5'-リボヌクレオチドの安定性に関する研究 (第4報)

トリウムイオンによる 5'-リボヌクレオチド脱リン酸の分析的応用

その 2. 製剤中の 5'-リボヌクレオチドの簡易定量法

(昭和 49 年 12 月 3 日受理)

楠 井 貞 郎* 村 越 明*
森 田 泰 輔* 森 秀 将*

Studies on the Stabilities of 5'-Ribonucleotides (IV)

Analytical Applications of the Dephosphorylation of 5'-Ribonucleotides
with Thorium Ion

Part 2. A Simplified Determination of 5'-Ribonucleotides in their Preparations

Sadao KUSUI, Akira MURAKOSHI, Taisuke MORITA and Hideyuki MORI

(Quality Testing Section of Takasago Plant, Takeda Chemical Industries, Ltd.:
1-5, Aioi-machi, Takasago-cho, Takasago, Hyogo)

A simplified procedure for the determination of 5'-ribonucleotide (5'-RNT) in seasoning preparations was developed by employing the dephosphorylation of 5'-RNT with thorium ion (Th(IV)).

In the assay, 5'-RNT was catalytically dephosphorylated at pH 3 at 100°C for 120 min with Th(IV) in large excess, and then determined colorimetrically on the basis of the well-known interaction between molybdate and phosphoric acid which was liberated from 5'-RNT. Before the dephosphorylation, monosodium glutamate, an inhibitor of dephosphorylation, in the preparations was removed by precipitation at its isoelectric point (pH 3.2), and the colored substances, an interfering factor in the assay of phosphate, in some preparations were also eliminated by passing through an activated charcoal column.

The present method was shown to be useful for the determination of 5'-RNT in the preparations, compared with conventional enzymatic and colorimetric methods using several commercial seasoning preparations.

(Received December 3, 1974)

緒 言

「食添三」に収載されている 5'-ribonucleotide (5'-RNT)のうち、特に 5'-イノシン酸ナトリウム (5'-IMP), 5'-グアニル酸ナトリウム (5'-GMP), および 5'-リボヌクレオチドナトリウム (5'-Rb) は、L-グルタミン酸ナトリウム (MSG) などと混合されて、いわゆる複合調味料やいわゆる“だし”として家庭で使用されている。こ

のような複合調味料やだし中の 5'-RNT は比色法¹⁾、酵素法²⁾などによって定量される。

酵素法では、5'-リボヌクレオチダーゼを用い、5'-RNT からリン酸を遊離させ、リン酸を比色定量することによって、5'-RNT が定量される。複合調味料やだしのような比較的限定された系では、酵素のような特異性はないが、5'-RNT に対して強い脱リン酸触媒作用をもつトリウムイオン [Th(IV)]³⁾ が十分酵素の代わりになり得ると思われた。そのため、本報では、そのような観

* 武田薬品工業株式会社 高砂工場試験課: 兵庫県高砂市高砂町相生町1番5号

点から検討を加え、Th(IV) を用いる方法もまた十分実用性があることを明らかにし得たので報告する。

実験方法

1. 試料

1.1 5'-RNT および MSG

5'-IMP, 5'-Rb (5'-IMP と 5'-GMP の等量混合物), MSG はいずれも武田薬品(株)製を使用。

1.2 複合調味料およびだし

スーパーマーケット(加古川市)で購入した複合調味料6種, だし(かつを風味)3種を使用。

2. 試薬

2.1 Th(IV) 溶液

硝酸トリウム ($\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 試薬特級, 和光純薬(株)製) を水に溶かして, 特別に断りのない限り $2 \times 10^{-1} M$ 溶液として用いた。

2.2 緩衝液

1 M 酢酸ナトリウム-塩酸 (pH 3) を用いた。

2.3 活性炭

白鷺印クロマト用活性炭(武田薬品(株)製) 50~150 mesh を, エタノール-濃アンモニア水-水 (50:5:45) の混液でよく洗い, 次いで $M/1000$ EDTA で洗ったのち, 十分水洗して用いた²⁾。

2.4 その他の試薬

試薬特級(和光純薬(株)製)を使用した。

3. 定量条件の検討方法

特別に断りのない限り, $6 \times 10^{-3} M$ 5'-IMP 溶液 0.5 ml, $6 \times 10^{-2} M$ Th(IV) 溶液 0.5 ml, $0 \sim 6 \times 10^{-1} M$ MSG 溶液 0.5 ml, および緩衝液 1.5 ml から成る全量 3 ml の反応混合物を第2報の方法³⁾で分解し (100°), 生成したリン酸をモリブデンブルー法による第1報の方法⁴⁾で定量して, 製剤中の 5'-RNT の定量条件を検討した。

なお, 脱リン酸の割合はリン酸定量時の測定波長 625 nm における吸光度 (A_{625}) で現した。

4. 定量法

4.1 複合調味料中の 5'-RNT

5'-RNT として 10~50 mg に相当する複合調味料をとり, 水約 25 ml に溶かし, 6 N 塩酸で pH 3.2 に調整した後, 水で全量 50 ml とする。30分間放置後遠心分離 (3000 rpm, 10分間) し, 上澄液を試験溶液とする。試験溶液 1 ml をとり, Th(IV) 溶液 0.5 ml, 緩衝液 1.5 ml を加えて, 100° (水浴中) で2時間加熱する。流水中で室温まで冷却後遊離したリン酸を定量⁴⁾し, あらかじめ 5'-IMP または 5'-Rb で同様に操作して作成した検量線から試料中の 5'-RNT 含量を求める。なお定量値はいずれも 5'-Rb として表現した。

4.2 だし中の 5'-RNT

5'-RNT として約 25 mg に相当するだしをとり, 水約 50 ml に溶かし, 希塩酸 10 ml を加えて水で全量を

100 ml とする。その 20 ml をとり, 活性炭カラム (10 × 70 mm) に吸着させ, 最初 0.01 N 塩酸 50 ml を通液し, 次いで 3% アンモニア含有50% メタノール溶液で溶出してその 150 ml を集める。溶出液を水浴上で蒸発乾固して水約 25 ml に溶かす。この液 1 ml を試験溶液として, 以下 4.1 複合調味料中の 5'-RNT の場合と同様に操作し, 試料中の 5'-RNT の含量を求める。

4.3 比色法

複合調味料中の 5'-RNT の比色法による定量は「呈味ヌクレオチド類を添加したグルタミン酸ソーダ」の「輸出品検査規格および純度検定法」¹⁾ によった。

すなわち, 5'-IMP 約 60 mg に相当する試料を精密にはかり, 水に溶解して 100 ml とした。この液の 1 ml をとり, 6 N 塩酸 4 ml を加え, 水で 10 ml とし, 水浴中で40分間加熱した。冷却亜鉛末 0.4 g を加え, ときどき激しく振り混ぜながら50分間放置した。これに水を加えて 20 ml とし, ろ過した。ろ液 10 ml をとり, 6 N 塩酸 1 ml を加え, 氷で冷却しながら0.3%亜硝酸ナトリウム溶液を加え, 10分間放置して, 0.5% スルファミン酸アンモニウム溶液を加えてよく振り混ぜた後, 5分間放置した。これに, 0.2% *N*-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩溶液 1 ml を加え, よく振り混ぜた後, 水を加えて 20 ml とし, 波長 515 nm における吸光度を測定した。5'-Rb を用いて同様に操作して作成した検量線から, 試料中の 5'-IMP の含量を求めた。

Fig. 1. Effect of MSG on the dephosphorylation of 5'-IMP with Th(IV) in the aqueous solution of pH 3 at 100°C

Each reaction mixture contained 3 μmol of 5'-IMP, 30 μmol of Th(IV), the prescribed amount of MSG, and 1.5 ml of 1 M acetate buffer (pH 3) in a final volume of 3 ml.

MSG (μmol): ○—○, 0; ◐—◐, 75; ●—●, 300.

Fig. 2. Effect of the removal of MSG on the dephosphorylation of 5'-IMP with Th(IV) at pH 3 at 100°C for 120 min.

The control reaction mixtures contained the same amounts of 5'-IMP, Th(IV) and the buffer as described in Fig. 1 and the indicated amount of MSG.

The MSG-removed reaction mixtures were prepared as follows; the solution consisting of 5'-IMP and MSG was adjusted to pH 3.2, the isoelectric point of MSG, with 6 N HCl, and centrifuged off a large portion of MSG as precipitate before addition of Th(IV) and the buffer.

●—●, control; ○—○, removal of MSG.

Fig. 3. Effect of amount of Th(IV) on the dephosphorylation of 5'-IMP at pH 3 at 100°C for 120 min.

The solution containing 5'-IMP (3 μmol) and MSG (300 μmol) was treated with the same procedure for removal of MSG as described in Fig. 2 prior to addition of the indicated amount of Th(IV) and the buffer.

Fig. 4. Calibration curve for the determination of 5'-IMP

Each reaction mixture containing the indicated amount of 5'-IMP, Th(IV) (100 μmol) and 1 M acetate buffer (pH 3, 1.5 ml) in a final volume of 3 ml was treated at 100°C for 120 min.

Table 1. Recovery of 5'-RNT from Mixtures of MSG and 5'-RNT

MSG : 5'-RNT (wt)	Recovery (%)	
	5'-IMP	5'-Rb
85 : 15	101.2	101.4
92 : 8	98.2	101.4
95 : 5	100.5	100.4
97 : 3	99.9	99.3
98.5 : 1.5	99.4	98.9

一方, 5'-GMP 約 60 mg に相当する試料を精密にはかり, 水に溶解して 100 ml とした. その 1 ml をとり, 2 N 塩酸 4 ml および水を加えて 10 ml とし, 水浴中で30分間加熱した. 冷後フォルン試液 2 ml および 30%炭酸ナトリウム溶液 5 ml を加えて, 15分間放置した後, 水を加えて 50 ml とし, 波長 750 nm における吸光度を測定した. 5'-Rb を用いて同様に操作して作成した検量線から, 試料中の 5'-GMP の含量を求めた.

5'-IMP と 5'-GMP の合計量をもって試料中の 5'-Rb 量とした.

4.4 酵素法

複合調味料およびだし中の 5'-RNT の酵素法による定量は中島らの方法²⁾によった.

すなわち, 4.1 および 4.2 で得た試験溶液 1 ml をとり, 水で 10 ml とした. この液 2 ml に Bull seminal 5'-nucleotidase 溶液 [0.05 M MgSO₄, 0.5 M トリス

緩衝液 (pH 8.5) を含む] 0.2 ml を加え, 37°で1時間反応させた. 反応液に60%過塩素酸 0.5 ml, 2.5%モリブデン酸アンモニウム溶液 0.4 ml, 還元試薬 (メタ重亜硫酸ナトリウム 15 g, 1-アミノ-2-ナフトール-4-スルホン酸 250 mg, 無水亜硫酸ナトリウム 500 mg を水に溶かして 100 ml とした液) 0.2 ml を加え, 水で 5 ml とし, 30分間放置後, 波長 660 nm における吸光度を測定した.

一方, あらかじめ 5'-Rb で同様に操作して作成した検量線から試料中の 5'-RNT の含量 (5'-Rb として表現) を求めた.

実験結果

1. 定量条件の検討

1.1 脱リン酸に対する MSG の影響

前報で述べたように⁹⁾, Th(IV) による 5'-RNT の脱リン酸はキレート作用のある物質が共存すると著しく弱められる. 複合調味料中には多量の MSG が含有され, しかも MSG は Cu(II), Co(II), Ni(II) など多くの金属とキレート化合物を形成する⁹⁾. そのため, MSG が共存した場合, Th(IV) による 5'-RNT の脱リン酸がどのような影響を受けるかを 5'-IMP を用いて調べた.

実験方法 3 で述べた処理法で, MSG を 0, 75, 300 μ mol (5'-IMP に対し, 0, 25, 100倍量) になるように加えて, 5時間にわたり 5'-IMP の脱リン酸を調べた.

Fig. 1 のように, MSG が含まれていないと, 5'-IMP の脱リン酸は1時間で平衡に達した. そのため, 以後の検討では, 原則として反応時間を2時間とした. 一方, MSG が存在すると, 脱リン酸は抑制され, MSG が多いほどその度合も大きくなった. これは MSG が Th(IV) をキレートして Th(IV) の脱リン酸触媒効果を弱めたためと思われる.

1.2 MSG の沈殿分離の効果

MSG の共存で 5'-IMP の脱リン酸が影響を受けることが分かったので, 大部分の MSG をその等電点付近 (pH 3.2) で沈殿させて分離除去した場合の効果について検討した.

5'-IMP 0.3 mmol と MSG 0, 3.75, 7.5, 15, およ

び 30 mmol (5'-IMP の 0, 12.5, 25, 50, および 100 倍) を水約 50 ml に溶かし, 6 N 塩酸で pH 3.2 に調整後全量の水で 100 ml とする. 30分間放置して析出した沈殿を遠心分離 (3000 rpm, 10分間) し, 上澄液 1 ml に Th(IV) 溶液 0.5 ml, 緩衝液 1.5 ml を加えて以下実験方法 3 に従って2時間処理した. 一方, pH 調整せずに同様に操作した場合 (MSG の沈殿分離操作がない) との脱リン酸の度合を比較して Fig. 2 の結果を得た.

明らかに MSG を分離除去した効果が認められた. 例えば, MSG が 5'-IMP の100倍共存した場合, 沈殿処理をしないと 5'-IMP の脱リン酸率は, MSG 無添加の場合の約40%まで低下するが, 沈殿処理によって約70%まで回復した. そのため, 以下の検討では, MSG の沈殿分離法を採用することにした. なお, Th(IV) の脱リン酸触媒作用が完全に回復し得なかったのは, MSG の一部が溶存したためと思われる.

1.3 Th(IV) 添加量の効果

MSG の大部分を沈殿分離しても Th(IV) の触媒効果は完全には回復しなかったので, 添加する Th(IV) の量を増加させてその効果を調べた.

1.2で得られた MSG/5'-IMP 100 の上澄液 1 ml に $3 \times 10^{-2} \sim 2 \times 10^{-1}$ M Th(IV) 溶液 0.5 ml (Th(IV) 15~100 μ mol), および緩衝液 1.5 ml を加えて, 以下実験方法 3 に従って2時間処理した.

Fig. 3 に示すように, 90 μ mol 以上の Th(IV) を加えると分解が平衡となった. そのため, 使用する Th(IV) 添加量を 100 μ mol, すなわち, 2×10^{-1} M 溶液を 0.5 ml 加えることにした.

1.4 定量操作

上に述べた結果をもとに, 実験方法 4.1 の複合調味料中の 5'-RNT の定量操作の方法を確立した.

この操作法における 5'-IMP の検量線は Fig. 4 のようであった. また, 5'-Rb の検量線も 5'-IMP の場合と同一の直線となったので, 定量時にはどちらを標準物質としてもよいことが分かった. ただし, 市販の複合調味料はほとんどが 5'-Rb の表示となっているので, 原則

Table 2. Determination of 5'-Rb in Commercial Flavor-enhancer Preparations

Preparations		Methods		
Name	Content on the label	Present	Colorimetric	Enzymatic
A	8%	8.4%	8.3%	7.8%
B	8	8.7	8.6	8.6
C	8	7.7	7.2	7.1
D	5	5.0	4.9	5.1
E	1.5	1.6	1.6	1.4
F	1.5	1.5	1.4	1.4

Table 3. Determination of 5'-Rb in Commercial Seasoning Preparations (Bonito-flavored)

Preparations	Methods	
	Presented	Enzymatic
G	0.6%	0.6%
H	2.3	2.2
I	1.5	1.4

として 5'-Rb を標準物質として用いることにした。

なお、生成したリン酸量は理論値の95%付近で一定となり、長時間加熱すると、リン酸の定量値が低下する現象が認められた。そのため、酵素法³⁾のように生成リン酸量から計算する方法をとらず、ここでは上述したような検量線による方法を採用した。

2. 定 量 例

2.1 MSG と 5'-RNT の混合物

MSG と 5'-IMP または 5'-Rb を種々の割合で混合し、実験方法 4.1 の方法に従って、混合物中の 5'-IMP または 5'-Rb を定量し、Table 1 の結果を得た。

MSG との混合比に関係なく、5'-IMP および 5'-Rb ともに十分満足すべき回収率であった。

2.2 市販の複合調味料

6 種の市販複合調味料中の 5'-Rb を実験方法 4.1 で定量し、比色法および酵素法で得られた結果と併せて Table 2 に示す。

三法での定量値はよく一致しており、Th(IV) を使用する方法もまた十分実用性があることが明らかとなった。

2.3 だ し

市販のだしに実験方法 4.1 を適用したが、だし中の着色物質のため、リン酸の定量が妨害された。そのため、酵素法で用いられている活性炭カラムで妨害物質を除く方法を前処理法として使用した (実験方法 4.2)。

その結果、Table 3 に示すように、酵素法とよく一致した値が得られた。したがって、だしのような比較的成分の複雑なものにも本法が適用できることが分かった。ただし、Th(IV) には酵素のような特異性がないので、2' または 3'-RNT が共存する場合には、本法は適用できない。

考 察

Th(IV) のもつ強い脱リン酸触媒作用を利用した本法は、Th(IV) が試薬として簡単に入手でき、しかも酵素

のような失活現象がないので、比較的手軽に製剤中の 5'-RNT の定量に応用できる。また、比色法が適用できないだしのようなものにも使用できる利点がある。

一方、特異性の点で酵素法に、また 5'-IMP と 5'-GMP との分別定量法でない点で比色法にそれぞれ劣る。

以上のような諸点から、本法は十分実用性があり、特にルーチン業務に用いる簡易法として使用するのが最も適当と思われる。

要 約

Th(IV) のもつ 5'-RNT に対する強い脱リン酸触媒作用を利用して、製剤中の 5'-RNT の簡易定量法が検討された。

Th(IV) による 5'-IMP の脱リン酸の度合は、MSG の共存で著しく低下するが、MSG の大部分をその等電点付近で沈殿除去すると、相当の回復がみられた。

さらに、Th(IV) の添加量を増加させると、5'-IMP の脱リン酸の度合は完全に回復した。

以上の結果をもとに確立した方法で市販の複合調味料中の 5'-RNT を定量した結果は、従来の比色法や酵素法とよく一致した。

だしのような比較的複雑な系でも酵素法と同じように活性炭カラムで着色物質を除けば、酵素法と同じ結果が得られた。

以上の結果、本法は十分実用性のある方法であると結論した。

謝 辞

本研究を行うに当たり終始ご鞭撻を賜った当工場長 多田統雄氏に深謝します。また実験に協力していただいた松尾みち子嬢に感謝します。

文 献

- 1) 第二種農林水産物の輸出検査の基準等を定める省令 (厚生省・農林省・通商産業省令第 2 号, 昭和 41 年 9 月 1 日)。
- 2) 中島宣郎, 市川恒平, 吉村育子, 栗山千枝子, 鎌田政喜, 藤田栄一郎: 農化, **37**, 558 (1963)。
- 3) 楠井貞郎, 村越 明, 森 秀将: 食衛誌, **15**, 356 (1974)。
- 4) 楠井貞郎, 村越 明, 森 秀将: 同上, **14**, 535 (1973)。
- 5) 楠井貞郎, 村越 明, 森田泰輔, 森 秀将: 同上, **16**, 153 (1975)。
- 6) 坂口武一, 上野景平: “金属キレート” III, 安定度定数 p. 48 (1967) 南江堂。