[農化 第 49 卷, 第 9 号, p. 495~497, 1975]

フロリジカラムクロマトグラフィー
による乳脂肪中のトコフェロールの
定量におよぼす FeCl_3
還元物質の影響

菅野長右衛門, 山内邦男, 津郷友吉*
(東京大学農芸化学科, *東京家政大学)

昭和 50 年 4 月 7 日受理

Influence of FeCl_3 -Reducing Substances Other
than Tocopherols on the Determination of
Tocopherols in Bovine Milk Fat by
Florisil Column Chromatography [Note]

By Choemon KANNO, Kunio YAMAUCHI
and Tomokichi TSUGO

Department of Agricultural Chemistry,
The University of Tokyo;
*Tokyo Kasei University

It was tried to simplify the determination of tocopherols in milk fat on ferric chloride and bathophenanthroline reaction, because most tocopherol (95%) was α -type. FeCl_3 -reducing substances other than tocopherols were determined with the same procedure as tocopherol described by us previously. Unsaponifiable matter corresponding to the total FeCl_3 -reducing substances was fractionated by eluting with petroleum ether, benzene, and ethanol, in that order, through Florisil column. FeCl_3 -reducing substances calculated as α -tocopherol were distributed approx. 21% in the petroleum ether, 60% in the benzene containing all of tocopherols, and 19% in the ethanol fraction. The benzene fraction was further separated on silicagel G thin-layer chromatography and α - and γ -tocopherol were determined. Total tocopherol content was approx. 45.0% (40~60%) of total FeCl_3 -reducing substances and approx. 76.5% (64~88%) of that of the benzene fraction. It was conclusively found that there was a difficulty to simplify the determination procedure of tocopherol in milk fat and, unless FeCl_3 -reducing substances other than tocopherols was removed, the determined values give erroneous high values. It is desirable to determine tocopherols separated from other FeCl_3 -reducing substances by

means of thin-layer chromatography in order to obtain the more correct values, although it is somewhat troublesome in the technique.

(Received April 7, 1975)

著者ら⁽¹⁾は、先に薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて分離したトコフェロール (T) 類の定量について報告した。その報告において乳脂肪から得た不けん化物を、TLC で T の分離の前に、中性アルミナを通し、フロリジカラムクロマトグラフィー (FCC) を行なうと、TLC における T の分離を妨害する物質、および T 以外の FeCl_3 還元物質の大部分が除去されることを明らかにした。TLC で分離した各 T は、それぞれスポットを削り取り、エタノールで抽出し、 FeCl_3 -バスフェナントロリン (BP) 反応で比色定量された。

FeCl_3 と α, α' -ジビリジル (Emmerie-Engel 反応) あるいは BP による反応は、T 類の定量に広く用いられている。これらの反応による場合、2 種の妨害物質が油脂中に存在することが知られている⁽²⁾。1 つは、還元力を有し、それゆえに高い定量値を与える。他は、還元力を持たないが、発色を抑制または増大させる。

この報告では、乳脂肪中に存在する T 類のうち α -T が大部分 (95%) を占めているので⁽³⁾、定量法を簡略化するために乳脂肪中の妨害物質を FCC で除去し、この段階で T の定量を行なうことができるか否かを検討した。

1. 実験方法

FCC による T を含む画分の分離、およびシリカゲル TLC による α - および γ -T の分別定量法は、前に報告したとおりである⁽¹⁾。 FeCl_3 還元物質は、FCC 前の不けん化物および FCC 後の各溶出画分について T と同様の方法で比色定量し、 α -T として計算した。

カロチンの測定は n -ヘキサン中で行ない⁽⁴⁾、ビタミン A 含量は活性化グリセロールジクロロヒドリン法で測定した⁽⁴⁾。

乳脂肪の調製は、生クリームから前に報告した方法で行なった⁽⁸⁾。分析に使用した乳脂肪は、5 g であった。

2. FeCl_3 還元物質の分離

FCC における FeCl_3 還元物質の分布を測定するために、石油エーテル 20 ml、ベンゼン 40 ml およびエタノール 30 ml で順次溶出し⁽¹⁾、各画分中の FeCl_3 還元物質を定量した (Table I)。9 個の試料における FCC 後の FeCl_3 還元物質の回収率は、約 97% であった。各画

Table I. Content of Tocopherol and Other FeCl₃-Reducing Substances in the Unsaponifiable Matter of Milk Fat

Sample No.	FeCl ₃ -Reducing substances* ¹				Recovery (B+C+D/A) (%)	Tocopherol (T)			E/C (%)	E/A (%)	Carotene* ³	Vitamin A* ⁴ fraction	
	A	B	C	D		α -T	γ -T	Total (E)* ²				C	D
	(μg/g)											(μg/g)	
1	42.4	11.2	21.7	8.5	97.6	15.7	1.6	17.5	80.7	41.3	4.4	3.1	2.2
2	59.8	18.7	31.8	8.1	98.0	23.6	1.3	25.1	81.5	42.0	5.8	3.1	2.6
3	39.3	7.9	20.1	9.8	96.2	14.3	1.1	15.6	77.6	39.7	3.6	2.4	2.6
4	26.8	2.9	15.9	6.4	94.0	9.0	0.9	10.1	63.6	37.7	0.9	2.6	2.8
5	37.8	9.6	20.4	5.7	94.4	13.0	0.9	14.1	70.0	37.3	4.1	2.9	2.5
6	36.9	4.9	22.1	9.0	97.5	15.4	0.8	14.1	72.4	44.4	2.3	1.9	2.5
7	59.5	7.6	44.5	5.6	98.5	34.5	1.5	36.3	81.6	61.0	3.4	4.7	2.1
8	57.6	8.0	35.9	11.4	96.0	30.6	1.0	31.7	88.3	55.0	8.6	3.2	3.1
9	77.4	21.6	49.5	7.9	102.3	34.9	1.0	36.0	72.7	46.6	3.8	4.8	2.4
Average ± S. D.					97.2				76.5	45.0			
					±2.3				±7.5	±8.1			

*¹ FeCl₃-Reducing substances were determined with the same procedure as tocopherol and calculated as α -tocopherol. Total FeCl₃-reducing substances (A) were determined before Florisil column chromatography and B, C and D was determined on petroleum ether, benzene and ethanol eluates through Florisil column, respectively.

*² γ -Tocopherol was calculated as α -tocopherol.

*³ Carotene in petroleum ether fraction through Florisil column was determined.

*⁴ Vitamin A in benzene fraction (C) and ethanol fraction (D) through Florisil column was determined.

分中のおもな成分は、TLC から観察すると、石油エーテル画分には β -カロチン、ベンゼン画分にはすべての T とビタミン A およびコレステロールの一部、エタノール画分には大部分のビタミン A とコレステロールおよび色素が含まれていると推定された。各画分における FeCl₃ 還元物質の分布割合は、石油エーテル画分に約 21%、ベンゼン画分に 60%、およびエタノール画分に約 19% であり、それぞれに対応する前記の成分によるものと思われる。Emmerie-Engel 反応で 1 μ g の β -カロチンは、2.5 μ g の α -T に相当する還元力を有することが報告されており⁽⁵⁾、石油エーテル画分中のカロチンに対する FeCl₃ 還元物質の比は、この値とはほぼ一致した。

T の定量法として、T 以外の FeCl₃ 還元物質の除去の代りに、 β -カロチンの補正係数を使うか^(5,6)、あるいはカロチンおよびビタミン A を加水分解する方法⁽⁷⁾が報告されている。Table I に示したように、FCC によってカロチンおよびビタミン A によると思われる還元物質は T を含むベンゼン画分から除去できるが、ベンゼン画分でさえも真の T を定量するためには、他の方法でさらに純化する必要があることが、TLC での実験から認められた。

3. トコフェロールと他の FeCl₃ 還元物質の分離

T を他の FeCl₃ 還元物質から分離し、同時に各 T を分

離するために、ベンゼンを展開溶媒としてシリカゲル TLC を行なった。分離した α - および γ -T は、別々に比色定量した。ただし、 γ -T は比較上 α -T として計算し、 α -T と加算して全 T とした (Table I, E)。TLC で定量された全 T 量は、全 FeCl₃ 還元物質 (A) の 40~60% (平均 45%) であり、ベンゼン画分中の FeCl₃ 還元物質 (C) の 64~88% (平均 76.5%) であった。ベンゼン画分中の 12~36% (平均 23.5%) は、 α - および γ -T 以外の FeCl₃ 還元物質、および TLC 中での α - と γ -T の 5~8% の損失によるものである。 α - と γ -T 以外の還元物質は、TLC 上で赤色スポットとして検出できない β -T、 δ -T、 α -トコトリエノール (α -T-3) および γ -T-3 などの微量成分⁽⁸⁾および、その他の未知の微量成分によると思われる。

T から他の還元物質を含めた妨害物質を除去するために、Thompson ら⁽⁹⁾は乳脂肪中の不けん化物を Decalso F カラムクロマトグラフィー (CC) 後、2 次元ペーパークロマトグラフィー (PC) で T を分離し、Emmerie-Engel 法で比色定量している。また、若生ら⁽⁷⁾は乳脂肪およびカロチンやビタミン A を硫酸で同時に加水分解し、Emmerie-Engel 法で T を定量している。Erickson ら⁽⁹⁾は、Dunkley ら⁽¹⁰⁾の方法により、初めけい酸 CC 後のベンゼン溶出画分を比色定量していたが、さらにこ

の画分をアルミナ CC を行なって、全 T 含量を BP 法で比色定量することによって、前者だけの場合よりも真の T 含量に近い値が得られると報告している。

しかし、FCC で得られた画分中の FeCl_3 還元物質を定量し、TLC による T の定量値と比較した結果、Emmerie-Engel 反応あるいは、その改良法である BP 法によって、乳脂肪中の真の T 含量を得るために定量法を簡略化することは困難であり、やはり最終的には TLC, PC, またはその他の方法を用いて定量することが望ましいと結論される。

- (1) 津郷友吉, 山内邦男, 菅野長右エ門: 農化, **42**, 367 (1968).
- (2) Vitamin E Pannel, Analytical Method Committee: *Analyst*, **84**, 356 (1959).

- (3) C. Kanno, K. Yamauchi and T. Tsugo: *J. Dairy Sci.*, **51**, 1713 (1968).
- (4) 東京大学農芸化学教室: 実験農芸化学, 上巻, 朝倉書店, 1962, p. 136.
- (5) J. Tösis and T. Moore: *Biochem. J.*, **39**, 498 (1949).
- (6) D. R. Erickson and W. L. Dunkley: *Anal. Chem.*, **36**, 1055 (1964).
- (7) 若生 宏, 倉谷英樹, 葛谷博敏: ビタミン, **25**, 369 (1962).
- (8) C. Kanno, K. Yamauchi and T. Tsugo: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2067 (1972).
- (9) S. Y. Thompson, K. M. Henry and S. K. Kon: *J. Dairy Res.*, **31**, 1 (1964).
- (10) W. L. Dunkley, A. A. Franke and E. Low: *J. Dairy Sci.*, **51**, 1215 (1968).