

サイフォン式によるフコイダンの抽出法と その品質評価

青木 央

The extracting process and quality evaluation of Fucoidan by a siphon method

Hiroshi Aoki

要 旨

フコイタンは、硫酸化多糖類のひとつであり、函館地域の特産品の褐藻類ガゴメにも含まれている。このフコイダンの新しい抽出方法として、ガラスサイフォンを利用した方法を開発した。

このサイフォン式によるフコイタンを FT-IR、HPLC や LC/MS の分析法などにより品質評価をしたところ、分子量は 200 万～160 万の高い分子量を持つ純度の良いフコイタンであることが判った。この方法では、行き過ぎた加熱と酸による加水分解を避け、固液分離操作が容易であるので効率のよいフコイダンの分離精製が可能になることが判った。透析によるイオン交換で精製したフコイタンナトリウム (Na) は、プルラン相当量として濃度が規定できた。フコイダンの滅菌標準液として、細胞を用いる各種の機能性研究の濃度依存性を計画できると判断された。

1. はじめに

フコイタンは、L-フコースと呼ばれる単糖を主な構成成分とする硫酸化多糖類の総称で、 α 1-3 結合による主鎖が構成されている。構成糖としては L-フコース以外に D-グルクロン酸、D-ガラクトース、D-マンノースなどを構成糖として含む。硫酸基は 2 位や 4 位の位置にエステル結合をしている。フコース ($C_6H_{12}O_5$) はグルコースのように 6 位の炭素に酸素がないので 6-デオキシヘキソース類とか 5-メチルペントース類などと呼ばれる。フコイタンは高分子多糖類であるから、化学構造は、複雑であるが、酒井、加藤らは、ガゴメ由来のフコイダンの化学構造を詳しく解析している。ガゴメ (*Kjellmaniella crassifolia*) はトロロコブ属の褐藻類であり、フコイタンを風乾物あたり 4% 程度含有する。その他には、モズク、ヒバマタなどの海藻類にも含有しているこ

とが知られている。このフコイタンは、カードラン硫酸やコンドロイチン硫酸などの硫酸化多糖類が示す多くの機能性を共有しているが、フコイタンに特有の化学構造に由来する機能性もある。フコイタンを詳しく知りたい場合は、集成された文献¹⁾がある。この文献の出版後になるが、私たちはフコイタンが持つ FGF (繊維芽細胞増殖因子) の活性化作用を利用した創傷被覆保護材などへの適用が可能なこと^{2,4)}を示している。

フコイダンの抽出法としては、ホルムアルデヒド溶液^{5,6)}や希釈塩酸などの酸性溶液^{7,8)}を用いた抽出方法が多く取られている。乾燥試料から、酸性溶液で一定時間、定温、攪拌するなどして得られた粗製のフコイタンから、アルギン酸を二価金属イオンで不溶化して除去するか、塩化セチルピリジウム (CPC: $C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$, MW358) と共に沈澱分離、もしくは、イオン交換樹脂で分画する

などの方法が実験目的に応じて選択、実施されている。

ここでは、量産化に適した工業技術としての製造方法を提案することを目的に研究開発を行った結果、ガラスサイホンを利用した塩化カルシウム法による抽出方法について良好な成績を得られたので、研究結果を述べる。ここでいう塩化カルシウム法は、アルギン酸カルシウムが不溶性のゲルである性質を利用し、フコイダンを褐藻類の粘性物質から分離する方法である。手順は目的とするフコイタン以外の色素や塩分はあらかじめ洗浄操作として除去し、次にアルギン酸を不溶化させて、フコイタンを抽出するという技術で、これまで多くの抽出方法にあるような粗製抽出物から順次、操作手順を繰り返して、高純度化するという技術とは異なる方法となっている。

FT-IR、HPLC そして LC/MS により、分子量が200万~160万の高純度のフコイタンが抽出されていることが確認された。すなわち、このサイフォン式によれば、行き過ぎた加熱と酸による加水分解（低分子化、硫酸基の脱離）を避けることが可能で、さらに、分離操作を難しくする粘性を排除することができるので、効率がよいフコイタンの分離精製が可能になることが判った。

2. 材料と方法

2.1 フコイタンの調製方法

ガゴメ由来のフコイタンは、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)で粉碎したガゴメ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。この抽出操作は通常のサイホン式によるコーヒーの抽出方法と同じである。ただし、熱源にアルコールランプなどの火災は厳禁である。この洗浄目的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。回収量を高め含有量を求めたい場合は、再び500mlの塩化カルシウム溶液で抽出操作を行い、1000mlメスシリンダーに合わせ放冷する。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(図1)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。ペレットを凍結乾燥し、抽出液の回収量から、粗製のフコイタン含有量が推定できる。(考察参照)

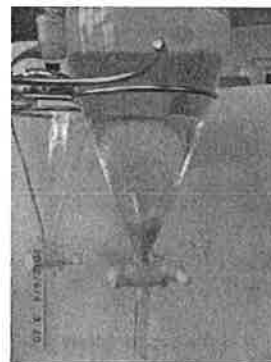


図1 分液ロートを使ったフコイタンの回収

2.2 フコイタンの精製方法(フコイタン Na の生成)

沈殿として回収したフコイタンのペレットは、0.9% NaCl、10m MEDTA・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回交換し、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(東洋濾紙製 A500A047A)でろ過(ろ過流量50ml/枚)した。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。引き続きHPLCなどの機器分析や培養細胞を用いた試験に供するため、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 $^{\circ}$ Cに保存した。

2.3 フコイタンの確認分析

最後に70%エタノール溶液(2倍相当量のエタノール)として、沈殿を回収、真空乾燥した試料を赤外分光分析(FT/IR-4200-ATR PRO450-S、日本分光製)により、ATR法で市販品と比較した。

2.4 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 (生化学用163-11811) を標準物質として定量した。分離カラムは TSK-GEL G5000PW (7.5mmφ×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。

2.5 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であり、文献⁹⁾ を参考にして設定した一覧を表 1 にまとめて示した。分析カラムは XK16-40 (GE Healthcare Life Science, 16mmφ×40 cm) に、4% アガロースゲルが充填材の成分である Bio-gel A-5m (100-200mesh, Range 10,000-5,000,000Da, Bio-Rad Laboratories, CA USA No.151-0740) を充填して行った。移動層は蒸留水 (LC/MS 用 関東化学 CatNo11307-79) 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℃ ± 2、湿度 50% に管理された恒温温室で実施した。

表 1 フコイダンの LC/MS 用の分析条件の設定一覧表

Multimode Ion source device	Agilent Technologies G1978B
Operation mode index	MM-ES+APCI
Capillary voltage (Vcap)	1000V
Charging electrode	2000V
Corona current	2 μA
Drying gas flow	5.5 L/min
Drying gas temperature	250℃
Nebulizer pressure	45psig
Vaporizer temperature	200℃
Fragmentor voltage	200V
Mass scan range	58-3000au
Eluent	D.W. only
Eluent Flow rate	0.6ml/min

2.6 試薬類

ヒバマタ (*Fucus vesiculosus*) 由来のフコイダン (シグマ社 F5631) を比較例に用いた。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) のプルランを用いた。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。

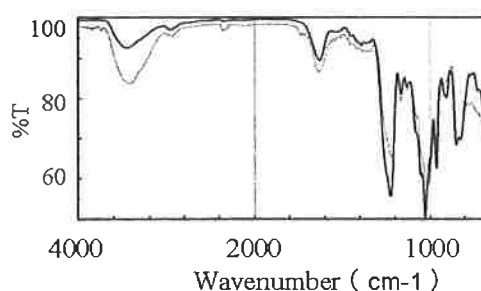


図 2 フコイダン Na の赤外分光分析

実線がゴゴメ由来フコイダン Na
破線がヒバマタ由来フコイダン (試薬)

3. 結果

調製したフコイダン Na を赤外分光分析した結果を図 2 に示す。フコイダン Na の乾燥品は、試薬のヒバマタフコイダンのスペクトルと比較し、よく一致することがわかった。1028, 1226, 964, 848, 680 cm⁻¹ のスペクトルの鋭さと切れの良さ、そして 1630, 3451 cm⁻¹ 近傍のスペクトルの吸収の低さなどから良質のフコイダンが抽出されていることがわかった。このことは、色調が試薬のフコイダンに比べて白いことから良品であることが判る。また、2.2 項のフコイダンの精

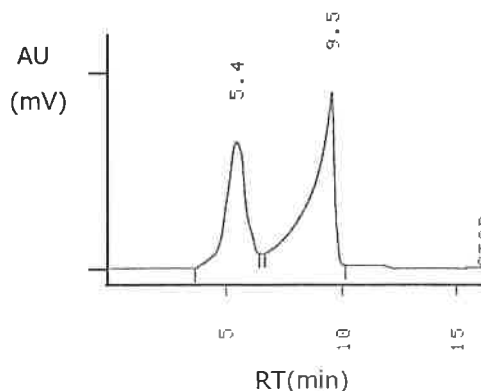


図 3 フコイダン Na の HPLC 分析例
フコイダンは 5.4min に検出される。9.5min は緩衝液 (PBS) のピークである。

製に用いたニトロセルロースメンブレンを赤外分光分析することで、タンパク質を除去していることを確認している。

2.1-2項の方法で、エタノール沈殿物の回収から以後の作業は、50ml容のネジ式キャップ付きPP製コニカル試験管を2本用いると作業の能率がよかった。100mlを超えない範囲での操作になり、最終的な仕上げ濃度はプルラン相当量として定量され、値は6mg/ml前後になる。このフコイダンのHPLCによる定量分析は、蒸留水に溶かしたプルランの検量線を1-10mg/mlで作成し、10 μ lを常法に従って分析する。クロマトグラフを図3に示した。この分析では、フコイダンの単一のピークが溶出時間(RT)5.4min頃に出現するが、示差屈折計を検出器に用いる関係でクロマトグラフには、PBS(-)のピークがフコイダンのあとの9.5min頃に現れる。このピークが緩衝液であることは、ブランクのクロマトグラフと比較することで容易に知れるが低分子化分析種の解析が不明瞭になる。このため、LC-MSの分析によっても確認をした。

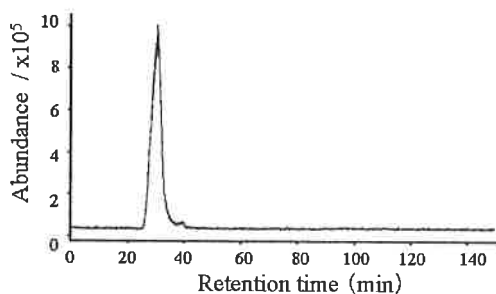


図4 フコイダン Na の全イオンクロマトグラフ例

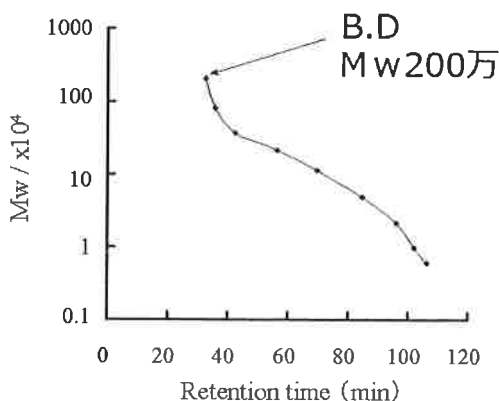


図5 フコイダンの分析用カラム分子量校正曲線
ブルーデキストラン(B.D)が重量平均分子量200万の校正点となる。最低分子量は6000が校正点。

全イオンクロマトグラフを図4に示した。この分析で使用されたカラムの分子量校正曲線を図5に示した。この校正曲線は、重量平均分子量(Mw)である。クロマトグラフのフコイダンの分子量は、ピーク頂点のRTから求めると180万の近傍にあって、ピークの半値幅から推定するに分布は ± 20 万になることがわかった。すなわち、200万から160万に分子量分布の中心を持つと推算される。低分子化の傾向がなく、分布が対称でシャープであることも知れた。フコイダンのピークに肩があるが、この面積比は2%未満であった。

フコイダンのピーク平均の質量スペクトルを図6aに示した。m/z225に主成分の硫酸化したフコース(グリコシド結合したフコースM(164-18))に硫酸がエステル結合した分析種のイオン： $[M + H_2SO_4 - H_2O - H]^+$ 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。フコイダンとして市販されている試薬(ヒバマタ由来)の場合を図6bに示したが、m/z371というイオンがガゴメのm/z305よりも強く観察されるという傾向がある。一方、アルギン酸の例を図6cに示す。アルギン酸の構成成分であるウロン酸水和物のグリコシド結合した分析種M(212-18)から由来すると見られるイオン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、塩化カルシウム法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、赤外分析の比較結果と合わせて判断すると、十分純度の高い高分子量のフコイダンが抽出精製されていることがわかる。

4. 考察

ここで示したサイフォン式の抽出方法は、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項で回収した抽出液450ml \times 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

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

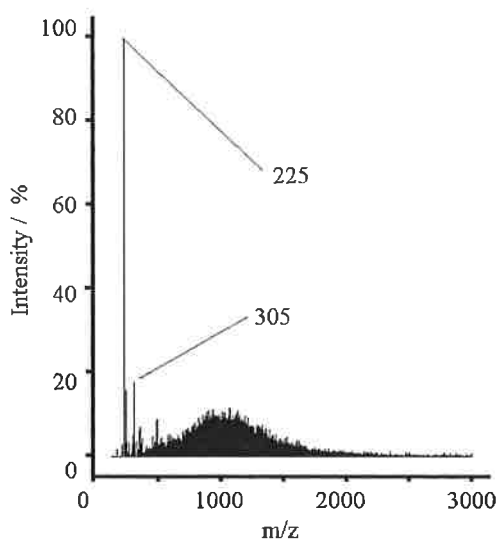


図6 a フコイダン Na の質量スペクトル
m/z 225 と305 が特徴的に強く出る。

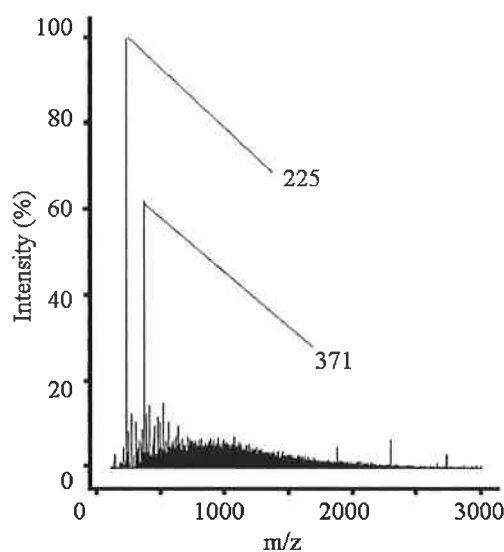


図6 b フコイダン (試薬) の質量スペクトル
ヒバマタからの製造、市販品

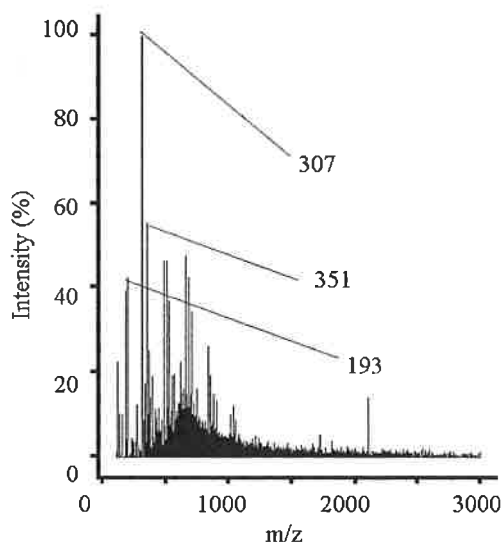


図6 c アルギン酸 Na (試薬) の質量スペクトル

と計算が可能である。図7に実験の様子を示す。分析精度は0.1%が限界(有効数字:少数点以下1桁)と思われる。このとき、カウンタイオンのCaとNaのコントロール(NaClの添加)を省略し、可溶性固形分の乾燥重量を分析値とすると、高値となる傾向が認められるので注意が必要である。

このサイフォン式では、定量性を重視しないで、良質のフコイダンの調製を目的とする場合やエタノールの消費を節約したい場合は、再抽出を省略する選択ができる便利な方法といえる。このサイフォン式のフコイダンの調製方法は、工業的なスケールでの生産設備に応用が展開できるとして、特許¹⁰⁾が成立している。

2.2項で精製されたフコイダン Na の PBS(-) 溶液は、プルラン相当量として濃度が規定されたフコイダンのろ過滅菌溶液であって、この溶液を適宜希釈して供する各種フコイダンの機能性研究の実験に適用が可能であり、品質も安定している。

本研究の LC/MS の結果から、次は、フコイダン Na を標準物質として出発し、試料を m/z225 のネガティブイオンにより定量分析する方法が、今後の新しいフコイダンの定量方法として提案できるのではないかとと思われるが、これにはいくつかの難題がある。イオンソースは ESI 方式で十分可能であると判断される。しかし、LC-MS のイオンソース、インタフェースが持つ基本的な特性の課題があり、一方で、有効な内部標準物質となる試薬も見あたらないので、定量性には課題が残る。同位体元素 (RI) を使う方法が技術としてはあるが、好都合なホットがないという限界もある。今後の発展を期待したい。

また、このフコイダンの分析に関連する大事な点では、化学構造が未解決の部分があり、これらは、機器分析などの解析では限界にあると思われる。コンブの代謝の解析から生化学的な合成回路の研究が解決の方向になると思われる。このことはフコイダンの構成糖の比率を推察させる重要な情報を与える期待されるので、呈色反応での純度検定の課題の解決に役に立つことだろう。例をあげるとアルギン酸の特異的な比色定量法であるカルバズール硫酸法をフコイダンの純度分析に適用しようとする、フコイダンの構成糖にウロン酸が含まれているので呈色反応がおこる。そのため、実際よりもフコイダンの純度が低い値とな

るので分析値の評価が難しい。この事情は文献¹¹⁾のアルギン酸定量法の開発を参考にすると理解が得られるのではないかと思う。理論的な補正值の妥当性にフコイダンの生化学的合成経路の情報が活用できれば、定量法の精度向上に大きく貢献できるだろう。

現在、フコイダンを活用した商品群がいろいろ流通してきており、このような状況下で、さらなる、商品の開発と普及をするにも、フコイダンに関する品質管理の上の分析技術の発展に期待が寄せられている。

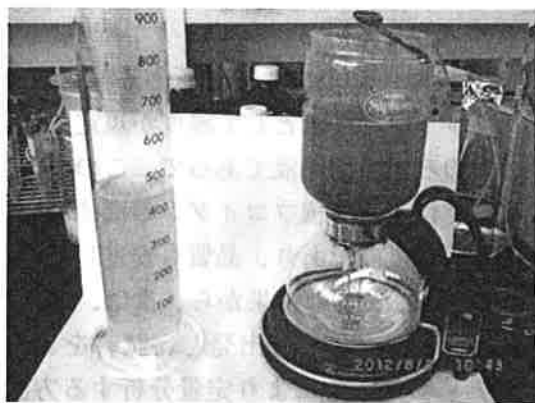


図7 サイホンを使った抽出と定量回収の実験

謝 辞

この研究は、公益財団法人函館地域産業振興財団が文部科学省から産学官連携促進事業費(H21-H25)として受けた研究資金(函館マリンバイオクラスター)により実施されています。関係各位に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 山田信夫: “海藻フコイダンの科学” (2006), (成山堂書店)
- 2) K.Murakami, H.Aoki, S.Nakamura, M. Taki-

- kawa, M. Hanazawa, S. Kishimoto, H. Hattori, Y. Tanaka, T. Kiyosawa, Y. Sato, M. Ishihara: Biomaterials, 31(2010) p83-90
- 3) K.Murakami, M. Ishihara, H.Aoki, S.Nakamura, S-I.Nakamura, S.Yanagibayashi, M. Takikawa, S. Kishimoto, H.Yokoe, T. Kiyosawa, Y. Sato: Wound Repair and Regeneration, 18(2010) p478-485
- 4) 青木央、石原雅之、中村伸吾、宮崎俊一: 医療用及び基礎化粧品用(スキンケア用)高分子材料並びにその製造方法、国際公開番号 WO2010-109588, 日本特許第5615804号 (2014)
- 5) 西出英一: ガゴメコンブからのフコース含有多糖の抽出法の検討, 日本水産学会誌, 47(9) (1981) p1233-1235
- 6) 西出栄一、安斎寛、内田直行: 日本産藻類中のフコース含有多糖量について, 日本水産学会誌, 53(6) (1986) p1083-1088
- 7) 田幸正邦、武田真治、照屋武志、玉城志博: ナガコンブ(*Laminaria angustata* var. *longissima*)から分離したフコイダンの化学特性, 日本食品科学工学会誌, 57(12) (2010) p495-502
- 8) 西野貴司、名雲照一: 種々の褐藻由来フコース含有硫酸化多糖画分の糖組成と抗血液凝固作用、日本水産学会誌 61(3) (1987) p361-363
- 9) S.Fischer, W.Duncan: Optimizing the Agilent Multimode Source; Agilent Technologies Technical Overview, EN,(2007) p 5989-6463
- 10) 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」日本特許 第4759706号 (2011)
- 11) 宇田川知子、小関友紀子、小泉恵子、五十嵐友二、淵上賢一: 新規アルギン酸定量法の開発、日本食品科学工学会誌, 60(11) (2013) p654-660