

魚類鮮度測定方法の標準化に向けた検討 -プロトコルの作成とシングルラボにおける評価-

吉岡武也、西村朋子、緒方由美

Study for Standardization of Fish Freshness Measurement Method - Protocol Development and Evaluation in a Single Laboratory -

Takeya Yoshioka, Tomoko Nishimura, Yumi Ogata

要 旨

科学的鮮度指標といわれる K 値は試験室ごとに異なる方法で測定され、統一的なものはない。K 値測定方法の標準化を目的に、プロトコルの作成とシングルラボによる性能確認を行った。過去に報告された K 値の測定法を元に、測定精度と作業性の点から試験試料の重量と中和の際に用いるアルカリの種類に改変を加えた。HPLC 測定に使用するカラムとしてシリカ系カラムの適性を検討し、アダマンチル基を官能基としたカラムを追加した。これらをもとに測定方法のプロトコルを作成して、単一試験室における性能確認を行った。添加回収率、測定範囲、併行精度などの測定をとおして標準化法としての適性を検討した。

1. はじめに

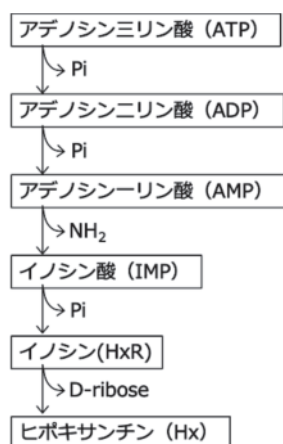
和食のユネスコ世界文化遺産登録を背景に、寿司、刺身のような水産物の生食が世界的に普及しつつある。新鮮でなければ生食できないので、鮮度を保持しながら輸送、保管する技術開発や施設整備が各地で取り組まれた結果、高鮮度の水産物が我が国から東南アジアや北米などに空輸されるようになり、その輸出力は増加傾向にある¹⁾。しかしながら、海外での生鮮水産物の売り場を見ると、生食用途の日本産水産物が見られるのは日系の量販店や飲食店のみである。日本産生鮮水産物の販路が限定される要因として、魚の扱いに不慣れな現地スタッフのみでは鮮度の良し悪しは判定できないので、生食用の日本産水産物は扱いにくいということが挙げられる。一方で国内の流通では、水揚げ地から首都圏の量販店に向けて発送される産直品の増加により、鮮度判定のプロである“市場の目利き”を通さない市場外流通が増加しており、全体の 50%を占めるに至っている²⁾。

現状、生鮮水産物の鮮度の判定はヒトの感覚に頼っており、明確な評価方法はない。鮮度の評価方法が標準化され、統一的な手法により客観的に評価されることにより、生鮮水産物の品質の適正な評価による公正な取引と、海外における生食市場の拡大が期待される。

科学的な鮮度指標として我が国の研究分野でデファクトスタンダード化している K 値の測定法を標準化する一環として、日本農林規格の試験法 JAS 制定を目指した取り組みを行った。既存の方法を改変して測定プロトコルを作成し、シングルラボ（単一試験室）における性能評価を行ったので報告する。

測定方法の標準化を検討する際には、あらかじめ適用範囲を定めておく必要がある。この報告では、測定対象は未凍結の硬骨魚類とし、採取部位は体側筋の普通肉とした。さらに、K 値の測定方法の検討であるが、K 値算出のもととなる ATP 関連物質にはそれ自体の含量で魚肉の状態を推測することが出来るので、測定の手順として ATP 関連物質 6 成

分の含量を求めて、そこから K 値を算出することとした。その際、ATP 関連物質の含量は参考値としての扱いとなる。死後の筋肉にておこる ATP の分解経路と K 値の算出式を図 1 に記した³⁾。



$$K \text{ 値 (\%)} = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx} \times 100$$

図 1 魚類筋肉での ATP の死後変化と K 値の算出式

2. 実験方法

2.1 試料魚肉

K 値の測定には、断りのない限り未凍結の魚肉を用いた。体側筋から普通肉を採取して包丁等で細切して、直ちに実験に用いた。

2.2 ATP 関連物質の測定と K 値の算出

細切した魚肉試料を量り取り、50mL 容量のディスポーザブルチューブに入れ、一定量の 5%過塩素酸 (PCA) 溶液を添加して破碎した。水酸化ナトリウムもしくは水酸化カリウム溶液を加え pH を 2.5 から 3.5 として、氷中で 30 分間静置した。清澄な部分から溶液の一部を取り出し、孔径 0.45μm のメンブランフィルターを通過させてろ液を回収した。ろ液にりん酸緩衝液を加え (4:1) 試料溶液とした。

試料溶液中の ATP 関連物質の測定は、HPLC にて行った。りん酸緩衝液を用いたアイソクラティック条件にて各成分を溶出させて、260nm の吸光度を測定した。得られた ATP 関連物質の測定値 (モル濃度) から図 1 の式に従い K 値を算出した。ATP 関連物質の標準試薬は、シグマ社製の純度 98%以上 (ADP のみ 95%以上) のものを用いた。

3. 実験結果と考察

3.1 既存の測定方法の調査

標準化に向けた K 値の測定方法を検討するために、既存の測定方法を調査した。国内外の公定法や国際規格に K 値の測定方法は見当たらないので、論文や特許などを調査した。2000 年以降に報告された代表的な測定法を表 1 に示した。いずれも強酸である PCA 溶液で魚肉を変性させて ATP 関連物質を抽出し、アルカリ溶液を添加して中和した後に、成分値を測定する方法である。この中で文献 1 と 2 は、

表 1 K 値測定法の報告例

番号	1	2	3	4	5
文献	新食品分析ハンドブック (2000) ⁴⁾	佐藤寛ら、特許第 4291381 (2001) ⁵⁾	胡ほか、日本水産学会誌 (2013) ⁶⁾	水産・食品化学実験ノート (2019) ⁷⁾	Fish and Fishery Product Analysis (2019) ⁸⁾
対象種	魚類(背部普通肉)	魚肉, 魚介類	魚類筋肉	魚類(普通筋)	魚類
測定成分	リン酸基を有する成分と有しない成分群	リン酸基を有する成分と有しない成分群	各成分	各成分	各成分
定量装置	分光光度計	ろ紙電気泳動装置	HPLC	HPLC	HPLC
測定方法	魚肉を過塩素酸溶液に懸濁してろ過する。ろ液を水酸化カリウムで中和する。沈殿を除去した上澄みをイオン交換樹脂に供し、リン酸基を持つ成分と持たない成分を各溶出させる。定容後に 250nm の吸収を測定して K 値を算出する。	魚肉を過塩素酸溶液に懸濁してろ過する。ろ液を水酸化カリウムで中和する。沈殿を除去した上澄みを採取してろ紙に滴下した後に、ろ紙電気泳動によりリン酸基を有する成分を移動させる。紫外線を照射して各スポットを発色させ、面積と濃さを測定して各成分の比から算出する。	魚肉を過塩素酸溶液に懸濁した後、水酸化カリウムを添加して pH を 2.0~3.5 として沈殿を除去する。緩衝液を加えて中性とした後に、ポリマー系カラムを装備した HPLC により各 ATP 関連物質を定量して K 値を算出する。	魚肉を過塩素酸溶液に懸濁してろ過する。ろ液を水酸化カリウムで中和する。沈殿を除去した上澄みを採取し、ポリマー系カラムを装備した HPLC により各 ATP 関連物質を定量して K 値を算出する。	魚肉を過塩素酸溶液に懸濁してろ過する。ろ液を水酸化カリウムで中和する。沈殿を除去した上澄みを採取し、シリカ系カラムを装備した HPLC により各 ATP 関連物質を定量して K 値を算出する。

ATP 関連物質をリン酸基の有無でグループ分けしてそれぞれを測定するもので、各物質を個別に測定する方法ではない。文献4と5は、PCA 溶液で抽出した後に水酸化カリウム溶液で中和するもので、強酸に強アルカリを加えて中和することから操作に熟練を要し、また変性したタンパク質と生成した過塩素酸カリウムの沈殿を除くために、それぞれ遠心分離を繰り返す必要があることから操作が複雑となる。文献3はPCA 溶液で抽出した後に、水酸化カリウム溶液を添加して pH3 程度とした後にメンブランフィルターで生成した沈殿を除去し、リン酸緩衝液にて中和させるもので、操作の簡便化が検討されており、使用する PCA 溶液の濃度や抽出の繰り返し回数の影響も調べられている。これらの結果から、文献3の胡らの方法⁶⁾をもとに、測定方法の検討を行うこととした。

3.2 測定方法の改良

測定値の精度、作業性、汎用性などの点から、文献3の方法の改変を検討した。

3.2.1 試料重量と測定偏差

文献3の方法では試料の採取量は約1gとされているが、試料の採取量を1、2、3gとした際の測定偏差を検討した。繰り返し測定した際の平均値と標準偏差を表2に示した。

表2 試料重量と測定値

試料重量	1g	2g	3g
1	11.9	10.8	11.5
2	10.8	11.3	11.2
3	11.0	10.8	11.3
4	11.3	11.3	11.0
5	10.9	10.9	11.0
平均値	11.2	11.0	11.2
標準偏差	0.44	0.27	0.24

マダイ肉を包丁で破碎した後に各重量で秤量し、30mlの5%PCA 溶液に懸濁して文献3の方法によりK 値を測定した。この操作を5回繰り返し、平均値と標準偏差を算出した。

K 値の平均値は約11%と試料の重量にかかわらず同一であったが、試料1gの試験区の標準偏差はやや高く、その他の試験区は低い値であった。この場合、採取量3gでは試料を懸濁する際に肉片がプラスチックチューブの内面に付着するなど回収するのに手間を要すことから、試料の秤量は約2gが好ましいと判断した。

3.2.2 中和方法の検討

表1の方法では、いずれも魚肉をPCA 溶液に懸濁した後に水酸化カリウム溶液を加えて中和している。これは、PCA のカリウム塩の水に対する溶解度が低いことを利用して、過塩素酸イオンをカリウム塩として沈殿させて除去し、イオン交換樹脂を用いて ATP 関連物質をリン酸基の有無により分離して K 値を算出するためである。過塩素酸カリウムの溶解度は低温ほど低いことから、中和後の溶液を氷冷して過塩素酸カリウムの沈殿を生成させている。しかし、水に対する溶解度は温度により大きく変動するので、沈殿が形成した後も時間経過により新たに沈殿が生成する場合があります、再度、ろ過するなど作業が複雑であった。

現在は HPLC が一般化し、K 値の測定も逆相モードカラムを用いた HPLC 法が主流であることから、試料溶液中の過塩素酸イオンを除去する必要は無いと思われる。ここでは HPLC にて定量分析する際の過塩素酸イオンの影響を検討した。過塩素酸ナトリウム塩の水に対する溶解度は高いことから、水酸化カリウム溶液と水酸化ナトリウム溶液でそれぞれ pH を調整した試験溶液を文献3で用いられている Asahipak GS-320HQ に供して HPLC チャートを評価したところ、各 ATP 関連物質の溶出パターンに変化は見られず、溶出時間も同一であった(図2)。

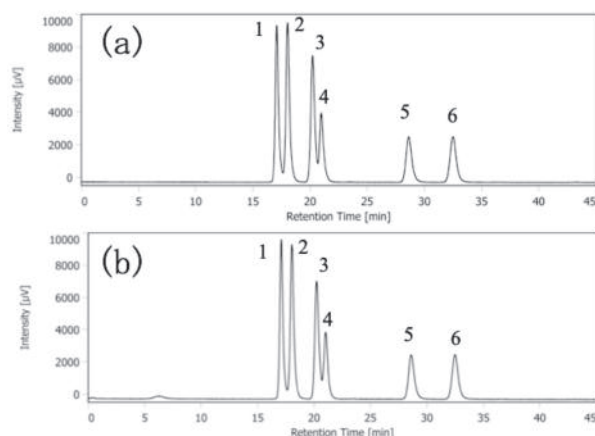


図2 HPLC チャートへの過塩素酸イオンの影響

PCA 溶液に ATP 関連物質の標準溶液を加え、水酸化カリウム溶液(a)もしくは水酸化ナトリウム溶液(b)で pH3 に調整し、1M リン酸緩衝液 (pH2.9) を 4:1 で添加した後に HPLC に供した。使用したカラムは Asahipak GS-320HQ、移動相は 200mM リン酸緩衝液 (pH2.9)、1ml/min、カラム温度 40°C。1:ATP、2:ADP、3:AMP、4:IMP、5:HxR、6:Hx。

さらに、魚肉を用いて各 ATP 関連物質の定量値への影響を検討した。マダイ肉の PCA ホモジナイズ液に ATP 関連物質の標準液を添加し、水酸化ナトリウム溶液で中和した後に、試料液に含まれる過塩素酸イオンと等量の塩化カリウム溶液を添加して過塩素酸カリウムの沈殿を形成させて、上澄み中の ATP 関連物質の濃度を HPLC にて測定し、結果を表 3 に示した。過塩素酸イオンの有無にかかわらず各 ATP 関連物質は同じ測定値が得られたことから、試料溶液中に過塩素酸イオンが残存しても測定に問題は無いと判断された。この結果から、PCA ホモジナイズ液の pH 調整には水酸化ナトリウム溶液を用いることとした。これにより過塩素酸塩の沈殿は生成せず、その後のろ過操作が容易になった。なお、HPLC に注入する試験溶液に過塩素酸イオンが含まれていることから、HPLC 移動相のリン酸緩衝液を調製する際にはリン酸のナトリウム塩を用いる必要がある。

表 3 測定値への過塩素酸の影響

	PCA残存	PCA除去
ATP	0.114	0.114
ADP	0.037	0.037
AMP	0.022	0.022
IMP	0.028	0.028
HxR	0.026	0.026
Hx	0.026	0.026
K値	20.4	20.6

マダイ肉を PCA でホモジナイズ後に ATP 関連物質の標準溶液を添加して水酸化ナトリウム溶液で pH を約 3 に調整した。一部の試料は塩化カリウムを添加して PCA を沈殿除去した。シリカ系カラムにて定量分析した。3 回測定した平均値。ATP、ADP、AMP、IMP、HxR、Hx は $\mu\text{mol/ml}$ 、K 値は%で示した。

3.2.3 HPLC カラムの検討

現状、HPLC による ATP 関連物質の定量の際には Asahipak GS-320HQ カラムを用いたリン酸緩衝液 (pH2.9) アイソクラティック法が主に用いられている。しかし、カラムが高価である、1 社のみからの販売であり継続した入手に不安がある、分析に時間を要すなどの課題があった。一方、HPLC による各種成分の分析にはオクタデシル基 (C18) などを官能基としたシリカ系カラムが用いられ、昨今では水系 100%の溶離液を用いて ATP 関連物質が分離できるとする製品も上市されている。ここでは、ポリマー系である Asahipak GS-320HQ の他に、シリカ系カラムで魚肉中の ATP 関連物質の分離定量が可能

か検討した。シリカ系カラムとして、オクタデシル基 (C18)、トルメチル基 (C1)、アダマンチル基 (C10) を官能基とするカラムを入手し、ATP 関連物質の標準液を注入して HPLC チャートを観察した (図 3)。いずれのカラムにおいても各 ATP 関連物質の明瞭なピークが確認され、分離度は 1.5 以上で良好な結果が得られた⁹⁾。ポリマー系カラムとシリカ系カラムでは分離機構が異なるため各 ATP 関連物質の溶出の順序は異なるが、シリカ系カラムはいずれも同じ順序での溶出となった。

次に、同一の試料溶液の ATP 関連物質の含量を異なるカラムを用いて測定し、測定値を比較した。鮮度の異なるアイナメ、ヒラメ、マサバ、ブリ、タ

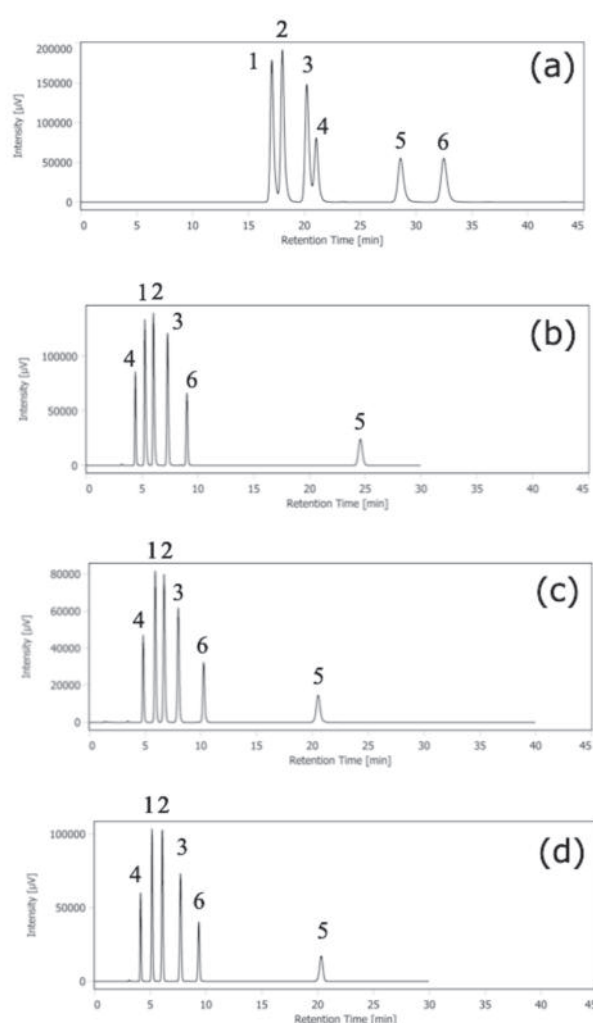


図 3 標準液の HPLC チャート

(a)Asahipak GS-320HQ、(b)Capcell Pak C18AQ、(c)Develosil HSR AQ、(d)Capcell Pak ADME-HR。

カラムサイズと溶出条件は、(a)6Å、7.5ID×300mm、200mM リン酸緩衝液(pH2.9)、0.6ml/min、注入量 20 μl 、(b)(c)(d)5S、4.6ID×250mm、50mM リン酸緩衝液(pH7.0)、1ml/min、注入量 10 μl 。いずれもカラム温度 40°C、検出波長 260nm。ATP 関連物質の濃度はカラムごとに設定し、移動相に溶解して注入した。図中の成分は図 2 を参照。

表 4 同一試料溶液の K 値測定値

		(単位(%))					
タイプ	官能基	製品名	アイナメ (K値≒4)	ヒラメ (K値≒8)	マサバ (K値≒9)	ブリ (K値≒27)	タイセイヨウサケ (K値≒85)
ポリマー系		Asahipak GS-320HQ	4.0	7.7	8.5	27.3	84.3
		InertSustain AQ-C18	6.9	15.4	11.0	27.4	85.3
シリカ系	オクタデシル基 (C18)	Capcell Pak C18AQ	4.2	7.3	8.9	26.9	84.5
		Develosil HSR AQ	5.3	7.6	14.3	28.9	85.3
		Shim-pack GIST C18-AQ	8.4	15.7	18.5	27.8	85.0
		Unison US-C18	4.5	8.3	9.2	26.8	84.3
		Triart C18	4.5	8.2	9.2	27.0	84.3
		トリメチル基 (C1)	Develosil HSR C1	4.1	7.2	8.8	26.8
	アダマンチル基 (C10)	Capcell pak ADME-HR	4.4	8.0	9.2	26.9	84.3

各魚肉より試料溶液を調製した。試料重量は 2g とし、中和には水酸化ナトリウムを用いた。HPLC 条件は図 2 を参照。

イヘイヨウサケ肉から ATP 関連物質を抽出して試料溶液を調製した。ポリマー系カラム (Asahipak GS-320HQ)、ならびに C18 カラム 6 種、C1 カラム 1 種、C10 カラム 1 種を用いて各 ATP 関連物質の含量を測定して結果を表 4 に示した。Asahipak GS-320HQ とトリメチル基 (Develosil HSR C1)、アダマンチル基 (Capcell Pak ADME-HR) では、いずれの魚肉試料でもほぼ同等の K 値が得られたが、オクタデシル基では一部の製品にて高い値となった。これらのカラムの各 ATP 関連物質の値を確認したところ、アイナメではイノシン、ヒラメではイノシン、マサバではイノシンとヒポキサンチン、ブリではヒポキサンチンに高い値が見られ、魚肉由来のマトリックスの影響と判断された。これらの結果から、リン酸緩衝液を用いたアイソクラティック条件での分析においてはオクタデシル基を官能基とするカラムにはマトリックスの影響を受けて正確な測定値が得られない製品が含まれることから、標準化法のカラムとして利用することは難しいと判断した。また、一般にシリカ系カラムは水系 100%の移動相においては耐久性が問題となるが、トリメチル基を官能基としたものは測定中に保持が弱くなる現象が認められたことから、利用は難しかった。アダマンチル基によるものはこの製品 (Capcell Pak ADME-HR) 以外には認められず、樹脂の製造ロットが異なる 3 本のカラムを用いても同様な測定値が得られたことから、ポリマー系カラム (Asahipak GS-320HQ) を併せて推奨できると判断した。

3.3 測定方法の性能評価

これらに加えて、ATP 関連物質の標準試薬の濃度

を吸光係数より算出する方法を検討し、図 4 に示した K 値の測定プロトコルを開発した。文献 3 からの主な変更は、試料の秤量重量、pH 調整の際の水酸化ナトリウムの利用、HPLC カラムにアダマンチル基を官能基としたものの追加などである。また、HPLC に注入する試料溶液の緩衝液濃度や pH が移動相と異なると、溶出位置やピーク面積に影響を及ぼすことがあることから、試料溶液にはリン酸緩衝液を添加して、組成を HPLC の移動相と同一とすることとした。

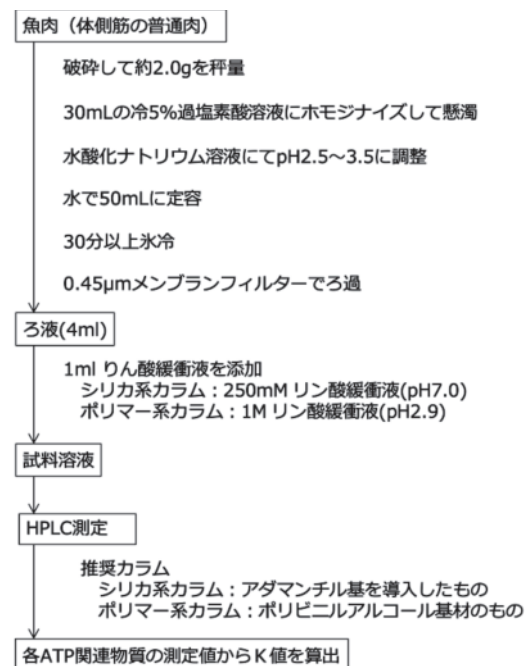


図 4 K 値の測定手順

リン酸緩衝液を調整する際に用いるリン酸塩はナトリウム塩を用いる。HPLC 条件は図 2 を参照。

次に、図4に示した方法の試験法としての確からしさを検証するために、北海道立工業技術センターにおいて性能評価を行った。

3.3.1 添加回収率

魚肉のPCAホモジナイズ液にATP関連物質の標準液を添加して一連の抽出操作を行い、各成分を定量して回収率を測定した。その際、魚肉試料にはATP関連物質が含まれているので、あらかじめ魚肉に含まれるATP関連物質の含量を測定し、標準試薬を添加した時の定量値から肉由来の値を差し引いて、添加した量で除して回収率とした。

標準液中の濃度は以下の方法により算出した。すなわち、各ATP関連物質を5mMとなるようにそれぞれ水に溶解して標準原液とした。各標準原液を50mMりん酸緩衝液(pH7.0)で100倍に希釈して吸光度を測定し、各物質の吸光係数から標準原液の濃度を算出した¹⁰⁾。それぞれの標準原液を混合して希釈し、混合標準液とした。

回収率の測定結果を表5に示した。各測定値は50ml定容時の量(μmol/50ml)として表した。やや鮮度低下した魚肉試料を用いたため、測定値(W₁)はIMP、HxR、Hxの含量が多い結果となったが、魚肉由来W₂を差し引いた回収量(W₁-W₂)は概ね1μmolとなった。添加した量W₀との比から回収率を算出したが、いずれの成分も94%以上となった。今回は各成分値の測定法ではなく比で表すK値の測定法であるが、この結果は分析法の妥当性確認に関するガイドラインに記載されている化学物質の定量分析法が満たすべき性能規準とガイドライン値(≥1mg/kgで80~110%)と比較して特に問題となる結果ではないと判断した¹¹⁾。

表5 標準溶液を添加した際の回収率

	測定値 W ₁ (μmol/50ml)	魚肉由来 W ₂ (μmol/50ml)	回収量 W ₁ -W ₂ (μmol/50ml)	添加量 W ₀ (μmol/50ml)	回収率 (W ₁ -W ₂)/W ₀ (%)
ATP	1.59	0.66	0.93	0.99	94.0
ADP	1.57	0.48	1.09	1.04	99.3
AMP	0.89	0.03	0.87	0.89	96.8
IMP	2.20	1.24	0.96	0.99	97.6
HxR	5.81	4.80	1.01	1.02	98.9
Hx	2.56	1.58	0.98	1.01	97.3

ホッケ肉にPCA溶液を添加したホモジナイズ液に終濃度が0.02μmol/mlとなるようにATP関連物質標準溶液を添加して含量を測定した(W₁)。肉由来の含量(W₂)との差から回収率を求めた。3回測定した平均値を示した。

3.3.2 測定範囲

図4に示した測定手順について、各ATP関連物質の測定可能な範囲について検討した。硬骨魚類体側筋の普通肉に含まれる各ATP関連物質の含量の最大値は、過去の文献等の報告によると、おおむねATPは8μmol/g、ADPは3μmol/g、AMPは0.5μmol/g、IMPは15μmol/g、HxRとHxはそれぞれ7μmol/gである。これを元に予想される試料溶液中の濃度を算出するとATPは256μmol/g、ADPは96μmol/g、AMPは16μmol/g、IMPは480μmol/g、HxRとHxは224μmol/gとなる。

一方、最小値については、K値1%に相当するATP関連物質の含量として、K値に影響が大きい分子となる成分の定量下限として算出した。すなわち、魚肉に含まれるATP関連物質の総量(K値算出の際の分母)を5μmol/gと仮定すると、K値1%に相当するK値算出の際の分子は0.05μmol/gとなる。分子はHxRとHxよりなるので、各成分の求める定量下限は0.025μmol/gとなる。肉試料に含まれる0.025μmol/gの成分は試料溶液に換算すると1μMと

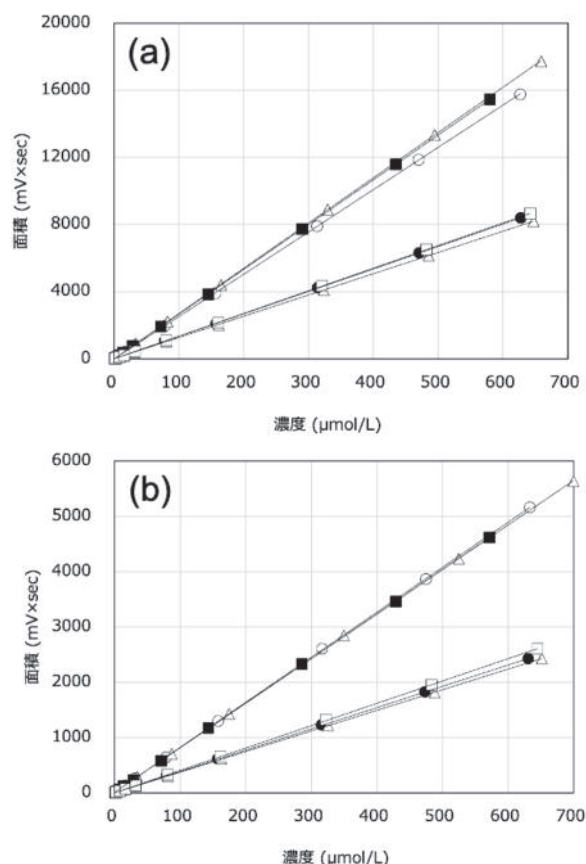


図5 各ATP関連物質の検量線

ATP関連物質を各濃度に希釈してHPLC分析に供して面積を記録した。HPLCの条件は図2を参照。a:Asahipak GS-320HQ、b:Capcell Pak ADME-HR。○:ATP、△:ADP、■:AMP、●:IMP、▲:HxR、□:Hx。

なる。ATP 関連物質の標品を溶解して 0.8 μ M から 640 μ M の範囲で段階希釈して HPLC に供した結果を図 5 に示した。Asahipak GS-320HQ と Capcell Pak ADME-HR のいずれにおいても予想される濃度範囲において直線であることを確認し、相関係数は 1.0000 であった。

3.3.3 併行精度

分析法の妥当性評価において、併行条件は同一と見なされる試料の分析において、短時間（通常 1 日以内）に、同じ分析者が、同じ試験室で同じ機器を用いて、同一の試験・測定項目について同じ分析法を用いて、独立した分析値・測定結果を得る観測条件であり、併行条件で得られた分析値又は測定結果の標準偏差（併行標準偏差: Sr）を平均値で除した値である併行相対標準偏差（RSDr）を併行精度の評価指標として用いるとされる¹¹⁾。K 値の異なる 3 種の魚肉試料を用いて、2 種類のカラムを使用して 10 回反復した際の測定値を表 6 に示した。高鮮度のヒラメを試料とした際の併行相対標準偏差はポリマー系カラム、シリカ系カラムのいずれも 4.0 であった。中鮮度のブリを試料とした場合は、それぞれ 0.5、0.2 となった。また低鮮度のタイセイヨウサケの場合は 0.5 と 0.1 となり、いずれも問題ない範囲と判断した。ポリマー系とシリカ系では中鮮度、低鮮度試料においてシリカ系カラムの併行相対標準偏差が小さい傾向があった。各魚種において、ポリマー

系カラムとシリカ系カラムの測定値を合わせて算出した併行相対標準偏差は、高鮮度試料で 4.0、中鮮度試料で 1.4、低鮮度試料で 1.1 であり、中鮮度、低鮮度試料において単独カラムで算出した場合よりもやや増加した。この要因として、各試料の測定値の平均値がポリマー系カラムとシリカ系カラムでわずかに異なることがあげられマトリックス成分の影響が推測されるが、測定法に求める精度から特に問題にはならないと判断した。

4. 結論

生鮮水産物にとって鮮度は最も重要な品質指標である。本研究では、死後に起こる ATP 関連物質の分解の経路が明らかになっている硬骨魚類を対象に、K 値の測定方法の標準化を目指して測定プロトコルの検討を行った。鮮度指標として K 値が提唱されたのは 1959 年であり、その後、多くの研究者によって測定方法が改良されてきた。K 値の測定理論としては、試料肉から ATP 関連物質を強酸である PCA で抽出して水酸化カリウム溶液により中和する手順はほぼ同一であるが、ATP 関連物質の測定は、リン酸基を持つ成分と持たない成分にグループ分けして測定する方法と、各 ATP 関連物質を個別に定量する方法に大別される。前者にはイオン交換法によるもの、ろ紙電気泳動によるものがあり、後者には HPLC によるものがある。本取り組みでは、過塩素酸による抽出とその後の中和操作について

表 6 各カラムにおける併行精度

試料 使用カラム	ヒラメ (K値 \approx 4)		ブリ (K値 \approx 18)		タイセイヨウサケ (K値 \approx 69)	
	ポリマー系	シリカ系	ポリマー系	シリカ系	ポリマー系	シリカ系
1	4.2	4.2	18.7	18.2	68.1	69.7
2	3.8	3.9	18.6	18.3	69.2	69.6
3	3.9	3.9	18.7	18.2	68.3	69.7
4	3.8	3.9	18.7	18.2	68.3	69.7
5	3.9	4.0	18.8	18.2	68.4	69.8
6	4.0	4.1	18.8	18.2	68.3	69.7
7	4.2	4.2	18.7	18.2	68.2	69.5
8	4.1	4.2	18.8	18.3	68.3	69.7
9	4.2	4.2	18.6	18.2	68.1	69.6
10	4.2	4.3	18.9	18.3	68.3	69.7
平均	4.02	4.07	18.72	18.24	68.34	69.66
併行標準偏差(Sr)	0.16	0.16	0.09	0.03	0.33	0.06
併行相対標準偏(RSDr)	4.00	4.02	0.47	0.15	0.48	0.09
平均		4.05		18.48		69.00
併行標準偏差(Sr)		0.16		0.25		0.72
併行相対標準偏(RSDr)		3.98		1.36		1.05

魚肉試料を液体窒素で凍結した後、破碎することにより凍結粉碎試料を作製した。K 値の測定方法は図 4 を参照。使用したカラムはポリマー系 Asahipak GS-320HQ、シリカ系 Capcell Pak ADME-HR。カラムサイズならびに HPLC 条件は図 2 を参照。

詳細に検討された方法をもとに、精度、作業性、汎用性の点から改変を行った。具体的には、試験試料の秤量重量と精度の関係、中和の際に水酸化ナトリウム溶液を使用することによるろ過作業の軽減、HPLCカラムとして一般的なシリカ系カラムの適応などを検討した。その結果をもとに測定プロトコルを作成した。

測定法が信頼できるものであるかを評価する項目として、選択性、検量線及び直線性、真度、精度、回収率、適用可能範囲、検出下限、定量下限、感度、頑健性、目的適合性、マトリックスの影響、測定の不確かさなどがある¹¹⁾。今回はこの中から、選択性、回収率、検量線及び直線性、精度などについて当試験室におけるシングルラボ評価を行った。その結果、選択性、回収率、検量線及び直線性は実際のK値測定の場合において問題ない結果と判断した。併行精度においては、2種類のカラムによる差を区別しないで統計計算を行ったところ、併行標準偏差 (Sr) から求めた室間差における値を見分ける限界は、ヒラメ (K値4%) では1.3%、ブリ (K値18%) では2.0%、タイセイヨウサケ (K値69%) では5.8%であった。この結果から作成した測定プロトコルは試験魚の鮮度を測定する上で利用可能な性能を有していると判断した。

測定法の妥当性を評価する指標として室間再現精度は重要である。これは複数機関が参加した室間共同試験によるもので、複数の分析機関が均質で安定な同一の分析用試料を文書化された同一のプロトコルを用いて定量し、その分析値から分析法の性能を評価する試験である。今回開発したプロトコルの標準化法としての妥当性を確認するためには、室間共同試験の実施が必要となる。

謝辞

本研究を行うに当たり、測定法の開発と評価にご協力いただいた北海道大学今野久仁彦名誉教授ならびに(独)農林水産消費安全技術センターの皆様へ感謝いたします。

記号一覧

ATP	アデノシン 5'-三りん酸
ADP	アデノシン 5'-二りん酸
AMP	アデノシン 5'-一りん酸
IMP	イノシン 5'-一りん酸
HxR	イノシン
Hx	ヒポキサンチン

参考文献

- 1)我が国の水産物輸出に関する取り組みの現状と課題 (2018). 東京水産振興会、東京. 2018
- 2)水産白書 (2021). 水産庁、東京. 2021
- 3)Saito T, Arai K, Matsuyoshi M : A new method for estimating the freshness of fish. Nippon Suisan Gakkaishi, 24(1959), pp. 749-750
- 4)新食品分析ハンドブック、6.7.2.K値、VBN (イオン交換樹脂法)、建帛社、東京. 2000
- 5)佐藤實:食肉の鮮度判定法、特許第 4291381 (出願日 2001.7.27)
- 6)胡亜芹、張佳琪、蛭谷幸司、今野久仁彦:魚肉からの ATP 関連化合物抽出法の簡便化、日本水産学会誌、79(2013)、pp.219-225
- 7)水産・食品化学実験ノート、第7章 4.ATP 関連化合物の抽出と鮮度判定 (HPLC 法)、恒星社厚生閣、東京. 2019.
- 8)Fish and Fishery Product Analysis, 2.5.5 Assessment of Nucleotides and Nucleotide Catabolite, Springer Nature Singapore, Singapore 2019
- 9)JIS K0124:2011、高速液体クロマトグラフィー 通則
- 10)National Academy of Science, Specifications and Criteria for Biochemical Compounds. 3rd Edition., Washington D.C. 1972
- 11)分析法の妥当性確認に関するガイドライン、農林水産省、東京. 2019