

オンライン固相脱水誘導体化 GC/MS システムを用いた アジ中ヒスタミン分析の検討（第一報）

○松尾俊介¹, 新川翔也¹, 島三記絵¹, 川上正美¹, 佐々野僚一¹

¹株式会社アイスティサイエンス

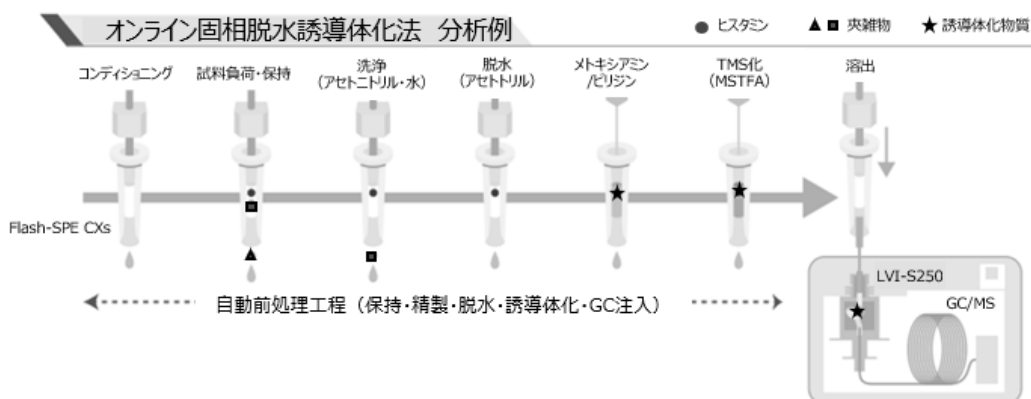
【目的】ヒスタミンは赤身魚中に含まれるヒスチジンにヒスタミン産生菌の酵素が作用し生成される。試験法はトリクロロ酢酸や塩酸で抽出しダンシルクロライドやフルオレスカミンによる誘導体化後に HPLC にて測定する方法が一般的である。本検討ではオンライン固相脱水誘導体化 GC/MS システムを用い MSTFA での TMS 誘導体化による試験の省力化および自動化を目的とした。

【方法】生鮮アジをドライアイス予冷凍結粉砕した試料 2g 採取し、0.1N 塩酸 25 mL でホモジナイズ抽出を行い、抽出器の洗液を合わせ 40 mL に定容し遠心分離後の上清を抽出液とした。抽出液 200 μ L 分取しアセトニトリル 800 μ L を混合し 10 分間静置し除蛋白後遠心分離を行い、上清を分取し 0.2 N 水酸化ナトリウム溶液を 120 μ L 添加し pH9 に調整し試料液とし、オンライン固相脱水誘導体化 GC/MS システム SPL-M100（アイスティサイエンス製、以下当システム）により分析を行った。当システムで自動で試料液を 100 μ L 分取しポリマー系陽イオン交換固相 Flash-SPE CXs（アイスティサイエンス製）に負荷しアセトニトリル・水（1:1）で洗浄後、アセトニトリ

ルで水を除去しメトキシアミン含有ピリジンおよび MSTFA を順次固相に含浸させ固相内で誘導体化（TMS 化）しヘキサンで溶出し、溶出液の全量を大量注入口装置 LVI-S250（アイスティサイエンス製）を搭載した GC/MSD（7890B-5977B アジレント・テクノロジー製）に注入し測定を行った。

【結果】塩酸抽出後アセトニトリルによる除蛋白と陽イオン交換固相での保持・精製効果で良好なクロマトグラムを得た。また、固相脱水誘導体化法により固相にヒスタミンを保持状態でアセトニトリル通液による脱水と誘導体化（TMS 化）を行い不揮発性アミンであるヒスタミンの GC/MS 分析や、当システムにより固相抽出から誘導体化、GC 注入までを全自動処理が可能となることが示唆された。当システムは固相からの溶出液全量を GC に注入することで定量に必要な感度を得られた。添加回収試験では試料中 100 ppm で約 76 % の回収率を得られた。

【考察】本検討では衛生基準の指標となる試料中 100 ppm での判定でヒスタミン試験の省力化が期待できるが、今後、他の試料への拡大や前処理条件の最適化が必要と考えている。



オンライン固相脱水誘導体化 GC/MS システムを用いた アジ中ヒスタミン分析の検討（第一報）

○松尾俊介¹, 新川翔也¹, 島三記絵¹, 川上正美¹, 佐々野僚一¹
1 株式会社アイステイサイエンス

1,目的

ヒスタミン食中毒は、ヒスタミンが高濃度に蓄積された食品、特に魚類及びその加工品を食べることにより発症する、アレルギー様の食中毒である。ヒスタミンは、食品中に含まれるヒスチジンにヒスタミン産生菌の酵素が作用し、ヒスタミンに変換されることにより生成する図4。また、ヒスタミンは熱に安定であり、また調理加工工程で除去できないため、一度生成されると食中毒を防ぐことはできない。1)

試験法はトリクロロ酢酸や塩酸、ギ酸で抽出しゲルシリクロライドやフルオレスカミンによる誘導体化後にHPLCにて測定する方法が一般的である。2) アミン類は誘導体化後にGC/MS測定が可能で、固相誘導体化とその自動化がすでに発表されている。3) 本検討では不揮発性アミンであるヒスタミンをオンライン固相脱水誘導体化GC/MSシステム（SPE-GC）を用いMSTFAでのトリメチルシリル（TMS）誘導体化による試験の省力化および自動化を目的とした。

2,抽出・除タンパク・pH調整

50 mL PPチューブ
↓
← 試料 アジ2 g (凍結粉砕)
↓
← 標準液 1000 ppmを0.2 mL添加 (試料中100 ppm)
↓
← 0.1 mol/L塩酸 25 mL
ホモジナイズ 12,000 rpm, 1 min
↓
← シャフトを0.1 mol/L 塩酸 5 mL×2回 洗入れ
撈拌
↓
40 mL定容 (0.1 mol/L 塩酸)
↓
遠心分離 (3,600 rpm, 5 min)

1.5 mL PPチューブ
↓
← 上清 200 µL
↓
← アセトニトリル (ACN) 800 µL 除蛋白
撈拌 (10 s)
↓
静置 (10 min)
↓
遠心分離 (14,000 rpm, 1 min)
↓
上清分取 (1 mL)
↓
← 0.2 mol/L 水酸化ナトリウムaq 120 µL (pH約9)
撈拌
↓
1.5 mL試料バイアルに移しSPE-GCにセット (100 µL分取)

図 1 前処理フロー

3,固相脱水誘導体化（SPE-GC自動工程）

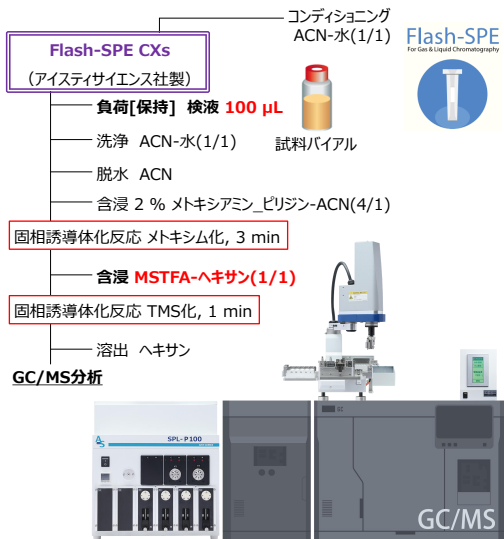


図 2 オンライン固相脱水誘導体化GC/MSシステム
(アイステイサイエンス社製)

4,GC/MS分析

オンラインSPE-GCシステム SPL-M100

(アイステイサイエンス社製)

SPE Cartridge : Flash-SPE CXs
Sampling Volume : 100 µL (固相負荷)

GC用大量注入口 LVI-S250

(アイステイサイエンス社製)

Insert Type : Spiral Insert
Injector Temp. :

220℃ (0.5 min)-50℃/min-290℃ (24 min)

GC/MS 7890B-5977B MSD

(アジレント・テクノロジー社製)

Inlet Mode Split 1:50

(注入2分後にガスセーバー, split 1:15)

Flow Mode : Constant Flow, 1 mL/min

Pre-Column : 不活性シリカキャピラリーチューブ0.25 mm i.d. x 1m

(ジーエルサイエンス社製)

Column : InertCap 5HT, 0.25 mm i.d. x 30 m, df:0.25 µm

(ジーエルサイエンス社製)

Oven Temp. : Total 26 min

100℃ (2 min)-10℃/min-320℃ (2 min)

Trans. Line Temp. : 290℃

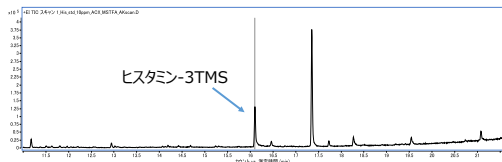
MS Method Scan, m/z 70-600 (2.8 min~)

図 3 GC/MS分析条件

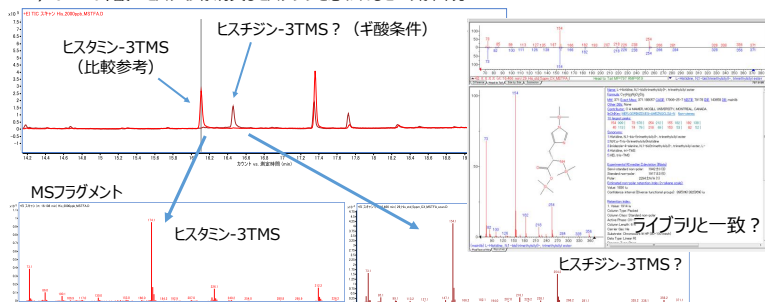
5,検討内容

【抽出液の検討】

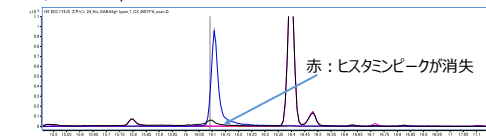
1) ACN・水 : RT16.1 分にピーク出現 (SPE以降のstdピーク確認のみ)



2) 0.1 %ギ酸 : ヒスタミンが消失しヒスチジンと思われるピークが出現



3) 0.1 mol/L塩酸 : ヒスタミンピークが消失



4) 0.1 mol/L 塩酸 + 0.2 mol/L水酸化ナトリウムaqでpHを約9に調整

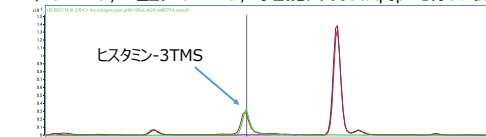


図 4 抽出溶媒種によるピーク挙動

【参考文献,出典】

1)厚生労働省ホームページ <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>

2)衛生試験法 注解 2005 p.180~182

3)株式会社アイステイサイエンス ホームページ 技術資料 <https://www.aisti.co.jp/technote>

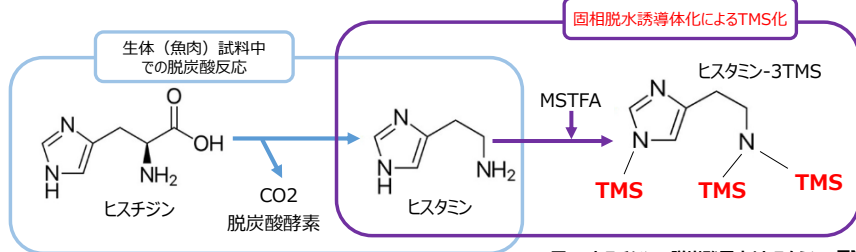


図 5 ヒスチジンの脱炭酸反応とヒスタミンのTMS化

6,結果

1) 検量線と添加回収試験結果 (N = 3)

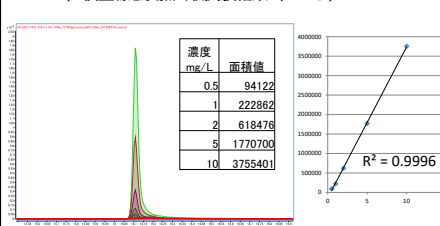
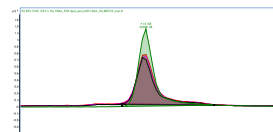


図 6 検量線の直線性



面積値	回収率 (%)
169303	76.0
163342	73.3
178382	80.0
平均	76.4
標準偏差	3.4
CV (%)	4.4

図 7 添加回収試験
(試料バイアル中1 ppm)

7,まとめ

- 抽出操作から試料液の調整では、0.1 N塩酸で抽出し、遠心分離後に上清を分取しアセトニトリルで除蛋白し0.2 N水酸化ナトリウム水溶液でpHを9付近に調整した。図 1
- 固相抽出カラムはFlash-SPE CXsを選択し、固相にヒスタミンを陽イオン交換相互作用で保持後に洗浄、アセトニトリル通液で脱水後に、メトキシアミン・ピリジン液でメトキシ化、続いてMSTFAでトリメチルシリル化（TMS化）を行った。（固相脱水誘導体化）図 2, 5
- 固相脱水誘導体化後の溶出液をGCにオンライン注入を行い、注入口にはGC用大量注入口を用いることで大量の溶出液を注入可能だった。図 2, 3
- 文献を参考に、抽出液を0.1 %ギ酸および0.1 mol/L塩酸を試したところ、いずれもヒスタミンピークが消失した。ギ酸ではヒスチジンと思われるピークが出現し、ヒスタミンからヒスチジンに変化した可能性があるが、原因及び詳細については不明であった。
- 0.1 mol/L塩酸で抽出後の固相に負荷前にpHを弱塩基とすることで安定的にヒスタミンピークを確認し、今回はpH9付近を採用した。図 4
- 1) ~ 3) の条件下で比較的良好な検量線直線性と衛生管理の指標となる試料中100ppmにおいて回収率、再現性を得た。図 6, 7 今後は他の試料での検討および回収率の向上を試みたい。