

〔醸酵工学 第58巻 第4号 203-207. 1980〕

ノ ー ト

高速液体クロマトグラフィーによる清酒中の
核酸関連物質の分析

山中 信介・川西 祐成・奥井 一義

奈良県工業試験場

High pressure liquid chromatography analysis of the nucleic acid components in *saké*.YAMANAKA, S., S. KAWANISHI, and K. OKUI (*Pref. Industrial Research Institute, Nara, Kashiwagi-cho, Nara 630*) *Hakkokogaku* 58: 203-207. 1980.

A negative correlation was observed between ultraviolet absorbance and quality of *saké* which was appraised by a sensory test. High pressure liquid chromatography (HPLC) was applied to investigate the ultraviolet absorbing constituents and three peaks were correlated with the quality of *saké*. The ultraviolet absorbing constituents were extracted from *saké* by treating with activated carbon, and then components of the three peaks were fractionated by gel chromatography with Sephadex G-15. The peaks were identified as uridine, hypoxanthine, and tyrosine by R_f values on thin-layer chromatography, HPLC retention times, UV and IR absorption spectra.

On the other hand, high pressure liquid chromatographic analysis of nucleic acid components was studied. Nucleotide monophosphates, nucleosides, and their bases were separated simultaneously in less than 90 min, on a column packed with polyethylene porous polymer gel (Shodex OHpak B-804) and eluted with a linear gradient of citric acid and ammonium phosphate buffer with varying pH, from 2.7 to 3.6.

著者らは、清酒中の紫外線吸収物質について検索中、清酒の紫外線吸収量と清酒品評会での官能検査の評価順とに負の相関のあることを見出した。これらの紫外線吸収物質は、その紫外吸収スペクトルの形状より、核酸関連物質もその一成分であろうと推定された。¹⁾ 清酒中および醸造工程中の核酸関連物質については多数の報告¹⁻⁸⁾ があるが、品質と関連づけたものは数少ない。これらの化合物を高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC と略記）にて分析し、品質と関連するピーク成分の単離・同定について検討した。

核酸関連物質の分析には従来より、ペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ろ紙電気泳動法、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどの方法があるが、これらはいずれも操作が繁雑であったり、分析に時間を要し、また多数の化合物を同時に定量分析するのは困難である。その目的のためには、HPLC は最適の手段であり、近年 HPLC による核酸関連物

質の分析については多数の報告⁹⁻¹⁵⁾ がみられる。著者らは、核酸塩基、ヌクレオシド、およびモノヌクレオチド類の迅速分析のために、Shodex OHpak B-804 を用いる HPLC について検討した。

実験材料および方法

試料 清酒の分析用試料は、昭和52年度大阪国税局管内市販酒品評会の出品酒のうち、上位と判定されたもの10点、中位10点、下位10点の合計30点を用いた。また紫外線吸収物質の単離に用いた清酒は、当試験場にて試醸したものを試料とした。核酸関連物質およびチロシンの標準品は、市販特級品またはこれに準ずるものを使用した。

清酒の紫外吸収スペクトル 日立556型二波長自記分光光度計を使用し、清酒を20~50倍に希釈し、試料とした。

清酒の高速液体クロマトグラフィー 高速液体クロマトグラフは、日本分光 TRI ROTAR を使用した。カラムは、Shodex Ionpak S-801 および OHpak B-804 を用い、検出器は、日本分光 UVIDEC-100 型紫外分光光度計を使用し、検出波長を 260 nm に設定した。移動相には純水を用い、流速は 0.8 ml/min とした。清酒は、0.45 μ m ミリポアフィルターにてろ過したものをそのまま 10 μ l 注入した。

清酒より紫外線吸収物質の分離・同定 清酒 4l を減圧濃縮しエタノールを除き、濃縮物を活性炭 200 g にパッチ式にて吸着させた。活性炭を水洗の後、50% エタノール溶液としてカラムに充てんし、同溶液 2l にて洗浄した。次にアンモニア性アルコール溶液（アンモニア 4%，エタノール 50%）1.5 l にて紫外線吸収物質を溶出させた。得られた溶液を減圧濃縮し、濃縮物を Sephadex G-15 によるゲルクロマトグラフィーにて、6つのグループに分画した。このうち、フラクション P1 を濃縮し水不溶性物質を除き、次にクロロホルム-*n*-プロパノール-メタノール混合溶媒にて、TLC による分取を行った。得られた溶液をさらに、クロロホルム-メタノール混合溶媒にてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、化合物 P1 の結晶を得た。化合物 P3 および P5 は、ゲルクロマトグラフィーによる分離で結晶を得たので、そのまま分析に供した。これらの化合物は、HPLC の保持時間、TLC の R_f 値、紫外吸収スペクトル、および赤外吸収スペクトルにて同定した。なお、赤外吸収スペクトルの測定は、日本分光 IR-G 型赤外分光光度計を使用した。

HPLC による核酸関連物質の分析 装置は清酒の分析の時と同様のものを用い、カラムは Shodex OHpak B-804 を使用した。溶離液は、0.01M クエン酸-0.03 M リン酸アンモニウム緩衝液を用いた。初期濃度は、クエン酸 86% (pH 2.7) とし、試料注入と同時にグラジエント溶出を開始し、最終濃度はクエン酸 10% (pH 3.6) とした。グラジエント時間は 53 分、流速は 0.8 ml/min、カラム温度 27°C (室温)、平均圧力 18 kg/cm² が適当であった。

実験結果および考察

清酒の品質と紫外吸収スペクトル 清酒の紫外吸収スペクトルを Fig. 1 に示した。清酒 30 点について検討の結果、品評会にて上位と判定されたものは一般

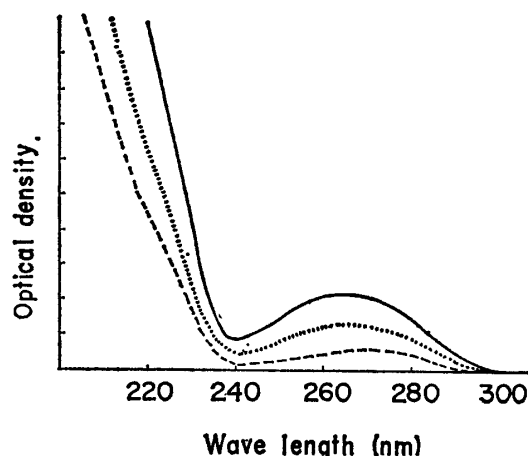


Fig. 1. UV absorption spectra of saké.

--- : upper grade saké,
 : middle grade saké,
 — : lower grade saké.

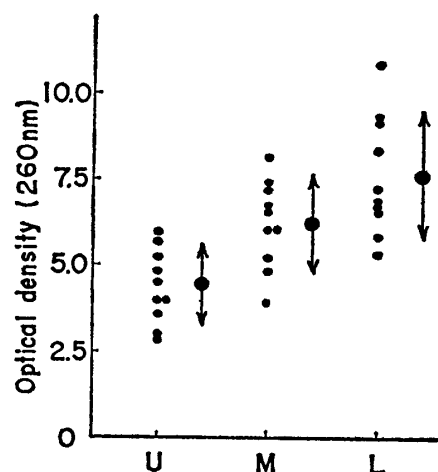


Fig. 2. Relation between UV absorbance and quality of saké.

U : upper grade saké,
 M : middle grade saké,
 L : lower grade saké.

的に吸光度が低く、下位の清酒では吸光度が高いという傾向が見られた。また中位の清酒は、上位と下位の間にばらついた。これを 260 nm の吸光度で比較すると Fig. 2 のような分布となり、上位、中位、下位の平均値の間に有意な差が認められ、清酒の 1 つの品質評価方法として意義のあることを認めた。

HPLC による清酒の分析 清酒を Ionpak S-801 を用いて分析した結果、25 分に特徴的なピークが見られ、上位酒ではピーク高が低く、下位酒では高いという傾向を示した。一方、OHpak B-804 を用いて分析

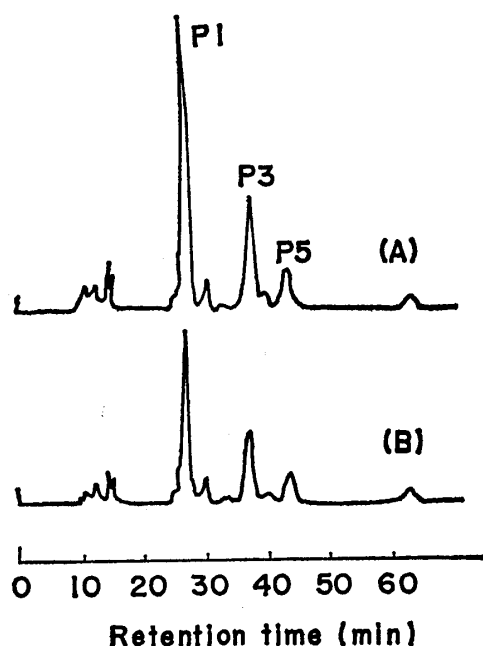


Fig. 3. Liquid chromatograms of saké.

Column : Shodex OHpak B-804, 50 cm×8 mm, eluent : distilled water, flow rate : 0.8 ml/min, detector : UV at 260 nm, samples (10 μ l) : (A) lower grade saké, (B) upper grade saké.

した結果を Fig. 3 に示した。高分子領域以外に約 10 のピークに分離したが、これらのうち P1, P3, P5 が清酒の品質と関連した。P1 は上位、中位、下位の順にピーク高が高くなる傾向を示し、特に上位と下位の間には有意な差が見られた。また P3 および P5 はともに、上位と中位の間には差がなく、下位との間に有意な差が認められた。

各ピーク成分の分離・同定 実験方法で述べたとおり、清酒の活性炭処理によって得られた濃縮物を、Sephadex G-15 によるゲルクロマトグラフィーを行い、水にて展開した。検出は、紫外分光光度計を用い、6つのグループに分画した。このうち、フラクション P1 について、実験方法で示した各種のクロマトグラフィーをくり返し、白色結晶 85 mg を得た。これは 260 nm に吸収極大を与え、シリカゲルによる TLC の R_f 値 (展開溶媒 : *n*-ブタノール : アセトン : 酢酸 : 5% アンモニア水 : 水 = 45 : 15 : 10 : 10 : 20), HPLC による R_t (27.3分), UV スペクトル, および IR スペクトル (Fig. 4) から、化合物 P1 をウリジンと同定した。一方、化合物 P3 および P5 は、Sephadex G-15 によるクロマトグラフィーにより、それぞれ結晶を得た。P3 は、シリカゲルによる TLC の R_f 値,

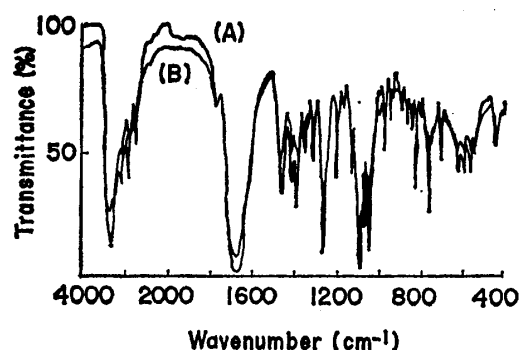


Fig. 4. Infrared spectra of uridine (KBr pellet).

(A) : authentic uridine,
(B) : isolated compound (P1) from saké.

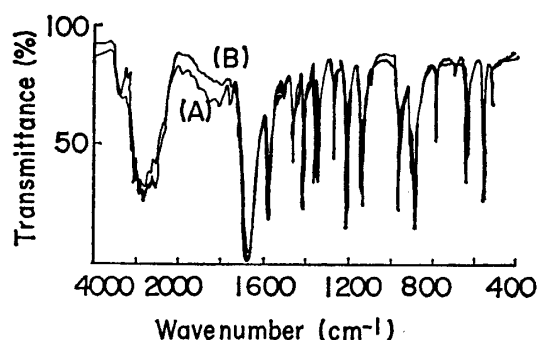


Fig. 5. Infrared spectra of hypoxanthine (KBr pellet).

(A) : authentic hypoxanthine,
(B) : isolated compound (P3) from saké.

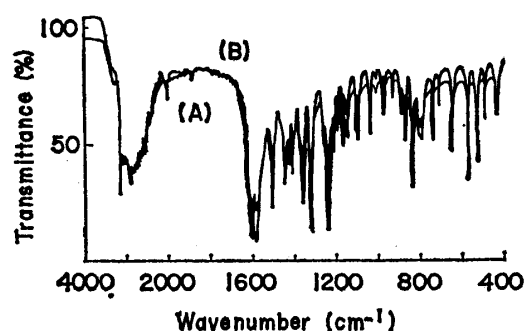


Fig. 6. Infrared spectra of tyrosine (KBr pellet).

(A) : authentic L-tyrosine,
(B) : isolated compound (P5) from saké.

HPLC による R_t (37.0分), UV スペクトル (λ_{\max} = 249 nm), および IR スペクトル (Fig. 5) より、ヒポキサンチンと同定した。また化合物 P5 は、ニンヒドリン反応陽性であり、HPLC による R_t (43.1分), UV スペクトル (λ_{\max} = 224 nm, 274 nm, 282 nm(s)), および IR スペクトル (Fig. 6) より、チロシンと同

定した.^{16,17)}

HPLC による核酸関連物質の分析 当初の HPLC 分析により, 清酒中のウリジン含有量は 21~83 mg/l (平均 44 mg/l), またヒポキサンチン含有量は 4~88 mg/l (平均 31 mg/l) となり, 現在までの報告^{1,2)} の約 10 倍の含有量であった. これは分析方法の相違に原因するものと思われた. 一方, 清酒の 260 nm における紫外吸収の寄与率は, ウリジンおよびヒポキサンチン両者により平均で約 6 割を占め, また核酸関連物質およびアミノ酸で約 8 割程度の寄与率を示した.

これらについての検討, および他成分の分析, さらに一般食品中の核酸関連物質の分析を行うために, HPLC による核酸塩基, ヌクレオシド, およびモノヌクレオチドの分別同時分析について検討した. カラムは Shodex OHpak B-804 を用い, 移動相として各種の緩衝液について検討した. その結果, クエン酸-リン酸アンモニウム緩衝液を用い, pH 2.7 から pH 3.6 までグラジエント溶出することによって最良のクロマトグラムが得られた. 流速を 0.8 ml/min, カラム温

度は室温 (27°C) とした時のクロマトグラムを Fig. 7 に示した. 3 種類のモノヌクレオチド, 7 種類のヌクレオシド, および 7 種類の核酸塩基を同時に 90 分で分析した. アデニンおよびグアニンの保持時間が若干遅れ, さらにこの付近からベースラインの変動がみられた. 従ってアデニンおよびグアニンを分析する必要のない時には, 流速を 1.0 ml/min とし, 他の 15 種類を 57 分間で分析することが可能である. 一般的にヌクレオチド, ヌクレオシド, 核酸塩基の順に溶出し, また各塩基の間では解離定数の高い順に溶出した. 一方, 清酒をこの条件下で分析すると, ウリジン, ヒポキサンチン以外に, 少量のウラシル, キサンチン, シチジン, およびグアニンを検出した. また食品中, 特に醸造食品や調味液中に含まれる核酸系調味料 (5'-モノヌクレオチド) の分析についても OHpak B-804 は適しており, 溶離液は 0.01 M クエン酸 86%, 0.03 M リン酸アンモニウム 14%, pH 2.7 の定組成溶出, 流速 1.0 ml/min の条件で, 5'-IMP, 5'-GMP, 5'-AMP を 22 分間で分析した.

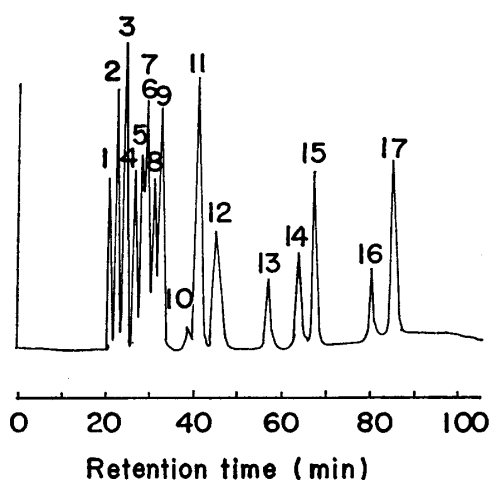


Fig. 7. Liquid chromatogram of an authentic mixture of nucleic acids.

Column : Shodex OHpak B-804, 50 cm×8 mm, eluent : 0.01 M citric acid—0.03M ammonium phosphate (monobasic) buffer, varying pH from 2.7 to 3.6 by linear gradient for 53 min, flow rate : 0.8 ml/min, average pressure : 18 kg/cm², detector : UV at 260 nm, 1 : 5'-IMP, 2 : 5'-GMP, 3 : 5'-AMP, 4 : uridine, 5 : inosine, 6 : thymidine, 7 : uracil, 8 : xanthosine, 9 : thymine, 10 : xanthine, 11 : hypoxanthine, 12 : guanosine, 13 : cytidine, 14 : adenosine, 15 : cytosine, 16 : guanine, 17 : adenine.

要 約

- 1) 清酒の紫外吸収量と清酒の官能検査による品質評価とが, 負の相関を示すことを認めた.
- 2) 清酒を HPLC にて分析し, 品質に関与する主な 3 つのピークを見出した.
- 3) これらのピーク成分について検討したところ, ウリジン, ヒポキサンチン, およびチロシンが同定された.
- 4) Shodex OHpak B-804 を用いた核酸関連物質の HPLC について検討し, 核酸塩基, ヌクレオシド, およびモノヌクレオチドを同時に 90 分で分析した.

本稿を終わるにあたり, 清酒の試料を提供いただいた大阪国税局鑑定官室の皆様へ感謝いたします. また, 発表の機会を与えられた奈良県工業試験場守川喜郎場長に, 深く感謝いたします.

文 献

- 1) 猿野, 阿野 : 醸工, **32**, 253 (1954).
- 2) 猿野, 佐々木 : 醸工, **33**, 474 (1955).
- 3) 猿野 : 醸工, **35**, 178 (1957).
- 4) 毛利, 橋田, 高田, 黒谷, 寺本 : 醸工, **43**, 922 (1965).
- 5) 足立, 柏原, 毛利 : 醸工, **46**, 6 (1968).

-
- 6) 足立, 柏原, 毛利: 醸工, **46**, 15 (1968).
7) 足立, 柏原, 毛利: 醸工, **46**, 898 (1968).
8) 足立, 柏原, 毛利: 醸工, **47**, 416 (1969).
9) 由岐: ふんせき, **1**, 27 (1977).
10) Horvath, C., Lipsky, S. R.: *Anal. Chem.*, **41**, 1227 (1969).
11) Brown, P. R.: *J. Chromatogr.*, **99**, 587 (1974).
12) 瀬田, 和志武, 安茂, 高井, 奥山: 分析化学, **27**, 73 (1978).
13) 瀬田, 和志武, 安茂, 高井, 奥山: 分析化学, **28**, 179 (1979).
14) Kirkland, J. J.: *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 72 (1970).
15) Burtis, C. A.: *J. Chromatogr.*, **51**, 183 (1970).
16) 大高: 農化, **24**, 366 (1951).
17) 小崎, 安井, 住江: 醸協, **20**, 102 (1962).
- (昭55. 1. 24 受付)