油脂の変敗に関する研究 (第3報)

不飽和脂肪酸メチル自動酸化物のチオバルビツール酸価とアゼライン酸
半アルデヒドメチル (8-ホルミルオクタン酸メチル)
の生成量について

(昭和43年3月1日受理)

天 野 立 爾*

Studies on Oxidative Rancidity of Fat and Oil (III) Thiobarbituric Acid-Value and the Amount of Methyl Azelasemialdehyde (methyl 8-formyloctanoate) in Autoxidized Unsaturated Fatty Acid Methyl Esters

Ryuji AMANO

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

The change of thiobarbituric acid value (TBAV), peroxide value, quantity of conjugated diene, amount of methyl azelasemialdehyde (methyl 8-formyloctanoate) etc. were measured by the respective adequate method during the process of autoxidation of both methyl linoleate, of methyl linolenate and of alkali isomerized methyl linoleate.

Each of the curves showing the change of TBAVs of the three esters had a respective peak, though there were some differences in the heights of the peaks by the kind of fatty acid. The peak height of methyl linolenate was about four times greater than that of methyl linoleate, while that of isomerized methyl linoleate was about one half of linoleate. Since the peaks of TBAV in the cases of methyl linoleate and linolenate appeared later than the peaks of conjugated diene and peroxide value (Fig. 1 and 2), substance[s] which gave TBAV was supposed to be formed not from their first oxidative product and conjugated diene hydroperoxide, but from furthermore oxidized substance[s].

Methyl azelasemialdehyde (MFO) was identified and determined by gas chromatography from each of the autoxidized esters. The amount of MFO formed from methyl linoleate was larger than those from the other esters. In case of methyl linoleate, the tendency was similar both in the formation of MFO and in the change of TBAV at several autoxidation levels. However, no red pigment, such as malonaldehyde TBA condensation product, was obtained from the reaction of TBA and MFO which was synthesized from 9,10-dihydroxy-stearic acid. From the facts, it can be considered that the change of TBAV was more closely related with MFO formation than with other indexes of lipid-autoxidation.

(Received March 1, 1968)

油脂, 油脂性食品あるいは不飽和脂肪酸の酸化過程におけるチオバルビツール酸 (以下, TBA) 価と他の酸化指標との比較は, 官能検査との相関性^{1)~3)}, 過酸化物質との関係⁴⁾, 酸素吸収量や共役ジエン量との関連^{5)~6)}など多くの報告がある。しかしこれらは TBA 価が油脂の酸

化変敗の程度を知るための指標として用い得るか否かの証明を試みたものが大部分で, TBA 価の本体あるいは機構の解明を目的としたものは少ない。

著者はこの TBA 価の本質を調べる目的で, 前報^{7)~8)}までに呈色物の同定, 2, 3 の酸化方法によるリノレン酸メチル自動酸化物における TBA 反応物の検索, 過酸化

* 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

物価やカルボニル価等の酸化指標との関連性の検討などを行なってきた。その結果多くの実験者が測定に用いている赤色色素はマロンアルデヒドと TBA との縮合物であり、このものは散光下、紫外線照射下あるいはγ線照射下に酸化させたリノレン酸メチル中に検出されること、リノレン酸メチルについては TBA 価とカルボニル価との自動酸化過程における消長がよく似ていることなどがわかった。

本報ではリノール酸、リノレン酸およびアルカリ異性化リノール酸の各メチルエステルを 50° の恒温で自動酸化させ、TBA 価をはじめ過酸化価、共役ジエン量、重量増加率、試料の分解率などを酸化過程を追いながら検討すると同時に、カルボキシル基に最も近い二重結合を酸化的に切断することによって生ずるアゼライン酸半アルデヒドメチルエステル (8-ホルミルオクタン酸メチル以下、MFO) の量の変化を観察した。

実験方法

試料

1) リノール酸メチル: サフラワー油を原料としてトラブロムステアリン酸を経て作った。ガスクロマトグラフィー (以下、GLC) による純度は 99% 以上、共役ジエン酸 0.01% 以下⁹⁾。トランス型二重結合は、赤外吸収スペクトルによる試験 (波数 965 cm^{-1}) では、少量が検出されるにすぎなかった。

2) リノレン酸メチル: 前報⁹⁾ に同じ。

3) アルカリ異性化リノール酸メチル: 上記リノール酸メチルを窒素気流中で 28% エチレングリコール製水酸化カリウムにより 170°~175° の温度で 30 分間異性化後、メチル化して製する。GLC による純度 94%、不純物はリノール酸メチル 4%、比吸光係数 ($E_{1\text{ cm}}^{1.0\%} = 87.6$, 波長 $233\text{ m}\mu$)。

4) MFO: オレイン酸より 9,10-ジオキシステアリン酸メチルを作り¹⁰⁾、これを、King¹¹⁾ の方法を準用して、過ヨウ素酸酸化して MFO を合成した。GLC による純度 93% (面積法)、非カルボニル系不純物 7%。

酸化方法

攪拌のために径約 2 mm のガラス玉 2 個を入れた直径 18 mm、高さ 25 mm のピーカーに試料エステル 0.22~0.23 g を取り (層厚約 1 mm)、50° のふ卵器中できどきふり動かしながら酸化させる。1 回の測定にこのピーカー 1 個の内容量を用いる。

酸化指標の測定法

1) TBA 価 (マロンアルデヒドの mol 数/試料 1 kg)、過酸化価 (ミリ当量数/試料 1 kg)、共役ジエン量 (波長 $233\text{ m}\mu$ における比吸光係数: $E_{1\text{ cm}}^{0.1\%}$) については前報⁹⁾ と同じ方法を用いた。

2) 重量増加率: 酸化前および測定時の重量から試料エステル 1 g についての重量増加率 (mg/g) を求めた。

3) 試料エステル分解率: 自動酸化エステルをそのま

ま酢酸エチルに溶かし、*p*-Tolylbenzoate を内部標準として GLC により試料エステルの残存量を定量し、分解率 (%) で表わした。GLC 装置は島津 GC-1 C 型、水素炎イオン化検出器、カラムは 5% Poly-diethylene glycol succinate-Chromosorb W の $4\text{ mm} \times 1.5\text{ m}$ ガラスカラム (以下、DEGS Column) を用いた。操作条件はカラム温度 170°, キャリヤーガス (N_2) 流量 70 ml/min 試料気化室温度 210° である。

4) MFO の生成量: 前記 3) の試料エステル分解率の測定のときに得られる GLC のチャートより内部標準、*p*-Tolylbenzoate、の保持時間に対する相対保持時間が 0.195 のピークの高さを測定し、内部標準とのピーク高の比で生成量を表わした。

MFO の同定

前記の方法で酸化させた自動酸化リノール酸メチル 0.1 g、2% の塩化水素を含む無水メタノール 2 ml、オルトギ酸メチル 0.1 ml を共セン試験管に取り、密センして一晩放置した後、氷冷しながらフェノールフタレインを指示薬としてメタノール製ナトリウムメチラートで素早く中和し、ただちに氷水で約 3 倍に希釈する。これをエーテルで抽出し、水洗、脱水後、濃縮して 10 ml とする。これをアセタール化自動酸化リノール酸メチル溶液 (以下、Acet Ox ML) とする。

先に合成した MFO についても同様な方法でアセタール化して Methyl 9,9-dimethoxy nonanoate (以下、Acet MFO) を製する。

また同じ自動酸化リノール酸メチル 0.1 g を 3 ml のエタノールに溶かし、Girard T 試薬 0.1 g、氷酢酸 0.3 ml を加え 37° のふ卵器中に一晩放置した後、10% 炭酸ナトリウム液で中和し、水を加えて約 10 ml とする。この液をエーテルで抽出し、水洗脱水後、濃縮して 10 ml にする。これを脱カルボニル自動酸化リノール酸メチル溶液 (以下、Decarb Ox ML) とする。

このように処理した Acet Ox ML, Decarb Ox ML, Acet MFO および未処理の自動酸化リノール酸メチル、MFO について DEGS Column, SE-30 Column (5% SE-30-Chromosorb W の $4\text{ mm} \times 1.85\text{ m}$ ガラスカラム) の 2 本を用いて GLC を行なった。操作条件は、DEGS Column についてはカラム温度 155°, キャリヤーガス (N_2) 流量 70 ml/min, SE-30 Column についてはカラム温度 165°, キャリヤーガス (N_2) 流量 65 ml/min であった。なお気化室の温度はすべて 210° にした。

実験結果および考察

1. 脂肪酸の種類と TBA 価について

50° で自動酸化させたリノール酸メチル、リノレン酸メチルおよびアルカリ異性化リノール酸メチルのいずれのエステルにおいても $\lambda_{\text{max}} 532\text{ m}\mu$ のマロンアルデヒド-TBA 縮合物が見出された。その量は各脂肪酸によって異なり、TBA 価の最大時において比較すると、

Fig. 1. Autoxidation of methyl linolenate at 50°C

TBAV: thiobarbituric acid value, POV: peroxide value, Conj. Diene: quantity of conjugated diene, Wei. Incr.: rate of weight increase, Samp. Decomp.: ratio of sample decomposition, MFO: amount of methyl azelasemialdehyde

Fig. 2. Autoxidation of methyl linolenate at 50°C

TBAV: thiobarbituric acid value, POV: peroxide value, Conj. Diene: quantity of conjugated diene, Wei. Incr.: rate of weight increase, Samp. Decomp.: ratio of sample decomposition, MFO: amount of methyl azelasemialdehyde

Fig. 3. Autoxidation of alkali isomerized methyl linolenate at 50°C

TBAV: thiobarbituric acid value, POV: peroxide value, Conj. Diene: quantity of conjugated diene, Wei. Incr.: rate of weight increase, Samp. Decomp.: ratio of sample decomposition, MFO: amount of methyl azelasemialdehyde

リノール酸メチルを1とした場合に、リノレン酸メチルは約4、異性化リノール酸メチルは約0.6であった。(Fig. 1, 2, 3)

Tarladgis ら⁶⁾が行なったリノール酸、リノレン酸の45°の酸化物についての実験では、リノレン酸はリノール酸の約2倍の呈色量であった。しかし Dahle ら⁵⁾は97.5%のリノール酸メチル(不純物はオレイン酸メチル2.5%)を用いて37°で酸化させたものについて、過酸化物質 0~2000 meq/kg の間では TBA 価はほとんど0であったと述べている。またリノール酸中の不純物として含まれるリノレン酸のために TBA 反応が呈色するものと推定している報告¹²⁾もある。

本実験で用いたリノール酸メチルについて TBA 価にこのような大きな影響を与える程のリノレン酸メチルの混入は考えられないので、この原因は、試料ではなく、酸化方法、酸化程度または TBA 価の測定法にあるものと考えて、50°および40°で酸化させたリノール酸メチルにつき Dahle ら⁵⁾の方法を用いて TBA 反応を行なったところ、かなりの呈色を認めた。しかしその呈色は著者の用いた方法に比べて弱く、酸化の初期では Dahle らの採用した試料の使用量では変化の程度がはっきりとは認められないかもしれない。

なおリノール酸メチルを50°および40°で酸化させたものの TBA 価、過酸化物質、共役ジエン量および重量増加率をそれぞれの最大値で比較すると、そこに達するま

での時間は遅いが、その値は 40° の方が大きくなっている。

2. TBA 価と他の酸化指標の消長の関連性について

TBA 価およびその他の酸化指標の酸化時間に対する変化を Fig. 1~3 に示した。これらから明らかなように、TBA 価ばかりでなく過酸化物質価、共役ジエン量(異性化リノール酸メチルを除く)、重量増加率、MFO 生成量なども極大値を有し、この酸化条件では、これらの反応を呈するものが安定な酸化生成物でないことを示している。

リノール酸、リノレン酸の自動酸化の第1次生成物は共役ジエンハイドロパーオキサイドが大部分であるといわれているが^{13)~16)}、本実験でも共役ジエン量を示す $\lambda 233 \text{ m}\mu$ の吸光度の値および過酸化物質価が共に酸化の比較的初期に極大値を持っていることがわかった。TBA 価の極大値はこの2つの指標の極大値より少し遅れて現われているが、このことは TBA 価を与える物質が第1次酸化生成物ではないことを示している。一方易揮発性物質の生成する場合には誤差が大きくなることはまぬがれないので、正確とはいえないが、酸素の吸収量を間接的に表わすと思われる重量増加率および、リノール酸、リノレン酸などの酸化経過を酸素の吸収量(ワールブルグ検圧計を用いている)と TBA 価の2つを追って実験している Tarladgis ら⁶⁾ は酸素吸収量がほぼ一定となった点に TBA 価の極大値があることを指摘していることなどから考えると、TBA 反応物は第1次酸化生成物のさらに酸化されたものである可能性が考えられる。

共役ジエンを始めから持っている異性化リノール酸メチルは他の2つのエステルとはかなり違った酸化過程を取ることが Fig. 3 から明らかとなった。しかし混在するリノール酸メチルの量(4%)から単純に計算した TBA 価よりも大きな TBA 価を与えるから、共役ジエン酸エステルの自動酸化物中にも TBA 反応を呈する物質が存在することが推定できる。

3. TBA 価と MFO 生成量について

自動酸化メチルエステルを GLC で分離すると MFO が検出される。Frankel ら¹⁷⁾ はダイズ油脂脂肪酸メチルエステルの自動酸化物から GLC により、野中¹⁸⁾ は魚油あるいは不飽和脂肪酸から 2,4-Dinitrophenylhydrazones としてペーパークロマトグラフィーにより、それぞれ MFO あるいはアゼライン酸半アルデヒドを検出している。

自動酸化リノール酸メチルでは MFO の生成量が他のエステルに比べて多く (Fig. 1~3)、しかもその生成量と TBA 価との間に著しい相関性がある。そこで MFO の同定と、これが自動酸化物中に生じているものか、あるいは GLC 操作中に熱によってその前駆物質から生じたものかを判定する目的で、実験方法の MFO の同定の項に述べた実験を行なった。この実験ではできる限り温和な条件により、MFO の除去または誘導体の生成を行ない、これらの目的を達するように心掛けた。その結果を

Fig. 4. Gas chromatograms of autoxidized methyl linoleate, methyl azelaaldehyde (methyl 8-formyloctanoate) and their derivatives

Column: 5% DEGS 4 mm $\times$ 1.5 m at 155°C
N₂ flow: 70 ml/min

Ox ML: autoxidized methyl linoleate, Decarb Ox ML: decarbonylized autoxidized methyl linoleate, Acet Ox ML: dimethylacetal derivative of autoxidized methyl linoleate, MFO: methyl azelasemialdehyde, Acet MFO: dimethylacetal of methyl azelasemialdehyde (methyl 9,9-dimethoxynonanoate)

Fig. 5. Gas chromatograms of autoxidized methyl linoleate, methyl azelaaldehyde and their derivatives

Column: 5% SE-30 4 mm $\times$ 1.85 m at 165°C
N₂ flow: 65 ml/min

Ox ML: autoxidized methyl linoleate, Decarb Ox ML: decarbonylized autoxidized methyl linoleate, Acet Ox ML: dimethylacetal derivative of autoxidized methyl linoleate, MFO: methyl azelasemialdehyde, Acet MFO: dimethylacetal of methyl azelasemialdehyde (methyl 9,9-dimethoxynonanoate)

Fig. 4, 5 に示した。

図からわかるように MFO の同定についてはほとんど

決定的であるが、生成時期についてはアセタール化あるいは脱カルボニル化が不完全のために一部が残ったのか、または GLC 操作中に生ずるのかは不明である。しかしいずれにしても大部分の MFO は自動酸化物中に存在していることは確実である。なお合成 MFO は TBA 反応により黄色の色素、 $\lambda_{\max}$ 455 m μ を生ずるが、 λ 532 m μ には顕著な吸収を示さず、TBA 価におよぼす MFO そのものの影響は小さい。このようなことからリノール酸メチル自動酸化物では TBA 価を与える物質の生成量と MFO の生成量との間には密接な関係があることがわかった。

リノレン酸メチル、異性化リノール酸メチルでは TBA 価との間に上記のような関係はなく、また生成量自体も少ない。今回の実験とは酸化条件が少々異なっているが、前報⁸⁾でリノレン酸メチルにつき TBA 価とカルボニル価との消長が類似していることを認めたが、そのカルボニル価の一部を占めると思われる MFO が TBA 呈色とほとんど関連性をもたないという事実は今後検討する必要があるように思える。

むすび

リノール酸メチル、リノレン酸メチルおよびアルカリ異性化リノール酸メチルを 50° で自動酸化させ、それらについて酸化過程を追いつながりながらチオバルビツール酸価、過酸化物価、共役ジエン量、重量増加率、試料エステル分解率、アゼライン酸半アルデヒドメチルエステル生成量などを測定した。

その結果以下に述べることがわかった。

1. これら 3 種の自動酸化エステルのチオバルビツール酸反応物中にマロンアルデヒドとチオバルビツール酸との縮合物の存在が認められた。

2. チオバルビツール酸価を示す物質は自動酸化の第 1 次生成物ではなく、そのさらに酸化した物質であり、チオバルビツール酸価が脂質の過酸化過程の初期を正確には表現していない可能性が示された。

3. 自動酸化リノール酸メチルについて種々の酸化程度におけるアゼライン酸半アルデヒドメチルエステルの生成量とチオバルビツール酸価との間には著しい相関性

が認められた。

終りに本実験に当たり終始ご指導いただきました東北大学教授内山 充博士ならびに国立衛生試験所食品部川城 巖博士に深謝する。

なお本報の要旨は日本薬学会東北支部第 23 回例会（昭和 43 年 2 月）で発表した。

文 献

- 1) G. A. Jacobson, et al.: J. Am. Oil Chemists' Soc. **41**, 124 (1964).
- 2) M. G. Schwartz, B. M. Watts: Food Research **22**, 76 (1957).
- 3) W. D. Pohle, et al.: J. Am. Oil Chemists' Soc. **41**, 649 (1964).
- 4) A. D. de Koning, M. A. Silk: ibid. **40**, 165 (1963).
- 5) L. K. Dahle, et al.: Arch. Biochem. **98**, 253 (1962).
- 6) B. G. Tarladgis, B. M. Watts: J. Am. Oil Chemists' Soc. **37**, 403 (1960).
- 7) 天野立爾: 食衛誌, **7**, 334 (1966).
- 8) 天野立爾: 食衛誌, **9** (2), 119 (1968).
- 9) 日本油化学協会: “油化学便覧”, p. 349, 丸善 (昭和 40 年).
- 10) T. P. Hilditch: J. Chem. Soc. **128**, 1828 (1926).
- 11) 日本化学会: “実験化学講座 19 卷, 有機化合物の合成 I”, p. 273, 丸善 (昭和 34 年).
- 12) K. M. Wilbur, et al.: Arch. Biochem. **24**, 305 (1949).
- 13) J. A. Cannon, et al.: J. Am. Oil Chemists' Soc. **29**, 447 (1952).
- 14) O. S. Privett, et al.: ibid. **30**, 61 (1953).
- 15) E. N. Frankel, et al.: ibid. **38**, 134 (1961).
- 16) O. S. Privett, et al.: ibid. **31**, 23 (1954).
- 17) E. N. Frankel, et al.: ibid. **38**, 161 (1961).
- 18) 野中順三九: 日水産, **21**, 1248 (1956).