

# Py-Tag 誘導体化試薬を用いた LC-MS/MS による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** 第一級アミン類と反応する Py-Tag 誘導体化試薬を用いた LC-MS/MS によるヒスタミン測定方法を検討したところ、ダンシルクロライド誘導体化 HPLC 法、又は HILIC 系カラムを用いた LC-MS/MS 法よりも迅速に測定することが可能となった。

**Key Words** : Py-Tag, ヒスタミン, LC-MS/MS

## 1. はじめに

ヒスタミン測定についてはこれまでに、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後 HPLC 測定をする方法<sup>1)</sup>、除蛋白後に誘導体化を行わず逆相系ポリマーカラムと陽イオン交換カラムで精製し HILIC 系カラムを用いて LC-MS/MS で測定する方法<sup>2)</sup>を報告した。今回は誘導体化試薬として 2,4,6-トリエチル-3,5-ジメチルピリリウムトリフルオロメタンスルホン酸塩 (以下「Py-Tag」という) を使用し、精製等を行わずに LC-MS/MS で測定する方法を検討した。

Py-Tag は、アルカリ条件下で第一級アミン類 (ヒスタミン、プトレシン等) と特異的に反応する質量分析用試薬であり<sup>3)</sup>、誘導体化時間が短く (50°C 15 分)、LC カラムとして、比較的安価で汎用性の高い ODS カラムを使用できるという特徴がある。

## 2. 試料

食品として鮮魚のブリ、魚加工品としてサバの干物、乳製品としてナチュラルチーズ、酒類として日本産ブドウから作られた赤ワインを試料に供した。

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されているが、今回使用した赤ワインについては、予め検出されないことを確認し使用した。

## 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 を水で 25mL に定容した。  
200mM Py0 (Py-Tag) 水溶液 (大陽日酸製)  
0.05% トリエチルアミン (以下 TEA という)  
0.05% TEA90% アセトニトリル

標準液用希釈液 : メタノール 1mL に 0.05% TEA90% アセトニトリルを加えて 200mL とした

0.1% ギ酸溶液

0.1% ギ酸アセトニトリル

試薬は特級あるいは LC-MS 用を使用した。

## 4. LC-MS/MS 測定条件

測定機器 : Quattro Micro API System (Waters 社製)

LC

カラム : InertSustain C18 (GL サイエンス)  
2.1mm×150mm 3μm

カラム温度 : 40°C

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% ギ酸アセトニトリル

A:B=98:2 (初期-1 分間ホールド) → 50:50 (7 分-5 分間ホールド) 98:2 (12.1 分-7.9 分間ホールド) 全 20 分

MS/MS

ESI-Positive : MRM モード

イオンソース温度 : 120°C

脱溶媒温度 : 400°C

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) : 286.2

プロダクトイオン (m/z) : 95.1

## 5. 検量線及び試験溶液調製方法の検討

### 5.1 誘導体化に用いるアルカリ溶液の検討

Py-Tag は pH9.5 のアルカリ条件下で反応させるとなっているが、アンモニウムイオンと反応する為、アンモニアや酢酸アンモニウムを使用できない。また、今回は検体からヒスタミンを抽出後、精製等を行わずに希釈のみで LC-MS/MS により測定することを目指していたことから、りん酸緩衝液等の不揮発性塩類は使用できない。そこで、アルカリ溶液として 0.05%TEA を使用し、ギ酸で pH を調製して、0.1ppm 標準溶液について誘導体化 (図 1) を 3 施行ずつ行い比較した。

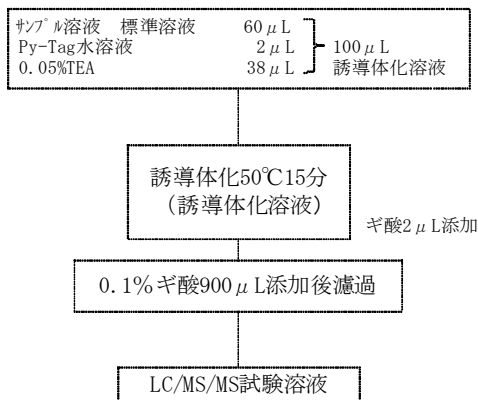


図 1 誘導体化法

0.05%TEA は pH 調製しない場合 pH11.5 となったが、誘導体化の効率が良くばらつきも小さかった。0.05%TEA99mL+0.5%ギ酸 1 mL は pH10.4 となり、ある程度は誘導体化することが出来たが、0.05%TEA と比較して誘導体化効率が悪く、ばらつきも大きかった。また、0.05%TEA をギ酸で調製し pH9.5 にした場合は誘導体化することが出来なかった。これは TEA に緩衝能がないため pH が酸性側に傾いた可能性が示唆された。そこで、pH がよりアルカリ側にあり、誘導体化効率が良かった 0.05%TEA (ギ酸で pH を調製しない) をアルカリ溶液として採用した (表 1)。

表 1 アルカリ溶液の検討

溶液名	面積値			平均	標準偏差	変動計数
	1	2	3			
水	24370	23224	23869	23821	574.51	2.41
0.05%TEA	35137	36243	34007	35129	1118.02	3.18
0.05%TEA99mL +0.5%ギ酸1mL	29554	33885	33752	32397	2463.01	7.60
0.05%TEA (ギ酸でpH調製)	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D

### 5.2 検量線直線性の確認

1~0.005µg/mL 標準溶液について誘導体化を行い、検量線の直線性を確認した (図 2)。

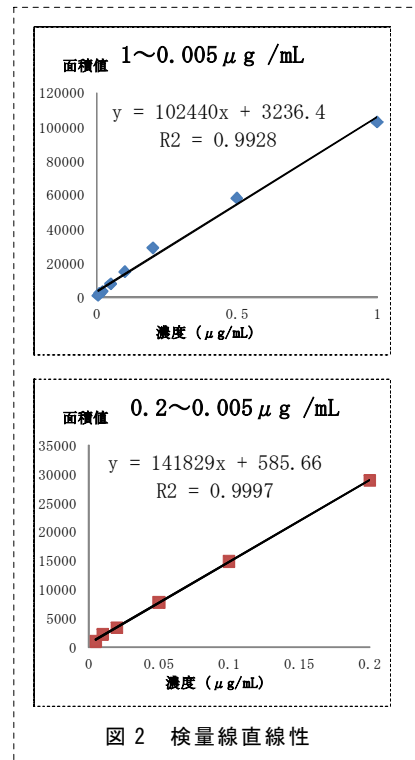


図 2 検量線直線性

0.5µg/mL 以上の濃度では、相関係数 (R<sup>2</sup>) が 0.995 未満と低くなったことから、検量線の最大濃度は 0.2µg/mL 以下とした (表 2)。また、クロマトグラムの S/N 比から定量限界値を 0.005µg/mL として検量線を作成することとした (図 3)。

表 2 検量線ファクター

検量範囲 (µg/mL)	相関係数 (R <sup>2</sup> )	傾き	y切片
1.0~0.005	0.9928	102440	3236
1.0~0.01	0.9932	101535	3871
1.0~0.05	0.9947	98556	6010
0.5~0.005	0.9911	115584	1985
0.5~0.01	0.9913	114318	2430
0.5~0.05	0.9918	109963	4027
0.2~0.005	0.9997	141829	586
0.2~0.01	0.9999	140987	707
0.1~0.005	0.9991	143527	536

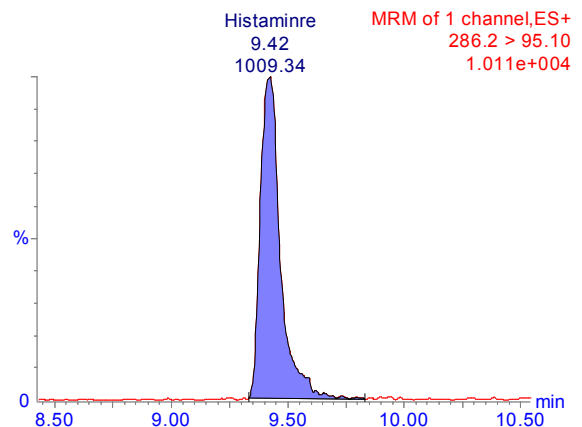


図 3 定量限界値クロマトグラム

### 5.3 検体抽出液の検討

鮮魚のブリと赤ワインを用いて検体抽出液の検討を行った。鮮魚のブリには0.5%ギ酸、メタノール、アセトニトリルを使用し、赤ワインにはメタノール、水、0.05%TEAを使用した。試験溶液の濃度が0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加回収試験を行った。

鮮魚のブリでは、0.5%ギ酸についてはホモジナイズ後に遠心しても溶液が混濁していた為、その後の作業を断念した。アセトニトリルでは添加回収率が21%と低くなった為、メタノールを使用することとした。

赤ワインでは、メタノールの添加回収率が83%となり他の2種の抽出液より低くなった。水と0.05%TEAは95%以上の添加回収率で大差はなかったが、操作性を考えて水を使用することとした(表3)。

表3 検体抽出液の検討

検体名	抽出溶媒	添加回収率 (%)
ブリ	メタノール	96
	アセトニトリル	21
赤ワイン	メタノール	83
	水 0.05%TEA	96 99

### 5.4 抽出時の洗いこみ回数の検討

食品のホモジナイズ後に行う洗いこみの回数について、鮮魚のブリを用いて試験溶液の濃度が0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加回収試験を行い検討した。洗いこみを行わない場合の添加回収率は72%、洗いこみ1回の場合は87%、洗いこみ2回の場合は88%となった。洗いこみ1回と2回ではほとんど差が見られないことから、洗いこみ回数は1回とした。

### 6. 試験溶液調製法

以上の結果から、以下のような試験溶液調製法とした(図4, 5)。

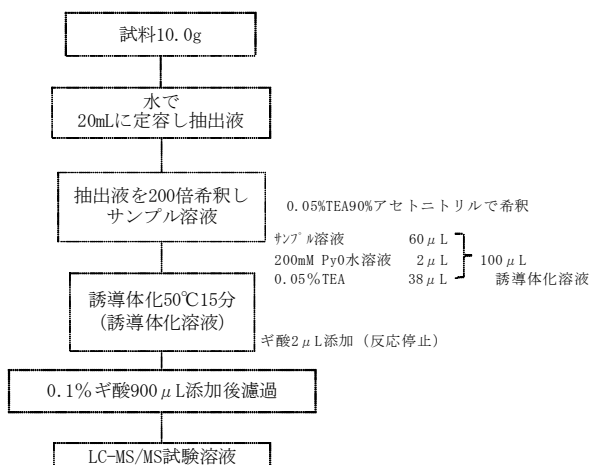


図4 酒類試験溶液調製法

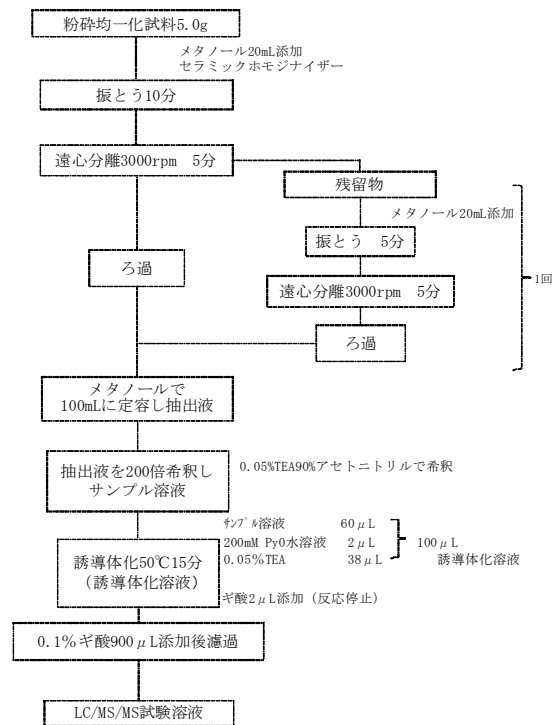


図5 食品試験溶液調整法

### 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<sup>4)</sup>、食品のブリ及び酒類の赤ワインを用いて妥当性評価を行った。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行った。なお、今回の測定条件における検量線はヒスタミン濃度0.2~0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で良好な直線性を示した。この場合の定量下限値は食品(ブリ)では40mg/kg、酒類(赤ワイン)では4mg/kgとなる。

### 8. 結果

真度、精度ともに目標値を達成した(表4)。

表4 評価結果

	結果 (%)		目標値 (%)
	ブリ	赤ワイン	
真度	96	81	70~120
併行精度	1.5	3.6	<10
室内精度	4.0	6.1	<15

また、妥当性評価された試験法を類似の食品に適応する場合として<sup>4)</sup>、魚加工品としてサバの干物、乳製品としてナチュラルチーズについて6試行で添加回収試験を行い、真度を確認したところ、サバの干物では96%、ナチュラルチーズでは93%となり、目標値を達成した。

## 9. 考察

Py-Tag は pH9.5 で反応させることとなっているが、pH11.5 となる 0.05%TEA を用いても安定した反応が得られたことから、緩衝液を使用せずに測定できることが明らかとなった。また、試験法の評価結果は良好であり、食品（鮮魚、魚加工品、乳製品等）及び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。

迅速性については、セラミックホモジナイザーを使用したこと、誘導体化時間が 15 分でありダンシルクロライド法の 60 分に比べて短いこと、精製作業を行わずに希釈のみで測定可能であること、LC-MS/MS の測定時間が 1 回あたり 20 分であることから、既報<sup>1),2)</sup>と比較して、より迅速な結果報告が可能となった。標準作業書を作成し日常検査に役立てて行きたい。

赤ワインの添加回収率が他の食品と比べて 10%以上低いことから、ポリフェノール等の影響が考えられたが、色素を精製することよりも迅速性を優先した。今後、より高い測定精度が必要であれば検討したい。

ヒスタミン以外の不揮発性腐敗アミン類への応用については、Py-Tag と誘導体化物の割合の変化により、誘導体化反応で競合する可能性が高いため、誘導体化溶液の調製方法（Py-Tag の添加量等）を含めて検討する必要がある。また、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ことから、これらに対する本法の応用については、今後の課題である。

昨今の経済連携協定等の締結状況（ヨーロッパ連合との経済連携協定や環太平洋パートナーシップ協定等）から将来的には発酵食品（チーズ、ワイン、魚醤等）の輸入量は増加することが見込まれる。輸入赤ワインではヒスタミンが検出されることがあり、チーズについても多くの報告例がある<sup>5)</sup>。その他の発酵食品についてもヒスタミンが含まれる可能性は否定できないことから、本法を用いた実態調査の必要性について検討して行きたい。

## 謝 辞

今回の検討に当たり、Py-Tag 誘導体化試薬を提供して頂いた、大陽日酸株式会社メディカル事業本部 SI 事業部 SI イノベーションセンター開発課の池田明夏里様、ならびに、同事業部営業部営業課の村主芳広様に深謝します。

## 文 献

- 1) 山口玲子, 宮本廣, “不揮発性アミン類分析法の検討” 千葉県環境保健研究所年報 第 18 号 :

2011, pp.56-60.

- 2) 山口玲子, “LC/MS/MS を用いたヒスタミン測定方法の検討” 千葉県環境保健研究所年報 第 24 号 : 2017, pp.74-76.
- 3) 池田明夏里, 寺内勉, 他 “新規誘導体化試薬「Py-Tag」を用いたヒスタミン分析方法の検討” 第 112 回日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集 : 2016, pp.76.
- 4) “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.
- 5) 井部明広, “発酵食品に含まれるアミン類” 東京都健康安全研究センター年報 第 55 号 : 2004, pp.13-22.