

## ノート

# 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

竹内 浩, 一色 博, 澤田陽子, 林 克弘, 前田千恵,  
原 有紀, 竹川雄太, 村田 将, 志村恭子

## Determination of Nonvolatile Amines in Foods by Solid-Phase Extraction

Hiroshi TAKEUCHI, Hiroshi ISSHIKI, Yoko SAWADA, Katsuhiko HAYASHI,  
Chie MAEDA, Yuki HARA, Yuta TAKEKAWA, Sho MURATA and Kyoko SHIMURA

健康危機発生の現場において、ヒスタミンをはじめとする不揮発性アミン類は、事案件数の極めて多いアレルギー様食中毒の原因物質である。健康危機発生時の迅速な対応が求められる中で、本研究は前処理を含めた測定時間の短縮化に着目し、健康危機発生対応に適した不揮発性アミン類の分析法を開発するため、既法の前処理方法を含めた測定法の分析検討を行った。陽イオン交換樹脂のミニカラムを用いた精製方法を検討した結果、迅速に測定溶液の調製を行うことが可能となった。添加回収実験の結果、回収率79.5~118.9%, 相対標準偏差1.1~9.7%と良好な結果が得られた。今後の健康危機発生時において、本研究により改良した分析法が適用可能となった。

キーワード：ヒスタミン, 不揮発性アミン類, 固相抽出, 高速液体クロマトグラフィー

### はじめに

ヒスタミンは、食品中のタンパク質やアミノ酸から主に微生物分解によって生成される食中毒の原因物質である。高濃度に含有する食品を摂取することにより、顔面紅潮、口部灼熱感とともに頭痛や蕁麻疹等を発症する。現在、Codex, EU, 米国, カナダ等において、それぞれの基準値が定められているが、我が国においては食品衛生法に基づく基準値は設定されていない。一方、ヒスタミン以外の不揮発性アミン類も同様に基準値は定められていないが、チラミンはヒスタミン同様に頭痛、動悸などのアレルギー様食中毒症状を引き起こすことや、同じくカダベリンは、食中毒症状を促進させる作用があることが知られており<sup>1)</sup>、健康危機発生時の対応のためには、多様な不揮発性アミン類の分析法を確立する必要がある。

全国的にヒスタミンによる食中毒などの健康危機発生事例が頻発する中で、当所においても、これまでに有症苦情事例において年間数件の食品中のヒスタミン分析などを行っている。これま

で当所では、衛生試験法・注解1990付・追補(1995)に基づき、イオン交換樹脂(アンバーライト・GC-50 Type I, 100~200メッシュ)を用いた分析法を採用してきたが、この方法は分析対象項目がヒスタミンのみであるだけでなく、イオン交換樹脂の活性化に長時間を要し、また多くの酸溶液を消費し、操作が煩雑であるという欠点がある。不揮発性アミン類の分析の多くは健康危害発生時に行われることを考慮すると、短時間で前処理することができ、またHPLCを用いて測定する方が実用性が高いものと考えられる。

そこで、本研究では、前処理を含めた測定時間の短縮化に着目して、既法の前処理法を含めた測定法を改良するなど、健康危機発生対応に適した不揮発性アミン類の分析法について検討した。その結果、良好な結果が得られたので以下に報告する。

## 実験方法

### 1. 試料

市販されているさばの味噌煮（缶詰）、チーズ、赤ワインを用いた。

### 2. 試薬

#### 1) 不揮発性アミン類標準試薬

ヒスタミン二塩酸塩、チラミン塩酸塩およびカダベリン二塩酸塩は和光純薬工業(株)製を用いた。

#### 2) 有機溶媒

アセトンは関東化学(株)製残留農薬試験用、メタノールは同社製高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

#### 3) その他の試薬

トリクロロ酢酸、炭酸カリウム、水酸化ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸二水素カリウム、テトラブチルアンモニウムブロミドおよびギ酸は和光純薬工業(株)製特級、ホウ酸はナカライテスク(株)製特級、フルオレスカミンは東京化成(株)製を用いた。

#### 4) 固相抽出ミニカラム<sup>1,2)</sup>

ジーエルサイエンス社製 InertSep MC-1 (200mg/10mL) を用いた。予めメタノール、水および 25mmol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) 各 5mL でコンディショニングした。

### 3. 標準溶液

標準溶液：各標準試薬を適量採り、水に溶解して 2,000 $\mu$ g/mL の各標準溶液を調製した。

混合標準溶液：標準溶液をそれぞれ 10mL ずつ混合し、水で 40mL に定容した (500 $\mu$ g/mL)。

### 4. 装置および測定条件

#### 1) ホモジナイザー

(株)日本精機製作所製 エクセルオートホモジナイザー

#### 2) RF-HPLC

液体クロマトグラフ：(株)島津製作所製 LC-10AD<sub>VP</sub>

蛍光検出器：同社製 RF-10A<sub>XL</sub>

カラム：(財)化学物質評価研究機構製逆相カラム  
L-column ODS (4.6mm i.d.×150mm, 5 $\mu$ m)

カラム槽温度：45 $^{\circ}$ C

移動相：A 液 0.05mol/L 酢酸緩衝液 (0.005mol/L テトラブチルアンモニウムブロミド含有, pH6.6), B 液 メタノール

B 液：50% (2min)  $\rightarrow$  70% (12min)  $\rightarrow$  85% (15min)

流速：1.0mL/min

検出波長：励起波長 390nm, 蛍光波長 480nm

試料注入量：50 $\mu$ L

### 5. 試験溶液の調製

#### 1) 抽出法

均一化した固体試料 10.0g に 3%トリクロロ酢酸溶液 20mL を加えホモジナイズ抽出後、4 $^{\circ}$ C 5,000rpm で 10 分間遠心分離し上清をろ過 (No.5A) した。残留物に 3%トリクロロ酢酸溶液 20mL を加え 5 分間振とう抽出後、同様に遠心分離し上清をろ過した。得られたろ液 (1) (2) を合一し、3%トリクロロ酢酸溶液で 50mL に定容し、抽出液とした。液体試料の場合は、試料 10.0g に 3%トリクロロ酢酸溶液を加えて 50mL に定容し、抽出液とした。

#### 2) 精製法

抽出液 1mL に 25mmol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) を加えて 20mL とし、ここから 1mL を分取し再度 25mmol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) を加えて希釈し 10mL とした。この溶液を InertSep MC-1 に全量負荷し、25mmol/L リン酸緩衝液 5mL, 次いで水 5mL で洗浄した後 100mmol/L 炭酸カリウム溶液で溶出した。ギ酸 12.5 $\mu$ L を入れた容器に溶出液 2mL の標線まで採取し試験溶液とした。以上の操作 1), 2) を図 1 に示した。

#### 3) 誘導体化法

玉瀬らの方法<sup>3)</sup>を改良した。即ち、0.2mol/L ホウ酸緩衝液 (pH9.0) 2mL に試験溶液 0.2mL を加え混合、さらに、0.6%フルオレスカミン・アセトン溶液 0.2mL を加え混合した。これをメンブランフィルター (PTFE 製 0.45 $\mu$ m) でろ過し、測定溶液とした。

### 6. 誘導体化条件の検討、カラム回収率および標準添加回収実験

#### 1) 誘導体化条件の検討

混合標準液 (500 $\mu$ g/mL) をさばの味噌煮の抽出液 (マトリックス溶液) で希釈しマトリックス混合標準溶液 (100 $\mu$ g/mL) を調製した。このものをさらにマトリックス溶液で希釈し 10, 1 および 0.1 $\mu$ g/mL のマトリックス混合標準溶液を調製した。調製した 0.1~100 $\mu$ g/mL の 4 濃度のマトリックス混合標準液について、水で希釈した混合標準溶液を対照に誘導体化率の違いを調べた。条件 A はマトリックス混合標準溶液 0.2mL に 0.2mol/L ホウ酸緩衝液 (pH9.0) 2mL と 0.3%フルオレスカミン・アセトン溶液 0.2mL を加えて誘導体化した。条件 B はマトリックス混合標準溶液 0.2mL に 0.2mol/L ホウ酸緩衝液 (pH9.0) 2mL と 0.6%フルオレスカミン・アセトン溶液 0.2mL を加えて誘導体化した。

評価方法としては、水で希釈した各標準溶液のピーク面積値を 100%とし、マトリックス混合標

準溶液の誘導体化率を求めた。

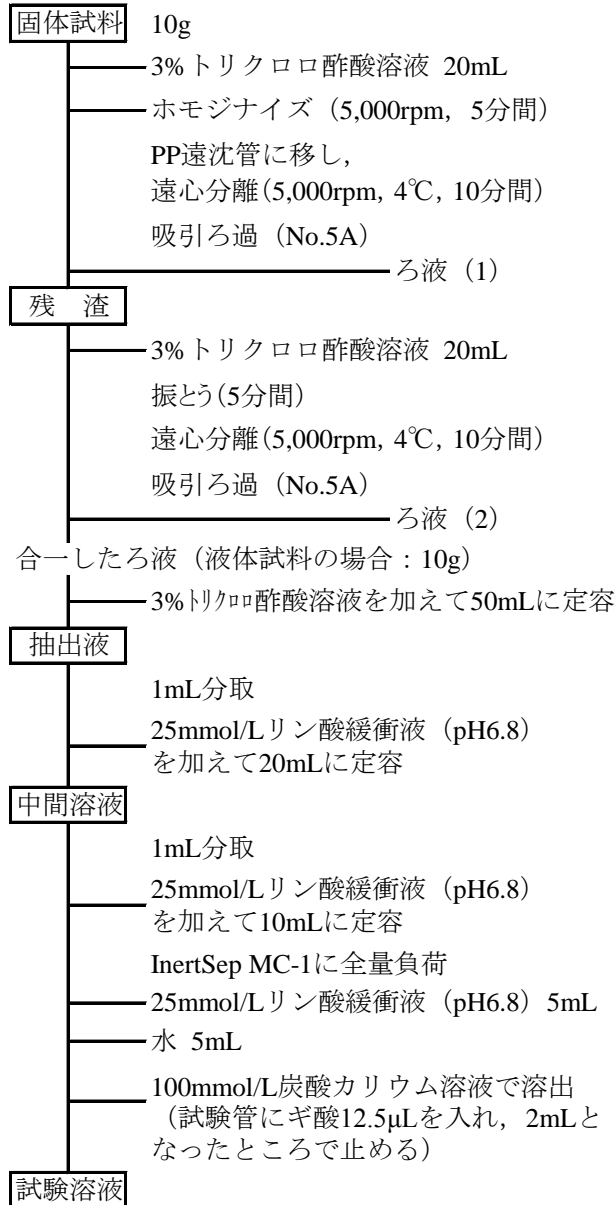


図1 不揮発性アミン類試験溶液調製法

## 2) カラム回収率

3%トリクロロ酢酸溶液 1mL に混合標準溶液 (500μg/mL) をそれぞれ 40μL (試料中不揮発性アミン類濃度 100μg/g に相当) と 2mL (試料中不揮発性アミン類濃度 5,000μg/g に相当) 添加し, 25mmol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) を加えて 20mL に定容した. ここから各 1mL を分取し再度 25mmol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) を加えて 10mL としカラム負荷液とした. 以降は精製法の試料負荷後の操作および誘導体化法に従って測定溶液の調製を行った.

回収率は, 水で希釈した標準溶液のピーク面積値を 100%として求めた.

## 3) カラムへの試料負荷量の検討

さばの味噌煮の抽出液に混合標準溶液 (500μg/mL) を加え, 各アミン類が試料濃度 10μg/g, 5,000μg/g となるように調製した. この溶液を 25mmol/L リン酸緩衝液 (pH6.8) で希釈し, カラムへの試料負荷量を変化させて回収率向上を図った.

## 4) 添加回収実験

低濃度側は試料 10.0g に各不揮発性アミン類を 100μg/g となるように混合標準溶液 (500μg/mL) を適量添加し, 高濃度側は分取した抽出液に混合標準溶液 (500μg/mL) を適量加えて 5,000μg/g となるように調製した. 以降, 図1に従って操作したものを添加回収実験の試験溶液とした. 各アミン類の含有量を算出し, 添加試料の含有量から未添加試料の含有量を差し引くことにより回収率を算出した.

## 実験結果および考察

### 1. 保持時間の確認と検量線および検出限界

標準溶液 0.005μg/mL でのヒスタミンの S/N が 3 であったが, 報告値 (検出限界値) を考慮し検出下限に 0.05μg/mL, 定量下限 0.1μg/mL を採用した. なお, 検出下限は試料中不揮発性アミン類濃度 10μg/g に相当し, ヒスタミンの食中毒が起こらないとされる安全域 5mg/100g (50μg/g) 以下<sup>4)</sup>を十分満たすものである.

不揮発性アミン類 3 種の検量線の直線性の確認を行った. 0.05~50μg/mL の濃度範囲で測定を行い, 検量線を作成したところ, 良好な直線性を示した (表 1) .

また, 標準溶液 0.5μg/mL を繰り返し誘導体化し, 測定した際の保持時間およびピーク面積の相対標準偏差 (RSD%) はそれぞれ 0.1~0.2%, 1.1~1.4%であった (n=5) .

表 1 不揮発性アミン類の保持時間および直線性

測定項目	保持時間 (min)	濃度範囲 (μg/mL)	相関係数
ヒスタミン	5.12	0.05~50	0.9999
チラミン	10.38	0.05~50	0.9999
カダベリン	13.78	0.05~50	0.9999

注) 試行回数 n=3

### 2. 誘導体化条件検討, カラム回収率および標準添加回収率

#### 1) 誘導体化の条件検討

条件 A では, カダベリンにおいて誘導体化試薬の不足により 10 および 100μg/mL の添加標準溶液濃度で誘導体化率の低下が見られた. 条件 B では, フルオレスカミンを 2 倍の濃度としたことで, ア

ミン等のマトリックスが多いサンプルでも高濃度側で定量的に誘導体化されることが確認できたことから条件 B を用いることとした (表 2)。

表 2 誘導体化の条件検討の結果

		各濃度の標準溶液に対する誘導体化率 (%)			
測定項目	条件	添加標準溶液濃度 (μg/mL)			
		0.1	1	10	100
ヒスタミン	A	136.3	109.9	102.7	96.2
	B	279.8	121.1	106.6	103.1
チラミン	A	112.9	101.9	100.9	95.7
	B	110.9	106.6	105.0	104.7
カダベリン	A	133.9	96.4	90.6	83.2
	B	214.9	110.3	100.7	100.7

条件A: 混合標準溶液0.2mL+0.2mol/Lホウ酸緩衝液 2mL  
+0.3%フルオレスカミン・アセトン溶液 0.2mL  
条件B: 混合標準溶液0.2mL+0.2mol/Lホウ酸緩衝液 2mL  
+0.6%フルオレスカミン・アセトン溶液 0.2mL

## 2) カラム回収率

試料中不揮発性アミン類濃度を 100μg/g および 5,000μg/g として行ったカラム回収率の結果は平均回収率 88.1~97.0%, 相対標準偏差 0.4~2.3%と良好であった (表 3)。

表 3 カラム回収率

測定項目	添加濃度 (μg/g)	回収率 (%)	RSD (%)
ヒスタミン	100	91.0	0.4
	5,000	97.0	2.2
チラミン	100	88.1	1.4
	5,000	96.0	1.7
カダベリン	100	89.9	1.7
	5,000	92.7	2.3

注) 試行回数 n=3

## 3) カラムへの試料負荷量の検討

カラムへの試料負荷量の検討として、さばの味噌煮の抽出液 (マトリックス溶液) に標準溶液を添加した溶液を用いカラムの回収率を検討した結果、カラムへの試料負荷量 0.1g の場合に、試料中不揮発性アミン類 5,000μg/g 添加時のヒスタミン回収率が 40%未満, チラミン回収率が 60%未満と味噌に含まれるアミン類によってミニカラムのイオン交換容量の多くを奪われた。そこでカラムへの試料負荷量を 0.01g まで減らしたところ、回収率 94.2~98.0%と良好であったことからこの条件を用いることとした (表 4)。

## 4) 不揮発性アミン類の添加回収実験

さばの味噌煮, チーズおよび赤ワインを用いた

添加回収実験では平均回収率は 79.5~118.9%, 相対標準偏差 1.1~9.7%と良好であり (表 5), 本法は中毒量の 1/10 から中毒量相当以上の高濃度の不揮発性アミン類を含有する試料にも適用可能とわかった。

## まとめ

陽イオン交換樹脂のミニカラムを使用することで、カラム前処理時間の短縮、精製操作の簡便化が可能となった。ミニカラムへの試料負荷量を 0.01g に減らすことで、試料中不揮発性アミン類が 5,000μg/g 試料添加時でも回収率を向上させることができ、誘導体化する前に試験溶液を希釈することなく試料中不揮発性アミン類濃度 10μg/g (1mg%, 中毒量の 1/100 量) から 10,000μg/g (1,000mg%, 中毒量の 10 倍量) の範囲で HPLC での定量が可能となった。カラム回収率では試料中不揮発性アミン類濃度 100μg/g (10mg%) 負荷時で回収率 88.0~91.0%, 相対標準偏差 0.4~1.7%, 5,000μg/g (500mg%) 負荷時で回収率 92.7~97.0%, 相対標準偏差 1.7~2.3%と良好な結果であった。3 種の食品を用いた添加回収実験においては、試料中不揮発性アミン類濃度 100μg/g (10mg%) 添加時の平均回収率は 79.5~118.9%, 相対標準偏差は 1.1~9.7%であったが、5,000μg/g (500mg%) 添加時は平均回収率 91.9~99.8%, 相対標準偏差 1.1~4.2%と良好であり、多くの食品に有用な方法であると考えられる。

表 4 カラムへの試料負荷量による回収率の変化

測定項目	添加濃度 (μg/g)	カラム試料 負荷量 (g)	回収率 (%)	標準偏差	RSD (%)
ヒスタミン	10 <sup>※</sup>	0.2	56.7	—	—
	10	0.1	106.2	1.4	1.3
	5,000	0.1	38.6	2.2	5.6
	5,000	0.02	83.0	6.9	8.3
	5,000	0.01	94.2	2.6	2.8
チラミン	10 <sup>※</sup>	0.2	84.5	—	—
	10	0.1	83.0	1.4	1.7
	5,000	0.1	56.9	1.5	2.6
	5,000	0.02	91.0	6.4	7.1
	5,000	0.01	94.5	1.1	1.2
カダベリン	10 <sup>※</sup>	0.2	103.0	—	—
	10	0.1	104.7	0.9	0.9
	5,000	0.1	88.0	1.9	2.0
	5,000	0.02	95.9	6.1	6.3
	5,000	0.01	98.0	1.5	1.5

注) 試行回数 n=3 ※は試行回数 n=1

表 5 不揮発性アミン類の添加回収実験結果

試料	添加濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )	ヒスタミン		チラミン		カダベリン	
		回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
さばの味噌煮	100	87.9	9.7	85.8	6.0	91.5	3.4
	5,000	94.2	2.8	94.5	1.2	98.0	1.5
チーズ	100	79.5	2.1	83.4	1.1	118.9	4.1
	5,000	95.8	2.7	91.9	2.1	99.8	1.1
赤ワイン	100	86.4	2.1	91.8	1.9	92.7	1.9
	5,000	97.5	4.2	92.8	3.0	99.0	2.0

注) 試行回数 n=3

### 文 献

- 1) Hui, J.Y., Taylor, S.L. Inhibition of *in vivo* histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine *N*-methyltransferase, and monoamine oxidase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **81**, 241-249(1985).
- 2) 坂本智徳, 赤木浩一, 樋脇 弘: 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).
- 3) 大月史彦, 肥塚加奈江, 林 隆義, 山本 淳: LC/MS/MS を用いた不揮発性腐敗アミンの一斉分析法の検討, *岡山県環境保健センター年報*, **34**, 99-103(2010).
- 4) 玉瀬喜久夫 他: 高速液体クロマトグラフィーによる魚肉中ヒスチジン, ヒスタミンの同時分析, *食品衛生学雑誌*, **25**, 525-529(1984).
- 5) 登田美桜 他: 国内外におけるヒスタミン食中毒, *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **127**, 31-38(2009).