

【資料】

## キャピラリー電気泳動法による 魚肉中ヒスタミン及びチラミンの迅速分析

武 志保, 劔持堅志, 難波順子, 今中雅章 (衛生化学科)

[キーワード: キャピラリー電気泳動, ヒスタミン, チラミン, アレルギー様食中毒]

### 1 はじめに

ヒスタミンはアレルギー様食中毒の原因物質であり、魚介類などの食品の腐敗の目安に使われる。ヒスタミンは必須アミノ酸であるヒスチジンがモルガン菌などのヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌により分解されて生じるもので、サバ、マグロ等の赤身魚にヒスチジンは多く含まれているため<sup>1)</sup>、赤身魚がアレルギー様食中毒の原因物質であることが多い。毎年、ヒスタミン起因の集団食中毒が日本全国で発生していて、最近週刊誌アエラ紙上<sup>2)</sup>でも取り上げられ話題となっている。アレルギー様食中毒は潜伏期が短く、80%以上が摂取後数分から1時間以内で発症し、顔面紅潮、じんま疹、動悸、吐き気、嘔吐、下痢、腹痛、頭痛、低血圧等の症状が出る。多くの場合は、24時間以内に快方に向かい、死亡例は一例も確認されていない<sup>3)~6)</sup>。

我が国では食品中のヒスタミンに関する法的規制は現在のところないが、欧米では規制値が取り決められている。「対 EU 輸出水産食品の取扱い」(平成7年7月5日衛乳第110号)では、サバ科及びニシン科の魚種について100 mg/kg と定めている。また、食中毒は100 mg/100 g で起こるとされている<sup>8)</sup>。

また、ヒスタミンと同様にアレルギー様食中毒の症状を起こすものとしてチラミン等がある<sup>7)</sup>。

ヒスタミン、チラミンは高速液体クロマトグラフィで測定する方法<sup>8,9)</sup>がよく知られているが操作方法が非常に煩雑である。そのため、今回はキャピラリー電気泳動装置<sup>9)</sup>を用いてヒスタミンとチラミンの迅速な同時分析法を検討した。更に UV スペクトル測定による同定法についても併せて報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 試料

岡山県内で販売されている魚介類を用いた。

#### 2.2 試薬及び標準液

ヒスタミン標準液: 試薬特級品を蒸留水に溶解して1,000 mg/L 標準溶液とした。

チラミン標準液: 試薬特級品を蒸留水に溶解して1,000 mg/L 標準溶液とした。

0.05 mol/L リン酸緩衝液 pH 2.5: リン酸を希釈し0.05 mol/L リン酸溶液を作成し、1 mol/L 水酸化ナトリウムで pH 2.5 に調製した。

#### 2.3 分析装置

##### 2.3.1 ホモジナイザー

IKA LABORTECHNIK 社製ウルトラタックス T-25 ベーシック

##### 2.3.2 キャピラリー電気泳動装置 (CE)

Hewlett-Packard 社製 G1600 A (フォトダイオードアレイ検出器)

#### 2.4 CE の測定条件

キャピラリー: フェーズドシリカ (内径 75  $\mu$ m, 有効長 56 cm, 全長 64.5 cm)

泳動緩衝液: 0.05 mol/L リン酸緩衝液 pH 2.5

電圧: 30 kV (Positive)

キャピラリー温度: 20°C

試料注入量: 50  $\mu$ L  $\cdot$  4 s

分離モード: キャピラリーゾーン電気泳動

検出波長: 210 nm

キャピラリーのコンディショニング: 試料注入前に泳動緩衝液で5分間フラッシング

#### 2.5 試験溶液の調製

魚介類の可食部をミンチにしたもの 5 g を遠沈管に取り、5% TCA 溶液 20 mL を加え、ホモジナイズした。これに 5% TCA を加え 50 mL に定容した。5分間振とうした後、10分放置し、ろ紙 (TOYO No. 5 A) を用いてろ過した。ろ液をメンブランフィルター (孔径 0.45  $\mu$ m) に通し、試験溶液とした。

### 3 結果及び考察

#### 3.1 ヒスタミン, チラミンのチャート

ヒスタミンとチラミンの標準液（各50mg/L）の混合品のチャートを図1に示した。どちらもシャープなピークが得られた。測定時間が10分程度と短く、試料導入力も1~25 nL 以下と少ないのがキャピラリー電気泳動の特徴である。

魚（マサバ, ヒラメ）の抽出液のチャートを図2, 図3に示した。

標準液と魚の抽出液のチャートを比較するとヒスタミンについては、妨害ピークはまったく見られなかった。一方、チラミンについては、その保持時間のすぐ近くに妨害ピークが2つあるので測定が難しいことが予想された。最初に図2のピーク1がチラミンであると考え、ピーク1とチラミンのUV スペクトルを比較した。チラミンは225及び275nm 付近に吸収を持つが、ピーク1は210及び260nm 付近に吸収を持つことから後者はチラミンではないと判断した（図4）。

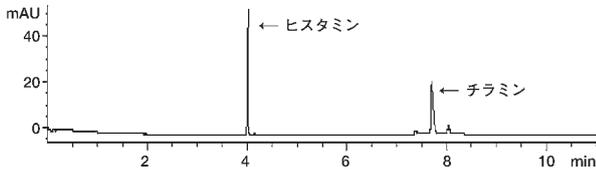


図1 標準液 (50mg/L) のチャート  
(試料注入量: 50mb・4s)

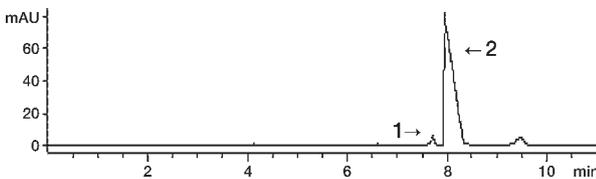


図2 マサバ抽出液  
(試料量 5g/5%TCA 溶液50mL, 試料注入量: 50mb・4s)

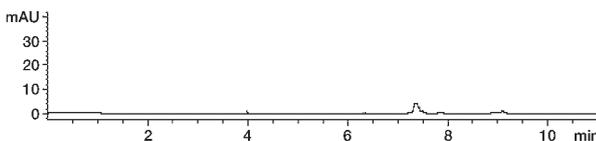


図3 ヒラメ抽出液  
(試料量 5g/5%TCA 溶液50mL, 試料注入量: 50mb・4s)

また、マサバでチラミンの添加回収実験を行ったチャートではピーク1と2の間にもうひとつピークがあり、このピークのUV スペクトルはチラミンと同一であった。このことより、ピーク1はチラミンではないと確認した。UV スペクトルでピークを確認することによりチラミンのピークの特定ができ定量も可能であることが分かった。

#### 3.2 ヒスタミン, チラミンの UV スペクトル

魚（マサバ）5g にヒスタミンを各5mg, 0.5mg, チラミンを各0.5mg 添加した抽出溶液の UV スペクトルを図4, 図5に示した。どちらも標準液の UV スペクトルと一致しており、このことは、ヒスタミン等の UV 測定による同定が可能なことを示唆している。

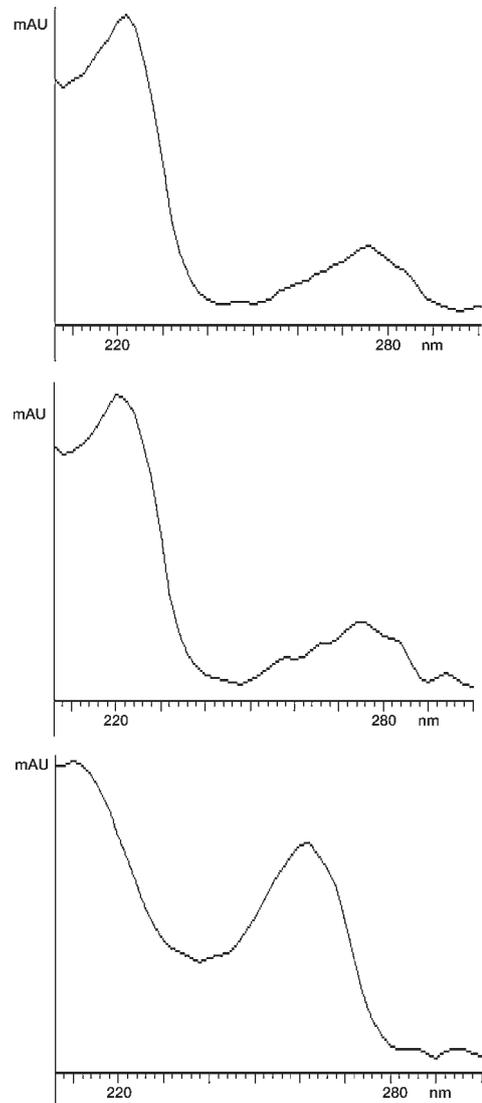


図4 標準液 (10mg/L) (上) とマサバ試料中 (中) のチラミンと図2のピーク1の UV スペクトル (下)

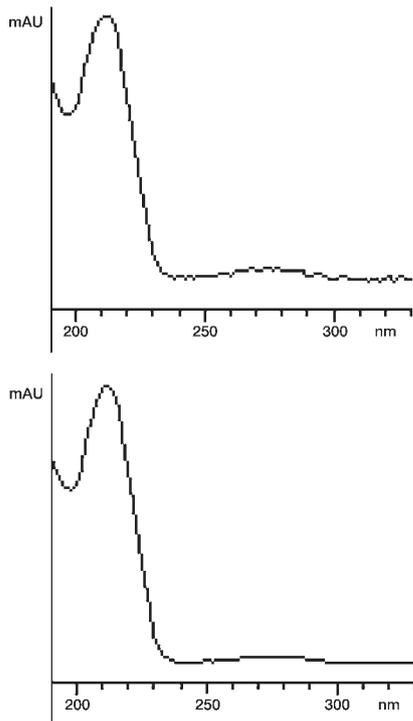


図5 標準液(10mg/L)(上)とマサバ試料中(下)のヒスタミンのUVスペクトル

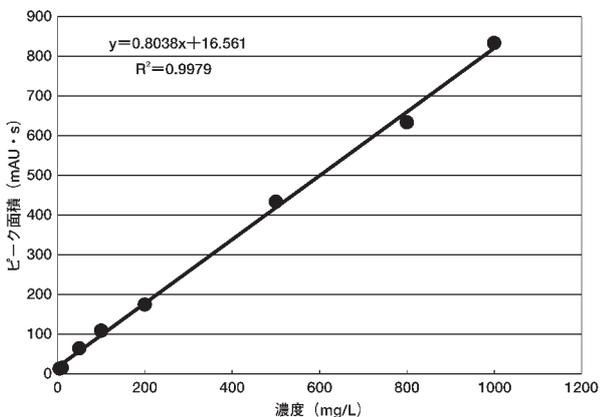


図6 ヒスタミンの検量線

### 3.3 検量線

ヒスタミン、チラミンの検量線を図6、図7に示した。5～1,000mg/Lの範囲でピーク面積と濃度で良好な直線を引くことができた。

### 3.4 添加回収実験

試料(マサバ)5gに対してヒスタミン標準液(1,000mg/L)0.5mL, 5mL, チラミン標準液(1,000mg/L)0.5mLを加え前処理を行い、その結果を表1に示した。それぞれ、113%, 98%, 103%と良好な回収率が得られた。

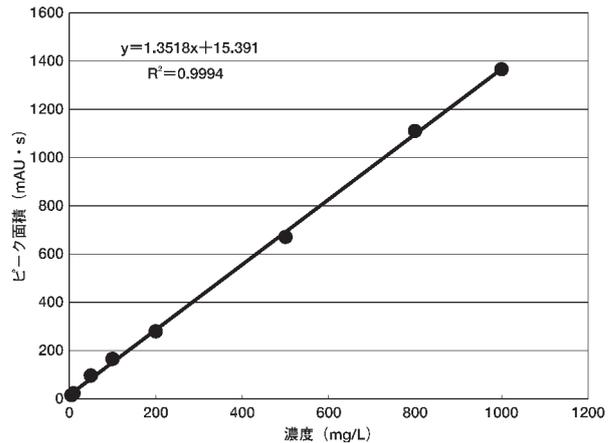


図7 チラミンの検量線

表1 ヒスタミン、チラミンの添加回収結果

添加量	ヒスタミン 0.5mg	ヒスタミン 5mg	チラミン 0.5mg
平均回収率(%)	113	98.2	103

※ヒスタミンはn=4, チラミンはn=3

表2 魚類中のヒスタミン、チラミンの経時変化

(mg/100g)

魚種	経日	保存状況	ヒスタミン	チラミン
マサバ	0		0	0
	1	室温	226	0
	3	室温	960	0
	1	4℃保存	14.4	0
	3	4℃保存	11.7	0
ヒラメ	0		0	0
	1	室温	16.4	3.4
	3	室温	60.4	427
	1	4℃保存	2.3	2.8
	3	4℃保存	22.9	0

### 3.5 魚類中のヒスタミン、チラミン量の経時変化

ヒスタミンの前駆物質であるヒスチジンの量が赤身の魚は多い<sup>1)</sup>ので、赤身の魚(マサバ)と白身の魚(ヒラメ)を使って、ヒスタミン、チラミンの経時変化を調べた。

魚をミンチにしたものを遠沈管に5gずつ秤量し、室温(約25℃)と4℃冷蔵庫に保存した。0日、1日後、3日後にそれぞれ前処理を行い、測定した。その結果を表2に示した。

室温で保存したものについてマサバは一日でヒスタミン量が226mg/100gとなり、食中毒を発生させるのに十分な量であった。3日後で960mg/100gとさらに

量が増えた。1日では腐敗臭もなく外観にも変化はなかった。3日後は腐敗臭がし、見た目にも水が出て腐っているのが分かる状態であった。1日室温に放置されたマサバは見た目ではヒスタミンが生成されていることが分からないため食中毒の原因となることが考えられた。

一方、ヒラメでは1日でヒスタミン量が16.4mg/100g、3日後には60.4mg/100gとなった。これはヒスタミンの前駆物質であるヒスチジンの含有量がヒラメは530mg/100gとマサバ(1,200mg/100g)の半分以下と少ないこと<sup>1)</sup>とヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌がヒラメは少なかったことが考えられ、3日後も食中毒を起こす量まで増加しておらず、ヒラメはアレルギー様食中毒を起こす原因食品にはなりにくいと推測される。

4℃で保存した場合、マサバ、ヒラメともヒスタミン量は微量増加したが、3日後でも、食中毒を起こすほどの量は検出されなかった。温度管理をすることでヒスタミンの発生を防ぐことができることが分かった。

チラミンについては室温で保存したヒラメのみ増加した。しかし、マサバ、ヒラメともチラミンの前駆物質であるアミノ酸チロシンの含有量は変わらない<sup>10)</sup>。このことより、ヒラメにのみチロシンを脱炭酸する酵素を有する細菌が多かったと可能性も考えられるが、詳細は不明である。

#### 4 まとめ

1. キャピラリー電気泳動を用いてアレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミン及びチラミンの迅速分析が可能となった。
2. サバは24時間室温に放置しておくとも食中毒量を超えるヒスタミンが検出された。
3. 中毒量を超えるヒスタミンが検出されても臭い、

外観等では判断できないため、魚の温度管理は重要であることが分かった。

4. ヒラメはアレルギー様食中毒の原因食品にはなりにくいことが考えられた。

#### 文 献

- 1) 科学技術庁資源調査会編：日本食品成分表フォローアップ成分完全収載，医歯薬出版，東京，1992
- 2) 朝日新聞社：Weekly AERA 2003. 3. 17, 86-87, 2003
- 3) 藤原喜久夫, 栗飯原景昭：食品衛生ハンドブック, pp 216-219, 南江堂，東京，1992
- 4) Taylor SL, Stratton JE, Nordlee JA. : Histamine poisoning (scombroid fish poisoning) : an allergy-like intoxication, J Toxicol Clin Toxicol, 27 (4-5), 225-40, 1989
- 5) Settignano GA : The restaurant syndromes. : N Engl J Med 1987 Jan-Feb, 8(1), 39-46
- 6) Gerry Predy, Lance Honish, William Hohn and Stephen Jones : Was it something she ate ? Case report and discussion of scombroid poisoning, CMAJ March 4, 2003, 168(5)
- 7) Rice, S.L. Sci. et al. : J. Milk Food Technol., 39, 353, 1976
- 8) 日本薬学会：衛生試験法. 注解, pp 172-175, 金原出版，東京，2000
- 9) 日本食品衛生協会：食品衛生検査指針理化学編, 276-279, 1991
- 10) 中嶋昌徳, 杉山明子：キャピラリー電気泳動を利用した魚介類中のヒスタミン迅速分析法について, 食衛誌, Vol. 40, No. 4, 285-290, 1999