油脂の酸化測定のための TBA 法における 反 応 物 質 に つ い て

浅 川 具 美*・野 村 幸 弘**・松 下 雪 郎

京都大学食糧科学研究所（宇治市五ヶ庄）

* 同志社女子大学家政学部（京都市上京区今出川通寺町西入）

** ハウス食品工業株式会社（東大阪市御厨）

On the Reacting Compounds in the TBA Method for the Determination of Lipid Oxidation

Tomomi ASAKAWA*, Yukihiro NOMURA** and Setsurō MATSUSHITA

Research Institute for Food Science, Kyoto University (Uji)

Present address * Doshisha Women's College (Kyoto)

** House Food Industry Co., (Higashiosaka)

When TBA method is applied to oxidized lipids, red color (about 530 nm) and yellow color (about 450 nm) are produced. The red color is rather stable and is used for the analysis, but the yellow color is unstable. An attempt was made to solve the mechanism of producing the yellow color by comparing the results of Sidwell's method (mainly red color) and Ottolenghi's method (2 colors). The reaction of hydroperoxides with TBA and the reaction under addition of Na_2SO_3 were also tested. From these experiments, the compound developing yellow color was deduced to be caused by an aldehyde which came from a primary decomposed product of hydroperoxides by further oxidative decomposition.

1 緒 言

油脂の酸化変質の程度の測定法として、TBA 法は広く利用されている。しかしながら、この方法には種々の問題点が残されており、過酸化価値、カルボニル価、酸価などに併せて、補助的な値として利用されているにすぎない。Dox ら¹⁾がアルデヒドと TBA の縮合を行い、Bernheim ら²⁾が食品の酸化変敗の測定に適用して以来、この方法は食品研究者の注目を集め、幾多の研究がなされてきた。それらについては大藪ら³⁾の総説に詳しい。それらの種々の論議をみるに、この方法は簡便に使用できる一方、pH、加熱温度、加熱時間、かきまぜの条件、光線、呈色物の放置時間などの影響を受けやすく、再現性に乏しいものとなっている。そこで、これを改良するため、TBA 法にはいくつかの変法が考案されてきた^{4)~9)}。しかしながら、いずれも不満な点があって根本的な解決には至っていない。それは発色の原理における説明が不十分なためと考えられる。

TBA は油脂の酸化生成物中のマロンアルデヒドと反応すると考えられ¹⁰⁾、Sinnhuber¹¹⁾ は TBA との呈色物質は 2 分子の TBA と 1 分子のマロンアルデヒドが縮

合したものと推定した。TBA はマロンアルデヒドの外に、種々のアルデヒドと反応することも報告され、ジェナール⁷⁾、グリオキザール¹²⁾などと反応して 540 nm 付近に最大吸収を示す赤色反応物が生成し、飽和アルデヒド^{7), 13)}、モノエナール⁷⁾、グリセリンアルデヒド¹⁴⁾などは 450 nm 付近に吸収を持つ黄色の化合物を生ずると報告されている。また種々のオレンジ色素を生ずる化合物も明らかにされている¹⁵⁾。なお Tarladgis ら⁵⁾と Yu ら¹⁶⁾はヒドロペルオキシドが測定に影響すると述べた。

さて、この方法を油脂の酸化測定に応用する際に、実際に呈色に関与する化合物は、上記の化合物中にあると考えてよいのだろうか。マロンアルデヒドが典型的な呈色物質として採り上げられているが、油脂の酸化においてマロンアルデヒドは検出し難いものであり、まだ疑問をはさむ余地はあるだろう。

本報においては、TBA 法として酢酸酸性溶液で抽出後加熱する Sidwell の方法⁴⁾と、酸化油をトリクロロ酢酸存在下 TBA と加熱後クロロホルムで油脂分を除く Ottolenghi の方法⁹⁾を使用し、その相異点を明らかにした。またリノール酸メチルのヒドロペルオキシドを TBA と反応させると、はじめは呈色しないが、反応液を放置

すると黄色色素を生ずること、あるいは亜硫酸ナトリウム存在下における TBA 反応の結果、黄色色素の生成しないことなどから、油脂酸化生成物中の TBA と反応する化合物についての論議を行うものである。

2 実験と結果

2.1 材 料

脂肪酸と大豆油は市販品を用いた。サフラワー油は吉原製油株式会社より提供された。リノール酸メチルヒドロペルオキシド (MLHPO) はカラムクロマトグラフィーと薄層クロマトグラフィーにより精製した¹⁷⁾。

2.2 測定方法

2.2.1 TBA 法としては、主として Ottolenghi (O-法)⁶⁾と Sidwell (S-法)⁴⁾の方法を用いた。本報ではこの両方法の比較が論点となるので、それらの方法について略記する。

O-法 試料 0.1 ml に 35% トリクロロ酢酸 (TCA) 1 ml, 0.335% TBA 試薬 2 ml を加え、沸騰浴中で 15 min 加熱し、冷却後 1 ml の氷酢酸と 2 ml のクロロホルムを加え、振とう後遠沈する。上澄み液を用いて吸光度を測定する。試料 1 g 当たりの O.D. として標示した。

S-法 試料 0.5 ml にクロロホルム 10 ml, 0.335% TBA 試薬 10 ml を加え、4 min 振とう後遠沈して、上澄み液を沸騰浴中で 30 min 加熱し、冷却後、吸光度を測定する。

2.2.2 GC-MS 分析

島津-LKB 9000 を用いた。担体にクロモソルブ-W, 60~80 mesh, 液相を 3% SE-52 としてガラスカラム (0.3×200 cm) につめ、100~250°C, 昇温 (5°C/min) 法により、ヘリウムガス (30 ml/min) で展開した。

運転条件は次のようである。イオンソース温度 330°, セパレーター温度 290°C, イオン化電圧 70 eV, トラップカレント 60 μ A, アクセレーター電圧 3.5 kV。

P.O.V. はヨウ素滴定法¹⁸⁾により、meq/kg で標示した。

2.3 脂肪酸酸化の時間的経過

5 ml のリノール酸メチルならびにリノレン酸を 50 ml の三角フラスコに入れ、37°C の空気浴中に置いて、酸化の進行過程を P.O.V, TBA 法 (O-法) で追跡した (Fig.-1, 2)。MLHPO はロータリーエバポレーターのフラスコ中に入れ、回転させながら 37°C に置いた (Fig.-3)。リノール酸メチルとリノレン酸においては、P.O.V. のピーク (それぞれ 12 日, 6 日) に少し後れて TBA 532 nm (赤色色素) の O.D. のピーク (それぞれ 15 日, 8 日) が現れた。ただし、リノレン酸の場合赤色色素の出現はリノール酸メチルに比べ早かった。TBA 450 nm の色素 (黄色色素) はリノール酸メチルの場合には赤色

色素の増減につれて変動したが、リノレン酸においてはほとんど生じなかった。MLHPO の場合は P.O.V. の減少につれ、赤色色素, 黄色色素共に増大しはじめ、その O.D. は後者の方が大であった。なお、Fig.-3 の実

Fig.-1 Autoxidation process of methyl linoleate. Incubated at 37°C.

Fig.-2 Autoxidation process of linolenic acid. Incubated at 37°C. Symbols are the same as in Fig.-1.

Fig.-3 Decomposition process of MLHPO. Incubated at 37°C. Symbols are the same as in Fig.-1.

験においては、約 100 hr のインキューベーションで MLHPO は薄層クロマトグラフィー¹⁷⁾では認められないまでに消失していた。その後存在する P.O.V. は二次生成物中に生じたヒドロペルオキシドによると考えられる。

2.4 油脂の酸化の時間的経過

それぞれ 20 ml のサフラワー油と大豆油を 100 ml の三角フラスコに入れ、50°C の空気浴中にインキュベートした (Fig.-4, 5)。その間 1 日 1 回は振り混ぜた。共に 2 週間目ころより P.O.V. が上昇し始めたが、赤色色素の増大は大豆油の方が早く、そのピークの生ずる日 (28 日) は P.O.V. のピークとほぼ一致した。サフラワー油の場合は P.O.V. のピーク (23 日) に後れて赤色色素のピーク (28 日) が現れた。黄色色素についてはさほどの相異はみられなかった。これらの油には、天然抗酸化剤も含まれているので、酸化の速さには違いがあつて当然であるが、サフラワー油は不飽和脂肪酸としては主としてリノール酸を含むものであり、大豆油はリノール酸に加えリノレン酸をも含む特徴がある。Fig.-1 と Fig.-4, Fig.-2 と Fig.-5 の図型がよく似ているのは含まれる不飽和脂肪酸が類似するためである。

Fig.-4 Autoxidation process of safflower oil. Incubated at 50°C. Symbols are the same as in Fig.-1.

Fig.-5 Autoxidation process of soybean oil. Incubated at 50°C. Symbols are the same as in Fig.-1.

2.5 黄色色素の生成

酸化したリノール酸メチルを用い O-法により発色後、室温に放置して、そのスペクトルの変化を測定した (Fig.-6)。その結果赤色色素は変化しないが、黄色色素は増大した。さらに時間が経つと黄色色素も減少した。これは、加熱して反応させたあと、何らかの化合物から変化してアルデヒドとなり、残存した TBA と反応したものと考えられる。なお黄色色素の生成は、油脂の種類、いいかえ

Fig.-6 Absorption spectrum of TBA-reacted oxidized methyl linoleate followed by O-method.

The colored solution was left at room temperature and the spectrum was measured after 30 and 60 min.

ば含まれる不飽和脂肪酸の種類により異なるようである。リノール酸ならびにリノレン酸を含む大豆油においては比較的黄色色素の生成は少なく、リノール酸メチル、あるいは主にリノール酸を含むサフラワー油においては生成量が比較的多かった。

2.6 黄色色素の除去

黄色色素は、赤色色素の生成、発色を阻害するものではないが、黄色色素の不安定さと色素生成物質の不明りようさは TBA 法に対する信頼度を弱めることとなっている。いま S-法に従うと、主として赤色色素生成物が抽出され発色する (Fig.-7 と全く同じ赤色色素型のスペクトルを示す)。この方法を詳細に検討すると、赤色色素を生ずるものは、もともと酢酸酸性において抽出されるもの、あるいは TBA と複合体を形成した上酢酸酸性で抽出されるものということがわかる。したがって、O-法と対比するとき、黄色色素を生成する化合物は、酢酸溶液に不溶性の物質であったものが、TBA と加熱に際して分解なり変形して水溶液に移行することになり、しかもクロロホルムでは抽出不可能という性質を持つようになったものと考えられる。分子量的には酢酸溶液抽出可能である低分子 (S-法で酢酸溶液に抽出されることから) の赤色色素発生物質と、クロロホルム可溶の長鎖化合物 (S-法では黄色色素生成物質の前駆体はクロロホルム層に含まれていることから) との中間に位するものであろう。S-法によらずに黄色色素を除くにはそのような中間体を生じさせないようにしなければならない。

2.7 Na_2SO_3 存在下の TBA 反応

Fig.-7 Absorption spectrum of TBA-reacted oxidized methyl linoleate followed by O-method when Na_2SO_3 is co-exist.

上述のように O-法によると、反応液は時間の経過と共に黄色色素を生ずる。これは放置中に反応が緩やかに進行することを意味し、それが酸化反応に基づく可能性がまず考えられる。そこで、TBA と加熱後反応液中の溶存酸素を除去するため Na_2SO_3 溶液を加えたところ¹⁹⁾、黄色色素の増加はストップした (Fig.-7)。そこで、発色加熱に先立って、0.1% Na_2SO_3 (無水) を含む TBA 溶液 (新鮮溶液) を用いると、反応後の黄色色素の発生は完全に止まると共に、赤色色素の生成が増加した。 Na_2SO_3 無添加の標準法に比べ 1.3~1.7 倍の増加を示した。なお赤色色素は 1 hr 後も変化がなかった。ただし、 Na_2SO_3 の効果は酸素除去に限られるわけではない。

2-8 MLHPO と TBA との反応

MLHPO と TBA を O-法により反応させても全く呈色しなかった。しかし、反応終了液を室温に放置すると黄色色素 (吸収極大 450 nm, 図は略す) が生じてきた。これは MLHPO の加熱分解により生じたものは TBA と反応しないが、それが徐々に変化してアルデヒドとなることを意味するのであろう。 Na_2SO_3 の存在下で発色させたものは、もちろん放置後も色素を生じなかった。

2-9 リノール酸メチル酸化生成物の GC-MS 分析

リノール酸メチルを酸化させたものを (P.O.V. 約 2,300)、薄層クロマトグラフィーにかけ (調製用プレート 0.25 mm, エチルエーテル: *n*-ヘキサン: 酢酸, 8:7:0.1)、二次生成物 (R_f 0~0.3) をエーテルで抽出, GC-MS にかける一方 (Fig.-8), エーテル抽出物はエーテルを追い出してヘキサン溶液としたのち、25% 酢酸で洗い (S-法抽出残分に当たる) ヘキサン層を分析に供

Fig.-8 Gas chromatogram of secondary products from oxidized linoleate. ① hexanal¹⁷⁾, ② nonadienal, ③ methyl octanoate¹⁷⁾, ④ 8-formylmethyl octanoate¹⁷⁾, ⑤ 8-formoxy methylnonanoate¹⁹⁾, ⑥ methyl linoleate.

Fig.-9 Gas chromatogram of acetic acid-washed secondary products from oxidized linoleate. The numbers are the same as in Fig.-8.

した (Fig.-9)。主なピークについては質量スペクトルにより同定した。両図を比較すると、中間に生ずるヘキサンール、オクタン酸メチル、8-ホルミルオクタン酸メチルは変化なく、酢酸では除かれなことがわかる。酢酸で抽出されたものとしては、ノナジエナルと 8-ホルムオキシノナル酸メチルが顕著であるが、前者は赤色物質を形成する可能性は濃く⁷⁾、後者はアルデヒドではないので発色しないであろう。

3 考 察

油脂の酸化過程に TBA 法を適用するとき、532 nm 付近に吸収をもつ赤色色素と 450 nm 付近に吸収をもつ黄色色素を生ずることはよく知られた事実である。この

うち、赤色色素は安定であるから、分析法としては一応利用できる。黄色色素は不安定で、利用はできないが、一体黄色色素を生ずるものは何だろうか。TBA 法の信頼性を高めるためにも発色の機構を探るのは意義のあることであろう。

緒言にも述べたように、赤色色素はマロンアルデヒド¹¹⁾やジエナール⁷⁾に基因するものであり、黄色色素は飽和アルデヒド^{7), 13), 14)}やモノエナール⁷⁾によるといわれる。なお黄色色素の不安定性についてもすでに述べられている^{8), 9)}。

上述の実験結果から、赤色色素生成物としてノナジエナール⁷⁾の可能性は非常に高いと考えられるが、本報における興味はむしろ黄色色素生成についてである。黄色色素を生ずる化合物については、実験結果よりその輪郭を画くことが可能となった。すなわち、この化合物はクロロホルムには溶けるが酢酸溶液で抽出されなかった物質が、TBA との加熱に際し、分解あるいは変形してクロロホルムよりはむしろ酢酸溶液へ溶けるようになり、それがさらに緩やかな反応によって過剰に存在する TBA と反応して黄色色素を生じたものと考えられる。発色の本体である分子の大きさはおそらく赤色色素を生ずるというマロンアルデヒドよりも分子の大きなアルデヒドであろう (2・6 参照)。リノール酸の場合はヒドロペルオキシドの分解に際しそのような中間体が生ずる可能性は多く (二重結合が 2 つで最初の生成物はモノヒドロペルオキシドであり、分解に際して途中で切れる可能性が高い¹⁷⁾)、リノレン酸においては分解が急激で

(二重結合が 3 つのため分解物が更に酸化分解を受けやすい)、一気に低分子のものとなり、中間体が得られ難いと想像される。実際、リノール酸メチルとサフラワー油の酸化に際して黄色色素の出現が顕著であり、リノレン酸、大豆油の酸化に際してその量の少ないことから示唆される場所である。さらに黄色色素が MLHPO から生ずることからも Fig.-10 のような図式が描かれる。

なお、酸化油脂と TBA との加熱に際し、新たな油脂の酸化が進行し、過大な値を与えるとして、抗酸化剤、BHA を添加する方法⁹⁾が提案されているが、上記実験結果は、それとは反対に、加熱中に呈色物質が減少することを意味しており、 Na_2SO_3 添加下での反応においては、呈色度がかえって増大した (532 nm) のである。これは呈色物質であるアルデヒド (一応マロンアルデヒドとしておく) が加熱中に一部酸化して減少するためと考え得るであろう。なお、ここでの Na_2SO_3 添加の効果は、この塩が有機化合物に対して直接還元的に作用するほど強力ではないことから、呈色分子に直接働いたとは考え難い。そこで一つにはこの塩の酸素除去効果¹⁹⁾が考えられるが、一つには酸性下 HSO_3^- のアルデヒドとの選択的 (マロンアルデヒドは妨害されない) コМПレックス形成²⁰⁾も無視しえないであろう。

Fig.-10 に提案した X, Y の構造は未同定であるが、ヒドロペルオキシドよりの二次生成物中の X は TBA 反応後直ちには呈色せず、時間の経過とともに黄色色素を生ずることから、いったん加熱操作により Y となったのち室温中で徐々に TBA と反応して黄色色素を生ずる。分画精製したヒドロペルオキシドと TBA とを加熱すると無色であるが、X が生じており、更に放置することにより (Y を経て) 呈色する。X, Y の本体については今後の課題として残される。

なお、ここに提案したものは、精製した脂肪酸またはトリグリセリドを用いた場合にのみいえることであって、食品中の脂質に適用する場合には、糖類なども存在するので、さらに別の要因も考慮する必要がある。

ガスクロマトグラフィーについては食糧科学研究所技官 泉谷定男氏の労をわずらわした。ここに謝意を表する。

(昭和 49 年 7 月 31 日受理)

文 献

- 1) A.W. Dox, G.P. Plaisance, *J. Amer. Chem. Soc.*, **38**, 2156, 2164 (1916)
- 2) F. Bernheim, M.L.C. Bernheim, K.M. Wilbur, *J. Biol. Chem.*, **174**, 257 (1948)
- 3) 大藪, 太田, 油化学, **18**, 699 (1969)
- 4) C.G. Sidwell, H. Salwin, M. Benca, J.H. Mitchell Jr., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **31**, 603 (1954)
- 5) B.G. Tarladgis, B.M. Watts, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **37**, 44 (1960)
- 6) A. Ottolenghi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 355

Fig.-10 Possible mechanism of the development of color in TBA method.

- (1959)
- 7) G.A. Jacobson, F.A Kirkpartick, H.E. Goff, Jr., *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **41**, 124 (1964)
- 8) T.C. Yu, R.O. Sinnhuber, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **44**, 256 (1967)
- 9) A.J. de Koning, M.H. Silk, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 165 (1963)
- 10) S. Patton, G.W. Kurtz, *J. Dairy Sci.*, **34**, 669(1951)
- 11) R.O. Sinnhuber, T.C. Yo, T.C. Yu, *Food Res.*, **23**, 626 (1958)
- 12) N.L. Smith, I.J. Tinsley, E.C. Bubl, *Food Technol.*, **14**, 317 (1960)
- 13) 天野, 食衛誌, **7**, 334 (1966)
- 14) S. Patton, *Food Res.*, **25**, 554 (1960)
- 15) F. Feigel, E. Libergott, *Anal. Chem.*, **36**, 132(1964)
- 16) T.C. Yu, R.O. Sinnhuber, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **41**, 540 (1964)
- 17) J. Terao, T. Ogawa, S. Matsushita, *Agr. Biol. Chem.*, 印刷中
- 18) B.D. Sully, *Analyst, London*, **79**, 86 (1954)
- 19) “分析化学辞典” p. 51 (1971), 共立出版
- 20) 川城, 藤井, 岩尾編, “新版食品添加物”, p. 70 (1973), 恒星社厚生閣
-