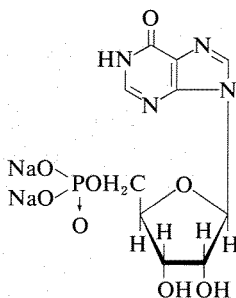


54 5'-イノシン酸二ナトリウム

Disodium 5'-Inosinate

別名：5'-イノシン酸ナトリウム

 $C_{10}H_{11}N_4Na_2O_5P$: 392.17

1. 試験法の概要

食品中の5'-イノシン酸二ナトリウムは、液体クロマトグラフィーにより定量する。獣鳥肉や魚肉中には、天然の5'-イノシン酸が分布している。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'-イノシン酸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¹⁾。

(2) 試料溶液の調製

① 水溶性食品

5'-イノシン酸二ナトリウムとして1~5mg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2²⁾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'-イノシン酸二ナトリウムとして1~5mg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)³⁾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⁴⁾。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回繰り返す, 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⁵⁾。

(3) 試料液の調製

試料溶液 Vml⁶⁾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⁷⁾。次にアンモニア水の溶液(1→10)⁸⁾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⁹⁾。これに水10ml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℃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0.250gを正確に量り, 水を加えて溶かして正確に100mlとする。この液2mlを正確に量り, 水を加えて正確に100mlとし, 標準液とする¹¹⁾(この液1mlは, 5'-イノシン酸二ナトリウム50 μ gを含む)。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℃

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: 254nm

② 定量

標準測定液 A_s, B_s及び試料液 A, B 5 μ lずつをそれぞれ正確に量り, それぞれを液体クロマトグラフに注入し^{12), 13)}, 得られたそれぞれのクロマトグラムからそれぞれのピーク高さ¹⁴⁾を求め, 次式によって検体中の5'-イノシン酸二ナトリウム含量 (g/kg) を求める¹⁵⁾。

$$5\text{-イノシン酸二ナトリウム含量 (g/kg)} = \frac{S \times (B - A)}{W \times V \times (B_s - A_s)} \quad 16)$$

S : 標準液中の 5'-イノシン酸二ナトリウム濃度 ($\mu\text{g/ml}$)

W : 試料の採取量 (g)

V : 試料溶液の採取量 (ml)

A_s : 標準測定液 A_s で得られたクロマトグラムの 5'-イノシン酸のピーク高さ

B_s : 標準測定液 B_s で得られたクロマトグラムの 5'-イノシン酸のピーク高さ

A : 試料液 A で得られたクロマトグラムの 5'-イノシン酸のピーク高さ

B : 試料液 B で得られたクロマトグラムの 5'-イノシン酸のピーク高さ

試薬・試液等

1. アデノシン-5'-ウリジン酸二ナトリウム：市販品を用いる。
2. エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム：[特級]
3. 過塩素酸：[60%，特級]
4. 活性炭¹⁷⁾：市販のクロマトグラフ用を次の方法で精製して用いる。標準網フルイ 105～250 μm の粒度のもの 200g を採り、塩酸 (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。
5. 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、カラムの半分ぐ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 300mg 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。
6. 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。
7. 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'-ウリジン酸二ナトリウム, pH7.5 で 37℃, 1 分間に 1 μmol の無機リン酸を

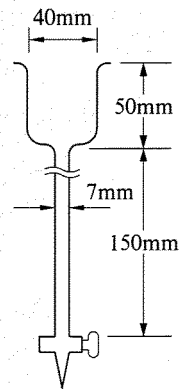


図 54-1 ガラス製カラム

- 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。
8. 酢酸アンモニウム [特級]
 9. 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, 水を加えて溶かして正確に 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, pH を 3.4 に調整し, メンブランフィルター (孔径 $0.45\mu\text{m}$) でろ過する¹⁸⁾。
 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 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。
 13. 硫酸マグネシウム : [特級]

[注]

- 1) 試料が調製機器に付着し, その後の操作が困難となる検体については包丁又はハサミ等でできる限り細切して試料とする。
- 2) 5'-イノシン酸は pH2~4 で活性炭に吸着されやすい性質がある。
- 3) 試料中のタンパク質等の分離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。
- 4) 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等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。
- 5) 水不溶性食品から 5'-イノシン酸二ナトリウムを抽出するために熱水を用いてもよい。
- 6) 通常は 10ml を用いるが, 5'-イノシン酸二ナトリウムとして 0.25~0.5mg を含むように試料溶液量を増減させることが望ましい。
- 7) 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。
- 8) 活性炭からの 5'-イノシン酸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'-イノシン酸と共に溶出されやすい。
- 9) 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。
- 10) この条件での酵素反応は 30 分間ではほぼ終了する。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て反応が完全に行われないことがある。ここで用いている酵素量では, ADP が 5'-イノシン酸と同程度又は若干多くても問題はない。

- 11) 冷蔵庫で1週間程度保存できる。
- 12) 標準測定液 B_s のクロマトグラムでは、5'-イノシン酸がピークとして得られる。しかし、標準測定液 A_s では、5'-イノシン酸のピークは消失する。試料液 B のクロマトグラムでは、5'-イノシン酸のピークのほかにも多数の妨害ピークが出現する。試料液 A のクロマトグラムでは、5'-イノシン酸及び他のヌクレオチドに相当するピークが消失する。標準測定液 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5'-イノシン酸のピークとする。なお、目的とするピークが小さすぎる場合には、試料液注入量を $100\mu\text{l}$ まで増量する。
- 13) 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。この場合は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。
- 14) 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。
- 15) 12) に述べたように、標準測定液 A_s のクロマトグラムでは5'-イノシン酸のピークは完全に消失するので、通常、 A_s の値はゼロである。また、試料液 A でも妨害ピークが少ないと A の値はゼロになる。
- 16) 検体中の5'-イノシン酸二ナトリウム含量 (g/kg) =
- $$\frac{1}{1,000} \times \frac{100}{V} \times 10 \times \frac{S}{W} \times \frac{B-A}{B_s-A_s}$$
- 17) 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'-イノシン酸が定量的に脱離、溶出されるようにしてある。
- 18) 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。