

58 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び 5'-リボヌクレオチドカルシウム

Disodium 5'-Ribonucleotide and Calcium 5'-Ribonucleotide

別名：5'-リボヌクレオチドナトリウム又は5'-リボヌクレオチド
ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウム

1. 試験法の概要

食品中の5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムは、5'-リボヌクレオチドの構成成分である5'-イノシン酸、5'-グアニル酸、5'-シチジル酸及び5'-ウリジル酸をそれぞれ測定する液体クロマトグラフィーにより、5'-リボヌクレオチドナトリウムとして定量する。必要があれば分子量比を乗じて5'-リボヌクレオチドカルシウムの量として求める。食品中には天然の5'-リボヌクレオチドが分布している場合もある。したがって、検体中にこれらの食品を素材として含有する場合には、定量値は素材由来の5'-リボヌクレオチドと添加されたものとの合計値である。

2. 試験法（液体クロマトグラフィー）

（1） 検体の採取と試料の調製

一般試料採取法を準用する。

（2） 試料溶液の調製

① 水溶性食品

5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムとして2~10mgに対応する、通常、20g以下の試料の量を精密に量り、水を加えて約90mlとし、塩酸（19→200）を加えてpHを約2¹⁾に調整した後、水を加えて正確に100mlとし、試料溶液とする。

② 水不溶性食品

5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムとして2~10mgに対応する、通常、20g以下の試料の量を精密に量り、過塩素酸溶液（2→25）²⁾30mlを加えてホモジナイズした後、遠心管に入れ、遠心分離（冷却下、10分間、10,000回転/分）して上澄液を分取する³⁾。残留物に過塩素酸溶液（2→25）30mlずつを加えて同様の操作を2回繰り返

し、全上澄液を合わせ、過塩素酸溶液 (2 → 25) を加えて正確に 100ml とし、試料溶液とする⁴⁾。

(3) 試料液の調製

試料溶液 Vml⁵⁾ を正確に量り、あらかじめ用意した活性炭カラムを通過させ、更に水約 20ml を通過させて洗浄する⁶⁾。次にアンモニア水の溶液 (1 → 10)⁷⁾ 20ml を流速約 0.5ml/分 で通過させ、流出液を集め、水浴上で蒸発乾固する⁸⁾。これに水 30ml⁹⁾ を正確に量って加え、振り混ぜた後、活性炭処理液とする。

活性炭処理液 1ml ずつを正確に量り、それぞれ 2 本の試験管に入れ、一方に酵素液 0.2ml、他方に硫酸マグネシウム・トリス緩衝液 0.2ml をそれぞれ正確に量って加え、37°C の恒温水槽中で 60 分間保つ¹⁰⁾。この液を常温まで冷却し、それぞれ試料液 A, B とする。

(4) 標準液の調製

5'-イノシン酸二ナトリウム (I) 及び 5'-グアニル酸二ナトリウム (G) それぞれ 0.250g ずつを正確に量り、合わせ、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、IG 液とする。

別に、5'-シチジル酸二ナトリウム (C) 及び 5'-ウリジル酸二ナトリウム (U) それぞれ 0.250g ずつを正確に量り、合わせ、水を加えて溶かして正確に 100ml とし、この液 10ml を正確に量り、水を加えて正確に 100ml とし、CU 液とする。

IG 液及び CU 液それぞれ 2ml ずつを正確に量って合わせ、水を加えて正確に 100ml とし、標準液¹¹⁾ とする (この液 1ml は、I 及び G を 50 μ g ずつ、C 及び U を 5 μ g ずつ含む)。

標準液 1ml ずつを正確に量り、それぞれ 2 本の試験管に入れ、(3) 試料液の調製における活性炭処理液と同様に以下の操作を行い、それぞれ標準測定液 A_S, B_S とする。

(5) 測定法

① 測定条件

液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充てん剤：多孔性強塩基性陰イオン交換樹脂

カラム管：内径 4.6mm, 長さ 250mm

カラム温度：60°C

移動相：1.5mol/l 酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液 (pH3.4)

流速及び圧力：1.5ml/分, 約 70kg/cm²

測定波長：254nm¹²⁾

② 定量^{13), 14)}

標準測定液 A_S, B_S 及び試料液 A, B それぞれ 5 μ l ずつを正確に量り、それぞれを液体クロ

マトグラフに注入し、得られたそれぞれのクロマトグラムから I, G, C 及び U のピーク高さ¹⁵⁾を求め、次式によって検体中の I, G, C 及び U 含量 (g/kg) を求める¹⁶⁾。

$$5\text{-イノシン酸二ナトリウム含量 (g/kg)} : I = \frac{3S_I(B_I - A_I)}{WV(B_{SI} - A_{SI})}$$

$$5\text{-グアニル酸二ナトリウム含量 (g/kg)} : G = \frac{3S_G(B_G - A_G)}{WV(B_{SG} - A_{SG})}$$

$$5\text{-シチジル酸二ナトリウム含量 (g/kg)} : C = \frac{3S_C(B_C - A_C)}{WV(B_{SC} - A_{SC})}$$

$$5\text{-ウリジル酸二ナトリウム含量 (g/kg)} : U = \frac{3S_U(B_U - A_U)}{WV(B_{SU} - A_{SU})}$$

S_I, S_G, S_C, S_U : 標準液中の I, G, C, U それぞれの濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

V : 試料溶液の採取量 (ml)

$A_{SI}, A_{SG}, A_{SC}, A_{SU}$: 標準測定液 A_S で得られたクロマトグラムの I, G, C, U それぞれのピーク高さ

$B_{SI}, B_{SG}, B_{SC}, B_{SU}$: 標準測定液 B_S で得られたクロマトグラムの I, G, C, U それぞれのピーク高さ

A_I, A_G, A_C, A_U : 試料液 A で得られたクロマトグラムの I, G, C, U それぞれのピーク高さ

B_I, B_G, B_C, B_U : 試料液 B で得られたクロマトグラムの I, G, C, U それぞれのピーク高さ

$$5\text{-リボヌクレオチド二ナトリウム含量 (g/kg)} = I + G + C + U$$

$$5\text{-リボヌクレオチドカルシウム含量 (g/kg)} = 5\text{-リボヌクレオチド二ナトリウム含量 (g/kg)} \times 0.985^{17)}$$

試薬・試液等

1. アデノシン-5'-リン酸二ナトリウム : 市販品を用いる。
2. アンモニア水 : [比重約 0.90, 特級]
3. エタノール : [99.5v/v %, 特級]
4. エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム : [特級]
5. 過塩素酸 : [60 %, 特級]
6. 活性炭 : 市販のクロマトグラフ用を次の方法で精製して用いる¹⁸⁾。標準網フルイ 105~250 μm の粒度のもの 200g を採り、塩酸溶液 (19 → 200) 1,500ml を加えて 30 分間かき混ぜた後、ろ過する。次に水 1,000ml を加えて 30 分間かき混ぜた後、ろ過する。これにアンモニア・エタノール混液 (アンモニア水・水・エタノール (1 : 9 : 10)) 1,500ml を加え、

- 30分間かき混ぜた後、ろ過する。更に水1,000mlずつとアンモニア・エタノール混液1,500mlずつを用い、上記の操作を2回繰り返す。これにエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液(0.372→1,000)1,000mlを加え、30分間かき混ぜた後、ろ過し、更に水を加えて洗液が中性になるまで洗浄を繰り返す。風乾して保存する。
7. 活性炭カラム：ガラス製カラム(図54-1)の下端に少量の脱脂綿を詰め、カラムの半分くらいまで水を溜めておき、10倍量の水に懸濁した活性炭約300mg¹⁹⁾をカラムに注入し、活性炭が沈降してから少量の脱脂綿で上部を軽く押さえ、水を流出させ、更に塩酸(1→1,000)約30mlを通過させた後、用いる。
 8. 酵素(5'-ヌクレオチダーゼ)：市販品として、蛇毒由来のものが入手できる。また、*Brevibacterium*, *Streptomyces*等の微生物の5'-ヌクレオチダーゼが簡単な精製操作によって得られ、本法に使用できる。
 9. 酵素液：酵素(5'-ヌクレオチダーゼ)1.0~1.25単位(I.U.B.酵素委員会による単位,1単位：基質アデノシン-5'-リン酸二ナトリウム, pH7.5で37°C,1分間に1 μ molの無機リン酸を生ずる酵素量)及び硫酸マグネシウム123.2mgに0.5mol/lトリス緩衝液(pH7.5)5mlを加えて溶かす。
 10. 0.5mol/lトリス緩衝液(pH7.5)：トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン60.6gに水約500mlを加えて溶かし、塩酸を用いてpHを7.5に調整した後、水を加えて全量を1,000mlとする。
 11. 硫酸マグネシウム・トリス緩衝液：硫酸マグネシウム123.2mgに0.5mol/lトリス緩衝液(pH7.5)5mlを加えて溶かす。
 12. トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン：市販の特級品を用いる。
 13. 硫酸マグネシウム：[特級]
 14. 酢酸アンモニウム：[特級]
 15. 1.5mol/l酢酸・酢酸アンモニウム緩衝液(pH3.4)：氷酢酸90.0gを正確に量り、水を加えて正確に1,000mlとし、A液とする。酢酸アンモニウム115.5gを正確に量り、水を加えて溶かして正確に1,000mlとし、B液とする。A液1,000mlにB液を加えてpHを3.4に調整し、メンブランフィルター(孔径0.45 μ m)でろ過する²⁰⁾。

[注]

- 1) 5'-リボヌクレオチドはpH2付近で活性炭に最も吸着されやすい。
- 2) 試料中のタンパク質等の分解をよくする目的で過塩素酸溶液を用いる。ホモジナイザー等はステンレス製を用いる。
- 3) 油脂含量の多い食品では、遠心分離したとき、油脂が遠心管の上層部に分離してくるので、上澄液に油脂が混入しないように駒込ピペットなどで上澄液を取り出す。必要に応じてセライト層でろ過する。

- 4) 水不溶性食品から5'-リボヌクレオチド二ナトリウムを抽出するために、熱水を用いてもよい。
- 5) 通常は10mlを用いるが、5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムとして0.5~1mgを含むように試料溶液量を増減させることが望ましい。
- 6) 洗浄液のpHが中性付近になるように必要により更に水で洗浄してもよい。
- 7) 活性炭からの5'-リボヌクレオチドの流出液としては、アンモニア水の溶液(1→20)、アンモニア・エタノール混液、アンモニア・*n*-ブタノール・エタノール混液(アンモニア水・水・*n*-ブタノール・エタノール(7:43:5:45))等も用いられる。アンモニア水の溶液に比較してアンモニア・アルコール系混液では活性炭に吸着された食品の褐変物が5'-リボヌクレオチドと共に溶出されやすい。
- 8) 水浴上で蒸発乾固する方法又はロータリーエバポレーターを使用する方法いずれを用いてもよい。この操作では硬質ガラス製の器具を用いる。
- 9) 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム含量が少なければ、水10mlを用いてもよい。その場合には、定量の計算式で3を掛けない。
- 10) この条件での酵素反応は30分間でほぼ終了する。酵素量は一般にはここで用いた量の1/5~1/10でも十分であるが、酵素量が少ないと、アデノシン-5'-二リン酸(ADP)等が共存する試料では、酵素反応が阻害されることがある。ここで用いられる酵素量では、ADPが5'-リボヌクレオチドと同程度又は若干多く含まれても問題はない。
- 11) 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムはI, G, C, Uの4成分の混合物であるが、I, G含量に比較してC, U含量は非常に少ないので、本液の組成を標準液とした。本液は冷蔵庫で1週間程度保存できる。
- 12) 5'-シチジル酸二ナトリウムの場合には、280nmの測定波長を用いると約2倍の感度が得られる。
- 13) 5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムの各成分は、C, U, I及びGの順で溶出する。標準液B_sのクロマトグラムでは上記4成分がピークとして得られる。しかし標準液A_sでは4成分のピークが消失する。
試料液Bでは、C, U, I及びGのピークのほかに多数の妨害ピークが、とくにCの溶出位置付近に出現する。標準液B_sとピークの保持時間が一致し、かつ試料液Aで消失したピークをそれぞれC, U, I及びGのピークとする。なお、目的とするピークが小さすぎる場合には、サンプル注入量を100 μ lまで増量する。
- 14) 妨害物質が少ない試料の場合には、酵素反応を省略して活性炭処理液をそのまま試料液とすることができる。この場合も標準測定液には標準液を用いる。
妨害物質がとくに存在しない場合には、熱水で抽出した抽出液をそのまま試料液とすることもできる。この場合も標準測定液には標準液を用いる。
- 15) クロマトグラムは鋭いピークとして得られるので、通常、ピーク高さを求めるが、面積法でもよい。
- 16) 13)でも述べたように、標準測定液A_sのクロマトグラムではI, G, C及びUのピークは完全に消失するので、通常A_{SI}, A_{SG}, A_{SC}及びA_{SU}の値はゼロとなる。また、試料液Aでも妨害ピークが少ないとA_I, A_G, A_C及びA_Uの値はゼロとなる。
- 17) 無水の5'-リボヌクレオチドカルシウムと無水の5'-リボヌクレオチド二ナトリウムの分子量比である。5'-リボヌクレオチド二ナトリウム及び5'-リボヌクレオチドカルシウムにはイノシン酸、グアニル酸、シチジル酸、ウリジル酸のナトリウム又はカルシウム塩が含まれているが、このうち、イノシン酸及びグアニル酸で95%以上を占めることになっている。無水の5'-イノシン酸二ナトリウムと5'-イノシン酸カルシウムの分子量比、無水の5'-グアニル酸二ナトリウ

ムと 5'-グアニル酸カルシウムの分子量比は共に 0.985 となる。

- 18) 活性炭の精製法として、活性化して吸着能を上げるよりも吸着能を低下させ、いったん吸着した 5'-リボヌクレオチドが定量的に脱離、溶出されるようにしてある。
- 19) しょう油のように褐変物質の多い検体の場合には、活性炭を 400~600mg に増量する。
- 20) 液体クロマトグラフィーで使用される充てん剤は微粒子であるため、液中の微細な浮遊物で目詰まりを起こす。それを防止する目的でフィルターを通してろ過する。