

Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS による食品中ヒスタミンの 迅速で容易な高感度・高信頼性分析 メソッドの開発

アプリケーションノート

食品テスト

著者

Nick Byrd
Campden BRI*
Chipping Campden, Gloucestershire
United Kingdom

*Campden BRI はイギリスに拠点を置く、
食品・飲料分野で技術的サポートを提供する
独立したグローバルな会員制組織です。
<http://www/campdenbri.co.uk/>

はじめに

生体アミン (BA) は、微生物、野菜、および動物の代謝過程で生成される塩基性窒素化合物です。これらの化合物は、魚類、チーズ、肉、ワイン、ビール、野菜、チョコレートなどの幅広い食品にさまざまな濃度で含まれます。食品に含まれる、生体アミンは、場合により、毒性や健康の問題を引き起こすことがあります。最も頻繁に生じる健康上の問題は、ヒスタミンが原因となるものです。

Campden BRI は、ヒスタミン、チラミン、トリプタミンなどの生体アミン化合物の分析に適した、液体クロマトグラフィ/トリプル四重極質量分析装置による生体アミンメソッドを開発しました。各国の法規制では、多くの場合、結果が求められるのはヒスタミンだけです。このアプリケーションノートでは、そのヒスタミンの分析について説明します。

ヒスタミンの健康被害はサバ科中毒と呼ばれます。これは、この疾患がマグロなどのサバ類の摂取と関連があるからです。実際に、2011~2012年の12か月間で、RASFF (European Commission Rapid Alert System for Food and Feed) から、魚肉製品について中毒に関する警告が7回、通関拒否が10回発効されました。欧州連合 (EU) の規制 No. 1441/2007 によるヒスタミンの法定上限は、サバ科、ニシン科、カタクチイワシ科、シイラ科、アミギリ科、およびサンマ科については 100~400 mg/kg です。



Agilent Technologies

食品に含まれる生体アミンを測定するための既存のメソッドでは、誘導体化後に高圧液体クロマトグラフィ (HPLC) と蛍光検出を使用しています。この分析には約 60 分の分析時間を要します。また、不十分な抽出と誘導体化手順で発生する干渉により、一般に結果の精度と一貫性が不十分になるというリスクも生じます。

このアプリケーションノートでは、UHPLC-MS/MS とマルチブルリアクションモニタリング (MRM) を使用したシンプルで迅速なメソッドについて説明します。このメソッドでは、迅速な酸抽出およびろ過の前処理だけで適用できます。このメソッドは、ヒスタミンだけではなく、チラミンやトリプタミンなどの生体アミンの分析に適用できることもアジレントのラボで確認されています。質量分析装置を使用しているため、誘導体化が不要です。実際の分析で同位体標識の内部標準物質を使用することにより、より信頼性の高い結果を得ることが可能です。

実験方法

試薬および標準

ヒスタミン標準と重水素化ヒスタミン内部標準を Qmx Laboratories (イギリス、タックステッド) から入手しました。ヒスタミン標準を使用し、アセトニトリルで 1,000 ppm 溶液を生成しました。この溶液を使用し、0.1 M HCl で検量線を作成しました。

装置

このメソッドは、Agilent 1290 Infinity LC と Agilent Jet Stream を搭載した Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムで開発したものです。機器の設定条件を表 1 に示します。

サンプル前処理

食品サンプル (10 g) に 0.1 M HCl 50 mL を加え、重水素化された同位体ヒスタミン内部標準を加えました。この試料を攪拌し、0.2 μm のナイロンフィルタでろ過しました。定量操作は 1~50 mg/L で行うため、試料を 1/5 希釈します。一般的な汚染を起こしている生体アミンの濃度範囲は 5~250 mg/kg であるため、この検量線から定量の結果を得ることができます。応答がこの範囲を超える場合は、サンプルをさらに希釈してから、再分析を行い定量します。

表 1. Agilent 1290 Infinity LC システムおよび Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムの機器の設定条件

LC 条件

分析カラム	Cogent Diamond Hydride カラム 100A 4 μm 150 × 2.1 mm 7000-15P-2	
カラム温度	30 °C	
注入量	0.5 μL	
移動相	A = 水、0.1 % ギ酸 B = アセトニトリル、0.1 % ギ酸	
流量	400 μL/min	
グラジエント プログラム	時間 (分)	% 溶媒 B
	0	70
	2	65
	6	10
	8	10
	9	70
	ストップタイム : 9 分	

MS 条件

取り込みパラメータ	Agilent Jet Stream を使用した ESI、 ポジティブイオン化、
シースガス温度	400 °C
シースガス流量	12 L/min
乾燥ガス流量	11 L/min
乾燥ガス温度	200 °C
ネブライザ圧力	45 psig
ノズル電圧	1,250 V
Vcap 電圧	5,500 V

分析パラメータ

トリプル四重極 LC/MS システムによるヒスタミン分析のパラメータを表 2 に示します。

表 2. ヒスタミンの取り込みパラメータ

標的化合物	プリカーサイオン	プロダクトイオン	コリジョンエネルギー	セル加速
ヒスタミン (定量イオン)	112	68.1	24	7
ヒスタミン	112	95.1	16	7
ヒスタミン	112	54.1	48	7
ヒスタミン D4	116	99.1	12	7
ヒスタミン D4	116	85.1	16	7

結果と考察

クロマトグラフィによる分離

C3 カラムを使用すると、ヒスタミンの良好なリテンションが得られると同時に、マトリックス効果が最小限に抑えられ、干渉から確実に分離できます。低濃度では、図 1 に示すように同じトランジションを持つ他の化合物が観察されることがあります。そのようなクロマトグラムでは、同位体ヒスタミン内部標準によって確実な定性と定量ができます。

チーズサンプル

サンプル A は標準の検量線作成の最低濃度の点より低い濃度ですが、このメソッドでは十分な感度が得られており、検量線を用いて定量することができます。この試料の抽出は 50 mL に 10 g を加えて行われたため、自然汚染では約 1 mg/kg であったと推定されます。サンプル B は 300 ppm のスパイク回収率の実験です。この試料の抽出は 100 mL に 10 g を加えて行われたため、289 mg/kg (>96 % 回収率) の結果が得られました。

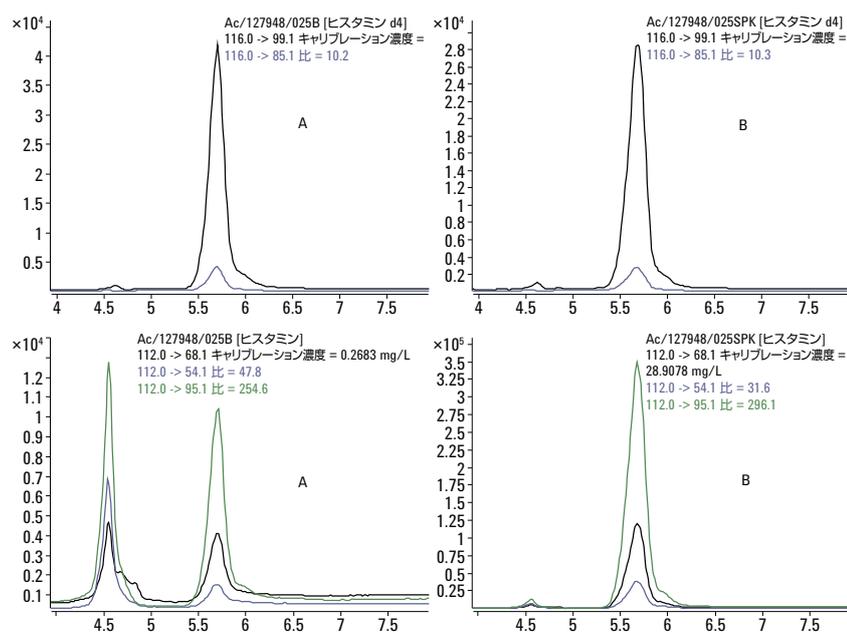


図 1. チーズサンプルに含まれるヒスタミンの定量およびクオリファイアのトランジション

定量および感度

ヒスタミンの検量線は、1~50 mg/L の範囲の定量で優れた直線性を示し、 R^2 値は概して 0.999 を超えています (図 2)。この範囲は、実際に EU の規制により求められる法定限界を大幅に下回るレベルです。食品マトリックス内で生体アミンの形成が始まるポイントを確認することは有効であり、このメソッドでは、図 1 に示すようにさらに低いレベルまで定量できる感度があります。

その他の実験

100 mg/kg (n = 10) でスパイクした魚の組織について回収率の実験を行いました。ヒスタミンの回収率は $99 \pm 4.6\%$ でした。他の 2 つの生体アミン (チラミン、トリブタミン) のデータは示していません。詳細情報については、アジレントまでお問い合わせください。

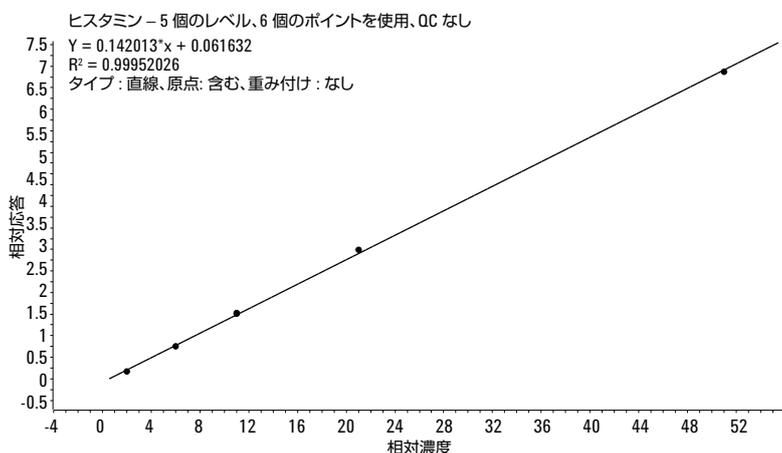


図 2. 0.1 M HCl での 1~50 mg/L のヒスタミンの検量線

結論

食品中のヒスタミンを測定するためのシンプルで迅速な、容易に実施できる分析メソッドを開発しました。このメソッドでは、迅速で低コストの抽出の前処理と、Agilent Jet Stream テクノロジーを搭載した Agilent 6490 トリプル四重極 LC/MS システムによる高感度 LC/MS/MS 測定と組み合わせました。このメソッドは、EU の法定規制の濃度から、ヒスタミン形成のポイントの確認までに適用できる低い検出下限を実現しています。このメソッドを他の Agilent トリプル四重極システムに適用する際には、アジレントまでお問い合わせください。このメソッドは、他の生体アミンの同時測定を組み込む場合にも活用できます。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2013

Printed in Japan

March 22, 2013

5991-1286JAJP



Agilent Technologies