〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
37 (3) 211-217 (1991)

チオバルビツール酸反応性物質 precursor としての 2-alkenal 類：
活性酸素並びに過酸化物による 2-alkenal 類の酸化分解

平山晃久, 三浦進司, 植田 緑, 田上恵理,
吉澤智子, 渡辺徹志
京都薬科大学

2-Alkenal as a Precursor of Thiobarbituric Acid Reactive Substance :
Oxidation of 2-Alkenal by Active Oxygen and Hydroperoxide

TERUHISA HIRAYAMA, SHINJI MIURA, MIDORI UETA, ERI TAGAMI,
TOMOKO YSHIZAWA and TETSUSHI WATANABE

Kyoto Pharmaceutical University, 5-Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607,
Japan

(Received January, 7, 1991)

For the evaluation of 2-alkenal as a precursor of thiobarbituric acid reactive substance (TBA-RS), 2-alkenal (C_3 – C_9 and 2,4-hexadienal) was incubated with *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) at 40°C for 2 hr, Fenton reagent (H_2O_2/Fe^{2+}) or hypoxanthine-xanthine oxidase (Hx-XOD) in citrate buffer at 37°C for 1 hr. A reaction mixture was made to react with thiobarbituric acid (TBA) in 70% acetic acid at 100°C for 30 min. The amount of red pigment formed from the 2-alkenal greatly increased by addition of *t*-BuOOH. These results indicate that the red pigment was formed from 2-alkenal by the addition of *t*-BuOOH during the incubation, but that was formed in the TBA reaction process. Then, the usage of TBA reagent containing Sn^{2+} (5 μ mol), which prevents *t*-BuOOH oxidation in the TBA reaction, 14.6 and 12.5 mol% of TBA-RS were formed from 2-hexenal and 2,4-hexadienal by heating with *t*-BuOOH at 100°C for 60 min, respectively. In Fenton reagent (H_2O_2/Fe^{2+}), the amount of TBA-RS from 2,4-hexadienal decreased to 28% during the reaction at 100°C for 60 min. In Hx-XOD, TBA-RS from 2-alkenal (C_3 , C_4 and C_6) and 2,4-hexadienal increased with superoxide oxidation.

From the above results, it is suggested that 2-alkenal was decomposed with *t*-BuOOH oxidation and Hx-XOD system, and thiobarbituric acid reactive substances were formed.

Keywords — 2-alkenal; *tert*-butyl hydroperoxide; Fenton reagent; xanthine oxidase; thiobarbituric acid reaction; thiobarbituric acid reactive substance; oxidation; active oxygen

我々は過酸化脂質中のカルボニル化合物に興味を持ち、過酸化脂質中のアクロレインの定量,¹⁾ 1,2-不飽和アルデヒド (2-alkenal) 類のケイ光定量法,²⁾ さらに高速液体クロマトグラフィー法による 2-alkenal 類の分別定量法³⁾ などについて検討を加えてきている。その結果、20 及び 50 時間 80°C で通気酸化した不飽和脂肪酸メチルエステル並びに植物油脂には C_5 , C_7 , C_8 並びに C_9 の 2-alkenal 類が 100 から 1000 μ g/g のオーダーで含有されていること

が判明した。

過酸化脂質中にはこれら 2-alkenal 類と共に過酸化ラジカル、過酸化物、過酸化水素などが存在することはよく知られている。⁴⁾

そこで今回、2-alkenal 類並びに 2,4-hexadienal がこれら活性な酸素や酸化物質によってさらに分解を受けるかどうかをチオバルビツール酸反応性物質 (TBA-RS) の増減を指標として検討した。その結果興味深い現象が認められたので報告する。

実験の部

試薬及び器具 リノレン酸メチル, クロトンアルデヒド(2-butenal), 2-hexenal, hypoxanthine(いずれも特級試薬)及び2,4-hexadienalは東京化成工業製を, 30%過酸化水素, ブチルヒドロキントルエン(BHT)(いずれも特級)及びアクロレイン(2-propenal)は和光純薬工業製を用いた. チオバルビツール酸, 酢酸はナカライテスク社製を用い, 2-pentenal (Aldrich 社製, 95%以上), xanthine oxidase [XOD (grade I), Sigma 社製], *tert*-butylhydroperoxide(*t*-BuOOH)(片山化学工業製)を使用した. 2-Heptenal, 2-octenal 及び 2-nonenal は formyl methyl triphenyl phosphorane と脂肪族アルデヒド類を用いる Trippett⁵⁾らの方法により合成し, ガスクロマトグラフィーで検定し, 純度95%以上の物を用いた. Malondialdehyde (MDA) は Marnett と Tuttle の方法⁶⁾により調製した Na 塩を用いた. その他の試薬はいずれも特級試薬を用いた.

装置 分光光度計: 島津製作所製 UV-120-02. 吸光度測定波長は 530 nm を用いた.

***t*-BuOOH による 2-alkenal の酸化** 50 μ g/ml の 2-alkenal/EtOH 溶液 1.0 ml に 500 μ g/ml の *t*-BuOOH/EtOH 溶液 1.0 ml を加え, 20 時間, 40°C で incubate し, 反応後 TBA 試薬 10 ml を加えた TBA 反応を行った.

H₂O₂-Fe²⁺ (Fenton) 系による 2-alkenal 類の酸化 Fenton の方法⁷⁾により反応を行った. すなわち 4 mM 2-alkenal/0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 1 ml に 4 μ mol Fe²⁺ 及び 0.5 μ mol H₂O₂ を加え, 1 時間, 37°C で incubate し, TBA 試薬 10 ml を加えて TBA 反応を行った.

Hypoxanthine (Hx)-XOD 系による 2-alkenal の酸化 Ishimitsu らの方法⁸⁾に従って反応を行った. すなわち 2 mM 2-alkenal/10 mM クエン酸緩衝液 (pH 5.5) 1 ml に 0.8 μ mol Hx 及び 0.03 unit XOD を加え, 2 時間, 37°C で incubate する. 反応後, 直ちに TBA 試薬 10 ml を加えて TBA 反応を行う. 対照には XOD 未添加の試料を用いた.

チオバルビツール酸 (TBA) 反応 衛生試験法⁹⁾に従い行った. ただし, 反応中の酸化を防止するため, 最終濃度が 0.01% となるよう BHT ethanol 溶液 0.5 ml を 0.35% TBA/70% 酢酸溶液 9.5 ml に添加して用いた. 検量線は MDA·Na で作成し, TBA-RS 量はアルデヒド量に対する生成 MDA の mol%

で表示した.

SnCl₂ 添加 TBA (Sn²⁺-TBA) 法 0.35% TBA/70% 酢酸溶液調製時に SnCl₂ 5 μ mol を添加して用い, TBA 法と同様に操作した.

すべての実験は 3 回ずつ行い, その平均値で表した. また標準偏差も記載した.

結果と考察

t-BuOOH による 2-alkenal 類の酸化

Fig. 1 には *t*-BuOOH (500 μ g) 添加及び未添加の 2-alkenal 類 (50 μ g) を 40°C で 20 時間反応後, 衛生試験法収載の TBA 反応を行った時の TBA-RS の生成量を 2-alkenal 類に対する mol% で表示したものである. *t*-BuOOH 未添加ではいずれも TBA-RS の生成量は平均値で 0.50 から 3.66 mol% の範囲で 2-hexenal が最も高かった. *t*-BuOOH 添加では 2-nonenal 27.55, 2-pentenal 23.3, 2-hexenal 23.0 mol% とこれら 2-alkenal からの生成量が多く認められた. 我がが既に報告しているように,³⁾ 過酸化脂

Fig. 1. Formation of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBA-RS) from Alkenals by *tert*-Butyl Hydroperoxide (*t*-BuOOH) Oxidation

図: without *t*-BuOOH, □: with *t*-BuOOH.

C₃=acrolein, C₄=crotonaldehyde, C₅=2-pentenal, C₆=2-hexenal, C₇=2-heptenal, C₈=2-octenal, C₉=2-nonenal, C₁₀=2-decenal, dienal=2,4-hexadienal.

Each alkenal (50 μ g) in ethanol was incubated with or without *t*-BuOOH (500 μ g) at 40°C for 2 h, and the reaction mixture was made to react with 0.35% TBA/70% acetic acid solution (10 ml) at 100°C for 30 min.

a) $p < 0.01$.

質から多量検出された 2-pentenal, 2-nonenal において TBA-RS の生成量の多いことは実際の食品の変質を考える上で興味深い結果である。また、未添加に対する増加率は 2-propenal (acrolein) の 31.6 倍が最も高かった。これらの現象は Kosugi らにより報告されている¹⁰⁾ TBA 反応中 *t*-BuOOH による 2-alkenal 類からの TBA-RS の生成によることも予想された。そこで生成量の多かった 2-hexenal について *t*-BuOOH (500 μ g) 添加, 40°C での反応時間による TBA-RS 生成の経時変化の測定を予備的に行ったところ、データは示していないが、反応時間による TBA-RS 生成量の増加は認められなかった。

すなわち、40°C での反応 0 時間でも一定の TBA-RS が生成していることは、現在用いられている TBA 反応時に 2-alkenal 類が *t*-BuOOH によって酸化分解を受けて TBA-RS が生成していることになる。

そこで、TBA 反応時の *t*-BuOOH など過酸化物の影響を取り除くことを考えた。過酸化物価測定時に用いられるヨウ化カリウム,¹¹⁾ 還元剤である塩化第一スズ、アスコルビン酸、システインなどの添加効果を Fig. 2 に示した。

2-hexenal (50 μ g) と *t*-BuOOH (500 μ g) の混合物に 0.01% BHT 添加 TBA/酢酸試薬を加え、各還元剤の一定量を加えて 30 分間、100°C で加熱し、冷後 530 nm における吸光度を測定し、プロットしたものである。ヨウ化カリウム、アスコルビン酸、シ

ステインでは 200 μ mol 以上の添加でようやく *t*-BuOOH の影響を取り除くことが可能となったが、 Sn^{2+} の添加は 1 μ mol で十分 *t*-BuOOH の影響を除去することができた。

つぎに TBA-RS に対する Sn^{2+} の影響を見るため、Table I に示すように 500 μ g *t*-BuOOH 存在下、

TABLE I. Recoveries of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBA-RS) from *t*-BuOOH EtOH Solution, 2-Hexenal + *t*-BuOOH and 2,4-Hexadienal + *t*-BuOOH^{a)}

Sample	MDA ^{b)} added(μ g)	TBA-RS ^{c)} found(μ g)	Recoveries (%)
<i>t</i> -BuOOH	0	0	—
	5	5.389 $\pm$ 0.091	107.8
	10	10.963 $\pm$ 0.629	109.6
<i>t</i> -BuOOH + 2-hexenal	0	0	—
	5	4.241 $\pm$ 0.250	84.8
	10	8.029 $\pm$ 0.205	80.9
<i>t</i> -BuOOH + 2,4-hexadienal	0	0.074 $\pm$ 0.026	—
	5	4.963 $\pm$ 0.052	99.3
	10	10.593 $\pm$ 0.094	105.9

a) The mixture of aldehyde (50 μ g) and *t*-BuOOH (500 μ g) was made to react with 0.35% thiobarbituric acid/ 70% acetic acid solution containing 5 μ mol SnCl_2 in boiling water bath for 30 min.

b) MDA: malondialdehyde sodium salt was used as a TBA-RS.

c) mean value $\pm$ standard deviation ($n=3$).

Fig. 2. Elimination Effect of Reducing Agent on *t*-BuOOH (500 μ g) Oxidation Against 2-Hexenal (50 μ g) in Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction

エタノール, 2-hexenal 及び 2,4-hexadienal に対する MDA の添加回収実験を行った. 回収率は 80.9% から 109.6% と良好であり, Sn は TBA-RS に何ら影響を及ぼさないことが分かった. また, 2-hexenal 及び 2,4-hexadienal 各 50 μg からの TBA 反応中 TBA-RS の生成は MDA に換算して 0.074 μg 以下であり無視できた.

そこで, この Sn^{2+} -TBA 法を用いて 2-alkenal 類の *t*-BuOOH による酸化分解について検討した. *t*-BuOOH (500 μg) 存在下, 2-hexenal 及び 2,4-hexadienal 各 25 μg を高温で反応するため沸点の高い *n*-ブタノール 1 ml 中, 100°C で加熱し, その後 Sn^{2+} -TBA 法で測定した時の TBA-RS の経時変化を Fig. 3 に示した. 両者とも, 15 分で TBA-RS の上昇が認められ, 1 時間後には 2-hexenal から 14.6 mol%, 2,4-hexadienal から 12.5 mol% の TBA-RS が生成した.

データーは示していないが, 40°C, 60°C, 80°C の温度条件でも 2-alkenal 類と *t*-BuOOH との反応について検討したが, 温度依存的に TBA-RS は増加した. すなわち, 過酸化物質存在下 100°C の加熱によって 2-alkenal 類から TBA-RS の生成することが示唆された.

この事実から, 油脂並びに脂肪性食品の 100°C 以上の加熱により, Pryor らの報告しているプロスタグランジン様の endoperoxide を経る経路¹²⁾ から

Fig. 3. Formation of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBA-RS) in the Reaction of Alkenals and *tert*-Butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) at 100°C

Alkenal (25 μg) and *t*-BuOOH (500 μg) in butanol was heated at 100°C, and the reaction mixture was made to react with TBA reagent containing 5 μmol SnCl_2 at 100°C for 30 min.

けでなく, 脂質の酸化により生じる過酸化物質と 2-alkenal 類の反応によっても TBA-RS の生成することが推定された.

Fenton 系による 2-alkenal 類の酸化

Kostka らは TBA 反応中, 多量の H_2O_2 の共存により MDA などの TBA-RS が分解されることを報告している.¹³⁾ そこで予備的に, MDA, 2-pentenal, 2,4-hexadienal に H_2O_2 を添加して 37°C で 2 時間 incubate したところ, Fig. 4-A に示すように MDA 量は H_2O_2 の用量依存的に減少した. また, alkenal 類について H_2O_2 2 μmol までは TBA-RS の増加が認められたが, それ以上では 2-pentenal はわずかに上昇が, 2,4-hexadienal では減少が見られ, これは TBA-RS の増加と減少のバランスによるものと考えられた. しかし, H_2O_2 の影響は Sn^{2+} 添加でも完全には抑制できなかった.

つぎに H_2O_2 の影響が少ない 0.5 μmol 共存下における Fe^{2+} の影響について検討した. Fe^{2+} を 0 から 4 μmol まで添加した時, 2-pentenal, 2,4-hexadienal とともに TBA-RS の増加が認められた. また MDA については Fe^{2+} の 0.5, 1.0 及び 2.0 μmol 添加で分解が起こり, 4 μmol 添加では分解が起こらない特異な現象が認められた (Fig. 4-B). さらに 37°C における incubate 時間を変えて検討した. データーは示していないが TBA-RS の生成量には変化が認められず, これは OH ラジカルの反応性の早さに起因するのか,あるいは TBA 反応により TBA-RS が生成するのかは判別できなかった.

そこで Fe^{2+} (2 μmol), H_2O_2 (0.5 μmol) 共存下, 4 μmol の 2-pentenal 及び 2,4-hexadienal の Sn^{2+} 未添加 TBA 反応時, 金属封鎖剤である EDTA の影響について検討した (Fig. 5). EDTA 未添加では 2,4-hexadienal 及び 2-pentenal からそれぞれ 68 及び 42 mol% の TBA-RS が生成したが, 5 μmol の EDTA 添加で, 3.6 及び 4.6 mol% にまで TBA-RS の生成が抑制された. つぎに 37°C における Fenton 試薬による 2-alkenal 類の酸化分解を行い, EDTA (5 μmol) 添加 TBA 法を行ったところ, データーは示していないが, TBA-RS の生成が認められなかったことから, Fenton 系すなわち OH ラジカルにより 2-alkenal から TBA-RS は生成しないことが分かった.

また 100°C で Fenton 試薬存在下 2-pentenal 及び 2,4-hexadienal を加熱したところ, Fig. 6 に示すように, EDTA 添加 TBA 反応において, 上記の結果とは逆に, 特に 2,4-hexadienal において著しい経時

Fig. 4. Formation and Degradation of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBA-RS) by H_2O_2 and Fe^{2+} Oxidation

Δ: malondialdehyde (MDA, 10 μg), ○: 2-pentenal (4 μmol), ●: 2,4-hexadienal (4 μmol).

A: MDA, 2-pentenal and 2,4-hexadienal was incubated separately with 0–4 μmol H_2O_2 at 37°C for 2 h, and the reaction mixture was made to react with TBA reagent containing 5 μmol $SnCl_2$ at 100°C for 30 min.

B: The mixture of aldehyde and 0.5 μmol H_2O_2 was incubated with 0–4 μmol Fe^{2+} at 37°C for 2 h, and the reaction mixture was made to react with TBA reagent containing 5 μmol $SnCl_2$ at 100°C for 30 min.

In MDA, TBA-RS was exhibited as MDA %, in alkenal, TBA-RS was exhibited as mol % against initial alkenal mol.

Fig. 5. Effect of EDTA on the Production of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBA-RS) from Alkenals and H_2O_2 in the Thiobarbituric Acid (TBA) Reaction Process

EDTA (0–30 μmol) was added to the mixture of alkenal (4 μmol), Fe^{2+} (2 μmol) and H_2O_2 (0.5 μmol), and the mixture was made to react with TBA reagent at 100°C for 30 min.

Fig. 6. Time Course of the Degradation of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBA-RS) in the Reaction of Alkenals and H_2O_2/Fe^{2+} at 100°C

The mixture of alkenal (4 μmol), Fe^{2+} (2 μmol) and H_2O_2 (0.5 μmol) was heated at 100°C, and the reaction mixture was made to react with TBA reagent containing 5 μmol EDTA at 100°C for 30 min.

的な TBA-RS の減少が認められ、この減少が何に起因するのかは現在不明であるが興味深い結果が得られた。

Hx-XOD 系による 2-alkenal 類の酸化

つぎにスーパーオキシド発生系であるヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼによる酸化について検討した。Fig. 7 は各 2-alkenal 類についてクエン酸緩衝液 (pH 5.5) 中 37°C、1 時間反応させた後、衛生試験法収載の TBA 法により TBA-RS を測定した結果である。

XOD 添加で C₃、C₄、C₆ の 2-alkenal 類並びに 2,4-hexadienal において TBA-RS の増加が認められた。特に 2-hexenal 及び 2,4-hexadienal では 2.3 及び 2.8 mol% と TBA-RS が検出された。また、対照に比較して TBA-RS 生成率の顕著なものは crotonaldehyde で約 5 倍であった。しかし C₈ 以上の 2-alkenal 類では TBA-RS の生成はブランクより少なかった。これは TBA-RS 以外の酸化分解物の生成によるものか現在は不明である。C₅ 及び C₇ では有意差がなく例外であるが、C 数の増加により TBA-RS の生成率が減少していることから、これは基質の緩衝液に対する溶解度の違いによるものと推定された。

つぎに TBA-RS 生成の認められた 2,4-hexadienal を用いて TBA-RS 生成におよぼす反応時間の影響について検討した。データは示していないが反応 30 分後から TBA-RS の増加が認められ、1.5 時間後には 3.4 mol% と最大となり以後減少した。この減少は TBA-RS が XOD 酵素タンパクと結合したものと考えられた。

以上の結果からスーパーオキシドによって 2-alkenal 類から TBA-RS の生成することが実証できたが、その生成量は *t*-BuOOH 処理に比べて僅かであった。

油脂過酸化時の過酸化物質価 (POV)、TBA 価並びに Sn²⁺-TBA 価の経時変化

Fig. 8 には通気しながら 80°C で自動酸化したりノレン酸メチルの各時間における衛生試験法収載の POV 並びに TBA 法と共に Sn²⁺-TBA 法のデータを示している。

POV (meq/kg) は 10 時間後を最高にそれ以後減少している。それに対し、MDA 量 (μg/g) で表示した TBA 価は加熱 4 時間後にピークを有し、それ以後徐々に減少している。今回開発した過酸化物質の影響を受けない Sn²⁺-TBA 法による TBA-RS の生成は加熱 8 時間後までは TBA 価と良く相関してお

り、既に著者らが報告している MDA に特異的な dansyl pyrazole 法¹⁴⁾の結果と良く一致していた。また、10 時間以降は TBA 価と異なり有意差はないが僅かな TBA-RS の上昇が認められた。これらの結果より、衛生試験法収載の TBA 価と Sn²⁺-TBA 価との差は TBA 反応時の過酸化物質によるものと推定される。

食用油脂など食品の変質を評価する場合、POV 並びに TBA 価が現在測定されているが、この TBA 値には POV で測定されたヒドロペルオキシドにより TBA 反応中に酸化分解された 2-alkenal 類由来の TBA-RS も含まれることになる。

さらに、生体膜の酸化を過酸化物質を用いて行い、その結果を TBA 反応で追求する場合には、2-alkenal 類の生成を TBA-RS の生成と見誤ることも考えられる。

POV と TBA の両者の結果を比較する上からも、過酸化物質の影響を受けない今回の Sn²⁺-TBA 法は有用であろうと考えられる。今後、生体における脂質の変質にも適用できるかどうか検討するつもりである。

ま と め

今回の実験により以下のことが明らかとなった。

1) 過酸化物質存在下、2-alkenal の TBA 反応時の TBA-RS の生成は知られているが、過酸化物質存在下、100°C で 2-alkenal 類を加熱し、その後、TBA 反応中過酸化物質の影響を除去できる、SnCl₂ 添加 TBA 反応を行ったところ、2-alkenal 類からの TBA-RS の生成を確認できた。

2) Fe²⁺ の影響を除去できる EDTA 添加 TBA 反応を用いて、Fenton 系 (H₂O₂/Fe²⁺) による 2-alkenal の 100°C における分解反応を行ったところ、経時的な TBA-RS の分解が認められた。

3) スーパーオキシド発生系である Hx-XOD により C₃、C₄ 及び C₆ の 2-alkenal 及び 2,4-hexadienal から僅かであるが TBA-RS が生成した。

4) 過酸化物質の影響を受けない SnCl₂ 添加 TBA 反応を用いて、自動酸化したりノレン酸メチルの経時変化を検討したところ、衛生試験法収載の TBA 反応より低値を示した。このことより SnCl₂ 添加 TBA 法は過酸化物質などの影響を受けない、新しい TBA-RS の測定法と考えられる。

Fig. 7. Formation of Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBA-RS) from Alkenals by Hypoxanthine-Xanthine Oxidase (Hx-XOD) Oxidation

C₃=acrolein, C₄=crotonaldehyde, C₅=2-pentenal, C₆=2-hexenal, C₇=2-heptenal, C₈=2-octenal, C₉=2-nonenal, C₁₀=2-decenal, dienal=2,4-hexadienal.

Alkenal (2 μ mol) in citrate buffer (pH 5.5) was incubated with or without Hx-XOD at 37°C for 1 h, and the reaction mixture was made to react with TBA reagent at 100°C for 30 min.

a) $p < 0.01$.

Fig. 8. Autooxidation of Methyl Linolenate at 80°C

Δ: peroxide value (meq/kg), ○: thiobarbituric acid value (μ g/g as MDA), ●: thiobarbituric acid value (μ g/g as MDA) by using TBA reagent containing 5 μ mol SnCl₂.

引用文献

- 1) 平山晃久, 山口昌史, 中田哲誌, 奥村美和, 山崎智美, 渡辺徹志, 福井昭三, 衛生化学, **35**, 303 (1989).
- 2) T. Hirayama, S. Miura, M. Araki, Y. Takeo, T. Watanabe, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 590 (1990).
- 3) T. Hirayama, S. Miura, Y. Mori, M. Ueta, E. Tagami, T. Yoshizawa, T. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1253 (1991).
- 4) 金田尚志, 植田伸夫, “過酸化脂質実験法,” 医歯薬出版, 東京, 1983, p.10.
- 5) S. Trippet, M. Walker, *J. Chem. Soc.*, **1961**, 1266.
- 6) L.J. Marnett, M.A. Tuttle, *Cancer Res.*, **40**, 276 (1980).
- 7) H.J.H. Fenton, *J. Chem. Soc.*, **65**, 899 (1894).
- 8) S. Ishimitsu, S. Fujimoto, A. Ohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4645 (1984).
- 9) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 東京, 1990, p.340.
- 10) H. Kosugi, K. Kikugawa, *J. Jpn. Oil. Chem. Soc.*, **38**, 224 (1989).
- 11) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 東京, 1990, p.338.
- 12) W.A. Pryor, J.P. Stanley, E. Blair, *Lipids*, **11**, 370 (1976).
- 13) P. Kostka, C.Y. Kwan, *Lipids*, **24**, 545 (1990).
- 14) T. Hirayama, N. Yamada, M. Nohara, S. Fukui, *J. Sci. Food Agric.*, **35**, 338 (1984).