衛生化学
THE JOURNAL OF
HYGIENIC CHEMISTRY
23 (5) 267-272 (1977)

抗酸化剤に関する研究 (第6報¹⁾)ブチルヒドロキシアニソール (BHA) の光分解 その2²⁾

呉地傳夫, 千田浩子

東京薬科大学³⁾Studies on the Antioxidants. VI.¹⁾Photodegradation of Butyl Hydroxyanisole (BHA). (2)²⁾

TSUTAO KURECHI and HIROKO SENDA

Tokyo College of Pharmacy³⁾

(Received February 7, 1977)

Quantitative fluctuation of butyl hydroxyanisole (BHA) after photo-oxidation was studied. Data on the residual amount of the compound and products formed indicated that irradiation of BHA with light results in the formation of oxidative product with exhaustion of BHA *per se*. Though the amount of BHA decreased in proportion to the duration of irradiation, the amount of oxidates, which was very small, did not show notable changes with time. Of the two oxidation products formed, a higher yield was regularly obtained with diphenyl compound than with diphenyl ether compound. The behavior of benzene and soybean oil, used as a solvent, was similar even in a different milieu.

Keywords—survival ; sunlight irradiation ; BHA oxidation products ; UV-light irradiation ; soybean oil ; quantitative change ; BHA isomer ; benzene ; edible oil

緒 言

抗酸化剤は、自動酸化の防止過程で自らが酸化され、酸化成績体を形成することが知られている。さきに著者は、ブチルヒドロキシアニソール (BHA) について実験を行い、そのベンゼン溶液に光照射し、酸化成績体として2量体を単離し構造を確認した。⁴⁾この場合の反応機序は、自動酸化に関与する酸化因子により BHA 自身が酸化され、発生した遊離基間で2量化が行われたものと理解され、BHA が酸化因子により消費される過程が示されたものとしてきわめて興味深い。さらに酸化成績体は抗酸化能を保有する活性物質であることを立証し、基質の抗酸化作用になお寄与している事実を明らかにした。¹⁾これらの実験結果から、BHA の酸化防止効果は、基質

ならびにその酸化成績体の量的消長も考慮して評価されねばならないことが示唆された。

そこで本報では、前報⁴⁾に続いて BHA の光酸化過程における量的変化について追究した。

BHA isomer の主体をなす 2-*tert*-butyl-4-methoxy phenol (2-BHA と略称) のベンゼンならびに食用油溶液に光照射し、基質の残存量および酸化成績体の生成量を経時的に定量した。他の isomer, 3-*tert*-butyl-4-methoxy phenol (3-BHA と略称) については、ベンゼン溶液に光照射したときの残存量を定量した。

実験の結果、BHA は光照射の過程で酸化され、酸化成績体を形成し自らは消失してゆくことが残存量ならびに生成量から定量的に確められた。BHA 残存率の推移

1) 第5報：呉地傳夫，衛生化学，**15**，301 (1969)。

2) 本論文の要旨は日本薬学会第90年会で発表。

3) Location : Horinouchi, Hachioji-shi, Tokyo (東京都八王子市堀之内1432-1)。

4) 呉地傳夫，衛生化学，**13**，191 (1967)。

は、全般的にゆるやかな曲線を描いてほぼ直線的に下降し、照射時間に比例して BHA 自身の酸化が進行していることをあらわしている。酸化成績体の生成率は、はじめは増大するがしだいに平行的となり、以後の測定値に著しい増減は認められなかった。このことは、酸化成績体の 2 次分解とも関連する結果であると考えられた。2 種の 2 量体のうち、ジフェニル化合物 (**2a** と略称) は、ジフェニルエーテル化合物 (**2b** と略称) にくらべ、いずれの場合においても高い生成率を示した。

このときの溶媒として食用油および活性物質を全く含まないベンゼンを用いたが、これらの挙動は異なる環境においても類似した傾向を示した。3-BHA は残存率をあらわす曲線の降下の程度が急傾斜で、2-BHA に比し酸化分解が速やかであることを示した。

つぎに各実験ごとに研究結果および考察について述べる。

1. 吸収曲線

2-BHA, **2a** および **2b** の各標準溶液 (クロロホルム) の吸収曲線は Fig. 1 のようになる。2-BHA は 292 nm, **2a** は 302 nm, **2b** は 288 nm にそれぞれの吸収極大値を示す。

2. 検量線

標準溶液から各種標準系列溶液を作成し、それぞれに

ついて吸光度を測定し検量線を作成した。その結果は Fig. 1 に示すとおり、10—50 $\mu\text{g/ml}$ の間で直線性を示した。

TABLE I. Recovery of 2-BHA and **2a** by Sephadex LH-20 Column Chromatography

Recovery % (μg)	
2-BHA (Added 50 $\mu\text{g/ml}$)	2a (Added 50 $\mu\text{g/ml}$)
101.0 (50.5)	103.4 (51.7)
98.8 (49.4)	100.8 (50.4)
97.4 (48.7)	99.2 (49.6)
98.4 (49.2)	97.6 (48.8)
96.6 (48.3)	98.4 (49.2)
100.0 (50.0)	96.2 (48.1)

TABLE II. Recovery of **2a** and **2b** separated by Thin-Layer Chromatography

Recovery % (μg)	
2a (Added 40 $\mu\text{g/ml}$)	2b (Added 40 $\mu\text{g/ml}$)
106.8 (42.7)	99.3 (39.7)
101.5 (40.6)	102.0 (40.8)
99.5 (39.8)	98.8 (39.5)
100.0 (40.0)	100.8 (40.3)
99.5 (39.8)	103.0 (41.2)

Fig. 1. Calibration Curve and Absorption Spectrum of 2-BHA and Its Oxidation Products (**2a** and **2b**)

Fig. 2. Survival of 2-BHA and 3-BHA in Benzene by Sunlight Irradiation

	Time hr	0	1	2	5	10	12	17	24	27	35	48	58	72	90	100
2-BHA	Survival mg	150	147	144	141	137	...	128	118	...	...	83	70	57	33	25
	Rate of Survival %	100	98.0	96.0	94.0	91.5	...	85.3	78.7	...	...	55.3	46.7	38.0	22.0	16.7
3-BHA	Survival mg	30	27.5	27.1	26.5	24.5	23.8	20.3	...	18.0	15.0	...	...	...	...	...
	Rate of Survival %	100	91.7	90.3	88.3	81.7	79.3	67.7	...	60.0	50.0	...	...	...	...	...

○: 2-BHA, ×: 3-BHA.

3. 回収成績

2-BHA および **2a** の Sephadex LH 20 カラムによる回収成績は Table I に示した. 計算値に対する平均回収率は, 2-BHA 98.7% (S.D. ± 1.58), **2a** 99.3% (S.D. ± 2.55) であった.

薄層クロマトグラフィー(TLC) かきとり法による **2a** および **2b** の回収成績は Table II に示した.

計算値に対する平均回収率は, **2a** 101.5% (S.D. ± 3.10), **2b** 100.8% (S.D. ± 1.77) を示した.

抽出後のシリカゲルは, 再度クロロホルムおよび酢酸エチルで振盪抽出し, この液について **2a** ならびに **2b** 残留の有無を TLC により検した.

4. ベンゼン中における BHA の消長

4-1. 日光照射下 BHA の消長 2-BHA および 3-BHA のベンゼン溶液を併置して太陽光線の直射下に曝露し, 経時的にサンプリングし残存量を定量した. 残存率を照射時間に対しプロットすると Fig. 2 のようになり, BHA の酸化分解が経時的に進んでいることを示した.

2-BHA の残存率は, 照射 55 時間で約 50%, 100 時間で 16.7% を示し, 最大照射 100 時間までの間ほぼ直線的に下降している. 3-BHA の場合は, 最大 35 時間照射の残存率は約 50% となり, 2-BHA に比し酸化分解が速やかであることを示した. この過程における 2-BHA 酸化生成体の生成を TLC 上で追跡した結果, ジフェニル化合物 (**2a**) は照射 5 時間後, ジフェニルエーテル化合物 (**2b**) は照射 10 時間後にそれぞれのスポットが認められた. このことから酸化の初期に **2a**, ついで **2b** が生

Fig. 3. Relation of 2-BHA and Its Oxidation Products (**2a** and **2b**) by UV-light Irradiation in Benzene△: **2b**, ×: **2a**, ○: 2-BHA.

成されることが推測された.

4-2. 紫外線照射下 BHA の消長 2-BHA ベンゼン溶液を紫外線照射したときの量的変化すなわち残存率および生成率を照射時間に対しプロットしたときの曲線は, Fig. 3 に示すとおりである.

2-BHA の残存率は, ならかなカーブを画いて下降しており, 基質が経時的に減少していることをあらわしている. 酸化生成体の生成率は, おおむね上昇がゆるやかで, 全般に **2a** の生成が多く, **2b** は 25—150 時間の測定範囲で余り変化がみられなかった.

測定の最大 150 時間における残存率は約 40%, 生成率は **2a** が約 29%, **2b** は約 5% を示し **2a** の生成率は **2b** の約 6 倍であった.

小括——2-BHA および 3-BHA ベンゼン溶液に日光

照射したときの残存率は、ほとんど直線的に下降し BHA が経時的に減少することを示した。3-BHA の場合は、下降の程度は急傾斜で、光に対して酸化分解が速やかであることを示した。酸化成績体を TLC で追跡した結果、はじめ **2a** ついで **2b** が生成することがわかった。2-BHA ベンゼン溶液を紫外線照射したときの残存率の推移は、日光照射のときとほぼ同じ傾向を示したが、その降下の程度は緩慢であった。酸化成績体の生成量を定量した結果、**2a** はおおむね経時的に増加し、75時間後 20.7%，150時間後 28.9% に達したが、**2b** の生成量はきわめて少なく、75時間後 4.3%，150時間後 5.1% を示し 25時間以降の測定値に著るしい増加は認められなかった。

5. 食用油中における BHA の消長

食用油中における BHA の紫外線照射に対する挙動に

Fig. 4. Relation of 2-BHA and Its Oxidation Products (**2a** and **2b**) by UV-light Irradiation in Soybean Oil

△: **2b**, ×: **2a**, ○: 2-BHA.

TABLE III. Relation of 2-BHA and Its Oxidation Products by UV-light Irradiation

Survival of 2-BHA (%)			Amount of product (%)				
			2 a		2 b		
Time(hr)	Solv.	Benzene	Oil	Benzene	Oil	Benzene	Oil
10		91.0	90.4	2.2	2.2	1.3	—
25		80.3	78.3	12.0	9.3	3.0	3.2
50		66.4	64.1	17.2	13.1	3.8	3.7
75		58.0	53.0	20.7	14.6	4.3	5.6
100		49.9	42.4	25.7	15.6	4.8	7.2
150		41.2	30.2	28.9	16.2	5.1	8.2

ついて検討するため、ベンゼン中におけると同様の条件下で実験を行った。

2-BHA のダイズ油溶液に紫外線照射し、経時的にサンプリングした液について、Sephadex LH 20 カラムを通し、油の大部分と基質および酸化成績体を分画し、ついで TLC のかきとり法により多少随伴する油および酸化成績体相互の分離を行ったのち、紫外吸収スペクトル (UV) 法を用いて残存量および生成量を定量した。残存率および生成率を照射時間に対しプロットしたときの曲線は Fig. 4 に示すとおりである。

2-BHA 残存率の降下の程度は、ベンゼン中とほぼ同じ傾向を示したが、酸化成績体の生成率はベンゼン中に比し **2a** は減少し、**2b** は増大する結果が得られた。**2a** の生成率は照射時間 50 時間以後はほぼ平行となった。

ベンゼンおよびダイズ油中の残存量ならびに生成量の定量結果を一括して Table III に掲げた。

小括——2-BHA は食用油中においても、ベンゼン中と同様光照射により酸化成績体を形成し、自らは経時的に消失してゆく過程が定量的に確められた。残存率を示す曲線は全般的にゆるやかな下降線を描き、ベンゼン中におけると同じ傾向を示したが、その残存量は全般に低い値が得られ、油脂中においては BHA が余分に消費されていることを示した。両酸化成績体の生成比は、**2a** が **2b** の 2—3 倍であった。

6. 紫外線照射における酸化成績体の安定性

2a, **2b** の生成量が照射時間に比して比較的増加しないことは、これらの 2 次分解とも関連することが考えられた。そこで両酸化成績体の光に対する安定性について

検討を加えた。

2a および **2b** ベンゼン溶液に紫外線照射したとき、つぎのような外観変化が観察された。**2a** ベンゼン溶液は、照射3時間までは無色であったが、しだいに液の外縁は微黄色となり、5時間以上照射したとき試料溶液の最大吸収波長はやや低波長部へずれる傾向が見られた。**2b** ベンゼン溶液は、照射30分後から黄色を帯びしだいに黄褐色となった。この現象は照射時間の延長につれて著明となり、288 nm の極大吸光度は漸次低下し、しだいに短波長部へ移行する。

これら紫外吸収スペクトルの変化については未だ説明し得ないが、分解生成物による影響と考えられる。著者は残存する基質を定量する前処理として TLC かきとり法を応用した。

一定時間光照射した試料を TLC で処理し、紫外吸収スペクトルを測定して得た定量結果は Table IV に示すようである。これによると **2a** は照射8時間までは余り変化がなく、50時間以後に減少が認められた。これに反して **2b** は分解減少が著しく、光に対して極めて不安定であることがわかった。

TABLE IV. Decomposition of **2a** and **2b** by UV-light Irradiation

Time(hr)	Survival (%)	
	2 a	2 b
1	96.0	85.0
3	95.0	76.0
5	96.0	40.0
8	95.0	—
⋮	⋮	⋮
50	77.6	3.9
100	44.5	1.9

ま と め

BHA が光照射により酸化され酸化成績体を形成し、自らも消失してゆく過程を定量的に明らかにした。このときの溶媒は、食用油およびベンゼンを用いたが、異なる環境においてもその量的挙動はおおむね類似した傾向を示した。

BHA が過氧化物その他の化学的活性物質を全く含まない環境下で、油脂中におけると同じような挙動を示したことは、酸化因子と抗酸化剤との関係ならびに自動酸化を防止しながら抗酸化剤自身が消耗してゆく過程などを解明する上に1つの示唆を与えたものと考えられる。

BHA の量的変化のうち 残存率の低下はほぼ経時的にみられ、BHA に対する光の反応量が照射時間に比例し

ていることを表わしている。酸化成績体は、はじめ **2a** ついで **2b** が形成され、その生成率は、**2a** の場合経時的に若干増大するが、**2b** は照射時間25時間以降ほとんど増加はみられなかった。**2a** と **2b** の生成比は、ベンゼン中で約4—6倍、食用油中で約2—3倍であった。

両酸化成績体は光照射により分解されることが認められた。とくに **2b** は光に対してきわめて不安定であることが知られた。これらの現象は、2-BHA の減少量に対して **2a** および **2b** の生成量が比較的に増加しない実験事実とも関係していると考えられる。

実 験 の 部

1. 試料 光照射における量的変化を調べるための試料としては、butyl hydroxyanisole (BHA) の異性体 2-*tert*-butyl-4-methoxy phenol (2-BHA) および 3-*tert*-butyl-4-methoxy phenol (3-BHA) を用いた。2-BHA は BHA (日本揮発油：サステン) を石油エーテルからくり返し再結晶し、TLC で単一物質であることを確認した。mp 64° の白色針状結晶。3-BHA は Universal Oil Product Co. 製をヘキサンから再結晶したものを用いた。mp 63° の微紅色柱状結晶。2,2'-dihydroxy-5,5'-dimethoxy-3,3'-di-*tert*-butyl diphenyl (**2a**) は著者が BHA 酸化成績体として単離したものを用いた。mp 224.5° の白色サイコロ状結晶。2'-3-di-*tert*-butyl-2-hydroxy-4',5-dimethoxy diphenyl ether (**2b**) は、著者が BHA 酸化成績体として単離したものを用いた。mp 78—79° の白色結晶。

ダイズ油は昭和産業製の抗酸化剤を含まない特製油を用いた。ヨウ素価 133, 酸価 0.06, POV 1.01 meq/kg.

カラムクロマト用シリカゲル (国産化学製) はメッシュ 100—200 のものを用いた。

TLC 用シリカゲルは、ワコーゲル B-5 を用いた。

展開溶媒はベンゼンを用いた。

スポットの呈色試薬は、2,6-ジクロロキノロンクロロイミド溶液 (1% エタノール溶液) を用いた。

2. ガスクロマトグラフィー (GLC) 装置は島津 GC-IB 型 (熱伝導度検出方式) を用いた。

GLC 条件：カラム温度 173°, 注入口温度 260°, 検出器温度 220°, キャリヤガス He 60 ml/min, フィラメント電流 170 mA, 感度 (range) 2 mV. 充填剤は thermol-1 (30—60 メッシュ) を固定相液体として用いた。

検量線は、5 ml 中 2-BHA 70 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg および 内部標準として 20% カプリン酸ニチル (CE) ベンゼン溶液 1 ml を含む各ベンゼン溶液を調製し、その 12 μ l を注入して得られたクロマトグラムからピークの面積比を求めて作製した。

3. 薄層クロマトグラフィー (TLC) 前報⁴⁾と同様の装置および条件で行った。

TLC かきとり法: TLC 分取装置は東洋科学製 TLC 用試料かきとり溶出装置 TLC-RE を用いた。0.5% **2a** および **2b** ベンゼン溶液をつくり検体とする。検液 40 μ l を、また検液 5 ml をベンゼンで 10 ml とした液 40 μ l をマイクロピペットを用いてそれぞれプレート上にはほぼ均一量ずつスポットし、ベンゼンで展開する。各スポット部位をけずりとクロロホルム 3 ml を加えて抽出する。抽出液は遠心分離し、残分は少量のクロロホルムで数回洗い、抽出液と合わせ全量をクロロホルムで正確に 5 ml とする。この液について 302 nm および 288 nm における吸光度を測定する。

4. Sephadex LH-20 SR カラム カラム: 13.5 $\times$ 2.5 cm 20 g.

溶出溶液: クロロホルム。

各画分に溶出された物質はつぎのようであった。

20 ml — 40 ml	油分
50 ml — 80 ml	2a および 2b
100 ml — 200 ml	2-BHA

2-BHA, **2a** の混合試料の分離回収試験は、2-BHA 10 mg および **2a** 4 mg を精確に秤り、クロロホルムで溶かした液について行った。はじめの 80 ml および 100—200 ml の画分留出液について、試料成分がそれぞれ 1 ml 中 50 μ g 前後含まれるようクロロホルムで調製する。この液について、292 nm および 302 nm における吸光度を測定する。

5. 紫外外部吸収スペクトル 日立自記分光光度計 EpS-3 型を用いて紫外外部吸収スペクトルを測定した。

検量線——2-BHA, **2a**, **2b** 各標準溶液 (50 μ g/ml) を用いてつぎのような標準系列をつくり、それぞれの吸光度 (292 nm, 302 nm および 288 nm) を測定して検量線を作成した。対照液にはクロロホルムを用いた。

標準溶液	50 μ g/ml	0	1	2	3	4	5
クロロホルム		5	4	3	2	1	0
試料濃度	10 μ g/ml	0	1	2	3	4	5

6. 日光照射による光酸化 シャーレ (内径 8.5 cm, 深さ 1.7 cm) に 2-BHA および 3-BHA 各 150 mg をそれぞれ精密に秤り、ベンゼン 20 ml を加えて溶かし、屋外に併置し太陽光線の直射下同時に光酸化した。この個々の試料について経時的に GLC 法により残存量を定量した。照射時間は延べ 100 時間まで行い、この間蒸発するベンゼンは適宜補った。なお、日没後は N_2 ガス気流中冷暗所に保管した。この実験は、10—12 月中おおむね

9.30 A.M.—3.00 P.M. の間晴天の日を選んで行った。

7. 紫外線照射による光酸化 照射装置は、内径タテ 55 cm, ヨコ 82 cm, 奥行 35 cm の木箱の上部に蛍光灯ランプ (ナショナル蛍光灯ランプ, 最大波長 3050 Å (FL 20 E)) 3 基を装備したものをを用いた。

試料は、2-BHA の 0.5% ベンゼン溶液 20 ml を内径 8.5 cm, 深さ 1.7 cm のシャーレに入れたもの 10 個を、また 4% ダイズ油溶液 10 g を同型シャーレに入れたもの 1 個を、光源より 27 cm の距離に併置し、最大 150 時間まで紫外線を連続照射した。この間蒸散するベンゼンは随時補った。内部の温度は 24—26° の範囲内にあった。一定時間毎にサンプリングした試料について 2-BHA 残存量および酸化生成体生成量を UV 法により定量した。

ベンゼン溶液は、サンプリングした試料の一定量を正確に秤取し、Sephadex LH 20 カラムを通してクロロホルムで溶出した。フラクション 100—200 ml について 2-BHA が 1 ml 中 10—50 μ g 含まれるようにクロロホルムで調製したのち UV 法スペクトルを測定した。フラクション 50—80 ml については **2a** と **2b** を分離するため、一定量を TLC プレート上に帯状にスポットし、ベンゼンで展開した。**2a** (R_f 0.46) および **2b** (R_f 0.51) のスポット部位をそれぞれかき取り、クロロホルムで抽出し調整したのち UV 吸収スペクトル法により定量した。

ダイズ油溶液は、サンプリングした試料油 0.5 g を正確に秤取し、Sephadex LH 20 カラムを通してクロロホルムで溶出した。フラクション 50—80 ml に **2a** および **2b** が分画されるが、これら相互の分離と若干随伴する油分を除くため、さらに一定量を TLC プレート上に帯状にスポットし、ベンゼンで展開した。**2a** および **2b** のスポット部位をかき取り、クロロホルムで抽出したのち UV 吸収スペクトルを測定した。つぎのフラクション 130—220 ml は、2-BHA が 1 ml 中 10—50 μ g 含まれるようにクロロホルムで調整したのち UV スペクトルを測定した。

0.5% **2a** ならびに **2b** ベンゼン溶液を正確に調整し、その 10 ml をそれぞれ内径 8.5 cm, 深さ 1.7 cm のシャーレに入れたもの各 10 個を照射箱中にセットし紫外線を連続照射した。光源と試料表面の距離は 27 cm, 内部の温度は 24—26° の範囲内にあった。この間蒸散するベンゼンは随時補った。一定時間毎にサンプリングした各試料は、ベンゼンで正確に 10 ml としたのち、TLC かきとり法により **2a** および **2b** の残存量を UV 定量した。