大豆リン脂質の食品化学的研究*

(第3報) リン脂質の自動酸化生成物; 揮発性脂肪酸,
アルコール類について

柴 崎 一 雄**・木 村 繁 昭**

Food Chemical Studies on Soybean Phospholipids

Part III. On volatile fatty acids and alcohols from autoxidized
phospholipids

KAZUO SHIBASAKI and SHIGEAKI KIMURA

Volatile fatty acids and alcohols which were produced from the phospholipids by autoxidation were examined by gaschromatography and thin layer chromatography. The following compounds were characterized; acetic acid, propionic acid, iso-butyllic acid, n-butyllic acid, n-valelic acid, methanol, ethanol, propanol, iso-butanol, n-butanol, iso-pentanol, and n-pentanol. Acetic acid and ethanol were the major components, and showed 94 % in a total fatty acid and over 98 % in a total alcohol, respectively. (Received Feb. 17, 1969)

褐変した凍豆腐や、麹菌を初めとして多くの微生物が関与してつくられる味噌中には原料大豆に由来するリン脂質がほとんど分解されてあまり残っていないことを報告した¹⁾。そして大豆リン脂質の構成脂肪酸としてはリノール酸のような不飽和脂肪酸が主であるので、この酸化生成物が食品の off flavor に関与することが考えられ、前報でこのリン脂質を自動酸化させた場合に多くのカルボニル化合物が生成することを報告した²⁾。

続いて本報ではリン脂質自動酸化生成物として揮発性脂肪酸およびアルコール類について検討した。

SMOUSE³⁾, HOFFMANN⁴⁾, 岩田ら⁵⁾はこれらのものが大豆油の酸化生成物中に、また ARAI⁶⁻⁷⁾らは大豆臭中に存在することを報告している。

実 験 の 部

1. 脂肪酸のガスクロマトグラフィー

脂肪酸はケイ酸カラムクロマトグラフィーで分離したリン脂質に 10 % KOH 溶液とエタノールを加え、窒素

気流下で2時間還流したのち、30 % H₂SO₄ で酸性にもどし、エーテル抽出して得た。このものをジアソメタンでメチル化し、ガスクロマトグラフィー用の試料とした。

ガスクロマトグラフィーは島津製作所製 GC-4 APTF 型の水素イオン化検出器を使用し、恒温槽温度 190 °C, 10 %-DEGS を充填した内径 3 mm, 長さ 3 m のカラム、キャリアーガスは N₂ 40 ml/min, H₂ 30 ml/min, 検出器および注入口温度 220 °C の条件で行なった。同定は酸化白金による接触還元と炭素数・保持時間の関係より行ない、測定結果は半値幅法より全体に対するピーク面積の比で表らわした。

2. アルコール類

(1) アルコール試料の調製

前報²⁾のごとく自動酸化させたリン脂質に水を加え、十分に攪拌抽出後別し、母液に 2,4-dinitrophenylhydrazine リン酸溶液を加え一夜放置し、カルボニル化合物を除きガスクロマトグラフィー用の試料とした。

* 大豆の食品化学的研究 (第12報)

** 東北大学農学部食糧化学科 (仙台市北六番丁 210)

Department of Food Chemistry of Agriculture, Tohoku University, Sendai.

(2) アルコール類の 3,5-dinitrobenzoate 誘導体の調製

上述の試料の1部を取り、NaClで飽和させたのち、少量のベンゼンで抽出を数回行ない、抽出液に3,5-dinitrobenzoylchloride、数滴のピリジンおよび無水硫酸ナトリウムを加え、1~2時間還流し黄色の溶液を得、TLC用の試料とした⁸⁾。

(3) アルコール類のガスクロマトグラフィー

Carbowax 1500 および PEG 400 を充填した内径3 mm、長さ3 mのカラムを用い恒温槽温度 90 °C、キャリアガスを N₂ 40 ml/min, H₂ 30 ml/min, 検出器および注入温度 120 °C の条件で行なった。同定は標準試薬との保持時間の一致より行なった。

(4) 3,5-dinitrobenzoate 誘導体の薄層クロマトグラフィー

常法に従いシリカゲル G (MERCK 製) で厚さ 0.3 mm, 20×20 cm の薄層を調製し使用前 110 °C で2時間活性化し、展開剤ベンゼン: リグロイン (50:50 v/v) およびトルエン: 酢酸エチル (90:10 v/v)⁹⁾、発色剤1% α -ナフチルアミンエタノール溶液を用いて TLC を行なった。同定は試料と同様に調製した標準 3,5-dinitrobenzoate 誘導体を用いた。

3. 揮発性脂肪酸

(1) 揮発性脂肪酸の調製

リン脂質酸化生成物を10倍量のジクロロメタンで、5時間攪拌抽出後、抽出液に同量の0.1 N-NaOH 水溶液を加え、激しく攪拌し水層を分離した。水層を85%リン酸でpH 8.0にしたのち、濃縮乾固し白色粉末を得2N-H₂SO₄で酸性にし、少量のエーテルで揮発性脂肪酸を抽出した¹⁰⁾。

(2) 揮発性脂肪酸のガスクロマトグラフィー

上記のようにして調製した揮発性脂肪酸をジアゾメタン法でメチル化した試料を、恒温槽温度 40 °C、検出器および注入温度 80 °C 以外は脂肪酸のときと同条件で行なった。同定は標準試薬との保持時間の一致と、炭素数と保持時間の関係より同定を行なった。

結果および考察

1. 大豆リン脂質の脂肪酸組成

ケイ酸カラムクロマトグラフィーで分離した大豆リン脂質をメチル化した

試料のガスクロマトグラフィーを行なった結果は第1図、またその定量値は第1表に示したとおりである。すなわちリノール酸が61.7%と圧倒的に多く、またリノレン酸7.8%、オレイン酸4.3%、さらに20:2が0.5%、20:3が0.5%、20:4すなわちアラキドン酸を4.3%含むことが明らかになった。

2. アルコール類の同定

DNP 処理した試料を Carbowax 1500, PEG 400 を用いてガスクロマトグラフィーを行なった結果は第2図、第3図に示したとおりである。すなわち Carbowax 1500 は PEG 400 に比較して保持時間、ピーク間距離が短かく、エタノールとメタノールの分離が不完全であった。しかし PEG 400 のみでメタノールが1種類多く検出されたのを除くと、ともにエタノール、プロパノール、イ

第1表 大豆リン脂質の脂肪酸組成

Fatty Acids	%
14:0	0.2
15:0	Trace
16:0	17.3
16:1	0.5
18:0	2.7
18:1	4.3
18:2	61.7
18:3	7.8
20:2	0.5
20:3	0.5
20:4	4.3

第1図 大豆リン脂質脂肪酸のガスクロマトグラム

第2図 大豆リン脂質自動酸化生成物-アルコール類の
ガスクロマトグラム

第3図 大豆リン脂質自動酸化生成物-アルコール類の
ガスクロマトグラム

ソ-ブタノール、ブタノール、イソ-ペンタノール、ペンタノールが同定され、エタノールは全体の98%以上であった。

さらにガスクロマトグラフィーの結果を確かめるために、DNP 処理した試料より 3,5-dinitrobenzoate 誘導

体を調製し TLC を行ない、1%-ナフチルアミンエタノール溶液で発色させた。この結果展開剤トルエン系ではメタノールとエタノール、ブタノールとイソ-ブタノール、ペンタノールとイソ-ペンタノールの重なった各々のスポット、およびプロパノールが検出された。いっぽうベンゼン系ではメタノールとエタノール、ペンタノールとイソ-ペンタノールの重なったスポットが、またこれらのスポット間に完全に分離しないプロパノール、イソ-ブタノール、ブタノールのスポットが検出された。ガスクロマトグラフィーおよび TLP の結果より、ともに同種類のアルコールが検出されたが、ガスクロマトグラフィーのほうが分離よく好結果が得られた。

SMOUSE⁹⁾ らは大豆油の戻り香よりエタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノールなどを、岩田¹⁰⁾ は酸化大豆油よりペンタノール、pent-1-en-3-ol, oct-1-en-3-ol を報告しているが、本実験の結果でもそのうちの同種のアルコール類も同定されたが、エタノールが98%以上と圧倒的に多く、これは前報でカルボニル化合物としてアセトアルデヒドがやはり圧倒的に多かったが、アルコール類はリン脂質を自動酸化させた際生成したアルデヒド、ケトンが還元され相当する炭素数のノルマル-アルコール、イソ-アルコールが生産されたものと推定される。

3. 揮発性脂肪酸の同定

HUNTER の方法で揮発性脂肪酸を調製し、ジアゾメタン法でメチル化した試料のガスクロマトグラフィーの結果は第4図に示したとおりであり、5個のピークが検出されこれらを標準物質

の保持時間との一致、および保持時間と炭素数の関係(第5図)より検討した結果、ピーク1は酢酸、ピーク2はプロピオン酸、ピーク3はイソ-酪酸、ピーク4は酪酸、ピーク5はバレリアン酸と判明した。またこれらの定量値は酢酸4.0%、プロピオン酸はtrace、イソ-酪酸

第4図 大豆リン脂質自動酸化生成物-揮発性脂肪酸
ガスクロマトグラム

第5図 大豆リン脂質自動酸化生成物-揮発性脂肪酸
の炭素数と保持時間の関係

は1.5%, 酪酸は3.9%, パレリアン酸は0.5%であり酢酸が圧倒的に多かったが, 官能テストの結果では揮発性脂肪酸のうちもっとも off flavor に関与するものは酪酸, パレリアン酸と推定された。

SMOUSE³⁾ および岩田ら⁵⁾ は揮発性脂肪酸の存在を報告しており, 本実験の結果でもそのうちの同種のものも同定され, 酢酸は SMOUSE の報告では少ないが本実験では94.0%と圧倒的に多かった。このことはカルボニル化合物が酸化すると相当する炭素数の脂肪酸になると考えられ, カルボニル化合物でアセトアルデヒドがやはり圧倒的に多く, これが酸化され酢酸になったものと推定される。また他の揮発性脂肪酸も相当する炭素数のカルボニル化合物が酸化された結果と推定される。

第6図 大豆リン脂質自動酸化生成物-高級脂肪酸
のガスクロマトグラム

いっぽう自動酸化生成物の遊離脂肪酸について恒温槽温度 190°C でガスクロマトグラフィーを行なった結果は第6図に示したとおりであり, ミリスチン酸, 15:0, パルミチン酸, 17:0, ステアリン酸が検出されたがオレイン酸, リノール酸, リノレン酸, アラキドン酸の不飽和脂肪酸が全く検出されず, リン脂質が自動酸化をうけた場合, 圧倒的に多いリノール酸そしてオレイン酸, リノレン酸, アラキドン酸などの不飽和脂肪酸がまず酸化され, カルボニル化合物, アルコール類, 揮発性脂肪酸に分解するものと推定される。MELVIN ら¹¹⁾ はオレイン酸および大豆油の自動酸化生成物としてアゼライン酸が主成分であると報告しているが, 本実験の結果では検出されず2次的に分解してさらに低分子になったものと推定される。

また30°Cでリン脂質を自動酸化させた場合は50°Cのときと同種の揮発性脂肪酸が検出され定量値もほぼ50°Cのときと等しかった。

要 約

リン脂質自動酸化生成物として揮発性脂肪酸およびアルコール類についてガスクロマトグラフィー, TLC で検討した。この結果揮発性脂肪酸として酢酸, プロピオン酸, イソ-酪酸, 酪酸, パレリアン酸が同定され, 酢酸が全体の94%と圧倒的に多かった。いっぽうアルコ

ール類としてメタノール、エタノール、プロパノール、イソブタノール、ブタノール、イソペンタノール、ペンタノールが同定され、エタノールが全体の 98 % 以上で圧倒的に多かった。

ガスクロマトグラフィーを行なうに際し、御指導を賜わった本学部杉沢博氏、秦正弘氏に厚く感謝の意を表する。

本報告の概要は昭和43年10月13日日本農芸化学会東北支部大会で講演した。

文 献

- 1) 柴崎一雄・木村繁昭：食品工誌，**16**, 57 (1969).
- 2) 柴崎一雄・木村繁昭：食品工誌，**16**, (6), (1969).
- 3) SMOUSE, T.H. and CHANG, S.S.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **44**, 509 (1967).
- 4) HOFFMANN, G.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **39**, 439 (1962).
- 5) 岩田直樹・森田昌治・太田静行：油化学，**14**, 241 (1965).
- 6) ARAI, S., SUZUKI, H., FUJIMAKI, M. and SAKURAI, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 863 (1966).
- 7) ARAI, S., KOYANAGI, O. and FUJIMAKI, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 863 (1967).
- 8) 実験化学講座，続5，有機化合物の定性確認法(上)，(丸善)，p. 402.
- 9) DHONT, J.H. and ROOY, C.: *Analyst.*, **86**, 527 (1961).
- 10) HUNTER, I.R. HAWKINS, N.G. and PENCE, J.W.: *Anal. Chem.*, **32**, 1757 (1960).
- 11) MELVIN, E.H. and WIEBE, R.: *J. Am. Oil Chemist's Soc.* **34**, 411 (1957).

(1969年2月17日受理)