

ノ ー ト

高速液体クロマトグラフィーによる数種魚類の
アンセリン及びカルノシンの測定

西 塔 正 孝 國 崎 直 道

Determination of Anserine and Carnosine Contents in Fish Muscles by
using High Performance Liquid Chromatography

Masataka SAITO and Naomichi KUNISAKI

Anserine and carnosine are found in the skeletal muscle tissue of most vertebrates. Anserine and carnosine have been attracted as antioxidative activity compounds. This paper reports a rapid analysis method of these compounds by using high performance liquid chromatography (HPLC). The contents of anserine and carnosine in picric acid extracts from 9 fish muscles were determined by HPLC. Anserine was detected in the muscle of fresh water fish, Ayu (*Plecoglossus altivelis*), Nijimasu (*Oncorhynchus mykiss*), Yamame (*Oncorhynchus masou*), Dojou (*Misgurnus anguillicaudatus*), and Wakasagi (*Hypomesus transpacificus nipponensis*), but carnosine was not detected. Unagi (*Anguilla japonica*) had only carnosine. On the other hand, both anserine and carnosine were detected in the sea water fishes, Sake (*Oncorhynchus keta*), Masunosuke (*Oncorhynchus tshawytscha*), and Katsuo (*Euthynnus pelamis*).

緒 言

イミダゾール化合物はL-ヒスチジン (His) 関連化合物であり古くから脊椎動物筋肉中に存在することが知られていた¹⁾。イミダゾール化合物はL-Hisと β -アラニンが結合したジペプチドの、カルノシン (β -Ala・L-His)、アンセリン (β -Ala・ π -methyl-L-His) およびバレニン (β -Ala・ τ -methyl-L-His) などが確認され、ウシ、ウマ、ブタ、トリ、クジラ、数種の魚などにこれらイミダゾール化合物が異なった含量で含まれていることが明らかとなっている。また、イミダゾール化合物の生理的役割については緩衝作用、抗酸化作用等の報告^{2, 3)}がなされているが、まだ不明の部分も多い。

そこで我々はイミダゾール化合物の脊椎動物における生理的役割を調べるため、アンセリンとカルノシンの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による簡便な検出方法の確立と数種魚類のイミダゾール化合物の定量を行ったのでその結果を報告する。

実 験 方 法

試薬 試験に供した試薬類は全て市販の特級を使用した。
試料の調製 試料魚はアユ (*Plecoglossus altivelis*)、ニジ

マス (*Oncorhynchus mykiss*)、ヤマメ (*Oncorhynchus masou*)、ワカサギ (*Hypomesus transpacificus nipponensis*)、サケ (*Oncorhynchus keta*)、マスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*)、ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*)、ウナギ (*Anguilla japonica*)、カツオ (*Euthynnus pelamis*)、を2003年9月～12月にかけて東京都中央卸売市場で入手し試料とした。なお、試料の産地や収穫場所等は切り身等もあったため、その詳細は不明であった。

購入した試料は皮や血合肉が混入しないようにして細切した背肉5gを精秤し、これに5倍量の1%ピクリン酸を加え、ポリトロンホモジナイザーで抽出し、3,000rpmで10分間遠心分離して上清液を得た。残渣に5倍量の1%ピクリン酸を加え同様に抽出を行い、この操作を3回繰り返して上清液を集め100mlにした。この中から一定量を取り、須山らの方法でピクリン酸を除去した⁵⁾。すなわち、抽出液の一定量をDowex2×8 Cl⁻タイプのイオン交換樹脂でピクリン酸を除去後、0.02M-HCl溶液40mlで溶出を行い、これをエバポレーターで濃縮しpH2.2のクエン酸リチウム緩衝液で一定量(10ml)にしたのち、0.45 μ mのフィルターを通してHPLC用試料とした。

イミダゾール化合物の定量 アンセリンおよびカルノシ

ンの分離定量は Abe⁴⁾らの方法を一部改良し、高速液体クロマトグラフィー（島津製作所 HPLC-LC10A）に供して定量した。すなわち、アンセリンおよびカルノシンの定量は Nucleosil-100-5SA cation exchange resin { $\phi 4.6 \times 250$ mm, ジーエルサイエンス (株)} を使用し、移動相に 80 mM リン酸カリウム (pH 5.6) を用いた。カラムオープン温度を 55°C、流速 1 ml/min のアイソクラティックモードで溶出し 210 nm で検出を行った。アンセリンおよびカルノシン {SIGMA (株)} を標準として用いて検量線を作製し濃度を測定した。

結果および考察

数種魚肉中のアンセリンとカルノシン含量 前述した方法で数種魚肉抽出液を調製し、一定量を HPLC で分析し、そのピーク面積からアンセリンおよびカルノシンの定量を行った。Fig. 1 に標準品のクロマトグラフを、ま

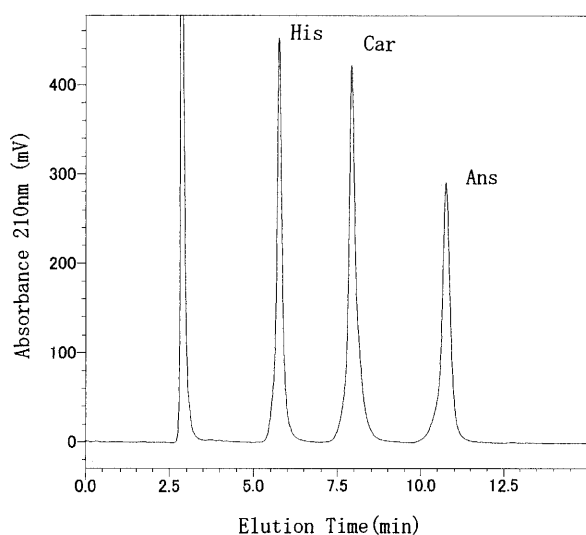


Fig. 1. Separation of standard compounds, L-histidine, anserine and carnosine by HPLC

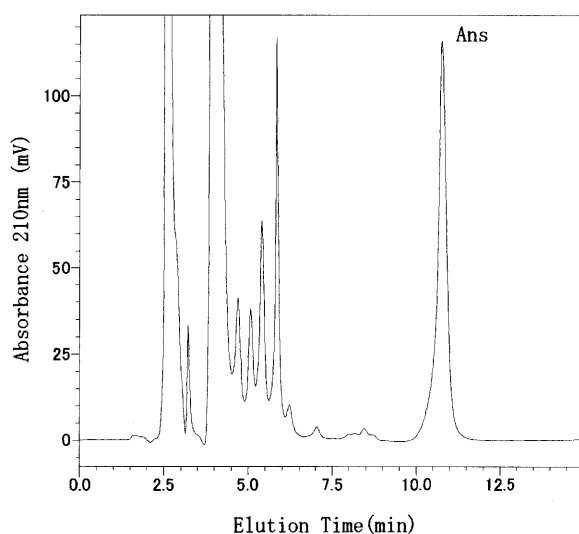


Fig. 2. Chromatogram of L-histidine-related compounds from nijimasu (*Oncorhynchus mykiss*) muscle extracts.

た、Fig. 2 にはニジマスのクロマトグラフを示したがカルノシンとアンセリンを短時間で分離することができた。このようにして得られた数種魚肉中のアンセリンとカルノシンの含量を Table 1 に示した。なお、今回は定量の再現性を目的としたため、分析を 2 回行いその平均値を示した。

Table 1 から明らかなように、淡水産の魚肉、すなわちアユ、ニジマス、ヤマメ、ドジョウ、ワカサギはアンセリンが 5 ~ 469 mg/100 g の範囲で検出されたがカルノシンは全く検出されなかった。しかし、ウナギにはアンセリンは検出されずカルノシンのみが検出された。一方、海水域に生息するサケ、マスノスケ、カツオにはアンセリンが 598 ~ 812 mg/100 g の範囲で検出されるほか、カルノシンも約 20 mg/100 g で検出された。

イミダゾール化合物の脊椎動物の含量については、例えばカルノシンは牛肉に 136 mg/100 g、豚肉に 255 mg/100 g 含まれる⁶⁾。一方、魚類ではアンセリンはメバチマダゴロに 1140 mg/100 g 含み加熱しても分解せず安定していると報告されている⁷⁾。また、一般的に魚類はアンセリン含量が高くカルノシンはほとんど含まないか、含んでいても微量であるとの報告もある⁸⁾。クジラ類はバレンを多く含みその含量は 1340 ~ 1990 mg/100 g と極めて高含量であり、さらにカルノシンを 117 ~ 300 mg/100 g およびアンセリンを 3 ~ 49 mg/100 g 程度で含有する。しかし、軟体類である貝や甲殻類のカニにはイミダゾール化合物は含まれていないとの報告もある⁹⁾。

L-His と β -アラニンからなるイミダゾール化合物が、なぜ同じ海産動物でもその魚種によって含まれるイミダゾール化合物と含量が異なるかは不明であり、また、その生理作用についての統一した見解は示されていない。イミダゾール化合物を高含量で含む魚は回避力が高い、あるいは長時間の遊泳力がある。また、クジラのように潜水時間が長い動物にそれらは必要であるなどと、種々論じられているが未だ理由は不明である。しかし、イミダゾール化合物は抗酸化力があるため、疲労回復、血液流動性促進作用、長寿効果などを効能に謳って、すでに“いわゆる健康食品”として市販されている現状にあ

Table 1. Contents of anserine and carnosine in nine fish muscles. (mg/100 g : wet matter)

魚 種	Anserine	Carnosine	Moisture (%)
Ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>)	65.3	—	77.1
Nijimasu (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	469.2	—	76.5
Unagi (<i>Anguilla japonica</i>)	—	231.4	69.3
Yamame (<i>Oncorhynchus masou</i>)	331.6	—	76.5
Dojou (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)	5.1	—	79.7
Wakasagi (<i>Hypomesus transpacificus nipponensis</i>)	183.9	—	84.1
Sake (<i>Oncorhynchus keta</i>)	796.9	21.0	67.2
Masunosuke (<i>Oncorhynchus Tschawyttscha</i>)	597.8	20.1	67.0
Katuo (<i>Euthynnus pelamis</i>)	812.0	21.2	65.5

る⁹⁾。

今回の実験ではイミダゾール化合物の HPLC による簡便な定量方法を検討し、数種魚肉中のイミダゾール化合物を短時間で測定することができた。今後アミノ酸や他のイミダゾール化合物の同時定量法の確立と、魚介類のイミダゾール化合物の含量を測定するとともに、これらの化合物の季節的変動、成長過程における役割、ヒトの長期摂取による生理的効果等について検討していきたいと考えている。

文 献

- 1) Suyama, M. Suzuki, T., Maruyama, M. and Saito, K.: Determination of carnosine, anserine, and balenine in the muscle of animal. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **36**, 1048-1053 (1970)
- 2) Decker, E.A. and Faraji, H.: Inhibition of lipid oxidation by carnosine. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 1201-1204 (1990)
- 3) Jung, H.K., Kyung, S.K., Soo, Y.C., Hyeok, Y.K., Moo, H.W. and Tae-Cheon, K.: Protective effects of carnosine, homocarnosine and anserine against peroxy radical-mediated Cu, Zn-superoxide dismutase modification. *Biochem. et Biophys. Acta.*, **1570**, 89-96 (2002)
- 4) Abe, H. and Okuma, E.: Discrimination of meat species in processed meat products based on the ratio of histidine dipeptides. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42**, 827-834 (1995)
- 5) 菅原龍幸, 前川昭男監修: 新食品ハンドブック, p42, 建帛社 (2000)
- 6) Crush, K.G.: Carnosine and related substances in animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.*, **34**, 3-30 (1970)
- 7) 平野敏行, 鈴木 健, 須山三千三: 高温加熱 F₀ 値 8 ~ 21 によるメバチおよびオヒョウのエキス成分の変化. 日水誌, **53**, 1457-1461 (1987)
- 8) 阿部宏喜: 魚類におけるイミダゾール化合物の代謝と生理機能に関する研究. 日水誌, **62**, 351-354 (1996)
- 9) 伊奈和夫監修: 海洋性アンセリンパワー, 史輝出版 (2003)