

硫化黒変に関する研究—Ⅲ

アスパラガス成分のシリカゲルによる分画と分画面分の腐食性

竹内伊公子, 長田 博光, 大塚 滋

Studies on Sulfur Stain of Internal Wall of Cans — III

Corrosion and Sulfur Stain with Fractions of Asparagus Extract with Silica Gel

Ikuko Takeuchi, Hiromitsu Osada and Shigeru Otsuka

In the previous papers, it was suggested that one of the corrosion factors of the internal wall of canned asparagus is a loose conjugated compound with glutamic acid and organic acids.

In the present study, in order to purify the corrosion factor, the aqueous solution (A-II-2), which caused the severe sulfur stain and corrosion of internal wall of cans, was examined. After the fractionation with activated carbon followed by silica gel, the sulfur stain and corrosion were remarkable with the methanolic fraction (Si-2). After the direct fractionation of A-II-2 with silica gel, both the severe sulfur stain and corrosion were observed with the methanolic portion (Fr. 2). Fraction 2 gave three spots which were identified by bromocresol green reagent. Crystals were isolated from the mixed solvent extract (Fr. 1), (m.p.158—162°C). The melting point and R_f value with thin layer chromatography were in agreement with those of pyroglutamic acid. The fact that pyroglutamic acid was not detected in the ethereal extract indicates that it is not free in fresh white asparagus. It is well known that glutamine and glutamic acid undergo changes to pyroglutamic acid.

農産缶詰や水産缶詰を問わず、缶詰の内面の腐食や硫化黒変の現象は大きな問題ともなる。これらを防止するためには、内容物中の成分に含まれる腐食や硫化黒変に影響をおよぼす要因物質（腐食因子）の究明が必要となる。前報¹⁾では、アスパラガス原料のアルコールによる抽出液を検索した結果、主たる腐食因子の1つとして、グルタミン酸と有機酸が何らかの形で結合した、特にグルタミン酸は容易に切断されて遊離の状態になりやすい有機（含硫）化合物が腐食に関与しているという知見を得た。トマト果実中の成分についても²⁾、共通した挙動を示す酸性物質の存在が認められた。この酸性物質を明らかにするために分離精製を試み、活性炭およびシリカゲルカラムによる分画面分の腐食および硫化黒変を比較した結果を報告する。

実験方法

1. 活性炭カラムによる分画

前報で報告したように、図1に従って得たエーテルに不溶な区分 A-II-2 を、あらかじめ洗滌した活性炭（Norite SX-II）のカラムを用いて、活性炭に吸着しない区分と、水で十分に洗い流した後、メタノールならびに2Nアンモニア水で溶出した区分に分画した。それぞれの区分を、C—

- 1, C-2, C-3とした.
2. シリカゲルカラムによる分画

活性炭に非吸着の区分C-1を、あらかじめクロロホルムで膨潤させたシリカゲル(メルク社製シリカゲル60, メッシュ70~230)のカラムを用いて展開し, 最初にクロロホルム:n-ブタノール(1:1 V/V)で, 続いてメタノールで溶出し, 最後に水で洗出した. それぞれの溶出区分を, Si-1, Si-2, Si-3とした.

3. A-II-2のシリカゲルカラムによる分画

A-II-2をシリカゲルカラムを用いて, 2に準じて分画を行った. 水で溶出した後, さらに2N塩酸で洗い流した. 各画

分をそれぞれ, Fraction 1, Fraction 2, Fraction 3, Fraction 4とした. (図2)

4. C-1ならびにSi-2の液体クロマトグラフィー

1および2で得たC-1ならびにSi-2の液体クロマトグラフィーは, 日立液体クロマトグラフ装置034型を使用した.

5. 各画分のシリカゲル薄層クロマトグラフィー

1, 2および3で得た各画分のアミノ酸および有機酸の定性は, シリカゲルの薄層クロマトグラフ(TLC)を用いて, n-ブタノール:酢酸:水(4:1:1, V/V)で展開し, ニンヒドリンならびにブロムクレゾール・グリーン(BCG)試薬で発色させた.

6. 各画分の有機酸含量

図1に従って得たA-II, A-II-1とA-II-2および3で分画した画分 Fraction 1, Fraction 2の各画分の有機酸の含量は, Partition chromatography³⁾によるシリカゲルクロマトグラムのパターンによった.

7. 各画分の腐食性

1, 2および3で分画した各画分をpH 7.0に調整後, McIlvaine buffer (pH 6.2) 溶液を加えて試料溶液として, 試験管に分取した. 純度約100%, 厚さ0.3mmのスズ板(2×2.5cm)をその中に浸漬させて, 封管後, 120°C, 20分間加熱殺菌した. 37°C, 1週間貯蔵後, 開封して, 溶出したスズ量をポーログラフ法⁴⁾で測定した. スズ板面の硫化黒変の度合を, 視覚的に+・-で判別し, 黒変度として表示した.

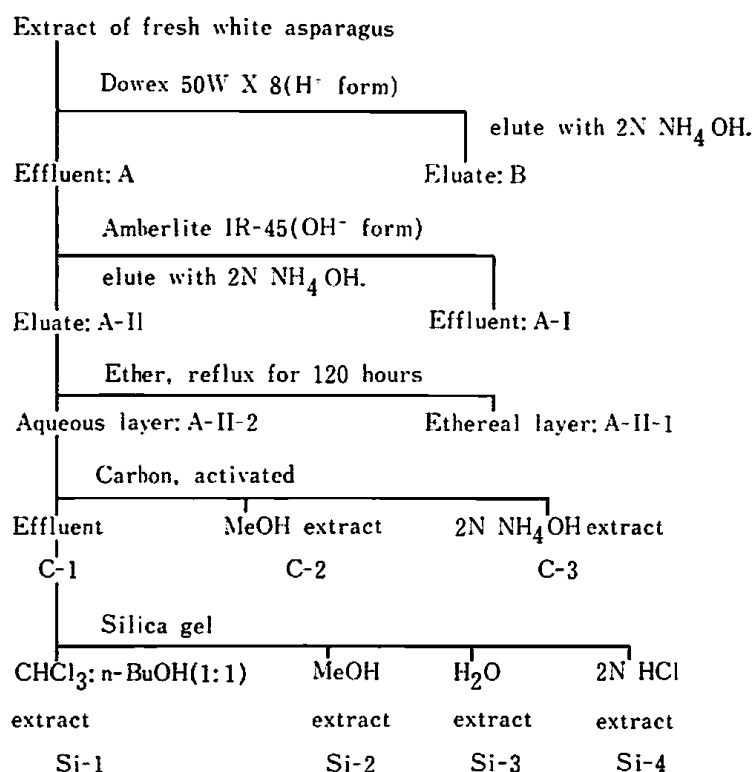


Fig. 1 Fractionation of the extract of fresh white asparagus

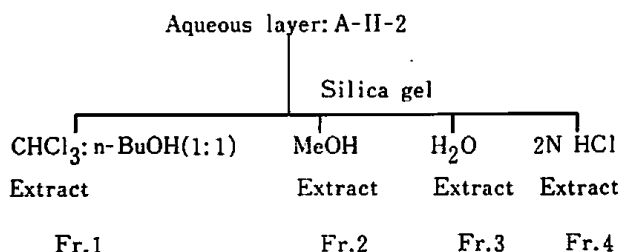


Fig. 2 Another fractionation of A-II-2 with silica gel.

実験結果

1. 各画分の腐食性

図1に従って、A-II-2の区分を活性炭、さらにシリカゲルカラムで分画した各画分の溶出スズの量および黒変度を、表1に示した。活性炭に非吸着の区分C-1では、スズの溶出が著しく、2Nアンモニア水で溶出した区分C-3では、硫化黒変の方がより著しかったが、非吸着および吸着の両区分に、スズの溶出と硫化黒変をともに生じて、その差異は認めがたかった。さらに、活性炭に非吸着の区分C-1を、シリカゲルのカラムで分画したところ、メタノールで溶出した区分Si-2に、スズの溶出ならびに硫化黒変が共に著しい結果を得た。最初の混合溶媒で溶出した区分Si-

Table 1 Detinning action and degree of sulfur stain of fractions of A-II-2 with activated carbon and silica gel.

Fraction	Tin dissolved (ppm)	Sulfur stain
C-1	450	+
C-2	100	+
C-3	290	++
Si-1	170	±
Si-2	440	+++
Si-3	40	-
Control	90	-

Table 2 Detinning action and degree of sulfur stain of fractions of A-II-2 with silica gel.

Fraction	Tin dissolved (ppm)	Sulfur stain
A-II-2	560	+++
Fr. 1	260	-
Fr. 2	600	+++
Fr. 3	100	-
Fr. 4	280	-
Control	60	-

1および最後に水で溶出した区分Si-3では、スズ溶出も硫化黒変もほとんどみられず、明らかに差異が認められた。

図2に従って、A-II-2をシリカゲルカラムで分画した画分の腐食性の結果を、表2に示した。スズ溶出量および黒変度はともに、メタノールの溶出区分Fraction 2に著しい結果を得た。他の画分とは明らかに差異があった。

2. 各画分の液体クロマトグラフィー

C-1, Si-2の両区分の液体クロマトグラムは、図3のとおりである。前報で述べたように、グルタミン酸の標品と一致する位置にピークを示すが、他には特長的なピークはみられなかった。

3. 各画分の薄層クロマトグラフィー (TLC)

図1に従って得た各画分のTLCの結果は、図4に示したとおりである。Si-1区では、Rf 0.1, Rf 0.3付近に3~4つのニンヒドリン陽性のスポット

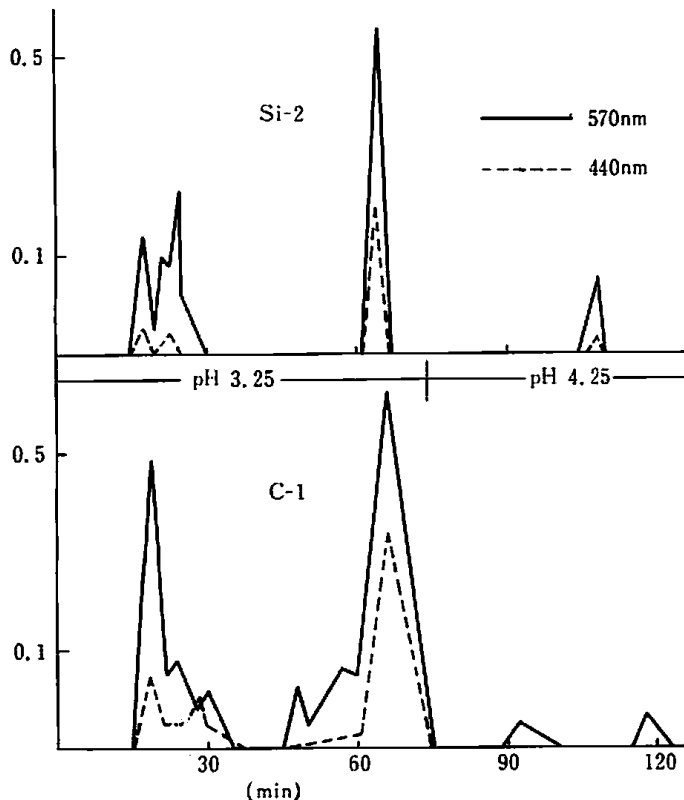


Fig. 3 Chromatograms of fractions of A-11-2 with activated carbon and silica gel.

をわずかに示した。Si-2区では、Rf 0.1, Rf 0.3~0.35, Rf 0.55~0.6 および原点付近に、Si-3区では、Rf 0.1, Rf 0.2, Rf 0.4 および原点付近にわずかにスポットがみられたが、いずれも不鮮明なスポットであった。また、有機酸の定性では、Si-1区はほとんど陰性であり、Si-3区は Rf 0.1と原点部分にBCG陽性の不鮮明なスポットをわずかに示した。スズ溶出ならびに硫化黒変が著しい Si-2区については、Rf 0.3~0.35, Rf 0.6 に3~4つおよび原点部分に鮮明なスポットの他に、いくつかの不鮮明なスポットがみられた。

図2に従って分画した各画分の TLC の結果は、図5に示したとおりである。Fraction 1には Rf 0.6 に BCG 陽性の鮮明なスポットと Rf 0.4 に不鮮明なスポットがみられた。Fraction 2では Rf 0.35~0.4, Rf 0.2 に2~3つの鮮明なスポットがみられた。Fraction 3では、Fraction 2と同位置にわずかに不鮮明ながらスポットを示した。Fraction 4には Rf 0.4の鮮明なスポットがみられた。なお、Rf 0.4のスポットは、標品のクエン酸、リンゴ酸にほぼ一致した。

Rf 0.6, Rf 0.4にBCG陽性のスポットを示す Fraction 1を減圧濃縮して得た濃縮残渣をシリカゲルカラムを用いてクロロホルムで展開し、クロロホルム:n-ブタノール (7:3, V/V) で溶出した。この混合溶媒で溶出した液を減圧濃縮した結果、濃縮残渣から白色結晶を得た。メタノール-エーテルで再結晶後、融点 158 ~ 162°C, Rf 0.58 (BCG発色) を与えた。

4. 各画分の有機酸組成とその含量

図1で得た画分 A-II, A-II-1, A-II-2 および 図2に従って得た画分 Fraction 1, Fraction 2の有機酸組成とその含量を、表3に示した。表中の数値は、原料100gあたりの mg 数に換算したものである。A-II区では、リンゴ酸およびクエン酸含量が高く、ついでピログルタミン酸が多かった。そしてわずかながら、フマル酸やコハク酸も検出された。A-IIをエーテルで処理した結果、エーテルに可溶な画分 A-II-1では、ピログルタミン酸、リンゴ酸およびクエン酸などの含量が低く、ほとんどエーテルには抽出されないで、A-II-2の水層の方に残存するという結果になった。また、Fraction 2ではリンゴ酸やクエン酸含量が高く、ピログルタミン酸もわずかに含まれていた。他は、検出されなかった。

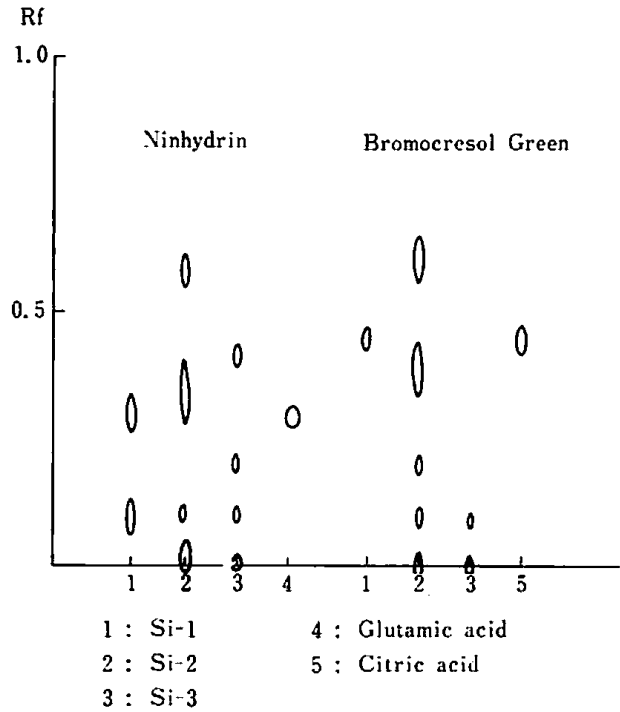


Fig. 4 Thin layer chromatogram of fractions of A-II-2 with activated carbon and silica gel.

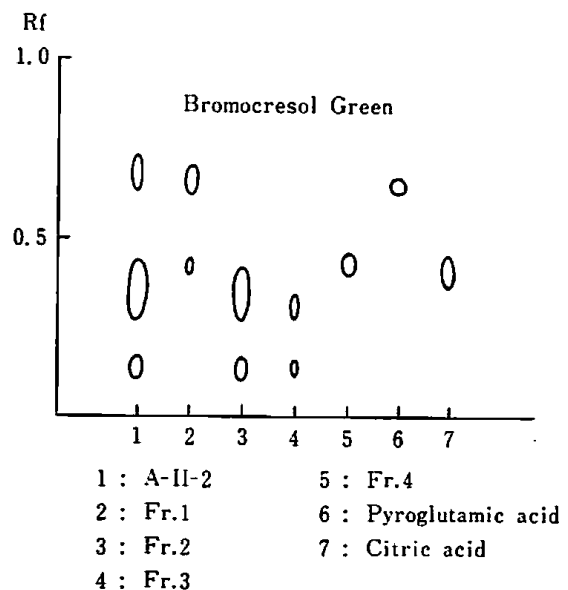


Fig. 5 Thin layer chromatogram of fractions of A-II-2 with silica gel.

考 察

前報において、生ホワイトアスパラガスのアルコールによる抽出液について、陽イオン、陰イオン交換樹脂処理の結果、アスパラガス缶詰の缶内面腐食因子（硫化黒変に關与する

因子を含む）の1つは、陽イオン交換樹脂に吸着されず、陰イオン交換樹脂に吸着する酸性物質であり、何らかの形で化学的結合したグルタミン酸が容易に切断されて遊離の状態になるという結果を得た。

この酸性物質を含む区分から、含硫化合物や芳香族化合物などを吸着し、分別する目的で、活性炭処理を行ない、それぞれの分画面分の腐食性を比較したところ、各画面にはあまり顕著な差異は認められなかった。

A-II から、油脂や遊離の有機酸などのエーテルに可溶な物質を分別する目的で、エーテルによる連続抽出を行ない、エーテル層および水層に分別した。それぞれの画面について有機酸組成とその含量を比較したところ、ピログルタミン酸、リンゴ酸およびクエン酸などが、エーテルには抽出されないで水溶液中に大部分が残存するという結果を得たため、さらに検討を要するが、これらの有機酸は、原料中に本来遊離の状態で存在したものではないと考えられる。

A-II-2 のシリカゲルカラムによる分画の結果、メタノールで溶出した区分 Fraction 2 に、スズの溶出ならびに硫化黒変を著しく認めたが、この区分が示した TLC 上のいくつかの BCG 陽性のスポットのうち、Rf 0.4 は標品のリンゴ酸に相応し、Rf 0.6 の小さいスポットは標品のピログルタミン酸と一致した。他の Rf 0.2 にみられたスポットが、未知の酸性物質に由来するものと考えられる。なお、ニトロプルシッド反応によるイオウの定性の結果、Fr. 2 は陽性であった。この Fr. 2 に存在する酸性物質（腐食および黒変因子の1つ）は、イオウを含んだ有機化合物と考えられる。各画面のイオウの定性および定量については、次回報告する。

混合溶媒で溶出した区分 Fraction 1 では、スズ溶出や硫化黒変はほとんど認められなかったが、この区分をさらにシリカゲルカラムで精製したところ、ピログルタミン酸様の結晶を得た。融点および Rf 値ともに、標品のピログルタミン酸に一致した。ところが、Dame⁵⁾ らは生アスパラガス中にはその存在を認めていない。さらに、グルタミン、グルタミン酸は容易に環化してピログルタミン酸を生成する。これらから、腐食因子の1つと目される酸性物質から切断されたグルタミン酸と生成したピログルタミン酸との間に可逆的反応が介在して、液体クロマトグラム上のグルタミン酸のピークならびに TLC 上のグルタミン酸のスポットの発現、そしてピログルタミン酸の晶出に關与したものと考えられる。

要 約

生ホワイトアスパラガスのエキス分のうち、イオン交換樹脂およびエーテル処理を行なって得た画面に、グルタミン酸および有機酸が何らかの形で結合した有機化合物が存在し、容易にグルタミン酸および有機酸を遊離する。このスズ溶出および硫化黒変がともに著しく認められた画面を、活性炭あるいはシリカゲルを用いて分画を行ない、各画面の腐食性を比較した。

Table 3 Contents of organic acids in A-II, A-II-1, A-II-2 and fractions of A-II-2 with silica gel column. (mg/100 g sample)

Acid	A-II	A-II-1	A-II-2	Fr. 1	Fr. 2
n- Butyric	3.92	3.16	—	—	—
Fumaric	9.69	4.03	1.69	—	—
Succinic	5.04	4.92	1.03	—	—
Pyroglutamic	27.85	0.83	43.19	30.56	3.12
Malic	73.08	2.58	62.70	22.05	44.16
Citric	69.20	6.98	45.88	—	55.87

活性炭処理では、各画分ともあまり差異は認めがたかったが、シリカゲルによる分画では、メタノールで溶出した画分にスズ溶出および硫化黒変が著しく、他の画分とは明らかな差異が認められた。この画分は、TLC上にまだ3つ以上のスポットを有し、そのうちRf 0.6, 0.4のスポットはそれぞれ、ピログルタミン酸とリンゴ酸に由来し、他に未知の酸性物質に由来すると考えられるRf 0.2のスポットを認めた。

混合溶媒で溶出した画分からは、腐食因子の1つと目される酸性物質から切断されて遊離したグルタミン酸が環化して、生成したと考えられるピログルタミン酸を分離した。

文 献

- 1) 竹内伊公子・長田博光・大塚 滋 : 食品工誌, 21, (7), 329 (1974) .
- 2) 竹内伊公子・前岡絹子・長田博光 : 食品工誌, 22, (1), 7 (1975) .
- 3) 長田博光・岡屋忠治 : 本誌, 6, 54 (1964) .
- 4) 岩本喜伴・前田秀子 : 本誌, 11, 175 (1974) .
- 5) C. Dame, C. O. Chichester and G. L. Marsh : *Food Research*, 21, 20 (1959) .