食品のコレステロール及び磷脂質含量について(第1報)

Studies on the Contents of Cholesterol and Phosphatides of Foods (1)

食品中総コレステロールの簡易定量法

A Simplified Method for the Determination of Total Cholesterol in Foods

(昭和35年9月14日受理)

川 端 純 一
(Junichi Kawabata)

A simple, rapid, accurate method for the determination of total cholesterol in foods has been devised.

The method involves saponification of the food with alcoholic KOH, extraction of the free cholesterol with petroleum ether and measurement of the cholesterol by means of the Liebermann-Burchard color reaction.

The following experiments have been carried out for the investigation of the proposed method.

1. In the recovery test with cholesteryl-palmitate, the reproducibility was 99.3%.
2. In the addition test with fish samples, $100 \pm 3\%$ of cholesterol was recovered.
3. The proposed method was compared with Schoenheimer-Sperry method for fish samples, and slightly higher values were obtained by the former.
4. The influences of fat soluble vitamins on the method were studied, and the result showed that there was no influence by fat soluble vitamins on Liebermann-Burchard reaction in the ordinary or common foods.

緒 言

コレステロールの定量法については、すでに多数の報告があるが簡易、正確、迅速の点でなお満足すべきものといえない。特に総コレステロールの定量の場合は、広く用いられているジギトニン比色法¹⁾ではエステル型コレステロールを加水分解する操作が加わるためコレステロール・ジギトニドの形成が不完全となり、定量値の低くなることがしばしば見られる。

また抽出液を直接比色する方法ではエステル型のコレステロールは Liebermann-Burchard 反応において高い値を示す²⁾ため、その補正を必要とする³⁾。

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において見られる⁴⁾が鹼化の条件、抽出液の選択等に不十分な点が多く正確な定量に適さないとしてその後省みられなかったのであるが、著者は食品中の総コレステロールを定量するに当り、この方法について検討改良を行い、極めて簡易正確な定量法を確立したので報告する。

実 験

95%エタノール
クロロホルム
石油エーテル (bP. 60~80°C)
50% KOH 液
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
反応試薬:
氷冷無水醋酸4部
氷冷濃硫酸1部 冷しながら混合

食品試料5g前後を鹼化フラスコに正確に秤取し、これに95%エタノール25ml, 50% KOH液3mlを加え、還流冷却器をつけて湯浴上で30分間加熱鹼化する。

フラスコを冷却した後内容物を分液ロートに移し、少量の水及び石油エーテルでフラスコを洗い、洗液は分液ロートに移す。

内容液は10~20mlの石油エーテルで4~5回振盪し、不鹼化物を抽出し、抽出液は一定量とする。

抽出液より一定量をエルレンマイヤーフラスコにとり、石油エーテルを溜去し、残渣にクロロホルム 5 ml を加えて溶かす。

反応試薬 2 ml を加え、Liebermann-Burchard 反応の発色を行い、室温 15 分間放置後光電比色計で 610 mμ の波長における吸光度を測定し、コレステロール標準液による吸光度と比較定量する。

結果並びに考察

1. 純粋コレステロール・エステルによる検討

精製コレステロール及び精製パルミチン酸より Page⁶⁾ 等の方法により Cholesteryl-palmitate を作り、精製後その純結晶 (mp. 76°C) の 38.2 mg をクロロホルムに溶かして 100 ml とした。この液 1 ml 中には 0.382 mg × 0.6187 = 0.2363 mg のコレステロールを含有する。

供試液 10 ml をとり、クロロホルムを溜去してエタノール 25 ml 及び KOH 液 3 ml を加え鹼化後石油エーテルで抽出を行い 50 ml とし、これより 10 ml を採取して比色定量した。

4 回の実験の平均値は第 1 表のごとくであり極めて高い再現率が得られた。

第 1 表 純粋エステルの定量

実験値：吸光度	0.305
コレステロール値	0.4692 mg
理論値：	0.4726 mg
再現率	99.28%

2. 添加実験

供試料としてヤナギノマイを用い、この磨砕した試料 10 g にそれぞれコレステロールを 5 mg 及び 10 mg 添加した後鹼化を行い、石油エーテルで抽出し比色定量を行った。実験成績は第 2 表のごとくで回収率は 100 ± 3% の範囲であった。

第 2 表 添加実験

	吸光度 (4 回 平均値)	コレステロール測定値	回収コレステロール量	回収率
		mg	mg	%
無添加	0.081	6.73	—	—
5mg 添加	0.135	11.67	4.94	98.8
10mg 添加	0.204	17.00	10.27	102.7

3. 魚類試料を用いたチグトニン比色法との比較

試料としてキウリ、ハタハタ、シシヤモ、アブラコを用い、本定量法（鹼化抽出比色法）とチグトニン比色法¹⁾による総コレステロール含量の比較測定を行った。実験成績は第 3 表のごとくである。

第 3 表 チグトニン比色法との比較

試料名	鹼化抽出比色法	チグトニン比色法
	mg%	mg%
ハタハタ	83.6	80.2
シシヤモ	120.0	111.5
キウリ	109.1	95.7
アブラコ	60.0	56.7

本定量法による測定値に比べ、チグトニン比色法ではやや低い値が得られた。チグトニン比色法は本定量法より操作が複雑であり、また前述のごとく鹼化後のチグトニッドの形成が不十分になる場合があるので低い値を示したものと考えられる。

4. 本定量法に対する脂溶性ビタミンの影響

本定量法で食品のコレステロールを定量する場合に脂溶性ビタミン類は不鹼化物として石油エーテルに移行し、Liebermann-Burchard 反応に影響を与える事が考えられるので次の実験を行った。

ビタミン A、D₂、E をそれぞれクロロホルム 5 ml に溶かし、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比色定量を行い吸光度を測定した。Liebermann-Burchard 反応試薬によるこれ等ビタミンの呈色は次のごとくであった。

A：青一退色一黄褐一褐緑

D：橙赤一黄一黄緑

E：橙赤一褐一褐緑一黄緑

この吸光度を測定した結果は第 4 表に示すごとくである。

第 4 表 脂溶性ビタミンの吸光度

	ビタミン含量 (CHCl ₃ 5 ml 中)	吸光度
ビタミン A	10 I.U.	0
	100	0.015
	1,000	0.200
ビタミン D	50 I.U.	0
	500	0.010
	5,000	0.180
ビタミン E	0.05 mg	0
	0.50	0.015
	5.00	0.280

動物性食品に含まれるこれ等ビタミンの含量は普通 100 g 中に A は 1,000 I.U. D は 5,000 I.U. E は 5 mg 以下であり、従って吸光度測定段階ではクロロホルム 5 ml 中の含量は A で 10 I.U., D は 50 I.U., E は 0.05 mg 以下となりこれ等の吸光度はいずれも 0 であるからコレステロールの比色定量に対する影響は全く考えられない。

5. 抽出液が着色している場合

鹼化後石油エーテルで抽出した液は、ほとんどの場合無色透明であり、着色があっても極めてうすく、直接比色を行うのに差支えはない。

しかし貝類などでまれに色素がアルカリで破壊されずに残り黄色に着色する場合もある。このような時は硅藻土による吸着脱色を行うと無色の液が得られる。この硅藻土処理を行った場合コレステロールが硅藻土に吸着されるおそれがあるので次の実験を行った。

供試料はアサリ貝でこれを鹼化後石油エーテルで抽出すると黄色の抽出液が得られる。この液の一部を採り、10mlにつき約0.5gの硅藻土を加え振盪した後濾過して無色の液を得た。

着色した抽出液と硅藻土処理液についてその2mlを用いそれぞれをチグトニン比色法で、また透明液については直接比色法も行いその吸光度を測定した。実験結果は第5表のごとくであり、硅藻土処理によるコレステロールの損失は認められなかった。また硅藻土処理液をチグトニン比色法で測定した値と直接比色法で測定した値はほぼ同値であった。

第5表 硅藻土処理によるコレステロール測定値の変化

	吸 光 度	
	チグトニン法	直接比色法
着 色 液	0.081	
硅 藻 土 处 理 液	0.081	0.082

総 括

食品中の総コレステロール定量法として簡易迅速、正

確な方法を考案した。

本定量法は試料を酒精性苛性加里液で鹼化した後不鹼化物を石油エーテルで抽出し、抽出液の一部を採って石油エーテルを溜去した後残渣をクロロホルムに溶かし、Liebermann-Burchard 反応によって直接比色定量するものである。本定量法については次の実験を行った。

1. Cholesteryl-palmitate を用いた回収試験を行い理論値に対して99.3%の再現率を得た。
2. 魚類試料による添加実験の回収率は100±3%であった。
3. 魚類試料についてチグトニン比色法との比較試験を行い、チグトニン比色法よりやや高い総コレステロール値を得た。
4. 本定量法に対する脂溶性ビタミンの影響を検討し、普通食品に含まれるこれ等ビタミンの含量では比色に対する影響のないことを認めた。

文 献

- 1) Yasuda, M.: J. Biochem. (Japan), **24**, 429 (1936)
- 2) Schoenheimer, R., Sperry, W. H.: J. Biol. Chem., **106**, 745 (1934)
- 3) Yasuda, M.: J. Biochem. (Japan), **24**, 433 (1936)
- 4) Autenrieth, W., Funk, A.: Münch. Med. Woch., **1x**, 1243 (1913)
- 5) Kingsley, G. R., Schaffert, R. R.: J. Biol. Chem., **180**, 315 (1949)
- 6) Page, I.H., Rudy, H.: Biochem. Z., **220**, 304 (1930)

(北海道大学医学部生化学教室)
(北海道立衛生研究所)