p-ベンゾキノン・グリシン反応系の褐変と抗酸化能

畑 中 千 秋, 大 村 浩 久

九州大学農学部食糧化学教室

Browning and Antioxidant Activity of *p*-Benzoquinone · Glycine System

Chiaki Hatanaka, Hirohisa Omura

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

J. Jap. Soc. Food and Nutr., 26 (7), 457~462 (1973)

Antioxidant activity and some reductones are demonstrated in the course of non-enzymatic browning of foods by amino-carbonyl reaction. Reductones, the important intermediate, are converted to melanoidin by condensation with some amino compounds. On the other hand, in the case of enzymatic browning, quinones are firstly formed from polyphenol compounds by the polyphenol oxidase and then polymerized to melanoidin by the similar reaction. Thus, the close relationship between enzymatic and non-enzymatic browning is presented. Therefore, reaction of quinones with amino compounds may offer an essential part of clue to elucidate the mechanism of browning of foods. From this point of view, reaction of *p*-benzoquinone and glycine was investigated as the model system.

Antioxidant activity was formed to some extent by heating of *p*-benzoquinone and enhanced by addition of glycine to the reaction mixture. In the reaction of *p*-benzoquinone and glycine, browning and reducing value as well as antioxidant activity were elevated with increasing pH, concentration of glycine and reaction time. Formation of diphenol was also observed after heating of *p*-benzoquinone with or without glycine. By comparing the course of these reactions, it was indicated that antioxidant activity was closely related with browning of the reaction mixture, but not much with reducing value and amount of diphenol formed. Furthermore, instead of glycine, efficiency of several amino acids such as cysteine was also established.

(Received July 18, 1973)

食品の酵素的褐変においては、ポリフェノール類がまず酵素的に酸化されて対応するキノンを生じ、これが含窒素化合物等と共重合を起こして色素を形成すると考えられている。事実、われわれはリンゴ酵素による褐変モデル系の吸収スペクトルを追及してキノンを生ずることを示した¹⁾。一方アミノカルボニル反応による非酵素的褐変においても、その過程の後半は反応性に富むレダクトンないしはオゾン類とアミノ化合物との共重合であって、酵素による場合と類似の反応が考えられる。したがってこのような酵素的ならびに非酵素的褐変における相互の共通性から、キノン類よりの色素の生成機構を解明すればアミノカルボニル反応の後半も類推され、逆もま

た同様であることが推定される。

他方これと関連して、還元糖とアミノ化合物とによる非酵素的褐変生成物が油脂に対し抗酸化力を持つことが認められ、種々の反応系について研究が行なわれている²⁾³⁾。したがってアミノカルボニル反応による褐変とキノンを介する褐変に共通性があるならば、後者においても抗酸化力の発現が期待されると思われる。そこで、まず最も簡単なモデル反応系として *p*-ベンゾキノン (*p*Q) とグリシン (Gly) とからなる反応系を設け、褐変、抗酸化力ないしは還元力を互に関連させて比較検討した。

実験方法

1. 試 薬

*p*Q:市販特級品を石油エーテルから再結して用いた。

アミノ酸:市販特級品を用いた。

リノール酸:市販一級品を用いた。富田⁴⁾によると、その純度は73.6%,他の脂肪酸26.4%を含む混合物であるが抗酸化剤は検出されなかった。試験にはリノール酸 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) で 150 ml に希釈し 0.02 M としたものを使用した⁵⁾。

2. 抗酸化力

上記リノール酸溶液 50 ml に褐変反応液 1 ml を添加、密栓して 37°C に放置し、経時的にロダン鉄法⁶⁾により生成した過酸化物を測定、その OD₅₀₀ 値を抗酸化力の指標とした⁴⁾。なお無添加区の OD₅₀₀ 値を control、反応液を加えたものの値を test とし、POV % (test OD₅₀₀ × 100 / control OD₅₀₀) も算出して比較に用いた⁴⁾。

3. 褐 変 度

OD₄₀₀ をもって示した。

4. 還 元 力

満田ら⁷⁾のインドフェノールブタノール法を用いて測定し、相当するアスコルビン酸の量をもって示した。

5. ジフェノール量

Behrman ら⁸⁾の *o*, *p*-2 価フェノール類の定量法をそのまま用いて測定し、ハイドロキノン量をもって表わした。

6. Gly 量

ニンヒドリン法⁹⁾をそのまま用いて概略の値を測定した。

7. ペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙 No. 51 を用い、ブタノール・酢酸・水 (4 : 1 : 1) で展開、0.1% 過マンガン酸カリウム・アセトン溶液をハイドロキノンの検出に用いた。

結果および考察

1. *p*Q・Gly 反応系の抗酸化力

まず *p*Q に Gly を添加した場合の抗酸化力を試験した。*p*Q・Gly 反応系および *p*Q 単独系 (終濃度各 0.25 M) それぞれ 10 ml を 60°C、3 時間反応させ、得られた褐変反応液を 10, 25, 50, 100, 200, 350 および 500 倍の 7 段階に希釈し抗酸化力を試験した。

Fig. 1 から *p*Q 単独系でもかなりの抗酸化力は認められたが、Gly と反応させるとその効果は高められ、たとえば 25 倍希釈液で 24 日後も酸化はほとんど認められなかった。

2. *p*Q に対する Gly の比率と抗酸化力

桐ヶ谷ら³⁾は糖に対するアミノ酸の比率を変えて得られる非透析性メラノイジンの抗酸化性を試験し、アミノ酸の比率と抗酸化能発現との関係を検討した。その結果、アミノ酸の比率が高い場合は、メラノイジン中の窒素含量も高く抗酸化能もすぐれていることから、メラノイジンの抗酸化能発現には窒素を含む部分構造が関与しているとした。*p*Q においても Gly の添加により褐変は促進され抗酸化力も増強されることを示唆する結果を得たので、さらにこの点を詳しく検討した。

*p*Q と Gly の割合を変えて 100°C、4 時間反応させて得られた褐変反応液の抗酸化力を Fig. 2 に示す。反応温度は高く時間は長いが *p*Q と Gly の濃度は低いので、抗酸化力は希釈することなくそのまま測定した。これから明らかなように、2.5 mM *p*Q + 2.5 mM Gly 系は他とくらべて顕著な抗酸化力を示した。また *p*Q の割合を減少させたもの (0.5 mM *p*Q + 2.5 mM Gly) の抗酸化力は 2.5 mM *p*Q 単独のものよりも劣っていた。これに対して、Gly の割合を低下させたもの (2.5 mM *p*Q + 0.5 mM Gly) の抗酸化力は若干低下するにしても *p*Q 単独のものよりは高かった。また 2.5 mM Gly 単独ではほと

Fig. 1. Antioxidant activity of *p*-benzoquinone (*p*Q). glycine (Gly) system.

A mixture of 0.25 M *p*Q and 0.25 M Gly was heated at 60°C for 3 hrs. After diluting the browning reaction mixture by 500, 350, 200, 100, 50, 25 or 10 times, 1 ml of the solution was added into 50 ml 0.02 M linoleic acid and incubated at 37°C. Peroxide content was estimated by ferric-thiocyanate method.

Dilution of the reaction mixture

1: control without sample; 2: ×500; 3: ×350; 4: ×200; 5: ×100; 6: ×50; 7: ×25; 8: ×10.

んど抗酸化性を示さなかった。これらのことから、Gly よりも *p*Q が抗酸化力発現の基本であって、その割合が抗酸化力に大きな影響を与え、Gly を反応させることによって抗酸化力を増強することが理解される。

そこで次に *p*Q の濃度を一定 (2.5 mM) に保ち、これに対する Gly の濃度を変えて、それぞれ 100°C、4 時間反応させたものの抗酸化力を希釈することなく試験した。抗酸化力の値は Fig. 1 や 2 に示すように経過日時によって異なるが、Fig. 3 には 4 日後のものを示した。なお還元力 (レダクトン量) および褐変度もあわせて求めた。

Fig. 2. Effect of the ratio of *p*Q to Gly on antioxidant activity.

Mixtures of *p*Q and Gly were heated at 100°C for 4 hrs. and peroxide content was estimated as in Fig. 1 without dilution.

Reaction mixture

- 1: 2.5 mM *p*Q + 2.5 mM Gly;
- 2: 2.5 mM *p*Q + 0.5 mM Gly;
- 3: 2.5 mM *p*Q; 4: 0.5 mM *p*Q + 2.5 mM Gly;
- 5: 2.5 mM Gly; 6: control without sample.

Fig. 3. Effect of concentration of Gly on antioxidant activity, browning and reducing value.

Mixtures of 2.5 mM *p*Q and Gly of various concentrations were heated at 100°C for 4 hrs. Peroxide content was estimated as in Fig. 1, after 4 day's incubation; browning was expressed as OD_{400} ; reducing value was assayed by indophenol method and expressed as corresponding amount of ascorbic acid.

Fig. 3 から明らかなように、Gly 濃度が増すにつれて抗酸化力はかなり上昇した。これに対して、還元力は Gly の添加によって急増するが、その濃度が 1 mM 以上ではほぼ一定に達し、それ以上 Gly を増しても還元力は上昇しない。一方着色度は 1 mM まで急増し、それ以後も徐々に増加を続ける。しかも着色度と抗酸化力はある程度比例することが観察された。すなわち、2.5 mM *p*Q に対し Gly 濃度が 1 mM までは抗酸化力と還元力ないし褐変度とは併行して増大したが、1 mM 以上においては還元力は変化しないが褐変と抗酸化力との増大をもたらしなんらかの反応が関与してくると推定された。この場合 1 mM が重要なポイントであると思われる。

3. *p*Q・Gly 反応に対する pH の影響

アミノカルボニル反応による褐変は pH に大きく影響され pH が上昇するほど強くなるので、*p*Q とアミノ化合物との褐変も pH により影響されると考えられる。そこで、5 mM *p*Q と 5 mM Gly との混合液を 1% クエン酸および 1% 水酸化ナトリウムとで pH を 3~9 に調整し、100°C、4 時間作用させた反応液そのものについて抗酸化力、褐変度および還元力を求め Fig. 4 に示した。

pH の上昇とともに抗酸化力、褐変度、還元力はともに増大する傾向が認められた。しかし、還元力は pH 4 以上ではほぼ一定値を示すのに対し抗酸化力および褐変度はともに増大を続けることから、前項における同じように抗酸化力は褐変と密接な関係にあるが、還元力との比例関係はみられなかった。

4. ハイドロキノンの生成

α -ジカルボニル化合物やキノンは酸化的に重合を受けるとともに褐変するが、この場合同時に起こる還元反応によって対応するエンジオール類が形成されると考えられ^{10)~12)}、*p*Q の褐変においてもハイドロキノ (HQ)

Fig. 4. Effect of pH on antioxidant activity, browning and reducing value.

Mixtures of 5 mM *p*Q and 5 mM Gly at various pH were heated at 100°C for 4 hrs. Peroxide content, browning and reducing value were estimated as in Fig. 3.

の生成が推定される。

25 mM *p*Q と 25 mM Gly との混合液を pH 7 に調整し、100°C、4 時間反応させたのち、ペーパークロマトグラフィーを行なった。また比較のため、同濃度の *p*Q 単独および *p*Q・アンモニア系についても同様の処理を行なったが、Fig. 5 に示すように、いずれの場合にも *Rf* 0.88 に過マンガン酸カリウム退色性のスポットが検出され、HQ のスポットに一致した。またこの部分をエタノールで抽出し紫外吸収スペクトルを測定したところ、いずれも 293 mμ 付近に吸収極大をもち HQ のものと同一であった (Fig. 6)。こうして *p*Q の褐変においても、少なくともその一部は HQ に変化することが認められ、これが抗酸化力ないしは還元力発現に多少とも影響を与えたと考えられた。

5. 反応の時間的推移

*p*Q と Gly とが反応した場合、Gly の減少とともに褐変ならびにジフェノールおよび還元力の増加が起こることを認めた¹³⁾。Gly の効果は *p*Q 単独の場合と比較してはじめて確認されるので、*p*Q 単独系の時間的推移も同一条件で追跡し、Fig. 7 に示した。なお比較を容易にするため *p*Q・Gly 系の経過¹³⁾もあわせて重複記載した。

こうして *p*Q を加熱した場合も、褐変、ジフェノールおよび還元力の増加がいずれも作用時間にほぼ比例して認められたが、Gly の添加により反応は著しく促進され、その効果が確認された。ジフェノール類は *p*Q・Gly 系では急速に生成され 3 時間でほぼ一定値 (280 μg/ml HQ) に達したが、*p*Q 単独の場合 11 時間後にほぼ同量のものが検出された。しかし還元力は、*p*Q・Gly 系では

Fig. 5. Paper chromatogram of the browning solution.

Mixtures were heated at 100°C for 4 hrs. Paper chromatography was carried out using butanol-acetic acid-water (4:1:1) as solvent and product was detected with potassium permanganate. Reaction mixture

- 1: 25 mM *p*Q+25 mM Gly; 2: 25 mM *p*Q;
- 3: 25 mM *p*Q+25 mM NH₄OH; 4: Gly (guide);
- 5: Hydroquinone (HQ) (guide).

Fig. 6. UV spectrum of product in the browning solution.

UV spectrum was estimated on the extract of the spot on the paper chromatogram (Fig. 5) by a Shimadzu multipurpose recording spectrophotometer, MPS 50, with "Absorbancy range" of 0~0.2 or 0~1.

Fig. 7. Effect of reaction time on browning, reducing value and diphenol in heated solution of *p*Q.

2.5 mM *p*Q was heated at 100°C for different time. Browning and reducing value were estimated as in Fig. 3. Diphenol was estimated by the procedure of Behrman and Goswami⁹⁾ and expressed as the amount of HQ. For easy comparison, data for the reaction mixture of 2.5 mM *p*Q and 2.5 mM Gly under the same condition¹³⁾ were also indicated.

同じく数時間で概略 85 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸相当量に達して一定となるのに対し、 $p\text{Q}$ 単独系ではその増加は微弱であって 11 時間後に 10 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸にすぎなかった。このようにジフェノール量と還元力とに大きな差があることは、両反応系におけるジフェノールはまったく同一のものとは考えられないことを示唆する。すなわち、一部 HQ の生成はともに考えられるが、さらに $p\text{Q}$ と Gly とによるストレッカー分解に起因するレダクトン類の生成や Gly が $p\text{Q}$ に付加し置換型ジフェノールを生成することなども推定される。また反応液の褐変も Gly により促進され、11 時間後に $p\text{Q}$ 単独の場合の約 2.5 倍に達した。なお、 $p\text{Q} \cdot \text{Gly}$ 系の褐変も反応初期に著しく進行したが、ジフェノール量、還元力ないし、Gly 残存量が一定値に達した後も徐々に着色度を増すことが観察された。

次に抗酸化力を同一反応系で経時的に求めて Fig. 8 に示した。 $p\text{Q} \cdot \text{Gly}$ 系では 9 時間および 11 時間加熱のものが最も強い抗酸化力を示した。 $p\text{Q}$ 単独系の 11 時間加熱のものも、control にくらべるとかなりの抗酸化力をもつが Gly 添加系のいずれよりも劣っていた。また 11 時間加熱後のジフェノール量に相当する HQ (270 $\mu\text{g/ml}$) の抗酸化力は $p\text{Q}$ 単独系よりもさらに低かった。とくに、 $p\text{Q} \cdot \text{Gly}$ 系の 6 時間ないし 11 時間加熱のもの

Fig. 8. Effect of reaction time on antioxidant activity in the reaction mixture of $p\text{Q}$ and Gly.

Peroxide content was estimated as in Fig. 1 in the reaction mixture of 2.5 mM $p\text{Q}$ and 2.5 mM Gly heated at 100°C for different time.

のジフェノール生成量や還元力にはほとんど差がみられないにもかかわらず抗酸化力には差があるので、ジフェノール量あるいは還元力のみで抗酸化力は判定されない。一方、褐変度は加熱時間の延長にともない引き続き増大することから、 $p\text{Q}$ に対する Gly の比率や pH の影響などからも認めたように、抗酸化力はむしろ褐変度に密接な関係があると思われる。すなわち反応の初期で生じた HQ、置換型ジフェノール類（レダクトン類）および遊離の Gly 等が加熱にともなって共重合を起こし、着色度が増すとともに抗酸化力が增強されると推定される。この場合、ジフェノール量と還元力については 6 時間加熱のものも 11 時間加熱のものも差は認められなかった。

6. アミノ酸の種類による効果

これまで $p\text{Q}$ とアミノ酸との反応をとくに Gly に限定して試験してきたが、最後に他のアミノ酸についても検討を加えた。それぞれ 5 mM の $p\text{Q}$ と各種アミノ酸との混合液を 100°C、4 時間加熱し、褐変度、還元力および抗酸化力を測定し Table 1 に示した。

$p\text{Q}$ とアミノ酸との反応系はいずれも $p\text{Q}$ またはアミノ酸単独系にくらべて強い抗酸化力を発現し、とくにヒスチジンとシステインの場合に顕著であった。還元力はシステインを除きアミノ酸の種類によって著しい差は認められなかった。システインの場合 490 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸相当量ととくに強い還元力を示した。反応系におけるシステイン自体の還元力は 80 $\mu\text{g/ml}$ 程度であるので、このような異常に高い値は $p\text{Q}$ との反応に起因するものと考えられる。事実、われわれは¹³⁾ $p\text{Q}$ と N-アセチルシステインとの反応について検討し、5 種類のジフェノールを検出したが、さらにその一つである HQ-N-アセチルシステインを結晶状に得て、これが非常に強い還元力（アスコルビン酸の 1.5 倍）をもつことを確かめた。他方、褐変度もアミノ酸の添加により $p\text{Q}$ 単独のものよりも上昇したが、その程度は種類により異なり、トリプトファンが最も顕著であり、次いでアスパラギン酸、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン、アルギニン等が比較的有効であった。このように、Gly の場合と同様に他のアミノ酸でもその添加により抗酸化力、褐変度ないし還元力はいずれも增強された。

要 約

$p\text{Q}$ とアミノ酸、とくに Gly との反応による抗酸化力ならびに還元力の発現および褐変について試験し次のような結果を得た。

1) $p\text{Q}$ 単独系においてもかなりの抗酸化力ならびに多少の還元力や褐変も認められるが、これに Gly 等アミノ酸を添加して反応させることによりいずれも增強さ

Table 1. Antioxidant activity, browning and reducing value of the reaction mixture of pQ and different amino acids.

Amino acid	Browning	Reducing value	POV % of pQ + amino acid	POV % of amino acid only
Ileu	1.60	82	23.0	73.6
Met	1.55	91	25.0	84.3
Cy.SH	1.85	490	7.8	69.5
Phe	1.50	82	16.3	73.4
Tyr	1.95	88	15.3	58.5
Try	3.15	88	15.3	54.6
Arg	2.00	85	17.3	65.6
His	2.18	82	7.6	13.2
Ala	1.80	91	25.0	67.1
Asp	2.60	88	25.0	65.6
AspNH ₂	2.15	85	25.6	69.5
Glu	1.85	82	22.1	67.9
Gly	1.65	82	27.8	79.8
Pro	2.35	85	25.0	85.9
pQ only	1.10	2.5	54.0	—

Mixtures of 5 mm pQ and 5 mm amino acid were heated at 100°C for 4 hrs. Antioxidant activity, browning and reducing value were estimated as in Fig. 3, but POV % was expressed as follows

$$\text{POV \%} = \frac{\text{OD}_{500} \text{ in test}}{\text{OD}_{500} \text{ in control}} \times 100.$$

れた。

2) 抗酸化力は反応溶液の pH, Gly 濃度あるいは作用時間によって著しく影響された。すなわち, pH や Gly 濃度が高くなるほど, また反応時間が長くなるほど, 得られた褐変溶液の抗酸化力は増強された。他方, 還元力や褐変も pH および反応時間により同様に影響された。

3) 抗酸化力は還元力には密接な関係はみられないが, 褐変度とはほぼ比例関係にあった。

4) pQ と Gly との反応で HQ の生成を認めたほか, 置換型ジフェノールの生成も推定された。

5) 抗酸化力, 還元力および褐変に対する種々のアミノ酸の効果が比較検討された。

本論文の要旨は昭和 46 年 10 月日本栄養・食糧学会ならびに日本栄養改善学会西日本支部大会 (太宰府) において発表した。なお本研究の一部は昭和 45 年度文部省総合研究費 (食品成分のラジカル反応 代表者 佐藤泰) によった。

文 献

- 1) 大村浩久, 尊田民喜: 栄養と食糧, 23, 367 (1970)
- 2) Kato, H.: *Agr. Biol. Chem.*, 32, 287 (1968)
- 3) 桐ヶ谷紀晶, 加藤博通: 農化, 43, 484 (1969)
- 4) 富田裕一郎: 学位論文 (九州大学), 17 (1970)
- 5) 山口直彦: 食工誌, 16, 140 (1969)
- 6) 満田久輝, 安本教伝: 栄養と食糧, 19, 210 (1966)
- 7) 満田久輝, 鹿内健彦: ビタミン, 13, 394 (1957)
- 8) Behrman, E.J. and Goswami, M.N.D.: *Anal. Chem.*, 334, 409 (1957)
- 9) 日本化学会編: 実験化学講座, 第 23 巻, 124, (1966), 丸善
- 10) Evans, C.D., Moser, H.A., Cooney, P.M. and Hodge, J.E.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 35, 84 (1958)
- 11) Mason, H.S.: *Nature*, 175, 771 (1955)
- 12) Hathway, D.E. and Seakins, J.W.T.: *Nature*, 176, 218 (1955)
- 13) 畑中千秋, 大村浩久, 野村男次: 農化, 46, 341 (1972)

(昭和 48 年 7 月 18 日受理)