

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350181

研究課題名(和文) 生原アミン類の生成を指標とした食品の新しい鮮度評価法に関する研究

研究課題名(英文) Study on new freshness assessment method of sea food based on the preparation of putrefactive amine

研究代表者

梶村 計志 (KAJIMURA, KEIJI)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・課長

研究者番号：40250336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：魚介類および加工品中に生成した生原アミン類(ヒスタミン、カダベリン、プトレスシン、チラミンおよびフェネチルアミン)の蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフによる一斉分析法を開発した。生原アミン類は5%トリクロロ酢酸で抽出した後、ミックスモードの固相カラムで精製された。22種類の市場流通品を対象とする実態調査が行われた。7種類の魚介加工品から生原アミン類が5～678mg/kgの濃度で検出された。さらに、生鮮魚(マグロ、ブリ、マダイ)を25℃で3日間保存し、生原アミン類の生成と消長について検討を行った。その結果、ブリにおいて、急激かつ高濃度のヒスタミン生成が確認された。

研究成果の概要(英文)：High performance liquid chromatographic method by using fluorescence detector was investigated for the simultaneous determination of nonvolatile amines (histamine, cadaverine, putrescine, tyramine and phenethylamine) in fish and its products. Nonvolatile amines were extracted with 5% trichloroacetic acid, and cleaned up with mixed-mode (ion-exchange and reversed-phase) mini-cartridge column. Survey of these five nonvolatile amines content in commercial 22 samples was conducted. Nonvolatile amines were detected in six of fish product samples, and its ranges were 5-678 mg/kg. Nonvolatile amines formation and decomposition in stored fishes were researched. Raw fish samples (tuna, yellowtail and porgy) were stored at the temperature of 25℃ for 3days. Rapid and high levels formation of histamine was observed in yellowtail.

研究分野：食品衛生学

キーワード：魚介類 不揮発性腐敗アミン フルオレスカミン ヒスタミン チラミン プトレスシン カダベリン
フェネチルアミン

1. 研究開始当初の背景

生鮮食品の鮮度は、品質に影響を及ぼす素因であるが、その評価は、五感による手法やATP及びその分解物の生成量から算出したK値を用いる方法により行われている。しかし、検査結果の数値化や客観的評価が難しく、腐敗に伴うタンパク質の変性、分解とATP関連物質の生成量に相関性がないことが問題視されている。腐敗に伴うタンパク質やペプチドの変性や分解と関連性がある、客観的な鮮度評価法の確立が求められている。

魚介類などタンパク質を多く含む食品では腐敗に伴い、生原アミン類が生成される。生原アミンは、タンパク質の変性および分解により遊離したアミノ酸に腐敗菌が産生する脱炭酸酵素が触媒として働き、産生される。生原アミンのひとつであるヒスタミンは、前駆アミノ酸であるヒスチジン含量が高い赤身魚の腐敗プロセスで生成され、アレルギー様食中毒を惹起する物質として知られている。申請者らは既に、ヒスタミンの分析法について検討を行っており、加工食品にも適用可能な迅速分析法を開発している。このような学術的背景および申請者らの検討結果をふまえ、本研究を着想するに至った。

本研究の成果により、生鮮魚介類の鮮度を迅速かつ客観的に評価することが可能となり、食中毒の未然防止や食品保存技術の発展に寄与することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質を多く含む魚介類やその加工品を対象とし、新しい食品の鮮度評価法を確立することを目的とする。タンパク質を構成するアミノ酸から腐敗により生成される生原アミン類を指標と

し、各食品におけるアミン類の生成状況を明らかにすることにより、新しい食品の鮮度評価法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 生原アミン類の分析法の開発

魚介類又はその加工品をフードプロセッサーで粉碎後、5%トリクロロ酢酸で抽出した(5g/50mL)。抽出液のpHを7.0に調整した後、りん酸緩衝液(pH6.8)で希釈し、ミックスモードの固相カラムに負荷した。その後、固相カラムをりん酸緩衝液(pH6.8)、水、メタノールで順次洗浄した後、4%ギ酸含有50%メタノール溶液で生原アミン類を溶出した。溶出液を減圧条件下で濃縮乾固した後、50%メタノールに再溶解し、試料溶液とした。

試料溶液中の各生原アミン類は、フルオレスカミンにより誘導体化した後、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフにより分析した。

(2) 市場品を対象とした実態調査

厚生労働省の食中毒発生事例(2010~2014年)を参考とし、原因と考えられる魚介類およびその加工品を選定した。大阪府内の販売店で鮮魚7検体、加工品15検体を購入し、5種類の生原アミン類(ヒスタミン、カダベリン、プトレスシン、チラミンおよびフェネチルアミン)を対象として、実態調査を行った。

(3) 腐敗試験

生食用のマグロ(外洋性赤身魚)、ブリ(沿岸性赤身魚)およびマダイ(白身魚)を試料として使い、腐敗試験を行った。均一化した試料5gを試験管に入れ、小さな穴を開けたアルミホイルで覆い、恒温槽(25℃)で3日間放置し、経日的な生原アミン類の生成と消長について調査を行った。

(4)Biogenic Amine Index(BAI)による評価

魚介類の腐敗に伴い生成されるアミン類の総量(試料中におけるヒスタミン、チラミン、カダベリンおよびプトレスシン濃度の総量($\mu\text{g/g}$))を算出し、BAIに基づく評価を行った。

4. 研究成果

(1)生原アミン類の分析法の開発

高速液体クロマトグラフィー条件の検討

高速液体クロマトグラフィーによる生原アミン類の分析は、0.05mol/L 酢酸緩衝液とアセトニトリルを用いた低圧グラジエント法により行った。移動相に使用する酢酸緩衝液のpHについて検討したところ、pH5.3に調整した場合に最も良好なピーク分離が得られた。また、カラムオープンの温度について検討したところ、40 $^{\circ}\text{C}$ ~60 の間では、50 が一斉分析に最も適していた。フルオレスカミンにより誘導体化された生原アミン類の検出は、蛍光検出器を使用し、励起波長390nm、蛍光波長480nmで行った。

固相抽出カラムによる精製条件の検討

固相抽出カラムによる生原アミン類の精製条件について検討を行った。市販されている6種類の固相抽出カラムについて比較を行ったところ、逆相と弱陽イオン交換の両モードが機能するミックスモードカラム(Waters社製、Oasis WCX, 500mg)が最も精製に適していた。溶出液の組成は、4%ギ酸を含有する50%メタノール溶液が優れていた。本法に従い、精製を行ったところ、大部分の妨害ピークが除去され、良好なクロマトグラムが得られた。

蛍光誘導体化条件の検討

ホウ酸塩緩衝液を用い、生原アミン類の蛍光誘導体化を行った。緩衝液のpHについて、pH7.2 から pH10 の間で検討したところ、8~9.5 が誘導体化に適していた。緩衝液に用

いるホウ酸塩の濃度は0.05Mから0.2Mの間で、マトリックス添加標準溶液を用いて検討した。ピーク強度が最大であった0.2Mを採用した。さらに、誘導体化試薬であるフルオレスカミンを溶解する溶媒についても検討し、アセトニトリルよりアセトンの方が混和しやすいことを確認した。誘導体化試薬であるフルオレスカミンの添加量は600 μg から2,400 μg の間では、ピーク強度に差はなかった。

試験法の妥当性評価

試料として市場流通品のマイワシの干物又はキハダマグロを用い、添加回収試験を行った。6種類の生原アミン類(ヒスタミン、カダベリン、プトレスシン、チラミン、フェネチルアミンおよびスペルミジン)を10 $\mu\text{g/g}$ 、50 $\mu\text{g/g}$ 又は100 $\mu\text{g/g}$ の濃度で添加した(n=5)、各生原アミンの回収率は85~100%の範囲であり、良好であった。また、スペルミジンを対象とする一部の相対標準偏差が、若干大きな値(RSD:11%)を示したが、他は概ね良好であった。検量線は、0.5 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で良好な直線性を示した。定量限界(S/N 10)は0.5 $\mu\text{g/mL}$ (試料中濃度5 $\mu\text{g/g}$)であった。

厚生労働省が定めた「食品中の金属に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」に基づく評価試験(分析者1名、2併行、5日間)を行ったところ、真度(84~90%)がガイドラインの基準をやや下回ったが、併行精度(0.9~2.0%)および室内精度(2.4~3.9%)は良好であった。

(2)市場品を対象とした実態調査

大阪府内の販売店で購入した鮮魚7検体および魚介加工品15検体を対象とし、生原アミン類(ヒスタミン、チラミン、カダベリン、プトレスシンおよびフェネチルアミン)の含有量について実態調査を行った。鮮魚7検体か

ら分析対象とした生原アミン類は検出されなかった。魚介類の加工品15検体のうち7検体から生原アミン類が検出された(5-678 mg/kg)。特に、イワシの丸干し加工品、アジ骨取り味醂干およびナンプラーからは、分析対象とした全ての生原アミン類が検出された。

(3)腐敗試験

腐敗に伴う pH 等の変化

生食用の魚介類(マグロ、マダイ、ブリ)を25℃で3日間保存し、腐敗に伴う pH の変化について調査を行った。マダイおよびブリは、保存開始から1日後に、マグロは2日後に腐敗臭が発生した(初期腐敗)。各試料とも腐敗臭の発生に伴い、pHの上昇が認められた。保存直後から3日後までの pH 変化は以下の通りである(マグロ:pH5.8-8.2、ブリ:pH5.9-7.4、マダイ:pH6.0-8.0)。

腐敗に伴う生原アミン類の生成

保存を開始した直後の検体から、対象となる生原アミン類(ヒスタミン、チラミン、カダベリン、プトレスシンおよびフェネチルアミン)は検出されなかった。マグロでは、保存開始1日後からカダベリンおよびヒスタミンの生成が確認された。また、保存開始2日後にはプトレスシンが、3日後には、チラミンも検出された。マダイでは、腐敗に伴いヒスタミン、チラミン、カダベリン、プトレスシンおよびフェネチルアミン含量の経時的な増加が認められた。特にカダベリンの生成は顕著であり、保存開始3日後に1216mg/kgに達した。ブリでも腐敗に伴い、分析対象とした5種類の生原アミン類の全てが検出された。特にヒスタミンの生成は著しく、保存開始1日後に濃度が4403mg/kgに達した。

(4)BAI に基づく評価

BAI は、マグロの鮮度を評価する指標であり、50 $\mu\text{g/g}$ 未満であれば食用に適するとされている。市場流通品を対象とした実態調査

の結果、腐敗が疑われたカタクチイワシ丸干およびアジ骨取り味醂干の BAI はそれぞれ 968 $\mu\text{g/g}$ 、502 $\mu\text{g/g}$ であった。また、腐敗試験における初期腐敗時のマグロ、マダイ、ブリの BAI はそれぞれ 201 $\mu\text{g/g}$ 、354 $\mu\text{g/g}$ 、4643 $\mu\text{g/g}$ であり、指標値である 50 $\mu\text{g/g}$ を超えていた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

H. Nagayoshi, K. Kakimoto, S. Takagi, Y. Konishi, K. Kajimura, Benzotriazole Ultraviolet Stabilizers Show Potent Activities as Human Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands, Environmental Science and Technology, 49, 578-587 (2015).

T. Yamaguchi, M. Okihashi, K. Harada, K. Uchida, Y. Konishi, K. Kajimura, K. Hirata, Y. Yamamoto, C Rapid and Easy Multiresidue Method for Analysis of Antibiotics in Meats by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63, 5133-5140(2015).

K. Kakimoto K, H. Nagayoshi, N. Inazumi, A. Tani, Y. Konishi, K. Kajimura, T. Ohura, T. Nakano, N. Tang, K. Hayakawa, A. Toriba, Identification and characterization of oxidative metabolites of 1-chloropyrene, Journal of Japanese Chemical Research in Toxicology, 28,1728-1736(2015).

T. Tagami, A. Takeda, A. Asada, A. Aoyama, T. Doi, K. Kajimura Y. Sawabe,

Simultaneous identification of 18 illegal adulterants in dietary supplements by using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, Food Hygiene and Safety Science, 55, 34-40(2014).

A. Aoyama, T. Doi, T. Tagami, K. Kajimura, Y. Sawabe, Simultaneous determination of 11 cosmetic-based preservatives by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography Science, 52, 1010-1015(2014).

K. Kakimoto, H. Nagayoshi, Y. Konishi, K. Kajimura, K. Oura, K. Hayakawa A.Toriba, Atmospheric chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons in East Asia, Chemosphere, 111, 40-46(2014).

T. Tagami, A. Takeda, A. Asada, A. Aoyama, T. Doi, K. Kajimura, Y. Sawabe, Simultaneous identification of hydroxythiohomosildenafil, aminotadalafil, thiosildenafil, dimethylsildenafil, thiodimethylsildenafil in dietary supplements with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, Food Hygiene and Safety Science, 54, 232-236(2013).

T. Tagami, A. Takeda, A. Asada, A. Aoyama, T. Doi, M. Kawaguchi, K. Kajimura, Y. Sawabe, H. Obana K. Yamasaki, A simple and selective detection method for aristolochic acid in crude drugs using solid-phase extraction, Journal of Natural Medicines, 67, 838-843(2013).

Y. Kitagawa, M. Okihashi, S. Takatori, K. Kajimura, H. Obana, M. Furuta T. Nishiyama, A rapid and simple method for the determination of 2-alkylcyclobutanones in irradiated meat and processed foods, Food Analytical Methods, 7, 1066-1072(2014).

[学会発表](計2件)

粟津薫、梶村計志:固相抽出-フルオレスカミン誘導体化HPLC法による市販魚介類のアミン類含有量調査、第110回日本食品衛生学会学術講演会(京都) 2015

粟津薫、梶村計志:固相抽出-フルオレスカミン誘導体化HPLC法による魚肉中アミン類分析の検討、第108回日本食品衛生学会学術講演会(金沢) 2014

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶村 計志 (KAJIMURA KEIJI)
大阪府立公衆衛生研究所
衛生化学部 食品化学課 課長
研究者番号: 40250336

(2) 研究分担者

萩原 拓幸 (HAGIWARA TAKUYUKI)
大阪市立環境科学研究所
食品保健グループ 副主幹
研究者番号: 00300997

粟津 薫 (AWAZU KAORU)
大阪府立公衆衛生研究所
衛生化学部 食品化学課 研究員
研究者番号: 30435888