HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類筋肉脂質の冷凍貯蔵中の変化：Ⅳ．低温におけるトリグリセライドおよびレシチンの自動酸化分解
Author(s)	高間，浩蔵
Citation	北海道大學水産學部研究彙報，25(2)，154-161
Issue Date	1974-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23522
Type	departmental bulletin paper
File Information	25(2)_P154-161.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
25 (2), 154–161. 1974.

魚類筋肉脂質の冷凍貯蔵中の変化
IV. 低温におけるトリグリセライドおよびレシチンの自動酸化分解*

高間浩蔵**

Changes in the Flesh Lipids of Fish during Frozen Storage
IV. Autoxidations of triglyceride and lecithin in cold storage

Kōzō Takama**

Abstract

Autoxidative decompositions of triglyceride and lecithin, major constituent lipids in fish flesh, were studied in cold storage.

Under the conditions in this work, $C_{20:5}$ and $C_{22:6}$, constituent polyunsaturated fatty acids in these lipids decreased decidedly, and furthermore in the process of oxidation, $C_{18:1}$ of triglyceride also decreased.

In the products formed by the oxidation of these lipids, propanal, ethanal and acetone were recognized to be the principal monocarbonyl compounds, and caproic and propionic acids to be likewise the principal volatile fatty acids.

Since some of these oxidative products have shown to be the most reactive with salt-soluble protein, the promotions of oxidative deteriorations of polyunsaturated lipids in fish flesh during cold storage were considered to concern effectively with the insolubilization of the protein.

緒　　言

魚肉脂質は多量の高度不飽和脂肪酸を構成分とするため酸化されやすく，魚肉を低温に貯蔵した場合でも酸敗は進行する。

Buttkus[1] は，不飽和脂質の代表的な酸化生成物であるマロンアルデヒドが，ミオシンのアミノ基と反応し，−20°C においても＋20°C の場合と同程度の反応性を示すことを明らかにした。また著者ら[2] は，脂質の酸化分解生成物として認められている低級アルデヒドや低級脂肪酸とアクトミオシン区たん白質との反応性ついて検討を行い，−20°C においてプロパナールとカプロン酸がとくにたん白質不溶化作用の高いことを報告し，低温貯蔵魚肉の脂質酸化分解物の生成が，塩溶性たん白質の変性にも関与し得ることを示唆した。

しかし，著者らの用いた脂質酸化生成物としての低級アルデヒドや低級脂肪酸などに関する従来の知見は，いずれも室温以上の酸化条件で得られたものであり，低温において検討されたものはほとん

* 昭和49年4月　日本水産学会年会（東京）にて講演発表

** 北海道大学水産学部食品化学第一講座
(*Laboratory of Food Chemistry I, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

ど見当らない。

本報では，魚肉脂質の主要成分であるトリグリセライド (TG) およびレシチン (Lec) を試料とし，それらを低温に貯蔵した場合の自動酸化分解生成物について検討した。

実験方法

TG および Lec の調製　ホッケ肉細砕物から2倍容のクロロホルム-メタノール (2:1) で4回抽出を繰返し，抽出液を濃縮後，セルローズカラムクロマト法によって非脂質成分を除去して総脂質を得た。これをケイ酸カラムに供しクロロホルム，アセトンおよびメタノールで順次溶出を行い，クロロホルム溶出区を濃縮して TG を調製した。またメタノール溶出区濃縮物を無水エタノールで処理して得たエタノール可溶部の粗 Lec をさらにケイ酸カラムに供し，クロロホルム-メタノール (5:5) および (4:6) 溶出区を濃縮して Lec を調製した。一方，ナガヅカ卵巣より調製した総脂質からアセトン分別によってリン脂質区分を得，これに無水エタノールを加えて可溶の区分を分別後，アルミナカラムクロマト法によって Lec を調製した。

脂質の純度　調製した TG および Lec の純度測定は，ケイ酸プレートを用いた薄層クロマト法 (TLC) によって行った。TG は，n-ヘキサン-エーテル-酢酸 (90:10:1) で展開し，50%-H_2SO_4 によってスポットを検出後，デンシトメーター (明日香製 OZUMOR-82) を用いて測定した結果，97% の純度であった。Lec は，クロロホルム-メタノール-酢酸-水-(75:20:1:2) で展開し，モリブデン酸アンモニウム-過塩素酸試薬で発色した結果，ホッケ肉およびナガヅカ卵巣から調製したいずれの Lec も単一スポットを示した。

脂質の酸化　直径約 9 cm のペトリ皿にあらかじめ脂質の約 10 倍量のセライト 545 をとり，これに脂質のエーテル (過酸化物除去) 溶液を注加後，充分に攪拌して均一化し，エーテルを揮散させた[3]のち −20°C に放置した。1 ケ月放置ののち，酸化を促進させるため 2～5°C の冷蔵庫へ移し入れた。たゞし Lec の酸化試料の調製は，ナガヅカ卵巣 Lec を用いて行った。

酸化試料からの TG および Lec の分別　TG 酸化試料からはクロロホルム-メタノール (2:1) で抽出して脂質を回収し，展開剤 n-ヘキサン-エーテル-酢酸 (90:10:1)，ケイ酸プレートによる TLC を行い，ローダミン 6G を噴霧後，UV ランプでスポットを確認，かきとったのち，小カラムに詰めクロロホルム-メタノール (1:9) で溶出して TG を分別した。Lec 酸化試料からは同様にして得た回収脂質をケイ酸カラムに供し，クロロホルム溶出物を除去したのち，クロロホルム-メタノール (5:5) で溶出して Lec を分別した。

揮発性酸化生成物の捕集　酸化試料を 25 ml の水とともにフラスコに移し，さらに 25 ml の水を加えて蒸留し，留出液 25 ml を捕集してカルボニル化合物および低級脂肪酸の検索に供した。

カルボニル化合物の検索　前記留出液の 10 ml に 2,4-ジニトロフェニールヒドラジン-H_2SO_4 試薬[4]を加えて一夜冷室に放置後，生じた沈殿を濾別し，中性になるまで水洗して減圧デシケーター中で乾燥しヒドラゾン (DNPH) を調製した。

(i) TLC　調製した DNPH を少量のクロホルムに溶解後，ケイ酸プレートにスポットし，ベンゼン-n-ヘキサン (75:25) で展開して各成分の分離を行いデンシトメーターで相対濃度を測定した。

(ii) 吸収スペクトル　TLC によって分離した各成分について市川ら[4]，平山[5]の方法に従いクロロホルムおよびエタノール溶液における近紫外部吸収スペクトルの測定およびアルカリ処理による吸収特性から物質の同定・推定を行った。

揮発性脂肪酸の検索　前記留出液の残りを 1N NaOH で微アルカリ性とし減圧濃縮乾固したのち，2 N H_2SO_4 で微酸性としてエーテル抽出を行い，エーテル層を乾燥後，溶剤を除去し日立F6-D ガスクロマトグラフ，ジエチレングリコールコハク酸ポリエステル(DEGS)，1m(3mm, i.d.) ガラスカラム，カラム温度 120°C の条件によるガスクロマト法 (GLC) によって成分測定を行った。

その他の実験法 (i) カルボニル価(CO-V) の測定 酸化試料 1 g をとり，熊沢ら[6] の方法に準じて測定し，meq/g 脂質で表示した。

(ii) チオバルビツール酸値 (TBA-V) の測定 Vyncke[7] の方法に準じて測定した。すなわち酸化試料 0.5 g をとり，15 ml の 7.5 % トリクロル酢酸溶液(0.1 % 没食子酸プロピルおよび 0.1 % EDTA 含有)を加えて 1 分間攪拌抽出後濾過し，濾液 5 ml に 5 ml の 0.02 M TBA 試薬を加えて沸騰水浴中 40 分間加熱後，流水中で 10 分間冷却して 538 nm における吸光値を測定し，E_{538}/g 酸化試料で表示した。

(iii) 脂肪酸組成の分析 酸化前後の TG および Lec を封管中 10 % HCl-メタノールとともに加熱し脂肪酸メチルエステルを調製後，DEGS, 1 m (3 mm, i. d.) ガラスカラム，カラム温度 200°C の条件による GLC によって脂肪酸組成の分析を行った。

結 果 お よ び 考 察

魚肉 Lec は TG に比して $C_{22:6}$ 酸の多いことが一般的であり，ナガヅカ卵巣 Lec の脂肪酸組成がホッケ肉 Lec のそれと近似することを認めたので，本実験における Lec 酸化試料の調製は脂質量の関係からナガヅカ卵巣 Lec を用いて行った。

酸化試料の調製は表面積を大きくするために脂質をセライト 545 にコーティングする方法で行ったが，貯蔵中の TBA 試薬反応性物質の生成量は図 1 のようである。−20°C, 1 ケ月の貯蔵では TG の酸化進行が極めて緩慢であったため，その後 2〜5°C の冷蔵庫へ移し入れた。冷蔵庫へ移し入れてから 20日，45日酸化の TG および 10 日酸化の Lec を酸化試料として以下の実験に供した。各酸化試料の CO-V および TBA-V は 表 1 に示してある。

酸化前後の TG および Lec の脂肪酸組成の変化 酸化前後の TG および Lec の主要構成脂肪酸の組成は表 2 に示してある。酸化前の TG は Lec に比し $C_{18:1}$ 酸が多く，$C_{20:5}$, $C_{22:6}$ 酸の高度不飽和脂肪酸は Lec に多く含有されている。酸化前の TG および Lec をそれぞれ 100 としたときの量的変化は表 3 に示してあるように，TG では 20 日酸化で約 66, 45日酸化で約 26 になり，GLC で得た脂肪酸組成から脂肪酸の平均分子量を求めそれらの脂肪酸量を算出すると，酸化前で 90 の脂肪酸が 20 日酸化で 59, 45 日酸化で 23 に減少したことを示している。Lec では 10 日酸化で約 64 となり，同様にして脂肪酸量を算出すると 66 から 42 に減少したことを示している。さらにこれらの結果から主要構成脂肪酸量を求めて同表に示してある。TG および Lec の酸化ではともに $C_{20:5}$, $C_{22:6}$ 酸が顕著に減少し，とくに TG 45 日酸化試料ではこれらの不飽和脂肪酸が全く消失していることのほか，$C_{18:1}$ 酸も多量に減少していることが特徴的である。以上のことから TG および Lec の酸化進行にともなって生成する分解物は，主に $C_{20:5}$, $C_{22:6}$ および $C_{18:1}$ 酸の分解に由来するものと考えられる。

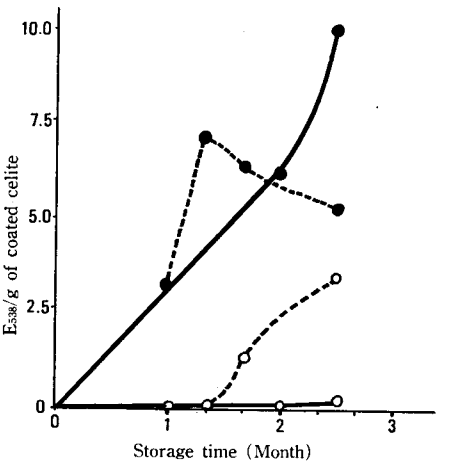

Fig. 1. Amounts of TBA-reactive compounds produced in autoxidizing triglyceride (○) and lecithin coated celite 545 (●), during storage at −20°C (—) and then at 2〜5°C (- - -).

カルボニル化合物 揮発性分解生成物のうち，カルボニル化合物は 2, 4-DNPH として

Table 1. *TBA and carbonyl values of autoxidized triglyceride (TG) and lecithin (Lec) in cold storage.*

	TG*		Lec*
	20**	45**	10**
TBA-V (E_{538}/g of coated celite)	1.33	3.50	7.34
CO-V ($\times 10^{-3}$ meq/g of lipid)	95.2	1542.2	160.6

* 421.3 mg of TG prepared form atka mackerel flesh was coated on 5 g of celite 545, and 312.5 mg of Lec prepared from northern blenny roe was coated on 3 g of the celite.

** Lipids coated celite were stored at −20°C for 1 month, and then transfered into a refrigerator (2～5°C) in order to promote their oxidation. The numbers refer to the storage days at 2～5°C.

Table 2. *Major fatty acid compositions of TG and Lec before and after autoxidation in cold storage.*

	TG			Lec	
	Before	After*		Before	After*
		20	45		
14:0	5.7	7.2	4.7	—	—
16:0	13.6	15.9	28.8	20.7	38.4
16:1	12.8	15.9	19.8	8.1	8.4
18:0	—	—	—	9.3	20.4
18:1	22.1	30.2	35.9	13.7	17.5
20:1	5.3	6.7	1.7	—	—
20:5	13.8	5.1	0	15.2	1.0
22:6	9.4	2.1	0	23.3	4.4

* Separations of lipids from oxidized samples were achieved by preparative TLC for TG, and silicic acid column chromatography for Lec.

分離後，TLC で各成分を分離した。これらの R_f 値，クロロホルムおよびエタノール溶液の吸収スペクトル測定結果，ならびにアルカリ処理による吸収スペクトル測定結果は表 4-1～4-3 に示すとおりである。

マロンアルデヒドの DNPH は R_f 0.08, $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 356 を示すことから，TG 20日，45日酸化試料における No. 1 成分はマロンアルデヒドと推定される。Lec 酸化試料における No. 1 成分はいずれの溶液における吸収極大波長も TG 酸化試料に比し長波長域にあり，$E_{400}^{CHCl_3}/E_{440}^{CHCl_3}=1.24$を示した。この値はペンタ-2, 3-ジオン-2, 4-DNPH の1.21[5] に近似することからこれに類した物質と考えられ，各酸化試料における No. 1 成分はいずれもジカルボニル化合物であると推定される。No. 2 成分は 0.25 N NaOH 処理 90 分後でも 520 nm 付近の吸収が消失せずケトンであることを示し，アセトンと推定される。

TG 20 日酸化および Lec 酸化試料における No. 3, 4 成分，ならびに TG 45 日酸化試料における No. 4, 5 成分はともに飽和アルデヒドであることが認められ，標品の R_f 値などと一致したことからそれぞれをエタナールおよびプロパナールと同定した。

Table 3. *Changes of amounts of TG and Lec, and the major fatty acids before and after autoxidation in cold storage.*

	TG			Lec	
	Before	After		Before	After
		20	45		
Lipid	100.0	66.4	25.6	100.0	64.4
Total fatty acid	90.0	59.5	22.9	66.4	41.8
14:0	5.1	4.3	1.1	—	—
16:0	12.2	9.5	6.6	13.7	16.1
16:1	11.5	9.5	4.5	5.4	3.5
18:0	—	—	—	6.1	8.5
18:1	19.8	18.0	8.2	9.1	7.3
20:1	4.7	4.3	1.4	—	—
20:5	12.4	3.0	0	10.0	0.4
22:6	8.4	1.2	0	15.5	1.8

The amounts of lipids were compared with 100.0 value of TG or Lec immediately before oxidation, and the fatty acids were calculated basing on the mean molecular weight obtained from GLC data.

Table 4–1. *Carbonyl compounds produced in autoxidizing TG during storage at 2～5°C for 20 days after storage at −20°C for 1 month.*

Spot No.	R_f	λ_{max}				Absorbance near at 520 nm[c]
		$CHCl_3$	EtOH	alk. EtOH[a]	alk. EtOH[b]	
1	0.08	352	355	429	420	—
2	0.19	370	362	430	432	R
3	0.41	355	353	429	425	D
4	0.54	359	358	432	432	D
5	0.71	378	377	470	467	D

a: 0.25N ethanolic NaOH
b: 0.001N 95% ethanolic NaOH containing 10% of chloroform
c: after 90 min treated with reagent of a; R: Remain, D: Disappear

飽和カルボニル-DNPH のクロロホルム含有エタノール性 NaOH 溶液は λ_{max} 430 を示し，エナールは 460 を，ジエナールは 480 を示す。また 2, 4-ペンタ・ジエナールは $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 384, $\lambda_{max}^{alk.\ EtOH}$ 481 を示し，2-ブテナールおよび 2-ペンテナールは $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 373～374, $\lambda_{max}^{alk.\ EtOH}$ 458 を示す[4] ことから，TG 20 日酸化試料における No. 5 成分はこれらの不飽和アルデヒドの混合物と推定される。

豊水[8,9] は，イカ肝油の加熱酸化により各種の飽和アルデヒドのほかに，2-ブテナール，2-ヘプテナール，2-オクテナール，2,4-ウンデカ・ジエナールの生成することを認め，Fisher ら[10]は，$C_{20:5}$, $C_{22:6}$ ω_3 酸の自動酸化により 2-ペンテナール，2-ヘキセナールの生成することを認めている。したがって本研究における原料脂質の脂肪酸組成からこれらに類した不飽和アルヒデドも生成していることが推察される。

TG 45日酸化試料における No. 8 成分および Lec 酸化試料の No. 6 成分はエナールのほか，$C_{6,7,8,9}$

Table 4–2. *Carbonyl compounds produced in autoxidizing TG during storage at 2～5°C for 45 days after storage at −20°C for 1 month.*

Spot No.	R_f	λ_{max}				Absorbance near at 520 nm[c]
		$CHCl_3$	EtOH	alk. EtOH[a]	alk. EtOH[b]	
1	0.07	354	358	432	430	—
2	0.18	364	362	435	428	R
3	0.25	358	354	435	420	D
4	0.40	355	355	430	428	D
5	0.55	357	358	432	430	D
6	0.61	364	363	443	440	R
7	0.67	362	361	437	430	R
8	0.74	373	371	452	450	D

Legends of a, b and c are shown in Table 4–1.

Table 4–3. *Carbonyl compounds produced in autoxidizing Lec during storage at 2～5°C for 10 days after storage at −20°C for 1 month.*

Spot No.	R_f	λ_{max}				Absorbance near at 520 nm[c]
		$CHCl_3$	EtOH	alk. EtOH[a]	alk. EtOH[b]	
1	0.06	392	399	553	548	—
2	0.20	370	362	433	432	R
3	0.40	355	355	430	427	D
4	0.55	358	358	434	430	D
5	0.69	362	360	434	432	R
6	0.81	371	370	442	446	D

Legends of a, b and c are shown in Table 4–1.

Table 5. *Relative amounts of monocarbonyl compounds produced in autoxidizing TG and Lec.*

Material	TG		Lec
	20*	45*	10*
Acetone	19.3	37.9	7.6
Uk	—	2.1	—
Ethanal	9.5	10.7	27.5
Propanal	15.4	19.3	46.1
Uk	—	7.2	—
Butanone	—	9.4	9.6
Penta-dienal	55.8		
Butenal, Pentenal		13.3	9.3
$C_{6,7,8,9}$ aldehydes			

* The numbers are shown in Table 1.

飽和アルデヒドの混合物であると推定される。このほか TG 45日酸化試料の No. 7 および Lec 酸化試料の No. 5 成分は飽和ケトンであることを示し，ブタノンと推定される。

各酸化試料のモノカルボニル化合物およびデンシトメーターによって求めた相対濃度を表5に示してある。TG 20 日酸化では多量のジエナールを含有する不飽和カルボニルが生成し，酸化の進行した

Table 6. *Relative amounts of volatile fatty acids (VFA) produced in autoxidizing TG and Lec.*

VFA	TG 45*	Lce 10*	VFA	TG 45*	Lec 10*
C_2	2.6	4.5	Uk	3.0	-
C_3	20.0	28.2	C_7	8.0	4.9
C_4	4.6	5.9	C_8	3.0	3.9
C_5	2.6	10.1	Uk	1.1	-
Uk	-	4.6	C_9	7.9	-
C_6	41.7	37.8			

* The numbers are shown in Table 1.

45日酸化試料では，これらの不飽和カルボニルがさらに分解し，主としてアセトンやプロパナール生成することが認められた。Fisherら[10]は，$C_{20:5}$, $C_{22:6}$ ω_3 酸の自動酸化による主要生成物が $C_{3,4,5}$ アルデヒドであることを報告しているように，$C_{22:6}$ 酸を多量に含有する Lec の酸化においてもプロパナールが主要生成物として認められた。このほか TG 酸化試料ではアセトンの生成が顕著であるのに対し，Lec 酸化試料ではエタナールが多量に生成することが特徴的差異として認められた。

揮発性脂肪酸　酸化試料の留出液から Na 塩として分離した揮発性脂肪酸を前述の方法で分析した結果は表6に示すとおりである。TG 20日酸化試料の揮発性脂肪酸は，生成量が極めて微量であり分析が困難であったため，本表にはTG 45日酸化および Lec 酸化試料の分析結果を示してある。

脂肪酸の同定は標品の t_R との比較によって行ったが，カプロン酸とプロピオン酸が TG および Lec に共通した主要酸化生成物として認められた。このほか TG 酸化試料では C_9 酸が特徴的な生成物として認められたが，これは Loury[11] がオレイン酸およびノナナールの自動酸化により C_9 酸の生成することを指摘しているように，TG の主要構成脂肪酸である $C_{18:1}$ 酸の酸化分解に起因しいると考えられ，前述の TG 45日酸化試料における $C_{18:1}$ 酸の顕著な減少 (Table 3) に対する結果と考えられた。

総　　括

魚肉脂質の主要成分である TG および Lec の低温における自動酸化分解について検討した結果，低温においてもこれらの酸化が進行し，主要構成脂肪酸の $C_{20:5}$, $C_{22:6}$ 酸が顕著に分解減少することを認めた。また酸化の進行にともなっては TG に多量に含有される $C_{18:1}$ 酸の分解も行われた。その結果生成したモノカルボニル化合物はプロパナール，エタナール，アセトンが，また揮発性脂肪酸はカプロン酸，プロピオン酸が主要なものであった。これらの物質の中には前述のように，−20°C で塩溶性たん白質と最も高い反応性を示すものがあり，魚肉の低温貯蔵においてもその不飽和脂質の酸化が進行することは，塩溶性たん白質の変性（不溶化）に対し促進的に関与し得ることが考えられた。

謝　　辞

本研究にあたり終始御指導を賜わった本学部五十嵐久尚教授，座間宏一助教授ならびに九州大学農学部豊水正道教授に深く感謝の意を表します。

文　　献

1) Buttkus, H. (1967). The reaction of myosin with malonaldehyde. *J. Food Sci.* 32, 432–434.

2) 高間浩蔵・座間宏一・五十嵐久尚 (1972). 魚類筋肉脂質の冷凍貯蔵中の変化-III. 脂質酸化生成

物の蛋白質に及ぼす影響．日水誌 **38**, 607–612.
3) 柴崎一雄・本木正雄・木村繁昭 (1969)．大豆リン脂質の食品化学的研究（第7報）．3-sn-phosphatidylcholine の自動酸化生成物について．食品工誌 **16**, 564–568.
4) 市川信孝・野老山 喬 (1966)．カルボニル化合物，p. 549–663. 実験化学講座続 5，丸善，東京.
5) 平山健三 (1957)．紫外スペクトル分析 p. 1–290. 実験化学講座 I. 丸善，東京.
6) 熊沢 恒・大山 保(1965)．2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いる酸化油の総カルボニル測定法．油化学 **14**, 167–171.
7) Vyncke, W. (1970). Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloracetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette. Seifen Anstrichmittel* **72**, 1084–1087.
8) 豊水正道 (1960)．酸化魚油の抗菌作用に関する研究-II. 酸化イカ油 methyl ester 中の carbonyl の paper chromatography による分離・同定．日水誌 **26**, 726–732.
9) 豊水正道 (1960)．同上-III. 酸化イカ油 methyl ester 中の carbonyl の gas-liquid chromatography による分離・同定．同誌 **26**, 733–738.
10) Fisher, M.P. and Wishner, L.A. (1968). Autoxidation of tissue lipids. II. Monocarbonyl compounds formed by the oxidation of methyl eicosapentaenoate, methyl docosahexaenoate, and cod-liver oil. *Lipids* **3**, 88–90.
11) Loury, M. (1972). Possible mechanisms of autoxidative rancidity. *Ibid.* **7**, 671–675.