アデニン, ヒポキサンチン, アデノシンおよび イノシンのイオン交換クロマトグラフィー による定量法について*

新井 健一・斎藤 恒行

(1962 年 10 月 23 日受理)

DETERMINATION OF ADENINE, HYPOXANTHINE, ADENOSINE AND INOSINE BY ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

Ken-ichi ARAI** and Tsuneyuki SAITO**

The assay method is based on the separation of adenine (A), hypoxanthine (H), adenosine (AR), inosine (HR), and nucleotides by using the ion exchange resins, DIA-ION SA-100 (formate type) and Dowex 1×2 (chloride type). The former is used for adsorption of nucleotides and the latter for adenine, hypoxanthine, adenosine and inosine. It is possible to differentiate adenine, hypoxanthine, adenosine and inosine from Dowex 1X2 quantitatively owing to their differences in the rate of elution by using the solvent system, $\text{NH}_4\text{OH-HCl-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, in which A is 0.1 N NH_4OH -0.035 N HCl -0.005 N $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, B is 0.001 N HCl -0.0002 N $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, in the stepwise elution system. The results are shown in Figs. 5 and 6.

種々の動物筋肉中にプリン塩基及びプリンヌクレオシド類が含まれている事が知られている。このプリン塩基およびヌクレオシド類の分析は、主に paper chromatography による場合が多かつた^{1,2)}。

著者等も数種類の水産動物筋肉中のプリン塩基およびヌクレオシド類について、イオン交換樹脂によつて分画した区分を paper chromatography を併用することで分析し、その結果について先に報じた³⁾。

近年、英国の N. R. JONES らは強塩基性アニオン交換樹脂によつて、プリン塩基、ピリミジン塩基およびそれらのヌクレオシド類を分析する方法を考案し、報じている⁴⁾。

動物筋肉中のプリンおよびピリミジンヌクレオチド類の分析に関する報告もまた、かなり提出されているが^{5,6)}、これらヌクレオチド類の分析と連続して行うことが可能で、しかも方法としてはかなり容易である N. R. JONES らの方法は大変都合が良い。

従来、水産動物筋肉にはプリン塩基およびヌクレオシド類として、ヒポキサンチン、イノシンおよび特別な場合にはアデニンが存在する^{1,3)}といわれているが、著者らはこれらの他にアデノシンを含む四化合物の分析を目的として、N. R. JONES らの方法を検討し、いくつかの点でとりあつかい易いように改良し、更に分析の必要条件を確めるために実験を行った。

実 験

試 薬 ヒポキサンチン (Fig. では H と略称) 和光純薬工業株式会社
イノシン (HR と略称) L. Light and Co., Ltd.

* 本報告は水産動物筋肉中の有機磷酸化合物に関する研究—第 XII 報。
水産無脊椎動物筋肉中の酸可溶核酸成分—IV. とする。

** 北海道大学水産学部水産化学教室 (Lab. of Chem., Fac. of Fish., Hokkaido Univ., Hakodate Japan.)

アデニン (A と略称) 和光純薬工業株式会社
 アデノシン (AR と略称) 東京化成工業株式会社
 アデニル酸 (AMP と略称) Sigma Chemical Co., Ltd.

これらの化合物はすべて 0.5~1.0 mg/ml の濃度に水に溶解して使用した。また、正確な濃度はこの溶液の吸光度から算出した。

方法 プリン塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチド類を各 0.2~1.0 mg ずつ溶解し、pH を 4.5~5.0 とし、DIA-ION SA-100 (50~100 メッシュ) 義酸型カラム 1.2×4.0 cm (4~5 ml) にとす。この条件では、イオン交換樹脂にヌクレオチド類のみが吸着され、プリン塩基、ヌクレオシド類は吸着されず水洗すれば容易に溶離する。水洗液量は 100 ml とし、これを通過液と合し、NH₄OH で pH 10~11 とした後、Dowex 1×2 (50~100 メッシュ) 塩酸型カラム 1.2×4.0 cm (4~5 ml) にとす。この条件では、プリン塩基およびヌクレオシド類は完全に吸着する。

プリン塩基およびヌクレオシド類の溶離は、N. R. JONES らの報じた gradient elution system と著者らが採用した stepwise elution system の場合の両方について検討した。gradient elution system の場合は、mixing vessel 中に 0.2 N NH₄OH—0.02 N HCl, 700 ml., reservoir 中には 0.01 N Na₂B₄O₇—0.05 N HCl を入れ、溶出口を 2 カ所として溶離を行つた。stepwise elution system では、gradient elution system の場合の経験から、まず 0.1 N NH₄OH—0.035 N HCl—0.005 N Na₂B₄O₇ (Fig. においては A 溶媒と略称)、次いで 0.001 N HCl—0.0002 N Na₂B₄O₇ (B 溶媒と略称) 溶液を流過し、各成分を溶離分別した。

定量は得られた分画の紫外線吸収により、島津分光光度計 QB-50 型を使用した。なお、ヒポキサンチン、アデニン、アデノシンは 260 mμ、イノシンは 250 mμ の吸光度を測定し、分子吸光係数はヒポキサンチンは 10.4×10^3 、アデノシンは 15×10^3 、イノシンは 12×10^3 を、既報の値との比較を行つた上、決定した。

実験結果

1) プリン塩基、ヌクレオシド類とヌクレオチドの分離

この目的のために DIA-ION SA-100 を主に使用した。同イオン義酸型 3 ml を使用する場合、AMP 6 mg について検討したところ、ヌクレオチドの吸着は完全であつて、次の水洗によつて溶離する心配は全く無かつた。吸着の条件は N. R. JONES らによると pH 6.0 で行われているが、著者らは pH 4.5~5.0 で行つた。pH 1.0 附近の酸性では、ヌクレオチドの一部溶離がみられるので良くない。この場合の pH の選定は、このとき同時にみられるプリン塩基およびヌクレオシド類の溶離に影響をおよぼしている。そのため

Fig. 1. Elution of hypoxanthine from DIA-ION SA-100 with distilled water.

Solid line: Eluting after adsorption of nucleotides at pH 4.2

Dotted line: Eluting after adsorption of nucleotides at pH 7.2

Exchanger: DIA-ION SA-100 (formate), 50~100 mesh, 1.2×2.7 cm. Each 20 ml. fraction was collected.

Sorbed material: Adenylic acid, 2 mg. and hypoxanthine, 0.43 mg.

に行つた実験結果を Fig. 1 に示した。ヒポキサンチン 0.43 mg を pH 4.5 および 7.2 の条件で DIA-ION SA-100, 5 ml にとすと、pH 7.2 においては弱い吸着が行われるようであつて、次の水洗による溶離にはるかに時間がかかる。すなわち pH 4.5 では水洗液量 60 ml に対し、pH 7.2 では 220 ml が必要であつた。したがつて、ヌクレオチドの吸着が完全であつて、イノシンおよびヒポキサンチン等の溶離ができるだけ容易な pH の条件が好ましいのであつて、著者らは上記の結果から pH 4.5~5.0 で行つている。

使用される DIA-ION の容量は、吸着したヌクレオチド類の分析をもつて行つたため 12 ml 位まで増加した時、イノシン、ヒポキサンチンの溶離にはほとんど不都合は起らず、水洗液量がわずか 20 ml 多く必

要なだけであった。N. R. JONES らはこの目的のために Dowex 1 義酸型を使用している。著者らは DIA-ION SA-100 義酸型と Dowex 1X2 義酸型の両方を使用して比較検討したが、AMP 2mg の吸着はいずれの場合も全く完全であり、イノシン、ヒポキサンチン各 1mg 位ずつの溶離にも不都合は起らなかった。一般に、樹脂容量が多いときダイヤイオンからの溶離が Dowex に比べてやや遅い傾向がみられるが、実際上の障害にはならなかった。

2) プリン塩基およびヌクレオシド類 相互の分離

A) Gradient elution system

この目的のために Dowex 1X2 塩酸型を使用した。はじめ N. R. JONES らの報じているように gradient elution system により、先に述べたように DIA-ION SA-100 義酸型で処理してから、イノシンとヒポキサンチンの分析を行いその結果を Fig. 2 に示した。

すなわち、ヒポキサンチン 0.43 mg とイノシン 0.54 mg の分離は完全であつて、回収率は各々 99.7, 98.6 % の好収率が得られた。また、溶離区分の pH を点線で示した。pH はヒポキサンチンの溶出の過程ではあまり変化は無いが、イノシンの溶出の過程でかなり急激な変化がみられる。したがつて、定量値と回収率の算出は各溶離区分を合せ、2 N HCl の濃度にメスアップしてから、再び吸光度を測定して行つた。なお、Fig. 2 から Fig. 6 まで全図は、ヒポキサンチンは 260 m μ 、イノシンは 250 m μ の吸光度で表してある。次に、アデノシン、ヒポキサンチンとイノシンの三成分の分析を Dowex 1X2, 6 ml を使用して行い、その結果を Fig. 3 に示した。

アデノシン 0.58 mg、ヒポキサンチン 0.27 mg とイノシン 0.28 mg の分離は完全であつて、回収率は各々 99.8, 97.1, 97.9 % と良好であつた。アデニンとイノシンの分離もまた、完全に行うことができるが、アデニンとヒポキサンチンは重なつて溶出され、N. R. JONES らの報ずるとおり、分離することはできなかった。

本方法において使用される樹脂の容量は、5 ml 位が最適なのであつて、それ

Fig. 2. Separation of hypoxanthine (H) and inosine (HR) on Dowex 1 by gradient elution. Dotted line: pH of effluent

Exchanger: Dowex 1X2 (chloride), 50~100 mesh, 1.2×4.5 cm.

Eluting solution: 0.2 N NH₄OH-0.02 N HCl (350 ml.) is in the mixing vessel and 0.01 N Na₂B₄O₇-0.05 N HCl in the reservoir

Flow rate: 1.0~1.5 ml./min.

Each 20 ml. fraction was collected

Sorbed material: Hypoxanthine, 0.43 mg. and inosine, 0.54 mg.

Fig. 3. Separation of adenosine (AR), hypoxanthine (H), and inosine (HR) on Dowex 1 by gradient elution.

Exchanger: Dowex 1X2 (chloride), 50~100 mesh, 1.2×5.5 cm.

Eluting solution: same as Fig. 2

Flow rate: 1.0~1.5 ml./min.

Each 20 ml. fraction was collected

Sorbed material: Adenosine, 0.58 mg, hypoxanthine, 0.27 mg, and inosine, 0.28 mg.

Fig. 4. Separation of hypoxanthine (H) and inosine (HR) on Dowex 1 by gradient elution.

Exchanger: Dowex 1X2 (chloride), 50~100 mesh, 1.2×4.5 cm. (solid line), and 1.2×2.7 cm. (dotted line)

Eluting solution: same as Fig. 2

Flow rate: 1.0~1.5 ml./min.

Each 20 ml. fraction was collected

Sorbed material: Hypoxanthine, 0.53 mg. and inosine, 0.82 mg.

Fig. 5. Separation of hypoxanthine (H) and inosine (HR) on Dowex 1 by stepwise elution

Dotted line: pH of effluent

Exchanger: Dowex 1X2 (chloride), 50~100 mesh, 1.2×4.5 cm.

Eluting solution: A (0.1 N NH_4OH ~0.035 N HCl ~0.005 N $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) and B (0.001 N HCl ~0.0002 N $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) as shown in figure

Flow rate: 1.0~1.5 ml./min.

Each 20 ml. fraction was collected

Sorbed material: Hypoxanthine, 0.50 mg. and inosine, 0.33 mg.

より少くなると分離が不完全となる。その結果を Fig. 4 に示した。

樹脂の容量が 3 ml のとき、ヒポキサンチン 0.53 mg とイノシン 0.82 mg の分離は完全でなく、更にイノシンの溶出もにぶくなるのでよくない。一方、樹脂容量が 8 ml 位まで増加した時は、両成分の溶出位置が遅れぎみになる他は 5 ml の場合とあまり変りなかつた。なお、以上の目的のために DIA-ION SA-100 塩酸型は使用できなかった。5 ml を使用する場合、ヒポキサンチンとイノシンは不完全ながら分離するが、樹脂容量がそれ以上少い時も、多い時も分離をそれ以上改善できなかった。

本方法によつてサンマ筋肉の過塩素酸抽出液に対するヒポキサンチンとイノシンの添加試験を行つた結果、回収率はそれぞれ 99.1, 98.4 % と良好であつた。

B) Stepwise elution system

Stepwise elution system に方法をきりかえるために、gradient elution system の実験の経験から、まずヒポキサンチンの溶出のために、A 溶媒 (0.1 N NH_4OH —0.035 N HCl —0.005 N $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) とイノシンの溶出のために B 溶媒 (0.001 N HCl —0.0002 N $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) を選び、順次流過させた。

Dowex 1×2, 5 ml 塩酸型を用い、ヒポキサンチン 0.50 mg とイノシン 0.03 mg を分析し、その結果を Fig. 5 に示した。

著者らが選定した A および B 溶媒はヒポキサンチンとイノシンを完全に分離し、その回収率はそれぞれ 97.1, 98.4 % と良好であつた。点線は溶離区分の pH を表すが、これによるとあきらかに gradient elution system の場合とちがつて、変動の少い pH で両成分が溶出されている。したがつて、総吸光度から直接定量値および回収率の算出が可能である。

この目的のために使用される樹脂の容量は、2.5 ml と 5 ml について検討したが、いずれの場合も分離は完全に行われる事がわかつた。その点あきらかに、gradient elution system の場合より優れている。ただし、アデノシンとヒポキサンチンの二成分を分離するためには、3 ml より 6 ml の時良い結果を示す。これを Fig. 6 に示した。

すなわち、樹脂容量が 3 ml のときはアデノシンとヒポキサンチンの分離が不完全であるが、6 ml のときは完全であつた。アデノシン 0.53 mg とヒポキサンチン 0.20 mg とイノシン 0.36 mg の回収率は、それぞれ 99.6, 96.0, 97.9 % であつた。なお、イカおよびサンマ筋肉の酸抽出液に対してヒポキサンチンとイノシンを添加した場合、回収率はイカについて 99.1, 95.7 %, サンマについては 97.2, 96.5 % であつた。

ヒポキサンチンとアデニンの分離については、この stepwise elution system による場合もうまくゆかず、重なつて溶出された。N. R. JONES らも同じ結果を経験しており、この分析の方法としてアデニンとヒポキサンチンの混合区分の 248 および 260 m μ の吸光度を測定し、次式による算出を提唱している⁴⁾。

$$E_{248} = 10.8x + 9.8y$$

$$E_{260} = 7.35x + 13y$$

x : ヒポキサンチンの濃度

y : イノシンの濃度

E_{248} : 248 m μ の吸光度

E_{260} : 260 m μ の吸光度

著者らはアデニン 1.02 mg とヒポキサンチン 0.48 mg, アデニン 0.51 mg とヒポキサンチン 0.96 mg の二試料について実験を行い、両成分を含む溶離区分を 2 N HCl 濃度にメスアップし、248 と 260 m μ の吸光度を測定して定量値を算出した。なお、回収率はそれぞれ 95.5, 100.4 および 96.3, 98.1 % を示した。ただし、試料が更に少量の場合は、2 N HCl 濃度に合わせる操作で余儀なくされる稀釈のため、吸光値が低くなりそのため誤差を生ずることとなつて良くない。したがつて、一方の成分が 0.5 mg 以下の場合には注意が必要である。

考 察

以上の実験結果から、著者らはプリン塩基およびヌクレオチド類の分析のために、N. R. JONES らの報じたイオン交換法の改良法である stepwise elution system を採用することとした。stepwise elution system によれば、変動の少い pH の条件でアデノシン、イノシン、アデニンおよびヒポキサンチンの溶離ができるから、溶離区分の吸光度から直接定量値の算出が可能となり、更に gradient elution system に比べると、実験のための設備その他の点でかなり有利といえる。

ヌクレオチド類の除去のために、DIA-ION SA-100 義酸型を Dowex 1 義酸型の代用とすることができが、この場合、単にヌクレオチド類を除去するだけの目的のためには樹脂容量が少なくよく、吸着したヌクレオチド類の分析および回収をも続けて行いたい場合には、樹脂容量を多くするか、または義酸型ではなくて塩酸型の樹脂を使用した方がよいことがわかつた。その検討結果については、後に報告する予定である。

この時試料液の pH は、著者らの採用した pH 4.5 と原報に述べている pH 6.0 との差異はほとんどないようである。N. R. JONES らはその報告において、プリン塩基、ヌクレオチド類だけではなくピリミジン

Fig. 6. Separation of adenosine (AR), hypoxanthine (H), and inosine (HR) on Dowex 1 by stepwise elution.

Exchanger: Dowex 1X2 (chloride), 50~100 mesh, 1.2×2.7 (upper figure) and 1.2×5.5 cm. (lower figure)

Eluting solution: same as Fig. 5

Flow rate: 1.0~1.5 ml./min.

Each 20 ml. fraction was collected

Sorbed material: Adenosine, 0.53 mg, hypoxanthine, 0.20 mg, and inosine, 0.36 mg.

塩基およびヌクレオシド類の分析をも可能としているが、詳細な実験条件を報じていないので、著者らの改良法と比べる訳にはゆかない。しかし、一般に動物筋肉中にはヒポキサンチン、イノシンの他アデノシンの存在が報じられているにすぎないから、動物の筋肉を対象とする場合では、著者らの改良法で充分満足できる。いくつかの水産動物筋肉中のプリン塩基およびヌクレオシド類の量の経時変化について、検討した結果は後に報ずる。

文 献

- 1) W. J. JORDAN and I. GRAY: *J. Biol. Chem.*, **215**, 669 (1955).
- 2) N. TOMLINSON and V. M. CREELMAN: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **17**, 5 (1960).
- 3) 斎藤恒行・新井健一: 本誌, **23**, 265 (1957).
- 4) N. R. JONES: *The analyst*, **85**, 111 (1960).
- 5) N. R. JONES and J. MURRY: *Biochem. J.*, **77**, 567 (1960).
- 6) 斎藤恒行: 本誌, **27**, 461 (1961).