

DOI 10.7251/VETJSR2301106A

UDK 577.175.8:597.552.512

Оригинални научни рад

ВЕРИФИКАЦИЈА И ПРОЦЈЕНА МЈЕРНЕ НЕСИГУРНОСТИ HPLC МЕТОДЕ ЗА УТВРЂИВАЊЕ КОЛИЧИНЕ ХИСТАМИНА У РИБИ И ПРОИЗВОДИМА ОД РИБЕ

Јелена АНИЧИЋ*, Милијана ГОЛИЋ, Биљана ПЕЋАНАЦ

Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука, Босна и Херцеговина

*Коресподентни аутор: Јелена Аничих, jelena.anicic@virs-vb.com

Сажетак

Циљ рада је приказати експерименталне резултате добијене при верификацији HPLC методе утврђивања садржаја хистамина у риби и производима од рибе за три врсте риба и производа од рибе и процијењену мјерну несигурност методе. Метода за утврђивање количине хистамина у риби и производима од рибе верификована је према BAS EN ISO 19343:2017. Оцијењени су следећи параметри верификације методе: утицај матрикса/линеарност, лимит квантификације, тачност, прецизност и процијењена је мјерна несигурност методе за три врсте рибе (туну, скушу и сардину). Доказана је линеарност у распону концентрација од 0 mg kg⁻¹ до 500 mg kg⁻¹ са коефицијентима корелације од 0,9925 до 0,9999. Лимит квантификације за све три врсте рибе износи 10 mg kg⁻¹. Тачност је оцијењена анализом контролних материјала преко искориштења и просјечна вриједност износи 96,61%. Прецизност је оцијењена у условима поновљивости и обновљивости на три концентрациона нивоа за три врсте рибе и изражена је као лимит поновљивости r и лимит обновљивости R . Лимити обновљивости R за туну износе 15,96 до 24,89%, за скушу 12,80 до 23,04%, а за сардину од 10,25 до 32,17%. Мјерна несигурност процијењена је на три концентрациона нивоа 25 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹ и 220 mg kg⁻¹ и износи респективно за туну 17,78 mg kg⁻¹, 11,40 mg kg⁻¹ и 13,88 mg kg⁻¹, за скушу 16,46 mg kg⁻¹, 12,56 mg kg⁻¹ и 9,14 mg kg⁻¹, а за сардину 22,98 mg kg⁻¹, 12,70 mg kg⁻¹ и 7,32 mg kg⁻¹. Добијени резултати параметара верификације усаглашени су с прописаним и препорученим критеријумима прихватљивости, те потврђују да је метода испитивања довољно поуздана и лабораторија је може користити у рутинском раду.

Кључне ријечи: верификација, хистамин, хроматографија, риба, HPLC.

УВОД

Формирање хистамина у производима од рибе је у директној корелацији с концентрацијом хистидина у ткиву и нивоом микроорганизама присутних у производу (Etiene, 2016). Количина хистамина која настаје зависи од врсте бактерија, температуре и времена изложености рибе (Jakšić и сар., 2017). Неправилно складиштење, лоше третирање и манипулација рибом и производима од рибе доводи до кварења намирница, које код људи узрокује симптоме сличне алергијској реакцији, познато као „скомброидно тровање“ (хистамин или скомбротоксин). Зато је садржај хистамина од велике важности за процјену токсичности хране и предложен је као индикатор хигијенске исправности (Ghazi и сар., 2015). Ризик од тровања хистамином држи се под контролом примјеном добре хигијенске и произвођачке праксе, повезане са системом анализе ризика и критичних контролних тачака (Shimoji и Bakke, 2019).

Правилник о микробиолошким критеријумима за храну животињског поријекла (Пропис, 2019) прописује максимално дозвољене количине хистамина у производима рибарства од рибљих врста повезаних с великом количином хистидина, у опсегу од 100 до 200 mg kg⁻¹, које се процјењују анализом репрезентативних 9 јединица из сваке серије узорака. Узорак је адекватан, односно задовољава одредбе Правилника уколико: средња вриједност резултата из 9 јединица не прелази 100 mg kg⁻¹; двије јединице прелазе вриједност од 100 mg kg⁻¹, али не прелазе 200 mg kg⁻¹ и ако ни једна јединица не прелази 200 mg kg⁻¹. Изузетак су производи рибарства обрађени ензиматским сазријевањем у саламури произведени од рибљих врста повезаних с великом количином хистидина, код којих је дозвољени опсег од 200 до 400 mg kg⁻¹ на 9 јединица производа и рибљи сос добијен ферментацијом производа од риба, који не смије имати концентрацију хистамина већу од 400 mg kg⁻¹ у једној јединици производа (Пропис, 2019).

Раздвајање и квантификација биогених амина најчешће се постиже јоноизмјењивачком хроматографијом, танкослојном хроматографијом, гасном хроматографијом, течном хроматографијом и ензиматским и радиоимунолошким методама (Malle и сар., 1996). HPLC је најчешће кориштена због својих оперативних предности (цијене и поновљивости) (Chen и сар., 2016).

Правилником о микробиолошким критеријумима за храну животињског

поријекла (Пропис, 2019), прописана референтна метода за утврђивање количине хистамина у риби и производима од рибе је HPLC метода. С обзиром да је метода стандардна, већ је била предмет валидације и њена прикладност за предвиђену намјену је утврђена. Имајући ресурсе који су услов за извођење методе, лабораторија је имплементирала стандардну методу, те како би потврдила способност постизања тачних и поузданих резултата испитивања, креирала је и извела студију верификације.

Циљ рада је приказати експерименталне резултате добијене при верификацији HPLC методе утврђивања садржаја хистамина у риби и производима од рибе за три врсте риба и производа од рибе и процијењену мјерну несигурност методе.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

У сврху верификације методе, анализе су изведене на узорцима три врсте рибе: туне (један узорак сирове рибе и пет производа: једна конзерва туне у саламури и четири конзерве туне у биљном уљу), скуше (један узорак сирове рибе и два производа: конзерве скуше у биљном уљу) и сардине (један узорак сирове рибе и један производ: конзерва сардине у биљном уљу). За оцјену параметара верификације поред обогачених узорака кориштени су и екстерно набављени контролни узорци: Fapas RM, TYG018RM, Canned fish, Tuna fish in brine, ref. value $220 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1}$ и Fapas QC, T27303QC, Canned fish, ref. value $31,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ($25,4\text{-}37,3 \text{ mg kg}^{-1}$).

Кориштен је стандард хистамин дихидрохлорида, произвођач Sigma Aldrich, чистоће $\geq 99\%$, batch no: WXBD1225V, и интерни стандард 1,7-диаминохептан, произвођач Sigma Aldrich, чистоће 98% , batch no: STBG2472V. За анализу, од референтних стандарда припремљени су основни раствор хистамина, концентрације $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ растварањем $1,034 \text{ g}$ хистамина дихидрохлорида у 50 mL дејонизоване воде (раствор је стабилан једну годину ако се чува у замрзивачу ($-20 \pm 5^\circ\text{C}$)) и основни раствор интерног стандарда 1,7-диаминохептана, концентрације $6,4 \text{ mg mL}^{-1}$, растварањем $0,320 \text{ g}$ 1,7-диаминохептана у 50 mL дејонизоване воде (раствор је стабилан три седмице ако се чува у фрижидеру ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)).

За припрему и обраду узорака кориштене су перхлорна киселина, натријум карбонат, данзил хлорид и L-пролин произвођача Sigma Aldrich, за пречишћавање екстракта толуен произвођача Honeywell, а за хроматографско раздвајање кориштени су ултрачиста вода и ацетонитрил, ацетонитрил HPLC grade, произвођача Fisher и Honeywell.

За филтрирање припремљеног узорка кориштени су PTFE/PP филтери величине пора 0,2 μm , а за упаравање гас азот 4.6.

Анализа је вршена на течном хроматографу са UV/VIS детектором, Agilent Technologies, InfinityLab LC Series 1260 Infinity II Quaternary System са припадајућим софтвером OpenLAB Chem Station Edition Rev. C.01.07 SR3 [465]. Кориштена је хроматографска колона Nucleosil C18, 5 μm 100Å (25 cm x 4,6 mm), Macherey-Nagel, LOT: 21301076.

Испитивање је рађено у складу с BAS EN ISO 19343 (ИСБИХ, 2018).

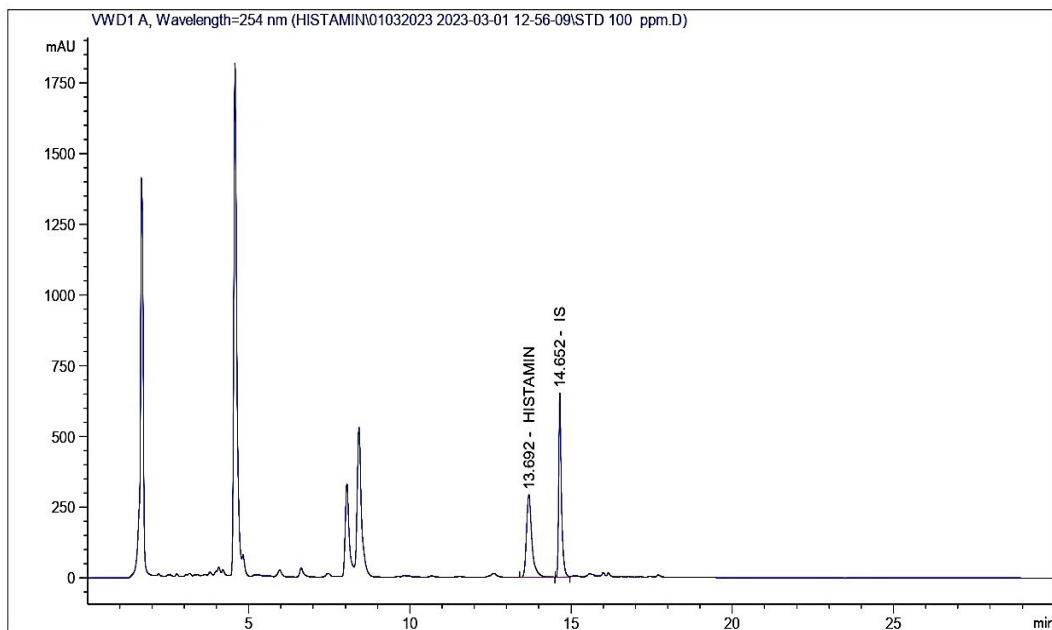
Калибрационе криве су рађене на матриксу исте врсте рибе као и узорак за анализу.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Експерименти су изведени у 15 радних серија од стране два аналитичара. Оцијењени су слједећи параметри верификације: утицај матрикса/линеарност, лимит квантификације, тачност, прецизност преко поновљивости и обновљивости методе те је процијењена мјерна несигурност методе за три врсте рибе на три нивоа концентрације. Обухваћени су узорци три врсте рибе (туна, скуша и сардина) и узорци производа од ових врста.

Успостављање лимита прихватљивости за параметре верификације рађено је на основу прописаних (Пропис, 2010) и препоручених критеријума (ИСБИХ, 2018), те сопственог искуства и лабораторијске праксе.

Хроматограм с раздвојеним пиком хистамина и интерног стандарда с означеним ретенционим временима у минутима, приказан је на Слици 1.



Слика 1 Примјер специфичног хроматограма за хистамин и интерни стандард

Правилник о спровођењу аналитичких метода и тумачењу резултата (Пропис, 2010) прописује општи критеријум искориштења за квантитативне методе 80-110%, док BAS EN ISO 19343 (ИСБИХ, 2018) наводи интервал од 60-140%. Један од разлога за овако широк интервал прихватљивости је тај што је метода BAS EN ISO 19343 (ИСБИХ, 2018) валидована на основу резултата испитивања у оквиру интерлабораторијске студије у којој је учествовало девет лабораторија из седам држава, те овакав критеријум код верификације тачности у једној лабораторији није прихватљив. Имајући то у виду, лабораторија је као критеријум прихватљивости за оцјену искориштења (тачности методе) дефинисала интервал 80-120% и кроз експерименте доказала способност методе у погледу овог параметра верификације. Оцјена тачности методе изведена је анализом референтног материјала Faras TYG018RM Canned fish, Tuna fish in brine и контролног материјала Faras T27303QC Canned fish, у 6 понављања и анализом обогаћених узорка за три врсте рибе на концентрационом нивоу 400 mg kg^{-1} . У Табели 1 приказани су резултати за искориштење преко референтног и контролног материјала. У Табели 2 приказани су резултати за искориштење преко обогаћених узорка.

Табела 1 Искориштење преко RM и QC материјала

Параметар	Fapas RM, TYG018RM, Canned fish, Tuna fish in brine, ref. value 220±5 mg kg ⁻¹	Fapas QC, T27303QC, Canned fish, ref. value 31,3 mg/kg (25,4-37,3 mg kg ⁻¹)
c _{sr} (mg kg ⁻¹)	208,1889	30,9996
sdv (mg kg ⁻¹)	1,5701	2,5217
Rec (%)	94,63	99,04

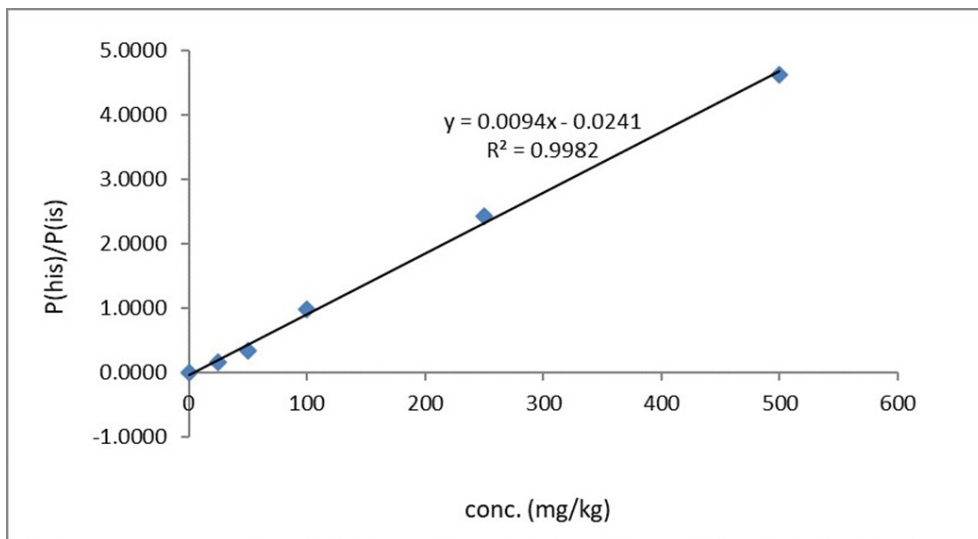
(c_{sr}): средња вриједност; (sdv): стандардна девијација; (Rec%): искориштење

Табела 2 Искориштење преко обогаћеног узорка на нивоу 400 mg kg⁻¹

Параметар	Туна	Скуша	Сардина
c _{sr} (mg kg ⁻¹)	385,6474	378,9199	391,5657
sdv (mg kg ⁻¹)	1,9049	3,4465	9,5088
Rec (%)	96,41	94,73	97,89

Тачност методе лабораторија је потврдила учешћем у РТ шеми од стране провајдера FAPAS у периоду август/септембар 2022., са z-score вриједношћу од 0,3 и средњом вриједношћу искориштења 97,6%, које је прихватљиво у односу на задати критеријум. Према Jakšić и сар. (2017), просјечно искориштење добијено истом методом анализом четири РТ (FAPAS) узорка на различитим концентрацијама хистамина износило је 101,5%, што је блиско просјечном искориштењу које смо добили анализама референтног и контролног материјала на два концентрациона нивоа (96,8%).

Доказана је линеарност методе у распону концентрација од 0 mg kg⁻¹ до 500 mg kg⁻¹ за све три врсте рибе с коефицијентима корелације од 0,9925 до 0,9999, и коефицијентима правца од 0,0070 до 0,0108. При свакој анализи је припремана калибрациона крива на узорку исте врсте као и узорак за испитивање. На овај начин се елиминише утицај матрикса и долази до поузданијег резултата. Примјер експериментално добијене калибрационе криве у матриксу приказан је на Слици 2.



Слика 2 Примјер експериментално добијене калибрационе криве у матриксу

Кроз податке из литературе, како за хроматографске тако и за ензимске методе, прихватљивим се сматра коефицијент корелације већи од 0,9. Jinadasa и сар. (2016) су линеарност методе анализе хистамина течном хроматографијом оцијенили коефицијентом корелације већим од 0,99, што је усаглашено с резултатима наших истраживања.

Мјерни опсег методе изражен је преко лимита квантификације. Узимајући у обзир максимално дозвољене количине хистамина прописане Правилником (Пропис, 2019), одабран је лимит квантификације као десет пута нижа вриједност од најниже прописане. Експеримент је постављен тако да је за сваку од три врсте рибе анализирано по шест узорака обогаћених на нивоу концентрације од 10 mg kg^{-1} . Израчунате су добијене концентрације, њихова средња вриједност (c_{sr}), стандардна девијација (sdv) и искориштење (Rec%). Добијени резултати приказани су у Табели 3. Искориштење обогаћених узорака на нивоу лимита квантификације је у прихватљивом опсегу и средња вриједност за три врсте рибе износи 105%.

Табела 3 Добијене експерименталне вриједности за лимит квантификације

Параметар	Туна	Скуша	Сардина
$c_{sr} (\text{mg kg}^{-1})$	10,2386	9,4321	11,8314
sdv (mg kg^{-1})	0,8908	0,3893	0,9817
Rec (%)	102,39	94,32	118,31

Када је ријеч о прецизности методе не постоји строго дефинисан критеријум за прихватљивост овог параметра верификације. Прецизност методе оцијењена је у условима поновљивости и обновљивости према BAS EN ISO 19343 (ИСБИХ, 2018), те су израчунати r и R лимити. Поновљивост методе оцијењена је анализом обогаћених узорака у шест поновљених испитивања на три концентрациона нивоа. За сваки радни дан и сваку серију израчунате су средња вриједност концентрације (mg kg^{-1}), стандардна девијација (mg kg^{-1}), коефицијент варијације поновљивости (%), искориштење (%) и лимит поновљивости r (mg kg^{-1} , %). За оцјену поновљивости за врсту рибе туна на концентрационом нивоу 220 mg kg^{-1} кориштен је референтни материјал (TYG018RM). Резултат поновљивости једне радне серије за сва три матрикса дат је у Табели 4.

Табела 4 Оцјена поновљивости за матриксе: туна, скуша и сардина

Ниво обогаћења	25 (mg kg^{-1})			100 (mg kg^{-1})			220 (mg kg^{-1})		
	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина
Број репликата	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Средња вриједност (mg kg^{-1})	24,95	26,15	28,95	108,42	101,43	107,63	187,78	221,14	229,35
Искориштење (%)	99,80	104,61	115,81	108,42	101,43	107,63	85,34	100,52	104,25
Стандардна девијација, s_r (mg kg^{-1})	1,22	2,09	0,72	2,37	1,86	3,85	4,91	9,97	8,65
Коефицијент варијације, CV_r (%)	4,88	7,99	2,50	2,19	1,83	3,58	2,23	2,22	3,77
Лимит поновљивости ($r = 2,8 \times s_r$) (mg kg^{-1})	3,41	5,85	2,03	6,64	5,21	10,78	13,76	27,92	24,24
Лимит поновљивости ($r = 2,8 \times CV_r$) (%)	13,66	22,37	7,00	6,13	5,12	10,02	6,24	6,22	10,56

Резултати валидационе студије ензиматске методе анализе хистамина на матриксу конзерва туне у уљу за искориштење су у опсегу 93,5-124,7%, а коефицијент варијације поновљивости на свим нивоима обогаћења < 20% (Shimoji и Bakke, 2019). У нашем истраживању је добијено искориштење за исту врсту матрикса у интервалу 85,34-101,43%, а коефицијент варијације поновљивости < 5% на сва три нивоа обогаћења (Табела 4). Овако различити резултати не изненађују с обзиром да је ријеч о двије методе с различитим принципом одређивања и различитим техникама мјерења.

Обновљивост методе оцијењена је анализом обогаћених узорака на три концентрациона нивоа за три врсте рибе од стране два аналитичара у различитим данима. Резултати добијени у експериментима за одређивање поновљивости методе за једног аналитичара обједињени су с резултатима добијеним за другог аналитичара за сваки ниво концентрације и сваку врсту рибе и израчунате средња вриједност концентрације (mg kg^{-1}), стандардна девијација (mg kg^{-1}), коефицијент варијације обновљивости (%), искориштење (%) и лимит обновљивости (mg kg^{-1} , %). У Табели 5 приказани су резултати за туну, скушу и сардину.

Табела 5 Оцјена обновљивости за матриксе: туна, скуша и сардина

Ниво обогаћења	25 (mg kg^{-1})			100 (mg kg^{-1})			220 (mg kg^{-1})		
	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина
Број репликата	12	18	18	18	16	18	14	18	12
Средња вриједност (mg kg^{-1})	27,08	25,99	28,50	108,35	102,17	102,96	201,76	218,33	224,78
Искориштење (%)	108,32	103,95	114,01	108,35	102,17	102,96	91,70	99,24	102,17
Стандардна девијација, s_R (mg kg^{-1})	2,40	2,14	3,27	6,17	6,42	6,53	14,00	9,97	8,23
Коефицијент варијације, CV_R (%)	8,89	8,23	11,49	5,70	6,28	6,35	6,94	4,57	3,66
Лимит обновљивости ($R = 2,8 \times s_R$) (mg kg^{-1})	6,74	5,99	9,17	17,29	17,98	18,31	39,22	27,92	23,06
Лимит обновљивости ($R = 2,8 \times CV_R$) (%)	24,89	23,044	32,17	15,96	17,584	17,78	19,43	12,80	10,25

Добијени резултати за средње вриједности концентрације, искориштење, стандардне девијације и коефицијент варијације су слични за матрикс туна, док се за матриксе скуша и сардина резултати разликују у односу на просјечне вриједности дате у стандарду. Коефицијенти варијације за скушу и сардину су нижи од наведених у стандарду, а искориштења доста виша, посебно за сардину, која је кроз овај рад узета за поређење као сродна врста рибе у односу на харингу. Иако се разликују, добијене вриједности се не сматрају неусаглашеним у односу на оне дате у стандарду. Напротив, утврђена је боља прецизност, што је било и очекивано с обзиром на услове процјене овог параметра. Стандард је дефинисао прецизност на основу резултата интерлабораторијске студије, док је прецизност у нашим условима оцијењена интралабораторијски. Такође се не смије занемарити чињеница да су експерименти обухватили три врсте рибе и три нивоа концентрације, па стога добијени лимити не морају бити примјењиви на друге нивое концентрације и друге врсте рибе и њихових производа. Munir и сар. (2021) су одабрали скушу за оцјену прецизности и тачности на два концентрациона нивоа, средњем и вишем, у шест понављања, у току седам дана, при чему је добијен коефицијент варијације обновљивости 7,38%, а искориштење 103%, што одговара нашим експерименталним резултатима за скушу.

Мјерна несигурност методе је процијењена на основу резултата стандардне девијације испитивања хистамина у условима обновљивости за све три врсте рибе на сва три концентрациона нивоа уз употребу фактора осигурања 2, како би се досегао ниво повјерења од приближно 95%. Резултати су приказани у Табели 6 за туну, скушу и сардину.

Табела 6 Мјерна несигурност за матриксе: туна, скуша и сардина

Ниво обогаћења	25 (mg kg ⁻¹)			100 (mg kg ⁻¹)			220 (mg kg ⁻¹)		
	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина	Туна	Скуша	Сардина
Коефицијент варијације, CV _R (%)	8,89	8,23	11,49	5,70	6,28	6,35	6,94	4,57	3,66
Проширена мјерна несигурност U = 2 x RSD (%)	17,78	16,46	22,98	11,40	12,56	12,70	13,88	9,14	7,32

Ghazi и сар. (2015) у својим експериментима утврдили су проширену мјерну несигурност (комбинована мјерна несигурност $\times 2$) за туну и остале врсте рибе која је износила 26,4%. Ова вриједност се може поредити са вриједношћу за проширену мјерну несигурност за сардину на најнижем концентрационом нивоу која износи 22,98 % и највиша је вриједност од експериментално добијених. Просјечна вриједност за проширену мјерну несигурност за све три врсте рибе је доста нижа од мјерне несигурности методе поменутих аутора.

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата испитивања параметара верификације за рибу и производе од рибе, а узимајући у обзир критеријуме прихватљивости за линеарност, поновљивост, обновљивост, тачност, искориштење, границу квантификације (LOQ), метода је успјешно верификована, те се може исправно спроводити у рутинском раду.

Разлике у резултатима за исте параметре верификације међу лабораторијама не изненађују с обзиром да је ријеч о методама с различитим принципима одређивања и различитим техникама мјерења. Разлике такође потичу од различитих приступа оцјени параметара верификације у погледу одабира матрикса и извођења експеримента.

У којем обиму ће лабораторија у својим радним условима извести верификацију зависи од много фактора. Изазов је да се нађе компромис између могућности (вријеме, финансије) и оптималног броја експеримената на основу којих је могуће утврдити карактеристике методе и оцијенити их у односу на прописане и/или препоручене критеријуме прихватљивости.

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Chen R., Deng Y., Yang L., Wang J., Xu F. (2016): Determination of Histamine by High-Performance Liquid Chromatography After Precolumn Derivatization with o-Phtalaldehyde-Sulfite. *Journal of Chromatografic Science*, 54(4):547-553.
- Etiene M. (2016): Methodology for histamine and biogenic amines analysis. *Seafoodplus Traceability*, Ifremer.
- Ghazi A. A., Mohamed M. M., Gad Alla S. A., Kennedy G., Atalla E. R. (2015): Optimization and Validation of Analytical Method for Determination of Histamine in Fish using HPLC-FLD. *Egyptian Journal of Pure and Applied Science*, 53(2):33-42.
-

- ИСБИХ (2018): Микробиологија ланца хране – Детекција и квантификација хистамина у риби и производима од рибе – HPLC метода. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 19343.
- Jakšić S., Baloš M. Ž., Mihaljev Ž., Prodanov Radulović J., Nešić K. (2017): Comparison of analytical methods for determination of histamine in reference canned fish samples. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 85 012066:1-6.
- Jinadasa B. K. K. K., Jayasinghe G. D. T. M., Ahmad S. B. N. (2016): Validation of high performance liquid chromatography (HPLC) method for quantitative analysis of histamine in fish and fishery products. *Cogent Chemistry*, 2(1):1156806.
- Malle P., Vallé M., Bouqelet S. (1996): Assay of Biogenic Amines Involved in Fish Decomposition. *Journal of AOAC International*, 79(1):43-49.
- Munir M. A., Mackeen M. M. M., Heng L. Y., Badri K. H. (2021): Study of Histamine Detection using Liquid Chromatography and Gas Chromatography. *ASM Sc. J.*, 16:1-9.
- Пропис (2010): Правилник о спровођењу аналитичких метода и тумачењу резултата. Службени гласник Босне и Херцеговине, 95/10.
- Пропис (2019): Правилник о микробиолошким критеријумима за храну животињског поријекла. Службени гласник Републике Српске 69/19.
- Shimoji K., Bakke M. (2019): Validation Study of Histamine Test for the Determination of Histamine in Selected fish Products. *Journal of AOAC International*, 102(1):164-180.

Рад примљен: 10.05.2023.

Рад прихваћен: 15.09.2023.
