

18 食品のコレステロール及び燐脂質含有量について (第1報)

食品のコレステロール定量方法の検討

18 Studies on the Contents of Cholesterol and Phosphatides of foods.

I Studies of determination Methods for Cholesterol in Foodmaterials.

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技 師 川 端 純 一

I 緒 言

近年高血圧症と関連して、血中コレステロール値の問題が関心を集めているが、血中コレステロール値は摂取食品の脂質組成と関係の深いことが報告されている。

従つて日常摂取する食品の脂質組成を明らかにすることが必要であるが、現在食品に含まれている脂質は、普通粗脂肪含量としてエーテル抽出物が測定されており、これを中性脂肪、燐脂質、糖脂質、コレステロール等に分類して多数の食品について測定した報告は見られない。

著者は広く日常摂取する食品について、いわゆる粗脂肪とともに、遊離型コレステロール、総コレステロール、燐脂質の含有量を測定し、食品成分の研究に資せんとした。

またこれ等諸成分の測定に当り、特に食品の総コレステロールの定量は、従来用いられている方法では満足すべき結果の得られないことがしばしば見られた。

すなわちコレステロールをヂギトニンをを用いて分離する場合は、エステル型のコレステロールを加水分解して行うのであるが、この操作によりコレステロールとヂギトニンの結合が不完全となり定量値の低くなるが見られる。

またヂギトニンをを用いないで直接比色を行う方法についても報告があるが、この場合はエステル型の値が高く出ること(安田¹⁾の報告に述べられている如くで用いることが出来ない。

試料を鹼化した後抽出液について直接比色を行う方法はコレステロールの初期の研究²⁾に見られるが、鹼化の条件、抽出液の選択等に不十分な点があるため正確な定量に適さない。

著者は総コレステロール定量法について検討を加え、極めて簡易正確な鹼化抽出直接比色法を確立したので、あわせてこれを報告する。

II 定 量 法

鹼化抽出直接比色法

原 理

食品にアルカリ性アルコール液を加えて加熱鹼化を行い、エステル型コレステロールを加水分解する。分解物に

石油ベンジンを加えて抽出を行い、コレステロール及び不飽和化物を完全に石油ベンジン層に移す。石油ベンジンの一定量を取り、石油ベンジンを溜去した後クロロホルムにコレステロールを溶かし、Liebermann-Burchard 反応により比色定量する。

試 薬

95%エチルアルコール—再蒸溜、精製
クロロホルム—再蒸溜、精製
石油ベンジン—再蒸溜、精製 (bp.60-80°)
50%苛性カリ液
濃硫酸—特級
無水醋酸—特級
コレステロール基準液
貯蔵液 (100mg% クロロホルム液)
実施液 (10mg% クロロホルム液)

操 作

(1) 試料採取

魚の場合は頭部、尾部、内臓、骨を除いた可食全部を合せてホモナイザーにより磨砕する。

磨砕した試料 5g 前後を鹼化フラスコに採り精秤する。

(2) 鹼 化

試料を秤取した鹼化フラスコに、エタノール 25ml、50%苛性カリ液 3ml を加え、還流冷却器をつけて湯浴上で 30 分間鹼化する。

(3) 抽 出

鹼化後フラスコを流水で冷し、水約 15ml を加えた後、内容物を分液ロートに移し、鹼化フラスコを石油ベンジン 20ml で洗い、洗液は分液漏斗に移す。常法による石油ベンジンの抽出を行い、一定容とする。

(4) 溶剤の溜去

石油ベンジン抽出液より一定容をエルレンマイヤーフラスコに採り、湯浴上で石油ベンジンを溜去する。

(5) クロロホルムによる溶解

石油ベンジンを溜去した残渣にクロロホルム 5ml を加え溶解する。

(6) 比 色

エルレンマイヤーフラスコに氷冷した無水醋酸 4 部をと

り、之に氷冷した硫酸1部を氷水で冷しながら加え、よく混合して反応試薬を作つておく。

クロロホルムに溶解した試料に2ml づつ反応試薬を加えて Liebermann-Burchard の反応を行わせる。

他に盲検としてクロロホルム 5ml に試薬 2ml を加えたもの及びコレステロール基準液 (0.1mg/ml) 5ml に試薬 2ml を加えたものを用意する。

試薬添加後室温に15分間保ち、発色させた後キュベットに採り、光電管比色計で 610m μ の波長における吸光度を測定する。

Ⅲ 鹼化抽出直接比色法についての検討

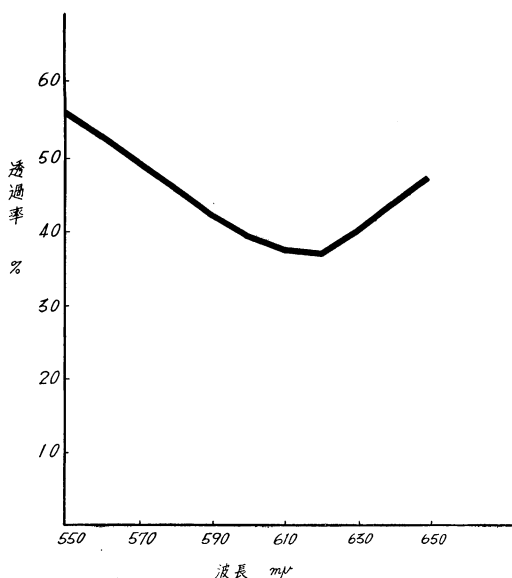
A Liebermann-Burchard 反応の検討

(1) Liebermann-Burchard 反応の透過率波長曲線の作製

Liebermann-Burchard 反応における極少透過率の波長を求めため次の実験を行つた。

コレステロール基準液 (0.1mg/ml) 5ml に試薬 2ml を加え、室温に15分間放置後その呈色をベックマン DU 型島津分光光度計を用いてその透過率波長曲線を測定した。実験結果は第1図の如くであり、620m μ に極小透過率が認められた。

第1図 透過率波長曲線



(2) 光電管比色計のフィルターを選定

実験には光電管比色計 (A. K. A. 光電管比色計) を使用したので此のフィルターを 620m μ に近いものについて次の如く選定した。

コレステロール基準液 (0.1mg/ml) をそれぞれ 1, 2, 3, 4, 5ml を採り、クロロホルムを加えて全容 5ml とする。

反応試薬 2ml を加え、室温に15分間放置後その呈色を

光電管比色計で異なつた番号の、フィルターを用い吸光度を測定した。

実験結果は第1表の如くであり、No. 8 610m μ のフィルターを用いた場合に最も高い吸光度が得られたので以後の実験においてはこれを用いることとした。

第1表 フィルター波長と吸光度

フィルター No.	フィルター波長 (m μ)	コレステロール含量				
		0.1mg	0.2mg	0.3mg	0.4mg	0.5mg
7	570	0.055	0.110	0.170	0.225	0.280
8	610	0.065	0.130	0.200	0.270	0.335
9	630	0.050	0.105	0.155	0.195	0.250
10	660	0.025	0.045	0.070	0.090	0.115

(3) Liebermann-Burchard 反応の呈色最大に達する時間と温度の関係

Liebermann-Burchard 反応の呈色最大に達する時間及びその継続時間と温度の関係を確めるため、コレステロール基準液 (0.1mg/ml) 5ml に反応試薬 2ml を加え、夫々を 10°C, 20°C の恒温に保ち、その吸光度を時間を置いて測定した。実験結果は第2表の如くである。

第2表 時間と吸光度

時間 (分)	吸光度	
	20°C	10°C
7	0.300	0.310
15	0.350	0.350
20	0.350	0.355
25	0.345	0.355
30	0.345	0.350
35	0.340	0.350
40	0.330	0.350
45	0.320	0.345
50	0.315	0.335
60	0.280	0.315

以上の実験結果より以後の実験は、反応温度は室温 (18~20°C) で15分間放置後測定する事とした。

B 純粋コレステロールエステルによる鹼化抽出直接比色法の検討

純粋のコレステロールエステルとして Cholesteryl Palmitate を用い、本定量法の検討を行つた。

(1) Cholesteryl Palmitate 液の作製

精製コレステロール及び精製パルミチン酸より Page³⁾等の方法により Cholesteryl Palmitate を作り、精製後その純結晶 (mp. 76°) 38.2mg をクロロホルムに溶解し 100ml とし供試液とした。

此の液 1ml 中には $0.382 \times 0.61868 = 0.2363\text{mg}$ の

コレステロールを含有する。

(2) 総コレステロールの定量

供試液 10ml を鹼化フラスコにとり、クロロホルムを溜去した後、エタノール 25ml に溶解する。

50% KOH 液 3ml を加えて 30 分間鹼化し、石油ベンジンで抽出を行い、50ml とする。此の中より 10ml をとり、石油ベンジンを溜去した後クロロホルム 5ml に溶かし、反応試薬 2ml を加えて Liebermann-Burchard の反応を行い、吸光度を測定した。

4 回の実験の平均値は次の如くであった。

供試液量	$10\text{ml} \times \frac{10}{50} = 2\text{ml}$
吸光度	0.305
コレステロール測定値	0.4692mg
理論値	0.4726mg
再現率	99.28%

測定値は理論値に対して 99.3% の再現率であった。

なお供試液 2ml を鹼化を行わずに反応試薬 2ml を加え、呈色反応を行わせてその吸光度を測定した場合は次の如くであり、従来の報告と同様エステル型は約 30% 高い測定値が得られた。

供試量	2ml
吸光度	0.400
コレステロール測定値	0.6153mg
理論値	0.4726mg
再現率	130.1%

C 添加試験

実際の試料を用いた場合に、鹼化抽出の過程におけるコレステロール損失の有無を調べるために次の添加試験を行った。

供試料としヤナギノマイを用い次の如く行つた。

(1) 無添加

試料 10g を鹼化フラスコにとり、エタノール 40ml、50% KOH 5ml を加え、還流冷却器をつけて湯浴上 30 分間の鹼化を行い、石油ベンジンで抽出して 100ml とす。

(2) 5ml コレステロール添加

試料 10g にコレステロール基準液 (1mg/ml) 5ml を添加して同様に鹼化を行い、石油ベンジンで抽出して 100ml とする。

(3) 10ml コレステロール添加

コレステロール基準液 10ml を添加し、同様に鹼化抽出して 100ml とする。

各抽出液より 2ml を採取し、石油ベンジンを溜去した後残渣にクロロホルム 5ml を加えて溶解し、試薬 2ml を加えて定量した。実験結果は第 3 表の如くで、回収率は 100% に近く、鹼化及び石油ベンジン抽出の過程におけるコレステロールの損失は認められなかつた。

第 3 表 添加実験

	吸光度		試料中のコレステロール (mg)	回収コレステロール量 (mg)	回収率 (%)
		平均			
無添加	0.075 0.080 0.085 0.085	0.081	6.73		
5gm 添加	0.130 0.140 0.135 0.135	0.135	11.67	4.94	98.8
10mg 添加	0.205 0.205 0.200 0.205	0.204	17.00	10.27	102.7

D 魚類による鹼化抽出直接比色法とチギトニン比色法の比較

鹼化抽出直接比色法による総コレステロールの定量は、純粋コレステロール・エステルの場合及び添加実験において満足すべき結果が得られたのであるが、実際の試料を用いた場合にも適用出来るかどうかを知るために次の実験を行つた。

供試料

ハタハタ、シシヤモ、キウリ、アブラコの可食部を磨碎し、各々 5g を秤取して供試料とした。

定量法

(1) 鹼化抽出直接比色法

試料を鹼化後石油ベンジンで抽出し、抽出液 100ml より 10ml を採取して、石油ベンジンを溜去後クロロホルム 5ml に溶かし、Liebermann-Burchard の反応を行い、吸光度を測定する。

(2) 鹼化抽出チギトニン比色法

前記鹼化抽出液 100ml より 10ml を採り石油ベンジンを溜去した後エタノール・エーテル 3 : 1 混液に溶かし、チギトニンを加えてチギトニン比色法により定量する。

(3) チギトニン比色法

試料を始めにエタノール・エーテル 3 : 1 混液で加温抽出を行い、抽出液を 100ml とする。之より 10ml を採り、飽和 KOH 0.1ml を加えて湯浴上約 20 分間加熱して鹼化する。中和後チギトニン液を加えてチギトニドを分離し、チギトニン比色法により定量する。

実験結果は第 4 表の如くである。

試料を直接鹼化した後石油エーテルで抽出した液は、これに含まれるコレステロールをチギトニンを用いて分離比色した場合も、直接比色した場合も全く等しい値が得られ

第4表 魚類を用いた総コレステロール定量法の比較

試料名	実験回数	総コレステロール含量 (mg%)		
		鹼化抽出直接比色法	鹼化抽出チギトニン比色法	チギトニン比色法
ハタハタ	4	83.6	83.6	80.2
シシャモ	4	120.0	120.0	111.5
キウリ	4	109.1	109.1	95.7
アブラコ	4	60.0	60.0	56.7

た。

すなわち直接比色法に対してコレステロール以外の物質による妨害作用は認められなかつた。

また此の値は、エタノール・エーテル抽出液によるチギトニン比色法の測定値に比べ高い値が得られた。

E 鹼化抽出直接比色法に対するビタミンA, D, Eの影響

ビタミンA, D, Eは鹼化抽出直接比色法において、不鹼化物として石油ベンジンに移行し、コレステロールの Liebermann-Burchard 反応に影響を与える事が予想されるので次の実験を行った。

ビタミンA, D₂, Eそれぞれの純品をクロロホルム 5ml に溶かし、Liebermann-Burchard 反応試薬を加えてコレステロールの定量と同様の条件で呈色を行い、吸光度を測定した。

Liebermann-Burchard 反応試薬による呈色は次の如くであつた。

ビタミンA 青—靛色—黄褐—褐緑

ビタミンD 橙赤—黄—黄緑

ビタミンE 橙赤—褐—褐緑—黄緑

此の吸光度を測定した結果は第5表の如くである。

第5表 ビタミンA, D, Eに対する Liebermann-Burchard 試薬の反応

	含 (CHCl ₃ 5ml 中)	量	吸 光 度
A — 1	A	10 I.U.	0
A — 2	A	100	0.015
A — 3	A	1,000	0.200
D — 1	D	50 I.U.	0
D — 2	D	500	0.010
D — 3	D	5,000	0.180
E — 1	E	0.05 mg	0
E — 2	E	0.50	0.015
E — 3	E	5.00	0.280

魚類に含まれるこれ等のビタミンの含量は、100g 中 A 1,000I.U., D 5,000I.U., E 5mg 以下であり、従つて吸光度測定段階では夫々 A-1, D-1, E-1 以下の含量となるが、此の吸光度は第5表の如く0であり、コレステロールの比色定量に対する影響は全く考慮する必要はなく、此の

10倍含量が含まれる場合でもほとんど影響は考えられない。

F 抽出液が着色している場合の処置

鹼化後石油ベンジンで抽出した液は、ほとんどの場合無色透明であり、着色があつても極めてうすく、直接比色を行うのに差支えない。

しかし貝類などのように色素がアルカリで破壊されずに残る場合もあり、この時は直接比色を行うことが出来ない。

このような場合は珪藻土による吸着脱色を行うと無色の液が得られる。

この珪藻土処理を行った場合にコレステロールが珪藻土に吸着されるおそれがあるので次の実験を行った。

アサリ貝の石油ベンジン抽出液は黄色にやや強く着色したのでこれを用い、さらにアサリ磨砕試料にコレステロールを 5mg 及び 10mg 添加した試料の場合も検討した。

試料を鹼化後石油ベンジンで抽出した液はその一部を採り、10ml につき約 0.5g の珪藻土を加え、振盪攪拌した後濾過して無色の液を得た。

総コレステロールの定量

珪藻土処理を行った液と無処理の液について、その 2ml を用いチギトニン比色法及び直接比色法を行い、その吸光度を測定した。

実験成績は第6表の如くである。

第6表 珪藻土処理と総コレステロール定量値

試 料	処 理 法	吸 光 度	
		チギトニン法	直接比色法
アサリ 無添加	そのまま	0.081	
	珪藻土処理	0.081	0.082
アサリ 5mg添加	そのまま	0.135	
	珪藻土処理	0.135	0.140
アサリ 10mg添加	そのまま	0.204	
	珪藻土処理	0.205	0.205

チギトニン比色法で検討した結果、珪藻土処理によるコレステロールの損失は認められなかつた。

また珪藻土処理を行った液について直接比色法で測定した値はチギトニン法とはほぼ同値が得られた。

IV 総 括

1 食品の総コレステロール定量法として試料を始めに鹼化した後石油ベンジンで抽出を行い、抽出液を溜去してクロロホルムに溶かし、Liebermann-Burchard 反応による直接比色を行う方法について検討し、本定量法により総コレステロールを正確でしかも簡易に測定し得ることを明らかにした。

2 本定量法では不鹼化物としてビタミンA, D, Eがコレステロールと共に抽出され、呈色するおそれがあるので、

これ等のビタミンについて Liebermann-Burchard 反応の検討を行った結果、食品に含まれるこれ等ビタミンの含量では比色に影響を与えないことを確めた。

3 抽出後の石油ベンジンが着色している場合は硅藻土処理によつて無色となり、定量が容易となる。この際この操作によりコレステロールの損失のない事を確めた。

V 文 献

- 1) M. Yasuda : J. Biochem. (Japan), **24**, 433
- 2) W. Autenrieth, A. Funk : Münch. Med. Woch. **Ix**, 1243 (1913).
- 3) I. H. Page, H. Budy : Biochem. Z., **220**, 304 (1930)