油脂の酸化生成物によるトコフェロール, アミノ酸 およびアスコルビン酸の分解

梶 本 五 郎, 生 田 啓 一

吉 田 弘 美, 芝 原 章

神戸学院大学栄養学部

Decomposition of Tocopherol, Amino Acids and Ascorbic Acid in Ethanol Solution by Oxidized Products of Oil during Autoxidation

Gorō KAJIMOTO, Keiichi IKUTA, Hiromi YOSHIDA
and Akira SHIBAHARA

Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University, Kobe 673

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 42, 185~190 (1989)

Comparisons were made of the effects of oxidized fatty acids (OFA, fatty substances insoluble in petroleum ether) and dimers (polymerized fatty acid fraction), and their secondary products (SP) of fatty acids separated from heated soybean oil, on the decomposition of tocopherol, several amino acids (valine, methionine, tryptophan, histidine, cysteine and arginine) and ascorbic acid in ethanol solution during oxidation at 60 or $20 \pm 2^\circ\text{C}$. The decomposition of tocopherol, amino acids (especially cysteine and histidine) and ascorbic acid was apparently promoted by OFA and SP. The decomposition ratio of these components increased with further addition of OFA and SP. The effect of SP on the decomposition of tocopherol, amino acids and ascorbic acid was similar to that of OFA. As reduction of nitroblue tetrazolium was observed upon addition of SP or OFA, it was considered that the oxidation of tocopherol, amino acids and ascorbic acid by OFA and SP might be attributable to the production of superoxide anion.

(Received November 11, 1988)

油脂の加熱酸化生成物の一つである酸化酸（西ドイツ¹⁾²⁾、アメリカ³⁾油化学協会では石油エーテル不溶性の酸化脂肪酸のことを酸化酸と呼んでいる。わが国では、油脂用語辞典⁴⁾、過酸化脂質実験法⁵⁾、その他の成書^{1)~9)}中にも酸化酸として記載されている）によって油脂中のトコフェロール(Toc)ならびにアルコール溶液中のTocが容易に分解されることを報告した¹⁰⁾¹¹⁾。おそらく官能基に富んだ酸化酸(OFA)によってTocが酸化分解をうけたものと思われるが、OFAにより活性酸素種の一つであるスーパーオキシドアニオン(O_2^-)を生成し、その O_2^- がTocの分解に関与していることも推測された¹²⁾。OFAによる O_2^- の発生は油脂の酸化機構を研究する上で興味をもたれるとともにToc以外の栄養成分の酸化分解を引き起こすことが危惧される。ところで、OFAの分別法とは別に、シリカゲルを用い、カラムクロマト

グラフィーで脂肪酸の重合物およびその二次酸化生成物(SP)を分別することができる。今回、SPとOFAが同性質を有するかを調べるとともに、Toc、アミノ酸、アスコルビン酸などの栄養成分の分解について比較検討した。

実験方法

1. Toc, アミノ酸, L-アスコルビン酸

Tocは混合Toc(*m*-Toc α -, γ -, δ -Toc 12:44:28)を用い、エーザイ(株)からの提供品で純度は80%であった。L-アミノ酸としてVal, Trp, Cys, Met, His, Argなどを選び、これらはいずれも半井化学薬品(株)から購入した。L-アスコルビン酸(AsA)は半井化学薬品(株)から購入した。

2. OFA および脂肪酸重合物の分別

OFAは前報¹¹⁾¹²⁾同様、 180°C で40時間加熱した大豆油をケン化し、常法どおり不ケン化物を除きAOCS

Table 1. Chemical characteristics of monomers, dimers and their secondary products or oxidized fatty acids obtained from heated soybean oil at 180°C for 40 h.

	Heated soybean oil	Fatty acids ^{a)}			
		Monomers ^{b)}	Dimers ^{c)}	Sp ^{d)}	OFA ^{e)}
Percentage (%)		90.1	4.8	5.1	3.6
Carbonyl value (meq/kg) ^{f)}	30.3	6.1	41.0	53.5	46.7
Anisidine values ^{g)}	183.5	27.9	367.2	640.6	562.0

^{a)} Fatty acids obtained from heated soybean oil by saponification. ^{b),c),d)} The monomeric, dimeric and its secondary product fractions in fatty acids obtained from heated soybean oil were separated by silica gel column chromatography. ^{e)} Heated soybean oil is saponified and the fatty acids are isolated by acidifying the mixture with hydrochloric acid and extracting it with petroleum ether. Those fatty acids are insoluble in petroleum ether. ^{f),g)} Determined by JOCS official method 2.4.22-73, 2.4.26-81, respectively. SP, secondary products, OFA, oxidized fatty acids.

法³⁾により石油エーテル不溶性の OFA を分別した。脂肪酸重合物の分別はシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィーで既報¹³⁾に準じ、モノマー、ダイマーおよびダイマー部の二次酸化生成物 (SP) 部にそれぞれ分別した。それらの収量割合、性質は結果のところで示す。

3. OFA および SP と Toc, アミノ酸, AsA との混合

1) Toc との混合 10 ml 容目盛付試験管に所定濃度の *m*-Toc エタノール溶液 10 ml をとり、それに OFA, モノマーおよび SP を 0.4 および 1.0% ずつそれぞれ添加してよく混合した後、60 および 20±2°C に保存した。対照に OFA, SP など無添加のものを同時に保存した。

2) アミノ酸との混合 10 ml 容ガラス栓付試験管に各アミノ酸 5 mg をとり、これを 60% エタノール 5 ml で溶解した。ついで、OFA, モノマーおよび SP を 2.5~15.0 mg ずつ添加してよく混合後、20±2°C に保存した。

3) AsA との混合 100 ml 容三角フラスコに所定濃度の AsA エタノール溶液 (60%) 30 ml を秤取し、これに OFA および SP を 3~30 mg ずつ添加してよく混合後、20±2°C に保存した。なお、2), 3) の場合、60% エタノールを用いたのは、アミノ酸, AsA ならびに OFA, SP いずれも溶解したからである。

4. Toc, アミノ酸, AsA の分解率の測定

1) Toc 残存率の測定 既報¹¹⁾同様の方法によった。

2) アミノ酸の分解率の測定 経目的に試験液より所定量を秤取し、ニンヒドリン比色法¹⁴⁾で 570 nm の吸光度を測定した。各アミノ酸の分解率は保存前の値を基準として算出した。

3) AsA の分解率の測定 経目的に試験液より所定量を秤取してインドフェノール法¹⁵⁾で測定し、検量線から AsA 量を求めた。分解率は保存前の AsA 量に対する割合から算出した。

実験結果と考察

1. 加熱油より分別した OFA ならびに SP の性状

実験方法 2 項で得た OFA およびモノマー、ダイマー、SP 部のそれぞれの収量割合、ならびにカルボニル価 (COV), アニシジン価 (An. V) を Table 1 に示す。SP 部が COV, An. V とともに最も高く、それぞれ 53.5 および 640.6 で、ついで、OFA の 46.7 および 562.0 であった。モノマーは加熱大豆油の COV, An. V よりも低かった。石油エーテル-ジエチルエーテル-酢酸 (80:20:1 v/v) の展開剤で行った TLC の薄層板上のスポット数はモノマーとダイマーは 6 種であったが、OFA と SP は 1 種で、いずれも原点付近にとどまっていた。ペルオキシド、エポキシド、アルデヒド、 α -ケト酸の呈色反応は OFA, SP とともに陽性で、かつ呈色色調はモノマー、ダイマーに比べて強かった。IR 測定の結果は、3,600~3,300 cm⁻¹ に OH の吸収、2,700~2,500 cm⁻¹ の OH 結合、1,725~1,700 cm⁻¹ の C=O、1,380 cm⁻¹ の C-CH₃、1,250 cm⁻¹ の -C-O-C-, 970~960 cm⁻¹ の -CH=CH- (トランス)、880 cm⁻¹ の OH と思われる吸収が OFA, SP とともに認められた。

ニトロブルー-テトラゾリウム (NBT) の還元を前報¹²⁾同様の方法で調べたところ、Table 2 に示すように OFA と SP は 560 nm の吸光度を増加させ、スーパーオキシドジスムターゼの添加で吸光度の増加率は減少した。したがって、OFA 同様、SP により O₂⁻ が発生した。一方、モノマー部は吸光度の増加なく、ダイマー部はわずかに吸光度が増加する程度であった。以上の結果のみでは OFA と SP が同一物質であるか否かはわからないが、よく似た性質をもつ酸化生成物といえる。以後の栄養成分の分解実験には OFA と SP を主に用いた。

Table 2. Effects of monomers, dimers and their secondary products or oxidized fatty acids on the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT).

Standing period (h)	Monomers			Dimers			Secondary products			Oxidized Fatty acids		
	2	7	24	2	7	24	2	7	24	2	7	24
Reduction of NBT (560 nm)	0.000	0.000	0.000	0.000	trace	trace	0.015	0.060	0.120	0.012	0.052	0.120
Added SOD (25 μ g/5 ml)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.005

Each reaction mixture contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.04 mM NBT, monomers, dimers, secondary products and oxidized fatty acids each 4 mg and 50% ethanol in 5 ml. Each reaction mixture was reacted in test tube (12 $\times$ 105 mm) during storage at 20°C. The reduction of NBT was determined from the changes in the absorbance at 560 nm.

Fig.1. Effect of monomers, secondary products and oxidized fatty acids on the decomposition of total tocopherol in ethanol solution during storage at 60 or 20 $\pm$ 2°C.

○, control (no addition); ●, monomers; □, secondary products; △, oxidized fatty acids.

^{a)} Percent of residual total tocopherol after storage at 60 or 20 $\pm$ 2°C based on those in ethanol solution before storage.

2. OFA および SP による Toc の分解

OFA, モノマーおよび SP を添加した試験液中の Toc 量を経日的に測定し Fig.1 の結果を得た。OFA と SP 添加試験液中の Toc は保存経過に伴い大きく減少し、60°C, 4 日目の Toc の残存率は OFA および SP 1% 添加で 32.0 および 27.0% であった。OFA および SP の 0.4% 添加, 20°C, 15 日目で Toc の残存率は 55.5 および 46.4% で、両者間では大差はないが、SP のほうが OFA よりも Toc の分解がやや多い傾向にあった。一方、モノマー添加では、対照（無添加）よりも Toc の分解がわずかに多い程度であった。

OFA による Toc の分解機構については不明ではあるが、前報¹²⁾で述べたように官能基に富んだ OFA により Toc が酸化分解をうけた。あるいは発生した O₂⁻ が Toc と反応して強力な酸化剤を形成し、Toc を分解させた。

また、微量の金属が存在した場合、O₂⁻ の不均化反応とそれに続く Harber-Weiss 反応からヒドロキシラジカル ($\cdot$ OH)、一重項酸素 (¹O₂) などが生じ、これらが Toc に作用することも考えられる。SP も OFA と同じような機構で Toc を分解させたものと推測される。

3. OFA および SP によるアミノ酸の分解

OFA を各アミノ酸に添加し、保存に伴う分解率を測定した。結果を Table 3 に示す。用いたアミノ酸中では Cys が最も分解されやすく、保存 2 日目までに急減した。20 $\pm$ 2°C, 10 日目で Cys の 51.0% が分解し、ついで、His, Trp の 33.0 および 22.5% の順であった。一方、Val, Met, Arg などは分解率が低く、それぞれ 8.0, 7.5 および 6.0% であった。ついで、OFA の添加量と Cys, His の分解率を測定し、Fig.2 の結果を得た。OFA の添加量が増すにしたがい両アミノ酸の分解

Table 3. The decomposition of each amino acid in ethanol solution by oxidized fatty acids during Storage at $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. (%)

OFA added (mg/5 ml)	Val		Trp		Cys		Met		Arg		His		
	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	
Standing period (day)	2	0.0	2.5	0.0	8.0	0.0	38.0	0.0	0.5	0.0	0.5	0.0	20.5
	4	0.0	4.0	1.0	12.0	1.0	46.0	0.0	1.5	0.0	1.0	0.0	25.0
	6	1.0	4.2	1.0	14.0	1.0	49.0	0.0	2.5	0.0	1.5	1.0	28.0
	8	1.5	6.4	1.0	19.0	2.0	50.3	1.0	5.0	0.0	3.0	1.5	30.0
	10	2.0	8.0	2.0	22.5	2.5	51.0	1.0	7.5	0.1	6.0	2.0	32.0

OFA, oxidized fatty acids. Values in Table were percent of amino acid decomposition during storage to amino acid contents before storage.

Fig.2. Percentages of decomposition cysteine and histidine in ethanol solution with different concentration of oxidized fatty acids during storage at $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

○, control (no addition); ●, OFA 2.5 mg/5 ml; △, OFA 5.0 mg/5 ml; ▲, OFA 10.0 mg/5 ml; □, OFA 15.0 mg/5 ml. OFA, oxidized fatty acids.

率は高くなった。アミノ酸では概して SH をもつもの、環状アミノ酸などが分解されやすいようである。

Cys, His の分解に対する OFA とモノマーおよび SP による比較結果を Fig.3 に示す。OFA を添加したものが両アミノ酸の分解量が最も多く、保存 10 日目で Cys と His の分解率は 50.0 および 29.3% で、ついで、SP 添加の 44.0 および 24.5% であった。一方、モノマー添加では、対照よりも両アミノ酸の分解がわずかに多い程度であった。ところで、OFA, SP によるアミノ酸の分解機構については不明であるが、自動酸化および光増感酸素酸化 ($^1\text{O}_2$, O_2^-) 時におけるアミノ酸の分解物の同定とアミノ酸の分解機構が解明されつつある¹⁰⁾。次回にはアミノ酸分解物の同定を行い、OFA および SP によるアミノ酸の分解機構を報告したい。

4. OFA および SP による AsA の分解

OFA, SP を添加した試験溶液中の AsA 量を経目的に測定し、Table 4 の結果を得た。OFA および SP に

より AsA はいずれも分解された。また、添加量が増すにしたがい AsA の分解も多く、OFA を 3, 15, 30 mg/30 ml 添加すると 5 日目で AsA はそれぞれ 33.6, 47.5 および 70.2% 分解された。もっとも AsA の場合、OFA, SP 無添加でも保存経過に伴い分解しているので、OFA や SP で実際に分解された値は、5 日目の場合は 29.0% を差引いた値である。AsA に対する SP の作用は OFA とほぼ同程度であった。

Toc, アミノ酸, AsA に対する OFA と SP の作用を比較したが、それらの分解率にはあまり差はなかった。おそらく、両者の COV, An. V, TLC, IR の結果からみてよく似た性質を有する酸化生成物であったためと思われる。

要 約

分別法を異にする方法で加熱大豆油から得た酸化酸 (OFA, 石油エーテル不溶性の酸化脂肪酸) と脂肪酸重

Fig.3. Effect of monomers, secondary products and oxidized fatty acids on the decomposition of cysteine and histidine in ethanol solution during storage at $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

○, control (no addition); ●, monomers (10 mg/5 ml); ■, secondary products (10 mg/5 ml); △, oxidized fatty acids (10 mg/5 ml).

Table 4. Changes in the decomposition of ascorbic acid in ethanol solution by oxidized fatty acids and secondary products during Storage at $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

		Percent of decomposition ascorbic acid (%)							
		OFA added (mg/30 ml)				SP added (mg/30 ml)			
		0	3	15	30	0	3	15	30
Storage period (day)	1	3.0	3.5	6.0	10.0	3.0	5.2	10.0	15.0
	2	7.0	9.0	11.0	19.5	7.0	10.0	20.0	26.0
	3	14.0	16.2	19.6	28.0	15.0	19.5	27.0	32.5
	4	23.5	25.4	32.0	48.1	23.5	26.3	32.0	47.0
	5	29.0	33.6	47.5	70.2	29.0	32.7	46.0	64.2

OFA, oxidized fatty acids; SP, secondary products.

合物ならびにその二次酸化生成物 (SP, カラムクロマトグラフィーで分別) の性質および栄養成分の分解作用について比較した。

1) OFA と SP の COV は 46.7 および 53.5, An. V は 562.0 および 640.6 で, 両値とも SP のほうがわずかに高い。ペルオキシド, エポキシド, アルデヒド, α -ケト酸の呈色反応は OFA, SP とともに陽性であった。OFA および SP によりスーパーオキシドが発生した。

2) Toc と OFA および SP の 1% 添加混合物を 60 および $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ に保存した。60°C, 4 日目で Toc の残存率は OFA の場合 32.0%, SP で 27% であった。

3) OFA の添加量が増すにしたがいアミノ酸は多く分解した。用いたアミノ酸中では, Cys が最も分解されやすく, ついで, His, Trp の順であった。SP と OFA とでは, SP よりも OFA のほうがアミノ酸の分解率がやや高い傾向にあった。

4) OFA の添加量が増すにしたがいアスコルビン酸

の分解率も高くなった。アスコルビン酸に対する SP の作用は OFA とほぼ同程度であった。

文 献

- 1) "Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft-Einheits Methode," C III-3 (68)
- 2) Arens, A., Guhr, G., Waibel, J. and Kroll, S.: *Fette Seifen Anstrichm.*, 79, 310 (1977)
- 3) Official and Tentative Methods of the Am. Oil Chem. Soc., G3-53
- 4) 日本油化学協会(編): 油脂用語辞典, 76 (1987) 幸書房 (東京)
- 5) 金田尚志, 植田伸夫: 過酸化脂質実験法 62 (1983), 医歯薬出版 (東京)
- 6) Mehlenbacher, V.C.: *The Analysis of Fats and Oils*, 556 (1960), The Garrard Press, Publishers (Champaign Illinois)
- 7) Cocks, L.U. and Ven Rede, C.: *Laboratory Handbook for Oil and Fat Analysts*, 126 (1966), Academic Press (London and New York)
- 8) Boekennoogen, H.A.: *Analysis and Characterization of Oil, Fats and Fat Products*, 16 (1964),

Interscience Publishers A. Division of John Wiley & Sons Ltd. (London, New York)

- 9) Williams, K.A. : Oils, Fats and Fatty Foods, 144 (1966), Gloucester Place (London)
- 10) 梶本五郎, 岡島紀子, 高岡真由美, 吉田弘美, 芝原 章 : 栄食誌, **41**, 213 (1988)
- 11) 梶本五郎, 高岡真由美, 吉田弘美, 芝原 章 : 栄食誌, **41**, 405 (1988)
- 12) 梶本五郎, 高岡真由美, 吉田弘美, 芝原 章 : 農化, **63**, 37 (1989)
- 13) 梶本五郎, 向井克憲 : 栄養と食糧, **17**, 319 (1965)
- 14) Moore, S. and Stein, W.H. : *J. Biol. Chem.*, **176**, 367 (1948)
- 15) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之(監修) : 改訂食品分析ハンドブック 335 (1982), 建帛社(東京)
- 16) 梶本五郎, 山庄司志朗, 芝原 章, 吉田弘美 : 抗酸化剤の理論と実際 116 (1984), 三秀書房(東京)

(1988年11月11日受理)