SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. L536

高速液体クロマトグラフィー

魚肉中の核酸関連物質の分析とマルチデータレポートを用いた鮮度（K 値）の自動計算

魚介類の筋肉は畜産動物に比べ、組織が軟弱で水分が多いため、腐敗が早いことで知られています。これら魚介類の鮮度を正確に判定することは、食の安心安全の面で非常に重要となります。

一般に、消費者は魚の目の色や魚体のハリなどの見た目で鮮度を判断しますが、動物の筋肉のエネルギー源である ATP（アデノシン三リン酸）の変化を筋肉の鮮度低下の指標とする方法も広く利用されています。この魚介類の鮮度を数値で評価する場合には K 値がよく利用されており、この値によって刺身用、焼き魚用のように調理方法が使い分けられています。

ここでは、HPLC を用い生マグロおよび解凍マグロの K 値を測定しました。また、それぞれのマグロの鮮度の経時変化について、マルチデータレポートを作成した例をご紹介します。

N. Iwata

■ATP 関連物質の分析

ATP 関連物質（ヒポキサンチン（Hx）、イノシン（HxR）、IMP、AMP、ADP、ATP）*1 の混合標準溶液（各 10 μmol/L）を分析しました。図 1 にクロマトグラムを、表 1 に分析条件を示します。

一般に、ATP 関連物質に代表される核酸塩基やヌクレオチド等は、リン酸緩衝液を用いたアイソクラティック溶離で分離することが多く、分析時間も長いです。

本稿では、移動相にイオンペア試薬を添加することで、構造にリン酸基を有する化合物を保持させ、かつ、グラジエント溶離で分離することで分析時間を短縮しました。また、夾雑成分のカラムへの吸着による圧力上昇を防ぐため、カラム洗浄工程を追加し、多検体処理を行う場合でも繰り返し安定して分析できる条件としました。

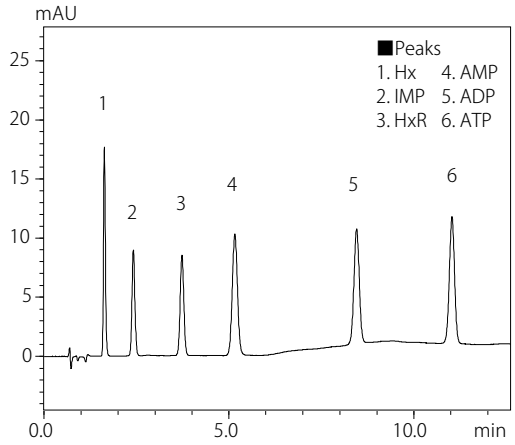

図 1　ATP 関連物質混合標準溶液のクロマトグラム

＊1 IMP：Inosine 5′-monophosphate, AMP：Adenosine 5′-monophosphate, ADP：Adenosine 5′-diphosphate, ATP：Adenosine 5′-triphosphate

表 1　分析条件

System	: Nexera™ series
Column	: Shim-pack™ GIST 3 μm C18 AQ (100 mm L. × 3.0 mm I.D., 3 μm)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Mobile phase ＊2	: A) Water/Acetonitrile=100/1 (v/v) containing 0.15 mol/L Phosphoric acid, 0.225 mol/L Triethylamine B) Water/Acetonitrile=80/20 (v/v) containing 0.15 mol/L Phosphoric acid, 0.225 mol/L Triethylamine
Time Program	: 0 %B (0-3.5 min) → 12 %B (11 min) → 100 %B (11.01-18 min) → 0 %B (18.01-28 min)
Column temp.	: 30 ℃
Injection volume	: 10 μL
Detection	: PDA 260 nm

＊2 Phosphoric acid: 10.2 mL, Triethylamine: 31 mL } → mixture of Water/ Acetonitrile 1 L

■再現性

表 2 に ATP 関連物質混合標準溶液（各 2 μmol/L）について、6 回繰り返し分析における保持時間と面積の変動係数（%RSD）を示します。いずれの成分においても、保持時間、面積ともに変動係数 1 %以下の結果が得られました。

表 2　6 回繰り返し分析における各成分の変動係数（%RSD）

Compounds	Retention time	Area
Hx	0.14	0.33
IMP	0.00	0.21
HxR	0.09	0.20
AMP	0.04	0.32
ADP	0.05	0.50
ATP	0.05	0.68

■魚肉の鮮度測定

魚介類など動物は、筋肉中のエネルギー源として ATP を利用しています。しかしながら、死後はそれを再生産する機能が失われるため、ATP は
ATP→ADP→AMP→IMP→HxR→Hx の順に逐次酵素的に分解することにより、減少し消失します。

一方で、魚介類の筋肉の K 値は ATP 関連物質総量に占める、リン酸を分子内に持たない成分（ヒポキサンチン、イノシン）の和の百分率であると定義されています。

$$\text{式}\quad \frac{\text{Hx}+\text{HxR}}{\text{Hx}+\text{HxR}+\text{IMP}+\text{AMP}+\text{ADP}+\text{ATP}}\times 100$$

上記の式は、値が小さいほど新鮮であることを示しています。また、ATP の変化速度や K 値の上昇は、温度履歴（貯蔵温度等）や時間に依存すると言われています。

■検量線

ATP 関連物質 6 成分について、検量線を作成したところ、いずれの成分においても寄与率 R^2=0.9999 以上と良好な直線性が得られました。図 2 に検量線を、表 3 に各成分の検量線濃度範囲と寄与率を示します。

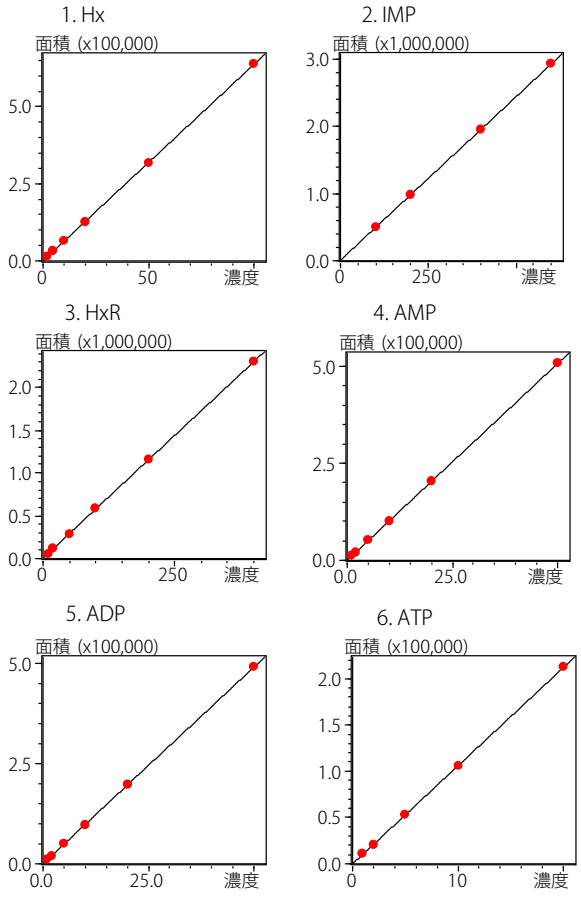

図 2　検量線

表 3　各成分の検量線濃度範囲と寄与率（R^2）

Compounds	Conc. Range (μmol/L)	R^2
Hx	2-100	0.9999972
IMP	100-600	0.9999905
HxR	10-400	0.9999822
AMP	1-50	0.9999917
ADP	1-50	0.9999960
ATP	1-20	0.9999931

■前処理

試料は、市販の生のびんちょうマグロと解凍のきはだマグロを使用しました。

前処理法は、「冷凍及び生鮮クロカジキの K 値による鮮度変化の比較について」[1] を参考にしました。

粉砕済の試料を 10 %過塩素酸で抽出後、次いで、5 %過塩素酸で 2 回抽出しました。3 回分の抽出液の上清は氷冷し、KOH 溶液（10 N、1 N、0.1 N）で中和した後、フィルターろ過し、HPLC に供しました。図 3 に前処理プロトコールを示します。

■マグロの鮮度測定

本稿では、購入直後に前処理したもの（購入後 0 日）と、1〜3 日間、冷蔵保存後に前処理したもの（購入後 1〜3 日）を分析し、K 値の変化を確認しました。図 4 に生のびんちょうマグロのクロマトグラムを、図 5 に解凍のきはだマグロのクロマトグラムを示します。図 4、5 の下段の図は上段の図を拡大したクロマトグラムとなります。また、表 4 に K 値の経時変化と各成分の定量値を示します。生より解凍の方が鮮度が良い結果となりました。

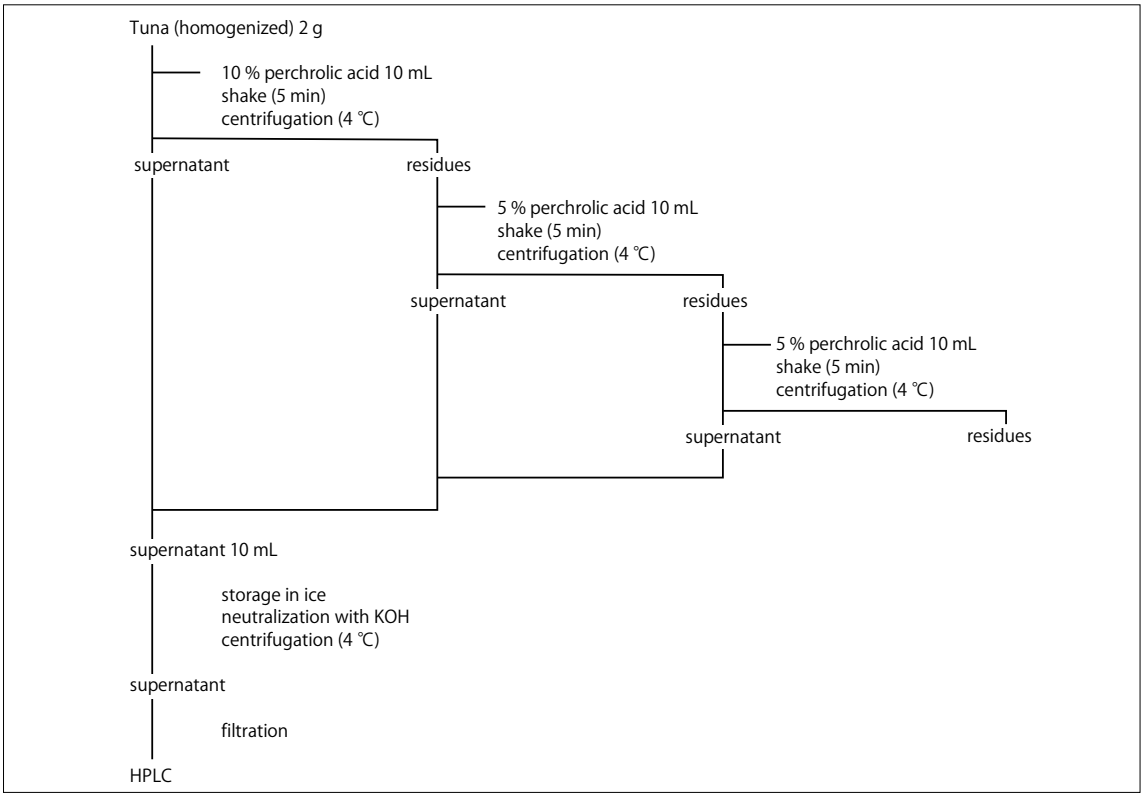

図 3　前処理プロトコール

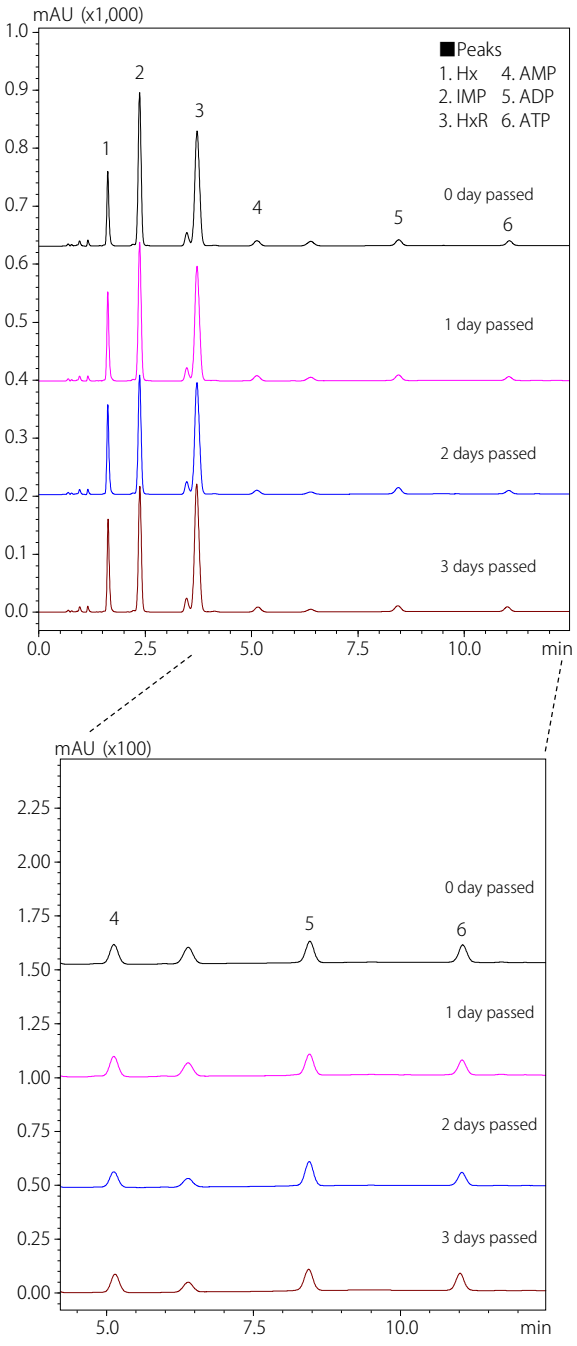

図 4　生びんちょうマグロのクロマトグラム

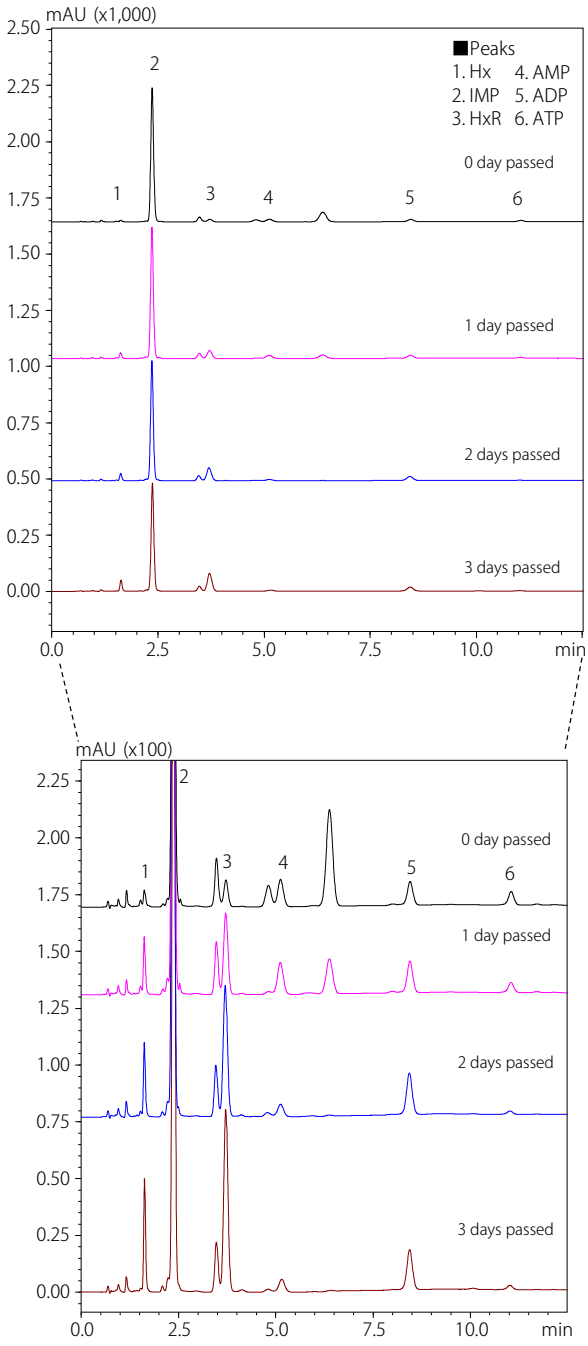

図 5　解凍きはだマグロのクロマトグラム

表 4　K 値の経時変化と各成分の定量値

Albacore Tuna

days	K value (%)	Quantitative value (μmol/L)					
		Hx	IMP	HxR	AMP	ADP	ATP
0	53.8	68.970	252.281	256.739	9.052	10.552	7.882
1	56.9	83.502	229.872	254.640	9.286	9.962	6.728
2	60.2	83.825	195.520	249.527	7.197	12.054	5.841
3	61.5	87.607	203.348	279.969	8.561	10.889	7.659

Yellowfin Tuna

days	K value (%)	Quantitative value (μmol/L)					
		Hx	IMP	HxR	AMP	ADP	ATP
0	2.5	3.619	582.971	12.103	10.156	10.657	5.724
1	8.7	12.794	559.034	43.472	13.641	14.310	4.413
2	14.5	17.020	496.849	71.427	4.992	19.459	1.574
3	20.9	26.589	451.304	99.401	5.299	18.558	1.926

Shim-pack GIST C18 AQ カラム耐久性

Shim-pack GIST C18 AQ は、逆相クロマトグラフィーで高極性化合物を保持するために使用するカラムで、100 %水系移動相を送液したとしても耐久性があり、良好なピーク形状が得られます。

ここでは、GIST C18 AQ カラムの耐久性を確認しました。実サンプルであるマグロを 300 回注入後もカラム負荷圧（最大圧）は上昇せず、安定して分析できることが確認されました。また、理論段数、シンメトリ係数に関して、実サンプル注入前と 300 回注入後を比較しました。いずれも減少率および悪化率は 10 %未満と良好な結果となりました。表 5 にカラム負荷圧（最大圧）、理論段数、シンメトリ係数について、実サンプル注入前と 300 回注入後の減少率、悪化率をまとめました。

表 5　実サンプル注入前と300回注入後の各パラメータの減少率、悪化率

Pmax. (MPa)

	Number of Injections		Decreasing rate (%)
	0	After 300	
Pmax.	22.15	22.15	0

Theoretical plate, N

	Number of Injections		Decreasing rate (%)
	0	After 300	
Hx	7692	7413	3.63
IMP	5692	5256	7.66
HxR	7679	7416	3.42
AMP	7057	6410	9.17
ADP	17048	16408	3.75
ATP	31533	28970	8.13

Symmetry

	Number of Injections		Deterioration rate (%)
	0	After 300	
Hx	1.165	1.163	-0.17
IMP	1.021	1.097	7.44
HxR	0.99	1.036	4.65
AMP	0.997	1.054	5.72
ADP	0.97	0.994	2.47
ATP	0.971	0.996	2.57

マルチデータレポート*3の活用

マルチデータレポートは、分析結果を表計算ファイルに自動転記する機能です。バッチ分析が終了すると同時にその結果を自動転記します。バッチ再解析でも使えるので、既に分析が終了したデータを使って自動転記することも可能です。この機能は、手作業による転記によって時間がかかること、および、転記ミス等へのあらゆるリスクを排除することができます。

本稿では、マグロ中の ATP 関連物質の測定結果から自動的にマルチデータレポートを作成しました（図 6）。自動的に K 値を算出しグラフ化することにより、K 値の経時変化をモニターすることが可能になります。

今回の生のびんちょうマグロは、購入当日（0 日経過）に 53.8 %と焼き魚として調理した方が良いとされるまで鮮度が落ちていました。冷蔵保存で 2 日を経過したころには、60 %を超え、腐敗していました。また、解凍のきはだマグロは、購入当日（0 日経過）に 2.5 %と刺身で食べることのできる鮮度でした。しかしながら、冷蔵保存で 3 日経過したころには、生で食べることをおすすめしない鮮度となっていました。

＊3 マルチデータレポートは LabSolutions™ DB/CS で対応

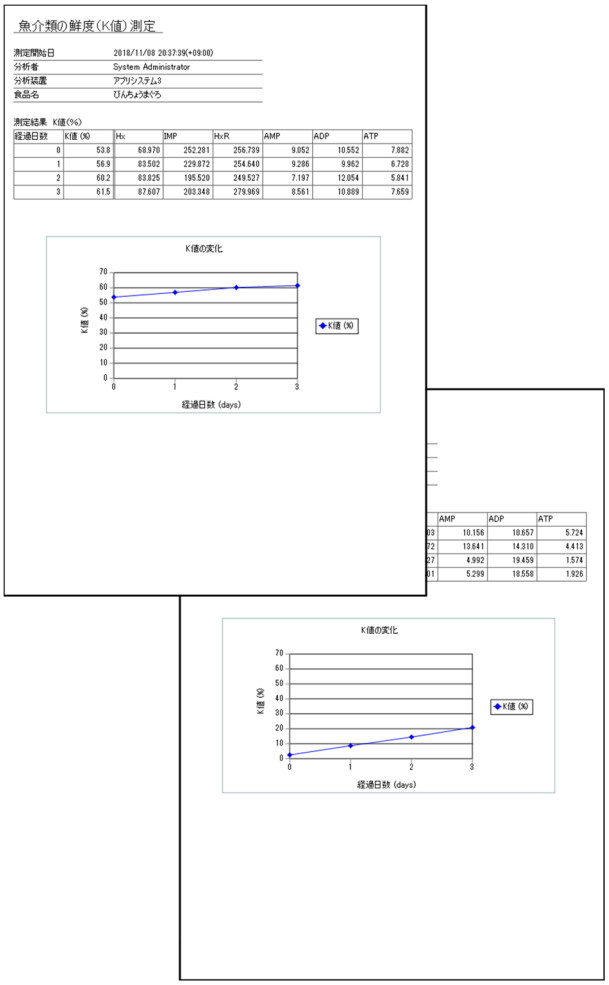

図 6　マグロの鮮度測定結果を示したマルチデータレポート

まとめ

Nexera series と Shim-pack GIST C18 AQ カラムを用いて、マグロの鮮度測定を行ったところ、生マグロと解凍マグロでは鮮度が大きく異なる結果となりました。また、GIST C18 AQ カラムでグラジエント分析を行うことにより、分析時間を短縮でき、多検体処理において繰り返し安定した分析が可能となりました。また、マルチデータレポート機能を用いることで、定量結果を自動転記し、さらに K 値を自動算出することで、K 値の変化率をモニターすることができました。

一方で、近年、ヒスタミンによる食中毒からアレルギーを発症する事例も報告されています。マグロなどの赤身魚が腐敗すると、ヒスタミン（アミノ酸の一種であるヒスチジンの代謝物）が高濃度に蓄積されます。HPLC でヒスタミンを分析することは可能ですが、前処理（誘導体化）が煩雑であったり、自動前処理をする場合にはシステムが大掛かりになります。したがって、今回のようにシンプルな構成の HPLC で ATP 関連物質を分析することで、簡易的に腐敗の状態を測定することも可能となります。

<参考文献>

1)　臼井一茂、渡辺悦生、「冷凍及び生鮮クロカジキの K 値による鮮度変化の比較について」、2012

Nexera、Shim-pack、および LabSolutions は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019 年 3 月

島津コールセンター 0120-131691 (075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。