

## 魚類のエイコサペンタエン酸及びドコサヘキサエン酸の 高速液体クロマトグラフィーによる定量

長田 博光, 中井由香子

### High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Extracted Fish Oil

Hiromitu Osada and Yukako Nakai\*

High performance liquid chromatograph equipped with a fluorescence detector was applied to the determination of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in extracted fish oil. Both acids were esterified with 9-anthryldiazomethane.

High performance liquid chromatographic separation was carried out using a Nacalai cosmosil 5C18-AR column with acetonitrile-water (9:1 v/v) as the mobile phase at a flow rate of 0.9 ml/min. The fluorescence detector was operated at an excitation wavelength of 365 nm and emission wavelength of 412 nm.

Recovery of 2.5 mg-10 mg EPA or DHA added in 1 g sardine oil was 93.0% - 108.9% for EPA, 96.0% - 106.5% for DHA, and coefficient of variation was 2.56%, 2.44%, respectively.

The EPA and DHA contents in fresh fish, dried fish and canned fish were determined by the high performance liquid chromatographic method. The following results were obtained, (1) EPA and DHA in fresh fishes were ranged from 31 mg to 3,843 mg and 178 mg to 5,263 mg in 100 g muscle, respectively, these figures being higher in red-fleshed fish than in white-fleshed fish. (2) In dried fishes, the ranges were from 354 mg to 3,573 mg and 751 mg to 2,481 mg in 100 g muscle, respectively, these figures being larger in dried saury than in other dried fishes. (3) In canned fishes, 38 mg to 2,632 mg and 75 mg to 4,442 mg in 100 g contents were determined as EPA and DHA, respectively. These figures were varied with canning process, being higher in canned boiled saury than in canned roasted "kabayaki" saury.

Key words: eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, high performance liquid chromatography, fresh fish, dried fish, canned fish.

近年、魚油に含まれている二重結合が五つのエイコサペンタエン酸 (EPA) や二重結合が六つのドコサヘキサエン酸 (DHA) が注目されるようになった。それは1978年にデンマークの

---

\* 元研究所職員。

この論文は缶詰時報, Vol.74, No.11, 85-92 (1995) に掲載されたものである。

Dyerberg らによるグリーンランドのエスキモー人を対象とした疫学調査が発端である。即ちグリーンランドに住むエスキモー人が白人に比べて心筋梗塞や脳梗塞が少ない<sup>1)</sup>。その原因を調べた結果、彼らは n-6 系の脂肪酸と相互に変化できない n-3 系の EPA に富む海獣や魚を主食にしていることが判明した。以来 n-3 系の不飽和脂肪酸に関する医学、薬学研究が活発となり、循環器系疾患の改善、制がん、老化防止、抗アレルギー、老人性痴呆の予防、糖尿病の改善、記憶学習機能の増進など種々の薬理効果が動物実験で確認されている<sup>2)</sup>。

EPA, DHA の分析は従来ガスクロマトグラフィー<sup>3)</sup>によって行われていたが、最近、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)<sup>4)</sup>でも分析できることが報告されている。しかし、まだ十分ではない。

本報では HPLC により EPA, DHA を分析するために、その分析条件について検討し、次いで、生、干し魚及び魚類缶詰中の EPA, DHA 量を分析した。さらに、缶詰製造法による EPA, DHA 量の変動について調べた。

## 実験方法

### 1. 機器

HPLC は日立 L-6000、カラムは Nacalai Cosmosil 5C18-AR、検出器は日立蛍光光度計 F-1050 を用いた。

### 2. 試薬

EPA 及び DHA は Cascade Biochem Limited (England) 製、ADAM (9-Anthryldiazomethane) はフナコン(株)製、アセトニトリルは和光純薬(株)製クロマトグラフ用を、また、水は超純水を使用した。他の試薬は全て和光純薬(株)製の特級を使用した。

### 3. EPA 及び DHA の分析条件

EPA 及び DHA 25mg をそれぞれアセトンに溶解し、10ml にして保存液とした。この液を 1ml 採集し、アセトンで希釈して 5 $\mu$ g/ml 溶液を調製した。ADAM は 50mg をアセトンに溶解し、5ml にした (冷凍保存で 1 週間使用可能)。この液 1ml に酢酸エチルを加えて 10ml にした。EPA 及び DHA 各 5 $\mu$ g/ml と希釈した ADAM 液 1ml を 10ml のメスフラスコに採取し、栓をして 40 $^{\circ}$ C の恒温室に 60 分間保存してエステル化した。その後酢酸エチルを加えて 10ml にし、0.45 $\mu$ m のフィルターでろ過し、HPLC にかけて Table 1 の条件で EPA 及び DHA を分析した。

Table 1. Analytical conditions of EPA and DHA by HPLC.

---

HPLC system :	Hitachi L-6000 type
Detector :	Hitachi F-1050 (Ex 365nm, Em 412nm)
Column :	Nacalai Cosmosil 5C18-AR (15 $\times$ 0.6 cm ID)
Column temperature :	40 $^{\circ}$ C
Mobile phase :	Acetonitrile : Water = 9 : 1 (v/v)
Flow rate :	0.9 ml/min.
Sample volume :	10 $\mu$ l

---

#### 4. 試料

平成6年1月から7年4月に市販された生魚、干し魚及び魚類缶詰を用いた。

#### 5. 缶詰の製造方法

市販の冷凍サマを流水中で解凍し、頭、尾及び内蔵を除去し、洗浄後一部は約3cmの長さに切断し、15%食塩水に15分間漬け、水洗後ツナ2号缶に200g詰め、真空度40cmHgで密封した。また、一部は同様に切断後ツナ2号缶に200g詰め、100℃、35分間蒸煮し、脱水後2%食塩水を加えて内容総量を200gにし、同様に密封した。他は背開きし、ガスオーブンで両面を約5分間焼き、3cmの長さに切断し、ツナ2号缶に160g詰め、砂糖、しょうゆ、グルタミン酸モノナトリウムを混合した調味液を40g加えて、同様に密封した。それぞれの缶詰は静置式レトルトを用いて115℃、60分間加熱殺菌し、冷却した。

#### 6. 脂肪の定量

試料をホモジナイズし、常法に従ってソックスレーの脂肪抽出器を用いて定量した。

#### 7. 脂肪酸の抽出

試料をホモジナイズし、そのホモジネート100gを秤取し、2-3倍量のクロロホルム-メタノール(2:1 v/v)混液を加え、攪拌した後5000rpmで30分間遠心分離し、液部を分別した。残渣は同様に2回繰り返して抽出し、液部を集めてろ過し、分液ロートに入れ、クロロホルム層を分別した。分別したクロロホルム溶液に無水硫酸ナトリウムを約10g加えて脱水し、ろ過した。ろ液は窒素ガス通気下で40℃、減圧濃縮し、脂肪を得た。

脂肪1gをナス型フラスコに採取し、エタノール50ml、50%水酸化カリウム1ml、10%ピロガロール1ml加え、70℃、1時間還流下で加熱した。その後水50ml加え、6N塩酸でpH5-6に調整し、分液ロートに移し、石油エーテル80ml加え、300spmで20分間振盪し、石油エーテル層を分別した。水層は同様に石油エーテルで3回繰り返して抽出した後、石油エーテル層を集め、無水硫酸ナトリウム約10g加えて脱水し、ろ過した。ろ液は窒素ガス通気下で40℃、減圧濃縮した。濃縮物はアセトンに溶かし、一定量にした。

### 結果と考察

#### 1. HPLCによるEPA及びDHAの定量

EPA及びDHAのHPLCクロマトグラムはFig. 1に示したように、いずれも5ng/10 $\mu$ lの濃度で十分な高さのピークを示し、EPAは21-23分、DHAは24-26分の位置に溶出した。それぞれ5回測定した場合の変動係数はEPAは2.56%、DHAは2.44%であった。また、イワシ油のHPLCクロマトグラムはFig. 2のように、標準のEPA、DHAと同じ位置にピークを示した。

希釈したイワシ油に標準のEPA及びDHAを2.5-10mg添加した時の回収率は、前者93.0-108.9%、後者96.0-106.5%であり、両者とも添加量が少ない場合若干低く、添加量が多くなるに従って高くなる傾向が認められた。以上の結果からHPLCにより魚油中のEPA及びDHAの定量は可能と考えられる。

#### 2. 生魚肉中の脂肪、EPA及びDHA含量

生魚肉中100g中の脂肪、EPA及びDHA含量はTable 2に示したように、実験に用いたサバの脂肪含量は12月中旬のものが最も多く、6月中旬のものが最も少なかった。EPA含量は6月上

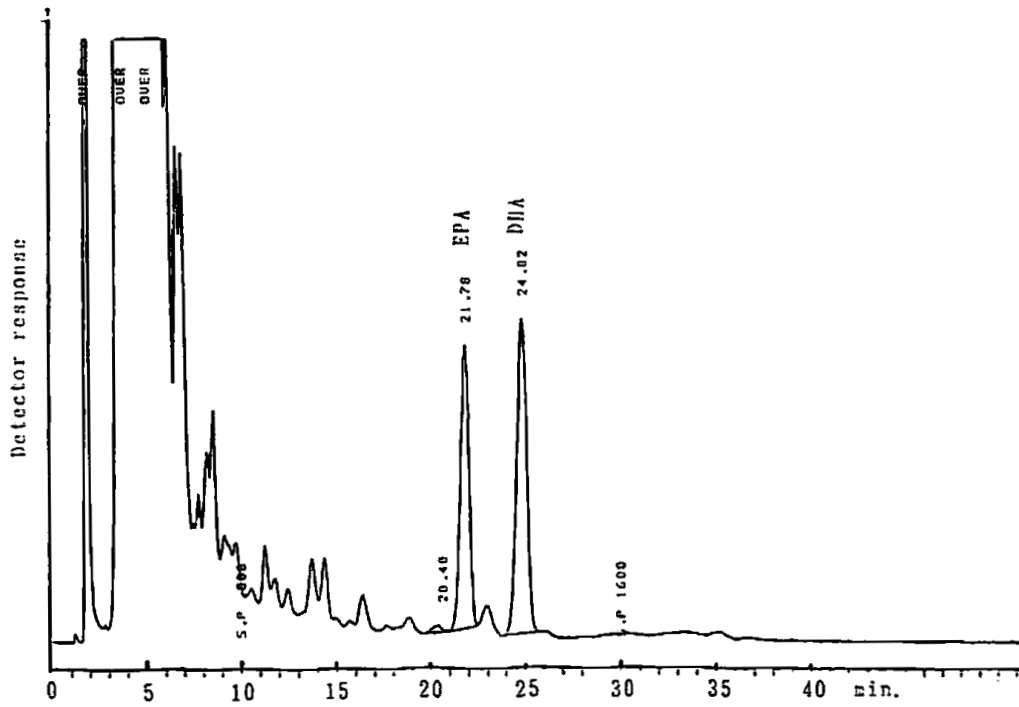


Fig. 1. Typical HPLC Chromatogram of EPA and DHA.

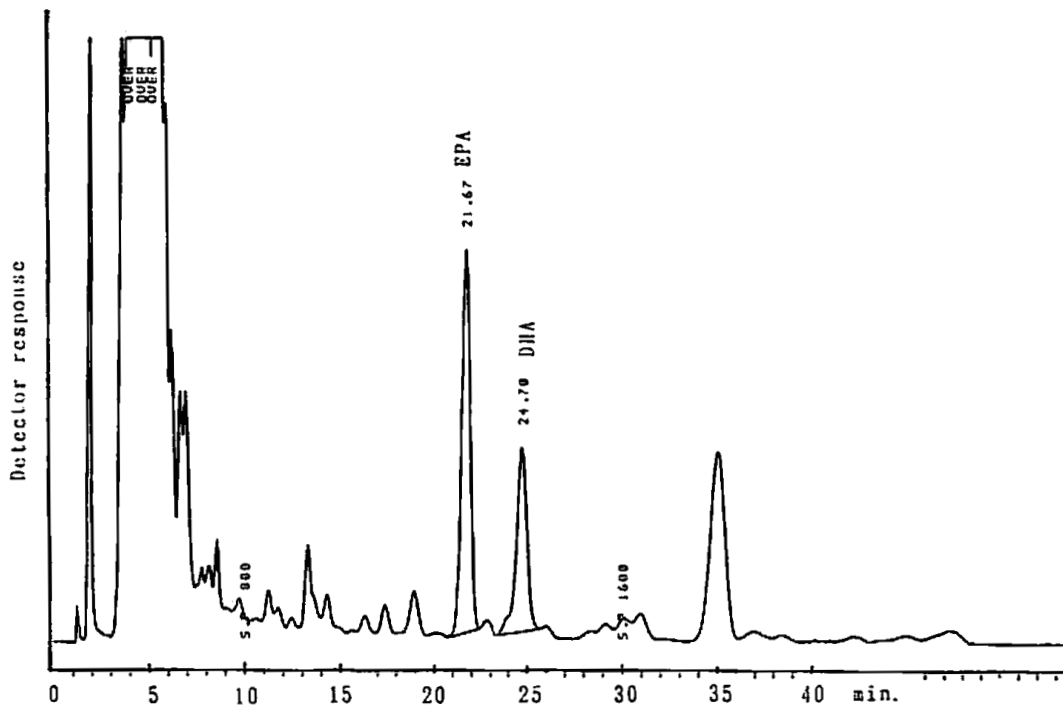


Fig. 2. HPLC Chromatogram of extracted sardine oil.

Table 2. Lipid, EPA and DHA contents in edible portion of raw fishes.

Raw fishes	Lipid (%)	EPA (mg/100g)	DHA (mg/100g)	Remarks	
Mackerel	13.6	3,332	1,768	6/3	33cm
Mackerel	6.8	755	1,346	6/15	33cm
Mackerel	25.1	904	2,159	10/19	38cm
Mackerel	29.0	1,798	4,698	12/13	38cm
Mackerel*	31.9	3,828	5,263	4/28	38cm
Sardine	15.6	3,822	2,028	6/3	25cm
Sardine	21.0	3,843	3,486	6/15	25cm
Sardine	15.5	729	1,938	10/7	25cm
Saury	27.6	3,422	4,140	8/26	34cm
Pink salmon	14.9	2,101	4,902	5/9	cut flesh
Yellowtail**	14.7	2,426	4,425	5/9	
Horse mackerel	2.2	163	554	8/17	15cm
Yellow fin tuna	0.77	31	178	11/8	cut flesh

\* Imported from Norway.

\*\* Garbage (head and backbone).

1) Month and day when sample was obtained.

2) Fish size (in length).

旬、DHA 含量は12月中旬のものが最も多く、それぞれ3,332mg, 4,698mgであった。6月中旬のやや小さく、脂肪の少ないサバはEPA, DHAともに少なかった。一般にサバ筋肉100gにはEPAは755-3,332mg, DHAは1,346-4,698mg含有していると考えられる。ノルウェー産のサバのEPA, DHA量はともに日本近海産のサバのこれらよりかなり多かった。

イワシの脂肪含量は6月中旬のものが最も多く、10月上旬のものが最も少なかった。EPA, DHA含量はともに脂肪含量が多い6月中旬のものに最も多く、脂肪含量の少ない10月上旬のものが最も少なかった。一般にイワシ筋肉100gにはEPAは729-3,843mg, DHAは1,938-3,486mg含有していると考えられる。

冷凍サンマは脂肪含量が約28%とかなり多く、EPA, DHA含量も3,422mg, 4,140mgであり、両者ともかなり多かった。

紅サケ切り身の脂肪含量は14.9%, EPA, DHA含量は100g当たりそれぞれ2,101mg, 4,902mgであり、DHAのほうがEPAより著しく多かった。これらの含量は部位によりかなり差があると考えられる。

ブリあらの脂肪含量は14.7%, EPA, DHA含量は100g当たりそれぞれ2,426mg, 4,425mgで両者とも多く、EPA, DHAの資源として利用できると考えられる。

一方、アジやキハダマグロは脂肪含量が少なく、それぞれ2.2%, 0.77%であった。そのために、両者の筋肉100g当たりのEPA, DHA含量はかなり少なかった。しかし、脂肪1g当たりのDHA含量は多く、アジでは252mg, キハダマグロでは231mgであった。

これらの値は矢澤ら<sup>5)</sup>の分析値より少し多いものも認められた。その原因は魚のサイズ、脂肪含量などの差によると考えられる。

### 3. 干し魚の脂肪, EPA 及び DHA 含量

市販の干し魚の脂肪, EPA 及び DHA 含量は Table 3 に示したように, 実験に用いた干し魚の脂肪含量はサンマ開き干しが最も多く19.85%, ウルメイワシが最も少なく5.82%であった。EPA, DHA 含量は脂肪量にほぼ比例しており, ウルメイワシ100 g当たりの EPA, DHA 含量はそれぞれ354mg, 751mgで, 最も少なく, またサンマ開き干しではそれぞれ3,573mg, 2,481mgで最も多かった。脂肪1 g当たりの EPA 含量はイワシ丸干しが最も少なく40mg, ムロアジ開き干しが最も多く115mgであり, いずれも生魚のそれより少なかった。一方, 脂肪1 g当たりの DHA 含量はイワシ丸干しが最も少なく85mg, ウルメイワシソフト干しが最も多く192mgであり, いずれも生魚のそれより若干少なかった。これらの結果から, 魚を乾燥すると DHA より EPA のほうがかなり酸化されやすいと考えられる。

Table 3. Lipid, EPA and DHA contents in dried fishes.

Dried fishes	Lipid (%)	EPA (mg/100g)	DHA (mg/100g)	Weight (g)
Sardine (maru-boshi)	8.84	354	751	3.5
Round herring (maru-boshi)	5.82	524	1,117	5.4
Mackerel scad (hiraki-boshi)	10.47	1,204	1,885	78.0
Saury (hiraki-boshi)	19.85	3,573	2,481	121.0
Herring (hiraki-boshi)	15.60	1,070	1,021	110.0
Capelin	17.09	1,685	1,453	14.4
Atka-mackerel (hiraki-boshi)	11.42	1,096	1,532	191.2

### 4. 市販缶詰中の脂肪, EPA 及び DHA 含量

市販缶詰の全内容物の脂肪, EPA 及び DHA 含量は Table 4 に示したように, 実験に用いたイワシ缶詰の脂肪含量は10.0-17.5%であり, 100 g中の EPA, DHA 含量はスープ煮に最も多く, それぞれ2,016mg, 1,944mgであった。味付では EPA, DHA 含量は818-1,860mg, 683-1,080mgであり, DHA より EPA のほうが多く含まれていた。

サバ水煮缶詰の脂肪含量は10.9-16.7%であり, EPA, DHA 含量はそれぞれ100 g当たり952-1,221mg, 2,126-2,221mgであり, イワシ缶詰とは反対に EPA より DHA のほうが多く含まれていた。

サンマ缶詰の脂肪含量は17.3-23.5%であり, EPA, DHA 含量はそれぞれ100 g当たり1,505-2,632mg, 2,232-4,442mgであり, かば焼缶詰には概して少なかった。その原因は魚を焼いている時, 脂肪が溶出, 落下したり, 酸化分解したためと考えられる。

缶詰中のこれらの値は, 平成4年度の大日本水産会の調査事業報告書<sup>6)</sup>に掲載されている値と, マグロ缶詰を除き, ほぼ類似している。

Table 4. Lipid, EPA and DHA contents in canned fishes.

Canned fishes	Lipid (%)	EPA (mg/100g)	DHA (mg/100g)	Can mark	
Seasoned sardine	17.5	1,208	683	SIK	931124
Seasoned sardine	10.0	1,860	1,080	SIK	931119
Seasoned sardine	13.2	818	884	TGKD	930804
Sardine in soup	14.4	2,016	1,944	TARA	930708
Boiled mackerel	16.7	952	2,221	TGKD	930708
Boiled mackerel	10.9	1,221	2,126	TJCFT	940415
Boiled saury	22.6	2,531	3,300	JNK	931007
Seasoned saury	23.5	2,632	4,442	JNK	920921
Roasted saury	18.9	1,814	2,759	JNK	931013
(kabayaki)					
Roasted saury	17.3	1,505	2,232	NGKZ	931020
(kabayaki)					
Boiled salmon	14.3	1,344	1,830	NGKZ	930729
Boiled nakabone	7.1	639	717	Miyako	931228
(salmon)					
Tuna in oil	20.8	42	166	INB	920623
Tuna in oil	18.8	38	75	G2	930727
Boild eyes	6.0	426	1,350	SGK	940219
(tuna)					

Table 5. The relationships between canning process of saury and lipid, EPA and/or DHA contents.

	Raw meat	Canned product		
		Boiled 1*	Boiled 2**	Kabayaki
Lipid : in solid (%)	27.64	28.45	27.20	18.02
in liquid (g)	—	1.20	1.87	9.80
EPA(mg/100g)	3,206	3,186	2,802	1,946
	<116>***	<112>	<103>	<108>
DHA(mg/100g)	4,146	3,182	3,427	2,307
	<150>	<134>	<126>	<128>

\* Boiled 1 : can packed with raw meat was sealed and then sterilized.

\*\* Boiled 2 : can packed with meat was steamed and drained drip and then sealed after addition of 2 % sodium chloride solution and sterilized.

EPA, DHA : content in solid.

\*\*\* < > : mg/1 g fat.

## 5. サンマの缶詰製造方法と脂肪, EPA 及び DHA 含量との関係

サンマを生詰と蒸煮法で水煮缶詰を, また焼いてかば焼缶詰を製造した場合の脂肪, EPA 及び DHA 含量は Table 5 に示したように, 生肉と比べると生詰法の水煮缶詰では脂肪含量は若

干増加していた。この原因は塩漬による脱水の影響と考えられる。EPA 及び DHA 含量はそれぞれ0.6%、8.1%減少していた。この原因は加熱による影響と考えられる。一方、蒸煮法による水煮缶詰では脂肪含量は1.6%減少しており、EPA 及び DHA 含量はそれぞれ12.6%、17.3%減少していた。この原因は蒸煮によって筋肉から出た脂肪を除去したためであろう。

かば焼缶詰では脂肪含量は34.8%減少し、EPA、DHA 含量はそれぞれ39.3%、44.4%は減少していた。サンマは焼くと脂肪が遊離しやすくなり、それを缶詰に加工すると脂肪の一部が液汁へ移行する。脂肪含量の減少に伴って EPA、DHA 含量も減少していた。このように、サンマ缶詰は製造方法により肉中の脂肪、EPA 及び DHA 含量に差が生じる。

### 要 約

HPLC により魚肉抽出油中の EPA、DHA を測定するために、その測定条件について調べた。HPLC は日立 L-6000、カラムは Nacalai Cosmosil 5C18-AR、移動相はアセトニトリル-水 (90:10 v/v) を用いた。検出は日立蛍光光度計 F-1050 を用い、Ex 365nm、Em 412nm の波長で行った。

EPA、DHA はそれぞれ21-23分、24-26分の位置に溶出した。イワシ油に添加した2.5-10mg の EPA、DHA の回収率はそれぞれ93.0-108.9%、96.0-106.5%、変動係数はそれぞれ2.56%、2.44%であった。

この HPLC で生魚、干し魚及び魚類缶詰中の EPA、DHA 含量を測定した結果、生魚の EPA は31-3,843mg、DHA は 178-5,263mg であり、両者とも赤身の魚のほうが白身の魚より多かった。干し魚では、EPA は354-3,573mg、DHA は751-2,481mg であり、両者ともサンマ開き干しに最も多かった。魚類缶詰では、EPA は38-2,632mg、DHA は75-4,442mg であり、両者ともサンマ缶詰に最も多かった。サンマをかば焼き缶詰にすると EPA、DHA 含量は水煮缶詰のそれらよりかなり減少した。

### 文 献

- 1) 熊谷 朗：EPAの医学，第1版 pp.21-23，中山書店，東京（1994）。
- 2) 食品と開発，26，No.4 pp.22-24（1991）。
- 3) 前田有美恵，石川雅章，山本正利：栄養・食糧，38，447-450（1985）。
- 4) 中島 滋，松下 至，土屋隆英：日水誌，59，1431（1993）。
- 5) 魚，80，13（1993）。
- 6) 高機能，高品質水産加工食品開発パイロット調査事業報告書，大日本水産会，pp.22-30（1993）。