

キャピラリー電気泳動による魚介類中の ヒスタミン及びヒスチジンの迅速分析について

江頭 勝¹・中嶋昌徳¹

Rapid Analysis of Histamine and Histidine in Fish using Capillary Electrophoresis

Masaru EGASHIRA and Masanori NAKASHIMA

要 旨

キャピラリー電気泳動(CE)によるヒスタミン及びヒスチジンの同時分析法を検討した。

抽出はトリクロロ酢酸溶液で行い、最適濃度は3%であった。

10ppmのヒスタミン及びヒスチジン標準溶液を測定したときの移動時間とピーク面積の相対標準偏差(RSD)(n=5)はヒスタミンが0.17%, 0.96%, ヒスチジンは0.31%, 1.02%と再現性は良好であった。

両者とも10～1000ppmの間で濃度とピーク面積の間の相関係数は0.999以上で、良好な直線性が得られた。ひらめ5gにヒスタミン、ヒスチジン各0.5mg, 5mg添加したときの回収率はヒスタミンが105%, 103%, ヒスチジンが103%, 101%であった。

また本法で30種類の魚についてヒスタミン及びヒスチジンを測定した。

Key Words: ヒスタミン Histamine, ヒスチジン Histidine, キャピラリー電気泳動 Capillary electrophoresis, トリクロロ酢酸 Trichloroacetic Acid, 魚 Fish, アレルギー Allergy, 食中毒 food poisoning, 不揮発性アミン non-volatile amine

I はじめに

魚が原因となって起こるアレルギー様食中毒は不揮発性腐敗アミンの一種であるヒスタミンが原因物質の一つであることが知られており、ヒスタミンは赤身の魚等に含まれる遊離ヒスチジンが *Morganella* などの細菌の脱炭酸酵素によりヒスタミンに代謝され、更にアンモニアへと分解されていく¹⁾。このため、ヒスタミンに起因する食中毒の原因を究明する場合、ヒスタミンだけでなく、ヒスチジン、アンモニアを測定することが必要となる。

ヒスタミンの測定には従来トリクロロ酢酸(以下TCA)溶液で抽出、pH調整後、イオン交換樹脂カラムで精製し、再びpH調整し、誘導体化した後高速液体クロマトグラフで測定する方法が用いられている¹⁻⁵⁾。この方法は操作が煩雑で検査に長時間を要するため、近年EIA(Enzyme Immuno Assay)法による短時間処理法が普及しつつある。しかし、大掛かりな設備がいらないと

いう利点はあるが、それでも短時間法で3時間はかかる⁶⁾。そこで別報でキャピラリー電気泳動(以下CEという)を用いたヒスタミンの迅速分析法を紹介したが⁷⁾、今回はCEによりヒスタミンとヒスチジンを迅速に同時分析する方法を検討したので報告する。

II 方法

1 試 薬

ヒスタミン標準品及びヒスチジン標準品：和光純薬工業(株)製特級

ヒスタミン、ヒスチジン標準溶液：ヒスタミン及びヒスチジン標準品50mgを3%TCAで50mlに定容して標準原液とし、適宜、3%TCAで希釈して標準溶液とした。

TCA、ほう酸、炭酸カリウム、硫酸、水酸化ナトリウム：市販の特級試薬を使用した。

2 装 置

キャピラリー電気泳動(CE)装置：ヒューレット・パッ

1.福岡市保健環境研究所 理化学課

カード社製, HP-3D CEシステムG1600(フォトダイオード
アレイ検出器付)
分光光度計: 島津製作所製, UV-240

3 CE測定条件

カラム: フェーズドシリカ(75 μ m i.d.×有効長 56cm,
全長 64.5cm),
泳動液: 0.05mol/l リン酸緩衝液 pH2.5,
電圧 30kV(Positive),
キャピラリー温度: 20℃,
試料注入量: 20000Pa·s(加圧),
分離モード: キャピラリーゾーン電気泳動
検出波長: 210nm
キャピラリーのコンディショニング: 試料注入ごとに泳
動液で5分間フラッシング

4 検査方法

試料 5g に 3%TCA20ml を加えホモジナイズし,
3%TCA で全量を 50ml に定容し, 遠心分離後 5A ろ紙で
ろ過し, ろ液を試料とした.

1) ヒスタミン及びヒスチジン

試料を 0.2 μ m ディスポーザブルフィルターでろ過し,
ろ液を CE で測定した.

2) アンモニア

試料を 1mol/l 水酸化ナトリウムで pH11 に調整し, イ
ンドフェノール青法²⁾ で比色定量した.

5 試料

1) 経日変化調査用試料

福岡市中央卸売市場に入荷した直後の 22 種類の鮮魚を
-30℃ で冷凍保存後解凍してヒスタミン, ヒスチジン及
びアンモニアを測定した.

III 結果と考察

1 CEによるヒスタミン, ヒスチジンの定量

1) 抽出液のTCA濃度の検討

別報ではヒスタミンを抽出するときタンパク質の影響
を除去するために 5%TCA 溶液で抽出を行ったが, CE
で測定する際に低濃度におけるヒスチジンのピーク形状
が悪くなるため, TCA 濃度を変化させて最適濃度を求
めた.

同一のウルメイワシのミンチを TCA 濃度を変えて測
定したところ図 1 に示すように, 3%以上で回収率がよ
かった. しかし, 図 2 に示すようにピーク形状は 2%以
下がよいが, 1%及び魚種によっては 2%でも除タンパク
効果が不十分で, 遠心分離しても完全に沈殿せず, 5A

ろ紙, ディスポーザブルフィルターによるろ過が困難な
場合があった. よって, 抽出は 3%TCA 溶液で行うこと
とした.

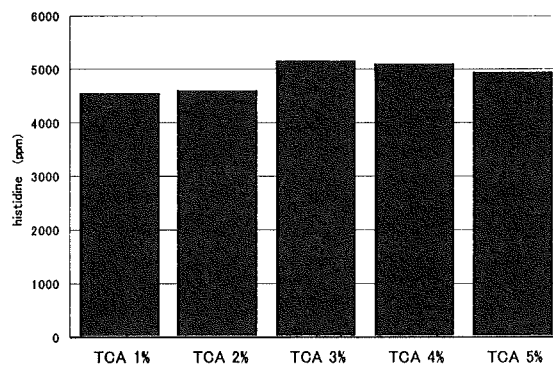


図1. 抽出液のTCA濃度別のヒスチジン測定結果
(同一のうるめいわしミンチを測定)

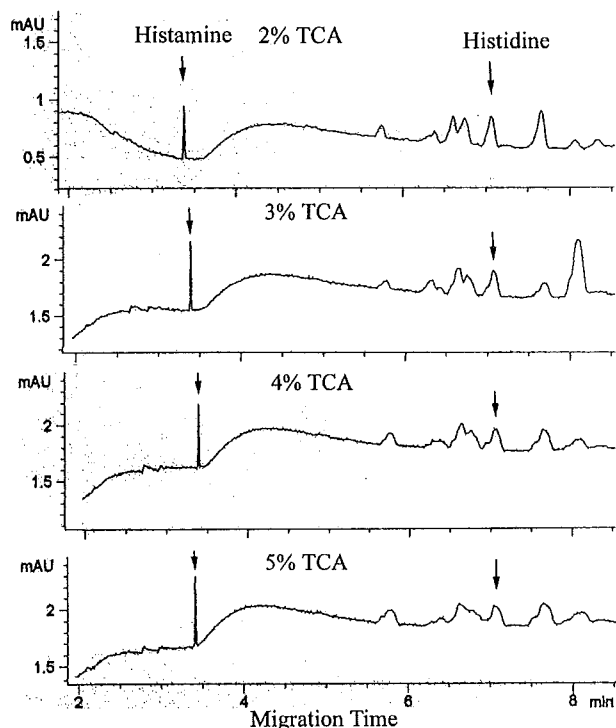


図2. 低濃度の場合の抽出液のTCA濃度によるピーク形状
への影響

2) 移動時間とピーク面積の再現性

10ppm のヒスタミン, ヒスチジン標準溶液を 5 回繰
り返し測定し, キャピラリー電気泳動法での移動時間と
ピーク面積の再現性を調べた.

表 1 に結果を示す. 移動時間の相対標準偏差(RSD)は
ヒスタミン 0.17%, ヒスチジン 0.31%で, ピーク面積の
RSD はヒスタミン 0.96%, ヒスチジン 1.02%で何れも再
現性は良好であった.

表1 10ppm のヒスタミン, ヒスチジン標準液を繰り返し測定したときの移動時間とピーク面積のRSD (n=5)

	RSD (%)	
	移動時間	ピーク面積
ヒスタミン	0.17	0.96
ヒスチジン	0.31	1.02

3) 定量範囲

次に本法でのヒスタミンとヒスチジンの直線性を調べた。各濃度とピーク面積の関係を図3, 図4に示す。ヒスタミン, ヒスチジンともに濃度 5 ~ 1000ppm の範囲でピーク面積との相関係数は 0.999 以上であり, 良好な直線関係が得られた。

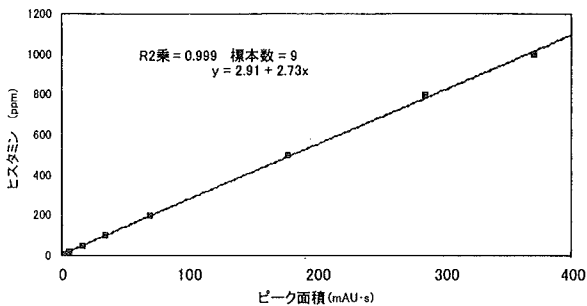


図3 ヒスタミン濃度とピーク面積の関係

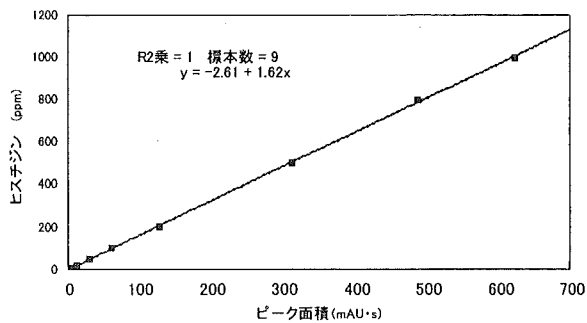


図4 ヒスチジン濃度とピーク面積の関係

5ppm 以上の濃度であれば吸収スペクトルによる定性確認ができるため, 定量下限値は試料濃度で 50ppm とした。図5にヒスタミン及びヒスチジンの吸収スペクトルを示す。

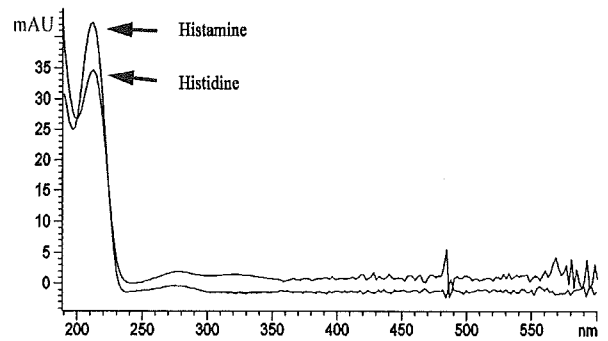


図5 ヒスタミン及びヒスチジンの吸収スペクトル

2 ヒスタミン及びヒスチジンの回収率の検討

ひらめ 5g にヒスタミン及びヒスチジンをそれぞれ 0.5mg, 5mg 添加し, 回収率と相対標準偏差を求めた。表2に示すように結果はヒスタミン及びヒスチジンともに良好であった。

表2 ひらめにヒスタミン及びヒスチジンをそれぞれ 0.5,5mg 添加したときの回収率と相対標準偏差 (n=5)

項目	添加量 (mg)	回収率	RSD
		(%)	(%)
ヒスタミン	0.5	105	5.2
	5	103	2.1
ヒスチジン	0.5	103	3.5
	5	101	2.7

3 鮮魚のヒスタミン, ヒスチジン及びアンモニア濃度の調査

本法によって各魚種でヒスタミン, ヒスチジンを測定し, 今後ヒスタミンによるアレルギー性食中毒発生防止の資料とするために, 表3に示すヒスタミンによるアレルギー性食中毒の危険度一覧表を作成した。

今回調査した 30 種全ての魚種でヒスタミンの測定を妨害するピークは見られなかった。

またアンモニア性窒素は 20 ~ 160ppm で鮮度は全て良好であり, 何れの魚からもヒスタミンは検出されなかった。

ヒスチジンの濃度が最も高かったのはブリで, マアジまでの上位 12 種の魚はヒスチジンを 4,000ppm 以上含有しており, 食中毒を起こす可能性が高いと考えられた。また, サヨリからカイワリのヒスチジン濃度は 2200 ~ 1900ppm であり, 食中毒を引き起こす可能性は比較的低く, マダイ以下の 15 種の魚はヒスチジン濃度が 500ppm 以下で食中毒の危険性はほとんどないと考えられた。

表3 魚種別のヒスタミン、ヒスチジン、アンモニア性窒素濃度

魚種	ヒスタミン (ppm)	ヒスチジン (ppm)	アンモニア性窒素 (ppm)
ブリ	(-)	15,000	40
サンマ	(-)	11,000	30
食キハダマグロ	(-)	10,000	17
中ホンマグロ	(-)	10,000	100
毒マイワシ	(-)	9,100	70
のムロアジ	(-)	8,700	60
危ウルメイワシ	(-)	7,400	80
険シマアジ	(-)	7,000	20
性マサバ	(-)	6,500	70
有カタクチイワシ	(-)	6,100	50
りトビウオ	(-)	5,700	82
マアジ	(-)	4,300	80
サヨリ	(-)	2,200	47
ヒラス	(-)	2,000	92
カイワリ	(-)	1,900	80
マダイ	(-)	430	87
オキエソ	(-)	420	120
食マアナゴ	(-)	240	100
中イトフエフキ	(-)	200	140
毒ホウボウ	(-)	150	86
のダツ	(-)	100	100
危ハリセンボン	(-)	93	58
険トビエイ	(-)	62	39
性コチ	(-)	(-)	59
無ゴマフグ	(-)	(-)	61
シイサキ	(-)	(-)	160
ヒラメ	(-)	(-)	70
チダイ	(-)	(-)	100
ヤリイカ	(-)	(-)	9
ウマヅラハギ	(-)	(-)	140

(-) : < 50ppm

IVま と め

キャピラリー電気泳動法によるヒスタミンとヒスチジンの同時分析を検討し、抽出は3%TCAが最適であった。

移動時間のRSDはヒスタミンは0.17%、ヒスチジンは0.31%で、ピーク面積のRSDはヒスタミン0.96%、ヒスチジン1.02%で何れも再現性は良好であった。

直線性については5ppm～1,000ppmの範囲でヒスタミン、ヒスチジンともにピーク面積との相関係数は0.999以上であり、良好な直線関係が得られた。

ひらめ5gに0.5mg及び5mg添加したときの回収率はヒスタミンが105%,103%、ヒスチジンが103%,101%、RSDはヒスタミンが5.2%,2.1%、ヒスチジンが3.5%,2.7%で良好であった。

また30魚種のヒスタミン、ヒスチジン及びアンモニアの濃度を調査したところ、赤身の魚はヒスタミン食中毒を起こす可能性が高く、自身の魚は食中毒を起こす可能性が低いことが確認された。

文 献

- 1) 吉田綾子, 中村彰夫: 食衛誌, 23(4) 339-343(1982)
- 2) 日本薬学会編” 衛生試験法・注解 1990 付・追補”(1995), 金原出版(東京), 1995, p.285-288
- 3) 厚生省生活衛生局監修” 食品衛生検査指針理化学編” 東京, 日本食品衛生協会, 1991, p.276-279
- 4) 食品産業戦略研究所編” 食品の腐敗変敗防止対策ハンドブック” 東京, サイエンスフォーラム社, 1996, p.62
- 5) 玉瀬喜久雄, 北田善三, 溝渕磨彦, 佐々木美智子: 食衛誌, 25(6), 525-529(1984)
- 6) ” 食品と開発 ” 東京, (株) 健康産業新聞社, vol.35, No.2, p12-14(2000)
- 7) 中嶋昌徳, 杉山明子: 食衛誌, 40(4), 285-290(1999)