

食品の変色とスペクトルとの関係（XII）：カテコールおよびピロガロールの自動酸化におけるESRスペクトル

尊田，民喜
九州大学農学部食糧化学教室

浅田，要一郎
日本冷蔵株式会社

稲富，良文
麒麟ビール株式会社

大村，浩久
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/23206>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 30 (3), pp.109-113, 1975-11. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



食品の変色とスペクトルとの関係 (XII)

カテコールおよびピロガロールの自動酸化に
おける ESR スペクトル

尊 田 民 喜・浅 田 要一郎¹⁾

稲 富 良 文²⁾・大 村 浩 久

九州大学農学部食糧化学教室

(1975 年 5 月 20 日 受理)

Relationship between Change of Color of Foods and Spectra (XII)

ESR Spectra in the Course of the Autoxidation
of Catechol and Pyrogallol

TAMIYOSHI SONDA, YOICHIRO ASADA, YOSHIFUMI INATOMI
and HIROHISA OMURA

Food Chemistry Institute, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

われわれは、カテコール、ピロガロール、クロロゲン酸などを代表的な基質とするリンゴ酵素の褐変モデル系について、色素形成過程を解明するために吸収スペクトルや生成色素などを検討してきた(大村・尊田, 1970; 大村ら, 1971; 尊田・大村, 1973)。

食品の酵素的褐変は、基質ポリフェノール類がまず酵素ポリフェノールオキシダーゼにより酸化されてキノンを生じ、これがアミノ酸などと共重合を起してメラノイジンを生ずることによると考えられている。色素の形成過程は極めて複雑であって未だほとんど解明されておらず、研究は酵素的酸化の段階、しかも酵素の特性を検討するにとどまり、酸化機構すら明らかにされていない。

ポリフェノール類を酸化すると、反応条件によって炭素・炭素、炭素・酸素あるいは炭素・窒素間などで縮合が起こる。この酸化過程における最初の中間体としてフェノキシラジカルの生成が推定される。これは最近磁化率の測定、あるいは電子スピン (ESR) スペクトルによって完全に証明されるようになった。すなわち、不対電子をもつフェノキシラジカルは電

子のスピンにより常磁性を示すため、磁化率の測定でその存在を証明することができる。しかし、磁化率の測定は比較的に安定なフリーラジカルが高濃度にある場合にのみ可能である。そのため最近では専ら ESR 法によっている。この方法では、安定なフェノキシラジカルはもちろん、寿命の短い不安定なフリーラジカルあるいは低濃度の場合でも検知される。さらに ESR スペクトルのシグナルの超微細構造 (hyperfine structure; hfs) を解析することにより、フリーラジカルの構造ならびにラジカル分子内の種々の位置でのスピン密度も求めることができる。

酵素ポリフェノールオキシダーゼでポリフェノール類を酸化する場合は 2 電子酸化反応であるので ESR スペクトルを測定することはできないといわれている (Yamazaki, 1971)。しかしこの酸化反応は極めて速やかであるために中間体の捕捉がむずかしく、外見上 2 電子反応と考えられる可能性もある。事実、ポリフェノールオキシダーゼと類似の銅酵素であるアスコルビン酸オキシダーゼによるアスコルビン酸の酸化においては、アスコルビン酸のフリーラジカルを生ずる

¹⁾ 現在 日本冷蔵株式会社

²⁾ 現在 キリンビール株式会社

ことが ESR スペクトルで検出されている (Hamilton, 1969). さらに尊田ら (1975) はリンゴ酵素・カテコール褐変系の透析性ならびに非透析性画分にフリーラジカルが存在することを認めている. そこで酵素的褐変反応のモデル実験として, ポリフェノール類のうちまずカテコールおよびピロガロールをアルカリで酸化させて ESR スペクトルを求め, 酸化機構の解析に資した.

実験方法

ESR スペクトルの測定には ESR 装置を用い, 23°C の恒温実験室で静止法および流動法により行なった. 装置は日本電子 JES-ME-IX 型である [磁場変調周波数: 100 KC; マイクロ波周波数帯: X バンド; マイクロ波検波: クリスタル; 円筒型空洞共振器: TE₀₁₁モード (JES-UCX-2 型); 可聴波検波: 位相検波; 記録計使用].

(a) 静止法 カテコールまたはピロガロール 20 mg を氷冷した溶媒 5 ml に溶かし, この溶液 1 ml に 0.1 N 水酸化ナトリウムを 1 ml 容ピペットから 1 滴加えて混合し, 直ちに測定セルに入れて ESR スペクトルを測定した. この場合, アルカリを混合してから測定開始までに 3~4 分を要した. できるだけ理論的なものに近い hfs を求めるためには測定条件の設定が問題であるので, 試料および溶媒によって測定条件を変えた. カテコールに対しては, 応答 0.3 秒, マイクロ波出力 8.0 mW, 磁場変調幅 0.5 ガウス, 磁場掃引幅 ± 10 ガウス, 磁場掃引時間 1 分とし, 一方ピロガロールに対しては, 応答 1 秒, マイクロ波出力 8.0 mW, 磁場変調幅 6.3 ガウス, 磁場掃引幅 ± 50 ガウス, 磁場掃引時間 50 秒とした. また利得もこれらの条件および溶媒に応じて適宜に適切な値を定めた.

(b) 流動法 自製の丸型流通混合装置 (Fig. 1) を用い, 試料 200 mg を水 100 ml に溶かした溶液と 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液とを混合しながら ESR スペクトルを測定した. 測定条件はいずれも応答 0.3 秒, マイクロ波出力 4.0 mW, 磁場変調幅 0.1 ガウス, 磁場掃引幅 ± 10 ガウスとしたが, 磁場掃引時間はカテコール 1 分, ピロガロール 5 分とし, さらに利得も溶媒に応じて選択した.

結果および考察

1. カテコール

静止法により測定したカテコールの ESR スペクトルを Fig. 2 に示す. A は水, B は 99.5% エチルア

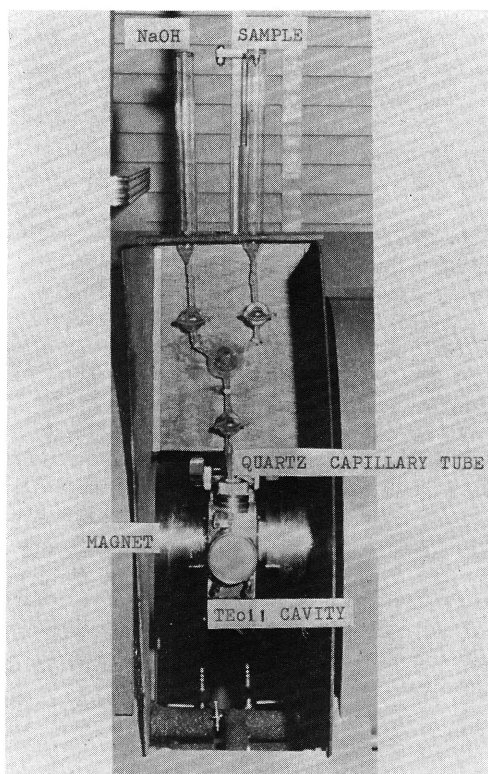


Fig. 1. Order-made attachment for the flow method.

ルコールを溶媒としたものであって, 測定に際し利得は前者で 3.2×1000 , 後者で 6.3×100 とした.

すでに Hewgill ら (1964) はアルカリ性溶媒中におけるカテコール自動酸化において, 9 本のシグナルをもつ *o*-ベンゾセミキノン陰イオンラジカルの ESR スペクトルを測定し, その結合定数は, 溶媒がエチルアルコールの場合 0.95 および 3.65 ガウス, ジメチルホルムアミドの場合 1.16 および 3.55 ガウスであることを示した. 溶媒が水の場合, 誘電率 ($\epsilon = 78.39$, 25°C) が高いので測定条件の設定が極めて困難であったが, Fig. 2-A のように一応 *o*-ベンゾセミキノン陰イオンラジカルの ESR スペクトルが求められた. それに対して溶媒がエチルアルコールの場合は, Fig. 2-B のように水の場合よりも理論的に近い hfs が観察された. これはエチルアルコールの誘電率 ($\epsilon = 24.55$, 25°C) が水のものよりも低いことに基づくものと考えられるが, さらにこの反応がエチルアルコールのような有機溶媒と水とからなる 2 相反応であって, 生じたフリーラジカルを有するカテコールの酸化生成物と水相の水酸化ナトリウムとの接触がある程度妨げ

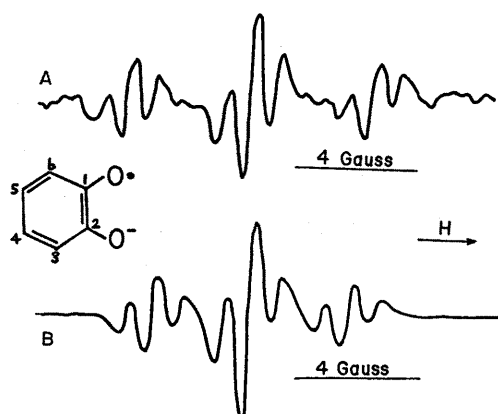


Fig. 2. ESR spectra of oxidized catechol recorded by the static method with an ESR spectrometer, model JES-ME-IX. Into 1 ml 0.4% catechol, 1 drop of 0.1N NaOH was added and ESR spectrum was recorded under the conditions of temperature 23°C, response 0.3 sec., power 8 mW, modulation width 0.5 gauss, sweep width ± 10 gauss and sweep time 1 min. A: solvent H_2O , gain 3.2×1000 ; B: solvent ethyl alcohol, gain 6.3×100 .

られて2次的な酸化を受けにくくなり、反応が緩慢であることも考えられる。

一方フリーラジカルが低濃度ないし短寿命で不安定な場合でも流動法を用いると生成したフリーラジカルを定常的に測定できる。誘電率の異なる水, N, N-ジメチルホルムアミド ($\epsilon = 36.71$, 25°C), メチルアルコール ($\epsilon = 32.70$, 25°C) およびエチルアルコールなどの溶媒を用い、流動法により測定した ESR スペクトルを Fig. 3 に示す。この場合測定に設定した利得はそれぞれ 3.2×100 , 1.2×100 , 2.0×100 および 2.0×100 である。

流動法では、Fig. 3 に示すように、有機溶媒だけでなく誘電率の高い水を溶媒に用いた場合でも、極めて明瞭な hfs が求められた。すなわち9本のシグナルが検出され、しかもその吸収強度比は $1:2:1:2:4:2:1:2:1$ であり、結合定数は 0.76 および 3.64 ガウスであった。他の溶媒でも類似の ESR スペクトルが求められ、流動法が静止法よりもすぐれていることは明らかである。これら4種の溶媒における hfs ではむしろ水の場合が最も理論的であるように思われる。なお結合定数にもほとんど差はなく、N, N-ジメチルホルムアミドで 0.84~0.96 および 3.46~3.68 ガウス、メチルアルコール 0.84 および 3.60 ガウス、エチルアルコール 0.84~0.86 および 3.64 ガウスであった。

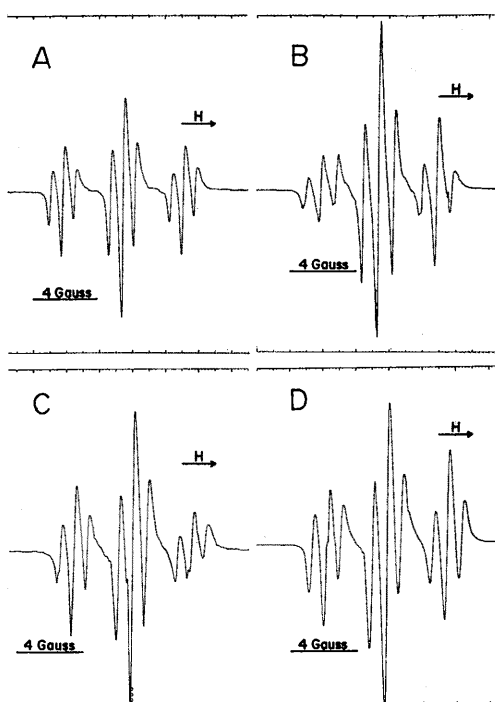


Fig. 3. ESR spectra of oxidized catechol recorded by the flow method. By mixing 0.2% catechol solution with 0.1N NaOH in the order-made attachment, ESR spectrum was recorded under the conditions of temperature 23°C, response 0.3 sec., power 4 mW, modulation width 0.1 gauss, sweep width ± 10 gauss, and sweep time 1 min. A: solvent H_2O , gain 3.2×100 ; B: solvent N, N-dimethylformamide, gain 1.2×100 ; C: solvent methyl alcohol, gain 2.0×100 ; D: solvent ethyl alcohol, gain 2.0×100 .

スであった。このような hfs は別に報告するように、まずベンゼン核の4と5に付いた水素原子によって $1:2:1$ に分裂し、それらは3および6における水素原子によってさらに $1:2:1$ に分裂して示されることが推定される(尊田・大村, 1975)。

2. ピロガロール

ピロガロールは最も簡単なトリフェノール化合物であって同じく褐変に関与する。強力な有機還元剤であって、アルカリ溶液中では急激に酸素を吸収し濃褐色になる。プルプロガリンなど若干の生成物は知られているが、ピロガロールの酸化反応については未解決の問題が残されている。

まず静止法によってピロガロールの酸化物の ESR スペクトルを測定した。測定は極めて困難であったが、種々検討の結果、溶媒にエチルアルコールを用い

た場合にのみ、利得 3.2×1000 で Fig. 4 に示すような結合定数 5.0 ガウスの二重項シグナルを持った hfs が得られるに過ぎなかった。

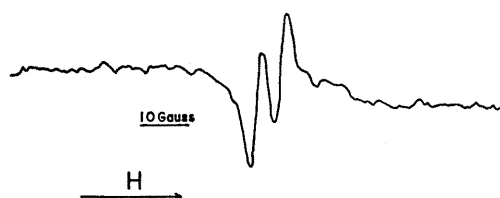


Fig. 4. ESR spectrum of oxidized pyrogallol recorded by the static method employing the same method as in Fig. 2, but under the conditions of temperature 23°C , response 1 sec., power 8 mW, modulation width 6.3 gauss, sweep width ± 50 gauss, sweep time 50 sec. and gain 3.2×1000 using ethyl alcohol as solvent.

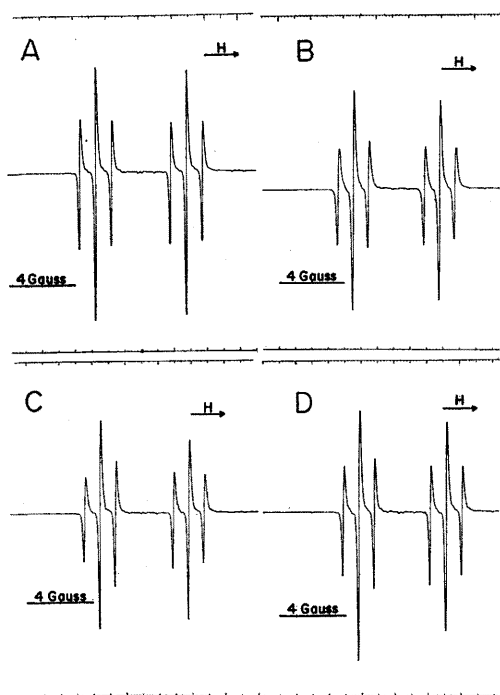
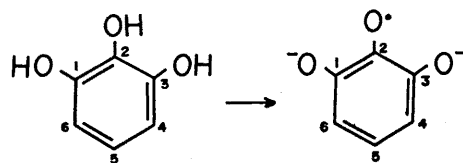


Fig. 5. ESR spectra of oxidized pyrogallol recorded by the flow method employing the same method as in Fig. 3, except with sweep time 5 min. A: solvent H_2O , gain 1.2×100 ; B: solvent N,N-dimethylformamide, gain 1.0×100 ; C: solvent methyl alcohol, gain 2.0×100 ; D: solvent ethyl alcohol, gain 1.4×100 .

ピロガロールの酸化は速やかに起るので、静止法によっては、水はもちろんその他の有機溶媒でも二重項

シグナルの検出さえかなり難しい。これに対して流動法によっては、Fig. 5 に示すように水 (A), N,N-ジメチルホルムアミド (B), メチルアルコール (C), エチルアルコール (D), いずれの溶媒においても 2 組の吸収強度比 1:2:1 の三重項シグナルよりなる明瞭な ESR スペクトルが求められた。各溶媒について、利得は水 1.2×100 , N,N-ジメチルホルムアミド 1.0×100 , メチルアルコール 2.0×100 , エチルアルコール 1.4×100 として測定したが、結合定数はそれぞれ水 1.00, 5.50 ガウス, N,N-ジメチルホルムアミド 0.96, 5.26 ガウス, メチルアルコール 0.96, 5.40 ガウス, エチルアルコール 0.96, 5.76 ガウスであって大きい相異はなかった。

こうしてピロガロールの酸化物については, Hoskins and Loy (1956) と同様に、2 組の三重項シグナルよりなる hfs が求められた。ピロガロールの 4, 5 および 6 位のうち 5 位で最も電子密度が高く、4 位と 6 位とは同じであるので (品川, 1972), カテコールと同様に電子密度の高いところから、すなわち 5 位の水素原子によりまず吸収強度比 1:1, 結合定数約 5.5 ガウスの二重項シグナルを生じ、ついで等価な 4 位と 6 位の水素原子によりそれらはそれぞれ 1:2:1, 結合定数 0.96 ガウスに分裂し hfs を示したものと推定される。静止法により求められた hfs は結合定数 5.0 の二重項シグナルをもち、上述のように 5 位の水素原子により初めに分裂したものを示していると考えられる。このような経過はカテコールの場合に類似し、したがってピロガロールの自動酸化においてもピロガロールのセミキノン陰イオンラジカルを生ずるものと思われる。



要 約

アルカリ性溶媒中における自動酸化により生じたカテコールおよびピロガロール酸化物の ESR スペクトルを静止法および流動法により測定した。

カテコールの酸化においては、静止法により、溶媒が水の場合も一応 9 本のシグナルを持つ hfs が求められたが、誘電率の低いエチルアルコールではさらに理論的に近い hfs が観察された。これに対して流動

法では、エチルアルコール、メチルアルコール、N, N-ジメチルホルムアミドはもちろん水を溶媒にした場合も明瞭な理論的 hfs, すなわち吸収強度比 1:2:1:2:4:2:1:2:1 からなり、結合定数 3.6 ガウスおよび 0.8 ガウスの *o*-ベンゾセミキノン陰イオンラジカルの ESR スペクトルが測定された。

一方ピロガロール酸化物の ESR スペクトルの測定はとくに静止法によっては難しく、測定条件を種々検討の結果、溶媒をエチルアルコールにした場合、結合定数 5.0 ガウスの二重項シグナルを持つ hfs が求められた。しかし流動法によっては、上記 4 種の溶媒いずれの場合にも、これらのシグナルが結合定数 0.96 ガウスでさらに 1:2:1 にそれぞれ分裂した hfs, すなわち二組の三重項シグナルよりなる ESR スペクトルが求められた。

文 献

- Hamilton, G. A. 1969 Mechanisms of two- and four-electron oxidations catalysed by some metalloenzymes. *Adv. in Enzymology*, **32**: 55-96
- Hewgill, F. R., T. J. Stone and W. A. Waters 1964 Aryloxyradicals. Part II. Application of electron spin resonance in the elucidation of reaction mechanisms. *J. Chem. Soc.*, **1964**: 408-410
- Hoskins, R. H. and B. R. Loy 1956 Paramagnetic resonance in solutions of oxidized pyrogallol. *J. Chem. Phys.*, **23**: 2461-2462
- 大村浩久・尊田民喜 1970 食品の変色とスペクトルとの関係 (III) リンゴ酵素による褐変液の吸収スペクトル. *栄養と食糧*, **23**: 367-373
- 大村浩久・尊田民喜・井上浩輔 1971 食品の変色とスペクトルとの関係 (IV) リンゴ酵素-カテコール系による褐変に対する pH の影響. *栄養と食糧*, **24**: 242-248
- 品川泰子 1972 量子薬理学へのいとぐち (2). 化学の領域, **26**: 478-487
- 尊田民喜・大村浩久 1973 食品の変色とスペクトルとの関係 (VI) リンゴ褐変色素の吸収スペクトル. *栄養と食糧*, **26**: 531-537
- 尊田民喜・村中 誠・大村浩久 1975 食品の変色とスペクトルとの関係 (XI) リンゴ酵素褐変系の ESR スペクトル. *栄養と食糧*, **28** 印刷中
- 尊田民喜・大村浩久 1975 食品の変色とスペクトルとの関係 (XIII) カテコールの自動酸化における ESR スペクトルの時間的变化. *栄養と食糧*, **28** 印刷中
- Yamazaki, I. 1971 One-electron and two-electron transfer mechanisms in enzymic oxidation-reduction reaction. *Adv. in Biophys.*, **2**: 33-76

Summary

ESR spectra were recorded by the static or flow method in the course of the alkaline autooxidation of catechol and pyrogallol.

Although water or ethyl alcohol was used in the oxidation of catechol as solvent, ESR spectrum composed of 9 signals was recorded by the static method. However, by the flow method, the distinctive hfs of *o*-benzosemiquinone anion radical with the relative intensity of 1:2:1:2:4:2:1:2:1 was observed, even water, N,N-dimethylformamide, methyl alcohol or ethyl alcohol had been employed as the solvent. The ESR spectrum has the coupling constants about 3.6 gauss and 0.8 gauss.

On the other hand, in the oxidation of pyrogallol, ESR spectrum having 2 signals with the coupling constant 5.0 gauss was recorded by the static method only in ethyl alcohol as solvent. However, by the flow method, hfs of 2 groups of the triplet was observed. The ESR spectrum was presumed to be formed by tripling (1:2:1) of each signal with the coupling constant of 0.96 gauss.