非酵素的褐変反応生成物の抗酸化性に関する研究 (第3報)

アンモニアとグルコースによる褐変反応液の分画
および得られた各画分の抗酸化性について

桐ヶ谷紀昌*, 加藤博通, 藤巻正生
(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 45 年 11 月 24 日 受理

Studies on Antioxidant Activity of Nonenzymic Browning Reaction Products Part III. Fractionation of Browning Reaction Solution between Ammonia and D-Glucose and Antioxidant Activity of the Resulting Fractions

By Norimasa KIRIGAYA,* Hiromichi KATO and Masao FUJIMAKI
*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
The University of Tokyo, Tokyo*

The browning reaction solution, obtained by heating an aqueous solution (pH over 9) of ammonia (3 M) and D-glucose (1 M) at 100°C for 7 hr, was dialyzed, and both outer and inner solution were fractionated by ion-exchange, thin layer, and gel-permeation chromatographies. The outer solution was passed through a column of DEAE-cellulose and the water-eluted fraction was separated by preparative thin layer chromatography with cellulose powder into four clear bands. The main band was much effective in inhibiting autoxidation of purified linolenic acid solution. The antioxidant activity, however, was distributed all over the colored fractions; comparing at the same optical density (490 m μ), lower molecular weight fractions were stronger than higher molecular weight fractions. The antioxidant activity of the browning reaction products was found to be hardly dependent on the hydrogen- or electron-donating activity which was estimated by the reaction with 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl. (Received November 24, 1970)

緒 言

著者らは前報¹⁾において、反応系をアルカリ性にし、窒素化合物の濃度を高くして反応させると、抗酸化性の強い褐変物質が生成することを報告した。そこで今回は、最も構造の簡単なアミノ化合物としてアンモニアを用い、アルカリ性下でグルコースと反応させて得られる褐変反応液を各種のクロマトグラフィーにより分画し、抗酸化性物質の分布状態をしらべ、かつ抗酸化性の強い画分の精製を試みた。なお、褐変物質の抗酸化性発現機構について予備的な検討を行なった。これらの結果について報告する。

実 験 方 法

1. 褐変反応液の調製 3M のアンモニアと 1M のグルコースを含む水溶液に適宜水酸化ナトリウムを加えて、反応系の pH を常に 9 以上に保ちながら、100°C に 7 時間加熱した。

2. 透析外液および内液の調製 上記 1 により得た褐変反応液をセロファンチューブに入れ、蒸留水で外液を更新しつつ、外液の pH が 8 以下になるまで透析する。pH 8 以下になったら、外液を更新せずにさらに 3 日間透析し、ほぼ中性に近い透析外液および内液を得た。これらを適当な濃度になるまで 40°C 以下で減圧濃縮して試験液とした。

3. カラムクロマトグラフィー 充填剤としては、

* 現在、森永製菓株式会社

Sephadex G-15, G-25 および G-50, DEAE セルロース およびホスホセルロースを用いた。

溶媒は主として水, 試料の量は 1 ml, 分画は 3 ml である。

4. 薄層クロマトグラフィー 塗布剤として薄層用セルロース粉末 (Serva 社製) を用いた。調製的にこなうため, 20×20 cm のガラスプレートに塗布剤を厚さ 0.5 mm に塗布した。溶媒は種々検討した結果, *n*-ブタノール-酢酸-水, 4:1:5 の上層が最も分離が良好であったので, これを用い, 二〜三重展開した。

5. 濾紙電気泳動 東洋濾紙 No. 51 (12×26 cm) を用い, 電極槽は 1% 塩化カリウム, 濾紙部分は水酸化ナトリウム, 硼酸, 塩化カリウムの緩衝液 (pH 9.0), 寒天橋は寒天 3% を含む塩化カリウム (1%) 溶液を加熱, 凝固させたものをそれぞれ用いた。約 15 mA の定電流で約 30 分間泳動した。

6. 抗酸化性の測定方法 基質として精製リノレン酸を用い, 前報⁽¹⁾と同様の方法で測定した。

7. DPPH 法による水素供与性の測定 DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 約 16 mg を 100 ml のエタノールに溶解し, これに水 100 ml を加えて濾過する。この濾液は 528 m μ に極大吸収を示す。この DPPH 溶液 5 ml を共栓遠心管にとり, これに適当濃度の試験液 5 ml を加え, 激しく振とうしたのち, 528 m μ の吸光値を測定する。

実験結果および考察

1. メラノイジンの分画と各画分の抗酸化性

pH 9 以上のアルカリ性下で, アンモニア (3 M) とグルコース (1 M) を 100°C で反応させて得られる褐変反応液を試料として用い, まず予備的に, Sephadex G-25 によるゲル濾過を行なった。その溶出パターンを Fig. 1 に示す。高分子域に小さい着色物質のピークがあり, 低分子域には大

きなピークが認められる。抗酸化性は溶出区分全域に認められるが, とくに低分子域のピークの抗酸化性が強い。このように, とくに低分子域にもメラノイジン (抗酸化性) のピークが存在するので, つぎに, 反応液を透析し, 外液と内液とに分け, それぞれについてさらに分画を行なった。分画の手順をまとめたのが, Fig. 2 で

Fig. 1. Gel-filtration Pattern of Browning Reaction Solution* with Sephadex G-25 and Antioxidant Activity of Each Fraction.

* A mixture of 3 M ammonia, 1 M D-glucose and about 1.5 M NaOH, the pH of which was adjusted to 9.0 or over, was heated at 100°C for 7 hr.

Eluent: distilled water, sample volume: 1 ml, flow rate: 20 ml/hr, fraction volume: 3 ml, gel bed: 2.5×70.0 cm.

Fig. 2. Fractionation Procedure of Browning Reaction Solution between Ammonia and D-Glucose.

Fig. 3. Chromatography of Brown Solution* with DEAE-Cellulose ($-\text{PO}_4$ type).

* The outer solution obtained by dialyzing the browning reaction solution of Fig. 1.

Eluent: distilled water $\rightarrow$ 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow$ 0.1 N HCl (stepwise elution), sample volume: 1 ml, flow rate: 17 ml/hr, fraction volume: 3 ml, ion exchanger bed: 2.5×15.0 cm.

ある。

まず、透析外液を DEAE セルロースのカラムでクロマトグラフィーを行なった (Fig. 3)。水で溶出される区分 (fr. 6~14, バンド A と名付ける), 0.2 M Na_2HPO_4 で溶出される区分 (fr. 19~49), および 0.1 N HCl で溶出してくる区分 (fr. 51~56, バンド B と名付ける) を得た。着色度から計算すると, バンド A は透析外液の約 10%, バンド B は約 67% を占めていた。

つぎに, バンド A をセルロース粉末の調製の薄層クロマトグラフィーで分画すると, 4 個のバンド (バンド A_1 , A_2 , A_3 , A_4) に分かれ, 分離状態は良好であった。このうち, A_1 が主要部分を占め, A_2 がこれに次ぎ, A_4 は極めて少量であった。

一方, バンド B も同様に薄層クロマトグラフィーにかけると, 原点に止っている部分 (バンド B_1) とかなり移動するバンド (B_2) とが主成分であった。この場合には, ほかに微細なバンドも多く認められ, tailing も起こった。

以上の分画により得られた各画分を同一吸光値 (E_{490})

Fig. 4. Antioxidant Activity of Browning Reaction Solution, Outer Solution, and Each Band Separated According to the Procedure of Fig. 2.

Antioxidant activity was compared with the same sample solution of the same color intensity, $E_{490} = 0.04$.

$=0.04$) に希釈して, その抗酸化性を比較した結果は Fig. 4 のとおりであった. すなわち, 褐変反応液, 透析外液, バンド A と順次抗酸化性は強くなった. しかしバンド A をさらに分画したバンド A_1, A_2, A_3 の抗酸化性は, A_1 が A とほぼ同等のほかほかえって弱くなった. また, バンド B_1, B_2 はさらに弱い. しかしながら, バンド A の成分の中では, バンド A_1 が主成分であり, 抗酸化性も強い. そこで, バンド A_1 を Sephadex G-15 のカラムで分画した. 結果は Fig. 5 に示されるごとく, 9 個のフラクション (fr. $a_1 \sim a_9$) を得たが, 分離の良好でない 2 個のピークが認められる. 抗酸化性も全画分に分散している.

つぎに, 透析内液についても分画を試みた (Fig. 2). まず, ホスホセルロースのカラムを通過させて得られる主要吸着帯の部分 (バンド C) をとり, これをさらに Sephadex G-50 のカラムで分画した. 結果は Fig. 6 に示されるようなパターンを示し, フラクション $c_1 \sim c_{16}$ が得られた. Fig. 5 と Fig. 6 に示される各フラクションの抗酸化性は, いずれも $E_{490}=0.1$ になるように希釈した試料について測定したものであるが, 両者を比較すると, バンド A_1 から得られた各画分 (Fig. 5) のほうが, 着色度当りの抗酸化性はかなり強いことがわかる.

前報^(1,2)において, 抗酸化性と着色度との間には密接な関連があることが明らかにされているが, 必ずしも比例関係にあるのではないことを上記の結果は示している. 重量あたりの着色度は重合度が大きくなるにしたがって増大することが知られている⁽³⁾. すなわち, 分子量

Fig. 5. Gel-filtration Pattern of Band A_1 with Sephadex G-15 and Antioxidant Activity of Each Fraction.

Antioxidant activity was compared with the same sample solution of the same color intensity, $E_{490}=0.1$.

Fig. 6. Fractionation of Band C by Sephadex G-50 (fine).

Eluent: distilled water, sample volume: 2 ml, flow rate: about 15 ml/hr, fraction volume: 3 ml, gel bed: 2.3×40.0 cm.

Antioxidant activity was compared with the same sample solution of the same color intensity, $E_{490}=0.1$.

の増大とともに着色度は強くなるが, 抗酸化性は必ずしも強くならないことがわかる.

2. フラクション a_8 の性質について

褐変反応液の透析外液を Fig. 2 の方法によって分画した最終のフラクション $a_1 \sim a_9$ は, かなり精製された画分であることが期待された. 本実験では抗酸化性がとくに強いフラクションは見出されなかったが, 抗酸化性とメラノイジンの化学構造との関係を明らかにする目的で, フラクション $a_1 \sim a_9$ の純度を濾紙電気泳動により検討してみた. 結果は Fig. 7 に示されるごとく, いずれも弱い蛍光 ($365 \text{ m}\mu$ を照射) を発するが, フラクシ

Fig. 7. Paper-electrophoresis of Fraction a_1 to a_9 .

Electrophoresis was performed at 15 mA for 30 minutes at room temperature. The buffer used was 1/5 M NaOH-1/5 M boric acid and KCl-water (2:5:6) (pH 9.0). A dotted area shows fluorescence ($365 \text{ m}\mu$).

ン $a_1 \sim a_4$ が精製度が高いことを示した。しかしメラノイジンの濾紙に対する吸着性のためか、泳動速度が遅く、また長時間通電すると、バンドはブロードに広がってしまう傾向を示した。したがって、Fig. 7 の結果から、単一性を論ずることは妥当でないようである。

フラクション $a_1 \sim a_4$ はバンド A_1 のうちの高分子区分に属するので (Fig. 5), ある程度の分子量範囲 (おそらく 1500~500) を含む類似した性質の混合物と思われる。フラクション a_3 の赤外吸収スペクトルを Fig. 8 に示す。3300 cm^{-1} 付近の吸収は OH または NH, 1630 cm^{-1} 付近は各種の二重結合, 1060 cm^{-1} 付近は OH の吸収と考えられる。各吸収は非常にブロードであり、したがって、OH は水素結合性 (会合性) であり、また、1800 cm^{-1} 付近まで吸収が伸びているので、C=O の存在が考えられる。このスペクトルのパターンは種々の還元糖およびアミノ化合物から得られるメラノイジンに共通した典型的なパターンである⁽³⁻⁵⁾。したがって、本実験で行なったようなかなり高度の分画操作を施しても、得られる画分の基本的構造は、もとのメラノイジン混合物とほとんど変わらないと考えられる。この事実および着色区分全体にわたって、強さの差はあるにせよ、抗酸化性が認められることから考察して、メラノイジンによる抗酸化性の発現に係る部分構造は、メラノイジンの基本構造の一部に関連があると考えらるべきであろう。

3. 水素供与性からみたメラノイジンの抗酸化性の検討

褐変反応生成物の抗酸化性に関しては、Hodge らは、ヘキソースと第二アミン塩類とによるメイラード反応溶液から、アミノヘキソースレダクトンを単離し、これを各種の植物油に添加して酸化防止に有効であることを報告している⁽⁶⁾。

第一アミンやアミノ酸の場合には、このような低分子レダクトンは分離されていないが、一般に褐変反応にともなってレダクトンが生成、蓄積されることが認められており^(2,7)、反応生成物の抗酸化性は主としてレダクトンの還元力に起因すると考えられている⁽⁸⁾。しかし一方、著者らはキシロースとグリシン各 0.8 M の混合水溶液を 100°C に 2 時間加熱して得られる褐変反応液を 2,6-ジクロロフェノールインドフェノールで処理して、レダクトンを酸化し、処理前後の抗酸化性を比較した結果、全く変化がないことを確認している⁽²⁾。すなわちこの場合、反応液中のレダクトンの還元型は全く抗酸化性に寄与していないことになる。

酸化防止剤の抗酸化性の多くは、水素供与性 (または電子供与性) によって説明されている。そこで、水素供与性の測定法として DPPH 法を用い、市販の酸化防止剤およびメラノイジンの水素供与性を測定し、抗酸化性との関係を検討してみた。Fig. 9 はアスコルビン酸、PG (Propyl gallate), BHA (Butylated hydroxyanisole), およびアンモニアとグルコースによる褐変反応液と DPPH との反応を測定した結果である。アスコルビン酸と PG はレダクトンであり、その還元力により DPPH は脱色され、反応は 1 分間でほぼ終る。しかしレダクトンでない BHA は DPPH との反応速度がかなり遅い。褐変反応液はレダクトンを含むが、その反応曲線は BHA と似ており、レダクトン以外に反応性の水素 (または電子) を有することを示している。ここでは 30 分後における DPPH 溶液の吸光値 (528 $\text{m}\mu$) の低下を測定して水素供与性を比較した。DPPH 溶液の O. D. を 0.90 から 0.53 まで低下させるに要する重量を計算すると、アスコルビン酸 17.6 μg , BHA 12.6 μg に対し、透析内液 (の固型分) は 125 μg , 透析外液は 198 μg となり、

Fig. 8. Infrared Spectrum of Fraction a_3 in Nujol Mull.

Fig. 9. Reactivity of Antioxidants and Browning Reaction Solution with DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Fig. 10. Comparison of Antioxidant Activity of Antioxidants and Brown Solutions with the Same Hydrogen-donating Ability.

The amount of each sample with the same hydrogen-donating ability was calculated from the result of Fig. 9.

褐変物質の水素供与性は前二者のおよそ 1/10 である。

Fig. 10 は水素供与性を同一にした物質について抗酸化性を比較した結果である。これを見ると、アスコルビン酸と BHA は同一水素供与性では抗酸化性もほぼ等しいが、褐変物質のほうは、透析内液、外液ともにその水素供与性に比して、はるかに強い抗酸化性を示している。このことは褐変物質の抗酸化性は水素供与性（または電子供与性）では説明できないことを示すものである。

水素供与性以外の考えられる抗酸化機構としては、(1) 金属キレート作用、(2) 過酸化物を還元的に分解する作用、(3) 褐変物質が成分的に混合系であり、また構造が複雑であるために起こる相乗効果、(4) その他の未知の機構が考えられるが、これらの点については今後検討していく予定である。

要 約

3M のアンモニアと 1M のグルコースを pH 9 以上に維持しつつ、100°C に 7 時間反応させて得られる褐変反応液を透析したのち、各種のクロマトグラフィーにより

分画し、得られた各画分の抗酸化性を比較した。

まず透析外液を DEAE セルロースのカラムに流し、そのまま溶出されてくる画分をセルロース粉末の薄層クロマトグラフィーで分別すると、4個の明瞭な画分に分離した。そのうちの主要画分は抗酸化性が最も強かった。この画分を Sephadex G-15 のカラムで分画すると、2つのピークが認められ、そのうちの高分子画分は電気泳動的に単一と思われる挙動を示した。しかし赤外吸収スペクトルは通常のメラノイジンのそれと同様であり、やはり重合物の混合物であると考えられた。一般に、着色区分全体にわたって抗酸化性が認められたが、同一着色度 (E_{490}) で比較した場合、低分子画分のほうが高分子画分よりも抗酸化性は強かった。

なお、褐変反応生成物の抗酸化性は、DPPH との反応性(水素または電子供与性)から期待されるよりははるかに強く、他の抗酸化機構によって発現すると考えられた。

終りに、本実験の研究費の一部を御援助下さった糧食研究会に謝意を表します。また、実験の一部に協力した

片野聰氏に感謝します。なお、本報告の概要は、昭和45年度日本農芸化学会大会において発表した。

-
- (1) 桐ヶ谷紀昌, 加藤博通, 藤巻正生: 農化, **43**, 484 (1969).
 - (2) N. Kirigaya, H. Kato and M. Fujimaki: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 287 (1968).
 - (3) 加藤博通, 五明紀春, 桐ヶ谷紀昌, 藤巻正生: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 368 (1970).
 - (4) T. L. Tan, M. L. Wolfrom and A. W. Langer, Jr.: *J. Agr. Chem. Soc.*, **72**, 5090 (1950).
 - (5) T. M. Reynolds: "Advances in Food Research," Vol. 5, Academic Press, Inc., New York, 1963, p. 1.
 - (6) J. E. Hodge and C. E. Rist: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 316 (1953); C. D. Evans, H. A. Moser, P. M. Cooney and J. E. Hodge: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **35**, 84 (1958).
 - (7) H. Kato, G. Noguchi and M. Fujimaki: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 916 (1968).
 - (8) 山口直彦, 横尾良夫, 小山吉人: 食品工誌, **11**, 184 (1964); 山口直彦, 小山吉人: 同上, **14**, 106, 110 (1967).