

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成24年1月18日受理(1月27日修正)

産技連/食品健康産業分科会
食品機能成分分析研究会 編

柑橘果実類のスフィンゴ糖脂質含有量（薄層クロマト法による）

作成者：産業技術総合研究所 健康工学研究部門

生体機能制御研究グループ 岩城知子

研究グループ長 中島芳浩

主任研究員 安部博子

株式会社 四国総合研究所 営業計画課 岡野美香

abe-abe@aist.go.jp

1. 柑橘類（ダイダイおよびユズ）について

1.1 概要

ダイダイは日本人にとって馴染みのある香酸柑橘の一つで、各地で庭先果樹として自家消費中心の栽培、利用が行われてきた。果汁は酢の代用として、成熟果皮は橙皮と呼ばれる芳香性苦味健胃薬（生薬）として古くから用いられている。果実が成熟した後も落果しにくく、新旧の果実が同一樹上に見ることができるため、ダイダイ（代々）と呼ばれるようになったとも言われる。縁起のよい果物とされ、正月の飾りに用いられる。

ユズもダイダイ同様、古くから食品として利用されてきた。果汁は香り・酸味を与える調味料として、果皮は七味唐辛子や柚子胡椒に香辛料として用いられるほか、製菓材料、ジャム・マーマレード類等の加工品も製造されている。韓国では、果皮ごとマーマレード様に加工したものを水・湯等で割る柚子茶が伝統的な飲料として知られている。食品以外には入浴剤として、また近年では、果皮から抽出した香気成分を香水や精油として利用することも増えた。ユズの近年の国内生産量は約28万tであるが、このうち四国の高知県（約50%）、徳島県（約14%）、愛媛県（約11%）で70%前後の生産量を示し、四国の特産柑橘となっている¹⁾。



図 1-1 ホンダイダイ



図 1-2 ユズ

1. 2 含有成分の機能性

柑橘類の機能性成分としては、フラボノイド、テルペン、リモノイド、カロテノイド、クマリン等が知られている²⁾。これらの機能性については近年盛んに研究が行われている。

他に、近年利用されはじめた機能性成分にスフィンゴ糖脂質がある。スフィンゴ糖脂質はセラミドを含むことから、皮膚の保湿・刺激緩和効果が認められ、特に化粧品に用いられている。スフィンゴ糖脂質の一つ、グルコシルセラミドは経口摂取した場合、消化管内で分解されてセラミドやスフィンゴシンとなって吸収され、大腸がん細胞のアポトーシス誘導や、大腸腺腫の発症を抑制する効果があることが報告されている³⁾。

1. 2. 1 スフィンゴ糖脂質を含む食品

一般に植物はグルコシルセラミドの含量が高く、小麦や米ぬか、トウモロコシ、コンニャク等から抽出されたスフィンゴ糖脂質が市場に出回っている。他に、リンゴパルプや沖縄特産柑橘シークワーサーなどの糖脂質についても研究が行われている^{4,5)}。ユズ由来セラミドは化粧品素材として商品化されている。

2. 糖脂質類についての説明

スフィンゴ糖脂質は、親水基として糖鎖、疎水基としてセラミドを持つ両親媒性の機能性複合糖質である。糖鎖を構成する単糖の種類やセラミド構造の違いによって多くの種類が存在する⁶⁾。セラミドはスフィンゴイド塩基に脂肪酸が酸アミド結合して形成される。スフィンゴイド塩基は18個の炭素と2本までの不飽和炭化水素鎖を持っており、不飽和炭化水素鎖の数および構造や含有比率は種や組織によって異なる。また、脂肪酸は主に炭素数14から26の飽和脂肪酸であることが多く、炭素数は種や組織によって異なる。そのため、セラミドの構造は非常に多様である。

糖鎖部分については、植物からは1から数個の糖を含むスフィンゴ糖脂質が単離・同定されているが、一般に最も多く含まれるのはグルコース1分子がセラミドに結合したグルコシルセラミドである⁷⁾。

3. 定量分析の方法について

柑橘類由来のスフィンゴ糖脂質の抽出および分析方法について述べる。スフィンゴ糖脂質は紫外吸収や蛍光を持たないため、一般に薄相クロマトグラフィー(TLC)による分離の後、糖部分の染色などによって検出される⁸⁾。この方法は簡易に多試料の定性分析が行えるためよく用いられるが、定量には熟練を要する。

3. 1 準備する器具など

1. 凍結乾燥機
2. 超音波破碎機
2. 遠心分離機
3. ロータリーエバポレーター
4. 蓋付き試験管 (有機溶媒に耐性のもの、15 ml 容以上)
5. スクリューキャップ付きチューブ (有機溶媒に耐性のもの、2 ml 容)
6. ナイフ、ミキサー等
7. 乳棒、乳鉢
8. 展開槽
9. TLC プレート シリカゲル 60 (メルクケミカルズ社製等)
10. 噴霧ビン
11. 乾熱滅菌器、ホットプレート等高温で温度管理のできる機器

[試薬]

1. クロロホルム
2. メタノール
3. ミリQ水
4. 0.8 N NaOH/MeOH (20.8 N NaOH 水溶液をメタノールで0.8 Nに希釈)
5. 酢酸
6. オルシノール硫酸溶液 (オルシノール0.2 gを硫酸11.4 mlに溶解後、ミリQ水を加えて100 mlとする。冷暗所保存。)
7. アセトン

8. グルコシルセラミド標準品（コンニャク由来等）

試薬は特級品を用いる。

3. 2 分析用試料の前処理・調整方法

<総脂質の抽出>

1. -30°C で凍結保存した果実を解凍し、果皮外側（フラベド）、果皮内側（アルベド）、可食部（さじょう、じょうのう膜）を選り分け、ナイフやミキサー等を用いて細分する。
2. 凍結乾燥後、乳鉢ですりつぶして粉末にする。もしくはできるだけ細かく砕く。
3. 粉末試料を 0.3 g を蓋付き試験管に取る。
4. 2 ml の抽出溶媒（クロロホルム：メタノール＝1：1，v/v）を加える。
5. 2 ml の 0.8 N NaOH/MeOH（水酸化ナトリウムのかわりに水酸化カリウムを用いてもよい）を加える。
6. 5 分間超音波処理する。
7. 42°C で 30 分間保温する。
8. 5 ml のクロロホルムを加える。
9. 2.25 ml のミリ Q 水を加えて攪拌する。
10. 遠心分離する。（1500 rpm, 5 分、室温）
11. 下層（有機層）を分取し、ロータリーエバポレーターで乾固する。
12. 0.5 ml の溶媒（クロロホルム：メタノール＝2：1，v/v）に溶解する。
13. 重量測定済みスクリュウキャップ付き 2 ml チューブに移し、減圧乾燥する。
14. 重量を測定し、10 mg/ml になるよう溶媒（クロロホルム：メタノール＝2：1，v/v）に溶解する。

3. 3 TLC による分析方法

(1) 展開溶媒の調整

展開溶媒はクロロホルム：メタノール：酢酸：ミリ Q 水＝20:3.5:2.3:0.7 (v/v) を用意し、展開を始める 3 時間程度前に展開槽に入れて飽和させておく。

(2) TLC

1. TLC プレートをアセトンで洗浄した後、ドライヤー（冷風）で乾燥させる。
2. 試料を載せる位置（TLC プレートの下および左右 2 cm 程度空ける）に鉛筆で薄く印をつける。
3. 試料と標準品をスポットし、ドライヤー（冷風）で乾燥させる。

4. 展開槽に入れて展開する。
5. 上部から 1 cm くらいのところで展開を止め、ドライヤー（冷風）で乾燥させる。
6. 0.2 % (w/v) オルシノール in 2 M H₂SO₄ (オルシノール硫酸液) (和光 5-メチルレソルシノール (オルシン)) を噴霧し、110℃で 10 分程度加熱する。
7. 呈色したらプレートを取り出し、スキャナー等で画像データとして取り込む。

(3) 定性および定量

TLC によって分離された物質は、スポットの位置(移動度)を標準品と比較することによって特定する。また、画像解析ソフト (NIH Image、ImageJ 等) を用いた発色濃度の比較により量を算出する。

4. 分析例

上記方法にて抽出したサンプルのクロマトグラムを図 4-1 に示す。分離された物質は移動度から標準品との比較により特定する。図 4-1 の結果から、ホンダイダイ、ユズの可食部分では標準品のグルコシルセラミドの移動度と一致するスポット (図中赤の矢印) が存在することから、これら部位にはグルコシルセラミドが含有されていることが分かる。

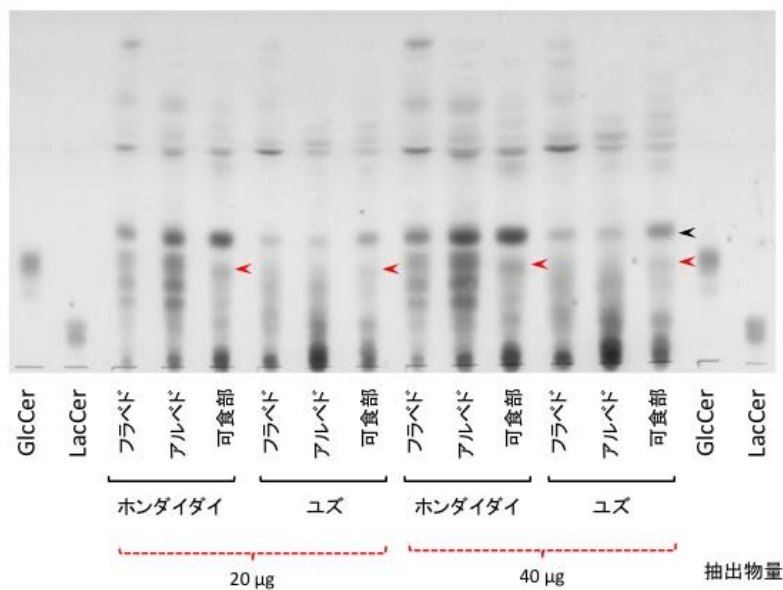


図 4-1 TLC によるホンダイダイ・ユズのスフィンゴ糖脂質の分析。グルコシルセラ

ミド(GlcCer)標準品およびラクトシルセラミド(LacCer)標準品はそれぞれ 2 µg、果実抽出物は 20 µg または 40 µg スポットした。下記 5 にて分析を行ったスポットに赤矢印を、ステリルグルコシドに黒矢印を付した。

定量する場合は標準品の色の濃さとの比較から算出する。図 4-2 に定量の例を示した。TLC によるグルコシルセラミドの発色 (図 4-2A) を画像解析ソフトで解析し、検量線を作成する (図 4-2B)。検量線をもとに、サンプル S の赤矢印で示したスポット (図 4-2A) を解析すると、グルコシルセラミド量は 1.8 µg と計算された。

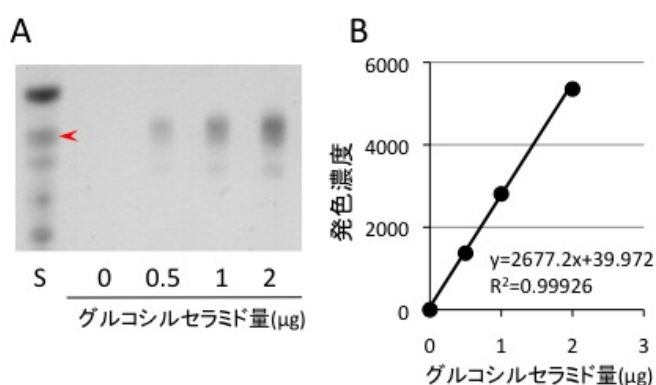


図 4-2. TLC による定量例。
A, TLC 分析例. S はサンプル例を示している. B, 検量線. A に示した TLC 結果を富士フィルム社製画像解析ソフト Multi Gauge Ver3.0 を用いて発色濃度を解析した. 発色濃度はピクセルあたりの発色量で示した.

5. 分析結果例

上記手法により、ホンダイダイおよびユズ可食部のグルコシルセラミド量分析を行った結果を表 1 に示す。

表 1. 柑橘可食部のグルコシルセラミド含量.

*グルコシルセラミド量は 3. 2 に記述した方法によって得られた粗抽出物 100 µg 当たりの重量で表した.

種類	グルコシルセラミド量(µg)*
ホンダイダイ	5.6
ユズ	2.35

果皮由来の粗抽出物は色素成分やフラボノイドのような糖脂質以外の物質を多く含み、TLC ではグルコシルセラミドとの区別が非常に曖昧で判別が難しい。また、フラベドおよびアルベドに含まれ、グルコシルセラミドとほぼ同じ移動度を示すスポットは 280 nm の吸収を持っていた。グルコシルセラミドは 280 nm の吸収を持たないことが知られているため、この成分はグルコシルセラミドではないと判断して定量分析は行わなかった。

6. 分析上の留意、注意点

植物の糖脂質にはグリセロ糖脂質やステリルグルコシドが多く含まれる。アルカリ存在下で抽出することによってグリセロ糖脂質を除くことができるが、ステリルグルコシドは残存する。TLC で分析する場合にはグルコシルセラミドとステリルグルコシドの移動度は非常に近く、一般的に中性糖脂質の分離に用いられる展開溶媒（例えばクロロホルム:メタノール:水=65:35:8）ではグルコシルセラミドとステリルグルコシドとの分離は大変困難である（図 6-1）。酢酸を含む展開溶媒を使用すると高さ 10 cm の TLC プレートでも両者を分離できる⁴⁾。また、柑橘類には多種類かつ多量のフラボノイドが含まれ、粗抽出物（総脂質画分）にはフラボノイドも混在している。フラボノイドは構成成分として糖（グルコースおよびラムノース）を有するものが多く、TLC でも検出される（図 6-1）。これらの成分との区別のためにも、標準品との比較は必須である。

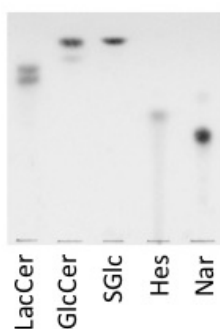


図 6-1 各標品の TLC. ラクトシルセラミド(LacCer)、グルコシルセラミド(GlcCer)、ステリルグルコシド(SGlc)、ヘスペリジン(Hes)、ナリンギン(Nar)それぞれ 3 μg をスポットした。ヘスペリジンとナリンギンは柑橘類に含まれるフラボノイドである。展開溶媒にはクロロホルム:メタノール:水=65:35:8 を用いた。

<引用・参考文献>

- 1) 農林水産省 特産果樹生産動態等調査 平成 21 年産
- 2) 柑橘加工品等に含まれる機能性成分、大野一仁ら、「食品中機能性成分の分析法マニュアル集」 4.
- 3) 菅原達也、*日本栄養・食糧学会誌*, 60, 11-17 (2007)
- 4) Takakuwa N, Saito K, Ohnishi M, Oda Y. *Bioresor. Technol.*, 96, 1089-1092 (2005)

- 5) 平成 19 年度 沖縄イノベーション創出事業顕在化ステージ「沖縄産柑橘類に含まれるスフィンゴ脂質に関する研究開発」成果報告書
- 6) Para MO, Hannun YA, Ng CK-Y. *New Phytologist*, 185, 611-630 (2010)
- 7) Fujino Y. *園田学園女子大学論文集*, 24, 149-162 (1990)
- 8) 脂質 III (新生化学実験講座 4), 日本生化学会編, 東京化学同人(1990)

-以上-