酵素法, 比色法, ガスクロマトグラフ法による コレステロール定量法の比較

中 川 靖 枝*,**, 辻 啓 介*, 岩 尾 裕 之*
辻 悦 子*, 鈴木 慎 次 郎*

* 国立栄養研究所

Comparison of Enzymatic, Colorimetric and Gas-Chromatographic Analyses in the Assay of Cholesterol

Yasue NAKAGAWA,*,** Keisuke TSUJI,* Hiroyuki IWAO,*
Etsuko TSUJI,* Shinjiro SUZUKI*

* The National Institute of Nutrition, Shinjuku-ku, Tokyo

Comparisons of several enzymatic methods, colorimetric methods and the gas chromatographic method for the determination of cholesterol were undertaken.

Three kinds of enzymatic method consisting of the respective cholesterol oxidase (EC 1.1.3.6) isolated from microorganisms (*Nocardia erythropolis* and *Brevibacterium sterolium*) or fungus (*Schizophyllum commune*) were applied to the assay of serum cholesterol. In the obtained data among these enzyme methods, there was no difference dependent on the variation of origin of enzyme. Substrate specificity of these enzymes was also investigated by comparing relative intensity of coloration to authentic cholesterol or analogues. Enzymatic responses of these methods to authentic sitosterol or stigmasterol were estimated as about 60-70% of that to cholesterol.

In the enzymatic method, concomitant presence of neutral sterols with cholesterol in foods also disturbed the determination of true cholesterol concentration.

A enzymatic and two colorimetric (Liebermann-Burchard and Kiliani) methods was compared to make clear the specificity for sterols (lanosterol, campesterol, sitosterol, stigmasterol, fucosterol, desmosterol and coprosterol). The enzymatic method gave lower values to various sterols measured as cholesterol than the above colorimetric methods.

The gas chromatographic procedure was the most suitable method for the determination of net cholesterol concentration in foods containing several neutral sterols.

(Received May 29, 1979)

コレステロール (以下 Chl) 定量法は, 簡易迅速でしかも精度のよい方法を求めて多年検討されてきた¹⁾ 結果, まず比色法による簡単な種々の定量法が考案されている²⁾³⁾. ついで酵素法が考案されたが, これは1972年 Richmond が *Nocardia* sp. の分泌する Chl 酸化酵素 (EC 1.1.3.6) の性質について報告したことに始まる⁴⁾. 1973年には Richmond⁵⁾, Flegg⁶⁾ らにより定量法が案出され, 1974年に Röschlaw⁷⁾, Allain⁸⁾ らにより確立された. 従来の方と測定原理が異なる酵素法では, 抽出操作, ケン化などの前処理が省略でき, 硫酸や水酢酸など

の過激な試薬も必要としないのでルーチン化する際の利点となっている. わが国でも血清 Chl の定量法として臨床検査に利用され⁹⁾¹⁰⁾, その精度のよさも確かめられている¹¹⁾. しかし, 本酵素は基質である Chl のみと特異的に反応するものではなく構造の近似したステロール類とも反応することが知られている⁵⁾⁸⁾¹²⁾. したがって Chl 以外のステロール類をも含む試料の定量法に適用することは避けなければならないが, なかには Chl 以外のステロールを含む食品への応用例も認められる¹³⁾. 酵素反応は, 酵素の立体構造と基質の形状がより密接な場合にその酵素の基質特異性が高まるものと考えられ, 起源の異なる菌株から分離された酵素では基質特異性も異なり, Chl のみに特異的に反応するものが存在することも期待

* 〒162 東京都新宿区戸山町 1

** 現在: 実践女子大学家政学部食物学科

〒150 東京都渋谷区東 1-1-11

される。市販の簡便な酵素法はいずれも ChI 酸化酵素によって生じた過酸化水素を種々な呈色反応系に導き比色定量する方法として開発されている。そこで ChI 酸化酵素の分離源の異なる市販酵素法 3 種について ChI や類似ステロールに対する基質特異性および反応速度を調べた。また血清とちがって ChI 以外のステロールを含む試料に適用する場合を考慮して、ガスクロマトグラフ法、比色法とも比較検討した。

実験方法

1. 試料

ステロール類：コレステロール、ラノステロール、カンペステロール、シトステロール、スティグマステロール、フコステロール、デスモステロール、コプロステロールは Applied Science 製ガスクロマトグラフィ用。

標準血清：セロノルムリビッド (Nyegaard 製オスロ)

水産物試料：クロロホルム：メタノール (1:1) で抽出したカキ油。

2. 不ケン化物画分の抽出¹⁴⁾

試料を 25 ml 容共栓試験管にとり、飽和 KOH 水溶液 2 容とエタノール 3 容を加えミキサーにて十分混合した。60~65°C の湯浴にて振盪しながら 1 時間ケン化後、水 5 容を加える。ヘキサンを加え 30 秒振盪し、上層のヘキサンを分別。5 回くりかえし不ケン化物を抽出した。

3. 酵素法

操作法：酵素法 A, B, C の分析条件については Table 1 に示した。各酵素法の指示に準じて試験管に試料を採取し反応液を添加した。十分混和後インキュベートし、ギルフォード分光光度計 240 にて各波長で比色した。反応液は各種酵素、緩衝液、発色剤、界面活性剤を

含み、各法の最適条件に調整されている。

4. 比色法

Liebermann-Burchard (L-B) 反応による方法として Sperry-Webb 法¹⁵⁾、Kiliani 反応による方法として Sobel らの方法¹⁶⁾¹⁷⁾を使用した。

5. ガスクロマトグラフ法

試料より抽出した不ケン化物画分に内部標準物質として 5 α -コレスタンを適量添加した¹⁴⁾。分析条件：装置は大倉モデル 802-FID。ガラスカラム 3 mm $\times$ 2 m にダイアソリッド ZS, 80~100 メッシュ (日本クロマト工業) を充てんした。キャリアーガス N₂ 流量 70 ml/min, カラム温度 280°C, 試料気化室 300°C に設定。定量値は半値幅法により面積比を求め算出した。ステロールの同定は標準品および文献値¹⁸⁾¹⁹⁾の保持時間で比較決定した。

実験結果および考察

1. 基質特異性

酵素法 A, B, C における検量線は Fig. 1 に示すように原点をとる直線性が得られた。ChI 酸化酵素は ChI のみに特異的に作用するものではなく、ステロール核の 3 β 位に OH 基を有し非エステル型で二重結合を 4 位または 5 位に有し、さらに 17 位の側鎖が適当な長さであることなどの条件を満たすステロールとも反応する⁵⁾⁸⁾¹²⁾。この条件に近似したステロールのうちから食品などに比較的多く含有されているシトステロールとスティグマステロールについて 3 酵素法で反応させたところ Fig. 2 のような結果が得られた。両ステロールとも 0~150 μ g の範囲内で、原点をとる直線が得られたので、反応ステロール量を 50 μ g とし比較した。各酵素法における ChI の呈色を 100 とした場合、シトステロールでは

Table 1. Summary table of analytical conditions in several enzymatic methods.

Condition	A	B	C
Esterase	Microorganism	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.
	Cholesterol ester hydrolase	Cholesterol ester hydrolase	Lipoprotein lipase
Oxidase	<i>Nocardia erythropolis</i>	<i>Brevibacterium sterolium</i>	<i>Schizophyllum commune</i>
Buffer	Phosphate	Phosphate	Phosphate
Optimal pH	7.7	7.4	5.3
Coloration	Peroxidase	Peroxidase	Peroxidase
	4-Aminophenazone	4-Aminoantipyrine	4-Aminoantipyrine
			Dimethylaniline
$\lambda_{\max}$ nm	500	500	550
Incubation			
Time min	15	15	20
Temp. °C	37.0	37.0	37.0

Fig. 1. Calibration curves of cholesterol with several enzymatic methods. Methods A, B and C: See Table 1.

Fig. 2. Comparison of substrate specificity of several enzymatic methods.

Each relative value of sitosterol or stigmasterol to that of cholesterol (100%) was shown. Methods A, B and C: See Table 1.

63~80%, ステリグマステロールでは 48~67% 呈色した。おのおの起源の異なる酵素を使用しているため、Chl 以外のステロールに対する反応に特徴がみられるのではないかと期待したが、どの方法でも両ステロールはかなり反応し明確な特徴はみられなかった。

さらにその他の類似ステロールについて酵素法 A で呈色反応を行なった。同時に、Chl の呈色反応にはきわめ

て多様な試薬があるが²⁰⁾、代表的な L-B 反応と Kiliani 反応を行ない呈色の度合は百分率で Table 2 に示した。また各ステロールの呈色液の色調はさまざまであり、このときの吸収曲線を求めたところ Fig. 3, 4, 5 のような波形となった。L-B 反応では吸収極大が 600~700 nm と広範囲にわたり、Chl と同傾向の曲線を示したのはカンベステロール、コプロステロールであった。Kiliani 反応では約 500~570 nm の間にあり、Chl に近いものはシトステロール、カンベステロールであった。すでに Burke ら²¹⁾が提起している仮説によれば L-B 反応ならびに Kiliani 反応は、ともにまず 3-5 コレスタジエンカルボニウムイオンが形成される。次いで数段階の反応を経て最終的に L-B 反応ではペンタエニルイオン、Kiliani 反応ではテトラエニルイオンを比色する。しかし、L-B 反応はさらに反応が進み 410 nm に吸収極大を有するコレスタヘキサエンシルホン酸に変化しやすいため呈色は不安定である。また、ステロール類がこれらの両呈色反応系において Chl の場合とは異なる最終産物を生じることも考えられ、それが Fig. 3, 4 の波形のちがいとなって現われたと推測される。

一方、酵素法においては Chl 酸化酵素による反応をできるだけ早期に定量化する目的で、Chl 酸化酵素による酸素消費量をとらえる方法^{22)~24)}、あるいは生成した過酸化水素を測定する電極法²⁵⁾なども検討されている。しかし生じた過酸化水素をさらに反応させて生成した赤色色素の濃度として比色化する方法が一般的である。この方法では Fig. 5 に示したように Chl 以外のステロールの呈色反応は起こるが、前述の 2 呈色反応と異なり色調はすべて同一であった。これは各ステロールが Chl 酸化酵素の作用を受け、生じた過酸化水素がその量に応じて酸化的縮合物の赤色色素の濃度として表現されたことを示している。すなわち Fig. 5 の波形から酵素法の呈色反応の最終産物はステロールによる違いがないことを示しており、この点が従来の呈色反応系におけるステロールと、過酸化水素を呈色反応に導く酵素法とは同じ比色法でありながら明白に異なる点である。

他方、標準血清を用いて 3 酵素法を比較定量した結果は Table 3 のようになった。各法の数値は推奨値に近似し、起源の違いによる著しい差はなかった。なおヒト血清では本酵素反応に関与する類似物質の共存率が低いので定量上の問題も少なく、L-B 反応による方法との比較や再現性のよさについてもすでに確認している¹¹⁾。したがって、酵素法を血清 Chl 定量法として適用することに問題はなく簡易迅速で、従来の比色法にくらべてきわめて優れた方法と思われた。

2. 比色法、酵素法、ガスクロマトグラフ法

一般に動物性食品のステロールは大部分が Chl とされ

Table 2. Relative rates of coloration and absorption maximum wavelength of authentic sterols by three methods.

Sterols	Enzymatic A ² 500 nm % ¹	Colorimetric			
		L-B ³		K ⁴	
		630 nm % ¹	$\lambda_{\max}$ ⁵ nm	560 nm % ¹	$\lambda_{\max}$ ⁵ nm
Cholesterol	100	100	630	100	565
Lanosterol	1.4	12.3	550	24.3	498
Campesterol	39.8	90.7	635	104.2	565
Sitosterol	62.8	41.0	680	80.5	565
Stigmasterol	47.7	56.6	695	78.0	560
Fucosterol	62.0	29.2	690	57.4	570
Desmosterol	77.3	49.7	690	71.4	570
Coprosterol	2.5	38.2	630	14.4	550

¹ Relative color intensity to that of cholesterol (100%).² 50 μ g sterol used. See Table 1(A).³ L-B : Liebermann-Burchard reaction. 300 μ g sterol used.⁴ K : Kiliani reaction. 100 μ g sterol used.⁵ Absorption maxima were measured with Union Spectrophotometer, SM 401.

Fig. 3. Absorption spectra of colored products formed by the Liebermann-Burchard reaction for authentic sterols.

The reaction cuvette contained 300 μ g of each purified sterol. 1, cholesterol; 2, campesterol; 3, sitosterol; 4, stigmasterol; 5, desmosterol; 6, fucosterol; 7, lanosterol; 8, coprosterol.

るが、水産物では他のステロール類を含むものもある²⁶⁾。Chl のみの場合は定量法の選択に制約は少ないが、Chl 以外のステロールも共存する際には問題がある。現在のところ Chl と種々なステロールを分画定量す

るにはガスクロマトグラフ法によることが多い。種々なステロール類を含有する試料としてカキ油を用い、比色法、酵素法、ガスクロマトグラフ法で定量した結果 Table 4 のようになった。試料をケン化後ケン化物を

Fig. 4. Absorption spectra of colored products formed by the Kiliani reaction for authentic sterols.

The reaction cuvette contained 100 μ g of each purified sterol. 1-8, see the footnotes of Fig. 3.

Fig. 5. Absorption spectra of colored products formed by cholesterol oxidase method (A) for authentic sterols.

The reaction cuvette contained 500 μ g of each purified sterol. 1-8, see the footnotes of Fig. 3.
Enzymatic method A: See Table 1.

抽出し、ジギトニン処理せずに直接不ケン化物の呈色反応を行なった場合、L-B 反応でも Kiliani 反応でもガスクロマトグラフ法の約 5 倍の数値を示した。次に不ケン化物をジギトニン処理した後に反応させたと、呈色妨害物が多少除去されたためか数値は少し低くなった。しかし、ジギトニン処理も Chl 酸化酵素の性質と同様

3 β -OH 基を有するステロールはいずれもジギトニドを形成するため、Chl のみを選択的に分別することは不可能である。したがって定量値は真の値より高いことが予測できる。先にも述べたように Chl の呈色反応は純粋に Chl のみの場合でも反応生成物が単一でない²¹⁾ので、呈色を妨害する夾雑物を除去したとしても他のステロール

Table 3. Comparison of reproducibility of cholesterol content in control serum¹ determined by several enzymatic methods.

No.	Enzymatic method		
	A	B	C
	Cholesterol mg/100 ml		
1	236	244	252
2	242	238	241
3	238	249	240
4	240	236	232
5	247	245	234
Average	241	242	240
SD	3.7	4.8	7.0

¹ Seronorm : recommended value, 243 mg/100 ml.² See Table 1.

Table 4. Comparison of cholesterol content in oyster oil by three methods.

Method	Preparation		Analytical value ⁵ mg/100 ml
	Ext. ¹	Dig. ²	
Colorimetric L-B ³	+	—	5,525
L-B	—	+	3,947
K ⁴	+	—	4,999
K	—	+	3,807
Enzymatic A ⁶	+	—	3,673
Gas chromatography	+	—	1,009

¹ Ext. : Extraction step of unsaponifiable matter.² Dig. : Isolation step by digitonide formation.^{3,4} See the footnotes of Table 2.⁵ Values estimated as cholesterol represent the mean of 2 or 3 determinations.⁶ See Table 1.

Fig. 6. Gas chromatogram of sterols in oyster oil.

1, 5- α -cholestane; 2, C 26 sterol; 3, 22-dehydrocholesterol; 4, cholesterol; 5, brassicasterol; 6, 24-methylene cholesterol; 7, sitosterol.

類を含有する物はさらに複雑な呈色となるのが明白である。

酵素法では不ケン化物を抽出後、ジグトニン処理は行なわず直接に酵素反応をさせた。不ケン化物中に混在している Chl 類似ステロールを本酵素反応では分別できないため定量結果は比色法と大差がなかった。これらのことから比色法および酵素法の分析値は真に Chl の量を表わしていないと考えられた。そこでこの不ケン化物画分

をガスクロマトグラフィにより分析したところ Fig. 6 のクロマトグラムが得られた。内部標準物質と Chl のピークより Chl 含量の数値を算出すると、比色法および酵素法の分析値の 1/3 に減少した。他のステロール類と区別することができる点において、この方法は比色法、酵素法より優れていた。したがって、数種のステロールが混在しているような食品の Chl 定量法としては比色法および酵素法ともに現時点では不適当と判断された。ただ

し酵素法においては今後さらに真に Chl のみと特異的に反応する酵素が見いだされるならば、簡易迅速な方法として広範囲な定量に適用できるものと期待される。

要 約

起源の異なる菌株から分離されたコレステロール酸化酵素によるコレステロール定量法について検討した。コレステロールに構造が近似したシトステロール、ステイグマステロールに対する3種の酵素反応は、おのおの約70%、約60%であった。本酵素の基質特異性をみるため類似ステロール7種を用いて酵素反応を試みた。同時に Liebermann-Burchard 反応と Kiliani 反応を行なったが、両呈色反応では各ステロールの色調が一樣でなかった。酵素法では色調は同様であったが、いずれもコレステロール以外の物質も呈色に影響をおよぼすことが明らかとなった。種々なステロールを含有する試料について、酵素法、比色法、ガスクロマトグラフ法で比較定量した。酵素法と比色法では数値に大差がなく、コレステロールのみを分画定量できる点においてガスクロマトグラフ法が最適であった。

本研究の一部は第110回コレステリン研究会(1977)にて報告した。

文 献

- 1) Kabara, J.J. : *Methods of Biochemical Analysis*, 10, 263 (1962)
- 2) 柴田 進, 山本きよみ, 亀岡満子 : 臨床病理, 13, 465 (1965)
- 3) Zlatkis, A. and Zak, B. : *Anal. Biochem.*, 29, 143 (1969)
- 4) Richmond, W. : *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 29 (Suppl.), 136 (1972)
- 5) Richmond, W. : *Clin. Chem.*, 19, 1350 (1973)
- 6) Flegg, H.M. : *Ann. Clin. Biochem.*, 10, 79 (1973)
- 7) Röschlaw, P., Bernt, E. and Gruber, W. : *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4, p. 1890 (1974), Academic Press (New York)
- 8) Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W. and Fu, P.C. : *Clin. Chem.*, 20, 470 (1974)
- 9) 正路喜代美, 茂手木皓喜, 菊地洋子, 倉持順子 : 臨床病理, 21 (補), 85 (1973)
- 10) 小林紀崇, 奥田 清 : *Laboratory-Automation*, 2, 37 (1974)
- 11) 中川靖枝 : 実践女子大学家政学 部 紀 要, 15, 47 (1978)
- 12) Uwajima, T., Yagi, H. and Terada, O. : *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1149 (1974)
- 13) 久城英人, 福井 巖, 有末一隆, 山口賀久, 小川善資, 林 長蔵, 山村雄一 : 動脈硬化, 3, 361 (1976)
- 14) 辻 啓介, 辻 悦子, 印南 敏 : 科学技術庁資源調査所報告書 (昭和53年度), p. 249 (1978)
- 15) Sperry, W.M. and Webb, M. : *Anal. Biochem.*, 187, 97 (1950)
- 16) Sobel, C. and Fernandez, A. : *Clin. Chem.*, 12, 739 (1966)
- 17) 辻 啓介, 鈴木慎次郎 : 栄養学雑誌, 30, 235 (1972)
- 18) 田村利武 : 油化学, 15, 561 (1966)
- 19) Ikekawa, N., Watanuki, R., Tsuda, K. and Sakai, K. : *Anal. Chem.*, 40, 1139 (1968)
- 20) 坂岸良克 : 検査と技術, 3, 28 (1976)
- 21) Burke, R.W., Diamondstone, B.I., Velapoldi, R.A. and Menis, O. : *Clin. Chem.*, 20, 794 (1974)
- 22) 奥田 潤, 河村守昭, 奥田 剛, 馬場茂明, 亀野靖郎 : 臨床病理, 23 (補), 273 (1975)
- 23) Noma, A. and Nakayama, K. : *Clin. Chem.*, 22, 336 (1976)
- 24) 野間昭夫, 中山啓子, 岡部紘明 : 脂質生化学研究, 18, 227 (1976)
- 25) 中根清司, 高阪 彰 : 臨床病理, 26 (補), 196 (1978)
- 26) 林 陽 : 油化学, 20, 726 (1971)

(昭和54年5月29日受理)