

MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW
Bestuur voor Onderzoek en Ontwikkeling

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ (CLO-GENT)
Oostende

Snelle detectie van histamine in visserijproducten met dunnelaag- chromatografie

W. VYNCKE



Mededelingen van het Rijkswateringenwetenschappelijk Instituut (CLO Gent)
Publicatie nr. 243 - D/1997/0889/2

MINISTERIE VAN MIDDENSTAND EN LANDBOUW
Bestuur voor Onderzoek en Ontwikkeling

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ (CLO-GENT)
Oostende

Snelle detectie van histamine in visserijproducten met dunnelaag- chromatografie

W. VYNCKE



Mededelingen van het Rijksoffice voor Zeevisserij (CLO Gent)
Publicatie nr. 243 - D/1997/0889/2

Samenvatting

De snelle screeningtest maakt gebruik van HPTLC Kieselgelplaten met als loopmiddel benzeen/triethylamine (80/20). Als extractiemiddel kan methanol, trichloorazijnzuur of perchloorzuur worden gebruikt. Het geëxtraheerde histamine wordt vooraf gedansyleerd. De ontwikkelingstijd bedraagt 20 min. De identificatie geschiedt onder UV-licht (366 nm). De gevoeligheid van de methode is 5 mg/100 g, hetgeen voldoende is daar de wettelijke limiet 10 mg/100 g bedraagt. De test is bruikbaar zowel op onbehandelde als op verwerkte vis (bv. in olie of saus).

1. INLEIDING.

Tijdens de opslag van pelagische vissen, hoofdzakelijk makreelachtigen, kunnen bacteriën het vrije aminozuur histidine, dat in deze vissen overvloedig voorhanden is, door decarboxylering in histamine omzetten. Dit is vooral het geval wanneer de vis gedurende een zekere tijd aan te hoge temperaturen werd blootgesteld. Histamine is toxisch en de vorming van dit biogeen amine dient dan ook vermeden te worden door gepaste voorzorgsmaatregelen tijdens de bewerking en de opslag van de vis (Pan en James, 1985).

Histaminevorming dient gecontroleerd te worden. De EU heeft in een hygiënerichtlijn normen vastgelegd voor de histamineconcentratie (zie bijlage). Op negen monsters mag de gemiddelde concentratie de 10 mg/100 g niet overschrijden. Twee monsters mogen maximum 20 mg/100 g bevatten (EU, 1993).

Voor accurate en reproduceerbare resultaten is vloeistofchromatografie aangewezen. Hiervoor kan atmosferische scheiding op kolom gevolgd door derivatisering met o-phtalaldehyde (OPA) worden toegepast. Dit is een van de officiële methoden van de AOAC (Helrich, 1990). Meestal echter wordt hogedrukchromatografie (HPLC) gebruikt. Hiervoor wordt voor of na de scheiding van histamine een derivatisering toegepast. In de meeste gevallen betreft het hier dansylchloride (Mietz en Karmas, 1977), OPA (Vidal-Carou *et al.*, 1990) of benzoylchloride (Yen en Hsieh, 1991).

Recentelijk werd ook de immuno-enzymatische detectie van histamine voorgesteld. Commerciële testkits zijn hiervoor beschikbaar. Deze methoden blijken evenwel nog relatief omslachtig te zijn (Etienne *et al.*, 1995)

Voor snel, oriënterend semi-kwantitatief onderzoek kan dunnelaagchromatografie (DLC) worden toegepast. Na scheiding met diverse loopmiddelen wordt histamine meestal colorimetrisch met ninhydrine (Lin *et al.*, 1977 ; Lieber en Taylor, 1978) of fluorimetrisch na derivatisering met OPA bepaald (Aures *et al.*, 1968).

Naguib *et al.* (1995) stelden recentelijk een bidimensionale DCL-methode voor waarbij histamine en andere biogene amines na derivatisering met dansylchloride zowel kwalitatief als kwantitatief snel en eenvoudig konden worden bepaald. Er werd besloten deze techniek op haar bruikbaarheid als semi-kwantitatieve screening-test te onderzoeken en waar nodig aan te passen.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Reagentia :

Extractie : methanol p.a., trichloorazijnzuur (TCA) 7,5 % (m/v) of perchloorzuur (PCA) 6 % (m/v).

Derivatisering : 50 mg dansylchloride (5-dimethylamino-1-naftaleensulfonylchloride) in 10 ml aceton oplossen.

Histaminestandaard : Stockoplossing : 165,7 mg histaminehydrochloride in 100 ml waterstofchloride 0,1 M oplossen. Werkoplossingen : verdunningen met gebruikte extractiemiddel maken.

Loopmiddel : benzeen/triethylamine 80/20

DLC-platen : HPTLC platen 10 x 10 cm Kieselgel 60 (Merck)

2.2. Extractie van histamine :

Met methanol :

Dit is de extractietechniek die in de AOAC-methode met kolomchromatografie wordt gebruikt (Helrich, 1990). Vijf g vis wordt met 30 ml methanol gehomogeniseerd en 15 min bij 55°C in warmwaterbad verwarmd. Na filtratie worden aan 1 ml extract 1 ml buffer pH 9 en 2 ml dansylchloride-oplossing toegevoegd. Er wordt dan 1 uur bij 55°C in een droogstoof verwarmd. Op te merken valt dat aangezien glas histamine adsorbeert, plastic buizen dienen te worden gebruikt.

Met trichloorazijnzuur :

Tien g vis wordt met 30 ml TCA-oplossing van 45°C in een plastic bekertje gehomogeniseerd. Na filtratie worden aan 1 ml extract 80 µl natriumhydroxide 4 M, 1 ml buffer pH 9 en 2 ml dansylchloride-oplossing toegevoegd. De rest van de procedure is zoals bij de methanolmethode.

Met perchloorzuur :

Zelfde procedure als voor TCA. Er wordt evenwel 150 µl natriumhydroxide 1 M toegevoegd (pH 9 controleren).

2.3. DUNNELAAGCHROMATOGRAFIE :

Vijf µl wordt op de concentratiezone van de plaat aangebracht. Histaminestandaarden overeenkomend met 5 en 10 mg/100 g worden eveneens gespot. Na drogen wordt de plaat in de chromatografietank gedurende 20 min ontwikkeld en opnieuw gedroogd. De identificatie gebeurt onder UV-licht (366 nm).

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Extractieprocedure

Naguib *et al.* (1995) passen een extractie met trichloorazijnzuur (TCA) toe. Hierbij wordt aan vis na homogenisatie met TCA en filtratie natriumhydroxide en natriumchloride toegevoegd. Histamine wordt vooraf met butanol/chloroform en heptaan geëxtraheerd voor de dansylering. Alhoewel bruikbaar, werden toch regelmatig minder goede scheidingen bekomen, vooral met vis in olie of saus. Een vereenvoudiging van de techniek waarbij na homogenisatie met TCA de pH met buffer op 9 werd gebracht, gaf betere resultaten.

Als extractiemiddel werd ook PCA i.p.v. TCA uitgetest. De resultaten waren dezelfde als voor TCA.

De extractie met methanol bleek eveneens bevredigend te werken (zie 3.4). Het voordeel van deze techniek is dat bij bevestigend onderzoek met de AOAC-methode (Helrich, 1990) met hetzelfde extract verder kan worden gewerkt.

3.2. Dansylering

Voor het toevoegen van dansylchloride dient de pH te worden gecontroleerd. Deze moet 8,8 - 9 bedragen. Bij grotere afwijking wordt geen kleur (fluorescentie) bekomen.

3.3. DLC-platen

Silicagel HPTLC-platen bleken scherpere en snellere scheidingen te geven dan de normale platen die door Naguib *et al.* (1995) werden gebruikt. De looptijd bedroeg 20 i.p.v. 35 min. Deze laatste kunnen evenwel ook worden aangewend.

3.4. Scheiding van histamine (fig. 1)

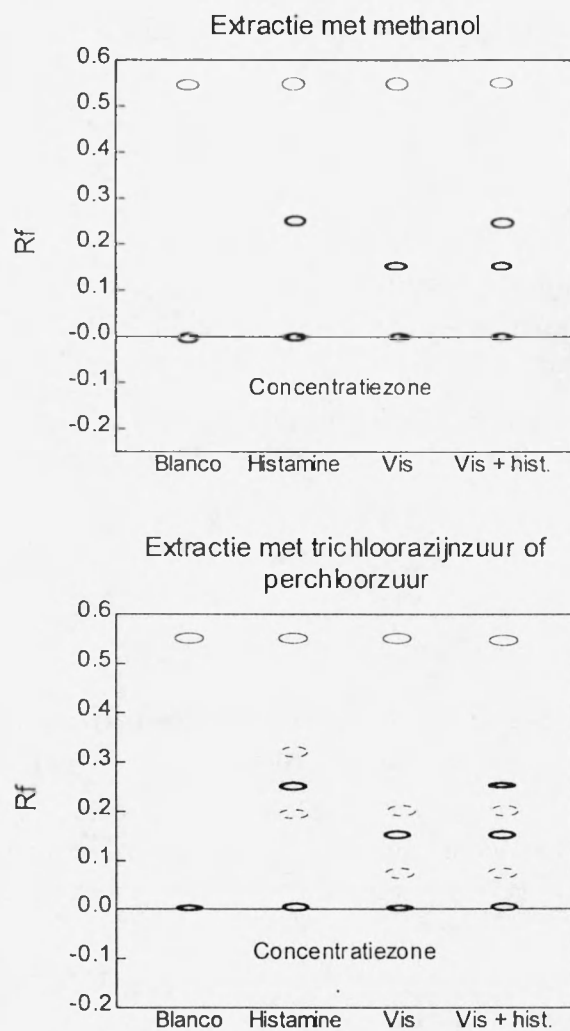


Fig. 1. Dunnelaagchromatogrammen met vis en histamine

Met de drie extractiemiddelen geeft dansylchloride een vlek op de startlijn en bij Rf 0,55. PCA, TCA en natriumhydroxide geven geen vlek. Met de methanolextractie geeft histamine een sterk gele vlek bij Rf 0,25. Met TCA en PCA is dit ook het geval maar er komen twee zwakke vlekken bij (Rf 0,15 en 0,32). De blanco geeft alleen de dansylchloridevlekken. Histidine, met verwante chemische structuur, geeft geen vlek en stoort aldus niet.

Vis geeft een duidelijke vlek op Rf 0,15 en en met TCA of PCA meestal een aantal lichte vlekken tussen Rf 0,07 en 0,20, zeer waarschijnlijk veroorzaakt door verbindingen met aminogroep (bv. vrije aminozuren).

Wanneer aanwezig, is histamine duidelijk te detecteren vanaf een concentratie van 5 mg/100 g. Deze detectiegrens ligt vrij hoog, maar gezien de wettelijke normen respectievelijk 10 en 20 mg/100 g bedragen is deze concentratie ruim voldoende om verdachte monsters te kunnen opsporen. Het juiste gehalte aan histamine dient dan eventueel met andere technieken (bv. HPLC) te worden bepaald.

3.5. Toepassing op visserijproducten

De methode werd op een aantal visserijproducten uit de handel toegepast. Deze waren :

- diepgevroren vis :

makreel en haring

- ingeblikte vis :

sardienen en ansjovis in olijfolie en in niet gespecificeerde plantaardige olie, makreelfilets in olijfolie, sojaolie en tomatensaus, haringfilets in mosterdsaus, tonijn in eigen nat en in provencaalse saus.

Nergens werd histamine gedetecteerd. Bij toevoeging van 5 mg/100 g histamine werd een duidelijke vlek bekomen (fig. 1). Met methanol was deze iets zwakker dan met TCA of PCA.

Literatuur

Aures, D., Fleming, R. en Hakanson, R. (1968) : Micro-analysis of tissue amines and of enzymes involved in their metabolism. *Journal of Chromatography* **33**, 480-493.

EU (1993) : Richtlijn van de Raad van 22 juli 1991 tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften voor de productie en het in de handel brengen van visserijproducten. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen van 24.09.91 Nr L 268/15.

Etienne, M., Luçon, M., Noël, J., Loréal, H. en Fleurence, J. (1995) : Test de tri par détection immunoenzymatique de l'histamine dans le poisson. IFREMER, Nantes, France, 28 p.

Helrich, K. (Ed.) (1990) : Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia, USA, p. 876.

Lieber, E. en Taylor, S. (1978) : Thin-layer chromatographic screening methods for histamine in tuna fish. *Journal of Chromatography* **153**, 143-152.

Lin, J., Baranowski, J. en Olcott, H. (1977) : Rapid thin-layer chromatographic-densitometric determination of histamine in tuna. *Journal of Chromatography* **130**, 426-430.

Mietz, J. en Karmas, E. (1977) : Chemical quality index of canned tuna as determined by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science* **42**, 155-158.

Naguib, K., Ayesb, A. en Shalaby, A. (1995) : Studies on the determination of biogenic amines in foods. 1. Development of a TLC method for the determination of eight biogenic amines in fish. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **43**, 134-139.

Pan, B.S. en James, D. (eds) (1985). Histamine in marine products : production of bacteria, measurement and prediction of formation. *FAO Fisheries Technical Paper*, (252) ; 62 p.

Vidal-Carou, M., Veciana-Nogués, M. en Mariné-Font, A. (1990) : Spectrofluorometric determination of histamine in fish and meat products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **73**, 565-567.

Yen, G. en Hsieh, C. (1991) : Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. *Journal of Food Science* **56**, 158-160.

BIJLAGE

Richtlijn van de Raad van 22 juli 1991 tot vaststelling van gezondheidsvoorschriften voor de productie en het in de handel brengen van visserijproducten (91/493/EEG), gewijzigd door Richtlijn 95/71/EG van 22 december 1995, art. 1.6.

Bijlage - Hoofdstuk V : Gezondheidscontrole en controle op de productie-eisen

II. Speciale voorwaarden

1. Organoleptische controles

...

Als op grond van de organoleptische beoordeling enige twijfel bestaat over de versheid van de visserijproducten, kunnen chemische of microbiologische controles worden uitgevoerd.

3. Chemische controles

A. Er worden monsters genomen die in een laboratorium worden onderzocht, teneinde de volgende parameters te controleren :

a. ...

b. Histamine

Per partij moeten negen monsters worden genomen :

- de gemiddelde concentratie mag niet hoger zijn dan 100 ppm;
- bij ten hoogste twee monsters mag de concentratie meer dan 100 ppm, doch niet meer dan 200 ppm bedragen;
- bij geen enkel monster mag de concentratie meer dan 200 ppm bedragen.

Deze maximumconcentraties gelden alleen voor vissoorten die behoren tot de families *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae* en *Coryphenidae*. De vissen van deze families die een enzymatische rijping in pekel hebben ondergaan, mogen echter hogere histamineconcentraties bevatten, die evenwel het dubbele van bovengenoemde waarden niet mogen overschrijden. De onderzoeken moeten worden verricht met behulp van wetenschappelijk erkende methoden die hun deugdelijkheid hebben bewezen, zoals de HPLC (hogedruk-vloeistofchromatografie).

