

HPLCによる食品添加物製剤中の5'-リボヌクレオチドの分析

荒木理江*, 萩原輝彦*, 安野哲子*, 樺島順一郎*
植田忠彦*, 鎌田国広*

Determination of 5'-Ribonucleotides in Food Additive Preparations by HPLC

Rie ARAKI*, Teruhiko HAGIWARA*, Tetsuko YASUNO*, Junichiro KABASHIMA*
Tadahiko UEDA* and Kunihiro KAMATA*

An analytical method for the determination of 5'-ribonucleotides (RN: 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP and 5'-IMP) in food additive preparations by HPLC was developed. The RN were separated by ion-pair HPLC on a YMC-Pack ODS column (250 mm × 4.6 mm I.D.) with 0.05 mol/L TEA (adjusted to pH 5.0 with phosphoric acid)-methanol (100:1) as a mobile phase. The recovery of 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP and 5'-IMP added to food additive preparations at 5 mg/g was 98.5%, 104.4%, 93.1% and 100.0%, respectively.

The proposed method was rapid, simple and accurate, and it can be applied to the analysis of food additive preparations with low concentration of RN.

Keywords: 5'-リボヌクレオチド 5'-ribonucleotides (5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP and 5'-IMP), 食品添加物製剤 food additive preparation, 高速液体クロマトグラフィー HPLC

緒言

5'-リボヌクレオチド二ナトリウム (RN) は、5'-イノシン酸二ナトリウム、5'-グアニル酸二ナトリウム、5'-シチジル酸二ナトリウム及び5'-ウリジル酸二ナトリウムの混合物又は5'-イノシン酸二ナトリウム及び5'-グアニル酸二ナトリウムの混合物であり¹⁾、調味料として使用され、第7版食品添加物公定書¹⁾(公定書)に記載されている。

RNの定量法として、公定書では、個別の成分を比色法により定量している。しかしこの方法は、試薬調製に時間がかかり、操作が煩雑で迅速性に欠ける。また、他の成分を含有する食品添加物製剤では定量できない場合がある等のいくつかの問題点がある。そこで、操作が簡便で迅速性に優れ、かつ製剤分析にも応用できる精度の良い定量法の開発が求められている。

近年、食品添加物製剤中のRNの簡易定量法としてイオン交換カラムを用いたHPLC法²⁻⁴⁾が報告されているが、オクタデシルシリル化シリカゲル (ODS) カラムを用いた定量法に関する報告は少ない。そこで今回、著者らはODSカラムを用い、トリエチルアミンをカウンターイオンとするペアードイオンクロマトグラフィーによる、RNの定量法を検討した結果、簡単な前処理により迅速にかつ、精度の高い定量法が得られたので報告する。また、本法を市販製剤に応用したので、その結果も併せて報告する。

実験

1. 試料

東京都内で入手した食品添加物調味料製剤5製品を試料とした。

2. 試薬及び標準溶液

1) 5'-シチジル酸二ナトリウム (5'-CMP), 5'-ウリジル酸二ナトリウム (5'-UMP), 5'-グアニル酸二ナトリウム (5'-GMP), 5'-イノシン酸二ナトリウム (5'-IMP): ヤマサ醤油(株)製を用いた。

2) RN標準溶液: 5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP及び5'-IMP各100 mgを精秤し、水に溶解して正確に100 mLとした。この液10 mLをとり、水で正確に100 mLとしたものを標準溶液とした。この液1 mLは、5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP及び5'-IMPを100 µgを含有する。

3) トリエチルアミン (TEA): カルボン酸分析計用 (関東化学(株)製)を用いた。

4) メタノール: HPLC用 (関東化学(株)製)を用いた。

5) 超純水: Milli-Q Labo (日本ミリポア社製) を使用して作製した。

その他の試薬はすべて市販特級品を用いた。

3. HPLC装置及び測定条件

HPLC装置: ポンプPU-1580, 紫外検出器UV-1570, カラムオープンCO-1560, クロマトデータ処理ソフトJASCO-BOWIN (日本分光工業(株)製)

* 東京都立衛生研究所生活科学部食品添加物研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

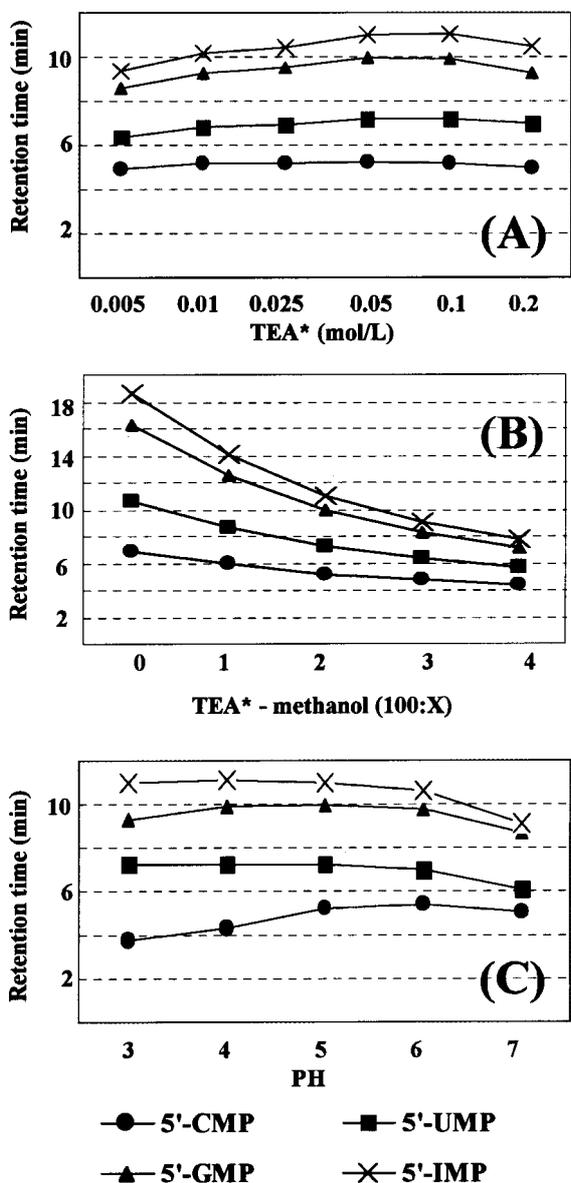


Fig. 1 . Effects of TEA* Concentration(A), Methanol Concentration(B) and PH(C) in the Mobile Phase on Retention Time of 5'-Ribonucleotides(5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP, 5'-IMP)

HPLC conditions : column, YMC-Pack ODS-AQ (250 × 4.6 mm I.D.) ; mobile phase, TEA*-methanol(100:1) ; flow rate, 1.0mL/min; detector, UV (260 nm) ; column temp., 40 ; Inj. vol., 10 μL
*TEA: The solution of triethylamine was adjusted to pH 5.0 with phosphoric acid

カラム : YMC-Pack ODS-AQ (250 mm × 4.6 mm I.D. , ワイエムシイ(株)製) , 移動相 : 0.05 mol/L TEA(pH 5.0, リン酸) - メタノール = 100 : 1 , 流速 : 1 mL/min , 測定波長 : 260 nm , カラム温度 : 40 , 注入量 : 10 μL

4 . 検量線の作成

RN標準溶液をそれぞれ 1 , 2 , 3 , 5 及び 10 mL をとり , 水を加えて正確に 20 mL とした . この液 10 μL ずつを

HPLC に注入し , 得られたクロマトグラムよりピーク面積を求め , 絶対検量線法により検量線を作成した .

5 . 定量

試料約 1 g を精密に量り , 水を加えて正確に 100 mL とした . これを検量線の範囲に入るように適宜 , 水を加えて希釈し試験溶液を作製した .

試験溶液 10 μL を HPLC 装置に注入し , 得られたクロマトグラムのピーク面積から , あらかじめ作成した検量線より試験溶液中の RN の含量を算出した .

6 . 公定書による定量

公定書 5'-リボヌクレオチド二ナトリウムの定量法に従って分析した .

結果及び考察

1 . HPLC 分析条件の検討

イオン交換カラムは , RN の構成成分である核酸の相互分離に優れていることから , 調味料製剤中の RN 分析に広く用いられている . しかし , イオン交換カラムは耐久性に難点があり , イオン濃度などの移動相の微妙な変化が保持時間の再現性及び分離に大きく影響することが知られている . そこで今回 , カラムの耐久性及び頑健性に優れている ODS カラムを用いた RN の分析法について検討した .

最初に , YMC-Pack ODS-AQ のカラムを用いてリン酸緩衝液 - メタノール混液を移動相に用いた逆相クロマトグラフィーで RN の分析を試みたところ , 5'-GMP と 5'-IMP の相互分離が不十分であった .

次に , イオン対試薬を用いたペアードイオンクロマトグラフィーについて検討した . 一般に , 酸性物質を分離するイオン対試薬に , 臭化 n - ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (第四級アンモニウム塩) や TEA (第三級アミン) を使用するペアードイオンクロマトグラフィー法が報告されている^{5,6)} . そこで , 臭化 n - ヘキサデシルトリメチルアンモニウムを用いて検討した結果 , 保持時間が長く (30 ~ 50 分) 良好なピーク形状が得られなかった . 一方 , TEA をイオン対試薬として用いたところ , RN の分離 , 保持時間及びピーク再現性に満足する結果が得られた . なお上記のカラムの他 , TSK-gel ODS-120A (東ソー(株)製) , Shim-pack CLC-ODS (島津(株)製) 及び Cosmosil 5 C18-MS (ナカライテスク(株)製) の 3 種類の ODS のカラムにおいても良好な結果が得られた . これらのことから著者らは , RN の分析を ODS カラムを用いた TEA によるペアードイオンクロマトグラフィーで行うこととした .

RN の保持時間及び相互分離に及ぼす移動相 (TEA 濃度 , メタノール濃度 , pH) の影響についてカラムに YMC-Pack ODS-AQ を用いて検討した . その結果 , Fig. 1 に示すように TEA 濃度は , 保持時間及び相互分離に大きな影響は与えなかった . しかしメタノール濃度はピークの保持時間及び相互分離に大きく影響し , 濃度が増加するに従い , 保持時間の減少が認められた . 一方 , pH は特に 5'-CMP の保持時間に影響を示し , pH が高くなるに従い , 相互分

Table 1 . Recoveries of 5'-Ribonucleotides added in Food Additive Preparation¹⁾

5'-Ribonucleotides	Content of ingredient (mg/g)	Added level (mg/g)	Observed (mg/g)	Recovery ²⁾ (%)	CV (%)
5'-CMP	UQL	5.20	5.12	98.5	0.6
		10.04	10.50	104.6	0.8
5'-UMP	UQL	5.18	5.41	104.4	1.2
		10.23	10.72	104.8	1.2
5'-GMP	4.0	5.20	8.84	93.1	0.6
		10.15	14.46	103.1	1.7
5'-IMP	26.2	5.00	31.20	100.0	3.7
		10.47	37.79	110.7	3.9

1) Sample A shown in Table 2 was determined.

2) Results of 4 replicates

UQL : Under quantitation limit

Table 2 . Determination of 5'-Ribonucleotides in Food Additive Preparation

Sample	Declared (%)	AS*					HPLC				
		5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	total (%)	5'-CMP	5'-UMP	5'-GMP	5'-IMP	total (%)
A	2.5	ID	ID	ID	ID	ID	UQL	UQL	0.4	2.6	3.0
B	100	ID	ID	45.1	44.2	89.3	UQL	UQL	48.0	49.7	97.7
C	100	ID	ID	48.9	43.3	92.2	UQL	UQL	47.8	47.7	95.5
D	1.7	ID	ID	ID	ID	ID	UQL	UQL	0.7	0.7	1.4
E	100	ID	ID	52.2	42.6	94.8	UQL	UQL	40.7	49.5	90.2

* Absorption spectrophotometry : The AS method is described in The Japanese Standards for Food Additive, 7th Ed

ID : Determination was impossible.

UQL : Under quantitation limit

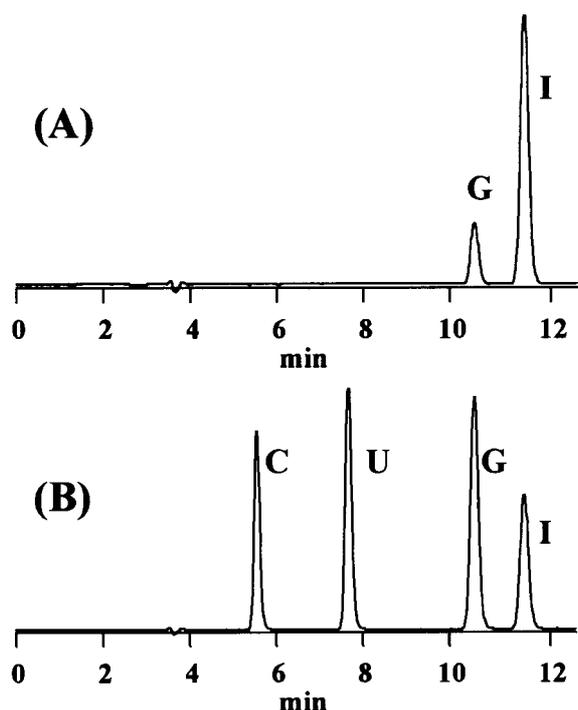


Fig. 2 . HPLC Chromatograms of 5'-Ribonucleotides

C: 5'-CMP, U: 5'-UMP, G: 5'-GMP, I: 5'-IMP

(A) Sample A listed in Table 2

(B) Standard

HPLC conditions are as in Fig. 1 .

離に若干の影響を与えた．そこで移動相は良好な分離が得られ、保持時間も適当な0.05 mol/L TEA (pH 5.0, リン酸) - メタノール = 100 : 1とした．

2 . 検量線

標準溶液を用いて、ピーク面積から5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP及び5'-IMPの検量線を作成した．その結果、いずれも5 ~ 50 µg/mLの範囲で良好な直線性を示し、相関係数は0.999であった．

3 . 添加回収実験

添加回収試験は、5'-GMP及び5'-IMPの含有表示がある市販調味料製剤1.0 gに5'-CMP, 5'-UMP, 5'-GMP及び5'-IMPを約5 mg/g及び10 mg/gとなるように添加した後、実験方法に従い定量した．その結果をTable 1に示す．5 mg/g添加時の回収率は、5'-CMP98.5%、5'-UMP104.4%、5'-GMP93.1%及び5'-IMP100.0%であり、10 mg/g添加では、5'-CMP104.6%、5'-UMP104.8%、5'-GMP103.1%及び5'-IMP110.7%といずれも良好な回収結果が得られた．また、定量再現性もCV値0.6 ~ 3.9%と良好であった．定量限界は試料中の濃度として0.1 µg/g (S/N = 10)であった．

4 . 市販製剤の分析

市販の食品添加物調味料製剤5製品について、本法と公定書による方法で試験した．その結果をTable 2に、そのクロマトグラムをFig. 2に示した．公定書法では、RN含

量表示が100%である単末製剤の成分定量は可能であったが、他の配合成分を多く含む複合製剤では、定量を行うことはできなかった。一方、本法では、RNの配合量が少ない複合製剤でも精度良く成分定量ができた。また、測定操作の面においても本法は公定書法に比較して操作性が格段優れており、分析時間も短時間で終わる等の利点を有していることが認められた。

ま と め

HPLCによる食品添加物製剤中のRNの分析法について検討した。カラムに逆相系のYMC-Pack ODS-AQカラムを、移動相に0.05 mol/L TEA (pH 5.0, リン酸) - メタノール = 100 : 1 を用いたペアードイオンクロマトグラフィーにより良好な結果が得られた。本法は、配合量の少ないRN複合製剤でも簡単な前操作で、迅速にかつ精度良く定量分析ができた。

文 献

- 1) 食品添加物公定書, 第7版, 464-466, 1999, 日本食品添加物協会, 東京.
- 2) 日本分析化学会関東支部編: 高速液体クロマトグラフィーハンドブック, 365, 1985, 日本分析化学会, 東京.
- 3) 楠井貞郎, 村越明, 清水希彦: 食品衛生学雑誌, 21, 373-380, 1980
- 4) 谷村顕雄, 藤井正美, 善平邦利, 他監修: 食品中の食品添加物分析法解説書, 411-420, 1992, 講談社, 東京.
- 5) R. B. Talor, M. I. Awad, R. G. Reid, *et al.*: *J. Chromatogr. B*, 744, 415-421, 2000
- 6) T. Uesugi, K. Sano, Y. Uesawa, *et al.*: *J. Chromatogr. B*, 703, 63-74, 1997