

健康危機管理に対応した食品中の不揮発性アミン類分析の検討

花石竜治 山本明美

健康危機管理に対応した、食品中の不揮発性アミン類の分析法を検討した。抽出、誘導体化法については、著者らの既報と同様とし、本研究では、高速液体クロマトグラフ(HPLC)条件を改良し、ヒスタミン、チラミン、プトレシン、カダベリン、スペルミジンの 5 種アミン類について分離条件を検討した。これらのフルオレスカミン誘導体の HPLC 分析において、C18 の逆相カラムに高 pH 条件の移動相を用いたところ、スペルミジンと魚介類の腐敗指標とされるアミン類 4 物質とが分離し、検査が可能となった。また、久保田ほかの既報の精製法を適用して添加回収試験を行ったところ、十分な回収率と繰り返し精度が得られた。以上から、本方法が健康危機管理対応の方法として有用であることが示された。

Key words: health risk management, non-volatile amines, fluorescamine, solid phase extraction, HPLC

1. はじめに

食中毒事案のうち化学性食中毒に分類される不揮発性アミン類(Non-volatile amines, NVA)中毒は、主にヒスタミン(Him)が原因物質である¹⁾。よってこれらの NVA のうち、Him 検査の方法を確立することは、最も重要といえる。

Him は、Him 受容体などに作用し、血管拡張作用を有し、神経毒性を持つとされる^{2,3)}。また、それ以外の NVA のプトレシン(Put)およびカダベリン(Cad)は、それら単独の毒性は未知ではあるが、Him と共存した場合に、その毒性を増強させるとされている³⁾。また、チラミン(Tym)は、各種の神経伝達物質と類似の分子構造を持ち、神経毒性を有するとされている^{2,3)}。

欧米等では Him で基準値が定められている³⁾ほか、魚介類の腐敗指標として生体アミン指標(Him+Tym+Put+Cad)が提案されている⁴⁾。Him が食中毒に関わる NVA のうち最も重要であるが、毒性を持ち、生体アミン指標を構成する NVA の検査法を確立し、食中毒事案発生という健康危機管理に対応した方法として整備することが望まれる。

著者らは、昨年度、Him 検査法として妥当性評価がなされた菊地ほかの方法⁵⁾を応用し、健康危機管理に対応する迅速な検査法を報告した⁶⁾。しかし、この方法は Him 検査に特化したものであり、NVA を幅広く検査対象とするものではなかった。

NVA のうち生体アミン指標を構成する 4 種(Him、Tym、Put、Cad)については、久保田ほか⁷⁾が高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による検査法を確立した⁷⁾。

そこで、本研究で著者らは、久保田ほかの方法を基礎として、生体アミンの一種として観測されるスペルミジン(Spd)も加え、5 種の NVA について、まず HPLC の分離条件を検討した。図 1 にこれらの NVA の分子構造を示す。

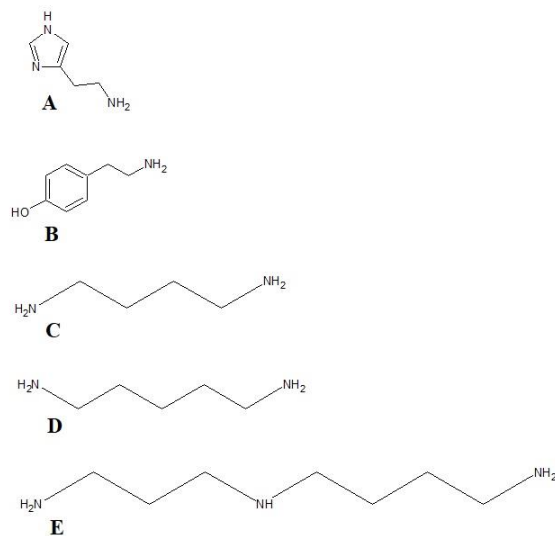


図 1 不揮発性アミン類(NVA)の分子構造。A: Him、B: Tym、C: Put、D: Cad、E: Spd。

NVA 検査法としては、Spd を除いた Him、Tym、Put および Cad をターゲットとし、添加回収試験を実施した。

Him のみを対象とした著者らの既報⁶⁾では、精製操作において、強陽イオン交換樹脂カートリッジを C18 カートリッジの後段にタンデムで装着し使用したが、本研究では久保田ほかの方法にならない、別種の強陽イオン交換樹脂カートリッジを単一で使用して、健康危機管理対応検査法として検討したので、報告する。

2. 材料および方法

2.1 試料

試料は青森市内のスーパーマーケットで購入したアジフライ、イワシ丸干しおよびサバ缶詰(味噌煮)を用いた。試料は包丁で細砕し、フードプロセッサを併用して均質化した。分析まで -20 °C で保存した。

2.2 試薬など

ヒスタミン二塩酸塩、チラミン塩酸塩、プトレシン二塩酸塩、カダベリン二塩酸塩、フルオレスカミン、トリクロロ酢酸(TCA)は、富士フィルム和光純薬製を用いた。スペルミジン三塩酸塩は、関東化学販売品を用いた。これらのうち、標準品は試薬特級、またはそれ以上のグレードのものを使用した。そのほかの試薬は、HPLC グレードまたは試薬特級に準じたものを用いた。また、膜ろ過フィルタは、Whatman 社 Syringe filter poresize 0.2 μm (PVDF 製)を用いた。水は超純水を用いた。

標準原液:NVA 塩酸塩を 0.1 mol/L 塩酸に溶かし、各アミン類として 5,000 μg/mL の溶液をそれぞれ調製した。

混合標準溶液 (Spd を除く) : Spd 以外の 4 種類の NVA の標準原液をそれぞれ 1 容積取り、0.1 mol/L 塩酸で 5 容積に希釈し、各 NVA の 1,000 μg/mL 溶液とした。

検量線用混合標準溶液 : 混合標準溶液 (Spd を除く) を適宜、0.1 mol/L 塩酸で希釈し、0.05 μg/mL から 5 μg/mL までの検量線用混合標準溶液を調製した。

0.1 mol/L リン酸塩緩衝液(pH 6.8) : リン酸二水素ナトリウム二水和物 7.80 g とリン酸水素二ナトリウム十二水和物 17.90 g を水に溶解し、1,000 mL とした。

0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 : 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 1 容積に水を加えて 5 容積に希釈し、調製した。

0.2 mol/L ほう酸塩緩衝液(pH 9.0) : ほう酸 2.47 g を水 170 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液

を滴加し pH 9.0 に調整し、水を加えて 200 mL とした。

5 % TCA : TCA 5.00 g を水に溶解して 100 mL とした。

0.3 %フルオレスカミン溶液 : フルオレスカミン 30 mg をアセトンに溶解し、全量を 10 mL とした。

0.02 mol/L 酢酸アンモニウム・アンモニア水緩衝液 (pH 9.0) : 酢酸アンモニウム 1.54 g を水 800 mL に溶かし、アンモニア水(1→10)を滴加して、pH 9.0 に調整し、水を加えて 1,000 mL とした。

0.1 mol/L 塩酸 : 塩酸 1 mL に水を加えて 120 mL とした。

1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 : 水酸化ナトリウム 4.00 g を水に溶かして 100 mL とした。

0.1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液 : 炭酸ナトリウム(無水) 1.07 g を水に溶かして 100 mL とした。

固相カートリッジ : ジーエルサイエンス社 強陽イオン交換樹脂ミニカラム InertSep MC-1、250mg/6mL を用いた。

pH 試験紙 : Advantec 社 Test paper UNIV pH 1-11 を用いた。

ろ紙 : Advantec 社 5A(110 mmφ)を用いた。

2.3 装置

HPLC : 島津製作所 Prominence シリーズ (蛍光検出器 RF-20XAS)

ホモジナイザ : IKA 社 T25DS1

ボルテクスミキサ : Scientific Industries 社 VORTEX-GENIE 2

遠心分離機 : 久保田商事 ユニバーサル冷却遠心機 5930

超音波洗浄機 : ブランソン社 卓上型超音波洗浄機 CPX3800-J

pH 計 : 堀場製作所 卓上形 pH 計 F-71

2.4 測定条件

カラム : ジーエルサイエンス社 InertSustain C18 (内径 4.6 mm、長さ 150 mm、粒径 5 μm)、移動相 : A 液 : 0.02 mol/L 酢酸アンモニウム・アンモニア水緩衝液 (pH 9.0)、B 液 : アセトニトリル、グラジェント条件 : 0 分 (A:B=75:25) → 2.5 分 (A:B=68:32) → 8.0 分 (A:B=68:32) → 10.0 分 (A:B=20:80) → 12.0 分 (A:B=20:80) → 12.01 分 (A:B=75:25) → 16.0 分 (A:B=75:25)、流速 : 1.0 mL/min、カラム温度 : 40 °C、検出器波長 : 励起波長 ; 390 nm、蛍光波長 ; 480 nm、注入量 : 20 μL、サンプルクーラー温度 : 4 °C

2.5 試験溶液の調製

抽出および蛍光誘導体化操作は、菊地ほか⁵⁾ および著者らの既報⁶⁾ によった。ただし、抽出は既報⁵⁾ からスケールダウンして行った。

また精製操作は、久保田ほか⁷⁾ によった。

(1) 抽出

均質化した試料 5 g を 50 mL 遠沈管に秤り取り、5 % TCA 20 mL を加えて、1 分間ホモジナイズした。これを 4 °C、毎分 3000 回転で 10 分間遠心分離した。上清はろ紙 5A でろ過し、ろ液を 50 mL メスシリンダに取った。遠沈管中の残渣には 5 % TCA 20 mL を加えて攪拌し、5 分間、超音波洗浄機で超音波処理した。これを上記条件で遠心分離して、その上清を同じろ紙でろ過し、ろ液を 50 mL メスシリンダに合わせて入れ、5 % TCA を加えて 50 mL に定容し、粗抽出液とした。

粗抽出液を 0.5 mL 取り、130 μ L の 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で中和し、次に 4.5 mL の 0.02 mol/L リン酸塩緩衝液を加えて負荷検液とした。負荷検液について、pH 試験紙で pH が約 7 であることを確認した。

負荷検液全量について、次の精製操作を行った。抽出操作のフローを図 2 に示す。

(2) 精製

固相カートリッジに、メタノール、水、0.02 mol/L リン酸塩緩衝液の各 5 mL をこの順に通液してコンディショニングを行い、その後、負荷検液を全量負荷した。次いで、0.02 mol/L リン酸塩緩衝液 5 mL で洗いこみ、水、メタノール、水を順次、それぞれ 5 mL 通液し、洗浄した。

最後に 4.5 mL の 0.1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液で目的物を溶出し、溶出液を 31.3 μ L のぎ酸を入れた目盛り付き試験管に採取した。これに 0.1 mol/L 炭酸ナトリウム溶液を加えて 5 mL とし検液とした。検液について、pH 試験紙で pH が約 4 であることを確認した。

精製操作のフローを図 3 に示す。

(3) 蛍光誘導体化

検液を 50 μ L 取り、2 mL の 0.2 mol/L ほう酸塩緩衝液(pH 9.0)に加えて、さらに 0.3 %フルオレスカミン溶液 200 μ L を加え、直ちにボルテクスミキサで 20 秒間攪拌した。この溶液を膜ろ過フィルタでシリンジろ過し、HPLC 用検液とした。

蛍光誘導体化操作のフローを図 4 に示す。

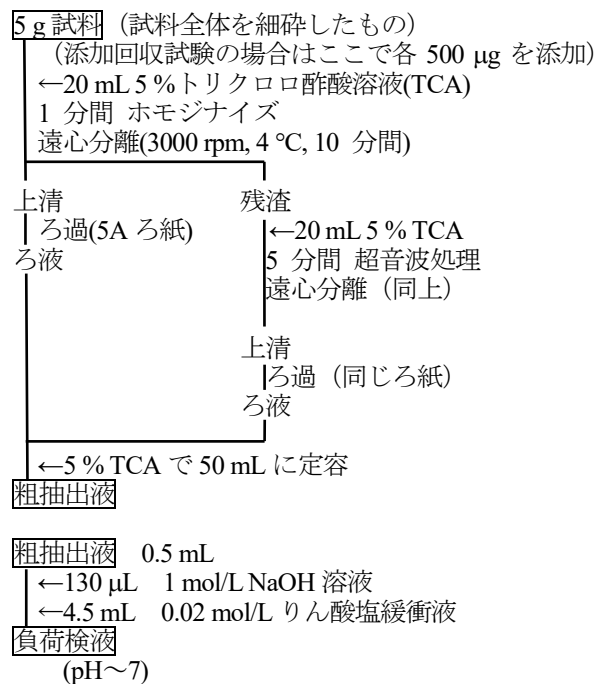


図 2 抽出操作のフロー

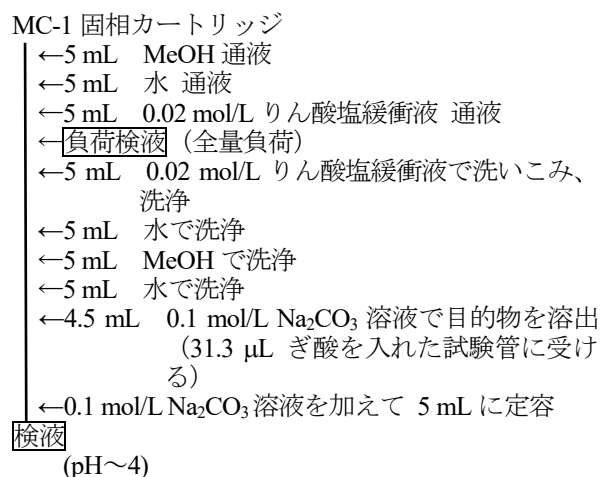


図 3 精製操作のフロー

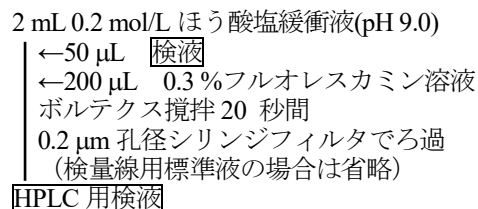


図 4 蛍光誘導体化操作のフロー

(4) 添加回収試験

試料 5 g に対して、アミン類濃度が各 100 μ g/g となるように、1,000 μ g/mL 混合標準溶液 (Spd を除く) を 0.5 mL 添加し、(1) の操作から前処理を行った。

ただし、アジフライは、試料中に水分が乏しかったため、5 % TCA 抽出液で湿潤してから混合標準溶

液 (Spd を除く) を添加して、(1) の操作から前処理を行った。

2.6 HPLC 測定

検量線用混合標準溶液について、前項の誘導体化操作を行い、HPLC 分析を行った。なお、膜ろ過フィルタによるシリンジろ過は省略した。各標準溶液について得られたピーク面積値から回帰直線の検量線を作成した。

検量線上の下限については、 $s/n = 10$ 以上となることを、検量線最低濃度とした。

得られた検量線パラメータと検液のピーク面積値から検液中の NVA 濃度を決定し、試料中の含有量を求めた。

3. 結果

3.1 HPLC 条件の検討

図 5(a), (b) に、久保田ほかの方法⁷⁾ の条件により得られた HPLC クロマトグラム、および本研究の条件検討で決定した HPLC 条件により得られた HPLC クロマトグラムを、それぞれ示す。

久保田ほかの条件では、Put と Spd のピークが重なるが、本研究の条件では、Spd のピークが二山形になるものの、その他の NVA 由来のピークと分離した。

3.2 実試料およびその添加検体の HPLC クロマトグラム

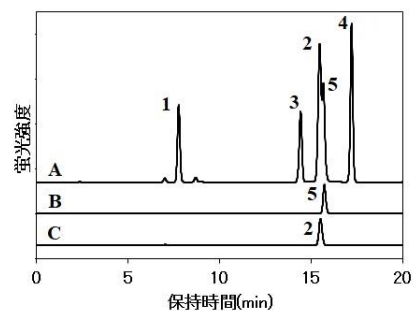
アジフライ、イワシ丸干しおよびサバ缶詰 (味噌煮) についての無添加 (SPBL) および 100 $\mu\text{g/g}$ 添加 (Spiked) の HPLC クロマトグラムを図 6(a)-(c) に示す。

3.3 検量線濃度範囲の決定

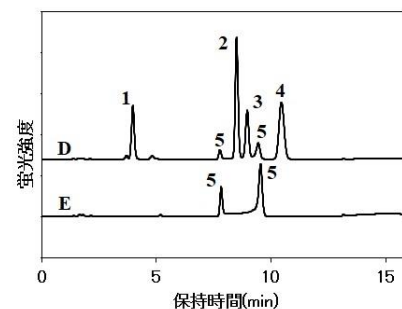
Him を除く 3 種類の NVA の検量線範囲を、検液の濃度で 0.05 $\mu\text{g/mL}$ から 5 $\mu\text{g/mL}$ とした。この濃度範囲は、検体中の含有量として 5 $\mu\text{g/g}$ から 500 $\mu\text{g/g}$ に対応する。Him については、検量線範囲を、検液の濃度で 0.1 $\mu\text{g/mL}$ から 5 $\mu\text{g/mL}$ とした。この濃度範囲は、検体中の含有量として 10 $\mu\text{g/g}$ から 500 $\mu\text{g/g}$ に対応する。

3.4 添加回収率の真度と繰り返し精度

アジフライ、イワシ丸干しおよびサバ缶詰 (味噌煮) について、本報告の添加回収試験 ($n=5$) を行い、表 1 に示す結果を得た。



(a) 久保田ほかの方法



(b) 本研究の方法

図 5 本研究により分離が改善した標準液の HPLC クロマトグラム。A、D : 5 種混合、B、E : Spd 単品、C : Put 単品。ピーク帰属 1: Him、2: Put、3: Tym、4: Cad、5: Spd。

4. 考察

4.1 本研究で検討した検査法の HPLC 分析条件について

本研究では、蛍光検出 HPLC の分離カラムおよび移動相を、久保田ほかの既報⁷⁾ から変更した。

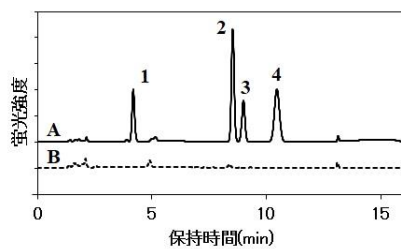
図 5 に示したように、本研究の方法では、アミン類の一種としてしばしば分析対象となるが生体アミン指標ではない Spd 由来ピークによる Put 由来ピークへの重なりを回避できた。

なお、本方法では、使用した移動相が高 pH であることから、それに耐えうる分離カラムを使用した。

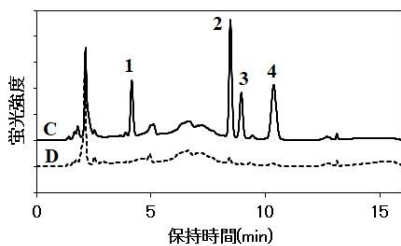
4.2 適用する検体の範囲

菊地ほかの妥当性評価までを含めた Him 分析法⁵⁾ では、特にサンプルとしてイワシ丸干しを用いた場合、TCA 抽出液を水酸化ナトリウムで中和する際に白濁が生じ、後段の固相カートリッジ精製に支障が出るため、遠心分離により懸濁物を沈降分離する必要があるとされた。

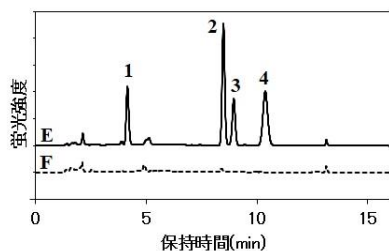
本方法では、その方法に比べて、TCA 抽出液の使用量を 10 分の 1 にし、中性緩衝液での希釈液量を 2 分の 1 にしたが、白濁は生じなかった。



(a) アジフライ



(b) イワシ丸干し



(c) サバ缶詰 (味噌煮)

図6 実試料に対する標準品の添加および無添加の場合の HPLC クロマトグラム。A, C, E: 添加 (Spiked 100 $\mu\text{g/g}$)、B, D, F: 無添加 (SPBL)。ピーク帰属 1: Him、2: Put、3: Tym、4: Cad。

本研究の方法は、抽出液の希釈率を高めた方法であり、中和時の沈殿生成を回避できたと考えられた。

4.3 定量下限とアミン類の海外での基準

本方法の Him の定量下限 10 $\mu\text{g/g}$ は、著者らの既報⁶⁾ の Him 単独の検査法の定量下限の 20 $\mu\text{g/g}$ を下回り、既報の検査法に比べて、より確からしく検査を行いうることが示された。

著者らが既報⁶⁾ で述べたように、Codex 委員会は、魚介およびその加工品の Him 濃度が 20 mg/100 g (=200 $\mu\text{g/g}$) を超えないことを基準としている⁸⁾。本方法の定量下限は、その基準値の 20 分の 1 であり、十分に、要求される精度で検査結果を与えるものと考えられた。

4.4 実試料への標準品無添加および添加でのクロマトグラム

図6に示したとおり、(a) アジフライおよび (c) サバ缶詰 (味噌煮) では、精製操作を経て得られた HPLC 用検液の HPLC クロマトグラムは、目的の NVA 以外のピークは小さく、また妨害もなかった。

また (b) イワシ丸干しでは、クロマトグラムのベースラインが変動したが、4種類の NVA については、妨害ピークがなく、定量に問題はなかった。

これらの検討結果から、本方法は、種々の検体に適用できることが期待される。

4.5 実試料での回収率と繰り返し精度

表1に示したとおり、回収率は、すべてのサンプルで4種類の NVA について、70%以上であった。

本方法は、健康危機管理対応の検査法として検討しており、分析法の性能基準を、「加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法」⁹⁾ の基準から引用すると、50%から200%の範囲となる。よって、本方法は健康危機管理対応の方法として性能基準を満たすと判断された。

また、繰り返し精度はすべてのサンプル、4種類の NVA について、変動係数 CV% (RSD%) が4%未満であった。

分析法の性能基準⁹⁾ には、RSD% < 30% と規定されており、本研究で得られた繰り返し精度はこの基準を満たすものであった。

4.6 実験の操作性と所要時間

固相カートリッジを二連でタンデムに連結して使用する著者らの既報⁶⁾ の方法でも、精製操作の分析時間は短縮されたが、本方法では、使用する固相カートリッジは1個であり、圧力損失の影響が少なく、単に陰圧にすることにより通液が可能であり、操作性に優れた。

本方法の分析の所要時間は、1名で検体数6個を分析した場合、抽出操作に1時間30分、精製操作に40分間、誘導体化および後処理に20分間を要し、抽出から HPLC までの所要時間は約2時間30分であった。

また、本方法では HPLC の1注入の所要時間が16分間のため、著者らの既報⁶⁾ より短時間で4種の NVA を判定可能となった。

5. 結論

本研究では、魚介およびその加工品中の NVA 4種

表 1 添加回収試験結果 (n =5)。RR% : 平均回収率、RSD% : 繰り返し精度。

物質名 項目	Him		Tym		Put		Cad	
	RR%	RSD%	RR%	RSD%	RR%	RSD%	RR%	RSD%
アジフライ	81.3	2.34	77.7	2.01	81.4	2.84	80.5	3.28
イワシ丸干し	85.0	3.18	82.2	2.91	85.5	3.33	84.0	3.10
サバ缶詰 (味噌煮)	89.5	0.88	85.8	1.38	85.9	1.61	85.3	1.95

についての一斉分析法を検討した。その結果、以下の知見が得られた。

- 1) HPLC 条件を改良し、魚介類の腐敗指標として提案されている生体アミン指標の Him、Tym、Put、Cad の分離がよい条件とした。
- 2) 最も分析が困難とされる検体であるイワシ丸干しについても、定型の分析方法で支障が出ることはなかった。このことから、本方法は、数多くの種類の検体に適用できる分析法と期待される。
- 3) 添加回収試験結果と分析所要時間から、本方法は、健康危機管理対応の検査法として適当であると考えられた。

文 献

- 1) 登田美桜他:国内外におけるヒスタミン食中毒.国立医薬品食品衛生研究所報告,**127**,31-38,2009
- 2) Rice, S. L. et al:Biologically active amines in food: a review.*J. Milk Food Technol.*,**39**,353-358,1976
- 3) Joint FAO/WHO export meeting on the public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products,2012

https://apps.who.int/iris/bistream/handle/10665/89216/9789240691919_eng.pdf

- 4) Prester, L.:Biogenic amines in fish, fish products and shellfish:a review.*Food Additives and Contaminants*,**28**,1547-1560,2011
- 5) 菊地博之他:フルオレスカミン誘導体化 HPLC 法による魚および水産加工品中のヒスタミン分析の性能評価.食品衛生学雑誌,**53**,121-127,2012
- 6) 花石竜治他:健康危機管理に対応した食品中のヒスタミン分析の検討.青森県環境保健センター年報,**30**,25-31,2019
- 7) 久保田晶子他:フルオレスカミン誘導体化 HPLC 法による食品中の不揮発性アミン類分析法.食品衛生学雑誌,**60**,61-67,2019
- 8) 内閣府食品安全委員会 編:ファクトシート.2014年3月26日最終更新. URL:
http://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/140326_histamine.pdf (2020年1月8日現在アクセス可能)
- 9) 加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法.厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡,平成25年3月26日.

An examination of the analytical method for the determination of non-volatile amines in foods for health risk management

Ryuji Hanaishi, Akemi Yamamoto

An analytical method for the determination of non-volatile amines (NVAs) in foods for health risk management was studied. The method already reported by the authors was employed for the extraction and derivatization of NVAs. In this study, the high-performance liquid chromatography (HPLC) conditions were explored to separate five types of NVAs, namely, histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, and spermidine. The use of high-pH mobile phases for a C18 reversed-phase column in the HPLC analysis of the fluorecamine derivatives of these amines enabled the separation of spermidine from four other amines considered to be an index for the decomposition of fishes, leading to a successful testing. In addition, a spike-and-recovery test was conducted using the purification procedure already reported by Kubota et al., which resulted in the sufficient recovery rates with high repeatability. In conclusion, the analytical method described in this report demonstrated its usefulness as a method for determining NVAs for health risk management.

Key words: health risk management, non-volatile amines, fluorecamine, solid phase extraction, HPLC