

## 9. ヒスタミンの定量法の検討

### Studies on the Determination of Histamine

鈴木 俊一 師尾 寿子\* 白石由美子  
岸 信夫 川越 章善 富所 謙吉

Shunichi Suzuki, Hisako Moroo, Yumiko Shiroishi,  
Nobuo Kishi, Fumiyoshi Kawagoe and  
Kenkichi Tomidokoro.

#### 1 緒 言

ヒスタミンはアレルギー様食中毒の原因の一つであり、遊離のヒスタジンを多量に含むサバ、サンマ、マグロ、イワシなどの魚が腐敗した際に生成される<sup>1)</sup>。その生成機構は *Proteus morgani* などの細菌が形成する脱炭酸酵素（ヒスタジנדカルボキシラーゼ）によって、ヒスタジンをヒスタミンと炭酸ガスとに分解する<sup>2)</sup>ということが明らかにされている。鮮度低下とともにヒスタミンは増加し、中毒量は食品 1 g 中 2 ~ 4 mg (2,000 ~ 4,000 ppm)<sup>3)</sup>とされているが、腐敗が進行すると 10 mg (10,000 ppm) まで達することがある。

衛生試験法に採用されているヒスタミンの定量法はろ紙クロマトグラフィー法<sup>3)</sup>であるが、半定量法であり、また操作に時間を要するという欠点がある。そこでわれわれは、比較的操作の簡易な河端法<sup>4)</sup>（イオン交換クロマトグラフィー法）に関して、日常検査にも適用できるよう発色時間とカラムについて検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

#### 2 実験方法

##### 2.1 装 置

分光光度計：日立 124 型

##### 2.2 試 薬

ヒスタミン標準液：二塩酸ヒスタミン 165.6 mg

\*札幌市豊平保健所

を水に溶かして 100 ml とする（遊離のヒスタミンとして 1,000 ppm）。

2 N 酢酸緩衝液 (pH 4.6)：酢酸 120 g と水酸化ナトリウム 40 g を水に溶かして 1 l とする。

0.2 N, 0.4 N 酢酸緩衝液 (pH 4.6)：2 N 酢酸緩衝液を水で 10 倍, 5 倍希釈する。

0.9% スルファニル酸溶液：スルファニル酸 0.9 g を 10% 塩酸に溶かし 100 ml とする。

展開液（ろ紙クロマトグラフィー用）：10% アンモニア水 100 ml と n-ブタノール 100 ml を分液ロートに取り、混合して一昼夜放置後、上層を使用する。

発色液（ろ紙クロマトグラフィー用）：スルファニル酸 0.25 g に 0.1 N 塩酸を加えて 50 ml とし、冷時これに 1% 亜硝酸ナトリウム溶液 50 ml をかき混ぜながら加える。

##### 2.3 イオン交換樹脂カラムの調製

Amberlite CG-50 (type 1) をビーカーに取り、5 倍量の 1 N 塩酸を加えて 10 ~ 20 分かく拌する。静置後上清を捨て、この操作を 2 ~ 3 回繰り返す。次に中性になるまで蒸留水で洗浄し、5 倍量の 0.2 N 酢酸緩衝液を加え緩衝化する。内径 1 cm のカラムに脱脂綿をつめ、活性化した樹脂を高さ 5.5 cm つめる。

##### 2.4 試験溶液の調製

細切した試料 10 g を乳鉢にとり、金剛砂約 5 g

を加えすりつぶす。水25mlを加え混合し、次に10%トリクロル酢酸(以下TCAと略す。)溶液25mlを加えてかき混ぜる。10分放置後、ろ紙(No. 5A)を用いてろ過する。

抽出液10mlを50mlビーカーにとり、10%水酸化ナトリウム溶液10~15滴加えてpH4.6(BCG試験紙)にする。これに0.4N酢酸緩衝液10mlを加えて混合し、カラムに注入する(流速2~3ml/分)。ビーカー、カラムの内壁を0.2N酢酸緩衝液で洗いながら合計180mlをカラムに通過させ、洗い落とす。次に20mlメスフラスコを受器にして、0.2N塩酸15mlでヒスタミンを溶出させる。溶出液は1.5N炭酸ナトリウム溶液20~25滴を加えpH7にし、水で20mlにメスアップする。

スルフェニル酸溶液と5%亜硝酸ナトリウム溶液を等量混合し氷冷しておき、20~30分後にそのうち2mlを1.1N炭酸ナトリウム溶液5mlのはいった共栓試験管に静かにのせるように注入する。1分後、カラム溶離液2mlを加え激しくふり混ぜて発色させ、正確に3分後カラム操作からのブランクを対照として、510m $\mu$ の波長で吸光度を測定する。

## 2.5 定量

ヒスタミン標準液を5%TCA溶液で希釈し10%水酸化ナトリウム溶液でpH7に修正、1~15ppm濃度にする。そのうち2mlをとり上記の方法で発色させ、検量線を作成、試験溶液の濃度を求める。

## 2.6 ろ紙クロマトグラフィーによる定量

衛生試験法による<sup>3)</sup>。

# 3. 実験結果

## 3.1 発色時間

ヒスタミン30 $\mu$ gをジアゾ試液で発色させ、吸光度の時間変化を測定した(図1)。

呈色は1~4分後まで最大かつ一定であり、5分後以降は徐々に退色している。したがって発色

時間は正確に3分と定めた。

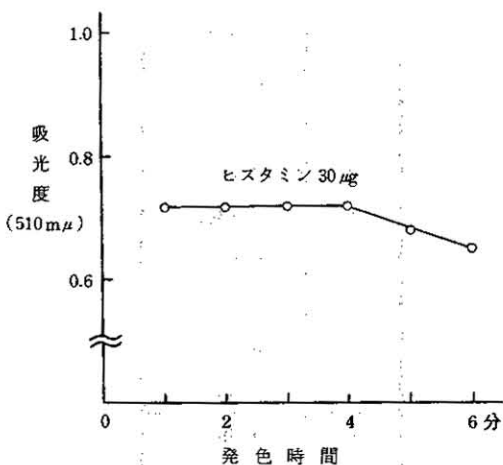


図1 ヒスタミンの発色時間変化

## 3.2 検量線

ヒスタミン0, 10, 20, 30 $\mu$ gを発色させ検量線を作成した(図2)。検量線は直線性を示したが、ややバラツキがみられ再現性も十分満足のゆくものではなかった(表1)。これはジアゾ反応の呈色物の不安定性によるものと思われるが、以後一つの試験溶液につき2度発色しその平均をとることにした。したがって検出限界は吸光度0.1とやや大きめにとり4 $\mu$ gとした。試料中に換算すると、20ppm(2mg/100g)であり、十分満足のゆくものであった。

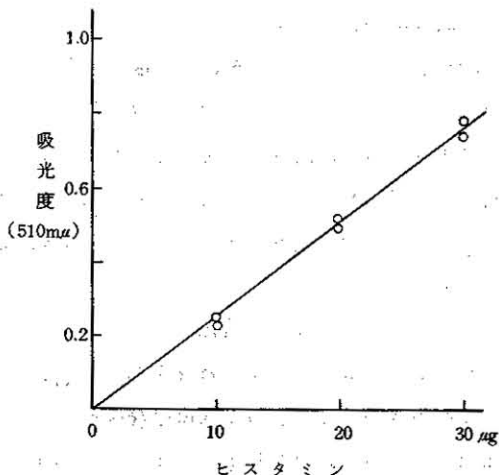


図2 ヒスタミンの検量線

表1 発色の再現性

	吸光度 (510 m $\mu$ )
1	0.703
2	0.718
3	0.704
4	0.730
5	0.697
6	0.617
7	0.686
8	0.682
$\bar{x}$	0.692
$\sigma$	0.0342
CV	0.049

ヒスタミン30  $\mu g$

### 3.3 イオン交換クロマトグラフィー

#### 3.3.1 ジアゾ反応陽性物質

ヒスタミン以外にジアゾ反応に陽性な物質は、魚肉中ではヒスチジン、チロシン、チラミン、トリプトファンがある。この中でヒスチジンを除く他の物質は、魚肉中では遊離の状態で存在している量が少ない。したがって妨害となるのはヒスチジンが主で、これを除去する酢酸緩衝液の量を検討した(図3)。魚肉2g中の遊離のヒスチジンは、最高20mg程度であるので、カラムにヒスチジン20mgを添加し、0.2N酢酸緩衝液を流して20mlずつのフラクションを取り発色させた。その結果ヒスチジンは140mlまでに洗い流されたので、緩衝液の量は余裕をみて180mlとした。なお、チロシン、チラミン、トリプトファンも完全に洗い流された。

#### 3.3.2 ヒスタミンの溶出

ヒスタミン5,000  $\mu g$  (検体中2,500 ppmに相当)をカラムに添加、0.2N酢酸緩衝液180mlを通過させた後、0.2N塩酸で溶出させた(図3)。0.2N塩酸15mlでヒスタミンはほとんど溶出し、

さらに10ml流した溶出液中には検出されなかった。また、0.2N酢酸緩衝液にはヒスタミンは検出されなかった。

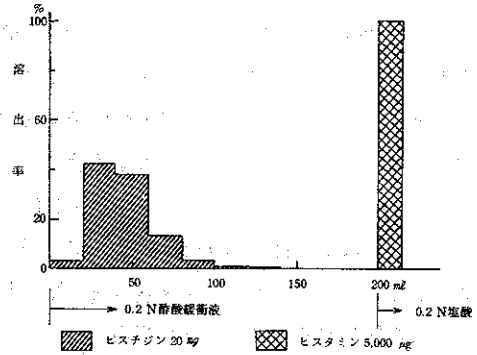


図3 ヒスチジンとヒスタミンの溶出

#### 3.3.3 カラムの交換容量

ヒスタミン30~10,000  $\mu g$ をカラムに添加し交換容量を調べた(図4)。10,000  $\mu g$ までの回収率は91~101%であり、かなりヒスタミンを含む魚でも対応できることがわかった。しかし、魚中5,000 ppm以上含有しカラム交換能力をこえる場合には、TCA抽出液10mlを2mlに減らしカラムに通過させることにした。これにより魚中25,000 ppmまでカラム交換ができる。

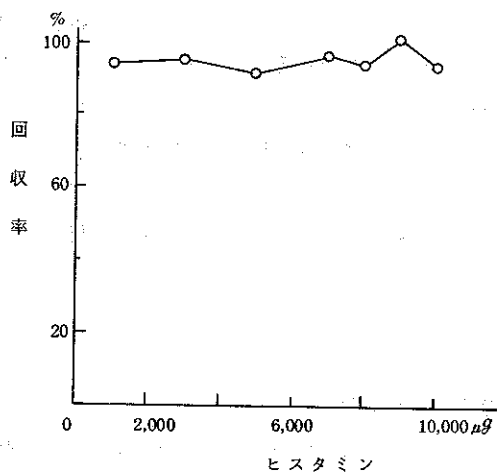


図4 カラムの交換容量

### 3.4 添加回収率

#### 3.4.1 さば

新鮮なさばを実験方法に従いカラムに通過させ、緩衝液20mlずつのフラクションを取ったが、前述のヒスタジン添加カラムと同じように140ml以後は発色物質がみられなかった。ヒスタミンは全く検出されず、このさばの抽出液にヒスタミン5,000  $\mu\text{g}$ 、10,000  $\mu\text{g}$ を添加、回収率はそれぞれ86%、96%であった。この結果、魚肉に対してもカラム交換容量は10,000  $\mu\text{g}$ まで問題なかった。

#### 3.4.2 カジキマグロ

新鮮なカジキマグロ(切身)にヒスタミン200  $\mu\text{g}$ 、2,000  $\mu\text{g}$ を添加し回収率を求めた(表2)。それぞれ平均99%、104%と良好な結果が得られた。

表2 添加回収率

添加量 ( $\mu\text{g}$ )	検出量 ( $\mu\text{g}$ )	回収率 (%)	平均 (%)
0	0	—	—
200	200	100	98.7 $\pm$ 2.3
	192	96	
2,000	200	100	104 $\pm$ 1.0
	2,100	105	
	2,060	103	
	2,080	104	

### 3.5 ろ紙クロマトグラフィーとの比較

新鮮なさばを3日間室温放置(15 $^{\circ}$ ~25 $^{\circ}$ )してかなりの腐敗臭を有するものを、イオン交換クロマトグラフィーとろ紙クロマトグラフィーで測定した。前者では3,200 ppm、後者では2,500~5,000 ppmであった。

## 4 考 察

河端らは、ジアゾ反応の呈色が4~5分後に最高に達し、このため比色定量は5分と決めて測定しているが、われわれが行ったところ1~4分後

に最大となり、5分後にはすでに呈色の度合が減少した。したがって発色時間を3分と定め測定することにした。

また河端法によると、カラムクロマトグラフィーの際にカラム内径8mm、樹脂の高さ5.5cmでヒスタミン以外のジアゾ反応陽性物質を洗い流す量に80ml、ヒスタミン溶出に8mlを要し、ヒスタミンの交換容量は7,000  $\mu\text{g}$ である。われわれはカラムの内径を1cmに変えたことにより、洗浄に180ml、ヒスタミンの溶出に15mlと流出量が増えたが、交換容量は10,000  $\mu\text{g}$ となり比較的ヒスタミン含量の多い試料にも対応できた。

衛生試験法のヒスタミンの定量はろ紙クロマトグラフィー法であるが、半定量法であること、検液を適当な濃度に希釈しそのつど円形ろ紙で展開するため時間がかかるということなどから、イオン交換クロマトグラフィー法のほうがよりすぐれている方法と思われる。ただし、呈色物の不安定性によるバラツキに関しては今後検討の余地があると考えられる。

## 5 結 語

イオン交換樹脂によるヒスタミンの定量法に検討を加え、若干の知見を得た。

(1) 呈色は1~4分後に最大となり、5分後ではすでに退色しているため、発色時間を正確に3分とした。

(2) カラムの内径を8mmから1cmに変えたことにより、交換容量は7,000  $\mu\text{g}$ から10,000  $\mu\text{g}$ と増え、かつ魚肉への回収率は99%、104%と良好な結果が得られた。

(3) 半定量法であるろ紙クロマトグラフィー法に比べ、操作は簡便であり、正確に定量ができ、よりすぐれた方法と思われる。

## 6 文 献

- 1) 土屋靖彦：「水産化学（水産学全集17）」：121，（1962），恒星社厚生閣
- 2) 寺田安一：「腐敗中毒」. 27，（1971），建帛社
- 3) 日本薬学会編：「衛生試験法注解」：88，（1973），金原出版
- 4) 河端俊治，内田大，赤野多恵子：日水誌. 26，1183，（1960）