

## 油脂中のステロール類の高速液体クロマトグラフィーによる定量

藤本 宣國<sup>①\*</sup>, 形井 雅昭<sup>\*\*</sup>, 廻 治雄<sup>\*\*\*</sup>

(1985年10月8日受理)

高速液体クロマトグラフィーによるステロールの分析法を検討した。分析対象としたステロールは、 $C_{27}$  のコレステロール、 $C_{28}$  のエルゴステロールとカンペステロール、 $C_{29}$  のスティグマステロールと $\beta$ -シトステロール及び $C_{30}$  のスクアレンを用いた。固定相は逆相タイプの Zorbax ODS, 移動相は非水系のメタノール-テトラヒドロフラン (99:1), 検出波長は UV の 205 nm を用いた。本法による定量性については、各ステロールのピーク高さの相対標準偏差が 7% 以下 (10 回繰り返し測定) と良好であり、又、検量線はエルゴステロールとコレステロールが 10~200  $\mu\text{g/ml}$  の間で、スティグマステロールとカンペステロールと $\beta$ -シトステロールが 15~200  $\mu\text{g/ml}$  の間で、又、スクアレンは 2~20  $\mu\text{g/ml}$  の間で直線関係が得られた。

### 1 緒 言

動植物油脂は主成分として脂肪酸やグリセリド、又、微量成分として不けん化物成分であるステロール、高級アルコール、炭化水素及び脂溶性ビタミンなどが認められる。これら各成分を有する動植物油脂中のステロールの分析法として、従来から GC<sup>1)~5)</sup>, カラムクロマトグラフィー (CC)<sup>6)</sup>, HPLC<sup>7)~13)</sup> などの各種クロマトグラフィーにより検討がなされている。GC<sup>1)~5)</sup> は油脂中のステロールをジキトニド体に誘導し、分別後再度アセテート体に誘導したものを分離定量する方法で比較的長い分析時間を必要とする。HPLC については Holen<sup>13)</sup> が 8 種のステロールを検討し、数種の試料に応用し、そのパターン分析を試みているが、他はいずれもステロール類の炭素数と二重結合の数及び二重結合の位置の差異による溶出挙動についての報告であり、実試料中のステロール類の同時定量の報告は見られない。

そこで今回、著者らは食用油脂中にわずかに含有が認められている、エルゴステロール、コレステロール、スティグマステロール、カンペステロール、 $\beta$ -シトステロールとこれらステロールの前駆物質であるスクアレンの 6 種類について、Zorbax ODS カラムを用いた HPLC

で分離条件を検討したところ、良好な結果が得られた。

更に、本法の応用として植物性食用油について、常法に従い 0.5 M 水酸化カリウム-エタノール溶液によるけん化法により脂肪酸などを除去した後、ステロールを炭化水素及び高級アルコール類などの混在物とともに不けん化物として抽出し、この抽出液中の混在物をフロリジルカラムクロマトグラフィー<sup>2)</sup> により分画精製し、得られたステロールの抽出液について、HPLC で分離定量を検討した。なお、本法では植物性食用油脂の定量を行う際、エルゴステロールは前処理操作において長時間を要したため分解してしまうのか、消失し、スクアレンは炭化水素であるため前処理操作の段階で Fr. 1 に溶出することから、他のステロールとの同時定量が困難であった。又、コレステロールについても混在物の影響のために同定が困難であり同時定量ができなかった。

### 2 実 験

#### 2.1 装置及び操作条件

高速液体クロマトグラフは島津製 LC-4A で同社製紫外線吸光度検出器 SPD-2AS を接続し、測定波長 205 nm, 感度 0.04 AUFS, カラム温度 30°C で測定した。

カラムは Zorbax ODS (島津製, 粒径 5~6  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm) で、ガードカラムとして Zorbax ODS (島津製, 粒径 5~6  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  50 mm) を分析カラムの前に接続して用いた。

移動相はメタノール (MeOH)-テトラヒドロフラン (THF) = 99:1 を用い、流速は 1.0 ml/min 又は 1.2 ml/min とした。

\* 大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所 : 540 大阪府大阪市東区大手前之町 9

\*\* 大阪工業大学応用化学科 : 535 大阪府大阪市旭区大宮町 5-16-1

\*\*\* 摂南大学薬学部薬学科 : 573-01 大阪府枚方市長尾峠町 45-1

この条件下でのステロールの分離条件, 溶出挙動及び再現性について検討し, 更にピーク高さ法による検量線を作成した. なお, 測定波長の選定は, 各ステロールの紫外外部吸収の最大吸光度がいずれも 200 nm 以下であることから, 便宜上 205 nm を選定した.

## 2.2 試 薬

ステロール標準品のうち, カンペステロールは Sigma 製のものを用いた. スクアレンは東京化成工業製, 他のステロールは和光純薬工業製を用いた. 移動相の MeOH 及び THF, 抽出溶媒用のヘキサンは林純薬工業製の液体クロマトグラフィー用のものを用いた. フロリジルは和光純薬工業製の 60~100 メッシュのものを用いた. その他の試薬は林純薬工業製試薬特級品を用いた. 食用油は山桂産業製, 神路油脂製及び平安油脂製のものを用いた.

ステロール標準品は THF に溶解して用いた.

0.5 M 水酸化カリウム-エタノール溶液: 油脂のけん化に用いた.

## 2.3 油脂中のステロールの抽出

油脂 1 g を反応瓶に採り, これに 0.5 M 水酸化カリウム-エタノール溶液 20 ml を加え, 常法どおり 90°C で約 1 時間, 加熱しけん化を行った. 次にこのけん化液中のステロールを含む不けん化物をジエチルエーテルを用いて抽出した後, 35°C で溶媒を減圧留去し, 残留物を 0.4 ml のクロロホルムに溶解し, 粗抽出液とした. この粗抽出液を直接 HPLC 装置に注入した場合, 不けん化物成分である粗抽出液中には炭化水素類, 高級アルコール類などの混在物がステロールの分離に悪影響を及ぼし, 良好なクロマトグラムが得られないことから, CC<sup>2)</sup>によるクリーンアップを行った. 粗抽出液をフロリジルを充てんしたカラムに入れ, このカラムをヘキサン-ジエチルエーテル (25:8) で洗浄し, 次にヘキサン-ジエチルエーテル (50:50) でステロールを溶出させた. 溶出液は 35°C で減圧乾燥し, 残留物に 3 ml の THF を加えて溶解し, 分析試料とした. なお, 本法ではスクアレンが炭化水素であるため, CC によるクリーンアップ処理を行ったために消失し, ステロールとの同時定量はできなかった.

## 3 結果及び考察

### 3.1 分離条件の検討

ステロール標準物質のクロマトグラムの一例を Fig. 1 に示した. 移動相としてはステロールの溶解性を考慮して MeOH と THF と水の 3 種混合溶媒及び MeOH と THF の 2 種混合溶媒の 2 種類について, 各ステロールの分離度及び保持時間などの分離挙動を検討したとこ

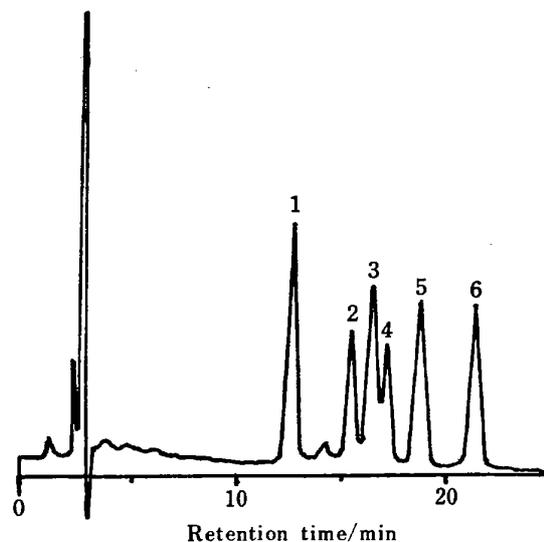


Fig. 1 Representative chromatogram of sterols

1: ergosterol 512 ng; 2: cholesterol 345 ng;  
3: stigmasterol 456 ng; 4: campesterol 368 ng;  
5:  $\beta$ -sitosterol 692 ng; 6: squalene 52 ng.  
Flow rate: 1.2 ml/min; Column temp.: 30°C;  
Detector: UV (205 nm); Sensitivity: 0.04 AUFS

ろ, 水系及び非水系のいずれの場合共, THF の組成比が減少するに従い分離度が向上し, 又, 水系の場合, 水の組成比が減少するに従い分離能の向上が認められ, 更に非水系の場合 THF の組成比が減少するに従いカンペステロールと  $\beta$ -シトステロールの分離能の向上が認められた. 以上の結果から, 移動相の組成が MeOH-THF=99:1 のとき良好な分離が得られたことから, 以後の実験においては, この組成比を用いた.

### 3.2 溶出挙動

**3.2.1 炭素数及び二重結合の位置と保持時間との関係**  
カラム温度 30°C, 移動相 MeOH-THF=99:1, 流速 1 ml/min の条件下で 6 種類のステロール類について, ステロールの炭素数及び二重結合の位置と保持時間との関係を Fig. 2 に示した. すなわち, C-22 の位置に二重結合を有するものは, C<sub>28</sub> のエルゴステロール, C<sub>29</sub> のスティグマステロール, C<sub>30</sub> のスクアレンがあり, 又, C-22 の位置に二重結合を持たないものは, C<sub>27</sub> のコレステロール, C<sub>28</sub> のカンペステロール, C<sub>29</sub> の  $\beta$ -シトステロールなどであるが, これら前者のグループを A グループ, 後者を B グループとし, 両グループについて横軸に炭素数, 縦軸に容量比の対数値をとると, 両グループとも炭素数の増加と共に容量比の増加が認められた. 従って炭素数が同じであっても C-22 の位置に二重結合が伴うと, 保持時間が増大することが判明した.

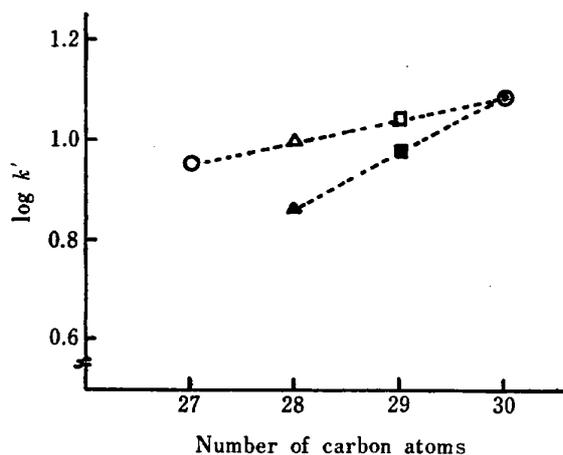


Fig. 2 Relation between number of carbon atoms and capacity factor ( $\log k'$ )

○: cholesterol; △: campesterol; □:  $\beta$ -sitosterol; ⊙: squalene; ▲: ergosterol; ■: stigmasterol

### 3.3 再現性

各ステロールの THF 溶液 (エルゴステロール 0.32 mM, コレステロール 0.22 mM, スティグマステロール 0.27 mM, カンペステロール 0.2 mM,  $\beta$ -シトステロール 0.41 mM, スクアレン 0.03 mM の混合溶液) 4  $\mu$ l を 10 回繰り返し測定を行った結果を Table 1 に示した。

Table 1 Reproducibility of chromatogram

Compound	R. S. D., %	
	Retention time	Peak height
Ergosterol	0.39	3.43
Cholesterol	0.56	6.14
Stigmasterol	0.50	5.09
Campesterol	0.53	3.17
$\beta$ -Sitosterol	0.43	6.89
Squalene	0.34	4.10

$n=10$ ; R. S. D.: relative standard deviation

各ステロールの保持時間の相対標準偏差はいずれも 0.5% 以下, 又, ピーク高さの相対標準偏差は  $\beta$ -シトステロールの約 6.9%, コレステロールの約 6.1% と若干相対標準偏差の大きいものもあるが, 全体として良好な結果であった。

### 3.4 検量線

2.1 に従って検量線を作成した結果, エルゴステロールとコレステロールはいずれも 10~200  $\mu$ g/ml, スティグマステロール, カンペステロール及び  $\beta$ -シトステロールはいずれも 15~200  $\mu$ g/ml, スクアレンは 2~20

$\mu$ g/ml の各範囲で原点を通る直線関係が得られた。又, 検出限界は  $S/N$  比が 3 のときでエルゴステロールが 38 ng, コレステロールが 26 ng, スティグマステロールが 34 ng, カンペステロールが 28 ng,  $\beta$ -シトステロールが 52 ng, スクアレンが 4 ng であった。

### 3.5 添加回収実験及び実試料への適用

**3.5.1 添加回収実験** 大豆油にステロールの混合溶液を一定量添加し, 2.3 に従って回収率を測定した結果を Table 2 に示した。大豆油中のスティグマステロール, カンペステロール及び  $\beta$ -シトステロールの平均回収率は 96.6~98.8%, 相対標準偏差 0.96~2.63% であった。なお, エルゴステロールは, 抽出操作及びクリーンアップ操作において長時間を要したため, エルゴステロールが酸化分解, 又は, 光分解が起こり, 徐々に減少してしまうのが認められ, 本法による定量は困難であった。

Table 2 Recovery of sterols added to soybean oil

No.	Originally present/ $\mu$ g	Added/ $\mu$ g	Found/ $\mu$ g	Recovery, %
Stigmasterol				
1	560	160	690	95.8
2	560	160	670	93.1
3	560	270	830	100
4	560	270	810	97.6
	Mean $\pm$ SD		96.6 $\pm$ 2.92%	
	R. S. D.		2.63%	
Campesterol				
1	600	180	760	97.4
2	600	180	750	96.2
3	600	230	810	97.6
4	600	230	820	98.8
	Mean $\pm$ SD		97.5 $\pm$ 1.08%	
	R. S. D.		0.96%	
$\beta$ -Sitosterol				
1	1930	320	2180	96.9
2	1930	320	2150	95.6
3	1930	410	2380	101.7
4	1930	410	2360	100.9
	Mean $\pm$ SD		98.8 $\pm$ 2.99%	
	R. S. D.		2.62%	

Amount of sample: 1 g

**3.5.2 実試料の分析** 2.3 の操作に従って抽出及びクリーンアップ処理操作を行い, 大豆油, 落花生油, ゴマ油, トウモロコシ油, ヤシ油, 綿実油, サフラワー油, オリーブ油, 米ぬか油, 菜種油などの市販食用油脂に応用し, そのうちの数例のクロマトグラムを Fig. 3 に示し, かつ, その結果を Table 3 に示した。オリ-

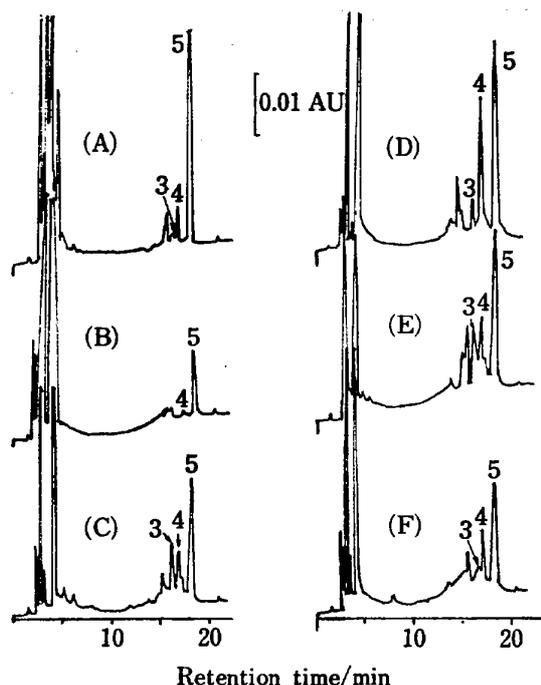


Fig. 3 Chromatograms of sterols in edible oils

Sample: (A) cottonseed oil (amount of injection 3 µl), (B) olive oil (5 µl), (C) soybeans oil (3 µl), (D) rapeseed oil (2 µl), (E) rice-bran oil (1 µl), (F) safflower oil (3 µl); Peaks: (3) stigmasterol, (4) campesterol, (5)  $\beta$ -sitosterol; Chromatographic condition same as Fig. 1.

Table 3 Determination of stigmasterol, campesterol and  $\beta$ -sitosterol in edible oil by HPLC

Sample oil	Stigma.	Campe.	$\beta$ -Sito.
Soybeans	0.56	0.60	1.93
Peanut	0.14	0.47	1.74
Sesame	0.24	0.50	1.50
Corn	0.79	1.64	6.66
Coconut	0.16	0.11	0.71
Cottonseed	0.12	0.45	3.84
Safflower	0.24	0.82	1.86
Olive	tr.	0.04	0.74
Rice-bran	2.05	2.99	8.35
Rapessed	N.D.	2.57	4.06

Figures are expressed in mg/g-edible oil. Stigma.: stigmasterol, Campe.: campesterol,  $\beta$ -Sito.:  $\beta$ -sitosterol

ブ油を除くいずれの試料とも妨害ピークは出現せずステイグマステロール, カンペステロール及び $\beta$ -シトステロールの同時定量ができた。しかしコレステロールについては, コレステロールのピークが未確認成分のピークと重なり, 分離が悪く定量が困難であった。

(1984年10月, 第15回中部化学関係学協会支部連合秋季大会において一部発表)

## 文 献

- 1) 日本薬学会衛生化学調査委員会編: 衛生化学, **13**, 69 (1967).
- 2) 阿部 博: 科学警察研究所報告, **21**, 323 (1968).
- 3) 日本油化学協会編: “基準油脂分析試験法”, p. 193 (1966), (朝倉書店).
- 4) A. Rutkowski, G. Jacini, P. Capella, M. Cirimele: *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, **43**, 89 (1966); *JAOCs*, **62**, 1344 (1985).
- 5) A. J. Sheppard, D. R. Newkirk, W. D. Hubbard, T. Osgood: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **60**, 1302 (1977); *JAOCs*, **62**, 1344 (1985).
- 6) R. A. Anderson, C. J. W. Brooks, B. A. Knights: *J. Chromatogr.*, **75**, 247 (1973).
- 7) 藤谷 健: 油化学, **28**, 468 (1979).
- 8) 鈴木明身: 油化学, **28**, 474 (1979).
- 9) H. H. Rees, P. L. Donnahey, T. W. Goodwin: *J. Chromatogr.*, **116**, 281 (1976).
- 10) 三上博久: 島津評論, **36**, 13 (1979).
- 11) H. Colin, G. Gulochon, A. Siouffi: *Anal. Chem.*, **51**, 1661 (1979).
- 12) J. M. DiBussolo, W. R. Nes: *J. Chromatogr. Sci.*, **20**, 193 (1982).
- 13) B. Holen: *JAOCs*, **62**, 1344 (1985).

☆

**Determination of sterols in fat by high performance liquid chromatography.** Nobukuni FUJIMOTO\*, Masaaki KATAI\*\* and Haruo MEGURI\*\*\* (\*Scientific Investigation Research Laboratory, Osaka Prefectural Police, 9, Otamaeno-cho, Higashi-ku, Osaka-shi, Osaka 540; \*\*Department of Applied Chemistry, Osaka Institute of Technology, 5-16-1, Omiya-cho, Asahi-ku, Osaka-shi, Osaka 535; \*\*\*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, 45-1, Nagao-touge-cho, Hirakata-shi, Osaka 573-01)

Simultaneous determination of ergosterol, cholesterol, stigmasterol, campesterol and  $\beta$ -sitosterol in edible oil has been developed by means of high performance liquid chromatography. The unsaponifiable matter of edible oil was obtained by saponification with 0.5 M-ethanolic KOH solution at 90°C for 1 h according to a standard method. Sterols in the reaction mixture were extracted with diethylether, and the extract was evaporated to dryness at 35°C. The residue was dissolved in chloroform, and chromatographed on florisil column. After eluting with the hexane/diethylether (25 : 8), the sterol fraction was collected by eluting with hexane/diethylether (50 : 50). The eluate of sterols was evaporated to dryness at 35°C. The residue was dissolved in 3 ml of tetrahydrofuran (THF) and injected into Zorbax ODS column (4.6 mm i.d. × 250 mm). The sufficient resolution was obtained by using MeOH/THF (99 : 1) as a mobile phase and column temperature at 30°C. A UV photometer was used as a detector at 205 nm. Relationships between capacity factors and the number of carbon atoms in sterols and the effect of the double bond at C<sub>22</sub> were studied. The chromatographic response was linear to the concentration of sterol in the range 15~200 µg/ml. Sterols were identified by the re-

tention times, and determined quantitatively by a peak height method. Three substances of sterol in ten of edible oil were detected by this method. Ergosterol and squalene in the edible oils, however, could not determined simultaneously, because they were lost a part during the pretreatment procedures.

(Received October 8, 1985)

---

***Keyword phrases***

determination of sterol by HPLC ; stigmasterol, campesterol, and  $\beta$ -sitosterol in edible oil; clean-up by florisil column.