報 文

5'-イノシン酸ナトリウムの簡易比色法^{*1} (その 2)

5'-イノシン酸から生成する Diazotizable Amine の構造

(昭和 57 年 4 月 9 日受理)

楠井 貞郎^{*2} 村越 明^{*2} 清水 希彦^{*2}

A Simplified Colorimetry Procedure for Sodium 5'-Inosinate Determination (Part 2)

Structures of Diazotizable Amines from 5'-Inosinic Acid

(Studies on the Stabilities of 5'-Ribonucleotides. VI)

Sadawo KUSUWI, Akira MURAKOSHI and Marehiko SHIMIZU

(Quality Control Section, Takasago Plant, Takeda Chemical Industries, Ltd: 1-5,
Aioi-machi, Takasago-cho, Takasago, Hyogo, Japan)

Two kinds of diazotizable amines were found to form on treatment of sodium 5'-inosinate (5'-IMP), a flavor-enhancer, with zinc powder in dilute hydrochloric acid. The reaction was applied to a simplified colorimetry procedure for 5'-IMP determination, as described in the previous paper.

These amines were isolated by column chromatography on cation-exchange resin and identified as 5-amino-1-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxyamide 5'-phosphate (I) and 5-amino-1-ribofuranosyl-imidazole-4-*N*-methylcarboxyamide 5'-phosphate (II) by ¹³C- and ¹H-NMR, and MS analyses.

The coloration mechanism is concluded to involve the decomposition of 5'-IMP to I and II, whose amino groups at the 5-position are diazotized, followed by coupling of I and II with the Bratton-Marshall reagent.

(Received April 9, 1982)

Key words: 5'-イノシン酸ナトリウム sodium 5'-inosinate; 比色法 colorimetry; diazotizable amine; 5-amino-1-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxyamide 5'-phosphate; 5-amino-1-ribofuranosyl-imidazole-4-*N*-methylcarboxyamide 5'-phosphate; 発色機構 coloration mechanism; 還元分解 reductive decomposition; ¹³C-NMR

緒 言

前報¹⁾では、5'-イノシン酸ナトリウム (5'-IMP) を亜

鉛末一酸で還元すると、diazotizable amine (DA) が生成することを明らかにし、本反応を利用して、5'-リボヌクレオチドナトリウム (「食添四」収載品) や複合調味料中の 5'-IMP に適用できる比色法を確立し、報告した。その際、DA には、2 種類あり、5-amino-1-ribo-

^{*1} 5'-リボヌクレオチドの安定性に関する研究 (第 6 報)

^{*2} 武田薬品工業 (株) 高砂工場品質管理課: 兵庫県高砂市高砂町相生町 1-5

furanosyl-imidazole-4-carboxamide 5'-phosphate (AICAR) 又は、その類縁化合物であると推定した。

本報では、5'-IMP を亜鉛末で還元的に分解して得られる2種の DA を単離し、その構造を明らかにすることができたので報告する。

実験方法

1. 試料

5'-IMP (「食添四」適合品、武田薬品工業(株)製) を使用。

2. 試薬

亜鉛末: 試薬特級 (和光純薬工業(株)製) を使用。

Bratton-Marshall 試薬 (BM 試薬): 0.2% *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (試薬特級、和光純薬工業(株)製) 溶液。

陽イオン交換樹脂カラム: Dowex 50 W-X 8 (100~200 mesh, Dow Chemical Co. 製) をガラス製カラムに充てん (3.5×80 cm) し、2 *N* 水酸化ナトリウム溶液、水、2 *N* 塩酸、水の各 3 L を順次流したものを使用。

5'-nucleotidase: Bull seminal 5'-nucleotidase²⁾ を使用。

その他: 特別にことわりのない限り、試薬特級 (和光純薬工業(株)製) を使用。

3. DA の生成・単離法

5'-IMP 13.3 g を 2 *N* 塩酸 500 ml に溶解し、氷冷下、かき混ぜながら、亜鉛末 164 g を徐々に加え、30 分間放置する。ガラスフィルター G3 (孔径 20~30 μ) で吸引ろ過し、ろ液を 2 *N* 水酸化ナトリウム溶液 (約 325 ml) で pH 6.4 に調整する。生成した沈澱をガラスフィルター G3 で吸引ろ過、水洗後、6 *N* 塩酸約 50 ml で溶解する。この液を陽イオン交換樹脂カラムへ少量ずつ流して吸着させる。次いで水 4 L を流し、溶出液を 100 ml ずつ分取し、その 0.1 ml を用いて BM 試薬で発色させる。呈色した区分 (2.0~4.0 L) を集め、2 *N* 水酸化ナトリウム溶液で中和後、40°, 減圧下に約 50 ml に濃縮する。この液について、前記と同じカラムクロマトグラフィーを行う。ただし、溶出には、最初 0.001 *N* 塩酸 4.6 L を用い、BM 試薬で発色した区分 (3.7~4.6 L) を集め、この区分を DA-F-1 とする。次いで、水 1.9 L を流し、BM 試薬による呈色区分 (0.5~1.4 L) を集めて、DA-F-2 とする。それぞれを 40°, 減圧下に約 50 ml に濃縮すると、針状結晶が析出する。それぞれの結晶をろ取り、少量の水で洗浄して、減圧下に乾燥 (20°, 5 時間) する。

DA-F-1 から得られた結晶 (DA-1) は、0.65 g (収率 4.9%)、DA-F-2 からの結晶 (DA-2) は、2.52 g (収率 18.9%) であった。

4. 各種分析法

4.1. DA

TLC による検出 (担体: TLC 用シリカゲル (螢光剤

入り)、展開溶媒: アセトン-10% アンモニア水-*n*-プロパノール (2:5:6)、はん点の検出: 紫外線 (波長約 250 nm) 又は BM 試薬による呈色)、及び BM 試薬による方法 (塩酸性で氷冷下、0.3% 亜硝酸ナトリウム溶液 1 ml を加え、10 分間放置、0.5% スルファミン酸アンモニウム溶液 1 ml を加え、5 分間放置、BM 試薬 1 ml を加えて、15 分後に波長 540 nm における吸光度を測定) は、前報の方法¹⁾を用いた。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、6000A 型ポンプ、440 型検出器 (ウォーターズ(株)製) に、ルーブ注入器 KHP-2 型 (協和精密(株)製) と記録計 u-225 MS 32 型 (日本電子科学(株)製) を接続した装置を、カラム Diaion CDR-10 (4.6×250 mm、三菱化成工業(株)製)、カラム温度 60°, 溶離液 0.3 *M* 酢酸アンモニウム溶液 (流速 1.9 ml/min)、検出波長 254 nm、注入量 5 μ l、の条件で操作した。

4.2. 5'-リン酸基

試料 50 mg をとり、水に溶かして 50 ml とする。その 1 ml をとり、5'-nucleotidase 溶液 (0.1 *M* トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、0.5 u/ml)²⁾ 1 ml を加えて、37° で 60 分間放置する。2.5% PCA 溶液 2 ml を加え、その 1 ml をとって、水 3.2 ml、10 *N* 硫酸 0.2 ml、2.5% モリブデン酸アンモニウム溶液 0.4 ml、還元試薬 (1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 0.2 g、亜硫酸水素ナトリウム 15 g、及び亜硫酸ナトリウム (無水) 0.5 g を水に溶かして 100 ml とする) 0.2 ml を加えて、37° で 20 分間放置し、波長 660 nm における吸光度を測定する。あらかじめ、0.1 mM リン酸-カリウム溶液を用いて作成した検量線から、試料中のリン酸の量を得て、これを 5'-リン酸基の含量とした。

4.3. 分子吸光係数 (ϵ)

試料 100 mg をとり、水に溶かして 100 ml とし、試料溶液とする。UV 吸収の ϵ は、試料液 1 ml をとり、0.1 *N* 塩酸 (pH 1.0) 及び 0.1 *M* 酢酸アンモニウム溶液 (pH 7.0) で、それぞれ 50 ml として測定した。BM 試薬発色による ϵ は、試料液 4 ml をとり、水で 100 ml とし、その 1 ml をとり、6 *N* 塩酸 2.5 ml を加え、水で 10 ml とし、以下、4.1 の方法で測定した。

分光光度計は、Beckman Model 35 を使用。

4.4. ¹H-及び ¹³C-NMR

試料を D₂O と NaOD との混液に溶解し、XL-100A-12 型 (Varian 社製) で測定した。

Chemical shift は、tetramethylsilane からの ppm 値で表わした。

4.5. MS

JMS-OISC (日本電子(株)製)を用い、試料を TMS 化 (試料 3 mg を無水ピリジン 0.5 ml に溶解し、*N,O*-bis-(trimethylsilyl)-acetamide 0.2 ml を加えて、60° で 1 時間反応させ、減圧濃縮) して測定した。

結 果

1. DA の生成・単離について

DA を単離するため、5'-IMP 定量条件¹⁾の約 150 倍の規模で、5'-IMP の亜鉛末一塩酸による分解を試みた。しかし、分解液を TLC で調べると、2 種の DA¹⁾ 以外に未分解の 5'-IMP のはん点 (R_f 0.34) が認められた。そのため、塩酸濃度を少し高め、亜鉛末量も増加させた実験方法 3 の条件とした。この条件では、TLC で 5'-IMP のはん点は検出されず、5'-IMP の定量条件の場合と同じ、2 種の DA (R_f : 0.42, 0.47) のみが認められた。又、HPLC で調べると、微小なピークが若干認められるが、5'-IMP (T_R 11'30'') のピークは、消失し、2 つの大きなピーク (T_R 8'00'', 9'40'') が出現した。

分解液から、未反応の亜鉛末をろ過後、ろ液をアルカリで中和すると、DA は亜鉛塩を形成して、沈澱となった。沈澱の生成は、pH 6.4~8.5 の間でほぼ完全に起こるので、単離操作に利用した。液性がアルカリ側になると、DA の亜鉛塩は、水酸化物を生成して、再び溶解する現象が認められた。

DA の亜鉛塩を塩酸で溶解して、陽イオン交換樹脂 (H^+ 型) に吸着させて、水で溶出すると、DA は、簡単に脱亜鉛された。DA の区分を濃縮して、再び陽イオン交換樹脂 (H^+ 型) へ吸着させ、うすい塩酸を流すと、2 種の DA のうち一方 (DA-1) が溶出し、DA-1 溶出終了後、水を流すと、もう一方 (DA-2) が溶出した (Fig. 1)。

それぞれの区分を濃縮すると、DA-1, 2 ともに針状結晶として析出した。それぞれは、TLC で単一のはん点

(DA-1: R_f 0.42, DA-2: R_f 0.47), HPLC で単一ピーク (DA-1: T_R 8'00'', DA-2: 9'40'') を与え、単一物質であることが確認された。

2. DA の構造について

DA-1, DA-2 は、Fig. 2 に示すように、 ^{13}C -NMR スペクトルから、それぞれ、5'-IMP のピリミジン環が開環した、5-amino-1-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide 5'-phosphate (AICAR), 5-amino-1-ribofuranosyl-imidazole-4-*N*-methylcarboxamide 5'-phosphate (AICAR- CH_3) と推定された。

その他の DA-1, -2 の分析データを Table 1 に示す。Table 1 のように、リボース残基の 5'-リン酸は、元素分析で理論値通りのリンが定量されている他に、5'-nucleotidase を作用させると、定量的にリン酸を遊離するので、変化をうけていないことが証明された。

1H -NMR スペクトルでは、溶媒として用いた ($D_2O + NaOD$) の重水素で置換される以外の水素は、すべて検出された。すなわち、DA-1 では、リボース残基の 5'-C に結合した H_2 が、4.10~4.27 ppm に、2', 3', 4'-C に結合した H (3H) が、4.36~4.8 ppm に、1'-C に結合した H が、5.76 ppm に検出され、又、イミダゾール環の 2-C に結合した H が 7.63 ppm に検出された。DA-2 では、DA-1 と同じ H が検出され、それ以外に、4-*N*-methylcarboxamide のメチル基の H_3 が、3.00 ppm に検出されて、Fig. 2 の構造を支持した。

DA-1, -2 ともに、そのままでは、MS で分子イオンのピークを与えないが、TMS 化すると、それぞれ hepta, hexa TMS 体が得られ、DA-1 の場合、 m/z 843 に、DA-2 では、 m/z 785 にそれぞれの分子イオンピークを与え、Fig. 2 の構造を支持した。又、DA-1 では、828 ($M^+ \cdot CH_3$), 770 ($M^+ \cdot TMS$), 755 ($M^+ \cdot TMS \cdot CH_3$), 698 ($M^+ \cdot 2TMS + H^+$), 683 ($M^+ \cdot 2TMS \cdot CH_3$), 626 ($M^+ \cdot 3TMS + 2H^+$) のピークが出現し、DA-2 では、770 ($M^+ \cdot CH_3$), 712 ($M^+ \cdot TMS$), 697 ($M^+ \cdot TMS \cdot CH_3$), 640 ($M^+ \cdot 2TMS + H^+$) 625 ($M^+ \cdot 2TMS \cdot CH_3 + H^+$), 568 (M^+

Fig. 1. Separation of diazotizable amines (DA-1 and DA-2) derived from 5'-IMP

Column, Dowex 50W-X8(100~200 mesh, H^+ type, 3.5×80 cm); eluent, (1) 0.001 *N* HCl, (2) water; flow rate, 1.6 ml/min; fraction size, 100 ml

Fig. 2. Structures and ^{13}C -NMR data of diazotizable amines (DA-1 and DA-2) derived from 5'-IMP

Numbers indicate chemical shift (ppm)

Table 1. Analytical Data for Diazotizable Amines (DA-1 and DA-2) Derived from 5'-IMP

	DA-1	DA-2
Anal. Calcd.	for $C_9H_{15}N_4O_8P \cdot H_2O$	for $C_{10}H_{17}N_4O_8P \cdot 4H_2O$
	C, 30.35; H, 4.81; N, 15.73; P, 8.70	C, 28.31; H, 5.94; N, 13.20; P, 7.30
Found	C, 30.54; H, 4.71; N, 15.93; P, 8.68	C, 28.51; H, 5.92; N, 13.37; P, 7.30
5'-Phosphate		
Calcd.	for H_3PO_4 : 27.53	for H_3PO_4 : 23.10
Found	27.46	22.94
UV $\lambda_{max}^{pH1.0}$ nm (ϵ)	246 (8,800), 268 (10,400)	246 (10,200), 266 (10,700)
$\lambda_{max}^{pH7.0}$ nm (ϵ)	268 (12,600)	266 (13,700)
Coloration (with Bratton-Marshall reagent)		
λ_{max} nm (ϵ)	540 (25,800)	540 (23,400)
1H -NMR	4.10~4.27 (2H, q, $-CH_2-O-$),	3.00 (3H, s, $-NHCH_3$), 4.06~4.20
($D_2O+NaOD$) δ	4.36~4.8 (3H, m, $-CH-O-$), 5.76	(2H, q, $-CH_2-O-$), 4.4~4.8 (3H, m,
	(1H, d, $\begin{smallmatrix} -O \\ \\ -N > CH- \end{smallmatrix}$), 7.63 (1H, s,	$-CH-O-$), 5.76 (1H, d, $\begin{smallmatrix} -O \\ \\ -N > CH- \end{smallmatrix}$), 7.64
	$\begin{smallmatrix} -N \\ \\ -N-CH \end{smallmatrix}$)	$\begin{smallmatrix} -N \\ \\ -N-CH \end{smallmatrix}$)
MS m/z	for hepta-TMS derivative	for hexa-TMS derivative
	843 (M^+), 828, 770, 755, 698, 683, 626	785 (M^+), 770, 712, 697, 640, 625, 568

Table 2. Relationship between Formed Diazotizable Amines (DA-1 and DA-2) and Coloration with Bratton-Marshall Reagent (A_{540})

5'-IMP (μM)	Formed diazotizable amine			A_{540}		
	DA-1 (μM)	DA-2 (μM)	Total formation rate (mol%)	Calcd.*	Found	Calcd. $\times 100$ Found
37.5	2.3	4.4	17.9	0.162	0.171	94.7
75	7.3	11.2	24.7	0.450	0.462	97.4
112.5	12.8	19.5	28.7	0.787	0.792	99.4
150	16.8	27.7	29.7	1.082	1.102	98.2

* Calculated from the ϵ values (shown in Table 1) of formed DA-1 and DA-2

3TMS+H⁺) のピークが検出された。

UV 及び BM 試薬での発色時の吸収スペクトルの特徴は、いずれも文献のそれ³⁾⁻⁶⁾とよく一致しており、Fig. 2 の構造に矛盾しない。

以上の結果から、DA-1 は、AICAR、DA-2 は、AICAR-CH₃ とそれぞれの構造が確定した。

3. 比色法との関係について

単離した DA-1、DA-2 を標品として、DA の生成量を HPLC (ピーク高さによる方法) で測定し、比色法との関連性を確認した。すなわち、5'-IMP を比色法の条件¹⁾で処理 (比色時の 5'-IMP 濃度 37.5~150 μM) し、HPLC で生成した DA-1、DA-2 を定量する一方、比色法通り、BM 試薬で発色させて波長 540 nm における吸光度 (A_{540}) を測定した。

Table 2 に示すように、DA-1、DA-2 の ϵ (Table 1)

を用いて、DA-1、DA-2 生成量から計算した A_{540} は、実測値の 94.7~99.4% (平均 97.4%) になり、本比色法における呈色度は、ほぼ定量的に DA-1、DA-2 の生成量で説明されることが確認された。

又、当然のことながら、5'-IMP 濃度と A_{540} との関係を図示すれば、直線関係が成立し、5'-IMP の検量線となるが、5'-IMP 濃度の低下につれ、 A_{540} は、より小さくなっていく傾向があり、前報にも述べたように、この検量線は原点を通らない。これは、Table 2 に示すように、DA 生成率が、5'-IMP 150 μM で 29.7%、37.5 μM で 17.9% と 5'-IMP 濃度の低下に従って、減少していくことによって起こる、と説明される。

全体的に、DA 生成率がせいぜい 30% 程度と低いことは、DA 生成反応の他に、多くの副反応を伴っていることを示唆し、前報にも述べたように、わずかな条件の

変化で、DA の生成反応と副反応の比率が変化する恐れがあるので、本比色法では、検量線は、定量の都度作成した方が良いと思われる。

考 察

5'-IMP を亜鉛末—塩酸で分解して生成する DA は、AICAR と AICAR-CH₃ で、共通してイミダゾール環の5位にアミノ基を有することが明らかとなった。従って、前報¹⁾で報告した、5'-IMP の比色法における発色機構は、次の反応式に示すように、5位アミノ基が亜硝酸でジアゾ化され、次いで BM 試薬とカップリングすることによって結論される。

公定法^{8),9)}での5'-IMP定量法は、5'-IMPを塩酸で加水分解して、Hypoxanthineとして、亜鉛末—塩酸でDAを生成させる。この場合、生成するDAの構造は、明らかにされていないが、前報で述べたように、この場合もDAは、2種存在すること、及び今回明らかにしたように、5'-IMPから直接生成するDAが、AICARとAICAR-CH₃であることから、5-amino-imidazole-4-carboxyamide (AICA)と5-amino-imidazole-4-N-methylcarboxyamideで、同じ発色機構によると推定される。

プリン誘導体の還元的加水分解で、AICAやその近縁化合物が生成するらしいことは、すでに報告されている¹⁰⁾。しかし、5'-IMPから、直接、還元的にAICARとAICAR-CH₃が生成する反応を証明したのは、本報

が初めてである。又、AICARは、プリンスクレオチドの合成中間体としてよく知られており、生化学的⁸⁾⁻⁵⁾、あるいは、化学的^{6),11)}手段で得られている。AICAR-CH₃も合成的手段⁶⁾で得られているが、本報の方法は、5'-IMPが食品添加物として市販されており、入手が容易であること、調製操作が、比較的簡単であることなどの利点があるので、AICAR又はAICAR-CH₃の実験室的な調製法としても有用と思われる。

謝 辞

本研究を行うに当たり、終始ご鞭撻を賜わった、当社高砂工場長、和田正三博士に深謝します。又、元素分析、NMR、MSの測定と有益なご助言をいただいた、当社化学研究所、菅正巳主任研究員、同主任研究員寺尾素次博士ならびに所員の方々に感謝します。

文 献

- 1) 楠井貞郎, 村越明, 清水希彦: 食衛誌, **21**, 381~385 (1980).
- 2) 楠井貞郎, 清水希彦, 西村淳, 村越明, 竹川正三, 田中淳子: 同上, **21**, 373~380 (1980).
- 3) Greenberg, G. R.: J. Biol. Chem., **219**, 423~433 (1956).
- 4) Flaks, J. G., Erwin, M. J., Buchanan, J. M.: *ibid.*, **228**, 201~213 (1957).
- 5) Huang, H. T.: Biochem., **4**, 58~62 (1965).
- 6) Burrows, I. E., Shaw, G.: J. Chem. Soc. (C), Org., **1967**, 1088~1093.
- 7) Bratton, A. C., Marshall, Jr. E. K.: J. Biol. Chem., **128**, 537~550 (1939).
- 8) 第四版食品添加物公定書, p. 403~408 (1978). (社)日本食品衛生協会.
- 9) 第三種農林水産物の輸出検査の基準を定める省令 (厚生省・農林省・通商産業省令第2号, 昭和41年9月1日).
- 10) Smith, D. L., Elving, P. J.: J. Am. Chem. Soc., **84**, 1412~1420 (1962).
- 11) Shaw, B.: *ibid.*, **83**, 4770~4772 (1961).