

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：85502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580229

研究課題名（和文）アルデヒドの可視化技術を利用した水産物の品質評価法の開発

研究課題名（英文）Development of the quality evaluation method of a marine product for using the visualization technology of aldehyde

研究代表者

田中 竜介（TANAKA RYUSUKE）

独立行政法人水産大学校・准教授

研究者番号：30399654

研究成果の概要（和文）：水産物の品質は様々な指標によって評価されているが、水産物は酸化し易い高度不飽和脂肪酸を多く含むことから、この酸化物に由来する物質を指標とすれば、正確な評価が期待できる。本研究は脂質酸化物の一つであるアルデヒド類に注目し、蛍光-高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する方法を開発する。また、品質指標は可視化されると汎用性が高いため、この HPLC での技術を応用し目視で判断できる簡易的な方法を開発する。

研究成果の概要（英文）：The quality of the marine product is estimated by various indicator. Since a marine product contains many poly unsaturated fatty acids which oxidize easily, the substance resulting from oxidized lipid will exactly evaluate quality of a marine product. This research develops the procedure of analyzing with a fluorescence-high liquid chromatography (HPLC) for the aldehyde which are one of the lipid oxides. Moreover, this research develop the simple procedure of visualized aldehyde applying the technology in this HPLC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産化学・分析化学

キーワード：アルデヒド・可視化・品質指標・水産物・薄層クロマトグラフィー・蛍光

1. 研究開始当初の背景

一般に水産物の品質評価法の一つとして、ATP 関連物質の分解を測定した K 値が使用されているが、これは死後の経過を客観的に見る指標であり、生存中の魚体の健康状態を評価しているものではない。生存中の魚体の健康状態が、死後の品質に影響を与えるため、それらを評価する手法が必要である。K 値だけで判断する品質評価に加え、新規の評価法

が必要不可欠であり、これを利用することにより、水産物の正確な品質評価が可能となる。本研究では、水産物の特徴である高度不飽和脂肪酸を多く含む脂質が酸化することによって生じるアルデヒド類に着目する。特に不飽和脂肪酸の酸化より生じる 4-hydroxy-2-alkenals が食品化学だけではなく生化学分野からも注目されている。これらには、n-6 系不飽和脂肪酸より生じる 4-hydroxy-

2-nonenal (HNE)、n-3系不飽和脂肪酸より生じる4-hydroxy-2-hexenal (HHE)が代表的なアルデヒドである。現在、これらのアルデヒドは2,4-dinitrophenylhydrazineで誘導体化し紫外可視検知器を搭載したHPLCによる分析、または、HNE、HHE抗体による分析が行われている。しかし前者においては誘導体化処理が煩雑で、紫外可視による検知のため感度が低く、他のアルデヒドとの区別が難しい。また、後者はターゲットを絞ることは可能であるが、抗体作成のための煩雑さや、作成にあたってのコストが高いため汎用性が低いなどの短所が挙げられる。

本研究では、水産物中のアルデヒド類をより感度の高い蛍光試薬で修飾し高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分離を行う。また、HPLCによる検出だけではなく、この技術を応用し迅速・正確に目視で判断できる簡易的な方法を開発し、水産現場での応用を目指す。この技術を利用し、生魚の健康状態ならびに水産物の保蔵中におけるHHE含量の変化を測定し、他の健康評価指標ならびに品質評価法との相関性を検証することによって新規の水産物の品質指標への提案を行う。

2. 研究の目的

水産物の品質は様々な指標によって評価されているが、水産物は酸化し易い高度不飽和脂肪酸を多く含むことから、この脂質の酸化物に由来する物質を指標とすることによって、正確な評価が期待できる。本研究は脂質酸化物の一つであるアルデヒド類に注目するが、化学的に不安定かつ微量であることから正確な分析が難しい。そこで、水産物中のアルデヒド類を蛍光物質で修飾し高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する方法を開発する。また、品質指標は可視化されると汎用性が高くなる。このHPLCでの技術を応用し目視で判断できる簡易的な方法を開発し、水産現場での応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) アルデヒドの分析条件の検討

① 蛍光試薬の検索

アルデヒドの分析は様々な方法が用いられているが、本研究では蛍光標識によるアルデヒドの分析を試みる。ここで、ホルムアルデヒドやアセトアルデヒドの蛍光標識分析について多くの報告があり、これらの報告を参考にHHEと高い反応性を持つ蛍光物質を検索する。

② 蛍光標識化アルデヒドの分析条件の検討

試料中には様々なアルデヒドが混在しているため、標識化操作によって様々な蛍光化アルデヒドが存在する。これを分析するために、蛍光検知器を接続したHPLCを使用するが、その分離条件について検討する。特にHHEに注目し他のアルデヒドの分離ならびに検出を目指す。

③ HHEの簡易分析法の開発

上述の①、②の方法で開発された技術を参考に簡易分析法の開発を行う。上述のHPLCを主体とした分析方法は、高精度の分析は可能であるが、一度に一試料の分析しか行うことができず、高額で、専門知識を必要とし、有機溶媒などの使用を必要とする。従って、即時性ならびに安全性が要求される水産現場には不向きであることから、新たな簡易的な方法が要求される。本研究では、薄層クロマトグラフィー(TLC)を利用した、多検体分析に対応する方法を開発する。

(2) アルデヒドを指標とした生魚の健康評価

① 人為的ストレス負荷魚の評価

人為的に酸化ストレスを与えたコイ(肝臓疾患を誘因する四塩化炭素の投与)におけるアルデヒド量の変化を観察し、健康指標の基準を作成する。

② 自然発生した病魚の評価

養殖現場にて発生した病魚をサンプリングしアルデヒド含量の測定を行い、その指標の有効性を検証する。

③ 生体内構成成分への影響の評価

脂質酸化、ヒドロキシ脂質、脂肪酸組成、脂溶性ビタミン、アミノ酸、核酸関連物質などの分析を行い、アルデヒドとの関連性について考察し、新たな健康指標を提案する。

(3) アルデヒドを指標とした加工品の評価

海藻食品・発酵食品に着目しHHEを利用した品質評価を行う。また、HHEの分析に限定せず、エキス成分に含まれるアミノ酸、核酸関連物質、有機酸などの成分も同時に測定し、総合的に品質評価を行いHHEの品質評価指標としての有効性を検証する。

4. 研究成果

(1) アルデヒドの分析条件の検討

① 蛍光試薬の検索

本研究では蛍光標識によるアルデヒドの分析を試みた。なお、着目するアルデヒドとして水産物に多く含まれるn-3系脂肪酸の酸化によって生じる4-hydroxy-2-hexenal(HHE)に注

目し、既報の dansylhydrazine など 4 種の蛍光試薬を検討した結果、1,3-cyclohexanedione (CHD)による蛍光標識による分析が最適であった。

② 蛍光標識化アルデヒドの分析条件

蛍光標識化された CHD-アルデヒドを HPLC によって分離する方法を検討した結果、汎用の ODS カラムを利用した逆相 HPLC により分離が可能となり、HHE をはじめとして、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロパナールなど主要なアルデヒドの分離分析が可能となった。(図 1)

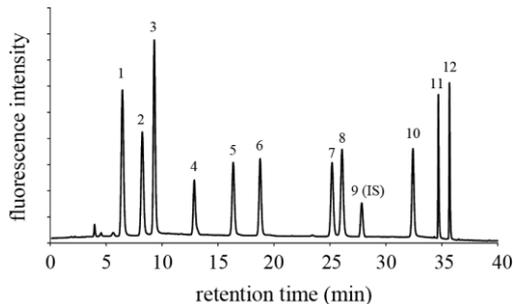


図 1. CHD-アルデヒドの HPLC クロマト

③ HHE の簡易分析法の開発

この HPLC の条件を参考にし、アルデヒドの可視化ならびに簡易的な分析方法を検討した結果、薄層クロマトグラフィー(TLC)の利用が有効であった。TLC 法は、安価、同時に多検体の分析が可能であり、目視での判定が可能である。はじめに、TLC の固定相を検討した結果、HPLC では逆相クロマトでの分離が最適であったが、TLC 法では順相シリカゲルによる分離が最適であり、分析コストも安価となった。また、可視化の観点から、CHD-アルデヒドの励起ならびに蛍光波長はそれぞれ、385 nm、450 nm であることから、汎用的な UV 照射ランプ (励起波長 350 nm) の照射によって、450 nm の蛍光が確認され、無色であるアルデヒド類が蛍光標識により可視化された。(図 2)

(2) アルデヒドを指標とした生魚の健康評価

① 人為的ストレス負荷魚の評価

コイに四塩化炭素を腹腔内に注射することにより人為的にストレスを与えた。四塩化炭素の投与によって、肝臓の脂質含量の増加、過酸化物質の上昇、我々がストレス指標として使用している脂質酸化由来のヒドロキシ脂質の増加がそれぞれ確認された。この結果は、既報と同様な結果を示した。そして、今回着目している HHE も有意に増加したことから、

新たな指標となり得ることが示唆された。また、同時に分析可能な他のアルデヒドについて検討したところストレスによる HHE の増加はプロパナールとの相関性が高かった。

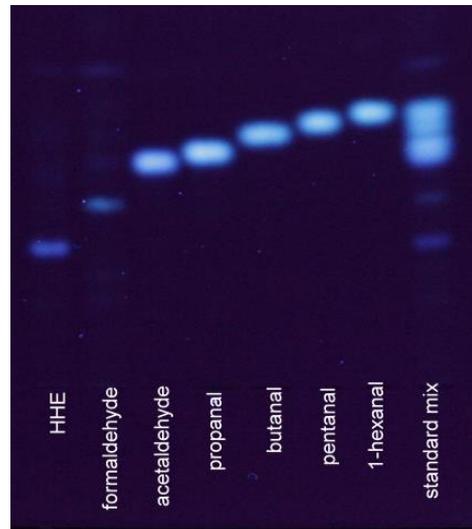


図 2. CHD-アルデヒドの TLC

② 自然発生した病魚の評価

養殖現場で発生した病魚をサンプリングし、人為的酸化ストレスモデルと同様にアルデヒドの分析を行い、病気の種類、魚種との関連性について検討した。今回分析した魚種ならびに病気の種類は、トラフグ (ピセリオ、トリコディナの寄生虫に感染)、ヒラメ (連鎖球菌に感染)、ブリ (黄疸菌に感染)、カンパチ (類結節症原因菌に感染) について分析を行った。この結果、魚種ならびに病気の種類に関係なく、四塩化炭素の投与と同様に病気魚の肝臓中の HHE ならびにプロパナールが増加したことから、これらの指標はストレスに反映することが示唆された。

③ 生体内構成成分への影響の評価

アルデヒドの生成は、臭いなどの品質劣化を引き起こすだけではなく、他の生体内構成成分にも影響をおよぼす。そこで、その影響について考察する必要があるため、上記①②の実験について、アルデヒド以外の他の成分を検討した結果、タンパク加水分解由来のアミノ酸の減少が確認された。

(3) アルデヒドを指標とした加工品の評価

海苔の等級格付けは専門の海苔検査委員による「目利き」ならびに「食味検査」による官能評価によって評価されている。この評価によって分別された海苔の品質評価をアルデヒド、特に HHE を指標とした場合、

高品質の海苔は HHE の値が低かった。他の成分においては、核酸関連物質、 α -Toc、EPA の含量が高い値を示し、海苔の品質と関連していた。また、発酵食品として、「くさや」について分析を行ったところ、HHE が高含量含まれていた。

<総括>

水産加工品の品質評価においては、品質劣化に伴う脂質酸化によって生成される二次酸化物のアルデヒド類に着目した。特に不飽和脂肪酸より生じ反応性が著しく高い HHE に注目し、分析方法の確立およびこれらを指標とした水産加工品の簡易的な品質評価法の提案を行った。さらに、本方法を指標として水産加工品の高品質化を目指した様々な水産加工品の製造方法・処理方法についての提案を行った。今後は生魚の健康状態の評価への応用を目指しているが、本研究では、生魚の健康状態を評価する際、代謝活性の高い肝臓を利用していたが、この方法では簡易性は乏しく、健康状態の経時的な変化を観察することはできない。そこで、血液を利用した簡易評価法の開発を行う。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Tanaka R, Naiki K, Tsuji K, Nomata H, Sugiura Y, Matsushita T, Kimura I: Effect of ant-oxidative treatments on lipid oxidation in skinless fillet of Pacific saury *Cololabis saira* in frozen-storage. *J. Food Process. Pres.*, (in press). DOI: 10.1111/j.1745-4549.2011.00652.x (査読有)
2. Tanaka R, Sugiura Y, Matsushita T: Simultaneous identification of 4-hydroxy-2-hexenal and 4-hydroxy-2-nonenal in foods by pre-column fluorogenic labeling with 1,3-cyclohexanedione and reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 36, 881-896 (2013). DOI: 10.1080/10826076.2012.678454 (査読有)
3. Tanaka R, Nakamura T: Effects of exhaustive exercise on lipid peroxide and hydroxy lipids in yellowtail. *N. Am. J. Aquacult.*, 74, 164-168 (2012). DOI: 10.1080/15222055.2012.672369 (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. 田中竜介: 魚肉中のアルデヒドの可視化簡易測定法の開発, 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011 年 9 月, 長崎大学.
2. Tanaka R: Simultaneous identification of

4-hydroxy-2-hexenal and 4-hydroxy-2-nonenal in foods by fluorometric RP-HPLC and TLC, 103rd AOCS Annual Meeting & Expo, 2012 年 5 月, Los Angeles (USA).

3. 田中竜介: クロマグの冷凍保管温度ならびに処理法による脂質影響, 平成 24 年度水産利用関係試験研究推進会議, 2012 年 11 月, 独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 竜介 (TANAKA RYUSUKE)
水産大学校・食品科学科・准教授
研究者番号: 30399654

(2)研究分担者

松下 映夫 (MATSUSHITA TERUO)
水産大学校・食品科学科・教授
研究者番号: 50399648

(3)連携研究者

()

研究者番号:

