

LC/MS/MS を用いたヒスタミン測定方法の検討

山口 玲子

(環境保健研究所 健康科学課)

要旨 これまでヒスタミンはダンシルクロライド誘導体化 HPLC 法で測定していたが、迅速性に欠けていた。そこで、カラム精製後に誘導体化を行わずに、LC カラムに HILIC 系カラムを用いて LC/MS/MS で測定する方法について検討したところ、逆相系ポリマーカラム及び陽イオン交換カラムで精製することにより測定可能となり、迅速性も向上した。

Key Words : ヒスタミン, HILIC系カラム, LC/MS/MS

1. はじめに

ヒスタミンはアレルギー様食中毒の主体であり、国内でも毎年発生が報告されている¹⁾。日本では現在食品中のヒスタミン量に関する法規制は行われていないが、諸外国では規制されており、国際連合食料農業機関/世界保健機構合同専門家会議で最大許容濃度を200mg/kgと定めている²⁾。これまでヒスタミンはトリクロロ酢酸で除蛋白を行い、ダンシルクロライドで誘導体化する方法により測定を行っていたが、試験溶液調製に時間がかかり、迅速性に欠けることが問題であった。そこで抽出にセラミックホモジナイザーを使用し、除蛋白後に誘導体化を行わず、逆相系ポリマーカラム³⁾及び陽イオン交換カラム⁴⁾で精製し、LCカラムに HILIC 系カラムを用いて LC/MS/MS で測定する方法を検討したので報告する。

2. 試料

鮮魚のブリ、魚加工品としてサバの干物、酒類として日本産ブドウから作られた赤ワインを使用した。なお、日本産ブドウから作られた赤ワインは、ヒスタミンが検出されないといわれており、今回使用した赤ワインについても、検出されなかった。

3. 試薬・試液

ヒスタミン標準原液 (1000ppm) : ヒスタミン二塩酸塩 (関東化学) 41.40mg を 5mM 酢酸アンモニウム 50% メタノール溶液で 25mL に定容した。

5%トリクロロ酢酸溶液

1%ギ酸溶液

0.5%ギ酸溶液

5mM 酢酸アンモニウム

50%メタノール

2%アンモニアメタノール溶液

試薬は特級あるいは LC-MS 用を使用した。

精製方法の検討には以下製品を使用した。

Oasis HLB 500mg/12mL (以下「HLB」という。)

Bond Elut SCX 1g/6mL (以下「SCX」という。)

InertSep PRS 500mg/6mL (以下「PRS」という。)

Oasis MCX 500mg/6mL (以下「MCX」という。)

Oasis WCX 150mg/6mL (以下「WCX」という。)

Bond Elut CBA 500mg /6mL (以下「CBA」という。)

4. LC/MS/MS 測定条件

LC

カラム : SHISEIDO CAPCELL CORE PC

2.1mm×150mm 2.7um

カラム温度 : 40℃

流量 : 0.2mL/min

グラジェント条件

移動相 A : 0.1%ギ酸

移動相 B : 0.1%アセトニトリル

A:B=10:90 (初期-1 分間ホールド) →90:10 (7分)

90:10 (15分) →10:90 (20分-5分間ホールド)

ド)

MS/MS

ESI-Positive : MRM モード

イオンソース温度 : 120℃

脱溶媒温度 : 400℃

コーンガス流量 : 50L/h

脱溶媒ガス流量 : 800L/h

コーン電圧 (V) : 17.0

コリジョン電圧 (eV) : 14.0

測定イオン

プレカーサーイオン(m/z) : 112.1

プロダクトイオン(m/z) : 95.1

5. 精製方法の検討

精製カラムの充填剤並びに使用法を示す(表1)。コンディショニングは全てメタノールで行った。

表1 精製カラム充填剤と使用法

| カラム名 | 充填剤 | 平衡化 | 洗浄 | 溶出液 |
|------|--------------|--------|---------------------------|------------------|
| HLB | 逆相系ポリマー | 水 | 無 | 水 |
| SCX | 陽イオン交換シリカゲル | 0.5%ギ酸 | ①水 ②メタノール | 2%アンモニア メタノール |
| PRS | 陽イオン交換シリカゲル | | | |
| MCX | 陽イオン交換ポリマー | | | |
| WCX | 弱陽イオン交換ポリマー | 5mM酢酸 | ①5mM酢酸アンモニウム ②50%メタノール | 0.5%ギ酸 |
| CBA | 弱陽イオン交換シリカゲル | アンモニウム | | |

5.1 逆相系ポリマーカラム

ヒスタミン 200 μg を 0.5%ギ酸で 20 mL に定容した溶液 1 mL を、HLB に負荷し水 15mL 溶出した溶液について、ヒスタミン濃度を測定した。この溶液の計算濃度 0.667 μg/mL に対し、測定濃度は 0.627 μg/mL となり、90%以上回収できることを確認した。

5.2 陽イオン交換カラム

陽イオン交換カラムにヒスタミン標準原液 1 mL (ヒスタミン 1000 μg) を負荷し、洗浄溶出乾固後、5mM 酢酸アンモニウム 50%メタノール溶液で 10mL に定容し 10 倍希釈した溶液 (ヒスタミン濃度 10 μg/mL に相当) について、ヒスタミン標準液 10 μg/mL と面積値を比較した(表2)。

表2 カラム別面積値の比較

| | 面積値 | 回収率(%) |
|----------|---------|--------|
| 10 μg/mL | 7267032 | |
| SCX | 6819442 | 94 |
| PRS | 7328619 | 101 |
| MCX | 6905796 | 95 |
| WCX | 6916102 | 95 |
| CBA | 5078108 | 70 |

CBA 以外の精製カラムはほぼ 100%の回収率となっており、使用可能と思われた。このうち SCX については、自然流下で使用した場合の流下時間が、他の精製カラムに比べ著しく長くなるため検討から除外した。また、WCX については pKa が 4.8 前後であり、ヒスタミンの pKa が 9.75 ということから、試料溶液の pH を 7~7.5 に調製する必要があり、検体の除蛋白操作をトリクロロ酢酸で行った場合、pH の調製が難しくなることから検討から除外した。

5.3 除蛋白と精製カラム連続使用の影響

除蛋白に使用するトリクロロ酢酸を LC/MS/MS に導入しない為には 2 種のカラムで精製することが必要と

考えられたことと、トリクロロ酢酸がカラム精製に影響するかを確認する為、HLB で精製後に PRS、MCX で精製する検討を行った。ヒスタミン標準原液を 5 μg/mL となるように 1%トリクロロ酢酸で希釈し、そのうち 5mL を HLB で精製して得た溶出液を、PRS、MCX にそれぞれ負荷し、洗浄溶出乾固後 5mM 酢酸アンモニウム 50%メタノール溶液で 5mL に定容した溶液(ヒスタミン濃度 5 μg/mL に相当) について、ヒスタミン標準液 5 μg/mL と面積値を比較した(表3)。

表3 HLB-PRS、HLB-MCX 面積値の比較

| | 面積値 | 回収率(%) |
|------------|---------|--------|
| 5 μg/mL | 4440047 | |
| HLB-PRS 精製 | 4096316 | 92 |
| HLB-MCX 精製 | 824289 | 19 |

HLB-MCX では回収率が 19%となったため、HLB-PRS を使用することとした。

6. 試験溶液の調製法

以上の結果から、鮮魚及び魚加工品は以下のような試験溶液調製法とした(図1)。

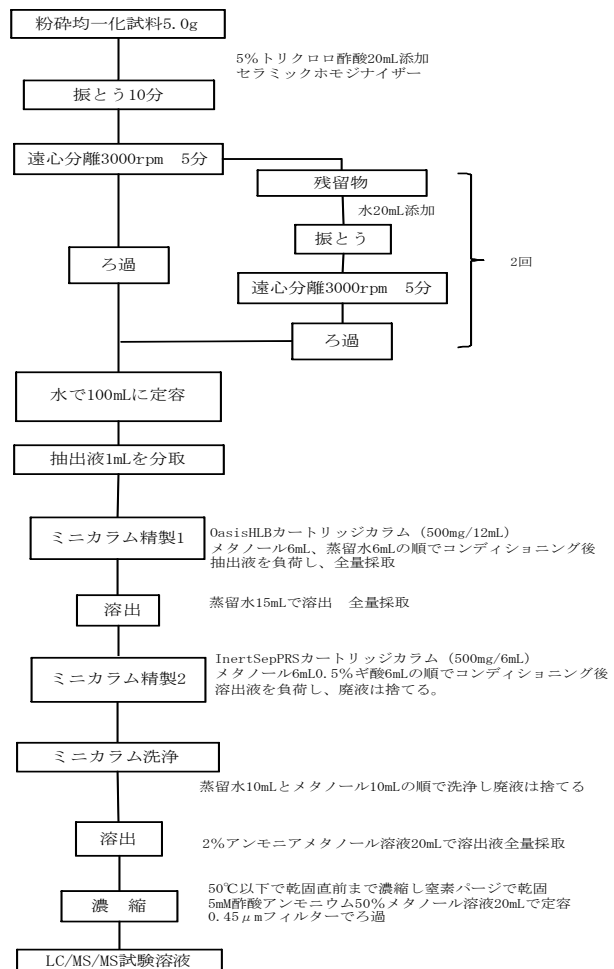


図1 鮮魚及び魚加工品試験溶液調製法

赤ワインについてトリクロロ酢酸で抽出を行ったところ、添加回収率が 60%台となった。そこで抽出溶媒を魚及び魚加工品の抽出液と pH が同程度である 1%ギ酸に変更したところ、添加回収率が 100%前後になったことから、以下のような試験溶液調製法とした (図 2)。

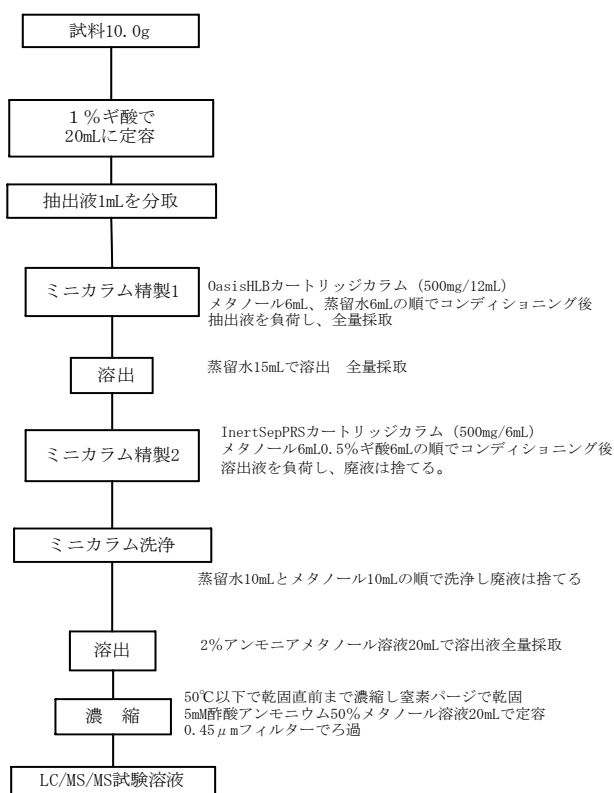


図 2 酒類試験溶液調製法

7. 試験法の評価

食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインを参考にして⁵⁾、鮮魚のブリ及び酒類の赤ワインを用いて行った。添加濃度はブリ 200mg/kg、赤ワイン 20mg/kg とし、施行回数は、真度は 7 回、精度は分析者 1 名が 1 日 3 回 5 日間分析する枝分かれ実験をおこなった。なお検量線はヒスタミン濃度 0.1~1 μg/mL の範囲とし、この場合の定量下限値はブリでは 40 mg/kg、赤ワインでは 4mg/kg である。

8. 結果

真度、精度ともに目標値を達成した (表 4)。

表 4 試験法の評価

| | 結果 (%) | | 目標値 (%) |
|------|--------|------|---------|
| | ブリ | 赤ワイン | |
| 真度 | 97 | 98 | 70~120 |
| 併行精度 | 4.1 | 1.7 | <10 |
| 室内精度 | 5.9 | 2.1 | <15 |

また、妥当性評価された試験法を類似の食品に適用

する場合として⁵⁾、サバの干物について 5 試行で添加回収試験を行い、真度を確認したところ 84%となり、目標値を達成した。

9. 考察

迅速性の観点では、抽出にセラミックホモジナイザーを使用し、除蛋白後に誘導体化を行わずに試験溶液を調製することで、試験溶液調製時間を従来法の半分程度短縮することが出来た。LC/MS/MS 測定時間は 1 検体あたり 25 分であり、検体数によっては検査依頼当日に結果を確認することが可能となった。

また、試験法の評価結果は良好であり、鮮魚、魚加工品、酒類の試験法として使用することが出来ると考えられる。今後は標準作業書を整備し検査依頼に対応していくと同時に、他の加工食品についても添加回収試験を行い、適応食品を増やしていきたい。サバの干物の添加回収試験結果は鮮魚のブリの結果と比較して 10%程度低くなったことから、塩分濃度等が測定結果に影響する可能性も否定できず、確認する必要があると思われる。

一方、ヒスタミン以外の不揮発性腐敗アミン類のアレルギー様食中毒への関与については不明な点が多いが、カダベリンなどのアミン類が共存することで食中毒が起こりやすくなる⁶⁾とも言われており、ヒスタミン以外の不揮発性腐敗アミン類測定について応用できるのかについては今後の検討課題としたい。

文 献

- 厚生労働省, “ヒスタミンによる食中毒について”, <http://www.mhlw.go.jp> (2017.3.31 アクセス)
- 内閣府食品安全委員会, “ヒスタミンファクトシート”, 平成 25 年 2 月 4 日
- 森岡浩文, 福地哲郎, 他, “キャピラリー電気泳動によるカタクチイワシ中のヒスタミン分析法の検討”, 宮崎県衛生環境研究所年報 第 19 号 : 2008, pp.65-67.
- 大月史彦, 肥塚加奈江, 他, “LC/MS/MS を用いた不揮発性腐敗アミン一斉分析法の検討” 岡山県環境保健センター年報 第 34 号 : 2010, pp.99-103.
- “食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部改正について”, 食安発第 1224 第 1 号, 平成 22 年 12 月 24 日
- 寺田安一, “腐敗中毒”, 建帛社 : 1971, pp.80.