

蛍光分析法による魚介類中の低分子 SH・SS 化合物の定量に関する研究

畠山 英子, 羽豆 強, 目黒 熙
(東北福祉大・食品衛生研)

Fluorometric Determination of Low Molecular Thiol(SH) and Disulfide(SS) Groups in Some Seafood

Eiko HATAKEYAMA, Tsuyoshi HAZU and Hiroshi MEGURO
Laboratory of Food Hygiene, Tohoku Fukushi University

N-(9-Acridinyl) maleimide (NAM) fluorometry was applied to low molecular thiol (SH) and disulfide (SS) groups in the pacific saury (*Coloalabis saira*) and the oyster (*Crassostrea gigas*). The low molecular SH was measured in buffer (pH 8.80) at room temperature after standing for one hour. The method was preliminary applied to check the change of low molecular SH and low molecular SS in the pacific saury and the oyster during the preservation at 4°C and the storage refrigeration.

低分子 SH 化合物の内、グルタチオンは、動植物や微生物の組織内に含まれている物質であり、(1)肝臓での解毒作用の活性化、(2)過酸化脂質生成の抑制、過酸化脂質に対する防御作用、(3)薬物中毒、慢性肝疾患、妊娠中毒、角膜損傷、皮膚障害、放射線・抗ガン剤による白血球の減少などの治療薬としての効果が明らかにされている。

本研究においては、魚介類中のグルタチオンに着目し、低分子 SH・SS 化合物の微量分別定量法について NAM 蛍光法を用いて検討を行い、それらの分析結果を報告する。

実験試料および方法

1. 試料

供試料として魚介類の内、サンマならびにマガキを用いた。

サンマは黒崎・鯨角沖20~30海里付近(北緯39° 55~40° 35)で漁獲され(平成9年11月)、約12時間後に水揚げされた新鮮魚を用いた。水揚げ後直ちに無作為に5個体抽出して三枚におろし、頭と中骨を取り除き、(A)背肉・(B)腹肉・(C)内臓の部位(fig. 1)に分け4°Cで保存し、ホモジナイズ後低分子 SH・SS 化合物含量の経時的分析を行った。

マガキは松島湾で養殖(平成10年3月)したものを使用し、4°Cで約24時間冷蔵保存した新鮮マガキ

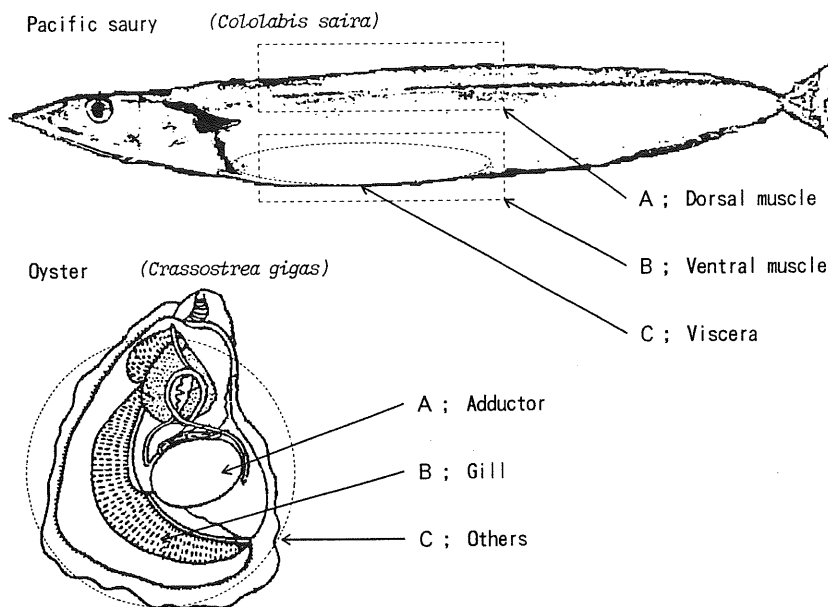


Fig. 1. Sampling parts of the pacific saury and the oyster

を供試料とした。(A)貝柱・(B)エラ・(C)その他の部位 (fig. 1) に分け、ホモジナイズ後、 -20°C で冷凍保存した試料を分析に供した。

各試料を0.1g精秤し、0.02M EDTA 5mlを加え、ウルトラディスペルザー LK-21 (ヤマト科学)を用いて均質化した。50%メタリン酸を0.56ml添加後10分間放置し、遠心分離 (10,000rpm 10min)を行った。上清をろ過後、ろ液2.5mlに対して1N水酸化ナトリウムを1.2ml加え試料溶液とした。

2. 定量

前処理した試料溶液0.1mlを0.5M炭酸ソーダー・ホウ酸緩衝液 (pH 8.80) 3.30mlに入れ、N-(9-アクリジニル)マレイミド (NAM) 溶液0.1mlを直ちに加え、室温で1時間反応後、蛍光強度 (励起波長360nm・蛍光波長435nm)を測定し、標準SH物質である還元型グルタチオン (GSH)を同様に反応させて作成した検量線から試料中のSH化合物含量を求めた¹⁻³⁾。

SS化合物含量は、前処理した試料溶液を2mAで5分間電解還元し、還元後の試料溶液0.1mlをSH定量時と同様にNAM法に供してSH量を求め、還元後の定量値から還元前の定量値を減じ1/2を乗じてSS化合物含量とした³⁻⁵⁾。電解還元装置を Fig. 2 に示す。

3. 定性

定性はHPLCにより行った。HPLCは日立655A-11ポンプにRF-530蛍光検出器 (島津)を接続し、分離カラムとしてハイパーカラム RT250-4リクロスフェア100RP-18粒径 $5\mu\text{m}$ (関東化学)を使用した。

また移動層には、アセトニトリル・リン酸緩衝液 (pH 6.60)を用いた。

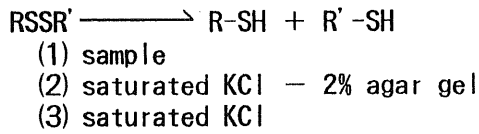
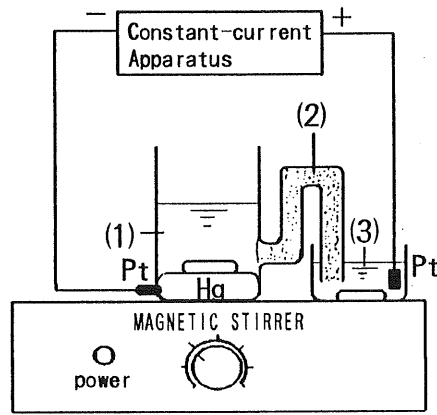


Fig. 2. Apparatus for electrolytic reduction of disulfide⁵⁾

なお定性時のサンマ試料については、新鮮魚の入手が困難であったために、漁獲後直ちに冷凍保存（-20℃）したものを使用した。

実験結果および考察

1. サンマの各部位における低分子 SH・SS 化合物含量の変化

冷蔵保存（4℃）したサンマの背肉と腹肉においては、低分子 SH・SS 化合物含量は $5 \times 10^{-8} \text{ mol/0.1g}$ 以下と少なく、その経時変化はほとんど見られなかった。内臓においては、低分子 SH 化合物含量は漁獲直後では約 $25 \times 10^{-8} \text{ mol/0.1g}$ と多く、保存時間の経過とともに減少した。低分子 SS 化合物は経過的に増加した（Fig. 3）。

サンマの低分子 SH・SS 化合物の含有量が最も多いのは内臓であった。内臓の低分子 SH・SS 化合物含量は経時的に変化することから、内臓の低分子 SH・SS 化合物含量および割合を測定することによって漁獲後の鮮度判定の可能性が示唆された。魚体の迅速かつ簡便な鮮度判定の方法論については更に検討を加えているところである。

2. マガキの各部位における低分子 SH・SS 化合物含量

予備実験を目的とし、冷凍保存（-20℃）したマガキを解凍して分析した結果を Table 1 に示す。

低分子 SH・SS 化合物はその他の部分において最も多く検出された。NAM 法によってマガキ中の低分子 SH・SS 化合物の測定が可能であることが判明した。

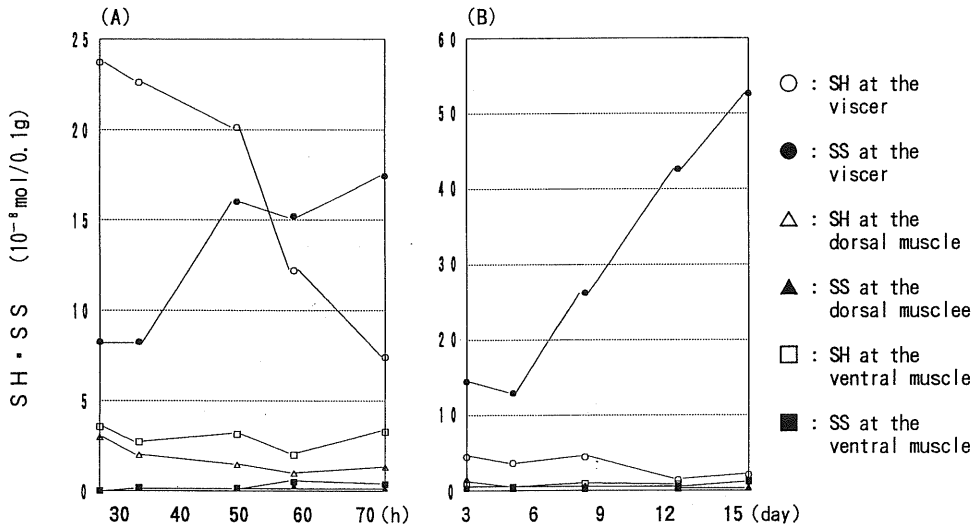


Fig. 3. The changes of low molecular SH and SS contents in pacific saury during preservation at 4°C

Table 1. Low molecular SH and SS contents in the oyster (10⁻⁸ mol/0.1g)

	SH	SS
Adductor	15.2	47.0
Gill	8.5	6.6
Others	2.3	13.2

3. SH化合物の定性

サンマ供試料を用いた HPLC によるクロマトグラムを Fig. 4 に示す。標準物質である GSH とシステイン (Cys) との対比により、サンマ中の低分子 SH 化合物は GSH と Cys であることが明らかになった。部位別の特徴をみると、内臓においては GSH よりも Cys が多く検出され、背肉と腹肉との顕著な差異が確認された。内臓における Cys 検出については、内臓中のプロテアーゼの影響によるものと考えられた。この HPLC による分析は、低分子 SH 化合物定量の際に用いた新鮮魚は用いておらず、冷凍保存魚体を用いて行ったために GSH と Cys の分別定量については、さらに検討する必要があり平成10年度の新鮮魚体入手時期を待って再度検討を行うこととした。

マガキについては、全体的に GSH と Cys の含有量が少なく、特に貝柱とエラには Cys がほとんど含まれていないことがわかった。その他の部分には同程度で含まれ、含有量もいずれの部位よりも多く存在していた (Fig. 5)。

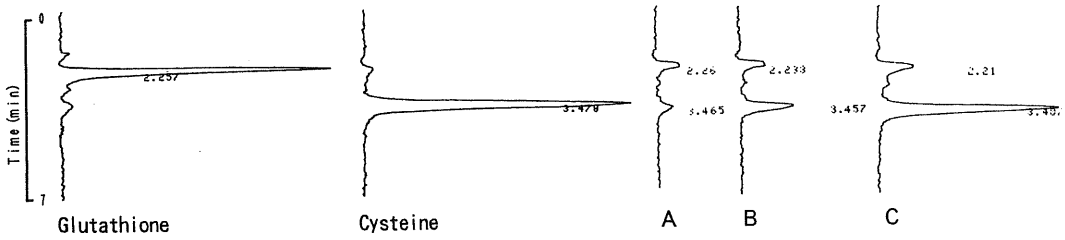


Fig. 4. Chromatogram of glutathione and cysteine using pacific saury by HPLC
 Column: Hibar colum RT 250-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) ; Temperature: Room temperature; Mobile phase: CH₃CN-0.02M KH₂PO₄ buffer solution (2:8) ; Flow rate: 1ml/min; Detection: EX 360nm, EM 435nm
 A: Dorsal muscle, B: Ventral muscle, C: Viscera

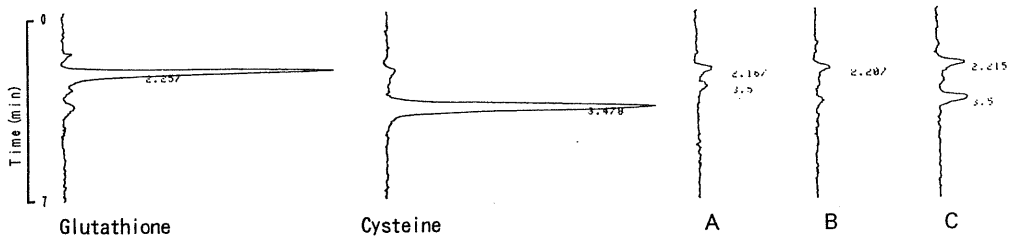


Fig. 5. Chromatogram of glutathione and cysteine using oyster by HPLC
 Column: Hibar colum RT 250-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) ; Temperature: Room temperature; Mobile phase: CH₃CN-0.02M KH₂PO₄ buffer solution (2:8) ; Flow rate: 1ml/min; Detection: EX 360nm, EM 435nm
 A: Adductor, B: Gill, C: Others

ま と め

1. サンマならびにマガキ中の低分子 SH・SS 化合物の分別定量が 10^{-8} mol/0.1g レベルで可能であった。
2. 低分子 SH・SS 化合物含量には部位により差異があり、サンマ・マガキともに内臓部において顕著に高い定量値を示した。
3. サンマの内臓部の低分子 SH 化合物含量は漁獲後直ちに漸減し、漁獲後50時間以降は急激に減少した。一方、低分子 SS 化合物含量は、漁獲後30時間以降急増し、その後も増加傾向をたどった。低分子 SH・SS 化合物と鮮度保持時間の間に相関があることが示唆された。
4. HPLC により低分子 SH 化合物は、GSH と Cys であった。この割合は、部位により異なることが明らかとなった。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、研究協力をいただきました間宮良伊氏に対し、深謝申し上げます。

文 献

- 1) Takahashi, H., Nara, Y. and Tuzimura, K. (1976) *Agric. Biol. Chem.*, 40 : 2493
- 2) Takahashi, H., Nara, Y. and Tuzimura, K. (1978) *Agric. Biol. Chem.*, 42 : 769
- 3) 畠山英子, 松本憲一, 越智猛夫, 鈴木建夫, 目黒 熙, (1983) 日本農芸化学会誌 57 : 1135
- 4) 畠山英子, 目黒 熙, (1997) 微量栄養素研究第14集 : pp.45
- 5) Hatakeyama, E., Matsumoto, N., Ochi, T., Suzuki, T., Ohru, H. and Meguro, H. (1989) *Anal. Sci.*, 5 : 657