

MONIKA FONBERG-BROCZEK, DOROTA SAWILSKA-RAUTENSTRAUCH,
BOŻENA WINDYGA

OZNACZENIE HISTAMINY W KONSERWACH RYBNYCH
METODĄ FLUORYMETRYCZNĄ,
PRZY UŻYCIU APARATU *SPEKOL-10*
Z PRZYSTAWKĄ FK DO POMIARÓW FLUORESCENCJI

THE SPECTROFLUOROMETRIC METHOD FOR HISTAMINE DETERMINATION
IN CANNED FISH PRODUCTS ON SPECTROPHOTOMETER *SPECOL 10*
WITH FK EQUIPMENT FOR SPECTROFLUOROMETRY

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: doc. dr hab K. Karłowski

*Opracowano modyfikację fluorymetrycznej metody oznaczania histaminy w konserwach rybnych, wykorzystując jednopromieniowy spektrofotometr *Spekol-10*, wyposażony w przystawkę FK do pomiarów fluorescencji i filtr GVK-48.*

Wykazano zgodność uzyskiwanych wyników z wartościami oznaczonymi wg zalecanej przez AOAC metody spektrofluorymetrycznej.

W związku z przypadkami występowania zatruc pokarmowych związanych z obecnością histaminy w przetworach rybnych, [6, 8] Komitet d/s Ryb i Przetworów Rybnych Komisji Kodeksu Żywnościowego FAO/WHO zwrócił uwagę na znaczenie występowania histaminy w przetworach z niektórych rodzajów ryb i zaproponował jako metodę odwoławczą wykrywanie tej aminy metodą spektrofluorymetryczną wg AOAC [1, 3].

Na ostatnim posiedzeniu tego Komitetu w marcu 1990 roku w Bergen (Norwegia) w toku dyskusji nad dokumentem dotyczącym solonych śledzi (CAC/RCP 26 – 1979) delegacje niektórych krajów (RFN, Francja, Egipt, Tajlandia) sugerowały konieczność limitowania histaminy i obniżenia jej poziomu do wartości 10 mg/100 g [4].

W Zakładzie Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH w 1988 r. oznaczono metodą spektrofluorymetryczną wg AOAC zawartość histaminy w konserwach rybnych i zaproponowano ją jako metodę odwoławczą [5].

W 1990 roku Morski Instytut Rybacki opracował projekt normy metodycznej dotyczącej fluorymetrycznej metody oznaczania histaminy w surowcach i przetworach z ryb i innych zwierząt wodnych [7], wzorując się na metodzie wg AOAC [2].

Przeszkodą do szerszego wykorzystania tej metody w oznaczeniach wykonywanych w kraju jest brak odpowiedniej, aparatury pomiarowej – spektrofluorymetrów, spełniających wymagania AOAC.

W związku z powyższym wykonano badania mające na celu sprawdzenie możliwości zastosowania powszechnie dostępnego dla większości laboratoriów

terenowych – jednopromieniowego spektrofotometru fotoelektrycznego – Spekol-10, firmy *Carl Zeiss Jena*, wyposażonego w przystawkę do pomiarów fluorescencji typu FK. Wyniki oznaczeń porównywano z otrzymanymi na spektrofluorymetrze – firmy *Aminco Bowman*.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Zasada metody polega na metanolowej ekstrakcji histaminy z badanego materiału, oczyszczeniu ekstraktu na kolumnie jonowymiennej i spektrofluorymetrycznym oznaczeniu fluoryzującego związku histaminy z aldehydem ortoftalowym (OPT).

Aparatura i sprzęt

Jednopromieniowy spektrofluorymetr fotoelektryczny Spekol-10 firmy *Carl Zeiss Jena* z przystawką do pomiarów fluorescencji typu FK oraz filtr GVK – 48 i kuwety typu 8F (1 cm).

Spektrofluorymetr firmy *Aminco Bowman* z kuwetami o 1 cm grubości warstwy.

Pozostały sprzęt i aparatura, odczynniki, przygotowanie próbek do badań, kolumn, wzorców i krzywych wzorcowych podano w poprzedniej pracy [5].

Pomiary fluorymetryczne

Pomiary względnej intensywności fluorescencji (IF) wykonywano w następujących warunkach:

Spekol-10: wzbudzenie $\lambda = 365$ nm, emisja filtr GVK – 48, czułość aparatu 1000,

Aminco Bowman: wzbudzenie $\lambda = 350$ nm, emisja 444 nm, szczeliny licząc od łuku ksenonowego 2,5; 2,0; 2,3 mm.

Przygotowanie krzywej wzorcowej i oznaczenie próbek

Wzorce histaminy i ślepą próbę przygotowano wg [5], otrzymując następujące stężenia robocze roztworów standardowych: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 $\mu\text{g}/5$ ml.

Wykonanie pomiaru na aparacie Spekol-10

Po wykonaniu reakcji z aldehydem ortoftalowym ustawia się wartość odniesienia próby ślepej (wartość jałową) na współczynnik przepuszczania promieniowania $v = 0\%$.

Wartość próby wzorcowej o najwyższym stężeniu (2,0 $\mu\text{g}/5\text{ml}$) ustawia się na współczynnik promieniowania $v = 100\%$ przy czułości aparatu = 1000.

Następnie można przystąpić do pomiaru innych próbek wzorcowych i sporządzenia krzywej wzorcowej (ryc. 2). Stężenie w próbkach badanych odczytuje się z krzywej wzorcowej, którą należy sporządzić każdorazowo przed wykonaniem serii pomiarów.

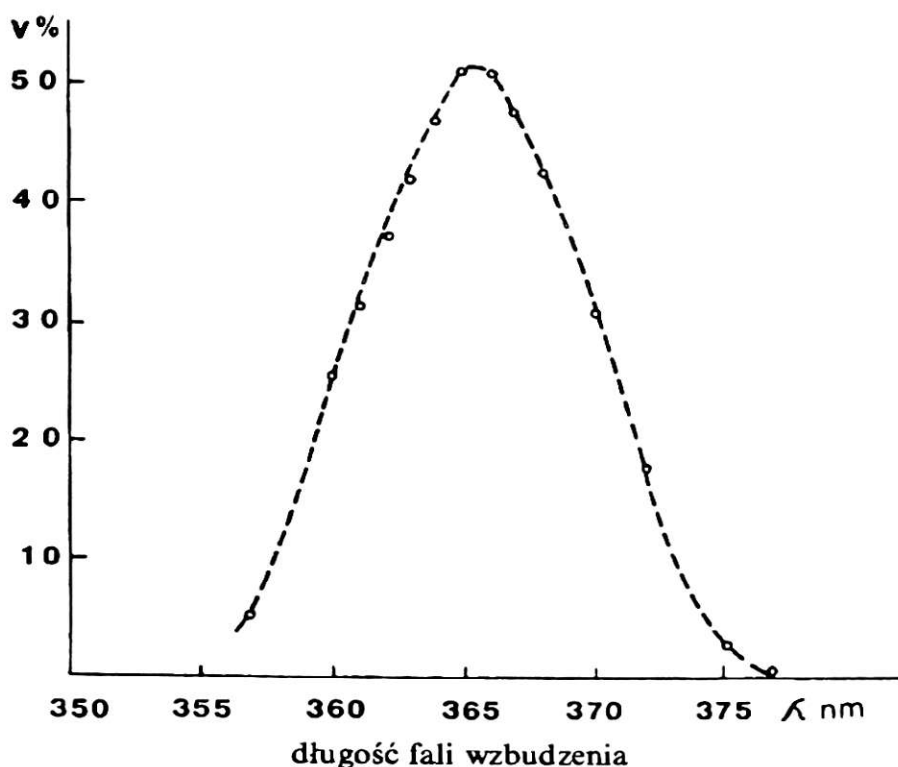
Krzywą wzorcową na aparacie *Aminco Bowman* przygotowuje się rutynowo [5].

Jeżeli próbka badana zawiera więcej niż 20 mg histaminy w 100 g konserwy rozcieńcza się eluat z kolumny 0,1N HCl do osiągnięcia wartości odczytu mieszczącego się w zakresie krzywej wzorcowej.

Oznaczenia próbek badanych wykonywano równolegle na aparatach *Spekol-10* z przystawką FK i spektrofluorymetrze *Aminco-Bowman*. Każdorazowo wykonywano oznaczenia równoległych 8 powtórzeń próbek. Wyniki opracowano statystycznie obliczając odchylenie standardowe (SD) i współczynnik zmienności (V%).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE.

Rycina 1 przedstawia natężenie promieniowania fluorescencyjnego (światło wtórne) fluorochromu otrzymanego w wyniku reakcji wzorca histaminy z aldehydem orto-ftalowym, wykreślone przy użyciu aparatu Spekol-10, zaopatrzonego w przystawkę FK i filtr GVK-48. Maksimum emisji, w tych warunkach przypada na długość fali wzbudzenia $\lambda = 365 - 366$ nm, którą wykorzystano w dalszych pomiarach.

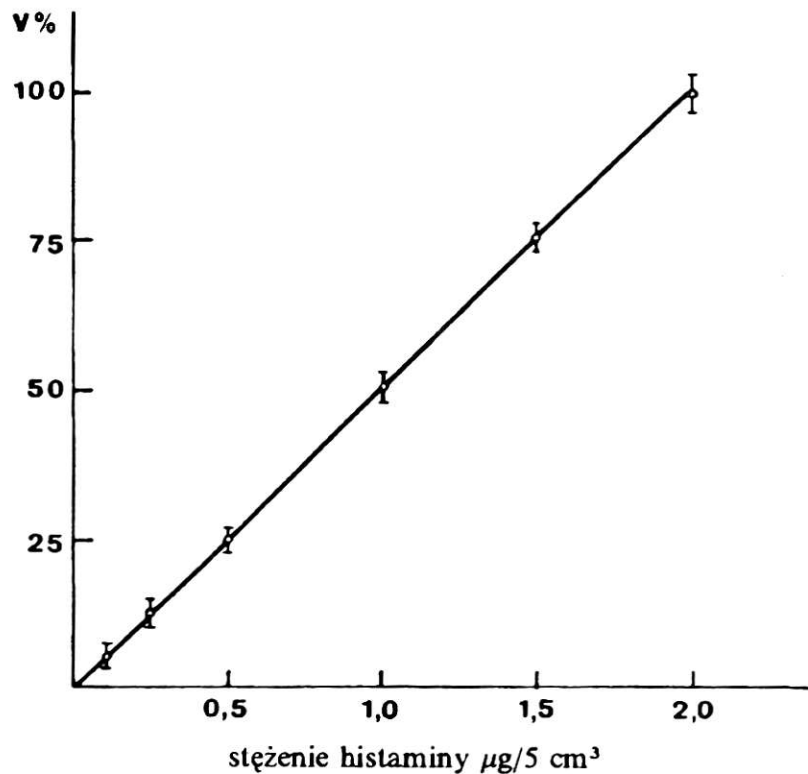


Ryc. 1. Widmo emisji związku histaminy z aldehydem orto-ftalowym (warunki wykonania: spektrofotometr *Spekol-10* z przystawką FK, filtr GVK-48, czułość aparatu 500, $2 \mu\text{g}$ histaminy/5 ml roztworu wzorcowego), v% – współczynnik przepuszczania promieniowania.
Fluorescence spectrum of fluorochrome after reaction of histamine with o-phthalaldehyde (spectrophotometer *Spekol-10* with FK equipment, GVK – 48 filter, scale of sensibility 500, $2 \mu\text{g}$ of histamine standard/5 ml of calibration solution)
v% light transmission coefficient.

Rycina 2 przedstawia krzywą wzorcową, wykonaną na aparacie Spekol-10 z przystawką FK w warunkach podanych w części doświadczalnej. W zakresie badanych stężeń jest ona linią prostą, przechodzącą przez środek układu współrzędnych.

Wykrywalność w opisanych warunkach ekstrakcji i rozcieńczenia wynosi 1 mg histaminy na 100 g próbki wyjściowej ($0,02 \mu\text{g}$ 1 cm^3 roztworu wzorcowego) [5]. Uwzględniając wymagania obowiązujące dla przetworów rybnych można uznać ją za zadowalającą.

Porównanie wyników oznaczeń zawartości histaminy w próbkach konserw rybnych przedstawia tabela I. Próbki konserw dobrano tak, aby wykazywały one niską (poniżej $10 \text{ mg}/100 \text{ g}$), średnią; (między 10 a $20 \text{ mg}/100 \text{ g}$) i wysoką (powyżej $30 \text{ mg}/100 \text{ g}$) zawartość histaminy.



Ryc. 2. Krzywa wzorcowa histaminy (warunki wykonania: spektrofotometr *Spekol-10* z przystawką FK, filtr GVK – 48, czułość aparatu 1000)
 V% – współczynnik przepuszczania promieniowania.
 Calibration curve of histamine standard (spectrophotometr *Spekol-10* with FK equipment, GVK – 48 filter, scale of sensibility 1000)
 V% light transmission coefficient.

Tabela I. Porównanie oznaczeń zawartości histaminy w próbkach konserw rybnych na spektrofluorometrze *Aminco-Bowman* i spektrofotometrze *Spekol-10*, z przystawką FK, – firmy *Carl Zeiss Jena*.
 Comparison of histamine determination in canned fish products on spectrofluorometer *Aminco Bowman* and spectrophotometer *Carl Zeiss Jena Spekol-10* with FK equipment for spectrofluorometry.

L.p.	Nazwa konserwy (produkcji jugosłowiańskiej)	Liczba równoleg. próbek n	Zawartość histaminy w mg/100 g					
			<i>Aminco-Bowman</i>			Spekol		
			X	SD	V%	X	SD	V%
1	Sardynka w oleju	8	7,49	0,48	6,4	8,23	0,35	4,3 +
2	Sardynka w oleju	8	5,50	0,71	13,0	5,59	0,47	8,5
3	„Issa” – Sardynka w oleju	8	61,25	2,60	4,3	61,38	3,20	5,2
4	Sardynka w oleju	8	36,44	3,75	10,3	36,83	2,42	6,6
5	Sardynka w oleju „Issa”	8	6,17	0,58	9,4	6,30	0,61	9,6
6	Sardynka w oleju	8	16,81	2,25	13,4	17,99	1,73	9,6

X – średnia arytmetyczna, SD – odchylenie standardowe, V% – współczynnik zmienności
 + – metody dają istotnie różne wyniki (obciążone błędem systematycznym)

Uzyskane wyniki wskazują, że można uznać obie metody za równorzędne. Tylko w jednym przypadku otrzymano istotnie różniący się wynik obciążony błędem

systematycznym (względna różnica między średnimi w tym przypadku wynosiła 9,9%). W pozostałych przypadkach różnice między metodami okazały się nieistotne.

WNIOSKI

1. Fluoryzujący związek histaminy z aldehydem ortoftalowym można oznaczać ilościowo na jednopromieniowym spektrofotometrze fotoelektrycznym *Spekol-10*, firmy *Carl Zeiss Jena* wyposażonym w przystawkę do pomiarów fluorescencji, typu FK, stosując długość fali wzbudzenia $\lambda = 365$ nm i filtr GVK-48. Limit wykrywalności metody w badanych warunkach wynosi 1 mg histaminy w 100 g próbki ryb lub przetworów rybnych ($0,02 \mu\text{g}/1 \text{ cm}^3$ roztworu badanego).

2. Fluorymetryczna metoda oznaczania histaminy wykorzystująca aparat *Spekol-10* z przystawką typu FK może być zalecana w rutynowej kontroli zawartości histaminy w konserwach rybnych.

M. Fonberg-Broczek, D. Sawilska-Rautenstrauch, B. Windyga

THE SPECTROFLUOROMETRIC METHOD FOR HISTAMINE DETERMINATION IN CANNED FISH PRODUCTS ON SPECTROPHOTOMETER *SPECOL 10* WITH FK EQUIPMENT FOR SPECTROFLUOROMETRY

Summary

The content of histamine in canned fish products was determined by fluorometric method recommended by AOAC with final determination of fluorescence on spectrophotometer *Spekol 10* with FK equipment of wave excitation for maximum of emission: $\lambda = 365$ nm, filter GVK - 48).

The method makes possible quick, reproducible, and sensitive determination (limit of detection: 1 mg/100 g of product) of histamine in canned fish products, on simple equipment available in every laboratory of count Sanitary Stations.

PIŚMIENNICTWO

1. Fluorimetric Methods (29) Official Final Action AOAC Methods, Thirteen Edition 1980, 296.
- 2. Fluorimetric Methods Official Final Action AOAC Methods, Fourteen Edition 1984, 341. – 3. Code of practice for salted fish – Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Fish and Fishery Products, XVII Session Oslo, Norway, 5 – 9 May, 1986, Alinorm 87/18, P II. – 4. Code of practice for salted fish. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on Fish and Fishery Products, XIX Session Bergen, Norway, 11 – 15 June, 1990. – 5. *Fonberg – Broczek M., Windyga B., Kozłowski J., Sawilska-Rautenstrauch D., Kahl S.*: Oznaczanie histaminy w konserwach rybnych metodą spektrofluorymetryczną. Roczn. PZH 1988, 39, 226. – 6. *Ganowiak Z., Gajewska R., Lipka E.*: Określenie aktywności dekarboksylazy histydynowej oraz poziomu wolnej histydyny i histaminy w tkance mięsnej ryb. Roczn. PZH 1990, 41, 50. – 7. Projekt PN – 91A ... Surowce i przetwory z ryb i innych zwierząt wodnych. Oznaczenie zawartości histaminy metodą fluorymetryczną. – 8. *Taylor S.L.*: Histamine food poisoning: toxicological and clinical aspects – a review. CRC. Crit. Rev. Toxicol. 1986, 17, 91.

Dn. 27.11.1990

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24