大豆油脱臭留出物中の抗酸化性物質に関する研究

清 野 肇*・渡辺昭一郎*・阿部芳郎**

* 北里大学衛生学部 (東京都港区白金 5-96-1)

** 慶応義塾大学工学部 (東京都小金井市前原 4-5-11)

Studies on the Antioxidative Compounds in the Deodorizer
Sludge of Soybean Oil

Hajime SEINO*, Shōichirō WATANABE* and Yoshirō ABE**

* Faculty of Hygienic Science, Kitasato University (Shirogane-5-9-1, Minato-ku, Tokyo)

** Faculty of Engineering, Keio University (Maehara-cho, Koganei-shi, Tokyo)

It is advisable to use natural antioxidative substances instead of synthetic antioxidants for foodstuff. In the previous reports the authors dealt that the unsaponifiable matter obtained from the deodorizer sludge of soybean oil had an inhibiting effect against the autoxidation of partially hydrogenated or thermally polymerized whale oils. There are several reports which dealt the presence of antioxidative substances except tocopherols in the sludge unsaponifiable. Some of these substances are assumed to have the structures similar to those of tocopherols. However, their structures and properties have not yet been fully studied because of the difficulty of their isolation.

In this paper, the concentration of these antioxidative substances from the unsaponifiable matter of the deodorizer sludge of soybean oil through silicagel column was investigated. Three antioxidative substances, one of them was new, were isolated from the concentrates by preparative thin layer chromatography. From the results of UV, IR, Mass and NMR spectra of these substances, it was found that these three antioxidative compounds were tocopherol dimers. The A.O.M. stabilities of partially hydrogenated whale oils containing the mixture of these tocopherol dimers or tocopherols were also determined. As a result it was observed that the mixture of tocopherol dimers had a strong inhibiting effect against the autoxidation of partially hydrogenated whale oil, although the potency was rather lower than that of the mixture of tocopherols.

1 緒 言

最近、合成食品添加物の人体に対する影響が問題となり、多くの話題を呼んでいる。抗酸化剤についても、合成品にかわって、植物油中に存在するトコフェロールなどの天然抗酸化性物質の利用を再検討しなければならぬ時期が来ているものと考えられる。

著者らは、さきにトコフェロールなどの抗酸化性物質を多量に含む大豆油脱臭留出物の利用を目的とした研究の一環として、脱臭留出物から得た不ケン化物中の抗酸化性成分をある程度濃縮し、その濃縮物を種々の加工鯨油に添加した場合、とくに水素添加鯨油ならびに加熱低重合鯨油に対していちじるしい抗酸化性を示すこと、また、濃縮物中にトコフェロール類似構造を有すると推定される二種類の抗酸化性成分が存在することを報告した^{1), 2)}。

脱臭留出物中の成分の抗酸化性については、竹内ら³⁾、

Hoffmann ら^{5), 6)}などが報告しており、また、植物油不ケン化物中のトコフェロール類似物質については、たとえば Shone^{7), 8)}, HcHale ら⁹⁾, Whittle ら¹⁰⁾ および Kováts¹¹⁾ など多くの報告があつて、トコフェロールの酸化生成物あるいはトコフェロール二量体などの存在が認められている。しかし、これらの物質は存在する量が少なく、また不安定で単離が困難なため、それらの構造や性質についてはまだ充分には研究されていないように思われる。

著者らは、前述のように大豆油脱臭留出物の利用を目的とした研究を続けているが、本報では、脱臭留出物から得た不ケン化物中に存在するトコフェロール類似物質をシリカゲルカラムによって濃縮し、濃縮物中に、従来存在を認められていた二種類のトコフェロール類似物質以外にもう一種類の抗酸化性物質の存在を認めた。さらに、この濃縮物から、三種類の抗酸化性物質を分取薄層クロマトグラフィーを繰り返して単離した。つぎ

に単離されたこれらの物質の UV, IR, 質量スペクトルおよび NMR スペクトルなどを測定した。その結果, これら三種類の抗酸化性物質はいずれもトコフェロール類の二量体であろうと推定された。ついで, さきにカラムクロマトグラフィーで得られた, これらトコフェロール二量体類の混合物ならびにトコフェロール類の混合物を種々の割合で選択水素添加鯨油に添加してその A.O.M. 安定度を測定し, 抗酸化力を比較した。その結果, トコフェロール二量体の混合物は, トコフェロール類混合物に比べていくらか劣るが, きわめて高い抗酸化力を有することが認められたので以下に報告する。

2 実験および結果

2.1 不ケン化物の抽出

水分を除いた大豆油脱臭留出物 920 g を 1000 ml のエチルエーテルに溶かして分液漏斗にとり, これを 6 N-塩酸 200 ml ずつで三回洗浄後, 水洗した。さらに 20%-水酸化カリウム水溶液を水層がフェノールフタレインでアルカリ性を示すまで加えてよく振った後, 水層とエーテル層を分離した。ついで, エーテル層を中性まで水洗し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥した後, エーテルを留去して中性部分 320 g を得た。

つぎに, この中性部分 75 g に対して 5%-ピロガロール・エタノール溶液 300 ml およびエタノール 1,500 ml を加え, 窒素気流中で加熱した。沸騰しはじめたのち, 60%-水酸化カリウム水溶液 75 ml をすみやかに加え, 2 hr 還流してケン化した。反応終了後, 室温まで冷却し, 内容物と同容の水を加え, 液々抽出装置を用いてエチルエーテルで不ケン化物を抽出した。エーテル溶液を水洗し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, エーテルを留去して不ケン化物を得た。この操作を繰り返し, 320 g の中性部分から 127 g の不ケン化物を得た。

2.2 不ケン化物の薄層クロマトグラフィー

植物油不ケン化物中の成分の薄層クロマトグラフィーによる分離に関しては多くの報告^{3), 8), 10)~15)}があり, いろいろの溶媒系が用いられている。著者らはこれらの報告を参考として, 各種溶媒系によって不ケン化物の薄層クロマトグラフィーを試みた。その結果, トコフェロール類およびトコフェロール類似物質類の分離には, *n*-ヘキサン-ベンゼン混合溶媒系が最も適していると思われた。Fig-1 に, *n*-ヘキサン-ベンゼンの混合比を 1:1 および 3:7 にした場合の薄層クロマトグラフィーの結果を示す。図中で, α , β , γ , δ の符号をつけたスポットはそれぞれ α -ないし δ -トコフェロールを, また, A, B のスポットは, トコフェロール類似物質と推定される抗酸化性を有する未知の成分のスポットである。竹内ら³⁾はこれらの抗酸化性を有する新物質を薄層クロマトグラフィーなどの手段によって分離し, その紫外および赤外線吸

収スペクトルなどを調べ, これらの物質はトコフェロール誘導体であろうと推定しているが, 著者らは以下に詳しく述べるように, 新抗酸化性成分が Shone^{7), 8)}, Whittle¹⁰⁾ らにより植物油不ケン化物中に見いだされたトコフェロール二量体に近似の化合物であることを認めた。

Fig-1 TLC of unsaponifiable matter.

2.3 抗酸化性物質の濃縮とトコフェロール誘導体の単離

不ケン化物中に存在するトコフェロール類ならびにトコフェロール誘導体類と思われる物質をそれぞれ濃縮するために以下のような操作を行なった。まず不ケン化物を 7 倍容の *n*-ヘキサンに溶解し, 0°C で 1 hr 保持して析出するステリンを減圧ろ別し, ろ液部の溶媒を留去して, カッ色, ペースト状の物質を不ケン化物に対して約 91% の割合で得た。つぎに, 内径 30 mm, 長さ 50 cm のガラス製カラムに 120°C で 3 hr 活性化したカラムクロマト用シリカゲル 180 g を充てんし, 上に得られたステリン類を除いた不ケン化物 3 g を *n*-ヘキサン:ベンゼン=1:1 (vol/vol) 混合溶媒を用いて, このカラム中を通過させた。溶出液を 9 g ずつフラクションコレクターによって捕集し, 各溶出液を薄層クロマトグラフィーで調べて同じ成分を含むものを合わせ, 10 個の区分とした。これらの各区分の薄層クロマトグラムを Fig-2 に示す。この結果, トコフェロール類は区分 6 および区分 7 に, またトコフェロール誘導体類は区分 4 に濃縮されていることが認められた。以上の濃縮操作を繰り返

Fig.-2 TLC of fractions of unsaponifiable matter separated through silicagel column.

し、トコフェロール類濃縮物約 5 g トコフェロール誘導体類濃縮物約 2.8 g を得た。両濃縮物とも Fig.-2 に明らかなようにいくつかの不純物を含んでいる。とくにトコフェロール誘導体類濃縮物中には濃縮前には見られなかったスポットが認められた。この成分は、30%-硫酸によってトコフェロール類と同様に淡黄色に呈色し、抗酸化性を有することが期待された。そこで、両濃縮物の成分の抗酸化性を Vioque らの方法¹⁴⁾にしたがい、つぎのようにして定性的に確認した。すなわち、両濃縮物を薄層プレートにスポットし、Fig.-2 と同様な条件で展開したのち、プレートにリノール酸を噴霧し、波長 365 m μ の紫外線を 10 min 照射して、リノール酸に過酸化物を発生させた。つぎに、1%-N,N'-ジメチル-*p*-フェニレンジアミン 塩酸塩-エタノール溶液をプレートに噴霧して呈色状況を観察した。その結果、Fig.-3 に示すように、トコフェロール誘導体類濃縮物中に新たに見られた成分は、トコフェロール類ならびに従来から存在を認められていた二種類のトコフェロール誘導体と同様に、紫外線の照射によるリノール酸の過酸化物の生成を妨げ、抗酸化性を有することが認められた。この物質もトコフェロール誘導体の一種であろうと推定されたので、以後トコフェロール誘導体 C と仮称する。

つぎに、トコフェロール誘導体類濃縮物から、分取薄層クロマトグラフィーによって、誘導体 A, B, C の単離を試みた。厚さ 0.75 mm の Kieselgel G プレートを用いて、*n*-ヘキサン：ベンゼン=3：7 混合溶媒によって展開し、A, B, C をそれぞれかき取り、エチルエーテルで抽出する操作を繰り返して、*n*-ヘキサン-ベンゼン混合溶媒系の薄層クロマトグラフィーで、それぞれ単一ス

Adsorbent: Kieselgel G, 0.5mm
 Eluting solvent: n-hexane/benzene=1/1 (vol/vol)
 Detection: After the development of T.L.C. linoleic acid was sprayed on the plate. Then the plate was exposed under UV light (365 m μ) for 10 min., and 1%-N,N'-dimethyl-*p*-phenylenediamine hydrochloride/ethanol was sprayed.

Fig.-3 Detection of antioxidative substances.

ポットを示す物質を得た。これらの物質はいずれも黄色の粘度の高い液体であった。

2.4 トコフェロール誘導体類の分析

2.3 で単離された三種類のトコフェロール誘導体類のそれぞれについて、エタノール溶液として UV スペクトルを測定した結果を Fig.-4 に示す。

Fig.-4 UV spectra of tocopherol derivatives in ethanol solution.

A, B, C はいずれもトコフェロール類とほぼ同波長の 298 m μ 付近に吸収極大を有することが認められた。つぎに、それぞれの IR スペクトルを測定した結果、Fig.-5~7 に示すように、波数 3500 cm⁻¹ 付近の水酸基の吸収がいずれも小さくなり、かつ高波数側にずれている

Fig.-5 IR spectrum of tocopherol derivative A.

Fig.-6 IR spectrum of tocopherol derivative B.

Fig.-7 IR spectrum of tocopherol derivative C.

点, $1650\sim 1610\text{ cm}^{-1}$ にトコフェロールでは認められなかった吸収がある点を除いては, トコフェロール類とほぼ似た吸収パターンを示し, さきの UV スペクトルの結果とあわせて, A, B, C がいずれもトコフェロール類によく似た構造を有していることが推定された。

つぎに, A, B, C それぞれの NMR スペクトルを測定した結果を Fig.-8 に示す。これらのスペクトルもトコフェロール類のそれによく似ていたが, $2.1\sim 2.2\text{ ppm}$ 付近の芳香環に結合したメチル基のプロトンのシグナルがトコフェロール類のそれよりも複雑に分岐しているのが認められた。またトコフェロールでは 4 ppm 付近のフェノール性水酸基のプロトンのシグナルが A ではほとんど認められず, B および C では 4.7 ppm に認められた。

さらに, これらの物質の質量スペクトルを測定した結

Fig.-8 NMR spectra of tocopherol derivatives.

Fig.-9 Mass spectra of tocopherol derivatives.

Table-1 Molecular weights of tocopherol derivatives.

	A	B	C
I	806	824	818
II	820-824	828-830	830-832

I : determined by vapor pressure equilibrium method
II : indicated by mass spectra

果を Fig.-9 に示す。これらの結果より、A では、820～824、B および C では 828～832 が、これらの物質の分子量を示すピークであろうと思われる。確認のため、これらの物質を酢酸エチル溶液として、蒸気圧平衡法によって分子量を測定した結果を質量スペクトルで示された値とともに、Table-1 に示す。その結果は、いずれもトコフェロール類の分子量の2倍に近い 820～830 を示し、これらの物質はトコフェロールの二量体であろうと推定される。

2.5 トコフェロール二量体の抗酸化力

2.3 で得られたトコフェロール類およびトコフェロール二量体類の濃縮物から分取薄層クロマトグラフィーによってできるだけ不純物を除き、それぞれの混合物を得た。これらの混合物の抗酸化力を比較するために、混合物を各種の割合で水素添加鯨油に加え、A.O.M. 安定度を測定した。試料として用いた水素添加鯨油は、Table-2 に示すような性質を持つものである。この試料油各 100 g にトコフェロール類あるいはトコフェロール二量体類の混合物をそれぞれ試料油に対して 0.01～0.15% の割合で加え、50°C の水浴上で 20～30 min、窒素ガス

Table-2 Characteristics of hydrogenated whale oil.

A.V.	S.V.	I.V.	mp(°C)	A.O.M. (hr)
0.17	187.4	65.1	36-38	25

Table-3 A.O.M. stabilities of hydrogenated whale oils containing tocopherols or tocopherol dimers.

Concentration of additives (%)	—	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15
Additives						
Tocopherols	25 hr	47	90	97	169	252
Tocopherol dimers	25	34	59	66	145	195

Fig.-10 A.O.M. stabilities of hydrogenated whale oils containing tocopherols.

Fig.-11 A.O.M. stabilities of hydrogenated whale oils containing tocopherol dimers.

を通じながらかくはん溶解させたものを安定度測定の試料とした。これらの各試料について、A.O.C.S. の規定¹³⁾にしたがって A.O.M. 安定度を測定した結果を Table-3 に、また測定中の過酸化物質の変化を Fig.-10, 11 に示す。

Table-3 および Fig.-10, 11 に見られるように、大豆油脱臭留出物不ケン化物から得たトコフェロール二量体混合物は、水素添加鯨油に対してきわめて高い抗酸化効果を示し、その効果は添加量が試料油に対して 0.01%～0.15% の範囲では、添加量の増加とともに試料油の A.O.M. 安定度もほぼ直線的に増加し、添加量が 0.15% の場合には無添加の試料の約 8 倍の安定度を示す一方、トコフェロール混合物の場合には、二量体混合物よりもさらに大きな抗酸化効果を示し、添加量が 0.15% の試料油は、無添加の試料の約 10 倍の A.O.M. 安定度を示した。

3 考 察

著者らが大豆油脱臭留出物の不ケン化物から単離した三種類の抗酸化性物質は、その分子量などからトコフェロールの二量体であろうと推定された。呉地^{16), 17)}は、BHA をベンゼン溶液中で光により酸化させ、得られた生成物を分析した結果、BHA 2 分子間の芳香核水素の離脱によって生じたジフェニル化合物および 2 分子の BHA の芳香核水素と水酸基水素の離脱によって生じたエーテル結合をもつ化合物の二種類の二量体が生じていることを報告している。また、Nilsson ら¹⁸⁾も、トコフェロール類およびモデル化合物を酸化重合させて得た生成物を UV, IR, NMR, 質量スペクトルなどで分析した結果から、トコフェロール類が重合する過程を推定し、それらがジフェニル構造もつ二量体、あるいはエーテル

Fig.-12 Dimers of γ -tocopherol.

わめて高い抗酸化効果を示した。著者らはさきに、大豆油脱臭留出物の不ケン化物を水素添加鯨油や加熱低重合結合をもつ二量体などを形成するとしている。著者らの得た三種類の化合物の分析結果のうち B および C のそれは、Nilsson ら¹⁸⁾が γ -もしくは δ -トコフェロールの二量体としているものの分析結果とよく一致している。なお、NMR スペクトルで芳香環のメチル基のシグナルがトコフェロールのそれよりも多く分岐しているのは、二量体の形成により、フリーローテーションが妨害を受けたためと考えられる。さらに、分子量測定の結果 B および C は、 γ -トコフェロールが Fig.-12 に示すような、(I) ジフェニル構造をもった二量体、あるいは (II) エーテル結合をもつ二量体を形成したときの分子量 830 と一致する値が得られており、B および C がそれらのいずれかの二量体である可能性がきわめて強い。また、A もその分子量およびその他の分析結果から、トコフェロール類の二量体であると思われる。

呉地¹⁷⁾は BHA の酸化によって生じた二量体が、抗酸化能を保有していることを報告しているが、著者らが得たトコフェロール類の二量体の混合物も、水素添加鯨油

に対してトコフェロール類混合物よりはやや劣るが、き鯨油に添加して A.O.M. 安定度を測定し、不ケン化物がきわめて高い抗酸化性を示すことを報告^{11), 21)}したが、本実験で得たトコフェロール類混合物およびトコフェロール二量体混合物の場合は、不ケン化物の 1/5~1/6 の添加量で不ケン化物とほぼ同等の効果を示すことが認められた。しかし、これらの混合物では、不ケン化物の際に認められる最適濃度が、添加量が 0.01~0.15% の範囲内では認められなかった。

(昭和 45 年 11 月 20 日受理)

文 献

- 1) 阿部, 清野, 李, 鈴木, 油化学, **15**, 94 (1966)
- 2) 阿部, 清野, 蓮見, 若松, 油化学, **18**, 183 (1969)
- 3) 竹内, 立川, 油化学, **16**, 185 (1967)
- 4) 立川, 竹内, 油化学, **17**, 77 (1968)
- 5) R.L. Hoffmann *et al.*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **39**, 323 (1962)
- 6) R.L. Hoffmann *et al.*, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **41**, 116 (1964)
- 7) G. Shone, *Chem. & Ind.*, Feb. 23, 335 (1963)
- 8) G. Shone, *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 315 (1962)
- 9) D. McHale, J. Green, *Chem. & Ind.*, June 15, 982 (1963)
- 10) K.J. Whittle, J.F. Pennock, *Analyst*, **92**, 423 (1967)
- 11) L.T. Kováts, E.B. Krasner, *Die Nahrung*, **11**, 671 (1967)
- 12) A. Seher, *Fette-Seifen Anstrichmittel*, **60**, 1144 (1958)
- 13) A. Seher, *Fette-Seifen Anstrichmittel*, **61**, 345 (1959)
- 14) Vioque *et al.*, *Grasas y Aceites*, **18**, 310 (1967)
- 15) A.O.C.S. Tentative Method Ce 12-57
- 16) 呉地, 衛生化学, **13**, 191 (1967)
- 17) 呉地, 衛生化学, **15**, 301 (1969)
- 18) J.L.G. Nilson, G.D. Daves, Jr., K. Folkers, *Acta Chemica scand.*, **22**, 207 (1968)