

高速液体クロマトグラフィーによる乳牛の血漿中のトコフェロール同族体の定量

誌名	畜産試験場研究報告 = Bulletin of the National Institute of Animal Industry
ISSN	0077488X
著者名	甫立,京子 浜田,龍夫
発行元	農林省畜産試験場
巻/号	39号
掲載ページ	p. 79-84
発行年月	1982年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



高速液体クロマトグラフィーによる乳牛の血漿中のトコフェロール同族体の定量

甫立 京子・浜田 龍夫

要 約

イタリアンライグラスサイレージ（5頭）ととうもろこしサイレージ（3頭）を給与した当時繁養のホルスタイン種乳牛の分娩後1ヶ月間の血漿中のトコフェロール量を高速液体クロマトグラフィー（HSLC）で測定した。またイタリアンライグラスハイウエファール給与群（8頭）の血漿中のトコフェロールについても測定し、3群の総トコフェロール量と同族体の割合について比較した。

1. 牛血漿中のトコフェロールをHSLCで測定すると、簡便法である直接蛍光測定法よりも低い値がえられた。すなわち、グラスサイレージ給与牛の子牛の出生時の血漿トコフェロールをHSLCで測定すると $0.36 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ であったが、直接蛍光測定法では $0.72 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$ であった。

2. イタリアンライグラスサイレージ給与群の α -トコフェロール値は分娩後1週目で最低値 $1.82 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$ を示し、その後次第に増加していった。子牛は初乳を飲む以前は $0.18 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ であったが、2週間後には $1.06 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$ に上昇した。

3. とうもろこしサイレージ給与群では分娩時に最低値 $3.22 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$ を示し、その後次第に増加していった。子牛は初乳を1週間飲むと $4.25 \pm 1.43 \mu\text{g/ml}$ と急激に上昇したが常乳を飲みだすと次第に減少し、1ヶ月後には $1.07 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$ になった。

4. イタリアンライグラスハイウエファール1ヶ月給与時と、イタリアンライグラスサイレージととうもろこしサイレージ給与群の分娩1ヶ月後の血漿中の総トコフェロール量はそれぞれ $8.02 \pm 1.17 \mu\text{g/ml}$, $3.19 \pm 0.88 \mu\text{g/ml}$, $4.51 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$ であった。 α -トコフェロールと $\beta + \gamma$ -トコフェロールの割合はそれぞれ92%と5~8%であり、給与された粗飼料の種類間でほとんど差がなかった。 δ -トコフェロールはイタリアンライグラスサイレ

ージでは微量であったが、その他では2~3%存在していた。

結 言

ビタミンEの作用について、実験動物においては多くの研究があり、ラットでは「抗不妊ビタミン」といわれている。反芻動物においても下垂体や副腎、子宮での含有量が著しく高いために繁殖との関係が示唆されている。現在それを裏付けるいくつかの研究¹⁾が報告されはじめた段階である。繁殖関係以外に、幼若動物のビタミンE欠乏時には筋ジストロフィーが発生する²⁾。また肉、ミルク中のフレーバーの変化を防止³⁾する作用もあり、反芻動物においても必須ビタミンである⁴⁾。

ビタミンEは青草や種子中⁵⁾に多く存在している。反芻動物に摂取されたビタミンEは、体内で利用され、また牛乳中へ移行し体外へ出される。高泌乳牛におけるビタミンE要求量の増加と放牧の機会の減少、通年サイレージを給与する飼養法では、乳牛でビタミンE欠乏が発生しやすい状態になっている。そこでビタミンEの要求量や給与量を新たに見直す必要が生じている。

単胃動物が摂取するビタミンEは α -と γ -トコフェロール(Toc)が主体であるが、反芻動物は多種類のTocを含有する粗飼料を摂取している。ビタミンEの同族体として天然に存在するのは8種類あるが、それぞれ生物活性が異なるのでこれらの量と割合を知ることが重要である。 α -Tocが最も生理作用が強く、 β -Tocは1/3、 γ -Tocは1/10である。従ってHSLCによってToc同族体を分離、定量することは特に反芻動物において意義が大きいと考えられる。

当場に繁養されているホルスタイン種乳牛にイタリアンライグラスハイウエファール、イタリアンライグラスサイレージととうもろこしサイレージを給与した時の血漿中のToc同族体をHSLCで測定した。また両サイレージを給与した乳牛の分娩後1ヶ月間の血漿中の α -Tocの変

化についても観察した。この時分娩された子牛についても同様にしらべた。

実験材料および方法

当場で繋養されているホルスタイン種乳牛を給与粗飼料によって3群にわけた。すなわちイタリアンライグラスヘイウエファー給与群(水分含量13%, 給与量7.3kg/日, 8頭, 分娩時期4月, 乳量25kg/日), イタリアンライグラスサイレージ給与群(水分含量63%, 給与量7.5kg/日, 5組親子, 分娩時期7~8月, 分娩1ヶ月後の乳量25kg/日), とうもろこしサイレージ給与群(水分含量70%, 給与量11kg/日, 3組親子, 分娩時期10月, 分娩1ヶ月後の乳量24kg/日)である。配合飼料は当場指定(大麦, とうもろこし, マイロ, ふすま, アルファルファミール等)の同一のものを11.5kg/日給与した。子牛は1週間初乳を飲み, それ以降は当場で搾乳した牛乳を与えた。

イタリアンライグラスヘイウエファー給与群は, 分娩3ヶ月後で, 1ヶ月間イタリアンライグラスヘイウエファーを摂取した時期に頸静脈よりヘパリン処理真空採血管で採血した。イタリアンライグラスととうもろこしサイレージ給与群は分娩0日, 7日, 14日, 21日, 30日に採血した。血漿は分離後, 測定時まで -75°C に貯蔵した。

ビタミンEの同族体の定量操作は阿部⁹⁾らの方法に従いHSLCを用いて行なった。血漿0.5mlは全て抗酸化剤(ピロガロール)存在下でアルカリ(水酸化カリウム)ケン化し, 内部標準物質としてトコール(Tocol)を使用した。HSLCの条件を表1, に示した。検出器にはUV検出器を使用した。また簡便法の直接蛍光測定法(Ex. 295nm, Em. 340nm)で得られた値とも比較した。

結 果

α -, β -, γ -, δ -Toc 標準物質のHSLCによる分離状態を図1に示した。図2にはトコールを内部標準物質とした場合の α -, β -, γ -, δ -Tocの重量比とピーク面積比

Table 1. HSLC conditions

model	TRI ROTAR-III (Japan Spectroscopic Co., Ltd.)
column	Finepak SIL NH ₂
mobile phase	n-hexane/isopropyl-ether/acetate =90/10/0.5
flow rate	1.5ml/min
detector	UVIDEC-100 III (295nm, Japan Spectroscopic Co., Ltd.)

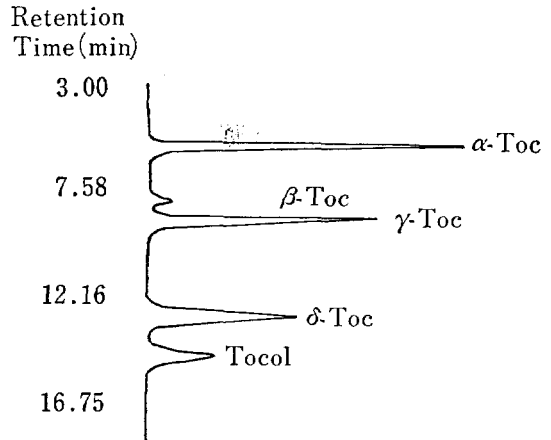


Fig. 1. Elution pattern of tocopherols. The standard retention times of tocopherols: α -Toc, 5.6min; β -Toc, 7.9min; γ -Toc, 8.8min; δ -Toc, 12.9; Tocol, 14.6min.

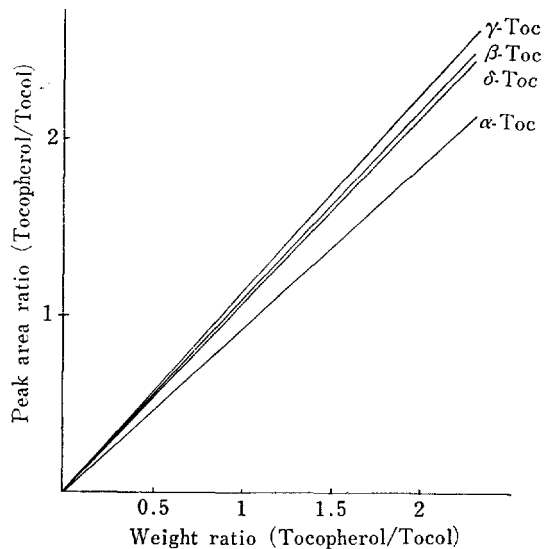


Fig. 2. Calibration curves of tocopherols.

の関係を示した。

直接蛍光法とHSLCでイタリアンライグラスサイレージ給与群から分娩された子牛の血漿中の α -Tocの値を比較した。直接蛍光法では $0.72 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$ であり, HSLCでは $0.36 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$ であった。

イタリアンライグラスサイレージ給与群の分娩後の血漿中の α -Tocの変化を示したのが図3である。親牛では, 分娩時が $2.06 \pm 0.67 \mu\text{g/ml}$ で, 1週目に最低値 $1.82 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$ を示し, その後次第に増加していった。子牛の場合, 初乳を飲む以前の値は $0.18 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$

ml と非常に低いのが 2 週間後には $1.06 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$ に達し、その後次第に増加する傾向を示した。

図 4 は、とうもろこしサイレージ給与群の血漿中の α -Toc の変化を示したものである。親牛の場合は、分娩時の $3.22 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$ が最低でその後次第に増加していった。子牛の場合は、初乳を 1 週間飲んだ時期に $4.25 \pm 1.43 \mu\text{g/ml}$ と非常に高くなったが、常乳に切り換わると次第に減少していく傾向を示した。

表 2 は、イタリアンライグラスヘイウエファー給与 1 ケ月目と、イタリアンライグラスサイレージ給与群ととうもろこしサイレージ給与群の分娩 1 ケ月後の血漿中の Toc 同族体の量を示したものである。総-Toc の量はそ

れぞれ $8.02 \pm 1.17 \mu\text{g/ml}$, $3.19 \pm 0.88 \mu\text{g/ml}$, $4.51 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$ で、イタリアンライグラスヘイウエファー給与群で最も高かった。Toc 同族体の割合は α -Toc が約 92% であることは 3 種類の粗飼料給与群に共通していて、 $\beta + \gamma$ -Toc は 5~8% であった。イタリアンライグラスサイレージ給与群では δ -Toc が検出されなかったり、検出されても微量であった。その他では 2~3% の δ -Toc が存在していた。子牛については、 α -Toc と微量の γ -Toc が検出された例が多く、とうもろこしサイ

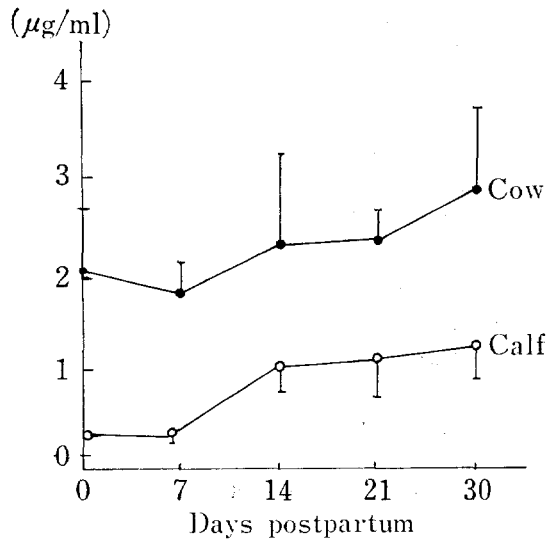


Fig. 3. Changes in α -tocopherol levels in plasma of cows fed on grass silage and their calves during a 30 d postpartum period.

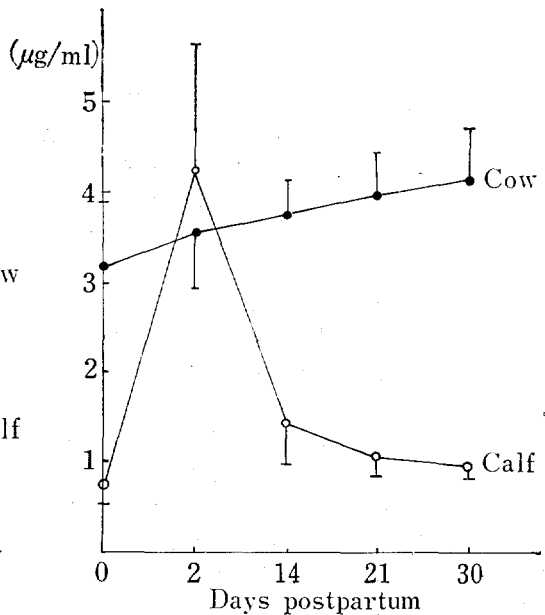


Fig. 4. Changes in α -tocopherol levels in plasma of cows fed on maize silage and their calves during a 30 d postpartum period.

Table 2. α -, β -, γ -, δ -tocopherol and total tocopherol contents of plasma of cows fed for one month on Italian ryegrass hay, Italian ryegrass silage, or maize silage ($\mu\text{g/ml}$)

Roughage fed	α -Toc	β -Toc	γ -Toc	δ -Toc	Total-Toc
Italian ryegrass hay (n=8)	$7.44 \pm 1.16^*$	0.27 ± 0.09	0.20 ± 0.06	0.11 ± 0.03	8.02 ± 1.17
Italian ryegrass silage (n=5)	2.94 ± 0.88	0.12 ± 0.04	0.13 ± 0.08	trace	3.19 ± 0.88
Maize silage (n=3)	4.14 ± 0.56	0.09 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.12 ± 0.15	4.51 ± 0.59

* Mean \pm S. D.

レーズ給与群から分娩された群で、血漿中の α -Toc量が一時的に上昇した時期に β -Tocが微量検出された。 δ -Tocは検出されなかった。

考 察

直接蛍光測定法は同族体を分離することなく総和を測定していたわけであるが、それぞれの同族体の生物活性の強さが異なることから分離、定量した方がよい。また今回の測定で直接蛍光測定法の方がHSLCの測定値より高くなっていたが、これはMCMURRAYらの報告⁷⁾と同じである。特に血漿のTocの平均値が人などよりも低い牛を測定する場合、さらに欠乏状態の試料を測定する場合には直接蛍光測定法では値が実際より高く示されることがあるので注意が必要であると考えられる。

分娩時または1週間後に血漿中のTocが低下することは、LATSCHER⁸⁾らが分娩後2～3日目に最低値を示したという報告に似た傾向を示している。この低下の原因は血漿中の多量のTocが初乳中へ移行することによると考えられる。とうもろこしサイレーズ給与群が分娩した子牛の血漿中のTocのなかで、特に初乳を1週間飲んだ時期は著しく高い値を示している。この時の初乳中のTocの量を測定した1例を示すと28.0 μ g/mlで2週間後の牛乳の約30倍、3ヶ月後の牛乳の約100倍のTocを含有していた。ビタミンE欠乏による筋ジストロフィーが幼若反芻動物に発生するが、妊娠中に直接子牛に移行するビタミンEの量がわずかなことから、ビタミンEを高濃度に含有する初乳の重要性が再確認された。グラスサイレーズ給与群の子牛の血漿中のTocの値の上昇がゆるやかだったのは、初乳中のTocの含有量が少ないことによると考えられる。

LYFORD⁹⁾らの報告では授乳中の肉牛で1.66 μ g/ml、哺育牛で0.80 μ g/ml、育成牛で1.11 μ g/mlであるが、今回の測定結果はそれよりも高い値を示した。

乳中へのTocの移行が減少し、分娩前のレベルまで回復したと考えられる分娩1ヶ月後のイタリアンライグラスサイレーズ給与群ととうもろこしサイレーズ給与

群、それにイタリアンライグラスヘイウエファー給与群の血漿中のTocの量とその同族体の割合を比較すると、とうもろこしサイレーズ給与群は、イタリアンライグラスサイレーズ給与群よりも血漿中のTocの値は高いが、ヘイウエファー給与群よりは低かった。とうもろこしサイレーズは一般にグラスサイレーズや乾草に比較して、乾物あたりの α -Tocの含有量は少ないが、綿羊を使用した実験では、組織への取り込み、血漿中の値は他の2つの粗飼料より高いことが示されている¹⁰⁾。今回ヘイウエファー給与群が高かった理由としては、ヘイウエファーの質がきわめて良好であり、ビタミンEの破壊が少なかったことと、乾物の摂取量が多かったことによると考えられる。

チモンサイレーズを給与した乳牛の血漿中のToc同族体をHIDROGLOU¹¹⁾が薄層クロマトグラフィーで測定している。分娩後60日の値であるが、 α -Tocが85 \pm 3%、 β + γ -Tocが12 \pm 2%、 δ -Tocが微量存在していた。牧草の種類や、サイレーズの調整法¹²⁾、貯蔵時間³⁾などによって粗飼料中のTocの含有量が変化するので血漿中のToc同族体の割合も変化する可能性は考えられる。とうもろこしサイレーズは α -Tocが約1/2、 γ -Tocと δ -Tocがそれぞれ約1/4ぐらいの割合で含有されているが、グラスサイレーズではほとんど α -Tocであるという報告¹⁰⁾があるが、今回の測定においては、 α -Tocは両者とも91.8%と92.2%で差が認められず、粗飼料中のTocの割合が血漿中の値に反映していないようであった。今後、飼料中のToc同族体についても実際に測定し、血漿中のToc同族体との関連を明らかにしていく必要があると考えている。子牛血漿中に β -Tocや δ -Tocが検出できなかった例が多かったのは、我々の測定においては検体量0.5mlであり、その検体量が少量の為検出できなかったものと考えられる。

終りに本実験を遂行するにあたり、御協力をいただいたエーザイ(株)山崎八十男氏、生理第2研究室甫立孝一氏、生理第3研究室諸氏、そして栄養部飼料品質管理研究室柗木茂彦氏に深謝いたします。

引 用 文 献

- 1) SEGERSON, E. C. et al: Selenium/vitamin E: Role in fertilization of bovine ova. *J. Dairy Sci.*, 60, 1001—1005, 1976
- 2) GILS, J. H. J. van and I. ZAYED: Myodegeneration in Friesian beef calves. 1. Experimental production of myodegeneration in newborn calves fed on α -tocopherol deficient synthetic milk diet. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 91, 1375—1421, 1966
- 3) SCHINGOETHE, D. J. et al: Vitamin E status of dairy cows fed stored feeds continuously or pastured during summer. *J. Dairy Sci.* 61, 1582—1589, 1978

- 4) OKSANEN, H. E.: Aspects of vitamin E deficiency in ruminants. *Acta Agric. Scand. Suppl.*, **19**, 22-28, 1973
- 5) BUNNELL, R. H., J. P. KEATING and A. J. QUARESIMO: Alpha-tocopherol content of feeds stuffs. *J. Agr. Food Chem.*, **16**, 659-664, 1968
- 6) 阿部皓一, 勝井五一郎：血清中のトコフェロール同族体の高速液体クロマトグラフィーによる定量, *ビタミン*, **49**, 259-463, 1975
- 7) McMURRAY, C. H. and W. J. BLANCHFLOWER: Application of a high-performance liquid chromatographic fluorescence method for the rapid determination of α -tocopherol in the plasma of cattle and pigs and its comparison with direct fluorescence and high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection methods. *J. Chromatogr.*, **178**, 525-531, 1979
- 8) LATSCHAR C. E. et al: Concentration of various constituents in blood of dairy cows during stages of terminal gestation and initial lactation. *J. Nutr.*, **38**, 503-516, 1949
- 9) LYFOLD, S. J. and B. E. COLBY: Blood tocopherol levels in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, **26**, 877-878, 1967
- 10) HIDIROGLOU, M.: Effect of diet on the metabolism of labelled tocopherol in sheep. *Br. J. Nutr.*, **37**, 215-225, 1977
- 11) HIDIROGLOU, M., J. R. LESSARD and J. M. WAUTHY: Blood serum tocopherol levels in calves born from cows winter fed hay or glass silage. *Can. J. comp. Med.*, **42**, 128-131, 1978
- 12) YOUNG, L. G. et al: Vitamin E stability in corn and mixed feed. *J. Anim. Sci.*, **40**, 495-499, 1975

Plasma Tocopherol Profiles Determined with High Speed Liquid Chromatography of Dairy Cows and Calves Receiving Different Roughages

Kyoko HODATE and Tatsuo HAMADA

Summary

Tocopherol concentrations in the blood plasma of dairy cows fed different roughages were determined at early stages of lactation. Plasma samples were obtained from three separate sources. Two groups of Holstein cows were designated as either Italian ryegrass silage or maize silage group. Plasma samples from cows and calves were taken at parturition and at 7, 14, 21 and 30 days of postpartum. Plasma samples of the third group were obtained from the Holstein cows fed Italian ryegrass hay for one month. Contents of individual tocopherols in the samples were analysed by high speed liquid chromatography (HSLC-UV method). This method was compared with a conventional method measuring the direct fluorescence of tocopherol. Plasma tocopherol contents measured by the direct fluorescence method were considerably higher than those obtained by the HSLC-UV method ($0.72 \pm 0.49 \mu\text{g/ml}$ vs $0.36 \pm 0.26 \mu\text{g/ml}$).

The mean plasma α -tocopherol content of the cows fed grass silage decreased from $2.06 \pm 0.67 \mu\text{g/ml}$ at parturition to $1.82 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$ at 7 days of postpartum, after which the concentration gradually increased. The mean plasma α -tocopherol content of the calves born from the cows fed grass silage was $0.18 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$ at birth, and it increased to $1.16 \pm 0.24 \mu\text{g/ml}$ at 14 days of age. α -Tocopherol content in the plasma of the cows fed maize silage showed the minimum value of $3.22 \pm 0.94 \mu\text{g/ml}$ at parturition. The mean plasma α -tocopherol content of the calves born from the cows fed maize silage increased to $4.25 \pm 1.43 \mu\text{g/ml}$ at 7 days of age, and in the following 3 weeks it decreased to $1.07 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$. On all sampling dates, the cows from the maize silage group showed higher tocopherol levels than those from the grass silage group.

Mean plasma tocopherol levels of the cows fed on grass hay, grass silage or maize silage for one month were 8.02 ± 1.17 , 3.19 ± 0.88 and $4.51 \pm 0.59 \mu\text{g/ml}$, respectively. The distributions of plasma tocopherol analogs in the cows obtained from the maize group and the grass hay group at 30 days after parturition showed that α -tocopherol averaged 92%, $\beta + \gamma$ -tocopherols 5~8% and δ -tocopherol 2~3%. Only a trace quantity of δ -tocopherol was detected in the plasma of the grass silage group.