HPLC による食品中のホスファチジルエタノールアミン、 ホスファチジルコリンおよびそれらのリゾ型の定量

村上 千秋・分部 麻希・丸山 武紀・新谷 勲

財団法人 日本食品油脂検査協会

(〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 3-27-8)

Determination of Phosphatidylethanolamine, Phosphatidylcholine and Lyso-types in Foods by HPLC

Chiaki MURAKAMI, Maki WAKEBE, Takenori MARUYAMA,
and Isao NIIYA

Japan Institute of Oils & Fats, Other Foods Inspection, Foundation
(3-27-8, Nihonbashi-Hamacho, Chuo-ku, Tokyo 103-0007)

Abstract :

- (1) A sensitive rapid method was established for determining phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine and lyso-types in foods by HPLC.
- (2) A Nucleosil 50-7 column, was used. Elution was carried out with a mixture of acetonitrile, methanol and 85% phosphoric acid (760 : 100 : 9) as the mobile phase. The UV detector was set at 202 nm.
- (3) The recovery phospholipids added to lard, margarine, cream powder and milk at 0.1% or 0.5% was from 85.7~103% and the coefficient of variance ranged from 0.71~3.47%. The detection limits were 0.002% for PE and PC and 0.005% for LPE and LPC.

Key words : HPLC, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine,
lyso phosphatidylethanolamine, lyso phosphatidylcholine

1 緒 言

現在、わが国では食品添加物の乳化剤のうちリン脂質としては、卵黄レシチン、植物レシチン、酵素処理レシチン及び酵素分解レシチンの使用が許可されている。その中で大豆レシチンは安価なため工業的な規模で生産され¹⁾、需要の98%を占めており2%が卵黄レシチンである²⁾。

酵素処理して得られる大豆レシチンは、ホスファチジルエタノールアミン (PE) 及びホスファチジルコリン (PC) の他にそれらのリゾ型であるリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、リゾホスファチジルコリン (LPC) を多く含んでいる。酵素処理は大豆レシチンにホスホリパーゼ A₂ 酵素でリン脂質の2位の脂肪酸を選択的に加水分解することでリゾレシチンを生成させる。このリゾレシチンは親水性に富み、乳化力はレシチンとは異なりカルシウムやマグネシウムの影響を受けず、エ

マルジョンは乳化温度、pH 範囲に関係なく安定である。特に、pH の低い状態で乳化力を示す²⁾。従って、リゾレシチンとレシチンでは二次的加工特性が異なるため使用される食品も異なる。一方、リン脂質の分析法としては日本油化学会では、二次元 TLC/脂質リン測定によるリン脂質の定量分析法が基準化されている³⁾。この方法ではリン脂質の変換はせずに無機リンとして表示している。HPLC によるリン脂質の分析法としては、基準油脂分析試験法⁴⁾にも記載されており、他にも山中、岡本、横地らの報告^{5)~7)}がある。リゾレシチンについては、坂川らのクッキングオイル中の LPC を分析した報告⁸⁾がある。そこで本報では HPLC を用いて、多く使用されている大豆リン脂質に比較的多く含まれる PE、PC⁹⁾ だけでなくそれらのリゾ型の迅速で高感度な分析方法について検討し、併せて市販食品中のそれらを分析した。

連絡者：村上千秋

2 実 験

2・1 試料及び試薬

PC, PE, LPC の標準品は大豆製のもの, LPE はオレオイルを用いた。これらは Sigma Chemical 社製の純度が 99% 以上のものである。添加回収用のリン脂質はツルレーシチン(株)より恵与された SLP ペースト(大豆レシチン)及び SLP ペーストリゾ(酵素分解大豆レシチン)を用いた。内部標準物質(I.S)には(株)同仁化学研究所社製のベンジルジメチルテトラデシルアンモニウムクロリド(ゼフィラミン)を用いた。カラムは Varian sample preparation products 社製の Bond Elute LRC アミノプロピル (NH₂), シアノプロピル (CN), シリカ (SI) 及びジオール (2OH) を用いた。アセトニトリル, メタノール及びエタノールは高速液体クロマトグラフ用, その他のクロロホルム, リン酸及びヘキサンは和光純薬(株)製の特級試薬を用いた。調査試料のマーガリン, ファットスプレッド, クッキングオイル, 唐揚げ粉, クリームパウダー, コーヒーホワイトナー及びホイップクリームは市販品を用いた。

2・2 装 置

実験には, HPLC ポンプ (L-7100 型), カラムオープン (L-7300 型), 波長可変紫外分光検出器 (L-7420 型), オートサンプラー (L-7250 型) 及びインテグレーター (L-7500 型) はいずれも(株)日立製作所製の装置

を用いた。分離カラムには(株)Chemco 社製の Chemuco Pack Nucleosil 50-7, 4.6 i.d.×300 mm, ガードカラムには Nucleosil 50-7, 4.6 i.d.×50 mm を用いた。

2・3 検量線の作成

PE 及び PC では 20 mg, LPE 及び LPC では 40 mg をクロロホルム 20 ml に溶かした。内部標準物質溶液はゼフィラミン 300mg を 100 ml のクロロホルムに溶かし調製した。PE, PC, LPE 及び LPC 混液の 1~5 ml を 10 ml のメスフラスコに採り, 内部標準物質溶液を 1 ml 加えてクロロホルムで 10 ml とした。HPLC に 20 μ l 注入し得られた内部標準物質に対する各リン脂質の重量比と内部標準物質に対する各リン脂質の面積比から検量線を作成した。なお PE, PC 及び LPC の定量は大豆リン脂質換算で求め, LPE はオレイン酸換算で求めた。

2・4 測定条件及び分析法

移動相はアセトニトリル/メタノール/85%リン酸 (760:100:9) を用い, 検出波長は 202 nm で行った。移動相の流量は 1.4 ml/min, カラム温度は 40℃で行った。

市販試料の調製は油脂試料及び粉末試料では 2 g を共栓付き遠沈管に採り(含水試料では無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後)クロロホルム及び内部標準物質を加えて溶解または, ホモジナイズ抽出し約 20 ml とした。

Scheme 1 Analytical Procedure for Determination of PE, PC and Lyso-types in Foods.

次に、あらかじめ *n*-ヘキサン 5 ml でコンディショニングした 2OH カラムにその 2 ml を負荷した。カラムはクロロホルム 3 ml で洗浄した後、メタノール 20 ml で PE, PC 及びそのリゾ型を溶出した。溶出液は減圧下で乾固し、残渣をクロロホルムに溶解し HPLC 用検液とした。その操作手順を Scheme 1 に示す。

3 結果及び考察

3.1 精製カラムの検討

定量分析の場合、抽出溶媒中に内部標準物質を添加して抽出した方が操作がより簡便であると考えた。また、試料から PE, PC 及びそのリゾ型をクロロホルムで直接抽出するとトリアシルグリセリン及び炭化水素などが同時に抽出されるため、クロマトグラム上で妨害や基線の乱れ及びカラムライフに悪影響を与えることが予想される。そこで、ボンデルートの CN, NH₂, SI 及び 2OH カラムを用い、抽出液からリン脂質を精製する条件について検討した。その結果を Fig. 1 に示す。CN カラムでは PE, PC 及び LPL の回収率が悪く、SI カラムでは内部標準物質の回収率が約 20% と悪かった。NH₂ では全成分が 95% 以上の回収率であり、2OH カラムでは 98% 以上であった。NH₂ 及び 2OH カラムで良好な結果が得られたが、繰り返し分析の再現性は NH₂ カラムより、2OH カラムの方が良好であったので本実験では 2OH カラムを使用した。

3.2 分離条件の検討

内部標準物質及び測定波長は坂川らの報告⁸⁾の第4級アンモニウム塩であるゼフィラミンを用い、202 nm で測定した。移動相条件は山中らの⁵⁾アセトニトリル、メタノール、85%リン酸 (780:10:9) では LPC の溶出に時間を要することからメタノールの割合を 100 とし、流速は 1.4 ml/min で分析した。ゼフィラミンはメタノール

Fig. 2 HPLC Chromatogram of PE, PC and Lyso-types.

の割合の増減により、リン脂質の各成分より移動し易いので、他成分と重ならないように位置を決定することができた。PE, PC (大豆製) の各 0.5 mg/ml と LPE (合成オレオイル), LPC (大豆製) の各 1 mg/ml を 20 μ l 注入したときのクロマトグラムを Fig. 2 に示した。

3.3 検量線

検量線は 0~40 μ g の範囲で直線性を示し、感度は PC, PE, LPC 及び LPE の順に低かった。その検量線を Fig. 3 に示す。

リン脂質を 202 nm 付近の波長で定量する場合、構成する脂肪酸の不飽和結合の数により感度が異なるため、

Fig. 1 Recoveries of PE, PC and Lyso-types and I.S. by Various Columns.

Fig. 3 Calibration Curves of PE, PC and Lyso-types.

標準品及び定量するリン脂質の油糧種子の起源が問題である。またリゾ型の感度は2位が加水分解されているため1位の不飽和結合の数に依存する。大豆レシチンの不飽和脂肪酸の組成は主に 18:1, 18:2, 18:3 であり、総脂肪酸ではそれぞれ 13.5%, 61.2%, 5.4%, 2位では 12.7%, 75.1%, 6.2%, 1位では 14.3%, 47.3%, 4.6%を占める¹⁰⁾。従って、大豆製のリゾ型の感度は元のリン脂質の1/2以下になるが検出は可能であった。LPEの感度はオレイン酸鎖の結合したものを標準品として用いたため、大豆製のPEより約1/6に低下した。

3.4 添加回収率の検討

添加回収に用いたレシチンは、ツルーレシチン製の SLP-ペースト及び SLP-ペーストリゾ中の PE, PC, LPE 及び LPC の含量を標準品から定量し、食品に各々0.1及び0.5%相当量を添加した。回収率は、添加前の SLP-ペースト及び SLP-ペーストリゾを標準として割合を求めた。

油脂試料としてラード、乳化型油脂試料としてマーガリン、粉末試料としてクリームパウダー及び液体試料として牛乳に PE, PC 及びそれらのリゾ型を 0.1%及び

Table 1 Recoveris of PE, PC and Lyso-types Added to Several Kinds of Foods.

	Lard				Margarine			
	Recovery (%)				Recovery (%)			
	0.10%		0.50%		0.10%		0.50%	
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
PE	103	2.00	99.9	1.21	103	1.22	99.9	3.05
LPE	102	1.58	101	1.81	101	0.71	101	1.00
PC	98.0	1.55	98.2	0.53	97.5	0.82	97.8	0.40
LPC	99.4	1.42	101	1.01	95.1	0.72	95.4	0.50

	Cream powder				Milk			
	Recovery (%)				Recovery (%)			
	0.10%		0.50%		0.10%		0.50%	
	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
PE	103	2.00	101	2.27	98.5	2.91	96.8	3.64
LPE	97.7	1.42	96.3	2.56	88.5	3.47	88.5	1.36
PC	96.2	1.80	95.3	2.37	97.7	0.97	97.7	1.73
LPC	92.9	1.79	95.0	2.71	85.7	0.92	86.5	1.71

0.5%添加し、5回の繰り返し分析による回収率及び変動係数を求めた。その結果を Table 1 に示す。ラードでは回収率が 98.0~103%であり、変動係数は 2.0%以内であった。マーガリンでは回収率が 95.1~103%であり、変動係数が 3.05%以内であった。クリームパウダーでは回収率が 92.9~103%であり、変動係数が 2.71%以内であった。牛乳では回収率が 85.7~98.5%で変動係数が 3.64%以内であった。水分量の比較的小さい試料に比べ、水分量の多い液体試料ではリゾ型の回収率が約 85%と低かった。しかし、全試料を通し変動係数が 4%以内でありほぼ満足する結果が得られた。

3・5 市販品の分析結果

市販品の分析結果を Table 2 に示す。マーガリン 15 銘柄（国産品の業務用 5 銘柄、国産品の家庭用 5 銘柄、外国産 5 銘柄）を分析した結果、すべての銘柄から PE 及び PC が検出された。PE と PC の総量は業務用では 0.012~0.083%、家庭用では 0.016~0.202%、外国産では 0.011~0.059%であり、総量の最高値は国産品の家庭用で最も高かった。しかし、いずれの製品からもリゾ型は検出されなかった。ファットスプレッドでは国産品 5 銘柄、外国産 1 銘柄を分析した。その結果、マーガリンと同様にすべての検体から PE 及び PC が検出され、国産品 1 銘柄と外国産から LPE 及び LPC が検出された。総量では国産品では 0.018~0.132%、外国産では 0.048

%であった。LPE及び PLCが検出された国産品、外国産のファットスプレッドではいずれも風味原料としてマスタードが使用されていた。クッキングオイルでは国産品 3 銘柄、外国産 1 銘柄を分析した。すべての銘柄から PE 及び PC が検出された。国産品では総量が 0.008~0.101%であったが、外国産からは PE と PC がそれぞれ 0.602%、1.138%と LPE 及び LPC がそれぞれ 0.050%、0.089%検出された。外国産では PE と PC の総量が 1.74%と非常に多く、LPE と LPC では 0.139%と少なかった。リゾレシチンとしての機能はリン脂質中に約 60%含まれていないと発揮しないことから¹¹⁾、リゾ型は添加されたものではないと考える。唐揚げ粉 5 銘柄を分析した結果では、全銘柄から PE 及び PC が検出され、総量では 0.027~0.232%であり、LPE 及び LPC は検出されなかった。クリームパウダー 5 銘柄の分析結果では、全ての銘柄から検出されなかった。コーヒーホワイトナー 4 銘柄を分析した結果では、1 銘柄からは検出されなかったが、他の 3 銘柄からは PE 及び PC が検出された。総量では 0~0.148%であり、リゾ型は検出されなかった。コーヒーホワイトナーに酵素処理レシチンを添加すると、ホットコーヒーにクリーム液やクリームパウダーを加えた場合にできる分離や沈澱を改善²⁾することができる。ホイップクリームの 1 銘柄の分析結果も同様に PE 及び PC が総量で 0.068%検出され、リゾ

Table 2 Contents of PE, PC and Lyso-types in Commercial Foods.

	(%)				
	PE	LPE	PC	LPC	Total
Margarine					
Bekery (5 brand)	0.004~0.046	nd	0.006~0.045	nd	0.012~0.083
Table (5 brand)	0.006~0.088	nd	0.010~0.115	nd	0.016~0.202
Foreign (5 brand)	0.005~0.025	nd	0.006~0.034	nd	0.011~0.059
Fatspread					
Domestic (5 brand)	0.007~0.026	0.053	0.009~0.039	0.014	0.018~0.132
Foreign (1 brand)	0.030	0.012	0.002	0.004	0.048
Cooking oil					
Domestic (3 brand)	0.004~0.046	nd	0.004~0.055	nd	0.008~0.101
Foreign (1 brand)	0.602	0.050	1.138	0.089	1.879
Flour					
(5 brand)	0.002~0.101	nd	0.018~0.135	nd	0.027~0.232
Cream powder					
(5 brand)	nd	nd	nd	nd	nd
Coffee whitener					
(4 brand)	nd~0.066	nd	nd~0.082	nd	nd~0.148
Whip cream					
(1 brand)	0.031	nd	0.037	nd	0.068

型は検出されなかった。

小日山らは家庭用調理マーガリン、業務用ファットスプレッド及び国産品のクッキングオイル中のリン脂質の含有量を報告^{12)~14)}しており、家庭用調理マーガリンでは、12 銘柄中 5 銘柄から 0.02~0.09%, 業務用ファットスプレッドでは 0.01~0.03%, 国産品のクッキングオイルでは 0.10~2.06%と報告している。本実験結果の総量と比較すると、国産品のクッキングオイルでは 0.101%と低かったが、その他ではほぼ一致した。また、坂川らの報告⁸⁾では、市販のクッキングオイルの 5 検体中 2 検体からリゾ型が検出されたが、本実験では検出されなかった。

食用加工油脂製品の原料油脂は精製油が用いられているので、検出されたリン脂質は大豆製のレシチンが添加されたものとする。そこで、本実験の PE, PC 及び LPC の定量は大豆リン脂質の標準品から求めたが、LPE は大豆製の標準品の入手が困難なためオレイン酸鎖換算で求めた。

卵黄レシチンの場合、リン脂質を構成する不飽和脂肪酸はアラキドン酸が多く⁵⁾、そのほとんどが 2 位に多い¹⁰⁾ので 1 位を飽和脂肪酸が占める¹⁰⁾。従って、卵黄レシチンの PE 及び PC のピークは、アラキドン酸が多いため大豆レシチンと形状が異なり⁵⁾、LPE 及び LPC は検出されないか、または感度が非常に劣ると考えられるので判別できる。

本報の要旨は平成 10 年 9 月、第 37 回油化学討論会（福岡）にて発表した。

（受付：1999 年 3 月 10 日、受理：1999 年 5 月 24 日）

文 献

- 1) 衛生技術会編, “食品用乳化剤と乳化技術” (1979) p. 138.
- 2) 菰田 衛著, “レシチン—その基礎と応用” 幸書房 (1991) p. 82.
- 3) 日本油化学会編, 基準油脂分析試験法, 4.3.3.1—1996.
- 4) 日本油化学会編, 基準油脂分析試験法, 4.3.3.2—1996.
- 5) 山中樹好, 藤田 直, 油化学, 39, 393 (1990).
- 6) 岡本 裕, 原 節子, 戸谷洋一郎, 油化学, 33, 34 (1984).
- 7) 横地俊弘, 鈴木 修, 油化学, 31, 580 (1982).
- 8) 坂川信昭, 林 泰男, 忠田吉弘, 青山吉一, 田中真澄, 渡邊久芳, 農林水産省消費技術センター, 調査研究報告, 19, 37 (1995).
- 9) W.J. Hurst, R.A. Martin, *J. Am. Oil Chem Soc.*, 61, 1462 (1984).
- 10) 桑山英夫, 白井 浩, 油化学, 23, 341 (1974).
- 11) 江木 衷, フードケミカル, No 1, 51 (1987).
- 12) 小日山正剛, 丸山武紀, 兼松 弘, 新谷 勲, 油化学, 39, 1050 (1990).
- 13) 小日山正剛, 丸山武紀, 兼松 弘, 新谷 勲, 油化学, 40, 46 (1991).
- 14) 小日山正剛, 木下葉子, 丸山武紀, 新谷 勲, 油化学, 41, 52 (1992).

[ノート] HPLC による食品中のホスファチジル
エタノールアミン, ホスファチジルコリン
およびそれらのリゾ型の定量

村上千秋・分部麻希・丸山武紀・新谷 勲

財団法人日本食品油脂検査協会 (〒103-0007 東京都中央区日本橋浜町 3-27-8)

(1) HPLC による食品中のホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルコリン及びそれらのリゾ型の高感度で迅速な分析方法を開発した。

(2) HPLC 条件は移動相には, アセトニトリル/メタノール/85% リン酸 (760:100:9), カラムにはヌクレオジル 50-7 を用いた。検出器は UV で 202 nm で測定した。

(3) ラード, マーガリン, クリームパウダー及び牛乳に 0.1% 及び 0.5% 添加した時の回収率は 85.7~103% で変動係数は 0.71~3.47% であった。検出限界はホスファチジルエタノールアミン, ホスファチジルコリンが 0.002% でリゾホスファチジルエタノールアミン, リゾホスファチジルコリンが 0.005% であった。

(連絡者: 村上千秋) Vol. 48, No. 8, 801 (1999)

[ノート] 赤潮プランクトン *Heterocapsa*
circularisquama の脂肪酸組成

山岡到保^{*1}・滝村 修^{*1}・布施博之^{*1}・村上克治^{*1}・高山晴義^{*2}

^{*1} 中国工業技術研究所 (〒737-0197 広島県呉市広末広 2-2-2)

^{*2} 広島県水産試験場 (〒737-1207 広島県安芸郡音戸町波多見 6)

広島湾から得られた *Heterocapsa circularisquama* の脂質を研究するため, 15 種類の微細藻類を用いて実験した。定常期に達した細胞から抽出した脂質中の脂肪酸は, GC と GC-MS で分析した。*H. circularisquama*, *Alexandrium tamarense*, *Prorocentrum micans* は, 全脂肪酸中で DHA の占める比率が高いことが認められた。*H. circularisquama* の DHA は, リンを添加しない培地より添加した培地中で多く, 32.6~52.1 $\mu\text{g/L}$ であった。また DHA は, 温度 24°C, 照度 8,000 lux のとき多く得られた。

(連絡者: 山岡到保) Vol. 48, No. 8, 807 (1999)