

LC-MS/MS を用いた農産食品及び農産加工食品を対象とした
不揮発性アミン類の分析法の開発

The Development of Analysis Method of Nonvolatile Amines in Agricultural Food and Agricultural Processed Food Using LC-MS/MS

上田友紀子 藤井 良昭 大前 詩穂
青柳 直樹 西村 一彦

Yukiko UEDA, Yoshiaki FUJII, Shiho OMAE,
Naoki AOYANAGI and Kazuhiko NISHIMURA

Key words: nonvolatile amines (不揮発性アミン類); agricultural food (農産食品); agricultural processed food (農産加工食品); LC-MS/MS (液体クロマトグラフータンデム型質量分析計)

緒 言 方 法

不揮発性アミン類 (NVA) は、食品中のアミノ酸等が微生物により分解される過程で生成する。NVA の中で特にヒスタミン、チラミン、プトレシン及びカダベリンは公衆衛生学的リスクが指摘されており¹⁾、ヒスタミンはアレルギー様食中毒の、チラミンは血圧上昇や片頭痛の原因物質として知られ、プトレシン及びカダベリンはアレルギー様症状を助長することが報告されている²⁾。高濃度に NVA が蓄積された食品はアレルギー様食中毒を引き起こし、中毒の原因となった食品の大半は魚類とその加工食品であることが知られている³⁻⁴⁾。その一方で、農産食品や発酵食品から高濃度の NVA が検出された事例も報告されている⁵⁻⁸⁾。しかし、近年の国内における含有実態を調査した例は少ない⁸⁾ ことから、現在流通している農産食品及び農産加工食品中の NVA 含有実態を解明することは重要であると考えた。これまで報告されている農産食品及びその加工食品中の NVA 分析法は、比色法⁵⁾ 及びダンシル誘導体化が必要な方法⁸⁾ であった。他方、筆者らは、水産食品を対象とした LC-MS/MS による NVA 分析法⁹⁾ の開発を報告している。本分析法は、誘導体化の必要がないことから操作も比較的簡便であり、検出感度も良好である。そこで本法の農産食品及び農産加工食品への適用を検討した。しかし、一部の試料で NVA を十分に抽出することができず、満足な回収率が得られなかった。このため、抽出方法を検討し、農産食品及び農産加工食品を対象とした分析法を開発したので、報告する。

1. 試料

試料は札幌市内で購入し、当所で開発した水産食品を対象とした NVA 分析法⁹⁾では満足な回収率が得られなかった赤ピーマン（生鮮）、ハクサイ（生鮮）及びハクサイ（漬物）を用いた。試料は包丁で細切した後、フードプロセッサーを用いて均質化し、-30℃で保存した。

2. 試薬及び試液

標準試薬は、富士フィルム和光純薬(株)製のヒスタミン二塩酸塩、関東化学(株)製のカダベリン二塩酸塩及びチラミン塩酸塩、Merck 社製のプトレシン二塩酸塩を用いた。各標準試薬をそれぞれアミンとして 5,000 mg/mL 溶液になるよう 0.1 mol/L 塩酸に溶解し、標準原液を調製した。各標準原液を混合し、0.1 mol/L 塩酸を加え、1,000 mg/mL の混合標準溶液を調製した。

試薬は関東化学(株)製のLC/MS用アセトニトリル、蒸留水、残留農薬・PCB試験用 *n*-ヘキサン（以下、ヘキサン）、HPLC用メタノール、特級トリクロロ酢酸（TCA）、富士フイルム和光純薬(株)製のLC/MS用ギ酸、試薬特級のリン酸二水素ナトリウム 2水和物、リン酸二水素ナトリウム 12水和物、水酸化ナトリウム及びHoneywell社製のLC/MS用ギ酸アンモニウムを用いた。100 mmol/L リン酸緩衝液（pH6.8）は、リン酸二水素ナトリウム 2水和物 7.8 g、リン酸二水素ナトリウム 12水和物 17.9 g を水に溶解し、全量を 1,000 mL とした。20 mmol/L リン酸緩衝液（pH6.8）は、100 mmol/L リン酸緩衝液を水で希釈して調製した。溶出溶媒はメタノール 30 mL と水 70 mL 及びギ

表1 不揮発性アミン類のMRM条件

	Q1 (<i>m/z</i>)	Quant		Qual		極性
		Q3 (<i>m/z</i>)	CE (eV)	Q3 (<i>m/z</i>)	CE (eV)	
ヒスタミン	112	95	18	83	14	+
チラミン	138	121	10	77	30	+
プトレシン	89	72	10			+
カダベリン	103	86	10	69	18	+

Q1：プリカーサーイオン、Q3：プロダクトイオン

CE：コリジョンエネルギー、Quant：定量イオン、Qual：確認イオン

酸1 mLを混合した。希釈溶媒は、10 mmol/L ギ酸アンモニウム及び0.1%ギ酸含有水溶液とアセトニトリルを4：6に混合した。

弱陽イオン交換カラムはWaters社製 Oasis WCX（60 mg、3 mL）（以下WCX）、ろ紙はGE Healthcare Technologies社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

ホモジナイザーはIKA-Werke社製 ULTRA-TURRAX T25 basic、S25N-18G シャフトジェネレータ、ボルテックスミキサーはScientific Industries社製 VORTEX-GENIE 2、遠心分離機は（株）久保田製作所製ユニバーサル冷却遠心機5930を用い、固相抽出操作はジエールサイエンス（株）製GL-SPE吸引マニホールドキットを用いた。

LCはAgilent Technologies社製1260 Infinity II LC、MS/MSはAgilent Technologies社製6495C Triple Quad LC/MSを用いた。LC分析カラムはMerck社製Discovery HS F5-3（3 μ m、2.1 $\times$ 100 mm）を用いた。カラム温度は40℃、移動相はA液10 mmol/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のイソクラティック溶出条件とした。流量は0.25 mL/min、試験溶液の注入量は3 μ L、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。

4. 試験溶液の調製

均質化した試料5.0 gを50 mL容PP製遠沈管に量りとり、メタノール12.5 mLを加え、10分間静置した。2分間ホモジナイザーで均一化した後、5% TCA 7.5 mLを加え、さらに2分間均一化した。5% TCA 5 mLでシャフトを洗浄した後、激しく振とうし、3,300 rpm、5分間、4℃で遠心分離し、ろ紙でろ過した。残さにメタノール7.5 mL、5% TCA 7.5 mLを加え、2分間ボルテックスミキサーでかくはんした後、上記と同様に遠心分離し、上清をろ過した。得られたろ液を合わせ、5% TCAで50 mLに定容し、抽出溶液とした。この抽出溶液から0.15 mL分取し、1 mol/L水酸化ナトリウム溶液を0.045 mL、20 mmol/L リン酸緩衝液2.8 mLを加えた。この溶液をメタノール3 mL、蒸留水3 mL、20 mmol/L リン酸緩衝液3 mLでコンディショニングしたWCXに全量負荷した。20 mmol/L リン酸緩衝液3 mL、蒸留水3 mL、50%メタノール溶液3 mLで順次洗浄した後、溶出溶媒3 mLで溶出した。これを希釈溶媒

で50倍希釈し、試験溶液とした。

5. 検量線

混合標準溶液（各1,000 μ g/mL）を希釈溶媒で希釈し、0.1～15 ng/mLの範囲の4点で検量線用の標準溶液を調製した。

6. 添加回収試験

赤ピーマン（生鮮）、ハクサイ（生鮮）及びハクサイ（漬物）の3試料を用いて添加回収試験を行った。添加濃度は100 ppm及び1 ppmの2濃度、併行回数は5回、ブランク試料に添加し、室温で30分程度静置した後、「4. 試験溶液の調製」に従い試験溶液を調製した。

結果及び考察

1. 抽出溶媒の検討

当所で開発した水産食品を対象としたNVA分析法⁹⁾で赤ピーマンを対象に添加回収試験を行ったところ、ヒスタミンは71%、チラミンは66%、プトレシンは76%及びカダベリンは75%と満足な回収率が得られなかった。また、操作過程で遠心分離を行った後に繊維質などの浮遊物があり、試料が沈降しづらく、残さの膨潤も認められ、ろ過時の操作性が悪く、回収率に影響していると考えられた。そこで、試料組織中の水と共にNVAを効率よく抽出する目的で、メタノールを加えて回収率及び操作性の改善を試みた。すなわち、試料にメタノールを加えて10分間静置した後、メタノール：5% TCA＝1：1となるよう5% TCAを加えて抽出した場合と5% TCAのみを用いた場合の回収率を比較検討した。結果を図1に示した。5% TCAのみに対して、メタノールを加えることで回収率がすべて

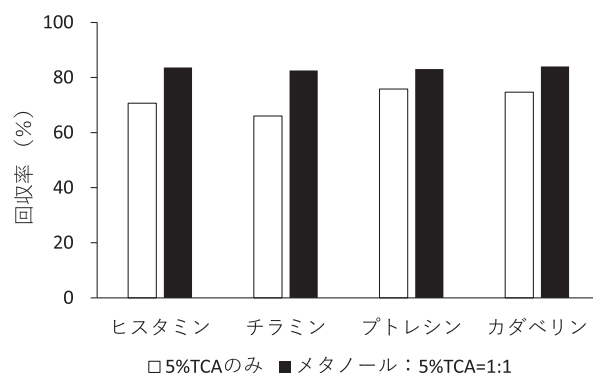


図1 抽出溶媒の比較検討

表2 添加回収試験結果

試料	添加濃度 (ppm)	ヒスタミン		チラミン		プトレシン		カダベリン	
		真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)	真度 (%)	併行精度 (%)
赤ピーマン (生鮮)	100	87	2.8	87	1.6	88	2.9	88	2.9
	1	83	4.2	91	2.3	83	5.4	88	3.3
ハクサイ (生鮮)	100	85	7.1	88	3.0	89	1.4	91	1.5
	1	91	3.0	103	3.7	91	9.5	101	3.4
ハクサイ (漬物)	100	93	1.2	97	1.2	95	1.5	97	1.5
	1	91	0.9	95	2.0	96	7.9	96	4.1

7～17%程度向上した。さらに、残さの膨潤も抑えられ、遠心分離後の浮遊物が減り、操作性も向上したため、この条件で抽出することにした。

2. マトリックス効果の影響確認

赤ピーマン（生鮮）、ハクサイ（生鮮）及びハクサイ（漬物）を用いてマトリックス効果を検討した。まず、各無添加試料から調製した試験溶液をマトリックス溶液とし、混合標準溶液を希釈溶媒または各マトリックス溶液で0.10、0.20、0.25、0.50及び1.0 ng/mLに調製した溶液からピーク面積と濃度の近似直線の傾きを算定した。次に、希釈溶媒に対するマトリックス溶液の傾きの比（勾配比率）を算定し、パーセント（%）で表した値をマトリックス効果として評価した。ヒスタミンは105～107%、チラミンは98～100%、プトレシンは101～106%及びカダベリンは104～107%の勾配比率であり、マトリックス効果の影響は少なく定量に問題がないことが確認された。

3. 添加回収試験

検討した抽出条件で赤ピーマン（生鮮）、ハクサイ（生鮮）及びハクサイ（漬物）の3試料を用いて添加回収試験を実施した（表2）。真度はヒスタミンで83～93%、チラミンで87～103%、プトレシンで83～96%及びカダベリンで88～101%であり、併行精度は最大で9.5%と良好な結果が得られた。定量下限値は、いずれの試料及びNVAに対してもSN比10以上が確認されたことから、1 ppmとした。さらに、農産食品27種、農産加工食品13種を用いて添加回収試験を100 ppm添加、試行回数1回で行ったところ、農産食品の回収率はヒスタミンで80～95%（平均87%）、チラミンで76～96%（平均86%）、プトレシンで77～101%（平均88%）及びカダベリンで83～96%（平均90%）であった。農産加工食品の回収率は、ヒスタミンで79～93%（平均87%）、チラミンで78～93%（平均

87%）、プトレシンで77～102%（平均88%）及びカダベリンで82～94%（平均89%）と良好な結果が得られた。

以上の結果より、本分析法は農産食品及び農産加工食品中の不揮発性アミン類を精度よく分析可能な方法であることが示唆された。今後は、本研究で開発した分析法を用いて調査を継続し、農産食品及び農産加工食品中のNVA含有実態を解明していく。

文 献

- 1) FAO/WHO: Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products, https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/89216/9789240691919_eng.pdf?sequence=1（確認：2024年6月5日）
- 2) 井部明宏：食品に含まれるアミン類. 日本調理科学会誌, **47**, 341-347 (2014)
- 3) 登田美桜, 山本 都, 畝山智香子, 森川 馨：国内外におけるヒスタミン食中毒. 国立衛研報, **127**, 31-38 (2009)
- 4) 都丸亜希子, 登田美桜, 工藤由起子：日本のヒスタミン食中毒事例における魚種およびヒスタミン生成菌に関する文献情報解析. 食衛誌, **63**, 109-116 (2022)
- 5) 岡本玲子, 高木兵治：農家日常食品のアミン含量. 農村生活研究, **44**, 26-30 (1978)
- 6) 松本知子, 彼谷俊夫：植物中のアミンについて. 日本農芸化学会誌, **56**, 209-212 (1982)
- 7) Sánchez-Pérez S, Comas-Basté O, Rabell-González J, Veciana-Nogués MT, Latorre-Moratalla ML, and Vidal-Carou MC: Biogenic Amines in Plant-Origin Foods: Are they Frequently Underestimated in Low-Histamine Diets?. Foods, **7**, 205 (2018)
- 8) 半田彩実, 川鍋ひとみ, 井部明広：市販漬物中の不揮発性アミン類含有量とそれらの含有由来. 食衛誌, **59**, 36-44 (2018)
- 9) 藤井良昭, 加賀岳朗, 上田友紀子, 上野健一, 久保田晶子, 西村一彦：LC-MS/MSによる水産食品中の不揮発性アミン類分析法の検討. 道衛研所報, **70**, 39-43 (2020)