

## 食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成23年3月31日受理  
産技連/食品健康産業分科会  
食品機能成分分析研究会 編  
[s-food@m.aist.go.jp](mailto:s-food@m.aist.go.jp)

### 牛乳に含まれる糖脂質

作成者：(独)産業技術総合研究所 北海道センター  
生物プロセス研究部門 主任研究員 仲山賢一  
e-mail: [k-nakayama@aist.go.jp](mailto:k-nakayama@aist.go.jp)

## 1. 牛乳について

### 1.1 概要

牛乳は、ウシの乳汁であり、主に牛乳生産用に育種されたホルスタインやジャージー種などの乳牛から得られる。牛乳は主に中東やヨーロッパで利用されていたが、日本ではほとんど利用されていなかった。日本で牛乳の食用が本格的になるのは明治以降であり、比較的歴史の浅い食品の一つである。牛乳はそのまま飲まれる他、チーズ、バター、ヨーグルトなどに加工される他、料理の食材としても用いられるなど幅広く利用されている。牛乳の成分は、ウシの品種や個体差、季節、飼料などにより変動することが知られている。製品化する際には、ウシによる個体差などをなくすために均一化しているのが一般的である。

北海道は広大な土地を利用した酪農が盛んなことから、牛乳の生産量も多く、国内生産の約4割を占めている。牛乳の製品販売や加工業者なども北海道には数多く存在しており、牛乳および乳製品は北海道の主要な産品の一つである。

牛乳には大きく分けて生乳と言われる乳牛などから絞られた牛乳を原材料として100%使用している無添加のものと、原材料が生乳100%ではないカルシウムやビタミン、果汁やコーヒーなどを加えたりして消費者の嗜好に合わせて加工されたもの（いわゆる乳飲料）とがある。無添加のものは、さらに無調整のものと調整されたものがあり、無調整のものがいわゆる一般的な牛乳であり、調整されたものとしては低脂肪牛乳などとして販売されている。

### 1.2 食品あるいは含有成分の機能性

牛乳には様々な成分が含まれているが、無調整のものには無脂乳固形分と乳脂肪分が含まれている。このうち無脂乳固形分は、たんぱく質(約3%)、糖質(約4.6%)、ミネラル(約0.7%)が含まれると言われている。乳脂肪分は牛乳全体で約3.5%含まれているとされている。

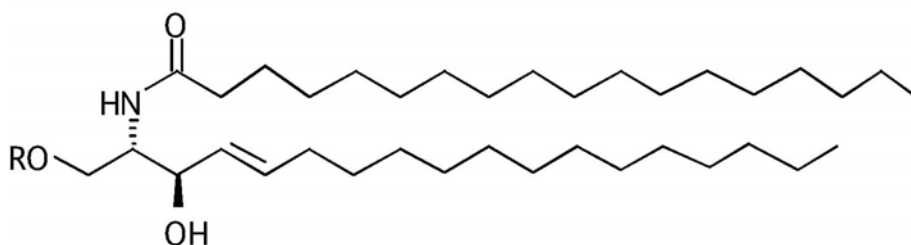
### 1. 2. 1 糖脂質類を含む食品

糖脂質は普遍的に存在する脂質成分であり、主に細胞の表面膜にマイクロドメインを形成して存在している。真核生物の場合、その脂質成分はセラミドであり、皮膚などでは肌の保湿およびバリア機能を保つために機能していることが知られている。この様なことから、元々生物である食品中には必ず糖脂質が含まれており、その構造も生物により多種多様であることが知られている。牛乳には細胞などは含まれないが、糖脂質が豊富に含まれていることが知られている。牛乳生産過程で糖脂質などが原乳中に分泌されるものと考えられる。

<引用・参考文献>

## 2. 糖脂質についての説明

牛乳の糖脂質は主に GM3 と GD3 というガングリオシドと呼ばれるシアル酸の結合したものであることが知られている。ガングリオシドは、ヒトなどでも見出される糖脂質であり、特に脳神経系に多く見出されていることから、脳・神経系で重要な役割を果たすと考えられている。GM3、GD3 とも細胞増殖制御に関わることが知られており、細胞表層での増殖因子レセプター制御もしくは糖脂質の集合体から細胞内リン酸化酵素を活性化することで細胞の増殖をコントロールしていることが考えられている。GM3 と GD3 の存在比は、乳牛の状態により変化することが知られており、機能との関連が注目されている。



GM3: R=NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc

GD3: R= NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc

図2-1 一般的な糖脂質の構造

## 3. 定量分析の方法について

牛乳からの糖脂質の抽出方法と、TLC による定性、定量方法を述べる。

### 3. 1 準備する器具など

1. ファルコンチューブ (15ml 容)

2. 遠心分離器
3. 遠心減圧濃縮装置
4. C18 SepPack カートリッジ (0.1g)
5. 展開槽
6. TLC プレート(シリカゲル)
7. 110°Cの電気オーブン

[試薬]

1. 2-プロパノール (特級)
2. ヘキサン (特級)
3. メタノール (特級)
4. クロロホルム(特級)
5. オルシノール
6. 硫酸 (特級)
7. GM3 標準品
8. GD3 標準品

### 3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

1. 牛乳(市販品、無調整牛乳)1ml をメスピペットなどで採取し、2-プロパノール 2.75ml およびヘキサン 1.25ml と共にファルコンチューブに入れ、1 分間 3 回振とう抽出を行う。
2. 3,000 回転で 5 分間遠心した後、抽出液を回収し、残渣にさらに 2-プロパノール 2.75ml およびヘキサン 1.25ml、脱イオン水 1ml を入れ 1 分間 3 回振とう抽出を行う。その後同様に遠心操作をし、抽出液を回収し、最初の抽出液と合わせる。
3. 合わせた抽出液について、遠心乾燥機にて溶媒を完全に留去する。
4. 乾燥した試料に 0.1M KCl を 1ml 加え懸濁する。溶けない残渣が出てくるが、水槽タイプの超音波発生器を用いて完全に懸濁を行う。
5. クロロホルム-メタノール(2:1)、メタノール、0.1M KCl で処理した C18 SepPack カートリッジに 4. の試料をアプライし、さらに水 1ml で洗浄する。この時、懸濁した不溶物もアプライする。
6. 水で洗浄した後、メタノール 1ml、クロロホルム-メタノール(2:1) 2ml で糖脂質画分を溶出し、これらの画分は一つに合わせ、遠心乾燥機を用いて完全に溶媒を留去する。
7. 上記の試料に 100  $\mu$ l のクロロホルム-メタノール(2:1)を加え、攪拌してよく溶かす。溶けないものについては遠心操作により除く。

### 3. 3 HPLC による分析方法

1. シリカゲルの TLC プレートへ等間隔に GM3 および GD3 の標準品およびお試料をキャピラリーなどを用いてアプライする。量は、標準品(GM3, GD3)が 0.5~2  $\mu$ g となるようにアプライし、抽出試料は 2  $\mu$ l アプライする。
2. クロロホルム-メタノール-水が 60:35:8 の展開溶媒で上記 TLC プレートを展開す

- る。展開溶媒がプレートの90%の高さに達するまで展開をする。
3. TLC プレートを完全に乾燥させた後、0.4%オルシノール、10%硫酸液を噴霧する。
  4. TLC プレートを 110℃のオーブンに入れ加熱し、発色させる。発色の濃度により、量を測定する。

#### 4. 分析例

##### 4. 1 TLC を用いた分析例

TLC クロマトグラフィーにより分離された物質は移動度から標準物質と比べ特定する。定量には同時に展開発色した標準試料を用い、画像解析ソフトにより発色濃度から量を算出する。図4. 1-1にTLCプレートをを用いたクロマトグラムを示す。

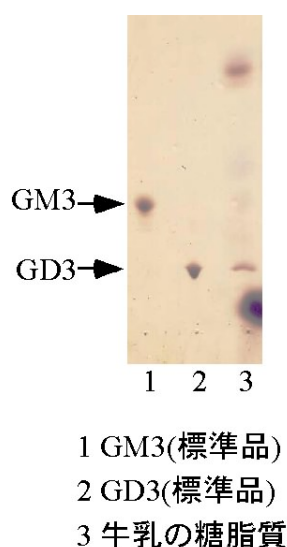


図4. 1-1 TLC クロマトグラフィーによるサンプルの分析例

#### 5. 食品の分析結果例

上記手法により、牛乳のGM3およびGD3の分析を行った結果を表5-1に示す。牛乳中のGM3およびGD3の量比は、泌乳期により異なるとされており、最初はGM3の量が多いが、時間の経過と共にGD3が増えてくるとされている。今回はGD3が主なガングリオシドとして観察されたが、異なる季節では全く異なる量比となる可能性がある。

表5-1 牛乳の糖脂質量

	糖脂質の量(μg/ml)
GM3	13.1
GD3	24.5

## 6. 分析上の留意、注意点

TLCクロマトグラフィーによる分析は、定性的な分析には優れているが、発色の感度が低いことと、結果を画像として取り込みソフトウェアによる解析を行わなければならないことなどから、定量には誤差を含みやすい。発色もオルシノールの噴霧の均一性にも個人差が出ることから、定量性に大きな誤差が含まれる可能性が高い。

そのため、非熟練者においてはこの分析手法の適用は難しく、蒸発光散乱検出器の使用などで糖脂質分析定量性の精度を上げる必要がある。

## 7. その他

特になし。

## 8. 定量法に関する引用・参考文献

特になし

-以上-