

## 通電クロマトグラフィーによるヒスチジン、ヒスタミンの分離

著者	柿本 大壱
雑誌名	鹿児島大学水産学部紀要=Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University
巻	3
号	2
ページ	45-49
別言語のタイトル	Study on the Separating-process of Histamin from Histidine by the Electro-chromatographic Method
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10232/10683">http://hdl.handle.net/10232/10683</a>

# 通電クロマトグラフィーによる ヒスチジン, ヒスタミンの分離

柿 本 大 巻

## Study on the Separating-process of Histamin from Histidine by the Electro-chromatographic Method.

Daiichi KAKIMOTO

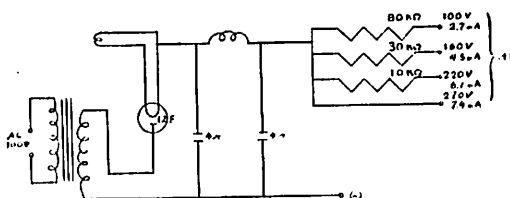
### 序

濾紙クロマトグラフィーの一つに通電クロマト法がある。此の方法は通常法と共に現在広く無機物やアミノ酸類の分離検出に用いられている。一般に食品による食中毒の原因とされているヒスタミンの分離検出は予防衛生の見地からも甚だ重要なことであるが、ヒスタミンの前駆物質と見做されるヒスチジンとその性質が甚だ類似している為ヒスタミンの定量は容易ではない。近年濾紙クロマト法の進歩に伴い之等の物質の検出も比較的容易に行われ良好な結果を得た例もある、例えば門田氏<sup>(1)</sup>は濾紙クロマト法により検出される該物質の呈色面積から含有量を測定している。然し乍ら通常の濾紙クロマト法では展開に長時間を要する不便がありヒスタミン、ヒスチジンの分離も必ずしも容易ではない。著者は大原、永井氏等<sup>(2)</sup>が無機物の分離に用いた通電クロマト法を応用し、ヒスタミン、ヒスチジンの分離を試みた結果前述の欠点を償い簡易迅速に両成分を分離し得る条件を発見したのでここにその成績を報告する。

### 実験の部

第 1 図

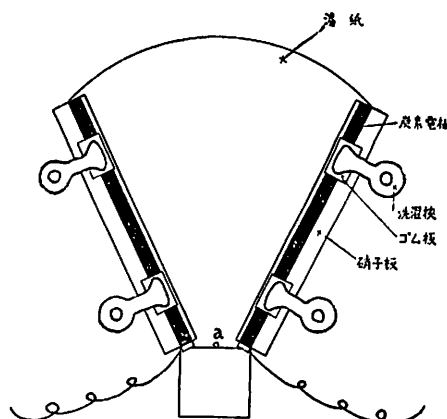
配線図



1. 装置：装置及び配線図は第1図に示した通りである。

2. 濾紙：径 12.5cm の東洋濾紙 (No. 2 又は No. 3) を第2図に示した如く扇形に切つたものを用いた。扇形の濾紙の要に当る部分には溶媒に浸漬するための耳をつけてあり、a は試料原点を示したものである。濾紙の種類は本法に於ては殆んど影響がなかつた。

第 2 図



3. 電極：白金電極の代りに炭素棒を用いた。濾紙と密着するように炭素棒は成るべく角型のものが望ましいが丸棒のものであれば濾紙に接する側を平に削つて用いた方が便利である。

4. 操作：通電クロマトを行うには先ず第2図に示したように扇型濾紙の両縁を炭素棒と絶縁物(硝子板)の間にはさみ、濾紙にたるみの出来ぬ様に水平に固定する。試料液はa部に毛细管を用いてとる。試料の採取法並びに量は通常法と同じでよい。次に濾紙の基部(扇の要にあたる部分)を折り曲げて溶媒に浸し同時に電流を通ずる。溶媒は基部より扇の先端に向つて全面に拡がるが濾紙の表面は水平に保つか又は溶媒の滲透方向に少しく傾斜せしめ、あたかも通常法に於ける下降法に準ずるようにすれば展開に要する時間が短縮されるようである。電圧は切替スイッチにより 100, 160, 220, 270 V を自由に用いることが出来る。溶媒が展開して濾紙の先端に達するのを待ち電流を断ち濾紙を装置より外し、乾燥したる後通常法と同様呈色剤を噴霧し現出する斑点を同定の試料とした。

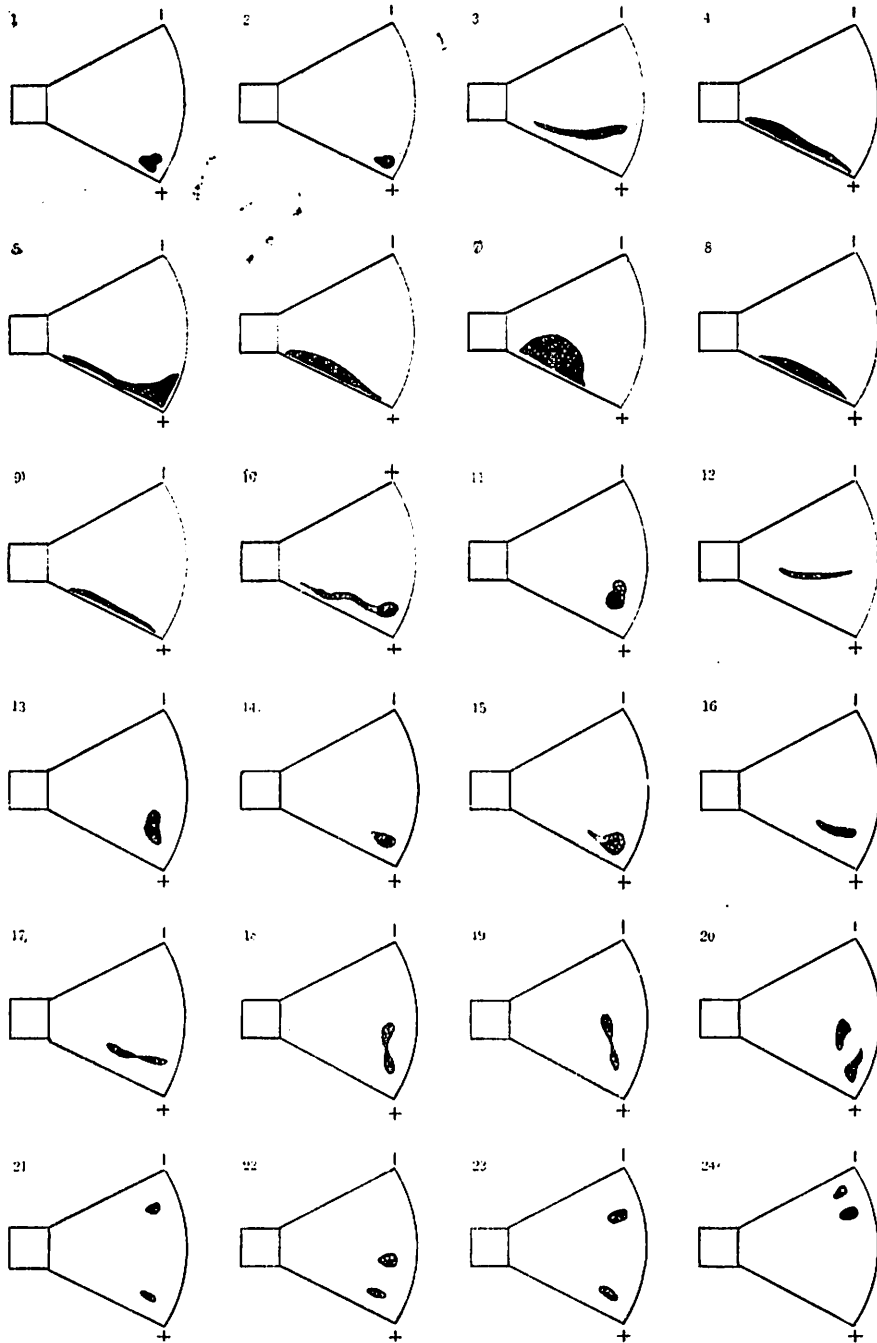
5. 呈色剤：(1) ニンヒドリン 0.25% 水飽和ブタノール溶液。  
(2) デアゾ試薬 (a) スルファニール酸の 0.9% HCl (10%) 溶液. (b) 5% NaNO<sub>2</sub>  
(a) 液 1.5 cc に (b) 液を同容加えて 50 cc. とす。

### 実験結果

前記の装置と操作によりヒスチジン、ヒスタミンの分離を試みたが使用した展開剤及び電圧等の条件は第1表の通りで、得られたクロマトグラムは第3図の通りである。なお試料としては市販のヒスタミン、ヒスチジン(何れもモノヒドロクロリッド)の0.1%水溶液或は其れ等の等量混合液を用いた。

第1表及び第3図の(1)(2)(3)に示した如く展開剤が蒸留水の場合はヒスチジンとヒスタミンは分離しない。電圧を220Vにまで上昇せしめると第3図(3)の如く之等の物質は尾を曳くようになる。次にpH 5.6~8.4の磷酸塩緩衝液を展開剤として両物質の移動状態を各々電圧を変化させて試験した結果は図の(4)~(10)の如くで、この場合は両物質とも同一極(+)の方に偏し斑点とはならず拡がりを示し両物質の分離は全然行われぬ。又稀薄な塩酸溶液(pHで4.4~4.6程度)を展開剤とした場合は第3図(ロ)に示す如く両物質共両極の中央位に出現するが分離が出来なかつたので更にアンモニウム塩、醋酸等を展開剤として分離を試みたが第3図(13~18)の如く炭酸アンモニウムの1%水溶液の場合100Vの電圧では第3図(18)に示したように首折れた斑点を示し両物質の分離に可能性を暗示する結果を得た。これにより同一溶媒を用い電圧を160Vに替えた結果第3図(19)の様に両物質の分離が更に著しく220Vに於て明瞭な分離が確認された(第3図20)。270Vに電圧を高めると第3図(21), (22), (23)に示す様にヒスチジンが一侧、ヒスタミンは+側に分離した。なおデアゾ反応呈色物質としては他の多くの化合物も存在するがニンヒドリン反応呈色をも同時に呈色する物質としてはチロジンがある。依つてヒスチジンとチロジンの混合液を試料とし前と同様の実験を行つた結果炭酸アンモニウム溶液を溶媒とした場合270Vで両物質とも一侧に移動するが明瞭に分離することを認めた。以上の実験によりヒスタミン、ヒスチジン、チロジン三物質の分離は通電クロマト法により適当な展開剤を用うれば比較的容易に而も約60分以内の短時間でその目的を達し極めて明確な判定を下し得ることが解つたので次に此等の物質の分離定量につき実験した。

第 6 図



第1表 各種展開剤を使用した場合の通電クロマト法によるヒスチジン、ヒスタミンの分離

供番 試号	試料	展開剤及び pH	展開時間	使用電圧
1	ヒスチジン	蒸溜水 5.8	60分	160ボルト
2	ヒスタミン	" "	" "	" "
3	ヒスチジン + ヒスタミン	" "	" "	220
4	ヒスチジン	磷酸塩緩衝液 8.0	" "	100
5	ヒスタミン	" "	" "	" "
6	ヒスチジン	" "	" "	160
7	ヒスタミン	" "	" "	" "
8	ヒスチジン	" 5.6	" "	100
9	ヒスタミン	" "	" "	" "
10	ヒスチジン	" "	" "	160
11	ヒスタミン	" "	" "	220
12	ヒスチジン + ヒスタミン	稀塩酸 4.0	30	" "
13	"	硫酸アンモニウム 6.4	60	" "
14	"	" "	" "	270
15	ヒスチジン	塩化アンモニウム "	" "	" "
16	ヒスチジン+ヒスタミン	" "	" "	" "
17	"	醋酸 4.0	" "	220
18	"	炭酸アンモニウム 7.0	30	100
19	"	" "	" "	160
20	"	" "	" "	220
21	"	" "	" "	270
22	"	" 6.0	" "	" "
23	"	" 7.3	" "	" "
24	ヒスチジン + チロジン	" "	" "	" "

註. 呈色はニンヒドリン及びデアゾ試薬を用いた。pH は東洋濾紙試験紙により定め、炭酸アンモニウムの pH は炭酸又はアンモニアにより調節した。

第2表 通電クロマト法を用いた場合のヒスチジン、ヒスタミンの消失限界濃度

ヒスタミン		ヒスチジン	
1cc 中の $\gamma$	デアゾ反応	1cc 中の $\gamma$	デアゾ反応
300	+	300	+
270	+	270	+
240	+	240	+
210	-	210	+
180	-	180	+
150	-	150	+
120	-	120	+
90	-	90	+
60	-	60	-
30	-	30	-

著者は先にゼラチンの定量を濾紙クロマト法を用いて行つたが<sup>(3)</sup>茲に再び同様な原理と方法を用い通電クロマトによるヒスチジン、ヒスタミンの定量を試みた。先ずデアゾ試薬による両物質の消失限界濃度を決めた結果は第2表の通りである。

次に本法の一実施例として天然物中のヒスタミン及びヒスチジンを分離すると同時にヒスタミンを上記の方法で定量した。試料として市販のウルメイワシの肉部のみを用い之を約 20°C の室温に放置し一定時間経過後の試料の水浸液につき稀釈法によつてヒスタミンを測定したが

回収率を求めるため共試料に 0.1mg の市販ヒスタミンモノヒドロクロリッドを添加したものについても同時に測定した。その結果を第3表に示した。

此の方法により勝れた回収率でヒスタミンの定量を行い得ることを知った。

第3表 ウルメイワシ肉中のヒスタミンの測定

時間	試料 ウルメイワシ	ウルメイワシ+ヒスタミン (0.1 mg)	
		実測値	回収率
0	0 mg %	0.10 mg %	100 %
24	1.20	1.29	99
48	3.78	3.88	97

### 考 察

著者の行つた上記の実験結果では所要時間は通常の濾紙クロマト法に比べて甚だ短く約60分以内で展開を終る。此の展開時間は溶媒の種類と濃度によつて決められるが水溶液を展開剤とする本法は有機溶媒を用いるよりも迅速なことは当然である。而も通常法による之れ迄の研究者の方法に比べ分離能も優れている。然し乍らジアゾ試薬により呈色する物質はヒスチジン、ヒスタミン、チロジン等の他にも多数存在し而も天然物中にその大多数の物が発見されている。例えばビタミン B<sub>6</sub> とか核酸系塩基類の或る物質、ピリミジン誘導体等である。本実験はヒスチジン、ヒスタミン、チロジン三物質の共存する試料よりの各々の分離の可能性を証明したにすぎず、従つて更に多種類の物質の分離は今後に残された課題であるが要するに通電クロマト法により比較的性質の類似した物質を簡易な方法で分離検出ないしは定量することの可能性を示したわけである。

### 摘 要

- 1) ヒスタミン、ヒスチジン、チロジンの通電クロマト法による分離につき実験した。
- 2) 之等の物質を通電クロマトにより分離するための条件として展開剤に炭酸アンモニウムの稀薄水溶液を用い、270 V の電圧下に於て操作すると良好な結果を収め得ることが判明した。
- 3) 本法は通常の濾紙クロマト法に比べ分離能が良好であると共に所要時間は著しく短くて済む事を特長とする。

終りに臨み本研究に終始御助言を賜り且つ論文の御校閲を賜つた本学柏田教授並びに本研究の一部を援助した原口明朗君に謝意を表す。

### Résumé

1. The separating process of histamin from histidine and tyrosine mixture by electro-chromatographic method was studied.
2. By using the highly diluted ammonium carbonate solution for developing reagent under the 270 v. electric pressure the most desirable results was obtained.
3. It was ascertained that not only in the speed but in the separating capacity the more effective result than common chromatographic method could be got by this process.

### 文 献

1. 門田：京大食糧科研 6, 30 (1951).
2. 大原, 永井：日化誌 73, 12 (1952).
3. 柿本, 金沢：日水誌 18, 433 (1952).