Thin layer chromatography* 並びに circular chromatography による carotenoids の簡易分離定量法

片 山 輝 久

(1964 年 3 月 16 日受理)

SIMPLE PROCEDURES FOR QUALITATIVE DETERMINATION OF CAROTENOIDS BY THIN LAYER AND CIRCULAR CHROMATOGRAPHY

Teruhisa KATAYAMA**

A method for separation of small amounts of carotenoids has been desired and paper chromatography and thin layer chromatography seemed to be the best prospect among the available techniques.

Circular chromatography and thin layer chromatography have advantages of simplicity of apparatus, speed, reproductivity and particular suitability.

1. Carotenoids can be separated finely by thin layer chromatography with silica gel as adsorbent, but epoxides turn to be furanoid oxides while developing. So to the samples which contain epoxides this silica gel thin layer chromatography can not be applicable.

2. Carotenes can be separated and determined quantitatively by thin layer chromatography with magnesium oxide as adsorbent.

3. Xanthophylls can not be separated by the circular chromatography of Kieselguhr paper, but it was difficult to separate zeaxanthin from lutein and after extracting zeaxanthin and lutein band, zeaxanthin was separated from lutein by the circular chromatography of magnesium oxide paper.

Carotenes can be separated easily by the circular chromatography of magnesium oxide paper.

4. The incorporation of 2-C¹⁴-mevalonic acid into carotenoids in green peaches and apricots was noticed by circular chromatography and developing.

魚類の保蔵、海藻の貯蔵中における carotenoids の変化、並びに carotenoids の biosynthesis, photosynthesis における carotenoids の役割を微量で追究し得る方法を案出する目的をもつて本研究に着手した。

著者はすでに carbonyl compounds, esters, alcohols, hydrocarbons につき chromatostrip (Thin layer chromatography) を用いて分離確認し得ることを明らかにした¹⁾。前報²⁾に引続き thin layer chromatography を用い carotenoids を分離定量し得ることを明らかにし、さらに circular chromatography の方法をも検討し、ほぼ同一の結果を得たのでここに報告する。

Carotenoids の thin layer chromatography については WITERSTEIN³⁾⁴⁾⁵⁾, STAHL⁶⁾らの報告がある。著者は carotene 区を分離し phytofluene, phytoene, α -carotene, β -carotene, γ -carotene の Rf-値を決定した。

また circular chromatography については JENSEN ら⁷⁾⁸⁾の研究があるが、lutein, zeaxanthin の相互

* Thin layer chromatography は chromatostrip と全く同一ものである。

** 鹿児島大学水産学部生物化学教室 (Lab. of Marine Biochemistry, Faculty of Fisheries, University of Kagoshima, 470, Shimo-arata, Kagoshima). (印刷費負担)

分離は Kieselguhr paper を用いるのみでは不可能であつたが、この band を切り取り、溶出して magnesium oxide paper を用いることにより容易に分離し得ることを明らかにした。したがって carotenoids は石油エーテルとメチールアルコール混合の分配率の差により carotene 区と xanthophyll 区に分ち⁹⁾、carotene 区は magnesium oxide paper を用いて分離確認し、xanthophyll 区は Kieselguhr paper にて分離し、lutein, zeaxanthin の band は、さらに溶出して magnesium oxide paper にかけて容易に分離し得る目的を達することができ、carotenoids の前駆物質である labelled 2-C¹⁴-mevalonic acid を注射して carotenoids の radioactivity を X線フィルムにとることにより容易に測定し得ることを明らかにしたのでここに報告する。

実験並びに実験結果

I. Thin layer chromatography による carotenoids の分離定量法

A. Silica gel を吸着剤とする thin layer chromatography silica gel 20 g と石膏 5 g をよく混合し、これに水 42 cc を加え、硝子板に均一に拡げた。strip の乾燥、貯蔵法は既報¹⁾²⁾と全く同一の方法を用いた。展開溶媒: 30 % 酢酸エチル・ヘキサンを用いると分離は非常に良好であるが、epoxides は塩酸を加えることなく

furanoid oxide となり最大吸収帯に shift を生じ、epoxides を含む天然物の分離には不適合であつた。

B. Magnesium oxide を吸着剤とする thin layer chromatography による carotenes の分離確認法

a. Thin layer の調製 magnesium oxide: hyflosupercel (1:2) の混合物に水を加え糊状となし、硝子板上に均一に拡げた。その調製法並びに乾燥、貯蔵法は既報¹⁾²⁾と全く同じ方法を用いた。

b. 展開方法並びに展開溶媒 展開溶媒は 2 % アセトン・石油エーテルを用い、展開装置、方法は既報¹⁾²⁾と同じである。

c. Carotenes の Rf-値 phytofluene, phytoene, α -carotene, β -carotene, γ -carotene は天然物より著者の単離したものをを用いた。Rf-値は Table 1 の如くであつた。

II. Circular chromatography による carotenes 並びに xanthophylls の分離、確認

A. Circular chromatography による xanthophylls の分離、確認 Kieselguhr paper は SCHLEIDER and SCHÜLL No. 287 を用い、中心部に試料をつけ、展開溶媒として 10 % アセトン・石油エーテルを用いた。なお試料 neoxanthin, violaxanthin, lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin, β -carotene は著者が天然物より単離したものをを用いた。得られた Rf-値は Table 2 の如くである。

Table 1. Separation of carotenes by thin layer chromatography

Compound	Rf-value
α -carotene	0.53
β -carotene	0.37
γ -carotene	0.07
Phytoene	0.63
Phytofluene	0.10

Adsorbent: Magnesium: hyflosupercel (1:2).
Developing solvent: 2 % acetone in petroleum ether.

Table 2. Separation of carotenoids by circular chromatography.

Compound	Rf-value
Neoxanthin	0.25
Violaxanthin	0.62
Lutein	0.71
Zeaxanthin	0.73
Cryptoxanthin	0.94
β -carotene	0.98

Adsorbent: Kieselguhr paper
Developing solvent: 10 % acetone in petroleum ether.

B. Circular chromatography による carotenes 並びに xanthophylls の分離, 確認 magnesium oxide: hyflosupercel (1:2) 混合物 20 g をとり, これに 50 %メチールアルコール 100 cc を加えよく混合し, 濾紙 No. 1 を 1~2 回浸した後 95°C で約 10 時間乾燥器中にて乾燥した。

a. lutein, zeaxanthin の分離, 確認 前記 magnesium oxide paper を用い, 展開溶媒は 20 %アセトン・石油エーテルを用いて展開すると, lutein, zeaxanthin はよく分離することができた。

b. Carotenes の分離, 確認 前記 magnesium oxide paper を用い, 展開溶媒は 2.5 %アセトン・石油エーテルを用いた。得られた結果は次の如くである。

III. Circular chromatography による radio-activity の検定

Peaches, Apricots の青い果物に 2-C^{14} -mevalonic acid を約 0.02 cc 注射後 24 時間放置して carotenoids を抽出し, 90 %メチールアルコール, 石油エーテルの分配率の差により carotenes と xanthophylls に分ち, それぞれ magnesium oxide paper, Kieselguhr paper を用い circular chromatography にかへ, 展開後 X 線フィルムを密着して 2 週間暗所に放置後現像すると次の如く

Table 3. Separation of lutein from zeaxanthin.

Compound	Rf-value
Lutein	0.88
Zeaxanthin	0.70

Adsorbent: The paper impregnated with magnesium oxide: hyflosupercel (1:2).

Developing solvent: 20% acetone in petroleum ether.

Table 4. Separation of carotenes by magnesium oxide paper.

Compound	Rf-value
α -carotene	0.83
β -carotene	0.75
γ -carotene	0.35
Phytofluene	0.90

Adsorbent: The paper impregnated with magnesium oxide: hyflosupercel (1:2).

Developing solvent: 2.5% acetone in petroleum ether.

Fig. 1. Radioautograph of carotenoids.

mevalonic acid の carotenoids への転移を明らかにすることができる。

総 括

1. Thin layer chromatography 並びに circular chromatography による carotenoids の微量, 分離確認法を検討したが, silica gel を用いた thin layer chromatography, circular chromatography による分離は極めて良いが, epoxides は furanoid oxide を作り, 分離定量には用い得ないが, epoxides の存在は容易に確認することができる。

2. Magnesium oxide を用いる thin layer chromatography により, carotenes は容易に分離確認, 定量することができる。

3. Kieselguhr paper を用いる circular chromatography により xanthophylls の分離, 確認定量は, lutein, zeaxanthin 以外は可能である。lutein, zeaxanthin はさらに magnesium oxide paper により分離確認, 定量することができる。また magnesium oxide paper により carotenes の分離定量は極めて容易である。

4. Circular chromatography により, carotenoids 生合成の中間体である 2-C¹⁴-mevalonic acid を注射後 carotenoids を抽出して, circular chromatography にかけて, 中間体の carotenoids への転移を X 線フィルムを用いて容易に判定し得る。

文 献

- 1) 片山輝久: 本誌, **21**, 413 (1955), **21**, 417 (1955), **21**, 425 (1955), **22**, 244 (1956), **26**, 814 (1960).
- 2) 片山輝久: 未発表.
- 3) A. WINTERSTEIN and B. HEGEÜS: *Chimica*, **14**, 18 (1960).
- 4) A. WINTERSTEIN and R. STUDER: *Chem. Ber.*, **93**, 2951 (1960).
- 5) A. WINTERSTEIN: *Angew. Chem.*, **72**, 902 (1960).
- 6) L. LEHNERT: A Chapter "Dünnschicht-Chromatographie von Carotin- und Carotinoid-gemischen" in *Carotine und Carotinoids* edited by K. LANG-MAINZ, 1963, Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- 7) A. JENSEN: *Acta Chem. Scad.*, **14**, 950 (1960).
- 8) A. JENSEN: *Acta Chem. Scad.*, **15**, 1605 (1961).
- 9) F. J. PETRACEK and L. ZECHMEISTER: *Anal. Chem.*, **28**, 1484 (1956).
- 10) T. KATAYAMA, T. O. M. NAKAYAMA and C. O. CHICHESTER: 印刷中.