

### 3) 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

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

#### 要旨

食中毒の迅速な原因究明に資するため、8種の不揮発性腐敗アミン類を対象に、試料を20%トリクロロ酢酸及び精製水で抽出・希釈し、LC/MS/MSで測定する迅速一斉分析法の検討を行った。また、上記分析法について、8種の水産物試料等を用いた妥当性評価試験を行ったところ、各成分とも「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」の目標値を満たす良好な結果が得られたことから、本法は食品中不揮発性アミン類の迅速一斉分析法として有効な手法であると考えられる。

**キーワード** : LC/MS/MS, 不揮発性腐敗アミン類, 迅速一斉分析法, 食中毒

#### はじめに

不揮発性腐敗アミン類（以下「アミン類」という。）は、食品中でタンパク質やアミノ酸が微生物的腐敗により分解<sup>1-3)</sup>される過程で生じる食中毒の原因物質である。アミン類による食中毒は、赤身魚やその加工品で発生しやすく<sup>4), 5)</sup>、顔面紅潮、じんましん、頭痛等のアレルギー様症状を呈し、その主体はヒスタミンとされ、国内の化学物質性食中毒の中では最も発生件数が多い。

なお、アミン類のうちヒスタミンは、我が国においては食品衛生法に基づく基準値は設定されていないが、国際食品規格委員会（以下「Codex」という。）をはじめ、EU、米国、カナダ等において水産物の基準値等が設定されており、その取扱いが規制されている。

一方で、ヒスタミン以外のアミン類については、明確な基準値等は設定されていないものの、アミン類を原因とする食中毒のメカニズムは不明な点が多く、これらについてもアレルギー様症状の発現や増強等が示唆されているなど、ヒスタミン以外の影響因子の評価の必要性が指摘されている<sup>4), 6)</sup>。このことから、近年

ヒスタミン以外のアミン類の一斉分析法についても多くの手法が報告されている<sup>7-13)</sup>。

なお、アミン類は、その生成源が食品由来であり、食品中に一定程度存在しているため、食中毒の原因検索においては、その存在の有無だけではなく、定量値と食中毒濃度域との比較及び腐敗の程度の評価が必要となる。このため、アミン類の分析法は、その定量値の正確性が要求され、真度、精度等の妥当性が確認されている手法が求められる。

当所では、アミン類を原因としたアレルギー様食中毒の主体であるヒスタミンの迅速分析法（以下「従来法」という。）を開発<sup>14), 15)</sup>し、食中毒発生時の原因検索分析を行ってきたが、分析対象成分がヒスタミンのみであり、ヒスタミン以外のアミン類の評価ができなかった。さらに、従来法はマトリックス一致標準溶液を使用した定量法を用いていたが、食中毒の原因となり得る食材は多岐にわたり、原因食材と同種で、かつ、ヒスタミンが含有されていないマトリックス用食材の確保は困難であることから、突発的に発生する食中毒に対応する原因検索分析法としては不十分であっ

た。

また、食品中のアミン類の一斉分析法としては、衛生試験法・注解に示されているダンシルクロリド誘導体化 HPLC 法<sup>16)</sup> が広く知られているが、対象アミン類等の誘導体化が必要なため操作が煩雑であり、検体によっては妨害ピークの出現により精製操作が必要な場合があるなど迅速性の面で問題がある。

そこで、今回、迅速な食中毒発生時の原因検索及びヒスタミン以外の影響因子の評価も可能な分析法の開発を目的に、8 種のアミン類（アグマチン、カダベリン、スペルミジン、チラミン、トリプタミン、ヒスタミン、フェネチルアミン及びプトレシン）を対象に、迅速一斉分析法（以下「本法」という。）の検討を行った。

さらに、本法について、「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」<sup>17)</sup>（以下「ガイドライン」という。）に基づく妥当性評価試験を行ったところ、良好な結果が得られたので報告する。

## 実験方法

### 1 分析対象アミン類

アレルギー様症状の発現や増強等が指摘されているアグマチン、カダベリン、スペルミジン、チラミン、トリプタミン、ヒスタミン、フェネチルアミン及びプトレシン並びにヒスタミンの前駆物質であるヒスチジンを分析対象とした。なお、ヒスチジンについては、食中毒の直接的な原因物質ではなく、また、元来水産物中に多量に含まれているため、含量のモニターのみを行うこととし、前処理の検討及び妥当性評価試験においては評価対象から除外した。

### 2 試薬等

#### 2.1 標準品

標準品は、アグマチン、スペルミジン、チラミン、ヒスタミン、フェネチルアミン及びプトレシンは和光純薬工業製、カダベリンは関東化学製、トリプタミンは Sigma-aldrich 製を用いた。

#### 2.2 混合標準溶液

各標準品を秤量後、0.1N 塩酸に溶解して 1000mg/L の混合標準原液を調製し、これを適宜精製水で希釈したものを混合標準溶液とした。

#### 2.3 その他の試薬等

アセトニトリル：和光純薬工業製（HPLC 用）

0.1N 塩酸：和光純薬工業製（局方一般試験法用）

トリクロロ酢酸：和光純薬工業製（試薬特級）

ろ紙：ADVANTEC 東洋（株）製（NO.5C, 150mm）

ろ過フィルター：GL Sciences 製（水系クロマトディスク,13N,0.45 $\mu$ m,）

ポリプロピレン製バイアル：GL Sciences 製

## 3 試料

### 3.1 前処理検討用試料

分析対象のアミン類が不検出 (<0.5mg/100g) であることを確認した水産物（アジ、イワシ、サケ、サバ、マグロ）の切り身及び水産物加工品（アジ塩焼き、アジ煮付け、アジフライ）をそれぞれフードプロセッサで細切したものをを用いた。

### 3.2 妥当性評価試験用試料

Codex における水産物等のヒスタミン腐敗基準（10mg/100g）を参考に、上記 3.1 で示した試料に 10mg/100g となるように混合標準溶液を添加し、30 分間放置したものをを用いた。

### 3.3 経時変化測定用試料

上記 3.1 で示した水産物試料を 25℃で 0 時間、12 時間、1 日、2 日、3 日、5 日間放置したものをを用いた。

## 4 LC/MS/MS 測定条件

LC：Nexera X2（島津製作所社製）

・注入量：10 $\mu$ L

・分離カラム：Merck 社製 ZIC®-pHILIC (2.1 $\times$ 50mm, 5 $\mu$ m)

・カラムオープン温度：40℃

・移動相：A 液（精製水）、B 液（アセトニトリル）、C 液（1%ギ酸）、D 液（250mM 酢酸アンモニウム）

・グラジエント条件：表 1 のとおり。

MS/MS：TRIPLEQUAD5500(ABSCIEX 社製)

・イオン化法：ESI(positive)

・イオン化条件：CUR(20psi),CAD(7psi),TEM(600℃),

・GAS1(70psi),GAS2(50psi),IS(4500V),EP(10V)

・分析モード：sMRM（測定条件は表 2 のとおり。）

## 5 分析法

3 で調製した試料 1.0g に 20%トリクロロ酢酸 5mL 及び精製水 20mL を加えてホモジナイズし、ろ紙を用いてろ過後、精製水で 50mL に定容する。これを精製水で 200 倍希釈後、1mL 分取し、0.1mL の精製水を添加後、ろ過フィルターを用いてろ過したものを試験溶液とする。なお、検量線は、混合標準原液を 5, 50, 100, 200 及び 500  $\mu$ g/L になるように精製水で希釈し、それぞれ 0.01%トリクロロ酢酸 1mL に 0.1mL 添加後、フィルターろ過したものをを用いる（最終濃度 0.5, 5, 10, 20 及び 50 $\mu$ g/L）。

表 1 LC グラジエント条件

min	A(%)	B(%)	C(%)	D(%)	flow (mL/min)
0	55	40	5	0	0.4
3	0	5	75	20	0.4
8	0	5	75	20	0.4
8.1	55	40	5	0	0.4
15	55	40	5	0	0.4

表 2 MS/MS 測定条件

Compound	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)
Agmatine	131.1	71.9	36	19
	131.1	59.9	36	15
	131.1	114	36	15
Cadaverine	103.1	86	56	15
	103.1	69	56	20
	103.1	103.1	56	5
Histamine	112.1	94.6	51	17
	112.1	95.1	51	19
	112.1	40.9	51	35
Histidine	156.1	109.9	21	19
	156.1	93	21	29
	156.1	55.9	21	41
Phenylethylamine	122.1	105.1	16	17
	122.1	76.9	16	35
	122.1	79	16	30
Putrescine	89.1	71.9	46	11
	89.1	71.9	46	5
	89.1	89.2	46	5
Spermidine	146.1	72.2	61	19
	146.1	112.1	61	11
	146.1	129	61	10
Tryptamine	161.1	117	36	31
	161.1	144.1	36	15
	161.1	114.8	36	41
Tyramine	138.1	120.8	31	13
	138.1	76.8	31	37
	138.1	50.7	31	59

## 結果及び考察

### 1 LC カラム及び測定条件の検討

LC/MS/MS を用いた分析では、選択性、感度、精度等を確保するために、対象化合物を再現性良く保持・溶出できる LC カラム及び測定条件を選択することが

重要となる。

従来法では、分析対象であるヒスタミンが高極性化合物であり、HPLC 分析で広く用いられる逆相クロマトグラフィーではカラムでの保持が困難なことから、親水性相互作用クロマトグラフィー（以下「HILIC」という。）を用い、その特性に鑑みて、保持時間の変動等の再現性の低下を防止するためイソクラテックモードにて測定を行っていた。

しかし、今回対象としたアミン類は、その極性の範囲が広く、イソクラテックモードですべてのアミン類を保持・溶出できる条件は困難と考えられた。なお、従来法にて用いた HILIC カラムである Merck 社製 ZIC-pHILIC の充填剤は、多孔性ポリマー基材にスルホベタイン型の両性イオン型官能基を共有結合させたものであり、親水性相互作用に併せて静電的相互作用による保持・溶出が期待できる。このことから、従来法と同様に ZIC-pHILIC を用い、親水性相互作用及び静電的相互作用を利用し、段階的にアミン類を保持・溶出させるため、精製水、アセトニトリル、ギ酸及び酢酸アンモニウムを用いた 4 液混合グラジエントモードによる測定条件を検討した。その結果、表 1 に示した条件により今回対象としたアミン類すべてにおいて良好なピーク形状が得られた（図 1）。

なお、HILIC カラムは、その固定相表面の水和層<sup>18)</sup>の安定化が不十分であった場合、保持時間の変動等再現性低下が生じることが知られている。今回の測定条件では、測定中に LC カラム内の溶媒及び塩組成の変化が生じ、上記保持時間の変動等再現性低下が懸念されたため、繰り返し測定（50 µg/L, n=5）による測定再現性の評価を行った。その結果を表 3 に示す。

表 3 に示すとおり、保持時間の変動 (RSD%) は 0.10~0.38%, ピーク面積の変動 (RSD%) は 0.62~4.07% であり、食中毒の原因検索分析に用いる測定条件としては十分な再現性が得られた。

また、定量範囲を確認するため、今回対象としたアミン類の各濃度の混合標準液（0.5, 5, 10, 20 及び 50 µg/L）を本条件で測定（n=5）し、得られた検量線の相関係数及び定量限界に対応する濃度（0.5 µg/L、以下「下限値」という。）から得られるピークの S/N 比を求めた。その結果を表 4 に示す。

表 4 に示すとおり、今回対象としたアミン類は、下限値の S/N 比がガイドラインに示されている定量限界の指標値（S/N 比 ≥ 10）を満たしており、また、測定範囲 0.5~50 µg/L において良好な相関（r=0.9997~0.9999）が得られたことから、0.5~50 µg/L の範囲で定量が可能であることが確認できた。

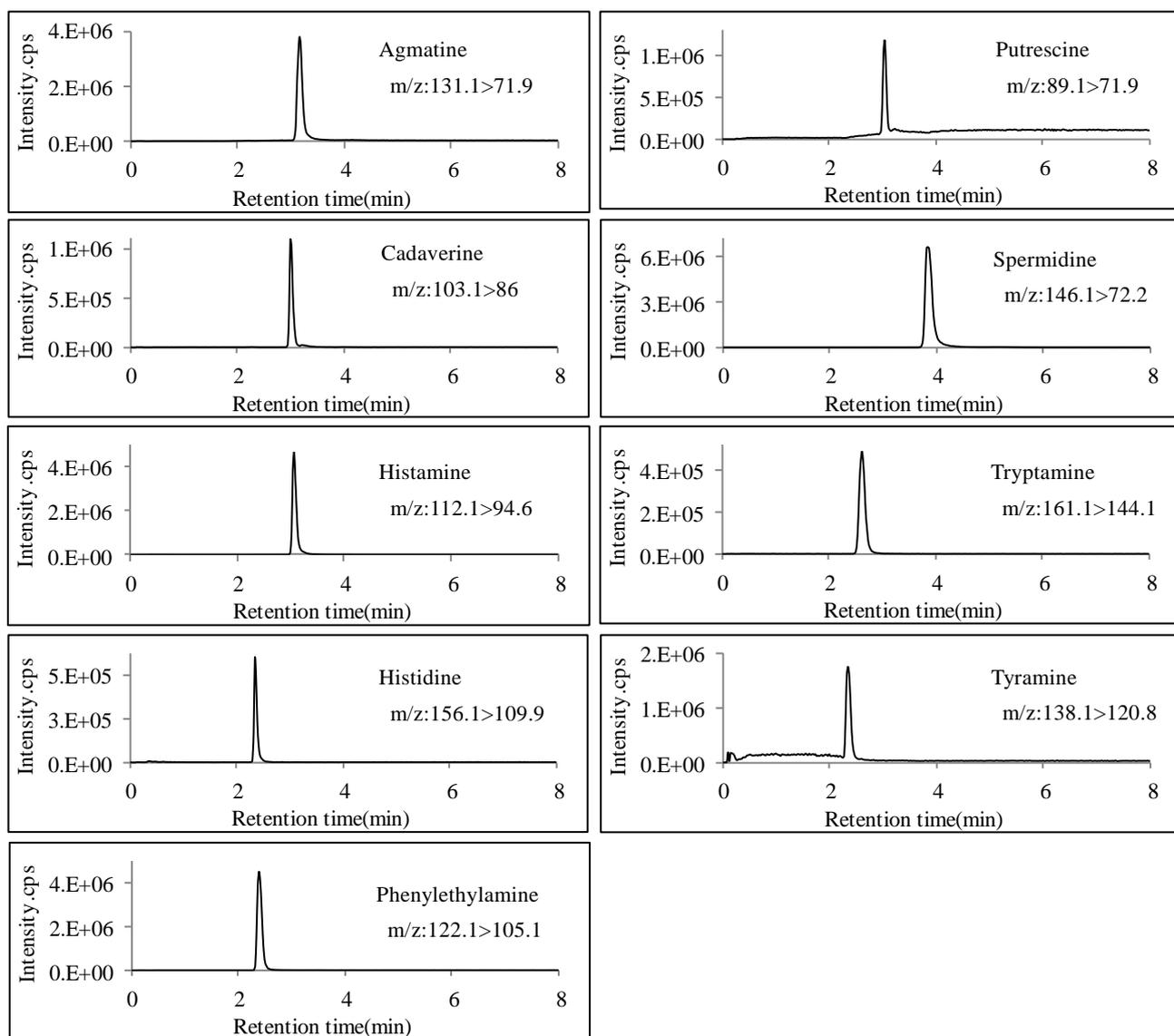


図1 分析対象アミン類のクロマトグラフ (測定濃度: 50  $\mu$ g/L)

表3 測定再現性の評価結果

Compound	Rtime		Area	
	Ave.	RSD (%)	Ave.	RSD (%)
Agmatine	3.11	0.13	4.8E+06	2.98
Cadaverine	2.98	0.14	1.1E+06	1.86
Histamine	3.02	0.14	4.2E+06	2.14
Histidine	2.35	0.38	4.6E+05	3.58
Phenylethylamine	2.41	0.37	5.6E+06	1.21
Putrescine	3.01	0.12	9.1E+05	4.07
Spermidine	3.74	0.10	1.1E+07	2.34
Tryptamine	2.63	0.41	7.5E+05	1.87
Tyramine	2.37	0.36	2.0E+06	0.62

表4 検量線の相関係数及び定量下限濃度の S/N 比

Compound	Correlation coefficient (r)	Signal/Noise ratio
Agmatine	0.9998	43.9
Cadaverine	0.9997	94.3
Histamine	0.9999	80.3
Histidine	0.9999	92.1
Phenylethylamine	0.9999	267.8
Putrescine	0.9997	25.2
Spermidine	0.9997	143.4
Tryptamine	0.9998	84.8
Tyramine	0.9999	17.7

## 2 前処理の検討

### 2.1 希釈倍率の検討

LC/MS/MS を用いた分析では、試験溶液中の夾雑物の影響により、目的成分のイオン化抑制又はイオン化促進（以下「マトリックス効果」という。）が起こり、その測定強度が変動するため、特に精製操作を行わない前処理法においては定量分析の障害となる。このため、従来法では、試験溶液と標準溶液中のマトリックス効果を等しくすることを目的に、マトリックス一致標準溶液を用いていたが、前述のとおり食中毒の原因検索分析法としては、マトリックス一致標準溶液の使用は現実的ではない。なお、一般的にマトリックス効果は、試験溶液中のマトリックス量が多いほど大きくなるため、試験溶液の希釈により試料由来のマトリックス効果を低減することができると考えられた。

そこで、マトリックス効果が無視できる希釈倍率を

検索するため、3.1 前処理検討用試料を従来法で抽出し、その抽出液を各段階（100, 1,000, 5,000, 10,000 倍）に希釈した後、1mL 分取し、100 $\mu$ g/L の混合標準溶液を 0.1mL 添加したものと、これと同濃度の混合標準溶液との LC/MS/MS 測定ピーク面積（以下「測定強度」という。）を比較（n=1）し、希釈倍率とマトリックス効果の検証を行った。その結果を図 2 に示す。

図 2 に示すとおり、各成分とも 100 倍及び 1,000 倍希釈でマトリックス効果と思われる測定強度の増減がみられたが、希釈倍率の上昇に伴い、各成分ともすべての試料において強度比が 100% に近づき、10,000 倍希釈では強度比がほぼ 100% となった。このことから、前処理に際しては、試料を 10,000 倍以上希釈することでマトリックス効果が無視できると考えられ、マトリックス一致標準溶液を使用しない広範囲の水産物等を対象とした定量分析が可能であると推察された。

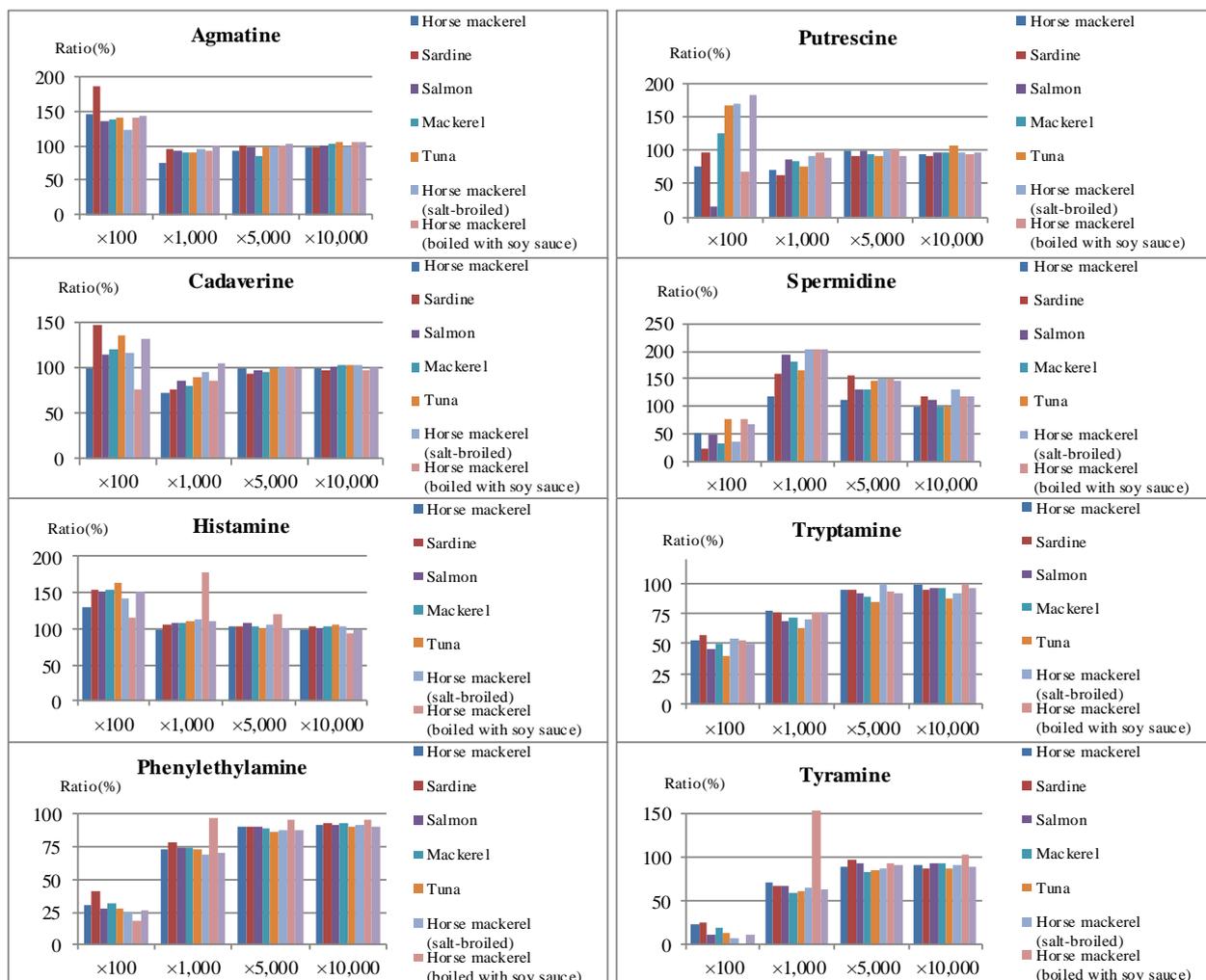


図 2 マトリックス効果の検証

なお、試料を 10,000 倍希釈した場合の定量下限値は、先の検討で設定した下限値から換算して 0.5mg/100g となる。これは、食中毒を引き起こす可能性があると考えられるヒスタミン濃度 (5mg/100g)<sup>4)</sup> の 10 分の 1 であり、アミン類を対象とした分析法としては十分と考えられる。

## 2.2 試験溶液充填バイアルの検討

今回の検討に際して、一部のアミン類(アグマチン, スペルミジン, ヒスタミン及びプトレシン)において、バイアル充填後の時間経過に伴い測定強度が低下する現象がみられた。これは試験溶液充填バイアルにガラスバイアルを用いていたため、ガラス中のシラノール基に塩基性を有するアミン類が吸着したものによると考えられた。このため、ポリプロピレン製バイアルを用いることにより、吸着を抑制できると考え、ポリプロピレン製バイアルとガラスバイアルの試験溶液(混合標準溶液 10 $\mu$ g/L)充填直後の測定強度と 1~10 時間後の測定強度との比較 (n=1) を行い、安定性の評価を行った。その結果を図 3 に示す。

図 3 に示すとおり、ガラス製バイアルでは、充填後直ちに測定強度が減少し、充填 10 時間後には 1/10 程度に減少したが、ポリプロピレンバイアルでは充填後 10 時間を経過しても測定強度に大きな変化は見られず、吸着とみられる現象が確認されなかったため、試験溶液はポリプロピレン製バイアルに充填することとした。

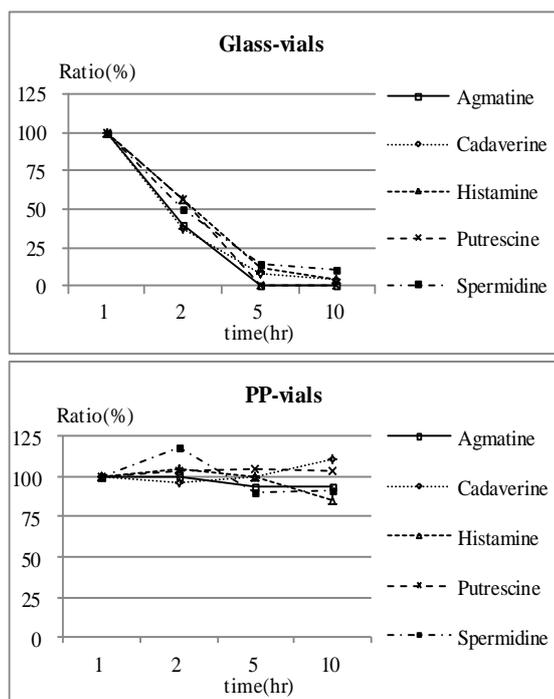


図 3 バイアル中の安定性評価試験

以上の検討結果を踏まえ、また、更なる迅速化のため、従来法において行っていたホモジナイズ後の 30 分間の静置及び遠沈操作を省略し、不揮発性腐敗アミン類の迅速一斉分析法(本法)を作成した(図 4)。

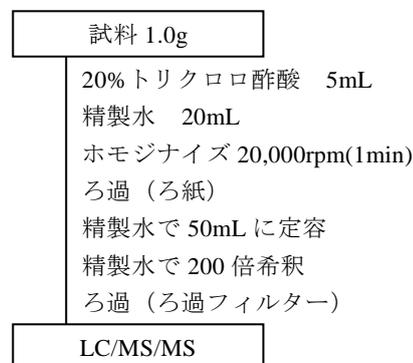


図 4 本法の分析フロー

## 3 妥当性評価試験

本法について、8 種のアミン類を対象に 3.2 妥当性評価試験用試料を用いて、ガイドラインに基づき、分析者 2 名、2 併行 5 日間の添加回収試験を実施し、真度、併行精度及び室内精度を算出した。その結果を表 6 に示す。

表 6 に示すとおり、8 種の水産物試料等での評価結果は、アグマチンで真度 (88.4~99.8%)、併行精度 (3.0%~5.9%) 及び室内精度 (4.1%~6.6%)、カダベリンで真度 (95.1~107.2%)、併行精度 (2.2%~5.7%) 及び室内精度 (3.1%~6.0%)、ヒスタミンで真度 (91.5~104.4%)、併行精度 (1.5%~8.6%) 及び室内精度 (2.8%~8.6%)、フェネチルアミンで真度 (88.8~97.8%)、併行精度 (1.4%~6.9%) 及び室内精度 (2.2%~6.8%)、プトレシンで真度 (82.7~96.7%)、併行精度 (3.4%~7.3%) 及び室内精度 (4.3%~7.9%)、スペルミジンで真度 (100.2~119.4%)、併行精度 (3.5%~8.0%) 及び室内精度 (4.7%~10.7%)、トリプタミンで真度 (85.4~96.5%)、併行精度 (2.2%~6.8%) 及び室内精度 (2.2%~6.8%)、チラミンで真度 (82.9~92.9%)、併行精度 (1.2%~6.3%) 及び室内精度 (1.8%~6.3%) となり、今回対象としたすべてのアミン類でガイドラインに示される添加濃度 0.1mg/kg<の目標値(真度:70~120%, 併行精度:10%>, 室内精度:15%>)を満たす良好な結果が得られた。

このことから、本法は、今回用いた水産物試料等に適用できるとともに、マトリックス効果や水産物及びその加工の種類の違いによる真度の不良等も認められなかったため、多くの水産物及び水産物加工品に適用できると推察される。

表 6 妥当性評価試験結果

Horse mackerel				Sardine			
Compound	Trueness (%) <sup>*1</sup>	RSDr (%) <sup>*2</sup>	RSDwr (%) <sup>*3</sup>	Compound	Trueness (%) <sup>*1</sup>	RSDr (%) <sup>*2</sup>	RSDwr (%) <sup>*3</sup>
Agmatine	96.9	4.2	5.5	Agmatine	93.4	4.7	4.7
Cadaverine	107.2	2.7	4.6	Cadaverine	101.5	4.4	4.4
Histamine	104.4	2.7	3.3	Histamine	99.2	4.0	5.0
Phenylethylamine	97.8	2.5	2.6	Phenylethylamine	95.1	3.6	3.9
Putrescine	96.6	4.7	6.9	Putrescine	96.7	6.0	6.0
Spermidine	119.3	3.7	5.3	Spermidine	119.4	7.0	7.9
Tryptamine	96.5	2.2	2.3	Tryptamine	89.8	4.4	4.4
Tyramine	88.2	1.2	1.8	Tyramine	85.9	4.5	4.5

Salmon				Mackerel			
Compound	Trueness (%) <sup>*1</sup>	RSDr (%) <sup>*2</sup>	RSDwr (%) <sup>*3</sup>	Compound	Trueness (%) <sup>*1</sup>	RSDr (%) <sup>*2</sup>	RSDwr (%) <sup>*3</sup>
Agmatine	99.8	4.8	4.9	Agmatine	97.8	4.9	5.0
Cadaverine	106.3	2.8	3.1	Cadaverine	104.3	4.3	5.8
Histamine	99.5	8.6	8.6	Histamine	100.5	3.4	4.0
Phenylethylamine	97.7	3.3	3.3	Phenylethylamine	94.0	2.5	2.8
Putrescine	94.5	4.3	4.3	Putrescine	96.1	5.6	5.6
Spermidine	119.4	4.7	5.8	Spermidine	118.0	8.0	8.0
Tryptamine	94.3	4.4	4.4	Tryptamine	91.9	2.2	2.2
Tyramine	92.9	3.3	3.3	Tyramine	86.2	3.9	3.9

Tuna				Horse mackerel(salt-broiled)			
Compound	Trueness (%) <sup>*1</sup>	RSDr (%) <sup>*2</sup>	RSDwr (%) <sup>*3</sup>	Compound	Trueness (%) <sup>*1</sup>	RSDr (%) <sup>*2</sup>	RSDwr (%) <sup>*3</sup>
Agmatine	91.6	5.9	6.6	Agmatine	95.8	3.0	4.1
Cadaverine	99.4	5.7	6.0	Cadaverine	104.3	2.2	3.2
Histamine	97.0	5.9	6.2	Histamine	101.2	1.5	2.8
Phenylethylamine	88.8	6.8	6.8	Phenylethylamine	90.6	1.4	2.2
Putrescine	91.9	7.3	7.3	Putrescine	96.0	4.4	4.4
Spermidine	114.0	3.5	4.7	Spermidine	112.3	4.4	4.7
Tryptamine	85.4	6.8	6.8	Tryptamine	92.9	3.5	3.5
Tyramine	82.9	6.3	6.3	Tyramine	86.9	2.6	2.6

Horse mackerel(boiled with soy sauce)				Horse mackerel(deep-fried)			
Compound	Trueness (%) <sup>*1</sup>	RSDr (%) <sup>*2</sup>	RSDwr (%) <sup>*3</sup>	Compound	Trueness (%) <sup>*1</sup>	RSDr (%) <sup>*2</sup>	RSDwr (%) <sup>*3</sup>
Agmatine	88.4	5.4	9.6	Agmatine	92.4	5.4	5.4
Cadaverine	95.1	5.3	5.4	Cadaverine	102.1	3.0	4.3
Histamine	91.5	5.0	5.0	Histamine	99.7	4.0	4.0
Phenylethylamine	94.7	1.4	2.6	Phenylethylamine	94.2	2.3	2.3
Putrescine	82.7	7.2	7.7	Putrescine	93.6	3.4	6.4
Spermidine	100.2	7.5	10.7	Spermidine	107.0	6.8	6.8
Tryptamine	94.1	2.2	2.2	Tryptamine	92.1	2.8	3.1
Tyramine	88.1	3.6	4.3	Tyramine	84.4	1.4	3.6

\*1 Mean recovery rates(%)

\*2 RSD(%) of repeatability

\*3 RSD(%) of within-laboratory repeatability(n=2×5)

#### 4 アミン類の経時変化

前述のとおり、アミン類は、食中毒の原因検索において、その定量値と食中毒濃度域との比較及び腐敗の程度の評価が必要となる。なお、食中毒濃度域に関しては、過去の事例<sup>4)</sup>を参考に評価することになるが、腐敗の程度については、水産物の種類毎にアミン類の含有量が異なるため、アミン類の生成と腐敗の関係に関するデータの集積<sup>19-23)</sup>が必要となる。

そこで、当該データの集積に資するため、3.3 経時変化測定用試料について、本法を用いてアミン類の定量 (n=1) を行った。その結果を表 7 に示す。

表 7 に示すように、アミン類は、0~5 日の日数経過に伴い、水産物の種類によって以下の特徴的な挙動を示した。

アジでは、トリプタミン以外のすべてのアミン類が検出された。なお、カダベリン及びヒスタミンは高濃

表 7 アミン類の経時変化 (単位 : mg/100g)

Sample	Days	Agm	Cad	Him	Phm	Put	Spd	Tpm	Tym	Hid
Horse mackerel	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	480
	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	480
	1	0.6	28	130	ND	ND	ND	ND	2.9	150
	2	ND	36	580	2.0	ND	ND	ND	2.7	2.7
	3	ND	74	380	10	ND	ND	ND	1.3	1.4
	5	ND	350	430	45	1.0	0.9	ND	22	4.8
Sardine	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	540
	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	520
	1	29	84	110	7.6	ND	ND	0.6	16	240
	2	43	200	770	12	ND	ND	1.1	27	120
	3	53	290	890	22	29	ND	2.5	41	15
	5	50	270	720	22	63	ND	2.8	39	75
Salmon	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	41
	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	50
	1	ND	12	0.6	ND	14	ND	ND	0.7	23
	2	ND	70	8.9	ND	310	ND	ND	40	23
	3	ND	190	1.6	ND	550	ND	ND	56	29
	5	ND	460	25	ND	600	ND	ND	52	20
Mackerel	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	900
	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	870
	1	ND	1.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	770
	2	ND	62	100	ND	110	1.1	ND	3.1	500
	3	ND	240	415	3.6	350	ND	ND	47	270
	5	ND	370	510	6.1	420	ND	0.7	29	50
Tuna	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1000
	0.5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	910
	1	ND	1.5	6.0	ND	ND	ND	ND	ND	830
	2	ND	23	170	ND	37	1.7	ND	ND	350
	3	ND	47	240	ND	150	2.4	ND	1.3	440
	5	ND	140	470	ND	260	2.5	ND	2.1	70
Agmatine : Agm	Cadaverine : Cad	Histamine : Him	Histidine : Hid	Phenylethylamine : Phm						
Putrescine : Put	Spermidine : Spd	Tryptamine : Tpm	Tyramine : Tym							

度 (100mg/100g 以上) 検出された。また、カダベリン、フェネチルアミン及びプトレシンについては、日数を経るごとにその濃度が増加したが、アグマチン及びヒスタミンについては、それぞれ 1 日目及び 2 日目を境に減少する傾向を示した。

イワシでは、スペルミジン以外のすべてのアミン類が検出された。なお、カダベリン及びヒスタミンは高濃度 (100mg/100g 以上) 検出された。また、アグマチン、フェネチルアミン、プトレシン及びトリプタミンについては、日数を経るごとにその濃度が増加したが、カダベリン、ヒスタミン及びチラミンについては、3 日目を境に減少する傾向を示した。

サケでは、カダベリン、ヒスタミン、プトレシン及びチラミンが検出された。なお、カダベリン及びプトレシンが高濃度 (100mg/100g 以上) 検出された。また、カダベリン、ヒスタミン及びプトレシンについては、日数を経るごとにその濃度が増加する傾向を示したが、チラミンは 5 日目に減少した。

サバでは、アグマチン以外のすべてのアミン類が検出された。なお、カダベリン、ヒスタミン及びプトレシンが高濃度 (100mg/100g 以上) 検出された。また、カダベリン、ヒスタミン及びプトレシンについては、日数を経るごとにその濃度が増加したが、チラミンは 5 日目に減少した。

マグロでは、カダベリン、ヒスタミン、プトレシン、スペルミジン及びチラミンが検出された。なお、カダベリン、ヒスタミン及びプトレシンが高濃度 (100mg/100g 以上) 検出された。また、検出されたすべてのアミン類で日数を経るごとにその濃度が増加した。

なお、今回、ヒスタミンの前駆物質であるヒスチジンの定量を併せて行った。ヒスチジンは、すべての水産物においてヒスタミン濃度の増加に伴い濃度が減少する傾向を示し、また、ヒスチジンの濃度が比較的低かったサケについては、検出されるヒスタミンの濃度が比較的低濃度であるなど、その濃度には明確な相関がみられた。

アミン類の生成量は、腐敗過程に関与する脱炭酸酵素の種類や活性度等に支配される<sup>16)</sup>ことから、水産物の種類、生育環境、個体差、部位、保存状態等によってその濃度は大きく異なると考えられる。一方で、今回のデータに見られるように、アミン類は水産物の種類によって、時間経過に伴いそれぞれ特徴的な検出傾向及び挙動を示すことから、今後、これらのデータを集積することにより、定量的な腐敗の程度の評価が可能となることが期待できる。

## ま と め

食中毒の迅速な原因究明に資するため、8 種の揮発性腐敗アミン類を対象に、試料を 20% トリクロロ酢酸及び精製水で抽出・希釈し、LC/MS/MS で測定する迅速一斉分析法の検討を行った。また、本法について、8 種の水産物試料等を用いた妥当性評価試験を行ったところ、各成分ともガイドラインの目標値を満たす良好な結果が得られた。

本法は、多くの水産物及び水産物加工品において 8 種類のアミン類を同時に分析・評価することができ、また、マトリックス一致標準溶液を用いないため、突発的に発生する食中毒に対して対応が可能である。さらに、使用する溶媒等が少なく分析にかかる費用も安価で、かつ、操作が簡便なため、その前処理時間も 1 検体当たり 30 分程度と短いことから、アミン類を原因とする食中毒発生時の原因検索分析法として非常に有効な手法であると考えられる。

## 文 献

- 1) E.Karmas, J.L.Mietz : *Lebensm.Wiss.Technol*, 11, 333-337 (1978) .
- 2) 観公子, 牛山博文, 新藤哲也, 齊藤和夫 : *食品衛生学雑誌*, 46(3), 127-132 (2005) .
- 3) 後藤哲久, 佐藤吉朗, 吉田充 : *食品危害要因その実態と検出法*, (株) テクノシステム, 343-349 (2014) .
- 4) 登田美桜, 山本都, 畝山智香子, 森川馨 : *国立衛研報*, 127, 31-38 (2009) .
- 5) FAO, WHO : “joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products “ (2012) .
- 6) 井部明広 : *東京都健康安全研究センター研究年報*, 55, 13-22 (2004) .
- 7) 竹内 浩, 一色博, 澤田陽子, 林克弘, 前田千恵, 原有紀, 竹川雄太, 村田 将, 志村恭子 : *三重保環研年報*, 14, 41-45 (2012) .
- 8) 山口玲子, 宮本廣 : *千葉市環境保健研究所年報*, 18, 56-60 (2011) .
- 9) 柿木康宏, 山下梓, 宮本靖久, 鴨脚毅, 望月直樹 : *分析化学*, 60(2), 157-162 (2011) .
- 10) V.Gianotti, U.Chiuminatto, E.Mazzucco, F.Gosetti, M.Bottaro, P.Frascarolo, M.C.Gennaro : *Journal of Chromatography A*, 1185, 296-300 (2008) .
- 11) 大月史彦, 肥塚加奈江, 林隆義, 山本淳 : *岡山県環境保健センター年報*, 34, 99-103 (2010) .
- 12) 坂本智徳, 赤木浩一, 樋脇弘 : *食品衛生学雑誌*, 51(3), 115-121 (2010) .

- 13) 中里光男, 小林千種, 山嶋裕季子, 立石恭也, 川合由華, 安田和男: 東京都立衛生研究所研究年報, **53**, 95-100 (2002) .
- 14) 吉田達雄, 濱田寛尚, 吉元秀和, 飛野敏明, 村川弘: 熊本県保健環境科学研究所報, **40**, 20-24 (2010) .
- 15) Tatsuo Yoshida, Hirotohi Hamada, Hiroshi Murakawa, Hidekazu Yoshimoto, Toshiaki Tobino, Kei Toda : ANALYTICAL SCIENCES, **28**, 179-182 (2012) .
- 16) 日本薬学会: 衛生試験法注解, 199-201 (2010) .
- 17) 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, 食安発 1224 第 1 号.
- 18) MERCK KGaA: “A Practical Guide to HILIC” , p. 4 (2008) .
- 19) 前田彰, 棚橋高志, 横井岳志, 伊藤正純, 田中豊, 山田貞二, 鶴田益清, 林樹: 愛知県食品衛生検査所平成 14 年度愛知県食品衛生監視員研修会資料.
- 20) 永山敏廣, 田村行弘, 真木俊夫, 観公子, 直井家壽太, 三島太一郎: 衛生化学 **31**, 362~370 (1985) .
- 21) 山中英明, 松本美鈴: 食品衛生学雑誌, **30**(5), 396~400 (1989) .
- 22) 山中英明, 塩見一雄, 菊池武昭: 食品衛生学雑誌, **30**, 170-174 (1989) .
- 23) 厚生省生活衛生局監修: “食品衛生検査指針理化学編” , 269~279 (1991) .