

# Usporedba dva komercijalna testa za kvantitativnu analizu histamina u ribi

Šimat,<sup>1</sup> V..

Znanstveni rad

## Sažetak

Biogeni amini mogu djelovati toksično ili potencirati histaminsko otrovanje kod ljudi. Histamin je daleko najvažniji toksični biogeni amin prisutan u ribi, pa se javlja potreba za pouzdanim i učinkovitim metodama za detekciju i kvantifikaciju histamina i drugih biogenih amina u ribi i proizvodima mora kako bi se otkrili što ranije u proizvodnom lancu. U ovom radu uspoređena su dva komercijalna testa za determinaciju i kvantifikaciju histamina u ribi s HPLC metodom, kako bi se procijenila njihova učinkovitost i korisnost u analizi histamina u riboprerađivačkim tvornicama. Raspon vrijednosti histamina dobivenih testovima bio je sličan u uzorcima bez dodatka standarda, dok se u uzorcima sa standardima raspon kretao od -25 do 15% u odnosu na srednju vrijednost. Vrijednosti iskorištenja i ponovljivosti testova kretale su se od 98 – 114% i 7 - 14 % rsd. Oba test imala baždarnu krivulje s R2 vrijednosti iznad 0,998, ali je zabilježena je manja djelotvornost testova u odnosu na HPLC metodu.

**Ključne riječi:** histamin, ELISA, kvantitativni test, riba

## Uvod

Biogeni amini su nehlapljive organske baze niske molekularne težine koje se mogu sintetizirati mikrobnim, životinjskim i biljnim metaboličkim procesima (Mendes, 2009). Ukoliko se proteinska namirnica kao što je riba, izloži uvjetima pogodnima za rast i razvoj mikroorganizama, za očekivati je da će doći do nastanka biogenih amina koji se pridružuju fiziološkim aminima već prisutnima u ribi. Konačni sadržaj različitih amina ovisi o više čimbenika među kojima su priroda proizvoda, uvjeti skladištenja, posebno temperatura, te prisutnost mikroorganizma. Biogeni amini kao biološki aktivni spojevi u hrani mogu imati negativni utjecaj na zdravlje potrošača, a konzumacijom većih koncentracija ovih spojeva dolazi do trovanja ljudi (Mah i

Hwang, 2009). Histamin nastaje bakterijskom dekarboksilacijom aminoskiseline histidin pod djelovanjem enzima histidin-dekarboksilaze. Optimalna temperatura za razvoj ovog toksina je 20-25°C, ali je i pri temperaturama od +4 °C kroz 3-7 dana zabilježen porast količine histamina u mišiću ribe (Dalgaard i sur., 2000). U određenom razdoblju između ulova i konzumacije dolazi do razvoja specifičnih bakterija čijom aktivnošću nastaju biogeni amini, ali i drugi produkti razgradnje tkiva kao što su ukupne hlapljive baze dušika (TVB-N) i trimetilamin (TMA-N) (Dalgaard, 2000). Unatoč modernizaciji opreme i rashladnih sustava za rukovanje ribom stopa trovanja histaminom i drugim biogenim aminima nije snižena kroz zadnja dva desetljeća (Dalgaard i sur., 2008). Histamin, kada-

verin, putrescin, tiramin, triptamin, β-feniletilalanin, agmatin, spermin i spermidin se smatraju najznačajnijim biogenim aminima hrane morskog porijekla. Njihova prisutnost u mesu ribe smatra se izvrsnim pokazateljem stupnja svježine, budući su zastupljeni u vrlo malim količinama u svježoj ribi, a tijekom vremena skladištenja i pod nepovoljnim uvjetima skladištenja, količina im se povećava (Dalgaard i Emborg, 2009). Zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, jedan od najproučavanijih biogenih amina je histamin. Trovanje histaminom spada u trovanja hranom uzrokovana konzumacijom hrane s visokim količinama histidina, a još je odavno poznato pod nazivom skombroidno trovanje (skombrotoksizam), te se vezivalo uz konzumaciju riba iz porodice *Scombr-*

<sup>1</sup> Vida Šimat, dipl. ing. morskog ribarstva, Centar za studije mora, Sveučilišta u Splitu, Livanjska 5/III 21000 Split vida@unist.hr

Tablica 1. Razlike nekih karakteristika između Veratox i Histamine Food ELISA testova

Table 1 Differences between Veratox i Histamine Food ELISA test kits characteristics

Karakteristike testova Test kits characteristics	Korišteni testovi Used test kits	
	Histamine Food ELISA	VERATOX Quant. His. Test
Postupak ekstrakcije i filtracije Extraction and filtration procedure	1 ml suspenzije dobivene otapanjem 10 g homogeniziranog uzorka u 90 ml destilirane vode, uz miješanje kroz 15 minuta, centrifugiran je 5 min na najvećoj brzini. 20 µl supernatanta otopljeno je u 10 ml destilirane vode.	10 g homogeniziranog uzorka suspendira se u 90 ml destilirane vode, uz miješanje (3×15-20 sekundi, s pauzama od 5 minuta). Sadržaj se filtrira kroz Whatman #1 filter papir, a 100 µl supernatanta otopljeno je u 10 ml pufera za razrjeđivanje.
Osigurani reagensi i standardi Supplied reagents and standards	Svi potrebni reagensi, šest standarda (0, 0,5, 1,5, 5, 15 i 50 µg/L histamina) i dvije kontrole osigurani su u sklopu testa.	Svi potrebni reagensi i šest kontrola (0, 2, 5, 10, 20 i 50 mg/L histamina) osigurani su u sklopu testa.
Dodatna oprema potrebna za rad Materials not provided with tests	Centrifuga Laboratorijska miješalica Čitač za mikro jažice (@450 nm) pipetor (12-kanalni) Bočice i epruvete za uzorke	Whatman #1 filter papir Čitač za mikro jažice (@650 nm) pipetor (12-kanalni) Bočice i epruvete za uzorke
Vrijeme trajanja testa Test duration	90 min	60 min
Stabilnost reagensa Stability of reagents	Stabilni na temperaturi od 2-8 °C	Stabilni na temperaturi od 2-8 °C
Broj analiza po testu Number of analysis per test	Do 96	Do 48
Napomena Comments	Prije provođenja testa svi reagensi moraju biti sobne temperature. Proizvođač preporuča raditi sve analize u duplikatu. Ne koristiti stakleno laboratorijsko posuđe.	Prije provođenja testa svi reagensi moraju biti sobne temperature.
Predstavništvo u RH Sales representative in Croatia	Nema	NOACK d.o.o., Zagreb
Internet stranica Internet page	<a href="http://www.ldn.de">www.ldn.de</a>	<a href="http://www.neogen.com">www.neogen.com</a>

dae. Obzirom da su zabilježeni slučajevi u kojima je trovanje uzrokovano konzumacijom drugih vrsta riba, kao i drugim namirnicama, kao što su sir, vino i fermentirani mesni proizvodi, naziv skombrotoksizam izmijenjen je u poremećaj uzrokovan konzumacijom histamina iz hrane, odnosno "histaminskim trovanjem" (Taylor i Lyons, 1984).

Otrovanje histaminom javlja se

vrlo brzo nakon konzumacije. Kao bitno za naglasiti je da su količine koje uzrokuju trovanje vrlo individualne, a osjetljivost pojedinca pripisuje se smanjenoj aktivnostima enzima monoamino-oksidadze (MAO), diaminooksidaza (DAO) i histamin-N-metil transferaza (HMT) odgovornih za intoleranciju na histamin. Ljudsko tijelo je u stanju metabolizirati veći dio histamina iz gastrointestinalnog trakta, međutim, u nekim slučajevima

(kada pojedinac ima smanjene aktivnosti enzima) ovi mehanizmi su nedostadni, te u situacijama visokog unosa histamina (200-500 mg/kg) dolazi do njihovog ulaska u krvotok i do otrovanja (Dalgaard i sur, 2008; Dalgaard i Emborg, 2009). Interesantna je i činjenica da histamin nije jednako raspoređen po cijeloj ribi, pa su mogući pojedinačni slučajevi trovanja pojedinaca iz grupe osoba koje su konzumirale različite dijelove iste ribe. Otrovanja su vrlo česta, odvijaju se u različitim dijelovima svijeta, te jednako zahvaćaju sve dobne skupine, spolove i rase (Hall, 2003; Dalgaard i sur., 2008). U Sjedinjenim Američkim Državama i Ujedinjenom Kraljevstvu preko 30% trovanja hranom morskog porijekla opada na histaminsko trovanje (Dalgaard i sur., 2008), dok je u Hrvatskoj zabilježen samo 1 slučaj epidemije, koji je obuhvaćao 17 ljudi, u razdoblju od 1993. do 2003. (Capak i sur., 2006). Karakteristično je da nema korelacije između potrošnje ribe i stope otrovanja histaminom. U zemljama kao što su Havaji, Japan ili Danska, u kojima je povećana konzumacija ribe s visokim udjelom slobodnog histidina (*Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresoidae*) zabilježena je viša stopa histaminskog trovanja (Dalgaard i sur., 2008). Izostanak evidencije trovanja u nekim državama, uključujući Hrvatsku, može se pripisati slijedećim čimbenicima: incidenti trovanja uključuju manji broj ljudi, česti su i pojedinačni slučajevi trovanja, simptomati su blagi i kratkotrajni i često imaju veliku sličnost s alergijskim reakcijama, pa izostaje konzultacija s liječnikom.

Određivanje ukupnog sadržaja svih biogenih amina za različite riblje vrste s ciljem određivanja indeksa biogenih amina pokazalo se vrlo učinkovitim u procjeni sigurnosti i kvalitete određenih ribljih vrsta i proizvoda. Osim toga, mnoge specifične bakterije kvarenja proizvode

više od jednog biogenog amina, pa indeksi koji uključuju više biogenih amina bolje ukazuju na stanje ribe ili proizvoda (Dalgaard, 2000).

Zakonske granice EU regulative (EC, 2005) za kritične količine histamina u ribi preuzete su *Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu* (2008), a uključuju dvije skupine ribljih proizvoda: (1) količine histamina u ribama s visokim udjelom slobodnog histidina (*Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombrosidae*) i (2) proizvode ribarstva dobivene preradom ribe s visokim udjelom slobodnog histidina u procesu enzimatskog zrenja u salamuri. Od devet uzoraka prosječni sadržaj histamina mora biti ispod 100 mg/kg za (1) i ispod 200 mg/kg za (2). Za dva od devet uzoraka dopuštena je dvostruko veća količina histamina, ali ne veća od 200 mg/kg za (1) i 400 mg/kg za (2). EU regulative i hrvatski zakoni nemaju određene kritične granice za ostale biogene amine, a porodice riba *Belonidae*, *Gempylidae*, *Istiophoridae* i *Xiphiidae* nisu obuhvaćene pravilnicima, iako su povezane s histaminskim trovanjem (Dalgaard i Emborg, 2009).

Potreba za pouzdanim i efikasnim metodama za detekciju i kvantifikaciju histamina i drugih biogenih amina u ribi i proizvodima mora javlja se kako bi se bolje razumjelo i upravljalo nastankom ovih spojeva u ribi i proizvodima mora. Analitičke metode za determinaciju biogenih amina mogu pomoći u identifikaciji bakterija odgovornih za njihov nastanak, te na taj način pridonijeti boljem razumijevanju i rješavanju tog problema (Dalgaard i Emborg, 2009). Dostupni su različiti postupci i brojne instrumentalne metode za detekciju histamina i drugih biogenih amina u hrani. Sam histamin može se odrediti fluorescentnim metodama ili enzimatskim testovima bez potrebe za skupom laboratorijskom

opremom (Önal, 2007; Rogers and Staruszkiewicz, 2000). Ipak, za separaciju i kvantifikaciju većeg broja biogenih amina najčešće se koriste HPLC metode u kombinaciji sa predkolonskom ili post-kolonskom derivatizacijom koristeći dansyl klorid i o-ftalaldehid kao derivatizacijske reagense. Klasične HPLC metode koriste kromatografske kolone s česticama punjenja veličine od 4-5 µm rezultirajući tlakom u HPLC sistemu nižim od 200 bar i vremenom elucije u rasponu od 20 do 60 minuta (Eerola i sur., 1993; Malle i sur., 1996; Veciana-Nogués i sur., 1995; Önal, 2007). U novije vrijeme u analizu biogenih amina uvedene su metode ultra visokotlačne tekuće kromatografije (UHPLC), koje koriste kolone veličinom čestica punjenja manje od 2 µm, čime se postiže vrijeme elucije kraće od 10 minuta, značajno smanjena potrošnja eluenta, ali i tlak sistema u rasponu od 700-800 bara (Latorre-Moratalla i sur., 2009; Mayer i sur., 2010). UHPLC sistemi su vrlo skupa laboratorijska oprema i još nije dostupna u laboratorijima kontrole kvalitete proizvoda mora, međutim elementi UHPLC metoda uspješno su primijenjeni na klasičnim HPLC sistemima čime je postignuto poboljšanje analiza u pogledu vremena analize i utroška kemikalija, bez gubitka učinkovitosti metoda (Šimat i Dalgaard, 2010). Obzirom na brojne metode koje su dostupne za analizu histamina u hrani (Önal, 2007), te tendenciju da se analize histamina provode u sklopu prerađivačkih industrija kad laboratoriji nisu dostupni, u tu svrhu na tržištu su prisutni brojni enzimski testovi za detekciju i/ili kvantifikaciju histamina (Rogers i Staruszkiewicz, 2000). Termin ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) je korišten za veliku raznovrsnost imunoloških metoda, koje su upotrebljavane za određivanje i mjerenje antigena ili antitijela, u raznim ispitivanjima u veterini, proizvodnji hrane, medicini, ekologiji te u mnogim drugim granama.

Omogućuje brzi *screening* ili kvantifikaciju traženog analita na većem broju uzoraka. Kvantitativno određivanje koncentracije analita provodi se mjerenjem intenziteta obojenja produkta reakcije koji nastaje interakcijom enzima i dodanog supstrata, odnosno mjerenjem apsorbance dobivenih produkata koristeći spektrofotometrijski ELISA čitač. Nedostatak ovih metoda u analizi biogenih amina je mogućnost određivanja samo jednog biogenog amina, obično histamina ili tiramina, što ih čini ograničavajućima za znanstvena istraživanja.

U ovom radu uspoređena su dva komercijalna testa za kvantitativnu analizu histamina u ribi kako bi se procijenila njihova učinkovitost i korisnost u analizi histamina u riboprerađivačkim tvornicama u sklopu interne kontrole propisane HACCP planom. Dan je pregled i osvrt na pripremu uzorka, provođenje testa na uzorcima mršave (tuna) i masne (haringa) ribe, a dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima dobivenim HPLC metodom.

## Materijali i metode

### Uzorci ribe

Uzorci ribe korišteni za usporedbu dva komercijalna test kitta su meso tune (*Thunnus albacares*) iz konzerve s 1% NaCl-a proizvođača Amanda Seafood Ltd., Frederikshavn, Danska i smrznuti fileti haringe (*Clupea harengus*) kupljeni u trgovini (Irma, Rødovre, Danska). Ocijeđeno meso tune homogenizirano je u kuhinjskom sjekaču i podijeljeno u dva dijela, svaki težine 700 g. Jedan dio mesa odmah je vakuumiran i smrznut, dok je u drugi dio dodana otopina standarda histamina (50 mg/kg), te je uzorak ponovno homogeniziran, vakuumiran i smrznut. Uzorci tune (sa i bez dodatka histamina) čuvani su na -20 °C do i analizirani unutar 12 dana. Smrznuti fileti haringe odmrznuti su preko noći na tem-

Tablica 2. Rezultati testova i HPLC analize histamina u uzorcima haringe i tune sa i bez dodatka standarda (n=12)

Table 2 Results of tests and HPLC analysis of histamine in samples of herring and tuna with and without standard addition (n=12)

Uzorc Samples	Histamine Food ELISA		VERATOX Quant. His. Test		HPLC metoda HPLC method (Šimat i Dalgaard, 2011)	
	Raspon dobivenih vrijednosti The range of values obtained (mg/kg)	Srednja vrijednost ± standardna devijacija Mean± standard deviation (mg/kg)	Raspon dobivenih vrijednosti The range of values obtained (mg/kg)	Srednja vrijednost ± standardna devijacija Mean± standard deviation (mg/kg)	Raspon dobivenih vrijednosti The range of values obtained (mg/kg)	Srednja vrijednost ± standardna devijacija Mean± standard deviation (mg/kg)
Tuna Tuna	2,01-3,94	3,06 ± 0,65	2,47-3,28	2,98 ± 0,32	1,47-2,14	1,97 ± 0,37
Tuna s dodanim standardom* Tuna with standard	47,24-65,43	57,41±6,33 <sup>A</sup>	45,96-70,82	60,50±8,53 <sup>B</sup>	50,19-51,99	51,79±0,39 <sup>C</sup>
Haringa Herring	1,61-2,17	2,03 ± 0,22	0,08-0,12	0,08 ± 0,04	0,83-0,94	0,89 ± 0,04
Haringa s dodanim standardom* Herring with standard	45,54-59,92	52,82±4,84 <sup>A</sup>	51,27-62,57	58,22±3,45 <sup>B</sup>	50,87-51,27	51,06±0,15 <sup>C</sup>

\*Srednje vrijednosti u istom redu koje su označene različitim velikim slovom statistički se značajno razlikuju na razini 95% vjerojatnosti (p<0,05)

\* Mean values in the same row and labelled with the same uppercase letter do not differ significantly (p<0,05).

peraturi od 2(±1) °C, homogenizirani i pripremljeni istim postupkom kao i meso tune. Uzorcima ribe određen je udio masti prema metodi Bligh i Dyer (1959).

### Kitovi za određivanje histamina

Dva komercijalna test kita Veratox (proizvod # 9505, Neogen Europe Ltd, Ayr, Scotland) i Histamine Food ELISA (proizvod # BA 10-3100, Labor Diagnostica Nord GmbH & Co. KG, Nordhorn, Njemačka) za kvantitativnu analizu histamina u ribi korištena su na ranije opisanim uzorcima ribe (tuna i haringa). Priprema uzoraka i analize test kitovima provedene su prema uputama proizvođača uključenima u testove. Standardi, kontrole, svi potrebni reagensi, te reakcijske jažice za analize također su bili uključeni u testove. Detaljniji opisi provedenih postupaka opisani su u daljnjem tekstu.

Postupak provođenja Veratox testa obuhvaća homogenizaciju uzorka, ekstrakcijski postupak u destiliranoj vodi, čime se omogućuje da se

slobodni histamin, u uzorcima i standardima, natječe s enzimskim konjugatom histamina za vezana mjesta antitijela u reakcijskim jažicama. Ne vezani enzimski konjugat se zatim uklanja ispiranjem, nakon čega se u jažice dodaje supstrat koji reagira s vezanim konjugatom kako bi došlo do obojane reakcije. Intenzitet plave boje obrnuto je proporcionalan koncentraciji histamina. Podaci o optičkoj gustoći dobiju se vizualno ili spektrofotometrijski, očitavanjem apsorbance testa ELISA čitačem na 650 nm. Temeljem očitavanja dobivenih za standarde histamina koncentracija od 0 do 50 ppm, pristupa se konstruiranju kalibracijske krivulje, te očitavanju koncentracija za svaki pojedini uzorak.

Postupak provođenja Histamine Food ELISA testa također zahtijeva homogenizaciju uzorka. Derivatizacija histamina je dio pripreme uzorka. Uporabom acilacijskog reagensa histamin u uzorcima, standardima i kontrolama kvantitativno derivatizira u N-acilhistamin, te se vezuje za

antitijela krute faze u reakcijskim jažicama. Acilirani histamin i histamin vezan za krutu fazu natječu se za točno određeni broj antitijela. Kada je sustav u ravnoteži, slobodni antigeni i slobodni kompleksi antigen-anti-serum se ispiru. Supstrat se očitava ELISA čitačem na 450 nm, a količina antitijela vezanih za krutu fazu obrnuto je proporcionalna koncentraciji histamina u uzorku. Iz rezultata standarda histamina koncentracija od 0 do 50 ppm, konstruirana se kalibracijska krivulja i očitavanju koncentracija za svaki pojedini uzorak.

### Određivanje histamina HPLC metodom

Za određivanje histamina u uzorcima tune i haringe HPLC metodom korištena je pred-kolonska derivatizacija Dansyl kloridom (Šimat i Dalgaard, 2011). Ukratko: 5,00 (±0,01) g homogeniziranog mesa ribe i 15 mL 0,4 mol/L HClO<sub>4</sub>, uz dodatak 125 µl otopine unutarnjeg standarda (1,7 heptanediamine, Sigma–Aldrich, St.Louis, MO, USA) homogenizirano je kroz 1 minutu koristeći Ultra

Turrax (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany). Homogenat je zatim centrifugiran (10 minuta na 3000 rpm) i supernatant filtriran kroz 0,45 µm filter papir. Jedan mililitar filtriranog ribljeg ekstrakta alkaliziran je dodatkom 200 µl NaOH otopine (2 mol/L) i 300 µl zasićene otopine NaHCO<sub>3</sub>. Derivatizacija je provedena dodatkom 1,00 mL otopine Dansyl klorida (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO, USA) prethodno otopljenog u acetonu (10 mg/mL), te inkubacijom na 40 °C 45 minuta. Višak DCI otklonjen je dodavanjem 150 µl otopine NH<sub>4</sub>OH (1 mol/L) u derivatizirani uzorak, te je otopina ostavljena u mraku 1 sat. Acetonitril je dodan do volumena od 5 mL nakon čega je uzorak filtriran kroz staklene filtere direktno u HPLC vijale (Whatman 1,6 µm cat. No. 6882-2516, Frisette, Knebel, Danska). Za pripremu standardne otopine korišten je histamin dihidroklorid (Sigma–Aldrich, St.Louis, MO, USA) otopljen u vodi i 0,4 mol/L HClO<sub>4</sub> u rasponu od 0,5 do 100 mg/L, te je za dobivanje kalibracijske krivulje i evaluaciju linearnosti HPLC metode korišteno 8 točaka.

HPLC analize provedene su koristeći klasični HPLC sustav Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany) opremljen otplinjačem, binarnom pumpom, auto-samplerom, grijačem kolone, UV i fluorescentnim detektorom. Separacija je rađena na Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (50 mm × 4,6 mm ID, veličina čest, punjenja 1,8 µm) koloni koristeći 0,1 mol/L amonijev acetat i acetonitril kao eluente.

### Analiza podataka

Kalibracijske krivulje iz kojih su očitavane vrijednosti testova dobivene su grafički prikazujući očitavanja apsorbance (srednja vrijednost 10 očitavanja) pet standardnih otopina. Koeficijent determinacije (R<sup>2</sup>) između poznatih koncentracija otopina standarda i površina pikova određen je linearnom regresijom za oba testa.

Za usporedbu učinkovitosti testova u analizi količine histamina u tuni i haringi, određivana je analitička i „instrumentalna“ ponovljivost testova, odnosno uspoređivani su rezultati dobiveni iz pet zasebnih ekstrakcija s rezultatima pet ponovljenih analiza jednog ekstrakta, te postotak iskorisćenja testova (*eng.* recovery). Sve analize rađene su iz prethodno opisanih uzoraka.

Analizom varijance (ANOVA) ocijenjen je utjecaj odabira testa i vrste ribe na rezultate, a multipli test rangova na razini značajnosti p ≤ 0,05 korišten je za procjenu statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti rezultata.

Program Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) korišten je za sve statističke analize.

### Rezultati i diskusija

Sadržaj biogenih amina u hrani može biti povezan i s procesom obrade ili kontaminacije tijekom proizvodnje i neodgovarajuće pohrane (Mariné-Font i sur., 1995). Dakle, prisutnost relativno velikih količina biogenih amina u ribi ukazuje na nedostatke u lancu proizvodnje ili rukovanja, što može predstavljati toksikološki rizik za potrošače. Ukoliko je ribe čuvana na niskim temperaturama (<4°C) neće izgubiti na svježini, ipak, kroz dulji vremenski period neke psihofilne bakterije imaju sposobnost dekarboksilacije histidina i u takvim uvjetima, pa nastanak histamina pri niskim temperaturama nije u korelaciji sa senzorskom ocjenom ribe (Dalgaard i Emborg, 2009). Količina histamina tada je dobar pokazatelj svježine ribe. Obzirom na brojne metode koje su dostupne za analizu histamina u hrani, te tendenciju da se analize histamina provode u sklopu prerađivačkih industrija kad laboratoriji nisu dostupni, u tu svrhu na tržištu su prisutni brojni enzimski testovi za detekciju i/ili kvantifikaciju histamina (Rogers i Staruszkiewicz,

2000). Brzina, jednostavnost korištenja i mogućnost provođenja bez laboratorijski uvjeta, samo su neke od prednosti komercijalnih testova. U ovom radu ocijenjena je korisnost i učinkovitost dva komercijalna testa za kvantitativnu analizu histamina u uzorcima ribe s i bez dodatka standarda histamina.

Razlike nekih karakteristika (postupci pripreme uzorka, dostupnost potrebne opreme, vrijeme trajanja testa, broj analiza po testu i cijene testova) Veratox i Histamine Food ELISA testova prikazane su u Tablici 1. Postupak ekstrakcije i filtracije kod oba testa vrlo je jednostavan, a u sklopu kita osigurani su svi potrebni reagensi i standardi. Za određivanje histamina VERATOX testom u uzorcima s rasponom kvantifikacije od 5 do 100 ppm proizvođač preporučuje dodatno razrjeđivanje 100 ml već razrijeđenog uzorka u 100 ml pufera za razrjeđivanje ekstrakta, dok za Histamine Food ELISA test takav korak nije potreban. Način izvođenja testa razlikuje se u acilacijskom koraku koji je potreban za Histamine Food ELISA test, te u vremenu trajanja testa. Ukupno vrijeme inkubacije tijekom izvođenja testa iznosi 20 minuta kod VERATOX testa i 70 minuta (90 minuta ukoliko se inkubacija radi bez miješalice) kod Histamine Food ELISA testa.

Kako bi se ocijenila učinkovitost testova u određivanju histamina u ribi testovi su izvedeni na uzorcima masne (haringa) i mršave (tuna) ribe sa i bez dodatka standarda. Udio masti za uzorke tune iznosio je 1,4 ± 0,3%, dok je isti za uzorke haringe bio 11,6 ± 1,1%. Dobiveni rezultati analiza prikazani su u Tablici 2, te su uspoređeni s rezultatima dobivenim HPLC metodom.

Raspon dobivenih vrijednosti u uzorcima tune bez dodatka standarda je sličan i kod oba testa vrijednosti su nešto više od vrijednosti



Tablica 3. Validacijski parametri za analizu histamina komercijalnim test kitovima i HPLC metodom.

Table 3. Validation parameters obtained for test kits and HPLC histamine analysis

Validacijski parametri Validation parameters	Uspoređivane metode Compared methods		
	Test kitovi Test kits		HPLC metoda HPLC method
	Histamine Food ELISA	VERATOX Quant. His. Test	(Šimat i Dalgaard, 2011)
R <sup>2</sup>	0,998	0,999	0,999
Granica detekcije (mg/kg)* Limit of detection (mg/kg)	0,75	2	0,30
Granica kvantifikacije (mg/kg) Limit of quantification (mg/kg)	2,5	2,5	0,75
Raspon kvantifikacije (mg/L)* Range of quantification (mg/kg)	2,5-250	2,5-40	0,5-370
Iskorištenje Tuna % Recovery Tuna %	114,22 ± 12,59	114,06 ± 16,84	94,00 ± 5,30
Iskorištenje Haringa % Recovery Herring %	98,29 ± 9,63	114,36 ± 8,16	104,00 ± 6,00
IP <sup>a</sup> Tuna %rsd IP <sup>a</sup> Tuna %rsd	1,14	9,69	0,30
AP <sup>b</sup> Tuna %rsd AP <sup>b</sup> Tuna %rsd	11,02	14,77	5,00
IP Haringa %rsd IP Herring %rsd	2,17	3,08	0,30
AP Haringa %rsd AP Herring %rsd	9,8	7,13	5,02

\*Podaci iz o karakteristikama testova iz uputa priloženih uz testove

\* Data on the test characteristics from the instructions accompanying the test

<sup>a</sup>IP-instrumentalna ponovljivost; AP – analitička ponovljivost<sup>a</sup>IP-instrumental repeatability; AP- analytical repeatability.

dobivenih HPLC metodom. Usporedba srednjih vrijednosti t testom pokazala je da se rezultati dobiveni testovima značajno ne razlikuju. Statistički značajna razlika zabilježena je u uzorcima tune s dodanim standardom kod sve tri metode. Veći raspon dobivenih vrijednosti zabilježen je kod VERATOX Quant. His. testa. U usporedbi s HPLC metodom srednje vrijednosti oba testa pokazuju više rezultate, a razlika između pojedinih mjerenja veća je od 10 mg/kg (Tablica 2). Raspon dobivenih vrijednosti u uzorcima haringe bez dodatka standarda statistički se značajno razlikuju. U usporedbi s rezultatima HPLC metode količine histamina dobivene Histamine Food ELISA testom pokazuju više, odnosno kod VERATOX testa niže vrijednosti. Granica detekcije oba testa iznosi 2,5 mg/kg, pa preciznost testova pri ovako niskim koncentracijama histamina nije oč-

kivana. Između srednjih vrijednosti histamina dobivenih iz uzoraka haringe s dodanim standardom zabilježena je statistički značajna razlika (Tablica 2, Slika 1). Razlike između pojedinih mjerenja manje su nego kod uzoraka tune sa standardom i značajno veće u odnosu na HPLC metodu. Usporedba srednjih vrijednosti, standardne pogreške (SE) i 95%-tnog intervala pouzdanosti (1,96\*SE) količine histamina u uzorcima riba s dodanim standardom prikazani su na Slici 2. Rasponi dobivenih vrijednosti za uzorke tune s dodanim standardom kreću se od -25 do 15% u odnosu na srednju vrijednost, dok su isti kod uzoraka haringe niži i kreću se od -14 do +12%. Raspon vrijednosti između pojedinih mjerenja HPLC metodom varira od 1-2% u odnosu na srednju vrijednost, neovisno o ribi. Velike razlike u pojedinačnim mjerenjima mogu,

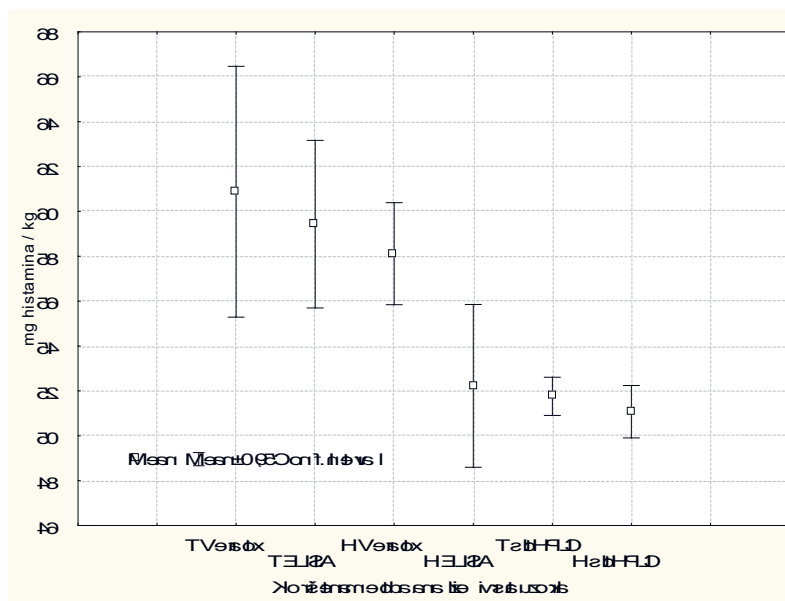
posebno kod većih količina histamina, navoditi na pogrešne zaključke o svježini ribe.

Dva komercijalno dostupna testa, evaluirana kao alternativa kromatografskim metodama, pokazala su slične rezultate u postotku iskorištenja, s iznimkom za haringu. Raspon tih vrijednosti kretao se od 98 – 114% za količine histamina u tuni i haringi (Tablica 3). Postotci iskorištenja histamina (98 – 114%) za dva kita ocjenjena ovom studijom odgovaraju ranije objavljenim rezultatima 115 ± 17% (Muscarella i sur., 2005) za Histamine Food ELISA kit i 107 ± 9% za Veratox quantitative histamine test (Rogers i Staruszkiewicz, 2000). Oba testa imala su kalibracijske krivulje s vrijednostima R<sup>2</sup> iznad 0,998. Ponovljivost testova za determinaciju histamina izražena je kao postotak relativne standardne devijacije (% rsd) za ponavljana testiranja uzorka s dodanim standardima (Instrumentalna ponovljivost, n = 5, 50 mg/kg) i analize ponavljanih ekstrakcija (Analitička ponovljivost, n = 5, 50 mg/kg). 'Instrumentalna' ponovljivost za uzorke tune i haringe kretala se u rasponu od 1,1 do 9,7 % rsd a 'analitička' ponovljivost 7,1 - 14,8 % rsd (Tablica 3). Histamine Food ELISA test pokazao je bolje validacijske parametre u pogledu ponovljivosti.

Korisnici testova mogu biti osobe zaposlene u laboratorijima za kontrolu namirnica ili ostale osobe upoznate s metodama analiza histamina u proizvodima ribarstva. Procedure su jednostavne, te se uz minimalni trening mogu provoditi u sklopu riboprerađivačkih pogona. Unatoč manjoj djelotvornosti testova u odnosu na HPLC metodu, podaci potvrđuju prikladnost test kitova za ocjenu histamina kao jednostavnu alternativu kromatografskim metodama u sklopu HACCP programa unutar tvornica. Ipak, u slučajevima povišenih količina histamina u ribi, rezultate je potrebno potvrditi odobrenom

metodom. Prema *Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu* (Anon., 2008), količina histamina u proizvodima ribarstva od ribljih vrsta povezani s visokom količinom histidina mora biti određena HPLC metodom (Malle i sur., 1996) i udovoljavati ranije navedenim kriterijima. Uzimajući u obzir da su biogeni amini produkti endogenih i/ili egzogenih enzimatskih aktivnosti, usporavanjem tih reakcija može se kontrolirati i njihov nastanak. Prevencija stvaranja histamina prije svega uključuje hlađenje i kontrolu temperature ribe, te održavanje hladnog lanca i smanjenje početnog mikrobiološkog onečišćenja ribe. EU regulative (EC, 2004) i *Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla* (Anon., 2007) nalažu da se svježiji proizvodi ribarstva moraju održavati na temperaturi koje je približna temperaturi otapajućeg leda. U inspekcijskoj praksi taj pojam obuhvaća temperature između 0 i +2 °C (Dalgaard i Emborg, 2009), međutim temperature <4°C smatraju se ispravnima. Zbog sposobnosti nekih psihrofilnih mikroorganizama da stvaraju histamin i pri nižim temperaturama, određivanje biogenih amina predloženo je za procjenu higijenske ispravnosti sirovine, te je u većini slučajeva nastanak biogenih amina povezan s neodgovarajućim skladištenjem ili korištenjem sirovina niske početne kvalitete (Veciana-Nogues, i sur., 1997). Histamin je daleko najvažniji toksični biogeni amin prisutan u ribama, ali i ostali mogu djelovati toksično ili potencirati histaminsko otrovanje (Shakila i sur., 2001), te izazvati bolesti i neugode (Gloria, 2006). Toksikološka djelovanje drugih amina očituje se u stvaranju zasićenosti crijevnih enzima, čime se sustav oksidacije amina iz probave smanjuje, a vjerojatnost trovanja povećava (Taylor i sur., 1989). Određivanje profila biogenih amina za različite riblje vrste s ciljem određivanja indeksa biogenih amina pokazalo se vrlo učinkovitim u procjeni sigurnosti i kvalitete određenih

Slika 1. Srednje vrijednosti analiziranih uzoraka tune (T) i haringe (H) s dodanim standardima VERATOX Quant. His. testom, Histamine Food ELISA testom i HPLC metodom. Figure 1. Mean values of analyzed samples of tuna (T) and herring (H) with added standards by Veratox Quant. His. Test, Food Histamine ELISA and HPLC method.



ribljih vrsta i proizvoda. Osim toga, mnoge specifične bakterije kvarenja proizvode više od jednog biogenog amina, pa indeksi koji uključuju više biogenih amina bolje ukazuju na stanje ribe ili proizvoda (Dalgaard, 2000). Zbog navedenog kroz znanstvene publikacije uvedeni su kemijski indeksi koji uz histamin za procjenu kvalitete uzimaju u obzir sve ili neke biogene amine (Metz i Kmas, 1977; Veciana-Nogues, i sur., 1997; Duflos i sur., 1999; Jørgensen i sur., 2000). U ovakvim procjenama HPLC metode imaju prednost u odnosu na elisa testove, jer jednim injektiranjem mogu separirati i kvantificirati više biogenih amina.

### Zaključak

Analizirani testovi pokazuju manju djelotvornost i preciznost u kvantificiranju histamina u uzorcima tune i haringe u odnosu na HPLC metodu, te je preporučljivo da se u slučajevima povišenih količina histamina u ribi, rezultate potvrdi odobrenom HPLC metodom. U sklopu riboprerađivačkih tvornica potrebna je brza, jednostavna i precizna metoda ko-

jom bi se, posebno kod prijema velikih količina ribe, moglo brzo odrediti da li riba udovoljava u pogledu mikrobioloških kriterija. Osim testova opisanih u ovom radu, različiti proizvođači nude tzv. *alert* ili *screening* testove za histamin, kojima se uzorci uspoređuju sa standardom poznate koncentracije, te se bez kvantifikacije određuje da li je koncentracija histamina u uzorku povišena ili nije. U nedostatku laboratorija i opreme opisani testovi za kvantifikaciju histamina mogu poslužiti za kontrolu sirovine.

### Literatura

- Anonimno (2007): Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla (NN 99/2007)
- Anonimno (2008): Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN74/2008)
- Bligh, E. G., W. J. Dyer (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Capak, K., A. Barišin, G. Petrović, P. Jeličić (2006): Rezultati 10-godišnjeg praćenja karakteristika epidemija trovanja hranom u Hrvatskoj. 31. Stručni skup, Zdravstvena ekologija u praksi, 10-12. svibnja 2006, Šibenik, Zbornik radova, str. 222.

## Comparison of two commercial tests for quantitative analysis of histamines in fish

### Summary

Biogenic amines are known to cause intoxication or potentiate histamine food poisoning in people. Histamine is the most toxic biogenic amine formed in fish; therefore finding reliable and efficient methods to detect and quantify histamine and other biogenic amines in seafood early in the production chain is needed. Usefulness and efficiency of two test kits for quantitative analysis of histamine were evaluated in this paper as alternatives to the chromatographic methods if seafood production, when more advanced laboratory equipment is not available. The range of values obtained by histamine tests was similar in samples without the addition of standards, while in samples with standards it varied from -25 to 15% compared to the means. Recovery and repeatability of the test kits ranged from 98 to 114% and 7 - 14 % *rsd*. Both kits had standard curves with  $R^2$ -values above 0.998 but were less efficient than the chromatographic method.

**Key words:** histamine, ELISA, quantitative test, fish

## Komparation von zwei kommerziellen Testen für quantitative Analyse von Histamin in Fisch

### Zusammenfassung

Biogene Amine können toxische Wirkung haben und eine Histaminvergiftung bei Menschen potenzieren. Histamin ist das bedeutendste toxische biogene Amin in Fisch. Deshalb besteht der Bedarf nach zuverlässigen und wirksamen Methoden für Detektion und Quantifikation von Histamin und anderen biogenen Aminen in Fisch und Meeresfrüchten, damit sie möglichst früh in der Herstellungskette entdeckt werden können. In dieser Arbeit werden zwei kommerzielle Teste für Determination und Quantifikation von Histamin in Fisch mit HPLC Methode verglichen. Dies mit der Absicht, ihre Wirksamkeit und Nützlichkeit bei der Analyse von Histamin in den Fischfabriken zu beurteilen. Die Spannweite von Histaminwerten bekommen durch die Teste war ähnlich in Mustern ohne Zusatz von Standarden, während sich die Spannweite in Mustern mit Standarden von -25 bis 15 % bewegte, in Bezug auf den mittleren Wert. Die Werte der Nutzung und Wiederholung von Testen bewegten sich von 98 – 114 % und 7 – 14 % *rsd*. Beide Teste hatten Eichungskrümmungen mit  $R^2$  Werte über 0,998, jedoch wurde eine kleinere Wirksamkeit der Teste in Bezug auf die HPLC Methode festgestellt.

**Schlüsselwörter:** Histamin, Elisa, Quantitativer Test, Fisch

**Dalgaard, P.** (2000): Fresh and lightly preserved seafood. In: Shelf life Evaluation of Foods 2nd edition, Man C. M. D., A. A. Jones (Eds.), Aspen Publishing Inc., Maryland, USA, pp. 110-139.

**Dalgaard, P., J. Emborg** (2009): Histamine fish poisoning - new information to control a common seafood safety issue. In: Foodborne pathogens - Hazards, risk analysis and control. 2 edn, C. de W. Blackburn, P. J. McClure (Eds.), Woodhead publishing limited, Cambridge. pp. 1140-1160.

**Dalgaard, P., J. Emborg, A. Kjølbj, N. D. Sørensen, N. Z. Ballin** (2008): Histamine and biogenic amines - formation and importance in seafood. In: Improving seafood products for the consumer, Børresen, T. (Ed.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 292-324.

**Duflos, G., C. Dervin, P. Malle** (1999): Relevance of Matrix Effect in Determination of Biogenic Amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). J. AOAC Int. 82(5), 1097-1101.

**EC (2004):** Regulation (EC) No 853/2004 of 29 April 2004 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union, 226, 22-82.

**EC (2005):** Commission regulation (EC) No

2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union, 338, 1-25.

**Eerola, S., R. Hinkkanen, E. Lindfors, T. Hirvi** (1993): Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. J. AOAC Int. 76(3), 575-577.

**Glória, M. B. A.** (2006): Bioactive amines. In: Handbook of Food Science, Technology and Engineering, Vol. I. Hui, Y. H. (Ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. pp. 13-38.

**Hall, M.** (2003): Something fishy, Six patients with an unusual cause of food poisoning! Emerg. Med. 15, 293-295.

**Jørgensen, L. V., P. Dalgaard, H. H. Huss** (2000): Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amine and pH. J. Agr. Food Chem. 48(6), 2448-2453.

**Latorre-Moratalla, M. L., J. Bosch-Fusté, T. Lavizzari, S. Bover-Cid, M. T. Veciana-Nogués, M. C. Vidal-Carou** (2009): Validation of an ultra high pressure liquid chromatography method for the determination of biologically active amines in food. J. Chrom. 1216(45), 7715-7720.

**Mah, J-H., H-J. Hwang** (2009): Inhibition of biogenic amine formation in a salted and

fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. Food Contr. 20(9), 796-801.

**Malle, P., M. Valle, S. Bouquelet** (1996): Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. AOAC Int. 79(1), 43-49.

**Mariné-Font, A., M. C. Vidal-Carou, M. Izquierdo-Pulido, M. T. Veciana-Nogués** (1995): Aminas biógenas en alimentos: unos microcomponentes de interés múltiple. Rev. Esp. Nutr. Comunitaria, 1(4), 138-141.

**Mayer, H. K., G. Fiechter, E. Fischer** (2010): A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. J. Chrom. 1217(19), 3251-3257.

**Mendes, R.** (2009): Biogenic amines. In: Fishery products Quality, Safety and authenticity, Rehbein, H., J. Oehlenschläger (Eds.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. pp. 42-67.

**Mietz, J. L., E. Karmas** (1977): Chemical quality index of canned tuna as determined by HPLC. J. Food Sci. 42, 155-158.

**Muscarella, M., M. Iammarino, D. Centoze, C. Palermo** (2005): Measurement of histamine in seafood by HPLC, CE and ELISA: Comparison of three techniques. Vet. Res. Comm. 29, 343-346.

**Önal, A.** (2007): A review: Current analytical



## Paragone di due test commerciali per l'analisi delle istamine nel pesce

### Sommario

Le amine biogene possono agire tossicamente o stimolare dall'uomo l'intossicazione da istamina. L'istamina e un'amina biogena tossica di massima importanza presente in pesce, e perciò bisogna utilizzare i metodi che siano affidabili ed efficaci nella detezione e quantificazione di istamine e altre amine biogene, presenti in pesce e negli altri prodotti di mare, cosicché sia più facile trovarle al più presto possibile nella catena di produzione. Quest'articolo paragona due test commerciali, quello di determinazione e quello di quantificazione di istamine in pesce, utilizzando il metodo HPLC, per poter valutare la loro efficienza e il loro vantaggio nell'analisi di istamine nella produzione del pesce. L'intervallo di valori di istamine ottenuti con i test era simile ai campioni senza aggiunta di standard, e nei campioni con gli standard l'intervallo variava tra -25 e 15% in relazione con la media. I valori d'utilizzo e di possibilità di fare i test di nuovo variavano dal 98 al 114% di rsd. Tutti e due i test avevano la curva calibrata con il valore R2 sopra 0,998, ma è entrata in evidenza anche un'efficacia minore di questi test rispetto al metodo HPLC.

**Parole chiave:** istamina, elica, test di quantità, pesce

methods for the determination of biogenic amines in foods. Food Chem. 103, 1475-1486.

**Rogers, P. L., W. F. Staruszkiewicz** (2000): Histamine test kit comparison. J. Aquat. Food Prod. Tech. 9(2), 5-17.

**Shakila, R. J., G. Jeyasekaran, R. Lakshmanan** (2001): Biogenic amines as quality indicators in fish and fish products. INFOFISH International, 4, 56-61.

**Šimat, V., P. Dalgaard** (2011): Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic

amines in seafood. LWT - Food Science and Technology. 44: 399-406.

**Taylor, S. L., D. E. Lyons** (1984): Toxicology of Scombroid Poisoning. In: Seafood toxins. Ragelis, E. P. (Ed.), Washington, D.C., American Chemical Society. pp. 417-430.

**Taylor, S. L., J. E. Stratton, J. A. Nordlee** (1989): Histamine poisoning (scombroid fish poisoning) - An allergy-like intoxication. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 27, 225-240.

**Veciana-Nogués, M. T., T. Hernández-Jover, A. Mariné-Font, M. C. Vidal-Carou** (1995):

Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. J. AOAC Int. 78(4), 1045-1050.

**Veciana-Nogués, M. T., A. Mariné-Font, M. C. Vidal-Carou** (1997): Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationship with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines and organoleptic changes. J. Agr. Food Chem. 45, 2036-2041.

Dostavljeno: 12. listopada 2010.  
Prijeto: 12. studenoga 2010.

# MESO SUBSCRIPTION FOR MESO

## The first Croatian meat journal

I subscribe to 6 (six) issues of the MESO journal, at the price of 400,00kn (for Croatia) or 70 EUR (for abroad). At my request I will receive a specimen copy of the journal. The cost of delivery is included.

**I will pay the subscription in a following way:**

(Please choose the desired method of payment and write the necessary information)

Postal money order  Bank wire transfer to the bank account

**Please send your order by mail, fax or e-mail.**

Name and surname	
Corporation	
Address	post-code
Tel/fax	
e-mail	
Date	
Personal signature (Signature required)	Company stamp

**Zadružna štampa d.d.** • Jakićeva 1, 10000 ZAGREB, Croatia  
**Phone:** 00385( 1) 2316-050, **Fax:** 00385(1) 2314-922, 2316-060  
**E-mail:** meso@meso.hr

VAT number: 3223094 • Bank account nr. 2360000-2100316203 • Name of the bank: Zagrebačka banka  
 Address of the bank: Maksimirska 86-88 a, 10000 ZAGREB SWIFT CODE: ZABHR2X  
 Contry of the company: HRVATSKA/CROATIA/ • IBAN KOD: HR3823600001101905427