

スクアレンの酸化劣化に関する検討

河野 恵宣*・芝原 敦*・孫 偉*・塩盛 弘一郎*・
馬場 由成・吉澤 秀和・上村 芳三・幡手 泰雄
(受理 平成8年6月5日)

OXIDATION OF SQUALENE

Yoshinobu KAWANO, Atsushi SHIBAHARA, We SON,
Koichiro SHIOMORI, Yoshinari BABA,
Hidekazu YOSHIZAWA, Yoshimitsu UEMURA
and Yasuo HATATE

Oxidation behaviors of squalene were investigated in various conditions. Oxidation rates of squalene were measured by batch and flow reactor systems. In batch system, oxygen pressure depression in the reactor were measured continuously and automatically. In flow system, total concentrations of peroxides formed were measured by a titration method, and six kinds of peroxides were separately detected by a HPLC instrument with UV detector and with chemical luminescence (CL) detector for each time. Oxidation of squalene was proceeded by two periods of the induction having very low rate and the acceleration having very high rate. Overall formation rates of peroxides were represented by the first order equations for squalene concentration in both periods. Both rate constants for the rate equations were determined as a function of temperature. It was found by the gel permeation chromatograph and HPLC analysis that peroxides were decomposed or polymerized consecutively to form low molecular weight carbonyl, ketone or carboxylic acids and tetramer of squalene.

1. 緒 言

生体内および皮膚上に存在する不飽和脂質は酸素の存在下の種々の条件で酸化され過酸化物を生成する。過酸化物は不安定であり酸素または他の脂質や過酸化物との反応または分解反応を繰り返して、種々の酸、アルデヒドおよびケトン類等身体的に有害な二次生成物を生じる。脂質の酸化反応に関して、その反応機構の定性的解析は多く、その反応がラジカル連鎖反応で進行することが報告されている^{1, 2)}。しかし、その速度を定量的に検討した研究は非常に少なく、速度解析の研究は殆ど行われていない。筆者らは、脂質の構成

脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸およびそれらのエチルおよびメチルエステルの酸化反応速度がラジカル連鎖反応機構によって説明されることを示し、その機構に基づいて、それらの酸化反応速度を工学的に利用できる速度式として表した^{3, 4, 5)}。スクアレンは人間の皮膚表面における脂質の主たる構成脂肪である³⁾。スクアレン(C₃₀H₅₀)はドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)と同様な複数の不飽和結合を有する炭化水素系脂質であり、酸化に対して非常に感度の高い脂質である。従って、酸素存在下における過酸化物および二次酸化物の生成といった酸化反応挙動に対する方策を講じるが必要となる。本

* 宮崎大学工学部

報では、スクアレンの酸化反応速度解析を行うための基礎的知見を得るため、スクアレンの酸化反応における酸素の結合箇所と各種生成物の生成速度に関する定性的な解析を行うことを目的として研究を行った。

1. 実験

1.1 試料および分析方法

スクアレンは純度 99 % 以上のもの(綺羅化粧品(株)から提供された)をそのまま精製せずに使用した。酸素および窒素ガスは純度 99.9 および 99.999 % のものを、高圧ポンプより、塩化カルシウムおよびソーダライム管を通して直接反応器に送入した。スクアレン濃度は高速液クロマトグラフ(HPLCと略称する)でカラムにCAPCELLPAC-C18(資生堂(株))を用いメタノールを移動相として分離後、UV検出器で検出定量した。スクアレンは保持時間 17 min で検出された。スクアレンの6種類の酸化物はHPLCで分離後、ルミノールを用いる化学発光(CL)検出器で検出定量した。HPLC/CLの分析チャートの一例を図1に示す。極性の高い6個の過酸化基を有する過酸化物は3.2 minに検出され、5~1の過酸化基を有した過酸化物は3.6, 4.2, 5.1, 6.1 および 16 minに検出されている⁸⁾。さらに、生成した過酸化物の全濃度をヨウ素滴定法⁴⁾に従って測定した。この測定で酸化反応で使用された酸素の量、即ち、過酸化基の全量を決定した。ヨウ素滴定法で使用したチオ硫酸、重クロム酸カリウム、デンプン試薬はいずれも試薬特級をそのまま用いた。また、反応後期において、溶液の粘度が高くなり、反応溶液中に酸素を送入できなくなった。この期間で生成した最終生成物の分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフ(GPC)で測定した。

1.2 実験装置および方法

スクアレンの酸化反応速度は、回分式装置と連続式装置の二つの反応装置を用いて測定した。回分式装置のフローシートを図2に示し、反応器の概略を図3に示す。(この測定を測定Aと略称する)Rは反応容器、KA, KB, KCはコック、Vは容積約800 mlのガス溜ガラス容器、PM1およびPM2は圧力自動測定装置(1.0 bar および -1000 mm H₂O ~ 1000 mm H₂O 測定可能)である。まず、反応容器にスクアレン約45 g(約50 ml)を精秤して仕込む。コックKAを閉じ、KBおよびKCを開の状態状態で真空ポンプで、反応容器中のスクアレンから気泡が発生しなくなった後、更に約20分(反応容器およびガス溜容器を)減圧する。KCを

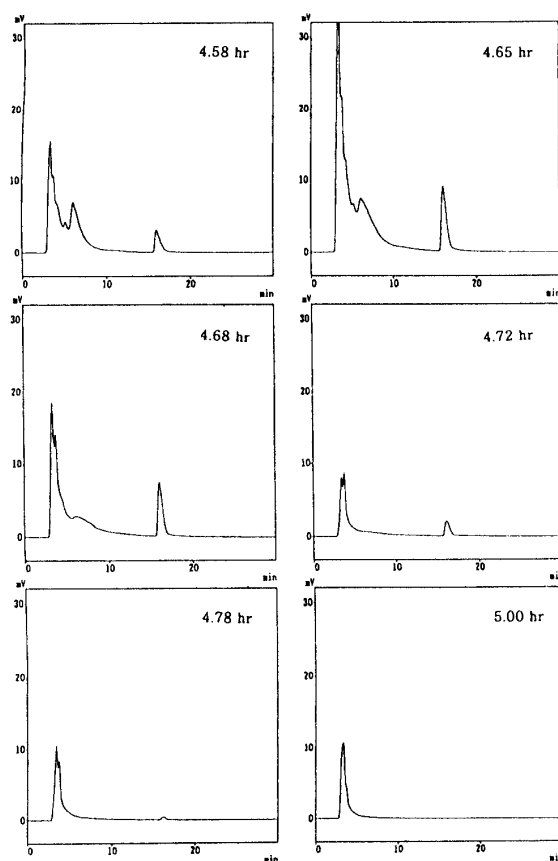


Fig. 1. HPLC chromatogram of oxidation products with chemiluminescence detector

閉じ、KBを反応容器向きに開き、KAを開にして、約0.2 barの酸素ガスを封入して、KAおよびKBを閉じる。反応容器の外筒に所定温度のポリエチレングリコールを流して、反応容器と試料の温度を所定温度まで上昇させる。試料が所定温度に達した後、KCを開き、酸素を反応容器に約700 mm H₂O封入してKCを閉じる。酸化反応は酸素封入直後に開始され、反応の進行とともに反応容器中の酸素圧力が減少する。容器内の酸素の圧力変化はPM2によって連続的に自動的に測定した。酸素および窒素ガスはシリカゲルおよびソーダライム管を通して、水分および二酸化炭素を除去して使用した。尚、反応容器は暗箱内に設置して、紫外線から遮断した。反応中に減少した酸素は全て酸化反応に使用されたものと仮定して、容器中の酸素圧力変化から反応容器中の脂質の過酸化物価(POV)を次式によって決定した。

$$POV = \Delta n \times 10^3 / \{w \times 10^{-3}\} \quad (1)$$

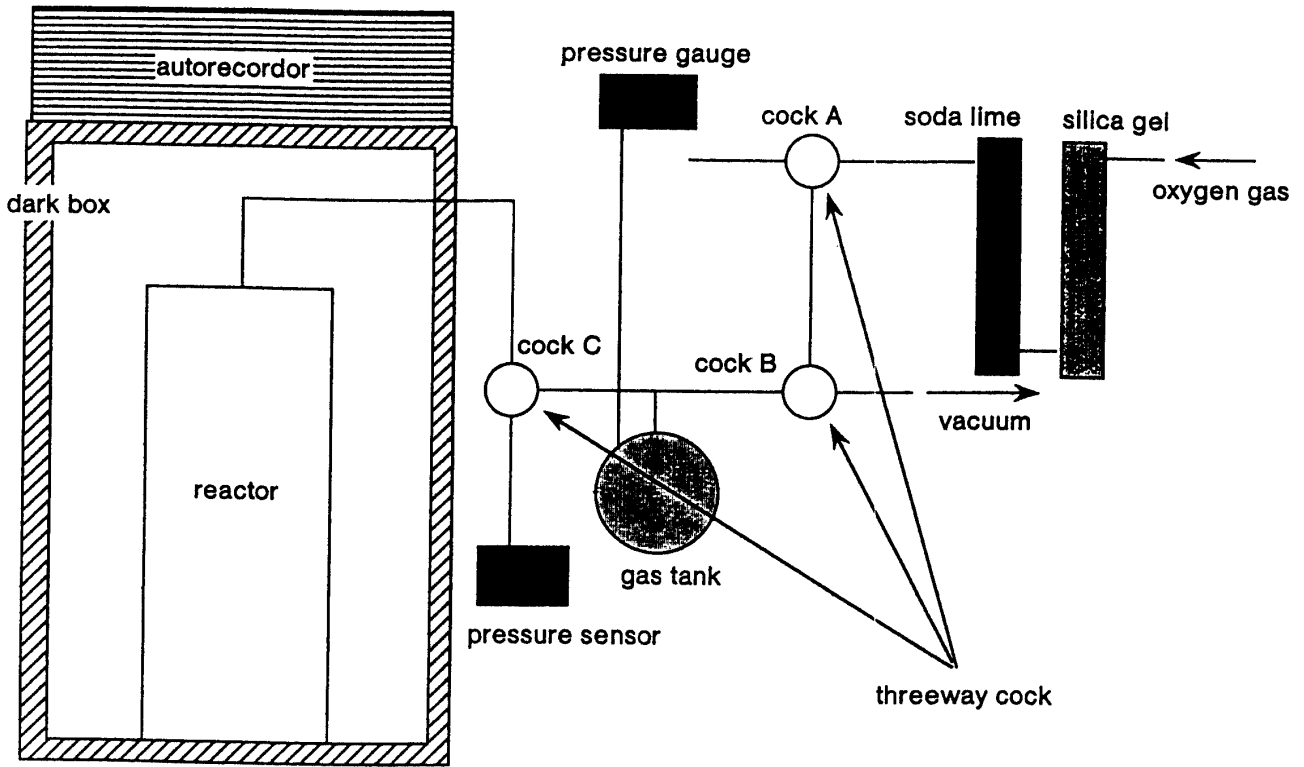


Fig. 2. Experimental apparatus of batch reactor system

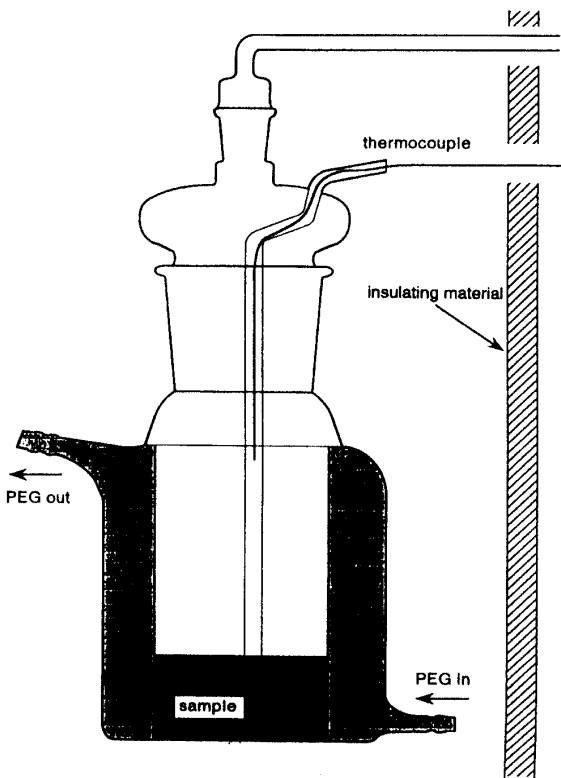


Fig. 3. Batch reactor

w は反応容器中の脂質重量 (g) である。 Δn は反応に使用された酸素のモル数であり、以下の式で表される。

$$\Delta n = (V_R/RT) \Delta p \quad (2)$$

V_R は反応容器の空間体積で、 0.385 dm^3 である。 Δp は反応開始時から任意の時間までの酸素圧力の減少量である。

POV をモル濃度 C_p に換算すると、

$$C_p [\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}] = (1/2) \text{POV} \times \rho \times 10^3 \quad (3)$$

ρ は反応溶液の密度である。

酸素圧力 p は連続的に自動的に測定できるので、反応器中の過酸化値が連続的に測定できる。本測定法では、 p の測定誤差が $(\pm) 1 \text{ mm H}_2\text{O}$ 以下で、POV の測定誤差は $(\pm) 0.1$ 以下となっており、特に過酸化値生成量の小さな反応初期の POV の測定に適している。

連続型反応装置の概略を図 4 に示す。(この実験を実験 B と略称する) 反応器は二重管型気泡塔であり、反応器下部には、送入した酸素を一様に分散させるためガラス分散版を取り付けてある。反応温度を調節す

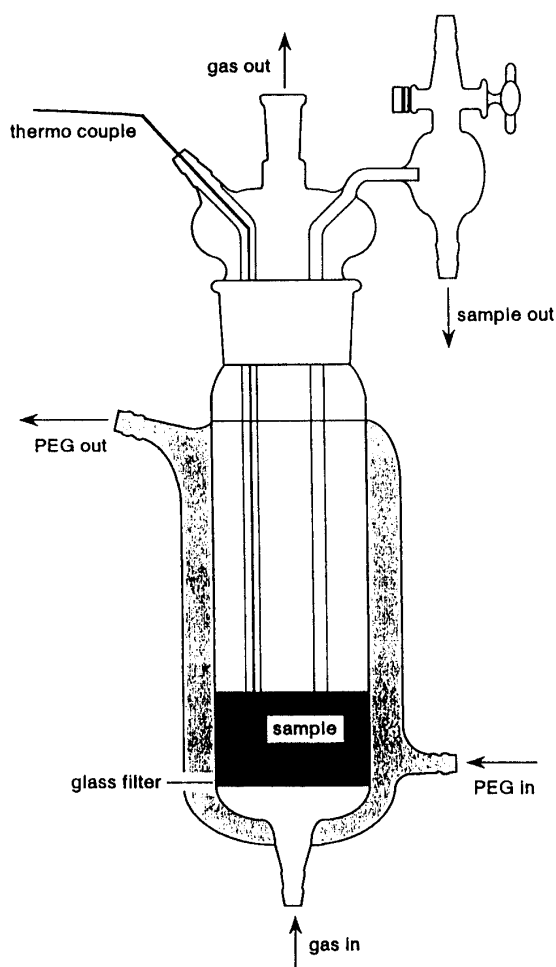


Fig. 4. Bubble column reactor

るため、二重管の外筒には所定温度のPEGを還流させた。また、反応器はガラスウールおよびアルミホイルで覆って、紫外線の影響をなくした。まず、試料約50gを精秤して反応器に仕込み、窒素ガスを下方より約50 ml/minで吹き込み、溶液温度が所定の温度になるまで保温する。溶液が所定温度に達した後、窒素ガスを酸素に切り替え、約320 ml/minで送入する。窒素および酸素ガスはいずれもシリカゲルおよびソーダライム管を通して水分および二酸化炭素を除去して使用した。酸素流量は、反応が酸素供給速度に支配されない領域で行われることを予め確認した流量である。反応開始後、反応溶液を所定時間ごとに採取してHPLCおよびヨウ素滴定法によって過酸化物質濃度を測定した。反応温度は溶液内に挿入した熱電対によって測定した。

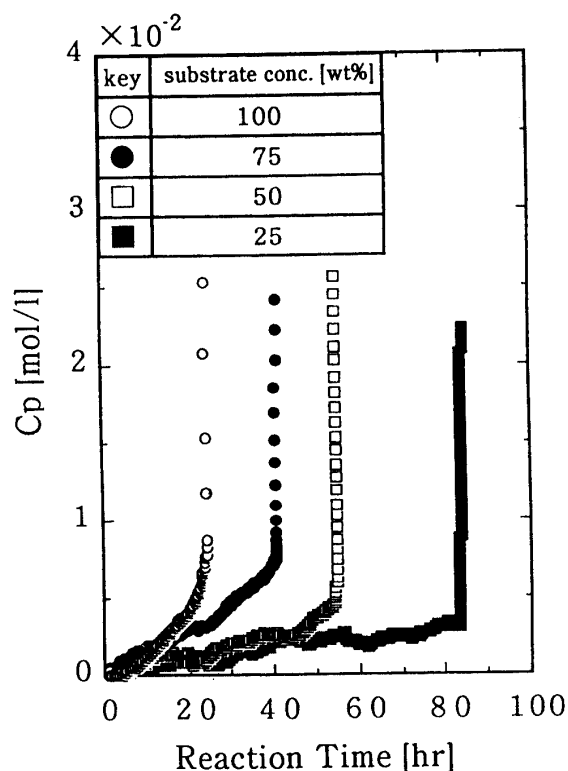


Fig. 5. Effect of squalene concentration on the oxidation in the batch system at 353K

2. 実験結果および考察

2.1 回分型反応器による酸化反応速度(測定A)

測定Aによって、スクアレンの酸化反応速度を測定した。スクアレンにラウリン酸エチルを添加して反応溶液中のスクアレン濃度を变化させた場合、反応溶液中の過酸化物質濃度 C_p の時間的变化を図5に示す。いずれの場合も、反応初期に、酸化反応速度が非常に小さい誘導期間(段階)が存在している。誘導期間はスクアレン濃度が少ないほど長くなる。誘導期間を経過すると、反応は急激に進行し、速度が非常に大きくなっている。(この段階を加速段階と略称する)。誘導段階から加速段階に変わる期間はスクアレン濃度が高いほど短くなり、 C_p の値は、スクアレン濃度とともに大きくなる。反応溶液がスクアレンのみの場合、酸化反応速度に及ぼす反応温度の影響を図6に示す。いずれも酸化反応が誘導期と加速期の二段階によって進行する。また、誘導期は温度の上昇に伴って短くなり、その速度は大きくなっている。これらの結果より、スクアレンの酸化反応は、反応初期の反応速度が非常に小さい誘導期とある程度反応が進行して過酸化物質が生

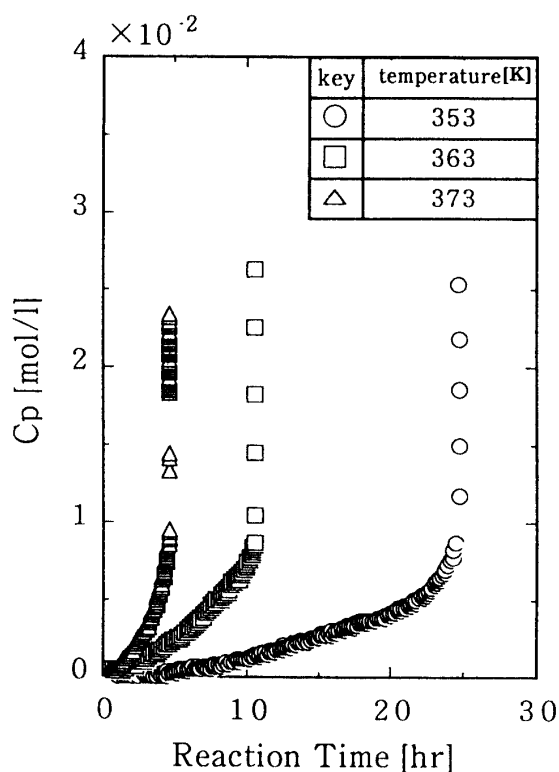


Fig. 6. Effect of temperature on the oxidation in the batch system

成して、誘導期に比較して非常に速い速度を示す加速期の二段階の反応で進行する。またその速度はスクアレン濃度と温度に依存することがわかる。

2.2 連続型反応装置による酸化反応速度 (測定 B)

測定 B による酸化反応の測定結果を、測定 A の結果と併せて図 7 に示す。測定 A では、封入酸素量が少ないため、過酸化生成量は最大 5×10^{-2} mol/dm³ と小さいが、測定 B の場合には、酸素は流通状態であるから、過酸化物の最大濃度は 5×10^{-1} mol/dm³ となる。過酸化物の最大濃度は、反応温度が低いほど高く (353, 363 および 373K において 5.0×10^{-1} , 2.5×10^{-1} および 1.6×10^{-1} mol/dm³) になった。反応温度が高くなると、過酸化物の重合または分解が促進され、過酸化物としての寿命が短くなり、見かけの生成量は減少すると考えられる。過酸化物生成が 5×10^{-2} mol/dm³ 以下の初期段階 (誘導期) における C_p と反応時間との関係を図 8 に示した。測定 A および B の測定法において、過酸化物の生成挙動は殆ど等しく、両反応器において、殆ど同じ反応挙動で進行していると推測できた。加速期において、酸化反応の進行に伴って反応溶液の粘度が急激に高くなり、反応溶液

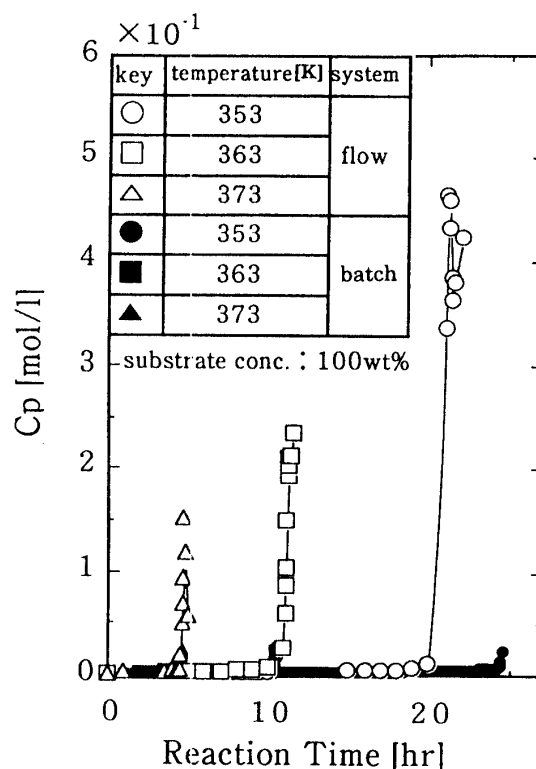


Fig. 7. Effect of temperature on the oxidation in the bubble column reactor

から揮発性の成分が発生し始めた。過酸化物濃度は時間と共に増加するが、最大濃度に到達後減少した。測定 B における溶液温度変化を図 9 に示した。反応温度を 353, 363 および 373K とした場合であるが、加速期においては、急激な反応の進行によって反応溶液温度が設定温度より急激に上昇している。

2.3 酸化反応速度

図 5 に示した 353K における C_p の経時変化より、誘導期の見かけの過酸化物生成速度が脂質濃度に一次反応であると仮定した。

$$dC_p/dt = -dC_s/dt = k_1 C_s \quad (4)$$

$$-\ln(C_s/C_{s0}) = k_1 t \quad (5)$$

実験結果を $-\ln(C_s/C_{s0})$ と t についてプロットして図 10 に示す。脂質初濃度 C_{s0} を 100, 75, 50 および 25 wt% と変化させた場合である。実験結果は C_{s0} に無関係に原点を通る一本の直線にプロットされることがわかる。脂質濃度 100% として、反応温度を 353, 363 および 373K における結果を図 11 に示した。実験結果は何れも原点を通る直線にプロットされ、実験

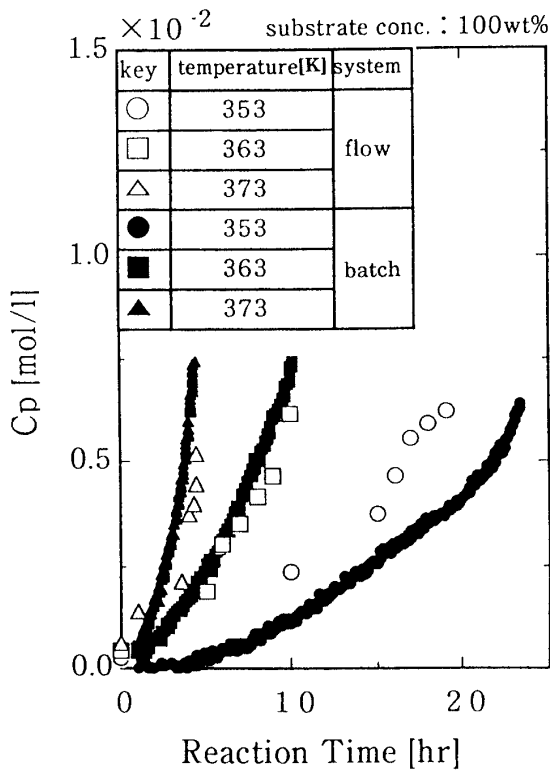


Fig. 8. Effect of temperature on the oxidation in the induction period

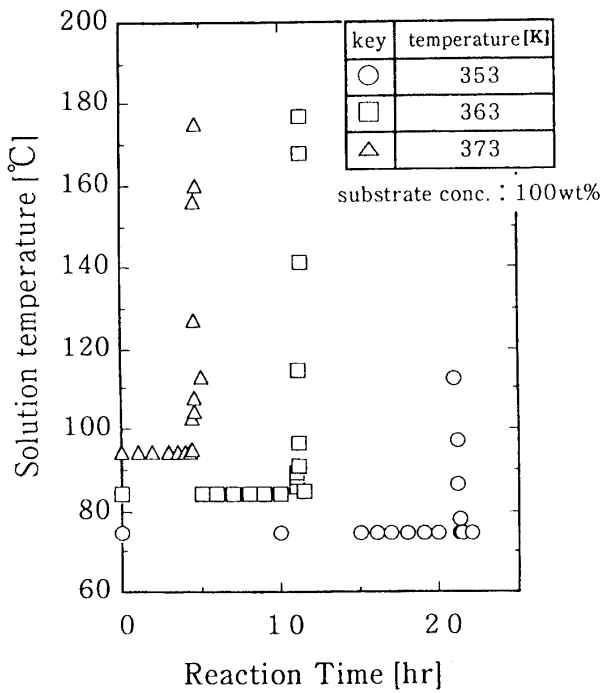


Fig. 9. Temperature of the reaction solution during the oxidation in the bubble column reactor system

結果が Eq. (5) で説明されることを示している。各々の勾配から、速度定数 k_1 の値を求め、Arrhenius プロットして図12に示した。

誘導期と同様に、加速期に於ける過酸化生成速度が脂質濃度に一次反応速度で表されると仮定した。

$$dC_p/dt = -dC_s/dt = k_2 C_s \quad (6)$$

従って、

$$-\ln(C_s/C_{s0}) = k_2 t \quad (7)$$

加速期における濃度変化から、 $-\ln(C_s/C_{s0})$ を t に対してプロットし、図13に示した。実験結果は何れも原点を通る直線にプロットされている。直線の勾配は濃度によって幾分異なると思われるが、その平均値を用いた。反応温度 353, 363 および 373K における実験結果をプロットして図14に示した。これらの温度領域では、実験結果は、何れも原点を通る直線にプロットされることが判る。直線の勾配より、速度定数 k_2 を求め、 $(1/T)$ に対してプロットし図15に示した。

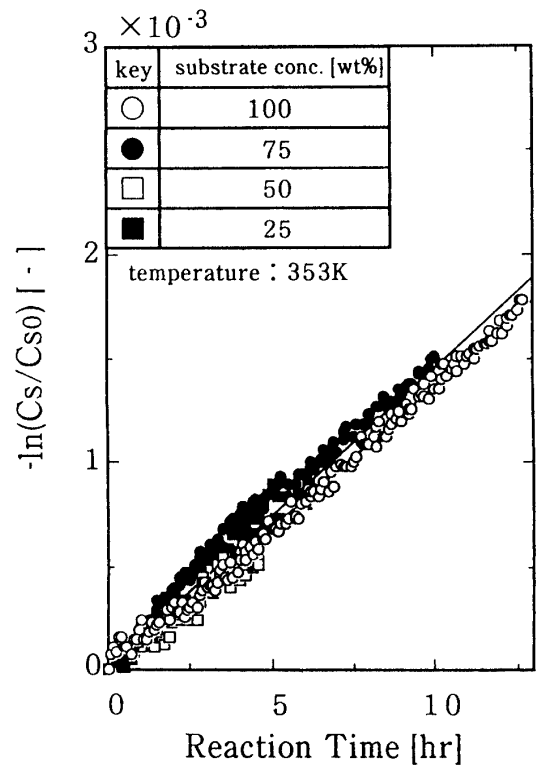


Fig. 10. Relationship between $-\ln(C_s/C_{s0})$ and reaction time at various squalene concentration in the induction period

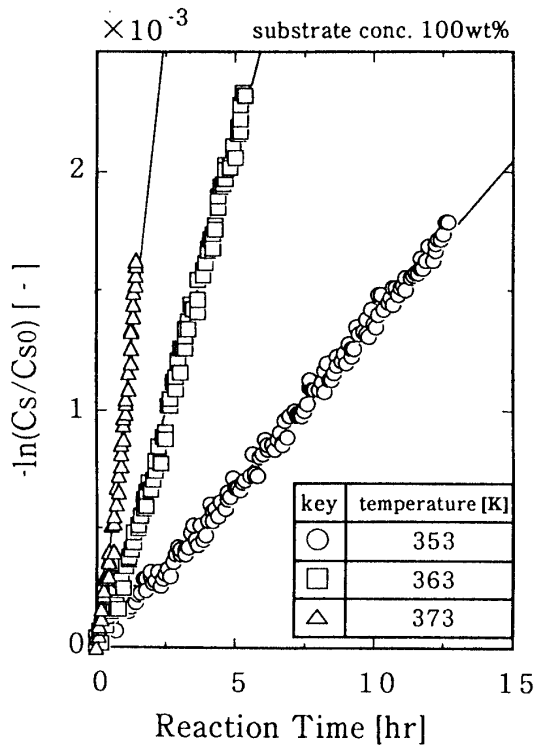


Fig. 11. Relationship between $-\ln(C_s/C_{s0})$ and reaction time at various temperature in the induction period

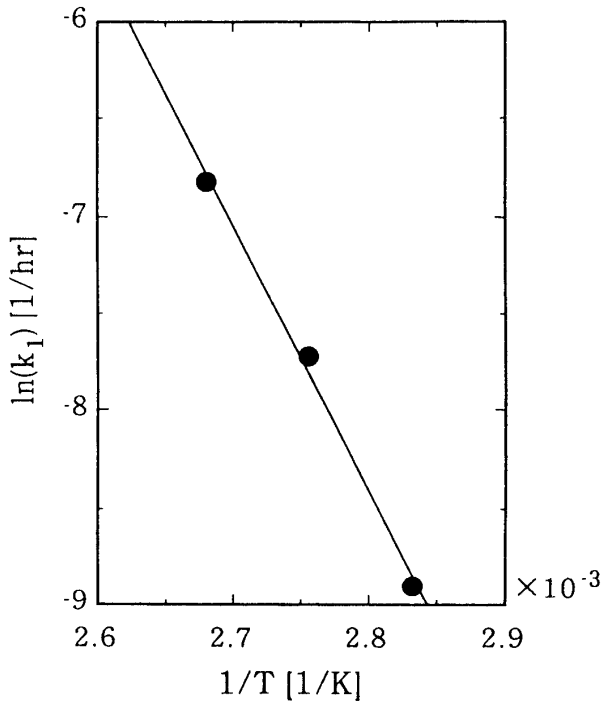


Fig. 12. Arrhenius plot in the induction period

これらに結果より、誘導期および加速期の酸化反応速度は脂質濃度に関して一次反応で近似できることが判った。各々の速度定数は以下の通りである。

$$k_1/h^{-1} = 7.9 \times 10^{12} \exp(-1.37 \times 10^4/T) \quad (8)$$

$$k_2/h^{-1} = 3.7 \times 10^{13} \exp(-1.20 \times 10^4/T) \quad (9)$$

2. 4 HPLC (UV) による酸化反応生成物の検出

反応前の純度 99 % (2.08 mol/dm³) スクアレンの HPLC/UV 測定結果より、図16に示すように、スクアレンは保持時間17分で検出されることがわかった。反応中の試料を HPLC で分析しその濃度 C_s を以下によって求めた。

$$C_s = 2.08 \times 0.99 \times (S_i/S_0) \quad [\text{mol/dm}^3] \quad (10)$$

S_0 は反応前のスクアレンのピーク面積 S_i は任意の反応時のスクアレンのピーク面積である。反応温度 373K で、反応溶液がスクアレンのみの場合、反応初期からのスクアレンの濃度変化 ΔC_s および過酸化物

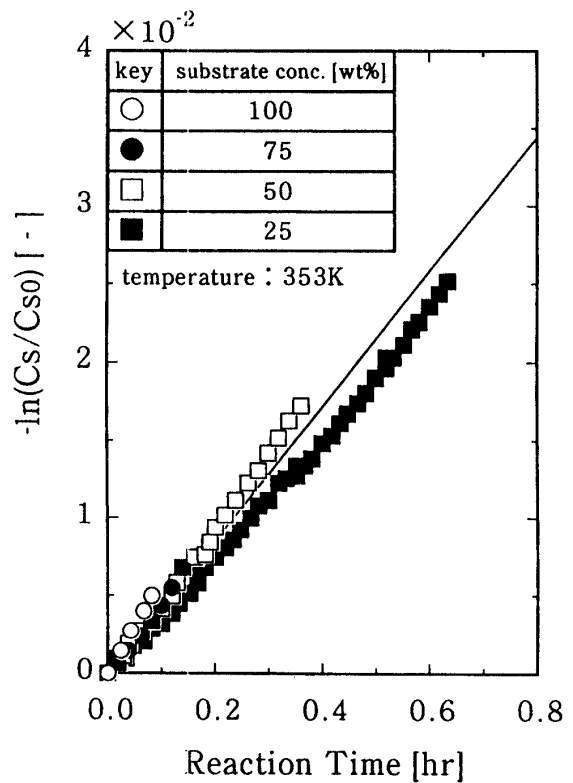


Fig. 13. Relationship between $-\ln(C_s/C_{s0})$ and reaction time at various squalene concentration in the accelerated period

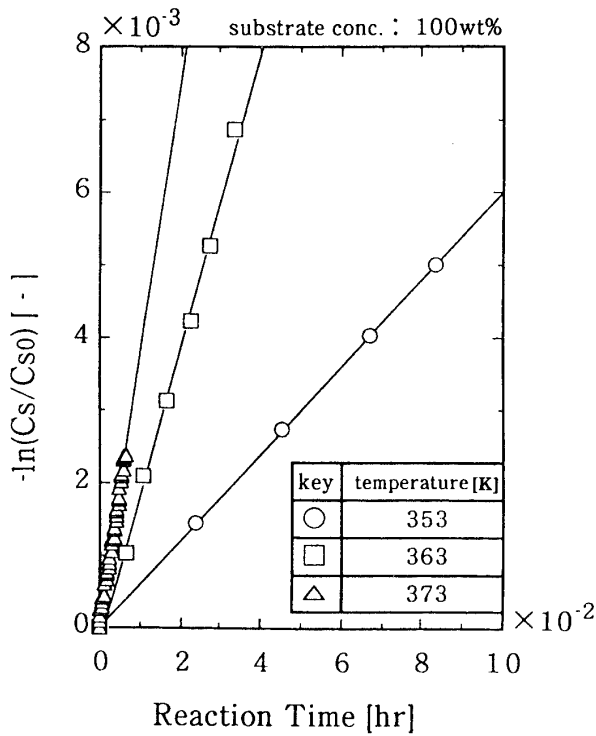


Fig. 14. Relationship between $-\ln(C_s / C_{s0})$ and reaction time at various temperature in the accelerated period

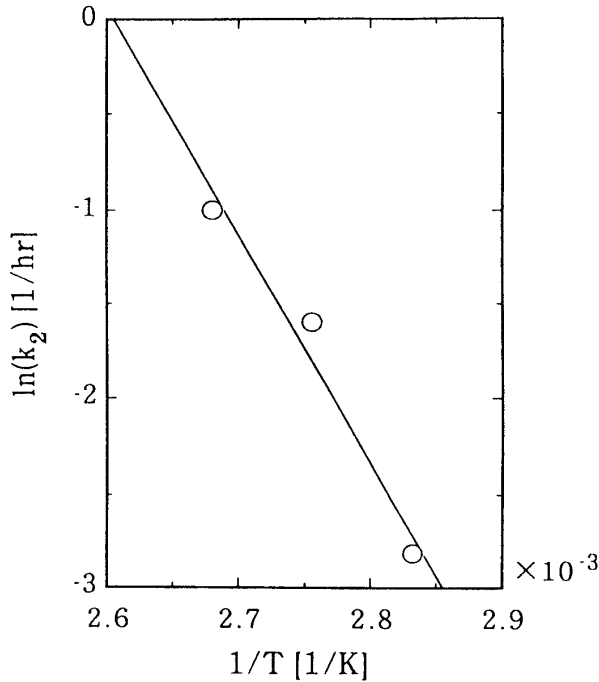


Fig. 15. Arrhenius plot in the accelerated period

濃度 C_p の経時変化を図17に示す。 C_s は初濃度 (2.08 mol/dm^3) から時間とともに減少し、反応時間5時間で殆ど消滅した。一方、過酸化物の生成量は最大で 0.2 mol/dm^3 とスクアレンの減少量に比較して非常に小さい。このことは、スクアレンの大部分が過酸化物を経て、それ自身の重合および分解反応を繰り返して重合体および二次生成物に変化していること示唆している。反応温度 373K 、スクアレンのみの場合において、 C_p および溶液温度の経時変化の詳細を図18に示す。過酸化物生成量の増加に従って反応温度が急激に上昇し、酸化反応が減少すると溶液温度は減少する。

2. 5 HPLC (CL) による酸化反応生成物の検出

図2に示した反応物の HPLC/CL 分析チャートの結果より、この酸化反応では、6種類の過酸化物が生成し、過酸化基を6個結合した過酸化物が最大極性をもち保持時間は最も短い。保持時間が3.2, 3.6, 4.2, 5.1, 6.1 および 16 min のピークは、各々過酸化基数が6~1と漸次減少した過酸化物を検出している。

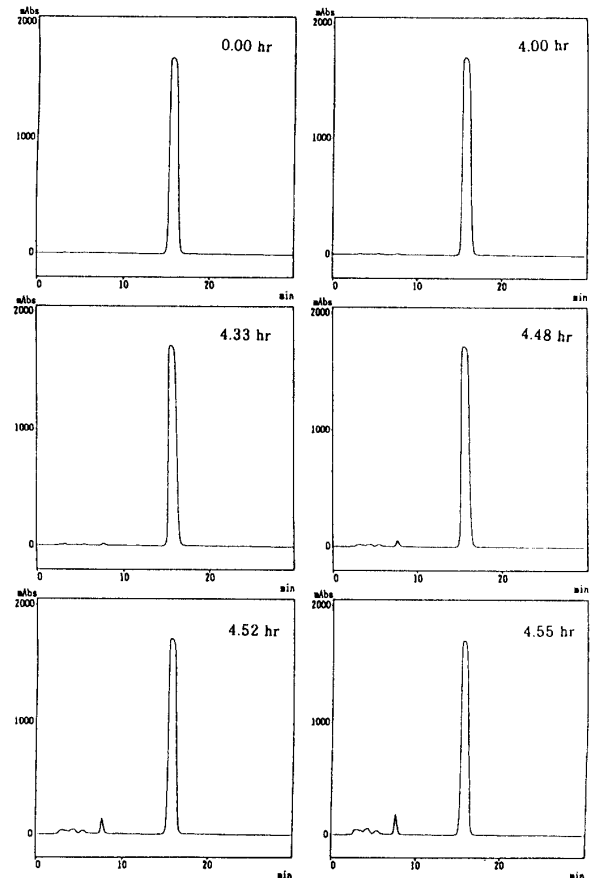


Fig. 16. HPLC chromatogram of squalene with UV detector

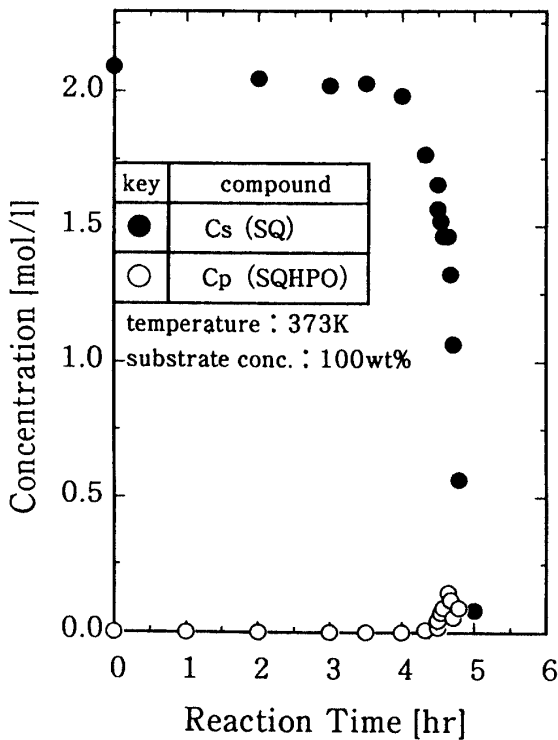


Fig. 17. Concentration changes of squalene and hydroperoxide during the oxidation

それぞれの保持時間におけるピークの高さの経時変化を図19に示す。反応開始から、4.5 時間後に、保持時間 16 min および 3.2 ~ 6 min (5 個) に合計 6 個のピークが現れ始めた。3.2 min (6 個の過酸化基を持った) のピークは他のピークより高く、反応時間 4.6 時間で最大になり、その後時間とともに減少した。16 min のピーク (1 個の過酸化基を持った) も、4.6 時間後に最大になった後減少を始め、最終的には消滅した。保持時間が 6.1, 5.1 および 4.2 min の過酸化基を 2 ~ 4 個持った過酸化物の生成量は少ないが、他の過酸化物と同様に、4.6 時間で最大生成量を示した。この結果は、ヨウ素滴定法で求めた全過酸化物濃度、 C_p が反応時間 4.6 時間で最大値を示した結果 (図9) と良く一致している。即ち、ヨウ素滴定法で測定した全過酸化物は過酸化基を 1 ~ 6 個有した過酸化物の総量として表れたものと考えられる。過酸化物と二次生成物の生成経路として以下の反応が考えられる⁷⁾。

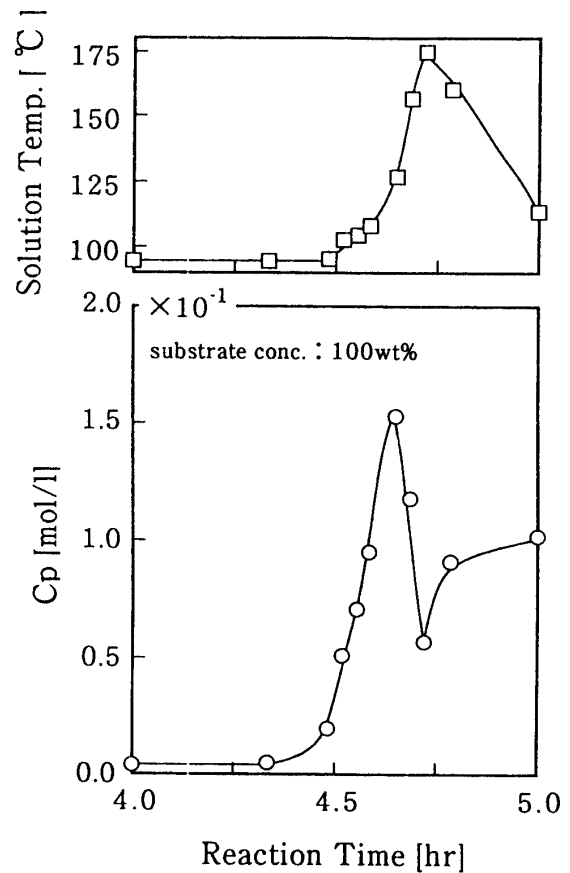
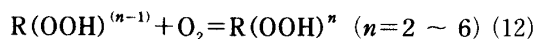
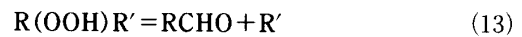
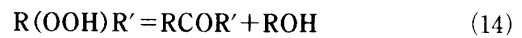


Fig. 18. Changes of hydroperoxide concentration and solution temperature in the accelerated period

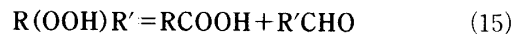
過酸化物の分解による二次生成物の生成
アルデヒドの生成



ケトンとアルコールの生成



酸の生成



この他過酸化物の大部分は多量体に変性する。Eq. (11) によって $R(OOH)$ 型の過酸化物が生成し、連鎖的に反応を続けて、 $R(OOH)^n$ ($n=2 \sim 6$) の 6 種の過酸化物を生成する。過酸化物、 $R(OOH)^n$ ($n=2, 3, 4, 5$) の反応性は $n=6$ の過酸化物の反応性に比較して高いため、分解、酸化反応または重合反応によって最終的に $RCOR'$, $RCHO$, ROH または $RCOOH$ 等の分解物を生じ、さらに多量体を生成する。しかしながら、各々の反応速度については明確ではな

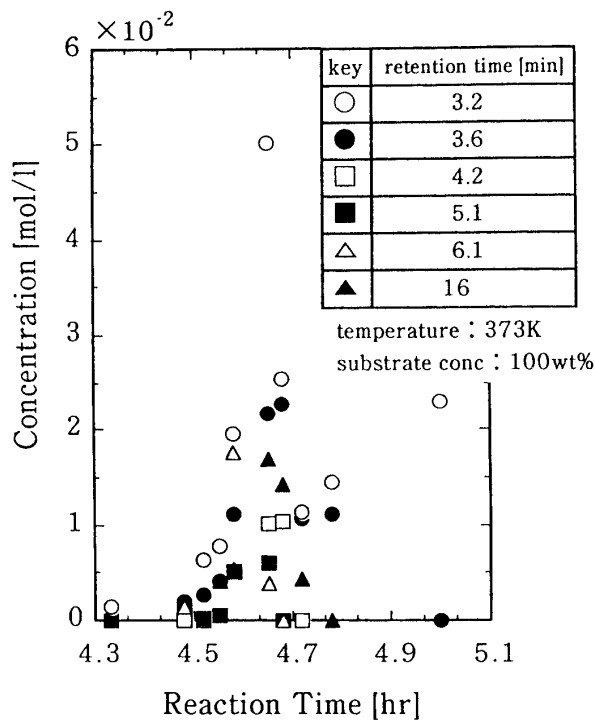


Fig. 19. Formation behavior of each hydroperoxide compounds in the accelerated period

く、更に検討することが必要である。

2.6 揮発性成分の FT-IR 分析結果

粘性流体の分解で発生した揮発性成分を水溶液として捕取した。水溶液の FT-IR 分析結果では、 1330 cm^{-1} 以下に $\text{C}=\text{O}$ および $\text{C}-\text{O}-\text{O}$ 結合による吸収、 1370 および 1710 cm^{-1} にカルボニル基による吸収および 3400 cm^{-1} に三重結合の $\text{C}-\text{H}$ 基による吸収が認められた。反応後期に生成する揮発性成分は低分子量のカルボニル化合物と過酸化化合物および三重結合を有した化合物であると推測された。

2.7 GPC(ゲルパーミエーションクロマトグラフ)による重合物の分子量測定

酸化反応の反応進行によって、反応液の粘度が非常に高くなり、溶液中への酸素送込が不可能になった。高粘性物質について GPC によってその分子量を測定した。GPC 分析結果を図20に示す。反応初期では、分子量 410 のスクアレンのピークのみ検出された。反応時間の経過とともに、410 の他に分子量が約 1650 にピークが検出された。反応の進行に伴って、スクアレンが4分子重合した4量体が生成したと考えられる。

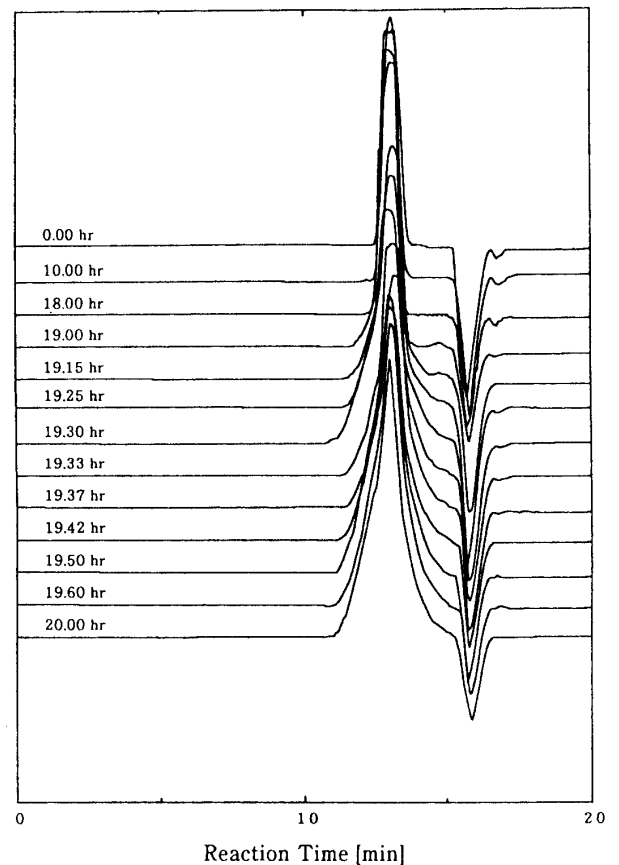


Fig. 20. GPC analysis of oxidation compounds

3. 結 論

回分型反応装置および連続型反応装置を用いて、スクアレンの酸化反応速度を測定し、微小な酸化挙動を定性、定量の両面から検討した。

- (1) 過酸化生成反応は、非常に遅い誘導期とその約103倍の速度の加速期の2段階で進行する。
- (2) 過酸化生成速度は誘導期および加速期の両期間において、脂質濃度に関して一次反応で、その速度定数は次式で表せる。

$$k_1/h^{-1} = 7.9 \times 10^{12} \exp(-1.37 \times 10^4/T)$$

$$k_2/h^{-1} = 3.7 \times 10^{13} \exp(-1.20 \times 10^4/T)$$

- (3) スクアレンは6個の不飽和結合を有しており、その酸化反応によって6種類の過酸化化合物が生成される。
- (4) スクアレンの酸化反応は逐次的に進み、過酸化化合物はいずれも反応性が高く過酸化化合物としての寿命は非常に短く、続いて起こる重合反応および分解反応によって過酸化化合物は重合体やケトン、酸類に変性され

る。

- (5) 重合体の分子量を GPC (ゲルパーミエシオンクロマトグラフ) で測定し, 4 量体が生成していることがわかった。

Nomenclature

C : concentration	[mol/dm ³]
k : reaction rate constant	[1/h]
n : number of mole	[mol]
p : pressure	[mm H ₂ O]
POV : peroxide value	[mmol/kg-oil]
R : gas constant	[dm ³ /mol/K]
S : area of HPLC peak	[—]
T : temperature	[K]
t : time	[h]
V _R : volume of reactor	[dm ³]
w : weight of sample	[g]
ρ : density	[g/cm ³]

<Subscripts>

p : peroxide
s : squalene
R : reactor
0 : initial

Literature cited

- 1) E.N. Frankel, R.F. Gawood, B.P.S. Khanbay, G.P. Moss and B.C.L. Weedon; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2233 (1984)
- 2) J.I. Gray; J. Am. Oil Chem. Soc., 55, 539 (1978)
- 3) Y. Hatate, Y. Kawano and H. Sone; J. Chem. Eng. Japan, 22, 401-412 (1989)
- 4) Y. Kawano, H. Sone and Y. Hatate; J. Chem. Eng. Japan, 22, 703-705 (1989)
- 5) Y. Kawano, Y. Saito, K. Shiomori and Y. Hatate; J. Chem. Eng. Japan, 27, 537-540 (1994)
- 6) 河野恵宣, 曾根秀樹, 幡手泰雄, 碓 醇; 宮崎大学工学部研究報告, 34, 165 (1988)
- 7) 太田静行; “食品油脂の劣化とその防止”, 幸書房, 1977
- 8) 河野善行, 阪本興彦, 中村哲治, 宮澤陽夫; 油化学, 42, 204, (1993)