

魚肉中のヒスタミンの定量並びにその改良の検討

竹内伊公子・長田 博光

Modified Colorimetric Determination of Histamine in Marine Products

Ikuko Takeuchi and Hiromitsu Osada

Recently, an analytical data of histamine in canned tuna was reported to be different among the Kawabata's, AOAC's colorimetric and fluorometric methods. Therefore, a simple, sensitive and reliable method to determine histamine in marine products is necessary.

FDA recommends the fluorometric method as the reliable and best means to determine histamine in canned foods.

Histamine in exportable canned tuna in brine was practically determined by the three above mentioned methods. The value obtained by the fluorometric method was fully satisfactory to meet the FDA's safety guide line (1 mg%), whereas the value obtained by the Kawabata's method was above the FDA's safety guide line.

It seems that the cause of the high value usually obtained by the Kawabata's method is due to the existence of substances disturbing the diazo reaction. Those are not thoroughly eliminated by the single treatment with the cation exchange resin. After those are eliminated by the treatment with the anion and cation exchange resins, histamine can be determined either by the AOAC's colorimetric or fluorometric method, but the value was not coincident thoroughly.

ヒスタミンは、マグロ、カツオ、サバ、イワシなどの赤身魚に多く含まれる遊離のヒスチジンからモルガン菌などの脱炭酸酵素作用によって生成する。これを多量に摂取すると、じん麻疹、脈博昂進、頭痛などの食餌性アレルギーに似た症状のアレルギー様食中毒をひきおこす。

近年、米国でおきたヒスタミン中毒事件以降、FDAはマグロ缶の輸入に対して、ヒスタミン含量で規制しようとしている。その安全基準は、1 mg%とも云われ、ヒスタミンの測定方法として、AOACの蛍光分析法を推奨している。

ヒスタミンの定量法としては、従来、河端法¹⁾、AOACの比色法²⁾、AOACの蛍光分析法³⁾、高速液体クロマトグラフィーによる方法^{4),5)}などがあるが、最近、Lerkeら⁶⁾が指摘している様に、定量方法の違いによる測定値のバラツキが大きな問題になり、簡便でかつ精度がよくて信頼性の高い測定方法が望まれる。

本報では、河端法、AOACの比色法及び蛍光分析法で、輸出用マグロ水煮缶詰中のヒスタミン含量を測定し、これらの値がFDAの安全基準(1 mg%)に抵触するか否かを調べた。

次に、河端法で測定した値が一様に高い値を示したので、その原因を究明し、定量法の改良を試みた。

実験方法

1. 試料

輸出用マグロ水煮缶詰（キハダ及びビンチョウ）を試料とした。市販缶詰として、マグロ味付、カツオ味付及びサケ水煮缶詰を試料とした。

2. 分析方法

ヒスタミンは、河端法¹⁾、AOACの比色法²⁾、蛍光分析法³⁾及び改良法に従って測定した。

河端法：7%トリクロル酢酸（TCA）で、魚肉中のヒスタミンを抽出し、これをカチオン交換樹脂（Amberlite CG50W×8）で処理し、0.1N塩酸で溶出後、ジアゾ反応によって発色、日立分光光度計（510 nm）で測定した。

蛍光分析法：メタノールで魚肉中のヒスタミンを抽出し、これをアニオン交換樹脂（Bio-Rad AG1×8）で処理し、得られた流出液の得られた流出液の蛍光強度を島津分光光度計（Em 444 nm, Ex 350 nm）で測定した。

改良法：メタノールで魚肉中のヒスタミンを抽出し、これをAG1×8で処理後、さらにCG50W×8で処理し、0.1N塩酸の抽出液について、ジアゾ発色し、日立分光光度計（510 nm）で測定した。

3. CG50W×8で処理、溶出区分の蛍光分析によるヒスタミン含量

魚肉の7%TCAによるヒスタミン抽出液を、CG50W×8で処理し、0.1N塩酸で溶出した区分を蛍光分析により、ヒスタミン含量を測定した。

4. AG1×8並びにCG50W×8で処理、溶出区分のヒスタミン含量

魚肉のメタノールによるヒスタミン抽出液を、AG1×8で処理し、得られた流出液をさらにCG50W×8で処理し、0.1N塩酸で溶出した区分のヒスタミン含量をジアゾ反応により比色定量した。

5. シリカゲル薄層クロマトグラフィー（TLC）による、溶出区分（CG50W×8処理）及び流出区分（AG1×8処理）中のジアゾ反応陽性物質のクロマトグラム

TCA及びメタノールによる魚肉中のヒスタミン抽出液をCG50W×8及びAG1×8で処理し、得られた溶出区分及び流出区分、またAG1×8で処理後、さらにCG50W×8で処理し、0.1N塩酸の溶出区分それぞれをTLC（シリカゲル60, TLCプレート5748）にかけ、10%アンモニア水で飽和した*n*-ブタノールで展開し、ニンヒドリン及びジアゾ試薬で発色し、アミン類の定性を行った。

実験結果及び考察

Table 1. Histamine content in exportable canned tuna.

| Sample | Kawabata's method (mg%) | Colorimetric method (mg%) | Fluorometric method (mg%) |
|--------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 5.54 | 0.95 | 0.12 |
| 2 | 5.42 | 0.45 | 0.13 |
| 3 | 5.97 | 0.6 | 0.16 |
| 4 | 4.86 | 0.75 | 0.16 |
| 5 | 5.48 | 1.05 | 0.15 |
| 6 | 3.60 | 0.85 | 0.11 |
| 7 | 3.13 | 0.7 | 0.1 |
| 8 | 3.15 | 0.1 | 0.12 |
| 9 | 6.25 | 0.95 | 0.11 |
| 10 | 5.54 | 1.5 | 0.09 |

1. 3法による輸出用マグロ水煮缶詰中のヒスタミン含量

輸出用マグロ缶詰のヒスタミン含量を表1に示した。ヒスタミン含量は、蛍光分析法では0.09~0.16mg%, 比色法では0.1~1.5mg%, 河端法では3.13~6.25mg%を示し、特に河端法で測定した値は一様に高い値を示した。

蛍光分析法で測定した場合、輸出用マグロ水煮缶詰のヒスタミン含量は、FDAの安全基準(1mg%)に抵触することなく、十分に低い値を示した。

河端法による測定値が、比色法及び蛍光分析法にくらべて高い値を示したのは、TCAによる魚肉中のヒスタミン抽出液をCG50W×8で処理した場合、ジアゾ反応陽性のヒスタミン以外のアミン様物質が十分に除去されないで、0.1N塩酸で溶出した区分にそれらが混在したためと考えられる。

2. TCA及びメタノールによるヒスタミン抽出液のTLC

TCA及びメタノール抽出液のTLCの結果は、図1に示した通りである。メタノール抽出液では、ヒスタジン(Rf値0.03)及びヒスタミン(Rf値0.34)のスポット以外に、ジアゾ反応陽性でRf値0.11及び0.68を有する2つのスポットが認められた。TCA抽出液では、ヒスタミン以外にジアゾ反応陽性でRf値0.11を有するスポットが認められた。

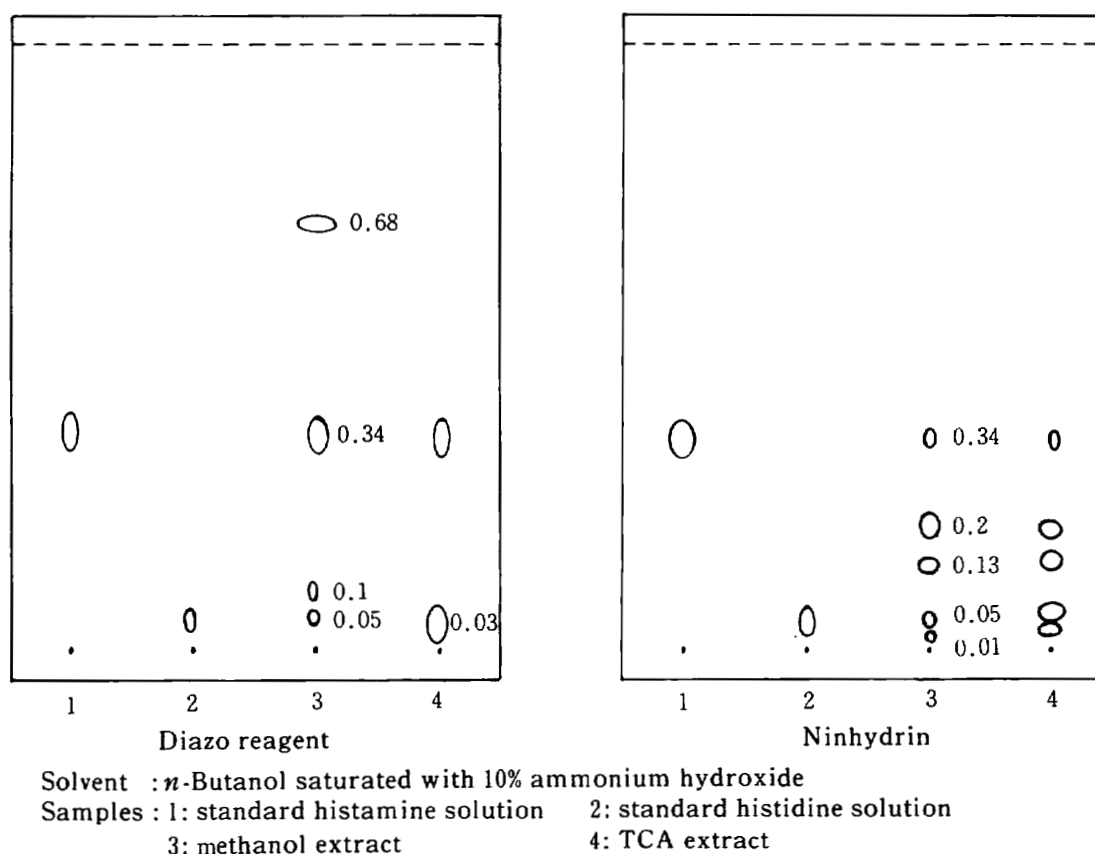
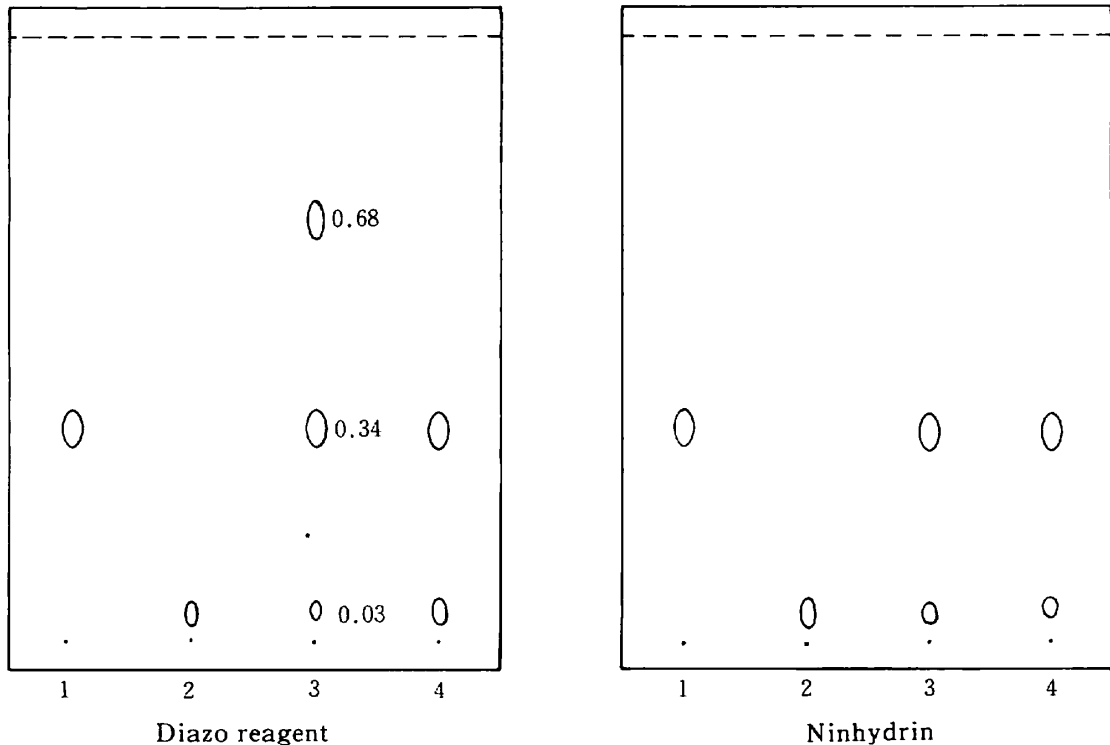


Fig.1. Silica gel thin layer chromatograms of the methanol and TCA extracts.

3. CG50W×8及びAG1×8で処理、溶出区分及び流出区分のTLC

溶出区分及び流出区分それぞれのTLCは、図2に示した通りである。溶出区分では、ヒスタミン以外にジアゾ反応陽性でRf値0.03を有するスポットを、流出区分では、Rf値0.03, 0.11及び

0.68を有するスポットが認められた。



Solvent : *n*-Butanol saturated with 10% ammonium hydroxide
 Samples: 1: standard histamine solution 2: standard histidine solution
 3: the effluent of the anion exchanger 4: the eluate of the cation exchanger

Fig.2. Silica gel thin layer chromatograms of the eluate of the cation exchanger treatment and the effluent from the anion exchanger treatment.

4. CG50W×8で処理，溶出区分の蛍光分析によるヒスタミン含量

表2に示した様に，TCA抽出液をCG50W×8で処理し，溶出区分のヒスタミン含量を蛍光分析で測定した結果，0.11～0.24mg%であった。一方，AG1×8で処理し，得られた流出区分を蛍光分析で測定したヒスタミン含量は，0.099～0.16mg%を示し，ほとんど同様の値が得られた。

また，CG50W×8及びAG1×8で処理し，得られた溶出区分及び流出区分共に，TLC上にジアゾ反応陽性でRf値0.03，0.11及び0.68を有するス

Table 2. Comparison of analytical values of histamine in canned mackerel after the treatment with the cation and anion exchange resins.

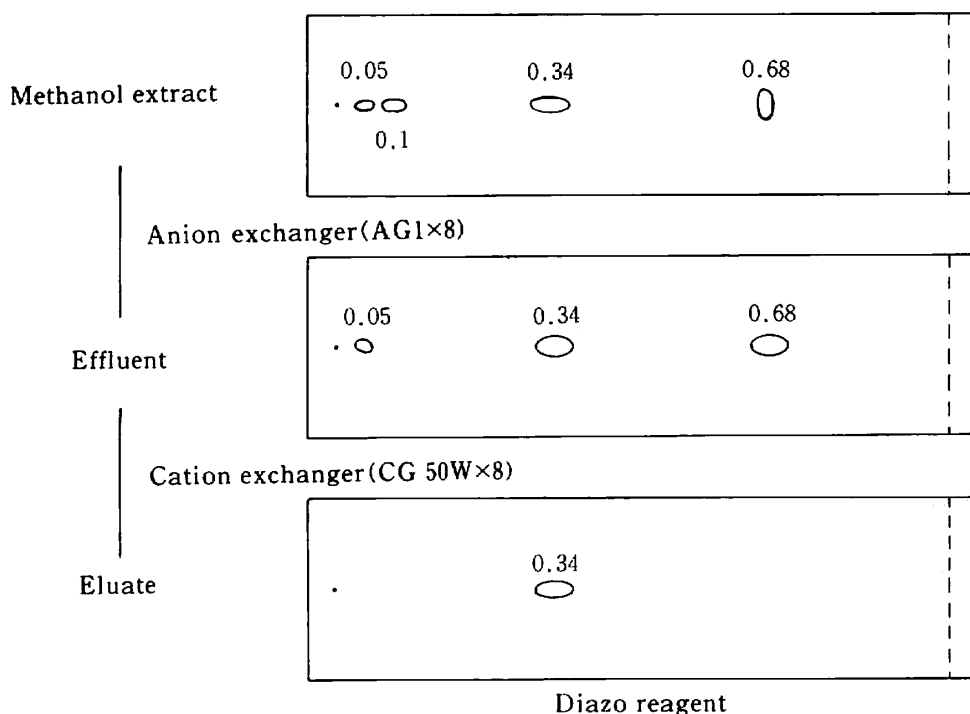
| Sample | Cation exchange resin (CG 50W×8,mg%) | Anion exchange resin (AG 1×8,mg%) |
|--------|---|--------------------------------------|
| 1 | 0.19 | 0.12 |
| 2 | 0.16 | 0.13 |
| 3 | 0.24 | 0.16 |
| 4 | 0.2 | 0.16 |
| 5 | 0.16 | 0.15 |
| 6 | 0.11 | 0.11 |
| 7 | 0.14 | 0.1 |
| 8 | 0.16 | 0.12 |
| 9 | 0.18 | 0.11 |
| 10 | 0.16 | 0.09 |

(Histamine was determined by the fluorometric method.)

ポットを示した。これらはジアゾ反応による比色定量では妨害物質だが，O-フタルアルデヒド試薬

による蛍光物質を生成せず蛍光分析による測定値が、比色分析による測定値よりも低い値を示したと考えられる。

5. ヒスタミン定量における妨害物質の除去



Solvent : n-Butanol saturated with 10% ammonium hydroxide

Fig.3. Elimination of substances disturbing the diazo reaction.

メタノール抽出液を、AG1×8、さらにCG50W×8で処理した場合のTLCを図3に示した。メタノール抽出液では、4つのジアゾ反応陽性のスポットを示したが、まず、AG1×8処理後では、3つのスポットを示し、さらにCG50W×8処理では、単一のスポット（Rf値 0.34）を示した。これは標品のヒスタミンのRf値に一致した。

6. AG1×8、さらにCG50W×8で処理、溶出区分のヒスタミン含量

AG1×8、さらにCG50W×8で処理し、ヒスタミン以外のジアゾ反応陽性物質を除去した区分のヒスタミン含量を、ジアゾ反応により比色定量し、その結果を表3に示した。ヒスタミン含量は、河端法で測定して得られた値3.3 mg%に対して、

ヒスタミン以外のジアゾ反応陽性物質を除去した後では、得られた値は1.7 mg%であった。また、蛍光分析による測定値は、1.4 mg%とより低い値を示した。

このことは、河端法で測定した値が一般に高い値を示すのは、ジアゾ反応陽性のヒスタミン以外のアミン様物質が検液中に混在するためと考えられたが、これらの妨害物質の除去にもかかわらず、比色分析では十分に低い値を示すには到らなかったもので、別の何らかの要因があるものと考えられる。

Table 3. Histamine content of the effluent of anion exchange resin and the eluate of cation exchange resin by the fluorometric and diazo colorimetric methods.

| Sample | Fluorometric method (mg%) | Colorimetric method (mg%) |
|----------|---------------------------|---------------------------|
| Effluent | 1.5 | 3.3 |
| Eluate | 1.4 | 1.7 |

7. 市販缶詰及び生サバ肉のヒスタミン含量

市販のマグロ味付、カツオ味付、サケ水煮缶詰及び生サバ肉を試料とし、メタノールによるヒスタミン抽出液を、AG1×8、さらにCG50W×8で処理し、妨害物質のアミン様物質を除去した後、ジアゾ反応によりヒスタミン含量を比色定量した結果を、表4に示した。これらの値は、従来

Table 4. Comparison with histamine content by Kawabata's, AOAC's fluorometric and modified colorimetric methods.

| Sample | Kawabata's method (mg%) | Fluorometric method (mg%) | Modified method (mg%) |
|--------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | 7.1 | 1.61 | 3.5 |
| 2 | 12.18 | 0.09 | 2 |
| 3 | 1.59 | 0.02 | 1.3 |
| 4 | 1.8 | 0.05 | 0.8 |

- 1 : Seasoned tuna
 2 : Seasoned skipjack
 3 : Boiled salmon
 4 : Mackerel flesh(raw)

の河端法で測定した値よりも20~84%の低い値を示したが、蛍光分析法による測定値に十分に一致するには到らなかった。

要 約

1. 輸出用マグロ水煮缶詰のヒスタミン含量を調べた。3定量方法でその値を比較した結果、測定値に大きな差がみられ、AOACの蛍光分析法による測定値は全体に低い値を示し、河端法による測定値は一般に高い値を示した。
2. 蛍光分析法で測定した値は、十分に低い値を示し、FDAの安全基準(1mg%)に抵触するものではなかった。
3. AG1×8、さらにCG50W×8で処理し、ヒスタミン以外のジアゾ反応陽性のアミン様妨害物質を除去し、蛍光分析及び比色分析でヒスタミン含量を測定し、比較したが、両分析による測定値は充分には一致しなかった。

文 献

- 1) Kawabata, T., Uchida, Y. and Akano, T.: Jap. Soc. Sci. Fish., 26, 1183(1960).
- 2) AOAC, 316(1975).
- 3) AOAC, 296(1980).
- 4) Turuta, Y., Kohashi, K. and Ohkura, Y.: J. Chromatogr., 146, 490(1978).
- 5) Seiler, N. and Knodgen, B.: J. Chromatogr., 221, 227(1980).
- 6) Lerke, P.A. and Laurence, D.B.: J. Food Sci., 41, 1282(1976).