

# Razvoj kromatografske metode za određivanje biogenih amina u tkivu školjkaša

---

Orešković, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:023765>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Ivana Orešković

**RAZVOJ KROMATOGRFSKE  
METODE ODREĐIVANJA  
BIOGENIH AMINA U TKIVU  
ŠKOLJKAŠA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivone Jakaša.

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ivone Jakaša na stručnom vodstvu, nesebičnom prijenosu znanja i iskustva, strpljenju, podršci i utrošenom vremenu tijekom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem mag. ing. Ines Peremin na pomoći, podršci i susretljivosti u laboratoriju te svim suradnicima Laboratorija za analitičku kemiju na ugodnoj radnoj atmosferi.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za analitičku kemiju

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Biotehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Bioproceno inženjerstvo

## RAZVOJ KROMATOGRAFSKE METODE ZA ODREĐIVANJE BIOGENIH AMINA U TKIVU ŠKOLJKAŠA

*Ivana Orešković, univ. bacc.ing. biotechn. 0058206739*

**Sažetak:** Prisutnost biogenih amina u školjkašima i ribi pokazatelj je svježine i kvalitete plodova mora i proizvoda od plodova mora za ljudsku konzumaciju. Cilj ovog rada bio je razviti analitičku metodu za određivanja 6 biogenih amina prisutnih u tkivu modelnog školjkaša, i to u tkivu dagnje te primijeniti razvijenu metodu za praćenje promjena koncentracije biogenih amina u tkivu dagnji pohranjenih kod različitih uvjeta kratkotrajnog skladištenja. U tu su svrhu ispitivani različiti pristupi ekstrakciji biogenih amina iz tkiva dagnji, metodama derivatizacije i separacije derivatizacijskih produkata primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Razvijena metoda primijenjena je za ispitivanje utjecaja uvjeta skladištenja na stvaranje biogenih amina u tkivu dagnji i to pri različitim temperaturama i vremenima skladištenja. Indeks biogenih amina povećao se i s porastom temperature i duljinom skladištenja, dok je temperatura imala daleko veći utjecaj na porast koncentracije biogenih amina od vremena skladištenja pri istim temperaturnim uvjetima.

**Ključne riječi:** *biogeni amini, školjkaši, tekućinska kromatografija, dansil klorid, indeks biogenih amina*

**Rad sadrži:** 65 stranica, 14 slika, 6 tablica, 68 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Ivone Jakaša

**Pomoć pri izradi:** Ines Peremin, mag, ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ivone Jakaša (mentor)
3. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan (član)
4. prof. dr. sc. Damir Iveković (zamjenski član)

**Datum obrane:** 22.09.2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of chemistry and biochemistry  
Laboratory for analytical chemistry

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### DEVELOPMENT OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF BIOGENIC AMINES IN BIVALVE TISSUE

*Ivana Orešković, univ. bacc.ing. biotechn. 0058206739*

**Abstract:** Presence of biogenic amines in seashells, fish and seafood are considered as indicators of spoilage and/or quality of seafood for human consumption. The objective of this study was to develop an analytical method for determination of six biogenic amines present in mussel tissue of a model seashell and to apply this method to monitor changes in biogenic amine concentration during different storage conditions. For this purpose, different approaches for extraction, derivatization and separation of derivatization products by high-performance liquid chromatography was investigated. Developed method was used to investigate how storage conditions influence the development of biogenic amines at different temperatures over various storage times. Biogenic amine index increased as the storage time and temperature increased. Notably, temperature showed to have stronger influence on the increase in biogenic amine concentration compared to storage time under same temperature conditions.

**Keywords:** *biogenic amines, bivalve, liquid chromatography, dansyl chloride, biogenic amine index*

**Thesis contains:** 65 pages, 14 figures, 6 tables, 68 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** Ivone Jakaša, Full professor

**Technical support and assistance:** Ines Peremin, mag. ing.

**Reviewers:**

1. Vlatka, Petravić Tominac, PhD, Full professor (president)
2. Ivone, Jakaša, PhD, Full professor (mentor)
3. Sunčica, Beluhan, PhD, Full professor (member)
4. Damir, Iveković, PhD, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 22.09.2023.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Školjkaši .....	3
2.2. Biogeni amini .....	3
2.3. Metabolički put biogenih amina u školjkama .....	5
2.4. Toksični učinak biogenih amina.....	8
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>15</b>
3.1. Materijali .....	15
3.1.1. <i>Kemikalije</i> .....	15
3.1.2. <i>Mjerni uređaji i aparatura</i> .....	16
3.1.3. <i>Uzorci</i> .....	16
3.2. Metode rada.....	16
3.2.1. <i>Priprema standardnih otopina</i> .....	16
3.2.2. <i>Priprema otopina reagensija</i> .....	17
3.2.3. <i>Priprema tkiva školjkaša</i> .....	18
3.2.4. <i>Optimiranje ekstrakcijskih uvjeta za određivanje biogenih amina iz tkiva dagnji</i> .....	18
3.2.5. <i>Derivatizacija biogenih amina u tkivu dagnji i standardima za kalibraciju</i> .....	20
3.2.6. <i>Uvjeti kromatografske analize</i> .....	22
3.2.7. <i>Praćenje promjene koncentracije biogenih amina u tkivu dagnji promjenom uvjeta skladištenja</i> .....	23
3.2.8. <i>Evaluacija razvijene analitičke metode</i> .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>28</b>
4.1. Identifikacija dansil derivata biogenih amina.....	28
4.2. Optimiranje uvjeta kromatografske analize.....	29
4.3. Optimiranje uvjeta ekstrakcije i kemijske modifikacije biogenih amina .....	33
4.4. Optimiranje derivatizacije biogenih amina u tkivu dagnji i standardima za kalibraciju .....	35
4.5. Evaluacija analitičke metode.....	42
4.5.1. Kalibracija .....	42
4.5.2. Efekt matrice .....	43
4.5.2. Efikasnost ekstrakcije .....	44
4.5.3. Ponovljivost.....	46
4.5.4. Osjetljivost metode (granica detekcije i kvantifikacije) .....	46



4.6. Utjecaj uvjeta skladištenja na razinu biogenih amina u realnim uzorcima .....	47
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>52</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>53</b>

# 1. UVOD

Prisutnost biogenih amina u školjkašima, ribi i ribljim proizvodima pokazatelj je svježine i kvalitete plodova mora i proizvoda od plodova mora za ljudsku konzumaciju. Interes za određivanje biogenih amina je u porastu zbog njihovog utjecaja na ljudsko zdravlje. Dok je niska razina biogenih amina prihvatljiva za ljudsko zdravlje, prekomjerno nakupljanje biogenih amina u ljudskom tijelu može biti toksično za organizam, što može dovesti do ozbiljnih problema za zdravlje opće populacije i sigurnost hrane (Wang i sur., 2021). Biogeni amini su organske baze niske molekulske mase s različitom strukturom; alifatskom, aromatskom i heterocikličkom strukturom (Liu i sur., 2018). Uobičajeni biogeni amini koji se nalaze u hrani i čija se razina koristi kao pokazatelj svježine i kvalitete u najvećem broju proizvoda uključuje 4 biogena amina i to histamin, triptamin, putrescin i kadaverin. Među navedenim biogenim aminima histamin se smatra važnim toksinom jer njegovo nakupljanje može izazvati niz toksičnih učinaka (Arulkumar i sur., 2023). Putrescin i kadaverin imaju niski toksikološki efekt, međutim mogu djelovati kao prekursor kancerogenih N-nitrozamina u prisutnosti nitrita (Qu i sur. 2022).

Biogeni amini u plodovima mora koji su povezani s kvarenjem su putrescin, kadaverin, tiramin i histamin (Lehane i Olley, 2000). Nastaju zbog prisustva bakterija na površini tkiva, koje se raspada, a odgovorne su za dekarboksilaciju odgovarajuće slobodne aminokiseline enzimima endogene dekarboksilaze ili transaminaciju aldehida i ketona pomoću enzima aminokiselinskih transaminaza (Prester, 2011; Park i sur., 2010). Prijevoz morskih plodova i ribe u države koje nemaju vlastiti izvor te skladištenje imaju važnu ulogu u stvaranju biogenih amina. To se posebno odnosi na vrijeme potrebno za prijevoz plodova mora i njihovih proizvoda od mjesta ulova do mjesta proizvodnje te dalje do potrošača te temperaturu njihova skladištenja u skladištima. Povišena temperatura dovodi do postupnog raspadanja proizvoda i posljedično porasta koncentracije biogenih amina (Prester, 2011).

U svrhu zaštite potrošača važno je pratiti kvalitetu prehrambenih proizvoda, pa stoga i razviti pouzdanu analitičku metodu za složenu matricu kao što je tkivo školjkaša. Različita strukturna građa pojedinačnih biogenih amina, niska molekulska masa te apsorpcija UV zračenja i nativna fluorescencija nedovoljno visoka za analitičke svrhe predstavljaju izazov pri razvoju metoda za određivanje biogenih amina u tkivu školjaka (Liu i sur, 2018). Većina objavljenih

analitičkih metoda opisuje istovremeno određivanje do osam različitih biogenih amina u realnim uzorcima životinjskog porijekla (Zhu i sur., 2016) i to mesa (Wojnowski i sur., 2019), umaka od soje (Dong i Xiao, 2017), kobasica i sir (Liu i sur., 2018) te alkoholnih pića kao što su pivo i vino (Fernanda Angulo i sur., 2020; Daniel i sur., 2015; Romano i sur., 2012). S druge strane problem predstavlja i činjenica da je u dosadašnjim istraživanjima fokus većinom bio usmjeren na određivanje histamina (Zhang i sur., 2021) te u manjem opsegu drugih biogenih amina u ribljim proizvodima dok su literaturni podaci koji opisuju analitičke metode za određivanje biogenih amina u školjkašima ograničeni.

Cilj ovog rada je prvenstveno (i) razviti analitičku metodu određivanja pojedinačnih biogenih amina prisutnih u tkivu modelnog školjkaša, i to u tkivu dagnje te primjenom razvijene metode (ii) pratiti promjene koncentracije biogenih amina u tkivu dagnji pohranjenih u različitim uvjetima temperature i vremena kratkotrajnog skladištenja. U dijelu razvoja metoda naglasak će biti na ispitivanje različitih pristupa ekstrakciji biogenih amina iz tkiva dagnji, metodama derivatizacije i separacije derivatizacijskih produkata primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u sprezi s detektorom s nizom dioda. Razvijena metoda bit će podvrgnuta validaciji u svrhu utvrđivanja pouzdanosti i točnosti dobivenih analitičkih rezultata.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Školjkaši

Razred školjkaša (*Bivalvia*) pripada koljenu mekušaca (*Mollusca*). Tijelo im je građeno simetrično, duguljasto smješteno unutar dvije ljušture. Vanjski sloj ljušture je građen od organske tvari konhiolina i kalcijeva karbonata (Wallace i Taylor, 1996).

Školjkaši imaju trup i stopalo, a na kraju tijela imaju škržni i izmetni otvor. Na početku tijela se nalazi usni otvor na koji se nastavlja jednjak i želudac. Plašt obavija tijelo koje izlučuje kalcijeve soli za nastanak ljuštura a sastoji se od trepetljivog epitela. Škrge se nalaze ispod plašta pomoću kojih se odvija izmjena plinova. Nadalje, mišićavo stopalo na donjoj strani plašta služi za prihvaćanje za podlogu i ukopavanje u pijesak (Wallace i Taylor, 1996).

U Jadranskom moru komercijalno se uzgajaju dvije vrste školjkaša: crna dagnja (lat. *Mytilus galloprovincialis*) (slika 1) i europska ravna kamenica (lat. *Ostrea edulis*) (Arapov i sur., 2010).



**Slika 1.** Crna dagnja (lat. *Mytilus galloprovincialis*) (Bohnam i sur., 2017)

### 2.2. Biogeni amini

Biogeni amini koji se prate kao pokazatelji svježine i kvalitete bioaktivne su organske molekule niske molekulske mase.

Nastaju dekarboksilacijom aminokiselina ili aminacijom i transaminacijom aldehida i ketona tijekom metaboličkih procesa (Özogul i Özogul, 2019). Spojevi koji se smatraju biogenim aminima moraju biti proizvedeni u živim organizmima i sadržavati barem jednu amino skupinu (Koller, 2020).

Prema kemijskoj strukturi, biogeni amini se dijele na alifatske (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatske (tiramin, feniletilamin) i heterocikličke (histamin i triptamin) amine (Özogul i Özogul, 2019) (slika 2).

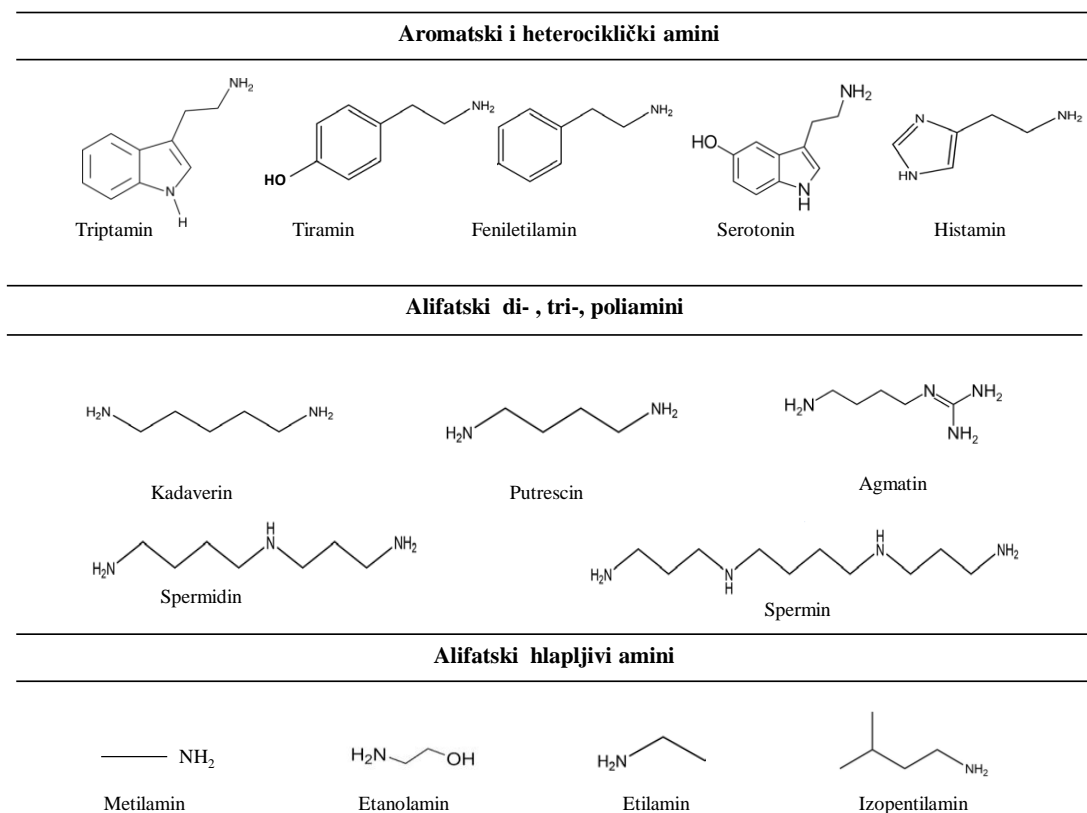
Aromatski i heterociklički amini razlikuju se u strukturi svojih prstena. Aromatski amini (feniletilamin i tiramin) imaju benzenski prsten, dok heterociklički amini (histamin i triptamin) imaju modificiranu strukturu prstena: dvostruki prsteni i/ili prsteni u kojem je jedan ili više ugljikovih atoma supstituiran s dušikom. Alifatski amini su acikličke molekule, ali se razlikuju po broju amino skupina. Na temelju broja amino skupina u njihovoj strukturi klasificiraju se kao monoamini (feniletilamin i tiramin), diamini (kadaverin, putrescin) te poliamini (spermidin i spermin) (Spano i sur., 2010).

Alifatski nehlapljivi amini (putrescin, kadaverin, spermin) imaju dvije ili više amino skupina, dok alifatski hlapljivi amini (npr. etilamin, metilamin) sadrže jednu ili dvije amino skupine te su kraćih lanaca od prethodno spomenutih, što ih čini puno hlapljivijim (Koller, 2020).

Alifatske amine karakterizira intenzivni, odbojni miris i niski tlak para (Zeisel i DaCosta, 1986). Biogeni amini manje su topljivi u vodi od aminokiselina iz kojih nastaju enzimskom pretvorbom. Zbog ove karakteristike navedeni amini su hlapljivi i imaju jak, neugodan miris. Posebno kadaverin i putrescin, karakterističnog su mirisa raspadajućeg mesa i mesa koje trune (Koller, 2020).

Amini se mogu podijeliti na endogene i egzogene. U endogeno nastale amine ubrajaju se neurotransmiteri koji se proizvode u tkivima organizma. Ova skupina uključuje kateholamine (dopamin, epinefrin i norepinefrin), indolamini (serotonin, melatonin i 5-hidroksitriptamin) i histamini. Prisutni su u mesu, ribi i voću i igraju važnu ulogu u tijelu kao neurotransmiteri (Wojcik i sur., 2020). Egzogeno nastali amini mogu biti rezultat aktivnosti dekarboksilaze fermentacijske mikroflore (Wojcik i sur., 2020). Nazvani su prema aminokiselinama iz kojih su nastali. Putrescin, kadaverin, spermidin i spermin reguliraju funkciju nukleinskih kiselina, sintezu proteina i stabilizaciju membrana u živim stanicama. Međutim, prisutnost biogenih amina u hrani povezana je s mikrobnom aktivnošću (Spano i sur., 2010). Najčešći biogeni

amini u plodovima mora povezani s kvarenjem su histamin, tiramin, putrescin i kadaverin (Lehane i Olley, 2000).



**Slika 2.** Podjela biogenih amina prema kemijskoj strukturi (Izrađeno prema Erdag i sur., 2019)

### 2.3. Metabolički put biogenih amina u školjkama

Biogeni amini prirodno su prisutni u niskim koncentracijama u školjkašima, a mogu nastati i sintezom amonijaka i transaminacijom aldoza i ketoze kao sporednim reakcijama u glavnim metaboličkim putevima (Francisco i sur., 2019).

Tijekom razgradnje morskih plodova proizvode se različite koncentracije biogenih amina. Gram-negativne bakterije smatraju se dominantnim bakterijama koje proizvode biogene amine u ribama, glavonošcima i školjkama (Serratore i sur., 2021). Biogeni amini se u

školjkašima proizvode dekarboksilacijom odgovarajućih slobodnih aminokiselina katalitičkim djelovanjem mikrobnih dekarboksilaza specifičnih za supstrat kod čega dolazi do uklanjanja  $\alpha$ -karboksilne skupine iz molekule aminokiselina dajući odgovarajuće amine (Liu i sur., 2018).

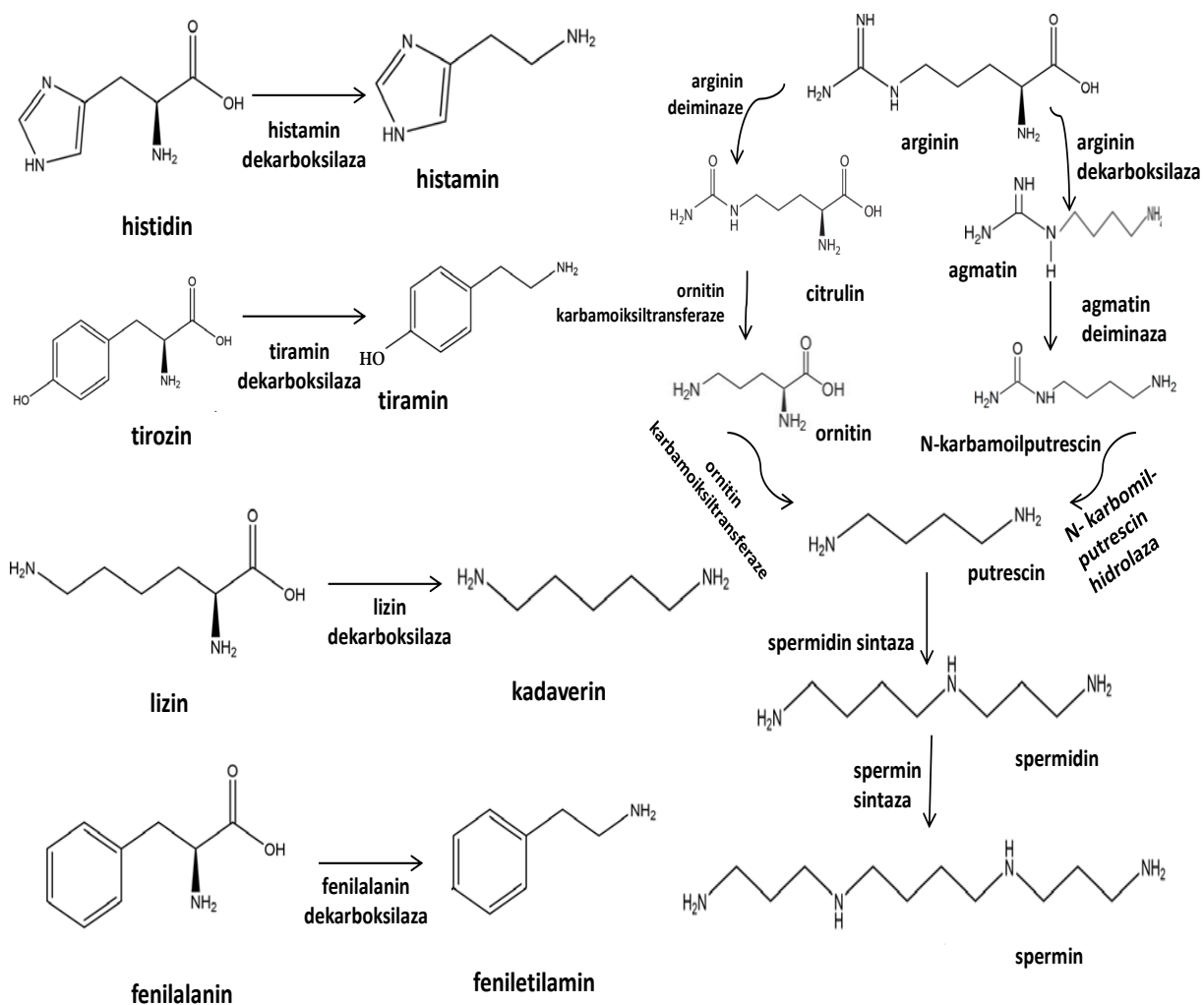
Ribljí mišić prirodno je bogat slobodnim aminokiselinama, a sadržaj se može povećati i nakon smrti. Pokazano je da nastajanje aminokiselina ovisi o sezoni berbe i aktivnosti hranjenja prije hvatanja. Na primjer, riba ulovljena tijekom ljeta ili u sezoni hranjenja brzo oslobađa velike količine lizina i arginina (Flick, 2005). Proces dekarboksilacije može se odvijati kroz dva biokemijska puta: posredovanjem endogenih enzima dekarboksilaza koji se prirodno pojavljuju u ribama ili školjkama, ili egzogenih enzima koje oslobađaju različiti mikroorganizmi povezani s morskim plodovima, međutim, endogena proizvodnja diamina beznačajna je u usporedbi s egzogenim putem (Flick, 2005).

U istraživanju sastava biogenih amina u ribi i ribljim proizvodima Park i sur. (2010) navode da osim dekarboksilacijom aminokiselina biogeni amini nastaju i transaminacijom aminokiselina, aldehida, ketona enzimima aminokiselinskim transaminazama. Metabolički put biogenih amina prikazan je na slici 3.

Uvjeti za tvorbu biogenih amina djelovanjem mikroorganizama su: dostupnost slobodnih aminokiselina, prisutnost mikroorganizama koje proizvode enzim dekarboksilazu i uvjeti koji omogućuju rast bakterija, sintezu dekarboksilaze i aktivnost dekarboksilaze (Spano i sur., 2010). Aktivnost dekarboksilaza se pojačava u prisutnosti fermentirajućih ugljikohidrata, kao što je D-glukoza (Waqas i sur., 2019).

Faktori koji utječu na kontrolu uvjeta za nastajanje biogenih amina su temperatura, pH vrijednost, koncentracija soli i vrijeme. Prije pojave hladnjaka, riba i morski plodovi su se usoljavali i skladištili do nekoliko mjeseci kako bi se spriječilo kvarenje. Dodatkom povećane koncentracije soli smanjuje se aktivnost dekarboksilaza mikroorganizma, a time i nakupljanje biogenih amina (Waqas i sur., 2019; Gardini i sur., 2016). Metode poput hlađenja također inhibiraju nakupljanje biogenih amina, ali studije pokazuju da neke bakterije proizvode biogene amine čak i pri temperaturi nižoj od 5 °C (Naila i sur., 2010). Primjena aditiva i konzervansa u hrani također može odgoditi sintezu biogenih amina, primjerice, natrijev sorbat odgađa stvaranje biogenih amina, dok dodatak 2 % natrijeva heksametafosfata odgađa proizvodnju histamina. Kapsaicin, kurkumin i piperin prirodni su aditivi izolirani iz začina crvene paprike, kurkume i crnog papra za koje je pokazano da inhibiraju nastajanje biogenih

amina (Naila i sur., 2010). U svježoj ribi nalazi se oko 1 g histidina na 100 g tkiva tune, rjeđe se nalazi u obliku histamina, ali njegova razina raste s napredovanjem raspadanja tkiva ribe (Jeya Shakila i sur., 2003).



**Slika 3.** Metabolički put biogenih amina u školjkašima (Izrađeno prema Francisco i sur., 2019)

Aerobni i anaerobni uvjeti imaju ulogu u razvoju biogenih amina, pa je tako pokazano da prisustvo kisika inhibira stvaranje biogenih amina (Waqas i sur., 2019).



## 2.4. Toksični učinak biogenih amina

Visoke koncentracije biogenih amina mogu uzrokovati intoksikaciju, poremećaje mišićnog i živčanog sustava. Najčešći simptomi kod ljudi koji se pojavljuju su: osip, glavobolja, mučnina, hipo- i hipertenzija, srčana opalpacije, moždana krvarenja, anafilaktički šok (Innocente i sur., 2007).

Trovanje histaminom je trovanje hranom koje može biti uzrokovano konzumiranjem ribe koja sadrži visoku koncentraciju slobodnog histamina u mišićnim tkivima. S trovanjem histaminom često se povezuju skombroidne ribe iz obitelji *Scomberesocidae* i *Scombridae*, koje uključuju tunu. Egzogeni histamin je produkt dekarboksilacije histidina mišićnog tkiva koji javlja se kod riba. Budući da visoke razine histamina mogu nastati u ribama s dobrim organoleptičkim svojstvima, svježja riba može također sadržavati histamin kao i pokvarena riba (Zhernov i sur., 2023). Međutim, intoksikacija histaminom najčešće se razvija nakon konzumiranja pokvarene ribe (Zhernov i sur., 2023). Za razliku od riba, kod školjkaša i glavonošaca povećanje koncentracije histamina je daleko niže, pa trovanje histaminom nije povezano s njihovom konzumacijom (Prester i sur., 2010). Histamin se primarno metabolizira kod ljudi pomoću enzima diamin oksidaze i histamin-N-transferaze (Maintz i Novak, 2007). Kadaverin i putrescin smatraju se pojačivačima toksičnosti histamina, što može objasniti nedostatak toksičnosti čistog histamina u studijama oralne primjene kod ljudi (FAO, 2012). Kao dokaz njihovog doprinosa pojačanju toksičnosti, pokazano je da kadaverin i putrescin inhibiraju diamin oksidaze i histamin N-transferaze u modelu jejunuma štakora (Taylor i Lieber, 1979) što dovodi do nakupljanja histamina. U drugoj *in vivo* studiji provedenoj na štakorima, prisutnost i kadaverina i putrescina povećala je količinu nemetaboliziranog histamina (Hui i Taylor, 1985). Minimalna razina kadaverina ili putrescina koja potencira toksičnost histamina je nepoznata. Omjer kadaverina ili putrescina i histamina koji je potreban da izazove učinak ne mora biti visok, ali nije jasno jesu li njihove razine prisutne u pokvarenoj ribi dovoljne da pojačaju toksičnost histamina kod ljudi. Kuhanje, konzerviranje ili zamrzavanje ne može smanjiti razine histamina, jer je ovaj spoj stabilan pri visokim temperaturama (Visciano i sur., 2014).

Osim histamina, tiramin prisutan u ribi, mesu, ribljim namirnicama može uzrokovati nekrozu crijevnih stanica. Tiramin se proizvodi iz aminokiseline tirozina pomoću enzima tirozin dekarboksilaze i metabolizira ga monoamino oksidaza. Konzumirani tiramin nema štetnih učinaka na ljudsko zdravlje budući da stijenka crijeva i jetra uključuju monoamino oksidazu,

enzim koji metabolizira tiramin u manje aktivnu *p*-hidroksilfeniloctenu kiselinu (Özogul i Özogul, 2019). S druge strane, kada se unese u visokim koncentracijama hranom ili kod pacijenata liječenih lijekovima inhibitorima monoaminooksidaze, detoksikacija tiramina može biti neadekvatna i dovesti do oslobađanja noradrenalina iz živčanog sustava. Enzim monoaminooksidaza, deaminira amine koji potječu iz hrane i igra ulogu u njihovoj razgradnji prije nego što dopiju u krv. Korištenjem lijekova za liječenje depresije, inhibitorima monoaminooksidaze, onemogućavaju proces detoksikacije te može doći do nakupljanja tiramina u krvi u visokim koncentracijama što rezultira hipertenzijskom krizom za pacijenta (Smith i Durack, 1978).

## 2.5. Analitičke metode određivanja biogenih amina

Određivanje biogenih amina je kompleksno zbog različite kemijske strukture pojedinih amina, a ujedno su u matrici prisutni u vrlo niskim koncentracijama (An i sur., 2015). Najčešće tehnike separacije koje se primjenjuju za određivanja biogenih amina u hrani su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC), kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*, CE), ionska kromatografija (engl. *ion chromatography*, IC), tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*, TLC) i plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) (An i sur., 2015). Zbog visoke osjetljivosti i rezolucije, tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) postala je važna metoda za određivanje biogenih amina. Najčešće korišteni detektori uključuju detektor za mjerenje apsorpcije elektromagnetskog zračenja u ultraljubičastom području (engl. *ultraviolet detector*, UVD) i detektor emisije fluorescencije (engl. *fluorescence detector*, FLD) (Sagaratini i sur., 2012). Posljednjih je godina HPLC u sprezi s spektrometrijom masa (engl. *mass spectrometry*, MS) postao važna tehnika u analizi biogenih amina (Sagaratini i sur., 2012). Prednost primjene spektrometrije masa u odnosu na tzv. klasične načine detekcije (UVD i FLD) očituje se kroz jednostavniju pripremu uzorka u kojem nije potrebno provesti korak derivatizacije, odnosno kemijske modifikacije biogenih amina u kemijski oblik pogodan za detekciju pomoću UVD ili FLD (Sagaratini i sur., 2012). Ipak, treba napomenuti da važnu prepreku za korištenje spektrometrije masa za detekciju biogenih amina u hrani predstavljaju daleko veći troškovi nabave i održavanja opreme, ali i dodatno nezadovoljavajuća ionizacija u MS-u (Pataca i sur., 2021; David i sur., 2020). Zbog navedenoga se HPLC reverznih faza u sprezi s detektorom s nizom dioda (RP-HPLC-DAD)

smatraju dovoljno osjetljivim metodama, pa su i najčešće metode izbora za određivanje biogenih amina u hrani (Munir i Badri, 2020; Liu i sur., 2018; An i sur., 2015). Nasuprot detektoru s nizom dioda, fluorescencijski detektori pokazuju veći odziv detektora, odnosno osjetljivost te time postižu i znatno niže vrijednosti granice detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i granice kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) za spojeve od interesa (Plenis i sur., 2019).

Za određivanje biogenih amina u hrani primjenom RP-HPLC-DAD potrebno je prije same kromatografske analize biogene amine izdvojiti, odnosno ekstrahirati pogodnim otapalima iz matrice hrane, ekstrakt pročistiti te prisutne amine derivatizacijom prevesti u oblik pogodan za detekciju, a po potrebi ponovo ekstrahirati u hlapljivo otapalo i ukoncentrirati (Fu i sur., 2016). Druga svrha derivatizacije amina je nastanak nepolarnih ili manje polarnih hlapljivih spojeva, jer jako polarni amini imaju tendenciju zadržavanja u koloni i mogu izazvati tzv. „efekt pamćenja” (An i sur., 2015). Efekt pamćenja, izraz poznat i kao „*carry-over*“ opisuje slučaj poznat u kromatografiji u kojem se analiti iz prethodne analize, koji su se zadržali u koloni, pojavljuju u sljedećoj analizi.

Što se tiče metoda izdvajanja biogenih amina iz matrice hrane, glavne su metode koje se primjenjuju ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction*, SPE), ekstrakcija između dviju tekućih faza (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE) i ekstrakcija između dviju tekućih faza potpomognuta isoljavanjem (engl. *salting-out liquid-liquid extraction*, SALLE) (Francisco i sur., 2019; Fu i sur., 2016). Iako je SPE, kao i druge vrste ekstrakcije temeljene na SPE, široko upotrebljavana metoda za pročišćavanje uzoraka i izolacije biogenih amina, ponekad je potreban i dodatak specifičnih kemijskih spojeva kako bi se osiguralo uklanjanje potencijalnih interferenata kao što su lipidi, proteini i polifenoli. Međutim, ovi spojevi imaju slične strukture kao biogeni amini, što može predstavljati problem kod derivatizacije, što posljedično otežava kvantifikaciju i detekciju biogeni amini. Kemijski spojevi koje se obično dodaju su trikloroctena kiselina (TCA), etil acetat, klorovodična kiselina, perklorna kiselina, dietil eter i polivinilpirolidon čime su smetnje matrice, do određene mjere, svode na minimum (Neofotistos i sur., 2018). Tradicionalne metode ekstrakcije otapalom ne da zahtijevaju samo veliki volumen organskih otapala, već i više uzastopnih ekstrakcija, pročišćavanje zbog uklanjanja lipida, proteina, bojila, te ukoncentriravanje radi povećanja relativne količine analita u odnosu na volumen otapala. Sve navedeno zahtjeva dugo vrijeme pripreme uzorka, a ujedno je takav pristup i ekološki neprihvatljiv. Organska otapala nisu pogodna zbog snažnog polarnog karaktera biogenih amina, pa će ekstrakcija rezultirati većom topljivosti u vodi u

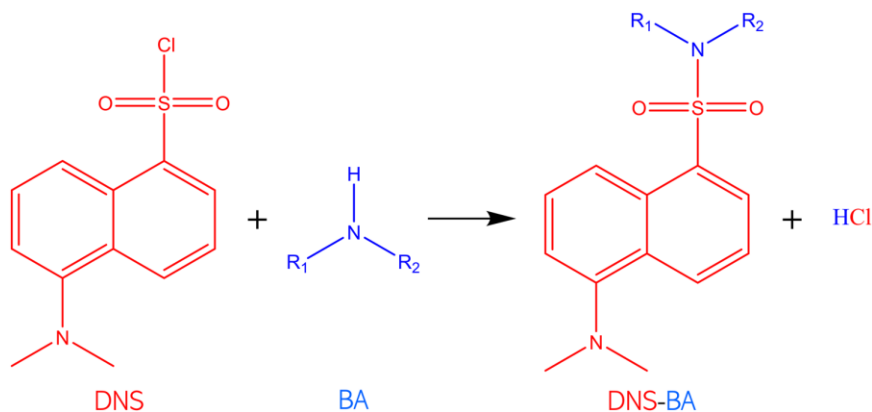
odnosu na organska otapala. Drugi razlog neefikasnosti tradicionalne ekstrakcije je složenost matrice u kojoj se nalaze brojni interferenti, ali i istodobna prisutnost različitih biogenih amina u različitim koncentracijama (Pataca, 2021). Jedan od novijih pristupa za ekstrakciju biogenih amina iz ribe, a koji smanjuje vrijeme i potrošnju reagensija za pripremu uzorka temelji se na tzv. QuEChERS pristupu. QuEChERS je tip disperzivne ekstrakcije na čvrstoj fazi (dSPE) i skraćeni je naziv za brzu, jednostavnu, jeftinu, efikasnu, robusnu i sigurnu metodu za pripremu uzorka za analizu (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (Guo i sur., 2022). Ekstrakcija QuEChERS sustavom pripreme uzorka provodi se u organskom otapalu. Nakon provedene ekstrakcije u uzorak se dodaju soli kako bi se potaknulo odvajanje organske faze. Zatim slijedi korak pročišćavanja organske faze dodatkom sorbenta za uklanjanje vode i tvari koje su se ekstrahirale zajedno s aminima. Nakon centrifugiranja gornja faza se izuzme i podvrgne postupku derivatizacije. Ekstrakcija otapalom potpomognuta isoljavanjem ima prednost u usporedbi s drugim tehnikama ekstrakcije, budući da je brža i koristi se manji volumen organskog otapala nego kod ekstrakcije između dviju tekućih faza, a ujedno je isplativije od ekstrakcije na čvrstoj fazi (Francisco i sur., 2019). Prema podacima iz dostupne literature, izravna ekstrakcija biogenih amina vodenim otopinama jakih kiselina iz tkiva ribe metoda je izbora. Uzorci krute hrane (npr. riba, meso, sir, kobasice, povrće) za HPLC i kapilarnu elektroforezu često se otapaju u kiselim otopinama (0,1 – 0,6 M) trikloroetane, perklorne ili klorovodične kiseline kako bi se ujedno istaložili i uklonili proteini (Blondin Tsafack i Tspomo, 2022).

Derivatizacija je kemijska modifikacija analita (koji imaju nisku apsorpciju zračenja u UV području kada se za detekciju analita koristi UV detektor) kemijskim i fizikalnim metodama s ciljem povećanja osjetljivosti metode (David i sur., 2020; Pataca, 2020). Kriteriji za odabir reagensa za derivatizaciju s analitom su: selektivnost prema funkcijskoj skupini analita, koncentracija analita u matrici, metoda određivanja ciljanog spoja, broj moguće proizvedenih derivata, kinetički aspekti i reakcijski mehanizmi derivatizacije (David i sur., 2020).

Derivatizacija se može provesti na više načina ovisno o vrsti uzorka kao što su: *in situ* derivatizacija, derivatizacija s ekstrakcijom između dviju tekućih faza ili ekstrakcija između krute i tekuće faze s derivatizacijom (David i sur., 2020). Derivatizacija s ekstrakcijom između dviju tekućih faza provodi se *in situ* derivatizacijom na način da se nakon derivatizacije u izvornom uzorku provede ekstrakcija derivata analita u pogodno otapalo. (David i sur., 2020). Ekstrakcija između krute i tekuće faze s derivatizacijom također se odvija u jednom koraku, a ekstrakcija i derivatizacija odvijaju se na čvrstoj fazi ili na

međupovršini između tekuće i čvrste faze (Atapattu i Rosenfeld, 2013). Ukoliko se provodi prvo ekstrakcija amina iz matrice te nakon toga se odvija reakcija derivatizacije povećava se vjerojatnost pogreške i gubitak analita u uzorku prije određivanja biogenih amina odabranom analitičkom metodom (Francisco i sur., 2019). Kako bi se izbjegle greške može se provoditi *in situ* derivatizacija. Može se općenito primijeniti na analite male molekulske mase ili na hidrofilne spojeve (David i sur., 2020). Ponekad se radi predpriprema kod složenih matrica u smislu uklanjanja proteina i ostalih eventualnih interferenata (Zhong i Zhou, 2019). Klasičan reagens za *in situ* derivatizaciju je 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH), poznat kao Bradyjev reagens, koji se koristi za derivatizaciju karbonilnih spojeva koji slabo apsorbiraju u UV području. Derivati nastali reakcijom kondenzacije snažno apsorbiraju UV zračenje i poboljšavaju osjetljivost određivanja. Ovaj je reagens topljiv u uobičajenim otapalima koji se koriste za pripremu mobilne faze, acetonitrilu, metanolu ili etanolu, a reakcija se odvija uz prisustvo kiseline (David i sur., 2020). Izravnu derivatizaciju ekstrakta ekstrahiranih kiselina je uspješno koristio niz autora za prehrambene matrice s relativno niskim sadržajem slobodnih aminokiselina kao što su meso, riba i povrće (Innocente i sur., 2007). Za određivanje biogenih amina u morskim organizmima do 2020. godine postoji mnogo istraživanja u kojima derivati biogenih amina najčešće nastaju reakcijom amina s derivatizacijskim reagensima kao što su dansil klorid (DNS-Cl), *o*-ftaldialdehid (OPA), benzoil klorid ili dabsil klorid (DBS-Cl) (Liu i sur., 2018). Dabsil klorid nije prikladan za određivanje biogenih amina HPLC metodom jer nastali derivati nisu stabilni (Liu i sur., 2018). U usporedbi s drugim reagensima za derivatizaciju, derivati dansil klorida su stabilniji, metode koje se temelje na nastajanju dansil derivata su osjetljivije, točnije i preciznije. 5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil klorid (DNS-Cl) je reagens koji se koristi u biokemijskim metodama za analizu spojeva koji sadrže amino skupinu (Mantonanelli i sur., 2020). Derivatizacija s dansil kloridom ima prednost jer omogućuje UV detekciju (kod 254 nm) i brzo vrijeme elucije pri tome koristeći jednostavan gradijentni program eluiranja koji se sastoji od vode i acetonitrila ili metanola dok derivatizacija *o*-ftaldialdehidom (OPA) predstavlja dobar izbor kada se istovremeno određuju slobodni amini i aminokiseline, ali zahtijeva i dulje vrijeme eluiranja (Innocente i sur., 2007). OPA reagens reagira samo s primarnim aminima i derivati nisu jako stabilni (Fu i sur., 2016). Još jedna prednost dansil klorida je što formira derivate s primarnim i sekundarnim aminima, a nastali derivati su stabilni kroz dulje vrijeme čak i na sobnoj temperaturi (Sagrati, 2012).

Kako je već navedeno, dansil klorid je reagens za derivatizaciju biogenih amina koji reagira s primarnim i sekundarnim amino skupinama (Francisco i sur., 2019). Dansil klorid je aromatski ugljikovodik naftalen koji u svojoj strukturu sadrži sumpor i fluorescentnu kemijsku skupinu. Pojava fluorescencije je rezultat nastajanja derivata (boja samog reagensa nije fluorescentna) vezanjem na amino skupine aminokiselina, ali se koristi i za obilježavanje biogenih amina (Koller, 2020). Kemijska reakcija između dansil klorida i amina u kojoj nastaju sulfoamid i klorovodična kiselina prikazan je na slici 4 (Silva, 2005).



**Slika 4.** Reakcija derivatizacije biogenog amina reagensom dansil kloridom (Mantonanelli i sur., 2020)

S obzirom da je kinetika reakcija biogenih amina s dansil kloridom relativno spora, reakcije se izvode kod povišene temperature, što onemogućuje primjenu derivatizacije s dansil kloridom nakon separacije biogenih amina u izvornom kemijskom obliku u kromatografskoj koloni, a prije detekcije. Zbog toga je derivatizaciju biogenih amina potrebno provesti prije same separacije. Temperatura i vrijeme dva su važna obrnuto povezana parametra koji utječu na izvođenje reakcije derivatizacije amina s dansil kloridom. Derivatizacijom kod povišene temperature skraćuje se vrijeme potrebno za derivatizaciju, pri čemu treba voditi računa da previsoka temperatura može smanjiti stabilnost nastalih dansil derivata (Silva, 2005). pH vrijednost je najznačajniji čimbenik koji utječe na dansilaciju amina. Reakcija se odvija u lužnatom mediju koji, osim temperature, pridonosi ubrzavanju reakciju derivatizacije. Preveliki suvišak dansil klorida i nastale dansil sulfonske kiseline može interferirati prilikom detekcije derivata jer mogu eluirati zajedno s derivatima od interesa (Silva, 2005). Stoga se često za uklanjanje suviška dansil klorida i nastale dansil sulfonske kiseline dodaju prolin, natrijev glutamat, amonijak ili metilamin (Silva, 2005). Reakcijom dansil klorida i amonijaka

nastaje produkt DNS-NH<sub>2</sub> (Yu i sur., 2020). Isto tako kada suvišak dansil klorida reagira s aminokiselinama kompetitivnom reakcijom nastaju derivati aminokiselina. Cilj korištenja sredstava za uklanjanje suviška dansil klorida je minimalizirati nusprodukte dansilacije koji bi mogli interferirati s derivatima od interesa (Stephens, 1986).

Prednost korištenja dansil klorid u odnosu na druge reagense za određivanje amina primjenom tekućinske kromatografije je mogućnost određivanja i sekundarnih amina, nastali derivati su stabilniji te se može se koristiti više sustava detekcije, i to UVD i FLD (Silva, 2005).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

Sve kemikalije korištene u ovom radu naveden su u tablici 1. Za pripremu otopina korištena je ultra-čista voda proizvedena na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

**Tablica 1.** Popis kemikalija korištenih za izradu rada

KEMIKALIJA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Natrijev karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	<i>p.a.</i>	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	<i>p.a.</i>	
Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )	96 %	
Perklorna kiselina ( $\text{HClO}_4$ , 70%)	96 %	
Magnezijev sulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	96,6 %	Lachner, Češka
Heksan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ )	$\geq 99$ %	
Heksan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ )	$\geq 99$ %	
Cikloheksan ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ )	$\geq 99$ %	
Diklormetan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )	$\geq 99$ %	
Natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ )	99,96 %	
L- prolin ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$ )	$\geq 99$ %	Sigma-Aldrich, SAD
1,7diaminoheptan ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_7\text{NH}_2$ )	98 %	
Kadaverin dihidroklorid ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2 \cdot 2 \text{HCl}$ )	$\geq 99$ %	
Spermin tetrahidroklorid ( $\text{C}_{10} \text{H}_{26}\text{N}_4 \cdot 4\text{HCl}$ )	$\geq 99$ %	
Spermidin trihidroklorid ( $\text{C}_7\text{H}_{19}\text{N}_3 \cdot 3\text{HCl}$ )	$\geq 98$ %	
Tiramin hidroklorid ( $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ )	$\geq 98$ %	
2-feniletilamin hidroklorid ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ )	$\geq 99$ %	
Putrescin dihidroklorid ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$ )	$\geq 99$ %	
Histamin dihidroklorid ( $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3 \cdot 2\text{HCl}$ )		
Aceton ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ )	$\geq 99$ %	Merck, Njemačka
Kloroform ( $\text{CHCl}_3$ )	$\geq 99$ %	
Toluen ( $\text{C}_7\text{H}_8$ )	$\geq 99$ %	
Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )	99,8 %	
5-(dimetilamin)naftalin-1-sulfonil klorid ( $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClNO}_2\text{S}$ )	$\geq 99$ %	Thermo Fisher Scientific, SAD
Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )	99,9 %	Fisher Scientific, SAD



### ***3.1.2. Mjerni uređaji i aparatura***

Uzorci su analizirani na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti Agilent Technologies 1100 series opremljen binarnom pumpom, automatskim uzorkivačem, sustavom za otplinjavanje mobilne faze i detektorom s nizom elektroda (DAD) (Agilent, SAD). Za održavanje temperature kromatografske kolone korišten je Jones Chromatography grijač Model 7981 (Jones Chromatography, SAD). Za pripremu uzoraka korištena je sljedeća aparatura: centrifuga Mikro 220 (Hettich GmbH, Njemačka) i mini centrifuga IKA mini G (IKA- Werke GmbH & Co. KG, Njemačka), analitička vaga (A&D Instruments Ltd, Japan), mješač IKA vibrax- VXR Model 2200 (IKA works Inc, SAD), vakuum koncentrador (Eppendorf, Velika Britanija) i termoblok MBT 250 (ETG, Njemačka).

### ***3.1.3. Uzorci***

Za optimiranje uvjeta ekstrakcije, derivatizacije i kromatografske analize korišten je modelni organizam školjke dagnje iz razloga što je lako dobavljiva u većim količinama potrebnim u postupku razvoja i validacije analitičkog postupka i to kao neobrađena (sirova i dostupna na lokalnoj tržnici ribe) i kao obrađena (smrznuta i prethodno toplinski obrađena te dostupna u lokalnim trgovinama hrane).

Za istraživanje uvjeta kvarenja kod različitih temperatura, vremenskih perioda i validacije razvijene analitičke metode korištena je neobrađena školjka dagnje (sirova te dostupna na lokalnoj tržnici ribe) koja je prenesena u laboratorij na ledu.

## **3.2. Metode rada**

### ***3.2.1. Priprema standardnih otopina***

Ishodne otopine biogenih amina pripremljene su otapanjem njihovih hidroklorida odgovarajuće odvage u 10 mL ultra-čiste vode sljedećih masenih koncentracija:  $\gamma$ (kadaverin) = 4,01 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (putrescin) = 4,01 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (spermin) = 4,01 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (spermidin) =

4,29 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (histamin) = 4,01 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (tiramin) = 4,00 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (feniletilamin) = 4,30 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (1,7 diaminoheptan) = 5,23 mg mL<sup>-1</sup>.

Radna otopina smjese biogenih amina pripravljena je razrjeđivanjem ishodnih otopina u 10 mL ultra-čiste vode u kojoj su masene koncentracije iznosile:  $\gamma$ (kadaverin) = 0,25 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (putrescin) = 0,68 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (spermin) = 0,56 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (spermidin) = 0,52 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (histamin) = 0,32 mg mL<sup>-1</sup>,  $\gamma$ (tiramin) = 1,60 mg mL<sup>-1</sup> i  $\gamma$ (feniletilamin) = 0,08 mg mL<sup>-1</sup>.

Za konstruiranje baždarnog dijagrama pripravljene su standardne otopine biogenih amina različitih koncentracija u vodi, perklornoj kiselini i supernatantu školjke sukcesivnim razrjeđivanjem radne otopine u ultra-čistoj vodi u koncentracijskom rasponu: 5,36 – 1371,40 ng mL<sup>-1</sup> za kadaverin, 14,06 – 3599,92 ng mL<sup>-1</sup> za putrescin, 11,72 – 2999,93 ng mL<sup>-1</sup> za spermin, 10,75 – 2750,92 ng mL<sup>-1</sup> za spermidin, 6,53 – 1671,39 ng mL<sup>-1</sup> za histamin, 33,40 – 8549,85 ng mL<sup>-1</sup> za tiramin i 1,80 – 459,55 ng mL<sup>-1</sup> za feniletilamin.

Alikvoti pripremljenih razrijeđenih otopina biogenih amina i radne otopine pohranjeni su na -18 ° C do analize.

Na dan analize standardne otopine su ostavljene na sobnoj temperaturi do potpunog otapanja

### **3.2.2. Priprema otopina reagensija**

Otopine natrijeva hidrogenkarbonata, masene koncentracije,  $\gamma = 20$  mg mL<sup>-1</sup>, natrijeva karbonata, množinske koncentracije  $c = 2$  mol L<sup>-1</sup> i kalijeva hidroksida, množinske koncentracije  $c = 0,88$  mol L<sup>-1</sup>, pripravljene su u ultra-čistoj vodi. Otopina prolina masene koncentracije  $\gamma = 100$  mg mL<sup>-1</sup>, pripravljena je u ultra-čistoj vodi. Ishodna otopina unutarnjeg standarda (IS) 1,7 diaminoheptana masene koncentracije  $\gamma = 5,23$  mg mL<sup>-1</sup> pripremljen je u ultra-čistoj vodi. Radna otopina unutarnjeg standarda čija je masena koncentracija iznosila 0,33 mg mL<sup>-1</sup> pripravljena je razrjeđivanjem ishodne otopine u ultra-čistoj vodi. Otopine derivatizacijskog reagensa dansil klorida pripravljene su na više koncentracijskih razina u acetonu u svrhu optimiranja derivatizacijskog postupka (opisano u poglavlju 3.2.5.). Otopina derivatizacijskog reagensa pripravljena je u svakom danu provođenja derivatizacijskog postupka.

### ***3.2.3. Priprema tkiva školjkaša***

Tkivo sirovih neobrađenih dagnji na ledu je odvojeno od ljuštore odmah nakon dopreme s lokalne tržnice i mehanički je usitnjeno i homogenizirano u mehaničkoj kuhinjskoj miješalici. Tkivo zamrznutih toplinski obrađenih dagnji kupljenih u lokalnoj trgovini hrane također je mehanički homogenizirano u mehaničkoj kuhinjskoj miješalici. Homogenizirane smjese su podijeljene na manje odvage i pohranjene na  $-18^{\circ}\text{C}$  do analize.

### ***3.2.4. Optimiranje ekstrakcijskih uvjeta za određivanje biogenih amina iz tkiva dagnji***

S obzirom da je u literaturi opisano više postupaka ekstrakcije biogenih amina iz uzoraka hrane, za izbor najpogodnije metode izabrana su četiri pristupa za testiranje, a koji su i dodatno modificirani. Prva metoda je bila ekstrakcija „kruto-tekuće“ temeljena na tzv. QuEChERS sustavu pripreme uzorka u koje su se nakon provedene ekstrakcije u tekuće otapalo dodala sol kako bi se potaklo odvajanje organske faze. Organska faza se pročistila dodatkom sorbenta za uklanjanje vode i tvari koje su se ekstrahirale zajedno s biogenim aminima. Nakon centrifugiranja izuzela se gornja faza i podvrgnula postupku derivatizacije dansil kloridom. Druga metoda ekstrakcije biogenih amina iz tkiva dagnji nakon derivatizacije reagensom dansil kloridom bila je ekstrakcija organskim otapalima. Odvojena organska faza se uparila u struji dušika. Treća metoda se temeljila na ekstrakciji biogenih amina iz tkiva dagnji vodenom otopinom jake kiseline nakon koje je slijedio postupak derivatizacije dansil kloridom. Četvrta metoda se temeljila na ekstrakciji biogenih amina iz tkiva dagnji vodenom otopinom jake kiseline nakon koje je slijedio postupak derivatizacije dansil kloridom i zatim druga ekstrakcija derivata dansil klorida u pogodno organsko otapalo.

#### ***3.2.4.1. Ekstrakcija temeljena na tzv. QuEChERS sustavu***

Za ekstrakciju biogenih amina iz realnih uzoraka, u epruvetu od 15 mL odvagano je 1 g prethodno homogeniziranog i smrznutog tkiva dagnji i dodano je 1 mL acetonitrila. Zatim je dodano točno 30 mg čvrste soli natrijeva klorida, 125 mg čvrste soli magnezijeva sulfata i 600  $\mu\text{L}$  pripremljene standardne otopine smjese biogenih amina. Dodatno je provedena i ekstrakcija bez dodatka soli, natrijeva klorida i magnezijeva sulfata. Nakon miješanja (30

min) smjesa je centrifugirana kroz 5 minuta pri 3500 g. Isti postupak je proveden i za standarde na način da je umjesto uzorka uzeto 600  $\mu\text{L}$  pripremljene standardne otopine smjese biogenih amina i 400  $\mu\text{L}$  ultra-čiste vode.

Ekstrakcijski uvjeti su ispitani i za smjesu otapala i to acetonitril:metanol (v/v 1:1 i v/v 1:2), acetonitril:etanol (v/v 1:1 i v/v 1:2).

Nakon provedene ekstrakcije, 500  $\mu\text{L}$  bistre otopine je uzeto za daljnji postupak derivatizacije ekstrahiranih biogenih amina (opisano u poglavlju 3.2.5.).

#### ***3.2.4.2. Izravna ekstrakcija organskim otapalima***

U epruvetu od 15 mL odvagano je 1 g prethodno homogeniziranog i smrznutog tkiva dagnji i dodano je 1 mL acetonitrila. Uzorak je direktno podvrgnut derivatizacijskom procesu prema opisnom postupku u potpoglavlju 3.2.5.. Derivati biogenih amina centrifugirani su kroz 5 minuta pri 3500 g. Za ekstrakciju derivata dansil derivata biogenih amina uzeto je 500  $\mu\text{L}$  bistre gornje faze za što je korišteno 500  $\mu\text{L}$  organskog otapala i to heksana, cikloheksana, dietiletera. Nakon miješanja (5 min) organska faza je odvojena u drugu epruvetu od 2 mL te je sadržaj uparen do suha u struji dušika. U epruvetu je dodano 500  $\mu\text{L}$  acetonitrila prije same kromatografske analize.

#### ***3.2.4.3. Ekstrakcija s vodenom otopinom jake kiseline***

Za ekstrakciju biogenih amina iz realnih uzoraka u epruvetu od 15 mL odvagano je 1 g prethodno homogeniziranog i smrznutog tkiva dagnji i 4 mL vodene otopine perklorne kiseline, množinske koncentracije  $c = 0,4 \text{ mol L}^{-1}$  te 20  $\mu\text{L}$  otopine unutarnjeg standarda (1,7-diaminoheptana) masene koncentracije  $\gamma = 0,88 \text{ mg mL}^{-1}$ . Smjesa je tijekom 30 minuta snažno miješana na mješaču IKA vibrax-VXR Model 2200 nakon čega je centrifugirana kroz 10 minuta pri 3000 okretaja u minuti (rpm) radi odvajanja krute i tekuće faze. Otopina iznad taloga je prenesena u drugu plastičnu epruvetu od 15 mL. Ukupno su provedene tri uzastopne ekstrakcije u cilju provjere koliko je ekstrakcija potrebno da se najveća količina biogenih amina prevede u ekstrakcijsko otapalo.

Za pripremu standardnih otopina primijenjen je isti pristup kao i kod ekstrakcije iz tkiva dagnji, 1 mL standardnih otopina otpipetirano je u epruvetu od 15 mL dodano je: (i) 4 mL

otopine perklorne kiseline, množinske koncentracije  $c = 0,4 \text{ mol L}^{-1}$  ili (ii) ultra-čiste vode i 20  $\mu\text{L}$  pripremljene otopine unutarnjeg standarda (1,7-diaminoheptana). Smjesa je tijekom 30 minuta snažno miješana nakon čega je centrifugirana kroz 10 minuta pri 3000 rpm.

Ekstrakcijski uvjeti su ispitani s vodenim otopinama perklorne kiseline kod niže ( $c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) i kod više ( $c = 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) koncentracije.

Nakon provedene ekstrakcije, 500  $\mu\text{L}$  bistre otopine uzeto je za daljnji postupak derivatizacije ekstrahiranih biogenih amina (opisano u poglavlju 3.2.5.).

#### ***3.2.4.4. Ekstrakcija s vodenom otopinom jake kiseline i organskim otapalom***

Za ekstrakciju biogenih amina iz realnih uzoraka primijenjena je ista metoda opisana u prethodnom poglavlju 3.2.4.3.. Nakon provedene ekstrakcije i derivatizacijskog postupka dansil derivati biogenih amina ekstrahirani su iz reakcijske smjese pogodnim organskim otapalom. Organsko otapalo izbora bili su heksan i dietileter.

Za ekstrakciju dansil derivata biogenih amina uzeto je 500  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese, dodano je 500  $\mu\text{L}$  dietiletera (ili heksana) te je smjesa snažno miješana na mješaču IKA vibrax-VXR Model 2200 kroz 2 minute. Smjesa je zatim centrifugirana kroz 2 minute pri 3000 rpm radi odvajanja vodene i organske faze. Organska faza je odvojena u mikro epruvetu volumena 2 mL, uparena do suha u struji dušika te je ostatak otopljen u 400  $\mu\text{L}$  acetonitrila prije kromatografske analize. Ukupno su provedene tri uzastopne ekstrakcije s dietileterom.

#### ***3.2.5. Derivatizacija biogenih amina u tkivu dagnji i standardima za kalibraciju***

Neposredno prije provedbe jednostupanjske derivatizacije pripremljena je otopina dansil klorida u acetonu različitih koncentracija koje su korištene za optimiranje derivatizacijskog postupka.

U epruvetu od 15 mL otpipetirano je 500  $\mu\text{L}$  prethodno profiltriranog ekstrakta dobivenog ekstrakcijom opisanom u poglavlju 3.2.4.2. i 10  $\mu\text{L}$  otopine unutarnjeg standarda. Smjesa se promiješala te se pH smjese podesio na 7 dodatkom pripremljene vodene otopine kalijeva hidroksida. Zatim se dodalo 200  $\mu\text{L}$  pripremljene otopine natrijeva karbonata, množinske koncentracije  $c = 2 \text{ mol L}^{-1}$  i 700  $\mu\text{L}$  otopine dansil klorida pripremljene u acetonu, masene

koncentracije  $\gamma = 15 \text{ mg mL}^{-1}$ . Reakcijska smjesa je promiješana i inkubirana pri  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 15 minuta. Nakon završene reakcije, u reakcijsku smjesu je dodano  $100 \text{ }\mu\text{L}$  vodene otopine prolina za zaustavljanje reakcije prevođenjem suviška dansil klorida u dansil derivat prolina. Alternativno, umjesto otopine prolina, reakcijskoj smjesi je dodano  $100 \text{ }\mu\text{L}$  25 % otopine amonijaka. Smjesa je promiješana i ostavljena na sobnoj temperaturi kroz 30 minuta ili zagrijana pri  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 15 minuta nakon čega je smjesa ostavljena da se ohladi na sobnu temperaturu. U zadnjem koraku je smjesa centrifugirana kroz 5 minuta pri 4000 rpm i  $500 \text{ }\mu\text{L}$  smjese je profiltrirano kroz PTFE filter papir dimenzija pora od  $22 \text{ }\mu\text{m}$  prije kromatografske analize. Za derivatizaciju standarda biogenih amina pripremljenih u vodi ili u vodenoj otopini perklorne kiseline opisanu u poglavlju 3.2.4.3. uzeto je  $500 \text{ }\mu\text{L}$  pripremljene otopine standarda u vodi odnosno otopini perklorne kiseline i derivatizacija je provedena na isti način kao i u slučaju ekstrakta tkiva dagnji.

Za optimiranje derivatizacijskog postupka ispitani su sljedeći radni uvjeti:

- temperatura derivatizacije
- vrijeme derivatizacije
- pH reakcijske smjese
- koncentracija dansil klorida
- zaustavljanje reakcije

Za podešavanje pH uzoraka i standardnih otopina smjese biogenih amina prije same derivatizacije korištena je pripremljena vodena otopina natrijeva hidrogenkarbonata ( $\gamma = 20 \text{ g L}^{-1}$ ) i natrijeva karbonata ( $\gamma = 666,7 \text{ g L}^{-1}$ ). Ispitani su uvjeti derivatizacije kod dviju pH vrijednosti reakcijske smjese: (i) 8 – 9 i (ii) 10,5 – 11. Postupak ekstrakcije i derivatizacije proveden je prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5. uz razliku da je dodano  $60 \text{ }\mu\text{L}$  dansil klorida ( $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u  $500 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka tkiva dagnje ili standardne otopine biogenih amina te se derivatizacija provodila pri temperaturi  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  kroz 15 minuta. Reakcija se zaustavila dodatkom  $100 \text{ }\mu\text{L}$  prolina ( $\gamma = 100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te su derivati ostavljeni u mraku kroz 30 minuta. U sljedećem pokusu reakcija se zaustavila dodatkom 25 % otopine  $\text{NH}_3$  i reakcijska smjesa se dodatno inkubirala kroz 15 minuta pri temperaturi  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  kako bi se uklonili ostaci acetona i amonijaka. Reakcija smjesa se zatim ostavila u mraku kroz 30 minuta.

Utjecaj temperature i vremena inkubiranja na derivatizacijski postupak ispitan je kod dviju temperatura,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ , a inkubacija se provodila kroz vremenski period od 12, 15 i 30

minuta. Postupak derivatizacije je proveden pri pH 8 – 9 uz dodatak 85  $\mu\text{L}$  dansil klorida ( $\gamma = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u 500  $\mu\text{L}$  uzorka ili standardne otopine biogenih amina. Reakcija se zaustavila dodatkom 100  $\mu\text{L}$  vodene otopine prolina ( $\gamma = 100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ili dodatkom 100  $\mu\text{L}$  25 % vodene otopine  $\text{NH}_3$ .

Za ispitivanje utjecaja koncentracije dansil klorida na učinkovitost derivatizacije 700  $\mu\text{L}$  dansil klorida koncentracija 3,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , 7,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , 15  $\text{mg mL}^{-1}$  i 25  $\text{mg mL}^{-1}$  dodani su u reakcijsku smjesu prije inkubiranja. Reakcija se zaustavila dodatkom 100  $\mu\text{L}$  prolina ( $\gamma = 100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ili dodatkom 100  $\mu\text{L}$  25 % otopine  $\text{NH}_3$ .

### 3.2.6. Uvjeti kromatografske analize

Tijekom razvoja analitičke metode bilo je potrebno provjeriti utjecaj sastava mobilne faze, protok mobilne faze i temperature kromatografske kolone na separaciju dansil derivata biogenih amina. Za separaciju dansil dervata biogenih amina korištena je PerfectSil Target ODS-3 HD 5 $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6mm (MZ Analysentechnik, Njemačka). Konačni uvjeti kromatografske separacije i detekcije prikazani su u tablici 2. Za sastav mobilne faze korištena je ultra-čista voda i acetonitril. Mobilna faza A bila je smjesa acetonitril : voda = 80:20 (v/v), a mobilna faza B bio je čisti acetonitril.

**Tablica 2.** Konstantni uvjeti analize primjenom tekućinske kromatografije

<b>Parametar</b>	<b>Uvjet</b>
Temperatura kolone	45 ° C
Protok mobilne faze	1 $\text{mL min}^{-1}$
Volumen injektiranja	20 $\mu\text{L}$
Valna duljina mjerenja	254 nm

Tijekom razvoja metode optimirani su uvjeti gradijenta mobilne faze. Ispitani gradijenti (volumni omjeri) mobilne faze A i B prikazani su u tablici 3.

Optimirani uvjeti analize dansil derivata biogenih amina za sve provedene eksperimente u ovom radu korišten je gradijent mobilne faze 4 (tablica 3).

**Tablica 3.** Gradijenti mobilne faze

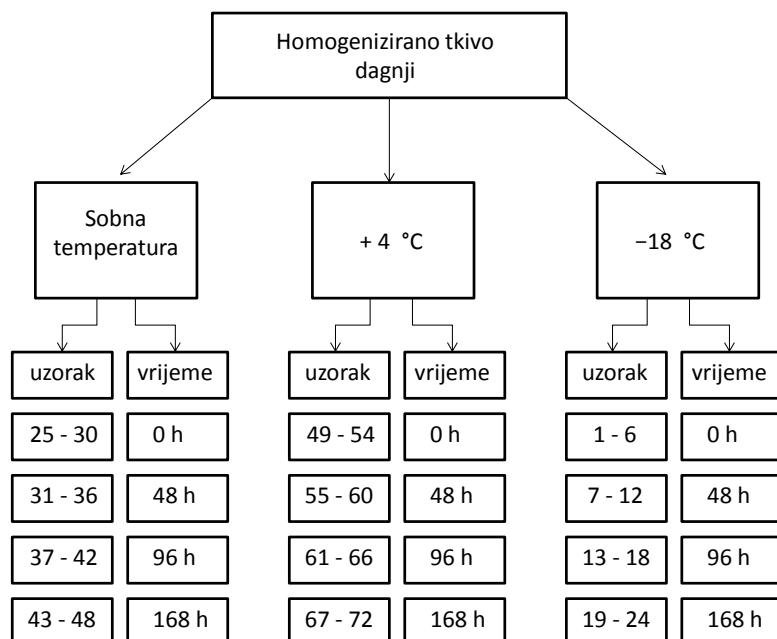
Gradijent mobilne faze	Mobilna faza	Vrijeme [min]						
		0	7	11	15	17	19	
mobilne faze 1	A [v/v], %	60	20	18,2	10	60	60	
	B [v/v], %	40	80	81,8	90	40	40	
Gradijent mobilne faze 2	Mobilna faza	Vrijeme [min]						
		0	7	11	12	16	18	
mobilne faze 2	A [v/v], %	60	20	18,2	5	60	60	
	B [v/v], %	40	80	81,8	95	40	40	
Gradijent mobilne faze 3	Mobilna faza	Vrijeme [min]						
		0	7	9	10	14	16	18
mobilne faze 3	A [v/v], %	60	20	18	5	5	60	60
	B [v/v], %	40	80	82	95	95	40	40
Gradijent mobilne faze 4	Mobilna faza	Vrijeme [min]						
		0	7	8	9	13	15	17
mobilne faze 4	A [v/v], %	60	20	18	5	5	60	60
	B [v/v], %	40	80	82	95	95	40	40

### 3.2.7. Praćenje promjene koncentracije biogenih amina u tkivu dagnji promjenom uvjeta skladištenja

Kako bi se ispitali uvjeti skladištenja u kojima dolazi do promjene koncentracije biogenih amina u tkivu dagnji odvagani uzorci mase 1 g i preneseni u plastične epruvete od 15 mL. Uzorci su skladišteni pri različitim temperaturama u zamrzivaču ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), hladnjaku ( $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), i uvjetima sobne temperature tijekom različitog vremenskog perioda. Uzorci tkiva dagnji s oznakom 1-24 su pohranjeni su u zamrzivaču pri  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uzorci s oznakom 25-48 su pohranjeni su u hladnjaku pri  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dok su uzorci s oznakom 49-72 bili pohranjeni na realnoj sobnoj temperaturi. Promjena temperature uzoraka ostavljenih u sobnim uvjetima, pri  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pri  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  u različitom vremenskom periodu prikazana je na slici 2. Prosječna sobna temperatura iznosila je  $+22,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 6 dana (168 h), dok je promjena temperature bila u rasponu od  $+18,8$  do  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Shema uzorkovanja prikazana je na slici 5.

Uzorci su nakon proteka određenog vremenskog razdoblja na sobnoj temperaturi i kod  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pohranjeni na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  do kromatografske analize. Svi uzorci tkiva dagnji analizirani su razvijenom analitičkom metodom prema opisanom postupku ekstrakcije (opisano u poglavlju 3.2.4.3.) uz napomenu da je u postupku ekstrakcije korištena je otopina unutarnjeg standarda masene koncentracije  $0,33\text{ mg mL}^{-1}$ ) i derivatizacije (opisano u poglavlju 3.2.5.).





**Slika 5.** Promjena temperature uzoraka ostavljenih u uvjetima sobne temperature, pri +4 °C i pri -18 °C u različitom vremenskom periodu

### 3.2.8. Evaluacija razvijene analitičke metode

U svrhu validacije razvijene analitičke metode za određivanje biogenih amina iz uzorka tkiva dagnji određeni su sljedeći parametri: razlučivanje, efikasnost ekstrakcije, točnost, ponovljivost, osjetljivost analitičke metode, odnosno, granica detekcije i granica kvantifikacije.

#### 3.2.8.1. Kalibracija

S obzirom da odziv detektora na određene sastojke od interesa može jako ovisiti o matrici u kojoj su analiti i standardi određeni, uspoređen je odziv detektora za dva slučaja:

a) vodene otopine standarda različitih koncentracija biogenih amina u očekivanom rasponu biogenih amina u uzorcima podvrgnuti su derivatizaciji i kromatografskoj analizi prema optimiranoj razvijenoj analitičkoj metodi.

b) u standardne otopine različitih koncentracija biogenih amina u očekivanom rasponu biogenih amina dodan je jednak volumen otopine perklorne kiseline kao i za ekstrakciju biogenih amina iz tkiva dagnje i smjesa je podvrgnuta derivatizaciji prema razvijenoj analitičkoj metodi.

Za izračun koncentracija pojedinih biogenih amina korišten je omjer površine ispod kromatografskog pika i unutarnjeg standarda. Standardne otopine biogenih amina za konstruiranje regresijskih krivulja pripremljene su sukcesivnim razrjeđivanjem radne otopine smjese biogenih amina, a u kojima je koncentracijski raspon biogenih amina iznosio 0 – 0,61  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za feniletilamin, 0 – 4,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za putrescin, 0 – 1,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za kadaverin, 0 – 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za histamin, 0 – 11,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za tiramin, 0 – 3,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za spermidin i 0 – 4,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  za spermin.

Kalibracijski pravci su izračunati metodom najmanjih kvadrata osim u slučaju spermina za koji je ovisnost odziva detektora o koncentraciji nelinearna pa se koristila regresijska analiza polinoma drugog stupnja.

### **3.2.8.2. Efekt matrice**

Za određivanje efekta matrice u standardne otopine različitih koncentracija biogenih amina u očekivanom rasponu biogenih amina dodan je jednak volumen otopine perklorne kiseline kao i za ekstrakciju biogenih amina iz tkiva dagnje i smjesa je podvrgnuta derivatizaciji prema razvijenoj analitičkoj metodi. U uzorke tkiva dagnji pohranjenih na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  dodana je usporediva koncentracija standardnih otopina različitih koncentracija kao i jednak volumen otopine perklorne kiseline kao i za ekstrakciju biogenih amina iz tkiva dagnje. Nakon ekstrakcije smjesa je podvrgnuta derivatizaciji prema istoj analitičkoj metodi.

Efekt matrice izračunat je kao omjer nagiba pravca izračunatog za analitičke standarde ( $S_{\text{otapalo}}$ ) pripremljene u otapalu i nagiba pravca za analitičke standarde pripremljene u tkivu školjki ( $S_{\text{tkivo dagnje}}$ ).

$$\text{Efekt matrice (\%)} = \frac{S_{\text{otapalo}}}{S_{\text{tkivo dagnje}}} \cdot 100 \quad [1]$$

### 3.2.8.3. Efikasnost ekstrakcije

Za ispitivanje efikasnosti ekstrakcije biogenih amina iz realnih uzoraka tkiva dagnji primijenjene su tri uzastopne ekstrakcije s istim volumenom vodene otopine perklorne kiseline prema metodi upisanoj u poglavlju 3.2.4.3. Efikasnost ekstrakcije pojedinih biogenih amina nakon prve ekstrakcije izračunata je prema izrazu,

$$\text{Efikasnost 1. ekstrakcije (\%)} = \frac{\text{količina biogenog amina nakon 1. ekstrakcije}}{\text{količina biogenog amina nakon sve 3 ekstrakcije}} \cdot 100 \quad [2]$$

### 3.2.8.4. Ponovljivost

Za određivanje ponovljivosti razvijene analitičke metode, 6 individualno pripremljenih realnih uzoraka tkiva dagnji mase od 1 g podvrgnuto je opisanom postupku ekstrakcije, derivatizacije i kromatografske analize unutar jednog dana analizom 6 replikata na jednoj koncentracijskoj razini. Ponovljivost je izračunata kao relativna standardna devijacija (RSD) izražena u postocima prema izrazu:

$$RSD(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100 \quad [3]$$

u kojem SD predstavlja standardnu devijaciju raspršenosti podataka oko srednje vrijednosti, dok  $\bar{X}$  predstavlja srednju vrijednost podataka (izračunatu kao aritmetička sredina).

### 3.2.8.5. Osjetljivost metode (granica detekcije i kvantifikacije)

Za određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije konstruiran je baždarni dijagram u niskom koncentracijskom rasponu u blizini granice detekcije, odnosno kvantifikacije. Granica detekcije (engl. *limit of detection*, *LoD*) i granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*,

$LoQ$ ) izračunata je iz izračunatih vrijednosti rezidualne standardne devijacije ( $SD_{res}$ ) i nagiba kalibracijskog pravca (engl. *slope*,  $S$ ) na temelju sljedećih izraza:

$$LoD(\mu\text{g mL}^{-1}) = 3,3 \cdot \frac{SD_{res}}{S} \quad [4]$$

$$LoQ(\mu\text{g mL}^{-1}) = 10 \cdot \frac{SD_{res}}{S} \quad [5]$$

### 3.2.8.6. Indeks biogenih amina

Indeks biogenih amina (engl. *biogenic amine indeks*,  $BAI$ ) izračunat je iz izraza prema Veciana-Nogues i sur. (1997),

$$BAI (\text{mg kg}^{-1}) = \text{Histamin} + \text{Putrescin} + \text{Kadaverin} + \text{Tiramin} \quad [6]$$

### 3.2.8.7. Obrada podataka

Za obradu svih podataka, uključivo linearnu regresiju i statističku obradu podataka korišten je Prism 9.5.1. (Graph-Pad, SAD).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Biogeni amini imaju ulogu neurotransmitera, pokazatelja kvalitete, odnosno svježine hrane, ali mogu izazvati i toksični efekt na ljudsko zdravlje. Zbog toga ih je važno odrediti i u namirnicama morskog podrijetla. Istovremeno određivanje više biogenih amina u uzorcima često je zahtjevno zbog njihove različite strukture, pa time i fizikalno-kemijskih svojstava.

Iako je publiciran veliki broj radova za određivanje biogenih amina u ribama, literaturni podaci za određivanje biogenih amina u školjkašima izrazito je ograničen. Stoga je u ovom radu bio cilj razviti analitičku metodu za određivanje biogenih amina u modelnom organizmu i to u tkivu dagnji. Dagnje su kao modelni organizam izabrani zbog svoje lokalne dostupnosti u većim količinama, kao svježe ili toplinski obrađene i duboko smrznute. Kao analitička metoda izbora za analizu odabrana je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u sprezi s detektorom s nizom dioda. Metoda je dalje primijenjena za praćenje promjena koncentracije biogenih amina u tkivu dagnji pohranjenih u različitim uvjetima temperature i vremena kratkotrajnog skladištenja. Za razvoj metode i praćenje promjena koncentracije izabrano je sedam biogenih amina koji se koriste kao indikatori svježine hrane i to feniletilamin, putrescin, kadaverin, histamin, tiramin, spermidin i spermin.

HPLC metoda za određivanje biogenih amina uz prethodnu derivatizaciju s dansil kloridom, koja je korištena u ovom radu, omogućila je potpunu separaciju kromatografskih pikova svih sedam dansil derivata biogenih amina te pouzdanu kvantifikaciju svih dansil derivata biogenih amina osim spermina.

### **4.1. Identifikacija dansil derivata biogenih amina**

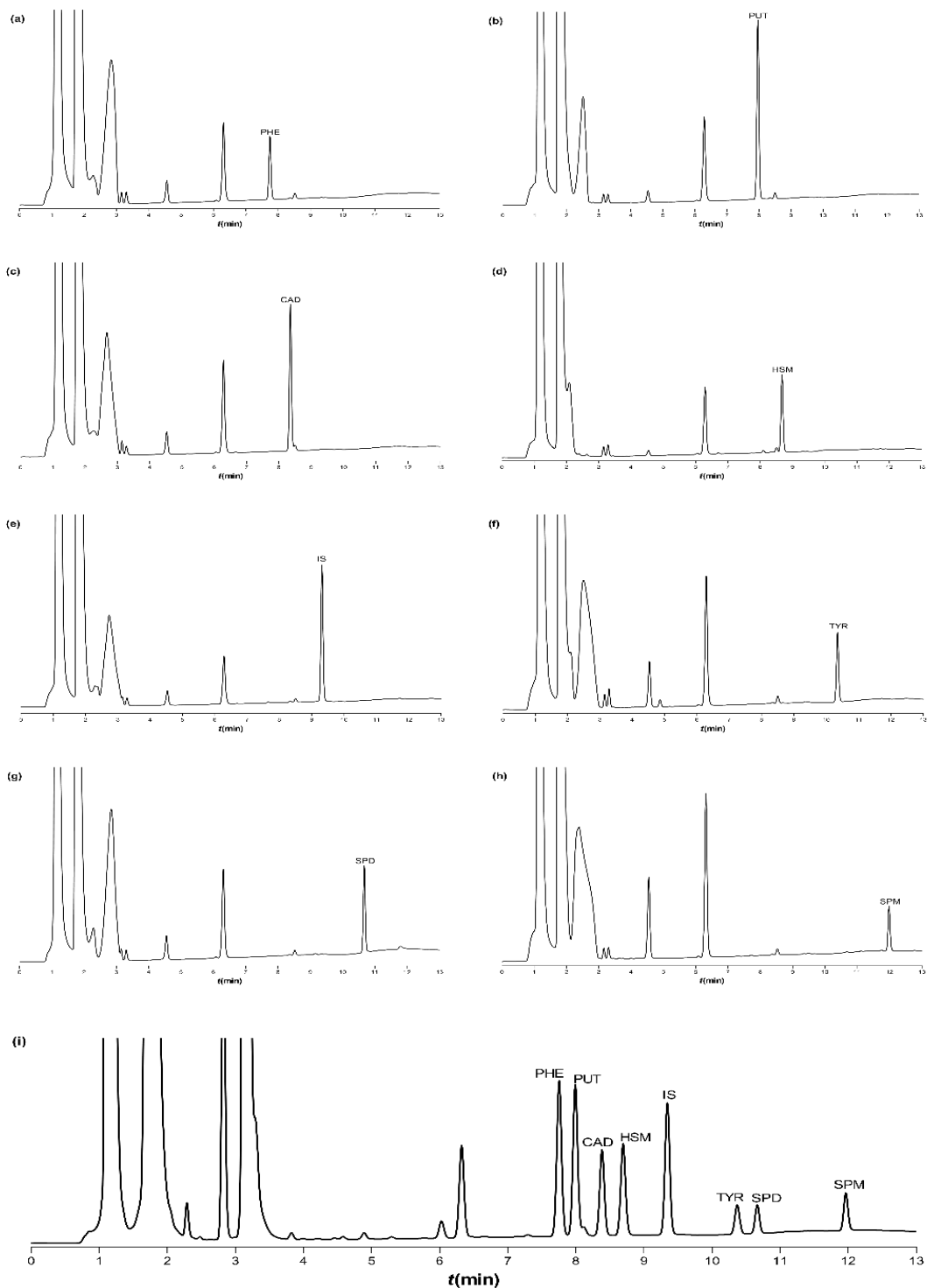
Pripremljene standardne otopine pojedinačnih biogenih amina i smjese standarda biogenih amina u vodi podvrgnute su, nakon ekstrakcije, derivatizaciji pomoću regensa dansil klorida. Dansil derivat svakog biogenog amina identificiran je na temelju vremena zadržavanja. Redosljed vremena zadržavanja pojedinih dansil derivata biogenih amina u kromatogramima određen je iz pojedinačnih kromatograma individualnih derivata standarda biogenih amina. Na slici 6 prikazani su kromatogrami derivata pojedinačnih biogenih amina i smjese biogenih amina pri optimiranim uvjetima kromatografske analize opisanima u poglavlju 3.2.6.

Vremena zadržavanja pojedinih dansil derivata biogenih amina bila su približno 7,8 min za feniletilamin, 8,1 min za putrescin, 8,5 min za kadaverin, 8,8 min za histamin, 9,5 min za unutarnji standard, 10,5 min za tiramin, 10,8 min za spermidin i 12,0 min za spermin.

#### **4.2. Optimiranje uvjeta kromatografske analize**

Tijekom razvoja metode optimirani su uvjeti gradijenta mobilne faze kako bi se postigla prihvatljiva separacija dansil derivata biogenih amina u najkraćem mogućem vremenskom periodu kromatografske analize. U tu svrhu su ispitani najpovoljniji omjeri mobilnih faza A (smjesa vode i acetonitrila u volumnom omjeru 80:20) i B (acetonitril), a rezultati utjecaja mobilne faze na separaciju dansil derivata biogenih amina prikazani su na kromatogramima na slici 7. S obzirom da je postignuta dovoljno dobra separacija prvih 5 kromatografskih pikova, promjena gradijenta je bila prvenstveno usmjerena na skraćivanje vremena zadržavanja tiramina i spermina te u većoj mjeri spermidina, što je i postignuto povećanjem udjela organske faze B nakon 7. minute.

Iz kromatograma na slici 7d je vidljivo da se pri optimiranim uvjetima postiže najkraće vrijeme analize, ali i potrebno razdvajanje kromatografskih pikova (krivulja) što je potvrđeno i izračunatim razlučivanjem prema danom numeričkom izrazu, koje je za sve susjedne pikove iznosio najmanje 1.



**Slika 6.** Reprezentativni RP-HPLC-DAD kromatogrami dansil derivata standarda pojedinačnih biogenih amina pri optimiranim kromatografskim uvjetima: a) PHE → feniletilamin, b) PUT → putrescin, c) CAD → kadaverin, d) HSM → histamin, e) IS → unutarnji standard, f) TYR → tiramin, g) SPD → spermidin, h) SPM → spermin, (i) smjesa standarda dansil derivata biogenih amina

$$R = \frac{2(t_r(B) - t_r(A))}{w(B) - w(A)} \quad [7]$$

u kojem je,

$R$  → razlučivanje

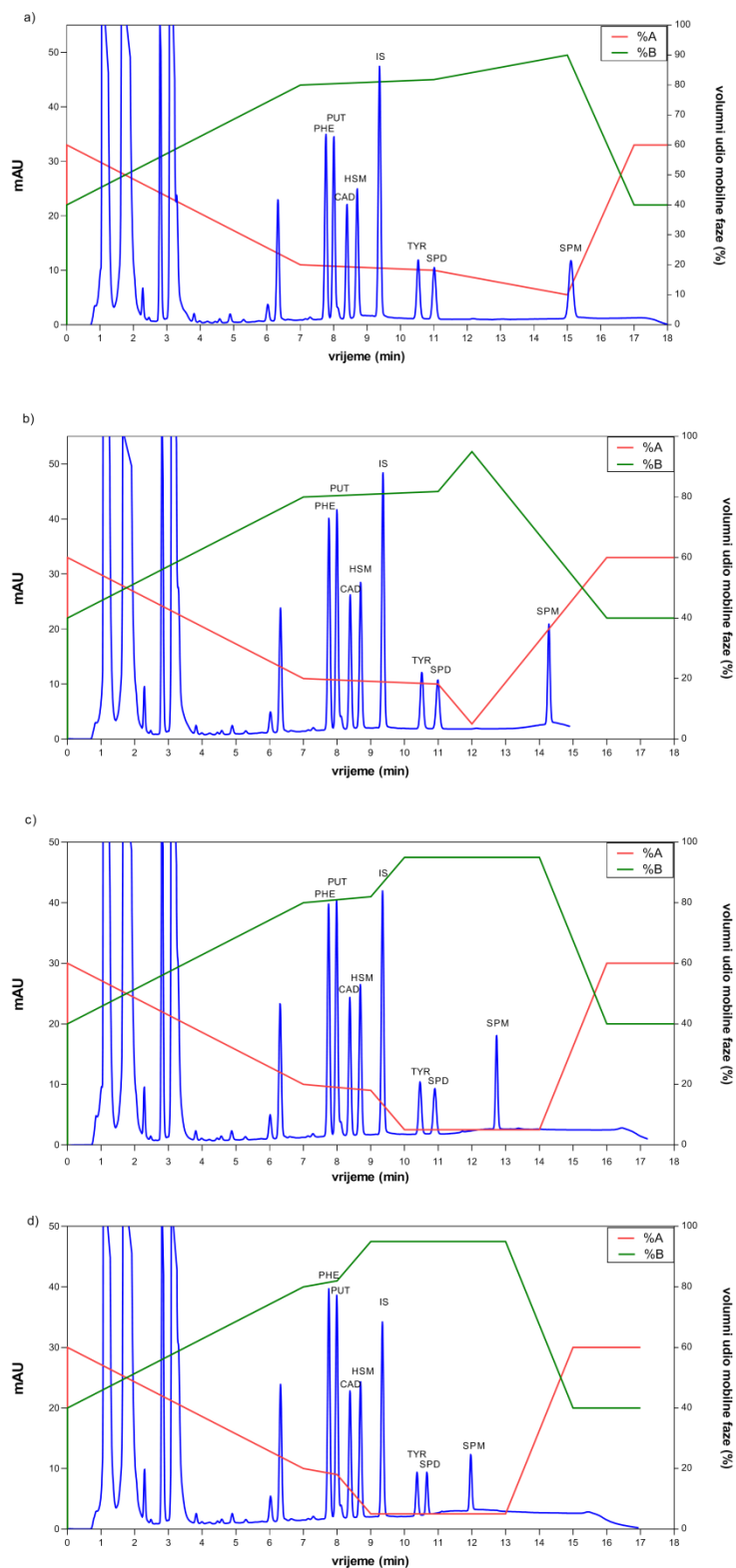
$t_r(B)$  → vrijeme zadržavanja sastojka koji izlazi kasnije (s)

$t_r(A)$  → vrijeme zadržavanja sastojka koji izlazi ranije (s)

$w$  → širina kromatografskog pika u bazi (s)

Razlučivanje između susjednih kromatografskih pikova prema izračunu je iznosilo 1,00 za feniletilamin/putrescin, 1,80 za putrescin/ kadaverin, 1,40 za kadaverin/histamin, 1,33 za histamin/interni standard, 2,16 za interni standard/ tiramin, 1,51 za tiramin/spermidin te 6,85 za spermidin/spermin. Kao što se može vidjeti iz kromatograma na slici 7d pikovi su dobro odvojeni do bazne linije i eluiraju kao oštri i simetrični pikovi te bez interferirajućih pikova kod svih sastojaka.





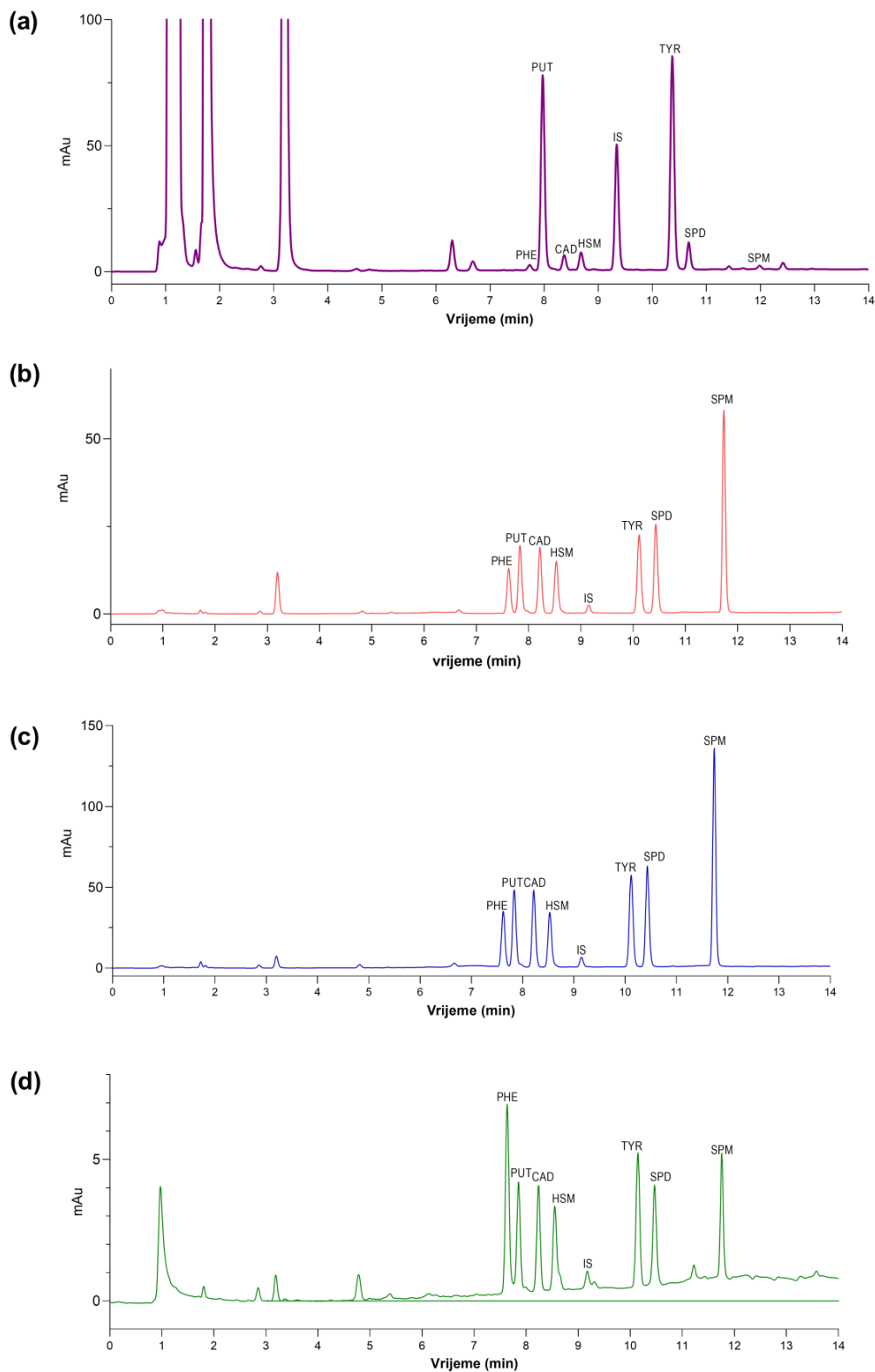
**Slika 7.** Utjecaj gradijenta mobilne faze na separaciju dansil derivata biogenih amina a) gradijent mobilne faze 1, b) gradijent mobilne faze 2, c) gradijent mobilne faze 3, d) gradijent mobilne faza 4. (PHE → feniletilamin, PUT → putrescin, CAD → kadaverin, HSM → histamin, IS → unutarnji standard, TYR → tiramin, SPD → spermidin, SPM → spermin)

### 4.3. Optimiranje uvjeta ekstrakcije i kemijske modifikacije biogenih amina

Kao prvi korak u analizi biogenih amina bilo je potrebno provjeriti koje je ekstrakcijsko otapalo najpogodnije za njihovo izdvajanje iz uzorka. U tu svrhu je, na temelju dostupnih podataka iz literature, izabrano nekoliko pristupa; ekstrakcija temeljena na Quechers pristupu, zatim ekstrakcij u organsko otapalo (dietileter, kloroform, diklorometan, heksan), vodenu otopinu jake kiseline (klorovodična i perklorna kiselina) te dietileter nakon prethodne derivacije s dansil kloridom.

Ekstrakcija biogenih amina iz tkiva školjke temeljena na Quechers pristupu opisana u poglavlju 3.2.4.1. i izravna ekstrakcija organskim otapalima opisana u poglavlju 3.2.4.2. nisu se pokazali pogodnim metodama za ekstrakciju svih biogenih amina. Ispitivanje najboljeg ekstrakcijskog otapala provedeno je u standardnim otopinama biogenih amina i očekivano manja koncentracija biogenih amina ekstrahirana je s organskim otapalima nego s perklornom kiselinom. Koncentracija standardnih otopina biogenih amina bila je viša u otopinama iz kojih su biogeni amini ekstrahirani s organskim otapalima, nego vodenom otopinom perklorne kiseline (slika 8). Organska otapala nisu pogodna zbog snažnog polarnog karaktera biogenih amina, pa će ekstrakcija rezultirati većom topljivosti u vodi u odnosu na organska otapala. Dodatan razlog neefikasnosti tradicionalne ekstrakcije s organskim otapalima je složenost matrice u kojoj se nalaze brojni interferenti (Pataca i sur., 2021).

S obzirom na složenost matrice organska otapala ili smjesa otapala nisu pogodne za sve istražene biogene amine zbog svoje složene građe. Prema dostupnoj literaturi najviše se za određivanje biogenih amina upotrebljava ekstrakcija s jakom kiselinom zatim derivatizacija i ponovno ekstrakcija organskim otapalom. Stoga je razvoj analitičke metode bio usmjeren na što manje koraka te se odbacio korak druge ekstrakcije u organskom otapalu. Ispitana je ekstrakcija s otopinom perklorne kiseline množinskih koncentracija  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  i  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ . Kadaverin, putrescin, tiramin i spermidin se prema realnim koncentracijama standarda bolje ekstrahiraju pomoću otopine perklorne kiseline koncentracije  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ . Spermin se nije mogao kvantificirati niti ekstrakcijom organskim otapalima niti perklornom kiselinom jer se derivatizacija dansil kloridom nije pokazala kao povoljna za ovaj amin. Kao bolje ekstrakcijsko otapalo se pokazala otopina perklorne kiseline koncentracije  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ . Stoga se za provođenje drugog dijela istraživanja dalje provodila ekstrakcija s perklornom kiselinom koncentracije  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Slika 8.** Reprezentativni RP-HPLC-DAD kromatogram standardnih otopina pojedinih amina u obliku njihovih dansil derivata pri ekstrakciji s otapalima: a) perchlorna kiselina, b) kloroform, c) dietileter, d) heksan (PHE → feniletilamin, PUT → putrescin, CAD → kadaverin, HSM → histamin, IS → unutarnji standard, TYR → tiramin, SPD → spermidin, SPM → spermin)

#### 4.4. Optimiranje derivatizacije biogenih amina u tkivu dagnji i standardima za kalibraciju

U svrhu optimiranja uvjeta derivatizacije ispitani su derivatizacijski uvjeti pri različitim pH vrijednostima reakcijske smjese, koncentracijama dansil klorida, temperaturama i vremenskom periodu derivatizacije. U tu svrhu eksperimenti su provedeni sa standardima za kalibraciju, ali i na tkivu dagnji.

S obzirom da se reakcije s dansil kloridom odvijaju u lužnatom mediju, a u literaturi se opisuju različite vrijednosti pH reakcijske smjese u rasponu od 8 do 12 kao optimalne za derivatizaciju biogenih amina s dansil kloridom (Hernández-Cassou i Saurina, 2011), ispitana je efikasnost derivatizacije pri pH 8 - 9 i pri pH 10,5 - 11 u tkivu dagnji. Na slici 9 prikazani su kromatogrami derivata dansil derivata biogenih amina iz kojih je vidljivo da se veći analitički signali postižu pri pH 10,5 – 11 nego pri pH 8 – 9. Prema istraživanju Jastrzębska i sur. (2013) najjači analitički signal dansil derivata dobiven je pri pH 9,3, dok je prema Francisco i sur. (2019) te Herrero i sur. (2016). pH vrijednost reakcijske smjese mora biti iznad 10 za optimalnu derivatizaciju dansil kloridom. Optimalna pH vrijednost za derivatizaciju biogenih amina s dansil kloridom iznosi 10 prema Dadáková i sur. (2009), dok prema Ramos i sur. (2014) iznosi 11. U ovom radu su ispitana obje vrijednosti pH (slika 9) i zaista se pokazalo da optimalna pH vrijednost za derivatizaciju iznosi 10,5 – 11 što je u skladu s istraživanjima Francisco i sur. (2019), Herrero i sur. (2016), Dadáková i sur. (2009).

Optimalna koncentracija derivatizacijskog reagensa u reakcijskoj smjesi također doprinosi odzivu detektora. Za optimiranje količine dansil klorida u reakcijskoj smjesi prvobitno su provedene derivatizacije kod 3 različite koncentracije i to 3,75 mg mL<sup>-1</sup>, 7,5 mg mL<sup>-1</sup> i 15 mg mL<sup>-1</sup>. Rezultati na slici 10 pokazuju da je analitički signal najveći za sve dansil derivate nakon dodatka 700 µL otopine dansil klorida koncentracije 15 mg mL<sup>-1</sup> u reakcijsku smjesu. Najveći analitički signal, odnosno odziv detektora, postignut je dodatkom 700 µL otopine dansil klorida koncentracije 15 mg mL<sup>-1</sup>, a najniži analitički signal je postignut pri koncentraciji 3,75 mg mL<sup>-1</sup> dansil klorida (slika 10). U sljedećem koraku se ispitalo može li dodatno povećanje količine dansil klorida i dalje biti popraćeno s povećanjem analitičkog signala, pa je stoga dodatno provedena derivatizacija dodatkom 700 µL otopine dansil klorida koncentracije 25 mg mL<sup>-1</sup> u reakcijsku smjesu. Najveća koncentracija dansil klorida dovela je do supresije analitičkog signala (slika 12 b). Dobiveni rezultati se ne razlikuju u standardima (slika 12 c) niti u uzorku tkiva dagnji (slika 12 a, b). Pataca i sur. (2021) u svom su radu za

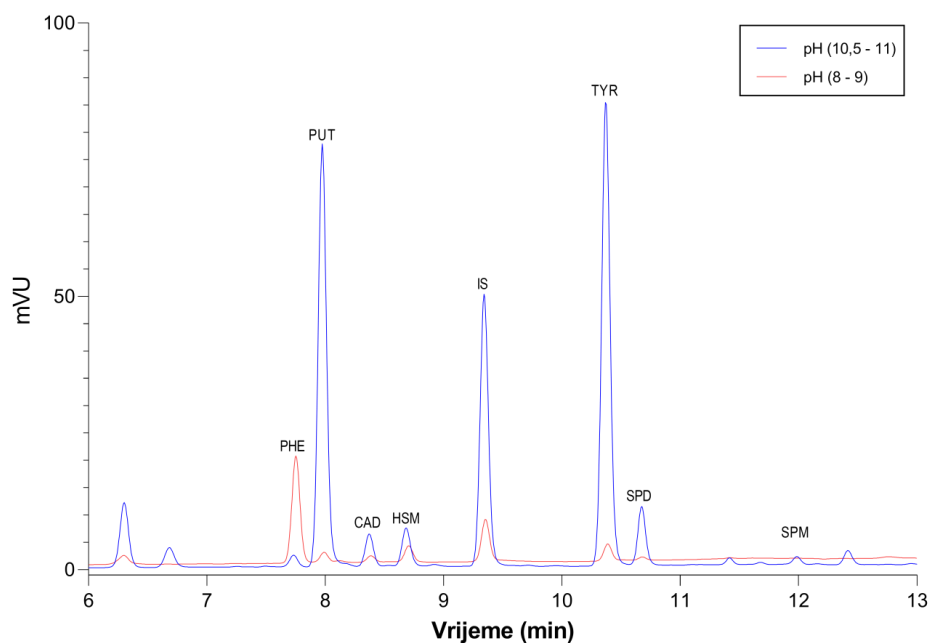
derivatizaciju koristili koncentraciju dansil klorida od 3 mg mL<sup>-1</sup> kao optimalnu, što je koncentracija koja je u ovom radu rezultirala nižim odzivom detektora. Istraživanje Kim i sur. (2009) za određivanje biogenih amina u uzorcima ribe, lignji i školjaka i istraživanje Šimat i sur. (2011) pokazuju da je optimalna koncentracija dansil klorida za derivatizaciju 10 mg mL<sup>-1</sup>, što je također niža korištena koncentracija u odnosu na ovaj rad. Prema dostupnoj literaturi ovaj rad je po prvi puta uključio i ispitivanje utjecaja derivatizacije i pri daleko višoj koncentraciji dansil klorida i to 25 mg mL<sup>-1</sup>. Razlog za to leži u činjenici da je matrica tkiva školjkaša kompleksna, da može sadržavati i druge sastojke koji mogu reagirati s dansil kloridom, što posljedično dovodi do smanjene količine derivatizacijskog reagensa raspoložive za derivatizaciju analita. Na temelju rezultata kao optimalna koncentracija dansil klorida za daljnji rad izabrana je koncentracija od 15 mg mL<sup>-1</sup>.

U radu Hernández-Cassou i Saurina (2011) reakcija analita s dansil kloridom zahtijeva vrijeme reakcije 20 – 60 min i temperaturu 40 °C – 70 °C. Najčešće korištena temperatura derivatizacije je 40 °C tijekom 45-60 min (Proestos i sur., 2008.; Mo Dugo, i sur., 2006.; Jeya Shakila i sur., 2001). Derivatizacija na povišenoj temperaturi koristi se iz razloga što visoka temperatura povećava efikasnost derivatizacije i proces završava u kratkom vremenu (Dadakova i sur., 2009). Pri temperaturama reakcijske smjese u kojoj se odvija derivatizacija višim od 60 °C, nastali dansil derivati biogenih amina nisu stabilni (Zhu i sur., 2016). Temperatura viša od 65 °C može uzrokovati razgradnju dansil derivata što rezultira promjenom oblika pikova i smanjenjem visine kromatografskih pikova (Dadakova i sur., 2009). U ovom radu su odabrane dvije temperature za derivatizaciju i to 55 °C i 60 °C, a prema Pataca i sur. (2021) i Jastrzębska i sur. (2013). Na temelju rezultata pri temperaturi od 55 °C nisu vidljive razlike u efikasnosti derivatizacije u odnosu na 60 °C, stoga je temperatura od 55 °C izabrana kao optimalna temperatura derivatizacije u ovom radu. Međutim, vidljive su razlike u duljini trajanja derivatizacije pri optimalnoj temperaturi (slika 11). Produljenjem vremena derivatizacije s 15 minuta (slika 11a) na 30 minuta (slika 11b) opada jačina analitičkog signala. Jednaki rezultati pri navedenim uvjetima su dobiveni i u standardnim otopinama (slika 11c) i u tkivu dagnji. U istraživanju Dadakova i sur. (2009) također je ispitana i derivatizacija pri 20 °C (sobna temperatura) kroz 20 h i uspoređena s derivatizacijom pri 50 °C kroz 1 sat. Razlog za izbor sobne temperature leži u činjenici da dulje vrijeme derivatizacije, ali pri nižoj temperaturi ne bi trebao dovoditi do značajne degradacije dansil derivata (Dadakova i sur., 2009). Dobiveni rezultati u ovom radu su u

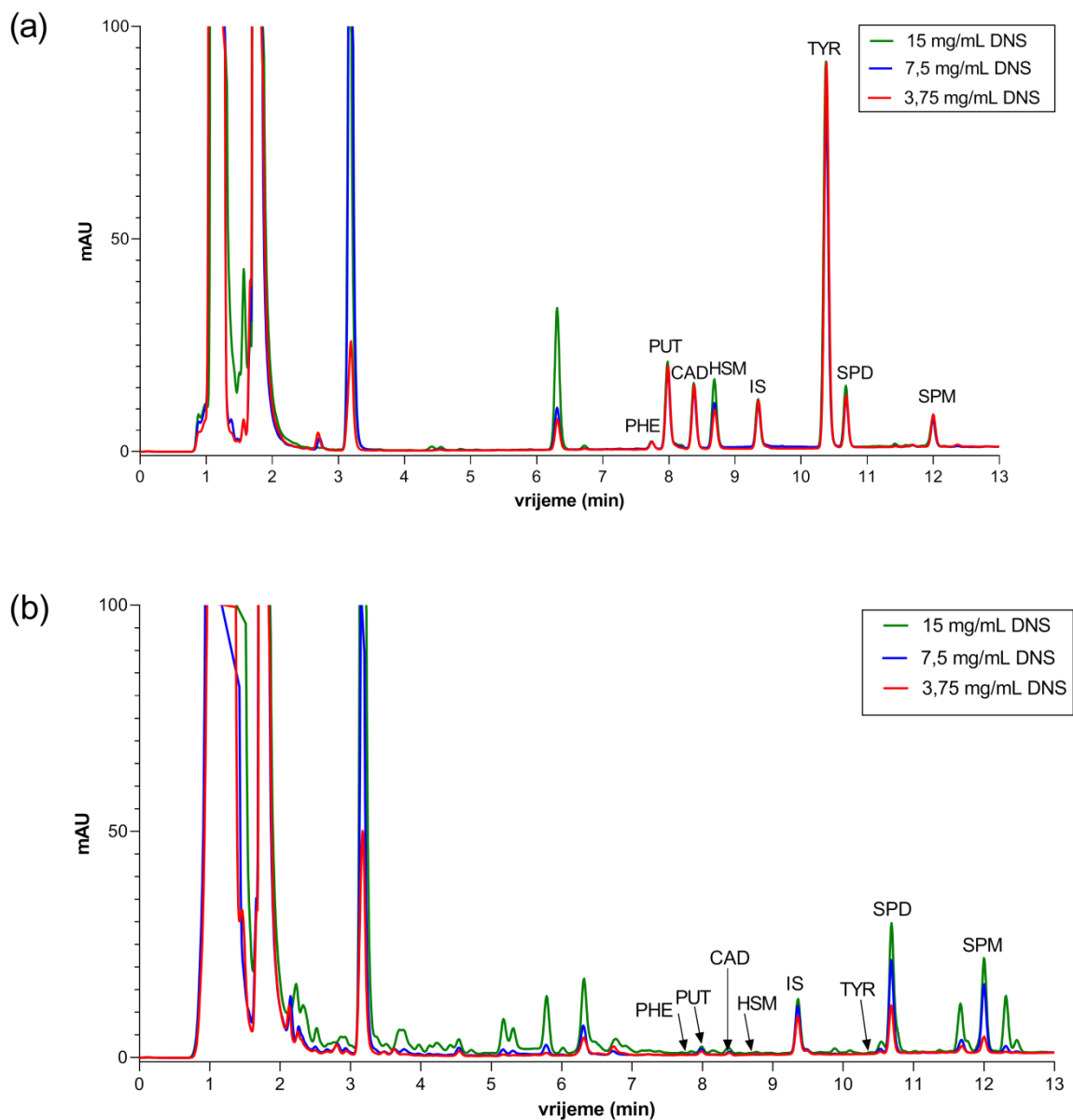
skladu s istraživanjem Dadakova i sur. (2009) utoliko da niža temperatura reakcijske smjese u kojoj se odvija derivatizacija pogoduje stabilnosti nastalih dansil derivata.

S obzirom na sve navedeno, kao optimalni uvjeti derivatizacije biogenih amina u standardnim otopinama i tkivu dagnji te validacije analitičke metode uzeti su: pH reakcijske smjese 10,5 – 11, dodatak od 700  $\mu\text{L}$  otopine dansil klorida koncentracije 15  $\text{mg mL}^{-1}$  u reakcijsku smjesu, temperatura derivatizacije od 55  $^{\circ}\text{C}$  te vrijeme derivatizacije od 15 minuta.

Važan korak nakon provedene derivatizacije je uklanjanje suviška dansil klorida. Suvišak dansil klorid reagensa i njegovih nusprodukata ometaju separaciju derivata biogenih amina (Liu i sur., 2018). Nastanku povećane koncentracije nusprodukata derivatizacije, dansil sulfonske kiseline (DNS-OH) i dansil amida (DNS-NH<sub>2</sub>) pogoduje lužnati pH koji pomiče ravnotežu kemijske reakcije prema nastanku produkta. Dansil sulfonska kiselina može ometati kromatografsko razdvajanje amina, jer može koeluirati s dansil derivatima s izraženijim hidrofilnim karakterom (Silva, 2005). Kako bi se nadvladao taj problem, u reakcijsku se smjesu nakon proveden derivatizacije, dodaju reagensi za potrošnju suviška derivatizacijskog reagensa. Najčešće se dodaje amonijak, amonijev hidroksid ili aminokiselina prolin. U ovom radu ispitan je utjecaj dodatka amonijaka i otopine prolina te se je promatrao njihov utjecaj na koeficijent određivanja biogenih amina u svrhu uklanjanja suviška dansil klorida. Dodatkom prolina uklanja se višak dansil klorida stvaranjem ioniziranog dansil derivata prolina, koji ostaje u vodenoj fazi zajedno s DNS-OH (Silva, 2005). Razlog zašto je prolin bolji reagens za uklanjanje suviška dansil klorida od amonijaka, prema istraživanju Stephans (1986), je da dodatkom amonijevog hidroksida nastaju velike koncentracije dansil amida (DNS-NH<sub>2</sub>) čiji kromatografski pikovi zbog nastalog amonijaka mogu maskirati kromatografske pikove derivata analita. Prema istraživanju De May i sur. (2012) dodatak amonijaka također nije mogao dovoljno ukloniti suvišak dansil klorida. Kao rezultat toga, male količine nusprodukata mogu se i dalje detektirati u kromatogramu i vidljiv je utjecaj na kromatografski pik putrescina (De May i sur., 2012). U daljnjem istraživanju De May i sur. (2012) ni dodatak dvostruke koncentracije amonijaka i udvostručenje vremena inkubacije nisu utjecali na smanjenu pojavu nusprodukta. U ovom radu se prolin pokazao kao bolji reagens za uklanjanje suviška dansil klorida što je u skladu s opažanjima u istraživanju De May i sur. (2012). Nakon optimiranja derivatizacijskog procesa, i promjenom zaustavljanja reakcije dodatkom otopine prolina, spermin i dalje nije bilo moguće pouzdano kvantificirati.

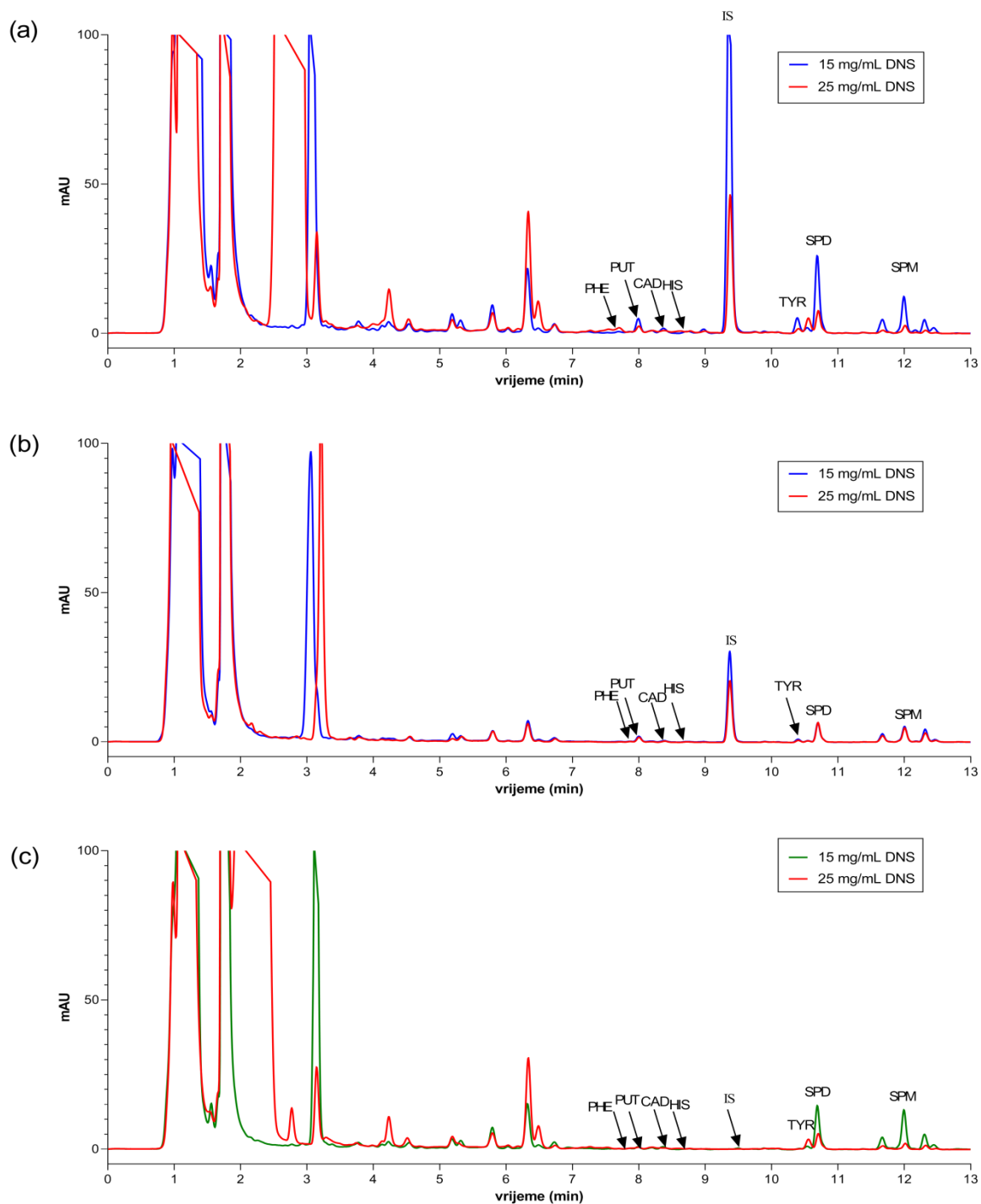


**Slika 9.** RP-HPLC-DAD kromatogrami dansil derivata biogenih amina u tkivu dagnji derivatizirani dansil kloridom pri pH 8 – 9, dodatkom 60  $\mu\text{L}$  DNS ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) u reakcijsku smjesu pri 60 °C tijekom 15 minuta i pH 10,5-11, dodatkom 700  $\mu\text{L}$  DNS ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) u reakcijsku smjesu pri 55 °C tijekom 15 minuta (PHE → feniletilamin, PUT → putrescin, CAD → kadaverin, HSM → histamin, IS → unutarnji standard, TYR → tiramin, SPD → spermidin, SPM → spermin)

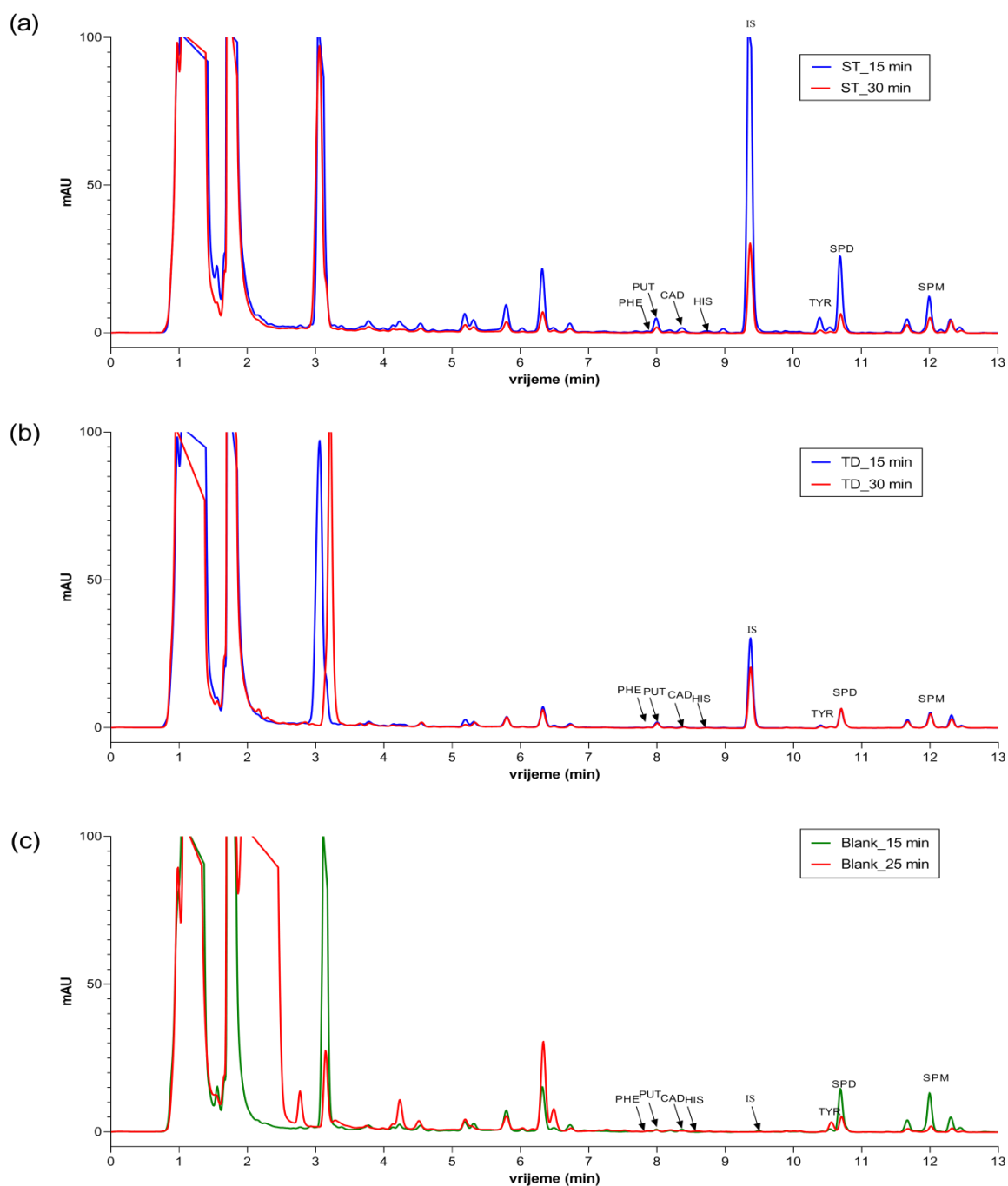


**Slika 10.** RP-HPLC-DAD kromatogrami dansil derivata biogenih amina u (a) standardnoj smjesi biogenih amina u ultra-čistoj vodi i (b) tkivu dagnji dodatkom 700 µL otopine dansil klorida tri različite koncentracije (15, 7,5 i 3,75 mg mL<sup>-1</sup>) u reakcijsku smjesu (DNS → dansil klorid, PHE → feniletilamin, PUT → putrescin, CAD → kadaverin, HSM → histamin, IS → unutarnji standard, TYR → tiramin, SPD → spermidin, SPM → spermin)





**Slika 11.** RP-HPLC-DAD kromatogrami dansil derivata biogenih amina nakon derivatizacije pri 55 °C u (a) tkivu dagnji kroz 15 minuta , (b) tkivu dagnji biogenih amina kroz 30 minuta i (c) slijepoj probi (ultra-čista voda) kroz 15 minuta dodatkom 700 µL otopine dansil klorida dvije različite koncentracije (15 i 25 mg mL<sup>-1</sup>) u reakcijsku smjesu (DNS → dansil klorid, PHE → feniletilamin, PUT → putrescin, CAD → kadaverin, HSM → histamin, IS → unutarnji standard, TYR → tiramin, SPD → spermidin, SPM → spermin)



**Slika 12.** RP-HPLC-DAD kromatogrami dansil derivata biogenih amina nakon derivatizacije pri 55 °C u (a) tkivu dagnji dodatkom 700  $\mu\text{L}$  otopine dansil klorida koncentracije 15  $\text{mg mL}^{-1}$  u reakcijsku smjesu, (b) tkivu dagnji dodatkom 700  $\mu\text{L}$  otopine dansil klorida koncentracije 25  $\text{mg mL}^{-1}$  u reakcijsku smjesu i (c) slijepoj probi (ultra-čista voda) kroz 15 minuta dodatkom 700  $\mu\text{L}$  otopine dansil klorida koncentracije 15  $\text{mg mL}^{-1}$  u reakcijsku smjesu. Derivatizacijska reakcija se provodila pri 55 °C kroz 15 minuta (BLANK  $\rightarrow$  slijepa proba, ST  $\rightarrow$  standardi, TD  $\rightarrow$  tkivo dagnji, PHE  $\rightarrow$  feniletilamin, PUT  $\rightarrow$  putrescin, CAD  $\rightarrow$  kadaverin, HSM  $\rightarrow$  histamin, IS  $\rightarrow$  unutarnji standard, TYR  $\rightarrow$  tiramin, SPD  $\rightarrow$  spermidin, SPM  $\rightarrow$  spermin)

#### **4.5. Evaluacija analitičke metode**

U drugom dijelu istraživanja evaluirana je razvijena analitička metoda za određivanje biogenih amina u tkivu dagnji. Za evaluaciju metode određen je koeficijent određivanja pojedinačnih dansil derivata biogenih amina, efekt matrice, efikasnost ekstrakcije, ponovljivost i osjetljivost razvijene analitičke metode i razlučivanje kod optimiranih kromatografskih uvjeta separacije. Pri optimiranim uvjetima postiže se najkraće vrijeme analize, ali i potrebno razdvajanje kromatografskih pikova (krivulja) što je potvrđeno i izračunatim razlučivanjem koje je za sve susjedne pikove pojedinačnih biogenih amina iznosio najmanje 1.

##### **4.5.1. Kalibracija**

S obzirom da su standardne otopine biogenih amina pripremljene u vodi, a koji se iz tkiva dagnji ekstrahiraju s vodenom otopinom perklorne kiseline, ispitano je ima li razlike u odzivu detektora kada se standard priprema na isti način kao i realni uzorak, ili bez dodatka perklorne kiseline. U tu svrhu su standardi podvrgnuti istim postupcima pripreme uzorka za analizu kao i u slučaju realnih uzoraka. U 1 mL vodene otopine standarda dodano je 4 mL vodene otopine perklorne kiseline ( $c = 0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) ili jednaki volumen vode.

Dobiveni kalibracijski pravci za svaki biogeni amin u smjesi izračunati su metodom najmanjih kvadrata osim u slučaju spermidina za koje je ovisnost odziva detektora o koncentraciji nelinearna pa se koristila regresijska analiza polinoma drugog stupnja. U slučaju spermina primjenom optimiranog postupka nije bilo moguće dobiti odziv detektora sa zadovoljavajućim koeficijentom određivanja u potrebnom koncentracijskom području. Vrijednosti koeficijenta određivanja ( $R^2$ ) za sve dansil derivate pripremljene i u vodi i nakon dodatka perklorne kiseline iznosile su više od 0,99 osim u slučaju standarda spermidina. Koeficijent određivanja spermidina je iznosio 0,89 u perklornoj kiselini. Treba napomenuti da je u ovom dijelu ispitivanja za zaustavljanje reakcije u uklanjanje suviška neizreagiranoeg derivatizacijskog reagensa korišten amonijak. Usporedo je ispitano zaustavljanje reakcije dodatkom otopine prolina, čiji je dodatak rezultirao boljim koeficijentom određivanja za spermidin ( $R^2 > 0,95$ ) te je bio reagens izbora u daljnjem radu.

Numerički rezultati su prikazani u tablici 4 iz kojih je vidljivo da dodatak perklorne kiseline utječe na derivatizaciju biogenih amina. Priprema standardnih otopina bez dodatka perklorne kiseline u smjesu biogenih amina rezultirala bi izračunatim vrijednostima koncentracije biogenih amina približno 20 % većima bez dodatka perklorne kiseline, osim u slučaju tiramina kod kojeg je trend upravo suprotan. Na temelju dobivenih rezultata u daljnjem istraživanju baždarni pravci su pripremljeni dodatkom perklorne kiseline, a koeficijent određivanja bio je veći od 0,986 za feniletilamin i spermidin, odnosno 0,994 za sve ostale amine. Dobiveni koeficijenti određivanja u uzorcima dagnji u skladu su s istraživanjem Kim i sur. (2009) u kojem su koeficijenti određivanja bili u rasponu od 0,94 do 0,98. Spermin se u daljnjem istraživanju nije kvantificirao jer nije dobio smislen odziv detektora ni nakon optimiranja metode niti promjenom zaustavljanja reakcije dodatkom otopine prolina.

**Tablica 4.** Kalibracijski pravci i krivulje ( $H_2O \rightarrow$  derivatizacija provedena nakon ekstrakcije smjese standarda biogenih amina pripremljenih u vodi,  $H_2O + PCA \rightarrow$  derivatizacija provedena nakon ekstrakcije smjese standarda biogenih amina pripremljenih u vodi vodenom otopinom perklorne kiseline)

Biogeni amin	$H_2O$		$H_2O + PCA$	
	Jednadžba pravca/krivulje	$R^2$	Jednadžba pravca/krivulje	$R^2$
Feniletilamin	$y = 0,0636x - 0,00018$	0,9947	$y = 0,0805x + 0,00090$	0,9985
Putrescin	$y = 0,2976x - 0,0040$	0,9997	$y = 0,3606x + 0,0040$	0,9990
Kadaverin	$y = 0,0581x + 0,0023$	0,9991	$y = 0,0725x + 0,0019$	0,9968
Histamin	$y = 0,0621x - 0,00033$	0,9978	$y = 0,0718x + 0,09588$	0,9934
Tiramin	$y = 0,1922x + 0,00005$	0,9995	$y = 0,1736x + 0,0181$	0,9989
Spermidin	$y = 0,03322x^2 + 0,0614x + 0,00059$	0,9989	$y = 0,04837x^2 + 0,006035x + 0,05886$	0,8936

#### 4.5.2. Efekt matrice

Prilikom razvoja metode važno je istražiti i efekt matrice kao izvora mogućih interferencija sastojaka u smjesi koji mogu utjecati na odziv detektora, analizu i pouzdanost dobivenih rezultata. Efekt matrice, kao mjera moguće interferencije pojedinih sastojaka u smjesi, a time

posljedično i na analizu i kvantitetu dobivenih podataka, određen kao omjer nagiba pravca standardnih otopina u otapalu i dodanih u tkivo dagnje prikazan je u tablici 5. Efekt matrice kretao se u rasponu od 0,65 % za histamin do 152,9 % za feniletilamin, a najveći utjecaj interferenata je pokazan za tiramin (22,7 %) i feniletilamin (152,9 %). Rezultati upućuju na zaključak da matrica uzorka tkiva dagnje utječe na analitički postupak nekih dansil derivata biogenih amina. Iako je različiti efekt matrice uočen za sve dansil derivate biogenih amina, najveći efekt matrice dobiven za feniletilamin mogao bi biti posljedica činjenice da je njegova razina u tkivu dagnji bila izrazito mala, pa je i koncentracijski raspon standardnih otopina također nizak, što može doprinijeti izraženijem uočenom efektu matrice.

#### **4.5.2. Efikasnost ekstrakcije**

Zbog instrumentalnih problema analiza uzoraka za određivanje efikasnosti ekstrakcije nije bila uspješno provedena što je rezultiralo podacima koji su bili nepouzdana. Stoga, efikasnost ekstrakcije nije mogla biti izračunata.

**Tablica 5.** Kalibracijski pravci i krivulje (PCA → derivatizacija provedena nakon ekstrakcije smjese standarda biogenih amina pripremljenih u vodi vodenom otopinom perklorne kiseline, tkivo dagnje → derivatizacija provedena nakon ekstrakcije smjese standarda biogenih amina dodanih u tkivo dagnji vodenom otopinom perklorne kiseline)

Biogeni amin	PCA		Tkivo dagnje		Efekt matrice (%)
	Jednadžba pravca	$R^2$	Jednadžba pravca	$R^2$	
Feniletilamin	$y = 0,000080x + 0,00089$	0,987	$y = 0,000032x + 0,00092$	0,995	152,90
Putrescin	$y = 0,00036x + 0,0042$	0,998	$y = 0,00035x + 0,0147$	0,999	2,47
Kadaverin	$y = 0,000072x + 0,0019$	0,995	$y = 0,000066x + 0,0138$	0,998	8,72
Histamin	$y = 0,000071x + 0,00092$	0,993	$y = 0,0000728x + 0,0369$	0,998	0,65
Tiramin	$y = 0,000137x + 0,00005$	0,981	$y = 0,000178x + 0,0146$	0,998	22,73
Spermidin	$y = 0,000058x^2 + 0,033$	0,950	$y = 0,000064x^2 + 0,232$	0,991	7,77

### 4.5.3. Ponovljivost

Ponovljivost, izražena kao relativna standardna devijacija (%), određena je unutar jednog dana analizom 6 replikata u realnim uzorcima tkiva dagnji. Ponovljivost je iznosila 6,5 % za feniletilamin, 12,5 % za putrescin, 8,7 % za kadaverin, 16,5 % za tiramin, 25,7 % za spermidin. Zbog pojave interferencija u kromatogramima na vremenima zadržavanja histamina, nije bilo moguće odrediti ponovljivost. Ponovljivost je u usporedbi s literaturnim podacima za određivanje biogenih amina u ribama bila lošija u usporedbi s radom Šimat i Dalgaard (2011) i Zhai i sur. (2012) u kojima su ponovljivosti iznosile od 1,4 % do 5,6 % za sve biogene amine. Nasuprot tome, u radu Pataca i sur. (2021) ponovljivost je iznosila do 11 %, odnosno i do 17 % u radu Sagratini i sur. (2012) kao razlog navode uočene interferente iz matrice u rasponu od 2 % do 50 %. Ovdje treba istaknuti da je ponovljivost u ovom radu određena u realnim uzorcima dagnji, a ne u standardnim otopina što je čest slučaj u literaturi, pa bi to mogao i biti razlog što je ponovljivost za neke biogene amine lošija od one koja je navedena u većem broju radova. U malom broju radova koji su istraživanja proveli na školjkašima, ponovljivost često nije niti određivana. Tako u istraživanju Prester i sur. (2009) ponovljivost nije određena jer je raspon koncentracija određenih biogenih amina bio je ispod granice detekcije. Sve navedeno jasno upućuje na činjenicu da efekt matrice ima veliki utjecaj na ponovljivost u određivanju biogenih amina iz ribe i školjkaša.

### 4.5.4. Osjetljivost metode (granica detekcije i kvantifikacije)

Za određivanje granice detekcije konstruiran je baždarni dijagram u niskom koncentracijskom rasponu opisanom u potpoglavlju 3.2.4.8. Granica detekcije izračunata je prema izrazu (3) prikazanom u potpoglavlju 3.2.4.8. Granica detekcije iznosila je za feniletilamin 21,48 ng mL<sup>-1</sup>, za putrescin 78,51 ng mL<sup>-1</sup>, za kadaverin 27,19 ng mL<sup>-1</sup>, za histamin 54,84 ng mL<sup>-1</sup>, za tiramin 168,93 ng mL<sup>-1</sup> i za spermidin 43,08 ng mL<sup>-1</sup>. Granica detekcije izražena u odnosu na masu tkiva dagnje iznosila je za feniletilamin 0,40 mg kg<sup>-1</sup>, za putrescin 1,46 mg kg<sup>-1</sup>, za kadaverin 0,51 mg kg<sup>-1</sup>, za histamin 1,02 mg kg<sup>-1</sup>, za tiramin 3,15 mg kg<sup>-1</sup> i za spermidin 0,80 mg kg<sup>-1</sup>.

Za određivanje granice kvantifikacije konstruiran je baždarni dijagram u niskom koncentracijskom rasponu opisanom u potpoglavlju 3.2.4.8. Granica kvantifikacije izračunata je prema izrazu (4) prikazanom u potpoglavlju 3.2.4.8. Granica kvantifikacije iznosila je za feniletilamin  $65,08 \text{ ng mL}^{-1}$ , za putrescin  $237,92 \text{ ng mL}^{-1}$ , za kadaverin  $82,40 \text{ ng mL}^{-1}$ , za histamin  $166,22 \text{ ng mL}^{-1}$ , za tiramin  $511,92 \text{ ng mL}^{-1}$  i za spermidin  $130,55 \text{ ng mL}^{-1}$ . Granica kvantifikacije izražena u odnosu na masu tkiva dagnje iznosila je za feniletilamin  $1,21 \text{ mg kg}^{-1}$ , za putrescin  $4,44 \text{ mg kg}^{-1}$ , za kadaverin  $1,54 \text{ mg kg}^{-1}$ , za histamin  $3,11 \text{ mg kg}^{-1}$ , za tiramin  $9,22 \text{ mg kg}^{-1}$  i za spermidin  $2,44 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Granice detekcije određene u ovom radu slične su vrijednostima navedenima u istraživanju Šimat i Dalgaard (2011) u kojem je za određivanje biogenih amina korišten UV detektor, dok su u radu (Wang i sur., 2021) granice detekcije bile nešto niže. Zhang i sur. (2021) i Sagratini i sur. (2012) su za određivanje biogenih amina u tkivu riba koristili LC-MS te je zbog veće osjetljivosti spektrometrije masa u odnosu na UV i granica detekcije bila osjetno niža.

#### **4.6. Utjecaj uvjeta skladištenja na razinu biogenih amina u realnim uzorcima**

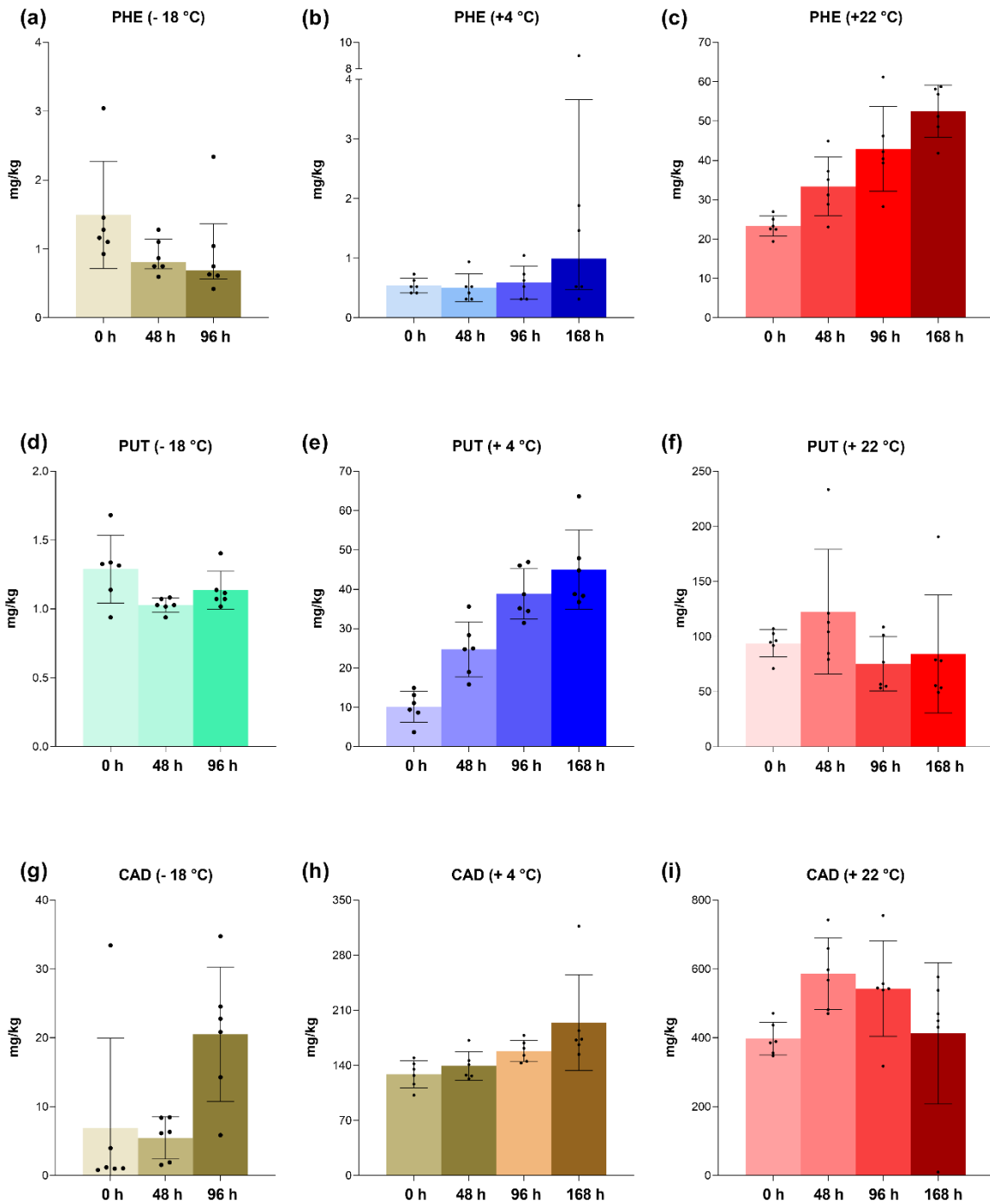
Analitička metoda je primijenjena za praćenje utjecaja uvjeta skladištenja na razinu biogenih amina u tkivu dagnji pri različitim uvjetima temperature i vremena skladištenja. Rezultati su prikazani na slikama 13 i 14.

Na slici 13 i slici 14 može se uočiti da povišenjem temperature raste i razina svih biogenih amina. Najviša razina pojedinih biogenih amina bila je pri prosječnoj temperaturi od  $+22 \text{ °C}$  nakon 168 sati skladištenja. Najviša razina pojedinih biogenih amina bila očekivano kod sobne temperature nakon 168 sati skladištenja. Najveća razlika u koncentraciji biogenih amina skladištenih pri  $+4 \text{ °C}$  u odnosu na one skladištene n pri  $+22 \text{ °C}$  uočena je za feniletilamin (približno 30 do 50 puta) (slika 14b,c), dok je najmanja razlika u koncentraciji bila za spermidin. Prema istraživanju Prester i sur. (2009) zabilježene su neznatne promjene koncentracija za sve biogene amine u mediteranskoj dagnji pri temperaturi od  $+22 \text{ °C}$ , osim za histamin čija se koncentracija se povisila za 1,5 puta tijekom 24 h. Za razliku od ostalih biogenih amina, trend je bio suprotan, koncentracija spermidina bila je manja kod sobne temperature u odnosu na temperaturu pri  $+4 \text{ °C}$ . Dobiveni rezultat je u skladu s rezultatom istraživanja An i sur. 2015 na kamenicama u kojem je uočen porast koncentracije od

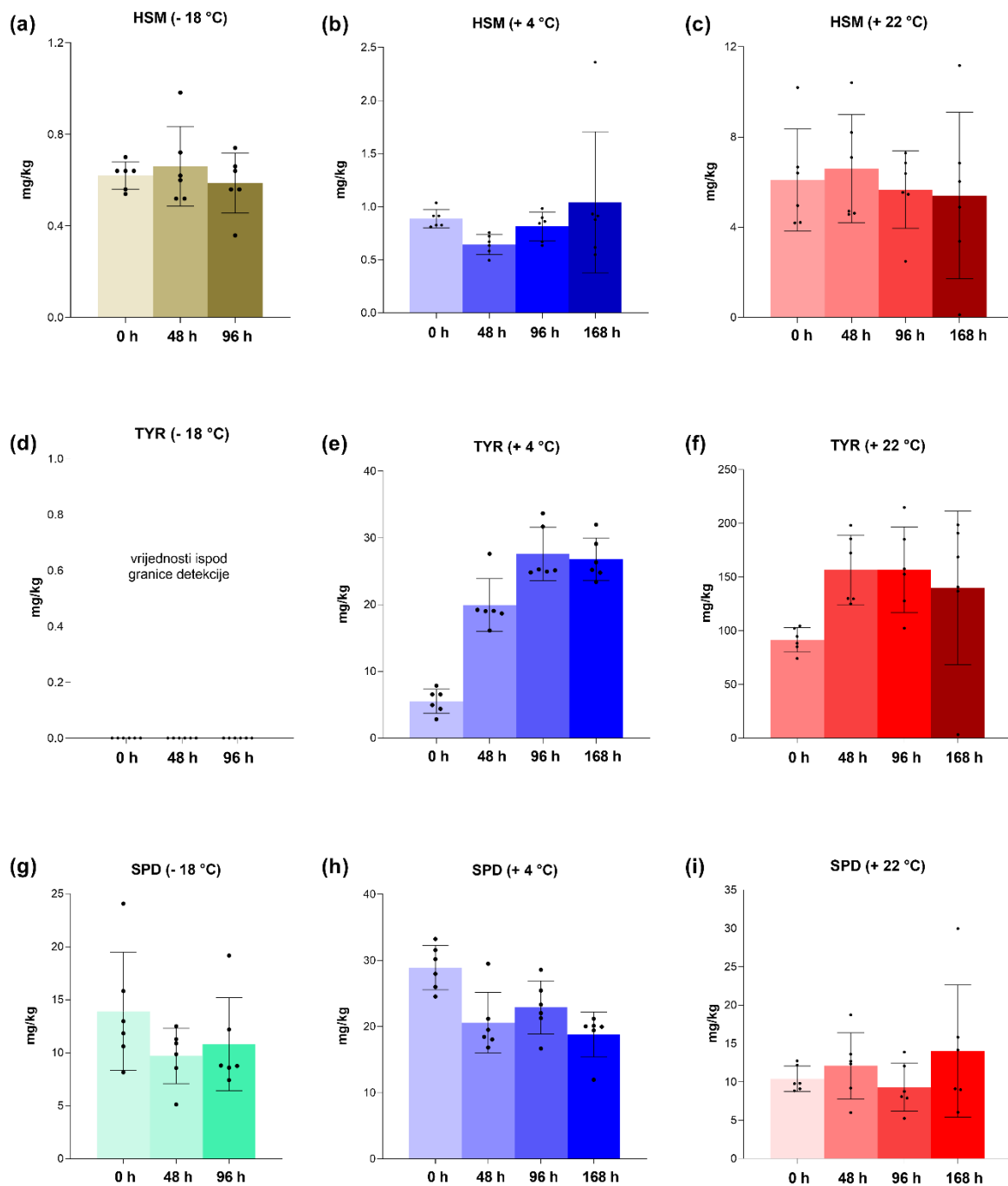


46,7 mg kg<sup>-1</sup> do 119,7 mg kg<sup>-1</sup> kod spermidina nakon dva dana skladištenja pri temperaturi od +4 °C. Istraživanje Mietz and Karmas (1997) pokazuje da je razina histamina, putrescina, kadaverina niska u svježim uzorcima tune, a raste s napredovanjem raspadanja tkiva. Spermidin i spermin imaju suprotan trend, njihova se koncentracija smanjuje s raspadanjem uzorka (Pataca i sur., 2021), što je uočeno i slučaju dagnji, u kojima se količina spermidina smanjila kod skladištenja pri sobnoj temperaturi u odnosu na skladištenje pri +4 °C. Visoke koncentracije spermina i spermidina su pokazatelj dobre kvalitete dok suprotan trend ukazuje raspadanje tkiva (Pataca i sur., 2021). Temeljem navedenog može se zaključiti da je kvaliteta dagnji skladištenih na sobnoj temperaturi narušena.

Najniže razine biogenih amina očekivano su određene pri temperaturi od -18 °C bez obzira na vrijeme skladištenja. Podjednake koncentracije feniletilamina uočene su -18 °C i kod +4 °C. Interesantno, kod -18 °C koncentracija tiramina bila je ispod granice detekcije. Kod skladištenja pri +4 °C tiramin i putrescin te u manjoj mjeri kadaverin pokazuju tendenciju porasta koncentracije s vremenom skladištenja. Ovaj rezultat je u skladu s istraživanjem An i sur. (2015) u kojem se koncentracija putrescina povisila 7 puta skladištenjem pri temperaturi od +4 °C, dok je razina fenietilamina, histamina i tiramina tek neznatno porasla. Pri +22 °C isti trend porasta koncentracije s vremenom skladištenja može se zamijetiti i u slučaju feniletilamina. Dobiveni rezultati u ovom radu ukazuju na to da je porast koncentracije biogenih amina u većoj mjeri ovisan o temperaturi, a ne o vremenu skladištenja pri istim temperaturnim uvjetima. Jedan od razloga za promjene razine biogenih amina je da povišenje temperature pogoduje razvoju bakterija koje se nalaze na tkivu koje se raspada, a koje su odgovorne za dekarboksilaciju slobodnih aminokiselina enzimima dekarboksilazama (Prester, 2011). Značajan porast bakterija koje formiraju amine pri 25 °C zabilježen je u istraživanju Kim i sur. (2009). Također, je uočeno da su bakterije *Enterobacter* spp. uzrok nastajanja histamina, kadaverina i putrescina u istraživanju na uzorcima riba, lignji i školjaka (Kim i sur., 2009).



**Slika 13.** Dijagrami ovisnosti promjene koncentracije fenietilamina, putrescina, kadaverina o vremenu skladištenja pri sljedećim temperaturama: dijagrami a) ,c) , g) pri  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dijagrami b) , e) , h) pri  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , i dijagrami c) , f) , i) pri prosječnoj sobnoj temperaturi od  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  (PHE → feniletilamin, PUT → putrescin, CAD → kadaverin)



**Slika 14.** Dijagrami ovisnosti promjene koncentracije fenietilamina, putrescina, kadaverina o vremenu skladištenja pri sljedećim temperaturama: dijagrami a) ,c) , g) pri  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , dijagrami b) , e) , h) pri  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , i dijagrami c) , f) , i) pri + prosječnoj sobnoj temperaturi od  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  (HSM → histamin, TYR → tiramin, SPD → spermidin)

Osim temperature skladištenja još dva važna parametara koji pokazuju promjenu kvalitete morskih proizvoda, a izraženi su kao indeks kvalitete (engl. *quality indeks, QI*) i indeks biogenih amina (Mietz i Karmas, 1977.; Veciana-Nogue's i sur., 1997). Indeks kvalitete se određuje kao omjer zbroja koncentracija histamina, putrescina, kadaverina i znamenke 1 i zbroja koncentracija spermidina i spermina (Pataca i sur., 2021). Visoke koncentracije spermidina i spermina i niske koncentracije putrescina, histamina i kadaverina indikatori su dobre kvalitete (Pataca i sur., 2021). Međutim, njihova formula ne uključuje i tiramin, pa su Veciana-Nogue's i sur. (1997) alternativno predložili formulu koja predstavlja zbroj biogenih amina uključujući i tiramin, ali bez spermina i spermidina. U ovom radu nije određen indeks kvalitete jer razvijenom analitičkom metodom nije bilo moguće odrediti spermin. Indeks biogenih amina izračunat prema formuli predloženoj od strane Veciana-Nogues i sur. (1977) za pojedine uvjete skladištenja prikazan je u tablici 6.

**Tablica 6.** Indeks biogenih amina pri pojedinim uvjetima skladištenja izražen u  $\text{mg kg}^{-1}$

Temperatura skladištenja	BAI ( $\text{mg kg}^{-1}$ )			
	Vrijeme skladištenja			
	0 h	48 h	96 h	168 h
-18 °C	24,2	17,7	34,0	-
+4 °C	174,7	205,8	248,9	288,4
+22 °C	623,1	918,1	832,8	708,6

Indeks biogenih amina (BAI) povećao se s duljinom skladištenja i s povećanjem temperature skladištenja. Očekivano, razlika u indeksu biogenih amina bila je najveća između skladištenja pri temperaturi od -18 °C i +22 °C. Indeks biogenih amina je bio između 24 i 52 puta veći kod skladištenja pri +22 °C. Najmanja razlika je bila između skladištenja pri temperaturi od +4 °C i +22 °C te se kretala u rasponu od 3,3 do 4,5 puta. Kod skladištenja pri +4 °C indeks biogenih amina postupno raste, dok kod skladištenja pri +22 °C dostiže svoj maksimum nakon 48 h skladištenja, nakon čega je dolazi do njegovog postupnog snižavanja.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Razvijena je analitička metoda za određivanje 6 biogenih amina u tkivu školjkaša koja se temeljila na ekstrakciji biogenih amina s perklornom kiselinom, derivatizaciji ekstrahiranih biogenih amina s dansil klorid te separaciji nastalih derivata tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u sprezi s detektorom s nizom dioda.
2. Optimirani su uvjeti derivatizacije biogenih amina te su se kao optimalni uvjeti pokazali temperatura niža od 60 °C, kraće trajanje procesa derivatizacije kroz 15 minuta, više koncentracije dansil klorida (15 mg mL<sup>-1</sup>) i pH uvjeti reakcijske smjese između 10,5 i 11.
3. Odziv detektora bio je linearan za pojedinačne biogene amine a koeficijent određivanja bio je veći od 0,99 za sve biogene amine u koncentracijskom području određivanja.
4. Razvijena analitička metoda pokazala se dovoljno osjetljivom za detekciju i kvantifikaciju svih 6 biogenih amina.
5. Razvijena analitička metoda primijenjena je za praćenje utjecaja uvjeta skladištenja na razinu biogenih amina u tkivu dagnji pri različitim uvjetima temperature i vremena skladištenja.
6. Najniže razine biogenih amina u tkivu dagnji su određene pri temperaturi od -18 °C bez obzira na vrijeme skladištenja.
7. Povišenjem temperature tijekom 168 h rastu razine feniletilamina, putrescina, kadaverina, histamina i tiramina koje dostiže svom maksimum pri temperaturi od +22 °C nakon 168 sati skladištenja.
8. U slučaju spermidina, razina pri temperaturi od +22 °C nakon 168 sati skladištenja usporediva je s onom pri -18 °C, dok je najveća razina uočena kod skladištenja pri +4 °C.
9. Indeks biogenih amina u tkivu dagnji povećao se s duljinom skladištenja i s povećanjem temperature skladištenja.

## 6. LITERATURA

An D, Chen Z, Zheng J, Chen S, Wang L, Huang Z, Weng L (2015) Determination of biogenic amines in oysters by capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence. *Food Chem* **168**, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.019>

Arapov J, Bužančić M, Skejić S, Mandić J, Bakrač A., Straka M., Ninčević Gladan, Ž. (2020) Phytoplankton dynamics in the middle Adriatic estuary, with a focus on the potentially toxic genus *Pseudo-nitzschia*. *J Mar Sci Eng* **8**, 1-22. <https://doi.org/10.3390/jmse8080608>

Arulkumar A, Paramithiotis S, Paramasivam S (2023) Biogenic amines in fresh fish and fishery products and emerging control. *Aquac Fish* **8**, 431- 450. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.02.001>

Atapattu SN, Rosenfeld JM (2013) Solid phase analytical derivatization as a sample preparation method. *J Chromatogr A* **1296**, 204-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.020>

Blondin Tsafack P, Tsopmo A (2022) Effects of bioactive molecules on the concentration of biogenic amines in foods and biological systems. *Heliyon* **8**, 1-12.

Bohnam V, Shields J., Riginos C (2017) *Mytilus galloprovincialis* (Mediterranean mussel), CAB, Wallingford. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.7307>, Pristupljeno 15. kolovoza, 2023.

Dadáková E, Křížek M, Pelikánová T (2009) Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chem.* **116**, 365-370. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.018>

Daniel D, Dos Santos VB, Vidal DT, do Lago CL (2015) Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1416**, 121-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.065>

David V, Moldoveanu SC, Galaon T (2020) Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomed Chromatogr* **35**, 1-50. [https://doi: 10.1002/bmc.5008](https://doi.org/10.1002/bmc.5008)

Dong H, Xiao K (2017) Modified QuEChERS combined with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce. *Food Chem* **229**, 502-508. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.120>

Erdag D, Merhan O, Yildiz B (2019) Biochemical and Pharmacological Properties of Biogenic Amines. U: Proestos C (ured.) *Biogenic Amines*, IntechOpen, London, str. 1-14.

FAO/WHO (2012) *Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products*. FAO/WHO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. <https://www.fao.org/3/i3390e/i3390e.pdf>. Pristupljeno 1. Kolovoza 2023.

Fernanda Angulo M, Flores M, Aranda M, Henriquez-Aedo K (2020) Fast and selective method for biogenic amines determination in wines and beers by ultra high performance liquid chromatography. *Food Chem* **309**, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125689>

Flick G (2005) Problematic compounds for procedures, processors. *Glob. aquacult. Advocate*. <https://www.globalseafood.org/advocate/scombrottoxins-part-1/> Pristupljeno 15. kolovoza 2023.

Francisco KCA, Brandão PF, Ramos RM, Gonçalves LM, Cardoso AA, Rodrigues JA (2019) Salting-out assisted liquid-liquid extraction with dansyl chloride for the determination of biogenic amines in food. *Int J Food Sci Technol* **55**, 248-258. [https://doi:10.1111/ijfs.14300](https://doi.org/10.1111/ijfs.14300)

Fu Y, Zhou Z, Li Y, Lu X., Zhao C, Xu G (2016) High-sensitivity detection of biogenic amines with multiple reaction monitoring in fish based on benzoyl chloride derivatization. *J Chromatogr A* **1465**, 30-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.067>

Gardini F, Özogul Y, Suzzi G, Tabanelli, G, Özogul, F (2016) Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A Review *Front Microbiol* **7**, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01218>

Guo X, Dai Z, Zhang W (2022) Pollution, exposure and risk of biogenic amines in canned sea fish: Classification of analytical methods based on carbon spheres QuEChERS extraction combined with HPLC. *Molecules* **27**, 1-15. <https://doi.org/10.3390/molecules27196243>

Hernández-Cassou S, Saurina J (2011) Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques. *J Chromatogr B* **879**, 1270-1281. <https://doi:10.1016/j.jchromb.2010.11.020>

Herrero A, Sanllorente S, Reguera C, Ortiz MC, Sarabia LA (2016) A new multiresponse optimization approach in combination with a D-Optimal experimental design for the determination of biogenic amines in fish by HPLC-FLD. *Anal Chim Acta* **945**, 31-38. <https://doi:10.1016/j.aca.2016.10.001>

Hui JY, Taylor SL (1985) Inhibition of in vivo histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine N-methyltransferase, and monoamine oxidase. *Toxicol Appl Pharmacol* **81**, 241-249. [https://doi:10.1016/0041-008x\(85\)90160-7](https://doi:10.1016/0041-008x(85)90160-7)

Innocente N, Biasutti M, Padovese M, Moret S (2007) Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chem.* **101**, 1285-1289. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.026>

Jastrzębska A, Piasta A, Szłyk E (2013) Simultaneous determination of selected biogenic amines in alcoholic beverage samples by isotachophoretic and chromatographic methods. *Food Addit Contam* **31**, 83-92. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2013.855326>

Jeya Shakila J, Vijayalakshmi K, Jeyasekaran G (2003) Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature. *Food Chem* **82**, 347-352. [https://doi:10.1016/S0308-8146\(02\)00552-6](https://doi:10.1016/S0308-8146(02)00552-6)

Jeya Shakila R, Vasundhara T, Kumudavally K (2001) A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chem* **75**, 255-259. [https://doi:10.1016/S0308-8146\(02\)00552-6](https://doi:10.1016/S0308-8146(02)00552-6)

Kim MK, Mah JH, Hwang HJ (2009) Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chem* **116**, 87-95. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.010>



Koller H (2020) Biogenic amines as a product of the metabolism of proteins in beer. (Disertacija), Sveučilište u Maine, Maine. <https://digitalcommons.library.umaine.edu/etd/3259/> Pristupljeno 25. srpnja 2023.

Lehane L, Olley J (2000) Histamine fish poisoning revisited. *Int J Food Microbiol* **58**, 1-37. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00296-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00296-8)

Liu SJ, Xu JJ, Ma CL, Guo CF (2018) A comparative analysis of derivatization strategies for the determination of biogenic amines in sausage and cheese by HPLC. *Food Chem* **266**, 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.001>

Maintz L, Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* **85**, 1185-1196. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>

Mantoanelli JOF, Gonçalves LM, Pereira EA (2020) Dansyl chloride as a derivatizing agent for the analysis of biogenic amines by CZE-UV. *Chromatographia* **83**, 767-778. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03896-x>

Mietz JL, Karmas E (1977) Chemical quality indeks of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *J Food Sci* **42**, 155-158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb01240.x>

Mo Dugo G, Vilasi F, La Torre GL, Pellicanò TM (2006) Reverse phase HPLC/DAD determination of biogenic amines as dansyl derivatives in experimental red wines. *Food Chem* **95**, 672-676. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.001>

Munir MA, Badri KH (2020) The importance of derivatizing reagent in chromatography applications for biogenic amine detection in food and beverages. *J Anal Methods Chem* **2020**, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2020/5814389>

Naila A, Flint S, Fletcher G, Bremer P, Meerdink G (2010) Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *J Food Sci* **75**, 139-150. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>

Neofotistos GAD, Tsagkaris AS, Danezis GP, Proestos C (2019) Emerging Trends in Biogenic Amines Analysis. U: Proestos C (ured.), Biogenic amines, IntechOpen, London, str. 1-17.

Özogul Y, Özogul F (2019) Biogenic Amines Formation, Toxicity, Regulations in Food. U: Saad B, Tofalo R (ured.) Biogenic Amines in Food: Analysis, Occurrence and Toxicity, Royal Society of Chemistry, London, str. 1-17.

Park JS, Lee CH, Kwon EY, Lee HJ, Kim JY, Kim SH (2010) Monitoring the contents of biogenic amines in fish and fish products consumed in Korea. *Food Control* **21**, 1219-1226. <https://doi:10.1016/j.foodcont.2010.02.001>

Pataca JKG, Porto-Figueira P, Pereira JAM, Caldeira H, Câmara JS (2021) Profiling the occurrence of biogenic amines in different types of tuna samples using an improved analytical approach. *Food Sci Technol* **139**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110804>

Plenis A, Ołędzka I, Kowalski P, Miękus N, Bączek T (2019) Recent trends in the quantification of biogenic amines in biofluids as biomarkers of various disorders: A Review. *J Clin Med* **8**, 1-55. <https://doi:10.3390/jcm8050640>

Prester L (2011) Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Addit Contam* **28**, 1547-1560. <https://doi:10.3390/jcm8050640>

Prester L, Orct T, Macan J, Vukušić J, Kipčić D (2009) Determination of biogenic amines and endotoxin in squid, Musky octopus, Norway lobster, and mussel stored at room temperature. *Arh Hig Rada Toksikol* **61**, 389-397. <https://doi:10.1080/02652030802520878>

Proestos C, Loukatos P, Komaitis M (2008) Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chem* **106**, 1218-1224. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:85943283>

Qu Y, Wang J, Liu Z, Wang X, Zhou H (2022) Effect of storage temperature and time on biogenic amines in canned seafood. *Foods* **11**. <https://doi.org/10.3390/foods11182743>

Ramos R M, Valente IM, Rodrigues JA (2014) Analysis of biogenic amines in wines by salting-out assisted liquid-liquid extraction and high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Talanta* **124**, 146-151. <https://doi:10.1016/j.talanta.2014.02.026>.

Romano A, Trip H, Lonvaud-Funel A, Lolkema JS, Lucas PM (2012) Evidence of two functionally distinct ornithine decarboxylation systems in lactic acid bacteria, *Appl Environ Microbiol* **78**, 1953-1961. <https://doi:10.1128/AEM.07161-11>

Sagrati G, Fernández-Franzón M, De Berardinis F, Font G, Vittori S, Mañes J (2012) Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem* **132**, 537-543. <https://doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.054>

Serratore P, Bignami G, Ostanello F, Lorito L (2021) Hazard identification related to the presence of *Vibrio* spp., biogenic amines, and indole-producing bacteria in a non-filter feeding marine gastropod (*Tritia mutabilis*) commercialized on the Italian market. *Foods* **10**, 1-12. <https://doi.org/10.3390/foods10112574>

Silva M (2005) Quantitation by HPLC of amines as dansyl derivatives. *J Chromatogr A* **70**, 445-470. [https://doi:10.1016/S0301-4770\(05\)80018-1](https://doi:10.1016/S0301-4770(05)80018-1)

Smith CK, Durack DT. (1978) Isoniazid and reaction to Cheese. *Ann Intern Med* **88**, 520-521. <https://doi:10.7326/0003-4819-88-4-520>

Spano G, Russo P, Lonvaud-Funel A, Lucas P, Alexandre H, Grandvalet C, Coton E i sur. (2010) Biogenic amines in fermented foods. *Eur J Clin Nutr* **64**, 95-100. <https://doi:10.1038/ejcn.2010.218>

Stephens K (1986) Amino Acid Analysis by Dansylation: An Honors Thesis (ID 499) Thesis Director (Počasni rad), Ball State University, Muncie. <https://docplayer.net/19094555-Amino-acid-analysis-by-dansylation-an-honors-thesis-id-499-kay-stephens-thesis-director-ball-state-university.html>, Pristupljeno 22. kolovoza, 2023.

Šimat V, Dalgaard P (2011) Use of small diameter column particles to enhance HPLC determination of histamine and other biogenic amines in seafood. *LWT - Food Sci Technol* **44**, 399-406. <https://doi:10.1016/j.lwt.2010.08.011>

Taylor SL, Lieber ER (1979) In vitro inhibition of rat intestinal histamine-metabolizing enzymes. *Food Cosmet Toxicol* **17**, 237-240. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90287-6](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90287-6)

Veciana-Nogués MT, Mariné-Font A, Vidal-Carou MC (1997) Biogenic Amines as Hygienic Quality Indicators of Tuna. Relationships with Microbial Counts, ATP-Related Compounds, Volatile Amines, and Organoleptic Changes. *J Agric Food Chem* **45**, 2036-2041. <https://doi.org/10.1021/jf9609111>

Visciano P, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G (2014) Histamine poisoning and control measures in fish and fishery products. *Front Microbiol* **5**, 1-3. <https://doi: 10.3389/fmicb.2014.00500>

Wallace RL, Taylor WK (1996) *Invertebrate Zoology*, 5.izd., Prentice Hall College Div, Hoboken.

Wang J, Liu Z, Qu Y (2020) Ultrasound-assisted dispersive solid-phase extraction combined with reversed-phase high-performance liquid chromatography-photodiode array detection for the determination of nine biogenic amines in canned seafood. *J Chromatogr A* **1636**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461768>

Waqas A, Mohammed GI, Al-Eryani DA, Saigl ZM, Alyoubi AO, Alwael H, Bashammakh AS, O'Sullivan CK, El-Shahawi MS (2019) Biogenic amines formation mechanism and determination strategies: Future challenges and limitations. *Crit Rev Anal Chem* **50**, 485-500. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1657793>

Wójcik W, Łukasiewicz M, Puppel K (2020) Biogenic amines - formation, action and toxicity—review. *J Sci Food Agric* **101**, 2634-2640. <https://doi: 10.1002/jsfa.10928>

Wojnowski W, Namiéśnik J, Płotka-Wasyłka J (2019) Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for in situ determination of biogenic amines in meat: Estimation of meat's freshness. *Microchem J* **14**, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.10.034>

Yu W, Lewis NS, Gray HB, Dalleska NF (2020) Isotopically selective quantification by UPLC-MS of aqueous ammonia at submicromolar concentrations using dansyl chloride derivatization. *ACS Energy Lett* **5**, 1532-1536. <https://doi.org/10.1021/acsenenergylett.0c00496>

Zeisel SH, DaCosta KA (1986) Increase in human exposure to methylamine precursors of 7N-nitrosamines after eating fish. *Cancer Res* **46**, 6136-6138. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3779634/>

Zhai H, Yang X, Li L, Xia G, Cen J, Huang H, Hao S (2012) Biogenic amines in commercial fish and fish products sold in southern China. *Food Control* **25**, 303-308. <https://doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.057>

Zhang X, Fang C, Huang D, Yang G, Tang Y, Shi Y, Kong C, Cao P, Cai Y (2021) Determination of 8 biogenic amines in aquatic products and their derived products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization. *Food Chem* **361**, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130044>

Zhernov YV, Simanduyev MY, Zaostrovvtseva OK, Semeniako EE, Kolykhalova KI, Fadeeva IA i sur. (2023) Molecular Mechanisms of Scombroid Food Poisoning. *Int J Mol Sci* **24**, 809. <https://doi.org/10.3390/ijms24010809>

Zhong D, Zhou Y (2019) Derivatization in Sample Preparation for LC-MS Bioanalysis. U: Li W, Jian W, Fu Y (ured.) *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*, John Wiley & Sons, Hoboken, str. 260-274.

Zhu H, Yang S, Zhang Y, Fang G, Wang S (2016) Simultaneous detection of fifteen biogenic amines in animal derived products by HPLC-FLD with solid-phase extraction after derivatization with dansyl chloride. *Anal Methods* **8**, 3747-3755. <https://doi:10.1039/C6AY00010J>.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja IVANA OREŠKOVIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ivana Orešković

Vlastoručni potpis