

食品からのクロロホルム・メタノール抽出による脂質の酸化

平岡英子

(京都女子大学家政学部)

平成3年7月17日受理

Oxidation of Lipids during Extraction from Foods with Chloroform-Methanol

Eiko HIRAOKA

Faculty of Home Economics, Kyoto Women's University, Kyoto 605

In this study, lipids were extracted from various foods with chloroform-methanol in the absence or the presence of antioxidants and the extent of oxidation during this procedure was determined in terms of peroxide value, TBA value, and tocopherol content. The oxidation of lipids proceeded during and after extraction and was inhibited by the addition of appropriate amount of antioxidants. This oxidation was significant in samples rich in hemoglobin or after heating. Therefore, it is required to pay sufficient attention to the oxidation of lipids during extraction from beef and storage, blue-skinned fishes or their processed foods. It is also very important to show the extraction condition at the presentation of data about lipid oxidation.

(Received July 17, 1991)

Keywords: oxidation 酸化, lipids 脂質, chloroform-methanol mixture クロロホルム・メタノール混液, extraction 抽出, peroxide value 過酸化値, tocopherol トコフェロール.

1. 緒言

近年、日本人の食生活の欧米化に伴う成人病予防の観点から、高度不飽和脂肪酸の摂取が推奨されている。一方、過酸化脂質の摂取と疾病や老化との関係についても注目されており、食品脂質の酸化の程度を正確に把握し、コントロールしていくことが大きな課題となってきた。通常、動物性食品の酸化の程度は、Folch らや Bligh & Dyer の方法に従い、クロロホルム・メタノール混液 (CM) を用いて抽出された脂質について、過酸化値 (PV)、チオバルビツール酸 (TBA) 値、酸価 (AV) などを測定することにより判定される^{1)~9)}。

CM は組織を強力に破壊するため脂質抽出率には優れているものの、脂質以外の成分の混入によって抽出時に酸化が起こる可能性は大きい。著者は先に、揚げ牛肉から CM を用いて抽出を行うと、他の溶媒を用いた場合に比べてトコフェロール (Toc) が明らかに減少し、また抽出した脂質の酸化安定性も著しく劣ることを認めた¹⁰⁾。また、Watanabe らは、マグロの脂肪酸組成におよぼす CM 抽出の影響を検討し、常法通りの抽出操作で高度不

飽和脂肪酸が減少することを報告している¹¹⁾。これらの結果はいずれも CM 抽出時に酸化が起こっていることを示しているが、その酸化の程度や抽出条件による違いを詳細に検討した報告はなく、抗酸化剤の添加に関しても曖昧なのが現状である。一般に食品中の脂質の酸化度を示す数値は、試料の個体差や処理の仕方、あるいは測定法の違いなどから各報文間で比較するのは難しいが、脂質の酸化に関するより正確な情報を交換するためには、少なくとも抽出条件の再検討、統一が必要と思われる。本報告では、食品からの CM 抽出に伴う脂質の酸化程度および抽出脂質の酸化の進行を解析し、この酸化を抑えるために必要な抗酸化剤の量に検討を加えた。

2. 実験方法

(1) 試料およびその調製

4~7 月にかけて市販の新鮮なマアジを 1 回につき 6~8 尾、5 回にわたって購入し購入時の試料間の差をみた。購入したマアジは三枚に卸し、皮および皮下脂肪を除いて普通肉と血合肉に分けてフードカッターで均一にし

表 1. BHT 無添加および添加したマアジ普通肉、血合肉からクロロホルム・メタノール混液で抽出した脂質の性状

試料 ^{a)}		総脂質 (%)	PV(meq/kg)		TBA 値 ^{c)}		α -Toc(μ g/g) ^{d)}	
			BHT(%) ^{b)}	0	0.5	0	0.5	0
普通肉	①	4.1	5.3	4.8	4.8	4.2	173.8	194.0
	②	7.4	2.2	1.2	4.3	1.7	129.0	159.3
	③	9.1	2.5	1.4	4.7	2.4	91.3	107.6
	④	10.3	4.8	3.3	8.1	3.3	103.1	135.2
	⑤	5.3	6.6	5.3	9.4	5.0	90.1	129.1
血合肉	①	12.0	5.4	3.0	9.5	3.6	165.6	267.3
	②	19.5	5.3	2.6	8.6	2.8	149.1	211.5
	③	19.4	5.2	2.7	8.3	4.2	107.3	207.5
	④	15.3	8.3	4.3	20.0	5.6	17.0	160.7
	⑤	19.1	7.6	4.3	14.8	5.5	66.5	175.0

^{a)}魚は4～7月のもの、1試料につき6～8尾を使用し、3回の平均値で示した。^{b)}BHTの添加量は試料重量に対する割合。^{c)}脂質1kgあたりのマロンジアルデヒドをmgで示した。^{d)}脂質あたりの値。

た。各種食品からの抽出はマアジの他に牛肉、卵黄、大豆を用い、各試料間の有意差を検定するために同一試料につき5回の繰り返し実験を行った。牛肉はもも肉をブロックで購入しミンチにした。卵黄は新鮮鶏卵黄を凍結乾燥し、大豆は乾豆を煮熟して皮を除きいずれも細砕した。マアジと牛肉はミンチにしたものを、50g当たり1分間電子レンジにかけて加熱試料とした。

(2) 脂質の抽出方法

各試料からのCM混液(クロロホルム/メタノール:2/1:v/v)による脂質の抽出はFolch¹²⁾らの方法に準じて行った。操作の概略は、試料(水分70%)に12倍量のCM液を加え、ホモジナイザー(日本製機)で12,000回転、2分間攪拌抽出した後、吸引濾過した。残渣に1/2量のCM混液を加え、再度上記の操作を行った。抽出液を合せ、0.2容の蒸留水を加えて水洗し、3,000回転、10分遠沈した。下層をロータリーエバポレーターで減圧濃縮して得た脂質をクロロホルムで定容し抽出脂質とした。抽出操作中の酸化度を知るために、試料重量の0.5%のブチルヒドロキソトルエン(BHT)をCM混液に添加して抽出したものを対照として比較した。抽出開始から測定までの時間はおよそ2時間であった。また、抽出操作は直射日光の当たらない実験室内で行い、室温は23±1℃であった。なお、抽出はすべて特級試薬を用いて行った。

(3) 脂質の性状

CM抽出による脂質の酸化度の指標としてPV, TBA値, Toc量を測定した。PVの測定は基準油脂分析試験

法¹³⁾、TBA値は松下的方法¹⁴⁾で行った。Toc量の測定は高速液体クロマトグラフィーで行った。装置は島津LC-6Aを用い、カラムは島津ソルバックスNH₂(4.6mm×150mm)、移動相はヘキサン/イソプロパノール(100/2:v/v)、流速1.0ml/分、検出器は島津分光蛍光光度計RF-535(Ex. 290nm, Em. 330nm)で行った。

(4) 抽出脂質の変化

マアジ血合肉40gから上記通りCM抽出し、得た脂質をクロロホルムで50mlに定容した。この抽出脂質(抽出開始から2時間のもの)を室温に放置し、1, 2, 4, 22, 46時間後(抽出開始からは3, 4, 6, 24, 48時間後)にPV, TBA値およびToc量を測定した。抽出時に0.5% BHTを添加したものを対照とした。

(5) 抗酸化剤の添加量

マアジ血合肉各5gにBHTを0, 0.2, 0.5, 1.0%, ビロガロールを0, 0.05, 0.1, 0.5%および各割合のBHTとビロガロール両者をCMに添加して前述通りCM抽出しToc量を測定した。

3. 結果と考察

(1) 各種食品から抽出した脂質の性状

表1に、5つのマアジ普通肉と血合肉からCM抽出により得られた脂質の性状を示した。BHT添加のPVは、普通肉では1.2～5.3mg/kg、血合肉では2.6～4.3mg/kgの幅が見られるが、普通肉と血合肉の間にはほとんど差はなく、TBA値も同様であった。このように、購入した時点でのマアジの試料間に若干の差はあるものの

食品からのクロロホルム・メタノール抽出による脂質の酸化

表 2. BHT 無添加および添加した各種食品からクロロホルム・メタノール混液で抽出した脂質の性状

試料		総脂値	PV (meq/kg)			TBA 値 ^{b)}			総 Toc (μg/g) ^{c)}		
		(%)	BHT(%) ^{a)}	0	0.5	0	0.5	0	0.5		
生	牛	6.6	8.8	**	5.4	8.1	**	1.4	0.0	**	37.9
	もも肉	±0.1	±0.6		±0.2	±2.3		±0.0	±0.0		±4.9
	アジ	5.8	6.6	**	5.3	9.4	**	5.0	90.1	**	129.1
	普通肉	±0.1	±0.2		±0.3	±0.8		±0.8	±5.4		±2.1
加 熱	アジ	19.1	7.6	**	4.3	14.8	**	5.5	66.5	**	175.0
	血合肉	±0.2	±1.3		±0.5	±2.0		±0.9	±2.8		±8.6
	牛	6.6	17.0	**	7.1	27.3	**	2.2	0.0	**	29.1
	もも肉	±0.2	±1.7		±0.8	±2.7		±0.2	±0.0		±4.2
そ の 他	アジ	5.5	8.2	*	7.1	13.8	**	6.5	18.3	**	67.0
	普通肉	±0.0	±0.5		±0.5	±1.7		±1.4	±6.0		±3.3
	アジ	22.6	57.9	**	8.4	65.9	**	13.9	0.0	**	53.0
	血合肉	±0.4	±22.7		±1.1	±15.0		±2.6	±0.0		±8.8
凍結乾 燥卵黄 煮大豆	凍結乾	61.6	1.6	n. s	1.8	0.5	n. s	0.4	66.4	n. s	66.9
	燥卵黄	±0.5	±0.3		±0.4	±0.1		±0.1	±5.4		±3.5
	煮大豆	8.8	1.6	n. s	1.6	0.6	n. s	0.7	977.8	n. s	911.0
		±0.6	±0.6		±0.8	±0.1		±0.2	±18.8		±88.4

数値は5回の平均値 $\pm$ 標準偏差。^{a)}BHT添加量は試料重量に対する割合。^{b)}脂質1kgあたりのマロンジアルデヒドのmgで示した。^{c)}総Tocは脂質あたりの α -, γ -, δ -の総計。* 5%の危険率で有意差有り, ** 1%の危険率で有意差有り, n.s有意差なし。

普通肉と血合肉の酸化程度に差は認められなかった。一方、 α -Toc量は普通肉よりも血合肉の方が多かった。一般に魚の普通肉は血合肉に比べて酸化安定性が高いとされており、その原因の一つとして、山田¹⁵⁾は普通肉のToc量が血合肉に比べて多いことをあげているが、筆者は表1に示したアジの他、サバやイワシにおいても普通肉よりむしろ血合肉の方がToc量が多いという結果を得ている。

これらの試料からBHT無添加で抽出すると、いずれの試料においてもBHT添加に比べて α -Tocが減少し、PV、TBA値が高くなる傾向にあった。次に、マアジを含めた数種の食品について試料間の影響を除くために同一試料を5つに分けて抽出し、そのBHT添加と無添加の平均値の差をt検定した(表2)。無添加でCM抽出すると牛肉、マアジ普通肉、マアジ血合肉では添加に比べて有意に α -Tocが減少し、PV、TBA値が増加した。この傾向は、牛肉、マアジ血合肉で強く認められ、さらに加熱した牛肉およびマアジ血合肉でBHT添加と無添加との差が著しく大きくなった。また、表には示してい

ないが加熱血合肉の場合、PV、TBA値、 α -Tocのような高感度の酸化マーカーのみならず、脂肪酸レベルでも対照に比べてBHT無添加でエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸の有意な低下が見られ、これはマグロの脂肪酸組成におよぼすCM抽出の影響を検討したWatanabeら¹¹⁾の報告と一致する。

一方、煮大豆および乾燥卵黄ではPV、TBA値、Toc量のいずれにも対照と無添加との間に有意差は見られなかった。脂質の酸化は種々の要因に影響される。抽出時の外的因子としては、空気、温度、時間および光の影響などがあげられるが、食品によって酸化の状況が異なる原因としては、その脂肪酸組成、Toc量、リン脂質量などのほかに金属やヘム化合物量などが考えられる。今回用いた試料の分析の結果、マアジ、卵黄にはエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸など高度不飽和脂肪酸が含まれ、大豆もリノール酸を約50%含んでおり、脂肪酸組成では牛肉が最も安定である。一方、Toc量は大豆で脂質1gあたり約1mgと最も多く、次いでマアジ血合肉>普通肉>卵黄>牛肉の順である。総脂質中に占

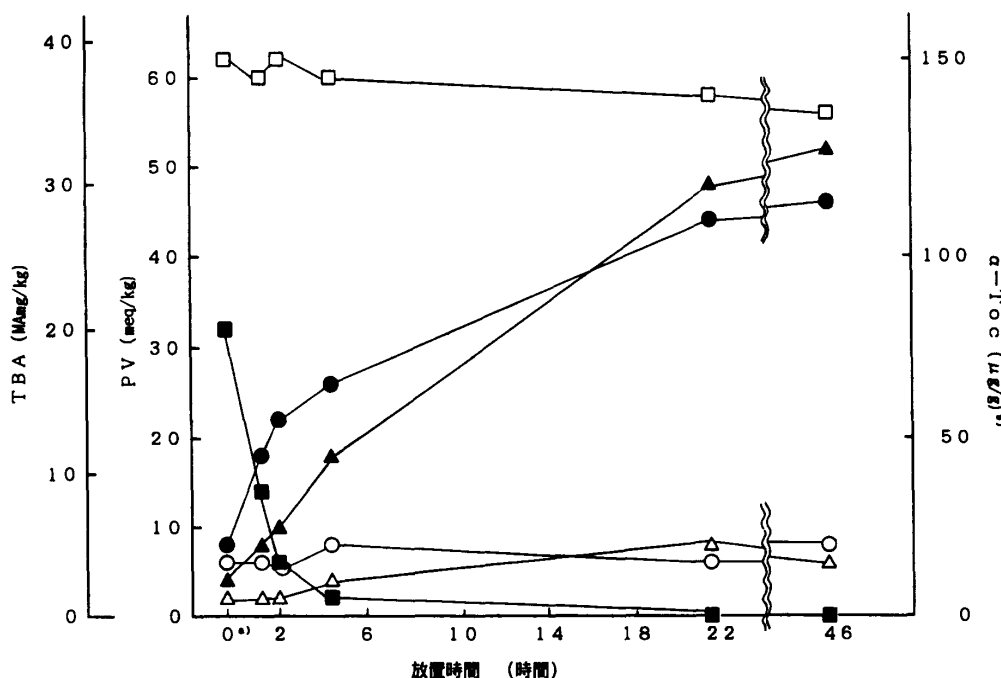


図 1. クロロホルム・メタノール混液で抽出したマアジ血合肉脂質の放置による変化
 a) 抽出直後, b) α -Toc は脂質あたりの値, ○—○ BHT 0.5%・PV, △—△ BHT 0.5%・TBA 値, □—□ BHT 0.5%・ α -Toc, ●—● BHT 無添加・PV, ▲—▲ BHT 無添加・TBA 値, ■—■ BHT 無添加・ α -Toc, BHT の添加量は試料重量に対する割合。

めるリン脂質の割合は卵黄が約 30%, マアジ血合肉, 普通肉, 牛肉, 大豆では 5~10% であった。また試料中の鉄を測定して脂質 1g あたりで示すとおよそ卵黄 150 μ g, マアジ普通肉 400 μ g, 血合肉 1,000 μ g, 大豆 500 μ g となる。このように, これらの要因は BHT 無添加で酸化が容易に起こる牛肉, アジ普通肉, 血合肉のグループと酸化が起こりにくい卵黄, 大豆のグループに分ける因子とは考えにくい。

以上の点から, CM 抽出による脂質の酸化は牛肉やマアジに共通に含まれるヘム化合物によるものと考えられる。脂質の自動酸化を促進する要因の一つにヘム化合物があるのはよく知られているが¹⁶⁾CM で抽出した場合にも, その操作中に牛肉中のヘム化合物が脂質と接触し, 酸化を促進するものと推察される。また, 魚を加熱すると各種の酸化分解物が生成すると言われており¹⁷⁾¹⁸⁾, これらの酸化分解物は抽出操作中のヘム化合物の酸化作用をさらに促進するため, 生肉に比べて加熱肉の方が BHT 無添加での酸化が進みやすいものとする。

(2) 抽出脂質の変化

図 1 にアジ血合肉から CM 抽出した脂質の放置による変化を示した。BHT 添加のものでは Toc の若干の減少はあるものの PV, TBA 値ともほとんど変化しなかつ

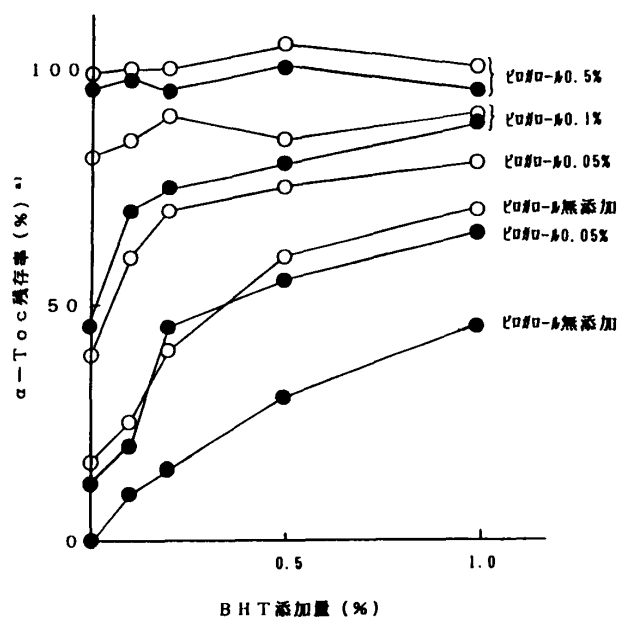


図 2. マアジ血合肉に対する抗酸化剤の添加量と Toc 残存率

a) α -Toc 残存率はピロガロール 0.5% + BHT 1.0% の α -Toc 量を 100% とした時の値, BHT, ピロガロールの添加量は試料重量に対する割合, ○ 未加熱血合肉, ● 加熱血合肉。

食品からのクロロホルム・メタノール抽出による脂質の酸化

表 3. マアジ血合肉およびアジ干物に対する BHT, ピロガロールの添加量と PV

	添加量 ^{a)} (%)	PV (meq/kg)			
		マアジ血合肉		アジ干物可食部	
		未加熱	加熱	購入直後	3 日冷蔵
無添加	0	7.6±1.5**	57.9±22.7**	20.9±1.3**	64.0±7.1**
BHT	0.1	5.9±0.5*	10.3±0.5**	18.3±0.8**	54.3±7.5**
	0.2	5.0±0.5	9.7±0.6*	15.0±0.8	52.3±4.4**
	0.5	4.6±0.3	8.4±1.1	14.6±0.6	46.8±3.2
	1.0	4.3±0.5	8.3±0.8	13.9±0.7	44.8±1.4
ピロガロール	0.5	4.1±0.4	8.1±0.4	13.7±0.8	44.7±3.0

^{a)} 添加量は試料重量に対する割合。* 0.5%ピロガロール添加の PV との間に 5%危険率で有意差有り, ** 0.5%ピロガロール添加の PV との間に 1%の危険率で有意差有り。

た。一方, BHT 無添加で抽出した場合, 抽出中の酸化によって抽出直後ですでに α -Toc は約 40%に減少し, さらに放置することによって 4 時間後には数%となり 22 時間後にはほとんど検出できなかった。PV は抽出直後では BHT 添加のもので 4.3 meq/kg, 無添加で 7.6 meq/kg とその差は小さいが, BHT 無添加では放置中の α -Toc 量の減少とともに経時的に上昇し, 放置 4 時間後には 24.5 meq/kg, 22 時間後には 42.3 meq/kg に上昇した。また TBA 値にも同様の傾向が認められた。

ところで, 表 2 に示したように加熱血合肉のような酸化の起こりやすい試料では抽出直後ですでに α -Toc はほとんどなくなって PV, TBA も著しく上昇しており, 酸化の速度は試料によってかなり異なるものと思われる。以上の結果より, CM 抽出による脂質の酸化は抽出操作中および放置中に経時的に進行していること, したがって抗酸化剤無添加で抽出した供試油を用いると, 抽出開始から測定までの時間によってその測定値にかなり差が生じる可能性があることがわかった。

(3) 抗酸化剤の添加量

マアジ血合肉およびマアジ加熱血合肉に試料重量に対し BHT 0~1.0%およびピロガロール 0~0.5%を添加して抽出した時の, 抽出脂質の α -Toc 残存率を図 2 に示した。またその時の PV を表 3 に示した。 α -Toc 残存率は BHT およびピロガロールの添加量の増加に伴って高くなっており, 未加熱, 加熱血合肉ともに Toc の分解を完全に抑えるためにはピロガロール 0.5%の添加が必要であった。一方, PV は抗酸化剤の増量に伴って低くなるものの, 未加熱マアジ血合肉では BHT 0.2%添加とピロガロール 0.5%との間に有意差は認められず, また加熱した血合肉では BHT 0.5%添加との間に有意差は

認められない。したがって, これらの試料では BHT 0.2%または 0.5%が PV の測定に必要な添加量と考えられる。

酸化の進んだ試料の例として, 表 3 にアジ干物に対する抗酸化剤の添加量と PV を示した。マアジ血合肉同様, アジ干物においても BHT 0.2%あるいは 0.5%の添加が必要であった。CM を用いた抽出脂質について酸化度を測定している報文をみるとその抽出方法には「Folch あるいは Bligh & Dyer 法に準拠した」と記述されているのみのものが多いため, 抗酸化剤の使用の有無や使用量については明らかでないが, 抗酸化剤の使用を明記した報文^{19)~21)}ではその使用量は 0.002%~0.06%である。しかし, 本実験でも明らかのように, 抗酸化剤の適量は酸化の起こり易さつまり試料中の酸化分解物の量やヘム含量などによって異なってくるので, 抽出時には試料および実験目的に応じて使用する抗酸化剤の種類と量について検討する必要がある。著者の経験では PV および TBA 値の測定には BHT 0.2%が一応の添加量の目安となると考えている。ちなみに, これは上記報文で使用されている量の 3~100 倍である。ところで BHT は脂質として回収されるので, PV, TBA 値等を計算する時注意が必要である。今回筆者は BHT 無添加抽出での脂質回収量を用いて計算したが, 添加した BHT が 100%回収されるとして脂質量を補正して計算しても同じ数値を得た。また, 大豆油に BHT を添加しても PV, TBA 値に変化は認められなかったことから, BHT はこれらを測定する実験の抗酸化剤として適当と考えられる。なおピロガロールは BHT よりも少量で強い抗酸化力を示すが, ピロガロールを添加した脂質の PV は経時的に低くなる傾向が認められるので, その使用には注意を要す

る(未発表)。また、抽出時に抗酸化剤を用いることができない実験では、常に抽出で得た試料油の酸化程度を把握しておくことが必要である。この場合、対照としてピロガロールを適量添加して抽出を行い、Tocを測定することによって抽出による酸化の指標にすることができる。

以上の結果より、獣肉や魚肉から抗酸化剤無添加で脂質をCM抽出すると、その操作中および放置中に経時的に酸化が進行し、PVやTBA値など酸化度を示す数値にも影響することが明らかとなった。このCM抽出による脂質の酸化は、ヘム含量の多いものや加熱した試料で著しく進むので、牛肉や魚肉およびそれらの調理、加工、保存品からCM抽出する際には、適量の抗酸化剤を添加するなど、十分な注意を払う必要がある。また、脂質の酸化度を測定する報告には抽出条件の明記が必要であると考えられる。

4. 要 約

各種食品からCMによって脂質を抽出し、その操作中および放置中の脂質の酸化の程度と抗酸化剤の適量について検討した。

(1) 牛肉、マアジ普通肉、血合肉からBHT無添加でCM抽出すると、BHT添加のものに比べてTocは減少しPV、TBA値は有意に高くなった。この傾向は生肉よりも加熱肉で顕著に認められた。卵黄、煮大豆では有意な変化はなかった。

(2) マアジ血合肉からCM抽出した脂質は放置中にもその酸化が進んだ。BHT無添加で抽出した場合、Tocは抽出直後ですでに約50%に減少しており、さらに4時間放置すると約2%に減少した。PV、TBA値もTocの減少に伴って上昇した。

(3) 酸化の起こりやすい食品(マアジ血合肉)あるいはすでに酸化の進んだ食品(アジ干物)から脂質をCM抽出する場合には、かなり多量の抗酸化剤(BHT 0.2~0.5%)が必要であった。

本研究の実施にあたり貴重なご助言、ご指導を下さいました神戸学院大学堀本五郎教授、奈良女子大学の楊輝佳教授、本学成田宏史助教授に深く感謝致します。

なお、本論文の一部は平成3年度日本家政学会第43回大会において発表した。

引 用 文 献

- 1) 奥 忠武：日食工誌，30，351 (1983)
- 2) 原 節子，古賀由里，戸谷洋一郎：栄食誌，41，220 (1988)
- 3) 横川洋子：調理科学，22，224 (1989)
- 4) 宅野雅巳，太田静行：油化学，39，410 (1990)
- 5) 佃 信夫：日食工誌，27，388 (1980)
- 6) 田代勇生，露木英夫：日食工誌，31，512~513 (1984)
- 7) 山口邦子，豊水正道，中村 孝：日水誌，50，1245 (1984)
- 8) 伊達邦子，角田聖斎，内山 均：家政誌，35，840 (1984)
- 9) 山本由喜子，宮本梯次郎：調理科学，23，308 (1990)
- 10) 平岡英子：調理科学，24，304 (1991)
- 11) Watanabe, E., Fukuda, M., Hayashi, T. and Toyama, K.: Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 52, 1473 (1986)
- 12) Folch, J., Lees, M. and Stanley, C.H.: J. Biol. Chem., 226, 497~509 (1957)
- 13) 日本油化学協会(編)：基準油脂分析試験法，2. 4. 12-17 (1972)
- 14) 松下雪郎：栄養と食糧，34，532 (1981)
- 15) 山田充阿弥：東海区水産研究所業績，99，23 (1979)
- 16) Tappel, A.L.: Arch. Biochem. Biophys., 44, 378 (1953)
- 17) 小泉千秋，Kieu-Thu, C. T., 野中順三九：日水誌，45，1307~1312 (1979)
- 18) Zipzer, M. W. and Watis, B. W.: Food Technol., 15, 318~321 (1960)
- 19) 浅野一郎，松下雪郎：栄食誌，37，273 (1984)
- 20) 浅川具美：調理科学，19，302 (1986)
- 21) Cho, S.-Y., Endou, Y., Fujimoto, K. and Kaneda, T.: Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 542 (1989)