

魚肉の脂質過酸化におよぼすNaClおよびFeイオンの影響

目的

食塩はすり身を作る際に加えるなど、水産加工上重要である。Kannerら¹⁾は七面鳥の筋肉組織の脂質過酸化におけるNaClの影響を報告している。これによると、NaClを加えた筋肉組織において、脂質過酸化が促進されるためMDAが生成され、またNaCl濃度を増すことにより、それは促進される。しかし、Ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt (以下EDTA)やセルロプラスミンが同時に存在するとNaClの作用は抑制される。EDTAやセルロプラスミンの他にも、Feイオンやアスコルビン酸などのいろいろな物質の存在によりNaClの作用は、抑制または促進の両方の影響を受ける。また、魚肉組織において、NaClを加えると脂質過酸化が促進されるため脂質過酸化の指標となるマロンジアルデヒド(MDA)が生成され、NaCl濃度を増すことにより促進されることが、確認されている。そこで、魚肉の脂質過酸化におよぼすNaClおよびFeイオンの影響を明らかにするためにMDA、4-ヒドロキシ-2-ヘキセナール(HHE)、カルボニル修飾タンパク質(CP)、脂質含量および脂肪酸組成を測定した。

方法

1) 試薬

i) MDA、CPおよびHHE測定用試薬

1,3-Diethyl-2-thiobarbituric acid(DETBA)は、Aldrich Chemicalsより購入した。2,6-ジ-tert-ブチル-p-クレゾール(Butyl Hydroxy Toluene 以下BHT)は東京化成工業より購入した。Sodium dodecyl sulfate(以下SDS)、1,1,3,3-tetraethoxypropane、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(以下DNPH)、尿素は、和光純薬より購入した。尿素は、和光純薬より購入した。Bio-Rad Protein Assay Kit(以下PAK)はBio-Rad Laboratoriesより購入した。なお、このPAKは標準として牛血清アルブミンを使用した。高性能液体クロマトグラフィー(以下HPLC)用の溶媒はすべて、HPLC用の試薬を用いた。他の試薬については、できうる限り特級を用いた。

ii) 脂質含量および脂肪酸組成測定用試薬

クロロホルム(1級)は、和光純薬より購入したものを蒸留し、窒素ガスを通気して冷蔵庫に保管後、2週間以内に使用した。メチルアルコール(1級)は、蒸留して使用した。以下、単にメタノールと記す。内部標準物質 Tricosanoic acid(SIGMA社製 C23:0)は、クロロホルムに溶解させ使用した。他の試薬については、できうる限り特級を用いた。

2) 試料

試料のブリは、一般の市場で購入した。皮および内蔵を取り除き、脂身と血合筋を削除した後、筋肉組織のみをフードプロセッサーで30秒間、細かく刻んだ。その試料を四等分し、Control(Control区)、0.3M NaCl(NaCl区)、30 μ M FeCl₃(Fe区)、0.3M NaCl+30 μ M FeCl₃(NaCl+Fe区)となるように調製した。それぞれをポリエチレンバッグにいれて、0°Cで貯蔵した。以上の条件で貯蔵した試料のMDA、CP、HHE、脂質含量および脂肪酸組成を測定し、それぞれの値の変動を観察、検討した。MDA、CPおよびHHE含量は、0、3、7日目に、脂質含量および脂肪酸組成は0および7日目に測定した。

3) MDAの測定法

Sakai et al.の方法により行った。¹⁾試料をテフロンホモジナイザーに1gずつ正確に秤量し、生理的食塩水を20ml加えホモジネートを作成した。その0.5mlを、栓付試験管に採取し、0.125Mリン酸緩衝液(pH3,0.4%SDS,10mM DETBA,4mM BHTを含む)を3.5ml加えた。100°Cのヒーターブロックで150分間反応させた。反応後、水道水を流しながら冷却し、酢酸エチルを4ml加え、激しく振盪した。2500rpmで15分間遠心分離を行い、その上清0.5mlを共栓付試験管に採取し、エバポレーターで濃縮乾固した。これを200 μ lのメタノールで再溶解し、その20 μ lをHPLCに注入し分析した。分析用のポンプには、BIP1 pump(日本分光工業)を、インジェクターには7725 Injector(島津製作所)、カラムにはInertsil ODS(5 μ m particle size 250 \times 4.6 mm i.d.;GL Science)をそれぞれ用いた。検出波長はEx515nm-Em555nmの条件で行い、検出器にはRF-10A 分光蛍光検出器(島津製作所)を用いた。展開溶媒は、アセトニトリル:0.1M NaCl溶液=3:1を用いた。なお溶出量は1ml/minとした。

4) CPの測定法

Sakai et al.の方法により行った。²⁾試料を、テフロンホモジナイザーに1gずつ正確に秤量し50mM Tris-HCl(1mM EDTAを含む)を、20ml加えホモジネートを作成し、4°C、10000rpmで10分間遠心分離を行った。上清を栓付試験管2本に3.5ml

ずつ採取し、10%トリクロロ酢酸を3.5ml加え、2500rpmで15分間遠心分離を行い蛋白質を沈殿させ、上清を除去した。一方の栓付試験管には、2N-HClのみを、もう一方には、10mM DNPHを含んだ2N-HClを5mlずつ加え、15°Cに調整した恒温槽で5~10分おきに攪拌しながら1時間反応させた。反応後、2500rpmで15分間遠心分離を行い、上清を除去した。その沈殿物に、エタノール-酢酸エチル(1:1)混合液を、5ml加え洗浄し、2500rpmで15分間遠心分離を行い上清を除去した。この操作を3回繰り返して行った。沈殿した蛋白質に、8M尿素を3.5ml加え、再溶解させた。吸光度は、UV-1200 分光光度計(島津製作所)で測定した。カルボニル残基含量は、ガラスセルを用いて360nmで測定し、 22000^{-1} のモル吸光度係数を用いて、nmol/mg proteinで算出した。protein量は、プロテインアッセイキットで測定した。

5) HHEの測定

Sakai et al.の方法により行った。³⁾試料を三角フラスコに1gずつ正確に秤量し、試料に対して0.5%のBHTを添加した。この三角フラスコに2.5mM DNPHを含んだ1N-HClを20ml加え、低温(4°C)暗所で2時間放置し、抽出と誘導化を同時に行った。反応後、濾紙で濾過し3倍量のジクロロメタンを加えて激しく攪拌し、分液漏斗を用いて、HHE-DNPH誘導体を含む下層をなす型フラスコに採取した。この操作を2回繰り返した。そのなす型フラスコをエバポレーターで濃縮乾固した。得られた残渣を2mlのクロロホルムで溶解し、あらかじめ3mlのヘキサン:クロロホルム=2:1で洗浄したSilica Gel Disposable Extraction Columnに注入した。注入後、ヘキサン:クロロホルム=2:1混合液3mlを2回カラムに注入し試料を展開させHHE-DNPH誘導体を含むバンドを分離させた。分離したバンドをクロロホルム6mlで溶解させ、溶出液を10ml容共栓付褐色試験管に採取し濃縮乾固した。これを500 μ lのメタノールで再溶解しHPLC用プレフィルターで濾過後その20 μ lをHPLCに注入し測定した。分析用のポンプには、880-PU pump(日本分光工業)を、インジェクターには7725i Injector(島津製作所)、カラムにはUltrasphere C18(25cm \times 4.6mm i.d., Beckman)をそれぞれ用いた。検出波長は365nmで、検出器には、SPD-M10AVP紫外可視検出器(島津製作所)を用いた。展開溶媒は、30mM sodium citrate/27.7mM acetate buffer (pH4.75):methanol=35:65を用いた。なお溶出量は1ml/minとした。この測定法による検出限界は、0.1nmol/g以下である。HHEのDNPH誘導体のピークの同定は、その保持時間およびスペークテストにより行った。

6) 脂質の抽出および定量法

脂質の抽出は、主としてFolchらの方法⁴⁾に準じて行った。試料10gを、200ml容コニカルビーカーに採取し、90mlのクロロホルム-メタノール(2:1, v/v)を加え、氷冷しながら2分間ホモジナイズ(ULTRA-TURRAX使用)した。ホモジネートは、少量のクロロホルム-メタノールでよく洗い込みながら吸引濾過(桐山 ロート直径40mm、濾紙No.5A)した後、残渣を元のコニカルビーカーに戻し、60mlのクロロホルム-メタノールを加えた。再びこれを氷冷しながら、1分間ホモジナイズした後、ホモジナイザーを10mlのクロロホルム-メタノールで洗い込んだ。そして、ホモジネートを吸引濾過し、残渣、コニカルビーカーを15mlのクロロホルム-メタノールでよく洗い込み、濾液を採取した。以上の濾液を300ml容分液ロートへ定量的に移し、これに0.2倍量の0.9%NaCl水溶液を加え、2~3分間激しく振とうした後、低温室に一昼夜静置した。静置後、2層に分離した下層のクロロホルム層を500ml容褐色試験瓶に移し無水硫酸ナトリウムを加えて脱水乾燥した後、500ml容ナス型フラスコに濾過(東洋濾紙 濾紙No.5A)した。これをロータリーエバポレーターで濃縮後、クロロホルムで25ml容共栓付試験管へ洗い込み、25mlにメスアップして総脂質抽出液とした。

脂質含量は、総脂質抽出液10mlをそれぞれあらかじめ恒量を求めておいた50mlナス型フラスコに採り、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固させた後、恒温器(105°C)に入れて1時間、デシケーター中で40分間放冷後、直ちに秤量して求めた。

7) 脂肪酸の分析および定量法

i) 脂肪酸メチルエステルの調製

上記6)で調製した総脂質抽出液から約30mgの脂質抽出物と内部標準物質3mgを10mlスクリーキャップ付試験管に採り、ヒートブロック内で40°Cに加温しながら窒素ガスを通気し濃縮乾固した。そして直ちに0.5M KOH-メタノール溶液1.0mlを加え5分間、続いてaq. HCl-メタノール溶液0.4mlを加えて5分間、それぞれヒートブロック内で100°Cに加熱しケン化およびメチルエステル化を行った。冷水中で冷却後、ガラス蒸留水2mlとn-ヘキサン5mlを加え2分間振とうした後、遠心分離器にかけた。上層のn-ヘキサン層を別の10ml褐色遠沈管に移した。得られた脂肪酸メチルエステルのn-ヘキサン抽出物に無水硫酸ナトリウムを加え、脱水乾燥したものをガスクロマトグラフィー(GC)用の試料とした。

ii) 脂肪酸メチルエステルの同定と定量

ガスクロマトグラフ装置には、GC - 14APF型（島津製作所製）を用いた。カラムはキャピラリーカラム（SUPELCO社製、SUPELCO WAX TM10 Fused silica capillary column 30m, 0.32mmID, 0.25 μ m film thickness）を使用した。カラム温度は初期保持温度185 $^{\circ}$ Cで8分間、その後毎分3 $^{\circ}$ Cで230 $^{\circ}$ Cまで上昇させ、分析終了まで保持した。また、注入部および検出器の温度はそれぞれ240、250 $^{\circ}$ Cに設定した。キャリアーガスにはヘリウムガスを用い、流速は毎分1.25kg/cm 2 とした。また検出器は水素イオン化検出器（FID）を使用し、水素ガス0.6kg/cm 2 、圧縮空気圧1kg/cm 2 とした。クロマトグラム上の脂肪酸メチルエステルの各ピークは、C14:0、C15:0、C16:0アルデヒド、C16:0、C16:0 (ω 7)、C16:1 (ω 7)、C17:0、C17:1、C18:0アルデヒド、C18:0、C18:1 (ω 9) (ω 7)、C18:2 (ω 6)、C18:3 (ω 6) (ω 3)、CLA、C20:0、C20:1(ω 9)、C20:2 (ω 6)、C20:3 (ω 6)、C20:4 (ω 6)、C20:5 (ω 3)、C21:5 (ω 3)、C22:4 (ω 6)、C22:5 (ω 6) (ω 3)、C22:6 (ω 3) の各脂肪酸メチルエステルについて鶏肉脂質標準脂肪酸メチルエステルとの対比により同定、あるいは相対保持時間により推定し、データ処理装置クロマトパック C - R4A（島津製作所）を用いて面積を測定した後、内部標準法で定量計算した。

結果

図1は、MDA量の変動を示したグラフである。Control区は、3日目まで増加し、7日目まではほとんど変化はなかった。NaCl区は、Control区と同様に、3日目まで増加し、7日目まではほとんど変化はなかった。Fe区は、7日目まで増加した。NaCl+Fe区を加えたものは、3日目に著しく増加し、7日目まで増加し続けた。増加の幅は、Control区に対してFe+NaCl区、Fe区、NaCl区の順に大きかった。図2は、CP量の変動を示したグラフである。Control区、NaCl区、Fe区、Fe+NaCl区すべて、7日目まで増加した。増加の幅は、MDAと同様に、Control区に対してFe+NaCl区、Fe区、NaCl区の順に大きかった。図3は、HHE量の変動を示したグラフである。Control区は、3日目まではほとんど変化しなかったが、7日目には増加した。NaCl区は、3日目に減少し、7日目には増加した。Fe区は、3日目に増加し、7日目には、減少した。NaCl+Fe区は、3日目までは、ほとんど変化しなかったが、7日目には減少した。7日目に減少したのは、HHEは非常に不安定で反応性が高い物質であるため、酸化が進み他のアルデヒドに変化したためであると考えられる。表4に、脂質含量と主な脂肪酸組成の変化を示した。オレイン酸、リノール酸、リノレン酸やアラキドン酸の脂肪酸組成は、ほとんど変化しなかったが、ドコサヘキサエン酸（以下DHA）とエイコサペンタエン酸（以下EPA）量は、わずかに減少した。図15は、DHAとEPA量の変動を示したグラフである。DHA、EPAともにControl区は、7日目までほとんど変化しなかったが、NaCl区、Fe区、NaCl+Fe区は、減少した。減少の幅は、NaCl+Fe区、Fe区、NaCl区の順で大きかった。これは、DHA、EPAなどの ω 3高度不飽和脂肪酸が脂質過酸化によりHHEやMDAなどのアルデヒドに変化したためである。

考察

以上の実験結果から、NaClは、3日目までは脂質過酸化にはさほど影響はないが、それ以降は脂質過酸化を促進すると考えられる。また7日目のMDA、CP、DHA、EPA含量の違いから、Feイオンは、NaClよりも脂質過酸化を促進すると考えられる。Feイオンが、過酸化脂質を生成するメカニズムは、第1段階としては、細胞内でのミトコンドリアなどでの電子伝達系から漏出した電子が酸素を還元し初めにスーパーオキシド ($\cdot O_2^-$) をつくり、これがFe $^{3+}$ の触媒作用を受けパーフェリルイオン (Fe $^{2+} \dots O_2$) であるラジカルを生成し、このラジカルが脂質の過酸化反応を引き起こすと考えられている。5) また、NaClが過酸化脂質を生成するメカニズムは、解明されていないが、Kanner らの実験結果からは、NaClが蛋白質とキレート結合しているFeを遊離させ、Feイオンが生じ、これが触媒となり、ラジカルを生成すると報告されている。15)

加工食品には、NaCl含量が高いものが多い。また、すり身を作る際にNaClを添加する。このように、NaClは、食品の保蔵加工上で重要な成分ではあるが、脂質過酸化を促進する要因でもあり、加工食品の安全性を考える上で非常に重要な問題である。今後、加工した魚肉や畜肉について実験を行い、加工食品の脂質過酸化におよぼすNaCl影響を明らかにする必要がある。

参考文献

1) Sakai, T., Habiro, A., and Kawahara, S. High-performance liquid chromatographic analysis of 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid-malonaldehyde adduct in fish meat. J. Chromatogr. B, 726,

313-316 (1999)

2) Sakai, T., Nasu, A., and Habiro, A. Changes in protein carbonyls and malonaldehyde content in stored fish meat. *Fisheries Sci.*, 64, 495-496 (1998).

3) Sakai, T., Matsushita, Y., Sugamoto, K., and Uchida, K. Lipid peroxidation-derived hepatotoxic aldehyde, 4-hydroxy-2-hexenal, in fish. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1399-1400 (1997).

4) Folch, J., Less, M., and Sloane, G. H. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957).

5) Kanner, J., Harel, S., and Jaffe, R. *J. Agric. Food Chem.* 39, 1017-1021 (1991).

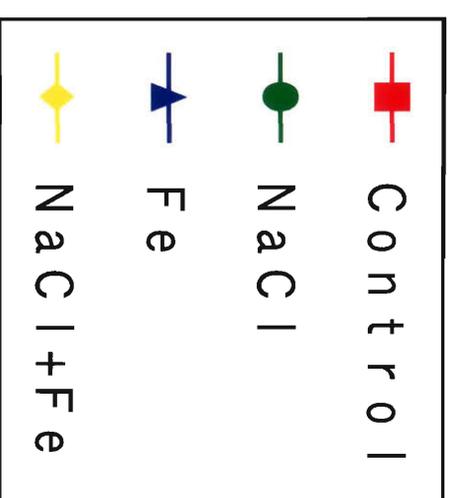
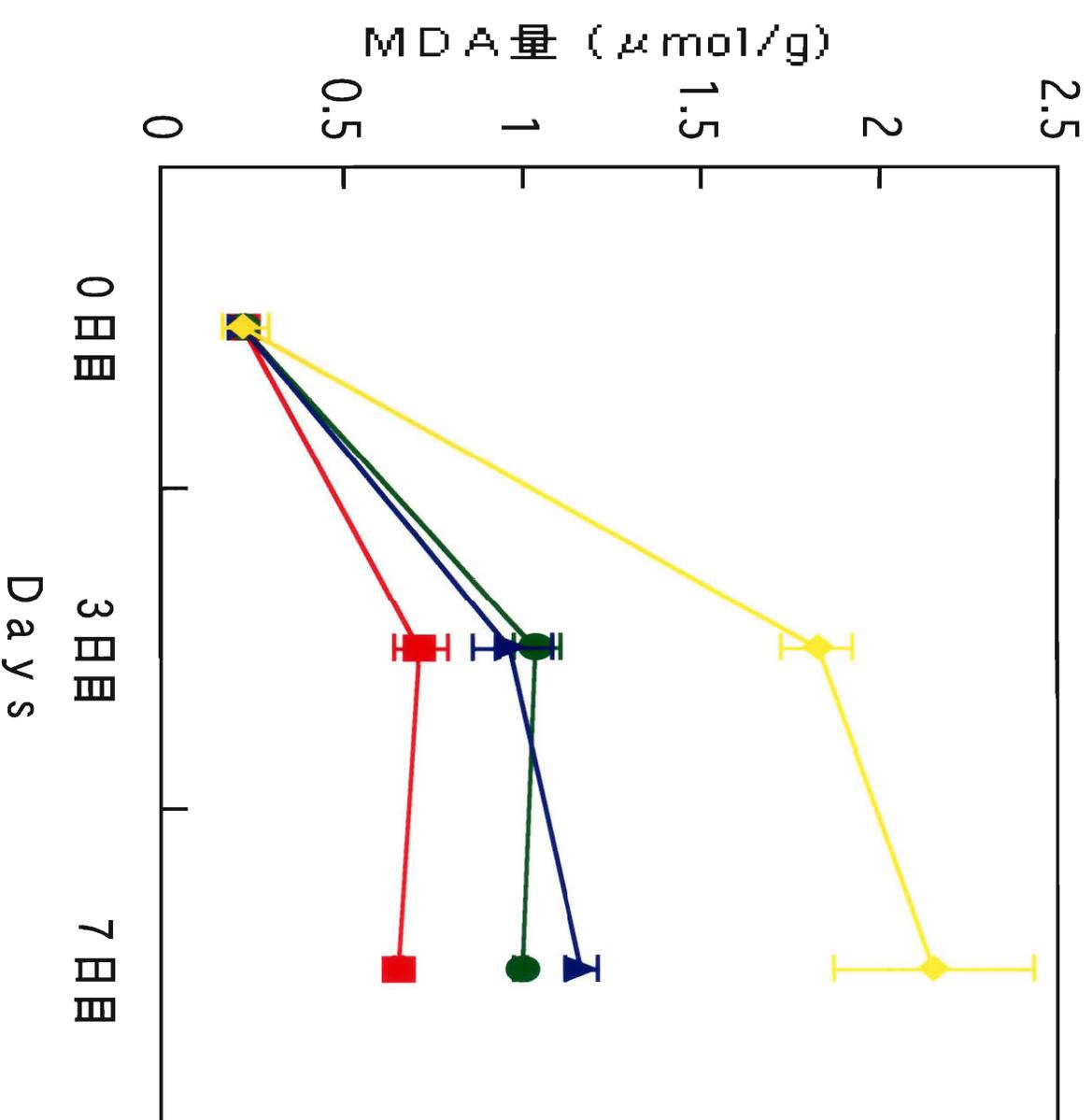


図1. 0°C.貯蔵魚肉中のMDA量の変動

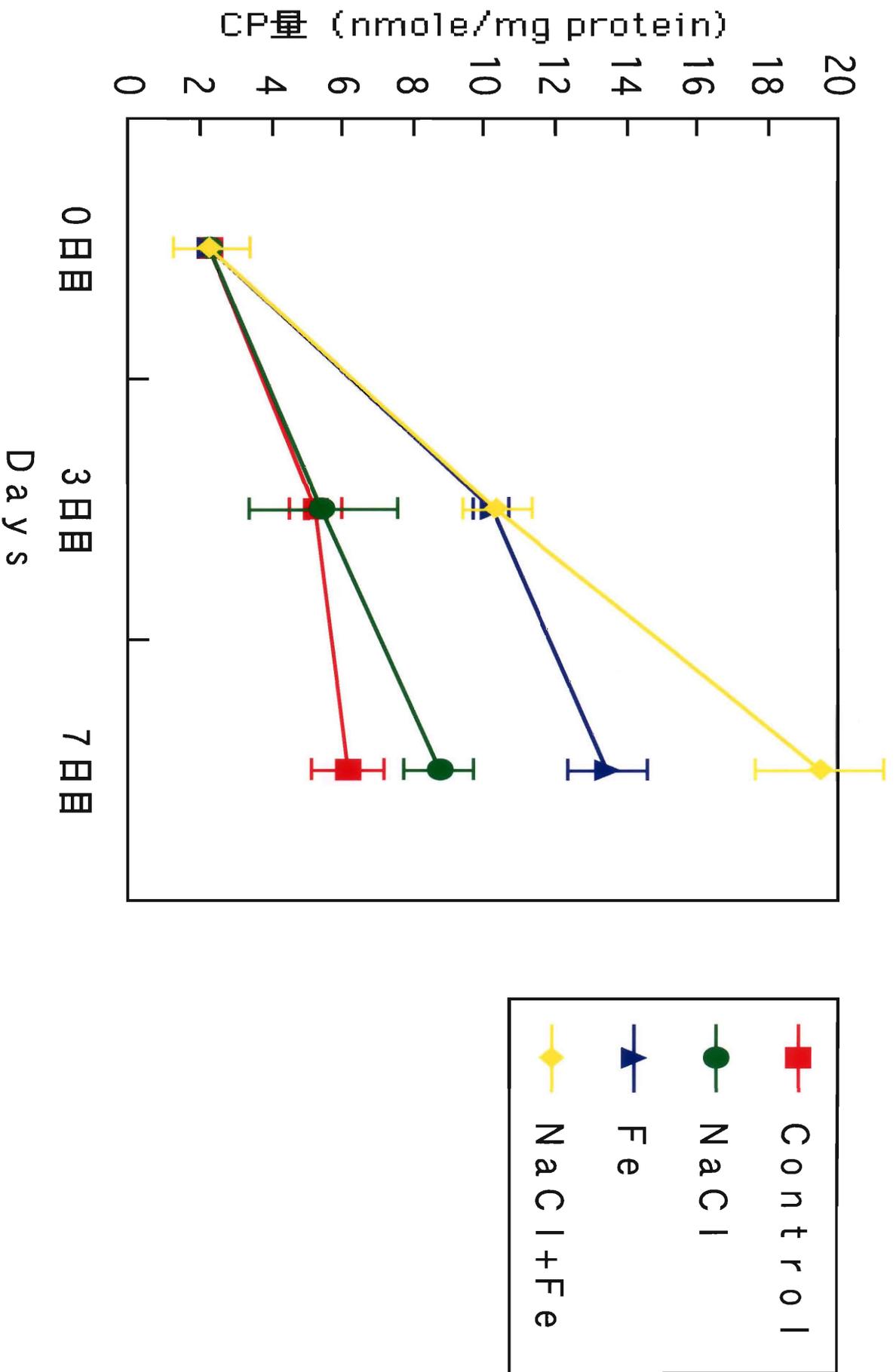


図2. 貯蔵魚肉中のCP量の変動

表1 脂質含量と主な脂肪酸組成の変化

	0日目		7日目		
	Control	Control	0.3M NaCl	30 μ M FeCl ₃	0.3M NaCl+30 μ M FeCl ₃
脂質含量(%)	7.38	7.27	7.435	7.025	7.72
(mg/g lipid)					
C18:1 (ω 9)オレイン酸	138.84	139.99	139.93	135.87	136.64
C18:2 (ω 6)リノール酸	6.96	7.08	7.04	6.86	6.79
C18:3 (ω 3)リノレン酸	3.44	3.52	3.40	3.32	3.35
C20:4 (ω 6)アラキドン酸	10.38	10.50	10.19	9.98	9.53
C20:5 (ω 3)EPA	52.64	52.60	51.53	49.89	46.71
C22:6 (ω 3)DHA	155.65	159.69	151.85	145.70	134.78