

システインの加熱による硫化水素生成に対するフマル酸塩の抑制機構ならびにその生成物の安全性

長田 博光, 朽木由香子, 畔上 二郎, 松本 浩孝

Inhibitory Mechanism of Monosodium Fumarate for Generation of Hydrogen Sulfide from Heated Cysteine and Safety Assessment of the Formed Substance

Hiromitsu Osada, Yukako Kutsuki, Jiro Azegami* and Hirotaka Matsumoto*

In order to clarify the inhibitory mechanism of monosodium fumarate for generation of hydrogen sulfide from sulfur-containing substance, aqueous mixture of monosodium fumarate and cysteine was heated at 115°C for 80 minutes.

The product formed was isolated by ether extraction, electro dialysis and ion exchange and then crystallized in ethyl alcohol.

The structural formula of the crystal was determined from its physical and chemical properties, elementary analysis, and mass and infrared spectrometries. The molecular formula was $C_7H_{11}O_6NS$, and structural formula was S-(1,2-dicarboxyethyl)-cysteine (DCEC) containing a C-S bond.

The acute toxicity of DCEC was assessed by single oral administration to rats. At the dose of 1g/kg, temporary clinical symptoms such as salivation or diarrhea were recognized, but body weight increased steadily throughout the experiment, and no significant difference was noted as compared with the control group.

Key words : monosodium fumarate, hydrogen sulfide, inhibitory mechanism, S-(1,2-dicarboxyethyl)-cysteine, acute toxicity.

魚介類を缶詰にすると、缶内面に黒変の生成することがある。その原因は主として魚介類の筋肉に含まれている遊離あるいはタンパク質構成の含硫アミノ酸が缶詰製造工程中の加熱殺菌時に分解して生成した硫化水素と缶内面の露出金属との反応によって生じた硫化鉄¹⁾による。

それゆえ、この黒変は硫化水素の生成を抑制すると防止できると考え、種々の添加物の硫化水素生成抑制効果を調べた。その結果、グルコース、フルクトースなどの還元糖類、フマル酸、酢酸などの有機酸類、アセトアルデヒド、臭素酸カリウム、亜硫酸ナトリウムなどが有効²⁾であった。

これらのうち、食品添加物として認可されており、肉質を変化させないフマル酸モノナトリウム（以下フマル酸塩と略記）をカニ、マグロ水煮缶詰などに添加し、硫化水素生成抑制ならびに

*：食品薬品安全センター秦野研究所

注 本論文は缶詰時報73(1)65(1994)掲載論文を転載したものである。

Table 1. Amount of hydrogen sulfide generated by heating sulfur-containing compounds.

Sulfur-containing compounds	Hydrogen sulfide ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Cysteine	27,000
Cystine	270
Taurine	0
Methionine	0
Cysteic acid	0
Cysteamine	138
Homocysteine	610
Methylmercaptan	26
Glutathione	686
Allylthiourea	0
Cystamine	0
Dimethylsulfide	270

Each solution was adjusted to pH 7.0 (cystine solution was adjusted to pH 10.0), and after heating at 115°C for 80 min., hydrogen sulfide was determined by Almy's method.

缶内面黒変防止効果を調べた。その結果、各缶詰の注液に0.5~2.5%の範囲でフマル酸塩を添加すると硫化水素の生成は著しく抑制され、また、缶内面に黒変の生成はほとんど認められなかった³⁾。

本報ではフマル酸塩の硫化水素生成抑制機構を明らかにするために、含硫化合物のうち硫化水素を最も多く生成するシステイン (Table 1) にフマル酸塩を添加し、加熱後その生成物の構造を調べた。また、この生成物を摂取した場合の安全性を確認するためにラットを用いて調べた。

実験方法

1. 試薬

フマル酸塩及びシステイン塩酸塩は和光純薬製特級を使用した。

2. システインとフマル酸塩の加熱生成物の分離及び精製

システインとフマル酸塩の加熱生成物は Fig. 1 に示したようにシステイン塩酸塩とフマル酸塩を等モル混合、溶解し、10%水酸化ナトリウムでpH7.0に調整し、大型試験管に注入した。封管後缶詰の殺菌条件と同様に115°C、80分間加熱した。冷却後ろ過し、遊離の有機酸の抽出方法⁴⁾に準じて10%塩酸でpH3.0に調整し、未反応のフマル酸を除去するためにエーテルで120時間連続抽出した。エーテルを除去後10%塩酸でpH7.0に調整し、旭硝子(株)製ME型電気透析器を用いて電圧15Vで透析し、脱塩した。透析処理液をDowex 50W×8 (50~100メッシュ, H⁺型)を充填したカラム (3×26cm)に通し、水で十分洗浄後10%塩酸で溶出した。溶出液を電気透析して塩素を除去し、濃縮後エチルアルコールを加え、冷却し、結晶を生成させた。

3. 結晶の分析

1) 理化学的性質

結晶の溶媒に対する溶解性、ニンヒドリン反応、ニトロプルシド反応、水溶液のpHならびに塩酸に対する安定性を調べた。

2) HPLC分析

結晶を和光純薬製のpH2.2のクエン酸緩衝液に溶解し、日立835形高速アミノ酸分析計で分析した。

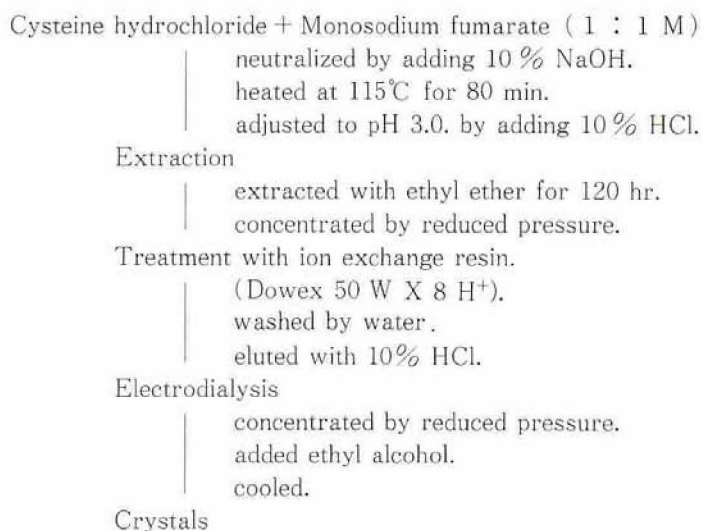


Fig. 1. Crystallization of the product formed by heating a mixture of cysteine and fumarate.

3) 元素分析

炭素、水素及び窒素は酸素循環燃焼方式、酸素は熱分解白金炭素法、イオウはフラスコ燃焼イオンクロマト法でそれぞれ分析した。

4) 質量分析

分子量は結晶を水-メタノール (1 : 1 V/V) に溶かし、日立LC-MS1000型で測定した。

5) FT赤外スペクトル

結晶を臭化カリウムタブレットとし、島津製作所製FTIR-8100Mで測定した。

4. 結晶の毒性

生後4週の雌雄のSprague-Dawley系ラットを8日間予備飼育した後正常な雌雄各20匹を5匹ずつ各4群に分け、結晶を水に溶かし、500, 1,000及び2,000mg/kg単回経口投与し、15日間一般状態及び体重を調べた。15日目に屠殺剖検した。なお、ラットは投与前18時間と投与後3時間の絶食期間を除く全飼育期間中固形飼料CE-2 (日本クレア株式会社製)を自由に摂取させた。また、飲料水は全飼育期間を通じて水道水を自由に摂取させた。

結 果

1. システインとフマル酸塩の加熱生成物の理化学的性質

得られた結晶の形状と理化学的性質は Fig. 2 及び Table 2 に示したように、柱状であり、水に易溶、メタノールには僅かに溶けるが、他の有機溶媒には不溶であった。0.01M水溶液のpHは2.92で、ニンヒドリン反応は陽性、ニトロプルシド反応はそのままでは陰性であったが、金属ナトリウムを加えると陽性になった。この結果から結晶はアミノ基とイオウを含んでいることが判明した。6N塩酸中で115°C、2時間加熱してもほとんど変化しなかった。

2. アミノ化合物

結晶のアミノ酸分析計 (HPLC) によるクロマトグラムは Fig. 3 に示したように、約11分の位置に単一のピークを示した。このピークは Fig. 4 に示したように、システイン酸、タウリン、システインなどの含硫アミノ酸とは全く異なっていた。

Table 2. Physical and chemical properties of the product formed by heating a mixture of cysteine and fumarate.

Physical and chemical properties	
pH	2.92(0.01 M solution)
Ninhydrin reaction	+
Nitroprusside reaction	+(by adding of metallic sodium)
Solubility in : Water	+
Methanol	±
Ethanol	-
Chloroform	-
Butanol	-
Benzene	-
Hydrolysis*	-

Solubility: + soluble, ± slightly soluble, - insoluble.

* The Product was heated at 115°C for 2 hours in 1N to 6N HCl solutions.



Fig. 2. Crystals formed by heating a mixture of cysteine and fumarate. (×50)

3. 元素分析値

結晶の元素分析値は **Table 3** に示したように、窒素 5.0%，イオウ 11.8%であった。これらの数値から結晶中には窒素及びイオウ原子が一つずつ含まれていることが判明した。

4. 分子量

結晶の分子量は **Fig. 5** に示した質量スペクトルから 237 であった。

5. 赤外スペクトル

結晶の赤外スペクトルは **Fig. 6** に示したように、ほぼ 3485, 3000, 2600, 1720, 1605, 1565, 1520, 1410, 1325, 1230, 1180, 1045, 850 及び 680 cm^{-1} に吸収帯が認められ、1410 cm^{-1} の吸収帯に C-S の結合の存在することが判明した。

6. 結晶の構造式

結晶の元素分析値、分子量及び赤外スペクトルからこの結晶の化学式は $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_6\text{NS}$ であり、その構造は **Fig. 7** に示したように、1966年に Kuwaki ら⁵⁾ が人尿から発見した S-(1,2-dicarboxyethyl)-cysteine (DCEC と略称) であることが明らかとなった。

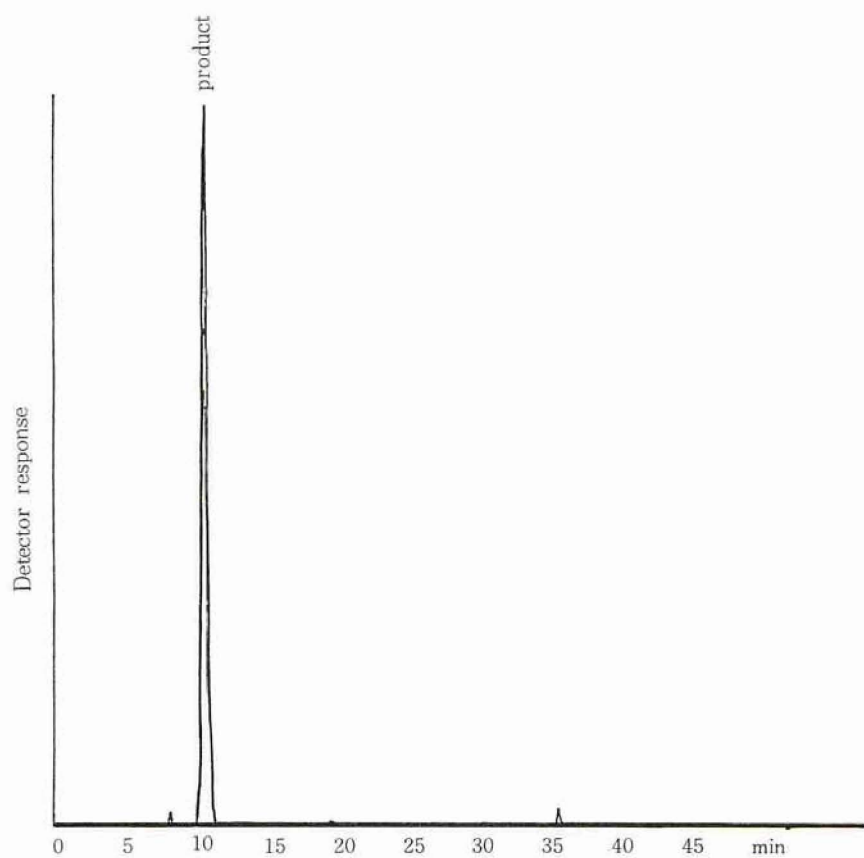


Fig. 3. HPLC chromatogram of the product formed by heating a mixture of cysteine and fumarate.

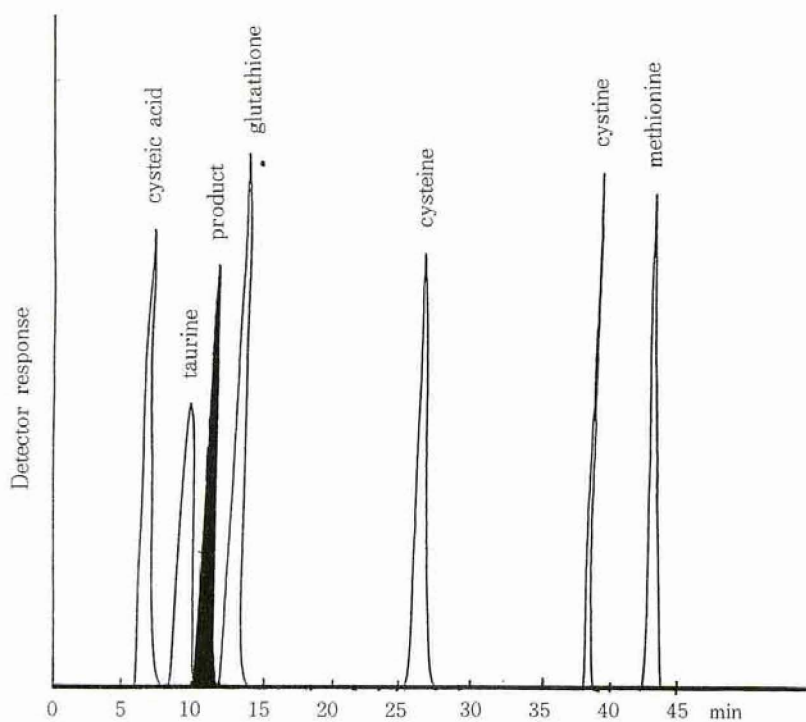
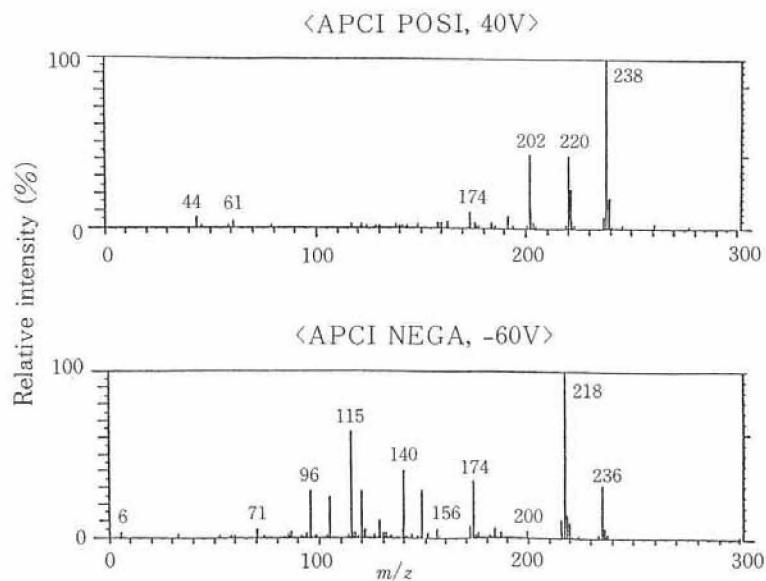
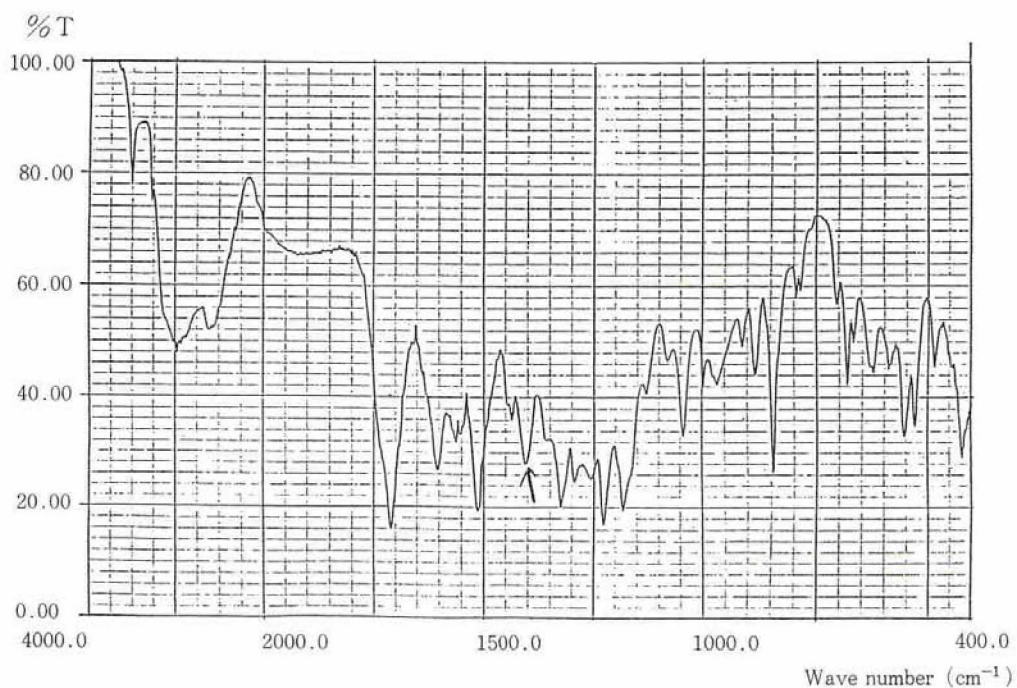
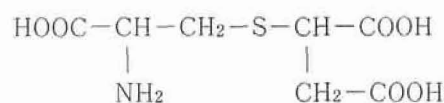


Fig. 4. HPLC chromatogram of the product formed by heating a mixture of cysteine and fumarate and sulfur-containing amino acids.

Table 3. Elementary analysis of the product formed by heating a mixture of cysteine and fumarate.

Elements	Experimental values (%)
C	35.3
H	5.6
N	5.0
O	38.9
S	11.8

**Fig. 5.** Mass spectra of the product formed by heating a mixture of cysteine and fumarate.**Fig. 6.** IR spectrum of the product formed by heating a mixture of cysteine and fumarate.



S-(1, 2-dicarboxyethyl)-cysteine(DCEC)

Fig. 7. Structural formula of the product formed by heating a mixture of cysteine and fumarate.

7. DCECの安全性

DCECのラットに対する安全性は Table 4 及び Fig. 8 に示したように、雌雄ともにいずれの投与群にも死亡は認められなかった。1,000mg/kg投与群の雌雄各5例中1例と2,000mg/kg投与群の雌5例中1例及び雄5例中3例に投与後2～12分から一過性の流ぜんがみられた。また、1,000mg/kg投与群の雄5例中1例、2,000mg/kg投与群の雌5例全部及び雄5例中4例に投与後5～7時間に水様性下痢便の排泄が認められた。しかし、それ以降異常はみられなかった。体重は雌雄いずれの投与群とも順調に増加したが、投与量が多いほどその増加量は僅かに少なかった。また、剖検では雌雄いずれも肉眼的変化は認められなかった。

Table 4-1. Individual clinical symptoms in female rats after single oral administration of DCEC.

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical symptoms	Time of appearance**
Control	1	— *	
	2	—	
	3	—	
	4	—	
	5	—	
500mg/kg	6	—	
	7	—	
	8	—	
	9	—	
	10	—	
1,000mg/kg	11	—	
	12	—	
	13	Salivation	7 min.
	14	—	
	15	—	
2,000mg/kg	16	Diarrhea	5 hr. 50 min., 5 hr. 55 min.
	17	Diarrhea	5 hr. 9 min., 5 hr. 59 min.
	18	Salivation, Diarrhea	6 min., 6 hr. 32 min.
	19	Diarrhea	4 hr. 56 min.
	20	Diarrhea	4 hr. 59 min.

* : No abnormality in general condition.

** : Time elapsed from administration until appearance of clinical symptoms.

Table 4-2. Individual clinical symptoms in male rats after single oral administration of DCEC.

Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical symptoms	Time of appearance**
Control	1	—*	
	2	—	
	3	—	
	4	—	
	5	—	
500mg/kg	6	—	
	7	—	
	8	—	
	9	—	
	10	—	
1,000mg/kg	11	—	
	12	—	
	13	Salivation	12 min.
	14	—	
2,000mg/kg	15	Diarrhea	5 hr. 43 min.
	16	Salivation, Diarrhea	6 min., 6 hr. 32 min.
	17	Salivation	5 min.
	18	Diarrhea	5 hr. 55 min.
	19	Diarrhea	5 hr. 59 min.
	20	Salivation, Diarrhea	2 min., 6 hr. 27 min.

* : No abnormality in general condition.

** : Time elapsed from administration until appearance of clinical symptoms.

Table 5. Effects of various factors on DCEC formation.

	Yield of DCEC
pH	maximum formation at pH 6.0.
Heating temperature	maximum formation at 115°C.
Heating time at 115°C	maximum formation for 80 minutes.
Salt	2% decrease under presence of 5% NaCl.
Sugar	1.8-4.6% decrease under presence of 1.0-10.0% sugar.
Starch	2.7-3.5% decrease under presence of 7.5-10.0% starch.
Protein	1.9-7.1% increase under presence of 1.0-10.0% protein.

考 察

フマル酸塩を魚介類の缶詰製造時に添加するとそれらの筋肉中へフマル酸塩が浸透し、遊離あるいはタンパク構成アミノ酸のうちのシステインと結合し、加熱によってその結合は増強され、熱や酸に安定なC-S結合を形成するために、硫化水素の生成が抑制され、たとえ缶内面に金属が露出しているても硫化鉄が形成されないの、缶内面の黒変は発生しないと考えられる。なお、フマル酸塩の添加により缶内面腐食が生じることはない。³⁾

DCECの生成条件はTable 5に示したように常温でも生成するが加熱温度が高く、加熱時間が長く、また、pHが中性付近で生成しやすいので、中性域の魚介類にフマル酸塩を添加することは他のpHの食品に添加した場合より硫化水素の生成は著しく抑制されると考えられる。

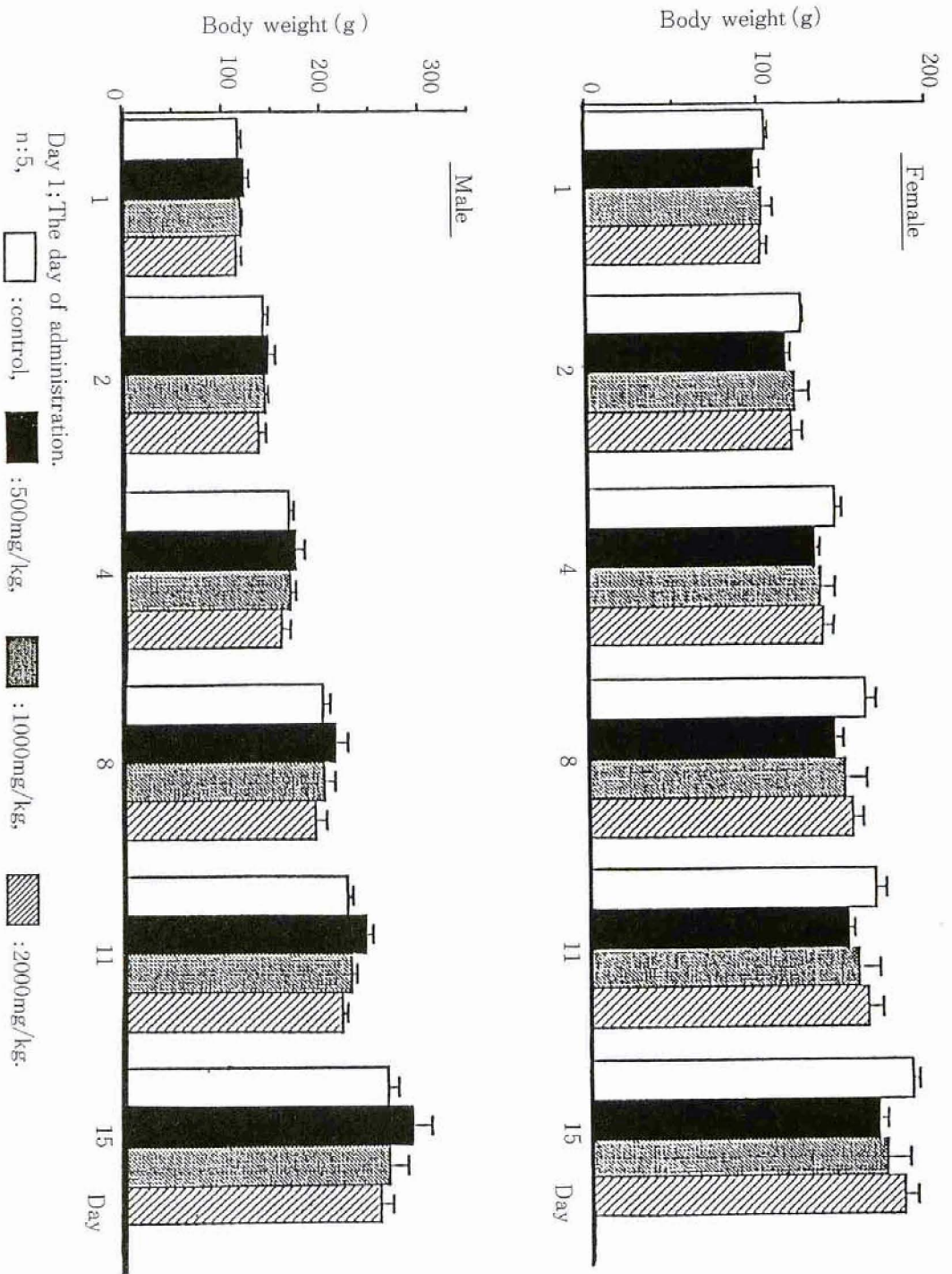


Fig. 8. Changes in body weight of rats after single oral administration of DCEC.

フマル酸はクエン酸の代謝中に生成する物質で、常に人体に存在する。システインも人体に常在物質であるため、これらが体内で結合しても、水原ら⁶⁾によって証明されているように、尿と共に排泄される。それゆえ、缶詰にフマル酸塩を添加し、含硫化合物と反応して生成したDCECを摂取しても急性毒性はないと考えられる。しかし、DCECの安全性についてはさらに慢性毒性についても調べなければ完全に無毒とはいえないと考える。

要 約

フマル酸塩の硫化水素生成抑制機構を解明するために、システインとフマル酸塩混液を加熱し、その反応生成物の理化学的性質を調べた。また、HPLC、元素分析、質量及び赤外スペクトル分析によりその構造を調べた。

システインとフマル酸塩の反応生成物はC-S結合を有するS-(1,2-dicarboxyethyl)-cysteine(DCEC)であった。

さらに、DCECの安全性を明らかにするためにラットにそれを単回経口投与して調べた。DCEC 1 g/kg以上の投与では一過性の流ぜんや下痢便の排泄が認められたが、体重は正常に増加し、対照との間に有意差はほとんどなかった。

最後に本研究に協力していただいた東洋製罐(株)技術本部研究部第1研究室、伊藤 誠主任部員ならびに元素分析、質量分析及び赤外スペクトル分析に協力していただいた島津テクノリサーチ株式会社ならびに日立計測エンジニアリング株式会社にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 長田博光・竹内伊公子・朽木由香子：缶詰時報，**65**，562～569 (1986)。
- 2) 長田博光・竹内伊公子・朽木由香子：缶詰時報，**65**，1201～1208 (1986)。
- 3) 長田博光・竹内伊公子・朽木由香子：缶詰時報，**67**，473～480 (1988)。
- 4) 上田隆蔵・永井史郎・森口繁弘：発酵工誌，**37**，94～99 (1969)。
- 5) Kuwaki T. and Mizuhara S.: *Biochem. Biophys. Acta*, **115**，491～493 (1966)。
- 6) 水原舜爾：栄養と食糧，**22**，437～445 (1967)。