

TOSOH

SEPARATION REPORT

超高性能逆相クロマトグラフィー用充填カラム TSKgel Octadecyl-NPRによる食品タンパク質の 迅速分離

—— 目 次 ——

	ページ
1. はじめに	1
2. カラム使用上の注意	1
3. 実験条件	2
4. 結果と考察	3
5. おわりに	6

1. はじめに

近年、大豆タンパク質や小麦タンパク質などの植物タンパク質は加工食品の原料として広く用いられています。これらの加工食品に含まれる植物性タンパク質や動物性タンパク質の分析法の開発は原料や製品の品質管理あるいは製造工程の管理に重要です。従来、食品タンパク質の分析は主に電気泳動により行われていました。^{1)~3)}しかし、電気泳動法は操作が煩雑なこと、分析時間が長いことなどから、リアルタイムの分析結果が求められる品質管理や製造工程の管理には適していません。クロマトグラフィーによる分析法^{4)~6)}も長時間かかるためこれまであまり用いられていませんでした。一方、最近、当社は充填剤にポアを持たない超高性能イオン交換クロマトグラフィー用充填剤^{6)~7)}(セパレーションレポートNo.056、057参照)、超高性能逆相クロマトグラフィー用充填剤(セパレーションレポートNo.063参照)および超高性能疎水性クロマトグラフィー用充填剤(セパレーションレポートNo.064参照)を開発しました。非多孔性充填剤では充填剤内部での試料の拡散が起こらないため、試料ピークの広がりを抑えることができます。したがって、非多孔性充填剤は多孔性充填剤よりも短い分析時間で優れた分離能を持ちます。そこで、非多孔性充填剤カラムTSKgel Octadecyl-NPRを用いた逆相クロマトグラフィーによる食品タンパク質の分離を検討したので紹介します。

2. カラム使用上の注意

非多孔性逆相クロマトグラフィー用充填剤カラムTSKgel Octadecyl-NPRは、微量試料でも分離分析できる非常に高性能のカラムです。しかし一方では、このカラムは汚れに対しても非常に敏感です。したがって、このカラムを効果的に使用するためには、カラムの保守に対して、従来の多孔性充填剤カラムよりも一層の注意が必要です。

(1) 溶離液

カラムは試料中の汚れによる汚染のほか、溶離液に使用した水や試薬中の不純物により汚染されます。したがって、水および有機溶媒はHPLC用グレードを使用して下さい。また、イオンペア試薬等に用いる試薬類はHPLC用グレードまたは特級品を使用して下さい。さらに、溶離液はフィルター(0.22 μ mまたは0.45 μ m)で濾過したものを使用して下さい。

(2) HPLCシステム

溶媒グラジエントは、デッドボリュームが小さく高精度で再現性の高い高圧(吐出)グラジエント方式をおすすめします。高圧(吐出)グラジエント方式を用いた場合、カラムの平衡化に要する時間は10分程度ですが、低圧(吸引)グラジエント方式の場合、15~20分間です。

また、カラム内への微粒子や不純物の進入を防ぐため、インジェクションバルブと送液ポンプの間にラインフィルター(フィルターアセンブリー、品番 14594と0.45 μ mフィルター、品番 06280)を取り付けて下さい。フィルターの交換時期は、使用する溶離液の種類あるいは溶離液の通液量によって異なりますが、流速1.0ml/minで送液した場合に、装置配管系の圧力損失がラインフィルター装置直後よりも、15~25kg/cm²上昇したときをフィルター交換の目安として下さい。また、フィルター交換頻度が非常に高くなった場合は、フィルター交換時にフィルターガードを超音波洗浄して下さい。詳細についてはフィルターアセンブリーに添付されている取扱説明書を参照して下さい。

(3) 洗浄再生

TSKgel Octadecyl-NPRは樹脂ベースの逆相クロマトグラフィー用充填剤ですので、優れた化学的安定性を有しています。したがって、アルカリ性溶液による洗浄が可能です。

タンパク質、ペプチドの逆相(クロマトグラフィー)では、分離を行った後、ブランクグラジエントを行うと未回収の試料のピークがしばしば観察されます。このような場合、分離を行った直後に、グラジエント最終溶離液をカラムに流したまま、0.05~0.2N NaOHとアセトニトリルの混合液(4 : 6)をサンプルループより数回注入することによって、短時間でカラムを洗浄することができます。詳細については、カラムに添付されている取扱説明書を参照して下さい。

3. 実験条件

(1) 試料の調製

試料は脱脂大豆粉(Sigma社)、市販の牛肉・豚肉・鶏肉・ハム・ソーセージを用いました。

図-1に試料の調製法を示します。肉試料中の脂質はアセトン処理により抽出、除去しました。アセトン処理後の乾燥肉試料あるいは脱脂大豆粉に水を加え、25℃あるいは80℃でかくはんしてタンパク質を抽出しました。懸濁液を遠心分離、濾過して不溶物を除き、分析用試料としました。

(1) 脂質の除去

肉試料、10g
↓ +冷アセトン、100ml
↓ ホモジナイズ
↓ 遠心分離
沈澱
↓ アセトン処理(同上、2回)
沈澱
↓ 乾燥
乾燥肉試料

(2) HPLCシステムおよび分析条件

送液ポンプはコンピュータコントロールマルチポンプCCPM、検出器は紫外可視検出器UV-8010を用いました。カラムはTSKgel Octadecyl-NPR(内径4.6mm、長さ3.5cm)を用いました。TSKgel Octadecyl-NPRは粒子径2.5μmの非多孔性親水性樹脂の表面にオクタデシル基を導入した逆相クロマトグラフィー用充填剤です。溶出は、100mM過塩素酸中のアセトニトリル濃度を5%から80%まで10分間に直線的に変化させて行いました。測定温度は25℃、流速は1.5ml/min、検出は220nmの吸収で行いました。

(2) タンパク質の抽出

乾燥肉試料または脱脂大豆粉、200mg
↓ +水、20ml
↓ 60分間かくはん(25℃または80℃)
↓ 遠心分離
上清
↓ 濾過(0.45μmメンブレンフィルター)
濾液
↓ +アジ化ナトリウム(最終濃度0.01%)
分析用試料

4. 結果と考察

(1) 大豆タンパク質と肉タンパク質の識別

図-2に牛肉タンパク質と大豆タンパク質およびそれらの混合物の分離を示します。いずれの場合も約8分という短時間で良好に分離されました。牛肉タンパク質のクロマトグラム(図-2(a))には7分付近にメインピークが見られました。一方、大豆タンパク質のクロマトグラ

ム(図-2(b))には牛肉タンパク質とは異なる溶出位置、4分付近に特徴的なピークが認められました。図-2(c)は牛肉タンパク質と大豆タンパク質との等量混合物の分離を示します。矢印は大豆タンパク質に特徴的なピークです。牛肉と大豆タンパク質を混合した場合、これらのピークの有無により、大豆タンパク質の混入を知ることができます。

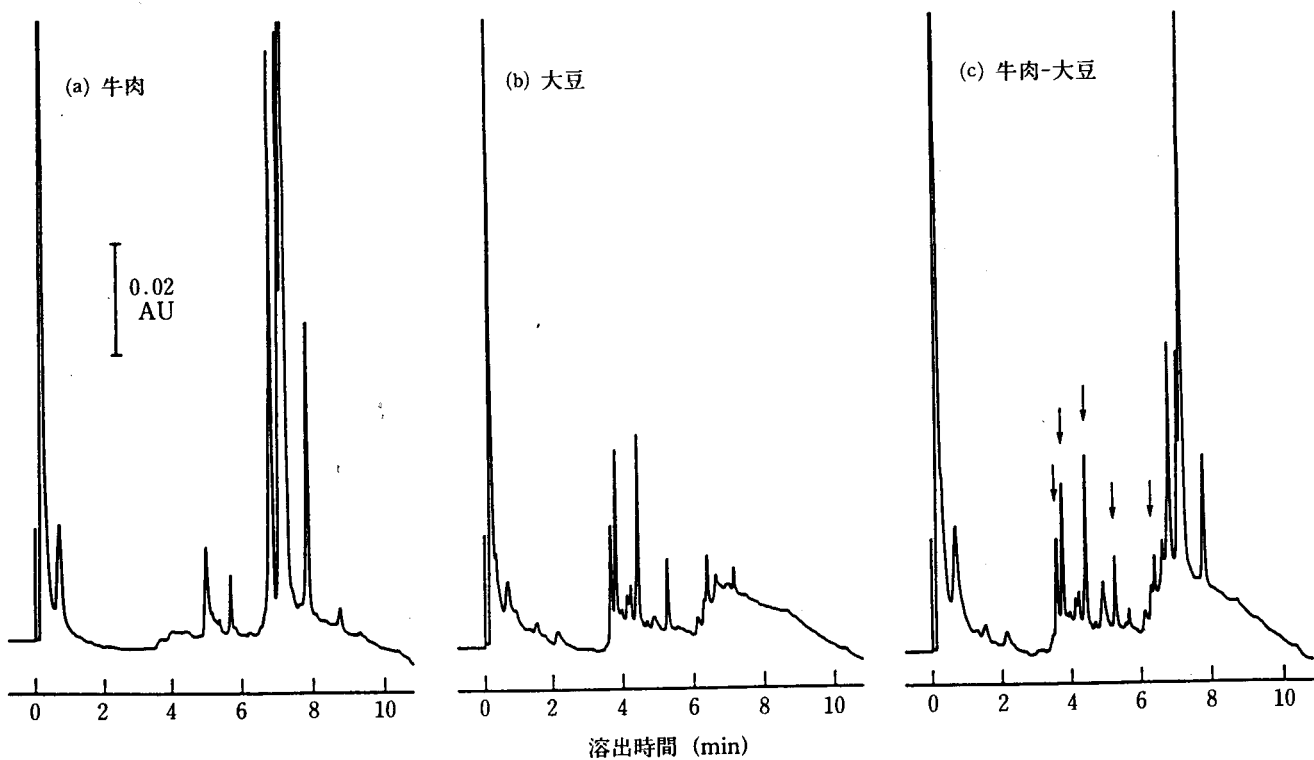


図-2 牛肉タンパク質と大豆タンパク質の分離

溶離液； A：100mM過塩素酸を含む5%アセトニトリル溶液

B：100mM過塩素酸を含む80%アセトニトリル溶液

A→Bリニアグラジエント(10分)

流速：1.5ml/min

温度：25°C

検出：UV(220nm)

試料；(a) 牛肉タンパク質(20 μ g)

(b) 大豆タンパク質(10 μ g)

(c) 牛肉-大豆タンパク質混合物(各10 μ g)

矢印は大豆タンパク質に特徴的なピークを示す。

図-3、4にそれぞれ豚肉、鶏肉と大豆タンパク質の分離を示します。いずれも牛肉の場合と同様に4分付近のピークにより大豆タンパク質を検出することができました。以上のように、大豆タンパク質のクロマトグラム

には各種肉タンパク質とは異なる溶出位置に特徴的なピークが存在し、肉タンパク質と大豆タンパク質との識別が可能であることがわかりました。

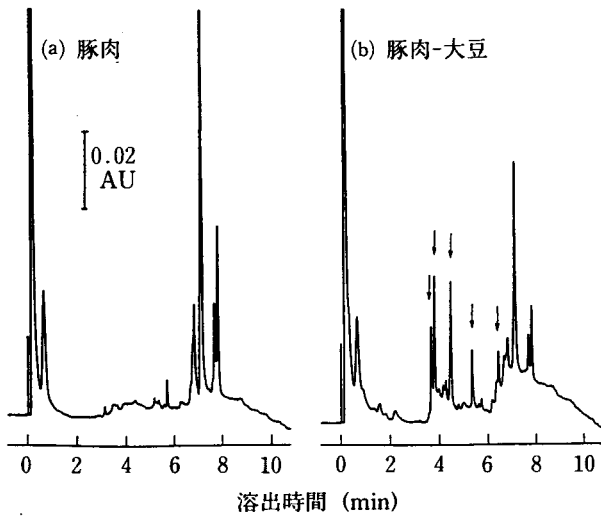


図-3 豚肉タンパク質と大豆タンパク質の分離

溶離条件；図-2に同じ

試料；(a) 豚肉タンパク質(20 μ g)

(b) 豚肉-大豆タンパク質混合物(各10 μ g)

矢印は大豆タンパク質に特徴的なピークを示す。

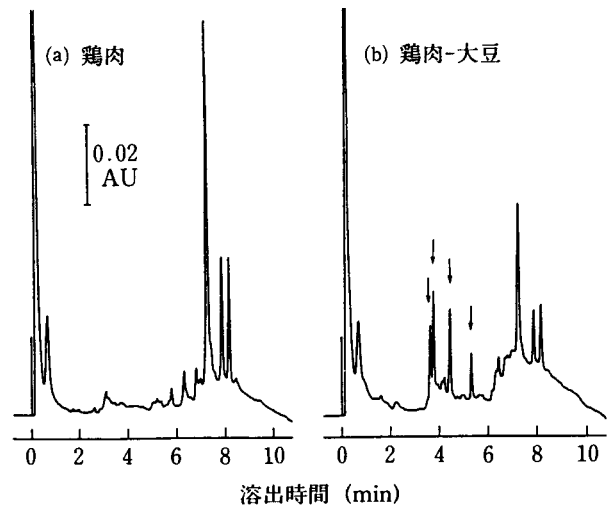


図-4 鶏肉タンパク質と大豆タンパク質の分離

溶離条件；図-2に同じ

試料；(a) 鶏肉タンパク質(20 μ g)

(b) 鶏肉-大豆タンパク質混合物(各10 μ g)

矢印は大豆タンパク質に特徴的なピークを示す。

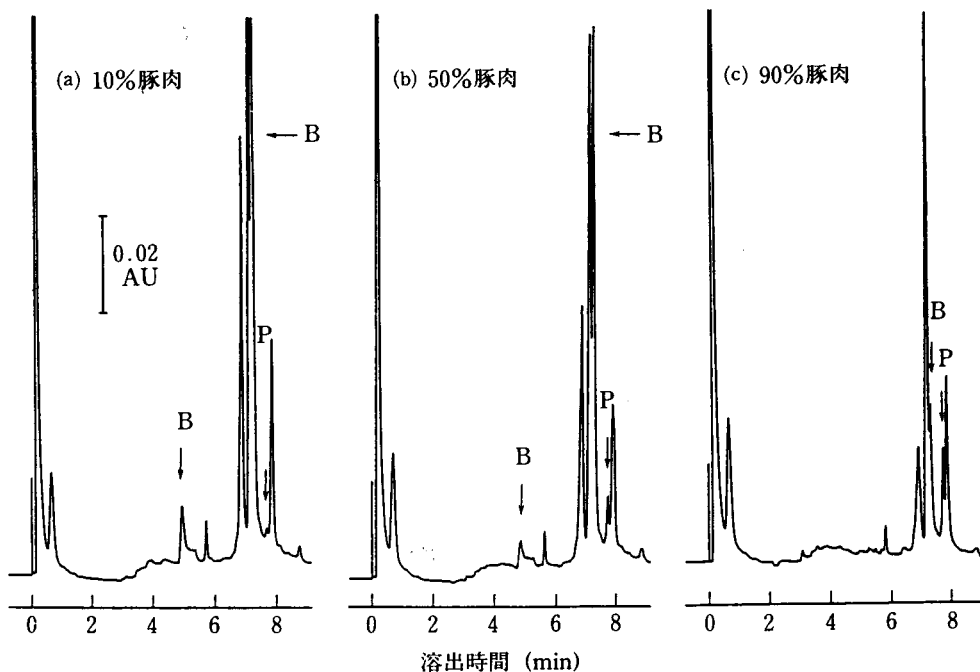


図-5 牛肉-豚肉タンパク質混合物の分離

溶離条件；図-2に同じ

試料；牛肉-豚肉タンパク質混合物

(20 μ gタンパク質)

(a) 9:1 (b) 5:5 (c) 1:9 (牛肉：豚肉)

矢印は牛肉タンパク質(B)、豚肉タンパク質(P)に特徴的なピークを示す。

(2) 肉種の識別

図-5に牛肉タンパク質と豚肉タンパク質との混合物の分離を示します。5分のピークと7分付近のピークは豚肉タンパク質の割合が高くなるにしたがって小さくなり、豚肉タンパク質のみのクロマトグラム(図-3(a))にはこれらの位置にはピークは存在しませんでした。したがって、これらのピークの有無によって牛肉と豚肉の識別が可能で、一方、7.5分付近のピークは豚肉タンパク質の割合が高くなるにしたがって大きくなっていますが、牛肉タンパク質のみのクロマトグラム(図-2(a))にもこの位置にわずかながらピークが存在しました。したがって、牛肉タンパク質にごく少量の豚肉タンパク質を混合した場合には豚肉タンパク質の検出は困難であると思われる。

図-6は、牛肉タンパク質と鶏肉タンパク質との混合物、および豚肉タンパク質と鶏肉タンパク質との混合物のクロマトグラムです。いずれの場合も、矢印で示したように各種肉タンパク質に特徴的なピークが存在し、これらのピークの有無により肉種の識別が可能であると考えられます。

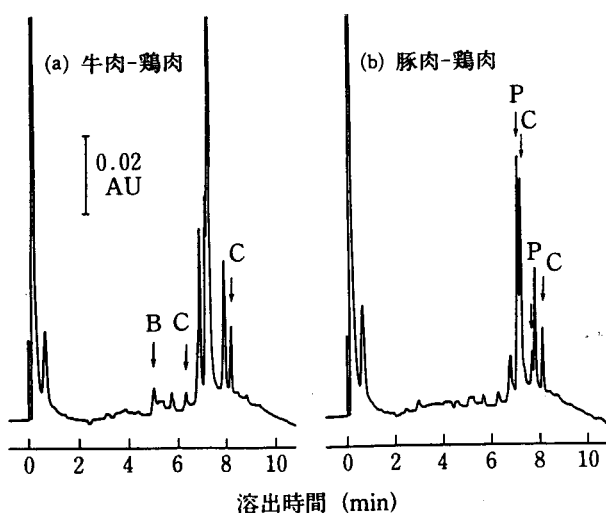


図-6 肉タンパク質混合物の分離

溶離条件；図-2に同じ

試料；(a) 牛肉-鶏肉タンパク質混合物(各10 μ g)

(b) 豚肉-鶏肉タンパク質混合物(各10 μ g)

矢印は牛肉タンパク質(B)、豚肉タンパク質(P)、鶏肉タンパク質(C)に特徴的なピークを示す。

(3) 加工肉製品の分析

図-7に豚肉、植物タンパク質および卵タンパク質を原材料とした市販のハムを分析した結果を示します。ハムなどの加工肉製品では加熱処理などによりタンパク質は変性されています。図-7(a)は80 $^{\circ}$ Cに加熱して抽出した豚肉タンパク質のクロマトグラムです。25 $^{\circ}$ Cで抽出した豚肉タンパク質(図-3(a))とは異なり、4.5分付近にメインピークが見られました。(b)は25 $^{\circ}$ Cで抽出したハム抽出液のクロマトグラムです。ハム抽出液のクロマトグラムには加熱抽出した豚肉タンパク質と同じく、4.5分付近にメインピークが認められ、肉タンパク質の存在が示唆されました。しかしながら、ハム抽出液の分離パターンは25 $^{\circ}$ Cで抽出した豚肉タンパク質や加熱抽出豚肉タンパク質の分離パターンとは異なっています。これは、このハムの原料として用いられた、豚肉タンパク質以外のタンパク質の影響、あるいは、タンパク質の可溶化の程度や変性状態に対する加工処理の影響と思われる。

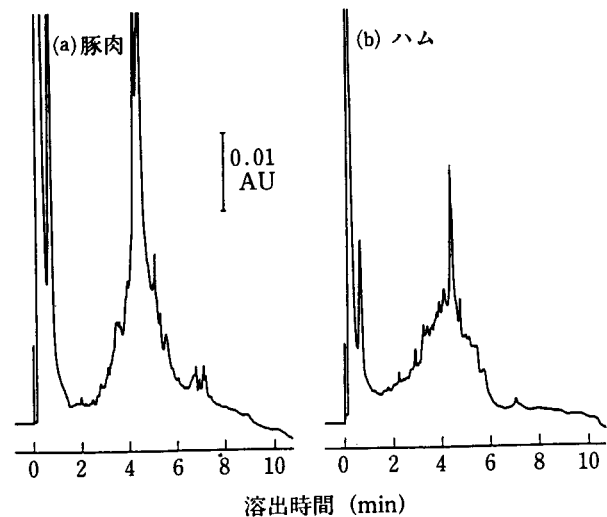


図-7 ハム抽出液の分析

溶離条件；図-2に同じ

試料；(a) 加熱抽出豚肉タンパク質(5 μ g)

(b) ハム抽出液(5 μ g)

図-8に豚肉と鶏肉を原料としたソーセージの分析結果を示します。(a)、(b)はそれぞれ80°Cで抽出した豚肉タンパク質および鶏肉タンパク質のクロマトグラムです。いずれの場合にも、25°Cで抽出した場合(図-3(a)、図-4(a))とは異なり、4.5分付近にメインピークが見られました。(c)は25°Cで抽出したソーセージ抽出液のクロマトグラムです。加熱抽出した鶏肉タンパク質に特徴的な3分から4分にかけてのピークが認められ、鶏肉タンパク質の存在が示唆されました。しかしながら、4分から6分にかけての分離パターンは加熱抽出タンパク質の分離パターンとは異なっています。これは、加工によりタンパク質の可溶性や変性状態が変化したものと思われる。

以上のことから、加工肉製品中のタンパク質の分析を詳細に行うには、タンパク質の抽出条件を検討する、あるいは、あらかじめ適当な加工処理を施した各種原料から抽出したタンパク質と比較する必要があると思われる。

5. おわりに

以上のように、非多孔性充填剤TSKgel Octadecyl-NPRを用いた逆相クロマトグラフィーにより、各種肉タンパク質、大豆タンパク質、加工肉製品中のタンパク質などが非常に短時間で高分離能で分離できました。したがって、TSKgel Octadecyl-NPRはリアルタイムの分析結果が求められる加工食品の品質管理や製造工程の管理などに有用であると考えられます。

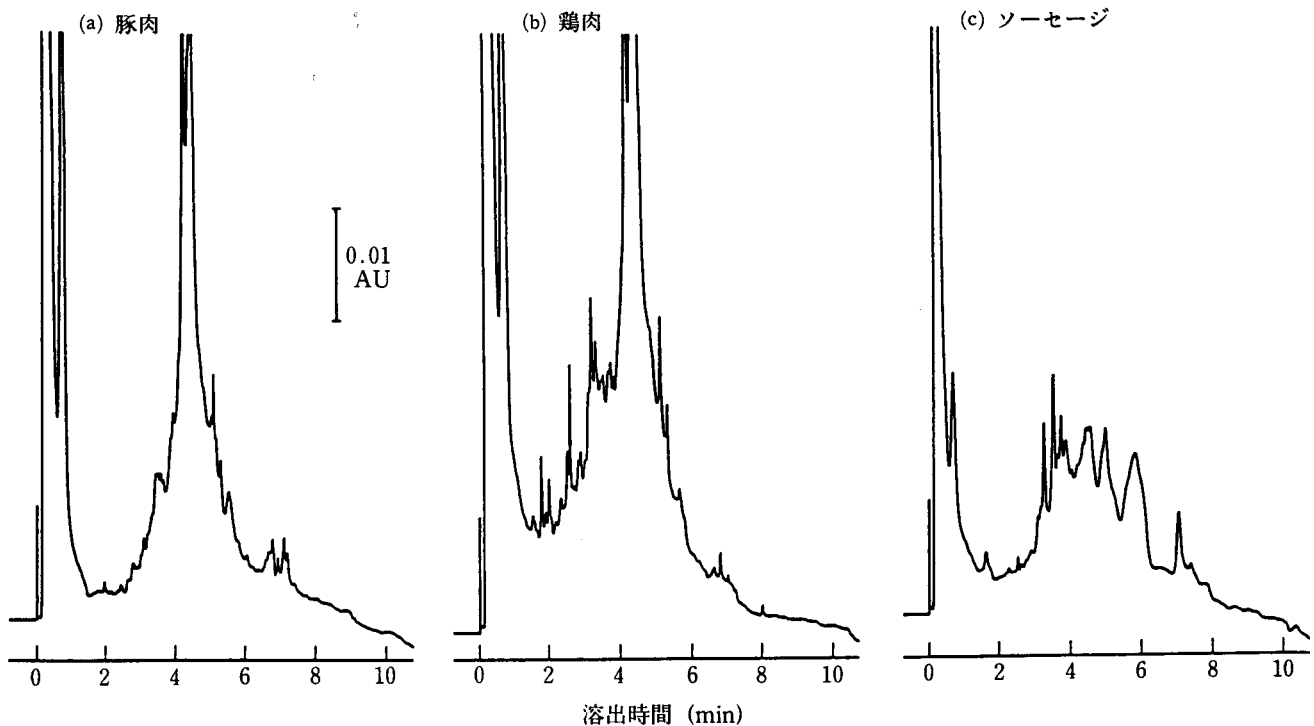


図-8 ソーセージ抽出液の分析

溶離条件；図-2に同じ

試料；(a) 加熱抽出豚肉タンパク質(5 μ g)

(b) 加熱抽出鶏肉タンパク質(5 μ g)

(c) ソーセージ抽出液(1.5 μ g)