

エルゴステロールの紫外線照射反応に及ぼす照射波長と プレビタミンD₂の生成量について

高村一知 星野浩子 豊増哲郎* 田中徳夫* 中沢 武**

Effects of Wavelength of Ultraviolet Ray on the Formation Rate of Pre-vitamin D₂ From Ergosterol

KAZUNORI TAKAMURA HIROKO HOSHINO TETSUO TOYOMASU*
NORIO TANAKA* and TAKESHI NAKAZAWA**

In the ultraviolet (hereafter called UV) irradiation of ergosterol, the effects of wavelength (UV irradiation lamp 254nm and 310nm) were investigated on the formation of pre-vitamin D₂. The determination of pre-vitamin D₂ used high performance liquid chromatography. The results were as follows:

- (1) The precursor of vitamin D₂ is pre-vitamin D₂. It was formed when ergosterol (solution alcohol) was exposed to UV irradiation (254nm and 310nm).
- (2) The formation rate of pre-vitamin D₂ with the irradiation of 254nm-lamp increased about 3 times higher than those with the irradiation of 310nm-lamp (after 60 minutes).
- (3) When ergosterol was irradiated with 254nm-lamp and 310nm-lamp at the same time, the formation rate of pre-vitamin D₂ increased about 1.4 times higher than those with 254nm-lamp only.
- (4) The ergosterol contents decreased gradually as the UV irradiation time went on.

近年、わが国では急速な高齢化に伴い、成人の骨軟化症や高齢者の骨粗鬆症などの疾患が増加し、カルシウムやビタミンDに対する関心が高まり、高カルシウム食品やビタミンD含量の高い食品の開発が行われている。

このうち、キノコ類に存在するエルゴステロール (Erg) に紫外線殺菌灯 (254nm) を用いて照射し、ビタミンD₂ (D₂) の前駆物質であるプレビタミンD₂ (Pre-D₂) を生成し、Pre-D₂を加熱によりD₂に変換させD₂含量を増加

させる研究^{3,4,6)}が行われている。小林^{1,2)}らは、Ergが紫外線によりPre-D₂に変換する光化学反応の有効紫外線波長は230~350nmであり、そのうち295nmが最大であると報告している。このことから、254nmを主波長とする紫外線殺菌灯を用いるより、295nm前後の波長の紫外線灯を照射するほうがD₂への変換率が高いと考えられるが、これまで254nmの紫外線殺菌灯を用いた研究はあるが、295nm前後の波長照射による報告は殆どない。

Key Words: ergosterol, pre-vitamin D₂, ultraviolet irradiation, ultraviolet wavelength

*財団法人 日本きのこ研究所 〒376 群馬県桐生市平井町8-1

**森産業株式会社 〒376 群馬県桐生市平井町8-1

そこで今回、実用面への基礎実験として、254nmを主波長とする紫外線殺菌灯と、310nmを主波長とする健康線用蛍光ランプを用いて、どちらが効率よくErgからPre-D₂に変換するかについて高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、比較試験を行ったので報告する。

実験方法

1. 試薬および装置

(1) 試薬：試薬はすべて和光純薬工業社製の試薬特級品を用いた。HPLCの移動相はイソプロピルアルコール：n-アミルアルコール：ヘキサン(0.4:0.1:99.5)を用いた。

(2) 装置：高速液体クロマトグラフ装置は日本精密科学社製S-310A型で、HPLCのカラムはNucleosil 100-5(150mm×4.6mm i.d.)を用いた。また記録計は島津クロマトパックC-R6A型を用いた。

紫外線殺菌灯(主波長254nm-20W、紫外線出力4.1W) および健康線用蛍光ランプFL20 S-E(主波長310nm-20W、紫外線出力2.9W)

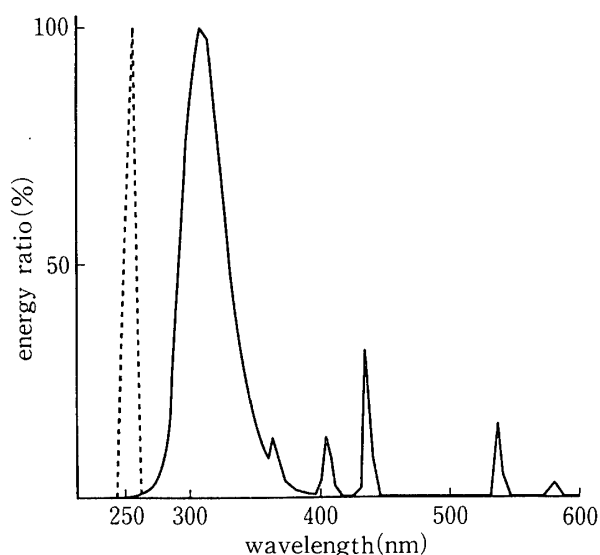


Fig.1 Spectral energy distribution of UV irradiation lamp
solid line : 310nm UV irradiation lamp
broken line : 254nm UV irradiation lamp

は東芝ライテック社製で、Fig.1に示すような分光エネルギー分布⁷⁾を持つ紫外線灯を用いた。

2. 紫外線灯の照射方法

エルゴステロールの標準液は、エチルアルコールとイソプロピルアルコールに各々溶かして80 μ g/mlの試験溶液を調製した。これらの溶液5mlを浅型ビーカーに入れ、このビーカーの周囲を冷水(+7 $^{\circ}$ C)で冷却し、紫外線照射中の試験溶液はスターラーで緩やかに攪拌させた。

照射方法は、310nmの紫外線灯は高さ400mmに、また254nmの紫外線灯は高さ600mmに設置し、試験溶液の上部から紫外線を10分間隔で120分まで照射した。この紫外線照射灯の高さが異なるのは、254nmの紫外線灯は310nmの紫外線灯に対して、紫外線出力が約1.4倍であるから、この紫外線出力の違いをなくすために、便宜的に照射距離で差をつけた。

3. エルゴステロールおよびプレビタミンD₂の定量方法

紫外線を照射した溶液をHPLC用の移動相で10倍に希釈し、その2 μ lを1-(2)のHPLC装置に注入してErgとPre-D₂を定量した。Ergの標準液の調製は常法通り行い、その添加回収率は97.5% \pm 5.2 (Mean \pm S.D(n=5))であった。

またPre-D₂は合成物が市販されていないので、HPLCの保持時間の近接しているD₂を標準品として用いて、Pre-D₂の定量値にかえた。この添加回収率は89.2% \pm 8.2 (Mean \pm S.D(n=5))であった。

実験結果

1. エルゴステロールの紫外線照射物のHPLCクロマトグラム

実験方法2、3に従って、Ergに主波長254nmと310nmの紫外線を60分間照射してFig.2とFig.3のHPLCクロマトグラムを得た。図からわかるように両クロマトグラムの形は同

様であり、A (保持時間4.7分) が未知物質、B (保持時間8.1分) はPre-D₂、C (保持時間11.0分) はErgで、波長254nmも310nmも反応成績体は同一であった。

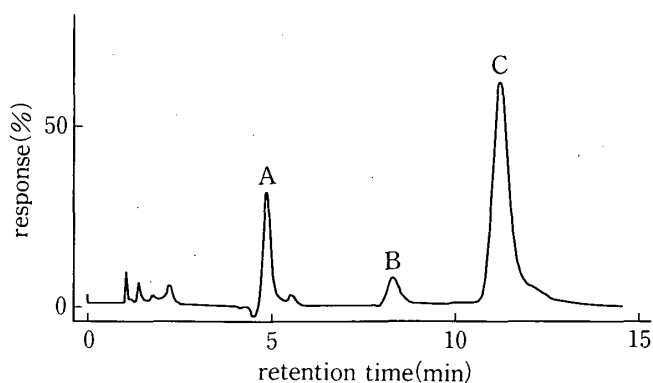


Fig. 2 HPLC chromatogram of ergosterol irradiated by the UV lamp of 310nm

The marks in the chromatogram mean, A: unknown substance; B: pre-vitamin D₂; C: ergosterol.

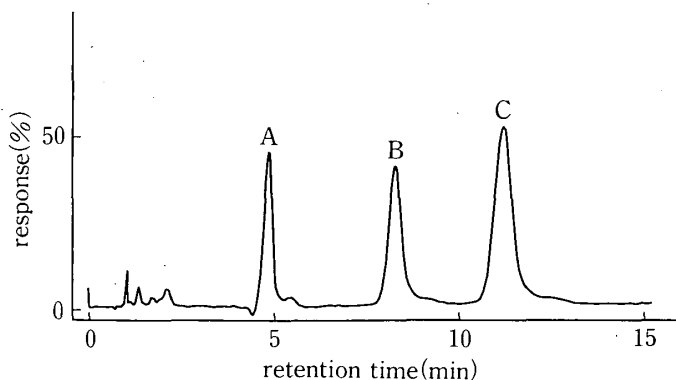


Fig. 3 HPLC chromatogram of ergosterol irradiated by the UV lamp of 254nm

The marks in the chromatogram mean, A: unknown substance; B: pre-vitamin D₂; C: ergosterol.

2. 紫外線照射によるプレビタミンD₂の生成量

(1) Ergのイソプロピルアルコール溶液

Table 1は、Ergをイソプロピルアルコールに溶解して、主波長254nm (高さ600mm) と310nm (高さ400mm) の紫外線を10分間隔で120分まで照射し、Pre-D₂のピーク面積をD₂量に換算した結果である。

254nmの紫外線照射では、10分からPre-D₂の生成が始まり、時間の経過とともに徐々に生成量が高くなり、60分では24.50 μ g/mlとなり120分では60.94 μ g/mlとなった。これに対して310nmの紫外線照射では、30分からPre-D₂の生成が始まり、60分では8.03 μ g/mlとなり120分では19.64 μ g/mlであった。この両波長の照射によるPre-D₂の生成量を比較すると、254nmの紫外線照射の方が60分も120分でも約3倍高かった。

(2) Ergのエチルアルコール溶液

Table 2は、Ergをエチルアルコールに溶解して、上記と同様に紫外線照射実験を行った結果である。254nmの紫外線照射によるPre-D₂の生成量は、20分で21.93 μ g/ml、60分で87.83 μ g/ml、120分で154.41 μ g/mlであった。そして310nmのPre-D₂生成量は、40分(8.36 μ g/ml) から生成が始まり60分で13.40 μ g/ml、120分で20.84 μ g/mlと、254nmの紫外線照射の方がPre-D₂生成量が高かった。

(3) 液性の相違によるPre-D₂の生成量

Table 1とTable 2から、Ergをイソプロピルアルコールとエチルアルコールでそれぞれ溶解し、液性の相違によるPre-D₂の生成量を比較すると、310nmの紫外線照射では殆ど差はないが、254nmの紫外線照射ではエチルアルコールに溶解した方がイソプロピルアルコールに溶解した時より約7倍も高かった。

(4) 254nmと310nmの紫外線の同時照射

Table 2に254nmと310nmの紫外線照射灯を高さ600mmから同時に照射した結果を示した。Pre-D₂の生成量は、20分で60.48 μ g/ml、60分で122.98 μ g/ml、120分で200.19 μ g/mlであった。この結果を254nmの紫外線照射と比較すると60分で1.4倍、120分で1.3倍とPre-D₂の生成量が高かった。

Table 1 Yield of pre-vitaminD₂ in the ergosterol solutions (isopropyl alcohol) irradiated by UV lamp

(μg/ml) (n = 3)

UV wavelength (nm)	UV irradiation time (minuts)												
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
254	0	1.51	5.30	9.08	14.12	22.94	24.50	39.59	41.52	45.97	51.89	52.73	60.94
310	0	0	0	2.55	3.82	3.98	8.03	9.18	12.50	16.07	16.07	17.85	19.64

254nm-lamp was irradiated from the distance of 600mm, while 310nm-lamp was irradiated from the distance of 400mm.

Table 2 Yield of pre-vitaminD₂ in the ergosterol solutions (ethylalcohol) irradiated by UV lamp

(μg/ml) (n = 3)

UV wavelength (nm)	UV irradiation time (minuts)							
	0	20	40	60	80	100	120	
254	0	21.93	50.88	87.83	114.44	134.61	154.41	
310	0	0	8.36	13.40	17.06	19.24	20.84	
254+310	0	60.48	93.45	122.98	151.86	171.53	200.19	

254nm-lamp was irradiated from the distance of 600mm, while 310nm-lamp was irradiated from the distance of 400mm.

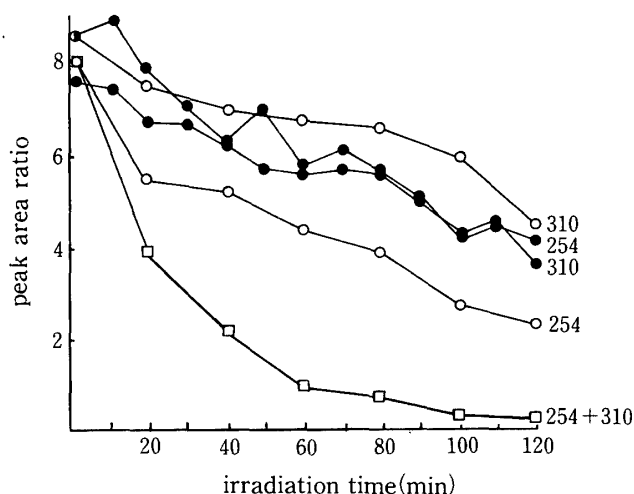


Fig. 4 The degradation of ergosterol by UV irradiation

- : isopropyl alcohol solution
- : ethyl alcohol solution
- : ethyl alcohol solution

3. 紫外線照射によるエルゴステロール量とPre-D₂の同定

Fig. 4 は、254nmの紫外線殺菌灯と310nmの健康線用蛍光ランプを照射した時のErgの減少量をグラフで示した。

この結果から、254nmおよび310nmの紫外線を照射すると時間の経過と共に、両波長ともErg量は減少した。その減少の傾向は、両波長とも殆ど差異はみられなかった。また、254nmと310nmの紫外線を同時照射では、Ergの減少傾向は急激であった。

これらの結果は、紫外線照射によりErgからA (Fig.2,3) の未知の反応成績体と、B (Fig.2,3) のPre-D₂が生成していることが示唆される。そこで、Bの反応成績体を前報⁵⁾と同様にLC-MSで確認したところPre-D₂であった。

考 察

小林^{1,2)}らの紫外線によるErgからPre-D₂への光化学反応実験は、回析格子型照射分光器を用いてErgに単色光を照射し、各波長ごとに照射時間を変え照射エネルギー量を(4.0×

10⁸erg/cm²)一定にしている。この実験から有効紫外線波長は230~350nmであり、そのうち295nmが最大値であるが、Pre-D₂の生成率の高い波長領域は285~310nmと報告している。

今回、われわれが使用した健康線用蛍光ランプの分光エネルギー分布(Fig. 1)は、Pre-D₂の生成率の高い波長領域から大きく外れていないのに、Pre-D₂の生成率が254nmの紫外線殺菌灯より低い値を示したのは、295nmの比エネルギーが約50%程度と低いことが考えられる。それは254nmと310nmの紫外線灯を同時に照射すると、254nmの単独照射よりもPre-D₂の生成量が増加することからも示唆される。

しかし、TOSHIBA技術資料⁷⁾による健康線用蛍光ランプの一般的な特性は、ランプから500mmの距離における健康線の強さは約1.8 E-Viton/cm² (健康線またはドルノー線の単位)で、これは真夏快晴時、正午の直射太陽光中の健康線の強さに相当するので、Pre-D₂生成率の低いことは他に原因があるかと考えられるので、今後の検討課題としたい。

要 約

紫外線の254nmおよび310nmに主波長を持つ紫外線照射灯を用いて、エルゴステロールに紫外線を照射し、どちらの紫外線領域が効率よくエルゴステロールからプレビタミンD₂

に変換するかについて比較試験を行った。また生成するPre-D₂は、HPLCで定量した。

1. Ergのアルコール溶液に254nmおよび310nm波長の紫外線を照射すると、D₂の前駆物質であるPre-D₂が出来ることを確認した。
2. Pre-D₂の生成率を照射時間60分で比較すると、254nmの方が、310nmに対して約2倍高かった。
3. 254nmと310nmの波長の紫外線を同時に、60分照射すると、254nmの単独照射よりも約1.4倍高くなった。
4. Erg量は、照射時間とともに両波長ともに徐々に低くなった。

文 献

- 1) 小林 正、弘岡道子、康村満枝：ビタミン、**50** (5-6)、185、(1976)。
- 2) 小林 正、吉本佐雅子、康村満枝：ビタミン、**50** (4)、157、(1976)。
- 3) 高村一知、星野浩子：New Food Industry、**37**、(8)、33、(1995)。
- 4) 高村一知、星野浩子：聖徳栄養短期大学紀要、**25**、10、(1994)。
- 5) 高村一知、星野浩子：叶多謙蔵：聖徳栄養短期大学紀要、**24**、23、(1993)。
- 6) 竹内敦子、岡野登志夫、和田知子、須藤都、新谷有美、小林 正：ビタミン、**65** (3)、121、(1991)。
- 7) TOSHIBA技術資料：No.F-125、(1992)