

清酒に含まれるアミン

堀井 幸江・橋口 知一・伊豆 英恵・須藤 茂俊

Contents of amines in Sake

Sachie HORII, Tomokazu HASHIGUCHI, Hanae IZU and Shigetoshi SUDO

緒 言

ヒスタミンやチラミンといったアミンは、ヒトに対して、血圧上昇、片頭痛などの生理活性を持つことが知られている^{1,2)}。ヒスタミンは、アレルギー様食中毒の原因物質であり、日本国内における1998～2008年のヒスタミンによる食中毒患者数は1,577人と報告されている³⁾。また、チラミンは、モノアミノオキシダーゼの作用を阻害するような薬剤を服用中の人が多量に摂取すると血圧上昇をもたらすことが知られている⁴⁾。

アミンは、醤油、味噌、チーズ、ワインなどの発酵食品にも含まれており⁵⁻¹⁰⁾、私たちは日頃食べている食品からアミンを摂取している。ヒスタミンと他のアミンやアルコールを摂取した場合には、毒性の相乗作用も懸念されているため^{1,2,9)}、酒類中のアミン濃度の把握が必要である。日本国内で市販されているワイン、紹興酒、ビール中のアミン濃度については、井部¹⁰⁾により2004年に報告されているものの、近年における清酒中のアミン濃度は報告されていない。

他方で、清酒におけるその他のアミンであるカダベリン、エタノールアミン、フェネチルアミン、イソブチルアミン及びアグマチンは、醸造工程中の米麴、酵母、細菌によって生成するとされており¹¹⁻¹³⁾、その含有量は、無添加酒>普通アル添酒>増醸酒の順に多く、また、貯蔵酒>普通酒>吟醸酒の順に多いと報告されている¹⁴⁾。酒母におけるアミン含有量は、生酏>高温糖化酏>速醸酏の順で、生酏は他の2者に比べて、著しく多いと報告されており、その原因は酒母の仕込初期におけるpH経過の相違と細菌類の作用によるものと考えられている^{14,15)}。

近年、清酒の多様化が進行しており、乳酸菌や硝酸還元菌の働きを利用した生酏、山麩酏を使用した清酒が数多く市販されている。しかし、使用した酒母ごとの市販清酒中のアミン濃度は知られていないことから、分析を行うこととした。また、生酏以外にも乳酸菌を利用した酒母として菩提酏があり^{16,17)}、これを使用した清酒も販売されていることから、菩提酏を使用した市販清酒についてもアミンの分析を行った。

材料及び方法

アミンの分析方法は、アミノ基誘導体化試薬キットAccQ・Tag™ Ultra (Waters) を用いて誘導体化し、高速液体クロマトグラフィー質量分析装置を用いて定量を行った。詳細は以下に記すとおりである。

1. 試料

市販清酒は小売店から41点を購入し、分析に供した。その内訳は表1に示すとおりである。

表1 分析対象市販清酒41点の内訳

酒母の種類	点数
生酏	5
山麩酏	9
菩提酏	3
純米酒 (酒母の表示なし)	12
普通酒 (酒母の表示なし)	12

2. 試薬

ヒスタミン二塩酸塩、フェネチルアミン、トリプタミン塩酸塩、1,4-ジアミノブタン (プトレシン) 二塩酸塩、カダベリン二塩酸塩、イソアミルアミン、スベルミンは関東化学株式会社から購

入した。チラミン、アグマチンは和光純薬工業株式会社から購入した。これらをそれぞれ精秤し、ヒスタミン二塩酸塩、トリプタミン塩酸塩、チラミンはメタノール、1,4-ジアミノプタン二塩酸塩、カダベリン二塩酸塩、イソアミルアミン、スベルミン、アグマチンは水、フェネチルアミンはアセトニトリルに溶解して10mMとしたものを標準原液とした。

3. 装置

高速液体クロマトグラフィーには、Waters社製のACQUITY UPLCシステムを使用し、検出器にはタンデム四重極型質量分析装置Quattro Premier XEを使用した。測定条件は表2、3に示すとおりである。

4. 誘導体化

清酒を20倍に希釈して、AccQ・Tag™ Ultraの手順に従って、6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) でサンプルの誘導体化を行った。

5. 統計処理

統計的有意差の検定は、有限会社オーエムエス出版のソフトウェアStatcelを用いてScheffe法により行った。

結果と考察

1. 分析精度

チラミン、フェネチルアミン、トリプタミン、イソアミルアミン及びプトレシンは0.01、0.05、0.25、1.25 μ M、ヒスタミン、カダベリン及びスベルミンは0.05、0.25、1.25、6.25 μ M、アグマチ

表2 アミン分析におけるUPLC条件

UPLC	Waters ACQUITY UPLC® system		
検出器	Quattro Premier™ XE		
カラム	Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 (1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm)		
カラム温度	55°C		
移動相	A : AccQ・Tag™ Ultra Elute A (100 ml) + 水 (900 ml) B : AccQ・Tag™ Ultra Elute B		
流量	0.5 ml/min		
注入量	2 μ l		
グラジエント	時間(分)	A (%)	B (%)
	0.00	99	1
	0.54	99	1
	2.54	95	5
	3.54	85	15
	4.54	70	30
	7.05	10	90
	7.65	10	90
	7.75	99	1
	8.70	99	1

表3 アミン分析における検出器条件

イオン化	ESI, ポジティブ			
キャピラリー電圧	3.0 kV			
脱溶媒ガス	1000 l/h			
脱溶媒温度	400°C			
コーンガス	50 l/h			
ソース温度	130°C			
MRMモード				
	プレカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (V)
ヒスタミン	282.30	112	22	12
チラミン	308.39	171	38	30
フェネチルアミン	292.36	171	34	22
トリプタミン	331.39	171	34	24
アグマチン	301.38	171	34	24
イソアミルアミン	258.33	171	32	28
プトレシン	259.15	171	30	16
カダベリン	273.18	171	22	18
スベルミン	373.34	171	36	40

ンは、4、20、100、500 μ Mの濃度で検量線を作成した。回帰直線の決定係数は、 $R^2=0.99$ 以上であった。9種類のアミンをそれぞれ1.25 μ Mの濃度で含むアミン混合液の6回測定時のピークエリアの変動係数は、2.0%（トリプタミン）から12.2%（アグマチン）で全てのアミンの分析で適当な精度であった。標準溶液を分析した時のクロマトグラムのピーク高から、シグナルとノイズ比=3を検出下限、シグナルとノイズ比=10を定量下限とした（表4）。

2. 添加回収試験

添加回収試験においては、清酒にヒスタミン、カダベリン及びスベルミンを40 μ M、チラミン、フェネチルアミン、トリプタミン、イソアミルアミン及びプトレシンを20 μ M、アグマチンは1000 μ Mの濃度で添加したものをを用いた。回収率は105.6%（カダベリン）～118.5%（チラミン）の範囲で、分析を行った全てのアミンに対してやや高くなる傾向が見られたが、分析には問題ないと考えられた（表5）。

3. 市販清酒中のアミン含有量

市販酒41点の分析結果を表6に示す。平均値は、検出下限値未満の濃度を不検出とし、検出下限値以上かつ定量下限値未満の濃度を定量下限値として、検出試料内での平均値とした。すなわち、平均値は、検出下限値未満のサンプル（不検出としたサンプル）を除いて算出した。アグマチンは全ての試料から検出され、全41点の平均値は276.6 mg/l、普通酒の平均値は183.8 mg/lであった。松永ら¹⁸⁾は特級、一級及び二級の清酒中のアグマ

チン濃度を平均値150.4 ppm（試料数23）と報告しており、今回分析した普通酒の濃度は、それと同程度であった。アグマチンは麹菌の生産するアルギニン脱炭酸酵素がアルギニンに作用してアグマチンに変換するため¹⁹⁾、清酒中に高濃度に存在していると考えられる。

フェネチルアミンも全ての試料から検出されたものの、その濃度は最大でも2.31 mg/lであった。ヒスタミン、チラミン、トリプタミン、イソアミルアミン、プトレシン、カダベリン及びスベルミンについては、いずれかの試料において検出されているものの、その濃度は最大でも11.78 mg/lであった。

使用した酒母により濃度に有意な差が見られたのは、フェネチルアミン、およびアグマチンで、いずれも山麩酐で濃度が高かった。フェネチルアミンは山麩酐と純米酒、山麩酐と普通酒の濃度に、アグマチンは山麩酐と普通酒の濃度に有意な差が見られた。それ以外のアミンについては、使用した酒母による差は認められなかった。梅津¹⁵⁾は、生酐、速醸酐及び高温糖化酐のアミン濃度を比較し、生酐が全般的に見て著しく多いと報告している。しかしながら、今回の市販清酒の分析結果において、酒母の違いによるアミン濃度の有意な差は、山麩酐使用酒におけるフェネチルアミン、アグマチンにしか認められなかった。これは、アミンが清酒醸造過程に混入してくる細菌類の作用以外にも、酵母の自己消化によって生成すること¹³⁾、酒母の使用量がもろみ全体からすればわずかであることが影響していると考えられる。また、菩提酐使用酒のアミン濃度についても、他の清酒と大差は見られなかった。

表4 アミン分析における分析の妥当性確認

	相対標準偏差 ^a (%)	定量下限 ^b (mg/l)	検出下限 ^c (mg/l)
ヒスタミン	3.1	1.67	0.50
チラミン	4.7	0.07	0.02
フェネチルアミン	5.8	0.06	0.02
トリプタミン	2.0	0.32	0.10
アグマチン	12.2	13.02	3.91
イソアミルアミン	4.4	0.002	0.001
プトレシン	5.5	0.009	0.003
カダベリン	2.5	1.53	0.46
スベルミン	5.1	0.10	0.03

a アミン混合液の6回繰り返し試験

b シグナル/ノイズ \geq 10

c シグナル/ノイズ \geq 3

表5 アミン分析における回収率

	添加濃度 (μ M)	添加濃度 mg/l換算値	回収率 ^a (平均値 \pm 標準偏差) (%)
ヒスタミン	40	4.4	107.6 \pm 1.4
チラミン	20	2.7	118.5 \pm 9.0
フェネチルアミン	20	1.9	113.8 \pm 12.6
トリプタミン	20	3.2	114.7 \pm 2.0
アグマチン	1000	130.2	107.0 \pm 4.3
イソアミルアミン	20	1.7	108.9 \pm 10.0
プトレシン	20	1.8	116.8 \pm 7.2
カダベリン	40	4.1	105.6 \pm 7.6
スベルミン	40	8.1	111.0 \pm 5.8

a 3回繰り返し試験

表6 市販清酒中のアミン濃度

		ヒスタミン	チラミン	フェネチルアミン	トリプトタミン	アグマチン	イソアミルアミン	プトレシン	カダベリン	スベルミン
生酛 試料数：5	範囲(mg/l)	N.D.-5.25	0.16-1.27	0.16-0.96	N.D.-0.32	270.4-465.5	0.01-0.02	N.D.-0.02	1.53-2.17	N.D.-0.10
	平均値(mg/l)	5.25	0.55	0.60 ^{ab}	0.32	374.4 ^{ab}	0.01	0.02	1.68	0.10
	検出率(%)	20	100	100	20	100	100	20	100	60
山廃酛 試料数：9	範囲(mg/l)	N.D.-1.67	0.07-11.78	0.29-2.31	N.D.-0.47	189.0-545.7	N.D.-0.02	N.D.-0.02	N.D.-1.79	N.D.-0.10
	平均値(mg/l)	1.67	3.28	0.87 ^a	0.37	382.9 ^a	0.01	0.02	1.57	0.10
	検出率(%)	11	100	100	33.3	100	78	33.3	88.9	33
菩提酛 試料数：3	範囲(mg/l)	N.D.-1.67	N.D.-0.07	0.06-0.32	N.D.-0.32	34.6-300.3	0.01-0.02	N.D.-0.02	N.D.-1.73	N.D.
	平均値(mg/l)	1.67	0.07	0.15 ^{ab}	0.32	202.4 ^{ab}	0.01	0.01	1.63	N.D.
	検出率(%)	33.3	66.7	100	33.3	100	100	33.3	66.7	0
純米酒 試料数：12	範囲(mg/l)	N.D.-2.08	N.D.-0.19	0.06-0.59	N.D.-0.32	126.5-523.8	N.D.-0.02	N.D.-0.02	N.D.-2.04	N.D.-0.10
	平均値(mg/l)	1.75	0.09	0.22 ^b	0.32	267.5 ^{ab}	0.01	0.01	1.62	0.10
	検出率(%)	41.7	66.7	100	8.3	100	83.3	25	75	16.7
普通酒 試料数：12	範囲(mg/l)	N.D.-1.79	N.D.-0.67	0.06-0.63	N.D.-0.32	42.0-368.2	N.D.-0.02	N.D.-0.14	N.D.-1.67	N.D.-0.10
	平均値(mg/l)	1.70	0.17	0.15 ^b	0.32	183.8 ^b	0.01	0.09	1.55	0.10
	検出率(%)	33.3	66.7	100	16.7	100	83.3	25	58.3	16.7
赤ワイン*	範囲(mg/l)	0-10	0.13-9.51	0.18-5.18	0-0.38	N	0.08-11.8	0.74-28.6	0.03-0.48	N
白ワイン*	範囲(mg/l)	0-9.9	0-7.80	0-10.4	0-0.14	N	0-31.5	0.11-10.4	0-0.38	N
輸入ビール*	範囲(mg/l)	N.D.-9.0	N.D.-56.8	N.D.	N	N	N	1.8-12.9	N.D.-45.9	N.D.-18.9
国産ビール*	範囲(mg/l)	N.D.	0.8-1.6	N.D.	N	N	N	2.9-6.6	0.2-25.5	N.D.-0.1
ワイン**	範囲(ppm)	0.3-1.4	0.4-5.6	0.3-2.0	N	0.3-0.4	N	0.7-9.0	0.3-4.9	N
ビール***	範囲(ppm)	N.D.-21.6	0.5-67.5	N.D.-8.3	N.D.-5.4	0.5-40.9	N	1.5-15.2	N.D.-39.9	N.D.-3.9

同一列の異なるアルファベット間で互いに有意差がある。(Scheffe test $p < 0.05$)

*：井部らのデータ¹⁰⁾を引用

**：松永らのデータ¹⁸⁾を引用

***：Izquierdo-Pulidoらのデータ²⁰⁾を引用

N.D.：不検出

N：分析データなし

清酒中のアミン含有量は、アグマチンを除けば、ワイン、ビールと同程度またはそれ以下であった。現在、国内におけるアミン類に対する食品衛生法の基準はなく、コーデックス規格においては、ヒスタミンの最大基準値は魚肉100g中20mgとされている。しかし、アルコールや他のアミンの共存下では、毒性の相乗作用が懸念されるため^{1,2,9)}、今後も注意が必要であると考えられる。

参 考 文 献

- Shalaby AR, *Food Res. Int.* **29**, 675-690 (1996)
- Maintz L and Novak N, *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1185-1196 (2007)
- 登田美桜, 山本 都, 畝山智香子, 森川 馨, 国立医薬品食品衛生研究所報告, **127**, 31-38 (2009)
- Wunderer H, 江戸清人, 金谷節子監訳, 医薬品と飲食物の相互作用, *じほう*, 71-75 (2002)
- 井部明広, 田村行弘, 上村 尚, 田端節子, 橋本秀樹, 飯田真美, 二島太一郎, 衛生化学, **37**, 379-386 (1991)
- 井部明広, 上村 尚, 田端節子, 早野公美, 田村行弘, 東京都立衛生研究所研究年報, **46**, 102-107 (1995)
- 中里光男, 小林千種, 山嶋裕季子, 立石恭也, 川合由華, 安田和男, 東京都立衛生研究所研究年報, **53**, 95-100 (2002)
- Mayer HK, Fiechter G, and Fischer E, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 3251-3257 (2010)
- Stratton JE, Hutkins RW, and Taylor SL, *J. Food Prot.*, **54**, 460-470 (1991)
- 井部明広, 東京都健康安全研究センター研究年報, **55**, 13-22 (2004)
- 醸造物の成分, 財団法人日本醸造協会, 77 (1999)
- 梅津雅裕, 枳尾 昌, 醸工, **40**, 354-360 (1962)
- 梅津雅裕, 醸工, **48**, 103-109 (1970)
- 梅津雅裕, 醸協, **57**, 359-365 (1962)
- 梅津雅裕, 醸工, **39**, 241-247 (1961)
- 松澤一幸, 山中信介, 坂井拓夫, 寺下隆夫, 醸協, **97**, 734-740 (2002)

- 17) 最新酒造講本, 財団法人日本醸造協会, 83 - 84 (1980)
- 18) 松永明信, 大戸幹也, 牧野正雄, 富山県衛生研究所年報, 9, 154 - 157 (1986)
- 19) 小泉幸道, 鶴高重三, 日本農芸化学会大会講

演要旨集, 79 (2005)

- 20) Izquierdo-Pulido M, Hernández-Jover T, Mariné-Font A, and Vidal-Carou MC, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3159 - 3163 (1996)