不飽和度の異なるトリグリセリド中におけるトコフェロールの熱酸化による二量体の生成 (第2報)^{*1)}

γ -トコフェロールからジフェニルエーテル型 及びビフェニル型二量体の生成

藤 谷 健・安 藤 久 子

広島大学教育学部福山分校 (福山市緑町 2-17)

Oxidative Dimerization of Tocopherols during the Course of Thermal Oxidation of Saturated and Unsaturated Triglycerides. II.

Formation of 5-(γ -tocopheroxy)- γ -tocopherol and 5-(γ -tocopherol-5-yl)- γ -tocopherol from γ -Tocopherol

Tsuyoshi FUJITANI and Hisako ANDŌ

Fukuyama Branch School, Faculty of Education, Hiroshima University (2-17, Midorimachi, Fukuyama)

d - γ -Tocopherol (γ -Toc), which was dissolved in saturated and unsaturated triglycerides, was oxidized in air. Experimental conditions were the same as those described in Part I of this series. After the oxidation of γ -Toc in trilaurin at 180°C for 10 h, the reaction mixtures were separated by chromatography on a silicic acid column eluted with n -hexane-diethyl ether mixtures and three main products were isolated (**Table-1**). Products [I] and [III] were identified as the dimers of γ -Toc, 5-(γ -tocopheroxy)- γ -tocopherol (γ -TED) and 5-(γ -tocopherol-5-yl)- γ -tocopherol (γ -TBD), respectively, by means of UV absorption, IR absorption, NMR and MS spectroscopy (**Table-2**). These compounds were also confirmed by TLC and HSLC (**Figs.-1** and **2**). Product [II] was confirmed as the atropisomer of γ -TBD only by TLC and HSLC, for this compound could not be satisfactorily purified by chromatographic techniques.

The oxidative dimerization of γ -Toc during the course of thermal oxidation in trilaurin (Tri-La), in triolein (Tri-Ol) and in trilinolein (Tri-Li) was followed by HSLC. The concentrations of these dimers in reaction mixtures increased with the oxidation time, and reached maximum by the oxidation for 5 h. The quantities of formed γ -TED were greatly affected by the species of triglyceride molecules and were in the order of Tri-La>Tri-Ol>Tri-Li (**Fig.-5**), but the difference between the amount of γ -TBD formed in Tri-La and those in Tri-Li was not so remarkable (**Fig.-6**). This fact shows that the phenoxy radical of γ -Toc is more stable in saturated triglyceride than in unsaturated one under the condition of thermal oxidation.

1 緒 言

著者らは、油脂を空气中で加熱した場合に油脂中に含まれている抗酸化性物質であるトコフェロール類が熱酸化を受ける反応のモデルとして、合成トリグリセリド中にトコフェロール類を加えて熱酸化を行い、生成物のうち特にトコフェロール二量体類の生成について検討を続けている。そして、前報¹⁾においては α -トコフェロールからエタン型二量体の生成を認め、その生成量は酸化5hではほぼ一定値に達すること、及び飽和トリグリセリ

ド中における酸化の場合は不飽和トリグリセリド中における酸化の場合に比較して二量体の生成量が多いことを見いだした。しかし、このような熱酸化による二量体生成の傾向がトコフェロール同族体について一般的なものであるかどうかについては検討しなかった。

γ -トコフェロールの酸化に伴う二量体の生成については既にいくつかの報告があり、McHale ら²⁾は p -ベンゾキノンを用いて酸化することによってジフェニルエーテル型の二量体 (構造式は **Fig.-3**) の生成を認めており、この化合物は天然にも、綿実油脱臭留出物³⁾、大豆油³⁾、とうもろこし油⁴⁾、大豆油脱臭留出物³⁾中にもその存在が

^{*1)} 前報 油化学, 26, 337 (1977)

知られている。また、ビフェニル型二量体(構造式は Fig.-3) もとうもろこし油⁷⁾、大豆油脱臭留出物⁸⁾ 中にその存在が知られている。そして、トコフェロールの側鎖のイソプレノイド基をメチル基に代えたモデル化合物を用いた研究などから、これら二量体類の生成経路についての考察も行われている⁹⁾。最近、石川ら⁷⁾は、 γ -トコフェロールとトリメチルアミノオキシドを流動パラフィン中で 180°C で反応させ、ビフェニル型二量体の 2 つの異性体及びジフェニルエーテル型二量体の生成を報告している。

しかし、 γ -トコフェロールを加熱下に空気酸化したときの二量体の生成についての報告は少なく、清野ら⁸⁾ がパルミチン酸銅を触媒としてキシレン中で γ -トコフェロールを空気酸化し、数種の二量体と思われる物質の生成を認めた報告、及び湯木ら⁹⁾ が流動パラフィン中で γ -トコフェロールを熱酸化して二量体類を得た報告がある程度で、油脂中における酸化のモデルとなるようなトリグリセリド中における酸化や、生成する二量体の定量的取り扱いなどは全く行われていない。

そこで著者らは、前報の α -トコフェロールに引き続き、 γ -トコフェロールを飽和及び不飽和トリグリセリド中で熱酸化し、その生成物を分離同定するとともに、その生成経過を高速液体クロマトグラフィー(HSLC)で追跡した。その結果、 γ -トコフェロールの熱酸化によってジフェニルエーテル型二量体である 5-(γ -tocopheroxy)- γ -tocopherol 及びビフェニル型二量体である 5-(γ -tocopherol-5-yl)- γ -tocopherol (2 種の立体異性体とも) が生成することを確認し、その生成に及ぼす反応温度やトリグリセリドの不飽和度の影響などについて検討し、いくつかの知見を得たので報告する。

2 実 験

2.1 実験材料

2.1.1 d - γ -トコフェロール (γ -Toc)

γ -Toc はエーザイ株式会社製の天然トコフェロールミックスから、ケイ酸カラムクロマトグラフィーを繰り返して、分離、精製し、TLC で唯一のスポットを与え、HSLC で唯一のピークを示すものを実験に用いた。

2.1.2 トリグリセリド

トリラウリン (Tri-La) 及びトリリノレイン (Tri-Li) は前報¹⁾と同じものを用いた。トリオレイン (Tri-Ol) は半井化学製の市販試薬を、使用直前に Tri-Li と同じ方法で精製してから使用した。

2.2 実験方法

2.2.1 熱酸化

前報の α -Toc の場合と同様に、トリグリセリドに γ -Toc を 5% になるように加え、小試験管に入れて比表面積 0.5 cm²/g で、150±1°C または 180±1°C で所定の時

間加熱した。

2.2.2 酸化生成物の分離と確認

熱酸化反応終了後、反応物を前報と同じ方法でけん化して不けん化物を採取し、ケイ酸カラムクロマトグラフィーによって γ -Toc の酸化生成物を分離した。酸化生成物の確認のための UV, IR, NMR, MS スペクトルの測定は、前報と同じ方法によった。

2.2.3 HSLC による γ -Toc 及び二量体の定量

HSLC は別報¹⁰⁾の方法によった。未反応 γ -Toc の定量のためには *n*-ヘキサン (H)-ジイソプロピルエーテル (IPE) 99:10、ジフェニルエーテル型二量体及びビフェニル型二量体 (TLC の R_f 値の高い方の異性体) については H-IPE 98:2、ビフェニル型二量体 (TLC の R_f 値の低い方の異性体) については H-IPE 95:5 の移動相を用いた。

3 結 果

3.1 γ -Toc 熱酸化生成物の TLC 及び HSLC

Tri-La 中及び Tri-Li 中で γ -Toc を、180°C、10 h 熱酸化したもの、の不けん化物として得られた反応混合物の TLC を Fig.-1 に示す。この図からわかるように、Tri-La 中で酸化したものは A~D の 4 個のスポットを、Tri-Li 中で酸化したものは A~E の 5 個のスポットを与え、このうち A~D の 4 個のスポットは Emmerie-Engel 試薬に陽性で、これらの物質は還元性のフェノール性水酸基を有する化合物と考えられる。そして、これらのスポットは、同時に展開した既知の γ -Toc (スポット A) 及びその二量体 5-(γ -tocopheroxy)- γ -tocopherol

Fig.-1 TLC separation of reaction mixture after the oxidation of d - γ -tocopherol with air in tri-laurin and in trilinolein at 180°C, for 10 h.

(γ -TED)^{*2)} (スポット D), 5-(γ -tocopherol-5-yl)- γ -tocopherol の2つのアトロプ異性体 (γ -TBD (H) 及び γ -TBD (L))^{*3)} (スポット C 及び B) のスポットとの比較から, これらの化合物であろうと推定した。

スポット E は紫外線の下で顕著なけい光を発し, かつまた Emmerie-Engel 試薬に陰性で, 硫酸を噴霧して加熱すると特徴的な青色を呈した。このスポットは, Tri-La 中における γ -Toc の酸化生成物中にはほとんどその存在を認めることができず, かつ, Tri-Li のみを同じ熱酸化条件下で処理した場合, 及び Tri-Li 中で α -Toc を熱酸化した場合には全く生成しなかったで, この物質は γ -Toc の Tri-Li 中における熱酸化という条件下においてのみ生成する非還元性化合物と考えられる。

上記の反応混合物の HSLC の結果を Fig.-2 に示す。図のうち [A] は Tri-La 中で酸化したものを H-IPE 90:10 で溶出した場合のクロマトグラムで, 未反応 γ -Toc の大きなピークの外に, 保持時間の極めて短いところに酸化生成物と思われる2つのピークが認められるが, これからは反応生成物を推定することはできない。そこで, これらの酸化生成物のピークを分離させるため, 移動相中の IPE の濃度を低くしてクロマトグラフィーを行った。[B-1] 及び [B-2] は H-IPE 98:2 の移動相を用いた場合のクロマトグラムである。[B-1] に示した Tri-La 中における酸化生成物からは, γ -TED 及び γ -TBD (H) と思われるピーク (既知試料のクロマトグラムとの比較により確認) が認められた。一方, [B-2]

Sample	Mobile phase (H-IPE)
[A] Reaction mixture (oxidized in trilaurin)	90 : 10
[B-1] Reaction mixture (oxidized in trilaurin)	98 : 2
[B-2] Reaction mixture (oxidized in trilinolein)	98 : 2
[C] Reaction mixture (oxidized in trilaurin)	95 : 5
[D] Spot E shown in Fig.-1 (This product was separated by preparative TLC from the reaction mixture obtained by the oxidation of γ -Toc in trilinolein.)	98 : 2

Operating conditions:
 Instrument: Hitachi 635 High-speed liquid chromatograph
 Column packing: Hitachigel #3040, 2.1×500 mm
 Detector: UV photometer, 295 nm
 Flow rate: 1.0 ml/min

Fig.-2 High-speed liquid chromatograms of oxidized d - γ -tocopherol.

*2) この化合物については, 従来 γ -tocopherol diphenyl ether dimer という名称が慣用されているので, このような略号を用いた。構造式は Fig.-3 に示した。

*3) この化合物については, 従来 γ -tocopherol biphenyl dimer という名称が慣用されているので, このような略号を用いた。両異性体の区別は, TLC の R_f 値の高いもの (H) と低いもの (L) によって示した。構造式は Fig.-3 に示した。

に示した Tri-Li 中における酸化生成物では, γ -TBD (H) と思われるピークの大きさは Tri-La 中における酸化生成物の場合と同程度であるが, γ -TED と思われるピークが Tri-La 中における酸化生成物に比べて非常に小さくなっている反面, その前に帰属不明のピークがみられた。この帰属不明のピークと TLC におけるスポット E の関係をみるために, Tri-Li 中において酸化した反応混合物を TLC にかけて, 溶媒先端部のスポットをかき取って溶出し, これを HSLC にかけたところ, **Fig.-2** [D] にみられるように, このピークに一致した。

γ -TBD (L) の確認のためには, 移動相に H-IPE 95:5 を用い, 試料注入量を 10 倍にして HSLC を行った。そのクロマトグラムが **Fig.-2** [C] で, 他の生成物と同様に既知試料との比較から推定した。

Fig.-3 Structure of material and oxidation products.

以上の結果から, γ -Toc を飽和トリグリセリド中で熱酸化すると, 主酸化生成物は γ -TED, γ -TBD (H) 及び γ -TBD (L) であり, 不飽和トリグリセリド中で熱酸化した場合は, これら二量体類のほかに非還元性物質も生成することが推定された。また, 反応温度を下げて, 150°C で酸化したときの生成物は, TLC 及び HSLC でみた限りでは, 180°C 酸化の場合の生成物と定性的な差は認め

られなかった。

3.2 酸化生成物の確認

酸化生成物の分離確認のため, γ -Toc を Tri-La 中で 180°C, 10 h 酸化し, それをけん化して得たけん化物 0.556 g を, ケイ酸を固定相とし, n -ヘキサン-エチルエーテルを溶媒としたカラムクロマトグラフィーによって分離した。その結果, **Table-1** に示すような 4 成分が得られたが, 生成物 [I] と [II] は十分に分離しなかった。そこでこのフラクションを TLC で展開し, 板上からかき取って溶出させ, 両者をできるだけ純粋になるように分離した。[I] については純粋な状態で分離できたが, [II] は量的にも少なく, 完全に [I] が混入しない状態まで精製することができなかった。次にこれら各フラクションの TLC を行ったところ, [I] は **Fig.-1** のスポット D に, [II] はスポット C に, [III] はスポット B に, [IV] はスポット A に相当する物質であった。また, これら生成物の HSLC の結果も, **Fig.-2** の各ピークと一致した。

以上のクロマトグラフィーの挙動から, 生成物 [IV] は未反応 γ -Toc であることがわかったが, その他の酸化生成物については以下のようにして同定した。

Table-1 Separation of the unsaponifiable matter from the reaction mixture obtained by the oxidation of d - γ -tocopherol in trilaurin by silicic acid column chromatography.

Product	Solvent		Yield (mg)
	n -Hexane	Diethyl ether	
I and II	98	2	59.0
III	95	5	8.4
IV	90	10	414.5

The quantity of the unsaponifiable matter used in this experiment was 556 mg.

Table 2 Properties of the dimers separated from the oxidation products of d - γ -tocopherol.

Compound	Product [I]	Product [III]
	5-(γ -Tocopheroxy)- γ -tocopherol	5-(γ -Tocopherol-5-yl)- γ -tocopherol
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$, nm(ϵ)	293 (2930)	300 (6180)
IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CCl}_4}$, cm^{-1}	3580 (OH)	3550 (OH)
NMR δ	5.94 (1H, s, Ar-H)	4.22 (2H, s, OH)
	4.53 (1H, s, OH)	2.12 (6H, s, CH_3)
	2.29 (3H, s, CH_3)	2.09 (6H, s, CH_3)
	2.16 (3H, s, CH_3)	
	2.10 (3H, s, CH_3)	
	2.06 (3H, s, CH_3)	
MS m/e	830 (M^+), 603, 431, 416, 400	830 (M^+), 603, 416, 415
TLC R_f (n -Hexane-Diethyl ether 90:10)	0.74	0.38

生成物 [I] と [III] はともに黄かっ色、粘ちゅうな物質で、これについて UV, IR, NMR, MS スペクトルを測定した。その結果は Table-2 にまとめて示した。これを Nilsson¹⁾ら及び石川²⁾の文献値を参考にして検討した結果, [I] は γ -TED, [III] は γ -TBD (L) であることがわかった。また生成物 [II] は, 既知の γ -TBD (H) と完全に同じクロマトグラフィー的挙動を示すこと, 及び還元性を示すことなどから, γ -TBD (H) と同定した。

γ -Toc を Tri-Li 中で熱酸化したときに生ずる非還元性生成物 (Fig.-1 のスポット E) についても, これを TLC 板上からかき取って溶出して分離したが, これは単一の化合物ではないようであった。ただしこの物質は MS で 600 以上にピークを示さないことから, γ -Toc の二量体ではない。

3.3 二量体の生成に及ぼすトリグリセリドの不飽和度及び加熱温度の影響

γ -Toc の熱酸化に伴う主生成物であるところの γ -TED, γ -TBD (H) 及び γ -TBD (L) の経時的生成過程及びその生成に及ぼすトリグリセリドの不飽和度の影響をみるために, Tri-La, Tri-Ol 及び Tri-Li 中で γ -Toc を熱酸化し, 二量体類の生成を HSLC によって経時的に追跡した。

Fig.-4 Change in d - γ -tocopherol concentration during the course of thermal oxidation in saturated and unsaturated triglycerides.

Fig.-4 は未反応 γ -Toc の量を示したもので, いずれの場合も 180°C で酸化すると 150°C で酸化したときよりも γ -Toc の減少が速く, かつ不飽和度の高いトリグリセリド中における方が γ -Toc の酸化分解は著しかった。

Fig.-5 は熱酸化に伴う γ -TED の生成経過を示したもので, γ -TED はいずれの条件下においても酸化の初期に急激に増加し, 酸化時間 5 h くらいでほぼ一定値に達し, その後の変化は少なく, このくらいの時間で二量体の生成と分解がほぼ平衡するようと思われる。これは, 前報¹⁾に示したところの, α -Toc の酸化によって生ずる

Fig.-5 Change in γ -TED content during the course of thermal oxidation of d - γ -tocopherol in saturated and unsaturated triglycerides.

α -TED の消長とよく似た傾向である。また, γ -TED の生成量はトリグリセリドの不飽和度によって大きく異なり, Tri-La 中においてはかなり大量に生成するのに, Tri-Li 中における生成量は極めて少なく, Tri-Ol 中においてはその中間くらいの生成量である。このことは, 生成した γ -TED は不飽和トリグリセリド中における方が更に酸化分解を受けやすいことを示唆している。また, 同じトリグリセリド中における熱酸化においては, 酸化温度が 180°C と 150°C の場合を比較してみたところ, γ -TED の生成量に関する限りではそう顕著な差はみられなかった。

γ -Toc の熱酸化によって生成するもうひとつの二量体であるところの γ -TBD の 2 つの異性体の生成経過を, Fig.-6 に示した。これらの化合物の生成経過は, 熱酸化

Fig.-6 Changes in γ -TBD(H) and γ -TBD(L) contents during the course of thermal oxidation of d - γ -tocopherol in saturated and unsaturated triglycerides.

初期に急激に増加し、以後の変化が比較的少ない点では、いずれも γ -TED の場合と同様である。そして、Tri-La 中における γ -TBD の生成量は (H), (L) 両異性体とも γ -TED に比べて非常に少なく、双方を合わせても γ -TED の生成量に及ばない。しかし、 γ -TBD は γ -TED と異なり、トリグリセリドの不飽和度による生成量の差が少なく、 γ -TED の生成の少ない Tri-Li 中における酸化では、 γ -TED と同量あるいはそれ以上に生成している。

Fig.-7 Change in carbonyl value of triglycerides during the course of thermal oxidation.

熱酸化に伴うトリグリセリドの変質の程度をカルボニル価からみたのが Fig.-7 で、 α -Toc の場合と同様に、 γ -Toc の存在下においては、飽和トリグリセリドである Tri-La は、Tri-Li に比べて著しく熱酸化を受け難いことがわかった。

4 考 察

トリグリセリド中で γ -Toc を熱酸化するとき、その酸化されやすさはトリグリセリドの不飽和度や反応温度によって異なっているが、いずれの場合も前報¹⁾に示した α -Toc の場合に比べて著しく、 γ -Toc は α -Toc に比べて酸化されやすいことがわかる。これは、各種のトコフェロール同族体をミリスチン酸メチル及びリノール酸メチルに加え、自動酸化条件下において酸化されやすさを比較した Lehmann ら¹¹⁾の結果とも一致している。

トリグリセリド中で γ -Toc が熱酸化したとき生成する二量体は、 γ -TED 及び γ -TBD であるが、これら生

成物の反応系内における蓄積量が 5~10 h ではほぼ一定になることから、これくらいの酸化時間で、その生成と分解の速度がほぼ等しくなるものと考えられる。このことは、前報に示した α -Toc から生成する α -TED の場合と同じである。

飽和トリグリセリドである Tri-La 中においては、 γ -TED がかなり大量に生成し、 γ -TBD は比較的少量しか生成しない。Nilsson ら⁹⁾によると、トコフェロール類の酸化に際しては、まずフェノール性ヒドロキシル基の水素がラジカル的に引き抜かれてフェノキシラジカルが生成し、これがフェニルラジカルに転位するとされており、Tri-La 中で γ -TED の生成量が多いということは、この条件下ではフェニルラジカルに比べてフェノキシラジカルがより安定に存在するというを示している。一方、Tri-Li のような不飽和トリグリセリド中においては、 γ -TED の生成量が著しく減少する反面、 γ -TBD の生成量は Tri-La 中における酸化の場合とそう変わらない。すなわち、 γ -TED は、熱酸化条件下では、飽和トリグリセリド中における方が生成しやすく、これは前報の α -TED の場合と同じ傾向にある。

本研究に用いたトコフェロールを提供して頂いたエーザイ株式会社には厚くお礼申し上げます。また MS の測定をお願いした広島大学理学部の中山 充博士と江口鎮子さんに心から感謝の意を表します。

(昭和 52 年 8 月 11 日受理)

文 献

- 1) 藤谷 健, 安藤久子, 油化学, **26**, 337 (1977)
- 2) D. McHale, J. Green, *Chem. Ind. (London)*, **1963**, 982
- 3) M. Komoda, I. Harada, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **46**, 18 (1969)
- 4) J.L.G. Nilsson, G.D. Daves Jr., K. Folkers, *Acta Chem. Scand.*, **22**, 200 (1968)
- 5) 清野 肇, 渡辺昭一郎, 阿部芳郎, 油化学, **20**, 218 (1971)
- 6) J.L.G. Nilsson, G.D. Daves Jr., K. Folkers, *Acta Chem. Scand.*, **22**, 207 (1968)
- 7) Y. Ishikawa, E. Yuki, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 851 (1975)
- 8) 清野 肇, 河田幸子, 渡辺昭一郎, 阿部芳郎, 第 14 回油化学討論会・研究発表会講演 (1975)
- 9) 湯木悦二, 石川行弘, 第 14 回油化学討論会・研究発表会講演 (1975)
- 10) 藤谷 健, 油化学, **25**, 860 (1976)
- 11) J. Lehmann, H.T. Slover, *Lipids*, **11**, 853 (1976)