

高速液体クロマトグラフィーによる ヌクレオチド類の分析[†]

田代 豊雄・藤田 悦子・後藤田みゆき・

宇高 順子・田中 耕士*

愛媛大学教育学部食品化学研究室

(昭和61年10月9日受理)

Analysis of Nucleotides by High Performance Liquid Chromatography

Toyoo TASHIRO, Etsuko FUJITA, Miyuki GOTODA,

Junko UDAKA, and Koshi TANAKA*

Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Education,

Ehime University, Matsuyama-shi, Ehime 790

(Received October 9, 1986)

Anion exchange chromatography was carried out by three different eluting systems, using a high performance liquid chromatograph of Hitachi 655A-11 type, Hitachi gell 3013N of anion exchange porous polymer, and the authentic samples of nucleic acid related substances.

Method 1. The Nucleotides of 5' -CMP, 5' -UMP, 5' -IMP, 2' -AMP, 3' -AMP, 2' -GMP, and 3' -GMP could be separated by the eluting solution of 0.045M NH₄Cl·0.0075M KH₂PO₄·0.0075M K₂HPO₄·2% CH₃CN, pH 6.0, at column temperature of 45°C.

Method 2. The Nucleotides of 5' -CMP, 5' -UMP, 2' -, 3' -CMP, 5' -AMP, 5' -GMP, 2' -AMP, and 3' -GMP could be separated by the eluting solution of 0.06M NH₄Cl·0.01M KH₂PO₄·0.01M K₂HPO₄·2% CH₃CN, pH 8.0, at column temperature of 30°C.

Method 3. The Nucleotides of 5' -CMP, 5' -UMP, 2' -, 3' -UMP, 2' -GMP, and 3' -GMP could be separated by the eluting solution of 0.06M

[†]イオン交換クロマトグラフィーによる核酸関連物質の分析 第6報

*マルトモ株式会社・Marutomo Co. Ltd., Iyo-shi, Ehime 799-31

$\text{NH}_4\text{Cl} \cdot 0.01\text{M}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 0.01\text{M}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\%$ CH_3CN , pH 8.0, at column temperature of 45°C.

The nucleotides of 5′-AMP, 5′-CMP, 5′-GMP, 5′-IMP, 5′-UMP, 2′-, 3′-CMP, and 2′-, 3′-GMP of Katsuokezuribushi (slices of dried bonito meat) were separated and determined by anion exchange high performance liquid chromatography.

著者らは従来から食品中の核酸関連物質、すなわちヌクレオチド類、ヌクレオシド類、核酸塩基類について、カチオン交換樹脂およびアニオン交換樹脂を用いる液体クロマトグラフィーによって系統的に分離・定量する方法を検討してきた。^{1)~5)}そして、ヌクレオチド類については、アニオン交換樹脂を用いて一系統三種類の溶離液からなる段階溶出法により、5′-モノヌクレオチド類のみならず2′-, 3′-モノヌクレオチド類をそれぞれ分離・定量することができた。

今回は、アニオン交換樹脂を用いる高速液体クロマトグラフィーによって、従来の方法よりも短時間でモノヌクレオチド類を分離・定量する方法を検討したので報告する。

試料および実験方法

1. 試料

(1) 核酸関連物質

ヌクレオチド類のイオン交換クロマトグラフィーによる分離・分析を検討するために、つぎのヌクレオチド類の市販標品を使用した。

アデノシン-5′-リン酸 (5′-AMP), シチジン-5′-リン酸 (5′-CMP), グアノシン-5′-リン酸 (5′-GMP), イノシン-5′-リン酸 (5′-IMP), ウリジン-5′-リン酸 (5′-UMP), アデノシン-2′-, 3′-リン酸 (2′-, 3′-AMP), シチジン-2′-, 3′-リン酸 (2′-, 3′-CMP) (以上, 和光純薬製), グアノシン-2′-, 3′-リン酸 (2′-, 3′-GMP), ウリジン-2′-, 3′-リン酸 (2′-, 3′-UMP) (以上, Sigma Chemicals 製)。

また、ヌクレオチド類のイオン交換クロマトグラフィーにあたって、ヌクレオシド類および核酸塩基類との分離を検討するために、つぎのヌクレオシド類、核酸塩基類の市販標品 (和光純薬製) を利用した。

アデノシン, シチジン, グアノシン, イノシン, ウリジン, アデニン, グアニン, ヒポキサンチン, チミン, キサンチン。

イオン交換クロマトグラフィーに使用するにあたって、これら核酸関連物質の濃度は0.5 ml あたり各成分0.2~0.4 μmol とした。

(2) かつお削りぶし

ヌクレオチド類の定量に用いたかつお削りぶし (マルトモKK製) は従来のかつおぶし製造法による煮熟品 (A), 試験的な製造法による無煮熟品 (B), 切断肉煮熟品 (C), 切断肉無煮

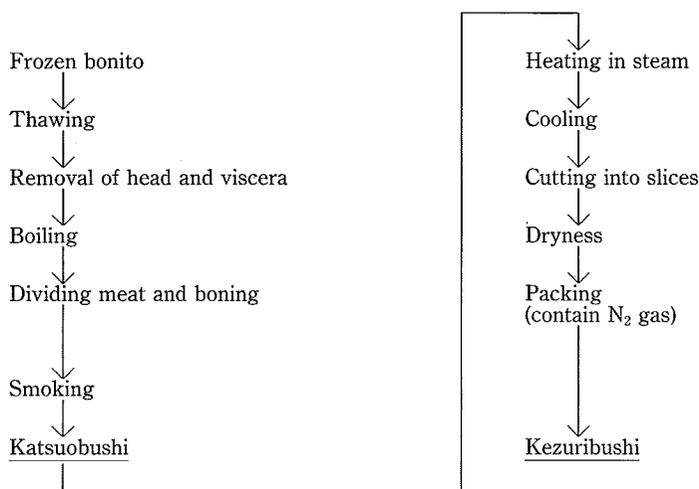


Fig. 1 Manufacturing process of Katsuokezuribushi

熟品 (D) である。

従来法による試料Aの煮熟品の製造工程は Fig.1 に示す通りである。この製造工程において煮熟工程を省いて焙乾したものが試料Bの無煮熟品である。かつおの頭、内臓を除去後、3枚におろし、さらに肉を縦に切断して煮熟し焙乾したものが試料Cの切断肉煮熟品である。切断肉を煮熟せずに焙乾したものが試料Dの切断肉無煮熟品である。

無煮熟品は煮熟工程を省くことにより、煮熟による成分損失の防止のみならず、かつお肉の自己消化による旨味の向上を意図したものであり、切断肉の利用は焙乾の能率化を意図したものである。

かつお削りぶしの核酸関連物質は過塩素酸抽出の常法⁴⁾によって調製し、アニオン交換クロマトグラフィーの分析に供した。

2. クロマトグラフ

日立製の高速液体クロマトグラフ (655A-11形) を使用した。充填剤は日立アニオン交換樹脂3013N, 分離用カラムは 4 mmφ×250mmのものを用いた。溶離液の流速は1時間あたり60 ml, 検出波長は260 nm とした。

3. 溶離液

イオン交換クロマトグラフィーにおける溶離液は0.045M塩化アンモニウム・0.0075Mリン酸一カリウム・0.0075Mリン酸二カリウムの混合水溶液および0.06M塩化アンモニウム・0.01Mリン酸一カリウム・0.01Mリン酸二カリウムの混合水溶液を所要のpHに調製し、またアセトニトリルを0~5%に添加して使用した。

イオン交換樹脂充填カラムに溶離液を30分間送液 (1ml/min) した後に、試料液の5~10 μlを送入した。

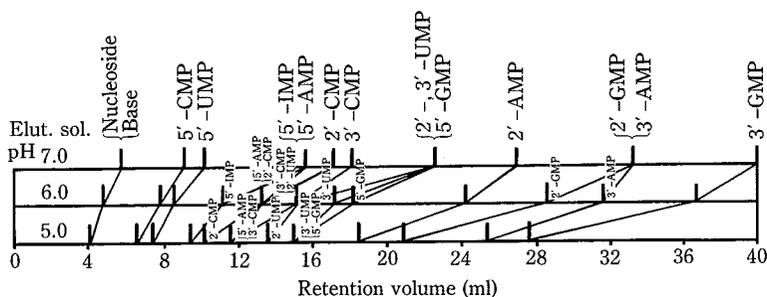


Fig. 2 Effect of pH of eluting solution on retention volumes of nucleic acid related substances.

Resin : Hitachi gell 3013N
 Column : 4mmφ×250mm
 Eluting solution : 0.045M NH₄Cl·0.0075M KH₂PO₄·0.0075M K₂HPO₄·2% CH₃CN, pH 5.0, 6.0, 7.0
 Column temperature : 45°C
 Flow rate : 60ml/h
 (The same resin, column, and flow rate were applied in the following.)

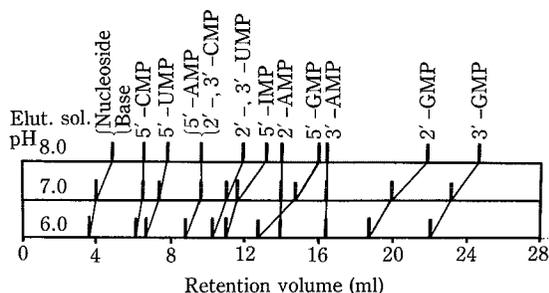


Fig. 3 Effect of pH of eluting solution on retention volumes of nucleic acid related substances.

Eluting solution : 0.06M NH₄Cl·0.01M KH₂PO₄·0.01M K₂HPO₄·4% CH₃CN, pH 6.0, 7.0, 8.0
 Column temperature : 45°C

結果および考察

1. 溶離液の水素イオン指数と核酸関連物質の保持容量

核酸関連物質の保持容量に対する溶離液のpHによる影響を調べた。溶離液として、0.045M塩化アンモニウム・0.0075Mリン酸一カリウム・0.0075Mリン酸二カリウム・2%アセトニトリルの混合水溶液をpH 5.0, 6.0, 7.0に調整し、また0.06M塩化アンモニウム・0.01Mリン酸一カリウム・0.01Mリン酸二カリウム・4%アセトニトリルの混合水溶液をpH 6.0, 7.0, 8.0に調整して用い、いずれもカラム温度45°Cにて展開した。これらの結果をFig.2および3に示した。これらの図は核酸関連物質の溶出されるピークの位置を簡略に示したものである。なお、図中のヌクレオシド・核酸塩基の溶出位置はこれらのうちで最終に溶出されるものの位

置を示している。アニオン交換クロマトグラフィーでは、ヌクレオチド類、核酸塩基類は一般的に展開当初に集中的に溶出される。

溶離液のpHを下げると核酸関連物質の保持容量は全般的に低下し、その程度はヌクレオチド類において著しかった。Fig.2から分かるように、pH 6.0の溶離液にて、ヌクレオチド類、核酸塩基類は保持容量5 mlまでに溶出され、5'-IMP、2'-、3'-AMP、2'-、3'-GMPなどが比較的良い状態で単離された。また、Fig.3から分かるように、pH 8.0の溶離液にて、ヌクレオチド類、核酸塩基類は保持容量5 mlまでに溶出され、5'-CMP、5'-UMP、2'-、3'-UMPが比較的良い状態で単離された。

2. 溶離液のアセトニトリルの添加濃度と核酸関連物質の保持容量

核酸関連物質の保持容量に対する溶離液のアセトニトリルの添加濃度の影響を調べた。溶離液として、0.045M塩化アンモニウム・0.0075Mリン酸一カリウム・0.0075Mリン酸二カリウムの混合水溶液にアセトニトリルを0、2、4%の濃度になるように加え、pH 6.0に調製したものをを用い、45℃にて展開した。その結果をFig.4に示した。また、0.06M塩化アンモニウ

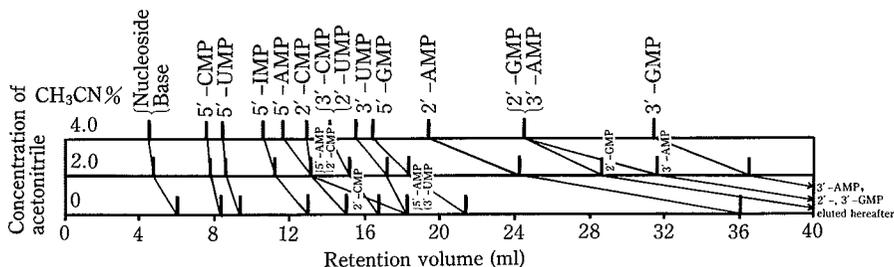


Fig. 4 Effect of acetonitrile concentration of eluting solution on retention volumes of nucleic acid related substances.

Eluting solution : 0.045M NH_4Cl ·0.0075M KH_2PO_4 ·0.0075M K_2HPO_4 , contained 0, 2.0, 4.0% of CH_3CN , pH 6.0
Column temperature : 45°C

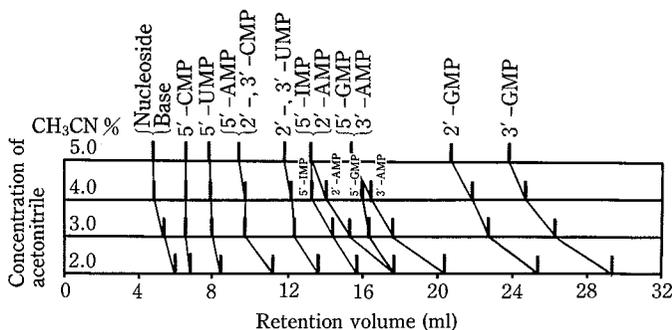


Fig. 5 Effect of acetonitrile concentration of eluting solution on retention volumes of nucleic acid related substances.

Eluting solution : 0.06M NH_4Cl ·0.01M KH_2PO_4 ·0.01M K_2HPO_4 , contained 2.0, 3.0, 4.0, 5.0% of CH_3CN , pH 8.0
Column temperature : 45°C

ム・0.01Mリン酸一カリウム・0.01Mリン酸二カリウムの混合水溶液にアセトニトリルを2, 3, 4, 5%の濃度になるように加え, pH 8.0に調製したものをを用い, 45℃にて展開した。その結果をFig.5に示した。

溶離液のアセトニトリルの添加濃度を高くすると核酸関連物質の保持容量は全般的に低下した。Fig.4から分かるように, アセトニトリル濃度2%の溶離液にて, 5'-IMP, 2'-, 3'-AMP, 2'-, 3'-GMPなどが比較的の良い状態で単離され, なお, アセトニトリルを添加しない場合に比べ, 特に2'-, 3'-AMP, 2'-, 3'-GMPの溶出が速かった。Fig.5から分かるように, アセトニトリル濃度2~5%のいずれの溶離液にても2'-, 3'-UMPが単離された。アセトニトリル濃度4~5%ではヌクレオシド類, 核酸塩基類は保持容量5 mlまでに溶出され, 5'-CMP, 5'-UMPが良い状態で単離された。アセトニトリル濃度5%にて2'-, 3'-GMPが単離され, また比較的に溶出が速かった。

3. カラム温度と核酸関連物質の保持容量

核酸関連物質の保持容量に対するカラム温度の影響を調べた。その結果をFig.6に示した。溶離液として, 0.06M塩化アンモニウム・0.01Mリン酸一カリウム・0.01Mリン酸二カリウム・2%アセトニトリルの混合水溶液をpH 8.0に調製して用いた。Fig.6から分かるように, 展開温度を下げると核酸関連物質の保持容量は全般的に高くなった。この溶離液では展開温度30℃にて2'-, 3'-CMP, 5'-AMP, 5'-GMPなどが比較的の良い状態で単離された。

4. ヌクレオチド類の系統的分離

後記の三つの条件の異った高速液体クロマトグラフィーによって5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-UMP, 2'-, 3'-AMP, 2'-, 3'-CMP, 2'-, 3'-GMP, 2'-, 3'-UMPなどを分離することができた。なお, 2'-AMPと3'-AMPおよび2'-GMPと3'-GMPは単離し得たが, 2'-CMPと3'-CMPおよび2'-UMPと3'-UMPはそれぞれに単離することができなかった。

(1) 溶離液はFig.2および4に記載されている0.045M塩化アンモニウム・0.0075Mリン酸一カリウム・0.0075Mリン酸二カリウム・2%アセトニトリルの混合水溶液 (pH 6.0) である。カラム温度は45℃である。この分析条件のものを方法1とした。そのクロマトグラムをFig.7および8に示した。

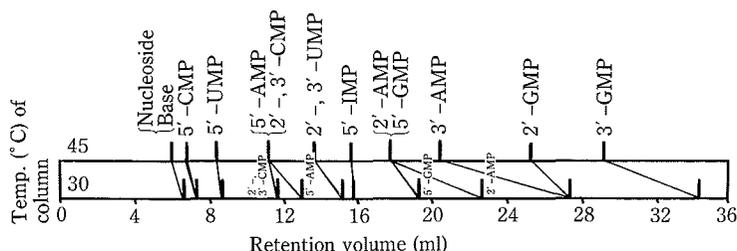


Fig. 6 Effect of column temperature on retention volumes of nucleic acid related substances.

Eluting solution : 0.06M NH₄Cl·0.01M KH₂PO₄·0.01M K₂HPO₄,
2% CH₃CN, pH 8.0
Column temperature : 30°, 45°C

Fig.7から分かるように、ヌクレオチド類、核酸塩基類は保持容量 6 ml にて溶出した。その後、ヌクレオチド類が溶出する。Fig.8から分かるように、この方法 1 によって、5'-CMP, 5'-UMP, 5'-IMP, 2'-AMP, 3'-AMP, 2'-GMP, 3'-GMP が分離された。この分析時間は 42 分である。

(2) 溶離液は Fig.6 に記載されている 0.06M 塩化アンモニウム・0.01M リン酸一カリウム・0.01M リン酸二カリウム・2% アセトニトリルの混合水溶液 (pH 8.0) である。カラム温度は 30°C である。この分析条件のものを方法 2 とした。そのクロマトグラムを Fig.9 に示した。

Fig.9 から分かるように、この方法 2 によって、5'-CMP, 5'-UMP, 2'-, 3'-CMP, 5'-AMP, 5'-GMP, 2'-AMP, 3'-GMP が分離された。この分析時間は 38 分である。ヌクレオチド類、

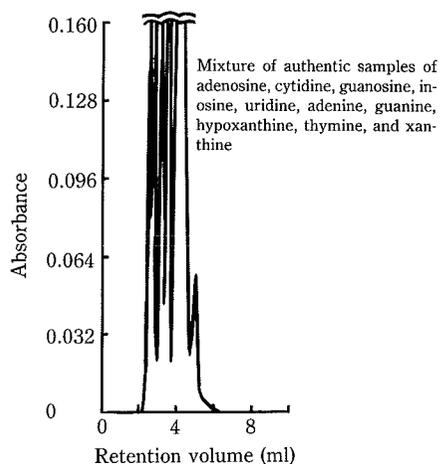


Fig. 7 Chromatogram of a mixture of nucleosides and bases.

Eluting solution : 0.045M NH₄Cl·0.0075M KH₂PO₄·0.0075M K₂HPO₄, 2% CH₃CN, pH 6.0
Column temperature : 45°C
Wave length : 260nm
(The same wave length was applied in the following)

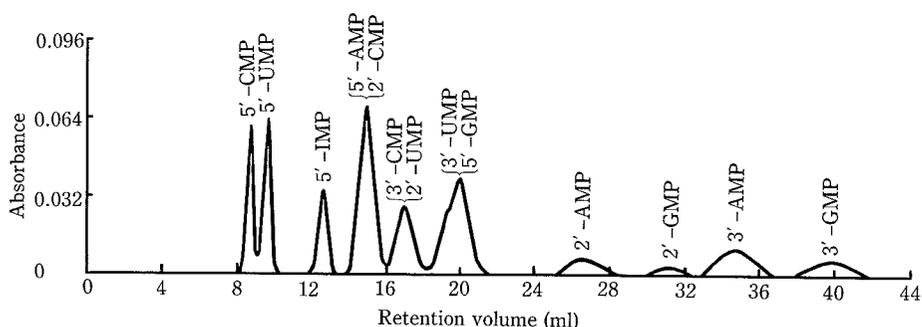


Fig. 8 Chromatogram of a mixture of nucleotides.

Eluting solution : 0.045M NH₄Cl·0.0075M KH₂PO₄·0.0075M K₂HPO₄, 2% CH₃CN, pH 6.0
Column temperature : 45°C

核酸塩基類はこの分析条件にて保持容量約 7 ml にて溶出されるので、Fig.9における 5'-CMP はヌクレオチド類、核酸塩基類の一部と重複する可能性がある。

(3) 溶離液は Fig.5 に記載されている 0.06M 塩化アンモニウム・0.01M リン酸一カリウム・0.01M リン酸二カリウム・5% アセトニトリルの混合水溶液 (pH 8.0) である。カラム温度は 45°C である。この分析条件のものを方法 3 とした。そのクロマトグラムを Fig.10 に示した。

Fig.10 から分かるように、この方法 3 によって、5'-CMP, 5'-UMP, 2'-, 3'-

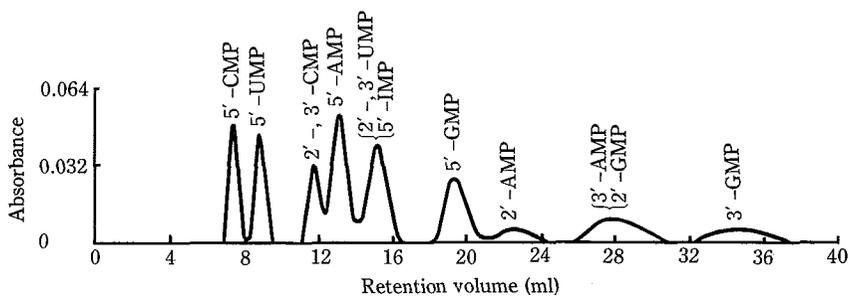


Fig. 9 Chromatogram of a mixture of nucleotides.

Eluting solution : 0.06M NH_4Cl ·0.01M KH_2PO_4 ·0.01M K_2HPO_4 ,
2% CH_3CN , pH 8.0
Column temperature : 30°C

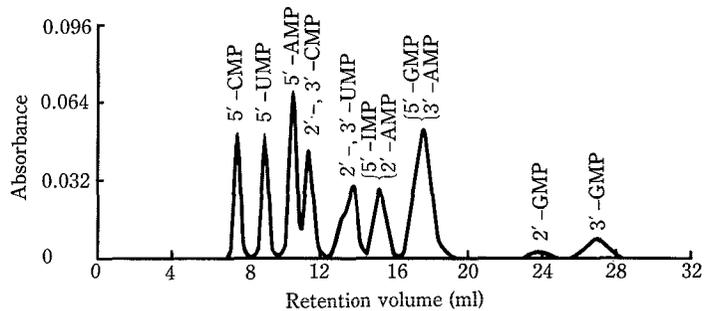


Fig. 10 Chromatogram of a mixture of nucleotides.

Eluting solution : 0.06M NH_4Cl ·0.01M KH_2PO_4 ·0.01M K_2HPO_4 ,
5% CH_3CN , pH 8.0
Column temperature : 45°C

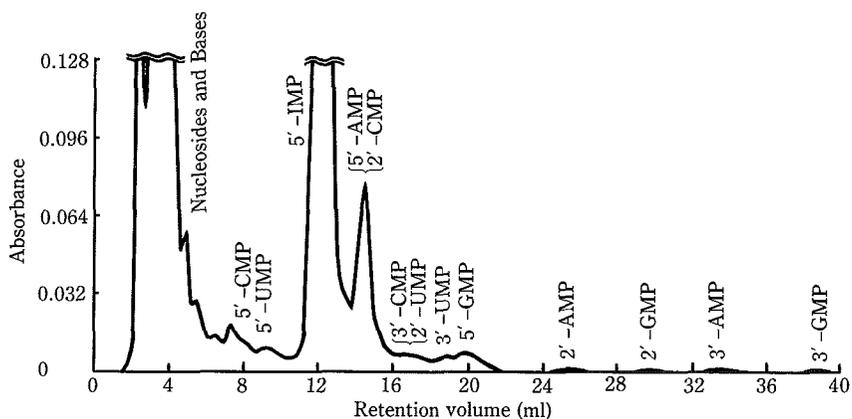


Fig. 11 Chromatogram of nucleotides of Katsuokezuribushi.

Eluting solution : 0.045M NH_4Cl ·0.0075M KH_2PO_4 ·0.0075M
 K_2HPO_4 , 2% CH_3CN , pH 6.0
Column temperature : 45°C

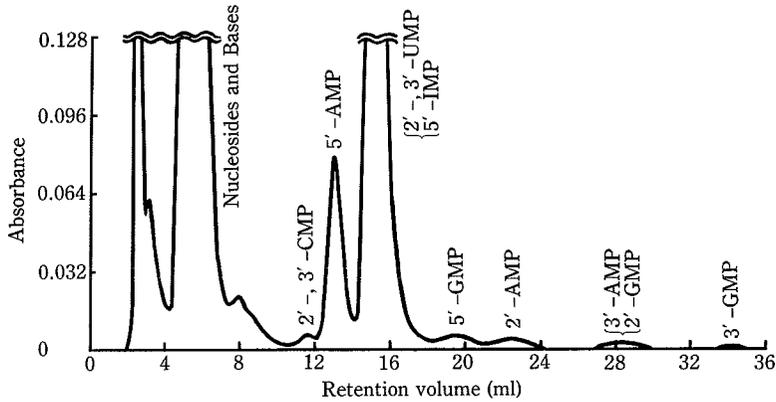


Fig. 12 Chromatogram of nucleotides of Katsuokezuribushi.

Eluting solution : 0.06M NH_4Cl ·0.01M KH_2PO_4 ·0.01M K_2HPO_4 ,
2% CH_3CN , pH 8.0
Column temperature : 30°C

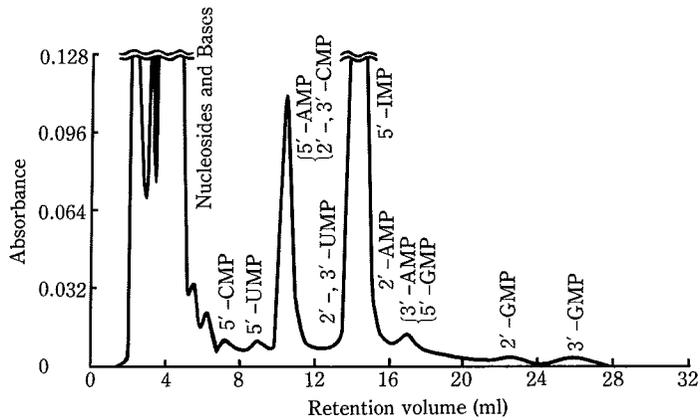


Fig. 13 Chromatogram of nucleotides of Katsuokezuribushi.

Eluting solution : 0.06M NH_4Cl ·0.01M KH_2PO_4 ·0.01M K_2HPO_4 ,
5% CH_3CN , pH 8.0
Column temperature : 45°C

— UMP, 2'—GMP, 3'—GMP が分離された。この分析時間は30分であり、特に短い。
なお、ヌクレオチド類、核酸塩基類はこの分析条件にて保持容量 5 ml までに溶出した。

5. かつお削りぶしのヌクレオチド類の分離・定量

かつお削りぶしの過塩素酸抽出試料について、前記の4の実験の方法1, 2, 3の条件にて高速液体クロマトグラフィーを行った。かつお削りぶしの試料A(煮熟品)について、そのクロマトグラムをFig. 11, 12, 13に示した。かつお削りぶしの試料B(無煮熟品), C(切断肉煮熟品), D(切断肉無煮熟品)についても、試料A(煮熟品)とほぼ同様なクロマトグラムを得た。

Fig.11から分かるように、5'—IMPが方法1によって、Fig.12から分かるように、2'

Table 1. Contents of nucleotides in Katsuokezuribushi.

| Samples | mg/100g | | | |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------|---|--|
| | A Boiling (usual method) | B No boiling (new method) | C Cut meat, boiling (new method) | D Cut meat, no boiling (new method) |
| 5'-AMP | 38 | 30 | 43 | 48 |
| 5'-CMP | 8 | 23 | 3 | 12 |
| 5'-GMP | 6 | 10 | 9 | 18 |
| 5'-IMP | 458 | 343 | 471 | 699 |
| 5'-UMP | 9 | 7 | 9 | 12 |
| 2',3'-AMP | + | + | + | + |
| 2',3'-CMP | 5 | 9 | 2 | 9 |
| 2',3'-GMP | 11 | 21 | + | 26 |
| 2',3'-UMP | + | + | + | + |

-, 3'-CMP, 5'-AMP, 5'-GMPが方法2によって、Fig.13から分かるように、5'-CMP, 5'-UMP, 2'-, 3'-GMPが方法3によって分離され、これらのヌクレオチド類を定量することができた。その定量は市販標品の当該ヌクレオチドのクロマトグラムの面積との対比によって行った。なお、Fig.11から分かるように、2'-, 3'-AMPは分離されるが微量であった。また、Fig.13から分かるように、2'-, 3'-UMPは、その溶出部位におけるベースラインが多少上っているが、ピークが現れていないので定量できない。

かつお削りぶしのモノヌクレオチド類の含有量を Table 1 に示した。

かつお削りぶしには5'-ヌクレオチド類とともに2'-, 3'-ヌクレオチド類が含まれていた。従来の製造法による供試のかつお削りぶしには5'-IMPが458mg/100g, 5'-AMPが38mg/100g含まれていたが、そのほかの5'-ヌクレオチド類および2'-, 3'-ヌクレオチド類の含量は僅少であった。従来の分析値^{6, 7)}では、かつおぶしの産地別、等級別、脂肪の多寡別によって相当な差があるが、5'-IMPは300~900mg/100g, 5'-AMPは30~50mg/100gである。そのほかの5'-モノヌクレオチド類, 2'-, 3'-モノヌクレオチド類については、その分析例が見当たらない。

かつおぶし製造工程における煮熟工程を省くことにより、煮熟による成分損失の防止とかつお肉の自己消化によるモノヌクレオチド類の量的増加を意図したが、無煮熟品のヌクレオチド類の含量は従来法による煮熟品に比較して多くなかった。しかし、切断肉無煮熟品にはヌクレオチド類特に5'-IMPが著しく多く含まれていた。このことについては、今後、試料件数を多くして検討する必要がある。

要 約

1. 装置に日立655A-11形高速液体クロマトグラフ、充填剤に日立アニオン交換樹脂3013N、試料に市販標品の核酸関連物質を用い、後記の三つの異った条件にて高速アニオン交換クロマトグラフィーを行った。

方法1. 溶離液に0.045M塩化アンモニウム・0.0075Mリン酸一カリウム・0.0075Mリン酸二カリウム・2%アセトニトリルの混合水溶液 (pH 6.0) を用い、カラム温度45℃にて、5'-CMP, 5'-UMP, 5'-IMP, 2'-AMP, 3'-AMP, 2'-GMP, 3'-

— GMP を分離することができた。

方法 2. 溶離液に 0.06M 塩化アンモニウム・0.01M リン酸一カリウム・0.01M リン酸二カリウム・2% アセトニトリルの混合水溶液 (pH 8.0) を用い、カラム温度 30°C にて、5'-CMP, 5'-UMP, 2'-, 3'-CMP, 5'-AMP, 5'-GMP, 2'-AMP, 3'-GMP を分離することができた。

方法 3. 溶離液に 0.06M 塩化アンモニウム・0.01M リン酸一カリウム・0.01M リン酸二カリウム・5% アセトニトリルの混合水溶液 (pH 8.0) を用い、カラム温度 45°C にて、5'-CMP, 5'-UMP, 2'-, 3'-UMP, 2'-GMP, 3'-GMP を分離することができた。

2. かつお削りぶしの過塩素酸による抽出物について、高速アニオン交換クロマトグラフィーを行い、5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-IMP, 5'-UMP, 2'-, 3'-CMP, 2'-, 3'-GMP を定量することができた。なお、2'-, 3'-AMP, 2'-, 3'-UMP は定量不可能であったが、微量含まれていた。

なお、本研究の概要は昭和 61 年度日本水産学会秋季大会 (高知) において発表した。

文 献

- 1) 田代豊雄・藤田悦子・宮本真理子・吉井順子：日食工誌, **27**, 131 (1980).
- 2) 田代豊雄・藤田悦子：日食工誌, **28**, 588 (1981).
- 3) 田代豊雄・藤田悦子・安永千里：日食工誌, **30**, 168 (1983).
- 4) 田代豊雄・藤田悦子・安永千里：日水誌, **49**, 1121 (1983).
- 5) TASHIRO, T., FUJITA, E., SEKIYA, M., and UDAKA, J.: *Mem. Fac. Educ. Ehime Univ., Nat. Sci.*, **6**, 59 (1986).
- 6) 藤田孝夫・橋本芳郎：日水誌, **25**, 312 (1959).
- 7) 小泉千秋：日水誌, **28**, 431 (1962).