

LC-MSを使用した飲料中のプリン体分析

伝統産業・地域活性化グループ 清野 珠美、田中 秀典、和田 潤

要 旨

近年、酒類業界では「プリン体ゼロ」のビールや日本酒、ノンアルコール飲料の開発が盛んになっており、低濃度領域でのプリン体分析が必要となっている。そこで、液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC-MS) を用いて、飲料中のプリン体濃度の高感度分析方法を検討したところ、4種類のプリン塩基について10-100 ppbの間で良好な検量線を作成することができた。その後、実際に市内クラフトビール製造者の製品開発にて本法を活用することで、プリン体濃度を100 mlあたり0.5 mg未未満まで低減したビールテイスト飲料の開発に寄与することができた。

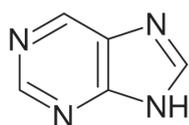
1. 緒言

プリン体とは、プリン骨格を含む化合物の総称である¹⁾。プリン体には、核酸・プリンヌクレオチド・プリンヌクレオシド・プリン塩基が含まれ (図1)、生物の遺伝情報や生体内代謝のエネルギーなど、生命活動において重要な役割を担っている。生体内のプリン体は代謝により最終的に尿酸となり、ヒト体内では1日に約700 mgの尿酸が生成される。一方で、ヒトは尿酸を常に一定量蓄えるようになっており、健常男性では約1200 mgの尿酸が蓄積されている (尿酸プール)。前述のように尿酸が生成されると、余剰分の尿酸は主に尿と共に排出され、尿酸プールは一定量が保たれる。尿酸は難溶解性の物質で、生体内で過剰になると、尿酸ナトリウムの結晶として関節などに析出し、痛風など

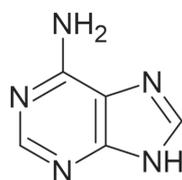
の関節炎を引き起こす。

プリン体は食品からも摂取される。食品に含まれるプリン体は、細胞に含まれる核酸が主であり、消化管でヌクレオシドや塩基まで加水分解されて体内に吸収される。食品からのプリン体摂取量の増加は、前述の尿酸プールの増大につながり、痛風などのリスクが高まるとされている。

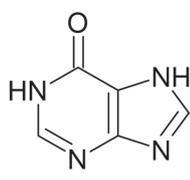
高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン²⁾に掲載されている酒類中のプリン体含有量を表1に抜粋した。蒸留酒にはプリン体はほとんど含まれていないが、醸造酒には1-12 mg/100 ml程度のプリン体が含まれている。アルコールの摂取は尿酸排出を阻害すると言われていたため、プリン体濃度が低くても、飲用量への注意が必要とされている。醸造酒のなかでも、ビールは原料



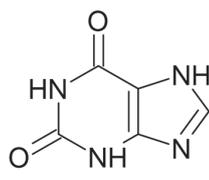
プリン (プリン骨格)



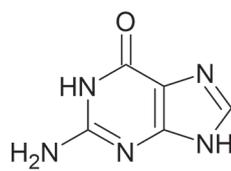
アデニン



ヒポキサンチン



キサンチン



グアニン

図1 プリン骨格とプリン塩基

表1 アルコール飲料のプリン体濃度²⁾ (mg/100 ml)

蒸留酒	
ウイスキー	0.1~0.3
ブランデー	0.4
焼酎	0.0
泡盛	0.0
梅酒	0.2
醸造酒	
ビール	3.3~8.4
地ビール (クラフトビール)	4.6~16.7
発泡酒 (プリン体カット)	0.1
ビールテイスト飲料	1.3
日本酒	1.2~1.5
ワイン	0.4~1.6

の麦芽に含まれる核酸に由来するプリン体が多く、その中でも近年流行している地ビール（クラフトビール）は、使用する麦芽量が多いものや、ろ過時に敢えて酵母を残存させて、うま味を付与している製品が多いため、プリン体がさらに高くなる傾向がある。

昨今の消費者の健康志向を受け、酒類業界ではプリン体濃度の低い酒類等の開発が盛んになっており、「プリン体ゼロ」のビールや日本酒が多く販売されている。製品開発にあたり、酒類メーカーの多くは100 mlあたり0.5 mg未満を「プリン体ゼロ」と定義している。このような背景から、プリン体の分析は低濃度領域での測定が求められている。

そこで、本稿では市内企業の協力の下、液体クロマトグラフ-質量分析装置（LC-MS）を用いて、飲料中のプリン体濃度の高感度分析方法を確立し、実際に「プリン体ゼロ」の製品開発に活用したので報告する。

2. 実験方法

試料中のプリン体の分析は、過塩素酸で加水分解処理を行い、プリン体をすべてプリン塩基に分解した後、LC-MSにて4種類のプリン塩基（キサンチン、ヒポキサンチン、アデニン、グアニン）を分析した。

加水分解処理は、ねじ口試験管に試料1 mlを入れ、過塩素酸（60%）122 μ lを加えて100 $^{\circ}$ C、1時間加熱して行った。放冷後、蒸留水を適宜加えて希釈し、0.45 μ mのフィルターでろ過後、分析試料とした。

LC-MS装置はACQUITY TQD (Waters) 又はLCMS-8050（島津製作所）を使用した。MS部の検出条件はポジティブモードで行い、各装置の自動最適化機能によって、装置パラメータ及びMRMトランジションを決定した（表2）。LC部については、カラムはDiscovery HS-F5 (2.1 \times 150 mm, 3 μ m, Supelco) を用い、カラム温度は40 $^{\circ}$ Cとした。流速は0.2 ml/minとし、溶出は移動相A：0.1%ギ酸、B：100%アセトニトリルの2液を

表2 プリン塩基のMRMトランジション (m/z)

	ACQUITY TQD	LCMS-8050
キサンチン	153.07 > 54.96	153.10 > 110.00
ヒポキサンチン	137.07 > 109.97	137.00 > 118.95
アデニン	136.13 > 91.51	136.15 > 119.00
グアニン	152.10 > 109.98	152.15 > 135.00

用いたグラジエントによって行った。グラジエント条件は次のとおりとした：0-10分 B濃度 0-67%、10-15分 B濃度 100%、15-25分 B濃度 0%。

別途、4種類のプリン塩基の標準試薬を用いて検量線を作成し、検量線と試料のピーク面積から各プリン塩基の濃度を算出した。プリン体濃度は、各プリン体塩基の濃度の和として算出した。

3. 実験結果と考察

前項のLC-MS分析条件に従って、4種類のプリン塩基の標準試薬を分析したところ、10-100 ppbの間で良好な検量線を作成することができ、本分析条件がプリン塩基の高感度分析に適用できることが示された（図2）。続いて、一般に店頭で販売されている日本酒製品及び「プリン体ゼロ」と表記している日本酒製品について、前項の方法に従ってプリン体濃度を分析したところ（表3）、日本酒は1.4 mg/100 mlであり、表1の文献値と同程度の数値となった。これに対し、「プリン体ゼロ」日本酒製品2点は、どちらも0.1 mg/100 mlとなり、前述した「プリン体ゼロ」の定義内の数値を示した。これらの結果から、本分析方法が「プリン体ゼロ」飲料の製品開発に活用できることが示された。

そこで、市内クラフトビール製造企業の協力により、新規ビールテイスト飲料の試作に本分析方法を活用することとした。協力企業の既存ビール製品、試作品（ビールテイスト飲料とそのプリン体低減処理をしたもの）のプリン体濃度を分析したところ（表3）、ビール製品は19.2 mg/100 mlとなった。今回使用したビール製品は、アルコール度数が7%と高く、麦芽の使用量が多い製品であったため、プリン体濃度が高いと考えられた。ノンアルコールであるビールテイスト飲料は、麦芽を原料に使用している製品もあり、プリン体は存在しているが、一般的にビールよりもプリン体濃度が低い（表1）。表3のとおり、今回分析した試作ビールテイスト飲料は1.3 mg/100 mlとなり、表1の文献値と同程度であった。さらにプリン体低減処理を行うことで0.2 mg/100 mlとなり、「プリン体ゼロ」の定義内の数値までプリン体を低減することができた。

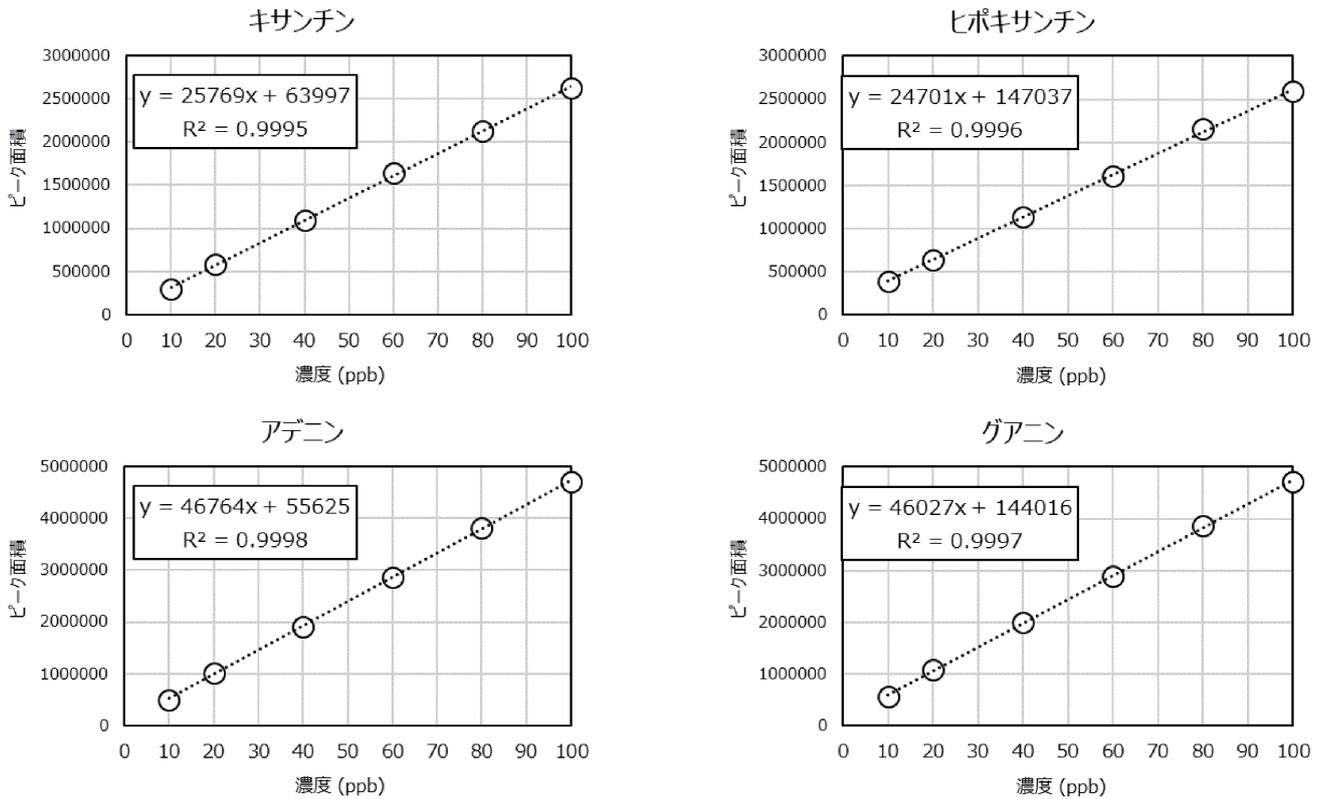


図2 プリン塩基の検量線 (分析はLCMS-8050で実施)

表3 LC-MSを用いたプリン体分析 実試料による分析値*

試料**	(mg/100 ml)				総プリン体
	キサンチン	ヒポキサンチン	アデニン	グアニン	
日本酒	0.3	0.4	0.2	0.4	1.4
日本酒(糖質ゼロ・プリン体ゼロ) A社	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1
日本酒(糖質ゼロ・プリン体ゼロ) B社	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
地ビール(クラフトビール)	0.9	1.1	4.4	12.8	19.2
ビールテイスト飲料	0.1	0.0	0.3	1.0	1.3
ビールテイスト飲料(プリン体低減処理)	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2

*分析値は計算後、小数点以下第2位を四捨五入し、小数点以下1位まで表記した。

**ビール試料の分析はACQUITY TQD、清酒試料の分析はLCMS-8050にて実施した。

4. 結論

LC-MSを用いた本分析法は、プリン塩基4種類について10 ppbまでの高感度分析が可能であることが示された。また、本分析法を活用して「プリン体ゼロ」飲料の製品開発に寄与することができた。

5. 謝辞

本研究を進めるにあたり、黄桜株式会社様に多大なるご協力をいただきましたことを、この場を借りて御礼申し上げます。

6. 参考文献

- 金子希代子: Gout and Nucleic Acid Metabolism, 31, 119-131 (2007).
- 日本痛風・核酸代謝学会ガイドライン改訂委員会: 高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン 第2版 (2010).