

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

ワカメのフコキサンチン

作成者：徳島県立工業技術センター主任研究員 吉本 亮子

1. ワカメについて

1. 1 概要

ワカメは、日本近海に広く分布し、また、古くは延喜式にもその名前が登場する、日本人にとって最も馴染み深い海藻のひとつである。

養殖技術の発達と、大量生産を可能にした湯通し塩蔵加工技術の開発により、現在ではそのほとんどが湯通し塩蔵加工されて、さらにこれを原料とした乾燥製品の生産量が増加している。このような現代的な製品とは別に、日本の各地には特色ある伝統的な製品が今も一定の生産量を維持している。

徳島県は、古くからのワカメの生産地であり、年間約 6000 トン（全国 3 位）の生産量である。江戸時代末期に今の鳴門地域で考案された「灰干しワカメ」はその名の通り、ワカメに草木灰をまぶし天日乾燥させた製品であるが、現在では灰を活性炭に変えてその製法が受け継がれている。素干しに近く、磯の香りと食感が楽しめる、味わい深い伝統食品である。

一方、新たな取り組みも始まっている。生長初期の新芽ワカメ（芽生えわかめ）の生鮮流通である。この商品は家庭で湯通しして食べるもので、普段は食べるのが少ない茎もまだ柔らかいためまるごと食することができる。茎部のうまみ成分は湯通ししても多くが残存するため、ワカメ本来の旬の味を楽しむことができるとして、需要は増加傾向である。

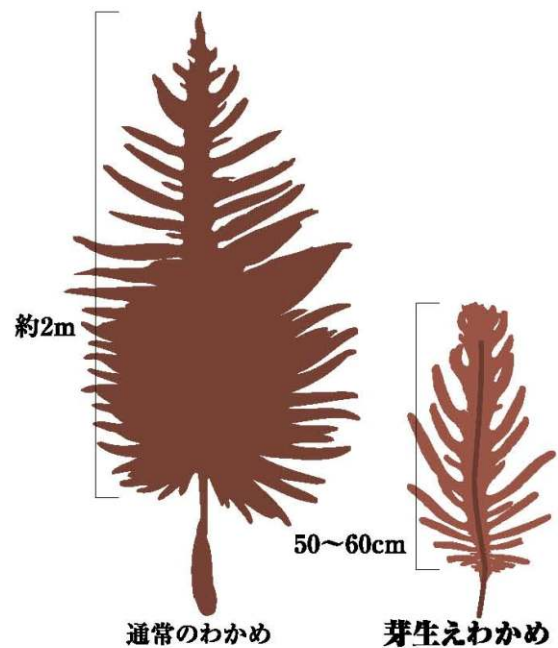


図 1. 1 - 1 ワカメ

1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

生鮮ワカメには約 0.2% 程度の脂質が含まれる。この中に含まれるフコキサンチンについて、ここ数年の間に、抗肥満をはじめとする健康増進のための機能性が報告されてきており¹⁾²⁾カロテノイド市場への素材提案も始まっている。

1. 2. 1 フコキサンチン類を含む食品

フコキサンチンが含まれるとされる食品類は、コンブ、モズクなどの褐藻類である。その他珪藻類にも含まれる。

<引用・参考文献>

1. H. Maeda et al, Int. J. Mole. Med., 18, p147-152 (2006)
2. 谷久典、FOOD STYLE21, 8, p67-69, (2006)

2. フコキサンチンについての説明

フコキサンチンは、ワカメ等褐藻類や珪藻類に多く含まれるカロテノイド色素であり、光合成系において、反応中心へエネルギーを供給する周辺集光装置でアンテナ色素として機能している（高市真一編、裳華房、p21（2006））。分子量 658.906。

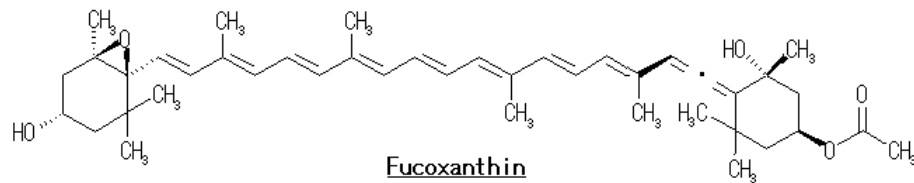


図 2 - 1

3. 定量分析の方法について

ワカメ生鮮品からのフコキサンチンの抽出、精製方法と、高速液体クロマトグラフィー及び超高速液体クロマトグラフィーによる定性、定量方法を述べる。

3. 1 準備する器具など

1. 共栓摺合三角フラスコ（褐色、200ml 容）
2. 分液ロート
3. 減圧濃縮装置、40～50℃の恒温水槽が必要。
4. ナス型フラスコ（300ml 容）
5. クロマト管（内径 30mm）
6. 試料濾過用フィルター（親水性 PTFE メンブラン、ポアサイズ 0.45 μm、13mm 径）
7. 高速液体クロマトグラフィシステム（HPLC）あるいは超高速液体クロマトグラフィシステム（UPLC）。紫外検出器（PDA 検出器）、質量分析計（MS）などを備えたもの。カラム恒温槽（40℃～50℃が保てるもの）が必須。
8. C18 逆相カラム（4.6×100mm、Unison UK-C18、粒子径 3.0 μm、Imtakt 製、2.1×100mm、ACQUITY UPLC BEH C18、粒子径 1.7 μm、ウォーターズ製）

[試薬]

1. アセトン（特級）
2. 石油エーテル（特級）
3. メタノール（特級）
4. ヘキサン（特級）
5. ギ酸（特級）
6. アセトニトリル（HPLC、LC/MS 用）
7. フコキサンチン標準品（94%、CaroteNature 社製など）
8. シリカゲル 100 メッシュ、メタノール洗浄したもの
9. セライト 545

標準品は、PDA 検出器では 0.1～50ppm 程度、MS では 1～50ppb 程度の濃度になるようにメタノールで調製する。

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

1. 細断したワカメ 50 g を精秤し、アセトン 150ml と共に三角フラスコに入れ冷暗所に静置する。
2. 2 時間経過後アセトン抽出液を回収し、更に新しいアセトン 150ml を入れ一夜抽出する。更にアセトンを交換して全アセトン抽出液とする。
3. 分液ロートに全アセトン抽出液と 100ml 石油エーテルを入れ、更に多量の蒸留水を入れて分液操作を行う。静置後上層にカロテノイド色素およびクロロフィル色素を得る。更に石油エーテル 100ml で 2 回分液操作を繰り返す。
4. 得られた上層を無水硫酸ナトリウムで脱水後ろ過する。
5. ろ液を 40℃で遮光下に減圧濃縮を行い、石油エーテルで 20ml にメスアップし、総抽出液とする。密栓して-30℃以下の冷凍庫で保管する。

3. 3 カラムクロマトグラフィーによる精製方法

1. シリカゲルとセライトを等量混合し、30 g を 100ml のヘキサンのスラリー状にしてクロマト管に詰めカラムを作成する。10cm 程度の長さとなる。
2. 総抽出液 5 ml をカラムに展開し、0～100%のアセトン-ヘキサン混液で段階的に溶出分画する。

3. 4 HPLC による分析方法

3. 4. 1 「HPLC-PDA 検出器システムの場合」

(1) 移動相の調製

アセトニトリル-水 = 75 : 25 に調製する。

(2) 分析条件

- ① 検出器、カラム恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。
検出波長：190～700nm
恒温槽：40℃
流量：毎分 1ml
- ② 移動相はイソクラティックで流す。

(3) 定性及び定量

- ① 抽出あるいは精製された分析試料は、試料濾過用フィルターを通し、分析に供する。
- ② 分離された物質の定性は保持時間および吸収スペクトルの形状により行う。PDA 検出器で得られたスペクトルを定性の補助、及び、ピークの純度確認に用いることが望まれる。
- ③ 定量は標準試料を用いた絶対検量線法により、クロマトグラムの面積から計算する。

3. 4. 2 「UPLC-MS システムの場合」

(1) 移動相の調製

移動相 A 及び移動相 B をアセトニトリル(MS 用)、蒸留水 (MS 用)、ギ酸を用いて以下のように調製する。

A 液：アセトニトリル-ギ酸 (99.9+0.1、v/v)

B 液：水-ギ酸 (99.9+0.1、v/v)

(2) UPLC 条件

- ① 検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。
カラム温度：50℃
注入量：5 μ L
流速：0.5ml/min
- ② 移動相溶媒の混合比（イソクラティック）：A 液 70%、B 液 30%。

(3) MS 条件

イオン化：ESI(+)
ソース温度：150℃
キャピラリー電圧：3.3kv
コーン電圧：50v

(4) 定性及び定量

- ① 抽出あるいは精製された分析試料は、試料濾過用フィルターを通し、分析に供する。
- ② 分離された物質の定性は保持時間およびマススペクトルによる質量電荷比 (m/z) により行う。
- ③ 定量は標準試料を用いた絶対検量線法により、マスキロマトグラムの面積から計算する。

4. 分析例

4. 1 HPLC-PDA 検出器システムを用いた分析例

分離された物質は保持時間及び吸収スペクトルから(標準物質と比べ)特定する。定量には標準試料を用い、クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。図 4. 1-1 に PDA 検出器を使った標準品のクロマトグラムを示す。

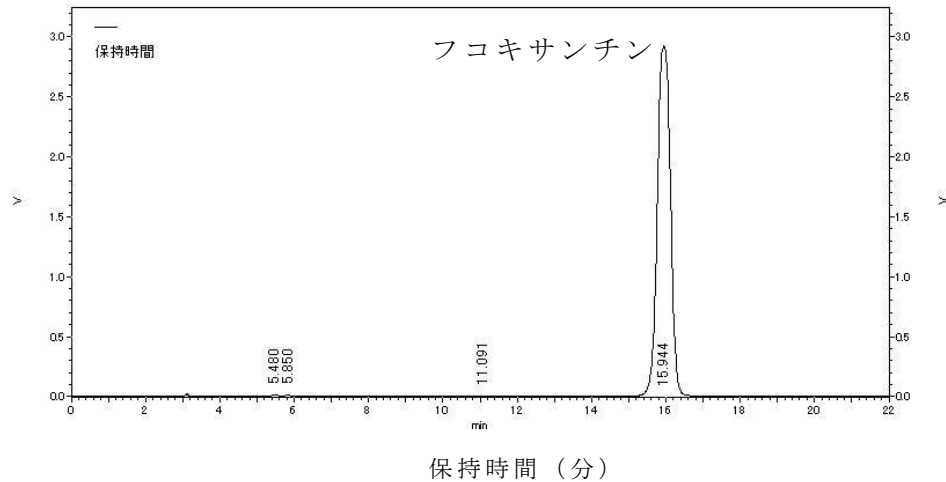


図 4. 1 - 1 標準品の HPLC-PDA システムによる分析例

4. 2 UPLC-MS システムを用いた分析例

分離された物質はマスクロマトグラムの保持時間およびマススペクトルから(標準物質と比べ)特定する。定量には標準試料を用い、クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。図 4. 2 - 1 に典型的なマスクロマトグラムを示す。

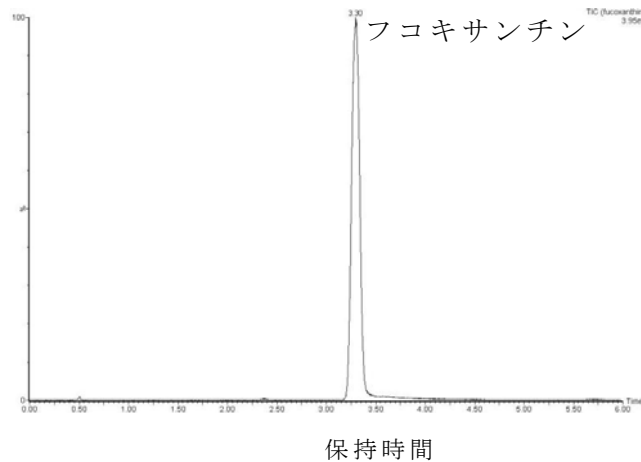


図 4. 2 - 1 標準品の UPLC-MS システムによる分析例

5. 食品の分析結果例

上記手法により、乾ワカメのフコキサンチンの精製、定量分析を行った。図 5 - 1 に、カラムクロマトグラフィーで得られたフラクション、溶出順に①から⑦を例示した。フラクション⑤に橙色のフコキサンチンを含むフラクションが得られた。このフラクションの乾重量は、原料の乾ワカメ 50g から 13mg であった。このフラクションは、HPLC-PDA システムにより、保持時間及び吸収スペクトルが標準品と一致した(図 5 - 2、図 5 - 3)。



① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦
図 5-1 乾ワカメのカラムクロマトグラフィー分画

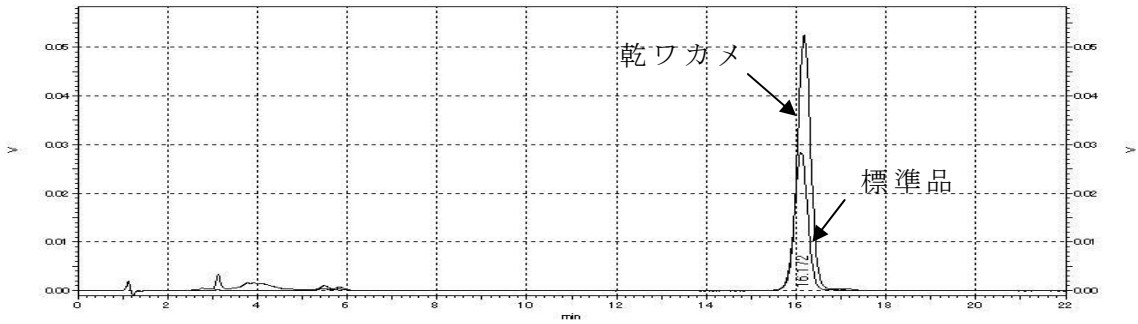
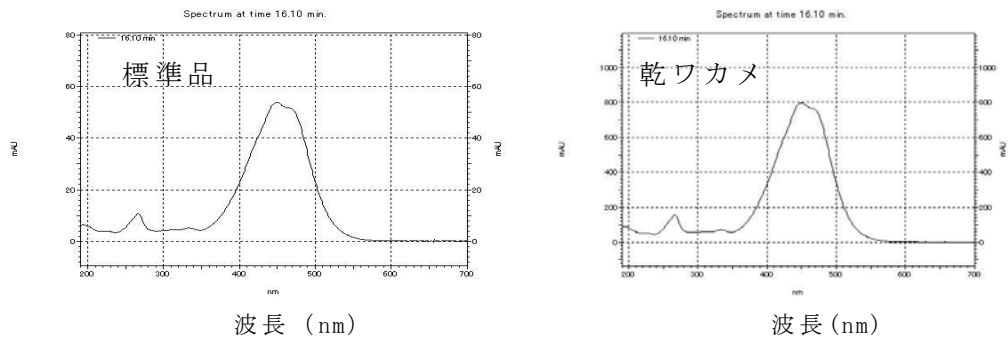


図 5-2 標準品および乾ワカメ抽出物のクロマトグラム



波長 (nm) 波長 (nm)
図 5-3 フコキサンチンの吸収スペクトル

さらに UPLC-MS システムを用いたクロマトグラフ (図 5-4)、トータルイオンクロマトグラフ (図 5-5) およびマススペクトル (図 5-6) の質量数情報より、この分画の主ピークはフコキサンチンであることが確認された。

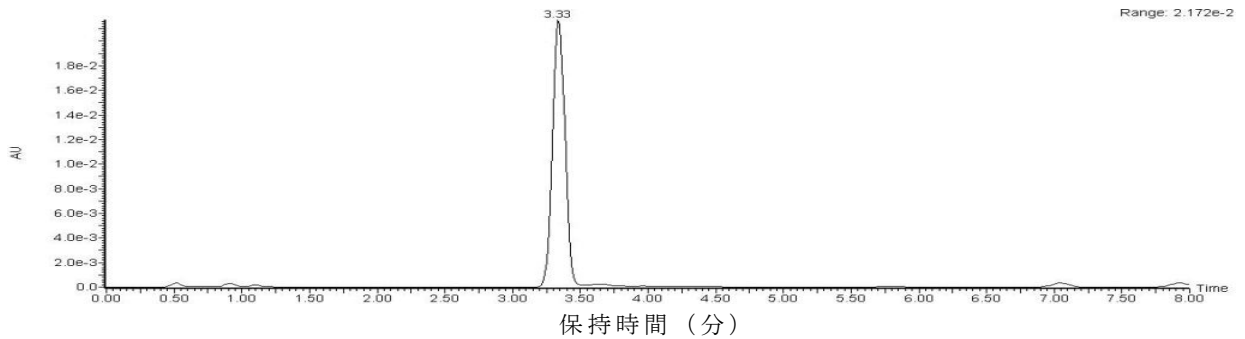


図 5-4 ワカメフコキサンチン分画の測定波長 445nm におけるクロマトグラム

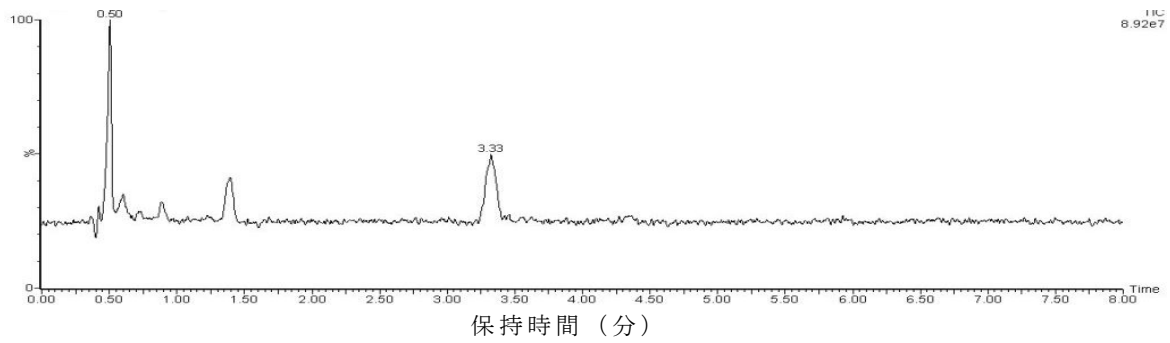


図 5 - 5 ワカメフコキサンチン分画のトータルイオンクロマトグラム

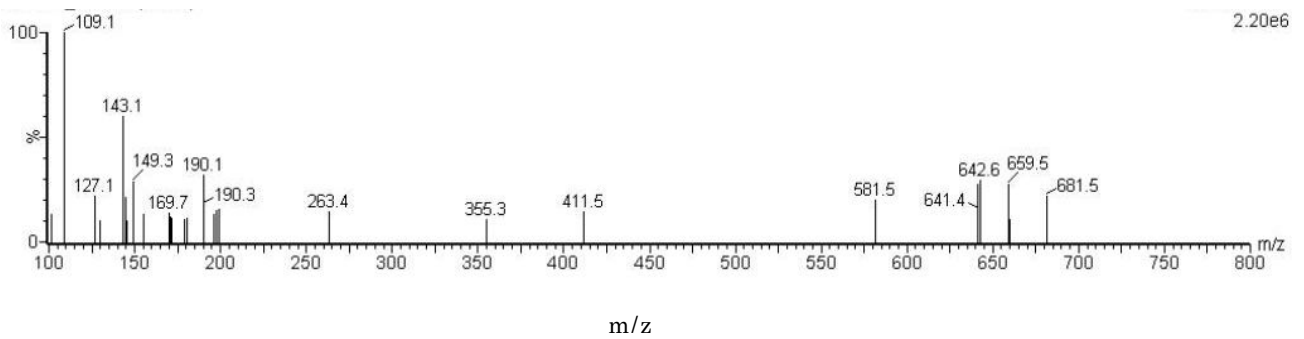


図 5 - 6 保持時間 3.33 分のピークのマススペクトル

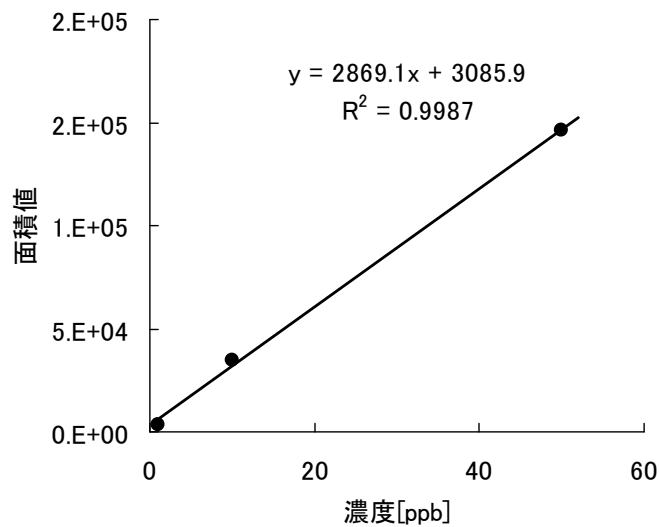


図 5 - 7 UPLC-MS システムを用いたフコキサンチンの検量線

フラクション⑤乾燥重量 1 g あたりのフコキサンチン含有量は、UPLC-MS システムで 37.7mg、HPLC-PDA システムで 36.7mg であった。

6. 分析上の留意、注意点

フコキサンチンは光により分解するため、抽出や調製は暗所で行い、保存容器も褐色が望ましい。カラムクロマトグラフィーで得られるフコキサンチンの純度は、条件により向上する。筆者らはこれまでに 95%程度を確認している。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1. 吉本亮子：徳島県立工業技術センター業務報告、p29（2006）

——以上——

[トップページに戻る](#)