

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3報)

トリプトファン・糖およびアルデヒド系反応生成物の抗酸化性

富田 裕一郎

Studies on Antioxidant Activity of Amino-Carbonyl Reaction Products

Part III. Antioxidant Activity of Browning Solution of Various Sugar or Aldehyde with Tryptophan

Yûichirô TOMITA

(Laboratory of Animal Nutrition)

アミノ酸と各種のカルボニル化合物との反応生成物の抗酸化物については不明の点が多い。そこで本報においては、前報¹⁾で明らかにしたトリプトファン・グルコース反応液調製の条件を適用して、トリプトファンと各種単糖類との反応液の抗酸化能について検討した。さらにトリプトファンと数種のアルデヒド類との反応液の抗酸化能を比較し、カルボニル化合物の構造と抗酸化能の発現との関係について検討を加えた。また、反応中にアミノ酸の分解物が、糖あるいは糖分解物と反応することも推察されるので、トリプトファン関連化合物の抗酸化能についても試験した。

実験方法

基質、自動酸化法、POV, TBA, DPPH および着色度測定法ならびに添加濃度は前報¹⁾記載の通りである。

1. 単糖類および糖アルコールとの反応液の調製

a. 供試糖：DL-グリセロール (C_3), D-エリスロース (C_4), D-リボース (C_5), D-キシロース (C_6), および D-グルコース (C_6) のアルドースとケトヘキソースの D-フラクトース (C_6) また糖アルコールの D-ソルビット (C_6) の7種である。

b. 反応液の調製法：反応液は $10^{-2}M$ の L-トリプトファンと $10^{-2}M$ の糖を含む pH 7.5, 0.05 M リン酸緩衝液の溶液を $120^{\circ}C$ で1時間加熱して調製した。

2. 数種のアルデヒドとの反応液の調製

a. 供試アルデヒド：飽和アルデヒドとしてアセトアルデヒド (C_2), プロピオンアルデヒド (C_3), n -

カプロンアルデヒド (C_8), 不飽和アルデヒドとしてアクロレイン (C_3), フルフラール, フェニルアクロレイン, α -ケトアルデヒドとしてメチルグリオキサール, α -オキシアルデヒドとしてグリセロール, 芳香環を有するものとしてベンズアルデヒド, さらにフェノール基を有する P -オキシベンズアルデヒドの10種である。

b. 反応液の調製法：反応液は $10^{-2}M$ トリプトファンと $10^{-2}M$ アルデヒドを含むように pH 7.5, 0.05 M リン酸緩衝液にとかし、封管として $120^{\circ}C$ で1時間加熱して調製した。

3. トリプトファン関連化合物および反応液の調製

a. 供試化合物：キヌレニン酸硫酸塩, キヌレン酸, 6-オキシキヌレン酸, 8-オキシキヌレン酸 (キサントレン酸), 4-オキシキノリン, キノリン酸, 5-オキシインドール酢酸, 2-ケト-7-オキシインドール酢酸およびキサントマチンに類似したフェノキサゾン核をもつカタリンの9種について試験した。

b. 試験液の調製：

i) これら9種の化合物をエチルアルコールに溶解し, pH 7.5, 0.05 M リン酸緩衝液で希釈して, リノール酸液に加え抗酸化能を比較した。この場合の添加濃度は $10^{-3}M$ である。

ii) グルコースとの加熱反応は $10^{-2}M$ の上述9種の化合物と $10^{-2}M$ のグルコースを含むように pH 7.5, 0.05 M リン酸緩衝液に溶解して, $120^{\circ}C$ で1時間加熱し調製した。抗酸化能の比較はリノール酸液への添加濃度が, カタリン $2 \times 10^{-5}M$, 6-オキシキヌレン酸 $6.7 \times 10^{-5}M$, 2-ケト-7-オキシインドール酢酸 $4 \times 10^{-4}M$, キノリン酸 $8 \times 10^{-4}M$, これ以外のものは

$2 \times 10^{-4} M$ となるように加えた。

結果および考察

1. 単糖類および糖アルコールとの反応生成物の抗酸化性

第1図に POV の, 第2図に TBA 値の経時的变化を示した。この結果, 各種の糖をトリプトファンと反応させた時に抗酸化能の発現に影響する割合は, ア

ルドースでは D -リボース \approx D -キシロース $>$ D -エリスロース $>$ D -グルコース $>$ DL -グリセロースの通りであった。この関係は POV の変化 (第1図) および TBA 値の変化 (第2図) 何れを見ても同じ結果が得られた。しかし, 3炭糖のグリセロースを除けば, 他の糖では極端な差はなく, 前報¹⁾で認められたアミノ酸の種類による差異に比べると影響は少ないと考えられる。

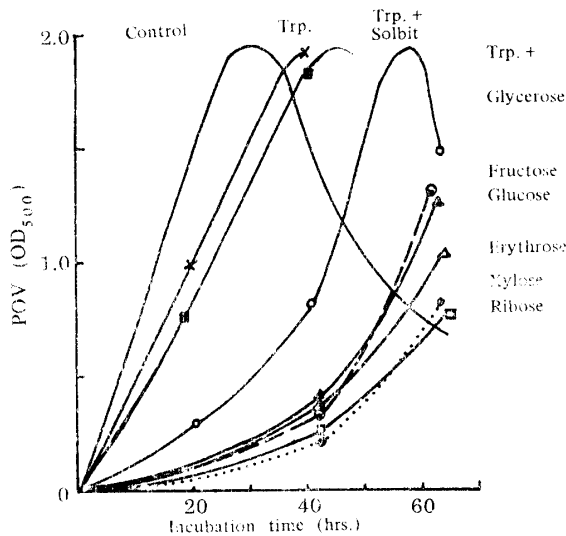


Fig. 1. Antioxidant Activity of Browning Solution of Various sugars with Tryptophan.

Linoleic acid was dissolved in ethyl alcohol and diluted with 0.05 M phosphate buffer of pH 7.5. This solution, containing 20% ethyl alcohol, was used as the substrate.

Five ml. of incubation mixture consisting of 2.5 ml. of linoleic acid solution and 2.5 ml. of the adequately diluted browning-solution was shaken at $40^{\circ}C$.

Final concentration of linoleic acid was $10^{-2} M$. The concentration in incubation mixture, shown on the basis of initially given amino acid, was $2 \times 10^{-5} M$.

A mixture of $10^{-2} M$ L-tryptophan and $10^{-2} M$ sugar in buffer solution was heated at $120^{\circ}C$ for 1 hr..

Peroxide value (POV) was determined as OD_{500} by the method of the previous paper.¹⁾

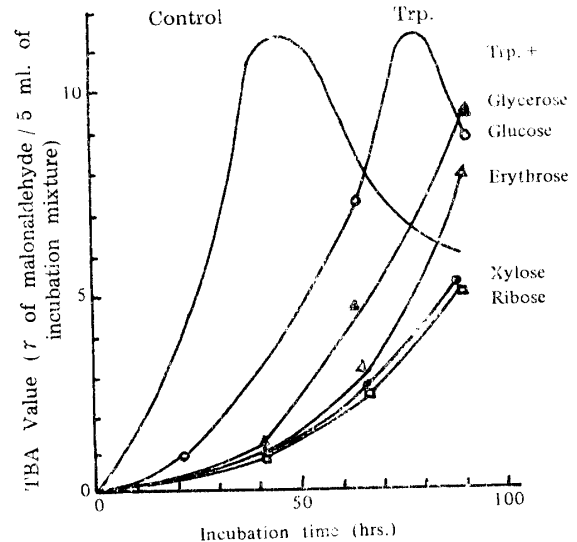


Fig. 2. Antioxidant Activity of Browning Solution of Various Sugars with Tryptophan.

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

TBA was determined according to the method of previous paper.¹⁾

ケトースである D -フラクトースとトリプトファンとの反応液はグルコースの場合とほとんど差はない。またソルビットとトリプトファンとの反応液の抗酸化能はトリプトファンのみの効力と差がなく共存するトリプトファンの抗酸化能のみが発現しているものと考えられる。桐ヶ谷ら²⁾は糖の種類をかえてアミノ酸と反応させて得たメラノイジンの抗酸化能について5炭糖であるキシロースを用いた時が強いことを報告しており, 本研究の結果と一致している。

着色度の測定結果を第1表に示したが, アルドース

Table 1. Color Intensity of Browning Solution of Various Sugars with Tryptophan.

| Sugar (with Trp.) | DL-Glycerose | D-Erythrose | D-Ribose | D-Xylose | D-Glucose | D-Fructose | D-Sorbitol |
|--------------------------------|--------------|-------------|----------|----------|-----------|------------|------------|
| Color Intensity (OD_{430}) | 2.800 | 1.497 | 1.428 | 1.565 | 0.934 | 1.131 | 0.093 |

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

ではグリセロースが最も着色度大であり、グルコースが最も小さい値を示した。糖の反応性は溶液中で開環型すなわちアルデヒド型で存在する量に平行しているといわれ、CANTER ら³⁾は5炭糖が6炭糖に比べて開環型の量が多いことを報告している。これらのことから第1表に示した3炭糖のグリセロース・トリプトファン系反応液の着色度が高いのは当然であろうと考えられる。しかし、このグリセロースとの反応液の抗酸化能は他の糖の場合に比べ最も弱く、従って反応するカルボニル化合物によって、中間生成物や着色物質の性質や構造が異なり、このため抗酸化能に差を生ずるものと考えられる。

2. アルデヒドとの反応生成物の抗酸化性

トリプトファンとアルデヒドとの反応液の着色度と抗酸化能の測定結果を第2表に示した。一般には、着色度の大きなものが抗酸化能も大であると言える。飽和あるいは芳香環を有するアルデヒド化合物との反応液では着色度はきわめて低く、また抗酸化能も弱い。 α 、 β -不飽和アルデヒドでは着色度も高く、抗酸化能も大となっているが、不飽和アルデヒドであるフルフラールはフラン環を形成するため着色度はアクロレインに比べると弱い。最も強い着色度を示したものはメチルグリオキサールであった。次いでグリセロース、

Table 2. Antioxidant Activity and Color Intensity of Browning Solution of Various Aldehydes with Tryptophan.

| Aldehyde (with L-Trp.) | Color Intensity (OD ₄₃₀) | POV % ^{a)} (24 hr.) |
|-------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Acetaldehyde | 0.053 | 81 |
| Propionaldehyde | 0.073 | 45 |
| n-Capronaldehyde | 0.044 | 91 |
| Acrolein | 2.175 | 11 |
| Methylglyoxal | 5.325 | 15 |
| Glyceraldehyde (DL-Glycerose) | 3.700 | 17 |
| Furfural | 0.341 | 64 |
| Benzaldehyde | 0.062 | 81 |
| Phenylacrolein | 0.380 | 63 |
| p-Hydroxy-benzaldehyde | 0.180 | 63 |

Preparation of the browning solution was the same as the shown in the legend of Fig. 1, except that the sealed tube was used and the sugar was replaced by the aldehyde.

The concentration in incubation mixture, shown on the basis of initially given L-tryptophan, was 5×10^{-6} M..

a): The values are shown as the percentage to peroxide value of the control experiment without browning solution after incubation for 24 hr..

アクロレインの順であり、 α 位の炭素にケト基やヒドロキシ基を有する化合物か、 α 、 β -不飽和化合物で、何れも α 位に反応活性の強い基を持っているものである。しかし着色度の大きいものが強い抗酸化能を示すとは限らず、着色度に比べると α 、 β -不飽和アルデヒドの場合が強い抗酸化能を示すと言える。また、 α 、 β -不飽和アルデヒドであるフェニルアクロレインは水にほとんど溶解しないので、アルコールに溶解し、緩衝液で希釈し反応を行なわせたが、反応液には黒色の油状物が沈澱した。この油状物はアルコールに易溶であり上液はやや黄色を呈し透明であった。従ってこれらは反応液に対する溶解度も反応の進行に影響していることが考えられる。

3. トリプトファン関連化合物の抗酸化性

トリプトファンは他の糖類あるいは、アルデヒドの存在で容易に分解され、また水溶液を加熱するとき少量のインドールが生成することが知られている⁴⁾⁵⁾。従って本反応条件下でもトリプトファンが分解されることが予想される。全ての分解生成物が抗酸化性を有するとは考えられないが、この中にインドール核を有するものが存在すると、良好な電子供与性を示し、抗酸化性に影響すると推察される。

a. 固有の抗酸化性

この結果を第3図に示したが、6-オキシ-8-オキシキヌレン酸、5-オキシインドール酢酸およびカタリンの抗酸化能が強いことが明らかとなった。キヌレン酸、4-オキシキノリンおよびキノリン酸は効果なく、逆に酸化促進的であった。

b. グルコースとの反応生成物の抗酸化性

第4図に測定結果を示したが、カタリンが最も強い効力を示し、次いで2-ケト-7-オキシインドール酢酸、5-オキシインドール酢酸、8-オキシキヌレン酸等が強い抗酸化能を示した。

着色度および DPPH 法による電子供与性を第3表に示したが、カタリンはそれ自体褐色の化合物であるが、着色度はきわめて強く、その他キヌレニン、4-オキシキノリン、8-オキシキヌレン酸および6-オキシキヌレン酸が強く着色した。キヌレニンと8-オキシキヌレン酸はそれ自体、黄色の化合物である。

DPPH 値はカタリンがきわめて高値を示し、5-オキシインドール酢酸、2-ケト-7-オキシインドール酢酸も高い値を示した。

以上の結果から、強い抗酸化性を示す化合物は何れも水酸基を有するが、水酸基を有するもので、キヌレン酸、4-オキシキノリンのように何れもキノリン核を

Table 3. Color Intensity and Electron Donating Ability of Browning Solution of Various Tryptophan-Related Compound with Glucose.

| Compound (with D-glucose) | Color intensity (OD ₄₃₀) | Electron Donating Ability ¹⁾ |
|------------------------------------|--------------------------------------|---|
| Kynurenine | 9.050 | 0.065 |
| Quinolic acid | 0.258 | 0.029 |
| 4-Hydroxy quinoline | 7.150 | 0.150 |
| Kynurenic acid | 1.200 | 0.029 |
| 6-Hydroxy kynurenic acid | 3.167 | 0.689 |
| 8-Hydroxy kynurenic acid | 7.760 | 0.415 |
| 2-Keto-7-hydroxy indol acetic acid | 0.420 | 10.750 |
| 5-Hydroxy indol acetic acid | 0.850 | 33.000 |
| Cataline | 34.600 | 130.000 |

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

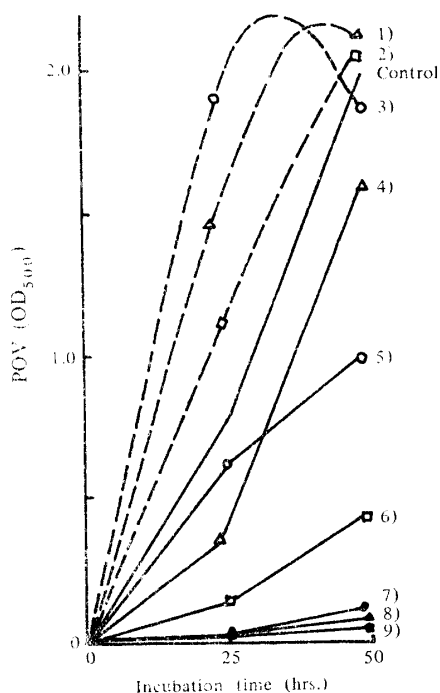


Fig. 3. Antioxidant Activity of Tryptophan Related Compounds.

Five ml. of incubation mixture consisting of 2.5 ml. the linoleic acid solution and 2.5 ml. of the adequately-diluted compound solution was shaken at 40°C. Final concentration of the compound was 10⁻³M.

1. Kynurenic acid, 2. 4-Hydroxy-quinoline, 3. Quinolic acid, 4. Kynurenine, 5. 2-Keto-7-hydroxy-indol acetic acid, 6. Cataline, 7. 6-Hydroxy kynurenic acid, 8. 5-Hydroxy-indol acetic acid, 9. 8-Hydroxy-kynurenic acid.

有し、4位の炭素に水酸基を有するものは強い抗酸化性を発現しないと考えられる。これらの構造式を示すと次の通りである。

ところが、この6位あるいは8位の炭素に水酸基の

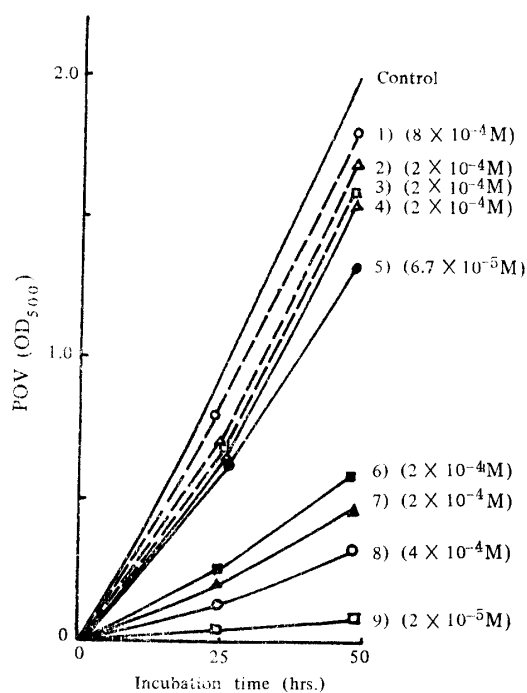
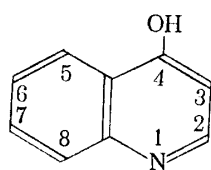


Fig. 4. Antioxidant Activity of Browning Solution of Tryptophan Related Compounds with Glucose.

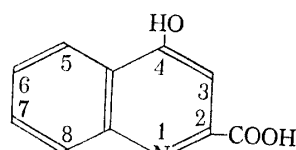
A mixture of 10⁻²M tryptophan-related compound and 10⁻²M D-glucose in 0.05M phosphate buffer of pH 7.5 was heated at 120°C for 1 hr..

Figures on curves indicated the concentration in incubation mixture, shown on the basis of the initially given tryptophan-related compound.

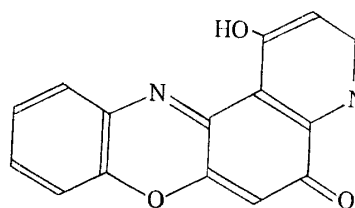
- 1): Quinolic acid, 2): Kynurenic acid, 3): 4-Hydroxy-quinoline, 4): Kynurenine, 5): 6-Hydroxy-kynurenic acid, 6): 8-Hydroxy-kynurenic acid, 7): 5-Hydroxy-indol acetic acid, 8): 2-Keto-7-hydroxy indol acetic acid, 9): Cataline.



4-オキシキノリン



キヌレン酸



カタリン

ついで 6-オキシおよび 8-オキシキヌレン酸は単独でも、水酸基のつかないものに比べ強い抗酸化性を示すことが認められた。これは一般的なフェノール性水酸基を有する抗酸化剤と同様にキノリン核のベンゼン環についた水酸基はH・を不飽和脂肪酸の酸化によって生じた遊離基に与える性質を示すものである。またピリジン核を有するキノリン酸は、抗酸化性を示さないことが明らかである。これらの中でカタリンは抗酸化能が強く着色度や電子供与能も大である。本化合物はトリプトファン代謝産物の一つである昆虫の眼色素キサントマチンの誘導体で、白内障の治療薬として利用されているものであり、この生理活性と密接な関係があるものと考えられる。

要 約

抗酸化性の発現は糖の種類によっても影響され、炭素数 3～6 個のアルドースではペントースであるリボース、キシロースとアミノ酸と反応したものが強い酸化能を示すことがわかった。炭素数 3 個のグリセロールでは着色度は高いにもかかわらず、抗酸化性は低かった。

トリプトファンと反応するカルボニル化合物について、構造の異なるアルデヒドを用いて試験した。そして飽和アルデヒド、芳香環を有するアルデヒドでは抗酸化性の増強はほとんどみられず、不飽和アルデヒド

で最も強く α -オキシ、 α -ケト基を有するものがこれに次いで強い効力を示すことを明らかにした。

また、加熱反応中にトリプトファン自体の分解が予想されるので、トリプトファン関連化合物の抗酸化性についても検討した。この中ではフェノキサゾン化合物の抗酸化性の強いことが認め、電子供与性も大であり、生理活性との間に何らかの関係が存在することが推察された。

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、阿久根了元教授、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：鹿児島大学農学部学術報告, **21**, 423, 453 (1971).
- 2) 桐ヶ谷紀昌, 加藤博道, 藤巻正生：農化, **43**, 484 (1969).
- 3) S. M. Canter, Q. P. Peniston : J. Am. Chem. Soc., **62**, 2113 (1940).
- 4) 頼尊豊治：大阪医学会誌, **38**, 1183 (1938).
- 5) H. S. Olcott, H. Frankel-Conrat : J. Biol. Chem., **171**, 583 (1947).

Summary

The possible structures of the carbonyl compounds, which, when heated with tryptophan, were capable of raising the strong antioxidant activity out of the resulting browning solutions were investigated.

As the result, it was found that α -, β -unsaturated-, α -keto- and α -hydroxy- compound were effective, and that, in the cases of sugar used as carbonyl compounds, pentoses exerted stronger effect than in those of hexose, tetrose and triose.

On the other hand, some of the tryptophan-related compounds, which may be related to the decomposed products of tryptophan produced by the browning reaction, were found to exhibit some strong antioxidative effects and high electron-donating- abilities.