高速液体クロマトグラフィーによる 生体試料中の N^ε-メチルヒスチ ジンの迅速分析法

飯島潤一*, 田島 眞**, 福島秀夫*

* 筑波大学体育科学系

** 農林水産省食品総合研究所

A Rapid Analysis of N^ε-Methylhistidine in Plasma and Urine of Human and Rat by High Performance Liquid Chromatography

Junichi IJIMA,* Makoto TAJIMA,**
Hideo FUKUSHIMA*

* Institute of Health and Sports Science,
University of Tsukuba, Niihari-gun, Ibaraki, 305

** National Food Research Institute,
Tsukuba-gun, Ibaraki, 305

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 36, 299~301 (1983) The Wassner's method (1980) for determination of N^ε-methylhistidine (τ -Meh) for determination of N^ε-methylhistidine (τ -Meh) was revised. This method was applied to analyse τ -Meh in rat plasma and urine.

Human plasma and urine were deproteinized with sulfosalicylic acid. Further hydrolysis (with 6N HCl, 100°C for 1 hr) was necessary in rat plasma and urine. Fluorescamine was added to the deproteinized samples and heated with perchloric acid according to the method of Nakamura and Pisano (1976). Reaction mixture (25-100 μ l) was injected into HPLC equipped with Zorbax BP-ODS column (ϕ 4 mm $\times$ 25 cm) and fluorometer. Solvent was 27% acetonitril-10 mM phosphate buffer, pH 7.5. Only two peaks of histidine and τ -Meh was detected. τ -Meh was eluted within 10 min. Regeneration of the column was not necessary. Linearity in standard curve from 33 pmol to 8.5 nmol of τ -Meh was observed. The sensitivity and separation were enough to estimate τ -Meh level in plasma and urine.

(Received October 13, 1982)

N^ε-メチルヒスチジン (τ -Meh) は、動物の骨格筋タンパク質中に特異的かつ一定の割合で存在し、筋タンパク質の崩壊に伴って遊離したものは、再利用や代謝されことなく排泄されることから、骨格筋タンパク質崩壊

の指標として利用されている¹⁾。 τ -Meh の分析は、通常、アミノ酸分析計で行なわれているが²⁾、N^ε-メチルヒスチジン、アンゼリンなどとの分離が困難であるうゑに、生体試料中の測定には感度が十分でなく、分析時間は高速型アミノ酸分析計を用いても約 200 分かかる。Wassner ら³⁾は、プレカラムによるケイ光誘導体化と高速液体クロマトグラフィーを組み合わせ、ヒト尿および血漿中の τ -Meh 分析法を開発している。著者らは、この方法がラット尿および血漿に適用できるかどうか、また、彼らは溶出液の濃度勾配を利用して分離を行なっているが、単一溶出液による分離を試みた。これにより、分析時間が短縮され連続分析が可能であったので報告する。

実験方法

1. 試薬

標品の τ -Meh, N^ε-メチルヒスチジンは、Calbiochem-Behring 社製、L-ヒスチジンは、宝興産社製、標準アミノ酸混合液は、和光純薬社製の B 型と AN 型とを用いた。ケイ光修飾試薬は、ロッシュ社製のフルラムを用い、その他の試薬は、和光純薬社製の特級試薬をそのまま用いた。水は、ミリポア社製の純水製造装置による、スーパー Q-活性炭処理水を用いた。

2. 試料前処理法

ヒト尿は、水で 10 倍に希釈して、その 1 ml に 50% スルホサリチル酸溶液 100 μ l を加えて、混和したものを 5,000 rpm で 30 分間冷却遠心し、除タンパク上清を試料とした。ヒト血漿は、250 μ l に 50% スルホサリチル酸溶液 25 μ l を加えて混和し、5,000 rpm で 30 分間冷却遠心した上清を試料とした。ラットの尿・血漿中にはアシル化された型の τ -Meh が存在するため¹⁾、尿・血漿のスルホサリチル酸除タンパク上清を 6 規定塩酸中 100°C で 1 時間加熱し、減圧乾固の後、水で溶解して試料とした。

3. 試料のケイ光誘導体化

標品のアミノ酸の 0.1 規定塩酸溶液または試料 100 μ l を 3 ml 容耐圧試験管 (テフロンシール付) に取り、250 μ l の 0.4 M ホウ酸緩衝液 (pH 12.2)、ついで 250 μ l のフルラム溶液 (170 mg/100 ml アセトニトリル) を迅速に加えて激しくかく拌し、5 分間室温放置後、35 μ l の 60% 過塩素酸を加え、密封して 80°C で 1 時間加熱した。加熱終了後、室温まで冷却し 100 μ l の 0.5 M 3-(N-モルホリノ) プロパンスルホン酸 (3 M 水酸化ナトリウム溶液) を加えて、この 25~150 μ l を高速液体クロマトグラフに注入した。

4. 高速液体クロマトグラフィー

島津社製 LC-3A 型高速液体クロマトグラフに、ゾル

* 〒305 茨城県新治郡桜村天王台 1-1-1

** 〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2

Fig. 1. Standard curve of N^{ϵ} -methylhistidine. Each quantity of N^{ϵ} -methylhistidine was converted into fluorescent derivative in the presence of 4.25 nmol of L-histidine. Standard curve was linear from 33 pmol to 8.5 nmol. $Y=20.4 X-2.20$, $r=0.999$.

Fig. 2. Chromatographic and fluorometric traces showing the different retention time of histidine and N^{ϵ} -methylhistidine in amino acid standard at different concentration of acetonitril in elutant.

Amino acid standard, type B contained L-histidine, N^{ϵ} - and N^{ϵ} -methylhistidine, L-lysine, L-arginine, L-anserine, L-ornitine, γ -aminobutyric acid, DL-(+)-*allo*- δ -hydroxylysine, ethanolamine, ammonium chloride and creatinine. L-histidine (213 pmol, peak 1) and N^{ϵ} -methylhistidine (213 pmol, peak 2) were detected.

Column: Zorbax BP-ODS, ϕ 4 mm $\times$ 25 cm.

Elutant: 0.01 M phosphate buffer containing ca. 27% of acetonitril.

Flow rate: 1.5 ml/min.

(A) 27.5% acetonitril in elutant, (B) 27.0% acetonitril in elutant, (C) 26.5% acetonitril in elutant.

Fig. 3. Chromatographic and fluorometric traces of N^{ϵ} -methylhistidine derivative from human urine (A) and hydrolyzed rat urine (B).

Fig. 4. Chromatographic and fluorometric traces of N^{ϵ} -methylhistidine derivative from human plasma (A) and hydrolyzed rat plasma (B).

ボックス BP-ODS のカラム (内径 4 mm, 長さ 25 cm) を装置し, 溶出液は, 27% アセトニトリル-0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) を毎分 1.5 ml で流した。検出器は, 島津社製 RF-510 LC 型分光ケイ光スペクトロモニタを用いて, 励起光波長は 390 nm, スリット幅 10 nm に, ケイ光波長は 477 nm, スリット幅 40 nm に設定した。定量計算は, 島津社製 ITG-4A 型デジタルインテグレータまたはピーク高より行なった。

結果と考察

生体試料の条件を考慮して, 注入量 25 μ l 中の L-ヒ

スチジン 4.25 nmol に対して, τ -Meh を 33, 67, 133, 265, 531 pmol, 1.06, 2.31, 4.25, 5.30, 8.50 nmol をそれぞれ添加し, L-ヒスチジンとの分離と τ -Meh の検量線について検討した。いずれの場合も L-ヒスチジンとは十分分離しており, ピーク高より求めた τ -Meh の検量線は, 33 pmol から 8.5 nmol の範囲にわたって直線性を示した (Fig. 1)。Fig. 2 に示すように τ -Meh の保持時間は, 溶出液中のアセトニトリルの割合に大きく依存しており, リン酸緩衝液の濃度, pH にはあまり影響されなかった。したがって τ -Meh の保持時間を一定にするには, アセトニトリルの割合をよく維持することが重要である。Fig. 2 に見られるように, N α -メチルヒスチジン, アンゼリンなどは, 加熱処理中に非ケイ光性の物質になるため, τ -Meh の分離を妨害しない。Fig. 3 にヒトおよびラットの尿, Fig. 4 にヒトおよびラットの血漿のクロマトグラムを示した。ラット血漿

250 μ l を用いて分析し, 110.5 pmol の τ -Meh を検出定量することができた (Fig. 4)。本法は単一溶出液を用いるため, カラムの再生が不要で, 分析終了後, ただちに次の試料を注入することができる。また, ケイ光誘導体化した試料は, 室温で 48 時間以上安定であった。

文 献

- 1) Young, V.R. and Munro, H.N.: *Fed. Proc.*, **37**, 2291 (1978)
- 2) Nishizawa, N., Shimbo, M., Hareyama, S. and Funabiki, R.: *Br. J. Nutr.*, **37**, 345 (1977)
- 3) Wassner, S.J., Schlitzer, J.L. and Li, J.B.: *Anal. Biochem.*, **104**, 284 (1980)
- 4) Nakamura, H. and Pisano, J.J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 334 (1976)

(昭和 57 年 10 月 13 日受理)

グルコマンナン, プルランならびにセルロースの血糖上昇抑制効果の比較

奥 恒 行, 藤田 温 彦, 細 谷 憲 政
東京大学医学部保健学科保健栄養学教室

Effect of Glucomannan, Pullulan and Cellulose on Blood Glucose Levels in Glucose Tolerance Test

Tsuneyuki OKU, Haruhiko FUJITA,
Norimasa HOSOYA

Department of Nutrition, School of Health
Science, Faculty of Medicine, the
University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) **36**, 301~303 (1983) Eight healthy subjects (average age 27.5 years old) were orally administered 200 ml of the control solution (containing 50 g of glucose) or the test solutions (containing 50 g of glucose and 5 g of glucomannan or cellulose), and compared with the suppressive effect on the enhancement of blood glucose level.

Glucomannan delayed the intestinal absorption of glucose and could significantly suppress the maximal level of blood glucose, but cellulose could not. Addition of pullulan of 5 or 10 g to glucose solution also did not show the suppressive effect on blood glucose level

(Received February 1, 1983)

難消化性多糖類, いわゆる食物繊維は食事後の血糖上昇を抑制し, 糖尿病の症状の改善や発生の予防をすることが明らかにされてきた^{1)~3)}。この難消化性多糖類による血糖上昇抑制作用は, それがもっている物理化学的性質, とくに水溶性と不水溶性によって効果の異なることが示唆されている^{4)~6)}。本研究では, 水溶性難消化性多糖類としてグルコマンナンならびに微生物産生多糖類であるプルランを用い, また不水溶性多糖類としてセルロースを用いて, 糖負荷試験を行ない, 血糖上昇におよぼすこれらの難消化性多糖類の影響を観察してみた。

実 験 方 法

1. 被 験 者

通常の生活をしている健康人 8 名 (男性 6 名, 女性 2 名) を被験者とした。被験者はすべて標準体重を維持したもので, 年齢は 20 歳代 6 名, 30 歳代 2 名である。被験者には試験前日夕食後から 12~14 時間絶食させ, 水またはお茶の飲用のみを許可した。

第 1 回目の試験では, 被験者のコントロール値を得るため難消化性多糖類を含まないブドウ糖液を飲ませた。難消化性多糖類の負荷試験の順位は無作為に決定した。おのおの負荷試験の間隔は 4~10 日間であった。

2. 試験糖液の調製

ブドウ糖 50 g をイオン交換水に溶かして 200 ml とし, これをコントロールとした。難消化性多糖類の効果を観察する場合には, ブドウ糖 50 g を含む水溶液 200 ml に難消化多糖類 5 g を添加し, 均一に混和した。試験糖液は飲みやすくするため冷蔵庫に 14~16 時間冷蔵した。

グルコマンナンはコンニャクイモから精製した高純度