

3. ガゴメフコイダンのサイホン式抽出と LC-MS 分析

食産業技術支援グループ ○青木 央

1. はじめに

ガゴメ昆布を活用した商品群がいろいろと流通しているなかで、フコイダン¹⁾の知名度が向上するにともない、さらなる、商品の普及を目指すにあたって、フコイダンの持つ機能性を拡販に利用できることから「表示」に対する期待が高まってきている。このフコイダンは、いろいろな手法により構造解析の方法が開示されているが、現在、加工食品の表示に適した分析方法が公表されていない。そしてまた、公定法にその後発展すると思われる、あるいは食物繊維の分析に準じた方法も現在、適当なプロトコルの開示がないと思われる。加工食品によっては、乾燥した葉体の粉末の配合比率から含有量を推量するという方法があるが、第三者検証が不能で最終製品の品質保証に適合する方法とはいえない。今回は、分析を実施する場合に必要な標準品に適するフコイダンを、ガラスサイホン(本頁右写真)を用いて調製する方法を紹介するとともに、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)などの機器分析の手法の開発を通して、このフコイダンの定量分析の周辺にある課題を考察する。

2. 方法

フコイダンの抽出法としては、ホルムアルデヒド溶液や希釈塩酸などの酸性溶液を用いた抽出方法が報告されている。その基本は、酸性抽出液からアルギン酸や色素など共存する不要物を除去し、分離精製する方法が多く取られている。この手法に従うと、抽出率を正確に求めて、元の抽出試料のフコイダン含有量を計算することはほぼ不可能である。抽出方法そのものに、一定の補正ができる方法が望まれている。サイホン式はその点で、その構造上、極めて有利であり、アルギン酸を Ca 塩として除くという方法を工夫することで、定量性が確保される。



2.1 ガラスサイホン式抽出法 (フコイダンの標準品の入手)



1.粉砕:ガゴメ由来のフコイダンは、函館市小安沿岸(北海道)より採取されたガゴメの風乾した葉体より抽出した。クロスビータミル(スリット刃目 2mm 規格)で粉砕した。**2.洗浄:**ガゴメ 15gを電熱式ガラスサイホン(コーヒー用ろ布付き、容量 500mlツインバード工業製 CM-851 型)に入れて、3ml 酢酸を含む 70%エタノール 500ml で洗浄目的の抽出操作を行う。**3.抽出:**次にこのエタノール抽出液は廃棄し、再び 0.65g塩化カルシウム2水和物を含む 500ml のイオン交換水で抽出操作を行う。1 分間沸騰させた後、抽出液を回収する。**4.沈降(体積圧縮):**回収した抽出液は、1000ml 分液ロートに適宜分注し、抽出液の 2 倍量相当のエタノールと最終濃度 0.9%となる量の NaClを加える。静置により生成した沈殿(左下写真)を下部より 50ml容量の遠心管に回収し、1000rpm、10 分間程度でペレットとする。**5.透析:**このペレットを 0.9%NaCl、10mMEDTA・2Na(pH5)に再溶解し透析した。透析は透析チューブ

(Spectra/por4、32mm 幅、12000-14000MW cut-off)を用い、5L の 0.9%NaCl 溶液(100 倍相当量)で行なった。透析液は 2 回交換。**6.除タンパク質:**最後に除タンパク質の効果も兼ねて 5.0 μ m、47mm ϕ のニトロセルロースメンブレン(A500A047A、東洋濾紙製)でろ過(ろ過流量 50ml/枚)した。**7.生理的平衡化:**その後、ダルベッコの PBS (-)(Sigma-Aldrich D8537)に対して透析(Spectra/por4、32mm 幅、12000-14000MW cut-off)をする。**8.滅菌:**さらに 0.45 μ m の PVDF メンブレンフィルター(MILLEX-HV 33mm ϕ)でろ過滅菌の作業と同時に 15ml 滅菌コニカルチューブに分注し 4℃に保存した。

2.2 フコイダン溶液の濃度定量

フコイダン濃度は、HPLC 装置(CCPD-8000 シリーズ、東ソー製)を用いて、プルラン WAKO 製(163-11811、生化学用)を標準物質として定量した。分離カラムは TSK-GEL G5000PW(7.5mm ϕ $\times$ 300mm、東ソー製)を用い、移動相は蒸留水、流量は 1.0ml/min とし、示差屈折計(RID-6A、島津製作所製)を使用した。

2.3 液体クロマトグラフ質量分析計による分析

LC-MS には、アジレントテクノロジー社製 1200 シリーズ LC と G6130A-MSD(RevB.04.02)を用いた。イオン源はマルチモード ESI/APCI ソース G1978B を備えた。ESI でのネガティブイオン測定が基本となる。分析カラムは XK16-40(GE Healthcare Life Science、16mm ϕ $\times$ 40cm)に、4%アガロースゲルである Bio-gel A-5m(100-200mesh、Range 10,000-5,000,000Da、Bio-Rad Laboratories、No.151-0740)を充填して行った。移動層は蒸留水で、流速は 0.6ml/min(圧力 20-24psi、チューブ交換作業を要す)に設定した。カラム温度を含めすべての装置は、室温 20℃ $\pm$ 2、湿度 50%に管理された恒温室で実施した。詳しい分析条件は参考文献²⁾を参照いただきたい。

2.4 試薬類

比較品としてヒバマタ(*Fucus vesiculosus*)由来のフコイダン(シグマ社 F5631)を適宜用いた。標準物質として、分子量分析には試薬セット Shodex P-82(SHOWA DENKO K.K.)を、定量分析には WAKO 製(生化学用 163-11811)のブ

ルランを用いた。ブルーデキストランは Blue Dextran 2000 (GE Healthcare Life Science)を用いた。アルギン酸 Na は WAKO 製 (80-120 規格、194-13321)を使用した。LC/MS の内部標準法ではビタミン B12 (VB12、MW1355.4、WAKO224-00344)を適宜、用いている。

3. 試験結果と考察

3.1 サイホン式によるフコイダンの含有量の推定

ここで示したサイホン式の抽出方法は、試料の定量性が一定程度確保されるので、フコイダンの定量方法として発展する可能性がある。例えば、2.1 項の 4. の体積圧縮で得られたペレットを凍結乾燥し、抽出液の回収量から、粗製のフコイダン含有量が次のように推定できる。

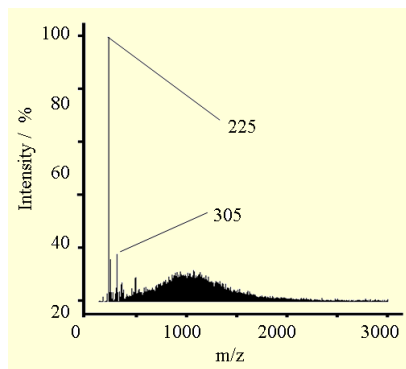
計算方法: 回収した抽出液 450ml × 2 回 = 900ml のうち 300ml から 260mg (凍結乾燥品) の沈殿を、15.0g のガゴメ粉末から調製できたとき、粗製のフコイダンの含有量 (Na 塩として) は

$$0.260\text{g}/300\text{ml} \times 900\text{ml}/15.0\text{g} \times 100 = 5.2\%$$

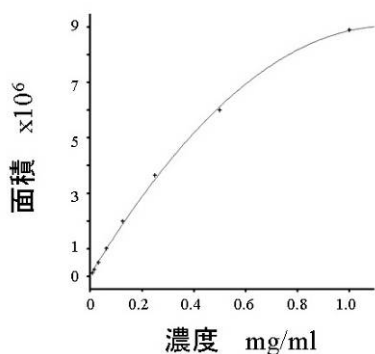
と乾燥重量法で計算が可能である。

3.2 サイホン式抽出フコイダンと LC/MS

この滅菌済みのフコイダンは、Na 塩にイオンコントロールがされており、プルラン相当量として濃度が 6mg/ml 前後になる。このサイホン式フコイダンの製造方法は量産型の研究に発展している³⁾。分子量が 160 ± 20 万と求められるこのフコイダンの質量スペクトルを本頁右上図に示した。m/z225 に主成分の硫酸化したフコース (フコース+1 硫酸: $[M + H_2SO_4 - H_2O - H]^+$) 由来のイオンが観測される。m/z305 は、おそらくは 2 つの硫酸基を持つフコースのイオンである。比較品の試薬 (ヒバマタ由来) の場合は、m/z371 というイオンが m/z305 よりも強く観察されるという傾向があった。一方、アルギン酸の場合は、構成成分であるウロン酸由来のイオン m/z193 $[M - H]^+$ がはっきりと判る。この m/z193 などのイオンの構成強度の比較から、フコイダン Na にはウロン酸が少なく、塩化カルシウムによるアルギン酸の除去が成功していることを示している。また、きょう雑する成分と見られるシグナルが少なく、ハイマス側の山形分布は高分子化合物の特徴が出現し、クロマトグラフを見ても十分純度の高いフコイダンが精製されていることがわかる。



3.3 定量分析を実施するときの技術上の課題



分析用標準品となると一般性状は、純度以外にも、色調、赤外分光分析による定性、水分分析、灰分分析などが試薬の試験成績書と同じく開示項目となると承知しているが、その前に、フコイダンには定量分析上の技術の課題があること述べる。m/z225を利用して、外部標準法により定量を目的として、検量線を描くと本頁左下図のようになる。LC-MSの仕組みの関係で2次曲線となるが、濃度のダイナミックレンジが10倍程度と狭いことが判る。一方、VB12などを内部標準として検量線を作成すると、直線に回帰できる。しかし、検出感度をベースラインノイズと比較して検出限界を求めようとすると、定量性に疑念を抱かせる結果が出現するようである。今のところ、LC/MSでは同位体を用いた分析にのみ定量性があるとされているようである。液体クロマトグラフィー (LC) の分離原理 (カラムの選択) と質量分析計 (MSD) 以外の検出器の組み合わせにより、さまざまな分析種に対応する高速液体クロ

マトグラフィー (HPLC) であるが、フコイダンに関しては精製試料にのみ適用できる方法があり、加工食品のような共存する他の成分の種類も量も多い中から、分離分析する方法に選択枝がないことをスライドで示す。

4. まとめ

ガラスサイホン式抽出法は、標準的な定量抽出法として発展する希望がある。液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を使った分析では、m/z225 がフコイダンを示すイオンとなり、m/z305 とともに定性分析に利用できる。しかし、この選択的イオンクロマトグラフからフコイダンを定量しようとする分析の定量性には大きな障壁がある。

謝辞

本件の発表内容は、文部科学省「地域イノベーション戦略支援プログラム」の支援を受けて実施されました。尚、この研究開発は、北海道と函館市が工業技術センターに委託する研究開発事業 (H26-28 年度) の課題の一部として継続しています。以上、関係者の皆様にはご支援感謝申し上げます。

【参考文献】

- 1) 山田信夫: 海藻フコイダンの科学、成山堂書店、東京 (2006)
- 2) 青木央: サイホン式によるフコイダンの抽出法とその品質評価、北海道立工業技術センター研究報告 第 13 号 p1-6 (2014)
- 3) 青木央、宮崎俊一: フコイダン抽出・精製装置及びフコイダンを抽出・精製する方法、特許第 4759706 号 (2011)