

LC-MS/MSによる食品中不揮発性腐敗アミン類の一斉分析法の検討

松尾 広伸, 谷口 香織, 辻村 和也

食中毒発生時の迅速な原因究明を目的として、LC-MS/MSを用いた食品中の不揮発性腐敗アミン類8成分の一斉分析法の確立に向け、条件の検討を行った。確立した分析法において、鮮魚および調理品を用いて添加回収試験を行ったところ、食中毒の原因となる成分であるヒスタミンおよびチラミンにおいては、それぞれ回収率は、82.6～95.1%、100～109%、その他6成分中5成分で、回収率は50～200%の範囲であり、食中毒時の原因究明としては、十分な回収率であると考えられた。さらに、本分析法を過去の食中毒試料および温度管理し作製した疑似食中毒試料に適用したところ、全ての試料から、食中毒を引き起こしうると考えられる濃度のヒスタミンを検出し、さらに、その他7成分についても、全ての試料からいずれかの成分を定量できた。これらから、食中毒時の不揮発性腐敗アミン類の迅速一斉分析法として、本手法は有効であると考えられた。

キーワード：不揮発性腐敗アミン類、ヒスタミン、食中毒、LC-MS/MS

はじめに

ヒスタミン(HA)は、鮮度の低下等により魚体中のアミノ酸が変化することによって生じる不揮発性アミン類(NVA)であり、アレルギー様食中毒の原因となる。その他のNVAとして、チラミン(Tyr)は、チーズやアルコール飲料等に多量に含まれた場合に、頭痛や血圧上昇の原因となる可能性が知られている。

HAは加熱しても分解されないため、一度産生されると、加熱調理がなされた食品であっても、食中毒の原因となる。登田らの調査¹⁾によると、HA食中毒事例における生ものの割合は7%であり、多くの場合、鮮度の落ちた魚類を加熱調理することで、食中毒が引き起こされていると考えられる。そのため、食中毒の原因究明の際には、生魚だけではなく、調理品においても、迅速かつ正確にHAを分析できることが重要である。

また、HAのみならず、その他のNVAは、同時に摂取された場合、HAの作用を増強する可能性が報告されている¹⁾ため、これらを把握することも食品衛生上重要である。

長崎県では平成30年度に2件、平成31年度に1件、給食施設からHAが原因と疑われる食中毒が発生しており、HA食中毒に対応する体制の充実が必要と考えられた。そこで、本研究においては、生魚および食中毒事例の多い調理品において、HA、Tyr、プトレシン(Ptr)、カダベリン(Cad)、スペルミジン(Spe)、アグマチン(Agm)、2-フェニルエチルアミン(PhA)、

トリプタミン(Try)を分析対象として、NVAの一斉分析法の検討を行ったため、報告する。

材料および方法

1 試料

大村市内のスーパーマーケットで購入したブリ、マグロ、サバを細切・均一化して試料とした。

2 試薬・器具

標準品は、HA二塩酸塩は関東化学(株)製、チラミン塩酸塩(食品分析用)、プトレシン二塩酸塩(食品分析用)、カダベリン二塩酸塩(食品分析用)、スペルミジン三塩酸塩、2-フェニルエチルアミン、トリプタミンは富士フィルム和光純薬(株)製、アグマチン硫酸塩は東京化成工業(株)製を用いた。

その他の試薬は、アセトニトリル(LC-MS用)、ギ酸(特級)は関東化学(株)製、1mol/L ギ酸アンモニウム溶液は富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。

精製水は、富士フィルム和光純薬(株)製を用いた。

器具は、セラミックホモジナイザはアジレント・テクノロジー(株)製の50 mL用、遠心分離フィルター(0.45 μ L)はsystech(株)製、フィルターバイアル(0.20 μ L)はGVSジャパン(株)製を用いた。

3 前処理方法

前処理方法について、図1に示す。

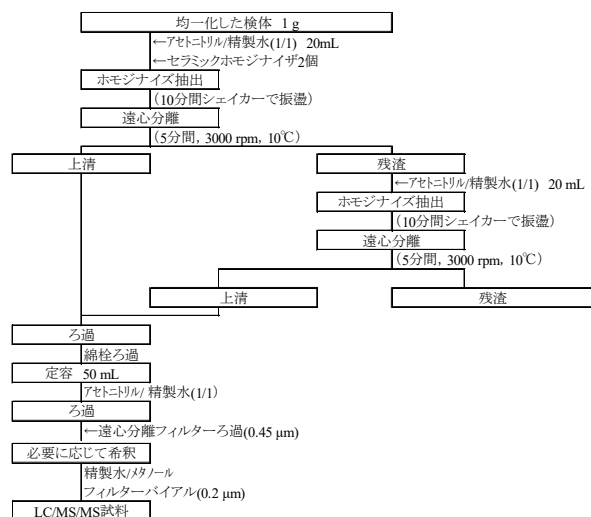


図1 前処理フロー

4 装置および分析条件

LC-MS/MSは、アジレント・テクノロジー（株）製 1260/6460Aを用いた。

(1) LC条件

- ・カラム：RESTEK（株）製 Allure PFP Propyl (2.1×150 mm, 5 μm)
- ・カラム温度：40 °C
- ・流速：0.2 mL
- ・移動相：A液：0.1%ギ酸、B液：ギ酸/ 1Mギ酸アンモニウム/メタノール(0.1/2/100)
- ・グラジエント条件：B10%(0-5 min)-B10→90%(5-10 min)-B90%(10-15 min)-B10%(15-20 min)
- ・注入量：1 μL

(2) MS/MS条件

- ・イオン化法：AJS（Agilent Jet Stream）-ESI
- ・極性：ポジティブ
- ・測定モード：MRM
- ・イオン源温度：350°C
- ・シーガス温度：350°C

化合物ごとのプリカーサーイオン(Q1)、プロダクトイオン(Q3)、フラグメンター電圧および衝突エネルギー(CE)については表1に示した。

表1 MRM分析における条件

化合物	Q1>Q3(定量) (m/z)	Q1>Q3(確認) (m/z)	フラグメンター 電圧(V)	CE(定量) (eV)	CE(確認) (eV)
HA	112>95	112>68	80	13	21
Tyr	138>121	138>77	80	29	7
Ptr	89>72	89>30	110	9	21
Cad	103>86	103>41	80	5	21
Spe	146>72	146>112	80	7	13
Agm	313>72	313>60	72	13	9
PhA	122>105	122>77	72	9	33
Try	161>144	161>117	72	25	7

結果および考察

1 MS/MS条件の検討

MS/MSトランジション、フラグメンター電圧およびCEは、Masshunter Optimizer(アジレント・テクノロジー株式会社)を用いて最適化し、最も強度の高いMS/MSトランジション、フラグメンター電圧およびCEの組み合わせを測定条件として選定した。

2 LC条件の検討

NVAは高極性塩基性化合物であることから、通常条件でのODSカラムではカラムに保持させることが難しい。そのため、HILICカラムを用いた報告^{2)~3)}がこれまで多くなされている。今回は、アルカリ性移動相条件下でのODSカラム、HILICカラム、マルチモードカラム、PFPカラムに分類される計6種のカラムを用いて、移動相条件を変えながら、検討を行った。アルカリ性移動相を用いたODSカラムおよびHILICカラムにおいては、Cad、Ptr、Speが溶出しにくい、もしくはピーク形状がブロードであり、マルチモードカラムにおいては、Speのピーク形状がブロードであった。PFPカラムにおいては、ギ酸のみの条件においては、PhAとTyrが溶出しなかったが、ギ酸アンモニウムを添加することで、これらが溶出するようになり、また、全体的にピーク形状の改善が確認できた。さらに、アセトニトリルからメタノールに有機溶媒を変更することで、分離の改善が確認できた。これらのことから、PFPカラムを選定した。定量範囲を確認したところ、全ての対象化合物について、5~100 ng/mLの範囲内で、決定係数R² ≥ 0.99の良好な直線性を確認した。

3 前処理方法の検討

食中毒発生の際は、迅速な対応が求められるため、簡便な前処理方法が望ましい。そこで、アセトニトリルによる除タンパク効果を期待して、抽出溶媒はアセトニトリル/水(1/1)として、セラミックホモジナイザを用いた粉碎抽出を2回繰り返すのみの、簡便な抽出方法を採用した。試料によっては、フィルターバイアルに通す際に、強い抵抗がある場合があったため、その前に遠心分離フィルターろ過を追加したところ、改善が見られた。

FAO/WHO合同専門家会議は、HAの経口摂取によるNOAELである健康な成人1人あたり50 mgを食中毒の発症の閾値としており、1食あたりの最大喫食量250 gを基に、有害な影響が認められない

表2 添加回収試験の結果

成分	サバの切り身		ブリの切り身		サバの竜田揚げ		ブリの照り焼き	
	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)	回収率(%)	RSD(%)
HA	87.7	7.3	82.6	1.7	88.4	5.1	95.1	2.4
Tyr	106	4.6	100	0.8	110	1.8	110	0.7
Ptr	69.5	13.3	90.9	2.1	68.4	7.9	80.2	4.7
Cad	70.9	7.8	88.7	1.7	70.7	5.3	79	2.0
Spe	87.4	15.9	44.5	6.9	27.1	23.6	42.5	33.3
Agm	91.9	6.1	87.4	3.2	83.3	4.7	95.3	2.9
PhA	123	13.2	97	0.5	118	1.4	118	1.4
Try	131	23.5	97	0.6	119	0.5	118	1.3

表3 NVA含有試料での検証の結果

検体	平均検体中濃度(μg/g)							
	HA	Tyr	Ptr	Cad	Spe	Agm	PhA	Try
疑似食中毒検体①(サバの切り身)	1660	954	585	1430	-	113	626	86.7
疑似食中毒検体②(マグロの切り身)	8970	-	-	500	-	-	3.50	-
サバの味噌煮	299	34.4	4.50	62.1	-	40.5	3.91	-
サバのフライ	1310	21.4	9.7	119	5.94	18.6	2.37	-
イワシのすり身揚げ	1610	236	10.6	202	-	267	39.3	3.13

とされる食品中HAの最大濃度を200 μg/g (原単位はmg/kg)と定めている⁴⁾。この最大値が200 μg/gであることを考慮して、ブリの筋肉およびブリの照焼を用いて、それぞれの抽出液の100倍希釈液にNVA8成分の混合標準液を40 ng/gになるよう添加後、分析を行い、マトリクス効果の検証を行った。マトリクスによる定量値への大きな影響は確認されず、本前処理法においては、抽出液を100倍以上希釈することで、生魚および調理品の定量分析が可能であると考えられた。

4 分析方法の検証

(1) 添加回収試験

HAのCODEXの衛生・取扱い基準値である200 μg/gになるように、NVA8成分を、ブリおよびサバの切り身、ブリの照焼、サバのフライに添加し、添加回収試験(試行回数n=5)を行った。試料の種類は、食中毒事例の多い食品から選定し、調理品については、WEB上の一般的と考えられるレシピを用いて調理した。結果を表2に示す。NVAの内、有毒な作用が確認されている、HAは82.6~95.1%、Tyrは100~109%であり、良好な結果が得られた。その他のNVAについては、Spe以外は、50~200%の範囲を満たしていた。各並行精度も、Spe以外は概ね良好な値を得られた。HAとTyr以外のNVAは単独の毒性は確

認されておらず、スクリーニングとして大まかな濃度が把握できれば十分であり、Speについては、食中毒における検出事例は少なく優先度は低いため、食中毒時の原因究明のための分析法としては、有用であると考えられた。

(2) NVA含有試料での検証

サバおよびマグロの切り身を26℃で4日間保存したものを、疑似食中毒試料とした。これらと過去の食中毒時の残食品3試料について、確立した分析法を適用した。結果を表3に示す。全ての試料から、食中毒を引き起こしうると考えられる濃度のHAを検出し、さらに、その他7成分についても、全ての試料からいずれかの成分を定量できた。これらのことから、本分析法によって、HAやTyrといった毒性のあるNVAの定量に加え、それ以外のNVAのHAの毒性増強作用の把握が可能であると考えられた。

まとめ

食中毒時の迅速な原因究明を目的として、LC-MS/MSを用いた食品中の不揮発性腐敗アミン類8成分の一斉分析法の検討を行った。確立した分析法において、生魚および調理品を用いて添加回収試験を行ったところ、食中毒の原因となる成分であるHAおよびTyrにおいては、それぞれ回収率は、82.6

～95.1%、100～109%、その他6成分中5成分で、回収率は50～200%の範囲であり、食中毒時の原因究明としては、十分な回収率であると考えられた。さらに、本分析法を過去の食中毒試料および作成した疑似食中毒試料に適用したところ、全ての試料から、食中毒を引き起こしうると考えられる濃度のHAを検出し、さらに、その他HAの作用を増強する可能性がある7成分についても、全ての試料からいずれかの成分を定量できた。これらから、食中毒時の不揮発性腐敗アミン類の迅速一斉分析法として、本手法は有効であると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 登田, 他: 国内外におけるヒスタミン食中毒, *国立衛研報*, **127**, 31-38 (2009).
- 2) 西名, 他: 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).

- 3) 宇川, 他: 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).
- 4) 5) FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization], *Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report, Italy, FAO and WHO, 2013, 126 p.* (ISBN 978-92-5-107849-5)

Simultaneous Analysis of Nonvolatile Putrefactive Amines in Foods by LC-MS/MS

Hironobu MATSUO, Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

We investigated a simultaneous LC-MS/MS-based analytical method for eight non-volatile putrefactive amines in foods to rapidly determine the cause of food poisoning. When the established analytical method was tested using raw fish and cooked products, the recovery of histamine and tyramine, which are the components that cause food poisoning, ranged from 82.6 to 95.1% and 100 to 109%, respectively. The recoveries of 5 out of 6 other components ranged from 50 to 200%. These recovery rates were considered sufficient for determining the cause of food poisoning. Furthermore, as a result of analyzing food poisoning specimens that had been stored and mock food poisoning samples that had been prepared using this method, histamine was detected in all samples at concentrations that could potentially cause food poisoning. In addition, one among the other seven non-volatile putrefactive amine components was also detected and quantified in all samples. These results suggest that this method is effective as a rapid simultaneous analytical method for nonvolatile putrefactive amines involved in food poisoning.

Key words: Non-volatile Putrefactive Amines、Histamine、Food poisoning、LC-MS/MS