

島津分光蛍光光度計RF-5000によるヒスタミンの分析

Quantitative Analysis for Histamine with The RF-5000 Recording Spectrofluorophotometer

ヒスタミンは、種々の動植物組織に見いだされるオータコイドの一種で、生理活性アミンとして毛細血管拡張、気管支や腸などの平滑筋収縮、胃酸分泌亢進など多くの薬理作用をもち、神経伝達物質、炎症、創傷治癒、細胞増殖などにおける役割も示されています。

食品では、魚介類の腐敗検査やアレルギー様食中毒の原因物質の検査などに際してヒスタミン試験が行われています。また、ヒトのアレルギーの研究のひとつとして、各種細胞から遊離されるヒスタミンの測定なども行われています。

測定には、薄層クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーなども用いられますが、ここでは操作が簡便な島津分光蛍光光度計RF-5000を用いて蛍光分析法により測定した例をご紹介します。

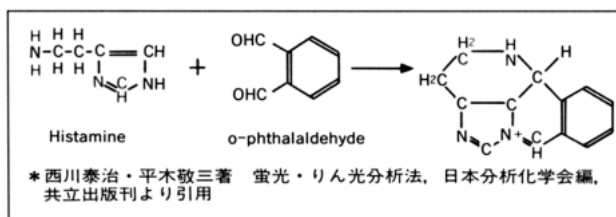


Fig. 1 反応式
Reaction

一般に、O-フタルアルデヒドはアルカリ性下で、第一級アミンと反応して蛍光物質を形成しますが、反応溶液を酸性にすることで、ヒスタミンや一部のアミノ酸の縮合物などを除く大部分のアミンによる蛍光は消失します。さらに、ヒスタミン以外のアミン類は、n-ブタノール抽出液を塩化ナトリウム飽和水酸化ナトリウム溶液で洗浄することで除去できます。Fig.1に、ヒスタミンとO-フタルアルデヒドとの反応を、Fig.2に測定前処理法を示します。

また、蛍光分析では測定波長条件の設定が重要です。RF-5000には、励起光波長を一定間隔で変えながら蛍光スペクトルを測定し、蛍光のピーク波長を約2分で見つけることのできる便利なマルチスペクトル機能があります。Fig.3にヒスタミンのマルチスペクトルの測定結果を、Table1にその分析条件を示します。ここでは励起光の波長を275~375nmの範囲で25nmごとに変化させていますが蛍光のピーク波長は443nmにあることがわかります。

なお、Fig.4、Table2に標準試料の蛍光スペクトルおよび分析条件を、Fig.5、Table3に検量線と分析条件を示します。この結果から、蛍光分析ではヒスタミン1ng/mL以下まで測定が可能であることがわかります。

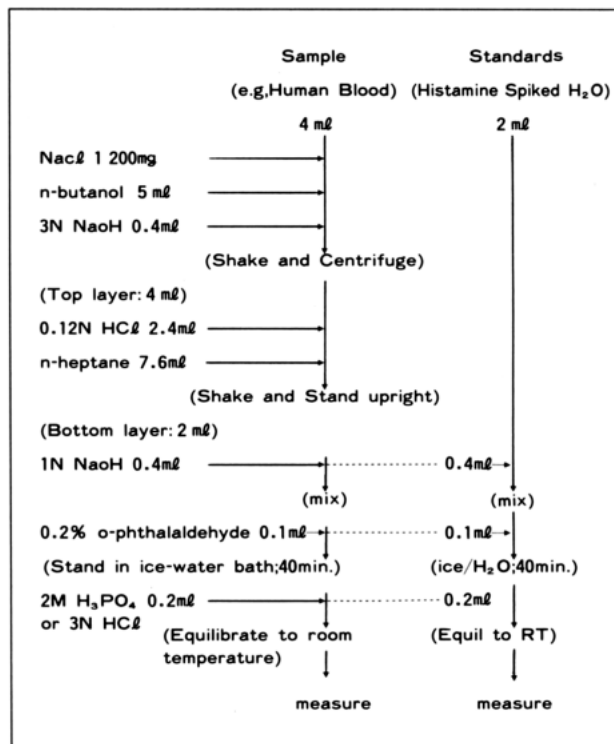


Fig. 2 測定前処理法 (REUBEN P. SIRAGANIANらの方法)
Histamine assay Sample Preparation

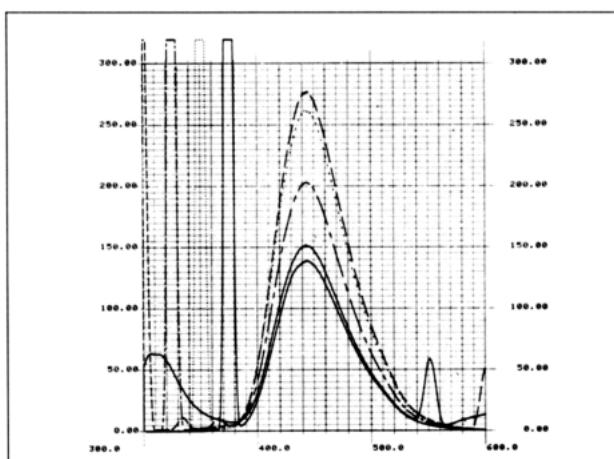


Fig. 3 マルチスペクトル測定結果
Multi-spectra

Table 1 マルチスペクトルの分析条件
Analytical Conditions for multi-spectra

*** MULTI-SPECTRA PARAMS ***	
EX 1 (nm)	275.0 300.0 325.0 350.0
EX 2 (nm)	375.0 400.0 425.0 450.0
EX 3 (nm)	475.0 500.0 525.0 550.0
EX 4 (nm)	575.0 600.0

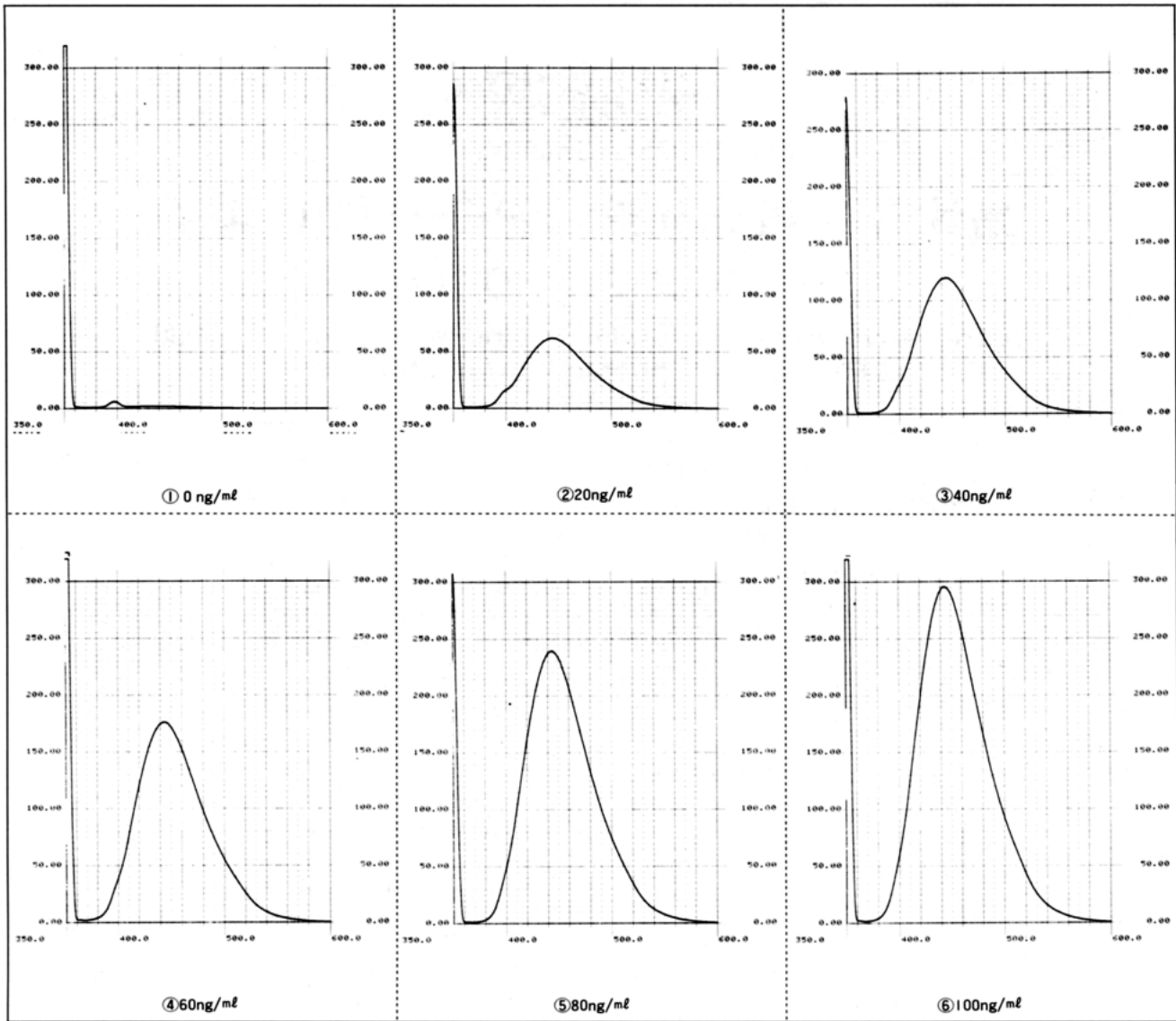


Fig. 4 標準試料の蛍光スペクトル
EM-spectra of Histamine Standards

Table 2 蛍光スペクトルの分析条件
Analytical Conditions for EM-spectra

```

*** PARAMETER LIST ***

SCAN MODE : SPECT      SELECT MODE : EM
λ (nm)      [ ] = 350.0
λ RANGE (nm)  EX      EM
  [START]    [ ]      [ ]
  [END]      [ ]      [ ]

SCAN SPEED : SLOW      RESPONSE (sec): AUTO
BAND WIDTH (nm)        REPEAT : OFF
  [ ] = 5.0             NO. OF SCANS = 1
  [ ] = 5.0             WAIT TIME  = 0.0
SENSITIVITY : HIGH     CELL POSITION : 1
FILE RES. : FINE       SHUTTER CONT. : MANUAL
    
```

Table 3 検量線の分析条件
Analytical Conditions for Calibration Curve

```

*** CALIB CURVE PARAMS ***

λ MODE : FIXED
          EX λ (nm)  EM λ (nm)
FIXED :   350.0    443.0
3-SET :

FACTORS :
BAND WIDTH : [ ] = 5.0    [ ] = 5.0
NO OF MEASUREMENTS : 2    RESPONSE (sec) : 4.0
X-AXIS : LINEAR           Y-AXIS : LINEAR
SENSITIVITY : HIGH        DEGREE : 1
START NO. OF SAMPLE : 1  CONC OUTPUT FACTOR : 1.0000
    
```

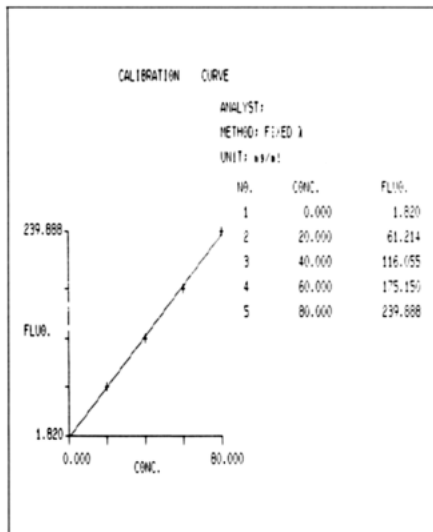


Fig. 5 検量線
Calibration Curve