

アミノ・カルボニル反応生成物の抗酸化性に関する研究

(第4報)

トリプトファン・グルコース系反応生成物中の
抗酸化性物質の検索

富 田 裕 一 郎

Studies on Antioxidant Activity of Amino-Carbonyl Reaction Products

Part IV. Antioxidative Substances in Reaction Products of Tryptophan with Glucose

Yûichirô TOMITA

(Laboratory of Animal Nutrition)

前報¹⁾²⁾において、トリプトファン・グルコース系反応液はその抗酸化能と着色度との間に密接な関連があり、着色物質が抗酸化性発現の一因子であること、さらにこれ以外に反応中間物質の存在も考慮しなければならぬことを明らかにした。KIRIGAYA ら³⁾はアミノ・カルボニル反応生成物の中で着色高分子物質のメラノイジンが抗酸化性を示すことを認めている。一方、低分子物質については、どの程度抗酸化性発現に関与しているかは不明である。反応中間物質は非常に反応性に富み不安定なため、反応液から単離することはきわめて困難と考えられるが、各種の方法を用いて分別を試み抗酸化能を比較することによって総合的な知見は得られるものと考えた。そこで、まずトリプトファン反応液を非透析部と透析部に分け、メラノイジンなどの高分子と、透析部の低分子部の抗酸化能につき検討した。次に透析部をイオン交換性樹脂カラムなどで分別して、抗酸化能物質の検索を試みた。また、トリプトファン・グルコース反応系の強い抗酸化能がメラノイジンに由来するかあるいは低分子物質に由来するかを明らかにするためリジン・グルコースおよびグリシン・グルコース反応系についても比較検討した。さらに、透析液を凍結乾燥した場合の安定性についても同様に検討を加え、凍結乾燥物の抗酸化能についても比較した。

実験方法

1. メラノイジンと低分子物質の分画および抗酸化能測定法

a. 反応液の調製および透析：グルコース 2,880

mg とグリシン 300 mg, リジン 732 mg, トリプトファン 816 mg をそれぞれ混合し, pH 9.0, 0.1 M リン酸緩衝液 40 ml を加え, 120°C で1時間加熱し反応液を調製した。得られた各反応液 20 ml をセロファン膜に入れ, 水 100 ml を用いて 5°C で透析し, 24 時間ごとに計 3 回水を交換し, 非透析部の内液, 透析外液 I, II および III に分画した。これらの各分画液は吸収スペクトルおよび薄層クロマトグラフィにより透析の程度を調べ, 抗酸化能を比較した。さらに, 反応液, 内液および外液 I の凍結乾燥物についても抗酸化能を測定した。

b. 抗酸化能測定法：

i) トリプトファン・グルコース反応系について透析内・外液の 280 m μ における吸光度を測定し, 反応液の 1,000 倍希釈液の 280 m μ における吸光度と等しくなるように調整し, この 2.5 ml を 2 \times 10⁻²M リノール酸液 2.5 ml に加え, 40°C で振とうしてリノール酸を自動酸化させ, 24 時間後の POV % を測定した。

ii) グリシン・グルコースおよびリジン・グルコース反応系について, 290 m μ における吸光度を測定し, 反応液の 1,000 倍希釈液のそれと等しくなるように調整した液を上と同様にリノール酸に加え, POV % を測定した。

iii) 凍結乾燥物

また, 透析内液および外液 I の凍結乾燥物についてもこれらと同様に処理して行なった。

反応液の直接凍結乾燥物については, 凍結乾燥後水を加えて, もとの容積にもどし, 1,000 倍に希釈して

上と同様にリノール酸液に加えて POV % を測定した。

2. 抗酸化性低分子物質の検索法

a. 検索法：従来より抗酸化性物質の検出試薬として種々のものが知られているが、著者は油脂の酸化測定法に基づいた方法⁴⁾⁵⁾につき、TLC 法への応用を試み、ロダン鉄試薬、チオバルビツール酸試薬を用いる二法を考察した。

i) 吸着剤：シリカゲル G (E・MERCK), 0.25 mm.

ii) 展開剤：*n*-ブチルアルコール・酢酸・水 (4 : 1 : 5)

iii) 検索試料： 10^{-2} M の L-トリプトファンと 10^{-2} M の D-グルコースを pH 7.5, 0.05 M のリン酸緩衝液に溶かし、120°C で 1 時間加熱し、前述の方法によって透析し、透析外液を調製し、検索試料とした。

iv) 検出試薬

1) ロダン鉄試薬

薄層を展開したあと約 10 分間風乾し、減圧デシケーター中で溶媒を除く。この薄層板に 1% リノール酸-エチルアルコール溶液を噴霧し約 10~15 分間 80°C の熱風を通してリノール酸を酸化し 5% チオシアン酸アンモニア溶液を軽く噴霧し、続いて 0.1% モール塩溶液を噴霧すると背景が赤色となるのに対し、抗酸化性物質のスポット部は白~淡黄色となる。

2) チオバルビツール酸試薬

前法と同じようにリノール酸を酸化させたあと、1% チオバルビツール酸溶液を噴霧し、さらに 80°C で処理すると赤紅色の背景に対し白色~黄色のスポットとして現われる。

3) その他の抗酸化性物質検出試薬

ジアゾ化スルフェニル酸⁶⁾

リンモリブデン酸⁶⁾

2,6-ジクロロキノククロイミド⁶⁾

α, α' -ジフェニル- β -ピクリルヒドラジル⁷⁾

エメリー・エンゲル試薬⁸⁾

フォルインフェノール試薬⁹⁾

4) その他の試薬および方法

ニンヒドリン⁸⁾

アンモニア性硝酸銀⁸⁾

エルソン-モルガン試薬⁸⁾

2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド⁸⁾

エールリッヒ試薬¹⁰⁾

2,6-ジクロロフェノールインドフェノール¹¹⁾

紫外線燈

3. イオン交換樹脂による抗酸化性物質の検索

a. 反応液の調製およびイオン交換クロマトグラフ

L-トリプトファン 5 mg と D-グルコース 8.8 mg を 10 ml の pH 7.5, 0.05 M リン酸緩衝液に溶解し、130°C で 1 時間加熱し、前述の方法により透析して、その透析液を塩酸で微酸性にして Dowex 50-W(H⁺) の 1.5×20 cm カラムに注ぎ、混合槽に蒸留水を 500 ml、貯液槽に 6 規定塩酸を入れて濃度こう配溶出法により分別を行ない、1 試験管に 10 ml ずつ分取した。

b. 抗酸化性物質の測定

各分画の抗酸化能の測定は ANGLIN の方法¹³⁾を一部改良して用いた。すなわちアンモニアガスを通じて中和した溶出液 1 ml に 0.2 M グリシンの 10% 塩化ナトリウム溶液 7 ml, 0.2% 塩化第 2 鉄の 0.1 規定塩酸溶液 1 ml, 0.2% α, α' -ジピリジル水溶液 1 ml を加え混合して、1 時間後に 525 m μ の吸光度を測定した。

結果および考察

1. 反応液の分画

(1) 透析による吸収スペクトルの変化

反応液の紫外外部吸収曲線を第 1 図に示したがトリプトファン系反応液の吸収スペクトルがトリプトファンの吸収スペクトルとほぼ一致するのに対し、リジンおよびグリシン系反応液では 290 m μ に吸収極大が認められた。川岸、並木¹⁴⁾によれば aci-レダクトン的一种である トリオースレダクトンはアルカリ性で 292 m μ に吸収極大を示すこと、EULER ら¹¹⁾はグルコースを酸あるいはアルカリで加水分解する際にトリオースレダクトンを生成することを明らかにしている。このことから、290 m μ の吸収極大は本レダクトンの生成を示唆しているものと考えられる。以上のようにこれらの反応液の吸収極大が異なるので、抗酸化能の比較試験にはトリプトファン系では 280 m μ 、リジンとグリシン系では 290 m μ の波長を用いて濃度を調整した。

なお、反応液を凍結乾燥して吸収スペクトルを測定したが変化はみられなかった。

各反応液の透析内・外液の吸収スペクトルを測定した結果、透析性物質は大部分が外液 I に透析されていることが認められた。この 1 例としてトリプトファン系反応液の透析内・外液の吸収曲線を第 2 図に示した。

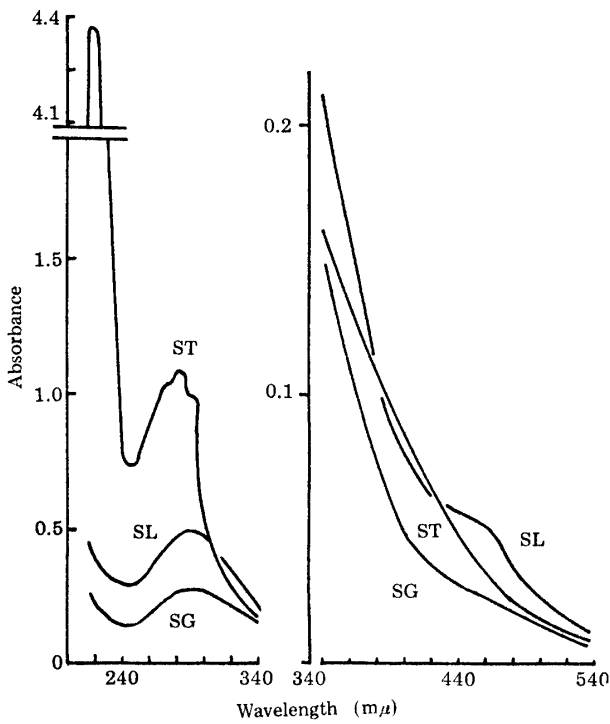


Fig. 1. Absorption Spectra of Browning Solutions of Glycine, Lysine and Tryptophan with Glucose.

A mixture of 0.4 M D-glucose and 0.1 M amino acid in 0.1 M phosphate buffer of pH 9.0 was heated at 120°C for 1 hr..

SG: DL-glycine-D-glucose (dilution ratio, A; 100-fold, B; 10-fold)

SL: L-lysine-HCl-D-glucose (dilution ratio, A; 100-fold, B; 10-fold)

ST: L-tryptophan-D-glucose (dilution ratio, A; 1,000-fold, B; 10-fold)

内液の吸収曲線を見ると特異的な吸収極大が消失し、一般的なアミノ・カルボニル反応の着色物質の示す特異性のない吸収を示しており、他のアミノ酸系の場合もこれに類似している。この結果、透析外液Ⅲまでにはほとんどの透析性物質は透析されていることが認められ、薄層クロマトグラフィによってこれを確かめた。

(2) 反応液の抗酸化性におよぼす凍結乾燥処理の影響

まず反応液を直接凍結乾燥した場合の抗酸化能を、もとの反応液の抗酸化能と比較して結果を第1表に示した。

この結果、凍結乾燥処理によって、いずれの反応液も抗酸化能が低下することが明らかとなった。すなわち、反応液を凍結乾燥処理したものは未処理のものに比べてPOV%もTBA%いずれも大きく抗酸化能の低下を示している。これは反応液の抗酸化性の発現

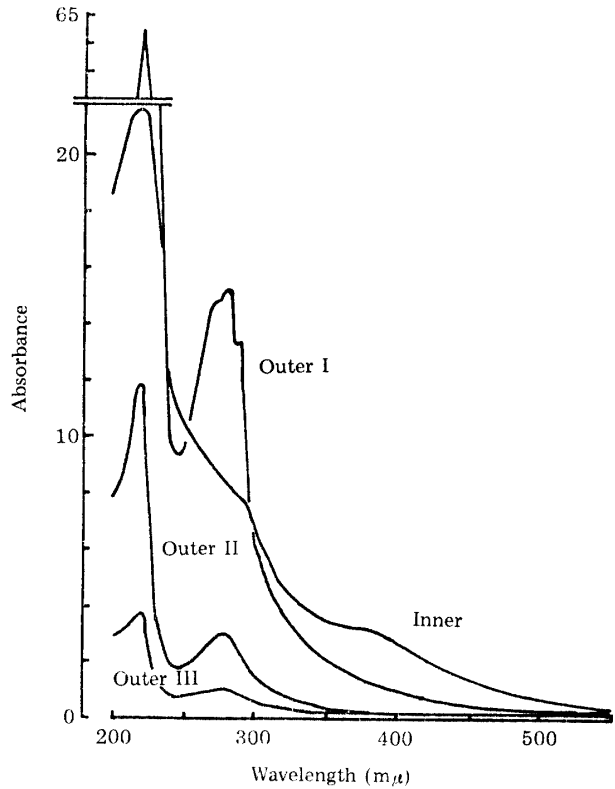


Fig. 2. Absorption Spectra of the Inner and the Outer Solution after dialysis of Browning Solution of Tryptophan with Glucose.

Preparation of browning solution was the same as shown in the legend of Fig. 1.

Ten ml. of the resulting browning solution was dialysed against 100 ml. of the distilled water for 3 days at 5°C, renewing the outer solution every day, and these outer solutions were shown as Outer I, II and III, respectively.

The inner and the outer solutions used for the measurement of absorption spectrum were prepared, corresponding to the solution diluted to 5- and 50-fold for the mother browning solution, respectively.

には、凍結乾燥処理によって酸化あるいは変性するような物質も関与していることを示している。

(3) 透析内・外液の抗酸化性におよぼす凍結乾燥処理の影響

透析内・外液の抗酸化能と凍結乾燥処理後の抗酸化能について比較した結果を第2表に示した。

内液および内液の凍結乾燥物については水に不溶であったのでエチルアルコールを加え溶解し、緩衝液で希釈したものについて測定したものである。

この結果によれば、内液の抗酸化能は外液に比べて強く、外ⅡおよびⅢはほとんど抗酸化能を示さず、透析液の抗酸化性物質は外液Ⅰに含まれることを示して

Table 1. Influence of Lyophilization on Antioxidant Activity of Browning Solution.

Browning solution (with D-glucose)	Antioxidant activity ^{a)}			
	—		Lyophilized	
	POV (%)	TBA (%)	POV (%)	TBA (%)
DL-glycine	34	80	54	80
L-lysine	24	60	48	78
L-tryptophan	6	8	26	27

Preparation of browning solution was the same as shown in the legend of Fig. 1.

Five ml. of incubation mixture consisting of 2.5 ml. of 2×10^{-2} M. linoleic acid solution and 2.5 ml. of the diluted browning solution (100-fold) was shaken at 40°C for 24 or 50 hr..

a): The values in the table are the percentage to the peroxide value or TBA value of the control experiment without browning solution.

いる。凍結乾燥の処理を行なうことによって、内液の抗酸化能はほとんど変化しない。しかし外液 I では低下が認められた。従って、反応液の凍結乾燥処理による抗酸化能の低下は透析性の低分子物質が酸化あるいは変性されたためと解釈される。

次に、アミノ酸を異にする反応液の抗酸化能の差は内液もまた外液にも差が認められることから、反応するアミノ酸によって生成される中間物質の種類や量が異なり抗酸化性に差を生じ、またメラノイジンも構造が異なり抗酸化能に差を生じて、これらの総合的な効力の和あるいは共助的効果として発現され抗酸化能に差が認められるものと推察される。

(4) 透析内外液の抗酸化能の比較

各凍結乾燥物の抗酸化能を比較した結果を第 3 図に示した。

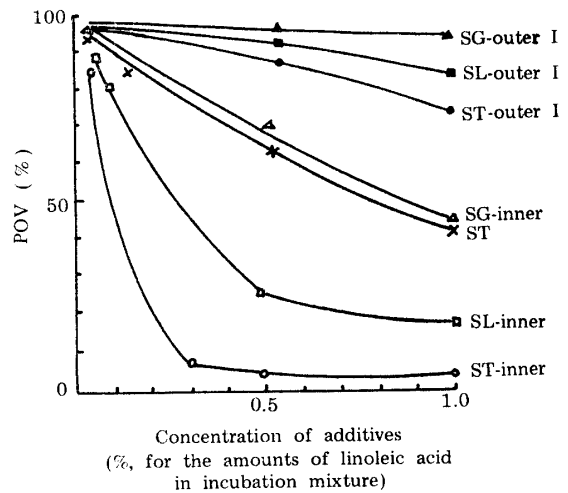


Fig. 3. Antioxidant Activity of Lyophilized reaction products.

Preparations of browning solution and dialysis were the same as shown in the legend of Fig. 1 and 2.

Incubation for the autoxidation of linoleic acid was the same as shown in the legend of Table 2., except that the solid matter obtained by lyophilization was added in incubation mixture, and that the incubation time was 20 hr..

この結果、いずれも内液すなわちメラノイジンの抗酸化能が強く、外液 I の凍結乾燥物の抗酸化能は低いことが明らかである。この外液の凍結乾燥物は吸湿性がきわめて大で、この中には未反応あるいは反応中に遊離した糖やその他のアルデヒド類のような抗酸化性を有しない物質を多量に含むと考えられ、また酸化促進的な物質も含まれるかも知れないので、凍結乾燥物の抗酸化能の低いのは予想されることである。そしてトリプトファン系の反応液を直接凍結乾燥したもの(第 3 図で ST で示した)の効力はこのメラノイジン(第 3 図の ST 内)の効力に比べてかなり劣ってい

Table 2. Influence of Lyophilization on Antioxidant Activity of Inner and Outer solution after Dialysis of Browning Solution.

Browning solution (with D-glucose)	POV (%)					
	Inner		Outer I		Outer	
	—	Lyophilized	—	Lyophilized	II	III
DL-glycine	60	64	81	95	112	111
L-lysine	20	23	51	64	100	110
L-tryptophan	7	5	20	31	89	92

Experimental conditions were the same as shown in the legend of Fig. 1 and 2.

The absorbances of inner and outer solution, which was followed by incubation with linoleic acid solution, were adjusted to be equal to them, of the mother browning solution diluted to 1,000-fold; the wavelength applied the browning solution of glycine- and lysine-glucose was 280 m μ , and tryptophan-glucose was 290 m μ .

る。

これらのことから、トリプトファン・グルコース系反応液の抗酸化能は主としてメラノイジンによるものとみてよいが、低分子物質の抗酸化能もある程度関与しているものと考えた。

2. 抗酸化性低分子物質の検索

前項において、透析部すなわち低分子部にも抗酸化性物質が存在することが知られたので、これらの分別を試みた。これらの物質は凍結乾燥しても抗酸化性を失うほど不安定なものなので、完全な単離は困難と考えられるが、これらの概要を知るためこの実験を行なった。

a. 薄層クロマトグラフィによる抗酸化物質の検索

薄層クロマトグラフィを利用する抗酸化剤の検出法については、種々研究されているが、いずれも抗酸化剤の化学構造が明らかで、この作用基と反応するものや、作用機構についても明らかにされている物質について適用されている方法である。すなわち、抗酸化性物質が多くの場合還元性を有することから還元能を調べるなどの検出法がとられているが、これらの反応に陽性な物質がすべて油に対し抗酸化的に働くとは限らないので、本研究に適する薄層クロマトグラフィによる検出法を考究し、次の方法を見出した。薄層クロマトグラム上にリノール酸を噴霧し酸化させると抗酸化性物質の存在する所ではリノール酸の酸化が遅くなり、これを何らかの手段で検出すれば、抗酸化物質の存在が明らかになるはずである。この検出法について

種々試験した結果、リノール酸を噴霧して酸化したのうち、先に POV の測定に利用したロダン鉄試薬⁴⁾ と TBA 値測定に利用したチオバルビツール酸試薬⁵⁾ で検出する2つの方法を考案し、既知の方法と併用し適用した。

本項では、考案した検出方法について述べ、更にトリプトファン・グルコース反応液の薄層クロマトグラフィを行ない、各種検出試薬によって呈色させた結果について検討した。

反応液をシリカゲル G の薄層板につけ、n-ブチルアルコール、酢酸・水で展開したあと、呈色させた結果を第3表に示した。

紫外線燈下で蛍光物質はほぼ全面に認められたが、ここでは種々の検出試薬で陽性を示した6つのスポット(分画)についてのみ検討を加えた。これらのスポットは R_f の高い方からスポット A~F とした。

肉眼による着色は原点スポット C, D および F を含んでいる部位にわずかに認められた。

スポット A は、フェノール化合物などに反応するジアゾ試薬およびインドール化合物や芳香族アミノに反応する、エールリッヒ試薬に対し陽性で、青白色の蛍光をもっていた。これは、トリプトファンの分解物として考えられるアントラニール酸、5-オキシアントラニール酸、インドール、5-オキシインドール、5-オキシインドール酢酸と類似していたが、純品との比較試験でこれらの物質ではないことがわかった。

スポット B は、抗酸性物質の検出試薬であるジフェ

Table 3. Thin Layer Chromatography of Browning Reaction Products Prepared from Tryptophan and Glucose.

Spot	A	B	C	D	E	F
Reagent	0.72	0.61	0.48	0.32	0.23	0.15
Color (naked)	—	—	Pale brown	Pale brown	—	Pale brown
Ninhydrin (Nin.)	—	—	+	+	+	+
Ammoniacal AgNO ₃	—	—	—	+	+	+
Elson-Morgan's	—	—	—	+	—	+
2, 3, 5, -Triphenyltetrazolium chloride	—	—	—	+	—	+
Ehrlich's	+	—	+	—	+	—
Diazotized sulfanilic acid (DSA)	+	—	+	+	+	+
α, α'-Diphenyl-β-picryl-hydrazyl (DPPH)	—	+	+	+	+	+
Phosphomolybdic acid (P-Mo)	—	+	+	+	+	+
Emerie-Engel's	—	—	+	+	+	+
2, 6-Dichloro-quinone-chloroimide	—	—	+	+	—	+
Folin's Phenol reagent	—	—	+	+	+	+
2-Thiobarbituric acid (TBA)	—	—	+	+	—	+
Ferric thiocyanate (Fe-SCN)	—	—	+	+	—	+
2, 6-Dichlorophenolindophenol (DCPI)	—	—	+	+	—	+
Fluorescence (3650 Å, UV Light)	Blueish white	Blueish white	Purple	Blueish white	Yellow	Yellowish blue

Silica gel G (0.25 mm), n-Butyl alcohol-Acetic acid-water (4: 1: 5)

ニルピクリルヒドラシル, リンモリブデン酸試薬に陽性であるが反応は弱く, 他のリノール酸噴霧試験などには陰性であった. そしてレダクトン検出試薬のジクロロフェノールインドフェノールに陽性であった. また糖およびトリプトファン誘導体の検出試薬に陰性で, レダクトン類の一種と推定されたが量的に少ないものと考えられる.

スポットCは, 標品と比較してトリプトファンであることが明らかになった. 抗酸化性物質の検出試験で陽性を示したが, 量が少ないときには反応が現われないこともある.

スポットDはニンヒドリン陽性であるが, トリプトファンに比べ発色が遅く, しかも呈色が異なり帯青紫色のスポットである. また糖やアミノ酸の検出試験であるアンモニヤ性硝酸銀, エルソン・モルガン, トリフェニルテトラゾリウムクロリド試薬に陽性で, トリプトファン誘導体の検出試薬であるエールリッヒ試薬にも陽性の物質である. 更にこのDは抗酸化性物質の検出試薬には陽性を示した. この付近に Rf を示すトリプトファン分解物としてキヌレニン, キヌレニン酸あるいはキサントレン酸も考えられるが, これらの純品との比較試験の結果否定された. 呈色反応などから, 糖アミノ酸の存在が考えられる. このスポットの部分にはなお数種の化合物が混在することも考えられるが, この部分の存在する抗酸化性をもつ物質を一応D物質とする.

スポットEはニンヒドリンおよびアンモニヤ性硝酸銀に陽性であるが, エルソン・モルガン試薬やトリフェニルテトラゾリウムクロリドには陰性であり, 抗酸化性もリノール酸を酸化して検出するロダン鉄およびチオバルビツール酸試薬には陰性であった. なおこれらの部分には数種の物質が多数混在しているものと考えられる.

スポットEはDと似た呈色を示したが, この Rf 付近には糖類あるいはレダクトン類やその他の分解産物を含む水溶性の大きい物質が存在すると考えられる. 従って糖アミノ酸の可能性もあるが, レダクトン類の存在も推定される. このスポット部に存在する抗酸化性物質をF物質とする. この部分には5-オキシトリプトファン, 5-オキシキヌレニンの存在も考えられるが, 純品との比較試験で否定された.

全ての抗酸化性物質の検出試薬に陽性であったのはC, DおよびFの3つであった. 他の抗酸化性試薬に陽性でも, リノール酸を酸化させて検出する方法(ロダン鉄法, チオバルビツール酸法)で陰性の場合であ

るが, 後者の方法で陽性の物質は確実に抗酸化性を有する物質といえる.

生体内においてトリプトファンはインドール核のピロロール環の間裂に伴い種々の中間代謝産物が生成されることが知られている. また酵素系によらず吉田ら¹⁵⁾はトリプトファン水溶液を日光にさらしたときキヌレニン, 3-オキシキヌレニンを, JAYSON ら¹⁶⁾はX線照射によってフォルミルキヌレニンの生成を認めており, 満田ら⁴⁾はリノール酸液にトリプトファンを加え自動酸化を行なった際に上述の3つの化合物の他に5-オキシトリプトファンおよび5-オキシインドール酢酸の存在を推定している. トリプトファン・グルコース系反応液の薄層クロマトグラフィでキヌレニンなどのスポットは認められなかった. 存在するとしても極く少量のものと考えた.

以上のようにこの方法ではトリプトファングルコース系反応液中には抗酸化性物質の検出試験に陽性のスポットが5つ認められた. しかし全ての抗酸化性物質の検出試薬に陽性を示したのは3スポットであった.

3. イオン交換樹脂による抗酸化性物質の検索

前項でトリプトファン・グルコース反応液中には抗酸化性を示す物質が多数存在することが知られた. そこでイオン交換性樹脂カラムを用いてこれらの物質を分別することを試みた.

イオン交換性樹脂の選択は稲神の方法¹²⁾を参照して行なった. 陽イオンおよび陰イオン交換性樹脂を用いてトリプトファンの吸着および溶出について検討した結果, 強酸性陽イオン交換性樹脂以外は全て吸着されずに通過するか, あるいは分離が悪いのでトリプトファンを含む反応液中の物質の分画には不相当であると考えられた. そこでトリプトファンとグルコースとの反応液をDowex 50-W(H⁺)を用いて分画し, 抗酸化性について検討を加えた.

結果は第4図に示した. また第4図で抗酸化性が認められた溶出分画の吸収曲線を第5図に示し, 比較のため第6図にL-トリプトファンの標品と反応液の吸収曲線を示した.

着色物質は強く吸着されほとんど溶出されず, カラムの上部にとどまったが, 試験管 No. 100 付近から着色物質の一部が溶出されてきた.

溶出されてきた抗酸化性物質は極めて多く, 中でもNo. 36 は高い値を示した. しかしNo. 84 より早く溶出したものは処理条件を同一にしても必ずしも常に高い値を示すとは限らず変動し, 不安定な物質であることを示した. この第4図は最も高い値を示した時の

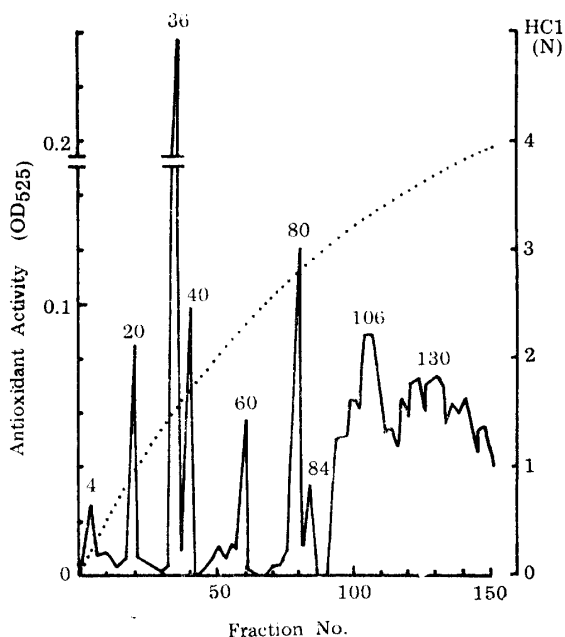


Fig. 4. Cation-exchange Chromatography of Outer Solution after Dialysis of Browning Solution of Tryptophan with Glucose.

A mixture of 8.8 mg. D-glucose and 5 mg. L-tryptophan in 10 ml. 0.05 M phosphate buffer of pH 7.5 was heated at 130°C for 1 hr., and then was followed by dialysis. The resulting outer solution was chromatographed by the gradient elution method on Dowex 50-W(H⁺) column (2×15 cm) with developer consisting of water and 6N HCl.

A fraction was collected 10 ml of eluant. Antioxidant activity was determined by Anglin method¹³⁾.

Figures on the peak is fraction-number.

ものである。

第5図の No. 4 は 230, 280 $m\mu$ に吸収極大を有し, 277~285 $m\mu$ のいわゆるフルフラール領域に極大を有することからフルフラールあるいはヒドロキミメチルフルフラールを含む可能性があるが, これらの物質が抗酸化性を有するとは考えられないので, 他の物質の混在が推察される。No. 20 から No. 80 にかけては特徴的な吸収は認められないが, 還元性が強いことからレダクトン類が含まれることが推定される。No. 106 は 340 $m\mu$ 付近に吸収を示したが, この溶出部には塩基性物質のトリプトファンに関連化合物の存在が考えられる。稲神は¹⁵⁾ Dowex 50-W(H⁺) カラムで塩酸濃度が2.5~5規定付近で溶出される物質としてアントラニール酸, アセチルキヌレニン, キヌレニン, キヌレニン酸, キサントレン酸を認めているが, これらの物質の吸収極大波長と No. 106 のそ

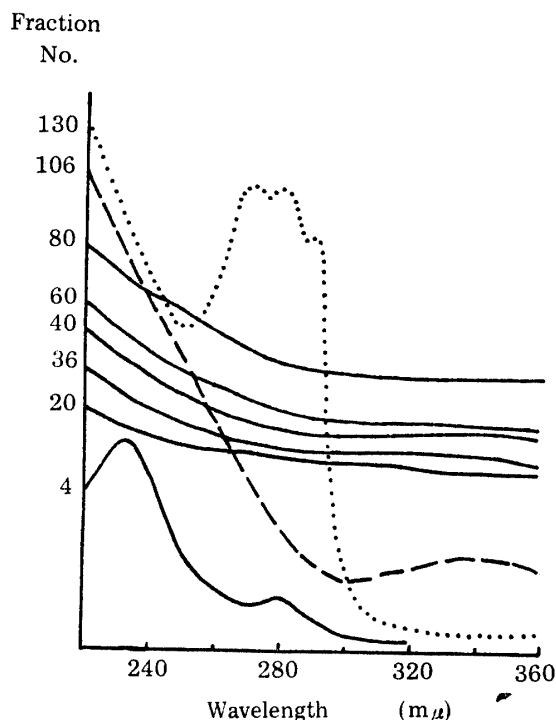


Fig. 5. Absorption Spectra of Some Fractions.

れとは異なり, また薄層クロマトグラフを行なった結果もこれらと一致するものは認められなかった。桜井ら¹⁷⁾によると, 一般にアミノ・カルボニル反応の中期段階において近紫外部に吸収を示す物質が生成されてくることが知られているので, あるいはトリプトファンと関連のない一般的な中間生成物かも知れない。

No. 130 の吸収極大は第6図に示したトリプトファンの吸収極大と一致しトリプトファンおよびその誘導体を含むものと考えられる。

また反応液自体の吸収曲線第6図に見られるようにトリプトファンの吸収曲線とほとんど変わらない。すなわち, 量的にはインドールに核を含む物質が多いと考えられる。なお各分画を中和したのち真空凍結乾燥し, リノール酸に対する抗酸化性を調べたが処理中に酸化されたのみか, トリプトファン分画を除く他の分画部は全く陰性であった。

イオン交換性樹脂カラムによる濃度こう配溶離法によって抗酸化性を示すと考えられる数種の不安定な物質の存在が認められたので, 更にこれらの分別を試みた。L-トリプトファン 0.2 g と D-グルコース 0.6 g とを pH 7.5, 0.05 M リン酸緩衝液 100 ml に溶解し, 130°C で1時間加熱して反応液を調整する。この反応液を透析して, 透析外液約 300 ml を塩酸で約 0.05 規定とする。この溶液を Dowex 50-W(H⁺) 2×

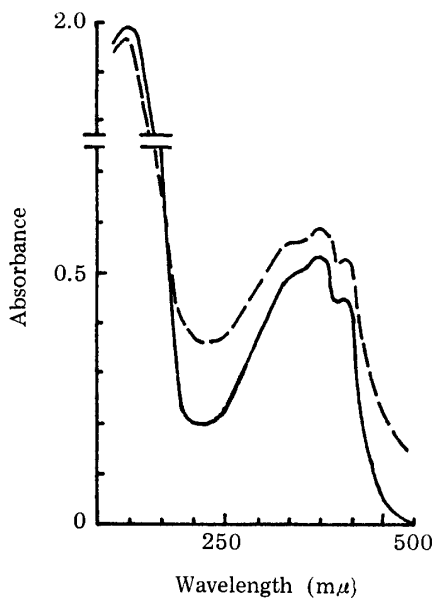


Fig. 6. Absorption Spectra of Tryptophan Solution and Browning solution of Tryptophan with glucose.

—: L-tryptophan solution
: Browning solution

Solvent: 0.05M. phosphate-buffer, pH 7.5

15 cm のカラムに通し、水洗して未吸着部と混合した。続いて 0.1 規定塩酸 500 ml を注加し、0.2, 0.5, 1.0, 2.5 規定塩酸各 2 l ずつで溶出した。更に 5 規定塩酸 2 l で 2 回溶出を行ない、これらを別々に窒素気流体中で、40°C 以下で減圧乾固を繰返して塩酸を除いた。残査を水で溶解し未吸着部を 0.1 規定塩酸部は 5 ml とし、他は 100 ml とした。更に、これらの一部をとり pH 7.5, 0.05 M リン酸緩衝液で 10 倍に希釈して、この 2.5 ml を 2×10^{-2} M リノール酸液 2.5 ml に加え、自動酸化を行なわせ過酸化価を測定し抗酸化能を比較した。

結果は第 7 図に示したが、トリプトファン・グルコース系反応液中の抗酸化性物質は未吸着部と 2.5 規定および 5 規定塩酸部に溶出される 2 つの区分に大別される。前者は中性あるいは酸性物質を、後者は塩基性物質を含むものと推定される。

ここで得た未吸着部の薄層クロマトグラフィを行ない抗酸化性物質の検出を試みた結果第 4 表のように抗

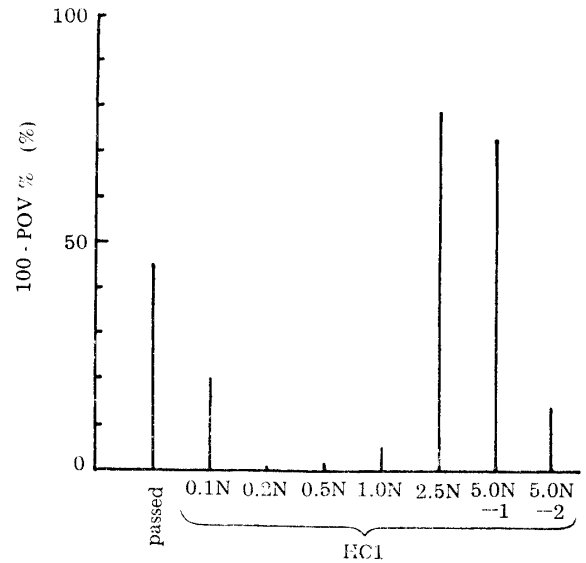


Fig. 7. Antioxidant Activity of fraction obtained by Cation-Exchange Chromatography of Browning Solution of Tryptophan with glucose.

Preparation of browning solution was the same as shown in the legend of Fig. 4.

The resulting browning solution was chromatographed by the stepwise elution method on Dowex 50-W(H⁺) column with the hydrochloric acid solution of the concentration indicated.

酸化性を示す 1 つのスポットが認められた。このスポットは前項で認めた F 物質と同一物と推定される。なおさきの F 物質はニンヒドリン陽性としたが、ここでは陰性となったのは F 物質部に混在していたニンヒドリン陽性物質が純化で除去されたのである。この化合物の単離を試みる間にこのスポットは消滅し、非常に不安定で酸化を受け易い物質で、インドフェノール試薬にも陽性を示し、レダクトン類と推定された。

次に、2.5 規定塩酸溶出部の薄層クロマトグラフィを行ない、抗酸化性物質の検出を試みた結果を第 5 表に示す。

この結果、抗酸化性を持つと考えられるスポットが認められた。Rf 0.78 のスポットはジフェニルピクリルヒドラジルでわずかに陽性を示したが、他の抗酸化性物質を検出する試薬では陰性であり、またニンヒドリンでも陰性を示した。これは先の TLC でレダクト

Table 4. Thin Layer Chromatography of Passed Fraction.

Rf	Fluorescence	Nin.	Ehrlich's	DSA	DCPI	TBA	Fe-SCN
0.20	Pale blue	—	—	—	+	+	+

Silica gel G (0.25 mm),
 n-Butyl alcohol-Acetic acid-water (4:1:5)

Table 5. Thin Layer Chromatography of 2.5 N HCl eluted fraction.

Rf	Nin.	DPPH	P-Mo	TBA
0.78	—	±	—	—
0.60	++	+	+	+
0.50	+	++	++	++

Silica gel G (0.25 mm)
n-Butyl alcohol-Acetic acid-Water (4:1:5)

種類の一つと推定したB分画の物質と同じものと考えられる。呈色反応の結果から一般的なアミノ・カルボニル反応によっても生成される物質と予想され、レダクトン的一种と考えられる。

Rf 0.60 のスポットは標品と比較した結果トリプトファンであることが確認された。

Rf 0.50 のスポットは、先の TLC でも認められたD物質と一致し、糖アミノ酸と推定される物質である。

5 規定塩酸溶出部は薄層クロマトグラフィによって検討したところ、2.5 規定塩酸溶出部と全く同じクロマトグラムが得られた。

さらに種々の方法によってD, F物質の純化、結晶化を試みたが、純化するにつれて抗酸化能は失なわれてゆき、ついには全く抗酸化能を示さない物質および着色物質に変化した。このようにトリプトファン・グルコース反応液には幾種の抗酸化性物質が含まれていたがいずれも不安定な化合物であった。なおメラノイジンとこれらの物質との間には抗酸化作用において多少の共助効果が見られたが、それ程度強いものではなかった。透析液中に存在する低分子の抗酸化性物質は反応液中に共存するときはかなり安定であるが、順次単離してゆくと急に不安定となる現象が見られた。これは還元性物質などにみられる相互に作用し合って安定化がはかられている現象とみられる。

要 約

トリプトファン・グルコース反応液中のどのような成分が、抗酸化能に関係しているかについて検討した。まず反応液を透析し、非透析性のメラノイジンと透析性の低分子物質にわけ、両者の抗酸化能を調べた。その結果、この反応液の抗酸化能は主としてメラノイジンにあるが、低分子物質もある程度関与しているものと考えられた。その各々を凍結乾燥すると前者では抗酸化能の低下はみられなかったが、後者では低下がみられ、不安定な物質よりなることがうかがわれた。

メラノイジンについてみるに、トリプトファン系のそれは、リジンおよびグリシンなどから作られたメラノイジンよりも強い抗酸化能を示し、メラノイジンの種類によって抗酸化能を異にすることがわかった。

さらに、この反応液の透析される部分に存在する低分子の抗酸化性物質の検索を行なった。そしてまず、抗酸化性物質の簡易な検出法について検討し、試料が展開された薄層クロマトグラムにリノール酸を噴霧し、ある時間酸化させたのち、チオバルビツール酸を反応させ、酸化が防止された部分が発色しないで白いスポットとして検出される方法、および同様にロダン鉄試薬で検出する方法を考案した。この検出法を用いて、イオン交換性樹脂 (Dowex 50 W(H⁺)) カラムで分別された分画について抗酸化性物質の検索を行なった。そして、前記の透析液には少なくとも5つ以上の抗酸化性を示す物質が検出され、そのうちの一部はレダクトン類で、すべて極めて不安定な化合物よりなることがわかった。そしてキヌレニン、ヒドロキシキヌレニンなどのトリプトファン分解物の存在は確認出来なかった。すなわち、トリプトファン・グルコース反応液の抗酸化能は主として着色物質のメラノイジンによっており、それにレダクトン類を含む数種の不安定な反応中間物質が共助的に関与して発現しているものと考えた。

本研究遂行上、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜わった 稲神馨博士 (元九大教授、現カルピス研究所長)、山藤一雄名誉教授 (九州大学)、九州大学豊水正道教授、大村浩久教授、阿久根元教授、鹿児島大学山田晃教授に感謝の意を表す。更に、御便宜を賜わった九州大学農学部食糧化学工学科の諸氏に対し謝意を表す。

文 献

- 1) 富田裕一郎：鹿大農学術報告. **21**, 423, 453 (1971).
- 2) 富田裕一郎：同上誌. **22**, 1 (1972).
- 3) N. KIRIGAYA, H. KATO and M. FUJIMAKI: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 287 (1968).
- 4) 満田久輝・安本教伝・岩見公和：栄養と食糧, **19**, 210 (1966).
- 5) L. K. DAHLE, E. G. HILL and R. T. HOLMAN: *Arch. Biochem. Biophys.*, **98**, 253 (1962).
- 6) A. SEHER: *Fette, Seifen Anstrichmittel*, **61**, 345 (1956).
- 7) J. GLAVIND and G. HOLMER: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **44**, 539 (1967).
- 8) 鈴木郁生：薄層クロマトグラフィの実際, 広川書店 (1968).

- 9) 松下雪郎：日本農芸化学会．昭和43年度大会講演要旨集，p. 298 (1968).
- 10) 稲神 馨：熊本県蚕業試験場報告. **6**(5)(1958).
- 11) H. VON EULER・野村男次・足立 達・山藤一雄：レダクトン化学の基礎とビタミンCの生化学的成果．内田老鶴圃 (1960).
- 12) 稲神 馨：化学の領域. **16**, 619 (1962).
- 13) C. ANGLIN, J. H. MAHON and ROSS A. CHAPPMAN : *J. Agr. Food Chem.*, **4**, 1018 (1956).
- 14) 川岸舜朗・並木満夫：食品照射. **2**, 73, 86 (1967).
- 15) 吉田善一・加藤勝：日化, **75**, 106 (1954).
- 16) G. G. JAYSON, G. SCHOLLES and J. WEISS : *Biochem. J.* **57**, 386 (1954).
- 17) 桜井芳人・満田久輝・柴崎一雄編：食品保蔵. p. 285, 朝倉書店 (1966).

Summary

For the detection of antioxidative compounds in the browning-reaction-products, various combinations of some techniques were employed; dialysis, lyophilization, spectrophotometric method, ion-exchange column and thin layer chromatography. In addition, it was designed that the rapid detecting method should be consisting of the combined reaction of the oxidation of linoleic acid sprayed on the thin layer chromatoplate and the color reaction of ferric thiocyanate or TBA solution sprayed on the same plate.

As the result, it was ascertained that melanoidine that is the macromolecule and brown colored compound was a major substance in the active agents and it was showed that it should play an important role in antioxidant action of these products. Moreover, it was found that the low molecular and colorless compounds such as the dialysable substances may be related to bring forth a little effect.