

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

四国地域イノベーション創出協議会
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

水産物のヒスチジン

作成者：愛媛県産業技術研究所

食品産業技術センター主任研究員 大野一仁

主任研究員 新谷智吉

1. 水産物および加工品について

1. 1 概要

愛媛県の主要な地域農水産物は、温州ミカン、イヨカンに代表される”柑橘類”と養殖ハマチ・マダイ、小魚等に代表される”水産物”である。

水産物では、八幡浜の沖合底引網漁業を中心とする水産市場、県南地域のマダイ・ブリ類の養殖業やカツオの水揚げを背景に、水産練り製品、鮮魚のフィレー加工、鰹節製造、めんつゆ、調味料製造、珍味製造、チルド製品、冷凍食品等様々な加工品が製造されている。

加工業界では、これまで、外観や食味といった、いわゆる“おいしさ”、にこだわった商品開発、製造販売を行ってきた。しかし、バブル崩壊以来、消費者の価値観も大きく変わり、食の安全性や健康機能性に関心が高まってきている。安全性については、HACCPの導入やISOの取得あるいはトレサビリティシステム等、それらの管理手法が利用されてきており、安全面への対応は急速に進んでいる。また、食品の健康性に配慮した食品造りにも力が傾注されており、食品の機能性に関する関心も高いのが現状である。

これまでに県内では、特定保健用食品として、水産物由来のペプチド（血圧が高めの人に適した食品）が製品化されている。

1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

魚介類には、現代人の健康維持に役立つ、EPA（血栓予防、抗炎症作用）、DHA（脳の活性化、視力低下予防）の高度不飽和脂肪酸、アミノ酸のタウリン（動脈硬化予防、心疾患予防）、色素成分であるアスタキサンチン（生体内抗酸化作用、免疫機能向上作用）等の機能性成分が豊富に含まれており、魚を中心とした日本型食生活が見直されている。

このような中、魚介類に含まれるアミノ酸の一種であるヒスチジンに肥満防止効果があることが注目されている。これまでの研究で、ヒスチジンの誘導体が脳内の満腹中枢を活性化し摂食抑制作用を促進すること、BMI（ボディマス指数）とヒスチジ

ン摂取量との間に負の相関がありBMIが低い人ほどヒスチジン摂取量が多いこと、ヒスチジンの摂取が肝組織における脂肪の分解を促進し肥満を防ぐ効果があること、ヒスチジンに脂肪分解促進作用や末梢組織におけるエネルギー消費亢進作用があること等が次々と報告されている。

愛媛県産業技術研究所では、ヒスチジンの肥満防止作用に着目し、マガツオから抽出したヒスチジンエキスを利用して、ヒスチジンを強化した魚介調味乾燥品を試作した。

1. 2. 1 ヒスチジンを含む食品

ヒスチジンは、カツオ、マグロ、サバ、イワシ、アジ、サンマやその加工品中に多く含まれている。また、魚介類以外では、鶏肉、ハム、チェダーチーズ、ドライミルクにも含まれている。

<引用・参考文献>

1. Sakata toshiie , Yoshimatsu H, Kurokawa M : Nutrition, 13, 403-411(1997).
2. 坂田利家 : 日本水産学会誌、66、125-126(2000).
3. 中島滋、田中香、濱田稔、土屋隆英、奥田拓道 : 肥満研究, 7, 276-282(2001).
4. Hironobu Yoshimatsu, Seiichi Chiba, Daisuke Tajima, Yuko Akehi, Toshiie Sakata : Exp Biol Med , 227, 63-68(2002).
5. H. Yoshimatsu, K. Tsukada, A. Niijima, N. Tatsukawa, S. Chiba, T Sakata : Eur. J. of Clin. Invest, 32, 236-241(2001).
6. Yoshinobu Hiraoka, Yoshitada Sasaki, Toshiaki Takiai, Akihiro Kawakubo, Syojiro Miyoshi, Shigeru Nakajima : Fish. Sci., 73, 1383-1387(2007).



写真 1 - 1 ヒスチジンを豊富に含む水産加工品
(煮干し、小魚調味乾燥品、削り節)

2. ヒスチジンについての説明

ヒスチジンは、塩基性アミノ酸の一種である。水には可溶であるが、エタノールやエーテルにはほとんど溶けない。体内でグルタミン酸に変換される。人間では、幼児の必須アミノ酸で、成人では必須ではない。

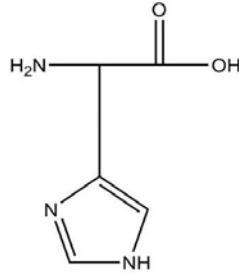


図 2 - 1 ヒスチジンの構造式

3. 定量分析の方法について

水産物及び水産加工品中のヒスチジンを高速液体クロマトグラフィーにより定量する方法を述べる。

アミノ酸のHPLC分析方法には、ポストカラム法（ニンヒドリン法、OPA法）、プレカラム法がある。従来、食品分野では、感度は高くないものの定量精度（再現性）がよく、分離可能なアミノ酸数の多いニンヒドリン法が採用されてきた。しかし、たんぱく質を構成している18種類のアミノ酸以外にもγ-アミノ酪酸、ヒドロキシプロリン等のアミノ酸も含まれていることから、これらのアミノ酸を同時に効率よく分析するためには、使用する溶離液の種類やカラム温度を時間経過とともに詳細に設定した分析プログラムで装置を運転する必要があるため、分析に長時間（1試料あたり2～2.5時間）を要してしまう。昼夜の連続運転をしても試料数が限られ反復試験が困難であることから、短時間に分析できる方法が望まれていた。

ところが、最近の分析技術の進歩により、多種類のアミノ酸を極めて短時間（10分間程度）で分析可能できるアミノ酸用の高速分析システムが開発され、実用機として研究機関等に導入されるようになってきた。

本マニュアルで使用するシステムは、誘導化試薬としてNBD-F（4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole）を用いて誘導体化し、逆相（ODS）カラムを用いて短時間（1サイクル約10分間）での分析が可能となった。

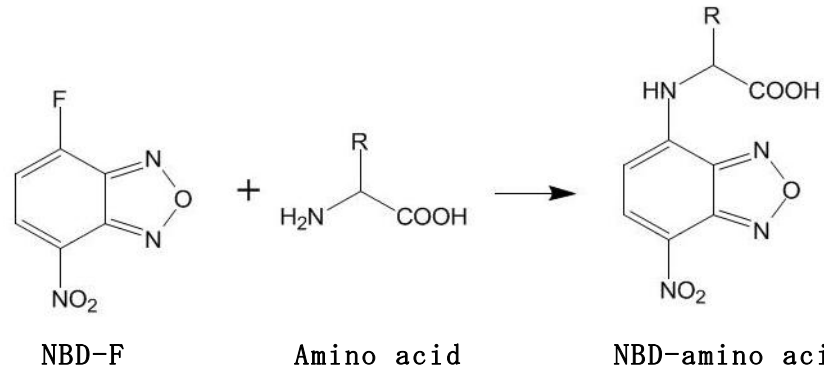


図 3-1 アミノ酸の NBD-F との反応 (誘導体化反応)

3. 1 準備する器具など

1. バキューム・リアクションチューブ (19×100 mm、 20 ml、 (アミノ酸加水分解用試験管))
2. 真空ポンプ
3. 冷却装置
4. ヒートブロック型加熱装置
5. 恒温水槽 (60℃セットできること)
6. エバポレーター
7. ビーカー100ml 容
8. ナス型フラスコ 50ml 容
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、25mm 径 : D I S M I C、25CS020AN, 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
アミノ酸高速分析システム (超高速 H P L C システム)
15. 分析用カラム
同上システムに対応した超高速アミノ酸分析用カラム (ZORBAX SB-C18 (1.8 μ m、3×50mm))

[試薬]

1. 塩酸 (20%、試薬特級)
2. 0.02mol/L 塩酸 (特級濃塩酸を超純水で希釈)
3. アミノ酸標準混合液
トリプトファン (試薬特級) を 0.02mol/L 塩酸で溶解し 2.5mmol/L の標準原液を調製する。
アミノ酸混合標準液 H 型 (2.5mmol/L、和光純薬工業株) 及び調製したトリプトファン標準原液を、各々 1ml ずつ取り、0.02mol/L 塩酸で 25ml に定容する

(0.1mmol/L)。標準原液、調製したアミノ酸標準混合液は、5℃以下で保存する。

4. 専用溶離液

超高速アミノ酸分析用溶離液 A

超高速アミノ酸分析用溶離液 B

5. 誘導体化試薬 一式

NBD-F による誘導体化試薬セット

超高速アミノ酸分析用反応緩衝液

超高速アミノ酸分析用反応中和液

超高速アミノ酸分析用反応試薬

超高速アミノ酸分析用反応試薬溶解液

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

(1) 試料の調製

1. たんぱく質として約10mgの試料を、バキューム・リアクションチューブに入れて、試料量を精秤する。
2. β -メルカプトエタノールを0.04%含む塩酸（20%）をチューブに10ml加える。
3. 冷却したエタノール浴（-45℃）にチューブを漬け凍結させる。
4. チューブを冷エタノール浴から取り出して、真空ポンプを接続して脱気する。
5. 試料を解凍させ、軽く振り混ぜ溶存している空気を追い出す。
6. チューブを冷エタノール浴に浸けながら脱気する。
7. 試料が凍結したら、チューブを冷エタノール浴から再び取り出し解凍して、軽く振り混ぜ空気を追い出す。
8. さらにチューブを冷エタノール浴に漬けて凍結・脱気を継続する。
9. 試料が凍結したら取り出し、チューブの蓋を閉め真空ポンプとの接続をはずす。
10. チューブを室温に放置する。
11. ヒートブロック型加熱装置にチューブをセットし、110℃で24時間加水分解処理をする。
12. 加水分解後、蒸留水を用いて、内容物をナス型フラスコに洗い込む。
13. エバポレーターで内容物を蒸発乾固させ塩酸を除去する。
14. 蒸留水を加えて、再度蒸発乾固させ塩酸を除去する。
15. さらにこの操作をもう一度行い、完全に塩酸を除去する。
16. 乾固後の固形物に0.02mol/L塩酸を加えて5~10mlに定容する。
17. 孔径0.20 μ mのメンブランフィルターでろ過して分析用試料溶液とする。

(2) 誘導体化処理

1. 調製した試料溶液（必要に応じて0.02mol/L塩酸で希釈した試料溶液）、または、アミノ酸標準混合液（0.1mmol/L）20 μ lを反応用エッペンチューブに入れる。
2. これに、反応緩衝液160 μ l加える。
3. さらに、反応試薬20 μ lを加え、タッチミキサーで攪拌する。
4. 反応用エッペンチューブを60℃の恒温水槽に浸し、正確に1分間加温する。
5. 反応用エッペンチューブに反応中和液を800 μ l加えてタッチミキサーで攪拌し

反応を停止させる（全部で容量は、1,000 μ lとなる）。

6. 反応液を、反应用エッペンチューブから、褐色バイヤルに移す。
7. 分析装置のオートサンプラーにセットする。

3.3 アミノ酸高速分析システム（超高速HPLCシステム）

(1) 移動相の調製

移動相は、専用の溶液2種（A、B）を使用する。

超高速アミノ酸分析用溶離液A、超高速アミノ酸分析用溶離液Bは、(株)日立ハイテクノロジーズ製のものをを用いる。

(2) 分析条件

- ① 検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。

検出波長:470nm

恒温槽:37℃

流量:移動相A、移動相Bの合計で毎分0.55ml

試料注入量:10 μ l

- ② 移動相溶媒の混合比(グラジエント)は以下のように調整する。

時間(分)	溶離液A (%)	溶離液B (%)
0.0	85.0	15.0
2.7	75.0	25.0
6.2	65.0	35.0
7.2	30.0	70.0
7.3	85.0	15.0
7.8	85.0	15.0

(3) 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から面積から計算するが、微量物質の場合はピーク高を用いる方が精度良く定量出来る場合もあるので、計算に用いる装置の特性に注意を払って選択することが必要である。

4. 分析例

4. 1 アミノ酸高速分析システム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に示す。

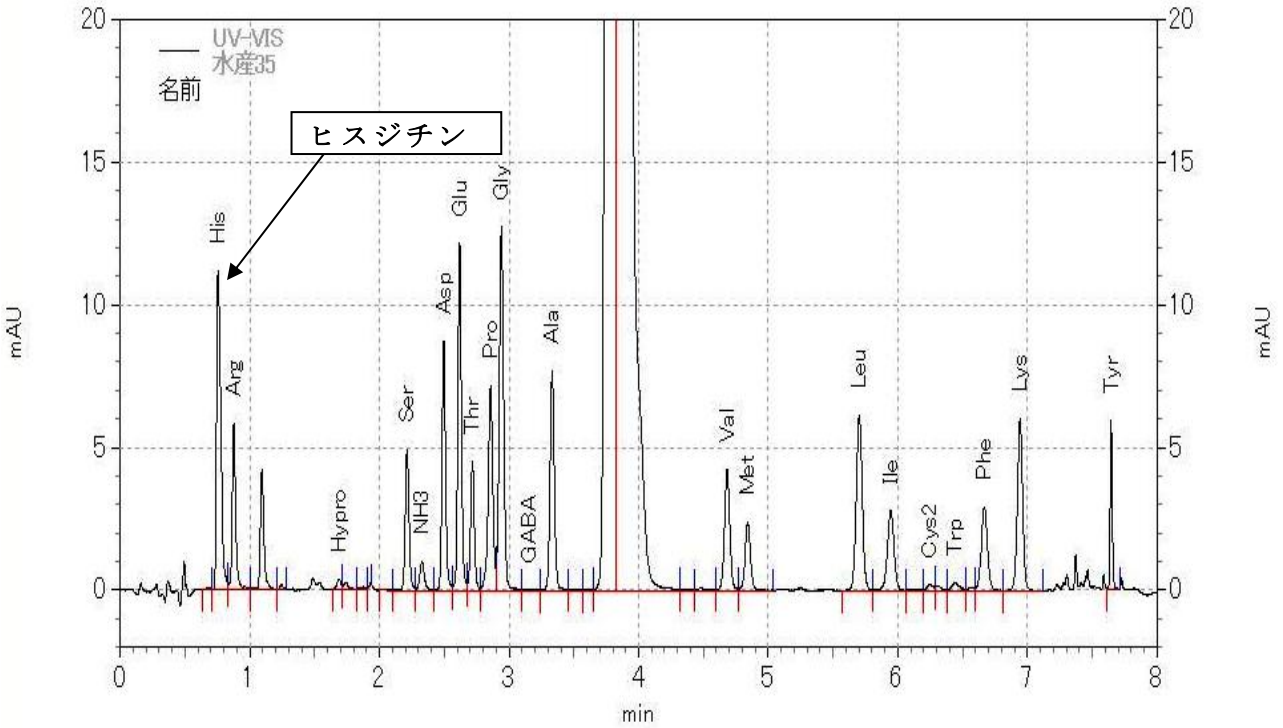


図 4. 1 - 1 かつお節のクロマトグラフ

5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、水産加工品中のヒスチジンの定量分析を行った。

表 5 - 1 水産加工品中のヒスチジン定量結果

試料	形状	ヒスチジン (mg/100g)
ちりめん	煮干し	1, 6 6 0
カタクチイワシめざし	塩干品	1, 5 0 0
さくら干し(イワシ)	調味乾燥品	1, 2 5 0
かつお節	削り節	5, 7 6 0
むろあじ削り	削り節	5, 4 6 0
五色煮	調味乾燥品	1, 8 7 0
焼き小アジ	調味乾燥品	1, 7 8 0
焼きめざし	塩干品(焙焼品)	2, 9 6 0

(※注意) なおこの測定結果は数多くの水産加工品のうちの一例であり、製品一般の分析結果ではない。

また、生鮮魚介類中のヒスチジン含量について下図のとおり示す。

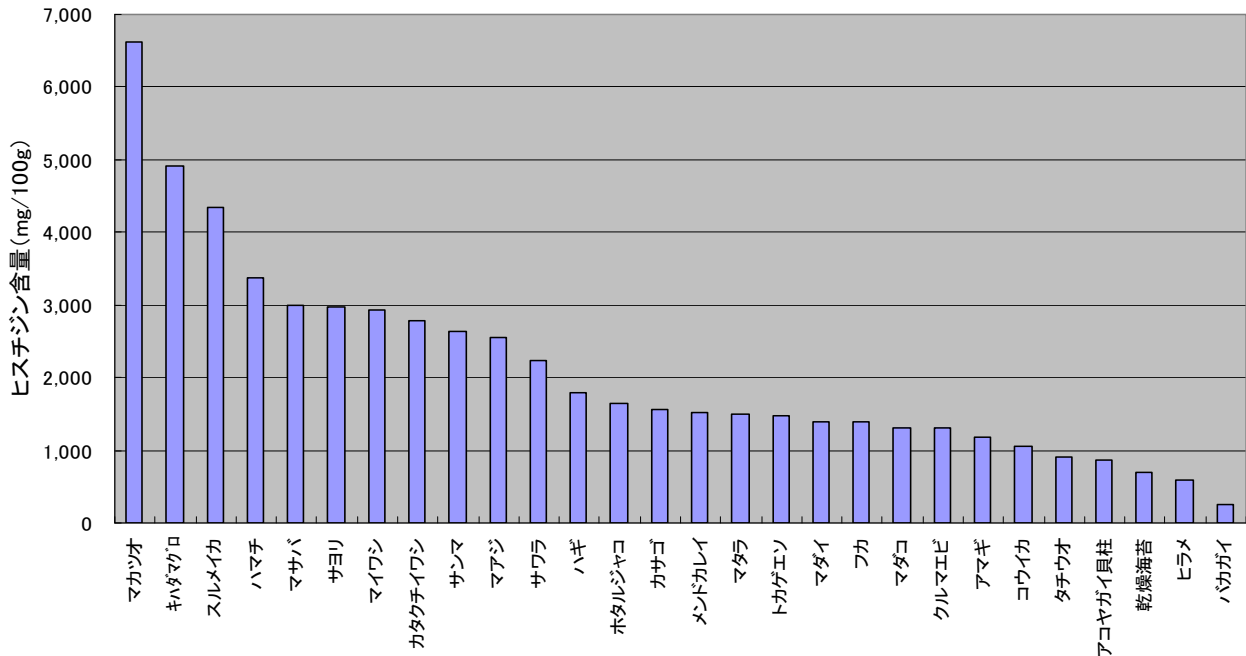


図 5 - 1 生鮮魚介類中のヒスチジン含量 ⁶⁾

6. 分析上の留意、注意点

NBD-Fによる誘導体化試薬は、温度・光により劣化するので、使用後は速やかに密栓し、遮光・10℃以下で保存する必要がある。

また、誘導体化処理では、各操作の時間の違いで、反応の度合いに差が出る可能性があるため、できれば特定の人連続して処理した試料について分析することが望ましい。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1. C. Aoyama, T. Santa, M. Tsunida, T. Fukushima, C. Kitada and K. Imai, Biomed. Chromatogr., 18, 630-636 (2004).

—以上—

[トップページに戻る](#)