イオン交換樹脂 (Amberlite CG-50) による ヒスタミンの簡易定量法

河端 俊治・内田 大・赤野多恵子

(1960 年 7 月 16 日受理)

A SIMPLE AND RAPID METHOD FOR THE DETERMINATION OF HISTAMINE IN FISH FLESH

Toshiharu KAWABATA, Yutaka UCHIDA and Taeko AKANO*

The method herein reported employs a cationic exchanger, Amberlite CG-50, type 1 (100~200 mesh) for separating histamine (Hm) from such interfering substances as histidine (Hd), tyrosine, tyramine, etc., in a trichloroacetic acid extract (TCA-extract) of fish flesh.

The outline of newly devised method by the authors is as follows:

A 10ml portion of a TCA-extract is adjusted to pH 4.6 and added to top of a cationic exchanger column (8×55mm; flow rate, 2~3ml/min.; pH of the resin is pre-conditioned to pH 4.6 with 0.2N acetate buffer).

The column is rinsed with 80ml of 0.2N acetate buffer at pH 4.6 and the Hm absorbed on the resin column is eluted with 8ml of 0.2N HCl. The reaction of the elute is adjusted to pH 7 and the volume is filled to 10ml with distilled water.

A 2ml aliquot of the elute is distributed in a colorimetric tube containing 5ml of 1.1N Na₂CO₃, coupled with 2ml of Paury's diazo reagent, and the absorbance is determined at 510 mμ by a Coleman spectrophotometer.

The recovery of Hm by this method was 99 to 101%. The maximum exchangeable capacity for Hm of the column was 7,000γ with pure Hm-2HCl solution and 6,000γ with decomposed fish extract. The presence of Hd, tyrosine, or tyramine in TCA-extract did not influence the Hm value.

ま え が き

魚介類の化学的鮮度測定法には古くから多くの方法が提唱されているが、何れも一長一短があり、現在のところ決定的な方法はないといつても差支えない。ヒスタミン (Hm) が鮮度判定の一つの指標として用いられるのは次の理由による。(1) Hm は新鮮な魚肉中には痕跡程度しか含まれず、その形成は主として細菌によるもので^{1),2)}、鮮度低下とともに増加する。(2) 揮発性塩基や pH は缶詰食品のような場合には加熱処理によつてかなり変化し、原料魚の鮮度とは必ずしも一致しないこともあるが、Hm は加熱によつて増減することはない。Hm はその母体ヒスチジン (Hd) が脱炭酸して生成されるので、一般に Hd 含量の多い赤身の魚種では鮮度低下につれて多量に形成されるが、白身の魚種では生成量は極めて少く、その量は鮮度と一致しないのが欠点である。ところで赤身の魚種によりしばしばアレルギー様食中毒³⁾ が起り、その原因物質には Hm や未知のヒスタミン様物質 (サウリンのごとき) がある。このような有毒物質の異常蓄積のときには魚は特殊な鮮度低下形式をとり²⁾、アンモニア-N やトリメチルアミン-N は正常値の範囲であり、かつ臭気その他でも異常は認められない。従つて Hm の測定や全迷走神経刺激物質の定量は食品衛生上からは重要な意味をもつてくる。

* 国立予防衛生研究所 食品衛生部 (Department of Food Control, National Institute of Health, Tokyo, Japan).

従来から Hm の定量方法には Bioassay⁴⁾, 沔紙クロマトグラフィー⁵⁾, Eggerth 法⁶⁾, 大田法⁷⁾があり, また陽イオン交換物質 (cotton acid succinate) の Hm に対する選択性を別用した McIntire-門田法⁸⁾や大田法を改良した富山法⁹⁾等がある。これらの中にはすぐれた方法もあるが, なかには定量誤差の大きいものもあり, 全般的に簡易性という点では更に改良, 工夫の余地がある。

著者らは今回 Amberlite CG-50 (type 1) を用いる Hm の簡易定量法を考案し, 種々検討の結果, この方法は簡易であり, かつ精度も良いことが判つたので, ここに報告する。

定 量 方 法

1. 試 薬

a) Hm 標準液: Hm-2HCl (和光純薬製) 165.61 mg を蒸留水に溶かして 100 ml とする。この溶液は Hm (遊離) として 1 mg/ml に相当する。b) 2N 酢酸緩衝液: 120 g の氷酢酸 (特級) と 40 g の水酸化ナトリウム (特級) を蒸留水に溶かして 1 l とする。(pH 4.6)。c) 0.4N 酢酸緩衝液 (pH 4.6): 2N 酢酸緩衝液を 5 倍にうすめて使用。d) 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6): 2N 酢酸緩衝液を 10 倍にうすめる。e) 0.2N 塩酸 (特級)。f) 1.5N 炭酸ナトリウム溶液 (特級)。g) 1.1N 炭酸ナトリウム溶液 (特級)。h) 5% 亜硝酸ナトリウム溶液 (特級)。i) 0.9% スルファニル酸溶液: スルファニル酸 (特級) 0.9 g を 10% 塩酸にとかし 100 ml とする。j) 10% トリクロル酢酸 (TCA): 除蛋白用。k) 10% 水酸化ナトリウム溶液 (特級)。

2. イオン交換樹脂柱の調製

a) 樹脂の準備: Amberlite CG-50 (type 1), 100~200 メッシュの樹脂をビーカー中にとり, 約 5 倍量の 1N 塩酸を加えて 10~20 分間かきまぜ, 静置後上清を捨てる。この操作を 2~3 回反覆し, 樹脂の洗浄とともに十分に [H] 型にする。(ただし一旦使用した樹脂を再使用するには, 予めアセトンで脱脂し, 次

Fig. 1. An Amberlite CG-50 Column for the Separation of Histamine.

に 2N 塩酸で十分処理する)。次に蒸留水で遊離の塩酸が十分に除去されるまで洗浄し, 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) 処理を行い, 樹脂の pH が 4.6 に至つたなら, 共栓ビン中に移して保存する。b) カラムは Fig. 1 に示したもので下端にガラス綿をつめ, ついで活性化した樹脂を高さ 5.5 cm (約 2 ml) につめ, 0.2N 酢酸緩衝液を流して均一に沈下させる。液の流下速度は 2~3 ml/min. になるようガラス綿の固さを調節する。またカラム中の気泡は完全に除かねばならない。

3. 定量操作

a) 魚肉抽出液の作製: 細切した魚肉 10 g を乳鉢中にとり少量の石英砂とともに十分すりつぶし, 蒸留水 20 ml を加えてよく混和する。次いで 10% TCA 20 ml を加えて混和後 10 分間放置し, 乾燥沔紙 (No. 5A) を用いて沔過する。(魚肉水分 80% のときこの沔液 1 ml は肉 1/4.8 g に相当する)。b) イオン交換樹脂カラムによる Hm の分離: 魚肉 TCA 抽出液 10 ml を 30~50 ml 容ビーカーにとり, これに 10% 水酸化ナトリウムを滴下して pH を 4.5~7 にし, 10 ml の 0.4N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) を加えて混合し, カラムに注入する。つぎに 80 ml の 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) をカラムに通過させるが, その一部で試料を入れたビーカーを洗浄し, カラム中に洗液を移す。

樹脂に吸着された Hm は 8 ml の 0.2N 塩酸で溶離する。溶離液は 1.5N 炭酸ナトリウム溶液を滴下して pH を 7 にし, 水を加えて 10 ml の定容とする。この溶液は Hm の濃度により比色に際して適

宜稀釈をする。(比色測定範囲は 2~25 γ の Hm)。c) 標準曲線: 標準 Hm 溶液を蒸留水で稀釈し、最終的に 5% になるよう TCA を加え、1~30 γ /ml の Hm 稀釈液を作る。各々を 10% 水酸化ナトリウムで中和し、b) の分離法に従って Hm をカラムに吸着、溶出する。この溶出液を次の d) に示した方法で発色させ、Coleman 光電比色計を用い 510 $m\mu$ で吸光度を測定し、標準曲線を作成する。(なお標準曲線の作成に当って Hm 溶液 (5% TCA に溶解) をカラムに通過させる操作を省略しても全く同一の標準曲線が得られたので、実用的にはカラム通過の段階を省略しても差支えないであろう)。d) Hm の発色: 比色管 (径 18mm, 長さ 180mm の試験管型) に 1.1N 炭酸ナトリウム溶液 5ml を加えておく。他方、氷浴中にてスルファニル酸を亜硝酸ナトリウム溶液の等量を混合してジアゾ試液を調製し、これを 20~30 分後に使用する。炭酸ナトリウム溶液を入れた比色管に 2ml のジアゾ試液を静かに注加し、1 分後に検液し (c) で示した pH 7 に調整した溶解液) 2ml を加えて、激しく振り混ぜる。検液を加えて 5 分後に 510 $m\mu$ の波長で吸光度を測定する。同時に検液の代りに蒸留水を用いて盲験を行ない、盲験値を測定値から差引く。e) 計算: 標準曲線から検液の吸光度に相当する Hm 値を求める。これに稀釈倍数を乗じて Hm 含有量を算出する。f) 別法: c) 以下に記載したジアゾ試液を用いる Hm の化学的定量法の代りに生物学的方法で Hm を求めてもよい。すなわち b) で作成した分離液を適宜稀釈し、モルモット摘出腸管を用いる Magnus 法で定量する。この際には栄養槽中に酸素の代りに空気を通ずれば操作は更に簡易化される¹⁰⁾。Hm の定量は標準 Hm (1~2 γ) の収縮程度と検液による収縮程度を比較する。(ただし生物学的方法では通常 5% 内外の誤差を伴う)。

定量方法の検討

1. 標準曲に関する検討

蒸留水にて稀釈して作成した Hm の稀釈液 (1~30 γ /ml) と 5% TCA に溶解し 10% 水酸化ナトリウムで中和した Hm の稀釈液 (1~30 γ /ml) を作成し、その各々 2ml を用い前記定量操作 d) と同様ジアゾ反応によって 510 $m\mu$ の波長で Hm の比色定量を行なった。

得られた結果は Fig. 2 の通りで、中和した Hm-TCA 溶液では曲線 I、中和しない Hm では曲線 II が得られた。すなわち I は II よりも傾きが大きであつたことから、中和したときの方が呈色度が高かつた。つぎに 5% TCA に溶解した Hm を pH 4.6 に反応を修正後、カラムに吸着させ、0.2N 塩酸で溶解後、pH を 7 に調整し、それについて同様の標準曲線を作成したが、得られた曲線は I と全く一致した。

従つて、本法における標準曲線は既知量の Hm-TCA 溶液を Amberlite CG-50 カラムに吸着、流出させて求める代りに、5% TCA に溶解した Hm を予め中和し、発色させて求めても実用的には差支えないことが判つた。なお比色定量の誤差は $\pm 1.6\%$ 以内であつ

Curve I; Hm in TCA solution was separated by the ion-exchanger technique and the elute was neutralized.

Curve II; Hm-HCl, un-neutralized.

Fig. 2. Standard Curves of Histamine measured by a Coleman Spectrophotometer at 510 $m\mu$.

た。

2. 樹脂活性化の pH および洗浄液の pH と Hm の吸着量

Hm の吸着量は樹脂柱の処理 pH によつて異なり、また魚肉中に存在する Hd などジアゾ反応陽性物質の吸着及び除去には洗浄液の pH が関係するので、ここでは樹脂の処理及び洗浄液の pH について検討を行なつた。

実験方法： 樹脂 (Amberlite CG-50, type 1, 100~200 メッシュ) を pH 4.2 から 5.0 まで 0.2 間隔の差を設けた 0.2N 酢酸緩衝液で活性化してカラムを作成した。試料は 0.2N 酢酸緩衝液に溶かした標準 Hm 溶液, Hd 溶液および市販新鮮サバ肉 TCA 抽出液と、これに既知量の Hm を加えたもの、さらに腐敗させたサマ肉の TCA 抽出液を使用した。試料をカラムに注入後に使用した洗浄液はそれぞれの樹脂の活性化に使用したと同一 pH の 0.2N 酢酸緩衝液各 80ml を用いた。定量操作は前記の方法に従つた。

実験結果： 得られた結果は Table 1 に示した。すなわち pH 4.6 では標準 Hm 溶液の回収率は 95.8% であり、この回収率は Fig. 2 に示した曲線 II (予め中和しない Hm 溶液) とほぼ一致したが、pH 4.4 より酸性では Hm の流出が著しかつた。またサバ肉の TCA 抽出液に 60.4 γ の Hm を加えたときの回収率は pH 4.6 以上ではほぼ 100% となつた。Hd の吸着は pH 4.6 以下では無視できる程度であるが、pH 4.8 以上では吸着量が増加する傾向が認められた。特に腐敗サマ TCA 抽出液の分析値から判るように pH 4.8 以上では判定値が増加する。これは Hm 以外のジアゾ反応陽性物質の吸着が増加したためと思われる。

以上の結果からみて樹脂の活性化並びに洗浄液の pH は 4.6 が最も妥当であろう。

Table 1. Effect of Conditioning of the Resin and the pH of Effluent upon the Recovery of Histamine.

Size of a column; 8×55mm (ca. 2ml)
Flow rate; 2~3ml/min.

Samples analyzed	pH value of resin column and that of effluent									
	pH 4.2		pH 4.4		pH 4.6		pH 4.8		pH 5.0	
	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)
Hm; 60.4 γ	36.5	60.4	51.0	84.5	58.0	95.8	59.0	97.3	59.0	97.3
Hd; 7,400 γ	0.9	—	1.8	—	1.8	—	2.9	—	4.2	—
TCA-extract of fresh mackerel flesh	4.7	—	5.7	—	5.9	—	9.6	—	12.8	—
" + Hm, 60.4 γ	43.5	64.1	56.0	86.7	66.0	99.7	70.0	99.9	73.5	100
TCA-extract of decomposed saury flesh	5,700	—	7,200	—	7,400	—	7,750	—	8,100	—

Note: Treatment of the resin (Amberlite CG-50, type 1, 100~200 mesh) and rinsing of the column were carried out with 0.2N acetate buffer of varying pHs.

3. カラムの洗浄に用いる 0.2N 酢酸緩衝液量と Hm および Hd の吸着量の関係

魚肉 TCA 抽出液中に存在する Hd 始め他のジアゾ反応陽性物質 (定量阻害物質) 除去のためカラムの洗浄に要する 0.2N 酢酸緩衝液量を検討した。

実験方法： 試料として Hm は 60.4 γ , 30.2 γ , Hd は 7,400 γ および Hm と Hd の混合液 (Hm 60.4 γ , Hd 7,400 γ ; Hm 30.2 γ , Hd 7,400 γ) をそれぞれカラムに注入し、40ml から 100ml までの量の 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) によつてカラムを洗浄し、Hm および Hd の吸着量を検討した。

実験結果： Table 2 に示したように、洗浄液量を 40ml から 100ml に増加しても Hm の流出は認め

Table 2. Effect of the Volume of Effluent upon the Recovery of Histamine.

Size of a column; 8×55mm (ca. 2ml)

Effluent; 0.2N acetate buffer of pH 4.6

Flow rate; 2~3ml/min.

Samples	Volume of effluent							
	40 ml		60 ml		80 ml		100 ml	
	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)
Hm; 60.4γ	57.0	94.5	—	—	57.5	94.8	57.5	94.8
Hm; 30.2γ	28.6	94.7	—	—	—	—	28.7	95.1
Hd; 7,400γ	54.0	—	2.8	—	1.2	—	1.2	—
Hm, 60.4γ+ Hd, 7,400γ	111	184* 94.5**	—	—	58.0	94.3	58.5	95.1
Hm, 30.2γ+ Hd, 7,400γ	82.5	274* 95.2**	31.2	104* 95.1**	30.1	95.8	29.9	95.5

Note: *, the figure includes Hd value. **, the figure excludes Hd value.

られず、Hm の水溶液についての回収率は 94~96% であった。(この場合溶出液の pH の修正は行なわなかった)。これは Table 1 の結果をよく一致する。一方 Hd を十分に除去するには洗浄液量 60ml 以下では不足で 80ml 以上で一定の低い値を得ることができた。

4. Hm, Hd 以外のジアゾ反応陽性物質の影響

新鮮魚肉中には Hd 以外にチロシンなどのようなジアゾ反応陽性物質が存在しており、腐敗に伴いチラミン, Hm, イミダゾール酢酸などのジアゾ反応陽性物質が形成される。

Developing solvent; *n*-butanol saturated with 10% ammonium hydroxide.
Samples: 1 and 2; original TCA-extract, 3 and 4; elute of the Amberlite column (Hm fraction), Hm; standard Hm solution (0.01ml of 500γ/ml), Hd; standard Hd solution (0.01ml of 1,000γ/ml).

Fig. 3. Paperchromatograms of the Original TCA-extract and the Elute of Ion-exchanger Column of the Saury Flesh inoculated with *Proteus morgani*.

まずチロシン、チラミンの影響を知るため、*l*-tyrosine, tyramine-HCl (ともに和光純薬製) のそれぞれ 1,000 γ /ml の水溶液 10ml づつをカラムに注入し、吸着の程度を調べたが、両者とも全く吸着されなかつた。

つぎに腐敗に伴い生成されるアンモニアおよびトリメチルアミンの影響を知るため、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の 200 γ /ml および TMA-HCl の 200 γ /ml の水溶液各 10ml をカラムに注入し、0.2N 塩酸溶解液についてジアゾ反応により比色を行なつたが、0.3 γ /ml, Hm 相当の発色を示した。この程度は実験誤差の範囲内であつて、実用的には無視できる。

つぎにサンマ肉に *Proteus morganii* を接種、培養後、TCA 抽出液を作成し、カラムを通過させ、前記方法に従つて 80ml の 0.2N 酢酸緩衝液で洗浄後、8ml の 0.2N 塩酸で溶離し、中和後 10ml の定容とした。原 TCA 抽出液とカラム溶離液について、アンモニア性ブタノール (10% アンモニア水飽和 *n*-ブタノール液) を溶媒として一次元ペーパークロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリンおよびジアゾ試液にて発色させた。得られたクロマトグラムは Fig. 3-a, b に示してある。なお対照に Hm および Hd を同様に展開発色させた。

これらのクロマトグラムから判るように、カラム溶液に含まれるジアゾ反応陽性物質は Hm 以外に認められなかつた。

5. 新鮮魚肉の TCA 抽出液に加えた Hm の回収率

市販の新鮮なサンマ肉を用いて TCA 抽出液を作成し、その 10ml ずつに既知量 (15.2 γ および 60.4 γ) の Hm を加えて本法による回収率を測定した。なお洗浄液量が 80ml と 100ml の場合について実験を 2 回行なつた。

得られた結果は Table 3 に示してあるが、回収率は 99~101% という結果が得られた。

Hm を 5% TCA にて希釈し、pH を 4.6 に修正した液を、樹脂に吸着、溶離した場合の回収曲線は Fig. 2 における中和後発色させた標準曲線 I と全く一致した。この事実は Amberlite CG-50 カラムによる Hm の定量には魚肉 TCA 抽出液を用いた方が都合がよいことを示すもので、また実用的にもこの試料作成法は便利である。

Table 3 に示したように新鮮なサバ肉抽出液中には 0.96 γ /ml (0.46mg%) の Hm が含まれている結果が得られたが、同抽出液をモルモット摘出腸管を用いる Magnus 法で定量したところ、Hm としては痕跡程度であつた。

なおカラム溶解液に既知量の Hm を加え Magnus 法で Hm の定量を行なつたが殆んど完全に回収されたので、カラム溶離液中には Magnus 法で定量を阻害する物質が含まれているとは考えられない。従つて新鮮魚肉中に含まれ、本法で Hm とともに出てくる極めて僅かのジアゾ反応陽性物質については今後の研究にまたねばならない。ただし實際上魚類の鮮度判定やアレルギー様食中毒原因究明に当つては問題にならない程度の値である。

また上記魚肉 TCA 抽出液中の Hm 以外の物質による盲験値の値に関して cotton acid succinate (C.S.) 法と本法の比較を行なうため、新鮮サバ肉 TCA 抽出液およびこれに既知量の Hm を添加した液について門田法⁹⁾で測定したところ、TCA が存在すると Hm は全く *n*-ブタノール層に移行せず、TCA 抽出液では C.S. 法を適用できないことが判明した。

6. カラムの Hm 交換容量

Fig. 1 に示したようにカラムには Amberlite CG-50 が 2ml つめられているが、その Hm に対する交

Table 3. Recovery of Histamine added to the TCA-extract of Fresh Saury (*Cololabis saira*) Muscle.

Volume of rinsing solution	Hm added (γ)	Hm found (γ)	Hm recovered (γ)	Recovery of Hm (%)
80 ml	0	9.6	—	—
	15.2	24.6	15.0	99.0
	60.4	70.5	60.9	101
100 ml	0	9.5	—	—
	15.2	24.6	15.1	99.5
	60.4	69.5	60.0	99.4

換容量を知るため、まず Hm の 5% TCA 溶液について検討を行なった。すなわち供試液量 10ml, 流速 2~3ml/min. と条件を一定にして, Hm を 1,000 γ から 10,000 γ までカラムに注入してその回収率を測定した。

結果は Table 4 に示したように Hm 7,000 γ までは 99~107% という回収率を示し, 10,000 γ では 72.4% という値を示した。これらの結果から供試カラムの Hm-2HCl に対する交換容量は約 7,000 γ である。

つぎに腐敗アンモ TCA 抽出液に既知量の Hm を加えたものについて交換容量の検討を行なったところ, 6,000 γ までは 100% の回収率を示したが, それ以上では樹脂が飽和することが判った。これは Hm 以外の塩基物質 (ジアゾ反応陰性のものも含む) の共存するため

に交換容量が低下したのであろう。従つて魚肉試料については Hm の交換容量は約 6,000 γ とするのが妥当であろう。

しかしながら交換容量は樹脂性の大きさ, クロス・リンケージによつても異なり, 流下速度が大になれば Hm の流出も起り得るので, Hm の定量にはできるだけ条件を一定で行なわなければならない。(筆者らの経験では 2~3ml/min. が最も適当であつた。)

7. 本法と C. S. 法, Magnus 法との比較

種々の鮮度のサバ肉を用い本法と McIntire-門田の C. S. 法⁸⁾, モルモット摘出腸管を用いる Magnus 法について Hm 定量値の比較を行なった。

実験方法: 市販の新鮮サバ肉 100g に対し滅菌蒸留水 400ml を加えブレンダーにかけた。このうち, 200ml を滅菌ルー・フラスコに入れ対照とし, 残部を別のルー・フラスコに移し *Proteus morganii* #73 株を接種し, 20~21°C で放置した。この間フラスコ中の魚肉懸濁液の一部を一定時間ごとに採取し, 種々の鮮度の魚肉について TCA 抽出液およびメタノール抽出液を作成した。すなわち TCA 抽出液は懸濁液 20g に 10% TCA 20ml を加えて攪拌し, 10 分後濾過した (この濾液 1ml は魚肉 0.1g に相当する)。メタノール抽出液は懸濁液 10g に 4 倍量のメタノール (1 級) を加えて時々かきまぜ, 一夜放置後, 翌日上澄液を濾過するとともに残留物を 2 回 80% メタノールで洗浄, 抽出を繰返し, 濾液と合せて湯浴上でメタノールを留去した。得られたシロップ状の残留物はエーテルで脱脂し, 水に溶解して 10ml の定容とした (この抽出液 1ml は魚肉 0.2g に相当する)。

上記作成した TCA 抽出液については本法で, メタノール抽出液について C. S. 法および Magnus 法*で測定し, 結果は何れも Hm 相当量として比較を行なった。なお Hm の定量に先立つて各抽出液についてアンモニア水飽和ブタノール液を展開剤として一次元ペーパークロマトグラフィーを行ない, Hm の生成の確認を行なうとともに Hm 以外の追走神経刺激物質の存在を調べたが, 何れのクロマトグラムの部分についても陰性の結果を示した。

実験結果: 得られた結果は Table 5 に示したが, *Proteus morganii* 接種群, 対照ともに本法と Magnus 法 (測定誤差 $\pm 5\%$) とはほぼ一致した値を示したのに対し, C. S. 法では 0 日目および対照の 1, 2 日目に採取した試料では本法や Magnus 法より過大値を示した。

この原因は C. S. が Hd に対して吸着能をもっているためと考えられ, このことは次の実験から明らかに

Table 4. Exchangeable Capacity of the Resin Column.

Size of a column; 8×55mm (ca. 2ml)

Flow rate; 2~3ml/min.

Effluent; 0.2N acetate buffer of pH 4.6

Amount of Hm added to a column	Hm found (γ)	Recovery of Hm (%)
1,000	1,040	104
2,000	2,130	106
3,000	2,970	99.0
4,000	4,270	107
5,000	5,085	102
6,000	6,020	100
7,000	7,050	101
10,000	7,240	72.4

* メタノール抽出物の Magnus 法による値は Hm のみでなく, すべての迷走神経刺激物質による収縮能が Hm として示される。供試 *P. morganii* #73 株は分離当時は Hm のほか Saurine (未知迷走神経毒)²⁾を形成したが, 継代培養中に変異を起したらしく, 現在では Hm のみを生成するようになった。その事実今回の実験でもペーパークロマトグラフィーで明らかになった。

Table 5. Comparison of Amounts of Histamine determined by the Present Method and Other Techniques

Materials examined; TCA-extracts of inoculated and uninoculated mackerel flesh suspension with *Proteus morganii* # 71.

Method \ days	Uninoculated suspension (control)			Inoculated suspension		
	0	1	2	0	1	2
Present	0.38	0.21	50.8	0.38	330	405
C. S.	18.7	26.5	58.5	18.7	245*	299*
Magnus**	0.05	0.24	45.8	0.05	333	376
Freshness						
odor	normal	fishy	putrid	normal	normal	normal
NH ₃ -N (mg%)	18.6	25.6	83.2	18.6	17.2	19.0
pH	5.96	6.02	6.75	5.96	6.63	7.25

Note: 1) Results of histamine are shown in mg% of original flesh.

2) * ; experimental error caused by an over-exchange capacity of C.S. column.

3) **; a strip of guinea pig intestine was used and the method included about 5% of error.

なつた。

使用した C.S. は和光純薬および小宗化学に依頼して作製したもので、実施法は正確に門田法に従った。ただし Hm, Hd の比色は本法に記載したジアゾ反応で Coleman 比色計を用い 510m μ にて吸光度を測定し、Fig. 1 に示した標準曲線 II を使用した。実験結果によると 2 種の C.S. は Hd 3,330 γ に対して 224 γ Hm 相当量の吸着を示した (6.7%)。この吸着される Hd は、C. S. カラムの洗浄に用いる水およびエタノールをそれぞれ 20ml まで増加しても吸着量を減少させることができなかった。

つぎに C.S. 法に対するチロシン、チラミンの影響を調べてみると、チロシンは全く影響しないが、チラミンは 4,500 γ に対し 463 γ Hm 相当量 (10.3%) が吸着され、これらの物質が、共存する試料では当然過大値の原因となりうる。

これらの事実から C. S. 法は魚肉のように Hd やチラミンの共存する試料には不適当といわねばならない。(なお C.S. カラムの溶離液を Magnus 法で測定すれば、Hd やチラミンなどの影響を殆んど受けなくて済む。しかしモルモット腸管は Hd の量が多くなると腸管が弛緩して Hm 定量の誤差を招くおそれがある)

要 約

1. Amberlite CG-50 (type 1, 100~200 メッシュ) を用いる Hm 簡易定量法を考案した。
2. 本法の概要は魚肉 TCA 抽出液を予め pH 4.6 に修正し、その一定量を 0.2N 酢酸緩衝液で pH 4.6 に調整した樹脂カラム (8×55mm) に通過させ、さらに 80ml の 0.2N 酢酸緩衝液 (pH 4.6) をカラムに通過させる。次いで吸着された Hm は 8ml の 0.2N 塩酸にて溶離し、pH をほぼ 7 に修正した後 10ml の定容とする。

溶離液中の Hm はジアゾ反応により比色定量するが、モルモット摘出腸管を用いる Magnus 法で行なう。

3. 本法は魚肉中に含まれる Hd やチロシン、その分解産物であるチラミンの影響を受けない。またアンモニアやトリメチルアミンも本法による定量の妨害とならない。

4. 本法で使用するカラムの Hm に対する交換容量は Hm-2HCl では約 7,000 γ 、魚肉抽出液では約 6,000 γ

であり、回収率は $100 \pm 1\%$ である。

本研究は昭和 35 年度厚生科学研究費によつて実施した。ここに記して謝意を表わす。

文 献

- 1) M. KIMATA and M. TANAKA: *Memoirs of Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ.*, **2**, 12 (1954).
- 2) 河端俊治・石坂公成・三浦利之・佐々木忠尚: 本誌, **22**, 41 (1956).
- 3) 河端俊治・石坂公成・三浦利之: 本誌, **21**, 335 (1955); **21**, 341 (1955); **21**, 347 (1955); **21**, (1167).
- 4) R. M. GESLER and M. MATSUBA: *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **114**, 151 (1955).
- 5) 門田 元・林 孝一郎: 京大食糧科研報, **6**, 30 (1951).
- 6) A. H. EGGERTH, R. J. LITWIN and J. V. DEUTSCH: *J. Bact.*, **37**, 187 (1939).
- 7) 大田冬雄: 本誌, **24**, 41 (1959).
- 8) 門田 元・井上淳太郎: 本誌, **19**, 916 (1953).
- 9) 津田 厚・富山哲夫: 本誌, **25**, 451 (1959).
- 10) 河端俊治・鈴木 茂: 本誌, **25**, 473 (1959).