

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

花石竜治 山本明美

健康危機管理事案に対応した迅速な食品中のヒスタミン分析法を検討した。基礎とする方法として菊地らの既報(菊地博之ほか, 2012)の、C18 および強酸性陽イオン交換樹脂の固相カートリッジ精製法により精製した溶出液をフルオレスカミンにより誘導体化する方法を採用した。この方法に、精製段階での溶出液の塩基をテトラブチルアンモニウムヒドロキシド(TBAH)とする変更を加えて、分析所要時間を短縮した。標準液測定による検量線作成時に乖離率を計算し、検量線範囲を決定し、イワシ丸干しなどを用いて、添加回収率を求めた。検討した TBAH 法は十分な回収率を与え、健康危機管理時の分析手法として有用であることが示された。

Key words: Health Risk Management, Histamine, Fluorescamine, Tetrabutylammonium Hydroxide, Sardine.

1. はじめに

ヒスタミン中毒は、食中毒事例のうち理化学的検査の対象となるものであり、発生頻度は高い。本県の関係するところでは、2015年に、東京都新宿区で青森県産のブリ加工品を喫食し発症した事例¹⁾があった。食中毒事例に係る検査用務においては、患者の治療に資するべく、原因物質を迅速に同定・定量することが要求され、信頼性の高い検査を迅速に遂行することが求められる。

ヒスタミンはイミダゾール環に、第一級アミノ基を持った側鎖が結合した分子構造を持ち、アミノ酸の一種であるヒスタジンの脱炭酸で生じるとされる。

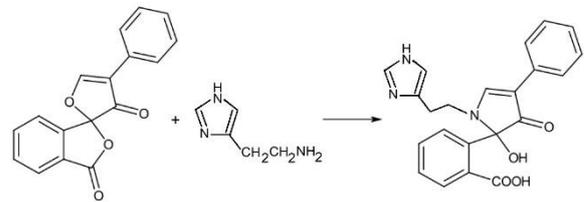
日本では、ヒスタミンの食品中の濃度については規制値がないため、その分析の公定法は示されていない。その分析法として「衛生試験法・注解」²⁾には、ダンシルクロリド誘導体化法が記載されている。この方法はヒスタミンをほかの不揮発性アミンと同時に定量できる長所がある一方、分析工程数が多く、所要時間が長いという短所がある。

迅速なヒスタミン定量法として報告されている方法は、HILIC(親水性相互作用クロマトグラフィー)カラムを用い LC-MS/MS 法により定性を兼ねて誘導体化せずに測定する方法³⁾、蛍光検出 HPLC を用い、ヒスタミンをフルオレスカミン⁴⁾⁸⁾(図1に反応式を示す。)、ピレンブチリルクロリド⁹⁾あるいは *o*-フタルジアルデヒド¹⁰⁾により、蛍光物質に誘導体化して、測定する方法が報告されてい

る。

LC-MS/MS 法は迅速だが、夾雑物による妨害があり、また機器を汚す短所がある。当所は LC-MS/MS を1台しか所有していないため、HPLCによる迅速分析法を検討した。

栗津らは、C18 固相カートリッジを強酸性陽イオン交換樹脂固相カートリッジにタンデムに連結し、フルオレスカミンにより誘導体化する方法を報告している⁴⁾。菊地らは、栗津らの方法を改良を加え、その分析法の妥当性評価を行った⁵⁾。フルオレスカミン法は、ダンシルクロリド誘導体化法に比べ誘導体化反応時間が短い(1分間以内)特徴を持つ。



フルオレスカミン ヒスタミン 誘導体(蛍光物質)
図1 ヒスタミンとフルオレスカミンとの反応式

栗津らの方法⁴⁾および菊地らの方法⁵⁾は、どちらも固相カートリッジからの目的成分の溶出にアンモニア・メタノール溶液を用いる。アンモニアは塩基性条件で求核性を持ち、誘導体化試薬のフルオレスカミンと反応すると考えられるため、

これを誘導体化の前に除外する必要がある、溶媒揮散、乾固に時間・工程を要する。

本研究では菊地らの方法⁵⁾を基礎として、今村らの報告¹¹⁾を参考に、アンモニアの代わりに、溶媒揮散と乾固を必要とせず、求核性が弱く塩基性の強い塩基であるテトラブチルアンモニウムヒドロキシド(以下、「TBAH」という。)を用い、より分析時間を要しない方法を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サバ缶詰(水煮および味噌煮)、イワシ丸干しを用いた。試料は包丁で細碎し、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、フルオレスカミン、トリクロロ酢酸(TCA)、 0.5 mol/L テトラブチルアンモニウムヒドロキシド(TBAH)溶液は、富士フィルム和光純薬製を用いた。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、膜ろ過フィルターは、Whatman社 Syringe filter poresize $0.2\ \mu\text{m}$ を用いた。水は超純水を用いた。

ヒスタミン標準溶液：ヒスタミン二塩酸塩を 165.6 mg 取り、 0.1 mol/L 塩酸で溶解し、 100 mL に定容した ($1,000\text{ mg/L}$ 標準原液)。標準原液を 0.1 mol/L 塩酸で適宜希釈し、 $0.3\sim 100\text{ mg/L}$ の検量線作成用標準溶液を調製し、標準原液は添加回収試験用添加溶液として使用した。

100 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH 6.8)：りん酸二水素ナトリウム 2水和物 7.8 g とりん酸水素二ナトリウム 12水和物 17.9 g を水に溶解し、 $1,000\text{ mL}$ とした。

50 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH 6.8)および 25 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH 6.8)： 100 mmol/L リン酸塩緩衝液 1容積に水を加えてそれぞれ 2容積および 4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下し pH 9.0 に調整し、水を加えて 200 mL とした。

5% TCA：TCA 5.0 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。

50 mmol/L 酢酸塩緩衝液(pH 6.6)：酢酸ナトリウム 4.10 g を水 800 mL に溶解し、30%酢酸溶液および 3%酢酸溶液を加え、pH 6.6 に調整し、水で全量を $1,000\text{ mL}$ とした。

0.1 mol/L TBAH 溶液： 0.5 mol/L TBAH 溶液 2 mL にメタノールを加えて 10 mL とした。

濃アンモニア水・メタノール(5:95)：アンモニア水 5 mL にメタノール 95 mL を加えた。

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

固相カートリッジ：SepPak Plus C18(360 mg) (Waters 社)の下部に強酸性陽イオン交換樹脂ミニカラム Bond Elut Jr. SCX(500 mg) (Agilent 社)を連結して用いた。

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

2.3 装置

HPLC：島津製作所 Prominence

ホモジナイザー：IKA 社 T25DS1

ボルテックスミキサー：Scientific Industries 社 VORTEX-GENIE 2

遠心分離機：久保田製作所 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製 Inertsil ODS-3(内径 4.6 mm 、長さ 150 mm 、粒径 $5\ \mu\text{m}$)、移動相：A液： 50 mmol/L 酢酸塩緩衝液(pH 6.6)、B液：アセトニトリル、グラジエント条件： $0\text{ 分}(A:B=80:20)\rightarrow 9.0\text{ 分}(A:B=80:20)\rightarrow 15.0\text{ 分}(A:B=20:80)\rightarrow 20.0\text{ 分}(A:B=20:80)\rightarrow 20.01\text{ 分}(A:B=80:20)\rightarrow 30.0\text{ 分}(A:B=80:20)$ 、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 $20\ \mu\text{L}$ 、サンプルクーラー温度： 4°C

2.5 試験溶液の調製

(1) 抽出

均質化した試料 10 g を 100 mL 遠沈管に秤り取り、5% TCA 40 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。上清は定性ろ紙 5A でろ過し、ろ液を 100 mL 比色管に取った。遠沈管中の残渣には 5 % TCA 40 mL を加えて、ガラス棒で攪拌し、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 100 mL 比色管に合わせて入れ、5 % TCA を加えて 100 mL に定容し、粗抽出液とした。

粗抽出液を 5 mL 取り、5 % TCA を 5 mL 加えた後、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を加えて、pH 試験紙で時々調べながら中和し、およそ pH 7 とした。これに 100 mmol/L リン酸塩緩衝液 10 mL を加えて、精製操作を行う負荷検液とした。

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(項 2.2)に、メタノール、水、100 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH 6.8)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。次いでこれに 50 mmol/L リン酸塩緩衝液を通液して、タンデムカートリッジを洗浄した。この後に、C18 カートリッジを撤去し、以下、SCX カートリッジについて、精製操作を行った。

SCX カートリッジに、25 mmol/L リン酸塩緩衝液、水、メタノールを順次、それぞれ 10 mL 通液し、洗浄した(※)。次に 0.1 mol/L TBAH 溶液 10 mL を通液し、溶出する画分を採取した。これにメタノールを加えて 10 mL の検液とした。(この操作を「TBAH 法」という。)

また、対照方法として、※の状態の SCX カートリッジに、濃アンモニア水:メタノール(5:95)を 10 mL 通液し、溶出する画分を採取した。この溶液に窒素ガスを吹き付け、溶媒を揮散し乾固したのち、0.1 mol/L 塩酸を 2 mL 正確に加え、残渣を溶解して検液とした。(この操作を「AM 法」という。)

TBAH 法の精製操作のフローを図 3 に、AM 法のフローを図 4 に示す。

(3) 蛍光誘導体化

検液(TBAH 法あるいは AM 法)を 50 μ L とり、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、直ちにボルテックスミキサーで 20 秒間攪拌した。この溶液を膜ろ過フィルターでシリンジろ過し、HPLC 用検液とした。

誘導体化操作のフローを図 5 に示す。

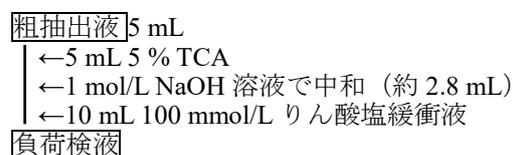
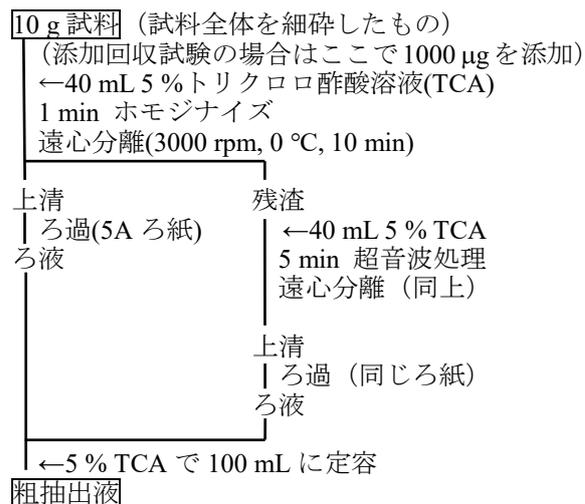


図 2 抽出操作のフロー

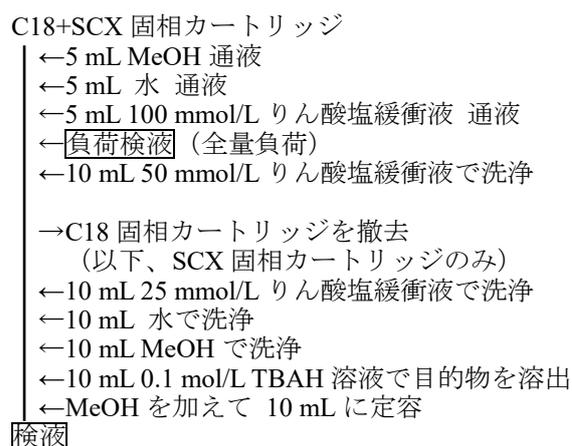


図 3 精製操作のフロー (TBAH 法)

(4) 添加回収試験

試料 10 g に対して、ヒスタミン濃度が 100 μ g/g となるように、1000 mg/L 添加回収試験用添加溶液を 1 mL 添加し、(1)の操作から前処理を行った。

C18+SCX 固相カートリッジ
 ←5 mL MeOH 通液
 ←5 mL 水 通液
 ←5 mL 100 mmol/L リン酸塩緩衝液 通液
 ←**検液** (全量負荷)
 ←10 mL 50 mmol/L リン酸塩緩衝液で洗浄
 →C18 固相カートリッジを撤去
 (以下、SCX 固相カートリッジのみ)
 ←10 mL 25 mmol/L リン酸塩緩衝液で洗浄
 ←10 mL 水で洗浄
 ←10 mL MeOH で洗浄
 ←10 mL 濃アンモニア水:メタノール(5:95)で目的物を溶出
 窒素吹付で溶媒揮散、乾固
 ←2 mL 0.1 mol/L 塩酸で溶解
検液

図4 精製操作のフロー (AM法)

2 mL 0.2 mol/L ほう酸塩緩衝液(pH 9.0)
 ←50 μ L **検液**
 ←200 μ L 0.3%フルオレスカミン溶液
 Vortex 攪拌 20 sec
 0.2 μ m シリンジフィルタでろ過
 (検量線用標準液の場合は省略)
HPLC 用検液

図5 誘導体化操作のフロー

2.6 HPLC 測定

検量線作成用標準溶液について、前項の誘導体化操作を行い、HPLC 分析を行った。なお、膜ろ過フィルター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一次回帰直線の検量線を作成した。検量線上の各点の設定濃度Aと検量線上の計算濃度Bから、乖離率

(%difference $D = (A - B)/B \times 100 \%$)を算出し、検量線の下限を決定した。

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ヒスタミン濃度を決定した。

3. 結果

3.1 分析条件の検討

用いた試料の中で最も夾雑物による妨害が大きいとされる⁴⁾ イワシ丸干しを用いた場合について、添加回収率をAM法(n=1)およびTBAH法(n=5)について求めたところ、前者で87.4%、後者で75.2% (併行精度:変動係数 5.3%)であった。

図6に、固相カートリッジを用いた精製操作を行わない未精製の粗抽出液のクロマトグラム (標準品を無添加および添加)、TBAH法およびAM法により精製した検液 (標準品を添加) のクロマトグラム並びに標準溶液のクロマトグラムを比較した。

3.2 検量線濃度範囲の決定

検量線を濃度の高い方からプロットし、乖離率の絶対値が10%を超えたところを、検量線における最低濃度と考えた。表1に測定値と計算結果を示す。この検討により、最低濃度は1 mg/Lと決定された。この濃度は、検体中の濃度に換算して20 μ g/gに相当した。なお、標準液から誘導体化したHPLC 用検液を用いた繰り返し測定によるバラツキの標準偏差を σ とした場合、その 10σ は1 mg/Lを下回っていた。

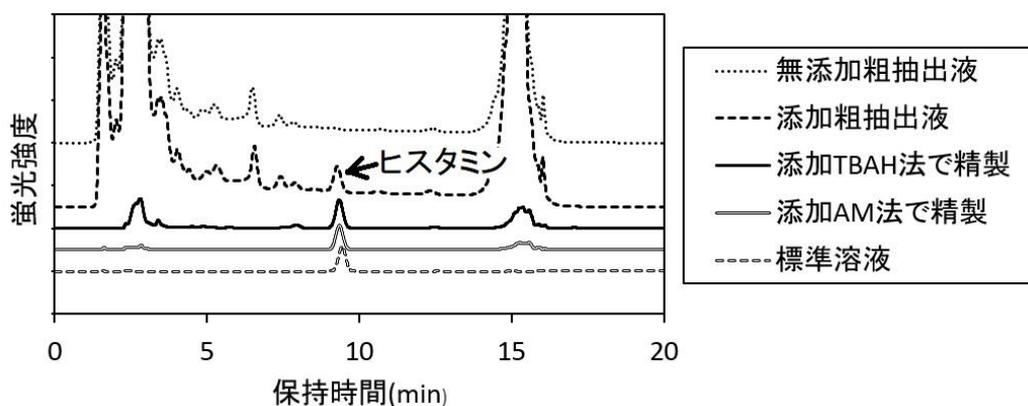


図6 イワシ丸干し試料のクロマトグラム

3.3 食品試料への適用性確認

イワシ丸干しのほかに、サバ缶詰（水煮および味噌煮）に対しても TBAH 法を適用し($n=1$)、添加回収率を求めて、表 2 に示す結果を得た。

表 1 乖離率の算出

濃度(mg/L)	ピーク面積	乖離率%
100	20700000	-0.01
50	10300000	-0.05
20	4120000	0.19
10	2020000	1.43
5	1020000	-0.22
2	405000	-1.79
1	200000	-4.69
0.5	98700	-10.73

表 2 TBAH 法を食品試料に適用した場合の
添加回収率

試料	添加回収率%
イワシ丸干し	75.2
サバ缶詰（水煮）	80.8
サバ缶詰（味噌煮）	75.0

4. 考察

4.1 検量線範囲および試料における定量下限

TBAH 法の試料における定量下限は 20 $\mu\text{g/g}$ である。Codex 委員会は、マグロ、イワシ等の缶詰や急速冷凍水産加工品等の衛生および取扱において、検体のヒスタミン濃度が 20 $\text{mg}/100\text{g}$ (=200 $\mu\text{g/g}$)を超えないことを基準としている¹²⁾。本法の定量下限 20 $\mu\text{g/g}$ は、その Codex 基準値の 10 分の 1 であり、要求される精度で検査結果を与えるものと考えられた。

なお、ヒスタミンの中毒発症量には個人差があり、成人では 50 $\mu\text{g/g}$ ~100 $\mu\text{g/g}$ で感受性が高い群が発症し、100 $\mu\text{g/g}$ ~1000 $\mu\text{g/g}$ で食中毒を生じる可能性があるとされている。1000 $\mu\text{g/g}$ 以上では食中毒を生じる可能性が高く重篤な症状を呈すとされており、成人よりも小児のほうが少ない量の摂取で発症すると考えられている¹³⁾が、本法で充分対応可能と考えられた。

4.2 TBAH 法の分析所要時間

抽出以降の操作を比較すると、ダンシルクロリド誘導体化を行う「衛生試験法・注解」法²⁾では、誘導体化反応に 1 時間の加温（あるいは終夜、室温で放置）を要し HPLC 用検液調製まで約 3 時間以上を要する。これに対して菊地らの方法⁵⁾（AM

法）は、上記方法の工程である液液分配や溶媒除去操作がなく分析時間が短縮されているが、精製操作の最後の溶媒揮散・乾固操作に時間を要する。ただし、誘導体化は 1 分間以内に終了する。TBAH 法では、溶媒揮散・乾固操作がなく、誘導体化が AM 法と同様に 1 分間以内に終了するため、操作が単純化され、所要時間がさらに短縮された。

以上から TBAH 法は、分析を省力化し、かつ分析時間を短縮する方法であると考えられた。

4.3 食品試料への適用可能性

イワシ丸干し、サバ缶詰（水煮および味噌煮）の 3 種類の試料について TBAH 法の添加回収率は 70%以上であり、十分な真度を与える方法と考えられた。

なお、イワシ丸干しについては併行精度($n=5$)も良好であった。しかし AM 法がより高い回収率を与えたことから、迅速な TBAH 法をスクリーニング法とし、AM 法を定量法とすることも一法と考えられた。

5. 結論

今回、検討した TBAH 法のヒスタミン分析法について、下記の点により有用性が示された。

- 1) 国際基準に対する超過の有無を、十分な真度および精度で測定できること。
- 2) 分析が省力化され、また分析時間が短縮されること。
- 3) 現段階では 3 種類の試料での検討に留まるが、ヒスタミン含有の可能性のある代表的な試料について、十分な真度を与えられること。

当所では、2019 年 9 月に、精製操作を省いたヒスタミン検査方法の健康危機管理標準作業書 (SOP)を策定したところである。今後は本研究の知見を踏まえて、より信頼性の高い検査方法として精製操作を含めた検査方法の SOP を定め、健康危機管理態勢を整備することを予定している。

文 献

- 1) 平成 27 年 1 月 11 日 東奥日報、東奥日報社、11 Jan, 2015.
- 2) 日本薬学会 編：衛生試験法・注解 2015. pp.205-207, 金原出版, 東京, 2015.
- 3) 茶屋真弓, 他: LC/MS/MS による不揮発性アミン類の迅速一斉分析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

一所報, **19**, 56-63, 2018.

4) 粟津 薫, 他: タンデム固相抽出を用いた魚肉中ヒスタミン分析法の検討. 食品衛生学雑誌, **52**, 204, 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) 竹内 浩, 他: 固相抽出を用いた食品中不揮発性アミン類分析法の検討. 三重県保健環境研究所年報, **14**, 41-45, 2012.

7) 村上友規, 他: フルオレスカミン蛍光誘導体化 UPLC 法を用いたヒスタミン迅速分析法. 食品衛生学雑誌, **59**, 121-125, 2018.

8) 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.

9) 坂本智徳, 他: 固相抽出-エキシマー蛍光誘導

体化 HPLC 法による食品中不揮発性アミン類の分析, 食品衛生学雑誌, **51**, 115-121, 2010.

10) Jin-feng Peng et al.: Development of an automated on-line pre-column derivatization procedure for sensitive determination of histamine in food with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **1209**, 70-75, 2008.

11) 今村寿一, 他: 水酸化テトラメチルアンモニウム. 有機合成化学, **45**, 909-913, 1987.

12) 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)

13) 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.

(Summaries follow)

An examination of analysis of histamine in food for health risk management

Ryuji Hanaishi, Akemi Yamamoto

A rapid analysis method of histamine in food for health risk management cases was explored. As a basic technique, the present authors adopted a method already reported by Kikuchi et al. (Hiroyuki Kikuchi et al., 2012), in which the eluted solution purified by solid-phase extraction using a C18 cartridge and a strongly acidic cation exchange resin cartridge was derivatized with fluorescamine. The method was modified using tetrabutylammonium hydroxide (TBAH) as a base in the eluted solution in the purification step to shorten the time required for analysis. At the time of drawing a calibration line based on the results of standard solution measurement, percent differences were calculated and the ranges of the calibration line were determined, and spike recovery rates were calculated using sardine dried whole. Using the TBAH method, sufficient recovery rates were obtained, suggesting that the TBAH method was useful as an analytical method in health risk management.

Key words: Health risk management, Histamine, Fluorescamine, Tetrabutylammonium hydroxide, Sardine