

Anna Czajkowska-Mysiek¹⁾, Joanna Leszczyńska²⁾

ZAWARTOŚĆ HISTAMINY W PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH ZAWIERAJĄCYCH RYBY PRZEZNACZONYCH DLA NIEMOWLĄT I MAŁYCH DZIECI

- ¹⁾ Zakład Jakości Żywności Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego
Kierownik: dr *B. Bartodziejska*
- ²⁾ Instytut Podstaw Chemii Żywności Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechniki Łódzkiej
Kierownik: prof. dr hab. *S. Wysocki*

Do najbardziej toksycznych amin biogennych występujących w żywności zaliczana jest histamina. Jej obecność w produktach dla niemowląt i małych dzieci może powodować powstawanie procesu o podłożu pseudoalergicznym. Celem pracy była ocena zawartości histaminy w gotowych produktach przeznaczonych dla dzieci i niemowląt zawierających ryby.

Hasła kluczowe: histamina, żywność dla niemowląt, żywność dla małych dzieci, ryby, HPLC.

Key words: histamine, foods for infants, food for young children, fish, HPLC.

Histamina (β -imidazolyloetyloamina) jest jedną z najbardziej toksycznych heterocyklicznych amin biogennych (1). W organizmie ludzkim powstaje w wyniku dekarboksylacji (w obecności fosforanu pirydoksalu) aminokwasu – histydyny (2). Egzogenna histamina spożyta z pożywieniem w niewielkiej ilości jest rozkładana przez odpowiednie enzymy – diaminooksydazę (DAO) oraz N-metylotransferazę histaminy (HNMT) i wydalana z organizmu (3). Histamina w żywności powstaje głównie w wyniku działalności bakterii, zarówno celowo dodanych jak i stanowiących jej zanieczyszczenie (4). Najczęstsze przypadki zatruc pokarmowych związane są ze spożyciem ryb zawierających duże ilości histaminy takich jak makrele, śledzie, tuńczyki i sardynki (5) oraz serów dojrzewających (6). Obecność histaminy w bardzo szerokich granicach stwierdzono także w napojach, owocach, alkoholu, czekoladzie, sokach, warzywach oraz roślinach strączkowych (2,7,8). Pobranie z żywnością dawki histaminy na poziomie 5–10 mg może wywołać pseudoalergiczną reakcję u ludzi wrażliwych (9). W przypadku spożycia od 70 do 1000 mg histaminy w posiłku, dochodzi do zatrucia histaminą (skombrotoksizm), prowadzącego u osób wrażliwych nawet do śmierci (10). Maksymalna zawartość histaminy jest limitowana w rybach i produktach rybnych i wynosi $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (11).

Żywność dla niemowląt i małych dzieci do lat 3 jest przeznaczona do spełnienia szczególnych potrzeb zdrowotnych niemowląt odstawianych od piersi oraz zdrowych

małych dzieci w celu ich stopniowego przystosowania do zwykłej żywności (12). Potencjalne niebezpieczeństwo może wystąpić po spożyciu pokarmu zawierającego histaminę już w niewielkiej ilości, która może dodatkowo aktywować jej uwalnianie z komórek tucznych i powodować proces na podłożu pseudoimmunologicznym. W przypadku wystąpienia reakcji pseudoalergiczej u dziecka objawy najczęściej mają bardzo ostry przebieg i są niebezpieczne dla zdrowia i życia. Na rynku handlowym dostępnych jest wiele gotowych do spożycia dań dla dzieci i niemowląt zawierających m.in. ryby. W literaturze brak jest jednak danych przedstawiających zawartość histaminy w tych produktach.

Celem pracy była ocena zawartości histaminy w gotowych daniach zawierających ryby przeznaczonych dla dzieci i niemowląt z zastosowaniem metody RP-HPLC-FLD.

MATERIAŁ I METODY

Przeprowadzone badania dotyczyły 18 produktów dla niemowląt i małych dzieci zawierających w swoim składzie ryby, w postaci gotowych dań w słoiczkach (obiadki, zupka) dostępnych na rynku detalicznym. Wśród badanych dań znalazły się produkty zalecane dla dzieci w wieku od 4 miesięcy do 3 lat. Badane produkty pochodziły od 4 wiodących producentów tego typu żywności w Polsce i opatrzone były deklaracjami o zawartości procentowej i gatunku ryby.

Zawartość histaminy oznaczono metodą wysokosprawną chromatografią cieczą w odwróconym układzie faz z detektorem fluorescencyjnym (RP-HPLC-FLD) z zastosowaniem derywatywacji pre-kolumnowej aldehydem o-ftalowym w obecności tiolu (OPA/2-ME), według zwalidowanej własnej procedury badawczej (13). Zastosowana metodyka badań charakteryzuje się niską granicą wykrywalności w próbkach (LOD) $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, współczynnikami zmienności (CV) w zakresie 1,5 – 4,6% (wyznaczone na podstawie analiz substancji wzorcowych wykonanych w ciągu 5 kolejnych dni) oraz dokładnością, jako błąd względny (RE) $-4,97\% < \text{RE} < 0,09\%$ (zarówno dla wyników otrzymanych na podstawie analiz wykonanych w ciągu jednego dnia, jak i w ciągu 5-ciu kolejnych dni). Odzysk histaminy (93,9 – 120,7%) oszacowano na podstawie serii 6 pomiarów fortyfikowanej próbki warzywno-rybnej. Do analiz wykorzystano chromatograf cieczowy Performance (Schimadzu) w układzie dwukanałowym, wyposażony w autosampler i detektor fluorymetryczny RF-20A pracujący przy długościach fali $\lambda_{\text{wz}}/\lambda_{\text{em}} = 330/440 \text{ nm}$. Do rozdzielania zastosowano kolumnę Gemini-NX (Phenomenex) $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, 110 \AA poprzedzoną pre-kolumną o tym samym wypełnieniu ($4 \times 3 \text{ mm}$). Fazę ruchomą stanowił acetonitryl: 10 mM fosforan potasu pH 7,2 z 1% 2-oktanolu (70:30 v/v)/10 mM fosforan potasu pH 7,2 i przepływie gradientowym przy prędkości przepływu $V = 0,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Homogenne próbki ($10,00 \pm 0,02 \text{ g}$) odważano w dwóch równoległych powtórzeniach i ekstrahowano 0,4 M kwasem nadchlorowym. Następnie wirowano ($5500 \times \text{g}$) w temp. 4°C przez 15 min. Tak przygotowane ekstrakty filtrowano z zastosowaniem systemu filtracji Simplicity z filtrami Millex PTFE $0,2 \mu\text{m}$ (Merck), do naczynek 1,5 ml. Następnie poddawano derywatywacji gotowym roztworem OPA/2-ME (Sigma-

-Adrich) przy pH=9 i po 2 minutach poddawano analizie. W celu analizy ilościowej histaminy w próbkach wykonano krzywą wzorcową na 5 poziomach stężeń, opartą na zależności stężenia histaminy od pola powierzchni otrzymanego piksu. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 10, wykorzystując jednoczynnikową analizę wariancji z testami post-hoc Tukeya dla nierównej liczebności próbek dla określenia istotności różnic na poziomie $p < 0,05$. Normalność rozkładu sprawdzono przy pomocy testu *Shapiro-Wilka*, a założenia jednorodności wariancji testem *Browna-Forsythe'a*.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badane produkty zawierały w swoim składzie od 8 do 12% ryby, stanowiącej dodatek do składników głównych czyli warzyw, ryżu lub makaronu. Większość z 18 próbek stanowiły produkty zawierające łososia (28%), tuńczyka (22%), dorsza, mintaja, rybę morską (brak określenia gatunkowego) i pangę z łososiem (11%), a także jedno danie zawierające suma.

Uzyskane za pomocą metody RP-HPLC-FLD wyniki badań zawartości histaminy w 18 dostępnych na rynku detalicznym gotowych daniach rybnych dla niemowląt i małych dzieci przedstawiono w tabeli I.

Analiza badanych próbek wykazała występowanie wolnej histaminy w produktach dla dzieci i niemowląt na poziomie od $< 30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (LOQ) do $429,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Na podstawie wyników jednoczynnikowej analizy wariancji dla określonych 6 grup ryb występujących w badanych daniach (łosoś, tuńczyk, ryba morską, dorsz, mintaj, panga) wykazano z $p < 0,05$, brak istotnych statystycznie różnic między wynikami uzyskanymi dla produktów zawierających łososia, rybę morską, dorsza, mintaja oraz pangę ($0,8508 \leq p \leq 0,9999$). Natomiast dania dla dzieci i niemowląt z tuńczykiem zawierały histaminę w ilości statystycznie istotnie różniącej się ($0,0002 \leq p \leq 0,0003$) od zawartości tej aminy uzyskanej dla pozostałych grup ryb występujących w badanych produktach. Należy zwrócić uwagę, że wszystkie analizowane dania z tuńczykiem pochodziły od tego samego producenta.

Ze względu na ograniczoną liczbę badań prowadzonych w zakresie wyznaczenia poziomu toksyczności histaminy, na podstawie poziomu niewywołującego dających się zaobserwować szkodliwych skutków NOAEL (ang. *No Observable Adverse Effect Level*) wyznaczono potencjalną sugerowaną maksymalną dawkę jednorazową ARfD=50 mg (ang. *Acute Reference Dose*) dla zdrowej osoby dorosłej (3). Nie uwzględnia ona jednak grup wysokiego ryzyka takich jak niemowlęta, dzieci, kobiety w ciąży czy osób starszych. W celu interpretacji uzyskanych wyników badań odniesiono się więc do wartości ArfD=5 mg, którą przyjęto jako sugerowaną maksymalną dawkę jednorazową dla osoby wrażliwej (9), oszacowując % tej wartości z uwzględnieniem założenia, że spożyty zostanie 1 badany produkt dziennie (obiadek lub zupka) przez dziecko lub niemowlę w zalecanym przez producenta wieku oraz średniej masie ciała dziewczynek i chłopców określonej przez WHO (14) (tab. I). Oszacowane wartości %ArfD mieszczą się w zakresie 0,7–5,5% dla dań zawierających łososia, rybę morską, dorsza, mintaja oraz pangę oraz 8,4–15,6% dla produktów z tuńczykiem.

Table 1. Wyniki zawartości histaminy w produktach spożywczych zawierających ryby przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci
 Table 1. Histamine contents in fish-based food products intended for infants and young children

Producent nr	Nazwa produktu	Gatunek ryby, zawartość [%]	Zalecany dla dzieci w wieku	Zawartość histaminy $\bar{x}_{gr} \pm SD$ [$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$]	% ARfD oszacowanej dla	
					dziewczynek	chłopców
1	obiadek ziemniaczki z lososiem	losoś, 8	1-3 lata	< 30 ^{*a}	1,2-0,8	1,1 - 0,7
2	obiadek tuńczyk z ryżem i cukinią	tuńczyk, 10,5	po 9 m-cu	378,5 ± 18,7 ^b	12,9	11,9
3	makaron tagliatelle z ryba i brokułami	ryba morska, 12	po 7 m-cu	< 30 ^{*a}	1,2	1,1
2	zupka krem z warzyw i tuńczyka	tuńczyk, 10	po 6 m-cu	429,1 ± 12,2 ^b	15,6	14,4
2	obiadek warzywa z delikatną rybą	dorsz, 11	po 9 m-cu	91,9 ± 7,0 ^a	3,0	2,7
3	kluseczki z rybą i warzywami w pomidorach	ryba morska, 12	po 11 m-cu	71,7 ± 2,6 ^a	2,5	2,3
1	obiadek jarzynki z delikatną rybką	losoś, 8	po 5 m-cu	109,0 ± 8,49 ^a	2,8	2,5
3	makaron z lososiem, marchewką i brokułami	losoś, 8	po 15 m-cu	76,7 ± 0,8 ^a	2,8	2,6
3	gotowana marchewka z ziemniakami i lososiem	losoś, 8	1-3 lata	91,1 ± 7,1 ^a	3,6-2,3	3,3-2,2
1	obiadek smakowita rybka z warzywami	mintaj, 12	po 8 m-cu	< 30 ^{*a}	1,0	0,9
3	marchewka z ziemniaczkami i lososiem	losoś, 8	po 5 m-cu	< 30 ^{*a}	1,2	1,1
1	obiadek jarzynki z gotowaną marchewką	mintaj, 8	po 5 m-cu	< 30 ^{*a}	0,8	0,7
2	obiadek kluseczki z tuńczykiem w pomidorach	tuńczyk, 10,5	po 9 m-cu	306,7 ± 8,0 ^b	10,0	9,2
2	obiadek makaron z tuńczykiem i warzywami	tuńczyk, 11	1-3 lata	344,9 ± 18,9 ^b	13,6-8,7	12,6-8,4
4	marchewka z ziemniakami, ryżem i rybą	panga, 7 i losoś, 1	po 4 m-cu	< 30 ^{*a}	1,2	1,1
4	kluseczki ze szpinakiem, śmietaną i rybą BIO	sum, 8	po 7 m-cu	135,0 ± 5,0 ^a	5,5	5,0
4	ryba z hodowli ekologicznej z kluseczkami w sosie pomidorowym	panga, 8 i losoś, 1	po 11 m-cu	89,8 ± 7,1 ^a	3,6	3,3
2	obiadek ryż z warzywami i rybką	dorsz, 11	po 9 m-cu	32,5 ± 2,0 ^a	1,1	1,0

* poniżej LOQ dla histaminy / below the LOQ for histamine, SD - odchylenie standardowe / standard deviation, wartości w kolumnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie statystycznie na poziomie $p < 0,05$ / values presented in column denoted with different letter are statistical significance at the $p < 0,05$ level, ARfD=5 mg - sugerowana maksymalna dawka jednorazowa dla osoby wrażliwej / acute reference dose for sensitive individuals

WNIOSKI

1. Największą zawartość wolnej histaminy oznaczono w produktach dla dzieci i niemowląt zawierających w swoim składzie tuńczyka.
2. Uzyskane wyniki badań wskazują na potrzebę wykluczenia tuńczyka jako składnika dań przeznaczonych dla dzieci i niemowląt oraz prowadzenia dalszych badań ukierunkowanych na ocenę ryzyka występowania wolnej histaminy w tych produktach.

A. Czajkowska-Mysiek, J. Leszczyńska

HISTAMINE CONTENT IN FISH-BASED FOOD PRODUCTS INTENDED
FOR INFANTS AND YOUNG CHILDREN

S u m m a r y

The aim of this work was to evaluate the histamine content in selected fish-based food products intended for infants and young children using the RP-HPLC-FLD method. The obtained histamine content in 18 tested products was estimated in the range from $<30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (LOQ) to $429,1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The highest histamine levels were found in meals containing tuna. The level of free histamine in the tested samples was also analyzed in relation to the acute reference dose (ArfD) estimated for sensitive individuals. The presence of the acute reference dose on 0,7 – 5,5% of the ArfD per species like salmon, cod, pollock, pangasius and other sea fish and 8,4 – 15,6% of the ArfD for tuna levels was shown.

PIŚMIENNICTWO

1. *Berthold A., Nowosielska D.*: Aminy biogenne w żywności. *Medycyna Wet.*, 2008; 64 (6): 745-748.
2. *Gawarska H., Sawilska-Rautenstrauch D., Ścieżyńska H., Minorczyk M., Postpułski J.*: Występowanie wolnych amin biogennych: histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny w owocach i warzywach oraz ich produktach. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2012; 45 (3): 105–110.
3. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods, *EFSA Journal*, 2011; 9 (10): 1-93.
4. *Halász A., Baráth A., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W.*: Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Food Sci. Technol.*, 1994; 5:42–48.
5. *Lehane L., Olley J.*: Histamine fish poisoning revisited. *J. Food Microbiol.*, 2000; 58 (1–2): 1–37.
6. *Sawilska-Rautenstrauch D., Fonberg-Broczek M., Gawarska H., Starski A., Jędra M., Karłowski K.*: Występowanie amin biogennych w serach dojrzewających pochodzących z rynku warszawskiego. *Roczn. PZH*, 2010; 61 (4):361–365.
7. *Santos M.*: biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996; 29:213–231.
8. *Czerniejewska B., Surma O., Plust D., Bienkiewicz G.*: Zawartość histaminy w owocach, *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin.*, 2012; 296 (23):5–12.
9. *Cieślak I., Migdał W.*: Aminy biogenne w żywności. *Brom. Chem. Toksykol.*, 2011; 44 (4): 1087–1096.
10. *Frattini V., Lionetti C.*: Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high-performance liquid chromatography Derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of “free” species. *J. of Chromatogr. A.*, 1998; 809: 241–245.
11. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych.
12. Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 609/2013 z dnia 12 czerwca 2012 r. w sprawie żywności przeznaczonej dla niemowląt i małych dzieci oraz żywności specjalnego przeznaczenia medycznego i środków spożywczych zastępujących całodzienną dietę, do kontroli masy ciała oraz uchylające dyrektywę Rady 92/52/EWG, dyrektywy Komisji 96/8/WE, 1999/21/WE, 2006/125/WE i 2006/141/WE, dyrektywę Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/39/WE oraz rozporządzenia Komisji (WE) nr 41/2009 i (WE) nr 953/2009.
13. Procedura Badawcza PS–16 z dnia 19.05.2014 r. „Badanie zawartości histaminy w produktach warzywno-rybnych metodą HPLC-FLD”.
14. WHO Child Growth Standards. Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. *Methods and development*, 2006.