

卵黄からのコレステロール抽出方法の改善に係る検討

岡島 俊哉¹⁾, 栗嶋 香奈²⁾, 阪野 航³⁾

Study on the Improvement of the Extraction Method of Cholesterol from Egg Yolk

Toshiya OKAJIMA, Kana KURISHIMA, Wataru SAKANO

要 旨

コレステロールは近年、健康志向の高まりからその役割や性質あるいは食品中の含量について興味を持たれている。そして、食品からコレステロールを取り出す実験法もいくつか提案されている。本報告では、日常的に摂取されている卵黄からコレステロールを取り出す方法について、学校での教材化を念頭において検討した。抽出、精製、けん化、結晶化の各段階において用いる適切な溶媒の検討、操作方法の改善を行った。その結果、従来ジエチルエーテルが多く用いられてきた理由、ジエチルエーテル、ヘキサン、アセトン及びアセトニトリルを併用する結晶化効率の向上、精製やけん化段階での新手法の開発などいくつかの改善ができた。コレステロールの抽出は化学に興味を持たせることができる実験であり、栄養学的視点だけでなく、化学的視点からも興味深い教材であることを明らかにした。

1. 緒言

コレステロール（図1）およびその脂肪酸エステル（以下、コレステロール等、という）は一日の必要量を肝臓において生合成されるが、食事からも腸管を経て生体に取り込まれている。コレステロール等は、生物の細胞膜を強化したり滑らかに保つ等、生体の構成成分として必須である。通常60kgの体重の男性では、多い順で、脳・神経系に27g、筋肉に25g、脂肪組織・結合組織に26g、皮膚に13g、血液に9g程度含まれるとされている。このように体内に普遍的に存在するコレステロールであるが食事からの摂取量過多が継続すると血中濃度が上昇していき、その水に難溶性な性質のために血液中の他の難溶性成分を巻き込んで血管壁に沈着しやすくなり、動脈内腔を狭くしたり硬化させるなどの経過を経て虚血性疾患（狭心症、心筋梗塞、脳梗塞等）を起こす原因となる。また、細胞膜において脂質二重膜の空隙を充填して強化する成分であるため、生合成量や摂取量が不足する傾向が続く場合には細胞膜がもろくなり、最終的には脳出血などのリスクも高まるとされている。そのため、コレステロールは食事からの一日当たりの

1) 佐賀大学 文化教育学部 環境基礎講座

2) 佐賀大学 文化教育学部 学校教育課程

3) 佐賀大学 文化教育学部 人間環境課程

適切な摂取量が決められている。

卵黄や烏賊（イカ）などはそのコレステロール等を多く含む食材の一つであり、食品に含まれるコレステロールを抽出する教材としてしばしば用いられる。また、胆石などからの抽出も行われる。

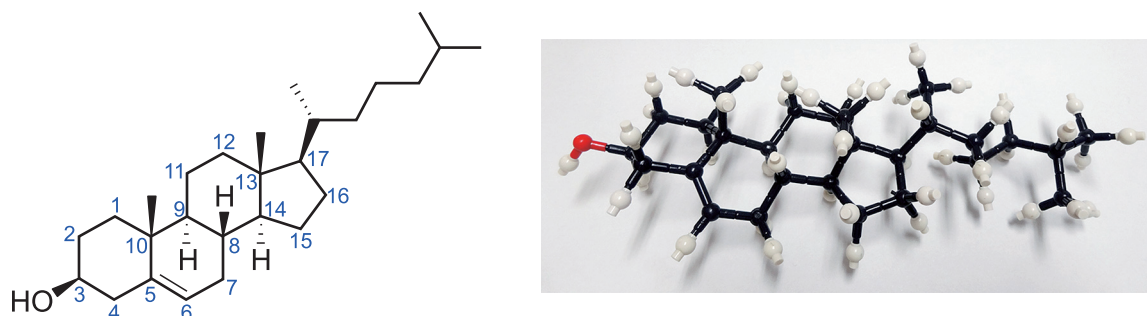


図1. コレステロールの化学式（左）と分子模型

コレステロールの抽出実験には抽出、濃縮、クロマトグラフィー、結晶化などの化学操作の基本手法が多く含まれており、化学操作を学ぶ教材として魅力が大きい。しかしながら、コレステロールを多く含む食品には中性脂肪も多く含まれていることが多く、いずれも脂溶性であるため、両者の分離に時間と手間を要する。このことは、教材化の大きな障害である。これまでいくつか教材化を試行した論文等が提出されているが、いずれも学校で実験を行うことができる条件（特に時間的制約）を事実上満たしていない。たとえば、カラムクロマトグラフィーを行い分画する操作、中性脂肪やコレステロールエステルなどのけん化（鹸化）などは大変時間がかかり、また技能を要する操作である。従って、卵黄などの食品に含まれるコレステロールを、より多量の中性脂肪（トリグリセリド）から如何に効率的に分離できるか、如何に簡単かつ速やかにできるだけ純粋な状態で得られるか、が教材化成功のカギである。文献1)においてもクロマトグラフィーを行っているが、この操作をせずにコレステロールを得ることができれば、教材として極めて有用な教材になり得る。

これまで、コレステロールの抽出実験についての報告は実験書やインターネット等において散見するものの、詳細な条件検討（溶媒や精製のデータ提供）を行った文献はほとんど見当たらない。また、その多くは溶媒としてジエチルエーテルを用いているが、他の溶媒の不都合等その理由を系統的に記載した論文も見当たらない。そこで本研究では、一連の操作を簡潔にするための抽出溶媒の検討、精製条件（カラムクロマトグラフィーの充填剤の違いと手法）を中心に考察した。

2. 有機溶媒

本研究で使用した有機溶媒は、ジエチルエーテル ($C_2H_5OC_2H_5$)、アセトン (CH_3COCH_3)、クロロホルム ($CHCl_3$) の3種類である。その他、小スケールの実験をヘキサン ($n-C_6H_{12}$)、アセトニトリル (CH_3CN)、ジクロロメタン (CH_2Cl_2)、エタノール (C_2H_5OH)、テトラヒドロフラン (THF, C_4H_8O) でも行った。ジエチルエーテルは消防法危険物第4類の特殊引火物に区分され、沸点が低く揮発性が高く、引火性も大きい。しかしながらジエチルエーテルが用いられる理由として、コレステロールを比較的良く溶かすこと、有機溶媒の中では毒性が比較的低いこと、卵黄から注されてくる夾雑物が比較的少ないことが挙げられる。従来、卵黄からのコレステロールの抽出はジエチルエーテルで行われてきたが、その理由についても本研究で確認した。

3. 実験

3-1. 抽出

実験は大きく二つの段階に分けられる。最初の段階は抽出である。抽出に用いた装置はソックスレー抽出器である。まず、ゆで卵の卵黄部分を取り出して重量を計り、砕いて円筒ろ紙に入れる（写真1）。円筒ろ紙をソックスレー抽出器（写真2）にセットして溶媒を加熱還流させ、円筒ろ紙中の卵黄を繰り返し有機溶媒で浸漬し、溶媒に可溶性成分を卵黄からすべて抽出する。

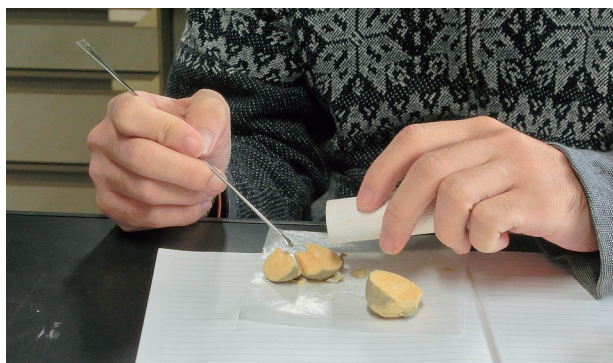


写真1. 卵黄を円筒ろ紙に入れる



写真2. ソックスレー抽出器

溶媒は左からアセトン、ジエチルエーテル、クロロホルム

この装置は、加熱されて蒸発してくる溶媒蒸気を最上部の冷却塔で液化し、卵黄を一定時間浸して可溶成分を溶出させ、下部の溶媒貯留容器に抽出していく装置である。欠点としては加熱に弱い成分の抽出には適用できないが、コレステロール等は熱で分解しにくいいため利用でき、装置内部の溶媒の動き（状態変化や個液抽出の様子）がわかりやすいので教材装置としても有用である。

写真2では、右端の装置で中央部の円筒ろ紙を浸している様子（黄色に着色）がわかる。円筒ろ紙の内部に卵黄が入っている。中央のマントルヒーターで加熱しているフラスコの着色は、溶出された成分による色である。

中央円筒部が次第に液体で満たされていき、ある液量に達すると可溶成分を溶解した溶媒が細管を下って、下のフラスコに戻る。この際抽出されてくる卵黄から溶出した可溶成分を“粗抽出成分”と呼び、コレステロール等のほかに中性脂肪など、用いた溶媒に応じた可溶成分が抽出されてくる。

粗抽出成分を溶かした溶液をスリナスフラスコに移しエバポレータ（写真3）を用いて有機溶媒のみ蒸発留去しフラスコに残った成分の重量を測る。



写真3. エバポレータ

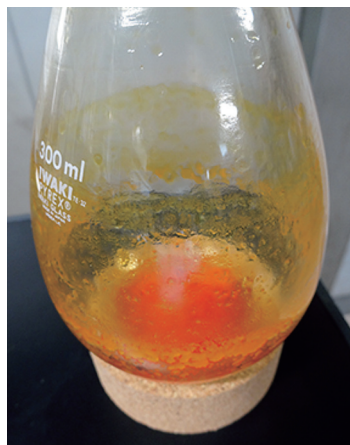


写真4. 溶媒留去後



写真5. 抽出後の残留固形物

有機溶媒の種類を変えて卵黄の重量、抽出されてきた可溶成分（写真4）の重量および円筒ろ紙に残った固形物の重量を表1に示す。写真5は残った固形物でかなり固く主にタンパク質とされている。

表1. 三種類の溶媒によるソックスレー抽出結果の比較

質量 (g)	クロロホルム	アセトン	ジエチルエーテル
卵黄	30.4	29.1	35.7
粗抽出成分	10.4	14.4	11.8
残渣	8.7	4.8	7.7
抽出率 (%)	34.1	49.7	33.1

※抽出率 (%) = 粗抽出成分の重量 (g) / 卵黄の重量 (g)

3-2. コレステロールの溶解性（溶媒による違い）

コレステロールおよび中性脂肪の溶媒への可溶性について調べた。表2に結果をまとめて示す。また、溶解の様子を写真6に示す。コレステロールを溶解しない溶媒は、ヘキサン、アセトニトリル、エタノールおよびアセトンであり、比較的溶かす溶媒はジエチルエーテル、容易に溶かす溶媒はテトラヒドロフラン（THF）、ジクロロメタンおよびクロロホルムの三種類であった。

また、中性脂肪（その代表として今回はトリパルミトイルを用いた）については、溶解する溶媒は、ジクロロメタンとクロロホルムであり、ある程度溶解する溶媒は THF、残りの五種類の溶媒は溶解しなかった。

表2. 各種溶媒のコレステロールと中性脂肪（トリパルミトイル）の溶解性

溶媒名	化学式	コレステロール	トリパルミトイル
ヘキサン	C ₆ H ₁₂	不溶	不溶
アセトニトリル	CH ₃ CN	不溶	不溶
エタノール	C ₂ H ₅ OH	不溶	不溶
テトラヒドロフラン（THF）	C ₄ H ₈ O	易溶	難溶
ジエチルエーテル	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅	溶	不溶
アセトン	CH ₃ COCH ₃	不溶	不溶
ジクロロメタン	CH ₂ Cl ₂	易溶	易溶
クロロホルム	CHCl ₃	易溶	易溶

本結果から、コレステロールをできるだけ多く溶かしかつ中性脂肪の溶解を比較的抑える溶媒は、ジエチルエーテルという結果が得られた。実際、今回抽出に用いた溶媒三種（ジエチルエーテル、クロロホルム、アセトン）を比較した結果、クロロホルムの抽出液は褐色透明、アセトンとジエチルエーテルの抽出溶媒は黄色不透明となった。クロロホルムが中性脂肪を多く抽出してくるもののその溶解性が高いこと、後者二種の溶媒は、用いた一定の溶媒量では抽出された中性脂肪の溶解の飽和に達して完全に溶解できず、濁りを生じているものと推測した。

アセトンは表1に示すように抽出の段階では最も抽出効率の良い（可溶成分の重量が最も多い）溶媒であったが、次段の精製を行う際に必要な（濃縮後の）粗抽出生成物を溶解できなかったことから、次段の操作へのスムーズな移行という点で不適という結果になった。

この時点で、クロロホルムとジエチルエーテルの二種類の溶媒を候補として残した。

表1と表2を比較すると、卵黄からの抽出率と、標準品であるコレステロールとトリパルミトイルの溶媒に対する溶解性は異なることがわかる。すなわち、クロロホルムが、いずれの標準品も良く溶かす溶媒であるが、実際には卵黄より多くの成分を溶解してきたのはアセトンであった。アセトンは脂溶性物質だけでなく水溶性物質もある程度溶解してくるとされているので、糖やアミノ酸のような比較的分子量の小さい物質を溶解してきたと考えられる。経験則として、疎水性物質の抽出においてはクロロホルムやアセトンは、その溶解性の高さが脂溶性物質の抽出に好んで用いられる理由の一つになっている。実際、人体標本を作成する際に、アセトンを用いて内臓を洗浄することも行われている。

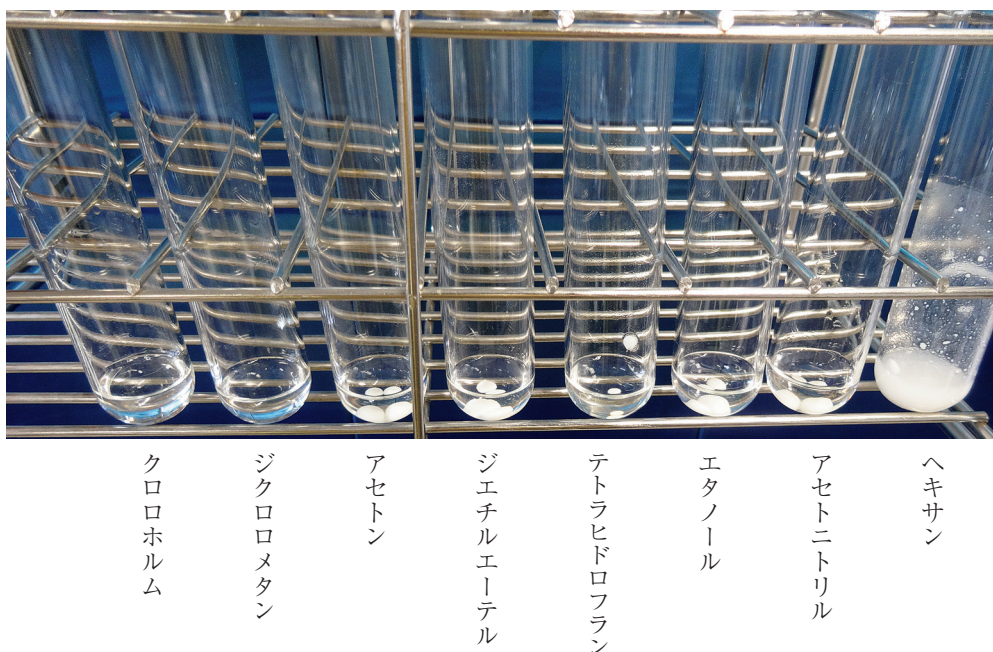


写真6. 各種溶媒のコレステロール溶解の様子
(溶解性は表2を参照)

ジエチルエーテルはその後の精製段階を考えると抽出段階でも用いたい溶媒であるが、ジエチルエーテルの低い沸点のためソックスレー抽出時の冷却水の管理には注意を要した。すなわち、特に早朝に冷却水の流量を調節しても、その後に（棟内の）上水使用量が増加してくるので水圧が下がり、止まることもあった。その際には短時間でも沸点の低いジエチルエーテルが簡単に蒸発してしまい（担当者の注意力に依存するところが大きい）、抽出物が焦げ付きやり直しとなったこともある。そのため、抽出という比較的長時間加熱を継続する場合には、沸点の比較的高い溶媒を用いる方が望ましい。今回は、抽出時間を27時間に統一し、円筒ろ紙の部分が黄色に変色しない（コレステロールは無色であるが他の何らかの可溶成分の溶出が全て終了したと考えられる）状態まで、還流を行った。

3-3. ろ過クロマトグラフィー

ろ過クロマトグラフィーはカラムクロマトグラフィーの一種で、流出画分を取り分けるのではなく、溶媒を一度に流下させる手法である。溶液が充填剤を通過する間に充填剤に吸着しやすい溶質が（充填剤に吸着されて）除去される。溶媒を一気に流下させるので、画分化していくよりも極めて短時間で（簡易に）精製できる操作である。今回は、充填剤としてシリカゲル（ SiO_2 ）とアルミナ（酸化アルミニウム、 Al_2O_3 ）を検討した。

一般にシリカゲルは酸性とされ、粗抽出成分に含まれるアルカリ性（塩基性）成分を除去でき、アルミナは塩基性であるため酸性成分を除去できるとされている。そして、いずれの充填剤も極性があるので、極性成分も吸着除去できるとされている。

まず、標準品のコレステロールをいくつかの溶媒に溶かし、ろ過クロマトグラフィー（シリカゲル（10g）とアルミナ（15g）をそれぞれ通す）を行い、流出してきた留出液をエバポレータを用いて溶媒除去して重量を測定し、コレステロールの回収率を調べた。クロロホルム、ジエチルエーテルともに、コレステロールは10gのシリカゲルを通して全量を回収することができた（すなわち回収率は100%と考えてよい）。アセトンは極性が高くシリカゲル中の不純物さえも溶出させてくるとされているので試さなかった。使用したカラムの内径は20mmで、流したジエチルエーテルの量は充填層であるシリカゲルおよびアルミナの長さの2倍を目処として十分な溶媒量であることを確認できた（写真7）。

以上をまとめると、シリカゲルによってかなりの着色物質は除去できたものの、トリパルミトイルについてはクロロホルム、ジエチルエーテルともにろ過クロマトグラフィーでは除去できなかった。ジエチルエーテルはコレステロールを容易には溶かさないが、粗抽出成分にはジエチルエーテルにコレステロールを溶解させる成分（他の脂溶性成分）が含まれていると考えており、混合物の溶解と標準品の溶解性に違いが生ずる理由の一つと考える。逆にこのことは結晶化に適する候補溶媒として、溶解性の高いクロロホルムとジエチルエーテルが不適切であり、溶解性の低いアセトンやヘキサンが候補となりうることも推測させた。

実際に、粗抽出成分をジエチルエーテルおよびクロロホルムを用いてろ過クロマトグラフィーを行った結果を表3に示した。その結果、シリカゲルではほぼ3g程度の夾雑物を除去できることがわかったが、アルミナろ過クロマトグラフィーでは、流出物を濃縮した重量は充填剤を通す前とほとんど変わらないことがわかった。すなわち、ソックスレー抽出の段階で抽出されてきた極性物質等はシリカゲルろ過クロマトグラフィーにおいてほぼ全量除去されるので、アルミナは使用しなくて（省略して）よいことがわかった。

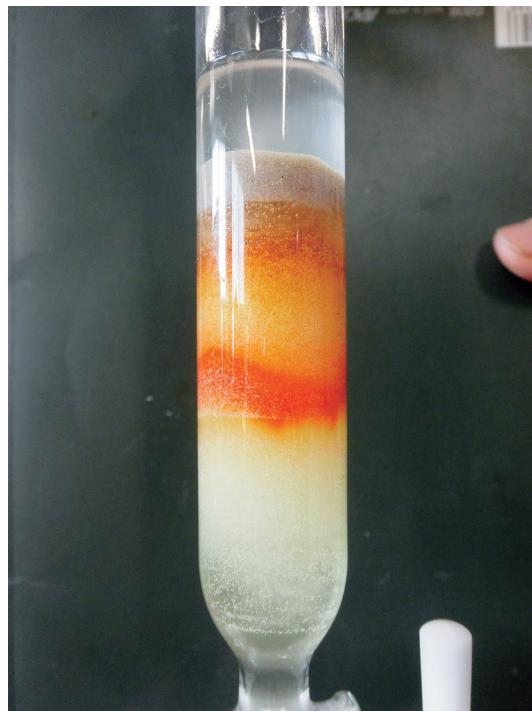


写真7. ろ過クロマトグラフィーの途中経過
（充填剤はシリカゲル、赤色の帯は卵黄に含まれるヨードに因る）

表3. シリカゲルとアルミナろ過クロマトグラフィー比較

	ジエチルエーテル	クロロホルム
シリカゲル		
充填前試料重量 (g)	11.8	10.4
流下後試料重量 (g)	8.5	6.8
夾雑物除去重量 (g)	3.3	3.6
残渣率 (%)	72.2	65.3
アルミナ		
充填前試料重量 (g)	8.5	6.8
流下後試料重量 (g)	8.3	6.5
夾雑物除去重量 (g)	0.3	0.3
残渣率 (%)	97	96

※残渣率 (%) = 流下後試料重量 (g) / 充填前試料重量 (g)

3-4. けん化の条件検討

ソックスレー抽出段階で得られた粗生成物には中性脂肪が多く含まれている。純粋なコレステロールを得るためには、けん化という反応を行い、中性脂肪（トリグリセリド、TG）をアルカリ性の条件で脂肪酸とグリセリンに分解させることが効果的である。しかしながら、この段階は、脂肪酸ナトリウム（石鹼）を製造する工程と同じであるので、その界面活性効果から分離操作が極めて煩雑になる。この段階をより簡単にするために、水—有機層二層法を開発し、有機層を吸い出し新たに加えることを繰り返す手法によるけん化を検討した。この方法は石鹼の生成による分離困難を防ぎながら、分解されて有機層に抽出されてくるコレステロールのみを純粋に分離する手法であり、学校においても難しくない操作として考案した。有機層に用いる有機溶媒の条件としては、①比重が水よりも小さいこと、②水と混和しない（二層になる）こと、③コレステロールを溶解するがTGを溶解しないこと、である。表2および写真6の条件検討からこの三つの条件に適する溶媒はジエチルエーテルのみに絞られたので、実際にけん化反応を行った。その結果、ジエチルエーテルを加え抜き取る作業を繰り返して濃縮したところ、126mgのけん化生成物を得ることができた。この操作の段階で、けん化の際の加熱によって沸点の低いジエチルエーテルが沸騰を繰り返してしまい、臭気の発生がひどかった。今回は大学の実験室なので可能ということであるが、実験室でも局所排気装置がないといけない（教室では実験できない）し、局所排気装置があってもその作業スペースの関係から多数の生徒が同時に体験できない（時間的制約）ことになるので、さらなる条件検討を進めている。現在は水層のみ加熱しながら同時にエーテル層を冷却するための装置の作成に取り組んでいる。

けん化は最も時間のかかる段階であるので、収率を上げることとともに、この段階を簡潔にできれば教材化が大きく前進することになる。

3-5. 結晶化に用いる溶媒

最終段階として結晶化の条件を検討した。コレステロール等の溶解性の高い三種類の溶媒、沸点が高く溶媒留去に時間を要するアセトニトリル、エタノールをのぞく3種の溶媒ヘキサン、ジエチルエーテル、アセトン及びアセトニトリルについて検討した。その結果、ジエチルエーテルに溶解させた溶液にアセトンを添加するとコレステロールの結晶が析出すること、及びアセトニトリルとヘキサンの組み合わせで結晶を精製できることを見出した(表2)。その結晶をろ過してTLC解析したところ標準品のコレステロールであることがわかった(写真8)。一般に卵黄に含まれるコレステロールの量は今回用いた卵黄30g程度の重量では400-500mgと見積もられるので、収率にしておよそ30%となりあまり高くなかった。そのため、収率の向上が今後の課題である。

3-6. まとめ

卵黄からコレステロールを効率よく抽出できる溶媒系として本研究の結果をまとめると、抽出段階ではアセトン、クロロホルム(ジクロロメタンも可)またはジエチルエーテルのいずれでも良いこと、精製のろ過クロマトグラフィーの段階では、シリカゲルのみで極性物質等はほぼ全量除去できるので、アルミナは使用しなくてもよいこと、そして展開溶媒としてはジエチルエーテルが最適であること、けん化の際の有機層としてはジエチルエーテルのみ可能であること(さらなる操作の検討は必要)、結晶化においては、ジエチルエーテル-アセトン、及びアセトニトリル-ヘキサンの組み合わせによりTG中からコレステロールのみを結晶化できる一連の手順を完成させた。

食品からのコレステロールの抽出はこれまで単一溶媒(ジエチルエーテル)で行われてきたが、その理由として学校等でいくつかの溶媒を組み合わせることへの技術的あるいは知識的な限界もあったと思われる。ジエチルエーテルは揮発性が高いことで取扱が簡単となり、身体への毒性も比較的低い、という利点はあったが、単一溶媒であるので、カラムクロマトグラフィーという最も煩雑で時間がかかる操作が不可欠であることが課題であった。今回、最も大きな課題としてけん化反応の詳細な条件検討が残るものの、生徒が十分に理解できる知識で(溶媒の種類と特性の学習を含む)、時間と労力を抑えた実験手法を開発できた。今後はけん化反応の操作の改善とともに、学校における実践授業による操作の改善を行っていきたいと考えている。



写真8. 簡易ろ過装置

4. 参考文献

- (1) 戸谷義明 愛知教育大学研究報告 47 (自然科学編), pp37-42(1998).
- (2) 三橋達雄 有機化学実験法 培風館 東京 pp115-120(1971).
- (3) フィーザー・ウィリアムソン 有機化学実験 原書6版 丸善、東京 pp219-226(1989).
- (4) 五訂増補日本食品標準成分表 (文部科学省).