

# HPLC-ELSDによる植物由来グルコシルセラミド素材定量分析法の単一試験室妥当性確認

誌名	日本食品科学工学会誌
ISSN	1341027X
著者	宮下, 留美子 奈良, 昌代 木下, 幹朗 間, 和彦 中塚, 進一 落合, 潔 大西, 正男
巻/号	59巻1号
掲載ページ	p. 34-39
発行年月	2012年1月

## HPLC-ELSD による植物由来グルコシルセラミド素材定量分析法 の単一試験室妥当性確認

宮下留美子<sup>1,2\*</sup>, 奈良昌代<sup>1</sup>, 木下幹朗<sup>2,3</sup>, 間 和彦<sup>1</sup>, 中塚進一<sup>4</sup>, 落合 潔<sup>1</sup>, 大西正男<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> 日本製粉株式会社中央研究所

<sup>2</sup> 岩手大学大学院連合農学研究科

<sup>3</sup> 帯広畜産大学食品科学研究部門

<sup>4</sup> 長良サイエンス株式会社

Single-laboratory Validation of HPLC-ELSD Method for Quantitative Analysis of Plant Glucosylceramides

Rumiko Miyashita<sup>1,2\*</sup>, Masayo Nara<sup>1</sup>, Mikio Kinoshita<sup>2,3</sup>, Kazuhiko Aida<sup>1</sup>,  
Shin-ichi Nakatsuka<sup>4</sup>, Kiyoshi Ochiai<sup>1</sup> and Masao Ohnishi<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Central Laboratory, Nippon Flour Mills Co., Ltd., 5-1-3 Midorigaoka, Atsugi, Kanagawa 243-0041

<sup>2</sup> The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550

<sup>3</sup> Department of Food Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada, Obihiro, Hokkaido 080-8555

<sup>4</sup> Nagara Science Co., Ltd., 840 Furuichiba, Gifu, Gifu 501-1121

Plant glucosylceramides (GlcCer) are currently used as functional materials in supplements, general foods, and drinks for skin care. However, the routine analytical method for quantification of the functional lipid has not yet been established because it is difficult to obtain analytical standard material. In this study, we carried out single-laboratory validation of the high-performance liquid chromatography/evaporative light-scattering detection (HPLC-ELSD) method for expansion of the matrix which has already been established. Performance characteristics such as selectivity, linearity, trueness (recovery), repeatability, and intermediate precision were examined. The reported analytical protocol, which was developed for the quantification of wheat GlcCer, was shown to be also applicable for different matrices such as rice and corn. Moreover, judging from these results together with published data, it was assumed that the method could be extended to other matrices by using the standard curves of individual GlcCer prepared from the same source material as the target matrices. (Received Jun. 15, 2011; Accepted Sep. 27, 2011)

**Keywords** : glucosylceramide, quantitative analysis, HPLC (High-performance liquid chromatography), ELSD (Evaporative light-scattering detection)

**キーワード** : グルコシルセラミド, 定量分析, 高速液体クロマトグラフィー, 蒸発光散乱検出器

スフィンゴ脂質は、長鎖スフィンゴイド塩基と長鎖脂肪酸が酸アミド結合したセラミドを共通成分とする脂質群で、スフィンゴイド塩基の1級アルコールに糖、リン酸コリンなどが結合した各種のスフィンゴ糖脂質やスフィンゴリン脂質（スフィンゴミエリンなど）として広く生物界に分布している。植物に含まれる代表的なモノグリコシル型のスフィンゴ糖脂質であるグルコシルセラミド（GlcCer）は、その構成成分である脂肪酸とスフィンゴイド塩基が多様であることから、両成分の組み合わせの違いによる多種の分子種混合物として存在する<sup>1)~3)</sup>。植物 GlcCer は、

細胞膜や液胞膜を構築する主要な脂質成分として両膜が関わる生物現象に深く関与することが示唆されているが、一方、経口摂取した場合には様々な食品機能性が期待できることが明らかになってきている<sup>2)1)~14)</sup>。特に2000年以降、美容分野へのニーズの高まりと共に、これを配合したサプリメントに代表される健康食品や一般食品、飲料などに機能性食品素材として広く利用、販売されている<sup>2)</sup>。現在、工業レベルで生産されている植物 GlcCer の原料は、トウモロコシ、コメ、コムギ、コンニャク、ダイズ、食用キノコ類、ビート等、多種多様であり、機能性食品素材としては GlcCer を2~20%（質量分率）含有すると表示された製品が上市されている。このように各種起源の植物性 GlcCer 素材の利用が進むと、その製品の品質を保証する上でこれらの GlcCer 濃度を正確に把握する必要性が出てくる。植

<sup>1</sup> 〒243-0041 神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3

<sup>2</sup> 〒020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

<sup>3</sup> 〒080-8555 北海道帯広市稲田町西二線

<sup>4</sup> 〒501-1121 岐阜県岐阜市古市場 840

\* 連絡先 (Corresponding author), miyashita@nippon.co.jp

物 GlcCer 素材中の GlcCer 分析法に関しては、先に鹿島らがコムギ抽出物について蒸発光散乱検出器付き高性能液体クロマトグラフィー (HPLC-ELSD) による分析法を報告しているが<sup>15)</sup>、標準品として入手可能な高純度品が試薬として市販されていなかったため、この分析法が広く利用されるには至っていない。本研究では、マトリックスの拡張を目的に、コムギで開発された既報の HPLC-ELSD 分析条件のプロトコル<sup>15)</sup> について最近市販された植物 (トウモロコシおよびコマ) 由来の単離精製 GlcCer を標準品として使用して、ICH のガイドライン<sup>9)</sup>、AOAC の単一試験室による妥当性確認のガイドライン<sup>10)</sup>、IUPAC の単一試験室による妥当性確認および回収率ガイドライン<sup>16)17)</sup> に基づき、単一試験室による妥当性確認を行った。

## 実験方法

### 1. 試薬

実験に使用した試薬や溶媒は、全て市販の特級品あるいは HPLC グレードのものを用いた。GlcCer 標準品としては、長良サイエンス製のトウモロコシおよびコマ由来の GlcCer (純度  $\geq 99\%$  TLC) を用いた。

### 2. 標準溶液の調製

GlcCer 標準品 50.0 mg を秤量後、クロロホルム/メタノール混液 (2:1, vol/vol) に溶解し正確に 20 ml として標準溶液とした。これを適宜希釈した後、内標準物質として 3 mmol/L 飽和型ホスファチジルエタノールアミン (PE, Dipalmitoyl タイプ, 和光純薬製) を正確に一定量加えた溶液を調製し、GlcCer 量として 2.0~12.0  $\mu\text{g}$  を HPLC-ELSD に供した。

### 3. 植物由来 GlcCer 含有食品素材からの検液の調製

市販のトウモロコシ胚芽およびコマ胚芽由来の各 GlcCer 素材 (日本製粉製、賦形剤としてシクロデキストリンを使用) ならびに GlcCer を含まない賦形剤のみからなるプラセボについて、各 1 g をクロロホルム/メタノール (2:1, vol/vol) を用いて加熱還流抽出 (6 時間) を行い、抽出液をロータリーエバポレーターによって減圧下で留去、乾固した。得られた脂質抽出物を精秤後、クロロホルム/メタノール (2:1, vol/vol) に再溶解し、これに適量の内標準溶液を混合してから HPLC-ELSD に供した。

### 4. HPLC-ELSD 分析

HPLC 装置には島津製 LC-10AD 型を用い、これに ELSD としてポリマーラボラトリー製 PL-ELS2100 型 (システム I) あるいは同社製 PL-ELS1000 型 (システム II) をそれぞれ接続して分析した<sup>15)</sup>。既報では検出器の可変パラメータとして、ドリフトチューブ温度 85°C、ガス流量 3.2 SLPM に設定したとされているが<sup>15)</sup>、本試験ではネプライザー温度 40°C、エバポレーター温度 70°C、圧縮空気流圧 1.0 SLM に設定して行った。なお、本試験の両検出器の主な違いは、光源ランプが LED とタングステン、検出部分が

Table 1 HPLC solvent program for a binary gradient

Time (min)	A	B
0	99	1
15	75	25
20	10	90
21	0	100
26	0	100
26.01	99	1
36	99	1

Solvents: (A) chloroform; (B) methanol-water (95:5, vol/vol)

フォトマルチプライヤーとフォトダイオードである点であった。分析カラムにはいずれの場合も既報と同じ GL サイエンス製 Inertsil Sil 100-5 (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm) を用い<sup>15)</sup>、それを既報では 35°C 設定のところを<sup>15)</sup>、より安定化させるため 40°C に保温して分析した。溶出液には既報と同様にクロロホルムとメタノール/水 (95:5, vol/vol) の両液の 2 液によるグラジエントを用いたが<sup>15)</sup>、連続分析でも安定した値が得られるよう Table 1 に記載した混合比に改変して用いた。

### 5. 分析能パラメータ

#### (1) 選択性 (Selectivity)

市販 GlcCer 食品素材およびそのプラセボからの脂質抽出物、植物由来 GlcCer 標準品、GlcCer 食品素材中に夾雑するステリルグルコシド (SG, 大豆由来、フナコシ製) および PE について、それぞれ単体および混合溶液を HPLC-ELSD に供し、それらのピークの分離度については第十六改正日本薬局方一般試験法 液体クロマトグラフィーに規定されている完全分離 1.5 以上を、HPLC のピーク分離度の基準として選択性を確認した<sup>10)</sup>。

#### (2) 直線性 (Linearity)

既報に基づき<sup>15)</sup>、GlcCer として 2.0~12.0  $\mu\text{g}$  の各濃度の検量線標準溶液を 5 点用いて、各濃度で 3 反復したときの検出器応答の直線性について検討した。

#### (3) 真度 (回収率) (Trueness (Recovery))

GlcCer 食品素材の賦形剤として使用されているシクロデキストリンに植物由来 GlcCer 標準品を添加して回収試験を行った (Table 2)。本試験では、ガイドラインを参考に<sup>9)</sup>、現在市販されている GlcCer 食品素材のメーカーにより製品規格として自主表示されている、一般的な GlcCer 濃度である 3% (質量分率) を 100% 濃度と設定し、異なる 3 濃度 (30%, 60%, 120% 濃度) を調製した。これら 3 濃度の回収率については、すべて同一日に併行条件下で 3 反復測定し、真度を求めた。

#### (4) 併行精度 (Repeatability precision) および室内再現精度 (Intermediate precision)

トウモロコシおよびコマ由来 GlcCer 標準品をそれぞれ試料に用い、分析結果に影響を与える試験室内の主な変動

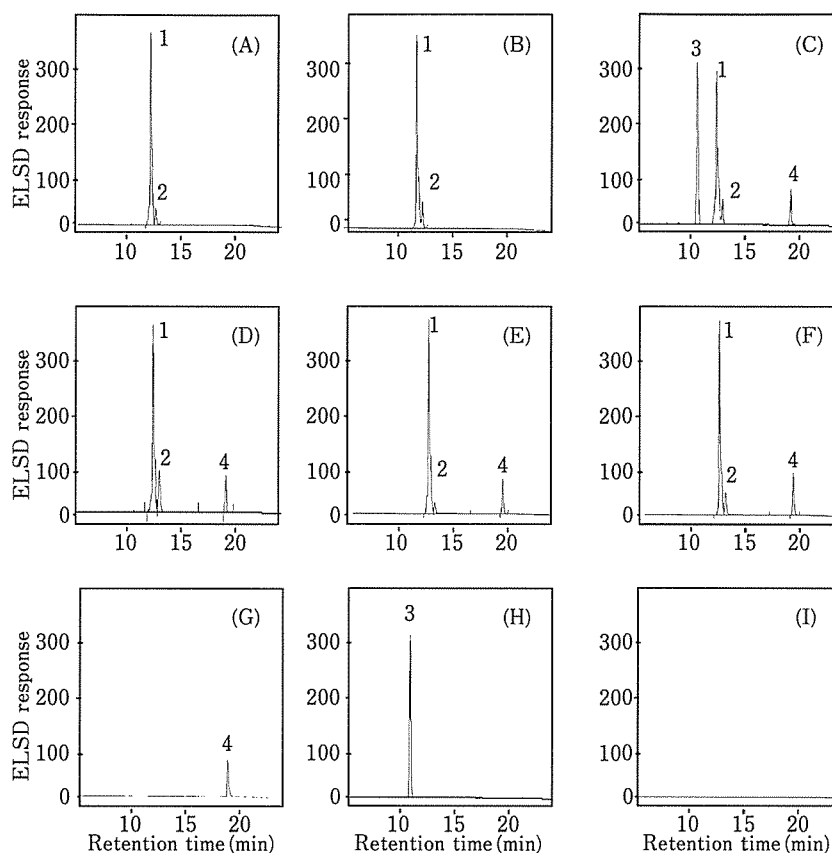


Fig. 1 Chromatograms obtained by conducting HPLC and an evaporative light scattering detector

(A) Glucosylceramide standard from maize, (B) Glucosylceramide standard from rice, (C) and (D) Lipid fractions obtained after extraction from food material, (E) and (F) Glucosylceramide standard and PE, (G) Internal standard (PE : L- $\alpha$ -phosphatidylethanolamine, dipalmitoyl (Wako Pure Chemical)), (H) Sterylglucoside from soybean, (I) Lipid fraction obtained after extraction from cyclodextrin.

要因として試験日 (6日), 試験者 (2名), 検出器 (システム I と II), 使用頻度の異なるカラム (2本) を取り上げ, 試験日に他の要因をランダムに割り付け, 各試験日に 2 反復測定の実験を行って併行精度と室内再現精度を求めた (Table 3).

#### (5) 統計処理

真度 (回収率) については, 3 濃度 3 反復測定した回収率データを一元配置分散分析で解析し, 平均回収率とその 95% 信頼区間を求めた. 併行精度および室内再現精度については, 基準品を 6 日間に各 2 反復測定したデータを一元配置分散分析で解析し, 併行標準偏差, 併行相対標準偏差, 室内再現標準偏差, 室内再現相対標準偏差を求めた. 検量線の累乗関数  $y = a \cdot x^b$  については, 5 検量線標準を各 3 反復した値  $y$  と濃度  $x$  を対数変換したデータに  $\log y = \log a + b \cdot \log x$  の式を当てはめ, 単回帰分析を用いてパラメータ  $a$  と  $b$  を求めた. データ解析には Excel 統計 2004 (社会情報サービス) を用いた.

## 実験結果および考察

### 1. 選択性

トウモロコシおよびコム由来の GlcCer 標準品単体および両成分を含有する食品素材からの脂質抽出物 (内標準物質の PE を含む), SG 標準品ならびにそれらの混合物を HPLC に供した結果を Fig. 1 に示す.

両 GlcCer 標準品はいずれも 2 つのピーク (ピーク 1 と 2) に分離されたが, GlcCer および GlcCer 食品素材に夾雑物として存在する SG (ピーク 3) ならびに内標準物質の PE (ピーク 4) はそれぞれカラムから分離して溶出された. これらの成分の分離は, HPLC のピークの判断基準<sup>11)</sup> から, ピーク 3 とピーク 1 は分離度 2.0 に, ピーク 1 とピーク 4 は分離度 6.7 となり, 十分な選択性があることが確認された. なお, 賦形剤のみからの脂質抽出物の場合 (Fig. 1 の I のクロマトグラム) は GlcCer と SG の両成分に由来するピークはまったく検出されなかった. また, 溶出液のグラジエント条件を既報<sup>15)</sup> から Table 1 に改変した結果, 分離が良くなるとともに, 連続分析でも安定した値が得られるようになった.

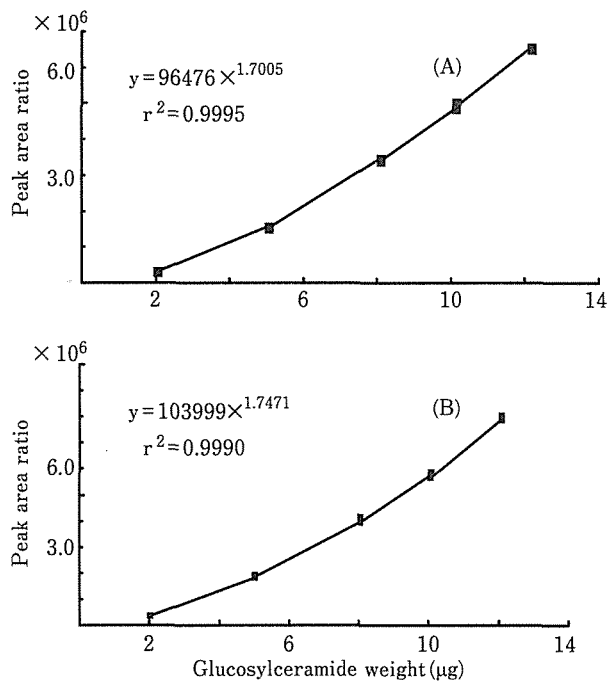


Fig. 2 Calibration curve for glucosylceramides analyzed by HPLC and an evaporative light scattering detector

(A) Glucosylceramide standard from maize.  
(B) Glucosylceramide standard from rice.

## 2. 直線性

既報<sup>15)</sup>を基に、トウモロコシおよびコメ由来 GlcCer 標準品を 2.0 μg から 12.0 μg の範囲で HPLC に供し、分析 (注入) 量 (x) とピーク面積 (y) との関係を累乗関数 ( $y = ax^b$ ) で近似したところ、Fig. 2 に示すように両 GlcCer とも作成した検量線はデータによく適合することが確認できた。

また、x と y の値を対数変換したデータに  $\log y = \log a + b \cdot \log x$  の式を当てはめ、単回帰分析を用いてパラメータ a と b を求め、この直線性の結果から、定量限界濃度 (QL) と検出限界濃度 (DL) を算出したところ<sup>1)</sup>、トウモロコシ由来については、QL が 0.09 μg / 注入量 (20 μL)、DL が 0.03 μg / 注入量 (20 μL) であった。コメ由来については、QL が 0.12 μg / 注入量 (20 μL)、DL が 0.04 μg / 注入量 (20 μL) であった。なお、トウモロコシ由来とコメ由来の検量線  $\log y = \log a + b \cdot \log x$  の傾きと切片には、共分散分析の結果、有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

## 3. 真度

トウモロコシとコメ由来 GlcCer 標準品を用い、添加量の異なる各試料における GlcCer の回収率を算出して本分析法の真度を検討した結果を Table 2 に示す。なお、本試験では標準品を用いたため、試料の均質性確認試験は省略した。

トウモロコシ由来 GlcCer 標準品については、30%、60% および 120% 濃度に相当する、1%、2% および 4% (質量分

Table 2 Recoveries of glucosylceramides

Spiking level (%) (mass fraction)	Percent recovery (%)		
	Maize	Rice	
1.0	109.1	103.8	
	98.6	100.8	
	96.6	98.5	
2.0	104.7	99.2	
	97.6	102.8	
	97.4	96.2	
4.0	97.0	101.0	
	101.5	101.1	
	98.4	103.2	
Average percent recovery (%)		100.1	100.7
Confidence interval of percent recovery (95%)		96.2~104.0	98.7~102.8

率) の各添加量における繰り返し分析 ( $n=3$ ) では、平均回収率は 100.1%、95% 信頼区間が 96.2~104.0% であった。また、コメ由来 GlcCer については、平均回収率は 100.7% で、95% 信頼区間は 98.7~102.8% であった。このように、本試験での回収率は、ガイドライン<sup>1)</sup>の濃度 1% (質量分率) の回収率許容範囲 (92~105%) から、いずれも良好であると判断された。

## 4. 併行精度および室内再現精度

トウモロコシ由来 GlcCer 標準品で実施した併行精度については、併行標準偏差 ( $S_r$ ) 0.04、併行相対標準偏差 ( $RSD_r$ ) 1.2%、室内再現精度については、室内再現標準偏差 ( $S_{IM}$ ) 0.06、室内再現相対標準偏差 ( $RSD_{IM}$ ) 1.8% であった (Table 3)。コメ由来 GlcCer で実施した併行精度については、 $S_r$  が 0.08、 $RSD_r$  が 1.2%、室内再現精度については、 $S_{IM}$  が 0.15、 $RSD_{IM}$  が 2.4% であった (Table 3)。

併行精度 ( $RSD_r$ ) については、ガイドライン<sup>1)</sup>の受入基準から HorRat が 2 以下の場合に受入可能と判断すると、それぞれの受入許容範囲はトウモロコシ由来では < 3.3%、コメ由来では < 3.0% となり、いずれも良好と判断された。また、室内精度 ( $RSD_{IM}$ ) については、受入可能の目安を Horwitz の式で求めた室内再現精度の 1/1.6 以下<sup>16)</sup>として同様に計算したところ、それぞれの受入許容範囲はトウモロコシ由来では < 4.2%、コメ由来では < 3.8% となり、いずれも良好と判断された。

以上の結果から、市販の機能性食品素材中の GlcCer を HPLC-ELSD 法で定量分析することについては、コムギで開発された既報の HPLC-ELSD 分析条件のプロトコル<sup>15)</sup>は異なるマトリックスにも適用が可能であることが確認された。

Table 3 Repeatability and intermediate precision of glucosylceramides

Day		1	2	3	4	5	6
Person		P1	P2	P1	P2	P1	P2
System*		I	II	I	I	II	II
Column**		New	Old	Old	New	Old	New
Added concentrations (%) (mass fraction)		Measurement value (%) (mass fraction)					
Maize	3.3	1	3.4	3.2	3.2	3.2	3.2
		2	3.3	3.3	3.2	3.3	3.3
Rice	6.2	1	6.2	6.3	6.3	6.5	6.3
		2	6.2	6.4	6.1	6.6	6.3
						Maize	Rice
Repeatability standard deviation ( $S_r$ )						0.04	0.08
Repeatability relative standard deviation ( $RSD_r$ %)						1.2	1.2
Intermediate precision standard deviation ( $S_{IM}$ )						0.06	0.15
Intermediate precision relative standard deviation ( $RSD_{IM}$ %)						1.8	2.4

\* Different detectors were used for system I and II.

\*\* Column : 'New' was injected less than 100 times.

'Old' was injected approximately 1000 times.

今回、試験に供したトウモロコシとコメでは、GlcCer分子種のスフィンゴイド塩基や脂肪酸の構成比率が似ている<sup>18)</sup>ため、本条件でのピーク形状や保持時間はほぼ等しく、またそれぞれのGlcCer標準品で作成した検量線  $\log y = \log a + b \cdot \log x$  の傾きと切片には有意差は認めなかったことから、これらは相互に利用が可能であると考えられる。しかし、上記構成比がトウモロコシやコメと異なる植物（たとえばコムギ、コンニャク、ダイズ、キノコ等）<sup>11)~3)19)</sup>についてはピーク形状や保持時間がトウモロコシやコメのそれとは異なる（宮下ら、未発表データ）。本研究での結果と、既報<sup>15)</sup>でコムギを用いた妥当性確認がされていることを考えると、それぞれの由来原料に対応した、すなわちマトリックスと一致する標準品を用いて検量線を作成することで、本法はトウモロコシ、コメ、コムギ以外の他のマトリックスへの拡張も可能であることが示唆される。今後は本試験で用いた以外の異なるマトリックスについても同様に分析されることが期待される。同時に、ELSDでは脂質クラスによって散乱光強度が異なることが予想されることから、GlcCerの構成脂肪酸の鎖長やスフィンゴイド塩基の違い（水酸基の数および二重結合の有無と立体配置）が検出感度にどの程度、影響を与えるかについても、主要な植物GlcCer分子種を単一成分として分離精製して検討する必要がある。なお、今回は測定条件をずらしたときの測定結果への影響など頑健性試験を行っていないが、カラムの温度、溶離液の流速などの変動要因についても、今後さら

に検討を進める必要がある。

## 要 約

本研究では、美容分野へのニーズと共に、健康食品や一般食品、飲料等に広く利用、販売されるようになった食品素材としての植物由来グルコシルセラミド (GlcCer) について、最近市販された標準試薬品（トウモロコシおよびコメからそれぞれ分離された精製 GlcCer）を用い、既報の蒸発光散乱検出器付き高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ELSD）分析の条件下での定量分析法の単一試験室による妥当性確認を行った。その結果、今回評価したパラメータ（選択性、直線性、真度、併行精度および室内再現精度）においてはいずれも良好な結果が得られた。このように、市販の機能性食品素材中の GlcCer を HPLC-ELSD 法で定量分析することについて、コムギで開発された既報の分析条件プロトコルは、異なるマトリックスにおいても適用が可能であることが確認された。また、植物 GlcCer には分子種多様性が見られるが、既報および本研究の結果から、測定する試料ごとに、マトリックスと一致する標準品を用いて検量線を作成することで、本法は他のマトリックスへの拡張が可能であると考えられた。

## 文 献

- 1) 大西正男, 伊藤精亮, 植物スフィンゴ脂質の構造特性と低温耐性. 油化学, 46, 1213-1225 (1997).
- 2) 西川研次郎監修, 食品機能性の科学編集委員会編集, 食品機能性の科学「第2節 スフィンゴ脂質」, pp.576-592, 産業技術サービスセンター (2008).
- 3) 大西正男, 植物および真菌の脂質, 特にスフィンゴ脂質の分子種特性と機能解析に関する研究, オレオサイエンス, 9, 543-551 (2009).
- 4) Tsuji, K., Mitsutake, S., Ishikawa, J., Takagi, Y., Akiyama, M., Shimizu, H., Tomiyama, T. and Igarashi, Y., Dietary glucosylceramide improves skin barrier function in hairless mice. *J. Dermatol. Sci.*, 44, 101-107 (2006).
- 5) Duan, R.D. and Nilsson, A., Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. *Prog. Lipid Res.*, 48, 62-72 (2009).
- 6) Schmelz, F.M., Sphingolipids in the chemoprevention of colon cancer. *Front. Biosci.*, 9, 2632-2639 (2004).
- 7) Aida, K., Kinoshita, M., Tanji, M., Sugawara, T., Tamura, M., Ono, J., Ueno, N. and Ohnishi, M., Prevention of aberrant crypt foci formation by dietary maize and yeast cerebrosides in 1,2-dimethylhydrazine-treated mice. *J. Oleo Sci.*, 54, 45-49 (2005).
- 8) Kinoshita, M., Aida, K., Tokuji, Y., Sugawara, T. and Ohnishi, M., Effects of dietary plant cerebroside on gene expression in the large intestine of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) - treated mice determined by DNA microarray. *J. Food Lipids*, 16, 200-208 (2009).
- 9) Yunoki, K., Renaguli, M., Kinoshita, M., Matsuyama, H., Mawatari S., Fujino, T., Kodama, Y., Sugiyama, M. and Ohnishi, M., Dietary sphingolipids ameliorate disorders of lipid metabolism in Zucker fatty rats. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 7030-7035 (2010).

- 10) Ono, J., Kinoshita, M., Aida, K., Tamura, M. and Ohnishi, M., Effects of dietary glucosylceramide on dermatitis in atopic dermatitis model mice. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, 708-711 (2010).
- 11) Furuya, H., Ohkawara, S., Nagashima, K., Asanuma, N. and Hino, T., Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **78**, 41-48 (2008).
- 12) Ohlsson, L., Burling, H., Duan, R-D. and Nilsson, A., Effect of a sphingolipid-enriched dairy formulation on postprandial lipid concentrations. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **64**, 1344-1349 (2010).
- 13) Nieuwenhuizen, W.F., Duivenvoorde, I., Voshol, P.J., Rensen, P.C.N., von Duvvenvoorde, W., Romijn, J.A. and Havekes, L., Dietary sphingolipids lower plasma cholesterol and triacylglycerol and prevent liver steatosis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **109**, 994-997 (2007).
- 14) Duan, J., Sugawara, T., Sakai, S., Aida, K. and Hirata, T., Oral glucosylceramide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene induced inflammatory response in mice by reducing TNF-alpha levels and leukocyte infiltration. *Lipids*, **46**, 505-512 (2011).
- 15) Kashima, M., Nakagawa, K., Sugawara, T., Miyazawa, T., Murakami, C., Miyashita, R., Ono, J., Deschamp, F.S. and Chaminade, P., Method for quantitative determination of cerebroside in "Plant Ceramide" foodstuffs by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Oleo Sci.*, **51**, 347-354 (2002).
- 16) Thompson, M., Ellison, S.L.R. and Wood, R., Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.*, **74**, 5, 835-855 (2002).
- 17) Thompson, M., Ellison, S.L.R., Fajgelj, A., Willetts, P. and Wood, R., Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, **71**, 337-348 (1999).
- 18) Sugawara, T., Aida, K., Duan, J. and Hirata, T., Analysis of glucosylceramides from various sources by lipid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J. Oleo Sci.*, **59**, 387-394 (2010).
- 19) Aida, K., Takakuwa, N., Kinoshita, M., Sugawara, T., Imai, H., Ono, J. and Ohnishi, M., Properties and physiological effects of plant cerebroside species as functional lipids. *Advanced Research on Plant Lipids*, pp.233-236, Kluwer Academic Publishers (2003).

#### 引用 URL

- i) [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf) (2011.9.13).
  - ii) [http://www.aoac.org/Official\\_Methods/slv\\_guidelines.pdf](http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf) (2011.7.20).
  - iii) <http://jpd.b.nihs.go.jp/jp16/YAKKYOKUHOU16.pdf> (2011.9.13).
  - iv) [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling\\_analysis\\_2004\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/report-sampling_analysis_2004_en.pdf) (2011.7.20).
- (平成 23 年 6 月 15 日受付, 平成 23 年 9 月 27 日受理)