塩化鉄法によるコレステロールの比色定量における 呈色反応と被検液の前処理について

鈴木 康 策

(1963 年 5 月 13 日受理)

ON THE COLOR REACTION OF THE DETERMINATION OF CHOLESTEROL BY FERRIC CHLORIDE METHOD AND SEVERAL PRELIMINARY TREATMENT

Kōsaku SUZUKI

Taken up out of procedures of determinations reported separately by KOMATSU and YASUDA mainly for serum cholesterol, several parts applicable to samples other than serum have been examined experimentally. The results obtained are summarized as follows.

1) When the alkaline solution containing cholesterol, for example the saponification mixture of a sample, is neutralized before addition of digitonin, acetic acid is preferable as a neutralization agent to hydrochloric acid. Strict neutralization is not always essential, so far as acetic acid is used for neutralization.

2) When evaporation of the solvent is carried out to isolate cholesterol dissolved in the mixture of acetic acid and ether according to Yasuda's procedure, it has to be done in the atmosphere of an inert gas such as carbondioxide.

3) Color reaction is performed better by the shaker of compound type (Fig. 1) than by the usual one of single type in regard to intensity, precision of color developed and actual handling.

塩化鉄法によるコレステロールの比色定量は血清コレステロールの新定量法として、1954 年、ZAK ら¹⁾ によつて発表されて以来、種々研究改良され、発展して来たが、その研究の対象はすべて血清コレステロールに限られている。塩化鉄法のもつとも優れている点は呈色反応によつて得られる呈色液の色相、呈色度が安定していること、およびその呈色度が強いいため僅少のコレステロールを定量するのに有利である、つまり測定用の試料が少量でよいことなどである。これらの点では LIEBERMAN-BURCHARD 反応による定量法よりはるかに優れているが、なお改良の余地が残されており、両方法の比較については ZAK ら¹⁾、小松²⁾、大山³⁾、吉川⁴⁾ の報文がある。著者も塩化鉄法の呈色試薬に関して一部検討したところを報告した⁵⁾。

塩化鉄法では呈色反応の結果得られる反応液の色相、呈色度は安定しているが、呈色反応のやりかた如何によつてはそのときどきに得られる呈色度の精度がかならずしもよくないので、反応を実施するときの手技にはかなり熟練する必要がある。ZAK ら¹⁾ の定量法ではコレステロールを純粋に分離することなく呈色反応を行なうのであるが、小松²⁾ は血清からコレステロールジギナイドを純粋に分離し、それについて呈色反応を行なうように改め、良い結果を得た。したがつて、コレステロールの分離法さえ適当に行なうならば、被検体は血清ばかりに限定されるわけではない。ゆえに定量法の基礎となる呈色反応そのものの実施法について少し改善し、なおコレステロールジギナイドの生成分離に関連した条件についても一部検討したので報告する。コレステロールジギナイドの生成分離は血清コレステロールの場合には SPERRY-WEBB 法が一応標準にされているが、本報告では YASUDA⁶⁾ の方法について検討した。なぜかといえば、YASUDA の方法

* 東京水産大学沼津実習場 (Numazu Fish. Lab., Tokyo Univ. Fish., Numazu-shi, Shizuoka-ken).

では血清ばかりでなく、組織の抽出液なども対象としているので、呈色反応に至るまでの前処理の方法は SPERRY-WEBB 法より多種類の被検体に適用できると考えたからである。

実験および考察

(1) 呈色度の精度 呈色反応のやりかたは小松の報告²⁾を改良した前報⁵⁾による。この呈色反応においては、被検液と呈色試薬との混合のしかたによつて呈色度が変化する²⁾。1本の振盪管に被検液を入れておき、つぎに試薬を器壁にそつて静かに加え、これを振盪する従来の方法²⁾においては、試薬の添加がかならずしも一定時間に終了するわけではなく、そのうえ、添加中、液が多少とも動揺するのをまぬかれない。これらのことがすべて呈色度に影響するから、このような混合のときの条件をいつも一定におさえるには熟練を要し、きわめてむずかしい。そこで Fig. 1 に示したように、すりあわせで接合する2本の部分からなる振盪管に被検液と試薬を別々に入れておき、反応を実施するときに両管を接合してから、一挙に激しく振盪するならば、混合条件を一定に保つことは従来の一管式振盪法よりかなり容易になる。

Table 1. Absorbancy of the color reaction mixtures produced by two types of shaker tubes.

Type of a shaker tube	Single type	Compound type
Absorbancy (570m μ , 1 cm.)	Found	0.493
		0.484*
		0.491
		0.492
		0.496
		0.495
		0.483*
		0.488
	Average	0.493
	Critical limit**	0.485~0.501
	Unbiased variance	8.30×10^{-6}
		0.519
		0.524
		0.520
		0.520
		0.523
		0.520
		0.521
		—
		0.521
		0.516~0.526
		3.33×10^{-6}

Concentration of the cholesterol solution tested is 0.2 mg/4.5 ml.

* abnormal at the level of significance 5 %

** level of significance 5 %

Fig. 1. A shaker tube. (Compound type)

式の場合より強くなる。この表の両測定値に差があるのは以上のような理由によるもので、この差は危険率 1 % において有意である。呈色度が強いということはそれだけ少量のコレステロールを検出 (定量) するのに有利となる。以上の理由から呈色反応は Fig. 1 に示した二管式振盪管をもつて行なうように改めた。なお、この図に示した振盪管の大きさはもちろんかならずしもこのとおりでなくてもよいが、被検液 4.5 ml, 試薬 3 ml の混合に適するよう設計したものである。

(2) コレステロール溶液の溶剤除去について YASUDA⁶⁾の実施法によれば、呈色反応を行なう一段階前において、コレステロールをエチルエーテル、酢酸の混合溶剤に溶解した状態でジギトニンから分離し、

るならば、混合条件を一定に保つことは従来の一管式振盪法よりかなり容易になる。したがつて、精度のよい実験値を得ることができると思われる。そこで、コレステロール濃度 0.2 mg/4.5 ml の酢酸溶液を用いて、従来の一管式振盪法、ここにいう二管式振盪法による呈色度の精度を比較した。結果は Table 1 のとおりである。この表で両者の不偏分散を比較すれば、二管式の精度が一管式よりもいくぶんよいようであるが、5 % の危険率において有意差は認められない。しかし、一管式においては、Table 1 のように測定値を精度よく揃えるにはなかなか手技に熟練を要し、それでも表にあるような異常値がときどき現われ、測定値の変動が大になりやすい。この点から見て二管式のほうが操作が容易で、

精度もよいものと判断してよい。また、被検液に試薬を加えてから、振盪混合するまでに静置される時間が長びくと、反応液の呈色度は弱くなる。一管式では試薬添加の始めから終りまで、振盪することなく経過する時間 (つまり試薬添加に要する時間) があるので、反応液の呈色度はこの時間の経過にともない弱くなる。これに反し、二管式では試薬の添加と同時に激しく振盪混合されるので、呈色度は一管

Table 2. Standard absorbancy of the color reaction mixture.

Absorbancy	
Found	0.656
	0.658
	0.654
	0.652
	0.660
	0.656
	0.654
	0.652
Average	0.655
Range	0.008

Concentration of the cholesterol solution tested is 0.3 mg./4.5 ml.

Table 3. Effect on absorbancy of the reaction mixture by conditions of evaporation of the cholesterol solution.

Atmosphere in the flask	Carbon dioxide		Air	
	Temperature of the water bath		Temperature of the water bath	
	70°C	100°C	70°C	100°C
Absorbancy	0.654	0.650	0.650	0.638
	0.650	0.658	0.640	0.652
	0.660	0.658	0.652	0.636
	—	0.652	0.642	0.646

After the same cholesterol solution as in Table 2 was added with ethyl ether, the solution was subjected to evaporation.

つぎに両溶剤を蒸発によつて除去し、コレステロールを純粋に単離するのであるが、溶剤蒸発時の条件をとくに規定していない。よつて、このことについて検討した。まず、コレステロールの酢酸溶液 4.5 ml (コレステロール 0.3 mg 含有) につき、繰返し呈色反応を行ない、吸光度を測定し、これを標準の吸光度とする。これは Table 2 のとおりである。つぎに同じコレステロール溶液 10 ml を取り、エチルエーテル 10 ml を加え、酢酸、エーテル混合溶液とし、容器内の空気を炭酸ガスで置換してから、または置換することなく、沸騰水浴上、あるいは 70°C の水浴上で加熱する。つぎに減圧にして液面に炭酸ガスまたは空気をたえず吹き込みながら、溶剤を完全に蒸発し去り、容器を水冷してから常圧に戻す。加熱水浴の温度が 70°C の場合はとくに液面にガスの吹き込みを行なわないと、蒸発が緩慢になる。このようにして得た残渣を酢酸 10 ml に溶解する。その 4.5 ml について呈色反応を行ない、吸光度を測定し、Table 3 の結果を得た。上記の蒸発がコレステロールに変化を与えなければ、Table 3 の測定値は Table 2 のものと一致するわけである。ゆえに、両表を比較してみると、炭酸ガスを通しながら蒸発を行なえば、100°C で蒸発してもコレステロールに影響を与えないものと認められる。空気中で蒸発を行なえば、温度が 70°C の場合でも、測定値が標準より多少小さくなるように見受けられるし、温度が 100°C の場合にはさらに小さい測定値が得られ、そのうえ測定値の分散が大になり、コレステロールに対する蒸発の影響が判然となつてくる。したがつて、溶剤除去の際は、炭酸ガスを通じながら行なうことが望ましい。蒸発時のこのような影響は空気酸化によるものと思われるから、炭酸ガスに限らず、他の不活性ガスを使用しても同じ効果があろう。また、使用するエーテルは過酸化物を含まぬものでなければならぬ。

(3) ジギトナイド生成時の溶液の中和について 組織の抽出液または粗脂肪には遊離型、結合型の両コレステロールが含まれているから、全コレステロールの定量には、試料をケン化し、つぎに中和してからジギトニン溶液を加えてジギトナイドの生成を行なわなければならない。よつて、ジギトナイド生成と中和条件との関係を調べた。粗脂肪などのケン化によつて生ずるグリセリンおよび脂肪酸(またはその塩)が混在していても、YASUDA の方法ではコレステロールジギトナイドの生成に影響しないことが判明しているから⁸⁾、中和条件を調べるための実験としては粗脂肪などのケン化液を使用するにはおよばない。ゆえに、コレステロールのアルコール溶液(濃度は 0.3 mg/4.5 ml) 10 ml に指示薬としてフェノールフタレン溶液 1 滴と約 2% の水酸化カリウム水溶液 3 滴を加えてアルカリ性にして、この溶液を 1% 塩酸、または 4% 酢酸によつて弱アルカリ性、または弱酸性になるように中和してから、いずれの場合も同様に YASUDA の方法にしたがつてジギトナイド生成の処理を行ない、生成が定量的に行なわれるかどうかを調べた。ただし、呈色反応を行なう前の溶剤の蒸発除去は前項に述べたとおりである。蒸発残渣は 10 ml の酢酸を加えて溶解し、その 4.5 ml について呈色反応を行ない、吸光度を測定し、Table 4 の結果を得た。ジギトナイドの生成が定量的に行なわれているならば、最後に得た被検液のコレステロール濃度は Table 2 の場合と同じに

Table 4. Effect on the formation of cholesterol-digitonide by the condition of neutralization of an alkaline alcoholic cholesterol solution.

Neutralization agent	4% Acetic acid		1% Hydrochloric acid	
	Weakly alkaline	Weakly acidic	Weakly alkaline	Weakly acidic
Absorbancy	0.656	0.654	0.654	0.646
	0.658	0.656	0.656	0.640
	0.658	0.648	0.648	0.628
	0.654	0.656	0.646	0.635

Cholesterol recovered from the test solution as digitonide was subjected to the color reaction to yield the reaction mixture showing above-mentioned absorbency.

さらに塩酸を加え、酸性度を強くするとますます吸光度が減少し、さらに酸性度を強くしてジギトナイドの生成を行なえば、同様な操作で呈色反応を行なっても赤紫色の呈色が発現しなくなる。このような観察から、中和剤としては希酢酸を使用すべきであるといえる。希酢酸で中和を行なうかぎり、中和の程度も厳正に中和点を守る必要がない。

なお Table 4 の実験においては、コレステロールもジギトニンとともに遊離の状態で溶存している酢酸溶液に試薬を反応せしめて呈色反応を行なつたのであるが、中和剤として酢酸を用いたところの吸光度を見ると、Table 2 の値と変わらない。Table 2 はコレステロールの酢酸溶液を被検液として呈色反応を行なつた場合で、反応液にジギトニンは含まれていない。つまり、被検液にこの程度（コレステロールジギトナイドは両成分 1 分子ずつの附加体である）のジギトニンが溶解していても、呈色反応に影響しないことがわかる。YASUDA⁶⁾ の方法では呈色反応は L-B 反応によるが、被検液はコレステロールのみを溶質とし、ジギトニンは除かれているが、塩化鉄反応によつて呈色反応を行なうかぎり、ジギトニンの除去は必要でない。

総 括

主として血清を対象とする小松²⁾、YASUDA⁶⁾ のコレステロール定量法の諸操作のうち、試料を血清に限らず、一般に共通する部分について検討し、つぎの結果を得た。

(1) コレステロールジギトナイド生成時の中和には希酢酸を用いるべきで、中和はかならずしも正確な中和点を守る必要はない。

(2) コレステロールの酢酸、エーテル混合溶液から溶剤を蒸発除去するときには炭酸ガス等の不活性ガスの雰囲気で行なう必要がある。

(3) 呈色反応を行なうとき、被検液と試薬の混合には従来の一管式振盪管より Fig. 1 の二管式振盪管を使用するほうが得られる呈色度の強さ、その精度、操作の難易の点から見て有利である。

文 献

- 1) ZAK, B., et al: *American Journal of Clinical Pathology*, **24**, 1307 (1954).
- 2) 小松節子: *日新医学*, **47**, 389 (1960).
- 3) 大山ヘルミ・その他: *日新医学*, **47**, 464 (1960).
- 4) 吉川春樹・その他: *医学のあゆみ*, **33**, 375 (1960).
- 5) 鈴木康策: *本誌*, **29**, 273 (1963).
- 6) Morio YASUDA: *Journal of Biochemistry*, **24**, 429 (1936).

なるはずであるから、Table 2 の吸光度と Table 4 の測定値を比較すれば、中和条件の影響を知ることができる。Table 4 中の弱アルカリ性とはからうじて指示薬の色が消失する程度で、弱酸性とはこれにさらに中和剤 1~2 滴を加えた程度で、中和点よりわずかに酸性になる。さて、Table 2 と Table 3 とを比較してみると、中和剤として酢酸を使用した場合は、中和の程度が多少酸性になつても、アルカリ性になつても、ジギトナイドの生成は量的に行なわれ、何等影響を受けないものと認められる。しかし、塩酸で中和した場合は、中和の程度が弱アルカリ性ならば、大して影響しないように見受けられるが、弱酸性になると、吸光度が標準よりも明らかに減少し、かつ再現性も失なわれ、ジギトナイドの生成が阻害されることがわかる。この中和において