

Application News

No. L530

高速液体クロマトグラフィー

HPLC による食品中総プリン体量の測定

プリン体はプリン骨格を持つ核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン塩基の総称であり、体内では最終的に尿酸に代謝されます。また、食事で摂取するプリン体は2割程度で、残りの8割は体内でつくられています。

尿酸の体外への排出と生成のバランスが取れず、体内に蓄積される（尿酸値が上がる）と高尿酸血症（痛風を含む）などを引き起こすことがわかっています。一方で、精神疾患では血清尿酸値が低いことが近年わかってきています。したがって、高尿酸血症患者の食事療法での摂取制限を含め、食生活においてプリン体量をコントロールすることは重要です。

ここでは、一体型高速液体クロマトグラフ “Prominence™-i”（以下、Prominence-i）を用いた食品中に含まれる総プリン体量の分析例をご紹介します。

N. Iwata

■ プリン塩基混合標準溶液の分析

プリン塩基5成分（アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、尿酸、キサンチン）の混合標準溶液を分析しました。分析カラムは昭和電工のマルチモードカラム、Asahipak GS-320HQを使用しました。移動相は、りん酸二水素ナトリウム二水和物とりん酸をモル比で4対1になるように混合したりん酸緩衝液を使用しました。図1にプリン塩基混合標準溶液（各10 mg/L）のクロマトグラムを、表1には分析条件をそれぞれ示します。

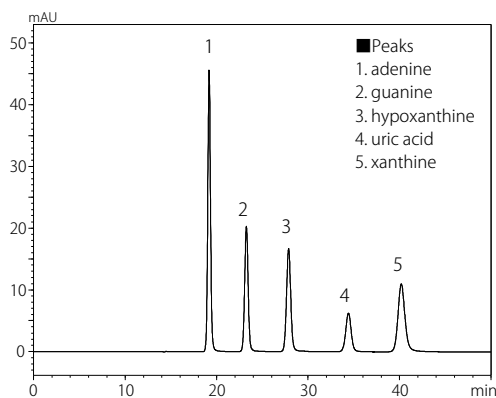


図1 プリン塩基混合標準溶液のクロマトグラム

表1 分析条件

System	: Prominence-i 3D
Column	: Shodex Asahipak GS-320HQ (300 mm L, 7.5 mm I.D., 6 μm)
Flow rate	: 0.6 mL/min
Mobile phase	: 150 mmol/L (sodium) phosphate buffer (pH 2.6)
Column temp.	: 35 °C
Injection volume	: 10 μL
Detection	: PDA 260 nm

■ 検量線

プリン塩基5成分について、0.1~20 mg/Lの範囲で検量線を作成したところ、いずれの成分においても寄与率0.9999以上と良好な直線性が得られました。図2に検量線を示します。

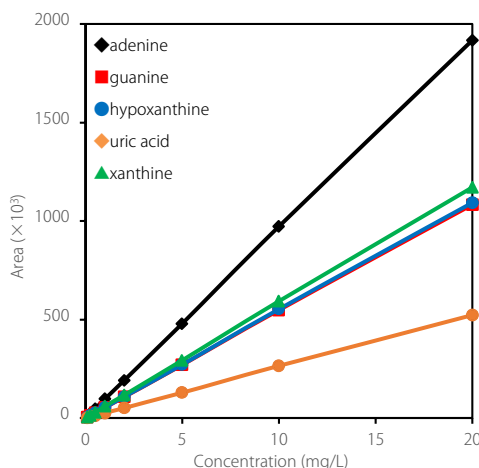


図2 検量線

■ 前処理

試料はマグロおよびブロッコリーを使用しました。マグロは市販の切り身を、ブロッコリーは可食部を切り分けただけのものを使用しました。

図3に前処理プロトコルを示します。粉碎済の試料を凍結乾燥し、過塩素酸（70%）で加水分解後、中和を行いました。得られた上清は、酵素処理を施さない前処理（前処理A、未処理液）と酵素処理を行う前処理（前処理B、処理液）に分け、未処理液は遠心ろ過、処理液は限外ろ過したものをHPLCに供しました。なお、過塩素酸での加水分解によりプリン塩基まで分解されます。

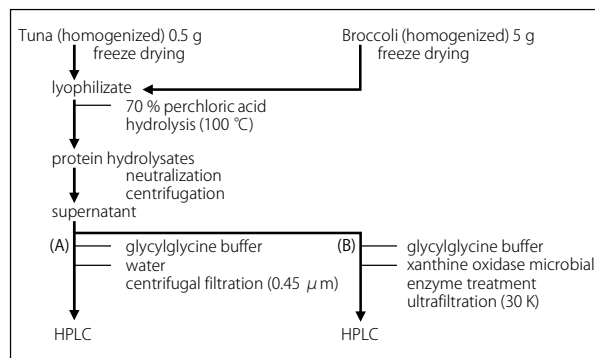


図3 前処理プロトコル

■ マグロの分析

畜水産物は筋肉を多く含むため、野菜、果物に比べ、プリン体が多く存在することが知られています。

図 4 にマグロを測定した結果を示します。黒線は標準溶液、赤は未処理液、青は処理液です。プリン塩基は酵素処理により酸化体となり、ピーク位置がシフトします。つまり、未処理液と処理液のクロマトグラムを比較し、処理液でピークの消失が確認されると、プリン塩基のピークであることとなります。また、未処理液と処理液のピーク面積値の差分から定量を行います。¹⁾

マグロからアデニン、グアニン、ヒポキサンチンが分離検出されました。得られた結果から、総プリン体量はマグロ 100 g 中 205.0 mg でした。また、仮にこれらのプリン塩基が全て尿酸に代謝された際の尿酸量、つまり、尿酸換算値は 251.9 mg/100 g でした。各塩基の含有量、総プリン体量、尿酸換算値を表 2 にまとめました。

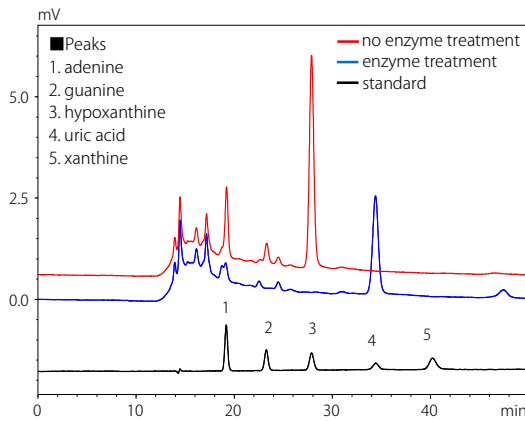


図 4 マグロのクロマトグラム

表 2 各塩基の含有量、総プリン体量、尿酸換算値 (mg/100 g)

	アデニン	グアニン	ヒポキサンチン	キサンチン
マグロ	17.0	12.4	175.6	0.0
ブロッコリー	25.9	32.0	0.4	0.0

	総プリン体量	尿酸換算値
マグロ	205.0	251.9
ブロッコリー	58.3	68.3

■ ブロッコリーの分析

図 5 にブロッコリーを測定した結果を示します。黒線は標準溶液、赤は未処理液、青は処理液です。ブロッコリーからアデニン、グアニン、ヒポキサンチンが分離検出されました。得られた結果から、総プリン体量はブロッコリー 100 g 中 58.3 mg でした。このとき、尿酸換算値は 68.3 mg/100 g でした。各塩基の含有量、総プリン体量、尿酸換算値を表 2 に示します。

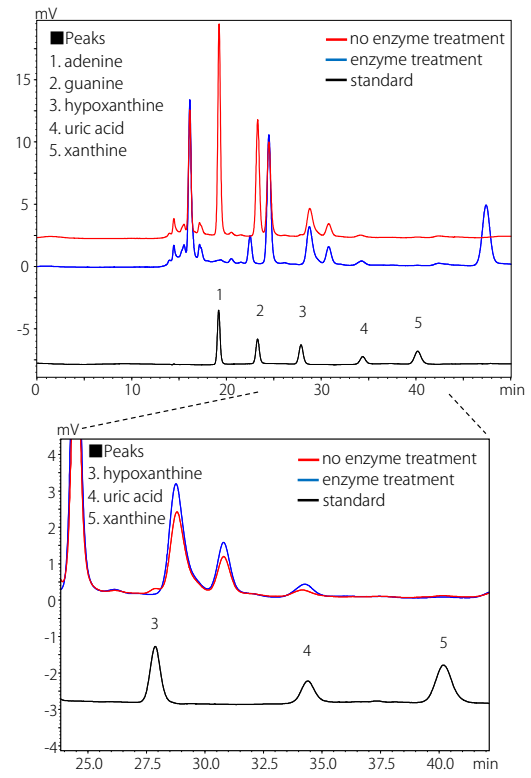


図 5 ブロッコリーのクロマトグラム

■ UV スペクトルでの確認

Prominence-i 内蔵のフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器は、酵素処理反応の進行を確認できます。

図 6 は図 4 中で約 20 分に溶出しているアデニンの溶出位置の UV スペクトルです。黒線は標準溶液、赤は未処理液、青は処理液です。図 4 より、処理液のアデニンの保持時間に検出されたピークにおいて、スペクトルからアデニンは確認されませんでした。すなわち、処理液のアデニンの保持時間に溶出しているピークは夾雑物と考えられます。

このように、酵素処理が進んだこと、あるいはプリン塩基が含まれていることの確認には、PDA 検出器を利用することが有用です。

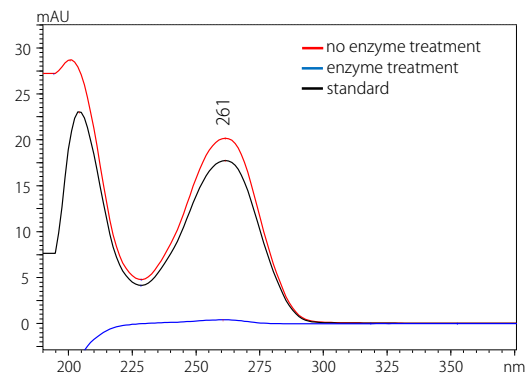


図 6 アデニン溶出位置のスペクトル

[参考文献]

1) Kaneko K, Yamanobe T and Fujimori S, Biomed Chromatogr, 23, 858-864 (2009)

本アプリケーションにおける作成には、帝京大学 薬学部 金子教授より多大なご協力を賜りました。

Prominence は、株式会社 島津製作所の商標です。

Asahipak は、昭和電工株式会社の登録商標です。

その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。

なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2018年9月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。