

牛の脂肪組織中に含まれる β -カロチンの簡易定量法について

加 香 芳 孝・小 島 正 秋

On the Simplified Method for the Determination of β -Carotene in Beef Adipose Tissues

Yoshitaka KAKÔ and Masaaki KOJIMA

(Animal Products Processing Research Laboratory)

I. 緒 言

青草多給肥育牛の屠体皮下脂肪には、黄色を呈するものがたまたまみとめられ、それは白色のものよりも枝肉としての市場価値を低下させられる場合が多い。この皮下脂肪黄色化の原因としては青草より移行するカロチノイドやキサントフィル、クリプトキサニン等によるものであることは、今日では明らかにされてきている。そして化学分析の結果によると、黄色牛脂中に溶存する色素の約80%は α -、 β -、 γ -カロチンであり、その中で β -カロチンは約65%程度の割合を占め、最も多いことも明らかにされている¹⁾。このカロチン類はいずれも赤色ないしは赤紫色を呈する物質であるが、量的に最も多く存在する β -カロチンが牛脂黄色化の主要原因となっているものと思われる。

このように黄色牛脂は青草に由来する β -カロチンを多量に含むもので、決して病変によるものではなく²⁾、われわれ人間がこの黄色牛脂を牛肉と共に食用に供することは、そのもつビタミンA効果からみても栄養学的にはむしろ好ましいことであるが、何分にも枝肉として、あるいは牛脂としてみた場合、習慣上低品位のものとして価値づけられている現状である。

鹿児島地方では古くより肉牛の肥育を行なう場合、大豆を多給する習慣があり、その結果として屠殺後枝肉とした場合、皮下脂肪が黄色を呈するのではなからうかといわれたり、また最近のわが国の飼料事情の反映として、青草のみによる和牛の粗放飼育が盛んになってきたが、この結果としても黄脂牛の出現がしばしばみられるので、鹿児島県当局としては、この問題解決のために数年前より努力を重ねているようであり、現在では一応の対策が打出されてきつつあるようである。

このような状況下で著者らもしばしば牛黄脂中のカロチン含量の定量を行なう必要にせまられたが、従来、脂肪組織中のカロチンを抽出分離し定量する方法

は報告が少なく、わずかに見出される報告¹⁾にもカラムクロマトグラフィーを用いる可成り複雑な方法³⁾⁴⁾がとられており、現状で必要とされるような実際問題に対処出来るような簡便かつ迅速な方法は見出されない。そこで著者らは多数の試料について同時にかつ迅速に β -カロチン含有量を定量し得る方法を考案し検討したので、その結果について報告する。

II. 実 験 方 法

著者らはまず藤田ら⁴⁾の報告している筋肉組織中のビタミンA定量法を参考として、脂肪組織の鹼化を行ない、その際の不鹼化物を石油エーテルで抽出し、この抽出液について β -カロチンの極大吸収を示す波長の一つである450 $m\mu$ における吸収⁵⁾を測定することにより定量を行なおうと試みた。

ところが、藤田らの方法によると組織の鹼化には、30% KOH-エタノールを使用することになっているが、KOHはこのような高濃度になるとエタノールに作用して褐色物質を生成し、しかもこの物質は一部石油エーテルに移行する欠点が認められた。その結果としてしばしば盲検値が被検試料の測定値より大となるような矛盾が生ずるため、実測上きわめて不都合であった。

そこでこのKOH濃度を低下させ、褐色物質の生成を抑制するとともに、低濃度KOH-エタノールで十分鹼化がなされる条件を検索した。また鹼化を行なう際、カロチンの酸化を防止するためヒドロキノンを使用する例があるが¹⁾⁴⁾、これの使用の適否、もしくはこれに代替するものについても検討した。

以上の検討の結果得られた最も適当と思われる条件にもとずき、分析方法を定め、その方法によって β -カロチンの標準曲線の作製、回収試験を行なった。

1. 方法の検討

藤田ら⁴⁾は動物筋肉組織中のビタミンA定量を行なう場合、組織脂肪の鹼化方法として30% KOH—95%

エタノールを使用している。牛脂肪組織中のカロチン含量を測定する場合も試料中に被鹼化物が相当多く含まれこれに近い条件にあるので、このままの方法をとって見たところ、まず鹼化を開始する以前に 30% KOH—エタノールはすでに黄褐色化しはじめており、試料 2 g に 20 ml の 30% KOH—エタノールを加えて所定の 75°C の水溶液中に浸し 50 分間反応させるとその褐色化はさらに進行した。そしてこの褐色物質は、以後の石油エーテルによる不鹼化物抽出の段階で一部抽出され、その結果として盲検値が試料測定値より高い値を示す場合さえ認められた。そこでこの褐色物質生成の防止方法、酸化防止剤添加の可否、適当する鹼化条件などについて以下のようにして検討した。

1) KOH 濃度の影響

以上のべたような褐色物質生成の原因は 30% という高濃度の KOH のためにエタノールが一部分解されるためであろうと考えられるので、まずこの濃度を低下させることを試みた。すなわち、一定量の被鹼化物を鹼化させるのに要する KOH の絶対量は不変であるという考え方にもとずき、30% KOH—エタノール 20 ml に対応するものとして、20% KOH—エタノール 30 ml、10% KOH—エタノール 60 ml を使用して比較実験を行なった。試料としては牛皮下脂肪組織各 2 g を用い、盲検も含めて反応させた。また加熱温度および時間も影響すると考えられるので藤田らの用いた温度より 5°C 低い 70°C で、組織の溶解が完全となる 90 分間反応させた後、その呈色状態を観察したところ、反応混合液にはいずれも黄色ないし黄褐色の呈色があったが、その呈色度の強さは KOH 濃度の高いものほど強い傾向があり、10% KOH—エタノール溶液の場合にはほぼ黄色のみの呈色であった。つぎに反応後の混合液を流水で冷却後、石油エーテルを用いて不鹼化物抽出操作を行なったところ、30%、20%

KOH 濃度の混合液からは黄色物質が石油エーテル層に移行したが 10% KOH 濃度のものでは殆んど移行しなかった。この点は特に盲検法で著しく認められた。いまその実測例を示すと第 1 表のとおりである。

2) ハイドロキノンの影響

脂肪中のビタミン A またはカロチノイドの定量を行なう際、酸化防止剤としてハイドロキノンを鹼化用 KOH—エタノールに加えて用いる¹⁴⁾ 例がみられるが、著者らは当初この方法を用いてみたところ、脂肪組織の試料についてはさほどではないが、盲検値にこのハイドロキノンの添加による影響が顕著にあらわれることをみとめた。すなわちハイドロキノンを加えたものは、加えないものより盲検値が高くなる傾向がみとめられた。これはハイドロキノンの KOH とエタノールの相互作用に何らかの触媒的作用をもつのではないかと推察された。しかもその傾向は KOH 濃度が高い程顕著であり、KOH 濃度を下げてもやはり多少の影響が残るのではないかと考えられた。そこでこのような薬品の添加をやめ、不活性の窒素ガスを反応容器中に満す方法に切換えて実験したところ結果はきわめて良好であった。従ってハイドロキノンの使用をやめ、窒素ガスのみを使用することとした。

3) 鹼化温度と時間の影響

上述の石油エーテル移行性の黄褐色物質生成は温度ならび反応時間も関連があるように思われるので 10% KOH—エタノールを用いて、藤田らの用いている 75°C より低い、50°, 60°, 70°C の温度について比較実験を行なってみたが、一般に脂肪組織は 70°C 以下では溶解し難いことが観察され、鹼化効果も不良のようであり、少なくとも 70°C 以上の温度が必要のように思われた。そこでその最低限の 70°C をえらび鹼化反応を行なわせてみると、反応時間と共にやや黄色度が強まるが、90 分後においても石油エーテル移行性の物質は殆んど形成されないようであった。それで反応を十分進ませる意味から 30 分毎に振盪し 90 分間反応させることとした。

2. 定 量 法

以上の検討の結果から導かれた条件にもとずき著者らは β -カロチンの定量法をつぎのように定めた。

脂肪組織（血液や脂肪以外の組織をよく取除き、3 mm の孔を有するプレートの肉挽器で一回細切しよく混合したもの）2 g または蒸留水 2 ml（盲検）を 100 ml 容共栓試験管にとり、これに 10% KOH—95% エタノール溶液 60 ml を加え、窒素ガスを吹込んでから内容をよく混合し、70°C の水浴に浸して 30 分毎

Table 1. The absorbance values found as the blank values for the β -carotene determination in cases of the saponification with 30%, 20% and 10% KOH-95% ethanol, at 450 μ in petroleum ether.

KOH concn. (%)	Absorbance
30	0.017~0.082
20	0.010~0.064
10	0.001~0.005

These absorbance values are summarized on six experimental data.

に振盪しつつ 90 分間鹼化を行なう。鹼化終了後一旦流水に浸して冷却した後、内容を 200 ml スキープ型分液ロートに移し、共栓試験管は石油エーテル 20 ml で 2 回洗い同じ分液ロートに加える。ついでこの分液ロートに窒素ガスを吹込み軽く振盪し、しばらく静置して二層が明確に分離するのを待って下層の鹼化物層（水層）を他の同容分液ロートに移す。先と同様にして石油エーテル 20 ml で 3 回試験管を洗い、逐次先の鹼化物層の入っている分液ロートに加え窒素ガスを吹込んでから軽く振盪し、しばらく放置して二層の明確な分離をみてから今度は下の水層（鹼化物層）をすてる。ここで 2 コの分液ロート中に残されている石油エーテル層は一つに合せ、空になった方の分液ロートは 10 ml の石油エーテルにて洗滌し洗液は他方に合する。

いうまでもなくこの石油エーテル層に不鹼化物が溶存し、カロチンもこの中に含まれている。

この石油エーテル層は約 40 ml の蒸留水で 4 回洗滌するとほぼ中性となるが、今度は石油エーテルと水とのエマルジョンができ、明確な分離が困難となってくるので、ここで 1~2 ml のメチルアルコールを加えてエマルジョンを破壊し明確に二層にわけてから水層のみをすてる。つぎに石油エーテル層を 100 ml 容ナス型フラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて 40°C で石油エーテルを減圧留去させる。若しこの時水が残って完全に乾涸せぬ場合は少量のメタノールを加えてから減圧留去を繰返す。完全に乾涸したならば、石油エーテル 10 ml を加えて不鹼化物を定量的に溶解し、これについて β-カロチンの石油エーテル中の極大吸収を示す波長 450 mμ における吸収を、日立 Model 101 分光光度計を用いて測定する。得られた測定値は後述の標準曲線もしくはそれより導かれた

実験式にあてはめて β-カロチンの実量を計算する。

結果ならびに考察

1. 標準曲線

定量の基礎となる標準曲線作製のために、Merck 社製 β-カロチンを購入し使用した。その結果第 1 図に示したように β-カロチンをそのまま石油エーテルに溶解した場合と、一旦鹼化操作を経由した場合とを同時にプロットしたが両者はほとんど一致し、10γま

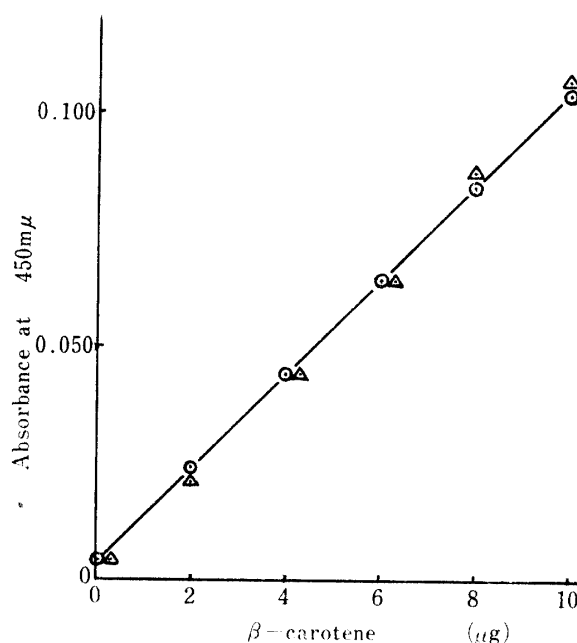


Fig. 1. Standard curve for β-carotene determination.

- ; β-carotene-petroleum ether solution itself,
- △; β-carotene passed through the saponification process in 10% KOH-95% ethanol at 70°C for 90 min.

Table 2. Results of the recovery test about β-carotene added to the beef hypodermic adipose tissue.

β-carotene added (μg)	Absorbance at 450 mμ		Differences between sample and blank value	Recovery (%)
	Standard	Sample		
0	0.000	0.040	—	—
2	0.020	0.059	0.019	95
4	0.040	0.078	0.038	95
6	0.060	0.097	0.057	95
10	0.100	0.139	0.099	99

1. The samples were obtained from the hypodermic adipose tissue of an old Japanese black cattle.
2. β-carotene was added to each sample as the petroleum ether solution of 2μg/ml.
3. Each absorbance value in the table indicates the difference between the measured value and the blank value.

での範囲内で Beer & Lambert の法則に適合することが明らかとなった。従って上述の方法で分析すれば酸化による損失はほとんどないことがうかがわれるし、一方盲検値も低く矛盾する結果の生ずる恐れは全くないことが確認された。

2. 回収試験

つぎに老廢牛の皮下脂肪を例にとり、これに既知量の β -カロチンを一旦石油エーテルに溶解し段階的に添加してその回収性を検討した。いまその結果を示せば第2表のとおりである。

表より明らかな通り 95% 以上の回収率を得ることができた。

このように本報にのべた牛脂肪組織中に含まれる β -カロチンの定量法は比較的簡便で、しかも安定した方法であり、化学的信頼性も高いものと思われる。

しかしながらこの方法ではカラムクロマト法によるような厳密な分離過程を経ないので純粋な β -カロチンのみの定量法ではないことはいうまでもないが、実際問題として多数の試料を同時に、しかも短時間で分析する必要のある場合、概略の β -カロチン量を求める方法としては十分活用し得るものと思われる。

摘 要

本報は牛脂肪組織中に含まれている β -カロチンの簡易かつ迅速な定量法についてのべたものである。

従来動物組織中に存在するカロチノイドの定量を行なった報告は少ないが、報告されているものの中でもその定量法は非常に複雑であり、実際問題に対処して

一時に多数の試料について定量を行なうことは困難である。

そこでわれわれ藤田らの報告している筋肉組織中のビタミンA定量法に準拠してより簡単かつ迅速な方法を考案し検討した。

すなわち、牛脂肪組織をまず 10% KOH—95% エタノール中で 70°C、90 分間鹼化させ、冷却後不鹼化物を石油エーテルで抽出し、ついで石油エーテルを一旦減圧留去後、一定量の石油エーテルに溶解し、この溶液について β -カロチンの極大吸収の一つである 450 $m\mu$ における吸収を測定するという方法である。これらの処理過程はすべて窒素ガスを封入して行なったが、その結果良好な標準曲線、回収率が得られた。

この方法は純粹に β -カロチンのみを定量する方法とはいえないが、牛脂肪組織中に天然に存在するカロチノイドの中で β -カロチンは最大の比率を占めていることが知られているので、その概略の量を捉えることが可能であり、実際問題に対処する上で有効な方法であると思われる。

引用文献

- 1) MIRNA, A. : *Fleischwirtschaft*, **12**, 168 (1960)
- 2) FLEISCHMANN, O. : *Fleischwirtschaft*, **7**, 722 (1955)
- 3) PURCELL, A. E. : *Anal. Chem.*, **30**, 1049 (1958)
- 4) 藤田・青山・川口：ビタミン，**6**，882 (1953)
- 5) 藤田秋治：ビタミン定量法，185 (1955)，南江堂。

Summary

This report provides a simplified method for the determination of β -carotene in the beef adipose tissue. Hitherto, only a few reports have been found, providing a method by which carotenoids contained in the animal adipose tissue can be determined, perhaps owing to the fact that, in general, the chemical determination method of carotenoids is so complicated as to make it difficult to apply it on many samples at the same time.

So we devised a simplified method for the determination of β -carotene in the beef adipose tissue, by modifying the determination method of vitamin A described by Fujita et al.

This is outlined as follows; beef adipose tissue was, at first, saponified at 70°C for 90 min in 10% KOH—95% ethanol, and then the unsaponified substances were extracted with petroleum ether.

After the petroleum ether in the extracted solution was once removed away in vacuo at 40°C, the remaining residues were redissolved in the definite volume of petroleum ether and the absorbance of this solution at 450 $m\mu$, a wave length at which β -carotene indicates spectrophotometrically, a maximal peak in petroleum ether solution was measured. Throughout all the experimental processes, nitrogen gas was used for avoiding the oxidation of β -carotene.

As the result from the above, we could obtain a fairly well standard curve and recoveries.

Though we do not regard this method as the only one by which the genuine β -carotene is to be analyzed, it is presumed that the quantity of β -carotene contained in the beef adipose

tissue can be determined by this method for the most part, as no ratio of any carotene existing naturally in the beef adipose tissue is larger than that of β -carotene occupied in the carotenoids.

Thus, this method seems to be very useful in dealing with the practical problems and the numerous samples at the same time.