

フルオレスカミン誘導体化HPLC法による不揮発性腐敗アミン一斉分析法の検討

高井靖智, 河島眞由美*¹, 桑田真里, 新宅沙織, 吉村暢浩*², 坂口勝規*³

Simultaneous Determination of Nonvolatile Amines by HPLC Following Fluorescamine Derivatization

Takai Yasutomo, Kawashima Mayumi*¹, Kuwata Mari, Shintaku Saori, Yoshimura Nobuhiro*²
and Sakaguchi Katsunori*³

キーワード：不揮発性腐敗アミン, フルオレスカミン, 誘導体化, 液体クロマトグラフ

Key Word: Nonvolatile Amine, Fluorescamine, Derivatization, HPLC

はじめに

ヒスタミン等の不揮発性腐敗アミンは、タンパク質やアミノ酸の微生物的腐敗による分解過程で生じ、アレルギー様食中毒の原因物質となる。

不揮発性腐敗アミンの一斉分析は、食中毒の原因探索や食品の腐敗程度を把握するために行われるが、HPLC分析法として広く使用されるダンシルクロライド誘導体化法¹⁾は、誘導体化に時間を要し、食中毒時等に必要となる迅速性に課題がある。一方、フルオレスカミン誘導体化法(図1)は、誘導体化が簡便で迅速性に優れるが、一斉分析法の報告例^{2) 3)}は少ない。

そこで、本研究では、迅速な処理が可能であるフルオレスカミン誘導体化 HPLC 法による5種不揮発性腐敗アミン一斉分析法を検討した。また、本法を用いて当県で発生したマグロカツによる食中毒の喫

食残品等を測定したので、あわせて報告する。

実験方法

1. 試料

和歌山県内で流通しているマグロ、サバ、イワシ丸干し並びに食中毒事例の喫食残品であるマグロカツおよび販売店等で保管されていた未加熱のマグロカツ半製品。

2. 試薬

1) 標準品

(1) 標準品

ヒスタミン(Him)二塩酸塩、プトレシン(Put)二塩酸塩及びビスペルミジン(Spd)は和光純薬製、チラミン(Tyr)塩酸塩及びカダベリン(Cad)二塩酸塩はSigma-Aldrich製を用いた。

(2) 標準溶液

各標準品を0.1 mol/L塩酸で溶解し、不揮発性腐敗アミンとして5000 µg/mLに調製したものを標準原液とした。各標準原液を混合し、0.1 mol/L塩酸を加え500 µg/mLの混合標準溶液を調製した。混合標準溶液を適宜希釈し、1~200 µg/mLの検量線用標準溶液を調製した。

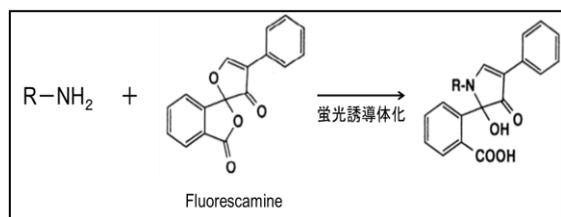


図1. フルオレスカミンによる誘導体化反応

なお、添加回収試験用の混合標準液は、各標準品を混合した後、0.1 mol/L 塩酸で溶解し、不揮発性腐敗アミンとして 5000 µg/mL に調製したものをを用いた。

2) 溶媒及び試薬

アセトニトリル、メタノールは Sigma-Aldrich 製高速液体クロマトグラフ用、アセトン、酢酸は富士フィルム和光純薬製高速液体クロマトグラフ用、酢酸ナトリウム、水酸化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム・2水和物、リン酸水素二ナトリウム・12水和物およびアンモニア水は富士フィルム和光純薬製特級、塩酸は関東化学製有害金属測定用、ホウ酸は富士フィルム和光純薬製アミノ酸自動分析用、トリクロロ酢酸は富士フィルム和光純薬製生化学用、フルオレスカミンは富士フィルム和光純薬製を使用した。なお、その他試液は以下の手順で調製したものをを使用した。

0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) : リン酸二水素ナトリウム・2水和物 7.8 g 及びリン酸水素二ナトリウム・12水和物 17.9 g を水に溶解し、全量を 1000 mL とした。

0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) : 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) を水で 2 倍希釈した。

0.025 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) : 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) を水で 4 倍希釈した。

0.2 mol/L ホウ酸緩衝液 (pH9.0) : ホウ酸 2.46 g を水約 150 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液で pH9.0 に調製した後、水で全量 200 mL とした。

0.3 %フルオレスカミン-アセトン溶液 : フルオレスカミン 30 mg にアセトンを加え 10 mL に定容した。

0.05 mol/L 酢酸ナトリウム水溶液 (pH6.6) : 酢酸ナトリウム 4.1 g を水約 800 mL に溶解し、30 %酢酸溶液で pH6.6 に調製した後、水で全量を 1 L とした。

20 %アンモニア水含有メタノール溶液 : 25 %アンモニア水とメタノールを 1 : 4 の割合で混合した。

3) 固相抽出カラム

固相抽出カラムとして、Waters 社製 Sep-Pak Plus

C18 (360 mg) (ODS ミニカラム) および Agilent 社製 Bond Elut Jr. SCX (500 mg) (SCX ミニカラム) を使用した。

4) フィルター

Millipore 社製 Millex-LH (0.45 µm) を使用した。

3. 装置

HPLC 測定条件を表 1 に示した。

表 1 HPLC測定条件

HPLC	: Waters ACQUITY UPLC H-classシステム
分析カラム	: 大阪ソーダ CAPCELL PAK C18 UG80 (4.6 mm×150 mm, 5 µm)
カラム温度	: 40°C
流速	: 1 mL/min
注入量	: 10 µL
移動相	: A液: 0.05 mol/L 酢酸ナトリウム水溶液 (pH 6.6) : B液: アセトニトリル
グラジエント条件	: 17%(0 min) → 23%(7.5 min) → 28%(8-16 min) → 50%(21 min) (B液) → 80%(22.5-32.5 min) → 17%(33-43 min)
検出器	: 蛍光検出器 (Ex: 390 nm, Em: 480 nm)

4. 試験溶液の調製方法

試験溶液の調製方法を図 2 に示した。

1) 抽出

ある程度細切した試料 5.0 g を 50 mL ポリプロピレン (PP) 製遠沈管に正確に量り入れ、5 %トリクロロ酢酸 20 mL を加えホモジナイズした後、4 °C、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。次いで、上清をろ紙 (No. 5A) によりろ過し、ろ液を分取した。さらに、残留物に 5 %トリクロロ酢酸 20 mL を加え、振とう機にて 5 分間振とうした後、4 °C、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清をろ紙 (No. 5A) でろ過した。得られたろ液を合わせ、5 %トリクロロ酢酸を加えて 50 mL に定容した。定容した液 10 mL を 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で中和した後、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) 10 mL を添加しよく混合したものを抽出液とした。

2) 精製

あらかじめメタノール 10 mL、蒸留水 10 mL 及び 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) 10 mL でコンディショニングした ODS ミニカラム (上部) と SCX ミニカラム (下部) を連結したタンデムカラムに抽出液を全量負荷した。0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) 10 mL (5 mL×2回) でカラムを洗浄した後、ODS ミニカラムを除去した。さらに、SCX ミニカラムに 0.025

mol/L リン酸緩衝液(pH6.8), 蒸留水, メタノール各 10 mL を順次注入しカラムを洗浄した後, 20 %アンモニア水含有メタノール溶液 20 mL を注入し, 溶出液を採取した. これを 40 °C以下で減圧濃縮した後, 窒素ガスを吹き付け, 完全に溶媒を除去した. この残留物に 0.1 mol/L 塩酸 2 mL を加えて, 超音波処理したものを精製溶液とした.

3) 誘導体化

0.2 mol/L ホウ酸緩衝液(pH9.0) 2 mL に精製溶液(標準溶液) 50 µL を添加し, ボルテックスミキサーにてよく攪拌した後, 0.3 %フルオレスカミン-アセトン溶液 200 µL を加え, ボルテックスミキサーにて 30 秒間攪拌した. 得られた液を 0.45 µm フィルターでろ過したものを試験溶液とした.

結果および考察

1. 誘導体化条件の検討

食品衛生検査指針¹⁾ に示されたヒスタミン分析法^{4) 5)} (以下, 個別法) を参考に, 誘導体化条件を検討したところ, ガラス容器内で誘導体化反応を行うと, フルオレスカミンの添加量等の条件を変更しても一部アミンの AREA 値がばらついた. そこで, 5 種アミン混合標準液(50 µg/mL) の誘導体化操作の際に, ガラス製容器を使用した場合と, ポリプロピレン(PP) 製容器を使用した場合の AREA 値を比較した(表 2). その結果, ガラス容器でばらつきが大きかった Put, Spd, Cad が, PP 製容器を用いると大きなばらつきはなく, AREA 値もガラス製容器で反応させた場合と比較し大きくなった. 以上のことから, 誘導体化は PP 製容器で実施することとした. なお, PP 製容器を用いた場合, 個別法で示されている条件で 5 種アミンの誘導体化が十分可能であったため, その他の条件は個別法に準じた.

表 2 誘導体化時にガラス製容器を使用した場合とPP製容器を使用した場合の比較(n = 3)

	Him	Tyr	Put	Spd	Cad
ガラス製容器使用時のAREA値のRSD(%)	1.1	1.1	7.4	15.6	9.9
PP製容器使用時のAREA値のRSD(%)	1.4	1.4	0.8	1.7	0.7
ガラス製容器のAREA値 / PP製容器のAREA値	96.9	97.4	89.2	58.2	87.5

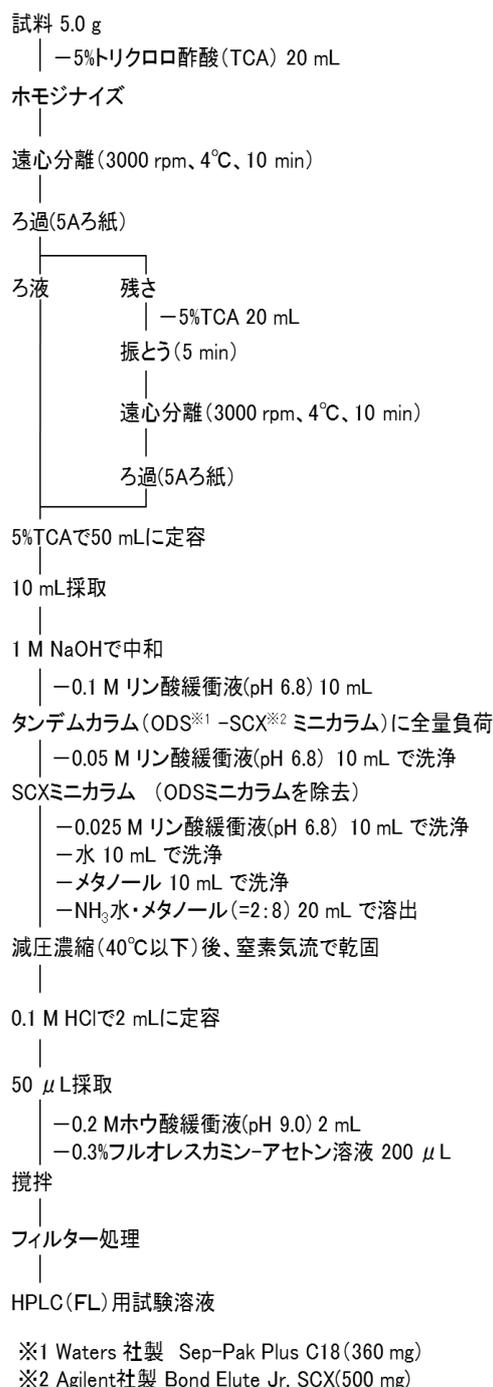


図 2 試験溶液の調製方法

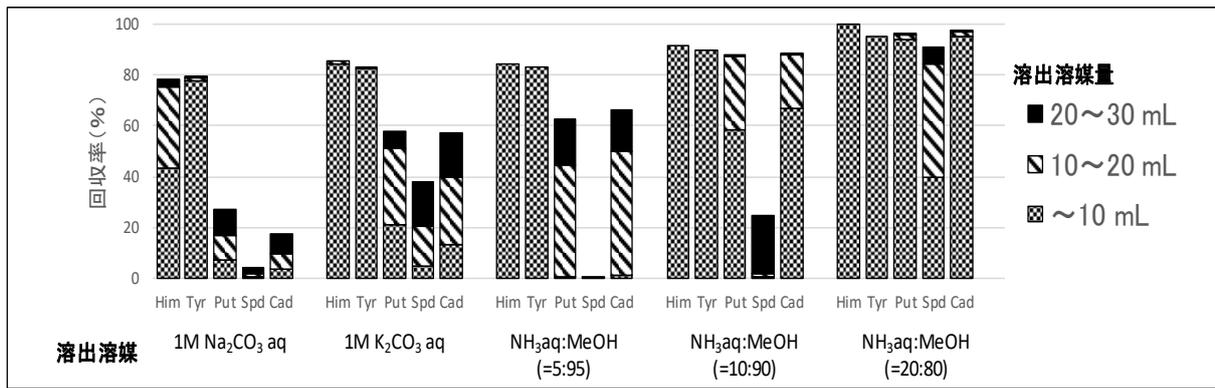


図3 各溶出溶媒によるカラム回収率の結果

2. 検量線および定量下限値

本誘導体化および測定条件にて、1~200 µg/mL の範囲で調製した混合標準溶液を測定したところ、アミン5種ともに決定係数 0.99 以上の良好な直線性を示した。また、検量線の最低濃度である 1 µg/mL において、各成分ともに $S/N \geq 10$ を満たしたことから、アミン5種の定量下限値を 1 µg/mL (試料中濃度 2 µg/g) とした。

3. 精製条件の検討

個別法で用いられている ODS ミニカラムの下部に SCX ミニカラムを連結したタンデムカラムを本法でも採用し、5種アミン全てを溶出できる最適な溶出液及びその溶媒量を検討した。0.05 mol/L リン酸緩衝液で希釈した 5種アミン混合標準液 (10 µg/mL) 10 mL をタンデムカラムに負荷、洗浄後、各種溶出液を 10 mL ずつ注入した時のカラム回収率の結果を図3に示した。今回検討した中で、最も良好に5種アミンを溶出できたのは20%アンモニア水含有メタノール溶液を用いた時で、溶媒量 20 mL でカラム回収率は 84.2~100.1%であった。Spd は、溶媒量 20 mL ~30 mL でも若干量の溶出が確認されたが、操作性を考慮し、溶出液には20%アンモニア水含有メタノール溶液を 20 mL 使用することとした。

3. 添加回収試験

マグロ、サバおよびイワシ丸干しを対象に、5種混合標準液を 100 µg/g 相当となるよう添加し、無添加試料と併せて試験溶液の調製方法に従い、回収試験を実施した。その結果、表3に示したとおり、全ての試料で5種のアミンが良好な回収率となった。

また、無添加試料から定量を妨害するようなピークは確認できず (図4)、本法は魚介類の検査に利用できると考えられた。

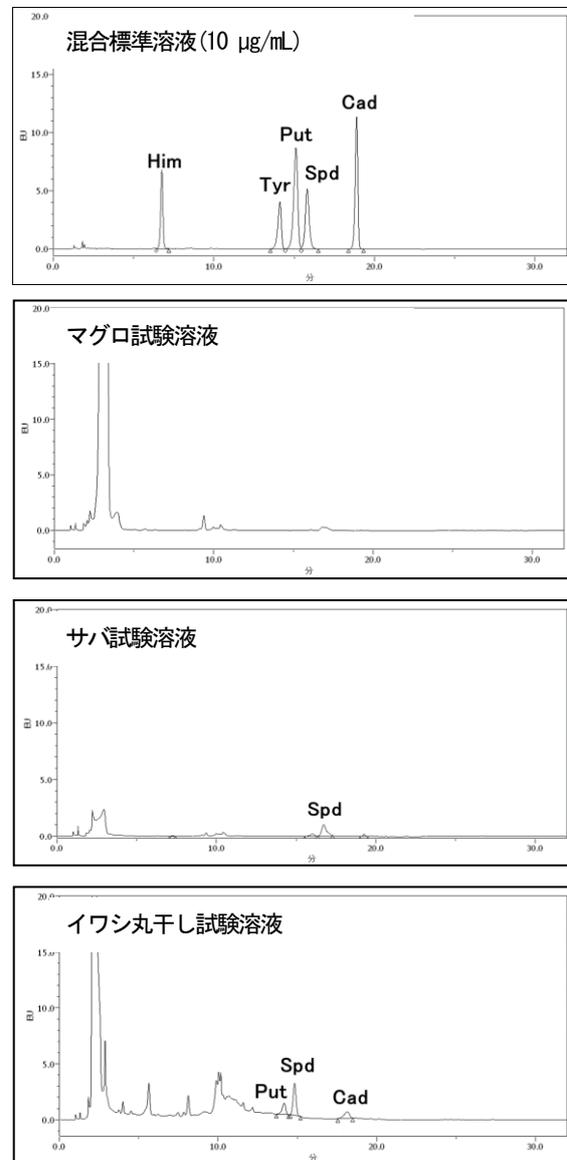


図4. 標準液および試験溶液のクロマトグラム

表3. 不揮発性アミンの添加回収試験結果 (n = 5)

試料	回収率 (%) (RSD (%))				
	Him	Tyr	Put	Spd	Cad
マグロ	91.6 (2.9)	78.7 (7.9)	85.9 (4.3)	80.0 (8.3)	86.5 (4.2)
サバ	92.3 (1.7)	89.3 (5.0)	89.6 (3.5)	86.0 (1.9)	89.3 (4.4)
イワシ丸干し	89.6 (1.7)	88.4 (3.4)	87.5 (1.3)	77.2 (2.7)	87.4 (1.5)

表4. 食中毒喫食残品の不揮発性腐敗アミンの測定結果 (mg/100 g)

	Him	Tyr	Put	Spd	Cad
喫食残品 (マグロカツのみ)	260	3.3	0.8	0.5	13
マグロカツ半製品 A	230	3.3	0.5	0.5	14
マグロカツ半製品 B	230	3.4	0.5	0.5	9.5
マグロカツ半製品 C	36	0.6	Trace	0.3	1.5

4. 食中毒事例喫食残品の不揮発性腐敗アミン含有量

食中毒事例の喫食残品であるマグロカツおよび販売店等で保管されていたマグロカツ半製品について、本法を用いて、不揮発性腐敗アミンの含有量を測定した結果を表4に示した。喫食残品および半製品の全てから高濃度の Him が検出され(36 ~260 mg/100 g)、他の不揮発性腐敗アミンも Him より低濃度であるが検出された。

ま と め

今回、マグロ、サバ及びイワシ丸干しについて、フルオレスカミン誘導体化法を用いた5種不揮発性腐敗アミン迅速一斉分析法を検討した。添加回収試験の結果は良好であり、本法は魚介類の検査に適用可能であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針 理化学 2015, 日本食品衛生協会 (東京), 784-795, 2015
- 2) 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, 三重保環研年報, 14, 41-45, 2012
- 3) 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分析法, 食衛誌, 60, 61-67, 2019
- 4) 栗津薫, 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, 食衛誌, 52, 199-204, 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, 食衛誌, 53, 121-127, 2012