

トリオースレダクトンとチオール化合物との反応による褐変および吸収スペクトルの変動

金, 殷鎬
九州大学農学部食糧化学教室

篠原, 和毅
九州大学農学部食糧化学教室

松長, 正長
九州大学農学部食糧化学教室

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/22172>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 39 (4), pp.127-134, 1985-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

トリオースレダクトンとチオール化合物との 反応による褐変および吸収スペクトルの変動

金 殷 鎬・篠原 和 毅
松 長 正 長・大村 浩 久

九州大学農学部食糧化学教室

(昭和59年9月21日受理)

Browning and Variation of Absorption Spectra by the Reaction of Triose Reductone with Thiol Compounds

EUN-HO KIM, KAZUKI SHINOHARA, MASAMI MATSUNAGA
and HIROHISA OMURA

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Agriculture,
Kyushu University 46-09, Fukuoka 812, Japan

緒 言

レダクトン化合物はその分子内にエンジオール [-C(OH)=C(OH)-], エナミノール [-C(OH)=C(NH)-], エンジアミン [-C(NH-)=C(NH-)-], チオールエノール [-C(SH)=C(OH)-] 基等を有する化合物の総称であり(野村・大村, 1969), 一般にそれらのレダクトン構造に基づき強い還元性を示す。これらは極めて反応性に富む化合物であり, 特にエンジオールレダクトンが種々のアミノ化合物と反応して新しい含窒素レダクトン(アミノレダクトン)を形成することはよく知られている(野村, 1961; 野村ら, 1964; H. Euler *et al.*, 1960)。一方, これらレダクトン化合物は食品の加工, 貯蔵ないし調理の過程に起こる食品成分間相互反応によつても生成し, 食品の褐変化, 香りの変動, 品質の低下ならびに抗酸化性の発現に関与する中間体として注目されている。われわれは, 先に食品の褐変に関連して代表的エンジオールレダクトンであるトリオースレダクトン(TR)とアミノ酸および核酸関連化合物との反応を行い, 褐変を認めるとともに数種のアミノレダクトンを単離した(篠原ら, 1974b; 篠原ら, 1975; 李ら; 1978)。また, 大村ら(1974)はTRが尿素, ヒドロキシウレア, オキシムなどと反応することを報告している。このようにTRは反応性に富み, 種々の化合物と反応することが予想される。TRとの反応が予想される

化合物としてアミノ化合物の他, 食品成分中にも存在するチオール化合物も注目される。

本報告では, TRと数種のチオール化合物との反応をそれらによる褐変およびTRに特徴的な吸収スペクトルの変動を求めることによつて検討した。

実 験 方 法

1. トリオースレダクトン(TR)の調製

常法(大村ら, 1974)に従つて調製した。

2. チオール化合物

チオール化合物として次の市販品を用いた。システイン(Cys), N-アセチル-L-システイン(NAC), ペニシラミン(PSH), グルタチオン(GSH), チオグリコール酸ナトリウム(STG)。

3. TRとチオール化合物との反応

篠原ら(1974a)と同様に, 25 mM TRと同モルのチオール化合物(1:1反応)あるいは50 mMのチオール化合物(1:2反応)を0.1M HCl-KCl緩衝液(pH 2.0), 0.1N Na₂HPO₄-NaH₂PO₄緩衝液(pH 7.0), および0.1N Na₂HPO₄-NaOH緩衝液(pH 12.0)に溶かし, 90°Cで4時間加熱した。

4. 吸収スペクトルの測定

常用の島津マルチパーパス自記分光光度計MPS-5000型により自動的に記録して求めた(大村ら, 1967)。測定は反応液を紫外部の場合600倍に, 可視部の場合100倍に希釈して行なつた。

5. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

褐変反応物の分離にはシリカゲルG (MERCK 製) を使用し、ブタノール・酢酸・水 (4:1:5) を溶媒として展開した。検出にはレダクトン性の検出試薬として0.1% 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールのエタノール溶液を、またS検出試薬として1%塩化パラジウム試薬を用いた。

実験結果

1. TR とチオール化合物との反応による褐変

TR とアミン類との反応において 1:1 縮合物のモノアニルと 1:2 縮合物のジアニルを形成することが明らかにされている (野村ら, 1962)。TR とチオール化合物との反応においても 1:1, および 1:2 の縮合物が形成される可能性が予想される。そこで 25 mM TR と同モルのチオール化合物 (1:1 反応) および 25 mM TR と 50 mM のチオール化合物 (1:2 反応) を酸性 (pH 2), 中性 (pH 7), およびアルカリ性 (pH 12) の各緩衝液に溶解し, 90°C で4時間加熱し, 反応液の褐変度を 450 nm の吸光度を測定することによって求めた (Fig. 1)。その結果褐変の程度はチオール化合物の濃度, 種類および反応時の pH によって異なった。1:1 反応においては特に pH 2 における TR と PSH, GSH および Cys との反応系が高い褐変度を示した。Cys のアミノ基がアセチル化された NAC およびアミノ基のない STG との反応液の褐変度は極めて低かった。従って TR-PSH, TR-GSH および TR-Cys 系の高い褐変度は TR とそれら分子中のアミノ基との反応によるものであって, TR とチオール基との反応による褐変度への寄与は低いことが推定された。このような傾向は 1:2 反応においても同様であった。また pH 7 における TR-GSH 系および pH 12 での TR-PSH 系を除いて, 一般に 1:1 反応系の褐変度は 1:2 反応系よりも高い値を示した。また, TR と STG を除くチオール化合物との反応においては褐変度は特に酸性側で高く, 中性およびアルカリ性での褐変度は著しく低下した。Fig. 1 中の括弧内の数字は加熱4時間後における pH を示すが, 特に pH 12 で反応を開始した場合に著しい pH の低下がみられた。TR と同じくエンジオールレダクトンに属するアスコルビン酸 (AsA) とチオール化合物との反応を同様に試験した結果, Fig. 2 に示したように TR の場合と異なり pH 12 における AsA-PSH 系においてのみ褐変がみられ, 他の反応系では褐変は 1:1 および 1:2 反応においても

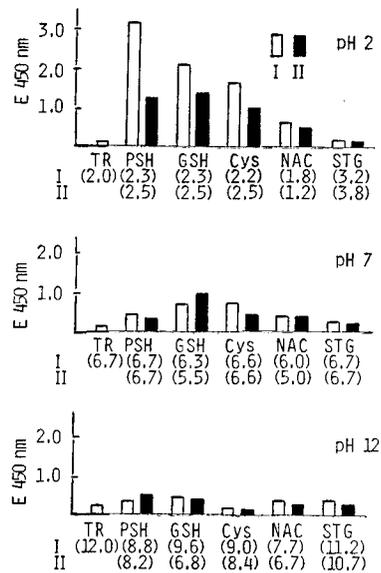


Fig. 1. Browning by the Reaction of TR and Thiol Compounds after Heating. I-TR: Thiol Compound=25 mM: 25 mM; II-TR: Thiol Compound=25 mM: 50 mM. The mixture was heated at 90°C for 4hr and the optical density was estimated at 450 nm.

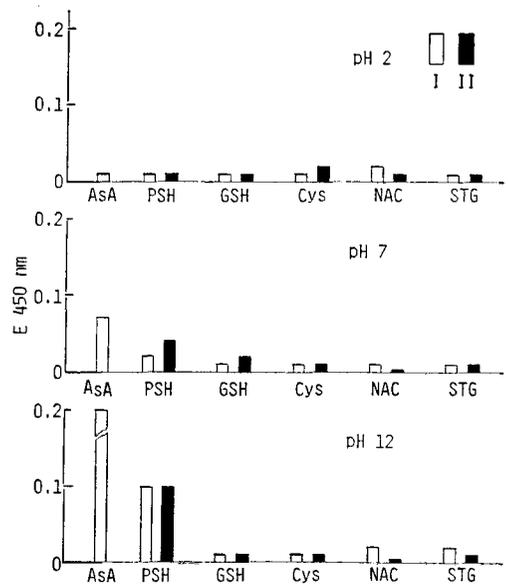


Fig. 2. Browning by the Reaction of AsA and Thiol Compounds after Heating. I-AsA: Thiol Compound=25 mM: 25 mM; II-AsA: Thiol Compound=25 mM: 50 mM. The mixture was heated at 90°C for 4hr and the optical density was estimated at 450 nm.

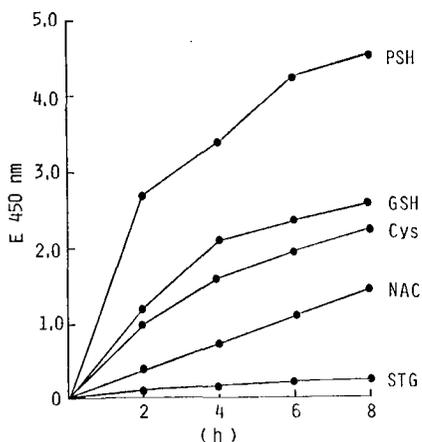


Fig. 3. Browning of the Reaction Mixture of TR and Thiol Compound. The reaction mixture of 25 mM TR and equimolar thiol compound in 0.1N HCl-KCl (pH 2) was heated at 90°C for 8hr, and the absorbance at 450 nm was measured at a regular interval.

ほとんど認められなかつた。このことは、チオール化合物に対する TR の反応性は AsA のそれよりも高いことを示唆する。

Fig. 3 は pH 2 における 25 mM TR と等モルのチオール化合物との反応による経時的な褐変度の変動を示す。TR と NAC との反応による褐変は加熱時間に応じ直線的に進行した。このことは TR が NAC の SH 基と反応したことを示唆する。TR と STG との反応は TR 単独の場合とほぼ同程度の褐変度を示した。一方、TR と PSH との反応による褐変は加熱時間の延長に伴い著しく増強した。Cys および GSH との反応系においては加熱 2 時間までは褐変は急速に進行したが、それ以後の褐変の進行度は緩慢であつた。

2. 吸収スペクトルの変動

次に、TR のチオール化合物との反応性を TR に特徴的な UV 吸収スペクトルの経時的変動および可視スペクトルの経時的変動から検討した。この場合、1:1 反応系が 1:2 反応系よりも高い褐変度を示したので 1:1 反応系について測定した。Fig. 4 は 25 mM TR のみを 90°C で 4 時間加熱した時の UV 吸収スペクトルの変動を示す。TR は pH 2 においては 270 nm に、中性およびアルカリ性下では 290 nm に最大吸収を示すが、TR のみを加熱した場合いずれの pH においても TR に特徴的な吸収の減少がみられた。それは特に pH 7 および 12 において顕著であ

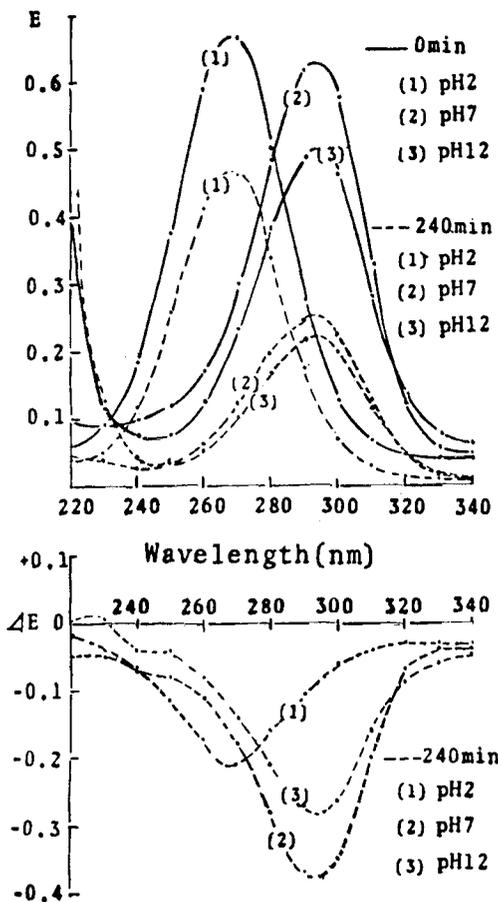


Fig. 4 UV Absorption Spectra and their Variations of TR. 25 mM TR was heated at 90°C for 4hr.

つた。

1) TR と Cys との反応

TR-Cys 系における紫外線吸収スペクトルと可視部吸収のスペクトルの変動をそれぞれ Figs. 5 および 6 に示す。UV スペクトルの変動はいずれの pH においても反応時間とともに TR に特徴的な吸収の減少がみられた。pH 2 においては反応 1 時間で 270 nm を中心に著しい吸光度の減少が観察された。この減少度は TR 単独の場合より高いものであつた。しかし 2, 3 および 4 時間後における吸光度の減少はわずかなものであつた。また、反応の進行に伴い 230 nm と 310 nm の付近を中心にわずかな吸光度の増加がみられた。同様な吸光度の増加は TR とアミノ化合物との反応においても観察されており、これがアミノレダクトンの生成を意味するものであることが確かめられている(大村ら, 1974)。従つて、Cys 系にお

いても同様な中間体が生成することが推定される。同様な傾向は増加度は低かったが pH 7 においてもみられた。pH 7 と pH 12 での反応の場合においても 259 nm を中心に吸光度が減少した。pH 12 での反応の場合 230 nm と 310 nm 付近の吸光度の増加は認められなかった。

一方、可視スペクトルの変動 (Fig. 6) は、pH 2 および 7 での反応において反応時間の経過に伴い 380 nm 付近以上の領域において吸光度が増加するとともに、380 nm 以下の短波長側では反応 1 時間以後において吸光度が減少する傾向がみられた。長波長領域において吸光度はわずかであり、特徴的な波長での吸光

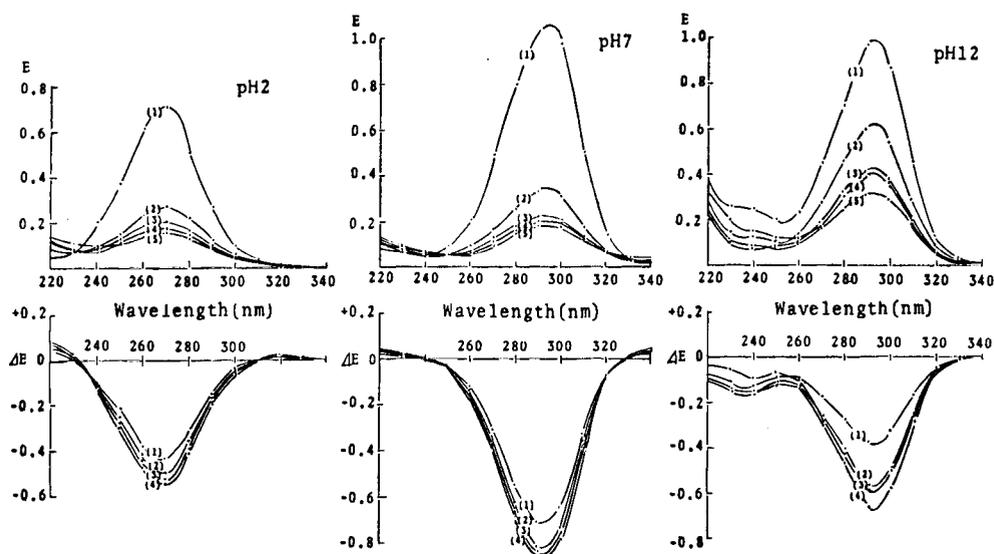


Fig. 5 UV Absorption Spectra and their Variations of the Reaction Mixture of TR and Cysteine. The reaction mixture of 25 mM TR and equimolar Cys was heated at 90°C for 4hr. E- (1): 0 min; (2): 60 min; (4): 180 min; (5): 240 min; ΔE - (1): 60 min; (2): 120 min; (3): 180 min; (4): 240 min.

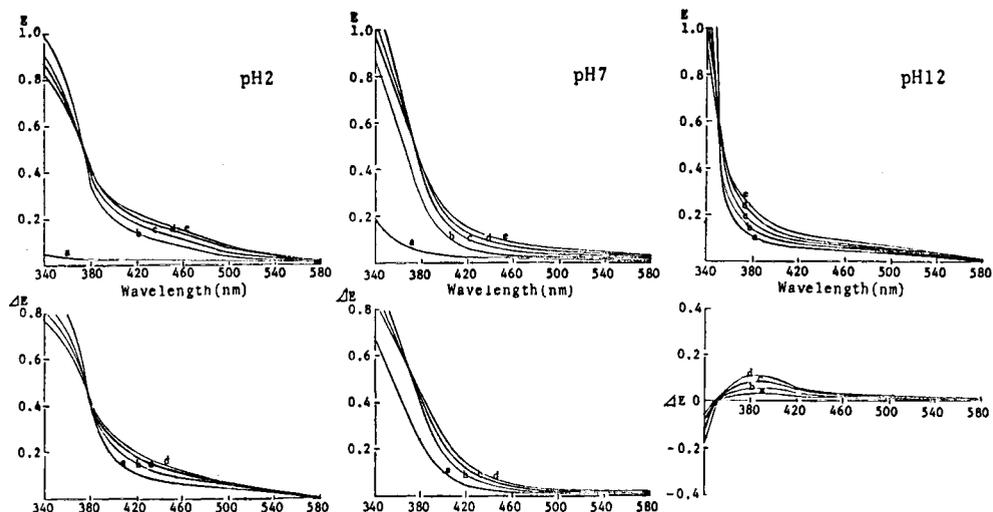


Fig. 6 Visible Absorption Spectra and their Variations of the Reaction Mixture of TR and Cysteine. The reaction mixture of 25 mM TR and equimolar Cys was heated at 90°C for 4hr. E-a: 0 min; b: 60 min; c: 120 min; d: 180 min; e: 240 min; ΔE -a: 60 min; b: 120 min; c: 180 min; d: 240 min.

度の増加はみられなかった。他方、pH 12での反応においては 380 nm を中心として吸光度が増加した。

2) TR と NAC との反応

TR-NAC 系における UV スペクトルの変動は、Fig. 7 に示すように Cys 系と同様に TR に特徴的な吸光度の減少がみられた。pH 2 での反応の場合 230 nm と 300 nm 付近の吸光度が増加したが、pH 7 と pH 12 の場合にはこの波長での吸光度増加は認

められなかった。

一方、反応液の可視吸収スペクトルは Fig. 8 に示すように Cys 系とは異なり、pH 2 および 7 での反応においては反応の経過とともに 340 nm から 580 nm 付近にかけて吸光度が増加した。特に pH 2 における短波長側の吸光度の増加は顕著であった。一方、pH 12 では 350 nm 以下の短波長側で反応時間の経過とともに減少したが、380 nm を中心として徐々に増

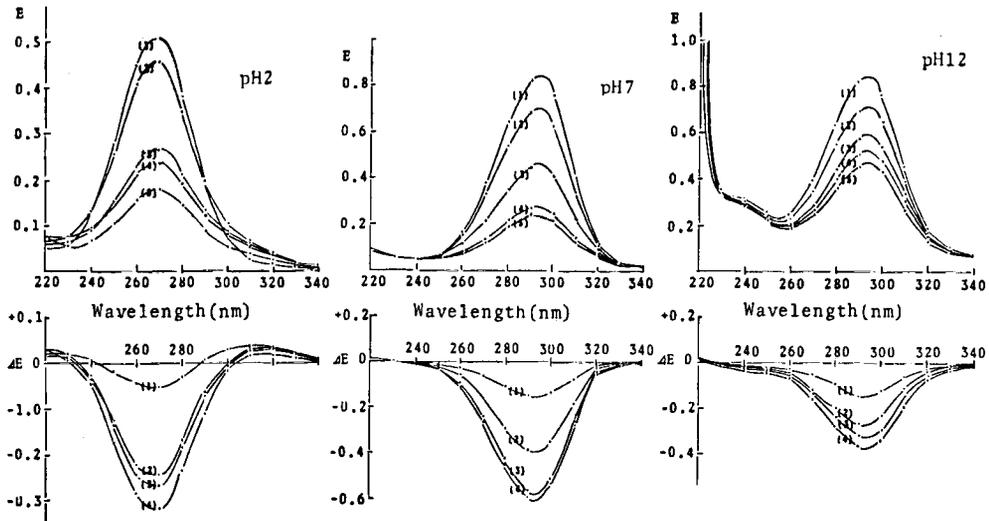


Fig. 7 UV absorption Spectra and their Variations of the Reaction Mixture of TR and N-Acetyl-L-Cysteine The experimental conditions were the same as in Fig. 5.

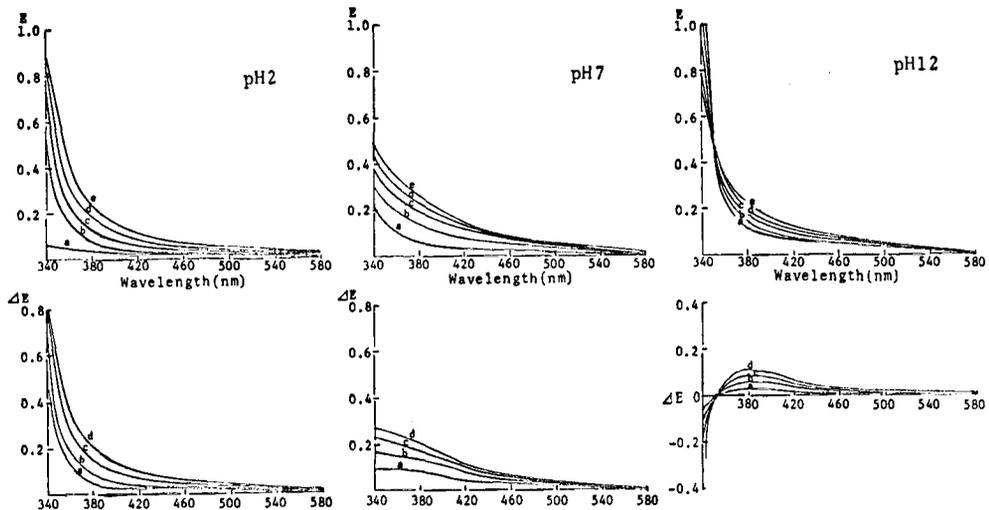


Fig. 8. Visible Absorption Spectra and their Variations of the Reaction Mixture of TR and N-Acetyl-L-Cysteine. The experimental conditions were the same as in Fig. 6.

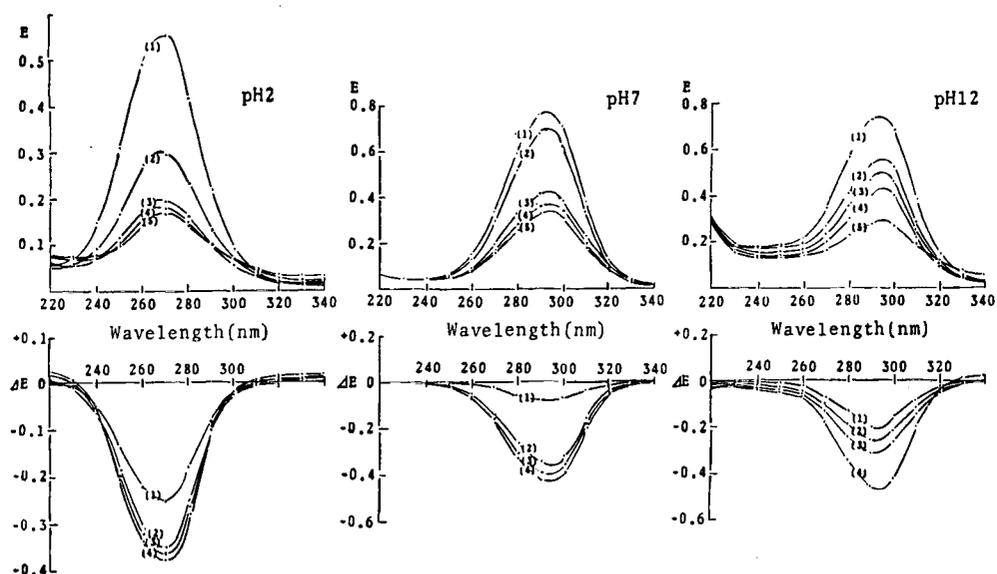


Fig. 9 UV Absorption Spectra and their Variations of the Reaction Mixture of TR and Sodium Thioglycollate. The experimental conditions were the same as in Fig. 5.

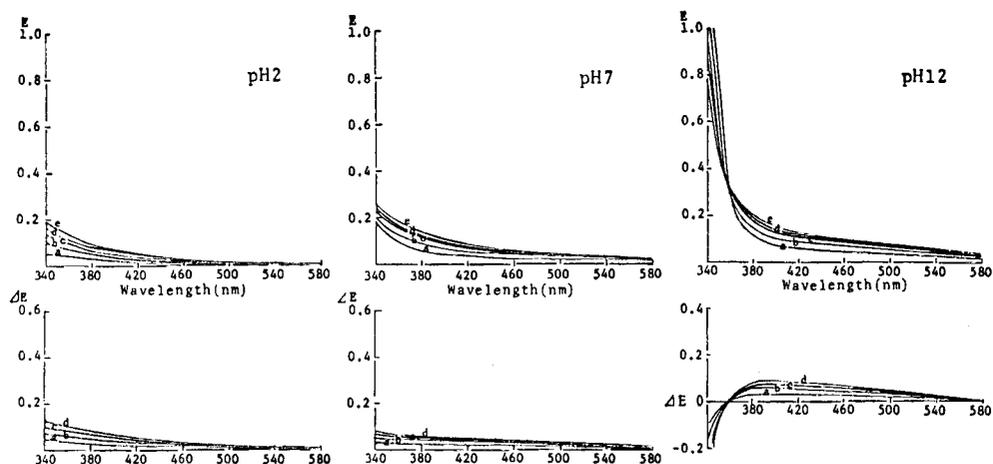


Fig. 10 Visible Absorption Spectra and their Variations of the Reaction Mixture of TR and Sodium Thioglycollate. The experimental conditions were the same as in Fig. 6.

加した。このようにアミノ基がアセチル基で保護された NAC と TR との反応において UV および可視スペクトルの変動がみられ、TR が SH 基とも反応することが確かめられた。

3) TR と STG との反応

TR-STG 系の UV 吸収スペクトルおよびその吸光度の変動は、上記の NAC 系とほぼ同様なパターンを示した (Fig. 9)。pH 2 の場合、230 nm と 310 nm 付近の吸光度がわずかに増加したが、pH 7 と pH 12

の場合、この波長での吸光度の増加は認められなかった。一方、反応液の可視吸収スペクトル (Fig. 10) は 340 nm から 580 nm にかけての吸光度の増加はわずかなものであった。pH 12 の場合、360 nm 以下での波長においては反応時間の延長とともに吸光度が減少したが、それ以上の波長では増加する傾向がみられた。このように TR と SH 化合物との反応においてそれらの UV および可視スペクトルに変動が認められ、TR が SH 化合物と反応することが確かめら

れた。

3. 反応液の薄層クロマトグラフィー

TR とチオール化合物との反応によって UV および可視吸収スペクトルの変動が認められ、種々の中間体が生じたことが推定された。そこでこれらの反応液の薄層クロマトグラフィーを行い、中間体生成の有無を検討した。Fig. 11 は pH 2 における TR と種々の SH 化合物との 1:1 液を 90°C 4 時間加熱後シリカゲル薄層クロマトグラフィーを行った結果を示す。TR と Cys, NAC, PSH, GSH との反応系において、出発物質とは異なる Rf 値をもつインドフェノール還元性および塩化パラジウム陽性の新たなスポットが検出された。また Cys 系では 2 種類の中間体が生成されることが認められた。

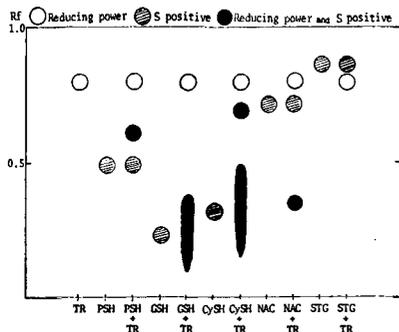


Fig. 11 Thin Layer Chromatogram of the Reaction Mixture of TR and Thiol Compounds. The reaction mixtures of 25 mM TR and equimolar thiol compounds were heated at 90°C for 4hr in 0.1N HCl-KCl (pH 2) and applied to silica gel thin layer chromatography with butanol: acetic acid: H₂O = 4:1:5 as solvent.

TR-PSH, -GSH および -Cys 系における生成物は TR とそれら分子内アミノ基との反応生成物であることも予想されるが、TR-NAC 系においても S 含有で還元性を示す生成物が検出されたことは、TR が SH 基と反応し、S 含有レダクトンを生成したことを推定させる。

以上のことから、TR はアミノ化合物のほかチオール化合物とも反応し、その中間生成物として還元性で S 含有化合物 (一種のチオールレダクトン) を生成することが推定された。しかし TR とチオール基との反応による褐変化は低いものであった。

要 約

TR と種々の SH 化合物との反応性を pH 2, 7 お

よび 12 において 90°C の加熱下で検討した結果、褐変はアミノ基とチオール基を含有する PSH, GSH, Cys との反応系において特に、酸性 (pH 2) で最も顕著におこり、中性 (pH 7), アルカリ性 (pH 12) においては低い着色がみられた。また、TR と Cys の誘導体でアミノ基がアセチル化された NAC 系あるいは STG 系の褐変度はいずれの pH においても TR 単独の場合よりも高く、TR が SH 基と反応することが示唆された。また、TR とチオール化合物との 1:1 (25 mM:25 mM) 反応系は特に pH 2 において 1:2 (25 mM:50 mM) 反応系より高い褐変がみられたが、中性、アルカリ性ではほぼ同程度であった。各 pH での反応液の UV 吸収スペクトルの変動を求めた結果、pH 2 においては 270 nm を、pH 7 と pH 12 においてはともに 295 nm を中心に反応の経過に伴い吸光度が著しく減少した。また、生成物の形成を示唆する吸光度の増加が特に酸性溶液下で 230 nm と 310 nm 付近にみられた。一方、可視吸収スペクトルの変動は特に短波長領域において著しい吸光度の増加がみられた。この吸光度の増加は酸性側と中性側での反応において顕著であり、また反応時間に応じ比例した。反応液中に中間体生成とみられるインドフェノール還元性でかつ塩化パラジウム陽性のスポットが TR と PSH, GSH, Cys および NAC との反応において検出された。

文 献

- Euler, H., H. Hasselquist and D. Nomura 1960 Beobachtungen über Pyridin- und Chinolin-N-Oxyde und Triose-Reduction-Derivate derselben. *Arkiv. Kem.*, 15: 283-289
- 李 鎮夏・篠原和毅・村上浩紀・大村浩久 1978 Triose Reductone と核酸関連化合物との反応. *農化*, 52: 11-17
- 野村男次 1961 レダクトンに関する研究 (第3報) Triose Reductone と 2, 3 の芳香族アミンとの反応. *農化*, 35: 444-446
- 野村男次・三東崇昇 1964 レダクトンに関する研究 (第8報) トリオースレダクトンとスルホンアミドの反応生成物. *農化*, 38: 306-308
- 野村男次・大村浩久 1969 レダクトンの化学. 内田老鶴園新社, 東京, 1-2 頁
- 大村浩久・内田 泰・尊田民喜 1967 剥皮リンゴ切片の可視部における反射ならびに吸収スペクトル. *九大農学芸誌*, 23: 33-42
- 大村浩久・藤田明男・佐藤雅子・大槻 実・飯尾雅嘉 1974 トリオースレダクトンと数種含窒素化合物との反応. *九大農学芸誌*, 28: 79-92
- 篠原和毅・曾 耀崑・井上 謙・佐藤雅子・大村浩久

1974 a トリオースレダクトンとアミノ酸との反応による褐変. 九大農学芸誌, 28: 139-144
篠原和毅・曾 耀崑・大村浩久 1974 b トリオースレダクトンとアミノ酸との反応による吸収スペク

トルの変動. 九大農学芸誌, 29: 15-21
篠原和毅・曾 耀崑・内野文弘・大村浩久 1975 トリオースレダクトンとトリプトファンとの縮合物. 農化, 49: 463-468

Summary

The mixtures of triose reductone (TR) and several thiol-containing compounds were heated at 90°C for 4hr and the browning intensity and variation of UV and visible absorption spectra of the reaction mixture measured.

The reaction of TR with cysteine (Cys), penicillamine (PSH) or glutathione (GSH) at pH 2 caused a marked browning, probably based on the reaction of TR with amino groups in their molecules. The browning intensity of the reaction mixture of TR and N-acetyl-L-cysteine (NAC) or sodium thioglycollate (STG) was higher than that of TR, suggesting that TR can react with SH groups. The 1:1 reaction system of TR and thiol-containing compounds caused higher browning than the 1:2 reaction system. With the reaction advanced, the UV absorption characteristic of TR decreased in all reaction systems. The increase in the absorption at near 230 and 310 nm and at the wavelength range of 340 to 460 nm, implying the formation of intermediate product, was also observed. Furthermore, the spots which are positive for 2,6-dichlorophenol indophenol and palladium chloride were detected thin-layer-chromatographically in the reactions of TR with PSH, GSH, Cys and NAC. These results suggest that TR reacts with SH groups of thiol-containing compounds to produce the thiol reductions as intermediates.