油脂の変敗に関する研究 (第5報)

リノール酸メチルヒドロパーオキシドの
酸化物およびその急性毒性

(昭和 47 年 2 月 22 日受理)

天 野 立 爾*

Oxidative Rancidity of Fat and Oil (V) Oxidative Products of Methyl Linoleate Hydroperoxide and the Acute Toxicity

Ryuji AMANO

(National Institute of Hygienic Sciences: 18-1, Kamiyoga
1-chome, Setagaya-ku, Tokyo)

It was reported previously that methyl linoleate hydroperoxide (ML-HPO) absorbed oxygen and the oxidized ML-HPO contained great quantities of methyl 8-formyl octanoate (MFO) and malonaldehyde (MA).

In this report, the oxidative products of ML-HPO were examined. A main product which had HO-, HOO- and *trans* -C=C- groups was separated from the oxidized ML-HPO by column chromatography. The molecular weight of the product was about 620 and decreased to a half by catalytic hydrogenation. It was indicated that the product was a dimer and the monomer units were combined by peroxy group (-O-O-). The dimer released easily MFO and MA on heating.

The reaction on glutathione and toxicity of the dimer were researched. Sulfhydryl group of glutathione decreased more quickly by the dimer than by ML-HPO when they were incubated with glutathione in phosphate buffer solution (pH 7.6) at 37°C. The dimer inhibited the growth of mice as well as ML-HPO.

(Received February 22, 1972)

不飽和脂肪酸の自働酸化において、第1次酸化生成物はヒドロパーオキシドであることは広く認められている^{1)~5)}。またこの物質から生ずる第2次、第3次の生成物についても非常に多種の化合物が確認されている。しかしながらヒドロパーオキシドのその後の運命あるいはその分解生成物の生成機構等についてはまだ不明な点も多いので、前報⁶⁾に引き続いてリノール酸メチルヒドロパーオキシド (ML-HPO) の酸化物につき実験した。

前報においては純 ML-HPO が自働酸化して酸素を吸収することを明らかにし、酸化した ML-HPO 中に多量の8-ホルミルオクタン酸メチル (MFO) およびマロナルデヒド (MA) が存在することを確認した。さらにこ

れらのアルデヒド類は純 ML-HPO の単なる熱分解物や、窒素中での分解物中からはほとんど検出されないこともわかった。この実験結果から、これらのアルデヒドの生成には酸素の必要なことが明らかとなった。またこれらの実験中に MFO および MA が遊離の形で当酸化物中に存在するのではなく、不安定な前駆体として存在するらしい結果が観察された。そこで今回は ML-HPO の酸化物を作り、その主要生成物を分離し、それにつき MFO および MA との関連性を調べ、化学構造の一部を推定した。またこの物質の毒性、生体成分との反応性についても検討した。

1. 実験方法

1-1. リノール酸メチルヒドロパーオキシドの酸化および酸化物の分離

* 国立衛生試験所：東京都世田谷区上用賀 1-18-1

酸化方法は前報の1-4の方法を約3倍のスケールにした方法、すなわちワールブルグ検圧計用のフラスコ（内容約40 mlの三角フラスコ）に ML-HPO 0.15 g を入れ、酸素中で45°において5.5時間振とう酸化させた。用いた ML-HPO は前報の方法によりリノール酸メチル自動酸化物から分離したもので、過酸化物価より求めた純度は96%であった。

酸化物をエーテルで抽出し、溶媒を減圧で除去し、得られた残留物1 gを前報の1-1で用いた分配カラムクロマトグラフィーに掛けて4つの区分に分割した。

1-2. 各区分の検査

分離した4つの区分について以下の試験を行なった。

1-2-1. 過酸化物価⁷⁾ およびチオバルビツール酸価⁸⁾の測定。

1-2-2. ガスクロマトグラフィー 検体をジクロロメタンに溶かし、内部標準としてフタル酸ジメチルを加えて試料とした。装置は島津 GC-3 AF 型、カラムは5% DEGS on Gas chrom Q 60~80, ステンレススチール 3 mm×1.5 m および 5% SE-30 Gas chrom Q 60~80, ステンレススチール 3 mm×1.5 m の2種類を用いた。その他の操作条件は注入温度約180°カラム温度150°, キャリヤガス (N₂) の入口圧 1.0 kg/cm² 等で行なった。

1-2-3. 薄層クロマトグラフィー プレートは Kiesel-gel G (Merck) 250 μ を110°, 1.5時間活性化したものを用いた。展開溶媒はベンゼン-メタノール (95:5), エーテル-石油エーテル (2:3), クロロホルム-酢酸エチル (7:3) 等を、また発色剤は1%硫酸セリウムを10%硫酸に溶かした液 (110°, 10~20分加熱), 2,4-ジニトロフェニルヒドラジンのリン酸酸性エタノール溶液, 1%過マンガン酸カリウム溶液および TBA 試液⁹⁾ (110°, 10分加熱) を適宜使用した。

1-2-4. 赤外線および近赤外線吸収スペクトルの測定 赤外線吸収スペクトル (IR) の測定は日本分光製 IR-S 型 IR スペクトロメーターを用い、Liquid Film で測定した。近赤外線吸収スペクトル (NIR) は日立製分光光度計 EPS-3 T 型を用い、四塩化炭素溶液で測定した。

1-2-5. 分子量の測定 ガラスササミスタ付きの手製の装置を用いたベンゼン氷点降下法による。

1-2-6. 水素化ホウ素ナトリウムによる還元 破碎した水素化ホウ素ナトリウム5分を氷冷したメタノール100分に溶かし、氷冷、かく拌しながら試料1分のメタノール溶液を少量ずつ加えて還元した。そのまま2時間かく拌を続けたのち、室温に1時間放置し、水を加えて希釈し、エーテルで抽出した。抽出液は水洗、乾燥後減圧で溶媒を除去した。

1-2-7. 接触還元 試料1分をメタノール100分に溶かし、酸化白金0.1分を加えて常法により室温、常圧下で3時間振とうした。触媒をろ去後、減圧でメタノールを

留去した。

1-3. グルタチオンとの反応性

検体に 1 mg/ml になるように0.2%の Tween 80 を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) を加え、超音波により乳化し、これと同量の 2×10^{-3} M のグルタチオン溶液を混和し 37° でインキュベートした。一定時間後その 1 ml を取り、 0.2×10^{-3} M の 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) リン酸緩衝液 (pH 7.6) 9 ml を加えてかき混ぜたのち、Spectronic 20 (Bausch & Lomb) を用いて波長 415 mμ の吸光度を測定した。

1-4. マウスに対する経口毒性の試験

マウス (DDY 系, オス, 体重 13~18 g) 1群5匹を用い試料 9.4~18.6 ml/kg を胃ゾンデで1回投与し、投与後の症状ならびに体重変化を観察した。対照としてリノール酸メチルを投与した。飼料および水は自由に摂取させた。

1-5. 8-ホルミルオクタン酸メチルおよび9-オキシノ

Fig. 1. Elution pattern of column chromatography of oxidized ML-HPO

Fig. 2. Thin-layer chromatogram of ML-HPO and column chromatographically separated fraction of oxidized ML-HPO

A. ML-HPO, B. 1st fraction, C. 2nd fraction, D. 3rd fraction, E. 4th fraction.

Solvent: benzene-methanol (95-5), Coloring reagent: 1% Ce(SO₄)₂ in 10% H₂SO₄

Table 1. Characteristics of Fractions Separated by Chromatography

	Peroxide value meq/kg	MFO I %	MFO II	Thiobarbituric acid value MA mol/kg
1st fraction (24%)	5600	1.2	—	—
2nd fraction (18%)	4800	13.3	+	0.08
3rd fraction (50%)	4350	11.1	—	0.11
4th fraction (8%)	2700	8.0	—	0.10

MFO I Determined by GLC

MFO II Detected by TLC

ナン酸メチル標品の調製法

9,10-ジオキシステアリン酸メチルを原料として Marker らの方法⁹⁾で過ヨウ素酸酸化し、得られたノナールとの混合物を減圧蒸留して MFO を製した。bp 110~112° (3 mm Hg), 純度99% (GLC による)

9-オキシノナン酸メチル (MON) は MFO を水素化ホウ素ナトリウムによりメタノール中で還元して製した。bp 136~139° (3 mm Hg)

2. 実験結果および考察

2-1. 酸化生成物の分離について

前記のような酸化条件で ML-HPO 1 mol は酸素約 0.75 mol を吸収し、強い変敗臭を有する淡かっ黄色の油状物に変化した。この酸化物はカラムクロマトグラフィーにより Fig. 1 に示したような溶離パターンを与えた。

第2, 第3, 第4の各区分ははっきり分離し得なかったが, ML-HPO 酸化物中の主要成分の分離を目的としているので Fig. 1 のように分画し, 第3区分を主要区分と見なした。Frankel ら¹⁰⁾は当実験と同様のカラムを用いてリノール酸メチルの自動酸化物を分離しているが, 著者が得た第3区分と一致する流出点に“第2次酸化生成物”が溶離することを認めている。なおこれらの区分は薄層クロマトグラフィー (TLC) でテーリングがあり (Fig. 2), いくつかの物質の混合物と考えられる。

第1区分は TLC (Fig. 2), 過酸化物価 (Table 1), IR などから未変化の ML-HPO に少量の酸化物が混入したものであることが明らかになった。またこの分配クロマトグラフィーの回収率は約87%であった。

2-2. 各酸化区分の特性について

分離した各区分について過酸化物価, チオバルビツール酸価 (TBA 価) およびガスクロマトグラフィー (GLC) ならびに TLC による MFO の検出を行なった。

その結果第2区分では GLC, TLC 共に MFO を検出したが, 第1, 第3, 第4区分では GLC によるみ検出され, TLC では確認できなかった。このことは第2区分に含まれる MFO と, 他の区分に, GLC で検出される MFO とは違った形態のもの (前駆体のようなもの) であることを示すと考え, 以下の3つの実験を行なった。

A さきの分配カラムクロマトグラフィーに MFO 標品を注入し, クロマトグラムを画かせると MFO は第2区分と重なった。

B 第3区分 (あるいは第4区分) を窒素中で180°に瞬時加熱したものからは, TLC によっても MFO が確認された。同様のことが180°加熱に替えて48時間, 37°に放置した場合にも認められた。

Fig. 3. Thin-layer chromatogram of 2nd fraction, 3rd fraction and heat decomposed 3rd fraction.

A. 2nd fraction, B. 3rd fraction, C. decomposed 3rd fraction, D. MFO
Solvent: pet. ether-ether (3-2), Coloring reagent: 2,4-dinitrophenylhydrazine.

Table 2. The Contents of MFO and MON in 2nd Fraction, 3rd Fraction and their Derivatives

	MFO (%)	MON (%)
2nd fraction	13.0	0
Reduced 2nd fraction*	4.4	7.5
3rd fraction*	11.1	0
Reduced 3rd fraction*	5.8	0.11
Hydrogenated 3rd fraction**	0.03	0.08

* by sodium borohydride

** by catalytic hydrogenation

Fig. 4. Infrared spectrum of 3rd Fraction

C 第2, 第3の両区分と第3区分の熱分解物を水素化ホウ素ナトリウム還元あるいは接触還元したのについて GLC により MFO と MON を定量し, Tabel 2 のような結果を得た。

実験Cによって生成する MON は最初から遊離の形で混入していた MFO が還元されてできたものと考えられる。水素化ホウ素ナトリウム還元物中に検出された MFO は遊離のものではなく, GLC 操作時に前駆体の熱分解によって生成したものであろう。

以上実験 A, B, C 等より, 第2区分中には遊離の MFO と前駆体形の MFO が存在し, 第3, 第4区分中には前駆体形の MFO が存在するものと判定した。またこの前駆体は不安定で, 加熱などにより容易に分解して MFO を放出することもわかった。

第2～第4区分の TBA 値は Table 1 のようであった。TBA 試験の標的物質である MA⁸⁾ についても MFO と同様に前駆体の存在を調べた。

まず TLC を使って第3区分中の遊離の MA を試験したが, はっきりした結果は得られなかった。そこで MA の水溶性を利用してつぎの実験を行なった。第3区分を一定量のエーテルに溶かし, 同容の水を加えて激しく振とう抽出後, 水層を取り, TBA 試液を加えて加熱発色し, MA 量を測定した。同様の操作を第3区分の熱分解物(窒素中, 180°) および MA 標準液についても行なった。その結果第3区分中には水溶性の MA はほとんど検出されなかった (0.0007 mole/kg) が, 熱分解したものからは 0.016 mole/kg の水溶性 MA が検出された。なお MA 標準液を用いた実験の回収率は約75%であった。

以上のように, MA の場合も MFO と同様に, 熱によって分解して MA を放出する前駆体のような物質が存在する可能性が高いものと判定した。

2-3. 第3区分の化学構造について

第3区分は酸化生成物中の主要区分で, 全酸化物の50%以上を占めているので, この区分の化学構造の一部について調べた。なおこの区分は, 2-2 に述べたように活性酸素を有し, 比較的不安定であるため, 官能基の測定, 誘導体の作製等の操作に制限があって, 十分に検討することができなかった。IR (Fig. 4) より水酸基ある

いはヒドロパーオキシ基, *trans* モノエンの存在が認められた。原料の ML-HPO 中にあった *cis-trans* 共役ジエンは消失しており, 9 から13位の間の炭素原子に酸化が起こっているものと思われる。NIR からヒドロパーオキシ基と水酸基と2つの官能基の存在が明らかになった。またヒドロパーオキシ基に由来する 1.46μ の吸光度はヨウ素法で測定した過酸化物質価, 4350 meq/kg に相当する強さの約1/4であった。なお, 以下に述べるように接触還元によって分子量が半減するので残りの活性酸素はジアルキルパーオキシ基によるものと推定される。

第3区分の平均分子量は 620 ± 40 であった。この数値は ML-HPO (分子量 326) のダイマーに相当する。そこでこのダイマーの結合様式につき検討した。

ダイマーを接触還元すると分子量は 330 ± 20 に半減した。このことから当区分は ML-HPO の基本骨格が C-O-O-C すなわちジアルキルパーオキシ基で結合したダイマーであることが明らかとなった。

2-4. グルタチオンとの反応性について

Christophersen¹¹⁾¹²⁾ は生体内の酸化脂質の無毒化にグルタチオンが大きな役割を演じていることを明らかにし, その反応の酵素系についても検討を加えている。また佐藤ら¹³⁾ は酸化油脂中に存在するケト酸が非酵素的にもグルタチオンと特異的に反応することを確認している。当実験で得られた第3区分がケト基を有するか否か

Fig. 5. Destruction of glutathione-SH by 3rd Fraction

Fig. 6. Effect of Oxidation Products on Body Weight Gain in Mice

●—● Methyl linoleate (Control), ○—○ 3rd Fraction,
△—△ ML-HPO

* Body weight at administration = 100

は、原料由来のエステル結合のために IR から明らかにし得ないが、佐藤らのケト酸と同様に油脂酸化の第2次生成物であることからグルタチオンとの反応性を調べた。なお SH 基の測定法には Ellman の原法¹⁴⁾をこの実験に便利なように変更した方法を用いた。

結果は Fig. 5 に示したように、この物質は ML-HPO に比較してはるかに強力にグルタチオン SH 基を消滅させた。活性酸素による酸化のために SH 基が減少するとすれば、過酸化物質の大きい ML-HPO の方が反応性が強くなければならぬから、第3区分による SH 基の分解には、他のファクターの関与があるものと考えられる。この事実は SH 化合物である酵素などに対する阻害作用となって現われる可能性もあり、生体に対しては毒性を持つものと思われる。

2-5. マウスに対する経口毒性について

第3区分および ML-HPO の経口投与によるマウス体重に与える影響は Fig. 6 に示したように両者ともほぼ同程度の体重増加抑制作用を有していた。

中毒時の症状はどちらの毒物も類似しており、投与後 1~2 時間で運動が不活発になり、立毛してうずくまった。24~48 時間後にはこれらの症状はほとんど回復した。

ML-HPO の 13.3 ml/kg 投与群および第3区分の 18.6 ml/kg 投与群中の各 1 匹が投与約 6 時間後にへい死した。これについて解剖したところ、両者に共通して以下のような処見があった、胃内面の充血と粘膜はく離、十二指腸回腸上部にかけての充血、その他肝の充血と混濁、ヒ臓の腫脹、腎中心部の充血等。

この実験でリノール酸メチルの 2 次酸化物である第3区分にも毒性が認められたが、酸変油脂の毒性においてもヒドロパーオキシドばかりでなく、第2次生成物にも毒性があることを示す文献も多い^{15~17)}。

3. 結 論

ML-HPO の酸化物中の主要区分を分離した。この区

分は加熱あるいは長時間の放置により MFO および MA を放出する比較的不安定な物質(群)であった。ヒドロパーオキシ基、水酸基、*trans* モノエン等の官能基を有し、ML-HPO の骨格が $-O-O-$ 、すなわちジアルキルパーオキシ基によって結合したダイマーであろうと推定した。

この主要区分は ML-HPO より過酸化物質価が低いにもかかわらず、グルタチオンのチオール基をより強く分解した。

マウスに対する経口毒性は、体重増加の阻害作用で観察すると、この区分は ML-HPO とほぼ同ような強さであった。

終りに本報告についてご指導、ご校閲をいただいた東北大学教授 内山 充博士、国立衛生試験所所長 川城 巖博士、同食品部長 田辺弘也博士ならびに動物実験につき種々ご便宜を与えられた国立衛生試験所小林和雄技官に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Farmer, E. H., Koch, H. D.: J. Chem. Soc. **1942**, 121 (1942).
- 2) Farmer, E. H., Sutton, D. A.: *ibid.* **1943**, 119 (1943).
- 3) Canon, J. A., Dutton, H. J.: J. Am. Oil Chemists' Soc. **29**, 447 (1952).
- 4) Privett, O. S., Lundberg, W. O., Khan, N. A., Tolberg, W. E., Wheeler, D. H.: *ibid.* **30**, 61 (1953).
- 5) Privett, O. S., Nickell, C., Tolberg, W. E., Paschke, R. F., Wheeler, D. H., Lundberg, W. O.: *ibid.* **31**, 460 (1954).
- 6) 天野立爾: 食衛誌, **11**, 439 (1970).
- 7) 日本油化学協会: “油脂化学便覧” p. 359 (1965) 丸善.
- 8) 天野立爾: 食衛誌, **9**, 119 (1968).

-
- 9) Maerker, G., Haebeler, E. T.: J. Am. Oil Chemists' Soc. **43**, 97 (1966).
 - 10) Frankel, E. N., Evans, C. D., Moser, H. A., McConnell, D. G., Jones, E. P.: *ibid.* **38**, 134 (1961).
 - 11) Christophersen, B. O.: Biochim. Biophys. Acta. **164**, 35 (1968).
 - 12) Christophersen, B. O.: *ibid.* **176**, 463 (1969).
 - 13) 佐藤政男, 内山 充: 日本食品衛生学会第 18 回学術講演会 1969 年 10 月 仙台.
 - 14) Ellman, G. L.: Arc. Biochem. Biophys. **82**, 70 (1959).
 - 15) 衣巻豊輔: 日水誌. **36**, 854 (1970).
 - 16) 伊藤誉志男, 磯部公明, 関田 寛, 大沢誠喜, 武田明治, 田辺弘也, 長尾重之, 桑村 司: 食衛誌. **11**, 268 (1970).
 - 17) 俣野景典, 土田雅子, 三浦利之, 武藤 健, 宮木高明: 昭和 42 年度油化学研究発表会, 1967 年 10 月, 名古屋.