研究ノート

トコフェロールの TLC-Densitometry 法による定量

巽さち江, 泉谷希光, 稲垣長典
共立女子大学栄養学研究室

Determination of Tocopherols by TLC-Densitometry

Sachie TATSUMI, Maremitsu IZUMITANI,
Choten INAGAKI

*Laboratory of Nutrition, Kyoritsu Women's
University, Chiyoda-ku, Tokyo*

Quantitative analysis of the tocopherols by
direct TLC-densitometry were studied.

This method composed of coloration of toco-
pherol with bathophenanthroline and measure-
ment of the optical density at 535 nm on the
TLC-plate.

From the calibration curves 0~2 μ g of toco-
pherols were determinative.

This methods would be applicable in non-
equipped laboratory with HPLC.

(Received March 23, 1981)

トコフェロールの定量分析法を TLC と直接デンスト
メトリーによって検討した。

この方法は Bathophenanthroline でトコフェロールを
検出し, TLC プレート上 535 nm で光学密度を測定す
るものである。

その結果ノーマルな検量線が得られ, トコフェロール
0~2 μ g の範囲で測定することができた。

この分析方法とサンプリングは簡単であり迅速であ
る。

食生活の変化にともない, リノール酸, リノレン酸な
どの不飽和脂肪酸を多量に含有する油脂の摂取量が増加
した。このような変化に対応してトコフェロール (以下
Toc.) の摂取量が問題とされており, 種々の食品中に含
まれる Toc. 同族体について定性・定量的に検討されて
いる。

著者らは植物種子脂質の酸化防止機構に Toc. が関与
しているものとして検討をすすめているが, その過程で

Toc. の含有量を相対的なレベルで定量する必要性が生
じたので, この目的に沿った Toc. の定量法について検
討することとした。

食品中の Toc. の定量法についてはすでに脂溶性ビタ
ミン研究委員会の E 小委員会において, 比色法をはじめ
蛍光法, TLC-GLC 法, HPLC 法などの定量法が十分
に検討され¹⁾, 現在では HPLC 法が最も簡便で精度の高
い値が得られる方法として用いられている。

しかし HPLC の設備を持たない場合は, HPLC の結
果により近い値が得られ, しかもできるだけ操作が簡単
で短時間に定量の可能な方法が必要と考え, 比色法を応
用した TLC-Densitometry 法について検討した。

これは TLC により Toc. 同族体を分離し, 発色剤を
ふん霧後可視部で Densitometry を行なう方法である。
1978 年山内²⁾らによって発色剤を用いず, そのまま紫外
部で Densitometry を行なう方法が報告されているが,
この方法によると検出限界濃度は 0~20 μ g である。著
者等の可視部検出方法では 0~2 μ g の範囲でより高感度
に定量が可能であり, 相対値検討の定量法として適当で
あることを確認したので報告する。

実験方法

1. 試料の調製

植物種子類は 30~60 メッシュに粉砕し, 粉末試料は
そのまま, クロロホルム:メタノール (2:1, V/V) の
混合液 5 倍量を加え, 10°C, 24 時間攪拌抽出し, 得られ
た粗脂質を一定量に希釈して用いた。

2. TLC

TLC の条件を Fig. 1 に示した。プレートはメルク社
製シリカゲル, 0.25 mm, 20×20 cm, を用いた。展開
溶媒は α , γ , δ -Toc. の分離にベンゼン:メタノール
(98:2)³⁾ を, また β -Toc. の分離には石油ベンジン:
とイソプロピルエーテル:ベンゼン:アセトン:エーテ
ル:酢酸 (85:12:10:14:1:1)³⁾ を用いた。発色剤と
して Bathophenanthroline を用い⁴⁾, 呈色したキレート
が酢酸溶液中でより安定であることから, 0.5% Batho-
phenanthroline-酢酸溶液と, 0.2% 塩化第二鉄-酢酸溶
液を使用時に同量混和して用いた。Toc. の標準溶液 (エ
ーザイ株式会社) は 25 mg% ベンゼン溶液とした。プ
レート上にまず標準溶液 1, 2, 3, ..., 8 μ l をスポットし,
試料はこの範囲に入るよう一定量に希釈して適当量をス
ポットした。検量線と同時に試料も同一プレートで展開
分離させ, 展開後溶媒を蒸散し, 発色剤をむらのないよ
うに十分ふん霧する。展開溶媒を揮散させたプレートに
ついて, Densitometry を行なう。

3. Densitometry

Densitometry の条件は Fig. 2 に示したように, 島

Plate

Silica gel plate (Merck Co., Ltd.)

0.25 mm, 20×20 cm

Activation: 110°C, 30~60 min

Solvent

Benzene : Methanol (98 : 2)

Detection

A : 0.5% Bathophenanthroline-acetic acid

B : 0.2% Ferric-chloride-acetic acid

(ie., equal quantity for A and B)

Standardd- α , β , γ , δ -Toc. (Eisai Co., Ltd.)—

—25 mg% in benzene

Fig. 1. Analytical conditions of tocopherols on thin-layer chromatography.

Scanner

Simazu Dual-Wavelength TLC scanner, CS-900

Linearizer LIN-53

Background correction unit BCU-1

Wavelength λ_R : 700 nm (Reference) λ_S : 535 nm (Sample)

Slit : 1.25×1.25 mm

Mode : Reflection zig-zag scanning method

Fig. 2. Analytical conditions of tocopherols on densitometry.

津製作所製 2 波長クロマトスキャナ CS-900 に、リニアライザー LIN-53、バックグラウンド補正装置 BCU-1 を使用した。波長はリファレンス側 700 nm、サンプル側 535 nm、スリット幅 1.25×1.25 mm、反射、ジグザグスキャンニングで測定を行ない、得られた測定値を積分値で示した。

実験結果および考察

得られた積分値から作成した検量線は Fig. 3 に示したとおりである。Toc. 0~2 μ g の間で直線を示し、この範囲で測定が可能であり、紫外部で Densitometry を行なった山内らの結果²⁾ より高感度に定量できることが明らかとなった。

標準試料では問題はないが、食品から抽出した粗脂質を TLC プレートにスポットする場合、試料の濃度に限界があり、薄く稀釈しスポットを連続して量を多く塗布する。また TLC 展開後、溶媒を蒸散させ発色剤をふん霧するまでの時間と、発色剤ふん霧後酢酸を揮散させ Densitometry を行なうまでの時間を一定にすることが

Fig. 3. Standard calibration curves of tocopherols.

▲ α -Toc., ■ β -Toc., × γ -Toc., ● δ -Toc..

必要である。

本法では従来の比色法のように TLC で同族体を分離し、かき取り、再抽出する操作がはぶけると同時に、検量線に見られるごとく測定値にバラツキが少ない結果が得られた。

次に本法で回収率試験を試みたところ Table 1 に示す値を得た。またこの方法の信頼性を確認するため、数種の食品について本法と、HPLC 法で定量した結果を Table 2 に示す。

両結果を比較してみると HPLC 法の結果に対し、本法の結果は全体として 10~20% 低い値を示している。しかし α , β , γ , δ -Toc. 間の比率がバラレルであり、相対値として利用することが可能であることを認めた。したがって本法は HPLC 法に比べ、精度に多少問題はあるが、簡便法としてかなり有効と考えられる。

要 約

TLC-Densitometry による Toc. の定量法を検討した結果を要約すると次のとおりである。

- 1) 操作が簡単で比較的短時間に定量が可能である。
- 2) 0~2 μ g の範囲で検量線が得られ、この範囲における相対値の定量が可能である。
- 3) 脂質含有量が比較的少なく、それに対し Toc. の含有量が多い食品についての定量が可能である。

本研究に当たり、標準品を提供していただきましたエーザイ株式会社阿部皓一氏に深く感謝いたします。

Table 1. Recovery of tocopherols.

	Sample (μg)	Added tocopherol (μg)	Observed (μg)	Recovery (%)
α -Toc.	0.52	0.95	1.45	98.64 $\pm$ 2.45*
γ -Toc.	0.46	0.80	1.19	94.44 $\pm$ 2.44
δ -Toc.	0.54	0.98	1.33	87.50 $\pm$ 4.15

* Means $\pm$ S.D.

Table 2. Tocopherol contents in food.

		($\mu\text{g/g}$)			
	Method*	α -Toc.	β -Toc.	γ -Toc.	δ -Toc.
Wheat germ	I	1849	629	n. d.	—
	II	2240	740	—	—
Cotton seed	I	262	—	214	—
	II	302	—	260	—
Soy bean	I	n. d.	—	553	376
	II	54	83	664	391

* Method I : TLC-densitometry, Method II : HPLC.

Values are the means of 3 or 4 n .

以上の要旨は第176回脂溶性ビタミン総合研究委員会
(1978年12月)において報告した。

文 献

- 1) 脂溶性ビタミン総合研究委員会・ビタミンE小委員会：ビタミン，51，373 (1977)

- 2) 山内 亮，松下雪郎：農化，52，51 (1978)
- 3) 阿部皓一，湧口泰昌，勝井五一郎：栄養と食糧，27，329 (1974)
- 4) 島園順雄，勝井五一郎(編)：ビタミンE，42 (1973)，朝倉書店(東京)

(昭和56年3月23日受理)