令和4年度（第17回）秋田県健康環境センター調査研究発表会抄録
食品衛生対策事業

LC-MS/MSによる食品中の不揮発性腐敗アミン類の一斉分析

○古井真理子　　藤井愛実*1　　松渕亜希子

1. はじめに

不揮発性腐敗アミン類の一種であるヒスタミンは、腐敗や発酵の過程で、食品中のヒスチジンにヒスタミン産生菌の酵素が作用して生成する食中毒の原因物質である。ヒスタミンによる食中毒は、過去10年間における国内の化学性食中毒の中で最も発生件数が多く、主な原因食品は、サバ、マグロ、イワシなどの赤身魚やその加工品、調理品である[1,2]。同じく不揮発性腐敗アミン類のチラミンやカダベリン等は、ヒスタミンと一緒に摂取することで、ヒスタミン解毒酵素の阻害やヒスタミンの腸管吸収を促進し、ヒスタミンの作用を増強させるといわれている[3]。

食品中の不揮発性腐敗アミン類の分析法は、従来から高速液体クロマトグラフ（HPLC）法[4]が利用されているが、この方法は前処理操作が煩雑で、迅速性に欠ける。食中毒発生時には、迅速な原因究明と被害拡大防止が求められるため、近年、高感度かつ高選択性を有する液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いた分析法が報告されている[5,6]。今回、当センターでもLC-MS/MSによる不揮発性腐敗アミン類の一斉分析法を検討し、県内流通食品について調査を行ったので、その概要を報告する。

2. 方法

2.1 標準品

ヒスタミン二塩酸塩、トリプタミン及びフェネチルアミン（2-フェニルエチルアミン）は富士フイルム和光純薬製、チラミン塩酸塩、カダベリン二塩酸塩、プトレシン二塩酸塩及びスペルミジン三塩酸塩はナカライテスク製、アグマチン硫酸塩は東京化成工業製を使用した。各標準品を0.1 M塩酸に溶解し、標準原液（1 mg/mL）としたのち、各標準原液を1 mLずつ混合し、0.1 M塩酸で10 mLに定容して混合標準溶液（100 μg/mL）を調製した。

2.2 添加回収試験

添加回収試験の試料はマグロ刺身、焼き塩サバ、魚醤を粉砕・均一化して用いた。CODEX委員会のヒスタミン基準値[3]を参考に、混合標準溶液を、マグロ刺身と焼き塩サバは100 μg/g（品質基準）、魚醤は400 μg/g（魚醤の衛生基準）となるよう添加し、添加回収試験（n＝3）を行った。

2.3 県内流通食品試料

試料は、令和3年度に秋田県内で流通していたマグロ刺身、カツオたたき、ブリ刺身、焼き塩サバ、しめサバ、サバ水煮缶詰、マグロ水煮缶詰、カツオ油漬缶詰、焼きサンマ、サンマ味噌煮、魚醤5種（県内製造のしょっつる、A～Eとする）を粉砕・均一化して用いた。

2.4 前処理法及び測定条件

試料の前処理法を図1に、LC-MS/MSの測定条件を表1に、イオン化条件を表2に示す。なお、一部のアミン類はガラスに吸着する[5]ため、ガラス製の器具やバイアルは直接使用しないようにした。

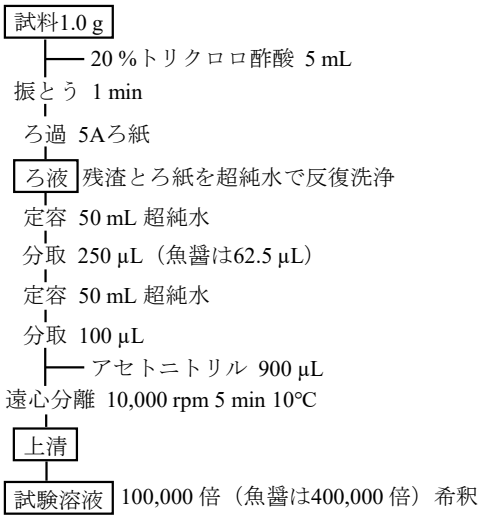

図1　前処理法

*1 生活環境部生活衛生課

表１　測定条件

LC-MS/MS装置	QTRAP4500（AB SCIEX）
カラム	Atlantis HILIC Silica （2.1 mm i.d.×150 mm, 3 μm）
移動相	A液（超純水：ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ：ﾒﾀﾉｰﾙ＝95：4：1混液）
	B液（0.2 %ぎ酸, 60 mMぎ酸ｱﾝﾓﾆｳﾑ含有,超純水：ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ：ﾒﾀﾉｰﾙ＝30：56：14混液）
グラジエント条件	B液：100 %（0 min）→100 %（2 min）→54 %（3 min）→54 %（5 min）→0 %（6 min）→0 %（10 min）→100 %（11 min）→100 %（25 min）
流　速	0.3 mL/min
カラム温度	40 ℃
注入量	5 μL
イオン化法	ESI（+）
測定モード	Scheduled MRM
イオン源温度	500 ℃
イオン源電圧	5000 V

表２　ＭＲＭ条件

成分名	定量イオン（*m/z*）	定性イオン（*m/z*）
トリプタミン	161.0>144.1	161.0>117.0
チラミン	138.0>121.0	138.0> 77.0
フェネチルアミン	122.0>105.0	122.0> 77.0
ヒスタミン	112.0> 95.0	112.0> 68.0
アグマチン	131.0> 72.0	131.0>114.0
カダベリン	103.0> 86.0	103.0> 69.0
プトレシン	89.0> 72.0	89.0> 54.9
スペルミジン	146.1> 72.0	146.1>112.0

（保持時間順）

3. 結果及び考察

3.1 検量線及び定量下限

0.1 ng/mL～25 ng/mL の範囲（8 点）で、ピーク面積による絶対検量線を作成した。スペルミジンを除き良好な直線性（相関係数 0.999 以上）であり、スペルミジンは相関係数 0.975 であった。

また、食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン[7)]に示されている定量下限の指標を参考に、ピークの S/N 比を求めた。トリプタミン、チラミン、フェネチルアミン、ヒスタミン、アグマチン、カダベリンの 6 成分は 0.1 ng/mL～0.25 ng/mL から S/N 比≧10 を満たしていた。プトレシン及びスペルミジンは 2.5 ng/mL から S/N 比≧10 を満たし、S/N 比≧3 を満たすのはプトレシンは 0.5 ng/mL から、スペルミジンは 1.0 ng/mL からであった。

3.2 添加回収試験

3.1の結果から、プトレシン及びスペルミジンを除く6成分について、各試料の添加回収試験を実施した。結果を表3に示す。各試料の回収率は6成分すべてが75～119 %であり、良好であった。

表３　添加回収試験結果（平均回収率（%）、n=3）

成分＼試料	マグロ刺身	焼き塩サバ	魚醤
トリプタミン	92.6 (2.6)	91.6 (5.0)	74.5 (2.1)
チラミン	85.6 (2.5)	100.3 (7.2)	83.0 (2.9)
フェネチルアミン	96.1 (2.8)	109.9 (4.1)	91.0 (2.7)
ヒスタミン	107.1 (2.9)	108.7 (3.4)	86.0 (1.5)
アグマチン	109.4 (4.1)	112.9 (4.8)	91.9 (13.5)
カダベリン	113.1 (6.0)	119.4 (3.7)	106.1 (15.4)

（　）内は相対標準偏差（%）

相対標準偏差は魚醤試料のアグマチン及びカダベリンがやや高い結果となったが、概ね良好な結果が得られた。なお、ブランク試料から微量検出された場合は差し引いて回収率を算出した。

検討の際、回収率が変動することがあり、カラムに試料中のナトリウムイオン等の夾雑物が残存していることが懸念された。そのため、試料を測定後、超純水20 μLを注入し、B液：0 %（0 min）→0 %（54 min）→100 %（55 min）→100 %（70 min）の条件でカラム内を洗浄し、その後平衡とピーク強度の確認として、1.0 ng/mL標準液を2回（魚醤は3回）繰り返し測定してから次の試料を測定することで、測定結果が安定した。

3.3 県内流通食品試料

県内流通食品試料の結果を表 4 に示す。ほとんどが定量下限値未満で、検出された試料は魚醤 2 種のみであり、CODEX 委員会のヒスタミン基準値である魚醤の衛生基準 40 mg/100 g と比較して十分に低い濃度であった。魚醤 A はヒスタミン中毒を起こす魚類としてファクトシート[3)]に記載のあるイワシ及びサンマが原材料に含まれ、魚醤 B は魚種を特定しない魚という原材料表記であった。魚醤 C～E はファクトシート[3)]に記載のないハタハタ、真鱈、ワカサギをそれぞれ原材料としていた。基準値と比較して問題のない濃度であったものの、魚種の違いがヒスタミン濃度の違いにつながったと示唆された。

表 4　県内流通食品試料の結果（mg/100g）

成分＼試料	マグロ刺身	カツオたたき	ブリ刺身	焼き塩サバ	しめサバ	サバ水煮	マグロ水煮	カツオ油漬	焼きサンマ	サンマ味噌煮	魚醤A	魚醤B	魚醤C	魚醤D	魚醤E
トリプタミン	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
チラミン	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
フェネチルアミン	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
ヒスタミン	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	6.2	5.8	－	－	－
アグマチン	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－
カダベリン	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－	－

－は定量下限値未満

4. まとめ

ヒスタミン、チラミン等 6 成分について、LC-MS/MS 法による一斉分析法を検討した。アグマチン及びカダベリンは、魚醤ではばらつきがみられるものの、概ね良好な結果が得られ、本分析法は食中毒発生時の分析として十分に適用できると考えられる。プトレシン及びスペルミジンの 2 成分は定性のみ可能で、高濃度であれば定量できる可能性が示唆された。

また、今回調査した県内流通食品はすべて、CODEX 委員会のヒスタミン基準値を超えるものはなかった。今後も食中毒の原因究明のための分析体制の整備に努めていきたい。

参考文献

1）厚生労働省：食中毒統計資料, URL. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html#j4-3 〔 accessed July 4, 2022〕.

2）厚生労働省：ヒスタミンにおける食中毒について,URL. https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html〔accessed July 4, 2022〕.

3）食品安全委員会：ファクトシート（ヒスタミン）. 最終更新日：令和 3 年 3 月 30 日,URL. https://www.fsc.go.jp/factsheets/index.data/210330histamine.pdf〔accessed July 4, 2022〕.

4）井部明広：不揮発性腐敗アミン，食品衛生検査指針理化学編 2015, 公益社団法人日本食品衛生協会，東京，2015，785-791.

5）西名武士他：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, 熊本県保健環境化学研究所報，**44**，2014，38-47.

6）太田康介他：水産物中に含まれる不揮発性アミンの分析法の検討，山形県衛生研究所報，**46**，2013，11-14.

7）厚生労働省:平成 22 年 12 月 24 日付け厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知，食安心発 1224 第 1 号.