

グリコサミノグリカン分析法と機能性食品の品質評価への応用

保健機能食品は、成分の機能効果を担保するための量的管理と、由来などを示す食品表示における質的管理が重要である。グリコサミノグリカンに分類されるコンドロイチン硫酸やヒアルロン酸といった機能性成分は、量的評価のみならず、由来を正確に判別可能な分析法による品質担保が求められる。本稿では、これら成分に対する既存分析法の紹介とともに LC-MS/MS を用いた分析法を開発したので紹介する。また、機能性食品の量的・質的評価の重要性についても解説する。

平井 健吾

1 はじめに

グリコサミノグリカン (GAG) は、私たち動物の関節 (軟骨) や皮膚、目 (角膜)、血液などの生体内組織に存在し、主として細胞膜表面や多くの結合組織の細胞外マトリックスに局在している。GAG は、一般的に、コアタンパク質と共有結合することでプロテオグリカン (PG) として存在し、GAG とコアタンパク質との相互作用を介して、細胞増殖や分化、細胞間コミュニケーション、接着、抗凝固などの機能を有し、それらは多岐にわたる。特に GAG の一種であるコンドロイチン硫酸 (CS) は動物組織に広く分布しており、動物や人体の水分を保持する役割をもっていることから、結合組織の関節、血管内壁、皮膚、骨などの保護剤であることに加え、種々の代謝反応において重要な役割を果たしている可能性が考えられている。また、ヒアルロン酸 (HA) も GAG の一種であり、関節液の潤滑剤としての性質をもっており、眼の硝子体の成分としても存在し、CS 同様に保水性に富む機能を有する。このため、CS や HA は、これら機能を有する成分として注目されており、医薬品のみならず、健康食品 (保健機能食品) の原料としても広く用いられている。しかしながら、健康食品は、医薬品のような厳格な品質要件を要求していないため、CS については表示量に満たない含有量 (量的管理の課題)、あるいは異なる基原の CS を含有した健康食品の流通 (質的管理の課題) が大きな課題であり、問題視されている¹⁾。健康食品の品質と安全性確保のためには、原料メーカーの正しい分析法による品質管理のみならず、販売メーカーも正しく品質管理された原料を使用することが重要である²⁾。

2 GAG を構成する二糖類

GAG の化学的構造は、硫酸基が付加された繰り返し二糖単位からなる直鎖状の酸性多糖類である。二糖単位はアミノ糖とウロン酸 (UA) またはガラクトース (Gal) から構成されている。さらに、アミノ糖は、*N*-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) または *N*-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc)、UA は、グルクロン酸 (GlcA) またはその C5 エピマーである L-イズロン酸 (IdoA) の構造をとる。GAG は、グリコシド結合の種類に基づいて、コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸 (CS/DS)、ヒアルロン酸 (HA)、ヘパラン硫酸/ヘパリン (HS/HP)、およびケラタン硫酸 (KS) に分類される (図 1)。HA を除くすべての GAG は、ヒドロキシ基の一部が硫酸基で修飾されており、硫酸化の程度やパターンの違いにより複雑で多様な構造を持つことが知られている。例えば、CS は GlcA と GalNAc が交互に繰り返される構造であり、硫酸化パターンに基づいて、主要な CSA, B, C, D, E の 5 種類に分類される。CS-A は主に A ユニット (アミノ糖の C4 位が硫酸化された一硫酸化二糖: GlcA-GalNAc4S)、CS-C は主に C ユニット (アミノ糖の C6 位が硫酸化された一硫酸化二糖: GlcA-GalNAc6S)、CS-E は E ユニット (アミノ糖の C4 位と C6 位が硫酸化された二硫酸化二糖: GlcA-GalNAc4S6S) を主成分として構成されている。CS-D は C ユニットを含むことに加え、D ユニット (アミノ糖の C6 位と UA の C2 位が硫酸化された二硫酸化二糖: GlcA2S-GalNAc6S) の構成割合が高いことが特徴的である。さらに、CS-B は、DS として知られており、B ユニット (アミノ糖の C4 位と UA の C2 位が硫酸化された二硫酸化二糖: IdoA2S-GalNAc4S) を含むことが各 CS の特徴と言える。上述したように、各 GAG は構成する二糖類の硫酸基の数と修飾される位置によって多様な構造を示すが、この多様性がさまざまな機能に関与している可能

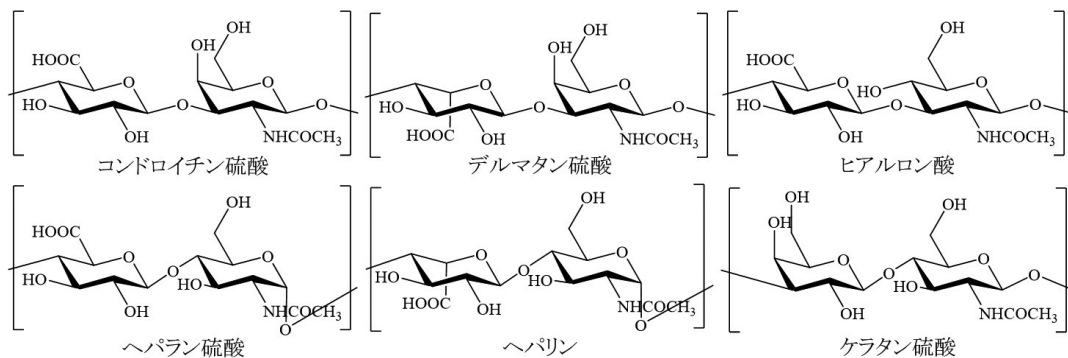


図1 GAG に分類される酸性多糖類の構造

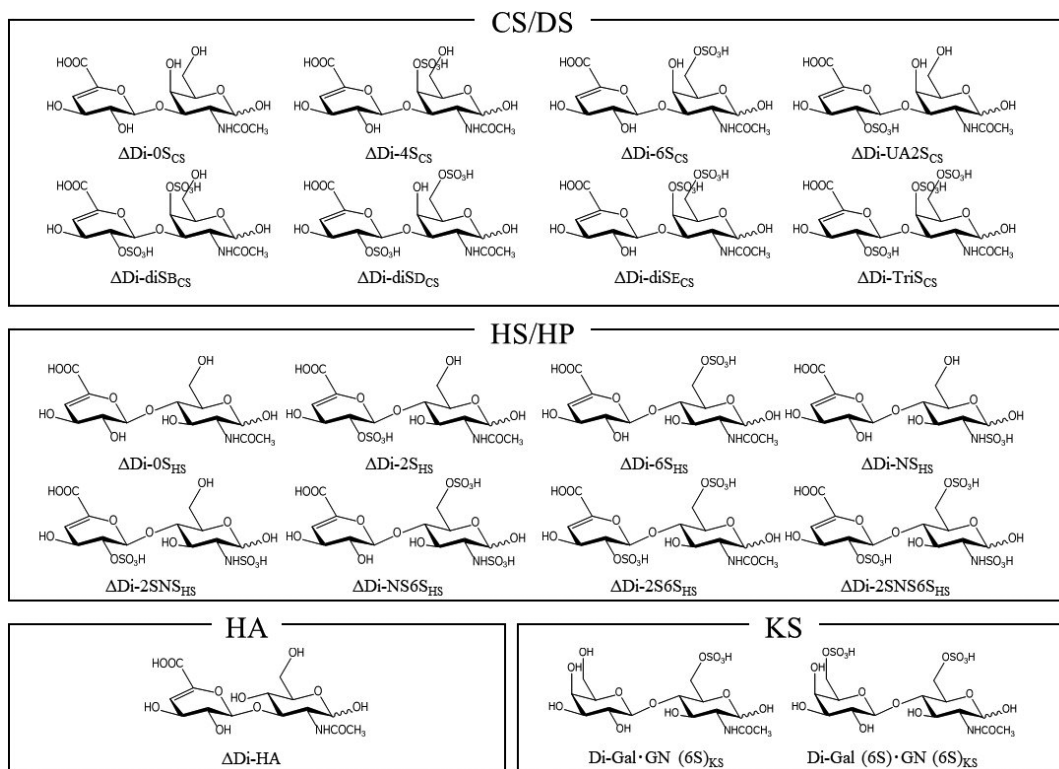


図2 各GAGを構成する二糖類の構造

性が考えられている。各GAGを構成する二糖類は、CS/DS由来として8種類、HA由来として1種類、HS/HP由来として8種類、KS由来として2種類の計19種類が存在していると考えられている(図2)。また、これらの硫酸化パターンは動物種や同一個体内の組織によっても異なり、例えば、CS-B(DS)はブタ皮膚由来、CS-Cはサメ軟骨由来、CS-Eはイカ軟骨由来などがよく知られている。

3 GAG 特異的分解酵素

上述したようにGAGは多様な二糖類で構成されており、それらの組成を詳細に解析することは、GAGの生体内における機能・役割や食品基原の推定を可能とするため重要な研究である。その組成解析には、GAGを構成二糖類にまで分解する必要があるが、GAGに特異的な酵素を用いて分解することがひとつの手法である。例え

ば、CSの特異的分解酵素は、一般的に知られているものとして、Chondroitinase ABC、Chondroitinase ACII、Chondroitinase Bがある。Chondroitinase ABCは、本稿で紹介したCSの5種類すべてに対して分解活性を示す。さらにHAに対しても活性を示すことが知られており、比較的寛容な酵素である。Chondroitinase ACIIは、CS-B(DS)以外のCSに対して分解活性を示す一方で、Chondroitinase Bは、CS-B(DS)にのみ活性を示す。そのため、試料中のDSの存在比を分析する上では、これら酵素を用いることで評価できる。一方で、HA特異的分解酵素にはHyaluronidaseがあるが、由来によっては4糖または6糖にまでしか分解できないため注意が必要である。また、HSに対してはheparitinaseという特異的酵素が存在し、HSを完全に二糖にまで分解するためにはheparitinase I、II、IIIの3種類の酵素を必要とする。さらにKSは、keratanaseと呼ばれる特異的分

解酵素が存在する。以上のことから、GAGの詳細解析にはこれらGAG特異的分解酵素を用いる必要があり、各酵素の反応条件の検討も重要である。

4 GAG分析法

GAGの分析には、これまで多くの手法が開発されており、化学分析法、発光分光法、クロマトグラフィー法、キャピラリー電気泳動法(CE)、質量分析法(MS)、核磁気共鳴分光法(NMR)などが挙げられる。これらの手法は、GAGの構造特性、量的・質的分析、硫酸化修飾の評価において有用であるが、それぞれに固有の利点と課題が存在する。そのため、目的に応じた手法の選択や複数手法の組み合わせが重要である。ここでは、食品中のGAG分析にフォーカスし、化学分析法、クロマトグラフィー法、MS法について紹介する。

4.1 化学分析法

GAG分析でよく用いられている化学分析法のひとつとして比色分析法がある。GAGが特定の試薬と反応し、発色する性質を利用して濃度を測定する手法であり、一般的には、吸光度を測定することで定量する。財団法人日本健康・栄養食品協会の「ムコ多糖・たんぱく食品」の試験法に記載されるカルバゾール硫酸法もこの手法のひとつであり、食品関連メーカーでのGAG定量にも用いられている。特殊な機器を必要としないため、簡易かつ迅速に測定できることがメリットである。また、ジメチルメチレンブルーによる比色分析を評価法とした研究も進んでおり、化学分析法の簡便性が伺える。しかしながら、これらの手法は二糖の一部であるウロン酸や硫酸化したGAGと反応するため、GAG特異的ではないうえに、異なるGAGの区別ができないという課題がある。抽出・精製されたGAGの総量を分析する上では効率的であるが、各GAGの定量、さらには二糖類の組成把握を目的とした場合には、課題が多い。

4.2 クロマトグラフィー法

目的に応じた適切なクロマトグラフィー法を選択することでGAGの詳細な解析が可能となる。逆相液体クロマトグラフィー(RP-LC)や親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)を用いた分離技術はよく知られており、分離した成分を紫外可視分光検出器や蛍光検出器を用いて検出する方法である。いずれもGAGを構成二糖類にまで分解してから分析することが望ましいとされる。一方で、陰イオン交換クロマトグラフィーやサイズ排除クロマトグラフィーを用いることで、GAGを未分解のまま測定可能であり、GAG種の分子サイズや分子量分布を測定することが可能である。食品中のGAG分析を考えた場合、前者に挙げたRP-LC、HILICがGAGの総量や二糖組成の解析が可能であるため合理的である

と考えられる。また、これらの測定手法は、二糖類を誘導体化することで分離や感度の向上が見込めるため、広く研究されている。近年、4-aminobenzoic acid ethyl esterを誘導体化試薬として用いることで、感度よくGAG構成二糖類を分析することに成功している³⁾。この方法は、誘導体化で課題となる、過剰な誘導体化試薬を容易かつ迅速に除去可能であり、食品分析のみならず臨床サンプルへの応用にも期待される。

4.3 MS法

GAGの構造解析や有力な定性手法として質量分析(Mass Spectrometry, MS)が用いられるようになってきた。MSを用いた測定ではターゲット分子のイオン化が必須であり、目的に応じたイオン化法の選択が重要となる。エレクトロスプレーイオン化法(ESI法)はエネルギー的にソフトなイオン化法であることから、分子量情報をそのまま得られる、高感度で微量分析が可能となるなど、GAGのさらなる構造解析の幅を広げる技術となっている。また、これは、LCに汎用されるイオン化法として知られている(LC-MSについては後述)。一方で、高分子化合物のイオン化効率が低いため、GAGを分析する場合には、構成二糖類にまで分解させて分析することが望ましい。別の手法として、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI法)を用いた研究も進んでいる。これはマトリックスと呼ばれる、ターゲット化合物をイオン化させるための助剤が必要となるが、レーザー照射により脱離・イオン化することで、高分子のGAGをそのまま分析することを可能にする。試料が微量な場合や純度が高くない場合でも測定が可能である。しかしながら最適なマトリックス選択の煩雑さやレーザー照射による脱硫酸化の課題があり、分析条件の最適化が課題である。

4.4 LC-MS, LC-MS/MS法

近年、上述した液体クロマトグラフィー(LC)とMSを組み合わせたLC-MS法やLC-タンデム質量分析法(LC-MS/MS法)が注目されている。これは、LCとMSを組み合わせることで、複雑な混合物をLCで分離するとともに、MSによりピンポイントでターゲット分子の解析を可能とする技術である。なかでも、選択イオンモニタリング法や選択反応モニタリング法(複数の組合せを選択する場合については多重反応モニタリングと呼ぶ)を用いることは、指定した m/z のみを検出することができるため、精度の高い定量分析を可能とする。すなわち、生体試料や食品中に存在する不純物の干渉を受けずにGAG由来の二糖類の評価が可能であるため、GAGの詳細解析の手法として広く用いられるようになってきている。特にトリプル四重極型質量分析計(MS/MS)では、高感度で選択的な検出が可能となるた

め、GAGに限らず、様々な分野において不可欠なツールとなっていると言っても過言ではない。この手法を食品分野に応用することは、GAGの総量の把握のみならず、構成二糖類の組成把握を可能とするため、健康食品の品質管理においては注目すべき分析法と考えられる。しかし、2章で述べたとおり、二糖類は類似した構造をしており（図2）、質量が同じ化合物については、質量分析計を用いた判別は困難である。また、各糖の開裂パターンから構造を推測する方法もあるが、構造類似性から特徴的なフラグメントイオンをもたないことが多く、その識別は複雑かつ煩雑なデータ解析となるため時間を要するという課題も考えられる。

5 LC-MS/MSを用いた二糖類の一斉分析

これまでに報告されてきたGAG分析法を踏まえ、LC-MS/MSを用いたGAG構成二糖類19種の一斉分析法を開発したので紹介する⁴⁾。筆者らの研究の目的は、開発した分析法を食品分野に応用した品質管理であるため、迅速性やより汎用的な方法が望まれると考えた。そこで、誘導体化を必要とせず、食品由来成分の妨害を回避するための高い選択性を有する質量分析計を用いた、LC-MS/MS分析法開発を検討した。本法は誘導体化不要のため、前処理工程を簡易化でき、さらに誘導体化の反応効率や安定性の懸念がなく、簡易にかつ迅速に分析可能である。一方で、検出器に質量分析計を組み合わせることによる上記記載の課題については、LC条件を詳細に検討することで対応した。すなわち、LC側で対象成分を分離することでGAG構成二糖類を個別に定量可能とし、MS/MS側で対象成分のみを選択的に検出する方法であり、食品由来の夾雑成分に妨害されることなく19成分を一斉に分析可能な手法である。ただし、イオン化における食品由来成分のマトリクスの影響には注意が必要となる。LC条件の詳細な検討については5・1章にて記載する。

5・1 LC分離条件の検討

分析対象19成分の二糖類は、先に述べたように類似した構造をしており、質量が同じものについては質量分析装置での同定が困難であるため、LCでの分離が必須である（例えば $\Delta\text{Di-OS}_{\text{CS}}$ 、 $\Delta\text{Di-HA}$ 、 $\Delta\text{Di-OS}_{\text{HS}}$ ； $m/z = 378.1$ であり特徴的なフラグメントイオンを持たない）。これら二糖類は高極性の糖類であるため、一般的に使用されるRP-LCでは分離が期待できない。したがって、分析にはHILICの使用が望ましいと考えた。これまでに報告されたGAG由来の不飽和二糖分析法を参考に、種々のカラムを検討したが、分離が不十分なことに加え、ピーク形状がブロードかつ非対称であること、糖類特有のアノマー異性体によるピークの分離などが見られ、課題が多く存在した。



図3 LC条件最適化によるピーク分離改善例

これら課題に対し、筆者らは分離カラムの最適化、移動相条件の最適化、カラムオープン温度の見直しによる改善を検討した。分離カラムには、一般的に粒子径が小さいものほど分離能が向上し、ブロードなピーク形状に関しては流速を上げることで改善が見込めるため、粒子系が小さく耐圧性の高いカラムを採用した。また、同じカラムを2本直列に連結することで物理的に移動距離が長くなるため分離向上を狙い、予想通りその効果が確認された。移動相条件については、塩濃度に着目し、これは分析試料とカラム担体の相互作用に影響があるとされる。そこでカラムの最適化だけでは分離の改善が不十分であった成分の更なる分離改善を図るため、塩濃度を5 mMから15 mMに変更したところ、分離の改善が見られた。これは固定相表面の水和層に塩が濃縮されることで、分析種が水和層に分配されやすくなり保持が向上した効果であると考えられる。さらに移動相のpHはイオン性化合物に対して保持挙動に影響を与えることに着目した。今回HILICモードでの分析であるため、解離状態の分析種は親水性が高くなるため、保持が強くなると予想した。分析対象は酸性化合物であることから、pHをアルカリ側にすることで、対象成分のイオン化を促進させ、その結果、保持が強くなり分離改善への効果が確認された（図3）。アノマー異性体は、環状構造をとる糖類特有の異性体であり、 α 体と β 体が存在する。通常この異性体は相互変換して存在しているが、本研究ではこれら異性体の分離は不要であることから、カラムオープン温度の最適化（高温設定）によってピーク分裂を最小限に抑えられた。これは、高温条件によりアノマー同士の相互変換の速度が速くなり、クロマトグラムにおける見かけ上、ひとつのピークとして観測されるようになったと考えられる。以上の対策によって、二糖類19成分すべての分離に成功した。

5・2 MS/MS条件の検討

ポジティブモードとネガティブモードを用い、GAG由来の二糖類19成分の標準品を用いたイオン化の確認を行った。その結果、いずれの成分においてもネガティブモードで検出が確認された（ポジティブモードでは検出が確認されなかった）。しかし、硫酸基の数が増えるにつれてその感度が低下し、硫酸基を三つもつ二糖（*e.g.*, $\Delta\text{Di-triS}_{\text{CS}}$ ）は検出されなかった。そこで、各標準品にアンモニアを添加したところ、上記の成分を含むすべてで検出可能となったため、MS/MS条件を最適化した。

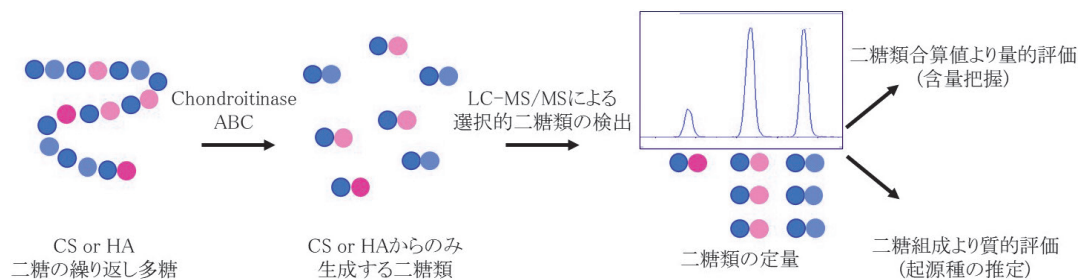


図4 本研究のCSとHAの構成二糖類分析フロー

6 食品原料分析への応用

食品中の化学物質等の分析データが正しいものかどうかを判断するためには、科学的かつ客観的に信頼できるデータであることを証明する必要がある。このためには、妥当性が確認された分析法を用い、分析結果の品質を保証できることを示すことが重要である。そこで筆者らは、開発した分析法を食品原料中の品質評価へ応用するために、妥当性評価試験を実施した。市販の食品原料を用い、標準添加法による検量線の直線性、真度、併行精度、定量下限、検出下限、マトリクス効果について検証し、本法の妥当性を確認した。なお、CSおよびHAを分析対象としているため、分解酵素には両者に活性を示すChondroitinase ABCを用いた（図4）。

6・1 食品原料分析（量的評価）

開発した分析法を用いて、CSおよびHAの各原料（CS原料：サンプルA、B、C、HA原料：サンプルD、Eとする）について分析した。定量には食品中のマトリクス効果を考慮可能な標準添加法を用い、検量線には純度の高いCSおよびHAの標準品を用いて定量した。各原料の規格値（表示量）と比較した結果、CS、HAの定量値は、ともに規格値と近似する値を示し（表1）、本法の量的評価の有用性が確認された。サンプルCについては、表示の含有率は硫黄換算によって算出されたものであり、4章で説明した化学分析法で実施した可能性が考えられる。本分析法で定量した結果と比較すると、10%以上多くなっており、CS以外の成分が上乘せされている可能性が懸念される。さらに、これまでに健康食

品中のCS含有率を調査した結果では、分析値と表示量で大きな差があったことが報告されていることから、これら成分を配合した健康食品では、原料の段階で含有率を正確に把握することが重要である。

6・2 食品原料分析（質的評価）

由来が既知の純度の高いCSおよびHA標準品を分析し、得られた二糖組成から各CSおよびHAの特徴を把握した（図5）。CS-Aは Δ Di-4SCSの割合が多く、CS-Bは Δ Di-4SCSの割合が多いことに加え Δ Di-diSBCSを唯一含んでいる。CS-Cは Δ Di-6SCSの割合が多く、CS-Dは Δ Di-6SCSの割合が多いことに加え Δ Di-diSDCSの割合がほかの種類に比べて多い。CS-Eは Δ Di-diSECSの割合が多いことが特徴である。これらの情報をもとに、各原料を分析して得られた二糖組成を標準品と比較することで由来を推測した。その結果、いずれも表示通りであり（図6）、分析した原料は質的に問題ないことが確認された。由来が既知の標準品を用いた組成解析からその特徴を把握することは、食品原料や健康食品に含まれるCSの由来を推測することができる。例えば、 Δ Di-diSBCSを含む組成の場合には、豚皮膚由来のCS-Bであることが推察され、 Δ Di-diSECSを多く含む組成の場合にはイカ軟骨由来のCS-Eであることが推察できる。これは食品偽造防止に適用可能である。由来によっては希少性の高いもの、高価なものも存在し、代わりに別の安価なCSを配合させた原料があった場合には、二糖組成を解析することで由来を推察し、食品偽造防止に適用可能である。本法は、質的評価の結果から、二糖を正確に分析可能であるため、食品偽造を確認する手段のひとつとし

表1 食品原料中のCSおよびHAの定量結果

No.	表記	由来	表示 (%)	定量値* (%)
A	ムコ多糖 (CS)	サメ軟骨	73.9	78.5
B	ムコ多糖 (CS)	サメ軟骨	80.2	76.2
C	ムコ多糖 (硫黄換算)	サメ軟骨	86.0	75.0
D	HA Na	発酵法	100.0	101.3
E	HA	発酵法	100.0	100.2

*各採取量の平均値

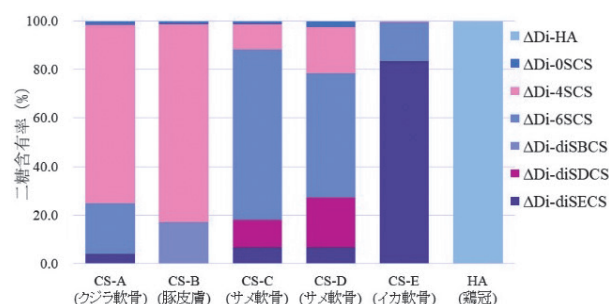


図5 異なる由来のCSおよびHAの二糖組成

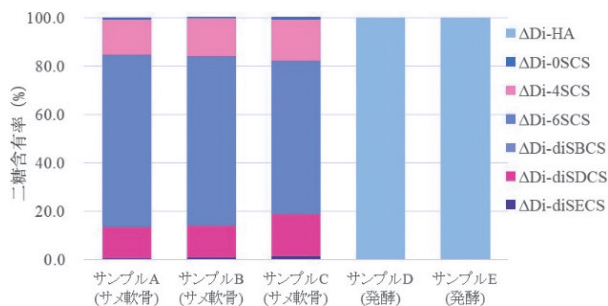


図6 食品原料中のCSおよびHAの二糖組成
(各サンプルのカッコ書きは表示の由来)

て有用であると考えられる。

7 終わりに

保健機能食品は、含有される有効成分の機能を担保するための量的管理と、食品表示にかかわるような由来の特定といった質的管理が重要である。本稿では、さまざまなGAGの分析法を紹介するとともに、筆者らが開発したLC-MS/MSを用いたGAG構成二糖類19成分の一斉分析法と食品原料中のCSおよびHAの量的質的評価について紹介した。対象にした成分は、数ある保健機能食品の有効成分のうちのごく一部にすぎないが、妥当性が確認された分析法によって、正確に分析することが極

めて重要である。消費者へ食品を届ける側の責務として、安心安全を担保する正しい分析法による評価の重要性を共有できていたら幸いである。

文 献

- 1) T. Toida : *Jpn. J. Food Chem. Safety*, **18**, 35 (2011).
- 2) D. Ji, M. Roman, J. Zhou, J. Hildreth : *JAOC Int.*, **90**, 659 (2007).
- 3) T. Ishii, K. Hirai, K. Higashi, A. Aijima, N. Yokota, T. Toida, Y. Iwasaki, R. Ito, N. Higashi, H. Akiyama : *Anal. Bioanal. Chem.*, **416**, 6209 (2024).
- 4) K. Hirai, T. Ishii, A. Aijima, N. Yokota, Y. Miyamoto, K. Higashi, Y. Iwasaki, R. Ito, N. Higashi, H. Akiyama : *Food Chem. X.*, **25**, 102239 (2025).



平井 健吾 (HIRAI Kengo)

アサヒクオリティアンドイノベーションズ株式会社解析科学研究所 (〒302-0106 茨城県守谷市緑1-1-21) 星薬科大学大学院薬品分析化学研究室 (社会人博士課程)。早稲田大学大学院先進理工学研究科修士課程修了。《現在の研究テーマ》代替タンパク食品としての昆虫食GAG調査、変形性関節炎のGAG解析。《趣味》トライアスロン、マラソン。

E-mail : kengo.hirai@asahi-qi.co.jp

会 員 の 拡 充 に 御 協 力 を !!

本会では、個人(正会員:会費年額9,000円+入会金1,000円、学生会員:年額4,500円)及び団体会員(維持会員:年額1口79,800円、特別会員:年額30,000円、公益会員:年額28,800円)の拡充を行っております。分析化学を業務としている会社や分析化学関係の仕事に従事している人などがお知り合いにおられましたら、ぜひ本会への入会を御勧誘くださるようお願い致します。

入会の手続きなどの詳細につきまして、本会ホームページ (<https://www.jsac.jp>) の入会案内をご覧ください。下記会員係までお問い合わせください。

◇〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2 五反田サンハイツ304号 (公社)日本分析化学会会員係

[電話:03-3490-3351, FAX:03-3490-3572, E-mail: memb@jsac.or.jp]