

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700798

研究課題名(和文)メイラード反応がビタミンの動態に与える影響の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of the effect of the Maillard reaction on dynamics of vitamins

研究代表者

能見 祐理(NOMI, Yuri)

新潟薬科大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：20614887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ基を有するビタミンはカルボニル化合物と競合的に反応することでメイラード反応を抑制するが、反応生成物の化学構造に関する報告は少ない。ビタミン由来メイラード反応生成物の探索を行った結果、ピリドキサミンとキシロースとの反応で生成する主要な化合物(XP-1)を見出した。構造解析により、XP-1はキシロースとピリドキサミン各1分子から、水2分子、アンモニアと水素各1分子が脱離した構造に相当する新規物質であることが確認された。XP-1の生成条件の検討した結果、高温・短時間の加熱で生成しやすいこと、キレート剤の添加により生成量が増加すること、五炭糖だけでなく六炭糖からも生成することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Vitamins containing amino group are effective in inhibiting the progress of the Maillard reaction. Although these vitamins are expected to react with carbonyl compounds, the structural data on the reaction products has been very few. As a result of the search for the Maillard reaction products derived from vitamins, the major reaction product derived from pyridoxamine and xylose, named XP-1, was identified as a novel compound. The effects of pH, temperature, DTPA and kinds of sugars on the formation of XP-1 were investigated. We observed that XP-1 was formed under weakly acidic and neutral conditions and that XP-1 production was markedly increased when heated at the temperature above 80 °C. These findings suggested that XP-1 was likely to be produced in food processed at the high temperature. In addition, we confirmed that XP-1 production was increased by the addition of DTPA, a strong metal chelator, and that XP-1 was formed from not only pentose but also hexose.

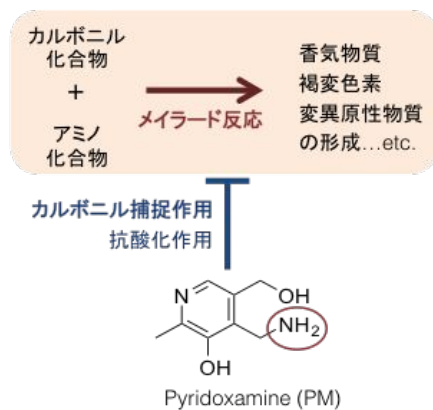
研究分野：食品化学、食品分析学

キーワード：メイラード反応 ピリドキサミン

## 1. 研究開始当初の背景

食品の加工・調理に伴う代表的な成分間反応としてメイラード反応がある。この反応はアミノ基とカルボニル基との間に起こる非酵素的褐変反応として広く知られているが、反応の条件(pH, 温度, 酸素の有無など)によって多種多様な生成物が生成するため、研究が始まってからほぼ1世紀近く経った現在でもいまだに反応機構の全容が明らかにされていない。元来食品中の反応として研究が進んだが、生体内でも同様の反応が起こることが証明されて以来、糖尿病合併症やアルツハイマーなどの疾病との関連についても研究が盛んに行われている。そのような背景を踏まえて、これまでにアミノ酸やペプチド、タンパク質などのアミノ化合物と、糖や脂質、その分解物などのカルボニル化合物とのモデル反応系の解析を通して研究が進められてきた。

一方で、前述したアミノ酸やペプチド、タンパク質以外にもアミノ基を持つ化合物は食品中に存在する。その中でも、本研究では特にアミノ基を含むビタミン(チアミン、ニコチンアミド、ピリドキサミン)のメイラード反応生成物に着目した。ビタミンは栄養成分として必要不可欠な物質だが、メイラード反応研究においては反応抑制剤としての役割が知られている。メイラード反応の抑制効果を示す理由として、アミノ基を含むために他のアミノ化合物との反応を競合的に阻害することが挙げられる。これらビタミンとカルボニル化合物との反応が予想されるが、ビタミン由来メイラード反応生成物の化学構造に関する報告は少ないのが現状である。



## 2. 研究の目的

食品中のビタミンが加工・調理に伴うメイラード反応によって修飾された場合、そのビタミンの生体利用度に影響が与えることが予想されるため、反応生成物についての知見を得ることは重要である。これまでにいくつか同定されているビタミンのメイラード物質は反応条件として中性付近の pH を採用して実験をしているが、メイラード反応は反応条

件を少し変化させるだけでもその生成物は多様に変化するため、たとえば実際の食品に近い弱酸性条件で反応させた場合、まだ報告されていない新規メイラード反応生成物が生じる可能性は大いにある。本研究では、アミノ基を有するビタミンのメイラード反応生成物の探索と構造解析、およびその動態の解析を行い、加工・調理時のメイラード反応によりビタミンが受ける影響の基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ビタミン由来メイラード反応生成物の探索

各種モデル反応系でのビタミン由来メイラード反応生成物の探索を行うとともに、各種反応条件とビタミン量との関連について検討することにした。糖(グルコース、キシロース)とアミノ基を含むビタミン(チアミン、ニコチンアミド、ピリドキサミン)を各種反応条件下(pH 5.0 or 7.4, 50-100 )で反応させた反応溶液を作製し、褐変度(OD 420 nm)やビタミン残存量について定量するとともに DAD-HPLC にて分析を行い、反応生成物の生成状況を確認した。

### (2) ピリドキサミン由来メイラード反応生成物の単離・構造解析

ビタミン由来メイラード反応生成物の探索を行った結果、ピリドキサミンとキシロースとの反応で生成する主要なメイラード反応生成物(XP-1)を見出したので、この反応生成物の単離と構造解析を行うことにした。ピリドキサミンとキシロース(各 60 mM)を 0.5 M リン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解し、90 で5時間反応させた。得られた反応溶液を分取 HPLC に供して精製し、主要な生成物である XP-1 について LC-ESI-QTOF-MS, NMR を用いて構造解析を行った。また、反応機構の解析のため、<sup>13</sup>C でラベル化したキシロースを用いて同様の実験を行った。

### (3) ピリドキサミン由来新規メイラード反応生成物の生成条件の検討

まず高感度・特異的に化合物を検出できる LC/MS/MS による定量方法を開発することにした。XP-1 標品を用いて LC/MS/MS (LCMS-8030, Shimadzu)による MRM 最適化と HPLC 分離条件の確立を行った。

完成した定量メソッドを用いて、各種反応パラメータ(加熱温度、pH、キレート剤の有無、糖の種類・濃度、緩衝液の濃度)が XP-1 生成量に及ぼす影響について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ビタミン由来メイラード反応生成物の探索

検討したビタミンのうち、ピリドキサミンが糖と共存した場合に最も消費されていたことから、メイラード反応によって消費されている可能性が示唆された。また、五炭糖であるキシロースとピリドキサミンとの反応モデル系で、メイラード反応由来の生成物と思われる化合物のピークを検出した(Fig. 1)。このピークは、キシロース-リジン反応系にピリドキサミンを添加した系においても検出され、その生成量はリジン共存下で増大することが確認された。したがって、この化合物はメイラード反応によって生じた反応中間体を經由して形成された可能性が高いと考えられた。この化合物をXP-1とし、単離・構造解析を行うことにした。

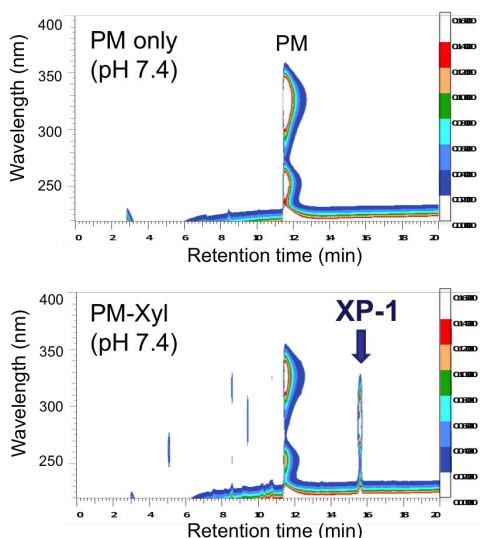


Fig. 1 PM-Xyl 反応溶液の HPLC クロマトグラム

### (2) ピリドキサミン由来メイラード反応生成物の単離・構造解析

LC-ESI-QTOF-MS による質量解析および組成演算の結果から、XP-1 は分子量 263、分子式  $C_{13}H_{13}N_1O_5$  であると決定した。これはキシロース 1 分子、ピリドキサミン 1 分子から水 2 分子、アンモニア 1 分子、水素 1 分子が脱離した構造に相当する。また NMR による構造解析の結果、XP-1 は新規化合物であることが確認された。また、 $1-^{13}C$ -キシロースを用いて検討を行った結果、キシロースの 1 位の炭素の反応部位を特定することができた。

### (3) ピリドキサミン由来新規メイラード反応生成物の生成条件の検討

XP-1 の定量分析を行うため、まず XP-1 標品を用いて LC/MS/MS による定量メソッドを構築した。XP-1 の標準品溶液を用いて外部標準法による定量性を調べた結果、10-500 ng/mL の範囲内で良好な直線性が得られ、検

量線の決定係数は 0.9982 であり、定量限界も非常に低い値となった。よって、本分析法が高感度で定量性に優れていることが明らかとなった。

完成した定量メソッドを用いて、各種反応パラメータ(加熱温度、pH、キレート剤の有無、糖の種類・濃度、緩衝液の濃度)が XP-1 生成量に及ぼす影響について検討した。pH (4.7, 7.4, 9.1) と温度 (50, 60, 80, 100 °C) の影響について検討した結果、中性条件下、80 °C 以上の高温条件で顕著に生成することが明らかとなった (Fig. 2, 3)。

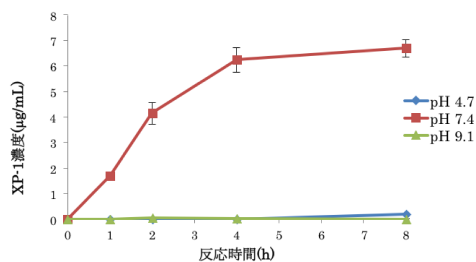


Fig. 2 pH を変化させた際の XP-1 生成量

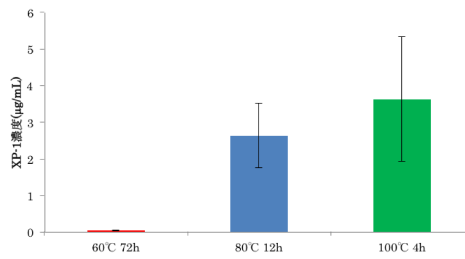


Fig. 3 加熱温度を変化させた際の XP-1 生成量

また、キレート剤の添加により XP-1 の生成量が増加することが明らかになった (Fig. 4)。XP-1 は中性条件下、高温・短時間の加熱反応で生成し易く、金属イオン存在下では分解する可能性が示唆された。さらに、五炭糖だけでなく六炭糖からも生成することが明らかとなった (Fig. 5)。

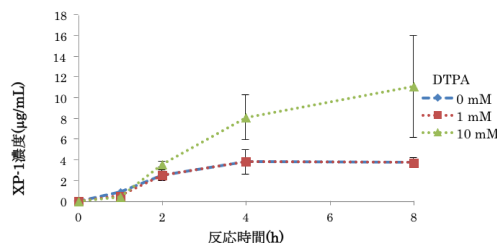


Fig. 4 DTPA を添加した際の XP-1 生成量

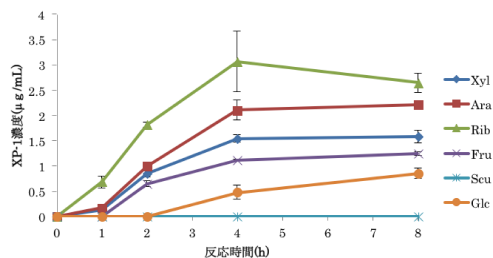


Fig. 5 糖の種類を変えた際の XP-1 生成量

XP-1 の生成機構については未だ不明な点が多いが、少なくともメイラード反応の中期段階で生成する反応性の高いカルボニル化合物が生成に関与して複雑な反応を経て生成する可能性が高いと考えられた。本化合物はその構造から抗酸化活性も期待されることから、今後は実際の食品中の分布やその生理活性について明らかにしていく必要があると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文](計2件)

Yamaguchi K, Homma T, Nomi Y and Otsuka Y, Characterization of Maillard reaction products derived from LEKFD - a pentapeptide found in  $\beta$ -lactoglobulin sequence, glycosylated with glucose - by tandem mass spectrometry, molecular orbital calculations and gel filtration chromatography coupled with continuous photodiode array, Food Chemistry, 145, 892-902, 2014.

Nomi Y, Masuzaki R, Terasawa N, Takenaka M, Ono H, Otsuka Y and Murata M, Formation mechanism and characterization of dilysyl-dipyrrolones, the Maillard-type yellow pigments, Food & Function 4 (7), 1067-1075, 2013.

### [学会発表](計3件)

Yuri NOMI, Ruriko MASUZAKI, Yuzuru OTSUKA and Masatsune MURATA, Formation mechanism and characterization of dilysyl-dipyrrolones, the Maillard-type yellow pigments, 11<sup>th</sup> International symposium on the Maillard reaction (ISMR)、2012年9月16-20日(Nancy, France)

能見 祐理、大塚 譲、ピリドキサミン由来メイラード反応生成物の化学構造、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月29日(神奈川)

能見 祐理、佐藤 眞治、大塚 譲、ピリドキサミン由来新規メイラード反応生成物の同定と生成機構の解析、日本食品分析研究会平成26年度学術集会、2014年9月5日(東京)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

能見 祐理 (NOMI, Yuri)