

## I .本測定に必要な器具類

- ・分光光度計

(吸光度計B )

- ・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)

- ・プラスチック製試験管

(容量約 50mL、10mLのもの)

- ・試験管立て

- ・アイスバス

- ・ストップウォッチ

- ・薬さじ



チェックカラーヒスタミン



吸光度計B  
発売元(株)共立理化学研究所



**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.測定用試料の調製方法

検体を約 5 g はかり取る



粉碎機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. 5C 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

※一回の測定で空白を含め  
4本(検液用、検液空白用、  
ヒスタミン標準液用、発色空白用)  
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マイクロピペット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

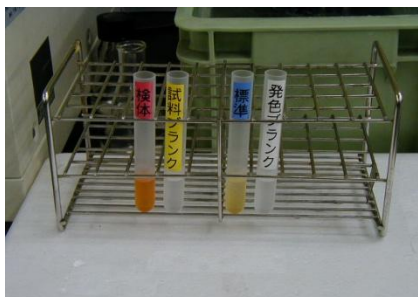
- ↓ ← 蒸留水 1.0ml 添加
  - ↓ ← 調製した検液 1.0 ml 添加
  - ↓ ← 緩衝液 0.4 ml 添加
  - ↓ ← 発色試薬液 0.4 ml 添加
  - ↓ ← 酵素液 0.4 ml 添加
- (計 3.2 ml となります)

37℃で約 15 分間加温 (遮光下・ウォーターバス使用)



吸光度計B で、検液値( $E_s$ )を測定

※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。



## 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 1.0ml 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 0.4 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)

↓  
吸光度計Bで、検液ブランク値(Eb)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 1.0ml 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℃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)

吸光度計Bで、ヒスタミン標準値(Estd)を測定  
・測定値は、通常  $0.8 \pm 0.1$  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 1.0ml 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 °Cで約 15 分間加温 (遮光下・ウォーターバス使用)

↓  
吸光度計B で、発色ブランク値 (Ec)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	検液ブランク値 Eb	ヒスタミン標準値 Estd	発色ブランク値 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



遮光下で、37℃ 15 分間反応させ、  
その後、吸光度計Bで、  
各反応液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<sup>※注</sup>

$E_b$  : 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 : 検体が調整時に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 )

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