

作成日：2018年9月3日

依頼者：株式会社アイ・ピー・シー

作成者：一丸ファルコス株式会社

『プロテウオーク』からのサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの分析方法

(1) 標準溶液の調製

標準品のプロテオグリカン、サケ鼻軟骨由来（富士フィルム和光純薬株式会社製）を精密に量り、リン酸緩衝液（pH 6.8）に溶解し、0.04、0.1 及び 0.2mg/mL となるように調製したものを標準溶液とする。なお、使用時には、室温減圧デシケーター（シリカゲル）で3時間乾燥したものをを用いる。

(2) 試料溶液の調製

1. 試料の秤量

20 粒分の重量を測定し、1 粒当たりの平均重量を測定する。

2. 試料溶液の調製と分析方法

本品を粉碎し、その粉碎物約 150mg を精密に量り、4M-グアニジン塩酸溶液 15mL を加え、超音波処理にて 15 分間抽出する。約 1800G で 10 分間遠心分離し、上清液を回収する。残留物に対して、上記の 4M-グアニジン塩酸溶液添加から遠心分離までの処理をさらに 2 回繰り返し行い、上清液を回収する。次に抽出液をろ過し、そのろ液は分子量分画膜（MWCO 5～10 万）を用いて、約 2400G で 30 分間遠心分離し、不透過側のプロテオグリカン分画を精製する。なお、プロテオグリカン分画は、7 回水洗を行う。得られたプロテオグリカン濃縮液にリン酸緩衝液（pH6.8）を加えて正確に 20mL とし、0.45µm のメンブランフィルターでろ過した後、このろ液を試料溶液とする。なお、試料溶液の調製方法は、同等の回収率が得られる方法であれば、他の方法を代用可能である。

試料溶液及び標準溶液を次の操作条件で液体クロマトグラフィーにより試験を行い、検量線から本品中のプロテオグリカン量を求める。

操作条件

分析計：HPLC 分析装置

検出器：示差屈折計

カラム：ゲルろ過カラム（例えば、東ソー株式会社製、TSKgel G5000PWXL）

カラム管：内径約 7.8mm、長さ 30cm のステンレス管

カラム温度：40℃

移動相：リン酸緩衝液（pH6.8）

流量：0.5mL/分

(3) 定性試験

定量試験において得られた標準溶液のサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンのピークと同じ保持時間に見られる試料溶液のピークをサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンとして同定する。

作成日：2018年9月3日
依頼者：株式会社アイ・ピー・シー
作成者：一丸ファルコス株式会社

『サケ鼻軟骨由来プロテオグリカン』の定性分析について

機能性関与成分を含む原材料であるプロテオグリカン含有サケ鼻軟骨抽出物（以下、本品という。）は、サケ鼻軟骨から酢酸溶液から抽出して得られたものである。一方、プロテオグリカンは、動物種によりその大きさが異なることが報告され^{1~5)}、Kakizakiらにより、液体クロマトグラフィーにて種の異なるプロテオグリカンの分析を行い、ウシ鼻軟骨由来とサケ鼻軟骨由来のプロテオグリカンの分子量が異なることも示されている⁶⁾。

以上より、液体クロマトグラフィーにより、標準品としてサケ鼻軟骨由来プロテオグリカンを用いて、標準品と比較することで、本品の基原の確認を行うこととした。

(1) 試料溶液の調製

本品約10mgを精密に量り、リン酸緩衝液（pH6.8）を加えて正確に20mLとしたものを試料溶液とする。

(2) 標準溶液の調製

標準品約2mgを精密に量り、リン酸緩衝液（pH6.8）を加えて正確に10mLとする。この液を5mLとり、リン酸緩衝液（pH6.8）を加えて正確に10mLとしたものを比較用標準溶液とする。

(3) 標準品

プロテオグリカン サケ鼻軟骨由来（富士フィルム和光純薬株式会社製）は、室温減圧デシケーター（シリカゲル）で3時間乾燥し用いる。

(4) 測定方法

試料溶液及び標準溶液について0.45 μ mのメンブレンフィルターを通した後、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。

操作条件

分析計：HPLC 分析装置

検出器：示差屈折計

カラム：ゲルろ過カラム（例えば、東ソー株式会社製 TSKgel G5000PWXL）

カラム管：内径約7.8mm、長さ30cmのステンレス管

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：リン酸緩衝液（pH6.8）

流量：0.5mL/分

基原の確認試験

本品のクロマトグラムと標準品のクロマトグラムを比較し、同一保持時間に認められるピークを確認することにより、基原がサケであることを確認する。

- 1) Watanabe H. et al., Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem.* 1998,124,(4),687-693
- 2) Doege, K. et al., Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones. *J Biol Chem.* 1987,25,262,(36),17757-17767
- 3) Walcz, E. et al., Complete coding sequence, deduced primary structure, chromosomal localization, and structural analysis of murine aggrecan. *Genomics.* 1994,22, 364-371
- 4) Doege, K. et al., Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J. Biol. Chem.*1991, 266, 894-902
- 5) Li, H. et al., cDNA cloning of chick cartilage chondroitin sulfate (aggrecan) core protein and identification of a stop codon in the aggrecan gene associated with the chondrodystrophy, nanomelia. *J Biol Chem.* 1993,268,(31),23504-23511.
- 6) Kakizaki I. et al., Biochemical and atomic force microscopic characterization of salmon nasal cartilage proteoglycan. *Carbohydrate Polymers.* 2014,103,538-549.

標準溶液及び試料溶液のクロマトグラム

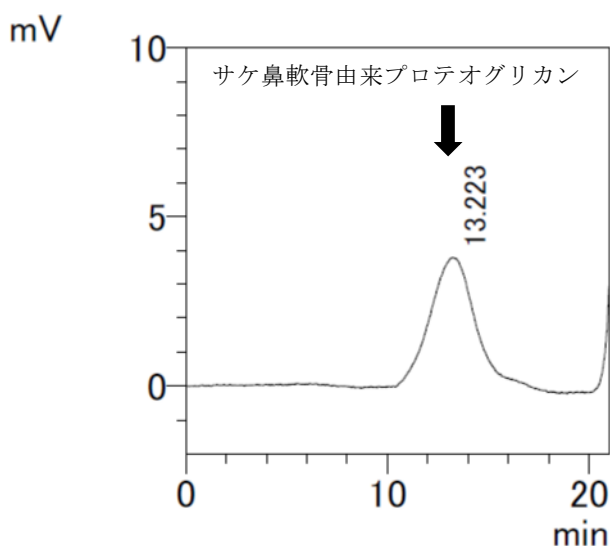


図1.標準溶液のクロマトグラム

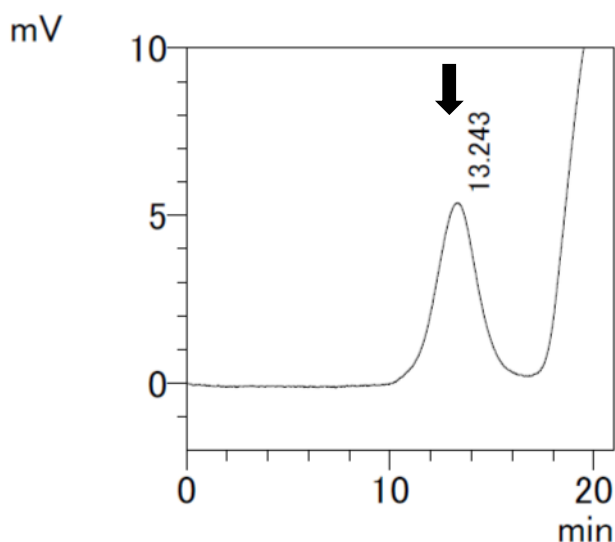


図2.試料溶液のクロマトグラム