

高速液体クロマトグラフィーによるホエイ中のラクトフェリンの分析方法の開発

食品・化学技術室 大垣 佳寛, 海老原 昇
次長 宮崎 浩子
古谷乳業株式会社 高野 和也, 白井 寛, 石出 卓也

Development of Analytical Method of Lactoferrin in Whey by High Performance
Liquid Chromatography

Yoshihiro OGAKI, Noboru EBIHARA, Hiroko MIYAZAKI,
Kazuya TAKANO, Hiroshi SHIROI and Takuya ISHIDE

本研究では、ホエイ中に含まれるラクトフェリン (LF) の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析方法を開発した。ブチル基を有するポリマー系逆相分配クロマトグラフィーカラムを用いることで、標準溶液やホエイ中のLFの分析を簡便に行うことが出来たが、乳からのLF回収率の向上が課題となった。

この方法を用いて生乳ホエイ及び、これをUHT殺菌した牛乳から抽出したホエイについてLFの定量分析を行った。その結果、生乳ホエイ中のLFは22.4mg/100mLと定量され、これは従来から報告されている値 (20mg/100mL) とほぼ一致していた。一方、これをUHT殺菌した牛乳のホエイでは1.0mg/100mLと定量され、牛乳中には未変性のLFはほとんど存在していないと推定された。

1. はじめに

ラクトフェリン (LF) は乳中に含まれる分子量約80,000の鉄結合性の糖タンパク質である。血漿に含まれ鉄イオンの輸送を担うトランスフェリンと類似の構造をもつ。LFは1939年に Sørensen らによって牛乳の乳清画分から赤色たんぱく質として発見され、1960年に母乳と牛乳から単離された¹⁾。LFは特に人の初乳に多く含まれ、乳児にとって感染防御など重要な働きをしている²⁾。LFの生理機能として、抗菌・抗ウイルス活性、ピフィズス菌増殖促進作用、免疫調節作用、抗酸化作用、鉄吸収調節作用などの多様な作用が知られている¹⁾。LFは未加熱の牛の生乳には約20 mg/100 mL、ナチュラルチーズには約300 mg/100 g含まれている¹⁾が加熱により変性しやすいと考えられている³⁾。現在LFはホエイからの工業的な大規模生産が実用化され⁴⁾ サプリメントとしても販売されている。

LFの分析方法としては、酵素免疫測定法 (ELISA)⁵⁾、

ラテックス免疫凝集法⁶⁾、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)^{7,8)} が用いられており、中でもELISAが最もよく用いられている。ELISAは、抗原抗体反応を用いて分析対象物を検出する方法で、LFに限らずたんぱく質の分析に幅広く用いられているが、たんぱく質等の抗原に合わせた抗体を調製する必要があり、これらを予め調製した分析キットも市販されているものの比較的高価である。さらに分析するたんぱく質や抗体の固相化に時間がかかるとともに、操作に熟練が必要である難点がある。ラテックス免疫測定法は抗体を感作 (吸着) させたラテックスを抗原と反応させて凝集させ、その濁りを光学的に測定するもので、ELISAに比べて測定が短時間で済み、操作も簡便であり多検体分析に適するが、分析キットが比較的高価であるに加え、一般に自動分析装置が必要となる。

本研究では、ポリマー系逆相分配クロマトグラフィーカラムを用いたHPLC法によるホエイ中のLF

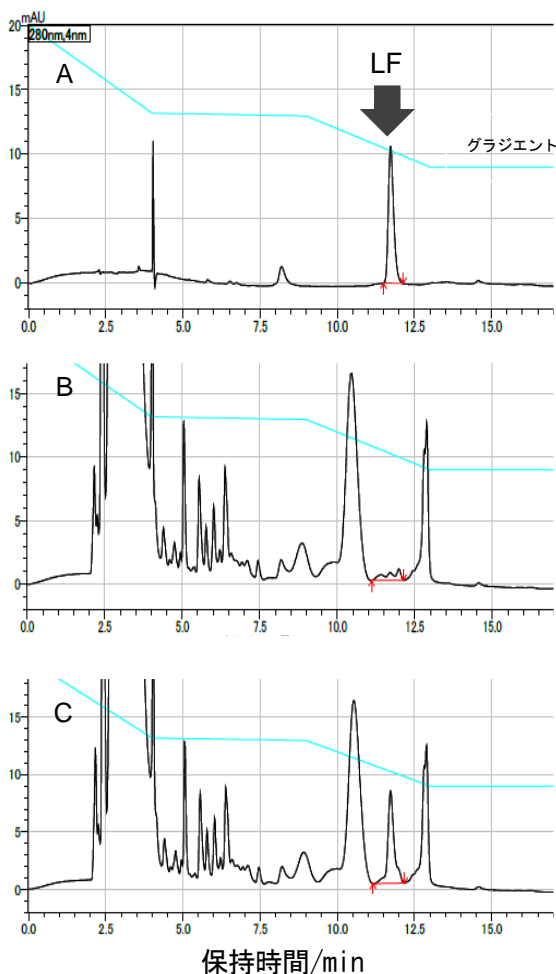


図1 LF標準品(A), UHT牛乳ホエイ(B), UHT牛乳ホエイにLFを混合したもの(C)のクロマトグラム

の分析法を開発し、生乳ホエイおよびこれをUHT殺菌した牛乳から抽出したホエイ中のLFの定量を試みたので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

生乳及びこれを超高温瞬間(UHT)殺菌した牛乳については古谷乳業株式会社から提供されたものを用いた。市販UHT牛乳については、千葉市内の小売店にて購入した。いずれの試料も冷蔵の状態でご所に搬入し、分析直前まで当所の冷凍庫にて-25℃で冷凍して保存して、分析直前に解凍して使用した。

2.2 試薬

LFの抽出に用いた酢酸、酢酸ナトリウムは富士フィルム和光純薬の特級試薬を用いた。LF標準品は同社の牛乳由来(含量95.0%以上)を用いた。

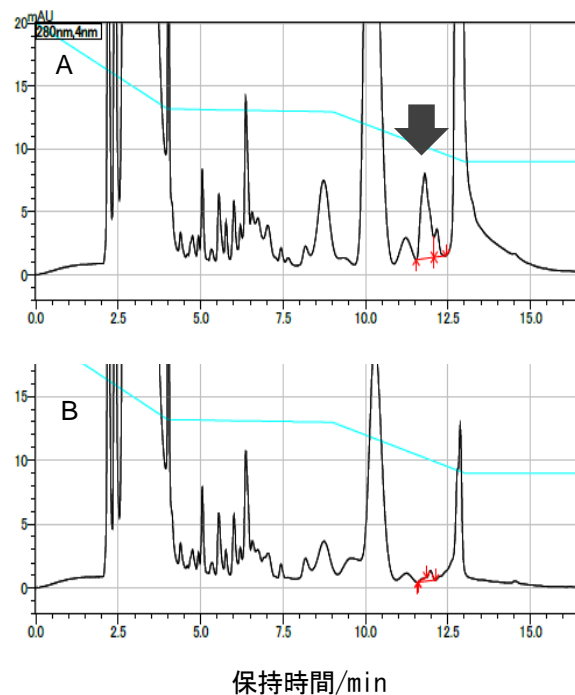


図2 生乳ホエイ(A)とこれをUHT殺菌した牛乳(B)ホエイのクロマトグラム

表1 生乳ホエイとこれをUHT殺菌した牛乳ホエイのラクトフェリン含有量(平均値±標準偏差(n=3))

	ラクトフェリン含有量(mg/100mL)
生乳ホエイ	22.4 ± 0.5
UHT殺菌後の牛乳ホエイ	1.0 ± 0.4

HPLCに用いたアセトニトリル及びトリフルオロ酢酸(TFA)は同社のHPLC用を用いた。

2.3 ラクトフェリンの抽出

遠心用チューブ(2.0 mL)に乳0.75mLと酢酸緩衝液(0.83 M 酢酸と0.2 M 酢酸ナトリウムの1:1混合溶液)0.75mLを加え⁹⁾、ふたを閉め1分間上下に激しく振とうした後、800×g(3000 rpm)で5分遠心分離し、上澄みを孔径0.20 μmのシリンジフィルター(セルロースアセテート製)でろ過したものを1回抽出試料とした。

3回抽出試料については、まず上記上澄みを試験管に回収し、沈殿の入った遠心用チューブに上記酢酸緩衝液を0.60 mL加え、ふたを閉め1分間上下に激しく振とうした後、800×gで5分遠心分離した上

澄みを再度試験管に回収した。再度遠心用チューブに上記酢酸緩衝液を0.60 mLを加え,同じ処理を繰り返し,上澄みを再度試験管に回収した。全ての溶液を合わせて3.0 mLに定容し, シリンジフィルターでろ過しHPLC試料溶液とした。

2.4 ラクトフェリンの分析

上記試料溶液について高速液体クロマトグラフ(島津製作所LCMS-8030)を用い以下の条件で分析を行った。カラム:Shodex Asahipak C4P-50 4D, 内径4.6mm×150 mm (昭和電工製), 溶離液(A):アセトニトリル+0.1% TFA, 溶離液(B):水+0.05% TFA, グラジエント条件:0%-31.0% A (0-4分), 31.0%-32.0% A (4-9分), 32.0%-50% A (9-13分), 50% A(13-18分); 50%-0% A(18-20分), 0% A (20-22分), 流速:0.80 mL/min, カラム温度:40°C, 検出器:ダイオードアレイ紫外可視分光光度計(280 nm), 注入量:25 μ L。

3. 結果及び考察

HPLCによるLFの分析においては,LFは分子量約80,000の高分子量のたんぱく質であり吸着性が大きいと考えられたため,吸着性の小さいカラムを用いる必要があると考えられた。疎水性低分子化合物の逆相HPLC分析にはオクタデシル基(C18)をもつカラムが用いられるが,このような炭化水素基の長いカラムを用いるとLFの吸着が強くなり溶離までの時間がかかりすぎると考えられた。LFを含む食品添加物やサプリメントの分析では,ブチル基(C4)を有するカラムを用いている^{7,8)}ので,今回牛乳中のLFの分析を行うにあたってこのカラムを採用した。

図1にLF標準品(10.0mg/100mL),市販のUHT牛乳から抽出したホエイ及びUHT牛乳にLFを混合した試料から抽出したホエイのクロマトグラムを示す。4~9分のグラジエントをゆるやかにすることによって,ラクトフェリンをうまく分離することができた。

また,牛乳中のLF濃度が20.0mg/100mLになるように,LFをほとんど含まない市販の牛乳(UHT牛乳)にLFを添加してホエイを抽出し,そのホエイ中のLFの濃度を測定することでどの程度牛乳中のLFが回収できるかを実験した。その結果回収率は62.8 \pm 6.8% (平均値 \pm 標準偏差)となった。1回抽出しただけの割には回収率がかなり高かった。そこ

で,複数回抽出を繰り返せば回収率を高めることが出来るかと考えて,酢酸緩衝液によるホエイ回収の後,酢酸緩衝液を加えて回収を2回行い(計3回抽出),回収液についてHPLC分析を行った。しかしながら,標準偏差は小さくなったものの回収率はほとんど変わらず65.0 \pm 2.6%となった。ホエイに酢酸緩衝液を加え分離する際,脂質やカゼインがLFを巻き込んで沈殿してしまい,その後再度酢酸緩衝液を入れて振り混ぜても回収できなかったのではないかと推定している。生乳そのもののLFを正確に分析するためには,回収率の向上が今後の検討課題として残った。従って,以下のLFの分析値は乳そのものの値ではなく,乳から抽出したホエイの分析値であることを留意されたい。

図2にこの分析法を用いた場合の,生乳から抽出したホエイ(A)及びこれをUHT殺菌した後の牛乳から抽出したホエイ(B)のクロマトグラムを示す。生乳ホエイで11.7分付近に出ているピークが,UHT殺菌後はほぼ消失しており,生乳ホエイに見られるこのピークはLFであると推定される。

さらに表1に,これらLFのピークの面積を用い,検量線として市販のLF標準品溶液を用いて,生乳ホエイとこれをUHT殺菌した牛乳ホエイについてLFの定量分析を行った結果を示す。なお,これらの分析値は酢酸緩衝液を加えて3回抽出した実験についてそれぞれ併行試験を行った場合の分析値である。

その結果,生乳から抽出したホエイ中のLFの含有量は22.4mg/100mLとなり,これは生乳で報告されている値(20mg/100mL)とほぼ同じ値であった。これはホエイについての値であり,前述の回収率を考慮すると生乳中にはLFはこれ以上含まれているのではないかと考えられる。一方,この生乳をUHT殺菌した牛乳のホエイでは1.0mg/100mLと定量された。実際は図2のBのクロマトグラムに示したとおりほとんどピークが検出されなかった。従って,UHT殺菌した牛乳には未変性のLFはほとんど存在していないと考えられる。

4. まとめ

本研究では,HPLCによるホエイ中のLFの分析方法を開発し,この方法を用いて生乳ホエイ及びこれをUHT殺菌した牛乳のホエイについてLFの定量分析を行った。その結果,生乳ホエイ中のLFは

22. 4mg/100mLと定量され、これは従来から報告されている値(20mg/100mL)とほぼ一致していた。一方、これをUHT殺菌した牛乳ホエイでは1.0mg/100mLとなりUHT殺菌した牛乳には未変性のLFはほとんど存在していないと考えられた。

参考文献

- 1) 山内恒治 日本食品科学工学会誌, 53, 193 (2006)
- 2) 上野 宏 ミルクサイエンス, 61, 105-112(2012)
- 3) 今井哲哉 ミルクサイエンス, 55, 227-235(2007)
- 4) 田村吉隆, 齋藤仁志 膜 (MEMBRANE), 30, 192-197(2005)
- 5) (例として)フナコシ株式会社ウェブサイト
<https://www.funakoshi.co.jp/contents/56118>
- 6) 難波俊二, 奥田優子, 石井利明, 藤澤宗駿, 盛田俊介 ミルクサイエンス, 53, 230-231(2004)
- 7) (例として) Shodexウェブサイト
<https://www.shodex.co.jp/ja/dc/01/03/25.html>
- 8) 厚生労働省, 消費者庁編 第9版食品添加物公定書2018, 979-980
- 9) Pereira, R.N, Teixeira, J.A, and Vicente, A. A J. Agric. Food Chem. 59, 11589-11597(2011)