アミノ酸と過酸化水素によるアルデヒド類の生成

(昭和 54 年 3 月 7 日受理)

山 中 英 明* 塩 見 一 雄*
宮 原 む つ 子* 菊 池 武 昭*

Formation of Aldehydes by Reaction between Amino Acids and Hydrogen Peroxide

Hideaki YAMANAKA, Kazuo SHIOMI, Mutsuko MIYAHARA
and Takeaki KIKUCHI

(Laboratory of Food Hygienic Chemistry, Tokyo University of Fisheries:
5-7, Konan 4-chome, Minato-ku, Tokyo)

The aldehydes formed by reaction between amino acids and hydrogen peroxide were investigated.

2,4-Dinitrophenylhydrazones of the reaction products of glycine, alanine, valine, leucine, isoleucine, and phenylalanine with hydrogen peroxide all gave single spots on thin layer chromatograms. Comparison of the *R_f* values, UV absorption maxima, melting points and colors of the 2,4-dinitrophenylhydrazones with those of standard carbonyl compounds showed that formaldehyde, acetaldehyde, isobutyraldehyde, isovaleraldehyde, 2-methylbutyraldehyde and phenylacetaldehyde, respectively, were produced from the above amino acids. It was considered that each of the amino acids was deaminated and decarboxylated by hydrogen peroxide. Acetaldehyde was also formed from sodium glutamate, aspartic acid and threonine. In the case of serine, formaldehyde was detected as a main reaction product. The amount of formaldehyde formed from serine was larger than that from glycine.

"Kamaboko", "Hanpen", herring roe and noodles which had been pretreated with hydrogen peroxide were found to have two to eight carbonyl components by thin layer chromatography. Acetaldehyde may be produced through the action of hydrogen peroxide on sodium glutamate, which is usually added to "Kamaboko" and "Hanpen" in large amounts.

(Received March 7, 1979)

近年、食品添加物の安全性について再点検がなされている。しかし、毒性試験は個々の食品添加物についてのものが多く、添加物相互間、あるいは添加物と食品成分との反応による相加的、相乗的毒性や有害物質の生成に関する問題はまだまだ十分に研究がなされていない。そこで、今回は、強い酸化力を有する過酸化水素に着目して

みた。過酸化水素は殺菌料として、あるいは漂白を目的として水産ねり製品、魚卵、ゆでめんなどに使用されている。過酸化水素はリン酸塩の存在下で安定化され¹⁾、食品中にも残存すると考えられる^{2)~4)}。この過酸化水素により食品中の成分が酸化されて有害物質が生成する可能性がある。すでに、石綿ら^{5),6)}は、グリシンと過酸化水素との反応によってホルムアルデヒドが生成することを報告している。そこで、本実験では食品中の成分とし

* 東京水産大学食品衛生化学講座：東京都港区港南
4-5-7

で、あるいは食品添加物の調味料、強化剤として広範に使用されているアミノ酸類を選び、過酸化水素との反応によって生ずる有害物質の検索を行ってみた。特に生成が推定されるカルボニル化合物を調べてみた。併わせて、過酸化水素を使用している市販食品についても同様にカルボニル化合物の検出を行った。

実験方法

1. アミノ酸と過酸化水素の反応生成物

各種アミノ酸と過酸化水素の反応により生ずるカルボニル化合物を2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-DNP) により2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (2,4-DNPH) 誘導体として析出させた。

(a) 使用アミノ酸: グリシン (Gly), L-アラニン (Ala), L-バリン (Val), L-ロイシン (Leu), L-イソロイシン (Ileu), L-セリン (Ser), L-スレオニン (Thr), L-フェニルアラニン (Phe), L-チロシン (Tyr), L-トリプトファン (Try), L-シスチン (CyS), L-システイン (CySH), L-メチオニン (Met), L-プロリン (Pro), L-アスパラギン酸 (Asp), L-グルタミン酸 (Glu), L-ヒスチジン (His), L-アルギニン (Arg), L-リジン (Lys), L-グルタミン酸ナトリウム (Na-Glu)。

(b) 反応: 共セン試験管中に3%過酸化水素 10 ml を入れ、3%濃度に各種のアミノ酸を加えた。この溶液を沸騰浴中で15分間加熱した。この反応液に2,4-DNP (2N 塩酸中に2%濃度に溶解) 8 ml を加え、2,4-DNPH に導いた。析出した2,4-DNPH 誘導体をろ過し、2N 塩酸で3~4回、さらに蒸留水で十分に洗浄し、デシケーター中で乾燥して結晶を得た。

(c) 薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析: Kieselgel 60 F₂₅₄ を用い、生成した2,4-DNPH 誘導体を少量のクロロホルムに溶解し着点した。展開溶媒としては種々検討の結果、石油エーテル (b.p. 30~60°): エチルエーテル (4:1) を用いた。同時に各種のカルボニル化合物標品より調製した2,4-DNPH も TLC で展開した。

(d) 吸収極大の測定: 2,4-DNPH 誘導体をクロロホルムに溶解し、(株)日立製作所製 139 型分光光度計を用いて紫外外部吸収極大を測定した。

(e) 融点の測定: 2,4-DNPH 誘導体の結晶の融点を Mitamura Riken-視野式微量融点測定装置により測定した。

2. グリシンおよびセリンと過酸化水素によるホルムアルデヒドの生成

(a) ホルムアルデヒドの検出方法: ホルムアルデヒドの確認にはアセチルアセトン法⁷⁾、クロモトロープ酸法⁸⁾、リミニ反応⁹⁾の3定性反応を用いた。

(b) ホルムアルデヒドの定量: アセチルアセトン改良法^{10), 11)}によった。

3. 過酸化水素使用市販食品中のカルボニル化合物

(a) 試料: かまぼこ、はんぺん、かずのこ、うどん

(b) 方法: 試料を細切して水蒸気蒸留を行い、生じたカルボニル化合物を2,4-DNP 溶液中に捕集した。析出した2,4-DNPH の結晶について、上述の方法と同様に分析を行った。また、上記の試料を10%過酸化水素中に10時間浸せきしたものについても同様な分析を実施した。

結果と考察

1. 各種アミノ酸と過酸化水素による反応生成物

まず、20種類のアミノ酸と過酸化水素との反応によるカルボニル化合物の生成の有無を調べるために2,4-DNP を加え、2,4-DNPH に導いた。アミノ酸の種類による2,4-DNPH 析出の有無、結晶の色調およびクロロホルム中の溶解性についての結果を一括して Table 1 に示した。Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Ser, Thr, Phe, Met, Pro, Asp, His, Na-Glu において2,4-DNPH の析出が観察された。しかし、Tyr, Try, CyS, CySH, Glu, Arg, Lys では2,4-DNPH を生成しなかった。生成した結晶の色調は黄色ないし橙色が大部分であった。また、クロロホルム溶解性についてみると、Pro, His のみが不溶で、その他はすべてよく溶けた。

Table 1. 2,4-Dinitrophenylhydrazones of the Reaction Products between Amino Acids and Hydrogen Peroxide

Amino acids	Precipitate	Colour	Solubility in chloroform
Gly	+	Yellow	Soluble
Ala	+	"	"
Val	+	"	"
Leu	+	"	"
Ileu	+	"	"
Ser	+	Orange-red	"
Thr	+	Orange	"
Phe	+	"	"
Tyr	—		
Try	—		
CyS	—		
CySH	—		
Met	+	Orange	Soluble
Pro	+	Brown	Insoluble
Asp	+	Orange	Soluble
Glu	—		
His	+	Yellow-brown	Insoluble
Arg	—		
Lys	—		
Na-Glu	+	Yellow	Soluble

そこで次に、生じた 2,4-DNPH の TLC 分析、紫外外部吸収極大ならびに融点測定を行った。TLC 分析の結果を Fig. 1 に、また吸収極大および融点測定の結果を Table 2 に示した。なお、対照として標品のホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、ブ

Fig. 1. Thin layer chromatogram of 2,4-dinitrophenylhydrazones of the reaction products between amino acids and hydrogen peroxide and the standard carbonyl compounds. Developing solvent; petroleum ether: ethyl ether (4:1). Standard: 1) formaldehyde, 2) acetaldehyde, 3) phenylacetaldehyde, 4) propionaldehyde, 5) crotonaldehyde, 6) butyraldehyde, 7) methyl ethyl ketone, 8) isovaleraldehyde, 9) isobutyraldehyde, 10) 2-methylbutyraldehyde.

チルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、イソバレルアルデヒド、2-メチルブチルアルデヒド、フェニルアセトアルデヒド、クロトンアルデヒド、メチルエチルケトンの 2,4-DNPH も同時に TLC 分析、紫外外部吸収極大および融点測定を行った。

Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Phe, Asp, Na-Glu に過酸化水素を加えた場合の反応生成物の 2,4-DNPH は TLC によって単一成分を与えた。Gly と過酸化水素の反応生成物は Fig. 1 より明らかなように TLC によって標品のホルムアルデヒドと同一の R_f 値を、また Table 2 より紫外外部吸収極大と融点がほぼ同じであった。石綿ら^{5),6)} もホルムアルデヒドが生成することを報告しており、今回の実験でもそれを再確認できた。次に、Ala と過酸化水素の反応生成物は標品のアセトアルデヒドと R_f 値が同一であり、吸収極大、融点はほぼ同じであった。以下同様にして、TLC 分析結果、紫外外部吸収極大および融点の測定結果を比較しながら見てみると、Val と過酸化水素からはイソブチルアルデヒド、Leu と過酸化水素からはイソバレルアルデヒド、Ileu と過酸化水素の反応では 2-メチルブチルアルデヒド、Phe と過酸化水素の反応ではフェニルアセトアルデヒドが生成されたものと思われる。Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Phe の化学構造式とそれぞれの生成したアルデヒドの化学構造式を比較してみると、Fig. 2 に示したように、各アミノ酸が過酸化水素によって、脱アミノならびに脱炭酸反応を起こし、対応するアルデヒドが生成したものと考えられる。

Table 2. UV Absorption Maxima and Melting Points of 2,4-Dinitrophenylhydrazones of the Reaction Products between Amino Acids and Hydrogen Peroxide and the Standard Carbonyl Compounds

Amino acids + H ₂ O ₂	$\lambda_{\max}$ in chloroform (nm)	M.P. (°C)	Carbonyl compounds	$\lambda_{\max}$ in chloroform (nm)	M.P. (°C)
Gly + H ₂ O ₂	349	164~166	Formaldehyde	349	166
Ala + H ₂ O ₂	356	143~154	Acetaldehyde	356	146~148 165~167
Val + H ₂ O ₂	358	180~182	Propionaldehyde	358	154
Leu + H ₂ O ₂	358	121~123	Butyraldehyde	358	123
Ileu + H ₂ O ₂	358	126~129	Isobutyraldehyde	358	181~184
Phe + H ₂ O ₂	358	119~121	Isovaleraldehyde	358	123~124
Asp + H ₂ O ₂	356	—	2-Methyl butyraldehyde	358	128~129
Na-Glu + H ₂ O ₂	356	145~150	Phenylacetaldehyde	358	121~122
Ser + H ₂ O ₂			Crotonaldehyde	373	188~190
Main component	349	166	Methyl ethyl ketone	363	114
Mixture	354	—			
Thr + H ₂ O ₂					
Main component	356	144			
Mixture	356	—			
Met + H ₂ O ₂					
Main component	366	132~145			
Mixture	367	—

Fig. 2. Formation of aldehydes from amino acids through deamination and decarboxylation by hydrogen peroxide.

Asp および Na-Glu と過酸化水素との反応生成物の 2,4-DNPH は Fig. 1 に示したように、やや弱い単一スポットを与えた。Rf 値はアセトアルデヒドと同一であった。紫外吸収極大もアセトアルデヒドのそれと同波長であった。

Ser と過酸化水素の反応生成物の 2,4-DNPH は 2 成分を示した。主成分はホルムアルデヒドと同一の Rf 値であり、紫外吸収極大、融点もホルムアルデヒドのそれと一致した。他の 1 成分は推定できなかった。Thr と過酸化水素の 2,4-DNPH もやはり 2 成分を与え、主成分はアセトアルデヒドと考えられたが、残りのカルボニル化合物は不明であった。また、Met と過酸化水素との反応生成物として得られたカルボニルは同定できなかった。

2. グリシンおよびセリンと過酸化水素によるホルムアルデヒドの生成

先の実験において種々のアミノ酸と過酸化水素の反応生成物を 2,4-DNPH に誘導して調べた結果、Gly および Ser からホルムアルデヒドの生成が考えられたが、念のため各種のアミノ酸と過酸化水素を反応させ、ホルムアルデヒドの生成の有無をアセチルアセトン法、クロモトローブ酸法、リミニ反応の三定性反応によって調べてみた。それらの結果、Gly および Ser からのみホルムアルデヒドの生成が起こることが確かめられた。その他のアミノ酸からのホルムアルデヒドの生成はみられなかった。

次に、Gly および Ser と過酸化水素との反応によるホルムアルデヒドの生成量を調べてみた。ホルムアルデヒドの定量はアセチルアセトン改良法^{9,10)}によった。まず、種々の濃度の過酸化水素水 10 ml 中に 3% 濃度に Gly あるいは Ser を溶解し沸騰浴中で 15 分間反応させた。氷冷下にて二酸化マンガンを加え、残存する過酸化水素を除去後ホルムアルデヒドの定量を行った。その結

Fig. 3. Effect of concentration of hydrogen peroxide on the formation of formaldehyde in reaction between hydrogen peroxide and glycine or serine at 98°C for 15 minutes. The concentration of amino acid was 3%.

Fig. 4. Effect of concentration of glycine or serine on the formation of formaldehyde in reaction between hydrogen peroxide and glycine or serine at 98°C for 15 minutes. The concentration of hydrogen peroxide was 3%.

果を Fig. 3 に示したが、過酸化水素濃度が高まるにつれてホルムアルデヒドの生成量が増加すること、Ser の方が Gly に比較して約 2 倍量のホルムアルデヒドの生成がみられることがわかった。

そこで上記の実験とは反対に、過酸化水素濃度を 3%

Fig. 5. Effect of reaction temperature on the formation of formaldehyde from glycine or serine with hydrogen peroxide for 15 minutes. The concentrations of amino acid and hydrogen peroxide were 3%, respectively.

Fig. 6. Effect of reaction time on the formation of formaldehyde from glycine or serine with hydrogen peroxide at 80°C. The concentrations of amino acid and hydrogen peroxide were 3%, respectively.

と一定にし、Gly および Ser の濃度を变化させ、上記と同じ反応条件ならびに処理を施した後ホルムアルデヒドの定量を行った。Fig. 4にその結果を示したが、アミノ酸濃度が高まるにつれてホルムアルデヒドの生成量は増大した。とくに、アミノ酸濃度が1%になると急激に増加し、4%までその増加が著しいが、8%になるとその生成量は4%の場合とほとんど同程度であった。これは高濃度になるとホルムアルデヒドの生成が極限に達するのか、あるいは生成したホルムアルデヒドがアミノ酸と結合するためと考えられる。

次に、Gly および Ser と過酸化水素の濃度をそれぞれ3%と一定にし、反応温度（反応時間15分）ならびに反応時間（反応温度80°）を変えたときのホルムアルデヒドの生成量を Fig. 5, 6 に示した。Fig. 5 より明らかなように、反応温度が高くなるに従い、Ser, Gly ともにホルムアルデヒドの生成量が増した。とくに、Ser の場合は70°を越えると著しく生成量が増加した。なお、ホルムアルデヒドの生成は室温（約22°）に1週間放置した場合にも Gly ならびに Ser において観察されたことを付記しておく。また、Fig. 6 に示したように、反応時間が長くなるに伴い、ホルムアルデヒドの生成量は増加した。

3. 過酸化水素使用市販食品中のカルボニル化合物

過酸化水素を用いている市販食品中に生ずるカルボニル化合物について調べてみた。かまぼこ、はんぺん、かずのこ、うどん（ゆでめん）がその主なる食品であり、かまぼこおよびはんぺんでは2~3%、かずのこ1~

Fig. 7. Thin layer chromatogram of 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds formed in "Kamaboko", "Hanpen", roe of herring and noodle pretreated with hydrogen peroxide during the commercial production. Developing solvent; Petroleum ether: Ethyl ether, (4:1); S: Standard carbonyl compounds: 1) Formaldehyde, 2) Acetaldehyde, 3) Phenylacetaldehyde, 4) Propionaldehyde, 5) Crotonaldehyde, 6) Butyraldehyde, 7) Methyl ethyl ketone, 8) Isovaleraldehyde, 9) Isobutyraldehyde, 10) 2-Methylbutyraldehyde; A: "Kamaboko" B: "Hanpen"; C: Roe of herring; D: Noodle.

Fig. 8. Thin layer chromatogram of 2,4-dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds in the foods shown in Fig. 7, which were further treated with 10% hydrogen peroxide for 10 hours

3%, うどん約 500 ppm の過酸化水素処理が一般的に行われている。そこで、これらの食品を水蒸気蒸留し、生ずるカルボニル化合物を 2,4-DNP 溶液中に捕集してヒドラゾンに誘導した。それらの 2,4-DNPH ならびに標品のアルデヒド類の 2,4-DNPH を TLC で分析した。

Fig. 7 に示したように、めいりょうな成分としてかまぼこおよびはんぺんで 3 成分、かずのこで 8 成分、うどんで 2 成分が検出された。かまぼこ、はんぺんおよびかずのこの成分のうち最も動きの遅い成分はアセトアルデヒドの 2,4-DNPH と同一と考えられたが、他の成分については不明である。かずのこの場合、成分数の多いのはアミノ酸と過酸化水素の反応によって生ずるカルボニルの他に、油脂の酸化によるカルボニルの生成が十分に考えられる。次に、上記の食品を 10% 過酸化水素中に 10 時間浸せき後、同様に水蒸気蒸留を行い、生ずるカルボニル化合物を 2,4-DNP 溶液中に捕集し、2,4-DNPH の TLC 分析を行った。その結果を Fig. 8 に示した。

Fig. 8 で明らかなように、かまぼこで 4 成分、はんぺんで 8 成分、かずのこ 7 成分、うどん 2 成分が検出された。とくにかまぼこ、はんぺん、かずのこにおいてはアセトアルデヒドの 2,4-DNPH と同位置に強い成分がみられた。これは、恐らくかまぼこやはんぺんの場合には多量に添加されるグルタミン酸ナトリウムと過酸化水素の反応により生じたものと推測される。また、かまぼこの場合最も動きの遅い成分は、濃度は低いけれどもホルムアルデヒドの 2,4-DNPH と同位置に検出された。他の成分については、いかなるカルボニル化合物の 2,4-DNPH かは不明である。

要 約

強い酸化力を有する殺菌料である過酸化水素と種々のアミノ酸との反応によって生ずるアルデヒド類について調べ、次のような結果を得た。

(1) Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Phe に過酸化水素を加えた反応液の 2,4-DNPH 誘導体を TLC により分離すると単一成分を与えた。標品との *R_f* 値、紫外部吸収極大、融点、結晶の色調の比較から、それぞれのアミノ酸からはホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、イソブチルアルデヒド、イソバレルアルデヒド、2-メチルブチルアルデヒド、フェニルアセトアルデヒドが生成されたことがわかった。各アミノ酸が過酸化水素により脱アミノ、脱炭酸反応を起こし、対応するアルデヒドが生成したものと考えられる。

(2) Na-Glu, Asp, Thr と過酸化水素からはアセトアルデヒドが生成した。

(3) Ser に過酸化水素を加えた場合は、主反応生成物としてホルムアルデヒドが検出された。Gly の場合より Ser の方がホルムアルデヒドの生成量は大きかった。

(4) 過酸化水素を使用している市販食品(かまぼこ、はんぺん、かずのこ、うどん)中のカルボニル化合物を TLC で調べたところ、2~8 成分が検出された。Na-Glu を多量に添加するかまぼこやはんぺんでは過酸化水素処理によってアセトアルデヒドの生成の可能性がある。

終りに臨み、種々御教示を賜った東北大学藤本健四郎助教授に深謝いたします。

なお、この報告は日本食品衛生学会第35回学術講演会(昭和53年5月、東京)において発表したものである。

文 献

- 河端俊治: “新食品衛生学” p. 149 (1975) 同文書院。
- 菅野三郎, 和田 裕, 中岡正吉: 食衛誌, 9, 50 (1968)。
- 川崎近太郎, 近藤雅臣, 永納秀男, 永山富雄: 同上, 9, 241 (1968)。
- 棚田益夫, 内田晴彦, 井出知佐子, 玉置幸美, 沢久美子: 同上, 14, 437 (1973)。
- 石綿 肇, 渡辺優子, 谷村頼雄: 同上, 12, 512 (1971)。
- 石綿 肇, 谷村頼雄: 同上, 14, 249 (1973)。
- 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 223 (1973) 金原出版。
- 川田十三夫, 俣野景典: “食品衛生学” p. 194 (1975), 講談社。
- 日本薬学会編: “衛生試験法注解” p. 224 (1973) 金原出版。
- Nash, T.: Biochem. J., 55, 416 (1953)。
- 岩見公和, 安本教伝, 満田久輝: 栄養と食糧, 27, 387 (1974)。