

含硫化合物の加熱による硫化水素生成に対する フマル酸の抑制効果とその機構

長田 博光

Inhibitory Effects and Mechanism of Fumaric Acid on Hydrogen Sulfide Generation by Heating Sulfur-containing Compounds or Substances

Hiromitsu Osada

The inhibitory effects of fumaric acid on hydrogen sulfide generation by heating sulfur-containing compounds or substances without cysteine, were investigated. Hydrogen sulfide generation from cysteamine, cysteine methyl ester, cysteine ethyl ester, onion, radish and egg white was remarkably inhibited by fumaric acid, while the generation from dimethyl sulfide, methyl mercaptan and glutathione was considerably inhibited, though to a somewhat lesser extent.

The main amino-containing compound formed by heating a mixture of cysteine and reducing sugar was cystine. When cysteine was heated with potassium bromide or sodium sulfate, cysteic acid and cystine were formed. And when cysteine was heated with chloroacetic acid or formaldehyde, S-(carboxymethyl)-cysteine and thiazolidine-4-carboxylic acid containing a C-S bond were formed, respectively.

Key words : sulfur-containing compound, hydrogen sulfide, inhibitory effect, inhibitory mechanism.

魚介類缶詰にフマル酸塩を添加すると硫化水素の生成が著しく抑制され¹⁾缶内面の黒変が防止される。その原因はフマル酸が魚介類の筋肉へ浸透し、遊離あるいはタンパク質構成のシステインと結合し、熱に安定なC-S結合を形成するためであることを明らかにした²⁾

本報ではシステイン以外の含硫化合物からの加熱による硫化水素生成に対するフマル酸の抑制効果、システインと種々の化合物の加熱によるアミノ化合物の生成ならびにクロロ酢酸、ホルムアルデヒドなどの硫化水素生成抑制機構について調べた。

実験方法

1. フマル酸の硫化水素生成抑制効果

グルタチオン、システアミン塩酸塩、システインエチルエステル、システインメチルエステル、ジメチルスルフィド、メチルメルカプタン、シスタミン二塩酸塩、タウリン、システイン酸及びメチオニンに等モルのフマル酸モノナトリウムを添加し、それぞれ水酸化ナトリウムでpHをほぼ中性に調整したのち試験管に入れ、密封し、115℃、80分間加熱した。また、玉ねぎ、大根及び卵白はそれぞれ10gホモジナイズし、フマル酸モノナトリウム1.0、1.5及び3.0gそれぞれ添加、溶解し、pH7.0に調整し、試験管に注入し、密封後同様に加熱した。加熱後20%酢酸亜鉛溶液中で開封し、Almy法³⁾で硫化水素量を測定した。

2. システインと種々の化合物との混合液の加熱によるアミノ化合物の生成

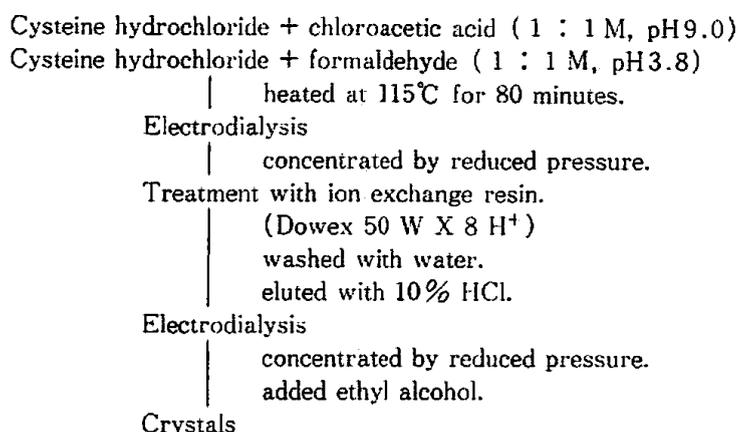


Fig. 1. Crystallization of products formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid and/or formaldehyde.

システイン塩酸塩 1 mM 溶液に等モルのクロロ酢酸、ホルムアルデヒド、臭素酸カリウム、亜硫酸ナトリウム、リンゴ酸、コハク酸、酢酸、ピルビン酸、グルタミン酸、グルコース、フルクトース及びD-グルクロノラク톤を加え、pH7.0に調整し、試験管に注入し、密封後115℃、80分間加熱した。開封後それぞれの液にpH2.2の緩衝液を加え、10倍に希釈し、日立835形高速アミノ酸分析計で分析した。

3. システインとクロロ酢酸及びシステインとホルムアルデヒドとの反応生成物の精製

システインとクロロ酢酸及びシステインとホルムアルデヒドの混合液を加熱すると多量の未知アミノ化合物が生成する。これらの化合物がS-(1,2-dicarboxyethyl)-cysteine (DCEC)と同様にC-S結合を形成して硫化水素の生成を抑制するの否かを明らかにするために、Fig. 1に示したように、システイン塩酸塩とクロロ酢酸を等モル混合し、pH9.0に水酸化ナトリウムで調整した。また、システイン塩酸塩とホルムアルデヒドとを等モル混合し、pH3.8に調整した。それぞれの液を試験管に注入し、密封後115℃、80分間加熱し、冷却した。開封後、pH7.0に調整し、旭硝子(株)製ME型電気透析器を用いて15Vの電圧で透析し、脱塩した。透析処理液をDowex 50W×8(50-100メッシュ、H⁺)を充填したカラム(3×26cm)に通し、水で十分洗浄し、10%塩酸で溶出した。溶出液を電気透析し、塩素を除去した後濃縮し、エタノールを加え、冷蔵庫に保存し、結晶を形成させ、その構造を調べた。

4. 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及び塩酸に対する耐性を調べた。

2) HPLC分析

結晶をpH2.2の緩衝液に溶解し、日立835形高速アミノ酸分析計で分析した。

3) 元素分析

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

4) 質量分析

分子量は結晶を水に溶解し、日立LC-MS2000型で測定した。

5) 赤外スペクトル

結晶をKBrタブレットとし、島津製作所製FTIR-8100Mで測定した。

結果及び考察

1. フマル酸の硫化水素生成抑制効果

種々の含硫化合物からの加熱による硫化水素生成に対するフマル酸の抑制効果を Table 1 に示した。グルタチオンからの硫化水素生成量は7.9%、システアミンからは0%、システインエチルエステルからは16.5%、システインメチルエステルからは0.7%と著しく抑制され、ジメチルスルフィドからは41.1%、メチルメルカプタンからは24%とかなり抑制された。また、玉ねぎからは6.5%、大根からは3%、卵白からは9.1%と著しく抑制された。

Table 1. Inhibitory effects of fumaric acid on hydrogen sulfide generation by heating sulfur-containing compounds and substances.

Sulfur-containing compounds and substances	Fumaric acid (M or g)	Hydrogen sulfide ($\mu\text{g}/100\text{g}$)
Glutathione (0.1M)	0	847
	0.1	67
Cysteamine (0.5M)	0	157
	0.5	0
Cysteine methyl ester (0.5mM)	0	532
	0.0005	88
Cysteine ethyl ester (0.5mM)	0	544
	0.0005	4
Dimethyl sulfide (1 M)	0	367
	1	151
Methyl mercaptan (1 M)	0	25
	1	6
Onion (10g)	0	339
	1	22
Radish (10g)	0	166
	1.5	5
Egg white (10g)	0	1,590
	3	145

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

Table 2. Amino-containing products formed by heating cysteine and various compounds.

Compounds	Amino-containing products RT:Min ^{*1} . (nM/ml)
Formaldehyde	19.68(117.2) ^{*2} , 38.24(31.9) ^{*5}
Acetaldehyde	25.89(17.7) ^{*3} , 38.26(90.0)
Potassium bromide	6.50(208.5) ^{*4} , 19.92(12.0), 34.56(51.8) ^{*2}
Sodium sulfate	6.34(67.1), 25.68(24.2), 36.8(24.0)
Chloroacetic acid	13.86(85.2) ^{*2} , 26.08(23.4), 38.18(47.6)
Malic acid	25.76(26.3), 38.18(60.9)
Succinic acid	26.02(25.0), 38.21(38.21)
Acetic acid	26.08(23.2), 38.18(77.09)
Pyruvic acid	6.72(13.7), 25.65(14.6), 37.92(18.7)
Glycolic acid	26.0(28.7), 38.18(56.0)
Glutamic acid	22.85(997.9) ^{*6} , 25.81(35.6), 38.42(91.1)
Glucose	26.0(28.7), 38.18(56.0)
Fructose	25.84(26.9), 38.21(55.3)
Glucuronolactone	25.97(22.8), 38.24(11.7)

Each solution (1mM/100ml) was adjusted to pH 7.0, and after heating at 115°C for 80min., retention time of the acid-containing product was determined by amino acid analyzer.

^{*1}RT:retention time. ^{*2}:Unknown amino acid. ^{*3}:Cysteine. ^{*4}:Cysteic acid. ^{*5}:Cystine. ^{*6}:Glutamic acid.

2. システインと種々の化合物の混合液の加熱による主な生成アミノ化合物

システインとホルムアルデヒドなどの混合液を加熱した時に生成するアミノ化合物は Table 2 及び Fig. 2 に示したように、システインとホルムアルデヒドからは約20分の位置に、システインとクロロ酢酸からは約14分の位置に未知アミノ化合物、また、両者ともシスチンの生成が認められた。システインと臭素酸カリウムからはシステイン酸、亜硫酸ナトリウムからはシステイン酸とシスチン、リンゴ酸、酢酸、グルコース、フルクトースなどからはシスチン、ピルビン酸からはシステイン酸とシスチンの生成が認められたが、かなりの未反応のシステインが残っていた。

3. システインとクロロ酢酸及びシステインとホルムアルデヒドの加熱により生成した未知アミノ化合物の同定

1) 理化学的性質

システインとクロロ酢酸及びシステインとホルムアルデヒドの加熱により生成した未知アミノ化合物の結晶の理化学的性質は Table 3 に示したように、前者は25℃前後の水には難溶であるが、温水には易溶であった。また有機溶媒には不溶であった。ニンヒドリン反応は陽性であり、ニトロプルシド反応はそのままでは陰性であったが、金属ナトリウムを添加すると陽性になった。6N 塩酸には耐性であり、0.01M 溶液の pH は2.95であった。一方、後者は水に易溶であり、0.01M 溶液の pH は4.12であった。その他の理化学的性質はいずれも前者のそれと同様であった。

2) 元素分析値

結晶の元素分析値は Table 4 に示したように、両者とも硫黄を含んでおりシステインとクロロ酢酸の加熱生成物の実験式は $C_5H_9O_2N_2S_2$ であり、システインとホルムアルデヒドのそれは $C_4H_7O_2NS$ であった。

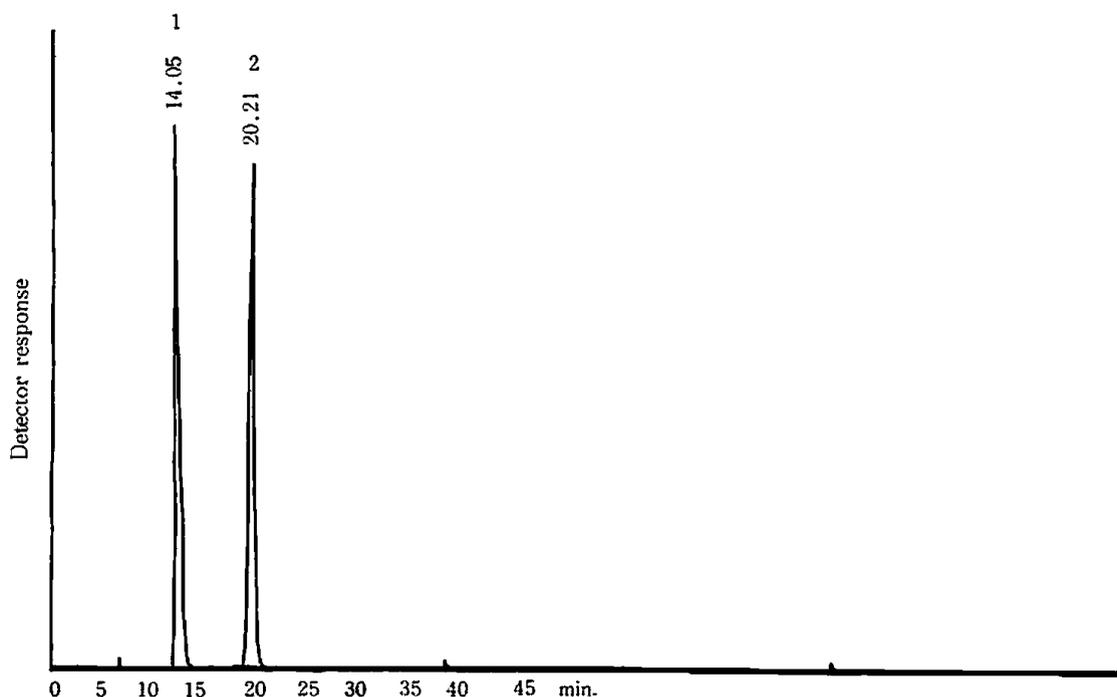


Fig. 2. HPLC chromatogram of the products formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid and/or formaldehyde.

- 1 : The product formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid.
- 2 : The product formed by heating a mixture of cysteine and formaldehyde.

Table 3. Physical and chemical properties of products formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid and/or formaldehyde.

	Physical and chemical properties	
	A*	B*
pH (0.01M solution)	2.95	4.12
Solubility in: Water	±* ¹	±* ¹
Organic solvent	—	—
Ninhydrin reaction	+	+
Nitropursside reaction	+* ²	+* ²
Hydrolysis* ³	+	+

A: The product formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid.

B: The product formed by heating a mixture of cysteine and formaldehyde.

*¹: Soluble in hot water.

*²: By adding of metallic sodium.

*³: The product was heated at 115°C for 2 hours in 6 N HCl solution.

Table 4. Elementary analysis of the products formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid and/or formaldehyde.

Elements	Experimental values (%)	
	A*	B*
C	32.7	36.0
H	5.0	5.3
N	7.6	10.5
O	16.7	22.9
S	35.6	25.6

A: The product formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid.

B: The product formed by heating a mixture of cysteine and formaldehyde.

3) 質量スペクトル

結晶の質量スペクトルはFig. 3及び4に示したように、システインとクロロ酢酸の加熱生成物の分子量は179、システインとホルムアルデヒドのそれは133であった。

4) 赤外スペクトル

結晶の赤外スペクトルはFig. 5及び6に示したように、システインとクロロ酢酸からの生成物は1,200, 1,520, 3,000 cm^{-1} に大きな吸収を示し、また1,410~1,420 cm^{-1} にC-S結合の吸収を示した。システインとホルムアルデヒドからの生成物は1,630, 2,260 cm^{-1} に大きな吸収を示し、また前者と同様、1,430 cm^{-1} にC-S結合の吸収を示した。

5) 結晶の構造

結晶の元素分析値、分子量、赤外スペクトルから、システインとクロロ酢酸からの生成物はFig. 7に示したように分子式は $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_6\text{NS}$ で、T. Ubukaら⁴⁾が発見したS-(carboxymethyl)-cysteineと同一であった。一方、システインとホルムアルデヒドからの生成物の分子式は $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2\text{NS}$ で、S. Ratnerら⁵⁾が発見したThiazolizine-4-carboxylic acidと同一であった。

システインを加熱するとFig. 8に示したように、そのまま加熱すると多量の硫化水素と少量のシスチンが生じた。クロロ酢酸やホルムアルデヒドを添加して加熱するとS-(carboxymethyl)-cysteineやThiazolizine-4-carboxylic acidのような新しい化合物と少量のシスチンが生じた。臭素酸カリウムを添加して加熱すると主としてシステイン酸を、また少量の未知アミノ化合物が生じた。亜硫酸を添加して加熱するとシステイン酸、シスチン及び少量の硫化水素が生じた。また還

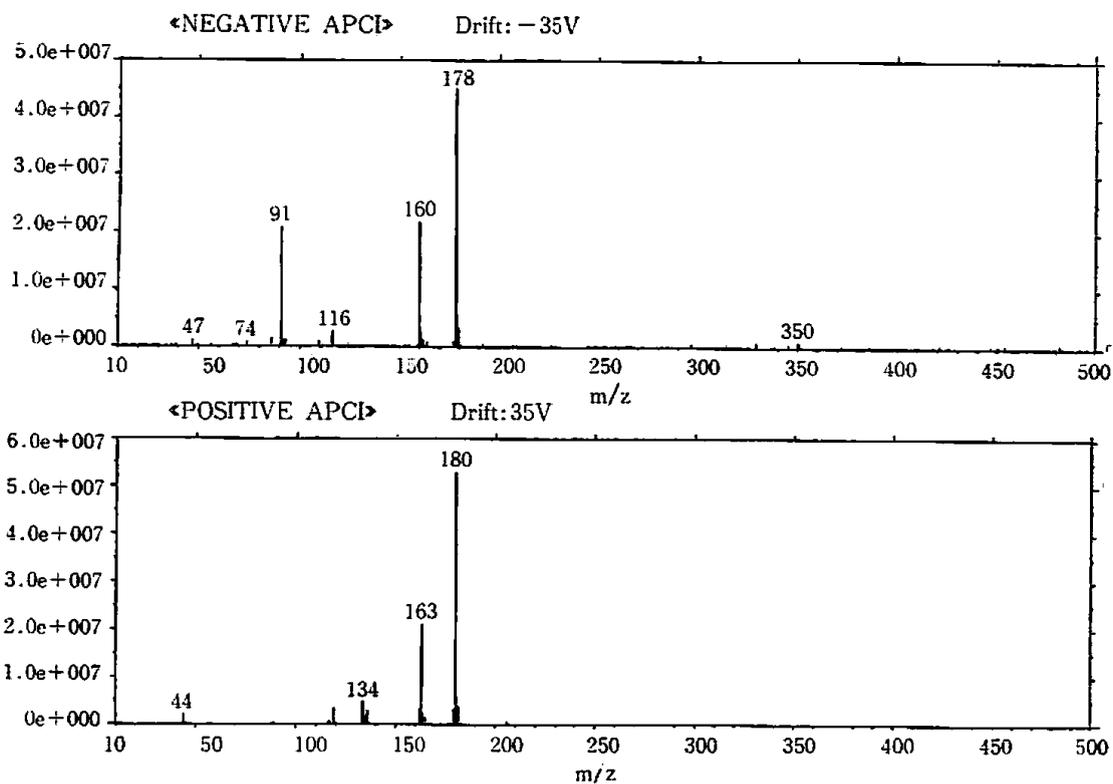


Fig. 3. Mass spectra of the product formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid.

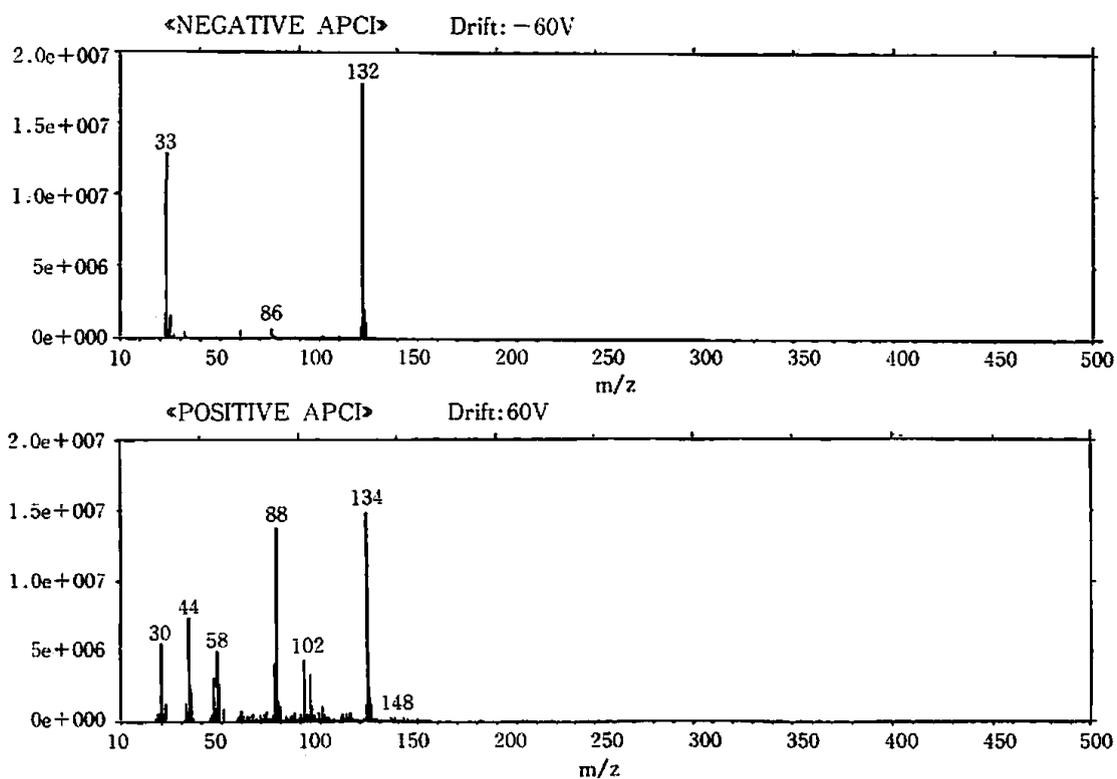


Fig. 4. Mass spectra of the product formed by heating a mixture of cysteine and formaldehyde.

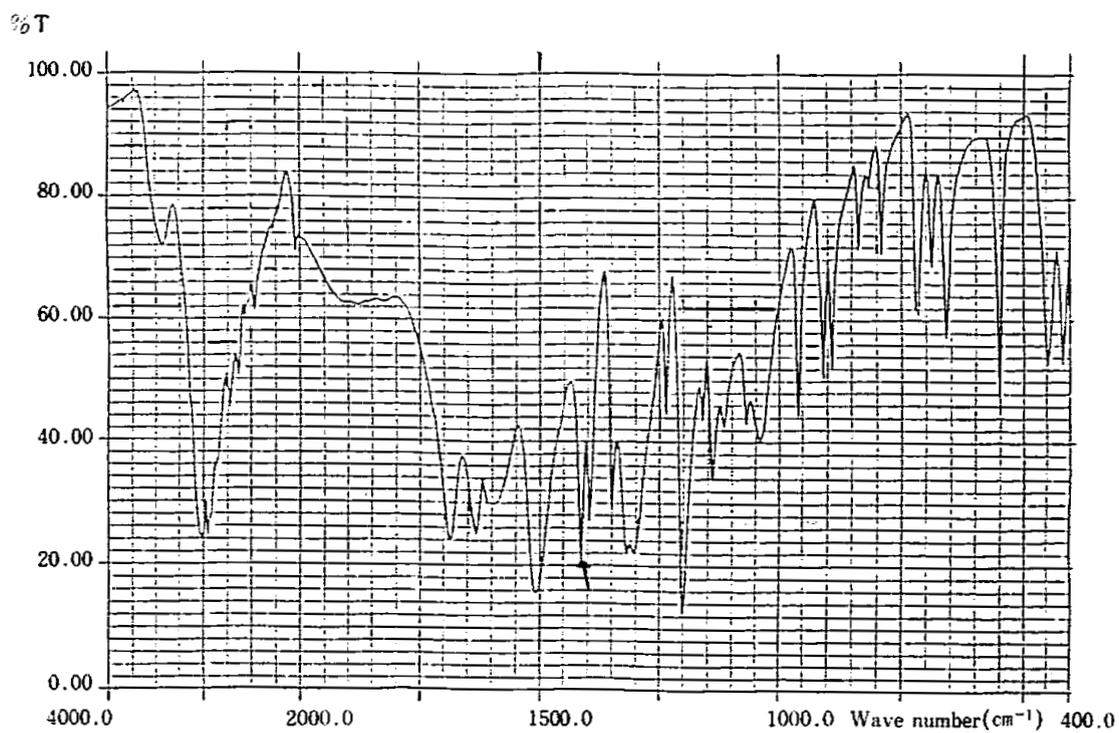


Fig. 5. IR spectrum of the product formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid.

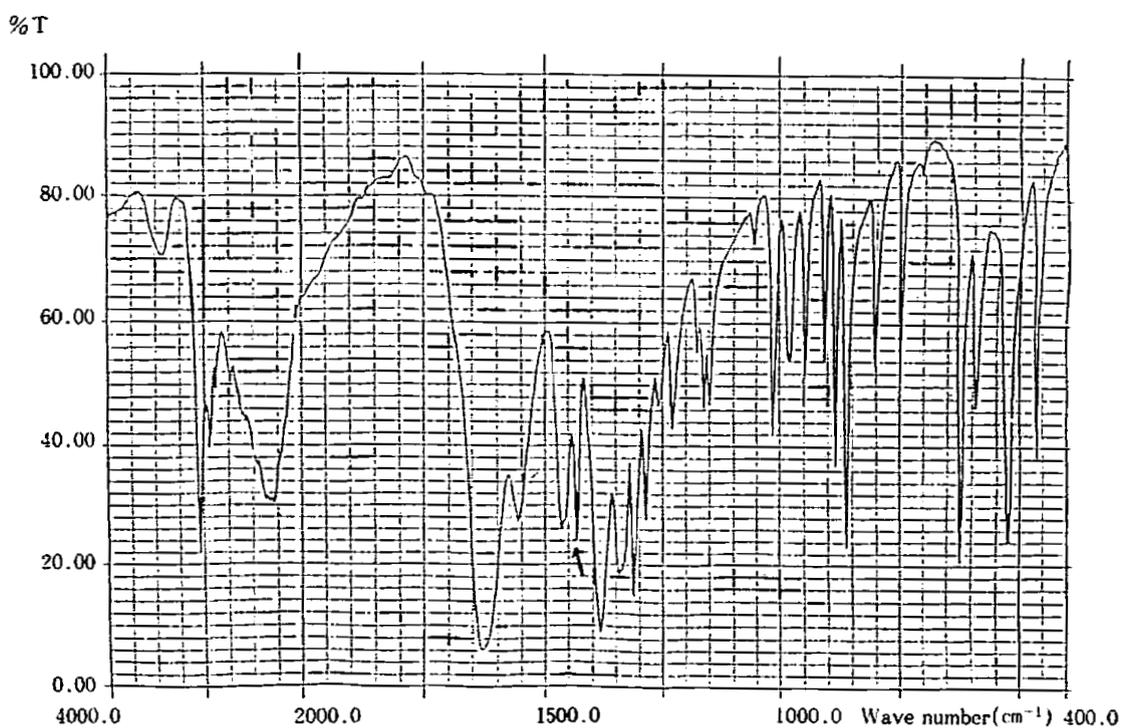
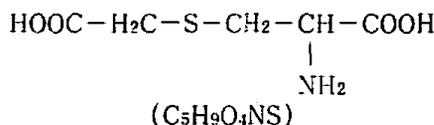
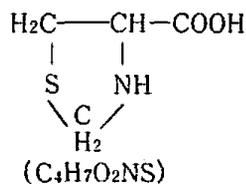


Fig. 6. IR spectrum of the product formed by heating a mixture of cysteine and formaldehyde.



S-(carboxymethyl)-cysteine



Thiazolidine-4-carboxylic acid

Fig. 7. Structural formulas of the products formed by heating a mixture of cysteine and chloroacetic acid and/or formaldehyde.

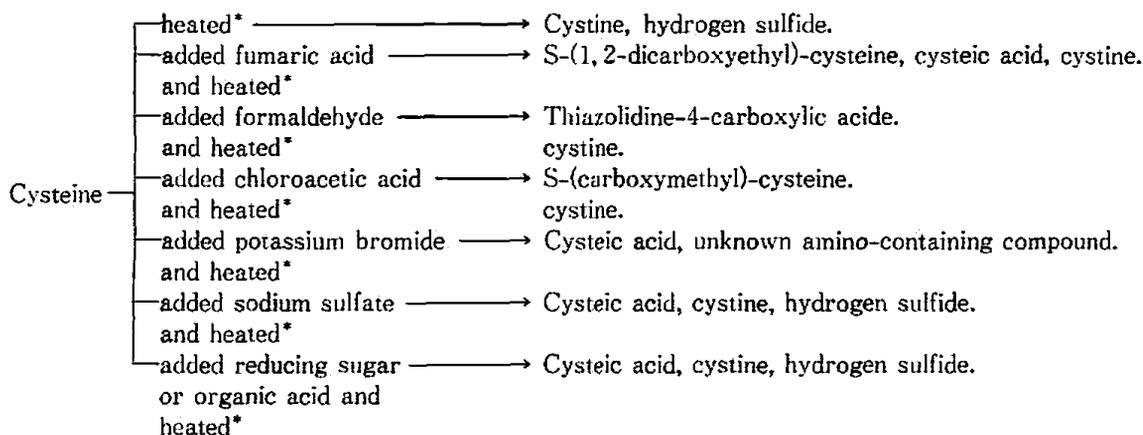


Fig. 8. Changes in cysteine by heating.
* : heated at 115°C for 80 minutes.

元糖やフマル酸以外の有機酸を添加して加熱するとシスチン及び硫化水素が生じ、未反応のシスチンがかなり残った。このように添加物の種類によって生成するものが異なり、酸化反応によって硫化水素の生成を抑制するものもあるが、アミノ化合物以外に硫黄を含む多くの揮発性化合物を生成していることも考えられる。

フマル酸は単にシスチンからの硫化水素の生成を抑制するだけでなく、メチルメルカプタン、ジメチルスルフィドあるいはこれらを多量含む食品からの硫化水素の生成を抑制するので、含硫化合物を含む大根、玉ねぎ、鶏卵などを缶詰にする場合、フマル酸を添加するとそれらの風味改良ならびに缶内面黒変防止にも有効である。

要 約

シスチン以外の含硫化合物の加熱による硫化水素生成に対するフマル酸の抑制効果ならびにシスチンと種々の化合物との加熱によって生じるアミノ化合物について調べた。

フマル酸はシステアミン、シスチンメチルエステル、シスチンエチルエステル、玉ねぎ、大根及び卵白からの硫化水素生成を著しく、またメチルメルカプタン、ジメチルスルフィド及び

グルタチオンからの硫化水素生成をかなり抑制した。

システインと還元糖類、フマル酸、ピルビン酸以外の有機酸の加熱生成アミノ化合物は主としてシスチンであり、臭素酸カリウム、亜硫酸ナトリウム及びピルビン酸とのそれはシステイン酸とシスチンであった。またクロロ酢酸及びホルムアルデヒドとの加熱生成物は両者ともC-S結合を有するS-(carboxymethyl)-cysteineとThiazolizine-4-carboxylic acidであった。

最後に元素分析、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、67, 473~486 (1988)。
- 2) 長田博光・朽木由香子：平成4年度日本水産学会春季大会講演要旨集、305 (1992)。
- 3) Almy, L. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, 47, 1381~1390 (1925)。
- 4) Kuwaki T. Kodama, H. and Mizuhara, S.: *Biochem. Biophys. Acta*, 141, 266~269 (1966)。
- 5) Ratner, S. Clarke, H. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 200~206 (1937)。