

要約

クッキーの焙焼中の香気生成における反応機構を検討した。これらの反応生成物が、糖とアミノ酸の加熱反応に由来すると考えられることから、フルクトースと β -アラニンを用いてその中間体をHPLCを用いて検索した。

その結果、ハインズ転移生成物やアマドリ化合物等の中間体が確認された。グルコースとアミノ酸とのアミノカルボニル反応においては、一般的にアマドリ化合物を経由し、色々な反応生成物が形成されることが知られている。フルクトースに関してはハインズ転移を経由するとされている。しかしながら、今回の中間体の検索において、フルクトース- β -アラニン、グルコース- β -アラニン、マンノース- β -アラニンを含む複数の反応生成物が生成されていることが推定された。

8-1 序

1912年 Maillard [5] が糖とアミノ酸混合液を加熱して著しく褐変することを報告して以来、多くの研究者によりこの分野の研究が続けられてきた [43、46、106]。それらの研究においてはグルコースを基質として用いたものが大半を占め [41]、グルコースについてのアミノカルボニル反応はかなり解明が進められ [6、115]、多くの中間体が同定されている [116]。しかしながら、フルクトースはケトースであることから、その反応機構はアルドースであるグルコースと異なると推定される [40、41、117、118]。

近年、序論でも触れたが、消費者の健康嗜好に伴って、果糖はさまざまな形で食品に添加されている。また、コスト面から異性化糖が食品工業的にかなり広く用いられている。そこで、フルクトースのアミノカルボニル反応における反応メ

カニズムを検討することは重要なことと考えられるが、いまだ共通の知見が得られていない [41、118]。

ここでは HPLC でフルクトースとグルコースを用いたアミノカルボニル反応の中間生成物の単離・同定を試みると共にすでに同定している反応生成物の生成過程を検討した。

8-2 糖とアミノ酸の反応からの生成物の単離・同定

β -アラニンをフルクトース、またはグルコースと混合し、試験管の中に入れて150℃で10分間加熱し、その反応生成物を蒸留水で抽出して HPLC で分析した。フルクトースと β -アラニンからの反応で、RI により FAC-1 と FAC-2 が測定された (Fig. 8-1)。グルコースの場合は GAC のみ検出できた。UV スペクトル (210 nm) による測定では、FAC-1 (Fig. 8-2) はさらに P1、P2、P3、P4 の4ピークに分かれた。これらのピークの FAB-MS のデータから、P1、P2、P4 の分子量はすべて 251 であった (Fig. 8-3)。FAC-2 もまた、251 の分子量を示した (Fig. 8-2)。

これら FAC-1 の3個のピークと FAC-2 は、ハインズ転移生成物の存在を示している [10、40、117、118]。FAC-1 の P2 の HPLC 分析の結果、この P2 はグルコースと β -アラニンの反応から単離された GAC の保持時間と一致した。また、P2 の $^1\text{H-NMR}$ のケミカルシフトを GAC、グルコース、フルクトース、標品のアマドリ化合物などのケミカルシフトと比較し、P2 は GAC や標品のアマドリ化合物と一致することが明らかになった (Fig. 8-4、8-6)。また、 $^{13}\text{C-NMR}$ の結果から、4個のメチレン基と3個のメチン基、1個のヘミアセタールの炭素と、1個のカルボキシル基の存在が考えられた (Fig. 8-5、8-7)。これらの結果、P2 と GAC はフルクトース- β -アラニンと同定した。Gallop ら [118] と Reynolds

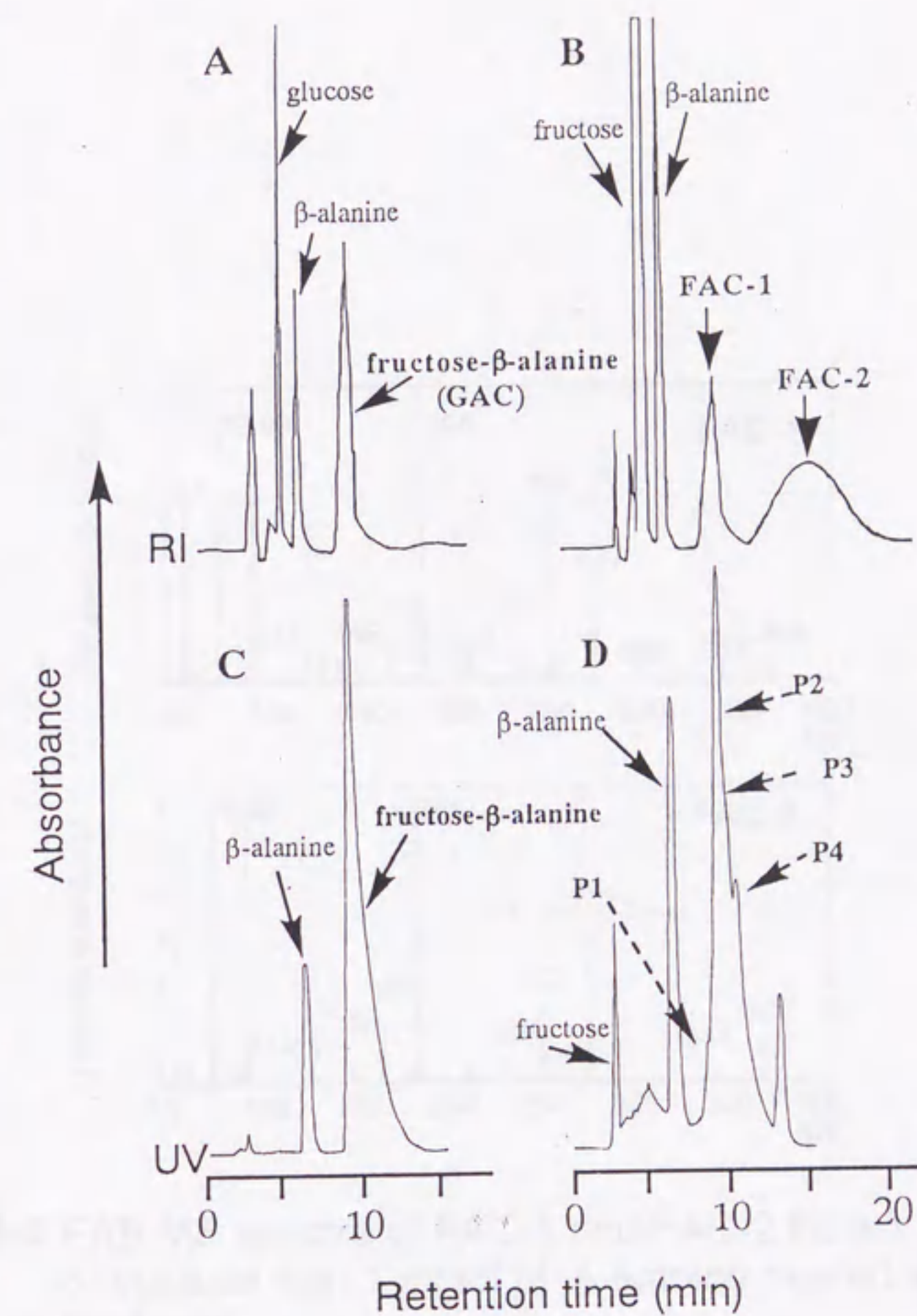


Fig. 8-1 High performance liquid chromatogram of the products from 1 mmol of either glucose (A and C) or fructose (B and D) with 1 mmol of β -alanine heated at 150°C for 4 min. Chromatographic conditions: Column; DEVELOSIL NH₂-5, mobile phase; CH₃CN:H₂O (7:3 v/v), detector; RI and UV (210 nm).

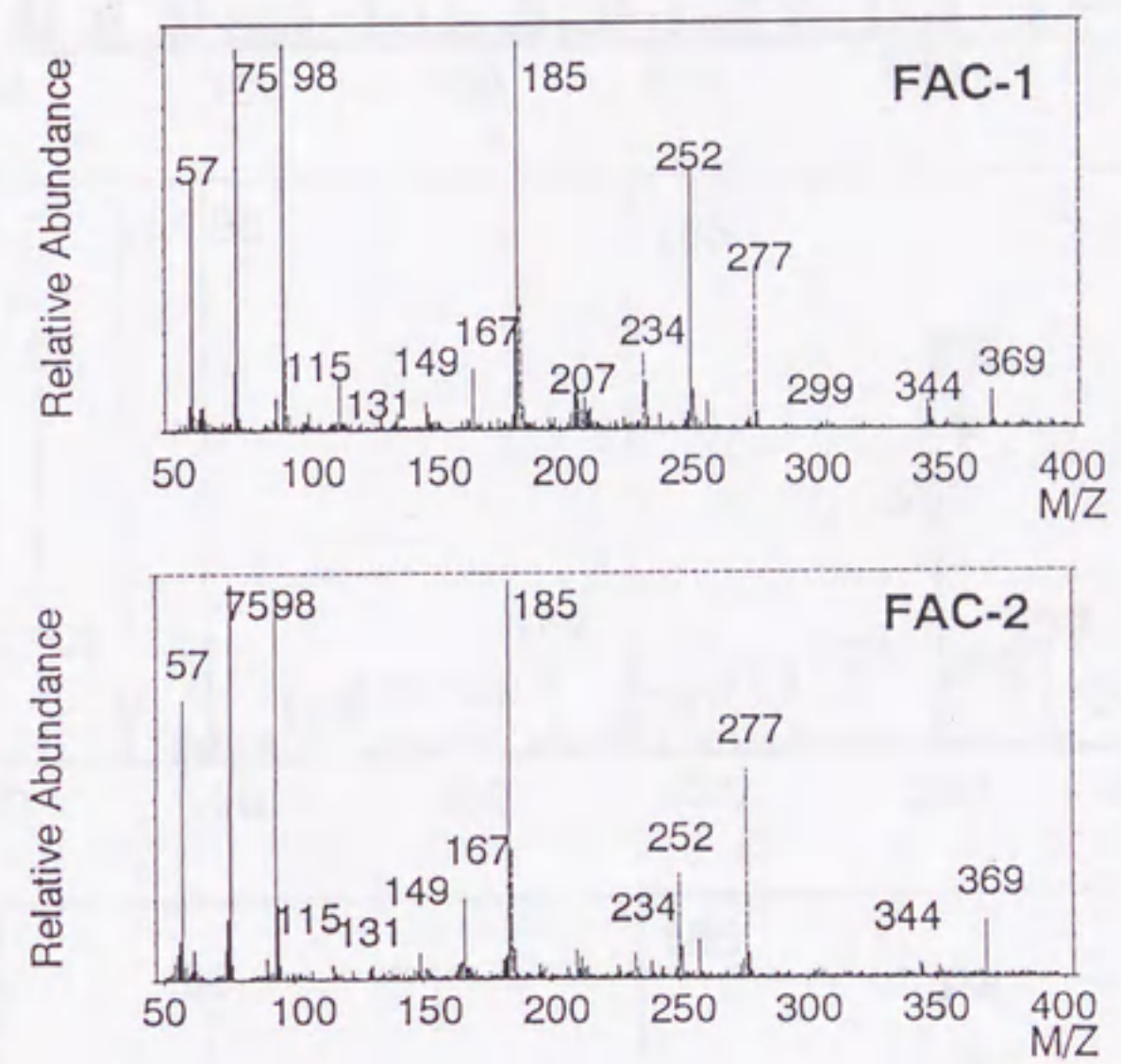


Fig. 8-2 FAB-MS spectra of FAC-1 and FAC-2 from 1 mmol of fructose with 1 mmol of β -alanine heated at 150°C for 4 min.

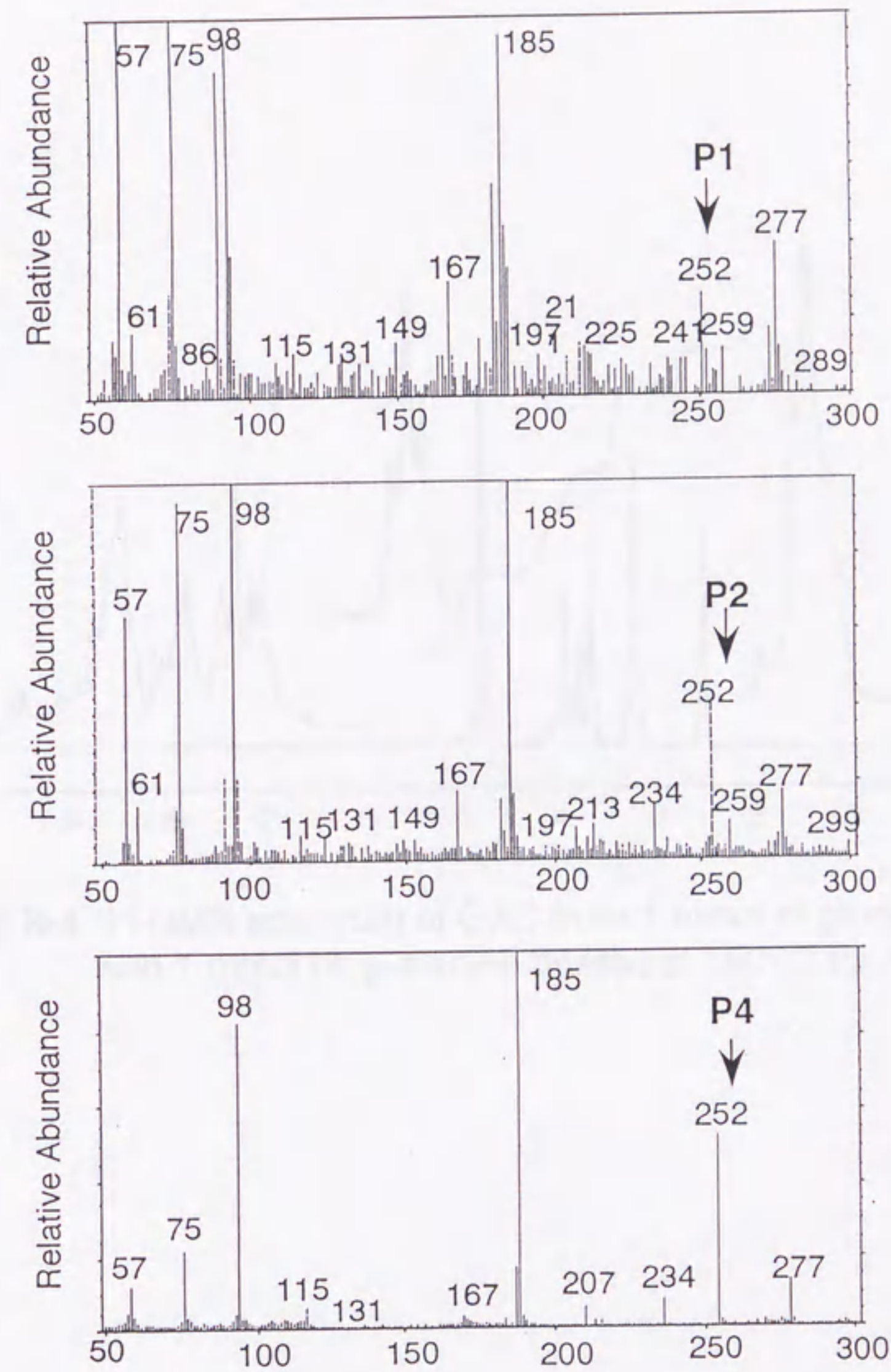


Fig. 8-3 FAB-MS spectra of P1, P2 and P4 of FAC-1 from fructose with β -alanine heated at 150°C for 4 min.

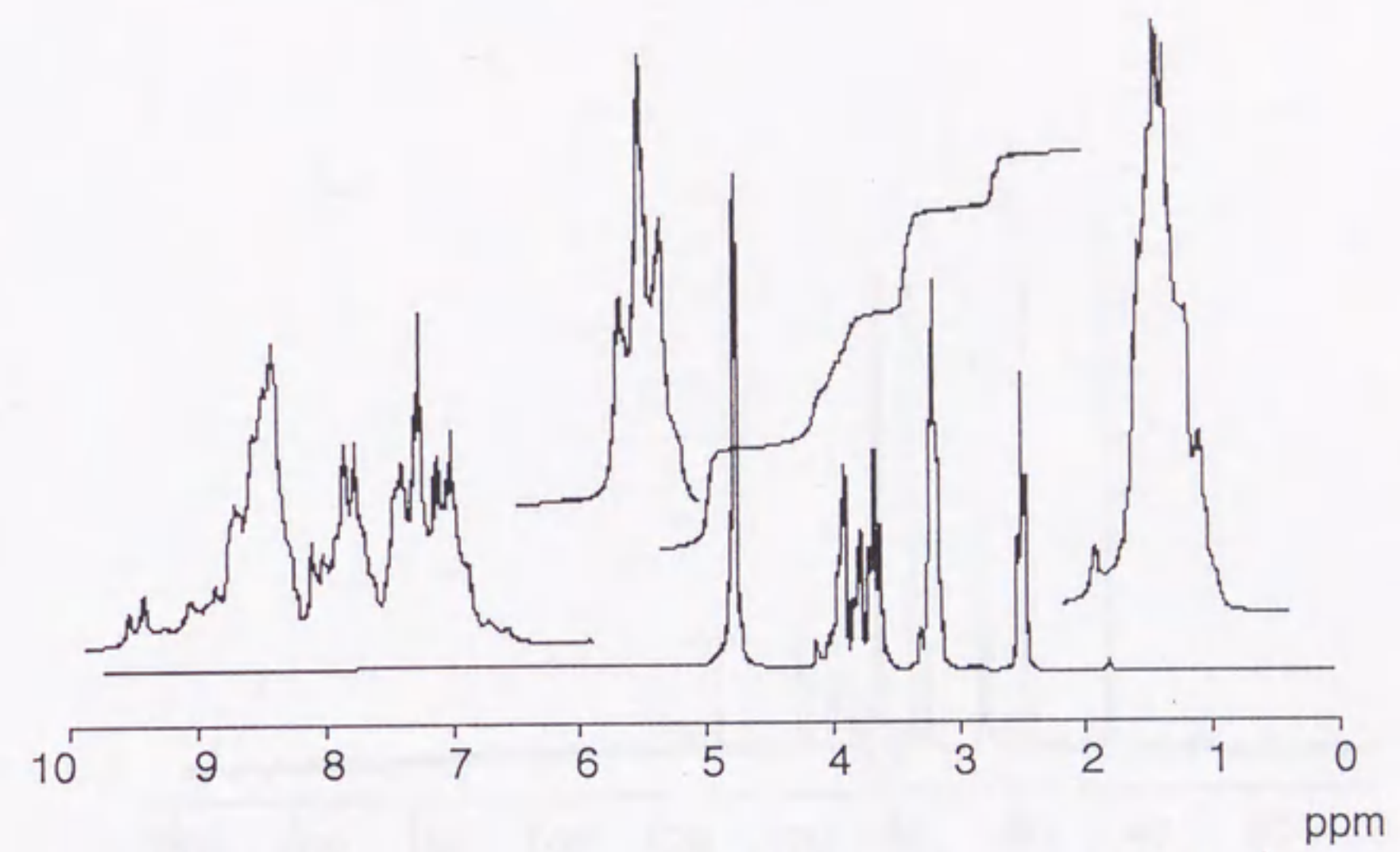


Fig. 8-4 ¹H-NMR spectrum of GAC from 1 mmol of glucose with 1 mmol of β -alanine heated at 150°C for 4 min,

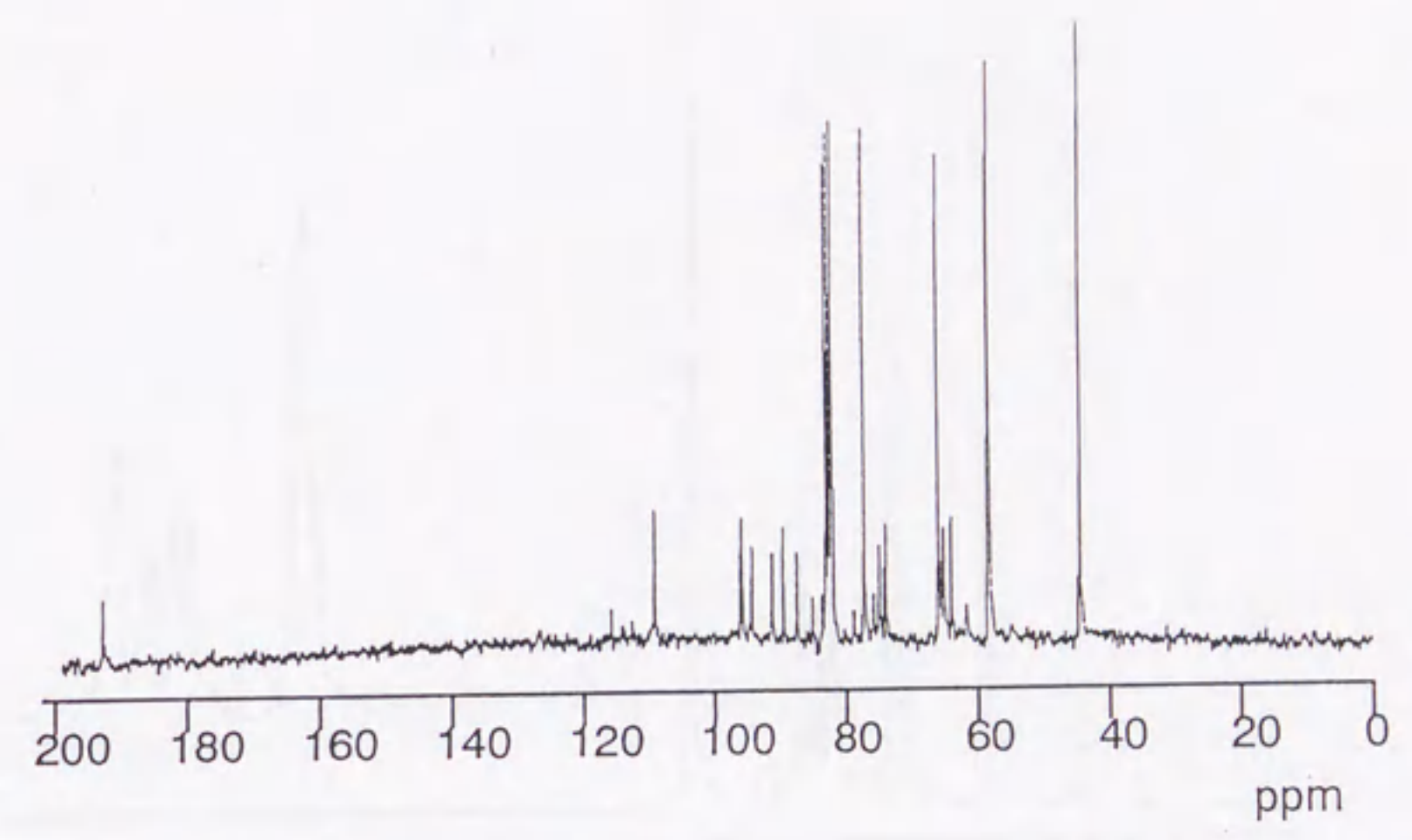
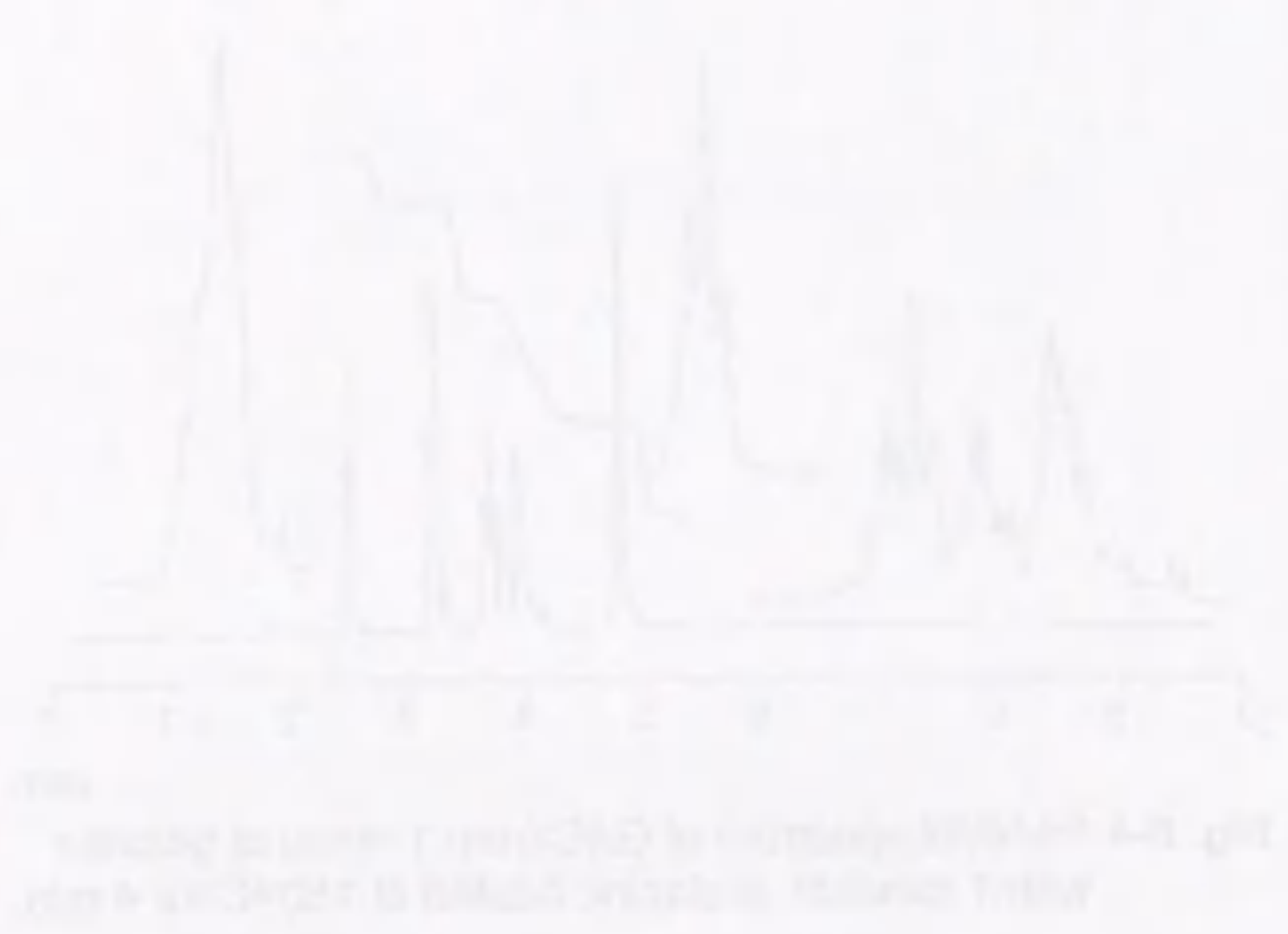


Fig. 8-5 ¹³C-NMR spectrum of GAC from 1 mmol of glucose with 1 mmol of β-alanine heated at 150°C for 4 min.

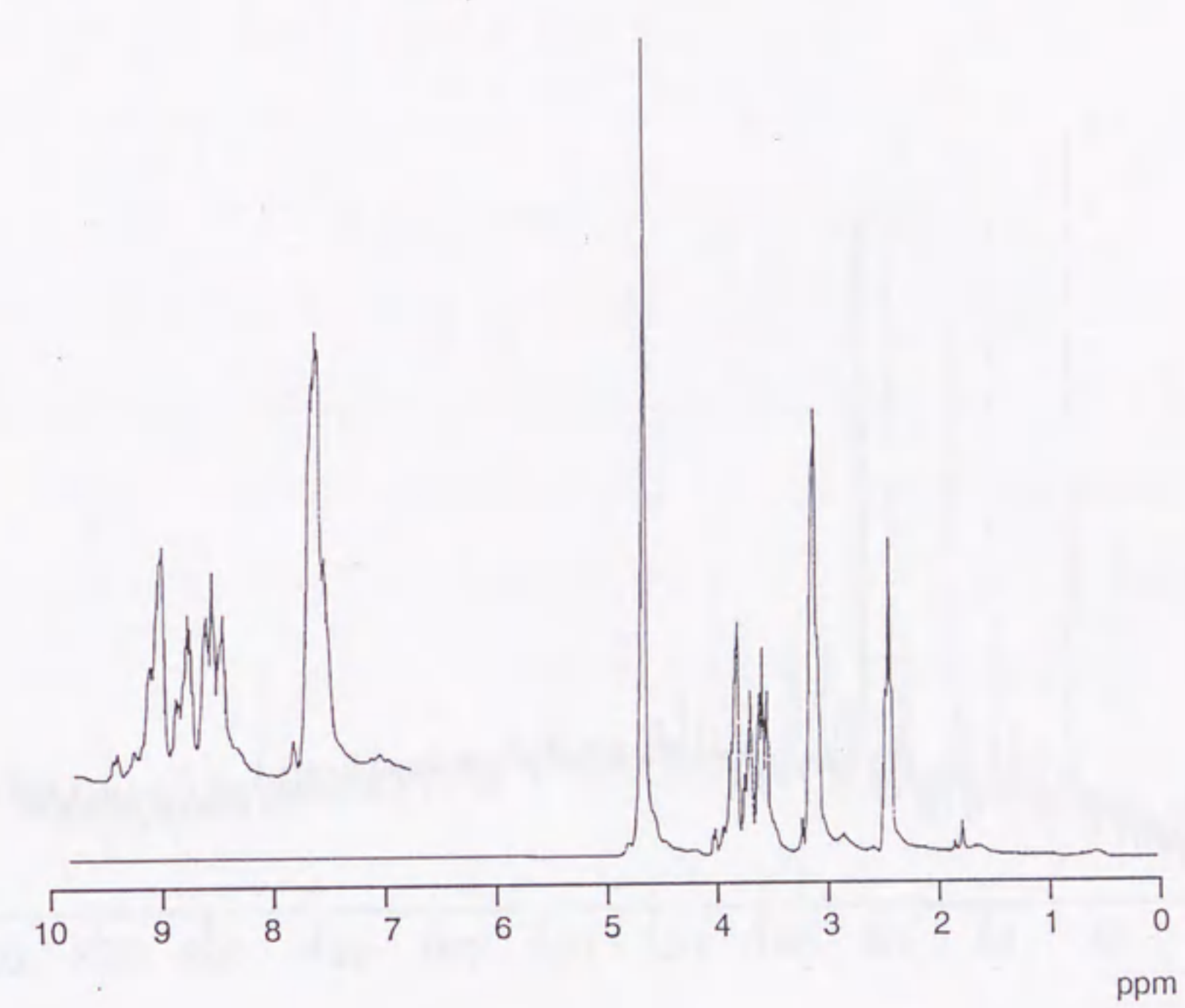
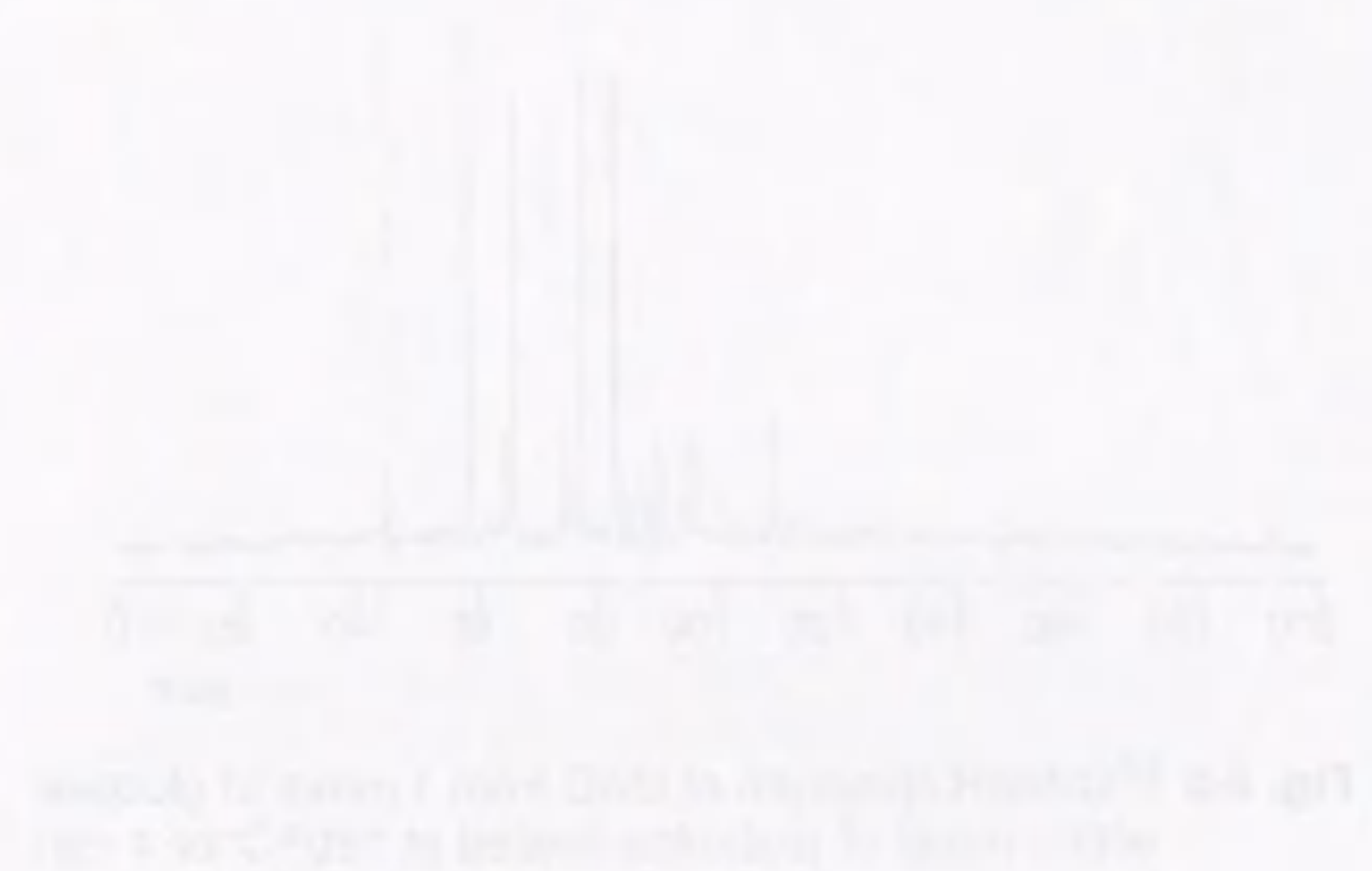


Fig. 8-6 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of FAC-1(P2) from 1 mmol of fructose with 1 mmol of β -alanine heated at 150°C for 4 min.

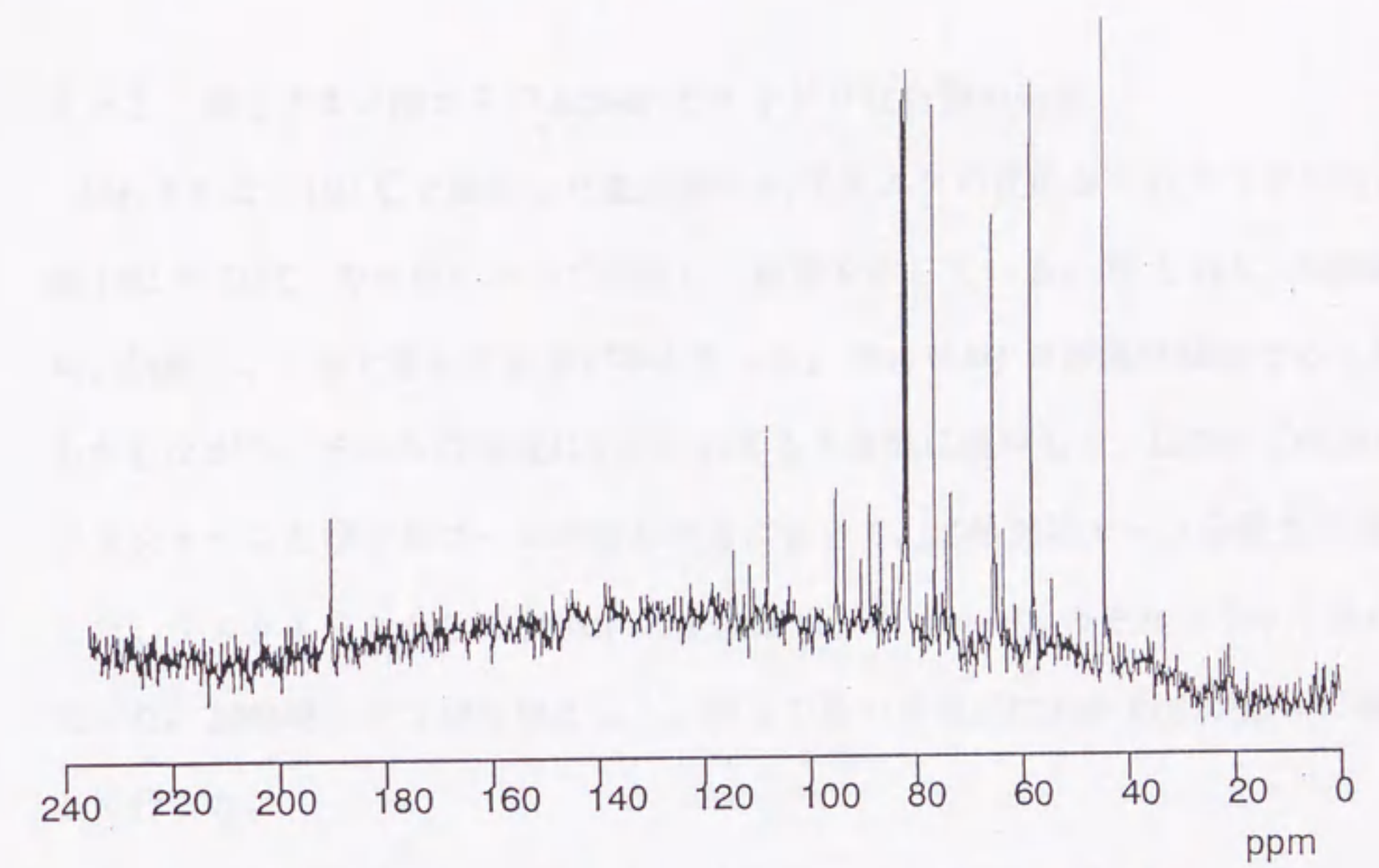


Fig. 8-7 ^{13}C -NMR spectrum of FAC-1(P2) from 1 mmol of fructose with 1 mmol of β -alanine heated at 150 °C for 4 min.

[120] は、溶液の中でアマドリ化合物は環状のヘミアセタール型で存在すると報告している。この研究において、1個のカルボニル基のシグナルは、一般的なカルボニル基のシグナルの位置 (200 ppm 付近) より高磁場 (108.3 ~ 109.0 ppm) に確認された。P2 や GAC のようなフルクトース- β -アラニン は、環状のヘミケトンのアセタール型を形成していると考えられる。

8-3 糖とアミノ酸からの DDMP とアマドリ化合物の生成

Fig. 8-8 は、150 °C で加熱した還元糖と β -アラニンの反応からのアマドリ化合物 (P2 や GAC) の生成について検討した結果を示している。P2 と GAC の形成は、加熱 2、3 分で最も生成量が多くなった。特に GAC の形成が顕著であった。しかしながら、それらの形成は 3 分を過ぎると急激に減少した。DDMP の生成は、フルクトース及びグルコースの相方の系において、加熱開始 4 ~ 5 分後まで増加した。フルクトースからの DDMP の生成量は、グルコースのそれよりやや多くなった。加熱時間が 5 分を越えると、両方の糖の系共に DDMP 形成が徐々に減少して行った。

8-4 各種アマドリ化合物からの DDMP 生成

フルクトース- β -アラニン、フルクトース- p -トルイジン、フルクトース- N_{α} -*tert*-Boc-リジンなどのアマドリ化合物を文献にしたがって調製した [121、122、123]。そして、それらを 150 °C で 10 分間加熱し、反応生成物を HPLC で分析した結果を Fig. 8-9 に示す。全てのアマドリ化合物から DDMP が顕著に生成され、特にフルクトース- β -アラニンとフルクトース- N_{α} -*tert*-Boc-リジンは優先的に DDMP を生成した。フルクトース- β -アラニン 1 mmol を加熱した場合の DDMP と HMF の生成量を Fig. 8-10 に示した。その結果、10 分加熱により

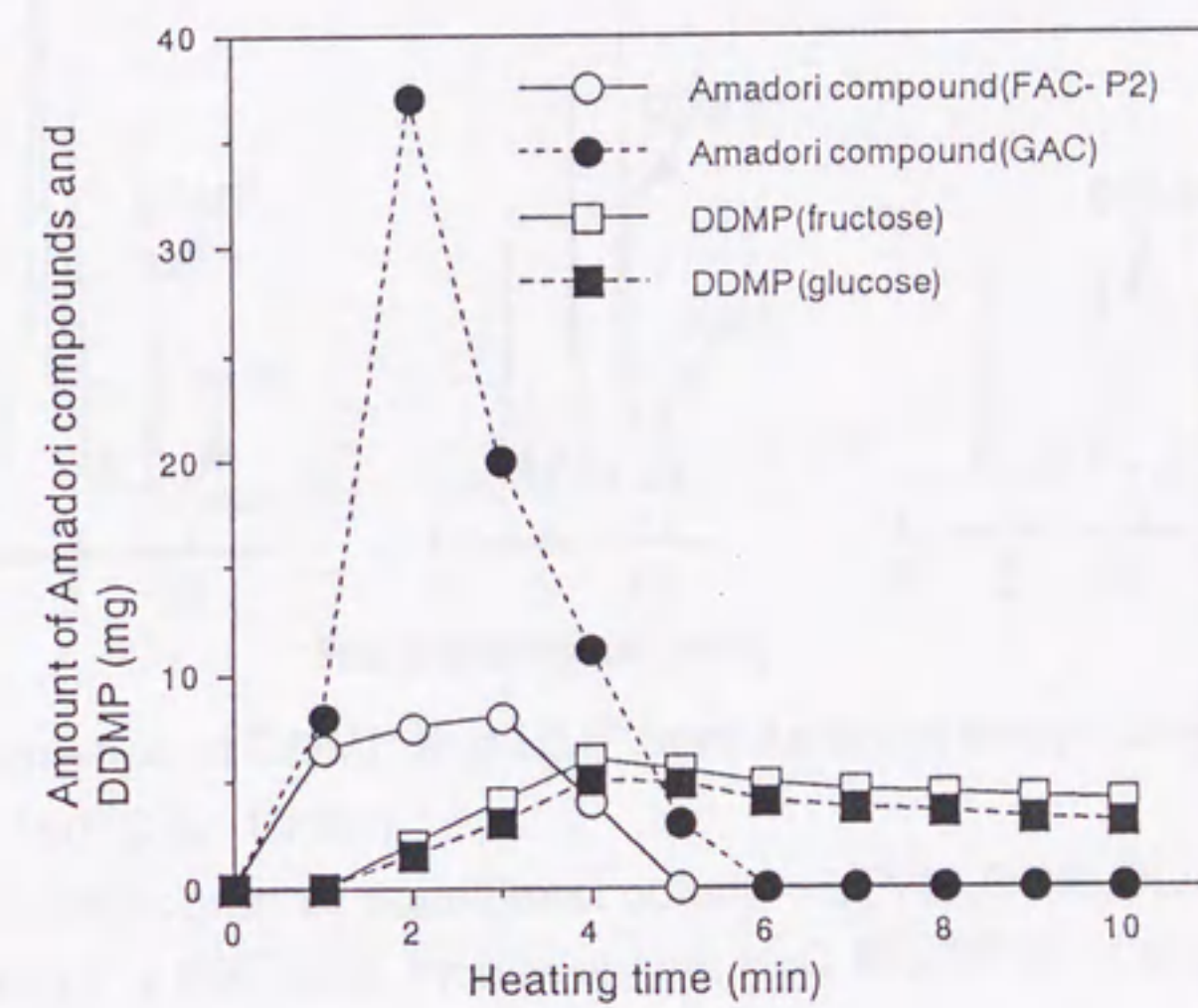


Fig. 8-8 Formation of Amadori compounds and DDMP from 1 mmol of either glucose or fructose with 1 mmol of β -alanine heated at 150°C for 10 min.

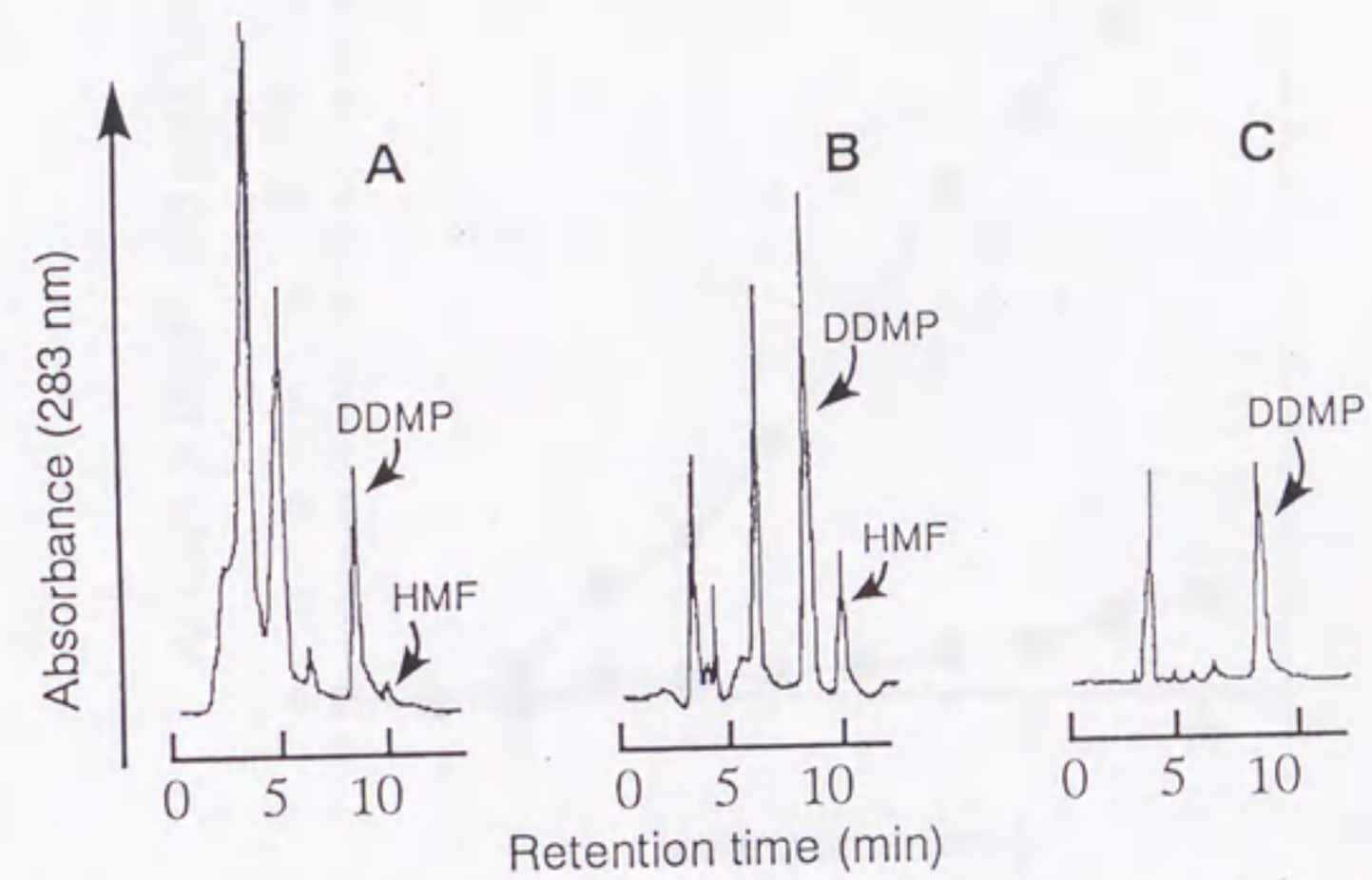


Fig. 8-9 Formation of DDMP and HMF from Amadori compounds heated at 150°C for 10 min.
 Chromatographic conditions: column; DEVELOSIL ODS-5 (4.6 mm i.d. x 250 mm), mobile phase; H₂O-MeOH (6 : 1 v/v), flow rate; 0.8 ml/min, UV detection; 283 nm, chart speed; 5 mm/min.
 A; Fructose-β-alanine, B; Fructose-ρ-toluidine, C; Fructose-Nα-t-Boc-lysine

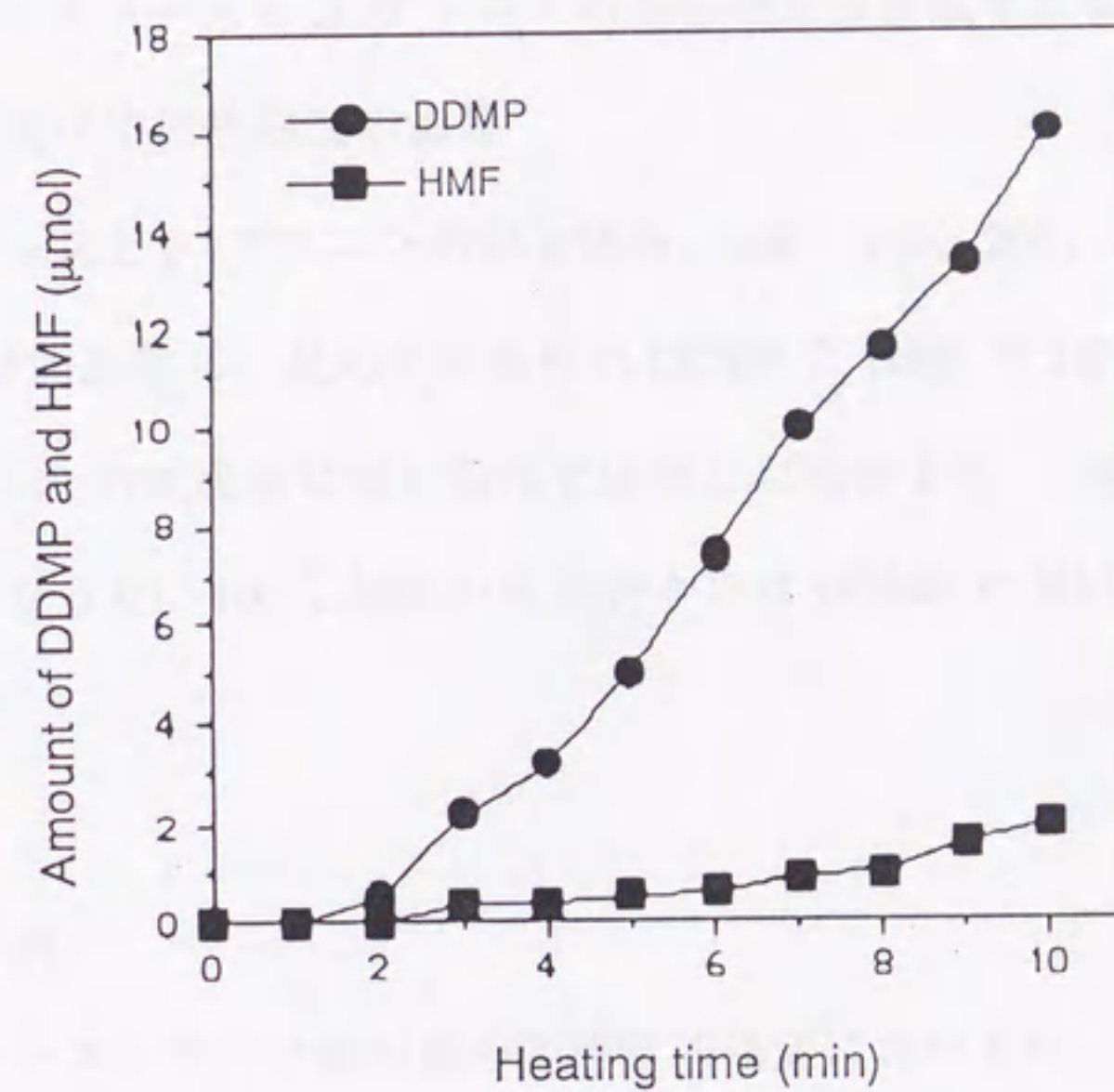


Fig. 8-10 Formation of DDMP and HMF from 1 mmol of fructose-β-alanine heated at 150°C for 10 min.

DDMP は 16 μmol (1.6 %)、HMF は 2 μmol (0.2 %) 生成された。

8-5 フルクトースと β -アラニンの混合物から生成される DDMP と HMF に及ぼす加熱温度の影響

フルクトースと β -アラニンの混合物を、100、150、200、250 $^{\circ}\text{C}$ のそれぞれの温度で 10 分間加熱し、反応生成物中の DDMP と HMF を HPLC で分析した (Fig. 8-11)。DDMP の生成量は他の温度で加熱した場合より、150 $^{\circ}\text{C}$ で加熱した場合に最も多くなった。100 $^{\circ}\text{C}$ 加熱の混合物からは DDMP と HMF はほとんど確認できなかった。

8-6 考察

フルクトースとアミノ酸の間の非酵素的褐変においては、一般的にハインズ転移として知られている反応を経由すると報告されている [117]。これは、アミノ基がフルクトースの C2 と結合し、フルクトースの 1 位の炭素が主に転移に関与し、アルデヒド基となり進む反応である (Fig. 8-12)。しかし、Mc Pperson ら [118] は、物理的な条件下でフルクトースの 1 位の炭素にアミノ基が直接的に攻撃すると報告している。

今回は、フルクトースと β -アラニンの反応から FAC-1 が検出された。グルコースと β -アラニンの反応から検出された GAC は、フルクトース- β -アラニン、すなわちアマドリ化合物であった。Fig. 8-1 に示したように FAC-1 はさらに UV 検出器により 4 つのピーク (P1、P2、P3、P4) に分かれた。そして、P1、P2、P4 は質量分析により同じ分子量 (251) であった。FAC-2 は単一ピークであった。これらの結果は、Fig. 8-12 に示したように、ハインズ転移生成物を含む理論的に可能な N-化合物 (5) ~ (8) の 4 種類が存在することを示唆している。FAC-2

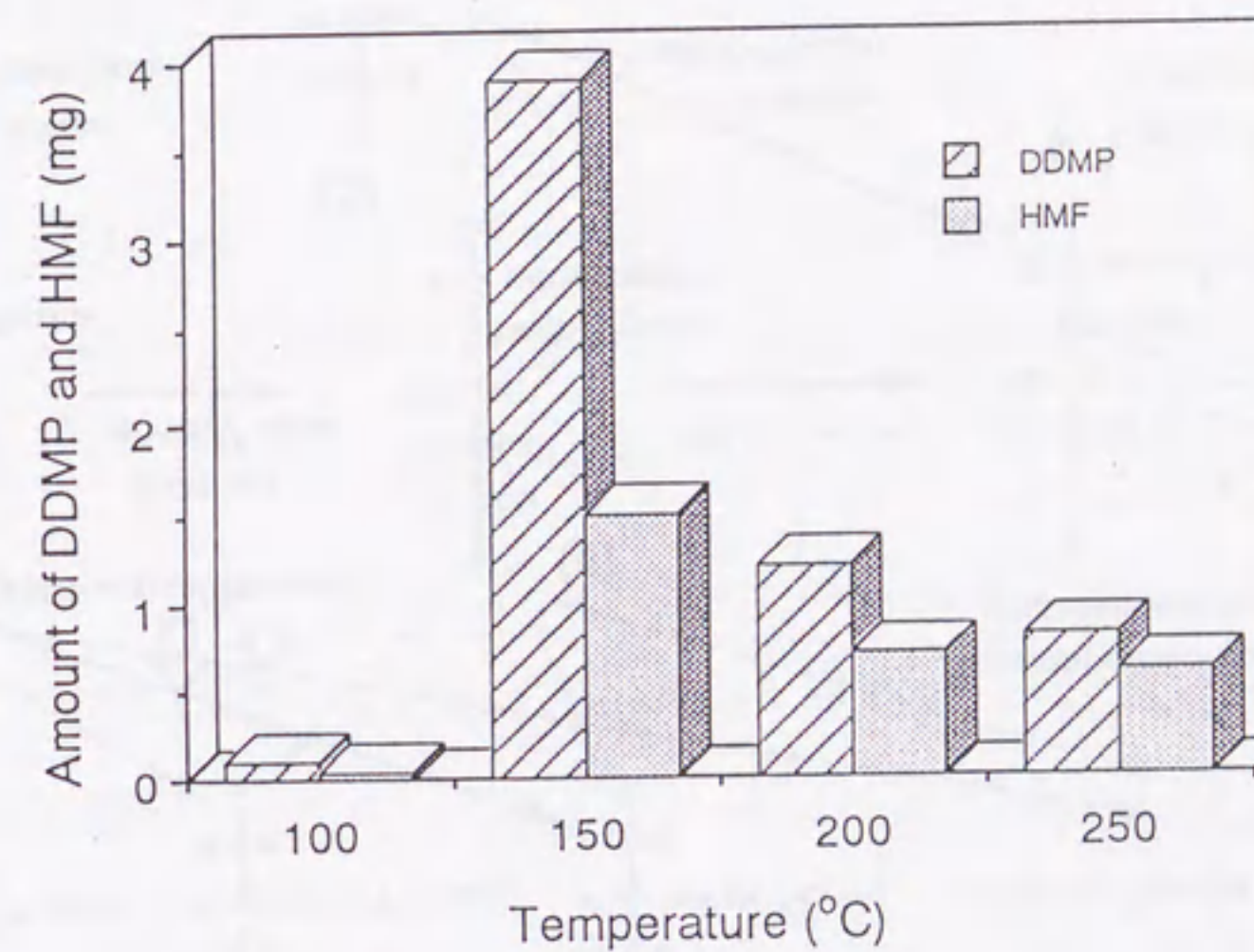


Fig. 8-11 Formation of DDMP and HMF from the reaction of each 1 mmol of fructose and β -alanine heated at 100, 150, 200 and 250°C for 10 min.

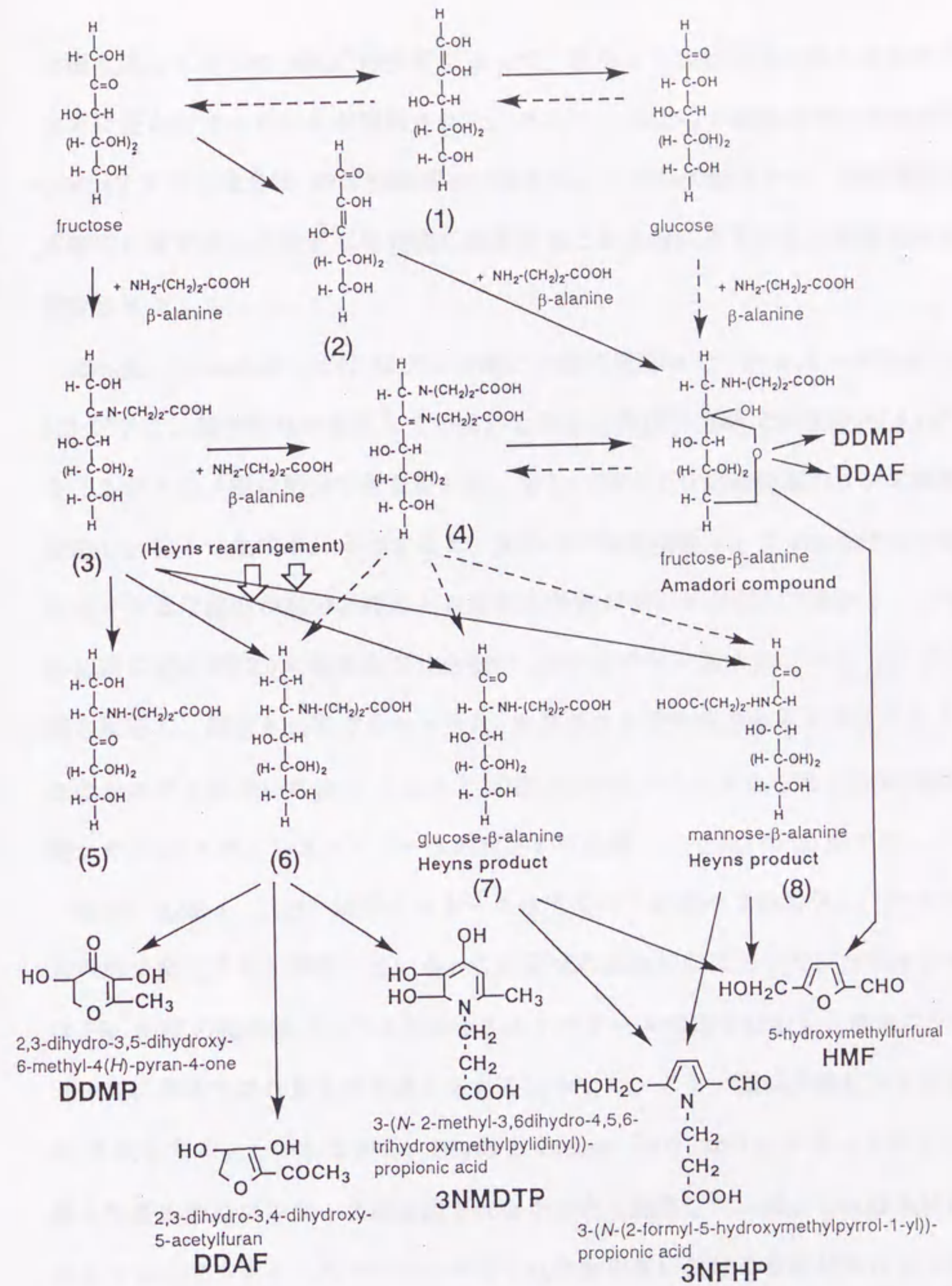


Fig. 8-12 Possible formation pathway of 5 compounds via N-substituted compounds in the reaction of fructose and β -alanine

は繰り返して行った HPLC の分析によって、異なった保持時間の他の生成物に徐々に変わっていくことが観察された。そして、FAC-2 の保持時間は最終的に GAC (アマドリ化合物) の保持時間と一致した。これらの結果から、加熱反応生成物中に最終的にアマドリ化合物に転移すると考えられる不安定な物質の存在が推定される。

Kitaoka と Onodera [124] はアミノ酸と一緒に反応させたグルコース溶液中に 1,2-ジアミノ糖の存在を報告している。しかし、今回の実験では化合物(4) のような 1,2-ジアミノ糖は同定できなかった。もし、アマドリ化合物がハインズ転移を経由し、徐々に生成されるとすると、反応の中間生成物として 1,2-ジアミノ糖が検出できる可能性が高い。これらの結果と著者のデータから、フルクトースは反応初期に化合物(2) に転移して化合物(2) のアルデヒド基は β -アラニンのアミノ基と反応し、結果としてフルクトース- β -アラニンが生成されたと考えられる。このシステムにおいて β -アラニンと反応したフルクトースからの P2 の生成は極僅かで、 β -アラニンとグルコースの反応から生成した GAC の 20% であった。

他方、Ledl ら [125] はフルクトースはアルカリ溶液中で異性化し、グルコースの形に変化すると報告している。この研究の反応初期において、フルクトースは Fig. 8-12 の化合物(1) のような 1,2-エンジオール構造を経由し、簡単にグルコースに異性化されるものと考えられる。そして、アミノ酸は異性化された糖の C1 と反応する。しかしながら、Heyns と Breuer [10] はフルクトースとアミノ酸との反応中にグルコースは確認されなかったと報告している。これは上に述べたように、フルクトースからのアマドリ化合物形成における反応経路に化合物(2) が存在する可能性を示している。

アマドリ化合物の形について、閉環型であるか開環型であるかについて多くの研究がある。今回の研究で、フルクトース- β -アラニンの ^{13}C -NMR の分析デー

タから、アマドリ化合物は閉環型で存在すると考える (Fig. 8-12)。これはフルクトース- β -アラニンの C2 のカルボニル基が 108.3 ppm に確認されたことから推定される。もしアマドリ化合物が開環型で存在するならば、カルボニル基のシグナルは 200 付近の低地場に確認されるはずである。また、閉環型の構造は開環型に比べ、フルクトースと β -アラニンからの DDMP をより容易に形成すると考えられる。もし、アマドリ化合物が開環型で存在すると、Kitaoka と Onodera [124] が報告しているように 1,2-ジアミノ糖を形成するかもしれない。しかし、この研究の中ではジアミノ糖は検出されず、優先的に DDMP が生成された。

DDMP 形成はフルクトースと β -アラニンの加熱の初期段階、すなわち FAC-1 と FAC-2 形成後すぐに観察された。さらに、DDAF [95] もフルクトースと β -アラニンの反応初期に、すなわち、150 °C で 2 分間の加熱で形成された。また、このシステムで、フルクトースと β -アラニンの 4 分間の加熱により 3NMDTP の生成が確認された [129]。これらの結果は、いずれも化合物(6)の存在を支持している。

化合物(7)と(8)は 3NFHP を導くと考えられる。Shaw と Berry [127] はアミノカルボニル反応中のピロールとピリジニールの形成は、アマドリ化合物から 3-デオキシソンを經由することを推論している。しかしながら、Nyhammer ら [128] は ^{13}C でラベルしたグルコースを用いた実験から、3-デオキシオンよりもグルコースからの方がピロールやピリジニールを速やかに形成すると報告している。今回のフルクトースと β -アラニンの反応において、3NFHP は 4 分以上加熱された場合大量に生成された [126]。化合物(7)と(8)のハインズ転移生成物は化合物(3)を經由して形成し、容易に、しかも早く、直接 3NFHP を生成すると推定される。

DDMP は Fig. 8-9 に示したように、アマドリ化合物の 150 °C、10 分間の加熱

によって形成される。アマドリ化合物からの DDMP の生成量は HMF の生成量より多かった。DDMP と HMF は 10 分間のフルクトース-β-アラニンの加熱によって増加し、DDMP の生成量は HMF の生成量の 8 倍に達した (Fig. 8-10)。すなわち、1 mmol のフルクトース-β-アラニンの 10 分間の加熱から、16 μmol の DDMP と 2 μmol の HMF をそれぞれ生成した。しかしながら、DDMP はフルクトース-β-アラニンの加熱後 2 分で検出されたが、HMF は加熱 4 分後から検出された [43]。Beck ら [129] は、アマドリ化合物はメチル基、ヒドロキシメチル基、C2 にアミノ酸が結合しているメチレン基をもつ 3 種類のデオキシオンに優先的に変化することを示した。今回の研究における DDMP の優先的な形成は、これらのデオキシオンを経由する経路が存在することを支持している。

また、HMF はタンパク質、アミノ酸、アミンが存在しない時、ヘキソースから徐々に作られる。また、HMF はアマドリ化合物であるフルクトース-β-アラニンから形成されるよりも、β-アラニンとフルクトースあるいはグルコースからの反応からの方がより多く生成した。この結果は、糖とアミノ酸の混合物からの HMF 生成が、糖の脱水やアマドリ化合物、ハインズ転移生成物などの色々の経路を経由して生成される可能性を示唆している。HMF の生成経路として考えられるものは次のとおりである。

[経路 1] フルクトース → 化合物(2) → 3-デオキシグルコソン(3DG)

→ HMF

[経路 2] フルクトース → 化合物(2) → アマドリ化合物 → 3DG

→ HMF

[経路 3] フルクトース → 化合物(3) → ハインズ転移生成物 → HMF

[経路 4] フルクトース → 化合物(3) → 化合物(4) →

ハインズ転移生成物 → HMF

[経路 5] フルクトース → 化合物(1) → グルコース →

アマドリ化合物 → 3DG → HMF

[経路 6] グルコース → アマドリ化合物 → 3DG → HMF

Kato [130] は HMF 形成の生成過程に 3DG が存在することを報告している。

DDMP 形成における温度の影響を Fig. 8-11 に示した。フルクトースと β -アラニンの加熱反応において 150 °C の加熱により生成する DDMP は、100、200、250 °C で生成する DDMP 量よりかなり多くなった。100 °C の加熱では DDMP と HMF はほとんど生成しなかった。それは、まだ 100 °C ではフルクトースが溶解していないためと考えられる。200 °C と 250 °C の加熱により生成された DDMP と HMF の量は、150 °C の加熱により生成された DDMP と HMF の生成量より少なかった。これは加熱温度が高ければ高いほど反応が早く進むためと考えられる。また、DDMP は 200 °C や 250 °C での加熱では形成されにくいと考えられる。フルクトースはハインズ転移生成物やアマドリ化合物が生成される前に、高い温度のためより低分子の物質に完全に分解されることも考えられる (Suarez [40])。そして、このような分解物が N-化合物 (Grandhee と Monnier [131]) やメラノイジンを形成すると推定される。

これらの結果を基に、150 °C で加熱されたフルクトースと β -アラニンは、アマドリ化合物やフルクトースの C₂ に β -アラニンが結合したハインズ転移生成物を含む N-化合物(5)~(8)を生成する。DDMP、3NMDTP、DDAF、3NFHP はこれらの N-化合物を経由して容易に生成されるように思われる。固相系において 150 °C の高温で加熱することは、クッキーのフレーバーとして望ましい DDMP や DDAF の形成のために最もよい条件であると考えられる。

第9章 総括

食品を加工したり保蔵する場合、食品成分間に種々の化学反応が生じ、食品の色や香など品質に様々な影響を与える。ここでは低水分系の食品を実験対象として、その加熱加工中における各種の成分間反応を多方面から検討することを目的として研究を行った。

低水分系食品としてクッキーを選び、加熱中における色の変化、加熱生成物について、クッキー原材料の影響を検討した。

小麦粉、卵、バター、糖、炭酸水素ナトリウムなどを用いてクッキーを調製し、その焙焼過程における経時変化をみるために150℃で1～10分間加熱し、それぞれの試料をメタノール/水で抽出した。その抽出液を分光光度計で測定すると、クッキーの加熱時間の増加に伴って波長281～295 nm付近の吸収が高くなり、この変化はクッキー原材料の中で特に糖の影響を強く受けていた。

最も変化の顕著であった波長283 nmを検出波長として、焙焼クッキーからの抽出物をHPLCで分析した。その結果、1～10のピークが得られ、特に3、5、6のピークが顕著であった。また、P6は標品のHMFと保持時間が一致し、HMFであると推定された。

P6はフルクトース単独の加熱反応から大量に生成されることから、糖に由来する生成物であることが明らかになった。P5はクッキー加熱初期段階に生成され、20分後までは一定割合で増加するが、その後、次第に増加が緩慢になった。また、このピークは各種クッキー原材料の組み合わせによる加熱反応で、糖と卵、特に卵白と反応した時に多く生成された。

これらの2つのメインピークを単離・精製し、構造決定を行った結果、これらのピークはDDMPとHMFであることを確認した。

焙焼クッキーの加熱生成物に及ぼすクッキー原材料の影響の研究から、クッキー原材料の中で特に糖の寄与が最も大きいことから、次に焙焼クッキーの品質に及ぼす各種糖の影響について検討した。糖としてペントース、ヘキソース、二糖類、三糖類を用いクッキーを調製し、150℃で10分間加熱後メタノール/水で抽出した後、その抽出液をHPLCで分析した。その結果、ペントース添加クッキーより得られた抽出液から顕著なピークが検出され、フルフラールと同定された。ペントース以外の糖を添加したクッキーからはDDAF、DDMP、HMFが検出された。DDMPは特にヘキソースを添加したクッキーにおいて認められた。DDAFとDDMPは甘い、クッキー様のフレーバーを有していた。

クッキーの物理的な特性、すなわち膨化度、形、色、表面の状態などに関する研究を行った。各種糖を添加したクッキーを調製してその違いを検討した結果、糖の融点や溶解度の違いによりクッキーの形状に大きな違いがあることが明らかになった。すなわち、フルクトース添加クッキーはスクロース添加クッキーに類似していたが、グルコース添加クッキーはクッキー表面にしわができ、またクッキーの横への伸展性が少なく、垂直方向へ高く盛り上がっていた。これらの現象は各種の糖により異なり、グルコース様のクッキーになったのはアラビノース、セロビノース、ラフィノースであった。また、膨化を助けるために炭酸水素ナトリウムをクッキーに添加すると、ペントース、ヘキソース、及び二糖類のセロビノース、ラクトース、マルトース添加クッキーに褐色の斑点が認められた。これらは糖の還元性の有無に関係していることが明らかになった。すなわち、還元性基を有する糖とアミノ酸、またはタンパク質によるアミノカルボニル反応が炭酸水素ナトリウムにより促進されるか、または糖自体が炭酸水素ナトリウムにより分解されることによって褐変が急速に起こり、クッキー中に褐色のスポットとして生じたものと考えられた。

クッキーの焙焼による着色は、スクロース添加クッキーではほとんど起こらなかった。ペントース、ヘキソース添加クッキーでは二糖類、三糖類に比べて早い段階から着色した。全体的にヘキソースよりペントース添加クッキーの方が着色が進んだ。特にリボース添加クッキーの着色は顕著であった。ヘキソースの中ではマンノース、フルクトース、ガラクトース添加クッキーが強く着色した。グルコース添加クッキーは、実験に用いた4種類のヘキソースの中で最も着色しにくかった。この実験を通して、一般的に食品に用いられる糖の中でクッキー焙焼における着色、クッキーの形状、テクスチャー、香気形成など物理的な特性やフレーバーの品質面においてフルクトースをクッキーに添加することは、クッキーに好ましい効果を及ぼすことが明らかになった。

クッキーからの好ましい香気生成がクッキー素材である糖と卵の反応から生成することから、更に研究を進めるために各種のタンパク質及びアミノ酸を糖と反応させ、香気生成に関する成分間反応について検討した。

タンパク質と糖との反応の結果、クッキー様香気をもつ DDMP はオボアルブミンとフルクトースの反応から最も多く生成した。アミノ酸とフルクトースをクッキー調製時の配合割合で混合し、加熱反応させると、ヒスチジン、アルギニンの塩基性アミノ酸において顕著な DDMP 生成が認められた。その他アラニン、プロリンとの反応においても DDMP が多く生成された。

DDMP 生成に及ぼす pH の影響を検討するためにグルタミン酸とフルクトースを混合し、その混合物に炭酸水素ナトリウムを 0 ~ 3 mmol 添加し、加熱反応させた。今回の実験においては水系ではなく固相系で反応を行っているため、一概に pH や pKa 値を問題にすることはできないが、炭酸水素ナトリウム 0.5 mmol 添加の場合が無添加の場合より DDMP の生成量が多くなり、その反応液に蒸留水 1 ml を加え、その pH を測定すると pH 6.5 付近であった。これらのことから、

DDMP が効率よく生成される pH は中性付近であることが明らかになった。しかし、アルギニン (pKa 値 10.75) やヒスチジン (pKa 値 7.59) の様に高い pKa 値のアミノ酸とフルクトースの反応からも DDMP 生成が多いことから、固相系においては pKa 値や pH 値とは異なる要因によることも推察される。いずれにしても、フルクトースと中性アミノ酸や塩基性アミノ酸との加熱反応から DDMP が多く生成されたことから、これらの反応においては 2,3-エンジオール構造を経由する反応が優先されるものと考えられる。

アミノ酸や糖との加熱反応物の構造について検討するために、フルクトースと β -アラニンを加熱反応させて反応生成物を HPLC を用いて単離した。各種の機器分析により、DDAF、DDMP、HMF、3NFHP、3NMDTP と 3DG を同定した。

また GC-MS の分析の結果、2 個のフラン、2 個のフラノン、3 個のピラン、4 個のピロールを同定した。すなわち、2-(ヒドロキシメチル)-フラン、イソマルトール、2,5-ジメチル-4-ヒドロキシ-3(2H)-フラノン、4-ヒドロキシ-2-アセチル-3(2H)-フラノン、2,3-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-6-メチル-4(H)-ピラン-4-オン、DDMP、2,3-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-6-ホルミル-4(H)-ピラン-4-オン、3-{N-(2-ホルミル-プロリル-1-イル)}-プロピオン酸、3-{N-(2-アセチル-プロリル-1-イル)}-プロピオン酸、3NFHP である [108]。これらの生成物中 DDMP が最も多く生成された [66、80、97、98]。一般的にクッキーの香気成分として報告されているマルトールは、HPLC、及び GC-MS 分析のいずれにおいても検出できなかった。

DDMP はマルトールの前駆体であると報告されていることから [45]、ここには記載してないが、著者はフルクトースと β -アラニンから単離した DDMP を試験管に入れ、150°C のブロックバスで 10 分間加熱し、その変化を経時的に検討したところ、マルトールの生成は認められなかった。Shaw ら [62] は、少量の塩酸と水を含むジクロールメタン溶液中で DDMP を 90 分室温で転移させるとイ

ソマルトールとマルトールが 10:1 の割合で生成されると報告している。これらのことから、クッキー調製時の条件下では DDMP からマルトールの生成は速やかに進む反応ではないことが推測される。

一方、Yaylayan と Mandeville [44] は、マルトールはアマドリ化合物の MS 測定中エレクトリック・インパクトによっても生じる、すなわち、マルトールは二次的生成物であると報告している。また、Fisher ら [56] は、1-デオキシ-D-エリスロ-2,3-ヘキソジウロースの水溶液とアセチルピペリジンのエタノール溶液の反応から HHMF を単離した。彼らが報告している HHMF の MS フラグメントは m/z : 126 (12), 111 (20), 98 (35), 85 (33), 84 (73), 57 (52), 56 (44), 55 (22), 43 (100), 42 (34) で、分子イオンの 144 はほとんど現れていなかった。彼らは HHMF から脱水が速く起こり、 m/z : 126 のフラグメントが現れたと報告している。以上のことなどを考え合わせると、Hodge ら [45] が実際のクッキー香気成分中には存在していないマルトールを同定したのは、アミノカルボニル反応に関する研究の初期に用いられた GC、GC-MS を主たる分析手法としていたために生じた問題ではないかと考えられる。

次に、クッキーの焙焼中の主たる香気成分の反応機構を検討した。今回同定した DDAF、DDMP、HMF、3NFHP、3NMDTP などの反応生成物が、糖とアミノ酸の加熱反応に由来すると考えられることから、経時的に生成量を検討した。一般的に糖とアミノ酸の反応は、酸性で 1,2-エンジオール構造を経由し、アルカリで 2,3-エンジオール構造を経由すると報告されている。この反応系での主要生成物 DDMP の生成は、pH 6.5 付近の中性領域で顕著であった。DDAF や DDMP の生成は 2,3-エンジオール構造を経由し、HMF は 1,2-エンジオール構造を経由すると考えられるが、クッキーなど固相系の焙焼条件下では、加熱反応の初期には、糖とアミノ酸から優先的に DDAF や DDMP が顕著に生成され、加熱後期に

は HMF が生成された。

さらに、フルクトースとアミノ酸の反応系における中間体を検討するために、フルクトースと β -アラニンを反応させ、その抽出液を HPLC を用いて分析した。その結果、アマドリ化合物などの中間体が確認された [126]。グルコースの様なアルドースとアミノ酸とのアミノカルボニル反応においては、一般的にアマドリ化合物を経由し、色々な反応生成物が形成されることが知られている。フルクトースなどケトースに関しては、ハインズ転移を経由することが報告されている。しかしながら、今回のフルクトースとアミノ酸の加熱反応に関する研究において、アマドリ生成物を含む複数の反応中間体の存在を確認した。また、著者が同定したクッキー抽出物中の香気物質の形成状態から、反応中間体の中にフルクトースの C1 にアルデヒド基をもつハインズ転移生成物ばかりでなく、メチル基やヒドロキシメチル基をもつ物質の存在が推定された。フルクトースとアミノ酸の反応がハインズ転移生成物のみを経由する場合は、C1 にアルデヒド基を有する HMF や 3NFHP の方が生成され易いはずである。実際には、C1 にメチル基を有する DDAF、DDMP、3NMDTP が検出され、特に DDMP 生成はグルコースからの生成より多いことから、ハインズ転移生成物を経由しない系が存在すると考えられる。また、一部アマドリ転移生成物も確認されていることから、フルクトースとアミノ酸の反応は複数の反応経路を経て進行するものと考えられる。今回の反応系では、C2 のカルボニル基にアミノ基が付加し、C1 がメチル基になる経路が優先されるものと考えられた。

最近、これらのアミノカルボニル反応由来のメラノイジンなどに活性酸素消去作用や抗酸化作用など制癌効果が認められ、生体系においてもマイナス面ばかりでなく、プラス面での効果が指摘されるようになった。食品中のアミノカルボニル反応生成物も香気形成など食品の品質面など二次機能ばかりでなく、今後、食

品の三次機能としての作用機構などの解明が待たれる。

1. 機能
2. 構造
3. 材料
4. 製造
5. 使用
6. 廃棄
7. 修理
8. 検査
9. 評価
10. 改善

1. 機能
2. 構造
3. 材料
4. 製造
5. 使用
6. 廃棄
7. 修理
8. 検査
9. 評価
10. 改善

品の三次機能としての作用機構などの解明が待たれる。

1. 機能
2. 構造
3. 材料
4. 製造
5. 使用
6. 廃棄
7. 修理
8. 検査
9. 評価
10. 改善

1. 機能
2. 構造
3. 材料
4. 製造
5. 使用
6. 廃棄
7. 修理
8. 検査
9. 評価
10. 改善

実験の部

1 第1部

1-1 装置

NMR: JEOL GX-200

¹H 200 MHz

¹³C 50 MHz

FAB-MS: JEOL JMS-DX-705L

matrix: glycerin

EI-MS: JEOL JMS-DX-303

70 eV

GC-MS: Hewlett-Packard 5792

GC VG analytical ZAB-HS-2F

MS VG 11/250 data system

IR: JASCO FT/IR-8300

JASCO IR-A3

HPLC: Toyo Soda Model HLC-803D pump

Varian Model 5000 Liquid Chromatograph

UV: JASCO U best-50 with a Hitachi Model 200-10

Shimadzu UV-160

Microwave Oven: Quasar model MQ 7757 BW

Conventional Oven: Kenmore Electric Oven, Saears

1-2 使用カラム及び充填剤

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用 カラム

Develosil ODS-5 (4.6 i.d. x 250 mm) 野村化学

(8 i.d. x 250 mm)

ODS-20 (20 i.d. x 250 mm)

SI-60-5 (4.6 i.d. x 250 mm)

(8 i.d. x 250 mm)

NH₂-5 (4.6 i.d. x 250 mm)

(8 i.d. x 250 mm)

ガスクロマトグラフィー (GC) 用 カラム

silica capillary column: DB-1, 30 m x 0.25 mm (filmthickness 0.25 mg)

J & W社

第2章の実験

1 材料

小麦粉は日清製粉(株)製フラワー(薄力粉)、バターは雪印乳業(株)製バター、グルコース、フラクトースは和光純薬(株)製 試薬特級、鶏卵は市販品を用いた。

2 試料の配合割合と調製

配合割合は薄力粉45%、糖(フラクトースまたはグルコース)20%、バター25%、卵10%、膨化剤として炭酸水素ナトリウムまたはベーキング・パウダー(B.P.)1%とした。これらのクッキー原材料を用い、配合条件の異なるクッキー生地を調製し、30 mm ϕ x 5 mm に成形した後オーブンで150 ~ 250 $^{\circ}$ Cで1 ~ 120 分間焙焼して供試試料とした。また、加熱生成物に及ぼす原材料の影響を見るためのモデル実験は、各材料を組合せ、ブロックバスで焙焼した。

3 吸光度の測定

焙焼した試料をメタノール:水(3:1 v/v)で抽出し、綿を詰めたキャピラリーでろ過し、さらにミリポアフィルターでろ過して(株)日立製作所製分光光度計200-10 型で測定した。

4 HPLCによる加熱生成物の検出

前記と同様の方法によって得られた試料について高速液体クロマトグラフィー法(以下HPLCと略す)により、下記の条件で加熱生成物を測定した。

機種:日本分光(株)製 TWINCL

検出機:日本分光(株)製 UVIDEC-100-III

カラム:野村化学(株)製 Develosil パックドカラム ODS-5
4.6 mm ϕ x 250 mm

移動相:水:メタノール(6:1 v/v)混液

流速:0.7 ml/min

温度:室温(20 \pm 5 $^{\circ}$ C)

検出波長:283 nm

第3章の実験

1 材料

小麦粉は日清製粉(株)製フラワー(薄力粉)、バターは雪印乳業(株)製バター、ペントース、ヘキソース、二糖類、三糖類などの糖は、和光純薬(株)製試薬特級、鶏卵は市販品、炭酸水素ナトリウムは和光純薬(株)製試薬特級を用いた。

ペントースとしてはリボース、キシロースやアラビノース、ヘキソースとしてはマンノース、フルクトースやグルコース、二糖類としてはスクロースとマルトース、三糖類としてはセロビオースを用いた。

2 試料の配合割合と調製

配合割合は薄力粉または片栗粉 45%、糖(各種糖) 20%、バター 25%、卵 10%、膨化剤として炭酸水素ナトリウム 1%とした。これらのクッキー原材料を用いて配合条件の異なるクッキー生地を調製し、30 mm ϕ x 5 mm に成形した後オーブンで 150 ~ 250 $^{\circ}$ C で 1 ~ 120 分間焙焼して供試試料とした。

3 吸光度の測定

焙焼した試料をメタノール:水 (3:1 v/v) で抽出して綿を詰めたキャピラリーでろ過し、さらにミリポアフィルターでろ過して(株)日立製作所製分光光度計 200-10 型で測定した。

4 HPLC による加熱生成物の検出

前記と同様の方法によって得られた試料について HPLC 法により、下記の条件で加熱生成物を測定した。また、構造を同定するために P5、P6 を単離・精製した。

機種: 日本分光(株)製 TWINCL

検出機: 日本分光(株)製 UVIDEC-100-III

カラム: 野村化学(株)製 Develosil パックドカラム ODS-5

分析用 4.6 mm ϕ x 250 mm

分取用 20 mm ϕ x 250 mm

移動相: 水:メタノール (6:1 v/v) 混液

流速: 分析 0.8 ml/min

分取 3.0 ml/min

温度: 室温 (20 \pm 5 $^{\circ}$ C)

検出波長: 283 nm

5 クッキーの形状測定

体積増加は、菜種法で行った。高さ、直径はノギスで測定した。特に、直径は

長径と短径を測定して平均値を求めた。

6 P5 の確認

HPLC による分取によって得られた P5 を FAB-MS、EI-MS、¹³C-NMR を用いて P5 を同定した。

7 P5 のアセチル化物の調製

HPLC で単離・精製した P5 を下記の方法でアセチル化し、P5 のアセチル化物を調製した。

水を完全に除去した試料 (1 ~ 10 mg) に無水ピリジン 0.5 ml、無水酢酸 0.5 ml を順に加え、よく混合した後、80 °C の乾熱器中で 2 時間反応させた。反応後、試料を氷冷しながら約 5 ml のメタノールを加えて無水酢酸を分解し、続いて少量のトルエンを加えてエバポレーターで乾固させ、少量のメタノールに溶解し、HPLC で単離・精製を繰り返して P5 のアセチル化物 (Ac. P5) を得た。

8 Ac. P5 の確認

アセチル化によって得られた Ac. P5 を EI-MS、IR、¹H-NMR を用いて分析した。

9 P6 の確認

FAB-MS を用いて構造を同定した。

第4章の実験

1 材料

小麦粉は日清製粉(株)製フラワー(薄力粉)、じゃがいもデンプンはトウカン(株)製片栗粉、バターは雪印乳業(株)製バター、フルクトース、グルコース、スクロースは和光純薬(株)製 試薬特級、鶏卵は市販品、炭酸水素ナトリウムは和光純薬(株)製 試薬特級を用いた。

2 試料の配合割合と調製

配合割合は薄力粉または片栗粉 45%、糖(各種糖) 20%、バター 25%、卵 10%、膨化剤として炭酸水素ナトリウム 1%とした。これらのクッキー原材料を用い、配合条件の異なるクッキー生地を調製し、30 mm ϕ x 5 mm に成形した後オーブンで 150 ~ 250 $^{\circ}\text{C}$ で 1 ~ 120 分間焙焼して供試試料とした。

3 吸光度の測定

焙焼した試料をメタノール:水(3:1 v/v)で抽出して綿を詰めたキャピラリーでろ過し、さらにミリポアフィルターでろ過して(株)日立製作所製分光光度計 200-10 型で測定した。

4 HPLC による加熱生成物の検出

前記と同様の方法によって得られた試料について HPLC 法により、下記の条件で加熱生成物を測定した。

機種: 日本分光(株)製 TWINCL

検出機: 日本分光(株)製 UVIDEC-100-III

カラム: 野村化学(株)製 Develosil パックドカラム ODS-5
4.6 mm ϕ x 250 mm

移動相: 水:メタノール(6:1 v/v) 混液

流速: 0.7 ml/min

温度: 室温(20 \pm 5 $^{\circ}\text{C}$)

検出波長: 283 nm

第5章の実験

1 試料

α ・ β -アラニン、 α ・ β ・ γ -アミノ酪酸、 α -アミノカプロン酸、 α -アミノカブ
リル酸、アルギニン、*N* α -アセチルアルギニン、ヒスチジン、ベンゾイルヒスチ
ジン、アセチルヒスチジン、リジン、*N* α -アセチルリジン、プロリン、ヒドロオ
キシプロリン、イミダゾール、D-フルクトースの全ての試薬は和光純薬製の試薬
特級を使用した。

2 試料の調製

前報と同様に、各アミノ酸 1 mmol とフルクトース 1 mmol を試験管に入れ、
150 °C のブロック・ヒーター中で 1 ~ 10 分間加熱した。加熱終了後急冷して反応
を止めた。

3 HPLC による DDMP の検出

加熱反応させた試料に蒸留水 1 ml を加えて反応生成物を抽出した。その後、
綿を詰めたキャピラリーでろ過し、さらにミリポワフィルターでろ過した試料を
下記に示す条件で分析した。

機 種：日本分光（株）製 TWINCL

検出機：日本分光（株）製 UVIDEC-100-III

カラム：野村科学（株）製 Develosil パックドカラム ODS-5、
4.6 mm ϕ x 250 mm

移動相：水：メタノール (6:1 v/v) 混液

流 速：0.8 ml/min

温 度：室温 (20 \pm 5 °C)

検出波長：283 nm

4 吸光度の測定

HPLC 分析用に調製した試料を更に 400 倍に希釈し、波長 420 nm での吸光度
測定によりその試料の褐変度を検討した。測定に当たっては（株）日立制作所製
分光光度計 200-10 型を用いた。

第6章の実験

1 試料

オボアルブミン、グルタミン酸、D-フルクトース、及び全ての試薬は和光純薬製の試薬特級を使用した。

2 試料の調製

オボアルブミン 1 mmol を塩酸水溶液と水酸化ナトリウム水溶液を用い、pH の調製を行った。その後、凍結乾燥してフルクトース 1 mmol を試験管に入れ、150 °C のブロック・ヒーター中で 1 ~ 10 分間加熱した。加熱終了後急冷して反応を止め、メタノール:水溶液で抽出した。

また、グルタミン酸 1 mmol とフルクトース 1 mmol の混合物に炭酸水素ナトリウムを 0 ~ 3 mmol を加え、試験管に入れ、オボアルブミンとフルクトースの場合と同様に 150 °C で 10 分間加熱し、急冷した後メタノール:水溶液で抽出した。

3 HPLC による検出

加熱反応させた試料に蒸留水 1 ml を加え、反応生成物を抽出した。その後、綿を詰めたキャピラリーでろ過し、さらにミリポワフィルターでろ過した試料を下記に示す条件で分析した。

機種: 日本分光(株)製 TWINCL

検出機: 日本分光(株)製 UVIDEC-100-III

カラム: 野村科学(株)製 Develosil パックドカラム
ODS-5、4.6 mm ϕ x 250 mm

移動相: 水:メタノール (6:1 v/v) 混液

流速: 0.8 ml/min

温度: 室温 (20 \pm 5 °C)

検出波長: 283 nm

4 吸光度の測定

HPLC 分析用に調製した試料をさらに 400 倍に希釈し、波長 420 nm での吸光度測定によりその試料の褐変度を検討した。測定に当たっては(株)日立製作所製分光光度計 200-10 型を用いた。

第7章の実験

1 試料

β -アラニン、D-フルクトース、及び全ての試薬は和光純薬製の試薬特級を使用した。

2 試料の調製

前報と同様に、 β -アラニン 1 mmol とフルクトース 1 mmol を試験管に入れ、150 °C のブロック・ヒーター中で 1 ~ 10 分間加熱した。加熱終了後急冷し、反応を止めた。

3 HPLC による DDMP の検出、及び P4、P11 の分取

加熱反応させた試料に蒸留水 1 ml を加え、反応生成物を抽出した。その後、綿を詰めたキャピラリーでろ過し、さらにミリポワフィルターでろ過した試料を下記に示す条件で分析した。また、P4、P11 の構造を確認するために、単離・精製した。

機種：日本分光（株）製 TWINCL

検出機：日本分光（株）製 UVIDEC-100-III

カラム：野村科学（株）製 Develosil パックドカラム ODS-5、

分析用 4.6 mm ϕ x 250 mm

分取用 20 mm ϕ x 250 mm

移動相：水：メタノール (6:1 v/v) 混液

流速：分析 0.8 ml/min

分取 3.0 ml/min

温度：室温 (20 \pm 5 °C)

検出波長：283 nm

4 吸光度の測定

HPLC 分析用に調製した試料をさらに 400 倍に希釈し、波長 420 nm での吸光度測定により、その試料の褐変度を検討した。測定に当たっては（株）日立製作所製分光光度計 200-10 型、島津製作所製 UV-160 型を用いた。

5 GC-MS による加熱生成物の検出

前記と同様の方法によって得られた試料について GC-MS により、下記の条件で加熱生成物を測定した。

機種：Hewlett-Packard 5792 ガスクロマトグラフィー

VG analytical ZAB-HS-2F マススペクトグラフィー

(with a VG 11/250 data system)

イオン電圧：70 eV

イオン源温度：180 °C

加速電圧：8000 eV

フィラメント補そく電流：100 mA

カラム：シリカ・キャピラリーカラム

DB-1 (30 m x 0.25 mm (i. d.)), フィルムの厚さ 0.25 mm)

温度プログラム：8分間 70 °C、70 ~ 180 °Cは 4 °C/min 昇温、保持温度 180 °C

キャリアーガス流量：30 cm/s He

6 P3 の確認

HPLC による分取によって得られた P5 を FAB-MS、¹H-NMR、¹³C-NMR を用いて P5 を同定した。

7 P4、P11 の確認

分取した P4、P11 を FAB-MS、¹H-NMR を用いて同定した。

8 P3、P11 のアセチル化物 (Ac. P3 と Ac. P11) の調製

HPLC で単離・精製した P3、P11 を下記の方法でアセチル化し、それらのアセチル化物を調製した。

水を完全に除去したそれぞれの試料 (1 ~ 10 mg) に無水ピリジン 0.5 ml、無水酢酸 0.5 ml を順に加え、よく混合した後、80 °C の乾熱器中で 2 時間反応させた。反応後、試料を氷冷しながら約 5 ml のメタノールを加えて無水酢酸を分解し、続いて少量のトルエンを加えてエバポレーターで乾固させ、少量のメタノールに溶解し、HPLC で単離・精製を繰り返してアセチル化物 Ac. P3 と Ac. P11 を得た。

9 Ac. P3 と Ac. P11 の確認

アセチル化によって得られた Ac. P3 を EI-MS、IR、¹H-NMR を用いて分析した。

10 キノキサリン誘導体の調製

フルクトースと β -アラニンの反応液にリン酸緩衝液 (pH 7.4) を 1 ml 加えた試料に、*o*-フェニレンジアミンを試料の約 2 等量になるように加え、37 °C で 90 分間反応させた。反応液をエバポレーターで濃縮し、HPLC で単離・精製を繰り返してキノキサリン誘導体 (QD-3DG) を得た。HPLC の条件は下記に示す。

カラム：野村科学 (株) 製 Develosil パックドカラム ODS-5、

分析用 4.6 mm ϕ x 250 mm

移動相：0.1 % TFA / CH₃OH / CH₃CN (9/2/1 v/v)

流速：0.8 ml/min

検出波長：320 nm

第8章の実験

1 試料

D-フルクトース、D-グルコース、 β -アラニン、 p -トルイジンは、和光純薬製の試薬特級を使用した。 $N\alpha$ -*t*-Boc-リジンはシグマケミカル社製を用いた。

1-デオキシ- β -アラミノ-D-フルクトース（フルクトース- β -アラニン）、1-デオキシ- p -トルイジノ-D-フルクトース（フルクトース- p -トルイジン）、1-デオキシ- $N\alpha$ -*t*-Boc-リジノ-D-フルクトース（フルクトース- $N\alpha$ -*t*-Boc-リジン）は Anet、Lowy と Borsook、Njoroge らの方法により、それぞれ調製された。他の試薬は全て試薬特級を用いた。

2 試料の調製

前報と同様に、 β -アラニン 1 mmol と、フルクトース、またはグルコース 1 mmol を試験管に入れ、150 °C のブロック・ヒーター中で 1 ~ 10 分間加熱した。加熱終了後急冷し、反応を止めた。反応液からの抽出物は、ミリポワでろ過し、HPLC 分析用の試料にした。

アマドリ化合物の加熱による変化の検討には、100 mg のフルクトース- β -アラニン、フルクトース- p -トルイジン、フルクトース- $N\alpha$ -*t*-Boc-リジンのそれぞれのアマドリ化合物を試験管に入れ、同様の方法で加熱された。

3 HPLC による DDMP の検出

加熱反応させた試料に蒸留水 1 ml を加え、反応生成物を抽出した。その後、綿を詰めたキャピラリーでろ過し、さらにミリポワフィルターでろ過した試料を下記に示す条件で分析した。

3-1 アマドリ化合物の検出

機種：東洋曹達工業（株）製 HLC-803D

RI 検出機：東洋曹達工業（株）製 RI-8

UV 検出機：東洋曹達工業（株）製 UV-8000

UV 検出波長：210 nm

カラム：野村科学（株）製 Develosil パックドカラム

NH₂-5、4.6 ϕ mm x 250 mm

移動相：アセトニトリル：水（7:3 v/v）混液

流速：1.5 ml/min

3-2 加熱生成物の検出

機種：東洋曹達工業（株）製 HLC-803D

UV 検出機：東洋曹達工業（株）製 UV-8000

UV 検出波長：283 nm

カラム：野村科学（株）製 Develosil バックドカラム
ODS-5、4.6 ϕ mm x 250 mm

移動相：水：メタノール（6:1 v/v）混液

流速：0.8 ml/min

UV 検出機：東洋曹達工業（株）製 UV-8000

UV 検出波長：210 nm

4 アマドリ化合物の単離・精製

β -アラニンと、フルクトース、またはグルコースとの反応からの FAC-1 と GAC は HPLC (RI 検出機) により、それぞれ単離・精製した。FAC-1 は、さらに UV 検出機により、P1、P2、P3、p4 の 4 つのピークに分かれるため、それぞれを分取した。

5 機器分析

FAC-1 及び GAC、P1、P2、P3、P4 の同定のために、NMR、FAB-MS を用い分析し、構造決定をした。

NMR：JEOL GX-200 型 (^1H ：200MHz、 ^{13}C ：50 MHz)

4 mm i.d. NMR チューブ

溶媒：D₂O

FAB-MS：JEOL GX-303 型

マトリックス：グリセロール

第2部 機器分析データ

1) 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one (DDMP) UV spectrum (water) : λ_{\max} 295 nm. Mass spectrum : a molecular weight of 144. ^{13}C -NMR (CDCl_3) : 15.6 ppm (C6), 67.5 ppm (C1), 71.4 ppm (C2), 130.1 ppm (C4), 165.0 ppm (C5) and 188.2 ppm (C3). FAB-MS spectrum : 145 ($\text{M}^+ \text{H}$) for the molecular ion, m/z 127 for loss of water and m/z 112 for loss of a methyl group. ^1H -NMR spectrum : 1.90 ppm (3H) and 4.05-4.25 ppm (5H).

2) acetylated 2,3-dihydro-3,5-diacetoxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one (Ac DDMP) EI-MS : m/z 186 for addition of a acetyl group and m/z 228 for two acetyl groups. ^1H -NMR (CDCl_3) : a singlet at 1.99 ppm (CH_3), a singlet at 2.11 ppm (AcO-C), 2.2 ppm (AcO-C=c), a quartet at 4.39 ppm (H_a), a quartet at 4.53 ppm (H_b) and a quartet at 5.41 ppm (H_c). The IR spectrum : ν_{\max} 1760, 1700 and 1628 cm^{-1} for 3 carbonyl groups from the configuration of DDMP and the acetylation of DDMP.

3) 2,3-dihydro-3,4-dihydroxy-5-acetylfuran (DDAF) UV spectrum (water) : λ_{\max} 288 nm. Mass spectrum : 144 (M^+ , 100), 126 (30), 113 (10), 101 (35), 84 (13), 73 (10), 55 (47), 43 (75), 31 (12), 18 (15). HR-MS : found, m/z 145.0571 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; calcd. for $\text{C}_6\text{H}_9\text{O}_4$, 144.0562. ^{13}C -NMR (CDCl_3) : 13.0 ppm (C6), 60.4 ppm (C1), 83.9 ppm (C2), 135.6 ppm (C4), 174.0 ppm (C5) and 196.5 ppm (C3). ^1H -NMR (D_2O) : 2.11 ppm (3H, s), 3.71 ppm (1H, q), 3.76 ppm (1H, q), 3.88 (1H, q).

4) acetylated 2,3-dihydro-3,4-diacetoxy-5-acetylfuran (Ac DDAF) UV spectrum (MeOH) : λ_{\max} 274 nm. Mass spectrum : 228 (M^+), 186 ($\text{M}^+ - \text{COCH}_3$), 144 ($\text{M}^+ - \text{COCH}_3 \times 2$), 126, 115, 101, 84, 55, 43. ^1H -NMR (D_2O) : 2.03 ppm (3H, s), 2.16 ppm (3H, s), 2.26 ppm (3H, s), 4.43 (1H, q), 4.52 (1H, q), 5.43 (1H, q).

5) 5-hydroxymethylfurfural (HMF) UV spectrum : λ_{\max} 283 nm. EI-MS : m/z 126. ^1H -NMR : a singlet at 3.30 ppm (OH), a singlet at 4.05 ppm (CH_2), a doublet at 6.58 ppm (H_4), a doublet at 7.37 ppm (H_3) and a singlet at 9.52 ppm (CHO).

6) 3-[N-(2-formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol-1-yl)]-propionic acid (3NFHP). UV spectrum (water) : a shoulder at 262 nm (ϵ , 6.2×10^3) and a maximum at 298 nm (ϵ , 1.52×10^4). ^1H -NMR (D_2O) : 2.87 (2H, t), 4.65 (2H, t), 4.81 (2H, s), 6.28 (1H, d), 7.10 (1H, d), 9.37 (1H, s). ^{13}C -NMR (CDCl_3) : 31.2, 45.6, 55.6, 111.8, 127.1, 132.3, 144.3, 175.5, 181.6 ppm. MS m/z : 197 (M^+ , 100), 179, 168 ($\text{M}^+ - \text{CHO}$), 152, 124 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$), 108. 3NFHP have a strong sweet aroma. The yield were 2.5 mg from 1 mmol of fructose.

7) acetylated 3-{N-(2-formyl-5-acetoxymethyl-pyrrol-1-yl)}-propionic acid (Ac 3NMDTP). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 2.08 (3H, s), 3.24 (2H, t), 4.75 (2H, t), 6.24 (1H, d), 6.89 (1H, d), 9.55 (1H, s). MS m/z : 239 (M^+), 211 ($\text{M}^+ - \text{CHO}$), 197 ($\text{M}^+ - \text{COCH}_3$), 179, 134, 108, 106. IR: one acetyl carbonyl (max 1740 cm^{-1}), one aldehyde (2650 and 1650 cm^{-1}), one carbonic acid (1725 cm^{-1}).

8) 3-{N-(2-methyl-3,6-dihydro-4,5,6-trihydroxyl-pyridinyl)}-propionic acid (3NMDTP). UV spectrum (water): λ_{max} 290 nm. $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 1.35 (3H, d), 2.64 (2H, t), 3.34 (2H, t), 4.06 (1H, s), 4.21 (1H, q). MS m/z : 215 (M^+), 197 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 180, 156, 144, 126, 115, 93. The yield were 0.4 mg from 1 mmol of fructose.

9) 3-deoxyglucosone (3DG). 3DG in the extract was carried out by retention time of HPLC, compared with authentic 3DG. The authentic 3DG used in this reaction was synthesized according to the method of Khadem et al. 7).

10) authentic 3DG: MS m/z 162 (M^+), 144 ($\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$), 127 ($\text{M}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$), 115, 97.

11) quinoxaline derivatived 3DG (QD-3DG). The extracts derived with *o*-phenylenediamine(OPD) were analyzed by HPLC, and then the retention time was compatible with that of the quinoxaline derivative from authentic 3DG.

12) GAC (1-deoxy- β -alanino-D-fructose; fructose- β -alanine). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 2.30 (2H, t), 3.00 (4H), 3.41~3.70 (5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): 48.4, 61.9, 69.4, 80.5, 85.4, 85.8, 86.3, 109.0, 194.6 ppm. MS m/z : 252 ($\text{M}^+ + 1$, 100), 234, 167, 149, 131, 115. The yield were 37.8 mg from 1 mmol of glucose with 1 mmol of β -alanine.

12) FAC-1-P2 (1-deoxy- β -alanino-D-fructose; fructose- β -alanine). $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): 2.30 (2H, t), 3.00 (4H), 3.41~3.70 (5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): 48.0, 61.3, 69.8, 80.8, 85.7, 85.8, 86.5, 108.3, 194.0 ppm. MS m/z : 252 ($\text{M}^+ + 1$, 100), 234, 213, 167, 149, 131, 115. The yield were 7.8 mg from 1 mmol of fructose with 1 mmol of β -alanine.

参考文献

1. 中村良、川岸舜朗、渡邊乾二、大澤俊彦：“食品機能化学”、三共出版、1989、pp1.
2. 藤巻正生：“食品機能、機能性食品創製の基盤”、学会出版センター、1988、pp1.
3. 浜中正樹：月刊フードケミカル、7、2 (1993).
4. 早川幸男：月刊フードケミカル、5、37 (1992).
5. Maillard, L.C., Hebd, C.R. : *Seances Acad. Sci.*, 154, 66 (1912).
6. Hodge, J. E. : *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928 (1953).
7. 中林敏郎、木村進、加藤博通：“食品の変色とその化学”、光琳書院、1967、pp230.
8. 中林敏郎、木村進、加藤博通：“食品の変色とその化学”、光琳書院、1967、pp247.
9. Barry, C. P., Honeyman, J. : *J. Chem. Soc.*, 4147 (1952).
10. Heyns, K., Breuer, H. : *Chem. Ber.*, 91, 2750 (1958).
11. 並木満夫：“最新食品フレーバー技術”、工業技術会、1988、pp94.
12. Ling, A. R. : *J. Inst. Brew.*, 14, 494 (1908).
13. Kawamura, S. : *Dev. in Food Chem.*, 13, 3 (1986).
14. Hodge, J. E., Mill, F. D., Fisher, B. E. : *Cereal Sci. Today*, 17, 34 (1972).
15. Hodge, J.E.: In *Chemistry and Physiology of Flavors*, Avi. Pub.Co., Westport, USA 1967, pp465.
16. Ledl, F., Fritsch, G., Pachmayr, O., Severin, T. : *Dev. Food Science*, 13, 173 (1986).
17. Maga, J. A. : *Dev. Food Science*, 3A, 283 (1982).
18. Mage, J. A. : *J. Agric. Food Chem.*, 29, 691 (1981).
19. Kobayashi, N., Fujimaki, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 29, 1059 (1965).
20. Tressel, R., Grunewald, K. G., Helak, B. : "Flavour 81", Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1981, pp397.
21. Tressel, R., Rewicki, D., Helak, B., Kamperschroer, H., Martin, N. : *J. Agric. Food Chem.*, 33, 919 (1985).
22. Tressel, R., Rewicki, D., Helak, B., Kamperschroer, H. : *J. Agric. Food Chem.*, 33, 924 (1985).
23. Tressel, R., Helak, B., Kamperschroer, H., Rewicki, D. : *J. Agric. Food Chem.*, 33,

- 1132 (1985).
24. Tressel, R., Grunewald, K. G., Kamperschroer, H., Rewicki, D. : *J. Agric. Food Chem.*, 33, 1137 (1985).
25. Tressel, R., Grunewald, K. G., Kamperschroer, H., Rewicki, D. : *J. Agric. Food Chem.*, 34, 347 (1986).
26. Kim, S. B., Hayase, F., Kato, H. : In *Amino-Carbonyl Reactions in Food and Biological System*. Kodansha Elsevier: Tokyo, 1985, pp383.
27. 木村浩久 : "食品機能、機能性食品創製の基盤"、学会出版センター、1988、pp319.
28. Omura, H., Jahan, N., Shinohara, K., Murakami, H. : *ACS Symp. Ser.*, 215, 573 (1983).
29. 加藤博通 : 月刊フードケミカル、8、29 (1992).
30. 早瀬文孝 : 生物と化学、31、592 (1993).
31. 加藤博通、早瀬文孝 : "食品の生体調節機能"、学会出版センター、1992、pp16.
32. Eichner, K., Karel, M. : *J. Agric. Food Chem.*, 20, 218 (1972).
33. Horn, J. H., Lichtenstein, H., Womach, M. : *J. Agri. Food Chem.*, 16, 741 (1968).
34. Kato, Y., Matsuda, T., Kato, N., Watamabe, K., Nakamura, R. : *J. Agric. Food Chem.*, 34, 351 (1986).
35. Comyo, T., Kato, H., Udaka, K., Horikosi, M., Fujimaki, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 36, 125 (1972).
36. Velisek, J., Davidek, J., Chuhrova, J., Kuhelka, V. : *J. Agric. Food Chem.*, 24, 3 (1976)
37. Abraham, A. C., Swamy, M. S., Perry, R. E. : In *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*, Alan R. Liss, 1989, pp123.
38. Chiou S-H, Chylack, L. T., Tung, W. H., Bunn, H. F. : *J. Biol. chem.*, 256, 5176 (1981).
39. Day, J. F., Thornbug, R. W., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. : *J. Biol. Chem.*, 254, 9394 (1979).
40. Suarez, G. : In *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*, Alan R. Liss, 1989, pp141.
41. Walton, D. J., McPherson, J. D., Shilton, B. H. : In *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*, Alan R. Liss, 1989, pp163.
42. Eble, A. S., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. : *J. Biol. Chem.*, 258, 9406 (1983).

43. Hodge, J. E., Moser, H. A. : *Cereal Chem.*, 38, 221 (1961).
44. Yaylayan, V. A., Mandeville, S. : *Spectroscopy*, 9, 73 (1991).
45. Hodge, J.E. : *Chemistry and Physiology of Flavors* (Schulz, Day, Libbey, eds.), pp.465, Avi. Pub.Co., Westport, USA (1967).
46. Berry, R. E., Tatum J. H. : *J. Agric. Food Chem.*, 13, 588 (1965).
47. Shaw, P. E., Tatum, J. H., Berry, R. E. : *Carbohydr. Res.*, 5, 266 (1967).
48. van Dam, H. E., Kieboom, A. P. G., van Bekkum, H. : *Starch*, 38, 95 (1986).
49. 石津日出子 : 調理科学、2、156 (1969).
50. 森田日出男・田辺脩 : 調理科学、3、135 (1970).
51. Hayashi, T., Mase, S., Namiki, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3131 (1985).
52. 山崎清子・島田キミエ : 調理と理論、第2版、同文書院、東京、1983、pp111.
53. Jeurig, H., Kuppens, F. J. E. M. : *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63, 1215 (1980).
54. Mills, F. D., Weisleder, D., Hodge, J. E. : *Tetrahedron Lett.*, 26, 1243 (1970).
55. Njoroge, F. G., Satre, L. M., Monnioer, V. M. : *J. Carbohydr. Chem.*, 167, 211 (1987).
56. Fisher, B. E., Sinclair, H. B., Goodwin, J. C. : *Carbohydr. Res.*, 116, 209 (1983).
57. Parliment, T., H. : 204th ACS National Meeting Abstract #214 (1992).
58. Gianturco, M. A., Gianmarino, S. and Pither, R. G. : *Tetrahedron Lett*, 19, 2051 (1963).
59. Harries, C. : *Ber.*, 35, 1176 (1902).
60. Severin, T., Seilmeier, W. : *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 137, 4 (1968).
61. Jurch, Jr., G. R. : *Carbohydr. Res.*, 15, 233 (1997).
62. Shaw, P. E., Tatum, J. H., Berry, R. E. : *Carbohydr. Res.*, 16, 207 (1971).
63. Shaw, P. E., Tatum, J. H., Berry, R. E. : *J. Agric. Food Chem.*, 16, 979 (1968).
64. Mills, F. D., Hodge, J. E. : *Carbohydr. Res.*, 51, 9 (1976).
65. Shigematsu, H.; Shibata, S.; Kurata, T.; Kato, H.; Fujimaki, M. : *J. Agric. Food Chem.*, 23, 233 (1975).
66. 西堀すき江・川岸舜朗 : 日食工誌 35, 235 (1988).
67. Yamazaki, W., Donelson, D. H. : *Cereal Chem.*, 49, 646 (1972).
68. Caul, J. F. : *Adv. Food Res.*, 7, 1 (1957).
69. Seguchi, M., Matuki, J. : *Cereal Chem.*, 54, 918 (1977).
70. Johnson, L. A., Hosenev, R. C. : *Cereal Chem.*, 56, 336 (1979).
71. Kissell, L. T., Yamazaki, W. T. : *Cereal Chem.*, 56, 324 (1979).
72. Gaines, C. S., Donelson, J. R. : *Cereal Chem.*, 62, 63 (1985).

73. Nagao, S., Ishibashi, S., Imai, S., Sato, T., Kanbe, T., Kaneko, Y., Otsubo, H. : *Cereal Chem.*, 54, 300 (1977).
74. Fujii, T., Danno, G. : 日食工誌, 35, 687 (1988).
75. Fujii, T., Kuyama, S., Danno, G. : 日食工誌, 37, 619 (1990).
76. Abboud, A. M., Hosoney, R. C. : *Cereal Chem.*, 61, 34 (1984).
77. Curley, L. P., Hosoney, R. C. : *Cereal Chem.*, 61, 274 (1984).
78. Doescher, L. C., Hosoney, R. C. : *Cereal Chem.*, 62, 263 (1985).
79. Doescher, L. C., Hosoney, R. C., Milliken, G. A. : *Cereal Chem.*, 64, 158 (1987).
80. Nishibori, S., Kawakishi, S. : *J. Food Sci.*, 55, 409 (1990).
81. Nishibori, S., Kawakishi, S. : *Cereal Chem.*, 54, 160 (1992).
82. Lento, H.G., Underwood, J.C., Willits, C.O. : *Food Res.* 23, 68 (1958)
83. 並木満夫、松下雪郎 : "食品成分の相互作用"、講談社サイエンティフィック、1980、pp6.
84. Kato, H., Sonobe, H., Fujimaki, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 771 (1977).
85. Hodge, H. E., 藤巻正生、市岡正道 (訳、監修) : "フレーバーの化学と生化学"、講談社、1972、pp451.
86. Nishibori, S., Kawakishi, S. : *Cereal Chem.*, 69, 160 (1992).
87. Shigematsu, H.; Shibata, S.; Kurata, T.; Kato, H.; Fujimaki, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 36, 1631 (1972).
88. Hayase, F., Kato, H. : *i.*, 45, 2559 (1981).
89. Namiki, M., Hayashi, T. : *J. Agric. Food Chem.*, 23, 487 (1975).
90. Wu, C. H., Russel, G. F., Powrie, W. D. : In *Amino-Carbonyl Reactions in Food and Biological System*. Kodansha Elsevier: Tokyo, 1985, pp135.
91. Tressl, R., Rewicki, D., Helak, B., Kamperschroer, H., Martin, N. : *J. Agric. Food Chem.*, 33, 919 (1985).
92. Mill, F. D. : *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1136 (1979).
93. Kato, H. : *Agr. Biol. Chem.*, 31, 1086 (1967).
94. Kato, H., Shigematu, H., Kurata, T., Fujimaki, M. : *Agr. Biol. Chem.*, 36, 1639 (1972).
95. Njoroge, F.G., Monnier, V., M. : In *The Maillard Reaction in Aging Diabets, and Nutri.*, Alan R. Liss Inc., 1989, 85.
96. 早瀬文孝、加藤博通 : 油化学、38、865 (1989).
97. Nishibori, S., Bernhard, A. R. : In submission to *J. Food Sci.* (1993).
98. Nishibori, S., Kawakishi, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 55, 1159 (1991).

99. Patton, S. : *J. Biol. Chem.*, 184, 131 (1950).
100. Yeo, H. C. H., Shibamoto, T. : *J. Agric. Food Chem.*, 39, 948 (1991).
101. Hiebl, J., Ledl, F.; Severin, T. : *J. Agric. Food Chem.*, 35, 990 (1987).
102. Heyns, K., Meinecke, K-H. : *Chem. Ber.*, 86, 1453 (1953).
103. Tatum, J. H., Shaw, P. F., Berry, R. E. : *J. Agric. Food Chem.*, 15, 773 (1967).
104. Hodge, J. E., Nelson, E.C. : *Cereal Chem.*, 38, 207 (1961).
105. Scheneck, J. R., Spielman, M. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, 67, 2276 (1945).
106. Tomita, H., Noguchi, M., Tamaki, E. : *Agric. Biol. Chem.*, 29, 515 (1965).
107. Njoroge, F. G., Fernandes, A. A., Monnioer, V. M. : *J. Carbohydr. Chem.*, 6, 553 (1987).
108. Ninomiya, M., Matsuzaki, T., Shigematsu, H. : *Biosci. Biotec. Biochem.*, 56, 806 (1992).
109. Kato, H., Sonobe, H., Fujimaki, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 41, 711 (1977).
110. Nakayama, T., Hayase, F., Kato, H. : *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1201 (1980).
111. Khadem, H. E., Horton, D., Meshreki, M. H., Nashed, M. A. : *Carbohydr. Res.*, 17, 183 (1971).
112. Morita, N., Inoue, K., Takagi, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2665 (1981).
113. Ledl, F., Beck, J., Sengl, M., Osiander, H., Estendorfer, S., Severin, T., Huber, B. : In *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1989, pp.23.
114. Hashiba, H. : In *Amino-carbonul reactions in food and biological systems*, Kodansha, Tokyo, 1985, pp.155.
115. Njoroge, F. G., Monnier, V. M. : In *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes, and Nutrition*. Alan R. Liss. Inc., New York, 1989, pp 85.
116. Hodge, J. E., Rist, C. E. : *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 316 (1953b).
117. Heyns, K., Meinecke, K. H. : *Chem. Ber.*, 86, 1453 (1953).
118. McPferon, J. D., Shilton, B. H., Walton, D.J. : *Biochemistry*, 27, 1901 (1988).
119. Gallop, P. M., Fluckiger, R., Hannenken, A., Minisohn, M. M., Gabbay, K. H. : *Anal. Biochem.*, 117, 427 (1981).
120. Reynolds, T. H. : In *Advances in Food Reserch*, Chichester, C.O., Academic Press: New York and London 1963, pp 1.
121. Anet, E. F. L. J. : *Aust. J. Chem.*, 10, 193 (1957).
122. Lowy, P. H., Borsook, H. : *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 3175 (1956).
123. Njoroge, F. G., Fernandes, A. A., Monnier, V. M. : *J. Biol. Chem.*, 263, 10646

(1988).

124. Kitaoka, S., Onodera, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 26, 572 (1962).
125. Ledl, F., Fritsch, G., Hiebl, J., Pachmayr, O., Severin, T. : In *Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems*, Kodansha Ltd., Tokyo 1985, pp 173.
126. Nishibori, S., Kawakishi, S. : In submitted (1993).
127. Shaw, P. F., Berry, R. E. : *J. Agric. Food Chem.*, 25, 641 (1977).
128. Nyhammer, T., Olsson, K., Pernemalm, P. A. : *ACS Symp. Ser.*, 1983, 215, pp 71.
129. Beck, J.; Ledl, F., Severin, Th. : *Carbohydr. Res.*, 177, 240 (1988).
130. Kato, H. : *Bull. Agr. Chem. Soc.*, 24, 1 (1960).
131. Grandhee, S. K., Monnier, V. M. : *J. Biol.Chem.*, 266, 11649 (1991).

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご指導ご鞭撻いただきました川岸舜朗教授に心より感謝の意を表します。また、DDMPの構造決定におきまして、有意義なご助言をいただき、ご指導いただきました大沢俊彦助教授に深く感謝いたします。そして、いつでも親切なご助言をいただきました内田浩二先生に心より感謝いたします。

さらに、名古屋大学で研究生活を始めるにあたって大変お世話になりました並木満夫名誉教授、椛山女学園大学教授・並木和子先生に深く感謝の意を表します。

また、アメリカ留学中、研究を進めるにあたり、いつも親切な助言と援助をいただきましたカリフォルニア大学教授、バーナード博士に深く感謝いたします。

また、色々な面でお世話になりました現静岡県立大学助教授・中山勉先生、示唆を与えていただきました現農林水産省果樹試験場・林建樹室長、いつも有意義な討論や助言をいただきました旧食品製造化学第一研究室・卒業生の皆さん、特に関谷啓二さん、小池真さん、蘇正徳さん、程栄助さん、勝崎裕隆さん、リジン、*p*-トルイジンのアマドリ化合物を提供していただきました常広淳さん、NMR、MS スペクトル測定においてご協力いただきました熊沢茂則さん、森光康次郎さん、現食品機能化学研究室の皆様感謝いたします。

報文目録

1. 西堀すき江, 川岸舜朗
クッキー調製における原材料配合条件の相違による加熱反応生成物について
日食工誌 35, 235-241 (1988).
2. S. Nishibori and S. Kawakishi
Effects of Dough Materials on Flavor Formation in Baked Cookies.
J. Food Sci. 55, 409-412 (1990).
3. S. Nishibori and S. Kawakishi
Foemation of 2,3-Dihydro-3,4-dihydroxy-5-acetylfuran in the Reaction between D-Fructose and β -Alanine.
Agric. Biol. Chem. 55, 1159-1160 (1991).
4. S. Nishibori and S. Kawakishi
Effect of Various Sugars on the Quality of Baked Cookies.
Cereal Chem. 54, 160-163 (1992).
5. S. Nishibori and R. A. Bernhard
A Model System for Cookies: Volatile Components Formed from the Reaction of Sugar and β -Alanine.
J. Agric. Food Chem. 41, 2374-2377 (1993).
6. S. Nishibori and S. Kawakishi
Formation of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(*H*)-pyran-4-one from Fructose and β -Alanine as a Model System of Baking Cookies.
J. Agric. Food Chem. 42, 1080-21085 (1994).