

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の前処理過程における 除たんぱく法の検討

松永 宏子*, 平元 秀和*, 廣瀬 達也*

Study of Deproteinization Methods for High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

MATSUNAGA Hiroko*, HIRAMOTO Hidekazu* and HIROSE Tatsuya*

* Osaka Customs Laboratory, 4-11-28 Nankohigashi, Suminoe-ku, Osaka, 559-0031 Japan

In HPLC analysis, impurities contained in the sample cause column deterioration or damage, which may prevent accurate analysis, therefore appropriate pretreatment is required before analysis. Protein is one of the components that is said to prevent correct analysis. When analyzing foods containing protein, we need to deproteinize them. However, despite deproteinization, column pressure sometimes rises during HPLC analysis, and the reason for this may be that an appropriate deproteinization method has not been selected. Therefore, by measuring the amount of residual protein in HPLC test solutions with various deproteinizations, it is possible to visualize the effects of each method and select an appropriate method. In this study, we made various deproteinizations in test solutions prepared for HPLC, measured the amount of residual protein in them using ultraviolet absorption spectroscopy and compared the effects of deproteinization.

1. 緒 言

高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」という。）は、様々な化合物の定性及び定量に適した、汎用性の高い分析手法として知られている。税関でも様々な分析に使用されており、例えば、税関分析法 No.108「菓子類のしょ糖分の定量分析法」では、菓子類に含まれるしょ糖の定量法として HPLC を用いた分析法が規定されている。

HPLC による分析の際、試料中に含まれる夾雑成分が、カラム内部の充填剤（固相）に吸着することで、カラムの劣化や破損に繋がる可能性があるため、分析前に適切な前処理を実施する必要がある。HPLC による分析を阻害する原因とされる成分のひとつにたんぱく質があげられ、税関分析法においても分析実施前に除たんぱく処理を実施することが定められている。しかし、除たんぱく処理を施したにもかかわらず、HPLC による分析中にカラムの内圧が上昇することがある。その原因として、前処理において試料に応じた適切な除たんぱく処理の方法を選択できておらず、試料に残留するたんぱく質のカラムへの吸着などの可能性が考えられる。そのため、様々な除たんぱく処理を実施した HPLC 用の検液について、残留するたんぱく質の量を測定し、それぞれの除たんぱく処理の効果を可視化することができれば、分析試料に応じた適切な除たんぱく処理の方法を選択できる可能性がある。

たんぱく質の定量方法のひとつに、紫外線吸収スペクトル法¹⁾が挙げられる。この方法は、試料を測定用セルに入れ、紫外可視分光光度計により特定の波長における吸光度を測定することで、

その波長における吸収を持つ物質の定量が可能な簡便な測定方法である。

そこで本研究では、様々な除たんぱく処理を実施した検液について、紫外線吸収スペクトル法によりこれら検液の吸光度を測定し、検液に残留するたんぱく質を定量した。得られた定量結果について、除たんぱく処理の効果を比較したところ、いくつかの知見が得られたので報告する。

2. 実 験

2.1 試薬、試料及び器具

2.1.1 試薬

メタノール、エタノール、アセトニトリル、蒸留水：HPLC 用（キシダ化学）

しょ糖、硫酸亜鉛七水和物、水酸化バリウム八水和物、グリセリン（キシダ化学）

炭酸水素アンモニウム（富士フイルム和光純薬）

ラクトアルブミン（MP Biomedicals, Inc.）

2.1.2 試料

脱脂粉乳（国内市販品）

デキストリン（輸入品）

2.1.3 器具

メンブレンフィルター：DISMIC（25HP045AN）（アドバンテック）（孔径 0.45 μm）

* 大阪税関業務部分析部門 〒559-0031 大阪府大阪市住之江区南港東 4-11-28

遠心式フィルターユニット：ビバスピインターボ 4 3, 5, 10,
30, 50, 100 kDa (ザルトリウス)
アミコンウルトラ-4 10, 30, 50,
100 kDa (メルク)

2.2 装置及び測定条件

2.2.1 紫外可視分光光度計

装置：UV-1800 (島津製作所)

波長：280 nm

2.2.2 冷却高速遠心機

装置：H-9R (コクサン), アングルローター

2.3 実験

2.3.1 たんぱく質の定量方法の検討

検討に使用する HPLC 用試料溶液として、水溶性のたんぱく質であるラクトアルブミン 0.02 g を 200 mL 容メスフラスコに量り取り、蒸留水 (以下「水」とする.) で定容したものを検量線用原液とした。これを異なる 5 本の 200 mL 容メスフラスコにそれぞれ 5, 10, 15, 20, 25 mL ずつ量り取り、水で定容したものを用意した。検液中に存在するたんぱく質の定量方法を検討するため、紫外線吸収スペクトル法¹⁾によって、水溶性たんぱく質の定量が可能か確認した。たんぱく質が吸収を持つとされている波長はいくつかあり、今回はたんぱく質中に存在するトリプトファン、チロシン及びフェニルアラニン残基²⁾に由来する吸収を示す、波長 280 nm における吸光度による比較・検討を行った。

これらの検液について、以下の除タンパク処理を実施したのち、紫外可視分光光度計により、波長 280 nm における吸光度を測定した。

2.3.2 脱脂粉乳における除たんぱく処理方法の効果の比較

HPLC によるミルク調製品に含まれる糖類の定量分析における除たんぱく処理を想定し、それぞれの除たんぱく処理の効果と比較するため、分析試料に脱脂粉乳を用いて実験を行った。

なお、除たんぱく処理に使用する試薬の中には、波長 280 nm 付近において吸収を持つものがあるため、紫外可視分光光度計の対照セルには、ブランクとして使用する水に対しても脱脂粉乳と同様の操作を実施したものをを用意した。

脱脂粉乳の採取量は、除たんぱく処理を実施後の検液中の脱脂粉乳濃度が同一になるよう、除たんぱく処理の方法ごとに調製し、脱脂粉乳に水を加えた後は、超音波洗浄装置を使用して脱脂粉乳を溶解させた。また、HPLC による定量分析用の検液を想定し、内標準液として使用されることがある 0.1 g/mL グリセリン水溶液を加えたのち、水で定容した。

2.3.2(1) 有機溶媒による変性沈殿法^{3)~5)}

① 75 %有機溶媒による変性沈殿法：100 mL 容メスフラスコに脱脂粉乳 0.58 g を量り取り、水に溶解させ、0.1 g/mL グリセリン水溶液 (以下、「内標準液」という.) を 10 mL 加え、水で定容した。

脱脂粉乳水溶液とアセトニトリル、エタノール、メタノールを、

調製後の比率が、有機溶媒：脱脂粉乳水溶液 = 3 : 1 となるようにそれぞれ混合し、5 分間静置した。静置後、ろ紙 (No. 5C) 及びメンブレンフィルターにてろ過したものを、検液とした。

② 50 %有機溶媒による変性沈殿法：100 mL 容メスフラスコに脱脂粉乳 0.29 g を量り取り、①と同様の操作を実施した。

同じくアセトニトリル、エタノール、メタノールについて、有機溶媒：脱脂粉乳水溶液 = 1 : 1 となるようにそれぞれ混合し、①と同様の操作を実施したものを検液とした。

2.3.2(2) 金属イオンによる沈殿法

税関分析法 No.108「菓子類のしょ糖分の定量分析法」をもとに、操作を行った。

除たんぱく剤として、硫酸亜鉛七水和物 20 g を量り取り、1000 mL の蒸留水に溶解させたもの (硫酸亜鉛水溶液) 及び、水酸化バリウム八水和物 18 g を量り取り、1000 mL の蒸留水に溶解させたもの (水酸化バリウム水溶液) をそれぞれ調製した。

200 mL 容三角フラスコに、脱脂粉乳 0.145 g を量り取り、70 mL の水に溶解させ、内標準液を 10 mL 加えた。硫酸亜鉛水溶液及び水酸化バリウム水溶液をそれぞれ 10 mL ずつ加えてよく混合し、5 分間静置した。静置後、ろ紙 (No. 5C) 及びメンブレンフィルターにてろ過したものを、検液とした。

2.3.2(3) 炭酸水素アンモニウムによる塩析法⁶⁾

除たんぱく剤として、100 mL 容メスフラスコに炭酸水素アンモニウム 7.9 g を量り取り、水で定容したもの (1 mol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液) を調製した。

100 mL 容メスフラスコに脱脂粉乳 0.145 g を量り取り、水に溶解させ、1 mol/L 炭酸水素アンモニウム水溶液を 30 mL 加えてよく振とうしたのち、内標準液 10 mL を加えてよく混合し、水で定容した。混合液の一部をろ紙 (No. 5C) にて 50 mL 容三角フラスコにろ過し、沸騰水浴中で 5 分間加熱し、炭酸水素アンモニウムを除去した。室温程度になるまで放冷し、メンブレンフィルターにてろ過したものを、検液とした。

2.3.2(4) 加熱による変性法

100 mL 容メスフラスコに脱脂粉乳 0.145 g を量り取り、水に溶解させ、内標準液 10 mL を加えてよく混合し、水で定容した。混合液の一部をろ紙 (No. 5C) にて 50 mL 容三角フラスコにろ過し、沸騰水浴中で 5 分間加熱した。室温程度になるまで放冷し、メンブレンフィルターにてろ過したものを、検液とした。

2.3.2(5) 限外ろ過法

200 mL 容メスフラスコに脱脂粉乳 0.29 g を量り取り、水に溶解させ、内標準液を 20 mL 加え、水で定容した。2.1.3 の各遠心式フィルターユニットに、それぞれに混合溶液を 4 mL ずつ加え、ろ液が 3 mL 程度となるまで遠心分離を行い、得られたろ液を検液とした。遠心分離の条件を Table 1 に示す。

Table 1 Conditions of centrifugation (angle rotor)

Vivaspin Turbo4	NMWL (Da)	3,000	5,000	10,000	30,000	50,000	100,000
	Speed, Time	3,000 ×g, 90 min		3,000 ×g, 30 min			
Amicon Ultra-4	NMWL (Da)		10,000		30,000	50,000	100,000
	Speed, Time		3,000 ×g, 60 min		3,000 ×g, 30 min		

NMWL: Nominal Molecular Weight Limit

Temp : 20 °C

2.3.3 模擬試料における除たんぱく処理方法の効果の比較

実際に輸入されたミルク調製品の分析を想定し、模擬試料として過去に分析依頼のあった試料を参考に、しょ糖、脱脂粉乳、デキストリンを、68:29:3の割合で混合したものを調製した。本研究では、75%アセトニトリルによる変性沈殿法、金属イオンによる沈殿法、限外ろ過法を検討した。また、検液中の脱脂粉乳が2.3.2で調製した検液と同量になるように、模擬試料水溶液を調製した。

2.3.3(1) 75%アセトニトリルによる変性沈殿法

100 mL 容メスフラスコに模擬試料 2.0 g を量り取り、2.3.2(1)の①と同様の手順で模擬試料水溶液を調製した。

2.3.3(2) 金属イオンによる沈殿法

100 mL 容三角フラスコに模擬試料 0.50 g を量り取り、2.3.2(2)と同様の手順で模擬試料水溶液を調製した。

2.3.3(3) 限外ろ過法

200 mL 容メスフラスコに模擬試料 1.0 g を量り取り、2.3.2(5)と同様の手順で模擬試料水溶液を調製した。

3. 結果及び考察

3.1 たんぱく質の定量方法の検討

それぞれの濃度のラクトアルブミン水溶液の吸光度について、横軸にラクトアルブミンの濃度を、縦軸に波長 280 nm における吸光度をプロットして検量線を作成した。結果を Fig. 1 に示す。検量線の決定係数は 0.99 以上となったことから、今回の検討におけるたんぱく質の簡易的な定量方法として使用することにした。

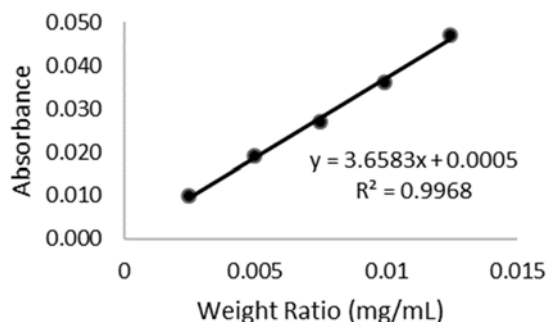


Fig.1 Calibration curve of Lactalbumin

3.2 脱脂粉乳における除たんぱく処理方法の効果の比較

それぞれの除たんぱく処理を実施した脱脂粉乳検液について、波長 280 nm における吸光度を測定した。結果を Table 2 に示す。

3.2.1 有機溶媒による変性沈殿法

本方法では、脱脂粉乳水溶液と有機溶媒を混合した際、①と②のいずれの場合においても混合液が白濁し、静置後は白色沈殿が生じるものの、混合液は白濁したままであった。特に 50%有機溶媒による除たんぱく処理を実施した場合においては、ろ過の際にろ紙やメンブレンフィルターが目詰まりし、除たんぱく処理に時間と手間を要した。①と②の検液を測定した結果、いずれの有機溶媒においても有機溶媒の割合が高い方が、吸光度が小さくなった。また、50%アセトニトリルによる除たんぱく処理を実施したものについては、他の有機溶媒による除たんぱく処理を実施したものより、吸光度が大きくなった。

3.2.2 金属イオンによる沈殿法

本方法は、今回の検討の中で、最も吸光度が小さくなったことから、脱脂粉乳に対しては金属イオンによる沈殿法が、最も除たんぱく効果が高いと考えられる。

3.2.3 炭酸水素アンモニウムによる塩析法

本方法は、他の除たんぱく処理の方法に比べ、吸光度が大きい結果となった。脱脂粉乳水溶液に炭酸水素アンモニウム水溶液を加えたところ、混合液は黄色く濁り、沈殿を生じた。その後ろ過や加熱処理を行ったが混合液は黄色いままであった。

3.2.4 加熱による変性法

本方法は、今回検討した除たんぱく処理の方法の中で、最も吸光度が大きかった。原因として、加熱前後で溶液の色に変化が無く、ろ過にも時間を要したことから、検液中にたんぱく質又はその他の夾雑物が残留していると考えられる。

3.2.1 から 3.2.4 までの方法は、たんぱく質を変性させる方法であることから、吸光度が大きいものについては、検液中から変性したたんぱく質を除去しきれない可能性が考えられる。上記の方法と遠心分離を組み合わせることで、除たんぱく効果が高まる可能性があるため、今後さらに検討する必要がある。

3.2.5 限外ろ過法

本方法は、概ね同程度の吸光度を示したが、アミコンウルトラ-4 の公称分画分子量 100,000Da の遠心式フィルターユニットでは、吸光度が大きくなった。牛乳に含まれるたんぱく質の分子量は約 14,000 から 76,000 との報告があり⁷⁾、公称分画分子量 100,000Da のフィルターユニットでは、たんぱく質を除去しきれなかった可能性が原因として考えられる。

以上の結果から、除たんぱく処理方法の違いにより脱脂粉乳水溶液の吸光度に差がみられたことから、脱脂粉乳に対する除たんぱく効果に差があると考えられる。

3.3 模擬試料による除たんぱく法の効果の比較

75%アセトニトリルによる変性沈殿法、金属イオンによる沈殿

法, 限外ろ過法を実施した模擬試料検液について, 波長 280 nm における吸光度を測定した. 結果を Table 3 に示す.

脱脂粉乳に対して除たんぱく処理を行った際の吸光度は, 吸光度の値が大きい順から限外ろ過法, 75 %アセトニトリルによる変性沈殿法, 金属イオンによる沈殿法であったが, 模擬試料に対して除たんぱく処理を行った場合は, 75 %アセトニトリルによる変性沈殿法が最も吸光度が大きくなった. これは, 有機溶媒を添加したため高分子成分が析出し, 溶液中で光の散乱が発生することで吸光度が大きくなった可能性が考えられる.

また, 脱脂粉乳と模擬試料を使用した場合で, 除たんぱく処理ごとの吸光度の差があったことから, 試料によって有効な除たんぱく処理の方法が異なる可能性があると考えられる.

Table 2 Absorbance of deproteinized test solutions containing skimmed milk

Method of deproteinization		Absorbance
Acetonitrile	50%	0.544
	75%	0.165
Ethanol	50%	0.271
	75%	0.197
Methanol	50%	0.240
	75%	0.211
Cation (zinc sulfate + barium hydroxide)		0.137
Salting out		0.750
Heating		0.809
Ultrafiltration 1 (Sartorius Vivaspin Turbo4)	3,000Da	0.204
	5,000Da	0.218
	10,000Da	0.200
	30,000Da	0.218
	50,000Da	0.204
	100,000Da	0.220
Ultrafiltration 2 (Merck Amicon Ultra-4)	10,000Da	0.217
	30,000Da	0.227
	50,000Da	0.241
	100,000Da	0.311

Table 3 Absorbance of deproteinized test solutions containing simulated sample

Method of deproteinization		Absorbance
Acetonitrile (75 %)		0.717
Cation (zinc sulfate + barium hydroxide)		0.096
Ultrafiltration 1 (Sartorius Vivaspin Turbo4)	10,000Da	0.160
	30,000Da	0.160
	50,000Da	0.156
	100,000Da	0.178
Ultrafiltration 2 (Merck Amicon Ultra-4)	30,000Da	0.172
	50,000Da	0.189
	100,000Da	0.249

4. 要 約

本研究では, 様々な除たんぱく処理を行った脱脂粉乳及び模擬試料検液について, 紫外可視分光光度計を用いて波長 280 nm における吸光度を測定することにより, それぞれの除たんぱく処理の方法の効果について検討した.

まず, 異なる濃度のラクトアルブミン水溶液を用いて, 紫外可視分光光度計にて波長 280 nm における吸光度を測定し, 検量線を作成したところ, 決定係数 0.99 以上となる, 良好な直線性を示した.

続いて, HPLC によるミルク調製品の定量の際の除たんぱく処理を想定し, 脱脂粉乳水溶液に対して様々な除たんぱく処理を実施した検液の, 280 nm における吸光度を測定し, 検液中に残留するたんぱく質の量を比較した. 測定の結果, 除たんぱく処理の方法ごとに吸光度に差が見られ, 脱脂粉乳検液では, 金属イオンによる沈殿法が最も吸光度が小さくなった.

また, 模擬試料としてしょ糖, 脱脂粉乳, デキストリンを混合したものについては, 75 %アセトニトリルによる変性沈殿法が最も吸光度が大きくなった. 脱脂粉乳で検討した場合と比較し, 除たんぱく処理ごとに吸光度の差があったため, 脱脂粉乳と模擬試料において, 有効な除たんぱく処理の方法が異なる可能性が示唆された.

文 献

- 菅原潔, 副島正美: “生物化学実験法 7 蛋白質の定量法・第3版”, P.131 (1990),(学会出版センター).
- 菅原潔, 副島正美: “化学と生物”, Vol.4, No.1, P.37 (1966),(日本農芸化学会).
- 増田靖子, 徳島將光, 五十嵐智大, 松本啓嗣: 関税中央分析所報, **60**, P11 (2020).
- 中村洋: “分析試料前処理ハンドブック”, P.179 (2003),(丸善).
- 日本分析化学会関東支部: “高速液体クロマトグラフィーハンドブック”, P.236 (2000),(丸善).
- 小川浩史, 馬越秀一, 松本啓嗣: 関税中央分析所報, **61**, P13 (2020).
- 清澤功: “玉川大学農学部研究報告”, p47 (2002),(玉川大学農学部).