動物エキス中のヒスチジン含有ジペプチド（アンセリン、カルノシン）の HPLC による迅速定量法

柳内延也^{*,**§}, 塩谷茂信^{*,**}, 水野雅之^{*,**}, 鍋谷浩志^{*}, 中嶋光敏^{*}

^{*} 独立行政法人 食品総合研究所

^{**} 東海物産株式会社

A Simple and Rapid HPLC Method for Quantification of Histidine-Containing Dipeptides, Anserine and Carnosine, in Animal Extracts

Nobuya Yanai^{*,**§}, Shigenobu Shiotani^{*,**}, Masayuki Mizuno^{*,**},
Hiroshi Nabetani^{*} and Mitsutoshi Nakajima^{*}

^{*} National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba-city 305-8642

^{**} Tokai Bussan Co., Ltd., 1-10-5 Iwamoto-chou, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0032

A simple method of HPLC for quantification of histidine-containing dipeptides (HCDP), anserine and carnosine, in animal meats was investigated. Each 10 μ L of extracts prepared by heat extraction from various animal meats including beef, pork, chicken, and tuna was applied to a TSKG-2500 PWX1 column, developed with 45% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid at a flow rate of 0.5 mL/min, and monitored with an UV detector at 210 nm. Both anserine and carnosine were eluted as an identical single peak and separated from other proteins, peptides and amino acids. Although a small amount of lysine and arginine were contained in the anserine-carnosine peak as major contaminants, these amino acids had no absorption at 210 nm. Therefore, the detected peak that showed the same retention time of anserine or carnosine was calculated as total HCDP. By using a standard curve of carnosine, total HCDP content in meat extracts was rapidly quantified within 30 min per one sample and the data obtained from this method were similar to those from an automatic amino acid analyzer.

(Received Mar. 14, 2003 ; Accepted Nov. 18, 2003)

動物エキス中に存在するアンセリン (β -alanyl-L-methyl-L-histidine) とカルノシン (β -alanyl-L-histidine) は β -アラニンと L-ヒスチジンが結合した抗酸化活性を持つジペプチドである^{1)~3)}。哺乳動物生体内ではカルノシン合成酵素が存在し⁴⁾、運動量やエネルギー消費の高い骨格筋や脳組織で生産されるが、アンセリンはカルノシンのヒスチジン残基の 1 位の N にメチル基が付加したものであり、カルノシンの代謝産物である。哺乳類の筋肉組織から抽出されるこれらヒスチジン含有ジペプチド (Histidine-containing dipeptides, HCDP と略記) はカルノシンが主体であり、鶏ではアンセリンとカルノシンの含量比率が逆転し、マグロなどの大型回遊魚ではアンセリンが主体である⁵⁾⁶⁾。

近年、食品機能性成分に対する関心が高まっているが、動物エキス中に存在するアンセリンやカルノシンも抗酸化

機能性成分として注目されてきている。このことから、動物エキス中のアンセリン-カルノシン含量を測定したり、エキスを製造する工程上でこれらのペプチドの挙動・消長を追跡するために、迅速・簡便な定量法が求められてきた。各種動物エキス中のアンセリン-カルノシン定量法についてこれまで多くの報告があるが、基本的にはアミノ酸自動分析計での定量法が一般的である。しかしアミノ酸自動分析計では 1 検体の測定に通常 150 分、標準液の分析を加えれば 300 分を要し、更に蛋白質を含む試料の場合には除蛋白質処理も必要であり、迅速・簡便性に欠けていた。また各種 HPLC 法⁷⁾⁸⁾ や比色定量法など⁹⁾¹⁰⁾ も報告されているが、これらも試料の調製や分画した成分の蛍光標識などの操作が必要であり、同じように迅速さに欠ける問題があった。

本報では、各種動物エキスに含まれるアンセリンとカルノシンを HCDP 総体として迅速・簡便に定量し、動物エキスの製造工程管理や品質管理に応用できる方法として、ゲルろ過 HPLC (GPC-HPLC) 法を検討した。本報の

^{*} 〒305-8642 つくば市観音台 2-1-12

^{**} 〒101-0032 東京都千代田区岩本町 1-10-5

[§] 連絡先 (Corresponding author): nyanai@nfri.affrc.go.jp

方法によれば、各種動物性エキス中のアンセリンとカルノシンは同じ単一ピークとして溶出され、標準品を用いた検量線定量により 1 検体わずか 30 分で HCDP 含量を測定することが可能であった。また、GPC-HPLC 法で測定された HCDP 含量はアミノ酸自動分析器で測定されたアンセリンとカルノシンの合計量と高い相関性を持つものであり、迅速・簡便、かつ比較的精度が高く HCDP を定量できる方法であったので、エキス製造と直結した原料評価、製品品質の評価及び製造管理の上で極めて利便性の高い方法であった。本報ではこの GPC-HPLC 法によるアンセリン-カルノシン総量の定量法について報告する。

実験方法

1. 試薬

L-アンセリン硝酸塩、L-カルノシン、分子量マーカーのチトクロム C (MW : 12 500), アプロチニン (MW : 6 500), バシトラシン (MW : 1 422), アンジオテンシン (MW : 1 050), Gly-Gly-Tyr-Arg (MW : 451) 及び Gly-Gly-Gly (MW : 189) は Sigma Chemicals (St. Louis, MO), アミノ酸自動分析用試薬及び生体用アミノ酸標準液、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸 (TFA) は和光純薬 (大阪) から購入した。

2. HPLC 装置

島津製作所 SCL-10A の装置に TSKG-2 500PWX1 カラム (東ソー, 東京) を連結し、波長 210 nm の UV 検出器 SPD-10A 及びデータ処理器 C-R7A plus (いずれも島津製作所製, 京都) を用いた。展開溶媒は 0.1% トリフルオロ酢酸含有 45% アセトニトリルを用い、室温、0.5 mL/min の流速で HPLC を行った。

3. 動物エキス

牛及び豚はいずれも腿肉を用い、鶏は中抜き屠体 (丸鶏) を用いて、試料重量 1 kg 当たり 3 L の逆浸透膜処理水 (RO 処理水, Milli-RX 12-α, ミリポア社, Bedford, MA) を加えて、100°C, 1 時間加熱抽出した。抽出後直ちに分液ロートへ移し、油層を除去した。マグロエキスは市販のマグロ煮汁エキスを購入した (東京商社, 東京)。すべてのエキスの固形分含量を 1% (W/W) に調整し、0.45 μm のフィルター (ミリポア社, Bedford, MA) でろ過して、被検試料とした。

4. HCDP の定量

L-カルノシン標準液 (10 mM) を 0.01 M HCl 溶液で調製し、0.45 μm のフィルターでろ過してから、正確に 0.5~4.0 mM に調製し、各濃度の標準液 10 μL を正確に 10 分間隔で TSKG-2 500 PWX1 カラムへ注入して HPLC を行った。10 分間隔で溶出されるカルノシン標準品のピーク面積で検量線を作成した。次に、各試料 (Brix 固形分濃度 1%) を 10 μL 注入して、同一条件で HPLC をおこなった。被検試料の HCDP ピーク面積からカルノシン標準品の検量線

を用いて定量した。また、各試料は分画分子量 10 000 の限外ろ過膜 (Centricon Plus-20, ミリポア社, Bedford, MA) で処理して、アミノ酸自動分析計 (日立 L-8500A, 日立市) を用いてアンセリンとカルノシンを個別に定量した。また、GPC-HPLC で分画された各ピークのアミノ酸組成を調べるために、0.5 分間隔で分画を回収して凍結乾燥して濃縮し、同様にアミノ酸自動分析計でアンセリン-カルノシン及びその他のアミノ酸を定量した。

実験結果

1. アンセリン-カルノシン標準品の GPC-HPLC クロマトグラム

分子量排除限界 10 000 の TSKG-2 500 PWX1 カラムに試薬のアンセリン硝酸塩とカルノシンそれぞれ 2 mM 注入した時の GPC-HPLC クロマトグラムは Fig. 1 に示す通りである。分子量 226 のカルノシンと分子量 240 のアンセリンはいずれも分子量マーカー 400 の位置に溶出され (溶出時間 16.8 分)、波長 210 nm における吸光率が等しいのでピーク面積は完全に同一であった。アンセリン硝酸塩で認められた溶出時間 21.3 分のピークは硝酸のピークである。

2. 各種動物エキスの GPC-HPLC クロマトグラム

動物性エキスは、いずれも void volume の位置に高分子画分があり、続いて分子量範囲 400 の位置 (溶出時間 16.8 分) と分子量範囲 200 以下 (溶出時間 19~20 分) の位置に主要なピークが観察された (Fig. 2)。高分子画分は蛋白質成分であり、また試験した全ての動物エキスではアンセリン-カルノシンと同一位置にピークを持ち、これはアンセリンとカルノシンで構成される HCDP のピークであると推定された。なお、溶出時間 19~20 分のピークはその他のアミノ酸とオリゴペプチド類、溶出時間 22 分は低分子の塩類であると推定された。

Fig. 1 GPC-HPLC chromatograms of standard carnosine and anserine-HNO₃

Ten μL of 1 mM carnosine (A) or anserine-HNO₃ (B) was applied to TSKG-2 500 PWX1 column and developed with 45% acetonitrile containing 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min. Carnosine and anserine were monitored at 210 nm.

Fig. 2 GPC-HPLC chromatograms of animal extracts

Each 10 μ L of extracts was applied to TSKG-2500 PWX1 column, developed with 45% acetonitrile containing 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min, and monitored at 210 nm.

A, Beef extract; B, Chicken extract; C, Pork extract; C, Tuna extract; solid arrows represent molecular ranges (daltons) and broken arrows indicate HCDP and histidine (His) peaks.

3. HCDP 画分のアミノ酸組成分析

分子量 400 に相当する HCDP ピークを構成する成分を調べるために、溶出時間 16.0~18.0 分の HCDP 画分を回収して、アミノ酸自動分析器によりアミノ酸組成を測定した。Fig. 3 にチキンエキスの HCDP 画分と溶出時間 20~22 分の画分のアミノ酸組成を示したが、HCDP 画分に共存するアミノ酸はリジンとアルギニンであり、痕跡のヒスチジンが観察された。ヒスチジンは Fig. 2 D に示したマグロエキスの HCDP 画分の直後に溶出されるピークであり、この部分が HCDP に混在したものである。HCDP 画分に混在するリジンとアルギニンは波長 210 nm に吸収を持たないアミノ酸であるので、各種動物性エキスの GPC-HPLC で検出される HCDP 画分のピークはアンセリンとカルノシンの混合体であった。

4. 各種動物性エキスの HCDP 含量の定量

L-カルノシン標準品の 0.5, 1.0, 2.0, 及び 4.0 mM 溶液を 10 μ L ずつ、10 分間隔で連続的にカラムに注入し、3 回測

Fig. 3 Amino acid composition of GPC-HPLC fractions

Upper panel shows the amino acid composition of HCDP (16~18min) fraction and lower panel shows the amino acid composition of 20~22 min fraction.

Fig. 4 Standard curve of carnosine obtained from GPC-HPLC for the quantification of HCDP content in extract sample

Each 10 μ L of various concentrations of standard carnosine was injected into the column at 10 min intervals, developed with 45% acetonitrile containing 0.1% TFA at a flow rate of 0.5 mL/min, and monitored at 210 nm. Each value indicate the mean of triplicate determinations.

定して得られるカルノシンピーク面積の平均値でプロットして検量線を作成した (Fig. 4). この検量線を用いて各種エキス中のアンセリンとカルノシンの総和である HCDP

Table 1 Comparison of anserine-carnosine (HCDP) quantification between GPC-HPLC and amino acid analyzer

Sample	GPC-HPLC	Amino acid analyzer (solid %)		
	HCDP (solid %)*	Carnosine	Anserine	Total HCDP
Beef	10.20	8.23	2.35	10.59
Chicken	10.61	3.12	7.93	11.05
Pork	7.93	7.48	0.46	7.94
Tuna	10.31	0.45	11.24	11.59

*, Molecular weights (M.W.) of HCDP in each animal extract were calculated from anserine-carnosine ratio determined by the amino acid analyzer. M.W. of HCDP in beef, chicken, pork and tuna were 230, 235, 227, and 240, respectively. Each value is the mean of three samples.

含量を測定し、アミノ酸自動分析計で測定されたアンセリンとカルノシンの合計量と比較した。その結果、GPC-HPLC で定量された HCDP 含量はアミノ酸自動分析計で測定されたアンセリンとカルノシンの合計量とほぼ一致するものであった (Table 1)。

考 察

動物エキスを含有される HCDP を構成するアンセリンとカルノシンは各動物種によってその含有比率が異なるものの⁵⁾⁶⁾、その抗酸化機能はほぼ同じと考えられる。従って HCDP を主成分とした各種動物エキスの製造工程や品質評価法としては、従来のアミノ酸自動分析計やその他の HPLC 法⁹⁾¹⁰⁾のようにアンセリンとカルノシンを個別定量してその合計値から HCDP 含量を定量することは必ずしも重要なことではない。また、各種動物エキス中の総 HCDP を測定する方法として比色定量法も報告されてきたが⁷⁾⁸⁾、これらの比色定量は共存するアミノ酸やほかの物質の影響を受けやすく、アミノ酸自動分析計による定量値より著しく高い含量として測定される欠点が見られた。これら既存の方法は測定に長時間を要したり、また分析コストが高価であることや定量精度が実用的ではないなどの短所を持っており、エキスの製造工程や品質の評価、或は多数の各種エキス原料の HCDP 含量評価などの目的には必ずしも適切な方法ではなかったのである。本研究ではこの目的に適応できる簡便性とアミノ酸自動分析計に匹敵する精度を持つ分析法の開発を試みて来た。

本報の GPC-HPLC による定量法では、アンセリンとカルノシンを個別に定量することは出来ないが、アミノ酸自動分析計でしか評価できなかった製造工程での各種エキス試料中のアンセリン-カルノシン含量を総 HCDP 含量として迅速に定量できる利点をもつものであった。すなわち、熱水抽出された畜肉エキス、鶏肉エキス、及び魚介エキスは、Fig. 2 に示したようにアンセリンとカルノシンからなる HCDP が単一ピークとして他の成分と分別されることから、除蛋白質などの前処理などを必要とせず、除菌ろ過するだけで HCDP の定量が可能である。また、標準品によ

る検量線作成が 10 分間隔で連続 4 濃度を注入することにより約 60 分間の HPLC 処理で作成可能である。更に、この検量線を用いて定量される総 HCDP 含量はアミノ酸自動分析計により測定されたアンセリンとカルノシンの個別定量値の合計と極めて近似しており、HCDP 総量の分析精度として両法はほぼ同等であった。問題点としては、マグロエキスのような魚肉エキスではヒスチジン含量が一般に高く、ヒスチジンは波長 210 nm に吸収を持ち、またアンセリン-カルノシンに近接して溶出されることである。このため HCDP ピークとヒスチジンピークとが重なり合う部分を生じ、マグロエキスの HCDP 含量が低く定量される傾向が認められた。

アンセリンとカルノシンを個別に定量できないことと、ヒスチジン含量の高いエキスの場合には若干定量精度が悪くなる欠点を持つが、各種動物エキス中の抗酸化性成分であるアンセリンとカルノシンを総量として測定し、動物エキスの評価或は製造管理や品質管理を行う上で、迅速・簡便であり、かつ比較的精度の高い測定法であると考えられた。なお、アミノ酸自動分析計に代わるアンセリンとカルノシンの個別定量は、ヒスチジンの発色法である p-ニトロベンゾイル塩酸法ではカルノシンは呈色し、アンセリンは呈色しないことから、この比色定量法と本法の GPC-HPLC 法を併用することによってある程度可能になると思われる。

要 約

動物エキス中に存在するアンセリンとカルノシンをヒスチジン含有ジペプチド (HCDP) 総量として測定する迅速・簡便な定量法について検討した。熱水抽出した各種動物エキス (牛肉、豚肉、鶏肉及びマグロ煮汁) を TSKG-2 500 PWX1 カラムへ注入し、0.1% トリフルオロ酢酸含有 45% アセトニトリルを溶媒として流速 0.5 mL/min で展開し、波長 210 nm の検出器で検出した。動物エキス中のアンセリンとカルノシンは同じ単一ピークとして溶出され、他の蛋白質、ペプチド及びアミノ酸と分離された。アンセリンとカルノシンで構成される単一ピークにはリジン

とアルギニンが微量混在していたが、これらのアミノ酸は波長 210 nm に吸収を持たないものなので、アンセリン又はカルノシンと同一の溶出位置に検出されたピークは HCDP ピークと見なすことが可能であった。本法ではアンセリンとカルノシンの個別定量は出来ないが、各種動物エキス中の HCDP 含量を 1 検体あたりわずか 30 分で定量が可能であり、この測定値はアミノ酸自動分析計で測定されるアンセリン-カルノシンの合計値と良く一致する結果であった。

本研究の一部は農水省ニューフードクリエーション技術研究組合一分離・抽出分科会の研究開発事業として行われたものである。

文 献

- 1) Wolff, W.A. and Wilson, D.W., Carnosine and anserine in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **109**, 565-571 (1935).
- 2) O'Dowd, T.J., Robins, D.J. and Miller, D.J., Detection, characterization, and quantification of carnosine and other histidyl derivatives in cardiac and skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* **967**, 241-249 (1988).
- 3) Chan, K.M. and Deck, E.M., Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* **34**, 403-426 (1994).
- 4) Kalyanker, D.D. and Meister, A., Enzymatic synthesis of carnosine and related β -alanyl and γ -aminobutyryl peptides. *J. Biol. Chem.* **234**, 3210-3218 (1959).
- 5) Boldyrev, A.A. and Severin, S.T., The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: Distribution, properties, and biological significance. *Adv. Enzymol. Regul.* **30**, 175-194 (1990).
- 6) Suyama, K. and Yoshizawa, Y., Free amino acid composition of the skeletal muscle of migratory fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **39**, 1339-1343 (1973).
- 7) Carnegie, P.R., Ilic, M.Z., Etheridge, M.O. and Collins, M. G., Improved high-performance liquid chromatographic methanol for analysis of histidine dipeptides anserine, carnosine and balenine present in fresh meat. *J. Chromatogr.* **261**, 153-157 (1983).
- 8) Teahon, K. and Rideout, J.M., A sensitive and specific high performance liquid chromatographic assay for imidazole dipeptides and 3-methylhistidine in human muscle biopsies, serum and urine. *Biomed. Chromatogr.* **6**, 16-19 (1992).
- 9) Parker Jr, C.J., Spectrophotometric determination of carnosine, anserine, and taurine in skeletal muscle. *Anal. Biochem.* **108**, 303-305 (1980).
- 10) Wolos, A., Piekarska, K., Oilecka, T., Ciereszko, A. and Jablonowska, C., A new rapid method for determination of anserine and carnosine in muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**, 623-626 (1983).

(平成 15 年 3 月 14 日受付, 平成 15 年 11 月 18 日受理)