

甘藷ステロールの定量法について

富田 裕一郎

A Method for the Determination of Sterols in Sweet Potato (*Ipomoea batatas*)

Yūichiro TOMITA

(Laboratory of Living Science)

I 緒 言

ステロールはカロチノイド色素，精油，樹脂，弾性ゴム等のテルペン類同様イソプレン基の重合したものと考えられている。

この様に共通の前駆物質から生成されたと思われるステロールとテルペン類間の関係はそれ以上は未だ明らかにされていない。

甘藷には，カロチン類と称せられる如く，高カロチン含有品種，比較的少ない品種，殆ど皆無の品種が存在するけれども，ステロールは何れの甘藷にも認められるところから，このステロールとカロチノイドの相互間に，何らかの関係が存在するのではないかと推察される。

従つて，甘藷ステロールの定量法を検討する必要を生じ，従来報告されている植物ステロール定量法のうち何れが甘藷に適用しうるか検討した結果を報告する。

本法の骨子は，抽出法，ステロールの精製法及び比色の三段階に大別されるが，Wall & Kelleyの方法¹⁾を若干改良したもので，Waghorne & Ball法²⁾をも参考とした。尚比色法は Liebermann-Burchard 呈色反応に基づく微量定量法である。

II 方法及び結果

A. 試 薬

アセトン

石油エーテル (b. p. 40~60°C)

10% KOH—95% EtOH

0.2% デギトニン—95% EtOH

80% EtOH

クロロホルム

無水酢酸

濃硫酸

氷酢酸

無水酢酸—濃硫酸混液 (20:1): 毎回新調

B. β -シトステロール標品

(m. p. 138°C, MeOH で再結)

C. 実 施 法

i. ステロールの抽出 (第1表)

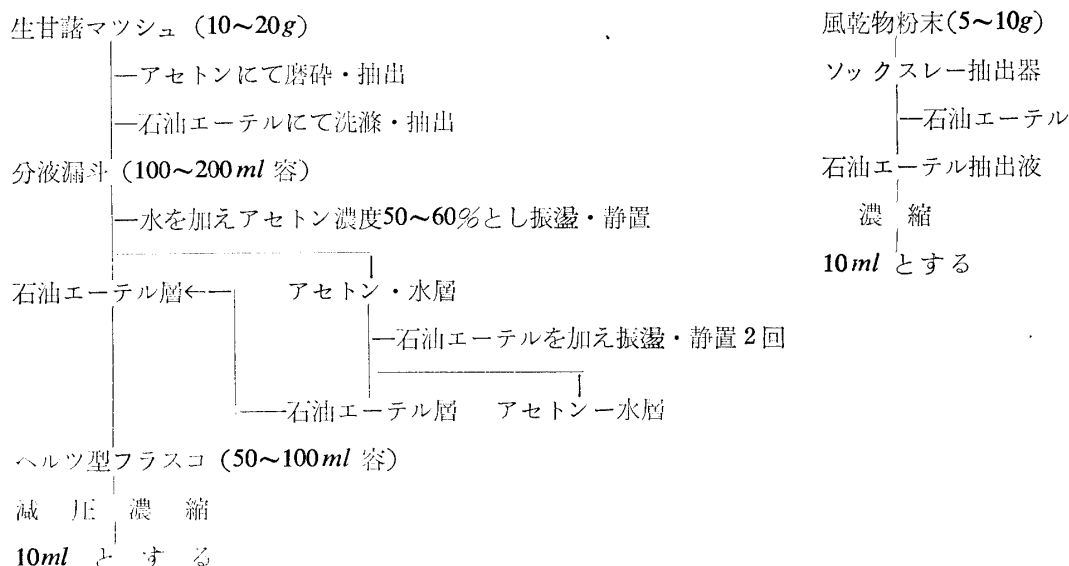
生甘藷から抽出する場合

試料 (10~20g) は、剥皮甘藷を縦に8等分し、その一つを摺りおろす。充分混合後秤取し、乳鉢中で石英砂と共にアセトンを加え磨砕後吸引濾過する。残渣は数回アセトンで上記同様処理後石油エーテルで2回処理し、濾液は合し分液漏斗に定量的に移す。水を加えアセトン濃度約50~60%程度にし、振盪、静置、石油エーテル層とアセトン-水層を分別する。ステロールは殆ど完全に転溶される。危険度を考慮して分別したアセトン-水層に更に石油エーテルを添加、振盪、静置、分別、石油エーテル層は前の石油エーテル層と合す。この操作を2回繰返し、全石油エーテル溶液は濃縮後10mlとする。

風乾物から抽出する場合

粉碎後 (5~10g) 石油エーテルでソックスレー抽出器を用いて抽出、濃縮後10mlとする。

第1表 甘藷ステロール抽出法



ii. ステロールの精製 (第2表)

ステロール・デギトニド沈澱の生成には、Wall & Kelley 法及び Waghorne & Ball 法を参考とし、Skellysolve B の代りに石油エーテルを用いた。

全ステロール

全ステロールは遊離及び結合ステロールを含むのであるが、この結合型ステロールを遊離するため鹼化処理を行なつた。即ち、

抽出液 4~5 ml とり、石油エーテルを加え約 10ml とし 5 ml の 10% KOH-95% EtOH を加え、30分間逆流冷却管を附して湯煎中で加熱、鹼化する。鹼化後石油エーテル及び EtOH を用いて 100ml 分液漏斗に移し、水を加え EtOH 濃度を約 50% にし振盪、静置、石油エーテル層と EtOH-水層とを分別し、EtOH-水層は石油エーテルを加え 2~3 回洗滌する。全石油エーテル層を合し、90% MeOH 溶液で 4~5 回洗滌、混在するキサントフィル及び残存アルカリを除去する。後石油エーテル層を濃縮し 10ml とする。

15ml 容の小遠沈管に 2~4 ml とり、径 2 mm、長さ約 13cm の攪拌棒を挿入、除々に湯煎中で

第 2 表 甘藷ステロールの精製

全ステロール	遊離ステロール	飽和ステロール
抽出液 4~5 ml	抽出液 2~4 ml	抽出液
—石油エーテルを加え 10 ml とする —5 ml 10% KOH-95% EtOH		蒸発乾涸
鹼化 —30分 reflux		クロロホルム 50 ml に溶解
—50% アルコール濃度になる様水添加		共栓三角フラスコ
不鹼化物 =石油エーテル層		—無水酢酸 5 ml —濃硫酸 5 ml
10 ml		振盪 5 分
2~4 ml を小遠沈管にとる←		飽和ステロール =クロロホルム層
蒸発乾涸		—50% EtOH で洗滌数回
—4 ml 0.2% デギトニン・95% EtOH		蒸発乾涸
アルコール蒸発除去		10 ml とする
—80% EtOH 攪拌・洗滌		
遠沈 3,000 r. p. m. 20 min		
デギトニド沈澱		
洗滌 石油エーテルで攪拌・洗滌 遠沈 3~4 回		
ステロール・デギトニド		
微量比色法 Liebermann-Burchard 反応		

蒸発乾涸後 4 ml の 0.2 % デギトニン -95 % EtOH を加え、攪拌、暫時放置後湯煎中でアルコールを蒸発乾燥する。但し、生じた沈澱は完全に乾涸せずやや湿つた状態にとどめ、暫時放置した後、過剰に存在するデギトニンを除くため 4 ml の 80 % EtOH を加え沈澱を可及的に碎き充分攪拌洗滌、3,000 r. p. m. で 20 分間遠心分離し、上清は駒込ピペットで注意して除く。後 4 ml の石油エーテルを加え、攪拌洗滌、3,000 r. p. m. で 15 分間遠心分離、上清は前同様にして除く。この石油エーテル洗滌を 3~4 回繰返し、カロチン及び他のリピッドを除去する。沈澱は湯煎中で乾涸する。

遊離ステロール

抽出液 2~4 ml を鹼化処理せず 15 ml 容小遠沈管にとり、蒸発乾涸しデギトニン溶液を添加する。後の処理は全ステロールの場合と同様に行う。

iii. 発色及び比色

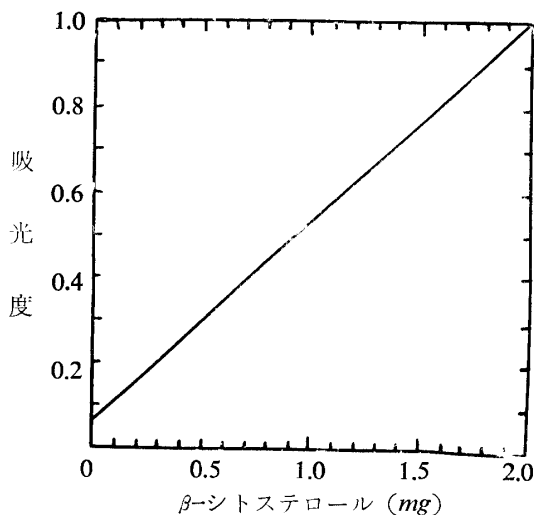
Schoenheimer Sperry³⁾ の試薬を改良せる Idler-Baumann⁴⁾ の Liebermann-Burchard 反応試薬即ち無水酢酸—濃硫酸 20:1 混液を用いた。

デギトニドを沈澱せしめた小遠沈管に 20 ml の氷酢酸を加え、攪拌しつつ湯煎中で除々に加温溶解し、Idler-Baumann の混液 4.2 ml を加えて、攪拌し 25°C に 30 分間放置後、650 m μ で測定する。

ブランクとして0.2%デギトニン溶液を蒸発乾涸し後同様処理する。

iv. 検量曲線(第1図)

β -シトステロール・デギトニドを調製し、 β -シトステロールとして0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50mgに相当するようとり、発色させ、吸光度を測定し作成した。



第1図 検量曲線

v. 飽和ステロール

Wall & Kelley 法に従い行なつた。これは Anderson & Nabenhauer⁵⁾ の研究に基くもので、不飽和及び飽和ステロールのクロロホルム溶液を無水酢酸及び濃硫酸で処理すると不飽和ステロールは酸層に移り、飽和ステロールはクロロホルム層に残る。酸を洗滌除去後、蒸発乾涸し、EtOH 溶液として後、ステロールをデギトニドとして沈澱させ秤量する方法である。

III 考 察

定量法の比較検討及び検量曲線の作成には β -シトステロール及び β -シトステロール・デギトニドを使用した。甘藷中に存在するステロールとしては、最も容易に得られ、又最も含量大と推定されるので、 β -シトステロールを供試した。定量法を抽出、精製、発色及び比色の三段階に分けて検討する。

抽出法の検討

抽出操作において問題となることは、生甘藷ステロール抽出の際、アセトン抽出溶剤として用いるが、そのアセトン溶液に溶存するステロールを石油エーテル溶液に転溶する条件である。即ち水を加えて石油エーテル層とアセトン・水層とを分離する際のアセトンの濃度である。

そこで、 β -シトステロールを0.40mg含むものを4個、0.60mg含むものを4個、1.00mg含むものを4個宛秤取し、各群を80, 70, 60, 50%にアセトン濃度になる様に加水分水し、振盪放置後石油エーテル層を小遠沈管に移し、蒸発乾涸後0.2%デギトニン液4ml加えデギトニド沈澱をとり、発色、650m μ で吸光度を測定し比較した結果を第3表に示したが、アセトン濃度が50~60%の場合には、殆ど転溶することが明らかである。しかし乍ら、アセトン-水層を更に2回石油エーテルで洗滌して、完全にステロールを転溶する。

第3表 β -シトステロールの石油エーテルへの転溶に及ぼすアセトン濃度の影響

アセトン濃度 % 回収量及び率	80		70		60		50	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
ステロール 添加量 mg								
0.40	0.36	90.0	0.38	95.0	0.39	97.5	0.41	102.5
0.60	0.53	88.3	0.57	95.0	0.59	98.3	0.60	100.0
1.00	0.90	90.0	0.95	95.0	0.99	99.0	1.04	104.0

ステロール精製法の検討

全ステロールは、鹼化処理して結合型ステロールを遊離して定量操作を行う。

鹼化後不鹼化物を石油エーテル層に転溶させる場合も、アセトン溶液から石油エーテル液に転溶する場合と同様、苛性カリ・アルコール溶液のアルコール濃度が問題となる。従つて、 β -シトステロールを 0.40, 0.60, 1.00mg を各 4 個宛秤取し、夫々 80, 70, 60, 50 % のアルコール濃度になる様に加水し、石油エーテル層と苛性カリ・アルコール・水層とを分別後石油エーテル層を小遠沈管にとり、蒸発乾涸し、デギトニンを加えデギトニドを生成させ、発色後 650m μ で吸光度を測定して比較した結果を第 4 表に示した。アルコール濃度 50 % の場合 95 % が石油エーテルに転溶するので、この苛性カリ・アルコール層を更に 2 回石油エーテルで洗滌すると完全に転溶する。

第 4 表 β -シトステロール鹼化処理後の石油エーテルへの転溶に及ぼすアルコール濃度の影響

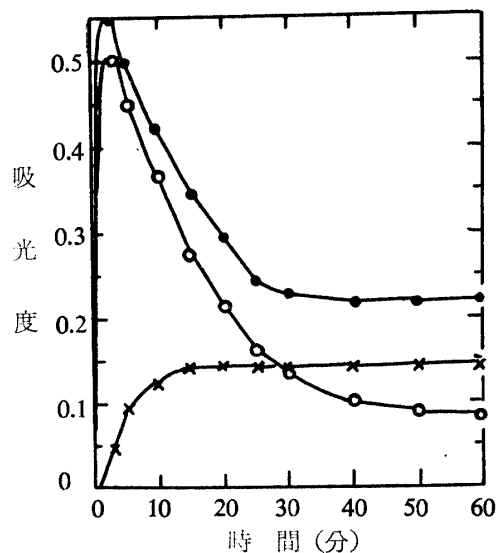
アルコール濃度 % 回収量及び率	80		70		60		50	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
ステロール添加量 mg								
0.40	0.06	15.0	0.10	25.0	0.30	75.0	0.38	95.0
0.60	0.05	8.3	0.14	23.3	0.49	81.3	0.58	96.7
1.00	0.12	12.0	0.26	26.0	0.72	72.0	0.95	95.0

近年コレステロール定量にコレステロールをピリジニウム塩として沈澱させ、精製する方法が報告されたが、植物ステロールのピリジニウム塩の溶解度は不明であり又実際の条件も知られていない。従来より利用されているデギトニンは全ての植物ステロールに作用し、難溶性のデギトニドを生成することが知られているのでデギトニンの沈澱を生ぜしめ、精製を行う方法をとることにした。Wall & Kelley 法及び Waghone & Ball 法を参考にした。

ステロールはデギトニドとして沈澱するが、不純物混在による測定値への影響が当然考えられる。甘藷においては、カロチン類をも供試するので含まれるカロチノイド色素が Liebermann-Burchard 反応により濃青藍色を呈することから、色素のステロール定量に及ぼす影響を検討せねばならない。

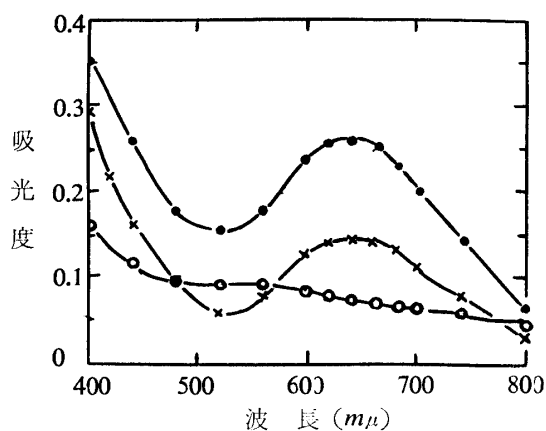
そこでカロチンの影響を見るため、合成 β -カロチン 0.4mg に β -シトステロール・デギトニド 1.2mg (β -シトステロールとして 0.3mg) を加えた場合、合成 β -カロチン 0.4mg のみの場合、 β -シトステロール・デギトニド 1.2mg のみの場合の三者夫々に氷酢酸 2.0ml、無水酢酸-濃硫酸混液 4.2ml を加え、呈色度の経時変化及び発色後 50 分後吸収曲線を測定した結果を第 2, 3 図に示した。

カロチンの混在する場合は、呈色度は添加直後が最大で、後急激に低下し 30~40 分後にはその変化は殆ど見られなくなる。一方、カロチンを含まぬ場合は徐々に増加し、約 15 分後は変化せず安定



第 2 図 Liebermann-Burchard 反応による呈色度の経時変化

- β -シトステロール・デギトニド (1.2mg) + β -カロチン (0.4mg)
- ×—× β -シトステロール・デギトニド (1.2mg)
- β -カロチン (0.4mg)



第3図 Liebermann-Burchard 呈色試薬添加50分後のステロール・ヂギトニド及びカロチンの吸収曲線

- β -シトステロール・ヂギトニド (1.2mg) + β -カロチン (0.4mg)
- ×—× β -シトステロール・ヂギトニド (1.2mg)
- β -カロチン (0.4mg)

Wall & Kelley はカロチンはヂギトニド沈澱に固く吸着され、洗滌しても除去は完全になし得ないと述べている。抽出液を蒸発乾涸して0.2%ヂギトニン95%エタノール液4.0mlを添加後攪拌、湯煎上でエタノールを蒸発乾涸するが、波澱を完全に乾涸するとカロチンは、実際に強く吸着されその溶出除去は容易ではない。けれども、ヂギトニド沈澱を蒸発乾涸する際、完全に乾涸させず、やや湿った状態にとどめるならば、後の石油エーテルで洗滌する際、沈澱を細かく砕き、充分攪拌洗滌することによつてカロチンは殆ど完全に除きうる事が判明した。

第5表は、 β -シトステロールを二群の小遠沈管に夫々0.40, 0.60, 1.00mg宛、更に合成カロチンを1.0mg宛加え、一群は沃素処理群、他の一群は未処理群とし比較した結果を示したものである。

第5表 沃素処理の影響 (カロチン 1.0mg 添加)

回収量 及び率 ステロール 添加量 mg	沃 素 処 理		沃 素 未 処 理	
	mg	%	mg	%
0.40	0.39	97.5	0.41	102.5
0.60	0.59	98.3	0.62	103.3
1.00	1.03	103.0	0.98	98.0

沃素によるカロチンの除去法は、5mlの0.2%沃素-石油エーテル液を加え、カロチン沃化物を沈澱させるため、 -20°C で30~60分放置後、Super Celを薄く敷いた小ヌツチエで濾過、冷却せる石油エーテルでかるく洗滌し、濾液は分液漏斗に移し、5mlの10%チオ硫酸ソーダ溶液を加え、激しく振盪して過剰の沃素を除去する。石油エーテル層は10~20mlの水で数回洗滌、後90%メタノール10~20mlを加え一回洗滌する。石油エーテル層は、薄黄色である。

石油エーテル溶液は小遠心管に入れ蒸発乾涸して、ヂギトニドの沈澱を生成させる操作に移り、後発色、測定を行う。

一方未処理群は、ステロール及びカロチン混合溶液の溶媒を蒸発乾涸し、ヂギトニンを加え、前

な呈色を示す。

以上の様にカロチンの存在は、実存のステロールの吸光度より高い値を与える事が判明したので、カロチノイドの除去を考慮せねばならない。

Wall & Kelley は、カロチン除去法として、Zechmeisterの見出した、カロチンが高度に不飽和な化合物であるため、沃素とすみやかに反応し不溶性のカロチン沃化物を形成することを利用した。即ち、0.2%沃素-Skelleysolve B液を加え、 -20°C に30~60分放置し、沃化物を沈澱させ、濾過後濾液に10%チオ硫酸ソーダ溶液を加え、振盪してチオ硫酸ソーダ層を除き、水洗、90% MeOHで洗滌する方法である。

カロチノイドは有機溶剤に易溶であり、従つてヂギトニド沈澱を石油エーテルで洗滌する過程において、色素を除去しうるならば、沃素処理は省いてもよいわけである。

述の方法で 3~4 回洗滌する。後発色，測定を行う。

結果は，両者間に殆ど差は認められない。

Liebermann-Burchard 反応に基く比色法

Idler & Baumann の使用した，無水酢酸—濃硫酸 (20: 1) 混液を用いた。

β -シトステロール・デギトニド 1.2 mg を秤取し，氷酢酸 2.0ml に溶解後，混液 4.2ml を加え攪拌し，25°C で保温しつつ色度の経時的变化を検討した結果を第 2 図に示し，混液添加 30 分後に吸収曲線を測定した結果を第 3 図に示した。

吸収極大は 620~680m μ に見られる。Idler & Baumann や Wall & Kelley 等は，620m μ で測定しているが，甘藷のステロールは後述の如く，640—680m μ に極大を有するので波長を変え 650 m μ で測定する事にした。

呈色試薬即ち混液は毎回新調する必要がある。長時間放置後の混液では，発色が不十分である。

又混液添加後保温する必要がある，低温であると十分な発色は期待できない。25°C に保温した場合と 5~10°C で行なった場合と比較すると，呈色度は，前者は 10~15 分後に最大となり，後変化しないが，後者では 30 分後で前者の約 1/10 程度，3 時間後でも最大とならない。

Liebermann-Burchard 反応は不飽和ステロールに作用し呈色反応を示すが，飽和ステロールは呈色しない。従つてこれは，重量法によらねばならない。

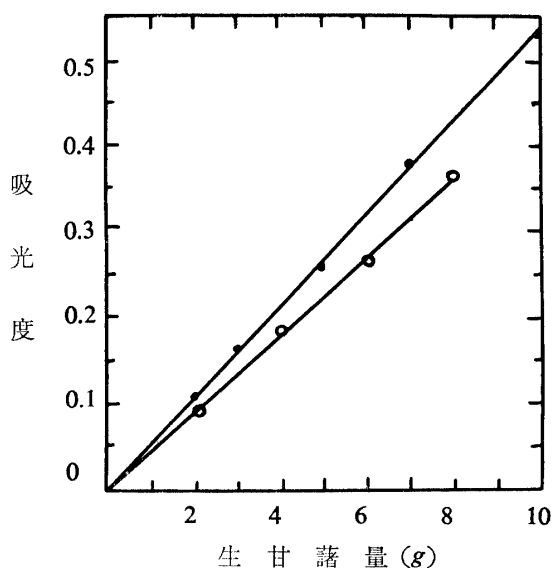
定量法には，この他重量法，滴定法があり比色法にも，他の呈色試薬を用いる方法がある。しかし乍ら，何れも一長一短があり，比較的簡単且つ短時間に定量しうる方法は，比色法であるといえる。

Zak et al が 1954 年に報告した FeCl₃- 酸液を呈色試薬として用いる方法は，⁷⁾ β -シトステロールについては，吸収極大を 410, 480m μ に有する青紫色を呈し，10 分後には呈色度は最大となり後変化せず安定であり，植物ステロール定量に適用しうるかも知れないと考えられるが，全ての植物ステロールについて完全に反応するか否か，未だ明らかにされておらないので，Liebermann-Burchard 反応に基く比色法を適用したが，更に検討する価値はあると考えられる。

甘藷ステロールについての検討

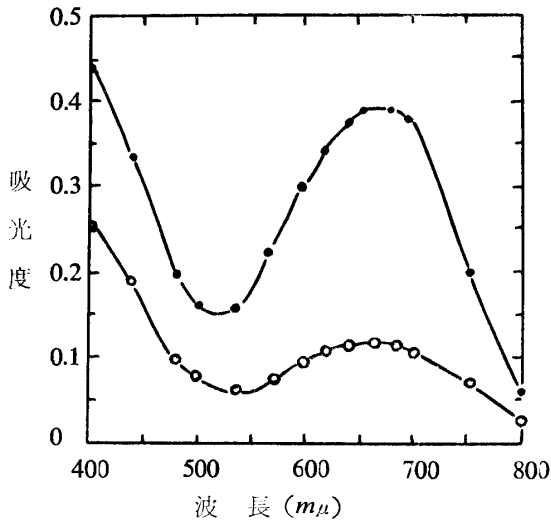
以上の様にして，検討した方法を，甘藷ステロール抽出液について検討した。

生藷 (隼人種) マッシュを 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 10.0g 秤取し，本法に従い，全ステロール及び遊離型ステロールを測定した結果は第 4 図の如くで，直線関係が認められ，又その発色後の吸収曲線は第 5 図の通りで全ステロールは 640~680m μ に極大が見出される。 β -シトステロールのそれとは若干ずれが認められるが，甘藷ステロールが β -



第 4 図 甘藷量と含まれるステロール呈色度との関係

●—● 全ステロール
○—○ 遊離ステロール



第5図 甘藷ステロールの Liebermann-Burchard 呈色試薬添加 30 分後の吸収曲線
 ●—● 全ステロール (7g の生甘藷から抽出)
 ○—○ 遊離ステロール (2g の生甘藷から抽出)

シトステロール以外のステロールをも混在することを示すものと考えられる。遊離型ステロールは 620~680 $m\mu$ に極大を有する。

全ステロール含量
 0.116 mg/g 生藷(隼人) 100 %
 遊離ステロール含量
 0.10 mg/g 86.2 %

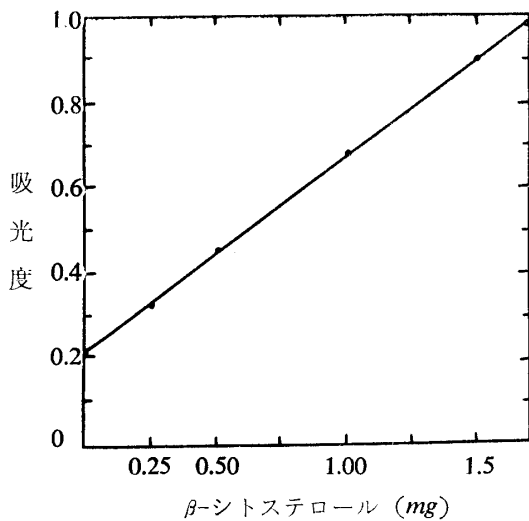
飽和ステロールは粉末 30g からの抽出液について定量したが秤量しうるだけの量は存在しなかつた。

回収率の検討

本法の信頼度を検するため、 β -シトステロール 0.40, 0.60, 1.00, 1.50, 2.00mg をとり、全ステロール定量法に従つて処理し、回収率を試験した。

第 6 表 回 収 率

No. 回収量及び率 ステロール 添加量mg	1		2		3	
	mg	%	mg	%	mg	%
0.40	0.38	95.2	0.39	97.5	0.41	102.5
0.60	0.61	101.2	0.60	100.0	0.58	96.7
1.00	0.97	97.0	1.05	105.0	1.02	102.0
1.50	1.47	98.0	1.49	99.3	1.47	98.0
2.00	1.96	98.0	2.01	100.5	1.98	99.0



第6図 甘藷ステロール抽出液に β -シトステロールを添加した場合の影響
 但し抽出液は β -シトステロールとして 0.5mg のステロール又 β -カロチンとして 0.2mg のカロチンを含む

結果を第 6 表に示したが、97.0~105 % の回収率を示し平均 99.3 % で充分信頼がおけると云える。

更に甘藷抽出液に β -シトステロールを加え影響を試験した。

即ち β -シトステロールとして 0.5mg 含み、カロチン約 0.2mg 含む抽出液に液に β -シトステロール 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 1.70mg を夫々添加し、本法に従い比色した結果を第 6 図に示したが、殆ど完全な回収率を示した。

定量可能な限界

β -シトステロールとして、0.2mg ~ 2.0mg の範囲であれば、充分目的を達せられる。

IV 要 約

WALL & KELLEY の方法に基く甘藷根塊中のス

テロール定量法について述べた。

1. ステロールの抽出は、生甘藷ではアセトン及び石油エーテルで行い、石油エーテルへのステロールの転溶には、水を加えてアセトン濃度を50~60%とする。風乾物からの抽出は石油エーテルを用い、ソックスレー抽出器で行う。

2. 結合ステロールはKOH-EtOHで鹼化し、石油エーテルへの転溶はアルコール濃度を50%にすると約95%が移行し、更に石油エーテルでアルコール層を2回洗滌すると、完全である。

3. ステロールはデジトニドとして沈澱させ、石油エーテルで洗滌して、カロチンやリビッドを除く。

4. Liebermann-Burchard 反応に基き発色後、 $650m\mu$ で測定

5. 甘藷全ステロールは、発色後 $640\sim 680m\mu$ に、遊離ステロールは $620\sim 680m\mu$ に極大を有する青藍色を呈する。

6. 回収率は、平均99.3%

終りに臨み、終始御懇切な御助言を戴き、御校閲を賜った山本喜男教授に対し、深謝する。

文 献

- 1) WALL, M. E. & E. G. KELLEY, *Anal. Chem.*, **19**, 677 (1947).
- 2) WAGHORNE, D. & C. D. BALL, *ibid*, **24**, 560 (1952).
- 3) SCHOENHEIMER, R & W. M. SPERRY, *J. Biol. Chem.* **106**, 745 (1934).
- 4) IDLER, D. R. & C. A. BAUMANN, *ibid*, **203**, 389(1953)
- 5) ANDERSON, R. J. & F. P. NABENHAUER, *J. Amer. Chem. Soc.*, **46**, 1957 (1924).
- 6) ZECHMEISTER, L., "Carotenoide" Berlin. Julius Springer 1934.
- 7) ZAK, B., N. MOSS, A. J. BOYLE & A. ZLATKS, *Anal. Chem.*, **26**, 773 (1954).

Résumé

For the quantitative determination of the sterols in sweet potato tuber (*Ipomoea batatas*), WALL & KELLEY's method was modified.

1. Sterols were extracted from raw materials by means of acetone and petroleum ether, followed by addition of water to the extracts. When the concentration of acetone in water was 50-60%, the sterols were completely transferred to petroleum ether layer.

In the cases of dried materials, it was treated with petroleum ether.

2. After saponification of the sterols of combined form in the extracts with alkaline ethanol, an equal volume of water to the ethanol was added in order to transfer the unsaponifiable ones into petroleum ether layer. The aqueous one was washed twice with petroleum ether.

3. The sterols were precipitated with digitonin-ethanol solution. Thus resulting digitonide was washed with petroleum ether to be free from carotenes and lipids which interfere with the following colorimetry on the basis of Liebermann-Burchard reaction.

4. The resulting colors of total and free sterols, of which absorption maximum was $640\sim 680m\mu$ and $620\sim 680m\mu$ respectively, were estimated at $650m\mu$ with a spectrophotometer.

5. The average of recoveries was 99.3%.