

5'-リボヌクレオチド調味料に含まれる ヌクレオチドのイオン交換クロマトグラ フィによる分離と定量

Separation and Determination of Nucleotides Contained in
5'-Ribonucleotide Seasoning by Ion Exchange Chromatography

大 山 重 信
Shigenobu OYAMA

(Received November 20, 1974)

Separation of the nucleotides in "ribotide" (one of 5'-ribonucleotide seasonings) was attempted by ion exchange chromatography using Cl-form resin.

Three main peaks in chromatogram were identified as CMP, GMP, and IMP, respectively. Inorganic phosphoric acid, CMP, GMP, and IMP, were separated successfully without overlapping one another in their eluted positions in chromatogram.

The contents of GMPNa_2 and IMPNa_2 in "ribotide" were 31% and 39%, respectively.

I 緒 言

昭和35年9月に5'- IMPNa_2 を食品添加物として使用することが厚生省令によって許可され、さらに昭和36年6月に5'- GMPNa_2 の使用も許可され、以来リボヌクレオチドを含む調味料は各家庭において馴染の深いものになっている。調味料としてのリボヌクレオチドの製法には種々あるようであるが、¹⁾一方法をごく簡単に紹介するならば、培養した酵母からリボ核酸を抽出し、これを加水分解して5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP, 5'-UMPとし、これらのうち

本文中では次の略号を使用した。

AMP ; adenosine monophosphate

GMP ; guanosine monophosphate

CMP ; cytidine monophosphate

UMP ; uridine monophosphate

PCA ; perchloric acid

5'-AMPにはデアミナーゼを作用させて、5'-IMP に変えてから、それぞれをナトリウム塩として結晶状に得るのである。これら4種のヌクレオチドナトリウム塩のうち旨味を有し調味料として特に有用なものは言うまでもなく 5'-IMPNa₂ と 5'-GMPNa₂ とである。この両者または片方を含む調味料は数種発売されているが“リボタイド”もその1種である。

食品中に含まれる 5'-IMP と 5'-GMP との定量を主目的とした研究としては Bergkvist²⁾らのformate 型イオン交換樹脂を用いる方法を改変した中島らの方法、富山らの 5'-nucleotidase³⁾による方法、活性炭とイオン交換樹脂とを組み合わせる方法などがあるが、筆者は“リボタイド”に含まれるヌクレオチドのC₁₂型樹脂による分画について若干の検討を行なってみたので、その結果について述べることにする。

II 実験方法

1. 試料

“リボタイド”（武田薬品工業製）を水または6%PCA溶液に溶解して用いた。

2. イオン交換樹脂

Dowex 1, X 2, 200-400 mesh を常法により活性化してC₁₂型としたものを内径1.4 cmのカラムに充填して用いた。

3. 溶出

Cohn-Carter⁶⁾の方法をもとにしてHCl-NaCl系の溶出剤を用い、0.7ml/minの流速で溶出した。溶出液は5mlずつ分取して260mμにおける吸光度を分光光度計により測定して溶出図を作製した。

4. 紫外吸収曲線によるヌクレオシドと塩基の同定

クロマトグラム中のピークに相当する部分は、次のようにしてその中に含まれる物質のヌクレオシド名および塩基名を求めた。すなわち、溶出液のpHを苛性ソーダまたは塩酸溶液で酸性、中性およびアルカリ性として紫外吸収曲線を求め、プリン系のヌクレオシドであるかあるいはピリミジン系のものであるかを判定した。ついでプリン系と思われるものは塩酸濃度が1Nになるように濃塩酸を加え100℃、1時間加水分解した後、1N塩酸濃度のままで紫外吸収曲線を求め、その後さらに苛性ソーダまたは塩酸でpHを中性およびアルカリ性として吸収曲線を求めた。他方、ピリミジン系と思われるものは減圧濃縮して乾固した後、60%PCAを加えて100℃、1時間加水分解した後60%PCA溶液のままで紫外吸収曲線を求め、その後さらにpHを中性としたアルカリ性として吸収曲線を求めた。

このようにして求めた吸収曲線を文献記載⁷⁾のものと比較してヌクレオシドおよび塩基名を判定した。

5. ペントース（リボース）の定量

Mejbaum の方法を Albaum⁸⁾ らおよび Leuthardt⁹⁾ らが改変した方法によって定量した。すなわち、試料 2 mℓ に 0.1%鉄明バンの塩酸溶液 2 mℓ，10%オルシンの95%エタノール溶液 0.2 mℓ を加え，沸騰水浴中で45分間加熱し，冷却後全量を 5 mℓ として 662.5 mμ における吸光度を測定した。標準曲線は 5'-AMP を用いて作製した。

6. 磷の定量

Bartlett の方法¹⁰⁾ に準じて行なった。

1) 全磷の定量

試料に濃硫酸および過酸化水素水を加えて加熱し，完全に酸化分解した後，モリブデン酸アンモニウム溶液および還元試薬を加え，沸騰水浴中で加熱後冷却して一定容とし，820mμ における吸光度を測定した。標準曲線は KH_2PO_4 を用いて作製した。

1) Acib-labile 磷の定量

前記の全磷定量操作中の硫酸および過酸化水素水による酸化分解を省き，他はまったく同様に行なった。

7. 分子吸光係数

シチジンは 6,800 (pH 2, 260 mμ)，グアノシンは 11,800 (pH 2, 260 mμ)，イノシンは 12,800 (pH 6, 250 mμ) および 7,400 (pH 2, 260 mμ) とした。

III 実験結果および考察

“リボタイド” 15mg を 6%PCA 22.5 mℓ に溶解したものを氷水で冷却しながら苛性カリを徐々に加え，生じた沈澱を汙過して得られた汙液に水を加え，全量を 100 mℓ とした後アンモニア水で pH 8.6 に調整してからイオン交換樹脂に吸着させた。樹脂柱の高さは最初 16cm であったが，試料液を吸着させた後では 11.9cm となり，そのうち吸着帯は 2.7cm を占めていた。これを Cohn-Carter 法に準じて溶出し，溶出液の E_{260} 値を測定してクロマトグラムを作製すると Fig. 1 に示すようになった。この図に幾つかのピークが見られるが，その主なるものはピーク 1，2 および 3 であり，そのうち 2 と 3 は極めて接近して溶出された。

このピーク 2 と 3 とを完全に分離するためには，樹脂量を増加させるかまたは溶出剤の一部を改変すればよいと考えられるので，後者の方法により 2 と 3 との分離を試みるとともに溶出の簡便化を図ることとした。

そのため数回実験を繰返して検討した結果，溶出剤としては Fig. 1 で用いた溶出剤のうち 0.01M NH_4Cl in 0.1M NH_4OH および 0.01M NH_4Cl の使用を省略した。また，0.003 M HCl と 0.01M HCl in 0.02M NaCl との中間に 0.01M HCl を用いることとした。

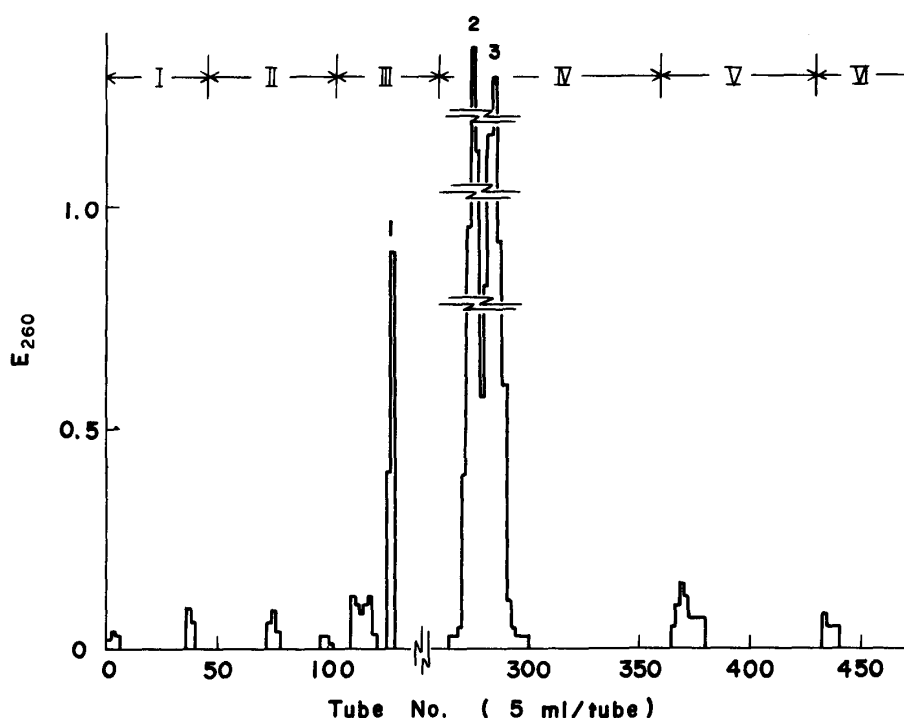


Fig. 1. Ion exchange chromatogram of "ribotide".

Resin ; Dowex 1, X 2, 200-400 mesh, Cl-form.

Column ; Diameter, 1.4cm. Height, 16cm.

Sample ; "Ribotide" 15mg in 6 % PCA solution. PCA in the sample solution was precipitated as K-PCA and eliminated by filtration. The pH value of filtrate was adjusted to 8.6 with ammonia water, and then the filtrate was adsorbed on to the column.

Eluents ; I, 0.01M NH_4Cl in 0.1M NH_4OH .

II, 0.01M NH_4Cl .

III, 0.003M HCl .

IV, 0.01M HCl in 0.2M NaCl

V, 0.01M HCl in 0.2M NaCl .

VI, 1M HCl .

Flow rate ; 0.7ml/min.

このように溶出剤を改変した後、試料として“リボタイド” 0.1mg/mlの水溶液50mlを用い、これをアンモニア水で pH 8.6としてから樹脂柱の高さ10cmのカラムに吸着させ（試料吸着後の樹脂柱の高さは 9.5cm）、溶出した場合のクロマトグラムの模様はFig. 2のようになり、ピー

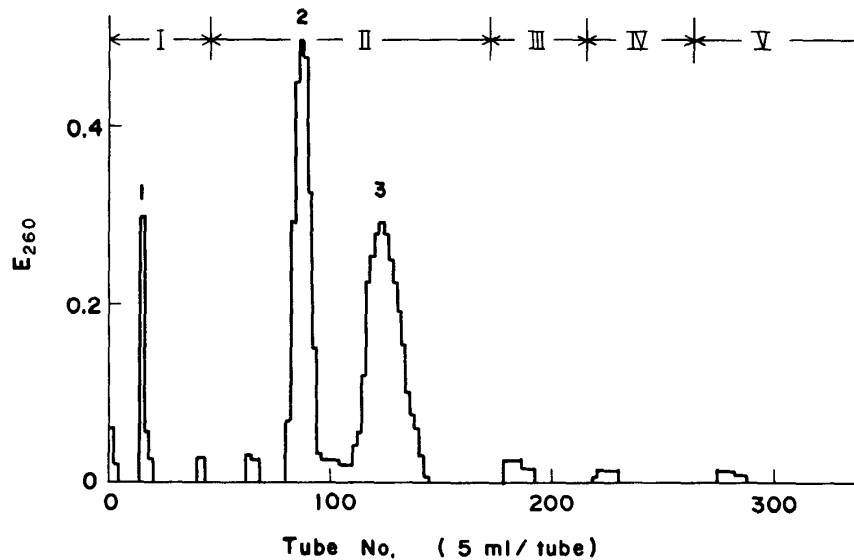


Fig. 2. Ion exchange chromatogram of "ribotide".

Resin ; Dowex 1, X 2, 200-400 mesh, C 1-form.

Column ; Diameter, 1.4cm. Height, 10cm.

Sample ; "Ribotide" 5 mg in water. The pH value of the sample solution adjusted to 8.6 with ammonia water, and then the solution was adsorbed on to the column.

Eluents ; I, 0.003M HC 1.

II, 0.01M HC 1.

III, 0.01M HC 1 in 0.02M NaC 1.

IV, 0.01M HC 1 in 0.2M NaC 1.

V, 1 M HC 1.

Flow rate ; 0.7ml / min.

クはそれぞれ完全に分離された。

しかし、もしこれらのピークの位置と無機燐の溶出位置とが重なれば、同定のためには不都合であるので、“リボタイド”水溶液試料中に無機燐(KH_2PO_4)をPとして $150\mu\text{g}$ 添加して樹脂に吸着、溶出を行なったところ、無機燐はFig. 2における Tube No. 63-76の位置に溶出され、その回収率は105.9%となり、無機燐の溶出位置と E_{260} 値からのピークの位置とは重複しないことが確認された。

Fig. 2におけるピーク1-3についてそれぞれ紫外外部吸収曲線を調べるとともにペントース、

acid-labile 燐，全燐量を測定し，この測定値と吸光度から分子吸光係数に基づいて求めた理論値とを比較し，理論値に対する測定値のモル比を計算することによって同定した結果は次のようであった。

すなわち，ピーク 1 の紫外外部吸収曲線はヌクレオシドとしてはシチジン，塩基としてはシトシンであることを示した。ペントース，燐量を測定したところ， acid-labile 燐はほとんど存在せず，またペントースの測定値がきわめて低く，CMP と仮定した場合，理論値に対するペントース： acid-labile 燐：全燐のモル比は 0.03：0：1.01 となった。オルシン—塩酸法ではプリン塩基に結合しているペントースだけが定量され，ピリミジン塩基に結合しているペントースは定量されないで，このピーク 1 の場合ペントースの低量値が低いのは当然であろう。よってピーク 1 は CMP と判定された，

ピーク 2 の紫外外部吸収曲線はヌクレオシドとしてグアノシン，塩基としてはグアニンであることを示していた。よってこれを GMP と仮定した場合，理論値に対する測定値のモル比は 0.94：0：0.90 となったので GMP と判定された。

ピーク 3 の紫外外部吸収曲線はイノシンおよびヒポキサンチンであることを示していた。よって IMP と仮定するとその理論値に対する測定値のモル比は 1.13：0：0.95 となり，IMP と判定された。

Table 1 は以上のような測定結果をまとめて示したものである。

ピーク 2 および 3 についてクロマトグラム中の各フラクションの吸光度を合計して GMP および IMP の“リボタイド”中における含量を計算すると GMPNa_2 として 31%， IMPNa_2 として 39% であり，両者の合計は 70% となった。

Table 1. Data of analysis of the fractions separated by ion exchange chromatography of "ribotide".

Fraction		1	2	3
Spectral type	Nucleoside	Cytidine	Guanosine	Inosine
	Base	Cytosine	Guanine	Hypoxanthine
Molar ratio to base	Pentose	0.03	0.94	1.13
	Acid-labile P	0	0	0
	Total P	1.01	0.90	0.95
Identification		CMP	GMP	IMP

VI 要 約

リボヌクレチオド調味量の1種である“リボタイド”を試料として、その中に含まれるヌクレオチドをC ℓ 型イオン交換樹脂を用いHC ℓ -NaC ℓ 系溶出剤によって分離することを試み、無機燐、CMP、GMP、IMPをそれぞれ完全に分離できることを明らかにした。

文 献

- 1) 緒方浩一：リボタイド文献集, p. 1, 武田薬品工業K. K. 食品事業部 (1964)
- 2) R. Bergkvist and A. Deutch : *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1877 (1954)
- 3) 中島宜郎, 市川恒平, 鎌田政喜, 藤田栄一郎：農化., **35**, 797, 803 (1962)
- 4) 富山哲夫, 北原慶子, 阿部大蔵：日本水産学会秋季大会発表 (於長崎) (1962)
- 5) 富山哲夫, 大山重信, 阿部大蔵：日本水産学会秋季大会発表 (1962)
- 6) W. E. Cohn and C. E. Carter : *JACS.*, **72**, 4293 (1950)
- 7) E. Chargaff and J. N. Davidson : *The Nucleic acids*, Academic Press Inc., New York (1955)
- 8) H. G. Albaum and W. W. Umbreit : *J. B. C.*, **167**, 369 (1947)
- 9) F. Leuthardt and B. Exer : *Helv. Chim. Acta*, **36**, 507 (1955)
- 10) G. R. Bartlett : *J. B. C.*, **234**, 466 (1958)