

# Pročišćavanje ekstrakata ribe u svrhu analize udjela histamina Raman spektroskopijom

---

**Pranjić, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2016**

*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:159:961832>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Marija Meštrović 651/PI

**PROČIŠĆAVANJE EKSTRAKATA  
RIBE U SVRHU ANALIZE  
UDJELA HISTAMINA RAMAN  
SPEKTROSKOPIJOM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sanje Vidaček te uz pomoć asistenta Tibora Janči, dipl. ing.

*Najiskrenije se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sanji Vidaček koja mi je svojim savjetima i znanjem pomogla u oblikovanju i pisanju rada te asistentu Tiboru Janči, dipl. ing. za svestranu pomoć, iskrene savjete i razumijevanje koje mi je ukazao tijekom izrade rada.*

*Veliko hvala mojim roditeljima koji su me svojom ljubavlju i podrškom ohrabrali i uvijek vjerovali u mene. Hvala vam na svim žrtvama kojim ste mi omogućili bezbrižno školovanje.*

*Posebnu zahvalnost dugujem suprugu koji mi je najveći izvor snage i motivacije, hvala ti za svu ljubav, podršku i razumijevanje.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### PROČIŠĆAVANJE EKSTRAKATA RIBE U SVRHU ANALIZE UDJELA HISTAMINA RAMAN SPEKTROSKOPIJOM

*Marija Meštrović, 651/PI,*

**Sažetak:** Biogeni amini (BA) su skupina organskih dušikovih spojeva koji nastaju dekarboksilacijom aminokiselina. U ljudskom organizmu igraju ulogu moderatora u brojnim biološkim reakcijama koje mogu imati i neželjene posljedice. Određivanje biogenih amina u ribi važno je zbog mogućeg toksikološkog djelovanja na ljudski organizam nakon unosa velike količine biogenih amina te zbog činjenice da postoji veza između visokog udjela biogenih amina u ribi i loših higijenskih uvjeta tijekom proizvodnog procesa. U ovom radu ispitivana je mogućnost primjene Raman spektroskopije za analizu histamina u ribi i proizvodima od ribe. Prilikom analize realnih uzoraka histamin nije mogao biti detektiran zbog interferencija koje potječu od drugih tvari prisutnih u ribljem mišićju. Stoga su uzorci ribe pročišćeni te se postupkom pročišćavanja iz uzorka gubi oko 63 % ukupnih tvari uz gubitak od 38 % histamina čime se potvrđuje uspješnost pročišćavanja na smanjenje utjecaja matriksa prilikom analize Ramanovom spektroskopijom.

**Ključne riječi:** biogeni amini, histamin, riba, HPLC, Ramanova spektroskopija

**Rad sadrži:** 41 stranica, 10 slika, 7 tablica, 32 literaturnih navoda, 1 prilog

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *izv.prof. dr.sc. Sanja Vidaček*

**Pomoć pri izradi:** *dipl.ing. Tibor Janči, asistent*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. *Marina Krpan*
2. Izv.prof.dr.sc. *Sanja Vidaček*
3. Doc.dr.sc. *Leo Gracin*
4. Izv.prof.dr.sc. *Ksenija Marković*

**Datum obrane:** 28. rujna 2016.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of food technology  
Laboratory for Meat and Fish

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### PURIFICATION OF THE FISH EXTRACT FOR HISTAMINE CONTENT ANALYSIS BY RAMAN SPECTROSCOPY

*Marija Meštrović, 651/PI*

**Abstract:** Biogenic amines (BA) are the group of organic nitrogen compounds formed by decarboxylation of amino acids and their occurrence gives rise to significant debate of their physiological effects in humans. The study of biogenic amines in fish is important because the possible and the possibility that there might exist a relationship between high amine contents and unsanitary conditions during the procedures. In this study the possibility of application of Raman spectroscopy for the analysis of histamine in fish and fish products. In the analysis of real samples histamine could be detected due to the interference originating from other substances present in fish muscles. Therefore, the fish samples purified and purification process of the sample loses about 63% of substances with a loss of 38% of histamine which confirms the success of treatment to reduce the impact of the matrix when analyzing Raman spectroscopy. toxicological risk that might results from an intake of a great quantity of these molecules.

**Keywords:** biogenic amines, histamine, fish, HPLC, Raman spectroscopy

**Thesis contains:** 41 pages, 10 figures, 7 tables, 32 references, 1 supplement

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Sanja Vidaček, Associate Professor*

**Technical support and assistance:** *B.Sc. Tibor Janči, Assistant*

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Marina Krpan*, Assistant professor
2. PhD. *Sanja Vidaček*, Associate professor
3. PhD. *Leo Gracin*, Assistant professor
4. PhD. *Ksenija Marković*, Associate professor

**Thesis defended:** 28 September 2016

<b>Sadržaj</b>	<b>stranica</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. BIOGENI AMINI.....	2
2.1.1. Nastajanje biogenih amina .....	4
2.1.2. Histamin .....	5
2.1.2.1. Sinteza i metabolizam histamina.....	5
2.1.2.2. Histaminsko trovanje .....	6
2.1.3. Mikroorganizmi odgovorni za proizvodnju biogenih amina u ribi.....	8
2.1.4. Utjecaj temperature i vremena skladištenja .....	9
2.1.5. Utjecaj atmosfere skladištenja, soli i pH .....	9
2.1.6. Utjecaj biogenih amina na ljudsko zdravlje.....	10
2.1.7. Zakonski propisi za udio biogenih amina u proizvodima ribarstva .....	11
2.1.8. Strategija za smanjenje nastajanja biogenih amina.....	12
2.1.9. Analitičke metode za određivanje biogenih amina .....	13
2.1.10. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) .....	15
2.1.10.1. Uređaji za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	18
3.2. MATERIJALI.....	18
3.2.1. Uzorci ribe.....	18
3.2.2. Kemikalije .....	18
3.2.3. Reagensi .....	19
3.2.4. Mobilna faza.....	19
3.2.5. Laboratorijska oprema.....	19
3.3. METODE RADA .....	20
3.3.1. Određivanje biogenih amina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) .....	20
3.3.2. Pročišćavanje histamina iz ekstrakata .....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
4.1. REZULTATI KROMATOGRFSKE ANALIZE .....	27
4.1.1. Standardni postupak .....	29
4.1.2. Postupak s pročišćavanjem.....	30
4.2. ISKORIŠTENJE POSTUPKA PROČIŠĆAVANJA POJEDINOG BIOGENOG AMINA .....	31
4.2.1. Standardni postupak .....	34
4.2.2. Postupak s pročišćavanjem.....	34
4.3. UKUPNO ISKORIŠTENJE .....	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>38</b>
<b>7. PRILOZI</b>	



## **1.UVOD**

U vremenu sveopće globalizacije sve je veća potreba za osiguranjem kvalitete i sigurnosti proizvoda, postavljaju se više granice u zakonskim regulativama glede kvalitete i sigurnosti proizvoda što naposljetku dovodi i do potrebe za preciznim i brzim analitičkim metodama. Preporuke o zdravom i ispravnom načinu prehrane gotovo uvijek uključuju ribu i proizvode od ribe. Međutim, i tada treba imati na umu potencijalne opasnosti koje mogu izazvati itekako ozbiljne zdravstvene tegobe odnosno bolesti.

Analize biogenih amina, kako u ribi, tako i u drugoj hrani i piću, pobuđuje sve veći interes među znanstvenicima, a i u široj društvenoj zajednici. Uzrok tolikog interesa jest njihov toksični učinak na ljudsko zdravlje, a ujedno su i dobri indikatori kvalitete, higijene vođenja proizvodnog procesa i očuvanosti same ribe. Vrlo je teško odrediti koncentraciju biogenih amina koje su toksične za ljude, jer toksične doze ovise o osjetljivosti pojedinca.

Biogeni amini su spojevi s dušikom koji su modulatori brojnih bioloških reakcija u ljudskom tijelu (Maintz i Novak, 2008) među kojima su najznačajniji histamin, putrescin, kadaverin, tiramin, spermidin, spermin, triptamin i 2-feniletilamin (Önal, 2007).

Do danas je razvijen velik broj metoda za analizu biogenih amina, no gotovo sve metode imaju određene nedostatke zbog kojih su teško primjenjive u uvjetima industrijskih laboratorija. Budući da je kontrola ribe kao sirovine ključna za prevenciju trovanja histaminom i dalje se intenzivno istražuju nove „brze“ metode za analizu histamina koje bi bile jednostavne za primjenu u uvjetima industrijskih laboratorija te uz prihvatljive troškove omogućile kontrolu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu čime bi se poboljšala kvaliteta i sigurnost finalnog proizvoda.

Ovaj rad proveden je u sklopu istraživanja mogućnosti primjene Raman spektroskopije za analizu histamina u ribi i proizvodima od ribe. Cilj ovog rada bio je ispitati metode za pročišćavanje histamina iz ekstrakata ribe, utvrditi iskorištenje postupka pročišćavanja pojedinog biogenog amina te ukupno iskorištenje histamina kao važnog parametra ovih analitičkih metoda.

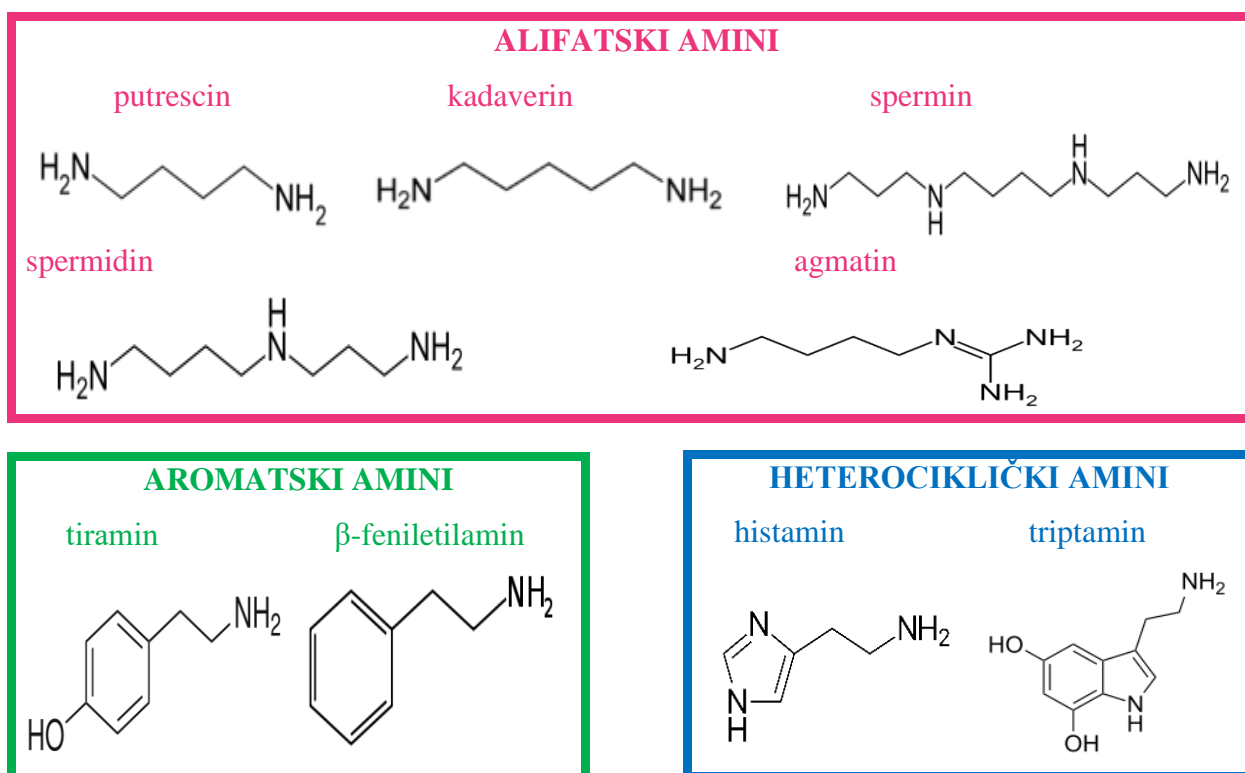
## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. BIOGENI AMINI

Biogeni amini su organske baze niske molekulske mase s biološkom aktivnosti koji se sintetiziraju ili metaboliziraju u stanicama živih organizama (životinjama, biljkama i mikroorganizama) (Mendes, 2009). Nalaze se u različitim vrstama fermentirane hrane i pića poput vina, sira, piva, kobasica, ribljih proizvoda i mesa kao posljedica dekarboksilacije aminokiselina što se povezuje sa kvarenjem hrane i pića, a također se pojavljuju i u nefermentiranoj hrani kao rezultat nepoželjne mikrobiološke aktivnosti.

Biogeni amini se mogu podijeliti u tri skupine prema njihovom porijeklu i kemijskoj strukturi (Slika 1):

- ALIFATSKI (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin);
- AROMATSKI (tiramin,  $\beta$ -feniletilamin);
- HETEROCIKLIČKI (histamin, triptamin) (Mohamed i sur., 2009).

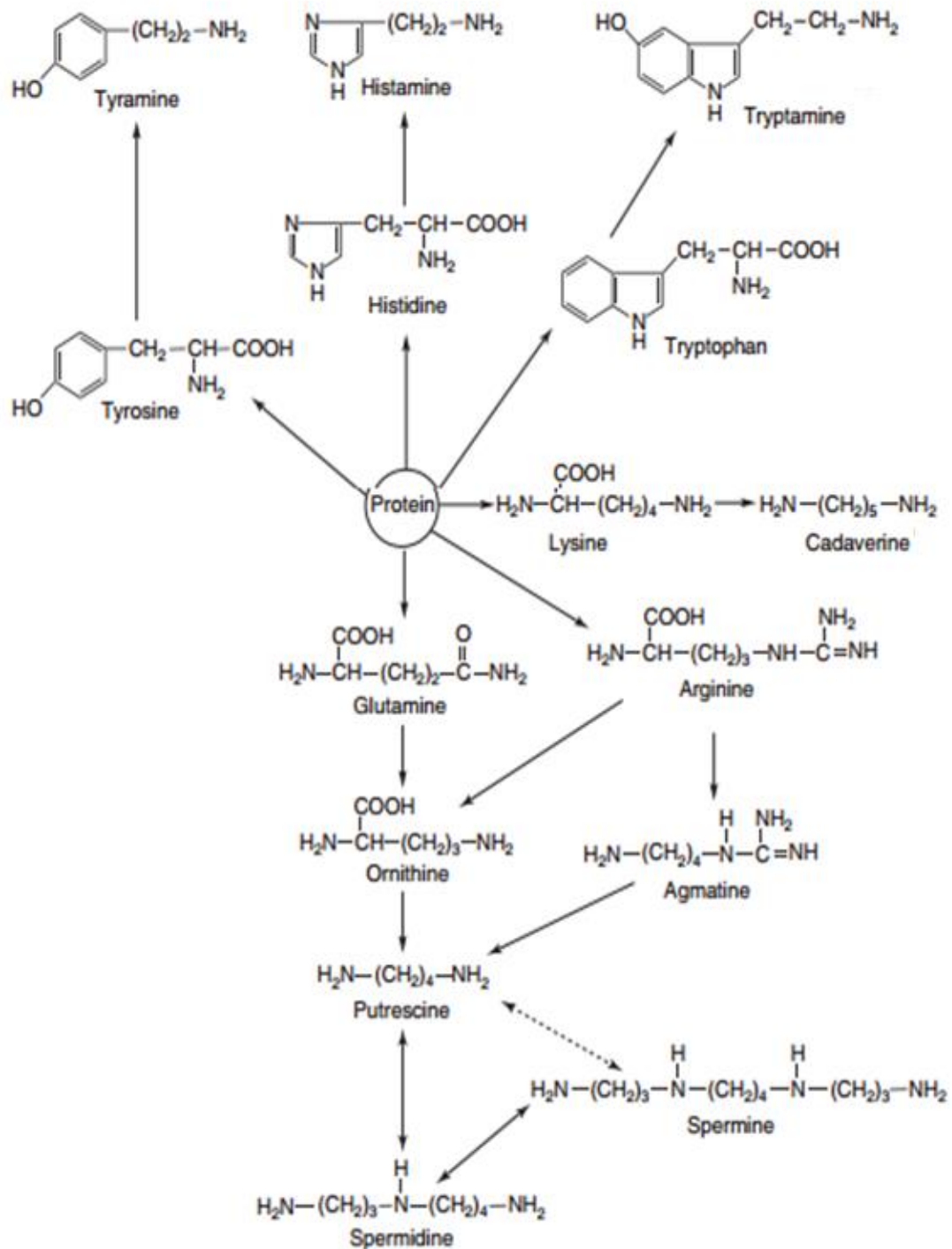


Slika 1. Kemijske strukture najznačajnijih biogenih amina (Önal, 2007)

Poliamini kao što agmatin, putrescin, spermidin, spermin i kadaverina su osnovni spojevi živih stanica i bitan su čimbenik u regulaciji biokemijskih funkcija nukleinskih kiselina,

sintezi bjelančevina i stabilizaciji membrana (Halász i sur., 1994), dok histamin, kadaverin i putrescin nastaju postmortalno dekarboksilacijom specifičnih aminokiselina prisutnih u ribi (Santos i sur., 1986).

Metabolički put njihovog nastajanja u ribi prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Metabolički put nastajanja biogenih amina u ribi (Mendes, 2009)

### 2.1.1. Nastajanje biogenih amina

Ukoliko se proteinska namirnica kao što je riba, izloži uvjetima pogodnima za rast i razvoj mikroorganizama, za očekivati je da će doći do nastanka biogenih amina koji se pridružuju fiziološkim aminima već prisutnima u ribi (Šimat, 2010a). Biogeni amini prisutni u ribi su gotovo u potpunosti rezultat djelovanja egzogenih enzima koji se oslobađaju iz različitih mikroorganizama koji su povezani s ribljim proizvodima, međutim postupak dekarboksilacije odvija se i endogenim enzimima, koji se prirodno nalaze u ribama, ali neznatno u odnosu na egzogene enzime. Konačni sadržaj različitih amina ovisi o više čimbenika među kojima su priroda proizvoda, uvjeti skladištenja, posebno temperatura te prisutnost mikroorganizma.

Preduvjeti za nastajanje biogenih amina djelovanjem mikroorganizama:

- dostupnost slobodnih aminokiselina;
- prisutnost enzima dekarboksilaza u mikroorganizmu;
- uvjeti koji omogućuju rast bakterija i aktivnost dekarboksilaze (Mendes, 2009).

U niskim koncentracijama su esencijalni za brojne fiziološke funkcije, međutim, ako se konzumiraju u velikim količinama njihova farmakološka aktivnost prelazi u toksičnost (Taylor, 1986) i predstavljaju zdravstveni rizik kod osjetljivih pojedinaca. Zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, jedan od najproučavanijih biogenih amina je histamin (Šimat, 2010a). Može se unijeti hranom, ali nastaje i endogeno u organizmu gdje je prisutan u niskim koncentracijama i uključen u razne funkcije poput alergijskog odgovora organizma, neurotransmisiji i krvožilnoj propusnosti (Ohtsu i Watanabe, 2003). Uz histamin, ostali biogeni amini kao putrescin, kadaverin, tiramin,  $\beta$ -feniletilamin, su jednako značajni u toksikološkom smislu, jer pojačavaju negativno djelovanje samog histamina (Bulushi i sur., 2009).

Prisutnost biogenih amina u mesu ribe smatra se izvrsnim pokazateljem stupnja svježine, budući su zastupljeni u vrlo malim količinama u svježoj ribi, a tijekom vremena skladištenja i pod nepovoljnim uvjetima skladištenja, količina im se povećava (Dalgaard i Emborg, 2009). Određivanje profila biogenih amina za različite riblje vrste s ciljem određivanja indeksa biogenih amina pokazalo se vrlo učinkovitim u procjeni sigurnosti i kvalitete određenih ribljih vrsta i proizvoda. U ovisnosti o udjelu pojedinih biogenih amina, te značajnosti korelacije u odnosu na druge parametre procjene svježine znanstvenici su kreirali nekoliko indeksa svježine koristeći sadržaj biogenih amina za pojedine riblje vrste. Za kadaverin i putrescin je utvrđeno da potiču toksičnost histamina, no unatoč tome u istraživanjima za parametar

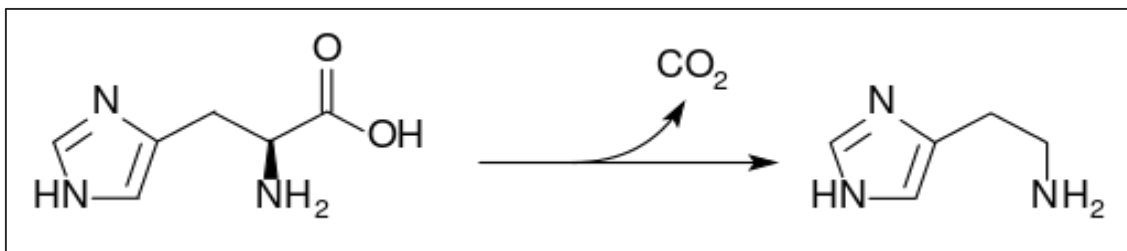
sigurnosti i kvalitete ribe i ribljih proizvoda uzima se isključivo histamin (Bulushi i sur., 2009).

### 2.1.2. Histamin

Intoksikacija histaminom je jedan od najpoznatijih sanitarnih problema povezanih s visokim udjelom biogenih amina u ribi i ribljim proizvodima, stoga je jedan od najproučavanijih biogenih amina.

#### 2.1.2.1. Sinteza i metabolizam histamina

Histamin nastaje bakterijskom dekarboksilacijom slobodne aminokiseline histidina pod djelovanjem enzima L-histidin dekarboksilaze (HDC) kao što je prikazano na Slici 3. Taj enzim je jedan od najvažniji enzima u metabolizmu proteina, jer sudjeluje u pregradnji jedne od osam esencijalnih aminokiselina, histidina, koji se nalazi u sastavu većine proteinskih namirnica (Vranešić Bender i sur., 2010).



Slika 3. Dekarboksilacija slobodne masne kiseline histidina u histamin uz djelovanje histidin-dekarboksilaze (Bogdanović i sur., 2009)

Karakterističan je za plavu ribu kao što je tuna, skuša, srdela, inćun dok bijela riba (npr.oslić) sadrži tek neznatne količine slobodnog histidina. Razine slobodnog histidina variraju od 1 g/kg u haringama do 15 g/kg u mesu tune (Nosić i Krešić, 2015). Iako je prisutan endogeno u niskim koncentracijama, histamin se također stvara u tkivu ribe u slučaju kada riba stoji duže vrijeme na sobnoj temperaturi, dakle nije svježa, pa ga možemo smatrati indikatorom kvarenja zbog nepravilno uskladištene ribe. Budući da je visok sadržaj histamina u hrani povezan s kvarenjem, količina histamina koja će nastati u hrani uvelike ovisi o upravljanju kvalitetom tijekom proizvodnog procesa.

Optimalna temperatura za razvoj ovog toksina je 20-25°C, ali je i pri temperaturama od +4°C kroz 3-7 dana zabilježen porast količine histamina u ribljem mišićju (Šimat, 2010a). Histamin je termostabilan stoga niti temperatura od 120°C tijekom 30 minuta ne smanjuje u znatnoj mjeri njegovu količinu u ribi. Isto tako je dokazano da se histamin ne uništava niti konzerviranjem, niti dimljenjem ribe.

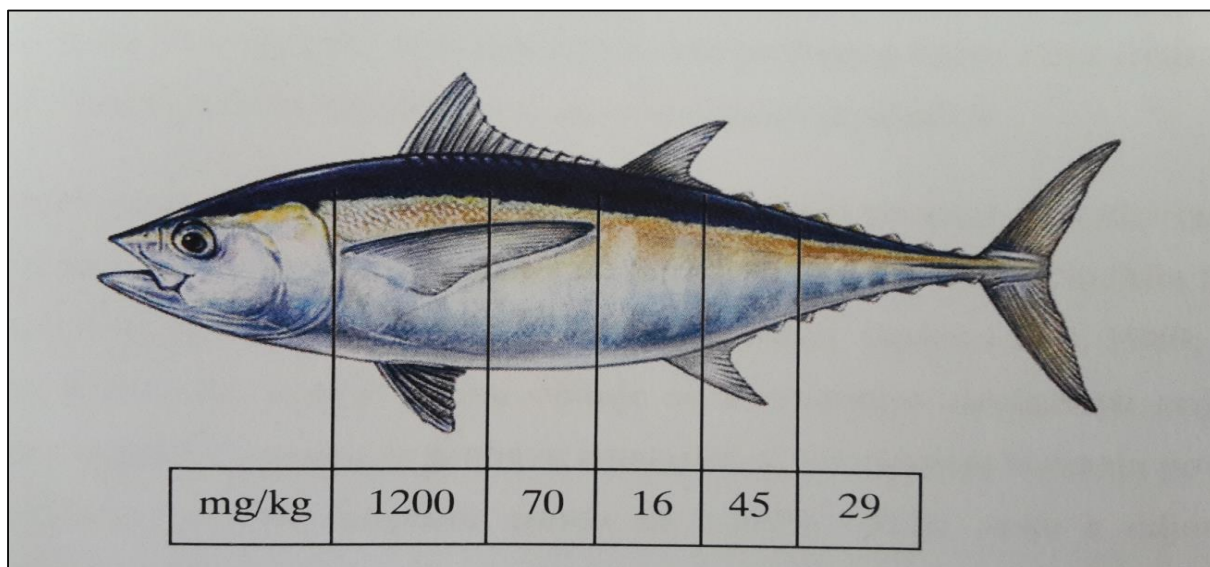
#### 2.1.2.2. Histaminsko trovanje

Preporuke o zdravom i ispravnom načinu prehrane gotovo uvijek uključuju ribu i proizvode od ribe koji predstavljaju potencijalne opasnosti koje mogu izazvati itekako ozbiljne zdravstvene tegobe odnosno bolesti. Jedna od takvih bolesti je i trovanje histaminom nakon konzumiranja ribe s visokim količinama slobodnog histidina.

Budući da se smatralo da do trovanja dolazi nakon konzumiranja plave morske ribe iz porodice Scombridae (skuša, srdela, tuna i srodne ribe), bolest se još naziva i skombroidno trovanje (skombrotoksizam). Obzirom da su zabilježeni slučajevi u kojima je trovanje uzrokovano konzumacijom drugih vrsta riba, kao i drugim namirnicama, kao što su sir, vino i fermentirani mesni proizvodi, naziv skombrotoksizam izmijenjen je u poremećaj uzrokovan konzumacijom histamina iz hrane, odnosno "histaminskim trovanjem" (Hungerford, 2010).

Ingestijom hrane koja sadrži male količine histamina ne dolazi do ozbiljnih zdravstvenih problema, međutim u velikim količinama histamin može biti toksičan. U probavnom sustavu čovjeka nalaze se enzimi diamin oksidaza (DAO) i histamin-N-metil transferaza (HMT) koji prevode histamin u bezopasne razgradne produkte. Međutim, kod velikih doza histamina kapacitet DAO i HMT za detoksifikaciju je ograničen, što rezultira ulaskom otrova u krvotok (Taylor i sur., 1989). Interesantna je i činjenica da histamin nije jednako raspoređen po cijeloj ribi, što pogotovo dolazi do izražaja kod velikih riba poput tune ili igluna. Naime, najveći broj mikroorganizama nalazi se na škrgama i u probavnom traktu ribe te kvarenje i nastanak histamina prvo započinje i najbrže se odvija u tim dijelovima tijela stoga su mogući pojedinačni slučajevi trovanja pojedinaca iz grupe osoba koje su konzumirale različite dijelove iste ribe (Slika 4).





Slika 4. Raspodjela histamina u mesu ribe (Šimat, 2010b)

Otrovanja su vrlo česta, odvijaju se u različitim dijelovima svijeta, te jednako zahvaćaju sve dobne skupine, spolove i rase. U Sjedinjenim Američkim Državama i Ujedinjenom Kraljevstvu preko 30% trovanja hranom morskog porijekla opada na histaminsko trovanje (Šimat, 2010a). Karakteristično je da nema korelacije između potrošnje ribe i stope otrovanja histaminom. Prvi primjer je Norveška, gdje je potrošnja plodova mora vrlo visoka, ali prijavljena pojava histaminskog trovanja je vrlo niska. Drugi primjer je Danska, gdje potrošnja plodova mora je umjerena i relativno visoka pojava histaminskog trovanja što je prvenstveno posljedica konzumiranja ribe iz porodica Scombridae (skuše, tune) koje sadrže velike količine slobodnog histidina (Dalgaard i Emborg, 2009).

Simptomi trovanja histaminom javljaju se vrlo brzo nakon konzumiranja ribe (nekoliko minuta do 1 sat), ovisni su o dozi, a očituju se kao difuzno crvenilo lica i gornjeg dijela tijela uz pečenje i svrbež oko usta, crvenilo oko očiju, zatim znojenje, mučnina, povraćanje, grčevi u truhu, lupanje srca i pritisak u prsima (Taylor, 1986). Budući da se ovi simptomi mogu zamijeniti i s drugim oblikom trovanja hranom, potreban je dodatni oprez i ozbiljnost. Kod težih slučajeva liječenje se provodi primjenom antihistaminika ili blokatora histaminskih receptora (Hungerford, 2010), međutim histaminsko trovanje uglavnom je blagog tijeka, te i bez tretiranja lijekovima prolazi samo od sebe već za nekoliko sati ne ostavljajući posljedice.

S obzirom na sličnost tjelesne reakcije na histamin s onom kod alergije na hranu, česte su dijagnostičke pogreške.

Kao bitno za naglasiti je da su količine koje uzrokuju trovanje vrlo individualne, a osjetljivost pojedinca pripisuje se smanjenim aktivnostima enzima diamino-oksidaža (DAO) i histamin-N-metil transferaza (HMT) odgovornih za intoleranciju na histamin. Broj ljudi s intolerancijom na histamin, kod kojih i male koncentracije histamina izazivaju pojavu drastičnih simptoma, je u porastu. Sposobnost razgradnje histamina iz hrane drastično se smanjuje uslijed konzumacije alkohola i djelovanja određenih lijekova zbog njihovog svojstva da inhibiraju diamin oksidažu. Zbog toga se preporučuje izbjegavati konzumaciju alkoholnih pića uz hranu s povećanim ili visokim koncentracijama biogenih amina (Vranešić Bender i sur., 2010).

### 2.1.3. Mikroorganizmi odgovorni za proizvodnju biogenih amina u ribi

Biogeni amini koji se povezuju s toksikološkim aspektom hrane morskog porijekla ipak su većinom rezultat mikrobiološke aktivnosti, te sposobnost i intenzitet proizvodnje jednog ili više biogenih amina od strane mikroorganizma povezani su više uz vrste bakterija unutar jednog roda koje ovise o povoljnim uvjetima za razvoj bakterija i provedbu dekarboksilacije (temperatura, pH i dr.) (Šimat, 2010a). Biogeni amini se u hrani stvaraju uglavnom kao produkti metabolizma mikroorganizama, posebno pripadnika *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* i *Lactobacillus*. Do 2004. godine vladalo je opće mišljenje da bakterije odgovorne za histaminsko trovanje pripadaju isključivo mezofilnim bakterijama, što je izazvalo nedoumice u svezi nastanka histamina na temperaturama nižim od 7-10°C. Psihrofilne bakterije (*Morganella psychrotolerans* i *Photobacterium phosphoreum*) izolirane su kao proizvođači histamina u ribi skladištenoj na 0°C. Danas je jasno da i mezofilne bakterije (*Morganella morgani*, *Hafnia alvei*, *Clostridium perfringens* i *Raoultella planticola*) i psihrofilne bakterije mogu proizvesti toksične koncentracije histamina i drugih biogenih amina u plodovima mora i time uzrokovati trovanje (Dalgaard i Emborg, 2009).

Probavni sadržaj riba, točnije crijeva mogu sadržavati veliku koncentraciju bakterija koje proizvode histamin što daje odgovor na tvrdnju da stvaranje histamina je vrlo izraženo u ribljem mesu blizu trbušne šupljine. Prema tome, preporučuje se učinkovito čišćenje crijeva i uklanjanje škrge, ali u praksi to nije moguće za manje ribe.

#### 2.1.4. Utjecaj temperature i vremena skladištenja

Dobro je poznato da temperatura ima značajan učinak na stvaranje bakterija odgovornih za stvaranje histamina u ribe. Istraživanja pokazuju da je optimalna temperatura za razvoj histamina 25°C, a rapidan rast pokazuje na temperaturi od 32,2°C. Prema tome, može se reći da je histamin prije rezultat nepravilnog skladištenja na povišenoj temperaturi, nego dugotrajnog skladištenja na relativno nižoj temperaturi (Mendes, 2009).

Histamin je biogeni amin koji prema nekim autorima izdržava temperaturu od čak 200°C, što znači da ga temperatura sterilizacije ne može uništiti (Bogdanović i sur., 2009). Enzim histidin dekarboksilaza može biti aktivan i na temperaturama konzerviranja hlađenjem. Vrlo je vjerojatno da enzim histidin dekarboksilaza ostaje stabilan i kod temperatura konzerviranja smrzavanjem te da se može vrlo brzo reaktivirati nakon odmrzavanja. Zbog toga je važno istaknuti atmosferu za pohranu (ambalaža) i očuvanje s NaCl, podešavanja pH, ili druge faktore koji se mogu koristiti za kontrolu stvaranja histamina.

Regulativa EU (EC 853/2004) zahtijeva da se svježi proizvodi ribarstva, odmrznuti neprerađeni te kuhani i rashlađeni proizvodi ribarstva, moraju održavati na temperaturi približno onoj topljenog leda (EU, 2004). Skladištenje plodova mora ispod 2°C ili 4,4°C, kao što traži EU i SAD propisi, sprečava stvaranje histamina od strane mezofilnih bakterija i smanjuje brzinu stvaranje histamina pod utjecajem psihrofilnih bakterija. Međutim, psihrofilne bakterije mogu proizvoditi toksične koncentracije histamina kod rashlađenih plodova mora na 2°C i na 4,4°C nakon određenog vremena skladištenja (Dalgaard i Emborg, 2009). Stoga predviđanje stvaranja histamina u ribama, kao funkciju vremena i temperature, može se koristiti kako bi se izbjegli uvjeti skladištenja koji rezultiraju stvaranje otrovnih proizvoda, jer prema postojećim podacima čak i ako ohlađen proizvod ribarstva može predstavljati opasnost od histaminskog trovanja.

#### 2.1.5. Utjecaj atmosfere skladištenja, soli i pH

Utjecaj promjene atmosfere pakiranja na formiranje histamina (MA) je predmet brojnih istraživanja te se sve više koristi u ribljoj industriji. Vakuum pakiranje i MA s plinskom mješavinom koja sadrži ugljični dioksid (CO<sub>2</sub>) i dušik (N<sub>2</sub>) nemaju značajni inhibirajući utjecaj na formiranje histamina u svježim plodovima mora. Međutim, MA s plinskom smjesom koje sadrži ugljični dioksid (CO<sub>2</sub>) i kisik (O<sub>2</sub>) sprječava stvaranje histamina u toksičnim koncentracijama iznad 500 mg/kg (Prester, 2011). Kod svježih tuna, modificirana

atmosfera ambalaže je pokazala da smanjuje stvaranje histamina značajno u odnosu na vakuum pakiranje.

Određena koncentracije NaCl inhibira rast bakterija, a time i stvaranje histamina u plodovima mora. Naravno, korištenje NaCl kao prevenciju stvaranja histamina zahtijeva prvo da histamin ne nastane u ribljem sirovinama prije dodataka soli. Drugo, količina NaCl mora biti dovoljna da se smanji rast bakterija odgovornih za stvaranje histamina. Postupak soljenja ne može jamčiti nisku razinu histamina kao niti ostalih biogenih amina iako je opaženo blago opadanje udjela histamina tijekom procesa zrenja slanih inćuna, što je objašnjeno difuzijom histamina u salamuru (Bogdanović i sur., 2009). Kod skuše na 20°C, 1 ± 2% NaCl blago potiče stvaranje histamina, a tvorba toksične koncentracije histamina je odgođena od jednog do dva dana sa 3% NaCl, te od jedan do četiri dana sa 4% NaCl (Dalgaard i Emborg, 2009).

Istraživanje provedeno na uzorcima dimljene ribe trupac (*Auxis thazard*) pokazalo je da se histamin formira brže na pH 6,2 u odnosu na pH 5,6 i pH 6,7. Sukladno s time *P. phosphoreum* je proizvela oko dvostruko više histamina pri pH 6,1 u odnosu na pH 6,5 (Dalgaard i Emborg, 2008). Stoga, snižavanje pH u plodovima mora do oko 6 može doprinijeti povećanoj stvaranju histamina.

#### 2.1.6. Utjecaj biogenih amina na ljudsko zdravlje

U niskim koncentracijama, biogeni amini su esencijalni za brojne fiziološke funkcije, no kad se konzumiraju u velikim količinama njihova farmakološka aktivnost prelazi u toksičnost (Taylor i sur., 1989). Navedimo prvo pozitivne strane biogenih amina.

To su izvori dušika i prekursori za sintezu hormona, alkaloida, nukleinskih kiselina i proteina (Karovičová i Kohajdová, 2005). Univerzalni su regulatori uključeni u kontrolu homeostaze organizma, a utječu na sve vitalne funkcije, kao i na opskrbu organa krvlju, djeluju kao hormoni (adrenalin i noradrenalin), utječu na želučanu i crijevnu sekreciju hormona, te na sposobnost pokretljivosti crijeva (Vranešić Bender i sur., 2010), a utječu također i na regulaciju tjelesne temperature i moždanu aktivnost (Karovičová i Kohajdová, 2005).

Male količine biogenih amina u intestinalnom traku se obično metaboliziraju do fiziološki manje aktivnih oblik putem djelovanja amino-oksidaza. Međutim, unos hrane s visokom koncentracijom biogenih amina može dovesti i do njihovog ulaska u sistemsku cirkulaciju te dovesti do raznih posljedica. Kod pojedinaca mogu uzrokovati nepoželjne učinak poput

glavobolje, mučnine, srčanih palpitacija, hipotenzije i hipertenzije, osipa, smetnje prilikom disanja (Taylor i sur., 1989).

Od svih biogenih amina, histamin ima najveći utjecaj na ljudsko zdravlje, te se njegove količine u prehrambenim proizvodima obično uzimaju kao pokazatelji svježine i kvalitete. O samom histaminu i njegovu djelovanju, detaljnije je opisano u zasebnom poglavlju. Putrescin, spermin, spemidin i kadaverin mogu još i ojačati negativne učinke histamina (Bulushi i sur., 2009), a kad reagiraju s nitritima mogu tvoriti karcinogene nitrozamine (Önal, 2007).

Slijedom toga, napori za smanjenje trovanja uzrokovanih biogenim aminima zaslužuju visoki prioritet (i) kako bi spriječili bolesti koje se prenose morskim plodovima, (ii) smanjenje ekonomskih gubitka u ribljoj industriji i (iii) doprinijeli povećanoj potrošnji plodovima mora s potencijalnim zdravstvenim beneficijama.

#### 2.1.7. Zakonski propisi za udio biogenih amina u proizvodima ribarstva

Zbog toksičnih učinaka koje mogu prouzročiti veće koncentracije biogenih amina, pravilnikom su propisane maksimalne koncentracije biogenih amina u hrani i piću (većinom izraženih kao količina histamina).

Zakonske granice EU regulative za kritične količine histamina u ribi preuzete su *Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu* (2008), a uključuju dvije skupine ribljih proizvoda: (1) količine histamina u ribama s visokim udjelom slobodnog histidina (*Scombridae* (skuše, tune), *Clupeidae* (srdele), *Engraulidae* (inćuni), *Coryfenidae* (lampuge)) i (2) proizvode ribarstva dobivene preradom ribe s visokim udjelom slobodnog histidina u procesu enzimatškog zrenja u salamuri. Od devet uzoraka prosječni sadržaj histamina mora biti ispod 100 mg/kg za (1) i ispod 200 mg/kg za (2). Za dva od devet uzoraka dopuštena je dvostruko veća količina histamina, ali ne veća od 200 mg/kg za (1) i 400 mg/kg za (2) (Tablica 1).

EU regulative i hrvatski zakoni nemaju određene kritične granice za ostale biogene amine. U SAD-u Američki ured za kontrolu hrane i lijekove (FDA, 2011) revidirao je kontrolnu točku koncentracije histamina u ribi s visokom količinom histidina smanjujući je sa 100 mg/kg na 50 mg/kg.

Referentna metoda izabrana od strane Europske komisije za separaciju i kvantifikaciju većeg broja biogenih amina je HPLC metoda u kombinaciji s pred-kolonskom ili post-kolonskom derivatizacijom koristeći dansil klorid kao derivatizacijski reagens (Malle i sur., 1996).

Tablica 1. Histamin- uzrokovanje, metoda određivanja i dozvoljene granice (Pravilnik, 2008)

Kategorija hrane		Mikroorganizmi /njihovi toksini, metaboliti	Plan uzimanja uzoraka		Granične vrijednosti		Ispitna referentna metoda	Faza u kojoj se kriterij primjenjuje
					M	M		
1.26	Proizvodi ribarstva od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina	<i>Histamin</i>	9	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC	Proizvodi stavljeni na tržište tijekom njihovog roka trajanja
1.27	Proizvodi ribarstva obrađeni enzimskim dozrijevanjem u salamuri, proizvedeni od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina	<i>Histamin</i>	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg	HPLC	Proizvodi stavljeni na tržište tijekom njihovog roka trajanja

#### 2.1.8. Strategija za smanjenje nastajanja biogenih amina

Prevenција nastanka histaminskoga otrovanja uključuje edukaciju stanovništva o pravilnome skladištenju namirnica u kojima se može razviti histamin (prije svega plave ribe i njezinih preradevina) te implementaciju HACCP (eng. hazard analysis critical control point) sustava kod svih subjekata u poslovanju s hranom koji sudjeluju u ulovu, preradi te distribuciji plave ribe i njezinih preradevina na tržištu.

Riba s toksičnim sadržajem histamina ne može se lako detektirati na temelju mirisa ili izgleda, jer ponekad visoke razine ne prate nikakvi znakovi kvarenja. Najučinkovitija prevencija je brzo hlađenje uhvaćene ribe (na temperaturama od 1-4°C) te skladištenje i obrada u higijenskim uvjetima. Prema načelima HACCP-a, specificirani vremenski rokovi i temperature na kritičnim kontrolnim točkama tijekom rukovanja ribom, kao i metode brze analize, pokazali su se djelotvornim u prevenciji kvarenja. Stoga se posljednjih godina većina incidenata povezuje sa sportskim ribolovom. Postoji niz standardnih i novih metoda sprječavanja razvoja bakterija (čuvanje u modificiranoj atmosferi, primjena konzervansa,

visokoga tlaka, radioaktivnoga zračenja, kao i kombinacije tih metoda) ili primjene enzima koji razgrađuju histamin (Vasić-Rački, 2010).

#### 2.1.9. Analitičke metode za određivanje biogenih amina

Potreba za pouzdanim i efikasnim metodama za detekciju i kvantifikaciju histamina i biogenih amina u ribi i proizvodima ribarstva javlja se kako bi se bolje razumjelo i upravljalo nastankom ovih spojeva u ribi i proizvodima ribarstva. U području kontrole i analitičkih metoda za određivanje udjela histamina ima još mnogo prostora za unaprjeđenje kako bi se kontrola mogla vršiti u realnim uvjetima proizvodnje što učestalije i na što većem broju uzoraka. Do sada je razvijen veliki broj analitičkih metoda za određivanje histamina od kojih svaka ima neke prednosti, ali i neke nedostatke koji otežavaju njenu primjenu u industriji. Zbog važnosti problema trovanja histaminom, ovo područje se intenzivno istražuje dugi niz godina. Tijekom tog vremena razvijen je izuzetno velik broj laboratorijskih analitičkih metoda za analizu histamina koje se uglavnom temelje na kromatografskim postupcima.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) najčešće je primjenjivana metoda za analizu histamina pri kojoj se histamin ekstrahira iz tkiva ribe pogodnim otapalom nakon čega je potrebno provesti derivatizaciju (reakcija s reagensom pri čemu nastaje kompleks koji ima izraženu apsorpciju svjetlosti (u UV dijelu spektra) koji se nakon separacije na kromatografskoj koloni može detektirati pomoću DAD ili UV detektora. U ovu skupinu metoda spada i metoda koju su razvili Malle i sur. (1996), a uredba EZ 2073/2005 ju navodi kao referentnu metodu za određivanje udjela histamina u proizvodima ribarstva.

Ostale skupine laboratorijskih metoda uključuju ionsku kromatografiju, kapilarnu elektroforezu, tankoslojnu kromatografiju, fluorometrijske metode, plinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom (LC-MS). Prednosti laboratorijskih metoda su robusnost, ponovljivost, preciznost i točnost, no njihova primjena je uglavnom ograničena na analitičke laboratorije (u znanstvene ili regulatorne svrhe). Njihovu primjenu u industrijskim kontrolnim laboratorijima uvelike ograničavaju činjenice da je za njihovu provedbu potrebna izrazito skupa laboratorijska oprema i instrumenti koji zahtijevaju skupo održavanje te osoblje koje je specifično educirano za rad na takvoj opremi. Osim toga, postupak pripreme uzoraka za sve ove metode je vrlo složen i dugotrajan (nekoliko sati) te nije moguće u realnom vremenu analizirati dovoljan broj uzoraka kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu ribe.

Kako bi se olakšala kontrola sadržaja histamina u industriji, razvijeno je nekoliko „brzih“ metoda za određivanje histamina koje su uglavnom bazirane na različitim enzimatskim metodama (ELISA). Opremu potrebnu za provođenje ovih metoda može se nabaviti na tržištu u obliku različitih kvalitativnih i kvantitativnih kitova koji sadrže sve potrebne reagense i spektrofotometar kojim se po završetku reakcij može očitati intenzitet boje na osnovu čega se dobiva podatak o količini histamina u uzorku. Cijene ovakvih kitova značajno su niže od cijena opreme potrebne za provedbu laboratorijskih metoda, no sva oprema osim spektrofotometra je predviđena za jednokratno upotrebu te u slučaju velikog broja analiza ukupni troškovi mogu postati značajna stavka. Glavni nedostaci ovih metoda su smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenima soljenjem i dozrijevanjem u salamuri, činjenica da i ove metode zahtijevaju različite postupke pripreme uzoraka te da iako su kitovi prijenosni, nisu prikladni za analize van laboratorija. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina prikazana je u Tablici 2.

Tablica 2. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina (FAO / WHO, 2013)

	<b>AOAC Metoda</b>	<b>HPLC Metode</b>	<b>Spektrofluoro metrijske metode</b>	<b>ELISA</b>	<b>Kolorimetrijs ke metode</b>
<b>Vrijeme potrebno za 1 test</b>	1 – 2 h	1 – 2 h	1 – 2 h	1 – 2 h	1 – 2 h
<b>Oprema</b>	Fluorometar	HPLC	Spektrofluorom etar	Spektrofotomet ar	Spektrofotomet ar
<b>Prag kvantifika cije</b>	1 – 5 ppm	1.5 – 5 ppm	1.5 ppb	2 – 5 ppm	20 ppm
<b>Raspon</b>	1 – 150 ppm	5–2500 ppm	1.5 ppb – 100 ppm	0 – 500 ppm	0.8 – 300 ppm
<b>Prednosti metode</b>	Robusnost, ponovljivost, točnost, preciznost	Analiza svih biogenih amina, točnost	Točnost, preciznost, cijena	Jednostavnost (kit), cijena, više testova istovremeno	Jednostavnost cijena, više testova istovremeno

Zbog toga se i dalje intenzivno istražuju nove „brze“ metode za analizu histamina koje bi bile jednostavne za primjenu u uvjetima industrijskih laboratorija te uz prihvatljive troškove



omogućile kontrolu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu čime bi se poboljšala kvaliteta i sigurnost finalnog proizvoda.

#### 2.1.10. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je danas jedna od najučinkovitijih metoda u analitičkoj kemiji sa širokom primjenom u farmaceutici, forenzici, te analizi hrane, kozmetike, nutraceutika i industrijskih kemikalija. Tom metodom mogu se separirati, identificirati i kvantificirati spojevi prisutni u tragovima (ppt) u bilo kojem uzorku koji se može otopiti u tekućini i zbog jednostavnosti rukovanja je našla široku primjenu te je najčešće primjenjivana metoda za analizu histamina.

HPLC metoda koristi se tekućom mobilnom fazom koja djeluje kao nosač za tekući uzorak. Injektirani uzorak prolazi kroz stacionarnu fazu uz povišeni tlak koji dodatno povećava efikasnost odvajanja. Uzorak se unosi u tok mobilne faze te dolazi do razdvajanja smjese na sastavne komponente koji se zadržavaju u koloni i na temelju vremena zadržavanja (vremena potrebnog da pojedina komponenta prođe kroz kolonu) identificira se pojedina komponenta. Vrijeme zadržavanja (retention time,  $R_t$ ) ovisi o prirodi komponente koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze.

##### 2.1.10.1. Uređaji za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

Osnovni dijelovi PLC sustava čine spremnik mobilne faze (otapala), crpka, sustav za unošenje uzorka, kolona, detektor i računalo.

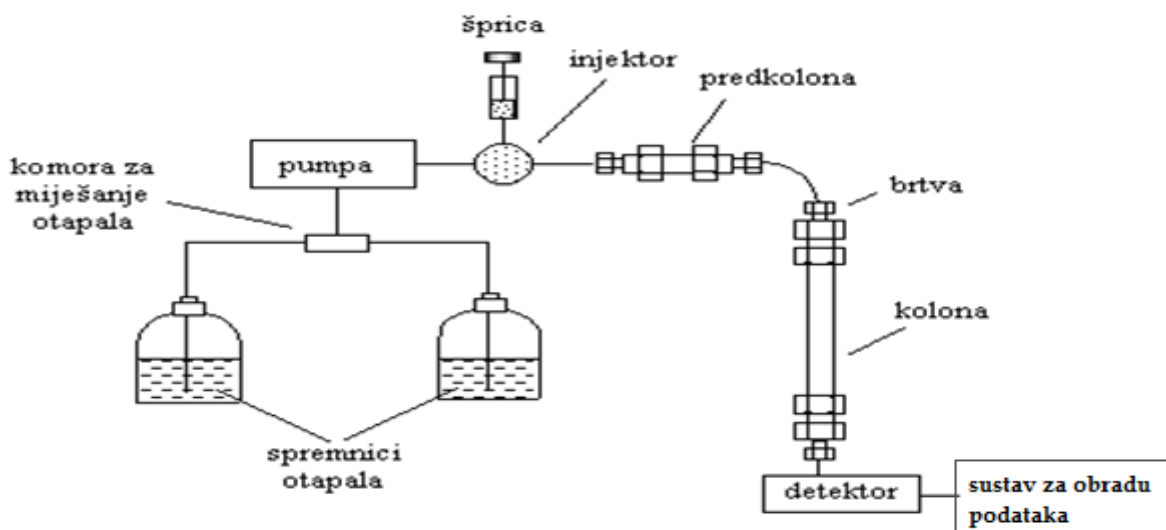
Uz spremnik mobilne faze može se nalaziti i sustav za otplinjavanje u kojem se otopljeni plinovi uklanjaju iz otapala, nošeni inertnim plinom. Razlog tome je što plinovi, zbog stvaranja mjehurića, mogu prouzročiti širenje zone eluiranih sastojaka i ometati rad detektora. Razdvajanje supstanci može se provoditi izokratnom ili gradijetnom eluacijom. Često se bolji kromatogram dobiva gradijetnom eluacijom nego izokratnom pri kojoj se koristi samo jedno otapalo. Kod gradijetne elucije koriste se dva ili više otapala različite polarnosti te se pritom odnos njihove zapremine mijenja na unaprijed utvrđen način.

Pumpa u HPLC sustavu služi za stvaranje i mjerenje specifične brzine potoka. U HPLC sustavima najčešće se koriste recipročne pumpe koje se sastoje od cilindrične komore koja se puni i prazni pomicanjem klipa, čime se stvara pulsirajući protok.

Uzorak se u kolonu unosi protokom mobilne faze preko sustava za unošenje uzorka kojeg obično čini plinski ventil s više izmjenjivih petlji. Kolone su najčešće izrađene od čeličnih ili staklenih cijevi koje su punjene zrcima punila promjera od 3-10  $\mu\text{m}$ . Kao punilo se najčešće upotrebljava silikagel, ali se u tu svrhu koriste i glinica, porozni polimeri i ionski izmjenjivači. Dimenzije HPLC kolona se kreću između 20 mm i 500 mm duljine i 1-100 mm unutarnjeg promjera.

Nakon što uzorak nošen mobilnom fazom prođe kroz kolonu, dolazi do detektorskog sustava koji u HPLC-u nije univerzalan, već se ovisno o prirodi uzorka i svojstvima analiziranog spoja koriste UV, fluorescentni ili ELSD detektor. Detektor je spojen s računalom koje prima električni signal i bilježi ga u obliku kromatograma (Skoog i sur., 1999).

Na slici 5. shematski je prikazana građa HPLC uređaja, s njegovim glavnim dijelovima.



Slika 5. Shematski prikaz HPLC uređaja (Luterotti, 2009)

Kromatogram je zapisak koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzorka (Kaštelan-Macan, 2003). Odziv detektora, ovisan o koncentraciji sastojka u uzorku bilježi se kao funkcija vremena zadržavanja čime se na kromatogramu dobivaju pikovi različite površine, odnosno, visine i položaja na vremenskoj osi. Svaki pik predstavlja odziv detektora za drugačiji spoj. Položaj pika na vremenskoj osi služi za identifikaciju sastojka, odnosno,

dokazivanje kvalitativnog sastava uzorka, dok se na temelju površine ispod pika ili njegove visine dobiva kvantitativna procjena sastojka u uzorku (Skoog i sur., 1999).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovaj rad proveden je u sklopu istraživanja mogućnosti primjene Raman spektroskopije za analizu histamina u ribi i proizvodima od ribe. Preliminarno istraživanje na analitičkom standardu histamina dalo je obećavajuće rezultate te omogućilo detekciju histamina pri koncentraciji od 100 mg kg<sup>-1</sup> ribe, no prilikom analize realnih uzoraka histamin nije mogao biti detektiran zbog interferencija koje potječu od drugih tvari prisutnih u ribljem mišićju (Janči i sur, 2016).

Svrha ovog rada bila je ispitati metode za pročišćavanje histamina iz uzoraka ribe, utvrditi iskorištenje postupka pročišćavanja pojedinog biogenog amina te ukupno iskorištenje histamina kao važnog parametra ove analitičke metode.

### 3.2. MATERIJALI

#### 3.2.1. Uzorci ribe

Uzorci svježe skuše (*Scomber scombrus*) nabavljeni su na ribarnici te su u poleđenom stanju prevezeni u laboratorij. RIBE su eviscerirane i filetirane te su uklonjene koža i kosti, a mišićno tkivo je usitnjeno i homogenizirano ručnim sjekačem (mikserom). Ovako pripremljeni uzorci korišteni su za pripremu ekstrakata za daljnje analize.

#### 3.2.2. Kemikalije

Standardi biogenih amina:

- Histamin- dihidroklorid (Histamine dihydrochloride), Sigma chemical Co. (Saint Louise, SAD)
- Spermidin-trihidroklorid (Spermidine trihydrochloride), Sigma chemical Co. (Saint Louise, SAD)
- Spermin-tetrahidroklorid (Spermine tetrahydrochloride), Sigma chemical Co. (Saint Louise, SAD)

- Kadaverin-dihidroklorid (Cadaverine dihydrochloride) Sigma chemical Co. (Saint Louise, SAD)
- Putrescin-dihidroklorid (Putrescine dihydrochloride), Sigma chemical Co. (Saint Louise, SAD)

### 3.2.3. Reagensi

- Dansyl-klorid, 98%, Acros organics, (New Jersey, USA)
- Aceton, J. T. Baker, (Nizozemska)
- Imidazol, 99%, Acros organics, (New Jersey, USA)
- L-prolin, 99%, Acros organics, (New Jersey, USA)
- 0,4 M perkloratna kiselina, Carlo Erba reagents, (Francuska)
- Zasićena  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Gram- mol, (Hrvatska)
- 0,1 M NaOH, J. T. Baker, (Nizozemska)
- 5 M NaOH, J. T. Baker, (Nizozemska)
- NaCl, Kemika, (Hrvatska)
- 1-butanol, Kemika, (Hrvatska)

### 3.2.4. Mobilna faza

- Acetonitril - ACN, Kemika, Hrvatska
- Destilirana voda

### 3.2.5. Laboratorijska oprema

- laboratorijsko posuđe

- odmjerne tikvice – 10ml, 100 ml i 500 ml, (Hrvatska)
- laboratorijske čašice – 10 ml i 50 ml, (Hrvatska)
- menzure – 50 ml, (Hrvatska)
- plastične kivete, (Hrvatska)
- propipetor, Brand, (Njemačka)
- mikropipetori od 100 – 1000 µl, Brand, (Njemačka)
- staklene bočice (vial) za HPLC – 20 ml, Agilent, (Njemačka)
- membranski filteri veličine pora 0,45 µm, Pall
- sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany)
- analitička vaga Kern, (Njemačka)
- homogenizator Ultra turax T-18, Sartorius GmbH, (Njemačka)
- ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex, (Belgija)

### **3.3. METODE RADA**

#### **3.3.1. Određivanje biogenih amina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)**

Određivanje biogenih amina provedeno je po metodi Malle i sur., 1996.

##### *Priprema otopine standarda*

Za pripremu otopina standarda korišteni su sljedeći standardi biogenih amina: histamin-dihidroklorid, kadaverin-dihidroklorid, putrescin-dihidroklorid, spermin-tetrahidroklorid i spermidin-trihidroklorid.

Odvagane su određene mase standarda u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopljeni su u vodi. Razrjeđivanjem stock otopine dobivene su koncentracije standarda ekvivalentne koncentraciji od 0, 10, 50, 100, 200, 400, 600, i 1000 mg/kg uzorka koje su uz dodatak

internog standarda korištene za konstrukciju baždarnog pravca. Pojedinačne otopine svakog standarda korištene su za određivanje retencijskog vremena pojedinog spoja.

### Priprema mobilne faze

Za pripremu mobilne faze koristi se acetonitril i destilirana voda. Kod mobilne faze A acetonitril i destilirana voda se miješaju u omjeru 60:40 a kod mobilne faze B koristi se čisti acetonitril.

Otopinu prije upotrebe kao mobilne faze za HPLC, potrebno je deaerirati u ultrazvučnoj kupelji za deaeraciju tijekom 20 minuta. Molekule zraka se moraju ukloniti da ne bi dospjele u kolonu te izazvale oštećenje kolone i nemogućnost očitavanja samih rezultata.

### Kromatografski uvjeti

Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) koristeći HPLC sustav Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany) pod sljedećim uvjetima:

Stacionarna faza	kolona Zorbax ODS (C18), 5 µm (250 x 4,6 mm I.D.)
Mobilne faza	A- voda:acetonitril 40:60 (v:v) B- acetonitril
Eluiranje	gradijentno
Gradijent	

<b>Vrijeme (min)</b>	<b>Mobilna faza A(%)</b>	<b>Mobilna faza B(%)</b>
0	100	0
6	62,5	37,5
8	62,5	37,5
13	12,5	87,5
20	12,5	87,5
20,01	100	0
30	100	0

Temperatura kolone	25 °C
Injektirani volumen	20 µl
Protok	1mL/min



Detektor	DAD, wavelenght 254 nm, Ref. Value 550 nm, Bw 80 nm
Vrijeme analize	30 min
Vrijeme uravnoteženja kolone	2min

Identifikacija spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva ( $R_t$ ) s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom UV-spektra. Kvantifikacija pojedinačnih biogenih amina provedena je na osnovi baždarnih pravaca koji su prikazani na priložima 1-6. Konstruirani su pomoći omjera površine pikova pojedinog biogenog amina i internog standarda i poznate masene koncentracije pojedinog biogenog amina. Svakom baždarenom pravcu pridružene su odgovarajuće jednadžbe pravca te su izračunati i koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) koji se kreću između 0,9986 i 0,999 (Tablica 3). Što je koeficijent determinacije bliži 1, prilagodba linearnog modela podacima je bolja te se može zaključiti da dobiveni podaci veoma dobro opisuju stvarni sastav biogenih amina u standardima te se prema tome mogu koristiti za identifikaciju biogenih amina u uzorcima ribe.

Tablica 3: Jednadžbe baždarnih pravaca

<b>Standard:</b>	<b>Jednadžba pravca</b>	<b>Koeficijent determinacije (<math>R^2</math>)</b>
putrescin dihidroklorid	$y=0,3166x$	0.997
histamin dihidroklorid	$y=0,311x$	0.999
kadaverin dihidroklorid	$y=0,3811x$	0.999
spermidin trihidroklorid	$y=0,3758x$	0.9991
spermin tetrahidroklorid	$y=0,4227x$	0.9986

#### Priprema otopina uzorka

U kivetu se odvaži 5 g uzorka, doda 500  $\mu$ l otopine internog standarda i homogenizira s 20 mL 0.4 M  $HClO_4$  na Ultra Turrax T-18 laboratorijskom homogenizatoru 2 minute na maksimalnoj brzini. Homogenizirani uzorak se prelije u odmjernu tikvicu od 50 mL, dopuni do oznake s  $HClO_4$ , vrati nazad u kivetu i stavlja u centrifugu na 3500 x g/3 min. Nakon centrifuge otpipetira se 100  $\mu$ l supernatanta, doda se 200  $\mu$ l zasićene otopine  $Na_2CO_3$  i 500  $\mu$ l otopine dansil-klorida, dobro se promiješa na tresilici i ostavi u mraku preko noći.

Idući dan se doda 100 µl otopine L-prolina, dobro promiješa na tresilici i ostavi da stoji 30 minuta u mraku. Nakon toga se dodaje 500 µl toluena, promiješa na tresilici i ostavi da se odvoje slojevi. Iz gornjeg sloja se uzme 200 µl, prebaci u vialku i upari u struji dušika do suhog. Suhi uzorak se otopi u 200 µl acetonitrila, dobro promiješa te se prebacuje u insert za vialku i stavlja u instrument.

Prilikom analize uzorka potrebno je provjeriti baždarni pravac pomoću otopina B1, B2, B3 i slijepe probe. Pripremljene otopine tretiraju se na isti način kao i uzorci; 100 µl otopine + 200 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 500 µl dansyl-klorida, promiješa se na tresilica i ostavlja u mraku preko noći.

*Otopina B1:* pipetira se 200 µl stock otopine histamina i 1 mL otopine internog standarda u odmjernu tikvicu od 100 mL i dopuni vodom do oznake.

*Otopina B2:* pipetira se 2 mL stock otopine histamina i 1 mL otopine internog standarda u odmjernu tikvicu od 100 mL i dopuni vodom do oznake.

*Otopina B3:* pipetira se 2 mL stock otopine histamina i 500 µl otopine internog standarda u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopuni vodom do oznake.

*Slijepa proba:* pipetira se 50 µl otopine internog standarda i dopuni do 5 mL sa HClO<sub>4</sub>.

Prilikom analize uzoraka priprema se još jedan uzorak više i u njega se dodaje 2 mL stock otopine histamina te se nakon analize računa stupanj iskorištenja koji treba biti u granicama R% = 80-120%.

### 3.3.2. Pročišćavanje histamina iz ekstrakata

Priprema uzoraka za analizu Raman spektroskopijom opisana je u Janči i sur. (2016). Budući da metoda nije dala adekvatne rezultate kod primjene na realnim uzorcima postupak pripreme uzoraka modificiran je na način da su uzorci podvrgnuti pročišćavanju prije analize Raman spektroskopijom. Uzorci su pročišćavani modificiranom metodom prema Lorentz i sur. (1987) pri čemu su ispitana 3 postupka pročišćavanja kako bi se postigli zadovoljavajući rezultati uz što jednostavniju pripremu uzorka. Postupci pročišćavanja opisani su u nastavku:

- a) **Postupak 1:** Uzorci za svaku koncentraciju biogenih amina su pripremljeni homogeniziranjem 5 g ribljeg mišićja u 50 mL 0,4 M HClO<sub>4</sub> pomoću Ultra Turrax T-18 laboratorijskog homogenizatora 2 minute na najvećoj brzini i filtriranjem kroz filter papir. Nakon toga, 2 mL filtriranog ekstrakta prebaci se u staklenu epruvetu s čepom

te se doda 0,4 mL 5M NaOH, 1,4 g NaCl i 2 mL 1-butanola. Smjesa se miješa na tresilici tijekom 10 min na 70 rpm i zatim se ostavi stajati nekoliko minuta dok se slojevi razdvoje. Nakon odvajanja slojeva, otpipetirano je 100 µl gornjeg butanolnog sloja, upareno u struji dušika do suhog te je ponovno otopljeno u 100 µl 0,4 M HClO<sub>4</sub>. Uzorci su nakon toga pripremljeni prema protokolu definiranom u Malle i sur. (1996).

b) **Postupak 2:** Uzorci za svaku koncentraciju biogenih amina su pripremljeni homogeniziranjem 5 g ribljeg mišićja u 50 mL 0,1 M NaOH zasićene s NaCl pomoću Ultra Turrax T-18 laboratorijskog homogenizatora 2 minute na najvećoj brzini i filtriranjem kroz filter papir. Nakon toga, 2 mL filtriranog ekstrakta prebaci se u staklenu epruvetu s čepom te se doda 0,4 mL 5M NaOH, 1,4 g NaCl i 2 mL 1-butanola. Smjesa se miješa na tresilici tijekom 10 min na 70 rpm i zatim se ostavi stajati nekoliko minuta dok se slojevi razdvoje. Nakon odvajanja slojeva, otpipetirano je 100 µl gornjeg butanolnog sloja, upareno u struji dušika do suhog te je ponovno otopljeno u 100 µl 0,4 M HClO<sub>4</sub>. Uzorci su nakon toga pripremljeni prema protokolu definiranom u Malle i sur. (1996).

c) **Postupak 3:** Uzorci za svaku koncentraciju biogenih amina su pripremljeni homogeniziranjem 5 g ribljeg mišićja u 50 mL 5 M NaOH zasićene s NaCl pomoću Ultra Turrax T-18 laboratorijskog homogenizatora 2 minute na najvećoj brzini i filtriranjem kroz filter papir. Nakon toga, 2 mL filtriranog ekstrakta prebaci se u staklenu epruvetu s čepom te se doda 0,4 mL 5M NaOH, 1,4 g NaCl i 2 mL 1-butanola. Smjesa se miješa na tresilici tijekom 10 min na 70 rpm i zatim se ostavi stajati nekoliko minuta dok se slojevi razdvoje. Nakon odvajanja slojeva, otpipetirano je 100 µl gornjeg butanolnog sloja, upareno u struji dušika do suhog te je ponovno otopljeno u 100 µl 0,4 M HClO<sub>4</sub>. Uzorci su nakon toga pripremljeni prema protokolu definiranom u Malle i sur. (1996).

Postupak pročišćavanja općenito završava uparavanjem 100 µl butanolnog sloja. Za potrebe analize Raman spektroskopijom uzorci su dalje pripremljeni prema protokolu

opisanom u Janči i sur. (2016). Za potrebe HPLC analize upareni uzorci otopljeni su u 100  $\mu$ L 0,4 M HClO<sub>4</sub> koja se koristi kao otapalo za ekstrakciju biogenih amina u metodi po Malle i sur. (1996) te su dalje analizirani prema istoj metodi.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

U području kontrole i analitičkih metoda za određivanje udjela histamina ima još mnogo prostora za unaprjeđenje kako bi se kontrola mogla vršiti u realnim uvjetima proizvodnje što učestalije i na što većem broju uzoraka.

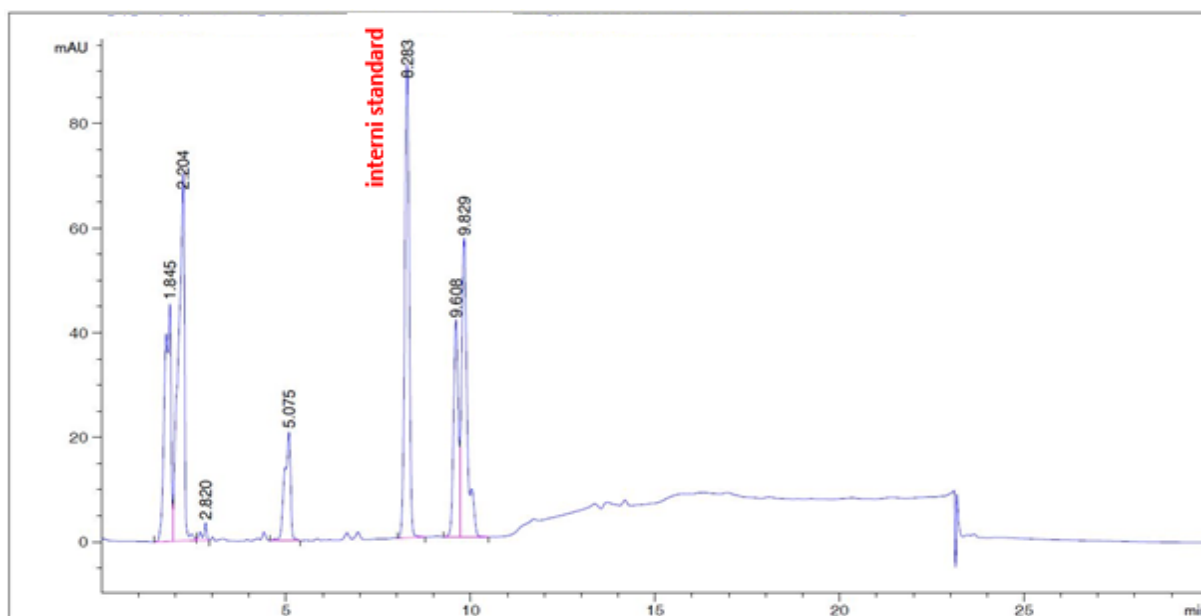
Ovaj rad proveden je u sklopu istraživanja mogućnosti primjene Raman spektroskopije za analizu histamina u ribi i proizvodima od ribe. Preliminarno istraživanje na analitičkom standardu histamina dalo je obećavajuće rezultate te omogućilo detekciju histamina pri koncentraciji od  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  ribe, no prilikom analize realnih uzoraka histamin nije mogao biti detektiran zbog interferencija koje potječu od drugih tvari prisutnih u ribljem mišićju. Svrha ovog rada bila je ispitati metode za pročišćavanje histamina iz uzoraka ribe, utvrditi iskorištenje postupka pročišćavanja pojedinog biogenog amina te ukupno iskorištenje histamina kao važne parametre ove analitičke metode.

Od 3 ispitana postupka za pročišćavanje ekstrakata, postupci 1 i 2 dali su zadovoljavajuće rezultate prilikom analize histamina Raman spektroskopijom, no jedino ekstrakti pročišćeni prema postupku 1 analizirani su HPLC metodom. Druga 2 ekstrakta nije bilo moguće analizirati HPLC metodom zbog formiranja gela nakon otapanja u  $0,4 \text{ M HClO}_4$  kako bi se izbjeglo začepljenje kolone ili eventualno nekog drugog dijela instrumenta.

U ovom poglavlju prikazani su rezultati kromatografske analize realnih uzoraka dobivenih provođenjem standardnog postupka i uzoraka podvrgnutih pročišćavanju prema postupku 1 prije analize Raman spektroskopijom opisanog ranije u poglavlju 3.3 te su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  standardna devijacija.

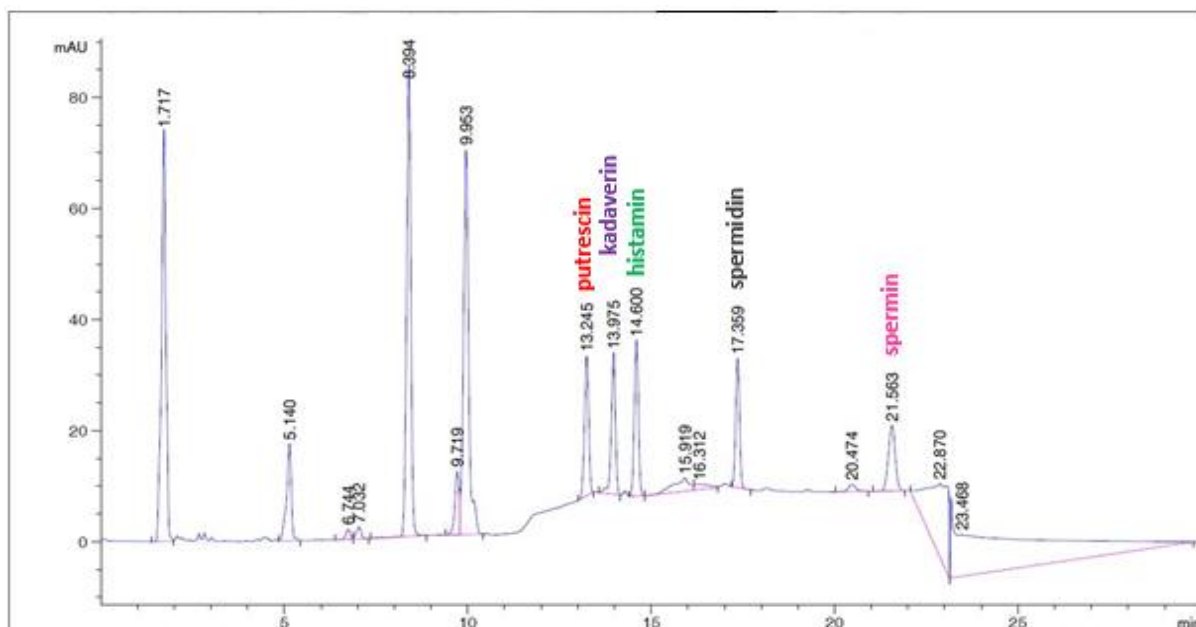
Eksperimentalni podaci dobiveni mjerenjem obrađeni su u MS Excel programu te pomoću tih rezultata su dobivene vrijednosti za iskorištenje postupka pročišćavanja pojedinog biogenog amina te ukupno iskorištenje histamina.

#### 4.1. REZULTATI KROMATOGRFSKE ANALIZE



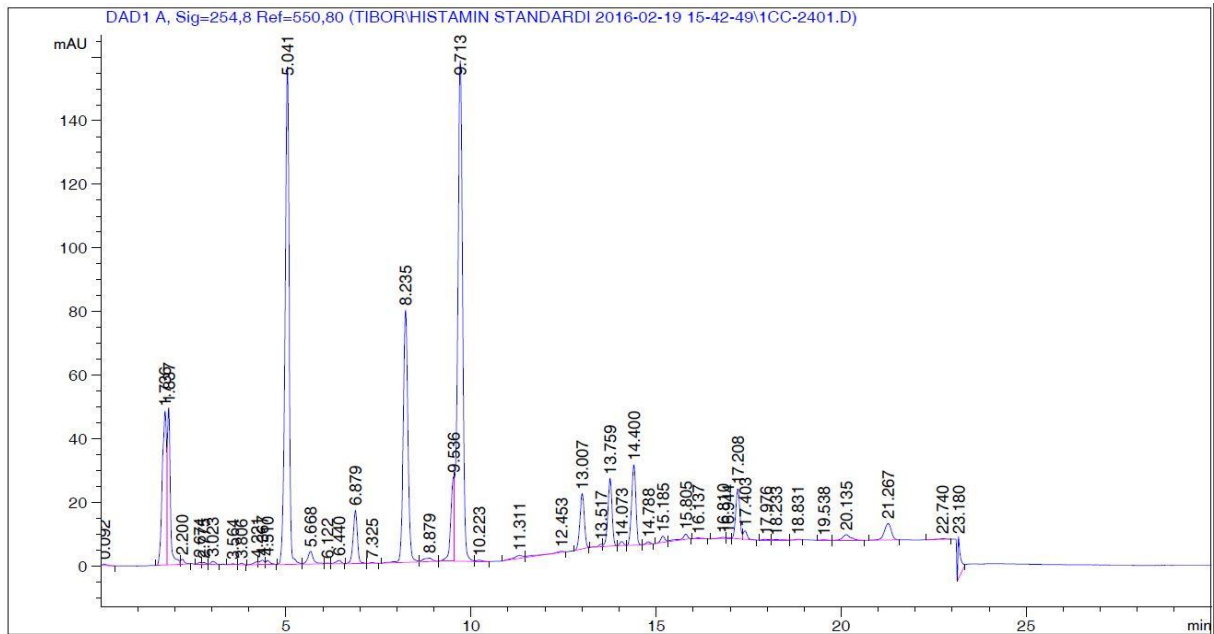
Slika 6. Kromatogram slijepe probe

Na kromatogramu (Slika 6) je označeno retencijsko vrijeme internog standard (Rt = 8,283 min).

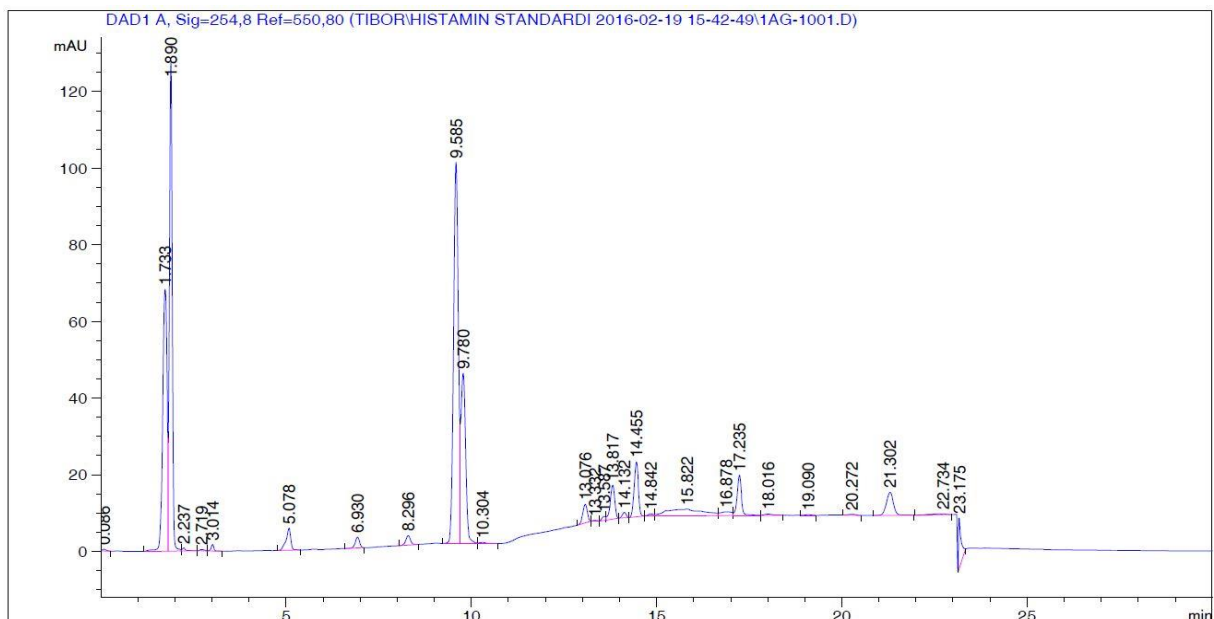


Slika 7. Kromatogram otopine standarda biogenih amina

Kromatogramom otopine standarda biogenih amina odredili smo retencijska vremena svakog pojedinog biogenog amina. Na kromatogramu (Slika 7) označeni su biogeni amini sa pripadajućim retencijskim vremenima: putrescin (Rt = 13,243 min), kadaverin (Rt = 13,974 min), histamin (Rt = 14,594 min), spermidin (Rt = 17,359 min), spermin (Rt = 21,572 min).



Slika 8. Kromatogram uzorka ribe koncentracije biogenih amina  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  dobivenog standardnim postupkom bez pročišćavanja



Slika 9. Kromatogram pročišćenog uzorka ribe koncentracije biogenih amina  $100 \text{ mg kg}^{-1}$



Na slikama 6 – 9 prikazani su kromatogrami slijepe probe, čistih standarada te uzoraka ribe (pročišćenih i nepročišćenih) s dodanom koncentracijom biogenih amina od 100 mg kg<sup>-1</sup>. Iz prikazanih kromatograma vidljivo je da se ukupan broj pikova (ili spojeva) značajno smanjio nakon postupka pročišćavanja uzoraka. Parametar iskorištenja pojedinog biogenog amina računat je na osnovu površine pikova pojedinog biogenog amina u pročišćenim i nepročišćenim uzorcima. Ukupno iskorištenje računato je kao % ukupne površine svih pikova u kromatogramu pročišćenog uzorka u odnosu na ukupnu površinu pikova nepročišćenog uzorka. Kako bi se dobili što točniji rezultati, ukupne površine svakog kromatograma korigirane su na način da su eliminirane površine pikova koji ne potječu niti od analitičkih standarada niti iz uzoraka ribe (pikovi vidljivi na kromatogramu slijepe probe).

Usporedbom kromatograma slijepe probe i otopine standarda biogenih amina možemo razlučiti pikove koji nisu povezani s biogenim aminima, odnosno s ribom te potječu najvjerojatnije od ostataka otapala, sredstva za derivatizaciju i ostalih kemikalija korištenih za pripremu uzorka. Također, usporedbom kromatograma otopine standarda biogenih amina u odnosu na kromatogram uzorka ribe vidljiv je veći broj pikova zato što se ovim postupkom ekstrakcije uz biogene amine ekstrahiraju i druge tvari koje su prisutne u tkivu.

U nastavku su prikazani rezultati za prosječne površine pikova biogenih amina i prosječnu korigiranu ukupnu površinu dobivenih standardnim postupkom i postupkom s pročišćavanjem.

#### 4.1.1. Standardni postupak

Tablica 4a. Prosječne površine pikova putrescina, kadaverina, histamina, spermidina i spermina te prosječna korigirana ukupna površina

Koncentracija mg kg <sup>-1</sup>	Prosječna površina pikova					Korigirana ukupna površina
	putrescin	kadaverin	histamin	spermidin	spermin	
10	17,97±0,8 5	25,08±0,1 4	19,05±0,16	31,29±2,82	11,63±0,51	3921,81±141,0 9
50	71,8±1,30	84,18±1,1 3	89,54±1,54	71,525±0,8 7	34,05±0,22	2604,81±207,6 7

Nastavak Tablica 4a.

<b>100</b>	134,33±15, 08	159,02±13, 42	188,55±10,9 2	110,71±9,11	65,71±2,7 6	4532,45±138 ,44
<b>200</b>	252,49±9,5 7	313,92±1,3 9	381,13±0,53	218,63±19,1 3	210,40±1 00,46	5337,13±195 ,58
<b>600</b>	847,39±2,3 7	1037,03±5, 25	1299,55±1,8 7	605,93±3,88	468,88±3, 13	6759,9±282, 09
<b>1000</b>	1307,89±68 ,50	1574,81±90 ,08	1967,48±166 ,55	997,17±79,2 7	821,08±7 1,02	118141,58±1 68,26

4.1.2. Postupak s pročišćavanjem

Tablica 4b. Prosječne površine pikova putrescina, kadaverina, histamina, spermidina i spermina te prosječna korigirana ukupna površina

<b>Koncentracija</b> <b>mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>Prosječna površina pikova</b>					<b>Korigirana</b> <b>ukupna</b> <b>površina</b>
	putrescin	kadaverin	histamin	spermidin	spermin	
<b>10</b>	4,6±0,62	18,81±1,4 5	10,23±0,95	7,97±1,07	9,64±0,4	1389,45±345,9 9
<b>50</b>	16,50±0,7 4	28,45±0,5 9	56,43±1,88	28,06±0,37	33,55±1,26	953,98±64,66
<b>100</b>	34,95±7,8 8	66,18±11, 72	123,52±14, 2	81,62±4,93	78,53±1,43	2248,17±404,0 8
<b>200</b>	33,96±0,7 1	53,39±0,1 8	223,11±3,0 9	79,34±1,75	116,01±2,3	1800,35±257,9 7
<b>600</b>	127,44±2, 45	181,36±1, 75	796,35±0,6 4	294,77±2,6 5	434,77±1,6 6	2222,79±228,4
<b>1000</b>	170,59±2 4,13	241,26±9, 93	1375,36±5 3,12	470,93±18, 49	726,76±65, 94	4441,06±245,9 5

Prikazane prosječne površine pikova za standardni postupak (Tablica 4a) i za postupak s pročišćavanjem (Tablica 4b) proporcionalne su koncentraciji spojeva u uzorku te su korištene za daljnje računanje potrebnih vrijednosti (Tablica 5).

Budući da su u kromatogramu prisutni i pikovi kemikalija korištenih za pripremu uzorka poput otapala, sredstva za derivatizaciju i dr. koji doprinose ukupnoj površini pikova, a ne

potječu iz uzorka za daljnju analizu rezultata potrebno je korigirati ukupnu površinu pikova. Ukupna površina pikova korigirana je tako da su oduzete površine svih pikova prisutnih na kromatogramu slijepe probe (Slika 6) te je za daljnji račun korištena korigirana vrijednost.

#### 4. 2. ISKORIŠTENJE POSTUPKA PROČIŠĆAVANJA POJEDINOG BIOGENOG AMINA

Tablica 5. Iskorištenje postupka pročišćavanja putrescina, kadaverina, histamina, spermidina i spermina

Koncentracija mg kg <sup>-1</sup>	Iskorištenje postupka pročišćavanja				
	Putrescin	kadaverin	histamin	spermidin	Spermin
10	25,59	75,01	53,71	25,48	82,88
50	22,98	33,83	63,02	39,23	98,66
100	26,01	41,62	65,51	73,72	119,51
200	13,45	17,01	58,53	36,29	55,13
600	15,03	17,48	61,27	48,64	92,72
1000	13,04	15,31	69,94	47,22	88,51
<b>Prosječna vrijednost</b>	<b>19,35</b>	<b>33,37</b>	<b>61,99</b>	<b>45,11</b>	<b>89,57</b>

Iskorištenje je dobiveno tako da je srednja vrijednost površine pikova biogenih amina dobivenih postupkom s pročišćavanjem podijeljena sa srednjom vrijednošću površine pikova biogenih amina za standardni postupak i prikazano je u obliku % pojedinog biogenog amina koji je ekstrahiran u butanolnu fazu tijekom pročišćavanja uzorka. Dobivene vrijednosti variraju u ovisnosti o koncentraciji, te su za daljnju usporedbu korištene srednje vrijednosti koje su pokazale da najbolje iskorištenje ima spermidin (89,5%) a zatim histamin (61,9%) (Tablica 5). Vrijednost za iskorištenje histamina je manja u odnosu na vrijednosti iz dostupne literature od 77,4% (McIntire i sur., 1947) dok vrijednosti iskorištenje prema metodi Lorentz i sur. (1987), pomoću koje je metoda pročišćavanja modificirana, nisu navedene. Navedene razlike u iskorištenju mogu se objasniti razlikama u postupku pripreme uzoraka i samog pročišćavanja. Istraživanje McIntire i sur., (1947) daje pregled metode pročišćavanja

histamina za provođenje biotestova. Glavne značajke ove metode su: vodeni ekstrakt tkiva koji sadrži histamin ekstrahira se n-butanolom pod uvjetima koji omogućuju gotovo potpuno uklanjanje histamina iz vodenog medija jednom ekstrakcijom (pH = 13 i koncentraciji Na-sulfata od 25 %).

Histamin se tada iz butanola ponovno izdvaja primjenom celuloznog sukcinata, s kojeg se eluira dodatkom malog volumena razrijeđene klorovodične kiseline. Dobiveni eluat neutralizira se natrijevim hidroksidom kako bi se pripremila izotonična otopina prikladna za izvođenje biotesta.

Tijekom procesa pročišćavanja histamina naglasak je bio na pronalasku jednostavne metode ekstrakcije kojom se histamin može izolirati od većine ostalih sastavnica vodenog ekstrakta biološkog porijekla. Dodatkom soli topljivih u vodenom mediju tijekom pripreme uzorka raspodjela histamina između vode i butanola pri visokim pH vrijednostima može pomaknuti u korist butanola te se postiže veći prinos histamina.

Smjesa soli (Na – sulfati i trinatrijeva fosfata) korištena prilikom istraživanja McIntire i sur., (1947) zbog visoke topljivosti u vodenome mediju bolji je izbor od NaCl korištenog za pročišćavanje histamina iz ekstrakta opisano ranije u zasebnom poglavlju, brzo se otapa te stvara optimalne uvjete za ekstrakciju te može biti jedan od razloga boljeg iskorištenja histamina.

Tijekom fluorimetrijsko-fluoroenzimatskog određivanja histamina u studijama patogeneze peptičkog ulkusa Lorentz i sur. (1987) su izostavili proces centrifugiranja prilikom ekstrakcije, te je korišteno 1M HClO<sub>4</sub> prilikom homogenizacije kako bi se prevenirali gubitci histamina zbog adhezije na mehanički homogenizator.

Razlika u postupku pročišćavanja vidljiva je i u izdvajanje histamina iz otopine butanola. Umjesto uparavanja butanolnog sloja u struji dušika McIntire i sur. (1947) koristili su adsorbens celulozni sukcinat kojeg karakteriziraju mehanička svojstva pamuka poput bujnosti (debljine). Zbog proteinskog sloja koji je smješten između dvije tekuće faze tijekom centrifugiranja, otežan je potpun prijenos butanolne faze u epruvetu sa celuloznim sukcinatom, te je moguće pouzdano prenijeti samo dio volumena, stoga se samo 83% histamina koji prelazi u butanolnu fazu prenosi na celulozni sukcinat što utječe na sveukupni manji prinos histamina.

Krajnji prinos histamina tijekom ovog postupka trebao bi iznositi 77.4 % od početne, ukupne količine histamina. Ovaj bi se iznos mogao povećati do 95 % provođenjem dvije ekstrakcije umjesto jedne što produžuje sveukupno vrijeme postupka.

Cilj ovog istraživanja bio je razviti postupak pročišćavanja uzoraka koji će omogućiti analizu histamina u uzorcima ribe pomoću Raman spektroskopije. Vrlo važan parametar postupka pročišćavanja bilo je vrijeme potrebno za pripremu uzorka i jednostavnost postupka pripreme zbog čega je postupak pročišćavanja prema metodi McIntire i sur. (1947.) maksimalno pojednostavljen i skraćen. Prikladnost postupka pročišćavanja procijenjena je na osnovi Ramanovih spektara uzoraka odnosno vidljivih karakterističnih vrpci histamina u Ramanovom spektru uzorka te usporedbe s literaturnim podacima.

Budući da je postupak pročišćavanja rezultirao jasnim Ramanovim spektrom histamina u uzorku uz relativno malo iskorištenje postupka pročišćavanja, može se zaključiti da je osim iskorištenja vrlo bitan parametar koncentracija drugih tvari prisutnih u uzorku. U nepročišćenim uzorcima utjecaj matriksa odnosno tvari koje su prisutne u uzorku svojim spektrom prekrivaju signale histamina te onemogućuju analizu (Janči i sur., 2016).

Lorentz i sur. (1987) je za glavni cilj istraživanja bio odrediti koja kombinacija metoda određivanja histamina i testova kvantitativnog određivanja daju 95%-tnu specifičnost za određivanje histamina a koncentracija drugih tvari imaju neznatan utjecaj na samo određivanje.

Kako bi se procijenila efikasnost uklanjanja drugih tvari prisutnih u uzorku uspoređene su vrijednosti udjela pojedinog biogenog amina u pročišćenim i nepročišćenim uzorcima (Tablica 6a i Tablica 6b).

#### 4.2.1. Standardni postupak

Tablica 6a. Postotak površine pikova biogenih amina u odnosu na ukupnu korigiranu površinu

<b>Koncentracija mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>putrescin</b>	<b>kadaverin</b>	<b>histamin</b>	<b>spermidin</b>	<b>spermin</b>
10	0,45	0,63	0,48	0,79	0,29
50	2,75	3,23	3,43	2,74	1,31
100	2,96	3,51	4,16	2,44	1,44
200	4,73	5,88	7,14	4,09	3,94
600	12,53	15,34	19,22	8,96	6,93
1000	1,11	1,33	1,66	0,84	0,69
<b>Prosječna vrijednost</b>	<b>5,82</b>	<b>7,07</b>	<b>8,62</b>	<b>4,63</b>	<b>3,52</b>

#### 4.2.2. Postupak s pročišćavanjem

Tablica 6b. Postotak površine pikova biogenih amina u odnosu na ukupnu korigiranu površinu

<b>Koncentracija mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>putrescin</b>	<b>kadaverin</b>	<b>histamin</b>	<b>spermidin</b>	<b>spermin</b>
10	0,33	1,35	0,73	0,57	0,69
50	1,73	<b>2,98</b>	5,91	2,94	3,51
100	1,55	2,94	5,49	3,63	3,49
200	1,88	2,96	12,39	4,41	6,44
600	5,73	8,15	35,82	13,26	19,55
1000	3,84	5,43	30,96	10,61	16,36
<b>Prosječna vrijednost</b>	<b>2,512</b>	<b>3,97</b>	<b>15,22</b>	<b>5,91</b>	<b>8,34</b>

Udio pojedinog biogenog amina za oba postupka smo dobili tako što smo srednju vrijednost površine svakog pojedinog biogenog amina podijelili sa srednjom vrijednosti

konjugirane ukupne površine (Tablica 4a i tablica 4b) te je prikazano u obliku % pojedinog biogenog amina (Tablica 6a i Tablica 6b). Rezultati pokazuju kako se postupkom pročišćavanja određenim aminima udjel smanjuje (putrescin i kadaverin) a određenim povećava (histamin, spermin i spermidin). Putrescinu se udjel od 5,82 % smanjio na 2,51% a kadaverinu sa 7,07 % na 3,97 % dok je histamin imao povećanje udjela sa 8,62 % na 15,22%, spermidin sa 4,63 % na 5,9 % te spermin sa 3,5 2% na 8,34 %.

### 4.3. UKUPNO ISKORIŠTENJE

Tablica 7. Ukupno iskorištenje procesa

Koncentracija mg kg <sup>-1</sup>	SP	PP	Ukupno iskorištenje
	prosječna vrijednost korigirane ukupne površine		
10	3921,81	1389,45	35,42
50	2604,82	953,97	36,62
100	4532,45	2248,16	49,61
200	5337,13	1800,35	33,73
600	6759,91	2222,79	32,88
1000	11362,97	4441,05	39,08
<b>Prosječna vrijednost ukupnog iskorištenja</b>			<b>37,89</b>

\*SP- standardni postupak, PP-postupak sa pročišćavanja

Iz rezultata prikazanih u tablicama (Tablica 6a i Tablica 6b) vidljivo je da se u pročišćenim uzorcima udio histamina povećao za 1,76, spermina za 1,27 i spermidina 2,37 puta dok se udio putrescina smanjio za 2,32 i kadaverina 1,78 puta. Iz rezultata prikazanih u tablici (Tablica 7) vidljivo je da se ukupno iskorištenje kreće u rasponu 32 – 50 % uz srednju vrijednost od 37% čime se mogu objasniti dobri rezultati prilikom analize histamina Raman spektroskopijom unatoč relativno niskom iskorištenju histamina.

Naime, dobiveni rezultati za iskorištenje ukazuju da se postupkom pročišćavanja u prosjeku gubi 38 % histamina dok se ukupna količina tvari prisutnih u uzorku smanjuje za oko 63%. Uklanjanjem 63% ukupnih tvari značajno se smanjuje utjecaj matriksa prilikom analize Ramanovom spektroskopijom te su na Ramanovom spektru jasno vidljive karakteristične vrpce histamina (Prilog 1).



## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju izvršenih analiza, dobivenih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. Ispitivani postupka 1 za pročišćavanje histamina iz ekstrakata gdje su uzorci pripremljeni homogeniziranjem ribljeg mišićja u 0,4 M HClO<sub>4</sub> dao je zadovoljavajuće rezultate prilikom analize histamina Raman spektroskopijom.
2. Postupkom pročišćavanja značajno se smanjuje količina tvari prisutnih u ekstraktu.
3. Postupkom pročišćavanja gubi se i dio analita (biogenih amina) iz uzorka.
4. Iskorištenje pročišćavanja pojedinog biogenog amina najveće je za spermin (89,57 %) a zatim histamina (61,99 %).
5. Prosječna vrijednost ukupnog iskorištenja kreće se u rasponu 32 – 50 % uz srednju vrijednost od 37% čime se može objasniti dobri rezultati prilikom analize pročišćenih uzoraka Raman spektroskopijom.
6. Postupkom pročišćavanja iz uzorka se gubi oko 63 % ukupnih tvari uz gubitak od 38 % histamina čime se potvrđuje uspješnost pročišćavanja na smanjenje utjecaja matriksa prilikom analize Ramanovom spektroskopijom.

## **6. LITERATURA**

Bogdanović, T., S. Lelas, E. Listeš, V. Šimat (2009) Histamini i biogeni amini kao indikatori svježine ribe i ribljih proizvoda *Meso*. **11 (5)**, 291-294.

Bulushi, I., S. Poole, H.C. Deeth, G.A. Dykes (2009) Amines in Fish: Roles in Intoxication, Spoilage, and Nitrosamine Formation – A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **49 (4)**, 369-377.

Dalgaard, P., Emborg, J (2008) Histamine and biogenic amines – formation and importance in seafood. U: Improving seafood products for the consumer. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. str.292-324.

Dalgaard, P., Emborg, J. (2009) Histamine fish poisoning – new information to control common seafood safety issue. U: Foodborne pathogens – Hazards, risk analysis and control. 2 . izd., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 292-324.

EU (2004) Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*. **226**, 22-82.

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization] (2013) Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products Meetingreport. [www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/news.../Histamine\\_Final\\_Report.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/news.../Histamine_Final_Report.pdf) , pristupljeno: 01.08.2016.

FDA (2011) Scombrotxin (Histamine) Formation In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance fourth ed. ed., (pp. 113 - 152). Washington, DC, USA: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutr., Office of Food Safety.

Halasz, A., Barath, A., Simons -Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends. Food Sci. Tech.* **5**, 42-48.

Hungerford, J.M. (2010) Scombroid poisonong: a review. *Toxicon*. **56**, 231-243.

Janči, T., Mikac, L., Ivanda, M., Marušić Radovčić, N., Medić, H., Vidaček, S. (2016) Optimization of parameters for histamine detection in fish muscle extracts by surface-enhanced Raman spectroscopy using silver colloid SERS substrates. *J. Raman Spectrosc.* doi: [10.1002/jrs.4991](https://doi.org/10.1002/jrs.4991).

Karovičová, J., Kohajdová, Z. (2005) Biogenic amine in food. *Chem. Pap.* **59** (1), 70-79.

Kaštelan-Macan, M. (2003) *Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb.*

Lorenz, W., Thon, K., Neugebauer, E., Stöltzing, H., Ohmann, Ch., Weber, D., Schmal, A., Hinterlang, E., Barth, H., Kusche, J. (1987) Reliability and practicability of the fluorometric-fluoroenzymatic histamine determination in pathogenetic studies on peptic ulcer: Detection limits and problems with specificity. *Agents and Actions.* **21**, 1/2.

Luterotti, S. (2009) *Uvod u kemijsku analizu, 3. izd., Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str. 223.*

Maintz, L., Novak, N. (2008) Histamine and histamine intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1185-1196.

Malle P., Valle M., Bouquelet S. (1996) Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Internat.* **79**, 43-49.

McIntire, F.C., Roth, L.W., Shaw, J.L. (1947) The purification of histamine for bioassay. *J. Biol. Chem.* **170**, 537-544.

Mendes, R. (2009) Biogenic amines. U: *Fishery products Quality, Safety and Authenticity.* (Rehbein, H., Oehlenschläger, J., ured.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford. str. 42-67.

Mohamed, R., Livia, S. S., Hassan, S., Soher, E. S., and Ahmed-Adel, E. B. (2009). Changes in free amino acids and biogenic amines of Egyptian salted-fermented fish (Feseekh) during ripening and storage. *Food Chem.* **115**, 635–638.

Nosić, M., Greta Krešić., G. (2015) Plava riba – prednosti ali i neki rizici konzumiranja. *Hrana u zdravlju i bolesti*. **4**, 16-27.

Ohtsu, H., Watanabe, T. (2003) New functions of histamine found in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 443-447.

Önal, A. (2007) A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* **103**, 1475-1486.

Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2008) *Narodne novine* **74**, Zagreb.

Prester, Lj. (2011) Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review, *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. **28 (11)**, 1547-1560.

Santos, C., Marine, A., Rivas, J.C. (1986) Changes of tyramine during storage and spoilage of anchovies. *J.Food Sci.* **51**, 512-515.

Šimat, V. (2010) Promjene parametara kvalitete u filetu hladno mariniranog incuna (*Engraulis encrasicolus*, L.). Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, str. 43.

Šimat, V. (2010) Usporedba dva komercijalna testa za kvantitativnu analizu histamina u ribi. *Meso*. **11 (6)**, 333-341.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, H.F. (1999) *Osnove analitičke kemije*, prvo izd. (preveli Kujundžić, N., Živčić-Alegratti, V., Živković, A.), Školska knjiga, Zagreb.

Taylor, S.L. (1986) Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* **17**, 91-128.

Taylor, S.L., Stratton, J.E., Nordlee, J.A. (1989) Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): An allergy-like intoxication. *Clinical toxicology*. **27**, 225-240.

Vasić-Rački, Đ., Galić, K., Delaš, F., Klapac, T., Kipčić, D., Katalenić, M., Dimitrov, N., Šarkanj, B. (2010) Toksikanti animalnoga podrijetla U: *Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu (HAH). str. 27-31.

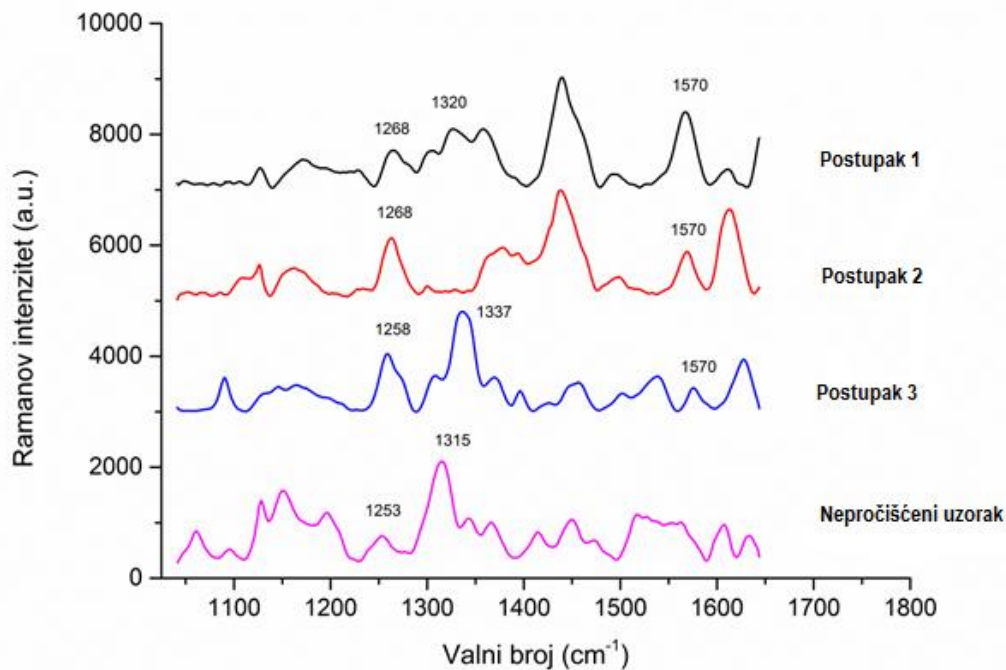
Vranešić, B., D., Verbanac, D., Krznarić, Ž. (2010) Intolerancija na histamin. *Dijetika*. **86**, 174-178.

## **7. PRILOZI**



## Prilog 1.

U prilogu 1 na slici 10. su prikazani Ramanovi spektri uzoraka ribe s koncentracijom histamina  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  pročišćeni prema postupcima 1, 2, 3 i spektar nepročišćenog uzorka. Na prvih 2 Ramanova spektra uzoraka ribe pročišćeni prema postupcima 1 i 2 jasno se vide karakteristične vrpce histamina na valnom broju  $1268$ ,  $1320$  i  $1570 \text{ cm}^{-1}$  dok se na spektrima uzorka ribe pročišćenog prema postupku 3 i nepročišćenog uzorka ne vide karakteristične vrpce histamina na valnom broju  $1268$ ,  $1320$  i  $1570 \text{ cm}^{-1}$ .



Slika 10. Ramanovi spektri uzoraka ribe s koncentracijom histamina  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  pročišćeni prema postupcima 1, 2, 3 i spektar nepročišćenog uzorka