

食品中のヒスタミン等不揮発性アミン類等の一斉分析法の検討

宇川夕子 伊藤志穂 大谷友香 望月美菜子 井上智 四宮博人

Studies on a rapid simultaneous analysis method for non-volatile amines such as histamine in foods

Sekiko UKAWA, Shion ITO, Yuka OTANI, Minako MOCHIZUKI,
Satoshi INOUE, Hiroto SHINOMIYA

Histamine food poisoning is an allergy-like food poisoning caused by the ingestion of fish containing unusually high levels of histamine generated due to improper temperature control. In order to promptly investigate the cause when food poisoning occurred, we studied a rapid simultaneous analysis method for non-volatile amines including histamine.

By using liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) coupled with hydrophilic interaction chromatography(HILIC) in isocratic elution mode, we could detect eight amines (histamine, agmatine, cadaverine, phenethylamine, putrescine, spermidine, tryptamine and tyramine) and an amino acid (ornithine) at the same time without derivatization. As the evaluation of the validity of this method is good, it is considered that the method can be used in rapid simultaneous analysis of non-volatile amines in foods.

Keywords : Histamine, non-volatile amines, HILIC, LC-MS/MS

はじめに

ヒスタミンをはじめとする不揮発性アミン類は、食品に含まれるアミノ酸が不適切な温度環境下で微生物による分解を受けて生成される物質(図1)で、食品腐敗の指標にもなっている。これらのアミン類は人体に対して様々な生理活性を持つが、特にヒスタミンは、高濃度に含有する魚類及びその加工品等を喫食した場合、発疹、顔面紅潮、頭痛等のアレルギー様症状を呈し、給食施設等における大規模食中毒の原因となっている。

ヒスタミン食中毒は、化学性食中毒の中では最も発生件数が多いが発症のメカニズムは不明な点が多く、単なる濃度依存ではなく他の不揮発性アミン類が共存することによりその作用が増強される¹⁾とも言われている。しかし、ヒスタミンについてはCodex, EU, 米国, カナダ等において水産物等における基準値が設定されているが、その他の不揮発性アミン類については基準値等は設定されてお

らずその含有実態はほとんど明らかにされていない。そのため、ヒスタミン等の不揮発性アミン類を同時に分析しこれらの物質の含有量を把握することが、ヒスタミン食中毒発生時に迅速な原因究明と被害拡大防止を図る上で重要である。

不揮発性アミン類の一斉分析法として、ダンシルクロライドで誘導体化し蛍光検出器付液体クロマトグラフで測定する分析法²⁾が知られているが、前処理が煩雑であり迅速性に欠ける。そこで、液体クロマトグラフィータンデム質量分析計(LC-MS/MS)を使用し、高極性物質の分離に適しているとされる親水性相互作用クロマトグラフィー(HILIC)による、ヒスタミン(Him)とその食中毒への関与が推測されている不揮発性アミン類(アグマチン(Agm), カダベリン(Cad), フェネチルアミン(Phm), プトレシン(Put), スペルミジン(Spd), トリプタミン(Tpm), チラミン(Tym))及びプトレシンの前駆アミノ酸であるオルニチン(Orn)の9物質を誘導体化せず測定を行う一斉分析法を検討し、その妥当性を評価したので報告する。

材料と方法

1 試薬・器具

標準品は、硫酸アグマチン、カダベリン二塩酸塩(食品分析用)、ヒスタミン二塩酸塩(食品分析用)、2-フェネチルアミン(特級)、プトレシン二塩酸塩(食品分析用)、スペルミジン(生化学用)、チラミン塩酸塩(食品分析用)、D,L-オルニチン二塩酸塩(特級)は和光純薬工業製、トリプタミン(analytical standard)はSigma-aldrich製を用いた。

その他0.1mol/L塩酸(容量分析用)、トリクロロ酢酸、ギ酸、ギ酸アンモニウム(以上、特級)、アセトニトリル、メタノール(以上、残留農薬・PCB試験用)は和光純薬工業製を用いた。

標準原液は、アミン類及びオルニチン標準品を0.1mol/L塩酸で溶解し、500µg/mLに調製した。各標準原液を適宜分取混合し、移動相溶媒で希釈したものを混合標準溶液とした。

精製水は超純水製造装置arium 611UV(ザルトリウス・メカトロニクスジャパン)により精製したものを使用した。

ろ過にはADVANTEC No.5A, PTFE製0.2µmシリンジレスフィルターMini-UniPrep(GCヘルスケア)を用いた。

2 装置

LC-MS/MSは、ACQUITY UPLC H-CLASS(LC)及びXevo TQD(MS/MS)(Waters)を用いた。ホモジナイザーはULTRA-DISPERSER(ヤマト科学)、遠心分離機はKUBOTA5200(久保田商事)を用いた。

3 測定条件

(1)LC条件

カラム; Waters製 UPLC ACQUITY BEH HILIC (2.1mmI.D. × 100mm, 1.7µm), カラム温度; 45, 移動相; 500mMギ酸アンモニウム(pH4.0):アセトニトリル:水:メタノール = 10:60:10:20, 流速; 0.2mL/min, 試料注入量; 2µL

(2)MS/MS条件

イオン化法; ESI(positive), キャピラリー電圧; 1.0kV, イオン源温度; 120, デソルベーションガス温度; 350, コーンガス流量; 50L/Hr, デソルベーションガス流量; 1000L/Hr, 測定モード; MRM, 各アミン類のMRM条件は表1のとおり。

4 試料

新鮮なマグロをフードプロセッサーで細切均一化したものを試料として用いた。

5 前処理方法

試料2.0gに20%トリクロロ酢酸2mL, 精製水20mLを加えて

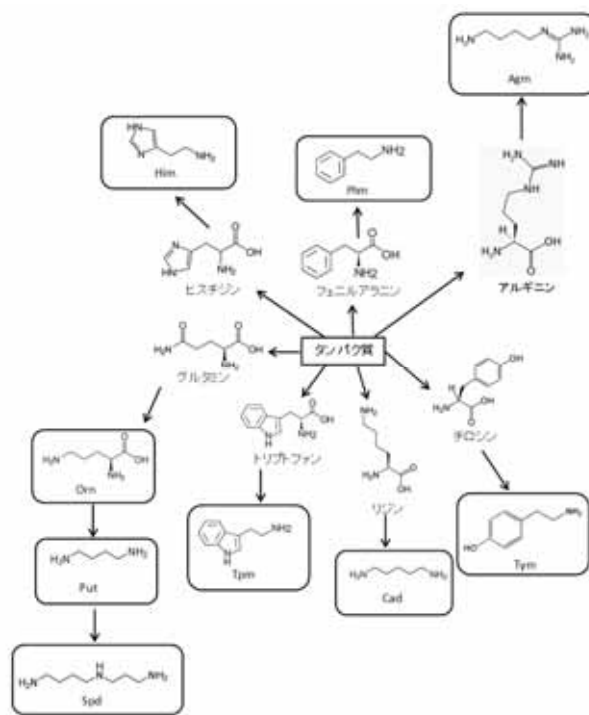


図1 不揮発性アミン類の生成過程

表1 MRM条件

	Cone (V)	Collision (eV)	モニターイオン
Agm	25	14	131.13 > 71.83
Cad	20	9	103.12 > 85.88
Him	25	11	112.09 > 94.88
Phm	20	11	122.10 > 104.90
Put	16	8	89.11 > 71.83
Spd	28	15	146.17 > 71.83
Tpm	20	10	161.11 > 143.99
Tym	19	9	138.09 > 120.94
Orn	19	14	133.10 > 69.81

ホモジナイズし、これに精製水10mLを加えて静置後遠心分離を行い、上清を分取し、精製水で50mLに定容した。この抽出液をろ紙を用いてろ過した後、移動相溶媒で適宜希釈しフィルターろ過した。

6 妥当性評価

「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」(平成19年11月15日付け食安発第1115001号)(以下、ガイドラインという。)に示された方法により、選択性、真度、併行精度及び室内精度を評価した。

なお、オルニチンについては試料中に含まれる成分であるが、他のアミン類と同様に妥当性評価を行った。

表2 移動相条件の検討

	A:500mMギ酸アンモニウム (pH4.0)		B:アセトニトリル		C:水		D:メタノール	
	10:60:30:0	10:70:20:0	10:80:10:0	10:60:20:10	10:60:10:20	10:60:0:30		
	ピーク形状	感度	ピーク形状	感度	ピーク形状	感度	ピーク形状	感度
Agm	×	×				×		
Cad	×	×				×		
Him								
Phm	×					×		
Put	×					×		
Spd							×	×
Tpm	×	×		×		×		
Tym	×	×						
Orn							×	×

結果及び考察

1 MS/MS測定条件の検討

イオン化法はLC/MS測定において汎用されているエレクトロスプレーイオン化(ESI)法を採用し、不揮発性アミン類等9物質の標準溶液フローインジェクション法により検討したところ、ポジティブモードで良好なイオン化が認められたため、ポジティブモードで印加電圧等の条件最適化を行い測定条件を決定した。

2 LCカラム及び移動相の検討

今回検討した9物質は、高極性塩基性化合物であるという共通点はあるものの、図1に示すとおりそれぞれの構造に大きな違いがあるため、それらを同時に保持し、良好な分析感度を得ることができるカラムを検討した。

ODSカラム、マルチモードカラム、HILICカラムに分類される6種類のカラムを用いて検討した結果、ODSカラムでは全てのアミン等を同時に保持させることが困難であり、マルチモードカラムではカラムに吸着して溶出しにくいアミンがあり良好な結果が得られなかった。HILICカラムのうちUPLC ACQUITY BEH HILICは、対象とした9物質全てを同時に保持し、良好に分離することができたため、以後の検討はこのカラムを使用して実施した。

移動相は、HILICで一般的に用いられているアセトニトリル/水系を用いて検討した。まず、500mMギ酸アンモニウム、アセトニトリル、水混液のアセトニトリル濃度を50~90%に変えて検討したが、いずれの濃度でもオルニチンのピーク形状が悪かったため、ギ酸を添加することで改善を図った。また、メタノールを加えることにより対象物質の保持の改善を図った。さらに、移動相の混合比率を検討した結果、表2に示すとおり、500mMギ酸アンモニウム (pH4.0) :アセトニトリル:水:メタノール = 10:60:10:20(アイソクラティック)の時にピーク形状、感度ともに全ての不揮発性アミン類等で良好な結果となった(表2)。図2に各アミン等

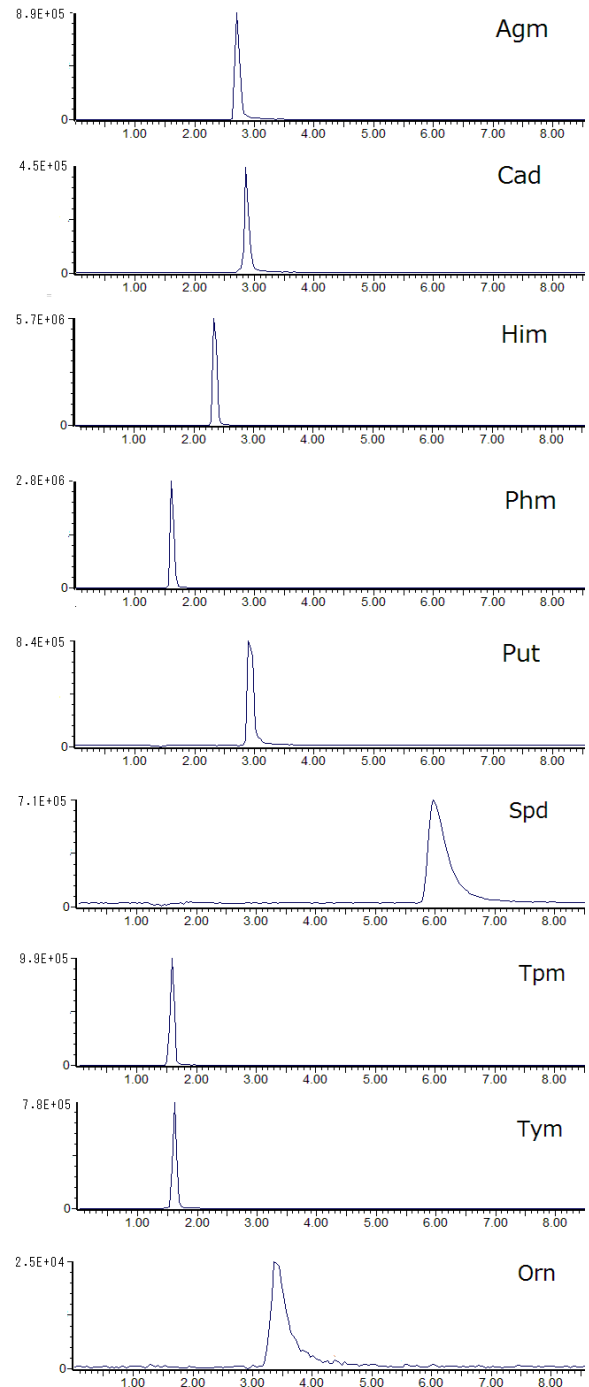


図3 各アミン類等標準品のクロマトグラム

表3 検量線の回帰式と決定係数

	回帰式	決定係数	範囲 (ng/mL)
Agm	y=1737.32x + 3914.50	0.9978	1-100
Cad	y=753.14x + 410.86	1.0000	1-500
Him	y=4084.37x + 5963.18	0.9967	1-200
Phm	y=2198.94x + 9542.57	0.9991	1-500
Put	y=1185.89x + 1137.29	0.9965	5-100
Spd	y=1973.78x - 7044.12	0.9984	5-500
Tpm	y=1327.62x + 13687.06	0.9994	1-1000
Tym	y=1161.94x + 4737.51	0.9968	1-200
Orn	y=30.56x - 582.44	0.9984	20-1000

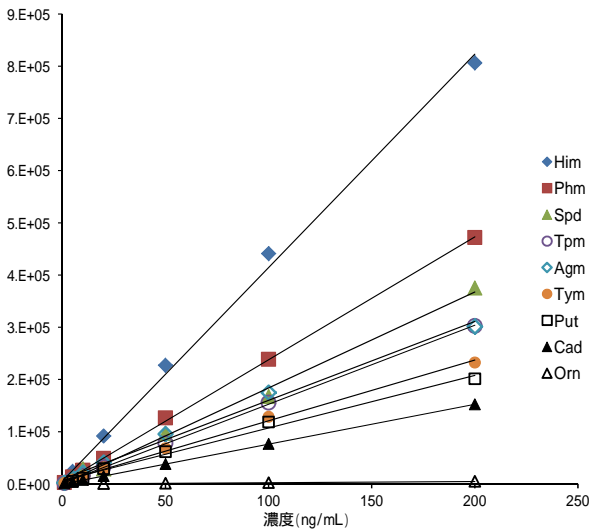


図3 各アミン等の検量線

標準品(100ng/mL)のクロマトグラフを示した。

3 検量線の検討

定量範囲を確認するため、混合標準溶液(各アミン等が1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000ng/mL)を本条件で測定した。表3に示すとおり、全ての物質について決定係数が0.9965以上と良好な相関を示した(表3)。図3に各アミン等の検量線を示した。この範囲は、ヒスタミンの無毒性量(50mg)³⁾の定量が可能であり、不揮発性アミン類等の一斉分析法として十分であると考えられる。

4 前処理法の検討

試験溶液の調製は、吉田らの報告⁴⁾を参考に均一化した試料をホモジナイズする際に20%トリクロロ酢酸を加えることで除タンパクを行った後、遠心分離、定容、ろ過し、移動相溶媒で希釈した。

サンプルマトリックスの影響を確認するため、試料抽出液に混合標準溶液を添加、希釈し測定を行ったところ、夾雑物によるピークはなく、保持時間、感度にも影響は見られなかったため本処理法を採用した。

5 妥当性評価

表4 妥当性評価結果

	Agm	Cad	Him	Phm	Put	Spd	Try	Tym	Orn
選択性	-	-	-	-	-	-	-	-	-
真度(%)	83.9	87.6	84.8	99.4	84.9	104.7	78.5	91.7	101.4
併行精度(RSD%)	1.71	2.56	2.31	6.80	1.14	3.38	2.16	1.82	5.53
室内精度(RSD%)	10.19	14.47	9.02	11.73	4.28	13.44	5.47	5.30	13.83
定量下限値(μg/g)	1	3	1	1	2	2	1	1	8

定量下限値はS/N=10として求めた。

試料2.0gに対して各アミン等を100μgずつ添加し、試験溶液の調製、測定を行い、2併行5日間の添加回収試験を行った。その結果を表4に示した。全てのアミン類で選択性、真度、併行精度、室内精度ともにガイドラインの判定基準を満たす良好な結果であった。また、オルニチンについても真度、併行精度、室内精度について良好であった。この結果から、本分析法が不揮発性アミン類の一斉分析法として妥当であると評価した。

まとめ

食中毒発生時に迅速な原因究明を行うためにヒスタミン、アグマチン、カダベリン、フェネチルアミン、プトレシン、スベルミジン、トリプタミン、チラミンの8種類の不揮発性アミン類及びプトレシンの前駆アミノ酸であるオルニチンの一斉分析法を検討した結果次のことが明らかになった。

- 1 今回検討した9物質全てがESI法のポジティブモードで選択性の高い検出が可能であった。
- 2 HILICカラムを用い、500 mMギ酸アンモニウム(pH4.0):アセトニトリル:水:メタノール=10:60:10:20混液移動相で再現性の良いアイソクラティックモードにより、9物質全てを良好に分離することができた。
- 3 マグロを試料として今回検討した分析法の妥当性を評価したところ、全ての不揮発性アミン等で良好な結果であり、本分析法が食中毒発生時の原因究明のためのスクリーニング法として有効であると考えられた。

なお、本研究は愛媛県立衛生環境研究所特別研究調査事業により行われたものである。

文献

- 1) 登田美桜ほか:国立医薬品食品衛生研究所報告127, 31-38(2009)
- 2) 日本薬学会編:衛生試験法・注解2005, 180-182(2005)
- 3) 食品安全に関するリスクプロファイルシート:農林水産省(2012)
- 4) 吉田達雄ほか:熊本県保健環境科学研究所報40, 20-24(2010)