SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. L554A

高速液体クロマトグラフィー

Nexera™デュアルインジェクションシステムによる魚肉の鮮度、腐敗状態の迅速測定

– 魚肉中のATP関連物質、ヒスタミンおよびアミノ酸の同時分析 –

魚介類の筋肉は畜産動物に比べ、組織が軟弱で水分が多いため、腐敗が早いことで知られています。魚介類の鮮度を正確に判定することは、食の安心安全の面で非常に重要となります。

動物の筋肉のエネルギー源である ATP（アデノシン三リン酸）の変化を筋肉の鮮度低下の指標とする方法も広く利用されており、魚肉の鮮度を数値で評価する場合には K 値がよく利用されています。

一方で、近年、不揮発性腐敗アミンであるヒスタミンによる食中毒からアレルギーを発症する事例も報告されています。マグロなどの赤身魚が腐敗すると、ヒスタミン（アミノ酸の一種であるヒスチジンの代謝物）が高濃度に蓄積されます。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ません。よって、国際食品規格委員会（Codex）や欧州をはじめとする各国では、ヒスタミン濃度の基準が設定されています。

アプリケーションニュース No. L536 では、魚肉の K 値を測定し、鮮度の経時変化について、マルチデータレポートを作成した例をご紹介しました。ここでは、Nexera デュアルインジェクションシステムを用いて、鮮度指標である K 値、腐敗状態の指標であるヒスタミンを同時分析した例をご紹介します。なお、本稿の分析条件では、魚肉に含有されるうまみをはじめとする栄養成分で知られるアミノ酸、核酸も同時分析可能でした。

N. Iwata

■二系統の分析を同時分析可能なデュアルインジェクションシステム

一般に、ATP 関連物質およびヒスタミンを含むアミノ酸を分析する際には、移動相、分析カラム、検出器などの分析条件が異なるため、2 台の HPLC でそれぞれを分析するか、あるいは、1 台の HPLC で分析を 2 回実施する必要があります。しかし、鮮度や腐敗状態のように、サンプルが経時変化するものに対しては、できる限り迅速に結果を得ることが求められます。Nexera デュアルインジェクションシステムでは、独立した 2 つの流路にそれぞれサンプルを注入することで、系統の異なる分析を同時に行うことが可能です。また、得られた 2 つの分析データは、一つのデータファイルに格納されるため、同一サンプルに対する統合的な解析とデータ管理が容易になります（図 1）。

本稿では、ATP 関連物質分析、ヒスタミンを含むアミノ酸分析の検出には、それぞれフォトダイオードアレイ（PDA）検出器（SPD-M40）と蛍光検出器（RF-20AXS）を使用しました。

■対象成分

対象成分は、ATP 関連物質 6 成分、ヒスタミンおよびアミノ酸 24 成分（タンパク質構成 20 成分と魚肉に関連する成分 4 成分）の計 31 成分です。 表 1 に対象成分を示します。

表 1　対象成分

ATP-related compounds*1		10	Serine	21	Tyrosine
1	Hx	11	Glutamine	22	Valine
2	IMP	12	Glycine	23	Methionine
3	HxR	13	Histidine	24	Histamine
4	AMP	14	Threonine	25	Cystine
5	ADP	15	β-Alanine	26	Tryptophan
6	ATP	16	Arginine	27	Phenylalanine
Histamine and amino acids		17	Alanine	28	Isoleucine
7	Aspartic acid	18	Taurine	29	Leucine
8	Glutamic acid	19	Anserine	30	Lysine
9	Asparagine	20	Carnosine	31	Proline

＊1: Hx: Hypoxanthine, HxR: Inosine, IMP: Inosine 5′-monophosphate,
AMP: Adenosine 5′-monophosphate,
ADP: Adenosine 5′-diphosphate, ATP: Adenosine 5′-triphosphate

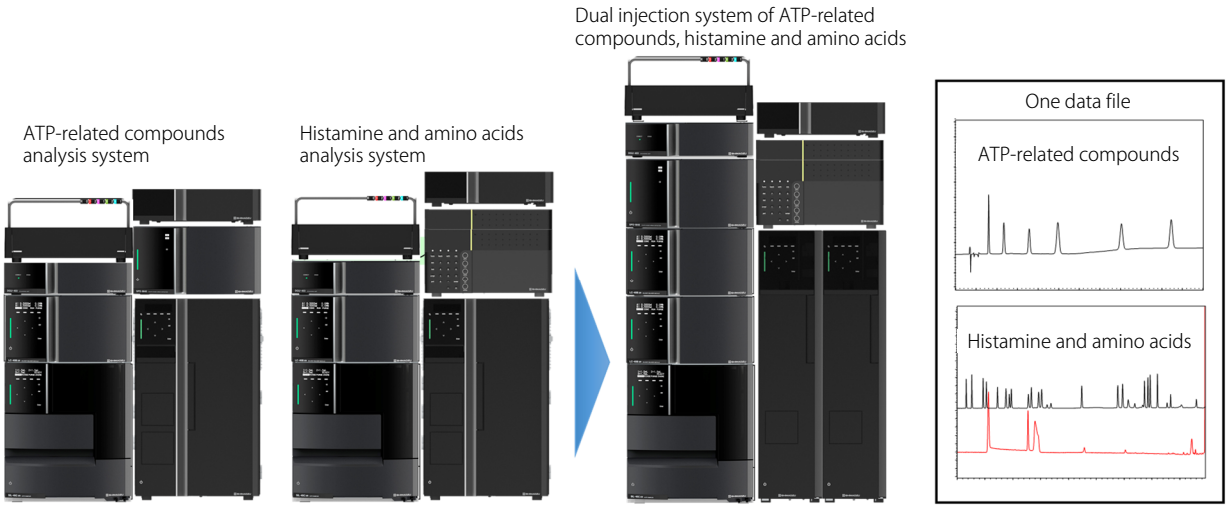

図 1　各シングルシステム（左）とデュアルインジェクションシステム（右）

■前処理方法および HPLC 分析条件

サンプルには、マグロを用いました。過塩素酸による除タンパクと抽出の後、中和を行い HPLC にて分析しました[1)]（図 2）。

表 2 に分析条件を示します。ATP 関連物質の分析は、アイソクラティック溶離で分離することが多いですが、グラジエント溶離を行うことにより、多検体分析において繰り返し安定した結果が得られる条件としました。ヒスタミンを含むアミノ酸分析は、*o*-フタルアルデヒド（OPA）およびクロロギ酸 9-フルオレニルメチル（FMOC）を用い、オートサンプラによる自動プレカラム蛍光誘導体化を行いました（表 3、4）。これにより、手動による煩雑な前処理（例えば、ダンシルクロリド誘導体化など）が不要であり、誘導体化から分析開始までの時間を一定にできます。

また、本稿では、低吸着ガラスバイアル TORAST™-H Glass Vial（図 3）を用いました。このバイアルは 1.5 mL と小容量の 150 μL の 2 種類のラインアップがあります。誘導体化試薬と誘導体化前の試料には、1.5 mL バイアルを用い、試料と誘導体化試薬を反応させるバイアルには、少量でも混ざりやすい 150 μL バイアルを用いました。図 4 にオートサンプラへのサンプルセット例を示します。Nexera のオートサンプラ SIL-40 シリーズは、サンプルラックを 3 個設置できるので、図 4 のように用途別にバイアルをセットすることでサンプルセットミスを防ぐことができます。

表 3　自動プレカラム誘導体化の概要

① MPA*2 solution 20 μL
② OPA reagent 20 μL
③ Sample 10 μL
④ Mix
⑤ FMOC reagent 5.0 μL
⑥ Mix
⑦ Injection

＊2 Mercaptopropionic acid

図 3　TORAST-H Glass Vial

表 4　誘導体化試薬の調製

- Mercaptopropionic acid solution
  Add 10 μL of 3 - mercaptopropionic acid into 10 mL of 0.1 mol/L borate buffer.
- OPA Reagent
  Add 0.3 mL of ethanol into 10 mg of *o*- phthalaldehyde and dissolve completely. Then add 0.7 mL of 0.1 mol/L borate buffer and 4 mL of ultrapure water.
- FMOC Reagent
  Dissolve 10 mg of 9 - fluorenylmethyl chloroformate into 50 mL of acetonitrile.

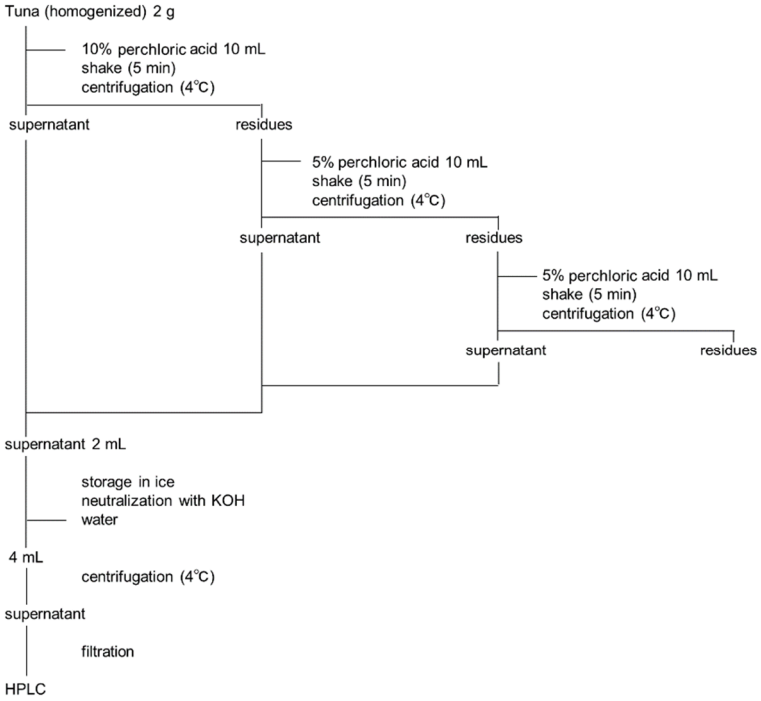

図 2　前処理プロトコール

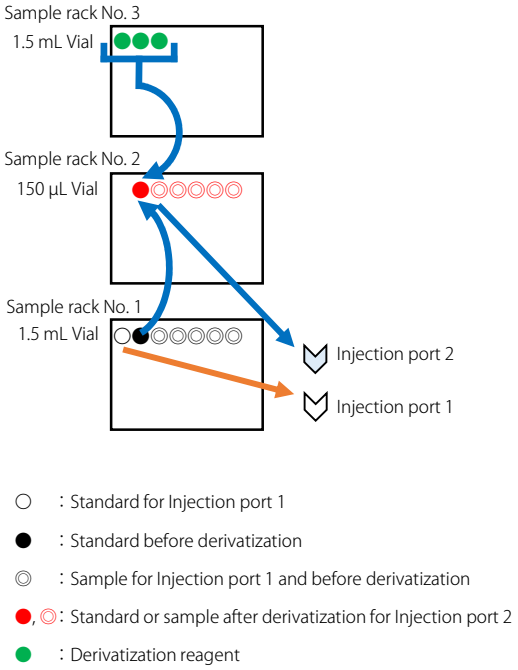

図 4　オートサンプラへのサンプルセット例

表 2　分析条件

		＜ATP-related compounds＞	＜Histamine and amino acids＞
System	:	Nexera dual injection system	
Column	:	Shim-pack™ GIST 3 μm C18 AQ (100 mm L, 3.0 mm I.D., 3 μm)	Shim-pack Velox™ C18 (100 mm L, 3.0 mm I.D., 2.7 μm)
Flow rate	:	0.8 mL/min	0.8 mL/min
Mobile phase	:	A) Water/Acetonitrile=100/1 (v/v) containing 0.15 mol/L Phosphoric acid, 0.225 mol/L Triethylamine B) Water/Acetonitrile=80/20 (v/v) containing 0.15 mol/L Phosphoric acid, 0.225 mol/L Triethylamine	A) 20 mmol/L (Potassium) phosphate buffer (pH 6.5) B) Acetonitrile/ Methanol/ Water =45/40/15 (v/v/v)
Time program	:	0%B (0-4 min)→12%B (11.5 min)→100%B (11.51-18.5 min) → 0%B (18.51-32 min)	5%B (0 min)→13%B (8 min)→25%B (15 min)→ 52%B (21.5 min) →100%B (21.51-27.50 min)→ 5%B (27.51-32 min)
Column temp.	:	30 ℃	35 ℃
Injection volume	:	10 μL	1 μL
Detection	:	PDA 260 nm	FL Ex: 350 nm, Em: 450 nm (Ch1) Ex: 266 nm, Em: 305 nm (Ch2)

■前処理抽出溶媒の検討と添加回収率の確認

過塩素酸にて ATP 関連物質を抽出する前処理方法は以前から報告されていますが、ヒスタミンやアミノ酸についても同様に抽出されるか検討しました。操作ブランクとして、水と過塩素酸にてそれぞれヒスタミン、ヒスチジンを各 1 μmol 添加し抽出したところ、いずれも過塩素酸の場合に安定した抽出効率が得られました（表 5）。

また、マグロを用いて、「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」に基づき、6 併行の添加回収試験を実施しました。ヒスタミンを国際食品規格委員会（Codex）の基準値濃度（10 mg/100 g）になるように添加し、30 分静置後、6 サンプルを同時に前処理しました。表 6 に添加回収試験結果を示します。真度（回収率の平均値）、併行精度ともに良好な結果となりました。

表 5　抽出溶媒の違いによるヒスタミン、ヒスチジンの抽出効率

N	Extraction efficiency (%)			
	Histamine		Histidine	
	Water	Perchloric acid	Water	Perchloric acid
1	84.0	97.7	93.8	92.5
2	100.8	95.7	102.1	93.0

表 6　ヒスタミンの添加回収試験（N=6）

N	Recovery rates (%)
1	96.8
2	98.3
3	99.8
4	99.8
5	101.0
6	103.0
Average (%RSD)	99.8 (2.14%)

■検量線

対象の 31 成分について検量線を作成したところ、いずれの成分においても寄与率 r^2=0.999 以上と良好な直線性が得られました。表 6 に各成分の検量線濃度範囲と寄与率を示します（表 7）。

■魚肉中の ATP 関連物質、ヒスタミン、アミノ酸の一斉分析および K 値、ヒスタミン濃度測定

生のきはだマグロを用い、購入直後に前処理したものと、保存温度を変更して 1 日後に前処理したものを分析し、K 値とヒスタミン濃度を確認しました。保存温度は、冷蔵（4 ℃）保存と室温（25 ℃）を検討しました。購入直後と購入 1 日後（4 ℃保存）を比較すると、K 値はわずかに上昇（+2.6%）し、鮮度の経時変化が認められました。また、保存温度を比較すると、25 ℃保存では K 値は大幅に上昇（+25.1%）し、鮮度が落ちましたが、ヒスタミンは生成されませんでした。

同様に、購入後 6 日間、冷蔵保存した生のびんちょうマグロについても、K 値とヒスタミン濃度を確認しました。その結果、K 値は 70.4%と腐敗と言われる領域にまで上昇し、かつ、Codex 基準値以下のヒスタミンが検出されました。濃度は 2.1 mg/100 g でした。図 5 に標準品およびマグロを分析したクロマトグラムを、表 8 に経過日数、保存温度におけるマグロの K 値とヒスタミン濃度を示します。

また、ヒスタミンは多数のアミノ酸と分離検出でき、魚肉に多いとされるヒスチジン、アラニン、タウリン、アンセリン、カルノシン、リジンなどの成分も同時に分析可能でした。表 9 に魚肉中に多いとされる核酸、アミノ酸について、各成分の濃度を示します。

表 8　経過日数、保存温度におけるマグロの K 値とヒスタミン濃度

	days	Temperature (℃)	K value*3 (%)	Histamine (mg/100 g)
Yellowfin Tuna	0	4	36.1	N.D.
	1	4	38.7	N.D.
		25	61.2	N.D.
Albacore Tuna	6	4	70.4	2.1

＊3 Definition formula for K value

$$\text{Formula}\quad \frac{Hx+HxR}{Hx+HxR+IMP+AMP+ADP+ATP}\times 100$$

表 7　検量線濃度範囲と寄与率（r^2）

	Compound	Conc. range (μmol/L)	r^2		Compound	Conc. range (μmol/L)	r^2
1	Hx	1-300	0.99982	17	Alanine	0.25-100	0.99994
2	IMP	1-300	0.99983	18	Taurine	0.25-100	0.99995
3	HxR	1-300	0.99984	19	Anserine	0.25-100	0.99997
4	AMP	1-300	0.99987	20	Carnosine	0.25-100	0.99995
5	ADP	1-200	0.99998	21	Tyrosine	0.25-50	0.99995
6	ATP	1-200	0.99944	22	Valine	0.25-50	0.99995
7	Aspartic acid	0.25-50	0.99994	23	Methionine	0.25-50	0.99996
8	Glutamic acid	0.25-50	0.99995	24	Histamine	0.25-50	0.99999
9	Asparagine	0.25-50	0.99995	25	Cystine	0.25-25	0.99953
10	Serine	0.25-50	0.99995	26	Tryptophan	0.25-50	0.99993
11	Glutamine	0.25-50	0.99995	27	Phenylalanine	0.25-50	0.99995
12	Glycine	0.25-100	0.99996	28	Isoleucine	0.25-50	0.99995
13	Histidine	0.25-100	0.99968	29	Leucine	0.25-50	0.99996
14	Threonine	0.25-50	0.99994	30	Lysine	0.25-100	0.99995
15	β-Alanine	0.25-50	0.99991	31	Proline	1-25	0.99953
16	Arginine	0.25-50	0.99994				

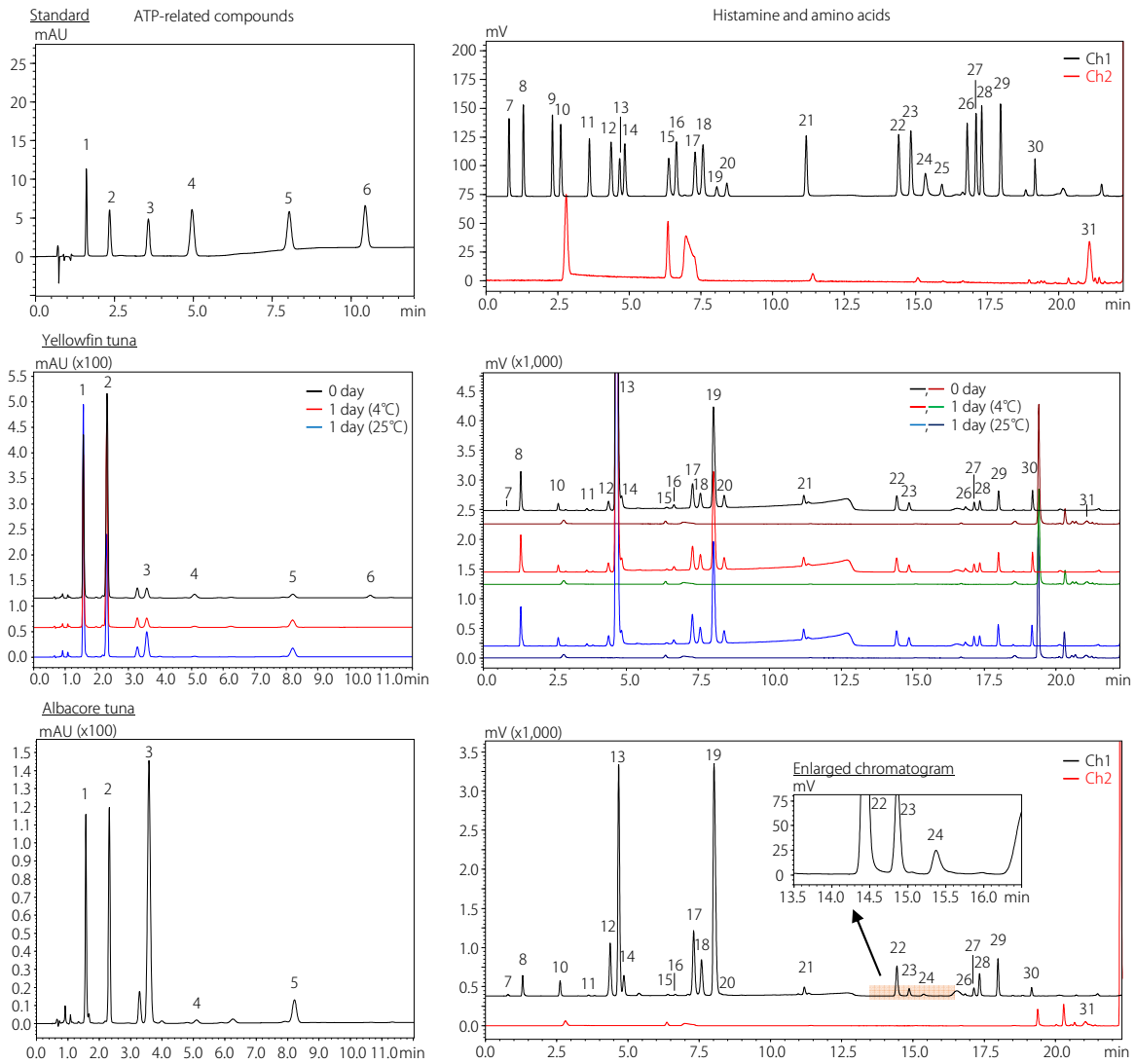

図 5　標準品およびマグロ（きはだ、びんちょう）のクロマトグラム

表 9　きはだマグロ中の核酸、アミノ酸の濃度

		Yellowfin Tuna (0 day) (μmol/L)*4
2	IMP	278.9
8	Glutamic acid	46.6
13	Histidine	(2416.0)
17	Alanine	55.7
18	Taurine	27.8
19	Anserine	(1062.5)
20	Carnosine	82.0
22	Valine	23.6
29	Leucine	20.4
30	Lysine	50.7

＊4 Values in parentheses are outside the quantification range.

まとめ

Nexera デュアルインジェクションシステムを用いて、マグロの鮮度測定とヒスタミンによる腐敗状態の測定を行いました。ATP 関連物質とヒスタミンは、同じ前処理で抽出可能でした。すなわち、同じ前処理で得られたサンプルから分析可能です。

K 値は、保存日数、温度によって経時変化があり、高温であるほど鮮度が落ちることを示しました。また、K 値で腐敗を示したサンプルにおいて、ヒスタミンも検出されました。さらに、ヒスタミンはアミノ酸と分離検出でき、魚肉に含有されるアミノ酸も同時分析が可能でした。

Nexera デュアルインジェクションシステムを用いて、鮮度や腐敗状態を同時分析することで迅速に結果を得られ、魚肉試料の状態を多角的に評価できました。

［参考文献］
1)　臼井一茂, 渡辺悦生, 冷凍及び生鮮クロカジキのK値による鮮度変化の比較について, 神奈川県水産技術センター研究報告, 5 号, 11-14 (2012)

Nexera、Shim-pack、および Shim-pack Velox は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
TORAST は、株式会社 島津ジーエルシーの商標です。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター
初版発行：2019 年 12 月
A 改訂版発行：2020 年 3 月
島津コールセンター　0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm
会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。