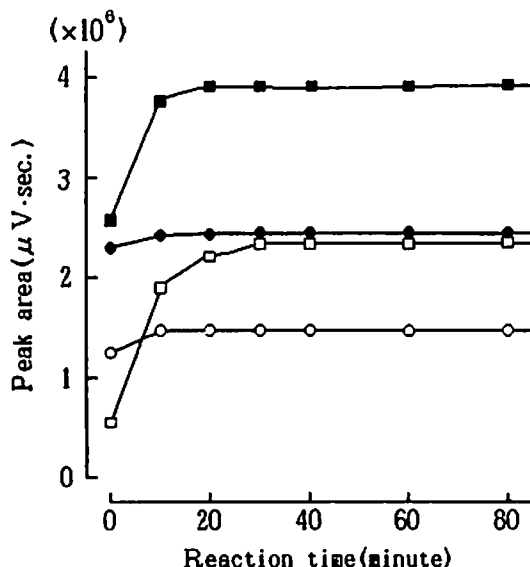


Fig. 2 Effect of reaction time on the formation of derivatives.

□, Formaldehyde; ■, Acetaldehyde;
●, Acetone; ○, Methyl ethyl ketone.

Table 2. Recovery of carbonyl compounds from standard solution with various content.

Carbonyl compounds	Contents $\mu\text{g}/\text{ml}$	Found $\mu\text{g}/\text{ml}$	Recovery %	RSD [*] %
Formaldehyde	0.0391	0.0372	95.14	3.9
	0.3910	0.3827	97.88	2.7
	3.9100	3.8329	98.03	2.3
Acetaldehyde	0.0402	0.0391	97.26	2.7
	0.4024	0.4010	99.65	2.3
	4.0240	4.0252	100.03	1.7
Acetone	0.0400	0.0389	97.25	2.2
	0.3997	0.3947	98.75	1.5
	3.9970	3.9899	99.82	1.1
Methyl ethyl ketone	0.0402	0.0404	98.50	1.9
	0.4019	0.4017	99.95	1.4
	4.0190	4.0225	100.09	1.1

* Relative standard deviation (n=3).

カルボニル化合物についても同じ試験を実施した結果、45℃・40分の反応条件でいずれの成分も回収率は95%以上あり、相対標準偏差も1.0~2.5%の範囲内にあり、松浦らの結果と同様、良好な結果であった。

3. 米飯からのカルボニル化合物の抽出

長期保存した容器詰米飯 10.0 g にエチルアルコール約 10 ml を加え、ホモジナイザー（約 8000 rpm, 1 分）で粉碎したのち、エチルアルコールで 50 ml に定容し、ただちにメンブランフィルターでろ過したものを、抽出時間 0 分の試験溶液とした。

また、老化の進んだ米飯は 1 回のホモジナイズで完全なペースト状にならなかったため、ホモジナイズしたのち密栓して室温で約 2 分間静置し、上澄み液を採取した残渣に約 10 ml のエチルアルコールを加えて再度ホモジナイズしたのち、1 回目に採取した上澄み液と合わせて、上記と同じくエチルアルコールで定容して、ろ過した。この操作に必要な時間が約 10 分であったことから、抽出時間 10 分の試験溶液とした。

さらに、エチルアルコールで定容したものに回転子を投入して密栓し、マグネチックスターラーで攪拌しながら、抽出時間 0 分を基準に 20~180 分経過したものを、上記と同じくろ過して試験溶液とした。

これら試験溶液を 45℃ で 40 分間反応溶液と反応させ、冷却後ろ過し、HPLC 法でカルボニル化合物を定量して、抽出時間と抽出量との関係を調べた (Fig. 3)。

米飯の臭いの質の変化を知るうえで重要なカルボニル化合物である、アセトンとアセトアルデヒドおよび異臭の原因と考えられている *n*-ヘキシルアルデヒド³⁾ が多く検出された。

その他、ホルムアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブチルアルデヒドなども検出されたが、検出量が少ないので結果から省いた。

アセトンは比較的抽出されやすく、ホモジナイズ 2 回目直後の抽出 10 分で、アセトアルデヒドと *n*-ヘキシルアルデヒドは抽出 20 分で、ほぼ最大値に達した。

ただし、抽出 180 分の値がわずかに高くなる傾向にあったものの、抽出 30 分の値のバラツキの範囲内にあることと、アセトアルデヒドの抽出 20 分の値は最大値に達した直後と考えられるので、確実に抽出するために抽出時間は 30 分とした。

また、米飯を完全にペースト状にしないと最大抽出量に到達する時間が長くなるので、2 回のホモジナイズと以降の攪拌を抽出条件とした。

4. 試験溶液でのカルボニル化合物の添加回収試験

エチルアルコールなどの溶媒抽出法では、米飯に含まれるカルボニル化合物以外の成分も溶出していると考えられ、反応溶液との反応を阻害している可能性が

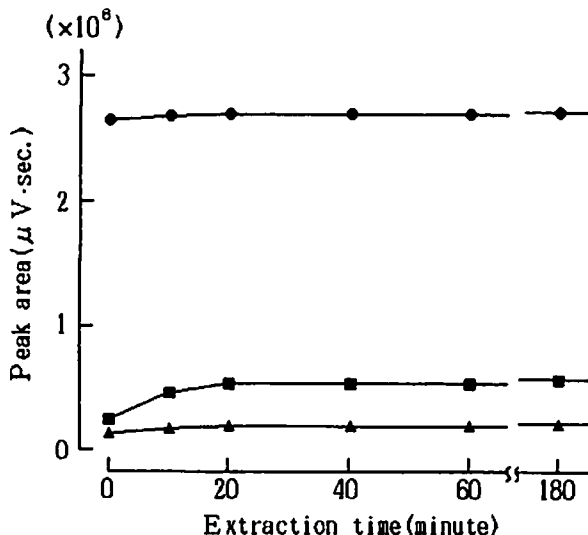


Fig. 3 Effect of extraction time on the concentration of carbonyl compounds extracted by ethyl alcohol at 20℃ from boiled rice.

●, Acetone ; ■, Acetaldehyde ;
▲, *n*-Hexylaldehyde.

ある。

そこで、米飯のエチルアルコールによるカルボニル化合物の抽出において、上記の抽出条件で得られた試験溶液に、約 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の各カルボニル化合物標準溶液を精秤して添加し、 45°C で40分間反応溶液と反応させ、冷却後ろ過したものを、HPLC法でカルボニル化合物を定量して回収率を求めた (Table 3)。

この場合も、結果と考察2. 同様、操作は密封系で行った。

いずれの成分も回収率は95~100%の範囲内にあり、繰り返し試験3回における相対標準偏差も1.5~4.5%と良好な結果であった。

このことから、米飯の抽出に用いたエチルアルコール中に他の成分が共存したとしても、カルボニル化合物と反応溶液との反応を阻害することはないと考えられる。

これらの結果から米飯中のカルボニル化合物の定量方法として、このHPLC法は分析精度にくわえて、簡便性・迅速性・安全性など、多くの点でGC法より優れた定量方法であると考えられる。

5. アセトンの同定

従来実施していたGC法で得られるクロマトグラム上では、アセトンとプロピオンアルデヒドが重なるため、文献³⁾などを参考にプロピオンアルデヒドと推定していた。

しかし、このHPLC法ではアセトンとプロピオンアルデヒドは完全に分離するので、保持時間からアセトンと推定したが、保持時間の一致だけでは断定できない。

一般に、有機化合物のクロマトグラフ法での分離挙動としては、炭素数が多いほど溶出時間が遅くなり、同族列において炭素数と保持時間の対数との間に直線関係があり、同族列でも側鎖のあるなしで、保持時間のずれることが知られていることから、実測した保持時間と分子内の構成炭素数との関係を調べた (Fig. 4)。

アルカノールの同族列については、炭素数1のホルムアルデヒドを除いて直線性が認められ、さらに、2-アルカノンの同族列であるアセトン、MEK、メチル *n*-プロピルケトンにおいても直線性が認められたことから、2-アルカノンの同族列の直線上にあり、炭素数3はアセトンのみであることから、アセトンと推定した。

また、検出したピークとヒドラゾン化アセトン標準溶液の吸収極大が約368nmと一致している

Table 3. Recovery of carbonyl compounds from boiled rice.

Carbonyl compounds	Content $\mu\text{g}/\text{ml}$	Added $\mu\text{g}/\text{ml}$	Total $\mu\text{g}/\text{ml}$	Found $\mu\text{g}/\text{ml}$	Recovery %	RSD * %
Formaldehyde	0.024	0.776	0.800	0.763	95.38	4.4
Acetaldehyde	1.762	0.892	2.654	2.599	97.93	3.7
Acetone	2.926	0.935	3.861	3.794	98.26	2.6
Propionaldehyde	0.016	0.990	1.006	0.974	96.82	2.1
Methyl ethyl ketone	0.022	0.856	0.878	0.872	99.32	1.6
Isobutyraldehyde (<i>n</i> -Butyraldehyde)	0.018	0.972	0.990	0.968	97.78	1.7
I sovaleraldehyde	0.008	0.915	0.923	0.922	99.89	1.4
<i>n</i> -Valeraldehyde	0.034	0.847	0.881	0.869	98.64	1.7
<i>n</i> -Hexylaldehyde	0.376	0.991	1.367	1.354	99.05	1.5

※ Relative standard deviation ($n=3$).

ことから、アセトンと推定される。

6. 市販容器詰米飯中のカルボニル化合物量

市販の容器詰米飯 (Table 4) および長期保存した容器詰米飯の試作品を試料として、カルボニル化合物量をHPLC法で定量した (Table 5)。

試作した長期保存品については、米飯香気の主成分であるアセトアルデヒドが減少するのに対し、アセトンと油脂の酸化臭として知られている n -ヘキシルアルデヒドの増加が認められ、臭気も油脂の酸化臭に類似していた。

この試料は米飯の異臭を確認するために、賞味期限を意図的に越えさせたもので、米飯が酸化するとアセトアルデヒドは減少し、アセトンおよび n -ヘキシルアルデヒドは増加する方向へ進むことを認めた。

そこで、アセトアルデヒド・アセトン・ n -ヘキシルアルデヒドの挙動を中心に、賞味期限内にある市販の容器詰米飯を評価すると、酸素吸収作用を持った容器 (機能性容器とする) や、脱酸素剤を添付した製品では、アセトンおよび n -ヘキシルアルデヒドはほとんど検出されなかった。

しかし、機能性容器や脱酸素剤を用いていない製品では明らかに増加しており、わずかではあるが臭いの質に差を感じ、特にNo 6の袋詰 (二重包装品) は、熱水による加熱後の開封時に油脂の酸化臭をわずかに感じた。

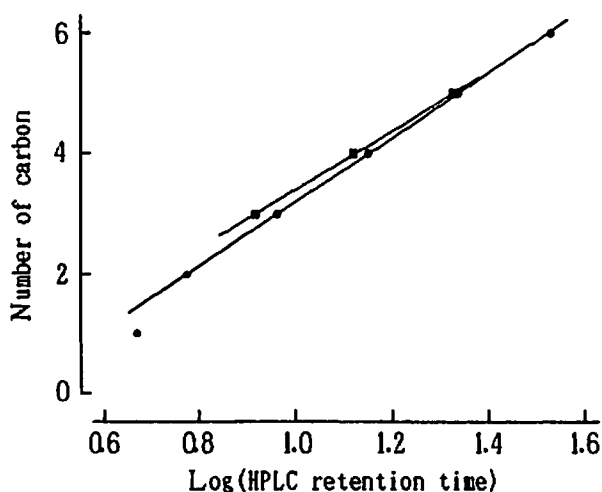


Fig. 4 Relationship between the logarithmic HPLC retention time and the number of carbon in composition of carbonyl compounds.

●, 1-Alkanal; ■, 2-Alkanone.

Table 4. Specification of commercial packed boiled rice.

Sample No.	Container	Material	Storage period month	Net wt. g	Absorbability of oxygen
1	Laminated film and tray	Nonglutinous rice Acidulant	4	200	Non
2	Laminated film and tray	Nonglutinous rice Acidulant	3	200	Non
3	Laminated film and tray	Nonglutinous rice	4	200	Oxygen absorbent tray
4	Laminated film and tray	Nonglutinous rice Gluconic acid	3	200	In package oxygen absorber
5	Laminated film and tray	Nonglutinous rice Gluconic acid	4	280	In package oxygen absorber
6	Laminated pouch	Nonglutinous rice	11	230	Non

Table 5. Analytical results of carbonyl compounds concentration in commercial packed boiled rice. (ppm)

Carbonyl compounds	Sample No.						
	1	2	3	4	5	6	(7) ^a
Formaldehyde	0.13	0.26	0.16	0.12	0.13	0.26	0.55
Acetaldehyde	5.32	5.11	5.40	5.62	5.79	6.41	0.73
Acetone	0.03>	0.03	trace	trace	trace	0.41	13.79
Propionaldehyde	trace	trace	trace	trace	trace	0.03>	0.05
Methyl ethyl ketone	0.03>	0.03>	0.03>	0.03>	0.03>	0.03	0.05
Isobutyraldehyde	0.03>	0.03	trace	trace	trace	0.04	0.13
(<i>n</i> -Butyraldehyde)							
<i>n</i> -Hexylaldehyde	0.03>	0.04	trace	trace	trace	0.22	2.03

※ Specification of trial packed boiled rice

Container, laminated film and tray; Material, nonglutinous rice, citric acid (pH=4.6>); Inert gas replacement condition of the head-space, mixed gas (40% : 60%) of nitrogen and carbon dioxide was blown for 5 seconds at 10 ℓ /minute; Net wt., 200g; Sterilization condition, 0.3 (Fo) at 110℃; Storage condition, for 15 months at 25℃.

ただし、開封して電子レンジ加熱した場合、ほとんど酸化臭は感じなかったが、臭いの質の変化をわずかに感じた。

アセトアルデヒドについては、長期保存品のように大きく減少することではなく、賞味期限内にある製品間には、ほとんど差は認められなかった。

このように容器詰米飯の場合、包材に機能性容器を用いるか、脱酸素剤を併用しないと、賞味期限内にあっても臭いの質の変化や異臭の生成が、わずかではあるが認められるので注意が必要である。

要 約

容器詰米飯中に含まれるアルデヒドやケトン類などのカルボニル化合物を、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによってヒドラゾン誘導体としたものを、高速液体クロマトグラフを用いて定量する方法を検討した。

1. カルボニル化合物の抽出は、除タンパクなどが容易なエチルアルコールを用いることで迅速簡略化できた。
2. 抽出量は、2回ホモジナイズしたのち、30分間攪拌抽出することで最大値に達した。
3. 抽出したカルボニル化合物と2,4-ジニトロフェニルヒドラジンとの反応は、45℃で40分間必要であった。
4. 賞味期限内の市販の容器詰米飯をこの方法で測定すると、酸化防止に対処していない容器の製品では、アセトンの増加による臭いの質の変化や、*n*-ヘキシルアルデヒドの増加による異臭の生成が認められた。

文 献

- 1) 清水康夫, 松任茂樹, 伊藤保之, 岡田郁之助: 農化, 43, 211-216 (1969).
- 2) 松浦弘明, 松浦法夫, 皆川憲夫, 廣田哲二: 分析化学, 46, 31-36 (1997).
- 3) 古橋樹雄, 綾野雄幸: 日食工誌, 18, 125-130 (1971).