Cotton Acid Succinate による ヒスタミンの定量について

門 田 元・井上 淳太郎

(京都大学農学部水産微生物学研究室)

The Quantitative Determination of Histamine
with Cotton Acid Succinate
Hajime KADOTA and Juntaro INOUE

McINTIRE's method for the purification of histamine was applied to the quantitative determination of histamine produced in decomposed meat extract of fish.

It was found that this method is very suitable for rapid determination of histamine in a large number of samples.

The essential features of this method are as follows: A decomposed meat extract of fish which contains histamine is extracted with *n*-butanol under conditions such that 83% of the histamine is removed from the aqueous phase in one extraction.

The histamine is recovered from the butanol by means of a new cation exchange medium, cotton acid succinate. The histamine is eluted from cotton acid succinate with a small volume of diluted hydrochloric acid and the elute is neutralized with sodium carbonate and diluted with water to give a suitable concentration for colorimetric determination with diazo-reaction.

さきに著者の一人門田は林と共に、水産物の腐敗過程において生成するヒスタミンの簡易定量法の一つとして paper chromatography による方法を発表した。¹⁾ この方法によればその所要時間は従来の方法に比し遙かに短縮されるとはいえ、なお 10 時間以上を要するのみならず、又その操作にも可成りの熟練が必要である。従つてこの方法は簡易定量法としては必ずしも満足すべき方法であるとは云い難い。そこで今回は更に簡易且つ迅速に行い得るヒスタミン定量法の確立を目的として、溶剤抽出及び陽イオン交換性物質 cotton acid succinate による選択吸着を併用した新しい方法を試み、良好な結果を得たので茲に報告する。

この方法の原理は既に 1947 年 Abott 研究所の McIntire らによつて blood plasma 中に存在するヒスタミンの bioassay に用いられたものである。²⁾ 著者らは同氏らの方法に若干の改良を加えて、これを水産物の腐敗生産物として生成するヒスタミンの簡易迅速定量に応用した。

この方法の大要は、先ず試料中に存在するヒスタミンを *n*-ブタノールで抽出し、この *n*-ブタノールを cotton acid succinate の層を通過させてヒスタミンをこれに吸着せしめ、次にこの cotton acid succinate に吸着しているヒスタミンを稀塩酸を用いて溶離し、これを比色定量するのである。

I cotton acid succinate の合成

cotton acid succinate は前記の McIntire らによつて始めて用いられた陽イオン交換性物質であり、ヒスタミンに対して高度の選択性を有している。その本体は繊維素分子中に存在するアルコール基に琥珀酸が

エステル結合した物質である。これは遊離のカルボキシル基を有するため、この基が陽イオン交換反応を示し、ヒスタミンと結合するものと考えられている。その合成方法は次の如くである。

合成方法：500 cc. 容の丸底フラスコに氷醋酸 300 cc. 及び無水醋酸 20 cc. を容れ、これに乾燥した醋酸ソーダ 5 g 及び無水琥珀酸 40 g を添加し、完全に溶解せしめた後、これに精製脱脂綿 10 g を投入する。このフラスコに磨り合わせガラス栓にて連結する逆流冷却器を附し、その先端に乾燥管をつける。而る後フラスコを 48 時間 100 °C に保ち、綿繊維を充分エステル化せしめる。次いで、このエステル化した綿を濾別し、蒸溜水を用いて充分洗滌した後、0.4 N 塩酸、蒸溜水及びエタノールにて更によく洗滌し、後真空乾燥器中で乾燥する。

こゝに用いる無水琥珀酸は市販の琥珀酸より次の方法で合成する。

瓦斯吸収装置に連結した逆流冷却器を附せる 1000 cc. 容の丸底フラスコに琥珀酸 118 g 及び塩化アセチル 215 cc. を容れ、これを水浴上還流下に穏かに加温する。1.5~2 時間で全酸を溶解せしめた後、溶液をそのまま放冷し、更に氷浴中で冷却すると暫時にして美麗な結晶が析出する。これを BUCHNER 濾斗に濾取し、エーテル 75 cc. 宛にて 2 回洗滌し、真空乾燥器中で乾燥する。その収量は 93~95 g である。本品は琥珀酸の無水物であつてその熔融点は 118~119 °C である。

I 定量操作

ヒスタミンを含有する試料水溶液 4.5 cc. 及び salt mixture* 1.2 g を 50 cc. 容のガラス共栓付き三角フラスコに入れ、激しく振盪して salt mixture を溶解せしめた後、これに *n*-ブタノール 5 cc を加え、振盪機にかけ、35 °C で 30 分間振盪抽出を行う。次いで、これを遠心分離して、ブタノール層と水層とを完全に分離せしめ、このブタノール層から 4 cc. をピペットでとり、(以上の操作を行えば、遠心分離後のブタノール層の量はブタノールが吸水するため、最初に加えたブタノールの量より増加して 5.54 cc となる。従つて、こゝにとり出した 4 cc. のブタノール中に含まれるヒスタミンの量はブタノール層全体の中に溶存しているヒスタミンの量の 4/5.54 即ち、約 72 % である) cotton acid succinate 100 mg を堅く充填した Fig. 1 に示すような吸着管にこの液を注ぐ。(この場合、吸着管を通過した液が 1 分間に約 10 滴の割合で落下するように予め cotton acid succinate の堅さを調節しておく) 次にこの CS (cotton acid succinate を以下 CS と略称する) を 95 % エタノール 3 cc., 蒸溜水 3 cc で順次洗滌し、CS をガラス棒で押しつけて洗滌液を充分除去した後、CS に 0.4 N 塩酸 1 cc. を加えて吸着しているヒスタミンを CS から溶離せしめる。更に数 cc. の蒸溜水で洗滌し、溶出液ならびに洗滌液を合し、これを 1.5 N 炭酸ソーダで中和する。次に蒸溜水を加えて一定量となし、その中の一定量を取り、木俣氏らの方法³⁾に準じてデアゾ反応による比色定量を行う。

上述のように試料中に含まれるヒスタミンの 83 % がブタノール層へ移行し、この 72 % を CS に吸着せしめることになるのであつて、こゝに得られる値はこの量を示している。従つて、こゝに得られる値に上記の補正を行えば試料中に存在するヒスタミンの真の値が得られる。

* 無水硫酸ソーダ Na_2SO_4 , 6.25 に対し、磷酸ソーダ $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ を 100 °C で 48 時間乾燥後 300 °C に 3 時間加熱したもの) 1 の割合で混合したものである。この 1.2 g を試料 4.5 cc. に加えると、その塩類濃度は 22.5 %, pH は 12.5 となり、試料中のヒスタミンは高率にブタノール層へ移行し得る状態となる。(この率は水とブタノールとの間におけるヒスタミンの分配係数に支配され、塩類濃度 pH 値等により影響を受ける。MoINTIRE ら²⁾は上記の如き条件下で水層よりブタノール層へのヒスタミンの移行率が最大となる事を示しているが、著者らの実験結果では、この条件下におけるヒスタミンの移行率(抽出率)は後に示す如く、83 % である。

Ⅲ ブタノールによるヒスタミンの抽出率

上記の定量操作を実施するに当たり、試料中のヒスタミンがブタノール層へ移行する割合が抽出時間及び試料中に含有されるヒスタミン量の多少によつてどのような影響を被るかを確かめるために行つた実験である。

先ず 400 γ /4.5 cc. のヒスタミン塩酸塩を含有する水溶液を試料に用い、ブタノールによる抽出時間を異にする以外は上記と同様の操作を行い、得られた値を 0.72 (4/5.54) にて除してその回収率を測定し、Table 1. に示すような結果を得た。

Table 1. Effect of extracting time on the recovery of histamine from aqueous solution by means of CS method.

Extracting time in minutes	10	20	30	60	90
Recovery of histamine %	74	81	83	83	83

(Concentration of histamine di HCl in aqueous solution : 400 γ /4.5 cc., Extracting temperature : 35°C)

即ち、抽出時間が 30 分以上の場合にはヒスタミンの回収率はいずれも 83 % となり、抽出時間の相違による抽出率の差異は認められない。又この実験に際して CS 吸着管を通過して流下したブタノールならびにヒスタミンを吸着した CS 吸着管の洗滌エタノール及び洗滌水についてヒスタミンの存否を検したが、いずれについてもその存在は全然認められなかつた。従つて、ブタノールに溶存するヒスタミンは CS により完全に吸着される事は明かである。即ち、この事実から試料中に存在するヒスタミンの 17 % は抽出操作の際にブタノール層へ移行せず、そのまま試料中に残留するものと考えられる。

次に、各種濃度のヒスタミン塩酸塩水溶液を試料として前記Ⅱの定量操作を行い、得られた値を 0.72 にて除してその回収率を測定し、Table 2 に示すような結果を得た。

Table 2. Effect of concentration of histamine on the recovery of histamine from aqueous solution by means of CS method.

Concentration of histamine di HCl γ /4.5 cc.	300	400	500	1000	1500	2000	5000
Recovery of histamine %	83	83	83	83	83	83	83

(Extracting time : 30 minutes, Extracting temperature : 35°C)

即ち、300 γ /4.5 cc. ~ 5000 γ /4.5 cc. の実験範囲内では試料のヒスタミン濃度の大小に拘らず回収率は常に 83 % である。

ブタノールによるヒスタミンの抽出率は水とブタノール間におけるヒスタミンの分配係数に支配されるのであるが、この抽出条件下では試料のヒスタミン濃度に関係なくほぼ一定であり、従つて上記の濃度範囲内にヒスタミンを含む試料を用いる場合には抽出率はいずれも相等しく常に 83 % の値が得られるのである。

Ⅳ CS の再生

Fig. 1 Cotton acid succinate tube.

一旦ヒスタミンを吸着、溶離した CS が最初と同様のヒスタミン吸着能力を保持するや否やをしらべるため、一旦使用済の CS を水及びエタノールにて洗滌、乾燥後更に数回繰返して使用した結果は Table 3 の如くである。本実験においては 400 γ /4.5 cc. のヒスタミン塩酸塩を含有する水溶液を試料として前記 II の定量操作を行い、得られた値を 0.72 にて除してその回収率を測定した。

Table 3. Recovery of histamine from aqueous solution by means of regenerated CS.

Times of regeneration of CS	0	1	2	3	4
Recovery of histamine %	83	83	83	83	83

(Concentration of histamine di HCl : 400 γ /4.5 cc., Extracting time : 30 minutes, Extracting temperature : 35°C)

即ち、Table 3 より明かなる如く、再生を 4 回繰返してもなお CS のヒスタミン吸着能力には全然変化が現われない。

V ヒスタミン以外のデアゾ反応呈色物質の影響

McINTIRE らの研究結果からも CS がヒスタミンに対して高度の選択性を有する事は明かであるが、著者らは魚肉中に存在する各種のデアゾ反応呈色物質中、その量の比較的多いヒスチジンが前記の方法によるヒスタミンの定量結果に影響を及ぼすや否やをしらべるため、ヒスチジン塩酸塩水溶液を試料として前記 II の定量操作を行い、この化合物が本法によるヒスタミンの定量結果に何等の影響を及ぼさない事を確めた。

VI 天然物（腐敗魚肉エキス）中のヒスタミン定量例

約 2 倍量の水を用いて抽出したマサバの肉エキスを常法に従つて滅菌し、これに魚肉腐敗細菌 *Achromobacter histamineum*.⁴⁾ を接種し、25~26°C において腐敗分解せしめ、一定時間毎に試料中のヒスタミンを前記 II の方法ならびに木俣氏の改良による EGGERTH 法³⁾ により定量し、両法による定量値を比較した。その結果は Table 4 の如くである。

Table 4. Determination of histamine in decomposed meat extract of *Scomber japonicus*.
(Comparison between CS method and KIMATA's method)

Incubation time in days*	Histamine di HCl γ in 1 cc. of sample (cs method)	Histamine di HCl γ in 1 cc. of sample (Kimata's method)
0	64	—
1	66	—
2	1873	1850
3	2609	2620
4	3078	3080

* Meat extract was inoculated with *Achromobacter histamineum* and incubated at 25~26°C.

時間であり、従来の方法にはみられない短時間において定量が出来る。従つて一時に多数の試料を扱う場合とか、短時間に結果を出す必要のある場合等には本法は極めて好適な定量法であると考えられる。なお、本法は技術的にも比較的容易であり、又その材料費も多量の高価な溶剤を必要とする従来の方法に較べて遙に低廉である。

又、同時に、試料に一定量の結晶ヒスタミン塩酸塩を添加したものについても、同様に前記 II の方法による定量を行い、その回収率を求めた。結果は Table 5 に示す如くである。Table 4 及び Table 5 中、CS 法による定量値は II 定量操作の末尾に記載したように補正した値である。

即ち、前記 II の定量方法によれば誤差 5% 以内と云う鮮度判定等の目的には充分な精度を有する値が得られ、而もその所要時間は 1.5~2

Table 5. Recovery of histamine from decomposed meat extract of *Scomber Japonicus* by CS method.

Incubation time in days *	Histamine added **	Histamine found **	Histamine recovered **	% Recovery
0	0	64		
0	333	390	326	97.9
1	0	66		
1	333	385	319	95.8
2	0	1873		
2	333	2209	336	100.9
3	0	2609		
3	1000	3613	1004	100.4
4	0	3078		
4	1000	4116	1038	103.8

* Meat extract was inoculated with *Achromobacter histamineum*. and incubated at 25~26°C.

** Histamine di HCl γ in 1 cc. of sample.

要 約

1947年 McINTIRE らによりヒスタミンの精製に用いられた陽イオン交換性物質 cotton acid succinate を用いて、水産物の腐敗生産物として生成するヒスタミンの簡易迅速定量を試み、回収率の高い好結果を得た。この方法は短時間に多数の試料を処理し得る点において既知の各種定量法に優るものである。

本研究に際し、終始得難なる御指導を賜った木俣正夫教授に深謝する。

文 献

- 1) 門田元, 林孝市郎: 京都大学食糧科学研究所報告, **6**, 30 (1951).
- 2) F.C. McINTIRE, L.W. ROY, and J.L. SHAW: Jour. Biol. Chem., **170**, 537 (1947).
- 3) 木俣正夫, 河合章: 京都大学食糧科学研究所報告, **5**, 21 (1951).
- 4) M. KIMATA and A. KAWAI: Memoirs of the Research Institute for Food Science, Kyoto University **6**, 1 (1953).