

チオン性界面活性剤によるイオン浮選との関係を明らかにすることができた。

終わりに、有益な助言を賜った東海大学教授佐々木恒孝先生に厚く御礼を申し上げます。又、実験に協力してくださった道勘寿子、大西洋之両技官に謝意を表します。

文 献

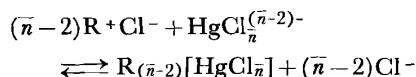
- 1) 野崎 亨, 木村 勇, 吉村 博: 本誌, **25**, 251 (1976).
- 2) 佐々木恒孝: 化学と工業, **20**, 862 (1967).
- 3) 浜口 博編: “超微量成分分析”, I 地球化学的試料, p. 11 (1970), (産業図書).
- 4) 西 一郎, 今井怡知郎, 笠井正威: “界面活性剤便覧”, p. 829 (1960), (産業図書).
- 5) 小松寿美雄, 野村俊明: 日化, **88**, 542 (1967).
- 6) L. G. Sillen, A. E. Martell: “Stability Constants of Metal-Ion Complexes”, p. 293 (1964), (Chem. Soc. London).

☆

Ion flotation of mercury(II). Toru NOZAKI, Nagao SUEMITSU, Toshikazu NIINAI and Toru HIROSE (Faculty of Engineering, Ehime University, 3-1, Bunkyo-cho, Matsuyama-shi, Ehime)

Ion flotation of mercury(II) in sodium chloride solutions with cationic surfactants, cetyltrimethyl ammonium chloride (CTMAC) and cetylpyridinium chloride (CPC),

was investigated. From 12.0 ml of sodium chloride solutions $\{(0.1 \sim 4.0) \text{ M}\}$ containing 20 to 100 ppm Hg(II) and $2.06 \times 10^{-3} \text{ M CPC}$, 98% of mercury was removed by bubbling nitrogen through $2.7 \text{ d} \times 20 \text{ cm}$ cell for 20 to 30 minutes and 95% of mercury with CTMAC of the same concentration under similar treatment. The reaction between chloromercury(II)ate ions and the surfactants can be assumed as follows:



where, R^+ means the surfactant cation and $\bar{n}$ represents the mean coordinate number of Cl^- in the complex anion. The relation between the mean coordinate number of the ligand Cl^- and the concentration of chloride ion was obtained from the molar ratio method and also by the continuous variation method. The existence of the species of HgCl_3^- and HgCl_4^{2-} could be ascertained.

(Received Oct. 17, 1975)

Keywords

Chloromercury(II)ate complexes

Ion flotation

Mercury(II)

Sodium chloride solution

イオン交換クロマトグラフィーによる筋肉中の カルノシン、アンセリン、バレニンの定量

西沢 直行*, 高野 靖**, 神立 誠***

(1976 年 1 月 5 日受理)

イオン交換クロマトグラフィーによる筋肉中のカルノシン、アンセリン、バレニンの分離、分析精度の向上、分析の迅速化を試み、よい結果を得た。

分析は、 $56 \times 0.25 \text{ cm}$ のカラムに強酸性陽イオン交換樹脂 Aminex A-5 を 50 cm の高さに充てんし、エタノールを 2.5% 含んだクエン酸緩衝液 (pH 4.15, ナトリウム濃度 0.38 M) で、カラム温度 57°C , 緩衝液の流量 5.4 ml/h で行った。本方法により、アミノ酸、エタノールアミン、クレアチニンの存在下で、カルノシン、アンセリン、バレニンが迅速に精度よく定量できる。分析所要時間はカルノシンまでで 5 時間 40 分で、分析精度は $(100 \pm 1.2)\%$ であった。本方法による筋肉の 1 回の分析必要量は 0.02 g である。マッコウクジラ、スジイルカ、ヒキガエル、ホタテガイの筋肉にバレニンの存在が認められた。

東京大学農学部農芸化学科: 東京都文京区弥生 1-1-1

現在 * 岩手大学農学部農芸化学科: 岩手県盛岡市上田 3-18-8

** 味の素中央研究所: 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1

*** 麻布獣医科大学: 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-7

1 緒 言

筋肉中に存在するカルノシン [N^{α} -(β -アラニル)ヒスチジン], アンセリン [N^{α} -(β -アラニル)- π -メチルヒスチジン] の定量法にはジアゾ反応を利用した吸光光度法とクロマトグラフィーによる方法がある. 吸光光度法¹⁾ではカルノシンのほかに共存するヒスチジンも発色するが, 筋肉中の遊離ヒスチジンが少ないためカルノシンとヒスチジンの合計量をカルノシンの値としている. そのため精密分析には適さないという欠点がある. イオン交換クロマトグラフィーによるカルノシン, アンセリンの定量については古くは Davey²⁾ が報告しているが, 今日, 広くその定量に用いられているのは, Moore らの原理³⁾⁴⁾ に基づくイオン交換クロマトグラフィーによる方法^{5)~8)}である. 鯨肉などにはカルノシン, アンセリンのほかにバレニン [N^{α} -(β -アラニル)- π -メチルヒスチジン] が存在する. これらの混合物の定量法については須山ら⁹⁾¹⁰⁾ が報告しているが, バレニンとカルノシンの分離は十分とはいえずピークはテーリングしている. 又, 分析所要時間は 22 時間である.

著者らは, Moore らの方法に更に改良を加え, 筋肉中のカルノシン, アンセリン及びバレニンの定量を目的として分離, 分析精度の向上, 分析の迅速化を試み, よい結果を得たので報告する.

2 実 験

2.1 試料の調製

2.1.1 標準物質 カルノシン, アンセリン, バレニンはマイルカ, メバチマグロ, ナガスクジラの筋肉からそれぞれ単離したもの¹¹⁾ を約 4 μ M/ml になるように pH 2.2 のクエン酸緩衝液に溶かして使用した.

2.1.2 筋肉試料の調製 Tallan ら¹²⁾ のピクリン酸による除たんぱく法に従って筋肉の抽出物を調製した. すなわち, 筋肉約 0.5 g に約 10 倍量の 1% ピクリン酸を加え, ワーリンブレンダーで 10 分間ホモジナイズし, 10000 rpm で 10 分間遠沈した. その上清液を Dowex 1 $\times$ 8 {塩素形, (200~400)メッシュ} のカラムに通してピクリン酸を除いた. 次に, その流出液をロータリーエバポレーターで減圧乾固し, 0.01M 塩酸 0.5 ml に溶かして試料溶液とした.

2.2 装 置

アミノ酸自動分析装置 (柴田 AA-600 型) を使用した.

2.3 イオン交換樹脂とイオン交換カラムの調製

強酸性陽イオン交換樹脂 Aminex A-5 (スルホン化ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体, 架橋度 8%, 球形, 粒子径 (10 $\pm$ 2) μ m, ナトリウム形, BIO-RAD 社製) を 56 $\times$ 0.25 cm のカラムに 50 cm の高さに充てんして使用した. 樹脂の充てんは, 先を細くした駒込ピペットで樹脂の懸濁液をとり管壁をつたえながら徐々に注ぎ, 初め (2~3) cm 詰ったところで窒素ボンベからガスで約 7 kg/cm² の圧をかけ充てんを早めながら行った. この操作を (4~5) 回繰り返して 50 cm の高さにした. カラムが細いため注意深く行う必要がある.

2.4 緩衝液

Moore ら³⁾⁴⁾ のクエン酸緩衝液 (ナトリウム濃度 0.38 M) にエタノールを 2.5% 添加し pH 4.15 で使用した.

2.5 ニンヒドリン溶液

Spackman ら⁴⁾ の方法に従って調製した.

2.6 分析方法

筋肉約 0.02 g 相当量 (容量にして約 20 μ l) をカラムに添加し, 緩衝液の流量 5.4 ml/h, ニンヒドリン溶液の流量 2.2 ml/h, カラム温度 57°C で分析を行った. この時のカラムの背圧は 15.5 kg/cm² であった. 記録は, 打点間隔 1 点/3 秒, 記録用紙の送り速度 90 cm/h で行った. カルノシンまでの分析所要時間は 5 時間 40 分であった.

3 結 果

3.1 pH の影響

クレアチニンとアンセリン, バレニンとカルノシンの分離に及ぼす緩衝液の pH の影響を Fig. 1 に示す.

Spackman ら⁴⁾ の方法では, カルノシン, アンセリン付近の溶出順序は, N^{π} -メチルヒスチジン (3-メチルヒスチジン), アンセリン, トリプトファン, クレアチニン, カルノシンであり, トリプトファンとクレアチニンはカラム温度の上昇とともにアンセリンよりも一層早く溶出されることが分かっている⁷⁾¹³⁾. このことを利用して, カラム温度 57°C, 緩衝液の pH 4.24, 緩衝液のエタノール濃度 2.5% の条件で, カルノシン, アンセリン, バレニン, クレアチニン及び塩基性アミノ酸の混合物についてまず分析を試みたところ, クレアチニン, アンセリン, バレニン, カルノシンの順序で溶出されることが明らかになった. しかし, クレアチニンとアンセリ

ンはほとんど分離せず、又、バレニンとカルノシンは分離度 (R_s)¹⁴⁾ にして 0.89 であり分離不十分であった。pH 4.29 ではこれらの分離は一層悪くなった。そこで pH を 4.15 に下げたところ、クレアチニンとアンセリンはほぼ完全に分離し、バレニンとカルノシンの分離は R_s 値にして 1.14 であり、飛躍的に向上した。

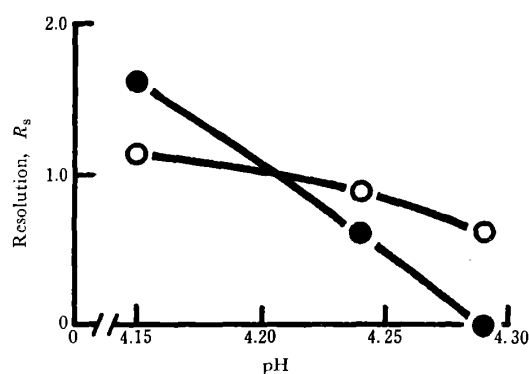


Fig. 1 Effects of pH on the separation of balenine and carnosine, and of creatinine and anserine

—○— Balenine and carnosine; —●— Creatinine and anserine

3.2 エタノール濃度の影響

クレアチニンとアンセリン、バレニンとカルノシンの分離に及ぼす緩衝液のエタノール濃度の影響を Fig. 2 に示す。カラム温度 57°C, pH 4.15 でエタノール濃度 2.5% ではクレアチニンとアンセリンはほぼ完全に分離し、バレニンとカルノシンとの分離は R_s 値にして 1.14 であり良い結果が得られた。しかし、エタノールを含ま

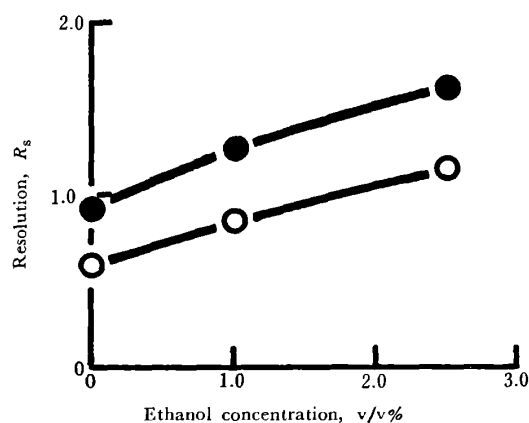


Fig. 2 Effects of ethanol concentration on the separation of balenine and carnosine, and of creatinine and anserine

—○— Balenine and carnosine; —●— Creatinine and anserine

ない緩衝液ではこれらの分離は R_s 値にしてそれぞれ 0.91, 0.59 であり、エタノールが分離に影響を与えていることが明らかになった。

3.3 塩基性アミノ酸との分離

塩基性アミノ酸は Fig. 3 に示すように、予想どおりアルギニンを除きすべてアンセリンの前に溶出され、これらのジペプチドの定量に影響を与えない。

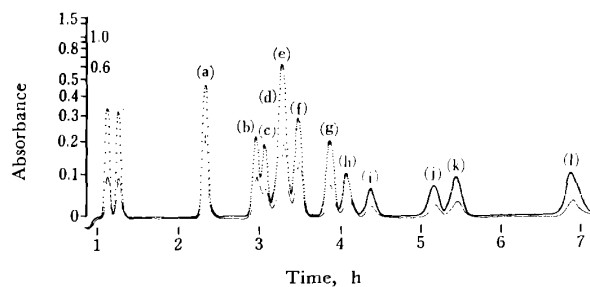


Fig. 3 Analysis of a mixture of amino acids, carnosine, anserine and balenine

(a) 4-Aminobutyric acid; (b) Ornithine; (c) Ethanolamine; (d) Tryptophan; (e) Ammonia; (f) Lysine and *N* π -methylhistidine; (g) Histidine; (h) *N* π -Methylhistidine and creatinine; (i) Anserine; (j) Balenine; (k) Carnosine; (l) Arginine; First and second peaks are tyrosine and phenylalanine, and the other acid and neutral amino acids are eluted with peaks of one another ahead of tyrosine.

3.4 分析精度

(0.029~0.427) μ M の濃度範囲における分析精度を Table 1 に示す。いずれも (100 $\pm$ 1.2)% を越えることはなく精度よく分析できた。

Table 1 Recoveries of carnosine, anserine and balenine from eight calibration runs

Carnosine		Anserine		Balenine	
μ mol	Recovery (%)	μ mol	Recovery (%)	μ mol	Recovery (%)
0.0408	$\left\{ \begin{array}{l} 102 \\ 100 \end{array} \right.$	0.0427	$\left\{ \begin{array}{l} 100 \\ 100 \end{array} \right.$	0.0295	$\left\{ \begin{array}{l} 100 \\ 100 \end{array} \right.$
0.163	$\left\{ \begin{array}{l} 99 \\ 98 \end{array} \right.$	0.170	$\left\{ \begin{array}{l} 101 \\ 99 \end{array} \right.$	0.118	$\left\{ \begin{array}{l} 101 \\ 100 \end{array} \right.$
0.285	$\left\{ \begin{array}{l} 99 \\ 99 \end{array} \right.$	0.298	$\left\{ \begin{array}{l} 99 \\ 99 \end{array} \right.$	0.206	$\left\{ \begin{array}{l} 100 \\ 100 \end{array} \right.$
0.408	$\left\{ \begin{array}{l} 101 \\ 100 \end{array} \right.$	0.427	$\left\{ \begin{array}{l} 99 \\ 100 \end{array} \right.$	0.295	$\left\{ \begin{array}{l} 102 \\ 100 \end{array} \right.$
Mean $\pm$ standard deviation	100 $\pm$ 1.2		100 $\pm$ 0.79		100 $\pm$ 0.79

3.5 分析例

スジイルカ、モルモット、ヒキガエルの骨格筋の分析例を Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6 に示す。又、マッコウクジ

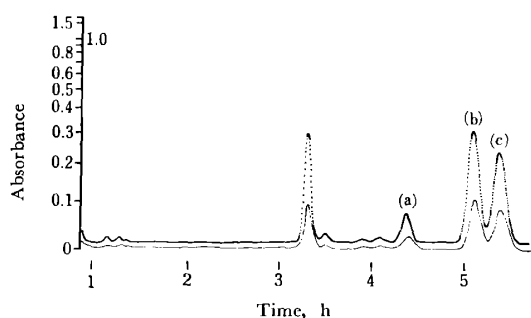


Fig. 4 Analysis of a skeletal muscle homogenate of blue white dolphin

(a) Anserine; (b) Balenine; (c) Carnosine; A sample corresponding to 0.005 g of wet tissue was added to the column.

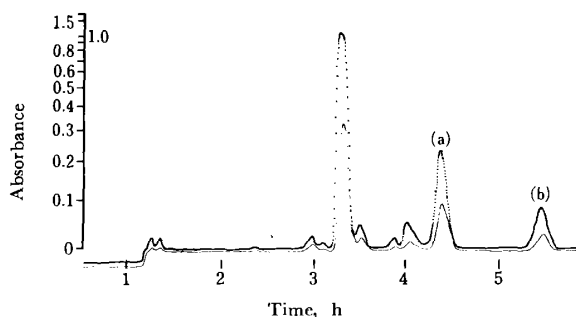


Fig. 5 Analysis of a homogenate of skeletal muscle of guinea pig

(a) Anserine; (b) Carnosine; A sample corresponding to 0.030 g of wet tissue was added to the column.

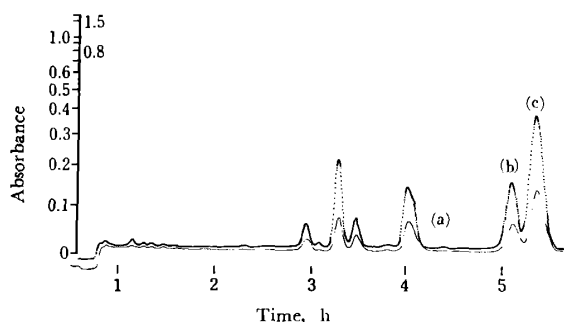


Fig. 6 Analysis of a homogenate of toad skeletal muscle

(a) Anserine; (b) Balenine; (c) Carnosine; A sample corresponding to 0.022 g of wet tissue was added to the column.

ラ, スジイルカ, ヒキガエル, 白ネズミ, モルモット, 家ウサギの骨格筋及びホタテガイの貝柱のカルノシン, アンセリン及びバレンインの濃度を Table 2 に示す。

4 考 察

クロマトグラフィーによる分離能に影響を与えている

Table 2 Concentrations of carnosine, anserine and balenine in various muscles (mg/100 g wet tissue)

	Carnosine	Anserine	Balenine
Sperm whale	252	89.4	2.4
Sperm whale ^{a)}	206	83.6	1.8
Blue white dolphin	439	119	500
Toad	392	0.8	69.0
Scallop	0	0	1.0
Rat	85.7	199	0
Guinea pig	117	27.1	0
Rabbit	40.1	409	0

a) Values by M. Suyama *et al.*⁹⁾

大きな要因は樹脂の粒子径¹⁵⁾, つまり, 樹脂相の表面積である。本実験では, 粒子径が小さくしかもその分布が均一な球形樹脂を使用したため, ピークはシャープで対称形を示し, その結果として分離が向上したものと考えられる。ピークの対称性にはそのほかカラムの温度が影響を与えており, 分析開始の温度が 30°C で途中 50°C に昇温する分析方法ではピークは一般にテーリングする。本実験では, カラム温度は 57°C に設定して行ったが, この 57°C 前後の温度ではほとんど分離に影響はないと考えられるので, 厳密に 57°C にこだわる必要はないと考えられる。Fig. 1, Fig. 2 に示されているように, pH が低いほど, 又, エタノール濃度が高いほど分離は向上するが, 本実験では筋肉中のカルノシン, アンセリン, バレニン迅速に精度よく分析するのが目的であり, 従って, 50×0.25 cm カラムで pH 4.15, エタノール濃度 2.5% と定めた。その結果, カルノシン, アンセリン及びバレニンの定量法として優れた結果が得られた。緩衝液の pH, イオン強度, 有機溶媒の濃度及びカラム温度などは, 当然, 目的によってほかのアミノ酸の分離との関係によって定められるべきものである。Fig. 3 に示されているように, 塩基性アミノ酸の中でリジンは *N*^ε-メチルヒスチジン (1-メチルヒスチジン) と, *N*^ε-メチルヒスチジンはクレアチニンと重なっておりそれぞれ定量は不可能である。トリプトファンはアンモニアとほとんど分離しておらずやはり定量不可能である。しかし, ヒスチジンは単一ピークとして溶出されており定量可能である。又, オルニチンもエタノールアミンと約 50% 分離しており定量可能である。β-アラニンはフェニルアラニンのすぐ後に溶出されやはり定量が可能である。

カルノシン, アンセリン, バレニンの分布とそのパターンは動物種によって大きく異なっていることがこの実験でもわずかな分析例ではあるが示された (Table 2)。又, ホタテガイにカルノシンが存在するという報告¹⁶⁾があるが, 本法による分析結果ではそれはクロマトグラフ

的にはバレニンであることが明らかになった (Table 2)。

イルカやヘビなどに存在すると思われていたオフイデイン [N^{α} -(β -アラニル)-2-メチルヒスチジン]^{17)~23)} は Wolff²⁴⁾ や須山¹¹⁾²⁵⁾ らによって否定されたのであるが、筋肉中のカルノシン、アンセリン、バレニンの生化学的機能がほとんど明らかにされていない現在²⁶⁾、本定量法はこの面での研究を進めるうえで有益ではないかと期待している。

最後に、本研究を行うに当たり終始ご協力して下さった東京大学農学部農芸化学科機器分析室の諸氏、カルノシン、アンセリン、バレニンの結晶を提供してくださった東京水産大学須山三千三教授、マッコウクジラ、スジイルカの筋肉試料を提供してくださった東京大学農学部水産学科の松井氏に深く感謝の意を表します。

(1970年4月1日、日本農芸化学会 1970年度大会において発表)

文 献

- 1) C. J. Parker, Jr. : *Anal. Chem.*, **38**, 1359 (1966).
- 2) C. L. Davey : *Nature*, **179**, 209 (1957).
- 3) S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein : *Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958).
- 4) D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore : *ibid.*, **30**, 1190 (1958).
- 5) D. H. Spackman : *Federation Proc.*, **23**, 371 (1964).
- 6) C. H. Kirkpatrick, R. A. Anderson : *J. Chromatog.*, **14**, 259 (1964).
- 7) J. V. Benson, Jr., J. A. Patterson : *Anal. Biochem.*, **13**, 265 (1965).
- 8) A. A. Christman : *ibid.*, **39**, 181 (1971).
- 9) M. Suyama, T. Suzuki, J. Nonaka : 日水会誌, **33**, 141 (1967).
- 10) M. Suyama, T. Suzuki, M. Maruyama, K. Saito : 同上, **36**, 1048 (1970).
- 11) M. Suyama, M. Maruyama : 同上, **35**, 471 (1969).
- 12) H. H. Tallan, S. Moore, W. H. Stein : *J. Biol. Chem.*, **211**, 927 (1954).
- 13) 西沢直行, 神立 誠 : 本誌, 投稿中.
- 14) 波多野博行, 堀 正剛, 六鹿宗治, 村上文子 : “液体クロマトグラフィーとその応用”, p. 31 (1974), (講談社).
- 15) P. B. Hamilton : *Anal. Chem.*, **30**, 914 (1958).
- 16) A. Lukton, H. S. Olcott : *Food Res.*, **23**, 611 (1958).
- 17) H. Imamura : *J. Biochem. (Tokyo)*, **30**, 479 (1939).
- 18) K. Kendo : *ibid.*, **36**, 265 (1944).
- 19) T. Tomita : *Z. Physiol. Chem.*, **304**, 72 (1956).
- 20) S. Tsunoo, K. Horisaka, Y. Miyashita, T. Takeda,

- N. Takatama : *Jap. J. Pharmacol.*, **14**, 401 (1964).
- 21) S. Tsunoo, K. Horisaka, M. Motonishi, J. Takeda : *J. Biochem. (Tokyo)*, **56**, 604 (1964).
- 22) J. Takeda : *ibid.*, **57**, 1 (1965).
- 23) S. Tsunoo, K. Horisaka, H. Tanabe, M. Murata, S. Takahashi, A. Musashi, J. Tanabe : *Jap. J. Pharmacol.*, **16**, 98 (1966).
- 24) L. Wolff, K. Horisaka, H. M. Fales : *Biochemistry*, **7**, 2455 (1968).
- 25) M. Suyama, M. Maruyama : *J. Biochem. (Tokyo)*, **66**, 405 (1969).
- 26) K. G. Crush : *Comp. Biochem. Physiol.*, **34**, 3 (1970).

☆

Determination of carnosine, anserine and balenine in muscle by ion exchange chromatography.

Naoyuki NISHIZAWA*, Yasushi TAKANO** and Makoto KANDATSU*** (Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo; Present address : *Department of Agricultural Chemistry, Iwate University, 3-18-8, Ueda, Morioka, Iwate; **Central Research Laboratory, Ajinomoto Co., Inc., 1-1, Suzuki-cho, Kawasaki-shi, Kanagawa; ***Azabu Veterinary College, 1-17-7, Fuchinobe, Sagamihara-shi, Kanagawa)

Carnosine [N^{α} -(β -alanyl) histidine], anserine [N^{α} -(β -alanyl)- π -methylhistidine] and balenine [N^{α} -(β -alanyl)- τ -methylhistidine] in muscles could be analyzed simply and accurately in the presence of amino acids, ethanolamine and creatinine by ion exchange chromatography. The resolution of these dipeptides in muscles was achieved on a 50×0.25 cm column of Aminex A-5 ion exchange resin. Sodium citrate buffer containing 2.5% of ethanol (0.38 M sodium and pH 4.15) was used as an eluent at a flow rate of 5.4 ml/h at 57°C throughout the analysis. The analysis time was 5 h and 40 min through carnosine. The duplicate determinations showed the reproducibility of this method to be within (100±1.2)%. The sample quantities corresponding to 0.02 g of wet tissue were optimum for this method. The data in this report indicated that balenine occurred in the skeletal muscles of sperm whale, blue white dolphin and toad, and in the muscle of scallop.

(Received Jan. 5, 1976)

Keywords

Anserine
Baleneine
Carnosine
Ion exchange chromatography
Muscle