魚肉中のアミンの生成について—Ⅲ.

魚肉中のヒスタミンの簡易検出法*

太 田 冬 雄

(鹿児島大学水産学部)

On the Formation of Amine in Fish Muscle—III.
—Simple Method for the Detection of Histamine in Fish Muscle—

Fuyuo Ota

Simple method for the detection of histamine in fish muscle, based on the extraction of histamine azo-compound with organic solvent, was presented. When *p*-nitroaniline was used for the preparation of diazo-reagent, using ethyl-acetate as a extracting agent, histamine azo-compound was easily transferred into the ester and separated from that of histidine. And furthermore the azo-compound of almost all the diazo-reaction positive substances presumably contained in fish muscle was also kept free from being transferred into the ester. At the high concentration of histidine, histidine azo-compound slightly passed into the ester, but it was possible to remove this by treating with dilute alkaline solution.

Detection procedure was summarized as follows: Fish muscle extract was obtained by shaking and filtering after being added 20 volumes of water (or successively 10 volumes of water and of 5% CCl_3COOH). To 1.0cc. of the extract, was added 2.0cc. of 2.0% Na_2CO_3 . To the above solution, was added 1cc. of diazo-reagent. After brief standing, 7cc. of ethyl-acetate was added to it and its solution was shaken vigorously. Histamine concentration was measured roughly from the intensity of rose color of ester layer. Diazo-reagent was freshly prepared by adding 0.1cc. of 5% NaNO_2 to 5cc. of 0.1% *p*-nitroaniline in 0.1N HCl solution, and it was used immediately after preparation.

ヒスタミンが食品中毒の主因であるかどうかについてはなお論議がある¹⁾としても、有毒物である事は古くから知られている事であり、最近の水産食品の中毒例^{2),3)}に於ても食品中に多量のヒスタミンが検出され、主要な原因物質とされている。しかも一般に鮮度判定指標として利用されている揮発性塩基量は概して少なかった事が明らかにされている。

しかしこの様な事は、元々揮発性塩基とヒスタミンとがその生成機構を異にする事から考えると当然起る事なのであつて、すでに木俣等⁴⁾は、魚肉の鮮度低下による揮発性塩基とヒスタミンの生成は必ずしも常に平行せず、ある温度 (20°C) 附近では揮発性塩基に対しヒスタミンの生成が著しく多く、従つてこの様な温度で貯蔵された時の揮発性塩基による鮮度判定には危険性のあることを指摘しており、筆者等⁵⁾も同様の事を確かめ、更に広い範囲の温度 (15~32°C) に危険性のあることを報告した。

従つてこの様な危険性を防ぐためには、原料の不鮮、加工過程に於ける汚染、鮮度の低下を避けるべきはいうまでもなく、一方鮮度判定の面からは、従来の鮮度指標の規準量に再検討の必要もある様に思われるが、むしろ実際問題としては、直接ヒスタミン量を測定して危険性を防ぐのが適確であると考えられる。(すでに GEIGER⁶⁾は魚肉の鮮度判定にヒスタミンの測定を提案している)。

しかしそのためには、ヒスタミンの簡易な検出、定量法が必要なのであるが、従来の検出、定量法^{7~13)}に

1957 年 12 月 12 日受理

* 本文の要旨は、日本水産学会 (1955. 4. 東京) にて発表した。

はこの目的に適當と思われるものが殆どなく、最近のイオン交換剤による方法¹⁴⁻¹⁸⁾は、これまでの方法に比し著しく簡易化されたとはいえ、なお上の目的の為には充分とはいえない難い様に思われる。そこで筆者は主として操作の簡易、迅速化に目標をおき諸種の実験工夫を試みた結果、ほぼ目的に副い得る方法を見出す事が出来た。方法は要するにヒスタミンのデアゾ呈色物を有機溶剤にて分離抽出する事を原理とするもので、本文ではこの原理に基づくヒスタミンの検出法について述べる。

実 験

1. 検出操作

魚肉の水浸出液 (1: 20)*¹ 1cc を採り、之に 2% Na_2CO_3 2cc を加え混和、次いで調製直後のデアゾ試薬*² 1cc を加えデアゾ呈色させる。之に醋酸エチル 7cc を加え激しく振盪する。静置後醋酸エチル層の呈色度よりヒスタミン (Hm) 量を推定する*⁴。新鮮肉では殆ど全く呈色なく、Hm 量に従つて赤紫色からその濃厚色となる。薄い rose では肉質が辛味を感じずる程度、明瞭な赤紫色では相当量 (約 50mg % 以上) を含むものと推定される。

2. Hm 及びヒスチジン (Hd) のアゾ色素 (AZ) の有機溶剤への移行性

本法の原理は、Hm-AZ がある種の有機溶剤に移行するが、他の AZ は移行しない事を前提としている。そこで先ず、魚肉中のデアゾ反応陽性物質中、量的に最も多い Hd を対象としてその AZ と Hm-AZ との有機溶剤への移行性を比較した。即ち Hm 20 γ , Hd 200 γ (共に和光純薬製 HCl 塩) を夫々含む溶液について、sulfanilic acid, *p*-nitroaniline 及び *p*-chloroaniline によるデアゾ試薬にて呈色させ、之に入手容易な各種有機溶剤を加えその移行性を観察した。その結果が Table 1 である。

移行性はデアゾ試薬調製のための芳香族アミン試薬の種類で異なり、sulfanilic acid の場合は Hm, Hd の AZ 共にいずれの溶剤にも移行しないが、*p*-nitroaniline では極く限られた溶剤への移行性が見られ、醋酸エステルに対しては特異的に Hm-AZ のみが移行した。又 *p*-chloroaniline では、かなり広範な移行性が見られ、エーテル、石油エーテル及び CCl_4 に対しては Hm-AZ のみが移行し Hd-AZ は殆ど移行しない。之らの結果からこの方法の基礎条件が掴めるのであるが、実際への適用性の諸点 (移行性、水液との分離及び回収等の難易) から考え、結局 *p*-nitroaniline によるデアゾ反応物を醋酸エチルで抽出するのが適當と考えた。即ち Hm-AZ は容易に醋酸エチルに移行し明い赤紫色を呈し定性的ではあるが Hm 濃度に比例し、Hd と共存する場合にも同様に移行

Table 1. Transferability of the azocompounds of histamine and histidine into organic solvents.

Organic solvents	SFA ¹		PNA ²		PCA ³	
	Hm ⁴	Hd ⁵	Hm	Hd	Hm	Hd
Ether	—	—	—	—	+	±
Pet. ether	—	—	—	—	+	—
Ligroine	—	—	—	—	±	—
Pet. Benzin	—	—	—	—	±	—
Chloroform	—	—	—	—	+	±
Benzene	—	—	—	—	+	±
CCl_4	—	—	—	—	+	—
CS_2	—	—	—	—	±	—
<i>n</i> -Butanol	—	—	+	+	+	+
Amyl alcohol	—	—	+	±	+	+
Toluol	—	—	—	—	+	±
Xylol	—	—	—	—	+	±
Methyl acetate	—	—	+	±	+	+
Ethyl "	—	—	+	—	+	+
Butyl "	—	—	+	—	+	+
Amyl "	—	—	+	—	+	±

1 sulfanilic acid, 2 *p*-nitroaniline, 3 *p*-chloroaniline
4 histamine, 5 histidine.

+: transferable ±: slightly transferable
—: not transferable

*¹ 又は除蛋白液。 *² 0.1% *p*-nitroaniline の 0.1N HCl 液 5cc に 5% NaNO_2 0.1cc を加える。

*³ 精製品が望ましい。 *⁴ エステル層を採り、無水 Na_2SO_4 で処理すると呈色が一層明瞭となる。

したからである。

3. Hm, Hd 以外のジアゾ反応陽性諸物質 AZ の醋酸エチルへの移行性

魚肉中には Hm, Hd 以外に多くのジアゾ反応陽性物質の存在が知られている。そこで之らの AZ の醋酸エチルへの移行性をしらべた。即ち試験標品の 20~50 γ を含む溶液について観察した結果、チロシン、グアニン、キサンチン、アデニン、尿酸、チミン、ピリドキシン、チアミン、イミダゾールプロピオン酸等の AZ はいずれも全く移行せず、チラミンの AZ は僅かに移行したが、その濃度に対する呈色度は Hm に比し遙かに低く、移行量も甚だ少なく、Hm と等量の時でも殆ど無視できる程度であつた。又イミダゾール醋酸は、濃度の高い時に僅かに移行したが、影響として認める程ではなかつた。即ち、Hm-AZ の醋酸エチルへの移行性は非常に特異的である。

4. Hm-AZ の醋酸エチルへの移行性に対する魚肉成分の影響

Hm-AZ の呈色或いはその移行性に対し、魚肉中の共存成分の影響が考えられるので、この点についてしらべた。その結果普通に知られているアミノ酸、有機塩基、乳酸、グリコーゲン等ではいずれも殆ど全く影響なく、僅かに尿酸、チアミンが、しかもかなり多量共存する場合に呈色を多少減少させたが、前者は今のところ魚肉中の存在が明らかでなく、又後者の肉中含量も影響する量より遙かに少ないから、実際問題として魚肉成分の影響は殆どないものと考えられる。事実、数種魚肉浸出液を加えたものでは殆ど移行性に差異は認められなかつた。(之らの諸点については、後報で定量的に示す。)

5. 醋酸エチルに移行した Hm 及び Hd の AZ に対する酸、アルカリの影響

前項 2. の実験で試験した Hd 量は、実際の魚肉試料の場合を考えると必ずしも充分な濃度とはいえない。そこで更に高濃度(試験液中 500~1000 γ)の場合について試験したところ、Hd-AZ が僅かに乍ら移行するのが見られた。その程度は Hm の危険性を問題にする呈色からすると、遙かに少ないものであつたから、検出法としては無視してもよいと思われるが、厳密にはこの影響を防止することが望ましい。(後報する定量法としては当然考えられるべき点である。)

そこで之について若干の工夫の試みたところ、簡単な処理で除き得る事が分つた。即ち醋酸エチルに移行した微量の Hd-AZ は稀 Na_2CO_3 で処理すると容易に Na_2CO_3 層に移行するが、Hm のそれは全く移行しない。又稀酸処理では逆に Hm-AZ は酸層に移行するが、Hd のそれは黄変するのみで移行しない。又中性附近の磷酸緩衝液では両者共に移行しない。従つて精密な検出定量のためには当然これらの除去処理が必要である。

考 察

食品中の Hm 量を求めるからには勿論、明確な定量値を得ることが望ましい。しかし食品中毒因としての量を問題にする限り、できるだけ迅速にその含量の程度を判定する事が必要である。しかも五十嵐¹⁹⁾によると魚肉中の Hm に基く辛味感覚量は 10~20mg %, 又清水等²⁰⁾によるとその中毒限界量は約 100mg % といわれる。従つて、実際問題としてはこの程度の判定ができれば、検出法としての目的は相当に達しているものと考ええる。

その点本法は、所謂検出法としては多少簡易さに欠けるかもしれないが、少しく注意すると半定量的な検出が可能である。即ち本法は食品衛生上からの Hm 検出法として実用できるものと考ええる。

要 約

1. 魚肉中のヒスタミン量の簡易に検出する方法を示した。この方法は *p*-nitroaniline を用いるジアゾ反応によるヒスタミンアゾ色素を醋酸エチルにて抽出することを原理とする。

2. ヒスタミンアゾ色素は醋酸エチルに移行するが、ヒスチジン及び他のジアゾ反応陽性物質のアゾ化合物はいずれも殆ど全く移行しない。ヒスチジンアゾ色素は高濃度の時に僅かに移行するが、この影響は稀アルカリ処理によつて容易に除かれる。

3. ヒスタミンアゾ色素の移行性, 呈色度に対し, 魚肉中の諸成分は殆ど全く影響しない。

終りに, 本文の御校閲を賜わった北大教授小幡彌太郎先生に感謝の意を表する。又文献その他に関し御援助を賜わった鐘紡中央試験所の増田所長, 貴重な試験標品を御分与下さった千葉大学腐敗研究所の安藤宗八先生及びその御斡旋の労を取って下さった同大学の福山正臣先生並に本学部黒木助教授に併せて感謝する。

文 献

- 1) 宮木高明: 自然, **7** (12) 12~20, (1952).
- 2) 柳沢文徳: 食品衛生, (1957), p. 41, 共立.
- 3) 河端俊治・石坂公成・三浦和之: 本誌., **21**, 335~340, 1167~1170, (1956).
- 4) 木俣正夫・河合 章: 京大食研報告., No. **6**, 83~98 (1952).
- 5) 太田冬雄・鰺坂比呂志: 鹿大水産紀要., **5**, 134~139 (1956).
- 6) E. GEIGER: *Food Res.*, **9**, 293~297 (1944).
- 7) K. K. KOESSLER and M. T. HANKE: *J. Biol. Chem.*, **39**, 497 (1919).
- 8) A. H. EGGERTH, R. J. LITWIN and J. V. DEUTSCH: *J. Bact.*, **37**, 187~203 (1939).
- 9) 秋山義春: 福岡医科., **30**, 1~40 (1937).
- 10) 横山良平: 東京医事新誌., 1948~1953 (1936).
- 11) 五十嵐彦仁: 北水誌月報., **1** (1) 24~31 (1944).
- 12) 門田 元・林孝市郎: 京大食研報告., No. **6**, 30~35 (1951).
- 13) 柿本大老: 鹿大水産紀要., **3**, 45~49 (1954).
- 14) F. C. MCINTIRE, L. W. ROTH and J. L. SHAW: *J. Biol. Chem.*, **170**, 537~544 (1947).
- 15) S. M. ROSENTHAL and H. TABOR: *J. Pharmacol. Expte. Teerap.*, **92**, 425~431 (1948).
- 16) 門田 元・井上淳太郎: 本誌., **19**, 916~920 (1953).
- 17) R. LUBSCHEZ: *J. Biol. Chem.*, **183**, 731~738 (1950).
- 18) 小牧庸夫: 日本医学雑誌., **12**, 574~587 (1953).
- 19) 五十嵐彦仁: 本誌., **8**, 161~164 (1939).
- 20) 清水 亘・日引重幸: 本誌., **20**, 206~208 (1954); **21**, 365~367 (1955).