報 文

精製食用油脂中のクロロフィル及び
フェオフィチンの同時蛍光定量

薄木理一郎・鈴木 俊久・金田 尚志

東北大学農学部食糧化学科 (仙台市堤通雨宮町 1-1)

Simultaneous Fluorometric Estimation of Chlorophylls
and Pheophytins in Refined Edible Fats and Oils

Riichiro USUKI, Toshihisa SUZUKI, and Takashi KANEDA

Department of Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Tohoku University
(1-1, Tsutsumidori-Amamiyamachi, Sendai)

It has been believed that chlorophylls are not remained in refined edible fats and oils, because their contents are below the limit of detection by spectrophotometric analysis. In this experiments, photo fluorometric quantification was investigated to evaluate simultaneously the content of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils.

Chlorophylls a and b, and pheophytins a and b were prepared respectively from acetone extracts of spinach and/or followed by the treatment of oxalic acid. Sixteen milliliters of acetone solution of each component (concentration ca. 0.15 mg/l) was added into 3.64 g of blank oil, which was prepared through the removal of photosensitizer in edible plant oils by using a activated carbon-Celite column. By the measurement of fluorescence intensity in four measurement systems (Ex 425-Em 663, Ex 454-Em 646, Ex 404-Em 670 and Ex 434-Em 655 nm) by spectrophotofluorometer, the following calculation formulas were introduced;

$$\text{Chl a} = (10.8 F_{425}^{663} + 0.307 F_{454}^{646} - 3.30 F_{404}^{670} - 4.91 F_{434}^{655}) \times 10^{-3} \text{ mg/kg oil}$$

$$\text{Chl b} = (0.566 F_{425}^{663} + 5.09 F_{454}^{646} - 0.199 F_{404}^{670} - 0.950 F_{434}^{655}) \times 10^{-3}$$

$$\text{Phy a} = (-8.09 F_{425}^{663} - 0.214 F_{454}^{646} + 11.7 F_{404}^{670} + 2.74 F_{434}^{655}) \times 10^{-3}$$

$$\text{Phy b} = (-4.81 F_{425}^{663} - 1.71 F_{454}^{646} + 1.23 F_{404}^{670} + 7.92 F_{434}^{655}) \times 10^{-3}$$

In the case of practical evaluation of refined edible oils, the fluorescence intensity of blank oil was subtracted from that of sample solution, dissolving 3.64 g oil in 16 ml of spectrum grade acetone. Thus, the identity and concentration of four components may be accurately and rapidly determined within the concentration range from 0.05 to 1 mg/kg oil as the total chlorophylls.

As the results of fluorometric quantification on several refined edible oils, it was confirmed that "chlorophylls" was presented at 0.06 to 0.3 ppm as the sum of four components, in which pheophytin a showed the highest content above 60%.

1 緒 言

光が油脂の酸化を大きく促進することは衆知の事実だが、この際、油脂中にクロロフィル (Chl) が残存していると酸化は一層促進される。

1938 年, Coe¹⁾ は油脂中の Chl 量と油脂の酸敗の間に密接な関連があることを初めて報告した。その後、油脂の酸化促進物質としての Chl の重要性を指摘する報告は多く出されている^{2)~7)}が、油脂の Chl 含量を定量した報告は少ない。しかもこれらはいずれも粗製油につい

ての分析結果^{8)~10)}であり、精製油についての報告は見当たらない。

従来、精製油に Chl は存在しないとされていたが、これは従来の定量法である吸光度法では測定できないほど残存量が微量であったためと思われる。

最近著者らは、Chl からマグネシウムが外れて生成するフェオフィチン (Phy) は Chl より強い光増感酸化能を有することを認めた¹¹⁾が、粗製油のデータ⁹⁾から推察して Chl のみでなく Phy も精製油に存在し、その酸化安定性に影響を及ぼすと予想される。そこで精製食用油

に含まれる Chl 及び Phy が酸化安定性にどのような影響を与えるかを明らかにするため、精製食用油中の Chl 及び Phy の蛍光定量を試みた。

2 実 験

2.1 標品の調製

2.1.1 クロロフィル a 及び b

Omata & Murata¹²⁾ の方法に準じ、新鮮なほうれん草のアセトン溶液から DEAE-Sepharese CL 6 B 及び Sepharese CL 6 B カラムによって精製分取した。その濃度決定にあたってはいくつかの吸光分析法^{13)~16)}について検討し、定量性、操作性の優れた Kirk の方法¹⁶⁾を採用した¹⁷⁾。

2.1.2 フェオフィチン a 及び b

ほうれん草アセトン溶液を 1% シュウ酸処理したものをショ糖とうもろこしデンプン (7:3) カラム¹⁸⁾により精製分取した。3 種の吸光分析法^{15), 17), 18)}による濃度決定を比較した結果、Tan & Fransis の方法¹⁸⁾を採用した¹⁷⁾。

2.1.3 光増感剤除去なたね油

Frankel らの方法¹⁹⁾に準じ、脱臭なたね油 (抗酸化剤無添加) のヘキサン溶液を活性炭カラム処理して調製した。

2.1.4 アセトン

半井化学 (株) 製スペクトル用アセトンを使用した。

2.2 装置

日立 204 型蛍光分光光度計を使用し、selector 10, sensitivity 12 で測定した。なお感度のチェックには 0.01% 硫酸キニーネ 0.1 N 硫酸溶液の 1 万倍希釈液を使用した。

3 結果及び考察

3.1 蛍光波長及び励起波長の選択

濃度決定のために吸光度を測定した Chl 及び Phy 各

Fig.-1 Fluorescence spectra of four pigments in rapeseed oil-acetone (1:4, vol/vol) solution.

a, b のアセトン溶液を 1000 倍希釈し、これに光増感剤除去なたね油をアセトン-油 (4:1, vol/vol) になるように溶解し、励起及び蛍光スペクトルを測定した結果を Fig.-1 に示した。各波長は、100% アセトン溶液として測定した結果よりおよそ 2~4 nm 短波長にシフトしていた。Chl a 及び Phy b の励起スペクトルに見られる短波長側の立ち上がりは東芝色ガラスフィルター L-39 (紫外線透過率 6.2%) を使用することによって改善されたが、これを使用しなくても蛍光スペクトルに変化がなかったため、以下の測定にはフィルターを使用しなかった。

3.2 試料油濃度の検討

光増感剤を除去した脱臭なたね油を用い、アセトンとの混合比を変化させた際の蛍光強度を Chl a について測定した結果を Fig.-2 に示した。油脂濃度が高い程強

Fig.-2 Variation of fluorescence intensity with oil level in rapeseed oil-acetone solution.

い蛍光が得られるが、定量性、操作性の点から油脂-アセトン (1:4, vol/vol) が適当と考えられた。

なお、光増感剤を除かないなたね油でも同様の結果が得られた。

3.3 定量性の検討

吸光分析によって濃度を求めた Chl a, b, Phy a 及び

* Each pigment solution used for photometric determination was diluted. It was impossible to compare directly the fluorescent intensities among four pigments, because the concentration of each one was different.

Fig.-3 Linearity of fluorescence intensities of chlorophylls and pheophytins with various concentrations.

b の 4 成分アセトン溶液 (およその濃度 7~22 mg/l) をさらにアセトンで 200~2000 倍に希釈し, これに脱臭なたね油を 4:1 (vol/vol) になるように添加し, **Fig-1** に示した波長を用いて蛍光強度を測定した。その結果は **Fig-3** に示したようにかなりよい直線性を示した。なお, ここで用いた脱臭なたね油にはわずかながらクロロフィル類が残存していたが, その蛍光強度は, 4 成分を添加しない時の蛍光強度として, 各直線が縦軸と交わる点で示してある。

3.4 定量式の算定

光増感剤除去なたね油に 4 成分のアセトン溶液をそれぞれ添加して濃度 $2.85 \sim 3.39 \times 10^{-2}$ mg/l のなたね油-アセトン (1:4, vol/vol) 混液を調製し, 各波長における蛍光強度を測定した。各波長におけるブランクを差し引き, 各成分 0.01 mg/l 当たりの蛍光強度として表したのが **Table-1** である。4 成分の相対強度は Chl b 1.88>Phy b 1.67>Chl a 1.44>Phy a 1.00 であった。

Table-1 Relative fluorescence intensity of each component in 0.01 mg/l solution.

	F_{425}^{663}	F_{454}^{646}	F_{404}^{670}	F_{404}^{655}
Chl a	8.644	0.070	4.920	4.450
Chl b	1.181	11.252	0.295	3.101
Phy a	1.948	0.067	5.977	0.269
Phy b	4.821	1.369	1.012	10.001

* Mixtures of refined rapeseed oil and acetone (1:4, vol/vol) was used as test solution, into which each pigment was added.

各蛍光波長における蛍光強度の合計であるから次のような式が成り立つ。

$$\Delta F_{425}^{663} = 8.644 \text{ Chl a} + 1.181 \text{ Chl b} + 1.948 \text{ Phy a} + 4.821 \text{ Phy b}$$

$$\Delta F_{454}^{646} = 0.070 \text{ Chl a} + 11.252 \text{ Chl b} + 0.067 \text{ Phy a} + 1.369 \text{ Phy b}$$

$$\Delta F_{404}^{670} = 4.92 \text{ Chl a} + 0.295 \text{ Chl b} + 5.977 \text{ Phy a} + 1.012 \text{ Phy b}$$

$$\Delta F_{404}^{655} = 4.45 \text{ Chl a} + 3.101 \text{ Chl b} + 0.269 \text{ Phy a} + 10.001 \text{ Phy b}$$

これらの式を行列式としてコンピューター処理し, 逆行列を求めることにより次のように書き換えられた。

$$\text{Chl a} = (1.963 F_{425}^{663} + 0.056 F_{454}^{646} - 0.600 F_{404}^{670} - 0.893 F_{404}^{655}) \times 10^{-3}$$

$$\text{Chl b} = (0.103 F_{425}^{663} + 0.926 F_{454}^{646} - 0.036 F_{404}^{670} - 0.173 F_{404}^{655}) \times 10^{-3}$$

$$\text{Phy a} = (-1.472 F_{425}^{663} - 0.039 F_{454}^{646} + 2.131 F_{404}^{670} + 0.500 F_{404}^{655}) \times 10^{-3}$$

$$\text{Phy b} = (-0.875 F_{425}^{663} - 0.311 F_{454}^{646} + 0.224 F_{404}^{670} + 1.442 F_{404}^{655}) \times 10^{-3}$$

この定量式の単位は mg/l で, 油脂-アセトン (1:4) 溶液 1 l 当たりの mg 数を示しているの, これを 1 kg の油脂当たりに直すと次式のようになる。

$$\text{Chl a} = (10.8 F_{425}^{663} + 0.307 F_{454}^{646} - 3.30 F_{404}^{670} - 4.91 F_{404}^{655}) \times 10^{-3} \text{ mg/kg oil}$$

$$\text{Chl b} = (0.566 F_{425}^{663} + 5.09 F_{454}^{646} - 0.199 F_{404}^{670} - 0.950 F_{404}^{655}) \times 10^{-3}$$

$$\text{Phy a} = (-8.09 F_{425}^{663} - 0.214 F_{454}^{646} + 11.7 F_{404}^{670} + 2.74 F_{404}^{655}) \times 10^{-3}$$

$$\text{Phy b} = (-4.81 F_{425}^{663} - 1.71 F_{454}^{646} + 1.23 F_{404}^{670} + 7.92 F_{404}^{655}) \times 10^{-3}$$

食用油脂についての実際の定量操作は次のように行った。すなわち, 油脂 3.64±0.05 g を 50 ml 共栓三角フラスコに精ひょうし, これにスペクトル用アセトン 16 ml を加えて溶解したものについて 蛍光波長 663 nm (励起波長 425 nm), 同 646 nm (454 nm), 同 670 nm (404 nm) 及び 655 nm (434 nm) の蛍光強度を測定した。光増感剤除去なたね油について同様の 4 点の蛍光強度を測定し, これをブランクとして試料油溶液の蛍光強度から差し引き, 上式に代入して各成分の濃度を算出した。

蛍光分光光度計の感度を切り替えずに測定し, 本式を用いて算定できる定量範囲は総クロロフィル量としておよそ 0.05~1 mg/kg oil である。

3.5 4 成分混合物の定量値の検討 (1)

4 種成分について, 1 種が他の成分の 2 倍の濃度になるような混合液を調製し, これに光増感剤除去なたね油を添加して蛍光定量した際の定量値を予想値と比較した (**Table-2**)。その結果, 各成分共にほぼ 10% 以内の誤差で定量できた。また a 体と b 体を比較すると, b 体の定量値に比べ a 体の定量値の方が多少信頼性に劣っていた。

4 成分混合物の吸光分析による定量法として Vernon¹⁵⁾, White ら¹⁹⁾の方法があるが, これはシュウ酸または塩酸によって Chl を Phy に変える操作が加わり, Phy の定量誤差は特に大きく数十%に達することがしばしばある¹⁷⁾。これらの吸光分析法に比較して本方法は操作性, 精度ともに優れた方法といえた。

3.6 精製食用油脂中の 4 成分の定量例

同一工場で製造された各種精製植物油の脱臭直後の油について蛍光定量した結果を **Table-3** に示した。本定量値は, 精製食用油中にも Chl, Phy が存在することを初めて示したものであり, 内容的には Phy a が最も多く 60% 以上を占めていた。また Chl と Phy を比べるとかなり Phy 含量は高くなっていた。

さらに Chl と Phy との合計でみると, a 体と b 体との比はおよそ 2:1 であり, 油の種類が変わってもほぼ一定であった。

著者らは, Phy が Chl より強い光増感酸化能を有し

Table-2 Comparison of found value with expected value of four pigment mixtures.

Mixing ratio of Chl a : Chl b : Phy a : Phy b	Chl a	Chl b	Phy a	Phy b
2a : 2b : 0 : 0	2.83* ¹ 2.84 101.3% ^{*2}	3.44* ¹ 3.38 101.6% ^{*2}	0.11* ¹ 0 * ²	0.04* ¹ 0 * ²
0 : 0 : 2c : 2d	-0.099 0	0.005 0	3.18 2.98 106.8%	3.45 3.36 103.0%
a : b : c : d	1.26 1.42 88.6	1.65 1.69 97.9	1.72 1.48 116.0	1.78 1.68 106.2
2a : b : c : d	2.77 2.84 97.6	1.64 1.69 96.9	1.58 1.48 106.5	1.78 1.68 106.1
a : 2b : c : d	1.47 1.42 103.3	3.43 3.38 101.5	1.48 1.48 99.6	1.69 1.68 101.0
a : b : 2c : d	1.35 1.42 95.5	1.71 1.69 101.0	3.05 2.97 102.4	1.78 1.68 106.5
a : b : c : 2d	1.37 1.42 96.4	1.70 1.69 100.6	1.62 1.48 109.0	3.44 3.36 102.5
mean $\pm$ S.D.	97.1 $\pm$ 6.1	99.9 $\pm$ 1.9	106.7 $\pm$ 8.8	104.2 $\pm$ 5.2

*1 $\times 10^{-2}$ mg/l

*2 Ratio of found value(upper number) versus expected one(lower number) was shown as percentage.

Table-3 Chlorophyll-and pheophytin-contents of several refined edible oils.

Oil*	Production date	Chl a	Chl b	Phy a	Phy b
Soybean	May 8, 1982	0 #	0.0049#	0.051#	0.013#
Soybean-salad	March 8, 1981	0.002	0.013	0.073	0.028
Rapeseed	May 11, 1982	0.015	0.031	0.132	0.042
Corn	May 20, 1982	0	0.019	0.114	0.040
Cottonseed	May 20, 1982	0.010	0.040	0.185	0.044
Safflower	June 9, 1982	0.032	0.060	0.167	0.053

* All sample oils were collected after deodorization process in the same manufacturer.

mg/kg oil.

ていることを既に認めており¹¹⁾, 精製食用油脂の酸化安定性を考える場合, 今後は Chl 含量よりはむしろ Phy 含量に注意を払わねばならないといえよう。

なお, 他の食用油脂の定量結果, 自動酸化時の組成変化等については次報²⁰⁾で明らかにしたい。

3.7 4 成分混合物の定量値の検討 (2)

Table-1 に示すように, Chl b を除く 3 成分は蛍光波長が近接するためお互いに影響し合っていると思われる, **Table-2** の結果もそれを裏付けている。とくに Chl a は実際の精製食用油ではその含量が極めて少なく。最も多い Phy a の影響を受けやすい。

そこで精製食用油の定量における Chl a の定量値の信頼性を調べるため, Chl a, Chl b, 及び Phy b の組成比を **3.6** での定量値に準じ 1:3:4 に設定し, これに Phy a 量を変化させて加えた場合の 4 成分の定量値を予想値と比較した。

その結果を **Fig.-4** に示した。Chl a を除く 3 成分が $\pm 10\%$ の範囲に収まったのに対し, Chl a の値は大きく変動した。しかし, 実際の油脂において Phy a が 70% を越えることはほとんどなく, 食用油脂についてのすべての測定値は Phy a 含量が $62 \pm 9\%$ の範囲内に存在したので, 本方法による定量は実用上問題ないと考えら

** Phy a was increasingly added into the acetone solution with compositional ratio of Chl a-Chl b-Phy b (1:3:4) similar to practical composition.

Fig.-4 Variation of four estimated values with pheophytin a content in total pigments.

れる。

なお, 同一試料について 7 回蛍光定量を行い, 定量値の変動を検討したところ (**Table-4**), 油の種類により多少異なるようであった。

3.8 共存カロテンの影響

本方法における励起波長が 404~454 nm にあるため,

Table-4 Fluctuation of evaluated values on refined cottonseed and safflower oils.

	Cottonseed oil			Safflower oil		
	Mean	Standard deviation	Coefficient variation (%)	Mean	Standard deviation	Coefficient variation (%)
Chl a	7.3	1.5	21	19	3.2	17
Chl b	40	2.7	6.7	56	5.4	9.6
Phy a	173	5.3	3.1	153	15	9.7
Phy b	41	1.7	4.2	44	3.8	8.7

* Results are mean value($\mu\text{g/kg}$ oil) of seven determinations.

Fig.-5 Variation of estimated pheophytin a with β -carotene content in tested oils containing four pigments.

カロテン含量の多いあるいは黄色の濃い試料では消光が生じることが予想される。そこでカロテン含量がクロロフィル類の蛍光定量値にどのような影響をもつかを知るために、4成分の組成と濃度が実際の油の平均的な値を示す試験油 (Chl a-Chl b-Phy a-Phy b=1:2.6:11.0:3.7) を調製し、4成分の合計量 (0.524 mg/l 油) の 1/10~20 倍量の再結した β -カロテンをアセトン溶液として添加し、量的に最も多い Phy a の定量値がどのように変化するかを検討した (Fig.-5)。

その結果、Chl a の定量値が予想値より 10% 以上低下するのは、カロテン濃度が 0.96 mg/l 油以上 (総クロロフィル量の約 2 倍) の時であり、この濃度の β -カロテン含有油の 447 nm における吸光度はおおよそ 0.23 を示していた。この事実より、色の濃い未精製の原油や脱酸油などの場合には、クロロフィル類の定量値は低く出ると考えられた。しかし、通常の精製食用油程度の着色度では、比較的颜色が濃い綿実油の場合でも 447 nm における吸光度は低く、定量値に問題はないといえた。

4 総 括

本方法によって初めて精製食用油中の Chl 及び Phy の定量が可能となった。従来クロロフィル類の蛍光定量は White らがフィルター型蛍光光度計を使用し標品の

みについて行ったもの²¹⁾が報告されているに過ぎない。本研究は White らの方法を参考にして行ったが、シュウ酸や塩酸の処理をしないで Phy 量も測定が可能なのが大きな特徴である。

衆知のように、蛍光分光光度計には装置定数のようなものがあり、本実験で求めた定量式を別の装置で直ちに使うことはできない。4成分の標準液を調製することにも多少の面倒があるが、各成分についておよそ 0.05 mg/l のアセトン溶液が調製できれば、この溶液 16 ml に大豆油のような比較的 Chl 含量の低い食用油 (あるいは光増感剤除去油) の 3.64 g を加えて蛍光強度を求めれば定量式の算出が可能であり、いったん定量式ができれば、その後の定量操作は極めて簡単といえる。前述したように、4成分混合物の定量に関して本方法は従来の吸光分析法より操作性、精度共にすぐれているので、なたねの green seed となたね油の Chl 含量が問題となっている今日、その利用価値は非常に大きいと思われる。

本研究の大部分は創立 30 周年記念油化学討論会、研究発表会 (1982 年 11 月、東京) で発表した。

(昭和 58 年 3 月 15 日受理)

文 献

- 1) M. Coe, *Oil & Soap*, **9**, 230 (1938)
- 2) K. Täufel, R. Müller, *Biochem. Z.*, **304**, 137 (1940)
- 3) W. Diemar, H. Ludwig, K. Weiss, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **50**, 349 (1943)
- 4) W.O. Lundberg, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 523 (1954)
- 5) F.A. Lea, *Nature*, **176**, 463 (1955)
- 6) H.A. Rawls, P.J. Van Santen, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **47**, 121 (1970)
- 7) A.H. Clements, R.H. Van Den Eugh, D.J. Frost, K. Hoogenhaut, J.R. Nooi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 325 (1973)
- 8) H. Niewiadomski, I. Bratkowska, E. Mossakowska, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 731 (1965)
- 9) J.A.G. Box, H.A. Boekenogen, *Fette, Seifen, Anstrichm.*, **69**, 724 (1967)
- 10) J.K. Daun, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **59**, 15 (1982)
- 11) Y. Endo, R. Usuki, T. Kaneda, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, for submission, "Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate"
- 12) T. Omata, N. Murata, *Photochem. Photobiol.*, **31**,

- 183 (1980)
- 13) G. Mackinney, *J. Biol. Chem.*, **140**, 315 (1940)
- 14) C.L. Comar, F.P. Zscheile, *Plant Physiol. Lancaster*, **17**, 198 (1942); AOAC-Tentative Method (12 th ed.), 3, 105-108
- 15) L.P. Vernon, *Anal. Chem.*, **32**, 1144 (1960)
- 16) J.T.O. Kirk, *Planta*, **78**, 200 (1968)
- 17) 薄木理一郎, 鈴木俊久, 金田尚志, 日本農芸化学会東北支部昭和 57 年度大会 要旨, p. 8 (昭和 57 年 10 月 2 日・盛岡)
- 18) C.T. Tan, F.J. Francis, *J. Food Sci.*, **27**, 232 (1962)
- 19) R.C. White, I.D. Jones, E. Gibbs, *J. Food Sci.*, **28**, 431 (1963)
- 20) R. Usuki, T. Suzuki, T. Kaneda, *Agr. Biol. Chem.*, 投稿予定, "Quantities of chlorophylls and pheophytins in refined edible oils and its compositional changes during autoxidation"
- 21) R.C. White, I.D. Jones, E. Gibbs, L.S. Butler, *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 773 (1972); I.D. Jones, R.C. White, E. Gibbs, L.S. Butler, *J. Agr. Food Chem.*, **25**, 143, 146 (1977)
-