

Sterol の 定 量 に 就 て

近 藤 研 究 室

森 茂 樹

緒 言

Sterols の定量法としては Liebermann 及び Burchard の比色法及び Windaus の Digitonin 法をその主なるものとして擧げることが出来る。Digitonin 法は1910年 Windaus¹⁾ の創案以來幾多の改良法が案出せられて居るが原理的には何等變るところなく二十數年來の常法とせられて居る。この方法は Sterol と Digitonin とによつて生ずる Digitonide を秤量する方法であるが、Digitonide の微量を秤量する場合には定量結果の不正確なることと、沈澱生成の緩なるがために定量を迅速に行ひ難い缺點がある。然るに Bloor²⁾ は氏の創案せる脂質の酸化定量法と Digitonin 法とを組合せ微量の Cholesterol を正確に定量する方法を提出した。Bloor の方法とは Cholesterol digitonide を規定クロム酸の過剰を加へて完全に酸化分解せしめ、反應後殘餘のクロム酸を滴定により定量し酸化に要したクロム酸の量より Cholesterol の量を算出する方法である。

Bloor の方法は近年同氏の指示の下に Okey,³⁾ Yasuda⁴⁾ 等が改良を加へ現在 Cholesterol の微量定量法としては最も完全に近き方法と思はれる。

Sitosterol, Stigmasterol, Ergosterol 等の Phytosterol が難溶性の Digitonide を生成することは既知のことであり、亦從來その定量にも Digitonin 法が用ひられて居る。けれども此の方法による時は常に必ずしも満足なる結果を得られないことは想像するに難くない。然るに筆者は Phytosterol の定量に Bloor 法を應用して微量をも正確迅速に定量し得ることを證明し得たのである。以下、實驗成績を記して同學の士の参考に供しやうと思ふ。

實 驗 成 績

1) 定 量 方 法

定量方法の原理は Sterol に Digitonin を作用せしめた時に生ずる難溶性の Digitonide を分離して之にクロム酸を作用せしめ酸化に要したクロム酸の量より Sterol の量を算出するのである。今定量に用ふる試薬を記せば次の通りである。

(a) 試 薬 :— 試薬は下記の如きもので Okey⁵⁾又は Yasuda⁶⁾の用ひたるものと大體同様である。

- (1) Absolute Ethyl alcohol
- (2) Petroleum ether (b. p. 40—60°)
- (3) 1 n Potassium bichromate
- (4) 0.1 n Sodium thiosulphate
- (5) 10% Potassium iodide
- (6) 1% 澱粉液
- (7) Nicloux 試薬: AgNO₃ 5g を H₂O 25 cc に溶解し, K₂Cr₂O₇ 5g を H₂O 50 cc に溶解し, 兩液を混合して Silver bichromate を沈澱せしめ, 之を遠心分離し水にて2回洗滌し乾燥せずして 500 cc の conc. H₂SO₄ を加へて溶解したるもの
- (8) Sodium ethylate : Metallic Sodium 2.5 g を absol. alcohol 100 cc に溶解せるもの
- (9) 10% H₂SO₄ 水溶液
- (10) 洗滌せる炭酸瓦斯
- (11) 0.5% Digitonin 酒精溶液
- (12) Acetone
- (13) Ether
- (14) 標準 Sitosterol 溶液 : 大豆油滓より分離せる Sitosterol-d-glucoside⁷⁾ を加水分解して調製せる Sitosterol (m. p. 138°C) 0.1 g を 90% 酒精 100 cc に溶解したるもので, この溶液 1 cc は Sitosterol 1 mg を含有す。
- (15) 標準 Sitosterol stearate 溶液 : Ritter⁸⁾ の方法により大豆 Sitosterol と Stearic acid とを 200°C に於て反應せしめ, 調製せる純 Sitosterol stearate (m. p. 95—100°C) 0.1 g を Ether, alcohol (1:1) 混液 100 cc に溶解したるものでこの溶液 1 cc は Ester 1mg を含有す。

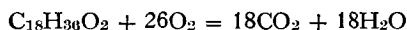
(b) 計算法 :— 有機化合物を適當の條件の下にてクロム酸を作用せしめれば完全に酸化せられて CO₂ と H₂O とに分解する。



即ち上式により K₂Cr₂O₇ 1 分子の中 3 O だけ酸化にあづかるわけである。

今例へば Stearic acid (C₁₈H₃₆O₂) が完全に酸化分解するときの反應式を示せば下式の如

くである。

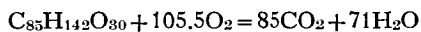
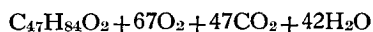
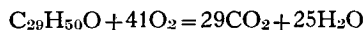


この関係により Stearic acid 1 mg を完全に酸化するに要する 0.1 n $K_2Cr_2O_7$ 液の量 (cc) は下の如くにして算出し得る。

Stearic acid (分子量 284.29) 1 分子を酸化するに要する 0.1 n $K_2Cr_2O_7$ は $26 \times 4 \times 10 \times 1000$ cc, さすれば Stearic acid 0.001 g を酸化するに要する 0.1 n $K_2Cr_2O_7$ の量は

$$\frac{26 \times 4 \times 10 \times 1000}{284.29 \times 1000} = 3.66 \text{ cc}$$

同様にして Sitosterol, Sitosterol stearate, Sitosterol digitonide 等が完全に酸化せられる場合の反応式は夫々下の如くで



これより各 1 mg を酸化するに要する 0.1 n $K_2Cr_2O_7$ の量を算出すれば夫々下表の如くである。

	分子式	分子量	0.1 n $K_2Cr_2O_7$
Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	414.50	3.96 cc
Sitosterol stearate	$C_{47}H_{84}O_2$	680.84	3.94
Sitosterol digitonide*	$C_{85}H_{142}O_{30}$	1643.4	10.18

今 Sitosterol digitonide を定量する場合 Sitosterol (digitonide として) 1 mg を完全酸化する場合, 所要の 0.1 n $K_2Cr_2O_7$ は 10.18 cc である。さすれば

$$\frac{\text{cc of 0.1 n } Na_2S_2O_3 \text{ (対照液)} - \text{cc of 0.1 n } Na_2S_2O_3 \text{ (検液)}}{10.18} = \text{mg Sitosterol}$$

(e) 操作法:— 別項 (d, e) の如き方法にて分離した Digitonide を 150 cc 容硬質エ氏フラスコ中に集め conc. H_2SO_4 1 cc, Nicloux 試薬 5 cc, 1 n $K_2Cr_2O_7$ 3cc を加へ電熱器にて加熱せる砂浴中に入れ温度 $130^\circ C$ に20分間保ち, 次に水 50 cc を加へ放冷後10% KI 液を加へ I_2 を遊離せしめ 0.1 n $Na_2S_2O_3$ 液にて1%澱粉液を指示薬として滴定した。

(d) 遊離 Sterol の定量法:— 検液一定量 (Sterol 含量 1 mg 以下) を採取し 0.5% Digitonin 酒精液 3 cc を加へ湯煎上にて蒸發乾涸し, 次に過剰の Digitonin を除去するために H_2O 10cc

* Sitoserol 及び Digitonin の分子式は

H. Lettr'e & H. H. Inhoffe, : Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naurstoffe, Ferdinand Enke, Stuttgart (1936) 所載の式によつた。

を加へて1分間煮沸し直に豫め濃厚硫酸—重クロム酸液にて煮沸後よく水洗せる微細アスピートを充填せる Allihn 管にて濾過し、次に温 Acetone 20 cc にて洗滌し更に Ether 5 cc にて2回洗滌し、次に 20 cc 沸騰純酒精にて残留せる Digitonide を溶解、濾過し之を 150 cc 容エ氏フラスコ中に集め、湯煎上にて酒精を蒸發し最後に CO₂ を通じて完全に酒精を放逐し前記(c)の方法により酸化滴定する。

(e) 全 Sterol の定量法:— 檢液一定量 (Sterol 含量 1 mg 以下) を採り、Ester 狀 Sterol を加水分解し游離 Sterol とするために 2 cc Sodium ethylate を加へ、湯煎上にて加温し最後に蒸發乾涸し、10% H₂SO₄ 數滴を加へて中和し Petrol. ether にて抽出し、抽出液を水洗後蒸發せしめ、0.5% Digitonin 酒精溶液 3 cc を加へて蒸發乾涸し、游離 Sterol の場合と同様に酸化滴定する。

(II) Sitosterol の定量

(a) 豫備試験:— 標準 Sitosterol 溶液 1 cc を採り乾燥後、前記の酸化試薬を加へ電熱器にて加熱せる砂浴中に静置し、砂浴の温度を 130°C に保ち一定時間後酸化し、滴定した。加熱は 10分間及び20分間行ひその結果を比較したるに20分間にて十分なることを確めた。

第 1 表

130°C にて10分間加熱したる場合			130°C にて20分間加熱したる場合		
供試 Sitosterol mg	0.1 n N ₂ S ₂ O ₈ cc	回 收 Sitosterol %	供試 Sitosterol mg	0.1 n N ₂ S ₂ O ₈ cc	回 收 Sitosterol %
1	3.90	98.48	1	3.92	98.89
1	3.83	96.72	1	3.93	99.24
1	3.88	97.98	1	3.94	99.50

(b) 游離 Sitosterol:— 標準 Sitosterol 1 cc を採り之に 0.5% Digitonin 酒精溶液 3 cc を加へ蒸發乾涸せしめ前記 (I, d) の方法により Digitonide を分離し、試薬を加へ 130°C にて 20分間加熱し酸化し滴定したる結果は下表の通りでこの操作によつて Sitosterol は殆ど全く損失することなく定量し得る。

第 2 表

實驗番號	供 試 Sitosterol mg	0.1 n N ₂ S ₂ O ₈ cc	回 收 Sitosterol mg
1	1	10.10	0.992
2	1	10.09	0.991
3	1	10.13	0.995
4	1	10.22	1.004
5	1	10.11	0.993

(c) 全 Sitosterol:— 標準 Sitosterol stearate 溶液 1 cc に Sodium ethylate 2 cc を加へ湯煎上にて約20分間加温水解して Sterol を全部游離の形態となしたる後 Digitonide を分離し酸化、滴定したる結果は下の如くである。

第 3 表

實驗番號	供 試 Sitosterol stearate mg	0.1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ cc	回 收 Sitosterol stearate mg
1	1	6.00	0.969
2	1	6.03	0.974
3	1	5.94	0.960
4	1	5.96	0.963

以上の實驗結果によれば Bloor 法は Sitosterol の定量に應用して十分なる結果を示すことが明瞭である。是に於て一般 Phytosterol の定量にも應用を試みやうと思ひ菜種、棉實、大豆より採油しその中の Sterol を定量した。二種の菜種* (近畿一號, 京都吾妻) は京都府立農事試驗場所産 (1935年收獲), 二種の棉實* (關農一號, King's Improved) は京大, 高槻農場産 (1935年收獲) 二種の大豆は大阪府下高槻町産 (1936年收獲直後) のものを選び種子 (棉實の場合のみ外殻を除去し) 2—3 g 倍量の無水 Na_2SO_4 と混和して粉碎し Ether にて抽出し, 抽出せる脂油を Ether-Alcohol (1:3) 混液に溶解し, 一定容となしその一部分を採取して游離 Sterol 及び全 Sterol を定量し, Ester 狀 Sterol を算出した。(第5表) 又各種種子の脂油含量は第4表の如くであつた。

第 4 表

試 料	種 子 g	脂 肪 g	脂 肪 %
I 菜 種 (近畿一號)	2	0.691	34.55
II 菜 種 (京都吾妻)	2	0.863	43.13
III 棉 實 (King's Improved)	2	0.770	38.50
IV 棉 實 (關農一號)	2	0.793	39.63
V 大 豆 (赤)	3	0.371	12.37
VI 大 豆 (黃)	3	0.450	15.00

第 5 表

試 料	供 試 料 Ether Alcohol (1:3)にとかし 50ccとなす g	全-Sterol		游離 Sterol		Ester 狀 Sterol %
		0.1n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ cc	%	0.1n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ cc	%	
I 菜種 (近畿一號)	0.691	5.23	0.74	4.23	0.60	0.14
II 菜種 (京都吾妻)	0.863	7.50	0.85	4.45	0.51	0.34

* 菜種及び棉實は京大, 高槻農場笹川八男三氏の配意により入手した。

森 : Sterol の 定 量 に 就 て

Ⅲ 棉實 (K. I)	0.770	6.10	0.82	4.71	0.60	0.22
Ⅳ 棉實 (關農一號)	0.793	6.44	0.80	5.68	0.70	0.10
Ⅴ 大豆 (赤)	0.371	2.84*	0.38	4.83°	0.32	0.06
Ⅵ 大豆 (黄)	0.450	5.55*	0.61	10.03°	0.54	0.07

* は檢液 10 cc, °は檢液 20 cc に對する滴定値

以上は Bloor が創案し Okey, Yasuda 等が改良した Cholesterol の定量法を Phytosterol に應用せんとして、まづ Sitosterol を用ひて吟味したる結果である。試験の結果は前掲の如くで前記諸氏が Cholesterol に就て行ひたる結果と比較して、筆者の實驗値が更によく計算値と一致し、この方法が Sitosterol の定量法として十分なることを確めた。Sitosterol 以外の Phytosterol に以上の方法を應用し同様に的確の數値を得るや否やは未知である。けれども一般の他の Phytosterol が Sitosterol と同様に難溶性 Digionide を作り、而も諸種の試薬に對する反應に於て大差なきことを考へれば、本法を Phytosterol の定量に應用して好結果を期待し得ることと信するのである。

要 約

1. Cholesterol の定量に用ひられて居る Bloor 法を Phytosterol の定量に應用せんと欲して Sitosterol 及び Sitosterol stearate の兩液を調製し、そのうちの Sterol を Bloor 法によつて十分正確に定量し得ることを實證した。

2. 其の結果として菜種油、棉實油及び大豆油中の游離せる Sterol 及び Ester 狀の Sterol を Bloor 法によつて定量して見た。

終に此の研究を行ふに當り終始御懇篤なる御指導を賜りし恩師近藤金助先生に對し謹んで感謝の意を表す。

(1936年12月 化學研究所講演會にて講述)

文 獻

- 1) A. Windaus, Z. f. physiol. Chem., **65**, 110(1910)
- 2) W. R. Bloor, J. Biol. Chem., **77**, 53(1928)
- 3) R. Okey, J. Biol. Chem., **88**, 367(1930)
- 4) M. Yasuda, J. Biol. Chem., **92**, 303(1931)
- (5), (6) 前 出
- (7) 近藤, 森, 日化. **57**, 1128(1936)
- (8) E. Ritter, Z. f. physiol. Chem., **34**, 461(1902)