

「チェックカラーヒスタミン」生魚用 クイックマニュアル

(セル幅 1cm の分光光度計を使用した場合)

I .本測定に必要な器具類

- ・分光光度計(吸光度計)

(470 nmの吸光度の測れるタイプ)



分光光度計

- ・ウォーターバス

(37℃に設定可能なタイプ)

- ・マイクロピペット

(0.4・1.0 mlの溶液を分注用)

- ・ピペッター用チップ類

(0.4・1.0 mlの溶液を分注用)

- ・メスピペットまたは、シリンダー

(24 mlの溶液を分注用)

- ・はかり

(1gが測定可能なタイプ)



- ・粉砕機(乳鉢、ホモジナイザー等)

- ・サンプルをボルする鍋、コンロなど

- ・ろうと

- ・ろ紙(No.5 C)

- ・アイスバス

- ・プラスチック製試験管

(容量約 50mL、10mLのもの)

- ・ストップウォッチ

- ・試験管立て

- ・薬さじ

**注意:ヒスタミンはガラスに吸着することがあります。
ご使用になる器具はプラスチック製のものをご使用ください**

Ⅱ. 試薬の調製方法

発色試薬液



発色試薬1瓶に蒸留水を**正確に9 ml** 加える(要遮光・要冷蔵)

酵素液



酵素1瓶に蒸留水を**正確に5 ml** 加える(要遮光・要冷蔵)



Ⅲ.測定用検体の調製方法

検体を約 5 g はかり取る



ホモジェナイザー等で検体を細かくする



細かくした検体を秤で正確に 1 g はかり取り、耐熱性のあるプラスチック製の容器(ボイル処理可能な容器)に入れる



抽出用溶液※注 をピペット等を用い、正確に 24 ml 加える



沸騰湯浴中で 20分程度加熱処理



アイスバス等で氷冷(約 20 °C 以下まで)



検体の入った容器をボルテックス等でよく攪拌し、再びアイスバスなどで十分氷冷、脂肪分を含む固形分と抽出液を良く分離させる



濾紙(No. 5 Cの濾紙)濾過する

※測定には検体抽出液が 2 ml以上必要です。



検体から抽出したろ液を検液とする



※注 0.1 M EDTA・Na水溶液

IV.測定方法

※一回の測定でblankを含め
4本(検液用、検液blank用、
ヒスタミン標準用、発色blank用)
のプラスチック製試験管が必要です。



検液および試薬はすべて自動ピペッターを用いて添加してください。

① 検液値の測定方法

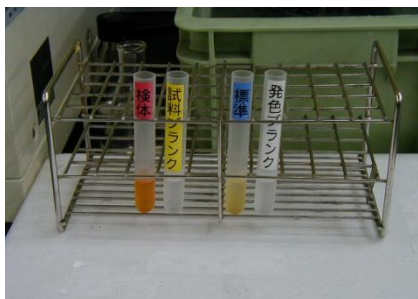
検液用試験管

- ↓ ← 蒸留水 1.0 ml 添加
- ↓ ← 調製した検液 1.0 ml 添加
- ↓ ← 緩衝液 0.4 ml 添加
- ↓ ← 発色試薬液 0.4 ml 添加
- ↓ ← 酵素液 0.4 ml 添加 (計 3.2 ml となります)

37℃で約15分間加温 (遮光下・ウォーターバス使用)

↓
分光光度計で、検液値(E_s)470 nm を測定

検液の吸光度(E_s)が1.0を超えた場合は、検液の吸光度が0.1～1.0の範囲に入るように、検液を蒸留水にて適宜希釈して再測定する。



② 検液ブランク値の測定方法

検液ブランク用試験管

- ↓ ← 蒸留水 1.0 ml 添加
- ↓ ← 調製した検液 1.0 ml 添加
- ↓ ← 緩衝液 0.4 ml 添加
- ↓ ← 発色試薬液 0.4 ml 添加
- ↓ ← 蒸留水 0.4ml 添加 (計3.2ml となります)

37 °Cで約 15 分間加温 (遮光下・ウォーターバス使用)

↓
分光光度計で、検液ブランク値(Eb)470 nm を測定

③ ヒスタミン標準値(検量線作成用)の測定方法

ヒスタミン標準用試験管

- ↓ ← 蒸留水 1.0 ml 添加
- ↓ ← 標準液 1.0 ml 添加
- ↓ ← 緩衝液 0.4 ml 添加
- ↓ ← 発色試薬液 0.4 ml 添加
- ↓ ← 酵素液 0.4 ml 添加 (計 3.2 ml となります)

37 °Cで約 15 分間加温 (遮光下・ウォーターバス使用)

↓ (オレンジ色に発色)

↓
分光光度計で、ヒスタミン標準値(Estd)470 nm を測定
・測定値は、通常 0.45 ± 0.1 を示します。

④ 発色ブランク値の測定方法

発色ブランク用試験管

- ↓ ← 蒸留水 1.0 ml 添加
 - ↓ ← 蒸留水 1.0 ml 添加
 - ↓ ← 緩衝液 0.4 ml 添加
 - ↓ ← 発色試薬液 0.4 ml 添加
 - ↓ ← 蒸留水 0.4 ml 添加
- (計 3.2 ml となります)

37℃で約 15 分間加温 (遮光下・ウォーターバス使用)

↓
分光光度計で、発色ブランク値(Ec)470 nm を測定

測定操作方法まとめ

注意：測定時はできるだけ遮光された環境でおこなってください

プラスチック製の試験管を4本用意する



下記の通り各試薬を加える



	検液値 Es	検液空白値 Eb	ヒスタミン標準値 Estd	発色空白値 Ec
蒸留水 (ml)	1.0	1.0	1.0	2.0 (1.0×2)
検液 (ml)	1.0	1.0	—	—
標準液 (ml)	—	—	1.0	—
緩衝液 (ml)	0.4	0.4	0.4	0.4
発色試薬液 (ml)	0.4	0.4	0.4	0.4
酵素液 (ml)	0.4	—	0.4	—
蒸留水 (ml)	—	0.4	—	0.4



37°C 15 分間反応させ、
分光光度計(吸光度計)で 470 nm の吸光度を測定する

IV.ヒスタミン濃度の算出方法

検体中のヒスタミン量 (mg / L = ppm)

$$= (E_s - E_b) \div (E_{std} - E_c) \times 4 \times 25 \times df$$

E_s : 検液の吸光度^{※注}

E_b : 検液ブランクの吸光度

E_{std} : 標準液の吸光度

E_c : 発色ブランクの吸光度

df : 検液の希釈倍率

4 : ヒスタミン標準液の濃度

25 : 検体の調整時に25倍に希釈した
ことによる希釈倍率

※注 検液の吸光度(E_s)が 1.0 を超えた場合は、検液の吸光度が 0.1~1.0 の範囲に入るように、検液を蒸留水にて適宜希釈して再測定する。

検液を希釈しない(1倍)場合は

検体中のヒスタミン量 (mg / L = ppm)

$$= (E_s - E_b) \div (E_{std} - E_c) \times 100$$