

cattle and the nature of adaptive reactions to the action of external stimuli]. *Extended abstract of Doctor's thesis*. K.: Nac. un-t bioresursiv i prirodokoristuvannja Ukraini [in Ukrainian].

2. Sudakov, M.O., Bereza, V.I., Pogursky, I.G. (1991). *Mikroelementozy silskohospodarskykh tvaryn [Microelementosis of farm animals]*. Kyiv: Urozhaj [in Ukrainian].

3. Klitsenko, H.T. (2001). *Mineralne zhyvlennya tvaryn [Mineral feeding of animals]*. Kyiv, Ukraine: Svit [in Ukrainian].

4. Levchenko, V.I. Vlizlo, V.V. Kondrahin, I.P. (2002). *Veterinarna klinichna biohimija [Veterinary Clinical Biochemistry]*. Bila Cerkva. 177-180 [in Ukrainian].

5. Vlizlo, V.V. Fedoruk, R.S. Ratic, I.B. (2012). *Laboratorni metodi doslidzhen u biologii, tvarinnictvi ta veterinarnij medicini [Laboratory methods of research in biology, livestock and veterinary medicine]*. Lviv: SPOLOM [in Ukrainian].

УДК 006.85:639.38:577.175.8

DOI: 10.31073/vet_biotech35-08

КАМІНСЬКА О.В., e-mail: mikology@ukr.net,

МАРЧЕНКО Т.В., e-mail: taya.marchenko@ukr.net,

МЕДВЕДЕНКО С.І., e-mail: mikologi2018@ukr.net,

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

ШЕВЧЕНКО Л.В., д-р вет. наук, проф., e-mail: shevchenko_laris@ukr.net

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДУ ВИЗНАЧЕННЯ ГІСТАМІНУ В РИБІ ТА РИБНІЙ ПРОДУКЦІЇ ЗА ДОПОМОГОЮ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З УФ-ДЕТЕКТОРОМ ТА ДЕРИВАТИЗАЦІЄЮ

Одним з показників, що характеризує безпечність риби та рибних продуктів є вміст гістаміну, який у великих концентраціях викликає ряд захворювань, що призводять навіть до летальних наслідків. Тому розробка методу визначення вмісту гістаміну у рибі і рибних продуктах є актуальною. У статті наведена методика визначення гістаміну у рибі та рибних продуктах за допомогою рідинного хроматографа з використанням ультрафіолетового детектору та дериватизації в діапазоні від 10 до 250 мг/кг. Детально описані пункти валідації, а також наведені валідаційні дані.

Ключові слова: гістамін, риба, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), алергія, 1,7 діаміногептан (ДАГ), внутрішній стандарт, зовнішні стандарти, дансилхлорид, дериватизація.

Вступ. На сьогоднішній день одними з найпоширеніших захворювань людини є алергічні реакції на різні чинники. Однією з причин виникнення алергій є вміст гістаміну у рибі та рибних продуктах, які людина споживає.

Значні концентрації гістаміну утворюються шляхом декарбоксілювання гістидину екзогенними ферментами мікроорганізмів, які знаходяться в рибі та рибних продуктах при порушенні умов їх зберігання. Небезпека отруєння людей гістаміном полягає у його стійкості до температурного фактора (заморожування та термічна обробка), а також у специфічних симптомах у людей, які можуть проявлятися протягом декількох годин чи діб, а випадки отруєння часто недооцінюються через невстановлену етіологію захворювання. Тому основним підтвердженням отруєння людини гістаміном є його виявлення у продуктах харчування, де за нормативами європейського законодавства він не повинен перевищувати 200 мг/кг свіжої риби та 400 мг/кг рибних продуктів, оброблених ферментаційним дозріванням в розсолі [1, 2].

В Україні як аналітичний референс-метод для виявлення гістаміну, відповідно до Наказу МОЗ від 19.07.2012 р. №548 зазначено метод вискоєфективної рідинної хроматографії [1]. Згідно Рішення комісії ЄС 2002/657/ЄС від 12 серпня 2002, як підтверджуючий метод визнано метод рідинної хроматографії з УФ детектором при використанні внутрішніх стандартів [3]. У зв'язку з цим виникає потреба у впровадженні референс методу вискоєфективної рідинної хроматографії визначення гістаміну в рибі та рибній продукції з дериватизацією та використанням внутрішніх стандартів [4, 5].

Метою роботи була валідація підтверджуючого методу визначення масової концентрації гістаміну в рибі та рибній продукції та оцінювання придатності методу на відповідність конкретних вимог для специфічного цільового використання шляхом отримання валідаційних даних: лінійність, межа кількісного визначення, правильність, прецизійність (збіжність, відтворюваність).

Матеріали і методи дослідження. Дослідження проводили на базі науково-дослідного хіміко-токсикологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Матеріалом для дослідження були річкова риба (фарш із карася) та морська риба (фарш із салаки). Для досліджень використовувались наступні реагенти та розхідні матеріали: сертифікований зовнішній стандартний зразок гістаміну 97% Sigma-Aldrich (Німеччина), внутрішній стандарт 1,7-Diaminoheptane 98% (DAH) Sigma-Aldrich (Німеччина), дансилхлорид 99% Sigma-Aldrich (Німеччина), L-пролін 99% Sigma-Aldrich (Німеччина), ацетонітрил для ВЕРХ 99,9% Sigma-Aldrich (Німеччина), перхлорна кислота 70–72% MerckKGaA (Німеччина). Дослідження проводились на рідинному хроматографі Varian Pro Star (виробник Varian Chromatography Systems, США), згідно відповідних параметрів хроматографування (табл.1). Конфігурація рідинного хроматографа: автосамплер, два насоси, ультрафіолетовий детектор,

термостат з хроматографічною оберненофазною колонкою Microsorb 100-5 C18, S250 × 4,6 Col.

Таблиця 1

Умови хроматографічного розділення і кількісного визначення гістаміну [5]

Параметри хроматографічного розділення	Встановлені умови
Стационарна фаза	оберненофазна колонка C18 з предколонкою
Рухома фаза	ацетонітрил-вода
Температура колонки	40°C
Детектор	ультрафіолетовий
Довжина хвилі	245 нм
Швидкість потоку	1 см ³ /хв
Об'єм елюювання	25 мм ³
Режим елюювання	градієнтний
Час хроматографування	20 хв

Принцип методу полягає в екстрагуванні зразку 0,2 М перхлорною кислотою, проведенні дериватизації дансилхлоридом (з концентрацією 7,5 мг/мл) і насиченим розчином натрію вуглекислого безводного, з нагріванням до 60°C на водяній бані, очисткою толуолом і наступним перерозчиненням в ацетонітрилі [5]. Очищений екстракт кількісно визначали за допомогою оберненої фази C18 на рідинному хроматографі з ультрафіолетовим детектором. При дослідженні використовували внутрішній стандартний розчин 1,7-діаміногептану та зовнішній стандартний розчин гістаміну, за співвідношенням яких було побудовано градувальну залежність через матрицю. Кількісне визначення масової концентрації гістаміну в рибі та рибній продукції проводили за співвідношенням площі піків зовнішніх стандартів до площі внутрішнього стандарту. Ідентифікацію гістаміну проводили за часом утримання. Вміст розраховували за допомогою градувальної залежності площі хроматографічного піку гістаміну від концентрації гістаміну в пробі.

Результати дослідження та їх обговорення. Оцінювання придатності методу проводили відповідно до норм похибок, зазначених Регламентом комісії 2002/657/ЄС від 12 серпня 2002 року про імплементацію Директиви Ради 96/23/ЄС щодо застосування аналітичних методів та інтерпретації результатів (табл. 2).

Норми похибок для методу визначення гістаміну [3]

Валідаційні параметри	Норми похибок
Масова частка гістаміну ≥ 1 мг/кг	
Збіжність ($S_T = 0,66 * S_R$)	$\leq 10,6\%$
Відтворюваність (S_R)	$\leq 16\%$
Коефіцієнт повернення	Від 80 до 110%

Визначення лінійності проводили, використовуючи спосіб додавання стандарту гістаміну до чистої матриці (проби фаршу з риби, що не містить гістамін) на рівні концентрацій: 0; 25; 50; 100; 150; 250 мг/кг. В результаті побудови калібрувального графіку по співвідношенню площ зовнішнього стандарту до внутрішнього отримали коефіцієнт кореляції $r=0,999$, що підтверджує лінійність методу (рис. 1).

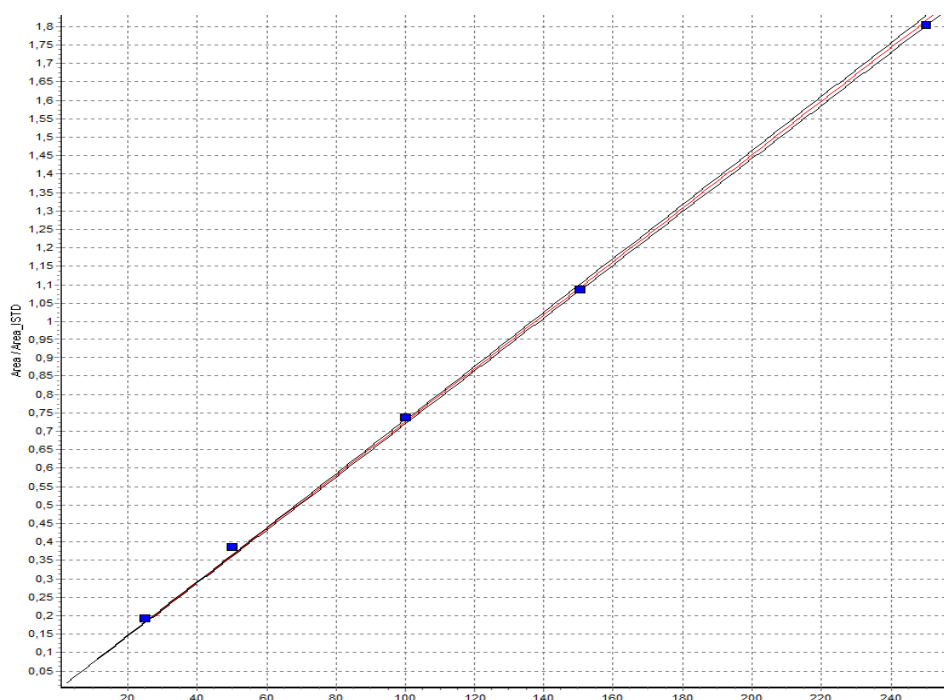


Рис. 1. Градувальна залежність концентрації гістаміну від співвідношень площ піків зовнішнього стандарту гістаміну до внутрішнього стандарту ДАН.

Таким чином, одержані дані підтверджують, що метод може застосовуватися в різних матрицях і може бути використаний для побудови калібрувальної кривої гістаміну в рибі і рибних продуктах.

На рисунку 2 зображено співвідношення площ піків зовнішнього та внутрішнього стандартів. Площа піків зовнішнього стандарту гістаміну зростає пропорційно збільшенню концентрації. При цьому площа піків внутрішнього

стандарту з однаковою концентрацією залишається постійною. За співвідношенням піків зовнішнього до внутрішнього стандартів будують градувальну залежність концентрації від площі піків. Час утримання стандартів залишається стабільним.

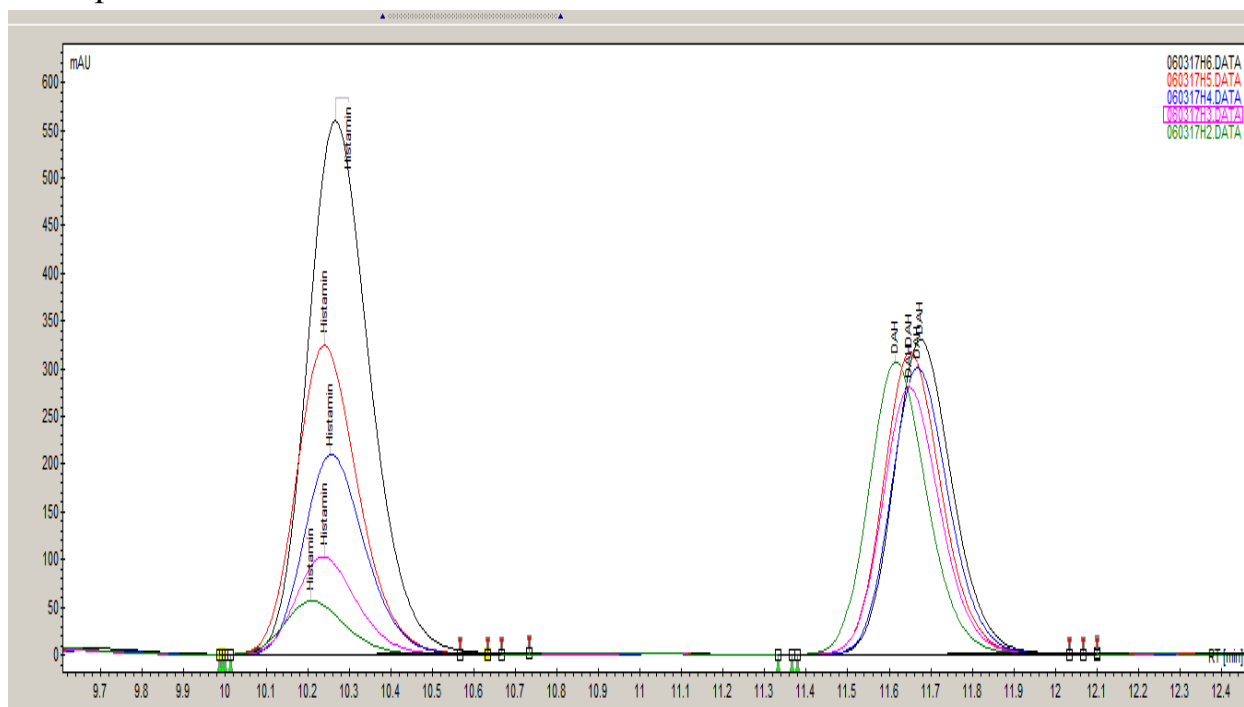


Рис. 2. Співвідношення площ піків стандартного зразку гістаміну та внутрішнього стандарту ДАН.

Визначення межі детектування (LOD) проводили шляхом шестикратного аналізу холостих проб риби (салака, карась), яка не містила даного аналіту повторених у трьох серіях трьома операторами. Розраховане стандартне відхилення результатів. До отриманого середнього значення результатів додали трьохкратне стандартне відхилення [3, 6].

Контроль межі кількісного визначення (LOQ) проводили шляхом шестикратного аналізу холостих проб риби (салака, карась), яка не містила даного аналіту повторених у трьох серіях трьома операторами. Розраховане стандартне відхилення результатів. До отриманого середнього значення результатів додали дев'ятикратне стандартне відхилення [3, 6].

Контроль збіжності (S_r) проводили шляхом проведення 6 досліджень зразків риби, додавши до них аналіт гістаміну на рівнях 50; 100; 150 мг/кг. Досліджували кожен зразок одним оператором, в одних і тих самих умовах. Отримані результати стандартного відхилення, отриманого в умовах збіжності, не перевищували норматив контролю збіжності $\leq 10,6\%$, що відповідає встановленим вимогам (табл. 2) [3, 6].

Контроль внутрішньолабораторної відтворюваності (S_R) проводили на різних зразках риби, додавши до них аналіт гістаміну на рівнях 50 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг. Дослідження проводилось в різні дні із залученням різних операторів та реактивів. Отримані результати стандартного відхилення, отриманого в умовах відтворюваності $\leq 16\%$, що відповідає встановленим вимогам (табл. 2) [3, 6].

Контроль правильності проводили шляхом додавання аналіту в матрицю на рівнях концентрацій 50; 100; 150 мг/кг, аналізуючи ступінь повернення аналіту. Ступені повернення для досліджених зразків отримані в діапазоні від 91% до 99%, що також відповідає межі допустимого значення від 80% до 110% (табл. 2) [3, 6].

Оцінювання розширеної невизначеності ($U_{розш.}$) проводили за результатами внутрішньолабораторної відтворюваності (S_R) як добуток стандартної невизначеності $u(y)$ на коефіцієнт охоплення k ($k = 2$), при рівні довіри $p=0,95$. Розширену невизначеність обраховували на трьох вищезазначених рівнях (табл. 3).

Таблиця 3

Основні результати оцінювання придатності методу

Матриця	Риба салака			Риба карась		
	2			3		
Межа детектування (LOD), мг/кг	4,87			4,97		
Межа кількісного визначення (LOQ), мг/кг	9,75			10,32		
Рівень концентрації	50 мг/кг	100 мг/кг	150 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг	150 мг/кг
Збіжність (S_r), мг/кг	1,83	3,42	4,09	2,6	2,39	5,26
Збіжність (S_r), %	4,0	3,4	2,8	5,6	2,5	3,8
Відтворюваність (S_R), мг/кг	3,33	3,42	4,76	2,65	7,13	12,75
Відтворюваність (S_R), %	7,3	3,4	3,2	5,6	7,4	9,1
Відсоток повернення, %	91	99	98	95	96	94
Розширена невизначеність $U_{розш.}$ на рівні 100 мг/кг*	6,66	6,84	9,52	5,3	14,26	25,5

Примітка: * – коефіцієнт охоплення $k=2$, при довірчій імовірності $p=0,95$.

Під час проведення оцінки придатності методу було отримано основні результати, які наведені в табл. 3. Таким чином, розроблена нами дана методика дозволяє виявляти вміст гістаміну в рибі та рибних продуктах в межах від 10 до 250 мг/кг, що відповідає вимогам Європейської директиви і може бути рекомендована для запровадження в лабораторіях ветеринарної медицини з метою контролю безпечності риби і рибних продуктів за вмістом гістаміну.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Впроваджена нами методика дозволяє виявляти гістамін у рибі та рибних продуктах за допомогою рідинного хроматографа з використанням ультрафіолетового детектору та дериватизації в діапазоні від 10 до 250 мг/кг.

Методика пройшла успішну апробацію, відповідає вимогам Регламенту комісії ЄС 2002/657/ЄС про імплементацію Директиви Ради 96/23 ЄС щодо застосування методів та інтерпретації результатів та акредитована Національним агентством з акредитації України. Метод володіє високими метрологічними характеристикам та відповідає Європейським вимогам.

Методика визначення гістаміну методом рідинної хроматографії є придатною для досліджень зразків риби та рибної продукції і рекомендована до використання в лабораторіях як підтверджуючий метод.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Наказ МОЗ України від 19.07.2012 р. № 548 «Про затвердження Мікробіологічних критеріїв для встановлення показників безпечності харчових продуктів» – Електронні дані. – Режим доступу: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1321-12>.
2. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance) [Electronic resource]. Mode of access: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>.
3. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C (2002) 3044) (2002/657/ЄС) [Electronic resource]. Mode of access: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1554728014967&uri=CELEX:32002D0657>.
4. Mayer H.K. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese / Mayer H.K., Fichte G., Fischer E. // J. Chromatogr. A 1217 – 2010. – P. 3251–3257.
5. Valle M. Liquid chromatographic determination of fish decomposition indexes from analyses of plaice, whiting, and herring / Valle, M., Malle, P. and Bouquelet S. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. (Int.) 79 (5) – 1996 – P. 1134–1140.
6. Настанова Eurachem «Придатність аналітичних методів для конкретного застосування. Настанова для лабораторій з валідації методів та суміжних питань»: за ред. Б. Мангуссона та У. Ернемарка: переклад другого видання 2014 р. – К.: ТОВ «Юрка Любченка», 2016. – 96 с.

ВАЛИДАЦІЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИСТАМИНА В РЫБЕ И РЫБНОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УФ-ДЕТЕКТОРА И ДЕРИВАТИЗАЦИИ / Каминская Е.В., Марченко Т.В., Медведенко С.И., Шевченко Л.В.

Одним из показателей, характеризующих безопасность рыбы и рыбных продуктов, является содержание гистамина, который в больших концентрациях вызывает ряд заболеваний, приводящих даже к летальному исходу. Поэтому разработка метода определения содержания гистамина в рыбе и рыбных продуктах актуальна. В статье приведена методика определения гистамина в рыбе и рыбных продуктах с помощью жидкостного хроматографа с использованием ультрафиолетового детектора и дериватизации в диапазоне от 10 до 250 мг / кг. Подробно описаны пункты валидации, а также приведены валидационные данные.

Ключевые слова: гистамин, рыба, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), аллергия, 1,7 диаминогептан (ДАГ), внутренний стандарт, внешние стандарты, дансилхлорид, дериватизация.

VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINING HISTAMINE IN FISH AND FISH PRODUCTS BY THE METHOD OF LIQUID CHROMATOGRAPHY USING AN UV DETECTOR AND DERIVATIZATION / Kaminskaya O.V., Marchenko T.V., Medvedenko S.I., Shevchenko L.V.

Introduction. Histamines are biogenic amines that are formed in fish and fish products during the decarboxylation of histidine with the involvement of enzymes that produce microflora with impaired storage conditions. Histamine is dangerous for humans in high concentrations, causing a number of diseases that even lead to death. As a result, there is a need to introduce a reference method of high performance liquid chromatography for the determination of histamine in fish and fish products with derivatization and the use of internal standards. Validation data and validation data are presented in detail.

The goal of the work was to implement a confirmatory method for determining the mass concentration of histamine in fish and fish products and assess the suitability of the method for compliance with specific requirements.

Materials and methods. Materials for research were river and sea fish. Studies were carried out on a liquid chromatograph Varian LC-1. The principle of the method is to extract the sample, carry out the derivatization of dansyl chloride, determine the mass concentration of histamine in the ratio of the area of external standards to the area of the internal standard.

Results of the research and their discussion. The assessment of the appropriateness of the method was carried out in accordance with the error rates specified in Commission Regulation 2002/657/EC of 12 August 2002 on the implementation of Council Directive 96/23/EC on the application of analytical methods and the interpretation of results.

The method has high metrological characteristics: repeatability from 2.8% to 5.6%, reproducibility from 3.2% to 9.1%, trueness from 91% to 99%.

Conclusions and prospects for further research. The technique introduced by us allows us to detect histamine in fish and fish products using a liquid chromatograph using an ultraviolet detector within 10-250 mg/kg. The methodology has been successfully tested, complies with the

requirements of Commission Regulation 2002/657/EC on the implementation of the Council Directive 96/23 on the application of methods and interpretation of results and accredited by the National Accreditation Agency of Ukraine.

Keywords: histamine, fish, high performance liquid chromatography (HPLC), allergy, 1,7-diaminoheptane (DAH), internal standard, external standards, dansyl chloride, derivatization.

REFERENCES

1. Nakaz MOZ Ukrayiny vid 19.07.2012 r. № 548 «Pro zatverdzhennja Mikrobiologichnih kriteriiv dlja vstanovlennja pokaznikiv bezpechnosti harchovih produktiv» [Order of the Ministry of Health of Ukraine dated of 19.07.2012 № 548 “On Approval of Microbiological Criteria for Determination of Food Safety Standards”]. (2012, 19 July). Retrieved from <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1321-12> [in Ukrainian].
2. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance). Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>.
3. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C (2002) 3044) (2002/657/EC). Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1554728014967&uri=CELEX:32002D0657>.
4. Mayer, H.K., Fichte G., & Fischer, E. (2010). A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *J. Chromatogr.*, 1217 (19), 3251-3257.
5. Valle, M., Malle, P., & Bouquelet, S. (1996). Liquid chromatographic determination of fish decomposition indexes from analyses of plaice, whiting, and herring. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 79 (5), 1134-1140.
6. Mangussona, B., Ernemarka, U. (2016). *Nastanova Eurachem “Pridatnist analitichnih metodiv dlja konkretnogo zastosuvannja. Nastanova dlja laboratorij z validacii metodiv ta sumizhnih pitan” [Eurachem Guideline “Suitability of analytical methods for a specific application. Guidelines for Laboratories for Validating Methods and Related Questions”]*. Kiev: Yurka Lyubchenko LLC, Is. 2, 96.