報 文

粗製綿実油の酸化安定性について

綿実の成熟度及び保存期間とその抽出油の酸化安定性

梶本五郎・吉田弘美・芝原 章・山庄司志朗

神戸学院大学栄養学部 (神戸市垂水区伊川谷町有瀬)

Oxidation Stability of Crude Cottonseed Oils

Effect of Maturity and Storage Period of Cottonseed on the
Oxidation Stability of Extracted Oils

Corō KAJIMOTO, Hiromi YOSHIDA, Akira SHIBAHARA and Shirō YAMASHŌJI

Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University (Arise, Ikawadani, Tarumi-ku, Kobe)

Oxidation stability of extracted oils from cottonseeds of various stages of maturity and storage period was investigated. According to experimental results, it was confirmed that the oxidation stability of the extracted oil from mature cottonseeds was higher than that from immature cottonseeds. After one and two years of storage, the extracted oils from those cottonseeds had the oxidation stability lower than that from immature cottonseeds which were harvested directly. Antioxidative components of crude cottonseed oil and were identified as tocopherols, gossypol, carotenoides and peptide-like substances by TLC.

1 緒 言

食用油脂の酸化安定性に及ぼす変動要因は既報¹⁾で述べたように非常に多く、その一つに搾油原料の問題がある。すなわち、搾油種子の産地、気候²⁾、栽培法、農薬³⁾及び除草剤⁴⁾の使用有無、収穫期⁵⁾ならびに保存条件⁶⁾などにより搾油油脂の酸化安定性は異なる。これら変動要因の内、安定性に最も大きく影響するものとして未熟種子⁷⁾ならびに損傷を受けた種子は、そうでない種子から得た油脂に比べ酸化安定性の劣ることが知られている^{8)~13)}。また、搾油油脂の精製処理有無とその安定性では粗原油の方が精製油よりも酸化安定性の高いことが報告されている^{14)~16)}。同時に粗原油の酸化安定性が非常に高いことから原料ならびに粗原油中の酸化防止成分の検索が盛んに研究されている。しかしながら、検索同定した酸化防止成分は概して高度不飽和脂肪酸を多く含む植物油脂の酸化安定性の向上にそれほど大きな効果はなく、より有効な成分の検出が望まれると共に、酸化防止成分の有効な組み合わせが必要である。

先に著者らは大豆¹⁷⁾、とうもろこし¹⁸⁾、落花生¹⁹⁾、綿実^{20)~22)}の成熟過程における脂質成分、トコフェロール (Toc) 及びゴシポールの量 (綿実のみ) の変動を調べ、脂質の変動と Toc の酸化防止作用との関連性を報告し、

あわせて種子中における Toc 及びゴシポールの生合成と種子中での存在意義について若干の検討を加えてきた。ところで、種子中の Toc 量は種子の品質 (未熟、完熟及び過熟種子)、産地、品種などにより異なり、また、保存期間が長くなると減少することが知られている。そこで、種子中の Toc 含有量及び Toc の減少量が粗原油の酸化安定性にどの程度影響するのかわかるため、今回は綿実をとりあげ、品質及び保存期間の異なる綿実から得た粗原油の酸化安定性を調べ、あわせて粗製綿実油中の酸化防止成分の検索を行い、二、三の知見を得たので、その結果を報告する。

2 実 験

2.1 試料

2.1.1 未熟、完熟及び過熟綿実

未熟、完熟及び過熟種子を得るために、昭和 53 年度本学農場で栽培し得られた綿実「*Gossypium hirsutum* L.」を本年 (昭和 54 年) も引き続き前報²²⁾ 同様の方法に準じて播種育成した。7 月 29 日より開花し、さく [蒴 (果実)] は開花後 (以後省略する) 10 d 目から急激に肥大し、55 d 前後にさくが裂け綿繊維が現れた (以後これをさく裂時と称する)。既報の実験から 65 d 目を完熟とした。酸化安定性試験の試料として 50 d 目 (I、

さく裂前)とさく裂後 10 d 目 (Ⅱ)及び 65 d 目 (Ⅲ, 便宜的に過熟種子と称する)の綿実を採取し, 直ちに脂質を抽出し, 抽出油の一般性状と酸化安定性の試験を行った。

2・1・2 保存期間の異なる綿実

54, 53 及び 52 年度産の完熟種子, すなわち保存期間 0 (Ⅱ), 1 年 (Ⅱ B) 及び 2 年 (Ⅱ E)の綿実を用いた。

保存条件は直射日光の当たらない場所に設置した大型恒温箱 (温度 $15 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 60~65%) に綿実を瓶に詰めた状態で保存した。なお, これらの綿実は収穫直後²⁰⁾, ²¹⁾と 2 年保存綿実は保存 1 年目に脂質を抽出し, その一般性状及び脂肪酸組成を求めておいた。

2・2 脂質の抽出と性状

前報同様, 各綿実を磨砕後, これにクロロホルム-メ

Table-1 Characteristics of cottonseed and their oil at various stages of maturity and storage period.

Crop year		1979			1978		1977		
Days after flowering (d)		50	65	120	65		65		
Storage period (mon)		0	0	0	0	12	0	12	24
Experiment division		I	II	III	II A ²¹⁾	II B	II C ²⁰⁾	II D	II E
Water contents (%)		50.7	10.5	10.3	10.4	10.1	11.6	10.2	10.2
Lipid contents (% of wet weight)		12.8	24.7	25.6	25.1	24.0	25.0	24.1	24.2
Weight lipid in seed (mg)		26.0	24.2	24.1	26.5	24.0	27.0	24.8	24.6
Lovibond color ^{a)}	R	2.0	3.0	3.4	2.5	7.0	3.0	7.7	9.0
	Y	0.5	1.0	1.0	0.7	0.5	0.7	0.7	0.7
	B	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.4	0.5
Tocopherol contents ($\mu\text{g/g}$ oil)	α	15 ^{b)}	188 ^{b)}	201 ^{b)}	277 ^{c)}	196 ^{b)}	297 ^{b)}	—	192 ^{c)}
	γ	558	487	235	204	174	213	—	126
	δ	3	4	Tr.	21	22	6	—	Tr.
Total-Toc		576	679	436	502	392	516	—	318
Gossypol contents ($\mu\text{g/g}$ oil)		132	72	60	67	60	62	—	60
Metal contents ²³⁾ (ppm)	Cu	3.6	2.5	0.6	—	0.4	—	—	0.6
	Fe	7.1	3.5	2.9	—	3.8	—	—	1.3
POV ^{d)} (meq/kg)		10.9	3.3	4.0	3.0	17.9	2.1	15.2	23.4
AV		0.3	0.3	0.4	0.3	0.5	0.3	0.4	0.5
COV ^{e)} (meq/kg)		92.0	91.7	71.8	66.5	77.3	68.9	71.6	74.1

a): Lovibond tintometer 133.4 mm ($5\frac{1}{4}$) cell.

b): Measured by high performance liquid chromatography.

c): Measured with spectrophotometric method at 534 nm by bathophenanthroline- FeCl_3 -orthophosphoric acid procedure.

d): POV, peroxide value was determined using conventional iodometric titration with thiosulfate.

e): COV, carbonyl value was determined by the method of Kumasawa²⁴⁾.

Tr.: trace.

Table-2 Fatty acid composition in extracted oils from cottonseed at different maturation and storage period.

Experiment division ^{a)}	I	II	III	II A	II B	II C	II D	II E
Fatty acid (%)								
12:0	1.4	1.1	0.9	1.0	1.1	1.5	1.4	0.6
16:0	31.3	28.4	26.1	28.1	27.5	25.5	26.3	24.9
16:1	1.2	0.9	0.8	0.8	1.2	Tr.	0.8	0.7
16:2	—	—	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.
18:0	1.6	1.7	1.8	1.7	2.1	2.6	1.7	1.9
18:1	14.2	13.1	15.1	15.8	15.1	16.4	15.9	15.1
18:2	47.9	53.3	53.9	51.8	51.6	53.0	52.7	55.5
18:3	0.2	0.1	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.	Tr.
20:0	0.3	0.2	0.2	Tr.	0.1	Tr.	Tr.	Tr.
T-Cp FA ^{b)}	2.0	1.2	1.1	0.8	1.2	1.0	1.2	1.1
18:1/18:2	0.29	0.25	0.28	0.31	0.29	0.31	0.30	0.27

a): For abbreviation, see **Table-1**.

b): Total cyclopropane and cyclopropene fatty acids. Tr.: trace.

タノール (2:1, vol/vol) を加えホモジナイズして常法により脂質を反復抽出後、水洗、脱水して総脂質を得た。それぞれ綿実の一般性状及び脂肪酸組成を **Table-1, 2** に示す。**Table-1** の高速液体クロマトグラフィーによる Toc の定量は、島津 LC-3 A, カラムは Zorbax SIL (4.6 mm×25 cm), 移動相はヘキサン-ジオキサン-エタノール (490:10:1, vol/vol/vol), 流速 1.5 ml/min, 検出波長 295 nm, チャートスピード 2.5 mm/min, クロマトピークの面積の重量を測り, 各 Toc の検量線から算出した。各 Toc はエーザイ株式会社からの提供品で, いずれもこれらの純度はガスクロマトグラフィーにより 97% 以上であった。**Table-2** の環式脂肪酸の定量は, 既報²¹⁾同様, Johnson の方法に準じて求め, 総環式脂肪酸量として表に示した。

2.3 カラムクロマトグラフィーによる粗原油成分の分別

あらかじめ使用前に 50% メタノール水溶液で数回傾斜法で洗浄したクロマト用活性アルミナ (メルク製品) を風乾後, 120°C で 3 h 加熱乾燥したものを 2×60 cm のガラスカラムに気泡がでないようにヘキサン溶液とともに 20 cm ほどの高さに充てんし, 少量のヘキサンに溶解した完熟種子から得た粗製綿実油 (II) 3 g を負荷した。200 ml のヘキサンで溶出, 続いてエーテル, メタノール, クロロホルム, アセトンの順にそれぞれ 200 ml ずつで溶出した。各溶出液はロータリエバポレーターで溶剤を回収してから残分の量を求め, さらに酸化防止力試験ならびに酸化防止成分の検索に供した。

2.4 酸化防止成分の検索

2.4.1 薄層クロマトグラフィーによる検索

2.3 の方法で得た各溶出物についてシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) で, **Table-3** に示す溶剤で展開後, それぞれの発色剤を用い, 色素ならびに酸化防止成分の同定を試みた。

2.4.2 ペーパークロマトグラフィーによるペプチド及びアミノ酸の検索

各溶出物を No 50 東洋汙紙にスポットし, 1-ブタノール-酢酸-水 (4:1:2), あるいは水飽和 1-ブタノールで展開後, ニンヒドリン呈色を行った。発色色調が紫色に近いことからペプチドと思われたので, 塩素-ヨードデンプン反応²²⁾を試み青紫色のスポットを得た。ペプチドであることが確認されたので, 発色部分 (発色前のもの) を切りとり, 水飽和 1-ブタノールで数回抽出を行った。各回の抽出液を集め, エバポレーターで溶剤を除去後, 6 N 塩酸を用い, 100°C で 5 h 加水分解した。次いで塩酸を完全に飛散させた後, 残分に 20% エタノール水を加え, 再度ペーパークロマトグラフィーでニンヒドリン呈色によるアミノ酸の同定を行った。

3 粗製綿実油の酸化安定性ならびに酸化防止成分の抗酸化性試験

3.1 粗製綿実油の酸化安定性試験

未熟, 完熟, 過熟綿実及び保存期間の異なる綿実から **2.2** の方法で得た粗製綿実油の酸化安定性を重量法試験 (径 45 mm のガラス製シャーレに試験油を 1±0.01 g はかり取り, 60±1°C 電気恒温器中に静置)²³⁾で行い, 0.5% 重量増加する点を求め日数で表した。

3.2 酸化防止成分の抗酸化性試験

粗製綿実油中に確認できた成分の抗酸化性試験のために, 入手したトコフェロール (α -, γ -, δ -Toc, 15:45:25 の混合 Toc), ゴシポール (シグマ製のゴシポール酢酸を遊離型にしたもの) 及びペプチド [Gly-Gly, Gly-Leu, タンパク質研究奨励会 (大阪) より購入] などを用い, それぞれ少量のエタノールに溶解し, 単一あるいは各種の割合で混合したものを酸化防止剤無添加の精製豚脂 (植田製油株式会社より譲り受け) ならびに精製綿実油 (半井化学薬品株式会社より購入) に添加し, よくかくはん後, 重量法試験とオープン試験²⁴⁾を行い, 2, 4, 6, 8, 10 d 目に油脂の過酸化値 (POV) を測定し, その酸化曲線より抗酸化力を比較した。結果は 10 d 目の POV を示した。なお経目的にはすべての添加油とも時間の経

Table-3 Chromatographic condition of TLC for analysis of the components of crude cottonseed oil chromatographed by active alumina column.

Materials	Solvent systems	Detection methods and reagents
Tocopherols	Benzen-Methanol-Ethyl ether (85:5:10, vol/vol/vol)	Bathophenanthroline-FeCl ₃ -reagent
Gossypol	Benzen-Methanol (98:2, vol/vol)	<i>p</i> -Anisidine reagent
Flavonides	Petroleum ether-Ethyl ether (85:15, vol/vol)	Aluminum chloride
Phenols	Petroleum ether-Ethyl ether (85:15, vol/vol)	4-Nitroaniline diazotised
Indols	Chloroform-Methanol-Hexane (95:5:15, vol/vol/vol)	4-Dimethylaminobenzaldehyd hydrochloric acid
Carotenoids	Chloroform-Methanol-Hexane (95:5:15, vol/vol/vol)	1) Indanedione 2) Antimony (III) chloride
Chlorophyll	Petroleum ether-Acetone-Propylalcohol (90:10:0.45, vol/vol/vol)	1) By naked eye 2) Spectrophotometry 660 nm
Lipids	Petroleum ether-Ethyl ether (85:15, vol/vol) Chloroform-Methanol (95:5, vol/vol)	Iodine vapor

過と共に過酸化物は増加し、経日途中で減少するものはなかった。

4 結果及び考察

4.1 綿実の未熟、完熟、過熟及び保存期間とその粗製綿実油の酸化安定性

未熟、完熟及び過熟ならびに保存期間の異なる綿実から得た粗製綿実油の酸化安定性の結果を **Table-4** に示す。

Table-4 Comparisons of oxidative stability of extracted oils at various stages of cotton seed maturation and storage period.

Experiment division ^{a)}	I	II	III	II B	II C
Weighing method Induction period ^{b)} (d)	50	213	205	184	182

a) : For abbreviations see **Table-1**.

b) : The point where the weight increased by 0.5%.

重量法試験の結果からみた場合、酸化安定性の最も低いものは 50 d 目 (I) の粗製綿実油で、これに反し完熟 (II)、過熟 (III) 綿実から得た粗製綿実油は非常に安定性が高く、また、保存 1 年及び 2 年のものはそうでない綿実の粗製綿実油に比べわずかに安定性が低い程度であった。完熟と過熟綿実の粗製綿実油の安定性にはほとんど差がなかった。I の粗製綿実油が最も酸化安定性の低い理由として **Table-1** に示すように Toc 及びゴシポールの量共に多いが、反面、酸化促進物質である Fe, Cu の微量金属も多い。したがって、酸化防止成分による防止効果よりも微量金属による酸化促進作用の方が上回ったためか、あるいはさく裂前の綿実は水分が多く、そのため成熟綿実に比べ、Kantha²⁷⁾ が指摘しているようにリパーゼ活性が高く、その綿実から得た粗製綿実油は酸化安定性がわるいのではないかと推察される。1 及び 2 年の保存綿実から得た粗製綿実油 (II B, II E) がわずかに安定性が低いのは、これら綿実の収穫直後の粗製綿実油 (II A 及び II C) に比べ、POV, AV, COV, 色度などは高く、逆に Toc 量が少ないことから保存期間中に綿実の酸化が起り、その結果やや安定性が低下したのではないと思われる。

4.2 Toc 及びゴシポールの添加と油脂の安定性

精製綿実油の酸化安定性については、同綿実から得た精製綿実油について今回検討しなかったが、今までに精製大豆油²⁸⁾、なたね油、綿実油などについて重量法試験で調べた結果では誘導期間が 15 d までで、50 d 以上の高い酸化安定性を示すものはなかった。通常、粗原油を精製することによりタンパク質、ガム質、脂肪酸、色素、有臭物質などが除去されるが、綿実の場合、ゴシポールもほとんど除去される。したがって、粗製綿実油の酸化

安定性の高い理由の一つとしてゴシポールの含有量が関与しているのではないかと思われた。もっとも Toc 及びゴシポール²⁸⁾の抗酸化性については、従来多くの報告があり、また、Toc 及びゴシポールは豚脂、水産魚油には顕著な効果を発揮するが、植物性液体油に対しては効果の少ないことも知られている^{29)~31)}。ところで、Toc とゴシポールの混合割合と抗酸化性については検討例が少ないので、各種の割合で混合し、豚脂及び精製綿実油 (Toc 及びゴシポール量、800 及び 15 $\mu\text{g/g}$) に添加し、酸化防止性を調べた。結果を **Table-5~7** に示す。なお、ゴシポールの添加量を最高 200 $\mu\text{g/g}$ とした

Table-5 Effect of tocopherols and gossypol on the autoxidation of lard.

Samples	Additive ($\mu\text{g/g}$)		POV ^{b)} (meq/kg)	Days ^{c)}
	Tocopherols	Gossypol		
Control ^{a)}	—	—	75.7	5.0
1	1000	—	35.0	40.0
2	200	—	28.8	55.0
3	100	—	33.0	46.0
4	—	200	29.5	22.0
5	—	100	40.0	19.5
6	—	20	63.3	14.6

a) : No additions of tocopherols and gossypol.

b) : POV at the 10 d of standing period.

c) : For abbreviations see **Table-4**.

Table-6 Effect of Varying the amounts of gossypol and tocopherols on the autoxidation of lard.

Samples	Additive ($\mu\text{g/g}$)		POV ^{a)} (meq/kg)	Days ^{b)}
	Gossypol	Tocopherols		
Control	0	0	75.7	5.0
1	0	1000	35.0	40.0
2	200	1000	19.7	56.3
3	100	1000	24.4	56.0
4	20	1000	33.9	52.0

a), b) : For abbreviations see **Table-5**.

Table-7 Effect of varying the amounts of gossypol and tocopherols on the autoxidation of refined cottonseed oil.

Samples	Additive ($\mu\text{g/g}$)		POV ^{a)} (meq/kg)	Days ^{b)}
	Gossypol	Tocopherols		
Control	0	0	70.4	14.0
1	0	200	68.0	14.5
2	200	0	65.2	15.0
3	100	0	66.4	15.0
4	20	0	60.0	14.7
5	100	200	68.2	15.5

a), b) : For abbreviations see **Table-5**.

のは、Table-1 に示したように粗製綿実油中のゴシボールの量が 200 $\mu\text{g/g}$ までであったからである。また、豚脂には Toc を最高 1000 $\mu\text{g/g}$ になるよう添加したが精製綿実油には Toc を最高 200 $\mu\text{g/g}$ としたのは、精製綿実油中には既存の Toc が 800 $\mu\text{g/g}$ 含有されていたからで、両油脂中の Toc 量をほぼ同じにすることにより、両油脂に対する Toc の効果を比較検討できるからと考えたためである。

豚脂に Toc 及びゴシボールを添加した場合、既報同様、酸化安定性が著しく向上し、中でも Toc の量が 200 $\mu\text{g/g}$ のものが最も安定性が高かった。ゴシボール 200 $\mu\text{g/g}$ 添加の場合、オープン試験結果では、Toc 200 $\mu\text{g/g}$ 添加とほぼ同効果を示していたが、重量法試験では、Toc の効果に比べ低い結果がみられた。したがって、安定性試験法により Toc とゴシボール間に効力の相違がみられた。

Toc とゴシボールの混合系では、Toc 単一系に比べ安定性の向上がみられ、いわゆる Toc とゴシボールの相加、もしくは若干の相乗効果が認められた。

一方、精製綿実油に Toc 及びゴシボールを添加した場合、無添加に比べわずかに酸化安定性が向上したのみであった。また、Toc とゴシボールの混合添加系でもそれぞれの単一添加と同じ結果であった。Frankel³²⁾ は油脂中の Toc 含有量として 400~600 $\mu\text{g/g}$ が最適濃度であると報告しており、本実験のように精製綿実油中に既に Toc が 800 $\mu\text{g/g}$ 含まれているものに Toc を添加しても効果がなく、むしろ Privett³³⁾、Parkhurst³⁴⁾ らが指摘しているように過剰量となり、Toc 自身が酸化され副反応物を生じ、これが油脂の酸化を促進する結果になったものと思われる。

4.3 粗製綿実油分別物の抗酸化性と成分の検索

粗製綿実油は酸化安定性が著しく高いにもかかわらず、粗製綿実油中に含まれる Toc 及びゴシボールの酸化防止成分を粗製綿実油中に含まれている量と同じだけ精製綿実油に添加しても酸化安定性はわずかに増加しただけであった。したがって、粗製綿実油中には Toc 及びゴシボール以外に有効な酸化防止成分の存在が考えられる。粗製綿実油中の酸化防止成分の検索にあたり、まず、粗製綿実油をカラムクロマトグラフィーで 5 溶出区分に分別し、得られたそれぞれの溶出物を精製綿実油に 0.02% になるよう添加し、オープン及び重量法試験で各溶出物の酸化防止性を比較した。各溶出物の割合とその酸化防止性の結果を Table-8, 9 に示す。なお、各溶出物の割合は、溶出物のみの重量比を求めたもので、なおかつ活性アルミナに吸着している着色物質があり、これは各種の有機溶剤、水、希酸、希アルカリ水溶液にも溶出されなかったため、今回検討しなかった。

いずれの溶出物もオープン試験ではかなり強い酸化防

Table-8 Characteristics of the fraction of crude cottonseed oil chromatographed by active alumina column.

Samples	Eluted fractions ^{a)}	Amount (%)	Color ^{b)}
Original			Red brown
1	Hexane	1.4	Red brown
2	Diethyl ether	86.4	Red brown
3	Methanol	5.0	Gray yellow green
4	Chloroform	6.1	Light yellow
5	Acetone	1.1	Light gray green

a) : A crude cottonseed oil was chromatographed on alumina with five kinds of mobile phases. b) : Each extracted materials was diluted with 10 ml chloroform and measured.

Table-9 Effect of materials from crude cottonseed oil separated using column chromatography on the autoxidation of refined cottonseed oil.

Samples	Additives		POV ^{b)} (meq/kg)	Days ^{c)}
	Eluted fractions ^{a)}	Amount (%)		
Control		0.00	63.2	14.0
1	Hexane	0.02	34.9	14.5
2	Diethyl ether	0.02	36.5	15.2
3	Methanol	0.02	45.1	13.0
4	Chloroform	0.02	38.9	13.5
5	Acetone	0.02	14.2	14.0

a) : A crude cottonseed oil was chromatographed on alumina with five kinds of mobile phases. b), c) : For abbreviations see Table-5.

止性を有し、中でもアセトン溶出物が最も酸化防止力が大であった。一方、重量法試験ではいずれも酸化防止性を示していない。両試験法による溶出物の酸化防止性の相違が精製綿実油のみなのか、植物性液体油全般にも当てはまるのかを調べるため、精製大豆油（酸化防止剤、シリコーン油、クエン酸など無添加）を選び、オープン試験で酸化防止力の高かったアセトン及びヘキサン溶出物をそれぞれ 0.01% になるよう添加し、その酸化防止力を調べた。Table-10 に示すように精製綿実油の場合

Table-10 Effect of materials from crude cottonseed oil separated using column chromatography on the autoxidation of refined soybean oil.

Samples	Additives		POV ^{b)} (meq/kg)	Days ^{c)}
	Eluted fractions ^{a)}	Amount (%)		
Control		0.00	91.0	13.0
1	Hexane	0.01	60.0	13.2
5	Acetone	0.01	17.9	13.0

a) : A crude cottonseed oil was chromatographed on alumina with five kinds of mobile phases. b), c) : For abbreviations see Table-5.

と同様、オープン試験の結果では両溶出物ともに強い酸化防止力を示し、重量法試験ではその効果は認められなかった。

次いで、各溶出物の成分検索を行い **Table-11** の結果を得た。

Table-11 Detection of components from crude cottonseed oil by column chromatography^{a)} and TLC^{b)}.

Components	Eluted fraction ^{a)}				
	Hexane	Diethyl ether	Methanol	Chloroform	Acetone
Tocopherols	—	+	Tr.	Tr.	—
Gossypol	+	+	Tr.	—	—
Flavonide	—	Tr.	Tr.	Tr.	+
Phenols	—	+	+	+	Tr.
Indols	—	—	Tr.	+++	—
Carotenoids	—	+	Tr.	—	—
Chlorophyll	—	—	+	—	—
Lipids	Tr.	+++	Tr.	Tr.	—
Peptide ^{c)}	+++	—	++	—	+

a): A crude cottonseed oil was chromatographed on alumina with five kinds of mobile phases. b): The condition of TLC is shown in **Table-3**. c): like peptide compounds.

—: negative, +: positive, weakness, ++: middle, +++: great, Tr.: trace.

ヘキサン溶出物には主にゴシポールとペプチド、エーテル溶出物には Toc, カロテノイド, 及び油脂, メタノール溶出物にはフェノール類, クロロフィル様色素, 及びペプチド, クロロホルム溶出物にはフェノール類, 及びインドール類, アセトン溶出物にはペプチドを検出した。表示は省略したが, ペプチドの構成アミノ酸としてメタノール溶出物には2種類のペプチドがあり, ペーバクロマトグラフィーで R_f 0.2 のペプチドは Arg と Met あるいは Lys, R_f 0.96 のペプチドは Leu と His のアミノ酸から成っていた。なお, これらのペプチドは溶剤によって溶出されたこと, R_f 値がいずれのペプチドとも一致せず, また, 塩酸分解後にアミノ酸以外にヨウ素発色による脂質と思われる成分が検出されることから, ペプチドと油脂あるいは脂肪酸との結合物と思われる。

各溶出物中の検索成分として Toc とゴシポールについては上記 **4.2** で酸化防止性の試験を行った。クロロフィルとインドール類については酸化促進性を有することを既に報告した^{35), 36)}。ペプチドの抗酸化性については山口^{37), 38)}及び著者ら^{39), 40)}も報告したが, 試験する系(非水系, 水系及び乳化系など)によって酸化防止力は相違する。ペプチドの酸化防止力は系のみでなく, Toc 及びゴシポールの共存下, あるいは安定性試験法によっても相違することを検討し, あわせて非常に酸化安定性

の高い粗製綿実油で, ペプチド様物質が安定性にどの程度の割合を占めているかを考察するため, Gly-Gly, Gly-Leu の2種類のペプチドを選び, 50% メタノールに溶解し, それぞれ精製綿実油に 0.02% になるよう添加した(減圧にてメタノールは留去した)。また, ペプチドとゴシポール(0.02% 及び 50 $\mu\text{g/g}$ 添加)との混合添加も行い, それぞれの酸化防止性を調べ, **Table-12** の結果を得た。なお, Toc は精製綿実油中に 800 $\mu\text{g/g}$ 含有されていたので, 新たに Toc を添加しなかった。

Table-12 Effect of gossypol and peptides on the autoxidation of refined cottonseed oil.

Samples	Additives	POV ^{a)} (meq/ kg)		Days b)
1	Control	65.2	14.0	
2	Gossypol, 50 $\mu\text{g/g}$	59.3	15.4	
3	Gly-Gly, 200 $\mu\text{g/g}$	57.3	15.6	
4	Gly-Leu, 200 $\mu\text{g/g}$	60.2	15.0	
5	Gossypol, 50 $\mu\text{g/g}$ + Gly-Gly, 200 $\mu\text{g/g}$	56.6	16.6	
6	Gossypol, 50 $\mu\text{g/g}$ + Gly-Leu, 200 $\mu\text{g/g}$	54.7	17.1	

a), b): For abbreviations see **Table-5**.

オープン試験結果よりみた場合, ペプチドの酸化防止力はわずかで, 重量法試験結果では, **Table-7** に示した Toc 及びゴシポールよりもペプチドの方がやや酸化防止力は高く, さらにペプチドとゴシポールの併用は相加もしくは若干の相乗効果が認められた。しかしながら, 重量法試験結果からみたペプチド, Toc 及びゴシポールの3種混合系, ならびに **Table-9** に示した粗製綿実油よりカラムクロマトグラフィーで分別した溶出物の精製綿実油に対する酸化防止性は非常に小さい。このことは①実験に用いたペプチドが油脂に不溶で均一に分散しなかった。しかし, 粗製綿実油中のペプチド様物質は油脂または脂肪酸と複合体を形成している可能性があり, 粗製綿実油中では均一に分散していた。②ペプチドの使用量が粗製綿実油中の含有量と異なっているため充分酸化防止力を発揮しなかったことなどが推察される。また, **Table-11** に示した成分以外に未検出部に有効な酸化防止成分の存在の可能性が考えられる。例えば, 粗製綿実油を活性アルミナカラムクロマトグラフィーで分別した場合, 各種の溶剤によっても溶出されず, 活性アルミナに強固に結合している着色物質がある。

そこで, 溶剤不溶の活性アルミナ吸着部に酸化防止成分が存在するかを検討すべく, 次の方法を試みた。

1) 粗製綿実油と粗製綿実油を **4.3** の方法で活性アルミナカラムにより分別したエーテル溶出物(油脂分を多く含む)の重量法試験による酸化安定性を比較した。

2) 各溶剤不溶の活性アルミナに吸着している着色部(カラムの上層部)と着色していない活性アルミナ部(カラムの下層部)をガラス管より取り出し, それぞれ

20 g に精製綿実油を 6 g ずつ加え、よく混合し、それをそれぞれ 5 等分し、5 個の容量 100 ml のビーカーに

* Characteristics of diethyl ether eluate is shown in **Table-8**.

Fig.-1 Oxidative stability of the crude cottonseed oil and the oil eluting from a active alumina column with diethyl ether.

Column chromatography and experimental condition: The crude cottonseed oil was layered on active alumina column, and the elution series were as follows: Hexane, diethyl ether, methanol, chloroform and acetone. The each elution volume was 200 ml. The polar fraction (20 g) adsorbed on active alumina after elution of acetone was cut off, and mixed with refined cottonseed oil (6 g). The mixture was used for oven test ($60 \pm 1^\circ\text{C}$). Control was the mixture of refined cottonseed oil (6 g) and active alumina (20 g).

Fig.-2 Effect of polar fraction in cottonseed oil on the autoxidation of the refined cottonseed oil.

入れ、 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 恒温器中に静置した。1 日 1 回かくはんし、経日的に 1 個ずつのビーカーを取り出し、エーテルで抽出した油脂の POV を測定した。結果を **Fig.-1**、**2** に示す。なお、活性アルミナカラムの下層部の無色部を燃やし有物のないことを確かめた。

重量法試験による誘導期間(0.5% 重量増までの日数)は、粗製綿実油の 213 d に比べエーテル溶出物では 15 d で酸化安定性は著しく低い。オープン試験による活性アルミナ着色部との混合油の酸化度合いは、無色部との混合油に比べて低い。したがって、粗製綿実油中の比較的強い酸化防止力を示す成分が活性アルミナに強固に結合し残っているものと思われた。本活性アルミナに結合している着色物質は、上述したように各種の溶剤、水、希酸、希アルカリ水にも溶出されなかったため、その成分については今回は検討せず、今後の課題にした。

(昭和 56 年 8 月 22 日受理)

文 献

- 1) 梶本五郎, 油化学, **28**, 738 (1979)
- 2) R.K. Downey, *Chem. & Ind. (London)*, **1976**, 401
- 3) R.E. Warthington, D.H. Smith, *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 619 (1973)
- 4) R.E. Wilkinson, W.S. Hardcastle, *J. Sci. Fd. Agric.*, **23**, 1031 (1972)
- 5) M. Loncin, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **76**, 104 (1974)
- 6) J.A. Robertson, W.H. Morrison, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 443 (1973)
- 7) C.T. Young, W.E. Mason, R.S. Matlock, G.R. Waller, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 314 (1972)
- 8) G.R. List, C.D. Evans, K. Warner, R.E. Beal, W.F. Kwolek, L.T. Black, K.J. Moulton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 8 (1977)
- 9) E.R. Sherwin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 809 (1978)
- 10) Y. Hoffmann, *Oléagineux*, **29**, 259 (1974)
- 11) J.S.R. Ohlson, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 299 (1976)
- 12) J.H. Sanders, *Oil and Soap*, **21**, 357 (1944)
- 13) R.P. Hutchins, *Oil and Soap*, **22**, 165 (1955)
- 14) L.H. Going, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 632 (1968)
- 15) G.R. List, C.D. Evans, H.A. Moser, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **49**, 287 (1972)
- 16) G. Johansson, P.O. Pehlgard, "Proceedings of International Developments in Palm Oil Incorporated Society of Planters", Kuala Lumpur (1977)
- 17) 吉田弘美, 梶本五郎, 農化, **46**, 355 (1972)
- 18) 吉田弘美, 梶本五郎, 農化, **46**, 625 (1972)
- 19) 芝原 章, 福水 誠, 山莊司志朗, 吉田弘美, 梶本五郎, 農化, **51**, 575 (1977)
- 20) 梶本五郎, 吉田弘美, 芝原 章, 山莊司志朗, 農化, **52**, 293 (1978)
- 21) 梶本五郎, 吉田弘美, 芝原 章, 山莊司志朗, 農化, **53**, 317 (1979)
- 22) 梶本五郎, 吉田弘美, 芝原 章, 山莊司志朗, 農化, **54**, 353 (1980)
- 23) 梶本五郎, 吉田弘美, 油化学, **21**, 842 (1972)

- 24) 熊沢 恒, 油化学, **14**, 167 (1965)
- 25) H.N. Rydon, P.W.G. Smith, *Nature*, **167**, 742 (1951)
- 26) 梶本五郎, 堀川和夫, 太田正徳, 中山孝夫, 米山 智, 平野二郎, 湯木悦二, 藤原正雄, 千葉重明, 益山新六, 油化学, **25**, 525 (1976); **27**, 38 (1978)
- 27) K.R.S. Kartha, *Chem. Ind. (London)*, **1971**, 506
- 28) 堀川和夫, 益山新六, 科工, **35**, 96 (1961)
- 29) W.M. Cort, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 321 (1974)
- 30) M.H. El-Mollah, *Seifen-Öle-Fette Wachse*, **100**, 469 (1974)
- 31) W.G. Bickford, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 91 (1954)
- 32) E.W. Frankel, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **61**, 1039 (1959)
- 33) O.S. Privett, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 321 (1954)
- 34) R.M. Parkhurst, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 641 (1968)
- 35) 梶本五郎, 栄養と食糧, **15**, 382 (1963)
- 36) 梶本五郎, 栄養と食糧, **16**, 56 (1963)
- 37) 山口直彦, 油化学, **25**, 249 (1976)
- 38) 山口直彦, 横尾良夫, 藤巻正生, 食品工誌, **22**, 425, 431 (1975)
- 39) 山庄司志朗, 吉田弘美, 梶本五郎, 油化学, **26**, 28 (1977)
- 40) S. Yamashōji, H. Yoshida, G. Kajimoto, *Yukagaku*, **28**, 421 (1979)
-