

食品に含まれる「あおり PG」の定量分析手法の開発

Development of quantitative analysis method for "AOMORI PG" in foods

川嶋 草平

県内事業者におけるプロテオグリカン（以下、「PG」）を使用した商品開発の促進、機能性表示食品等への届出支援及び PG 関連商品のブランド力強化を目的に、食品中の PG の定量分析手法の開発を行う。

青森県ではサケの鼻軟骨から抽出した PG である「あおり PG」について、産学官金が連携し関連産業の振興に取り組んでいる。PG 市場は拡大しており、令和 5 年 3 月時点で県内企業を中心に健康食品や化粧品など 285 品目が販売され、累計製造品出荷額は 485 億円となった。「あおり PG」を配合した食品については機能性表示食品への届出を行うことで、さらなる付加価値向上が期待される。一方で、機能性表示食品の届出には食品中に含まれる機能性関与成分を定量する分析手法について確立されている必要がある。青森県の特産果樹であるリンゴやゲル化剤などを含む加工食品にはペクチンやカラギーナンなどの多糖類が多く含まれており、PG の限外ろ過膜及びゲルろ過カラムによる分離や比色法であるカルバゾール硫酸法による検出が阻害されるという課題があった。そこで本研究では、主にリンゴやゲル化剤を原料に含む加工食品中の PG の定量方法について検討した。

今回、酸性条件下での強塩基性陰イオン交換樹脂による分離方法を新たに開発した。すなわち、PG を含む試料を pH1.4 以下の溶液に調製し、pH1.4 以下の酸性溶液で平衡化した強塩基性陰イオン交換樹脂に通液する。次に、樹脂に吸着した PG を塩化ナトリウム溶液で溶出し、回収した PG を HPLC で定量する方法である。

開発した手法により、これまで困難とされてきた農産物に含まれるペクチンや食品で利用されるゲル化剤との PG の分離が可能となった。今後、県内企業の機能性表示食品への届出可能な PG 配合商品が増加する他、より付加価値の高い PG 配合商品の開発が期待される。

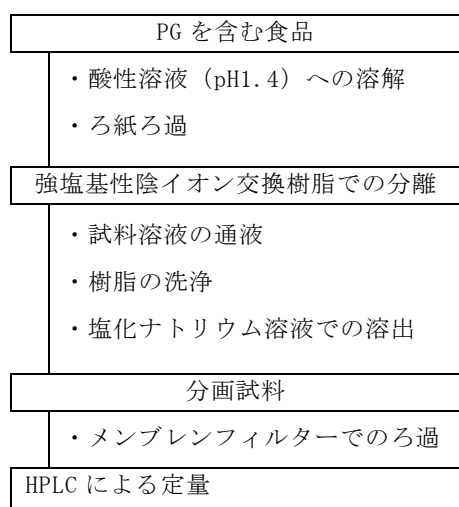


図 1 食品中の PG の定量フロー

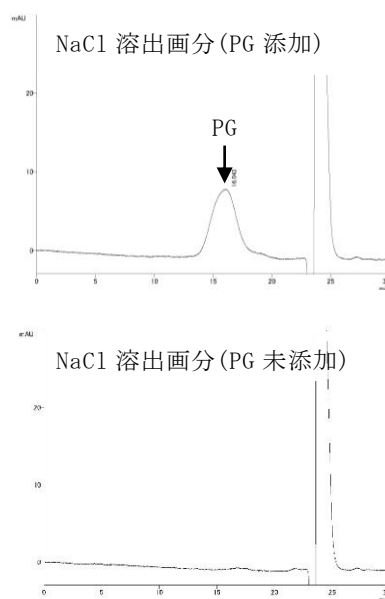


図 2 農産物粉末での PG 添加回収試験におけるクロマトグラム

1. 目的及び背景

プロテオグリカン（以下、「PG」）は動物組織における細胞外マトリックスの重要な構成成分で、分子量数万から数十万のコアたんぱく質に糖鎖であるグリコサミノグリカンが一本以上結合した生体高分子である。PG の役割として、主に皮膚の水分保持や関節の潤滑作用の他、日焼け抑制効果や腸内細菌群の調整作用などについて報告がある^{1,2)}。また、近年では新たに育毛効果についても報告があり、機能性素材として注目を集めている³⁾。

PG 市場は拡大しており、令和 5 年 3 月時点で県内企業を中心に健康食品や化粧品など 285 品目が販売され、累計製造品出荷額は 485 億円となった。また、青森県では医療・健康福祉分野における産業振興を目的に「青森ライフイノベーション戦略推進事業」を実施しており、特にモノ・コト健康美容産業振興事業では「あおもり PG」ブランド化と販路拡大支援により、県内企業の一層の外貨獲得の推進を目指している。

令和元年には、青森県内で初めてとなる錠剤型 PG 配合商品が機能性表示食品として販売され、それに続く形で令和 4 年には新たな錠剤型 PG 配合機能性表示食品が販売された。一方で、ゼリーなど消費者が手に取りやすい形状での PG 配合商品としては、令和 5 年 2 月時点で機能性表示届は行われていない。機能性表示食品の届出には食品中に含まれる機能性関与成分を定量し、その試験方法等について明らかにする必要がある⁴⁾。しかし、原料にリンゴやゲル化剤を含む加工食品にはペクチンやカラギーナンなどの多糖類が多く含まれており、PG の限外ろ過膜及びゲルろ過カラムによる分離やカルバゾール硫酸法による検出を阻害する要因となる。このため、加工食品中の PG の定量は困難とされてきた。

上記の課題を解決するため、プロテオグリカン販路拡大等支援事業の一環として、主にリンゴやゲル化剤を原料に含む加工食品中の PG の定量方法について令和 3 年度から研究を行ってきた。令和 4 年度には酸性条件下での強塩基性陰イオン交換樹脂による分離方法を新たに開発し、今年度は、開発した分離方法の特許出願に向けたデータ取得及び様々な食品に含まれる PG の分離条件を明らかにすることを目的に実験を行った。

2. 材料

（1）装置

強塩基性陰イオン交換樹脂：直径 2cm のガラス管（G2 ガラスフィルター付）に充填し使用した。通液はペリスタポンプ（Pharmacia）を用いた。

高速冷却遠心機：HITACHI、himac CR20F

高速液体クロマトグラフ：株式会社島津製作所、Prominence（装置構成：ポンプ LC-10ADvp、示差屈折計検出器：SPDM10Avp、インジェクター：SIL-10ADvp、カラムオーブン：CTO-10ACvp、デガッサー：DGU-14A、インターフェイス：SCL-10Avp、データ処理：CLASS-VP）

（2）試料

ハチミツ入りりんご酢は青森県内の事業者が製造する市販品を使用した。カブの葉、トマト及びエダマメは凍結乾燥後、粉砕しアルミ製チャック付き袋に乾燥剤と共に入れ、デシケーター内で保存したものを使用した。県内事業者が製造する PG 配合りんご酢ゼリーでの検討には、PG を配合しないゼリーの製造を事業者に依頼し、使用した。

（3）標準品および試薬

標準品として、「サケ鼻軟骨由来プロテオグリカン」（株式会社角弘）、「ペクチン、りんご由来」（富士フィルム和光純薬株式会社）、「ヒアルロン酸ナトリウム」（生化学用試薬、富士フィルム和光純薬株式会社）を使用した。各標準品は使用前にデシケーター内で 1 時間乾燥した。

試験で使用した試薬は全て特級または同グレード以上のものを使用した。

3. 実験方法

(1) ペクチン溶液中の PG 分離試験

1 mg/mL PG 水溶液及び 1 mg/mL ペクチン水溶液をそれぞれ 3 mL ずつ混合し、終濃度が 50mM となるよう塩酸及び超純水を加え 10 mL の試料溶液とした。事前に超純水及び 50mM 塩酸で洗浄、平衡化した強塩基性陰イオン交換樹脂（東ソー株式会社、TOYOPEARL® SuperQ-650C）10 mL に試料溶液を通液し、さらに 50mM 塩酸溶液 20 mL を通液、樹脂を通過した溶液を回収し通過画分を得た。次に超純水 30 mL を通液し洗浄画分を、1.5M 塩化ナトリウム溶液 30 mL を通液し溶出画分をそれぞれ得た。得られた各画分はカルバゾール硫酸法及びローリー法により、PG 及びペクチンの有無を確認した。

(2) 異なる方法で調製した酸性溶液での PG 分離試験

25mM 硫酸を濃硫酸で pH1.2 とした酸性溶液を調製した。1 mg/mL PG 水溶液及び 1 mg/mL ペクチン水溶液をそれぞれ 3 mL ずつ混合し、酸性溶液を 15 mL 加え試料溶液とした。事前に超純水及び酸性溶液で洗浄、平衡化した強塩基性陰イオン交換樹脂（東ソー株式会社、TOYOPEARL® SuperQ-650C）10 mL に試料溶液を通液し、さらに酸性溶液 12 mL を通液、通過した溶液を回収し通過画分を得た。次に酸性溶液 30 mL を通液し洗浄①画分を、超純水 30 mL を通液し洗浄②画分を、最後に 1.5M 塩化ナトリウム溶液 30 mL を通液し溶出画分をそれぞれ得た。得られた各画分はカルバゾール硫酸法及びローリー法により PG 及びペクチンの有無を確認した。

pH1.2 の塩化カリウム-塩酸緩衝液を酸性溶液として同様の試験を行った。得られた各画分はカルバゾール硫酸法及びローリー法により PG 及びペクチンの有無を確認した。なお、塩化カリウム-塩酸緩衝液については、JIS K8001(試薬試験方法通則)に基づいて調製された市販品（東京化成工業株式会社）を購入し使用した。

(3) ヒアルロン酸溶液中の PG 分離試験

5 mg/mL PG 水溶液及び 5 mg/mL ペクチン水溶液をそれぞれ 0.5 mL ずつ混合し、50mM 塩酸を加え 15 mL の試料溶液とした。事前に超純水及び 50mM 塩酸で洗浄、平衡化した強塩基性陰イオン交換樹脂（BIORAD、AG MP-1M）5 mL に試料溶液を通液し、さらに 50mM 塩酸溶液 15 mL を通液、通過した溶液を回収し通過画分を得た。次に超純水 25 mL を通液し洗浄画分を、1.5M 塩化ナトリウム溶液 25 mL を通液し溶出画分をそれぞれ得た。得られた各画分はカルバゾール硫酸法及びローリー法により、PG 及びヒアルロン酸の有無を確認した。

(4) ハチミツ入りりんご酢中の PG 分離試験

市販のハチミツ入りりんご酢 10 mL に 5 mg/mL PG 溶液を 1.0 mL 加え、塩酸で pH1.3 に調製し試料溶液とした。また、PG 溶液を添加しない試料溶液も同様の手法で調製した。事前に超純水及び 50mM 塩酸で洗浄、平衡化した強塩基性陰イオン交換樹脂（東ソー株式会社、SkillPak TOYOPEARL® SuperQ-650S, 5 mL）に試料溶液を通液し、さらに 50mM 塩酸溶液 15 mL を通液、次に超純水 25 mL を通液した。この時、樹脂を通過した溶液は廃棄した。最後に、0.6M 塩化ナトリウム溶液 25 mL、1.5M 塩化ナトリウム溶液 50 mL を順番に通液し 0.6M 溶出画分、1.5M 溶出画分をそれぞれ得た。

得られた各画分について、HPLC による PG の定量を行った。各試料を 0.45 µm フィルターでろ過し、HPLC へ注入した。また、検量線作成のため PG 標準品を超純水に溶解し、濃度 0.05、0.1、0.2 mg/mL の標準溶液を調製した。調製した標準溶液は-30℃で凍結保存し、分析時に室温で解凍後、0.45 µm フィルターでろ過し HPLC に注入した。得られたピーク面積から検量線を作成し、PG の定量を行った。

HPLC の分析条件を表 1 に示した。

表 1 HPLC 分析条件

カラム	TSKgel G5000-PWXL ϕ 7.8×300 mm (東ソー株式会社)
カラム温度	40℃
移動相	50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8)
流速	0.5 mL/min
注入量	50 μ L

(5) 農産物粉末中の PG 分離試験

カブの葉、トマト及びエダマメの粉末を等量ずつ混合し農産物粉末を調製した。農産物粉末 300 mg に PG 5 mg を加え、PG 含有農産物粉末を調製した。また、PG を加えない農産物粉末 300 mg も同様に調製した。PG 含有農産物粉末に 80%エタノール 15 mL を加え、かく拌後、遠心分離で上清を除去した。この操作を 3 回繰り返した。残渣に 15 mL の蒸留水を加え、かく拌後、超音波処理を行った。続いて遠心分離で上清を回収し、この操作を 3 回繰り返して、回収した上清を合わせ、蒸留水で 50 mL に定容した。定容後、ろ紙ろ過し得られたろ液のうち 25 mL を分取し、塩酸で pH1.3 に調製したものを試料溶液とした。事前に超純水及び 50mM 塩酸で洗浄、平衡化した強塩基性陰イオン交換樹脂 (東ソー株式会社、TOYOPEARL® SuperQ-650C) 5 mL に試料溶液を通液し、次に 50mM 塩酸溶液 25 mL、超純水 25 mL を通液した。この時、樹脂を通過した溶液は廃棄した。最後に 0.6M、0.8M、1.5M 塩化ナトリウム溶液をそれぞれ 25 mL ずつ通液し 0.6M 溶出画分、0.8M 溶出画分、1.5M 溶出画分を得た。

得られた各画分について、HPLC による PG の定量を行った。HPLC の分析条件はハチミツ入りりんご酢中の PG 分離試験に従った。

(6) りんご酢ゼリー中の PG 分離試験

りんご酢ゼリーを 50℃で加熱攪拌し均一化した後、15 g を分取し 5 mg/mL PG 溶液を 1.0 mL 加え攪拌、再度、均一化した。これを塩酸で pH1.3 に調製し、80℃のウォーターバスで 15 分間の加熱後、超音波処理により抽出した。遠心分離で上清を回収し、残渣に 50mM 塩酸を 30 mL 加え、再度、超音波処理による抽出及び遠心分離による上清回収を行った。抽出及び上清回収の操作を 3 回繰り返して、回収した上清を合わせ、50mM 塩酸で 100 mL に定容した。定容後、ろ紙ろ過し得られたろ液のうち 50 mL を分取し、試料溶液とした。また、PG 溶液を添加しない試料溶液も同様の手法で調製した。事前に超純水及び 50mM 塩酸で洗浄、平衡化した強塩基性陰イオン交換樹脂 (東ソー株式会社、SkillPak TOYOPEARL® SuperQ-650S, 5 mL) 5 mL に試料溶液を通液し、次に 50mM 塩酸溶液 25 mL、超純水 25 mL を通液した。この時、樹脂を通過した溶液は廃棄した。最後に 0.6M 塩化ナトリウム溶液 25 mL、2.0M 塩化ナトリウム溶液を 50 mL と 25mL に分け通液し、0.6M 溶出画分、2.0M 溶出①画分、2.0M 溶出②画分を得た。

得られた各画分について、HPLC による PG の定量を行った。HPLC の分析条件はハチミツ入りりんご酢中の PG 分離試験に従った。

4. 結果及び考察

(1) ペクチン溶液中の PG 分離試験

酸性条件で強塩基性陰イオン交換樹脂を用いた手法で、ペクチン溶液中の PG 分離について検討した。

試料中の PG の有無を判定する方法として、カルバゾール硫酸法が挙げられる。しかし、PG 及び

ペクチンはどちらもカルバゾール硫酸法で赤色の呈色を示すことから、この手法のみでは PG とペクチンの判別はできない。そこで、カルバゾール硫酸法とローリー法を組み合わせることにより PG の有無を判定した。ローリー法は試料中のタンパク質を測定する比色法であり、試料中にタンパク質が存在する場合は、青色の呈色を示す。PG は構造中にタンパク質を持つが、ペクチンは構造中にタンパク質を持たないため、ローリー法により PG とペクチンの区別が可能である。

PG を含んだペクチン溶液を強塩基性陰イオン交換樹脂で処理し、得られた各画分をカルバゾール硫酸法で分析したところ、通過画分、洗浄画分及び溶出画分がともに赤色に呈色したが、ローリー法では溶出画分のみ青色に呈色した（図 1）。このことから、PG は通過及び洗浄画分には含まれず、全量が樹脂に吸着し、その後 1.5M の塩化ナトリウム溶液によって溶出したことが示された。また、令和 4 年度に実施したプロテオグリカン販路拡大等支援事業における試験において、ペクチンは pH1.4 以下では樹脂に吸着せず全量が通過し、溶出画分には含まれないことが示されている。

以上の結果から、本手法において PG とペクチンが分離可能であることが明らかとなった。

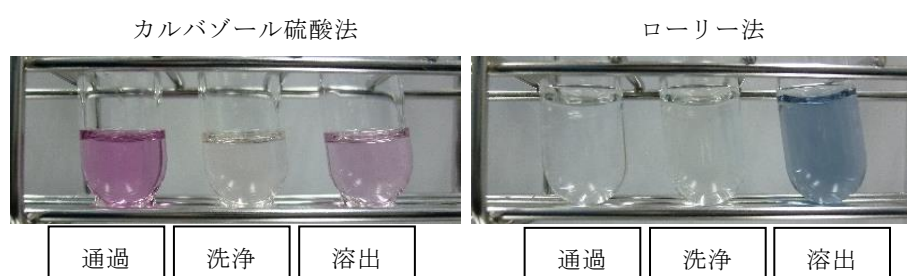


図 1 ペクチン溶液中の PG 分離試験における
カルバゾール硫酸法及びローリー法による各画分の呈色

（２）異なる方法で調製した酸性溶液での PG 分離試験

酸性条件での強塩基性陰イオン交換樹脂を用いた手法では、ペクチン溶液中の PG を分離可能であることが明らかとなった。試料溶液の調製や樹脂の平衡化に用いる酸性溶液として塩酸を使用した。その他の方法で調製した酸性溶液でも PG とペクチンの分離が可能か検討した。

硫酸で調製した酸性溶液を用いた分離試験では、カルバゾール硫酸法とローリー法の結果から、ペクチンとの分離が可能であることが示された（図 2）。次に、日本産業規格に記載の手法で調製した塩化カリウム-塩酸緩衝液を用いた分離試験においても、同様にペクチンとの分離が可能であることが示された（図 3）。

以上の結果から、分離に用いる酸性溶液は塩酸だけでなく、硫酸などの無機酸や緩衝液も使用可能であることが明らかとなった。

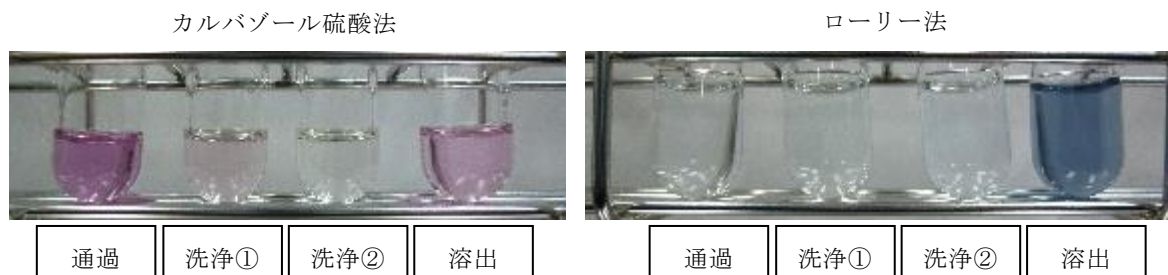


図 2 硫酸で調製した酸性溶液を用いた分離試験における
カルバゾール硫酸法及びローリー法による各画分の呈色

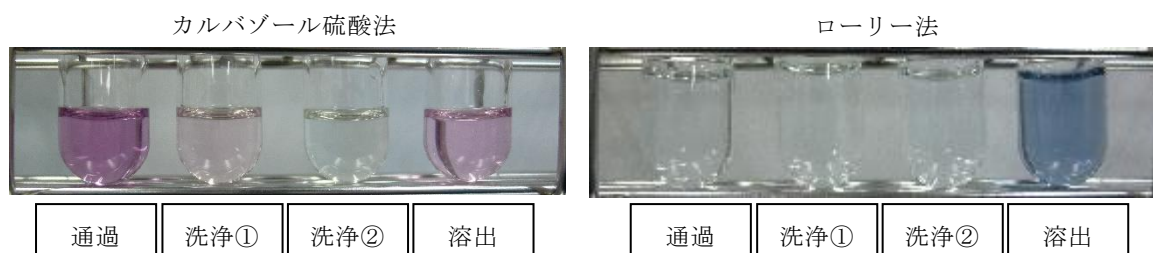


図3 緩衝液で調製した酸性溶液を用いた分離試験における
カルバゾール硫酸法及びローリー法による各画分の呈色

(3) ヒアルロン酸溶液中の PG 分離試験

ヒアルロン酸はサプリメントや化粧品など多くの商品に配合される一方で、構造中に酸性基としてカルボキシル基を持つ多糖類であるため、ペクチンと同様に従来法では PG との分離が困難である。新たに開発した酸性条件での強塩基性陰イオン交換樹脂を用いた手法で、ヒアルロン酸溶液中の PG を分離可能か検討した。

ペクチン溶液中の PG 分離試験と同様に、カルバゾール硫酸法とローリー法の結果から、ヒアルロン酸との分離が可能であることが示された (図 4)。



図4 ヒアルロン酸溶液中の PG 分離試験における
カルバゾール硫酸法及びローリー法による各画分の呈色

(4) ハチミツ入りりんご酢中の PG 分離試験

青森県の特産農産物であるりんごはペクチンを多く含み、その加工品に含まれる PG の分離、定量は困難である。新たに開発した酸性条件での強塩基性陰イオン交換樹脂を用いた手法で、ハチミツ入りりんご酢の PG を分離可能か検討した。

PG を添加したハチミツ入りりんご酢では、1.5M 溶出画分のクロマトグラムに PG の標準品と保持時間が一致するピークが確認された。一方で、PG を添加しないハチミツ入りりんご酢では、1.5M 溶出画分のクロマトグラムに PG のピークは確認されなかった。PG を添加したハチミツ入りりんご酢の溶出画分に含まれる PG は 4.5 mg であり、PG 添加量 5 mg に対して回収率は 90%であった (図 5)。

以上の結果から、ハチミツ入りりんご酢のようなペクチンを多量に含む食品中の PG について、本手法により分離、定量が可能であることが明らかとなった。

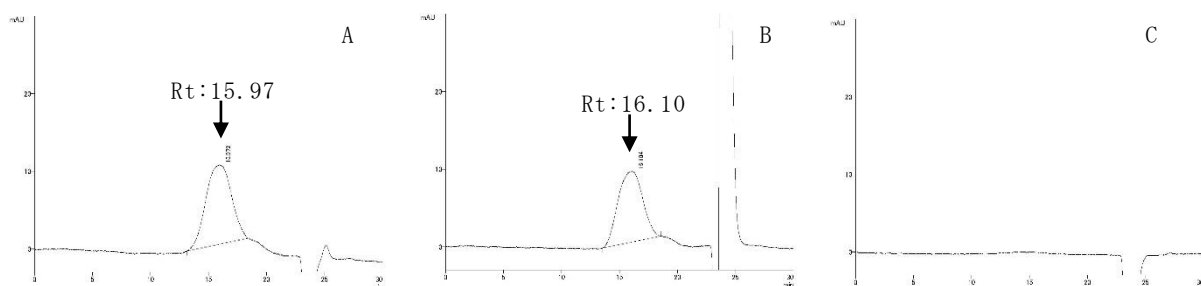


図5 ハチミツ入りリンゴ酢でのPG添加回収試験におけるクロマトグラム

A : PG 標準品 (0.1mg/mL) B : 1.5M 溶出画分(PG 添加) C : 1.5M 溶出画分(PG 未添加)

(5) 農産物粉末中のPG分離試験

農産物にはペクチンだけではなく様々な多糖類が含まれている。また、農産物は多糖類以外にも多くの成分を含み、従来法でのPGの分離、定量が困難である。そこで、過去に行ったPGの定量試験において、特にPGとの分離が難しいとされたカブの葉、トマト及びエダマメの凍結乾燥粉末を混合した農産物粉末を対象に、新たに開発した酸性条件での強塩基性陰イオン交換樹脂を用いた手法でPGの分離が可能か検討した。

凍結乾燥粉末を塩酸溶液で抽出した場合、PGが樹脂に保持されず通過した。そこで、抽出方法を変え、改めて分離試験を行った。初めに農産物粉末を含水エタノール溶液で洗浄し、夾雑物を除いた後、改めて塩酸溶液でPGを抽出した。

PGを添加した農産物粉末では、1.5M溶出画分のクロマトグラムにPGの標準品と保持時間が一致するピークが確認された。一方で、PGを添加しない農産物粉末では、1.5M溶出画分のクロマトグラムにPGのピークは確認されなかった。PGを添加した農産物粉末の1.5M溶出画分に含まれるPGは4.2 mgであり、PG添加量5 mgに対して回収率は84%であった(図6)。

以上の結果から、夾雑物を多く含む農産物粉末のような食品中のPGについて、本手法により分離が可能であることが明らかとなった。ただし、回収率については84%とハチミツ入りりんご酢での添加回収試験の結果を下回った。このことから、試料の洗浄条件について検討し、回収率を向上させる必要があると考えられた。

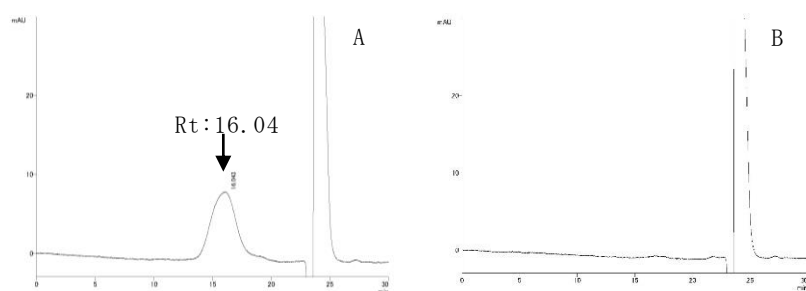


図6 農産物粉末でのPG添加回収試験におけるクロマトグラム

A : 1.5M 溶出画分(PG 添加) B : 1.5M 溶出画分(PG 未添加)

(6) りんご酢ゼリー中のPG分離試験

ゼリータイプの食品は高齢者など嚥下能力が低下した高齢者なども摂取しやすく、複数のゲル化剤を組み合わせることで様々な食感を作ることができる。一方で、酸性多糖類がゲル化剤として使用され、ゲル化剤の使用量も通常の食品より多いことから、PGの分離、定量は特に困難である。新たに開発した酸性条件での強塩基性陰イオン交換樹脂を用いた手法で、りんご酢ゼリーを対象にPG

の分離が可能か検討した。

PG を添加したりんご酢ゼリーでは、0.6M 溶出画分及び 2.0M 溶出②画分のクロマトグラムに PG の標準品と保持時間が一致するピークが確認された。一方で、PG を添加しないりんご酢ゼリーでは、溶出画分のクロマトグラムに PG のピークは確認されなかった。

これまで、陰イオン交換樹脂に吸着した PG は濃度 0.7M 以上の塩化ナトリウム溶液で溶出されることが明らかとなっていた。しかし、りんご酢ゼリーでの添加回収試験では、0.6M 溶出画分においても PG と思われるピークが確認された。このことから、複数の増粘多糖類が含まれる試料では、PG の溶出挙動が変わることが示唆された。

0.6M 溶出画に含まれる PG は 0.135 mg、2.0M 溶出②画分に含まれる PG は 0.235 mg であり、合計で 0.370 mg、PG 添加量 0.5 mg に対して回収率は 74%であった（図 7）。

以上の結果から、りんご酢ゼリーのようなペクチンや増粘多糖類を多量に含む食品中の PG について本手法により分離が可能であることが明らかとなった。また回収率については 74%であり、試料の抽出条件や樹脂から溶出条件について検討し、回収率を向上させる必要があると考えられた。

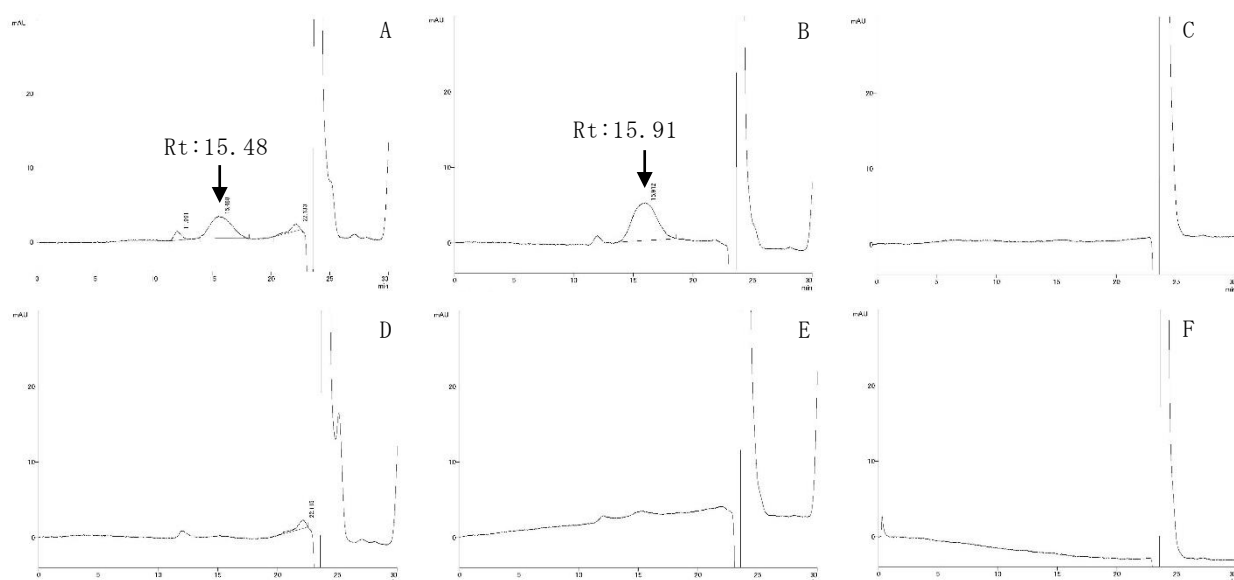


図 7 りんご酢ゼリーでの PG 添加回収試験におけるクロマトグラム

A : 0.6M 溶出画分 (PG 添加) B : 2.0M 溶出①画分 (PG 添加) C : 2.0M 溶出②画分 (PG 添加)
D : 0.6M 溶出画分 (PG 未添加) E : 2.0M 溶出①画分 (PG 未添加) F : 2.0M 溶出②画分 (PG 未添加)

5. まとめ

強酸性条件下での強塩基性陰イオン交換樹脂を用いた PG の分離・定量手法を開発したことにより、本県特産品であるリンゴを含んだ食品など、幅広い種類の PG 配合商品について品質管理による信頼性向上や機能性表示食品への届出による付加価値向上などが期待される。

今後、回収率向上のため抽出条件やイオン交換樹脂での分離条件を見直し、定量手法について県内分析機関への技術移転を検討する他、PG 配合商品を製造、販売する県内企業へ情報提供を行い、成果の社会実装を目指す。

なお、開発した手法について「プロテオグリカンの分離法」として特許出願（特願 2024-029589）し、第 100 回農芸化学会（令和 6 年 3 月 25 日、東京農業大学）において一般講演での発表を行った。

6. 参考文献

- 1) 後藤昌史, 末川裕, 花田友香子, 柿崎育子, 山本和司, 加藤陽治, サケ鼻軟骨熱水抽出物の経口摂取による日焼け抑制効果 - 無作為化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験 -, 応用糖質科学会誌, 6 (2), 138-146 (2016).
- 2) Asano K, Yoshimura S, Nakane A, Alteration of Intestinal Microbiota in Mice Orally Administered with Salmon Cartilage Proteoglycan, a Prophylactic Agent, PLoS ONE 8, e75008 (2013).
- 3) Nakane A, Shouhei H, Noriaki K, Naoki F, Eriko K, Krisana A, Salmon nasal cartilage proteoglycan stimulates hair growth, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 88(1), 107-110 (2024)
- 4) 公益財団法人日本健康・栄養食品協会, 機能性表示食品 - 届出試料作成の手引書 - 2020, 公益財団法人日本健康・栄養食品協会, 94-96 (2020).