低圧カラムクロマトグラフィーによる筋肉ATP 関連化合物の迅速定量法

宇田文昭*・内山 均**

Rapid Methods for Determination of ATP related Compounds in muscle by Low Pressure
Column Chromatography

Fumiaki UDA* and Hitoshi UCHIYAMA**

Synopsis

The rapid methods for determination of ATP related compounds in muscle by low pressure column chromatography have been studied.

The rapid separation was achieved at a high flow rate of 3 mL/min, by using a Perista Minipump and a small column ($\phi 5\text{ mm} \times 20\text{ mm}$) packed with an anion exchange resin (AG 1 $\times$ 4, -400 mesh, Cl type).

This made it possible to fractionate ATP related compounds into HxR+Hx, AMP, IMP, ADP and ATP in about 25 min by the concave gradient elution system. The hydrochloric acid-sodium chloride concentration gradients were prepared with two and three chambered gradient apparatuses.

When the flow rate was reduced to 2 mL/min, the time required for the separation increased to 40 min, but a better separation of each component was obtained at this flow rate.

(Received Oct. 18, 1987)

(本報では以下の略号を用いる。ATP, ADP, AMP: アデノシン三, 二, 一リン酸, IMP: イノシン酸, HxR: イノシン, Hx: ヒポキサンチン, PCA: 過塩素酸)

緒 言

魚類鮮度判定恒数, K値は, 1959年, 齊藤ら¹⁾により, 筋肉ATPの自己分解経路の生化学的解明を基礎と

して提唱された。このK値の応用面における有効性を検証するには, ATP関連化合物の消長と鮮度との関係を明らかにする必要があった。しかし当時, 既報のATP関連化合物の定量法^{2)~5)}には, 各成分がそれぞれに分画定量できる利点があったが, 操作が煩雑であり, 長時間を要する欠点があった。そこで, 内山ら^{6)~8)}は, 筋肉ATP関連化合物6成分を対象として, 約60分で分離する迅速分析法を提案した。そして本方法およびそれに基礎をおく改良法を用いて, K値が魚の“生きの良さ”と相関していることを明らかにした⁹⁾。以後, 多くの研究者^{10)~12)}により, その有効性が認知され, 研究および産業

*¹⁾野村生物科学研究所

**東京農業大学

*NRI Life Science

**Tokyo University of Agriculture

の両面において広くK値が採用されるようになった^{18)~19)}。

このような過程を経て、鮮魚の流通段階での品質調査にK値が利用されるようになり、同時に多数試料を分析するための簡易測定法^{18)~20)}が開発されるようになった。これらの方法の骨子は、K値がATP関連化合物総量に対するHxR+Hx量の百分率である点に着目し、各成分を分離することなく、単にHxR+Hx量を定量してK値を算出する方法である。

ところで近年、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたATP関連化合物の迅速分析法^{21)~23)}が報告されているが、高圧用のカラム、送液ポンプ、紫外吸収検出器など比較的高価な装置を必要とする。対比して従来の常圧操作でのカラムクロマトグラフィーは、分離能、分析時間の点で、HPLCに劣るものの、安価かつ汎用性のある装置が使用できる利点がある。このような点に着目して、J.X.KHYM²⁴⁾は陽イオン交換樹脂 (Aminex) およびクエン酸ナトリウムを溶離剤に用いる迅速定量法を報告した。筆者らも同様の趣旨から、前報の陰イオン交換樹脂 (AG 1×4, Cl型) カラムと塩酸一塩化ナトリウムの連続濃度勾配法に改良を加え、定量の迅速化を図った。

実験材料および実験方法

1. 試 薬

ATP, ADP, AMP, IMP, HxR および Hx (和光純薬) の各標準溶液濃度は分子吸光係数を用いて検定した。AG 1×4, -400 mesh, Cl型樹脂 (Bio Rad社) はアセトンで洗い脱イオン水に分散させて細粒を除いた後、1N水酸化ナトリウムで処理し、洗液のpHが中性になるまで脱イオン水で洗った。1N塩酸を加えてCl型とし、洗液のpHが中性になるまで水洗した。このアルカリ-酸処理を2回繰返した。

2. カ ラ ム

内径5mm、長さ60mmのガラスカラム下端に少量のガラスウールを詰め、陰イオン交換樹脂を20~25mmの高さに充填した。

3. 連続濃度勾配装置

3槽式濃度勾配装置は9チャンバー・オートグラッド (Technicon社) を、また2槽式濃度勾配装置は、底面積比が2:1となるような2つのプラスチック製円筒 (内径比、54mm:38mm) を細管でつないだ装置⁷⁾を

使用した。送液ポンプはペリスタ・ミニポンプ (SJ-1211, ミツミ科学) を用いた。

4. 溶 離 剤

以下に示す方法により調製した。

0.002 N HCl: 1 N HCl (和光純薬) 2mL を蒸留水で1Lとした。

0.01M NaCl—0.002 N HCl: 塩化ナトリウム0.59g, 1 N HCl 2mL を蒸留水で1Lとした。

0.3M NaCl—0.008 N HCl: 塩化ナトリウム17.6g, 1 N HCl 8mL を蒸留水で1Lとした。

5. ATP関連化合物の測定

溶出液の吸光度 (測定波長: 250nm) は日立 034 形多波長流動光度計に打点記録計を接続して記録した。フラクシオンコレクター (フナコシ薬品) を用いて分画した場合は、各画分の吸光度を日立 320 形自記分光光度計を用いて測定した。

6. 水素イオン濃度 (pH) および塩素イオン濃度の測定

pHは堀場 Model H-7 SD を用い、塩素イオン濃度は平沼クロライドカウンター Cl-5型を用いて測定した。

結 果

1. 分離条件とクロマトグラフィー

1) 3槽式濃度勾配装置を用いる場合 1 N NH₄ OH で試料のpHを9~10に調節し (TB試験紙), カラムに加える。陰イオン交換樹脂に吸着されない物質はカラム上部および送液部内の蒸留水 (約4mL) で溶出されるので、送液ポンプを第1溶離液 (0.002 N HCl) に接続し、約6mL流すとHxRとHxが同一ピークとして溶離し始める。このとき、送液ポンプをオートグラッド (第1および2槽: 0.002 N HCl, 第3槽: 0.3M NaCl—0.008 N HCl, 各30mL) に接続し溶出すると、水素イオンと塩素イオンの傾斜型濃度勾配によりAMP, IMP, ADP, ATPの順に溶離される。ATPの溶出がほぼ終了したとき、0.3M NaCl—0.008 N HCl 溶液を、次いで蒸留水をそれぞれ15~20mL流しカラムを再生する。カラム溶出液のpHが中性になれば、次の分析を開始することができる。流速3mL/minでは、カラムの再生時間を含め約40分で分析が終了した (Fig. 1)。

流速を2mL/minにすると、分析時間は約60分になる

Fig.1 Chromatogram of authentic Hx, HxR, IMP, AMP, ADP and ATP with a short column at low pressure.

Resin: AG 1×4, Cl, -400 mesh; Column: 5×20 mm; Gradient: Concave gradient elution system with three chambers; Flow rate: 3 ml/min.

が、AMP、IMP、ADPの3つのピークの分離が良好となった。

2) 2槽式濃度勾配装置を用いる場合 試料のpHを弱アルカリ性に調節してカラムに加える。送液ポンプを0.002N HClに接続し、HxR+Hxが溶離されるまで流した後、2槽式濃度勾配装置（第1槽：0.01M NaCl-0.002N HCl, 60ml, 第2槽：0.3M NaCl-0.008N HCl, 30ml）に切り換える。ATPが溶出された後カラムを再生する。分析時間は3槽式濃度勾配装置を用いた時とほぼ同等であった。

2. 3槽式および2槽式濃度勾配曲線の比較

3槽式および2槽式の濃度勾配装置を用い、前項1に示したそれぞれの分離条件でクロマトグラフィーを行い、

溶出液を1.8mlずつ分画して、そのpHと塩素イオン濃度を測定した。Fig.2 および3に示すように、3槽式では2槽式に比べ、AMPおよびIMPが溶出される部分の塩素イオン濃度の変化が緩やかである。このため、3槽式の濃度勾配装置を用いる方がAMPとIMPの分離が良好であった。

3. 標準物質の回収率

0.25~0.5μmolの標準物質を含む試料のpHを9~10に調節してカラムに加え、3槽式の濃度勾配法により溶出した。溶出ピークを25mlのメスフラスコに分取し、0.02N HClおよび蒸留水を加えて約pH2に調節し定容とした。吸光度から求めた回収率は97.3~100.9%であった (Table 1)。

Table 1 Recoveries of ATP and its related compounds in the column chromatography by a concave gradient elution system with 3 chambers

ATP related compound	Recovery (%)
Hx	99.2±1.00
HxR	99.0±3.91
IMP	100.9±0.67
AMP	100.6±1.33
ADP	97.7±0.55
ATP	97.3±1.57

0.25~0.5μmol of each reagent were used.

4. 実施例

1) 鶏肉ATP関連化合物の経時的変化 即殺鶏肉の低温貯蔵中のATP関連化合物の消長を調べた。

(1) 試料：-1℃に貯蔵された即殺鶏胸肉を経時的に採取し、PCA抽出中和液を調製した²⁵⁾。

(2) カラムクロマトグラフィー：AG 1×4, -400 mesh, Cl型樹脂を、内径5mmのカラムに25mmの高さに充填した。PCA抽出液0.92mlに1N NH₄OH 0.08 mlを加えてアルカリ性とし、カラムに吸着させ、約2.5 ml/minの流速で0.002N HClを3分間流した後、3槽式の濃度勾配法により、ATP関連化合物を溶出、その250nmの吸光度を測定して各化合物のピーク面積をH・W法により求めた。

(3) 結果：即殺直後の鶏肉のATP関連化合物の主成分はATPで、これにADPおよびAMPを加えたアデニンスクレオチドの合計はおよそ80%であった。しかし、1日後には約10%に減少、以後緩やかに低下し、6日後においても約5%の存在が認められた (Fig.4)。ア

Fig. 2 pH and chloride concentration gradient curves and separation of authentic ATP related compounds by a concave gradient elution system with three chambers.
Resin: AG 1×4, Cl, -400 mesh; Column: 5×20 mm; Flow rate: 2.7 ml/min;
Fraction volume: 1.8 ml

Fig. 3 pH and chloride concentration gradient curves and separation of authentic ATP related compounds by a concave gradient elution system with two chambers.
Resin: AG 1×4, Cl, -400 mesh; Column: 5×20 mm; Flow rate: 2.7 ml/min;
Fraction volume: 1.8 ml

デニヌクレオチドの減少によりIMPが急増し、1～2日後に約85%に達した。以後、この減少に伴いHxR+Hxが増加した (Table 2)。

2) サバペプチド液のIMP定量 低圧カラムクロマトグラフィーは HPLC に比べ分析供試量が多いの

で、フラクションコレクターに分取した各ピークの紫外部吸収スペクトルから、直接ATP関連化合物の同定が出来る。その分析例を以下に示す。

サバペプチドは新鮮なサバを原料に、酵素化学的処理により製造されたものである。各種の生理活性が認め

Fig. 4 Chromatograms of the acid soluble nucleotides in the chicken muscle during storage at -1°C .

Table 2 Changes in the amounts of ATP and its related compounds in the broiler breast muscle during storage at -1°C

(%)					
Days	ATP	ADP	AMP	IMP	HxR+Hx
0	55.2	14.4	11.1	18.5	0.8
1	1.7	3.0	5.1	84.7	5.5
2	1.2	2.5	2.9	84.8	8.6
4	1.1	2.8	2.8	78.8	15.0
6	1.2	2.2	3.0	70.4	23.2

られるため、健康食品として、また、家畜や植物の栄養剤として利用されるほか、醗酵食品の品質改良剤や調味

料としても利用されている²⁶⁾。

サバペプチドの呈味成分として、アミノ酸組成は調べられているので²⁶⁾、本報ではIMP含量を測定した。

(1) 試料 サバペプチド原液*0.5gを蒸留水で10倍に希釈した。不溶性成分が少量認められたが一夜冷蔵庫に放置すると白沈として分離したので、その上澄を分析試料とした。

(2) カラムクロマトグラフィー カラムおよび濃度勾配法は1)~(2)とほぼ同様の条件で行った。試料希釈液0.2mlに1N NH_4OH 0.06mlを加えてアルカリ性とし、カラムに吸着させた。蒸留水で洗い非吸着性物質を除去、0.002N HClを10分間流した後、濃度勾配法によりヌクレオチドを溶出した。溶離液をフラクションコレクターで2.7mlずつ分画し、250nmの吸光度を測定した。AMPおよびIMPの溶出位置に相当するピークについて、酸性およびアルカリ性における210~310nmの吸収スペクトルを測定し、IMPは250nmの吸光度および分子吸光係数を用いて定量した。

(3) 結果 Fig.5に示すように、4つのピークが認められた。溶出位置から、P1は非吸着性物質、P2はヌクレオシドおよび塩基、P3はAMP、P4はIMPと推定した。酸性およびアルカリ性の条件で調べた吸収スペクトルから、P3には不純物が含まれておりAMPと同定できなかったが、P4はその特徴的な吸収スペクトル (Fig.6) からIMPと同定した。P4の250nmの総吸光度から計算したIMPの含量はサバペプチド原液1gあたり6.4mgであった。

考 察

K値の測定には、簡易カラムクロマトグラフィー、酵素法、比色法、酸素センサーを用いる鮮度測定器などが開発されている。しかし、これらの方法はいずれもATP関連化合物を各成分に分離することなくK値を測定する方法である。従って、ヌクレオチド組成の検索には、クロマトグラフィーによる各成分の分別定量が必要である。

HPLCを用いて筋肉ATP関連化合物を15~25分で分析する方法が報告されている。しかし、このような高価な分析機器を使用しない従来のクロマトグラフィーも、その経済性と簡易性を重視して改良する必要がある。すでに筆者らは、陰イオン交換樹脂および塩酸一塩化ナトリウム系溶離剤を用い、ATP関連化合物を約60分で

* 天山水産株式会社より提供を受けた。

Fig. 5 Chromatogram of the water soluble fraction of "Saba peptides" (enzymatic digestible fraction of Mackerel).

Fig. 6 Absorption spectra of P4.

分析する系を確立したが、これをさらに迅速化する条件について検討した。

塩酸一塩化ナトリウム系の連続濃度勾配作成には、溶離液組成の選択により、3槽式および2槽式の濃度勾配装置が利用できることを確認した。また、短カラムを用いたので、市販のペリスタ・ミニポンプを使用し、3mL/minの流速を得ることができた。これにより分析時間約25分、カラム再生処理時間を含め約40分で完了する系を確立した。3槽式に比べ2槽式では、AMPとIMPの分離がやや不良だが、魚類筋肉中のAMPは少量であり、ヌクレオチド組成の確認の目的には十分利用可能であった。流速2mL/minでは、分析時間は約40分、カラム再生処理時間を含めると約60分となるが各成分の分離がより良好となった。

要 約

陰イオン交換樹脂 (AG 1×4) カラムおよび塩酸一塩化ナトリウム系の連続濃度勾配法を用いたATP関連化合物の迅速定量法について検討し、以下の結果を得た。

① AG 1×4, -400 mesh, Cl 型カラムの短縮 (φ5

mm×20mm) により、市販のペリスタ・ミニポンプを用い、3mL/minの流速を得ることができた。これにより、3槽式あるいは2槽式の濃度勾配装置を用い、ATP関連化合物を約25分でHxR+Hx, AMP, IMP, ADPおよびATPに分画することができた。分析はカラムの再生を含め約40分で完了した。なお、流速を2mL/minにすると分析時間は約60分とやや長くはなるが、各成分の分離がより良好となった。

② ATP関連化合物の標準物質での回収率は97.3～100.9%であった。

③ 本法はHPLCに比べ2～3倍の分析時間を要するが、一般の機器のみで分析できる利点があり、ヌクレオチド組成を確認する簡易、迅速なカラムクロマトグラフィーとして広く経済的に利用できることを確認した。

文 献

- 1) SAITO, T., ARAI, K. and MATUYOSHI, M.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **24**, 749-750 (1959)
- 2) COHN, W.E.: *Science*, **109**, 377 (1950)
- 3) COHN, W.E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1471 (1950)
- 4) COHN, W.E. and CARTER, C.E.: *ibid.*, **72**, 4273 (1950)
- 5) ANDERSON, N.G. and FADD, S.F.C.: *Biochem.*

- Biophys. Acta*, **55**, 275 (1962)
- 6) 清水照夫・宇田文昭・松宮弘幸・宮内圭治・鴈野重威：分析化学, **18**, 632—640 (1969)
- 7) EHIRA, S., UCHIYAMA, H., UDA, F. and MATSUMIYA, H.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **36**, 491—496 (1970)
- 8) 加藤 登・内山 均・宇田文昭：日水誌, **39**, 1039—1044 (1973)
- 9) 内山 均・江平重男・神名孝一：低温流通機構に関する総合研究中間報告書, **V**, 科学技術庁研究調整局編, 1—92 (1971)
- 10) 橋本周久・渡部終五：日水誌, **49**, 203—209 (1983)
- 11) 新井健一：多獲性赤身魚の有効利用 (日本水産学会編), 20—32, 恒星社厚生閣, 東京 (1980)
- 12) 江平重男・内山 均：日水誌, **45**, 121—126 (1979)
- 13) 内山 均：食品と低温, **10**, 76—85 (1984)
- 14) UCHIYAMA, H. and KATO, N.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **40**, 1145—1154 (1974)
- 15) 内山 均・江平重男：魚の低温貯蔵と品質評価法 (小泉千秋編), 96—105, 恒星社厚生閣, 東京 (1986)
- 16) 内山 均・角田聖斉：日水誌, **50**, 263—267 (1984)
- 17) 内山 均・江平重男：モダンメディア, **24**, 78—92 (1978)
- 18) 宇田文昭・内山 均：魚の低温貯蔵と品質評価法 (小泉千秋編), 24—35, 恒星社厚生閣, 東京 (1986)
- 19) 宇田文昭・林恵美子・内山 均・角田聖斉：東海水研報, **111**, 55—62 (1983)
- 20) 大橋 実・宇津木義雄：魚の低温貯蔵と品質評価法 (小泉千秋編), 48—59, 恒星社厚生閣, 東京 (1986)
- 21) LEE, E., OHSHIMA, T. and KOIZUMI, C.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 255 (1982)
- 22) 北田善三・蓮池秋一・佐々木美智子・谷川 薫・堀内龍太郎・弓場秀雄：日食工誌, **30**, 151—154 (1983)
- 23) 鎗本六良・三島敏雄・宇津木照洋・北島俊一・矢田 殖朗・保田正人：日水誌, **51**, 1363—1369 (1985)
- 24) KHYM, J. X.: *Clin. Chem.*, **21**, 1245—1252 (1975)
- 25) 江平重男・内山 均・宇田文昭：水産生物化学・食品学実験書 (齊藤恒行・内山 均・梅本 滋・河端俊治編), 17—31, 恒星社厚生閣, 東京 (1974)
- 26) 久保道徳：鯖ペプチドの医学, 124pp., 化学同人, 京都 (1983)

(昭和62年10月18日受理)