

## 노(尿)중 3-Methylhistidine 함량의 측정과 이용

정수현 · 서형주 · 김윤숙\* · 이효구\*\* · 강덕호\*\*\*

고려대학교 보건전문대학 식품영양과

\* 한국식품개발연구원

\*\* 공주대학교 식품공학과

\*\*\* 순천향대학교 사회체육학과

### Determination and Application of 3-Methylhistidine Levels in Urine

Soo-Hyun Chung, Hyung-Joo Suh, Yoon-Sook Kim\*, Hyo-Ku Lee\*\*, Duk-Ho Kang\*\*\*

*Dept. of Food and Nutrition, Junior College of Allied Health Science, Korea Univ.*

*\* Korea Food Research Institute,*

*\*\* Dept. of Food Technology, Kongju National Univ.*

*\*\*\* Dept. of Leisure and Recreation, Soonchunhyang Univ.*

#### Abstract

A modified method is given for the precolumn derivatization and subsequent high-pressure liquid chromatographic separation of 3-methylhistidine from urine. The elution contained isocratic solution with acetonitrile and 10 mM sodium phosphate (pH 7.5) requires less than 7 min. The recoveries of 3-methylhistidine from urine control were 93% to 106%. 3-Methylhistidine determinations were performed on urine samples from volunteers who were both male trained and non-trained physical undergraduates. As the result, urinary 3-methylhistidine content of volunteers increased significantly after weight training.

Key words : 3-methylhistidine, modified method, volunteer.

## 서 론

근육단백질은 합성과 분해를 반복하며, 단백질 분해에 의해 생성된 아미노산은 체내 단백질 합성을 위하여 재이용되거나, 재이용되지 않은 아미노산은 세노관에서 재흡수된다. 그러나 골격 근육단백질의 구성 아미노산으로서 액틴과 미오신 중에 미량으로 존재하는 3-methylhistidine(이하 3MH)은 단백질 분해에 의해 생성된 후 재이용, 재흡수되지 않고 노중으로 배설되는 것으로 알려져 있다<sup>1, 2)</sup>. Hickson 등<sup>3)</sup>은 운동의 강도, 시간, 빈도에 따른 노중 3MH의 증감을 보고하였으며, Pivarink 등<sup>4)</sup>도 웨이트 트레이닝에 의한 근육 단백질의 turnover가 3MH의 증가를 가져온다고

보고하였다. 따라서 노중 3MH은 근육단백질 분해의 지표로서 단백질 대사에 관한 연구<sup>5, 6)</sup>에 이용되고 있으며, 적정 식이조건에서 노중 3MH의 분비량을 측정함으로써 근육단백질 분해 정도의 추정이 가능하다.

3MH의 분석방법에는 이온교환 크로마토그래피에 의하여 3MH를 분리한 후 ninhydrin 또는 ninhydrin-orthopthaldehyde 유도체화하여 측정하는 방법<sup>1, 2, 7)</sup>과 아미노산 분석기를 이용한 측정법<sup>4, 8)</sup> 등이 있으나 전자는 분석에 요하는 시간이 길고 후자는 다른 아미노산과의 분리가 어려운 점 등의 단점이 있었다. Wasner 등<sup>9)</sup>은 3MH을 fluorescamine 유도체화한 후 고속액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 형광검출기로 분석함으로써 앞의 방법들보다 감도가 높고 분석시간이 단축된 3MH 분석방법을 개발하였다.

본 연구에서는 Wasnner 등<sup>9)</sup>과 Yoshida 등<sup>10)</sup>의 방법을 일부 수정하여 뇨중 3MH 함량을 측정하였으며, 웨이트 트레이닝을 단기간 실시한 피검자들을 대상으로 웨이트 트레이닝에 따른 뇨중 3MH 함량의 변화를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 뇨중 3-Methylhistidine 분석

24시간 채뇨한 시료를 잘 혼합한 후 200  $\mu$ l을 채취하여 증류수 750  $\mu$ l와 70% 과염소산(perchloric acid) 50  $\mu$ l가 들어 있는 1.8 ml Eppendorf micro-test tube에 가하고 vortex mixer로 혼합한 후 원심분리(5,000 rpm, 1 min)하여 시료의 뇨단백질을 제거한다. 상등액 75  $\mu$ l에 0.4 M sodium borate 용액(pH 12.2) 250  $\mu$ l를 가하여 시료를 중화시키고 fluorescamine 용액(160 mg / 100 ml acetonitrile) 250  $\mu$ l를 혼합한 후 5분간 정치시킨다. 여기에 과염소산(conc.) 35  $\mu$ l를 가하고 밀봉하여 80°C water bath에서 1 시간 유지하여 fluorescamine 유도체를 만든다. 이후 시료를 실온까지 방냉하고 0.5M propanesulfonic acid(in 3M NaOH) 용액 100  $\mu$ l를 가하여 다시 중화시키고 10  $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 형광검출기로 분석하였다. 본 연구에서의 HPLC 분석은 Waters사의 NovaPak C<sub>18</sub> column(3.9×150 mm, 4  $\mu$ m)과 Fluorescence detector(ex.:365 nm, em.:460 nm)을 사용하였으며, 이동상은 acetonitrile / 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5) (27.5:72.5, 0.6 ml/min) 이었다.

### 2. 피검자, 웨이트 트레이닝 및 채뇨

피검자는 19~23세의 체육학과 남학생들로서 웨이트 트레이닝을 장기간 실시해 온 5명(단련자 집단)과 웨이트 트레이닝을 실시하지 않은 4명(비단련자 집단)으로 총 9명의 피검자를 대상으로 하였다. 본 실험 기간은 총 10일간으로서 첫 3일간은 피검자들이 어떤 격렬한 운동이나 신체활동에 참가하지 않는 실험적 기간으로 하였으며 이후 7일간은 웨이트 트레이닝 기간으로 매일 15:00~16:00에 벤치프레스, 스쿼트, 암걸, 레트폴다운의 4종목을 60% 부하 강도로 실시케

하였다. 피검자들의 영양섭취는 1일 에너지 섭취량이 2,600~3,400 kcal인 한식으로 이틀을 주기로 같은 식단이 되도록 하였으며, 채뇨는 매일 15:00을 기준으로 24시간 뇨를 수집하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 뇨중 3-Methylhistidine의 분석

Fig. 1은 뇨중 histidine과 3-MH의 fluorescamine 유도체의 분리상태를 보여주는 크로마토그램이다. 뇨중 histidine과 3-MH의 fluorescamine 유도체의 체류시간은 각각 4.10분과 6.17분으로 Wasnner<sup>9)</sup>와 Yoshida 등<sup>10)</sup>의 보고에 나타난 용출시간(9분 및 15분대)보다 단시간에 용출되었다. 또한 histidine과 3-MH의 fluorescamine 유도체 peak는 서로 간섭함이 없이 분리가 충분하였으며, 비특이적인 형광산물들은 3분 이내에 용출되어 histidine과 3-MH의 peak에 영향을 미치지 않았다.

Fig. 2에 3-MH의 표준정량곡선을 나타내었다. 3-MH의 HPLC 주입량을 50, 100, 200, 300 및 500 pmole이 되도록 하고, 이를 3반복 시행한 결과 표준정량곡선은 그림과 같이 직선상으로 나타났다. 이 때의 직선식은  $Y=1874X-35514$ (X: 3-MH pmole injected, Y: peak area,  $r^2=0.990$ )로 표시할 수 있었다.

뇨에 인위적으로 3-MH를 첨가하고 본 실험의 분석 방법에 따라 3-MH 함량을 측정하여 그 회수율을 Table 1에 나타내었다. 대조구로 사용한 3-MH 함량이

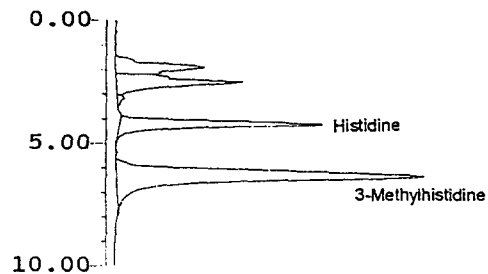
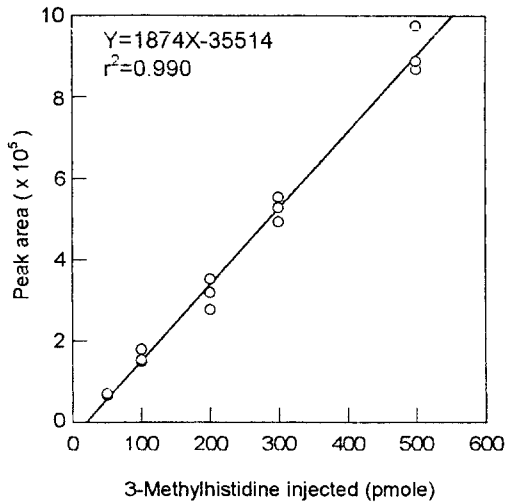


Fig. 1. HPLC chromatographic traces of histidine and 3 methylhistidine derivative from human urine.



**Fig. 2. Standard curve of 3-methylhistidine.** Standard curve is leanear over the range of 50 to 500 pmol.

**Table 1. Recovery of 3-methylhistidine added to urine control contained 256 pmole/injected**

3-MH added (pmole /injected)	3-MH recovered (pmole /injected)	3-MH recovery
50	52 ± 5.8	104%
100	93 ± 8.7	93%
200	212 ± 17.7	106%

256 pmole /10  $\mu$ l injected인 노에 각각 50, 100 및 200 pmole /10  $\mu$ l injected씩 3-MH를 첨가하고 이를 3회 반복 주입하였을 때 그 평균 회수율이 각각 104, 93 및 106%이었다. 따라서 본 실험방법은 노중 3-MH 함량의 측정에 효과적으로 사용할 수 있는 방법으로 생각된다.

## 2. 웨이트 트레이닝시 노중 3-Methylhistidine의 변화

Table 2에 웨이트 트레이닝의 각 기간별로 분비된 3-MH량을 나타내었다. 적응기간 3일째의 3-MH 분비량은 단련자와 비단련자가 각각  $264 \pm 16.7 \mu\text{mole /day}$  및  $253 \pm 11.8 \mu\text{mole /day}$  이었다. 웨이트 트레이닝 실시 1일 후에는 단련자와 비단련자 집단의 3-MH의 분비량은 각각  $296 \pm 10.7 \mu\text{mole /day}$  및  $282 \pm 15.8 \mu\text{mole /day}$ 로 두 집단 모두 적응기간보다 유의한 증가( $p < 0.05$ )를 나타내었다. 단련자 집단의 웨이트 트레이닝 실시 3일 이후의 3-MH 분비량은 조금 증가하다가 다시 감소하는 경향이었으나 유의한 변화는 아니었다. 비단련자 집단에서는 웨이트 트레이닝 3일 경과시에 다시 1일 보다 유의하게 증가( $p < 0.05$ )하여  $304 \pm 12.4 \mu\text{mole /day}$  이었으며, 이후 다시 낮아지는 경향이었으나 유의한 차이는 아니었다. 피검자의 체중을 보정한 3-MH의 분비량(3-MH mole / kg /day)은 적응기간 3일째에 단련자와 비단련자가 각각  $3.6 \pm 0.32 \mu\text{mole /kg /day}$  및  $3.7 \pm 0.26 \mu\text{mole /kg /day}$  이었으며, 웨이트 트레이닝 실시후 단련자

**Table 2. Changes in urinary 3-methylhistidine level during weight training**

Period	3-MH ( $\mu\text{mole /day}$ )		3-MH ( $\mu\text{mole /kg /day}$ )	
	Trained group	None-trained group	Trained group	None-trained group
adaptation 3rd day	$264 \pm 16.7^b$	$253 \pm 11.8^c$	$3.6 \pm 0.32^b$	$3.7 \pm 0.26^b$
weight training				
1st day	$296 \pm 10.7^a$	$282 \pm 15.8^b$	$3.8 \pm 0.42^{ab}$	$4.1 \pm 0.17^a$
3rd day	$308 \pm 12.9^a$	$304 \pm 12.4^a$	$4.0 \pm 0.40^a$	$4.4 \pm 0.29^a$
5th day	$307 \pm 11.8^a$	$301 \pm 9.2^{ab}$	$3.9 \pm 0.43^{ab}$	$4.4 \pm 0.31^a$
7th day	$297 \pm 17.0^a$	$298 \pm 13.2^{ab}$	$3.8 \pm 0.32^{ab}$	$4.3 \pm 0.34^a$

Means with the same letter within a same column are not significantly different at  $p < 0.05$  level by Duncan's multiple range test

집단은 3일 경과 후에 적응기간의 3-MH의 분비량과 유의한 증가( $p < 0.05$ )를 보여  $4.0 \pm 0.40 \mu\text{mole/kg/day}$ 를 나타내었고 비단련자 집단은 1일 경과후에  $4.1 \pm 0.17 \mu\text{mole/kg/day}$ 로 유의( $p < 0.05$ )하게 증가하였다. 이후 두 집단의 체중당 3-MH의 분비량은 조금 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었으나 유의한 변화는 아니었다. 이러한 결과는 Pivarink 등<sup>4)</sup>의 연구·보고와 같은 결과로서 노중 3-MH 분비량을 웨이트 트레이닝의 효과를 추정하는데 유용하게 이용할 수 있으며, 또한 단백질 대사의 종말산물로서 아미노산 이화의 지표로 이용되는 노소질소의 배설량과 상호보완적으로 이용한다면 운동에 의한 체중감량 효과 등을 추정하는데 더욱 효과적인 방법이 될 것으로 생각된다.

## 요 약

기존의 방법을 일부 수정하여 노중 3-methylhistidine을 분석하였다. 노중 3-methylhistidine을 fluorescamine 유도체화하여 HPLC에 주입하고  $C_{18}$  column과 10 mM acetonitrile/sodium phosphate buffer(pH 7.5)로 분리·용출시켜 형광검출기로 측정하였다. 3-methylhistidine의 체류시간은 7분 이내이었으며, histidine과의 분리상태도 서로 간섭함이 없이 양호하였다. 노에 3-methylhistidine을 첨가하고 이를 분석하였을 때의 회수율은 93~106%로 높은 수준이었다. 체육학과 남학생중 웨이트 트레이닝 단련자와 비단련자를 대상으로 조사한 단기간의 웨이트 트레이닝에 따른 노중 3-methylhistidine 함량의 변화는 두 집단 모두 웨이트 트레이닝후의 3-methylhistidine 분비량이 유의하게 증가하였다.

## 참고문헌

1. Young, V. R. and Munro, H. N. : N<sup>ε</sup>-Methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview. *Federation Proceedings*, 37(9), 2291(1972).
2. Long, C. L., Haverberg, L. N., Young, V. R., Kinney, J. M., Muro, H. N. and Geiger,

J. W. : Metabolism of 3-methylhistidine in man. *Metabolism*, 24, 929(1975).

3. Hickson, J. F. Jr., Wolinsky, I., Rodriguez, G. P., Pivarnik, J. M., Kent, M. C. and Shier, N. W. : Failure of weight training to affect urinary indices of protein metabolism in men. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 18(5), 563(1986).
4. Pivarnik, J. M., Hickson, J. F. Jr., and Wolinsky, I. : Urinary 3-methylhistidine excretion increases with repeated weight training exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 21(3), 283(1989).
5. Frontera, W. R., Meredith, C. N., O'Reilly, K. P., Knuttgen, H. G. and Evans, W. J. : Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *J. Appl. Physiol.*, 64(3), 1038(1988).
6. Poortmans, J. : Protein metabolism: Effects of exercise and training. *Medicine Sport*, 13, 66(1981).
7. Neuhauser, M. and Furst, P. : An automatic method for the determination of urinary 3-methylhistidine: normal values. *Anal. Biochem.*, 92, 294(1979).
8. Hickson, J. F. Jr. and Hinkelman, K. : Exercise and protein intake effects on urinary 3-methylhistidine excretion. *Am. J. Clin. Nutr.*, 41, 246(1985).
9. Wassner, S. J., Schlitzer, J. L. and Li, J. B. : A rapid, sensitive method for determination of 3-methylhistidine levels in urine and plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 104, 284(1980).
10. 芳田哲也, 井川正治, 森田恭光, 宮島俊名, 北博正 : 尿中 3-methylhistidine의測定法とその利用, 日本體育大學紀要, 14(1), 53(1984).

(1996년 6월 17일 수리)