リノール酸の自動酸化に対する インドール化合物の抗酸化作用

Antioxidative Action of Indole Compounds during the Autoxidation of Linoleic Acid

(昭和41年5月1日受理)

満田久輝 安本教傳 岩見公和
(Hisateru Mitsuda) (Kyoden Yasumoto) (Kimikazu Iwami)

Antioxidative activity of aromatic amino acids and indole compounds for the autoxidation of linoleic acid was found to correlate in some extent with the highest occupied molecular orbital energy which represents the electron donor property of respective molecule. 5-Hydroxytryptophan, one of the best electron donor among the compounds tested, was the most effective antioxidant. However, antioxidative activity of some indole compounds could not be interpreted simply by their highest molecular orbital energies.

Neither the chelating action for the possible metal traces nor the accelerated decomposition of hydroperoxide produced during the course of the reaction explained these actions of indoles. Tryptophan, while preventing the autoxidation of linoleic acid, underwent the ring cleavage at the position of between C₂ and C₃ or hydroxylation at C₃ to yield formylkynurenine, kynurenine, 3-hydroxykynurenine, 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindoleacetic acid, etc. Following mechanisms which were compatible with the experimental results were proposed for the antioxidative action of indoles; indole donates an electron from its π -pool to linoleic acid radical or peroxy radical produced during the autoxidation of linoleic acid to form a loose charge transfer complex through a "local" interaction; an electron transfer occurs within the complex, which brings cleavage of indole rings and an inhibition of autoxidation.

多くの食品は材料あるいは加工程度のいかにかわら
ず多少の遊離アミノ酸を含み、その種類や含量が当該
食品の食味のみならず加工または貯蔵中の酸化的劣化の
難易と関係があるように思われる。ある種のアミノ酸は
適当な条件下では不飽和脂肪酸の自動酸化を防止するの
に有効であることが知られている¹⁾²⁾。先に著者ら³⁾は生
乳や粉乳に一定量の tryptophan あるいは histidine を
添加すると酸化臭の発生が防止されることを報告した。
抗酸化剤の作用が電子供与能と直接関係があるならば、
利用しうる多種類のアミノ酸のうち芳香族アミノ酸およ
びその関連化合物に高い抗酸化能が期待される。アミノ
酸は食品の食味改善あるいは栄養補強に利用されることが
あるが、さらにそれらの抗酸化能を意識的に利用して
食品の品質向上に役立てるためには、その作用機構の解
明が前提となる。本研究はリノール酸の自動酸化におけ
る tryptophan などインドール化合物の抗酸化能を比較
し、その機構を明らかにせんとしたものである。

実験方法

I. 材料

リノール酸(純度98%以上)は Fulka A.G. から購入
したもの、他の試薬は市販特級品を用いた。リノール酸
0.8413 g を 30 ml エタノールに溶解し 0.1 M リン酸緩衝
液 (pH 7.0) にて 150 ml に希釈して 2×10^{-2} M 濃度
としたもの、または pH 依存性検討に対して 10^{-1} M リ
ノール酸・アルコール溶液を原液とした。リポオキシダ
ーゼは低温脱脂大豆の抽出液より精製結晶化⁴⁾、0.02
%に溶解して使用した。

II. リノール酸の自動酸化

2×10^{-2} M のリノール酸原液 10 ml, 添加物 2 ml, 緩衝
液 8 ml の混合液または 10^{-1} M リノール酸 0.5 ml, 添加
物 0.5 ml, 緩衝液 4 ml の混合液を 38°C の孵卵器内に
放置した。なお盲検は冷蔵庫内に保存した。特記しない
限り、添加物の最終濃度は 10^{-3} M である。

III. 測定法

各種添加物の抗酸化能は次の 4 法を併用して測定した。

(1) ポーログラフ法：リポオキシダーゼの作用によって吸収される酸素量をクラーク酸素電極を用いて測定し、残存リノール酸量を算出するものである。試料液 0.09 ml に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 2.81 ml を加えたものに、25°C に酵素液 0.1 ml を添加して反応を開始せしめた。

(2) TBA 法：脂肪酸の酸化に基づく食品の風味悪変の程度と関係のある TBA 値は Ottolenghi の方法⁵⁾によった。

(3) ロダン鉄法：生成された過酸化物量を測定するもので、Stine ら⁶⁾、Koch ら⁷⁾の方法を次のように改良した。試料液 0.1 ml に 75% エタノール 4.7 ml, 30% ロダンアンモニウム 0.1 ml, 2×10^{-2} M 塩化第一鉄の 3.5% 塩酸溶液 0.1 ml を加え、正確に 3 分後に 500 m μ における吸光度を測定した。

(4) DPPH 法：当該物質の電子供与能を調べるものである。Blois の方法⁸⁾を参考にし、 10^{-2} M 被測定物質溶液 0.5 ml に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 2.0 ml, 99% エタノール 1.5 ml, 5×10^{-4} M DPPH (2,2-diphenyl 1-picryl hydrazyl) アルコール溶液 1.0 ml を加え、525 m μ における吸光度の減少を測定した。

IV. Tryptophan の分解

分解産物の同定はペーパークロマトグラフ法によった。東洋ロ紙 No. 50 を支持体として n-ブタノール・水酢酸・水 (4:1:5) からなる溶媒で展開し、365 m μ の励起光照射時の蛍光を観察、あるいはニンヒドリン試薬 (1% ブタノール溶液)、エーリッヒ試薬 [エタノール・塩酸 (95:5) 混液に DMAB (*p*-dimethyl aminobenzaldehyde) を 2% 溶解したもの] で発色させた。

分解に伴い発生するアンモニアの定量には微量拡散分析法⁹⁾、インドール核を持つ化合物の比色定量には DMAB 法¹⁰⁾を用いた。

結果と考察

Fig. 1-(a), (b), (c) はリノール酸の自動酸化に対する tryptophan およびその関連インドール化合物の効果を調べたものである。5-OH tryptophan (5 Hydroxytryptophan) の抗酸化能は特に著しく、tryptophan, N-ethyltryptophan, N-chloroacetyltryptophan もそれについて良好な効果を示したが、indole, carbazole, IAA (indoleacetic acid) は極めて微弱な効果を示すにすぎなかった。5-OH tryptophan を除くすべてのトリプトファン誘導体の抗酸化能は実験条件下では tryptophan より劣っていた。Fig. 1-(a), (b), (c) を比較すれば明らかなごとく、リノール酸が分解するにつれて過酸化物価

Fig. 1. Antioxidative Action of Indole Compounds for the Autoxidation of Linoleic Acid.

The mixture of 10^{-2} M linoleic acid and 10^{-3} M addition in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.0 was incubated at 38°C for indicated time. Antioxidative activity was measured by; (a) polarographic-, (b) TBA-, and (c) ferric thiocyanate-method, respectively.

がまず極大値に達し、TBA 値がその後極大となる。このことはリノール酸の過酸化物が TBA 陽性物質へ変化する反応が比較的緩慢であることを意味し、TBA 値あるいは過酸化物価のみを指標として抗酸化能を検討する

Fig. 2. Antioxidative Action of Some Amino Acids. Experimental conditions were same as in Fig. 1 except for the concentration of 5-hydroxytryptophan.

Fig. 3. Electron Donating Ability of Indole Compounds to DPPH.

The reaction mixture of which composition was described in experimentals was kept at 12°C to allow the reaction proceed.

ことの危険性を示している。

各種濃度の 5-OH tryptophan, 4 種の芳香族アミノ酸, nordihydroguaiaretic acid, ascorbic acid 等の抗酸化能を比較検討したのが Fig. 2 である。5-OH tryptophan は低濃度でも著しい効果を示した。5-OH tryptophan は神経作用性物質セロトニンの前駆体であるが¹¹⁾, セロトニン類似の生理作用は示さず, その誘導体が広く動植物界に見出されるものである。

これら化合物の抗酸化作用の機作として遷移金属イオンのキレート化や過酸化物を分解しその定常濃度を減少せしめる可能性が考えられるが, 実験系に金属の混入が考えられないことおよび化合物単独または金属 (Cu⁺⁺) との共存下でも過酸化物の分解を促進あるいは遅延しえ

Fig. 4. pH Dependence of Antioxidative Action of Some Aromatic Amino Acids.

The reaction mixture of the composition as described in Fig. 1 but varied pH values was incubated for 3 days. Remained linoleic acid was determined by polarographic method.

なかった。これらのことから別の機作によることが明らかである。

安定なラジカルである DPPH は電子または水素原子を供給されてその特色ある紫色を失うが, その褪色度により被検物質の電子供与能をある程度推察することができる⁹⁾。Fig. 3 は各種インドール化合物の DPPH 反応性をみたものである。5-OH tryptophan, IAA, 2-methyl indole は有効な電子供与体となりうるが示されている。Carbazole, isatin は DPPH と殆んど反応しない。

各種フェノール化合物の抗酸化能は H. O. エネルギー (最高被占準位分子軌道エネルギー) と関係あるとされており¹²⁾, 芳香族アミノ酸および主なインドール化合物の H. O. エネルギー単位は¹³⁾¹⁴⁾, tryptophan 0.534, histidine 0.660, tyrosine 0.792, phenylalanine 0.908, indole 0.534, carbazole 0.537, IAA 0.479, 5-OH tryptophan 0.461 のごとくである。4 種の芳香族アミノ酸については Fig. 2 に示すごとく, リノール酸の自動酸化をよく防止するものほど明らかに H. O. エネルギーの低い傾向が認められ, 主なインドール化合物では 5-OH tryptophan が最も強力な抗酸化能を有することが理解できる。しかし IAA は H. O. エネルギーおよび DPPH との反応性 (Fig. 3) から 5-OH tryptophan に近い抗酸化能を有するものと考えられるにもかかわらず, Fig. 1 のように微弱な効果しか示さなかった。Indole, tryptophan, carbazole はそれらの H. O. エネルギーから, はば同程度の抗酸化能が期待されるが, Fig. 1, 3 からも明らかなごとく H. O. エネルギーとリノ

Table 1. Tryptophan Degradation Accompanied by the Autoxidation of Linoleic Acid.

The reaction mixture of 10^{-3} M tryptophan and 10^{-3} M linoleic acid in 0.1 M borate buffer of pH 9.0 was incubated at 38°C for one week, and then analyzed by paper chromatography.

Rf value	Reaction with			Assigned as
	Ninhydrin	Ehrlich reagent	Fluorescence	
0.96		+ (yellow)	+	Indole
0.77		+ (yellow)		(5-Hydroxyindoleacetic acid)
0.49	+	+ (orange)	+ (blue)	Tryptophan
0.41	+ (violet)		+ (blue)	Kynurenine
0.32	+ (violet)		+	(7-Hydroxytryptophan)
0.27	+ (yellow)			3-Hydroxykynurenine
0.22	+ (blue)		+	Formylkynurenine
0.16	+	(+)	+	(5-Hydroxytryptophan)

Fig. 5. Decomposition of Tryptophan Accompanied by the Autoxidation of Linoleic Acid. The mixture of 10^{-3} M linoleic acid and 10^{-3} M tryptophan in 0.1 M borate buffer of pH 9.0 was incubated at 38°C in the dark. The amounts of indole nucleus remained and ammonia liberated were determined and expressed as μ moles per each ml.

ール酸自動酸化に対する抗酸化能あるいはDPPH分解能との間に相関係を見出すことは困難である。以上の結果、インドール化合物の抗酸化能が分子軌道のエネルギー準位のみに依存するのではなく、構造上の要因によることは明らかである。

芳香族アミノ酸および 5-OH tryptophan の抗酸化能を種々の pH で検討したところ Fig. 4 の結果を得た。4 種のアミノ酸とも酸性側になるほど抗酸化能の低下がみられた。5-OH tryptophan は pH 6~10 の範囲で殆んど pH に依存しない秀れた効果を示した。アミノ酸の抗酸化能は溶媒の pH や組成に影響されるが、pH 依存性と各アミノ酸の極性基の解離状態とは直接の関係が認められない。

リノール酸と共存させると tryptophan の分解が早まることは、リノール酸の酸化が進むにつれてアンモニア

が発生し、インドール核を有する化合物量が減少する Fig. 5 の結果からも明らかである。リノール酸の自動酸化に際して生成した tryptophan の分解産物のペーパークロマトグラムは、主として Table 1 に示すようなスポットからなっていた。Formylkynurenine, kynurenine, 3-OH kynurenine, 5-OH tryptophan, 5-OH IAA など存在の推定された化合物はフェントン試薬¹⁵⁾¹⁶⁾、日光¹⁷⁾、X 線照射¹⁸⁾によって酸化したとき見出され、生体内代謝の中間体¹⁹⁾²⁰⁾としても認められるものである。このことはリノール酸の自動酸化に伴う tryptophan の分解が酵素的、非酵素的な反応と類似して $\text{C}_2\sim\text{C}_3$ 結合の開裂に始まるものであることを示唆している。5-OH tryptophan は Fig. 1, 2, 3, 4 でみたように高い抗酸化能を有しているので tryptophan の抗酸化能が tryptophan 分解中に一時生成する 5-OH tryptophan の影響をうけていることも考えられる。インドール化合物は一般に良好な電子供与体となり、適当な電子受容体と電荷移動型化合物を形成することができる。しかし carbazole などは H. O. エネルギーから予想される電子供与能に反して、強力な電子受容体であるヨウ素とも電荷移動型化合物を形成しえない²¹⁾。このことは電荷移動が起るためには構造上の要因がいかに重要かを示唆しており、電荷移動型化合物形成の良否がインドール類の抗酸化能発揮にも密接な関係にあるものと推察される。

従って、リノール酸の連鎖的自動酸化反応において律速的となっているある中間体は、インドール核の $\text{C}_2\sim\text{C}_3$ 位置を介して強い電荷移動型化合物を形成したのち、その π 電子プールから電子をうばって $\text{C}_2\sim\text{C}_3$ 結合を開裂せしめ、同時に自身は不活性物質に変化するという抗酸化反応機構が考えられる。

文 献

- 1) R. Marcuse: *Nature*, **183**, 886 (1960)
- 2) R. Marcuse: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 97(1962)
- 3) 満田久輝, 安本教傳, 岩見公和: 栄養と食糧, **18**, 59 (1965)
- 4) H. Mitsuda, K. Yasumoto, & A. Yamamoto: to be published
- 5) A. Ottolenghi: *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 355 (1959)
- 6) C. M. Stine, H. A. Harland, S. T. Caulter, and R. Jeness: *J. Dairy Sci.*, **37**, 202 (1954)
- 7) R. B. Koch, B. Stern, and C. G. Ferrari: *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 165 (1958)
- 8) M. S. Blois: *Nature*, **181**, 1198 (1958)
- 9) E. J. Conway: "Microdiffusion Analysis and Volumetric Error", p. 95, Crosby Lockwood and Son, 1950.
- 10) S. Udenfriend and P. E. Peterson: "Methods in Enzymology", Vol. 3, p. 613, Academic Press, 1957.
- 11) S. Udenfriend, E. Titus, H. Weissbach, & R. E. Peterson: *J. Biol. Chem.*, **219**, 335 (1956)
- 12) T. Fueno, T. Ree, and H. Eyring: *J. Phys. Chem.*, **63**, 1940 (1959)
- 13) B. Pullman and A. Pullman: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **44**, 1197 (1958)
- 14) A. Szent-Györgyi: "Introduction to a Submolecular Biology", p. 35, Academic Press, 1960.
- 15) A. Cier, C. Nofre, & L. Belin: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, 1237 (1961)
- 16) C. Nofre, J. P. Charrier, & A. Cier: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **45**, 913 (1963)
- 17) 吉田善一, 加藤 勝: 日本化学雑誌, **75**, 106(1954)
- 18) G. G. Jayson, G. Scholes, & J. Weiss: *Biochem. J.*, **57**, 386 (1954)
- 19) W. E. Knox & A. H. Mehler: *J. Biol. Chem.*, **187**, 419 (1950)
- 20) A. Meister: "Biochemistry of the Amino Acids", Vol. 2, p. 841, Tufts Univ., 1965.
- 21) A. Szent-Györgyi, I. Isenberg, & J. McLaughlin: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47**, 1089 (1961)

(京都大学農学部栄養化学研究室)

ネズミおよびイヌにおける DL-リジンの代謝

リジンの中間代謝産物として遊離のグルタル酸が主要なものであるかどうかを調べた。DL-リジン-2- $^{-6-^{14}\text{C}}$ をネズミおよびイヌに経口、腹腔内注射、胃管注入などの方法で投与し、断首(ネズミ)またはエーテル殺(イヌ)後、肝臓、屠体(ネズミ)、血漿(イヌ)の加水分解物からグルタミン酸およびアスパラギン酸をDowex 1で分離し、各骨格炭素の比放射能を測定した。

リジン-6- ^{14}C 投与により主として C-1がラベルされたグルタミン酸が生じ、いっぽうリジン-2- ^{14}C によって C-5がラベルされたグルタミン酸を生じた。アスパラギン酸についても同様であった。またリジン-2- ^{14}C を胃管で注入した場合およびリジン-6- ^{14}C を腹腔内に注射した場合、非カルボキシル性の炭素(C-2~4)がラベルされた割合が多かったが、これについてはリジンが腸内菌

によってアセテートとブチレートに異化され、結局 Standman 経路によってアセテート-2- ^{14}C になったものと説明される。

これらの結果から、哺乳類におけるリジンの異化作用の主要中間産物は遊離のグルタル酸でなくて、glutaryl-coenzyme A であることが示唆された。(表2)

Metabolism of DL-Lysine-2- and-6- ^{14}C in Rats and Dogs.

by Meghal S. K., Cheung H.S., O'Neal, R. M., Koeppe R. E.: *J. Biol. Chem.*, **241**, (11), 2622~2625(1966)

(堀 井)