



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	スフィンゴイド塩基の抗酸化機構とその応用
Author(s)	上村, 麻梨子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13534号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13534
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74252
Type	doctoral thesis
File Information	Mariko_Uemura.pdf



スフィンゴイド塩基の抗酸化機構とその応用
(Antioxidant mechanism of sphingoid base
and its application)

北海道大学大学院水産科学院
海洋応用生命科学専攻
Graduate School of Fisheries Sciences
Division of Marine Life Science

上村 麻梨子
Mariko Uemura

2019 (平成 31 年)

目次

略語

緒言	… 1
第1章 各種トリアシルグリセロール(TAG)の酸化に対するスフィンガニン(SGA)の抗酸化効果	… 8
第1節 酸素残存量の測定	…12
第2節 揮発性成分生成の分析	…29
第3節 個々の揮発性成分の分析	…35
第2章 揮発性成分の同定及び酸化初期時生成挙動の解析	…50
第1節 固相マイクロ抽出(SPME)法を用いた GCMS 分析による 揮発性成分の同定	…52
第2節 魚油の酸化初期時における揮発性成分の生成挙動	…61
第3章 アルデヒドと SGA との反応生成物の抗酸化活性	…70
第1節 アクロレイン(Acr)と SGA の反応性及びその生成物の抗酸化活性	…73
第2節 スフィンゴシン(SGO)と Acr の反応生成物(SGO-Acr)の抗酸化活性	…87

第4章 アミノ化合物と各種抗酸化剤の魚油 TAG に対する抗酸化活性	…95
第1節 アミノ酸の抗酸化活性	… 97
第2節 ヒドロキシ基を持つアミンの抗酸化活性	…107
第3節 アミンの抗酸化活性に及ぼすアミノ基の影響	…122
第4節 トコフェロールなどの抗酸化剤の影響	…138
 総合考察	 …145
 参考文献	 …155
 謝辞	 …162

略語

本論文では、下記の略語を用いた。

アクロレイン(Acr)	水素炎イオン化検出器(FID)
1-アミノ-2-ブタノール(AmiOH)	スフィンガニン(SGA)
α -トコフェロール(α T)	スフィンゴシン(SGO)
イソペンチルアミン(Iso)	スレオニン(Thr)
オクタデシルアミン(Oct)	静的ヘッドスペース(SHS)
オープンカラムクロマト管 (カラム)	セリン(Ser)
ガスクロマトグラフィー(GC)	トリアシルグリセロール(TAG)
ガスクロマトグラフ質量分析計(GCMS)	トコトリエノール(T3)
過酸化物価(POV)	トリカプリリン(MCT)
高度不飽和脂肪酸(PUFA)	熱伝導度検出器(TCD)
固相マイクロ抽出(SPME)	フィトスフィンゴシン(Phyt)
脂質ヒドロペルオキシド、過酸化脂質 (LOOH)脂質ペルオキシラジカル(LOO $\cdot$)	ブチルアミン(Ami)
脂質ラジカル(L $\cdot$)	プロパナール(Pro)
ジフェニル-1-ピレニルホスフィン(DPPP)	保持時間(RT)
ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)	ホスファチジルコリン(PC)
脂肪酸メチルエステル(FAME)	ホスファチジリエタノールアミン(PE)
上部空隙ガス分析ガスクロマトグラフィー (HS-GC)	メタノール (MeOH)
	メチルエステル(ME)
	リン脂質(PL)

緒言

脂質は人が生きていく上で、欠かせない栄養成分である。生体における脂質の主な役割は、3つある。1つ目はエネルギー源である。食品において三大栄養素の1つとして位置付けられ、他の栄養素であるタンパク質や炭水化物と比較した際に、2.25 倍のエネルギーを生むことが可能であり、主要なエネルギー源となっている。2つ目の役割は、生体膜の構成分子である。生体膜は外界環境から細胞内部を保護し、細胞内情報伝達系を制御している。そして3つ目の役割は、生理活性物質としての機能である。特に、脂質の中でも n-3 系高度不飽和脂肪酸(PUFA)のドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)を多く含む「魚油」は非常に機能性が高く(Shahidi *et al.* 2018)、多くの人の関心が寄せられている。その理由は DHA や EPA が、糖尿病(Rasic-Milutinovic *et al.* 2007)や動脈硬化に関係する心血管疾患(Laidlaw *et al.* 2014)等の疾病に対して効果的に働くと共に、脳機能の向上(Yehuda *et al.* 2005)等、多様な機能性を示すためである。また、現代では食生活等の生活習慣によって引き起こされる様々な疾病を予防するため、高い栄養性や機能性が付加された商品に人々の注目が寄せられている。こうした観点から魚油等による機能性の高い食用油脂の活用は予防医学において重要だと考えられる。

しかし魚油を食用油脂として用いる上で課題がある。それは魚油の著しく速い酸化劣化である。油の酸化は栄養価の低下や風味の劣化を引き起こす。これらの弊害が魚油では極めて短い時間に起こるため食用油脂としての応用は難しい。油脂酸化の反応機構については多くの研究が行われ、その主要な反応経路が明らかになっている。油脂の酸化に関わるのは油脂の主要構成成分である PUFA である。PUFA は長い炭化水素鎖から成り、その構造上に複数の二重結合を含む。この二重結合の数が多くなるにつれ、酸化劣化のスピードが速くなる(Miyashita 2014, 島尻 2013; Table 1)。魚油の酸化スピードが他の油に比べて極めて速いと言われるのは、DHA や EPA がそれぞれ5つ6つと多数の二重結合を有するためである。Table 1 に示されているように各二重結合の間の炭素に結合している水素をビスアリ

ル位水素と呼ぶが、これは Fig. 1 に示されているように、高いエネルギーを持つフリーラジカルなどにより引き抜かれ、脂質ラジカル(L[•])となった後に酸素が結合して脂質ペルオキシラジカル(LOO[•])となる。LOO[•]は不安定なため、安定化しようと他のビスアリル位水素を引き抜き、脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)を形成する。そのため、一度ラジカルが形成されると他のビスアリル位水素を引き抜いて脂質の酸化が連鎖的に起こり、劣化のスピードが速くなる。酸化反応が進行すると LOOH が生成するが、LOOH は分解反応なども起こし、低分子成分や他の酸化物へと変化する。これらのいわゆる二次酸化生成物のうち、低分子成分は風味劣化や栄養価の低下を引き起こす。このため、不飽和脂肪酸を多く含む油脂を利用するには効果的な抗酸化方法の確立が必要である。

このような酸化反応に対して基本的には、酸化した際に生成されるラジカル体を安定化させる水素ラジカルの供与が酸化防止に効果的である。そのため、トコフェロール等の水素ラジカル供与型の抗酸化剤は大きな役割を果たす。現在多くの油脂には、抗酸化剤としてビタミン E の一種である α -トコフェロール(α T)が主に添加されている。食用油脂として多用される菜種油や大豆油であれば、この方法で酸化を防止することができる。しかし、二重結合を非常に多く含む魚油などではこの方法だけで十分にその酸化劣化を防止することができない。こういった既存の抗酸化剤が適さない魚油に対し有効な抗酸化方法を確立するため、いくつかのアプローチで研究が進められている。まず 1 つに強力な抗酸化力を示す抗酸化物質の探索研究であり、カルノシンやカルノソール、カテキンなどフェノール化合物に関わる化合物が見出されている(Bhale *et al.* 2007, Erdmann *et al.* 2015, ^aFrankel *et al.* 1996, ^bFrankel *et al.* 1996, Maqsood *et al.* 2014, Dwyer *et al.* 2012, Pourashouri *et al.* 2016, Zhu *et al.* 2009)。しかし、上記の化合物を含む食品用添加物(ローズマリー抽出物や茶抽出物)には特殊な臭い成分が含まれていることが多く、食品への利用用途が限られている。そのため抗酸化効果を高めるため、抗酸化剤の組み合わせや抗酸化剤と抗酸化能をもたない物質、いわゆる相乗剤との組み合わせによる酸化防止方法も検討されている。例え

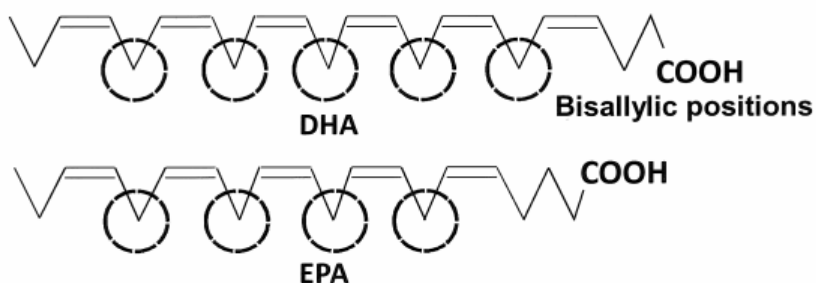
ばトコフェロールとアスコルビン酸やそのエステル体と組み合わせると、トコフェロールラジカルをアスコルビン酸で還元することでトコフェロールの抗酸化能を再生できる(勝木ら 1991)ため、より強力な抗酸化効果が期待できる。またトコフェロールとリン脂質(PL)の組み合わせが強い抗酸化効果を示すことも知られており(瀬川ら 1994)、PL でも特にホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)のアミノ基と脂質酸化物とのアミノカルボニル反応で生成される抗酸化物質の効果についての報告もある(Lu et al. 2012)。さらに、PL の他にも、リジンやヒスチジンなどのアミノ酸とアルデヒドなどのカルボニル基を有する脂質酸化物との反応により生成したピロール化合物の抗酸化性についての報告もある(Zamora et al. 2005)。その他、スフィンゴイド塩基の1種であるスフィンガニン(SGA)とトコフェロールの併用による魚油や大豆油に対する効果的な酸化防止能が報告されている(Shimajiri et al. 2013)。これは、第一級アミノ基と脂質酸化物中のカルボニル基とが反応して、強い抗酸化力を有するアミノカルボニル反応物が生成し、抗酸化能を発揮したためだと考えられているが、そのメカニズムは不明である。また、アミノカルボニル反応のメカニズムも全容は明らかになっておらず、その1つとしてFig.2のように進むといわれているが、その詳細は明らかになっておらず、生成物もはっきりとしていない。

上述のように多くの抗酸化方法が検討されているが、未だ魚油を食用油脂として汎用する上で十分な抗酸化法は確立されておらず、特に、魚油の酸化によって引き起こされる風味劣化を効果的に防止する方法が求められている。ところで、これまでの抗酸化法を比較した場合、魚油に対する有効な抗酸化法として最も期待できるのはSGAとトコフェロールとの併用といえる。魚油の酸化劣化で最も問題となるのは、酸化初期から生成する不快臭であるが、SGAとトコフェロールの組み合わせによりこの不快臭の生成を抑制できることが示唆されている。そこで、本研究では、SGAのようなアミノ化合物とトコフェロールとの併用で示される抗酸化の作用機構を明らかにし、それを基に魚油の酸化劣化を効果的に抑制できる新規抗酸化法の確立を目的とした。

第 1 章では、脂肪酸組成の異なる様々なトリアシルグリセロール(TAG)を用い、SGA と α T の併用による抗酸化効果について、酸素残存率及び酸化に伴い生成される揮発性成分の分析により検討した。第 2 章では、魚油酸化で生ずる揮発性成分の同定を行うと共に、酸化初期時でのこれら揮発性成分の生成挙動について検討し、魚油の風味劣化防止のための基礎的知見を得た。第 3 章では、第 2 章において、酸化油脂中に生成するアルデヒドなどの揮発性成分と SGA との反応生成物が、SGA の抗酸化活性に深く関わっていることが明らかになったので、SGA と魚油の主たる揮発性成分であるアクロレインとの反応生成物を調製し、その抗酸化活性を評価した。また第 4 章では、より強力な抗酸化方法を確立することを目指し、SGA 以外のアミノ化合物を用い、その構造と抗酸化活性の相関について検討を行った。また、SGA 存在下における α T 以外のビタミン E 同族体の抗酸化効果についても比較検討を行った。

Table 1. Oxidative stabilities of typical PUFAs in bulk phase or in organic solvents.

PUFA	Double bonds	Bisallylic positions	Relative oxidation rate	Oxidative stability
Linoleic (18:2n-6; LA)	2	1	1	↑ ↓
α -Linolenic (18:3n-3; LN)	3	2	2	
Arachidonic (20:4n-6; AA)	4	3	3	
Eicosapentaenoic (20:5n-3; EPA)	5	4	4	
Docosahexaenoic (22:6n-3; DHA)	6	5	5	



(Source: Junko Shimajiri, Master's thesis at Hokkaido University, 2013)

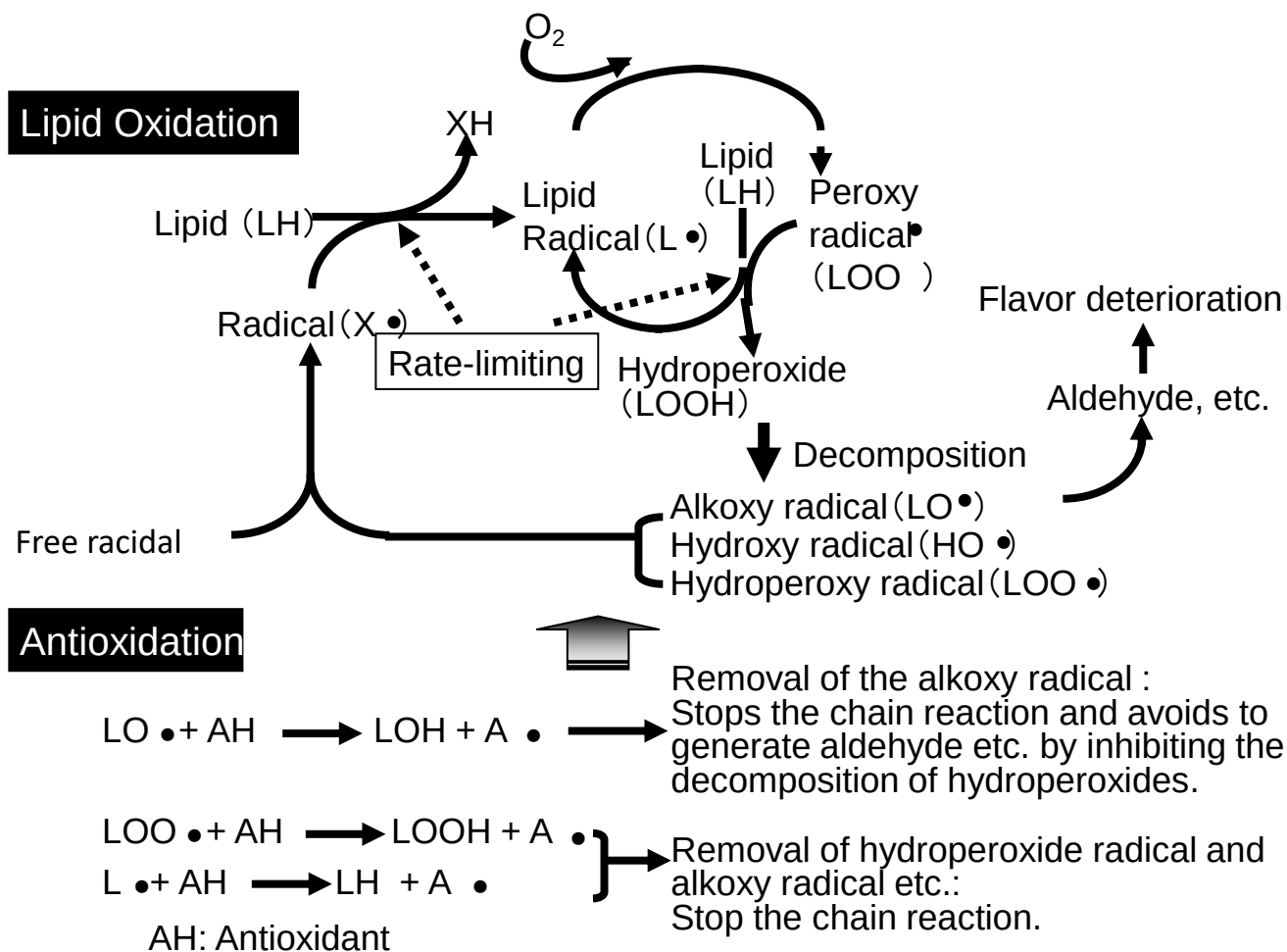


Fig. 1 The mechanisms of lipid oxidation and antioxidation

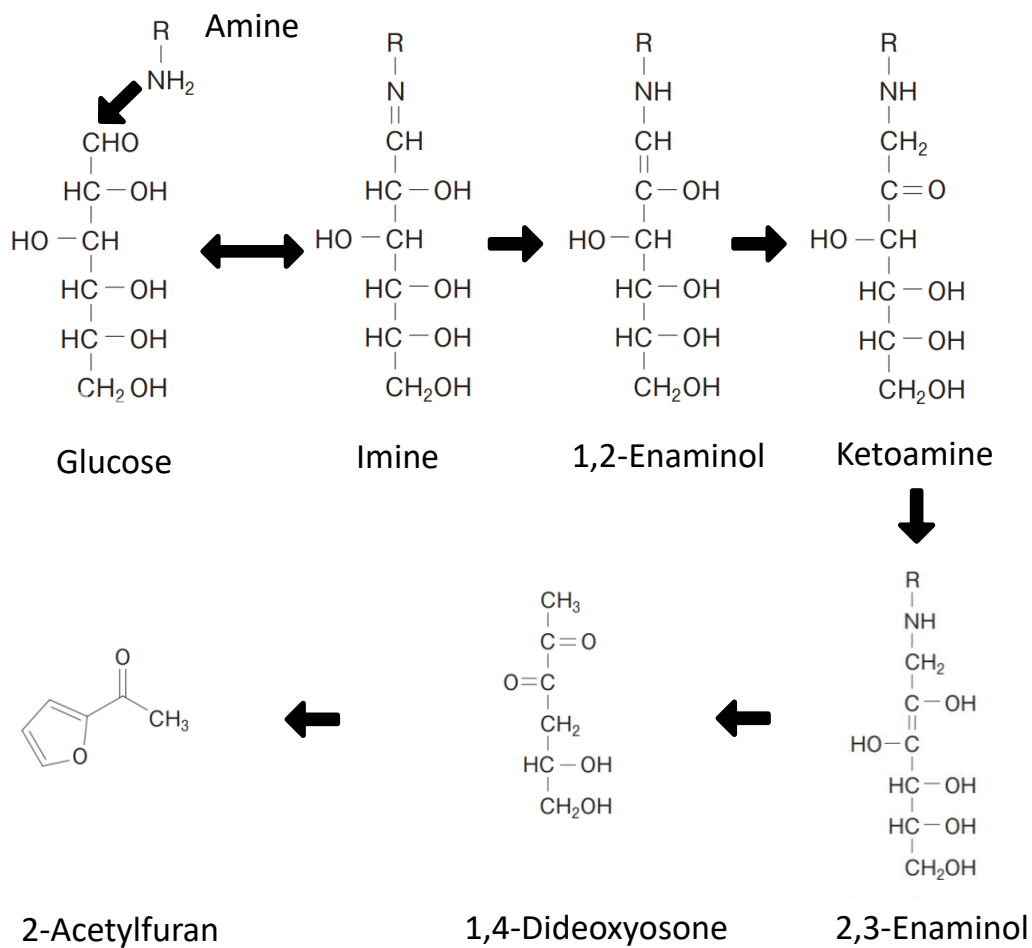


Fig. 2 One of the mechanisms of amino-carbonyl reaction

第1章 各種 TAG の酸化に対する SGA の抗酸化効果

序論

脂肪酸は鎖長の長さや不飽和度において様々なものが存在する。酸化に大きな影響を与える不飽和度においては、その値が高くなるにつれビスアリル位水素の数が増える (Table 1)。酸化により脂肪酸に酸素が結合するが、酸素の脂肪酸に対する吸収量測定に基づいた検討において、ビスアリル位と酸化の速度に相関性が見られるとの報告がある (Holman *et al.* 1947, Cosgrove *et al.* 1987)。例えば、リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、DHA の分子中のビスアリル位数は 1, 2, 3, 5 個であるが、その相対的な酸化速度は、リノール酸を 1 とすると、リノレン酸は 2.1、アラキドン酸は 2.9、DHA は 5.1 となることが報告されている (Cosgrove *et al.* 1987)。酸化の第一次生成物は 1 分子の酸素が各種脂肪酸に結合したヒドロペルオキシド (LOOH) で、酸素分子の結合位置は各脂肪酸の構造に応じて異なり、各々特定の LOOH が生じる (Frankel 1998)。酸化がさらに進行すると LOOH は分解し、揮発性成分などの低分子化合物が生じるが、揮発性成分の組成も各種脂肪酸の種類によって異なることが知られている (遠藤泰志 2015)。油脂は様々な脂肪酸が混合しており、主要脂肪酸が各油脂で異なっている。そのため酸化の速さや生じる揮発性成分も油脂ごとで異なることが予想されている。しかし、それぞれの油脂の酸化で生成する揮発性成分の組成は複雑であり、その詳細については不明な点も多い。酸化で生成する揮発性成分は、油脂の品質低下の最大の要因であり、その効果的な生成防止法を探る上でも、どのような揮発性成分が生成するかを明確にする必要がある。

油脂の酸化安定性は、結合している脂肪酸、特に二重結合を 2 個以上有する PUFA のビスアリル位水素数が多いほど低くなる。したがって、ビスアリル位水素をそれぞれ 4 個と 5 個有する EPA や DHA を多く含む魚油は非常に酸化されやすく、酸化に伴う不快臭の発生も著しい。このような酸化に伴う劣化反応の進行を抑えるため、一般的には抗酸化剤が添

加されている。一般的に、抗酸化剤は Fig.1 に示したように、プロトンを供与することで酸化の引き金となるラジカルを不活性化（消去）し油脂酸化を抑制している。LOOH の分解もラジカルや金属の存在により促進されるため、抗酸化剤の油脂への添加は、LOOH の分解に伴う揮発性成分の生成を抑制する能力を有する。しかし、EPA や DHA 由来の LOOH は、著しく反応性が高く、ラジカル消去型の抗酸化剤のみでその分解を完全に抑制することは難しい。そのため EPA や DHA を多く含む魚油の場合、酸化に伴う揮発性成分の発生とそれに伴う臭い劣化の問題により、食品等への利用が困難と考えられている。現在、魚油を含む各種製品が販売されているが、これらの製品では、魚油の酸化に伴う不快臭の発生をある程度見越した上で、他のフレーバーで魚臭が目立たないような工夫がなされている。例えば、マルハニチロ株式会社との共同開発を行っているさくらフォレスト株式会社より販売されている「きなり」という魚油配合のサプリメントや、日本水産株式会社より開発されている特定保健健康食品で DHA・EPA 含有飲料の「イマーク」においては、オレンジやヨーグルトによるフレーバーを用い魚臭の改善が行われている。これはマスキング作用、即ち他の臭いで魚臭をかき消すような芳香剤を用いた商品開発である。しかし、この場合、消臭剤とは異なり臭いを根本的に断つ方法ではないため、魚臭の原因であるアルデヒド類などを除去するものではなく、臭いの問題は完全には解決されていない。多くの人に魚油製品を広く流通させるためには、魚臭に対する効果的な解決方法が望まれる。

効果的な魚油の酸化劣化防止法を開発する上で重要な点として、上述のような少量の揮発性成分の生成を前提とすることが挙げられる。脂質の酸化に伴い生成される揮発性成分の中には、アルデヒドなどのカルボニル基を持った化合物が多く生成する^(a 和田ら 2013)。魚油の酸化でも主な揮発性成分はアルデヒド類と考えられており、少量のアルデヒド類の存在下で抗酸化性が発揮できる方法が求められている。この観点から、アルデヒドのカルボニル基とアミン基を有する化合物とのアミノカルボニル反応の利用が考えられる。というのも、アミノカルボニル化合物には抗酸化活性のあることが良く知られているからであ

る(Majid *et al.* 2019, Alaiz *et al.* 1996, Zamora *et al.* 1997)。例えば、カルボニル化合物としては脂質酸化に伴って生成する揮発性成分や還元糖などを、アミノ化合物としてはアミノ基を持つリン脂質(PL)やタンパク質、ペプチド、アミノ酸などを用いて両者を反応させ、生じたアミノカルボニル化合物の抗酸化性が報告されている(Majid *et al.* 2019)。特に PL を油脂に添加し、PL と油脂酸化物とのアミノカルボニル化合物の抗酸化効果を利用して油脂の酸化安定性を図る研究例が多い(Miyashita *et al.* 2018, Cui *et al.* 2015)。ホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)等の各種 PL クラス別の効果等に関する検討(瀬川丈史ら 1994)もあり、こうした場合に PC や PE が十分に抗酸化性を発揮するには、トコフェロールなどの既存の抗酸化物質の存在が不可欠であると考えられている。

アミン化合物としては、その他、スフィンゴ脂質の骨格部分であるスフィンゴイド塩基(SGA)を用いた場合に、魚油に対して強力な抗酸化活性が報告されている(Shimajiri *et al.* 2013)。この研究では、各種 PL やスフィンゴリン脂質を α -トコフェロール(α T)と併用した酸化試験について検討し、SGA の抗酸化効果が最も強く、ついで、スフィンゴミエリンが強く、セラミドなどのスフィンゴ脂質や PL の抗酸化効果がそれほど顕著ではないことを見出している。ただ、Shimajiri ら(2013)の研究では魚油を基質に用い、酸化に伴うヘッドスペース中の酸素残存率や油脂中に生成する過酸化物質(POV)を解析し、酸化劣化の評価が行われていた。しかし、酸化に伴う不快臭についての分析などは行っていなかったため、SGA 添加で魚油の酸化に伴う不快臭の生成抑制効果については明らかにされていない。

本章ではアミノカルボニル化合物の抗酸化活性に着目し、アミノ化合物の中でも強力な抗酸化活性を持つという報告(Shimajiri *et al.* 2013)があった SGA に注目した。また、酸化基質としては、脂肪酸組成、特に PUFA 組成が大きく異なる 4 種の油脂(魚油・エキウム油・亜麻仁油・大豆油)から得たトリアシルグリセロール(TAG)を用い、酸化で生成する揮発性成分の特徴に着目しながら、SGA によるその生成防止効果について検討した。

なお本章は 3 節から成る。第 1 節に酸素残存量の検討、第 2 節に揮発性成分総量の検討、

第 3 節では特定の揮発性成分の検討を行った。これらの検討により、SGA が示す抗酸化機構の解明を特に揮発性成分の生成に着目して試みた。

第1節 酸素残存量の測定

実験方法

1-1-1 試料及び試薬

油脂は魚油・エキウム油・亜麻仁油・大豆油の4種を用いた。魚油(DHA-55 : EPA-28MNを1:1に混合)はマルハニチロ株式会社より、エキウム油はDe Wit Specialty Oils 会社よりそれぞれ供与されたものを使用した。亜麻仁油及び大豆油は和光純薬(株)から購入した。DL- α -トコフェロール(和光一級)は和光純薬(株)から購入した。スフィンゴイド塩基(D-エリスロスフィンガニン(SGA))はフナコシ(株)より購入した。油脂の精製で用いた活性炭素(20~150mesh)とセライト 545RVS はナカライテスク(株)より、シリカゲル BW-80S は富士シリシア化学(株)より購入した。*n*-ヘキサン、クロロホルム、メタノール(MeOH)、ジエチルエーテルや1-ブタノール、2-プロパノールは全て和光純薬(株)より購入した。過酸化脂質の除去の確認に用いたジブチルヒドロキシトルエン(BHT)は関東化学(株)から、ジフェニル-1-ピレニルホスフィン(DPPP)は株式会社同仁化学研究所で製造された試薬を使用した。油脂の脂肪酸をメチルエステル化する際に使用した水酸化ナトリウム、超脱水メタノールは和光純薬(株)より、塩化水素-メタノール溶液は関東化学(株)より購入した。

なお、高速クロマト液体クロマトグラフィー(HPLC)分析の際に使用した溶媒はHPLCグレードを、その他溶媒は試薬特級を使用した。

1-1-2 油脂の精製

(1) α T の除去

ϕ 3 cm、長さ50 cmのオープンカラムクロマト管(カラム)を用いた。カラムの下端に脱脂綿を詰めた。活性炭素約45 gを110℃で1時間半加熱し、活性化させた後にデシ

ケーターで放冷した。放冷後、セライト約 45 g を加え *n*-ヘキサンを注ぎ、十分に混ぜ合わせた後に、活性炭素/セライトが均一になるようにカラムに充填した。この際、充填の仕方が不十分だとうまく α T の精製除去が行えないため、カラムを何度か叩き、充填剤の隙間が極力なくなるよう気を付けて充填した。カラムの上端に約 20 ml の *n*-ヘキサンに希釈させた各油脂 TAG25 g を添加した。溶出溶媒として *n*-ヘキサンを流速 2 滴/秒の下で 1200 ml 流した。得られた *n*-ヘキサン画分からロータリーエバポレーターにより溶媒を留去した。

(2) 過酸化脂質(LOOH など)の除去

ϕ 4 cm、長さ 50 cm のカラムを用いた。カラムの下端に脱脂綿を詰めた。約 200 g のシリカゲルに *n*-ヘキサンを注ぎ、十分に混ぜ合わせた後にカラムに充填した。 α T を除去した油脂を 20 ml の *n*-ヘキサンに溶解し、カラム上部に添加した。ついで、*n*-ヘキサン、2%、10%ジエチルエーテル含有 *n*-ヘキサン溶液を、流速 2 滴/秒の下でそれぞれ 200 ml、300 ml、1200 ml 流した。10%画分を回収し、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去させ、精製 TAG を得た。

1-1-3 精製 TAG の分析

(1) α T 除去確認

α T の除去の確認には、蛍光検出器を装備した HPLC を用いた。精製 TAG 約 50 mg を 1 ml の *n*-ヘキサンで希釈した。HPLC 分析時には、希釈液の 10 μ l を注入した。HPLC の分析条件は以下のとおりであり、これを基に残存 α T の有無を確認した。

[HPLC 分析条件]

カラム:	Si 60 (4.6×250 mm) (5 μm)(関東化学)
ポンプ:	L-2130 (日立)
検出器:	FL Detector L-2485 (日立)
カラムオーブン:	L-2350 (日立)
オートサンプラー:	L-2200 (日立)
移動相:	<i>n</i> -ヘキサン/2-プロパノール=99.2/0.8(v/v)
カラム温度:	25℃
流量:	1.0 ml/min
波長:	325 nm (励起波長 298 nm、蛍光波長 325 nm)

(2) LOOH の除去確認

クロロホルム：メタノール=2:1(v/v)溶液に BHT を約 10 mg/ml-クロロホルムとなるように加えた。次に、DPPP 約 1 mg をクロロホルム 5 ml に溶かして DPPP 溶液を調製した。各精製 TAG を試験管に約 1 mg 採取し、秤量器で正確に測った。各試験管に BHT 溶液を 100 μl、DPPP 溶液を 50 μl 加えて蓋をした後、暗所下 60 °C の湯浴で 60 分間加熱した。加熱後水冷し、3 ml の 2-プロパノールを加えた。HPLC 分析用のバイアル瓶に試験管中のサンプル溶液を 100 μl とり、2-プロパノール 900 μl を加えて十分に攪拌混合させた。HPLC 分析時は、このバイアル瓶の 2 μl を注入した。HPLC の分析条件は以下のとおりとし、LOOH の定量を行った。PV 法と DPPP の相関に関する報告(Akasaka *et al.* 1992) を基に、AOCS の公定法(AOCS 1998)で定めた POV が 1.0 meq/kg 以下であることを確認した。

[HPLC 分析条件]

カラム:	Develosil ODS-UG-5 (4.6×250 mm) (5 μm) (野村化学)
ポンプ:	L-2130 (日立)
検出器:	FL Detector L-2485 (日立)
カラムオープン:	L-2350 (日立)
オートサンプラー:	L-2200 (日立)
移動相:	メタノール/1-ブタノール=90/10 (v/v)
カラム温度:	40°C
流量:	1.0 ml/min
波長:	380 nm (励起波長 352 nm、蛍光波長 380 nm)

1-1-4 TAG の脂肪酸組成の分析

Prevot と Mordret のアルカリ低温メチルエステル化 (ME 化) 法(Prevot *et al.* 1976)に基づいて TAG の脂肪酸を ME 化した後、GC-水素炎イオン化検出器(FID)により脂肪酸組成の分析を行った。手順や ME 化に使用する 2N NaOH-MeOH や 2N HCl-MeOH の試薬調製は以下の通りである。

(1) 試薬調製

2M 水酸化ナトリウムメタノール溶液

水酸化ナトリウム 4.0 g を超脱水メタノール 50 ml にマグネチックスターラーを用いて攪拌させながら溶解させた。

2M 塩化水素メタノール溶液

3.3 M-塩化水素メタノール溶液 HCl-MeOH 溶液 10 ml に超脱水メタノール 3.7 ml を加えた。

(2) メチルエステル化

ねじ口試験管におよそ 10 mg の TAG をとり *n*-ヘキサン 1 ml と NaOH - MeOH を 200 μ l 加え、Vortex ミキサーで 10 秒間攪拌した後 50°C の湯浴で 30 秒間反応させた。その後 HCl-MeOH を 200 μ l 加えて 1 分間の Vortex ミキサーで攪拌した後に 5 分間 3000 rpm の遠心分離を行った。上層の *n*-ヘキサン溶液を他のバイアル瓶へ移して窒素ガスにより *n*-ヘキサン溶媒を除去し、油脂の脂肪酸メチルエステル (FAME) を得た。

(3) GC-FID 分析

得られた FAME を *n*-ヘキサンで濃度 5% に希釈した。その溶液の 1 μ l をマイクロシリンジで GC に注入し、分析を行った。GC-FID の分析条件は以下のとおりである。

[GC-FID 分析条件]

装置:	GC : GC-14B (島津)
	インテグレーター : C-R8A (島津)
検出器:	FID
検出器温度:	260°C
気化室温度:	250°C
スプリット比:	49 : 1
カラム:	Fused Silica Capillary Column Omegawax 320 (30 m×0.32 mm), (Supelco Inc.)

カラム温度: 200°C
キャリアガス: ヘリウム
流量: 1 ml/min

1-1-5 サンプル調製と酸化

α T と SGA のサンプルは予め希釈液を調製した。 α T は *n*-ヘキサンに、SGA はクロロホルム:メタノール=7:3 の溶媒に溶かし、それぞれ 0.15 mg/ml と 3 mg/ml の濃度に調整した。20 ml 容量バイアルに各サンプルを 1 ml ずつ採取し、窒素気流下のもとで溶媒除去を行った。その後、所定量の油脂を直接添加した。パスツールピペットの上端にゴム帽を取り付け、50 回のプッシュで酸化反応を起こすための空気を十分に送り込んだ。その後バイアル瓶にブチルセプタムゴムとアルミシールが一体になった蓋を取り付け、容器を密閉し、暗所下 50°C の温度でインキュベートした。本実験の分析で設けた 4 つのグループ及び各サンプル量は以下のとおりであり、それぞれ $n=3$ にて酸化実験を行った。

グループ 1: TAG 300 mg

グループ 2: TAG 300 mg + α T 0.15 mg

グループ 3: TAG 297 mg + SGA 3 mg

グループ 4: TAG 297 mg + α T 0.15 mg + SGA 3 mg

1-1-6 GC-熱伝導度検出器(TCD)による酸化評価

マイクロシリンジでヘッドスペースの 20 μ l を取り、一定時間毎に TCD を装備した GC へ注入し、分析を行った。酸化に伴ってヘッドスペース中の酸素のピークが減少するので、酸素と窒素のピーク比の変化を経時的に追い、油脂の酸化に伴う酸素残存量の減少変化に基づいた酸化評価を行った。GC-TCD の分析条件は以下のとおりである。

[GC-TCD 分析条件]

装置:	GC : GC-14B (島津)
	インテグレーター : C-R8A (島津)
電圧器:	AMP-7B
検出器:	TCD
検出器温度:	120°C
気化室温度:	120°C
カラム:	Molecular sieves-5Å (60/80 mesh; 3 m×2.1 mm)
カラム温度:	70°C
キャリアガス:	ヘリウム
ヘリウム圧:	50 kPa

結果及び考察

Table 2 および Fig. 3 は本検討で用いた油脂の各 TAG の脂肪酸組成を示している。油脂の酸化に関係する PUFA に着目すると、総 PUFA は魚油、エキウム油、亜麻仁油、大豆油でそれぞれ 52.2 %、68.5 %、60.8 %、56 %含まれていた。また、魚油が脂肪酸の中でも非常に酸化が速いと言われている EPA(20:5n-3)や DHA(22:6n-3)を多く含んでいることを確認できた。PUFA の中でも主要脂肪酸として、エキウム油ではリノール酸(18:2n-6)、 α -, γ -リノレン酸(18:3n-3, 18:3n-6)とステアリドン酸(18:4n-3)を、亜麻仁油はリノール酸(18:2n-6)や α -リノレン酸(18:3n-3)を多く含んでいた。また大豆油ではリノール酸(18:2n-6)を多く含み、各 TAG の PUFA における主要脂肪酸が異なることを確認できた。リノール酸や α -, γ -リノレン酸の二重結合の数が 2、3 個である一方で EPA や DHA はそれぞれ 5、6 個と多いため、Cosgrove ら(1987)のビスアリル位水素の数と酸化反応の相関性に関する報告や、本結果で示される総 PUFA 量も考え、本検討で用いた魚油は酸化速度が他の油脂よりも特に速いと考えられた。

Fig. 4,5 は、各油脂を 50°C で酸化させた場合のヘッドスペース中の酸素残存量の経時変化を表したグラフである。抗酸化剤の α T と SGA を各々単独あるいは両方を添加し、その酸化安定性を各 TAG について比較した。また Fig. 6,7 では各 TAG の酸化安定性を比較したグラフを示している。

Fig. 4,5 から、エキウム油、亜麻仁油、大豆油いずれの TAG でも、その酸化安定性の順番が、[TAG + SGA] < [TAG] < [TAG + α T] < [TAG + α T + SGA]となった。 α T と SGA の併用添加は非常に高い抗酸化性を示したが、SGA の単独添加はかえって酸化を促進した。したがって、SGA は α T と共存することで、 α T に対して優れた相乗的抗酸化作用を示すことが明らかになった。一方、魚油 TAG の酸化安定性は、[TAG] < [TAG + SGA] < [TAG + α T] < [TAG + α T + SGA]となった(Fig. 4 A)。他の TAG 同様に α T と SGA の併用添加で非常に高い酸化

安定性を示したが、SGA の単独添加では若干の酸化抑制を示し、他の TAG と異なる結果を示した。また、各 TAG 間の酸化安定性を比較した場合 (Fig. 6,7)、[TAG]、[TAG + α T]、[TAG + α T + SGA]いずれにおいても、その安定性の順番は、魚油 < エキウム油 < 亜麻仁油 < 大豆油となった。一方、[TAG + SGA]のみにおいてその順番が、エキウム油 < 亜麻仁油 < 魚油 < 大豆油となった。つまり本来容易に酸化する魚油に SGA のみを添加することでエキウム油、亜麻仁油よりも若干高い酸化安定性を示した(Fig.7A)。これは島尻(2013)による報告と異なる結果となった。その報告では、Table 3 に示された脂肪酸組成を持つ魚油で、SGA の単独添加は酸化を促進させたと報告している(Fig. 8)。この魚油の EPA+DHA 含量は本研究で用いた魚油のそれ(Table 2)よりかなり低い。Hidalgo ら(2003)は、アミノカルボニル化合物の抗酸化活性は、アミノ酸等のアミノ化合物と油脂、特に脂肪酸の酸化に伴い生成する揮発性成分との反応が関係するとしている。すなわち SGA 単独添加で抗酸化性を示さなかったエキウム油、亜麻仁油、大豆油に全く含まれない DHA や EPA の含有量が、過去の報告と比較して本実験の方が多かったことが上記の相違に関係している可能性が推定できる。これらのことから、本実験の魚油への SGA 単独添加で過去の報告と異なって若干ながらも酸化安定性を示した原因は、揮発性成分の生成量の違い、即ちその生成源である脂肪酸組成の違いによるものと推測された。

Table 2 Composition (weight %) of major fatty acids of fish oil TAG, echium oil TAG , linseed oil TAG and soybean oil TAG. TAG: triacylglycerol, *: < 0.05, - : not detected

Fatty acid	Fish oil	Echium oil	Linseed oil	Soybean oil
14:0	4.7 ± 0.4	0.0±0.0*	0.0±0.0*	0.1 ± 0.0*
16:0	11.4 ± 0.5	7.7 ± 0.3	5.6 ± 0.1	10.4 ± 0.1
16:1n-7	3.5 ± 0.2	0.1 ± 0.0*	0.1 ± 0.0*	0.1 ± 0.0*
18:0	3.3 ± 0.0*	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.0*	3.9 ± 0.0*
18:1n-7	1.78± 0.0*	0.6 ± 0.0*	0.8 ± 0.0*	1.4 ± 0.0*
18:1n-9	6.4 ± 0.0*	17.3 ± 0.3	25.7 ± 0.1	26.1 ± 0.1
18:2n-6	0.5 ± 0.0*	16.1 ± 0.2	16.9 ± 0.0*	51.4 ± 0.0*
18:3n-3	0.2 ± 0.0*	29.3 ± 0.1	43.9 ± 0.1	4.6 ± 0.0*
18:3n-6	0.4 ± 0.0*	11.6 ± 0.2	-	-
18:4n-3	1.8 ± 0.0*	11.4 ± 0.3	-	-
20:1n-9	1.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1*	0.2 ± 0.0*	0.3 ± 0.0*
20:4n-6	2.7 ± 0.1	-	-	-
20:5n-3	15.7 ± 0.2	-	-	-
22:5n-3	2.9 ± 0.1	-	-	-
22:6n-3	27.9 ± 0.8	-	-	-

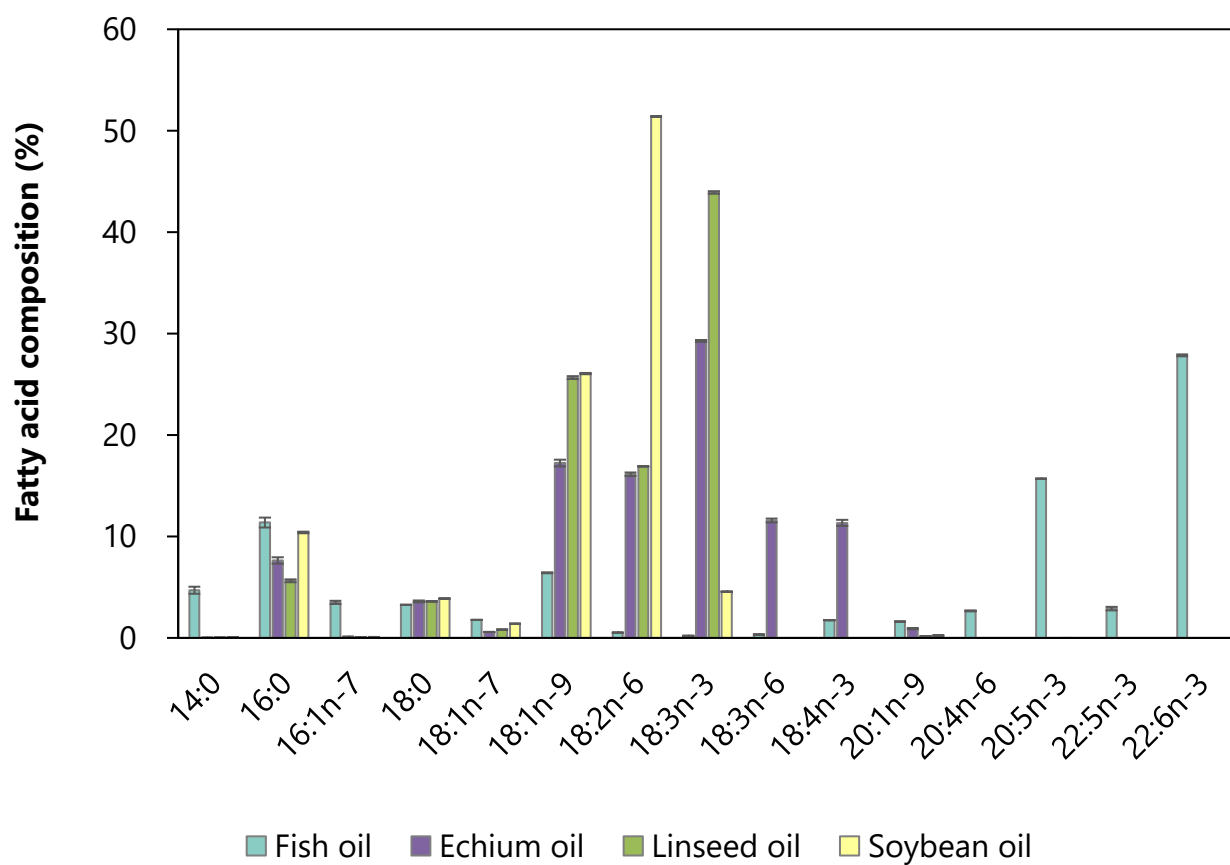


Fig. 3 Composition (weight %) of major fatty acids of fish oil TAG, echium oil TAG , linseed oil TAG and soybean oil TAG. TAG: triacylglycerol

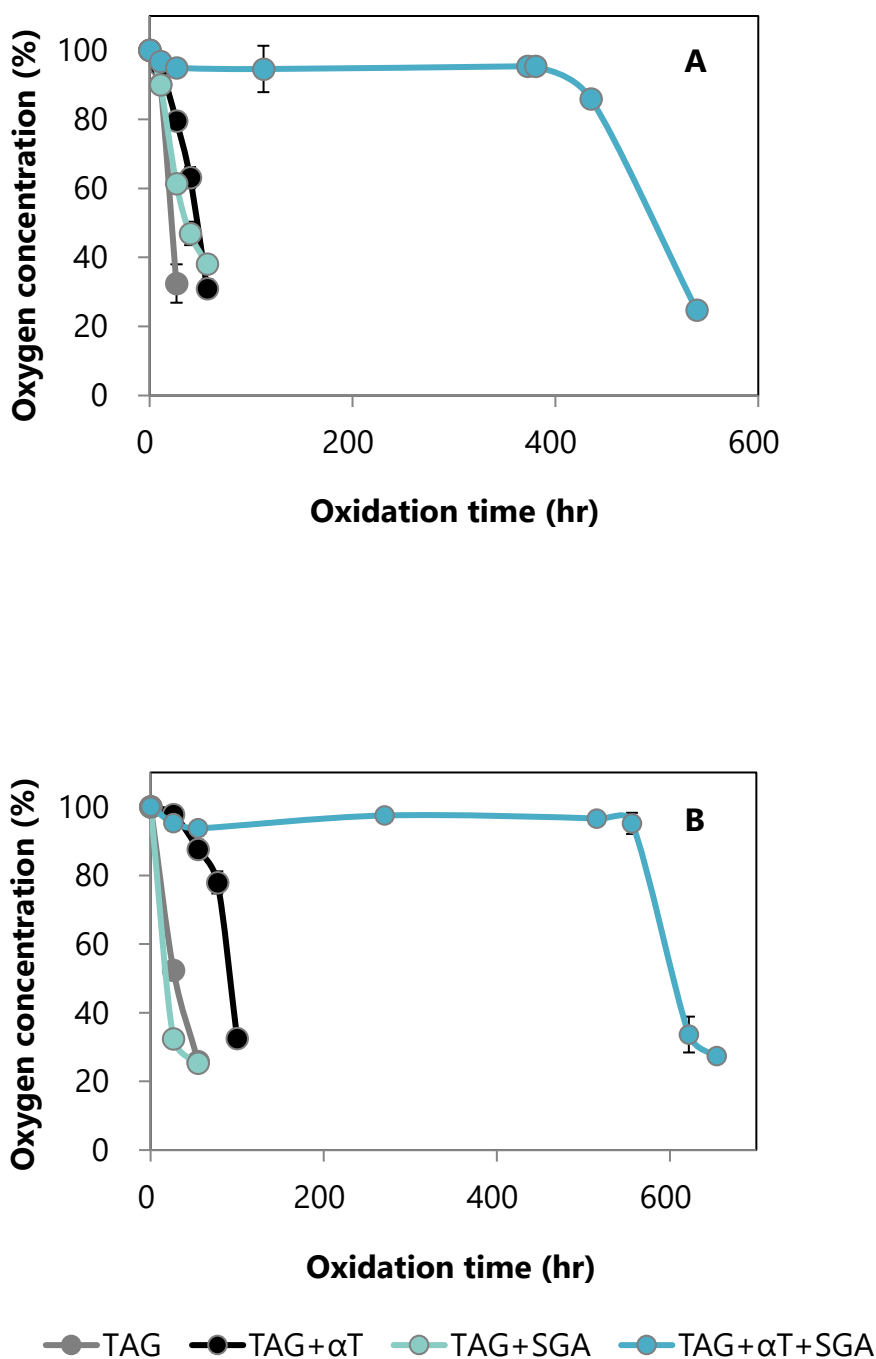


Fig. 4 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the oxidative stability of fish (A) and echium oil TAG (B). The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen in the head space gas of the vial. Oxidation was done at 50 °C in the dark. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments. TAG; triacylglycerol, SGA; sphinganine, α T; α -tocopherol

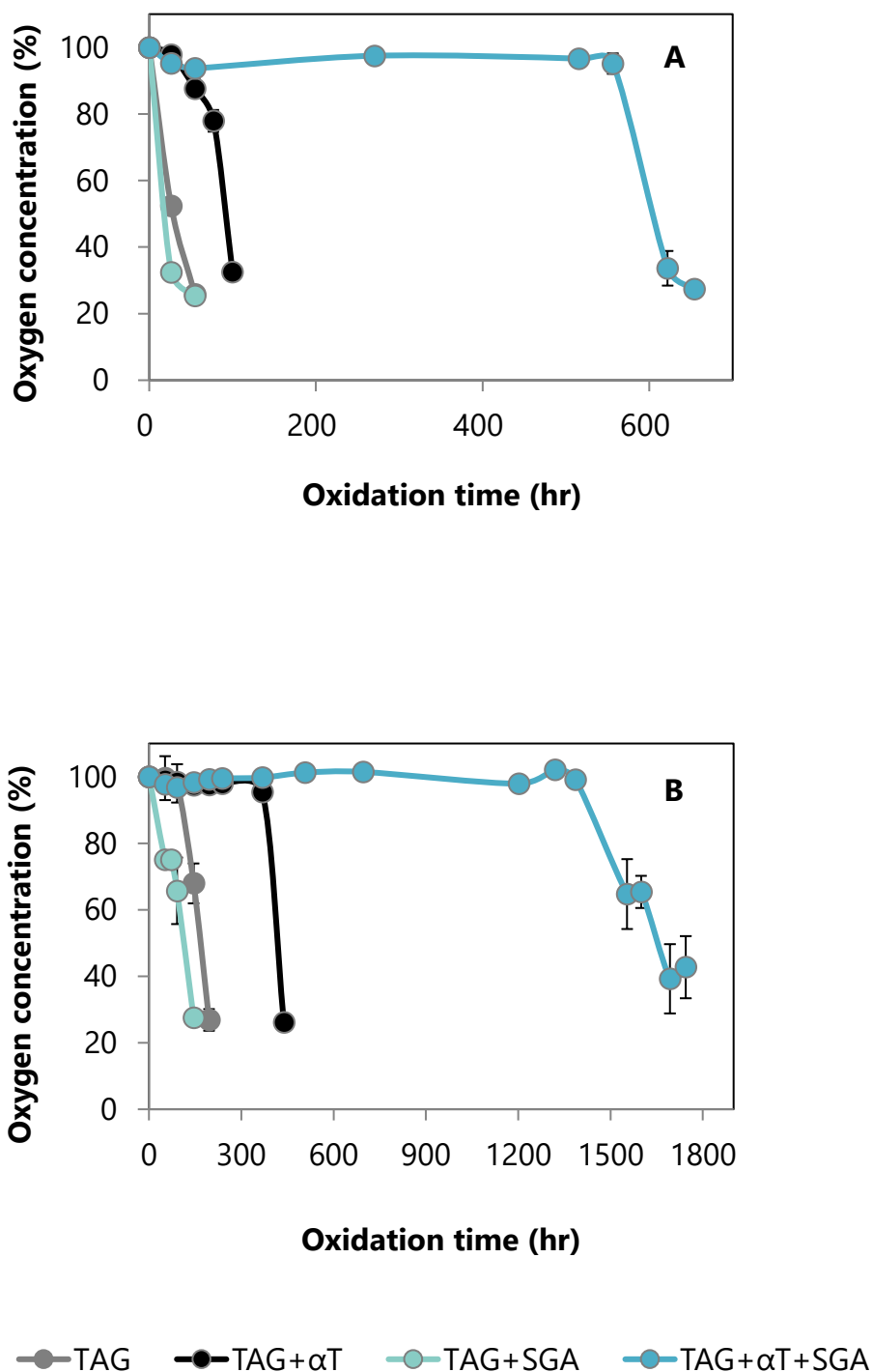


Fig. 5 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the oxidative stability of linseed (A) and soybean oil TAG (B). The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

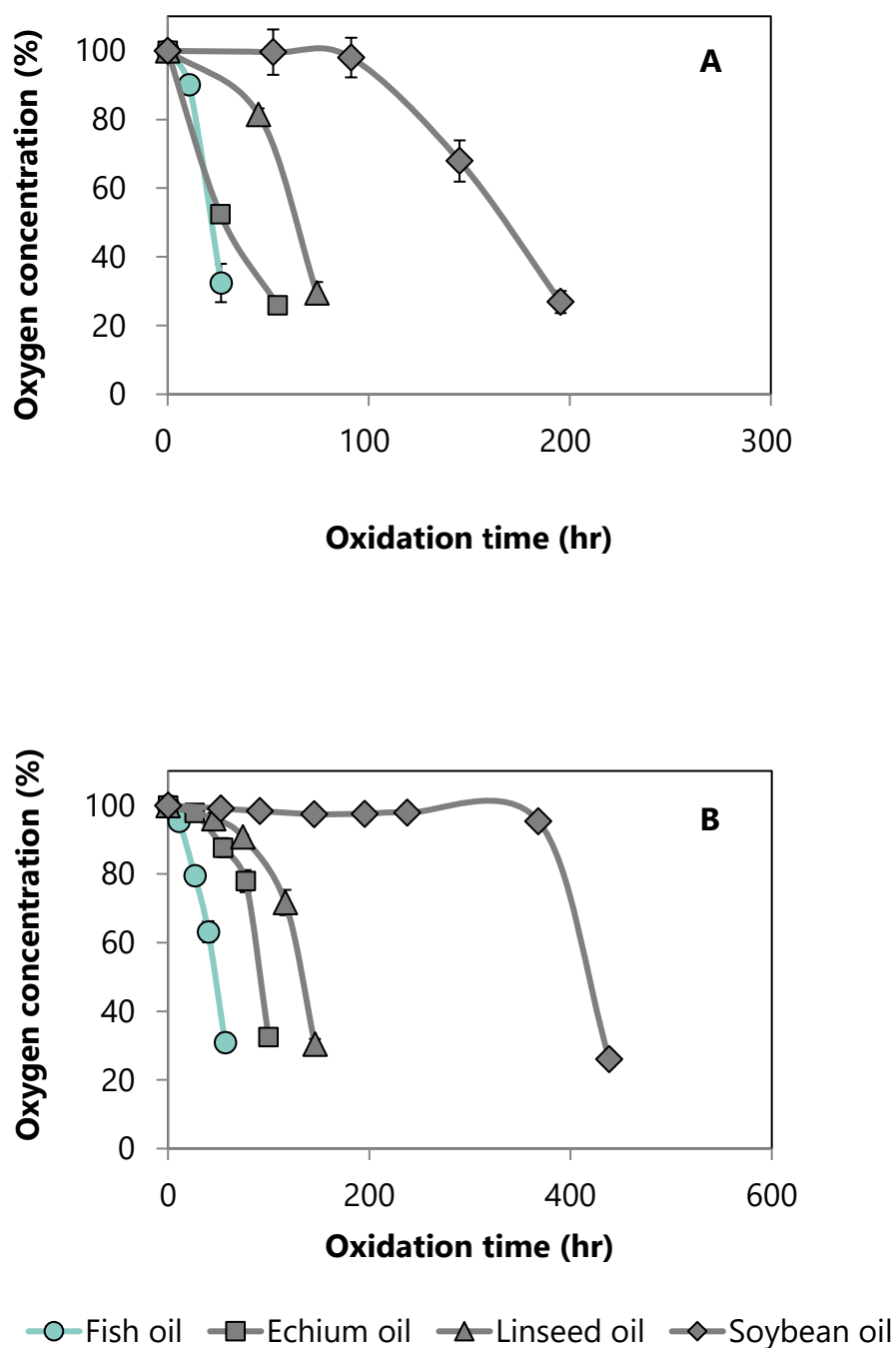


Fig. 6 Effect of fatty acid composition on the oxidative stability of fish, echium, linseed and soybean oil TAG without (A) and with (B) α T. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

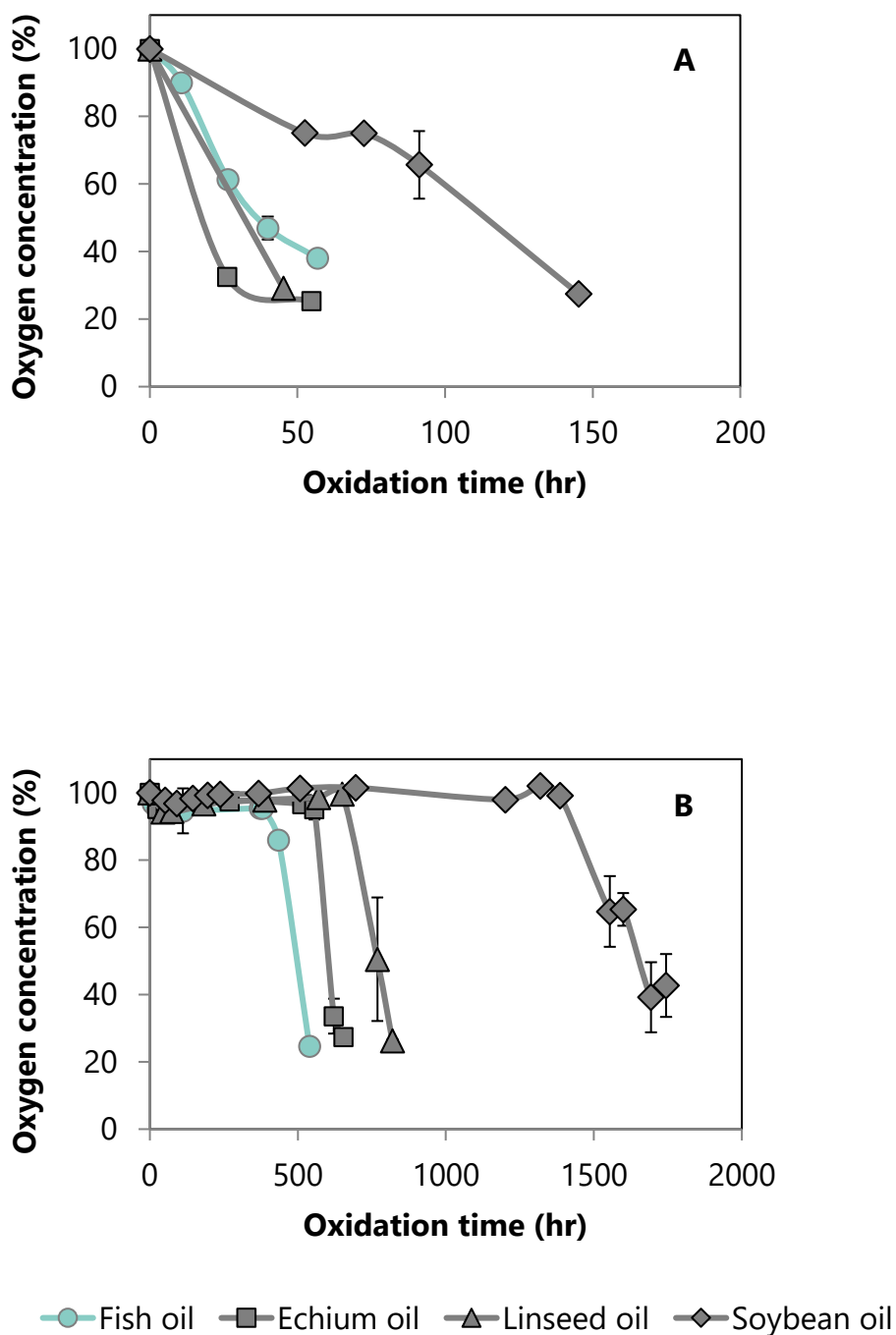
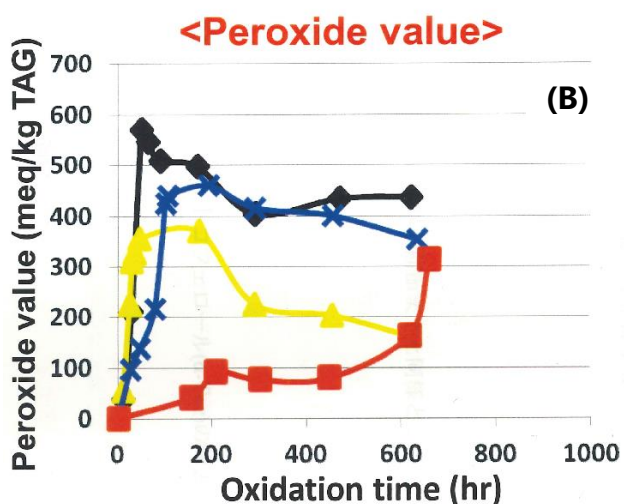
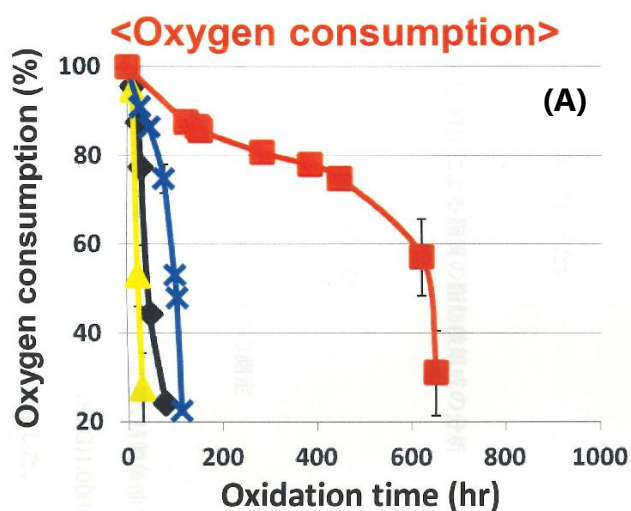


Fig. 7 Effect of fatty acid composition on the oxidative stability of fish, echium, linseed and soybean oil TAG in the presence of SGA without (A) and with (B) α T. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

Table 3 Fatty acids composition of fish oil TAG-1

Fatty acid	Weight %
14:0	7.7
16:0	8.6
16:1	14.3
18:1n-9	9.1
18:1n-7	3.3
18:2n-6	1.4
18:4n-3	3.4
20:0	3.8
20:1n-11	1.1
20:4n-6	1.7
20:5n-3	23.5
22:5n-3	2.1
22:6n-3	8.6
Unknown	15.2

(Source: Junki Shimajiri, Master's thesis at Hokkaido University, 2013)



Fish oil TAG(Control)
 +SGA
 +αT
 +αT+SGA

Fig. 8 Effect of SGA on the oxidative stability of fish oil TAG

A, changes in oxygen concentration in the headspace gas of the vial;

B, changes in peroxide value (meq/kg TAG)

(Source: Junko Shimajiri, Master's paper at Hokkaido University, 2013)

第 2 節 揮発性成分生成の分析

実験方法

1-2-1 試料及び試薬

用いた試料及び試薬は、前節と同じものを使用した。

1-2-2 油脂の精製

1-1-2 と同様の方法で行った。

1-2-3 各精製除去の確認

1-1-3 と同様の方法で行った。

1-2-4 上部空隙ガス分析ガスクロマトグラフィー(HS-GC)による揮発性成分の分析

各 TAG の調製と酸化は 1-1-5 と同様の方法で行った。HS-GC を用いて揮発性成分の分析を行い、各 TAG の酸化劣化について検討した。分析条件は以下のとおりである。

[HS-GC 分析条件]

装置:	GC : GC-2014AFSC (島津) (①)
	オートサンプラー : HS-20 (島津) (②)
	分析&解析ソフト : Labsolutions (島津)

①の設定

カラム : HP-1 (50 m×0.32 mm, 1.05 μm 膜厚) (Agilent Technologies)

カラム温度：40℃を 5 分間 ⇒ 3℃/min で 70℃まで
⇒ 20℃/min で 200℃まで

検出器: FID
検出器温度: 250℃
気化室温度: 250℃
スプリット比: 49 : 1
キャリアガス: ヘリウム
ヘリウム入口圧: 90 kPa
空気圧: 50 kPa
水素圧: 50 kPa

②の設定

流路: ループモード
オープン温度: 60℃
サンプルライン温度: 150℃
トランスファーライン温度: 150℃
バイアル保温時間: 3 分
バイアル加圧時間: 2 分
加圧平衡化時間: 0.1 分
ロード時間: 0.5 分
ロード平衡化時間: 0.1 分
注入時間: 1 分
ニードルフラッシュ時間: 5 分

結果及び考察

Fig. 9,10 は、各油脂を 50°Cで酸化させた場合のヘッドスペース中の揮発性成分総量の経時変化を表したグラフである。なお、本検討は、第 1 章第 1 節での酸素残存量測定時と同じサンプル瓶のヘッドスペースを用い分析を行った。

Fig. 9,10 より、 α T と SGA の併用添加は、どの油脂に対しても酸化に伴う揮発性成分の生成を強く抑制することがわかった。一般的な食用油に用いられる α T 等の抗酸化剤は、脂質酸化で生じるラジカルを補足する役割を担っており、アルデヒドなどの劣化臭を直接除去するのではなく、LOOH の生成を抑制しラジカルを不活性化することで、劣化臭発生の時期を遅らせる効果を有する。昭和 39-40 年に日本で、即席麺に含まれる油脂の著しい酸化劣化による食中毒事件が起きており、これが発端となって食品衛生法や日本農林規格で規格基準値が設定されることになった。当時は過酸化価を示す POV が 900 meq/kg を越えた食品もあり、安全性の面から現在では POV を一定値以下とすることが規格基準となっている(和田ら 2013)。この規格は食品の種類によっても異なり、10, 30, 50 meq/kg 以下などの基準があるが、多くの食品は 30 meq/kg 以下と設定されている(丸山 1998)。また同報告では過酸化価に関し、油脂の保存中における酸化度合を把握するもので使用期間などを判断するものでなく、酸化の連鎖反応が始まると過酸化価も急激に増加するため、過酸化価の基準値は可能な限り低い水準にすべきと述べている。一方、魚油などで生じる脂質過酸化物は、安定性が低く速やかに揮発性成分へと分解してしまうため、酸化速度の速い魚油において過酸化価と酸化臭の相関性が低いことが問題として挙げられている(Ritter et al. 2012)。このため、魚油に抗酸化剤を添加して製品化されている商品が過酸化物の基準値を満たしている場合でも、劣化臭が問題となることもある。

これに対して、SGA は α T と併用添加することで、第 1 節で示された酸素残存率の減少を強く抑えるだけでなく、本節での検討結果で示されたように揮発性成分の生成抑制にお

いても α T 単独添加による効果をはるかに上回る強い作用が示された。これまでの研究により、魚油の風味劣化の主因は EPA や DHA の酸化に伴い生成するアルデヒド類であるとしている。これに対して、アミン化合物はアルデヒドと反応して、その揮発性を失わせ、風味劣化を抑制すると考えられる。例えば、PUFA の酸化で生成する主なアルデヒドの 1 つである 4,5(E)-エポキシ-2(E)-ヘプテナール(EH) (Frankel E. N. 1991, Swoboda *et al.* 1978) は、アミノ酸のリジンとの間で速やかに反応（アミノカルボニル反応）することが報告されている(Hidalgo *et al.* 1993)。本研究で見られた SGA による揮発性成分の生成抑制作用は、SGA のアミノ基によるアミノカルボニル反応を介したアルデヒドの消去が大きく関わっていると推測できる。

また、揮発性成分が生成し始め酸素残存率が急激に低下し始める酸化初期に着目して、揮発性成分総量の違いを比較したところ、エキウム油、亜麻仁油、大豆油では、[TAG + SGA] > [TAG] > [TAG + α T] > [TAG + α T + SGA]の順で総揮発性成分生成量は低下した。一方で魚油では、[TAG] > [TAG + SGA] > [TAG + α T] > [TAG + α T + SGA]の順序となり、第 1 節における酸素吸収量の違いによって得られた酸化安定性の結果と一致した。

このように、本節で得られた揮発性成分総量から得られた各 TAG の酸化安定性と SGA の効果は、第 1 節の結果と一致しており、酸化評価の指標である酸素残存率や揮発性成分分析などを併用することで魚油の酸化安定性をより正確に把握できることが示された。また本検討結果から、 α T と SGA の併用添加が魚油を含めた不飽和度の高い TAG に対して強力な抗酸化性を示すこと、さらに食品加工で問題となっている油脂の臭気発生の抑制についても効果がある可能性が新たに示された。

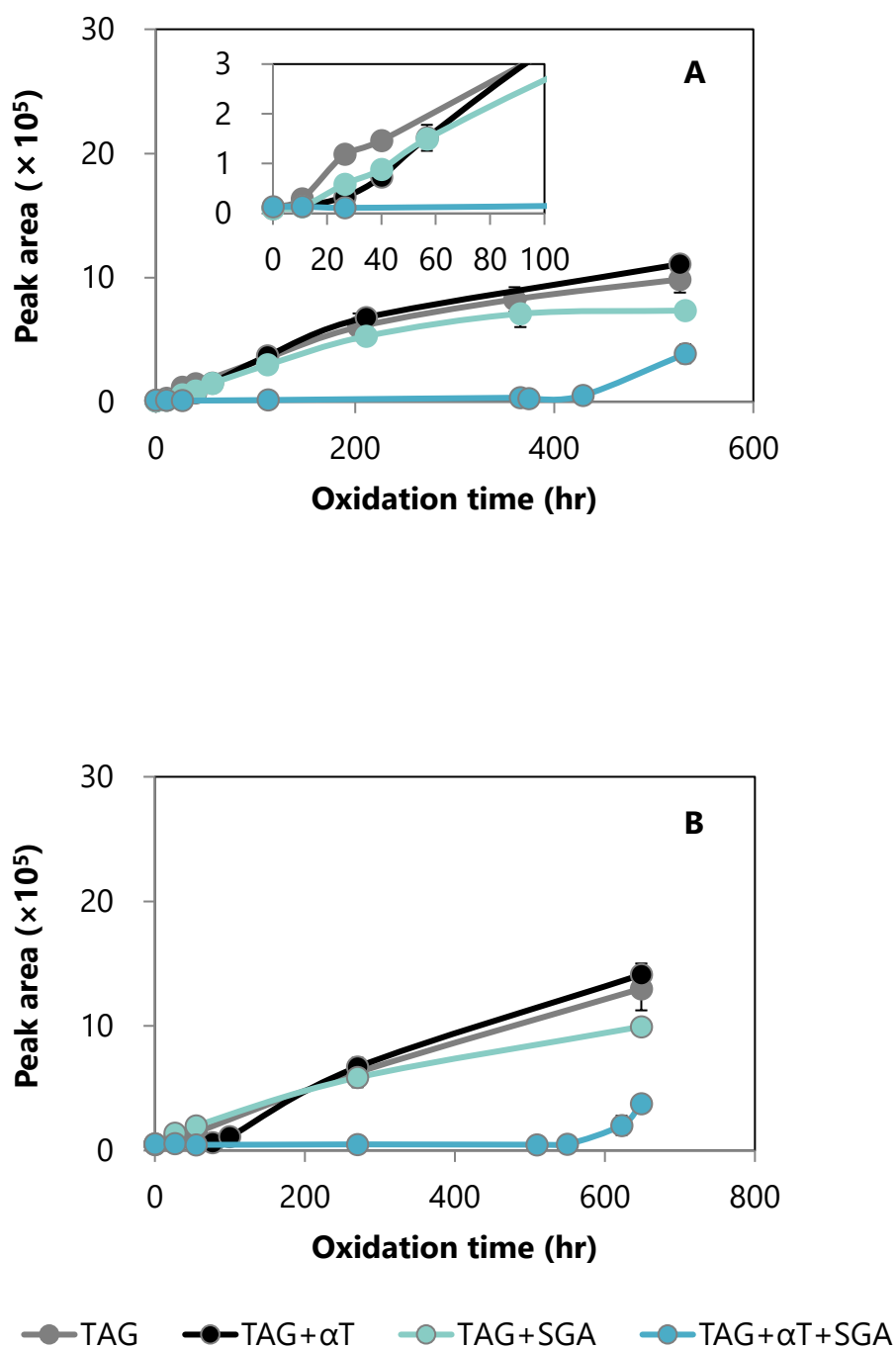


Fig. 9 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of total volatile compounds during the oxidation of fish (A) and echium oil TAG (B). The stability was analyzed by measuring the increase in the total peak areas of volatiles. The oxidation was done at 50 °C in the dark. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

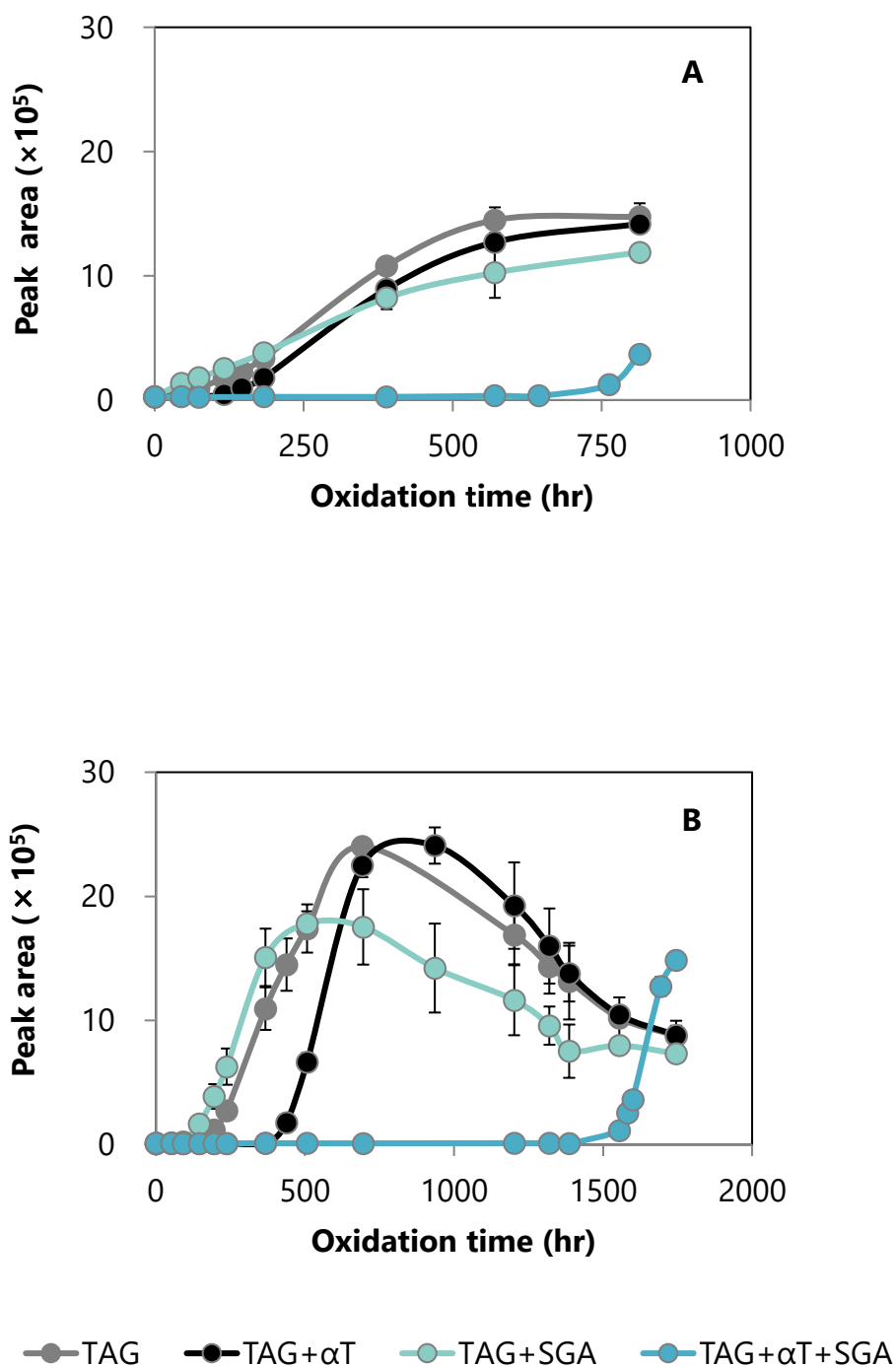


Fig. 10 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of total volatile compounds during the oxidation of linseed (A) and soybean oil TAG (B). The stability was analyzed by measuring the increase in the total peak areas of. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

第 3 節 個々の揮発性成分の分析

実験方法

1-3-1 試料及び試薬

用いた試料及び試薬は、前節までと同様とした。

1-3-2 油脂の精製

1-1-2 と同様の方法で行った。

1-3-3 各精製除去の確認

1-1-3 と同様の方法で行った。

1-3-4 HS-GC による酸化評価

1-2-4 と同様の方法で行い、1-2-4 で得られたデータを基に特定の揮発性成分に着目して解析を行った。

結果及び考察

Fig. 11 に、50°Cで 26.5 時間酸化させた魚油から生成した揮発性成分のクロマトグラムを示した。全てのクロマトグラムで、保持時間 (RT) =9.1 分付近に大きなピークが検出された。しかし油脂の精製に用いた *n*-ヘキサン溶媒を単独で分析したところ、同 RT にピークが表れたため、RT=9.1 分付近のピークは *n*-ヘキサンのものだとわかった。また精製後の油脂に窒素気流を 1 時間当て、溶媒の完全な留去を試みたところ、RT=9.1 分にピークが検出されなかったことから、クロマトグラム中の *n*-ヘキサンピークは油の酸化によって生成したものではないと判断した。

Fig. 4 A で示したように、魚油を 26.5 時間酸化した際には、[TAG], [TAG + α T], [TAG + SGA], [TAG + α T + SGA]の酸素残存率がそれぞれ、約 32、80、61、95%となり、[TAG + α T + SGA] では酸化が効果的に抑制されていたため、揮発性成分についても目立ったピークは検出されなかった。一方[TAG]では、RT=5.1 分付近に大きなピーク(揮発性成分 X)が検出された。また[TAG + α T]でもクロマトグラム中では同様のピークが一番大きく検出された。一方、[TAG + SGA]で最も大きく検出されたピークは RT=5.3 に溶出した。また[TAG + SGA]における揮発性成分 X のピーク 面積は 14196 であり、RT=5.3 で示されたピーク面積値 25584 より小さい値が示された。このことから ω -3 PUFA を多く含有する魚油の酸化では、SGA を添加しない場合には揮発性成分 X のピークが先行して多く生成されと考えられた。これらのことから 1 つの仮説として、SGA が X と反応し、その結果[TAG + SGA]では[TAG]単独あるいは[TAG + α T]とは異なり、X のピークが小さく表れたと考えられた。

Fig. 12 は各 TAG の酸化により生成した揮発性成分のクロマトグラムである。再び揮発性成分 X に着目し、各 TAG についてそのピーク面積を比較すると、魚油、エキウム油、亜麻仁油、大豆油それぞれで、62585、13385、2291、0 となった。すなわち、 ω -3PUFA の量及び二重結合の数が多く酸化速度が速い油脂において、X の生成量が増加することが示され

た。以上の結果から、[TAG]と比較した際に魚油のみで SGA の単独添加による若干の抗酸化効果が示された理由を以下のように推測した。まず、上述したように、SGA が揮発性成分 X と反応し、抗酸化活性に関わる反応生成物が生じたと考えた。また、Fig. 12 に示したように不飽和度が高く ω -3PUFA をより多く含有する魚油で X が多く生成することも分かった。したがって、魚油では揮発性成分 X が酸化のごく初期から先行して生じ、これと SGA が反応することにより何らかの抗酸化物質が生成し、これが、魚油に対する SGA の若干の抗酸化活性と関係していると推測した。

Fig. 13-20 は各 TAG の酸化において、4 つの揮発性成分、プロパナール(Pro)、ヘキサナール、揮発性成分 X 及び RT=5.8 に示される揮発性成分 Y に着目しそれぞれの生成量を経時変化で示したグラフである。揮発性成分 X 及び揮発性成分 Y に着目した理由は、SGA の単独添加で唯一抗酸化性を示した魚油の[TAG+SGA]において、その生成量を[TAG]と比較した際、それらの生成抑制が見られたことにある。また Pro 及びヘキサナールについては、それぞれ ω -3, ω -6 脂肪酸から生成する代表的な揮発性成分であり、揮発性成分による酸化指標となっている(Homma *et al.* 2015)ため両アルデヒドに注目した。なお各揮発性成分は予め標品で RT を確認し、Pro の RT は 5.3、ヘキサナールの RT は 17.9 であることを確認した。

魚油において SGA を添加した際に揮発性成分 Y の生成は抑制された。しかし Fig. 12 からわかるように、魚油の酸化で揮発性成分が検出され始めた初期段階では、Pro や揮発性成分 X のみが検出されており、Y はほとんど検出できなかった。加えて、Fig. 14 A で示されているようにその生成量について、酸化終了時(500 時間)まで分析したところ、生成量のレベルは Pro や揮発性成分 X と比べてかなり小さいこともわかった。Fig. 21 は大豆油の[TAG]の初期酸化段階での揮発性成分のクロマトグラムである。145.25 時間目から Pro や揮発性成分 X が検出され始め、揮発性成分 Y は少量のみ検出された。しかし、195.5 時間目では揮発性成分 Y のピーク面積が最大となった。また、Fig. 20 A で示されているように大

豆油の酸化では、酸化初期を除けば Y は主たる揮発性成分と考えられた。一方、大豆油では SGA 添加による揮発性成分の生成抑制は見られず、むしろ生成が促進された。これらのことから、SGA と反応して抗酸化活性を示す可能性のある揮発性成分は、X のように酸化のごく初期に生成するものであり、Y のような酸化後期に生ずる揮発性成分は SGA の抗酸化性とは無関係であると考えられた。

各 Fig.の結果から、どの TAG においても SGA と α T の併用添加で、Pro を除く 3 種の揮発性成分の生成が一定時間完全に抑制された。一方、Pro では、その生成を大きくは抑制できたものの、完全な生成抑制までには至らなかった。この理由についてさらなる詳細な検討が必要だと考える。

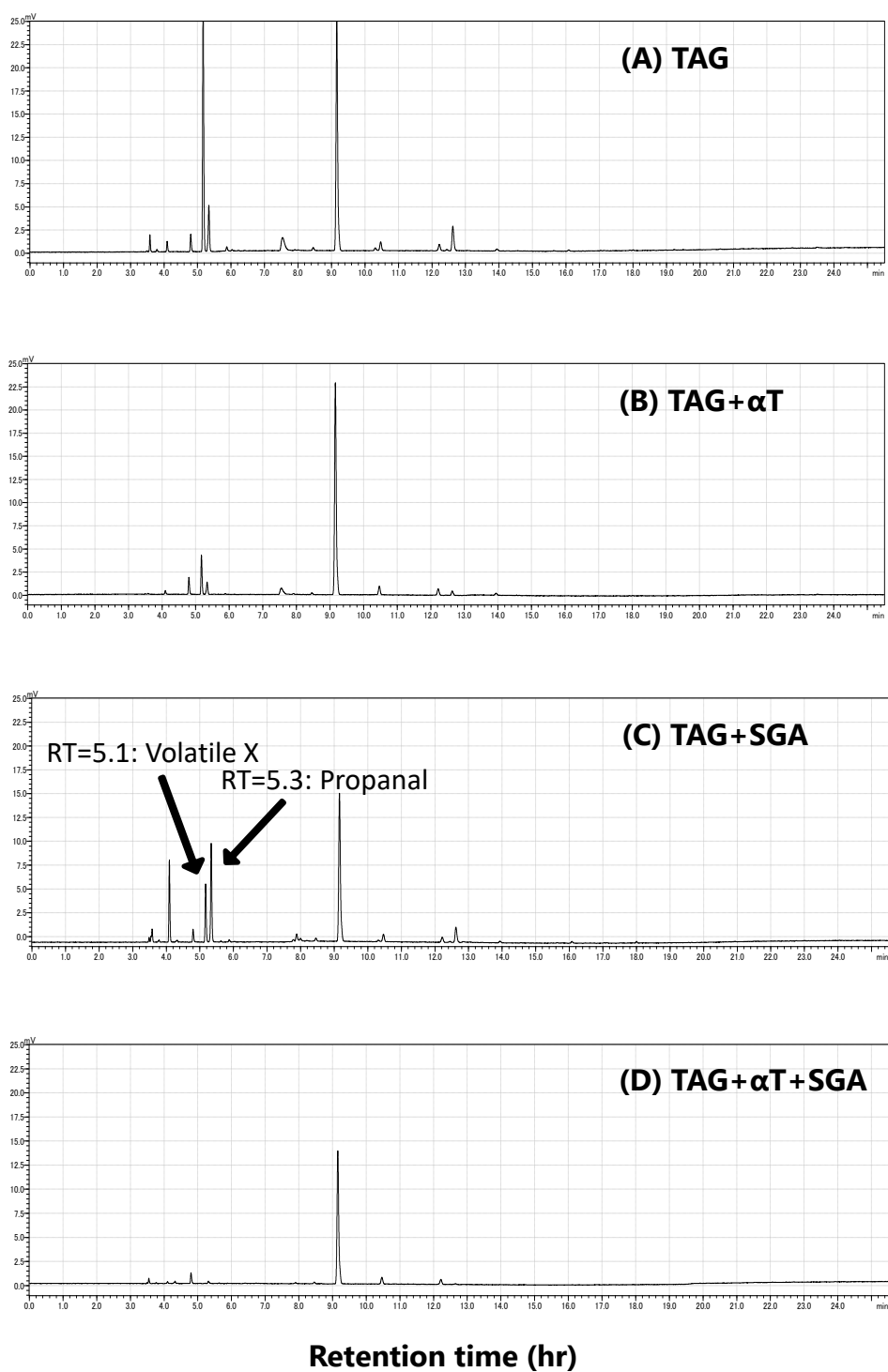


Fig. 11 Representative GC chromatograms of the volatile compounds from the oxidized fish oil TAG after 26.5 hr incubation at 50°C. A, TAG; B, TAG + α T; C, TAG + SGA; D, TAG + α T + SGA.

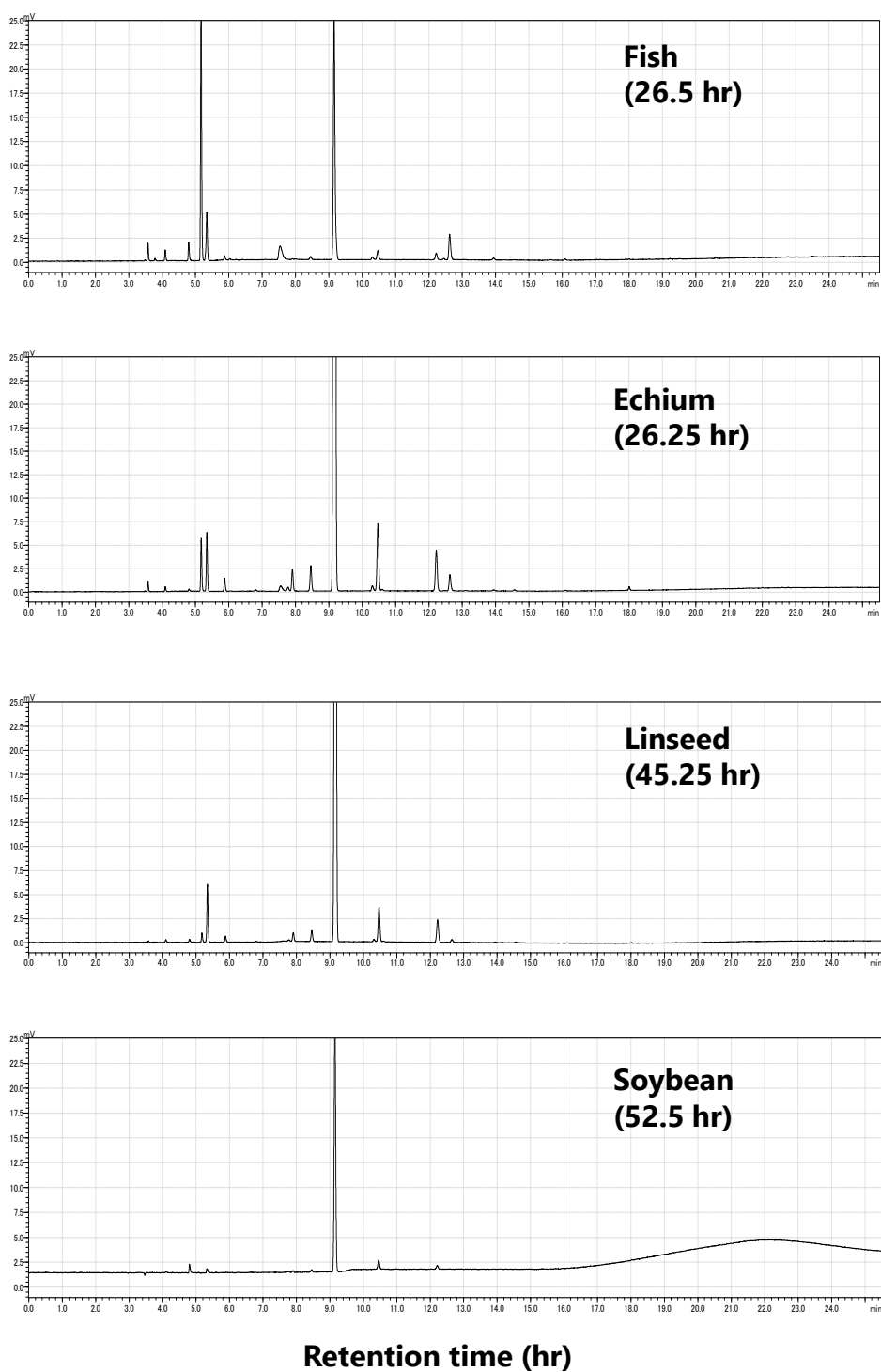


Fig. 12 Representative GC chromatograms of the volatile compounds from the oxidized fish, echium, linseed and soybean oil TAG after 26.5, 26.25, 45.25 and 52.5 hr incubation at 50°C ,respectively.

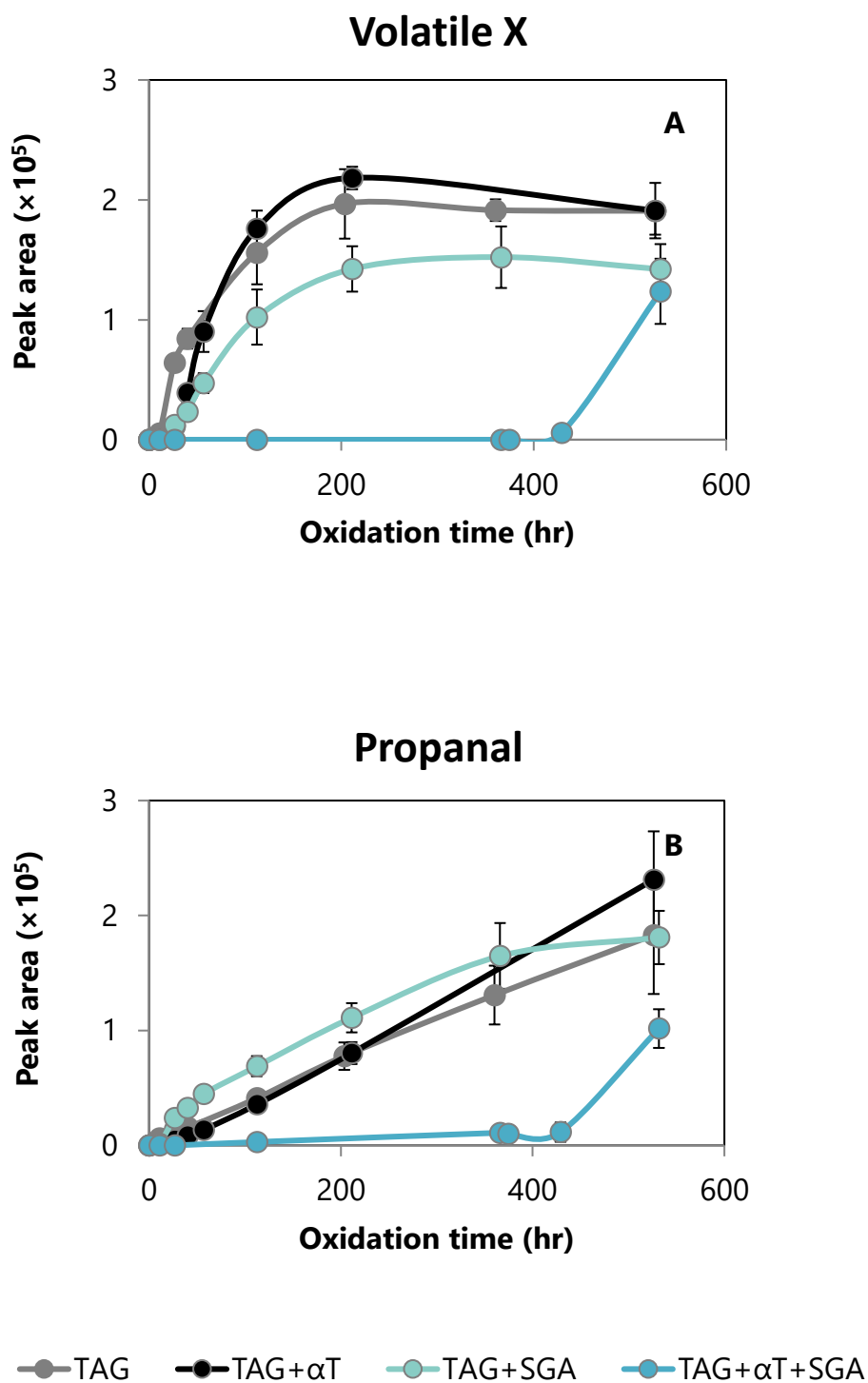


Fig. 13 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of major volatiles during the oxidation of fish oil TAG. Major volatiles: Volatile compound X (A), propanal (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

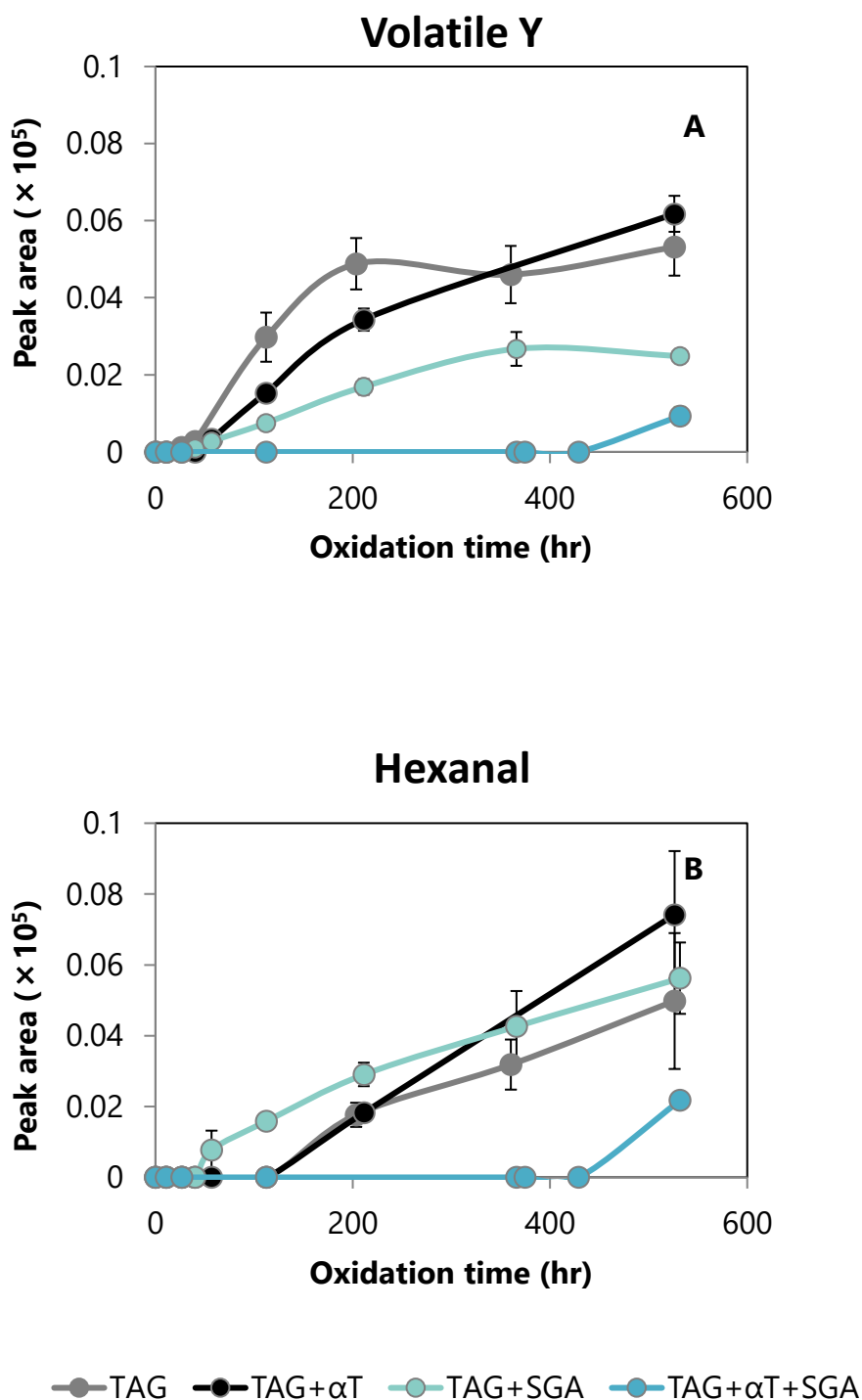


Fig. 14 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of major volatiles during the oxidation of fish oil TAG. Major volatiles: Volatile compound Y (A), hexanal (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

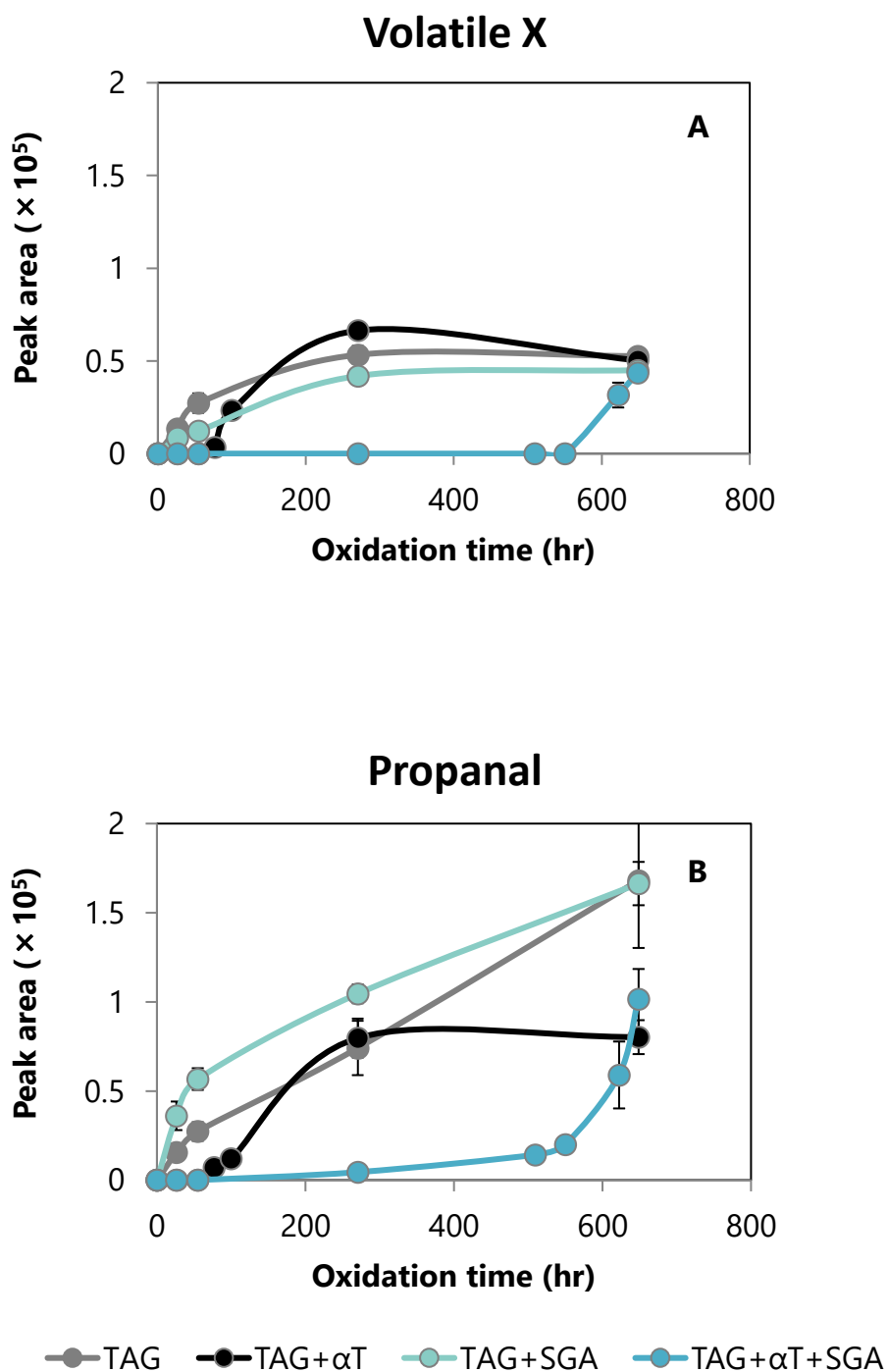


Fig. 15 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of major volatiles during the oxidation of echium oil TAG. Major volatiles: Volatile compound X (A), propanal (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

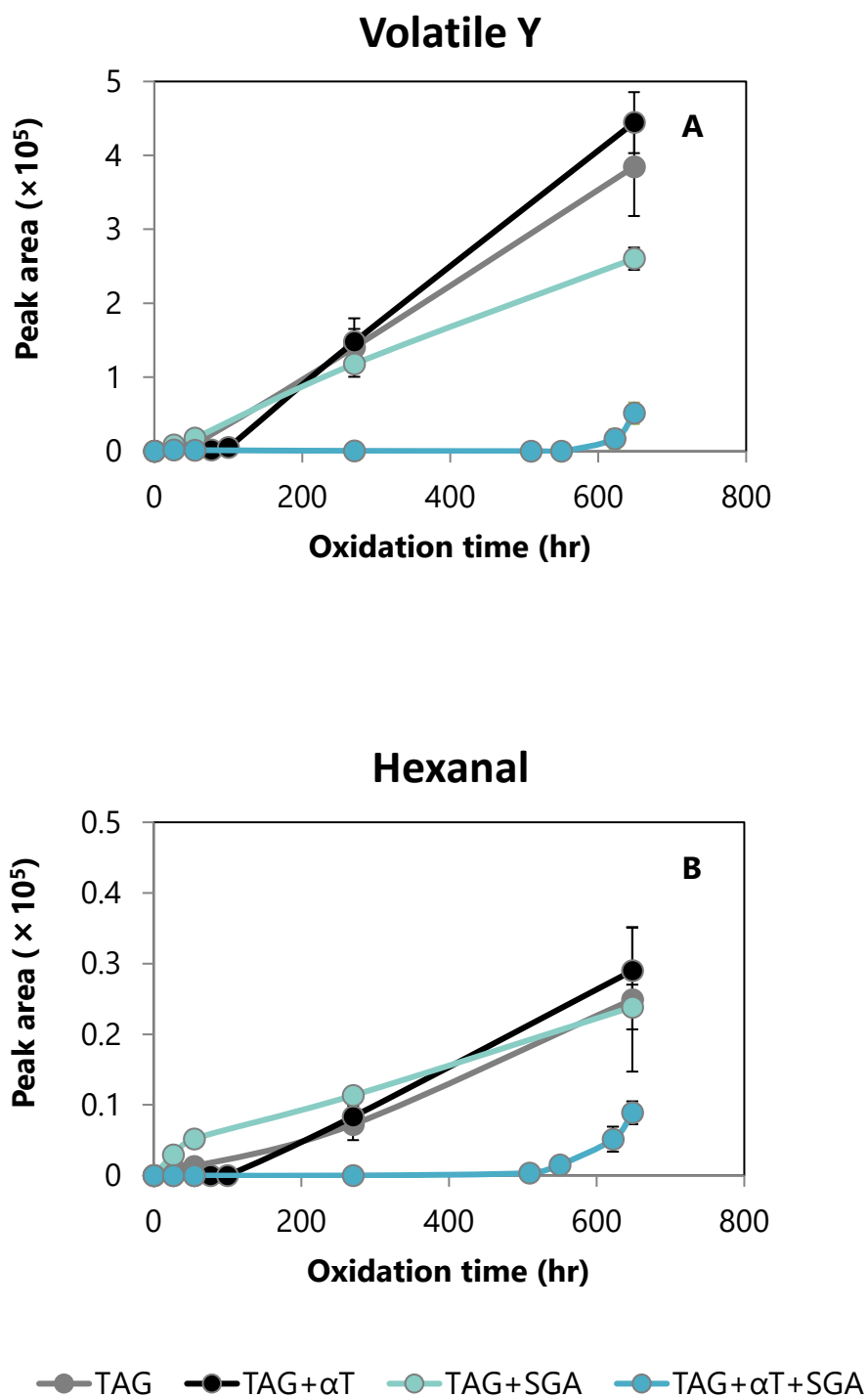


Fig. 16 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of major volatiles during the oxidation of echium oil TAG. Major volatiles: Volatile compound Y (A), hexanal (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

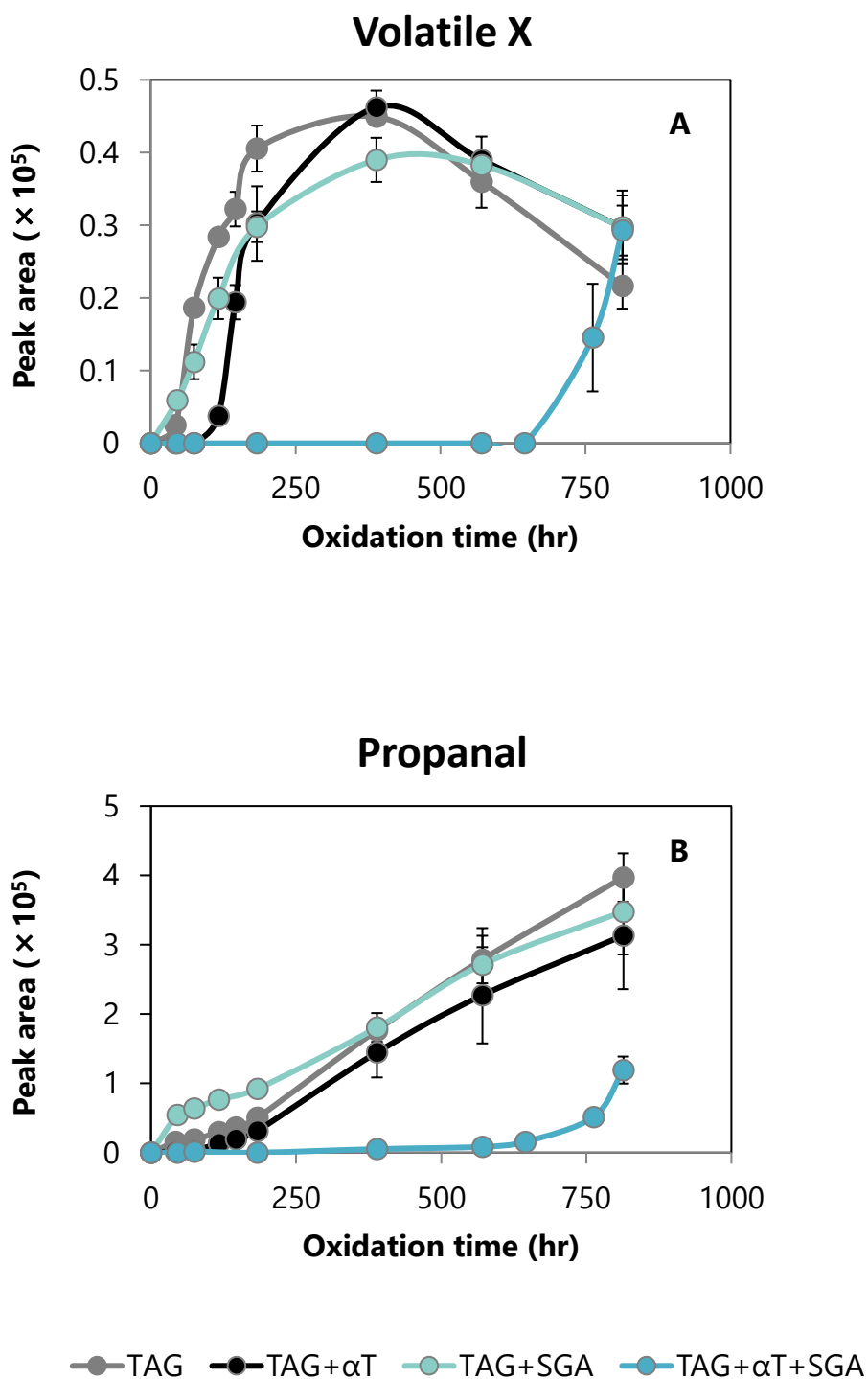


Fig. 17 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of major volatiles during the oxidation of linseed oil TAG. Major volatiles: Volatile compound X (A), propanal (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

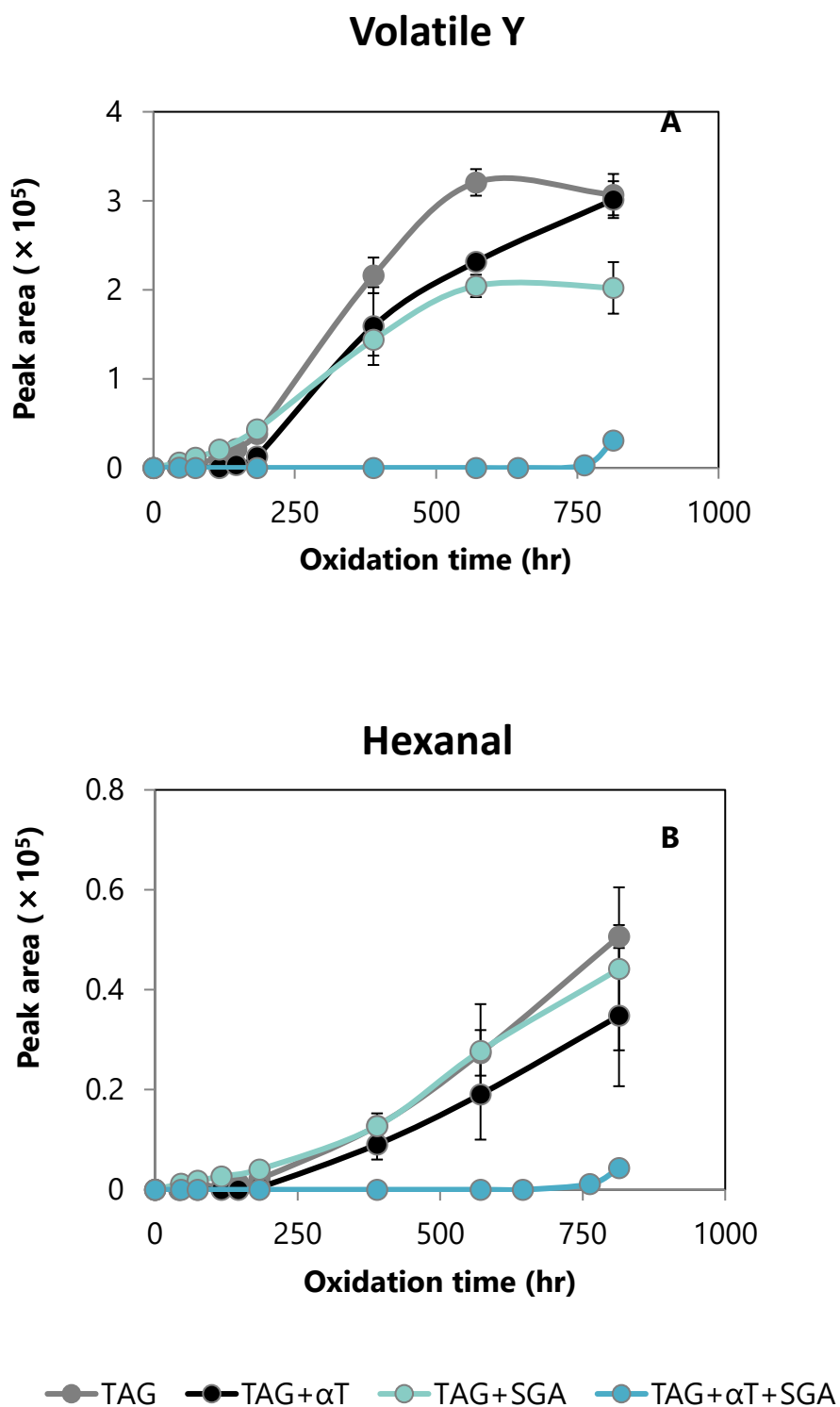


Fig. 18 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of major volatiles during the oxidation of linseed oil TAG. Major volatiles: Volatile compound Y (A), hexanal (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

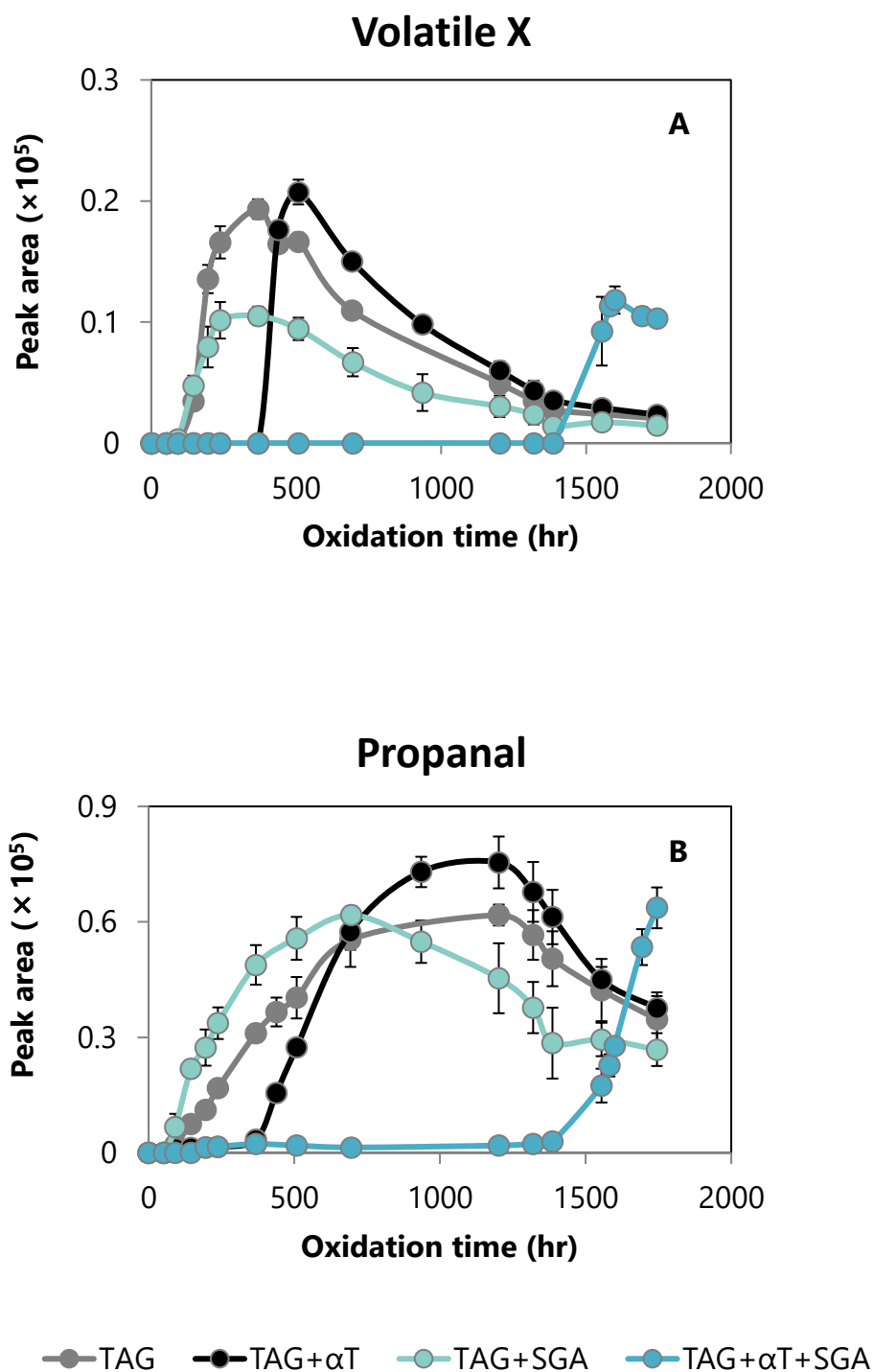


Fig. 19 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of major volatiles during the oxidation of soybean oil TAG. Major volatiles: Volatile compound X (A), propanal (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

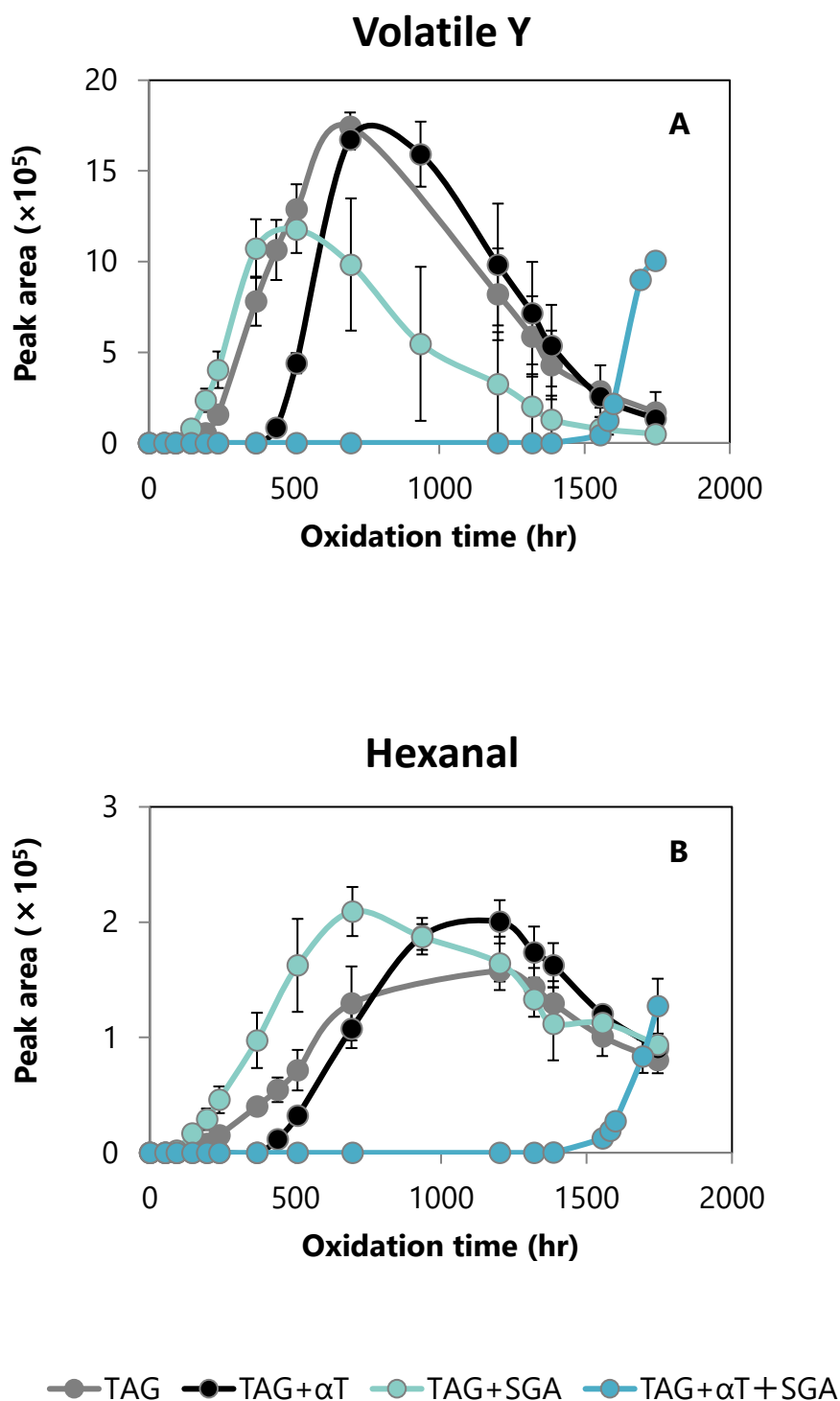


Fig. 20 Effect of SGA in the presence or absence of α T on the formation of major volatiles during the oxidation of soybean oil TAG. Major volatiles: Volatile compound Y (A), hexanal (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

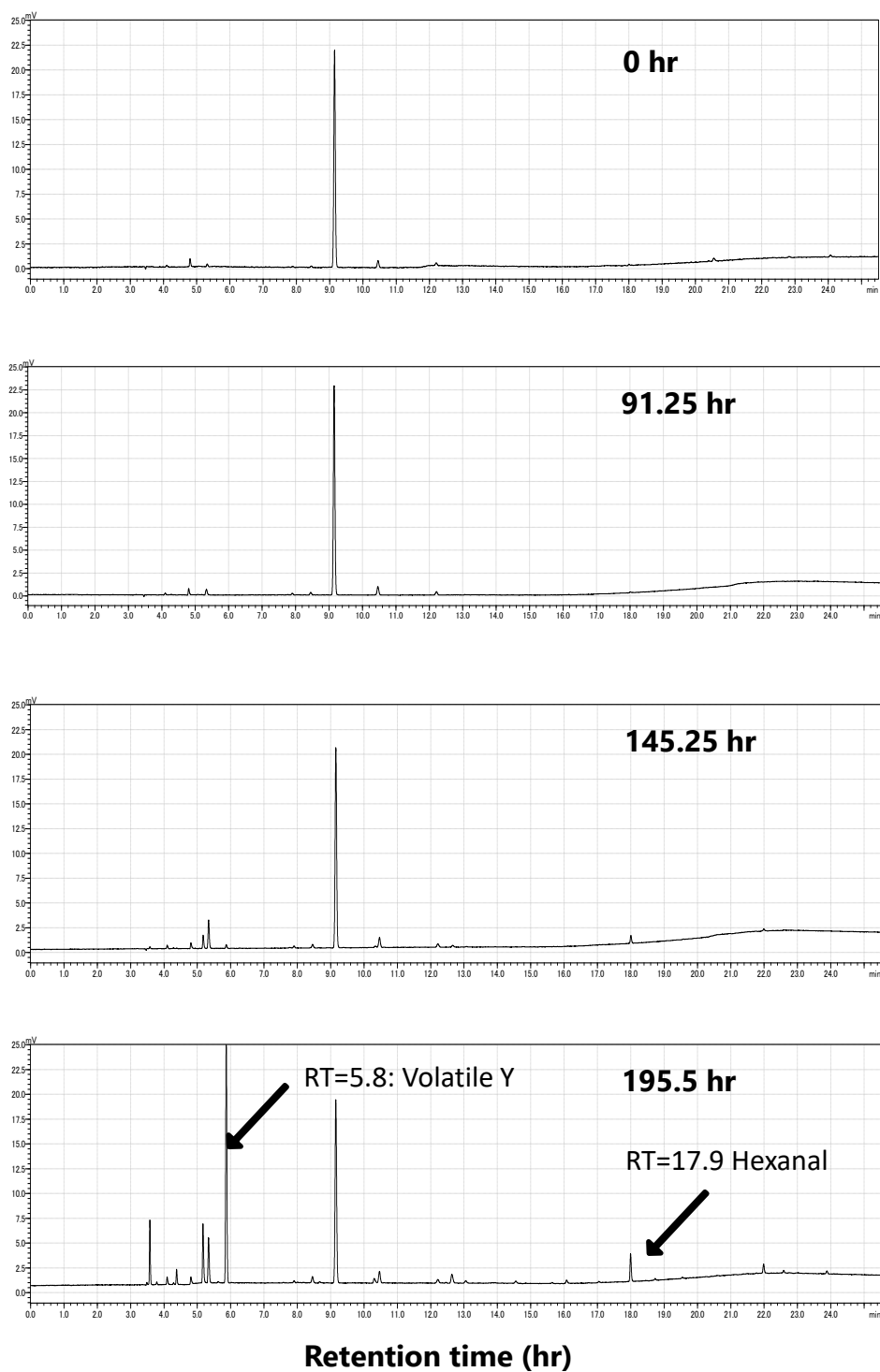


Fig. 21 Representative GC chromatograms of the volatile compounds from oxidized soybean oil TAG, after 0 , 91.25, 145.25 and 195.5 hr incubation at 50°C.

第2章 揮発性成分の同定及び酸化初期時生成挙動の解析

序論

前章での検討結果において、SGA が単独添加により若干ながらも抗酸化活性を示した対象油脂は魚油のみであった。この際、酸化魚油 TAG からの揮発性成分 X と Y の生成が SGA 添加により抑制された(Fig.13 A, 14 A)。脂質酸化で生じる揮発性成分は低分子であり、その多くはカルボニル基を持つアルデヒドやケトン類などである(^a 和田俊ら 2013)。これまで、多くのカルボニル化合物が魚油の酸化で生成する不快臭の原因として報告されており、Aidos ら(2002)は、1-penten-3-one と 2,4-(E, E)-heptadienal が、魚油の酸化で生じる劣化臭の指標として有効であると述べている。本研究において、魚油 TAG の酸化で検出された揮発性成分 X 及び Y も、カルボニル基を持った化合物である可能性が高い。この場合、SGA のようなアミノ基を持つ化合物とこれらの揮発性成分との間でアミノカルボニル反応が起こると考えられる。この反応により、揮発性成分 X と Y の含有量が減少し、SGA の添加により両成分の生成が抑制された結果となったことが推測できた。また、若干ながらも SGA の添加で抗酸化活性が示された原因として、アミノカルボニル化合物の関与の可能性も予測できた。以上より、揮発性成分 X と Y が、SGA の抗酸化活性と密接な関連があると考えられたため本章では、揮発性成分 X と Y の同定を行った。

同定にはガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) を用いた。この際、固相マイクロ抽出 (SPME) 法により酸化油脂試料を GC へ注入した。SPME は、液体試料・固体試料・大気試料から揮発性成分を簡単かつ迅速に抽出することができる手法であり、これにより、揮発性成分などの GC による高感度な分析が可能となる。そのため汎用性が高く、環境分析や食品、香料分析、医薬品分析等多方面で活用されている。酸化関連の研究においても SPME 法による酸化油脂の GCMS 分析が多用されている(Zhou *et al.* 2013, Lu F. S. H. *et al.* 2013)。SPME 法では揮発成分を吸着するためのファイバーを用いるが、これには様々な種

類が存在する。用いるファイバーは、最高使用温度、サンプルの極性や分子量等の違いにより用途が異なり、それぞれの分析に適したものを使用する。本実験では Pro と RT が近い低分子成分を同定するため、C3-C20 の揮発・半揮発性化合物の同定に適した DVB/CAR/PDMS ファイバーを用いた。

また、本章では、魚油 TAG の酸化で生成する各種揮発性成分やその他の酸化生成物との関連性について検討するため、POV 測定も行った。POV は、食品中に含まれる油脂の劣化度の最も一般的な指標である。酸化還元反応を利用したヨウ素滴定法による POV 測定は、様々な食用油脂の酸化評価に汎用されているが、魚油などのように EPA や DHA を多く含む油脂では、これらの PUFA から生成する過酸化物(LOOH)の安定性が極めて低く、場合によっては、過酸化物の蓄積による POV の増加はあまり見られない。Ritter ら(2012)は、魚油から生じる揮発性成分の生成に伴う酸化臭と POV との相関性の低さを問題に挙げている。そこで本研究では、ヘッドスペース中の酸素残存量（酸化による酸素吸収量）と揮発性成分の測定以外に、POV による評価方法も含めた魚油の脂質酸化に対する多角的な分析を行った。特に魚油では POV 値が低い時点でも風味劣化が見られるので、酸化の初期に焦点をあてて、異なる酸化指標（揮発性成分生成量、酸素残存量、POV）の関連性について考察した。

なお本章は2節から成る。第1節ではSPME法を用いたGCMSによる揮発性成分の同定、第2節では魚油の酸化初期時における揮発性成分生成挙動の解析について検討を行った。

第 1 節 SPME 法を用いた GCMS 分析による揮発性成分の同定

実験方法

2-1-1 試料

試料には第 1 章で分析が終了した[TAG+ α T+SGA]を用いた。揮発性成分 X は魚油 TAG で多く生成したため、魚油 TAG のサンプル[魚油 TAG+ α T+SGA]を用いて X の分析を行った。また、揮発性成分 Y は大豆油 TAG で多く生成したため、[大豆油 TAG+ α T+SGA]を用いて Y の分析を行った。

2-1-2 SPME 法によるサンプル抽出

SIGMA-ALDRICH 製の SUPELCO SPME ホルダーを用いた。ファイバーも同メーカーの SUPELCO SPME Fiber Assembly の 50/30 μ m DVB/Carboxen/PDMS を用いた。吸着及び脱離時間は、それぞれ 5 分、1 分で行った。

2-1-3 GCMS 分析

SPME によって酸化油脂中に生成した揮発性成分を吸着後、これを GCMS に注入した。分析条件は以下のとおりである。

[GCMS 分析条件]

装置: GCMS-QP2010 Ultra mass spectrometer (島津)

分析&解析ソフト: Labsolutions (島津)

データベース: NIST11s.lib

(GC の設定)

カラム：HP-1 (50 m×0.32 mm, 1.05 µm 膜厚) (Agilent Technologies)

カラム温度：40°Cを 5 分間 ⇒ 3°C/min で 70°Cまで

⇒ 20°C/min で 200°Cまで

検出器:	FID
検出器温度:	250°C
気化室温度:	250°C
キャリアガス:	ヘリウム
ヘリウム入口圧:	90 kPa
空気圧:	50 kPa
水素圧:	50 kPa
スプリット比:	18.4 : 1
分岐ユニット:	FID : MS = 1 : 0.88

(MS の設定)

イオン源温度:	200°C
インタフェース温度:	250°C
検出器電圧:	0.2 kV

結果及び考察

まず揮発性成分 X の同定を行った。揮発性成分 X は、魚油 TAG の酸化で特に顕著に検出される成分で、例えば、魚油 TAG の酸化で生じた揮発性成分を分析した第 1 章 3 節の Fig. 11 では、RT=5.1 のピークが X に相当する。このクロマトグラムでは、RT=5.1（揮発性成分 X）と 5.3 に隣り合う 2 本のピークが検出された。それぞれのピークの面積比は魚油 TAG に SGA を加えた場合と加えない場合とで異なるものの、魚油 TAG の酸化で生成する特徴的な揮発性成分であった。両ピークのうち RT=5.3 のピークについては、標品の Pro を用いた検討により Pro と同定された。そこで、次に、揮発性成分 X を同定するために、第 1 章の酸化実験で分析が終了した酸化 [魚油 TAG+ α T+SGA]を用いて GCMS 分析を行った。Fig. 22 に、この酸化油脂から生成した揮発性成分の FID 及び MS クロマトグラムを示したが、RT=4.3 と 4.4 に隣り合う顕著な 2 本のピークが見られた。RT は異なるものの、RT=4.3 と 4.4 に検出された 2 本のピークと、Fig. 11 で検出された RT=5.1 と 5.3 に検出されたピークは同一のものと推測できた。一方、標品の Pro を Fig. 22 と同様の条件で分析したところ、RT=4.5 付近にピークが検出された。この結果とデータベースを用いた検討から RT=4.4 は Pro であると判断し、RT=4.3 は上記の RT=5.1 と同じ揮発性成分 X に相当すると考えた。揮発性成分 X の MS 分析(Fig. 23)より、X のベースピークである $m/z=27$ は C_2H_3 の分子イオンに相当し、 $m/z=56$ は C_3H_4O の分子イオンに相当すると考えられた。以上より、データベースの結果を含めて考えると、RT=4.3 (X)は分子量が 56 である 2-プロペナール(アクロレイン：Acr)と同定することができた。またその後に Acr の標品を用いて GC-2014AFSC で分析したところ、RT=5.1 にピークが示されたことを確認することができた(データ未表示)。なお、Fig. 11 と Fig. 22 の分析において、Acr と Pro の RT にずれが生じたのは、分析機器の相違によるものと考えられる。すなわち、Fig. 11 の分析では GC-2014AFSC により揮発性成分を分析したが、Fig. 22 では GCMS-QP2010 Ultra mass

spectrometer を用いた GCMS 分析を行った。この場合、サンプルの注入口から検出器までの配管の長さが、両分析で異なり、このことが RT の違いに影響したと推測できた。

次に揮発性成分 Y の同定を行った。揮発性成分 Y は、特に大豆油 TAG の酸化で生ずる主たる揮発性成分であり、大豆油 TAG を 195.5 時間酸化させた試料のガスクロマトグラム上（第 1 章の Fig. 21）の RT=5.8 付近に検出された。Y は、大豆油 TAG の酸化で最も多量に生ずる揮発性成分のひとつ（Fig. 20A）であった。本章では、揮発性成分 Y の同定のための試料として、第 1 章の酸化実験で分析が終了した酸化 [大豆油 TAG+ α T+SGA]を用い、GCMS により Y の化学構造を解析した。GCMS により酸化大豆油 TAG の揮発性成分を分析したクロマトグラム（イオンクロマトグラムと FID クロマトグラム）を Fig. 24 に示したが、揮発性成分 Y に相当するピークは RT=5.1 に検出された。なお、揮発性成分 Y の Fig. 21 と Fig. 24 の分析における RT の違いは、上述のような分析機器の相違に起因すると考えられた。次に、揮発性成分 Y の MS 分析の結果を Fig. 25 に示した。Y のベースピークの $m/z=43$ は C_3H_7 に相当し、 $m/z=57$ は C_4H_9 に、そして $m/z=72$ は C_5H_{12} に相当すると考えられた。データベースと MS の結果より、本節 RT=5.1 に検出された揮発性成分 Y はペンタンと同定した。

Snyder ら(1988)は、大豆油の自動酸化により生成した揮発性成分を、液相との平衡状態を保ったまま揮発性成分を含む気相を取り出す方法（静的ヘッドスペース法; SHS 法）、揮発性成分を強制的に取り出す方法（動的ヘッドスペース法）、酸化脂質を直接 GC に導入する方法（直接導入法）の 3 手法を用いて比較分析した。このうちの SHS 法は、第 1 章 3 節で揮発性成分の分析に用いた方法と同一のものである。SHS 法では、液相との平衡状態を保ったまま揮発性成分を含む気相を GC に直接導入する。そのため分析過程での特定成分の増減は少ない。この SHS 法で大豆油の揮発性成分を分析した結果、ペンタンが最も多く生成していることを Snyder ら(1988)は報告している。ここで用いた大豆油の脂肪酸組成は示されていないが、酸化により生成したペンタンは、大豆油の主要 PUFA であるリノ

ール酸由来の LOOH の分解により生ずることを、同研究グループは既に報告している (Frankel *et al.* 1981)。一方、本検討で用いた大豆油 TAG も Fig. 3 に示したようにリノール酸を主たる PUFA として含んでおり、このリノール酸の酸化分解によりペンタンが生成したものと考えられた。

上述のように SHS 法を用いた酸化大豆油 TAG の分析では、ペンタンが主要な揮発性成分として検出されたが、SPME 法を用いた GCMS 分析では、Fig. 24 で示したように RT=18 分付近のピーク（ヘキサナール）の組成比のほうが、ペンタン（RT=5.1）よりも高かった。柴田 (2017) は大豆油 TAG の酸化で生ずる揮発性成分について、SHS と SPME の異なる方法で分析した。その結果、SHS 法で揮発性成分を GC に導入した場合には、ヘキサナールよりもペンタンの組成比の方が高くなるが、SPME 法で揮発性成分をファイバーに吸着して GC に導入した場合には、ペンタンよりもヘキサナールの組成比の方が高くなることを見出している。SPME を用いた検討において、揮発性成分を吸着するためのファイバーの種類はいくつか存在する。魚油の揮発性成分に対して 3 種類のファイバーを用いて抽出しその検出量を比較検討した結果、ファイバーの種類によって検出される主要な揮発性成分が異なることも Shibata *et al.* (2018) は示している。SHS 法では、生成した揮発性成分をそのまま GC に導入するが、SPME 法では揮発性成分をいったんファイバーに吸着させてから GC 内で脱理させて分析する。したがって、SPME 法では、特定の成分の濃縮や分解などによる消失が起こる可能性が指摘されている。よって SPME 法でヘキサナールのほうがペンタンよりも組成比が高くなった原因として、SPME ファイバーへの吸着性や安定性の違いが推測できる。

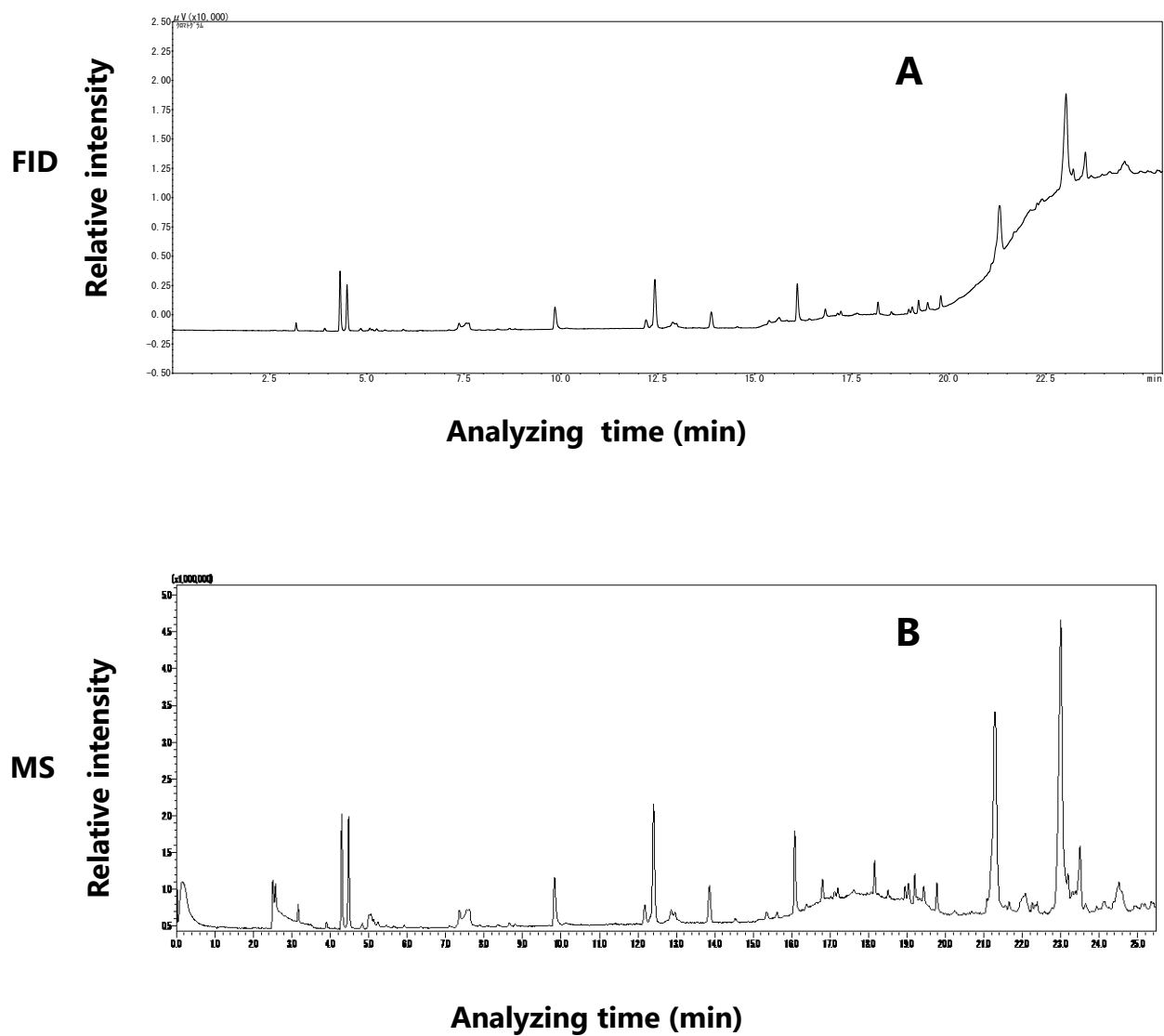


Fig. 22 Chromatograms of volatile compounds formed during oxidation of fish oil TAG. Peaks were detected by FID (A) and total ion in the mass spectrometry (B).

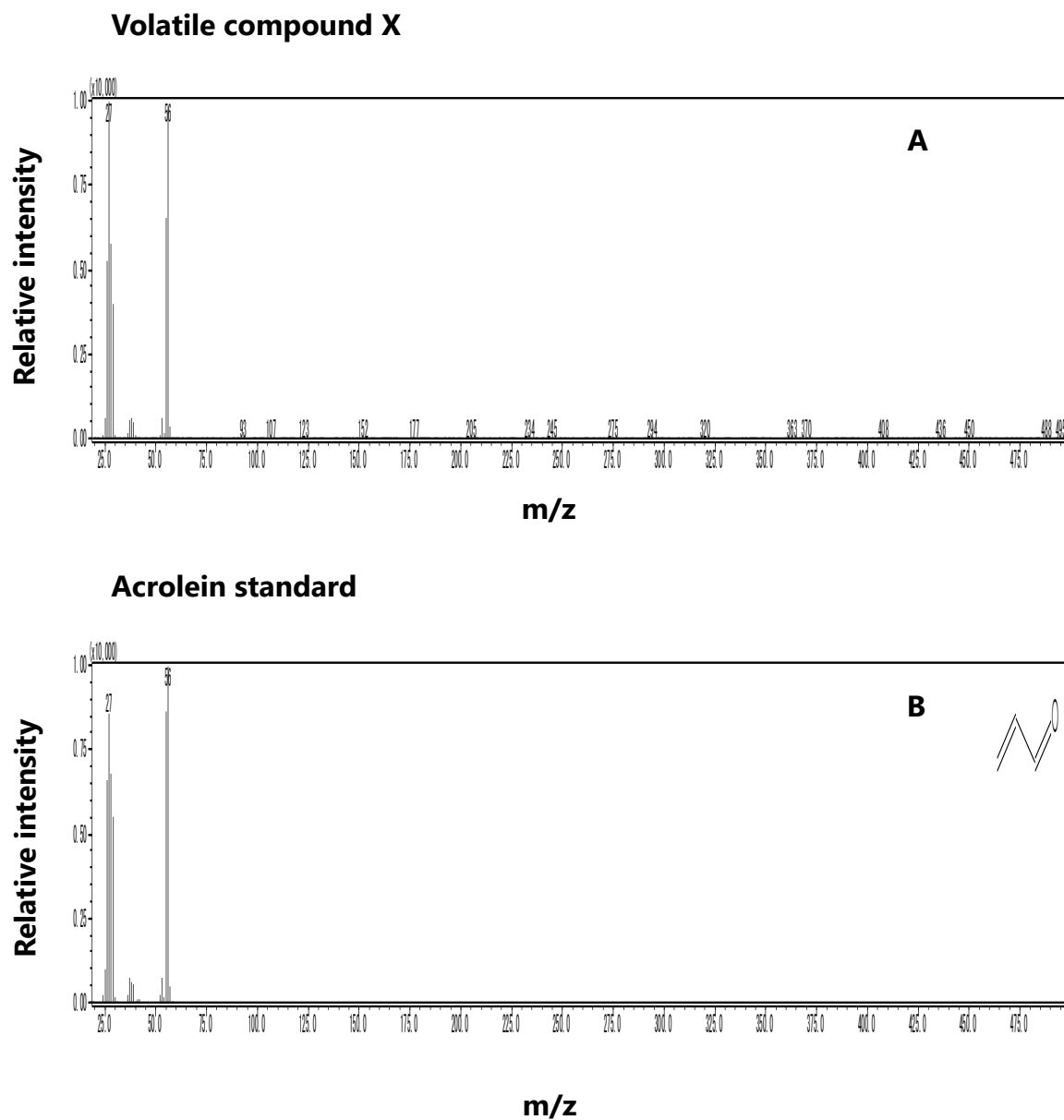


Fig. 23 Mass spectrums of volatile compound X (A) and standard acrolein (B).

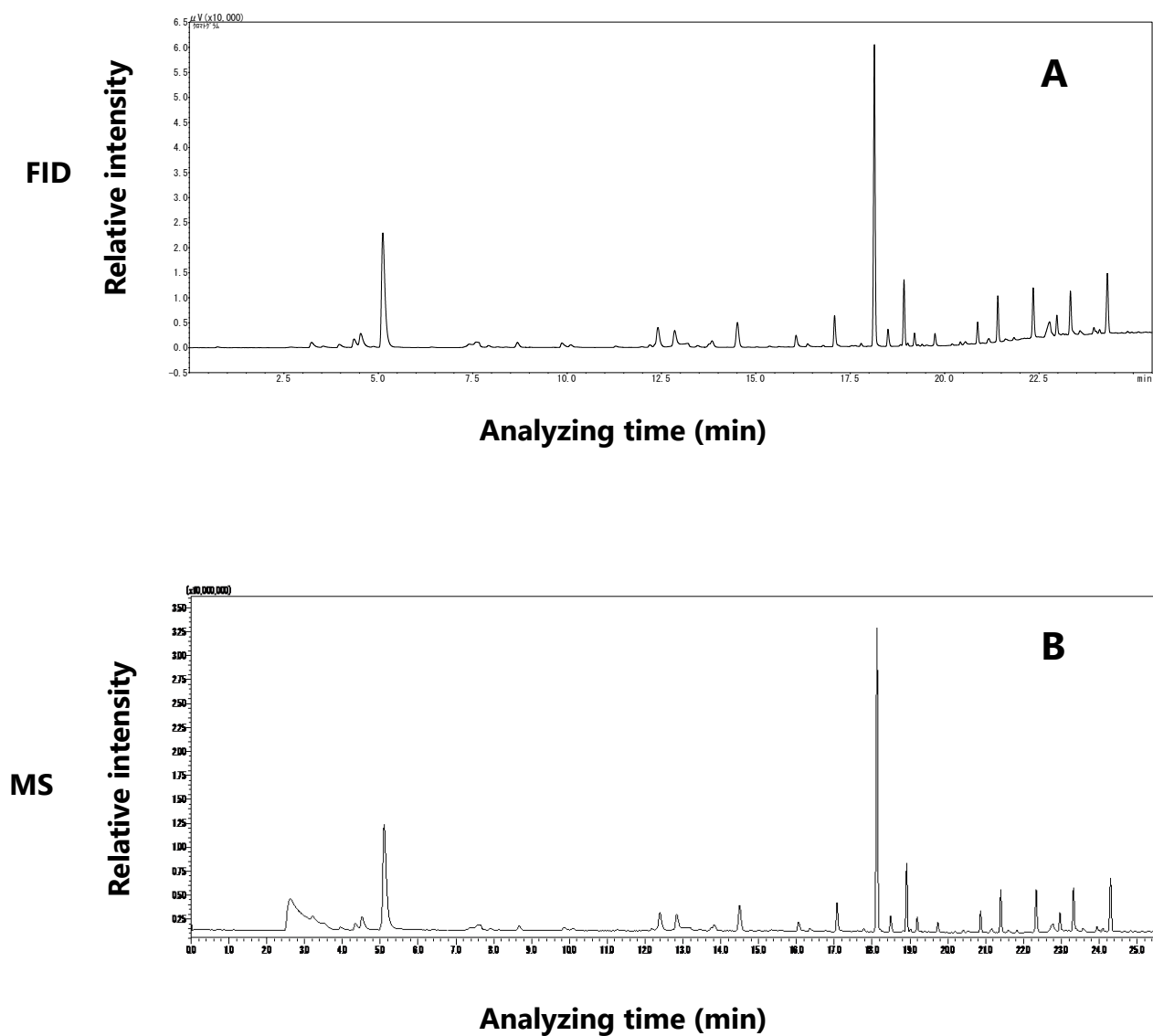
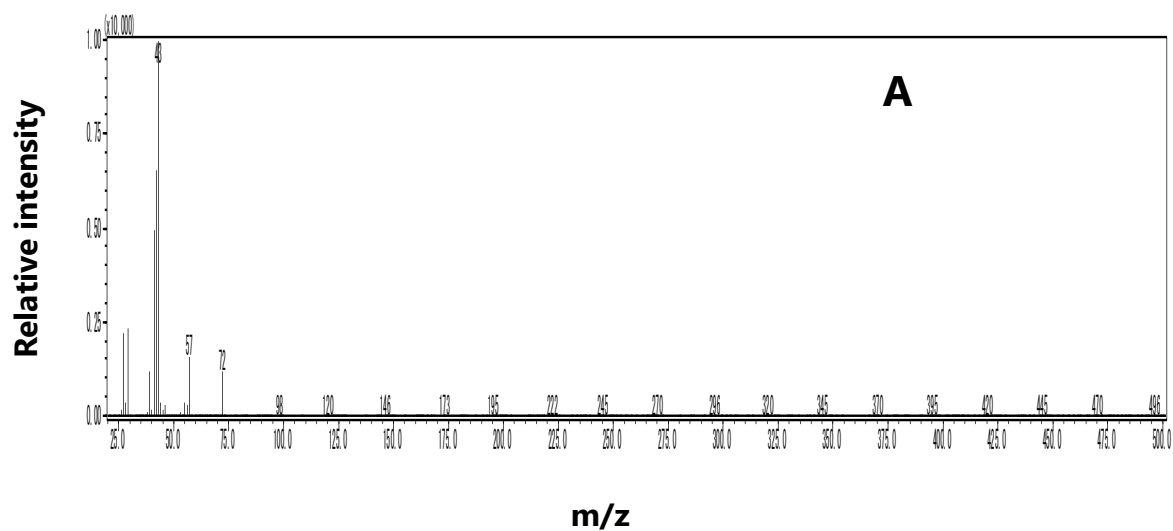


Fig. 24 Chromatograms of volatile compounds formed during the oxidation of soybean oil TAG. Peaks were detected by FID (A) and total ions in the mass spectrometry (B).

Volatile compound Y



Pentane standard

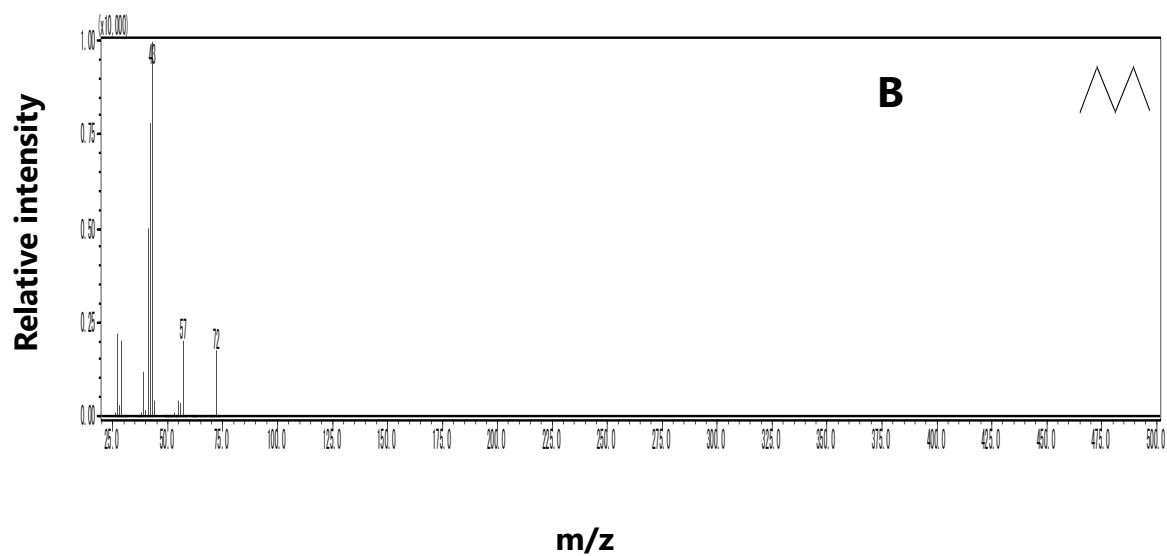


Fig. 25 Mass spectrums of volatile compound Y (A) and standard penatane (B).

第2節 魚油の酸化初期時における揮発性成分の生成挙動

実験方法

2-2-1 試料及び試薬

1-1-1 で使用した魚油を用いた。POV 測定において過酸化物を還元するため用いたヨウ化カリウム（試薬特級）は、和光純薬工業(株)より購入した。和光純薬工業(株)より購入したでんぷん(溶性)(和光一級)は滴定の終点を確認するため用いた。ヨウ化カリウムから生成したヨウ素の滴定には、関東化学(株)から購入した試薬特級のチオ硫酸ナトリウム五水和物を用いた。また、チオ硫酸ナトリウム溶液の力価を測定するため、半井化学薬品(株)から購入した純度 99.5 %試薬特級の重クロム酸カリウムを使用した。サンプル溶解用の溶媒としては、富士フィルム和光純薬(株)から購入した試薬特級の酢酸、クロロホルム、濃塩酸を用いた。

2-2-2 魚油の精製

1-1-2 と同様の方法で行った。

2-3-3 精製魚油 TAG の分析

1-1-3 と同様の方法で行った。

2-2-4 精製魚油 TAG の酸化

HS-GC 分析用の 20 ml 容バイアル瓶に約 600 mg の精製魚油 TAG を直接入れた。パスツールピペットの上端にゴム帽を取り付け、50 回のプッシュで酸化反応を起こすための空気をバイアル瓶中へ十分に送り込んだ。その後バイアル瓶にブチルセプタムゴムとアルミシ

ールが一体になった蓋を取り付け、容器を密閉し、暗所下 50℃の温度でインキュベートした。酸化時間 0、4、8、12 時間の 4 つのグループを設け、所定の時間になった後、速やかに-30℃の冷凍庫で保管した。各グループの分析は n=3 で行った。

2-2-5 POV による酸化評価

(1) 1%(v/w)でんぷん指示薬の調製

約 1 g のでんぷんに 100 ml の蒸留水を加え、60℃に設定した湯浴中で加熱しながら溶解させた。

(2) 1/10 N 重クロム酸カリウム標準溶液の調製

200 ml の共栓フラスコに 591.31 mg の重クロム酸カリウムを精秤し、ヨウ化カリウム約 10 g(実測値：10.0320 g)と濃塩酸 20 ml、さらに蒸留水 100 ml を加えて激しく振り、ヨウ素を遊離させた。その後速やかに常温暗所下で保管した。

(3) 1/10 N 及び 1/100 N のチオ硫酸ナトリウム標準溶液の調製

100 ml 容のメスフラスコにチオ硫酸ナトリウム五水和物 2.4819 g を精秤し、蒸留水でメスアップして 1/10 N のチオ硫酸ナトリウム標準溶液を調整した。また、この溶液から 10 ml をホールピペットでとり、100ml 容のメスフラスコを用いて 1/100 N の溶液を調整した。

(4) 飽和ヨウ化カリウム水溶液の調製

ヨウ化カリウムを適当量ビーカーにとり、ヨウ化カリウムの結晶が残るように蒸留水で強く振り混ぜながら溶解した。

(5) 1/10 N チオ硫酸ナトリウム標準溶液の力価測定

ビュレットに 1/100 N の(3)の溶液を注いだ後、(2)の溶液 10 ml を三角フラスコにとり、遊離したヨウ素の滴定を行った。淡黄色となったら 1%でんぷん指示薬を加え、生ずる黒紫色が消失した後、溶液は緑色を呈するので、これを終点とした。また重クロム酸カリウムを含まないヨウ化カリウム約 10 g(実測値：9.9969 g)と濃塩酸 20 ml 及び水 100 ml を混合した溶液を調製し、併せて空試験の滴定も行った。各滴定操作は n=3 で行い、これを基に以下の式に従って 1/10 N チオ硫酸ナトリウム標準溶液の力価を測定した。

$$1/10 \times A / 591.31 \times 10 = 1/10 \times f \times B$$

A= 重クロム酸カリウムの秤量値 (mg)

B= 1/10 N チオ硫酸ナトリウム溶液の滴定値 (ml)

f= 求める力価

なお f 値は 1.016 であった。

(6) 魚油 TAG に対する POV 測定

冷凍保管した各サンプルを常温で解凍した後、酸化劣化度に合わせ適宜 200–550 mg の油脂を 200 ml 共栓三角フラスコへ正確に秤取り、クロロホルム/酢酸=2/3(v/v) 35 ml を加え溶解させた。次いで、飽和ヨウ化カリウム水溶液 1 ml をメスピペットで加え、1 分間振り混ぜた。常温暗所で 5 分間静置した後、水 75 ml を加え激しく振とうした。1%でんぷん指示薬を用いて終点を確認しながら、ヨウ化カリウムの酸化で生じた遊離ヨウ素量を(3)で調整した 1/100 N チオ硫酸ナトリウム溶液で滴定することで分

析した。POV は次式により求めた。

なお本試験と並行し、試料魚油 TAG を加えない空試験も行った。

$$\text{POV} = \{(A-B) \times f/C\} \times 10$$

A=本試験の滴定量 (ml)

B=空試験の滴定量 (ml)

f=力価係数

C=試料採取量 (g)

2-2-6 GC-TCDによる酸化評価

1-1-6と同様の方法で行った。なおPOV測定と並行して行った。

2-2-7 HS-GC による酸化評価

1-2-4と同様の方法で行った。なおPOV測定及びGC-TCD分析と並行して行った。

結果及び考察

Fig. 26 は魚油の酸化初期時(0-12 時間)における酸素残存率と Acr 及びプロパナール(Pro)の生成量との関係を示したグラフである。酸素残存率が 95%の段階で、Acr 及び Pro は既に検出されることがわかった。そのため、酸素残存率よりも揮発性成分の測定、特に Acr や Pro といった成分の測定に基づいた方がより優れた酸化及び魚臭評価が可能であると考えられた。

Fig. 27 は 4 時間ごとに揮発性成分を分析した際のクロマトグラムの結果である。図中の黒色の矢印は魚油の酸化に伴い生じた揮発性成分である。Acr や Pro は酸化 4 時間後とかなり早い段階から生成することが示された。また酸化 8 時間後のクロマトグラムには 3 つの新たな小ピークが検出されたが、酸化のごく初期に生成される揮発性成分は主として Acr と Pro であることが明確にわかった。

Fig. 28 は揮発性成分総量と Acr 及び Pro の生成量との関係を表したグラフである。また Fig. 29 は揮発性成分総量中の Acr、Pro 及びそれ以外の揮発性成分量を割合で示したグラフである。揮発性成分総量は前述した黒色の矢印で示された各揮発性成分の面積値を足し合わせた値である。Fig. 27 に示されているように酸化初期では Acr や Pro が主として検出されるため、それ以外の揮発性成分が小さく見えるが、全体としては多くの揮発性成分が生じていることがわかる。魚臭の原因はこれらの揮発性成分に基づくものと考えられる。一方で Fig. 29 から魚油の酸化初期時では常に Acr が主要な揮発性成分であることが示されている。Acr は臭気物質としての嗅覚閾値が非常に低く、3.6 ppb だといわれている(Endo et al. 2013)。私たちの生活に馴染みのある揮発性成分としてアルコールすなわちエタノールがあるがこの閾値は 520 ppb である(永田ら 1990)。このため Acr はエタノール量に対して約 1/144 の低量でも臭いが認識できてしまう。また Acr は強い毒性を示すほか、独特の不快臭を示す物質であることも知られている(Gasee et al. 1996,

Uchida 1999)。本検討で示したように、Acr は魚油 TAG の酸化の初期から生成する主要な揮発性成分であり、かつ閾値の低い不快臭成分であることから、魚油の酸化に伴う風味劣化に Acr が大きく関係していることが考えられる。

また、Fig. 30 は魚油の酸化における POV の値と揮発性成分総量及び Acr の生成量の関係を示したグラフであり、各プロットで示される POV の数値は Table 4 に示してある。図から明らかなように、POV の挙動と揮発性成分総量は非常に類似した挙動を示している。POV は主として脂質過酸化物 LOOH の量を示しており、第 1 章 2 節で述べたように過去に即席めん中毒事件が起こった背景から、現在油脂を含む食品に対し POV の値が 10-50 meq/kg となるよう規制が設けられている。即席麺に関してはその値が 30 以下と設定されている。本実験では、酸化開始 4 時間後に POV が 30 meq/kg となったが (Table 4)、この時点で既に Acr は主要な揮発性成分として検出されており (Fig. 29)、POV が 30 meq/kg となる前から Acr は生成していることが容易に推察できる。また本検討の GC ではスプリット比 49 : 1 で分析を行っており、スプリットなしで酸化時間 4 時間後の魚油を GC 分析すれば、さらに大きな Acr のピークが検出されることが予想される。Ritter ら (2012) は、魚油から生じる揮発性成分の生成に伴う酸化臭と POV における相関性の低さを問題に挙げているが、本検討でも、POV 値が約 30 meq/kg を示したとき、魚油酸化に伴い生成する不快臭の主因と考えられる Acr がスプリット比 49 : 1 にも関わらず検出されたことが明らかにされた。したがって、魚油の酸化劣化の指標として POV を用いることは適当ではないと考えられた。

以上、魚油 TAG の酸化では、POV が 30 を示す前から多くの Acr が生成すること、反応性の高いアルデヒド化合物である Acr はアミノ化合物である SGA と反応して抗酸化物質へと変換する可能性があること、同時に魚油の初期酸化で生ずる不快臭の主因である Acr がこの反応により除去できることなどから、SGA を魚油の酸化に伴う風味劣化防止に利用する有効性が期待できると考えられた。

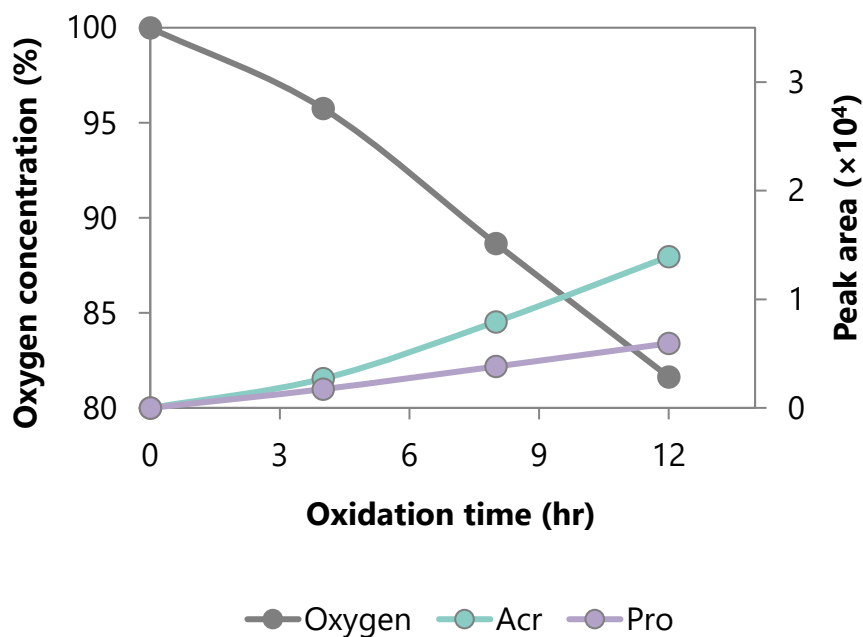


Fig. 26 Correlation between the decrease in oxygen and the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) in the oxidation of fish oil TAG within 12 hr. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

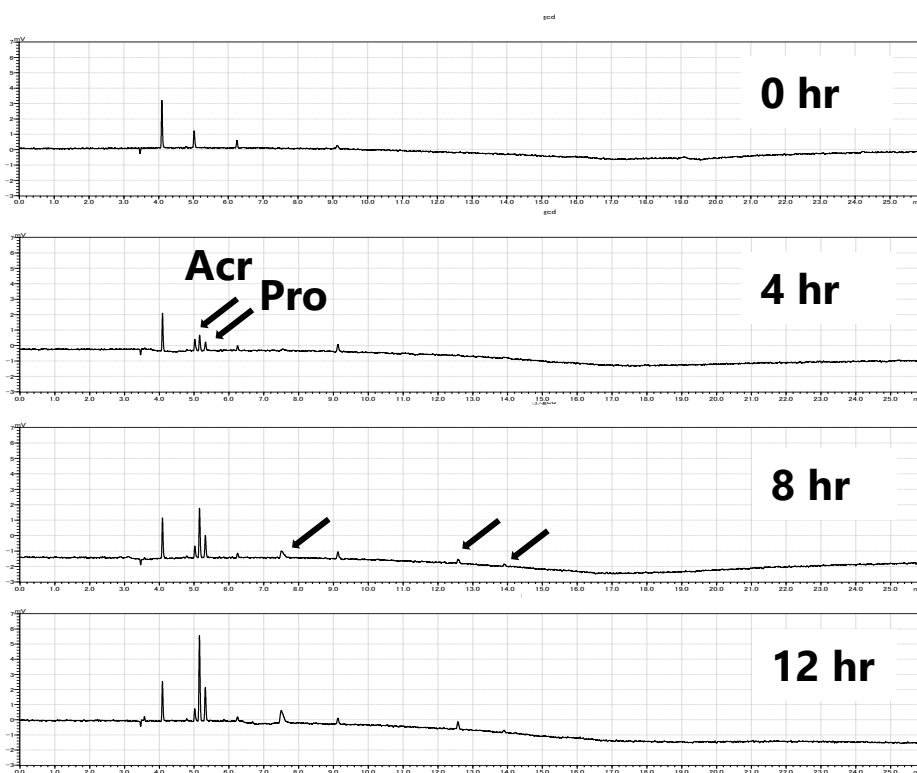


Fig. 27 Representative chromatograms of volatiles (shown by arrows) from the oxidized fish oil TAG after 0, 4, 8 and 12 hr incubation.

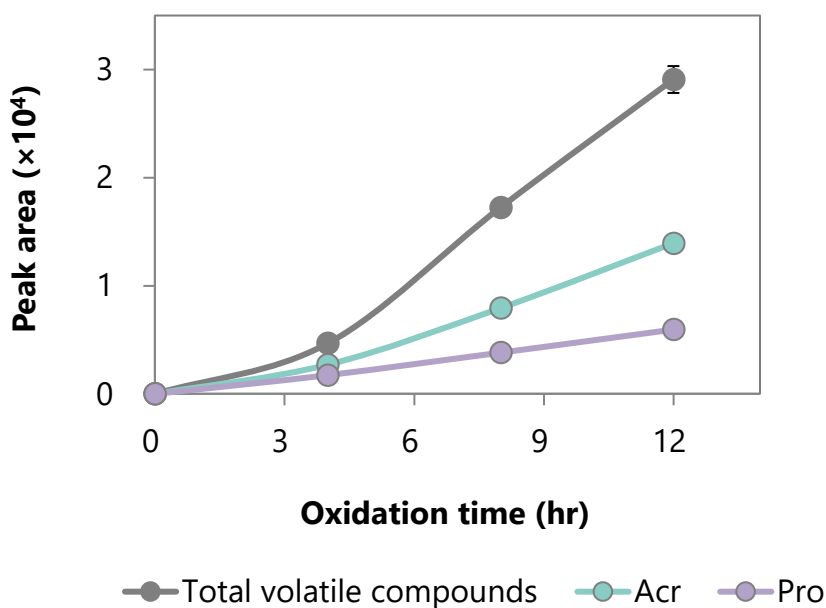


Fig. 28 Correlation between total volatile compounds and the formation of Acr and Pro in the oxidation of fish oil TAG for 12 hr. Total volatile compounds were calculated from the sum of peak areas shown by arrows in Fig. 27. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

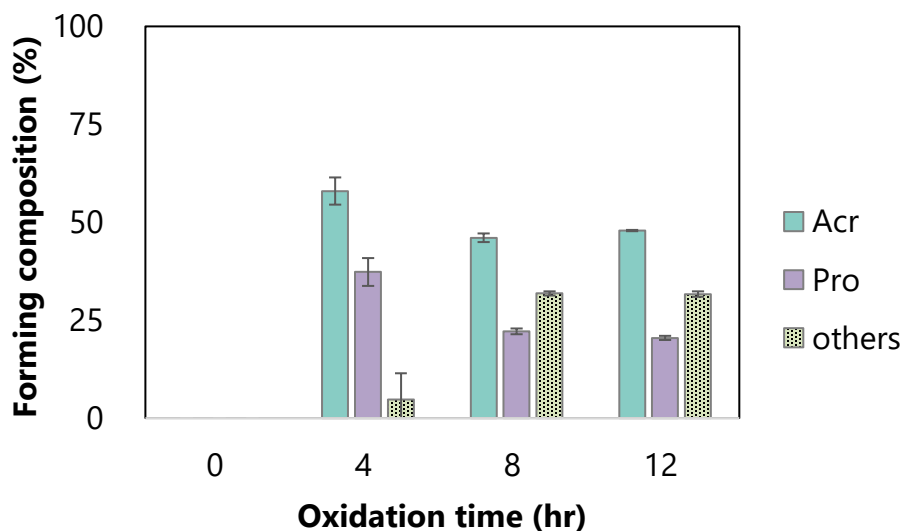


Fig. 29 Composition (%) of Acr and Pro in total volatile compounds formed during the oxidation of fish oil TAG at different incubation time.

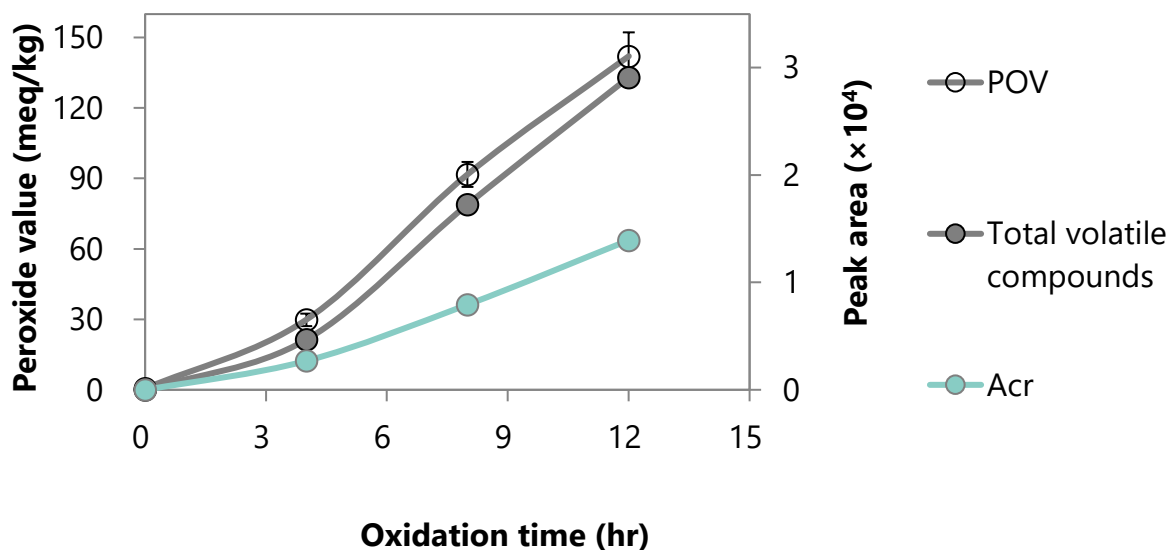


Fig. 30 Correlation among the increase in peroxide value (POV) and the formation of total volatile compounds and Acr in the oxidation of fish oil TAG for 12 hr.

Table 4 Peroxide value (POV) of oxidized fish oil TAG after 0, 4, 8 and 12 hr incubation.

Oxidation time (hr)	0	4	8	12
POV (meq/kg)	0.49 $\pm$ 0.21	29.82 $\pm$ 2.64	91.66 $\pm$ 5.31	141.98 $\pm$ 10.16

第3章 アルデヒドとSGAとの反応生成物の抗酸化活性

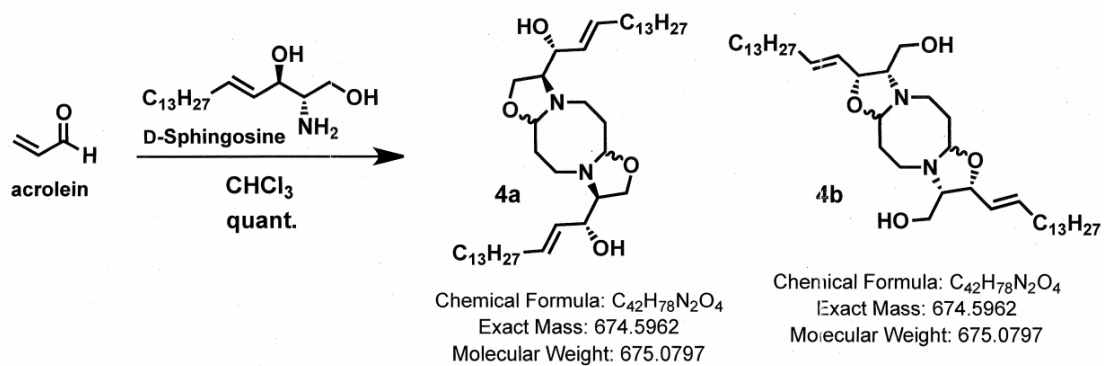
序論

第1, 2章より、魚油へのSGAの単独添加によって若干の酸化安定性向上が示されたこと、この際、アルデヒド類ではAcrの生成が大きく抑制されたことから、AcrがSGAとの反応性を示す可能性が考えられた。過去の報告では、4,5-エポキシ-2-ヘプテナールとアミノ化合物であるリジンを25°Cで16時間インキュベートしたところ、アミノカルボニル反応が起き、6-アミノ-2-(1H-ピロール-1-イル)ヘキソン酸が生成したと報告されている(Zamora *et al.* 1994, Hidalgo *et al.* 1995)。また同報告では、4,5-エポキシ-2-ヘプテナールは魚油のEPA等の ω -3脂肪酸の酸化により多く生成すると述べている。こうしたカルボニル化合物は、リジンの他にもブチルアミンのようなアミノ化合物とも反応してピロール化合物を生成することも報告されている(Hidalgo *et al.* 1993)。また、4,5-エポキシ-2-ヘプテナールとリジンとのアミノカルボニル反応生成物、6-アミノ-2-(1H-ピロール-1-イル)ヘキソン酸を、トコフェロール含有のオリーブオイルに添加すると、同反応生成物を含まないオリーブオイルと比べ、酸化安定性が向上したとの報告(Hidago *et al.* 2007)もある。一方、第1, 2章よりSGAと α Tを魚油TAGに添加することで、TAGの酸化が効果的に抑制され、特に、揮発性成分の生成が一定時間ほぼ完全に抑制できることが明らかになった。また、魚油TAGの酸化では、初期から不飽和アルデヒドであるAcrが主要な臭い劣化成分として生成することも見出された。これらのことから、カルボニル化合物としてのAcrとアミノ化合物であるSGAによるアミノカルボニル化合物が、魚油TAGの抗酸化と揮発性成分の生成抑制に大きく関与することが推測できた。

ところで、SGAと似た化学構造を持ちSGAにはない二重結合を1つ持つスフィンゴシン(SGO)とAcrとの反応性についての報告 (Takamatsu *et al.* 2014)では、両者の反応により、8員環構造を持つ生成物(SGO-Acr)が見出されている(Fig. 31)。仮に、SGO-Acrが抗酸化活性

を有することがわかれば、上記の推測を裏付けることになる。しかしSGO-Acrの抗酸化活性については未だ検討が行われていない。

そこで本章の第1節では、SGAとAcrの反応性について検討を行った。また、AcrとSGAとの反応で得られた生成物を魚油TAGに添加し、その抗酸化活性を検討した。なお、上記で述べた6-アミノ-2-(1H-ピロール-1-イル)ヘキソン酸の抗酸化活性は、試料油脂にトコフェロールを加えた時のみに見られたことから、本検討でもトコフェロールの影響について着目しながら分析を行った。また第2節では既に同定されたSGO-Acrの標品を頂き、その抗酸化活性を検討した。



Bioorg. Med. Chem. **2014**, 22, 6380-6386

mixture of products
65.7 mg

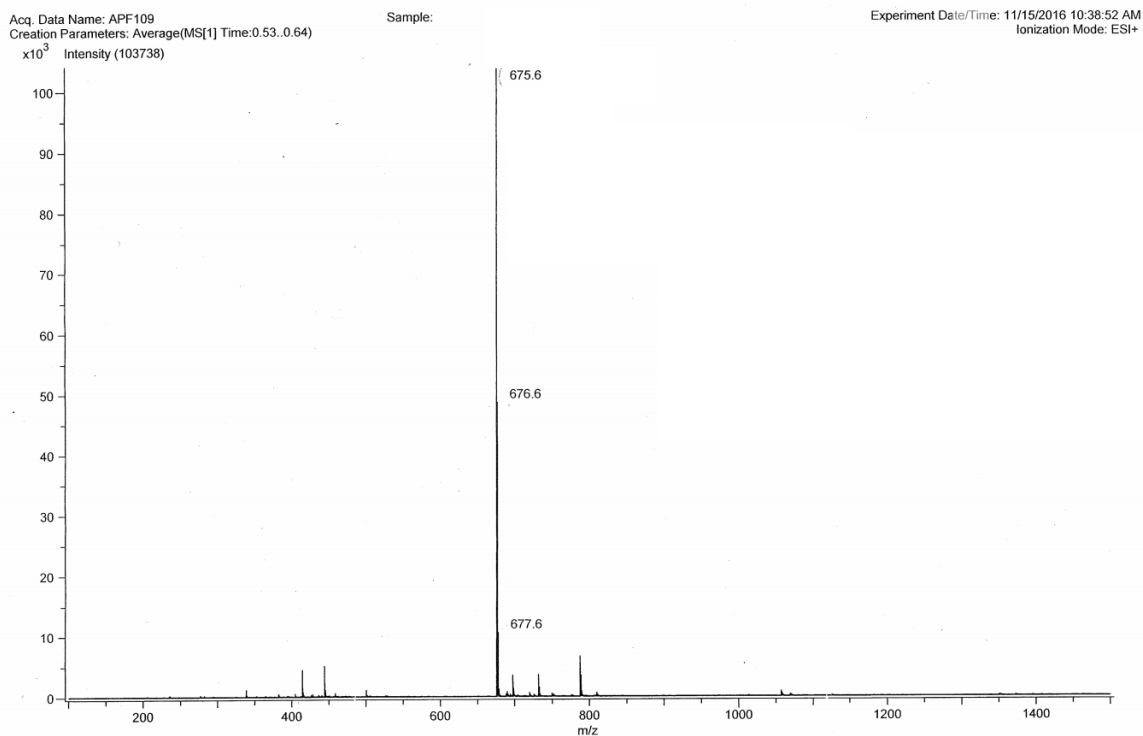


Fig. 31 The given information of identified reaction product of SGO-Acr.

第1節 Acr と SGA の反応性及びその生成物の抗酸化活性

実験方法

3-1-1 試料及び試薬

1-1-1 で用いた試料と試薬のほか、反応媒体としてトリカプリリン (MCT) を和光純薬(株)から購入して用いた。反応基質としての Acr は純度 90% のものを東京化成工業株式会社より購入した。Acr の希釈に用いた試薬特級のエタノールは和光純薬(株)より購入した。なお、TAG は魚油 TAG のみを用いた。

3-1-2 Acr の検量線の作成

(1) Acr のエタノール溶液の調製

1.5 ml 容バイアル瓶に Acr 356 μ l とエタノール 1 ml を取り、Vortex ミキサーで混合し、これを溶液(a)とした。別の 1.5 ml 容バイアル瓶で(a)の 10 μ l と 990 μ l のエタノールを混合し、これを溶液(b)とした。

(2) Acr 溶液の MCT への添加

HS-GC 分析用の 20 ml 容バイアル瓶に 300 mg の MCT を入れた。それぞれに(b) を 0, 1, 5, 10, 50 μ l、(a)を 1, 3, 5 μ l 加え Vortex ミキサーで混合した後、蓋をして密閉した。得られた各 MCT 溶液中の Acr 濃度は、0, 13.6, 68, 136, 680, 1360, 4080, 6800 ppm となった。

(3) 分析

1-2-4 の HS-GC 分析と同様の条件で、濃度の異なる Acr 溶液の分析を行い、検量線を作成した。なお、検量線の作成結果については、Table 5 と Fig. 32 に示した。

3-1-3 油脂の精製

1-1-2 と同様の方法で行った。

3-1-4 精製 TAG の分析

本検討では、2 回の実験を実施した。1 回目では魚油 TAG 中のトコフェロール含量などの確認をしなかったが、得られた結果などから、この TAG には若干のトコフェロールの混入が予測された。そこで、2 回目の実験では 1-1-3 と同様の方法で魚油 TAG を分析し、トコフェロールなどが存在しないことを確認した。

3-1-5 Acr と SGA の反応性評価

バイアル瓶に MCT 300 mg と SGA 3 mg、3-1-2 で調製した Acr 希釈(b)溶液を 13.1 μ l 添加し、暗所下 50°C で 6.5 時間反応させ、SGA との反応に伴う Acr ピーク面積の減少量を分析した。また、SGA を添加しない場合の Acr の変化量についても分析した。なお、n=3 にて実験を行った。

3-1-6 反応生成物の抗酸化活性評価

(1) 各種反応生成物の調製

バイアル瓶に MCT(300 mg)、SGA(3 mg)、 α T(0.15 mg)、3-1-2 で調製した Acr 希釈(b)溶液を 13.1 μ l 添加し、暗所下 50°C で 26.5 時間反応させ、反応生成物の調製を行った。各反応グループは以下のとおりである。それぞれ n=3 にて実験を行った。

《実験 1 回目》

グループ 1： MCT 300 mg

グループ 2： MCT 300 mg + α T 0.15 mg

グループ 3： MCT 300 mg + α T 0.15 mg + SGA 3 mg

グループ 4： MCT 300 mg + α T 0.15 mg + SGA 3 mg + Acr

グループ 5： MCT 300 mg + SGA 3 mg + Acr

《実験 2 回目》

グループ 1： MCT 300 mg + SGA 3 mg

グループ 2： MCT 300 mg + SGA 3 mg + Acr

(2) 魚油への反応生成物の添加

(1)で調製した反応生成物が入ったバイアル瓶の蓋を開け、魚油 300 mg を添加し駒込ピペットで十分に空気を送り込み、再度蓋をして暗所下 50°Cで酸化実験を行った。

(3) GC-TCDによる酸化評価

1-1-6と同様の方法で行った。

(4) HS-GC による酸化評価

1-2-4と同様の方法で行った。

結果及び考察

Table 6 は SGA と Acr の反応性を確認するため、MCT 中に Acr のみ、もしくは Acr と SGA の両方を添加し、暗所下 50℃でインキュベートした際の、反応 6.5 時間後の Acr 量を測定した結果である。Acr のみを加えた[MCT+Acr]では Acr 量の変化は見られなかったが、Acr と SGA の両方を加えた[MCT+SGA+Acr]では、Acr が完全に消失していた。このことから Acr が SGA と反応したことが考えられ、またその反応が速やかに起こることがわかった。Takamatsu ら(2014)は SGA と類似構造を有するスフィンゴイド塩基、SGO を Acr と常温で反応させ、30 分で反応が終了したことを確認している。このような報告からも Acr の反応性の高さがうかがえる。

Fig. 33 A より実験 1 回目での各グループの酸素残存率から得られた酸化安定性の順番は、 $[MCT] \leq [MCT + \alpha T] < [MCT + SGA + Acr] < [MCT + \alpha T + SGA + Acr] \div [MCT + \alpha T + SGA]$ と示された。一方、実験 2 回目の結果を示した Fig. 33 B では、 $[MCT + SGA] \div [MCT + SGA + Acr]$ という結果となり、両者共に 24 時間以内に速やかに酸化された。これは、実験 1 回目で用いた魚油 TAG の Toc 除去が不完全だった可能性が考えられる。つまり、実験 1 回目で[MCT + SGA + Acr]の抗酸化活性が高くなった原因として、もともと魚油 TAG 中に残存していた αT の関与が推定された。すなわち、実験 2 回目では、 αT を魚油 TAG から完全に除去したために、SGA とアクロレインとの生成物を添加しても抗酸化活性がほとんど発揮されなかったが、《実験 1 回目》では、魚油 TAG に αT が含まれていたために、SGA とアクロレインとの生成物のみを添加した場合([MCT + SGA + Acr])でも魚油 TAG は高い酸化安定性を示したものと推測できた。以上より、SGA と Acr から生じる反応生成物には油脂に対する抗酸化活性がほとんどないが、 αT が存在することで αT の抗酸化活性を相乗的に増大することがわかった。なお、実験 1 回目において、 $[MCT + \alpha T + SGA]$ 及び $[MCT + \alpha T + SGA + Acr]$ と比べて $[MCT + SGA + Acr]$ の抗酸化活性が低くなった原因は、魚油

TAG 中の α T の含有量が少なかったためと考えられる。したがって、 α T の添加量を増やすことにより、SGA あるいは SGA+Acr の抗酸化活性がさらに強くなる可能性が考えられた。

Fig. 34 は「実験 1 回目」における揮発性成分総量の分析結果である。また、Fig. 35-37 には、この場合の Acr 及び Pro の生成量の変化を示した。揮発性成分生成量の結果からも、各反応生成物添加による魚油 TAG の酸化安定性の順番は、酸素吸収量測定(Fig. 33A)の結果とほぼ同じで、 $[MCT] \leq [MCT + \alpha T] < [MCT + SGA + Acr] < [MCT + \alpha T + SGA] \approx [MCT + \alpha T + SGA + Acr]$ となった。また Fig. 35-37 に示したように、 $[MCT + SGA + Acr]$ 、 $[MCT + \alpha T + SGA]$ 、 $[MCT + \alpha T + SGA + Acr]$ といった反応生成物を魚油 TAG に加えることで、酸化初期の臭気成分である Acr 及び Pro の生成が効果的に抑制できた。反応組成物から α T と相乗的抗酸化作用を発揮する活性本体を分離しなければ明確な断定はできないが、活性本体は SGA と Acr との反応生成物である可能性が高いと推測される。

以上、SGA と Acr の反応生成物が抗酸化活性を示すためには、 α T の存在が不可欠であることが明らかになったが、その理由についてはいまだ不明である。これまでも、 α T 存在下で、アミノ基を持った PL が相乗的な抗酸化作用を示すことが報告されている(Kashima *et al.* 1991, Takenaka *et al.* 2007, Hidalgo *et al.* 2004, Lee *et al.* 2011, Cui *et al.* 2016)。このような報告を踏まえ、Cui ら (2016) は、 α T 存在下でのアミン化合物の抗酸化作用について、以下の 3 つの作用機構を挙げ、これらのうちのいずれか、もしくはそれらが複合的に関係すると述べている。すなわち、(1) α T 存在下での抗酸化力を持つメイラード反応(アミノカルボニル反応)生成物の生成、(2) 油脂中でのトコフェロールの存在状態に影響を与え、トコフェロールの抗酸化活性が発揮しやすいようにする、(3) トコフェロールの再生、の 3 つである。このうち、(2)については、異なる反応系における α T の存在状態の違いとその抗酸化活性との関係を基に説明することができる。例えば、 α T の分散状態は、TAG や脂肪酸また脂肪酸メチルなど基質形態によって異なっており、 α T の抗酸化活性は基質によっても影響を受けることが知られている (Huang *et al.* 1996)。また、生体膜には飽和あるい

は不飽和脂肪酸のついた PL、コレステロール、スフィンゴミエリン、たんぱく質などが存在しているが、 α T は不飽和脂肪酸のついた PL の近傍に存在しやすいと考えられている (Atkinson J. *et al.* 2010)。さらに、PC が α T と付加体を形成し、付加体の方が α T 単独よりも強い酸化安定性を示すことが報告されている (Koga *et al.* 1994)。これらの報告に基づき、Cui ら (2016) は、PL が α T に対して高い親和性を有し、かつ、界面活性能力も有するため、様々な存在状態の油脂中の PUFA 近くに α T を配置させることができ、これにより PL は α T に対して相乗的な抗酸化作用を示すとした。

一方本章では、 α T 非存在下で反応生成物の調製を行い魚油 TAG に添加し、その効果を検討した。 α T が存在(精製不完全のため魚油に含有)する場合のみ強い抗酸化活性が見られたが (Fig. 33 A)、 α T 非存在下では抗酸化作用を示さなかった (Fig. 33 B)。したがって、上記(1)の作用機構では、 α T 存在下での SGA の抗酸化作用を説明することはできないと考えることができる。ただ、SGA(官能基として OH 基 2 個と NH_2 基 1 個を有する)と Acr (炭素数 3 の不飽和アルデヒド) の化学構造から判断して、両者の反応生成物 (SGA-Acr) も非常に極性が高いと予想される。実際、Takamatsu ら (2014) は、スフィンゴイド塩基の SGO と Acr との反応生成物の調製を、クロロホルム中と極性の高いリン酸緩衝生理食塩水を用いて行い、いずれの溶液においても反応生成物の調製に成功している。この際に、SGA と類似構造を有する SGO と Acr の反応生成物の化学構造を報告しているが、その構造中にヒドロキシ基を持っており親水性の高い構造を有していた。したがって、SGA-Acr に仮に強い抗酸化活性があったとしても、極性が高いために、油脂中の PUFA へ近づきにくくなり、その抗酸化活性を発揮しにくかった可能性もある。Cui ら (2016) は、PL のみならず α T にも界面活性の特徴を示すと述べている。そのため、本研究では上述した(2)の作用機構が関係し、 α T が油脂中での SGA-Acr の存在状態を変え、抗酸化活性に影響したと考えられる。この点については今後さらなる検討が必要であると考ええる。

ところで、Shimajiri ら (2013) は、SGA と α T を魚油に添加した検討で、 α T の残存量を

測定した際、その減少が抑制されており、約 500 時間の間は 80%ほどが残存していたことを報告している。また、Cui ら(2016)は上述(3)のメカニズムに関し、 α -トコフェロールキノン等の α T の酸化物が脂質酸化に対する促進作用を有するという報告(Kim *et al.* 2007, Chaoman *et al.* 2009)を受け、酸化した α T を戻すこと(トコフェロールの再生)によって、これが脂質酸化を抑制できると述べている。したがって、PL 等のアミン化合物とトコフェロールとが示す抗酸化効果において、酸化トコフェロールからのトコフェロールの再生が関わっていることが指摘されている。しかし、このトコフェロールの再生には、酸化トコフェロールに対する電子供与が必要であるが、PL とトコフェロールの還元電位がほぼ同じ(約 600 mV)であると言われているため、両者間の直接的な電子の授受は考えにくい。一方で、Doert ら (2012)は、PE が α -トコフェロールキノンとの反応で PE- α -トコフェロンという付加体を形成することを MS で確認しており、この際に α T の再生効果を報告している。同著者の別の報告(Doert *et al.* 2017)では、アスコルビン酸と PE の付加体の形成についても MS で確認しており、この場合も α T の再生が起こることを報告している。こういった報告から、SGA あるいは SGA-Acr による酸化 α T の再生と、これによる抗酸化活性の発現の可能性もある。なお、Shimajiri ら (2013)は、酸化しない基質である MCT に α T と SGA を添加した場合、 α T は直線的に減少していくが、魚油 TAG に両者を添加した場合には、 α T は一定時間後にほとんど減少しなくなることを報告している。魚油 TAG では酸化の初期に Acr などのアルデヒドが生成し、これが SGA と反応して SGA-Acr を形成する。酸化しない MCT では SGA-Acr は生成せず、この場合には α T の減少が抑制されなかった。したがって、もし、SGA と α T の添加により魚油 TAG の酸化が抑制されることについて、酸化 α T の再生が関与しているとすれば、その再生化を担う活性本体は SGA ではなく、SGA-Acr と考えられる。

Table 5 Results of function formula and R-squared value of the acrolein’s standard curve in triplicate.

<i>n=3</i>	<i>y=ax</i>	<i>R²</i>
<i>No.1</i>	<i>y=280.58x</i>	<i>0.9969</i>
<i>No.2</i>	<i>y=251.08x</i>	<i>0.9933</i>
<i>No.3</i>	<i>y=339.76x</i>	<i>0.994</i>

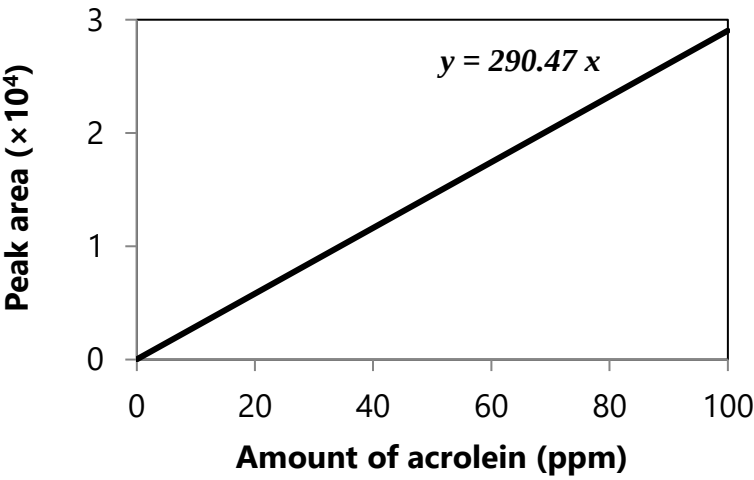


Fig. 32 Standard curve of acrolein (purity >90 (%)) at the different concentration (0-6800 ppm). This standard curve was used for determining acrolein concentration in the samples. Peak area of each concentration was determined in triplicate.

Table 6 Change in the Acr peak area before and after incubation at 50°C. Acr was incubated in medium chain triacylglycerol (MCT) with or without SGA.

	0 (h)	6.5 (h)
MCT+Acr 1	16762	19851
MCT+Acr 2	20137	22289
MCT+Acr 3	17892	22472
MCT+SGA+Acr 1	16768	0
MCT+SGA+Acr 2	17087	0
MCT+SGA+Acr 3	16095	0

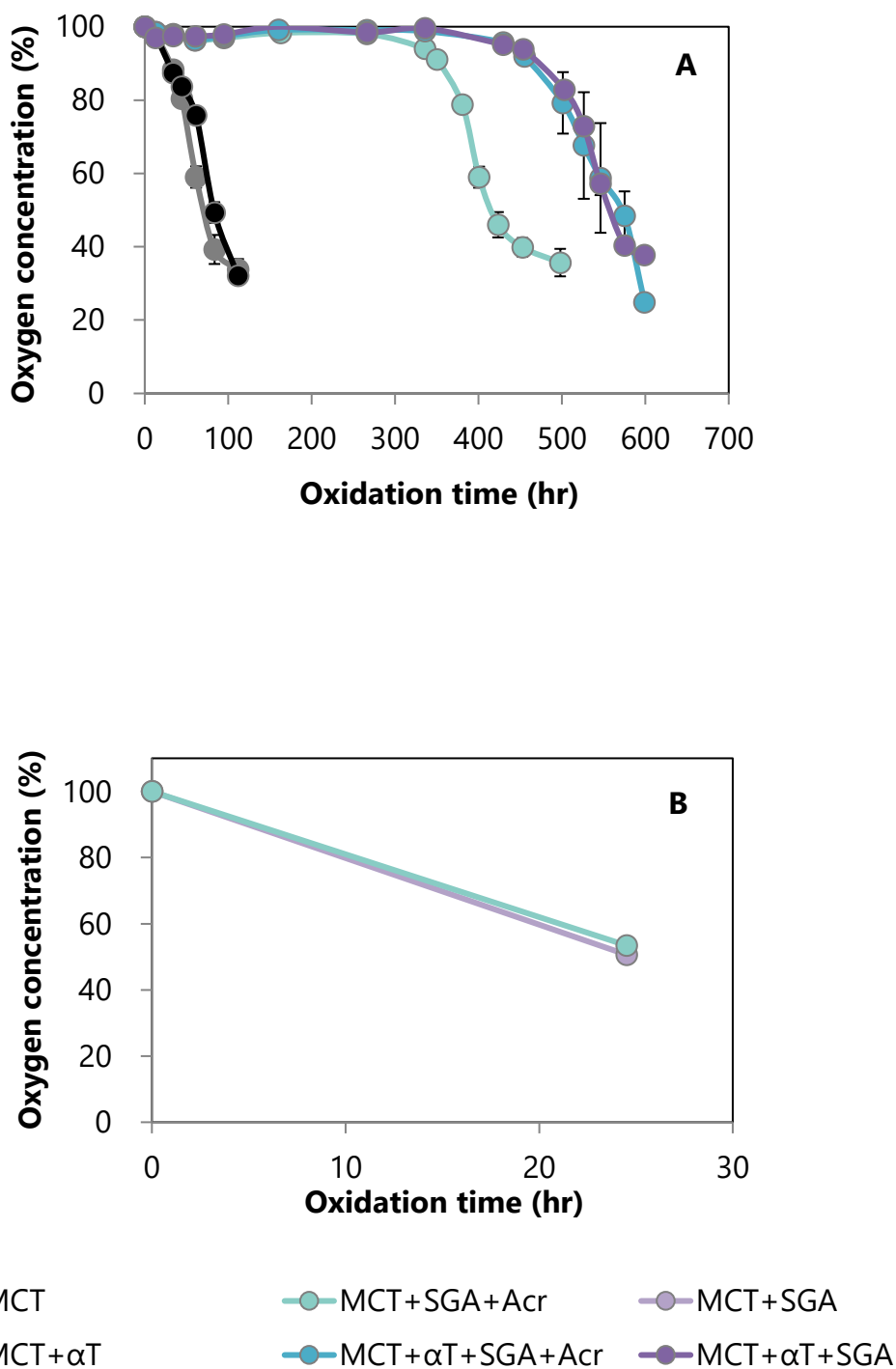


Fig. 33 Effect of different kinds of reaction products on the oxidative stability of fish oil TAG. Reaction product was obtained by the incubation of MCT alone (MCT), MCT+αT, MCT+SGA, MCT+SGA+Acr, MCT+αT+SGA, and MCT+αT+SGA+Acr. A, αT was found in the fish oil TAG; B, αT was completely removed from fish oil TAG. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

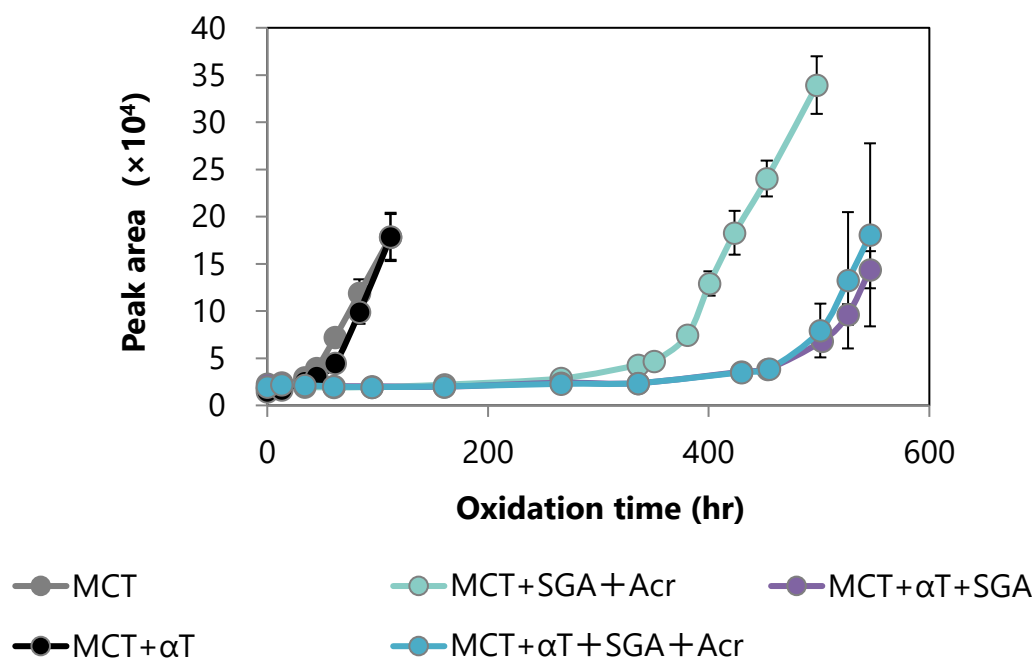


Fig. 34 Effect of different kinds of reaction products on the oxidative stability of fish oil TAG. Reaction product was obtained by the incubation of MCT alone (MCT), MCT+αT MCT+SGA, MCT+SGA+Acr, MCT+αT+SGA, and MCT+αT+SGA+Acr. The stability was analyzed by measuring the increase in the total peak area of volatiles. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

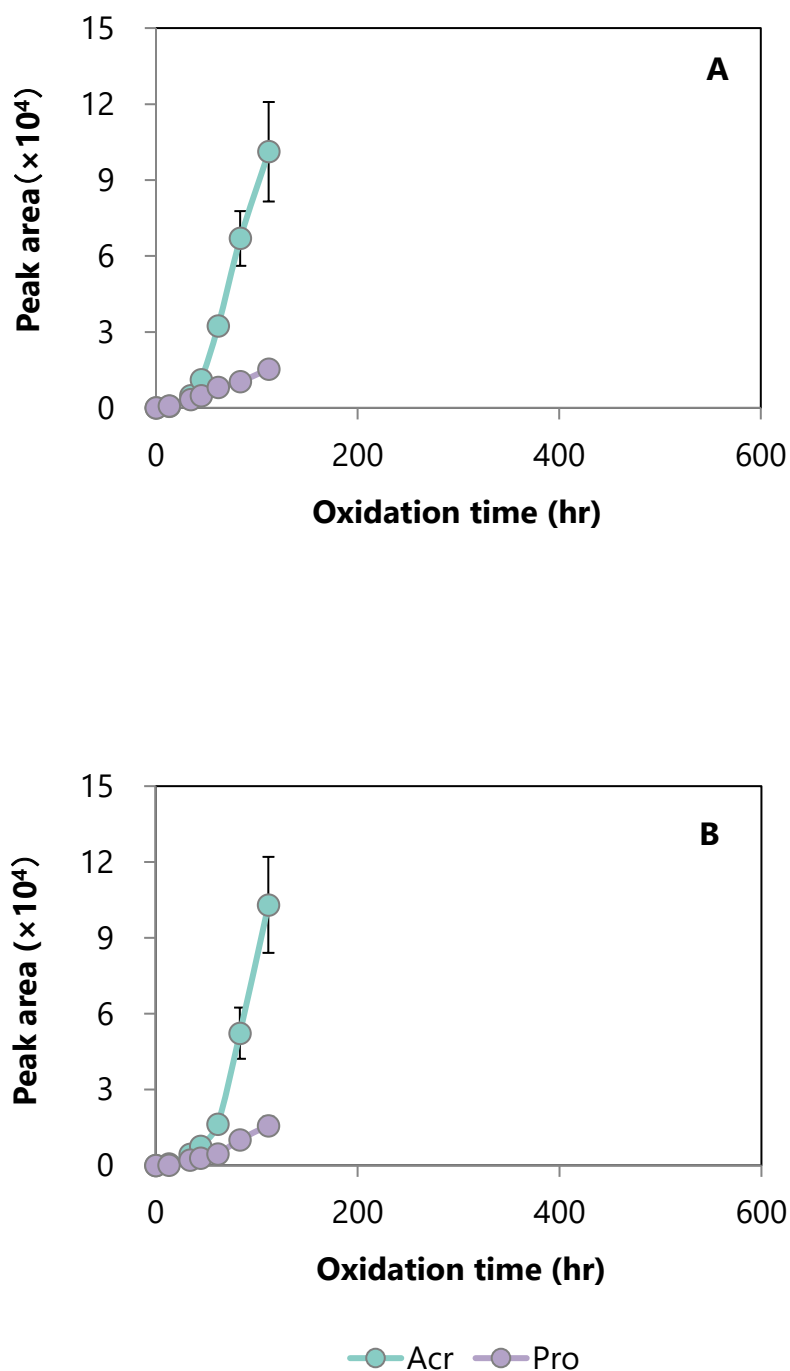


Fig. 35 Effect of reaction products (A, MCT; B, MCT+ α T) on the oxidative stability of fish oil TAG. The stability was analyzed by measuring the increase in Acr and Pro. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

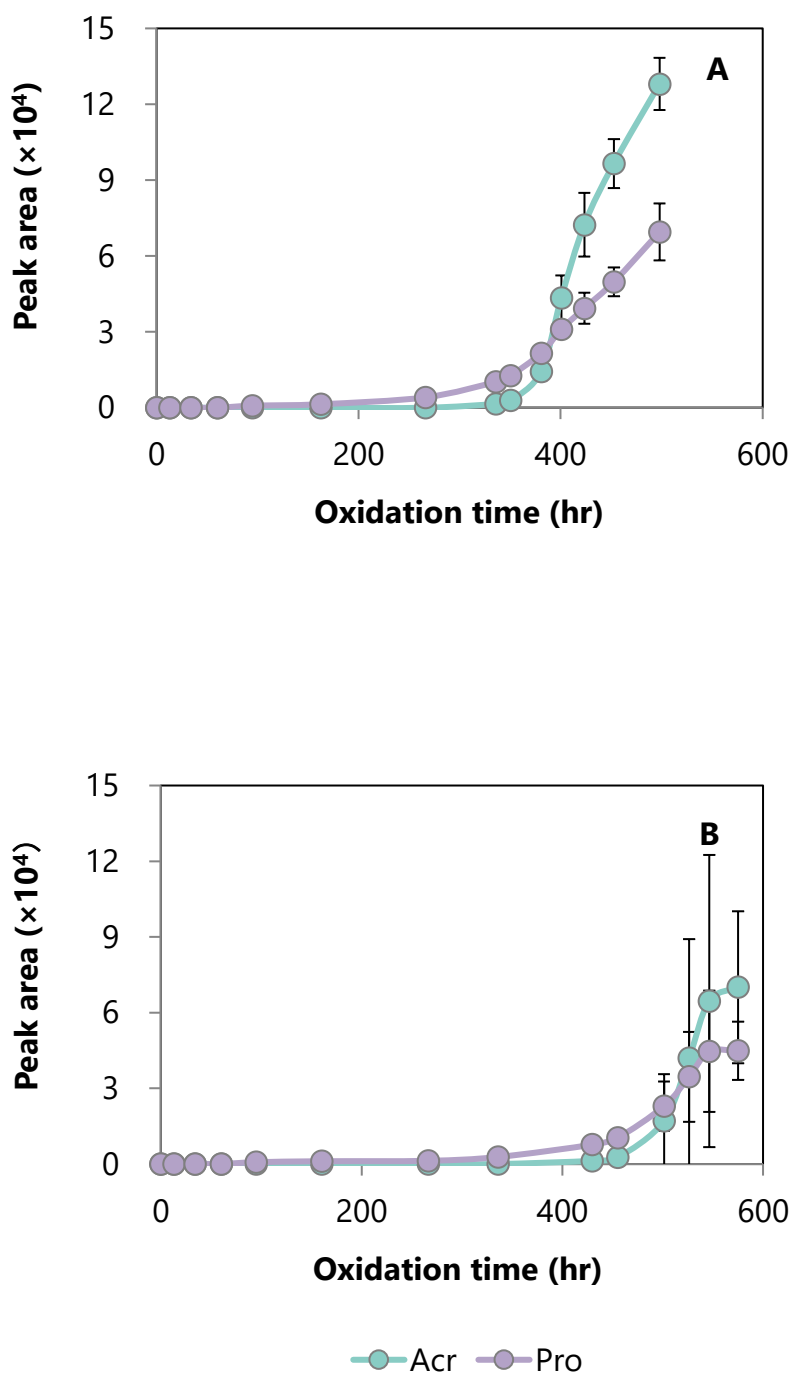


Fig. 36 Effect of reaction products (A, MCT+SGA+Acr; B, MCT+ α T+SGA+Acr) on the oxidative stability of fish oil TAG. The stability was analyzed by measuring the increase in Acr and Pro. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

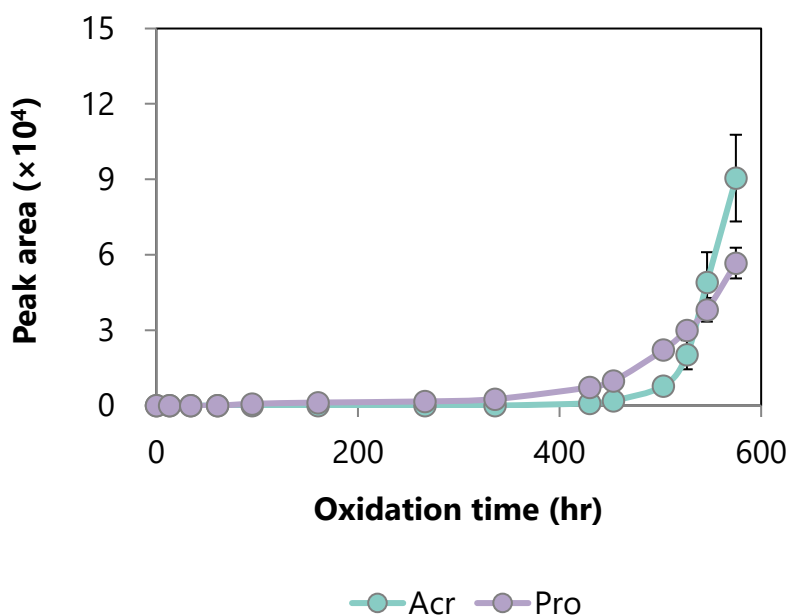


Fig. 37 Effect of reaction products (MCT+ α T+SGA) on the oxidative stability of fish oil TAG. The stability was analyzed by measuring the increase in Acr and Pro. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

第2節 SGO-Acr の抗酸化活性

実験方法

3-2-1 試料及び試薬

1-1-1 と同様の試薬を使用した。油脂は魚油のみを用いた。SGO と Acr の反応生成物 (SGO-Acr) は、Takamatsu ら(2014)の方法を基に合成した。合成と合成物の同定は理化学研究所により実施された。得られた生成物の化学構造を Fig. 31 に示した。

3-2-2 油脂の精製

1-1-2 と同様の方法で行った。

3-2-3 精製 TAG の分析

1-1-3 と同様の方法で行った。

3-2-4 サンプル調製と酸化

1-1-5 と同様の方法で行い、 α T は *n*-ヘキサンに、SGA と SGO-Acr はクロロホルム：メタノール=7：3 の溶媒に溶かし、それぞれ 0.15 mg/ml と 3 mg/ml の濃度に調整した。なお本実験の分析にもちいた酸化試料は以下に示したとおりである。それぞれ $n=3$ にて酸化実験を行った。

グループ1: TAG 300 mg + SGO-Acr 3 mg

グループ2: TAG 300 mg + SGA 3 mg

グループ3: TAG 300 mg + α T 0.15 mg + SGO-Acr 3 mg

グループ4: TAG 300 mg + α T 0.15 mg + SGA 3 mg

3-2-5 GC-TCDによる酸化評価

1-1-6と同様の方法で行った。

3-2-6 HS-GC による酸化評価

1-2-4 と同様の方法で行った。

結果及び考察

Fig. 38 A は酸素残存率の結果である。SGO-Acr は SGA と比較して魚油 TAG の酸化を抑制したことから SGO-Acr の抗酸化活性は SGA よりも強いということが示唆された。一方、本章第 1 節 Fig. 33 B では、SGA-Acr と SGA の酸化安定性に対する効果は示されなかった。この結果はスフィンゴイド塩基の種類(SGO と SGA)を反映していると考えられるが、Fig. 33B で TAG に添加した生成物は、Fig. 38A で用いたものとは異なり未精製物であるので、この点を立証するには純物質を用いた実験が必要である。しかし、Shimajiri ら(2013)は、魚油の酸化に対する SGA と SGO の単独添加による影響に違いはないと報告していることから、Fig. 38A と Fig. 33B で得られた違いは、反応生成物の組成(反応混合物と純物質)の違いに起因している可能性が高い。本章第 1 節で調製した SGA-Acr は MCT 中、50°C で 26.5 hr の加熱反応を行っている。一方、SGO-Acr の調製はクロロホルム中で常温において 30 min の反応を行っている。Takamatsu ら(2014)の報告では、SGO-Acr の安定性が 1 週間確認されている一方で、別のアミンと Acr の生成物の検討においては 2 日後に別の物質に変わり始めたことを示している。本章第 1 節での SGA-Acr の調製は、SGO-Acr の調製時より高い温度で長時間反応を進めたため、SGO-Acr の調製時よりも反応が進行し、抗酸化活性に影響を与えるような化学構造を持つ様々な物質が生成した可能性も考えられた。また、Takamatsu ら(2014)の報告では Acr を SGA に添加する際に、ゆっくり添加したと述べている一方で、本章第 1 節で調製した SGA-Acr は Acr をマイクロピペットで一気に添加し調整した。こういった実験方法の少しの違いが結果に影響した可能性も考えられた。

Fig. 38A の結果からは、その他、 α T 存在下では SGO-Acr の抗酸化活性はより強くなり、SGA+ α T を魚油に添加した場合とほぼ同等の抗酸化活性を示すことも明らかになった。ただ、Shimajiri ら(2013)は α T 存在下において SGA の方が SGO よりも強い抗酸化活性を示したとしており、この結果から判断すれば、 α T 存在下での SGO-Acr の抗酸化効果は SGA

と比べて低くなると予測されたが、Fig. 38A の結果はこの予測とは異なるものであった。

Fig. 38 B は揮発性成分総量を表した結果であり、得られた結果は、酸素残存量の分析結果とほぼ一致した。ただ、SGO-Acr を添加した場合、酸化時間およそ 30 時間目で一度揮発性成分量が大きく増加した。しかし酸素残存率の結果では高い酸化安定性が維持されていた。さらに、長時間高い酸化安定性を示した α T 存在下の SGO-Acr 添加グループでは、酸化約 30 時間後に増加してから急激な酸化が起こる約 200 時間目まで、揮発性成分総量の増減に大きな変化は見られなかった。そこで酸化初期時の Acr と Pro に着目し、それぞれの生成量を Fig. 39, 40 に示した。SGA を添加した Fig. 39, 40 の B では、酸素残存率が高い値を示している間、両グループともに Acr 及び Pro の生成はみられなかった。一方、SGO-Acr を添加した Fig. 39, 40 の A においては、酸素残存率が高い値を示している間でも Acr が多く生成した。また、Fig. 40 A の α T 存在下における SGO-Acr の添加グループでは、酸素残存率が急激に下がる酸化約 200 時間後までは、Acr の大きな増減は見られなかった。このような結果から、Fig. 38 A の急激な酸化が起こる前までに示された揮発性成分総量の大きな増加現象は Acr によるものだと考えられ、また魚油の酸化で生じる Acr に由来するものではない可能性が考えられた。そのため、SGO-Acr が逆反応を起こし、それによって Acr が生じた可能性も考えられた。よって、Fig. 38 で見られた SGO-Acr 添加の 2 グループにおいて酸素残存率が高い値を示しているにもかかわらず、Acr の生成により総揮発性成分が増加した原因としては、SGO-Acr が逆反応を起こし、それに由来する Acr が生成したという可能性が考えられた。

Takamatsu ら(2014)は SGO-Acr の構造を決定したが、本章ではこの生成物が魚油 TAG に対して抗酸化活性を示すことを明らかにした。一方、SGA と Acr との反応により調製した SGA-Acr には抗酸化効果が見られなかった。SGO-Acr と SGA-Acr の魚油 TAG の酸化に対する作用の違いは、SGO-Acr が単一成分であるのに対し、SGA-Acr が様々な成分を含む混合物である可能性のあること、比較的穏やかな条件下で得られた SGO-Acr は逆反応など

により Acr も生成するが、SGA-Acr は反応がかなり進行したもので、SGO-Acr の構造のような物質は多くないため、SGO-Acr とは違う活性を示したこと、などが理由として考えられた。また、Acr 添加方法における違いもあることから、これらが影響した可能性も考えられた。ただ、SGO-Acr と SGA-Acr いずれの場合も、 α T の存在により非常に強い抗酸化活性を示した。アミンと Acr との反応生成物が著しく高い酸化安定性を示す上で α T が必要である点は興味深い。本章ではその理由についても第 1 節で考察したが、この点についてさらに明確にするために、SGA や SGO 等のスフィンゴイド塩基に限らず他のアミンや α T 以外の抗酸化剤でもその活性の強さを検討する必要がある。

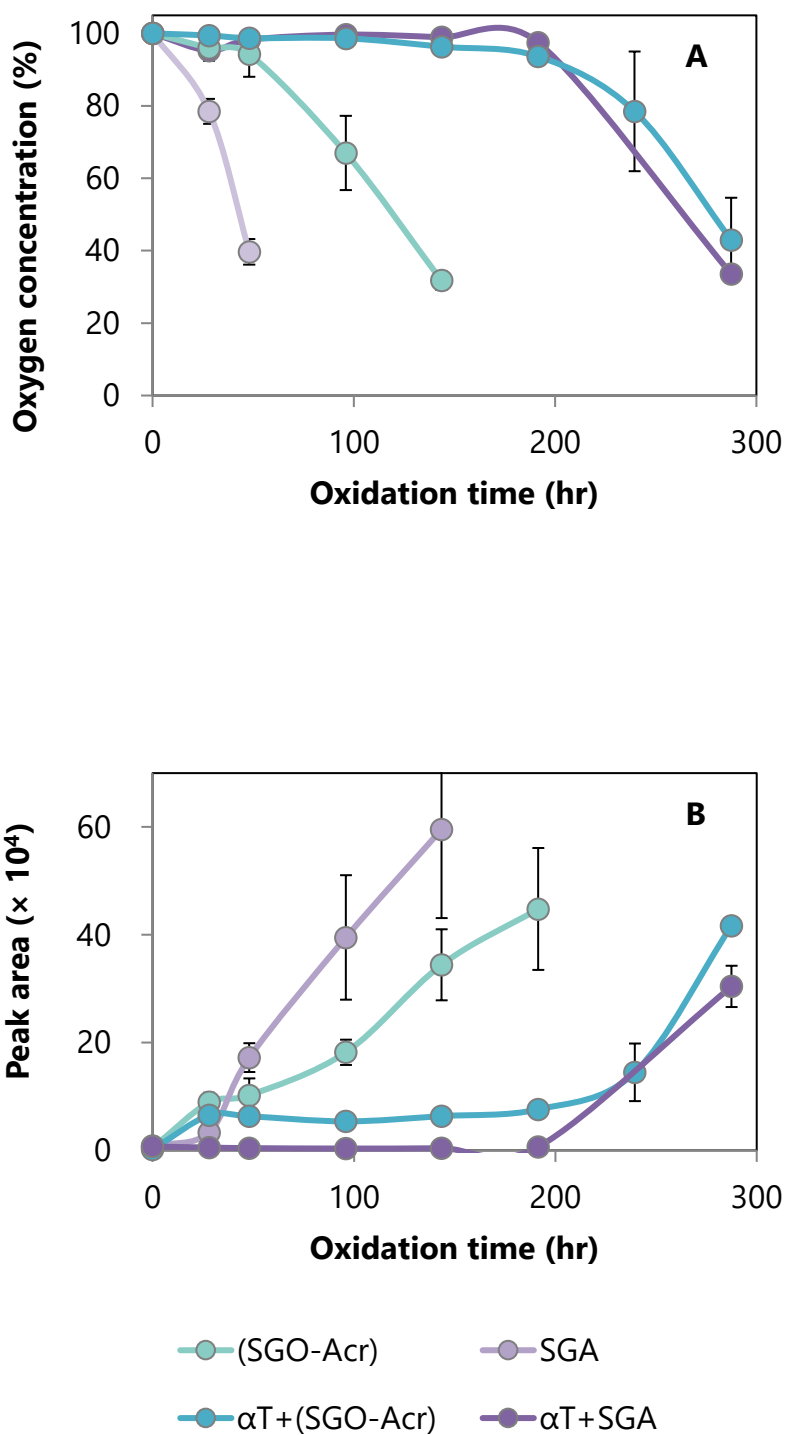


Fig. 38 Effect of the reaction product (SGO-Acr) of sphingosine (SGO) with Acr as compared with those of SGA, α T+SGA, and α T+SGO-Acr. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen (A) and the increase in total volatiles (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

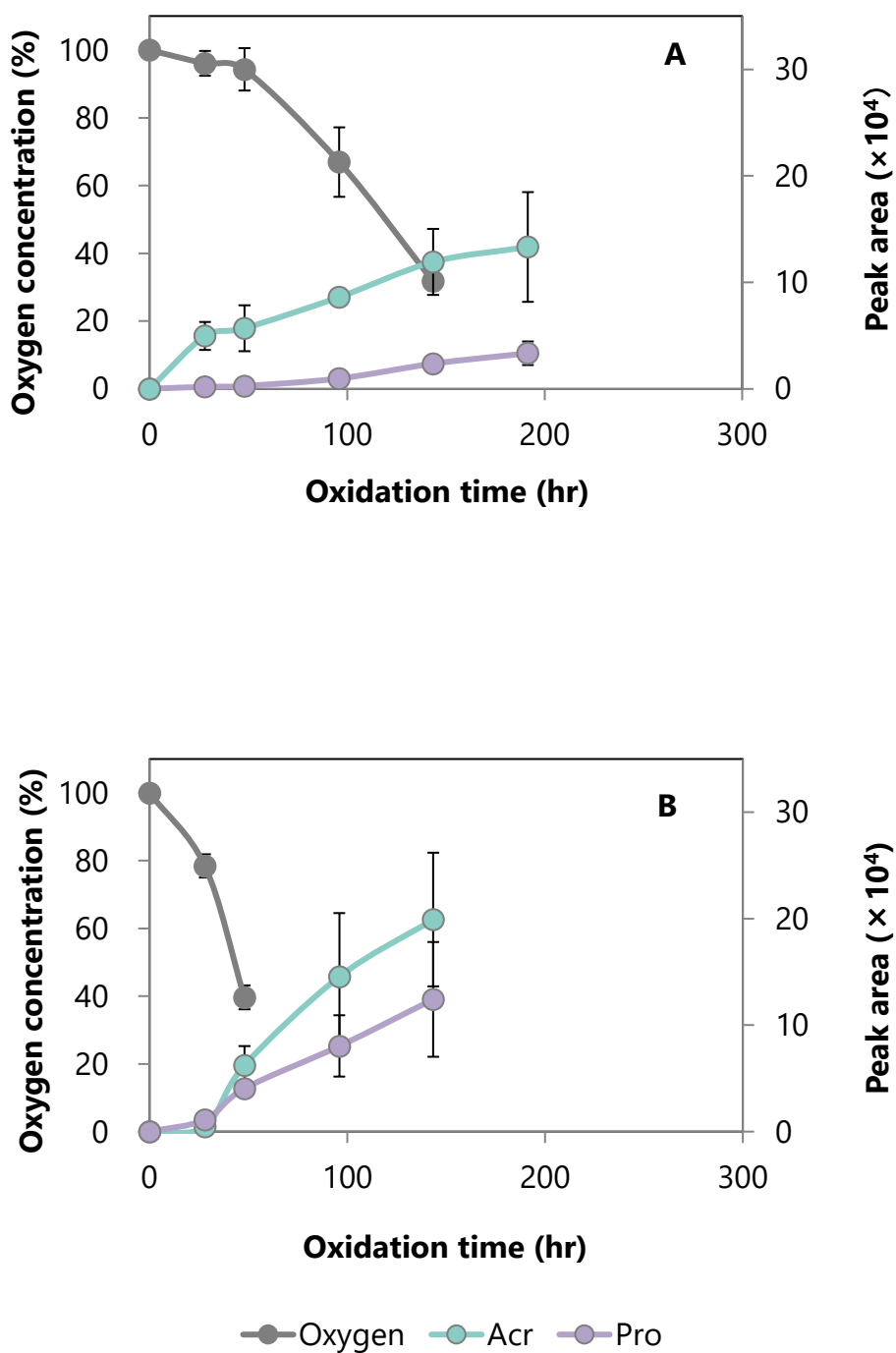


Fig. 39 Effect of SGO-Acr (A) and SGA (B) on the decrease in oxygen and the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

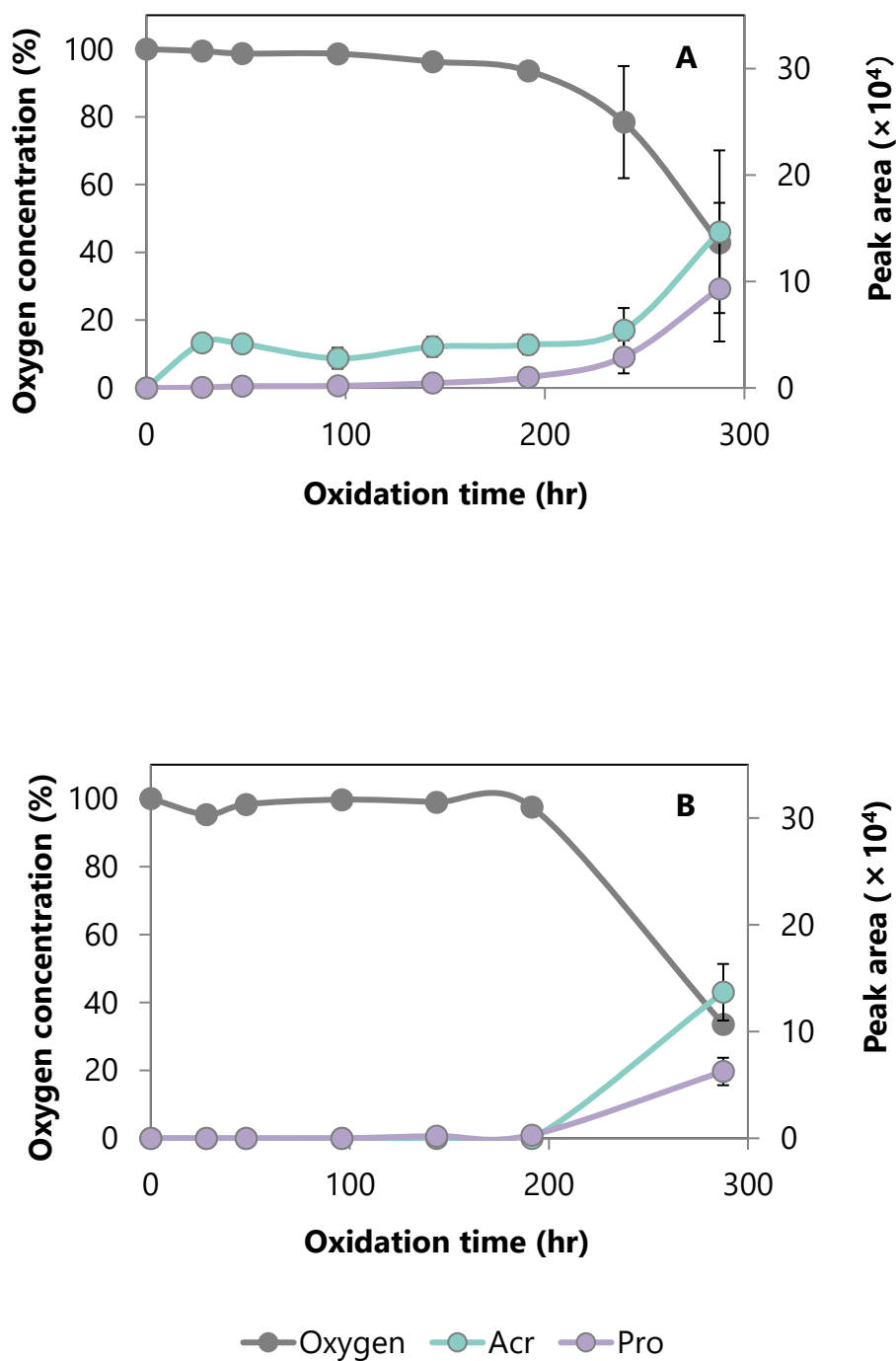


Fig. 40 Effect of SGO-Acr (A) and SGA (B) on the decrease in oxygen and the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the presence of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

第4章 アミノ化合物と各種抗酸化剤の魚油 TAG に対する抗酸化活性

序論

第1-3章では、スフィンゴイド塩基(SGA)による強力な抗酸化活性の作用機構の解明を目的とした検討を行った。その結果、酸化初期に生成するアルデヒド Acr が SGA と反応し、生じた反応生成物が α T 存在下で強力な抗酸化活性を示し、その後の揮発性成分の生成を強く抑えることがわかった。この反応は、カルボニル基とアミノ基とのアミノカルボニル反応に基づくものと考えられた。一方で菅原達也(2013)の報告によれば、SGA の自然界での存在量は非常に少ないことが示されており、そのため酸化防止を目的に食品添加物として SGA を利用することは、経済的な理由で難しいと考えられる。ただ、 α T 存在下での SGA の抗酸化活性は非常に強力であり、魚油の酸化に伴う風味劣化も効果的に抑制できたことから、SGA と同じような機能を有するアミノ化合物が探索できればその利用用途は広いと考えられる。

そこでまず、身近でかつ安価なアミンであるアミノ酸を用い、Acr との反応性に焦点を当てて、その抗酸化性について検討した。特に、スフィンゴイド塩基の体内合成においては、セリン(Ser)は合成基質となっている。またスレオニン(Thr)の化学構造は Ser に炭素が1つ伸長したアミノ酸である(Fig. 41)。そのため第1節では Ser と Thr によるアミノ酸を用いて検討を行った。

Fig. 47 に示されているように、SGA はアミノ基1個とヒドロキシ基2個を持つアミンであるため、そのアミノ基がアミノカルボニル反応に関わっていると考えられる。一方で、ヒドロキシ基が抗酸化活性に影響するかどうかについてはわかっていない。もし影響する場合はその点について検討することで、SGA が示す強い抗酸化活性の作用機構解明につながるばかりでなく、今後ヒドロキシ基を持つアミン、即ちアルコールアミンに着目した検討を進めることができる。そこで、第2節では、ヒドロキシ基の有無がアミンの抗酸化活

性に与える影響を比較検討するため、プチルアミン(Ami)と 1-アミノ-2-ブタノール(AmiOH)を用いて検討を行った。また、ヒドロキシ基の数にも着目し、ヒドロキシ基を 2 個有するセリノール(Ser-ol)と 3 個有するフィトスフィンゴシン(Phyt)を用いた検討も行った(Fig. 47)。

また、アミノ基のみを持つアミンについても検討を行った。第 2 節で用いた Ami にメチル基のついたイソペンチルアミン(Iso)や SGA と同様の炭素数を持つオクタデシルアミン(Oct)、またアミノ基を 4 個持ったスペルミンを用い、特に複数のアミノ基の抗酸化活性への影響に着目した検討を第 3 節で行った。

これまでは、アミノ化合物の SGA と α T の共存下での抗酸化性に関する検討を主に行ってきた。しかし α T の同族体は複数存在しており、大きくはトコフェロールとトコトリエノール(T3)の 2 つに分けられ、さらに各々 α , β , γ , δ 体が存在するため、計 8 つのビタミン E 同族体が存在する。そこで第 4 節では α T 以外の同族体も含め、その抗酸化活性への影響についても検討した。

第 1 節 アミノ酸の抗酸化活性

実験方法

4-1-1 試料及び試薬

1-1-1、2-2-1 と同様のものを用いた。油脂は魚油を用いた。なお、セリン(Ser)は純度 99% 特級試薬を関東化学(株)から、スレオニン(Thr)は純度 99%特級試薬のものを和光純薬(株)から購入した。それぞれのアミノ酸の化学構造は Fig. 41 に示した。

4-1-2 油脂の精製

1-1-2 と同様に行った。

4-1-3 精製除去の確認

1-1-3 と同様に行った。

4-1-4 サンプル調製

基本的に 1-1-5 と同様に行った。なお、Ser、Thr はどちらもメタノール：水=3:2 に溶かし、これまで用いてきた 1 サンプル当たりの SGA の添加量 3 mg に相当する mol 量、即ち 1 サンプル当たり 9.95×10^{-6} mol の添加ができるよう溶液の調製を行った。本実験ではアミノ化合物として上述のアミノ酸だけを用い、以下の 4 つのグループを設け、それぞれ $n=3$ にて酸化実験を行った。

1 グループ目： TAG 300 mg + Ser 9.95×10^{-6} mol

2 グループ目： TAG 300 mg + Thr 9.95×10^{-6} mol

3 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + Ser 9.95×10^{-6} mol

4 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + Thr 9.95×10^{-6} mol

4-1-5 GC-TCD による酸化評価

1-1-6 と同様の方法で行った。

4-1-6 HS-GC による酸化評価

1-2-4 と同様の方法で行った。

4-1-7 水中分散系での Acr とセリンの反応性の確認

4-1-4 で調製した Ser 1 ml をバイアル瓶に加え、エタノールに溶解させた Acr 1.07×10^{-6} mol を添加し、4-1-6 と同様の測定機器を用いて、50℃暗所における反応後の Acr 残存量を分析した。コントロールとして、Ser を含まないバイアル瓶にメタノール:水=3:2 の溶液 1 ml と Acr 1.07×10^{-6} mol を含むグループも用意した。グループの概要は以下のとおりであり、各グループは n=3 にて反応を行った。

1 グループ目： Acr

2 グループ目： Ser+Acr

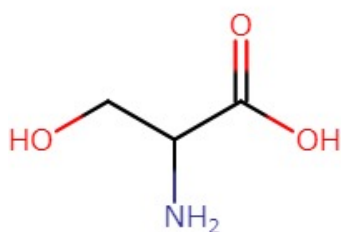
結果及び考察

Fig. 42 A は酸素残存率を B は揮発性成分総量を示したグラフである。第 1 章 1 節の Fig. 4 A で示されているように、 α T が存在していても魚油 TAG の酸化安定性は低く、50°C、50 時間のインキュベートにより、速やかに酸化されることが分かっている。これに対して SGA のようなアミノ化合物を α T と共存させると魚油 TAG の酸化安定性は著しく向上した。しかし、Ser と Thr を魚油 TAG に添加した場合には、 α T と併用添加しても、50 時間以内に魚油 TAG のほとんどが酸化されてしまった。酸化初期に生成する Acr と Pro の生成量を分析した結果(Fig. 43 と 44)からも、Ser と Thr は魚油 TAG に対し、全く抗酸化性を示さないことがわかった。アミノ基を持つアミノ酸は Acr との反応が可能であり、この反応により Acr の検出量が少なくなると予想していたが、 α T の有無に関わらず Pro よりも多くの Acr が検出される結果となった。酸化 48 時間後において各グループ間で Acr 及び Pro の生成量を比較したグラフが Fig. 45 A と B であるが、各酸化グループ間での大きな違いも見られなかった。通常 SGA を添加した場合、最初は SGA の疎水性が低いため油に不溶で、SGA の粉末を油脂中に見ることができる。しかし、Acr とのアミノカルボニル反応が進行するとともに SGA 粉末は消失し、油脂が黄色となる。この黄色はメイラード反応物に由来すると考えられる。一方、今回用いたアミノ酸は両方とも 48 時間の経過後、沈殿した状態で残存し、油脂の着色も見られなかった。Fig. 41 にアミノ酸と SGA の化学構造を示したが、それぞれの官能基に着目した場合、SGA はアミノ基(NH₂)を 1 個とヒドロキシ基(OH)を 2 個有する。一方、Ser と Thr にはアミノ基(NH₂)1 個、ヒドロキシ基(OH)が 1 個というように SGA に比べヒドロキシ基が 1 つ分少ないものの、代わりにカルボキシ基(COOH)1 個を持っている。一般的に、カルボキシ基はカルボニル基 1 個とヒドロキシ基 1 個に由来する強い極性を持ち、カルボキシ基同士が水素結合を形成するといわれている(ボルハルト・ショアー現代有機化学 2011)。このような極性の高さからアミノ酸 Ser と Thr は SGA とは異なり、油脂に

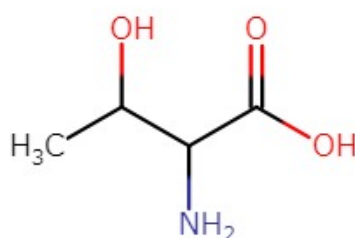
分散せずに Acr との反応が進まず、結果的に抗酸化活性が示されなかったと考えられた。

そこで、アミノ酸と親和性の高いメタノール水溶液を用い、アミノ酸と Acr との反応性について検討した。その結果(Fig. 46)、50℃で2時間半反応させた後、Ser を含むグループで Acr の残存量が大きく減少することが分かった。このような結果から、Ser と Acr には反応性があることが分かった。湯木ら(1974)は、アミノ酸及びそのエステル誘導体の抗酸化性に関する研究ではこれらの化合物の油脂に対する溶解度が小さいため、主としてリノール酸メチルを基質とするエマルションまたはリノール酸を基質とするアルコール溶液などの含水系で実験を行うべきと述べている。アミノ酸と Acr との親水性溶液での反応性試験やこのような過去の報告から、本検討で用いたアミノ酸が魚油に対して抗酸化性を持たず Acr の生成を抑制しなかった理由は、疎水性である油脂との親和性が低かったためだと考えられる。そのためアミノ酸を用いた抗酸化法はエマルション系において適切だと考えられる。

Serine (Ser)



Threonine (Thre)



Sphinganine (SGA)

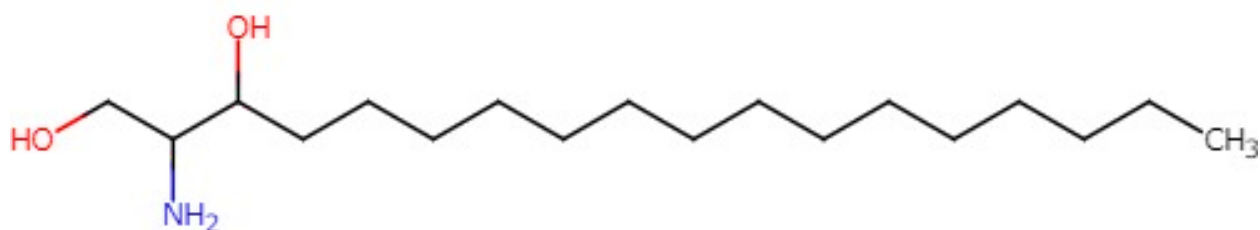


Fig. 41 Chemical structures of serine (Ser), threonine (Thre) and sphinganine (SGA).

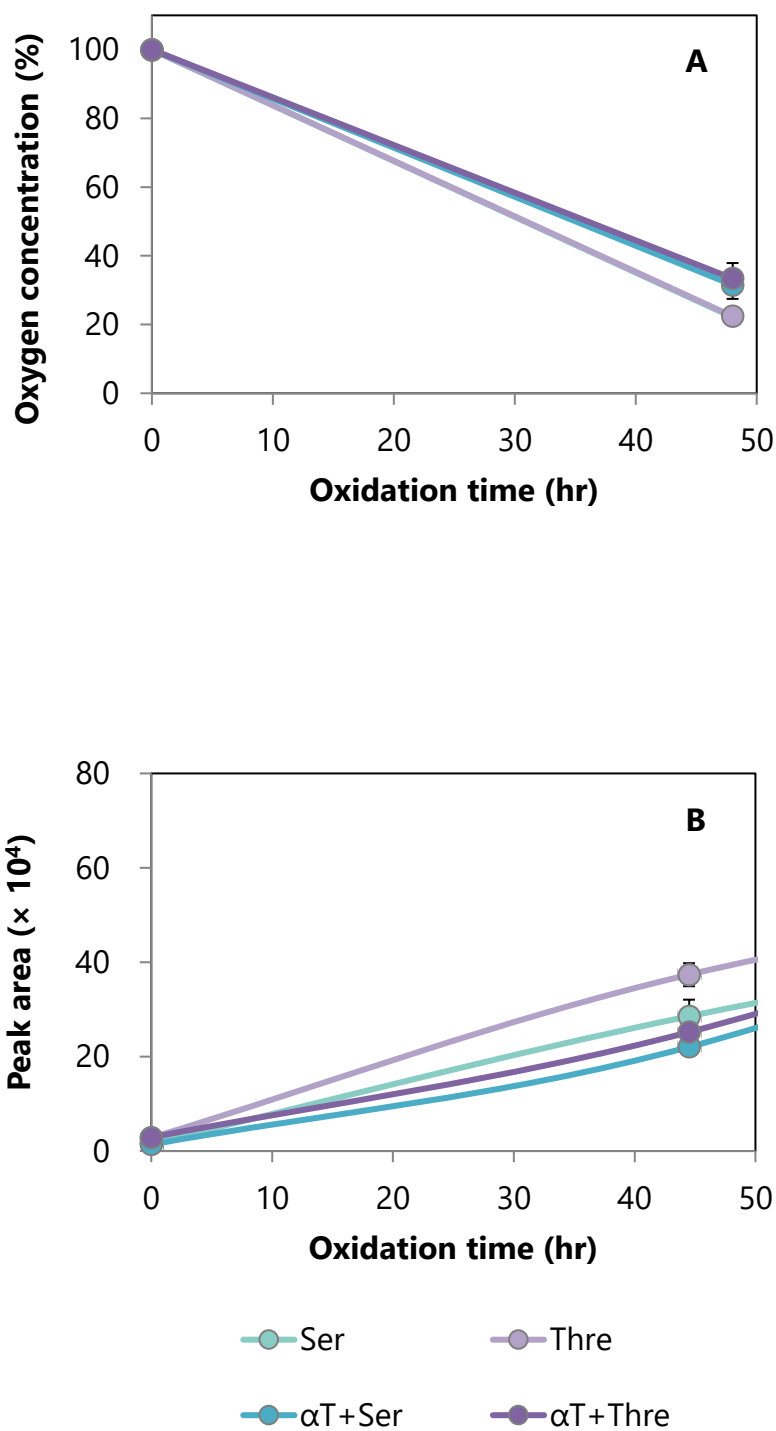


Fig. 42 Effect of serine and threonine on the oxidative stability of fish oil TAG without or with α -tocopherol(α T). The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen (A) and the increase in total volatiles (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments. Each amine was added at same molar concentration.

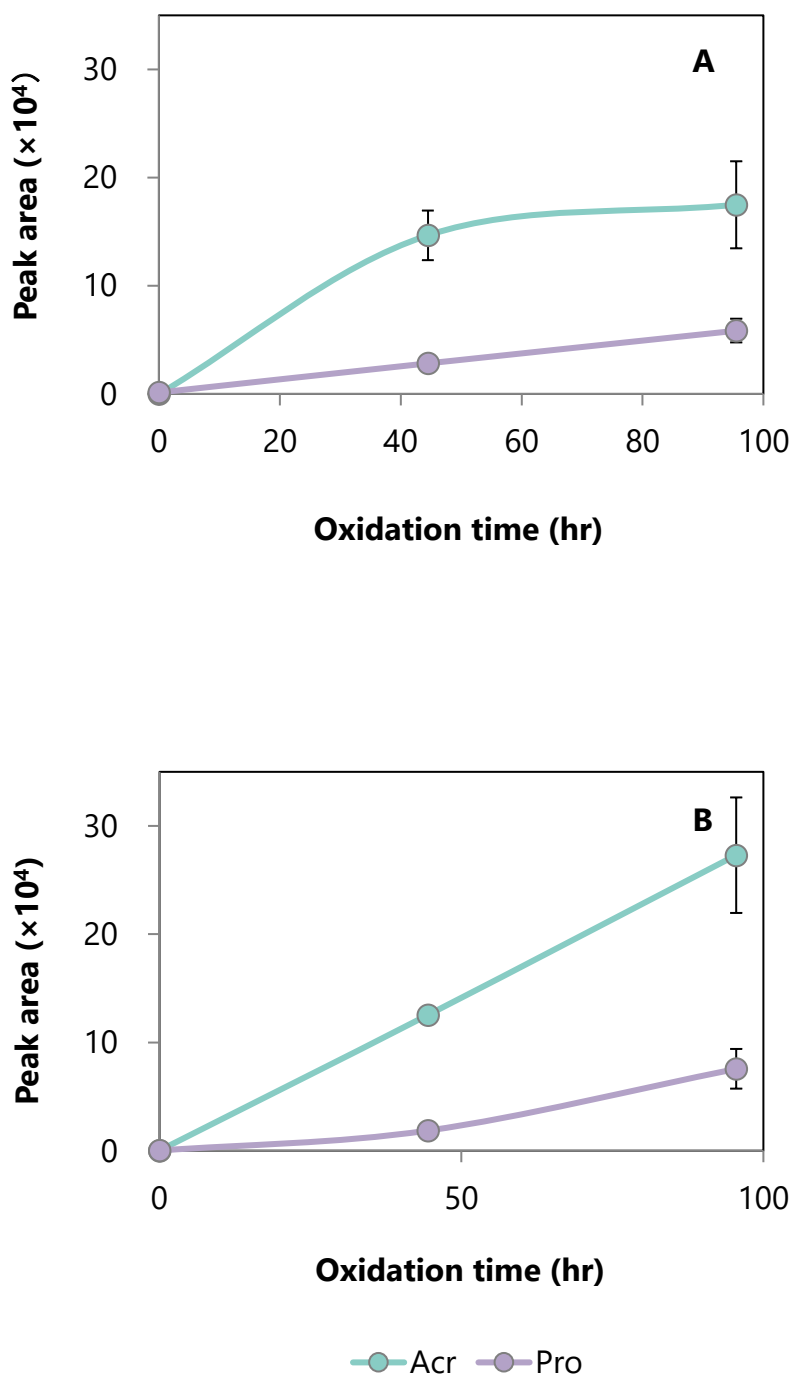


Fig. 43 Effect of serine on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation without (A) or with (B) α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

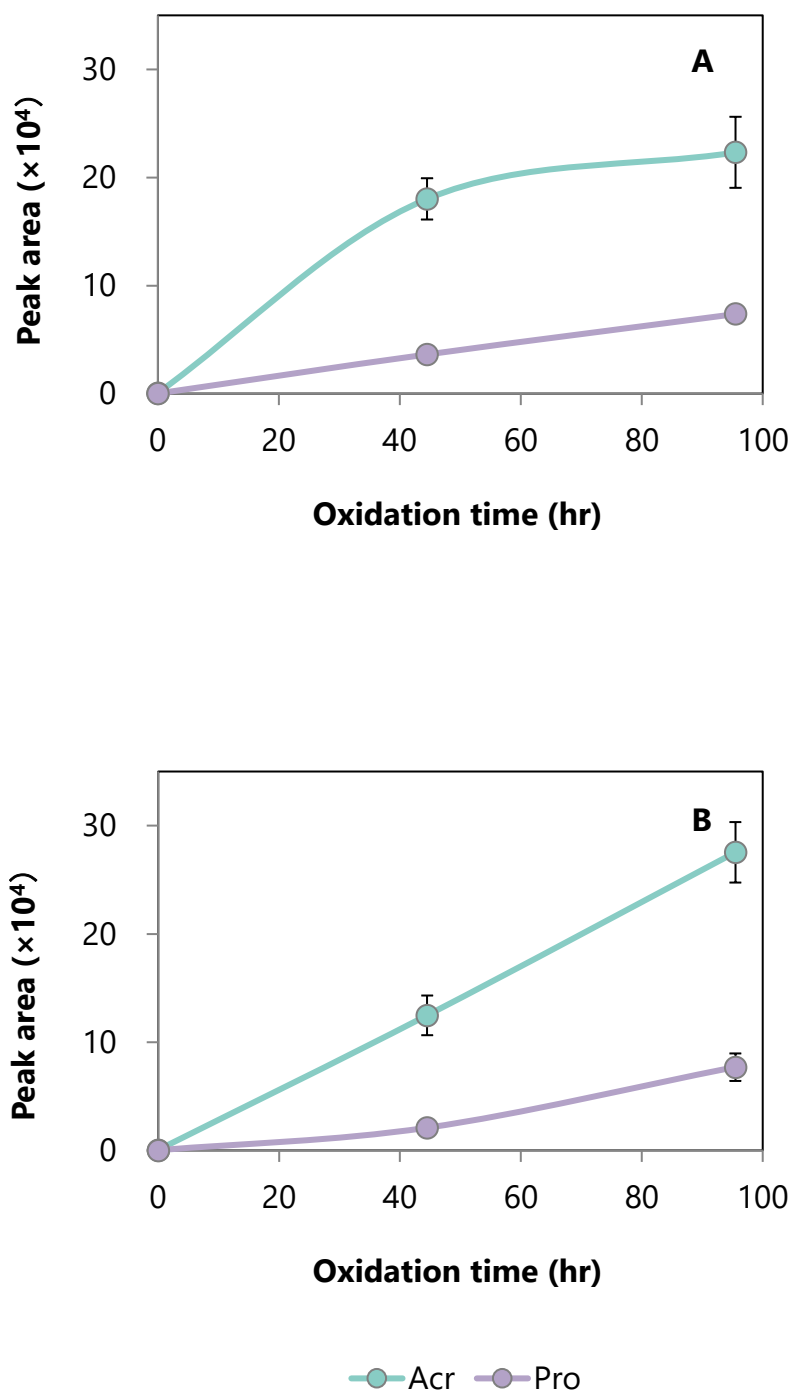


Fig. 44 Effect of threonine on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation without (A) or with (B) α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

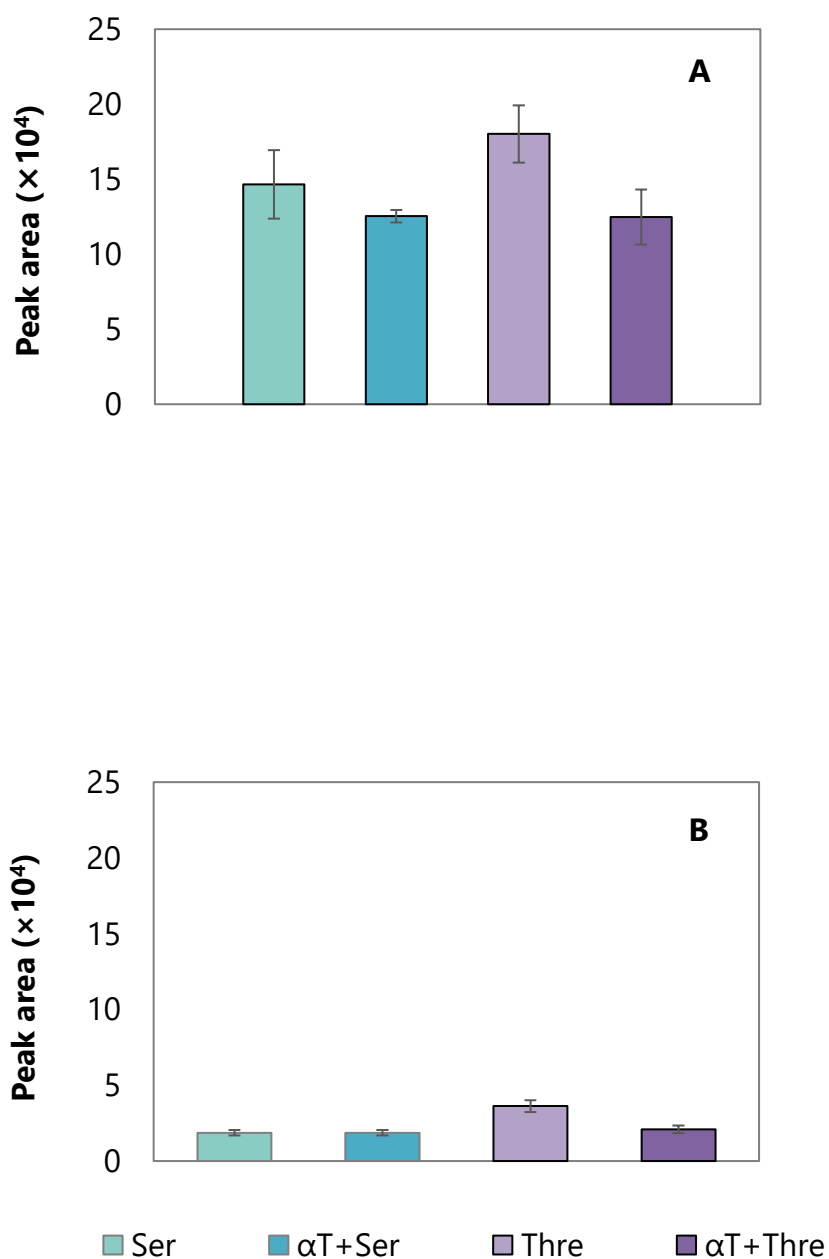


Fig. 45 Formation of acrolein (Acr) (A) and propanal (Pro) (B) in the oxidation of fish oil TAG after 48 hr incubation in the presence of serine (Ser), threonine (Thre), Ser + α T, and Thre + α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

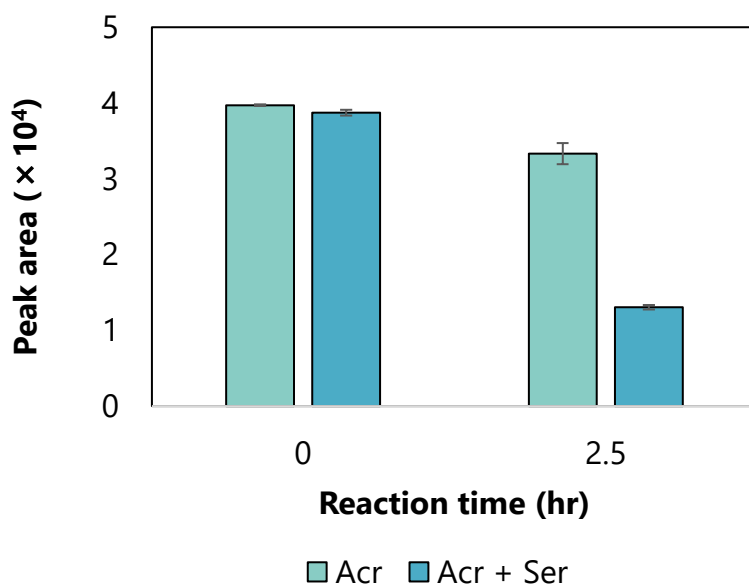


Fig. 46 Reactivity of serine (Ser) with acrolein (Acr) in aqueous phase. The data shows the peak area of acrolein (acr) after the incubation of Acr with or without Ser. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

第2節 ヒドロキシ基を持つアミンの抗酸化活性

実験方法

4-2-1 試料及び試薬

1-1-1 と同様のものを用いた。油脂は魚油を用いた。なお、ブチルアミン(Ami)、1-アミノ2-ブタノール(AmiOH)、は和光純薬(株)から購入した。セリノール(Ser-ol)および フィトスフィンゴシン(Phyt)は東京化成工業(株)から購入した。各種化学構造は Fig. 47 に示した。

4-2-2 油脂の精製

1-1-2 と同様に行った。

4-2-3 精製除去の確認

1-1-3 と同様に行った。

4-2-4 サンプル調製

基本的に 1-1-5 と同様に行った。なお Ami や AmiOH はエタノール、Ser-ol はメタノール、Phyt は SGA と同様にクロロホルム:メタノール=7:3 を用いて溶液を調製した。各種アミンの抗酸化活性を正確に測定するため、すべて同じ mol 量が添加されるよう 4-1-4 で述べたように 1 サンプル当たり 9.95×10^{-6} mol となるよう各種溶液を調製した。ほとんどは最終的に溶液を窒素気流下で留去したが、Ami や AmiOH の試薬は揮発性が高いため、エタノール溶液を含有したサンプルをそのまま酸化実験に用いた。なお Ami および AmiOH はエタノールも含めトータル 2 μ l の添加量にした。サンプル数が多かったため 2 回に分けて行った。前半は 6 グループ、後半は 8 グループを設け n=3 で行った。

【前半】

- 1 グループ目： TAG 300 mg + Ami 9.95×10^{-6} mol
- 2 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + Ami 9.95×10^{-6} mol
- 3 グループ目： TAG 300 mg + AmiOH 9.95×10^{-6} mol
- 4 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + AmiOH 9.95×10^{-6} mol
- 5 グループ目： TAG 300 mg + SGA 9.95×10^{-6} mol
- 6 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + SGA 9.95×10^{-6} mol

【後半】

- 1 グループ目： TAG 300 mg
- 2 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg
- 3 グループ目： TAG 300 mg + Ser-ol 9.95×10^{-6} mol
- 4 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + Ser-ol 9.95×10^{-6} mol
- 5 グループ目： TAG 300 mg + Phyt 9.95×10^{-6} mol
- 6 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + Phyt 9.95×10^{-6} mol
- 7 グループ目： TAG 300 mg + SGA 9.95×10^{-6} mol
- 8 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + SGA 9.95×10^{-6} mol

4-2-5 GC-TCD による酸化評価

1-1-6 と同様の方法で行った。

4-2-6 HS-GC による酸化評価

1-2-4 と同様の方法で行った。

結果及び考察

アミノ化合物としては Ami、AmiOH 及び SGA を用い、ヒドロキシ基の有無に着目したアミンの抗酸化性に着目した検討を行った。Fig. 48-51 にこれらのアミノ化合物の抗酸化活性について示した。Fig. 48 の(A)は酸素残存率、(B)は揮発性成分総量、Fig. 49-51 は酸化初期に生成する Acr 及び Pro の揮発性成分量を示したグラフである。

Fig. 48 A, B の結果からアミンの単独添加における魚油 TAG の酸化安定性は、 $[SGA] < [Ami] < [AmiOH]$ の順に高くなった。一方 αT との併用添加で比較を行った際、単独添加とは異なり、 $[\alpha T + Ami] < [\alpha T + SGA] < [\alpha T + AmiOH]$ の順となり、 αT 存在下においては SGA の方が Ami よりも抗酸化効果が高くなった。つまり、単独添加における抗酸化活性は αT との併用添加のそれとは必ずしも一致しないことがわかった。今回用いた Ami と AmiOH は炭素数やアミノ基数が全く同じであるが、単独添加ではヒドロキシ基を持つ AmiOH の抗酸化効果の方が若干高く、 αT との併用効果では、AmiOH で魚油 TAG の酸化安定性が著しく高くなったのに対し、Ami では αT と併用してもその抗酸化効果の増大は AmiOH ほどではなかった。このように αT による飛躍的な抗酸化活性の増大は、ヒドロキシ基を持たないアミンである Ami よりもヒドロキシ基を持つ SGA や AmiOH の方でより大きく示された。そのためヒドロキシ基を持つようなアルコールアミンと Acr のようなアルデヒドとのアミノカルボニル反応生成物がその抗酸化活性を示すのに、 αT は重要な役割を果たすと考えられた。また、アミノ化合物無添加時には、酸化初期においては Acr のほうが Pro よりも生成量が多いが、Ami と AmiOH を添加した場合には、Acr の生成が Pro よりも抑制された(Fig.49-51)。こうした Acr と Pro の生成量の特徴は SGA 添加でも見られた。これらの結果より、Ami、AmiOH、SGA といったアミノ化合物は、Pro よりも Acr との反応性の方が高く、Acr との反応生成物が生じ、それが抗酸化活性に作用したと考えられた。

次に、ヒドロキシ基の数や炭素数の違いに着目した検討を行った。Fig. 52 は Ser-ol、Phyt

及び SGA の魚油 TAG に対する抗酸化効果を分析したもので、Fig. 52 の(A) は酸素残存率を示し、(B)は揮発性成分総量を示している。また Fig. 53-56 は酸化初期に生成する Acr と Pro 量を示したグラフである。

Fig. 52 A, B から、Ser-ol、Phyt、SGA の単独添加による効果の違いはほとんど観察されなかった。 α T と併用した場合には、 $[\alpha T + \text{Ser-ol}] < [\alpha T + \text{Phyt}] < [\alpha T + \text{SGA}]$ の順で魚油 TAG の酸化安定性が向上した。なお Fig. 53-56 からアミンを添加したグループでは酸化初期において Acr の生成抑制が見られた。Phyt は Fig. 47 で示したように SGA と類似の化学構造を有し、SGA よりもヒドロキシ基が 1 個多い。両者の α T 存在下での抗酸化性を比較した場合、Phyt の抗酸化活性は SGA よりも若干低かった。一方、Fig. 48 に示したように、ヒドロキシ基を 1 個持つ AmiOH と 2 個持つ SGA の抗酸化活性を α T 存在下で比較した場合、AmiOH の方がより強い抗酸化活性を示した。このような結果から、 α T 存在下でより強い抗酸化活性をアミノ化合物が示すためには、アミノ化合物中にヒドロキシ基が存在することは重要であるが、活性の強弱はヒドロキシ基数に対応して増大するわけではないことが示された。

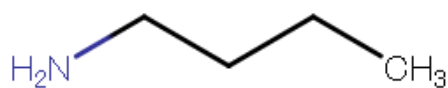
Ser-ol と SGA の化学構造を比較した場合(Fig. 47)、SGA は Ser-ol に炭素数 15 のアルキル鎖を付け足したような構造をとっており、 α T 存在下の抗酸化活性は SGA の方が強い。SGA は Ser-ol と比較して親油性が高く、これによって、SGA の方が Ser-ol よりも抗酸化活性が高く示されたと考えられた。一方で、ヒドロキシ基 1 個を有する炭素数 4 個の AmiOH とヒドロキシ基を 2 個を有する炭素数 18 個の SGA の抗酸化活性を比較すると(Fig. 48)、単独添加及び α T との併用いずれの場合でも、AmiOH は SGA よりも強い抗酸化活性を示した。

アルコールアミンが示す抗酸化活性におけるヒドロキシ基の作用は以下のことが推測された。ヒドロキシ基はプラスとマイナスの両方の効果を持ち、その両作用が総じて抗酸化活性に影響すると考えられた。プラスの効果において、AmiOH は極性が高い化合物である

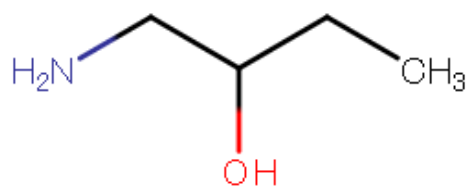
にもかかわらず、単独添加でヒドロキシ基を持たない Ami よりも強い抗酸化活性を示している。詳細なメカニズムは不明であるが、これはヒドロキシ基によるプラスの作用だと考えられる。一方でマイナスの効果において、 α T 存在下でヒドロキシ基の数が 3 個(Phyt)よりも 2 個(SGA)、2 個(SGA)よりも 1 個(AmiOH)というように、ヒドロキシ基の数が少なくなるほど強い抗酸化活性が示されている。加えて、AmiOH 以外のアルコールアミン即ちヒドロキシ基を 2 個以上持つ化合物においては、 α T 非存在下で全く抗酸化力が示されていない。このような結果から、ヒドロキシ基はアルコールアミンの極性に影響し、結果として油脂への分散が難しく抗酸化活性が示されなかったと考えられる。また第 3 章 1 節の考察で述べたとおり、 α T は界面活性の作用も有するため、 α T がそのヒドロキシ基によるマイナスの効果を打ち消す役割を示し、 α T 存在下でアルコールアミンは強力な抗酸化活性が示されたと考えられる。以上から、ヒドロキシ基は極性を高めるという点でマイナスの効果を与えると考えられる。よってヒドロキシ基によるこの 2 つの作用が抗酸化活性に影響すると考えられ、その作用が総和として、AmiOH で最も強い抗酸化活性が示されたと考えられる。

Saito ら(1997)は、PL 中のアミノ基に着目し、イワシ油酸化に対する様々なアミンやアルコールアミンを用いた検討を行った。その結果、ヒドロキシ基の存在により、アミンの抗酸化活性が増大することを見出した。このような報告からも、アミノ化合物中にヒドロキシ基を持つことは重要であると考えられるが、本検討で示したように、ヒドロキシ基の数の多さと抗酸化活性の強さに正の相関はなく、むしろ増えることで抗酸化活性が低く示されたため、ヒドロキシ基はプラスとマイナスの 2 つの効果を有しており、それが総じて抗酸化活性に影響すると考えられた。そのため、アミノ化合物やアルデヒドとで生じるアミノカルボニル化合物の極性と反応性、そして α T との相互作用などが、アミノ化合物の抗酸化活性に大きく影響を及ぼすものと推測できた。

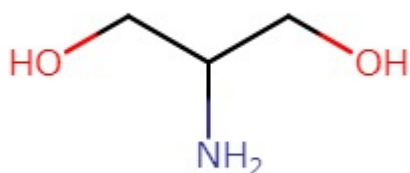
Butylamine (Ami)



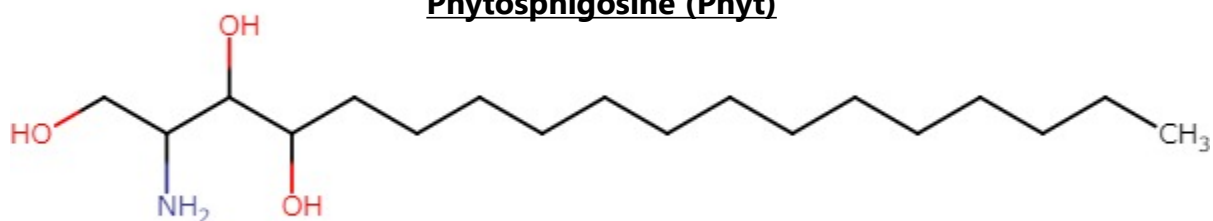
1-Amino-2-Butanol (AmiOH)



Serinol (Ser-ol)



Phytosphingosine (Phyt)



Sphinganine (SGA)

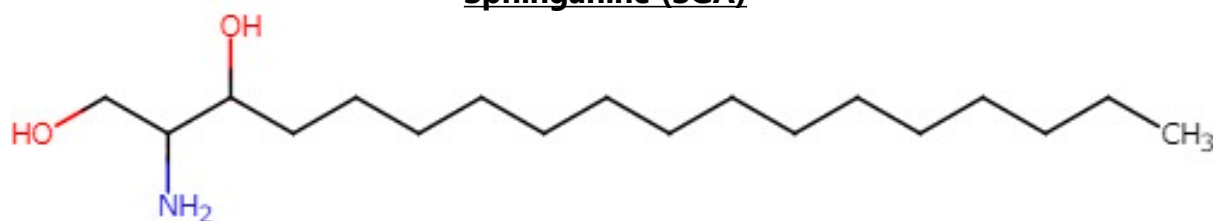


Fig. 47 Chemical structures of 1-amino-2-butanol (AmiOH), butylamine (Ami), serinol (Ser-ol), phytosphingosine (Phyt) and sphinganine (SGA).

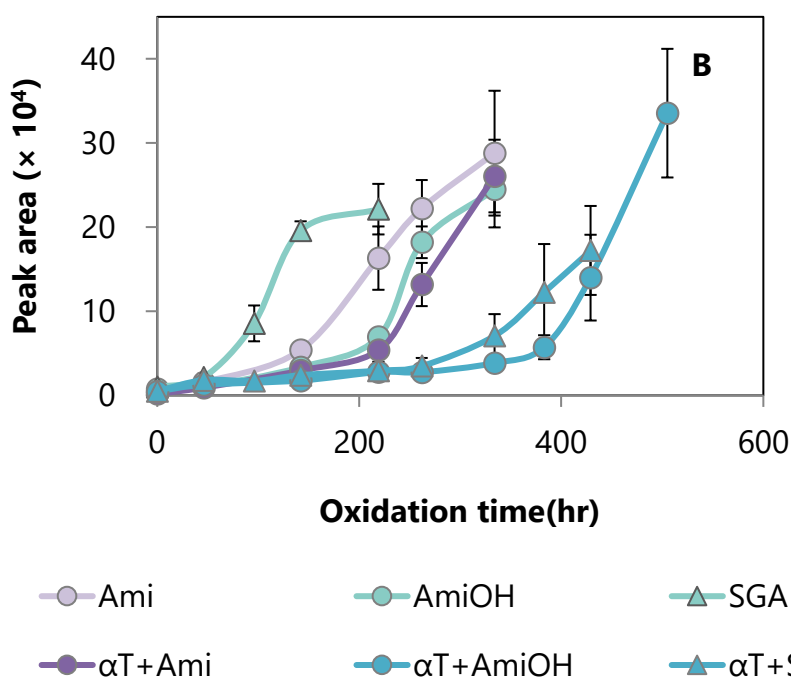
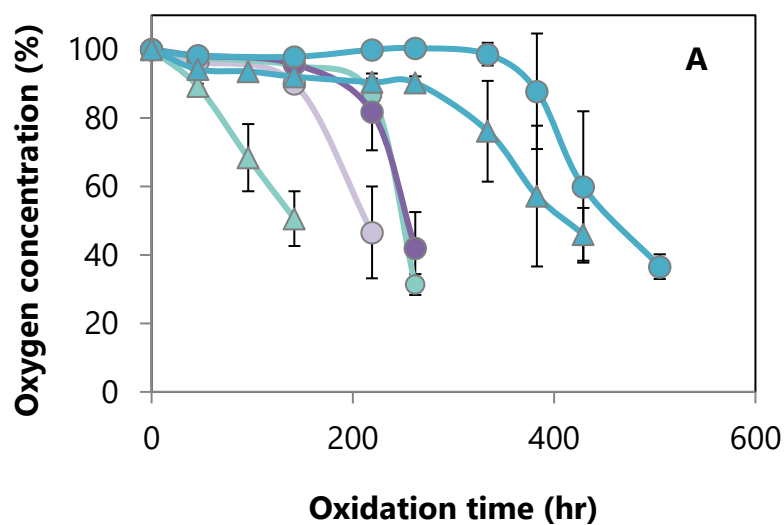


Fig. 48 Effect of amino alcohols on the oxidative stability of fish oil TAG with or without α T. Butylamine (Ami) was used. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen (A) and the increase in the total volatiles (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

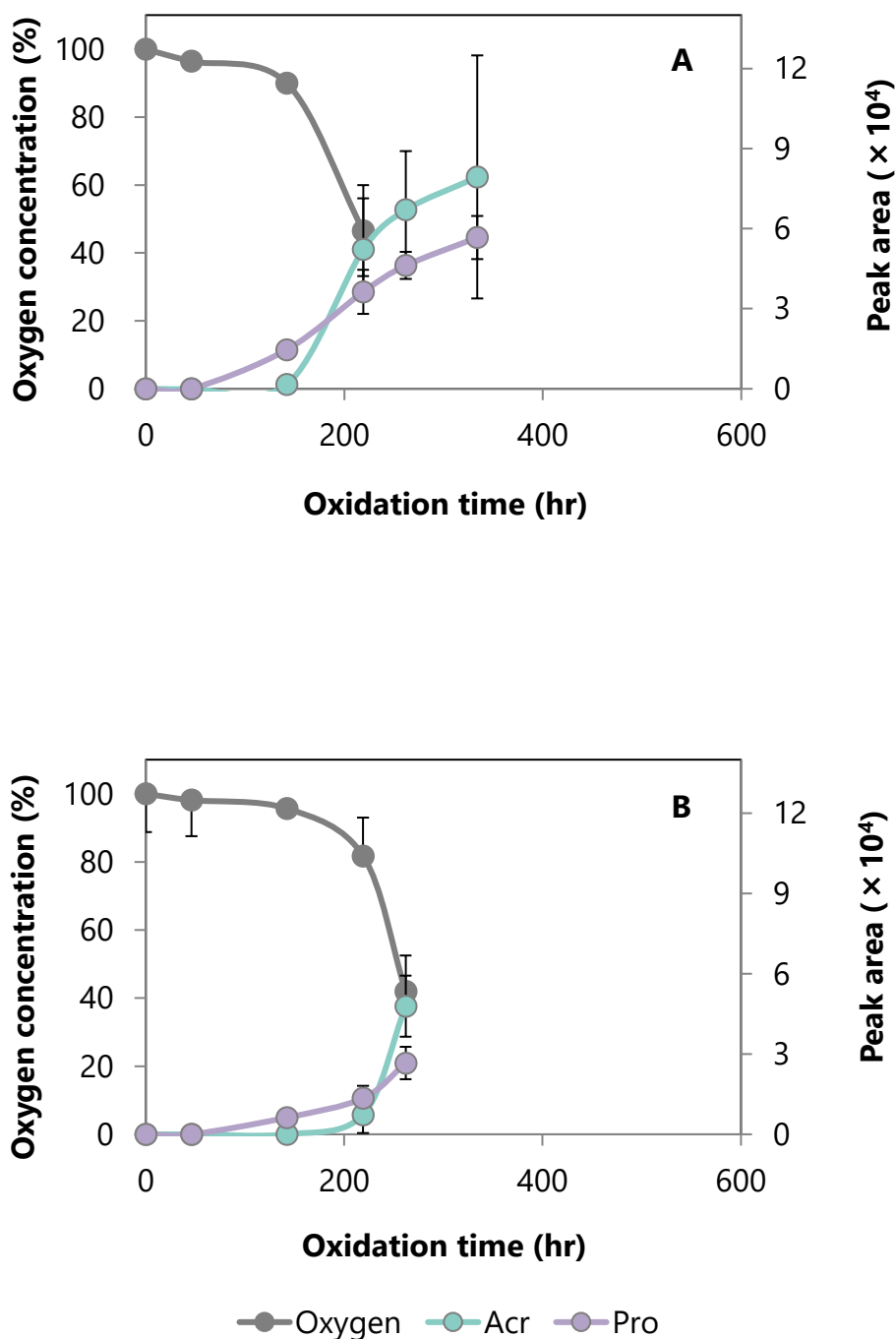


Fig. 49 Effect of butylamine on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation without (A) or with (B) α T. The figures show the both changes in oxygen concentration and aldehyde formation. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

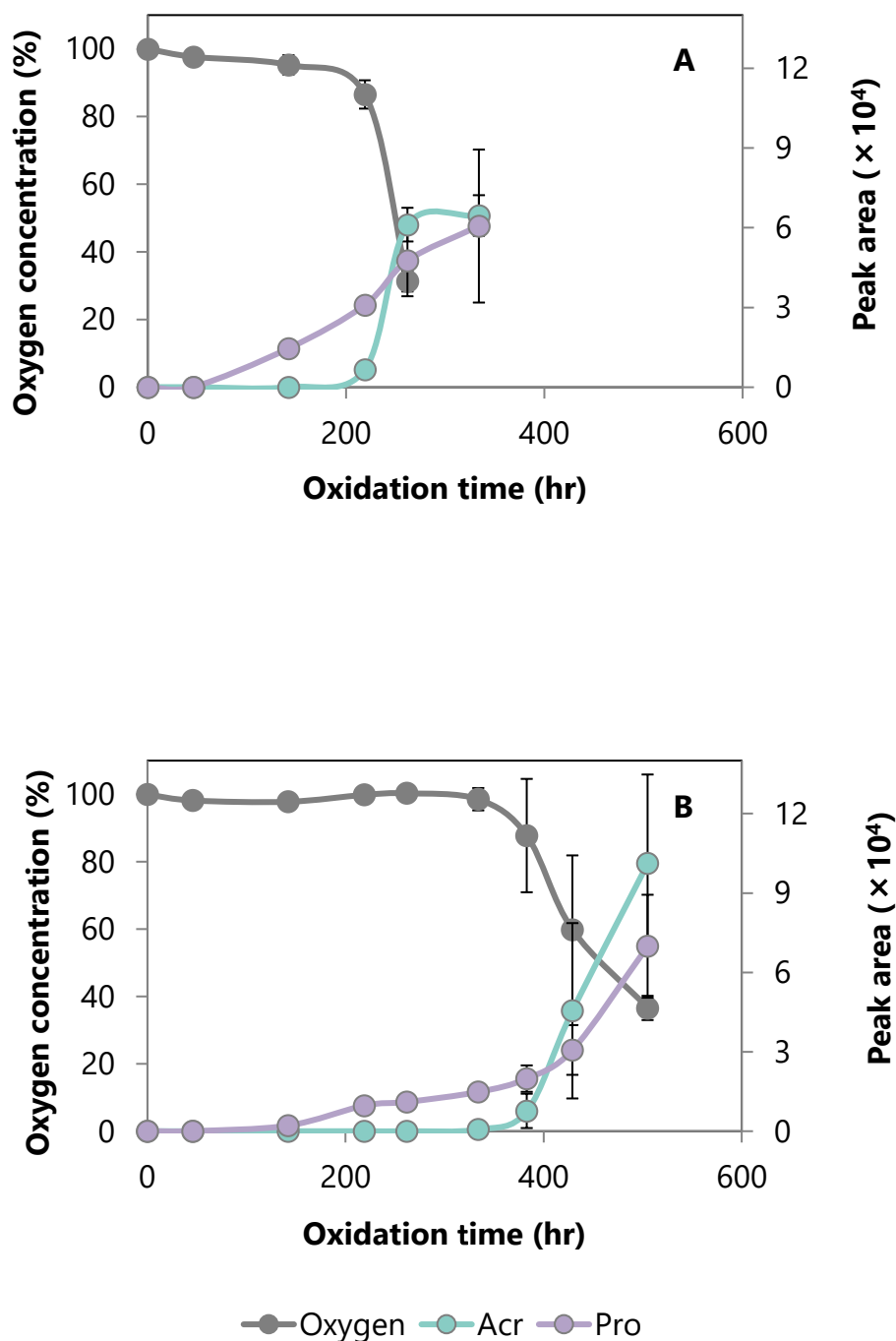


Fig. 50 Effect of 1-amino-2-butanol on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation without (A) or with (B) α T. The figures show the both changes in oxygen concentration and aldehyde formation. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

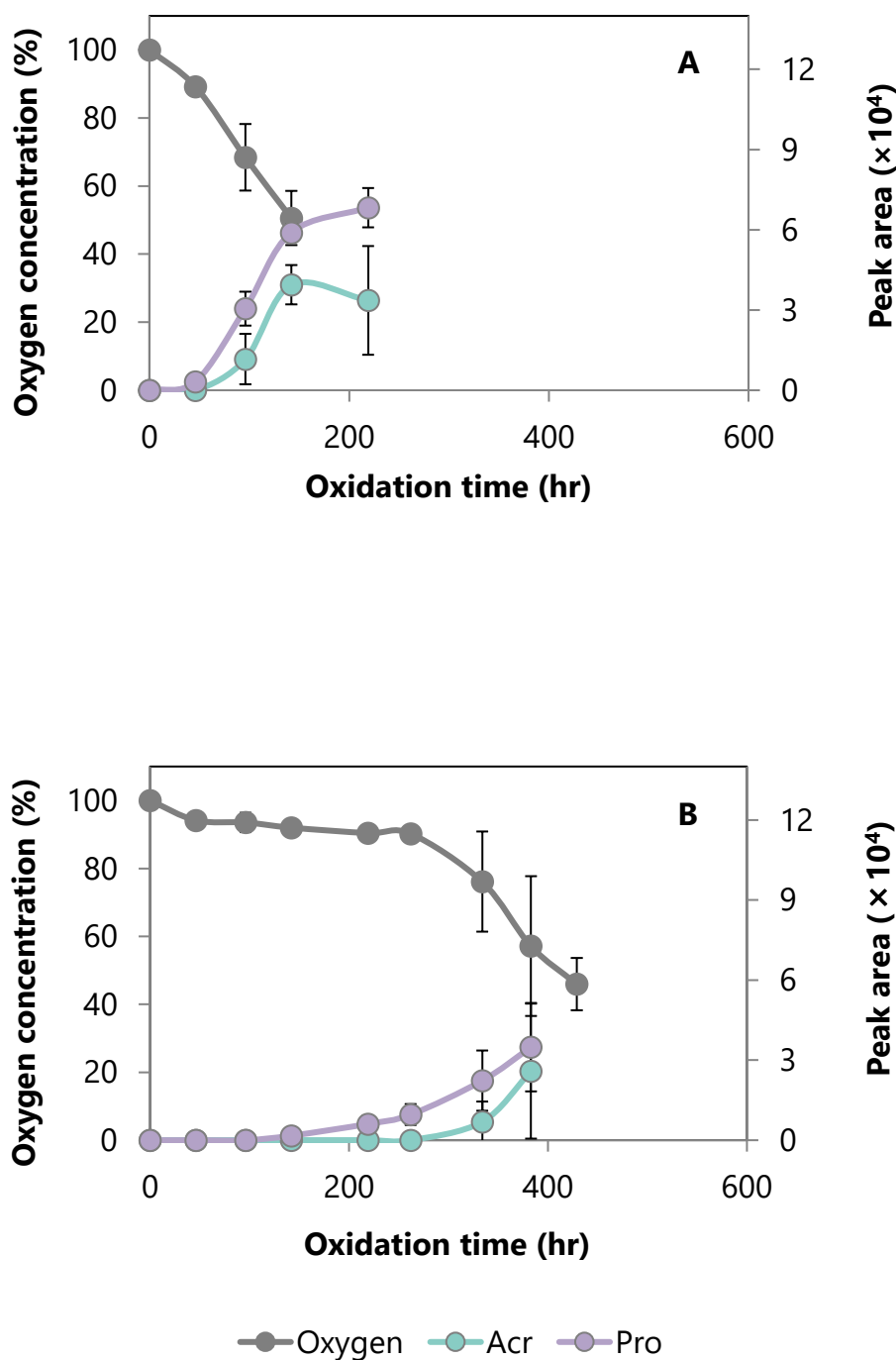


Fig. 51 Effect of SGA on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation without (A) or with (B) α T. The figures show the both changes in oxygen concentration and aldehyde formation. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

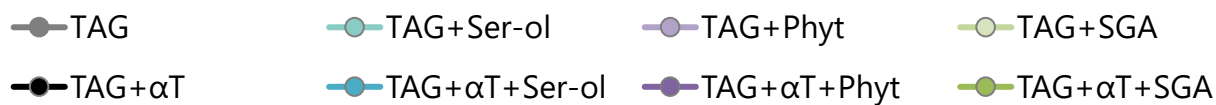
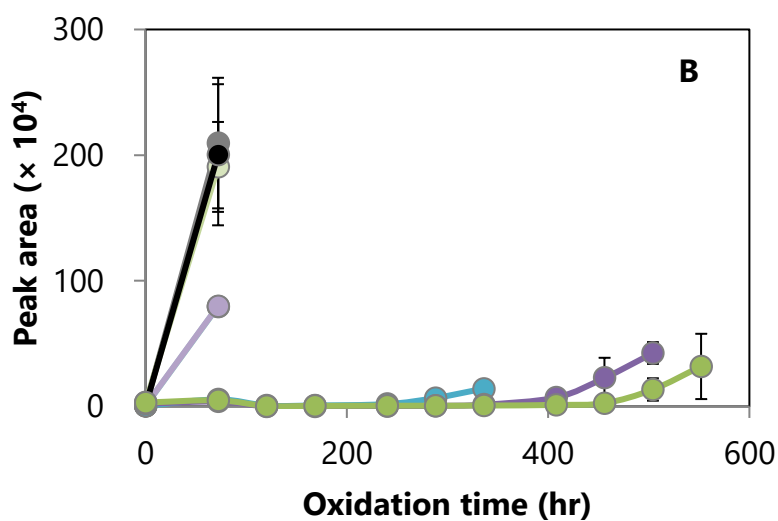
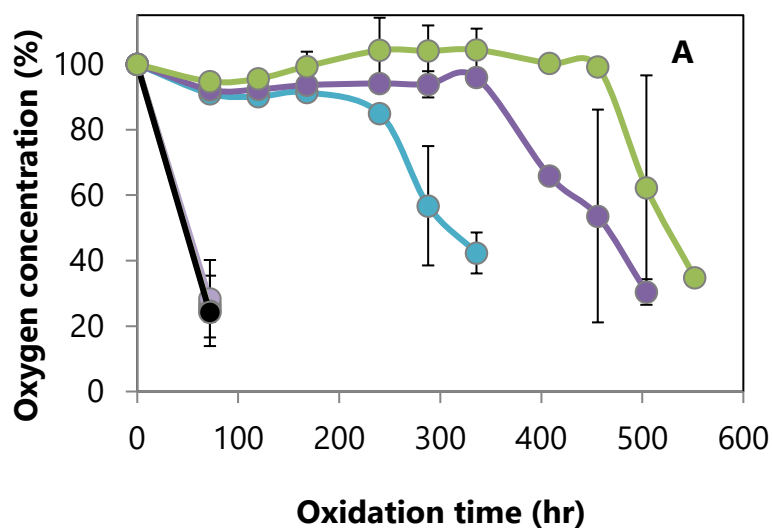


Fig. 52 Effect of amines having different numbers of OH group and carbon on the oxidative stability of fish oil TAG with or without α T. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen (A) and the increase in the total volatiles (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

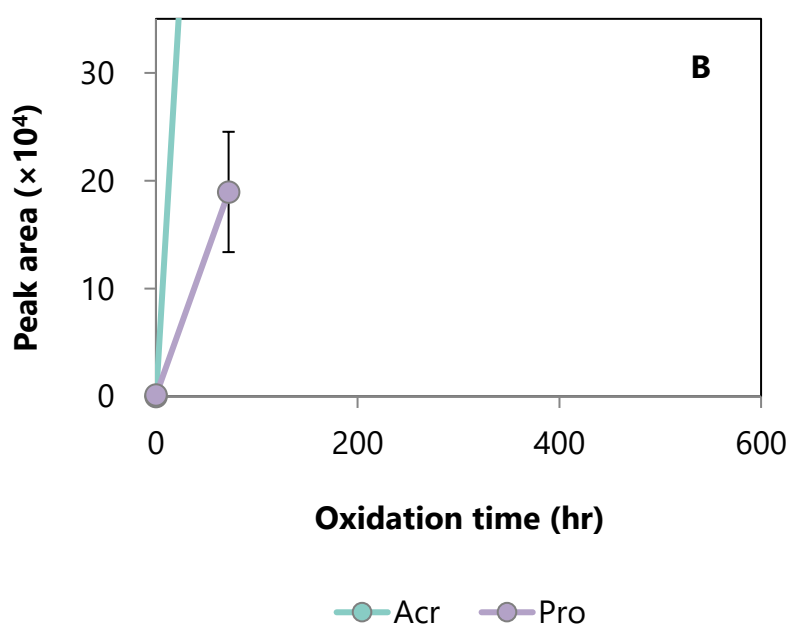
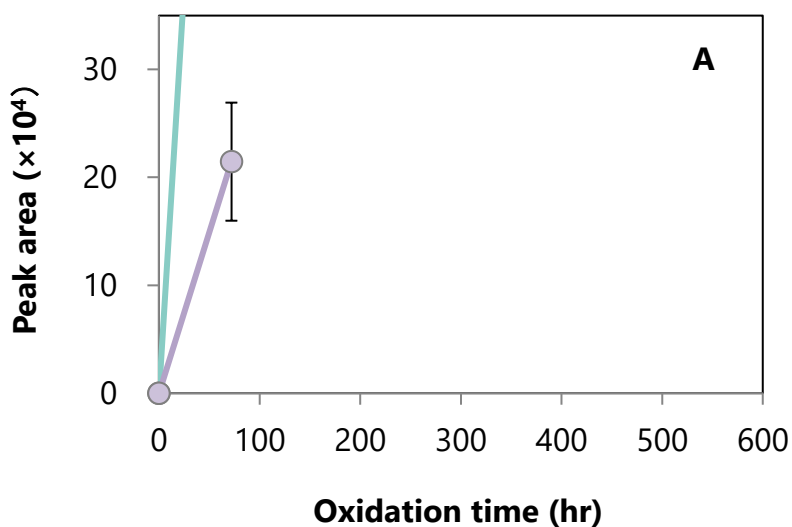


Fig. 53 Formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the oxidation of fishoil TAG in the absence (A) and presence (B) of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

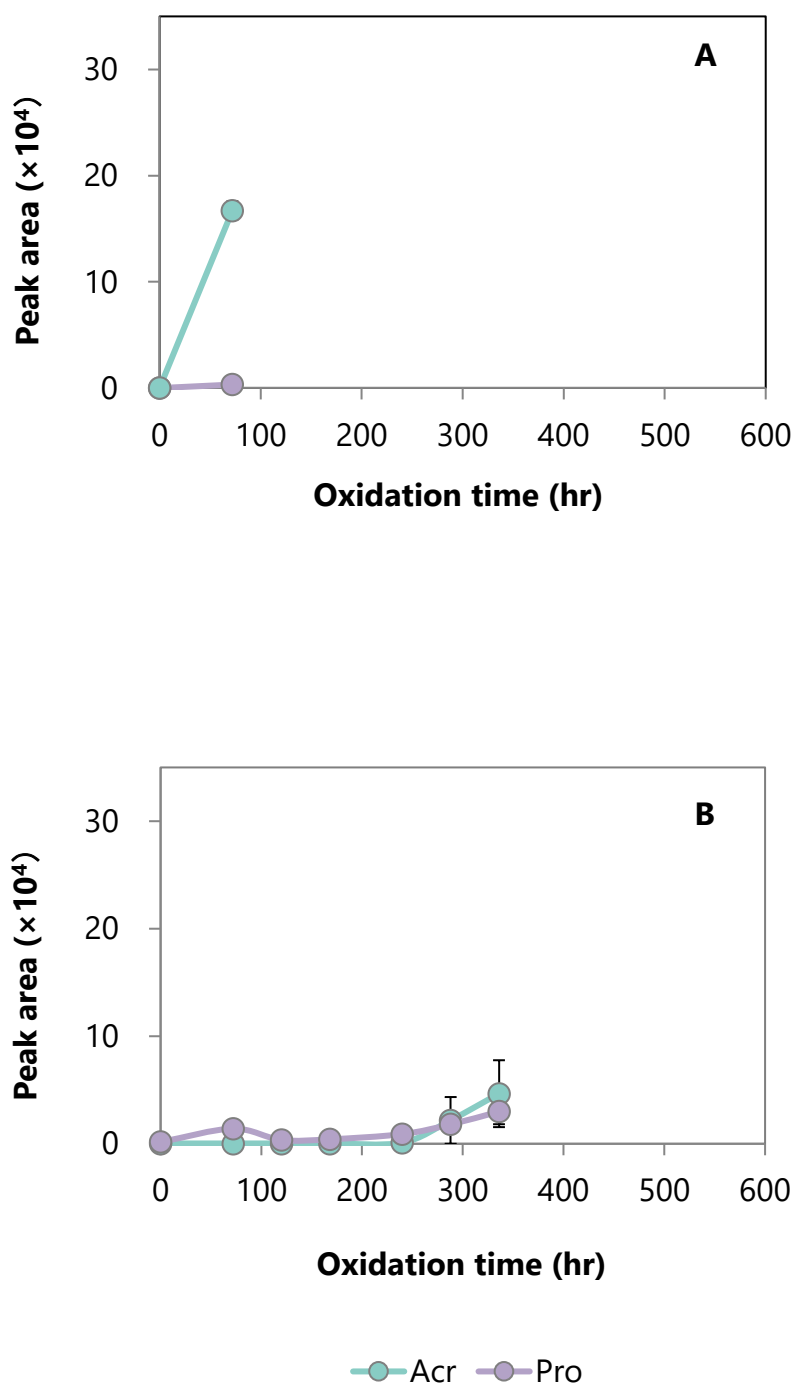


Fig. 54 Effect of serinol on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the absence (A) and presence (B) of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

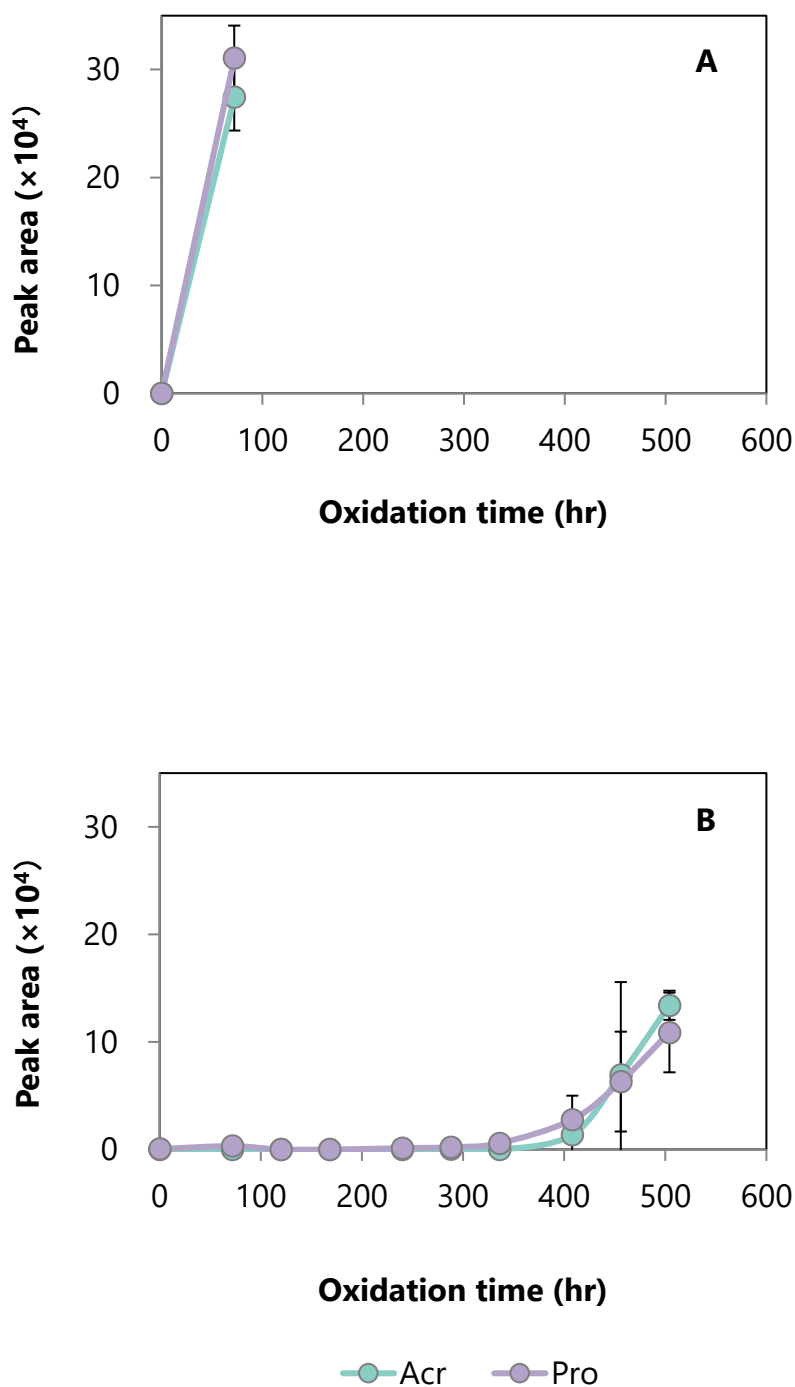


Fig. 55 Effect of phytosphingosine on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the absence (A) and presence (B) of αT. The data were expressed as the mean ± SD of three separate experiments.

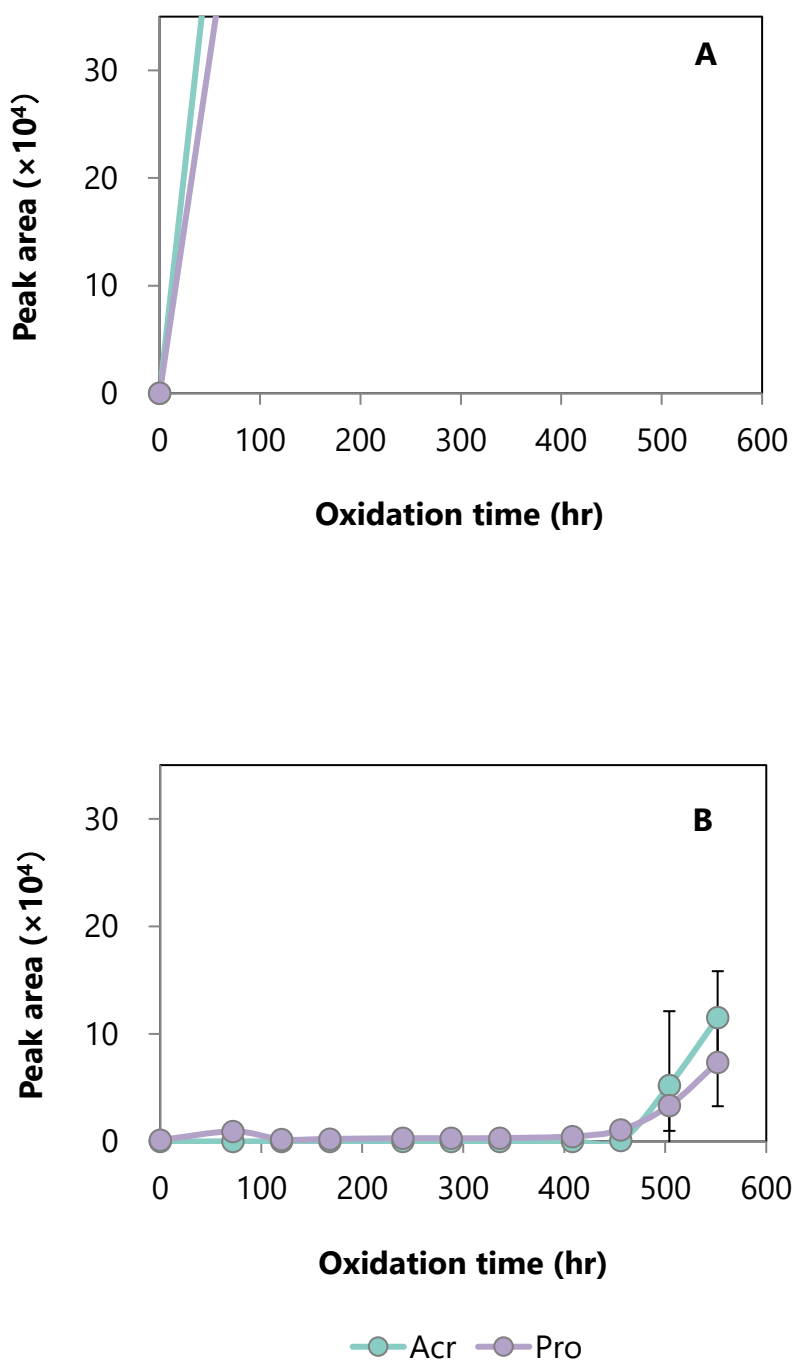


Fig. 56 Effect of SGA on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the absence (A) and presence (B) of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

第3節 アミンの抗酸化活性に及ぼすアミノ基の影響

実験方法

4-3-1 試料及び試薬

1-1-1 と同様のものを用いた。なお、イソアミルアミン(Iso)、オクタデシルアミン(Oct)、スペルミン(Spermine)はすべて和光純薬(株)から購入した。各種アミンの化学構造は Fig. 57 に示した。

4-3-2 油脂の精製

1-1-2 と同様に行った。

4-3-3 精製除去の確認

1-1-3 と同様に行った。

4-3-4 サンプル調製

基本的に 1-1-5 と同様に行った。なお Iso 及びスペルミンはメタノールを、Oct はクロロホルムを用い溶液の調製を行った。各種アミンの抗酸化活性を正確に測定するため、すべて同じ mol 量が添加されるよう 4-1-4 で述べたように 1 サンプル当たり 9.95×10^{-6} mol となるよう各種溶液を調製した。Iso 以外のアミンは最終的な溶液の除去は窒素気流下で行ったが、Iso は揮発性が高いため、メタノール溶液を含有したサンプルをそのまま酸化実験に用いた。なお Iso はメタノールも含めトータル 2 μ l の添加量とした。サンプル数が非常に多かったため 2 回に分けて行った。前半は以下の 8 グループ、後半は以下の 4 グループを設け、酸化実験は n=3 にて行った。

【前半】

- 1 グループ目： TAG 300 mg
- 2 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg
- 3 グループ目： TAG 300 mg + Iso 9.95×10^{-6} mol
- 4 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + Iso 9.95×10^{-6} mol
- 5 グループ目： TAG 300 mg + Oct 9.95×10^{-6} mol
- 6 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + Oct 9.95×10^{-6} mol
- 7 グループ目： TAG 300 mg + SGA 9.95×10^{-6} mol
- 8 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + SGA 9.95×10^{-6} mol

【後半】

- 1 グループ目： TAG 300 mg + SGA 9.95×10^{-6} mol
- 2 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + SGA 9.95×10^{-6} mol
- 3 グループ目： TAG 300 mg + Spermine 9.95×10^{-6} mol
- 4 グループ目： TAG 300 mg + α T 0.15 mg + Spermine 9.95×10^{-6} mol

4-3-5 GC-TCD による酸化評価

1-1-6 と同様の方法で行った。

4-3-6 HS-GC による酸化評価

1-2-4 と同様の方法で行った。

結果及び考察

これまでヒドロキシ基を持つアミンに着目してきた。ヒドロキシ基を2個以上持つアミン単独では抗酸化活性がほとんど示されなかったが、ヒドロキシ基を持たない Ami や 1 個有する AmiOH では単独でも効果を示すことが観察された。また、ヒドロキシ基を有するアミンでは、 α T 存在下でその抗酸化活性が著しく増大したが、ヒドロキシ基を持たない Ami ではそうした著しい抗酸化活性の増大は見られなかった。これらのことから、ヒドロキシ基の存在の有無が、アミンの抗酸化活性に大きな影響を与えることが予想された。そこでヒドロキシ基を持たない Iso、Oct、スペルミンなどのアミンに着目し、その抗酸化活性について SGA と比較検討した。

Fig. 58 は Iso、Oct 及び SGA を魚油 TAG に単独添加した場合の TAG の酸化安定性を示している。また、Fig. 59 はそれらのアミンを α T と併用添加した際に示された結果である。Fig. 58, 59 の(A)は酸素残存率を表し、(B)は揮発性成分総量を示している。

Fig. 58 A, B の結果より、ヒドロキシ基を持つ SGA とは異なり、Iso や Oct は単独添加でも強い抗酸化効果を示し、その強さは、 $[\text{Iso}] < [\text{Oct}]$ となった。一方、 α T との併用添加では、魚油 TAG の酸化安定性は $[\alpha\text{T} + \text{Iso}] \leq [\alpha\text{T} + \text{Oct}] \ll [\alpha\text{T} + \text{SGA}]$ の順で高くなり、SGA が最も強い抗酸化活性を示した。Fig. 60 は単独と併用添加をまとめて示したグラフであるが、 α T の存在により SGA の抗酸化活性が著しく高くなった反面、ヒドロキシ基を持たないアミンの抗酸化活性は SGA ほど伸びなかった。第2節の検討では、Ami のようなヒドロキシ基を持たないアミンは、単独添加でも魚油に対する効果的な抗酸化活性を示すことを明らかにした。その結果は本節の検討でも確かめることができた。一方、 α T の併用によるアミノ化合物の抗酸化活性の増大の程度は、ヒドロキシ基を持つアミンの方が持たないアミンよりも圧倒的に大きく、その結果強い抗酸化活性を示した。Fig. 61-64 で示したように、ヒドロキシ基を持たないアミンでも Acr の生成抑制がみられていることから、これ

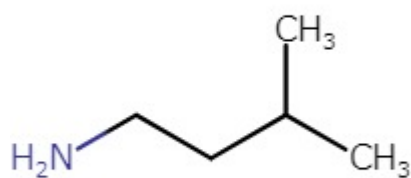
らのアミンも Acr と反応し、抗酸化活性を有するアミノカルボニル化合物が生成したと推測できた。

これまでに、ヒドロキシ基を持たないアミンとアルデヒドとの反応生成物についての研究は幾つかあり、ブチルアミンと 4,5-エポキシ-2-ヘプテナールとの間のピロール化合物の生成⁽⁹⁾Hidalgo *et al.* 1993)や、Acr と Oct のような脂肪族アミンとの間の 8 員環構造物あるいはホルミルデヒドロピペリジン(FDP)の生成 (Tanaka *et al.* 2012, Tsutsui *et al.* 2013) などが報告されている。トコフェロールやポリフェノールなどのラジカル補足型の抗酸化剤は、その構造中にヒドロキシ基を持っており、このヒドロキシ基(OH)からプロトンがフリーラジカルに供与され、これにより抗酸化性が発揮される。しかし、上述のヒドロキシ基を持たないアミンとアルデヒドとのアミノカルボニル化合物では、ヒドロキシ基以外の化学構造が関与したプロトン供与能の存在やまったく異なる作用機構による抗酸化作用が考えられる。こうした点を明確にするためには、反応生成物の構造を明らかにし、その抗酸化の作用機構を明らかにするとともに、油脂中での存在量なども分析する必要がある。

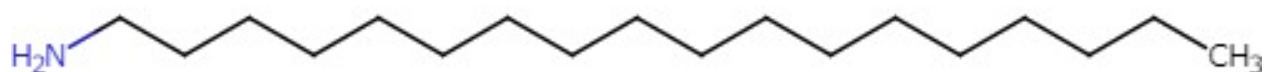
上述のように、アミノ基 1 個を持つアミンは単独添加でも優れた抗酸化活性を示した。そこで次に、アミノ基を複数個有するアミノ化合物、すなわちスペルミンの抗酸化活性について検討し SGA と比較した。Fig.65 A, B の結果から、スペルミンは単独添加でも非常に強い抗酸化活性を示し、 α T と併用した SGA の抗酸化活性をも大きく上回る結果となった。さらに、スペルミンと α T を併用した場合は、より強い抗酸化効果が見られた。これまでの研究では、アミノ基をそれぞれ 2, 3, 4 個持つ、プトレシン、スペルミジン、スペルミンを用いて魚油に対する抗酸化活性を検討し、アミノ基が多いアミンほど強い抗酸化活性を示すことが報告されている(Lovaas 1991)。また、ポリアミンは細胞内で抗酸化物質として働く可能性があるとの報告(Tadoloni 1988)や、ラジカル消去能を持つとの報告 (Das *et al.* 2004, Lagishetty *et al.* 2008) もある。さらに、アミノ基が増えるにつれてラジカル消去活性が上がることも報告されている(Drolet *et al.* 1986)。これらの報告は今回の検討結果と一

致している。一方、スペルミンが Acr と反応すること(Takamatsu *et al.* 2014)、Fig.66, 67 において示されたスペルミン添加で SGA 同様に Acr の生成が抑制されていることなどから、スペルミンと Acr の反応生成物がスペルミンの抗酸化活性に大きく関与している可能性が高い。今後はスペルミンの他、スペルミジン、プトレシン等の結合するアミノ基の数が異なるポリアミンを用い、その Acr などとの反応生成物を分離して、ポリアミンの抗酸化活性との相関を検討する必要がある。

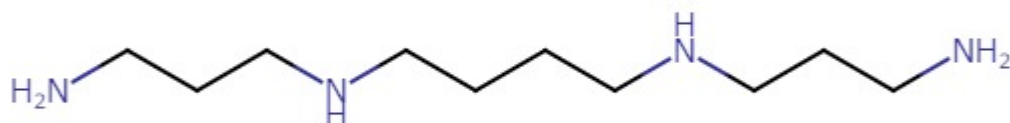
Isopentylamine (Iso)



Octadecylamine (Oct)



Spermine



Sphinganine (SGA)

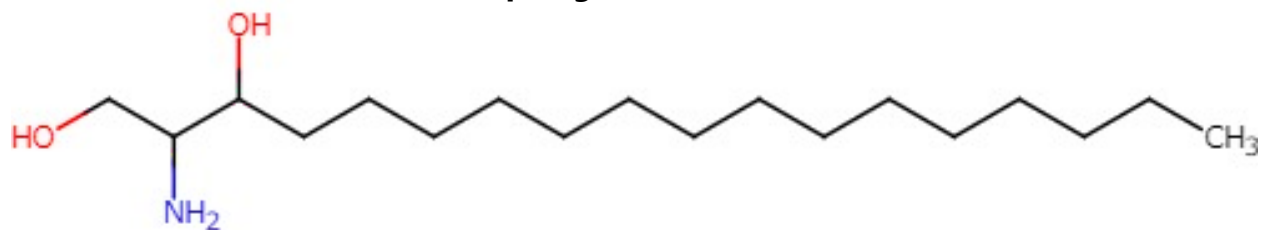
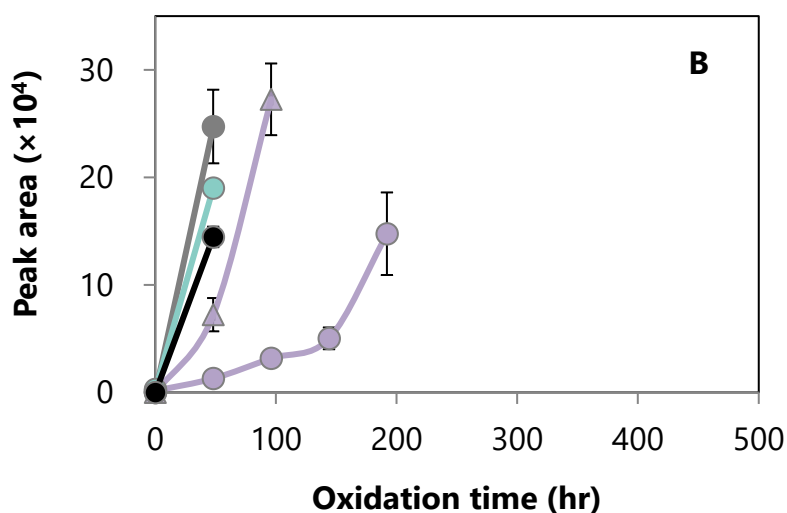
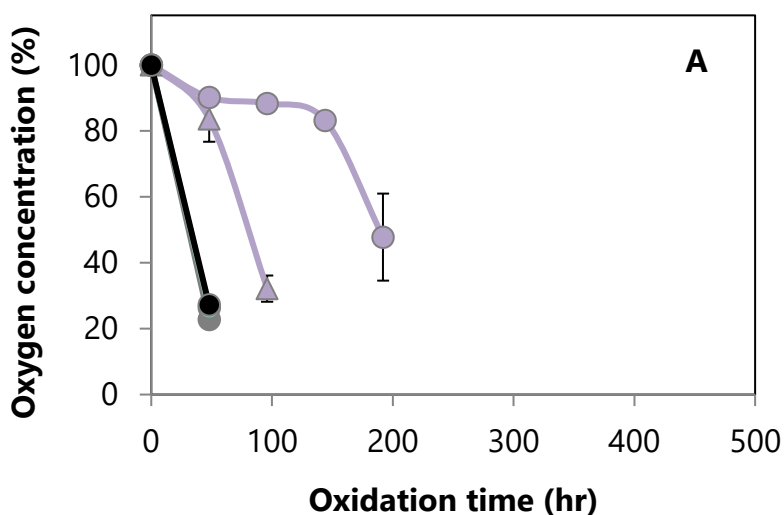
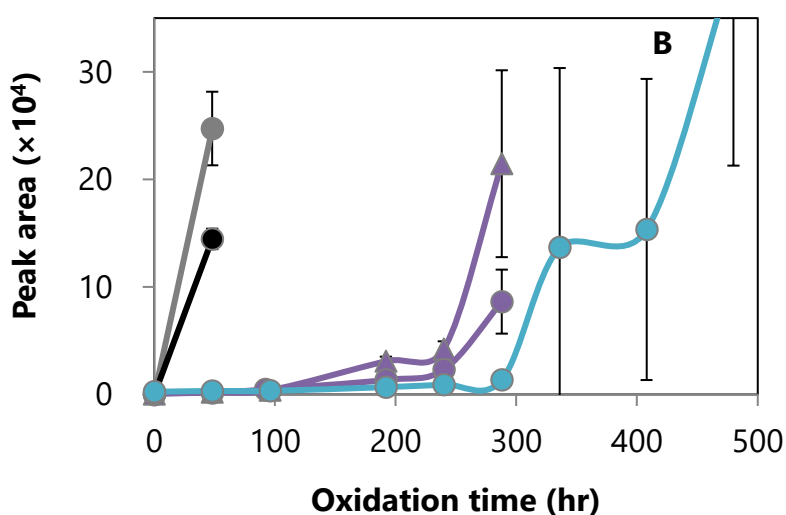
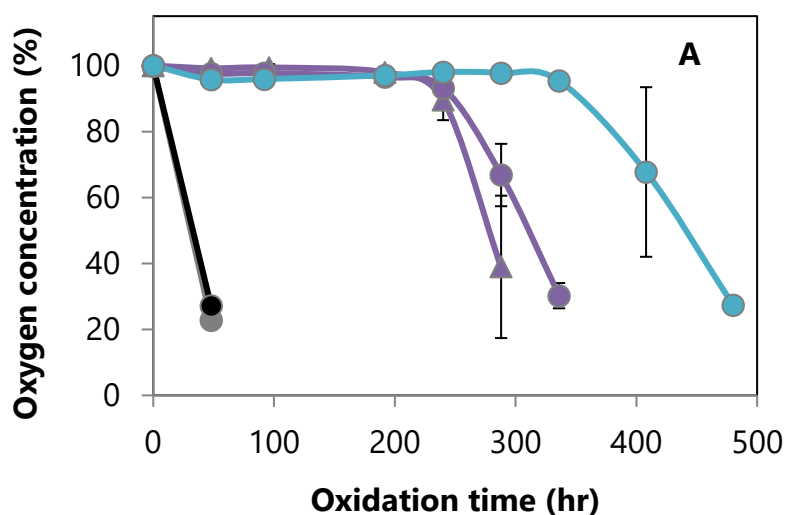


Fig. 57 Chemical structures of isopentylamine (Iso), octadecylamine (Oct), spermine and sphinganine (SGA).



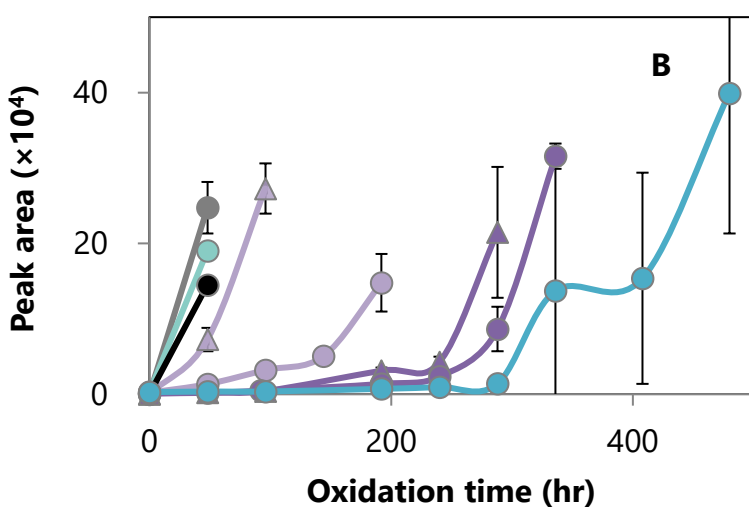
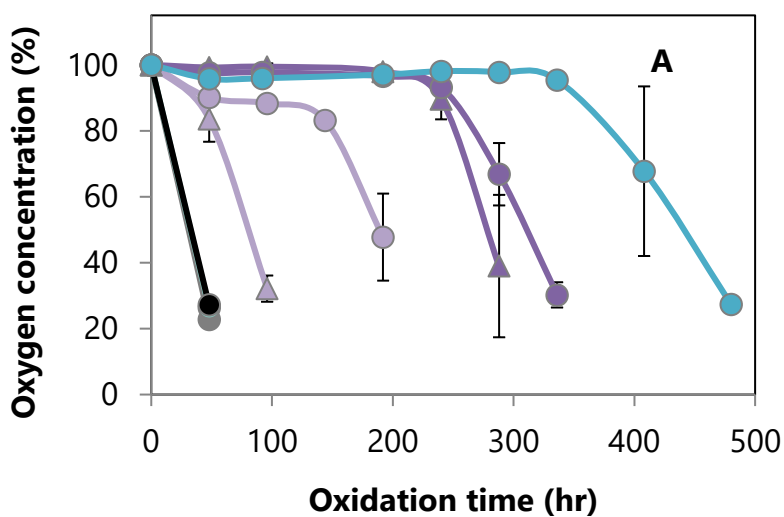
● TAG ▲ TAG+Iso ○ TAG+Oct ● TAG+SGA ● TAG+αT

Fig. 58 Effect of non-hydroxy amines on the oxidative stability of fish oil. The stability was compared with those of SGA and αT. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen (A) and the increase in the total volatiles (B). The data were expressed as the mean ± SD of three separate experiments.



—●— TAG —●— TAG+αT —▲— TAG+αT+Iso —●— TAG+αT+Oct —●— TAG+αT+SGA

Fig. 59 Effect of non-hydroxy on the oxidative stability of fish oil TAG in the presence of αT as compared with that of SGA. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen (A) and the increase in total volatiles (B). The data were expressed as the mean ± SD of three separate experiments.



● TAG ▲ TAG+Iso ● TAG+Oct ● TAG+SGA
 ● TAG+αT ▲ TAG+αT+Iso ● TAG+αT+Oct ● TAG+αT+SGA

Fig. 60 Effect of different kinds of amines on the oxidative stability of fish oil TAG in the presence of αT. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen (A) and the increase in the total volatiles (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

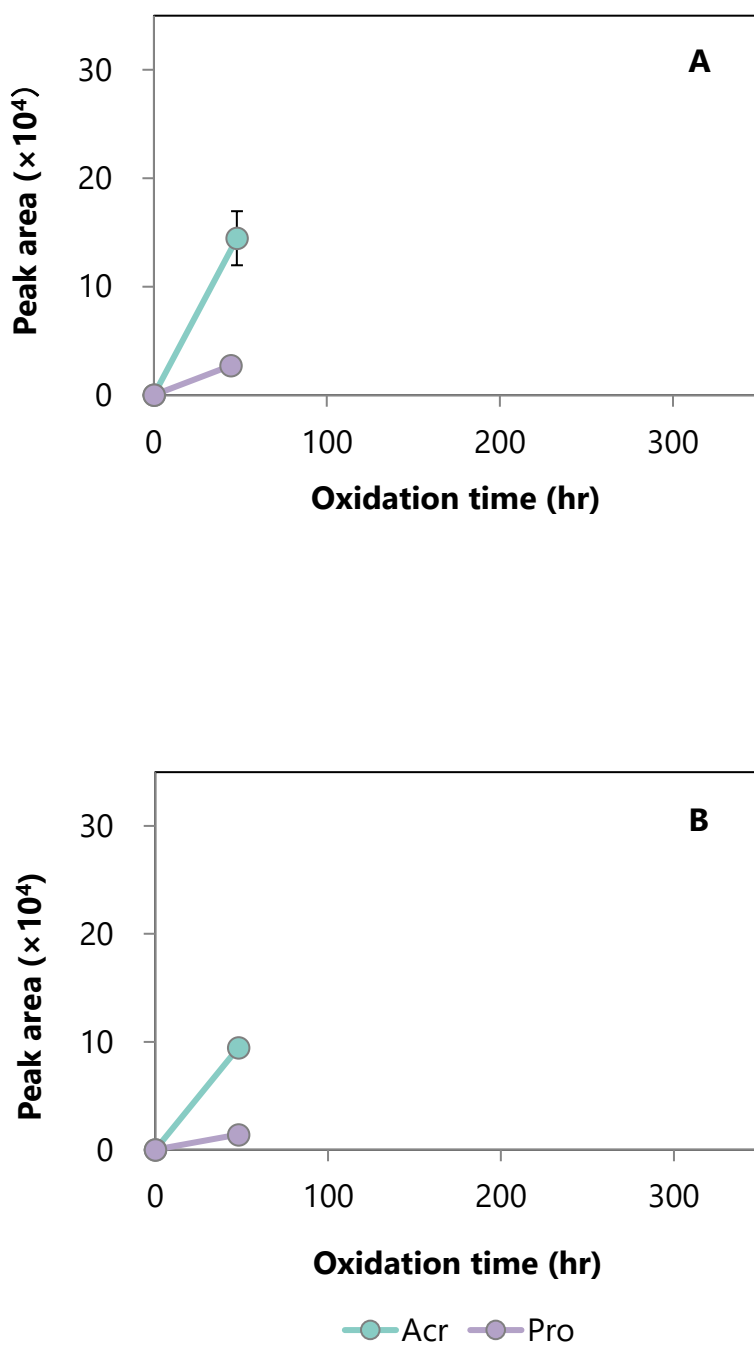


Fig. 61 Formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the oxidation of fish oil TAG without (A) and with (B) α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

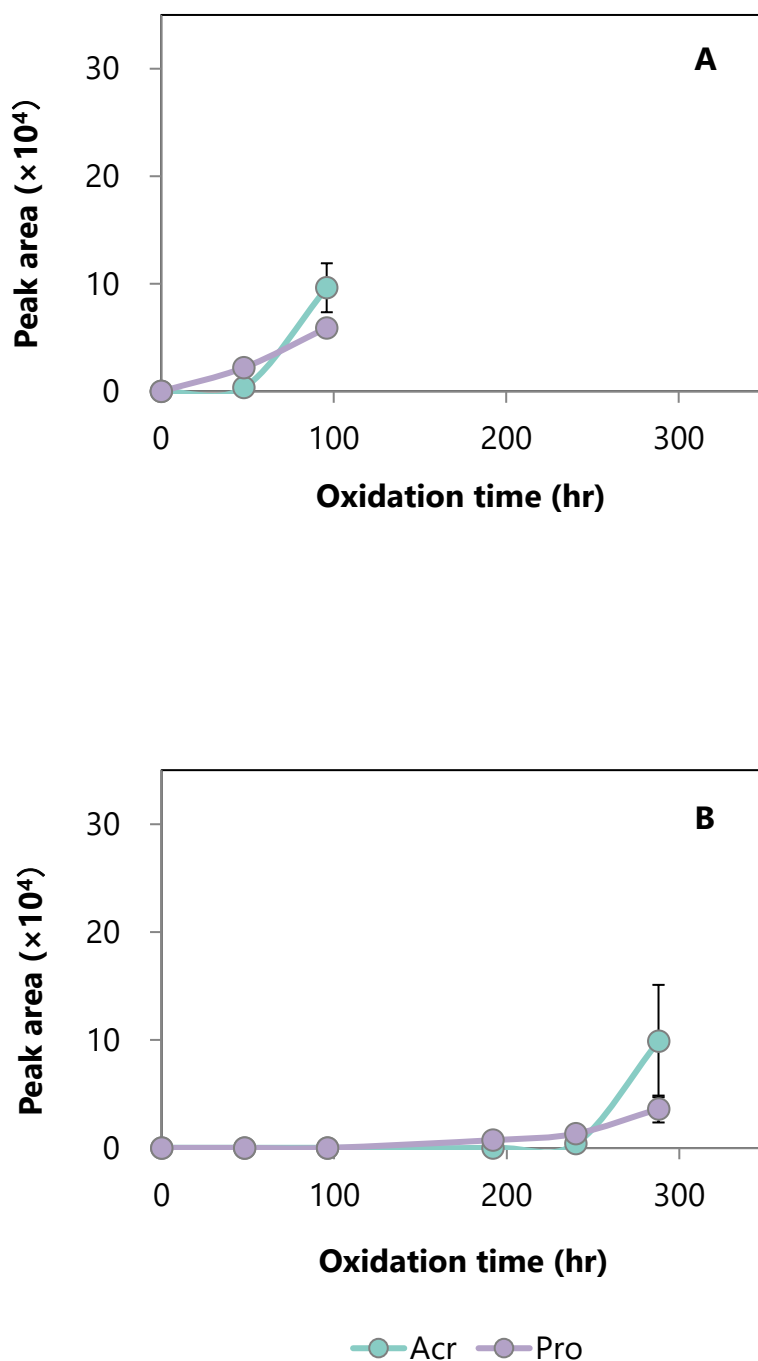


Fig. 62 Effect of isopentylamine on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the absence (A) and presence (B) of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

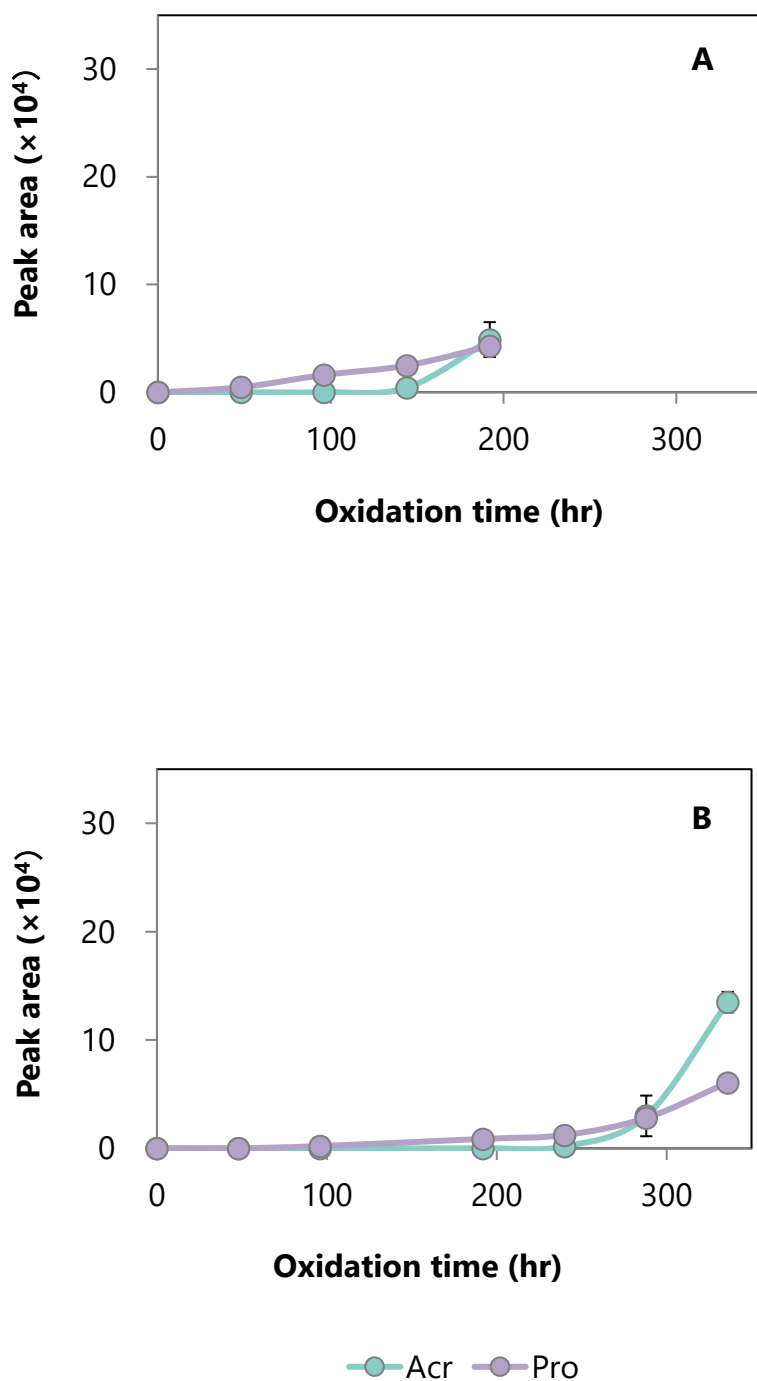


Fig. 63 Effect of octadecylamine on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the absence (A) and presence (B) of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

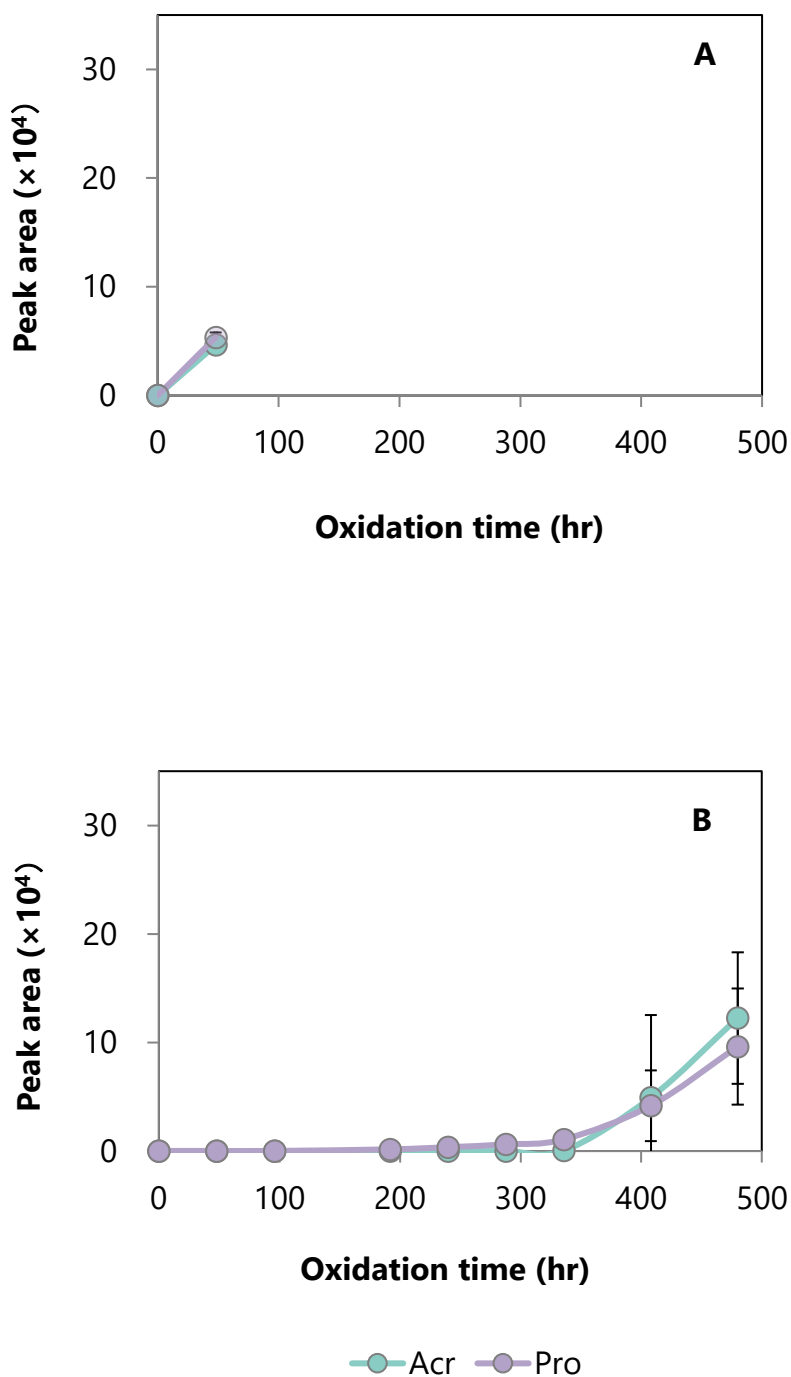
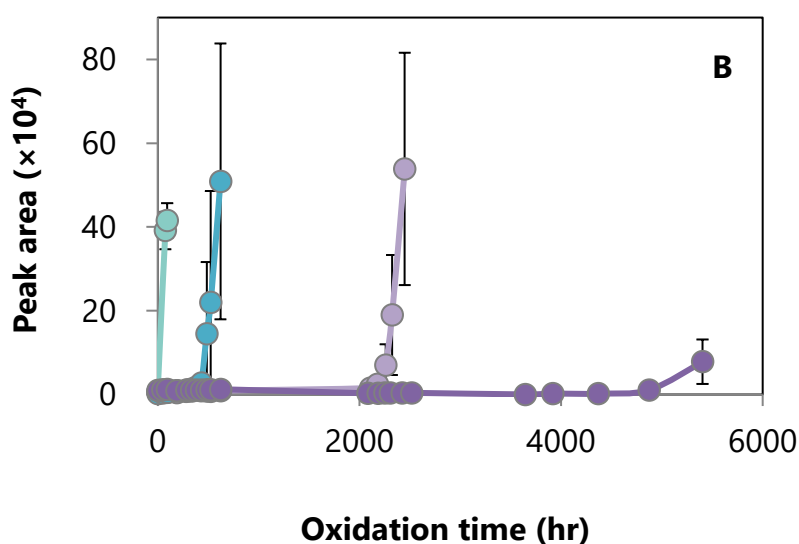
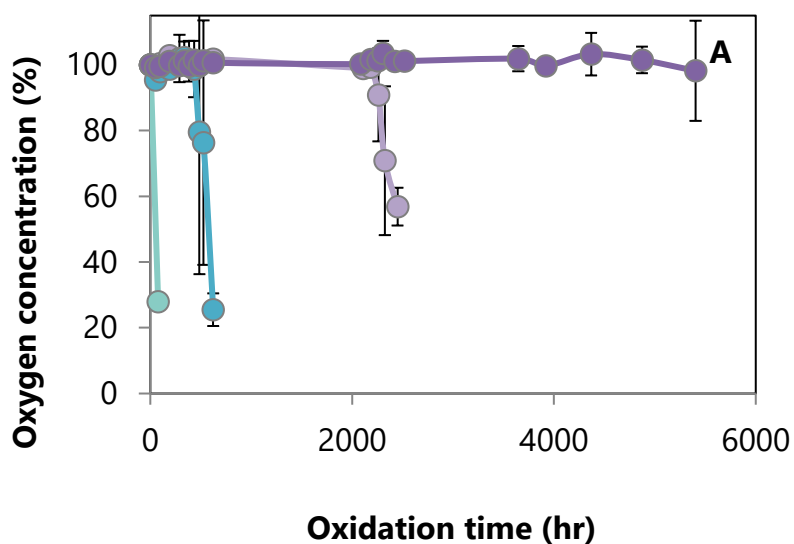


Fig. 64 Effect of SGA on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the absence (A) and presence (B) of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.



SGA Spermine
 α T+SGA α T+Spermine

Fig. 65 Effect of SGA and spermine on the oxidative stability of fish oil TAG with or without α T. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen (A) and the increase in total volatiles (B). The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

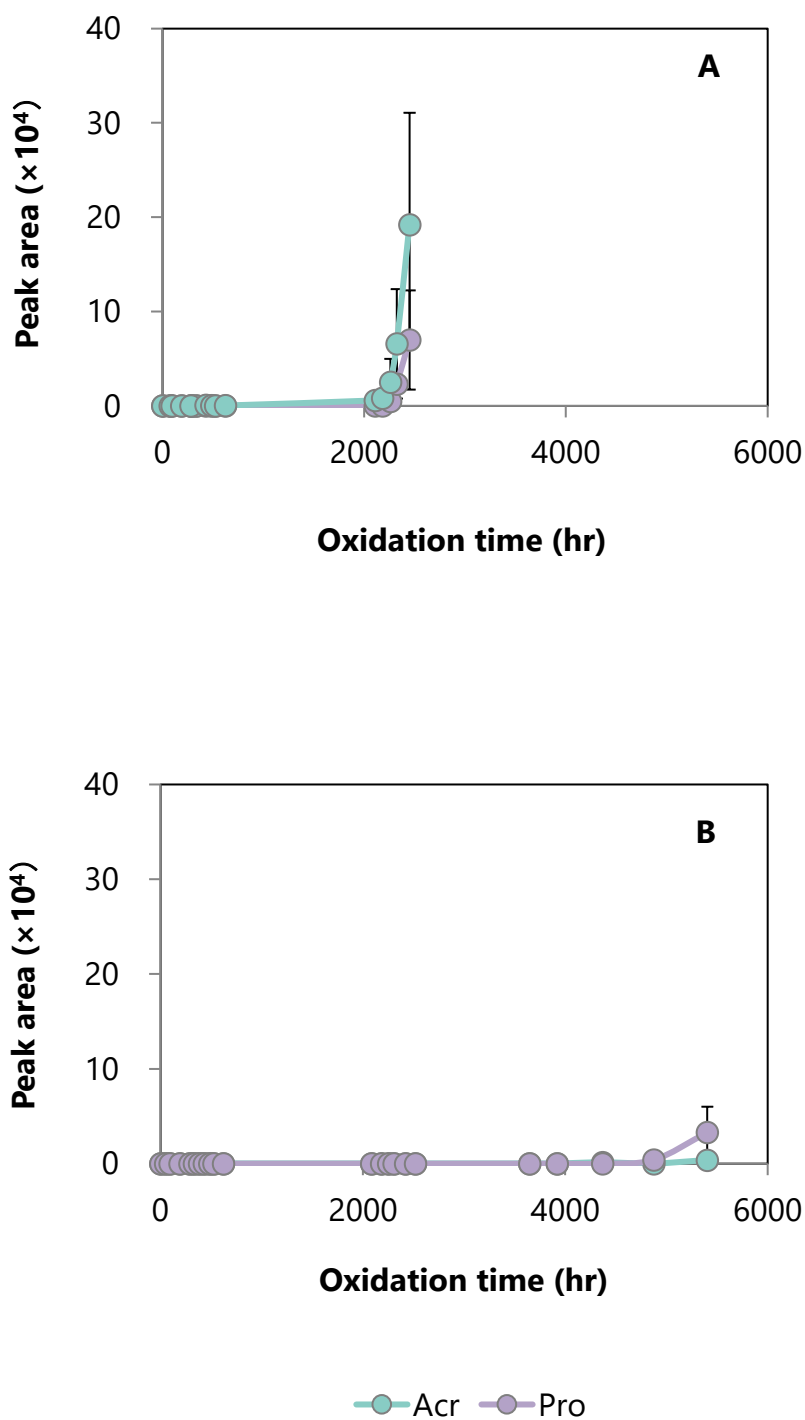


Fig. 66 Effect of spermine on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the absence (A) and presence (B) of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

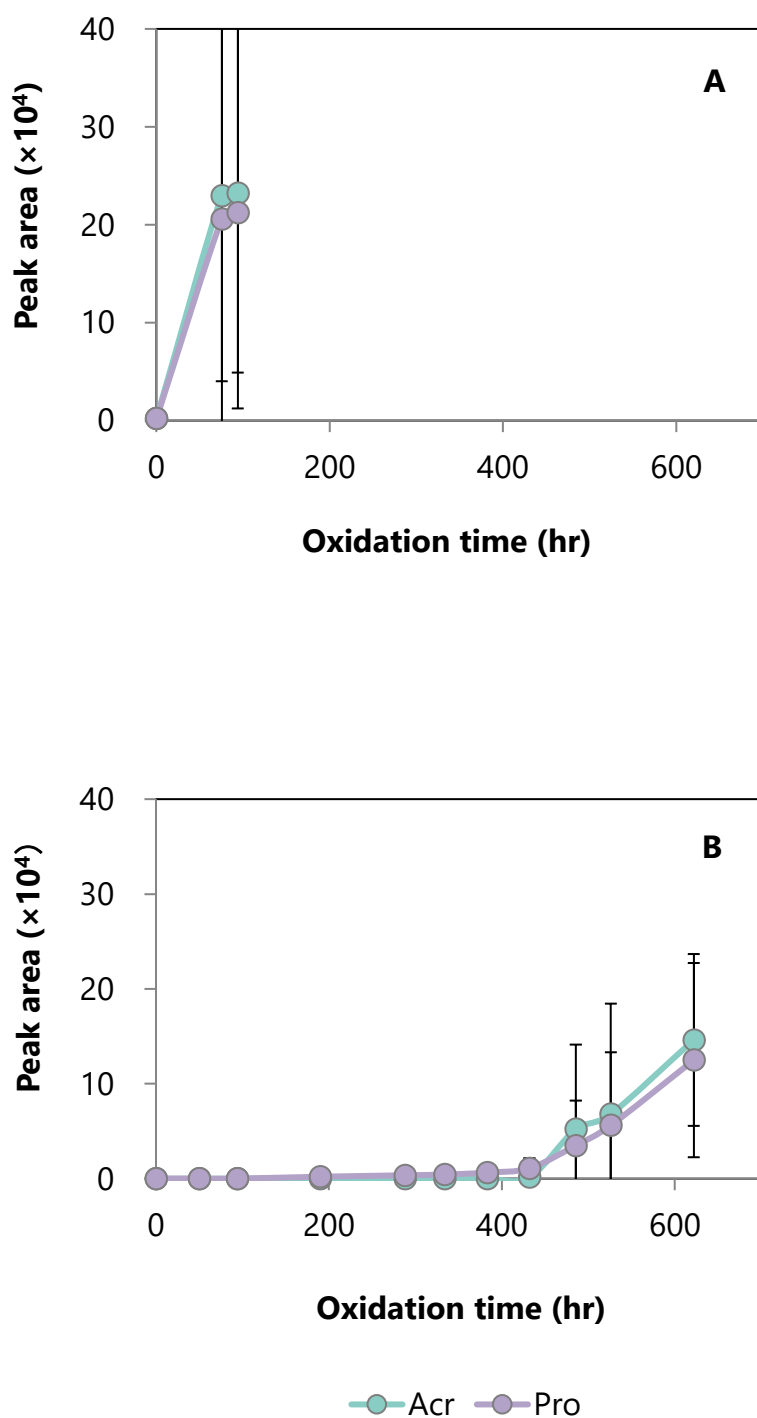


Fig. 67 Effect of SGA on the formation of acrolein (Acr) and propanal (Pro) during the fish oil TAG oxidation in the absence (A) and presence (B) of α T. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments.

第4節 トコフェロールなどの抗酸化剤の影響

実験方法

4-1 試料及び試薬

基本的に 1-1-1 と同様の試料・試薬を用いたが、油脂は魚油と大豆油のみを用いた。また抗酸化剤はこれまで用いていた α T の他、エーザイフード・ケミカル株式会社より供与されたトコトリエノール(T3)の α 、 β 、 γ 、 δ 体のそれぞれを用いた。(Fig. 68)

4-2 油脂の精製

1-1-2 と同様の方法で行った。

4-3 各精製除去の確認

1-1-3 と同様の方法で行った。

4-4 サンプル調製

1-1-5 と基本的に同様に行った。各種 T3 も α T と同様に扱った。バイアル瓶は 2 ml 容を用いたため、抗酸化剤および SGA はそれぞれ 0.05 mg/ml と 1 mg/ml のサンプル溶液を調製した。本実験の分析は魚油と大豆油それぞれに 12 のグループを設けた。各グループは以下のとおりであり、それぞれ $n=3$ にて実験を行った。

1 グループ目： TAG 100 mg

2 グループ目： TAG 99 mg + SGA 1 mg

3～7 グループ目： TAG 100 mg + α T、 α T3、 β T3、 γ T3、 δ T3 0.05 mg

8～12 グループ目： TAG 99 mg + α T、 α T3、 β T3、 γ T3、 δ T3 0.05 mg + SGA 1 mg

4-5 GC-TCD による酸化評価

1-1-6 と同様に行った。

結果及び考察

各種抗酸化剤を魚油および大豆油に添加した結果をそれぞれ Fig. 69、70 に示した。各 Fig の(A)は抗酸化剤を SGA と併用添加した際のグラフであり、(B) は抗酸化剤を単独で添加した際のグラフである。なお酸化安定性については、酸素残存率の測定のみで評価した。

Fig. 69 B の結果より、魚油へ抗酸化剤を単独で添加した際、いずれの場合も魚油 TAG は速やかに酸化され、抗酸化剤による違いは見られなかった。一方、抗酸化剤を SGA と併用添加した場合、Fig. 69 A に示されているようにすべての抗酸化剤で有効な抗酸化活性を示し、魚油 TAG の酸化安定性は、 $\partial T3 < \alpha T \leq \alpha T3 < \beta T3 < \gamma T3$ 順で高くなった。よって $\gamma T3$ と SGA の組み合わせが他のグループに比べてより強い抗酸化活性を示すことがわかった。また、SGA 存在下での α 体のトコフェロール(αT)とトコトリエノール($\alpha T3$)の抗酸化活性の違いはほとんどなかった。

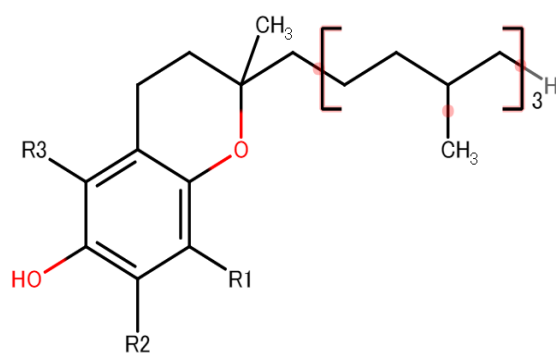
一方、大豆油 TAG に各抗酸化剤を添加した Fig. 70 の結果では、単独添加でも効果に違いが見られ、その酸化安定性の順番は、 $\alpha T \leq \alpha T3 < \beta T3 < \partial T3 \leq \gamma T3$ となった。また、抗酸化剤を SGA と併用添加した場合にも大きな違いが見られ、TAG の酸化安定性がさらに向上した。SGA 併用下での大豆油 TAG の酸化安定性は単独添加の際と同様で、 $\alpha T \leq \alpha T3 < \beta T3 < \partial T3 \leq \gamma T3$ の順にその酸化安定性が高くなった。また、大豆油においても抗酸化剤の単独添加及び併用添加で α 体のトコフェロールとトコトリエノールの抗酸化活性に大きな違いは見られなかった。

大豆油 TAG への各種抗酸化剤の単独添加と SGA との併用添加いずれの場合も、抗酸化剤は一定の抗酸化活性を示した。特に、SGA との併用では高い抗酸化活性が見られた。また、その効果の強さは単独添加と SGA との併用添加で一致した。魚油 TAG では酸化速度が早いため、各抗酸化剤の単独添加による違いは見出されなかったが、SGA との併用では違いが見られた。この場合の各ビタミン E 同族体の抗酸化活性の強さは、 $\partial T3$ を除けば大

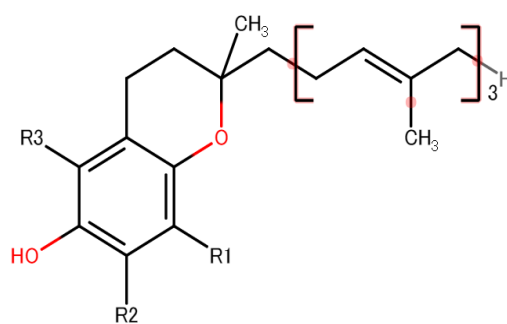
豆 TAG と魚油 TAG とで一致し、 $\alpha T \leq \alpha T3 < \beta T3 < \gamma T3$ となった。一般にビタミン E 同族体の抗酸化活性は、 α -、 β -、 γ -の順に高くなるとされており、本研究の結果もこれと一致した。以上より、ビタミン E 同族体のような抗酸化剤を SGA と併用した場合、その抗酸化活性の強弱は、抗酸化剤自体の抗酸化能に依存している可能性が示された。したがって、SGA との組み合わせで強力な抗酸化方法を確立するには、単体で強い効果を示す抗酸化物質の選択がよいと考えられた。

本検討では α 体のトコフェロール及びトコトリエノールの効果に違いが見られなかった。しかし、首藤菜子 (2018) は、 γ 体のトコフェロールとトコトリエノールを用いた検討において、トコトリエノールの方がより強い効果を示したことを報告している。また、他の報告 (Seppanen *et al.* 2010) でも、 $\gamma T3$ は $\alpha T3$ よりも高い抗酸化効果を示し、トコトリエノール系の抗酸化剤はトコフェロール系のものよりも優れた抗酸化効力を有することを述べている。そのため、今後 SGA との組み合わせで抗酸化方法を確立する際は、トコトリエノール系を用いることが望まれ、中でも $\gamma T3$ の活用が最も優れた抗酸化効力が得られると考えられる。

Tocopherol



Tocotrienol



α	$R1 = R2 = R3 = CH_3$
β	$R1 = R3 = CH_3, R2 = H$
γ	$R1 = R2 = CH_3, R3 = H$
δ	$R1 = CH_3, R2 = R3 = H$

Fig. 68 Chemical structures of vitamin E homologues.

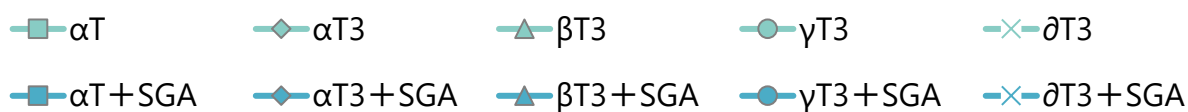
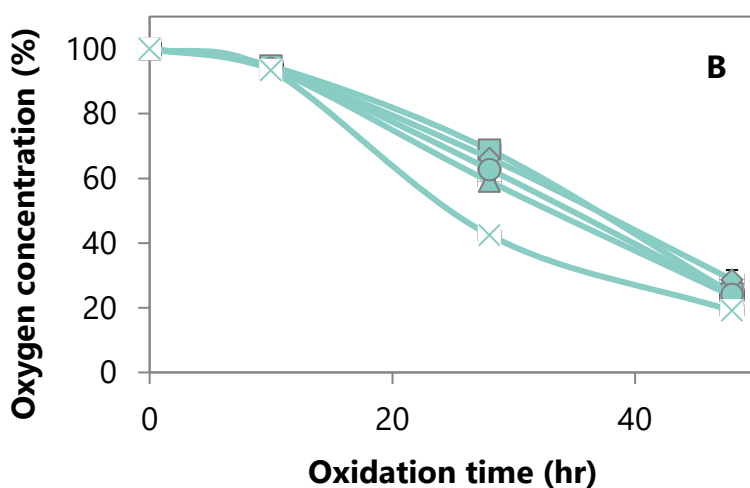
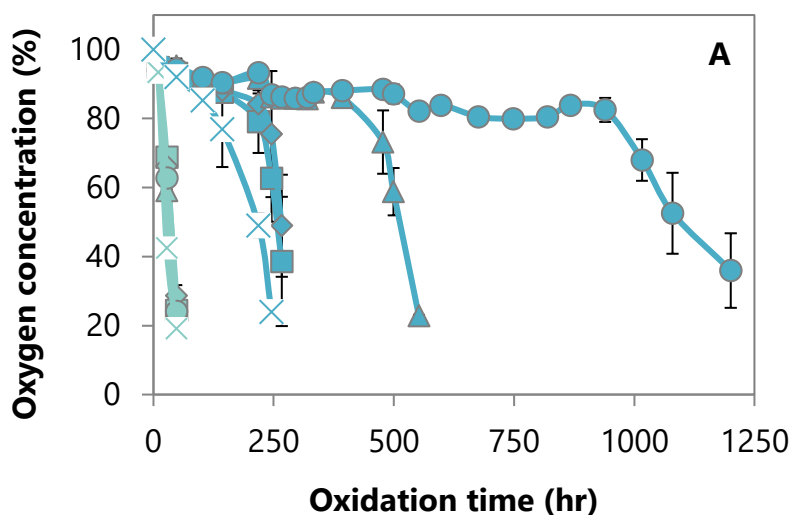


Fig. 69 Effect of vitamin E homologues on the oxidative stability of fish oil TAG with (A) or without (B) SGA. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments. Each antioxidant was added at same concentration (0.05 % (weight %)).

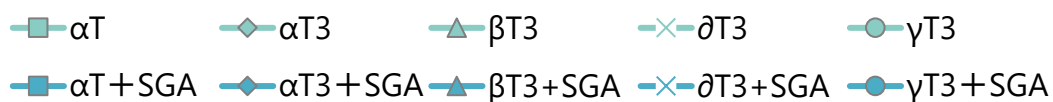
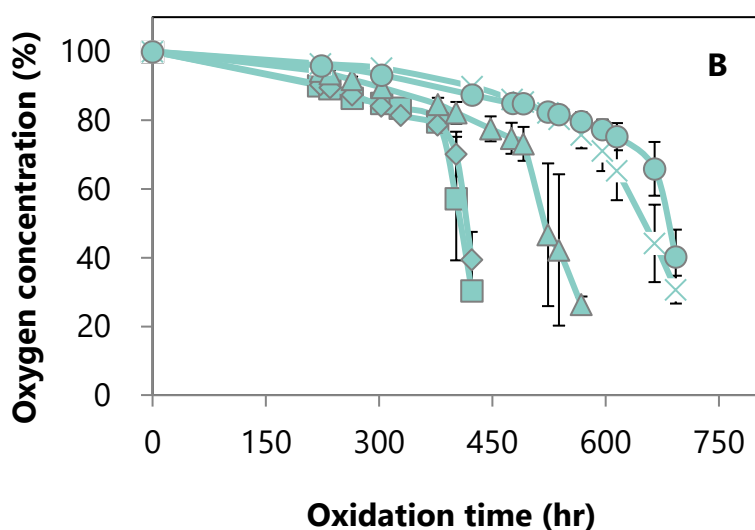
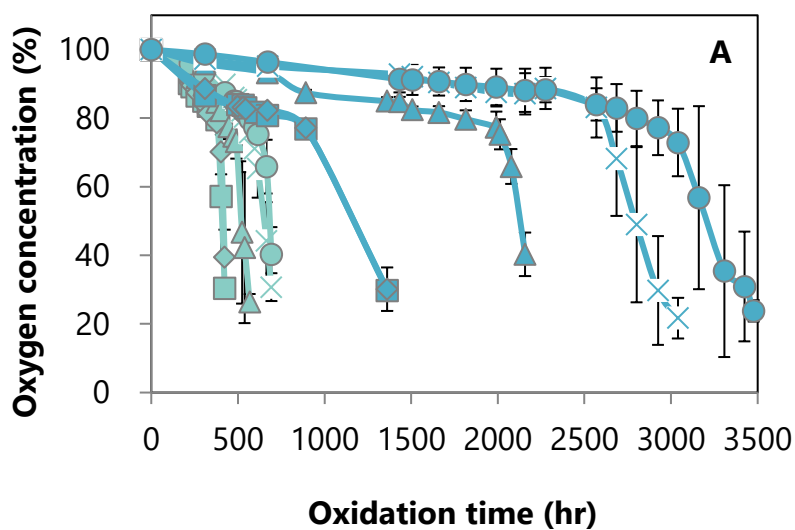


Fig. 70 Effect of vitamin E homologues on the oxidative stability of soybean oil TAG with (A) or without (B) SGA. The stability was analyzed by measuring the decrease in oxygen. The data were expressed as the mean $\pm$ SD of three separate experiments. Each antioxidant was added at same concentration (0.05 % (weight %)).

総合考察

現在、生活習慣病が問題視されており普段の食生活において栄養性の高い食品が求められている。動脈硬化症や糖尿病などの生活習慣病のリスクが高い状態の際、内臓脂肪の蓄積や高血糖の他高血圧などが見られる。また、これらが併発した状態はメタボリックシンドロームと呼ばれ、これは現代人がよく知る言葉の1つである。そのため、これらの病を予防するため、茶飲料などによる機能性食品が出回り始め、予防による健康意識が高まっている。この生活習慣病の原因の1つとして脂質の過剰摂取が挙げられる。その脂質の一種である飽和脂肪酸の過剰摂取には生活習慣病との関連性がある。そのため、厚生労働省により生活習慣病予防の目的として飽和脂肪酸の摂取目標量が提示され、摂取する上限量が示されている。一方で生活習慣病の予防効果が期待されている脂質があり、EPA や DHA 等の n-3 PUFA を多く含む魚油がそれに当たる。そのため n-3 PUFA は厚生労働省により目安量が定められており、目安量以上の n-3 PUFA 摂取を推奨している(厚生労働省 2015)。健康機能性の高い EPA や DHA を多く含む魚油は非常に注目されているが、応用するにあたり栄養価や風味等の品質面で酸化という課題が残されている。魚油を含む商品が既に製品化されているものの、臭いに関しては依然として問題が残されている。そのため魚油の食用油脂としての活用はさらに難しく、臭いを抑え、かつ強い抗酸化活性を有する効果的な酸化防止法の確立が強く望まれている。そこで本研究では過去に見られた SGA と α T の組み合わせによる強力な抗酸化作用(Shimajiri *et al.* 2013)のメカニズムを明らかにし、そのメカニズムを基により有効な酸化防止法を確立することを目的とした。

メカニズム解明に際し、第1章では、脂肪酸組成の異なる4種の油脂を用い、SGA 添加による揮発性成分への影響を明確にすることを目的とした。これは脂肪酸組成が異なることで生成される揮発性成分の種類が異なり、SGA と揮発性成分との間に生じるアミノカルボニル化合物による抗酸化活性に影響すると考えたためである。また、魚油の応用において臭

気成分の発生を効果的に抑えられることは重要でもあるためだ。そのため、Table 2, Fig. 3 に示されているような脂肪酸組成の異なる魚油、エキウム油、亜麻仁油そして大豆油由来の TAG を用いた。αT や SGA を単独添加あるいは併用添加し、酸素の残存量と揮発性成分の生成量による分析に基づき酸化評価を行った。その結果、[TAG]、[TAG + αT]そして[TAG + αT + SGA]のグループで魚油が最も早く酸化されたが、[TAG + SGA]のみ魚油はエキウム油や亜麻仁油と比べて酸化安定性が高く、魚油の[TAG]よりも若干の高い酸化安定性が見られた。また、生成された揮発性成分 X に着目すると、魚油の[TAG]では Pro よりも先行して生成されるのに対し、[TAG + SGA]では生成抑制されることを確認した。また魚油では揮発性成分 X の生成量は他の油脂よりも圧倒的に多かった。過去には、アミノ化合物と揮発性成分の生成物による抗酸化活性の確認が報告されている(Hidalgo *et al.* 2003)。そのため、魚油の[TAG + SGA]で若干の抗酸化効果が見られた理由を、魚油における揮発性成分 X が酸化のごく初期かつ Pro よりも先行して多く生じ、SGA と反応することで抗酸化物質が生成したためと推測した。また αT と SGA の併用添加が魚油を含めた不飽和 TAG に対して強力な抗酸化活性を示し、食品加工で問題になっている油脂の臭気成分生成に対する抑制効果が可能であることも示された。

第 2 章では、第 1 章に続いてさらなるメカニズムの解明を目的とし、特徴的に示された揮発性成分 X に関して SPME 法による GCMS 分析を用い、同定を行った。またその成分について魚油の酸化初期時における生成挙動をこれまでの酸素残存率、揮発性成分による解析に加えて、一般的な評価方法である POV 法も用い多角的な魚油の酸化評価を行った。GCMS による同定の結果、揮発性成分 X は Acr(アクロレイン)であることが判明した。またこれについて酸化初期(0-12 hr)に着目し、その生成挙動を解析した。その結果、Acr は魚油 TAG の酸化初期 (4 hr) から生成する主要な揮発性成分であり(Fig. 27, 29)、かつ閾値の低い不快臭成分である(Endo *et al.* 2013, Gasee *et al.* 1996, Uchida 1999)と報告されているため、魚油の酸化に伴う風味劣化に Acr が大きく関係することが考えられた。POV は一般的

に多くが 30 meq/kg を規定値として油脂の劣化に対する規制が設けられている。しかし Ritter ら(2012)は、魚油の酸化臭と POV の相関性が低いことを問題に挙げていた。本検討において POV 約 30 を示したのが酸化時間 4 時間目であったが、その際には既に上述したような不快臭を示す Acr は検出されていた。そのため本検討結果からも、魚油の酸化に対する POV 評価において不快臭である Acr の生成を考慮した際、適切でないことが考えられた。同時に本検討結果は、製品化された魚油配合商品において発生する不快臭の原因が Acr であることをより裏付けられる結果となった。一方で第 1 章において SGA の添加によって Acr(RT=5.1)のピークが生成抑制され(Fig. 11)、かつ抗酸化活性が示されたため、SGA の添加による抗酸化法は魚油の酸化初期に生ずる不快臭の主因 Acr を反応というかたちで除去し、その反応生成物が抗酸化活性を示す有効な酸化防止法であるという仮説が立てられた。

そこで第 3 章の 1 節では、SGA による抗酸化機構における上記の仮説を検証することを目的とし、SGA と Acr の反応性やその反応生成物(SGA-Acr)の抗酸化活性について検討を行った。また、化学構造決定がなされている SGO(二重結合を 1 つ多く持つ SGA の類似構造)と Acr の反応で生じる生成物(SGO-Acr)を頂くことができたため(Fig. 31)、第 2 節ではこれまで示されてきた抗酸化活性の活性本体を明らかにすることも目的とし、SGO-Acr の抗酸化活性を評価して SGA-Acr との効果と比較した。まず第 1 節の結果から、Acr は SGA と速やかに反応が起きることが分かった(Table 6)。この SGA-Acr を調製し、魚油に添加してその抗酸化活性の効果を検討した。しかし、SGA-Acr 自体には抗酸化活性が見られないことが分かった(Fig. 33 B)。一方で α T 存在下で SGA-Acr を添加した場合は、 α T 存在下での SGA 添加のグループに相当する強い抗酸化活性が示され(Fig.33 A)、Acr を含めた揮発性成分の生成も強く抑えることができた(Fig. 34, Fig.36)。以上の結果から仮説に立てた SGA による抗酸化機構において、SGA が酸化初期に生成する Acr と反応し、Acr を除去するとともに α T 存在下でその反応生成物が抗酸化物質の活性本体として働くことが明らかとなった。また、 α T が必要不可欠である理由についての考察だが、以下 2 つのどちらかあるいはは

両方によるものと考えられた。それは、(1) α T が反応性生成物の存在状態に影響を与えること、また、(2)反応生成物が酸化した α T を再生することの 2 つである。(1)に関し、Cui ら(2016)は PL のみならず α T にも界面活性の特徴を持っていると述べており、Takamasu ら(2014)が調製した SGO-Acr の生成物はクロロホルムのみならず極性の高いリン酸緩衝生理食塩水においても調製を可能としている。そのため、本研究で得られた SGA-Acr は極性が高い化合物であることが予測され、 α T の界面活性作用によって油脂中に分散することが可能となり、効果的に抗酸化力が働いたと考えられた。また、(2)に関しては、Doert ら(2012, 2017)によって PE が α T の酸化物やアスコルビン酸と付加体を形成し、 α T の再生効果を示すと明らかにされている。一方 SGA による抗酸化活性に関する先行研究(Shimajiri *et al.* 2013)において、MCT 及び魚油に SGA を添加した際に、魚油のみで α T の減少抑制効果が示された。そのため反応生成物である SGA-Acr は α T の再生効果を示すことを示唆しており、同時にその活性本体は SGA ではなく SGA-Acr である可能性を示した。

続いて 2 節では、既に化学構造が決定された SGO-Acr を用い、それが活性本体であるかを検討した。その結果、SGO-Acr は SGA-Acr とは異なって単独でも強い効果を示した(Fig. 38 A)。Shimajiri ら(2013)の報告において、 α T 存在下で SGO は SGA よりも効果が低いと報告されている。しかし本検討結果では、SGO-Acr は SGA に相当する強い抗酸化活性を示した(Fig. 38 A)。一方で揮発性成分総量に着目した際(Fig. 38 B)、SGO-Acr を添加したグループで約 30 時間目にして、一度大きく揮発性成分が増加した。また Fig. 39, 40 の(A)に着目したとき、酸素残存率が高い値を示しているにもかかわらず Acr が多く生成された。また Fig.40 A においては急激な酸化が起こるまでは一度 Acr が生成した後、大きく増減することなく概ね一定の値が示されたことから、魚油の酸化で生じる Acr に由来するものではないと考えられた。そのため、SGO-Acr が逆反応を起こし、Acr を生じてしまった可能性が考えられた。また、こちらで調製した SGA-Acr と、頂いた SGO-Acr の反応生成物の調製方法が異なっており、これが影響する可能性も考えられる。以上から、本検討では、先行研究

(Takamatsu *et al.* 2014)で示された SGO-Acr に抗酸化活性が示されることを新たに明らかにした。そのため、Fig. 31 に示されるような構造が SGA-Acr においても活性本体となる可能性があるが、抗酸化活性の挙動が異なること、SGO-Acr では逆反応を起こす可能性があること、さらに反応生成物の調製方法が異なることから、SGA-Acr には活性を示す SGO-Acr による純物質以外の化合物も含まれた混合物である可能性が考えられた。

第4章では、これまで明らかにされた抗酸化機構を基にして、様々なアミンやビタミンE同族体を用い、応用に向けたより強力な新規抗酸化法を確立することを目的として各種検討を行った。

そこで第1節では、安価かつ身近なアミンであるアミノ酸の Ser 及び Thr を用いて、魚油に対する効果を検討した。その結果、 α T 存在下でも全く効果が示されず(Fig. 42)、また Acr の生成が抑制されなかったため、Acr との反応の可能性も示されなかった(Fig. 43,44)。アミノ酸はカルボキシ基を持つため、非常に極性の高い化合物である。そのため、Ser や Thr は油脂に分散することができず、Acr との反応が進まなかったために抗酸化活性が示されなかったと考えられた。そこでメタノール水溶液を用いた水中分散系で Ser と Acr の反応性の確認を行った。その結果、2.5 時間後には Ser も加わったグループにおいて Acr の残存量が減少した(Fig. 46)。湯木(1974)らは、アミノ酸の油脂に対する溶解度の低さを述べていたことから、本検討で用いたアミノ酸においても魚油に対し溶解しにくかったと考えられた。以上のことから、アミノ酸は魚油に対する抗酸化法としては適切でないが、エマルション系においては適切である可能性が示された。

続いて第2節では、SGA の化学構造中に含む官能基のヒドロキシ基に着目し、それによる酸化安定性への影響について検討した。そこでまずはじめに、炭素数が4個でヒドロキシ基を持たない Ami と、1個持つ AmiOH を用い、さらに SGA も含めて検討した。その結果、単独添加における効果が、 $\text{Ami} < \text{AmiOH}$ と示された(Fig. 48)。AmiOH の方が高極性にもかかわらず、強い抗酸化活性を示したため、ヒドロキシ基が酸化安定性の向上に関わるこ

とが分かった。また併用添加の場合においては、単独添加での効果が $SGA < Ami$ であった一方で、 αT との併用では $Ami < SGA$ と示された。その中でも $AmiOH$ は最も高い効果を示し、 SGA や $AmiOH$ で αT 存在下における効果が大きく増大した(Fig.48)。そのため、ヒドロキシ基による酸化安定性への向上に αT が大きく関わるということが分かった。ヒドロキシ基の重要性について把握できたため、次にアルコールアミンの炭素数やヒドロキシ基の数による酸化安定性への影響を検討した。ヒドロキシ基を 3 個持ち炭素数が SGA (: ヒドロキシ基は 2 個)と同様の $Phyt$ と、炭素数を 3 個持ちヒドロキシ基の数が SGA と同様である $Ser-ol$ を用い検討を行った。その結果、単独添加においてはその効果に違いが見られなかった(Fig. 52)。一方で併用添加した際、ヒドロキシ基が 1 個多い $Phyt$ は SGA よりも効果が低く示され、炭素数が短い $Ser-ol$ は SGA よりも効果が低く示された(Fig. 52)。そのため、酸化安定性の向上に、ヒドロキシ基が存在することは重要であるが、活性の強弱はその数に相応して増大しないことがわかり、その炭素数は長い方が酸化安定性を向上させることが分かった。以上から、ヒドロキシ基は酸化安定性に影響するファクターであり、さらにその影響は αT との相互作用も関係すると分かった。Saito ら(1997)の各種アミノアルコールを用いた検討結果においてもヒドロキシ基が存在することでイワシ油の酸化安定性が向上されたため、過去の報告と一致することを確認できた。また、上記で示された各種アルコールアミンによる抗酸化効果への影響の大きさは、ヒドロキシ基によるプラスとマイナスの作用が総じて示された結果だと考えられる。つまりプラスの作用は、極性が高いにもかかわらずヒドロキシ基 1 個持つ $AmiOH$ が持たない Ami よりも単独添加においてより強い抗酸化活性を示す際の作用である。またマイナスの作用は、ヒドロキシ基 2 個以上持つ際に単独添加で効果がないこと、また αT 存在下で酸化安定性が増大するものの、ヒドロキシ基の数が増えたり炭素数が減る際に抗酸化活性が下がることから、極性の高さが影響して抗酸化活性が低く示される作用である。しかし αT は界面活性を有するため(Cui *et al.* 2015)、 αT の存在によってそのマイナスの作用が緩和され、特にヒドロキシ基を持つアルコールアミンで酸化安定

性が大きく増大したと考えられた。結果これらのヒドロキシ基による 2 つの作用が示される抗酸化活性に影響したと考えられた。

前節でヒドロキシ基の影響を確認できた一方で、ヒドロキシ基を持たない Ami の単独添加においても一定の効果を示すことが分かった。そこで第 3 節ではヒドロキシ基を持たないアミンによる酸化安定性への影響を検討した。まずは 1 個のアミノ基を持つアミンとして、Ami にメチル基のついた Iso、SGA と同様の炭素数 18 個を持つ Oct を選び、SGA も含めて検討を行った。その結果、Iso や Oct は第 4 章 2 節の Fig. 48 で示された Ami と同様に単独添加においても、ある程度の効果を示した(Fig. 58)。また α T と併用した場合はさらに効果は高まったが、SGA には及ばなかった(Fig. 60)。Fig. 62, 63 より Iso や Oct の添加による Acr の生成抑制効果が見られたことから、本検討でも Acr との各種アミノカルボニル化合物が生じたと考えられる。一般的な抗酸化剤であるトコフェロールやポリフェノールはその構造中にヒドロキシ基を持っている一方で、ヒドロキシ基を持たない Oct 等のアミンと Acr で生じるアミノカルボニル化合物にはヒドロキシ基を有するとは考えにくく、ヒドロキシ基以外の化学構造が関与したプロトン供与能の存在やまったく異なる作用機構による抗酸化作用が考えられた。これについては、反応生成物の化学構造決定など詳細な検討が今後必要になると考える。続いて 4 個のアミノ基を持つスペルミンを用いて検討を行った。その結果スペルミンは単独添加でも α T 存在下での SGA による効果を大きく上回る強い抗酸化活性が示された(Fig. 65)。また、 α T をスペルミンと併用した際は、さらに強い抗酸化活性を示した。Lovaas(1991)の報告では、アミノ基を 2, 3, 4 個持つ、プトレシン、スペルミジン、スペルミンによる魚油の抗酸化活性の検討において、アミノ基が多いアミンほど強い抗酸化活性が示されると報告している。またアミノ基が増えるとラジカル消去活性が上がるということも報告もある(Drolet *et al.* 1986)。本検討結果はこれらの報告と一致している。スペルミンと Acr の反応性やその生成物の化学構造については既に報告があり(Takamatsu *et al.* 2014)、Fig.66, 67 においてスペルミン添加によって Acr の生成が抑制されていること

などから、本検討で示されたスペルミン添加による強い抗酸化活性は、スペルミンと Acr の反応生成物によって示される可能性が高い。今後はアミノ基の数が異なるプトレシンやスペルミジンも含め、その反応生成物を同定し、抗酸化活性と反応生成物の構造との相関について検討する必要がある。以上、ヒドロキシ基を持たないアミンによるその酸化安定性について検討を行ったが、AmiOH を除くヒドロキシ基を持つアミンとは異なり、持たないアミンでは単独添加でもある程度の効果を示すことが分かった。またヒドロキシ基を持つアミン(SGA)による効果ほどではないが、 α T との併用でさらに高い酸化安定性が示されることがわかった。加えて、スペルミンのようにアミノ基を多く持つアミンは魚油に対して、さらに高い酸化安定性を示すことが分かった。よって、アミノ基は酸化安定性に影響するファクターであり、さらにその影響は、ヒドロキシ基を持つアルコールアミンほどの強さではないものの、 α T との相互作用も関係すると分かった。

前節までの結果から、 α T が反応生成物との相互作用をする重要な役割を担うことが分かった。 α T はビタミン E 同族体の 1 つであり、抗酸化活性の異なる他同族体が 7 つある。よって第 4 節では、SGA 存在下における、活性が異なる抗酸化剤の種類の違いによる酸化安定性への影響を検討した。サンプルは入手可能であった α , β , γ , δ T3 に加えて α T を用い、魚油と大豆油に対する検討を行った。魚油に抗酸化剤を単独添加した際、著しく速い酸化反応が起きたため、その効果に違いが見られなかった(Fig. 69 B)。一方で SGA と併用した場合では、 δ T3 < α T $\leq$ α T3 << β T3 << γ T3 の順番で高くなった(Fig. 69 A)。また、大豆油においては魚油に比べて穏やかに酸化反応が進むことから、抗酸化剤の単独添加による効果に違いが見られ、効果の高さは、 α T $\leq$ α T3 < β T3 < δ T3 $\leq$ γ T3 と示された(Fig. 70 B)。さらに、SGA と併用添加をした際は、その効果が単独添加と同様の順番で示されることが分かった(Fig. 70 A)。よって、抗酸化剤単体の効果の強さが、SGA との組み合わせによる相乗的な抗酸化活性の強さに影響することが分かった。本検討結果では、 α T と α T3 の効果において大きな違いが生じなかったが、Seppanen ら(2010)は、トコフェロールよりも

トコトリエノールの方が優れた抗酸化効力を有することを述べており、首藤(2018)は、 γ 体のトコフェロールとトコトリエノールを比較した際に、 γ T3 に強い抗酸化活性が示されたと報告している。ビタミン E は食品に使われる一般的な抗酸化剤であるが、その中でも特に γ T3 は、SGA との組み合わせによって、魚油に対する高い酸化安定性を示すことが分かった。

以上第 4 章では応用に向けたより強力な新規抗酸化法を確立することを目的として各種検討を行った。その結果、魚油の酸化安定性の向上には、アミノ酸よりも疎水性のあるアミンを用い、特にヒドロキシ基やアミノ基の官能基、またその数に着目して、単体で強い抗酸化活性を示す抗酸化剤と組み合わせることにより、強い新規抗酸化法を確立できることがわかった。

本研究は、過去に見られた SGA と α T の組み合わせによる強力な抗酸化作用(Shimajiri *et al.* 2013)のメカニズムを明らかにし、そのメカニズムを基により有効な酸化防止法を確立することを目的として各種検討を行った。その結果、魚油のごく酸化初期に生成する Acr が SGA とアミノカルボニル反応を起こして不快臭の原因を除去し、それとともに生じた反応生成物が α T との相互作用で強い抗酸化活性を示すことが分かった。また、さらに強い新規抗酸化法を確立するためには、ある程度の疎水性を持ったアミンにおける官能基やその数に着目し、単体で強い抗酸化活性を示す抗酸化剤との組み合わせが重要であると分かった。

アミノカルボニル反応においてだが、これには賛否両論がある。本研究でアミノカルボニル化合物による抗酸化活性が見られたように、Hidalgo ら(2007)でもアミノカルボニル反応で生じた生成物に抗酸化活性が示されたことを報告している。一方で、脂質の酸化反応により生じたアルデヒドや還元糖中のカルボニル基がアミンと反応してできるものを総称して糖化最終産物(AGEs)と呼ぶが、これは酸化ストレスや炎症、糖尿病や循環器疾患と関わることが報告されている(Silván *et al.* 2011)。しかし同時に、この AGEs の生成に関して高い温度の影響を受けることを述べている。Yasuhara ら(2003)は、Acr とアンモニアやアミノ酸であるアスパラギンとの反応から有毒性のあるアクリルアミドが生成することを報告し

ている。その生成に関して、25-200℃の温度における条件でその生成量を検討したところ、180℃以上で生成する量は、25℃で生成する量のおよそ約 73 倍以上多い量が生じると報告している。このような報告を踏まえ、常温下のアミノカルボニル反応で生じる生成物には毒性が低い可能性が考えられた。そのため本検討における SGA と Acr のアミノカルボニル反応で生じる生成物は、SGA が食経験のある成分であることも含め、安全である可能性は高いが、実際に応用にするにあたっては、その毒性試験も慎重に行う必要があると考える。

参考文献

- 遠藤泰志. 2015. 第 6 章 (p 154-172): 食用油脂の劣化. “油脂の科学” 戸谷洋一郎, 原節子 編集 朝倉書店発行
- 勝木泰隆, 松本茂, 露木英男 1991: α -トコフェロールの酸化防止作用についてのアスコルビン酸ステアリン酸エステルのシナジーズム. 食品衛生学雑誌 32: 533-537
- 厚生労働省 2015: 「日本人の食事摂取基準 (2015 年版) 策定検討会」報告書
- 柴田阿子 2017 (p21-29): 魚油の風味劣化機構および酸化安定性向上に関する研究. 北海道大学 水産科学院 修士論文
- 島尻淳樹 2013 (p6): スフィンゴイド塩基及びその分解物の抗酸化活性の検討. 北海道大学 水産科学院 修士論文
- 菅原達也 2013: 食品機能性成分としてのスフィンゴ脂質の消化と吸収. 日本栄養・食糧学会誌 66: 177-183
- 首藤菜子 2018 (p78-89): 効果的な魚油の酸化劣化防止法に関する研究. 北海道大学 水産科学院 修士論文
- 瀬川 丈史, 原 節子, 戸谷 洋一郎 1994: 魚油の高度不飽和脂肪酸に対するリン脂質の酸化防止挙動 (第 2 報) トコフェロールに対するリン脂質の相乗効果. 油化学 43: 515-519
- 永田好男, 竹内教文 1990: 三点比較式臭袋法による臭気物質の閾値測定結果. 日環セ所報 17: 77-89
- ボルハルト・ショアー現代有機化学 (第 6 版) [下] 2011 (p1047) 化学同人出版
- 丸山武紀 1998. (p98) 脂質栄養と脂質過酸化 学会センター関西
- 湯木悦二, 石川行弘, 吉和哲朗 1974: アミノ酸およびそのエステルの活性酸素法条件における抗酸化性について. 油化学 23: 497-500
- ^a 和田俊, 後藤直宏 2013 (p101-103): 食品機能学-脂質 丸善出版
- ^b 和田俊, 後藤直宏 2013 (p198-199): 食品機能学-脂質 丸善出版
- Aidos, I., Jacobsen C., Jensen B., Luten J. B., Van der Padt A., Boom R. M. 2002: Volatile oxidation products formed in crude herring oil under accelerated oxidative conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104: 808-818
- Akasaka K., Sasaki I., Ohguri H., Meguro H. 1992: A Simple Fluorometry of Hydroperoxides in Oils and Foods. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 56: 605-607

- Alaiz M., Zamora R., Hidalgo F.J. (1996): Antioxidative activity of pyrrole, imidazole, dihydropyridine, and pyridinium salt derivatives produced in oxidized lipid/amino acid browning reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 686–691.
- AOCS 1998: Official methods and recommended practices : Cd8-53
- Atkinson J., Harroun T., Wassall S. R., Stillwell W., Katsaras J. 2010: The location and behavior of α -tocopherol in membranes. *Molecular Nutrition & Food Research* 54: 641–651
- Bhale S.D., Xu Z., Prinyawiwatukul W., King J. M., Godber J. S. 2007: Oregano and rosemary extracts inhibit oxidation of long-chain n-3 fatty acids in menhaden oil. *Journal of Food Science* 72: C504–8
- Chapman T. M., Kim H. J., Min D. B. 2009: Prooxidant activity of oxidized α -tocopherol in vegetable oils. *Journal of Food Science* 74: : C536–C542
- Cosgrove J. P., Church D. F., Pryor W. A. 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22:299-304
- Cui L., Decker E. A. 2016: Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants? *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96:18–31
- Das K. C., Misra H. P. 2004: Hydroxyl radical scavenging and singlet oxygen quenching properties of polyamines. *Molecular and Cellular Biochemistry* 262: 127–133
- Doert M., Jaworska K., Moersel J-T., Kroh L. 2012: Synergistic effect of lecithins for tocopherols: lecithin-based regeneration of α -tocopherol. *European Food Research and Technology* 235: 915–928
- Doert M., Krüger S., Morlock G. E., Kroh L. W. 2017: Synergistic effect of lecithins for tocopherols: formation and antioxidant effect of the phosphatidylethanolamine—l-ascorbic acid condensate. *European Food Research and Technology* 243: 583-596
- Drolet G., Dumbroff E. B., Legge R. L., Thompson J. E. 1986: Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochemistry* 25: 367-371
- Dwyer S. P., O’Beirne D., N’í Eidhin D., O’Kennedy B. T. 2012: Effects of green tea extract and α -tocopherol on the lipid oxidation rate of omega-3 oils, incorporated into table spreads, prepared using multiple emulsion technology. *Journal of Food Science* 77: N58–65
- Endo Y., Hayashi C., Yamanaka T., Takayose K., Yamaoka M., Tsuno T., Nakajima S. 2013: Linolenic acid as the main source of acrolein formed during heating of vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists’ Society* 90: 959-964
- Erdmann M. E., Zeeb B., Salminen H., Gibis M., Lautenschlaeger R., Weiss J. 2015: Influence of droplet size on the antioxidant activity of rosemary extract loaded oil-in-water emulsions in mixed systems. *Food and Function* 6:793–804

- Frankel E. N., Neff W. E., Selke E. 1981: Analysis of autoxidized fats by gas chromatography mass spectrometry: VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autoxidized and photosensitized oxidized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids* 16:279-285
- Frankel E. N. 1991: Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54: 495-511
- ^aFrankel E. N., Huang S-W. 1996: Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 172: 201-208
- ^bFrankel E. N., Huang S-W, Aeschbach R., Prior E. 1996: Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 131-135
- Frankel E. N. 1998. Chapter 4 (p23-41), Lipid oxidation. THE OILY PRESS, vol. 10.
- Gasee F. R., Stenhuis W. H., Groten J. P., Freton V. J. 1996: Toxicity of formaldehyde and acrolein mixtures: in vitro studies using nasal epithelial cells. *Experimental and Toxicologic Pathology* 48: 481-483
- ^aHidalgo F. J., Zamora R. 1993: Nonenzymatic browning and fluorescence development in a (E)-4,5-epoxy-(E)-2-heptenal lysine model system. *Journal of Food Science* 58: 667-670
- ^bHidalgo F. J., Zamora R. 1993: Fluorescent Pyrrole Products from Carbonyl-Amine Reactio. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 16190-16197
- Hidalgo, F. J., Zamora, R. 1995: Characterization of the Products Formed during Microwave Irradiation of the Nonenzymatic Browning Lysine/(E)-4,5-Epoxy-(E)-2-heptenal Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1023-1028.
- Hidalgo F. J., Nogales F. T., Zamora R. 2003: Effect of the Pyrrole Polymerization Mechanism on the Antioxidative Activity of Nonenzymatic Browning Reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5703-5708
- Hidalgo F. J., Nogales F., Zamora R. 2004: Determination of pyrrolized phospholipids in oxidized phospholipid vesicles and lipoproteins. *Analytical Biochemistry* 334: 155-163
- Hidalgo F. J., León M. M., Zamora R. 2007: Effect of Tocopherols in the Antioxidative Activity of Oxidized Lipid-Amine Reaction Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4436-4442

- Holman R. T., Elmer O. C. 1947. The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 24:127-129
- Homma R., Suzuki K., Cui L., McClements D. J., Decker E. A.: Impact of association colloids on lipid oxidation in triacylglycerols and fatty acid ethyl ester. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:10161-10169
- Huang S-W., Hopia A., Schwarz K., Frankel E. N., German J. B. 1996: Antioxidant activity of α -tocopherol and Trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 444–452
- Kashima M., Cha G-S, Isoda Y., Hirano J., Miyazawa T. 1991: The antioxidant effects of phospholipids on perilla oil. *Journal of the American oil Chemists' Society* 68: 119–122
- Kim H. J., Lee H. O., Min D. B. 2007: Effects and prooxidant mechanisms of oxidized α -tocopherol on the oxidative stability of soybean oil. *Journal of Food Science* 72: C223–C230
- Koga T., Terao J. 1994: Antioxidant activity of a novel phosphatidyl derivative of vitamin E in lard and its model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42: 1291–1294
- Laidlaw M., Cockerline C. A., Rowe W.J. 2014: A randomized clinical trial to determine the efficacy of manufacturers' recommended doses of omega-3 fatty acids from different sources in facilitating cardiovascular disease risk reduction. *Lipids in Health and Disease* 13: 99
- Lagishetty C. V., Naik S. R. 2008: Polyamines: Potential anti-inflammatory agents and their possible mechanism of action. *Indian Journal of Pharmacology* 40: 121–125.
- Lee J., Choe E. 2011: Effects of phospholipids on the antioxidant activity of α -tocopherol in the singlet oxygen oxidation of canola oil. *New Biotechnology* 28: 691–697
- Lovaas E. 1991: Antioxidative effects of polyamines. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68: 353-358
- Lu, F. S. H., Nielsen, N. S., Baron, C. P., Jacobsen, C. 2012: Oxidative degradation and non-enzymatic browning due to the interaction between oxidized lipids and primary amine groups in different marine phospholipid emulsions. *Food Chemistry* 135: 2887-2896
- Lu F. S. H., Thomsen B. R., Hyldig G., Green-Petersen D. M. B., Nielsen N. S., Baron C. P., Jacobsen C. 2013: Oxidative stability and sensory attributes of fermented milk product fortified with fish oil and marine phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 90: 1673-1683

- Majid N., Mehdi V., Moein B. 2019: The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. *Food Chemistry* 275:644-660
- Maqsood S., Benjakul S., Abushelaibi A., Alam A. 2014: Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: a detailed review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13: 1125–1140
- Miyashita K. 2014: Paradox of omega-3 PUFA oxidation. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116: 1268-1279
- Pourashouri P., Shabanpour B., Abad Z. N. H., Zahiri S. 2016: Antioxidant effects of wild pistacia (*P. atlantica*), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and green tea extracts on the lipid oxidation rate of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 16: 729–737
- Prevot A. F., Mordret F. X. 1976: Utilisation des Colonnes Capillaires de Verre Pour l'Analyse des Corps Gras par Chromatographie en Phase Gazeuse. *Revue Francaise des Corps Gras* 23: 409-423.
- Rasic-Milutinovic Z., Perunicic G., Pljesa S., Gluvic Z., Sobajic S., Djuric I., Ristic D. 2007: Effects of n-3 PUFAs supplementation on insulin resistance and inflammatory biomarkers in hemodialysis patients. *Renal Failure* 29: 321–29
- Ritter J. C. S., Budge S. M. 2012.: Key lipid oxidation products can be used to predict sensory quality of fish oils with different levels of EPA and DHA. *Lipids* 47: 1169–79
- Saito H., Ishihara K. 1997: Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74: 1531-1536
- Seppanen C. M., Song Q. 2010: The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87: 469-481
- Shahidi F., Ambigaipalan P. 2018: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology* 9: 345–81
- Shibata A., Uemura M., Hosokawa M., Miyashita K. 2018: Acrolein as a major volatile in the early stages of fish oil TAG oxidation. *Journal of Oleo Science*. 67: 515-524
- Shimajiri Junki 2013: スフィンゴイド塩基及びその分解物の抗酸化活性の検討. Master's thesis at Hokkaido University
- Shimajiri J., Shiota M., Hosokawa M., Miyashita K. 2013: Synergistic Antioxidant activity of milk sphingomyeline and its sphingoid base with α -tocopherol on fish oil triacylglycerol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 7969–7975

- Silván J. M., Assar S. H., Srey C., Castillo D. D., Ames J. M. 2011: Control of the maillard reaction by ferulic acid. *Food Chemistry* 128: 208-213
- Snyder J.M., Frankel E. N., Selke E., Warner K. 1988: Comparison of gas chromatographic methods for volatile lipid oxidation compounds in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 65:1617–20
- Swoboda P., Peers K. 1978: Trans-4,5-epoxyhept-trans-2-enal –major volatile compound formed by copper and alpha-tocopherol induced oxidation of butterfat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 29: 803-807
- Tadoloni B., 1988: Polyamine inhibition of lipoperoxidation-The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochemical Journal* 249: 33-36
- Takamatsu M., Fukase K., Kurbangalieva A., Tanaka K. 2014: Imino [4+4] cycloaddition products as exclusive and biologically relevant acrolein-amine conjugates are intermediates of 3-formyl-3,4-dehydropiperidine (FDP), an acrolein biomarker. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22: 6380–6386
- Takenaka A., Hosokawa M., Miyashita K. 2007: Unsaturated phosphatidylethanolamine as effective synergist in combination with α -tocopherol. *Journal of Oleo Science* 56: 511–516
- Tanaka K., Siwu E. R. O., Hirosaki S., Iwata T., Matsumoto R., Kitagawa Y., Oradipita A. R., Okumura M., Fukase K. 2012: Efficient synthesis of 2,6,9-triazabicyclo [3.3.1] nonanes through amine-mediated formal [4+4] reaction of unsaturated imines. *Tetrahedron Letters* 53: 5899–5902
- Tsutsui A., Tanaka K. 2013: 2,6,9-Triazabicyclo[3.3.1]nonanes as overlooked amino-modification products by acrolein. *Organic and Biomolecular Chemistry* 11: 7208-7211
- Uchida K. 1999: Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends in Cardiovascular Medicine* 9: 109–113
- Yasuhara A., Tanaka Y., Hengel M., Shibamoto T. 2003: Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 3999-4003
- Yehuda S., Rabinovitz S., Mostofsky D. I. 2005: Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging. *Neurobiology of Aging* 26: 98–102
- Zamora, R., Hidalgo, F. J. 1994: Modification of lysine amino groups by the lipid peroxidation product 4,5(E)-epoxy-2(E)-heptenal. *Lipids* 29: 243-249
- Zamora R., Alaiz M., Hidalgo F.J. (1997): Feed-back inhibition of oxidative stress by oxidized lipid/amino acid reaction products. *Biochemistry* 36: 15765–15771.

- Zamora R., Hidalgo F. J. 2005: Coordinate contribution of lipid oxidation and maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 49-59.
- Zhou L., Zhao M., Khalil A., Marcic C., Bindler F., Marchioni E. 2013: Identification of volatiles from oxidised phosphatidylcholine molecular species using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405: 9125-9137
- Zhu Q, Liang C-P, Cheng K-W, Peng X, Lo C-Y. 2009. Trapping effects of green and black tea extracts on peroxidation-derived carbonyl substances of seal blubber oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1065–1069

謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学水産科学研究院 宮下和夫教授に心より深謝いたします。本研究をまとめるにあたり、貴重なご助言とご校閲を賜りました北海道大学水産科学研究院 細川雅史教授、また酒井隆一教授にも心から感謝いたします。また本研究を進めるにあたり、サンプルの提供や貴重なご意見を賜りました理化学研究所大学田中生体機能合成化学研究室 田中克典主任研究員にも感謝いたします。

さらに、サンプルとして魚油を提供して頂きましたマルハニチロ株式会社様、エキウムオイルを提供して頂きました De Wit Speciality oils 会社様、そして共同で研究に携わらせて頂きました雪印メグミルク株式会社様にも深く感謝いたします。進学に快く承諾して頂きました家族、そして大学生活を共に支え合った友人にも感謝いたします。

本研究は、日本学術振興会(JSPS)の特別研究員奨励費(JP18J11380)の助成により行われました。

最後に、本研究は北海道大学水産学部機能性物質化学研究室の皆様、専攻事務員の皆様方のご協力により行われたものです。厚くお礼申し上げます。