

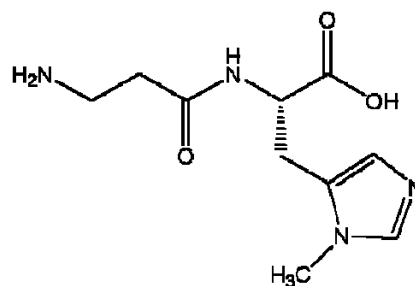
メカジキ魚肉粉末中のアンセリン分析法

(2012年10月10日最終査読済み)

作成者： 高知県工業技術センター 森山 洋憲
北海道立工業技術センター 青木 央
徳島県立工業技術センター 吉本 亮子
香川県産業技術センター 田村 章
愛媛県産業技術研究所 食品産業技術センター 平岡 芳信
産業技術総合研究所生物プロセス研究部門 仲山 賢一
産業技術総合研究所健康工学研究部門 垣田 浩孝
四国センター 内海 明博 / utsumi.a@aist.go.jp

1. メカジキ魚肉粉末のアンセリン標準分析法マニュアル

アンセリン (anserine) はアラニンとメチルヒスチジンの2つのアミノ酸からなるジペプチドの一種である。動物の骨格筋に高濃度に存在する。特に鶏肉やカツオ等の回遊魚では、アンセリンの比率が高い。この成分は、抗糖化作用、抗酸化作用等の生理機能が知られている。



アンセリンの分子構造
(分子量: 240.3)

1. 1 サンプル

メカジキ魚肉粉末 (10g NMIJ CRM 7403-a) (注1)

1. 2 準備する機器及び試薬

(1) 機器等

- 高速液体クロマトグラフ (グラジエント溶出機能、カラム恒温槽、UV 検出器を備えたもの) (注2)
- 親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) 用カラム (注3)
- 遠心分離機 (遠心加速度: 約 1200×g) (注4)
- エバポレーター (200mL 丸型フラスコ装着可、20~90°C) (注5)

- ・振とう機（振とう速度：20-200 rpm）（注 6）
- ・pHメータ（精度：pH±0.1）

(2) 試薬

- ・エタノール（HPLC用）（注 7）
- ・酢酸（試薬特級）
- ・酢酸アンモニウム（試薬特級）
- ・L-アンセリン硝酸塩（注 8）
- ・純水（HPLC用）（注 9）

1. 3 標準液及び緩衝液の調製

(1) アンセリン標準液（1.0mg/mL）

- 1) L-アンセリン硝酸塩 {分子量(MW) : 303.3} から、63.10 mg を精確に秤量し、純水で全量フラスコ 50 mL に定容する。この標準液のアンセリン(MW : 240.3) の濃度は 1.0mg/ml である。
- 2) 10 mL のメスフラスコを 4 個用意し、手順 1) で調製した標準液を 2.0、4.0、6.0、8.0mL 分取し、純水でそれぞれ 10 mL に定容する。この操作により、0.20、0.40、0.60、0.80 mg/mL の希釈標準液を調製する（注 10）。
- 3) 手順 1) で調製した 1.0 mg/ml を含めて合計 5 点の標準液を準備する。

(2) 4.55mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液（pH : 5.5）

- 1) 4.55mmol/L 酢酸アンモニウム溶液（注 11）800mL を 1L ビーカーに取り、マグネチックスターラで攪拌しながら、4.55mM 酢酸水（注 12）約 200mL を加えて、pH が 5.5 になるように調整する。
- 2) pH 5.5 に調整した酢酸アンモニウム緩衝液を 0.45 μ m のメンブレンフィルターでろ過して得る。（調製した緩衝液はできる限り当日使用する。）

(3) 0.65mmol/L 酢酸アンモニウム緩衝液

- 1) 項目(2)で得られた 4.55mM 酢酸アンモニウム緩衝液(pH:5.5)を 100mL 分取し、純水 600mL を加えて 7 倍に希釈して得る。

1. 4 試料の調製（注 13）

- 1) メカジキ魚肉粉末約 3.0 g を精確に秤量し {Ws (g)}、これをスクリューキャップ式の 50 mL 遠心管にとる。
- 2) 遠心管に純水 30mL を加える。
- 3) 遠心管を振とう機で、粉末を 5 分間懸濁させる。

- 4) 手順 3)の懸濁物を遠心分離する (例: 遠心加速度約 1200×g、5 分間)。
- 5) 上澄みを 100 mL 容の全量フラスコへ泡立たないように静かに移す (必要に応じてろ紙 (No. 5A) で濾過する)。
- 6) 残さに純水 30 mL を添加し、振とう機等で残さの塊をほぐす。
- 7) 手順 4)~6)と同様の操作を 2 回繰り返して、それぞれ元の 5)の採取液に加える。
- 8) 全量フラスコに純水で 100 mL に定容する。
- 9) 40 mL のエタノールを入れたスクリーキャップ式の 50 mL 遠心管を別途用意する。
- 10) 手順 8)の静置後のフラスコから上澄み 10mL をホールピペットで採取し、これを手順 9)の 50 mL 遠心管に移し、混合する。上澄み液から沈殿物を吸い込まないように注意する。
- 11)遠心管を 30 分間静置し、生じる淡黄色の浮遊物を遠心分離する (例: 遠心加速度約 1200×g、5 分間)。
- 12) 上澄みを 200 mL 容ナスフラスコに移す。
- 13)遠心管底部に淡黄色の沈殿物が残るので、エタノール/純水 = 4 / 1 (v/v)液 3mL で洗浄し、ろ紙(No. 5A)で濾過し、ナスフラスコに加える。この操作を 3 回繰り返す。
- 14)ナスフラスコの上澄みは、エバポレーターで、37°Cに加温しながら、約 1 mL になるまで濃縮する。
- 15) 濃縮試料に純水約 1 mL を添加後、10 mL 容全量フラスコに移す。
- 16)少量の純水で、フラスコ容器内壁に付着した試料を回収する操作を 3 回繰り返す。
- 17) 純水で 10 mL に定容する。
- 18) 定容した試料を HPLC 分析前処理用フィルター (孔径: 0.45 μm、内径: 13mmφ; 注 14) に通過させ、純水でアンセリン濃度が検量線の濃度範囲になるように希釈する (希釈倍率: N)。これを HPLC 用試料溶液とする。

1. 5 HPLC 分析条件 (注 15 及び 16)

カラム: 親水性相互作用クロマトグラフィー用カラム (注 3)

カラム温度: 40°C

移動相 A 液: 0.65 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) / アセトニトリル (25:75、v/v)

移動相 B 液: 4.55 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) / アセトニトリル (70:30、v/v)

グラジエント設定:

時間 (min)	A 液 (%)	B 液 (%)

0.00	100	0
13.00	0	100
16.00	0	100
16.01	100	0
22.00	100	0

流量 : 1.4 mL/min

検出波長 : 214 nm

試料注入量 : 10 μ L

1. 6 濃度の決定法 (測定例 1 及び 2)

- 1) 1. 3 項の(1)で調製した 0.20、0.40、0.60、0.80、1.0 mg/L アンセリン標準溶液を用いて、アンセリンの HPLC ピーク面積を測定し、直線回帰法からピーク面積-濃度間の検量線を作成する。
- 2) HPLC 用試料溶液のアンセリンの HPLC ピーク面積を測定し、手順 1)の検量線を用いて、HPLC 用試料溶液のアンセリン濃度 A (mg/mL) を算出する。
- 3) アンセリン濃度 A (mg/mL) から、下式によってメカジキ魚肉粉末サンプルのアンセリン含有量 (mg/g) を算出する。

$$\text{アンセリン含有量 (mg/g)} = \frac{100 \text{ (mL)} \times A \text{ (mg/mL)} \times N}{W_s \text{ (g)}}$$

A : HPLC 用試料溶液のアンセリン濃度 (mg/mL)

N : 希釈倍率

Ws : 試料採取量 (g)

なお、重量補正したアンセリン含有量は、別途求めた重量比 d (注 1) を上記値にかけると得られる。

○参考文献

L. Mora, M. A. Sentandreu, and F. Toldrá, "Hydrophilic Chromatographic Determination of Carnosine, Anserine, Balenine, Creatine, and Creatinine," *J. Agr. Food Chem.*, **55**(12), 4664-4669 (2007).

【注記】

- 1) 認証標準物質メカジキ魚肉粉末 (NMIJ CRM 7403-a) の取扱いについては、下記の HP 参照のこと。

http://www.nmij.jp/service/C/crm/61/7403a_J.pdf

(2012 年 9 月 13 日アクセス)

特に、乾燥重量の補正を必要とする場合は、上記認証書に記載されている方法を用いて、別途、

乾燥処理前の重量 : W_b (g)

乾燥処理後の重量 : W_a (g)

を求め、これらの比 (d)、

$$d = W_b / W_a$$

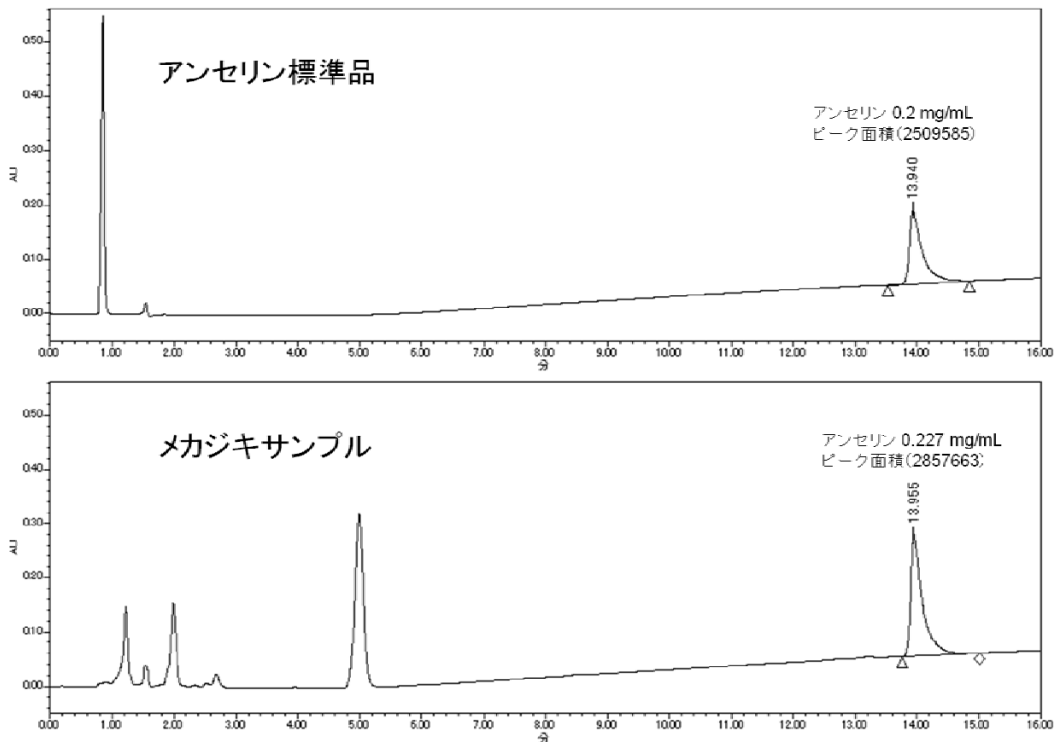
を求めておく。

- 2) 構成例 : ウォーターズ製
- ・デルタ 600 マルチソルベントシステム
 - ・2998 フォトダイオードアレイ検出器
 - ・カラムヒーター
 - ・Empower2 (システム制御及びデータ処理の標準ソフト)
- 3) 例 : ウォーターズ製 Atlantis HILIC Silica HPLC column186002031; 3 μ m、150mm \times 4.6mm I.D.。
- 4) 例 : 日立 himac CF16RX) 。
- 5) 例 : Buchi R-3000。
- 6) 例 : アズワン Shaking Baths SB-20。
- 7) 例 : ナカライ HPLC 用 99.5%。
- 8) 例 : シグマアルドリッチジャパン製 SIGMA-A1131。
- 9) 例 : MQ 水。
- 10) 10 mL メスフラスコを使用する場合は器具の洗浄、操作等、取扱いに細心の注意を要する。精確さの点では、50 mL メスフラスコを使用するのが望ましい。
- 11) 4.55mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 (酢酸アンモニウムの MW : 77.08) の調製
- 1] 酢酸アンモニウム (例えばナカライ特級 97%) を 362mg 秤量し、500mL ビーカーへ入れ、純水を約 400mL 加えて完全に溶解させる。
 - 2] 1000mL 全量フラスコに移す。
 - 3] 約 100mL の純水でビーカーを洗浄し、洗浄液もこの全量フラスコに移す。この操作を計 3 回繰り返す。
 - 4] 純水で 1000mL まで定容して得る。
- 12) 4.55mmol/L 酢酸水 (酢酸の MW : 60.05、密度 : 1.049g/mL(25°C)) の調製

- 1) 100mL 容全量フラスコに純水を約 50mL 入れる。
 - 2) 酢酸（例えばナカライ特級 99.7%）をメスピペットで 2.6mL を採取し、これを全量フラスコに入れる。
 - 3) 純水で 100mL まで定容する。(0.455mol/L 酢酸水)
 - 4) 手順 3 で調製した酢酸水 5mL を全量ピペットで採取し、500mL 全量フラスコに入れる。
 - 5) 純水で 500mL まで定容して得る。
- 13) 食品試料を分析する場合の手順
- 本件の分析方法を一般食品に適用させる場合は、以下のような方法がある。
- 生魚肉等は、「1.4 試料の調製」において、手順 1)~3) を、下記の 1]~3]に置き換える。
- 1] 骨と皮を除いた魚肉等を温度が上昇しないように注意しながら、フードプロセッサーやミートチョッパー等で 1~2mm 程度に微細化する。
 - 2] 微細化された魚肉等約 100g を精確に秤量し、4℃程度に冷却した純水を同量加えホモジナイザー（例：アズワン HG-200）で均質化する。
 - 3] 約 50g を精確に秤量し、スクリーキャップ式の遠心管（50 mL）にとる。
(計算時に魚肉等試料の希釈を考慮すること。)
- 14) 例：日本ミリポア(株)製 Millex-LH SLLHH13NL。
- 15) HILIC カラムについては下記 URL の Q&A を参照し、取り扱いに注意する。
WATERS 社 HP HILIC 分析法開発 FAQ：
<http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10137837&locale=145>
(2012 年 9 月 4 日アクセス)
- 16) 高速液体クロマトグラフの実施例
- 注記 1 に示す HPLC の装置構成の場合について例示する。
- 検出器の設定条件例：サンプリングレート 10 ポイント/秒、タイムコンスタント 0.4 秒、波長分解能 1.2 nm（高知県工業技術センターの微量成分分離分取システム付属の Waters 製 PDA 検出器 2998 を 2D チャンネルで使用した場合）
- グラジエント分析中は初期圧約 1580 psi から最大約 2200 psi にまで変化する（高知県工業技術センターの微量成分分離分取システムの場合）。1 分析サイクルについては初期圧に戻る時間を見定めて 22~26 分間に設定する。

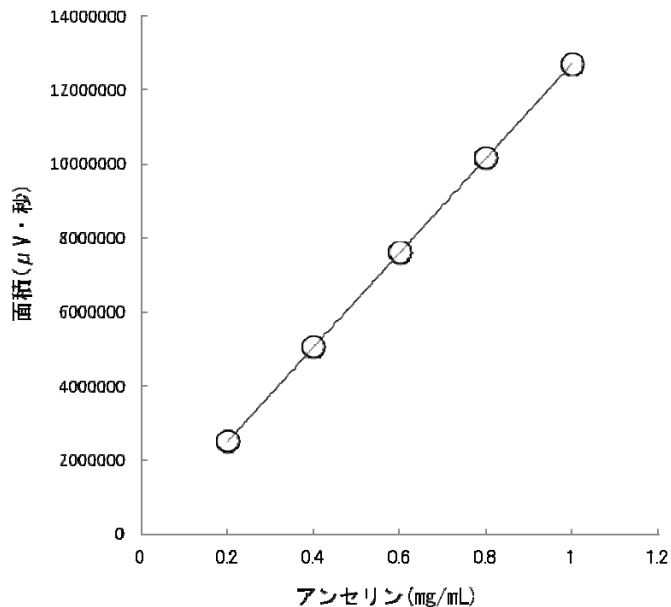
【測定例】

1) HPLC のスペクトル



アンセリン標準品とメカジキサンプルのクロマトグラム例

2) 検量線の図



アンセリンの検量線例