

高速液体クロマトグラフィーによる血清および肝組織中 α -トコフェロール（ビタミンE）定量法の検討

寺澤文字¹⁾, 内川典子²⁾, 野本昭三¹⁾

Studies on the HPLC method for determination of α -Tocopherol (Vitamin E) in serum and liver tissues.

We established a HPLC method for determination of α -Tocopherol (Vitamin E) in serum and liver tissues.

α -Tocopherol was extracted from serum and liver homogenate with a mixture of n-hexane and ethanol (4 : 1 v/v). The extracts were dried under gas flow of nitrogen at 40°C, and the residus were reconstituted with 200 μ l of 96% methanol. Twenty μ l of the reconstituted specimen was injected into HPLC system equiped with reverse phase ODS column 150 \times 4.6mm i.d., 20 μ l loop injector and fluorospectrophotometric detector (Ex.286nm, Em. 325nm), and eluted with 96 % methanol.

Within run precision, mean \pm SD and CV (obtained with this method) were 15.1 \pm 0.36 μ g/ml, 2.4% for serum (n=15) and 23.9 \pm 1.20 μ g/ml, 5.0 % for liver tissues (n=10). The values of α -Tocopherol (mean \pm SD) in serum from healthy adults (n=20) and in liver tissues from mongrel dogs (n=20) were 14.0 \pm 4.42 μ g/ml and 20.7 \pm 7.41 μ g/g, respectively. The method has an enough reproducibility and can be applied for determination of α -Tocopherol in biological materials in the field of laboratory medicine.

Key words:

Vitamin E, α -Tocopherol, HPLC, fluorospectrophotometry, allowable error limit

はじめに

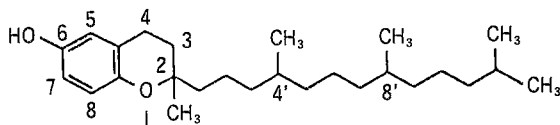
ビタミンEは、1922年 Evans らによって、ネズミの抗不妊因子として発見され¹⁾、無色ないし淡黄色、粘性のある油状物で、有機溶媒に溶け、水には不溶であるなどの性質を

持っている。ビタミンA, Dと共に脂溶性ビタミンに属し、ベンゼン核上のメチル基の数と位置、および側鎖の二重結合の有無の違いによる、8種類の同族体 (α , β , γ , δ の4種類のトコフェロールと4種類のトコトリエノール) が知られている (図1)。このうち、

1) 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科 : Fumiko Terasawa, Shozo Nomoto, Dept. of Medical Technology, School of Allied Medical Sciences, Shinshu Univ.

2) 信州大学医学部第二外科学教室 : Noriko Uchikawa, The Second Dept. of Surgery, School of Medicine, Shinshu Univ. Nagano, Japan.

トコフェロール類



2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyl)
-6-chromanol

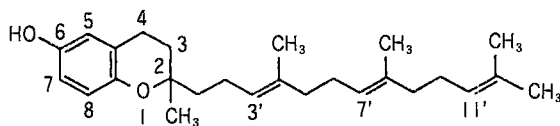
α -Toc ; 5,7,8-trimethyl tocol

β -Toc ; 5,8-dimethyl tocol

γ -Toc ; 7,8-dimethyl tocol

δ -Toc ; 8-methyl tocol

トコトリエノール類



2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyl)
trideca-3',7',11'-trienyl)-6-chromanol

α -Toc-3 ; 5,7,8-trimethyl tocotrienol

β -Toc-3 ; 5,8-dimethyl tocotrienol

γ -Toc-3 ; 7,8-dimethyl tocotrienol

δ -Toc-3 ; 8-methyl tocotrienol

図1. ビタミンE同族体

トコフェロールはビタミンEの本体をなすもので、なかでも α -トコフェロール(α -Tocと略す)は生物活性が最も高く、 α -Tocの活性を100とすると、 β は25、 γ は5、 δ は0.1といわれ²⁾、また生体内に存在するビタミンEのほとんどが α -Tocであることがわかっている。

ビタミンEは腸管から吸収されるとリポタンパクのうちのカイロミクロンにより肝に運搬され、またビタミンEに親和性をもつ形質膜、ミトコンドリア、ミクロソームなどに含まれるリン脂質によって、これらに貯蔵される。機能としては抗酸化作用、とりわけフリーラジカルのスクャベンジャー(捕捉因子)

としての役割などが知られている³⁾。また近年では、生体内に存在する数少ない脂溶性抗酸化物質として不飽和脂肪酸の過酸化反応抑制作用と生体膜安定化作用⁴⁾が注目され、さらに電子伝達系における酵素作用とユビキノンの生合成・体内保留、膜透過性、DNA生合成、セレン代謝などへも関与している⁵⁻⁷⁾ことから、ビタミンEと動脈硬化、老化および成人病、神経疾患などとの関連について研究が進められている⁸⁻¹²⁾。

ビタミンEの測定法としては、比色法、蛍光法、カラムクロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィーなど種々の方法が報告されているが、現在では、正確性、特異性、簡便性

などに優れていること、同族体の分離が可能などから高速液体クロマトグラフィー（high performance liquid chromatography, HPLC）が最も多く用いられている¹³⁻¹⁶。しかし HPLC 分析では、試料の前処理方法や、カラムの種類によって溶出液（移動相）を選択する必要が生ずることなどから、報告者によりそれぞれその手法は異なったものとなっている。今回、我々は、Lehmann¹⁴、阿部^{13,16}の方法を参考にしながら、前処理法には生体試料中の夾雑物の影響を受けにくい、ヘキサン：エタノールによる抽出法を使用するカラムが逆相系であることから、移動相にはメチルアルコール系を、また内部標準物質として、Toc 類と保持時間が近い、2,2,5,7,8-pentamethyl-6-hydroxycromman (PMC) を用いる、などの変更を加え、以下に述べるように設定した HPLC 法で、血清ならびに肝組織中の α -Toc の定量に関する検討を行った。

方 法

1. 装置：HPLC は島津ポンプモデル LC-5 A, データプロセッサ C-R3A, レオダイ ン7125型インジェクタ, および日立蛍光光度計 U-2000を用いた。

2. 試薬：

- (1) エチルアルコール（和光，特級）
- (2) メチルアルコール（ " ）
- (3) n-ヘキサン（ " ）
- (4) 0.1mol/l リン酸緩衝液，pH7.4
それぞれ0.1mol/l の Na_2HPO_4 と KH_2PO_4 （和光，特級）を80.4：19.6の割合で混合した。
- (5) 標準液
 - a. 換算係数用 α -Toc 同族体標準液（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

α -Toc 同族体標準品（エーザイ）の100mg を正確に秤り，96%メチルアルコールで100 ml とした。その5.0ml をとり，96%メチルアルコールを加えて100 ml とした。

b. 換算係数用 PMC 標準液(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

PMC（エーザイ）100mg を正確に秤り，96%メチルアルコールで100ml とした。その5.0ml をとり，96%メチルアルコールを加えて100ml とした。

c. 定量用 PMC 標準液（0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）

b 1.0ml をとり，エチルアルコールで100 ml とした。

a, b は，容器内の空気を N_2 ガスで置換した後，密栓，遮光し，冷蔵保存した。c は用時調整した。

3. 試料：健常人20名から採取した新鮮血清20本，pool 血清(再現性用)，およびイヌ肝臓20個，同一肝からの10片（再現性用）を用いた。

4. HPLC 条件：

カラム；Zorbax ODS (150 \times 4.6mm i.d.)

移動相；メチルアルコール：水=96：4

流速；1.2ml/min.

注入量；20 μl

検出（蛍光分析）；励起波長286nm

蛍光波長325nm（図2）

5. 操作法

(1) 換算係数の算出

換算係数用 α -Toc 標準液と換算係数用 PMC 標準液をそれぞれ0.5：1，2：1，4：1，6：1，10：1，20：1，40：1の比に混合し，それらの20 μl をカラムに注入して HPLC 分析を行い， α -Toc と PMC のピークの高さを求め，濃度比とピーク高さ比の直線性を確認したうえで，換算係数（濃度比/ピーク高さ比；F）を算出した(図3)。

(2) 組織試料の前処理

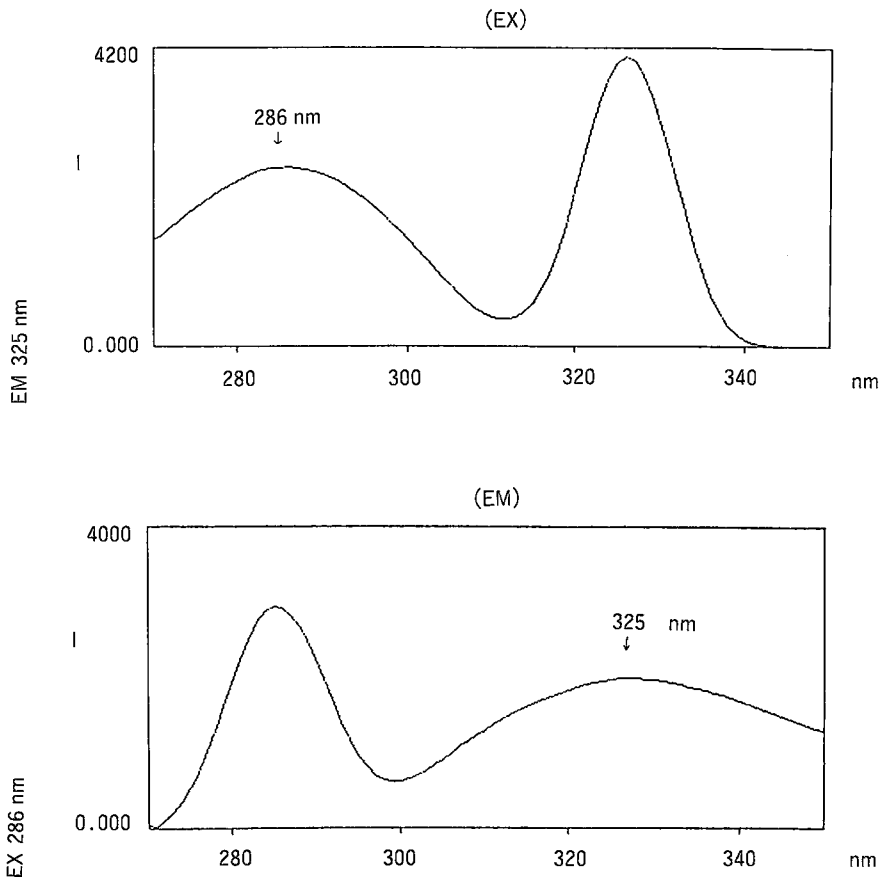


図2. 励起波長, 蛍光波長の選択

イヌ肝臓は、一片がほぼ0.5gくらいになるように切り出して正確に秤量し、直ちに液体窒素で凍結させて測定まで -80°C に保存し、測定に当たって各試料重量の6倍量の 0.1mol/l リン酸緩衝液、 $\text{pH}7.4$ を加えてホモジナイズした後、冷却遠心機3000rpmで10分間遠心し、その上清を用いた。

(3) 定量のための操作

血清および肝ホモジナイズ上清液を共栓付き試験管にそれぞれ 0.5ml ずつとり、これに定量用PMC標準液($0.5\mu\text{g/ml}$) 1.0ml を加えて攪拌し、さらにn-ヘキサン 4.0ml を加えて密栓し、5分間激しく混和し

たのち、3000rpmで10分間遠心した。その上清(n-ヘキサン層) 3.0ml を試験管にとり、 40°C のブロックヒーター内で N_2 ガスを通じながら溶媒を留去し、室温に戻し、残留物に移動相 $200\mu\text{l}$ を加えて溶かしてから $0.45\mu\text{m}$ のフィルターを通した後、その $20\mu\text{l}$ をカラムに注入し、HPLC分析を行った(図4, 5)。

肝組織および血清中の $\alpha\text{-Toc}$ 濃度は次式により求めた。

$$\alpha\text{-Toc} (\mu\text{g/ml})$$

$$= 0.5 \times A / B \times F \times C \times 2$$

$$0.5: \text{添加 PMC 標準液濃度} (\mu\text{g/ml})$$

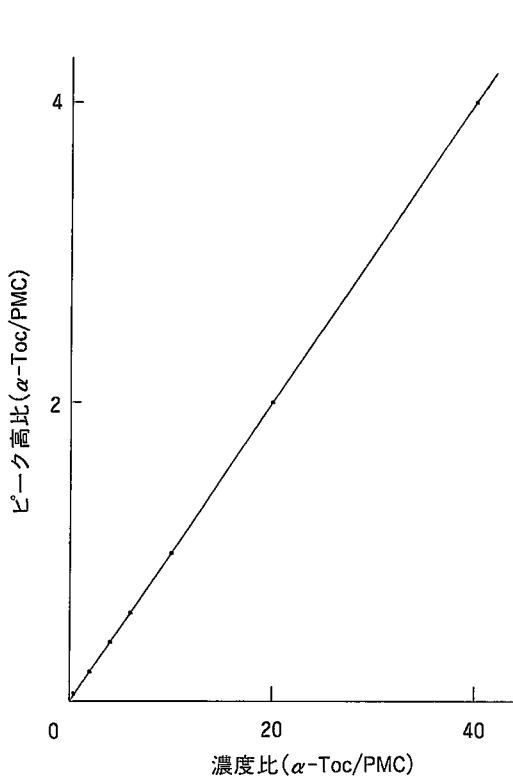


図3. α -Toc と PMC の濃度比とピーク高比の直線性

〔イヌ肝組織前処理〕

秤量
 | + 6 倍量 リン酸緩衝液 0.1 mol/l pH 7.4
 ホモジナイズ
 |
 3000rpm 10分 冷却遠心分離
 |
 上清

〔定量操作〕

血清または組織ホモジネート上清0.5 ml
 | + PMC-エチルアルコール標準液1.0 ml
 混和
 | + n-ヘキサン4.0 ml
 5 分間激しく振盪
 |
 3000rpm 10分 遠心分離
 |
 上清 (n-ヘキサン層) 3.0 ml
 |
 40°C, N₂ガス下で乾固
 | + 移動相200 μ l
 混和
 20 μ l を HPLC に注入
 α -Toc と PMC のピークの高さを測定

図4. 血清およびイヌ肝組織の前処理および定量操作

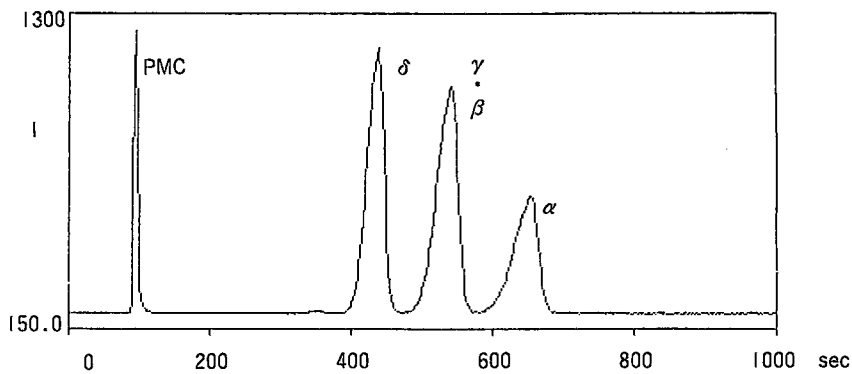


図5. HPLC 法によるトコフェロール同族体のクロマトグラム
 カラム; Zorbax ODS,
 蛍光分析; Ex 286 nm, Em 325 nm

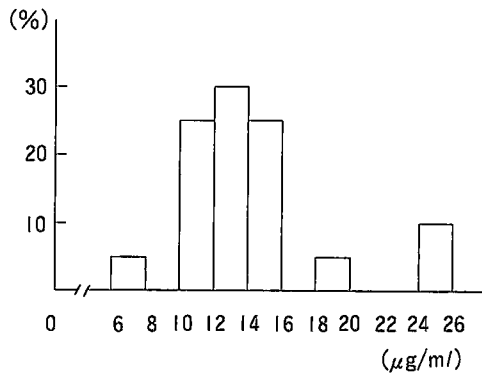


図6. ヒト血清中 α -Toc 濃度のヒストグラム

- A : 試料中 α -Toc のピーク高さ
 B : PMC 標準液のピーク高さ
 F : 換算係数
 (α -Toc と PMC の濃度比/ピーク高さ比)
 C : 組織試料の前処理段階での希釈倍数

肝の場合は、組織の比重を約1と仮定して、 $\mu\text{g/g}$ で表した。

結 果

- 再現性は、血清の場合、 $\text{mean} \pm \text{SD} = 15.1 \pm 0.36 \mu\text{g/ml}$, $\text{CV} = 2.4\%$ ($n=15$), 肝組織の場合、 $\text{mean} \pm \text{SD} = 23.9 \pm 1.20 \mu\text{g/ml}$, $\text{CV} = 5.0\%$ ($n=10$) であった。
- 濃度比とピーク高さ比の直線性は良好で、少なくとも α -Toc 濃度 0.5 から $40 \mu\text{g/ml}$ までの直線性はみとめられた。また換算係数は $F=9.86$ となった (図3)。
- 血清20本の測定値は $6.2 \sim 24.7$ ($\text{mean} \pm \text{SD} = 14.0 \pm 4.4$) $\mu\text{g/ml}$, イヌ肝組織 ($n=20$ 個体) では $11.6 \sim 38.4$ ($\text{mean} \pm \text{SD} = 20.7 \pm 7.4$) $\mu\text{g/g}$ であった (図6, 7)。

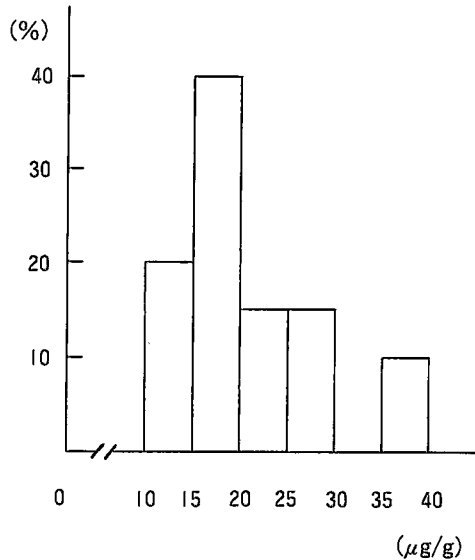


図7. イヌ肝組織中 α -Toc 濃度のヒストグラム

考 察

ビタミンEは動植物界に広く分布しているが、最近、動脈硬化巣での過酸化脂質の存在が明らかになってから、脂溶性であるビタミンEの抗酸化作用についてにわかに関心が集まるようになった。動脈硬化、老化、糖尿病のみならず生体膜安定化作用を有することなどから、神経・筋疾患、酸化的溶血との関連においても重要な役割をなすことが考えられ、研究が進められているところである^{17,18)}。ビタミンEをHPLC法で分析する場合、同族体の分離を考慮して、カラムには順相系を、検出法にはクロマン環のもつ蛍光を利用する蛍光法か、あるいは290~295nmでの吸収を利用するUV法が用いられている¹⁵⁾。このとき用いる蛍光波長、励起波長、または吸収波長は、カラムの種類によって選定される溶出液(移動相)によって若干変化があること、 α , β , γ などトコフェロールの同族体に固有の波長があること、また、検出器の機差から

生ずる最大吸収または最大励起波長の読みのずれ, などから報告者間に若干の差がみられ, それぞれ, 目的に適した条件を個々に選択することになる。今回は, ビタミンEの主体をなし, 生物活性が最も高い α -Tocを定量する目的から, カラムは逆相系の分離モードを有するODSを使用し(この場合には立体異性体である β と γ の分離は困難となる), 移動相にはメチルアルコール:水=96:4を用い, また検出法は, 励起波長286nm, 蛍光波長325nmの蛍光法を用いて実験を行った。その結果, 再現性は, 血清の場合, SD $0.36\mu\text{g}/\text{ml}$, mean $15.1\mu\text{g}/\text{ml}$, CV 2.4%($n=15$), 肝組織の場合, SD $1.20\mu\text{g}/\text{g}$, mean $23.9\mu\text{g}/\text{g}$, CV 5.0%($n=10$), α -Toc濃度は, ヒト血清中は $6.2 \sim 24.7$ (mean \pm SD= 14.0 ± 4.42) $\mu\text{g}/\text{ml}$, イヌ肝組織中は $11.6 \sim 38.4$ (mean \pm SD= 20.7 ± 7.41) $\mu\text{g}/\text{g}$ が得られた。

なお291nmによるUV法の実験では内部標準物質に用いたPMCと, 試料中の夾雑物のピークが重なったため定量は不可能であった。

一般に, 測定法の選択に当たっては, 対象や目的に応じて測定誤差の許容限界を設定した上で, 行うのが通例である。今回我々が, 血清および肝組織中 α -Tocの測定に当たって, 血清および肝組織とも測定再現性(σ_e)が α -Tocの真の生理的変動幅(σ_p)の1/4以下であることに許容限界を置いて, 方法の選択を開始した。結果は上述のように, 血清の見かけの変動幅(σ_a) $4.42\mu\text{g}/\text{ml}$ に対する測定再現性(σ_e)が $0.36\mu\text{g}/\text{ml}$, 肝組織の見かけの変動幅(σ_a) $7.41\mu\text{g}/\text{g}$ に対する測定再現性(σ_e)が $1.20\mu\text{g}/\text{g}$ で, これらから真の変動幅(σ_p)をそれぞれ推定すると, 血清の場合は $\sigma_p = \sqrt{4.42^2 - 0.36^2} = 4.40$, 組織の

場合は $\sigma_p = \sqrt{7.41^2 - 1.20^2} = 7.31$ となり, いずれの場合も $\sigma_e/\sigma_p < 1/4$ となり, 測定精度の上では十分に目標をクリアしている。したがって, 今回我々が選択した測定法は, 臨床的にも十分に有用性のある測定値が得られるものと判断するに至った。

また, すでに報告されている α -Toc濃度としては, ヒト血漿中 $5.2 \sim 12.5^{17}$, 12.5^{19} , 8.0^{14} , $7.69 \pm 0.66\mu\text{g}/\text{ml}^{20}$, 肝組織では総トコフェロールとしてヒト $6.6\mu\text{g}/\text{g}^{19}$, シロネズミ $25.2\mu\text{g}/\text{g}^{19}$ などがある。今回は例数が少なく, また血清中のビタミンE濃度は脂質濃度に比例するといわれている²¹⁾ことから, 脂質代謝との関連も含めて, さらに検討を加えることが必要であるが, 分析方法の検討という当初の目的は達せられたものと思われた。

ま と め

HPLC法による α -Toc(ビタミンE)の定量に関する検討を行った。内部標準法を用い, n -ヘキサン:エタノール(4:1 v/v)による抽出と窒素ガス下での乾固を行い, HPLC分析には, カラムはODS系, 溶離液はメチルアルコール:水の96:4混液, 検出は励起波長286nm, 蛍光波長325nmの蛍光分析を用いた。この方法は, 血清および組織の α -Tocの定量に要求される精密度を十分に満たす分析法であると認められた。

文 献

- 1) Evans, H. M., et al: Science, 56: 650-651, 1922.
- 2) 美濃 真, 他: ビタミンE同族体生物活性の比較検討. ビタミン, 62: 241-246, 1988.
- 3) 木畑正義, 他: 活性酸素とスカベンジャー(1) ビタミンE. 治療学, 19: 713-716, 1987.

- 4) 浦野四郎：ビタミンEの生体膜安定化作用。ビタミン, 63:75-85, 1989.
- 5) 山本順寛：ユビキノールとビタミンEの相乗的抗酸化作用。ビタミン, 65:678, 1990.
- 6) 安藤昭和：クロムによるDNA障害に対するビタミンEの効果。ビタミン, 62:197, 1988.
- 7) 池田律子：各種疾患における血漿ビタミンEと血清セレン濃度の変動。ビタミン, 63:215, 1989.
- 8) 池田郁男：ビタミンEと脂質代謝。ビタミン, 57:119-132, 1983.
- 9) Shitara, H., et al: J. Nutr. Sci. Vitaminol., 22:101-104, 1976.
- 10) 梅田文夫, 他：ビタミンEと糖尿病—とくに血小板および血管壁プロスタグランジン代謝異常—。ビタミン, 60:561-566, 1986.
- 11) 八木典子：ビタミンEが脳の老化に及ぼす影響について。ビタミン, 66:261, 1992.
- 12) 浦野四郎：神経末端への酸素毒性とビタミンE。ビタミン, 66:259, 1992.
- 13) Abe, K., et al: Quantitative Determination of Tocopherols by High-speed Liquid Chromatography. J.Nutr.Sci.Vitaminol., 2:1:21, 183-188, 1975.
- 14) Lehmann, J., et al: Improved Direct Determination of Alpha-and Gamma-Tocopherols in Plasma and Platelets by Liquid Chromatography, with Fluorescence Detection. Clin. Chem., 28:1784-1787, 1982.
- 15) 阿部皓一： α -トコフェロール。現代医療, 23:195-198, 1991.
- 16) 日本ビタミン学会編：ビタミン学実験法 I, 194-258, 東京化学同人, 東京, 1983.
- 17) 二木鋭雄：ビタミンEの研究の現況と将来。ビタミン, 63:590, 1989.
- 18) 美濃 真：ビタミンEの臨床的展望。ビタミン, 64:120-122, 1990.
- 19) 日本生化学会編：生化学データブック I, 1294-1301, 東京化学同人, 東京, 1979.
- 20) 石橋恭子, 他：高速液体クロマトグラフィーによる赤血球中のトコフェロール同族体の定量。ビタミン, 51:415~422, 1977.
- 21) 湯川 進：酸化LDLとビタミンE。ビタミン, 64:40~41, 1990.

受付日：1992年9月30日

受理日：1992年11月20日