論　文

LC-MS/MS によるキノコ及び魚介類の中毒成分迅速分析法

多田裕之，南谷臣昭，神山恵理奈，河村 博*

要　旨

キノコ中毒成分であるムスカリン，ムシモール，魚介類の中毒成分であるヒスタミン，カダベリン，チラミン，テトラミンについて，ポリマーベースで両性イオン官能基を有するカラムを用いた親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）により，またキノコ中毒成分であるイルージン S，α-アマニチン，β-アマニチン，ファロイジンについて，ODS カラムを用いた逆相クロマトグラフィーにより，LC-MS/MS で分析できる方法を確立した．キノコ中毒成分については，1.5%(v/v)トリフルオロ酢酸／アセトニトリルで抽出し，C18 ミニカラムで精製した．魚介類の中毒成分は，1.5%(v/v)トリフルオロ酢酸／アセトニトリル（15：85）で抽出し，0.05%(v/v)トリフルオロ酢酸含有 水／アセトニトリル（1：4）で 20 倍希釈した．キノコ中毒成分（6 種類）の検出限界は，0.0037～0.78 μg/g であり，魚介類中毒成分（4 種類）の検出限界は，0.038～2.0 μg/g であった．

キーワード：ムスカリン，ムシモール，イルージン S，アマニチン，ヒスタミン，テトラミン，LC-MS/MS

1　はじめに

厚生労働省のキノコ種類別食中毒発生状況 [1]によれば，平成 23 年までの過去 10 年間におけるキノコ中毒は，ツキヨタケ，クサウラベニタケ，カキシメジ，ドクササコ，テングダケが事件数，患者数共に 18 種類中上位 5 位を占めている．これに次ぐ上位 6 位にあるドクツルタケの中毒では，3 人の死者が出ており，岐阜県においても昭和63年と平成3年にこれによる中毒で死者が出ている．また，魚介類のヒスタミンによる全国の食中毒件数は，1998～2008 年の過去 11 年間において平均で年 8 件前後の届出数があり，2008 年では大規模な食中毒が複数確認されている [2]．更にチョウセンボラ等のエゾバイ科エゾボラ属巻き貝のテトラミンによる食中毒も毎年のように発生している [3, 4]．これら中毒事例の多いキノコ及び重篤な被害を及ぼすキノコの中毒成分のうち標準品が入手可能なツキヨタケのイルージン S，クサウラベニタケのムスカリン，テングダケのムシモール，ドクツルタケのアマニチン，ファロイジンについて，また，魚介類のヒスタミン及びヒスタミン中毒を増強させるといわれるカダベリン，チラミン [2]，更にエゾボラ属巻貝のテトラミンについて迅速に検査出来る方法を検討した。

キノコ中毒成分の分析法として，低分子で高極性のムスカリン及びムシモールについては，それぞれ Chung ら [5]の LC-MS を用いた方法及び角田ら [6]による HPLC-UV を用いた方法，辻川ら [7, 8]による GC-MS，LC-MS/MS を用いた方法等がある．イルージン S については笠原ら [9]による LC-MS/MS を使用した分析法，アマニチン，ファロイジンは石原ら [10]及び寺田ら [11]による HPLC-UV を用いた方法等がある。中毒発生時に，これらの分析法を用いて個別に分析すれば多くの労力を必要とし，結果提出までに長時間を要することになる。健康被害を及ぼす中毒事案の場合は，素早い対応により迅速に原因食品等を究明することが求められるため，高極性成分であるムスカリン，ムシモールについては Chung ら [5]が採用している親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）により，またイルージン S，アマニチン，ファロイジンについては ODS カラムを用いた逆相クロマトグラフィー(RPC)により，それぞれ一斉に LC-MS/MS で分析出来る簡便で迅速な方法を検討した．

ヒスタミン等の不揮発性腐敗アミンの分析法では，日本薬学会編衛生試験法・注解(2010)に示された方法 [12]，また竹内ら [13]による HPLC-FR を用いた方法があり，LC-MS/MS を使用した方法では伊藤ら [14]及び山本ら [15]による分析法等がある．また，テトラミンの分析では新藤ら [16]による LC-IC，伊藤ら [3]による LC-MS/MS を使用した方法が報告されている．キノコ中毒成分の分析と同様に，これらの分析法により個別に分析すれば長時間を要するため，中毒事案に素早く対応出来る

岐阜県保健環境研究所：504-0838　岐阜県各務原市那加不動丘 1-1

* 元 岐阜県保健環境研究所

ように，ヒスタミン，カダベリン，チラミン，テトラミンを一斉分析できる簡便で迅速な方法を検討した．これら 4 種類の成分はキノコのムスカリン，ムシモールと同様高極性成分であるため，測定についてはムスカリン，ムシモールと同一の LC 条件で一斉に MS/MS 測定出来る方法を検討した．

2　実験方法

2.1　試料

添加回収用試料として，市販のブナシメジ，エリンギ，シイタケ，キハダマグロ，シオサバ，アワビ，サザエを用いた．

2.2　試薬，標準溶液

標準品：和光純薬工業株式会社製 生化学用ファロイジン，特級ヒスタミン二塩酸塩，食品分析用チラミン二塩酸塩，食品分析用カダベリン二塩酸塩，生化学用ムシモール，生化学用ファロイジン，シグマアルドリッチ社製 α-アマニチン（タマゴテングタケ抽出品），β-アマニチン（タマゴテングタケ抽出品），（±）ムスカリンクロリド水和物を用いた．イルージン S は山形県衛生研究所より入手したツキヨタケ抽出品 10 mg/L メタノール溶液を用いた．

標準溶液：アマニチン，ファロイジンは標準品をメタノールに溶解し 100 mg/L の標準原液を調製した．これら標準原液及びツキヨタケ 10 mg/L メタノール溶液を，5 mmol/L 酢酸アンモニウム／同含有メタノール（1：1）に溶解し標準溶液を調製した．他の標準品については，水／メタノール（1：1）に溶解し 500 mg/L の標準原液を調製し，これを 0.05%(v/v) トリフルオロ酢酸含有 水／アセトニトリル（1：4）で希釈して標準溶液を調製した．

その他の試薬等：和光純薬工業株式会社製 特級アセトニトリル（抽出，精製に使用），LC/MS 用アセトニトリル（LC-MS/MS 移動相に使用），特級メタノール，特級トリフルオロ酢酸(TFA)，LC/MS 用ギ酸，特級ギ酸アンモニウムを用いた．

メンブランフィルター：ミリポア社製 MILLEX-LG SLLG H13 NL 孔径 0.2 μm を用いた．

C18 ミニカラム:アジレントテクノロジー社製 Bond Elut LRC-C18 500 mg

ホモジナイザー：マイクロテックニチオン社 ヒスコトロン NS50（ジェネレーターNS-10 外径 10.5 mm）

2.3　LC-MS/MS 装置及び測定条件

2.3.1　LC 条件①（ムスカリン，ムシモール，ヒスタミン，カダベリン，チラミン，テトラミン）

装置：アジレントテクノロジー社製 1200LC(SL)，分析カラム：メルク社製 SeQuant ZIC-pHILIC 2.1 φ×150 mm 5 μm 粒子径，移動相：A 液=50 mmol/L ギ酸アンモニウム（ギ酸で pH 3.2 に調整） B 液=アセトニトリル　B 液%=90—(15 分)→40(10 分間保持)，流速：0.2 mL/min，カラム温度：40℃，注入量：5 μL

2.3.2　LC 条件②（アマニチン，ファロイジン，イルージン S）

装置：アジレントテクノロジー社製 1200LC(SL)，分析カラム：インタクト社製 Cadenza CD-C18 2.0φ×150 mm 3.0 μm 粒子径，移動相：A 液=5 mmol/L 酢酸アンモニウム B 液=5 mmol/L 酢酸アンモニウム含有メタノール B 液%=10—(25 分)→100(5 分間保持)，流速：0.2 mL/min ，カラム温度：40℃，注入量：5 μL

2.3.3　MS/MS 条件

装置：AB SCIEX 社製 API4000 QTRAP，イオン化モード：ESI Posi，Ion Spray Voltage：5500 V，Turbo Spray Temp.及び MRM パラメータ：表 1 に示した．

表　1　MRM パラメータ

Analyte	Turbo spray temp.(℃)	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (V)
muscarine	600	174	57	46	33
muscimol		115	98	51	17
illudin S	400	265	217	71	13
α -amanitin		919	86	136	127
β -amanitin		920	86	146	123
phalloidin		789	753	116	29
histamine	600	112	95	46	21
cadaverine		103	86	36	15
tyramine		138	121	41	13
tetramine		74	58	41	31

2.4　試料溶液の調製

2.4.1　キノコ

試料がキノコの場合における試料溶液の調製法について図 1 に示した．試料 5.0 g をディスポーザブルの 50 mL 目盛付ポリプロピレン製遠沈管に採り，抽出溶媒 1.5%(v/v) TFA／アセトニトリル（1：9）30 mL を加え，外径 10.5 mm の回転刃を使用してホモジナイズした．次に同抽出溶媒で 50 mL に定容し，これを攪拌して 10 分間静置し，毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行った．この上澄液 2.0 mL を，アセトニトリル 8 mL，水／アセトニトリル（1：9）2 mL で前処理した C18 ミニカラムに通し，次に水／アセトニトリル（1：3）2.0 mL で溶出した．通過液，溶出液を合わせ，水／アセトニトリル(1：3)で 5.0 mL に定容し，0.2 μm 孔径のメンブランフィルターでろ過を行う．これをムスカリン，ムシモール測定用試料溶液とした．

先の上澄液を採り，前記と同様に C18 ミニカラム処理を行い，その通過液，溶出液を合わせて 40℃で減圧濃縮を行い，アセトニトリルを除去した．残渣にアマニチン等測定用移動相 A／B（1：4）溶液を加えて 2.0

mL に定容し，0.2 μm 孔径のメンブランフィルターでろ過を行った（フィルターが詰まる場合は毎分 3,000 回転で遠心してからろ過した）．これをアマニチン，ファロイジン，イルージン S 測定用試料溶液とした．

2.4.2　魚介類

試料が魚介類の場合における試料溶液の調製法について図 2 に示した．試料 2.0 g をディスポーザブルの 50 mL 目盛付ポリプロピレン製遠沈管に採り，抽出溶媒 1.5%(v/v)TFA／アセトニトリル（15：85）30 mL を加えてキノコと同様にホモジナイズし，次に同抽出溶媒で 50 mL に定容した．これを攪拌して 10 分間静置し，毎分 3,000 回転で 10 分間遠心分離を行った．この上澄液 1.0 mL に 0.05%(v/v)TFA 含有 水／アセトニトリル（1：4）を加えて 20 mL に定容し，0.2 μm 孔径のメンブランフィルターでろ過を行った．これをヒスタミン，カダベリン，チラミン，テトラミン測定用試料溶液とした．

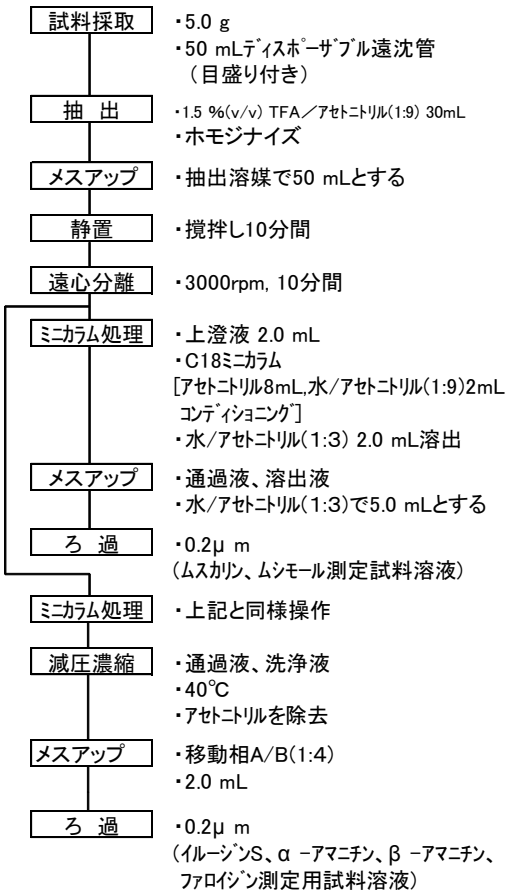

図　1　試料溶液の調製方法（キノコ）

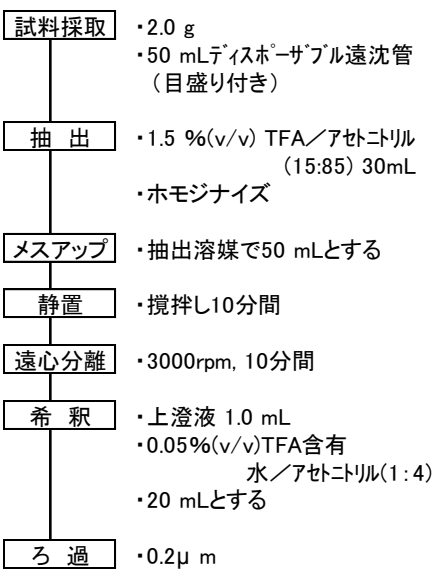

図2　試料溶液の調製方法（魚介類）

3　結果および考察

3.1　高極性成分 LC 測定条件

3.1.1　LC 条件

ムスカリン，ムシモール，ヒスタミン，カダベリン，チラミン，テトラミンは低分子でかつ第四級アンモニウム化合物又は第一級アミンであるため，極性の高い成分である．このような高極性成分はそのままでは LC 分析で汎用される ODS カラムでの測定は難しいため，誘導体化あるいはイオンペアー試薬を用いて分析を行う例が多いが，操作法が複雑となり結果を得るのに長時間を要し，またイオンペアー試薬の使用は感度低下や装置を汚染すること[17]が知られている．近年，HILIC により高極性成分を分析する方法が用いられており[3,5,14]，著者らはこの方法を用いて誘導体化等の煩雑な処理をすることなく分析出来る方法を検討した．

HILIC で使用するカラムは多くの種類が市販されているが，シリカベースのカラムであると基材上の残存シラノール基とのイオン交換相互作用により，ピークのテーリングが発生する場合がある[18]．今回対象の測定成分は，分子が小さいため残存シラノールと接近し易いと考えられ，特にテーリングによる支障が出る可能性が高いと考えられる．また，NH_2 カラムのようなイオン交換基を有する固定相の場合，イオン交換相互作用の関与が大きくなりピーク形状が悪くなる場合がある[18]．そこで今回はポリマーベースで，かつ電荷的に中性である両性イオンを官能基に持つ ZIC-pHILIC カラムを用いることとした．

移動相は，50 mmol/L ギ酸アンモニウムとアセトニトリルによるグラジエント分析を行ったが，50 mmol/L ギ酸アンモニウムの pH をギ酸により 3.0，3.2，3.5，4.0 と変えて測定したところ，各成分の感度が変動した．pH 4.0 とするとヒスタミンの感度は pH 3.2 に比して倍程度となったが，今回対象とした成分のうち最も感度が低いのはムシモールであり，この感度が最良となった pH 3.2 を選択した．

3.1.2　試料溶液組成

各成分のピーク形状が最良となる試料溶液の水と

アセトニトリルの比を求めるため，0.05%TFA を含有した水／アセトニトリル（1：9），同（1：4），同（1：1)溶液で標準溶液を作成しピーク形状を比較したところ，早い時間に溶出するムスカリン，チラミン，テトラミンでは（1：1）溶液より（1：4）溶液がシャープなピーク形状となり，(1：9) 溶液ではムスカリンでテーリングが見られた（図3）．よって，水とアセトニトリルの比率は1：4 とした．

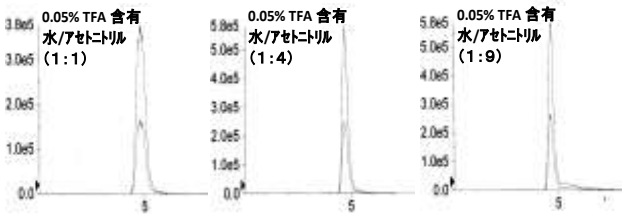

図3　試料溶液組成によるムスカリンのクロマトグラム

3.2　イルージン S 等 LC 測定条件

3.2.1　LC 条件

イルージン S，α-アマニチン，β-アマニチン，ファロイジンについては，ODS カラムを用いた RPC で測定した．迅速に分析出来るように，ルーチンの農薬分析で LC-MS/MS 装置に設置してあるカラム，移動相をそのまま用いることとし，カラムは Cadenza CD-C18，移動相は 5 mmol/L 酢酸アンモニウムと同含有メタノールのグラジエント法とした．β-アマニチンは分子量は大きいが環状ペプチド構造であり，かつカルボキシル基を持つ水溶性の高い成分で，初期有機溶媒濃度が 20%以上ではピーク形状がブロードであったが，10%ではシャープなピーク形状となった．また，α-アマニチンとβ-アマニチンの分子量の差は 1 であり，β-アマニチン測定時にα-アマニチンの同位体も測定されることや，今回使用した四重極質量分析計の場合，α-アマニチン測定条件で測定するとβ-アマニチンの一部も測定される（この逆もある）ため，2 つのピークは完全に分離している必要がある．今回の LC 条件では，完全に分離して測定することが出来た．

3.2.2　試料溶液組成

水溶性の高いβ-アマニチンは，0.05% TFA 含有 水／アセトニトリル混液ではピーク形状がダブルピークとなったため，移動相の A 液／B 液（1：1）溶液で標準溶液を作成したところ，シャープなピークとなった（図4）．

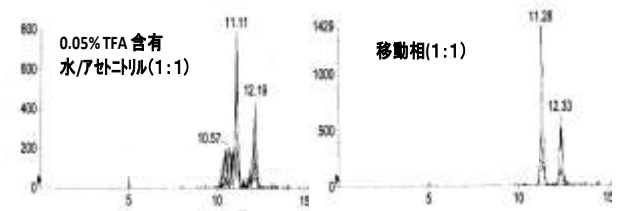

図4　試料溶液組成によるβーアマニチンのクロマトグラム

3.3　抽出，精製

3.3.1　キノコ

ムスカリン，ムシモールのような低分子成分を分析する場合タンパク質が障害となる．そのため抽出液に TFA 溶液とアセトニトリルの混液を用いて，抽出と同時に除タンパクを行った．これを遠心分離し，上澄液の一部を採って，油分等の夾雑成分を除去するため C18 ミニカラムに通した．また，最終溶液の水，アセトニトリルの組成が約 1 対 4 となるように，溶出液及びメスアップ液を水／アセトニトリル (1:3) とした．

アマニチン，ファロイジン，イルージン S は，前記の上澄液の一部を採り，ムスカリン，ムシモールと同様に C18 ミニカラム処理を行った．この通過液，洗浄液を合わせて減圧濃縮でアセトニトリルを除去し，最終溶液の移動相 A 液，B 液組成が約 1 対 1 となるように移動相 A 液／B 液（1：4）で定容した．また，対象成分が高濃度に含有され，かつより迅速性が要求される場合は，ムスカリン，ムシモール試料の C18 処理後 5.0 mL メスアップ溶液から 2.0 mL を採り，減圧濃縮して移動相 A 液／B 液（1：4）で 2.0 mL に定容したものを試料溶液としても良い．

3.3.2　魚介類

キノコと同様の方法で抽出操作を行い，添加回収試験を実施したところ，回収率が低く除タンパクが不完全であったと考えられた．そこで試料量を 2.0 g に減らし，更に抽出液を 1.5%(v/v)TFA／アセトニトリル（15：85）として TFA 溶液の割合を増加させた．

3.4　MS/MS クロマトグラム

ムスカリン，ムシモールについては，次項の添加回収試験で調製したブナシメジの試料溶液，ヒスタミン，カダベリン，チラミン，テトラミンについては，同キハダマグロの試料溶液を MS/MS 分析して得られたクロマトグラムを図 5 に示す．ムシモールは感度が低いがシャープなピークであり，ヒスタミンはピーク幅が多少広いが測定には問題ないと考えられた．他のピークについても，夾雑成分の影響のない良好なクロマトグラムが得られた．

イルージン S，α-アマニチン，β-アマニチン，ファロイジンについては，次項の添加回収試験で調製したブナシメジの試料溶液各を MS/MS 分析して得られたクロマトグラムを図 6 に示す．α-アマニチン測定時にβ-アマニチンが，β-アマニチン測定時にα-アマニチンも測定されるが，2 つのピークは完全に分離しており，測定上支障となることはなかった．他のピークについても，夾雑成分の影響のない良好なクロマトグラムが得られた．

3.4　添加回収試験

ムスカリン，ムシモールは25 μg を，α-アマニチン，β-アマニチン，ファロイジンは10 μg を市販のブナシメジ，エリンギにそれぞれ3 試料ずつ添加した．イルージンS は2.0 μg を市販のシイタケに同じく3 試料ずつ添加した．表2 に示すように，エリンギのムシモールは 80％台の平均回収率であったが，他は 93.1～103.2％であり良好な結果であった．

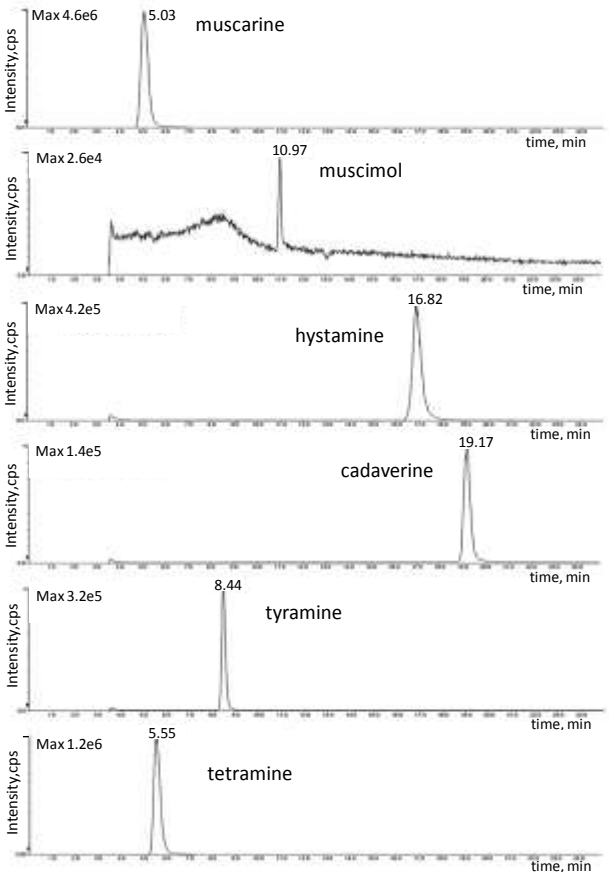

図5　高極性成分クロマトグラム

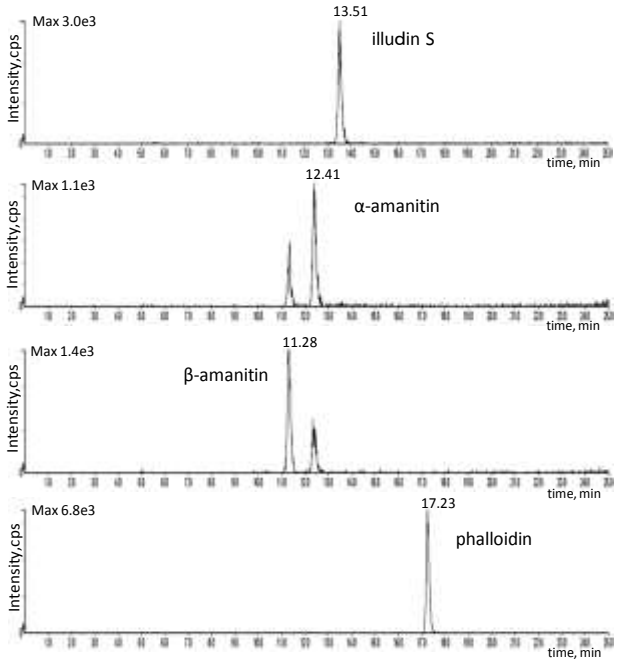

図6　イルージンS等クロマトグラム

ヒスタミン，カダベリン，チラミンは100 μg をキハダマグロ，シオサバに，テトラミンは100 μg をアワビ，サザエにそれぞれ3 試料ずつ添加した（サザエのみ内蔵と筋肉混合試料，他は筋肉）．表3 に示すように平均回収率は97.5～105.3％であり，良好な結果であった．

表2　キノコ添加回収試験（％）（n=3）

毒成分		ﾌﾞﾅｼﾒｼﾞ	ｴﾘﾝｷﾞ	ｼｲﾀｹ
ﾑｽｶﾘﾝ	平均値	93.1	94.0	—
	CV	4.1	1.9	—
ﾑｼﾓｰﾙ	平均値	94.1	80.2	—
	CV	6.2	4.7	—
ｲﾙｰｼﾞﾝ S	平均値	—	—	99.1
	CV	—	—	6.3
α－ｱﾏﾆﾁﾝ	平均値	103.2	96.8	—
	CV	1.0	6.2	—
β－ｱﾏﾆﾁﾝ	平均値	99.3	100.5	—
	CV	0.6	1.5	—
ﾌｧﾛｲｼﾞﾝ	平均値	99.8	99.0	—
	CV	1.5	3.6	—

（添加量：ﾑｽｶﾘﾝ、ﾑｼﾓｰﾙは25μg、ｲﾙｰｼﾞﾝSは2.0μg、他は10μg）

表3　魚介類添加回収試験（％）　（n=3）

毒成分		ｷﾊﾀﾞﾏｸﾞﾛ	ｼｵｻﾊﾞ	ｱﾜﾋﾞ	ｻｻﾞｴ
ﾋｽﾀﾐﾝ	平均値	99.8	99.6	—	—
	CV	2.5	2.0	—	—
ｶﾀﾞﾍﾞﾘﾝ	平均値	100.4	99.8	—	—
	CV	2.8	1.0	—	—
ﾁﾗﾐﾝ	平均値	101.0	97.5	—	—
	CV	1.0	0.9	—	—
ﾃﾄﾗﾐﾝ	平均値	—	—	105.3	98.8
	CV	—	—	4.7	2.4

（添加量：100 μg）

3.5　検出限界

S/N=3 による検出限界は，キノコ中毒成分で 0.0037～0.78 μg/g であり，最も感度が低かったのはムシモールであった（表4）．ツキヨタケのイルージンS 及びドクツルタケのα-アマニチン，β-アマニチン，ファロイジンは、数～数百 μg/g 含有され[9,11]，またベニテングタケ中のムシモールは乾燥試料で数十 μg/g 含有される[6]という報告がある．ムスカリン，ムシモールを除く中毒成分は測定上十分な感度が得られたと考えられるが，ムシモールについては，検出は可能であるが定量は困難な場合も考えられる．ただ，同じ中毒成分のイボテン酸は加熱により容易に脱炭酸してムシモールに変化する[6,7,19]ため，加熱調理品ではムシモール含量が高くなっている可能性がある．ムスカリンについては，含有量の報告は見あたらなかったが，今回対象としたキノコ中毒成分の中で最も感度良く分析することができた．

魚介類のヒスタミン，チラミン，カダベリン，テトラミンの S/N=3 による検出限界は，0.038～2.0 μg/g であった（表4）．これらのヒスタミン，チラミン，カダベリンの中毒時における含有量は，数百～数千 μg/g

の濃度になると考えられ[12,15]，またテトラミンは，エゾボラ属巻貝の唾液腺で数百～数千 μg/g，可食部で数十～数百 μg/g 含有されるという報告があり[20]，測定に十分な感度が得られたと考えられる．

表４　検出限界　（μg/g）

ムスカリン	ムシモール	イルージンS
0.0037	0.78	0.040
α-アマニチン	β-アマニチン	ファロイジン
0.14	0.068	0.025
ヒスタミン	カダベリン	チラミン
0.72	2.0	0.58
テトラミン	―	―
0.038	―	―

４　まとめ

１　キノコ中毒原因成分のうち，ツキヨタケのイルージン S，クサウラベニタケのムスカリン，テングダケのムシモール，ドクツルタケのα-アマニチン，β-アマニチン，ファロイジンについて，LC-MS/MS により迅速に分析出来る方法を検討した．また，魚介類の中毒成分であるヒスタミン，カダベリン，チラミン，テトラミンについても同様に，LC-MS/MS により迅速に分析出来る方法を検討した．

２　キノコ中毒成分は，1.5％(v/v)TFA／アセトニトリル（1：9）で抽出し，C18 ミニカラムに通して精製した．魚介類中毒成分は 1.5％(v/v)TFA／アセトニトリル（15：85）で抽出し，0.05％(v/v)TFA 含有 水／アセトニトリル（1：4）で 20 倍希釈した．

３　ムスカリン，ムシモール，ヒスタミン，カダベリン，チラミン，テトラミンは，ポリマーベースで両性イオン官能基のカラムを使用した HILIC により分析した．イルージン S，アマニチン，ファロイジンについては，C18 カラムを使用した RPC により分析した．

４　ムスカリン，ムスモール，α-アマニチン，β-アマニチン，ファロイジンは市販のブナシメジ，エリンギに，イルージン S は市販のシイタケにそれぞれ３試料ずつ添加し，平均回収率を求めたところ，エリンギのムシモールは 80％台であったが，他は 93.1％以上であった．また，ヒスタミン，カダベリン，チラミン，はキハダマグロ，シオサバに，テトラミンはアワビ，サザエにそれぞれ 3 試料ずつ添加し，平均回収率を求めたところ，97.5％以上であった．

５　2 種類のキノコ中毒成分と 4 種類の魚介類中毒成分については HILIC により，4 種類のキノコ中毒成分は RPC により迅速に LC-MS/MS で分析出来る方法を確立した．これにより，中毒発生時の迅速な行政対応に寄与できると考えられる．

謝　辞

貴重なイルージン S 標準物質を提供していただいた山形県衛生研究所の笠原義正先生に感謝します．

文　献

1) 厚生労働省，毒キノコによる食中毒等の発生状況，http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/syouhisya/101022-2.html

2) 登田美桃，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.

3) 伊藤光男，上田泰人，小島信彰，田中敏嗣：LC-ESI/MS･MS を用いたテトラミンの分析，神戸市環境保健研究所報，36，49-55，2008.

4) 竹田正美，清水降二，芹川俊彦，大西道代：エゾボラモドキによるテトラミン食中毒事例について，石川県保健環境センター研究年報，46，42-45，2009.

5) Wai-cheung Chung, Sau-ching Tso, Sai-tim Sze: Separation of Polar Mushroom Toxins by Mixed-Mode Hydrophilic and Ionic Interaction Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry, Journal of Chromatographic Science, 45, 104-111, 2007.

6) Koujun Tsunoda, Noriko Inoue, Yasuo Aoyagi, Tatsuyuki Sugahara: Simultaneous Analysis of Ibotenic Acid and Muscimol in Toxic Mushroom, *Amanita muscaria*, and Analytical Survey on Edible Mushrooms, 食品衛生学雑誌，34，12-17，1993.

7) Kenji Tsujikawa, Hiroyuki Mohri, Kenji Kuwayama, Hajime Miyaguchi, Yuko Iwata, Akinaga Gohda, Sunao Fukushima, Hiroyuki Inoue, Tohru Kishi: Analysis of hallucinogenic constituents in *Amanita* mushrooms circulated in Japan, Forensic Science International, 164, 172-178, 2006.

8) Kenji Tsujikawa, Kenji Kuwayama, Hajime Miyaguchi, Tatsuyuki Kanamori, Yuko Iwata, Hiroyuki Inoue, Takemi Yoshida, Tohru Kishi: Determination of muscimol and ibotenic acid in *Amanita* mushrooms by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B, 852, 430-435，2007.

9) 笠原義正，伊藤　健：LC/MS/MS によるツキヨタケおよび食中毒原因食品中の illudin S の分析，食品衛生学雑誌，50，167-172，2009.

10) 石原祐治，山浦由郎：毒きのこ中のアマニタトキ

シンの高速液体クロマトグラフィーによる迅速定量法，日本食品衛生学会学術講演要旨集，63，42-42，1992.
11) 寺田久屋，堀内春夫，阿部政夫，宮部正樹：調理食品中のアマニタトキシンの定量，名古屋市衛生研究所報，41，8-10，1995.
12) 日本薬学会編，衛生試験法・注解 2010，199-201，金原出版株式会社，2010.
13) 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：固相抽出を用いた食品中不揮発性アミン類分析法の検討，三重県保健環境研究所年報，14，41-45，2012.
14) 伊藤裕子，後藤智美，渡辺美奈恵，猪飼誉友，大島晴美，三上栄一：食品中の不揮発性アミン類の分析，全国衛生化学技術協議会年会講演集，46，148-149，2009.
15) 山本圭吾，木本聖子，森居京美，城山二郎：LC/MS/MS による魚介類中ヒスタミン分析法の検討，奈良県保健環境研究センター年報，44，53-57，2009.
16) 新藤哲也，牛山博文，観　公子，齋藤　寛，栗原康裕，上原真一，安田和男：イオンクロマトグラフィーによる巻貝（軟体動物）中テトラミンの分析及び調理による消長，食品衛生学雑誌，41，11-16，2000.
17) 四ノ宮美保，岩切良次：親水性相互作用クロマトグラフィーにおける極性農薬の保持挙動，環境化学，21，293-301，2011.
18) 吉田達成：親水性保持係数による HILIC 保持挙動の解析，Chromatography，29，7-15，2008.
19) 竹本常松，中島　正，横部哲朗：Tricholomic acid および Ibotenic acid の構造，天然有機化合物討論会講演要旨集，8，47-52，1964.
20) 新藤哲也，牛山博文，観　公子，齋藤　寛，栗原康裕，上原真一，安田和男：エゾバイ科巻貝（軟体動物）の唾液腺，可食部及び内臓中のテトラミン含有量，食品衛生学雑誌，41，17-22，2000.

Simultaneous Rapid Analysis of Toxins in Poisonous Mushrooms and Seafood by LC-MS/MS

Hiroyuki TADA, Tomiaki MINATANI, Erina KOHYAMA, Hiroshi KAWAMURA

Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan

Summary

Rapid analytical methods were developed to analyze 10 toxins in poisonous mushrooms and seafood. Muscarine, muscimol, illudin S, α-amanitin, β-amanitin and phalloidin in poisonous mushrooms were extracted with 30 mL of 1.5 %(v/v) trifluoroacetic acid－acetonitrile(1:9) from 5 g sample and the extract was diluted to 50 mL with the extractant. The solution was centrifuged and the supernatant was passed through a C18 mini-column. Histamine, cadaverine, tyramine and tetramine in seafood were extracted with 30 mL of 1.5 %(v/v) trifluoroacetic acid－acetonitrile (15:85) from 2 g sample and the extract was diluted to 50 mL with the extractant. The solution was centrifuged and the supernatant was diluted 20-fold with water-acetonitrile (1:4) which contained 0.05 %(v/v) trifluoroacetic acid. Muscarine, muscimol, histamine, cadaverine, tyramine and tetramine were analyzed by hydrophilic interaction liquid chromatography(HILIC) with ZIC-pHILIC and tandem mass spectrometry. Illudin S, α-amanitin, β-amanitin and phalloidin were analyzed by reversed phase liquid chromatography with an ODS column and tandem mass spectrometry. The detection limits (S/N=3) of 6 toxins in poisonous mushrooms were 0.0037-0.78 μg/g and those of 4 toxins in seafood were 0.038-2.0 μg/g.

Keywords: muscarine, muscimol, illudin S, amanitin, histamine, tetramine, LC-MS/MS