

不揮発性アミン類分析法の検討 (HPLC法について)

山口 玲子、宮本 廣

1 はじめに

不揮発性アミン類は、アミノ酸の微生物的腐敗による分解過程で生じるアミン類のうちヒスタミン、カダベリン、スペルミジン、チラミン、プトレシンなどをいう。不揮発性アミン類の試験は魚介類や食肉類等たんぱく質を主とする食品の腐敗の目安に、あるいはアレルギー様食中毒の原因検索の為にされる。

アレルギー様食中毒の主体はヒスタミンであるが、ヒスタミンが最少発症量(100mg/100g程度と言われている)より少ない場合でも食中毒を起こすことがあり、これはカダベリン等の他の不揮発性アミン類の相乗効果によるとされている^{文献2)}。

これまで、不揮発性アミン類の分析はヒスタミン測定用簡易キットで行っていたが、他の不揮発性アミン類も同時に精度よく測定できる分析方法^{文献1),2)}を導入する必要があると考え今回、複数の不揮発性アミンを高速液体クロマトグラフ(以下HPLCという)で同時に測定する方法を検討し、試験法の妥当性評価^{文献3)}をしたので報告する。

2 試験法の概要

試料から酸性下で不揮発性アミンを抽出し、オクタンスルホン酸ナトリウムでイオン対を形成し、カラム精製する。精製後ダンシルクロライドで誘導体化し、過剰なダンシルクロライドを除去後、トルエンに逆抽出し濃縮する。アセトニトリルで定容し、HPLCで測定する。

3 検体

検体は、重金属等のモニタリング検体として搬入された魚を使用した。

4 試薬・試液

トリクロロ酢酸：試薬特級
オクタンスルホン酸ナトリウム：試薬特級
C18,1000mgミニカラム
(Sep-Pak Vac 6cc 1g C18 Cartridges)
ミニカラムはメタノール 10 mL、水 5 mL、0.05mol/Lオクタンスルホン酸ナトリウム 5 mLの順で洗浄してか

ら使用した。

メタノール：残留農薬用
無水炭酸ナトリウム：試薬特級
ダンシルクロライド：生化学用
アセトン：試薬特級
プロリン：試薬特級
トルエン：残留農薬用
アセトニトリル：HPLC用
塩酸：試薬特級
ヒスタミン二塩酸塩：試薬特級
カダベリン二塩酸塩：試薬特級
プトレシン二塩酸塩：試薬特級
1,8-ジアミノオクタン：試薬特級
(検討ではチラミン塩酸塩・スペルミジンリン酸塩 6水和物も使用した)
20%トリクロロ酢酸：トリクロロ酢酸 20gを水に溶解し 100mLとした。
0.1mol/L オクタンスルホン酸ナトリウム：オクタンスルホン酸ナトリウム 2.16gを蒸留水に溶かして 100 mLとした。
(0.05mol/L オクタンスルホン酸ナトリウムは 0.1mol/Lオクタンスルホン酸ナトリウムを 2倍に希釈して使用した。)
メタノール:水(8:2)：メタノール及び水を容量比で 8:2になるように混合した。
1%ダンシルクロライド・アセトン溶液：ダンシルクロライド 100 mgをアセトンに溶かして 10mLとした。
10%プロリン溶液：プロリン 1.0gを水に溶かして 10 mLとした。

5 HPLC 測定条件

HPLC：島津製作所 LC-10 シリーズ
カラム：COSMOSIL5C18-AR-
長さ 25cm
内径 4.6mm
粒径 5 μm
col 温度：40
移動相：アセトニトリル：水=65:35

検出器：蛍光検出器 励起波長 325nm
蛍光波長 525nm

流量：1 mL/min
サンプル量：10 µL

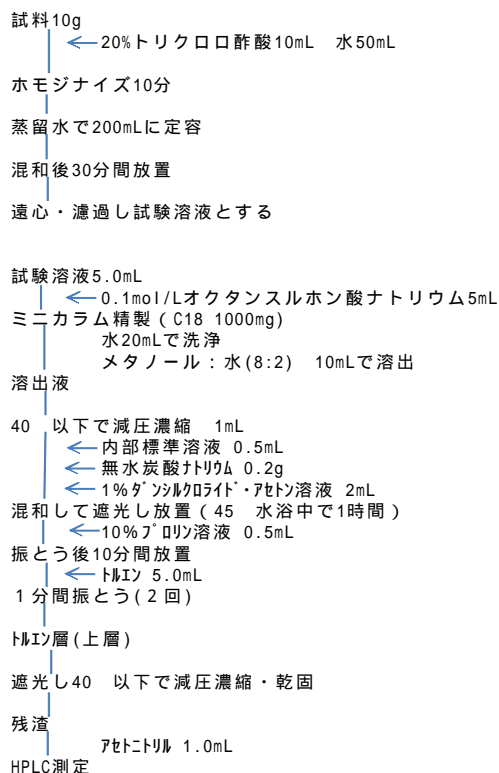
6 抽出方法

試料 10g をホモジナイザーカップに採り、これに20%トリクロロ酢酸 10 mL および水 50 mL を加えて15000 回転/分で 10 分間ホモジナイズした。これを水で200 mL に定容し、混和して 30 分間放置後、必要に応じて遠心・濾過し試験溶液とした。

試験溶液 5 mL を分取し、0.1mol/L オクタンスルホン酸ナトリウム 5 mL を加えてよく混和後、ミニカラムに負荷した。次いで水 20 mL でミニカラムを洗浄した後、メタノール：水(8:2)10 mL でアミン類を溶出し、溶出液を全量採取し 40 以下で減圧濃縮し、約 1 mL の濃縮液とした。

誘導体化は、濃縮液に内部標準溶液 0.5mL、無水炭酸ナトリウム 0.2g、1%ダンシルクロライド・アセトン溶液 2mL を加えてよく混和し、遮光して 45 の水浴中で1時間加温した。加温後 10%プロリン溶液 0.5mL を加え、振とうし 10 分間放置した。その後トルエン 5mL を加えて1分間激しく振とうし、上層のトルエン層を採取した。再度トルエンを加えこの操作を 2 回行い、トルエン層を合わせて 40 以下で減圧濃縮・乾固した。

残留物にアセトニトリル 1mL を加えてよく混和したものを HPLC 分析用試料とした(図 1)。



食品衛生検査指針化学編 2005 を一部改変

図 1 抽出方法

今回の検討では添加回収試験・枝分かれ試験を行い、添加量は、高濃度としてヒスタミンの最小発症量(100 mg/100 g)の4分の1、低濃度として Codex 規制値(100 µg/g)となるように標準液を添加した(表 1)。

表 1 添加量

	ヒスタミン		カダベリン		プトレシン		チラミン		スペルミジン	
	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
添加量(µg)	100	200	20	50	20	50	40	100	20	50
計算濃度(µg/mL)	25	62.5	5	12.5	5	12.5	10	25	5	12.5

7 検量線の作製

ヒスタミン標準原液(1000 µg/mL)：ヒスタミン二塩酸塩 165.6mg を 0.5mol/L 塩酸で溶解し 100.0mL とした。

カダベリン標準原液(1000 µg/mL)：カダベリン二塩酸塩 171.4mg を 0.5mol/L 塩酸で溶解し 100.0mL とした。

プトレシン標準原液(1000 µg/mL)：プトレシン二塩酸塩 182.7mg を 0.5mol/L 塩酸で溶解し 100.0mL とした。

ヒスタミン標準原液 25.0 mL、カダベリン標準原液 5.0 mL、プトレシン標準原液 5.0 mL を 100 mL メスフラスコに採り 0.5mol/L 塩酸で定容し、これを混合標準溶液とした。

(検討ではチラミン及びスペルミジンもそれぞれ 1000 µg/mL 標準原液を作製し、チラミン標準原液 10mL、スペルミジン標準原液 5.0 mL を加えて混合標準溶液として使用した)

内部標準物質 1.8-ジアミノオクタン原液(1000 µg/mL)：1.8-ジアミノオクタン 100.0mg を 0.5mol/L 塩酸で溶解し 100.0mL とした。

内部標準溶液の調製は、1.8-ジアミノオクタン原液 2.0 mL を 100 mL メスフラスコに採り 0.5mol/L 塩酸で定容し、内部標準溶液とした。

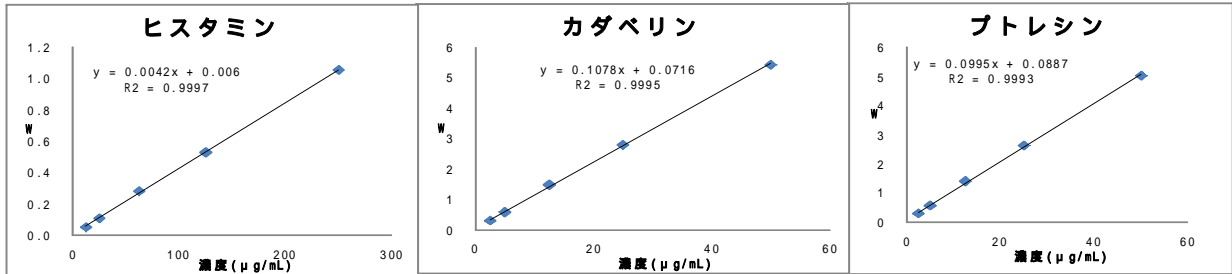
混合標準溶液 0.05、0.1、0.25、0.5、1.0mL を採り各々に 0.5mol/L 塩酸を加えて 1.0 mL としたものを調製し、誘導体化以降の操作を検体と同様に行って検量線を作成した。

8 添加回収試験

ヒスタミン、カダベリン、プトレシンでは 92.6~109.3%の回収率(真度)であった。チラミンでは 42.5~74.9%、スペルミジンでは 39.6~104.8%の回収率(真度)であった。真度は 70~120%で分析方法として妥当性があると評価できる^{文献3)}。今回の検討では、ヒスタミン、カダベリン、プトレシンでは妥当性があると評価できたが、チラミン、スペルミジンではばらつきも大きく、妥当性があると評価できなかった(図 2)。

ヒスタミン			カタペリン			ブトレシン			内標
濃度	面積値	内標比	濃度	面積値	内標比	濃度	面積値	内標比	面積値
12.5	27327	0.052	2.5	158653	0.302	151625	0.288	0.288	526139
25	56383	0.108	5	304230	0.581	293296	0.561	0.561	523253
62.5	144489	0.281	12.5	763396	1.484	717405	1.395	1.395	514307
125	280602	0.527	25	1488085	2.796	1396057	2.623	2.623	532216
250	470162	1.052	50	2429837	5.435	2249073	5.031	5.031	447079
低濃度1	49625	0.104	307371	0.645	288172	0.604	476811	23.4	5.2
低濃度2	51670	0.105	313330	0.634	303412	0.614	494152	23.6	5.3
低濃度3	51766	0.104	319396	0.642	295748	0.594	497813	23.4	5.1
低濃度4	33345	0.103	208026	0.642	202119	0.623	324191	23.2	5.4
低濃度5	38591	0.106	231039	0.635	222883	0.612	363955	23.9	5.3
高濃度1	136136	0.292	684400	1.469	606956	1.303	465994	68.3	13.0
高濃度2	148034	0.285	775498	1.494	745825	1.437	518949	66.7	13.2
高濃度3	135989	0.265	770613	1.503	708566	1.382	512792	61.9	13.0
高濃度4	143491	0.292	723766	1.471	638786	1.298	492011	68.2	13.0
高濃度5	141735	0.264	822148	1.530	764047	1.422	537205	61.6	13.5

	添加回収率(%)					
	ヒスタミン		カタペリン		ブトレシン	
	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
1	93.8	109.3	106.5	103.7	103.8	97.6
2	94.3	106.7	104.5	105.6	105.8	108.4
3	93.7	99.0	105.9	106.2	101.8	104.0
4	92.6	109.1	105.9	103.9	107.7	97.3
5	95.7	98.5	104.6	108.3	105.4	107.2
平均	94.0	104.5	105.5	105.6	104.9	102.9



チラミン			スベルミジン			内標
濃度	面積値	内標比	濃度	面積値	内標比	面積値
5	47873	0.091	2.5	105161	0.200	526139
10	97304	0.186	5	203735	0.389	523253
25	246910	0.480	12.5	468049	0.910	514307
50	477649	0.897	25	931655	1.751	532216
100	798026	1.785	50	1498612	3.352	447079
低濃度1	44439	0.093	123364	0.259	476811	4.5
低濃度2	48995	0.099	131665	0.266	494152	4.8
低濃度3	44193	0.089	100714	0.202	497813	4.2
低濃度4	37243	0.115	94836	0.293	324191	5.7
低濃度5	37782	0.104	97938	0.269	363955	5.1
高濃度1	156968	0.337	182037	0.391	465994	18.2
高濃度2	169934	0.327	430716	0.830	518949	17.7
高濃度3	177388	0.346	476970	0.930	512792	18.7
高濃度4	101961	0.207	196108	0.399	492011	10.9
高濃度5	168821	0.314	424312	0.790	537205	16.9

	添加回収率(%)			
	チラミン		スベルミジン	
	低濃度	高濃度	低濃度	高濃度
1	44.9	72.9	59.3	39.6
2	48.3	70.8	61.6	92.7
3	42.5	74.9	42.2	104.8
4	57.2	43.7	69.5	40.6
5	50.9	67.8	62.4	87.9
平均	48.8	66.0	59.0	73.1

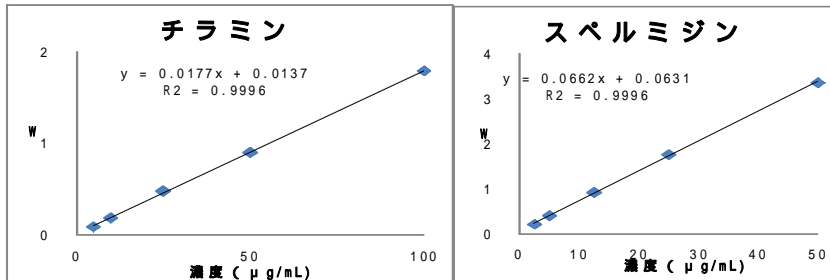


図2 添加回収試験

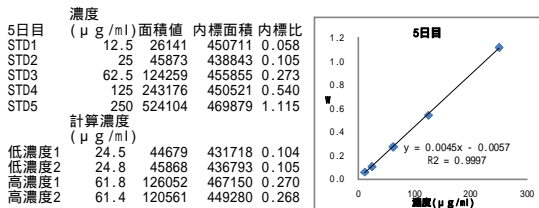
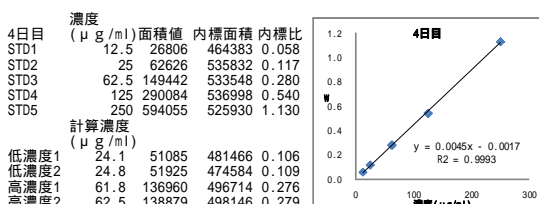
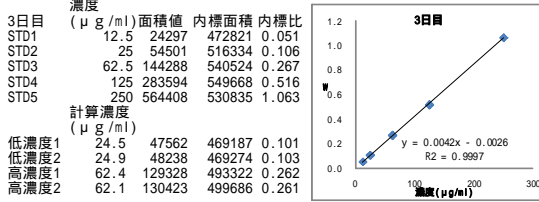
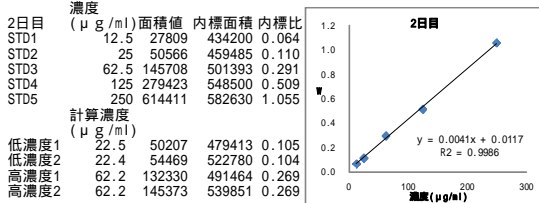
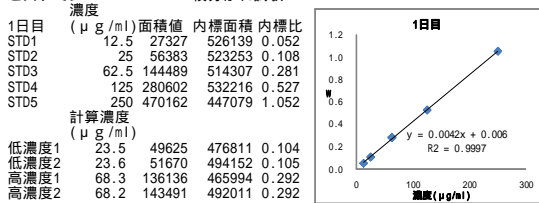
9 枝分かれ試験

2 検体で 5 日間の枝分かれ試験を行った。各分析値が 0.1 以上なので、ヒスタミン、カダベリン、ブトレシンでは、併行精度は 10% 未満、室内精度は 15% 未満であり妥当性があると評価できる。チラミン、スペルミジンでは、ばらつきが大きく今回の検討では妥当性があるとは評価できなかった^{文献 3)}(表 2、図 3)。

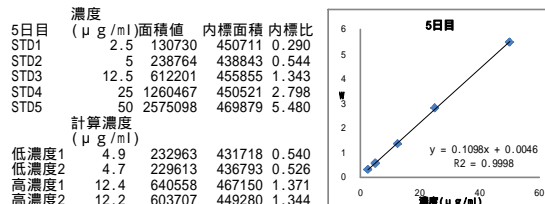
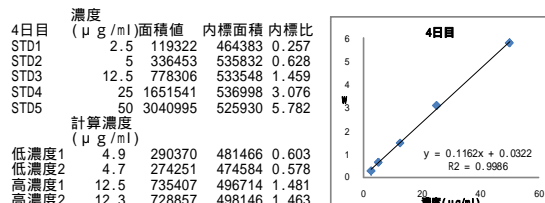
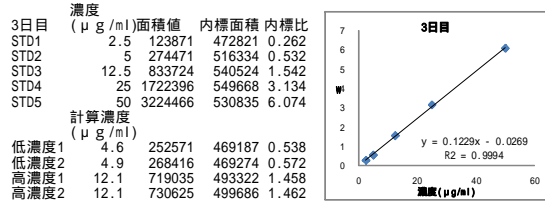
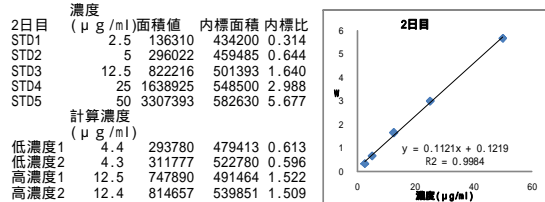
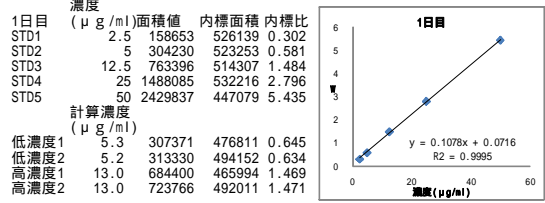
表 2 枝分かれ試験

計算濃度 (μg/mL)	ヒスタミン		カダベリン		ブトレシン		チラミン		スペルミジン	
	25	62.5	5	12.5	5	12.5	10	25	5	12.5
併行精度 (%)	1.17	0.41	2.65	0.81	3.33	0.62	23.90	14.66	9.37	25.77
室内精度 (%)	4.1	4.42	7.25	2.66	7.56	5.35	24.59	15.27	16.70	31.57

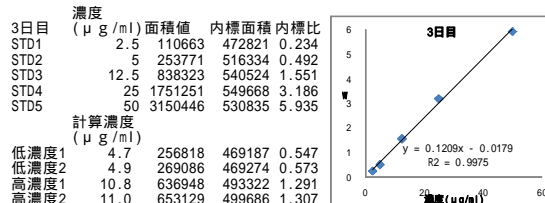
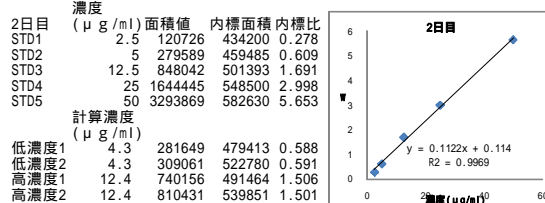
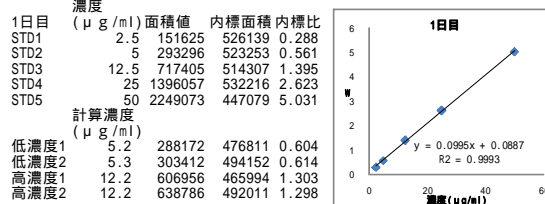
ヒスタミン 枝分かれ試験



カダベリン



ブトレシン



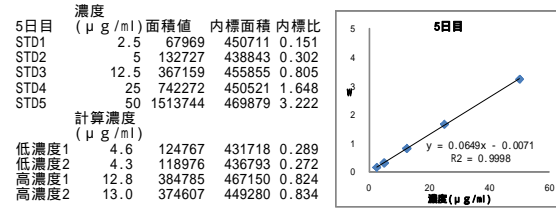
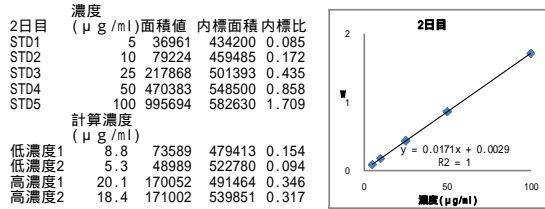
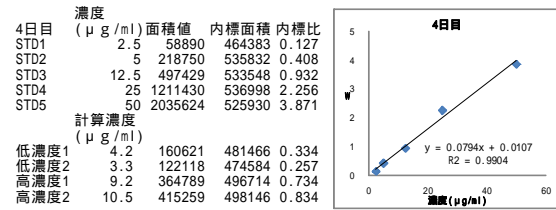
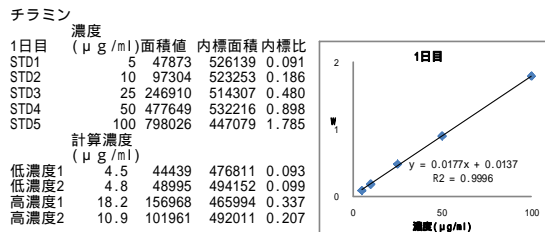
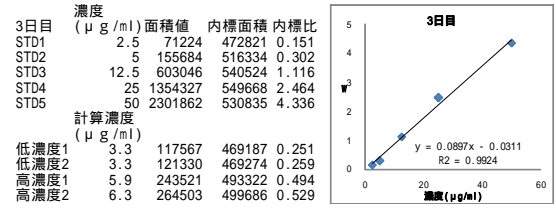
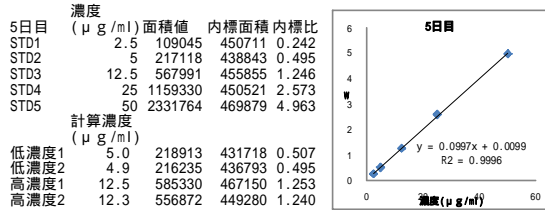
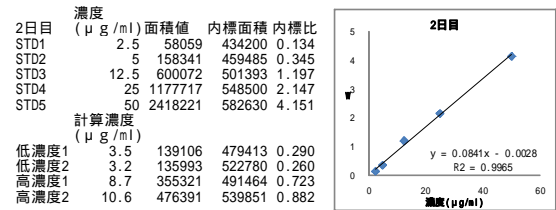
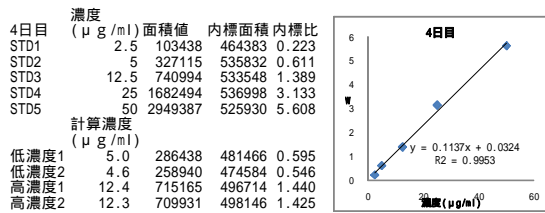
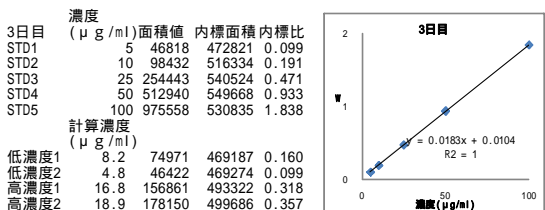


図3 枝分かれ試験



10 まとめ

不揮発性アミン類の試験法について今回は、食品衛生検査指針理化学編2005に掲載されているトリクロロ酢酸で抽出する方法を一部改変して検討した。ヒスタミン、カダベリン、プトレシンの3項目は、真度、併行精度、室内精度共に妥当性があると評価できたため標準作業書に追加した。チラミン、スベルミジンでは妥当性があるとは評価できなかった。また発酵食品については、検討することが出来なかった。魚介類のチラミン、スベルミジン及び発酵食品については、今後の検討課題とした。

参考文献

- 1) 食品衛生検査指針 理化学編 2005
厚生労働省監修 日本食品衛生学会
- 2) 衛生試験法・注解 2005
日本薬学会編集 金原書店株式会社
- 3) 『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』
食安発第1115001号 平成19年11月15日

