

キャピラリー電気泳動によるカタクチイワシ中のヒスタミン分析法の検討

森岡 浩文・福地 哲郎・野中 勇志・森川 麻里子
山本 雄三・樺山 恭子・平田 泰久

Analysis of Histamine in Dried Anchovies by Capillary electrophoresis

Hirofumi MORIOKA, Tetsuroh FUKUCHI, Yuji NONAKA, Marioko MORIKAWA,
Yuzo YAMAMOTO, Kyoko KABAYAMA and Yasuhisa HIRATA

Abstract

In this study, a capillary electrophoresis method using solid-phase extraction cleanup was developed for the determination of histamine in dried anchovies. An Oasis HLB column and Bond Elute SCX column were used for the refinement and the concentration of sample solution. In the recovery examination by this method, an excellent result of 94.8% was obtained.

The anchovies concerning with this complaint were analyzed by this method and 14.05mg/100g of histamine was detected.

Key words : histamine, capillary electrophoresis, solid-phase extraction

はじめに

アレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミンはサバなどの赤身魚に多く含まれるヒスチジンがヒスチジン脱炭酸酵素を有する細菌の増殖に伴い分解され産生される。このようなことからヒスタミンを原因とする食中毒は魚介類の不適切な保管管理によって発生し、毎年 10 件ほど報告されている¹⁾。

当所では魚肉中ヒスタミン分析を高速液体クロマトグラフ（以下 HPLC）で行い、併せてキャピラリー電気泳動（以下 CE）による分析も行っている。

今回、カタクチイワシ喫食による有症苦情発生時にヒスタミン分析を CE 法と HPLC 法で試みたところ、妨害ピークによる定量困難な事例に遭遇した。衛生試験法注解²⁾には、発酵食品の場合、イオン交換カラムによる精製を行うとよいとある。そこで CE によるヒスタミン分析で市販の固相カラムによる精製濃縮法を検討したので報告する。

方 法

1 試料

平成 19 年 9 月に県内保健所に届出のあった有症苦情品カタクチイワシの丸干し残品と店頭収去品を試料とした。

2 試薬

ヒスタミン標準液：和光純薬工業(株)製ヒスタミン二塩酸塩を蒸留水で溶解し、標準源液 1,000mg/L を調製した。

トリクロロ酢酸(TCA)：和光純薬工業製試薬特級
Oasis HLB カートリッジカラム(HLB)：ウォータース社製の HLB(200mg,6mL)をメタノール 5mL,蒸留水 5mL でコンディショニングして用いた。

Bond Elut SCX カートリッジカラム(SCX)：パリアン社製の SCX(500mg,6mL)をメタノール 3mL,0.1%リン酸 6mL でコンディショニングして用いた。

メンブレンフィルター：Whatman GD/X 0.45 μm

3 装置および測定条件

キャピラリー電気泳動装置(CE)：Hewlett-Packard 社製 G1600A

カラム内径 75 μm×有効長 56cm,全長 64.5cm

キャピラリー温度：20℃
 泳動液：50mmol/L リン酸緩衝液(pH2.5)
 電圧：30kV(positive) 注入圧：200hPa.sec
 分離モード：キャピラリーゾーン電気泳動
 測定波長：210nm

4 試料溶液の調製

細切した試料 5 g に 5%TCA を 15mL 加え、3 分間ホモジナイズした後に、遠心分離(3,500rpm, 5 分間)し、上澄液を分取した。さらに 5%TCA を 15mL 残渣に加え、5 分間振とうした後に遠心分離し、上澄液を分取して 50mL に定容した。上澄液はメンブレンフィルターでろ過した。

結果及び考察

1 CE による測定

既報³⁾の分析法で測定した結果を Fig.1 に示した。ヒスタミン標準液と同じイミグレーションタイムに見られるピークは面積が小さく形状の悪いものであった。

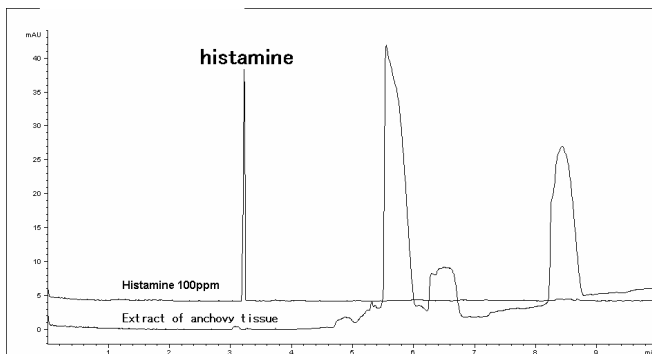


Fig.1 Electropherograms of the standard and extract of anchovy tissue.

2 固相カラムの選択

衛生試験法注解にある精製法で定量を行うには試験品中のヒスタミン濃度が低いと予想されたので精製濃縮法を検討した。中里ら^{4),5)}は不揮発性腐敗アミンの分析にイオンペア試薬と逆相カラムを用いた方法や陽イオン交換カラムによる精製法を報告している。しかし、試験品のカタクチイワシは、粉碎時に油分を多く含んでいたことやヒスタミンは高極性塩基性化合物であることから逆相系ポリマーHLB カラムと陽イオン交換カラム SCX を組み合わせて用いることを検討した。

3 HLB による溶出試験

HLB による溶出試験の結果を Fig.2 に示した。5%TCA に溶解したヒスタミン 500ppm, 1mL を負荷した。溶出は蒸留水で行い、溶出液を 2mL ずつ分取して CE で測定した。ヒスタミンは蒸留水 10mL で完全に溶出した。

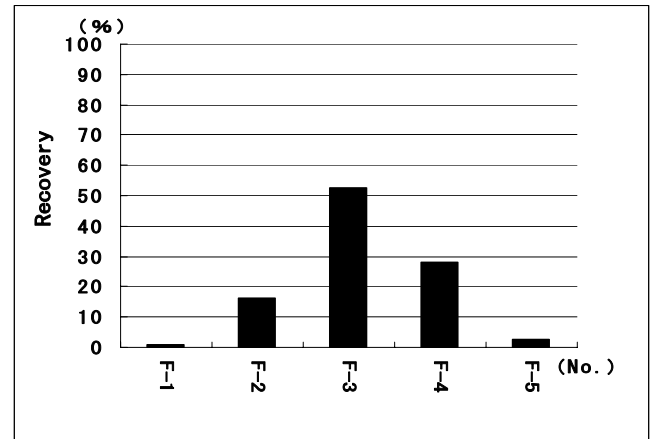


Fig.2 Elution profile of histamine from HLB cartridge

4 SCX による溶出試験

標準的な SCX の使用法から最適な方法を検討した。溶出試験の結果は Fig.3 に示した。5%TCA に溶解したヒスタミン標準液 100ppm, 1mL を負荷した。蒸留水 5mL とメタノール 5mL でカラムを洗浄した後、25%アンモニア：メタノール(5:95)の溶出液で溶出した。溶出液は 3 mL ずつ分取してエバポレーターで乾固し、蒸留水 1mL で定容後、CE で測定した。ヒスタミンは負荷液及び洗浄液からは検出されず、溶出液 18mL で完全に溶出した。

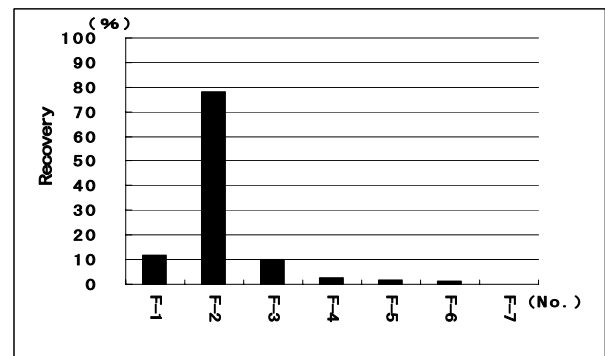


Fig.3 Elution profile of histamine from SCX cartridge

5 添加回収試験

今回検討した方法で市販のカタクチイワシを用いて添加回収試験を行った。HLB と SCX はそれぞれコンディショニングを行った後に連結し、抽出

液 5mL を負荷した.蒸留水 10mL でカラムを洗淨後,HLB をはずし,SCX を蒸留水 5mL とメタノール 5mL で洗淨した.溶出は 5%アンモニア・メタノール 20mL で行い,エバポレーターで乾固し,蒸留水 1mL で定容し,CE で測定した.回収率は 94.8%(n=3)と良好な値が得られた.

6 定量結果

苦情品を検討した精製法で分析したところ

Fig.4 のフェログラムが得られた.ヒスタミンのピーク形状はシャープで十分定量可能なものであった.この分析法で有症苦情品 14.05 mg/100g , 収去品 5.23 mg/100g の定量値が得られた.

検出したヒスタミンの濃度は一般に食中毒を起こすとされる 100mg/100g よりもはるかに少ない量であった.また,イワシなどのヒスタミン含量は水産加工の分野で,加工方法とともに多く調査されている.東京都の調査⁶⁾では干物類 337 検体の平均値が 52(6-340)mg/100g となっており,苦情品の定量値はこの平均をも下回る値であった.

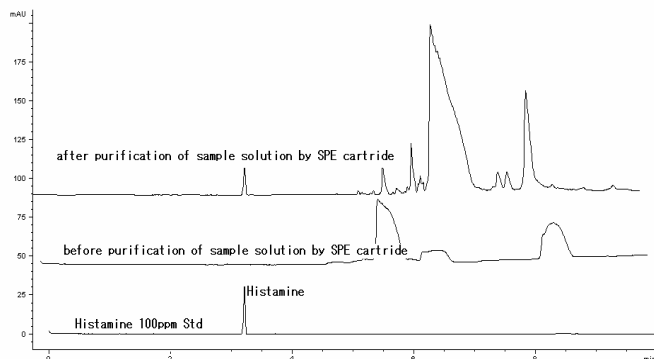


Fig.4 Comparison of purification of sample solution by SPE cartridges

まとめ

平成 19 年 9 月に,県内保健所に届出のあったカタクチイワシを原因とする有症苦情発生時に CE による分析を試みた.得られたフェログラムは,妨害によって定量できなかった.そこで HLB と SCX を使い,精製濃縮法を検討した.検討した方法による添加回収試験では 94.8%の良好な結果が得られた.

この分析法で苦情品と収去品のヒスタミン含有

量を試験したところ,有症苦情品 14.05 mg/100g , 収去品 5.23 mg/100g の定量値が得られた.

今回検討した精製濃縮法は,低濃度のヒスタミンを含有するアレルギー様食中毒の際,カタクチイワシ等に含有されるヒスタミンの分析に有用であると考ええる.

文 献

- 1) 厚生労働省:食中毒・食品監視関連情報 食中毒発生事例(平成 14 年～平成 19 年)
- 2) 森岡浩文: サバ中のヒスタミンによる中毒事例,宮崎県衛生環境研究所年報,18,58-60(2006)
- 3) 衛生試験法注解(2005),日本薬学会編
- 4) 中里光男: 固相抽出法を用いた食品中の不揮発性腐敗アミンの分析法,衛生化学,40(2), 203-209(1994)
- 5) 中里光男: 魚醤油中の揮発性塩基窒素及び不揮発性アミン類の分析,東京衛研年報,53, 95-100(2002)
- 6) 観 公子: 市販魚介類およびその加工品中のヒスタミン含有量調査,食衛誌,vol143(3), 127-132(2005)