リン脂質およびその加水分解生成物の抗酸化作用 (第 5 報)

アルキルリン酸エステルおよび β -グリセロリン酸の抗酸化作用機構

浦上 智子・亀山 史子・森川 尚子・梶本 堂子

大阪市立大学家政学部 (大阪市西区北堀江御池通)

Antioxidant Activity of Glycerylphosphatides and Their Hydrolysis Products. V. A Mechanism for the Antioxidant Activity of Alkyl Phosphates and β -Glycerylphosphoric Acid

Chieko URAKAMI, Ayako KAMEYAMA, Naoko MORIKAWA and Eiko KAJIMOTO

Faculty of the Science of Living (Miike-dori, Kitahoriye, Nishi-ku, Osaka)

Authors previously reported that β -glycerylphosphoric acid (β -GP) exhibits antioxidant activity in methyl oleate but it does not decompose hydroperoxides. This report deals further study to elucidate mechanism for inhibition of autoxidation of unsaturated fatty acid esters by phosphate esters.

Trimethyl, triethyl and tributyl phosphate (TBP) and β -GP were found as active in unsaturated fatty acid esters at a concentration range from 0.01 to 0.04%. Hexane solutions of methyl linoleate containing the same concentrations of TBP or β -GP showed a new absorption peak at 230 m μ , and the absorbancy at this peak tended to decrease as the concentration of the phosphate esters increased. Furthermore, another absorption bands at 3400~3350, 1929, 1090, 1050 cm⁻¹ and 880 cm⁻¹ were observed in the infrared region. The results appear to indicate that an interaction of the PO group of the phosphate esters possibly with the α -methylene group of the methyl linoleate molecule results in perturbation of the π electrons of the double bonds of the latter. Therefore, a possible mechanism for the observed antioxidant activity of these esters involves either such an interaction or the formation of an unstable oil-soluble product as a result of such an interaction in early stages of autoxidation, rather than decomposition of hydroperoxides as has generally been regarded for the phosphate esters.

1 結 言

リン脂質の抗酸化作用は正リン酸と同様過酸化物を分解することに起因すると考えられているが¹⁾, リン脂質から脂肪酸を除去したリン酸エステルの場合必ずしもそうではない。まずこれらリン酸エステルの酸性度は抗酸化作用の強弱には関連性がなく²⁾, また β -グリセロリン酸 (β -GP) は正リン酸と異なりオレイン酸メチル過酸化物の濃縮物を分解しない³⁾。さらにオレイン酸メチルに β -GP あるいはホスホリルコリンを添加し自動酸化中に生成する酸化物の定量を経時的に行なった結果, 過酸化物の分解によって生成するカルボニルやオキシランなどの酸素量が無添加の場合に比べて顕著に増加する現象は見られなかった⁴⁾。またこれらの化合物は基質の P.O.V. が高いと作用を失うので, 過酸化物分解作用を有していないと考えられる。

β -GP をオレイン酸メチルに添加し, 自動酸化中における水溶性リンの回収を調べたところ, 反応の初期に水溶性リンが急激に減少することを観察した⁵⁾。そこで, 脂溶性の中間体が生成していると考え, このものの単離を試みたところ, 不安定なリン含有の脂肪族系化合物が得られた³⁾。

基質分子とリン酸エステルとの間のこのような反応では基質分子の反応中心は二重結合あるいは α -メチレン基で, リン酸エステルでは PO または POH あるいは両者であると考えられる。そこで PO のみを有するトリアルキルリン酸エステルと β -GP の抗酸化作用を比較し, これらの化合物と基質分子との相互作用について紫外線および赤外線吸収スペクトルを検討した。

2 実 験

2.1 試 料

オレイン酸メチルエステルは市販のエステルを尿素処理⁶⁾したのちにさらに低温アセトン再結晶法⁷⁾を用いて精製したが、なおガスクロマト分析の結果、パルミチン酸 14%, 極微量のリノール酸が含まれていて、 n_D^{20} 1.4530, ヨウ素価 99.5, 227 m μ における $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ は 15.25 であった。リノール酸メチルは Nutritional Biochemical 社製の高純度のものでガスクロマト分析の結果、単一物であった。これらの試料は一定濃度のヘキサン溶液とし、使用直前まで真空中でアンプルに詰め冷暗所に保存した。

β -GP は前に報告した方法⁹⁾にしたがってナトリウム塩を遊離酸にした。溶液の濃度はリン定量法⁹⁾により決定した。

アルキルリン酸エステル類は東京化成会社製のもので、蒸留精製を行なった。リン酸トリメチルエステル (TMP) bp_s 75.5°C (197.2°C¹⁰⁾), n_D^{20} 1.3928 (1.3963¹⁰⁾), トリエチルエステル (TEP) bp_{1.5} 72°C (bp₂₀ 174~5°C), (bp₂₀ 174~5°C¹⁰⁾), n_D^{20} 1.4033 (n_D^{20} 1.4039¹⁰⁾), トリブチルエステル (TBP) bp_s 138.5°C (bp_s 143~5°C), n_D^{20} 1.4223 (n_D^{20} 1.4224¹⁰⁾). これらのリン酸エステルは一定濃度のエタノール溶液として使用した。

2.2 自動酸化方法

Martin の方法¹¹⁾に準じたもので、40~50 mg の基質を用いるためにフラスコおよび圧力計の全空容量は 48~52 ml にした。一連のセットのうち中間容量のものを標準とし他のものの容積の補正を行なった。気圧の変動の補正を行なった。

50 mg の基質を含有するヘキサン溶液をフラスコに入れ、これにリン酸エステル溶液を添加し、50°C 以下で減圧下溶媒を完全に除去したのち、フラスコを圧力計に取り付け、40 min 平衡に達するまで、50°C の恒温ソウ中に放置した。コックを開いて水銀柱を調節したのち、これを閉じ、この時を 0 時間とした。誘導期は水銀柱の差が補正約 10 mm に達するに要する時間で求めた。

2.3 紫外線および赤外線吸収スペクトルの測定

紫外線吸収スペクトルの測定は日立 EPS-022 型を用いた。リン酸化合物を添加した試料の吸光値よりリノール酸メチルの吸光値を差引いて 213 および 230 m μ の吸光値を求めた。赤外線吸収スペクトルの測定には日立 EPI-590 型を用い、試料の溶媒を真空中で完全に除去し、0.025 mm 厚さのフィルムで測定した。

3 結果と考察

3.1 リン酸エステルの抗酸化作用

リンの濃度を一定にして各リン酸エステルの抗酸化力を比較する目的で 50 mg の基質に 0.0001 m/mol 添加し誘導期を求めた結果を Table-1 に示す。オレイン酸メチル (MeO) およびリノール酸メチル (MeL) 基質中で TBP はトリアルキルリン酸エステル中で最も強い作用

を示した。しかしこの場合 TBP の濃度は他のものに比べ高いので、同一分子間の相互作用により抗酸化作用を充分発揮していないのではないかと考え、低濃度について β -GP とあわせて検討した。0.01~0.04% 濃度範囲について調べたのであるが代表的なもののみを Table-2 に示す。

Table-1 Antioxidant activities of the trialkyl phosphates at a concentration of 0.0001 m mol per 50 mg of substrate at 50°C.

Compd.	Concn. (%)	Induction period (hr)	
		MeO	MeL
Blank		42.0	3.3
TMP	0.028	—	5.1
TEP	0.036	47.0	3.7
TBP	0.053	59.0	5.6

MeO:Stands for methyl oleate, MeL: Methyl linoleate, TMP: Trimethyl phosphate, TEP: triethyl phosphate, TBP: Tributyl phosphate

Table-2 Antioxidant activities of the trialkyl phosphates and β -glycerylphosphoric acid at various concentrations in 50 mg of methyl linoleate at 50°C.

Compd.	Induction period (hr)	
	0.01%	0.02%
Blank	5.0	5.0
TMP	8.4	29.3
TEP	—	6.1
TBP	15.5	3.1
β -GP	25.8	27.9

See Table-1 for the abbreviations of the compounds.

TBP は MeL 中では 0.01% で最も強く、TMP は 0.02% で強い作用を示した。これに反し TEP は MeO 中でも (Table-1) また MeL 中でも (Table-1 および 2) ほかのトリアルキルエステルに比べ弱いようである。 β -GP は TBP よりも水溶性であるが、MeL 中では常に強い作用を示すようである。したがってこれらの結果は β -GP の POH グループのみならず PO グループも抗酸化作用に関係していることを示すものと考えられる。

3.2 紫外線吸収スペクトルと赤外線吸収スペクトル

Halpern ら¹²⁾ は TEP と TBP とは CHCl_3 および CH_2Cl_2 と水素結合することを観察し、水素結合の強度に差があることから TEP と TBP の PO 酸素の電子密度には差があると提案した。また Wagner¹³⁾ によれば P-O 結合が -I 効果を受ける場合には P-O 結合の赤外線吸収波数は低い方に移動し、+効果を受ける場合にはより大きい波数に移動する。たとえば trifluorophosphine oxide (F_3PO) は 1,404~1,393 cm^{-1} に、また, trimethylphosphine oxide ($(\text{CH}_3)_3\text{PO}$) は 1,176~1,170

Table-3 Ultraviolet absorbance of methyl linoleate containing various amounts of β -glycerylphosphoric acid and tributyl phosphate in hexane at 213 and 230 $m\mu$.

	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$		
	213 $m\mu$	230 $m\mu$	
	Observed	Observed	Calculated
MeL	10.36	0.71	
MeL+0.01% β -GP	7.35	2.89	
MeL+0.02% β -GP	6.35	2.40	
MeL+0.03% β -GP	6.52	2.46	
MeL+0.04% β -GP	5.81	2.05	
1% aq. soln. of β -GP	—	0.08	
MeL+1.0% β -GP	—	—	0.79
MeL+0.01% TBP	13.92	2.89	
MeL+0.02% TBP	13.55	2.73	
MeL+0.03% TBP	12.84	2.35	
MeL+0.04% TBP	13.38	2.58	
1% EtOH soln. of TBP	—	0.14	
MeL+1.0% TBP	—	—	0.85

EtOH stands for ethanol; see Table-1 for the abbreviations of the other compounds.

cm^{-1} に吸収を示す。そして TMP はこれらの中間に属し、 $1,275\text{ cm}^{-1}$ に吸収を示す。TEP の P-O 結合の吸収は $1,263, 1,275\text{ cm}^{-1}$ で TBP の場合は $1,168\text{ cm}^{-1}$ である¹²⁾ので、前者は TMP に後者は trimethylphosphine oxide に類似し、TBP の PO 酸素は高い電子密度を有していると考えられる。したがってリン酸エステルの抗酸化力にはアルキル基の立体効果も考慮しなければならないが、PO 酸素の電子密度がかなり関与していると考えられる。

そこで PO 酸素が基質分子となんらかの相互作用をしていると考えられるので、MeL に TBP と β -GP を添加し、紫外線吸収スペクトルを測定した。結果は Table-3 に示すように、いずれの場合も 230 $m\mu$ に新しい極大を示し、リン酸濃度が高くなるにつれて吸光値は小さくなる傾向を示した。TBP の場合は PO 酸素が関与していると考えられ、 β -GP の場合も同様な傾向であるので、PO グループが関与していると推定できる。230 $m\mu$ 付近の吸収は通常共役二重結合によるといわれていて、

Fig.-1 Infra red absorption spectrum of methyl linoleate containing 0.01% of tri butyl phosphate liquid film

リン酸化合物の添加はまた 213 $m\mu$ の吸収にも影響を与えていることから、MeL の不飽和結合になんらかの変化をもたらしing と考えられる。

つぎに MeL に β -GP と TBP とを 0.01~0.03% 濃度範囲で添加し、赤外線吸収スペクトルを測定した。この測定に用いた MeL のスペクトルは文献¹⁴⁾に一致した。いずれのエステルを添加した場合もまったく同じ傾向のスペクトルであるので、その 1 例を Fig.-1 に示す。特徴のある吸収波数は $3,400\sim 3,350, 1,929, 1,090, 1,050\text{ cm}^{-1}$ と 880 cm^{-1} である。 $3,400\sim 3,550\text{ cm}^{-1}$ の吸収は 1,3-グリコールに相当し¹⁵⁾、通常 OH の分子間の水素結合によるものとされているが、この実験条件下では、とくに TBP 添加の場合、水酸基の存在は考えられない。ただ α -メチレン基の水素がリン酸エステルの PO 酸素と水素結合することは考えられる (文献 12 参照) が、このような相互作用がこの付近に強い吸収を示すかどうかについてはさらに検討を要す。 $1,929\text{ cm}^{-1}$ の吸収は弱い、いずれの試料でも明らかに示されている。 $1,090\text{ cm}^{-1}$ と $1,050\text{ cm}^{-1}$ 付近の吸収は C-OH グループに帰属する¹⁶⁾といわれているが、このような基の存在は考えられない。過酸化物は 880 cm^{-1} に吸収を示すが、Fig.-1 に示すような強いものではないしまた試料に生成されているとも考えられない。さらに第三アルコールがこの付近で吸収を示すといわれているが、このような

グループの存在も考えられない。したがって、 $3,400\sim 3,350\text{ cm}^{-1}$ 以外の吸収波数はすべてアレン類似構造を意味する¹⁷⁾と考えられる。また 720 cm^{-1} の吸収は存在するので、MeL 分子のシス型は残されている。

以上に示した紫外線および赤外線吸収スペクトルにみられる現象をある程度満足させる相互作用は MeL の α -メチレン基とリン酸エステルの PO 酸素との間で起こり、つぎのように示すこと

ができるのではないかと考えられる。すなわちリン酸エステルとの水素結合の結果, C_{11} における超共役により (I), C_9 または C_{12} の二重結合の π 電子との共鳴が起こり, II および III に示すような pseudo-allenic 構造をとり, しかもこれがそれぞれ C_{12} あるいは C_9 の二重結合 (シス型) と共役する。

このような相互作用がリン含有の脂溶性化合物の生成³⁾に導き, また水溶性有機リンの回収が自動酸化の初期に急激に減少する^{5), 6)}原因にもなっているのではないかと考えられる。したがってこのような相互作用そのものあるいは相互作用により生成される不安定な化合物が基質の酸化を抑制すると考えられる。

終わりに紫外線および赤外線吸収スペクトルの測定に御協力頂いた本大学原子力調査室の松井教授 および大阪府立大学農学部農芸科学科の上田講師に感謝の意を表す。

(昭和 41 年 11 月 15 日受理)

文 献

- 1) K.U. Ingold, *Chem. Revs.*, **61**, 574, 581 (1961)
- 2) C. Urakami, H. Kameyama, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **33**, 29 (1960)
- 3) C. Urakami, Y. Goto, H. Kameyama, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **38**, 1035 (1965)
- 4) 未発表
- 5) C. Urakami, H. Kameyama, M. Okada, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **32**, 36 (1959)
- 6) J.G. Keppler *et al.*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **36**, 308 (1959)
- 7) D.K. Kolk, J.B. Brown, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **32**, 357 (1955)
- 8) C. Urakami, Y. Kakutani, H. Okura, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **29**, 921 (1956)
- 9) L. Ernster, *et al.*, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 942 (1950)
- 10) G.M. Kosolapoff "Organophosphorus Compounds" John Wiley & Sons, Inc., New York (1950)
- 11) H.F. Martin, *Chem. & Ind.*, **1961**, 364
- 12) E. Halpern *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4472 (1955)
- 13) E.L. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 161 (1963)
- 14) パンチカード No. 3973
- 15) パンチカード No. 4450
- 16) H.H. Zeiss, M. Tsutui, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 897 (1953)
- 17) L.J. Bellamy, *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, Methuen & Co., London (1958)

香料, 非イオン界面活性剤, 水の 三成分系状態図に関する研究

見 城 一 敏

株式会社高橋東洋堂 (新宿区新小川町)

Studies on Phase Diagrams of Ternary Systems of Essential Oils, Nonionic Surfactant and Water

Kazutoshi KENJŌ

Takahashi Tōyōdō Co., Ltd. (Shin-ogawa-machi, Shinjuku-ku)

Phase diagrams of ternary systems consisting of decaoxyethylene nonylphenyl ether (NP-10), essential oils different in polarity and water have been studied.

From the phase diagrams obtained, six essential oils were classified into two groups, the first group of higher polarity being ethyl phenyl acetate, geraniol and isoeugenol methyl ether; the second group of lower polarity being α -ionone, α -amyl cinnamic aldehyde and limonene.

In the ternary system containing the essential oil of the first group, the phase diagram showed that the hardening region decreases gradually and eventually disappears and approaches toward the phase diagram of aqueous binary system of surfactant having more decreased degree of polymerization of ethylene oxide, in accordance with the decrease in the weight ratio of NP-10 to essential oil (S/E ratio). It was also found that the phase diagram of ternary system containing essential oil of the second group showed no disappearance of hardening regions and also the appearance of a new hardening region with the decrease in S/E ratio. The latter phase diagram was quite different with that of binary system of aqueous surfactant.