

[ノート]

## LC/MS を用いたアレルギー様症状を引き起こす ヒスタミン等の不揮発性アミン類の分析

吉岡 直樹\* 吉田 昌史

### Rapid Determination of Nonvolatile Amines by LC/MS in Food Samples

Naoki YOSHIOKA\* and Masashi YOSHIDA

*Health Science Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan*

A rapid determination method of 4 nonvolatile amines, tyramine, putrescine, cadaverine and histamine in food samples by LC/MS was developed. Nonvolatile amines were extracted with 0.1% formic acid aqueous solution. After deproteinization with acetonitrile, the extract was diluted with 0.1% formic acid aqueous solution / 0.1% formic acid in acetonitrile (1:1). The recoveries from sardine mince fortified with the compounds at 100 µg/g ranged from 88.5 to 103.5 %. The quantitation limits ( $S/N=10$ ) in sardine mince were 20 µg/g (tyramine, putrescine and histamine) and 50 µg/g (cadaverine).

#### I はじめに

赤身魚やその加工品には、アミノ酸であるヒスタジンが多く含まれており、これらのヒスタジンは食品中でヒスタミン産生菌によりヒスタミンを生成する。ヒスタミンは加熱によっても分解されにくく、多量に摂取すると、顔面紅潮、頭痛、じんま疹等のアレルギー様の症状が引き起こされる。国内ではヒスタミンを含む食品による食中毒は年間 10 件程度発生している<sup>1)</sup>。

食品中のヒスタミンに関する基準値は国内では設定されていないが、EU やアメリカ等では基準値が設定されており、国際規格である Codex 規格では、魚類及び水産製品の一部について、腐敗基準として 100 µg/g、衛生

及び取扱基準として 200 µg/g が設定されている。ヒスタミンの分析法に関しては、公定法は示されていないが、食品衛生検査指針<sup>2)</sup>にはダンシルクロライドやフルオレスカミンを用いて誘導体化し、蛍光 HPLC を用いる方法が参考法として掲載されている。

今回、迅速分析法として、瀧澤らが報告している分析法<sup>3)</sup>を参考とし、食品中のヒスタミンの迅速な分析法を検討した。またヒスタミン生成と同様に、アミノ酸であるチロシン、リシン及びアルギニンから食品中の菌により生成される不揮発性アミン（チラミン、カダベリン及びプトレシン）もヒスタミンによる中毒症状を増強させる作用がある<sup>4)</sup>ので、これらも分析対象とした。

さらに、本分析法を用いて、兵庫県内で発生した「イワシのつみれ」による食中毒事例での調理残品等の不揮発性アミンの量を測定した。

健康科学部

\*別刷請求先：〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29  
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター  
健康科学部 吉岡 直樹

## II 方法

### 1. 試料

市販の「イワシのつみれ」を用いた。

### 2. 試薬及び試液

チラミン塩酸塩、プトレシン二塩酸塩、カダベリン二塩酸塩、ヒスタミン二塩酸塩は和光純薬製食品分析用を用いた。各不揮発性アミンの構造式をFig.1に示した。

各標準品10 mgを0.1 mol/L塩酸に溶解して50 mLとして標準原液を調製した。これらの標準原液を混合して50%アセトニトリルで希釈し、1 µg/mL混合標準溶液を作製した。

また、塩酸(特級)、ギ酸(高速液体クロマトグラフ用)及びアセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用)は和光純薬製を用い、シリンジフィルターはWhatman製 Puradisc (PP製, 0.45 µm)を用いた。

### 3. 装置及び測定条件

装置: Agilent 1200 Series LC + 6210 TOF

カラム: シグマ アルドリッチ Ascentis Express F5 (100 mm×2.1 mm, 2.7 µm)

移動相: アセトニトリル : 0.1%ギ酸水溶液 = 45:55

流速: 0.2 mL/min    カラム温度: 40°C    注入量: 1 µL  
イオン化法及びキャピラリー電圧: ESI (Positive, 2000 V)

乾燥ガス: 13 L/min (350°C)    ネブライザー圧力: 60 psig  
フラグメンター電圧: 125 V

定量イオン:

チラミン *m/z* 138.0913,    プトレシン *m/z* 89.1073,  
カダベリン *m/z* 103.1230,    ヒスタミン *m/z* 112.0869

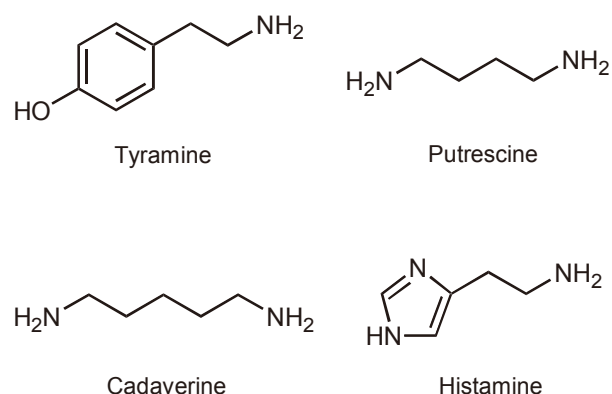


Fig.1 Chemical structures of nonvolatile amines

### 4. 試験溶液の調製

試料4 gを50 mL PP製遠沈管に入れ、0.1%ギ酸水溶液を25 mL加えて、1分間ホモジナイズした。ホモジナイザーの刃を0.1%ギ酸水溶液15 mLで洗い、この洗液と抽出液とを併せて0.1%ギ酸水溶液で50 mLに定容し、ろ紙(5A)でろ過したものを抽出液とした。これを1.25 mL分取し、0.1%ギ酸アセトニトリル2.5 mL加えて試験管ミキサーで混合して除タンパクを行い、さらに0.1%ギ酸水溶液を加えて5 mLとした。これを遠心分離(3000 rpm, 5分)した後、分取した上清に0.1%ギ酸水溶液 / 0.1%ギ酸アセトニトリル(1:1)を加えて10倍希釈した。これをシリンジフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

## III 結果及び考察

### 1. 抽出法の検討

試験溶液の調製は、瀧澤らの報告<sup>3)</sup>を参考とし、食品試料中の不揮発性アミンを0.1%ギ酸水溶液を用いて抽出し、2倍量の0.1%ギ酸アセトニトリルを加えて除タンパクを行った。これを0.1%ギ酸水溶液 / 0.1%ギ酸アセトニトリル(1:1)でさらに希釈し、試験溶液1 mLあたりの試料量を0.002 g相当にすることにより、試料マトリックスの影響を抑制することが可能であった。

分離カラムについては、瀧澤らはコアシェル型のHILICカラムを用いて分析を行っていたが、今回、HILICモードでも使用可能なフッ素化シリカカラムであるAscentis Express F5を用いても4種の不揮発性アミンが分析可能であった。

### 2. 添加回収試験

市販の「イワシのつみれ」に4種の不揮発性アミンを各100 µg/g相当添加し、回収試験を行った結果(n = 3)、回収率は、チラミン: 90.4 ± 1.7%, プトレシン: 103.5 ± 1.0%, カダベリン: 88.5 ± 3.1%, ヒスタミン: 102.8 ± 1.6%と良好な結果が得られた。また定量限界(S/N = 10)はチラミン、プトレシン、ヒスタミンで20 µg/g、カダベリンで50 µg/gと計算され、Codex規格の腐敗基準(100 µg/g)以下の濃度で定量が可能であった。Fig. 2に添加試料及びブランク試料から調製した試験溶液、各標準溶液(0.2 µg/mL)のLC/MSクロマトグラムを示した。

### 3. 調理残品の分析結果

平成28年に兵庫県内の施設で発生した食中毒事例において、残されていた調理済保存食及び調理済残品の「イ

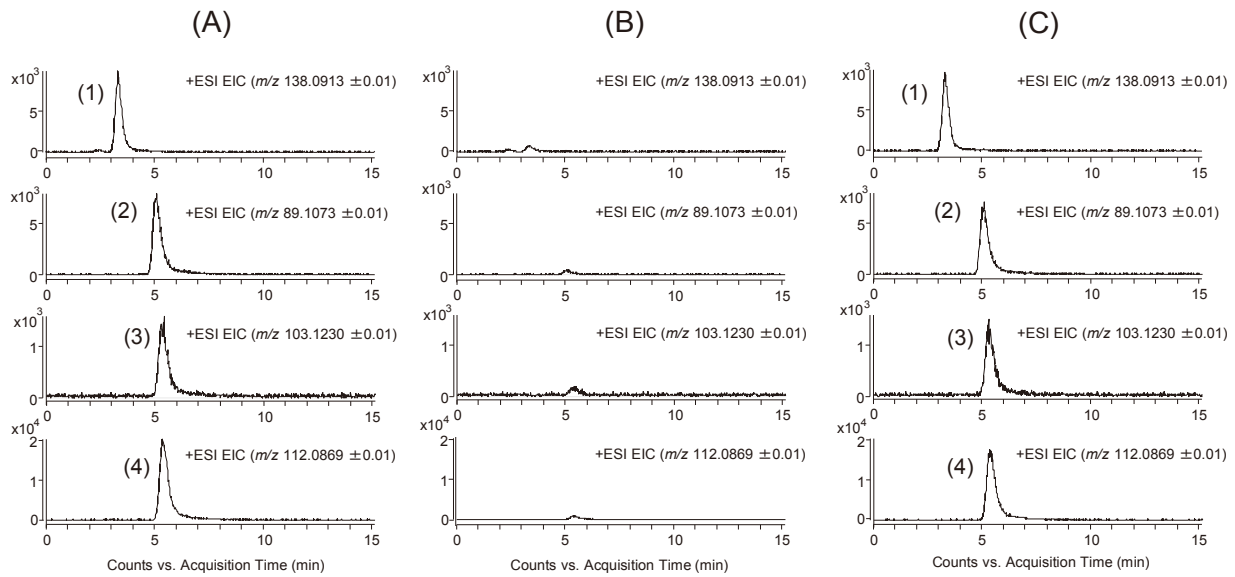


Fig.2 Typical extracted ion chromatograms obtained from (A) sardine mince fortified with tyramine (1), putrescine (2), cadaverine (3), histamine (4) at 100 µg/g, (B) blank sardine mince, and (C) 0.2 µg/mL standard solution by LC/MS

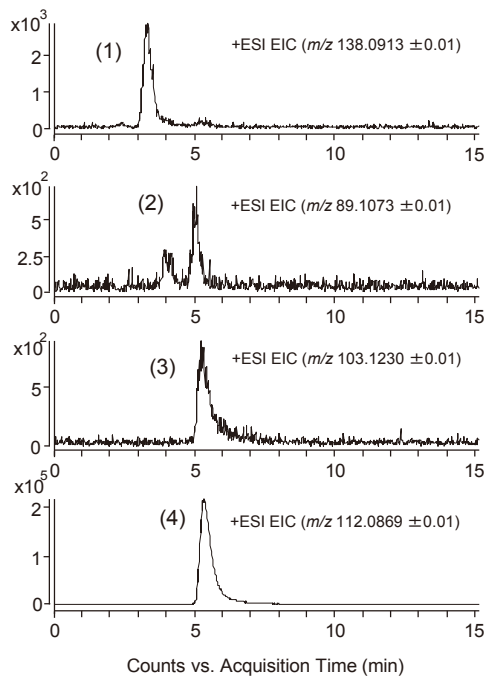


Fig.3 Extracted ion chromatograms obtained from remaining food sample of the case  
Tyramine: (1), putrescine (<LOQ): (2), cadaverine: (3), histamine: (4)

ワシのつみれ」を分析した結果、チラミンが23~26 µg/g、カダベリンが56~67 µg/g、ヒスタミンが840~980 µg/g、検出され、プトレシンは定量限界未満であった。Fig.3に調理済保存食から調製した試験溶液のLC/MSクロマトグラム例を示した。ヒスタミンに関してはCodex規格の衛生及び取扱基準(200 µg/g)を超過しており、「イワシのつみれ」が食中毒の原因食材と推定された。

#### IV 結論

4種の不揮発性アミン(チラミン、プトレシン、カダベリン、ヒスタミン)のLC/MSによる迅速な一斉分析法を検討した。試料を0.1%ギ酸水溶液を用いて抽出し、アセトニトリルを加えて除タンパク後、0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸アセトニトリル(1:1)で希釈することにより試験溶液を調製し、HLICカラムを用いてLC/MSで分析した。「イワシのつみれ」に4種不揮発性アミンを添加(100 µg/g相当)した時の回収率は、88.5~103.5%であり良好な結果が得られた。また定量限界はチラミン、プトレシン、ヒスタミンで20 µg/g、カダベリンで50 µg/gであった。

本法を用いて、平成28年に兵庫県内の施設で発生した食中毒事例における調理残品等を分析した結果、ヒスタミンが840~980 µg/g検出され、食中毒の原因食材と推定された。

## 謝 辞

試料採取、情報収集して頂きました県健康福祉事務所及び県生活衛生課の関係者の方々に深謝致します

## 文 献

- 1) 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. 国立医薬品食品衛生研究所報告, **127**, 31-38 (2009)
- 2) 食品衛生検査指針委員会: 食品衛生検査指針 理化学編 2015, p.784-795, 日本食品衛生協会, 東京 (2015)
- 3) 瀧澤裕, 庄司美加, 千葉美子, 大倉靖: ヒスタミンの迅速な分析法の検討. 宮城県保健環境センター年報, **32**, 73-76 (2014)
- 4) 伊藤誉志男: 食品衛生学, p.32-33, 廣川書店, 東京 (1999)

(平成 29 年 3 月 15 日受理)