

[ノート]

キャピラリー電気泳動による魚肉中ヒスタミン及びチラミンの同時分析

祭原ゆかり* 三橋隆夫 市橋啓子

Simultaneous Analysis of Histamine and Tyramine in Fish by Capillary Electrophoresis

Yukari SAIHARA*, Takao MITSUHASHI and Keiko ICHIHASHI

Health Science Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

A simple and rapid method for determining histamine and tyramine in fish was developed by capillary electrophoresis. Samples were homogenized with 5% trichloroacetic acid, filtered and subjected to capillary electrophoresis. Histamine and tyramine were well separated from other co-extracted components using phosphate buffer pH 3.5. Identification was performed on the basis of the migration time and the absorption spectrum obtained with a photodiode array detector. The recoveries of spiked histamine and tyramine in fish were $102 \pm 2.6\%$ and $101 \pm 2.0\%$, respectively. The determination limits were both 1.0mg/100g in the samples.

I はじめに

魚肉の腐敗に伴い、魚肉中のアミノ酸から生成されるヒスタミンやチラミンは、アレルギー様食中毒の原因物質となることが知られている。ヒスタミンはアレルギー様食中毒の主体で、必須アミノ酸であるヒスチジンが、脱炭酸酵素を有する細菌により分解されて生じる。また、チロシンの分解により生じるチラミンは、ヒスタミンの作用を増強させることが知られており、ヒスタミン含有量が少ない場合でも、チラミンが共存すると食中毒が起こりうる¹⁾。ヒスタミンが主原因の食中毒は毎年のように全国で発生しており、その試験には一般にHPLC法^{2,3)}が用いられている。ところが、この方法は前処理としてクлинаップ及び誘導体化の複雑な操作を伴い、長時間を要する欠点がある。食中毒事件などに即時に対応するためには、より迅速で簡便な試験法が求

められている。このため近年では、前処理が簡便で迅速なキャピラリー電気泳動を利用した分析法⁴⁾⁷⁾が開発されている。しかし、それらの方法は主にヒスタミンを分析対象としており、チラミンの測定については殆ど検討されていない。そこで我々は、魚肉中のヒスタミン及びチラミンの同時分析にキャピラリー電気泳動法の適用を試みたところ、良好な結果が得られたので報告する。

II 材料と方法

1. 試料

兵庫県神戸市内の小売店で販売されていた生の魚類5種(アジ, カツオ, サバ, イワシ及びマグロ)を用いた。

2. 試薬及び試液

ヒスタミン標準品は和光純薬工業(株)製のヒスタミン(特級)、チラミンは東京化成工業(株)のチラミン塩酸塩(特級)、その他の試薬などは市販の特級品を用いた。ヒスタミン標準品50.0mgを精製水で全量を50mLとし、ヒスタミン標準原液(1mg/mL)とした。チラミン塩酸塩標準品63.3mgを精製水で全

健康科学部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
健康科学部 祭原ゆかり

量を50mLとし、チラミン標準原液（チラミンとして1mg/mL）とした。各標準原液を精製水で適宜希釈して標準溶液を調製した。

泳動緩衝液はリン酸水素ニナトリウム・12水を精製水に溶かして0.025Mの溶液を作成し、リン酸（原液）を加えてpHを調整した。

精製水はMilli-Q純水製造装置（ミリポア社製）により調製したものを用了。

3. 装置及び測定条件

装置：大塚電子（株）製 CAPI-3300

キャピラリー：内径75 μ m, 長さ80cm（有効長68cm）のヒューズドシリカ管

試料導入：加圧法（5kpa, 3秒）

キャピラリー温度：35 $^{\circ}$ C

印加電圧：25kV（Positive）

検出器：フォトダイオードアレイ（検出波長215nm, 測定可能波長範囲190~600nm）

泳動緩衝液：0.025Mリン酸水素ニナトリウム水溶液をリン酸でpH3.5に調製

キャピラリーのプレコンディショニング：試料注入ごとに0.1M水酸化ナトリウム溶液及び泳動緩衝液で各2分間のフラッシング

4. 試料溶液の調製

試料溶液はトリクロロ酢酸（TCA）を用いる抽出法²⁾で調製した。細切した魚肉5.0gに5% TCA20mLを加え、ホモジナイザーで均一化した後、5% TCAを加えて全量50mLとした。次いで5分間振とうした後、10分間放置し、ろ紙（ADVANTEC, No.5A）を用いてろ過した。ろ液を更にメンブランフィルター（孔径0.45 μ m）でろ過し、試料溶液とした。

5. 定性及び定量

ヒスタミン及びチラミンの定性は、標準溶液及び試料溶液における各成分の移動時間及びUVスペクトル（205~300nm）を比較することにより判定した。定量は標準溶液でのピーク面積を用いて各成分の検量線を作成し、試料溶液中の各濃度を算出した。

III 結果および考察

1. UVスペクトルと測定波長

本法の分析対象物質であるヒスタミン及びチラミンの構造をFig. 1に示した。標準溶液におけるヒスタミンとチラミンの各ピークをフォトダイオードア

レイ検出器で測定したところ、Fig. 2のUVスペクトルが得られた。両成分のUVスペクトルは比較的類似しており、ヒスタミンは212nm付近、チラミンでは225nmと275nm付近に吸収極大が認められた。これより本法での測定波長は、両成分の同時測定に適した215nmを選んだ。

2. 泳動緩衝液 pH の影響

2.1 標準溶液

キャピラリー電気泳動では、各成分の移動時間は泳動緩衝液のpHに依存するため、pHの選択が重要となる。ヒスタミン及びチラミンは塩基性アミンであるため、酸性領域の泳動緩衝液が適している。酸性領域の泳動緩衝液として一般的なリン酸系緩衝液を用いて、標準溶液の測定におけるpHの影響を調べた（Fig. 3）。pHが2.5~5の範囲では、pHの上昇につれてヒスタミンとチラミンの移動時間は短く

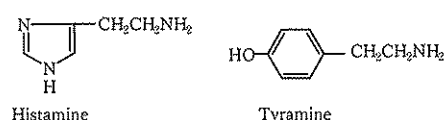


Fig.1 Structures of histamine and tyramine

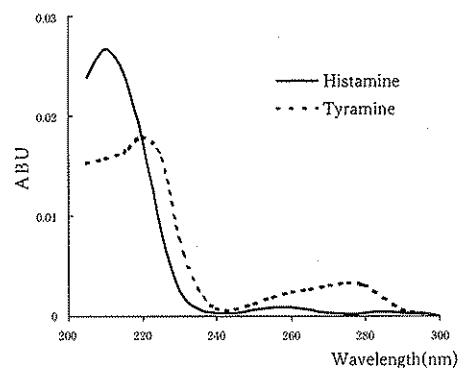


Fig.2 UV spectra of histamine and tyramine
The concentrations of histamine and tyramine were both 50 μ g/mL

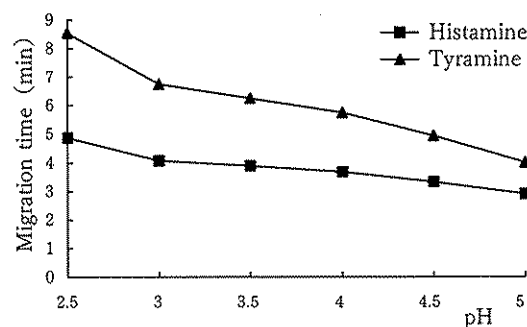


Fig.3 Effects of buffer pH on migration time

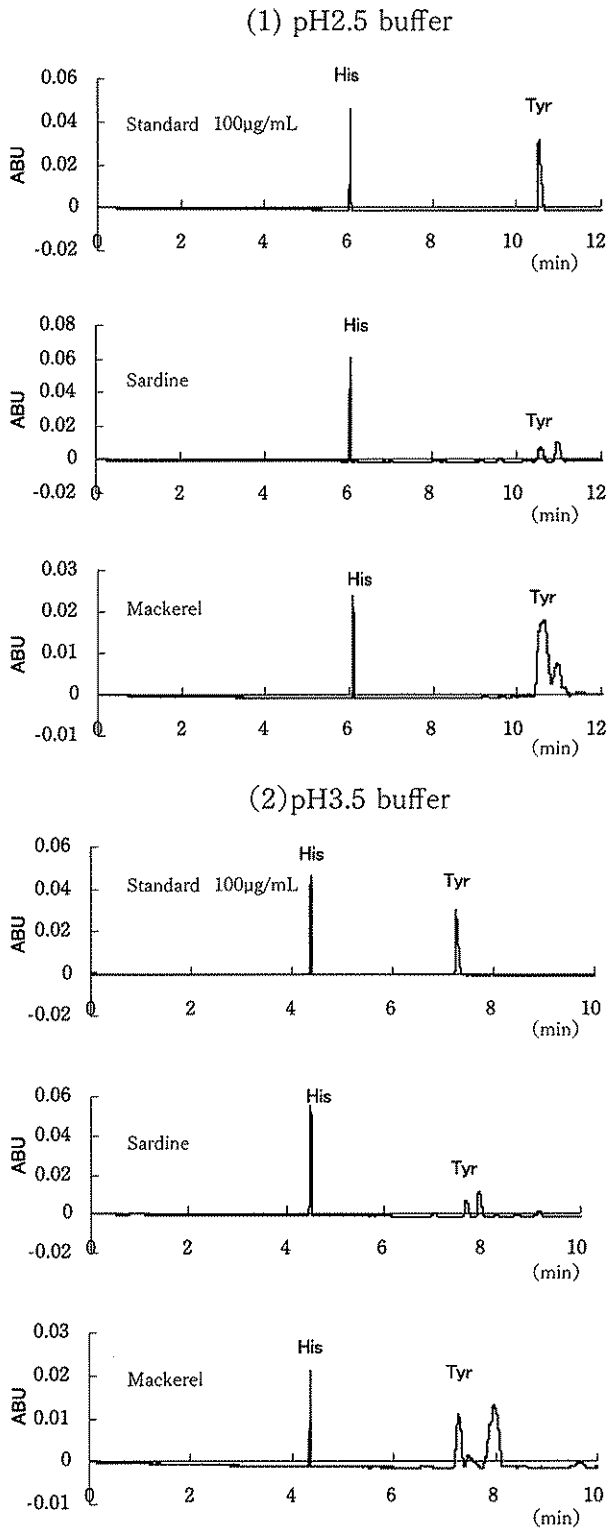


Fig.4 Electropherograms of standard and fish samples (pH 2.5, 3.5)
 His : Histamine, Tyr : Tyramine.
 Fish samples were preserved for 3 days at 35°C.
 Capillary : Fused silica tube , 80cm × 75µm id.
 Voltage : positive 25kV, Detection : 215nm
 Running buffer : 25mM phosphate buffer (pH 2.5 and 3.5)

なり、両者の移動時間の差も小さくなった。なお、酸性領域の泳動緩衝液中ではチラミンは1価、またヒスタミンは2価の陽イオンの状態となり得るため⁴⁾、陰極側の検出器にはヒスタミン、チラミンの順で到達する。

2.2 試料溶液

5種魚肉（アジ、カツオ、サバ、イワシ及びマグロ）の試料溶液について pH の影響を調べた結果、pH の値によっては問題点が認められた。泳動緩衝液の pH が 4.0 以上では、試料成分の凝固が原因と考えられるキャピラリーの詰まり現象が頻繁に起こった。また pH が 2.5 程度と低い場合、イワシ以外の 4 魚種ではチラミンの測定に妨害が認められた。標準溶液とイワシ及びサバの試料溶液の測定例を Fig. 4 に示した。pH2.5 の場合、イワシではチラミンのピークがほぼ分離していたのに対して、サバなど 4 魚種ではチラミンのピークに試料成分のピークが重なった。チラミンと重なる試料成分は不明であるが、移動時間が比較的短いことから、正に荷電している成分と推定される。一方、pH を 3.5 に上げることにより、全ての魚種でチラミンと試料成分のピークの重なりが解消された。これより、本法の泳動緩衝液 pH を 3.5 とした。なお、測定時間をさらに長くすると試料成分の他のピークが幾つか現われるが、分析時間を短縮するため測定時間は 10 分間とし、キャピラリー内の溶液を強制的に排出した。

3. 検量線

ヒスタミン及びチラミンそれぞれ 5 ~ 50 µg/mL の範囲で検量線を作成したところ (Fig. 5), 良好な直線性を示した。相関係数はヒスタミン及びチラミン共に 0.998 であった。

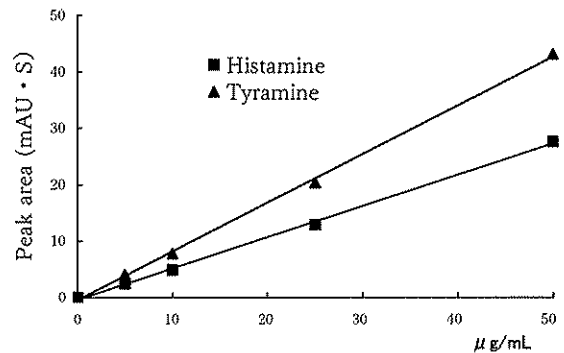


Fig.5 Calibration curves for histamine and tyramine

4. 添加回収実験

ヒスタミン及びチラミンを含まないことを確認した魚肉（アジ）5gに、ヒスタミン及びチラミンを試料濃度が各10.0mg/100gになるよう添加し、本法に従って操作して回収率（各5試行）を求めた。それぞれの回収率は102 ± 2.6%及び101 ± 2.0%と良好な値であった。なお、本法の定量下限値はヒスタミン及びチラミン共に1.0mg/100gであり、HPLC法²⁾の5.0mg/100g及び2.0mg/100gと比較して高感度な測定が可能であった。

5. HPLC法との比較

イワシ及びアジを室温で5日間放置したものを試料とし、本法とHPLC法²⁾で測定し、その測定値を比較した（Table 1）。本法とHPLC法の測定結果は、ほぼ一致しており本法の信頼性が確認された。

6. 魚肉中のヒスタミン及びチラミン含有量の測定

5種魚肉をミンチ状にしたものを35°Cの恒温槽の中で保存し、0~4日間のヒスタミン及びチラミン含有量の経時変化を本法により測定した（Table 2）。いずれの試料においても、抽出及びろ過操作の簡単な前処理で両成分の定量が可能であった。ヒスタミ

ンについては、全ての魚種で含有量が増加し、特にカツオは顕著であり3日後に1,000mg/100gを超過した。その含有量は最大値となった後、減少する傾向が3試料で認められた。試料である5種の魚類は赤身魚に分類され、ヒスタミンの前駆物質であるヒスチジンの含有量が多く、高濃度のヒスタミンが産出されやすいことが報告されている⁸⁾。なお、魚肉中のヒスタミン含有量が100mg/100gを超えると食中毒の危険性が高くなる²⁾。

チラミンは、含有量増加の程度がヒスタミンと比べて小さく、全ての試料で100mg/100gを超えるものはなかった。またマグロでは4日後においても、その生成が認められなかった。チラミンもヒスタミンと同様に魚種による生成量の違いが大きいと報告⁹⁾されているが、今回の調査でも同様の傾向であった。ヒスタミンやチラミンは細菌の作用により産出されるため²⁾、試料に当初付着していた細菌の種類や量などが保存後の増加量に大きく影響すると考えられる。

IV 要 旨

1. pH3.5のリン酸泳動緩衝液を用いることにより、魚肉中のヒスタミン及びチラミンの同時測定が

Table 1 Comparative results of histamine and tyramine contents in fish samples by capillary electrophoresis(CE) and HPLC methods²⁾

Sample*	(mg/100g)			
	Histamine		Tyramine	
	CE method	HPLC method	CE method	HPLC method
Sardine (iwashi)	403 ± 23	389 ± 41	65.9 ± 1.5	69.6 ± 5.4
Horse mackerel (aji)	67.0 ± 2.2	68.7 ± 3.9	38.2 ± 2.4	36.9 ± 4.7

* Fish samples were preserved for 5 days at room temperature.

Datas are expressed as means ± SD for 3 trials.

Table 2 Change of histamine and tyramine contents of fish samples with time

Period (day)	(mg/100g)									
	Horse mackerel (aji)		Bonito (katsuo)		Mackerel (saba)		Sardine (iwashi)		Tuna (maguro)	
	His.	Tyr.	His.	Tyr.	His.	Tyr.	His.	Tyr.	His.	Tyr.
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	ND	31	ND	157	ND	381	37	334	ND
2	25	12	847	ND	183	69	328	46	564	ND
3	84	39	1,120	15	38	65	292	64	563	ND
4	68	44	1,200	18	64	68	288	81	529	ND

ND : < 1.0mg/100g, His : Histamine, Tyr : Tyramine.

Samples were preserved at 35°C.

可能になった。本法でのヒスタミン及びチラミンの添加回収率は、ほぼ100%と良好な値であった。また定量下限値は、共に1.0mg/100gであり、HPLC法(5.0mg/100g及び2.0mg/100g)よりも高い感度を有していた。

2. 本法は、クリンアップや誘導体化などの前処理の操作が不要であり、簡便で迅速であった。特に食中毒事件など、試験結果が早急に求められる場合には有効に適用できると考えられる。

文 献

- 1) 細貝祐太郎, 松本昌雄監修: 食品安全セミナー1, 食中毒, p.216-227, 中央法規出版, 東京 (2001)
- 2) 日本薬学会: 衛生試験法・注解, p.180-181, 金原出版, 東京 (2005)
- 3) 樋田俊英, 後藤成一, 局 伸男, 金並和重, 曾根聡子, 神田尚徳: 高速液体クロマトグラフィーによる魚介類加工品中のヒスタミンの定量. 大分県衛生環境研究センター年報, 27,60-61 (1999)
- 4) Mopper, B., Sciacchitano, J.C.: Capillary zone electrophoretic determination of histamine in fish. J. AOAC Int., 77, 841-884 (1994)
- 5) Liao, W., Paek, H., Mabuni, C., Amgold, S. and Soliman, M.: Use of capillary electrophoresis with UV detection as a screening method to determine histamine in fish samples. J. Chromatogr. A, 853, 541-544 (1999)
- 6) 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, 40, 285-290 (1999)
- 7) 青山幸二, 小野雄造, 石黒瑛一: キャピラリー電気泳動による魚粉中ヒスタミンの定量. 飼料研究報告, 28, 51-58 (2003)
- 8) 長橋照子, 小澤 茂, 関口恭一: マグロにおける不揮発性腐敗アミン類の消長. 群馬県衛環研年報, 28, 73-77 (1996)
- 9) 鈴木 裕, 泉 広栄, 泉 紀子, 大西孝司, 四月朔日富司子: 魚介加工品中のヒスタミン含量とその保存中変化及び調理加熱による影響. 石川衛公研年報, 25, 292-300 (1988)