

Prisutnost histamina u ribi i proizvodima od ribe

Lončar, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:686004>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



**SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU**

IVANA LONČAR

**PRISUTNOST HISTAMINA U RIBI I PROIZVODIMA
OD RIBE**

ZAVRŠNI RAD

PULA, 2021.

**SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU**

IVANA LONČAR

**PRISUTNOST HISTAMINA U RIBI I PROIZVODIMA OD
RIBE**

ZAVRŠNI RAD

JMBAG: 0010177184

Status: redoviti student

Smjer: Znanost o moru

Kolegij: Sigurnost i kvaliteta proizvoda iz mora

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Gavrilović

PULA, 2021.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Ivana Lončar, kandidat za prvostupnika Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljeni način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

U Puli, 27.09.2021.

Student



IZJAVA O KORIŠTENJU AUTORSKOG DJELA

Ja, Ivana Lončar dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj Završni rad pod nazivom Prisutnost histamina u ribi i proizvodima od ribe koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 27.09.2021.

Potpis

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. BIOGENI AMINI.....	2
2.1. Nastajanje biogenih amina	2
2.2. Mikroorganizmi odgovorni za proizvodnju biogenih amina u ribi	4
2.3. Utjecaj biogenih amina na ljudsko zdravlje	5
3. HISTAMIN	6
3.1. Fizička i kemijska svojstva histamina	6
3.2. Sinteza i metabolizam histamina.....	8
3.3. Utjecaj temperature i vremena skladištenja	9
3.4. Utjecaj atmosfere skladištenja, soli i pH	10
3.5. Histaminsko trovanje	11
3.5.1. Slučajevi histaminskog trovanja	13
4. METODE ODREĐIVANJA HISTAMINA	15
4.1. Kolorimetrijske metode	16
4.2. Tankoslojna kromatografija (TLC - <i>Thin layer chromatography</i>)	17
4.3. Enzimske metode.....	17
4.3.1. Imuno-enzimske metode (ELISA – <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	18
4.4. Fluorimetrijske metode.....	18
4.5. Plinska kromatografija (GC – <i>Gas Chromatography</i>)	19
4.6. Tekuća kromatografija (HPLC - <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	19
4.7. Raman spektroskopija	19
5. ANALIZA HISTAMINA U RIBAMA.....	21
6. ZAKONSKA REGULATIVA I PRIMJENA NAČELA HACCP SUSTAVA	24
7. ZAKLJUČAK.....	29
8. SAŽETAK.....	30
9. LITERATURA	31

1. UVOD

U današnje vrijeme kada vlada nestašica hrane i glad u nekim dijelovima svijeta, u drugim dijelovima vlada pretjerana konzumacija nezdrave hrane i prezasićenost tržišta nekvalitetnim proizvodima općenito. Za oba problema stručnjaci predlažu korištenje zdravih, visoko nutritivnih namirnica. U te namirnice spada i riba kao bogat izvor proteina i drugih nutrijenata važnih za zdravlje ljudskog organizma. Riba, kao i druge namirnice koje konzumiramo, može sadržati prirodno prisutne kemijske spojeve koji u određenim količinama postaju štetni za ljudsko zdravlje, a time i konzumaciju. U te spojeve spadaju biogeni amini, koji su neophodni za fiziološke funkcije. Zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, jedan od najproučavanijih biogenih amina je je histamin. Određene bakterije proizvode enzim histidin dekarboksilazu kao nusprodukt svoga rasta. Taj enzim reagira sa slobodnim histidinom kojega u pojedinim ribama ima više dok ga u drugima ima manje (Nosić, 2010). Uslijed nepravilnog postupanja s ribom nakon ulova, histamin se može naći u ribi i proizvodima od ribe u visokim koncentracijama (Visciano i sur., 2014). Ako se riba ne ohladi neposredno nakon ulova, porast koncentracija histamina javlja se u relativno kratkom vremenu a konzumacijom ribe koja ima 60mg/100g mesa kod ljudi može dovesti do histaminskog trovanja (FAO, 2004). Kako bi se zaštitilo zdravlje potrošača provode se preventivna mjerenja i koriste odabrane metode za kontrolu histamina. Uz preventivne mjere, u koje spada i dobra higijenska praksa, uveden je kao nadogradnja i HACCP sustav za industrijski sektor.

2. BIOGENI AMINI

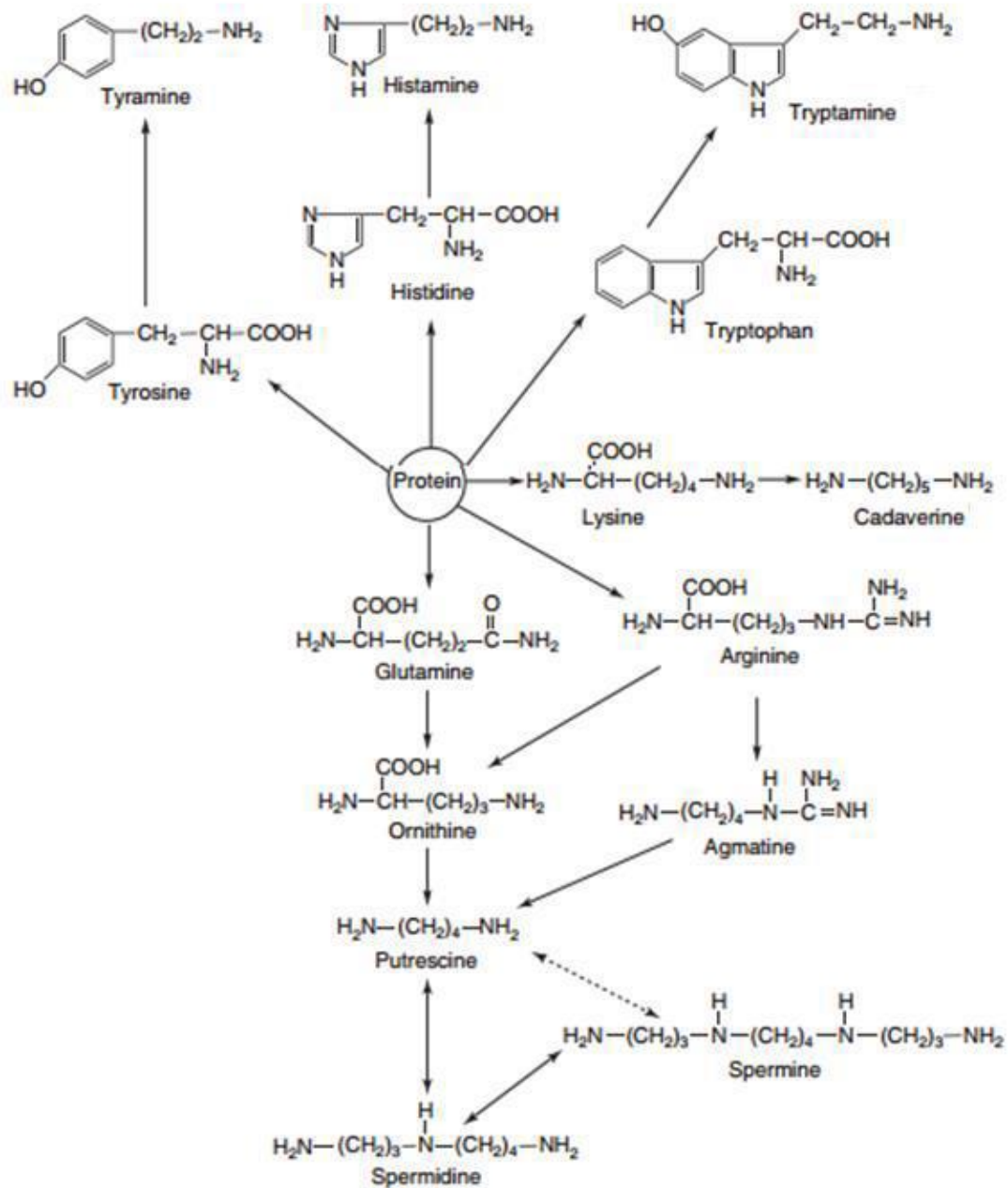
Biogeni amini su alkalne tvari s jednom ili više aaminskih skupina. Važni su dušikovi spojevi i biološki značajni u mikrobnim, biljnim i životinjskim stanicama (Karovičová i Kohajdová, 2005). Mogu se podijeliti u nekoliko grupa prema njihovoj kemijskoj strukturi – alifatski: kadaverin, putrescin, spermin, spermidin, aromatski: feniletilamin i tiramin, i heterociklički: histamin, triptamin (Mohamed i sur., 2009). U nefermentiranim namirnicama poput voća, povrća, mesa, mlijeka i ribe, endogenog su podrijetla i tada se nalaze u niskim koncentracijama. Visoke koncentracije biogenih amina mogu se naći u fermentiranoj hrani kao rezultat aktivnosti prisutne mikroflore. Broj mikroorganizama kao i njihova aktivnost se obično povećavaju za vrijeme kontrolirane ili spontane mikrobne fermentacije hrane ili tijekom kvarenja hrane. Budući da su mikroorganizmi u svježoj ribi zastupljeni u vrlo malim količinama, a tijekom vremena skladištenja i pod nepovoljnim uvjetima skladištenja količina im se povećava, njihova prisutnost u mesu ribe smatra izvrsnim pokazateljem stupnja svježine (Dalgaard i Emborg, 2009). Sadržaj biogenih amina u ribi i ribljim proizvodima ovisi o vrsti ribe, količini slobodnih aminokiselina koje sadrži, načinu na koji se riba obrađuje odnosno potencijalu za rast i razvoj bakterija u ribljim proizvodima te o uvjetima i temperaturi skladištenja ribe. Kako sadržaj biogenih amina u hrani može biti povezan i s procesom obrade ili kontaminacije tijekom proizvodnje i neodgovarajuće pohrane, prisutnost relativno velikih količina biogenih amina u ribi ukazuje na nedostatke u lancu proizvodnje ili rukovanja (Zovko, 2017). Poliamini kao što agmatin, putrescin, spermidin, spermin i kadaverin su osnovni spojevi živih stanica i bitan su čimbenik u regulaciji biokemijskih funkcija nukleinskih kiselina, sintezi bjelančevina i stabilizaciji membrana (Halasz i sur., 1994), dok histamin, kadaverin i putrescin nastaju postmortalno dekarboksilacijom specifičnih aminokiselina prisutnih u ribi (Santos, 1986).

2.1. Nastajanje biogenih amina

Nastaju dekarboksilacijom aminokiselina i mogu se očekivati u svakoj hrani koja sadrži proteine ili slobodne aminokiseline, a podvrgnuta je procesima koji omogućavaju mikrobiološku ili biokemijsku aktivnost. Proces je ovisan o specifičnim bakterijskim vrstama, a količina stvorenih biogenih amina ovisi o razini aktivnosti dekarboksilaza i dostupnosti aminokiselina (Rivas i sur., 2008).

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 (Pranjić, 2016). Slika 1. prikazuje metabolički put nastajanja biogenih amina u ribi.



Slika 1. Metabolički put nastajanja biogenih amina (Halasz i sur., 1994.)

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, 2010).

2.2. Mikroorganizmi odgovorni za proizvodnju biogenih amina u ribi

Biogeni amini koji se povezuju s toksikološkim aspektom hrane morskog porijekla uglavnom su rezultat mikrobiološke aktivnosti. Povezani su više uz vrste bakterija koje ovise o povoljnim uvjetima za razvoj bakterija i provedbu dekarboksilacije (temperatura, pH i dr.) (Šimat, 2010). Nastaju dekarboksilacijom slobodnih aminokiselina pod utjecajem enzima koji su produkt metabolizma mikroorganizama, posebno pripadnika porodica *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 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 morganii*, *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 može sadržavati veliku koncentraciju bakterija koje proizvode enzim odgovoran za dekarboksilaciju aminokiseline histidin što rezultira nastankom histamina. Navedeno pojašnjava tvrdnju da je stvaranje histamina vrlo intenzivno u ribljem mesu blizu trbušne šupljine. Prema tome, preporučuje se učinkovito uklanjanje utrobe i škrga, ali u praksi to nije moguće za manje ribe (Rohtek, 2018).

2.3. Utjecaj biogenih amina na ljudsko zdravlje

Konзумiranje biogenih amina u niskim koncentracijama ne predstavlja neposrednu opasnost za zdravlje, budući da ljudski organizam posjeduje nekoliko kontrolnih mehanizama za vlastitu sintezu biogenih amina, ali i za amine koji se unose konzumacijom hrane i pića. Izvor su dušika i prekursori za sintezu hormona, alkaloida i nukleinskih kiselina. Biogeni amini u ljudskom organizmu reguliraju tjelesnu temperaturu te krvni tlak (Karovičová i Kohajdová, 2005; Rohtek, 2018). Oni predstavljaju zaštitu mikroorganizmima kod kiselog okruženja. U malim koncentracijama esencijalni su za fiziološke aktivnosti poput održavanja pH želuca, aktivnost mozga, sekreciju hormona i pokretljivost crijeva (Arena i sur., 2001). Male količine biogenih amina u crijevnom traktu se obično metaboliziraju do fiziološki manje aktivnih oblika 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). Iz pregleda istraživanja biogenih amina u svijetu provedenih u 2011. i 2012. godini, može zaključiti da su najčešće ispitivane namirnice upravo riblji proizvodi. Najčešće se istražuje histamin (Nosić i Krešić, 2015). Uz histamin, u toksikološkom smislu jednako su značajni i ostali biogeni amini, jer pojačavaju negativno djelovanje samog histamina. Kad reagiraju s nitritima mogu tvoriti karcinogene nitrozamine (Önal, 2007). Za kadaverin i putrescin utvrđeno je da potiču toksičnost histamina, no usprkos tome u istraživanjima za parametar sigurnosti i kvalitete ribe i ribljih proizvoda uzima se isključivo histamin (Bulushi i sur., 2009). Iz navedenih je razloga važno utvrditi povezanost koncentracije histamina u ribi s vrstama bakterija koje ga mogu producirati. Također je razvijati nove ili poboljšavati postojeće analitičke metode za detekciju histamina, kako bi se osiguralo što brže obavljanje analize koncentracije histamina u ribi i proizvodima od ribe. Na taj bi način bi pri preradi i distribuciji bilo znatno ubrzano analiziranje većeg broja uzoraka i time smanjila mogućnost stavljanja zdravstveno neispravnog proizvoda na tržište (Erim, 2013).

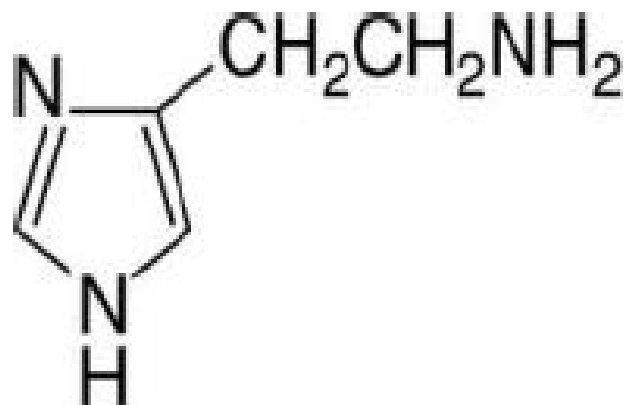
3. HISTAMIN

Premda je laboratorijska sinteza histamina izvedena davne 1907. godine, u prirodi su ga pronašli i izolirali Barger i Dale iz ražene glavnice 1910. godine (Tansey, 2003). Normalni je sastojak svakog organizma i sintetizira se u gotovo svim tkivima. Najviše ga ima u koži, plućnome i živčanome tkivu te u mastocitima. U svim navedenim tkivima histamin se nalazi u inaktivnom, vezanom obliku, a oslobađa se prema potrebi. Poslije otkrića i daljnjim napretkom tehnologije, istraživači otkrivaju njegove biološke funkcije. Tako su Dale i Laidlaw među prvima dokazali da histamin izaziva spazam bronhija i vazokonstrikciju kod nekih životinja (Tansey, 2003). Istraživanja koja su uslijedila potvrdila su da ova tvar pojačava lučenje želučane kiseline kod pasa (Parsons i Ganellin, 2006). Tek 1927. godine je dokazano prisustvo histamina u jetri i plućima čovjeka (Farmer, 1940). Kasnije je dokazano da je histamin prisutan i u mnogim drugim tkivima. Otuda je i naziv „histamin“ za tvar imidazol-etilamin, a potiče od grčke riječi „histos“ = tkivo i „amine“=amin, što bi u slobodnom prijevodu značilo amin prisutan u tkivima (Haas i sur., 2008). Daljnja istraživanja 1929. godine su pokazala da histamin igra vrlo važnu ulogu pri anafilaktičkim reakcijama (Farmer, 1940). Ova otkrića su nadalje pokrenula niz istraživanja u cilju proučavanja uloge histamina u alergijskim reakcijama i drugim fiziološkim procesima kod čovjeka, koja su i danas aktuelna.

3.1. Fizička i kemijska svojstva histamina

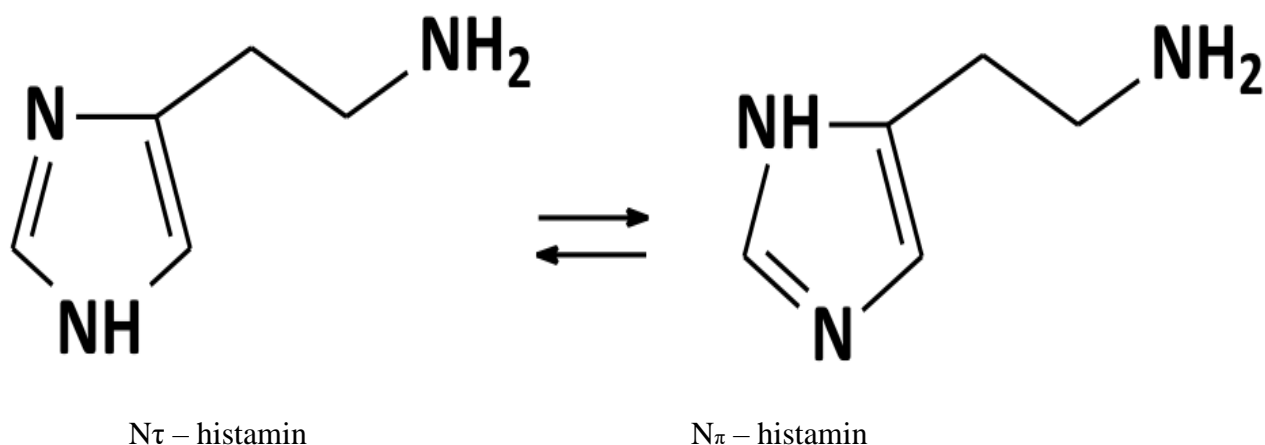
Histamin je higroskopska kristalna tvar, bez mirisa i okusa s talištem od 83 - 84°C i vrelištem od 209 - 210°C (Hui, 2006). Kristali histamina su stabilni na zraku, dnevnoj svjetlosti i sobnoj temperaturi. Dobro se otapa i u hladnoj i toploj vodi i metanolu, dok je slabo topljiv u dietil-eteru. Slobodna baza je topljiva u kloroformu, dok histaminske soli nisu. Otopina histamina je bezbojna (Petrović i sur., 2009).

Histamin se sastoji od imidazolnog prstena i alifatskog niza od 2 C atoma s amino skupinom na kraju niza (Slika 2). Njegova empirijska formula je C₅H₉N₃ i njegova molekularna težina iznosi 111,15 g/mol. Sinonimi za histamin su imidazol-etilamin, β-imidazol-etilamin, 1Himidazol-4-etanamin, 2- (4-imidazolil) etilamin, 2-aminoetil-imidazol. IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) naziv za histamin je 2-(1H-imidazol-4-il) etanamin (Stojanović, 2011).



Slika 2. Strukturna formula histamina (Flamini, 2008)

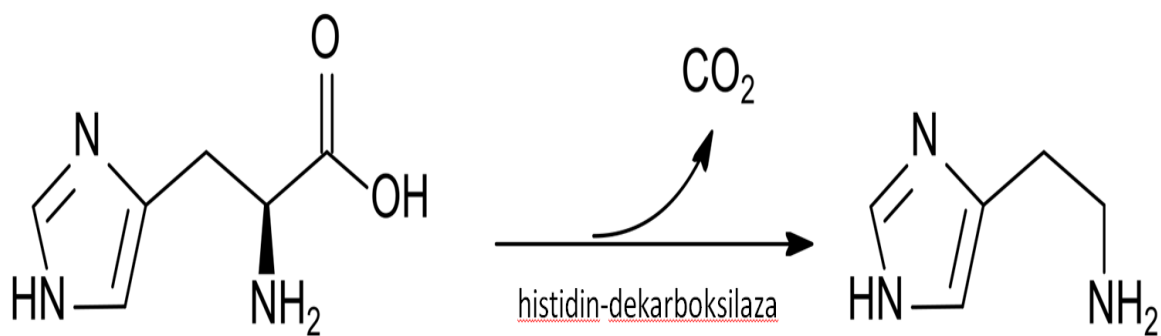
Na temelju strukturne formule može se zaključiti da histamin ima dva osnovna centra: alifatsku amino skupinu i atom dušika u heterociklusu (imidazolov prsten) koji nema proton. Ovisno o pH vrijednosti medija i pK vrijednosti ($pK_{a1} = 5,80$, $pK_{a2} = 9,40$ i $pK_{a3} = 14$ na 37°C) uspostavlja se ravnoteža između tri oblika histamina. Pri pH vrijednosti između 6,5 i 8,5 histamin je uglavnom u obliku monokationa (više od 80%), dok je pri pH nižem od 5 u obliku dikationa. Pri pH vrijednostima većim od 10 histamin se nalazi u obliku slobodne baze, a pri iznimno visokim pH vrijednostima dolazi do oslobađanja protona koji tvore anion (Ramírez i sur., 2003). S druge strane, histamin i u neutralnom i u obliku monokationa može biti u obliku dva tautomera kao posljedica prijenosa vodika između dva atoma dušika imidazolnog prstena (slika 3). Tautomerija histamina igra važnu ulogu u aktiviranju određenih tipova receptora (Ramírez i sur., 2003, Stojanović, 2011).



Slika 3. Tautometri neutralnog oblika histamina (Petrović i sur., 2009.)

3.2. Sinteza i metabolizam histamina

Histamin nastaje bakterijskom dekarboksilacijom slobodne aminokiseline histidina pod djelovanjem enzima L-histidin dekarboksilaze (HDC) kao što je prikazano na Slici 4. Taj enzim je jedan od najvažnijih enzima u metabolizmu proteina, jer sudjeluje u razgradnji jedne od osam esencijalnih aminokiselina, histidina, koji se nalazi u sastavu većine proteinskih namirnica (Vranešić Bender i sur., 2010).

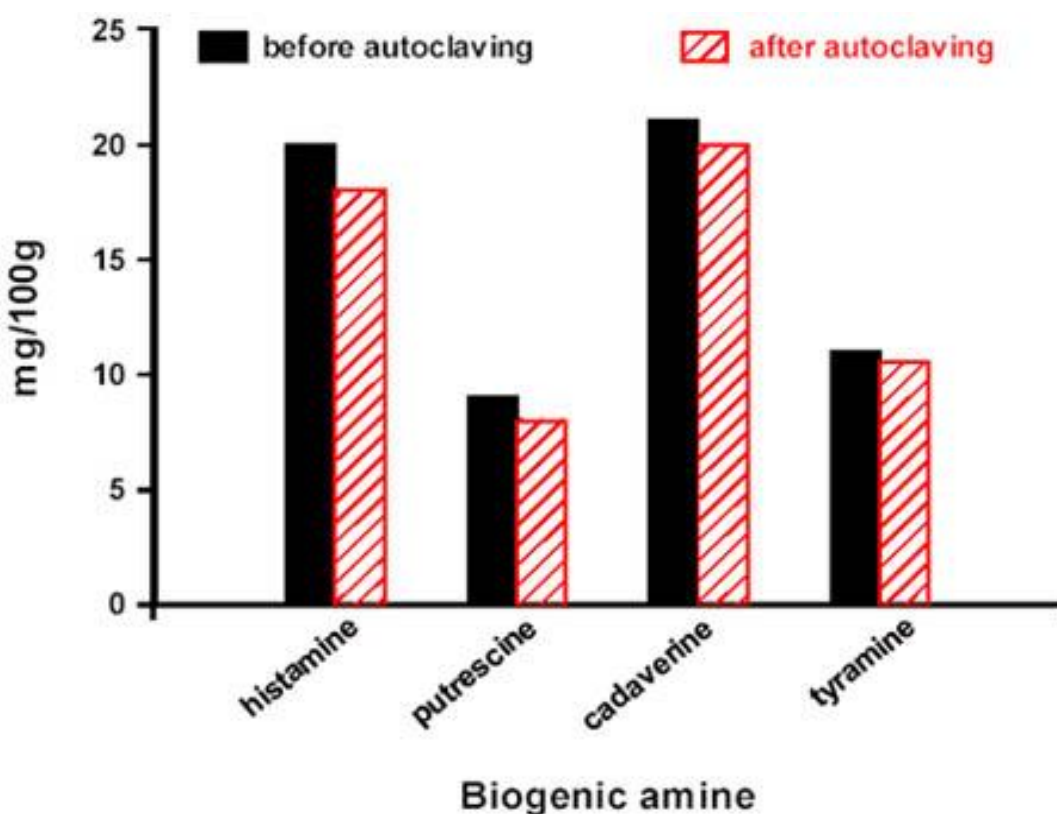


Slika 4. Metabolički put nastajanja histamina djelovanjem histidin – dekarboksilaze (Bogdanović i sur., 2009)

Djelovanje HDC enzima strogo je kontrolirano, sintetizira se u slučajevima kada stanica ima potrebu za histaminom i njegova količina u stanicama je ograničena. Zato se ovaj protein može otkriti samo u stanicama koje aktivno sintetiziraju histamin. Nakon što je dostignuta određena koncentracija histamina u stanici, HDC se vrlo brzo raspada. Inaktivacija HDC uglavnom se odvija na temperaturi iznad 65 °C. Upravo zato koncentracija biogenih amina je 4 do 10 puta niža prilikom kuhanja nego prilikom soljenja i sušenja (Bogdanović i sur., 2009). Histamin u sirovoj ribi uglavnom nastaje posredovanjem gram-negativnih crijevnih bakterija dok je histamin u vinu i siru nastao posredovanjem gram-pozitivnih bakterija (Landete i sur., 2005). Postoje dvije vrste HDC-a. Gram-pozitivne bakterije produciraju HDC koja sadrži aktivnu piruvatnu skupinu, dok HDC životinja i gram-negativnih bakterija ovisi o piridoksal-5-fosfatu. Također je moguće da pojedini proizvodi sadrže histamin koji potiče od obje vrste HDC (Hungerford, 2010). Jednom nastao enzim HDC može nastaviti producirati histamin u ribi i u slučaju kada bakterije nisu aktivne, odnosno kada su bakterije uginule (Economou i sur., 2007).

3.3. Utjecaj temperature i vremena skladištenja

Poznato je da temperatura ima značajan učinak na stvaranje bakterija odgovornih za nastanak histamina u ribe. Histamin je termostabilan te stoga niti temperatura od 120°C tijekom 30 minuta ne smanjuje u znatnoj mjeri njegovu količinu u ribi (Slika 5.). Prema nekim autorima izdržava temperaturu od čak 200°C, što znači da ga temperatura sterilizacije ne može uništiti (Bogdanović i sur., 2009).



Slika 5. Učinak zagrijavanja na skušu tretiranu biogenim aminima prije sterilizacije (FAO, 2004)

Nastanak histamina uglavnom je posljedica neadekvatnog rukovanja ribom, tj. skladištenja u uvjetima koji omogućuju mikrobiološku aktivnost. Bakterije, pomoću svog enzima dekarboksilaze stvaraju histamin u širokom temperaturnom rasponu. Optimalna temperatura za njegov nastanak je 20 - 25 °C, no brojna istraživanja zabilježila su porast koncentracije histamina i pri temperaturama do +4°C kroz period skladištenja od 3 do 7 dana (Kanki i sur., 2004). Rapidan rast histamina zabilježen je na temperaturi od 32,2°C, stoga se može reći da će se histamin prije razviti kao rezultat nepravilnog skladištenja na povišenoj temperaturi, nego dugotrajnog skladištenja na relativno nižoj temperaturi (Mendes, 2009). Kako je stvaranje

histamina kod riba uvijek post-mortalno, stvaranje histamina bi stoga trebalo moći biti potpuno kontrolirano. No, situacija u svijetu je upravo suprotna jer je histamin najčešći uzrok intoksikacija uslijed konzumacije ribe (Vidaček, 2013). Zbog toga je važno način pakiranja voditi računa i o drugim mogućim konzervansima koji će spriječiti umnožavanje bakterija, kao što su s NaCl, podešavanje pH, ili druge faktore koji se mogu koristiti za smanjenje broja bakterija i time aktivnosti bakterijske dekarboksilaze u svrhu kontrole stvaranja histamina (FAO, 2004). Regulatorna 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 za EU propise ili ispod 4,4°C za SAD propise, sprečava stvaranje histamina od strane mezofilnih bakterija i smanjuje brzinu stvaranje histamina pod utjecajem psihrofilnih bakterija. Međutim, psihrofilne bakterije mogu proizvoditi metabolit (enzim) te se koncentracija histamina povećava i može postići toksične koncentracije i kod rashlađenih plodova mora na 2°C i na 4,4°C nakon određenog vremena skladištenja (Dalgaard i Emborg, 2009). Stoga se predviđanje stvaranja histamina u ribama, kao funkciju vremena i temperature može koristiti kako bi se izbjegli uvjeti nepoštivanja temperaturnog režima nakon izlova i tijekom skladištenja, jer prema postojećim podacima čak i ohlađen proizvod ribarstva, ukoliko riba nije ohlađena neposredno nakon ulova (spriječeno umnožavanje bakterija, čija dekarboksilaza ostaje aktivna i kada bakterija ugine pri naknadnom hlađenju) može predstavljati opasnost od histaminskog trovanja (FAO, 2013).

3.4. Utjecaj atmosfere skladištenja, soli i pH

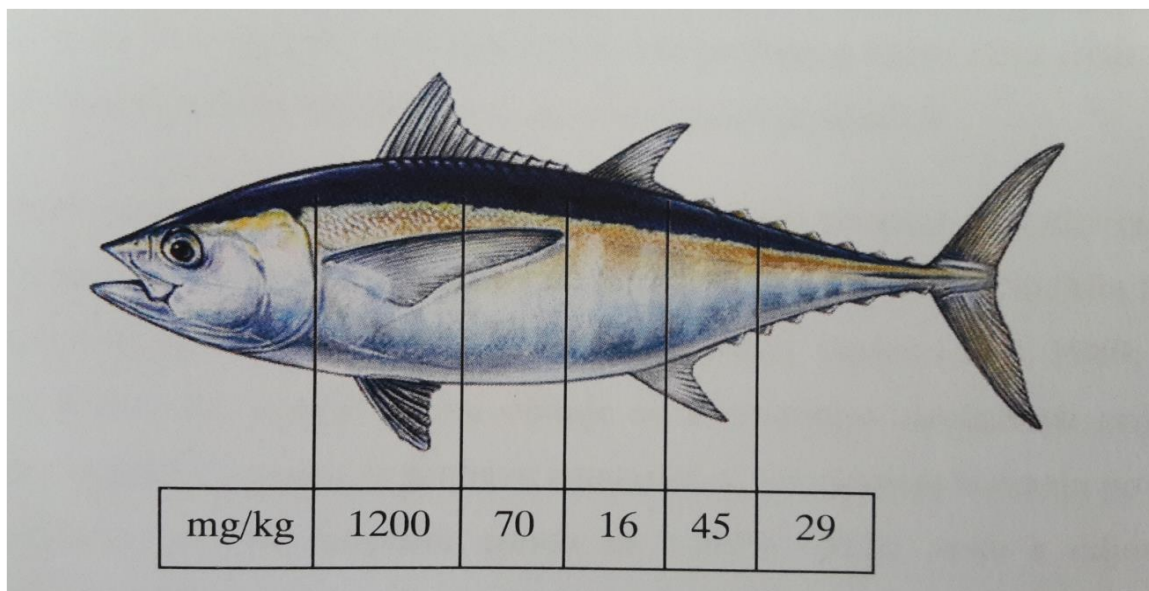
Za razliku od ranijeg pakiranja u atmosferi, korištenje modificirane atmosfere (MA) za pakiranja ribljih proizvoda postaje sve češće u ribljoj industriji. Vakuum pakiranje i MA s plinskom mješavinom koja sadrži ugljični dioksid (CO₂) i dušik (N₂) nemaju značajni inhibirajući utjecaj na formiranje histamina u svježim plodovima mora. Međutim, MA s plinskom smjesom koje sadrži ugljični dioksid (CO₂) i kisik (O₂) sprječava stvaranje histamina u toksičnim koncentracijama iznad 500 mg/kg (Prester, 2011). Kod svježih tuna, pakiranje u modificiranoj atmosferi 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 sredstva za 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 niti ostalih biogenih amina, iako je opaženo blago

opadanje udjela histamina tijekom procesa zrenja slanih inćuna. Navedeno, autori objašnjavaju difuzijom histamina u salamuru (Bogdanović i sur., 2009). Kod skuše na 20°C, dodatak $1 \pm 2\%$ 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, bakterija *Photobacterium 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 ribi do oko 6 može doprinijeti povećanom stvaranju histamina (Emborg i sur., 2005).

3.5. Histaminsko trovanje

Trovanje histaminom ovisi o sadržaju histamina u ribi, o tjelesnoj masi čovjeka te o količini histamina u proizvodu od te ribe. Ljudski organizam može podnijeti relativno velike količine histamina unesenoga u organizam namirnicama. Oko 95% histamina unesenoga u organizam preko probavnoga sustava crijevne bakterije acetiliraju i razgrade, te ga na taj način inaktiviraju (Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, 2021). Uneseni histamin će se detoksificirati u probavnom sustavu uz pomoć enzima diaminoksidaze (DAO) i histamin N-metiltransferaze (HMT). Ovaj zaštitni mehanizam prestaje djelovati ako je unos histamina i/ili drugih biogenih amina vrlo visok ili ako su navedeni enzimi blokirani drugim tvarima. Vjerojatno inhibicija crijevnog katabolizma histamina uzrokuje povećani prijenos histamina kroz stanične membrane te u krvotok (FAO, 1995). Ima i lijekova koji mogu potaknuti oslobađanje histamina. Neki od lijekova koji mogu blokirati DAO su: kontrastna sredstva, mišićni relaksatori, narkotici, analgetici, lokalni anestetici, antihipertenzivi, antiaritmici, antidepresivi, tuberkulostatici, neki antibiotici i dr. (Nosić i Krešić, 2015). Budući da se smatralo da do trovanja dolazi nakon konzumiranja plave morske ribe iz porodice *Scombridae* (skušovke), bolest se još naziva i skombroidno trovanje (skombrotoksizam). Obzirom da su zabilježeni slučajevi u kojima je trovanje uzrokovano konzumacijom drugih vrsta riba kao što su tuna, mahi - mahi, sardine, srdele i losos (Stojanović, 2011), 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 "histaminsko trovanje" (Hungerford, 2010). Ako se riba duže od 16 sati ne drži na temperaturama hlađenja (ili nižim) dolazi do nastajanja visokih koncentracija histamina, a za vrijeme od 24 sata bakterije proizvođači histamina mogu se dovoljno razmnožiti da stvore toksičnu koncentraciju histamina (Naila i sur., 2011). U pokvarenoj ribi zabilježene su razine histamina od čak 4000 mg/kg (Diel

i sur., 1997). Organoleptička svojstva ribe koja sadrže velike razine histamina obično su nepromijenjena, osim u slučajevima naprednog kvarenja. Simptomi trovanja histaminom javljaju se vrlo brzo nakon konzumiranja ribe bogate histaminom u periodu od nekoliko minuta do 1 sat, ovisni su o dozi, a očituju se kao difuzno crvenilo lica i gornjeg dijela tijela uz žarenje i svrbež oko usta, crvenilo oko očiju, zatim znojenje, mučninu, povraćanje, grčeve u trbuhu, lupanje srca i pritisak u prsima (Taylor, 1986). Simptomi se mogu manifestirati i ovisno o osjetljivosti organizma konzumenta i o nekim drugim parametrima. Interesantna je i činjenica da histamin nije jednako raspoređen po cijeloj ribi, što pogotovo dolazi do izražaja kod velikih riba poput tune ili igluna (Meštrović, 2016). 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 6).



Slika 6. Raspodjela histamina u mesu ribe (Šimat, 2010)

Broj ljudi s netolerancijom na histamin, kod kojih i male koncentracije histamina izazivaju pojavu drastičnih simptoma, je u porastu. Službenih statističkih podataka o tome nema dovoljno zbog malog slučaja prijavljivanja, jer su simptomi uglavnom blagi, ili zbog neukosti medicinskog osoblja koje histaminsko trovanje dijagnosticira kao trovanje s hranom (FAO, 2004). Također se simptomi histaminskog trovanja često mogu zamijeniti s trovanjem bakterijama roda *Salmonella* (Nosić i Krešić, 2015), pa se opravdano pretpostavlja da je prijavljeni broj oboljelih samo “vrh ledene sante” (Mulić i sur., 2004). 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. Kod osoba s kroničnim srčanim oboljenjima, visokim tlakom i oboljenjima organa za disanje histaminsko trovanje može dovesti do znatnog pogoršanja zdravstvenog stanja. Sposobnost razgradnje histamina iz hrane drastično se smanjuje uslijed konzumacije alkohola i djelovanja određenih lijekova zbog njihovog svojstva da inhibiraju DAO. Zbog toga se preporučuje izbjegavati konzumaciju alkoholnih pića uz hranu s povećanim ili visokim koncentracijama biogenih amina (Vranešić Bender i sur., 2010). U vrste riba koje sadrže visoku razinu slobodnog histidina, pa prema tome predstavljaju i rizik za histaminsko trovanje, ubrajaju se sljedeće: inćun, različite vrste tuna, haringa, skuša, lokarda, srdela, papalina. Bijela riba (npr. oslić) sadrži tek neznatne količine slobodnog histidina. (Nosić i Krešić, 2015).

3.5.1. Slučajevi histaminskog trovanja

Na histaminsko trovanje ribom otpada 5% svih oboljenja vezanih za hranu kao i 37% svih bolesti vezanih za ribu podrijetlom iz mora ili oceana. Ova vrsta trovanja ribom je ujedno i najčešća u svijetu. Prema podacima baze podataka RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*) za EU, od početka 1995. do kraja 2001. godine zabilježeno je 35 slučajeva trovanja ribom i ribljim proizvodima, dok je u periodu od 2002.-2010. godine registrirano 315 slučajeva, od kojih je u osam uzoraka ribe koncentracija histamina bila iznad 4000 mg/kg (Nosić i Krešić, 2015). Prvi slučaj histaminskog otrovanja zabilježen je u Velikoj Britaniji 1799. godine. Najviše slučajeva trovanja je zabilježeno u SAD-u, Japanu i Ujedinjenom Kraljevstvu. Manji broj slučajeva je zabilježen u Kanadi, Novom Zelandu, Francuskoj, Njemačkoj, Švedskoj, Šri Lanki, Češkoj, Slovačkoj, Nizozemskoj, Australiji, Indoneziji, Južnoj Africi i Egiptu (Muscarella i sur., 2013). Histaminsko trovanje zabilježeno 1973. godine u Japanu se zbog velikog broja oboljelih (2 656 slučajeva) smatralo problemom globalnih razmjera (Singh i sur., 2012). Histaminsko trovanje obuhvaća 38% slučajeva svih trovanja morskim proizvodima u Americi i Velikoj Britaniji.

Uočeno je da količina konzumirane ribe u pojedinoj zemlji nije proporcionalna s brojem zabilježenih trovanja. U Danskoj, Novom Zelandu, Francuskoj i Finskoj broj oboljelih je dvije do pet osoba godišnje na milijun stanovnika, dok na Havajima broj trovanja godišnje iznosi 31 osobu na milijun stanovnika (Nosić, 2010). Pretpostavlja se da riba ulovljena na Havajima u sportskom ribolovu može doći direktno u trgovine i restorane bez da prođe stroge provjere

kojima je svakodnevno podvrgnuta riba u industrijskoj proizvodnji. Kako je ovo područje inače poznato kao okupljalište sportskih ribolovaca time bi se mogao objasniti i veliki broj trovanja ljudi histaminom godišnje (Hungerford, 2010).

Intenzitet histaminskog trovanja ovisi o tjelesnoj masi potrošača, količini histamina u samoj namirnici te naravno i o konzumiranoj količini namirnice, najveći broj trovanja histaminom je u dječjim vrtićima (Marinšek, 1984). Zabilježen je slučaj trovanja u Lousianni 14.12.2006. godine, kada je konzumirana tunjevina porijeklom iz Indonezije, pri čemu se razboljelo 6 od 23 osobe koje su konzumirale odreske tunjevine. U slučaju u Tennessee-ju (25.11.2006.) konzumirana je tunjevina porijeklom iz Vijetnama. Pet osoba se razboljelo nakon što je jelo odreske tunjevine iz restorana. Slučaj iz Španjolske (15.11.1995.) govori o tridesetogodišnje muškarcu koji je 30 minuta nakon konzumiranja obroka tunjevine pocrvenio, počeo se znojiti, pao mu je krvni tlak te je imao vrtoglavicu, glavobolju, povraćao i teško disao. Medicinski je tretiran s epinerfinom, tekućinama, kisikom, steroidima i antihistaminicima. Simptomi su nestali nakon nekoliko sati. U našem području je prvo otrovanje ribljim konzervama opisano 1973. godine. Otrovanje se dogodilo u jednoj bolnici za tuberkulozu i obuhvatilo je 6-30 osoba koje su konzumirale sardine u ulju. U Hrvatskoj su u razdoblju od 1.1.1992. do 31.12.2001. godine utvrđena četiri masovna histaminska trovanja hranom, od kojih su tri (75%) uzrokovana konzumacijom plave ribe (srdela, inćuni, tuna). Masovno trovanje koje se dogodilo 1998. godine u Rijeci utvrđeno je u transportnih radnika koji su prenosili riblje brašno (Mulić i sur., 2004).

4. METODE ODREĐIVANJA HISTAMINA

Praćenje sadržaja histamina naširoko se koristi u prehrambenoj industriji i dobiveni rezultati se koriste za kontrolu kvalitete sirovina, poluproizvoda i gotovih proizvoda, praćenje procesa fermentacije, kontrolu ispravnosti tehnološkog procesa, kao i tijekom istraživačkog rada i razvoja novih tehnologija. Tako postoji i potreba za pouzdanim i efikasnim metodama za detekciju i kvantifikaciju histamina i biogenih amina u ribi i proizvodima ribarstva. Iako je senzorna ocjena (izgled, boja, okus, miris i tekstura) koristan alat kontrole svježine i kvalitete ribe i ribljih proizvoda, sadržaj histamina ne može se lako detektirati na temelju mirisa ili izgleda jer, ponekad, visoke razine histamina ne prate nikakvi znaci kvarenja. Zanimanje za histamin i njegov toksični učinak doveli su do razvoja velikog broja različitih metoda za njegovo određivanje. Svaka od tih metoda ima neke prednosti, ali i nedostatke koji otežavaju njezinu primjenu u industriji. Oprema potrebna za provođenje ovih metoda podrazumijeva različite kvalitativne i kvantitativne kitove sa potrebnim reagensima i spektrofotometar kojim se po završetku reakcije može očitati intenzitet boje na osnovu čega se dobiva podatak o količini histamina u uzorku. Različiti postupci pripreme uzoraka unatoč prijenosnim kitovima, smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenim soljenjem i dozrijevanjem u salamuri kao i neprikladnost za analize van laboratorija glavni su nedostaci ovih metoda (Etienne i sur., 2006). Razvijen veliki broj analitičkih metoda za određivanje histamina (Tablica 1.) koje se uglavnom temelje na kromatografskim postupcima.

Tablica 1. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina (FAO, 2013)

	AOAC metoda	HPLC metode	Spektrofluorometrijske metode	ELISA	Kolorimetrijske metode
Vrijeme potrebno za 1 test (h)	1-2	1-2	1	1	1
Oprema	Flurometar	HPLC	Spektrofluorometar	Spektrofotometar	Spektrofotometar
Prag kvantifikacije	1 – 5 ppm	1.5 – 5 ppm	1.5 ppb	2 – 5 ppm	20 ppm
Raspon	1 – 150 ppm	5 – 2500 ppm	1.5 ppb – 100 ppm	0 – 500 ppm	0.8 – 300 ppm
Prednosti metode	Robusnost, ponovljivost, točnost, preciznost	Analiza svih biogenih amina, točnost, preciznost	Točnost, cijena preciznost,	Jednostavnost (kit), cijena, više testova istovremeno	Jednostavnost, cijena, više testova istovremeno, jednostavna kalibracija

Neke od rutinskih analiza, polukvantitativnih i kvantitativnih metoda za određivanje histamina koje se koriste za proizvode ribarstva su: kolorimetrijske, tankoslojna kromatografija, enzimске, imunoenzimске ELISA, fluorimetrijske, tekuća i plinska kromatografija, raman spektroskopija (Etienne, i sur., 2006; Ćavar, 2017).

4.1. Kolorimetrijske metode

Kolorimetrijske metode za određivanje histamina općenito su složenije, zahtijevaju prethodno pročišćavanje pomoću ionskog izmjenjivača i izvođenje reakcije bojenja između izoliranog histamina i bakra koji zajednički tvore kompleks crvene boje. Suvremene modificirane kolorimetrijske metode relativno su brze, jeftine i vrlo pogodne za "screening" test. Naime, kod jednostavnije kolorimetrijske metode, nakon ekstrakcije i pročišćavanja ekstrakta s n - butanolom dobiveni pročišćeni ekstrakt se upari do suhog i otopi u destiliranoj vodi. Obojena

reakcija izvodi se s p-fenildiazonijskim sulfonatom i intenzitet bojenja se određuje spektrofotometrijski na 496 nm, s osjetljivošću od 10 mg/kg (Etienne i sur., 2006)

4.2. Tankoslojna kromatografija (TLC - *Thin layer chromatography*)

Tradicionalne TLC starije su metode koje se još uvijek dosta koriste u kontrolnim laboratorijima jer su brze. Određene faze se mogu automatizirati i više uzoraka može se analizirati na jednoj ploči u isto vrijeme. Nedostaci ovih tehnika su da pripadaju polukvantitativnim metodama u smislu točnosti, imaju nisku preciznost i visoku granicu detekcije. Također, otapala koja su korištena za razvoj kromatograma su uglavnom toksična. Klasična tankoslojna kromatografija prikladna je kao "*screening*" metoda za uzorke koji sadrže više od 50 mg/kg histamina, tako da se nakon potvrde prisutnosti, histamin dalje određuje točnijom metodom. U posljednje vrijeme, dostupnost velikog broja stacionarnih faza, instrumenata za automatsku analizu uzorka i denzitometrijsku detekciju doveli su do usavršavanja tradicionalnih tankoslojnih kromatografskih tehnika i poboljšanja osjetljivosti, a dobiveni rezultati se mogu usporediti s rezultatima tekuće kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC – *High performance liquid chromatography*) i plinske kromatografije (GC- *Gas chromatography*).

Tankoslojna kromatografija visokih performansi (HPTLC - *High - performance TLC*) je vrlo osjetljiva i selektivna metoda, omogućuje istovremeno kvantitativno određivanje više biogenih amina i ne zahtijeva sofisticiranu opremu. Budući da se njom mogu separirati, identificirati i kvantificirati spojevi prisutni u malim vrijednostima u bilo kojem uzorku koji se može otopiti u tekućini, a jednostavna je za rukovanje, ova je metoda našla široku primjenu te je najčešće primjenjivana metoda za analizu histamina (Etienne i sur., 2006).

4.3. Enzimske metode

Temelj enzimskih metoda za određivanje histamina je pretvorba histamina u imidazol acetaldehid sa stvaranjem vodikovog peroksida u reakciji koju katalizira enzim diamin-oksidaza. Vodikov peroksid se dalje pretvara u kisik i vodu uz pomoć drugog enzima peroksidaze, a paralelno se odvija oksidacijska reakcija bezbojnog leuko-kristalvioleta u ljubičasti kristalviolet. Intenzitet boje je proporcionalan količini histamina, što se može vizualno odrediti za kvalitativnu, i spektrofotometrijski za kvantitativnu analizu. Osjetljivost ove metode je oko 0,5 mg/kg histamina. Prednosti enzimskih metoda su kratko trajanje analize

i dobro slaganje s AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) fluorimetrijskom metodom i HPLC metodom. Međutim, DAO enzim također reagira s drugim biogenim aminima, poput agmatina, putrescina i kadaverina, kada su prisutni u visokim koncentracijama, pa se mora paziti da se uklone smetnje kako bi se osigurala bolja selektivnost. U posljednje vrijeme, da bi se pojednostavio analitički postupak u primjeni enzimskih metoda, razvijeni su enzimski biosenzori i test trake ili tzv. "dipstick" testovi koji omogućuju brzu i jednostavnu analizu (Etienne i sur., 2006).

4.3.1. Imuno-enzimske metode (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELISA metode često se koriste za određivanje histamina u ribi i plodovima mora, u sirevima i vinu. Razne tvrtke proizvode komercijalne ELISA kitove za histamin (na primjer Neogen, Immunotech, Biomedix) koji su jednostavni za uporabu, vrlo su specifični i osjetljivi, omogućuju brzu analizu i dajući točne rezultate uz nisku cijenu. Komercijalni ELISA testovi za kvalitativnost su na primjer „Alert ® for histamine“ i „Histamarine test kits“. Za kvantitativnu analizu se, na primjer, može koristiti „Veratox®, Ridascreen®“. Kao dio testova za kvantitativnu analizu, određeni se kitovi primjenjuju za određeni raspon koncentracija histamina. Osjetljivost ove tehnike se kreće od 2,5 mg/kg do 50 mg/kg, ovisno o korištenim kitovima (Etienne i sur., 2006).

4.4. Fluorimetrijske metode

Fluorimetrijske metode za određivanje histamina zahtijevaju prethodno pročišćavanje ekstrakta za uklanjanje potencijalno ometajućih tvari, najčešće primjenom stupaca s ionskim izmjenjivačima. Osim toga, potrebna je prethodna derivatizacija histamina sa specifičnim reagensom kako bi nastali fluorescentni derivati. Derivatizacija se najčešće izvodi s o-ftalaldehidom, naftalen-2,3-dikarbaldehidom, danzil kloridom i fluoreskaminom. Fluorimetrijska metoda koja uključuje ekstrakciju histamina metanolom, pročišćavanje ionskom kromatografijom, derivatizaciju o-ftalaldehidom i fluorimetrijsko određivanje, također je standardna AOAC metoda za određivanje histamina u ribi i plodovima mora. Iako osjetljiva i reproduktivna, fluorimetrijska AOAC metoda vrlo je složena i oduzima puno vremena (Etienne i sur., 2006).

4.5. Plinska kromatografija (GC – *Gas Chromatography*)

Izravno određivanje histamina plinskom kromatografijom vrlo je rijetko zbog niza nedostataka, od kojih se najznačajniji nedostatak odnosi na ograničenu hlapljivost histamina. Slabo isparavanje histamina dovodi do sporog ili nepotpunog eluiranja iz kolone, rastegnutih vrhova i neproduktivnih rezultata. Stoga se derivatizacija uglavnom provodi radi dobivanja više hlapljivih derivata histamina, radi poboljšanja selektivnosti i osjetljivosti određivanja neovisno o detektoru koji se koristi, s poboljšanim ukupnim odvajanjem. U ove svrhe, najčešće korišteni reagensi za derivatizaciju histamina su izobutil kloroformat i pentafluoropropionski anhidrid. Uvođenje kolona naprednih performansi na tržište omogućilo je izravno utvrđivanje histamina plinskom kromatografijom. Pomoću kolone CP - SIL 19CB pri određivanju histamina bez derivatizacije plinskom kromatografijom - masenom spektrometrijom (GC-MS) postignuta je granica detekcije od 5 mg/kg. Direktnim određivanjem značajno se skraćuje vrijeme analize i izbjegavaju pogreške koje mogu nastati reakcijom sinteze derivata (Etienne i sur., 2006).

4.6. Tekuća kromatografija (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*)

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. Kako je HPLC tehnika sofisticirana, metoda se može koristiti u specijaliziranim laboratorijima za provjeru nekih uzoraka nakon prvog probnog testa. Tom metodom mogu se separirati, identificirati i kvantificirati spojevi prisutni u tragovima 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 (Etienne i sur., 2006).

4.7. Raman spektroskopija

U analizi kvalitete i sigurnosti hrane u posljednje vrijeme izražen je velik interes za primjenu brzih, neinvazivnih metoda poput Raman spektroskopije. Raman spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika koja se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s vibracijskim modovima molekule odnosno pomaku u valnoj duljini ili

frekvenciji raspršene zrake svjetlosti koji je posljedica neelastičnog raspršivanja prilikom interakcije fotona i molekula ispitivane tvari. Snimanjem intenziteta raspršene svjetlosti u odnosu na valnu duljinu ili frekvenciju dobiva se Ramanov spektar koji je karakterističan za određenu molekulu. Glavno ograničenje kod široke primjene ove metode, prije svega je činjenica da je Raman raspršenje efekt slabog intenziteta te zahtijeva relativno visoku koncentraciju analita u uzorku ili veliku snagu izvora svjetlosti kako bi se signal mogao detektirati. Rezonantna Raman spektroskopija (RRS) i spektroskopija površinski pojačanog Raman raspršenja (SERS) specifične su tehnike koje se koriste za povećanje intenziteta signala odnosno osjetljivosti Raman spektroskopije (Mathies, 1995). U novije vrijeme Raman spektroskopija postala je vrlo važna metoda s mnogim područjima primjene čije su glavne prednosti jednostavna priprema uzoraka te mogućnost *in situ* analize (Long, 2002; Ferraro, 2003).

5. ANALIZA HISTAMINA U RIBAMA

U ribljim proizvodima, razina histamina od posebnog je značaja jer se njegova koncentracija povećava tijekom kvarenja ribljeg mesa, što je dobar pokazatelj nedovoljnog hlađenja i loših higijenskih uvjeta (naknadne kontaminacije bakterijama uslijed loše higijene i/ili poremećaja hladnog lanca). Brzo hlađenje nakon smrti ribe koja se smatra skombrotoksičnom je najvažniji faktor u prevenciji nastanka histamina. Ovo je posebno važno za ribu koja potječe iz toplih voda te za tunu koja je sposobna generirati toplinu u svom mišićju (Silbande i sur., 2017). Svježa visokokvalitetna riba obično sadrži manje od 10 mg/kg histamina, dok se kod starije ribe koncentracija može povećati na preko 1000 mg/kg. Simptomi trovanja mogu se već pojaviti kada se konzumira riba s razinom histamina od 400 mg/kg (FAO, 2004). U tablici 2. navedene su najčešće ribe iz našeg područja i ribe koje možemo naći na policama trgovina, koje mogu sadržavati histamin.

Tablica 2. Vrste riba koje mogu imati prisutan histamin (izrađeno prema FDA, 2011)

Vrsta	Latinsko ime
Indijska skuša	<i>Rastrelliger kanagurta</i>
Skuša	<i>Scomber scombrus</i>
Gofovi	<i>Seriola</i> spp.
Gof	<i>Seriola dumerili</i>
Lokarda	<i>Scomber japonicus</i>
Rod inćuna	<i>Anchoa</i> spp.
Rod inćuna	<i>Anchoviella</i> spp.
Pacifički inćun	<i>Cetengraulis mysticetus</i>
Inćuni	<i>Engraulis</i> spp.
Rod inćuna	<i>Stolephorus</i> spp.
Inćun	<i>Engraulis encrasicolus</i>
Vrsta palamide	<i>Cybiosarda elegans</i>
Bijela tuna („dogtooth tuna“)	<i>Gymnosarda unicolor</i>
Pastirica atlantska	<i>Orcynopsis unicolor</i>
Palamide	<i>Sarda</i> spp.
Palamida	<i>Sarda sarda</i>

Okrugla haringa	<i>Etrumeus teres</i>
Vrsta haringe	<i>Harengula thrissina</i>
Rod haringi	<i>Ilisha</i> spp.
Sleđevka	<i>Opisthopterus tardoore</i>
Vrsta haringe	<i>Pellona ditchela</i>
Rod lojki	<i>Alosa</i> spp.
Atlantska haringa	<i>Clupea harengus</i>
Srdela	<i>Sardina pilchardus</i>
Rod Indopacifičke srdele	<i>Sardinops</i> spp.
Šarun (ili Atlantski šarun)	<i>Trachurus trachurus</i>
Šnjurci	<i>Caranx</i> spp.
Plavi trkač	<i>Caranx crysos</i>
Šaruni	<i>Trachurus</i> spp.
Rod lojki	<i>Alosa</i> spp.
Vitka tuna	<i>Allothunnus fallai</i>
Rod rumbaca	<i>Auxis</i> spp.
Rumbac	<i>Auxis rochei</i>
Rod luceva	<i>Euthynnus</i> spp.
Luc	<i>Euthynnus alletteratus</i>
Pacifička prugasta tuna	<i>Katsuwonus pelamis</i>
Dugorepa tuna	<i>Thunnus tonggol</i>
Dugoperajna tuna	<i>Thunnus alalunga</i>
Žutoperajna tuna	<i>Thunnus albacares</i>
Crnoperajna tuna	<i>Thunnus atlanticus</i>
Južna plavoperajna tuna	<i>Thunnus maccoyii</i>
Velikooka tuna	<i>Thunnus obesus</i>
Atlantska plavoperajna tuna	<i>Thunnus thynnus</i>
Tune	<i>Thunnus</i> spp.
Menhadeni (krmne sleđevke)	<i>Brevoortia</i> spp.
Pacifički menhaden	<i>Ethmidium maculatum</i>

Harengula	<i>Harengula</i> spp.
Goleme srdele	<i>Sardinella</i> spp.
Srdela golema	<i>Sardinella aurita</i>
Kusača	<i>Scomberesox saurus</i>

6. ZAKONSKA REGULATIVA I PRIMJENA NAČELA HACCP SUSTAVA

Mnoge zemlje propisuju maksimalno dopušteni sadržaj histamina u određenim vrstama hrane, dok drugim propisima o kvaliteti i higijeni hrane utvrđuju postupke kako bi se opasnost od formiranja histamina u hrani svela na najmanju moguću mjeru. Hrvatska ulaskom u Europsku uniju primjenjuje njene zakone. Tako Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu donosi zakonske granice za kritične količine histamina u ribi. Za ribu i riblje proizvode najveći dopušteni sadržaj histamina je 100 mg/kg, dok je za fermentirane riblje proizvode dopušteno 200 mg/kg. Ova regulativa propisuje da od devet uzoraka uzetih u jednom uzorku, sadržaj histamina u dva uzorka može prelaziti 100 mg/kg (ili ukupno 200 mg/kg), ali ni u jednom uzorku ne smije prelaziti 200 mg/kg (ili 400 mg/kg). Zamrznuta morska riba, konzervirana riba i pasteurizirane konzerve ne smiju sadržavati više od 40 mg histamina na 100 g ribljeg mesa (NN 117/03, 130/03 i 48/04). Američka agencija za hranu i lijekove (US FDA, 2011) propisuje maksimalno dopušteni sadržaj histamina u ribi od 50 mg/kg, a riba sa sadržajem histamina iznad te razine zabranjena je za prehranu ljudi.

Neke od preporuka US FDA (2011) su:

1. riba izložena zraku ili vodi temperature iznad 28.3° C treba staviti na led ili u slanu vodu ili ledenu salamuru temperature do 4.4°C što je prije moguće nakon ulova, ali ne više od 6 sati nakon smrti
2. riba izložena zraku ili vodi temperature niže od 28.3° C treba biti na ledu ili u slanoj vodi, ledenoj salamuri temperature do 4.4° C što je prije moguće nakon ulova, ali ne više od 9 sati nakon smrti
3. riba koja je očišćena i sa izvađenom utrobom prije hlađenja treba biti na ledu ili u slanoj vodi, ledenoj salamuri temperature do 4.4° C što je prije moguće nakon ulova, ali ne više od 12 sati nakon smrti
4. riba koja je ulovljena pod uvjetom da je mrtva riba izložena vodi temperature 18.3° C ili niže kroz 24 sata ili manje, treba biti na ledu ili u slanoj vodi, ledenoj kaši ili salamuri temperature do 4.4° C što je prije moguće nakon ulova, ali ne više od prethodno navedenog vremena počevši sa vremenom kad se riba izvadi iz okoliša temperature 18.3° C ili niže.

Uz navedene mjere podrazumijeva se poštivanje dobre higijenske prakse (DHP) kako bi se spriječila kontaminacija mikroorganizmima, prvenstveno bakterijama. Kao nadgradnja na DHP uvodi se i obavezna primjena HACCP sustava (FAO, 2004).

6.1. HACCP sustav

HACCP sustav (*Hazard Analysis Critical Control Points*) je znanstveno utemeljen pristup, zasnovan na identifikaciji posebnih opasnosti i mjera za njihovu kontrolu ili prevenciju radi osiguranja sigurnosti hrane. On predstavlja stručan, racionalan i sustavan pristup za analizu i upravljanje biološkim, kemijskim i fizičkim opasnostima u cijelom prehrambenom lancu — od ulova/uzgoja do stola. (FAO, 2004). Na preventivne mjere koje moraju biti detaljno opisane i koje provode trenirane osobe, nadograđuje se HACCP. I preventivni programi i HACCP uključuju pažljivo bilježenje svih pojedinosti i radnji kako bi se osigurala dokumentacija da je sustav u funkciji i da potpuno kontrolira sve opasnosti čija je pojava moguća u određenom tehnološkom procesu proizvodnje hrane (FAO, 2004).

Svrha njegova uvođenja je:

1. Učiniti proizvod maksimalno sigurnim
2. Biti u mogućnosti to dokazati

Preduvjeti za uspostavu sustava temeljenog na HACCP načelima su provođenje:

1. DHP – dobre higijenske prakse
2. DPP – dobre proizvođačke prakse
3. SOP – standardnih operativnih postupaka
4. SSOP – standardnih sanitacijskih operativnih postupaka

Tvrtke za plodove mora, da bi mogle uopće provoditi i izraditi HACCP plan, moraju osigurati sljedeće preduvjete:

1. Sigurnost vode koja se koristi u dodiru s hranom ili površinama u dodiru s hranom
2. Stanje i čistoća površina u dodiru s hranom, uključujući posuđe, rukavice i drugu odjeću
3. Sprječavanje unakrsne kontaminacije

4. Pranje ruku, dezinfekcija ruku i sanitarnih čvorova
5. Zaštita hrane, materijala za pakiranje hrane i površina u dodiru s hranom od kontaminacije sredstava za čišćenje, goriva, pesticida itd.
6. Pravilno označavanje, skladištenje i uporaba otrovnih spojeva
7. Kontrola zdravstvenih stanja zaposlenika
8. Kontrola štetočina (Tzouros is ur., 2000)

Tek kada je navedeno osigurano, može se pristupiti izradi HACCP plana.

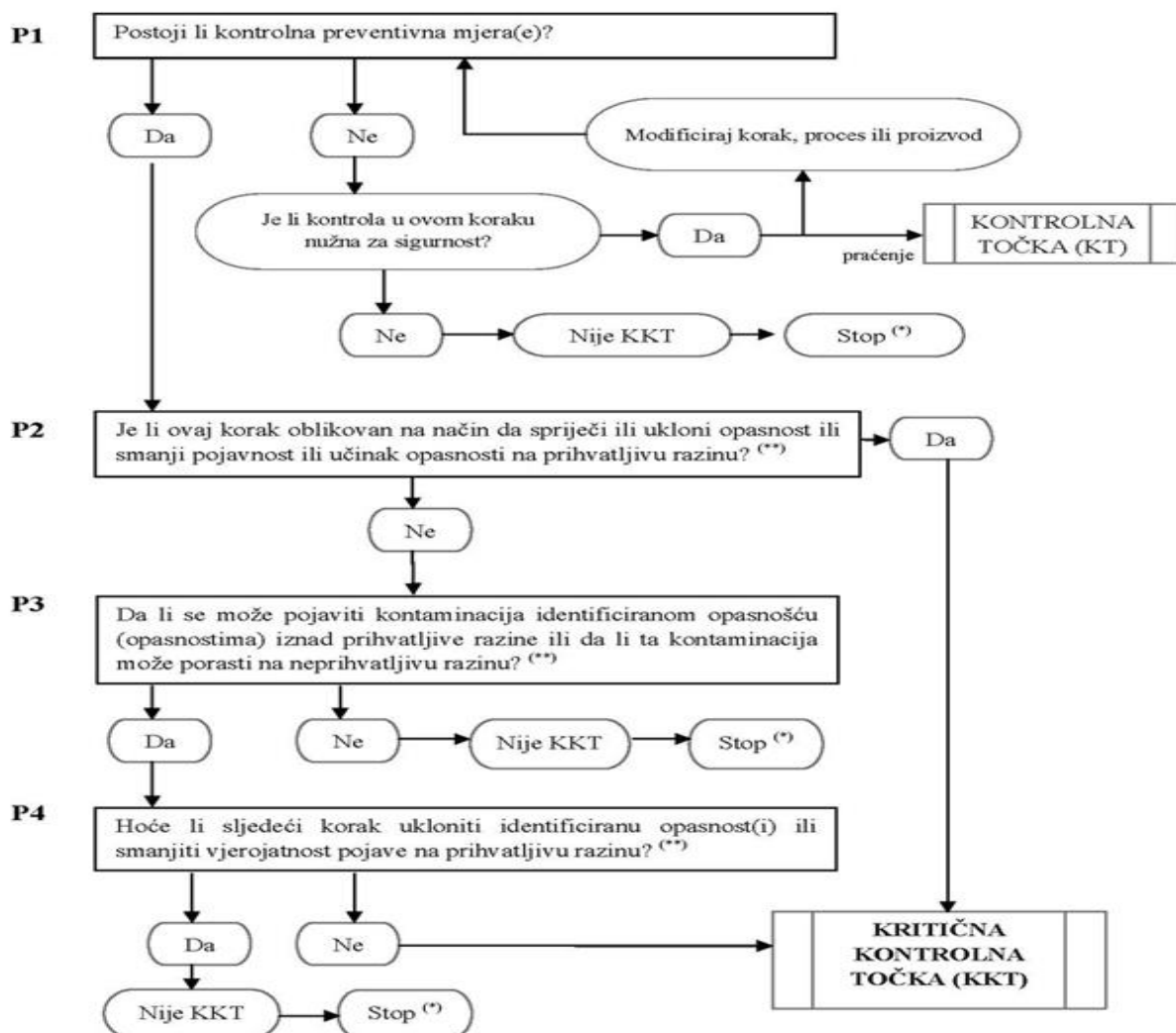
Sedam je načela HACCP sustava:

1. Provesti analizu opasnosti
2. Odrediti kritične kontrolne točke (KKT)
3. Utvrditi kritične granice za svaku KKT
4. Uspostaviti sustav i procedure nadzora u svim KKT
5. Uspostaviti popravne radnje koje se poduzimaju kad nadzor pokazuje da pojedina KKT nije pod kontrolom
6. Uspostaviti procedure za verifikaciju kako bi se potvrdila učinkovitost HACCP sustava
7. Utvrditi dokumente i evidencije primjerene prirodi i opsegu posla koji će pokazivati učinkovitu primjenu mjera navedenih u točkama 1 do 6 (FAO, 2004).

KKT je točka u proizvodnoj liniji/procesu gdje se može mjeriti nekoliko parametara te ukoliko oni nisu zadovoljavajući, provode se planom predviđene.

Identifikacija KKT se provodi pomoću tzv. stabla odlučivanja (Slika 7).

STABLO ODLUČIVANJA



(*) Nastavi na sljedeću identificiranu opasnost u opisanom procesu.

(**) Prihvatljive i neprihvatljive razine trebaju se odrediti u okviru sveobuhvatnih ciljeva pri određivanju KKT u HACCP planu.

17

Slika 7. Stablo odlučivanja o kontrolnoj kritičnoj točki –KKT

https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_06_68_1307.html, 20.09.2021.)

Prva dva pitanja na slici sedam odnose se na sirovine. Važno je napomenuti da, ako se identificirana opasnost može otkloniti ili smanjiti u kasnijem koraku procesa proizvodnje ili uobičajenom uporabom potrošača, točka kontrole sirovina nije KKT. Ukoliko je odgovor na pitanje tri „Može li se u ovom koraku dogoditi kontaminacija, ponovna kontaminacija ili čak umnožavanje patogena“ "Ne", nije riječ o KKT. Međutim, ako je odgovor "Da", pitanje četiri

će odlučiti je li ovaj korak KKT. Samo točke na kojima se mogu kontrolirati doista značajne opasnosti trebaju biti označene kao KKT. Postoji tendencija da se previše kontrolira i da se imenuje previše KKT. To treba izbjegavati jer dovodi do stvaranja zabune i skreće pozornost s prave KKT te do nepotrebnog dokumentiranja koje šteti procesu proizvodnje smanjujući njegovu efikasnost. (FAO, 2004).

Kod KKT bilo kakvo odstupanje od utvrđenih kritičnih granica uvijek dovodi do mogućeg problema za zdravstvenu ispravnost proizvoda. Korak primanja prvi je KKT u bilo kojoj preradi morskih plodova, a postupci praćenja se uglavnom svode na provjeru dokumenata (potvrde o mjestu, načinu ulova, datumu i dr.). No kod biogenih amina KKT bi trebala biti odmah nakon ulova ribe, jer se njihov porast javlja prilikom nepravilnog rukovanja, odnosno nepoštivanja hladnog lanca i/ili loše higijene, na ribarskom plovilu ili tijekom prijevoza do postrojenja. Jedan od velikih problema u osiguravanju sigurnosti morskih proizvoda je što prerađivači često nemaju kontrolu i nemaju podatke o povijesti sirovine. Ovo je ozbiljna slabost u procesu, te bi se trebali poduzeti svi naponi za prevladavanje ovog problema. Značajne opasnosti povezane sa sirovinama moraju biti identificirane i kontrolirane prije nego što se sirovina primi u tvornicu. Preventivna mjera je brzo hlađenje ribe odmah nakon ulova. Općenito, riba bi se trebala polediti ili hladiti u hlađenoj morskoj vodi odmah nakon ulova, a najduže do 12 sati nakon ulova. U slučaju velikih riba poput tuna, riba bi trebala biti ohlađena na unutarnju temperaturu od 10 ° C ili manje unutar 6 h nakon ulova (FAO, 2004).

7. ZAKLJUČAK

Riba se u svijetu ubraja među zdrave namirnice i u nekim zemljama spada u glavne izvore proteina u ljudskoj hrani. Ona u sebi sadržava biogene amine, koji spadaju u biološki aktivne spojeve te se nalaze u svim živim organizmima. Koncentracija biogenih amina u ribi se povećava do toksičnih razina djelovanjem bakterijskih dekarboksilaza. Među biogenim aminima se posebno izdvaja histamin, čija se koncentracija povećava kako svježina ribe opada, te se koncentracija histamina u ribi može smatrati dobrim pokazateljem svježine ribe i ribljih proizvoda.

Histamin nastaje bakterijskom dekarboksilacijom slobodne aminokiseline histidina, te jednom kad nastane jako teško se može uništiti. Podnosi temperature do 200°C, a soljenje, mariniranje, dimljenje tek malo usporavaju njegov rast. Sprečavanje njegovog nastajanja se postiže brzim hlađenjem ribe, te držanje ribe na ledu, u hladnoj vodi ili hladnoj salamuri do obrade sa soli, dimom, određenim pH, posebnim postupcima vakumiranja ili drugim načinima konzerviranja. Najviše ga ima u plavoj ribi, gdje ubrajamo npr. tune, sardine i skuše, te je najčešći uzrok intoksikacija uslijed konzumacije ribe. Trovanje histaminom često je pogrešno detektirano sa alergijom na hranu. Jačina reakcije ovisi o količini unesenog histamina i o samoj individui, tako da su reakcije jače kod žena i male djece. Najčešći simptomi su crvenilo i osip kože, glavobolja i mučnina. Simptomi se povlače nakon nekoliko sati, ali kod ljudi sa kroničnim oboljenjima može doći do ozbiljnih posljedica te je potrebna medicinska pomoć.

Za detekciju histamina najčešće korištene metode su: tankoslojna kromatografija, enzimske metode, imuno-enzimske metode, fluorimetrijske metode, tekuća kromatografija visoke djelotvornosti i Raman spektroskopija. Ukoliko je koncentracija histamina veća od 100mg/kg u svježoj ribi ili više od 200 mg/kg u mariniranoj ribi, proizvod se smatra zdravstveno neispravnim. Da riba ostane visoke kvalitete, pored dobre higijenske prakse u EU je obavezna primjena i HACCP sustava te sledljivost kojima se prati svaki korak u procesu proizvodnje i obrade ribe. Pogoni koji imaju HACCP dokumentaciju mogu tvrditi da su njihovi proizvodi maksimalno sigurni za potrošače, ukoliko njihov HACCP plan obuhvaća i kontrolu histamina. Ta kontrola treba započeti odmah na ribolovnom plovilu jer do porasta histamina dolazi uslijed nepravilnog rukovanja sa ribom – dugo stajanje/povišene temperature ili zbog neadekvatne higijene. To se sprečava stavljanjem ribe na led odmah nakon ulova. Pored mjera dobre higijenske prakse, HACCP plan je zakonski obavezan za sve objekte za preradu i predstavlja nadgradnju na higijenske mjere, čime se postiže najveća razina sigurnosti hrane u svrhu očuvanja zdravlja potrošača.

8. SAŽETAK

U ovom radu je opisan histamin, biogeni amin, koji ukoliko je prisutan u ribi i proizvodima od ribe u višim koncentracijama može uzrokovati štetne posljedice po zdravlje potrošača. Opisan je njegov nastanak i toksično djelovanje na zdravlje potrošača te opisane metode analize i mjere za sprječavanje njegovog nastanka. Također je prikazana zakonska regulativa vezana za provođenje preventivnih mjera u svrhu sprječavanje njegovog nastanka te propisi koji se odnose na maksimalno dozvoljene koncentracije u ribi i ribljim proizvodima.

Ključne riječi : riba, biogeni amini, histamin, HACCP

ABSTRACT

This paper describes histamine, a biogenic amine, which, if present in fish and fish products in higher concentrations, can cause harmful effects on consumer health. Its occurrence and toxic effects on consumer health are described, as well as methods of analysis and measures to prevent its occurrence. Legislation related to the implementation of preventive measures in order to prevent its occurrence is also presented, as well as regulations related to the maximum permitted concentrations in fish and fish products.

Key words: fish, biogenic amines, histamine, HACCP

9. LITERATURA

Arena, M., Narda, M. (2001) Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol*, 90(2): 9-13.

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

Bulushi, I., Poole, S., Deeth, H., Dykes, G. (2009) Biogenic amines in fish: role in intoxication, spoilage and nitrosamine formation- A review. *Food Sci. Nutr.*, 49: 369-377.

Ćavar, A. (2017) Određivanje udjela histamina u srdeli HPLC metodom i Raman spektroskopijom. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.

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*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 292-324.

Diel, E., Bayas, N., Stibbe, A., Müller, S., Bott, A., Schrimpf, D., Diel, F. (1997) Histamine containing food: Establishment of a German food intolerance databank (NFID). *Inflammation Research* 46, Supplement: 187-188.

Economou, V., Frillingos, S., Papadopoulou, C. (2007) Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse. *Food Additives and Contaminants*, 24: 820-832.

Emborg, J., Laursen, B., Dalgaard, P. (2005) Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 °C—effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 101: 263– 279.

Etienne, M. (2006) SEAFOODplus – Traceability – Valid – Methods for chemical quality assessment - Methodology for histamine and biogenic amines analysis. Ifremer, Nantes.

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 (1995) Quality and Quality Changes in Fresh Fish. FAO Fisheries Technical Paper 348, Rome: Corporate Document Repository, Fisheries and Aquaculture Department.

FAO (2004) Application of risk assessment in the fish industry. FAO Fisheries Technical Paper 442. Rome: Corporate Document Repository, Fisheries and Aquaculture Department.

FAO (2013) Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting Report,

Farmer, L. (1940). Histamine in anaphylaxis and allergy. Bulletin of the New York Academy of Medicine, 16:618-630.

FDA (2011) Scombrototoxin (Histamine) Formation. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance 4. ed. 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.

Ferraro, J. R. (2003) Introductory raman spectroscopy, Academic press.

Flamini, R. (2008) Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

Ganellin, C. R., Pepper, E. S., Port, G. N. J., Richards, W. G. (1973) Conformation of histamine derivatives. 1. Application of molecular orbital calculations and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Journal of Medicinal Chemistry, 16:611-616.

Haas, H. L., Sergeeva, O. A., Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. Physiological Reviews, 88:1183-1241.

Halasz A, Barath A, Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends Food Sci. Technol., 5: 42- 49.

Hui, Y. H. (2006). Handbook of food science, technology and engineering. Vol 1, Hui, Y. H., Ed, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Fl.

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

Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., Tsukamoto, T. (2004) Photobacterium phosphoreum caused a histamine fish poisoning incident. *Int. J. Food Microbiol.*, 92: 79-87.

Karovičová, J., Kohajdová, Z. (2005) Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 59: 70-79.

Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I. (2005) Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?. *Journal of Applied Microbiology*, 99:580–586.

Long, D. A. (2002) *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

Marinšek, J., Doganoc, D. (1984) Korelacija između sadržaja histamina u mesu riba i rezultati biološkog opita na kunićima. U: Zbornik radova sa VI. savjetovanja posvećenog higijenskoj ispravnosti i kvaliteti mesa riba, rakova i mekušaca u proizvodnji, preradi i prometu, 1. i 2. listopad 1984, Opatija, str. 111-117.

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

Mohamed, R., Livia, S. S., Hassan, S., Soher, E. S., Adel, A. 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.

Mulić, R., Giljanović, S., Ropac, D., Katalinić, V. (2004) Neke epidemiološke osobitosti alimentarnih toksoinfekcija u Hrvatskoj u razdoblju 1992.- 2001. godine. *Acta Med Croat.*, 58: 421-427.

Muscarella, M., Lo Magro, S., Campaniello, M., Armentano, A., Stacchini, P. (2013) Survey of histamine levels in fresh fish and fish products collected in Puglia (Italy) by ELISA and HPLC with fluorimetric detection. *Food Control*, 31: 211-217.

Naila, A., Flint, S., Fletcher, G.C., Bremer, P.J., Meerdink, G., Morton, R.H. (2011) Biogenic amines and potential histamine- forming bacteria in Rihaakuru (a cooked fish paste). *Food Chem.*, 128: 479 - 484.

Narodne novine 117/03, 130/03 i 48/04 Pravilnik o toksinima, metalima, metaloidima te drugim štetnim tvarima koje se mogu nalaziti u hrani. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi.

- Nosić, M., Krešić, G. (2015) Plava riba – prednosti ali i neki rizici konzumiranja. *Hrana u zdravlju i bolesti*, 4(1): 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 Chemistry*, 103: 1475-1486.
- Parsons, M.E., Ganellin, R.C. (2006) Histamine and its receptors. *British Journal of Pharmacology*, 147: 127–135.
- Petrović, S., Mijin, D., Stojanović, N. (2009) Hemija prirodnih organskih jedinjenja. Tehnološko-Metalurški Fakultet Univerziteta u Beogradu, Univerzitetski udžbenik, Beograd. Str. 409-410.
- Pranjić, M. (2016) Pročišćavanje ekstrakata ribe u svrhu analize udjela histamina Raman spektroskopijom. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- Prester, Lj. (2011) Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. *Food Add Contam*, 28: 1547- 1560.
- Ramirez, F.J., Tuñón, I., Collado, J.A., Silla, E. (2003). Structural and vibrational study of the tautomerism of histamine free-base in solution. *Journal of American Chemical Society*, 125: 2328-2340.
- Rivas, B., Gonzalez, R., Landete, J.M., Muñoz, R. (2008) Characterization of a second ornithine decarboxylase isolated from *Morganella morganii*. *J. Food Prot.*, 71(3): 657-661.
- Rohtek, N. (2018) Određivanje biogenih amina u hrvatskim vinima. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- Rossi, S., Lee, C., Ellis, PC., Pivarnik, LF. (2002) Biogenic amines formation in bigeye tuna steaks and whole skipjack tuna. *J. Food Sci.*, 67: 2056-2060.
- Silbande, A., Cornet, J., Cardinal, M., Chevalier, F., Rochefort, K., Smith-Ravin, J., Adenet, F. (2017) Characterization of the spoilage potential of pure and mixed cultures of bacterial species isolated from tropical yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Journal of Applied Microbiology*, 124: 559-571.

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

Singh M, Badrie N, Neeway-Fyzul A, Ramsubhag A (2012) A prevalence study of histamine producing bacteria in two commercial tropical marine fish sold in Trinidad. West Indies. *J Nutr Food Sci*, 2: 1-6

Stojanović, Z. (2011) Elektrohemijsko određivanje histamina. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Šimat, V. (2010) Usporedba dva komercijalna testa za kvantitativnu analizu histamina u ribi. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu XII(6)*: 333-341.

Tansey, E. M. (2003). Henry Dale, histamine and anaphylaxis: reflections on the role of chance in the history of allergy. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 34: 455–472.

Taylor, S. L., Stratton, J., Nordlee, A. (1989) Histamine poisoning (scombroid fish poisoning) - An allergy-like intoxication. *J. Toxi-col. Clin. Toxicol.*, 27: 225-240.

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

Taylor, S. L., Lyons, D.E. (1984) Toxicology of Scombroid Poisoning. U: *Seafood toxins*. Washington, D.C., J. Am.Chem.Soc., 417-430.

Tzouros, N., Arvanitoyannis, S. (2000) Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) System to the fish/seafood Industry: a review. *Food Rev. Int.*, str. 273–325.

Vidaček, S. (2013) Tehnologija ribe, Konzerviranje proizvoda ribarstva hlađenjem. str. 50-77.

Visciano, P., Schirone, M., Paparella, A. (2020) An overview of histamine and other biogenic amines in fish and fish products. *Foods*, 9:1795.

Vranešić, Bender, D., Verbanac, D., Krznarić, Ž. (2010) Intolerancija na histamin. *Dijetetika* 86:174-178.

Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije (2021) http://mail.zjzjosijek.hr/histaminsko_otrovanje01.html (09.09.2021.)

Zovko, M. (2017) Određivanje udjela histamina u mariniranoj ribi Raman spektroskopijom i HPLC metodom, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu.