

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

水産物のヒドロキシプロリン

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

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

水産物については、一般的には、魚肉の硬さは筋肉中に含まれるコラーゲンの量と相関があるとされ、死後の軟化は時間経過に伴うコラーゲン繊維の崩壊が原因とされている。

コラーゲンは、皮膚や血管、骨等の組織に存在する繊維状のたんぱく質で、繊維状たんぱく質が3本撚り合わさったような3重らせん構造をしていることから、水産物およびその加工品の物性に大きく関与している成分であるとされている。

コラーゲンは、従来、牛や豚の骨・皮から抽出され、食品、医薬品、生体材料等に利用されてきた。近年、世界中でのコラーゲン需要の増加やBSE問題の影響から、水産原料からのコラーゲン（フィッシュコラーゲン）の抽出、ゼラチンやコラーゲ

ンペプチドの製造が盛んになっている。

精製コラーゲンについては、市販化粧品の保湿成分や毛髪修復成分として利用されているほか、創傷治癒効果や抗血小板作用、骨強度に対するゼラチンの添加効果が報告されている。

愛媛県産業技術研究所では、養殖魚の中骨からコラーゲンを抽出する方法について検討している。

このマニュアルで取り上げるヒドロキシプロリンは、コラーゲンやゼラチン中に特異的に多く含まれているアミノ酸で、コラーゲンの定量をする際にヒドロキシプロリン含量を測定しこれを基に算出している。



エイヒレ調味加工品

中華クラゲ

写真 1-1 コラーゲンを含有する水産加工品

1. 2. 1 ヒドロキシプロリン（コラーゲン）を含む食品

コラーゲンは、動物の皮膚や血管、骨等の組織に存在するたんぱく質で、牛や豚の骨・皮にも多く含まれている。

また、コラーゲンを変性して調製するゼラチンは、ゲル化剤等として食品全般に広く利用されており、そのため測定の指標となるヒドロキシプロリンも含有されている。

<引用・参考文献>

1. 石見佳子：効性評価及び健康影響評価プロジェクト解説集，2004/11/04，国立健康・栄養研究所ホームページ
2. 田中秀幸、佐藤智樹：食品と開発，36，58-60（2001）.
3. 敦司ほか：日本食品科学工学会誌，50，67-71（2003）

2. ヒドロキシプロリン（コラーゲン）についての説明

ヒドロキシプロリンは、1つのイミノ基及びカルボキシル基を有するイミノさんの一種で、グルタミン酸から可逆的に生成される。皮膚、骨中のコラーゲンに多く含有

される。

コラーゲンは、ペプチドが3重らせん構造をしており水には溶解しないが、加熱することにより変性して水に可溶なゼラチンになる。ゼラチンをさらに加水分解したものは、コラーゲンペプチドと呼ばれている。

コラーゲン中のヒドロキシプロリンの含量については魚種により異なることが報告されているが、一般的には、ヒドロキシプロリン量に係数 9.75 を乗じてコラーゲンの推定値として算出されている。

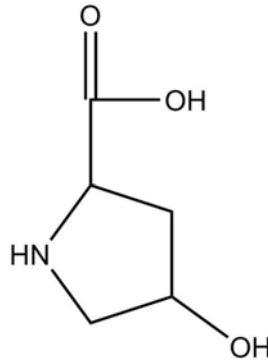


図 2-1 ヒドロキシプロリンの構造式

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ドロキシプロリ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。

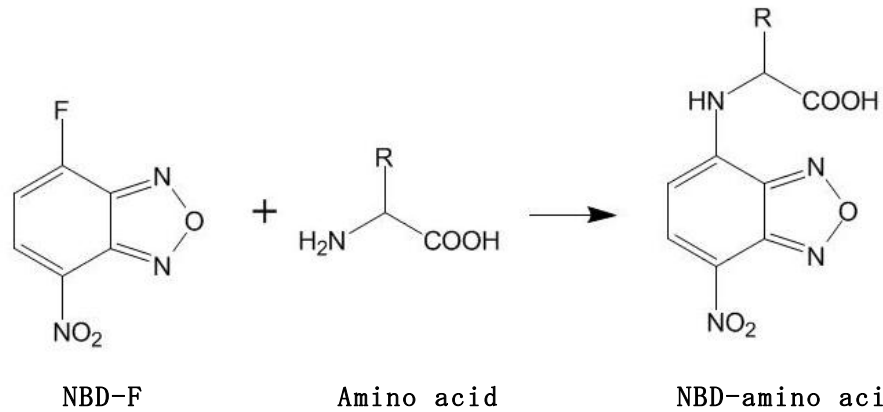


図 3-1 アミノ酸の NBD-F との反応 (誘導体化反応)

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°C 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 μm、25mm 径: DISMIC、25CS020AN, アトバンテック社製)
11. ピペッター (10~1,000 μl)
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 HPLC 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 μm、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
ヒスチジン (試薬特級)、トリプトファン (試薬特級) を、各々 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 γ -アミノ酪酸標準原液、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. 反应用エッペンチューブを 60°C の恒温水槽に浸し、正確に 1 分間加温する。
5. 反应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)日立ハイテッ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°C

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	8 5. 0	1 5. 0
2. 7	7 5. 0	2 5. 0
6. 2	6 5. 0	3 5. 0
7. 2	3 0. 0	7 0. 0
7. 3	8 5. 0	1 5. 0
7. 8	8 5. 0	1 5. 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ムを図に示す。

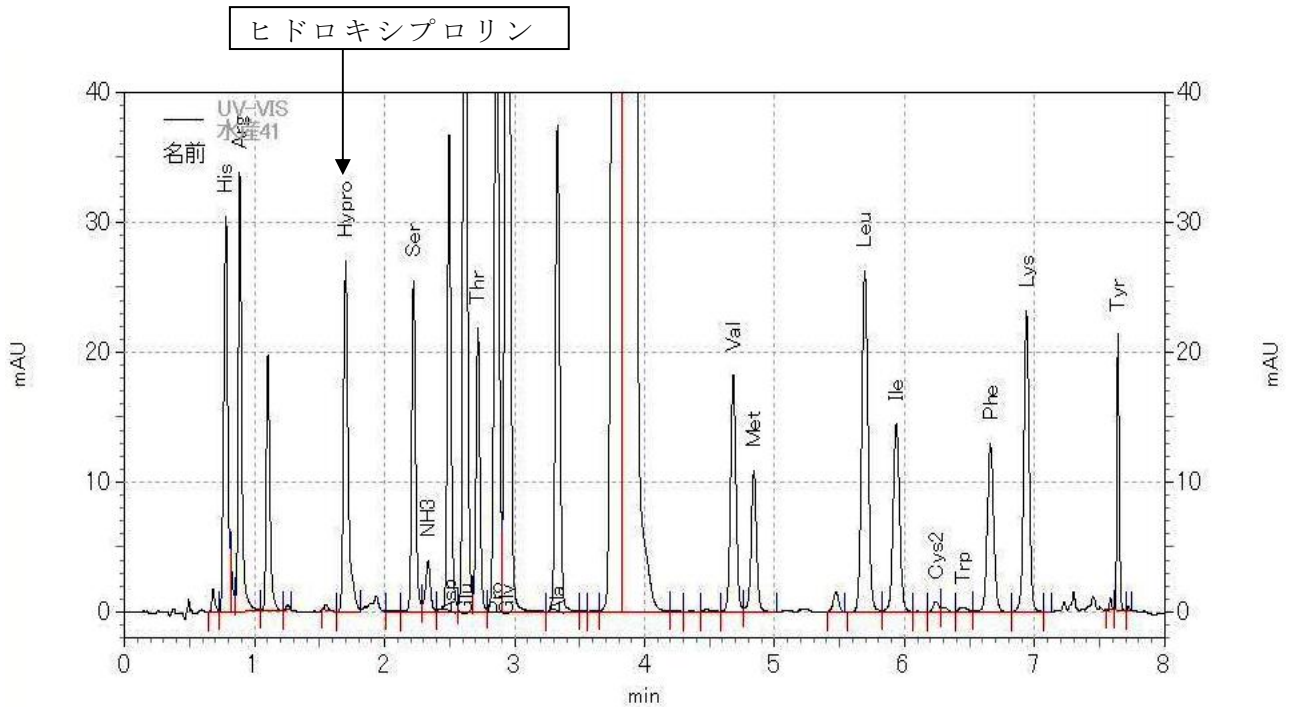


図 4. 1-1 エイヒレ調味加工品のクロマトグラム

5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、水産加工品中のヒドロキシプロリンの定量分析を行った。

表 5-1 水産加工品中のヒドロキシプロリン定量結果

試料	形状	ヒドロキシプロリン (mg/100g)
エイヒレ珍味	調味乾燥品	1, 190
中華クラゲ	調味チルド品	180
中華クラゲ	調味チルド品	220
ミズクラゲ乾燥品	乾燥品	620
ハマチコラーゲン	抽出品(乾燥品)	4, 970
マダイコラーゲン	抽出物(乾燥品)	800
コラーゲンペプチド	乾燥粉末	11, 000
コラーゲンペプチド	乾燥粉末	12, 000

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

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ので、できれば特定の人が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](#)