報 文

二次元薄層クロマトグラフィー-脂質リン測定 によるリン脂質の定量分析

渡辺睦人^{*1}・伊藤俊洋^{*2}・飯田雅昭^{*3}・岡部篤宣^{*4}・川口良成^{*5}

新保喜久雄^{*6}・園 良治^{*7}・無類井建夫^{*8}・金子俊之^{*1}

^{*1} 昭和産業株式会社総合研究所 (〒273 船橋市日の出 2-20-2)

^{*2} 北里大学教養部 (〒228 相模原市北里 1-15-1)

^{*3} 味の素株式会社中央研究所油脂研究所 (〒230 横浜市鶴見区大黒町 7-41)

^{*4} 財団法人日本食品分析センター (〒151 東京都渋谷区元代々木 52-1)

^{*5} 財団法人日本油脂検査協会 (〒164 東京都中野区本町 4-19-13)

^{*6} 財団法人杉山産業化学研究所 (〒245 横浜市戸塚区影取町 11)

^{*7} ツルレーシチン工業株式会社研究開発室 (〒515-26 三重県一志郡嬉野町大字新屋庄 686-2)

^{*8} 日清製油株式会社研究所 (〒221 横浜市神奈川区千若町 1-3)

Quantitative Analysis of Phospholipid Composition by Two Dimensional Thin-layer Chromatography Followed by Lipid Phosphorus Determination

Mutsuhito WATANABE^{*1}, Toshihiro ITOH^{*2}, Masaaki IIDA^{*3}, Atsuyoshi OKABE^{*4},

Yoshinari KAWAGUCHI^{*5}, Kikuo SHIMBO^{*6}, Ryoji SONO^{*7}, Tateo MURUI^{*8},

and Toshiyuki KANEKO^{*1}

^{*1} Showa Sangyo Co., Ltd. (2-20-2, Hinode, Funabashi)

^{*2} Kitasato University (1-15-1, Kitasato, Sagami-hara)

^{*3} Ajinomoto Co., Ltd. (7-41, Daikoku-cho, Tsurumi-ku, Yokohama)

^{*4} Japan Food Research Laboratories (52-1, Motoyoyogi, Shibuya-ku, Tokyo)

^{*5} Japan Association of Fats & Oils Inspection Institute (4-19-13, Honcho, Nakano-ku Tokyo)

^{*6} Sugiyama Chemical & Industrial Laboratory (11, Kagetori-cho, Totsuka-ku, Yokohama)

^{*7} True Lecithin MFG. Co., Ltd. (686-2, Niwanosho, Ureshino-cho, Ichishi-gun, Mie)

^{*8} Nisshin Oil Mills Ltd. (1-3, Chiwaka-cho, Kanagawa-ku, Yokohama)

A method for the determination of phospholipid composition was developed in collaboration with seven laboratories. The phospholipids were separated on two-dimensional silica gel thin-layer chromatography, using basic and acidic solvent systems in conjunction. The phosphorus content of each fraction was determined by colorimetry after digestion with perchloric acid. Five different conditions to develop this method were carried out using several phospholipid mixtures such as commercial soybean lecithin and egg yolk lecithin.

The repeatability and reproducibility values determined from a statistical analysis of the results indicated that the determination of phospholipid composition by this method could be carried out to an acceptable degree of precision for the major phospholipid components of both commercial lecithins described above.

1 結 言

リン脂質は、生体膜構成員としてほとんどすべての生物組織に広く分布している。近年の生命科学のめざましい発展の中で、デリケートな生命現象を支える生体膜機能の重要性がクローズアップされており、その構成員であるリン脂質群にも研究者の熱い視線が注がれている。

一方、我々の日常生活の中でも、リン脂質は様々な分野に、姿、形を変えて登場して来ており、食品、製菓、医学、界面化学へと、その需要は、量、質ともに急速な広がりを見せている。このような状況の中で、リン脂質組成分析法を眺めて見ると、これといった基準化されたものがあるわけではなく、各研究者がそれぞれの研究目的にあわせて工夫をこらし、微妙な分析技術を競っている

のが現状である。これに対し、業界などからは、基準化されたリン脂質分析法の確立を望む声もあり、特に近年のファインケミカルズとしての高純度リン脂質を含めた商品の品質判定にも利用できる精度の高いリン脂質組成測定法の確立が要望されている。当然のことながら、このような分析法の基準化は、実用的なニーズに応えるだけでなく、様々な研究領域での問題解決にも十分に役立つことが期待される。一方このような要望は、日本国内のみならず、世界的にも強くあり、IUPAC の油脂及び同誘導体委員会でも、リン脂質分析法の基準化の準備が 1980 年以来進められてきた。

このような背景の中で、日本油化学協会の「油脂及び油脂製品試験法部会」の中に「リン脂質検討小委員会」が設けられ、リン脂質組成測定法の基準化が討議されてきた。その中で高速液体クロマトグラフィー法、薄層クロマトグラフィー-デンストメトリー法、薄層クロマトグラフィー-水素炎イオン化検出器法 (TLC-FID 法) などいくつかの分析法が検討されたが、これらはいずれも現時点では一長一短があり、今回の基準化の目的には充分ではないと判断された。ただし、高速液体クロマトグラフィー法は、近い将来基準法として取り上げられる可能性を残しながら、今回は見送ることにし、ケイ酸の二次元薄層クロマトグラフィー法であらかじめそれぞれのリン脂質を分離し¹⁾、その中に含まれる脂質リンを無機リンに分解し、リンモリブデン酸錯体として吸光分析する方法²⁾が、今日での基準化の目的に最もかなったものである、との判断がくだされた。また、表示法についても種々の議論を重ねたが、リン脂質を構成している脂肪酸が一定でないことや、標品が入手しにくいとため、リン脂質への換算係数を現時点では決めかねるため、無機のリンとして表示する方向で合意が得られた。そこで、この方法についての基準化のための分析条件を確立するために、新たに日本油化学協会の「油脂及び油脂製品試験法部会」の中に、日本国内 8 機関の参加を得て「リン脂質専門委員会」が設けられ、IUPAC の油脂及び同誘導体委員会で検討中の分析法^{1), 2)}を参考にして合同実験を行い、諸条件に検討を加え、リン脂質リン組成を再現性よく定量し得る方法を確立したので報告する。

2 実 験

合同実験に参加した機関は、次の 7 機関である。(なお、委員会は 8 機関)

味の素 (株)、北里大学、昭和産業 (株)、(財) 杉山産業化学研究所、ツルーレシチン工業 (株)、日清製油 (株)、(財) 日本食品分析センター

2.1 試 薬

標準リン酸溶液：1.0986 g の特級リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) を水に溶解して 250

ml とし、この溶液 5 ml を 100 ml に希釈し、検量線作成用標準リン酸溶液とした。

モリブデン酸アンモニウム溶液：特級モリブデン酸アンモニウム 5.8 g を 20 ml の特級濃塩酸に溶解し、水で 100 ml に希釈した。この溶液は使用の 24 h 以上前に調製した。

分析用試料として用いた精製大豆レシチン、及び粗大豆レシチンはツルーレシチン工業株式会社製のもの、精製卵黄レシチン、粗卵黄レシチン、及び卵黄油はキューピー株式会社製のものを、ヘキサン溶液として配布した。(本報では、市販されている大豆や卵黄のリン脂質混合物を、それぞれ大豆レシチン、卵黄レシチンと称する。)

その他の試薬はすべて市販の試薬特級をそのまま用いた。

2.2 方 法

以下の方法に従って、実験を行った。

2.2.1 薄層クロマトグラフィー

リン含量に応じ試料約 0.2~0.5 g を 100 ml メスフラスコにはかり取り、ヘキサンに溶解して 100 ml とし試料溶液とする。この 100 μl をマイクロシリンジ (100 μl が正しくはかりとれるもの) を用い、シリカゲル薄層板 (10×10 cm または 20×20 cm、厚さ 0.25 mm、市販のプレコート薄層板) の右下端で、両端から 1.5~2 cm の所に負荷する。試料を負荷した薄層板を、展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：7N 水酸化アンモニウム (130：60：8 vol/vol/vol) で上昇法により展開する。溶媒先端が薄層板の約 80% に達してから、展開槽から取り出し溶媒を減圧デシケーター中で吸湿を防ぎながら蒸発させたのち、薄層板を右に 90 度回転させ展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：酢酸：水 (170：25：25：6 vol/vol/vol) で再度上昇法により展開する。展開終了後、薄層板を風乾し、あらかじめヨウ素を入れた発色槽に入れ各リン脂質のスポットを確認して印をつける。

2.2.2 定 量

a. 検 量 線

標準リン酸溶液 (リン量 50 $\mu\text{g/ml}$) の 0, 40, 80, 120, 160, 200 μl を分解用試験管 (内径 19 mm、高さ 10 cm 以上) に取り、沸騰石 2 個と 70% 過塩素酸 1 ml、濃硝酸 2~3 滴を加え、続いて金属製ブロックヒーターにて、140°C または 160°C で、60 min または 90 min 加熱した後、室温まで冷却し、水 14 ml を加えて良く混合する。次に、この 10 ml を遠心分離用試験管 (16~20 ml 容でストッパー付き) に取り、モリブデン酸アンモニウム溶液 1 ml を加え激しく振った後、酢酸ブチル 5 ml

を加え再度よく振とうする。続いて 2000~3000 rpm で約 3 min 遠心分離し、上澄みを分光光度計で酢酸ブチルを対照として 310 nm の吸光度を測定する。測定結果は普通目盛の方眼紙に縦軸に吸光度を、横軸にリン量を取り検量線を描く。

b. リンの定量

(イ) リン脂質画分中のリンの測定

2・2・1 の項で得たリン脂質画分を薄層板よりはいく離し分解用試験管にシリカゲルごと移し、2・2・2・a と同様に操作してリン量を測定する。

(ロ) 総リンの測定

試料溶液 100 μ l を分解用試験管に取り、ヘキサンを留去したのち 2・2・2・a と同様に操作してリン量を測定する。

3 結果と考察

3・1 経 緯

5 回の合同実験は、Table-1 に示した試料と分解条件で行った。まず、第 1 回合同実験は、細部の条件の規制をせずに、IUPAC で検討の方法に従い、当該方法の精度、問題点の把握を目的として行った。その結果、総リンについては変動係数 7.51% と合同実験としては全く問題の無いものと考えられたが、各成分の相対比については、変動係数 6.27%~25.95% とばらつきが見られた。原因として薄層板上での分離不良、20×20 cm の薄層板使用のためカススポットが大きくなったこと、又、薄層に使用したシリカゲルがリンの回収に影響を及ぼしている等、種々の意見が出された。しかし、なれの点を考慮すると、若干の条件規制により、公定法化可能と判断した。

そこで、第 2 回合同実験では、薄層板を 10×10 cm とし、負荷量も第 1 回の半分の 0.5 mg 相当として実験を行ったところ、総リン量の変動係数は 4.69%、各成分の相対比率については、変動係数 3.90%~7.46% と良好な結果が得られた。又、薄層板からの回収リン量の総リン量に対する回収率は、92.1% であった。改善理由としては、3・2 で述べるような事に加えて熟練度も影響したものと考えられた。また、薄層板の大きさは無関係であった。

第 3 回合同実験は、前 2 回の実験が精製大豆レシチンで行っているため、試料の範囲を広げるべく、粗大豆レシチン、及び精製卵黄レシチンを試料とした。その結果、粗大豆レシチンは前回同様の良好な結果であったが、精製卵黄レシチン

Table-1 Experimental conditions chosen in the collaborative meetings.

Experiments	Samples	Digestion conditions
First	Refined soy lecithin	140°C, 60 min*
Second	Refined soy lecithin	140°C, 60 min
Third	Crude soy lecithin Refined yolk lecithin	140°C, 60 min
Fourth	Crude soy lecithin Refined soy lecithin Crude yolk lecithin	140°C, 60 min & 160°C, 90 min
Fifth	Refined soy lecithin Refined yolk lecithin	160°C, 90 min

* IUPAC Testing Method.

についてはばらつきの大きな結果が得られた。一部の機関では、経験的に卵黄レシチンの場合、分解温度を 160°C にしており、その結果高い数値を示していたことから、3・4 で述べるような検討を一部の機関で行った。

この結果をもとにして、第 4 回合同実験は分解条件の確認のため、全機関により 140°C 60 min と 160°C 90 min の比較を、精製大豆レシチンと粗卵黄レシチンを試料として行った。その結果、160°C 90 min の値の方が 140°C 60 min より高い定量値を示し、卵黄レシチンの場合には危険率 5% で有意差が見られた。これより、分解条件を 160°C 90 min に変更すると同時に、リン脂質含量や、構成成分の差異により分解率が異なることが予想され、3・5 に述べる検討を行った。

第 5 回合同実験は、以上の総まとめを目的として、精製大豆レシチンと精製卵黄レシチンを試料として実験を

Fig-1 Typical chromatograms of a commercial refined soybean lecithin (a) and a commercial refined yolk lecithin(b) on silica gel G plate.

行った。結果は、基準法として充分満足のいく結果であった。

以下に結果を示す。

3.2 薄層クロマトグラフィー

Fig.-1 に精製大豆レシチン及び精製卵黄レシチンのヨウ素を発色剤に用いたクロマトグラムを示した。この結果から分離状況は良好と判断し、以下展開溶媒は固定した。**Fig.-1** には、合わせて Dittmer 試薬³⁾陽性画分に○印を付したが、同定確認されている以外のリン含有成分も数多く見られる。そこで合同実験に際しては、主たる成分、すなわち大豆レシチンの場合には phosphatidylcholine (以下 PC と略)、phosphatidylethanolamine (以下 PE と略)、phosphatidylinositol (以下 PI と略)、及び phosphatidic acid (以下 PA と略) の 4 成分を、卵黄レシチンの場合には PC, PE, 及び sphingomyelin (以下 SPM と略) の 3 成分を、それぞれ単一成分として、それ以外の Dittmer 試薬陽性画分 ($X_1 \sim X_7$) 及び原点については一括して Others として統計処理した。

薄層クロマトグラフィーに関する操作法については、成書のとおりであるが、二次元展開に移行する際の溶媒留去中に吸湿したり、一晚放置するなど放置時間が長くなると二次元展開時の分離が異常に悪くなる現象が見られた。従って、溶媒留去に際しては、ハンドドライヤーで強制的に行うか、減圧デシケーター中で処理する等の配慮が必要であると判断した。

更に、リン脂質画分のシリカゲルを TLC プレートよりかきとる際には、少量の蒸留水またはアルコールを噴霧してシリカゲルを軽く湿らせると、飛散することなく容易にはく離することができた。

3.3 検量線

5 機関について標準リン酸溶液の酢酸ブチルを対照とした吸光度を、同一グラフ上にプロットした所、**Fig.-2** に示した検量線を得た。なお、他 2 機関は試薬ブランクを対照としたため対象としなかった。その結果、回帰方程式は $P = -0.142 + 9.461 \times \text{Abs}_{310\text{nm}}$ で、相関係数は $r = 0.9996$ と極めて高い相関を示し、高濃度でも直線性を示すことを確認した。各濃度における吸光度の変動係数は、すべて 2% 以下のばらつきで、良好な結果であった。

また、酢酸ブチル層に抽出されたリンモリブデン酸錯体は、 $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$, $\epsilon_{310\text{nm}} = 2.4 \times 10^4$ を示し、抽出直後より少なくとも 6 h は一定の吸光度を示すことを確認した。

以上の結果より、無機リンの定量には、本法が基準法として採用するに十分耐えうるものと判断した。

3.4 リン脂質分解条件

本法で微量のリン脂質を分解するために採用した過塩素酸による湿式分解比色法と、基準油脂分析試験法⁴⁾ 2.2.8.1-71 リン脂質 (比色法) で採用されている乾式灰化比色法の比較を **Table-2** に示した。**Table-2** の精製大豆レシチンの (1), (2) は、ロットが異なる試料を意味する。湿式灰化法では、 140°C 60 min の条件は

Fig.-2 Calibration curve obtained in five different laboratories.

Fig.-3 Effects of digestion temperature and period.

Table-2 Effects of digestion conditions on total phosphorus content.

Samples	Average values found in the seven laboratories (mg/g)		Dry ashing method ⁴⁾ (mg/g)
	140°C 60 min	160°C 90 min	
Refined soy lecithin (1)	26.7	28.6	29.4
Range	(22.8~29.3)	(27.0~29.9)	
Standard deviation	2.48	1.10	
Crude soy lecithin	17.9	19.1	19.9
Range	(15.6~19.0)	(17.4~20.2)	25.2
Standard deviation	1.37	1.15	
Crude yolk lecithin	20.9	23.8	
Range	(18.7~24.0)	(22.0~25.9)	31.4
Standard deviation	2.17	1.47	
Refined soy lecithin (2)	—	30.3	
Range	—	(28.2~32.3)	37.2
Refined yolk lecithin	—	36.2	
Range	—	(34.5~37.9)

Fig.-4 Total phosphorus analysis of egg yolk oil.

分解不充分と考えられ、160°C 90 min の条件では乾式分解法との間に差が見られなかった。

また、精製卵黄レシチンを試料として、分解温度及び時間を検討した結果を Fig.-3 に示した。分解温度は 160°C 以上、分解時間は 60 min 以上でリン測定値が一定となった。分解温度は高いほど、また分解時間は長いほど望ましいと考えられるが、過塩素酸（沸点約 200°C）使用の安全性を考慮して分解条件は 160°C 90 min とすることとした。

a: LP-100, Refined soy lecithin 100%
 LP-60, Refined soy lecithin/Soy salad oil (60:40)
 LP-50, Refined soy lecithin/Soy salad oil (50:50)
 LP-40, Refined soy lecithin/Soy salad oil (40:60)
 LP-30, Refined soy lecithin/Soy salad oil (30:70)

Fig.-5 Total phosphorus analysis of regulated soy lecithin.

Table-3 Analysis of total phosphorus content in the several lecithins studied.

Collaborative experiments	First ^a	Second ^a	Third ^b		Fourth ^a						Fifth ^b	
Sample ^c	RSL	RSL	CSL	RYL	CYL		RSL		CSL		RSL	RYL
Digestion (°C)	140	140	140		140	160	140	160	140	160	160	
Condition (min)	60	60	60		60	90	60	90	60	90	90	
Laboratory A	28.0 (0.48)	29.3 (0.08)	18.7	31.7	22.0 (5.50)	24.9 (0.89)	29.3 (0.39)	29.9 (0.32)	19.3 (2.45)	19.9 (1.48)	31.3	35.8
B	32.3 (0.91)	29.5 (0.66)	19.7	32.2	24.0 (1.61)	25.9 (0.55)	29.3 (0.56)	29.5 (1.22)	19.3 (0.99)	20.1 (0.49)	30.4	36.8
C	29.0 (1.15)	28.8 (0.96)	18.3	32.1	23.0 (2.14)	24.3 (3.17)	28.7 (2.66)	29.4 (1.56)	18.9 (1.46)	18.8 (2.90)	31.0	36.2
D	27.6 (0.47)	27.6 (0.05)	17.8	28.0	20.6 (0.58)	22.2 (0.33)	26.3 (0.35)	27.0 (0.61)	17.7 (1.59)	17.4 (1.03)	30.1	36.3
E	26.3 (1.39)	27.0 (0.34)	19.9	29.3	18.7 (11.2)	22.8 (0.83)	24.8 (1.26)	28.9 (2.15)	17.0 (7.01)	19.4 (1.69)	28.2	34.5
F	29.9 (0.39)	29.6 (0.49)	20.3*	36.1*	18.7 (4.95)	24.4 (0.58)	22.8 (3.34)	27.5 (2.54)	15.6 (1.28)	20.2 (0.84)	32.3	38.0
G	26.3 (0.40)	31.1 (1.57)	20.3*	36.4*	19.1 (9.53)	22.0 (5.45)	26.1 (2.79)	28.1 (5.34)	17.5 (6.48)	17.7 (5.10)	28.9	35.7
Average	28.5	29.0	19.3	32.3	*20.9	*23.8	26.8	28.6	17.9	19.1	30.3	36.2
Standard deviation	2.14	1.36	1.01	3.14	2.17	1.47	2.48	1.10	1.37	1.15	1.41	1.07
C.V. (%)	7.51	4.69	5.23	9.72	10.38	6.18	9.25	3.85	7.65	6.02	4.65	2.96

(), Intralaboratory C.V. (%); ※, Digestion condition 160°C 60 min; *, $P \leq 0.05$.

a: Average of four measurements (mg/g of sample),

b: Average of two measurements (mg/g of sample),

c: RSL, Refined soy lecithin

CSL, Crude soy lecithin

RYL, Refined yolk lecithin

CYL, Crude yolk lecithin

Table-4 Analysis of phospholipid composition by phosphorus (Second and third experiments)

Samples	Refined soy lecithin ^a					Crude soy lecithin ^b					Refined yolk lecithin ^b			
Components	PC	PE	PI	PA	Others	PC	PE	PI	PA	Others	PC	PE	SPM	Others
Laboratory A	6.75	5.76	5.22	4.24	4.12	4.39	3.74	2.79	2.09	2.43	20.83	2.80	0.76	1.73
B	6.75	6.09	4.59	4.13	3.73	4.49	3.89	2.72	2.28	2.37	16.41	3.61	0.36	1.95
C	7.10	6.54	4.73	4.26	2.99	5.00	4.43	3.23	2.38	2.07	21.57	3.67	0.85	2.65
D	7.18	6.78	5.17	4.53	3.70	5.42	4.78	3.47	2.75	2.57	22.28	3.16	0.66	3.09
E	6.64	6.35	4.88	3.95	4.08	4.65	4.05	3.21	2.51	4.74	20.59	3.49	0.99	3.59
F	7.16	6.25	5.94	3.95	6.11	5.74 ^c	4.60 ^c	3.18 ^c	2.83 ^c	4.33 ^c	23.33 ^c	2.77 ^c	1.05 ^c	6.99 ^c
G	8.39	6.52	5.21	4.16	3.17	6.21 ^c	5.33 ^c	4.20 ^c	2.63 ^c	3.05 ^c	24.55 ^c	4.10 ^c	2.07 ^c	2.96 ^c
Average	7.14	6.33	5.11	4.17	3.99	5.13	4.40	3.26	2.50	3.08	21.37	3.37	0.96	3.28
Standard deviation	0.594	0.335	0.444	0.200	1.028	0.686	0.558	0.492	0.264	1.043	2.592	0.487	0.539	1.759
C.V. (%)	8.32	5.29	8.69	4.80	25.76	13.37	12.68	15.09	10.56	33.86	12.13	14.45	56.15	53.63

(Digestion condition : 140°C, 60 min; mg/g of sample, average of two measurements)

a : The second experiment

b : The third experiment

c : Digestion temperature 160°C

Table-5 Analysis of phospholipid composition by phosphorus (Fifth experiment)

Samples	Refined soy lecithin					Refined yolk lecithin			
Components	PC	PE	PI	PA	Others	PC	PE	SPM	Others
Laboratory A	7.86	7.11	4.76	3.29	4.26	24.40	4.00	1.31	2.52
B	7.13	6.72	4.09	3.52	3.88	24.53	6.24	4.51	1.63
C	8.10	7.68	4.67	3.63	3.72	25.09	5.48	1.84	2.50
D	8.56	7.55	4.83	3.27	5.40	23.10	3.26	1.03	0.99
E	7.55	6.73	4.65	3.82	4.46	27.13	4.85	0.91	0.91
F	9.08	7.81	4.90	3.90	6.30	23.40	4.62	1.65	7.05
G	7.41	6.89	4.38	3.40	5.21	22.50	6.03	1.33	2.45
Average	7.96	7.21	4.61	3.55	4.75	24.31	4.93	1.37	2.58
Standard deviation	0.648	0.46	0.284	0.249	0.929	1.538	1.079	0.329	2.091
C.V. (%)	8.14	6.38	6.16	7.01	19.56	6.33	21.89	24.01	81.05

(Digestion condition 160°C, 90 min; mg/g of sample, average of two measurements)

Table-6 Recovery of phosphorus on TLC plate (Fifth experiment)

Samples		Refined soy lecithin			Refined yolk lecithin		
		Total phosphorus	Sum total on tLC plate	Recovery (%) ^a	Total phosphorus	Sum total on TLC plate	Recovery (%) ^a
Laboratory	A	31.3 mg/g	27.28 mg/g	87.2	35.8 mg/g	32.23 mg/g	90.0
	B	30.4	25.34	83.3	36.8	33.91	92.1
	C	31.0	27.80	89.7	36.2	34.91	96.3
	D	30.1	29.61	98.3	36.3	28.38	78.1
	E	28.2	27.21	96.5	34.5	33.80	97.9
	F	32.2	31.99	99.4	37.9	36.72	96.8
	G	28.9	27.29	94.3	35.7	33.38	93.5
Average		30.3	28.26	93.3	36.2	33.33	92.1
Standard deviation		1.404	2.535	—	1.069	2.590	—
C.V. (%)		4.63	8.97	—	2.95	7.77	—

(Average of two measurements)

a, (Sum total on TLC plate)×100/(Total phosphorus)

3.5 適用範囲について

卵黄油を試料として、分解時間を検討した結果を **Fig.-4** に示した。アセトン不溶物としてリン脂質含量が約 30% の卵黄油は、分解温度 160°C では 3h 以上で一定の値を示し、乾式灰化比色法の値 11.7 mg/g とほぼ一致した。

また、精製大豆レシチンに大豆サラダ油を加えて、リン脂質含量を調整した試料で総リンを測定した結果を **Fig.-5** に示したが、分解温度 160°C ではリン脂質含量が 50% 以下になると分解時間 90 min では不充分であった。

以上のことから、リン脂質含量 50% 以下のものは分解時間を適宜延長する必要があると考えられた。又、リン脂質含量の特に低い試料に適用する場合には、アセトン不溶物を分離する等の濃縮操作を組み合わせることが望ましいと考えられた。

3.6 合同実験結果

3.6.1 総リンの定量

第 1 回～第 5 回の合同実験で測定したレシチンの総リンを **Table-3** に示した。第 1 回～第 3 回の合同実験は 140°C 60 min の分解条件で行ったが、160°C で分解を行った一部の機関の分析値はやや高い値を示した。第 4 回合同実験では、140°C 60 min と 160°C 90 min との分解を比較したところ、全般に 160°C 90 min の方が高い値を示すと同時に、ばらつき少なく、**3.4** で述べたように乾式灰化比色法の値とよく一致した。第 5 回合同実験は、最終的分解条件である 160°C 90 min で行い、機関間の変動係数 (C.V.) は 5% 以内と良好な結果であった。

3.6.2 リン脂質リン組成の定量

第 2, 3 回合同実験の分解を 140°C 60 min で行った結果を **Table-4** に、また第 5 回合同実験の分解を 160°C 90 min で行った結果を **Table-5** に示した。160°C

90 min の分解では、主要成分の機関間の変動係数はおおむね 10% 以下と良好であった。

3.6.3 TLC プレートから回収率

第 5 回合同実験における、総リンに対する TLC プレートからの回収率を **Table-6** に示した。精製大豆レシチン及び精製卵黄レシチンの平均回収率はいずれも 90% 以上で、機関間に若干のばらつきは見られるものの高率で回収されており、充分満足できる結果であった。

このことから、TLC プレートからすべてのリン脂質成分を回収しなくても、総リン量と TLC プレートから回収した対象成分のリン量の比で、リン脂質リン組成比を求めることが可能と判断した。

4 結 言

レシチン中のリン脂質リン組成は、二次元 TLC にて各成分を分画した後、各リン脂質成分を過塩素酸を用いる湿式灰化法により分解し、リンをリンモリブデン酸錯体として、比色法により測定する方法で、精度、再現性ともに良く定量することができた。

終わりにのぞみ本研究の発表を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻をいただいた油脂及び油脂製品試験法部会の浅原照三部会長、並びに橋本哲太郎幹事に対し深甚の謝意を表すものである。また、試料を御提供下さったツルレーシチン工業株式会社、キューピー株式会社両社に対し心から感謝する次第である。

なお、本研究の一部は油化学講演会（昭和 61 年 6 月）にて発表した。

（昭和 61 年 7 月 29 日受理）

文 献

- 1) W.L. Erdohl, A. Stolyhwo, O.S. Privett, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 513 (1973)
- 2) R.R. Lowry, I.J. Tinsley, *Lipids*, **9**, 491 (1974)
- 3) J.C. Dittmer, R.L. Lester, *J. Lipid Research*, **5**, 126 (1964)
- 4) 日本油化学協会編, 基準油脂分析試験法 2.2.8.1-71