

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成23年3月9日 受理
産技連四国食品健康産業分科会
食品機能成分分析研究会 編

水産物のエイコサペンタエン酸とドコサヘキサエン酸

作成者：愛媛県産業技術研究所
食品産業技術センター技術支援室長 平岡芳信
嘱託研究員 園田浩二

1. 水産物および加工品について

1.1 概要

日本では、ブリ類の養殖（15万5千t：平成20年度）が盛んで、愛媛県においてもハマチの養殖は、全国第2位の生産量（2万7千t：平成20年度）があり、地場水産業の基盤を形成している。これまで、ハマチの出荷形態は、活魚あるいはラウンドで行われていたが、近年、輸送コストの削減と消費地でのさばき手不足や調理後の廃棄物処理等の関係から流通形態が変化し、フィレーでの出荷割合が増加してきている。

その結果、生産地に頭部、中骨、内臓、シラコ等の未利用資源が多量に残ることとなった。このため、生産地では、これら未利用資源の有効利用と高付加価値化技術の開発が重要な課題となっている。

愛媛県産業技術研究所では、養殖ハマチの未利用資源の成分分析を行い、食品素材としての利活用方法を検討した。その結果、それぞれの未利用資源の成分組成は異なっていたが、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)、カルシウム(Ca)、亜鉛(Zn)、コラーゲン等の機能性成分が豊富に含まれていることを明らかにした。また、これらの有効成分の抽出方法及び貯蔵方法を検討し、食品素材として、これらを種々の食品等に添加し機能性食品として商品化する技術を開発した。

ここでは、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)の分析方法について述べる。

1.2 食品あるいは含有成分の機能性

現在、EPAやDHAは、マグロの眼窩油から抽出されたものがよく利用されているが、養殖ハマチの加工残渣も、EPAやDHAの供給源としての利用価値が高い

例えば、平成20年度の愛媛県の養殖ハマチのフィレー向け出荷量は約6,000tであり、その加工残渣は約2,650tにも達しているが、そのうち頭部830tから208tの脂質が抽出可能で、その脂質には14tのEPAと27tのDHAが含まれている。更に、中骨は522t排出されているが養殖ハマチの中骨は脂質が多いことが特徴で7tのEPAと14tのDHAが含まれている。

ハマチ油の利用法の1つとして、愛媛県の特産品であるジャコ天ぷらに添加し、脂質

及び脂質中のEPA・DHA等の機能性成分を強化した練り製品の製造や、鶏の飼料に対して2.5～10%のハマチ油を添加して1週間以上給餌すれば卵にDHAだけが特異的に取り込まれDHAの豊富な卵を生産することも可能である。鶏肉中では、DHAだけでなくEPAも同時に増加し、特に鶏脂質中や肝臓における蓄積量が大きく増加している

養殖ハマチの中骨は、ハマチの魚体重量の8.7%を占めることから、種々の加工利用方法が開発されている。養殖ハマチの中骨の一般成分の特徴は、コイ、スズキ、スケトウダラなどの骨と比較して粗灰分が少なく、脂質含量が非常に多いことである。更に、レトルト処理では、脂質の減少がなく、DHA、EPA量の低下も少ないことから、Ca供給源としての利用以外に機能栄養成分としての利用が考えられる。骨をレトルト処理することにより含まれるコラーゲンがゼラチン化し溶出しやすくなっているため微細化によりペーストを作製することができる。このペーストはCa、EPA、DHA源として利用可能であり、だしの素、ラーメンスープの基材、水産練製品の天然の調味料等への試作開発が進められている。これを添加した加工品として、ドレッシング、パン、スポンジケーキ、かりんとう、煎餅、ハム、ソーセージ、缶詰等の試作品が検討されている。一方、骨の加熱処理による脆弱化温度では魚肉タンパク質（ミオシン）は分解され、缶詰肉のようにばさばさした食感になるため、なるべく温和な条件下で骨コラーゲンのゼラチン化ができるならば、骨も食べられる骨付き肉の食品が可能となり、骨無し魚肉よりCa、P、脂質に富む食品が期待されている。

1. 2. 1 EPAやDHAを含む食品

EPAやDHAの機能性が確認されるに従って、魚介類の栄養素が見直され、多くの魚の機能性成分の解析が行われてきた。特に、近年、EPAやDHAを含有した食品の開発が行われており、例えば、EPA入りのドレッシング、ソーセージ、サプリメント、DHA入りの粉ミルク、キャンディ、ガム、ソーセージ、卵、アジなハム、アジなウィンナー、アジなハンバーグ、アジなソーセージ、サケフレーク、さつまあげ、魚そうめん、魚コロケ、マグロの目玉焼き、サプリメント等が開発・販売されている。

<引用・参考文献>

1. Dyerberg, J., Bang, H. O., Hjorne, N.: Am. J. Clin. Nut. 28, 958-966 (1975).
2. 国崎直道:この病気にこの魚, 平成4年9月1日, 株式会社法研
3. 菅忠明、平岡芳信、相原宏:愛媛工試研究報告, 31, 103-106 (1992).
4. 菅忠明、平岡芳信、平野和恵、黒野美夏、橋本照:愛媛工試研究報告, 32, 107-110 (1993).
5. 黒野美夏、平岡芳信;菅忠明;平野和恵、橋本照:愛媛工試研究報告, 32, 111-114 (1993).
6. 平岡芳信、城敦子、成田公義、岡弘康:平成6年度～10年度水産物機能栄養マニュアル化基礎調査事業総合報告書, 水産庁資源生産推進部研究指導課, 東京, 374-388 (1998).

2. 機能性成分

2. 1. エイコサペンタエン酸 (EPA) について説明

エイコサペンタエン酸 (Eicosapentaenoic acid、略称 EPA) またはイコサペンタエン酸 (Icosapentaenoic acid) は、 ω 3 脂肪酸の一つで、5つのシス-二重結合をもつ20炭素のカルボン酸である。

EPAの発見は、グリーンランドに住むエスキモー人に対する疫学調査であることはよく知られている。すなわち、ダイアベルグ博士は、デンマーク領グリーンランドの極寒の地に住むイヌイットが、魚やアザラシ、カリブー、オットセイを常食にし、野菜や果物をほとんど食べることがないのに、成人病にかかる人はほとんどなく、ビタミンC不足による壊血病にかかることもないことから、海産物を通じてEPAを多量に摂取し、体内に蓄積されているため、であると結論を出している。

また、日本においても水産物摂取量の多い漁村と、平均的摂取量の近郊農山村の比較調査結果から、漁村では農村の約3倍の魚肉を摂取し、血液中のEPA含量も約1.7倍と高いことを、血液性状の比較でも漁村住民は中性脂質が低く、血小板凝集性も低い、農村住民に比較して動脈硬化を起こしにくい性状であることを述べている。上記結果より、食事中的魚の割合を増やすことによって成人病にかかりにくい体質への改善につながる可能性を述べている。

EPAは、①血液が凝固するのを防ぎ、血栓（心筋梗塞、脳梗塞）予防の効果を持つ。②高血圧や動脈硬化の原因となる血中のコレステロールを減らす。③血液中の中性脂肪値を減らす。等の機能性を保持している。

また、EPAは、イワシ、養殖ハマチ、マグロ（脂身）等、魚油に多く含まれ、日本人は魚類を食べることによって多く摂取してきた。ヒトでは、体内で合成できない α -リノレン酸から体内でEPAを合成するため、広義では必須脂肪酸となる。健康目的でDHAとともにサプリメントに用いられている。

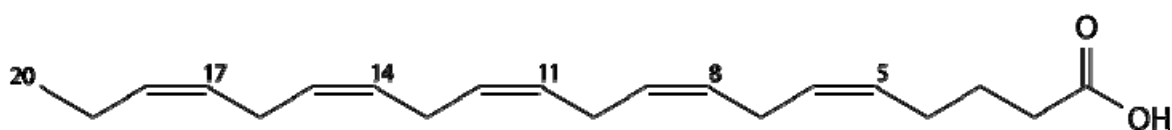


図 2 - 1 エイコサペンタエン酸の構造式

2. 2. ドコサヘキサエン酸 (DHA) についての説明

ドコサヘキサエン酸 (Docosahexaenoic acid、略称 DHA) は、不飽和脂肪酸のひとつで、6つの二重結合を含む22個の炭素鎖をもつカルボン酸 (22:6) の総称で、通常は生体にとって重要な4, 7, 10, 13, 16, 19位に全てシス型の二重結合をもつ、 ω -3脂肪酸に分類される化合物である。

現在までにDHAによる効果としては学習能力向上作用、網膜反射能力向上作用、

制ガン作用、血中コレステロール低下作用、血中脂質低下作用、抗血栓作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、抗糖尿病作用が報告されている。一方、リノール酸の取り過ぎがこれらの病気や症状を加速させていることや、喫煙や飲酒がDHA濃度レベルを低下させることも報告されている。DHAを摂ることに关しては特に妊娠・授乳期の母親の必須の栄養素であるとして、粉ミルクへの添加や母親のDHAの積極的な摂取を奨める活動がすでに世界の公的レベルで始められている。

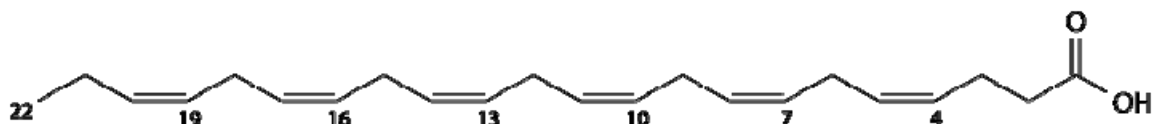


図 2 - 2 ドコサヘキサエン酸の構造式

3. 定量分析の方法について

水産物及び水産加工品中のEPAやDHAをガスクロマトグラフィーにより定量する方法を述べる。

ガスクロマトグラフィー (Gas Chromatography, GC) はクロマトグラフィーの一種であり、気化しやすい化合物の同定・定量に用いられる機器分析の手法である。サンプルと移動相が気体であることが特徴である。

この方法は、移動相に気体を用いるので分析する試料も気体である必要がある。試料を気体状態に保つためにガスクロマトグラフ内は通常高温になっており、また、試料は揮発性が高く熱に対しても安定である必要がある。したがって、難揮発性の試料や、熱に不安定な試料はこの分析法には適さないので適当な前処理 (誘導体化) を行なう必要がある。

また、ガスクロマトグラフの検出器としては、水素炎検出器 (Flame ionization detector:FID) が一般に採用されている。これは、分離された有機化合物を水素炎中に導きイオン化させ、生じた荷電粒子量を電氣的に検出するものである。

3. 1 準備する器具など

1. 電子天秤
2. ビーカー200ml
3. 分液ロート 300ml
4. ロート台
5. 三角フラスコ 200ml
6. メスフラスコ 100ml 容
7. ホモジナイザー (T18 ベーシック)
8. ネジ付試験管 10ml

9. メスフラスコ 5～10ml 容
10. 試料濾過用メンブランフィルター(セルロースアセテート膜を使用したもの、ポアサイズ 0.20 μ m、13mm 径：DISMIC、13CS020AN, アトバンテック社製)
11. ピペッター(10～1,000 μ l)
12. エッペンチューブ(2ml 容)
13. タッチ式試験管ミキサー
14. 分析装置
ガスクロマトグラフィー (FID)
15. 分析用カラム
同上システムに対応したガラスカラム (unisol 3000(3×3m))
16. 恒温水槽 (60℃セットできること)

[試薬]

1. メタノール(試薬特級)
2. クロロホルム (試薬特級)
3. 0.5%-硫酸亜鉛
4. n-ヘキサン (試薬特級)
5. 2N-水酸化ナトリウム-メタノール (試薬特級)
6. 5%-塩酸-メタノール (試薬特級)
7. 200ppm-トリフェニルエチレン n-ヘキサン溶液
8. エイコサペンタエン酸
9. ドコサヘキサエン酸
10. 窒素ガス (移動相用：30ml/min)

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

(1) 試料の調製

1. 魚肉として約10gの試料を、ビーカーで精秤する。
2. これに、メタノールを50ml加える。
3. ホモジナイザーで2分間、粉碎抽出する。
4. これに、クロロホルムを50ml加える。
5. ホモジナイザーで2分間、粉碎抽出する。
6. No. 2のろ紙でろ過し、ろ液を300mlの分液ロートへ、残留物を再びビーカーへ移す。
7. 残留物にクロロホルムを40ml加える。
8. ホモジナイザーで2分間、粉碎抽出する。
9. No. 2のろ紙でろ過し、ろ液を300mlの分液ロートへ移し1回目のろ液と合わせる。
残留物を再びビーカーへ移す。
10. 残留物にクロロホルムを40ml加える。
11. ホモジナイザーで2分間、粉碎抽出する。
12. No. 2のろ紙でろ過し、ろ液を300mlの分液ロートへ移し1回目のろ液と合わせる。

13. これに、0.5%-硫酸亜鉛35mlを加える。
14. 1分間振とうした後、静置する。
15. 下層のクロロホルム層を100mlのメスフラスコに定容する。

(2) 脂肪酸のメチル化処理

1. このクロロホルム層から約1ml（脂質約5mg相当）をネジ付き試験管に移す。
2. 恒温水槽でクロロホルムを蒸発させ、乾固する。
3. 200ppmトリフェニルエチレンを含有するn-ヘキサン1mlを加え、溶解させる。
4. これに、2N-水酸化ナトリウム-メタノール溶液を0.2ml加える。
5. これを、20秒間振とうする。
6. これを、1分間、60℃恒温水槽で加温し、さらに、20秒間振とうする。
8. 2N-塩酸-メタノール溶液を0.2ml、加え、振とう後、静置する。
9. n-ヘキサン層（上澄み）を駒込ピペットで分取し、約3分の1に濃縮する。
10. この溶液をガスクロマトグラフィーの分析用試料溶液とする。

3. 3 ガスクロマトグラフィー

(1) 分析条件

検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下のとおりである。

検出器：F I D

試料注入温度：230℃

ガラスカラム：3mm×3m

充填材：unisole 3000

カラム温度：230℃

移動相：窒素ガス 30ml/min

試料注入量：10 μ l

(2) 定性及び定量

- ① 分離された物質の定性は保持時間により行う。
- ② 定量は標準試料を用いた、内標を用いない絶対検量線法による。通常はクロマトグラムの面積から計算する。

4. 分析例

4. 1 ガスクロマトグラフィーによる分析例と定量分析結果

分離された物質は保持時間から（標準物質と比べ）特定する。定量には標準試料を用い、クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。以下に典型的なクロマトグラフを図4に示す。

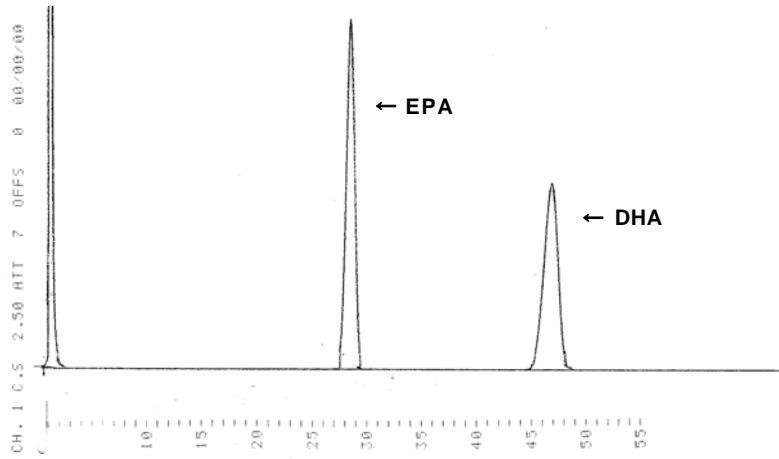


図 4 - 1 . E P A 及び D H A の 標 品 の ク ロ マ ト グ ラ ム

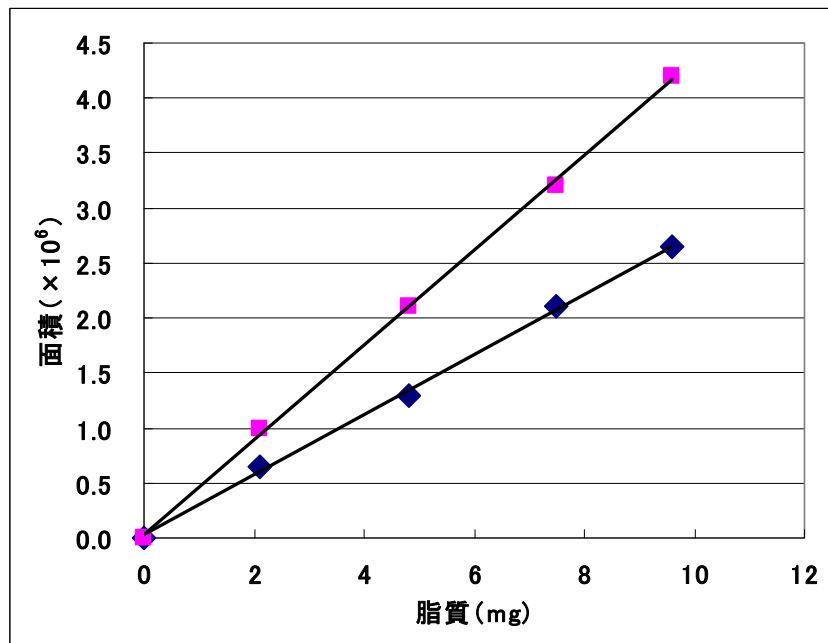


図 4 - 2 . E P A 及び D H A の 検 量 線 作 成 例

5. 食品の分析結果例

養殖ハマチの中骨は、他の魚種の中骨と異なり、脂質が多く、EPAやDHAを高濃度に含んでいるため、まず、中骨の分析結果を表5に示す。また、養殖ハマチの中骨の加工品を製造するためには、中骨のレトルト処理を行うことによって中骨を軟化させる必要がある。しかし、EPAやDHAが加工品を製造する工程で減少する懸念があるため、レトルト処理行程中のEPAとDHAの消長について、上記手法を用いて検討した結果を図5に示す。表5及び図5より、上記手法を用いて、養殖ハマチの中骨中のEPAやDHAを測定することが可能であることが分かった。また、中骨中のDHA含量は20分間のレトルト処理により約20%減少したが、EPA含量は変化しないことが分かった。

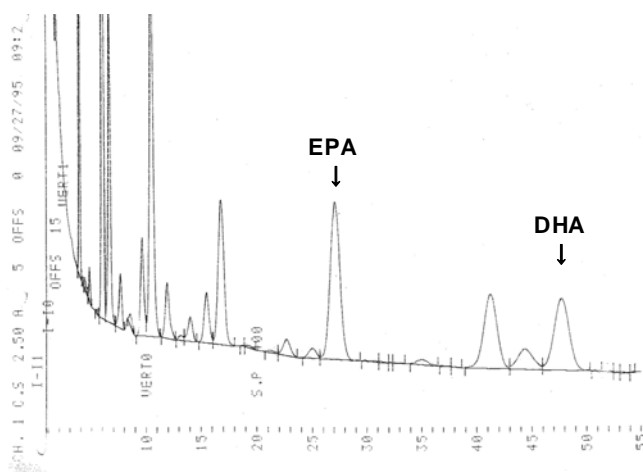


図5-1. 養殖ハマチの中骨のEPA, DHAの分析例

表5. 養殖ハマチの中骨のEPA, DHAの分析例

項目	中骨(g/100g)
水分	39.2
たんぱく質	14.4
脂質	22.4
灰分	19.8
EPA	1.5
DHA	2.9

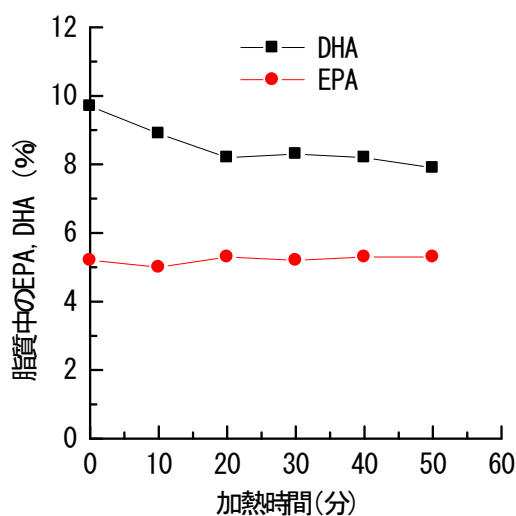


図5-2. 養殖ハマチの中骨を120℃でレトルト処理した時の脂質中のEPA, DHAの変化の分析例

6. 分析上の留意、注意点

魚肉あるいは魚骨から抽出した脂質は、酸素、温度・光により劣化するので、抽出後は速やかに窒素置換し冷蔵庫で保管する必要がある。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1. 前田有美恵、越智寿美子、山本政利、増井俊夫、松原壮六郎：食衛誌，28，384-389(1987)。
2. 秦和彦、藤田孝夫：食品工業，9，53-59(1995)。
3. 丸山一輝：New Food Industry, 34(10), 49-54(1992)。
4. 平岡芳信：日水誌 66(1), 147(2000)。
5. 平岡芳信、城敦子、成田公義、平山和子、菅忠明：日水誌, 67(2), 261~266(2001)。
6. 平野和恵、平岡芳信、菅忠明、黒野美夏、橋本照：愛媛工試研究報告, 32, 101-106(1993)。
7. 平岡芳信、菅忠明、黒野美夏、関伸夫：日本食品工学会誌, 5(3), 137~142, (2004)。

-以上-