

「チェックカラー ヒスタミン」取扱い説明書

商品コード: 60441



注意！

1. キット中の試薬を飲んだり、素手で触れたり、目に入れたりしないでください。
2. 取扱い説明書の使用上の注意および取扱い上の注意に従って取扱ってください。

本キットは、比色反応を利用してサンプル中のヒスタミンの濃度を測定するために使用します。この取扱い説明書では、生もしくは冷凍されたサバ科の魚(マグロ、サバ、カツオなど)および、それらの缶詰中のヒスタミンの測定方法を記載します。本測定法は、自主衛生検査用です。公定法ではありません。

【特長】

1. 本キットは、ヒスタミンの測定について妥当性を評価し、AOAC-RI PTM^{*1} 認証を取得しました。(ライセンス No.041802)
2. 抽出操作が、HPLC 法や AOAC の OMA 法^{*2} などより簡単です。
3. 本測定法は、HPLC 法のような煩雑な操作は不要です。しかも短時間で精度良くヒスタミンを測定することができます。

*1 PTM: Performance Tested Method

*2 OMA 法: Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL
掲載の測定法

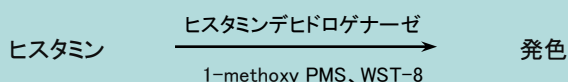
【用途】

本測定方法は、生もしくは冷凍されたサバ科の魚(マグロ、サバ、カツオなど)および、それらを原料とした缶詰(水煮缶、オイル缶)中のヒスタミンを定量することを目的としています。

【対象とする使用者】

本キットは、基本的な実験操作を訓練された従事者向けに設計されています。

【測定原理】



ヒスタミンは 1-methoxy PMS^{*3}、テトラゾリウム塩(WST-8^{*4})の存在下、ヒスタミンデヒドロゲナーゼを作用させることにより、テトラゾリウム塩を発色させます。470 nm 付近で測定することにより、ヒスタミン濃度を定量できます。

*3 1-methoxy PMS: 1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェイト

*4 WST-8: 2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム-ナトリウム

【キットの性能】

1. 特異性: 本測定法は、試料中に含まれるカダベリン等多くのアミンの影響は受けません。ただし、高濃度のアグマチンでは強い影響を、高濃度のプロレッシンでは弱い影響を受けます。

2. 測定範囲:

	吸光度計の光路長	
	1 cm	2 cm
サンプル中 (ppm)	20-300	10-150
検液中(25 倍希釈後のサンプル) (ppm)	0.8-12	0.4-6

3. 測定時間: 検液調製後、各試薬を分注してから約 20 分

【キットの構成】

本製品は以下の試薬より構成されています。

試薬名	主成分	数量
酵素試薬	ヒスタミンデヒドロゲナーゼ	凍結乾燥品 6 本
発色試薬	1-methoxy PMS WST-8	凍結乾燥品 6 本
緩衝液	トリス緩衝液	24 mL 3 本
標準液	ヒスタミン	30 mL 1 本

キットの測定回数について:

本キットは、60 回測定用です。本測定の際には、検体の測定(検液値と検液ブランク値を測定してその差を求めます)に加えて標準の測定(標準値と発色ブランク値を測定してその差を求めます)が必要になります。そのため、1 回に処理する検体の数によって 1 キットで処理可能な検体の数が変化します。

例えば、1 回でキットの試薬を全て使い切る場合には、標準の測定が 1 測定で済みますので、59 検体の処理が可能です。

一方、1 回の測定で 5 検体ずつ処理する場合には、毎回標準の測定が 1 測定加わり 6 測定が必要です。すなわち、測定回数 10 回、処理できる検体数は、50 検体となります。

【使用上の注意】

本製品の性能を十分に活用していただくため、以下の点にご注意ください。

- ①品質保持期限が切れた製品は使用しないでください。測定が正確に行えないおそれがあります(品質保持期限は外箱に記載してあります)。
- ②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ガラス製のものを使用しないでください。
- ③異なるロットの試薬を混合して使用しないでください。測定が正確に行えないおそれがあります。
- ④本製品は 18~30°C にしばらく置いてからご使用ください。
- ⑤本製品は長期間常温で保存しないでください。
- ⑥検体の調製では、微生物汚染に注意し、速やかに行ってください。また、検体の腐敗を防ぐため、検体をすりつぶす工程、加熱抽出後の工程は、検体を必ず冷却(0~10°C)してください。
- ⑦検体の加熱では、検体の突沸および加熱された容器による火傷等には充分注意してください。
- ⑧抽出した検体を濾紙で濾過する場合、濾過に 5 分以上かかる時は濾紙を交換してください。また脂肪分が多い検体については、濾液を集める前に抽出した液を充分冷やしてください。
- ⑨直ちに検液を測定しない場合は凍結してください。凍結融解は、1 回を限度としてください。また、検液を解凍する場合、10°C 以下で行ってください。さらに、解凍中は微生物の汚染には充分注意してください。
- ⑩試薬の反応の時間は必ず遵守してください。測定が正確に行えないおそれがあります。
- ⑪標準液の蓋の開け閉めは速やかに行い、液の蒸発には充分注意してください。

- ⑫マグロ、サバ、カツオ以外の魚や発酵工程のある食品で、アグマチン含有量が多い場合、測定値が高くなります。

〔測定に使用する推奨機器〕

- ・吸光度計 B (ABS-B 470)、吸光度計 RGB (DPM2-ABS)
(発売元: 株式会社共立理化学研究所)
- または、470 nm 付近が測定できる吸光度計*5
- *5 1.5 mL 以下のサンプル量に適したセルをご使用ください。

〔キット以外に必要な器具〕

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。

- (1) 添加用ヒスタミン溶液を用意する場合: ヒスタミン二塩酸塩、0.1 N 塩酸、プラスチック製のメスシリンダー(100 mL 容)、加熱式でないデシケーター
- (2) 検体を小片化するもの(粉碎機、乳鉢、あるいはホモジナイザー等)
- (3) 秤(0.1 g、1.0 mg が量れるもの)
- (4) 耐熱性コニカルチューブ(50 mL 容、キャップ付で密閉性のよいもの)
- (5) ピペットとチップ(0.5, 0.1 mL を測定するため)
- (6) 葉さじ
- (7) 蒸留水
- (8) 濾紙(No.5C 濾紙)とプラスチック製の漏斗。もしくは、遠心機と遠心チューブ
- (9) プラスチック製のメスシリンダー (25 mL)
- (10) プラスチック製小試験管(約 10 mL 容)と試験管立て
- (11) 37±1°C を設定可能な恒温槽
- (12) 温度計
- (13) タイマー
- (14) ボルテックスミキサー
- (15) 煮沸水に耐性のあるウォーターバス
- (16) アイスバス
- (17) 0.1 M EDTA・2Na (pH 8.0) 溶液 (抽出用溶液として)
- (18) 抽出用溶液を用意する場合: EDTA・2Na・2H₂O、NaOH もしくは KOH、ビーカー(1,000 mL 容)、メスシリンダー (1,000 mL 容)、蓋付きの容器、pH メーター

〔抽出用溶液の調製〕

EDTA2 ナトリウム 2 水和物 37.2 g をはかりとり、1,000 mL 容器に入れる。蒸留水を加えて液量を約 750 mL に合わせる。攪拌子をいれて良く混合する。水酸化カリウム水溶液、または水酸化ナトリウム水溶液で上記溶液を pH 8.0 に合わせる。pH は、攪拌を止めた状態で合わせる。これを 1,000 mL メスシリンダーに移し、蒸留水で 1,000 mL にメスアップする。調製後はきれいな容器に移し替え、室温で保存する。

〔測定〕

1. 検液の調製

- 1) 検体を 10 g 程度採取し、粉碎機等を用い細かくすりつぶします。ここから正確に 1.0 g 秤量し、50 mL 容のコニカルチューブに入れます。
- 2) これに抽出用溶液を正確に 24.0 mL 加えます(検体は、抽出用溶液を加えたことにより 25 倍に希釈されます)。
- 3) コニカルチューブのふたをしっかりとしめ、10 秒間ボルテックスで激しく攪拌します。
- 4) コニカルチューブごと沸騰水中で 20 分間加熱します。
- 5) 検体が入ったコニカルチューブを氷中で 20°C 以下になるまで 10 分程度冷却します。
- 6) 冷却後、検体をきれいなスパーテル等を用いて細かくほぐします。その後、氷中で 5 分間静置させ固形物質と液体を分離させます。

- 7) 分離した液体を濾紙(No.5C)で濾過または、遠心分離(10,000×g、5 分間)し、上清を集め、検液とします。

2. 試薬の調製

(発色液)

発色試薬は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。内容物が飛散しないようにゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れるようにして開栓してください。開栓した発色試薬 1 瓶(10 回測定分)に 11 mL の蒸留水を加え、泡立たない程度に攪拌して溶解してください。調製後必ず冷却(0~10°C)してください。溶解した発色液は、一度で使い切ることをお勧めします。

やむを得ず保存する場合は、冷蔵(2~8°C)または凍結(-10°C 以下)してください。保存期間は、冷蔵(2~8°C)で 1 週間、凍結(-10°C 以下)で 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度としてください。なお、解凍する際は流水中で素早く行い、解凍後必ず冷却(0~10°C)してください。また発色試薬は光(特に自然光)に敏感に反応します。取扱いの際には、測定場所に自然光が入らぬようブラインド等で遮光してください。

(酵素液)

酵素試薬は凍結乾燥後、陰圧下で封栓してあります。内容物が飛散しないようにゆっくりとゴム栓を持ち上げ、切り込み部分から空気を入れるようにして開栓してください。開栓した酵素試薬 1 瓶(10 回測定分)に 6 mL の緩衝液を加え、泡立たない程度に攪拌して溶解してください。調製後必ず冷却(0~10°C)してください。室温に放置すると測定が正確に行えないおそれがあります。

溶解した酵素液は、一度で使い切ることをお勧めします。やむを得ず保存する場合は、凍結(-10°C 以下)してください。凍結による保存期間は 1 ヶ月間、凍結融解は 3 回を限度としてください。なお、解凍する際は流水中で素早く行い、解凍後必ず冷却(0~10°C)してください。

3. 測定

注意:

- ・検液と標準液の測定は、必ず同時に行ってください。
- ・発色試薬が光に敏感に反応するため、加温中は必ず遮光してください。

- 1) 測定器のゼロ点調整は蒸留水で行ってください。ゼロ点調整は測定器の取扱い説明書の方法に従って行ってください。
- 2) 小試験管を用意します。1 検液測定するには、2 本(検液値と検液ブランク値を測定します)試験管が必要になります。また、1 回の測定に標準値を測定するため 2 本(標準値と発色ブランク値を測定します)試験管が必要になります。したがって、1 回の測定で 1 検液処理するのに試験管 4 本が必要となります。1 回の測定で 2 検液処理するには試験管 6 本、1 回の測定で N 検液処理するには(2N+2)本それぞれ必要になります。
- 3) 検液値(ES)の測定として、小試験管に検液、発色液、酵素液をそれぞれ 0.5 mL ずつ入れ、良く混合し、37±1°C で 15±2 分間加温し反応させます。発色試薬が光に敏感に反応するため、加温中は必ず遮光してください。反応後、この反応終了液を吸光度測定用セルに入れ、470 nm 付近の波長で吸光度を測定します*6。
- *6 検液値(ES)が 1.0 を越えた場合は、検液値(ES)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(3.測定 1)~4)の操作)をしてください。
- 4) 検液ブランク値(Eb)の測定は 3) で加える酵素液の代わりに緩衝液を用います。以下 3) と同様の操作を行い吸光度を測定します。
- 5) 標準値(Estd)の測定は、3) で加える検液の代わりにキットに添付されている標準液を用います。以下 3) と同様の操作を行い、吸光度を測定します。Estd 値は吸光度計 B(または、吸光度計 RGB)を使用した場合 0.85 前後を示します。(光路長 1 cm

の吸光度計の場合 0.5 前後となります。)Estd 値がこの範囲外の場合は、操作手順を確認し、再試験を実施してください。

- 6) 発色ブランク値 (Ec) の測定は、3) で加える検液の代わりに蒸留水、酵素液の代わりに緩衝液を用います。以下 3) と同様の操作を行い、吸光度を測定します。Ec 値は吸光度計 B (または、吸光度計 RGB) を使用した場合 < 0.10 (光路長 1 cm の吸光度計の場合 < 0.05) を示します。Ec 値がこの範囲外の場合は、操作手順を確認し、再試験を実施してください。

吸光度測定条件

波長 : 470 nm 付近

最終液量 : 1.5 mL

測定操作

	検液値	検液 ブランク値	標準値	発色 ブランク値
検液 (mL)	0.5	0.5	—	—
標準液 (mL)	—	—	0.5	—
蒸留水 (mL)	—	—	—	0.5
発色液 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
酵素液 (mL)	0.5	—	0.5	—
緩衝液 (mL)	—	0.5	—	0.5
	Es	Eb	Estd	Ec

数字は添加量 (mL) — は、無添加を表す。

4. データの取扱い

検体中ヒスタミン量の計算方法は以下の通りです。

検体中のヒスタミン量 (ppm)

$$= (Es - Eb) \div (Estd - Ec) \times 4 \times 25 \times (100 \div \text{回収率}(\%))$$

但し、Es: 検液値、Eb: 検液ブランク値、Estd: 標準値、Ec: 発色ブランク値。なお、式中の 4 は、標準液のヒスタミン濃度が 4 ppm であること、25 は検体が予め抽出時に 25 倍に希釈されていることによる希釈倍率をあらわします。

添加回収率は[添加回収試験の方法]記載の手順で決定します。

[添加回収試験の方法]

添加回収率は下記の添加回収試験を行い算出します。本キットは、味付けされた加工品、発酵食品等では、添加回収率が著しく低くなる可能性があります。

1. 添加用ヒスタミン溶液 (1,000 ppm) の調製

ヒスタミン二塩酸塩をデシケーター (加熱式でないもの) の中で 2 時間乾燥させます。乾燥後、167 mg を精秤し、0.1 N 塩酸に溶解し 100 mL とします。

2. 検液の調製

- 1) 検体 10 g 程度を採取し、粉碎機等で細かくすりつぶします。
- 2) 2本のコニカルチューブ (A・B) を用意し、すりつぶした検体を正確に 1.0 g ずつ秤量し、それぞれのチューブに入れ、検体A、検体Bとします。
- 3) チューブ (検体A) に 1,000 ppm ヒスタミン標準液 0.1 mL を、チューブ (検体B) に蒸留水 0.1 mL を加えます。
- 4) 検体A・Bにそれぞれ正確に抽出用溶液 24.0 mL を加え、コニカルチューブのふたをしっかりとめ、10秒間ボルテックスで激しく攪拌します。コニカルチューブごと沸騰水中で 20 分間加熱します。(検体A・Bは抽出用溶液を加えたことにより25倍に希釈されます。検体Aに添加されたヒスタミン濃度は、25倍希釈後4 ppmとなります。そのため、検体Aに添加されたヒスタミン濃度は100 ppmとみなせます。)

- 5) 検体A・Bの入ったコニカルチューブを20°C以下になるまで氷中 10分程度で冷却します。
- 6) 冷却後、検体をきれいなスパーテル等を用いて細かくほぐします。
- 7) 5分間氷中で静置させ、固形物質と液体を分離させます。
- 8) 7) を濾紙 (No. 5C) で濾過、または、遠心分離 (10,000 × g, 5 分間) し上清を集め、それぞれ検液A・検液Bとします。

注意: 添加回収試験は、別の濃度 (例 500 ppm) でも評価可能です。添加濃度を変更した場合、添加回収率を算出する計算式も変更してください。遠心して上清を集める際は固形物質が混ざらないよう注意してください。

3. 測定

「[測定] 3.測定」に従って検液A・Bそれぞれのヒスタミン量を測定します。各検体につき、3回ずつ測定を行い、平均値を取ることをお勧めします。

4. 添加回収率の算出

添加回収率の計算方法は、以下の式で算出します。なお、A は、検体A中のヒスタミン量 (ppm) を、Bは、検体B中のヒスタミン量 (ppm) をあらわします。添加回収率を求める場合、ヒスタミン量A、Bの算出は、それぞれ、「5.データの取扱い」の式で、回収率を100%として計算してください。

$$\text{添加回収率}(\%) = (A - B) \div 100^{*7} \times 100(\%)$$

*7 添加したヒスタミン量 (ppm)

[廃棄の方法]

発色試薬および酵素試薬の容器は、ガラス、ゴム、アルミの材質からなっています。緩衝液および標準液の容器は、本体がポリエチレン製、キャップがポリプロピレン製です。廃棄の際は各々を分別して、都道府県・市町村が定める廃棄物の適正処理に従って廃棄処理してください。

[取扱い上の注意]

本製品を安全にご使用いただくため、以下の点にご注意ください。

- ① 本測定法は公定法ではありません。本製品を自主衛生検査以外の目的には使用しないでください。
- ② 本製品は簡易迅速検査用キットです。必要に応じて従来法 (食品衛生検査指針記載の方法など) を併用してください。
- ③ 本製品の試薬類を使用前後に口に入れたり、直接手で触れたり、眼に入れたりしないでください。
- ④ 使用後の器具を洗浄する際は、手袋を使用してください。
- ⑤ 誤って飲み込んだり、眼に入った場合は、口や眼を水にて良く (15 分間) すすいだ後、直ちに医師に連絡を取り診察を受けてください。手に付いた場合は、水で良く洗浄してください。
- ⑥ 食品類への混入がないよう充分ご注意ください。廃液処理の際は、地下水及び上水道へ混入しないよう注意してください。
- ⑦ ヒスタミンは有毒な物質であるため、眼に入れたり、吸入、経口摂取、皮膚への付着が生じないようにし充分取扱いには注意してください。また、本キット以外の試薬と混合しないでください。毒性ガスが発生する場合があります。
- ⑧ 取扱い説明書に記載されている所定以外の方法で使用しないでください。特に独自に試薬類を希釈したり、所定量以上混合することは避けてください。
- ⑨ 本製品は幼児の手の届かないところに保管してください。

〔保存方法〕

1. キットの保存: 冷暗所(2~8℃)で保存。凍結厳禁。
2. 品質保持期限: 本キットの外箱に記載。

〔保証〕

製造元では、本製品が所期の品質を有することおよび、本製品に不具合があった場合代替の製品を提供することを保証しますが、それ以外の保証は致しません。製造元は、特別な若しくは結果として生じる損害または、本製品の使用から直接的または間接的に生じる費用を含むいかなる損害にも責任を負いません。

製造元

キッコーマンバイオケミファ株式会社

〒105-0003 東京都港区西新橋 2-1-1

Tel: 03-5521-5490 Fax: 03-5521-5498

E-mail: biochemifa@mail.kikkoman.co.jp

URL: <http://biochemifa.kikkoman.co.jp/>