

## LC-MS/MS による水産食品中の不揮発性腐敗アミン類分析法の検討

### Study of Analytical Method of Nonvolatile Amines in Fishery Products by LC-MS/MS

藤井 良昭                      加賀 岳朗                      上田友紀子  
上野 健一                      久保田晶子\*<sup>1</sup>                      西村 一彦

Yoshiaki FUJII, Takero KAGA, Yukiko UEDA, Ken-ichi UENO  
Akiko KUBOTA and Kazuhiko NISHIMURA

**Key words :** nonvolatile amine (不揮発性アミン) ; fishery product (水産食品) ; weak-cation exchange (弱陽イオン交換) ; LC-MS/MS (液体クロマトグラフィー質量分析計)

#### 緒 言

不揮発性腐敗アミン類 (NVA) は、食品中のタンパク質がアミノ酸に分解され、さらにアミノ酸が微生物により分解される過程で生成する<sup>1)</sup>。NVA の中でヒスタミンはアレルギー様食中毒の主原因となる物質であり<sup>2,3)</sup>、食品衛生管理上、特に重要である。また、チラミン、カダベリンやプトレシンは、ヒスタミンによるアレルギー様症状を助長することが報告されている<sup>4,5)</sup>。このため、アレルギー様食中毒が発生した際には、ヒスタミンの含有検査に加えて他の NVA も同時に検査することが、食中毒原因の究明に重要と考えられる。

食品中の NVA 定量分析には、蛍光検出器付き HPLC (HPLC-FL) が広く利用されている<sup>6,7)</sup>。一方、近年、高感度かつ高選択性を有する液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS/MS) を用いることで、NVA の誘導体化を行わない迅速な試験法も報告されている<sup>8-10)</sup>。

我々は既報<sup>11)</sup>において、抽出液の精製に強陽イオン交換ミニカラム<sup>12)</sup>を用い、フルオレスカミン誘導体化法<sup>13,14)</sup>による HPLC-FL 分析法を報告した。本研究では、既報<sup>11)</sup>の試験法を基に、誘導体化を要しない NVA の LC-MS/MS 分析法を構築するため、LC 条件及び固相抽出による精製法を検討し、構築した試験法による添加回収試験を実施して性能を確認した。

#### 方 法

##### 1. 試料

試料は、札幌市内の小売店で購入したサンマ (生)、メ

カジキ (生)、サバ水煮 (缶詰)、サバ味噌煮 (缶詰)、マグロ油漬 (缶詰) 及びアンチョビ (ペースト) を用いた。生試料は筋肉、缶詰試料は液汁を除いたものを細切した後、フードプロセッサーを用いて均一化し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。ペースト試料は十分に均一化された製品のため、そのまま $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

##### 2. 試薬及び試液

ヒスタミン二塩酸塩は富士フィルム和光純薬 (株) 製、カダベリン二塩酸塩及びチラミン塩酸塩は関東化学 (株) 製、プトレシン二塩酸塩は Sigma-Aldrich 製を用いた。標準原液は、各標準品を  $0.1 \text{ mol/L}$  塩酸に  $5,000 \text{ mg/L}$  となるように溶解して調製した。混合標準溶液は、各標準原液をそれぞれ  $1,000 \text{ mg/L}$  となるように混合し、 $0.1 \text{ mol/L}$  塩酸で希釈して調製した。

アセトニトリル、ギ酸及びメタノールは富士フィルム和光純薬 (株) 製 LC/MS 用、アセトンは富士フィルム和光純薬 (株) 製残留農薬試験用、ギ酸アンモニウムは Honeywell 製 LC/MS 用、その他の試薬は富士フィルム和光純薬 (株) 製特級を用いた。水は富士フィルム和光純薬 (株) 製 LC/MS 用及びオルガノ (株) 製 PURE LAB flex-UV で精製した水を用いた。 $20 \text{ mmol/L}$  リン酸緩衝液は、既報<sup>11)</sup>と同じ方法で調製した。弱陽イオン交換ミニカラムは Waters 製 Oasis WCX (60 mg、3 mL) (以下、WCX)、ろ紙は GE ヘルスケア製ワットマン定量ろ紙 No. 41 (直径 125 mm) を用いた。

##### 3. 装置及び分析条件

LC は Agilent Technologies 製 1260 Infinity II LC を用い、MS/MS は Agilent Technologies 製 6470 Triple Quad LC/MS を用いた。LC 分析カラムは SUPELCO 製 Discovery HS F 5-3 ( $3.0 \mu\text{m}$ 、 $2.1 \times 100 \text{ mm}$ ) を用いた。カラム温度は

\*<sup>1</sup> 現 北海道空知総合振興局保健環境部保健行政室試験検査課

表1 不揮発性アミン類のMRM条件

化合物名	Q1 ( <i>m/z</i> )	Fragmentor voltage (V)	Quant		Qual-1		Qual-2		極性
			Q3	CE	Q3	CE	Q3	CE	
			( <i>m/z</i> )	(eV)	( <i>m/z</i> )	(eV)	( <i>m/z</i> )	(eV)	
ヒスタミン	112	93	95	13	68	25	41	33	+
チラミン	138	64	121	9	77	33	51	50	+
カダベリン	103	69	86	9	69	17	41	25	+
プトレシン	89	64	72	9					+

Q1：プリカーサーイオン Quant：定量イオン Q3：プロダクトイオン Qual-1, Qual-2：確認イオン CE：コリジョンエネルギー

40℃、移動相はA液10mmol/Lギ酸アンモニウム及び0.1%ギ酸含有水溶液；B液アセトニトリル=40：60のアイソクラティック溶出条件とした。流量は0.25mL/min、試料注入量は5μL、イオン化モードはESI、測定モードは多重反応モニタリング（MRM）とした。表1に化合物ごとのMRM分析条件を示した。

ホモジナイザーはIKA社製ULTRA-TURRAX T 25 basic、S 25 N-18 Gシャフトジェネレータを用いた。固相抽出操作はジーエルサイエンス(株)製のGL-SPE吸引マニホールドキットを用いた。

#### 4. 試験溶液の調製

均一化した試料5.00gを50mL容PP製遠沈管に秤取した。5%トリクロロ酢酸（TCA）水溶液15mLを加えて1分間ホモジナイズした後、5%TCA水溶液10mLでシャフトを洗浄、この液を合わせ、4℃、3,300rpmで5分間遠心分離した。上清をろ過し、残さに5%TCA水溶液15mLを加え5分間振とうし、同様に遠心分離した後、ろ過してろ液を合わせ、5%TCA水溶液を用いて50mLに定容した（抽出液）。

抽出液0.15mLに1mol/L水酸化ナトリウム溶液0.045mL、20mmol/Lリン酸緩衝液（pH6.8、以下pHは同じ）2.8mLを加えて混合しWCXへの負荷溶液とした。WCXによる精製は次のように行った。WCXにメタノール3mL、水3mL、20mmol/Lリン酸緩衝液3mLを順次通液してコンディショニングし、負荷溶液を全量負荷した後、20mmol/Lリン酸緩衝液3mL、水3mL、50%メタノール3mLで順次洗浄した。ミニカラム内の水を十分に除去した後、ギ酸-メタノール-水（1：30：70）混液3mLで溶出した（精製溶液）。

精製溶液200μLを採り、10mmol/Lギ酸アンモニウム及び0.1%ギ酸含有水溶液-アセトニトリル（4：6）混液（希釈溶媒）で正確に10mLに定容した。この溶液を4℃、15,000rpmで10分間遠心分離し、上清を試験溶液としてLC-MS/MS分析に供した。

#### 5. 検量線

混合標準溶液（各1,000mg/L）を希釈溶媒で希釈し、0.05～20μg/Lの範囲で検量線用の標準溶液を調製した。

#### 6. 添加回収試験

「1. 試料」に示した水産食品6種を対象とし、試料5.00gに混合標準溶液を添加した後、「4. 試験溶液の調製」に従い試験溶液を調製し、添加量に対する分析値から回収率を算定した。添加濃度は100mg/kg、併行回数は5回とした。なお、無添加試料中にNVAが含まれていたアンチヨビでは、添加試料の分析値から無添加試料の分析値を差し引き回収率を算定した。

### 結果及び考察

#### 1. LC条件の検討

NVAのLC-MS/MS分析では、親水性相互作用（HILIC）を利用したカラム<sup>8-10</sup>やペンタフルオロフェニル（PFP）カラム<sup>15</sup>など、イオンペア試薬を必要としないHPLCカラムの使用例が報告されている。本検討では、PFPカラムを用いた分析報告を参考に、PFPカラムとその移動相条件の最適化を検討した。まず、移動相としてA液：0.1%ギ酸水溶液、B液：アセトニトリルによるグラジエント溶出を試みたが、溶出後の初期移動相による平衡時間を15分とした場合でもNVAの保持時間が安定しなかったため、アイソクラティック溶出とすることとした。次に、移動相A液とB液の混合割合を変えてNVAのピーク形状を確認したところ、NVA4種を分離可能な条件では、カダベリン及びプトレシンピークのテーリングが認められ、良好なピーク形状を得ることができなかった。HILIC系カラム分析において、ギ酸アンモニウム水溶液を用いることで良好なピーク形状を得られるとの報告<sup>16</sup>があることから、移動相A液に10mmol/Lとなるようにギ酸アンモニウムを添加したところ、カダベリン及びプトレシンのテーリングが改善された。そこで、移動相A液として10mmol/Lギ酸アンモニウム及び0.1%ギ酸含有水溶液、B液にアセトニトリルを用いてアイソクラティック溶出条件で混合割合の最適化を実施した結果、移動相A：移動相B=40：60の条件で、良好なピーク形状及び分離を得ることができた（図1）。

#### 2. 固相抽出による精製条件の検討

##### 1) 溶出溶媒の検討

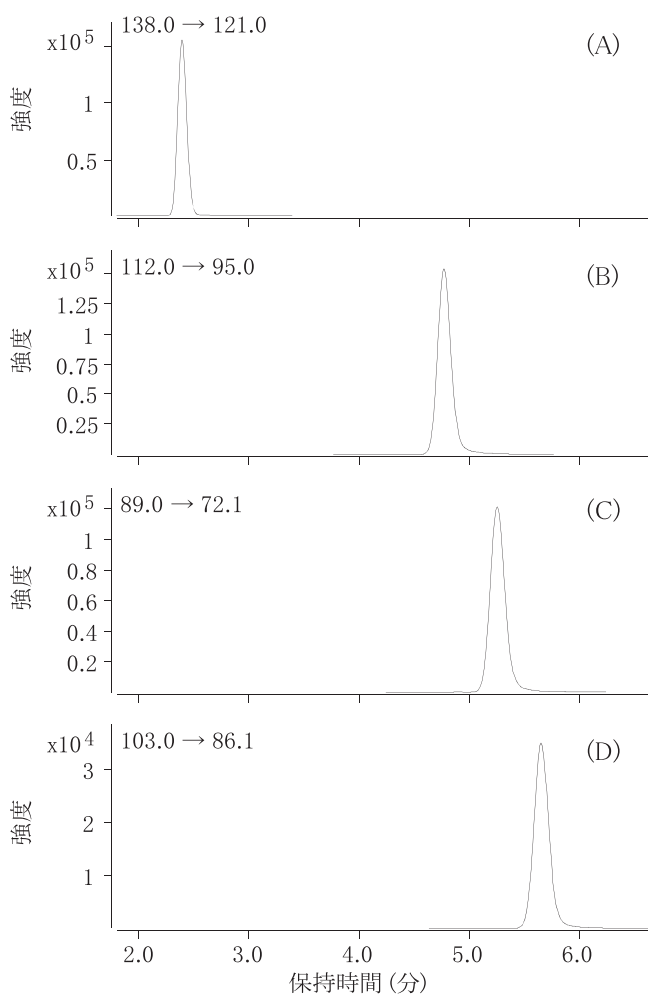


図1 不揮発性アミン類のMRMクロマトグラム  
 (A) チラミン (B) ヒスタミン  
 (C) プトレシン (D) カダベリン  
 各 10 ng/mL (試料換算 100 mg/kg 相当)

我々は、HPLC-FLによる分析法において、TCA抽出液を強陽イオン交換ミニカラムで精製する方法を報告した<sup>11)</sup>。本方法は良好な精製効果が得られるものの、溶出に強アルカリまたは高塩濃度の溶媒を必要とするため、調製した試験溶液をLC-MS/MSで分析するには脱塩工程が必要になり、操作が複雑になる。そこで、LC-MS/MS分析に適した揮発性溶媒であるギ酸により溶出可能なカルボキシル基を官能基にもつ弱陽イオン交換ミニカラムWCX<sup>8,17)</sup>を使用する精製法を検討した。

まず、1%ギ酸水溶液による溶出を試みた結果、NVAの回収率は80%程度と、改善の余地がみられた。そこで、朝倉<sup>17)</sup>と同様にギ酸水溶液にメタノールを加えた溶出溶媒を検討した。20 mmol/Lリン酸緩衝液で希釈してpH 6.8に調整した混合標準溶液をWCXに負荷し、水3 mLで洗浄した後、ギ酸を1%、メタノールをそれぞれ10、20、30、40、50%含有するように調製した溶液3 mLで溶出した。その結果、メタノール割合を30%以上とすることでほぼ完全に回収できることが確認されたため、溶出溶媒はギ酸-メタノール-水(1:30:70)混液を使用すること

とした。

## 2) 負荷溶液の検討

食品試料からのNVA抽出液を陽イオン交換ミニカラムで精製する場合、効果的にアミノ酸類を除去するために負荷溶液を中性に調整する必要がある<sup>11,12)</sup>。そこで、負荷溶液のpHをリン酸緩衝液で調整し、WCXに負荷して回収率を確認したところ、既報<sup>11)</sup>による強陽イオン交換ミニカラムの場合と同様に、リン酸緩衝液濃度が高いほど、また負荷溶液の塩分濃度が高いほどNVAの回収率が低下する傾向が認められた。そこで、既報と同様に、TCA抽出液を1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液中で中和した後、20 mmol/Lリン酸緩衝液で希釈してpHを調整した溶液を負荷溶液とした。

## 3. マトリックス効果抑制方法の検討

サンマ、サバ水煮試料の抽出液をWCXで精製し分析を行うと、マトリックス効果が認められ、ヒスタミン、カダベリン及びプトレシンではイオン化促進、チラミンではイオン化抑制を受けることが確認された。そこで、精製溶液を希釈することによるマトリックス効果の抑制を検討した。それぞれの無添加試料から試験溶液を調製し、希釈溶媒を用いて5、10、50、100倍希釈した後(マトリックス溶液)、それぞれに混合標準溶液を添加しマトリックス効果を確認した(図2)。なお、マトリックス効果は、混合標準溶液を希釈溶媒に添加した場合のピーク面積に対するマトリックス溶液に添加した場合のピーク面積の割合(面積率)で評価した。その結果、希釈倍率を高くするとマトリックス効果は軽減し(面積率が100%に近づき)、50倍と100倍希釈では大きな違いは認められなかった。以上の結果から、精製溶液は希釈溶媒で50倍希釈することとした。メカジキ、サバ味噌煮、マグロ油漬け及びアンチョビ試料に対して同様に50倍希釈によるマトリックス効果を検討したところ、ヒスタミンは98~103%、チラミンは95~101%、カダベリンは98~103%、プトレシンは99~104%の面積率であり、マトリックス効果は希釈により抑制可能なことが確認された。

## 4. 添加回収試験

水産食品6種について、添加回収試験を実施した結果を表2に示した。回収率はヒスタミンで84~94%、チラミンで89~102%、カダベリンで84~92%、プトレシンで90~98%、各併行精度は最大4.2%と、良好な結果が得られた。また、定量下限値は、すべてのNVAでS/N>10を満たした1 mg/kgに設定した。今回検討した結果では、生鮮魚介類だけではなく、味噌煮や油漬けなどの水産加工品でも結果に顕著な差は認められず、いずれの食品でも良好な回収率及び併行精度を得られることが確認できた。

以上より、構築した本試験法は、種々の水産食品中の不揮発腐敗アミン類を迅速かつ精度良く分析可能である有用な方法と考える。

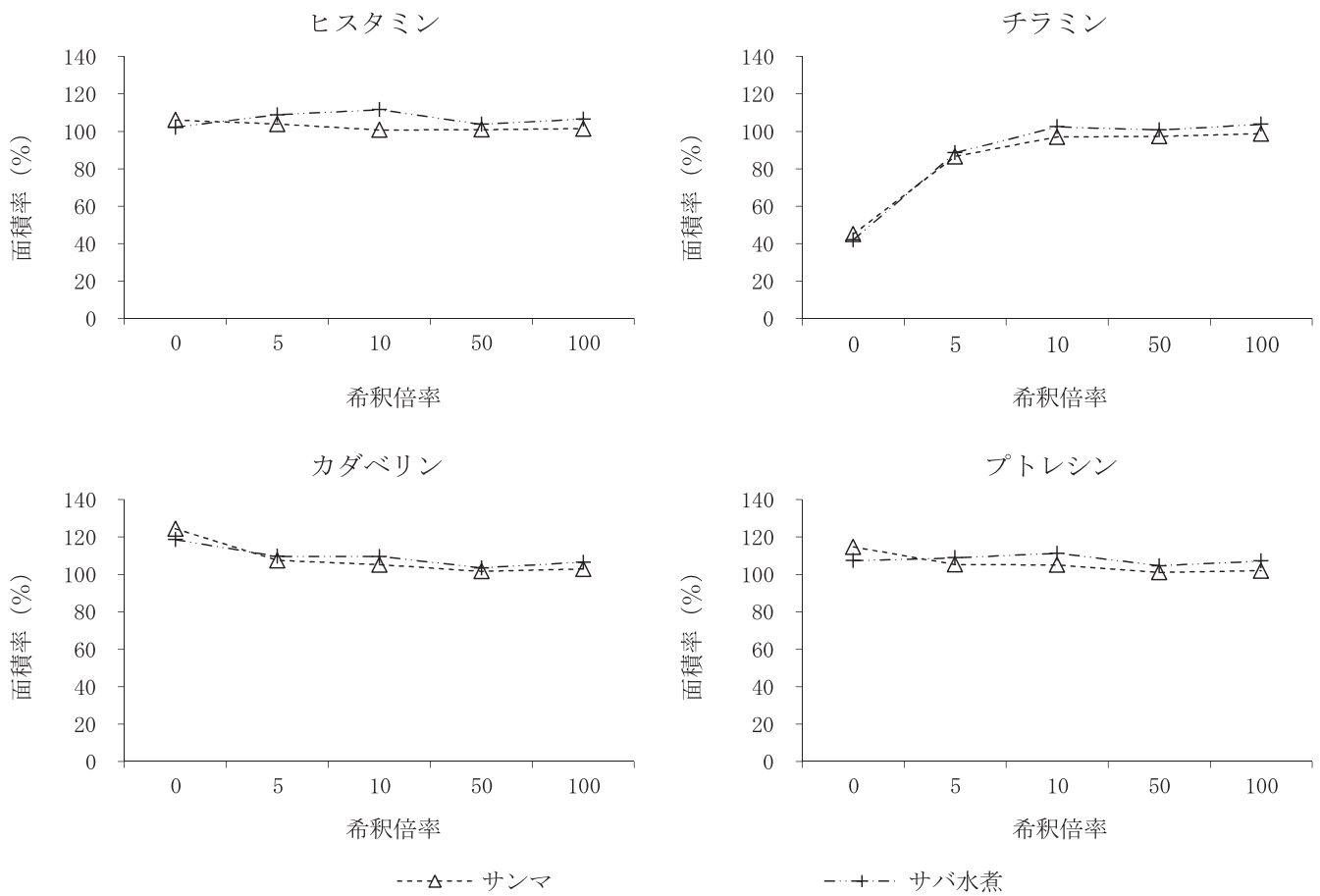


図2 希釈によるマトリックス効果への影響

面積率 (%) = ピーク面積 (マトリックス溶液希釈) ÷ ピーク面積 (希釈溶媒\*希釈) × 100  
 ※ 希釈溶媒: 10 mmol/L 硝酸アンモニウム及び 0.1% 硝酸含有水溶液-アセトニトリル (40:60)

表2 添加回収試験結果

試料	ヒスタミン		チラミン		カダベリン		プトレシン	
	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)	真度 (%)	RSD (%)
サンマ	90	2.3	91	2.9	84	3.5	90	3.1
メカジキ	91	2.5	97	2.1	91	2.2	97	2.6
サバ水煮	93	1.2	99	0.7	92	1.9	97	1.1
サバ味噌煮	84	2.3	89	2.2	85	2.5	91	2.6
マグロ油漬け	94	0.9	96	0.9	91	1.1	98	0.8
アンチョビ	94	2.7	102	2.4	89	4.2	97	3.2

添加濃度: 100 mg/kg  
 真度: 平均回収率

RSD: 併行精度 (相対標準偏差)

すべて n=5

## 文 献

- 1) 宮木高明：食品の腐敗. 食衛誌, 3, 214-220 (1962)
- 2) 藤井建夫：アレルギー様食中毒. 日本食品微生物学会雑誌, 23, 61-71 (2006)
- 3) 食品安全委員会：ファクトシートヒスタミン (概要), [https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/140326\\_histamine.pdf](https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/140326_histamine.pdf) (確認：2020年4月1日)
- 4) FAO/WHO:Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products, [https://www.who.int/foodsafety/publications/histamine\\_risk/en/](https://www.who.int/foodsafety/publications/histamine_risk/en/) (確認：2020年4月1日)
- 5) 井部明広：食品に含まれるアミン類. 日本調理科学会誌, 47, 341-347 (2014)
- 6) 半田彩実, 川鍋ひとみ, 井部明広：ダンシル誘導体化反応の改良による食品中の不揮発性アミン類分析法. 食衛誌, 58, 149-154 (2017)
- 7) 中里光男, 齊藤和夫, 諸角 聖, 和宇慶朝昭, 石川ふさ子, 藤沼賢司, 守安貴子, 二島太一郎, 田村行弘：固相抽出法を用いた食品中の不揮発性腐敗アミンの分析法. 衛生化学, 40, 203-209 (1994)
- 8) 大月史彦, 肥塚加奈江, 林 隆義, 山本 淳：LC/MS/MSを用いた不揮発性腐敗アミンの一斉分析法の検討. 岡山県環境保健センター年報, 34, 99-103 (2010)
- 9) 西名武士, 飛野敏明, 宇梶徳史, 濱本 愛, 松本理世, 増永ミキ, 野田康平, 村川 弘：LC/MS/MSを用いた食品中不揮発性腐敗アミン類の迅速一斉分析法の検討. 熊本県保健環境科学研究所報, 44, 38-47 (2014)
- 10) 宇川夕子, 伊藤志穂, 大谷友香, 望月美菜子, 井上智, 四宮博人：食品中のヒスタミン等不揮発性アミン類等の一斉分析法の検討. 愛媛衛環研年報, 20, 6-9 (2017)
- 11) 久保田晶子, 藤井良昭, 加賀岳朗, 西村一彦, 上野健一：フルオレスカミン誘導体化 HPLC 法による食品中の不揮発性アミン類分析法. 食衛誌, 60, 61-67 (2019)
- 12) 坂本智徳, 赤木浩一, 樋脇弘：固相抽出-エキシマー蛍光誘導体化 HPLC 法による食品中不揮発性アミン類の分析. 食衛誌, 51, 115-121 (2010)
- 13) 玉瀬喜久雄, 北田善三, 溝渕磨彦, 佐々木美智子：高速液体クロマトグラフィーによる魚肉中ヒスチジン, ヒスタミンの同時分析. 食衛誌, 25, 525-529 (1984)
- 14) 粟津薫, 野村千枝, 山口瑞香, 尾花裕孝：タンデム固相抽出を用いた魚肉中ヒスタミン分析法の検討. 食衛誌, 52, 199-204 (2011)
- 15) 吉岡直樹, 吉田昌史：LC/MSを用いたアレルギー様症状を引き起こすヒスタミン等の不揮発性アミン類の分析. 兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター研究報告, 8, 35-38 (2017)
- 16) 柿木康宏, 山下 梓, 宮本靖久, 鴨脚 毅, 望月直樹：HILIC-MS/MSを用いたビール中の不揮発性アミンの一斉分析. 分析化学, 60, 157-162 (2011)
- 17) 朝倉敬行, 北村真理子, 竇龍久枝, 中里光男, 安田和男：LC-MS/MSによる魚粉中のヒスタミンの分析法. 日本食品化学学会誌, 25, 86-91 (2018)