

へしこ中のヒスタミン生成に関する研究（その1） ～不揮発性アミン類一斉分析法の検討～

土屋小百合・六戸部真里・柴田祐子・田中宏和

Studies on a Rapid Simultaneous Analysis Method for Non-volatile Amines in the Fermented Food
“HESHIKO”

Sayuri TSUCHIYA, Mari MUTOBE, Yuko SHIBATA, Hirokazu TANAKA

1. はじめに

へしこは福井県の郷土料理のひとつであり、秋から冬に豊富にとれたサバを室内で乳酸発酵させて作られる昔ながらの保存食である。現在では、保存食としての価値は少なくなったが、独特の風味や芳香が好まれ、嗜好品として食べられている。

ヒスタミンは、サバやイワシなどの赤身魚等に多く含まれるヒスチジンが微生物の働きにより脱炭酸されることで生成される。ヒスタミンを多く蓄積した食品を喫食すると、アレルギー様の症状を呈する食中毒を引き起こす。また、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ともいわれている¹⁾。糠発酵食品であるへしこについても、ヒスタミン食中毒が懸念される。そのため、当センターにおいても分析法の構築が求められる。

ヒスタミンを含む不揮発性アミン類の一斉分析法については、ダンシルクロライドで誘導体化した後に蛍光検出器付液体クロマトグラフで測定する分析法が、食品衛生検査指針に示されているが、前処理が煩雑であり迅速性に欠ける。そこで、迅速性に優れた LC-MS/MS を用いた分析法^{2) -4)} を検討した。

2. 方法

2. 1 試料

福井県内で製造または販売されているへしこ製品3検体を用いた。

2. 2 測定対象

測定対象とした不揮発性アミン類はアグマチン (Agm)、カダベリン (Cad)、ヒスタミン (Him)、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) の8種類とした。

2. 3 試薬等

標準品：アグマチン硫酸塩 (Trc Canada)、カダベリン二塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用)、ヒスタミン二塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用)、2-フェネチルアミン (富士フィルム和光純薬(株)、特級)、プトレシン二塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用)、スペルミジン (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用)、トリプタミン (Sigma-aldrich、analytical standard)、チラミン塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、食品分析用) を使用した。

混合標準原液：各標準品を0.1N塩酸に溶解し、1000ppm単体標準液を調製した。次に、この単体標準液を1 mL ず

つ正確に量り取り、移動相で全量10 mLとして100ppm混合標準原液を調製した。

移動相試薬等：アセトニトリル、メタノールおよびギ酸は、富士フィルム和光純薬(株)製の LC-MS/MS 用を、塩酸は富士フィルム和光純薬(株)の特級を、1mol/L ギ酸アンモニウムは富士フィルム和光純薬(株)製の HPLC 用を使用した。

2. 4 機材等

固相カラム：Sep-Pak Vac 6cc(500 mg)C18 Cartridges (Waters)

メンブランフィルター：DISMIC 13HP 0.20 μ m (アドバンテック東洋(株))

2. 5 装置および測定条件

装置：液体クロマトグラフ質量分析計 Prominence 20A/3200Q TRAP (株島津製作所/AB Sciex)

流速：0.4 mL/min

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

注入量：10 μ L

イオン化：ESI Positive (+)

MRM 条件：表1のとおり。

表1 MRM 条件

化合物名	Agm	Cad	Him
定量イオン	131.2>72.2	103.1>86.2	112.1>95.1

化合物名	Phm	Put	Spd
定量イオン	122.1>105	89.1>72.2	146.2>72.2

化合物名	Tpm	Tym
定量イオン	161.2>144.1	138.2>121.2

2. 6 分析カラムおよび移動相の検討

過去に報告されている方法^{2) -4)} を参考に不揮発性アミン類を同時に保持し、良好な分析感度を得ることができる分析カラムおよび移動相の条件を検討した。

検討した分析カラム：Xbridge BEH Hilic 粒子径 5.0 μ m、2.1mmi.d.×150mm (Waters)

検討した移動相：①A液：0.45%ギ酸 60mM ギ酸アンモニウム水溶液、B液：アセトニトリル、②500mM 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

2. 7 検量線範囲および定量限界の検討

検量線範囲を確認するため、混合標準溶液 (各不揮発性

アミン類が、0.1、0.3、0.5、5、10、20、50 ng/mL) を測定し、相関係数を算出した。ベースラインからの分離が明確に確認できた濃度を各不揮発性アミン類の最低濃度とした。

また、各不揮発性アミン類の検量線の最低濃度において、S/N 比を求め、検量線範囲内で定量が可能か確認した。

2. 8 前処理方法

過去に報告されている方法^{2),3)}を参考に以下の方法で実施した。フローを図1に示した。

凍結粉碎した試料 1.0g に精製水を加え、40mL に定容後、セラミックホモジナイザーを入れて5分間振とうした。次に、遠心分離 (3000rpm、5分間) し、上清 1mL を分取し、0.1%ギ酸アセトニトリル 4mL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、遠心分離 (3000rpm、5分間) し、上清 0.8mL を分取し、移動相を用いて 10mL に定容した。さらに、5mL をメタノール 6mL、60%アセトニトリル水溶液 6mL の順でコンディショニングした C18 固相カラム (500mg/6mL) に負荷し、移動相 4mL で洗浄後、移動相を用いて 10mL に定容し、0.20 μ m のメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

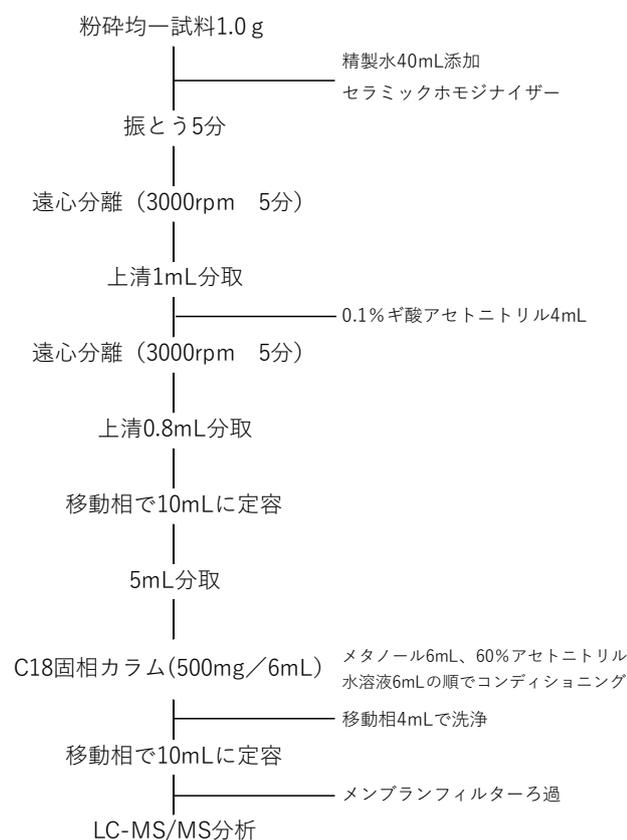


図1 分析法フロー

2. 9 マトリックス効果の検証

へしこ製品中に含まれる夾雑成分の影響が懸念されることから、マトリックス効果の検証を行うこととした。

予め不揮発性アミン類が含まれていないことを確認した試料3検体について、図1に示す方法で調製した試験溶液に混合標準液を 20ng/mL となるように添加し、添加濃度と定量値の比を算出し、検証した。

2. 10 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) に準じて、真度、併行精度および室内精度を評価した。

予め不揮発性アミン類が含まれていないことを確認した試料に試料中濃度 100 μ g/g になるよう混合標準溶液を添加した試料を用いた。検査者 1 名が添加試料を 1 日 2 併行、5 日間繰り返し測定した。

3. 結果および考察

3. 1 分析カラムおよび移動相

不揮発性アミン類は、高極性塩基性化合物であり、それぞれの構造は大きく異なる。先行事例²⁾⁻⁴⁾でも使用されていた親水性クロマトグラフィーである HILIC カラムを用いて測定したところ、良好に分離できたため、このカラムを使用することとした。

移動相は、まず、A 液に 0.45%ギ酸 60mM ギ酸アンモニウム水溶液、B 液にアセトニトリルを用いた方法、同 A 液および B 液を用いてグラジエントを行う方法を検討したが、すべての不揮発性アミン類のピークは確認できなかった。そのため、宇川らの報告⁴⁾に示される 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) で測定したところ、すべての不揮発性アミン類が良好に分析できた。以上から、500mM ギ酸アンモニウム (pH 4.0): 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) が適当であると判定された。

3. 2 検量線範囲および定量限界

Agm、Cad、Him および Tpm は 0.1~50ng/mL、Phm は 0.3~50ng/mL、Put、Spd および Tym は 5~50ng/mL の範囲で相関係数 0.995 以上の良好な直線性が得られた。その結果を表2に示した。

また、すべての不揮発性アミン類の検量線の最低濃度において、S/N 比を求めたところ、すべて S/N \geq 10 を満たしており、検量線の範囲内で定量が可能であることが確認された。

表2 検量線範囲・直線性

	相関係数	定量限界濃度のS/N比	範囲 (ng/mL)
Agm	1.0000	30.9	0.1-50
Cad	0.9999	20.8	0.1-50
Him	0.9997	150	0.1-50
Phm	0.9997	10.7	0.3-50
Put	1.0000	25.5	5-50
Spd	0.9997	81.0	5-50
Tpm	0.9999	11.6	0.1-50
Tym	0.9999	17.8	5-50

3. 3 マトリックス効果の検証および対策

マトリックス効果の検証結果を図2に示した。すべての不揮発性アミン類において70~110%となり、マトリックスの影響は低いと考えられた。ただし、Himについては、75~76%と低く、他の不揮発性アミン類に比べ、マトリックスの影響を受けやすいと考えられた。

Him についてのマトリックス効果対策として、試験溶液を移動相を用いて2倍に希釈して測定したところ、Himの回収率は107~111%となり、マトリックス効果の低減が確認された。そのため、Him については、試験溶液を2倍希釈して測定することが適当と判断した。

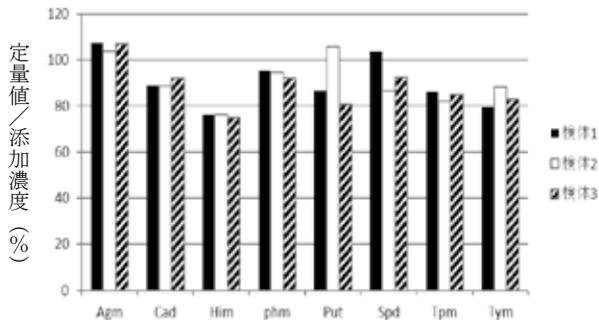


図2 マトリックス効果検証結果

3. 4 妥当性評価

妥当性評価の結果を表3に示した。真度は75.3~108.1%、併行精度は2.4~9.1%、室内精度は2.8~11.8%となり、すべての不揮発性アミン類で、真度、併行精度および室内精度について、良好な結果となった。

表3 妥当性評価結果

	真度 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)
Agm	104.5	2.4	2.8
Cad	88.1	5.7	6.7
Him※	108.1	3.4	4.8
Phm	91.5	4.5	4.6
Put	91.4	9.1	9.4
Spd	105.7	6.6	11.8
Tpm	75.3	4.8	5.5
Tym	75.9	8.5	11.4
ガイドライン 目標値	70~120	10未満	15未満

※Himについては試験溶液を2倍希釈し測定

4. まとめ

糠発酵食品であるへしこ中に含まれる不揮発性アミン類の一斉分析に適用できる方法を検討した。

LC-MS/MSにてHILICカラムを用い、500mMギ酸アンモニウム (pH 4.0) : アセトニトリル : 水 : メタノール

=10 : 60 : 10 : 20 混液移動相を用いたアイソクラティック分析により、不揮発性アミン類8物質を良好に分析することができた。

また、C18固相カラムを用いた精製工程を含む一斉分析法で妥当性評価を行ったところ、測定対象とした不揮発性アミン類全てにおいて、選択性、真度、併行精度および室内精度について、ガイドラインの判定基準を満たす良好な結果が得られた。

以上から、本報で評価検討した分析法は、へしこ製品の汚染実態調査に十分活用できると判断された。また、本分析法は、食品衛生検査指針に示された方法より簡便で分析時間の短縮化が図れることから、ヒスタミン食中毒が疑われる健康危害発生時に迅速に原因を特定する上で有効であると考えられた。

参考文献

- 1) 井部明弘：発酵食品に含まれるアミン類，東京都健康安全研究センター研究年報，55，13~22（2004）
- 2) 瀧澤裕，千葉美子，高橋美保：LC/MS/MSを用いた不揮発性アミン類分析法の妥当性評価，宮城県保健環境センター年報，33，81~82（2015）
- 3) 茶屋真弓，穂積和佳，岩元由佳，原田卓也，吉田純一：LC/MS/MSによる不揮発性アミン類の迅速分析法の検討と鮮魚中のヒスタミン産生菌の分離について，鹿児島県環境保健センター年報，19，56~63（2018）
- 4) 宇川夕子，伊藤志穂，大谷友香，望月美菜子，井上智，四宮博人：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，愛媛県立衛生環境研究所年報，20，6~9（2017）