

3 調査研究

3・1 報 文

1) 水産物中ヒスタミン分析法の開発

吉田 達雄 濱田 寛尚 吉元 秀和 飛野 敏明 村川 弘

要 旨

高極性化合物の分析が可能な HILIC-MS/MS を用いることにより，化学物質性食中毒の原因となるヒスタミンを簡易迅速に分析する方法を開発した。水産物試料 4 種類（マグロ刺身，サバ味付，塩サバ，アジの開き）について添加回収試験を行った結果，すべての試料について回収率 102～105%，相対標準偏差は 1.6～5.0% となり，良好な値が得られた。また，ヒスタミンを含有する試料（カツオ水煮）を用いて，本分析法による分析値を衛生試験法に示されている HPLC-FL による分析値と比較した結果，それぞれ分析値は 66 及び 69mg/kg で，同等の値となった。本法は，ヒスタミン食中毒における迅速な原因究明に対して非常に有効な手法であることが明らかとなった。

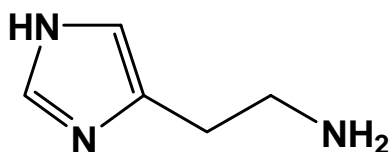
キーワード：HILIC-MS/MS，ヒスタミン，水産物，食中毒

はじめに

ヒスタミンは，顔面の紅潮，頭痛，じんま疹，発熱などのアレルギー症状を引き起こす化学物質であり^{1),2)}，食品中のヒスチジンがモルガン菌 (*Morganella morganii*) などの細菌により脱炭酸されて生成される。ヒスタミン食中毒は，微生物が直接的な原因ではないため，化学物質性食中毒として分類される。国内の化学物質性食中毒の事例では，ヒスタミン食中毒が最も多く，登田ら²⁾の報告によると，国内における 1998～2008 年のヒスタミン食中毒の総届出件数は 89 件，患

者数は 1577 人であった。ヒスタミン食中毒の原因食品として最も事件数が多かったのはマグロ（33%）であり，次いでカジキ（18%），サバ（13%）で赤身魚が多い。これは，赤身魚であるマグロ，カジキやサバなどは，ヒスチジン含量が多いため，鮮度低下により，ヒスタミンが生成されやすいことによるものと考えられている。

国内において食品中のヒスタミンに関する規制はないが，厚生労働省通知「インドネシア産切り身魚類の取扱いについて」において，20mg/100g を超えてヒスタミンが検出された場合，輸入者に対し当該貨物の積み戻し等を指導することとされている。国際的指標となるコーデックス規格では，ヒスチジン含量が高い魚類を対象に腐敗基準として 10mg/100g，衛生及び取扱基準として 20mg/100g と設定している。また，登田ら²⁾は中毒症状と食品中のヒスタミン濃度の関係につい



Histamine

て、5mg/100g 以上において食中毒を生じる可能性があるとしている。

食中毒発生における被害拡大防止のためには、食中毒の原因を迅速に把握する必要があり、原因物質を迅速に定性・定量を行うことのできる分析法が求められる。ヒスタミンは高極性化合物であり、逆相クロマトグラフィーでは保持が困難で、保持されてもシャープなピークが得られにくい。そのため、食品中のヒスタミン分析においては、衛生試験法に示されているダンシル誘導体化³⁾、オンカラム蛍光誘導体化⁴⁾やキャピラリー電気泳動を用いる方法⁵⁾など煩雑な前処理を行う必要があり、分析操作に数時間を要する。

一方、高極性化合物を分離する方法として、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いる方法が報告されている⁶⁻⁸⁾。これは、順相クロマトグラフィーの一種であり、水と有機溶媒の混合溶液と、それより高極性の固定相を用いる分離モードである。順相クロマトグラフィーでは非水溶性の有機溶媒を移動層に用いることが多く、親水性の化合物の中にはこの溶媒系に溶解しないため分析できない物質も多かったが、HILIC は、移動相が水系であり、高極性の化合物も溶解、分離が可能である。この HILIC の特性を用いることにより、高極性化合物であるヒスタミンを保持し、良好なピーク形状が得られることが推定できた。

そこで今回、ヒスタミンを簡易迅速に分析する方法の開発を目的として、HILIC を用い、さらに化合物の選択性が高い LC/MS/MS を併用する分析方法を検討した。試験方法は、水産物を試料として標準品の添加回収試験により行った。更に、HILIC-MS/MS を用いて、ヒスタミンを含有する試料の定量を行うとともに、衛生試験法に示されているダンシル誘導体化と HPLC-FL を組み合わせた方法³⁾による定量を行った。両者の定量値を比較し、実試料への適用性の確認を行い、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1 試料の調製

ヒスタミンが不検出であることを確認した水産物試料 4 種類 (マグロ刺身, サバ味付, 塩サバ, アジの開き) をそれぞれフードプロセッサーにより均一化し、これに食中毒を生じる可能性があるヒスタミン濃度 50mg/kg²⁾ となるようにヒスタミン標準溶液を添加し、添加回収試験用試料とした。また、ヒスタミンを含有する水産物試料 (カツオ水煮) を実試料への適用性試料とした。

2 HILIC-MS/MS 測定

2.1 HILIC-MS/MS 測定用試験溶液調製

HILIC-MS/MS 測定用試験溶液の調製方法を図 2 に示した。1 で調製した試料 5g に 20% トリクロロ酢酸 5ml 及び蒸留水 50ml を加えてホモジナイズし、さらに蒸留水 40ml を加えた後、30 分間静置した。次いで遠心分離 (3,000rpm, 5min) を行い、上澄みをろ過 (ADVANTEC GB-140, 東洋濾紙) 後、蒸留水を用いて 200ml に定容した。これを 0.1% ギ酸・メタノール (1:1) 溶液で 10 倍希釈し、非水系フィルター (GL クロマトディスク 25N 0.45µm, GL Sciences 製) を用いて、ろ過したものを HILIC-MS/MS 測定用試験溶液とした。

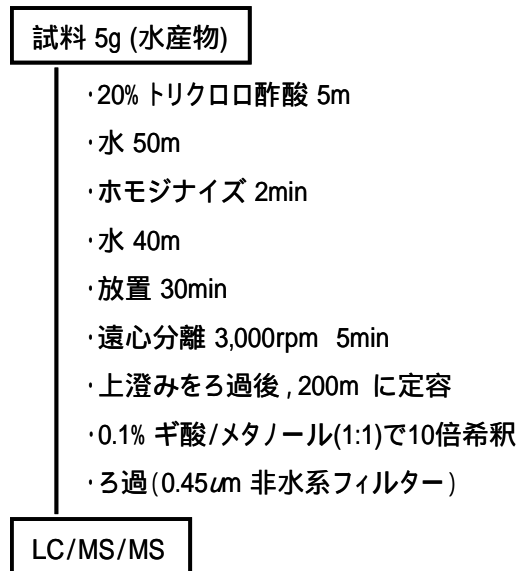


図2 分析方法のフロー

2.2 LC/MS/MS 測定

LC は、Waters 社製 Waters2795, MS/MS は Waters 社製 Quattro Premier を使用した。分離カラムは、スルホベタイン型の両性イオン型官能基を共有結合した Merck 社製 ZIC-pHILIC (長さ 150mm, 内径 4.6mm, 粒子径 5µm) を用いた。また、LC/MS/MS の測定条件は表 1 及び 2 に示した。なお、検量線は、無添加試料液を使用してマトリックスメタスタンダード溶液を用いて作成した。

3 HPLC-FL 測定

3.1 HPLC-FL 測定用試験溶液調製

HILIC-MS/MS と比較する従来法は、衛生試験法注解により実施した³⁾。すなわち、1 で調製した試料に蒸留水を加え、ホモジナイズした後、塩酸を添加した。

表1 LC/MS/MS 測定条件

LC 条件	
カラム	ZIC-pHILIC 150 × 4.6mm, 5 μ m(Merck)
移動相	A=水 B=アセトニトリル C=500mM 酢酸アンモニウム
移動相組成	A:B:C=45:50:5
流量	0.5m /min
カラム温度	40
注入量	20 μ
測定時間	20min
MS/MS 条件	
イオン化方法	ESI (ポジティブモード)
キャピラリー電圧	3kV
ソース温度	120
デゾルベーション温度	350
コーンガス流量	100 /hr
デゾルベーションガス流量	1,000 /hr
測定モード	MRM

表2 MRM 条件

MRM trace(m/z)	Cone(V)	Collision(eV)
117.78 > 94.61 ^{a)}	20	15
117.78 > 67.59 ^{b)}	20	20

a)定量イオン b)定性イオン

これを蒸留水で定容し、放置した後、内部標準液として 1,8-ジアミノオクタノール塩酸溶液及び無水炭酸ナトリウムを加え、ダンシルクロリド・アセトン溶液によりダンシル化を行った。反応後、プロリン溶液により反応をおさえた後、トルエンで抽出、濃縮し、アセトニトリル定容したものを HPLC-FL 測定用試験溶液とした。

3.2 HPLC-FL 測定条件

ポンプは島津製作所製 LC-10AD, カラムオープンは島津製作所製 CTO-10A, FL 検出器は島津製作所製 RF-10A を用いた。分離カラムは, GL Sciences 製 Inertsil ODS-3 (長さ 250mm, 内径 3.0mm, 粒子径 5μm) を用いた。試料注入量は 10μl, カラム温度は 40, 移動相は蒸留水-アセトニトリル (4:6), 流速は 1ml/min, 測定波長は Ex:325nm, Em:525nm とした。

結果及び考察

1 分析条件

HILIC においては、移動相の一部が固定相として機能し、固定相中に水が豊富な液相が形成される⁹⁾。HILIC における目的成分の分離は、この親水性の環境と移動相との間での分配的な相互作用によって達成される。そのため、分離が、移動相から供給される水相に大きく依存してしまうため、カラムの平衡化が不十分であった場合、保持時間の変動や再現性の低下等を引き起こす。このことから、移動相については、移動相組成が一定で、カラムを十分に平衡化させることができるイソクラチック条件を用いた。

また、LC/MS/MS 条件設定においては、ヒスタミン標準溶液 1mg/l をフローインジェクションにより直接 MS 部に導入し、イオン化条件を検討した結果、表 2 に示す条件が最適となった。

表3 添加回収試験結果

	マグロ刺身		サバ味付		塩サバ		アジの開き	
	平均 ^{a)}	RSD	平均 ^{a)}	RSD	平均 ^{a)}	RSD	平均 ^{a)}	RSD
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
ヒスタミン	103	5.0	105	3.1	102	3.2	102	1.6

^{a)}添加濃度:50mg/kg 試行回数:3

表4 HILIC-MS/MSとHPLC-FL(従来法)の比較

		濃度				
		HILIC-MS/MS		HPLC-FL(従来法)		比率 ^{b)}
		平均 ^{a)}	RSD	平均 ^{a)}	RSD	
ヒスタミン	カツオ水煮	66mg/kg	1.1	69mg/kg	1.8	96

^{a)}試行回数:3 ^{b)}比率:HILIC-MS/MS / HPLC-FL 濃度

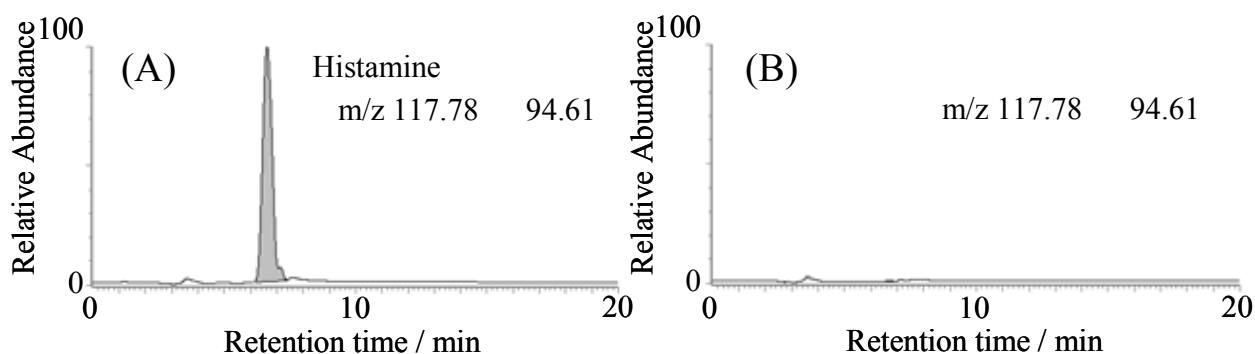


図3 MRM クロマトグラム (A)50mg/kg ヒスタミン添加マグロ刺身抽出液 (B)無添加マグロ刺身抽出液

検量線については、マトリックス一致標準溶液を用いることにより 1 ~ 500ug/l (試料中濃度 0.4 ~ 200mg/kg) の範囲で良好な直線性 ($R^2 > 0.999$) が得られた。本条件の測定により得られたクロマトグラム例を図3に示した。HILIC-MS/MSでは、HILICによる分離に併せ、高感度かつ選択性の大きいLC/MS/MSを測定に用いる。そのため、試料を希釈して測定することが可能であり、精製操作をすることなく、妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られた。

2 添加回収試験

水産物試料4種類(マグロ刺身,サバ味付,塩サバ,アジの開き)を用いて,試行回数3回で添加回収試験を実施した。回収率及び相対標準偏差の結果を表3に

示した。いずれの試料においても,妨害ピークのない良好なクロマトグラムが得られた(図3)。回収率は102 ~ 105%,相対標準偏差は1.6 ~ 5.0%となり,試料の違いによる回収率の変動はなく,すべての試料について良好な回収率が得られた。

3 HILIC-MS/MSの実試料への適用性試験

HILIC-MS/MSの実試料への適用性を確認するため,ヒスタミンを含有する試料(カツオ水煮)を用いて,HILIC-MS/MSと衛生試験法に示されているHPLC-FLにより分析を行った。分析値の比較を表4に示した。HPLC-FLにおいては,分析値69mg/kg(相対標準偏差:1.8%)となり,HILIC-MS/MSにおいては分析値:66mg/kg(相対標準偏差:1.1%)となった。HPLC-FLと

HILIC-MS/MS で得られた値の比は 96%となり、同等の値を示した。

4 検出限界及び定量限界

本分析法で用いた検量線の最小濃度は、 $1\mu\text{g}/\text{l}$ である。これは、試料中濃度で $0.4\text{mg}/\text{kg}$ となる。また、この検量線最小濃度でのクロマトグラムにおける S/N 比は、80 であった。今回、S/N 比が 3 より大きいときに検出限界とし、S/N 比が 3 より十分に大きかったため、このときの試料中濃度 $0.4\text{mg}/\text{kg}$ を定量限界とした。この濃度は、ヒスタミン食中毒を引き起こす可能性があるとして $50\text{mg}/\text{kg}^2$ の 100 分の 1 未満の濃度であり、食中毒原因の特定を目的とした本分析法の定量限界として、十分な濃度であると考えられた。

ま と め

高極性化合物を分析可能な HILIC-MS/MS を用いることにより、化学物質性食中毒の原因となるヒスタミンを簡易迅速に分析する方法を開発した。水産物試料 4 種類（マグロ刺身、サバ味付、塩サバ、アジの開き）について添加回収試験を行った結果、すべての試料について回収率は 102 ~ 105 %、相対標準偏差は 1.6 ~ 5.0 % となり、良好な値が得られた。また、ヒスタミンを含有する試料（カツオ水煮）を用いて、本分析法と衛生試験法に示されている HPLC-FL による分析値を比較した結果、それぞれ 66 及び $69\text{mg}/\text{kg}$ となり、同等の値であった。本法が実試料に対しても有効な方法

であることがわかった。

HILIC-MS/MS 法は、選択性が高い LC/MS/MS を用いて測定を行うため精製する必要がなく、簡易な方法である。また、分析時間は、約 1 時間と短い。これは、衛生試験法に示されている HPLC-FL にかかる約 4 時間に比べて 4 分の 1 であり、より迅速に結果を得ることができる。さらに、有機溶媒や試薬の使用量も少ないなどの利点もある。本法は、ヒスタミン食中毒における迅速な原因究明に対して非常に有効な手法であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 観公子, 牛山博文, 新藤哲也, 上原真一, 安田和男: 食衛誌, 41, 116-121(2000).
- 2) 登田美桜, 山本都, 畝山智香子, 森川馨: 国立衛研報, 127, 31-38 (2009).
- 3) 日本薬学会: 衛生試験法注解, 199-201(2010).
- 4) 斉藤貢一, 堀江正一, 徳丸雅一, 服部静司, 中澤裕之: 食衛誌, 39, 39-41(1998).
- 5) 中嶋昌徳, 杉山明子: 食衛誌, 40, 285-290(1999).
- 6) A. J. Alpert: *J. Chromatogr.*, 499, 177-196(1990).
- 7) 岩崎雄介, 井之上浩一, 伊藤里恵, 吉村吉博, 斉藤貢一, 中澤裕之: 分析化学, 54, 135-142(2005).
- 8) 池上亨, 田窪宏貴, 田中信男: *Chromatography*, 29, 1-6(2008).
- 9) MERCK KGaA: "A Practical Guide to HILIC", p. 4(2008).