

種々の酸化条件下の機能性高度不飽和脂質に対する トコフェロールの酸化防止能

原 節子*¹・関田 文人*²

Anti-oxidative Activity of Tocopherol for Functional Polyunsaturated Lipid under Various Oxidation Conditions

Setsuko Hara*¹ and Ayato Kanda*²

ABSTRACT: Anti-oxidative activity of tocopherol (Toc) and synergistic effect of phosphatidylethanolamine(PE) against Toc were evaluated for functional polyunsaturated lipid under various autoxidation conditions. Polyunsaturated lipid was accelerated under the autoxidation conditions of UV irradiation, and ferrous chloride, 2, 2'-azobisisobutyronitrile (AIBN), and methylene blue added into the substrates, respectively. Toc showed, however effective anti-oxidative activity for polyunsaturated lipid under those conditions, especially under UV irradiation and AIBN adding conditions. Moreover, excellent synergistic effect of PE against Toc was observed under dark and ferrous chloride adding conditions. The excellent synergistic effect of PE under ferrous chloride adding condition was considered by the regeneration of Toc from tocopheroxy radical which is formed by donating hydrogen radical from Toc to lipid peroxy radical, and chelating activity of PE against ferrous ion which has accelerating activity for autoxidation of the lipid. From those results obtained, it was found that a proper means must be tried in the prevention of autoxidation for polyunsaturated lipid by understanding the existing circumstances of lipid.

KEYWORDS: Polyunsaturated lipids, Anti-oxidative activity, Tocopherol, Phosphatidylethanolamine, Radical chain reaction

(Received October 2, 2006)

1. はじめに

脂質は食品においしさを付与する性質を持つため、その消費量が食生活の欧米化とともに増加してきたが、近年生活習慣病や肥満との関連から問題視されるようになってきた。しかし、脂質は糖質・タンパク質とともに三大栄養素の一つとして、また、生体の種々の生理機能を調節するものとして、食生活に欠かすことのできない重要な成分である。食品に利用されている油脂はグリセリンと3分子の長鎖脂肪酸(主にC16~18)のエステルであるトリアシルグリセリン(TAG)構造をもち、その物

理的・化学的および栄養学的な性質はその構成脂肪酸の性質に基づくことが知られている。

近年、各種脂肪酸のもたらす生理活性が注目を集め、魚油に含まれるドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)などのn-3系高度不飽和脂肪酸は血栓防止作用や抗アレルギー作用を、また植物油に含まれるリノール酸などのn-6系高度不飽和脂肪酸は血清脂質低下作用を示すことが明らかとなり、これらの高度不飽和脂肪酸を構成成分とする脂質をバランス良く摂取することが提唱されている^{1,2)}。

しかし、高度不飽和脂質はその構造中に酸化に対して不安定な二重結合を多く含むため、図1に示したようにラジカル連鎖的に空気中の酸素と速やかに反応して過酸化脂質を形成する。すなわち、二重結合を2つ以上含む

*1 物質生命理工学科教授(Professor, Dept. of Materials and Life Sciences)

*2 物質生命理工学科助手(Research associate, Dept. of Materials and Life Sciences)

高度不飽和脂肪酸を構成脂肪酸とする脂質 (LH) では、熱・光・金属などの影響によって、2 つの二重結合に挟まれたメチレン基に結合した水素 (二重アリル水素) が水素ラジカル (H・) として引き抜かれ、脂質ラジカル (L・) が形成される。L・は空気中の三重項酸素と速やかに反応して脂質ペルオキシラジカル (LOO・) となり、さらに他の LH から H・ を引き抜き、脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) となる。この際、同時に形成された脂質ラジカル (L・) は再び酸素と反応するため、次々と連鎖的に酸化一次生成物である LOOH が蓄積する。

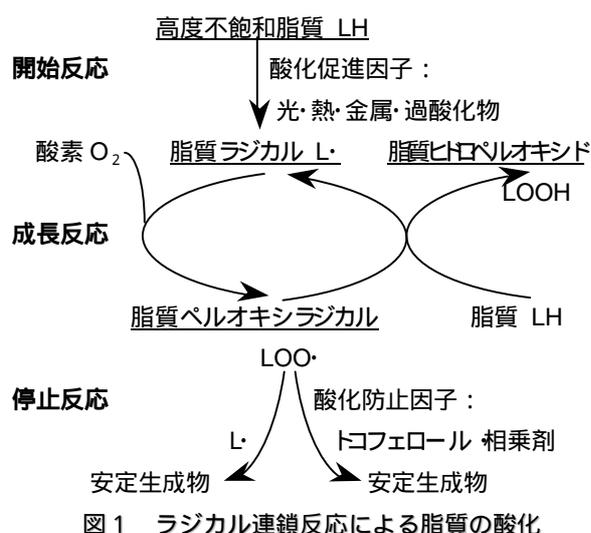


図1 ラジカル連鎖反応による脂質の酸化

また、生成した LOOH はさらなる酸化反応により分解して、アルデヒド、遊離脂肪酸および炭化水素などの酸化二次生成物を形成する。これらの酸化二次生成物は揮発性の低分子化合物であり、微量の存在であっても閾値が低いため、食品や食用油脂の風味に大きく影響し、品質の低下をもたらすことが問題となる。さらに自動酸化が進行した場合には生体に対して種々の悪影響を示すことも明らかになっているため、油脂および油脂含有食品の自動酸化の防止は品質管理上、重要な課題である^{3),4)}。

油脂および油脂含有食品の酸化防止のために現在利用されている主な対策として次の5種が挙げられる。

- 酸素量の低減 (真空包装や脱酸素剤の使用など)
- 光・熱の遮断 (遮光フィルムや缶詰め、冷凍・冷蔵保存など)
- 鉄や銅など触媒作用をもつ微量金属の除去 (金属不活性剤の使用など)
- クロロフィルのような光増感剤の除去 (油脂の精製)
- ラジカル連鎖反応の停止・ラジカルの消去 (酸化防止剤の使用など)

特に、不飽和脂質の自動酸化反応は主に前述のラジカル連鎖反応により進行するため、その反応における成長段階を停止することができる酸化防止剤の使用は非常に有効であり、現在、天然の酸化防止剤であるトコフェロール (Toc) が主に利用されている。また、Toc に対して大豆油製造工程における副産物として得られるリン脂質の1種であるホスファチジルエタノールアミン (PE) が相乗的に作用し、Toc と PE の共存系ではより優れた酸化防止効果が発揮されることをすでに著者らは報告している⁵⁻¹¹⁾。これらの Toc や PE の酸化防止効果および酸化防止相乗効果は精製された不飽和脂質を基質として用いた非水系および乳化系、暗所における実験に基づいた試験の結果であるが、実際の食品に含まれる高度不飽和脂質およびこれらを含む食品は流通において様々な環境におかれることが予想されるため、種々の酸化促進条件下における酸化防止剤の作用を明らかにすることが必要と考えられる。本研究においては、高度不飽和脂質の機能性をさらに活用するために、各種酸化促進条件下における高度不飽和脂質の酸化挙動を調べ、それらの条件下における Toc の酸化防止作用および PE の酸化防止相乗作用を詳細に解析し、効果的な酸化防止法を確立することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 基質

リノール酸を主構成脂肪酸とするハイリノールサフラワー油をメチルエステル化した後、試料油に含まれていた Toc と過酸化物を真空蒸留によって除去し、自動酸化試験の基質として用いた。

2.2 自動酸化試験条件

下記の6種の酸化条件下に試料を静置して自動酸化試験を行った。なお、自動酸化温度はすべて 30 とした。

- : 暗所系
- : 紫外線 (13W UV ランプ, 650Lux) 照射系
- : 塩化鉄 () 0.005% 添加した基質を用いた暗所系
- : 脂溶性ラジカル発生剤である 2,2-アゾビスイソブチロニトリル (AIBN) を 1% 添加した基質を用いた暗所系
- : 光増感剤であるメチレンブルー (MB) を 0.2% 添加した基質を用いた UV (650Lux) 照射系
- : MB 0.2% を添加した基質を用いた暗所系

自動酸化試験に際しては酸化一次生成物量を示す過酸

化物価 (PV) を電位差滴定法, 共役ジエン (CD) 量を UV 分析法, 基質の脂肪酸組成の変化をガスクロマトグラフィー (GLC) により経時的に追跡した。また, Toc 添加試料については Toc 残存率を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。

3. 結果と考察

3.1 自動酸化試験

試験試料として, 基質のみ (S), 0.1% の Toc を添加した基質 (T) および 0.1% の Toc と 1% の PE を添加した基質 (TP) の 3 種を用いた。これらの試験試料は 2.2 に記述した 6 種の条件下の自動酸化試験に供し, 経時的に PV, CD 量, 脂肪酸組成および Toc 残存率を測定した。

表 1 各酸化条件下の自動酸化試験に用いた基質の脂肪酸組成と性状

酸化条件		暗所	UV 照射	FeCl ₂ 添加暗所
脂肪酸組成)	C16:0	6.6	6.1	7.0
	C18:0	1.4	2.1	2.0
	C18:1	12.8	13.4	12.0
	C18:2	79.0	78.4	79.0
	C18:3	0.2	0.0	0.0
PV (meq/kg)		0.5	0.0	0.3
CD (%)		-	0.3	0.3
Toc (ppm)		0.0	0.0	0.0
酸化条件		AIBN 添加暗所	MB 添加 UV 照射	MB 添加暗所
脂肪酸組成)	C16:0	8.8	8.1	6.9
	C18:0	1.5	2.0	1.9
	C18:1	12.3	11.8	12.2
	C18:2	77.4	78.1	79.0
	C18:3	0.0	0.0	0.0
PV (meq/kg)		1.2	3.7	1.3
CD (%)		0.3	0.3	0.3
Toc (ppm)		0.0	0.0	0.0

UV 紫外線, FeCl₂ 塩化鉄 (), AIBN 2,2'-アゾビスイソブチロニトリル, MB :メチレンブルー, C16:0 :パルミチン酸, C18:0 :ステアリン酸, C18:1 :オレイン酸, C18:2 :リノール酸, C18:3 :リルン酸, PV 過酸化物価, CD 共役ジエン, Toc :トコフェロール

また, 自動酸化条件 ~ の試験においては暗所下における無添加基質の試験をコントロールとして同時に行った。

なお, それぞれの自動酸化試験に用いた基質の脂肪酸組成, PV, CD 量および Toc 含有率を表 1 に示した。

3.2 各種酸化条件下における高度不飽和脂質の酸化挙動

図 2 に 暗所下および UV 照射下の自動酸化試験における PV と Toc 残存率の経時変化を併せて示した。

なお, 暗所下におけるコントロール (C) は基質のみの試料 (S) と同一であるため S として図示した。

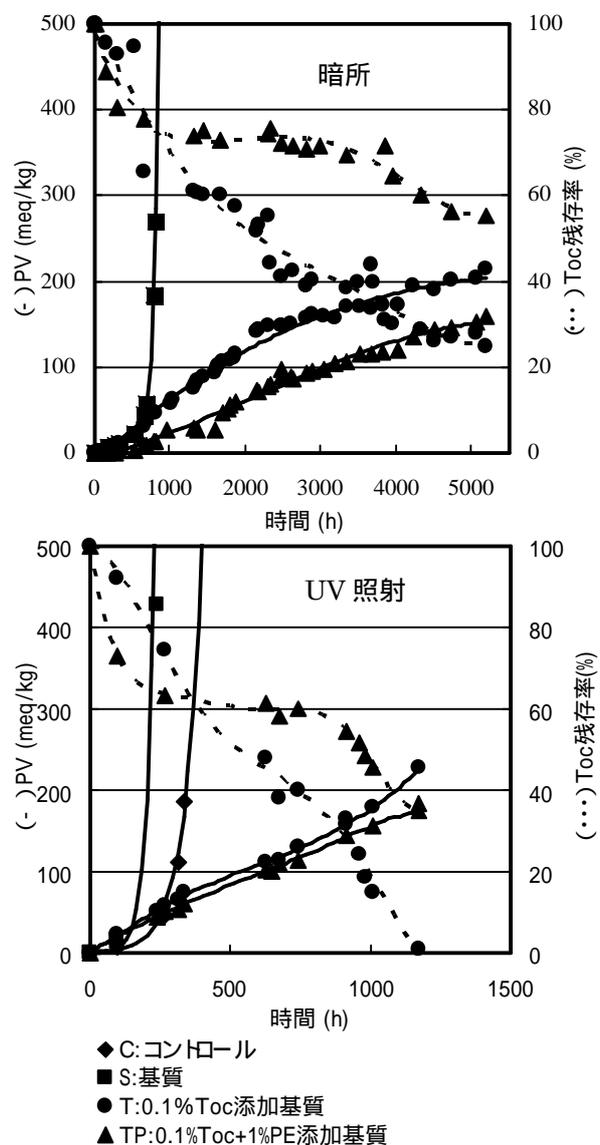


図 2 暗所および紫外線照射下の自動酸化試験における PV と Toc 残存率の経時変化

これらの結果から, 暗所下において C では 300 時間経過後から急激に PV が上昇したのに対し, T および TP

では 5,000 時間経過後の PV がそれぞれ約 200 と 150meq/kg であり, C と比べて顕著に上昇が抑制され, Toc の酸化防止効果および Toc と PE の共存効果が確認された。また, PE の添加によって自動酸化中の Toc の消費はかなり抑制され, PE の Toc に対する相乗効果が明確に認められた。次に, 紫外線照射下では暗所下の C と比較して S の PV は早い時間から急激に上昇し, UV による明確な酸化促進作用が認められた。これは UV によってラジカル開始反応が促進されたことを示している。なお, 試料 T と TP は S よりもかなり PV の上昇が抑制されていたが, T と TP の差はほとんど認められなかった。

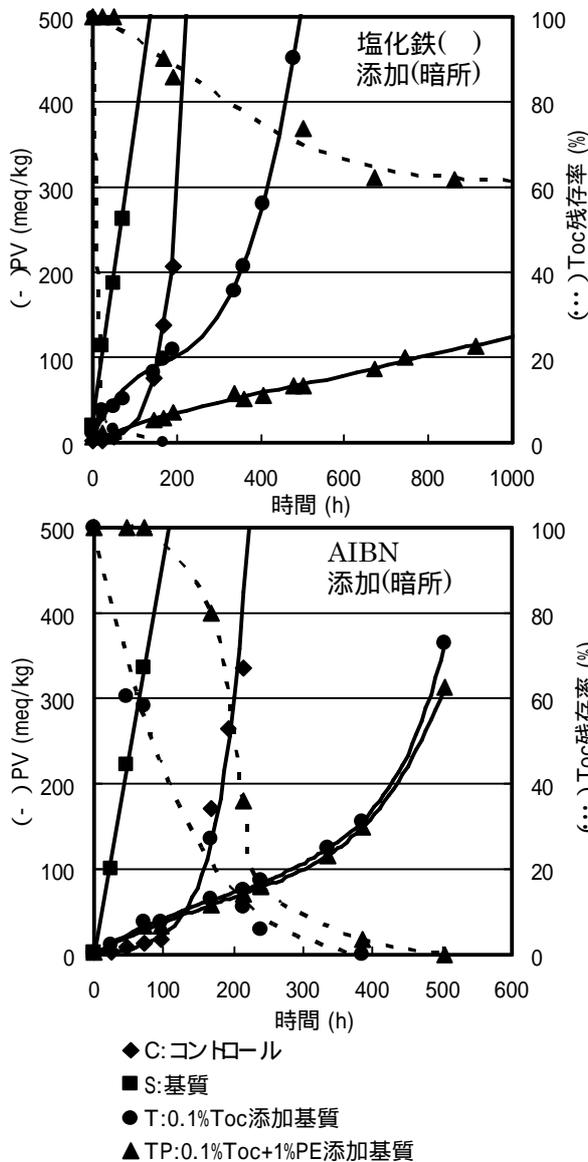


図3 塩化鉄(Ⅲ)およびAIBN添加基質の自動酸化試験におけるPVとToc残存率の経時変化

次に, 酸化促進剤である塩化鉄(Ⅲ)0.005%添加系およびAIBN 1%添加系の暗所における自動酸化試験

の結果を図3に示した。ではCと比較してSは試験開始直後からPVが急激に上昇し, 塩化鉄(Ⅲ)の顕著な酸化促進作用が観察された。Tでは試験開始直後からTocが激減したが, PVの上昇はSよりも抑制されていた。さらにTPにおいては試験開始後1,000時間を経過してもPVは120meq/kg程度であり, またTocの減少速度も遅かったことから, PEが非常に効果的に酸化抑制効果を示すことが確認された。

また, AIBN添加系ではよりさらに酸化が促進された。なお, Tocの酸化防止効果は顕著であったが, PEのTocに対する相乗効果は確認されず, とはまったく異なる自動酸化挙動を示した。

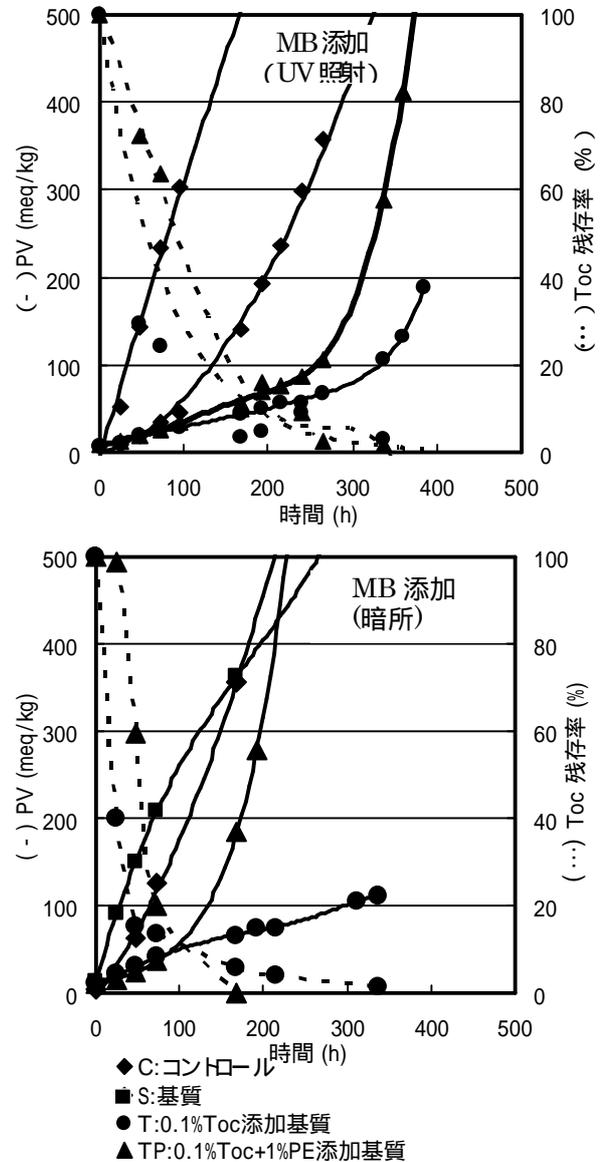


図4 MB添加系(UV照射下と暗所)の自動酸化試験におけるPVとToc残存率の経時変化

続いて、光増感作用を示す MB を添加した基質を用い、UV 照射下または暗所で行った自動酸化試験の経時変化を図 4 に示した。UV 照射下の S は暗所下、無添加の C に比較して PV の上昇が著しく、MB の光増感作用により基質の酸化が促進されていることが確認された。なお、T および TP では S と C に比較して PV の上昇が抑制されていたが、T と TP の間には大きな差は見られなかった。また、暗所系での MB 添加基質の S は無添加基質の C とほとんど差がなく、MB は UV 照射下のみで酸化促進効果を示すことが判明した。

3. 3 Toc と PE の酸化防止効果の比較

3.2 の結果から、酸化条件によって基質の自動酸化挙動に顕著な差が見られること、また Toc および PE の酸化防止作用も異なることが判明したので、さらに各酸化

条件下において、PV が 100meq/kg に到達するまでの時間を、暗所、無添加の C を 1.00 として比較した結果を図 5 に示した。まず、～ の各種酸化条件下における無添加基質である試料 S について比較すると、暗所系の 1.00 に対し ～ では 0.18～0.43 となり、いずれも酸化が促進される条件であることが確認された。次に、T は 1.09～4.55 の値を示し、いずれの酸化条件においても酸化防止効果を発揮していたが、酸化条件によってかなり効果が異なることが判明した。さらに TP でも 1.86～4.64 と酸化条件により大きな差が見られた。そこで各種酸化条件における Toc および PE の作用を明らかにするため、各条件下で PV が 100meq/kg に到達する時間について、同条件下の S を 1.00 として図 6 に示した。

その結果、暗所では Toc の添加により酸化速度は 1/2 以下に抑制されること、さらに PE の添加によってさら

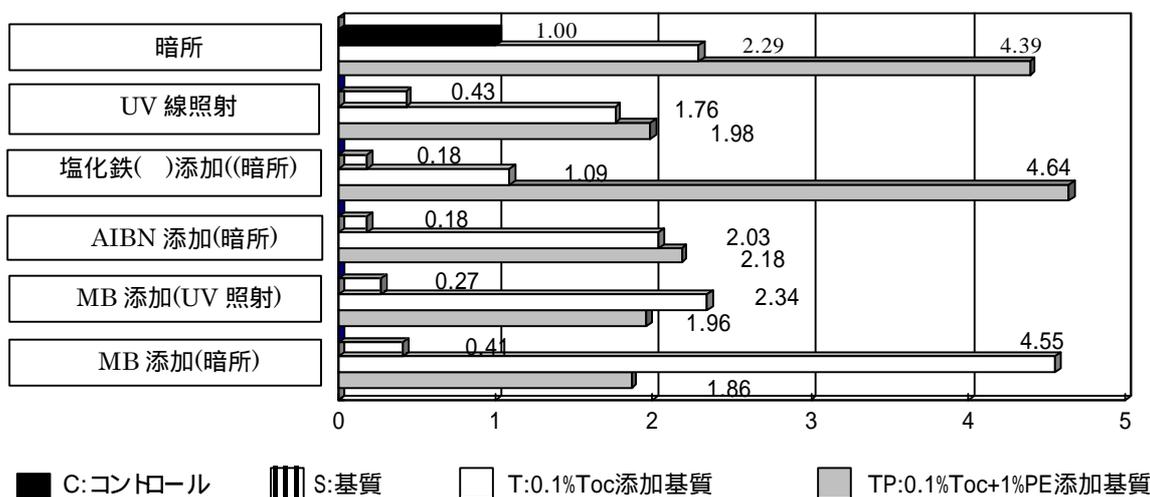


図 5 各種酸化条件下の試験において PV が 100meq/kg に到達する時間の比較 (コントロール=1.00)

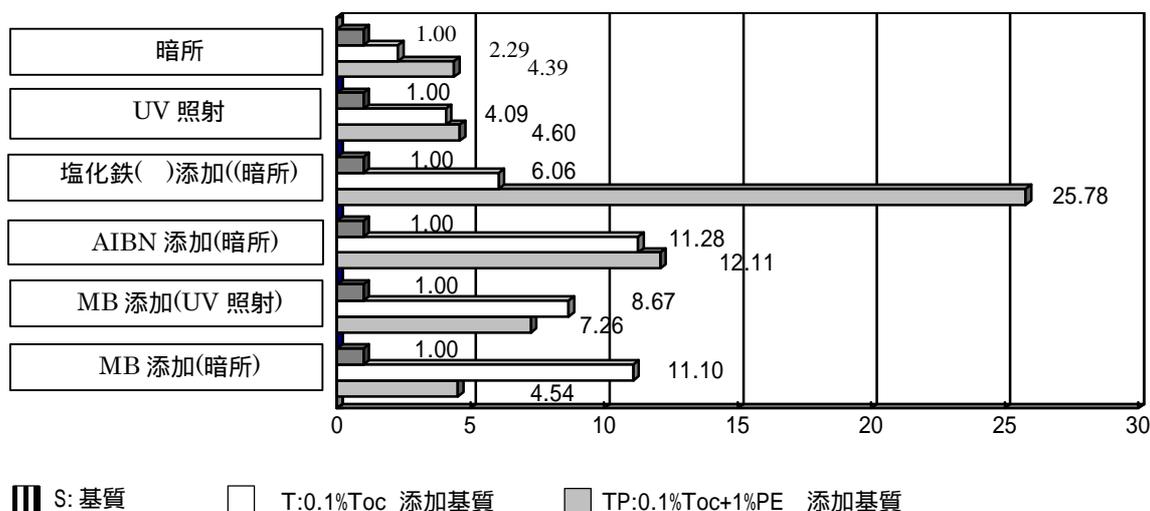


図 6 各種酸化条件下の試験において PV が 100meq/kg に到達する時間の比較 (基質=1.00)

に 1/2 以下、つまり S に対しては 1/4 以下にまで抑制され、Toc の酸化防止効果に加えて PE の Toc に対する相乗効果が確認された。すなわち、図 7 に示したように Toc は脂質の自動酸化によって発生した LOO· に H· を供与し、自らがトコフェロキシラジカル (Toc·) となってラジカル連鎖反応を停止することにより脂質の酸化を防止することが知られているが、PE はそのアミノ水素から H· を Toc· に供与して、Toc を再生する役割を果たすことにより、有効な酸化防止相乗剤として作用すると考察された。また、の塩化鉄()添加系において T が 6.06 であったのに対し、TP では 25.78 と非常に高い値であった。これは PE が Toc の再生効果に加えて、PE 分子中のリン酸部分が、鉄イオンとキレート化合物を形成して鉄イオンの酸化促進作用を不活性化するため

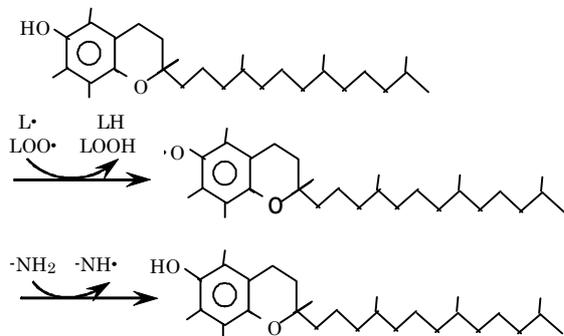


図7 PEからトコフェロールへの水素ラジカル供与の推定機構

と考察された。

一方、と の酸化条件においては T とくらべて、TP はわずかに高値を示したものの大差はなく、PE の相乗効果は発揮されないことが判明した。

これは UV 照射および AIBN の添加によって、急速にラジカル連鎖開始反応が進行して多量の L· が発生したため、Toc が Toc· になった後、PE によって再生されることなく、不可逆的にトコフェロキシキノに酸化されたことによると考察された。

これらの結果から、PE による Toc の再生速度はあまり速くないものと考えられた。さらに MB 添加系では TP が T より酸化速度が速い結果を得たことから、MB 添加系においては PE がむしろ酸化促進作用を示すことが懸念されたため、さらに基質に PE のみを添加して同条件で酸化試験を実施した結果、PE の酸化促進効果はまったく確認されなかった。したがって、MB 添加系の結果については今後さらに検討する必要があると考えている。

3. 4 PV と CD 生成量の関係

の酸化条件下での自動酸化試験における酸化メカニズムを解明するため、PV と CD 生成量の関係を図 8 に示した。UV 照射系以外の酸化条件においては、いずれの試料も両者の間にほぼ同一の直線関係が認められ、これらの酸化条件においては酸化メカニズムには差のな

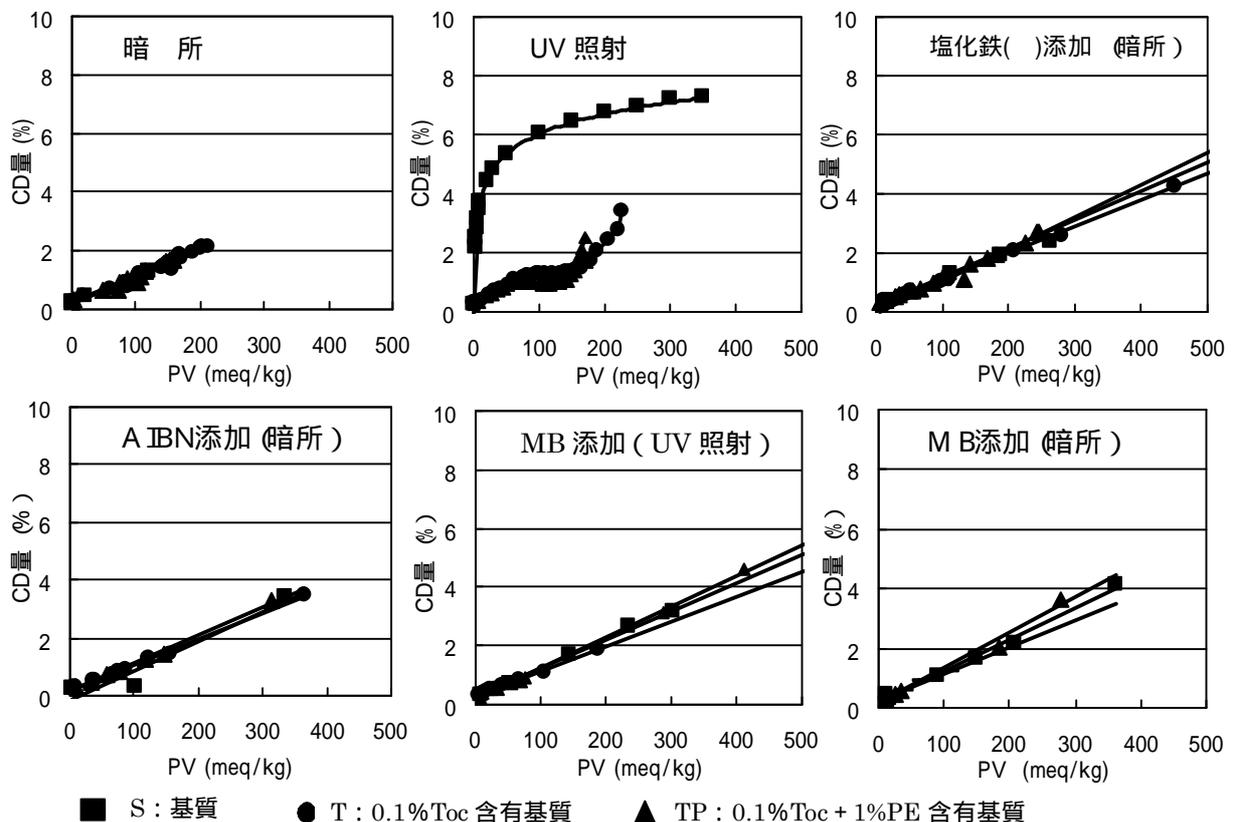


図8 各種酸化条件下の自動酸化試験における PV と CD 量の関係

いことが確認された。しかし、UV 照射系の基質のみの試料 S では酸化の進行に伴い、CD 量は急激に上昇したのに対し、LOOH の蓄積は見られないことから、UV 照射によってリノール酸の非共役二重結合が共役化するか、あるいは生成した LOOH の酸素 酸素結合が速やかに開裂することが推察された。

4. おわりに

高度不飽和脂質の各種酸化条件における自動酸化挙動と Toc および PE の酸化防止効果について検討し、以下の結果を得た。

1) 高度不飽和脂質は UV 照射、鉄イオンやラジカル発生剤の存在下、あるいは光増感剤の存在下では酸化が顕著に促進されることが確認された。実際の食品は多成分混合系であり、これらの酸化促進系に高度不飽和脂質が存在する機会は非常に多いと考えられるため、その酸化防止には十分な対策が必要である。

2) Toc を添加した試料ではいずれの酸化促進系においても自動酸化が抑制され、ラジカル発生剤や光増感剤の添加系において特に顕著な酸化防止効果が確認された。

3) Toc と PE をあわせて添加した試料については、暗所系および鉄イオン添加系で PE の Toc に対する明確な相乗効果が観察された。特に、鉄イオン添加系では酸化速度が基質のみの試料と Toc 添加試料に対してそれぞれ 1/6, 1/25 以下まで抑制された。これは PE による Toc の再生作用に基づく相乗効果に加えて、鉄イオンの酸化促進効果をキレート作用により不活性化する作用が発揮されたためと考察された。

これらの結果から、高度不飽和脂質の酸化防止に際しては、その存在状態を十分考慮して、適切な酸化防止策を講じることが重要と考えられた。

参考文献

- 1) 和田俊, 後藤直宏共著「食品機能学」丸善出版(2004)
- 2) 板倉弘重「脂質の科学」朝倉書店(2001)
- 3) 上田隆史編, 原節子分担執筆「生化学」第10章 生体酸化, 化学同人(2004)
- 4) 鈴木修, 佐藤清隆, 和田俊監修, 戸谷洋一部分担執筆「機能性脂質の新展開」第5章 脂質の酸化抑制機構, シーエムシー(2001)
- 5) 津志田藤二郎, 寺尾純二, 平田孝編集, 戸谷洋一郎, 原節子分担執筆「食品の光劣化防止技術」第2章第4節 抗酸化物質の食品への応用(3)その他の物質, サイエンスフォーラム(2001)
- 6) 原節子, 曾根環, 戸谷洋一郎, 日本油化学会誌, 49, 937(2000)
- 7) 戸谷洋一郎, 日本油化学会誌, 48, 1233(1999)
- 8) 渡辺将人, 原節子, 戸谷洋一郎, 日本油化学会誌, 6, 21(1998)
- 9) 瀬川丈史, 鎌田正純, 原節子, 戸谷洋一郎, 油化学, 44, 36(1995)
- 10) 瀬川丈史, 原節子, 戸谷洋一郎, 油化学, 43, 515(1994)
- 11) 原節子, 岡田規男, 日比野英彦, 戸谷洋一郎, 41, 130(1992)