

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

四国地域イノベーション創出協議会
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

ワカメの糖脂質群

作成者：産業技術総合研究所 健康工学研究センター
生体機能評価チーム長 仲山 賢一

1. ワカメの糖脂質について

1. 1 概要

徳島県のワカメは鳴門において養殖が盛んであり名産品として知られている。このような海草類の糖脂質はあまり報告がないことから不明な部分が多く、新規な機能などが期待できる。

生体に含まれる糖脂質成分は、その構造にセラミド成分を含んでいることから、近年、機能性成分として利用することが盛んになっており、様々な利用が試みられている。特に植物に含まれる糖脂質はその含量が比較的多いこと、また、食品加工した際の廃棄成分に含まれることなどから、産業利用が試みられている。その活性は幅広く、主に皮膚の保湿や免疫系への関与、さらには抗ガン作用の可能性も報告されている。

1. 2 ワカメの糖脂質の機能性

糖脂質は一般的に様々な効果があるといわれている。その多くは、免疫系との関わりにより有効であるとされているが、一部は直接的な抗ガン効果や神経系への作用なども報告されている。その作用メカニズムは学術的に研究もされており、糖脂質の機能の一部は、糖タンパク質との糖鎖同士の相互作用による結合によるものであるとする学術論文が発表されている(1)。このように糖脂質の機能は糖鎖部分の寄与が大きいと考えられるが、経口摂取された場合、消化管などでの分解により、セラミドやスフィンゴシンに分解され吸収されることが知られており、セラミドやスフィンゴシン由来の効果が観察されることも知られてきている。スフィンゴシンやセラミドは、糖脂質とはまた異なる生理作用が報告されていることから、食品として経口摂取される場合は様々な効果が期待できる。

1. 2. 1 類似の糖脂質を含む食品

ワカメなどの海草の糖脂質は知られていない。

<引用・参考文献>

1. Kawashima N, Yoon SJ, Itoh K, Nakayama K., J Biol Chem. Vol.284, pp6147-6155,

2009

2. 糖脂質類についての説明

糖脂質は、様々な種類が知られているが、ここでは一般的に動物や植物で観察されるセラミドを含む糖脂質についての説明をする。

糖脂質の基本的な構造を図1に示す。脂質部分はセラミドと呼ばれるものであり、スフィンゴシンという塩基部分とそれに結合する脂肪酸部分に分かれる。スフィンゴシンは植物では様々な構造が知られており、これと結合する脂肪酸の多様性から多様なものが存在する可能性がある。ここでは、主に観察される主要なスフィンゴシンからなる糖脂質について言及する。

次に糖鎖部分であるが、動物では非常に多様な糖鎖が結合していることが知られている。一方、植物ではグルコースが一分子結合したタイプの糖脂質しか見いだされておらず、植物では糖鎖部分の多様性はないと考えられている。ワカメについてはこれらの糖脂質とは異なり、非常に大きな糖鎖の結合した糖脂質が観察される。

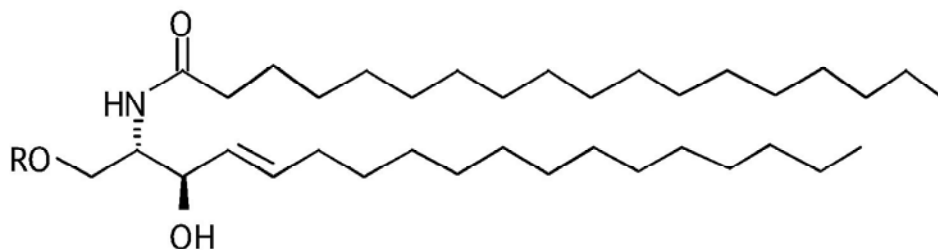


図1 糖脂質の構造

3. 定量分析の方法について

ワカメ由来の糖脂質の抽出および分析方法について述べる。糖脂質は、紫外吸収や蛍光などを持たないことから、その検出には、糖部分の染色などが用いられてきた。しかしながら、この手法では微量の糖脂質の検出は不可能であり、定量性もないことから、本マニュアルでは高速液体クロマトグラフィーと蒸発光散乱検出器(ELSD)を用いた分析手法を用いる。

3. 1 準備する器具など

1. 有機溶媒に耐性のあるミキサー(ステンレス製)
2. ブフナー漏斗
3. 濾紙、セライト
4. ロータリーエバポレーター

5. 分液漏斗
6. 2液グラジエントの出来る高速液体クロマトグラフシステム、蒸発光散乱検出器 (ELSD)
7. アミノカラム (4.6x250mm)

[試薬]

1. ヘキサン (試薬特級)
2. 2-プロパノール (試薬特級)
3. Milli-Q 水
4. クロロホルム
5. メタノール
6. アセトニトリル
7. NaCl

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

ワカメ 20g に対して、ヘキサン 25ml、2-プロパノール 55ml を加えて、ミキサーで採油滓を破碎しながら糖脂質を抽出する。抽出は、1 分間の破碎を 3 回繰り返すことにより行う。破碎抽出後、ブフナー漏斗に濾紙をセットし、必要であればセライトを濾紙上にひき、吸引濾過を行う。濾過された残渣は、2-プロパノール、ヘキサン、水の 55:25:20 の混合溶液で、再度ミキサーを使用した抽出を行う。

合計 2 回行った抽出濾過液を合わせ、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮を行う。完全に溶媒を除くために、エタノールを加えながら、濃縮を行う。完全に溶媒が除去され乾固したら、クロロホルム、メタノールの 2:1 の液を 45ml 加えて抽出乾固物を溶解する。溶解したら、分液ロートに移し、水を 7.5ml 加えよく攪拌する。攪拌後静置し、液層が分離するのを待つ。分離した上層を糖脂質画分として集め、下層は減少した上層と同じ量のクロロホルム、メタノール、0.1% NaCl 水溶液 (1:10:10) を加え、分液漏斗で激しく攪拌する。攪拌後、液が二層に分かれるのを待つが、このとき必要であれば一晩放置する。二層に分かれたら、上層を糖脂質画分として集める。この操作は 2~3 回繰り返す。

上層は一つに集め、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮を行う。

3. 3 HPLC による分析方法

(1) 移動相の調製

A 液としてアセトニトリルを、B 液として 30%アセトニトリル、70% 200mM 酢酸/トリエチルアミンを用いる。

(2) 分析条件

分離用カラムはアミノ基を持つ担体を充填したカラムを用いる。カラムのサイズは直径 4.6mm、長さ 250 mm のものを用いる。移動相は 0.5mL/min で、初期状態は A 液: 100%でカラムを平衡化し、サンプルをアプライした後、50 分後に B 液: 100%まで直線的に溶媒濃度を上げる。検出は蒸発光散乱検出器 (ELSD) で行う。

(3) 定性及び定量

定量は標準品であるコンニャクから分離された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

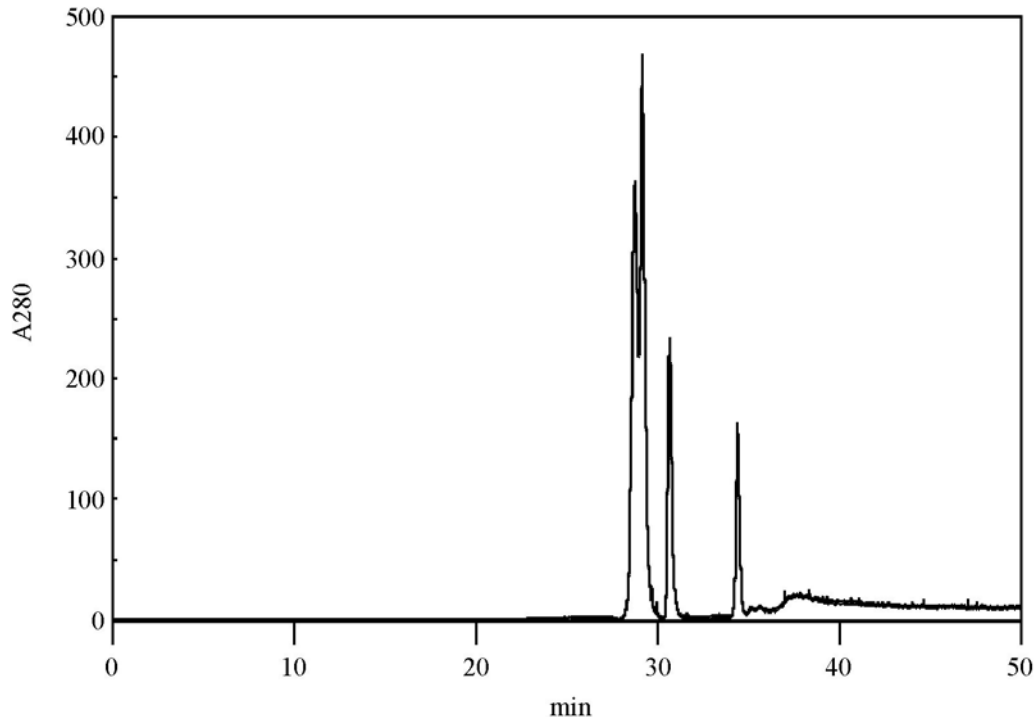


図 2 HPLC によるワカメの糖脂質の分析

ワカメの糖脂質は非常に大きな糖鎖が結合していると考えられるため、他の糖脂質とは異なり、クロロホルムやメタノールを使用した分離系では分画できない。このため、分離には通常糖鎖の解析に用いるアミノカラムを用いた。分離パターンからは糖鎖長の推定は困難であるが、少なくとも 4 種類の長さの糖鎖があると考えられる。また、糖脂質の抽出物は、紫外吸収を持つものがほとんどなく、ほぼ全てが ELSD のみで検出される物質であったこと、TLC 解析ではオルシノール硫酸で染色されるなど、ほぼ全てが糖脂質であると考えられる。

5. 分析上の留意、注意点

通常の糖脂質とは異なり、糖鎖が長いことから、有機溶媒の含量の多い溶媒系での分離は困難である。また、クロロホルム/メタノールの混合溶媒での溶解も困難である。溶解にはメタノール/水の混合溶媒が適している。

——以上——

[トップページに戻る](#)