成蹊大学理工学研究報告
J. Fac. Sci. Tech., Seikei Univ.
Vol.44 No. 2 (2007) pp.65-73
（特別研究費に係る論文）

大豆リン脂質クラスの新規分画法

原　節子[*1]・宇野　奈奈[*2]・戸谷　洋一郎[*3]

Novel Fractionation Method for Soy Phospholipid Classes

Setsuko HARA*[1], Nana UNO*[2], and Yoichiro TOTANI*[3]

ABSTRACT : A novel method for the fractionation of crude soy phospholipids was developed using hexane/ethanol solvent system to take the place of conventional acetone fractionation. Phospholipid purity of 97.6% achieved by the present method using cold hexane/ethanol (4/1) mixed solvent was found equivalent to that by conventional acetone fractionation. This method should serve as a safe alternative to the latter whose use has been attended with harmful acetone oxides remaining in purified phospholipids.

Keywords: soy phospholipids, acetone fractionation, hexane/ethanol mixed solvent, phosphatidylcholine

(Received September 26, 2007)

１．緒　論

グリセロリン脂質（PL）は様々な分野で幅広く利用されている。例えば，食品分野では主に安価である大豆 PL がマーガリン，クリーム類，菓子類等の乳化剤として大量に利用され，酵素的に改質して乳化作用を向上させたリゾリン脂質（LPL）は乳化剤のみならず，デンプンの老化防止剤としても利用されている [1)]。化粧品分野では水素添加大豆 PL が乳化剤としてクリームや乳液に，またその高い親水性を利用して天然保湿・潤滑剤としてローションなどに配合されている。その他に生理学的，栄養学的な効用も注目され，医薬品や健康食品，栄養補助食品にも配合されている。すなわち，PL の生理機能として，肺機能改善，血清コレステロール低下，肝臓脂質代謝異常改善，神経機能改善，動脈硬化症の改善 [2,3)] などがあり，その界面活性作用を利用して大豆油や中鎖脂肪酸トリグリセリド（MCT）を水溶液中に分散させた O/W 型エマルション製剤は栄養輸液として，さらにドラッグデリバリーシステムや遺伝子デリバリーシステムにも応用されている [4)]。また，PL の *sn*-1 位と *sn*-2 位に結合した脂肪酸（FA）を様々な機能性 FA と変換し，その FA の生理機能を PL に付与することも試みられている [5)]。さらに，記憶学習機能向上作用，制ガン作用，コレステロール低下作用などを持つイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）などの高度不飽和脂肪酸（PUFA）を構成脂肪酸として持つ機能性 PL は PUFA と PL の機能を併せ持っており，脳機能改善作用や神経伝達系への作用 [6,7)] などがあると報告されている。その他にも，PL は塗料，インキ，感光剤に添加すると顔料の沈殿防止効果が発揮されることも報告され，様々な分野で多量に使われている。

工業的には大豆および卵黄由来の PL が主に利用されており，全世界で年間約 11 万トンが生産され，日本では 7,550 トンの市場規模と言われている [8,9)]。これらの PL は PL 純度 65-70%程度のペースト状の粗製品から，95%以上に精製された粉末状のものまで様々な形態で製品化されている。特に，量的に最も多く，安価な粗製大豆 PL は大豆油製造時の副産物として，脱ガム工程で油分と分離されて得られる。この粗製 PL は茶褐色ペースト状物

*1：成蹊大学理工学部物質生命理工学科教授
(Professor, Dept of Materials and Life Science,
e-mail: shara@st.seikei.ac.jp)
*2：成蹊大学大学院工学研究科博士前期課程修了生
*3：成蹊大学名誉教授

質であり，臭気も強いことから，そのままでは取り扱いにくく，広範な用途に用いることが困難である[9]。それ故，PL の分画・精製には従来からアセトンを使用した溶媒分画法が用いられてきた。このアセトン分画法は主にホスファチジルコリン(PC)を中心とした PL がアセトンに対して溶解性が低いことを利用し，アセトン可溶部としてトリグリセリド(TG)をはじめとした中性脂質を，アセトン不溶部として PL を回収している。この方法は操作が簡便であり，効率が良いことから精製 PL を製造するため広く工業的に用いられているが，得られた PL を食品･香粧品･医薬品などへ利用することを考慮すると，安全性の高い溶媒の使用が望まれている。アセトンは **Fig.1** に示すように，有害な有臭物質であるアセトン酸化物(アセトン二次生成物)の生成が懸念され，製品の臭いや風味を損ねる原因となることが報告されている[10,11]。

このような問題点を解決すべく，アセトン分画法に代わる様々な分画法がこれまでにも開発されている。例えば，高畑らは粗製 PL を 2 倍量のヘキサン（Hex）に溶解した後，5～25w/w%の水を含む C1～C4 の低級アルコールを Hex に対して 0.05～1.5 倍量加えて混合すると，アルコール画分に原料と類似した組成をもち，色調や風味の改善された PL が得られることを報告している[11]。村山らは Hex／含水エタノール（EtOH）系溶媒を用いた無担体液々分配クロマトグラフィーによって分配液の上層に PE を，下層に PC ををそれぞれ分画・精製できることを報告している[12]。また，粗製 PL を重量比率が水（H_2O）/EtOH＝90/10～60/40 または H_2O/プロピレングリコール＝90/10～50/50 の水混和性アルコール類と混和し，上層に油層，下層に PL 含有の水性層を生ずるように相分離させ，油層を除去することを目的とした白川らの特許 H3-22396 の方法では，80～90%純度の精製 PL が得られている[13]。特許 H1-197492 の酢酸エステルを使用した場合には，TG 含有 PL の重量(g)に対して 4 倍以上の容量（mL）の酢酸エステルに粗製 PL を溶解した後，-5℃以下に冷却して分画することによって，溶媒不溶部に PC 含有率の高い，純度 99%以上の精製 PL が得られると報告されている[14]。また，96%程度の精製 PL が得られる超臨界流体抽出法[15] や分子量の違いにより分ける限外ろ過膜分離法なども報告されている[16]。しかし，その実際的な分離能，溶媒および設備費用などを含めた全体的なコスト面から実用化されているものはほとんど無く，大量の精製 PL を得るためにはアセトン溶媒分画法に頼るほかに道がないのが現状である。また，PL は加熱されると酸化，褐変を引き起こすために，その処理は低温で短時間であることが好ましい。それ故に，本研究ではアセトンを使用しない大量分画法として，安全性に優れた新規溶媒分画法を確立することを目的とした。すなわち，脂質に対して非常に優れた溶解性を有するものの，環境破壊やオゾン層破壊などを引き起こす塩素系溶媒を避けて，EtOH/Hex/H_2O 系のような限られた溶媒系を用いて精製 PL を単離することについて検討した。

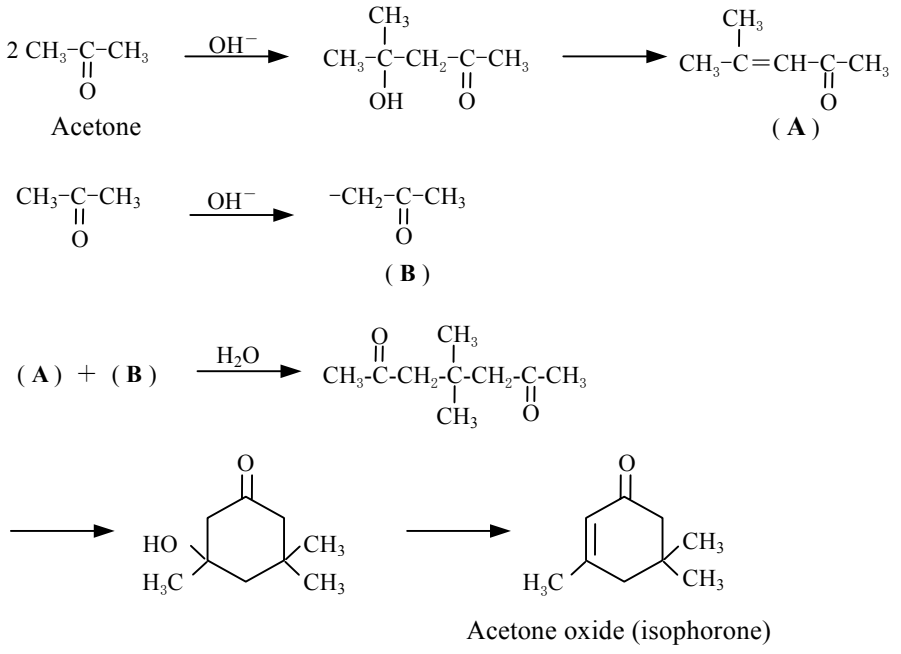

Fig. 1　Formation of Acetone Oxide (Isophorone)[10]

２．実験方法

2．1　試料と試薬

新規分画法の検討に用いた PL は池田糖化工業(株)から提供された Bunge Limited（ブラジル）製の粗製大豆 PL であり，その性状は **Table 1** に示したとおりであった。

また，分析の際に標準物質として用いた日清オイリオグループ（株)製の PL 製品である精製大豆 PL ベイシス LP-20B（PC-30）と PC 濃縮大豆 PL ベイシス LP-60B（PC-70）の性状を **Table 2** に示した。なお，本実験で用いた試薬はすべて市販特級品をそのまま使用した。

Table 1　Characterization of Crude Soy PL.

Lipid Composition（%）	TG	FA	PL			
			PC	PE*[1]	PI*[2]	Others
	29.6	0.3	19.8	14.7	17.0	18.6

Fatty Acid Composition（%）	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
	16.4	2.2	18.4	56.2	6.8

Color by Lovibond Method	Red	Yellow	Neutral
	4	30	—

Peroxide Value（PV, meq/kg）	1.0
Acid Value (AV)	15.8

[1]：ホスファチジルエタノールアミン，[2]：ホスファチジルイノシトール，以下同じ

Table 2　Lipid and Fatty Acid Compositions of PC-30 and PC-70.

			PC-30	PC-70
Lipid Composition (%)	TG		0	0.5
	FA		0	0
	Others		2.7	1.9
	PL	PC	35.6	67.1
		PE	19.8	14.2
		PI	28.9	3.1
		Others	13.0	13.2
Fatty Acid Composition (%)	C16:0		19.2	14.4
	C18:0		4.0	3.5
	C18:1		7.9	12.5
	C18:2		60.9	62.5
	C18:3		8.0	7.1

2．2　PL 分画法

試料として粗製大豆 PL を用いて **Fig.2** に示したように溶媒分画を行い，PL を精製する方法を検討した。なお，分画溶媒は EtOH/Hex/H_2O の混合溶媒系とし，溶媒比と溶媒量を種々に変えた。すなわち，5g の試料をビーカーに採取し，これに所定量の分画溶媒を加えて 5 min 撹拌後，1h 静置した。次に，吸引濾過により溶媒不溶部と可溶部に分け，不溶部

は減圧乾燥し，可溶部は脱水・脱溶媒を行った。なお，従来法であるアセトン分画法はPL試料に対して10倍量以上の冷アセトンを撹拌しながら加えて氷冷静置すると，溶媒不溶部に約 95%以上の純度を持った精製PLを分画できる。従って，新規法では10倍量以下の分画溶媒を用いて得られた不溶部のPL純度がTLC-FID分析により95%以上になるような分画法の開発を目指した。

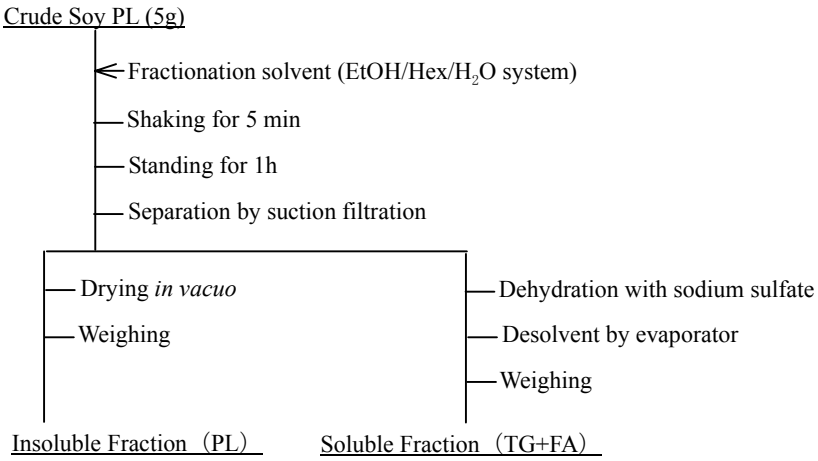

Fig. 2　Solvent Fractionation Procedure for PL.

2. 3　分析法

溶媒による分画・濃縮法を検討する際に得られた溶媒可溶部と不溶部の脂質組成はTLC-FID分析により測定し，良好な結果が得られたものについてはその脂肪酸組成をGLC分析した。また，原料である粗製大豆PL，EtOH/Hex分画不溶部および可溶部はそれぞれロビボンド法による色相，過酸化物価（PV），酸価（AV）も併せて測定した。

2. 3. 1　脂質組成

TLC-FID分析はイアトロスキャンMK-5型（三菱ヤトロン㈱）を用いて行った。すなわち，試料を 1%クロロホルム溶液とし，その1μLをクロマロッドS-Ⅲ（三菱ヤトロン㈱）に負荷して一次展開溶媒であるベンゼン/クロロホルム/酢酸（35/15/1）によりPL区分とTG区分を分離し，二次展開溶媒であるクロロホルム/メタノール（MeOH）/H_2O（75/25/2）によりPC，PE，PIなどの各種 PLを分離した後，水素流量 160mL/min，空気流量 2,000mL/min，スキャンスピード 20cm/min，記録・定量計算をクロマトパック CR-6A型（㈱島津製作所）により脂質組成を分析した。二次元TLC分析は2波長フライングスポットスキャナ CS-9300（(株)島津製作所）を用いて定量した。まず，Merck社製のプレコートTLCプレート（Silica Gel 60，10×10cm）の下端から1.5cm，右端から1.5cmの位置に分析試料（1%のクロロホルム溶液）を負荷して，一次展開溶媒にクロロホルム/MeOH/28%アンモニア水系を，二次展開溶媒にクロロホルム/MeOH/酢酸/ H_2O 系を用いて分離した。個々の脂質の確認には10%硫酸銅-8%リン酸試薬を，PL の確認には Dittmer 試薬（Zinzade 試薬）を，アミノ基の確認にはニンヒドリン試薬を，酸性PLの確認にはローダミン6G試薬を，コリンの確認には Dragendorff 試薬を発色試薬としてそれぞれ用いた。

2. 3. 2　脂肪酸組成

粗製大豆 PL および分画して得られた溶媒可溶部と不溶部の脂肪酸組成は Jham 法[17]により構成脂肪酸をメチルエステル化した後，結合型キャピラリーカラム HR-SS-10（0.25mm×25m，信和化学工業㈱）と FID 検出器を装備したガスクロマトグラフ GC-18A 型（㈱島津製作所）を用いて GLC 分析を行った。その分析条件はヘリウム(80kPa)をキャリアーガス，注入口・カラム・検出器の温度を 250℃，スプリット比を 50/1 とした。

2. 3. 3　PLの性状分析

分画・濃縮の過程で PL の自動酸化や加水分解が起るか，否かをチェックするために，自動滴定装置 GT-05 型（三菱化学㈱）を用いて電位差滴定-PV 法[18]で PV を，中和滴定法で AV をそれぞれ測定した。

３． 結果と考察

3. 1 PL 分画法

試料として粗製大豆 PL を用いて，2.2 の方法により PL を精製するために種々の溶媒系の組成比を検討した。

3. 1. 1 塩化マグネシウムの添加効果

まず，基準としたアセトン分画法において，PL が金属塩と複合体を形成する性質を利用して [10]，PL 沈殿剤として 10%塩化マグネシウム ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)-MeOH 溶液を少量添加していることを参考にして，EtOH と 10% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$/EtOH 溶液を組み合わせた溶媒を用いて検討した。すなわち，MeOH の毒性を考慮して本研究では MeOH 溶液を EtOH 溶液に換えて分画溶媒を調製し，粗製大豆 PL に対して溶媒量を 1.1 倍から 8.8 倍まで変化させた結果を **Fig.3** に溶媒不溶部と溶媒可溶部における PL の回収率・純度としてそれぞれ示した。

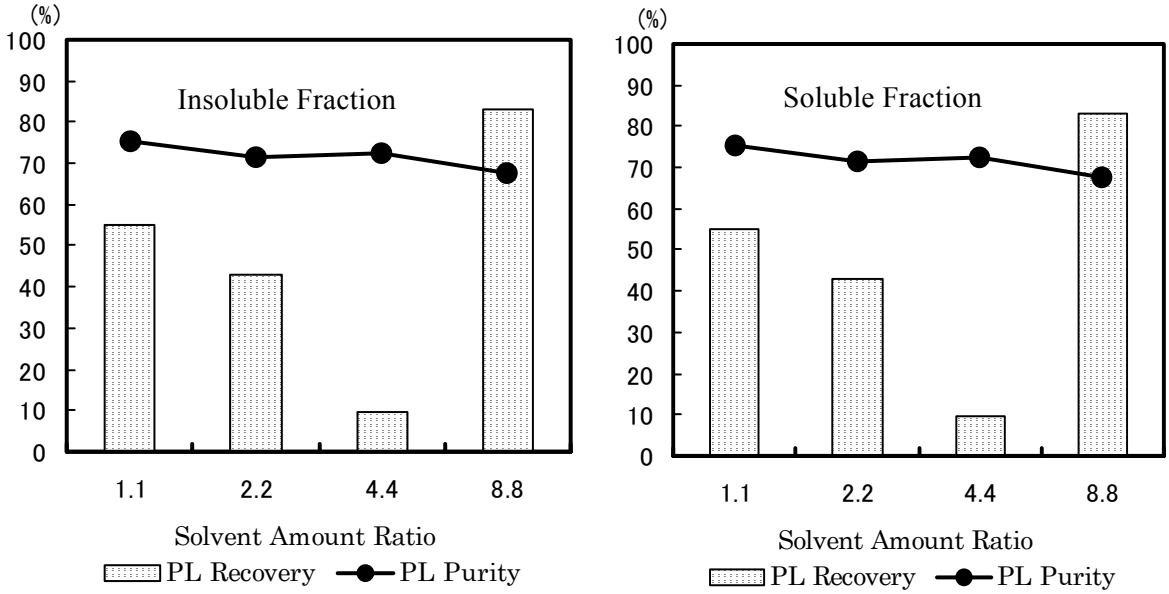

Fig.3 Fractionation of Crude Soy PL with EtOH/$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (10/1) Solvent System.

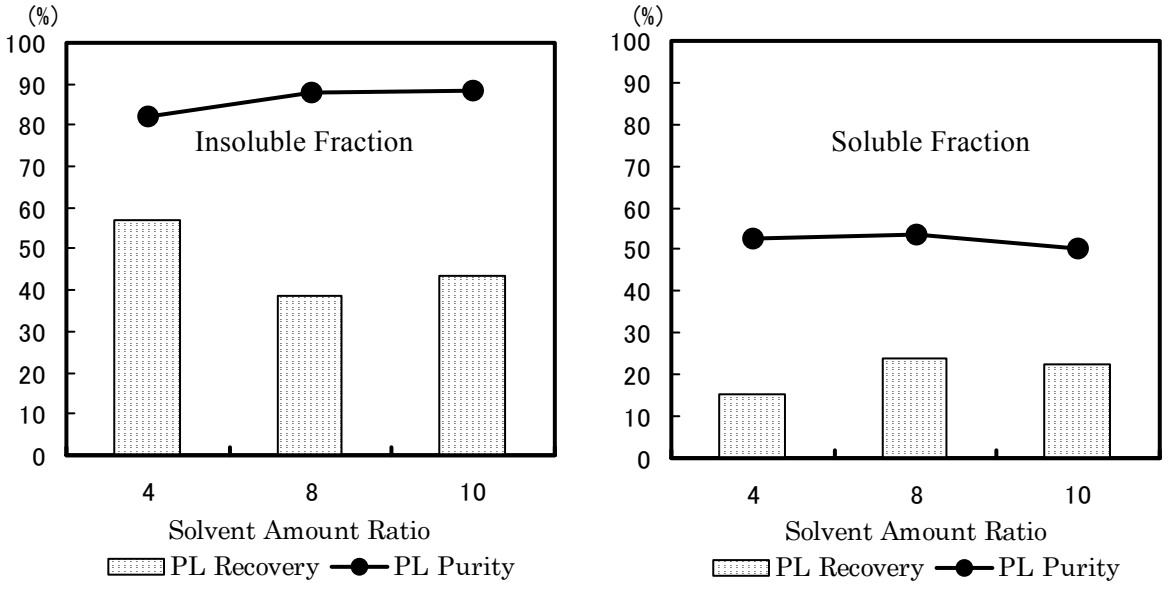

Fig.4 Fractionation of Crude Soy PL with EtOH Solvent System Containing 2mL of 10%$MgCl_2 \cdot 6H_2O$-Ethanol Solution.

なお，溶媒不溶部と可溶部はいずれも粘性のあるどろどろとした液状であった。また，溶媒量が 1.1 倍と 2.2 倍では不溶部に回収率は低いものの 70～75%純度の PL が回収されたが，8.8 倍量のときには不溶部に約 70%，可溶部に約 80%の PL が存在してしまい，明確な分画をすることができず，回収率も不溶部が約 85%，可溶部は 100%を超える結果となった。これは使用した溶媒量が多かったことと，多量の $MgCl_2$ 量が除去できずに残存してしまったためと考えられた。なお，全体的に 10%$MgCl_2$・$6H_2O$ /EtOH 溶媒系の場合は脱溶媒が困難であり，1.1～4.4 倍の系では PL 回収率が 10～55%に過ぎなかったことから，PL を不溶部に確実に分画できる方法とは言い難かった。それ故，次に 5g の粗製大豆 PL に対して EtOH を主とした溶媒系に 10%$MgCl_2$・$6H_2O$-EtOH 溶液を 2mL だけ添加して分画を検討した結果を **Fig. 4** に示した。しかし，不溶部は粘性の強いペースト状から固体の蝋状となったが，PL 純度はいずれの場合も 90%以下であり，目標とする PL 純度 95%以上にはならなかった。また，無水 $MgCl_2$ を使用した溶媒系についても検討を行ったが，$MgCl_2$・$6H_2O$ を用いた結果と同様であった。

3. 1. 2 分画温度の影響

溶媒を氷冷（約 0℃）して分画を検討した結果は **Fig. 5** に示したように，いずれの場合でも PL 回収率と PL 純度に大差は見られなかった。しかし，不溶部に得られた PL の状態が室温（約 24℃）においては黄褐色の蝋状であったのに対して，氷冷溶媒で分画した場合には黄色の粉末状のものを含む状態となったことから，目的とする粉末状に近づけるのではないかと考えて，以下の実験はすべて氷冷溶媒で分画を行うことにした。

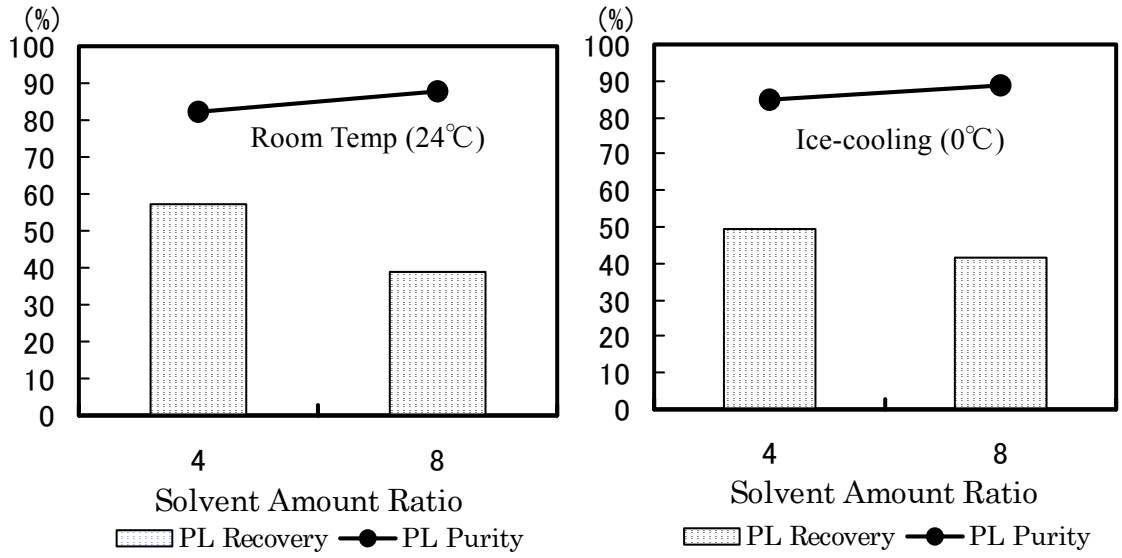

Fig. 5 Effect of Temperature on Fractionation of Crude Soy PL with EtOH Solvent System Containing 2mL of 0%$MgCl_2$·$6H_2O$-Ethanol Solution.

3. 1. 3 EtOH/Hex 系の検討

次に，粗製大豆 PL がペースト状であるため EtOH 系の分画溶媒に均一に試料が分散しないと考えられたので，試料が液状になるように Hex を最少量加えた後，EtOH を用いて分画を行った結果を **Fig. 6** に示した。

Fig. 6 から明らかなように，Hex を使用することにより溶媒不溶部の PL 純度は 90%以上となり，PL 回収率も多少向上した。従って，EtOH のみよりも Hex を組み合わせた溶媒系を用いた方が良好な結果が得られると考えられた。また，粗製大豆 PL を Hex に溶解させてから所定量の EtOH を加えて手早く撹拌を行った方が好ましく，これは粗製大豆 PL 中の単純脂質を先に Hex に溶解させることによって，それらを溶媒可溶部へ分画できるためと考えられた。

特に，溶媒量を試料 PL に対して 6 倍量用いる方が好結果につながった。それ故，次に溶媒量を試料 PL に対して 6 倍量に固定して，EtOH/Hex の割合を 2/1，4/1，5/1 に変化させて分画を試みた結果，いずれの溶媒比においても 90%以上の純度の PL を得ることができた。これより，溶媒混合比については Hex 量に対して EtOH 量を 2 倍以上にすれば良好な結果が得られることが判明した。続いて，PL 純度が 93.5%に達した EtOH/Hex(4/1)に溶媒比を固定して溶媒量の検討を行った結果，溶媒量が試料に対して 5 倍以上であれば不溶部の PL 純度はすべて 90%以上になり，さらに 9～10 倍量では 95%程度に達した。

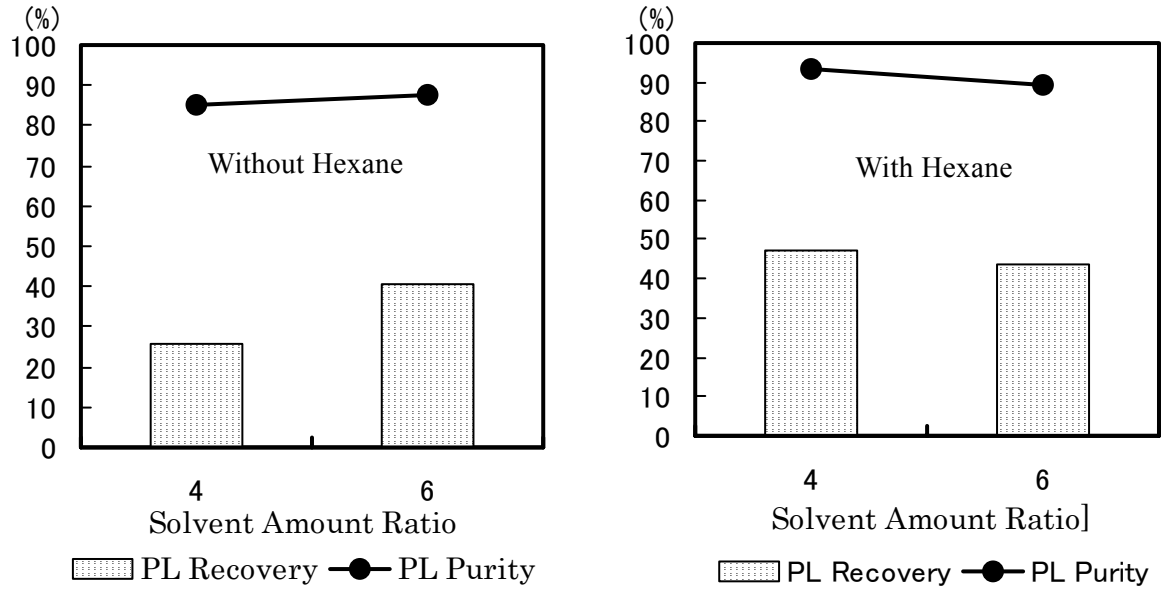

Fig.6　Effect of Micro-amounts of Hexane on Fractionation of Crude Soy PL.

3. 1. 4　撹拌効率の影響

溶媒量は可能な限り少量にすることが望ましいため，次にこれまで分画溶媒を加えた後に 5min の手撹拌を行っていた操作をマグネティックスターラーによる撹拌に代えてその効率を検討した。すなわち，あらかじめ粗製大豆 PL に所定量の Hex を加えて均一に溶解した後, Hex 量の 4 倍量の EtOH を手早く注ぎ入れて約 1,000rpm の速度でマグネチックスターラーを用いて撹拌した。その結果，**Fig. 7** に示したように 6 倍量の溶媒量を用いると不溶部の PL 純度は 95%になり，溶媒量を 8 倍量使用した場合には PL 純度は本実験で検討した約 70 種の分画条件の中で最高の 97.6%にまで達した。

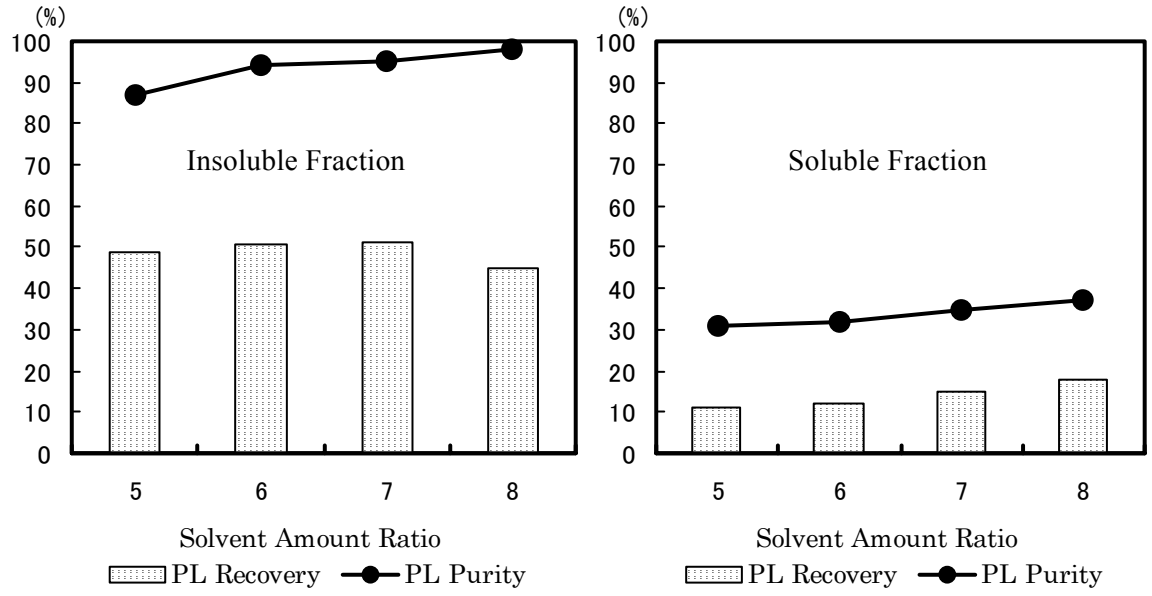

Fig.7　Purity and Recovery of PL fractionated with EtOH/Hexane (4/1) Solvent under Magnetic Stirring (%).

3. 1. 5　EtOH/Hex 分画とアセトン分画の比較

本実験で得られた最適分画条件の EtOH/Hex（4/1）溶媒分画法と従来法であるアセトン分画法の結果を比較して **Table 3** に示した。これより, 新規分画法では EtOH/Hex（4/1）溶媒を試料に対して 8 倍量使用し，マグネティックスターラーを用いて, 約 1,000rpm の撹拌を 5min 行い，1 h 氷冷後の溶媒不溶部として純度 97.6%の PL を得ることができた。すなわち，この新規法はアセトン分画法と比べて使用する溶媒量が少ないにも拘らず，精製 PL の純度はアセトン分画法に匹敵するものであった。

Table 3 Comparison of Fractionated PL by Usual and Novel Methods.

			Usual Method			Novel Method		
			Acetone Fractionation			EtOH/Hex Fractionation		
Solvent Used			Acetone			EtOH/Hex（4/1）		
Solevent Amounts (Ratio to Sample PL)			10 times larger quantity of sample PL amounts			8 times larger quantity of sample PL amounts		
Fractionation Procedure			Adding cold acetone into sample PL, stirring with glass rod for 5 min in an ice-cooling bath, and then standing as it is over 1h.			Desolving sample PL with Hex, stirring by magnetic stirrer for 5 min under ice-cooling, adding fixed amounts of cold EtOH quickly, and then standing as it is over 1h.		
Recovery of PL for 5g Sample (%)			Insoluble	Soluble	Total	Insoluble	Soluble	Total
			66.5	28.8	95.3	44.9	47.4	92.3
Lipid Composition (%)			Insoluble	Soluble		Insoluble	Soluble	
	PL composition	PC	38.6	0		15.5	26.1	
		PE	12.9	0.7		20.0	7.7	
		PI	21.9	0.2		36.4	0	
		Others	24.8	1.4		25.7	0.9	
	TG		1.8	94.8		2.4	64.4	
	FA		0	2.9		0	0.9	
PV（meq/kg）			2.1	—		2.0	—	

4．総　括

本研究ではアセトン分画法に代わる大豆 PL クラスの新規分画・濃縮法の開発を目的として，粗製大豆 PL から精製 PL を得る方法を以下のように確立した。すなわち, アセトンより生体に対する安全性の高い冷 EtOH/Hex（4/1）の溶媒系を粗製大豆 PL に対して 8 倍量用いることにより，PL 純度 97.6%の精製 PL を得ることが可能となり，従来法であるアセトン分画法に匹敵する高純度の PL を調製できる新規 EtOH/Hex 分画法を確立した。

それ故，本法は有害性が心配されるアセトン分画法に代わる安全で簡便な分画方法として，工業的にも有効な方法であると考えられる。

参考文献

1) 小林英明，卵黄リゾレシチンの性質と応用，フードケミカル，Vol. 42, 42-47 (1989)
2) 高　行植，園　良治，各種大豆レシチンの製造と利用，フードケミカル，　Vol. 53, 45-50 (2001)
3) 永尾晃治, 柳田晃良，リン脂質の栄養と生理機能，オレオサイエンス，　Vol. 2, 129-135 (2002)
4) 石井文由，リン脂質を利用した製剤：21 世紀のリピッドエマルションの話題と将来性，オレオサイエンス，　Vol. 2, 197-203 (2002)
5) 原　節子，戸谷洋一郎，構造リン脂質の調製，オレオサイエンス，Vol. 2, 13-17 (2002)
6) 細川雅史，高橋是太郎，高度不飽和リン脂質の酵素的改変と機能特性，オレオサイエンス，Vol. 2, 19-25 (2002)

7) 橋本道男,ドコサヘキサエン酸による脳機能改善作用と神経疾患への応用，オレオサイエンス，Vol. 6, 67-76 (2006)
8) 奈良部　均，リン脂質－工業的生産の現状と将来－，油化学, Vol. 41, 897-902 (1992)
9) 佐藤清隆，機能性脂質の開発，CMC Books Co., p. 230-258 (1999)
10) 菰田　衛，レシチン－その基礎と応用－，幸書房，p. 22-79, p. 144-147 (1991)
11) 高畑昌弘, 野村誠治, 中村和広, 河原義治, 特開　平 1-277457 (1989)
12) 村山　弥, 液々分配分画法を用いた生体関連物質の分離精製，Bio Industry, Vol. 2, 640-649 (1985)
13) 白川洋一，伊藤　誠，小山恵司，箕輪祥男，山本五郎，特公　平 3-22396 (1991)
14) 大木隆正, 佐藤旨孝, 工藤　聰，特公　平 1-197492 (1989)
15) 安芸忠徳, 村上哲也, 超臨界流体抽出の新しい応用，油化学，Vol. 35, 281- 286 (1986)
16) 岩間昭男，膜分離法による大豆油精製技術とその経済効果，油化学, Vol. 34, 852-858 (1985)
17) G.N. JHAM, F.F.F. TELES and L.G. CAMPOS, Use of Aqueous HCl/MeOH as Esterification Reagent for Analysis of Fatty Acids Derived from Soybean Lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc*., Vol. 59, 132-133 (1982)
18) S. HARA, Y. KURODA, S. NAKAGAWA, Y. TOTANI, Modified Potentiometric Method with Isooctane for Paroxide Value Determination, J. Jpn. Oil Chem. Soc.,Vol. 43, 18-22 (1994)