

## 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

大月史彦, 肥塚加奈江, 林 隆義, 山本 淳 (衛生化学科)

【調査研究】

## 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

### Studies on Simultaneous Determination of Nonvolatile Amines by LC/MS/MS

大月史彦, 肥塚加奈江, 林 隆義, 山本 淳 (衛生化学科)

Fumihiko Otsuki, Kanae Koeduka, Takayoshi Hayashi, Jun Yamamoto

#### 要 旨

ヒスタミン等の不揮発性腐敗アミン類を多量に含む食品は、食中毒の原因となることもあり、これらを迅速に分析することは重要であることから、特性の異なる不揮発性腐敗アミン6種をLC/MS/MSを用いて一斉分析する方法について検討を行った。前処理に逆相-弱陽イオン交換ミックスマード固相, LCカラムとしてHILIC系マルチモードカラムを用いることにより、特性の異なる6種の不揮発性腐敗アミンについて誘導体化等を行うことなく一斉に分析することができ、スクリーニング手段として有用であった。なお、回収率が低いため定量手段としては今後の前処理の改善が必要であった。

[キーワード：ヒスタミン, 不揮発性腐敗アミン, マルチモードカラム, LC/MS/MS法]

[Key words : Histamine, Nonvolatile Amines, Multimode Column, LC/MS/MS]

#### 1 はじめに

ヒスタミン等の不揮発性腐敗アミンは、アレルギー様食中毒の原因物質の一つであり、サバ・アジ等アミノ酸を多く含む食品の不適切な保管により毎年のように食中毒が発生している。<sup>1~3)</sup>

不揮発性腐敗アミンの生成メカニズムとしては、腐敗に伴う脱炭酸酵素生産菌の増殖によりアミノ酸が脱炭酸されて生成することがよく知られ<sup>4,5)</sup>、また、複数の不揮発性腐敗アミンが同時に存在することにより、食中毒の増感作用があることも指摘されている<sup>1)</sup>。

日本では今のところ食品中のヒスタミン量に関する法規制はなされていないが、世界の多くの国では規制がなされており<sup>6,7)</sup>、これらの不揮発性腐敗アミンを測定する必要性は大きい。

不揮発性腐敗アミンの分析法としては、蛍光誘導体化後HPLC-蛍光、キャピラリー電気泳動、酵素比色法等<sup>4,6~9)</sup>が用いられているが、操作が煩雑であったり、同時分析ができなかったりする。

近年多く用いられるようになったLC/MS/MS法は、農薬の一斉分析等でも用いられている高い選択性・再現性を持つ有効な手段である。そこで今回著者らは、同法を用いて不揮発性腐敗アミンの同時分析について、検討を

行ったところ、若干の知見を得たので報告する。

#### 2 実験方法

##### 2.1 試料

市販のアジみりん干, サバみりん干, アジひらき干, アジ(生)を試料として用いた。

##### 2.2 試薬

- 1) 不揮発性腐敗アミン標準原液：アグマチン硫酸塩(Fluka製)17.53 mg, プトレシン二塩酸塩(Alexis製)18.27 mg, ヒスタミン二塩酸塩(ナカライテスク株式会社製)16.56 mg, カダベリン二塩酸塩(Sigma製)17.14 mg, チラミン塩酸塩(Sigma製)12.66 mg, トリプタミン塩酸塩(Aldrich製)12.28 mgをそれぞれ正確に量り取り, 5mM酢酸アンモニウム50%メタノール溶液で10mLに定容し, 各々1,000 $\mu$ g/mLの標準原液とした。
- 2) 不揮発性腐敗アミン混合標準液：1)で調整した標準原液各々1mLを取り, 5mM酢酸アンモニウム50%メタノール溶液で10mLに定容し, 100 $\mu$ g/mLの混合標準液とした。
- 3) 除タンパク溶液：トリクロロ酢酸(特級)50gを蒸留水で溶解, 1000mLに定容し, 5%トリクロロ酢酸溶

液を調整した。

- 4) Oasis WCX カートリッジカラム (WCX) : ウォータース社製の WCX (150 mg, 6mL) をメタノール 5mL, 蒸留水 5mL の順にコンディショニングして用いた。
- 5) その他の試薬は特級品及び LC/MS 用を使用した。

## 2.3 装置及び測定条件

- 1) LC—HPLC : 島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム, カラム : 東ソー株式会社製 TSKgel VMPak-25 (2.0 mm I.D. x 5 cm), カラム温度 : 40 °C, 移動相 : A 液 (0.1 % ギ酸水溶液) と B 液 (0.1 % ギ酸アセトニトリル), グラジエント条件 : A/B=10/90 (0-1min) - 90/10 (7-15min) - 10/90 (20-25min), 移動相流量 : 0.2 mL/min, 試料注入量 : 5 µL
- 2) MS/MS—MS : Applied Biosystems 製 API3200 QTrap, インターフェース : Turbo V source, イオン化モード : ESI positive mode, イオン源温度 : 600 °C, イオン化電圧 : 5500V, 測定法 : MS/MS モード, 測定イオン (precursor ion/product ion) : アグマチン (131.2/72.0, 131.2/114.1) プトレシン (89.1/72.0, 89.1/89.1) ヒスタミン (112.1/95.1, 112.1/68.0) カダベリン (103.1/86.1, 103.1/103.1) チラミン (138.1/121.1, 138.1/77.0) トリプタミン (161.1/144.1, 161.1/117.1)

## 2.4 前処理操作

- 1) 抽出—粉砕した試料約 5g を 50mL ポリプロピレン遠沈管に取り, 添加試料には, 不揮発性腐敗アミン混合標準液 1mL を添加混合し, 30min 静置した。これに 5% トリクロロ酢酸 15mL を加え, 2min ホモジナイズした。これを 3500rpm で 5min 遠心分離後, 上清をろ紙 (5A) でろ過し 50mL メスフラスコに移した。遠沈管の残渣に再度 5% トリクロロ酢酸 15mL を加え, 5min 振とう後, これを同様に遠心分離, ろ

過し, 50mL メスフラスコに合わせて移し, 5% トリクロロ酢酸でメスアップした。

- 2) クリーンアップ—抽出溶液 5mL を取り, 5M 水酸化ナトリウムで pH=7 に調整後, WCX カラムに負荷した。次いで 28% アンモニア水 20 倍希釈溶液 5mL, 50% メタノール溶液 5mL の順にカラムを洗浄後, 2% ギ酸 50% メタノール溶液 25mL を用いてアミン類を溶出した。これを 40 °C 減圧下で乾固直前まで濃縮し, 5mM 酢酸アンモニウム 10mM 塩酸 50% メタノール溶液で 10mL に定容後, 0.45µm フィルターでろ過したものを試験溶液とした。

## 2.5 検量線

検量線はマトリックス添加検量線を作成した。100µg/mL の不揮発性腐敗アミン混合標準液をアジミりん干抽出液をクリーンアップした溶液を用いて希釈し, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2µg/mL の混合標準液を調整し, その 5 µL を LC/MS/MS に注入し, ピーク面積法により検量線を作成した。

## 3 結果および考察

### 3.1 LC カラムの選択

HPLC カラムの検討結果を表 1 に示した。

最初に通常の ODS カラムを用いて確認したところ, チラミンとトリプタミン以外はまったく保持されなかった。今回測定対象とした 6 種の不揮発性腐敗アミンのうち, チラミンとトリプタミンはベンゼン環を有し, いくらか親水性が低いものの, 他のアミンは非常に親水性が高いことが理由と考えられた。そこで, 数種の親水性相互作用 (HILIC) 系カラムを用いて検討を行ったところ, HILIC 系マルチモードカラムである「東ソー TSKgel VMPak-25」<sup>10)</sup> で保持時間, ピーク形状とも図 1 に示すとおり, 良好な結果が得られた。

表 1 HPLC カラム検討結果

カラム 測定項目	一般的な ODS カラム	Atlantis HILIC-Si	Discovery HS-F5	TSKgel VMPak-25
アグマチン	×保持されず	×テーリング	×ブロード	○
プトレシン	×保持されず	×テーリング	×ブロード	○
ヒスタミン	×保持されず	△	△	○
カダベリン	×保持されず	×テーリング	×ブロード	○
チラミン	○	○	○	○
トリプタミン	○	○	○	○

マルチモードカラムを用いることにより、親水性の高いカダベリン、ヒスタミン、プトレシン等も、チラミンやトリプタミンと同時分析できた。

### 3.2 移動相の選択

移動相として、最初にメタノール-水系を用いたが、VMpak-25は耐圧性能が低くメタノール-水系ではカラム耐圧を超える恐れがあった。そこで、0.1%ギ酸アセトニトリルと0.1%ギ酸水溶液を用いたところ、カラム圧力が低下し、ピーク形状も良好なクロマトグラフが得られた。

### 3.3 抽出操作とクリーンナップ

不揮発性腐敗アミン類は親水性が高いため、トリクロロ酢酸水溶液で除タンパクと抽出を実施している例<sup>1,3,5,8)</sup>が多く、準じて行ったところ、濁り・着色等が多くLC/MS/MSに導入するにはクリーンナップを追加する必要があると思われた。

クリーンナップ固相の検討結果を表2に示した。

クリーンナップについては、固相カラムを用いる例が報告<sup>8)</sup>されており、各種固相カラムで検討を行ったが、6種の不揮発性腐敗アミンの特性の違いから、これらを同時にクリーンナップすることは困難であった。そこで、

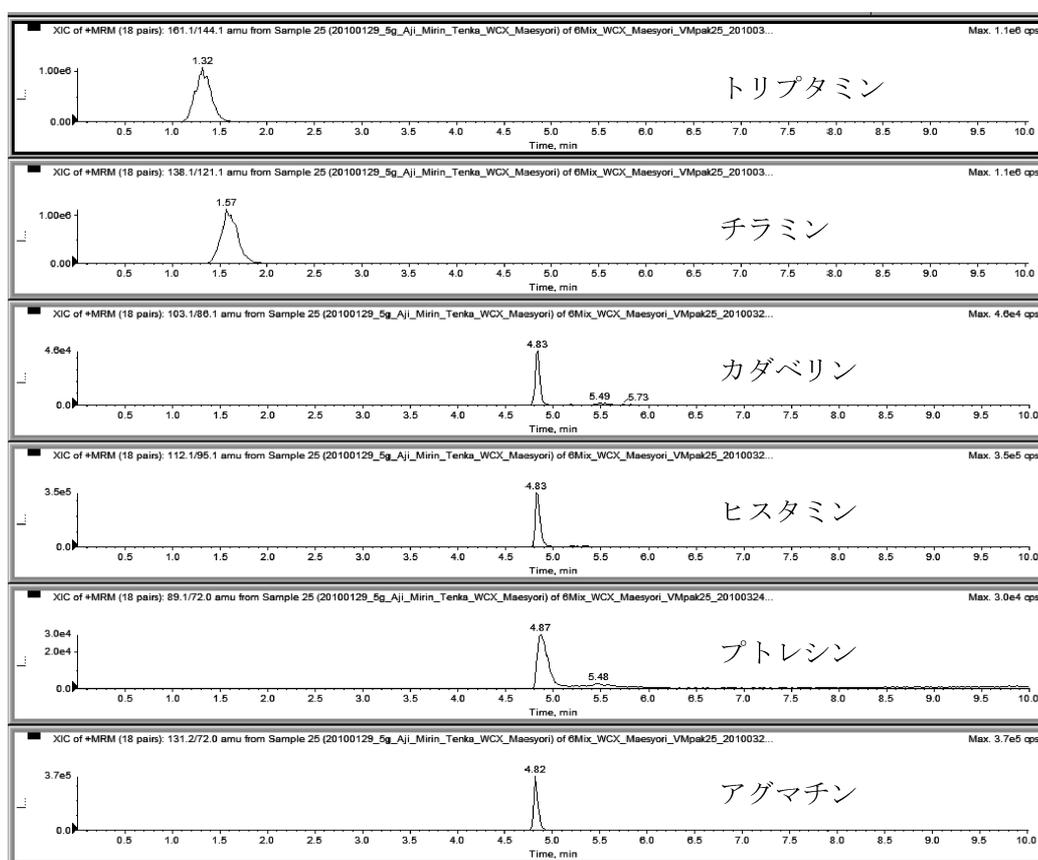


図1 LC/MS/MSクロマトグラム(アジみりん干添加品)

表2 クリーンナップ固相検討結果

固相 測定項目	Bond Elut SCX	Bond Elut PRS	Oasis MCX	Oasis HLB	Oasis WCX
アグマチン	× 溶出せず	× 溶出せず	× 溶出せず	△ 負荷時流失	○
プトレシン	× 溶出せず	△ 溶出し難い	× 溶出せず	△ 負荷時流失	○
ヒスタミン	◎	◎	△ 溶出し難い	△ 負荷時流失	○
カダベリン	× 溶出せず	△ 溶出し難い	× 溶出せず	△ 負荷時流失	○
チラミン	◎	△ 負荷時流失	△ 溶出し難い	○	○
トリプタミン	◎	△ 負荷時流失	△ 溶出し難い	○	○

逆相とイオン交換の二つのモードで幅広い物質を保持できるWCXを用いたところ、6種のアミン全てを保持・溶出することが可能であった。その分子構造や後述の添加回収率等の結果から、チラミンとトリプタミンが逆相モード、その他がイオン交換モードで保持されていると考えられた。

### 3.4 添加回収試験

添加回収試験(n=5)の結果を表3に示した。添加回収試験は不揮発性腐敗アミンが未生成の新鮮な生アジに不揮発性腐敗アミン混合標準液を添加して行った。

チラミンとトリプタミンでは相対標準偏差が10%以下とばらつきが小さかったが、その他のアミンでは比較的ばらつきが大きかった。チラミンとトリプタミンは、固相カラムでの精製時に主として逆相モードで安定に保持されているのに対し、その他のアミンはイオン交換モードで保持されるため、夾雑イオンによる妨害等が多いのが原因だと考えられた。なお、回収率は50~120%程度であった。

### 3.5 実試料による試験

実試料による試験結果を表4に示した。検体は、実際に食中毒の発生の可能性が高いアジみりん干、サバみりん干、アジひらき干の加工品を用い、各アミンが20 $\mu\text{g/g}$ となるよう混合標準液を添加して添加回収実験を行った。

サバみりん干からヒスタミンとチラミンが検出されたが、食中毒症状を起こすといわれる1000 $\mu\text{g/g}$ の1%未満であった。

また、生アジを用いた添加回収試験時と比較すると、チラミンとトリプタミンは50~60%と同程度の回収率であるのに対し、その他のアミンは回収率が低く、また食品によるばらつきも大きく、特にアジひらき干で回収率が低かった。アジひらき干は表面に塩の析出が見られたので、イオンクロマトグラフで確認したところ、他に比べて塩分と思われるナトリウム、塩素の濃度が倍近くあり、固相カラムでの精製時にイオン交換のモードが妨害されたのが原因だと考えられた。これに対し、チラミンとトリプタミンは主として逆相モードで保持されてい

表3 添加回収試験 (n=5) (生アジ使用)

測定項目	平均回収率(%)	相対標準偏差(%)	ブランク値
アグマチン	118	12	ND
ブトレシン	48	24	ND
ヒスタミン	72	13	ND
カダベリン	82	12	ND
チラミン	61	6	ND
トリプタミン	49	5	ND

「ND」は0.2 $\mu\text{g/g}$ 未満

表4 実試料による試験( $\mu\text{g/g}$ ) (無添加試料及び20 $\mu\text{g/g}$ となるよう添加)

測定項目	アジみりん干		サバみりん干		アジひらき干	
	無添加試料	回収濃度(回収率%)	無添加試料	回収濃度(回収率%)	無添加試料	回収濃度(回収率%)
アグマチン	ND	12.8 (64.0%)	ND	19.4 (97.0%)	ND	9.50 (47.5%)
ブトレシン	ND	3.64 (18.2%)	ND	7.34 (36.7%)	ND	0.96 (4.8%)
ヒスタミン	ND	6.78 (33.9%)	2.68	13.1 (52.1%)	ND	3.66 (18.3%)
カダベリン	ND	6.10 (30.5%)	ND	14.6 (73.0%)	ND	3.58 (17.9%)
チラミン	ND	11.5 (57.5%)	0.84	13.6 (63.8%)	ND	11.9 (59.5%)
トリプタミン	ND	9.16 (45.8%)	ND	9.54 (47.7%)	ND	8.64 (43.2%)

「ND」は0.2 $\mu\text{g/g}$ 未満

るため、塩分等による妨害が少なく、同程度の回収率になったと考えられた。

実際の加工品は、醤油・食塩・アミノ酸等の夾雑イオンの原因となる原料を使用しているため、これらを取り除く前処理法の検討が必要と考えられた。

### 3.6 中毒濃度と検出下限

一般に、不揮発性腐敗アミンの中毒濃度は $1000\mu\text{g}/\text{g}$ 以上といわれている<sup>4,6,7)</sup>が、本法での検出下限は、最も回収率の低いアジヒラキ干のプトレシン(4.8%)でも $5\mu\text{g}/\text{g}$ 未満と十分な検出力を持っており、スクリーニング的にアミン類の一斉分析を行うことが可能であるが、回収率のばらつきが大きいため、内部標準の使用等を行わないと、正確な定量は難しいと考えられる。

## 4 まとめ

著者らは、今回LC/MS/MSを用いて、特性の異なる不揮発性腐敗アミン6種の一斉分析法の検討を行った。前処理に逆相-弱陽イオン交換ミックスモード固相、LCカラムとしてHILIC系マルチモードカラムを用いることにより、検出下限 $5\mu\text{g}/\text{g}$ 未満で一斉分析を行うことが可能であった。しかし、物質によっては回収率が低いため、正確な定量を行うためには、クリーンアップ法の追加検討や同位体標準物質(サロゲート)の使用が必要であると考えられた。

### <文 献>

- 1) 観公子, 牛山博文, 新藤哲也, 斉藤和夫: イワシの蒲焼きによるヒスタミン食中毒, 東京衛研年報, 52, 163-166, 2001
- 2) 森岡浩文, 福地哲郎, 中村公生, 小坂妙子: サバ中のヒスタミンによる中毒事例, 宮崎県衛生環境研究所年報, 18, 58-60, 2006
- 3) 千葉美子, 林都香, 福原郁子, 長谷部洋, 遠藤美砂子ら: 化学物質・自然毒による食中毒事例および食品苦情事例, 宮城県保健環境センター年報, 26, 112-114, 2008
- 4) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 2005, 180-182, 金原出版, 東京, 2005
- 5) 観公子, 牛山博文, 新藤哲也, 斉藤和夫: 市販魚介類およびその加工品中のヒスタミン含有量調査, 食品衛生学雑誌, 43(3), 127-132, 2005
- 6) 武志保, 劔持堅志, 難波順子, 今中雅章: キャピラリー電気泳動法による魚肉中ヒスタミン及びチラミンの迅速分析, 岡山県環境保健センター年報, 27, 89-92, 2003
- 7) 佐藤常雄: 水産物中のヒスタミン簡易測定法の開発, 日本水産学会誌, 73, 831-834, 2007
- 8) 森岡浩文, 福地哲郎, 野中勇志, 森川麻里子, 山本雄三: キャピラリー電気泳動によるカタクチイワシ中のヒスタミン分析法の検討, 宮崎県衛生環境研究所年報, 19, 65-67, 2007
- 9) 日本食品衛生協会: 食品衛生検査指針理化学編, 621-630, 日本食品衛生協会, 東京, 2005
- 10) 梶田弘子, 阿久津千寿子, 畠山えり子, 小向隆志: LC/MS/MSによる乳中のアミノグリコシド系抗生物質の一斉分析, 食品衛生学雑誌, 49(3), 189-195, 2008