

## レチノールとトコフェロール同族体の同時測定について

里村由紀子・木村美恵子・糸川嘉則  
(京都大学医学部衛生学教室\*)

### Simultaneous Determination of Retinol and Tocopherols by HPLC

Yukiko SATOMURA, Mieko KIMURA, Yoshinori ITOKAWA  
*Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University*

Simultaneous determination of retinol,  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -toc),  $\beta$ -tocopherol ( $\beta$ -toc),  $\gamma$ -tocopherol ( $\gamma$ -toc), and  $\delta$ -tocopherol ( $\delta$ -toc) was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). It had been difficult to separate  $\beta$ -toc and  $\gamma$ -toc completely when retinol and tocopherols were determined simultaneously by HPLC. A new reversed-phase column made it possible to separate  $\beta$ -toc and  $\gamma$ -toc completely with determination of retinol. The HPLC conditions were as follows, column: YMC-PACK A-302 S-5 120A ODS ( $\phi$  4.6mm $\times$ 150mm), mobile phase: 70% isopropanol, sample solvent: 99.5% methanol, detector: UV (290nm), flow rate: 0.5ml/min, temperature: ambient, and column pressure: 120Kg/cm<sup>2</sup>. This method maybe useful to clarify the relationship between retinol and tocopherols.

トコフェロールがレチノールの生体内動態に影響を及ぼしていることは、よく知られている<sup>1,2)</sup>。トコフェロールとレチノールを同時に測定することは、両者の関係を明らかにするうえで重要であると考えられる。一方、トコフェロール同族体である $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -トコフェロールは、その生物活性が異なる上<sup>3)</sup>、体内挙動も異なるという報告<sup>4)</sup>もみられる。従って、レチノールの生体内動態に及ぼす影響も、トコフェロール同族体によって異なることが考えられる。現在までに、数種類の HPLC によるレチノールとトコフェロール同族体の同時測定法が報告されている<sup>5-7)</sup>。しかし、レチノールと同時にトコフェロールを測定する方法では、トコフェロール同族体のうち $\beta$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールを完全に分離、測定することは、困難とされてきた。

新しい逆相カラムを用いて、レチノールと同時に $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -、 $\delta$ -の4つのトコフェロール同族体を完全に分離、測定する方法について検討した結果を報告する。

---

\*所在地：京都市左京区吉田近衛町（〒606）

## 実 験 方 法

カラムは、YMC-PACK A-302 S-5 120A ODS を用いた。ポンプは島津 LC-3A, サンプルインジェクターは島津 LC-1, 検出器は島津紫外分光光度計検出器 SPD-2A, レコーダー及びコンピューターとしては島津クロマトパック C-R6A を使用した。

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -トコフェロールはエーザイ株式会社のビタミン E 同族体セット 生化学・分析用を, レチノールは Fluka Chemical 製のビタミン A アルコールを用いた。他の試薬は半井テスクの HPLC 用のものを用いた。

レチノール及びトコフェロール同族体の混合標準液100  $\mu$ l を室温下でカラムに注入し, 紫外分光光度計検出器を用いて290nm で検出した。

はじめに, 試料溶媒は99.5%メタノールとし, 移動相の組成のみをエタノール, メタノール, イソプロパノールに変化させてレチノール及び各トコフェロール同族体の分離を試みた。

さらに試料溶媒をメタノールから, エタノール, イソプロパノールに変えて, 検討を加えた。

## 結 果 及 び 考 察

### 1) 移動相について

メタノールでは移動相中のメタノール含有量を変化させても,  $\beta$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールを独立した2個のピークとして分離することはできなかった。

Fig. 1 は, 95%エタノールを移動相とした時に得られたクロマトグラムである。95%エタノールでは $\beta$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールを分離することはできなかった。移動相のエタノール含有量を減量して分析を行った結果, 86%以下のエタノール濃度では不完全ながら,  $\beta$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールを2個のピークとして分離できることが判明した。80%エタノールを移動相とした時のクロマトグラムをFig. 2 に示す。 $\beta$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールの保持時間の差は2.7分であるが, 各ピークの幅が広く, 分離は不十分であった。

移動相をイソプロパノールに変えて濃度を変化させた。その結果, 70%イソプロパノールを移動相として用いた時に, レチノールと $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -トコフェロールを各々独立したピークとして分離することが可能となった (Fig. 3)。保持時間は, レチノール13.6分,  $\alpha$ -トコフェロール49.8分,  $\beta$ -トコフェロール43.7分,  $\gamma$ -トコフェロール41.6分,  $\delta$ -トコフェロール35.0分であった。

### 2) 試料溶媒について

移動相: 70%イソプロパノールの条件下では, エタノール及びイソプロパノールを試料溶媒とした時は, メタノールを試料溶媒とした時と比較して,  $\beta$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールの分離が不十分であった。

### 3) 標準曲線について (Fig. 4)

レチノール, 各トコフェロール同族体ともに, 各々0.1  $\mu$ g から2.0  $\mu$ g の範囲で, 試料濃度とピーク面積の間に直線関係が認められた。

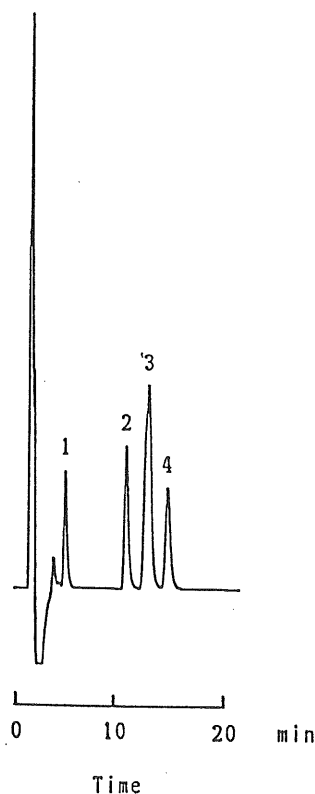
**Fig. 1.** Chromatogram of retinol and tocopherols.

(95% ethanol as mobile phase)

Peaks: 1=retinol( $0.1\mu\text{g}$ ) 2= $\delta$ -tocopherol( $1\mu\text{g}$ )  
 3= $\beta$ -tocopherol( $1\mu\text{g}$ ) +  $\gamma$ -tocopherol( $1\mu\text{g}$ )  
 4= $\alpha$ -tocopherol( $1\mu\text{g}$ )

Conditons:

column; YMC-PACK A-302 S-5 120A ODS  
 ( $\phi$  4.6mm $\times$ 150mm) mobile phase; 95% ethanol,  
 sample solvent; 99.5% methanol, sample size;  
 $100\mu\text{l}$ , flow rate; 0.7ml/min, detector; spec-  
 trophotometric detector (290nm), temperature;  
 ambient.

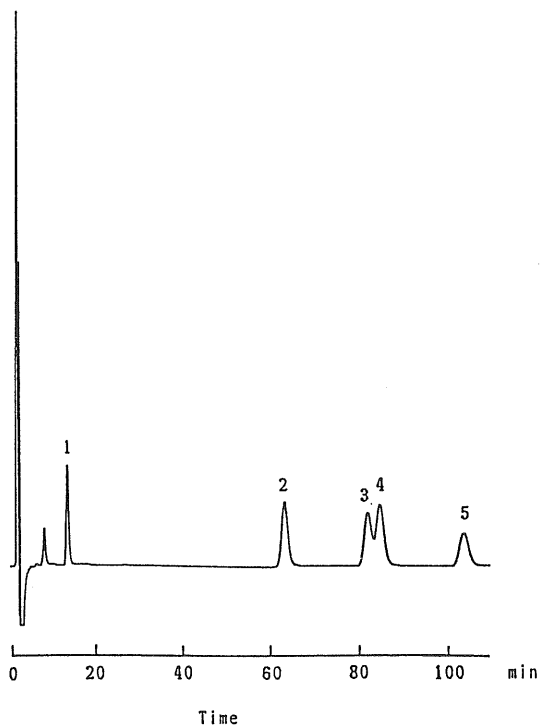
**Fig. 2.** Chromatogram of retinol and tocopherols.

(80% ethanol as mobile phase)

Peaks: 1=retinol ( $0.1\mu\text{g}$ ) 2= $\delta$ -tocopherol( $1\mu\text{g}$ )  
 3= $\gamma$ -tocopherol( $1\mu\text{g}$ ) 4= $\beta$ -tocopherol( $1\mu\text{g}$ )  
 5= $\alpha$ -tocopherol( $1\mu\text{g}$ )

Conditons:

column; YMC-PACK A-302 S-5 120A ODS  
 ( $\phi$  4.6mm $\times$ 150mm) mobile phase; 80% ethanol,  
 sample solvent; 99.5% methanol, sample size;  
 $100\mu\text{l}$ , flow rate; 0.7ml/min, detector; spec-  
 trophotometric detector (290nm), temperature;  
 ambient.



**Fig. 3.** Chromatogram of retinol and tocopherols.

(70% isopropanol as mobile phase)

Peaks: 1=retinol(0.1  $\mu$ g) 2= $\delta$ -tocopherol(1  $\mu$ g)3= $\gamma$ -tocopherol(1  $\mu$ g) 4= $\beta$ -tocopherol(1  $\mu$ g)5= $\alpha$ -tocopherol(1  $\mu$ g)

Conditons:

column; YMC-PACK A-302 S-5 120A ODS

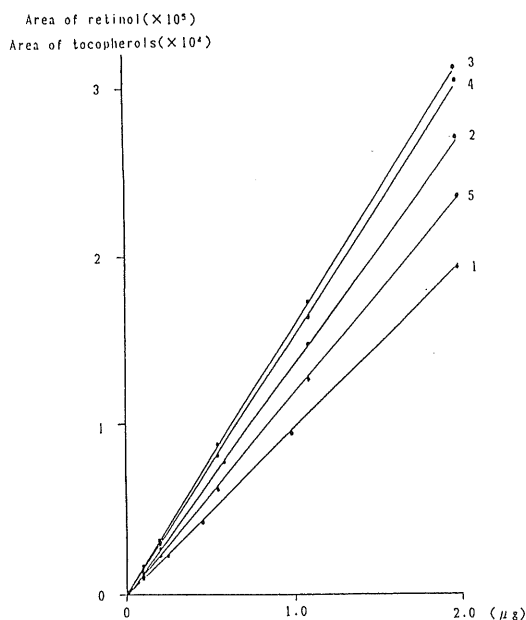
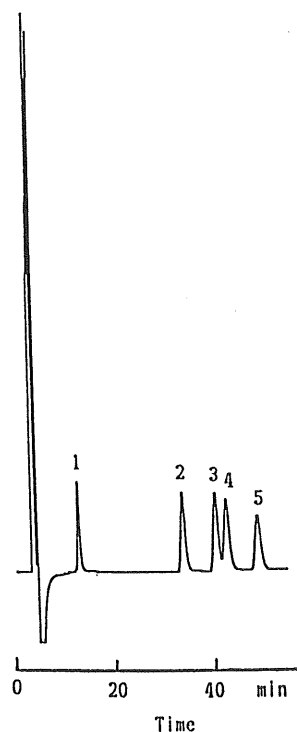
(  $\phi$  4.6mm  $\times$  150mm) mobile phase; 70% ethanol,

sample solvent; 99.5% methanol, sample size; 100

 $\mu$ l, flow rate; 0.5ml/min, detector;

spectrophotometric detector(290nm), temperature;

ambient.

**Fig. 4.** Calibration graph obtained for retinol and tocopherols.1=retinol, 2= $\delta$ -tocopherol, 3= $\gamma$ -tocopherol, 4= $\beta$ -tocopherol, 5= $\alpha$ -tocopherol. Conditions:column; YMC-PACK A-302 S-5 120A ODS(  $\phi$  4.6mm  $\times$  150mm) mobile phase; 70% isopropanol,sample solvent; 99.5% methanol, sample size; 100  $\mu$ l, flow rate; 0.5ml/min, detector; spec-

trophotometric detector(290nm), temperature; ambient.

4) 検出感度について

検出感度は、レチノール0.2ng,  $\alpha$ -トコフェロール20ng,  $\beta$ -トコフェロール15ng,  $\gamma$ -トコフェロール15ng,  $\delta$ -トコフェロール10ngであった。

この測定法は、今後レチノールとトコフェロール同族体の相互関係を検討する上で、有用であると考えられる。生体試料の分析条件について、さらに検討中である。

文 献

- 1) AMES, S. P. (1969) Am. J. Clin. Nutr. 22: 934
- 2) NAPOLI, J. L., A. M. MC CORMICK, B. O'MEARA and E. A. DRATZ (1984) Arch. Biochem. Biophys. 230: 194
- 3) 美濃真, 玉井浩, 安田和人, 山田智恵子, 五十嵐脩, 林真粧美, 平原文子, 勝井五一郎, 貴島静正 (1988) ビタミン 62: 241
- 4) 平原文子, 木村修一 (1990) ビタミン 64: 251
- 5) RUSSELL, M. J., B. S. THOMAS and E. Wellock (1986) J. High Resolution Chromatogr. Chromatogr. Commun. 9: 281
- 6) DRISKELL, W. J., J. W. NEESE, C. C. BRYANT and M. M. BASHOR (1982) J. Chromatogr. 231: 439
- 7) HATAM, L. J. and H. J. KAYDEN (1979) J. Lip. Res. 20: 639