

キノコ中のエルゴステロールおよびビタミン D₂ の定量

桐 淵 壽 子

(埼玉大学教育学部)

平成元年 8 月 30 日受理

Determination of Ergosterol and Vitamin D₂ in Fungi

Toshiko KIRIBUCHI

Faculty of Education, Saitama University, Urawa 338

A simplified method for the determination of ergosterol and vitamin D₂ in fungi was established. That is, a fraction containing free sterols and vitamin D₂, which was separated by a preliminary fractionation with a Florisil column, was subjected to high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Zorbax ODS column (reversed-phase type) with 95% methanol as a mobile phase. The two peaks corresponding to vitamin D₂ and ergosterol were clearly observed with separation from other concomitants on the chromatogram of HPLC. The overall recoveries of ergosterol and vitamin D₂ by the proposed method were 95.1 ± 0.7 (mean \pm S.E.) and $94.9 \pm 0.4\%$ (mean \pm S.E.), respectively.

Then the proposed method was applied to the analysis of ergosterol and vitamin D₂ in fungi, commercial dried Shiitake and Hiratake. The results obtained were satisfactory. In both cases, the sterols were for the most part to exist in free form, and the all of the sterol component was demonstrated to be ergosterol. Vitamin D₂ was present in small amount in both commercial Shiitake and Hiratake and it increased by sun or ultraviolet light irradiation.

(Received August 30, 1989)

Keywords: ergosterol エルゴステロール, vitamin D₂ ビタミン D₂, analysis of sterols ステロールの分析, Florisil column chromatography フロリジルカラムクロマトグラフィー, HPLC 高速液体クロマトグラフィー, Shiitake シイタケ.

1. 緒 言

ビタミンDの微量定量法に関しては、小林ら^{1)~3)}の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法が報告されている。この方法は試料抽出物をケン化し、不ケン化物について、2段階の HPLC を用いて分析を行っているが、著者はさらに簡便な方法でエルゴステロールとビタミン D₂ の分別定量法を確立したので報告する。また、本方法を用いてキノコのテルゴステロールとビタミン D₂ の分別定量を行った。

2. 実験方法

(1) 試 料

干シイタケは市販の大分産香信を使用した。ヒラタケ (市販シメジ) および生シイタケは秩父産のもので、

採取2日後 (低温室 5~7°C に保存) のものを試料とした。

(2) 標準試薬

ビタミン D₂ は日本薬局方エルゴカルシフェロール、和光純薬(株)製を、エルゴステロールは Sigma Chemical 社製を使用した。

(3) フロリジルカラムクロマトグラフィー⁴⁾

干シイタケは傘の部分を粉碎し、ヒラタケは熱風乾燥 (60°C, 20 時間) 後粉碎した。粉末試料をアセトン抽出 (65~70°C, 20 時間)⁵⁾ した抽出物を分析用試料とした。フロリジルカラムクロマトグラフィーは、Kiribuchi らの方法⁴⁾に従ってステロールの分画を行った。

フロリジルカラムクロマトグラフィーによる溶出液はリーベルマン反応により定量した。すなわち、溶出液

1.0 ml をとり、溶媒を除去後クロロホルム 2.0 ml を加え、無水酢酸と濃硫酸混合液 (20:1, 使用前に混合) 2.0 ml を加えてよく混和し、正確に 30 分間放置後、655 nm で測定した。エルゴステロールの検量線から、ステロールの定量値を求めた。

(4) 薄層クロマトグラフィー (TLC)⁴⁾

TLC 用のガラスプレート (10 cm×20 cm, 20 cm×20 cm) にシリカゲル G (Merck社製) を 0.25 mm の厚さにコーティングし、乾燥後 120°C, 2 時間活性化した。展開溶媒としてクロロホルム-メタノール-酢酸-水 (90:8:1:1) を用いて展開後、濃硫酸をプレートに噴霧し、110°C, 10 分間加熱してスポットを検出した。

(5) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC は島津 LC-3A 型, 検出器は島津 SPD-2A 型 (波長 265 nm で測定), クロマトバックは島津 C-RIA を使用した。逆相カラム Zorbax ODS (Dupont 社製, 4.6 mmφ×15 cm) を用いて, 40°C, 移動相 95%メタノール溶液, 流速 1 ml/分で分析した。フロリジルカラムクロマトグラフィーより得られた遊離型の画分は, そのまま HPLC の分析用試料とした。エステル型画分はケン化後, グリコシド型画分は酸加水分解⁴⁾後, それぞれ遊離型のステロール画分を HPLC の分析用試料とした。

(6) 紫外線照射装置

Fig. 1 に示したようにダンボールの箱 (縦, 横, 奥行: 46×60×69 cm) の中に, ステンレスを張った 2 個の照明板を用意し, それぞれに 15W の殺菌灯 (NEC GL-15, 主波長 254 nm) を取り付け, 光がもれないようふたをして照射した。

3. 結果および考察

(1) 標準エルゴステロールおよびビタミン D₂ の定量
標準エルゴステロールおよびビタミン D₂ は, 各約 10

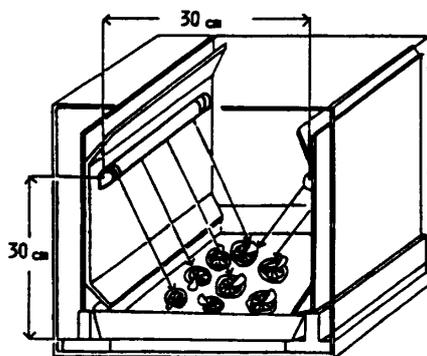


Fig. 1. An apparatus for ultraviolet light irradiation

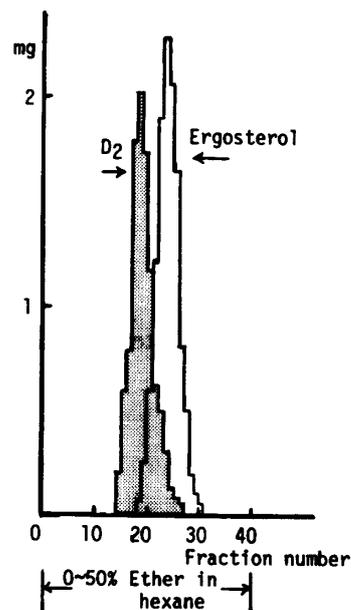


Fig. 2. Florisil column chromatogram of authentic ergosterol and vitamin D₂

Ergosterol (9.653 mg) and vitamin D₂ (9.735 mg) were subjected to chromatographic separation on Florisil column (12 g) by the gradient elution method, respectively. Eight ml fractions were collected.

mg を秤量し, それぞれフロリジルカラムクロマトグラフィーを行った。Fig. 2 に示したように, エルゴステロールは, 18 本目から溶出し, 23 本目で最大となったが, ビタミン D₂ は, 14 本目から溶出し, 18 本目で最大となった。このようにビタミン D₂ が溶出しはじめ, 溶出が最高に達したところからエルゴステロールが溶出しはじめ, 両者が存在するときは重なって溶出される。定量はいずれもリーベルマン反応によった。エルゴステロールおよびビタミン D₂ は, それぞれ検量線を作成して 655 nm* で測定した。Fig. 2 からわかるように, エルゴステロールとビタミン D₂ の混合物のフロリジルカラムクロマトグラムは一つのピークとして溶出され分離されないため, この画分 (画分 No. 13~32) を集め, 次に HPLC で分析した。

溶媒を除去した後, 適量のエタノールに溶解し, HPLC の分析用試料とした。このエルゴステロールとビタミン

* ビタミン D₂ のリーベルマン反応の呈色は, 一般のステロールの呈色と色調が異なり, 黒味を帯びた青色であり, 655 nm での測定は最適ではないが, 試料中の大部分はエルゴステロールであるのでビタミン D₂ も同じ波長で定量した。ビタミン D₂ の検量線から十分測定可能である。

キノコ中のエルゴステロールおよびビタミン D₂ の定量Table 1. Determination of ergosterol and vitamin D₂ by using two steps chromatography*

| Trial | Ergosterol | | | Vitamin D ₂ | | |
|-------------|------------------|------------------|--------------|------------------------|------------------|--------------|
| | Added value (mg) | Found value (mg) | Recovery (%) | Added value (mg) | Found value (mg) | Recovery (%) |
| 1 | 9.653 | 9.310 | 96.4 | 9.735 | 9.295 | 95.5 |
| 2 | 9.653 | 9.031 | 93.6 | 9.735 | 9.170 | 94.2 |
| 3 | 9.653 | 9.073 | 94.0 | 9.735 | 9.132 | 93.8 |
| 4 | 9.653 | 9.319 | 96.5 | 9.735 | 9.335 | 95.9 |
| Mean ± S.E. | | 9.183 ± 0.066 | 95.1 ± 0.7 | | 9.233 ± 0.042 | 94.9 ± 0.4 |

* The first step was chromatographed on Florisil column and then the second step was analyzed by high-performance liquid chromatography.

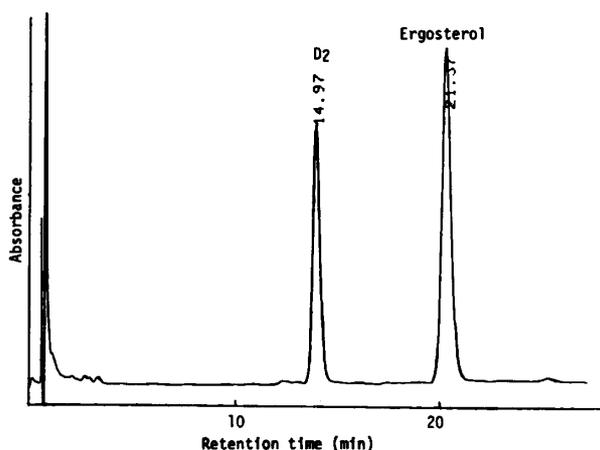


Fig. 3. High-performance liquid chromatogram of ergosterol and vitamin D₂ mixture fractionated by Florisil column chromatography

Analytical conditions: instrument, Shimadzu LC-3A; column, Zorbax ODS (4.6 mmφ × 15 cm); column temp., 40°C; mobile phase, 95% methanol; flow rate, 1 ml/min; detector, SPD-2A (265 nm).

D₂ の混合物を HPLC に注入し分析した結果, Fig. 3 に示したように非常によく分離することができた。

このように, フロリジルカラムクロマトグラフィーと HPLC を組み合わせてエルゴステロールとビタミン D₂ を分別定量したさいの回収率は, Table 1 に示すようにいずれも約 95% であり, ほぼ満足できる結果と考えられる。

(2) 干シイタケおよびヒラタケ (市販シメジ) 中のエルゴステロールおよびビタミン D₂**の分析

前述の方法をキノコのエルゴステロールとビタミン

** シイタケやマイタケにはエルゴカルシフェロールとプレエルゴカルシフェロールが含まれていることが知られており⁶⁾⁷⁾, ここではプレエルゴカルシフェロールを含む広義のビタミン D₂ をさすことにする。

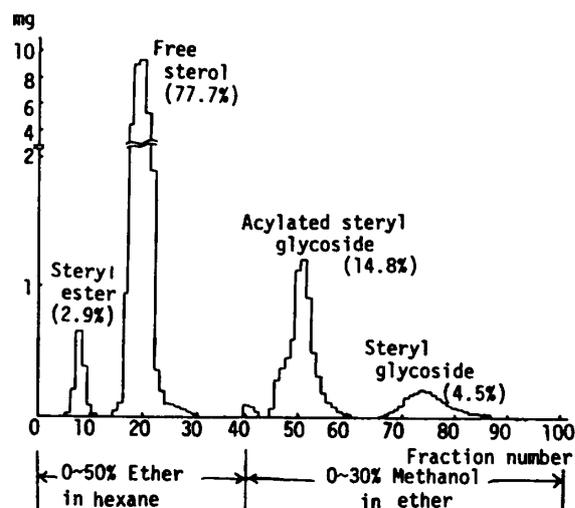


Fig. 4. Fractionation of Hiratake sterols on Florisil column

Acetone extract of Hiratake (7.5 g) was subjected to chromatographic separation on Florisil column (12 g) by the gradient elution method. Eight ml fractions were collected.

D₂ の測定に応用した。キノコに存在するビタミン D₂ は, 前述の標準品を使って分析した場合よりはるかに少量であるため, エルゴステロールとビタミン D₂ の比率 100:1 (紫外線を 3 時間照射したときの比率に相当) の混合物について分析し, 十分に定量可能であることを確認した。

干シイタケおよびヒラタケの粉末試料のアセトン抽出物について, フロリジルカラムクロマトグラフィーを行った。その結果, いずれも一般の植物ステロールと同様に四つの型, すなわちエステル型, 遊離型および 2 種の配糖体 (アシルグリコシドおよびグリコシド) に分画された。この四つの型のステロールは TLC でも確認した⁴⁾。ヒラタケの分析結果の一例を Fig. 4 に示す。遊離型の画分は, そのまま溶媒を除去したのち, エタノール

Table 2. Determination of ergosterol and vitamin D₂ in commercial dried Shiitake

| | Ester form | | Free form | | Acylglycoside | | Glycoside | |
|------------------------|---------------------|-------|---------------------|--------|---------------------|--------|---------------------|--------|
| | (mg% in dry matter) | (%) | (mg% in dry matter) | (%) | (mg% in dry matter) | (%) | (mg% in dry matter) | (%) |
| Ergosterol | 9.73 | (3.6) | 256.7 | (95.7) | 1.08 | (0.40) | 0.65 | (0.24) |
| Vitamin D ₂ | 0.007 | | 0 | | — | | — | |

Data are expressed in mean value for three experiments.

Table 3. Fractionation of commercial Shiitake and Hiratake sterols on Florisil column

| Fungi | Ester form | | Free form | | Acylglycoside | | Glycoside | |
|---------------------------|---------------------|-------------|---------------------|--------------|---------------------|--------------|---------------------|-------------|
| | (mg% in dry matter) | (%) | (mg% in dry matter) | (%) | (mg% in dry matter) | (%) | (mg% in dry matter) | (%) |
| Commercial dried Shiitake | 26.9 ± 1.42 | (7.6 ± 0.4) | 253.6 ± 5.04 | (71.9 ± 0.8) | 41.9 ± 1.84 | (11.9 ± 0.5) | 30.6 ± 3.38 | (8.5 ± 1.0) |
| Commercial Hiratake | 10.9 ± 0.78 | (2.5 ± 0.3) | 352.0 ± 27.2 | (78.6 ± 1.2) | 66.8 ± 4.99 | (15.0 ± 0.9) | 17.4 ± 0.75 | (3.9 ± 0.4) |

Sterol of each fraction was calculated as ergosterol. Data were expressed in mean S.D. (n=6).

に溶解して HPLC で分析した。エステル型はアルカリでケン化した後不ケン化物を、配糖体は酸で加水分解した後ステロール画分を、それぞれ HPLC で分析した。干しシイタケの分析結果を Table 2 に示す。また Table 3 には干しシイタケとヒラタケのフロリジルカラムクロマトグラフィーによる各ステロール画分の割合を示した。

Table 3 によると、遊離型が最も多く、干しシイタケでは約 72%，ヒラタケでは約 79% と、いずれも大部分を占め、エステル型は少ない。配糖体としては、干しシイタケ、ヒラタケともにアシलगリコシドとグリコシドが存在していたが、両グリコシドの合計は約 20% であった。しかし、HPLC による測定 (Table 2) では、干しシイタケの場合にはほとんどが遊離型 (95.7%) であり、ついでエステル型が 3.6% であったが、配糖体 (0.64%) はわずかであった。繰り返し実験でも同様の結果を得た。この相違は次のように考えられる。すなわち、フロリジルカラムクロマトグラフィーによる溶出液の定量は、リーベルマン反応によるが、配糖体の部分、とくに最後に溶出されるグリコシドはシャープに溶出せず、少量ずつ長時間にわたって溶出されるために測定誤差が大きくなること、またエルゴステロール以外のステロール類も測定されている可能性のあることなどから測定値が大きくなったものと考えられる。一方、Table 2 の測定例は、HPLC で測定したためエルゴステロールだけが測定されている。したがって、Table 2 と 3 とでは量的に少ないエステル型と配糖体でかなり測定値に差

が現れた。ヒラタケの場合も HPLC による測定結果に同様の傾向がみられ、大部分が遊離型であり、ついでエステル型で配糖体はきわめて少量であった。

これらを総合すると、干しシイタケのエルゴステロールは、約 96% が遊離型で含まれており、約 4% がエステル型や配糖体として存在すると思われる。小野ら⁹⁾はシイタケ中のエルゴステロールについて、エステル型が 34~45% 存在すると報告しているが、竹内ら¹⁰⁾はエステル型 2%、遊離型 98% と報告している。しかしこの場合に配糖体については考慮していない。

シイタケの約 96% を占める遊離型画分のステロールは HPLC によりエルゴステロールであると同定したが、さらにこの画分から得られた結晶はガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) によっても、エルゴステロールであることを確認した (GC-MS は鳥津分析センターに依頼、鳥津 GCMS-7000 型で分析)。エステル型および配糖体のステロール部分も HPLC による分析からは、エルゴステロールに相当するピークが得られた。エステル型のステロール部分もきれいな結晶となり、エルゴステロールであることを確認した。しかし、配糖体ではエルゴステロールのほかに、保持時間がエルゴステロールよりもいくらか早い時点で大きなピーク (未確認) が現れており、本実験ではエルゴステロールのみであるとはいえない。なお、ヒラタケの遊離型ステロールはエルゴステロールであることを GC-MS により確認した。

干しシイタケのエルゴステロール含量は栽培時期によ

キノコ中のエルゴステロールおよびビタミン D₂ の定量

る差がほとんど認められなかった。ビタミン D₂ はほとんど検出できず、もし存在していても非常にわずかであり、本方法によっては測定限界以下であると考えられる。しかし Table 2 に示したように、試料によってはビタミン D₂ が検出される場合があった。この場合、大部分を占める遊離型ではなく、エステル型に認められたことは興味深い。配糖体は少量のため測定が困難であった。ヒラタケの場合も、栽培時期や生長の違いによるエルゴステロール含量の差はほとんどみられず、またビタミン D₂ も認められなかった。

(3) キノコに日光や紫外線を照射したさいのビタミン D₂ の生成

市販の干しシイタケとヒラタケに日光や紫外線を照射したさいのエルゴステロールからビタミン D₂ への生成量を検討した。これらのキノコには、遊離型エルゴステロールがフロリジルカラムクロマトグラフィーによると、約 72~79%, HPLC によると約 96% 存在していた (Table 2 および 3)。このように大部分が遊離型エルゴステロールであることから、本実験では、日光あるいは紫外線の照射時間を変えて照射した場合の遊離型エルゴステロールとビタミン D₂ の生成量を比較した。結果は Table 4 に示すとおりである。

市販の干しシイタケを日光に 3 時間あるいは 14 時間当てたところ、ビタミン D₂ が生成され、この場合、14 時間日光に当てたほうが 3 時間の場合の約 2 倍量のビタミン D₂ の生成をみた。またヒラタケを熱風乾燥したものにさらに日光を 6 時間あるいは 9 時間当てると、ビタミン D₂ が生成されるが、生成量は長時間日光に当てた

ほうが高い値を示した。

一方、紫外線を照射すると、ビタミン D₂ が多量に生成される。干しシイタケについて比較すると、日光に当てた場合よりビタミン D₂ の生成量のはるかに多く、3 時間照射では紫外線のほうが約 40 倍もビタミン D₂ が生成されることがわかる。これはキノコが受ける紫外線量が異なるためと考えられる (本実験では受光量は測定していない)。遊離型以外のビタミン D₂ の生成については次報¹⁰⁾に報告する。

エルゴステロールに紫外線 (280~310 nm) を照射するとビタミン D₂ が生成されることは以前から知られており、昔は生シイタケを天日乾燥することで干しシイタケを製造していたため、日光中の紫外線の働きでビタミン D₂ が生成され、ビタミン D₂ のよい供給源とされていた。しかし、最近ではほとんどが室内乾燥で製造されており、ビタミン D₂ はほとんど生成されていないと考えられる。しかし市販品の中にはビタミン D₂ がわずかに認められる場合もあり、その量は約 3 IU/g 乾物あたりであった (Table 2)。なお、これは遊離型よりもエステル型であることが興味深い。従来の報告では、ビタミン D₂ はすべて遊離型とされている。竹内らは市販の干しシイタケが室内乾燥で製造されているにもかかわらず、ビタミン D₂ が存在し²⁶⁾⁷⁾、これはシイタケ栽培中木洩れ日を浴び、このわずかな紫外線がビタミン D₂ を生成したためと報告している⁶⁾¹¹⁾。

本研究では、ビタミン D₂ が測定される場合と、されない場合とがあったが、これはシイタケの栽培中に日光をどれだけ受けていたかによるものと思われる。栽培中に傘ができ、収穫までの期間中の天候が悪く、日照時間が少ない (ほとんどない) ような場合にはビタミン D₂ は生成されず、したがって市販の干しシイタケ中にビタミン D₂ が含まれる場合と含まれない場合のあるのは当然と考えられる。

以上に述べたように、キノコ中に含まれるエルゴステロールとビタミン D₂ は、フロリジルカラムクロマトグラフィーと HPLC とを組み合わせることにより容易に分別定量することができ、ほぼ満足できる結果を得た。本方法は小林ら¹¹⁻³⁾がビタミン D 定量法として報告している二段階の HPLC による方法に比べて、より簡便に定量することができる。本実験では、分析用試料はすべて粉末試料を用いたが、生のまま脂質を抽出し、その脂質をフロリジルに吸着させてクロマトグラフィーを行うことも可能である。このように試料の前処理なしに容易に分析のできることは、素材中のビタミン D₂ の正確な

Table 4. Determination of ergosterol and vitamin D₂ in commercial Shiitake and Hiratake

| Fungi | Ergosterol (mg/g*) | Vitamin D ₂ | |
|------------------|-----------------------|------------------------|---------|
| | | (μg/g*) | (IU/g*) |
| Shiitake | | | |
| Commercial dried | 2.33 | 0 | 0 |
| +sunlight (3 h) | 1.89 | 0.85 | 34 |
| +sunlight (14 h) | 1.71 | 1.59 | 64 |
| +UV** (2 h) | 2.18 | 23.26 | 930 |
| +UV** (3 h) | 2.37 | 33.97 | 1,356 |
| Hiratake | | | |
| Heat dried | 4.04 | 0 | 0 |
| +sunlight (6 h) | 3.65 | 7.37 | 295 |
| +sunlight (9 h) | 3.42 | 8.39 | 335 |

* Dry matter. ** Ultraviolet light irradiation.

含量を知る上でも意義のある方法と考えられる。

4. 要 約

(1) フロリジルカラムクロマトグラフィーと HPLC を組み合わせた分析法により、キノコ中のエルゴステロールおよびビタミン D₂ の分別定量を簡便に行うことができる。

(2) 市販の干しシイタケとヒラタケ中のビタミン D₂ とエルゴステロールの定量を行った。干しシイタケはビタミン D₂ の存在が認められる場合とほとんど検出されない場合があった。ヒラタケにはエルゴステロールがシイタケと同程度含まれるが、ビタミン D₂ はほとんど検出できなかった。

(3) 干しシイタケとヒラタケに日光や紫外線を照射するとビタミン D₂ が生成された。日光にさらす時間の長いほどビタミン D₂ の生成量は多くなり、紫外線照射によりさらに多量のビタミン D₂ が生成された。

終わりに本実験に協力された榎本みさお、島田恵美子、古田久美子の諸氏に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) Okano, T., Takeuchi, A. and Kobayashi, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 539 (1981)
- 2) 竹内敦子, 岡野登志夫, 寺岡澄子, 村上裕美子, 鞘本万里子, 澤村節子, 小林 正: *ビタミン*, **58**, 439 (1984)
- 3) 小林 正: *ビタミン学実験法 I*, 日本ビタミン学会編, 東京化学同人, 東京, 82~122 (1983)
- 4) Kiribuchi, T., Mizunaga, T. and Funahashi, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 770 (1966)
- 5) Kiribuchi, T., Chen, C. S. and Funahashi, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 265 (1965)
- 6) 竹内敦子, 岡野登志夫, 寺岡澄子, 村上裕美子, 鞘本万里子, 澤村節子, 小林 正: *ビタミン*, **58**, 501 (1984)
- 7) 竹内敦子, 岡野登志夫, 鳥居まゆみ, 畠井由美, 小林 正: *ビタミン*, **59**, 195 (1985)
- 8) 小野忠義, 杉浦 涉, 松岡憲固, 有本邦太郎: *栄養と食糧*, **26**, 547 (1973)
- 9) 竹内敦子, 岡野登志夫, 鞘本万里子, 澤村節子, 小林 正: *ビタミン*, **58**, 589 (1984)
- 10) 桐沢壽子: *家政誌*, **41**, 401 (1990)
- 11) 小林 正, 竹内敦子, 岡野登志夫: *ビタミン*, **62**, 483 (1988)