報 文

TLC-酵素法による部分加水分解リン脂質中のリゾホスファチジルコリン及びホスファチジルコリンの定量

栗山 健一・無類井建夫

日清製油(株)研究所(〒221 横浜市神奈川区千若町1-3)

Determination of Lysophosphatidylcholine and Phosphatidylcholine in Partially Hydrolyzed Phospholipid by TLC-Enzyme Method

Ken-ichi KURIYAMA and Tateo MURUI

Research Laboratory, The Nisshin Oil Mills, Ltd.

(1-3, Chiwaka-cho, Kanagawa-ku, Yokohama-shi, 〒221)

We describe a new method for determination of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in partial hydrolyzed phospholipids. The method consists of fractionation of choline-containing phospholipid by preparative TLC and enzymatic determination based on the choline-oxidase-phenol method. The method affords better specificity and shorter time than the conventional two-dimensional TLC method are possible. Reproducibility ($CV < 3\%$) and good agreement with those of two-dimensional TLC method were confirmed. This method is thus applicable to the determination of lysophosphatidylcholine and phosphatidylcholine in partially hydrolyzed phospholipids.

1 緒 言

生体膜の必須構成成分であるリン脂質はその多様な特性によって、食品、化粧品、医薬品等の広い分野で乳化剤や医薬品素材として需要を増している¹⁾。特に食品分野では、乳化剤の多様化が進みつつあり、その中で酵素反応によるリン脂質の加水分解やエステル交換等によりさらにその機能の向上が検討されている。大豆リン脂質等をホスホリパーゼ A₂ で部分加水分解して得られるいわゆる部分加水分解リン脂質は、親水性の高さと乳化安定性から、新規の乳化剤としてその応用が注目されている^{2)~6)}。一方、この部分加水分解リン脂質の主要成分であるリゾホスファチジルコリン (LPC) やホスファチジルコリン (PC) の分析法には、二次元薄層クロマトグラフィー (二次元 TLC) 法⁷⁾、TLC-FID 法⁸⁾、HPLC 法^{9)~11)}、酵素法¹²⁾等多数報告されている。しかしながら、TLC を基本とする方法で部分加水分解リン脂質中の PC や LPC を分析する場合、LPC の他に少量ではあるが他のリゾリン脂質も混在し、TLC 上でこれらリン脂質との十分な分離が必要となる。従って、二次元 TLC 法や TLC-FID 法では、非常に熟練度の高い正確な分析技術が必要となり品質管理に適さない。HPLC

法は、操作が比較的簡便でリン脂質の組成分析に有効な方法であり、検出器としては UV 検出器⁹⁾、RI 検出器¹⁰⁾、MS 検出器¹¹⁾等が検討されている。最も広く用いられる UV 検出器では、構成脂肪酸の種類により応答が異なるため定量分析における標準物質の選択には注意を要し、また、PC と LPC の溶出条件が大きく異なることから同時に両者を測定することは現在のところ困難である。

一方、酵素反応を利用した PC や LPC の分析法はおもに臨床検査分野において広く採用されており¹³⁾、現在ではそのための酵素剤もキットとして容易に入手できる状況にある。最もよく用いられている酵素分析法はコリンオキシダーゼフェノール法¹²⁾でコリンを含むリン脂質から特異的にホスホリパーゼ D によってコリンを遊離し、コリンオキシダーゼとペルオキシダーゼの酸化還元反応によって、フェノールと 4-アミノアンチピリンから生成するキノ系色素の吸光度を測定する方法である。この方法は分子内にコリンを含有しないリン脂質の妨害を受けないが、コリンを測定するために PC、LPC 及びスフィンゴミエリン (Sph) を相互に区別することができない¹²⁾。このように部分加水分解リン脂質のような PC、LPC や他のリゾリン脂質が混在した複雑

な組成の試料の分析には、従来の分析法では充分とはいえず、品質管理等の分野からも改善が求められている。

そこで筆者らは、TLCの分離機能と酵素反応の特異性を組み合わせ、部分加水分解リン脂質中のPC、LPCを個々に定量する方法を検討した。その結果、本法(TLC-Enz法)は、1)従来の二次元TLC法に比べて迅速かつ簡便であること、2)他の脂質やリン脂質種の影響を受けずに両者の同時定量が可能なこと、3)精度も良好であることが判明した。また、本法を検討する過程において、シリカゲルに吸着したリン脂質の酵素反応は、通常とは異なる興味深い挙動を示すことが判明し、これらについて若干の検討を行ったのでその結果についてもあわせて報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

2.1.1 標準溶液

二次元TLC法⁷⁾により純度を確認した大豆及び卵黄由来の高純度PC(いずれもリポイド社製)、LPC(大豆由来は分取HPLCにより調製、卵黄由来はリポイド社製)、モノパルミトイル及びモノステアロイルLPC(AVT社製)、卵黄由来のSph(AVT社製)、各20mgをそれぞれ10mLメスフラスコにはかり取り、クロロホルムで溶解後定容とし、各標準溶液とした。

2.1.2 試料溶液

LPCまたはPCとして10mg以上になるように部分加水分解リン脂質を10mLメスフラスコにはかり取り、クロロホルムで溶解後定容とし、試料溶液とした。

2.1.3 測定用酵素液

リン脂質定量用試薬デタミナーPL(20mL×8協和メデックス社製)を用い、酵素剤1本を酵素剤溶解液20mLに溶解して、測定用酵素液とした。なお、測定用酵素液1mLにはホスホリパーゼD 2.5 U、コリンオキシダーゼ 2.0 U、ペルオキシダーゼ 12.5 U、4-アミノアンチピリン 1.0 mM、フェノール 10.6 mM、グッド緩衝液 0.1 M (pH 7.0)を含む。

2.1.4 酵素

Streptomyces sp. 由来のホスホリパーゼ D (以下 PL-D, EC 3.1.4.4, ベーリンガー・マンハイム山之内社製), *Alcaligenes* sp. 由来のコリンオキシダーゼ (以下 COD EC 1.1.3.17, フナコシ薬品社製), *Horse radish* 由来のペルオキシダーゼ (以下 POD, EC 1.11.1.7, ベーリンガー・マンハイム山之内社製)を用いた。

その他、残留農薬試験用アセトン 300 (和光純薬社製)、TLC板はシリカゲル 70 プレート (和光純薬社製) (10×10 cm)を用いた。

2.2 装 置

分光光度計は、U-3410 型 (日立製作所社製)を使用した。

2.3 方 法

2.3.1 TLC

試料溶液 50 μ L をマイクロシリンジを用いて TLC 板の下端から 1 cm の点に塗布し、クロロホルム/メタノール/酢酸/水=50/40/12.5/3 (vol/vol/vol/vol) で上昇法により展開した。約 1 h 後、TLC 板を展開槽から取り出し十分に乾燥した後、標準試薬の PC、LPC 及び Sph とほぼ同じ R_f 値の区分をかきとり、試験管 (10×150 mm) に移した。

2.3.2 酵素反応と定量

PC、LPC 及び Sph の各区分のシリカゲル粉末を移したそれぞれの試験管に測定用酵素液 3 mL を加え、37℃で2h加温した。水層をピペットを用いて、別の試験管 (10×150 mm) に移した後、シリカゲルの残さにアセトン 2 mL を加えてかくはんした。静置後、アセトン層をピペットを用いて全量とり、先の水層と合わせ遠心分離 (4,000×g, 20 min) した。水を対照として、上澄み液の 400, 485 及び 650 nm における吸光度を測定し、分光光度計付属の 3 波長演算機能を用いて 485 nm における補正吸光度を得た。同時に試薬ブランクとして測定酵素液 3 mL を、上記の操作に従って測定し、得られた補正吸光度を試料の補正吸光度から差し引き、試料溶液中の LPC または PC による吸光度とした。

2.3.3 検量線

標準溶液の 0~0.2 mL を前項に従って TLC 及び酵素反応に供し、各 PC または LPC 量に対してそれぞれの吸光度をプロットして検量線を作成した。

3 結果及び考察

3.1 TLC

TLC-Enz 法はコリンを含まない他のリン脂質が混入してもその影響を受けないので、TLC では PC と LPC (試料が卵黄由来の場合 Sph) が確実に分離すれば充分であった。2.3.1 に示した展開条件による標準の PC、LPC 及び Sph の相互の分離度合は良好であった (PC ; R_f =0.7, Sph ; R_f =0.5, LPC ; R_f =0.3)。また部分加水分解リン脂質においても、PC、LPC 及び Sph の区分は十分に分離していた。

3.2 検量線

2.3.3 に従い検量線を作成したところ、PC は、0.05~0.3 mg の範囲において、また LPC は、0.02~0.2 mg の範囲で良好な直線性を示した (Fig.-1)。また、由来にかかわらず PC は同一の検量線となるが、LPC では、由来によって検量線に若干の相違が存在した (Fig.-1)。これは、各標準溶液に用いた高純度リン脂質の脂肪酸組成から得られる平均分子量が、PC はその

Fig.-1 Calibration curve for PC, LPC and Sph.

Table-1 Analytical data of standard samples.

	Soy PC	Egg PC	Soy LPC	Egg LPC
Phospholipid (%) ¹⁾				
PC	93.6	96.1	N. D.	N. D.
LPC	Trace ²⁾	2.7	97.0	96.5
Sph	N.D. ³⁾	1.2	N.D.	Trace
Fatty acid composition (%)				
14:0	—	—	—	0.4
16:0	12.8	32.5	11.5	67.6
16:1	—	1.3	—	0.6
18:0	3.1	12.5	8.2	28.1
18:1	10.0	31.3	9.6	2.9
18:2	67.0	16.3	62.9	0.4
18:3	7.0	—	5.3	—
20:0	—	—	2.5	—
20:1	—	—	—	—
20:4	—	3.3	—	—
22:6	—	2.9	—	—
Avr. MW.	771	770	520	504

1) Determined by two dimensional TLC method.

2) Trace<1 %

3) Not detected.

由来にかかわらずほぼ同じであるのに対し、LPCでは由来によって平均分子量が3%異なるためと考えられた (Table-1)。従って、横軸を mol 単位とすることで LPC でも大豆及び卵黄の由来にかかわらず、同一の検

Fig.-2 Calibration curve for LPC.

量線により正しく分析できることが判明した (Fig.-2)。さらに、分子量既知のモノパルミトイル、モノステアロイル LPC を用いた二つの検量線によっても確認された (Fig.-2)。

3.3 酵素反応と吸光度の関連性

TLC-Enz 法は、リン脂質をシリカゲルに吸着させたまま酵素を作用させるため、シリカゲルの酵素反応に及ぼす影響について調べた。

3.3.1 反応速度と反応率

TLC-Enz 法では、試料の由来に関係なく PC, LPC とともに 2 h の加温で吸光度は一定値に達し、呈色は少なくともさらに 2 h の加温の延長によっても変化しなかった (Fig.-3)。TLC-Enz 法の反応速度と反応率を検討するために、同量の標準 PC または LPC 0.1 mg を TLC 処理を行わず、そのまま 2.3.2 の酵素反応に供し (以下、直接反応法)、TLC-Enz 法と吸光度を比較した (Fig.-3)。直接反応法では 15 min 以内に反応は終了し、吸光度は 0.390 であった。これに対し TLC-Enz 法では反応終了までに 2 h の加温が必要であり、吸光度も 0.334 であった。これは、シリカゲルに吸着した基質に対する酵素反応は、反応速度と反応率 (直接反応法の吸光度を 100 とした場合の吸光度比) が低下することを示している。さらに反応速度の低下は LPC 及び PC の間に差異なく、反応率の低下は PC が LPC よりも大きいことも明らかになった。

3.3.2 シリカゲルの影響

酵素反応に対するシリカゲル粉末の影響を調べるため酵素液 3 mL に大豆由来の LPC 0.1 mg と未使用の TLC 板からかきとったシリカゲル粉末を加え、以下 2.3.2 の酵素反応に供し吸光度を測定した (Table-2)。

0.1 mg of LPC or PC was added to enzyme soln.
Fig.-3 Time course of enzyme reactions of TLC-Enz method and Direct method.

Table-2 Effects of silica gel on enzyme reaction.

Silica gel (mg)	Absorbance (485 nm)	%
0	0.390	100
20	0.386	99
50	0.378	97
100	0.367	94

Incubations were carried out at 37°C for 1 h with 0.1 mg soy LPC, silica gel and enzyme solution.

ただし、反応時間を1 hとした。通常の TLC 展開条件における PC または LPC のスポットのシリカゲル量は約 20 mg であることからシリカゲル粉末自体の酵素反応に対する影響は希少であった。

3.3.3 反応速度に対する酵素量の効果

測定用酵素液の構成酵素である PL-D, COD あるいは POD を測定用酵素液に追加し、LPC を基質として反応速度と反応率の変化について調べた。反応速度は PL-D を追加することによって、やや速くなり約 1 h で反応は終結したが、COD や POD ではほとんど変化が見られなかった (Fig.-4)。

反応率の低下については、PL-D の追加によっても顕著な変化は見られなかった (Fig.-5)。また、PC を基質としても同様の結果が得られた。

以上の結果より、TLC-Enz 法における酵素の反応速度の低下は PC, LPC のコリン部分を切断する段階に由来すると推測されるが、シリカゲルに吸着されたリン脂

One unit of PL-D, COD or POD was added to enzyme soln. with 0.1 mg of LPC.

Fig.-4 Effects of additional PL-D, COD or POD on TLC-Enz method.

One or five units of PL-D were added to enzyme soln. with 0.1 mg of LPC.

Fig.-5 Effects of additional PL-D on time course of enzyme reaction.

質の一部は測定用酵素液では脱着せず、PL-D の作用を受けたい状態にあることが示唆された。

3.3.4 呈色

TLC-Enz 法はシリカゲルの存在下で酵素反応を行うため、生成した色素の一部がシリカゲルに吸着することが認められた。そこで酵素反応後、シリカゲルに吸着した色素の脱着を目的として、アセトンを加えてシリカゲルを洗浄した。アセトンはシリカゲルから色素を効果

的に脱着した。またアセトンの添加量に伴い色素の最大吸収波長は短波長側へシフトし、発色の増感が認められた (Table-3)。このアセトン添加による発色変化の詳細については、現在検討中である。

また、この発色の増感は、アセトンを加えることによる希釈に基づく呈色の低下を補う程度のものであった。

3・4 再現性及び定量精度

標準溶液を TLC-Enz 法に供し、繰り返し分析 ($n=10$) を行った。定量値の平均及び変動係数を求めたところ Table-4 に示したように変動係数は 3 % 以下であり良好な再現性を得た。また定量精度を検討するために市販の濃縮大豆リン脂質 (PC=約 14.0 %, LPC=0.1 % 以下, Sph=N.D.) に高純度 LPC を 1~50 % (wt/wt) の濃度になるように加え、LPC 添加濃縮大豆リン脂質を調製した。これらを TLC-Enz 法に供して、各 LPC 含量を求め定量精度を検討した。各濃度において相対誤

Table-3 Effect of the amount of acetone on absorbance.

Addition	Absorbance*	λ max
Acetone 0 (mL)	0.359	505
0.1	0.359	505
0.2	0.358	500
0.5	0.354	495
1.0	0.356	490
2.0	0.337	485
Water 0 (mL)	0.359	505
0.1	0.353	505
0.2	0.338	505
0.5	0.308	505
1.0	0.274	505
2.0	0.219	505

* Red dyes were prepared by incubation with 0.6 mg of 4-aminoantipyrine, 1.5 mg of phenol, 1 unit of POD, and 0.006 mg (approximately) of hydrogen peroxide in 50 mM Tris/HCl buffer (pH 7.0) 3.0 mL at 37°C for 15 min. After incubation, water or acetone 0~2.0 mL were added to red dye solutions, and absorbance at λ max were measured.

Table-4 Reproducibility of TLC-Enz method.

Phospholipids	Avg. (mg)	S. D.	C.V. (%)
PC*	0.094	0.0027	2.9
LPC	0.097	0.0012	1.2

* 0.1 mg of soy PC and LPC were measured by TLC-Enz method. ($n=10$ experiments).

差は、10 % 以内と良好な結果を示した (Table-5)。これらの結果から、TLC-Enz 法は直接反応法に比べ反応率と反応速度の低下を伴っているが、その割合は常に一定であるので LPC 及び PC の定量分析への適用は実用上充分に可能であると判断した。

3・5 従来法との比較

TLC-Enz 法と二次元 TLC 法による PC 及び LPC の定量値を実際の部分加水分解リン脂質等について比較したところ各濃度段階において両法の定量値はよく一致していた (Table-6)。

従来法である二次元 TLC 法は、複雑なリン脂質組成を有する部分加水分解リン脂質を試料とする場合、非常に熟練度の高い分析技術が必要となる。また、操作手順が煩雑で長時間を要する。これに対して TLC-Enz 法は、比較的簡便で特異性も高く、分析時間も 5 h 以内で一度に数サンプルが測定可能なことから、より品質管理に適していると考えられた。

以上により TLC-Enz 法は、部分加水分解リン脂質等の PC 及び LPC を特異的に再現性よく分析することが可能であることが判明した。

Table-5 Precision of TLC-Enz method.

Sample	Calculated (%)	Experimental (% , $n=5$)
A	1.0	1.1 $\pm$ 0.02
B	2.8	3.0 $\pm$ 0.05
C	5.0	5.0 $\pm$ 0.10
D	19.8	20.8 $\pm$ 0.20
E	48.4	49.1 $\pm$ 1.30

Table-6 Correlation between two dimensional TLC method and TLC-Enz method.

	Method	PC (%)	LPC (%)
Soy lecithin A	TLC ¹⁾	20.5	—
	TLC-Enz ²⁾	22.0	0.3
Soy lecithin B	TLC	14.0	0.4
	TLC-Enz	15.0	0.5
Egg lecithin	TLC	64.0	2.5
	TLC-Enz	65.0	3.0
Soy lysolecithin A	TLC	0.1	18.2
	TLC-Enz	—	19.0
Soy lysolecithin B	TLC	1.8	55.2
	TLC-Enz	2.0	56.3
Egg lysolecithin	TLC	—	96.9
	TLC-Enz	—	99.9

1) TLC ; two dimensional TLC method

2) TLC-Enz ; TLC-Enz method

4 結 論

TLC と酵素反応を組み合わせた LPC 及び PC の定量法を検討した。TLC-Enz 法は、特異的に LPC 及び PC を同時に精度よく定量可能であった。また従来法との一致性も高く部分加水分解リン脂質等の複雑な組成を有する試料の分析に、実用上十分に適していることが明らかとなった。また、定量法を検討する過程において、シリカゲルに吸着したリン脂質の酵素反応は、通常の酵素反応と異なり興味深い挙動を示すことがわかった。キノン系色素のアセトン存在下における挙動を含め、これらは不明な点も多く残されており、今後さらに検討を加えこれらを明らかにしていく予定である。

本研究の内容の一部は第 30 回油化学研究発表会（浜松）で発表した。

〔平成 4 年（1992 年）1 月 28 日受理〕

文 献

- 1) 藤川琢馬, 油化学, **40**, 951 (1991)
- 2) 藤田 哲, 鈴木一昭, 農化, **64**, 1355 (1990)
- 3) 藤田 哲, 鈴木一昭, 農化, **64**, 1361 (1990)
- 4) 藤田 哲, フードケミカル, **12**, 31 (1989)
- 5) 小林英明, フードケミカル, **12**, 42 (1988)
- 6) 青井暢之, ケードケミカル, **12**, 48 (1989)
- 7) 日本油化学協会編, 基準油脂分析試験法, 2.2.8.4
- 8) 田中正康, 油化学, **26**, 454 (1977)
- 9) N. Sotirhos, C. Ho, S.S. Chang, *FETT. Wiss. Technol.*, **88**, 6 (1986)
- 10) T. Yamagishi, H. Akiyama, S. Kimura, M. Toyoda, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 1801 (1989)
- 11) W.W. Christie, *J. Lipid Res.*, **26**, 507 (1985)
- 12) M. Takayama, S. Itoh, T. Nagasaki, I. Tanimizu, *Cline. Chim. Acta.*, **79**, 93 (1977)
- 13) 岡部和彦, 藤井 守, *Medical Technology*, **8**, 1068 (1981)