ノート

タンデム固相抽出を用いた魚肉中
ヒスタミン分析法の検討

(平成 23 年 1 月 24 日受理)

栗津 薫* 野村千枝 山口瑞香 尾花裕孝

Determination of Histamine in Fish and Fish Products
by Tandem Solid-Phase Extraction

Kaoru AWAZU*, Chie NOMURA, Mizuka YAMAGUCHI and Hiroataka OBANA

Osaka Prefectural Institute of Public Health: 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku,
Osaka 537-0025, Japan; *Corresponding author

A simple and practical method was developed for the determination of histamine in fish and fish products by solid-phase extraction and fluorescence derivatization. Histamine was extracted with trichloroacetic acid. The extract was neutralized and diluted with phosphate buffer (pH 6.8), and cleaned up with a tandem-connected octadecyl silica (ODS) and strong cation exchange silica (SCX) cartridge. After removal of the solvent, histamine was derivatized with fluorescamine and analyzed by ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Recovery tests of histamine from six kinds of fish and fish products showed acceptable recovery (83–92%) with low relative standard deviation (less than 5%). This method could be useful for determination of histamine in fish.

(Received January 24, 2011)

Key words: ヒスタミン histamine; 食中毒 food poisoning; 魚, 魚肉 fish; 水産加工品 fish product; コーデックス規格 Codex standard; 高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography; 固相抽出 solid-phase extraction; フルオレスカミン fluorescamine

緒言

ヒスタミンは、食品中のタンパク質やアミノ酸が主に微生物の作用で分解されて生成し、顔面紅潮、口部灼熱感、頭痛などを発症する食中毒の原因物質である¹⁾。ヒスタミン食中毒は日本国内で年間 10 件程度、患者数は 100 名程度発生しており^{*1}、2009 年 1 月には札幌市の小学校給食で患者数 279 名の大規模な食中毒が発生した^{*2}。食中毒の主な原因食品は魚類および水産加工品であり、米国、EU、およびコーデックス規格ではヒスタミン含有量が規制されているが^{*3~*5}、日本国内に流通する食品に対する規制はない。しかし、ヒスタミンは低温保存および加熱調理により分解されないことから、食品の大量生産および流通の発達による食中毒の拡大が懸念される。

食品中のヒスタミンの一般的な分析法は、食品衛生検査指針²⁾に示されている HPLC 法である。検査指針には、精製法として陽イオン交換樹脂を用いたオープンカラム精製、およびイオンペアクロマトグラフィーを利用した固相抽出カートリッジカラム精製が示されている。オープンカ

ラム精製は、衛生試験法³⁾や他の文献^{4)~6)}で報告されており、広く用いられてきたが、樹脂の活性化に高濃度の酸を大量に使用するために操作が煩雑である。当所では、吉田らの方法⁶⁾を参考にオープンカラム精製を行っていたが、イワシやサバなどの脂質含有量の高い試料を分析時に、クロマトグラム上に定量の妨害となるピークが見られ、十分な精製効果が得られなかった。近年、操作が簡便な固相抽出カートリッジカラム精製を利用したヒスタミンの分析法が報告されている^{7)~12)}。

*1 厚生労働省 食品安全情報 食中毒に関する情報 食中毒統計資料 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html#4-2>

*2 札幌市教育委員会「学校給食におけるヒスタミン食中毒再発防止対策に関する報告書」<http://www.city.sapporo.jp/kyoiku/top/kyushoku/information/report.pdf>

*3 Fish and Fisheries products Hazards and Controls Guidance Third Edition, June 2001, Appendix 5 FDA& EPA Safety Levels in Regulations and Guidance

*4 Council Directive 91/493/EEC of 22 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products

*5 CODEX STAN 36-1981, Rev.1-1995
CODEX STANDARD FOR QUICK FROZEN FINFISH, UNEVISCEATED AND EVISCERATED

* 連絡先 awazu@iph.pref.osaka.jp

大阪府立公衆衛生研究所：〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

そこで、本研究では、魚肉中のヒスタミン分析において、精製操作の簡便化および妨害物質を多量に含有する試料への適用を目的に、固相抽出カートリッジカラムを用いた精製操作を検討した。ヒスタミン食中毒は、食品中のチラミンやカダベリン、プトレスシンなどのヒスタミン以外の腐敗アミン類が発症に関与するとされているが¹⁾、本研究では主な原因物質であるヒスタミンを分析対象とした。はじめに、ヒスタミン分析で汎用されている陽イオン交換カラムのSCX、および逆相系-陽イオン交換系ミックスモードカラムのMCXを用いた精製を試みたが、妨害物質の除去が不十分であった。妨害物質は、試料中に高濃度に含有される脂質およびアミノ酸であると考えられたので、逆相系カラムのODSの下部にSCXを連結し、脂質およびアミノ酸の除去を目的に精製操作を検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実験方法

1. 試料

大阪府内の小売店で購入した鮮魚3検体（サンマ1検体、ブリ1検体、マグロ1検体）、水産加工品5検体（アジ干物1検体、イワシ丸干し2検体、サバみりん干し1検体、サワラ西京漬1検体）、調理済食品4検体（アジ南蛮漬1検体、カジキマグロステーキカツ1検体、ブリ照焼1検体、マグロ角煮1検体）、食中毒事例の残品1検体（マグロ醤油漬1検体）を試料とした。試料は、筋肉部をフードプロセッサーで細切均一化した。分析するまで-20℃で冷凍保存した。

2. 試薬

標準品：和光純薬工業(株)製特級品のヒスタミン二塩酸塩を用いた。

標準原液：ヒスタミンとして2,000 µg/mLになるように0.1 mol/L 塩酸に溶解し、調製した。

標準溶液：標準原液を0.1 mol/L 塩酸で希釈し、2.5 µg/mL から 100 µg/mL になるように調製した。

蛍光誘導体化試薬：和光純薬工業(株)製のフルオレスカミン(4-Phenylspiro[furan-2 (3*H*),1' (3'*H*)-isobenzofuran]-3,3'-dione) 15 mg をアセトン 5 mL に溶解し、0.3%フルオレスカミン溶液を調製した。

その他：メタノールは和光純薬工業(株)製高速液体クロマトグラフ用、その他の試薬は和光純薬工業(株)製特級品を用いた。水はヤマト科学(株)製 Autostill WA53 で精製したものを用いた。

0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8)：リン酸二水素ナトリウム 2 水和物 7.8 g と、リン酸水素二ナトリウム 12 水和物 17.9 g を水に溶解し、全量を 1,000 mL とした。

0.05 mol/L リン酸緩衝液および 0.025 mol/L リン酸緩衝液：0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) をそれぞれ水で 2 倍および 4 倍に希釈し、調製した。

アンモニア含有メタノール：25%アンモニア水とメタノールを 5:95 の割合で混合し、調製した。

0.2 mol/L ホウ酸緩衝液 (pH 9.0)：ホウ酸 1.23 g を水 85 mL に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 9.0 に調整後、水で全量を 100 mL とした。

0.05 mol/L 酢酸緩衝液 (0.005 mol/L テトラブチルアンモニウムブロミド含有, pH 6.6)：酢酸ナトリウム 4.1 g を水 800 mL に溶解し、30%酢酸溶液で pH 6.6 に調整したものに、テトラブチルアンモニウムブロミド 1.61 g を溶解し、水で全量を 1000 mL とした。

固相抽出カラム：ODS は Waters 社製 Sep-Pak Plus C18 (360 mg) を、SCX は Varian 社製 Bond Elute Jr. SCX (500 mg) を用いた。ODS の下部に SCX を連結し、あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL、および 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) 5 mL の順にコンディショニングして精製に用いた。

メンブランフィルター：アドバンテック東洋(株)製 DISMIC (親水性 PTFE, 13 mmφ, 0.2 µm) を用いた。

3. 装置

高速ホモジナイザー：KINEMATICA 社製ポリトロン Model K PT10-35

遠心分離機：日立工機(株)製 himac SCR20B

高速振とう機：東京理化工機(株)製 CM-1000

HPLC：(株)島津製作所製 LC-10 シリーズ

蛍光検出器：(株)島津製作所製 RF-10A

4. HPLC 条件

分析カラム：Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm)、カラム温度：50℃、流速：0.8 mL/min、注入量：20 µL、移動相：0.05 mol/L 酢酸緩衝液 (0.005 mol/L テトラブチルアンモニウムブロミド含有, pH 6.6)-メタノール (1:1)、蛍光検出：励起波長 390 nm、蛍光波長 480 nm

5. 試験溶液の調製

5.1 抽出

試料 5 g を 50 mL 容のポリプロピレン製遠沈管に採取し、5%トリクロロ酢酸溶液 20 mL を添加、直ちに高速ホモジナイザーで粉碎し、抽出した。4℃, 5,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清をろ紙 (No. 5A) によりろ過した。残留物に 5%トリクロロ酢酸溶液 20 mL を添加、5 分間高速振とう機で振とうして抽出後、4℃, 5,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清をろ紙 (No. 5A) によりろ過した。得られたろ液を合わせて、5%トリクロロ酢酸溶液で 50 mL に定容し、抽出液とした。

5.2 精製

抽出液 10 mL を 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で pH 6~8 に中和後、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) 10 mL を添加し希釈した。希釈した抽出液を、ODS の下部に SCX を連結したカラムに負荷した。0.05 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8) 10 mL で ODS からヒスタミンを溶出した後、ODS を取り去り、0.025 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.8)、水およびメタノール各 10 mL で SCX を洗浄した。アンモニア含有メタノール 10 mL でヒスタミンを溶出

し、40℃の水浴上で減圧乾固後、残渣を0.1 mol/L 塩酸溶液2 mLに溶解し、試験溶液とした。

5.3 誘導体化

検量線用標準溶液、または試験溶液0.05 mLを遮光した試験管に採取し、0.2 mol/L ホウ酸緩衝液(pH 9.0) 2 mLを添加し混合した後、0.3%フルオレスカミン溶液0.2 mLを添加して直ちに澄明な溶液になるまで混合した。これをメンブランフィルターでろ過し、測定溶液とした。

6. 定量試験

標準溶液をヒスタミン濃度2.5 µg/mLから100 µg/mLの範囲内で数点調製し、5.3の方法に従い誘導体化を行った。測定溶液20 µLをHPLCに注入し、ピーク面積を用いる絶対検量線法により定量した。

結果および考察

1. 蛍光誘導体化条件

ヒスタミンのHPLC測定は、測定感度を向上させるためにアミノ基を蛍光誘導体化する方法が一般的であり、ダンシルクロリド^{2),3)}、フルオレスカミン¹³⁾によるプレカラム誘導体化法、オルトフタルアルデヒドによるポストカラム誘導体化法⁶⁾が知られている。ダンシルクロリドによるプレカラム誘導体化法は、誘導体化反応に加熱操作を必要とし、未反応試薬除去のためにトルエンによる再抽出を行うなど操作が煩雑であり、迅速性に欠ける。オルトフタルアルデヒドによるポストカラム誘導体化法は誘導体化反応の自動化が可能であるが、ポストカラム分析に適用可能なHPLCを必要とする。そこで、本研究では反応速度が速く、室温で反応が完了し、未反応試薬の除去が不要である、フルオレスカミンによるプレカラム誘導体化法を行った。はじめに、玉瀬らの方法¹³⁾に従って誘導体化およびHPLC測定を行ったが、ピーク面積の再現性が得られなかった。フルオレスカミンは水によって分解されるため、誘導体化反応の完了前に未反応のフルオレスカミンが分解したと考えられたので、0.3%フルオレスカミン溶液を添加後、直ちに澄明な溶液になるまで混合した。この誘導体化操作に従って、ヒスタミン濃度50 µg/mLの標準溶液を5回繰り返し誘導体化したときのピーク面積の相対標準偏差は1.2%であり、良好な再現性が得られた。

2. HPLC条件

フルオレスカミン誘導体化ヒスタミンは、酸性基を有する構造であるため、移動相中で解離し、逆相系分析カラムに保持されにくい。玉瀬らは、移動相に添加したイオンペア試薬と、酸性基のイオン対形成を利用して、カラムへの保持を改善することにより、クロマトグラム上のヒスタミン、ヒスチジン、およびアミノ酸の良好なピーク分離を得た¹³⁾。この方法を参考に、移動相の酢酸緩衝液とメタノールの混合溶液にテトラブチルアンモニウムブロミドを添加し、逆相系の分析カラム(ODS)を用いて測定した。

3. 検量線および定量下限

ヒスタミン濃度2.5 µg/mLから100 µg/mLの範囲内

において決定係数0.999以上の良好な直線性が得られた。また、定量下限値($S/N \geq 10$)は5 µg/mLであり、試料中濃度に換算すると10 µg/gであった。

4. 抽出法の検討

魚肉はタンパク質含量が高く、分析の妨害となるため、除タンパク操作を行った。ヒスタミンの抽出と除タンパク操作を同時に行うため、抽出補助剤にトリクロロ酢酸を用いた。抽出法の検討用試料は、ヒスタミンを検出したイワシ丸干しを用いた。30秒間のホモジナイズ操作のみではヒスタミンの抽出が不十分であったため、森岡らの方法¹⁰⁾を参考に、30秒間のホモジナイズ操作後に5分間の高速振とう操作を加えて抽出を行った。これにより、ヒスタミンの定量値が約10%増加し、抽出効率が向上した。

5. 精製法の検討

日本国内に流通する食品に対するヒスタミン含有量の規制はないが、米国は50 µg/g、EUおよびコーデックス規格は100 µg/gであり^{*3~*5}、低濃度のヒスタミンの分析法が必要である。玉瀬らは、魚肉のトリクロロ酢酸抽出液を精製せずに、ヒスタミンを誘導体化してHPLC測定を行ったが、定量下限値は50 µg/gであり、低濃度の分析に適さなかった¹³⁾。魚肉はタンパク質および脂質含有量が高く、低濃度の分析を行うためには、精製および濃縮操作が必要であった。ヒスタミンは高極性塩基性化合物であり、陽イオン交換樹脂に保持されるので、近年、固相抽出カートリッジカラムのSCX^{9),10),12)}およびMCX¹¹⁾を用いた精製法が報告されている。

そこで、SCXおよびMCXを用いた精製操作を検討した。検討用試料は、オープンカラム精製時に良好な精製効果が得られなかったイワシ丸干しを用いた。試料抽出液を負荷したカラムを、希酸およびメタノールを用いた妨害物質の洗浄、塩基性条件におけるヒスタミンの溶出を検討したが、十分な精製効果が得られなかった。試料に含有される脂質の除去が不十分であるのが原因と考えられた。

森岡らは、カタクチイワシ中のヒスタミン分析において、脂質の除去のために逆相系ポリマーカラムのHLBと、SCXを組み合わせて精製した¹⁰⁾。これを参考に、脂質の除去を目的にODSの下部にSCXを直列に連結して、精製操作を検討した。試料抽出液を連結したカラムに通液後、ODSを取り除き、希酢酸および50%メタノールを用いてSCXを洗浄した。2.5%アンモニウム含有メタノールによるヒスタミンの溶出を行ったクロマトグラムをFig. 1(a)に示した。ODS精製を追加することにより、試料中の脂質および色素の除去に効果があったが、クロマトグラム上に妨害ピークが見られた。試料に高濃度に含有されるアミノ酸は、ヒスタミンと同様に酸性条件下でSCXに保持されるので、妨害ピークはアミノ酸であると考えられた。

坂本らは食品中不揮発性アミン類の分析において、抽出液を中性リン酸緩衝液を用いて中和することで、アミノ酸の大部分を両性イオンとし、SCXへの保持を抑制した¹²⁾。これを参考に、精製操作を行った。

Fig. 1. HPLC chromatograms of whole dried sardine fortified at 50 µg/g, and cleaned up with ODS and SCX connected cartridge

- (a) Trichloroacetic acid extract was loaded on the column, which was washed with diluted acetic acid and 50% EtOH, and eluted with 2.5% ammonia in MeOH
 (b) Cleaned up by the proposed method

Fig. 2. Elution profile of histamine from ODS cartridge

ODSを用いた脂質の除去、およびSCXへのアミノ酸の保持の抑制を目的に、中和した抽出液を中性リン酸緩衝液(pH 6.8)で希釈後、ODSとSCXを連結したカラムに負荷した。次に、中性リン酸緩衝液を用いてカラムを洗浄し、ODSに一部滞留したヒスタミンを溶出した。ODSを取り除き、希釈した中性リン酸緩衝液、水、メタノールの順にSCXを洗浄した後、アンモニア含有メタノールを用いて、ヒスタミンを溶出した。負荷時よりも低濃度の中性リン酸緩衝液でカラムを洗浄することにより、アミノ酸の影響と考えられる妨害ピークを低減することができた。

ODSにおける溶出試験の結果をFig. 2に示した。ヒスタミンとして500 µgを含む5%トリクロロ酢酸溶液10 mLを中和後、0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 6.8)10 mLで希釈し、メタノールと水でコンディショニングしたODSに負荷した。洗浄液に0.05 mol/Lリン酸緩衝液(pH 6.8)を用いて、2 mLごとの洗浄溶出画分を採取し、通過液とともにヒスタミン量を測定した。その結果、負荷したヒスタミンの82%がODSに保持されずに通過し、残りの18%は洗浄液6 mLで溶出した。

Fig. 3. Elution profile of histamine from SCX cartridge

SCXにおける溶出試験の結果をFig. 3に示した。ヒスタミンとして500 µgを含む5%トリクロロ酢酸溶液10 mLを中和後、0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 6.8)10 mLで希釈し、メタノールと水でコンディショニングしたSCXに負荷した。0.05 mol/Lおよび0.025 mol/Lリン酸緩衝液(pH 6.8)、水、メタノール各10 mLの順で洗浄後、溶出液にアンモニア含有メタノールを用いて、5 mLごとの溶出画分を採取し、ヒスタミン量を測定した。ヒスタミンは通過液および洗浄液には溶出せず、最初の5 mLの溶出画分ではほぼ100%、次の5 mLで1%未満であるが溶出した。

以上の検討によって得られたクロマトグラムをFig. 1(b)に示した。本法による精製操作を行うことで、妨害ピークが除去され、良好なクロマトグラムが得られた。

6. 添加回収試験

鮮魚3検体、水産加工品3検体について、添加回収試験を実施した。添加濃度は米国の規制値(50 µg/g)*³またはコーデックス規格の規制値(100 µg/g)*⁵を参考にした。各検体につき試料中ヒスタミン濃度が50 µg/g、または

100 µg/g になるように標準溶液を添加したものを 5 試料調製した。本法に従って試験溶液を調製し定量した結果を Table 1 に示した。平均回収率は 83~92%, 相対標準偏差は 5% 以下であり, 良好な結果が得られた。

食中毒事例を想定して, 水産加工品 (イワシ丸干し) に, 試料中ヒスタミン濃度が 1,000 µg/g になるように標準溶液を添加し, 本法に従って試験溶液を調製し定量した。平均回収率は 74%, 相対標準偏差は 5% であり, 本法は中毒量相当の高濃度のヒスタミンを含有する試料にも適用可能であった。

7. 実試料の分析

本法を用いて, 鮮魚 3 検体, 水産加工品 5 検体, 調理済食品 4 検体, および食中毒事例の残品 1 検体を分析した結果を Table 2 に示した。水産加工品のイワシ丸干し 1 検体から 170 µg/g, 調理済食品のブリ照焼から 28 µg/g, マグロ角煮から 78 µg/g のヒスタミンを検出した。イワシ丸干しは米国およびコーデックス規格の規制値を, マグロ角煮は米国の規制値を超えて, ヒスタミンを検出した。食中毒事例の残品であるマグロ醤油漬からは 4,600 µg/g のヒスタミンを検出した。

結 論

固相抽出カートリッジカラム精製を用いて, 魚肉中のヒスタミン分析法の検討を行った。試料のトリクロロ酢酸抽出液を中和し, 中性リン酸緩衝液で希釈したものを, ODS と SCX を直列に連結したカラムで精製した。ヒスタミンをフルオレスカミンで蛍光誘導体化し, イオンペアクロマトグラフィーを利用して蛍光検出器付き HPLC で測定した。その結果, 試料由来の妨害物質の影響を軽減し, 良好なクロマトグラムが得られた。

米国およびコーデックス規格の規制値における添加回収試験の結果は良好であった。また, 食中毒発生時の高濃度のヒスタミンを含有する試料にも適用可能であった。

本法は, 精製および誘導体化操作が簡便であり, 脂質含量の高い魚肉中のヒスタミン分析法として有用である。

なお, 本研究の要旨は, 第 46 回全国衛生化学技術協議会年会 (2009 年 11 月, 盛岡市) において発表した。

Table 1. Recovery of histamine in fish and fish products

Sample		Spiked level (µg/g)	Average recovery (%) / RSD (%) (n=5)
Fish	Pacific saury	100	83 / 4
	Yellowtail	100	83 / 3
	Tuna	50	86 / 1
Fish products	Dried horse mackerel	50	92 / 3
		100	92 / 4
	Whole dried sardine	50	84 / 2
		100	91 / 5
		1,000	74 / 5
	Dried mackerel seasoned with sweet sake	100	88 / 2

Table 2. Histamine content in fish, fish products, prepared foods and a food poisoning sample

Sample		Number of sample	Histamine content (µg/g)
Fish	Pacific saury	1	ND
	Yellowtail	1	ND
	Tuna	1	ND
Fish products	Dried horse mackerel	1	ND
	Whole dried sardine	2	ND, 170
	Dried mackerel seasoned with sweet sake	1	ND
	Spanish mackerel preserved in white soybean paste	1	ND
	Fried horse mackerel pickled in vinegar	1	ND
Prepared foods (Cooked)	Fried marlin	1	ND
	Yellowtail broiled with soy sauce	1	28
	Cooked tuna	1	78
	Tuna marinated in soy sauce	1	4,600

ND: not detected (< 10 µg/g)

文 献

- 1) Silla Santos, M. H. Biogenic amines: Their importance in food. *Intl. J. Food Microbiol.*, **29**, 213-231 (1996).
- 2) 厚生労働省監修. 食品衛生検査指針理化学編 2005. 東京, 日本食品衛生協会, 2005, p. 621-630.
- 3) 日本薬学会編. 衛生試験法・注解 2005. 東京, 金原出版, 2010, p. 199-201. (ISBN 978-4-307-47039-1)
- 4) Nagayama, T., Tamura, Y., Maki, T., Kan, K., Naoi, Y., Nishima, T. Non-volatile amines formation and decomposition in abusively stored fishes and shell-fishes. *Eisei Kagaku (Jpn. J. Toxicol. Environ. Health)*, **31**, 362-370 (1985).
- 5) Saito, K., Horie, M., Nose, N., Nakagomi, K., Nakazawa, H. Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Anal. Sci.*, **8**, 675-679 (1992).
- 6) Yoshida, A., Nakamura, A. Quantitation of histamine in fishes and fishes products by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Jpn.)*, **23**, 339-343 (1982).
- 7) Nakazato, M., Saito, K., Morozumi, S., Wauke, T., Ishikawa, F., Fujinuma, K., Moriyasu, T., Nishima, T., Tamura, Y. Determination of putrefactive non-volatile amines in foods following sample cleanup by solid phase extraction. *Eisei Kagaku (Jpn. J. Toxicol. Environ. Health)*, **40**, 203-209 (1994).
- 8) Oguri, S., Enami, M., Soga, N. Selective analysis of histamine in food by means of solid-phase extraction cleanup and chromatographic separation. *J. Chromatogr. A*, **1139**, 70-74 (2007).
- 9) Nakazato, M., Kobayashi, C., Yamajima, Y., Tateishi, Y., Kawai, Y., Yasuda, K. Determination of volatile basic nitrogen (VBN) and non volatile amines in fish sause. *Tokyotoritsu Eisei Kenkyusho Kenkyu Nenpo (Annual Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)*, **53**, 95-100 (2002).
- 10) Morioka, H., Fukuchi, T., Nonaka, Y., Morikawa, M., Yamamoto, Y., Kabayama, K., Hirata, Y. Analysis of histamine in dried anchovies by capillary electrophoresis. *Miyazakiken Eisei Kankyo Kenkyusyo Nenpo (Annual Report of the Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment)*, **19**, 65-67 (2007).
- 11) Peng, J. F., Fang, K. T., Xie, D. H., Ding, B., Yin, J. Y., Cui, X. M., Zhang, Y., Liu, J. F. Development of an automated on-line pre-column derivatization procedure for sensitive determination of histamine in food with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, **1209**, 70-75 (2008).
- 12) Sakamoto, T., Akaki, K., Hiwaki, H. Determination of nonvolatile amines in foods by liquid chromatography following excimer-forming fluorescence derivatization and solid-phase extraction. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Saf. Sci.)*, **51**, 115-121 (2010).
- 13) Tamase, K., Kitada, Y., Mizobuchi, M., Sasaki, M. Simultaneous determination of histidine and histamine in fish by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **25**, 525-529 (1984).