

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19日受理

産技連/食品機能成分分析研究会 編

s-food@m.aist.go.jp

柑橘類のスフィンゴ糖脂質 (HPLC を用いた定量法による)

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あり、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



図 1-1 ホンダイダイ



図 1-2 ユズ

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⁾。

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、小麦や米ヌカ、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。ほかに、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 0 から 2 本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

ダイダイ果皮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、糖部分の染色などによって検出される。しかしながら、この薄層クロマトグラフィー(TLC)による定量は熟練を要し、非熟練者では定量性に難があることから、ここで述べる高速液体クロマトグラフィー(HPLC)と蒸発型光散乱検出器(ELSD)を用いた分析手法が開発され、用いられるようになった⁸⁾。

3. 1 準備する器具など

1. 凍結乾燥機
2. 超音波破碎機 (超音波発信槽に試験管を浸けるタイプのもの)
3. 遠心分離機
4. ロータリーエバポレーター
5. 2液グラジエントのできる高速液体クロマトグラフシステム(島津製作所製HPLCシステム Prominence)、ELSD (島津製作所製蒸発型光散乱検出器 ELSD-LTII)
6. シリカゲルカラム (10×150 mm、Inertsil SIL-100A 5 μm、GLサイエンス社製)
7. 蓋付き試験管
8. ミキサー等
9. 乳棒、乳鉢
10. 不織布やメッシュフィルターなど (目が粗く、破碎した果実を濾過するのに適したもの。)

[試薬]

1. クロロホルム(特級またはHPLCグレード)
2. メタノール(特級またはHPLCグレード)
3. ミリQ水
4. 水酸化ナトリウム(特級)
5. 0.8 N NaOH/MeOH [20.8 N NaOH水溶液をメタノール(特級)で希釈]
6. コンニャク由来グルコシルセラミド(長良サイエンス製、フナコシ商品コード NS170302) [溶媒 (クロロホルム(特級) : メタノール(特級) = 2 : 1, v/v) で 1 mg/ml に溶解し、標準品として使用]

試薬は試料の抽出には特級、HPLCにはHPLCグレードを用いる。

3. 2 分析用試料の前処理・調整方法

1. -30°C で凍結保存した果実を解凍し、可食部（果肉とじょうのう膜）を選び分け、ミキサー等を用いて細分する。
2. 不織布等を用いて濾過し、不溶性画分を回収する。
3. 不溶性画分を凍結乾燥後、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。
4. 粉末試料 0.3 g を蓋付き試験管に取る。
5. 2 ml の抽出溶媒（クロロホルム(特級)：メタノール(特級) = 1 : 1, v/v) を加える。
6. 2 ml の 0.8 N NaOH/MeOH を加える。
7. 5 分間超音波処理する。
8. 42°C で 30 分間保温する。
9. 5 ml のクロロホルムを加える。
10. 2.25 ml のミリ Q 水を加えて攪拌する。
11. 遠心分離する。(1500 rpm, 5 分、室温)
12. 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。
13. 2 ml の溶媒（クロロホルム(特級)：メタノール(特級) = 2 : 1, v/v) に溶解する。

3. 3 HPLC による分析方法

(1) 移動相の調整

A 液：クロロホルム(HPLC グレード)

B 液：95 %メタノール(HPLC グレード)/ 5 % ミリ Q 水

(2) 分析条件

分離用カラムはシリカゲルを担体とし、サイズは内径 10 mm×長さ 150 mm のものを用いる。分析前に A 液：89 %、B 液：11 %でカラムを平衡化しておく。溶出は 30 分後まで行う。

[1] 検出器、溶媒の流量等の条件

検出器：ELSD

カラム温度：室温

流量：A 液、B 液の合計で毎分 2 ml

試料注入量：50–100 μl

[2] 溶媒の混合比は以下のように調整する。

時間 (分)	A 液 (%)	B 液 (%)
0-10	89	11
10-17	87	13
17-24	85	15
24-35	0	100

(3) 定性および定量

定量は標準品であるコンニャク由来グルコシルセラミドを用い、そのピークの面積値から定量を行う。

4. 分析例

分離された物質は溶出時間から標準品との比較により特定する。定量には標準品のクロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。典型的なクロマトグラムを図4-1、図4-2、図4-3に示す。グルコシルセラミドは図4-3の標準品のクロマトグラムで示されているとおり OD280 の吸収を示さない。従って、同標準品の溶出時間付近のピークで OD280 の吸収を示さないピークがグルコシルセラミドである。

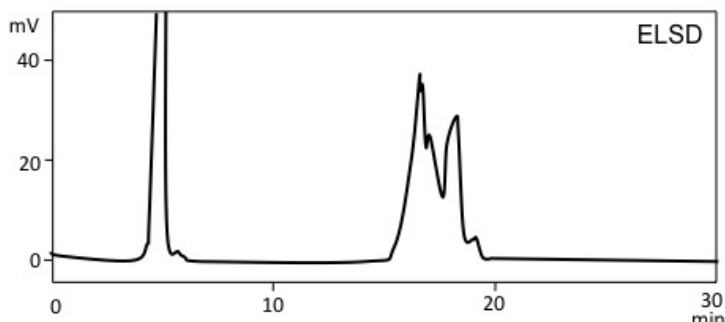
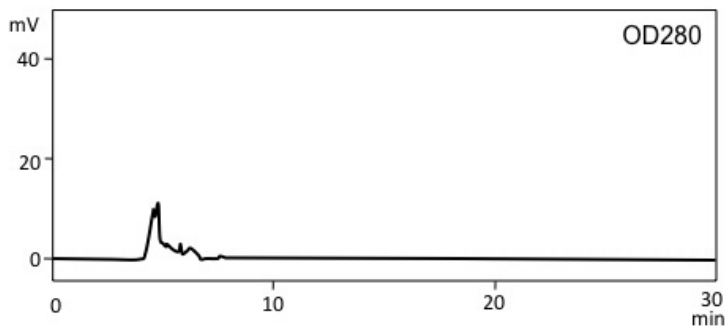


図4-1 HPLCによるコンニャク由来グルコシルセラミド(標準品)の分析. 1 mg/mlに溶解した標準サンプル 40 μ lをHPLCに供した結果を示す. 本分析では、20~40 μ l (20~40 μ g相当)を用いて分析を行った. グルコシルセラミドはELSDで16~18.2分に検出された.

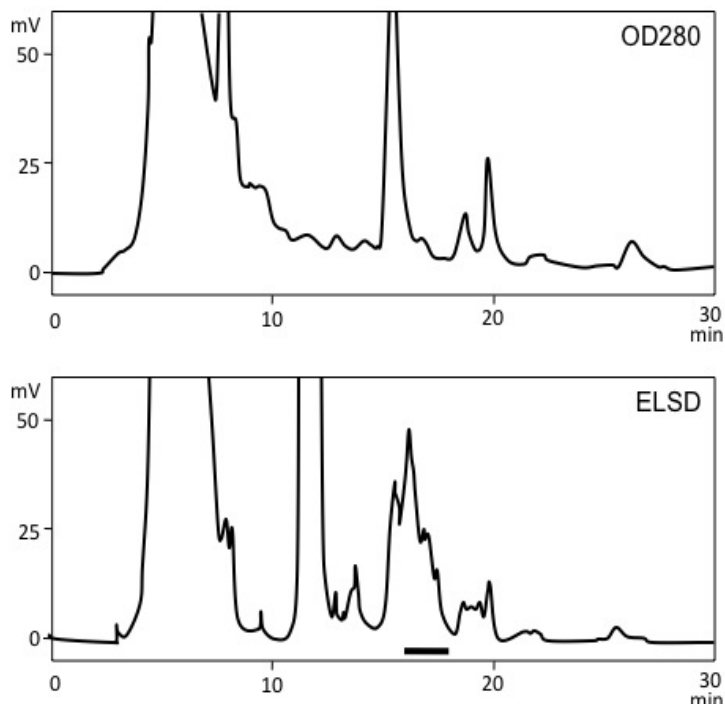


図4-2 HPLCによるホンダイスフィンゴ糖脂質の分析. ELSDによって検出されるコンニャク由来グルコシルセラミドの溶出時間をバーで示した. 70 μ l の抽出サンプルを HPLC に供した結果を示す.

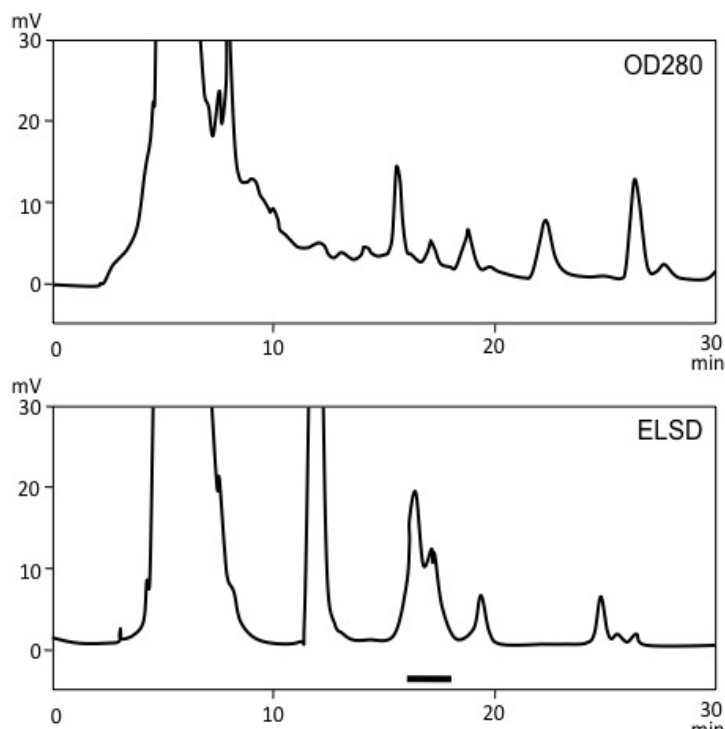


図4-3 HPLCによるユズスフィンゴ糖脂質の分析. ELSDによって検出されるコンニャク由来グルコシルセラミドの溶出時間をバーで示した. 50 μ l の抽出サンプルを HPLC に供した結果を示す.

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に含まれるグルコシルセラミドの定量分析を行った。ユズは高知県産（2010年11月収穫）、ホンダイダイは香川県産（2010年3月収穫）を-30℃で冷凍保存した物を材料に用いた。ホンダイダイは16.2～17.1分（図4-2）、ユズは16.3～17.3分（図4-3）にELSDで検出されたピークをグルコシルセラミドとして扱った。検出されたグルコシルセラミド量は、ホンダイダイ凍結乾燥品1g中686.1μg、ユズ凍結乾燥品1g中389.7μgと計算された。

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。HPLC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溶出時間は近いいため、標準品との比較は必須である。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、粗抽出物にはこれらのフラボノイドも混在している。フラボノイドはELSDでも検出されるが、糖脂質とは異なり280nmの吸収がある。実際の定量ではOD280の値をモニターし、280nmでも明確にピークが検出された場合は、そのピークの面積は計算に加えないよう留意する。また、果皮由来糖脂質のフラボノイドとの分離はこの手法でも非常に困難であるため正確な定量は難しいが、おおよその定量については本マニュアル集「柑橘果実類のスフィンゴ糖脂質含有量（薄層クロマト法）」を参照されたい。

<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) Sugawara T, Miyazawa T. *Lipids*, 34, 1231-1237 (1999)