ROCZN. PZH, 1979, T. XXX, Nr 1

REGINA GAJEWSKA, ZENON GANOWIAK, ANNA LEBIEDZIŃSKA

OZNACZANIE HISTAMINY W TKANCE MIĘSNEJ RYB METODĄ KOLORYMETRYCZNĄ

(NOTATKA LABORATORYJNA)

Z Zakładu Bromatologii Instytutu Chemii i Analityki
Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: doc. dr hab. Z. *Ganowiak*

Histamina pochodna imidazolowa powstaje w tkance mięsnej ryb na drodze autolitycznego i bakteryjnego rozpadu histydyny. Spośród metod oznaczania histaminy, zastosowanie znalazły między innymi metody chromatograficzne [1, 3], fluorometryczne [2, 6] i kolorymetryczne [4, 5].

Celem pracy było zaadaptowanie kolorymetrycznej metody Ota [5] do rutynowanych oznaczeń histaminy w tkance mięsnej ryb jako wskaźnika przydatności ryb do spożycia. Wybór metody uzasadnia jej przydatność do szybkich i seryjnych oznaczeń zawartości histaminy w materiale biologicznym.

METODYKA

Odczynniki

1. 5%-owy roztwór kwasu trójchlorooctowego
2. 1%-owy roztwór wodorotlenku sodowego
3. 4%-owy roztwór węglanu sodowego
4. Odczynnik dwuazowy: rozpuszczano 0,1 g p-nitroaniliny (oczyszczonej przez rozpuszczenie w gorącej wodzie destylowanej i wykrystalizowanie w temp. pokojowej, a następnie po przesączeniu wysuszonej w temp. 80°C) w 100 cm³ 0,1 n kwasu solnego i przechowywano w lodówce do chwili użycia. Oddzielnie przygotowano roztwór 4—5% azotynu sodowego w wodzie destylowanej tuż przed użyciem. Odczynnik dwuazowy otrzymano przez zmieszanie 10 cm³ roztworu p-nitroaniliny i 1 cm³ roztworu $NaNO_2$. Należy go również przygotować przed użyciem.
5. Siarczan sodowy bezwodny
6. Octan etylu
7. Wzorcowy roztwór histaminy:

a) roztwór podstawowy otrzymano przez rozpuszczenie 0,1656 g dwuchlorowodorku histaminy (suszonej 2 godz. nad H_2SO_4) w 100 cm³ wody destylowanej; 1 cm³ odpowiada 1 mg histaminy,

b) 10 cm³ roztworu podstawowego rozcieńczono do 100 cm³ wodą i otrzymano roztwór, w którym 1 cm³ odpowiada 100 μg histaminy,

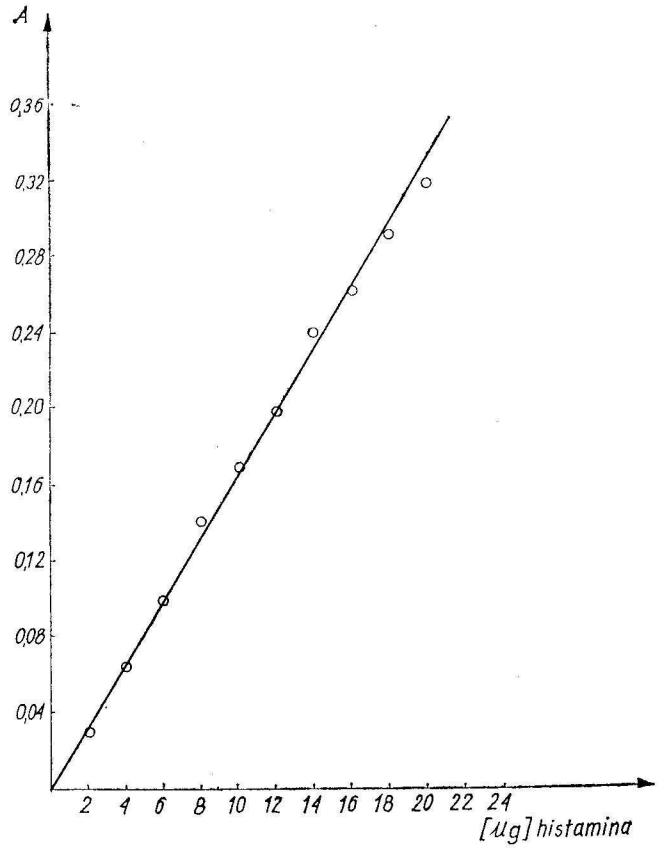
c) przez rozcieńczenie 5 cm³ roztworu „b" do 100 cm³ wodą uzyskano roztwór, w którym 1 cm³ zawiera 5 μg histaminy (roztwór nietrwały).

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Do jednakowych probówek kalibrowanych z doszlifowanymi korkami poj. 15—20 cm³ odmierzono od 0,002 do 0,020 mg histaminy w 1 cm³ wodnego roztworu. Uzupełniono wodą do 2 cm³ i dodano 1 cm³ 4% roztworu węglanu sodowego. Następnie probówki wstawiono do lodówki na okres 3—5 min. Po ochłodzeniu do-

dano 1 cm³ zimnego świeżo przygotowanego odczynnika dwuazowego i całość ponownie ochładzano w temp. 0 do —5°C (5 min.). Z kolei dodano 7 cm³ octanu etylu i probówki po zatknięciu doszlifowanymi korkami energicznie wytrząsano przez 30—60 sek. Po rozdzieleniu się warstw pobierano suchą pipetą górną warstwę do następnej suchej probówki i odwadniano bezwodnym siarczanem sodowym. Pomiaru absorbancji różowego estru histaminy dokonano na spektrofotometrze „Specol" przy długości fali 496 nm wobec próby ślepej.

Próbkę ślepą przygotowano jak próbki wzorcowe, bez dodatku histaminy. W celu określenia czułości metody dla każdego poziomu stężeń krzywej kalibracji wykonywano po 4 równoległe oznaczenia. Czułość metody wyrażono stosunkiem przyrostu wartości absorbancji do przyrostu stężenia histaminy. Najmniejsze stężenie histaminy dające reakcję barwną z odczynnikiem dwuazowym przyjęto jako granicę wykrywalności metody.



Ryc. 1. Krzywa wzorcowa histaminy

Oznaczanie histaminy w tkance mięsnej ryb

Odważono 10—25 g (w zależności od zawartości histaminy) farszu tkanki mięsnej ryb i dodano 100—150 cm³ 5% roztworu kwasu trójchlorooctowego. Całość homogenizowano przez 3 min., następnie przenoszono do kolby miarowej pojemności 250 cm³, uzupełniano kwasem do kreski i odstawiano na okres 10 min. Po tym czasie całość odwirowano przez 5 min. przy ok. 3000 obrotów na minutę. 1 cm³ uzyskanego w ten sposób ekstraktu odpowiada 0,04—0,1 g tkanki (w zależności od odważki farszu tkanki mięsnej ryb). Z kolei pobrano do kalibrowanej probówki 1 cm³ ekstraktu, zobojętniono 1% roztworem wodorotlenku sodowego i całość uzupełniono do objętości 2 cm³ wodą destylowaną. Ciąg dalszy postępowania tak jak opisano przy wykonywaniu krzywej wzorcowej.

Odzysk metody zbadano oznaczając histaminę w tkance mięsnej ryb fortyfikowanej roztworem wzorcowym histaminy w zakresie stężeń 0,002—0,010 mg na 10—25 g materiału doświadczalnego.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Na podstawie badań stwierdzono, że odzysk histaminy z tkanki mięsnej ryb wynosił od 88% do 108%, średnio 98%.

W badanym zakresie stężeń od 2—20 μg histaminy, czułość metody wynosiła 0,017. Wykrywalność metody wynosiła około 2 μg/1 cm³ ekstraktu. Opisana metoda kolorymetryczna może być stosowana do rutynowych oznaczeń histaminy w tkance mięsnej ryb, której zawartość przyjęto za wskaźnik ich przydatności do spożycia.

Р. Гаевска, З. Гановяк, А. Лебедзиньска

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИСТАМИНА В МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ РЫБ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Резюме

Адаптировали колориметрический метод Ота для рутиновых определений гистамина в мышечной ткани рыб, как показателя пригодности рыб для потребления.

Установлено, что в мышечной ткани рыб метод даёт выход 88—108% гистамина, в среднем 98%. Минимально обнаруживаемое количество составляло 2 мкг/1 см³ экстракта.

R. Gajewska, Z. Ganowiak, A. Lebiedzińska

HISTAMINE DETERMINATION IN THE MEAT OF FISH BY THE COLORIMETRIC METHOD

Summary

The colorimetric method of Ota was adapted for routine determination of histamine in the meat of fish as an index of the suitability of fish for eating.

It was found that histamine recovery from fish meat was from 88% to 108%, mean 98%. The detectability of the method was 2 μg/l ml of the extract.

PIŚMIENNICTWO

1. *Buliński R.:* Badania nad zawartością niektórych biologicznie czynnych amin w produktach spożywczych: Bromat. Chem. Toksykol. 1968, 1, 63. — 2. *Leske P. A., Bell L. D.:* A rapid fluorometric method for the determination of histamine in canned tuna.: J. Food Sci. 1976, 41, 1282. — 3. *Lin J. S., Baranowski J. D., Olcott H. S.:* Rapid thin layer chromatographic — densitometric determination of histamine in tuna: J. Chromatog. 1977, 130, 426. — 4. *Loo L. Y.:* The content of histamine and fish food poisoning, New Zealand Med. J. 1975, 82, 381. — 5. *Ota F.:* On the formation of amine in fish muscle. III. Simple method for the detection of histamine in fish muscle, Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 1958, 24, 37. — 6. *Taylor S. L., Lieber E. R.:* Specificity and sensitivity of seven histamine detection methods, J. Food Sci. 1977, 42, 1584.

Dn. 7.VI.1978 r.
80-416 Gdańsk, ul. K. Marksa 107