変敗油の調理に及ぼす影響(第18報)

Influence of Rancid Oil on the Cooking (Part 18)

クロロフィル分解物の分別と確認について

Separation of decomposition product of chlorophyll

(昭和37年9月17日受理)

梶 本 五 郎

(Goroh Kajimoto)

The heat decomposition products of chlorophyll were separated by silicagel column chromatography, and a fraction giving Ehrlich's color reaction was isolated.

The substance was examined by chemical analysis, paper-chromatography and spectrophotometry and was supposed to be a pyrrole derivative, not to be pyrrole itself.

緒 言

油揚げほうれん草のクロロフィルが油脂に移行し、移行したクロロフィルがさらに分解し、エーリッヒ呈色物を生じ、油脂の着色と酸敗を早めることを報告した¹⁾。

今回、クロロフィルの分解により生じたエーリッヒ呈色物の確認を行なうため、シリカゲルを用い、油脂、クロロフィルおよびエーリッヒ呈色物質を溶媒分別し、分別したエーリッヒ呈色物質の第二水銀塩の窒素量、ペーパークロマトグラフィ、吸収スペクトルを測定し、ピロール誘導体であることを確認したので、その結果を報告する。

実 験 の 部

1. 試料および試料の調製

大豆油(市販大豆油)

Chlorophyllin(メルク製品)。

ピロール(林純薬株式会社製品)。

大豆油に30%アルコールに溶解したクロロフィルを、0.02%添加し、170°Cで90分間加熱し、クロロフィルの分解によりエーリッヒ呈色反応を示す油脂を調製した。なお、未分解のクロロフィルは多量残っていた。

クロロフィルを加熱分解した油をクロロフィル分解油と呼び、ほうれん草を170°Cで揚げ、ほうれん草中のクロロフィルが油脂に移行し、さらに一部分解したものをほうれん草分解油と呼ぶ。

2. 実験方法および結果

1) シリカゲル入カラムクロマトグラフィによるクロロフィル分解物の分別について

クロロフィル分解油およびほうれん草分解物を分別するため、あらかじめシリカゲルによる分別を試みた。

すなわち、径1.5cm、長さ50cmのガラス管に200°Cにて1時間乾燥したクロマト用シリカゲルを20cmの高さにつめ、石油ベンゼンと共にそれぞれの分解油1gを注流し、石油ベンゼンにて可及的に溶出を繰返して大部分の油脂を除去し、引き続き99%アルコールにて溶出を繰返し、最後に30%アルコールにて溶出を行なった。

溶出後、各分別溶出液について、蛍光反応、エーリッヒ反応を調べ、陽性を+、陰性を-と記した。

その結果は第1表のとおりである。

第1表 シリカゲル分別によるクロロフィル分解油、ほうれん草分解油の分別溶出液の反応

分別溶剤	石油ベンゼン	99% アルコール	30% アルコール
試 料	クロロフィル分解油	ほうれん草分解油	ほうれん草分解油
溶 出 色 調	無色	無色	黄色
蛍 光 反 応	—	—	—
エーリッヒ反 応	—	—	—

クロロフィル分解油、ほうれん草分解油とも、99%アルコール溶出液はエーリッヒ反応陽性であり、30%アルコール溶出液には蛍光反応を認めた。したがって分解物の分別にシリカゲル使用が可能と考えられる。しかしそれぞれが完全に単離されたわけではなく、アルコール溶出部には、なお少量の油脂が含有されていた。

ところで、エーリッヒ呈色物がいかなる物質であるか

を調べる。

エーリッヒ反応は、ピロール特有の反応でなく、アミノ酸にも発色し、時によって油脂の酸化生成物にも発色するといわれているので、さらに分別、検討する必要がある。

まず、エーリッヒ反応を示すアルコール溶出液について、ニンヒドリン呈色反応を調べると陰性であった。

したがってアミノ酸ではないと思われ、クロロフィルはヘモグロビンと異なり、たん白質をもたないので、アミノ酸でないと断定できる。

次いで、油脂の酸化生成物がエーリッヒ反応を呈するかを調べるため、各種の脂肪酸を170°Cにて120分間加熱し、反応をみると、第2表のとおりである。

第2表 各脂肪酸の加熱前後のエーリッヒ反応

飽和脂肪酸			不飽和脂肪酸		
定性反応	エーリッヒ反応		定性反応	エーリッヒ反応	
処 理	加熱前	加熱後	処 理	加熱前	加熱後
カブロン酸	—	—	トウハク酸	—	卅
カブリル酸	—	—	エルカ酸	—	卅
カブリン酸	—	+	オレイン酸	卅	卅
ラウリン酸	trace	trace	リノール酸	—	卅
ミリスチン酸	—	卅			
パルミチン酸	—	—			
ステアリン酸	—	—			
アラキジン酸	—	trace			
ベヘン酸	—	—			

飽和脂肪酸では、ミリスチン酸、ラウリン酸が呈色し不飽和脂肪酸では、ほとんど反応を示した。大豆油には、オレイン酸、リノール酸含有量多く、分別したアルコール溶出液のエーリッヒ呈色物は、クロロフィルの分解物とオレイン酸、リノール酸等の酸化生成物とが考えられる。この両呈色物の関係を確認める必要がある。一般にアルコールに溶解した油脂は蒸留によってアルコールのみ留出され、油脂分が残留するので、この場合、エーリッヒ呈色物がアルコールと共に留出されてくるかを検討した。

すなわち、シリカゲルで分別した、クロロフィル分解物のエーリッヒ反応を示すアルコール溶液と、オレイン酸、リノール酸のエーリッヒ反応を示すアルコール溶液をそれぞれ蒸留し、留出されるアルコール液 (Bp 80°C にて蒸留されてくるもの) について、エーリッヒ反応を調べた。その結果、クロロフィル分解の分別アルコール液は陽性で、脂肪酸の蒸留アルコールは陰性であった。

したがって、油脂の酸化生成物は残り、クロロフィル

分解物のエーリッヒ呈色物のみが、いくぶんアルコール液と共に留出されてきたものと思われ、留出物はアミノ酸および油脂の酸化生成物でもなく、クロロフィル分解物のピロール環物質と推察される。

以後の実験には、蒸留して得られたエーリッヒ反応を示すアルコール液を用い、本試料を、エーリッヒ呈色アルコール液と呼ぶ。

試みに、ピロール環物質が上記の方法により分別できるかを確かめるためあらかじめピロール環物質としてピロールをえらび、大豆油1gにピロール1mg、クロロフィル1mgを混合し、その混合物を前同様、シリカゲル層に石油ベンゼンと共に注流し、石油ベンゼン、99%アルコール、30%アルコールの順にて溶出を行ない、それぞれの溶出液について、各反応を調べると、第3表のとおりである。

第3表 シリカゲル入カラムクロマトグラフィによるピロール、クロロフィルの分別

検出法	溶出溶剤と 溶出順序	石 油 ベンゼン (1)	99%アル コ ー ル (2)	30%アル コ ー ル (3)
	溶 出 色 調	無 色	黄 色	緑 色
	螢 光 反 応	—	—	+
	エーリッヒ 反 応	—	+	—

エーリッヒ反応は、99%アルコール溶出液のみに発色し、さらに蒸留を行ない、留液のアルコール液について反応をみると同様陽性であった。

2) ピロール環塩化第二水銀塩の窒素量について

クロロフィルの分解、ほうれん草分解油に検出したエーリッヒ呈色物が、ピロール環物質とすれば、構造中に窒素有するので、窒素の定量を試みた。

窒素の測定に際し、ピロールは飛散し易いので、ピロール環の塩化第二水銀塩として窒素量を測定した。

即ち向井²⁾の方法に準じ、エーリッヒ呈色アルコール液に塩化第二水銀の飽和溶液を滴下し、白濁の程度が不変になるまでさらに塩化第二水銀の飽和溶液を加え、白色沈澱物を汙過し分別し、水洗およびベンゼンによって過剰の塩化第二水銀を除いた。このピロール環塩化第二水銀を50°Cで減圧乾燥した。

なお、分離したピロール環の塩化第二水銀塩のピロール環呈色反応は陽性であった。

次いで得られたピロール環の塩化第二水銀塩の一定量を取り、Dumas法で窒素量を測定し、窒素量は塩化第二水銀塩に対する百分率で表わした。

その結果は第4表のとおりである。

栄 養 と 食 糧

第4表 ピロール環塩化第二水銀塩の窒素量

試 料	ピ ロ ール	インドール	ア ニ リ ン	ア ン モ ニ ア	クロロフィル分解分別ピロール環	ほうれん草分解分別ピロール環
塩化第二水銀塩の窒素量 (%)	1.54	1.41	6.23	5.41	0.3	0.2

第5表 クロロフィル分解物のピロール環物質のペーパークロマトグラフィ

展開剤	ブタノール4 酢 酸 1 水 2	メタノール4 水 1	メタノール4 水 1 固 定 剤	メタノール1 水 5	水	ブタノール・酢酸・水 (発色させたもの)
ピ ロ ール	0.80	0.76	0.75	0.81	0.85	0.56
インドール	0.99	0.80	0.62	0.57	0.57	1.0
クロロフィル分解分別ピロール環	0.73	0.79	0.77	0.66	0.75	0.66

また、数種の窒素化合物について、同様塩化第二水銀塩を作り窒素量をも比較した。

クロロフィル分解のピロール環アルコール液の塩化第二水銀塩には0.3%の窒素を含有し、ほうれん草分解のピロール環アルコール液の塩化第二水銀塩には0.2%の窒素を含有し、量的には非常に少なかった。

3) クロロフィル分解物のピロール環物質のペーパークロマトグラフィについて

クロロフィルの分解物が、エーリッヒ呈色反応を示し、且つ窒素を有していたので、ピロール環物質だと考えられるが、いかなる構造のものか、あるいは数種のピロール環物質の混合であるか否かは判別し難いので、ペーパークロマトグラフィによる検討を行なった。

ピロールならびにピロール誘導体のペーパークロマトグラフィについては、殆んど報告をみないようで、ピロールはスポットしている間および展開中に飛散するものか、あるいは展開中に α 位が閉じ、したがって呈色を示さなくなるものか、ペーパークロマトグラフィについては難点があり、先に著者³⁾はピロールをエーリッヒ試薬にて発色させ、その発色液について展開し、赤色部のRfを比較検討したのであるが、今回、展開距離を短くすることにより、展開後の発色が可能であり、且つRf値の差を示すことを知ったので、ペーパークロマトグラフィによる判別を試みた。

すなわち10cm²の汙紙(No. 50, 40×40, ペーパークロマト用汙紙を裁断)の下より1cmの高さに、標準のピロール、インドールと試料のピロール環アルコール液を2cm間隙にスポットし、各種の溶媒にて高さ9cmまで展開し、展開後30°Cにて30分間風乾し、ただちにエーリッヒ試薬を噴霧して赤色の発色部を比較した。

また、固定剤の使用は、各試料をスポット後、これに

10ml の大豆油をエーテルで100mlとなした固定剤に噴霧した。固定剤使用は相互関係のRfは比較できるが、固定剤の噴霧量によってRfは変化する。長所としては発色後、色調が消えず、安定であった。

以上の結果を示すと第1図、第5表のとおりで、代表的な2種についてのみ図示(第1図)した。

第1図 クロロフィル分解物のピロール環呈色物のペーパークロマトグラフィ

ピロールとインドールについては、それぞれの展開液によりRfが異なることから、ピロール環物質の検討にペーパークロマトグラフィが使用できると考えられ、且つピロール環物質の構造を決める一応の目安になると思う。クロロフィルの分解物から分別したピロール環は1箇で、Rfはどの展開液ともピロールと異なることから、ピロール誘導体と考えられる。(次報にピロール誘導体のペーパークロマトグラフィを報告し、構造決定を行なう。)

4) クロロフィル分解物のピロール環物質の吸収スペクトルについて

ペーパークロマトグラフィからみて、クロロフィルの分解物がピロール誘導体であると考えられ、且つ発色スポットが一種であったので、ピロール環アルコール液の

紫外部の吸収曲線を測定した。

その結果は第2図のとおりである。

第2図 クロロフィル分解物のピロール環物質の吸収曲線

標準のピロールの吸収曲線とは異なることから、ピロール誘導体であると考えられる。

考 察

クロロフィルが油脂中で分解し、ピロール環物を生成するといった報告は見当たらないが、向井⁴⁾は鯨肉の着色は血液のポリフィリン核が開環し、ピロール環物質が生ずることに起因すると報告している。したがって、植物のクロロフィルも血液の分解と同様の作用を受けるものと類推され、ポリフィリン核を開環し得る物質として油脂中の過酸化物が考えられ、事実過酸化物の多い変敗油程クロロフィルの分解が早いことから思惟される。

クロロフィルの分解によって生じたものがピロール環物質であるか否かは、一応シリカゲル分別によって得られたものがエーリッヒ試薬にて発色し、塩化第二水銀塩中に窒素を有することからピロール環物質であろうと推察される。

その分解して得られたピロール環物質はいかなる物質であるかは、塩化第二水銀塩の窒素を測定しただけでは、塩化第二水銀塩の構造不明なピロール環物質の現段階では決めることはできず、また吸収スペクトルにしても文献の抄録の見当たらない現在、ピロール環構造を決め難い。今後これらの点について検討していきたい。

要 約

1. 大豆油にクロロフィルを0.02%添加、170°Cで90分間加熱し、エーリッヒ反応を呈す油脂と、ほうれん草を170°Cで油あげし、ほうれん草葉中のクロロフィルが油脂に移行し、移行したクロロフィルがさらに分解し、エーリッヒ反応を示す油脂とを調製し、径1.5cm、長さ50cmのガラス管にクロマト用シリカゲルを20cmつめ、石油ベンゼンと共に調製した油脂を注流し、石油ベンゼンにて大部分の油脂を除去し、引続き99%アルコール、30%アルコールの順にて溶出した。99%アルコール溶出液にはエーリッヒ呈色反応を認めた。

エーリッヒ反応を示すアルコール溶液をさらに蒸留し、アルコールと共に蒸留して出てくるエーリッヒ反応呈色物について以下の実験を行なった。

2. エーリッヒ呈色アルコール液に、塩化第二水銀の飽和液を滴下し、塩化第二水銀塩を作り、Dumas法で窒素量を求め、クロロフィル分解の塩化第二水銀塩には0.3%の窒素量、ほうれん草分解の塩化第二水銀塩には0.2%の窒素が含まれていた。

3. エーリッヒ呈色アルコール液のペーパークロマトグラフィを行ない、発色数1つを検出し、そのRfは標準のピロールと異なった。

4. エーリッヒ呈色アルコール液の紫外部の吸収スペクトルを測定したが、ピロールでなく、ピロール誘導体と考えられる。

文 献

- 1) 梶本：本誌，16，56（1963）
- 2) 向井：日水誌，20，610（1954）
- 3) 梶本：本誌，13，5，313（1961）
- 4) 向井：日水誌，21，8（1953），20，2（1954）
20，3（1954），20，7（1954）
21，3（1955）

（神戸森女子短大）