

魚類加工食品中に含まれるヒスタミンをはじめとする 7種アミン類のLC-MS/MS分析

吉井 要 中村 貴憲 鳥居 潤 宇野 玲子 土田 貴正

Quantitative Determination of Seven Nonvolatile Amines including
Histamine in Processed Fish Foods by LC-MS/MS

Kaname YOSHII Takanori NAKAMURA Jun TORII
Reiko UNO Takamasa TSUCHIDA

要 旨

LC-MS/MSによる魚類加工食品中のアミン類の一斉分析法を確立した。魚類加工食品として、オイルサーディン、さばのへしこ及びキハダマグロの刺身を使用し、測定対象のアミン類は、ヒスタミン、アグマチン、カダベリン、フェネチルアミン、プトレシン、トリプタミン、チラミンの7種類とした。試料からの測定成分の抽出は、5%トリクロロ酢酸水溶液を使用した。抽出液の精製は、逆相固相カラムに夾雑物を保持させる方法で検討し、その結果、充填剤にオクチル基を有するInertSep C8が最も良好であった。定量は、精製後の溶液を測定時の移動相と同組成の溶媒で希釈したものをLC-MS/MSにより分析し、絶対検量線法で行った。測定法の妥当性は、「食品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」(厚生労働省通知. 平成22年12月24日. 食安発1224第1号、以下「妥当性評価ガイドライン」という。)に従い、1日2併行の標準品添加回収試験を5日間実施して評価した。妥当性評価の結果、選択性、真度、併行精度及び室内精度について、妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。

キーワード：ヒスタミン、不揮発性腐敗アミン類、魚類加工食品、高速液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析計
Keyword : Histamine, Nonvolatile amines, Processed fish foods, LC-MS/MS

はじめに

ヒスタミンは、食品に含まれるアミノ酸の一種であるヒスチジンがヒスタミン産生菌の働きで脱炭酸により生成するアミンである。高濃度のヒスタミンを含む食品、特に魚類及びその加工食品を喫食すると、顔面の紅潮、じんましん、発熱、嘔吐、頭痛などのアレルギー症状に似た症状を呈することがある。このヒスタミン食中毒は、半日程度で回復することがほとんどで、重症化することは少ない。厚生労働省ホームページ「ヒスタミンによる食中毒について」(<https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>)によると、平成25年から令和4年までの10年間に日本国内で発生したヒスタミン食中毒事件数は年間平均9.7件であるが、同患者数の年間平均は204.4人であり、保育園や学校が関係する大規模な食中毒事例が多く見られる。食品中のヒスタミンは調理工程での加熱に対して安定であり、調理工程で除去することができないため、ヒスタミン食中毒の予防には、ヒスタミン産生菌の働きを抑えてヒスタミンの生成反応を進行させないことが重要であるので、原材料である魚の保管、製造工程、加工食品の保存及び喫食までの一貫した温度管理が求められる。食品の安全性や品質に関する国際的な基準を定めるコーデックス規格は、ヒスチジン含有量が高い魚種を対

象に、食品中のヒスタミン濃度の基準値を腐敗基準として100 mg/kg、衛生及び取扱基準として200 mg/kgを設定しているが、日本国内においては、食品中のヒスタミン濃度に関する規制は設けられていない。魚類が腐敗する際にタンパク質等の分解を経て生成するアミン類は、ヒスタミンの他にも多数存在し、これらを不揮発性腐敗アミン類(以下、アミン類)という。ヒスタミン以外のアミン類は国際的にみても基準値設定等がされていない状況である。ヒスタミン食中毒のメカニズムは依然として不明な点が多いが、ヒスタミン以外のアミン類が、ヒスタミン食中毒の影響因子である可能性を指摘する報告^{1,2)}もあり、ヒスタミンだけでなく、他のアミン類の食品中濃度を調べることには意義がある。

京都府では、ヒスタミン食中毒予防の観点から京都府食品衛生監視指導計画に基づく流通食品の取去検査を令和4年度から実施している。取去する流通食品は、京都府内で製造された魚類加工食品を主なターゲットとしている。当研究所では、これに向けて令和3年度からヒスタミン分析法の検討を開始した。今回、分析法確立時に得られた知見について報告する。なお、取去検査の検査成分はヒスタミンであるが、前述のとおり、ヒスタミン食中毒とほかのアミン類との関連を指摘する報告等も散見されることから、測定対象化合物はヒスタミンに加えてアグマチン、カダベリン、フェネチルアミン、プトレシン、トリプタミン及びチラミンの合計7種類とした。

(令和6年1月4日受理)

アミン類の分析法は、食品衛生検査指針には、固相カラムによる精製ののちにダンシルクロライドを用いて誘導体化し、蛍光検出器付きHPLCで測定する方法が掲載されている³⁾。近年は、LC-MS/MSを用いて、誘導体化せずに直接アミン類を分析する方法が数多く報告されており、LC-MS/MSは、HPLCと比べて非常に高感度で分析ができることから、煩雑な精製操作を行わず、溶媒による希釈のみを前処理とする分析を可能としている^{4,5)}。しかし、夾雑物が特に多い加工食品を分析するにあたっては、精製工程が必要と考えられるケースが多く、弱陽イオン交換カラムで精製する方法⁶⁾、逆相系ポリマーカラムと陽イオン交換カラムを組み合わせて精製する方法⁷⁾などが報告されている。これらの方法は、誘導体化を要しないものの、固相カラムに通液するにあたってpH調整や緩衝溶液の使用等を必要とし、工数が多くなっている。我々は簡便かつマトリックスの影響を抑える前処理方法を検討したので報告する。

材料及び方法

1. 試料

試料は、市販のオイルサーディンの缶詰、さばのへしこ及びキハダマグロの刺身を使用した。「へしこ」は、北陸地方周辺の日本海沿岸地域の伝統料理であり、さば等の赤身魚を塩漬けにした後、米糠に長期間漬け込み熟成させた保存食である。さばのへしこは骨及びヒレを取り除き、表面に付着した麹等の添加物を拭き取り、オイルサーディンはオイルを切り、固形部分をフードプロセッサで均一化し、冷凍と融解を繰り返さないように5 gずつ小分けにして冷凍保存したものを検査に供した。

2. 試薬等

ヒスタミン二塩酸塩標準品、チラミン塩酸塩標準品、プトレシン二塩酸塩標準品、カダベリン二塩酸塩標準品、2-フェ

ニルエチルアミン及びトリプタミンは、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(株)製を使用した。

アセトニトリル、メタノール、ギ酸、1 mol/Lギ酸アンモニウム水溶液、トリクロロ酢酸は富士フィルム和光純薬(株)製を使用した。水はメルクミリポア社製Milli-Q Direct16により精製して使用した。

3. 試液の調製

5% (w/v) トリクロロ酢酸水溶液は、50.0 gのトリクロロ酢酸を1000 mLに定容して調製した。0.1% (w/v) ギ酸水溶液は、1.0 gのギ酸を1000 mLに定容して調製した。10 mmol/Lギ酸アンモニウム及び0.1% (w/v) ギ酸含有水溶液は、1 mol/Lギ酸アンモニウム水溶液10 mLを0.1% (w/v) ギ酸水溶液で1000 mLに定容して調製した。希釈用溶液は、10 mmol/Lギ酸アンモニウム及び0.1% (w/v) ギ酸含有水溶液400 mLとアセトニトリル600 mLを混合して調製した。検量線の作成に使用する混合標準溶液は、各アミン類の標準品をそれぞれ0.1 mol/L塩酸を用いて5 µg/mLの標準原液を調製した。それらを混合し、希釈用溶液で段階的に希釈して0.1 ng/mL~20 ng/mLの範囲で調製した。

4. 機器及び測定条件

高速液体クロマトグラフシステムは、島津製作所(株)製Nexera X2、タンデム質量分析計はAB Sciex社製QTRAP4500を使用した。分析カラムは、ペンタフルオロフェニル(PFP)カラムSUPELCO社製Discovery HS 5-3(粒径3.0 µm、内径2.1 mm、長さ100 mm)を使用した。各アミンのMRM条件は表1に、LC及びMS/MSの測定条件は表2に示した。MRM条件は、QTRAP4500オペレーションソフトのインフュージョン分析により最適化した。MS/MS測定条件も、同ソフトのフローインジェクション方式による自動最適化により決定した。LC測定条件は、PFPカラムを用いて水産物加工品中の4種のアミン類を分析した藤井ら⁶⁾の報告を参考に設定した。

表1. 各アミン類のMRM条件

| 化合物 | 定量イオン | | | | 確認イオン | | | | | |
|----------|-------|---|--------|--------|-------|-------|--------|--------|----|----|
| | m/z | | DP (V) | CE (V) | m/z | | DP (V) | CE (V) | | |
| ヒスタミン | 112.0 | > | 94.9 | 16 | 19 | 112.0 | > | 67.9 | 16 | 29 |
| アグマチン | 131.0 | > | 72.0 | 16 | 19 | 131.0 | > | 114.0 | 16 | 15 |
| カダベリン | 103.0 | > | 85.9 | 1 | 13 | 103.0 | > | 69.0 | 1 | 21 |
| フェネチルアミン | 122.0 | > | 104.9 | 1 | 17 | 122.0 | > | 76.9 | 1 | 37 |
| プトレシン | 89.1 | > | 72.0 | 31 | 13 | — | | — | | — |
| チラミン | 138.0 | > | 120.7 | 41 | 13 | 138.0 | > | 76.9 | 41 | 25 |
| トリプタミン | 161.0 | > | 143.8 | 36 | 15 | 161.0 | > | 116.8 | 36 | 33 |

DP: デクラスタリング電位 CE: コリジョンエネルギー

表2. LC及びMS/MSの測定条件

| | | |
|-----------|-------------|--|
| LC測定条件 | 流量 | 0.25 mL/分 |
| | 注入量 | 5 µL |
| | カラム | SUPELCO社製Discovery HS 5-3 (3.0 µm, 2.1 × 100 mm) |
| | カラム温度 | 40 °C |
| | 移動相 | 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 |
| | 分析時の移動相組成 | A液：B液 = 40：60 (isocratic) |
| MS/MS測定条件 | イオン化法 | エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード |
| | 測定モード | 多重反応モニタリング (MRM) |
| | ターボガス温度 | 500 °C |
| | ターボスプレー圧力 | 80 psi |
| | ネブライザーガス圧力 | 60 psi |
| | カーテンガス流量 | 30 mL/分 |
| | コリジョン反応ガス流量 | 8 mL/分 |
| | イオンスプレー電圧 | 5500 V |
| | エントランス電圧 | 10 V |

5. 試験溶液の調製方法

試験溶液の調製方法を図1に示す。試料の前処理工程の概略は以下の通りである。すなわち、試料に除タンパク作用のあるトリクロロ酢酸水溶液を加え、セラミックホモジナイザー (Agilent Technologies社製) を入れて振とうした。その後、遠心分離し、ろ紙 (ADVANTEC No.5C 110mm) を用いて上清と沈殿を分離した。沈殿に対して同抽出操作を2度繰り返し、上清3回分を合わせてトリクロロ酢酸水溶液で50 mLに定容して抽出液とした。抽出液を逆相固相カラムで精製した後、希釈用溶液で希釈して試験溶液とした。

なお、測定対象のアミン類は、ガラス器具に吸着しやすいため、各種標準溶液の調製から試料の前処理及び測定試料を封入するバイアルに至るまで、全ての器具についてポリプロピレン (PP) 製又はポリメチルペンテン (PMP) 製の樹脂製品を使用した。

6. 標準品添加回収試験の方法

添加試料は、試料5 gにコーデックス規格の腐敗基準に従い試料中濃度が100 mg/kgとなるように標準品を添加して作製した。試料及び添加試料から抽出・精製等を経て作製した試験溶液をLC-MS/MS測定し、絶対検量線法で定量した。妥当性評価ガイドラインは、「試験対象である農薬等を含まない試料 (ブランク試料) に試験対象の農薬等を添加した試料 (添加試料)」を用いて標準品添加回収試験を行うこととしているが、本分析法の測定対象であるアミン類は生体内の化学反応で生成するため、完全にこれらのアミン類を含まないブランク試料を準備するのは困難である。そのため、ブランク試料からアミン類を検出した場合には、添加試料の測定結果から差し引き、標準品添加回収率を算出した。

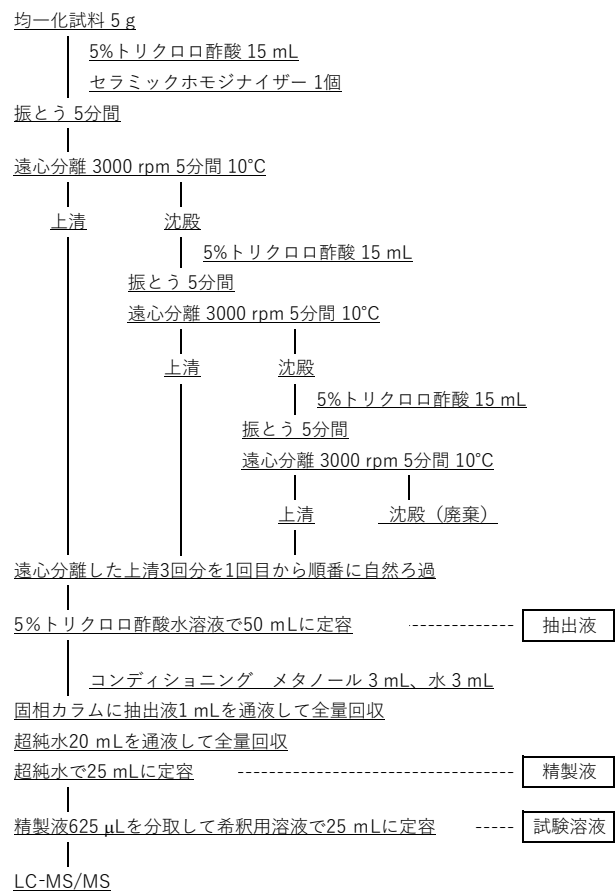


図1. LC-MS/MSによる7種アミン類の定量分析に供する魚類加工食品の抽出及び精製工程

7. 抽出液の精製法の検討

7-1. 抽出液に含まれる夾雑成分による

マトリックス効果の確認

オイルサーディン、さばのへしこ及びキハダマグロの刺身の添加試料をそれぞれ図1に従って処理し、得られた抽出液を25 µL分取し、希釈用溶液で25 mLに定容したものを直接測定し、標準品添加回収率を計算した。この実験はn = 2で2日間実施し、回収率の平均値を算出した。

7-2. 固相カラムを用いた精製法の検討

後述するように、上述の抽出液を溶媒で希釈するのみの前処理では、マトリックスの影響を十分除去できなかったため、抽出液を固相カラムを用いて精製した。固相カラムによる精製は、測定成分を保持させ共存している夾雑成分を分離・洗浄する手法（保持法）と、測定成分を素通りさせ夾雑成分を固相に保持させる手法（素通り法）がある。本検討は、固相カラム通液で精製と同時に濃度を希釈することができる素通り法で検討した。また、前処理操作をより簡便にするため、抽出液にpH調整等を施さずに直接固相カラムに通液する方法で検討した。固相カラムは、Waters社製Oasis PRiME HLB (200 mg)、ジーエルサイエンス(株)製InertSep PLS-2 (270 mg)、InertSep C18 FF (500 mg)、InertSep C8 (200 mg) 及びInertSep CH (200 mg) の5種類を使用した。使用した5種の逆相固相カラムは、PLS-2が最も充填剤の疎水性が高く、次いでHLB、C18、C8、CHの順である。PLS-2はスチレンジビニルベンゼン共重合体（SDB）を、HLBはジビニルベンゼンとN-ビニルピロリドンとの共重合体を充填剤とするカラムである。C18及びC8はそれぞれオクタデシル基及びオクチル基を有するシリカゲルベースのカラムであり、CHは官能基としてシクロヘキシル基を有する特殊なもので、エチル基（C2）固相と同程度の極性をもつ。図1の前処理フローにより、オイルサーディンを試料として5種の固相カラムを用いて標準品添加回収試験をn = 1で実施し、標準品添加回収率を比較した。

結果及び考察

1. 測定条件の検討

表1のとおり、MRM条件は、プトレシン以外のアミン類は「定量イオン」と「確認イオン」の2種類のトランジションを設定することができた。プトレシンは、低分子量のためプロトン付加体と考えられるm/z 89.1のプリカーサーイオンと同イオンから中性のアンモニア分子が脱離したものに相当するm/z 72.0のプロダクトイオンの組み合わせからなる一つのトランジションのみを設定するに留まった。

ヒスタミン等の高極性塩基性化合物を誘導体化せずにLCで分離する方法として、順相クロマトグラフィーの一種である親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）を用いる方法が一般的である。逆相クロマトグラフィーにおいては、汎用性の高いオクタデシル（C18）カラムは高極性塩基性化合物の保持が困難とされているが、ペンタフルオロフェニル（PFP）カラムはフェニル基に電気陰性度が高いフッ素原子が結合していることによる水素結合性及び双極子相互作用等が、高極性塩基性化合物の保持を可能としている。藤井ら⁶⁾は、PFPカラムを用いて、ヒスタミン、カダベリン、プトレシン及びチラミンの4種類のアミンを分析したが、我々は、同条件でアグマチン、フェネチルアミン及びトリプタミンについても分離、ピーク形状ともに良好であることを確認した。

2. 前処理工程の検討

魚類加工食品は、魚由来のたんぱく質や油脂だけでなく、製造時に添加する塩、植物油、調味料等、LC-MS/MS分析においてマトリックス効果をもたらす物質及びカラムの劣化等が懸念される物質を多量に含む。また、抽出補助剤に使用したトリクロロ酢酸は強酸であり、高濃度ではLCに導入できない。西名ら⁴⁾は、水産物及び水産物加工食品をトリクロロ酢酸水溶液及び精製水で抽出した後、精製水で希釈する方法でLC-MS/MSによる8種類のアミン類の迅速一斉分析法を報告した。本検討では、抽出液を希釈用溶液で1000倍に希釈して測定したときのマトリックス効果の影響を確認した。結果を図2に示す。標準品添加回収率は、すべての試料で7種

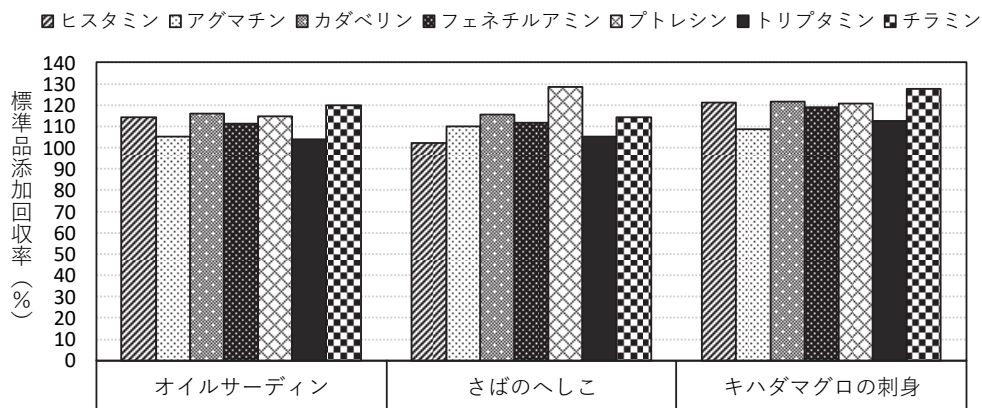


図2. 3種類の魚類加工食品を試料とした7種アミン類の標準品添加回収試験において抽出液に溶媒希釈のみの前処理を施した場合の添加回収率

類のアミン類について100%を超える結果となり、特に、オイルサーディンのチラミン、さばのへしこのプトレシン及びマグロのヒスタミン、カダベリン、フェネチルアミン、プトレシン、チラミンについては120%を超える回収率となった。この結果から、マトリックス成分によるイオン化促進が示唆され、本検討の試料の種類及び希釈倍率において、溶媒希釈のみではマトリックス効果を低減できないと考え、次に、固相カラムによる精製を検討した。

3. 固相カラムによる精製条件の検討

結果を図3に示す。いずれのカラムの結果も、標準品添加回収率が100%以下に収まったことから、逆相固相カラムで精製することにより、図2で見られたマトリックス効果（イオン化促進）は低減することができたと考えられる。個別の結果については以下のとおり考察する。PLS-2はフェネチルアミン及びトリプタミンが標準品添加回収率0%、チラミンが63%となり、3種のアミンが妥当性評価ガイドラインの目標値である70~120%を逸脱した。HLBはトリプタミンが0%、フェネチルアミンが50.7%、チラミンが68.6%であった。

本検討では固相カラムを素通り法で検討したため、回収率が低下したアミンは、固相に吸着し、脱離し難かったものと考えられる。PLS-2及びHLBにおいて共通して回収率が低かった3種のアミンはいずれもベンゼン環を有し、固相のベンゼン環と強い親和性があったものと考えられる。固相にベンゼン環を含まないC18カラムの結果は、PLS-2及びHLBと比べて改善したがトリプタミンの65.3%が70%を下回る結果となった。検討した充填剤の中で最も疎水性が低いCHは、トリプタミンを除くアミン類については回収率が78%~91%と良好であったが、トリプタミンの回収率が10.3%と70%を大きく下回った。この原因は定かではないが、CHカラムの充填剤とトリプタミンの分子構造との間に特異的な相互作用が生じた結果であると考えられる。最も良好な結果は、C8カラムで得られ、7種のアミン類において約78%~96%の標準品添加回収率であった。C8カラムは、充填剤にベンゼン環を含まずC18よりも疎水性が低いため、測定成分の固相からの脱離性が向上したことで良好な結果が得られたと考える。この結果から、精製に用いる固相カラムはInertSep C8を採用した。

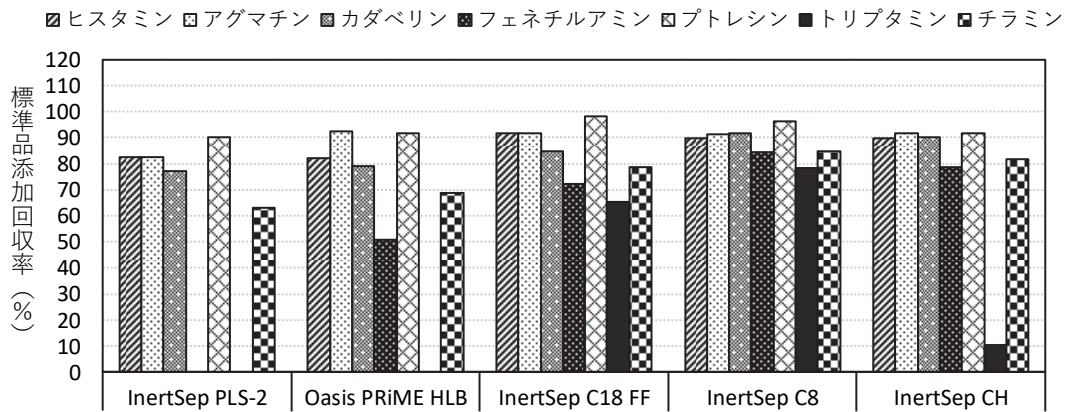


図3. オイルサーディンを試料とした7種アミン類の標準品添加回収試験における固相カラムの種類ごとの添加回収率

4. 妥当性評価試験

妥当性評価ガイドラインに従い、1日2併行の標準品添加回収試験を5日間実施して評価した。結果を表3に示す。いずれの試料においても、7種のアミン類において、定量を妨害するピークは確認されず選択性は良好であった。真度は73.9~98.3%、併行精度は1.5~6.4%、室内精度は2.3~8.8%と

なり、すべての試料及び項目について妥当性評価ガイドラインの目標値を満たした。定量下限値は、検量線試料の測定結果からS/N \geq 10を満たす濃度に設定することとし、ヒスタミン、カダベリン、フェネチルアミン、トリプタミン及びチラミンは試料中1 mg/kg、アグマチン及びプトレシンは試料中2 mg/kgとなった。

表3. 妥当性評価試験の結果

| 化合物 | さばのへしこ | | | | オイルサーディン | | | | キハダマグロの刺身 | | | |
|----------|--------|--------|-------------|-------------|----------|--------|-------------|-------------|-----------|--------|-------------|-------------|
| | 選択性 | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | 室内精度 (RSD%) | 選択性 | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | 室内精度 (RSD%) | 選択性 | 真度 (%) | 併行精度 (RSD%) | 室内精度 (RSD%) |
| ヒスタミン | ○ | 88.4 | 1.6 | 3.4 | ○ | 93.1 | 4.0 | 7.2 | ○ | 89.5 | 3.1 | 3.2 |
| アグマチン | ○ | 95.7 | 1.7 | 3.1 | ○ | 95.4 | 2.6 | 4.0 | ○ | 94.8 | 2.1 | 3.8 |
| カダベリン | ○ | 97.8 | 1.5 | 3.9 | ○ | 98.3 | 6.4 | 7.1 | ○ | 96.4 | 4.2 | 4.2 |
| フェネチルアミン | ○ | 76.1 | 1.9 | 2.3 | ○ | 77.1 | 4.6 | 7.4 | ○ | 76.2 | 4.0 | 4.0 |
| プトレシン | ○ | 92.9 | 2.6 | 5.8 | ○ | 96.8 | 2.6 | 5.9 | ○ | 94.4 | 3.0 | 5.7 |
| チラミン | ○ | 78.9 | 1.5 | 3.3 | ○ | 79.2 | 3.1 | 8.8 | ○ | 78.7 | 3.5 | 3.5 |
| トリプタミン | ○ | 76.7 | 3.0 | 3.6 | ○ | 73.9 | 4.2 | 7.5 | ○ | 75.2 | 3.5 | 4.1 |

選択性の○はガイドラインの基準を満足したことを示す。

ガイドラインの目標値：真度 70~120%、併行精度 10%未満、室内精度 15%未満

引用文献

- 1) 井部明広. 2004. 発酵食品に含まれるアミン類. 東京都健康安全研究センター研究年報, 55, 13-21.
- 2) 登田美桜, 山本都, 畝山智香子, 森川馨. 2019. 国内外におけるヒスタミン食中毒. 国立医薬品食品衛生研究所報告, 127, 31-38.
- 3) 公益社団法人日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針理化学編2015. p785-791.
- 4) 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. 2014. 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.
- 5) 茶屋真弓, 穂積和佳, 岩元由佳, 原口卓也, 吉田純一. 2018. LC/MS/MSによる不揮発性アミン類の迅速一斉分析法の検討と鮮魚中のヒスタミン産生菌の分離について. 鹿児島県環境保健センター所報, 19, 56-63.
- 6) 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. 2020. 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. 北海道立衛生研究所所報, 70, 39-43.
- 7) 山口玲子. 2017. LC/MS/MSを用いたヒスタミン測定方法の検討. 千葉県環境保健研究所年報, 24, 72-74.