
UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

Zorica S. Stojanović, dipl. inž. – master

ELEKTROHEMIJSKO ODREĐIVANJE HISTAMINA

Doktorska disertacija

Mentor:

Dr Jaroslava Švarc-Gajić, docent

Novi Sad, 2011.

TEHNOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U NOVOM SADU
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Zorica Stojanović
Mentor: MN	Dr Jaroslava Švarc-Gajić, docent
Naslov rada: NR	Elektrohemijsko određivanje histamina
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2011.
Izdavač: IZ	Autorski reprint

Mesto i adresa: MA	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja, 121 strana, 42 slike, 18 tabela, 139 literaturna navoda
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Hemijsko-tehnološke nauke, Primenjena hemija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Histamin, elektrohemijsko određivanje, hronopotencimetrija, tankoslojna živina elektroda, čvrsta zlatna elektroda, tankoslojna niklova elektroda, prehrambeni proizvodi
UDK	547.78:624.138.5
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Važna napomena: VN	-

Izvod:
IZ

U ovom radu su razvijene elektrohemijske metode za određivanje histamina. U svim elektrohemijskim ispitivanjima korišćena je hronopotencimetrija. Istraživanja su obuhvatila optimizaciju uslova elektroanalitičkih tehnika i upoređivanje mehanizama generisanja analitičkog signala primenom različitih radnih elektroda, razvoj odgovarajućeg postupka pripreme uzoraka za analizu i samo određivanje histamina u hrani i piću. Ispitana je mogućnost primene čvrste zlatne elektrode, tankoslojne živine i tankoslojne niklove elektrode za elektrohemijsko određivanje histamina. U slučaju elektrooksidacije histamina, razjašnjeni su mehanizmi generisanja signala na primenjenim elektrodama. Optimizacija uslova elektroanalitičkih tehnika obuhvatila je odabir odgovarajućeg pomoćnog elektrolita i njegove koncentracije, ispitivanje uticaja početnog potencijala i struje oksidacije na analitički signal analita. Pored toga, za svaki elektrohemijski sistem definisana su osetljivost i reproduktivnost, selektivnost, kao i opseg linearnosti. Primenom tankoslojne niklove elektrode uočena je pojava adsorpcionog koncentrovanja analita, te su u slučaju ovog elektrohemijskog sistema ispitani i uticaji vremena adsorpcije i temperature ispitivanog medijuma na analitički signal histamina. Na tankoslojnoj živinoj elektrodi analitički signal se generisao usled direktne oksidacije histamina primenom konstantne struje. Na ostale dve elektrode, pored elektrodnih reakcija odvijale su se i hemijske reakcije, tako da se oksidacija histamina u oba slučaja odigravala po ECE mehanizmu (elektrodna reakcija – hemijska reakcija – elektrodna reakcija).

Na čvrstoj zlatnoj elektrodi, generisanje signala je bilo posledica oksidacije histamina elektrogenerisanim hlorom, dok se u slučaju tankoslojne niklove elektrode radilo o kombinovanoj katalitičko-adsorpcionoj hronopotencijometriji. Tankoslojna živina elektroda je pokazala dobru selektivnost pri koncentracijama aminokiselina i histamina nižim od 5 mg/dm^3 , dok je pri višim koncentracijama dolazilo do preklapanja analitičkih signala. Ostali elektrohemijski sistemi nisu pokazali odgovarajuću selektivnost. Najveća osetljivost je ostvarena primenom tankoslojne niklove elektrode ($\text{LOD} = 0,11 \text{ mg/dm}^3$), zatim sledi čvrsta zlatna elektroda ($\text{LOD} = 0,27 \text{ mg/dm}^3$) i na kraju tankoslojna živina elektroda ($\text{LOD} = 1,31 \text{ mg/dm}^3$). U okviru definisanja postupka pripreme uzoraka, ispitana je efikasnost različitih ekstrakcionih tehnika i različitih ekstragenasa u pogledu izdvajanja histamina iz uzoraka. Pored toga razvijeni su odgovarajući postupci prečišćavanja ekstrakata primenom preparativnih hromatografskih tehnika, i to na tankom sloju i na stubu adsorbensa. Po definisanju optimalnih uslova elektrohemijskog određivanja histamina, kao i razvijanja postupka pripreme uzoraka, histamin je određen u različitoj hrani i piću.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	03.12.2010.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>Dr Ljubinka Rajaković, redovni profesor, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, član</p> <p>Dr Radomir Malbaša, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Novi Sad, predsednik</p> <p>Dr Jaroslava Švarc-Gajić, docent, Tehnološki fakultet, Novi Sad, mentor</p>

FACULTY OF TECHNOLOGY

UNIVERSITY OF NOVI SAD

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph publication
Type of record: TR	Textual material, printed
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Zorica Stojanović
Mentor: MN	Dr Jaroslava Švarc-Gajić, Assistant professor
Title: TI	Electrochemical determination of histamine
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2011
Publisher: PU	Author reprint

Publication place: PP	21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	7 chapters, 121 pages, 42 figures, 18 tables, 139 references
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Chemical-Technological Science, Applied Chemistry
Subject, Key words SKW	Histamine, electrochemical determination, chronopotentiometry, thin film mercury electrode, solid gold electrode, thin film nickel electrode, foodstuffs
UC	547.78:624.138.5
Holding data: HD	Library of the Faculty of Technology of Novi Sad, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Note: N	-
Abstract: AB	
<p>In this work, the electrochemical methods for the determination of histamine were developed. All electrochemical investigations were carried out by chronopotentiometry. The research included optimization of the experimental parameters of electroanalytical techniques and comparison of the mechanism of the analytical signal generation by using the different working electrodes. Upon the development of sample preparation procedure, histamine was determined in different food and beverages. The possibility of applying solid gold electrodes, thin film mercury electrode and thin film nickel electrode for electrochemical determination of histamine was examined. The mechanisms of histamine electrooxidation on different working electrodes were explained and elaborated. Optimization of the experimental parameters of electroanalytical techniques included the selection of appropriate supporting electrolyte and its concentration, and investigation of the influence of initial potential and oxidation current on histamine analytical signal. Beside this, for each electrochemical system sensitivity and reproducibility, selectivity as well as linearity range were defined. The use of thin nickel film electrode resulted in adsorptive accumulation, and in that case the effects of accumulation time and medium temperature on histamine analytical signal were defined. On thin film mercury electrode, histamine analytical signal was generated due to direct oxidation of histamine by a constant current. On other two electrodes, electrode reactions were coupled with chemical reaction, and histamine oxidation was by ECE mechanism (electrode reaction – chemical reaction – electrode reaction). On solid gold</p>	

electrode histamine was oxidized indirectly by electrogenerated chlorine, while in the case of thin film nickel electrode combination of catalytic and adsorptive chronopotentiometry was responsible for signal generation. Thin film mercury electrode showed good selectivity for histamine and amino acids concentrations below 5 mg/dm³, but higher concentrations caused the overlapping of analytical signals. Other electrochemical systems did not show adequate selectivity. The best sensitivity was achieved by thin film nickel electrode (LOD = 0.11 mg/dm³), followed by a solid gold electrode (LOD = 0.27 mg/dm³), and by thin film mercury electrode (LOD = 1.31 mg/dm³). In order to define adequate sample preparation procedure, the efficiency of different extraction techniques and different solvents were tested for histamine extraction from the samples. Appropriate procedures for purification of extracts were defined as well, by applying preparative thin layer and column chromatography. After optimization of the electrochemical methods for histamine determination, as well as the procedure of sample preparation, developed methods were applied for histamine determination in various food and beverages.

Accepted on Scientific Board on: AS	December 3 rd 2010
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>Dr Ljubinka Rajaković, Professor, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, member</p> <p>Dr Radomir Malbaša, Associate professor, Faculty of Technology, Novi Sad, president</p> <p>Dr Jaroslava Švarc-Gajić, Assistant professor, Faculty of Technology, Novi Sad, mentor</p>

Spisak publikacija proisteklih neposredno iz rada na doktorskoj disertaciji:

(M21) Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu

1. Švarc-Gajić, J., **Stojanović, Z.** (2010). *Electrocatalytic determination of histamine on a nickel-film glassy carbon electrode*. *Electroanalysis* 24, 2931-2939.
2. Švarc-Gajić, J., **Stojanović, Z.** (2011). *Determination of histamine in cheese by chronopotentiometry on a thin film mercury electrode*. *Food Chemistry* 124, 1172-1176.
3. **Stojanović, Z.**, Švarc-Gajić, J. (*In Press, Accepted*). *A simple and rapid method for histamine determination in fermented sausages by mediated chronopotentiometry*. *Food Control*, DOI 10.1016/j.foodcont.2011.05.022.

(M33) Saopštenje sa međunarodnog skupa stampano u celini

1. Švarc-Gajić, J., **Stojanović, Z.**, Marjanović, N., Suturović, Z., Kravić, S. (2009): *Catalytic chronopotentiometric determination of histamine on gold electrode*. EuroFoodChem XV, Food for the future – the contribution of chemistry to improvement of food quality, Proceeding 2, Copenhagen, Denmark, 179-182. 5 – 8 July 2009. ISBN 978-87-993033-5-9.
2. **Stojanović, Z.**, Švarc-Gajić, J., Marjanović, N., Suturović, Z., Kravić, S. (2009): *Chronopotentiometric determination of histamine on thin film mercury electrode*. EuroFoodChem XV, Food for the future – the contribution of chemistry to improvement of food quality, Proceeding 1, Copenhagen, Denmark, 209-212. 5 – 8 July 2009. ISBN 978-87-993033-4-2.

(M34) Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu

1. Švarc-Gajić, J., **Stojanović, Z.**, Suturović, Z., Kravić, S. (2010). *Comparisson of different extraction techniques for electrochemical histamine determination*. International Conference, Extraction of the organic compounds, ICEOC-2010, Book of abstracts, Voronezh, Rusija, 294-294. 20 - 24 September 2010. ISSN: 2079-3510.
2. **Stojanović, Z.**, Švarc-Gajić, J., Suturović, Z., Kravić, S. (2010). *Examination of extraction efficiency of histamine from canned fish by applying chronopotentiometry*. International Conference, Extraction of the organic compounds, ICEOC-2010, Book of abstracts, Voronezh, Rusija, 297-297. 20 - 24 September 2010. ISSN: 2079-3510.

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Cilj istraživanja	3
2	TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE	4
2.1	Histamin	5
2.1.1	Fizičke i hemijske osobine histamina	5
2.1.2	Sinteza i metabolizam histamina	7
2.1.3	Rasprostranjenost histamina u organizmu	9
2.1.4	Oslobađanje histamina, mehanizam delovanja i uloga u organizmu	9
2.2	Netolerancija na histamin	13
2.2.1	Histamin u hrani	14
2.2.2	Zakonska regulativa	17
2.2.3	Metode određivanja histamina	17
2.3	Hronopotencimetrija	26
2.3.1	Istorijat	26
2.3.2	Teorijske osnove hronopotencimetrije	27
2.3.3	Elektrodni procesi sa učešćem više elektroaktivnih vrsti	31
2.3.4	Instrumentacija za hronopotencimetriju	33
2.4	Kombinovani elektrohemijski procesi	33
2.4.1	Katalitički procesi	36
3	EKSPERIMENTALNI DEO	39
3.1	Instrumentacija	40
3.2	Pribor i posuđe	43
3.3	Hemikalije i rastvori	44
3.4	Formiranje i priprema radnih elektroda	44
3.5	Uzorci	46
3.5.1	Priprema uzoraka	47
3.6	Ispitivanje tačnosti razvijenih elektrohemijskih metoda i ispravnosti definisanih postupaka pripreme uzoraka	52

4	REZULTATI I DISKUSIJA	54
4.1	Određivanje optimalnih uslova za elektrohemijsko određivanje histamina	55
4.1.1	Tankoslojna živina elektroda	55
4.1.2	Čvrsta zlatna elektroda	64
4.1.3	Tankoslojna niklova elektroda	74
4.1.4	Poređenje elektrohemijskih metoda	91
4.2	Definisanje postupka pripreme uzoraka	92
4.2.1	Optimizacija uslova ekstrakcije	92
4.2.2	Preparativna tankoslojna hromatografija	94
4.2.3	Preparativna kolonska hromatografija	95
4.3	Određivanje histamina u prehrambenim proizvodima	99
5	ZAKLJUČCI	104
6	LITERATURA	107
7	PRILOG	118
7.1	Spisak slika	119
7.2	Spisak tabela	120

1 UVOD

Pri unosu hrane ili većih količina nekih supstanci hranom, kod nekih ljudi se mogu javiti neželjene reakcije organizma. Ove reakcije na hranu se mogu podeliti u dve osnovne grupe:

1. toksične
2. netoksične
 - imunološki posredovane (alergija na hranu)
 - neimunološki posredovane (netolerancija na hranu).

Toksične reakcije (trovanje hranom) se javljaju usled konzumiranja hrane kontaminirane bakterijama ili su posledica unosa toksina hranom u velikim količinama. Unošenje manjih količina toksina, ali veoma učestalo, takođe može da dovede do pojave toksičnih reakcija na hranu. Razvojem novih tehnologija i kontrole kvaliteta sirovina, međuproizvoda i gotovih proizvoda, kao i uvođenjem rigoroznih standarda u prehrambenim proizvodima, retko se dešava da hrana sadrži toksične materije, dok se raznovršnošću konzumiranih namirnica sprečava njihovo nagomilavanje u organizmu.

Alergija i netolerancija na hranu su oblici reakcija preosetljivosti koje pogađaju samo osetljivu populaciju i uzrokovane su netolerancijom pojedinaca prema uobičajenoj hrani koja kod drugih osoba ne izaziva štetne efekte. Alergiju na hranu izazivaju alergeni koji iniciraju imuni odgovor organizma. U okviru alergijskih reakcija, razlikuje se alergija koja uključuje familiju imonoglobulina E (IgE – *Immunoglobulin E*) koja se naziva i brza alergijska reakcija, i alergija na hranu koja nije posredovana imunoglobulinima klase E (odložena alergijska reakcija). Netolerancija na hranu ne uključuje imunološki sistem i prateći simptomi nisu takvog intenziteta da bi mogli da ugroze život. Međutim, simptomi kod netolerancije na hranu su jako često slični simptomima pri klasičnim alergijskim reakcijama, ali su blaži i kraće traju. Uzroci netolerancije na hranu su nedostatak ili defekt određenih enzima u organizmu i prisustvo farmakološki aktivnih supstanci u hrani. Razlikuju se enzimska netolerancija i farmakološka netolerancija (Ortolani & Pastorello, 2006). Reakcije koje se ne mogu svrstati u bilo koju od ove dve grupe zbog nepoznatog mehanizma nastajanja pominju se u literaturi kao idiosinkratska, odnosno nedefinisana netolerancija na hranu (Ortolani & Pastorello, 2006). Tipična enzimska netolerancija je netolerancija laktoze koja je rezultat nedostatka enzima laktaze (β -galaktozidaze) koji kod zdravih osoba proizvode ćelije mukoze tankog

creva. Farmakološka netolerancija hrane je uzrokovana vazoaktivnim aminima i drugim supstancama prisutnim u hrani, od kojih sve pokazuju farmakološku aktivnost. U ovu grupu se ubraja netolerancija na histamin koja je i najčešća farmakološka netolerancija hrane.

Histamin je niskomolekularna organska baza koja pripada grupi biogenih amina. U čovekovom organizmu histamin učestvuje u velikom broju fizioloških i patofizioloških procesa. Najvažnija uloga histamina je pri alergijskim reakcijama preosetljivosti. U fiziološkim procesima histamin je važan faktor u procesu sekrecije želudačne kiseline i ima funkciju neurotransmitera u nekim regijama mozga. Pored toga, histamin ima uticaja i na imunološki sistem čoveka. Sinteza, transport, skladištenje, delovanje i razgradnja histamina u organizmu čoveka su strogo regulisani. Histamin se može uneti u organizam i hranom u kojoj nastaje mikrobiološkom aktivnošću u toku prerade, proizvodnje i skladištenja. U većim koncentracijama histamin je pretežno prisutan u hrani bogatoj proteinima, fermentisanoj hrani i piću. Povećana količina histamina u hrani najčešće nastaje u toku kontrolisane ili spontane fermentacije, zbog upotrebe sirovina lošijeg kvaliteta, usled mikrobiološke kontaminacije ili u toku kvarenja hrane. Konzumiranje takve hrane može da dovede do netolerancije i pojave simptoma sličnih onim kod alergijskih reakcija.

Savremeni trendovi u oblasti kontrole kvaliteta i bezbednosti hrane ističu značaj određivanja tragova supstanci koje mogu izazvati nepoželjne efekte. Histamin pripada ovoj grupi supstanci jer može da izazove različite farmakološke, fiziološke i toksične efekte u organizmu. Pored toga, uzimajući u obzir poreklo histamina u hrani, on je pogodan i kao hemijski pokazatelj kvaliteta, svežine i higijenske ispravnosti hrane. Određivanje histamina u hrani i piću je veoma složeno i otežano jer se uvek javlja u smeši sa drugim organskim jedinjenjima i u veoma niskim koncentracijama. Zbog toga je neophodno da analitičke metode koje se koriste za određivanje histamina poseduju visoku selektivnost i veliku osetljivost.

Interesovanje za histamin i njegove toksične efekte doveli su do razvoja velikog broja različitih metoda. Koriste gasna hromatografija, visoko-pritiska tečna hromatografija i kapilarna elektroforeza. Hromatografske tehnike i kapilarna elektroforeza s jedne strane pružaju niz prednosti kao što su velika selektivnost i visoka osetljivost, ali sa druge strane ove tehnike zahtevaju skupu i sofisticiranu instrumentaciju i veliko iskustvo analitičara. Pored toga, vreme trajanja analize primenom ovih tehnika je značajno.

Za rutinsko određivanje histamina poželjno je koristiti brze i jednostavne, tzv. „*screening*“ metode jer one omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom intervalu. Hronopotencimetrija se može ovde svrstati kao veoma elegantna i jednostavna elektroanalitička tehnika koja omogućava analizu čitavog spektra jedinjenja.

1.1 Cilj istraživanja

Osnovni cilj istraživanja izvedenih u ovom radu je bio razvoj elektrohemijskih metoda za određivanje histamina. U svim elektrohemijskim ispitivanjima korišćena je hronopotenciometrija. I pored uobičajene primene elektrohemijskih detektora pri određivanju histamina tečno-hromatografskim tehnikama, detaljnim pregledom literature je utvrđeno da u dosadašnjim istraživanjima hronopotenciometrija nije primenjivana za elektrohemijsko karakterisanje histamina i njegovo kvantitativno određivanje. Elektroaktivnost supstance eksploatisana u hromatografskim tehnikama je bila polazna osnova za razvoj individualnih elektroanalitičkih metoda u cilju kvantifikacije histamina. Istraživanja su obuhvatila optimizaciju uslova elektroanalitičkih tehnika i upoređivanje mehanizama generisanja analitičkog signala primenom različitih radnih elektroda, razvoj odgovarajućeg postupka pripreme uzoraka za analizu i samo određivanje histamina u hrani i piću. Ispitana je mogućnost primene čvrste zlatne elektrode, tankoslojne živine i tankoslojne niklove elektrode za elektrohemijsko određivanje histamina. Utvrđeni mehanizmi generisanja signala na različitim elektrodnim materijalima su pokazali da se elektrohemijsko određivanje histamina, u zavisnosti od elektrodnog materijala i medijuma, ne mora izvoditi klasičnom hronopotenciometrijom nego i mnogo kompleksnijim kombinovanim elektrohemijskim tehnikama. U slučaju elektrooksidacije histamina, razjašnjeni su mehanizmi generisanja signala na primenjenim elektrodama. Optimizacija uslova elektroanalitičkih tehnika obuhvatila je odabir odgovarajućeg pomoćnog elektrolita i njegove koncentracije, ispitivanje uticaja početnog potencijala i struje oksidacije na analitički signal analita, kao i ispitivanje i definisanje opsega linearnosti za svaku od izabranih elektroda. S obzirom da različite supstance prisutne u realnim uzorcima kao što su aminokiseline mogu uticati na analitički signal histamina, ispitan je uticaj aminokiselina na elektrohemijsko određivanje histamina. Ispitana je efikasnost različitih ekstrakcionih tehnika i različitih ekstragenasa u pogledu izdvajanja histamina iz uzoraka. Pored toga su razvijeni odgovarajući postupci prečišćavanja ekstrakata. Po definisanju optimalnih uslova elektrohemijskog određivanja histamina, kao i razvijanja postupka pripreme uzoraka, pristupilo se određivanju sadržaja histamina u različitoj hrani i piću sa našeg tržišta.

2 TEORIJSKI DEO SA PREGLEDOM LITERATURE

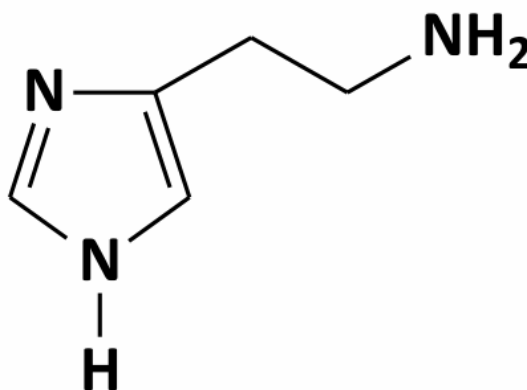
2.1 Histamin

Laboratorijska sinteza histamina je izvedena još 1907. godine, ali u to vreme nije bila poznata njegova biološka funkcija i nije se znalo da li se supstanca nalazi u prirodi (Tansey, 2003). Prisustvo histamina u prirodi su dokazali George Barger i Henry Dale 1910. godine, kada su otkrili i izolovali histamin iz ekstrakta ražene glavnice (Barger & Dale, 1910). Otkriće i ubrzo nakon toga razvoj tehnike za proizvodnju histamina uz visok prinos dali su podsticaj i drugim istraživačima u to vreme da ispituju hemijska, fiziološka i farmakološka svojstva histamina. Dale i Laidlaw su među prvima dokazali da histamin izaziva spazam bronhija i vazodilataciju kod nekih životinja (Tansey, 2003). Istraživanja koja su usledila potvrdila su da ova supstanca povećava sekreciju želudačne kiseline kod pasa (Parsons & Ganellin, 2006). Tek 1927. godine je dokazano prisustvo histamina u jetri i plućima čoveka (Farmer, 1940). Kasnije je dokazano da je histamin prisutan i u mnogim drugim tkivima. Otuda je i naziv „histamin“ za supstancu imidazol-etilamin, a potiče od grčke reči „histos“ = tkivo i „amine“ = amin, što bi u slobodnom prevodu značilo amin prisutan u tkivima (Haas, Sergeeva & Selbach, 2008). Dalja istraživanja 1929. godine su pokazala da histamin igra veoma važnu ulogu pri anafilatičkim reakcijama (Farmer, 1940). Ova otkrića su dalje pokrenula niz istraživanja u cilju proučavanja uloge histamina u alergijskim reakcijama i drugim fiziološkim procesima kod čoveka, koja su i danas aktuelna.

2.1.1 Fizičke i hemijske osobine histamina

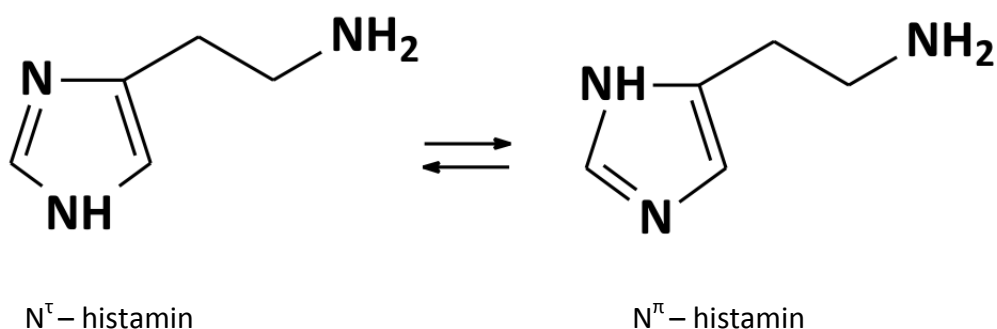
Histamin je higroskopna kristalna supstanca, bez mirisa i ukusa sa tačkom topljenja od 83 - 84°C i tačkom ključanja od 209 - 210°C (Hui, 2006). Kristali histamina su stabilni na vazduhu, dnevnoj svetlosti i sobnoj temperaturi. Dobro se rastvara u hladnoj, toploj vodi i metanolu, dok se slabo rastvara u dietil-eteru. Slobodna baza je rastvorljiva u hloroformu, dok soli histamina nisu. Rastvori histamina su bezbojni.

Histamin se sastoji od imidazolovog prstena i alifatičnog niza od 2 C atoma sa amino-grupom na kraju niza (Slika 1). Njegova empirijska formula je $C_5H_9N_3$ a molekulska masa iznosi 111,15 g/mol. Sinonimi za histamin su imidazol-etilamin, β -iminazolil-etilamin, 1H-imidazol-4-etanamin, 2-(4-imidazolil)etilamin, 2-aminoetil-imidazol. Naziv po IUPAC-u za histamin je 2-(1H-imidazol-4-il)etanamin.



Slika 1. Strukturna formula histamina.

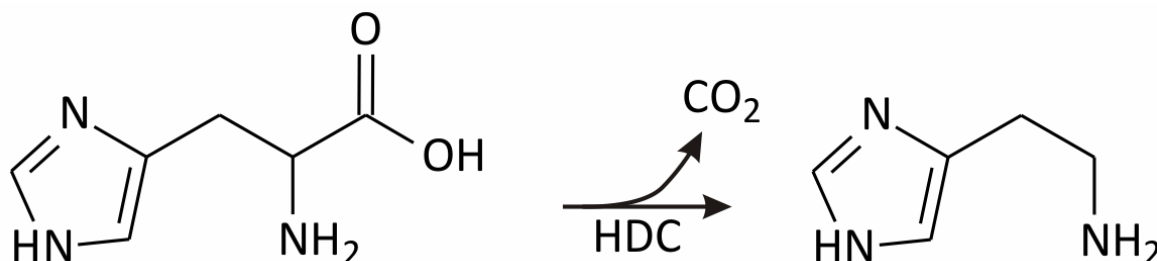
Na osnovu strukturne formule se može zaključiti da histamin ima dva bazna centra: alifatičnu amino grupu i azotov atom u heterociklusu (imidazolov prsten) koji nema proton. U zavisnosti od pH vrednosti sredine i pK vrednosti ($pK_{a_1} = 5,80$, $pK_{a_2} = 9,40$ i $pK_{a_3} = 14$ na 37°C) (Ganellin *et al.*, 1973), uspostavlja se ravnoteža između tri oblika histamina. Pri vrednostima pH između 6,5 i 8,5 histamin se uglavnom nalazi u obliku monokatjona (više od 80%), dok pri pH nižim od 5 u obliku dikatjona. Pri vrednostima pH višim od 10, histamin se nalazi u obliku slobodne baze, a pri ekstremno visokim vrednostima pH dolazi do otpuštanja protona pri čemu nastaje anjon (Ramírez *et al.*, 2003). S druge strane, histamin i u neutralnom i u obliku monokatjona može da se nalazi u obliku dva tautomera koji nastaju kao posledica premeštanja vodonika između dva azotova atoma imidazolovog prstena (Slika 2) (Ramírez *et al.*, 2003). Tautomerizam histamina ima veliku ulogu pri aktivaciji određene vrste receptora (Ramírez *et al.*, 2003).



Slika 2. Tautomeri neutralnog oblika histamina.

2.1.2 Sinteza i metabolizam histamina

Histamin u organizmu nastaje dekarboksilacijom aminokiseline histidina, u reakciji koju katalizira enzim L-histidin-dekarboksilaza (HDC - histidine decarboxylase) (Slika 3).



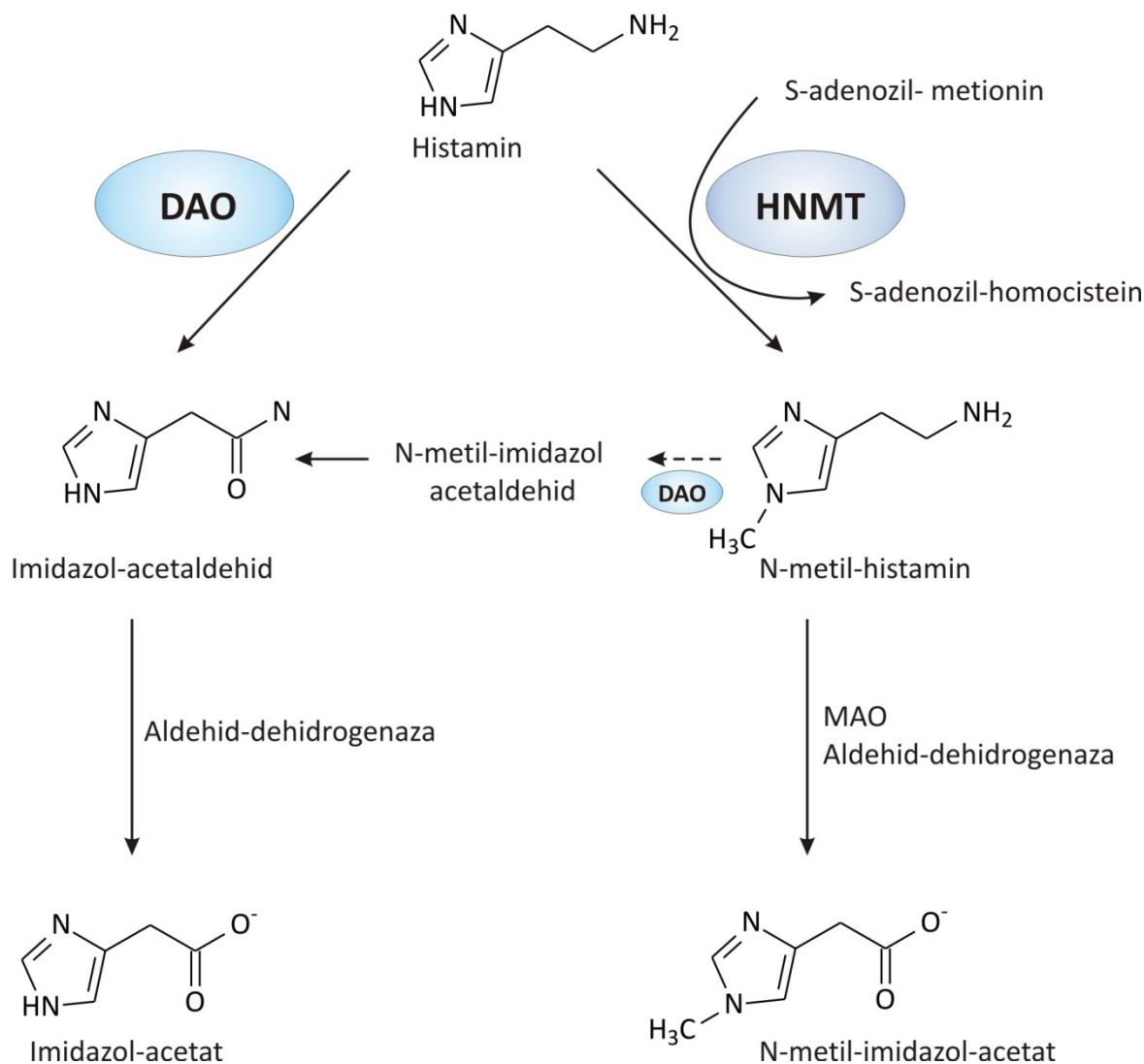
Slika 3. Sinteza histamina.

Aktivnost HDC enzima je strogo kontrolisana, sintetiše se u slučajevima kada ćelija ima potrebu za histaminom i njegova količina u ćelijama je ograničena. Zbog toga je ovaj protein moguće detektovati jedino u ćelijama koje aktivno sintetišu histamin. Nakon postizanja povećane koncentracije histamina u ćeliji, HDC se veoma brzo razlaže.

Pored sinteze histamina u ćelijama čoveka i sisara, njega mogu da sintetišu i određene bakterije, tako da se, prema poreklu, histamin može svrstati u prirodne i u biogene amine. Prirodni amini se formiraju u toku „*de novo*“ biosinteze, tj. „*in situ*“ iz svojih prekursora, dok se biogeni amini formiraju bakterijskom dekarboksilacijom slobodnih aminokiselina (Hui, 2006).

Kod čoveka se nakon nastanka histamin ili deponuje ili veoma brzo razgrađuje u cilju njegove konverzije u fiziološki neaktivne metabolite. Glavni putevi inaktivacije histamina kod čoveka su metilacija imidazolovog prstena, uz aktivnost enzima histamin-N-metil-transferaze (HNMT) i oksidativna deaminacija primarne amino grupe uz pomoć enzima diamino-oksidge (DAO, ranije - histaminaza) (Maintz & Novak, 2007; Toyo'oka, 2008). HNMT katalizira premeštanje metil grupe sa S-adenozil-L-metionina na sekundarnu amino grupu imidazolovog prstena, pri čemu nastaje N-metilhistamin. DAO u prisustvu kiseonika vrši oksidativnu deaminaciju histamina uz nastanak imidazol-acetaldehida. Nedostatak ili smanjena aktivnost enzima za deaktivaciju histamina usled inhibicije može da dovede do akumulacije histamina. Primarni produkti metabolizma histamina se dalje prevode u fiziološki neaktivne produkte (Slika 4). N-metilhistamin se dalje prevodi u N-metil-imidazol-acetaldehid, u reakciji koju katalizira monoamino-oksidge B (MAO B) ili DAO. S druge strane, imidazol-acetaldehid se uz pomoć aldehyd-dehidrogenaze prevodi u imidazol-acetat.

Imidazolski derivati koji nastaju kao krajnji produkti razgradnje histamina se eliminišu urinom.



Slika 4. Razgradnja histamina u organizmu.

Put metabolizma histamina zavisi od mesta gde se on nalazi. DAO je sekretorni protein koji se izlučuje u cirkulaciju nakon stimulacije i odgovoran je za inaktivaciju ekstracelularnog histamina (Schwelberger *et al.*, 1998; Maintz & Novak, 2007). U suprotnom, intracelularni protein HNMT, drugi najznačajniji enzim za inaktivaciju histamina, može da transformiše histamin koji se nalazi unutar ćelije (Klocker *et al.*, 2005). Uopšteno gledano, nešto veći afinitet prema histaminu ima HNMT (Michaelis-Menten-ova konstanta (k_m): 6 - 13 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u odnosu na DAO (k_m : 20 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) (Maintz & Novak, 2007).

Za razliku od HDC enzima koji se sintetiše samo kada ćelija ima potrebu za histaminom, enzimi koji razlažu histamin HNMT i DAO se konstantno sintetišu i njihova koncentracija u ćelijama je približno konstantna. Kod sisara, DAO je najzastupljenija u tankom i debelom

crevu, placenti i bubrežima (Schwelberger *et al.*, 1998). HNMT se distribuira u gotovo celom organizmu, s najizraženijom aktivnošću u bubrežima, jetri, slezini, debelom crevu, prostati, jajnicima, kičmenoj moždini, bronhijama i dušniku (Maintz & Novak, 2007). Inaktivacija histamina u ekstracelularnom prostoru centralnog nervnog sistema se izvodi pomoću HNMT enzima (Haas, Sergeeva & Selbach, 2008). U slučaju kada je HNMT inhibirana, razlaganje histamina preuzima DAO. U svim ostalim slučajevima aktivnost DAO u centralnom nervnom sistemu je neznatna. HNMT je takođe ključni enzim pri razgradnji histamina u bronhijalnom epitelu, dok je DAO od najvećeg značaja u gastrointestinalnom traktu, gde služi za razlaganje histamina unešenog hranom. Smanjena aktivnost DAO može da služi kao potencijalni indikator oštećenja sluzokože creva kod upalnih ili neoplastičnih oboljenja (Maintz & Novak, 2007).

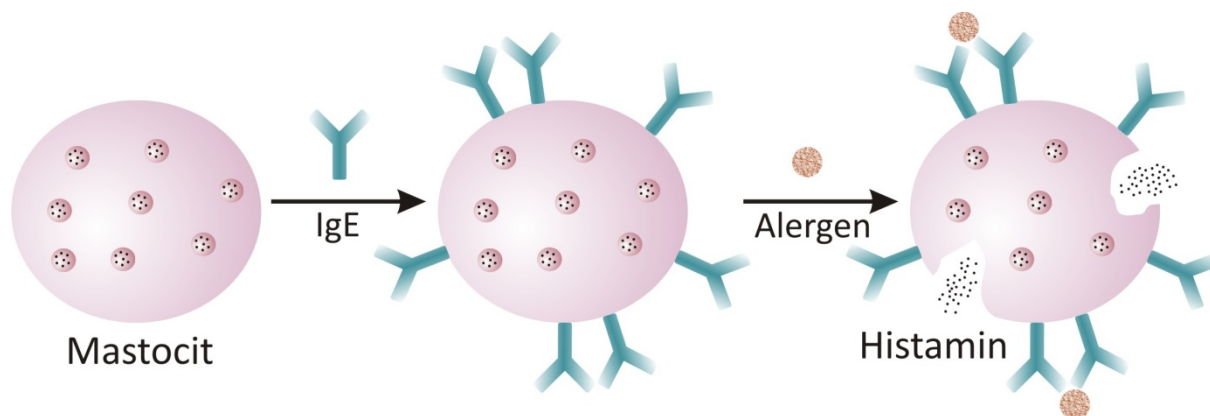
2.1.3 Rasprostranjenost histamina u organizmu

Histamin je kod čoveka distribuiran u celom telu, ali je najviše koncentrisan u plućima, koži i gastrointestinalnom traktu. Od ukupnog histamina u organizmu, najveće količine sadrže mastociti u tkivima i bazofili u krvi, dok se u manjim količinama nalazi u „histaminocitima“ u želudcu, ćelijama epidermisa i u histaminergičnim neuronima u centralnom nervnom sistemu (Lieberman & Anderson, 2007; Varagić & Milošević, 2004). Niske koncentracije histamina su pronađene u trombocitima, limfocitima i monocitima u perifernim krvnim sudovima (MacGlashan, 2003). U mastocitima i bazofilima, histamin je skladišten u specijalnim intracelularnim granulama. U ovim granulama histamin se nalazi u kompleksu sa kiselim proteinom i heparinom velike molekulske mase (makroheparin), fiziološki je neaktivan i ne podleže biotransformaciji (Varagić & Milošević, 2004). U ostalim ćelijama histamin se ne deponuje, već opstaje veoma kratko, nakon čega se razgrađuje. Iako je pronađen u mnogim biljkama i životinjama, histamin je posebno važan kod fiziologije čoveka.

2.1.4 Oslobođanje histamina, mehanizam delovanja i uloga u organizmu

Histamin ima ulogu u velikom broju normalnih i patofizioloških procesa u organizmu čoveka. Najvažniji patofiziološki mehanizam u kojem mastociti i bazofili oslobađaju histamin je imunološki. Pri vezivanju alergena za specifične receptore koji se nalaze na ovim ćelijama, dolazi do njihove degranulacije, oslobađanja histamina i pojave određenih fizioloških reakcija. Na slici 5 je prikazan najznačajniji mehanizam oslobađanja histamina pri

neposrednim reakcijama preosetljivosti tipa I, gde se histamin iz mastocita oslobađa egzocitozom. Kada alergen prvi put dospe u organizam dolazi do senzibilizacije i stvaranja antitela (specifični imunoglobulin IgE) od strane B limfocita. IgE se vezuje za svoje receptore koji se nalaze na površini mastocita, bazofila ili nekih drugih ćelija. Pri sledećem kontaktu sa istim alergenom (antigenom), alergen se vezuje za dva ili više antitela, pri čemu dolazi do degranulacije i oslobađanja histamina i drugih medijatora reakcije preosetljivosti (Toyo'oka, 2008). U alergijskim reakcijama tipa II, imunološko oslobađanje histamina je posredovano imunoglobulinima klase IgG i IgM (Švarc-Gajić, 2009).



Slika 5. Imunološko oslobađanje histamina.

Pored imunološkog iniciranja degranulacije mastocita posredstvom IgE i drugim antitelima, različiti neimunološki stimulansi kao što su neki neuropeptidi, citokini, lipoproteini, adenzin, superoksidaze, alkohol, određena hrana, i drugi hemijski i fizički faktori (ekstremne temperature, trauma) takođe mogu aktivirati mastocite (Maintz & Novak, 2007).

Nakon oslobađanja, histamin se jako brzo širi i prenosi krvotokom u ostale delove tela gde se vezuje za određene receptore. Osetljivost i reakcija određenih vrsta ćelija na histamin zavisi od vrste receptora koji se nalaze na toj ćeliji. Poznata su četiri tipa histaminskih receptora: H₁, H₂, H₃ i H₄ (Tabela 1) (Lieberman & Anderson, 2007; Jutel *et al.*, 2002; Dy & Schneider, 2004). Oni se nalaze na površini ćelijskih membrana ili su locirani u ćelijama skoro svih delova tela, uključujući kožu, centralni nervni sistem, glatku muskulaturu respiratornog, gastrointestinalnog i vaskularnog sistema. Široka rasprostranjenost histaminskih receptora, ali i mastocita i bazofila u organizmu ukazuje na širok spektar funkcija histamina kod čoveka. Kada se veže za određenu vrstu receptora, histamin pokreće niz fizioloških ili patofizioloških reakcija (Tabela 1). Histamin se najčešće ne vezuje selektivno samo za jednu vrstu receptora nego ima sposobnost aktivacije različitih tipova histaminskih receptora.

Tabela 1. Vrste histaminskih receptora i biološki efekti histamina (Lieberman & Anderson, 2007; Jutel et al., 2002; Dy & Schneider, 2004).

Vrsta receptora	Mesto nalaženja	Funkcija / Efekti po aktiviranju
H ₁	Široko rasprostranjeni: glatka muskulatura respiratornog i vaskularnog sistema, nervne ćelije, hondrociti, hepatociti, dendritske ćelije, endotelijalne ćelije, T i B limfociti, monociti, neutrofili.	Kontrakcija glatke muskulature, povećanje permeabilnosti krvnih sudova, stimulacija nervnih završetaka. Stimulacija endotelijalnih ćelija, povećanje usvajanja histidina u bazofilima, indukcija sekrecije efedrina u srži nadbubrežne žlezde. Glavni receptori koji uzrokuju alergijske simptome. Aktivacijom dolazi do svraba, kašlja i bronhospazama usled stimulacije vagusa i vazodilatacije.
H ₂	Široko rasprostranjeni u istim ćelijama kao i H ₁ receptori.	Povećanje sekrecije želudačne kiseline i pepsina, smanjenje proliferacije limfocita, pozitivan inotropni i hronotropni efekat na srce, smanjenje oslobađanja histamina iz bazofila.
H ₃	Centralni nervni sistem, histaminergični neuroni, limfociti, manje zastupljeni u perifernim tkivima.	Inhibicija sinteze histamina u centralnom nervnom sistemu, plućima i koži, modulacija holinergične neurotransmisije, uticaj na funkcionisanje centralnog nervnog sistema.
H ₄	Mastociti, bazofili, limfociti, hematopoetske ćelije u koštanoj srži, manje izraženi u nervnim ćelijama, hepatocitima i perifernim tkivima.	Na osnovu mesta gde se nalaze, može se pretpostaviti da H ₄ receptori imaju ulogu pri regulaciji imunog odgovora organizma, mada njihova fiziološka uloga još uvek nije dovoljno poznata.
H ₁ + H ₂		Vazodilatacija, crvenilo, glavobolja, hipotenzija, promena sekrecije sluzi u respiratornom sistemu (H ₁ - povećanje viskoziteta i H ₂ - povećanje količine sluzi).

Rezultat patofizioloških reakcija na histamin je pojava različitih alergija. Prema vrsti receptora za koje se histamin veže mogu nastati i različiti oblici alergijskih reakcija, od onih tipičnih na koži i području disajnih puteva (spazam bronhija) gde se vezivanje odvija preko H₁ receptora, preko „gastrointestinalnih alergija“ gde se histamin vezuje za H₂ receptore, do nekih neuroloških problema (vrtoglavice, glavobolje) ako dolazi do vezivanja na H₃ receptore. U reakcijama tipa anafilakse dolazi do aktiviranja svih histaminskih receptora, što ima za posledicu širokolikvu simptomatologiju. Većina simptoma alergijskih reakcija su rezultat uticaja histamina na kardiovaskularni i respiratorni sistem izazivajući povećan protok krvi,

vazodilataciju, povećanu propustljivost krvnih sudova, bronhokonstrikciju i spazam glatke muskulature. Preko H_1 receptora, histamin izaziva kontrakciju glatke muskulature ileuma, bronhija i bronhiola, kao i uterusa. Takođe preko H_1 receptora, histamin širi krvne sudove u ljudskom organizmu. Histamin povećava frekvencu i mišićni volumen srca dejstvom na H_2 receptore u srcu. Ubrizgan intradermalno, histamin izaziva crvenilo kože i otok. Crvenilo nastaje usled vazodilatacije malih arteriola dok je otok posledica povećane permeabilnosti kapilara (Varagić & Milošević, 2004). Efekti histamina u zavisnosti od njegove koncentracije u plazmi su dati u tabeli 2 (Maintz & Novak, 2007).

Tabela 2. Efekti histamina u zavisnosti od njegove koncentracije u plazmi.

Koncentracija histamina u plazmi (ng/cm ³)	Klinički efekti
0-1	Normalno stanje
1-2	Povećanje sekrecije želudačne kiseline, ubrzanje rada srca
3-5	Tahikardija, glavobolja, crvenilo, urtikarija, svrab
6-8	Snižavanje arterijskog pritiska
7-12	Bronhospazam
~ 100	Srčani udar

Pri normalnim fiziološkim procesima, histamin utiče na imuni, gastrointestinalni i nervni sistem. Uticaj histamina na imuni sistem se ostvaruje njegovim vezivanjem za različite vrste receptora koji se nalaze na limfocitima, dendritima, makrofazima i hematopoetskim ćelijama (Jutel *et al.*, 2002). Pored toga, histamin utiče na sazrevanje i aktiviranje ćelija imunog sistema i sekreciju nekoliko vrsta citokina (Schneider *et al.*, 2002). Vezivanjem za H_2 receptore koji se nalaze u parijetalnim ćelijama želuca, histamin povećava sekreciju želudačne kiseline (Grandi & Morini, 2006). Parijetalne ćelije reaguju i na koncentracije histamina koje su nedovoljne da izazovu stimulaciju H_2 receptora u krvnim sudovima. U centralnom nervnom sistemu histamin ima ulogu neurotransmitera. Iako je u mozgu prisutan u mnogo manjoj količini nego u drugim tkivima (koža ili pluća), njegova neurotransmiterska uloga je izražena. Aktivacija histaminergičnog sistema u mozgu utiče na homeostazu i ponašanje, uključujući spavanje i budnost, učenje i pamćenje, anksioznost, kretanje, apetit i neuroendokrinu regulaciju (Passani *et al.*, 2007). Histamin utiče na libido i erektilnu funkciju kod muškaraca (Cará *et al.*, 1995). Kod muškaraca sa visokim nivoom histamina u krvi imaju problema sa impotencijom (Ojeda, 2003). Uloga histamina pri erekciji je posredovana uglavnom aktivacijom H_2 receptora, mada i H_3 receptori mogu biti uključeni

(Cará *et al.*, 1995). Nivo histamina u krvi utiče i na seksualno ponašanje žena. Žene sa nižim koncentracijama histamina u krvi teže doživljavaju orgazam, dok one sa povišenim nivoom mnogo lakše i češće.

2.2 Netolerancija na histamin

Histamin se sintetiše u organizmu čoveka, ali se može uneti u organizam posredstvom hrane i pića. Različite namirnice prirodno sadrže histamin ili on nastaje kao rezultat razgradnje pojedinih komponenti hrane usled metaboličkih procesa prisutnih mikroorganizama. Pri normalnim uslovima, mala količina histamina koja je uneta hranom se metaboliše u fiziološki manje aktivne degradacione produkte. Međutim, kod nekih ljudi namirnice koje sadrže veće količine histamina mogu izazvati netoleranciju na hranu i pojavu takozvane „pseudoalergijske“ reakcije (Leszczyńska *et al.*, 2004). Tipični simptomi koji prate netoleranciju na histamin su gastrointestinalni poremećaji (dijareja, povraćanje, mučnina), grčevi i bolovi u donjem stomaku, zatim kihanje, curenje nosa i zapašćenje nosa, glavobolja, vrtoglavica i malaksalost. Neretko se javlja i crvenilo kože uz jak svrab, aritmije i tahikardija, a ponekad i otežano disanje zbog laganog spazma bronhija (Hui, 2006; Lehane & Olley, 2000; Wöhrl *et al.*, 2004). Simptomi najčešće nestaju nekoliko sati po konzumiranju namirnica bogatih histaminom. Smrtnost usled netolerancije na histamin je jako retka i uglavnom zavisi od pojedinca, tako da na primer kod pacijenata sa srčanim bolestima rizik od infarkta miokarda je mnogo veći (Ortolani & Pastorello, 2006).

Netolerancija na histamin usled konzumiranja hrane sa njegovim povećanim sadržajem se ponekad opisuje kao trovanje hranom. Naziv trovanje nije uvek prikladan jer se ne radi o reakciji koja će se pojaviti kod svih ljudi, već samo kod pojedinaca kod kojih je prag podnošljivosti prema histaminu niži u odnosu na normalnu populaciju. Unošenje veće količine histamina dovodi do trovanja preosetljivih individua, a usled ograničenosti detoksikacionog mehanizma (Rauscher-Gabernig *et al.*, 2009; Lehane & Olley, 2000).

Najčešći uzrok netolerancije na histamin je njegova smanjena ili nedovoljna razgradnja kao posledica smanjene aktivnosti DAO ili NHNT (Maintz & Novak, 2007), gde u većoj meri utiče smanjena aktivnost DAO koja je odgovorna za razgradnju histamina koji potiče iz hrane. Patološka stanja gastrointestinalnog trakta takođe mogu biti uzrok smanjene produkcije DAO. Alkohol i neki lekovi (antihistaminici, antimalarici) takođe povećavaju rizik od histaminske netolerancije pošto deluju inhibitorno na DAO (Hui, 2006). Povećana koncentracija metabolita histamina takođe može da inhibira DAO. Pored toga, drugi biogeni

amini koji mogu biti prisutni u hrani (tiramin, putrescin, kadaverin) kompetitivnom inhibicijom smanjuju aktivnost DAO i time snižavaju prag tolerancije prema histaminu (Lehane & Olley, 2000).

Nakon konzumiranja hrane koja sadrži velike količine histidina takođe se može javiti netolerancija na histamin, usled transformacije histidina u histamin pod dejstvom stomačnih bakterija (Ortolani & Pastorello, 2006).

Iz navedenog se može zaključiti da je određivanje praga toksičnosti histamina veoma teško zbog toga što efektivna doza zavisi od velikog broja faktora, među kojima su najznačajniji individualna efikasnost detoksikacionog mehanizma (individualna osetljivost i zdrastveno stanje) i vrsta hrane koja se konzumira (kvalitativne i kvantitativne karakteristike hrane) (Hui, 2006). Ponekad i jako niske koncentracije histamina mogu prouzrokovati simptome netolerancije (Bodmer *et al.*, 1999). Sinergističko delovanje histamina i drugih supstanci koje se nalaze u hrani takođe otežava određivanje praga toksičnosti histamina.

Dijagnoza netolerancije na histamin se postavlja na osnovu postojanja dva ili više tipičnih simptoma histaminske netolerancije i poboljšanja stanja nakon ishrane bez histamina (Maintz & Novak, 2007). Standardno lečenje uključuje dijetu izbegavanjem namirnica sa potencijalno visokim sadržajem histamina uz primenu H₁ i H₂ antagonista. Pored toga, razgradnja histamina se može poboljšati unosom vitamina C i B₆, koji utiču povoljno na aktivnost DAO. Kod osoba sa smanjenom aktivnošću DAO enzima, prevencija nastanka netolerancije podrazumeva strogu i trajnu dijetu s obzirom na sve složeniji sastav hrane. Na tržištu se mogu naći suplementi koji sadrže DAO i predstavljaju alternativnu mogućnost lečenja za ovakve slučajeve.

2.2.1 Histamin u hrani

Neke namirnice kao što su meso, voće i povrće, sadrže male količine endogenog histamina kao prirodnog metaboličkog produkta ili medijatora. Veće količine histamina se obično nalaze u fermentisanoj hrani i piću. Za razliku od IgE-posredovane alergije na hranu gde obično ingestija čak i vrlo malih količina alergena uzrokuje simptome, kod histaminske netolerancije važna je količina histamina u hrani.

Preduslovi za formiranje histamina u hrani su raspoloživost slobodnog histidina, prisustvo mikroorganizama sa izraženom aktivnošću HDC enzima (starter kulture ili mikroorganizmi dospeli kontaminacijom) i povoljni uslovi za rast mikroorganizama, sintezu i aktivnost dekarboksilaze (Hui, 2006; Bodmer *et al.*, 1999.). Nekontrolisani uslovi

fermentacije, upotreba „divljih“ sojeva za fermentaciju, mikrobiološka kontaminacija ili kvarenje hrane mogu da dovedu do povećane produkcije histamina. Hrana bogata proteinima, a naročito hrana koja sadrži slobodni histidin se odlikuje visokim sadržajem histamina.

HDC enzim sintetišu mnogi mikroorganizmi koji su prirodno prisutni u hrani ili mogu dospeti u nju kontaminacijom pre, u toku ili nakon prerade hrane. Neke bakterije i kvasci koji se koriste kao starter kulture pri procesu proizvodnje takođe mogu da utiču na povećanu produkciju histamina usled izražene aktivnosti HDC enzima (Hui, 2006). Međutim, u literaturi se ističe da su za povećan sadržaj histamina mnogo češće odgovorni mikroorganizmi koji su u hranu dospeli kontaminacijom, nego što su to starter kulture (Bodmer *et al.*, 1999). Mikrobiološki sojevi sa visokom proteolitičkom enzimskom aktivnošću takođe potencijalno povećavaju rizik za nastanak histamina, usled povećanja dostupnosti slobodnog histidina.

Količina histamina u hrani može biti direktan pokazatelj nivoa mikrobiološke kontaminacije hrane ali i kvaliteta hrane uopšte, zbog toga što i nakon uklanjanja bakterija iz hrane, njihovi zaostali enzimi mogu da nastave proizvodnju histamina. Uzimajući u obzir navedene uslove koji pogoduju povećanju količine histamina u hrani i piću, visoki sadržaji mogu ukazati i na loše skladištenje i čuvanje sirovina i gotovih proizvoda, ili na neispravnost proizvodnog procesa. Pored toga, količina histamina u hrani se jako često koristi kao pokazatelj svežine raznih proizvoda.

Sadržaj histamina u hrani razlikuje se u zavisnosti od vrste namirnica, načina proizvodnje, starosti i uslova skladištenja. Sveža i pravilno uskladištena ili obrađena hrana i piće sadrže male količine histamina. Nivo histamina može jako varirati i u okviru iste vrste namirnica, pa se smatra da su proizvodi sa nižim sadržajem boljeg kvaliteta. Povišen nivo histamina veoma često sadrže riba i riblji proizvodi, sirevi i drugi mlečni proizvodi, meso i mesni proizvodi, fermentisano povrće, proizvodi od soje i alkoholna pića kao što su vino i pivo (Ekici *et al.*, 2004; Yongmei *et al.*, 2009; Valsamaki *et al.*, 2000; Aygün *et al.*, 1999).

Trovanje histaminom sa pseudoalergijskim efektom je najčešće uzrokovano konzumiranjem ribe iz podreda *Scombridae* (barakuda, skuša, tuna, sabljarka) koje su veoma dobre podloge za formiranje histamina zbog visokog sadržaja slobodnog histidina u njihovom mesu (Kim *et al.*, 1999; Hungerford, 2010). Zbog toga se u literaturi trovanje histaminom najčešće naziva „*scombroid poisoning*“ (Lehane & Olley, 2000; Hungerford, 2010). Međutim ovaj naziv nije potpuno opravdan jer je histaminsko trovanje zabeleženo i nakon konzumiranja drugih vrsta riba kao što su mahi-mahi, sardele, sardine i losos (Auerswald *et al.*, 2006). Povećan sadržaj histamina u ribi i ribljim proizvodima je najčešće posledica kvarenja usled mikrobiološke kontaminacije. U pokvarenoj ribi su zabeleženi sadržaji

histamina od čak 4000 mg/kg (Diel et al., 1997). Senzorne osobine ribe koja sadrži velike količine histamina obično nisu promenjene, osim u slučajevima poodmaklog kvarenja.

Sveže mleko obično sadrži veoma male količine histamina, dok su nešto veći sadržaji zabeleženi u fermentisanim mlečnim proizvodima. Pri proizvodnji sireva drastično se povećava sadržaj histamina, tako da zreli sirevi mogu da sadrže i više od 1000 mg/kg histamina (Bodmer et al., 1999; Aygün et al., 1999). Takođe, meso i proizvodi od mesa obično sadrže relativno malo histamina, dok veće količine mogu da se nalaze fermentisanim mesnim proizvodima kao što su kobasice (Ekici et al., 2004; Hiu, 2006, Suzzi & Gardini, 2003). Tome doprinosi način proizvodnje fermentisanih mesnih proizvoda koja se odvija pri povišenim temperaturama i uz učešće velikog broja mikroorganizama visoke metaboličke aktivnosti. Histamin je pronađen u kupusu, plavom patlidžanu, paradajzu, cvekli, pasulju i spanaću, mada je u voću i povrću generalno prisutan u veoma malim količinama (Hiu, 2006). Obično se sadržaj histamina u povrću i proizvodima od povrća kreće do 10 mg/kg (Kalač et al., 2002). U kiselom kupusu se mogu nalaziti nešto veće količine histamina, naročito kod proizvoda dobijenih tradicionalnim načinom proizvodnje gde se koriste „divlji“ sojevi za fermentaciju. Upotreba i odabir odgovarajućih starter kultura za proizvodnju kiselog kupusa obezbeđuju bolji kvalitet proizvoda usled kontrolisanog procesa fermentacije. U turšiji je takođe zabeležen nešto viši sadržaj histamina, u odnosu na sveže povrće (do 75 mg/kg) (Ekici & Coskun, 2004). Soja sos, kineski tradicionalni fermentisani začin, može da sadrži velike količine histamina čak do 592 mg/kg (Yongmei et al., 2009). U vinu sadržaj histamina se obično kreće do 16 mg/dm³ (Karovičová & Kohajdová, 2005; Hui, 2006), mada su zabeleženi i sadržaji preko 40 mg/dm³ (Achilli et al., 1994). Za razliku od vina, u pivu je sadržaj histamina obično niži i najčešće je ispod 3 mg/dm³. Viši sadržaji histamina od oko 25 mg/dm³ su zabeleženi u vrstama piva koja se dobijaju spontanom fermentacijom (Tang et al., 2009; Izquierdo-Pulido et al., 1996).

Histamin koji se nalazi u hrani se ne može razoriti pri kivanju i pasterizaciji, te je zbog toga proizvodnja hrane i pića bez histamina ili sa veoma niskim sadržajem histamina veoma važan element u prehrambenoj industriji. Puno pažnje poklanja se razvoju prehrambenih tehnologija u cilju proizvodnje hrane sa nižim sadržajem histamina (*low-histamine technology*) (Bodmer et al., 1999). Prvi korak pri razvoju novih tehnologija podrazumeva isključivanje neželjenih mikroorganizama sa izraženom aktivnošću dekarboksilaza kao i vođenje procesa pri uslovima koji ne pogoduju aktivnosti ovih enzima. Takođe treba izbegavati upotrebu sojeva koji nisu provereni u pogledu sposobnosti stvaranja histamina. Mora se voditi računa i o kvalitetu sirovina koje se koriste, kao i o uslovima u toku procesa proizvodnje i skladištenja međuproizvoda i gotovih proizvoda (Bodmer et al., 1999).

2.2.2 Zakonska regulativa

Mnoge zemlje propisima o kvalitetu i higijenskoj ispravnosti hrane propisuju maksimalno dozvoljen sadržaj histamina u pojedinim vrstama namirnica. Regulativa Evropske Unije (Regulation (EC) 2073/2005) propisuje maksimalno dozvoljen sadržaj histamina u ribi i ribljim proizvodima (EU, 2005). Za ribu i riblje proizvode maksimalno dozvoljen sadržaj histamina je 100 mg/kg, dok je za fermentisane riblje proizvode dozvoljeno 200 mg/kg. Ova Regulativa propisuje da od devet uzetih proba jednog uzorka, sadržaj histamina u dve probe sme da pređe 100 mg/kg (odnosno 200 mg/kg), ali ni u jednoj probi ne sme da pređe 200 mg/kg (odnosno 400 mg/kg). U Srbiji je pravilnikom takođe propisan maksimalno dozvoljen sadržaj histamina u ribi i proizvodima od ribe („Sl. list SRJ“, br. 5/92, 11/92 – ispr. i 32/2002). Prema članu 13 ovog pravilnika, sveža morska riba ne sme sadržati više od 20 mg histamina na 100 g ribljeg mesa. Smrznuta morska riba, riblje konzerve i pasterizovane konzerve ne smeju sadržavati više od 40 mg histamina na 100 g ribljeg mesa. Američka agencija za hranu i lekove (US Food and Drug Administration) propisuje maksimalno dozvoljen sadržaj histamina u ribi od 50 mg/kg (Hwang *al.*, 2003), a riba sa sadržajem histamina iznad tog nivoa je zabranjena za ljudsku potrošnju. Neke zemlje su postavile grube smernice u pogledu maksimalno preporučenog sadržaja histamina u vinu koji je mnogo niži nego u ribi, zbog prisustva etanola. Maksimalni preporučeni sadržaj histamina u vinu od 2 mg/dm³ predložen je u Nemačkoj, 5 - 6 mg/dm³ u Belgiji, 8 mg/dm³ u Francuskoj i 10 mg/dm³ u Švarcaskoj (Vidal-Carou *et al.*, 2003).

Pravilnici koji definišu prihvatljiv sadržaj histamina u drugim namirnicama ne postoje, iako njegov sadržaj može da iznosi i preko 1000 mg/kg (Aygün *et al.*, 1999). Po regulativi (EC) 2073/2005, koja predstavlja jedan od kriterijuma bezbednosti hrane, ovakva hrana se ne bi mogla svrstati u bezbednu.

2.2.3 Metode određivanja histamina

Praćenje sadržaja histamina se široko primenjuje u prehrambenoj industriji i dobijeni rezultati se koriste za kontrolu kvaliteta sirovina, međuproizvoda i gotovih proizvoda, praćenje procesa fermentacije, kontrolu ispravnosti tehnološkog procesa, kao i pri istraživačkom radu i razvoju novih tehnologija.

Pri razvoju metode za određivanje histamina, analitičar se susreće sa problemima kao što su kompleksnost matriksa uzorka i veoma niske koncentracije histamina u uzorku. Zbog prisustva potencijalno interferirajućih supstanci, potrebno je razviti selektivnu metodu, dok

niske koncentracije nameću uslov da razvijena metoda poseduje odgovarajuću osetljivost. Interesovanje za histamin i njegov toksični efekat doveli su do razvoja velikog broja različitih metoda za njegovo određivanje (Silla-Santos, 1996). Većina razvijenih metoda uključuje određivanje i ostalih biogenih amina kao što su putrescin, kadaverin, tiramin, triptamin, spermin, spermidin (Önal, 2007). Pored toga, u većini slučajeva razvijena metoda se može primeniti samo za specifičnu vrstu uzorka.

Oficijalne AOAC metode za određivanje histamina u morskoj hrani obuhvataju biološku, hemijsku i fluorometrijsku metodu (AOAC, 2002). Biološke metode su bile prve metode za određivanje „*scombroid*“ toksina u ribi, a zasnivale su se na merenju parametara kao što su iznosi kontrakcija ileuma zamorčeta koji predstavlja organ osetljivih na histamin. Biološka metoda je bila i prva AOAC metoda za određivanje histamina, ali ova tehnika se danas jako retko koristi jer je zamenjena daleko jednostavnijim i elegantnijim instrumentalnim tehnikama. Fluorimetrijska AOAC metoda se najčešće koristi za validaciju i potvrdu tačnosti novih razvijenih metoda za određivanje histamina.

Uopšteno posmatrano, u analitici histamina se mogu razlikovati polukvantitativne i kvantitativne metode. Za rutinsko određivanje histamina poželjno je koristiti brze i jednostavne, pa čak i polukvantitativne metode („*screening*“ metode) jer one omogućavaju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom intervalu. „*Screening*“ metode se uglavnom koriste za potvrđivanje prisustva histamina iznad određene koncentracije, nakon čega se on određuje nekom od tačnijih metoda. Rutinske metode za određivanje histamina koje se najčešće koriste su kolorimetrija, tankoslojna hromatografija, enzimske i enzimsko-imunološke metode (ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Navedene metode su veoma jednostavne, ne zahtevaju skupu opremu i reagense, pogodne su kao „*screening*“ testovi i za veliki broj uzoraka. Kolorimetrija i tankoslojna hromatografija se prvenstveno koriste kao kvalitativne i u najboljem slučaju semi-kvantitativne metode. ELISA metode mogu da se koriste i za kvantitativnu analizu.

Kada se zahteva kvantitativno određivanje histamina ili kada je potrebno proveriti pouzdanost neke metode moraju se koristiti precizne i tačne metode. U slučaju spora takođe moraju da se primenjuju precizne i tačne metode. Za kvantitativno određivanje histamina najčešće se koriste fluorimetrija, gasna hromatografija, visoko-pritisna tečna hromatografija i kapilarna elektroforeza. Hromatografske tehnike, kao i kapilarna elektroforeza pružaju niz prednosti među kojima je najznačajnija što se ovim tehnikama mogu istovremeno određivati i drugi biogeni amini koji mogu biti prisutni u uzorku. Pored toga ove metode poseduju veliku selektivnost i osetljivost određivanja. Međutim one zahtevaju komplikovaniju pripremu uzoraka, skupu i sofisticiranu instrumentaciju i veliko iskustvo analitičara. Pored toga, vreme trajanja analize primenom ovih metoda je značajno.

2.2.3.1 Priprema uzoraka za analizu

Uzorci u kojima se planira određivanje histamina se moraju čuvati na određeni način, odnosno u sterilnim uslovima, u mraku i pri niskim temperaturama (oko -10°C), s obzirom da fizički (temperatura, UV zračenje) ali i drugi faktori (prisustvo mikroorganizama, diamino-oksida) mogu da utiču na povećanje nivoa histamina (Douabalé *et al.*, 2003).

Prvi korak pri kvantifikaciji histamina u različitim uzorcima je ekstrakcija. Rastvarači za ekstrakciju koji se koriste su metanol, 75% metanol, $0,1 \div 1 \text{ mol/dm}^3$ perhlorna kiselina, $5 \div 10\%$ trihlorsirćetna kiselina i $0,1 \text{ mol/dm}^3$ hlorovodonična kiselina (AOAC, 2005; Önal, 2007; Karovičová & Kohajdová, 2005). Najčešće primenjivane ekstrakcione tehnike su ekstrakcija uz mešanje (Auerswald *et al.*, 2006), ekstrakcija uz intenzivno mešanje (ultraturax) (Patange *et al.*, 2005; Lapa-Guimarães & Pickova, 2004) i ultrazvučna ekstrakcija (Cinquina *et al.*, 2004; Casella *et al.*, 2001; Favaro *et al.*, 2007). Nakon centrifugiranja, supernatant se profiltrira kroz membranski filter i dalje određuje nekom od metoda za određivanje histamina. Za prečišćavanje ekstrakta ponekad se koristi tečno-tečna ekstrakcija (Frébort *et al.*, 2000) ili ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE – *Solid phase extraction*) (Oguri *et al.*, 2007; Amorim *et al.*, 2010). Tečno-tečna ekstrakcija, uz korišćenje hloroforma, *n*-heksana ili *n*-heptana se koristi za uklanjanje masne faze iz prvobitnog ekstrakta (Frébort *et al.*, 2000; Draisci *et al.*, 1998; Mahendradatta & Schwedt, 1998). Tečno-tečnom ekstrakcijom je takođe moguće ukloniti slobodni histidin koji kod mnogih metoda za određivanje histamina predstavlja glavnu interferenciju (Mahendradatta & Schwedt, 1998).

Pri određivanju histamina u alkoholnim pićima, priprema uzorka je jednostavna i podrazumeva filtraciju kroz membranski filter, uz eventualno prethodno ili naknadno razblaženje (Achilli *et al.*, 1994; Casella *et al.*, 2001). Pri određivanju histamina u pivima, priprema može uključivati i degazaciju primenom ultrazvuka (Cortacero-Ramírez *et al.*, 2007).

Kod nekih metoda, uglavnom hromatografskih i fluorimetrijskih, pri određivanju histamina nakon ekstrakcije i prečišćavanja ekstrakta izvodi se derivatizacija. Uslovi i postupak derivatizacije zavise od vrste derivata koji se stvaraju, ali i od primenjene analitičke metode.

2.2.3.2 Kolorimetrija

Kolorimetrijske metode za određivanje histamina su uglavnom komplikovanije, zahtevaju prethodno prečišćavanje uz primenu jonoizmenjivača i izvođenje bojene reakcije između izdvojenog histamina i bakra koji formiraju crveno obojene komplekse (Bateman *et*

al., 1994). Savremene modifikovane kolorimetrijske metode su relativno brze, jeftine i veoma pogodne za „*screening*“ test (Patange *et al.*, 2005; Köse & Hall, 2000). Naime kod jednostavnijih kolorimetrijskih metoda, nakon ekstrakcije i prečišćavanja tečno-tečnom ekstrakcijom sa *n*-butanolom, dobijeni prečišćeni ekstrakt se uparava do suva i rastvara u destilovanoj vodi. Bojena reakcija se izvodi sa *p*-fenildiazonijum-sulfonatom i intenzitet obojenja se određuje spektrofotometrijski na 496 nm, uz osetljivost od 10 mg/kg (Patange *et al.*, 2005).

2.2.3.3 Tankoslojna hromatografija

Tradicionalne TLC (TLC – *Thin-layer chromatography*) metode su starije metode koje se još uvek puno koriste u kontrolnim laboratorijama zbog toga što su brze, pojedine faze se mogu automatizovati i može se istovremeno analizirati više uzoraka na jednoj ploči (Shalaby, 1994; Shalaby, 1995; Naguib *et al.*, 1995; Latorre-Moratalla *et al.*, 2009). Nedostaci ovih tehnika su što po tačnosti spadaju u semi-kvantitativne metode, imaju malu preciznost i visoku granicu detekcije. Takođe, rastvarači koji se koriste za razvijanje hromatograma su uglavnom toksični. Klasična tankoslojna hromatografija je pogodna kao „*screening*“ metoda za uzorke koji sadrže više od 50 mg/kg histamina, tako da se nakon potvrde prisustva, histamin dalje određuje nekom tačnijom metodom.

U poslednje vreme raspoloživost velikog broja stacionarnih faza, instrumenata za automatsku aplikaciju uzorka i denzitometrijska detekcija su doveli do usavršavanja tradicionalnih tankoslojnih hromatografskih tehnika i povećanja osetljivosti, a dobijeni rezultati se mogu porediti sa rezultatima HPLC i GC analize. Tankoslojna hromatografija visokih performansi (HPTLC – *High-performance TLC*) je veoma osetljiva i selektivna metoda, omogućava istovremeno kvantitativno određivanje više biogenih amina i ne zahteva sofisticiranu opremu (Lapa-Guimarães & Pickova, 2004; Shakila *et al.*, 2001; Shalaby, 1999).

2.2.3.4 Enzimske metode

U osnovi enzimskih metoda za određivanje histamina leži konverzija histamina u imidazol-acetaldehid uz nastanak vodonik-peroksida u reakciji koju katalizira enzim diamino-oksidaza (DAO). Vodonik-peroksid se dalje prevodi u kiseonik i vodu uz pomoć drugog enzima peroksidaze, a paralelno se odvija i reakcija oksidacije bezbojnog leuko-kristalvioleta u ljubičasti kristalviolet (López-Sabater *et al.*, 1993). Intenzitet obojenosti je proporcionalan količini histamina što se može utvrditi vizuelno za kvalitativnu, i spektrofotometrijski za kvantitativnu analizu. Osetljivost ove metode je oko 0,5 mg/kg histamina. Prednosti enzimskih metoda su kratko trajanje analize i dobro slaganje sa AOAC fluorimetrijskom

metodom i HPLC metodom (Ben-Gigirey *et al.*, 1998; Landete *et al.*, 2004). Međutim, DAO enzim reaguje i sa drugim biogenim aminima kao što su agmatin, putrescin i kadaverin, kada su prisutni u visokim koncentracijama, pa se mora voditi računa o eliminaciji interferencija kako bi se obezbedila bolja selektivnost (Ben-Gigirey *et al.*, 1998). U poslednje vreme, da bi se pojednostavio analitički postupak pri primeni enzimskih metoda, razvijeni su enzimski biosenzori (Male *et al.*, 1996) i test trake ili tzv. „*dipstick*“ testovi (Hall *et al.*, 1995) koji omogućavaju brzu i jednostavnu analizu.

2.2.3.5 Enzimsko-imunološke metode (ELISA)

ELISA metode se često primenjuju za određivanje histamina u ribi i morskoj hrani (Serrar *et al.*, 1995; Auerswald *et al.*, 2006; Muscarella *et al.*, 2005), u sirevima (Aygün *et al.*, 1999) i vinu (Marcobal *et al.*, 2005). Različite kompanije proizvode komercijalne ELISA kitove za histamin (Neogen, Immunotech, Biomedix) koji su jednostavni za korišćenje, veoma specifični i osetljivi, omogućavaju brzu analizu i obezbeđuju tačne rezultate po niskoj ceni. Na tržištu su dostupni ELISA testovi za kvalitativnu (Alert[®] for histamine, Histamarine test kits) i kvantitativnu analizu (Veratox[®], Ridascreen[®]). U okviru testova za kvantitativnu analizu, određeni kitovi se primenjuju za određeni opseg koncentracija histamina. Osetljivost ove tehnike se kreće od 2,5 mg/kg do 50 mg/kg, u zavisnosti od kitova koji se koriste.

2.2.3.6 Fluorimetrija

Fluorimetrijske metode za određivanje histamina zahtevaju prethodno prečišćavanje ekstrakta radi uklanjanja potencijalno interferirajućih supstanci, i to najčešće uz primenu kolona sa jonoizmenjivačima. Pored toga, neophodna je predhodna derivatizacija histamina sa određenim reagensom u cilju stvaranja fluorescentnih derivata. Derivatizacija se najčešće izvodi pomoću *o*-ftalaldehida, naftalen-2,3-dikarbaldehida (Zhang & Sun, 2004), dansil-hlorida (Shakila *et al.*, 2001; Naguib *et al.*, 1995) i fluoescamina (Adamou *et al.*, 2005).

Fluorimetrijska metoda koja podrazumeva ekstrakciju histamina metanolom, prečišćavanje jonskom hromatografijom, derivatizaciju *o*-ftalaldehidom i fluorimetrijsko određivanje, ujedno je i standardna AOAC metoda (Method 977.13) za određivanje histamina u ribi i morskim plodovima (AOAC, 2002). Iako je osetljiva i reproduktivna, fluorimetrijska AOAC metoda je veoma komplikovana i zahteva dosta vremena. U literaturi se mogu sresti i modifikovane AOAC metode koje pružaju mogućnost bržeg i jednostavnijeg određivanja. U ovim modifikovanim metodama, derivatizacija se izvodi sa *o*-ftalaldehidom (Douabalé *et al.*, 2003; Campo *et al.*, 2006).

2.2.3.7 Gasna hromatografija

Direktno određivanje histamina gasnom hromatografijom je jako retko zbog niza nedostataka, od kojih se najznačajniji nedostatak odnosi na ograničenu isparljivost histamina. Slaba isparljivost histamina dovodi do sporog ili nepotpunog eluiranja iz kolone, razvučenih pikova i nereproduktivnih rezultata. Zbog toga se uglavnom izvodi derivatizacija kako bi se dobili isparljiviji derivati histamina, poboljšala selektivnost i osetljivost određivanja nezavisno od detektora koji se koristi, uz poboljšanje celokupnog razdvajanja. U te svrhe, najčešće primenjivani reagensi za derivatizaciju histamina su izobutil-hloroformat (Fernandes *et al.*, 2001) i pentafluoropropiono-anhidrid (Antoine *et al.*, 2002).

Uvođenje kolona usavršenih performansi na tržište omogućilo je direktno određivanje histamina gasnom hromatografijom. Uz upotrebu kolone CP-SIL 19CB, pri određivanju histamina bez derivatizacije gasnom hromatografijom – masenom spektrometrijom ostvarena je granica detekcije od 5 mg/kg (Hwang *et al.*, 2003). Direktnim određivanjem se značajno skraćuje vreme analize i izbegavaju greške koje mogu da potiču od reakcije sinteze derivata.

2.2.3.8 Tečna hromatografija pod visokim pritiskom

Za određivanje histamina u hrani se već dugi niz godina u praksi u najvećoj meri primenjuje tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC – *High-performance liquid chromatography*) zbog visoke rezolucije, velike osetljivosti, dobre selektivnosti i relativno jednostavne pripreme uzoraka za analizu. Ova tehnika se uglavnom primenjuje za određivanje svih biogenih amina u hrani (Önal, 2007). Najčešće se izvodi hromatografija na obrnutim fazama (Marcobal *et al.*, 2005; Innocente *et al.*, 2007). Direktno određivanje histamina HPLC-om je moguće uz primenu UV detektora i merenjem apsorpcije na 214 nm ili na 220 nm (Cinquina *et al.*, 2004; Oguri *et al.*, 2007). Ipak, direktno određivanje se u praksi jako retko izvodi zbog njegove veoma slabe apsorpcije u UV i vidljivom delu spektra i odsustva fluorescencije histamina. Zbog toga se u praksi uglavnom izvodi predkolonska ili postkolonska derivatizacija, kako bi se obezbedila odgovarajuća osetljivost. Derivatizacija se najčešće izvodi sa *o*-ftalaldehidom (OPA – *o*-phtalaldehyde) i dansil-hloridom (Shakila *et al.*, 2001). Pored navedenih reagenasa, za derivatizaciju histamina i ostalih biogenih amina ređe se koriste dabsil-hlorid, 4-hloro-3,5-dinitrobenzil-trifluorid (CHBF), 9-fluorenmetil-hloroformat (Tang *et al.*, 2009), benzoil-hlorid (Tsai *et al.*, 2005), 2-(9-karbazol)etil-hloroformat (You & Zhang, 2002) i drugi. Prema Regulativi Evropske Unije (Regulation (EC) 2073/2005), HPLC metoda koja uključuje razdvajanje dansil-derivata je referentna metoda za određivanje histamina u ribi i proizvodima od ribe (EU, 2005). Derivatizacija sa dansil-

hloridom omogućava UV detekciju i brzo eluiranje iz kolone, uz veoma jednostavan gradijentni elucioni program primenom vode i acetonitrila ili metanola kao mobilne faze (Innocente *et al.*, 2007). *O*-ftalaldehid veoma brzo reaguje sa primarnim aminima u prisistvu 2-merkaptetanola (ME) uz nastajanje derivata biogenih amina koji intenzivno fluoresciraju te se mogu detektovati fluorimetrijski. Derivat OPA/ME i histamina može elektrohemijski da se oksiduje pri nižim potencijalima, što omogućava i elektrohemijsku detekciju (Harsing *et al.*, 1986; Jensen & Marley, 1995).

Razvoj nove generacije kolona koje mogu da izdrže veoma visoke pritiske (do 1000 bara), kao i razvoj odgovarajuće instrumentacije koja omogućava rad na tako visokim pritisicima doveli su do razvoja tzv. ultra-efikasne tačne hromatografije (UPLC – *Ultra-performance liquid chromatography*). UPLC metoda za određivanje histamina i ostalih biogenih amina je veoma brza, vreme analize je kraće od 6 minuta, dok je granica detekcije pri određivanju histamina 0,56 mg/kg (Dadáková *et al.*, 2009).

2.2.3.9 Hromatografija na izmenjivačima jona

Primena hromatografije na izmenjivačima jona za određivanje histamina i drugih biogenih amina je pogodna kada su u pitanju jako kompleksni matriksi uzoraka. Ekstrakcija se izvodi perhlornom kiselinom i dobijeni ekstrakt se bez dodatnog prečišćavanja direktno analizira. Za razdvajanje histamina uglavnom se koriste katjonski izmenjivači jona (Pastore *et al.*, 2005; Favaro *et al.*, 2007), dok se anjonski izmenjivači jona primenjuju ređe (Casella *et al.*, 2001). Detekcija se izvodi amperometrijski, a najčešće se kao indikatorska koristi zlatna elektroda. Prednost primene amperometrijske detekcije je što ne zahteva derivatizaciju histamina i drugih biogenih amina.

2.2.3.10 Kapilarna elektroforeza

Određivanje histamina kapilarnom elektroforezom je veoma brzo uz korišćenje kapilarnih kolona od stopljene silike (Zhang & Sun, 2004). Pravim odabirom pufera može se ostvariti dobro razdvajanje i selektivno određivanje više biogenih amina. Spektrofotometrijska, fluorescentna i elektrohemijska detekcija su najviše zastupljene. Fluorescentna detekcija zahteva derivatizaciju (Cortacero-Ramírez *et al.*, 2007), dok elektrohemijska i spektrofotometrijska detekcija omogućavaju direktno određivanje histamina (Weng *et al.*, 2001; Rossano *et al.*, 2006).

2.2.3.11 Elektrohemijske metode

Elektrohemijske metode su jeftine i osetljive, ali se veoma retko primenjuju zbog relativno visokog potencijala oksidacije histamina na uobičajeno primenjivanim elektrodama (Sarada *et al.*, 2000). Mala selektivnost elektroanalitičkih tehnika u slučaju određivanja histamina takođe ograničava njihovu primenu.

Staklasti ugljenik (GC – *glassy carbon*) i bor-dijamant (*boron-doped diamond electrode*) elektrode su korišćenje za ispitivanje elektrohemijskog ponašanja histamina primenom voltometrije i protočne tehnike uz injektovanje uzorka (FIA – *Flow-injection analysis*) sa amperometrijskom detekcijom, ali bez njegovog određivanja u realnim uzorcima (Sarada *et al.*, 2000). Potencijal oksidacije histamina na GC elektrodi je iznosio $\sim +1,2$ V (vs. ZKE – zasićena kalomelova elektroda). Pri izlaganju GC elektrode tako pozitivnim potencijalima dolazi do izdvajanja kiseonika ili do oksidacije samog elektrodnog materijala i pojave deformisanih voltamograma usled velike struje šuma. Bor-dijamant elektrode su pokazale bolje osobine u smislu da je signal histamina bio odvojen od struje šuma. Histamin se na bor-dijamant elektrodi oksidovao pri vrednostima potencijala od $\sim 1,4$ V (vs. ZKE), dok je porast struje šuma zabeležen tek na potencijalu od $\sim 1,6$ V (vs. ZKE).

Zbog male selektivnosti pri analizi realnih uzoraka, elektroanalitičke tehnike se uglavnom koriste za detekciju nakon primene neke od metoda razdvajanja kao što su hromatografske tehnike i kapilarna elektroforeza. Najčešće primenjivane elektroanalitičke tehnike su pulsna amperometrijska detekcija (PAD) (Hoekstra & Johnson, 1998), integralna pulsna amperometrijska detekcija (IPAD) (Draisci *et al.*, 1998; Pastore *et al.*, 2005; Favaro *et al.*, 2007) i integralna voltometrijska detekcija (IVD) (Hoekstra & Johnson, 1998). Kao radna elektroda kod ovih tehnika se najčešće koristila čvrsta zlatna elektroda (Draisci *et al.*, 1998; Hoekstra & Johnson, 1998; Favaro *et al.*, 2007). Za određivanje histamina u ribi primenom FIA i HPLC sa PAD, korišćena je GC elektroda na kojoj je elektrohemijski deponovano zlato (Carralero *et al.*, 2005). Za detekciju je bila neophodna bazna sredina jer se u njoj formira AuO koji ima ulogu katalizatora i omogućava elektrohemijsku oksidaciju biogenih amina. PAD se nije pokazala kao najbolja tehnika zbog velike struje šuma usled formiranja AuO na površini elektrode. Primenom integralnih tehnika može se ukloniti struja šuma, što dovodi do povećanja osetljivosti u odnosu na PAD. Pored zlatne elektrode, katalitički efekat je pokazala i GC modifikovana elektroda sa bakar-oksidi/hidroksidi filmom pri elektrooksidaciji histamina, što je bilo iskorišćeno za njegovo određivanje u ribi i vinu nakon hromatografskog razdvajanja (Casella *et al.*, 2001).

Membranske jon-selektivne elektrode razvijene za određivanje histamina takođe nisu pokazale dovoljnu selektivnost pri određivanju histamina u prisustvu drugih biogenih amina (Katsu & Hirodo, 1999; Amorim, *et al.*, 2010).

2.2.3.12 Biosenzori

Biosenzori predstavljaju kombinaciju elektrohemijskih i enzimskih metoda za veoma brzo, jednostavno i relativno jeftino određivanje histamina. Međutim, oni nisu komercijalno dostupni pa se ne koriste često za rutinske analize. Stabilnost imobilizovanih enzima je takođe ograničavajući faktor primene biosenzora. Princip biosenzora za određivanje histamina se uglavnom zasniva na elektrohemijskom praćenju smanjenja koncentracije kiseonika ili povećanja koncentracije vodonik-peroksida usled enzimske reakcije. Elektrohemijska oksidacija imidazol-acetaldehida koji nastaje iz histamina u enzimskoj reakciji takođe omogućava indirektno elektrohemijsko određivanje histamina (Keow *et al.*, 2007).

Biosenzori koji su razvijeni za određivanje histamina obuhvataju senzore sa amino-oksidadama (Tombelli & Mascini, 1998; Wimmerová & Macholán, 1999; Niculescu *et al.*, 2000), metilamino-dehidrogenazom (Zeng *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2002), kao i sa kinohemoprotein amino-dehidrogenazom i citohromom C-550 (Yamamoto *et al.*, 2001). Niculescu i saradnici (Niculescu *et al.*, 2000) su amino-oksidadu imobilisali na čvrstoj grafitnoj elektrodi na dva načina, bez i sa medijatorom. Kod prvog tipa biosenzora gde je prenos elektrona bio direktan, imobilizacija enzima se izvodila tako što se nakon odgovarajuće pripreme grafitne elektrode (sečenje, poliranje), ona jednostavno uranjala u rastvor enzima odgovarajuće koncentracije. Priprema drugog tipa biosenzora podrazumevala je upotrebu Os-bipiridin modifikovanog redoks polimera. Ostvarena granica detekcije je iznosila 0,3 mg/dm³ za prvi tip biosenzora i 0,24 mg/dm³ za drugi tip biosenzora. Zeng i saradnici (Zeng *et al.*, 2000) su razvili biosenzor na bazi metilamino-dehidrogenaze uz upotrebu elektroprovodljivog polimera polipirola za imobilizaciju. Film polipirola u kojem je bio imobilisan enzim je elektrohemijski formiran na zlatnoj minielektrodi u prisustvu fericijanida. Prednosti ovog senzora su što ne zahteva prisustvo dodatnih kofaktora i što nije osetljiv na kiseonik. Granica detekcije ostvarena primenom ovog senzora je iznosila 2,77 mg/dm³. Primenom biosenzora sa kinohemoprotein amino-dehidrogenazom (QH-AmDH) i citohromom c-550 kao medijatorom, ostvarena granica detekcije je iznosila 0,055 mg/dm³ (Yamamoto *et al.*, 2001). Wimmerová i Macholán (Wimmerová & Macholán, 1999) su razvili osetljiv biosenzor na bazi elektrode od paste ugljenika uz primenu medijatora i amino-oksidade dobijene iz graška. Elektroda od paste ugljenika je pokazala niz prednosti kada je u pitanju proizvodnja biosenzora. Pri pripremi biosenzora na bazi ugljenične paste, sve

komponente kao što su enzim, medijator, koenzimi i drugi dodaci se umešaju u pastu ugljenika bilo pojedinačno ili kao prethodno imobilisani na odgovarajući nosač čime se izbegavaju klasični veoma zahtevni postupci imobilizacije enzima.

Ostali biosenzori za određivanje histamina koji su opisani u literaturi rade na sličnom ili čak istom principu. Razlike se ogledaju u izvoru primenjenih enzima ili korišćenju različitih medijatora i provodljivih polimera koji se koriste za njihovu izradu.

Enzimi koji se koriste pri konstruisanju biosenzora za histamin mogu da izvode konverziju i ostalih biogenih amina, pa je selektivnost ovih senzora diskutabilna. U slučaju diamino-oksidge, osetljivost prema drugim biogenim aminima je mnogo manja nego prema histaminu. S obzirom da su u ribi i morskim plodovima ostali biogeni amini prisutni u mnogo nižim koncentracijama u odnosu na histamin, njihov uticaj se u ovim slučajevima praktično može zanemariti (Keow *et al.*, 2007). U svim ostalim slučajevima se mora voditi računa o interferencijama i adekvatnoj pripremi uzoraka za analizu. Biosenzori se takođe mogu koristiti za detekciju više biogenih amina, pri čemu se selektivnost postiže njihovim prethodnim hromatografskim razdvajanjem (Frébort *et al.*, 2000; Wimmerová & Macholán, 1999; Niculescu *et al.*, 2000).

2.3 Hronopotenciometrija

2.3.1 Istorijat

Početak dvadesetog veka Sand (Sand, 1901) i Karaoglanoff (Thomas & Henze, 2001) su postavili teorijske osnove hronopotenciometrije koju su nazvali „voltametrijom pri konstantnoj struji“. Prvi put je koriste za potvrdu Fikovog zakona difuzije i za određivanje koeficijenta difuzije. Gierst i Juliard su u analitici 1953. godine prvi put primenili merenje potencijala radne elektrode tokom elektrolize pri konstantnoj struji (Gierst & Juliard, 1953). Pre toga je hronopotenciometrija korišćena za fundamentalna ispitivanja u elektrohemiji. Naziv pod kojim je danas poznata uveli su Reilley i saradnici (Reilley, Everet & Johns, 1955). Radom Delahay-a i Mamantov-a (Delahay & Mamantov, 1955) započinje praktična primena hronopotenciometrije.

2.3.2 Teorijske osnove hronopotencijometrije

Hronopotencijometrija je elektroanalitička tehnika koja podrazumeva praćenje potencijala radne elektrode tokom elektrolize rastvora pri konstantnoj struji. Ispitivani rastvor se ne meša, tako da se kretanje elektroaktivnih vrsti ka površini radne elektrode vrši isključivo difuzijom. Transport mase migracijom umanjuje se pomoćnim elektrolitom visoke koncentracije, dok se konvektivni prenos mase umanjuje relativno kratkotrajnom elektrolizom (Švarc-Gajić, 2006).

Ako se u toku elektrolize na elektrodi redukuje supstanca iz rastvora, elektrodna reakcija se može prikazati jednačinom:



Kako je proces difuzije sporiji od elektrodne reakcije, koncentracija oksidovanog oblika supstance (Ox) na površini elektrode stalno opada i dolazi do sve veće razlike u koncentraciji elektroaktivne vrste u okolini radne elektrode i u rastvoru. Posledica ovoga je da potencijal elektrode zauzima sve negativnije vrednosti kako bi se elektroliza pri konstantnoj struji i dalje odvijala (Jovanović, 1978). Promena potencijala elektrode, sve dok je koncentracija oksidovanog oblika supstance na njenoj površini različita od nule, može se definisati Nernstovim izrazom (Galus, 1994):

$$E = E^\theta + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}(0,t)}{C_{Red}(0,t)} \quad (2)$$

gde su:

E – potencijal elektrode u stanju ravnoteže (V),

E^θ – standardni redoks potencijal (V),

R – univerzalna gasna konstanta (J/mol·K),

n – broj elektrona koji se razmeni u elektrodnoj reakciji,

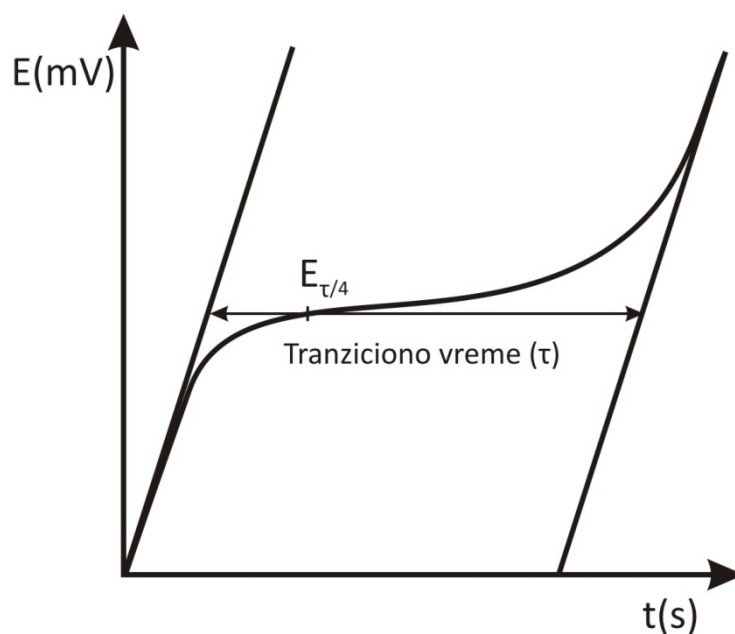
F – Faradejeva konstanta (C/mol),

$C_{Ox}(0, t)$ – koncentracija oksidovanog oblika supstance na površini elektrode u vremenu t (mol/dm³), i

$C_{Red}(0, t)$ – koncentracija redukovanog oblika supstance na površini elektrode u vremenu t (mol/dm^3).

U momentu maksimalne koncentracione polarizacije, odnosno kada se na površini radne elektrode redukuje i poslednja količina elektroaktivne supstance, dolazi do skoka potencijala radne elektrode. Vreme koje je potrebno da u uslovima elektrolize pri konstantnoj struji koncentracija elektroaktivne vrste na površini radne elektrode padne na nulu, zove se vreme prelaza ili tranziciono vreme. U suštini, tranziciono vreme je vreme do nagle promene potencijala (Jovanović, 1978).

Kod hronopotenciometrijskih određivanja dobijeni analitički signal ima koordinate “*potencijal radne elektrode – vreme*”, i koristi se za kvalitativno i kvantitativno karakterisanje ispitivanog sistema (Slika 6). Vrednost tranzicionog vremena (τ) je kvantitativna, a potencijal koji donekle odgovara standardnom potencijalu ($E_{\tau/4}$) kvalitativna karakteristika ispitivane elektroaktivne vrste.



Slika 6. Hronopotenciogram.

S obzirom da se u hronopotenciometriji elektroliza odvija pri konstantnoj struji, fluks supstance koja se redukuje na površini elektrode je takođe konstantan i može se predstaviti sledećim izrazom (Galus, 1994):

$$\Phi(t) = D_{Ox} \left(\frac{\partial C_{Ox}(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} = \frac{i}{nFA} = \text{const.} \quad (4)$$

Ako se posmatra proces na površini elektrode na nultom rastojanju od elektrode ($x = 0$), iz ovog izraza se matematičkim transformacijama pri graničnim uslovima može dobiti zavisnost koncentracije supstance na površini elektrode od vremena (Galus, 1994):

$$C_{Ox}(0, t) = C_{Ox}^0 - 2\lambda \left(\frac{D_{Ox}t}{\pi} \right)^{1/2} \quad (5)$$

gde su:

$C_{Ox}(0, t)$ – koncentracija određivane supstance na elektrodi u vremenu t ,

C_{Ox}^0 – početna koncentracija određivane supstance,

$$\lambda = \frac{i}{nFA D_{Ox}}$$

n – broj elektrona koji reaguju po jedinici elektroaktivne vrste,

A – površina elektrode,

i – struja elektrolize, i

D_{Ox} – koeficijent difuzije određivane supstance.

U hronopotencijometriji se u cilju kvantitativnog određivanja meri tranziciono vreme, odnosno vreme elektrolize nakon kojeg koncentracija elektroaktivne vrste na površini elektrode padne na nulu. Matematički se to može opisati uslovom da je $C_{Ox}(0, \tau) = 0$. Uz uslov $C_{Ox}(0, \tau) = 0$ izraz 5 se može napisati na sledeći način :

$$C_{Ox}^0 - 2\lambda \left(\frac{D_{Ox}\tau}{\pi} \right)^{1/2} = 0 \quad (6)$$

Iz jednačine 6 sledi da je tranziciono vreme:

$$\tau^{1/2} = \frac{\pi^{1/2} D_{Ox}^{1/2} nFA}{2i} C_{Ox}^0 \quad (7)$$

Jednačina 7 je osnovna jednačina hronopotencijometrijske analize, i važi isključivo za uslove difuzionog prenosa mase elektroaktivne vrste do površine radne elektrode. Ova jednačina se često povezuje sa imenom Sand-a (Sand, 1901), pošto je on prvi put izveo.

Iz jednačine 7 sledi da je proizvod $I \cdot \tau^{1/2}$ ne zavisi od gustine struje u slučaju konstantne površine elektrode i konstantne koncentracije depolarizatora (Galus, 1994). Konstantnost proizvoda $I \cdot \tau^{1/2}$ važi samo u slučaju kada vreme trajanja elektrolize ne prelazi nekoliko

desetina sekundi i kada se elektrodni proces odvija u uslovima linearne difuzije. Pri dužem trajanju elektrolize proizvod $I \cdot \tau^{1/2}$ se uvećava zbog konvencije izazvane gradijentom gustine koji nastaje usled elektrodne reakcije (Galus, 1994).

Kada su n , F , A , D_{Ox} i i konstantne veličine tranziciono vreme je jednako:

$$\tau^{1/2} = K \cdot C_{Ox}^0 \quad (8)$$

Odnosno

$$\tau = K' \cdot C_{Ox}^0{}^2 \quad (9)$$

gde su K i K' koeficijenti proporcionalnosti.

Iz izraza 7 i 9 se vidi da vrednost analitičkog signala raste sa kvadratom koncentracije. Nelinearnost analitičkog signala od koncentracije u velikoj meri otežava praktičnu primenu hronopotenciometrije, naročito pri kvantitativnom određivanju.

Primenjujući Nernstov izraz može se izvesti funkcionalna zavisnost između potencijala radne elektrode (E) i vremena elektrolize (t) (Delahay & Mamantov, 1955):

$$E = E_{\tau/4} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\tau^{1/2} - t^{1/2}}{t^{1/2}} \quad (10)$$

gde je:

$$E_{\tau/4} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_{Red}}{D_{Ox}} \right)^{1/2} \quad (11)$$

E_0 – standardni normalni redoks potencijal ispitivanog sistema.

Osnovna kvalitativna karakteristika ispitivanog sistema u hronopotenciometriji je potencijal $E_{\tau/4}$ koji se uspostavlja se u trenutku $t = \tau/4$. U razblaženim rastvorima i u slučaju procesa sa reversnim prenosom naelektrisanja vrednost potencijala $E_{\tau/4}$ odgovara polarografskom polutalasnog potencijalu. Izraz (10) je izveden za uslove katodne polarizacije radne elektrode, odnosno ako se na radnoj elektrodi dešava redukcija ispitivane elektroaktivne vrste. U slučaju anodne polarizacije radne elektrode (oksidacija), izraz za potencijal se može prikazati jednačinom 12 (slično kao izraz 10, ali je znak ispred drugog člana minus):

$$E = E_{\tau/4} - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\tau^{1/2} - t^{1/2}}{t^{1/2}} \quad (12)$$

Za elektrodne procese u kojima je prenos naelektrisanja nereverzibilan, Delahay i Berzins (Delahay & Berzins, 1953) su izveli sledeću jednačinu:

$$E = \frac{RT}{\alpha nF} \ln \frac{nFAK^0 C^0}{i} + \frac{RT}{\alpha nF} \ln \left[1 - \left(\frac{t}{\tau} \right)^{1/2} \right] \quad (13)$$

gde su:

α – koeficijent prenosa naelektrisanja,

i – struja elektrolize (A),

K^0 – konstanta brzine reakcije za nereverzibilni proces (cm/s), i

C^0 – koncentracija analita.

U hronopotenciometrijskim određivanjima tranziciona vremena moraju biti relativno kratka, s obzirom da su teorijske osnove bazirane na činjenici da nema konvektivnog prenosa mase. Pri određivanju se mora voditi računa da ne dođe do mešanja rastvora jer se time i tranziciono vreme produžava. Mešanje rastvora može imati uticaja i na $E_{\tau/4}$, a uticaj je izraženiji ako je tranziciono vreme duže.

Hronopotenciometrija se uglavnom koristi za kvantitativno određivanje metala. Međutim, pored redukcije metalnih jona, na površini radne elektrode se mogu dešavati reakcije oksidacije ili redukcije drugih elektroaktivnih supstanci. Neke organske supstance se mogu oksidovati ili redukovati na radnoj elektrodi, tako da se hronopotenciometrija može primeniti ne samo za određivanje metala, nego i za analizu velikog broja organskih supstanci koje direktno ili indirektno učestvuju u elektrodnim reakcijama (Švarc-Gajić *et al.*, 2008; Stojanović, 2007; Novakov, 2010; Savić, 2010).

2.3.3 Elektrodni procesi sa učešćem više elektroaktivnih vrsti

Sve prethodne prikazane relacije se odnose na slučaj kada je u ispitivanom rastvoru prisutna samo jedna supstanca koja učestvuje u elektrodnoj reakciji. Definisane hronopotenciometrijskog procesa je znatno složenije u prisustvu dve ili više elektroaktivnih vrsti. Berzins i Delahay (Berzins & Delahay, 1953) su izveli jednačinu tranzicionog vremena za slučaj dva depolarizatora:

$$(\tau_1 + \tau_2)^{1/2} - \tau_1^{1/2} = \frac{\pi^{1/2} n_2 F D_2^{1/2} A}{2i} C_2 \quad (14)$$

gde su τ_1 i τ_2 tranziciona vremena prvog i drugog depolarizatora.

Zavisnost prvog tranzicionog vremena τ_1 od koncentracije analita data je Sand-ovom jednačinom (7) a analogno njoj u slučaju dva depolarizatora ($\tau_1 + \tau_2$) važi sledeća jednačina (15):

$$(\tau_1 + \tau_2) = \frac{\pi F^2 A^2}{4i^2} (n_1 D_1^{1/2} C_1 + n_2 D_2^{1/2} C_2)^2 \quad (15)$$

Na osnovu jednačine (15) sledi relacija:

$$\tau_2 = \frac{\pi F^2 A^2}{4i^2} (2n_1 n_2 (D_1 D_2)^{1/2} C_1 C_2 + n_2^2 D_2 C_2^2) \quad (16)$$

Dalje na osnovu jednačine 7 i 16 uz uslov da je $C_1 = C_2$ i $D_1 = D_2$ važe relacije:

$$\tau_1 = \frac{\pi F^2 A^2}{4i^2} D C^2 \quad (17)$$

$$\tau_2 = \frac{\pi F^2 A^2}{4i^2} D C^2 (2n_1 n_2 + n_2^2) \quad (18)$$

Deljem jednačine 18 i 17 dobija se sledeća zavisnost (Delahay & Mamatov, 1955):

$$\frac{\tau_2}{\tau_1} = 2 \frac{n_2}{n_1} + \left(\frac{n_2}{n_1} \right)^2 \quad (19)$$

Ako oba depolarizatora u elektrodnim reakcijama razmene isti broj elektrona ($n_1 = n_2$), iz jednačine 19 dobija se da je $\tau_2 = 3\tau_1$, čime se dokazuje da se tranziciono vreme druge reakcije produžava, i da zavisi od koncentracije supstance koja se prva depolarizuje. Usled ovog fenomena moguće je povećati relativnu osetljivost dodatkom supstance čija će se reakcija odvijati pre reakcije analita, jer će to uzrokovati povećanje analitičkog signala određivane supstance.

U slučaju prisustva više elektroaktivnih vrsta važi opšta relacija (Relley, Everet & Johns, 1955):

$$(\tau_1 + \tau_2 + \dots + \tau_N)^{1/2} - (\tau_1 + \tau_2 + \dots + \tau_{N-1})^{1/2} = \frac{\pi^{1/2} n_N F D_N^{1/2} A C_N}{2i} \quad (20)$$

gde je N broj prisutnih elektroaktivnih vrsti.

2.3.4 Instrumentacija za hronopotenciometriju

Sve do pojave integrisanih kola, odnosno operacionih pojačavača koji su omogućili izgradnju veoma stabilnih izvora konstantne struje, instrumentacija za hronopotenciometriju bila je tehnički veoma složena. Pored toga, kako je u ovoj tehnici od bitne važnosti merenje vremena (koje može da iznosi samo nekoliko delova sekunde) sa promenom potencijala, u početku je manuelno uključivanje i isključivanje hronometra bilo jedno od glavnih izvora grešaka. Sa razvojem mikroprocesora i kompjutera, ovaj problem je gotovo u potpunosti prevaziđen. Ako je proces koji se dešava na površini elektrode reverzibilan, hronopotenciometrijska kriva nije deformisana kapacitetnim efektima i efektima promene stanja površine radne elektrode za vreme procesa, tako da je određivanje tranzicionog vremena veoma jednostavno.

U hronopotenciometriji se koriste elektrohemijske ćelije sa tri elektrode. Potencijal radne elektrode meri se u odnosu na referentnu, a struja teče između radne i pomoćne elektrode. Na ovaj način se sprečava polarizacija referentne elektrode. Najčešće korišćene referentne elektrode su kalomelova i srebro-srebrohloridna, a kao pomoćna elektroda gotovo isključivo se koristi platinska. Kao radne elektrode u hronopotenciometriji se koriste živine i čvrste radne elektrode. Čvrste elektrode se izrađuju od plemenitih metala (Pt, Au) ili različitih modifikacija ugljenika. Čvrsta elektroda od staklastog ugljenika se najčešće koristi kao radna elektroda (Švarc-Gajić *et al.*, 2008), ali i kao inertni nosač tankoslojnih elektroda.

2.4 Kombinovani elektrohemijski procesi

Mnoge elektroanalitičke metode, pogotovo difuzione metode, pored elektrodnih reakcija veoma često uključuju i hemijske reakcije. U hemijskim reakcijama mogu učestvovati reaktanti ili produkti elektrodnih reakcija, a u elektrodnim reakcijama, mogu učestvovati reaktanti ili produkti hemijskih reakcija. Ovi kombinovani procesi se označavaju terminom „kinetički procesi“ (Marjanović, 1979). Za definisanje kinetičkih procesa i razjašnjavanje mehanizma kinetičkih procesa najčešće se koriste difuzione elektroanalitičke metode kao što su polarografija, hronopotenciometrija, ciklična hronopotenciometrija i ciklična voltometrija. Pri analitičkim određivanjima, kinetički procesi i mehanizmi elektrodnih reakcija su veoma bitni jer u osnovi oni predstavljaju mehanizme generisanja signala.

Uobičajeno je da se mehanizmi elektrodnih procesa, odnosno različite moguće reakcione šeme označavaju kombinacijom skraćenica E i C koje ukazuju na prirodu posmatranog procesa (Wang, 2000; Bard & Faulkner, 2001). Simbol E označava elektrodnu reakciju, dok simbol C predstavlja hemijsku reakciju u homogenom sistemu. Jednostavne elektrodne reakcije izmene naelektrisanja se odvijaju E mehanizmom, i mogu se opisati opštom reakcionom šemom datom jednačinom (1).

Ukoliko se na površini elektrode i u njoj neposrednoj blizini odigrava više elektrodnih i hemijskih reakcija, reakcioni mehanizmi uključuju i opis hemijskih procesa. Opšti elektrohemijski reakcioni mehanizmi koji uključuju i hemijske reakcije su prikazani u Tabeli 3.

Tabela 3. Kombinovani elektrohemijski mehanizmi (Wang, 2000; Bard & Faulkner, 2001).

Oznaka	Elektrohemijski mehanizam	Opis	
EE	$A + e^- \rightleftharpoons B$ E_1^0 $B + e^- \rightleftharpoons C$ E_2^0	Proizvod prve elektrodne reakcije može da učestvuje u drugoj elektrodnoj reakciji, pri čemu se drugi prenos elektrona odvija pri pozitivnijim ili negativnijim potencijalima u odnosu na prvi korak.	
EC (ErCr ili ErCi)	ErCr a) $Ox + n e^- \rightleftharpoons Red$ $Red \rightleftharpoons Y$ b) $Ox + n e^- \rightleftharpoons Red$ $Red + X \rightleftharpoons Y$	ErCi a) $Ox + n e^- \rightleftharpoons Red$ $Red \rightarrow Y$ b) $Ox + n e^- \rightleftharpoons Red$ $Red + X \rightarrow Y$	Reversan prenos naelektrisanja i povratna hemijska reakcija nakon (ErCr) ili reversan prenos naelektrisanja i nepovratna hemijska reakcija nakon (ErCi).
EC'	$Ox + n e^- \rightleftharpoons Red$ $Red + Z \rightarrow Ox + Y$	Specifična grupa EC procesa koji se nazivaju katalitički procesi i uključuju reakciju redukovanog oblika <i>Red</i> sa vrstom Z koja nije elektroaktivna, pri čemu se regeneriše polazni oblik <i>Ox</i> .	
CE (CrEr ili CrEi)	CrEr a) $Y \rightleftharpoons Red$ $Red \rightleftharpoons Ox + n e^-$ b) $X + Y \rightleftharpoons Red$ $Red \rightleftharpoons Ox + n e^-$	CrEi a) $Y \rightleftharpoons Red$ $Red \rightarrow Ox + n e^-$ b) $X + Y \rightleftharpoons Red$ $Red \rightarrow Ox + n e^-$	Povratna hemijska reakcija pre reversnog prenosa naelektrisanja (CrEr) ili povratna hemijska reakcija pre ireversnog prenosa naelektrisanja (CrEi).
ECE	$Red_1 \rightleftharpoons Ox_1 + n_1 e^-$ $Ox_1 \rightarrow Red_2$ $Red_2 \rightleftharpoons Ox_2 + n_2 e^-$	Nakon prve elektrodne reakcije se odigrava hemijska reakcija u kojoj se generiše nova elektroaktivna vrsta koja podleže transformaciji u drugoj elektrodnoj reakciji.	
CEC	$X \rightleftharpoons Ox$ $Ox + n e^- \rightleftharpoons Red$ $Red \rightleftharpoons Y$	Nakon prve hemijske reakcije se odigrava elektrodna reakcija, koju prati druga hemijska reakcija.	

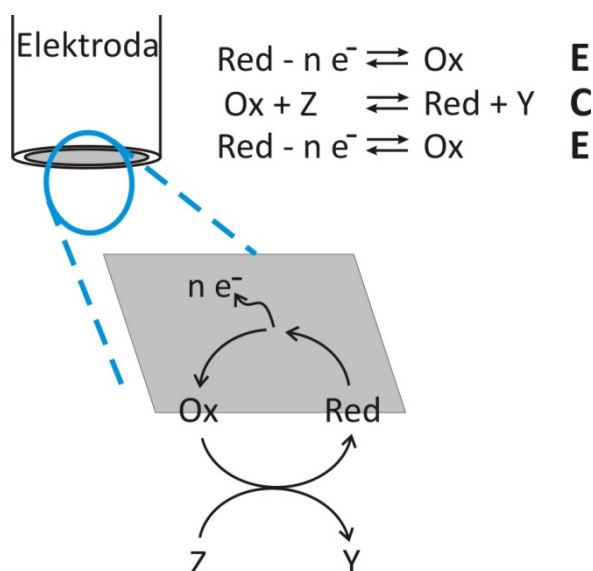
Iz tabele 3 se može videti da elektrodni mehanizmi obuhvataju veoma veliki broj kombinacija elektrodnih i hemijskih reakcija. EE, CE i EC procesi su najjednostavniji procesi. Kod EE procesa produkt prve elektrodne reakcije podleže daljoj transformaciji u drugoj elektrodnoj reakciji. U okviru EE procesa, od posebnog značaja su oni procesi u kojima se drugi prenos elektrona (druga elektrodna reakcija) odvija termodinamički lakše nego prvi. Uopšteno, molekuli ili atomi razmenom elektrona prelaze u vrste koje se dalje mnogo teže elektrohemijski transformišu. Naime, oblik supstance X je mnogo teže redukovati od oblika X . Takođe u slučaju oksidacije, oblik X^+ je mnogo teže oksidovati od oblika X . Međutim, ako je prvi elektronski prenos praćen značajnim strukturnim promenama ili velikom promenom u rastvorljivosti, može doći do promene standardnog potencijala elektrodnih reakcija i lakšeg odvijanja druge elektrodne reakcije (Bard & Faulkner, 2001). U slučaju EC procesa, produkt elektrodne reakcije reaguje dalje u hemijskoj reakciji pri čemu nastaje vrsta koja nije elektrodno aktivna pri potencijalima pri kojima se odvija prva elektrodna reakcija. Poseban EC' mehanizam je katalitička regeneracija prvobitnog oblika elektroaktivne vrste u toku hemijskog koraka. Ukoliko je vrsta Z (Tabela 3) prisutna u velikom višku u odnosu na vrstu Ox , onda je hemijska reakcija u drugom stupnju pseudo-prvog reda. U tipovima reakcija CE, elektroaktivna vrsta se generiše u hemijskoj reakciji koja predhodi elektrodnoj reakciji.

Složeniji kinetički procesi obuhvataju procese u kojima se sukcesivno dešavaju elektrodna, hemijska i, na kraju, ponovo elektrodna reakcija (ECE mehanizam) ili obrnuto (CEC mehanizam).

2.4.1 Katalitički procesi

Katalitički kinetički procesi su od velikog praktičnog značaja u elektroanalitici. Ovi procesi se mogu izučavati u više grupa i najčešće obuhvataju procese koji se dešavaju po CEC ili ECE mehanizmu, s tim da elektrodne reakcije kod drugog tipa mogu biti identične ili različite.

U najjednostavnijem slučaju, ako se posmatra ECE proces, s tim da su obe elektrodne reakcije identične (EC' proces), katalitički proces se može prikazati kao na slici 7.



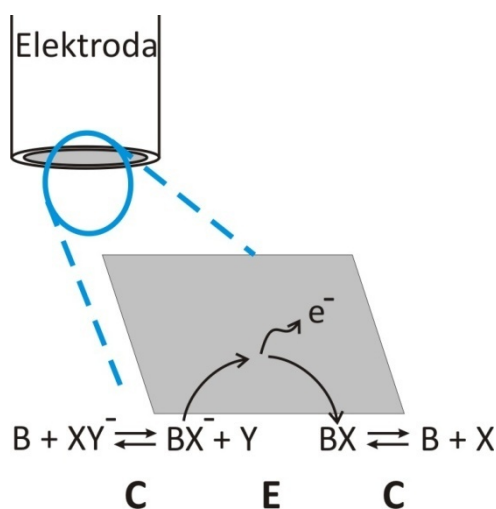
Slika 7. Reakcioni mehanizam katalitičkog ECE procesa.

U ovom slučaju, produkt elektrodne reakcije oksiduje elektro-neaktivan molekul Z, uz regenerisanje reaktanta elektrodne reakcije. Proces se opisuje na ovaj način ako supstanca Z ne može samostalno da reaguje sa radnom elektrodom i tada redoks par *Red/Ox* služi kao prenosilac elektrona sa elektrode na redoks par *Z/Y*. Usled hemijske reakcije u drugom stupnju koja se odigrava u neposrednoj blizini površine elektrode stvara se povećana koncentracija supstance *Red*, koja, ponovnom reakcijom sa elektrodom i pri istom potencijalu radne elektrode, uzrokuje povećanje analitičkog signala u odnosu na signal u odsustvu substrata. Uopšteno rečeno, pri istim eksperimentalnim uslovima bez obzira koja difuziona elektroanalitička tehnika se koristi, krajnji efekat ovih procesa se ogleda u povećanju kvantitativnih karakteristika. Pored ove prednosti, ECE procesi pružaju mogućnost određivanja i vrsti koje nisu elektroaktivne. Naime, primenom elektroaktivnog *Red/Ox* sistema može se posredno određivati i Z vrsta koja može ali i ne mora biti elektroaktivna. U praksi se takođe ECE reakcioni mehanizmi primenjuju kada Z vrsta elektrohemijski reaguje pri nepovoljnim uslovima potencijala. Tada je moguće Z vrstu posredno oksidovati pri mnogo umerenijim potencijalima, izbegavajući mnoge praktične probleme vezane za primenu izuzetno pozitivnih potencijala (građenje kiselih kompleksa, oksidacija elektrodnog materijala). I u ovom slučaju, pored snižavanja potencijala vrste Z jako često je pridružen i efekat povećanja osetljivosti određivanja.

U elektroanalitičkoj praksi katalitički ECE procesi se označavaju kao posredovane reakcije („mediated reactions“) dok se u elektrohemijskoj tehnologiji mnogo češće nazivaju indirektno elektrodne reakcije (Pletcher, 2009).

Kod druge grupe katalitičkih procesa koji se dešavaju po CEC mehanizmu, supstrat XY je elektroaktivan, dok je katalitička supstanca B elektrodno neaktivna. U ovom slučaju u elektrodnoj reakciji učestvuje reakcioni kompleks (BX), koji se stvara u prethodnoj hemijskoj reakciji iz katalitičkog agensa (B) i supstrata (XY). Elektrodnom reakcijom nastalog reakcionog kompleksa (BX) nastaje produkt (BX), koji u sledećoj hemijskoj reakciji ponovo oslobađa katalitički agens B , a zatim se ciklus ponavlja.

Katalitički proces u kome kao krajnji produkt nastaje oksidovani oblik supstrata, može se prikazati reakcionom šemom kao na slici 8.



Slika 8. Reakcioni mehanizam katalitičkog CEC procesa.

Krajnja faza katalitičkog CEC procesa je oksidacija supstrata X^- ($X^- - e^- \rightarrow X$) (Slika 8) koja je moguća i bez prisustva katalitičkog agensa B , međutim njegova primena znatno snižava potencijal elektrodnih procesa.

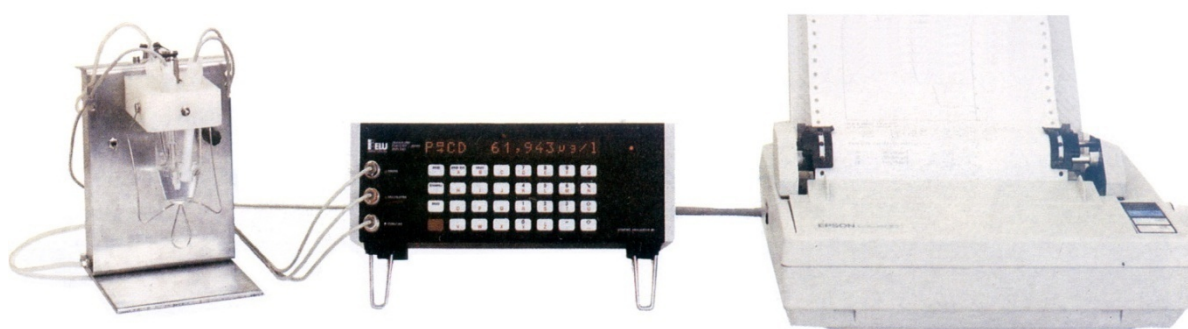
Iako postoje značajne razlike, kod oba katalitička procesa, ECE i CEC, sistemi *Red/Ox* i B imaju uloge slične katalizatorima u katalizovanim procesima.

Iz svega navedenog se može zaključiti da su u elektroanalitičkim određivanjima katalitički elektrodni procesi veoma bitni, s jedne strane što omogućavaju elektrohemijsko određivanje supstanci koje nisu elektrohemijski aktivne i s druge strane što, u slučaju elektroaktivnih supstanci omogućavaju određivanje uz mnogo veću osetljivost i pri znatno nižim vrednostima potencijala radne elektrode.

3 EKSPERIMENTALNI DEO

3.1 Instrumentacija

Sva elektrohemijska ispitivanja u ovom radu su izvedena uz primenu sistema za elektrohemijsku analizu domaće konstrukcije i proizvodnje (Tehnološki fakultet, Novi Sad i "Elektrouniverzal", Leskovac). Sistem za automatsku elektrohemijsku analizu sastoji se iz tri dela: osnovni deo, procesni deo i štampač (Slika 9).



Slika 9. Sistem za elektrohemijsku analizu.

Osnovni deo čini elektrohemijski uređaj M1, visokoautomatizovani instrument sa mikroprocesorskim vođenjem celog procesa, koji je izrađen na bazi analognih i digitalnih integrisanih kola. Analizator pruža mogućnost za potenciometrijsku i hronopotenociometrijsku striping analizu, hronopotenociometriju, kao i za elektrolizu pri konstantnom potencijalu ili pri konstantnoj struji. Vrednosti potencijala koji se mogu saopštiti su u opsegu od -2 V do +2 V, a konstantne struje od -50 μA do +50 μA . Tačnost zadavanja potencijala i struje definisana je greškom od $\Delta E < \pm 2$ mV, odnosno $\Delta i < \pm 0,2$ μA . Uređaj ima program za automatsko određivanje kvalitativnih i kvantitativnih veličina uz računanje sadržaja analita. Kvalitativna karakteristika analita je srednja vrednost potencijala platoa potenciograma ili hronopotenociograma. Rezolucija merenja potencijala iznosi $\Delta E < \pm 2$ mV. Kvantitativna karakteristika analita određuje se merenjem vremena između dve prevojne tačke signala odziva, uz tačnost definisanu greškom $\Delta t = 50$ ms. Postoji mogućnost automatske kalibracije vrednosti struja i potencijala, kao i „memorisanja“ rezultata poslednje analize. Pored navedenog, analizator upozorava analitičara u slučaju pogrešnog saopštavanja parametara analize i eventualnih neregularnosti tokom elektrohemijskog procesa. Nakon svake urađene analize, analizator daje informacije o njenoj ispravnosti, odnosno o vrsti i stepenu smetnje.

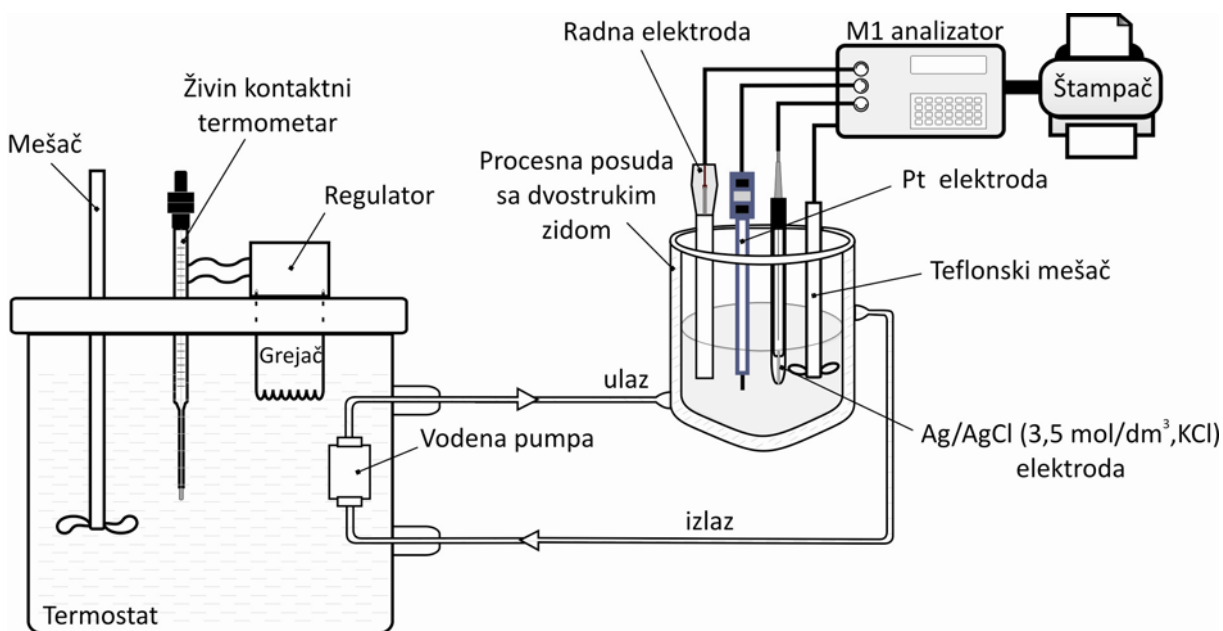
Procesni deo čini mehanička mešalica sa teflonskim mešačem i elektromagnetnim ventilom, procesna posuda, i elektrodni sistem koji obuhvata radnu, referentnu i pomoćnu elektrodu. Mehanička mešalica sa teflonskim mešačem omogućava reproduktivno mešanje rastvora. Elektromagnetni ventil koji je u sklopu sa analizatorom pruža mogućnost uvođenja inertnog gasa (za deaeraciju) u elektrohemijsku ćeliju. Rad mehaničke mešalice kao i elektromagnetnog ventila u potpunosti je kontrolisan osnovnim delom sistema. Korisnik sa sistemom za elektrohemijsku analizu komunicira preko ekrana sa svetlećim diodama i preko štampača (Epson LX-850).

Kao radne elektrode korišćene su tankoslojna živina elektroda, tankoslojna niklova elektroda i čvrsta zlatna planarna disk elektroda. Kao nosač tankog sloja žive i nikla korišćena je planarna disk elektroda od staklastog ugljenika ("Sigradur" G, $d = 3 \text{ mm}$) (GCE – *Glassy carbon electrode*) napravljena utiskivanjem cilindra od staklastog ugljenika pri povišenim temperaturama u teflonski nosač spoljašnjeg prečnika $D = 8 \text{ mm}$. Čvrsta zlatna planarna disk elektroda napravljena je na isti način, utiskivanjem cilindra od zlata ($d = 3 \text{ mm}$). Površine diskova (aktivne površine elektroda) iznosile su $7,07 \text{ mm}^2$.

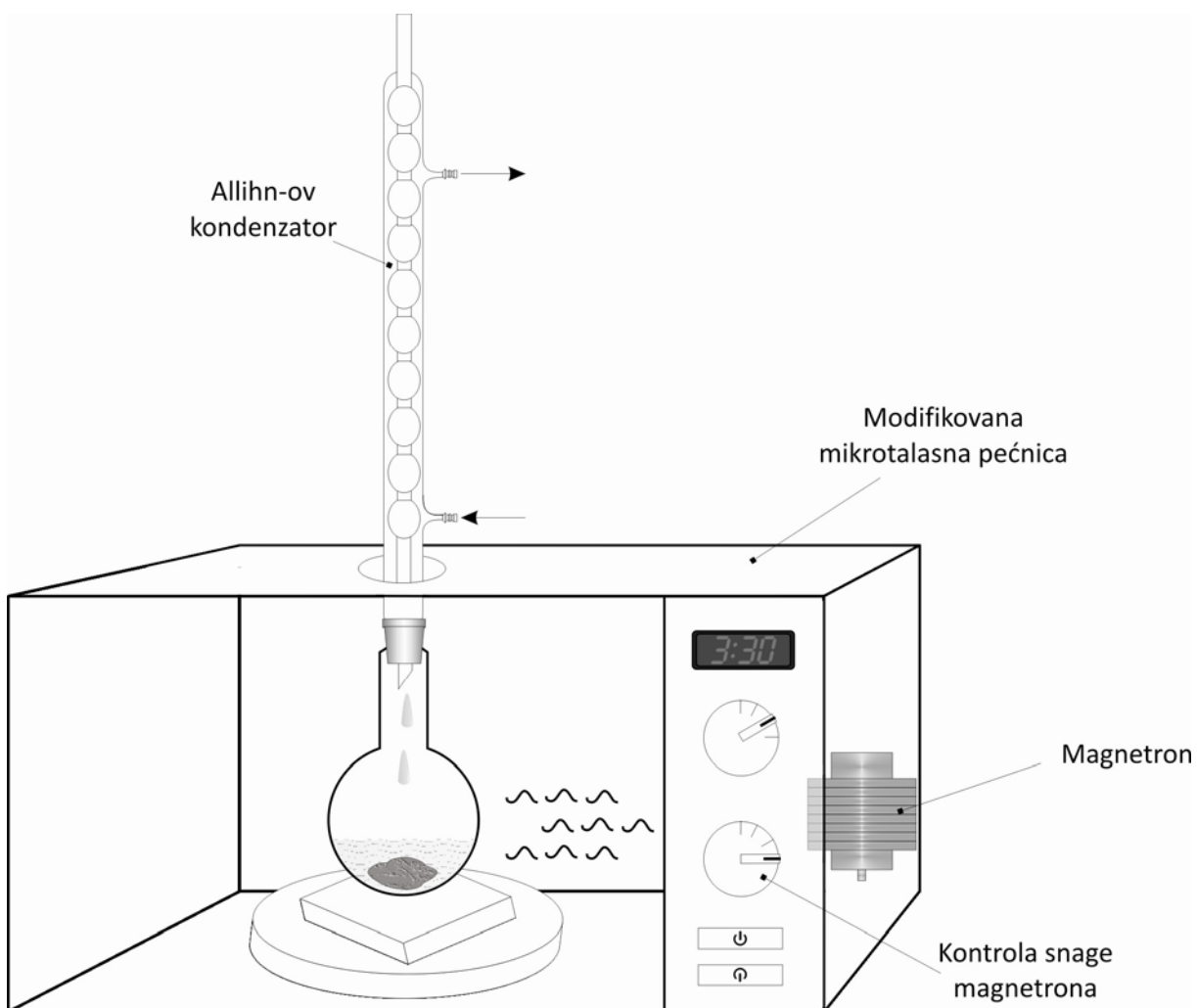
U svim ispitivanjima je korišćena referentna Ag/AgCl ($3,5 \text{ mol/dm}^3$, KCl) elektroda i sve vrednosti potencijala u ovom radu su date u odnosu na ovu referentnu elektrodu. Platinska žica ($\varnothing 0,7 \text{ mm}$, $l = 7 \text{ mm}$) ugrađena u stakleni nosač je korišćena kao pomoćna elektroda.

Za izvođenje eksperimenata pri kontrolisanim temperaturama korišćen je termostat Ultra-Kryostat MK 70, MLW Nemačka. Šema aparature za hronopotenciometrijsko merenje pri konstantnoj temperaturi je prikazana na slici 10. Na slici 10 se može videti i elektrohemijska ćelija sa elektrodnim sistemom.

Za mikrotalasnu ekstrakciju korišćena je modifikovana mikrotalasna pećnica za domaćinstvo (LG 800 W). Šema aparature je data na slici 11. Kako bi se omogućilo povezivanje ekstrakcione posude koja se nalazi unutar mikrotalasne pećnice sa Allihn-ovim hladnjakom koji ne sme biti u zoni dejstva mikrotalasa, na gornjem delu mikrotalasne pećnice napravljen je otvor prečnika 30 mm. Kroz otvor je provučen donji deo Allihn-ovog hladnjaka, koji se povezuje sa ekstrakcionom posudom. Umesto rotirajućeg postolja, u mikrotalasnu pećnicu je postavljena Petri ploča ($D = 190 \text{ mm}$, $H = 45 \text{ mm}$), a kao pomoćni držač ekstrakcione posude korišćeno je kućište od stiropora.



Slika 10. Šema aparature za hronopotenciometrijsko merenje pri konstantnoj temperaturi.

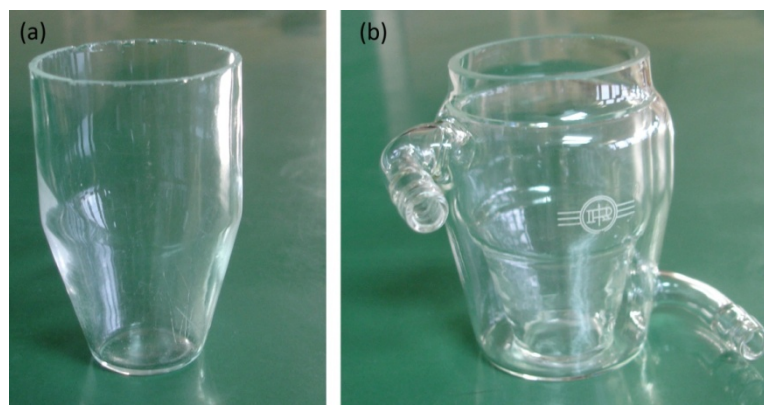


Slika 11. Šema aparature za mikrotalasnu ekstrakciju u otvorenom sistemu.

Pored navedenog, u radu su korišćeni ultrazvučno kupatilo sa radnom frekvencijom od 30 kHz i snagom od 500 W (Iskra, Šentjernej, Slovenija), rotacioni vakuum uparivač (Rotavapor-R, Büchi, Switzerland), optički mikroskop (Leica, Wetzlar, Nemačka), foto-aparat (Canon S50), bidestilator (MonoDest 3000, Brand, Nemačka), ultraturax homogenizer (Janke-Kunkel, Nemačka), kuhinjski mlin (MKM 6000, Bosch, Minhen, Nemačka), sušnica, analitička i tehnička vaga (Mettler).

3.2 Pribor i posuđe

U svim određivanjima korišćeno je uobičajeno laboratorijsko posuđe i pribor (propipete, pipete, mikropipete, normalni sudovi i dr.). Za elektrohemijska merenja su korišćene klasične procesne posude u vidu čaše od stakla sa konusnim reakcionim delom zapremine oko 50 cm³ (Slika 12a). Pri izvođenju eksperimenata pri kontrolisanoj temperaturi korišćene su procesne posude od kvarcnog stakla sa dvostrukim zidom, istog oblika i zapremine radnog dela posude kao i klasične procesne posude (Slika 12b).



Slika 12. Procesne posude za elektrohemijska merenja: a) klasična procesna posuda; b) procesna posuda sa dvostrukim zidom.

Posuđe je prano deterdžentom i ispirano česmenskom vodom, razblaženom azotnom kiselinom ($\text{HNO}_3 : \text{H}_2\text{O} = 1 : 1, \text{v/v}$), destilovanom i bidestilovanom vodom.

3.3 Hemikalije i rastvori

U eksperimentalnom radu je korišćen standard histamin-dihidrohlorid, proizvođača Fluka A.G., Švajcarska. Proizvođač sumporne, perhlorne i azotne kiseline „suprapure“ čistoće je Merck, Darmstadt, Nemačka. Sve ostale hemikalije korišćene u eksperimentalnom radu bile su analitičkog stepena čistoće. Korišćeni izopropanol, etanol, metanol, amonijum-hidroksid, n-butanol, etil-acetat, aceton, hloroform, sirćetna kiselina, trihlor-sirćetna kiselina i Britton-Robinson puferi (pH 9, pH 10 i pH 12) su proizvedeni u „Zorki“, Šabac, Srbija. Proizvođač natrijum-citrata x 2 H₂O je Laphoma, Skoplje, Makedonija, a ninhidrina i nikel-sulfata je Kemika, Zagreb, Hrvatska. Standardi aminokiselina, elementarna živa i Al₂O₃ (0,05 μm) su proizvedeni u Merck-u. Silikagel G (Kieselgel G) proizvođača Macherey-Nagel, Düren, Nemačka, je korišćen za tankoslojnu hromatografiju, dok je silikagel (Kieselgel 60) proizvođača LGC Promochem, Wesel, Nemačka, korišćen za kolonsku hromatografiju. Natrijum-monohidrogen-fosfatni i natrijum-dihidrogen-fosfatni puferi su proizvedeni u Centrohemu, Stara Pazova, Srbija. Proizvođač neutralnog, anjontropnog i katjontropnog Al₂O₃ je M. Woelm Eschwege, Nemačka.

Osnovni standardni rastvor histamina sadržaja 2 g/dm³ pripremljen je rastvaranjem odgovarajuće mase histamin-dihidrohlorida u bidestilovanoj vodi. Radni rastvori histamina određene koncentracije pripremani su razblaživanjem osnovnog standardnog rastvora bidestilovanom vodom neposredno pred svaku analizu. Rastvor Hg²⁺ jona (2 g/dm³) za formiranje tankoslojne živine elektrode pripremljen je rastvaranjem elementarne žive u 3 cm³ azotne kiseline uz zagrevanje i razblaživanje bidestilovanom vodom. Standardni rastvori aminokiselina (2 g/dm³) su pripremani rastvaranjem u 0,1 mol/dm³ HCl. 0,5% rastvor ninhidrina je pripreman rastvaranjem ninhidrina u smeši rastvarača aceton : izopropanol = 1 : 1 (v/v). Svi osnovni rastvori su čuvani na 4°C u mraku pre izvođenja eksperimenata.

3.4 Formiranje i priprema radnih elektroda

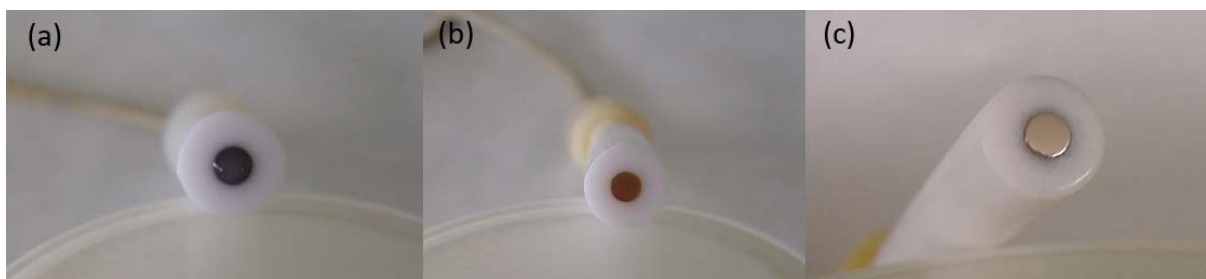
Radi obnavljanja površine GCE, elektroda je polirana vodenom suspenzijom Al₂O₃ prečnika čestica 0,05 μm, na početku gušćom uz postepeno razređivanje suspenzije. Nakon poliranja elektroda je detaljno ispirana pod mlazom bidestilovane vode, a zatim, radi uklanjanja nečistoća i eventualno zaostalih čestica Al₂O₃ tretirana u ultrazvučnom kupatilu u toku 10 min u rastvoru etanol : bidestilovana voda (1 : 1, v/v). Nakon toga, primenjena je i

elektrohemijska aktivacija elektrode saopštavanjem konstantne struje od $7 \mu\text{A}$ u 10 ciklusa u intervalu od $-0,7 \text{ V}$ do $0,7 \text{ V}$, u rastvoru $0,005 \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$. U istom rastvoru je testiran i proveravan kvalitet površine staklastog ugljenika. U slučaju dobrog kvaliteta površine staklastog ugljenika, test je morao biti završen za najviše 5 s. Nakon toga, površina GCE je mehanički čišćena filter-hartijom nakvašenom acetonom, a zatim bidestilovanom vodom. Testiranje kvaliteta GCE elektrode koja je korišćena za deponovanje žive je izvođeno na početku svakog radnog dana, a poliranje se izvodilo po potrebi, kada je uočen pad reproduktivnosti određivanja i oštine analitičkog signala, kao i onda kada rezultati testa elektrode nisu bili zadovoljavajući. GCE elektroda koja je korišćena za deponovanje nikla je polirana pre svakog formiranja filma nikla.

Tankoslojna živina elektroda (Slika 13a) je formirana elektrodepozicijom žive na površinu GCE pri konstantnoj struji. Rastvor za depoziciju sadržao je $2 \text{ g/dm}^3 \text{ Hg}^{2+}$ jona i 50 mm^3 koncentrovane HCl. Deponovanje žive je izvođeno primenom struje elektrolize od $-50 \mu\text{A}$, dok je vreme deponovanja iznosilo 240 s. Rastvor za deponovanje je intenzivno mešan tokom formiranja tankog sloja žive. Prva analiza na sveže formiranoj živinoj elektrodi nije uzimana u obzir.

Priprema Au elektrode (Slika 13b) je obuhvatala poliranje ređom vodenom suspenzijom Al_2O_3 , pranje elektrode bidestilovanom vodom i ultrazvučno čišćenje u bidestilovanoj vodi u trajanju od 5 min. Elektrohemijska aktivacija je izvođena saopštavanjem konstantne struje od $7 \mu\text{A}$ u 10 ciklusa u intervalu potencijala od $-0,7 \text{ V}$ do $1,35 \text{ V}$, u rastvoru $0,005 \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$. Zlatna elektroda je polirana pre svakog radnog dana ili po potrebi češće kada je uočen pad reproduktivnosti određivanja i oštine analitičkog signala. Mehaničko čišćenje filter-hartijom nakvašenom bidestilovanom vodom je izvođeno više puta u toku dana.

S obzirom da niklova elektroda nije uobičajena i da se retko koristi u elektrohemiji, uslovi formiranja tankoslojne niklove elektrode (Slika 13c) su optimizovani u okviru ovog rada. Postupak optimizacije i detaljan opis primenjenih uslova su dati u poglavlju „Rezultati i diskusija“. Tankoslojna niklova elektroda je formirana elektrodepozicijom nikla na površinu GCE pri konstantnom potencijalu. Deponovanje nikla je izvođeno pri optimalnom potencijalu od $-1,5 \text{ V}$ i vremenu elektrolize od 240 s, uz intenzivno mešanje rastvora. Rastvor za deponovanje nikla je sadržao $30 \text{ g/dm}^3 \text{ NiSO}_4$ i 20 g/dm^3 natrijum-citrata.



Slika 13. (a) Tankoslojna živina elektroda; (b) Čvrsta zlatna elektroda; (c) Tankoslojna niklova elektroda.

3.5 Uzorci

U okviru ove doktorske disertacije analizirano je ukupno 46 uzoraka različitih kategorija. Odabrani su uzorci u kojima se očekivao povećan sadržaj histamina. Uzorci su podeljeni u sledeće grupe: sirevi, fermentisane kobasice, konzervirane ribe i vina. Svi uzorci su uzorkovani sa tržišta iz različitih maloprodajnih objekata sa područja Novog Sada nekoliko dana pre analize, a do analize su čuvani u originalnim pakovanjima pri deklarisanim uslovima. U tabeli 4 je dat prikaz vrste uzoraka po grupama, kao i broj analiziranih uzoraka određene kategorije. U okviru iste kategorije uzoraka, analizirani su uzorci različitih proizvođača.

Tabela 4. Pregled analiziranih vrsta uzoraka po grupama.

Grupa uzoraka	Vrsta uzoraka	Broj uzoraka	Oznaka
Sirevi	Tvrđi sirevi		
	- Cheddar	4	1 - 4
	- Emmental	2	5, 6
	Meki sirevi		
	- Gorgonzola	2	7, 8
	- Camembert	2	9, 10
		Ukupno 10	
Vina	Bela vina	7	1 - 7
	Crna vina	5	8 - 12
		Ukupno 12	
Konzervirana riba	Tunjevina	7	1 - 7
	Sardina	5	8 - 12
		Ukupno 12	
Fermentisane kobasice	Peperoni	2	1, 2
	Čajna kobasica	2	3, 4
	Njeguška kobasica	2	5, 6
	Kulen	2	7, 8
	Piknik	2	9, 10
	Sremska kobasica	2	11, 12
		Ukupno 12	

3.5.1 Priprema uzoraka

Razvoj pripreme uzoraka za određivanje histamina je bio jedan od bitnijih elemenata ove doktorske disertacije, tako da je izvedeno ispitivanje koje je detaljnije opisano u poglavlju „Rezultati i diskusija“.

Prvi korak pri pripremi čvrstih uzoraka (sirevi, konzervirane ribe i fermentisane kobasice) je obuhvatao usitnjavanje u kuhinjskom mlinu i ekstrakciju, dok su tečni uzorci (vina) uparavani do suva. Za uparavanje je uzimano 30 cm³ vina. Nakon prvog koraka je sledio korak prečišćavanja preparativnom kolonskom ili tankoslojnom hromatografijom.

3.5.1.1 Ekstrakcija

Optimizacija postupka ekstrakcije histamina iz čvrstih uzoraka je obuhvatila odabir ekstragensa i ekstrakcione tehnike koja obezbeđuje najviši prinos histamina.

Pri ispitivanju ekstrakcione moći ekstragensa, poređeni su sledeći rastvarači: 0,1 mol/dm³ HClO₄, 0,1 mol/dm³ CH₃COOH, 0,1 mol/dm³ HCl, metanol, metanol : H₂O= 1 : 1 (v/v), etanol : H₂O= 1 : 1 (v/v) i butanol. Ekstrakcione tehnike koje su primenjene su uključile klasičnu refluks ekstrakciju, ekstrakciju uz intenzivno mešanje (Ultraturrax), mikrotalasnu i ultrazvučnu ekstrakciju. Masa od 25 g usitnjenog uzorka je merena u stakleni balon i zatim je dodavano 25 cm³ rastvarača. Ultrazvučna ekstrakcija je izvođena u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 10 min na 60°C uz korišćenje povratnog hladnjaka, dok je klasična refluks ekstrakcija izvođena u vodenom kupatilu na temperaturi od 80°C u trajanju od 1 h, takođe uz povratno hlađenje. Ekstrakcija uz intenzivno mešanje izvođena je primenom homogenizera „Ultraturrax“ tokom 10 min, pri maksimalnoj brzini obrtaja. Mikrotalasna ekstrakcija je izvođena pri snazi mikrotalasa od 320 W u trajanju od 10 min.

Nakon ekstrakcije izvođena je filtracija i odvajanje prvog ekstrakta, a zatim je postupak ekstrakcije ponovljen još jednom pri istim uslovima. Dobijeni ekstrakti su spojeni i koncentrovani na rotacionom vakuum uparivaču do suva.

3.5.1.2 Preparativna hromatografija na tankom sloju

Ploče za tankoslojnu hromatografiju su pripremane razvlačenjem 33% vodene suspenzije silika gela G (m/v) pomoću aplikatora, na staklene ploče dimenzija 20 x 20 cm. Debljina tankog sloja iznosila je 0,25 mm. Nakon nanošenja tankog sloja, ploče su preko noći sušene na vazduhu, a pre upotrebe dodatno aktivirane u sušnici na 100°C u trajanju od 1 h.

Startna linija je bila udaljena 1 cm od ivice ploče. Pri hromatografisanju ploče su postavljane vertikalno u komoru za hromatografisanje i razvijane jednodimenzionim i dvodimenzionim postupkom. Hromatografisanje je izvođeno na sobnoj temperaturi u pravcu u kome je sloj bio razvučen i to uzlaznom tehnikom. Kod dvodimenzionalnog postupka, nakon hromatografisanja u jednom smeru, ploče su vađene iz komore, sušene u sušnici u trajanju od 15 min na 100°C, a zatim, okretanjem ploče za 90° je ponovljeno hromatografisanje.

Pri optimizaciji uslova hromatografskog razdvajanja na ploče je nanošeno 500 µl model smeše histamina i 20 aminokiselina. Ispitana je efikasnost razdvajanja histamina od prirodnih aminokiselina uključujući arginin, histidin, leucin, izoleucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, valin, alanin, asparagin, asparaginska kiselina, cistein, glutamin, glutaminska kiselina, glicin, prolin, serin i valin. Ukupna koncentracija aminokiselina u model smeši je iznosila 1000 mg/dm³ (koncentracija pojedinih aminokiselina je iznosila 50 mg/dm³), dok je koncentracija histamina iznosila 400 mg/dm³. Kod jednodimenzionog postupka na

ploču su, pored model smeše, nanošeni standardi aminokiselina i histamina pojedinačno na odvojena startna mesta. Ploče su razvijane sledećim mobilnim fazama:

- etil-acetat : metanol : NH₃ (4 : 3 : 2, v/v/v)
- hloroform : metanol : NH₃ (2 : 2 : 1, v/v/v)
- metanol : NH₃ (20 : 1, v/v)
- aceton : NH₃ (95 : 5, v/v)

Kod dvodimenzionalnog postupka, na dve odvojene ploče su nanošeni model smeša (500 µl) i standard histamina (100 µl osnovnog standardnog rastvora histamina). Hromatogrami su razvijani primenom sledećih mobilnih faza:

- A) *n*-butanol : aceton : voda (2 : 2 : 1, v/v/v) i B) hloroform : metanol : NH₃ (12 : 7 : 1, v/v/v)
- A) i B) etil-acetat : metanol : NH₃ (4 : 3 : 2, v/v/v).

Nakon optimizacije hromatografskog razdvajanja, tankoslojna hromatografija je primenjena kao preparativna tehnika za prečišćavanje ekstrakta uzorka. Suvi ostatak polaznog ekstrakta je rastvaran uz ultrazvučne vibracije u 5 cm³ metanola, a alikvot je dalje prečišćen preparativnom tankoslojnom hromatografijom. Na ploče je nanošeno 500 mm³ ekstrakta, u uglu ploče 2 cm od ivice. Hromatogrami su razvijani dvodimenzionim postupkom sa mobilnom fazom etil-acetat : metanol : NH₃ (4 : 3 : 2, v/v/v), u oba razvijanja. Svaki uzorak je analiziran u tri ponavljanja. Pored ploča sa uzorkom, razvijane su još dve kontrolne ploče. Na jednoj ploči je nanošen ekstrakt uzorka a na drugoj standardni rastvor histamina. Kontrolne ploče su izazivane ninhidrinskim reagensom, a položaj histamina je utvrđen na osnovu R_f vrednosti. Ploče sa uzorcima za analizu nisu izazivane da bi se sprečila elektroaktivnost histamina. Histamin je izdvajan sa tankog sloja struganjem silika gela u prečniku + 1 cm oko tačke očekivanog položaja histamina. Eluiranje sa adsorbensa je izvođeno pomoću 20 cm³ odgovarajućeg pomoćnog elektrolita. Nakon centrifugiranja, histamin je elektrohemijski određivan u supernatantu.

3.5.1.3 Preparativna kolonska hromatografija

Pri pripremi kolona za hromatografiju, u staklenu kolonu (l = 50 cm, d = 2 cm) na dno je stavljen sloj vate i preko nje kolut hartije za ceđenje, tako da prekrije vatu. Na hartiju je nanošena stacionarna faza i raspoređivana staklenim štapićem, dok je stub stacionarne faze pakovan uz pomoć vakuuma. Masa stacionarne faze korišćene za pripremu kolone je iznosila 40 g što je približno odgovaralo visini stuba od 40 cm, zavisno od primenjene stacionarne faze. Na vrh stuba je stavljan još jedan kolut hartije za ceđenje.

U tabeli 5 su dati sistemi stacionarnih i mobilnih faza koje su ispitane u pogledu efikasnosti razdvajanja histamina od ostalih aminokiselina, koje se najčešće koekstrahuju sa histaminom.

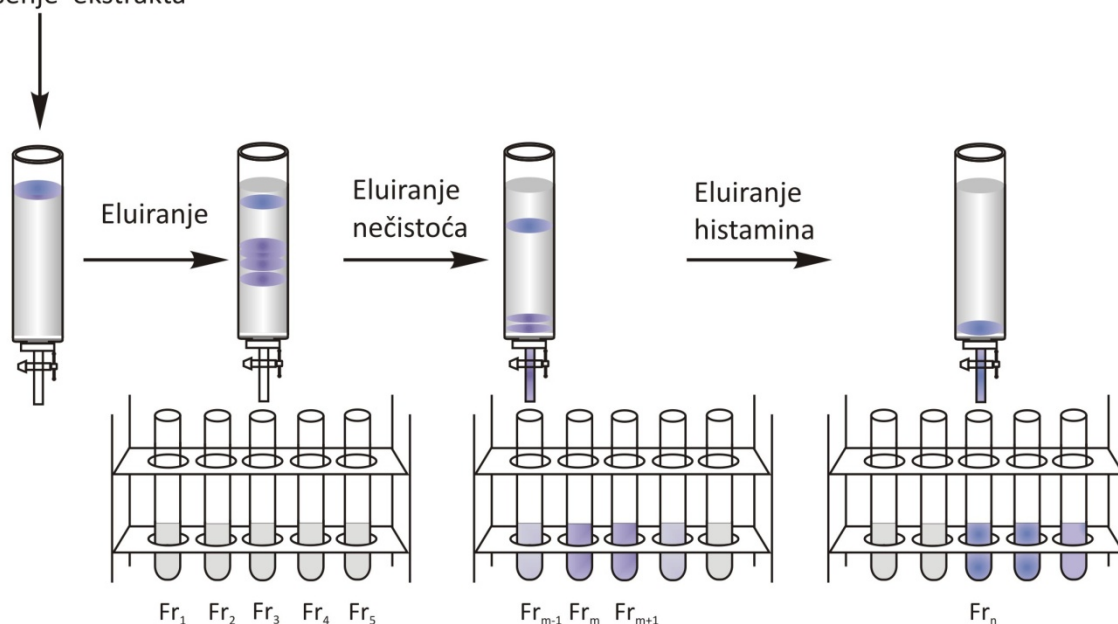
Tabela 5. Ispitani sistemi stacionarnih i mobilnih faza u preparativnoj kolonskoj hromatografiji.

Redni broj	Stacionarna faza	Mobilna faza (v/v/v)
1	Silika gel	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 4 : 3 : 1
2	Silika gel	acetone : NH ₃ = 95 : 5
3	Silika gel	hloroform : metanol : NH ₃ = 2 : 2 : 1
4	Silika gel	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 5 : 2 : 1
5	Silika gel	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 3 : 5 : 3
6	Silika gel	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 3 : 4 : 3
7	Silika gel	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 3 : 3 : 4
8	Silika gel	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 2 : 6 : 2
9	Silika gel	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 3 : 5,5 : 1,5
10	Silika gel	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 4 : 3 : 2
11	Al ₂ O ₃ , neutralni	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 4 : 3 : 1
12	Al ₂ O ₃ , katjotropni	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 4 : 3 : 1
13	Al ₂ O ₃ , anjotropni	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 4 : 3 : 1
14	Silika gel : Na ₂ SO ₄ : MgO = 3 : 2 : 1	etil-acetat : metanol : NH ₃ = 4 : 3 : 1

Nakon kondicioniranja kolone sa 30 cm³ mobilne faze, nanošeno je 10 cm³ model smeše aminokiselina i histamina, i izvođeno eluiranje komponenata smeše pri protoku mobilne faze od 3,3 cm³/min. Protok mobilne faze je podešavan pomoću teflonske slavine na kraju kolone. Tokom hromatografisanja prikupljano je 20 frakcija, od po 4 cm³ svaka (Slika 14), koje su analizirane hromatografijom na tankom sloju silika gela. Tankoslojna hromatografija je u ovom slučaju služila za kvalitativnu analizu frakcija dobijenih kolonskom

hromatografijom, u cilju određivanja uslova za dobijanje frakcija koje sadrže samo histamin, odnosno za određivanje optimalnih uslova razdvajanja histamina od ostalih aminokiselina. Način pripreme ploča je opisan u poglavlju 3.5.1.2. Pored frakcija, na tanak sloj je nanošen i standard histamina. Ploče su razvijane jednodimenzionalnom uzlaznom tehnikom uz primenjenu mobilnu fazu etil-acetat : metanol : $\text{NH}_3 = 4 : 3 : 2$ (v/v/v), na sobnoj temperaturi u pravcu u kome je sloj bio razvučen. Nakon hromatografisanja, izazivanje hromatograma je izvedeno prskanjem sa ninhidrinskim reagensom. Utvrđivanje prisustva histamina u pojedinim frakcijama je izvedeno na osnovu R_f vrednosti razdvojenih supstanci i R_f vrednosti standarda histamina.

Kondicioniranje kolone
i nanošenje ekstrakta



Slika 14. Prečišćavanje ekstrakta kolonskom hromatografijom.

Pri određivanju optimalnih uslova preparativne hromatografije, veoma je bitno odrediti kapacitet kolone, odnosno moguće opterećenje kolone (zapremina uzorka koji se nanosi). Nakon odabira odgovarajućeg sistema stacionarna - mobilna faza, da bi se ispitaio uticaj aplikovane zapremine uzorka na efikasnost razdvajanja nanošene su zapremine od 1 cm^3 , 2 cm^3 , 5 cm^3 , 10 cm^3 , 12 cm^3 i 15 cm^3 model smeše i poređena je rezolucija hromatografisanja u zavisnosti od opterećenja kolone model smešom.

Nakon odabira odgovarajućeg sistema stacionarna-mobilna faza i zapremine uzorka za postizanje efikasnog razdvajanja, preparativna kolonska hromatografija je primenjena za izolovanje histamina iz uzoraka. Pri pripremi uzoraka za analizu, suvi ostatak polaznog ekstrakta ili uparenog vina, je rastvaran uz ultrazvučne vibracije u 12 cm^3 metanola, a alikvot (10 cm^3) je dalje prečišćavan preparativnom kolonskom hromatografijom. Kolona napunjena

silika gelom je prvo kondicionirana sa 30 cm³ mobilne faze (etil-acetat : metanol : NH₃ = 2 : 6 : 2, v/v/v), zatim je nanošen alikvot i nakon toga izvedeno eluiranje mobilnom fazom. Frakcije koje sadrže histamin su spajane i koncentrovane na rotacionom vakuum uparivaču. Suvi ostatak je rastvaran u pomoćnom elektrolitu i sadržaj histamina je određivan elektrohemijski.

3.6 Ispitivanje tačnosti razvijenih elektrohemijskih metoda i ispravnosti definisanih postupaka pripreme uzoraka

U cilju provere tačnosti definisanih elektrohemijskih metoda, analizirani su standardni rastvori histamina pri prethodno određenim optimalnim uslovima. Određeni sadržaji su poređeni sa sadržajima standardnih rastvora uz proračun „recovery“ vrednosti:

$$Recovery = \frac{C_{Histamina\ određeno}}{C_{Histamina\ dodato}} * 100 \quad (21)$$

Gde su:

$C_{Histamina\ određeno}$ - koncentracija histamina određena u standardnom rastvoru (mg/dm³),

$C_{Histamina\ dodato}$ - koncentracija pripremljenog standardnog rastvora (mg/dm³).

Pri ispitivanju ispravnosti definisanih postupaka pripreme uzoraka, na tanak sloj ili kolonu je nanošen model rastvor sa poznatim sadržajem histamina. Model rastvori su za elektrohemijsko određivanje pripremani na dva prethodno opisana načina (preparativnom tankoslojnom i kolonskom hromatografijom). Pripremljene probe su analizirane hronopotencijometrijom na tankoslojnoj živinoj elektrodi, a vrednost „recovery“-a je računata:

$$Recovery = \frac{G_{Histamina\ određeno}}{G_{Histamina\ dodato}} * 100 \quad (22)$$

$G_{Histamina\ određeno}$ - određena količina histamina nakon prečišćavanja (mg),

$G_{Histamina\ dodato}$ - nanešena količina histamina (mg).

Pravi „recovery“ test je podrazumevao „spajkovanjeⁱ“ uzorka određenom količinom standarda histamina i koristio se za potvrdu tačnosti i ispravnosti celokupnog postupka, uključujući i fazu pripreme uzorka i samu elektroanalitičku tehniku. Samleveni uzorci su direktno odmeravani u balon za ekstrakciju. U uzorcima je prethodno određen stvarni sadržaj histamina, a količina dodatog histamina pri spajkovanju je bila približno ista kao i analiziranom uzorku. Uzorci vina su spajkovani tako što je standardni rastvor histamina direktno dodavan uzorku, pre uparavanja. Na osnovu razlike u sadržajima u realnom i spajkovanom uzorku, i tačno dodate količine standarda, rezultati „recovery“ testa su računati na sledeći način:

$$Recovery (\%) = \frac{G_{ukupno} - G_{uzorka}}{G_{dodato}} * 100 \quad (23)$$

gde su:

G_{ukupno} – određen sadržaj histamina u spajkovanom uzorku (mg/kg),

G_{uzorka} – određen sadržaj histamina u uzorku (mg/kg),

G_{dodato} – količina standarda histamina dodatog uzorku (mg/kg).

ⁱ „Spajkovanje“ - engl. *spike*, termin usvojen u krugu analitičara za proces dodavanja poznate količine standarda u analizirani uzorak ili model sistem, pri validaciji analitičkih metoda.

4 REZULTATI I DISKUSIJA

U prvom delu ovog poglavlja prikazani su rezultati vezani za razvoj elektrohemijskih tehnika za određivanje histamina primenom tankoslojne živine elektrode, zlatne elektrode i tankoslojne niklove elektrode. Drugi deo opisuje optimizaciju uslova pripreme uzoraka primenom tankoslojne i kolonske hromatografije. U trećem delu poglavlja su prikazani rezultati određivanja sadržaja histamina u različitim realnim uzorcima primenom optimizovanih elektrohemijskih metoda.

4.1 Određivanje optimalnih uslova za elektrohemijsko određivanje

histamina

U model rastvorima histamina ispitana je mogućnost primene tankoslojne živine elektrode, čvrste zlatne elektrode i tankoslojne niklove elektrode. Za sve primenjene radne elektrode određeni su vrsta i odgovarajuća koncentracija pomoćnog elektrolita, kao i opseg potencijala hronopotenciometrijskog ciklusa. Pored toga, za svaki elektrohemijski sistem su objašnjeni mehanizmi generisanja analitičkog signala, ispitan je uticaj struje oksidacije na analitički signal i definisan je opseg linearnosti. Za svaku od primenjenih elektroda je određena granica detekcije i granica kvantifikacije. Na niklovoj elektrodi način deponovanja histamina je bio specifičan i obuhvatio je i adsorpciju, tako da su ispitani i uticaj temperature i brzine mešanja. S obzirom da različite supstance prisutne u uzorcima, kao što su aminokiseline, mogu uticati na analitički signal histamina, ispitane su njihove interferencije.

Sve analize su izvedene u nedeoerisanim rastvorima, u pet ponavljanja, ukoliko drugačije nije navedeno. Temperatura rastvora u okviru jedne serije ispitivanja nije se menjala više od $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

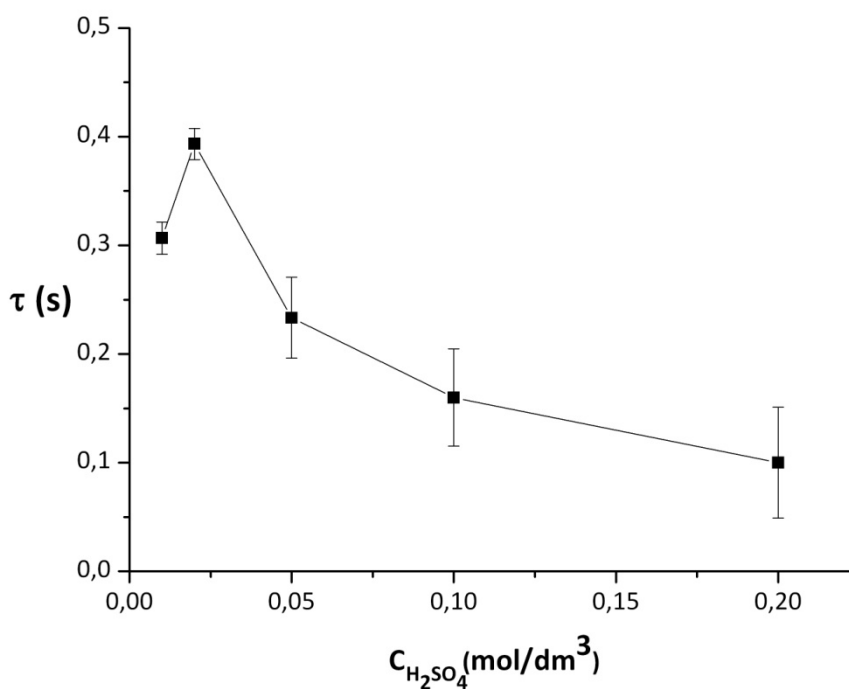
4.1.1 Tankoslojna živina elektroda

4.1.1.1 Uticaj vrste i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal histamina

U cilju ispitivanja uticaja pomoćnog elektrolita na elektrohemijsko ponašanje histamina na tankoslojnoj živinoj elektrodi, izvedena su preliminarna ispitivanja u različitim pomoćnim elektrolitima. Uticaj vrste elektrolita je ispitan analizom rastvora sadržaja 20 mg/dm^3 histamina u $0,05 \text{ mol/dm}^3$ azotnoj, hlorovodoničnoj, perhlornoj, sumpornoj, sirćetnoj i

trihlorsirćetnoj kiselini, amonijum-hidroksidu, natrijum-hidroksidu, natrijum-dihidrogenfosfatnom puferu i natrijum-monohidrogenfosfatnom puferu. Elektrooksidacija histamina uz generisanje analitičkog signala je primećena u sumpornoj kiselini, azotnoj kiselini i trihlorsirćetnoj kiselini. Histamin se u ovim pomoćnim elektrolitima oksidovao u veoma uskom opsegu potencijala od 0,250 do 0,270 V. Poredeći sumpornu, azotnu i trihlorsirćetnu kiselinu kao pomoćne elektrolite, nije bilo značajnih razlika po pitanju veličine signala ali je najoštrij analitički signal histamina dobijen u sumpornoj kiselini. U svim daljim ispitivanjima sumporna kiselina je korišćena kao odgovarajući pomoćni elektrolit.

Uticaj koncentracije sumporne kiseline na analitički signal histamina je ispitan u opsegu od 0,01 mol/dm³ do 0,3 mol/dm³. Ispitivanja su izvedena u rastvorima histamina sadržaja 10 mg/dm³, u opsegu potencijala hronopotenciometrijskog ciklusa od -0,4 V do 0,4 V, uz primenjenu struju oksidacije od 18,1 μA. Rezultati ispitivanja su prikazani na slici 15. Svaka tačka na dijagramu predstavlja srednju vrednost pet ponovljenih analiza, dok vertikalne crtice na tačkama označavaju reproduktivnost izraženu kao 2SD.



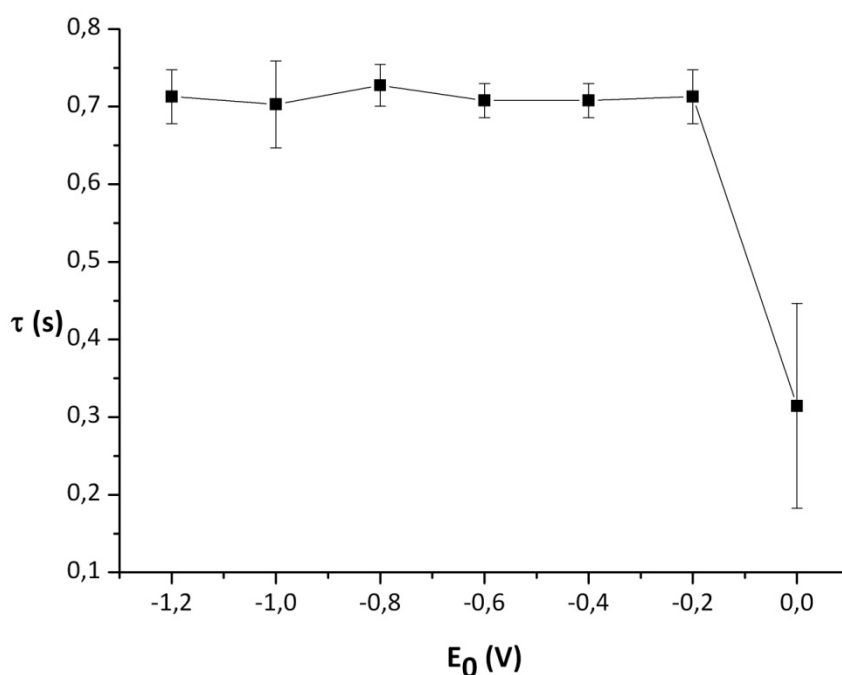
Slika 15. Uticaj koncentracije H₂SO₄ na analitički signal histamina. C_{His} = 10 mg/dm³; i = 18,1 μA; tankoslojna živina elektroda.

Sa porastom koncentracije sumporne kiseline potencijal oksidacije histamina se kretao ka nešto negativnijim vrednostima, dok je veličina analitičkog signala značajno opadala uz istovremeno smanjenje reproduktivnosti. U sumpornoj kiselini koncentracije 0,3 mol/dm³

nije dobijen signal histamina. Relativna standardna devijacija vremena oksidacije histamina za koncentracije sumporne kiseline više od $0,02 \text{ mol/dm}^3$ je bila veća od 10%. U svim daljim ispitivanjima usvojena je koncentracija sumporne kiseline od $0,02 \text{ mol/dm}^3$, s obzirom da je analitički signal bio veoma oštar i reproduktivan (RSD = 3,65%).

4.1.1.2 Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina

Uticaj početnog potencijala (E_0) na analitički signal histamina je ispitan u intervalu od $-1,2 \text{ V}$ do 0 V u model rastvoru sadržaja 20 mg/dm^3 histamina. Primenjena struja oksidacije je iznosila $18,2 \mu\text{A}$ dok je završni potencijal bio $0,4 \text{ V}$. Dobijeni rezultati, kao i reproduktivnost analitičkog signala su prikazani na slici 16. Svaka tačka na dijagramu predstavlja srednju vrednost pet uzastopnih analiza. Reproductivnost je prikazana kao 2SD odstupanje od srednje vrednosti.



Slika 16. Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina. $C_{\text{His}} = 20 \text{ mg/dm}^3$; $i = 18,2 \mu\text{A}$; tankoslojna živina elektroda.

Kao što se može videti na slici 16, promena početnog potencijala u intervalu od $-1,2 \text{ V}$ do $-0,2 \text{ V}$ nije uticala značajno na analitički signal određivane supstance, kao ni na reproduktivnost. Pri početnom potencijalu od 0 V zabeležen je oštar pad analitičkog signala uz istovremeno smanjenje reproduktivnosti. Potencijal oksidacije histamina nije se značajno menjao u ispitanom opsegu početnog potencijala.

Ukoliko se analiza izvodi u obrnutom, tj. katodnom smeru može se zaključiti da li su elektrodni procesi reverzibilni ili nisu. Odsustvo analitičkog signala u katodnom smeru promene potencijala (od 0,4 V do -1,2 V) je ukazalo da se na tankoslojnoj živinoj elektrodi histamin oksiduje ireverzibilno. Uzimajući u obzir veličinu i reproduktivnost vremena oksidacije histamina, početni potencijal od -0,4 V je odabran kao odgovarajući u svim daljnim ispitivanjima sa tankoslojnom živinom elektrodom.

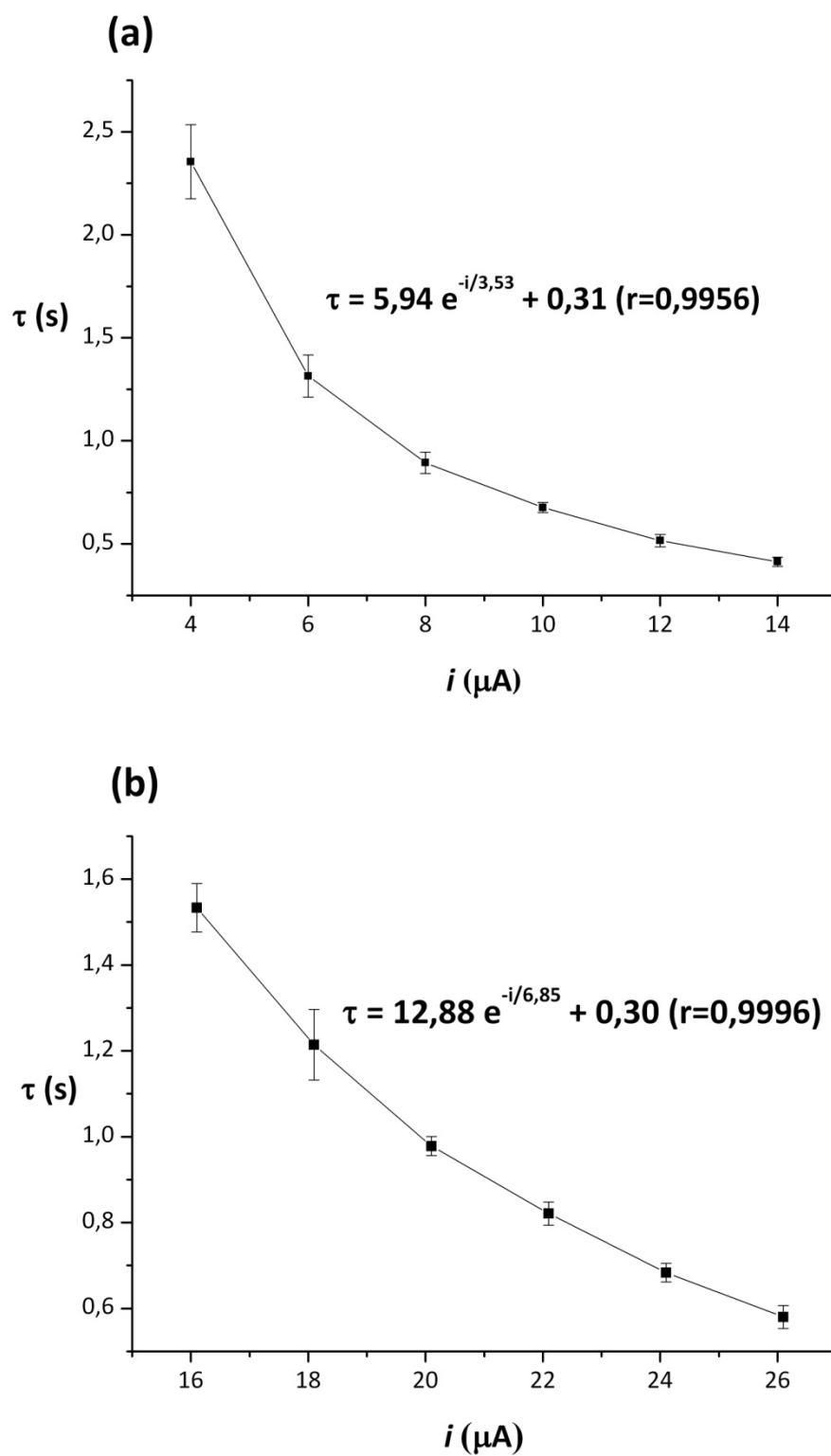
Završni potencijal ($E_{\text{završno}}$) u svim ispitivanjima je iznosio 0,4 V, s obzirom da se u odabranom elektrolitu na tankoslojnoj živinoj elektrodi histamin oksidovao pri potencijalu od $\sim 0,27$ V. U usvojenom potencijalnom opsegu od -0,4 V do 0,4 V, tankoslojna živina elektroda je bila stabilna i mogla se koristiti za ~ 30 analiza, odnosno ~ 30 hronopotenciometrijskih ciklusa.

4.1.1.3 Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina

Struja oksidacije je jedan od najvažnijih eksperimentalnih parametara hronopotenciometrijske analize. Njenim pravilnim odabirom moguće je dobiti veoma oštar i reproduktivan signal. Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina je ispitivan u rastvorima sadržaja 10 mg/dm^3 i 50 mg/dm^3 histamina. Za sadržaj histamina od 10 mg/dm^3 struja oksidacije je varirana u intervalu od $4 \text{ }\mu\text{A}$ do $14 \text{ }\mu\text{A}$, a za sadržaj od 50 mg/dm^3 histamina od $16,1 \text{ }\mu\text{A}$ do $26,1 \text{ }\mu\text{A}$. Zavisnosti vremena oksidacije histamina od primenjene struje oksidacije za oba sadržaja su date na slici 17. Prikazane vrednosti vremena oksidacije predstavljaju srednju vrednost pet ponavljanja, dok prikazani intervali oko svake vrednosti predstavljaju reproduktivnost za ispitanu struju oksidacije, izraženu kao 2SD.

U oba slučaja analitički signal histamina je opadao saopštavanjem većih struja oksidacije po eksponencijalnoj funkciji. Pri manjim strujama reproduktivnost analitičkog signala je bila lošija usled dobijanja razvučenijih hronopotenciograma. Ipak, za niže sadržaje histamina bilo je potrebno primeniti manje struje oksidacije. Sa povećanjem struje oksidacije, potencijal oksidacije histamina se pomerao ka negativnijim vrednostima (od 0,250 V do 0,298 V).

Optimalna vrednost struje oksidacije koju treba primeniti zavisi od koncentracije analita, tako da je birana u zavisnosti od sadržaja histamina u uzorku. Što je koncentracija analita bila niža, potrebno je bilo primeniti manje struje kako bi se ostvarila odgovarajuća osetljivost. Međutim, suviše male struje su uzrokovale značajno smanjenje reproduktivnosti određivanja i razvlačenje hronopotenciograma, odnosno dobijanje hronopotenciograma sa nedovoljno izraženim prevojima. Pored toga, primena suviše malih struja može da uzrokuje duga vremena oksidacije, a time i odstupanje od Sand-ove jednačine.



Slika 17. Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina (a) $C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$ i (b) $C_{\text{His}} = 50 \text{ mg/dm}^3$; tankoslojna živina elektroda.

Optimalni eksperimentalni uslovi za hronopotenciometrijsko određivanje histamina na tankoslojnoj živinoj elektrodi su sumirani u tabeli 6 (Švarc-Gajić & Stojanović, 2011).

Tabela 6. Optimalni eksperimentalni uslovi hronopotenciometrijskog određivanja histamina na tankoslojnoj živinoj elektrodi.

Parametar	Optimalni uslovi
Pomoćni elektrolit	H ₂ SO ₄
Koncentracija pomoćnog elektrolita (mol/dm ³)	0,02
E_0 (V)	- 0,4
$E_{završna}$ (V)	0,4
I_{opseg} (μA)	3 - 30

4.1.1.4 Uticaj koncentracije na analitički signal histamina

Za kvantitativno određivanje opseg linearne zavisnosti analitičkog signala od koncentracija analita je od velikog značaja. Zbog toga je karakter zavisnosti vremena oksidacije od koncentracije histamina ispitan za tri opsega sadržaja histamina: 1,5 - 10,5 mg/dm³, 5 - 30 mg/dm³ i 20 - 90 mg/dm³. Ispitivanja su izvedena pri definisanim optimalnim uslovima. Struje oksidacije su iznosile redom 12,3 μA za prvi opseg, 16 μA za drugi opseg i 18,2 μA za treći opseg. Eksperimenti su izvedeni u pet ponavljanja za svaki koncentracioni opseg.

Dobra linearnost zavisnosti vremena oksidacije od koncentracije histamina je ostvarena za sva tri ispitana opsega sadržaja. U tabeli 7 su date vrednosti nagiba, odsečka, standardne devijacije nagiba i odsečka kao i koeficijenti korelacije za svaki od tri ispitana opsega koncentracija. Iako je za sva tri opsega sadržaja histamina dobijena linearna zavisnost, odsečki na osi τ nisu bili zanemarljivi. S obzirom na značajne odsečke na ordinati, mnogo je pogodnija primena metode kalibracione krive za izračunavanje sadržaja histamina u uzorcima u odnosu na metodu dodatka standarda, te se ona i preporučuje.

Tabela 7. Zavisnost vremena oksidacije od sadržaja histamina (tankoslojna živina elektroda).

Opseg sadržaja (mg/dm ³)	Zavisnost ^a	SD _b ^b	SD _a ^c	Koeficijent korelacije
1,5 – 10,5	$\tau = 0,027 \times C_{\text{His}} + 0,283$	0,002	0,027	0,9986
5 – 30	$\tau = 0,042 \times C_{\text{His}} + 0,178$	0,013	0,025	0,9945
20 – 90	$\tau = 0,039 \times C_{\text{His}} - 0,358$	0,003	0,113	0,9965

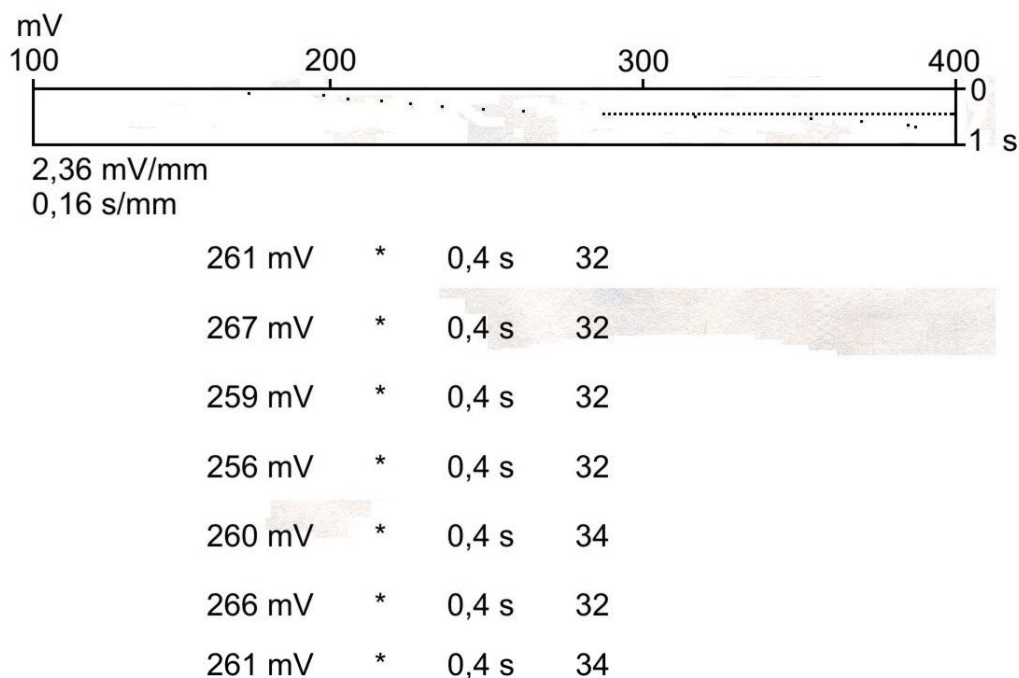
^a τ , vreme oksidacije u sekundama; C_{His} , sadržaj histamina u mg/dm³.

^b SD_b, standardna devijacija nagiba (n = 5).

^c SD_a, standardna devijacija odsečka (n = 5).

4.1.1.5 Ponovljivost i reproduktivnost

Ponovljivost (analitička reproduktivnost) je određena na osnovu sedam uzastopnih analiza rastvora histamina sadržaja 10 mg/dm³ i 50 mg/dm³, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Primenjene struje oksidacije su iznosile 12,3 μA i 18,5 μA , redom. Između analiza ispitivani rastvori su kratkotrajno mešani uz naknadno umirenje rastvora u trajanju od 15 s. Relativna standardna devijacija za niži sadržaj histamina je iznosila 2,99%, dok je za viši sadržaj iznosila 2,14%. Pri datim eksperimentalnim uslovima, histamin se na tankoslojnoj živinoj elektrodi oksidovao pri relativno reproduktivnim vrednostima potencijala od ~ 260 mV. Relativne standarde devijacije potencijala oksidacije histamina su iznosile 1,48% i 2,36%, za niži i viši sadržaj histamina, redom. Originalni zapis analizatora pri određivanju ponovljivosti u rastvoru sadržaja 10 mg/dm³ histamina je prikazan na slici 18.



Slika 18. Ponovljivost određivanja sa kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama na tankoslojnoj živinoj elektrodi. $C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 12,3 \mu\text{A}$.

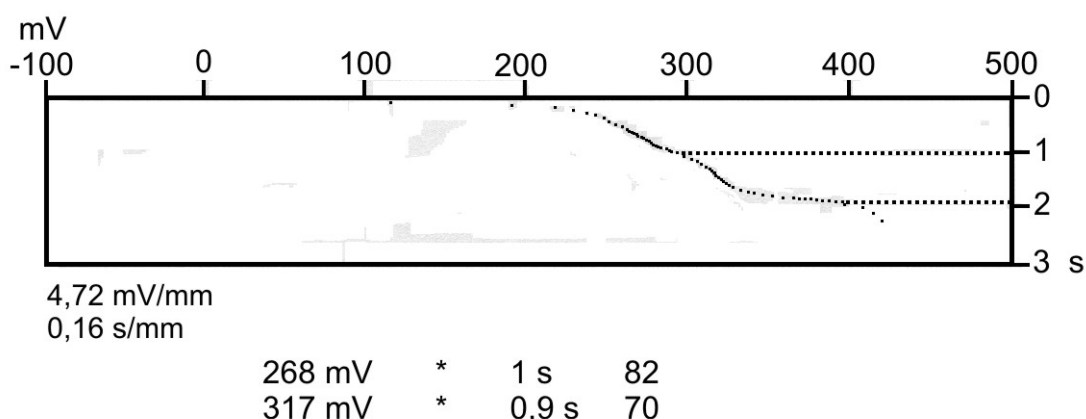
Reproduktivnost je određena pri istim eksperimentalnim uslovima kao i ponovljivost, analizom pet različitih rastvora istog sastava. Relativne standardne devijacije su iznosile 3,34% za sadržaj histamina od 10 mg/dm^3 i 4,72% za sadržaj histamina od 50 mg/dm^3 . Relativne standardne devijacije potencijala oksidacije histamina su redom, za niži i viši sadržaj histamina, iznosile 1,48% i 2,43%.

4.1.1.6 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Nakon optimizacije uslova hronopotenciometrijskog određivanja histamina na tankoslojnoj živinoj elektrodi, granica detekcije (*Limit of Detection*, LOD) i granica kvantifikacije (*Limit of Quantification*, LOQ) su određene primenom $X_{sr} \pm 3SD$ i $X_{sr} \pm 10SD$ kriterijuma (ASC, 1980). Primenjena struja oksidacije je iznosila $12,2 \mu\text{A}$. X_{sr} i SD su srednja vrednost i standardna devijacija sadržaja histamina pet uzastopnih analiza određenih u slepoj probi, interpolacijom u kalibracionu krivu definisanu za niže koncentracije histamina blizu LOD. Ostvarena granica detekcije pri datim uslovima je iznosila $1,31 \text{ mg/dm}^3$ histamina, dok je granica kvantifikacije iznosila $3,54 \text{ mg/dm}^3$ histamina.

4.1.1.7 Interferencije

Slobodne aminokiseline su zastupljene u realnim uzorcima i njihovo prisustvo može značajno uticati na analitički signal histamina. Zbog toga je bilo neophodno ispitati selektivnost određivanja histamina u prisustvu aminokiselina. Ispitani su uticaji aminokiselina koje su po strukturi slične histaminu kao što su histidin, prolin, triptofan i tirozin (naročito je histidin slične strukture) ali i ostalih aminokiselina (cistein, lizin, fenilalanin). Dvokomponentni standardni rastvor sa histaminom i ispitivanom aminokiselinom je analiziran pri prethodno definisanim optimalnim uslovima zasebno za svaku aminokiselinu. Za svaku od ispitanih aminokiselina dve vrste eksperimenta su sprovedene. Prvo ispitivanje je obuhvatilo postepeno povećanje koncentracije histamina ($1 - 25 \text{ mg/dm}^3$) pri konstantnoj koncentraciji određene aminokiseline (5 mg/dm^3). U drugom eksperimentu koncentracija histamina je bila konstantna (5 mg/dm^3), dok je varirana koncentracija aminokiselina ($1 - 25 \text{ mg/dm}^3$). Analizom smeše histamina i aminokiselina utvrđeno je da pri istim uslovima hronopotenciometrijske analize dolazi pored oksidacije histamina i do oksidacije aminokiselina. Pri sadržajima aminokiselina i histamina ispod 5 mg/dm^3 , signali histamina i aminokiseline bili su jasno razdvojeni (Slika 19). Potencijali oksidacije aminokiselina bili su približno isti za različite aminokiseline ($\sim 320 \text{ mV}$), a nešto pozitivniji u odnosu na potencijal oksidacije histamina. Predpostavlja se da su za oksidaciju aminokiselina bili neophodni pozitivniji potencijali usled sternih smetnji primarne karboksilne grupe koja je otežavala oksidaciju primarne amino-grupe. Povećanjem koncentracije bilo koje komponente binarne smeše, dolazilo je do preklapanja signala histamina sa signalom aminokiseline. Pri višim koncentracijama, tranziciona vremena pojedinih komponenti su bila duža, a dobijeni hronopotenciogrami razvučeniji tako da je određivanje prevojne tačke prvog platoa bilo otežano.



Slika 19. Hronopotenciogram rastvora koji sadrži 5 mg/dm^3 histamina i 5 mg/dm^3 cisteina; tankoslojna živina elektroda.

4.1.1.8 Ispitivanje tačnosti definisane metode

U cilju potvrde tačnosti definisane elektroanalitičke tehnike uz primenu tankoslojne živine elektrode, analizirani su standardni rastvori poznatog sadržaja histamina. Određeni sadržaji i izračunate vrednosti „recovery“ testa su dati u tabeli 8.

Tabela 8. Rezultati određivanja histamina u standardnim rastvorima primenom hronopotencimetrije sa tankoslojnom živinom elektrodom.

Histamin dodat (mg/dm ³)	Histamin određen (mg/dm ³)
1,5	1,52 ± 0,02 ^a (101,33) ^b
5,0	5,04 ± 0,08 (100,80)
7,0	7,03 ± 0,21 (100,43)
10,0	10,09 ± 0,32 (100,90)
20,0	20,12 ± 0,57 (100,60)

^a Srednja vrednost ± 2 SD, n=5.

^b Vrednosti u zagradi predstavljaju srednju vrednost „recovery“ testa u %, n=5.

Vrednosti „recovery“ testa su se kretale u intervalu od 100,43% do 101,33%, uz veoma dobru reproduktivnost određivanja (RSD = 0,79 ÷ 1,59%). Dobijeni rezultati su potvrdili tačnost definisane hronopotencimetrijske metode za određivanje histamina na tankoslojnoj živinoj elektrodi.

4.1.2 Čvrsta zlatna elektroda

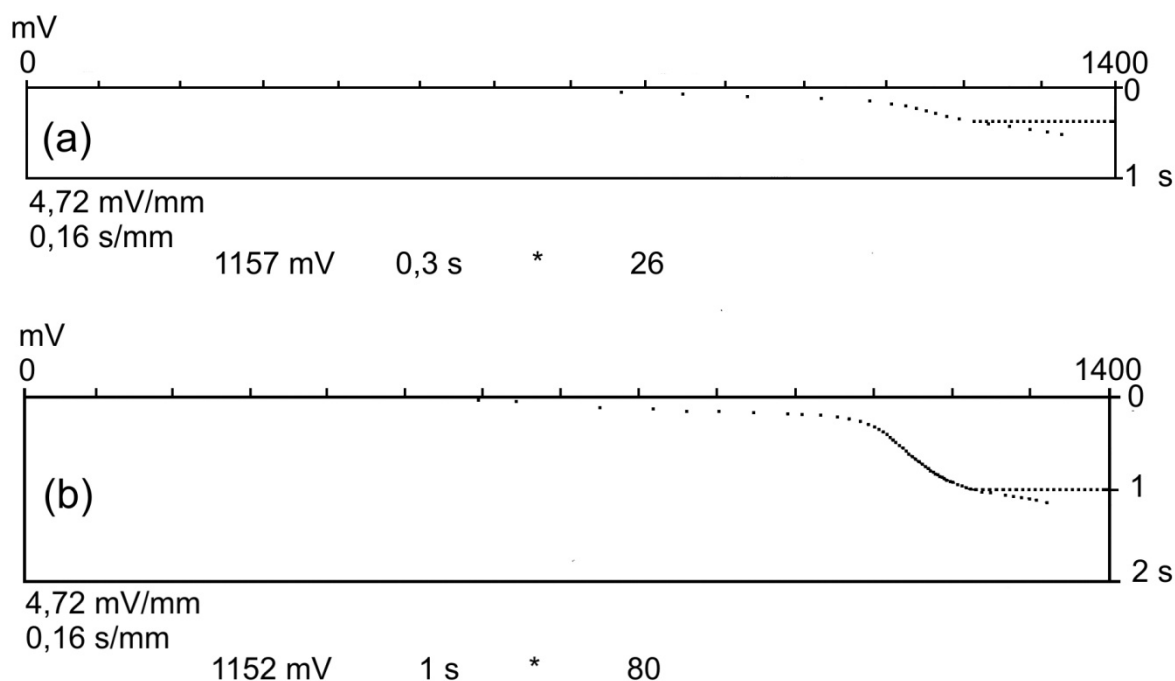
Preliminarna elektrohemijaska merenje sa čvrstom zlatnom elektrodom su izvedena analizom standardnih rastvora histamina u različitim pomoćnim elektrolitima, u cilju ispitivanja njihovog uticaja na elektrohemijasko ponašanje histamina. Ispitivanja su izvedena u sumpornoj, azotnoj, hlorovodoničnoj, sirćetnoj, perhlornoj i trihlorsirćetnoj kiselini, natrijum-hloridu, amonijum-hidroksidu i natrijum-hidroksidu. Koncentracija svih ispitanih pomoćnih elektrolita se kretala od 0,001 mol/dm³ do 0,05 mol/dm³. Struja oksidacije je iznosila 10,2 μA, a hronopotencimetrijsko merenje je izvedeno od početnog potencijala od -0,2 V do završnog potencijala od 1,35 V.

Bazni pomoćni elektroliti nisu bili povoljni za elektrooksidaciju histamina na zlatnoj elektrodi, s obzirom da se u njima nije javljao analitički signal analita. U kiselim pomoćnim

elektrolitima dolazilo do oksidacije histamina i pojave analitičkog signala. U sumpornoj, azotnoj, sirćetnoj, perhlornoj i trihlorsirćetnoj kiselini histamin je detektovan tek pri sadržajima iznad 75 mg/dm^3 , a potencijal oksidacije analita u ovim elektrolitima je iznosio $\sim 1,32 \text{ V}$. U pomoćnim elektrolitima koji disocijacijom oslobađaju Cl^- (NaCl , HCl), histamin je mogao biti detektovan i pri mnogo nižim sadržajima od 5 mg/dm^3 histamina, ali pri nešto negativnijim potencijalima od $\sim 1,15 \text{ V}$. U ovim elektrolitima, pri analizi slepe probe detektovan je analitički signal pri istim vrednostima potencijala ali mnogo nižeg intenziteta u odnosu na analizirane rastvore histamina.

4.1.2.1 Mehanizam oksidacije histamina na čvrstoj zlatnoj elektrodi

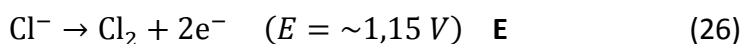
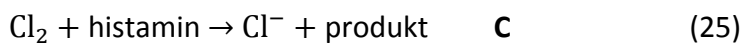
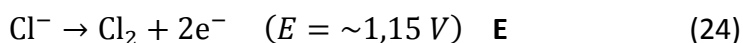
Hronopotenciogrami dobijeni u $0,0025 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ bez (a) i sa 5 mg/dm^3 histamina (b) su prikazani na slici 20. Primenjena struja oksidacije je iznosila $10,2 \text{ } \mu\text{A}$, a merenje je izvedeno u opsegu potencijala od $-0,2 \text{ V}$ do $1,35 \text{ V}$.



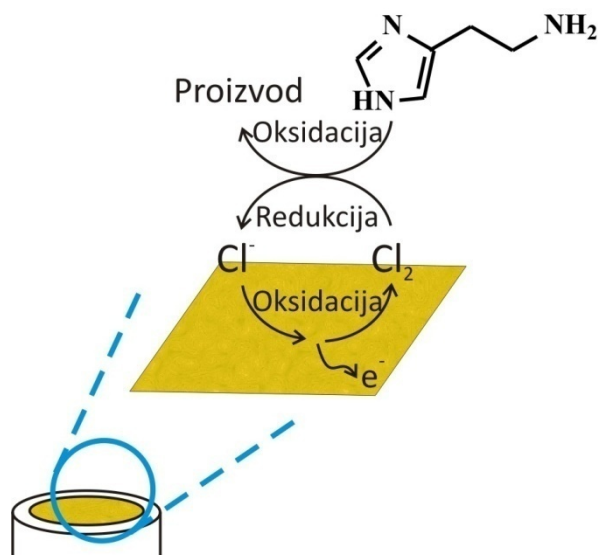
Slika 20. Hronopotenciogram $0,0025 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ (a) bez histamina i (b) sa 5 mg/dm^3 histamina. $i = 10,2 \text{ } \mu\text{A}$; zlatna elektroda.

Na osnovu signala dobijenog u slepoj probi pri potencijalu od $\sim 1,15 \text{ V}$ (Slika 20a), može se pretpostaviti da je primenjena konstantna struja uzrokovala oksidaciju hloridnih jona (Huang *et al.*, 2008). Pri dodatku histamina u posmatrani pomoćni elektrolit dolazilo je do značajnog povećanja analitičkog signala u odnosu na signal u slepoj probi (Slika 20b). Slični rezultati su dobijeni kada se kao pomoćni elektrolit koristio natrijum-hlorid. Oštri signali

histamina koji su dobijeni u elektrolitima sa hloridnim jonima se mogu objasniti važnom ulogom hlora koji je bio generisan primenom anodnih stuja i njegovim posrednim učešćem u oksidaciji histamina. Generisani hlor je verovatno igrao ulogu elektron-transfer posrednika (medijatora) ukazujući da se oksidacija histamina odigravala indirektno i u suštini je predstavljala hemijsku oksidaciju. Naime, primarna amino-grupa histamina se oksidovala u kiseloj sredini elektrogenerisanim hlorom, pri čemu je nastajao odgovarajući produkt N-Cl-amin (Kotiaho, Hayward & Cooks, 1991). U ovom elektron-posredovanom mehanizmu, elektrogenerisani hlor je imao ulogu akceptora elektrona u reakciji oksidacije. Mehanizam oksidacije histamina na čvrstoj zlatnoj elektrodi u prisustvu hloridnih jona odgovara ECE mehanizmu (Slika 21) (Stojanović & Švarc-Gajić, *in press*), i može se opisati sledećim reakcijama:



Nakon elektrodne reakcije generisanja hlora, u neposrednoj blizini elektrode i na njenoj površini odigravala se hemijska reakcija oksidacije histamina, prouzrokujući povećanje koncentracije Cl^- jona u blizini elektrode, koji su dalje ponovnom reakcijom sa elektrodom pri nepromenjenom potencijalu uzrokovali veći analitički signal u odnosu na signal koji bi se javljao samo u prisustvu Cl^- jona. Sve ove reakcije se moraju odigravati u difuzionim uslovima, pa se mora voditi računa da ne dođe do pomeranja ispitivanog rastvora. Indirektna oksidacija histamina je bila praćena smanjenjem potencijala oksidacije i značajnim povećanjem osetljivosti.



Slika 21. Mehanizam oksidacije histamina na čvrstoj zlatnoj elektrodi
(Stojanović & Švarc-Gajić, *in press*).

4.1.2.2 Uticaj vrste i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal histamina

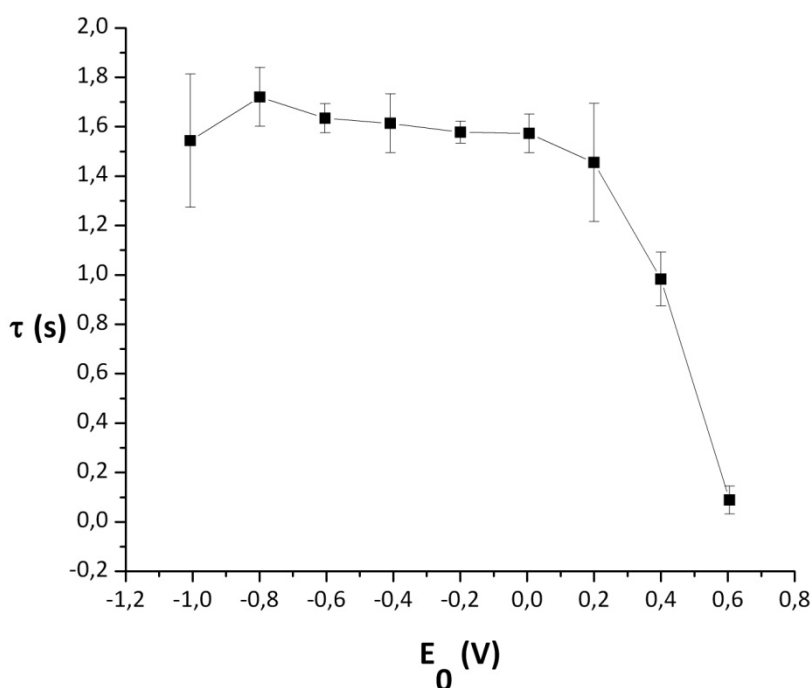
S obzirom na prethodno objašnjeni mehanizam generisanja signala, uticaj vrste elektrolita na analitički signal histamina je ispitan u pomoćnim elektrolitima sa hloridnim jonima, tj. u hlorovodoničnoj kiselini i natrijum-hloridu. Bolji signal u smislu oštine i reproduktivnosti je dobijen kada je kao elektrolit korišćena hlorovodonična kiselina, i zbog toga je ona izabrana kao pomoćni elektrolit u svim daljnim ispitivanjima sa čvrstom zlatnom elektrodom.

Uticaj koncentracije hlorovodonične kiseline na analitički signal histamina je ispitan u model rastvorima histamina sadržaja 5 mg/dm^3 . Koncentracija HCl je varirana od $0,001 \text{ mol/dm}^3$ do $0,05 \text{ mol/dm}^3$. Hronopotenciometrijska analiza je izvođena u opsegu potencijala od $-0,2 \text{ V}$ do $1,35 \text{ V}$ uz primenu struje oksidacije od $18,2 \text{ } \mu\text{A}$. Koncentracija hlorovodonične kiseline je imala uticaja na veličinu signala u slepoj probi, ali i na analitički signal histamina i njegovu reproduktivnost. Sa povećanjem koncentracije HCl, vreme oksidacije histamina se povećavalo. Koncentracije HCl više od $0,01 \text{ mol/dm}^3$ su doprinosile velikom signalu u slepoj probi, ali i smanjenju reproduktivnosti analitičkog signala histamina usled dobijanja veoma razvučenih hronopotenciograma. Mehurići hlora adsorbovanog na površini radne elektrode su se mogli jasno uočiti pri ovim uslovima. Deformisani hronopotenciogrami i nereproduktivni analitički signali mogli su se objasniti činjenicom da se u ovakvim uslovima oksidacija histamina nije odvijala samo u difuzionom sloju već i u masi ispitivanog rastvora, ali ne po ECE mehanizmu. Višak elektrogenerisanog hlora difundovao je u rastvor i dovedio do nekontrolisane oksidacije. Odgovarajuća količina hlora koja je dovoljna da oksiduje

histamin u difuzionom sloju, a da pri tom ne utiče na reproduktivnost usled prekrivanja elektrode mehurićima gasa, bila je kritičan parametar u posredovanom mehanizmu oksidacije histamina. Uzimajući u obzir uobičajene sadržaje histamina u realnim uzorcima, koncentracija HCl od $0,0025 \text{ mol/dm}^3$ je omogućavala zadovoljavajuću osetljivost i dobru reproduktivnost, i ova koncentracija pomoćnog elektrolita je usvojena za sva dalja ispitivanja.

4.1.2.3 Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina

Uticaj početnog potencijala (E_0) na analitički signal histamina je ispitan u intervalu od $-1,0 \text{ V}$ do $0,6 \text{ V}$ u model rastvoru sadržaja histamina od 20 mg/dm^3 . Struja oksidacije je iznosila $30,3 \mu\text{A}$, dok je završni potencijal bio $1,35 \text{ V}$. Merenja su izvedena u pet ponavljanja za svaki primenjeni početni potencijal. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 22. Reproductivnost je prikazana kao odstupanje od srednje vrednosti iskazano kao 2SD.



Slika 22. Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina. $C_{\text{His}} = 20 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30,3 \mu\text{A}$; zlatna elektroda.

Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina je imao sličan karakter zavisnosti kao kod tankoslojne živine elektrode. Na slici 22 se jasno može videti da promena početnog potencijala u intervalu od $-1,0 \text{ V}$ do 0 V nije značajno uticala na analitički signal histamina kao i na reproduktivnost signala. Smanjenje analitičkog signala je zabeleženo pri

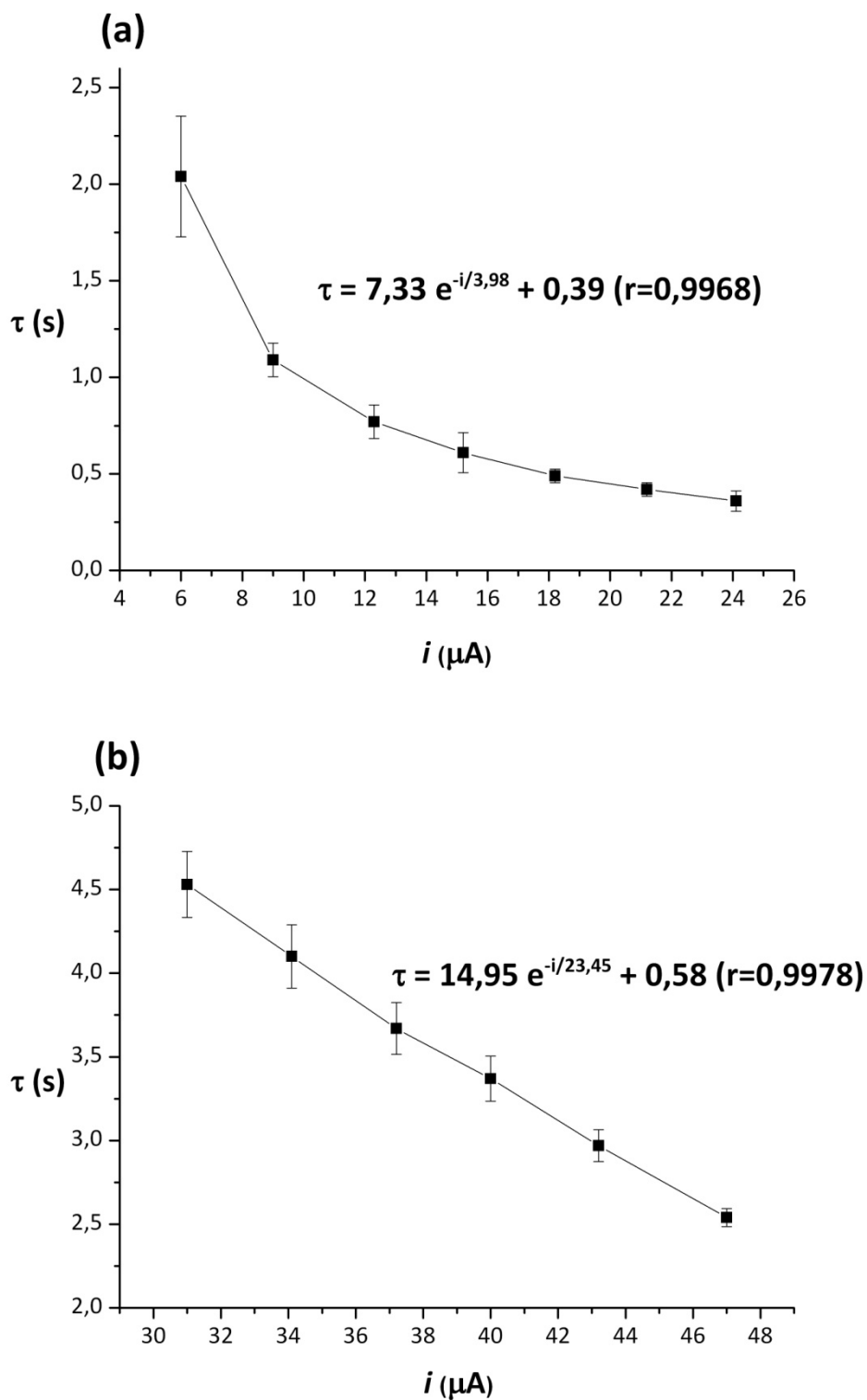
početnim potencijalima pozitivnijim od 0 V. Potencijal oksidacije histamina se nije značajno menjao u ispitivanom opsegu početnog potencijala i iznosio je $\sim 1,16$ V. Početni potencijal od $-0,2$ V je usvojen kao optimalni u svim daljnim ispitivanjima na zlatnoj elektrodi, s obzirom da je reproduktivnost analitičkog signala pri ovom početnom potencijalu bila najbolja (RSD = 2,78%). Završni potencijal ($E_{\text{završno}}$) u svim ispitivanjima je bio 1,35 V, uzimajući u obzir da se u odabranom elektrolitu histamin na čvrstoj zlatnoj elektrodi oksidovao pri potencijalu od $\sim 1,16$ V.

4.1.2.4 Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina

Uticaj struje oksidacije na analitički signal za rastvore histamina sadržaja 10 mg/dm^3 je ispitan u intervalu od $6,0 \mu\text{A}$ do $24,1 \mu\text{A}$, dok je u rastvorima histamina sadržaja 50 mg/dm^3 ispitan interval obuhvatio struje oksidacije od $16,0 \mu\text{A}$ do $46,0 \mu\text{A}$. Dobijene zavisnosti vremena oksidacije od struje oksidacije su prikazane na slici 23. Svaka tačka na dijagramima predstavlja srednju vrednost pet ponovljenih analiza, dok prikazani intervali oko svake tačke predstavljaju reproduktivnost za ispitanu struju oksidacije izraženu kao 2SD.

Kao što se moglo očekivati, analitički signal histamina je opadao sa porastom struje oksidacije po eksponencijalnoj funkciji u oba slučaja, za niži i viši sadržaj histamina. Za niži sadržaj histamina, sa porastom struje oksidacije poboljšavala se i reproduktivnost. Pri višim sadržajima histamina (50 mg/dm^3), reproduktivnost se nije značajno menjala sa porastom struje oksidacije do čak $40 \mu\text{A}$, što se može uočiti i na slici 23b. Struje oksidacije više od $40 \mu\text{A}$ su ipak doprinosile poboljšanju reproduktivnosti i smanjenju relativne standardne devijacije u slučaju čvrste zlatne elektrode.

Primenom nižih struja oksidacije potencijal oksidacije histamina se pomerao ka pozitivnijim vrednostima usled dobijanja razvučenijih hronopotenciograma i kretao se u intervalu od 1140 mV do 1200 mV.



Slika 23. Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina (a) $C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$ i (b) $C_{\text{His}} = 50 \text{ mg/dm}^3$; zlatna elektroda.

Optimalni eksperimentalni uslovi hronopotenciometrijskog određivanja histamina na čvrstoj zlatnoj elektrodi su sumarno prikazani u tabeli 9 (Stojanović & Švarc-Gajić, *in press*).

Tabela 9. Optimalni eksperimentalni uslovi hronopotenciometrijskog određivanja histamina na čvrstoj zlatnoj elektrodi.

Parametar	Optimalni uslovi
Pomoćni elektrolit	HCl
Koncentracija pomoćnog elektrolita (mol/dm ³)	0,0025
E_0 (V)	- 0,2
$E_{završna}$ (V)	1,35
I_{opseg} (μA)	6 - 47

4.1.2.5 Uticaj koncentracije na analitički signal histamina

Uticaj koncentracije histamina na analitički signal je ispitan za tri koncentraciona opsega: 2 - 10 mg/dm³, 10 - 50 mg/dm³ i 20 - 100 mg/dm³. Struje oksidacije su iznosile redom: 7 μA za prvi opseg, 30,3 μA za drugi opseg i 47 μA za treći opseg. Eksperimenti su izvedeni u pet ponavljanja za svaki ispitani opseg.

Linearna zavisnost analitičkog signala histamina od koncentracije je dobijena za sva tri ispitana opsega sadržaja. U tabeli 10 su date vrednosti nagiba, odsečka, standardne devijacije nagiba i odsečka kao i koeficijenti korelacije za svaki od tri ispitana opsega.

Tabela 10. Zavisnost vremena oksidacije od sadržaja histamina (zlatna elektroda).

Opseg sadržaja (mg/dm ³)	Zavisnost ^a	SD _b ^b	SD _a ^c	Koeficijent korelacije
2 – 10	$\tau = 0,766 \times C_{\text{His}} + 1,282$	0,074	0,084	0,9980
10 – 50	$\tau = 0,042 \times C_{\text{His}} + 0,778$	0,003	0,075	0,9950
20 – 100	$\tau = 0,027 \times C_{\text{His}} + 1,099$	0,002	0,090	0,9945

^a τ , vreme oksidacije u sekundama; C_{His} , sadržaj histamina u mg/dm³.

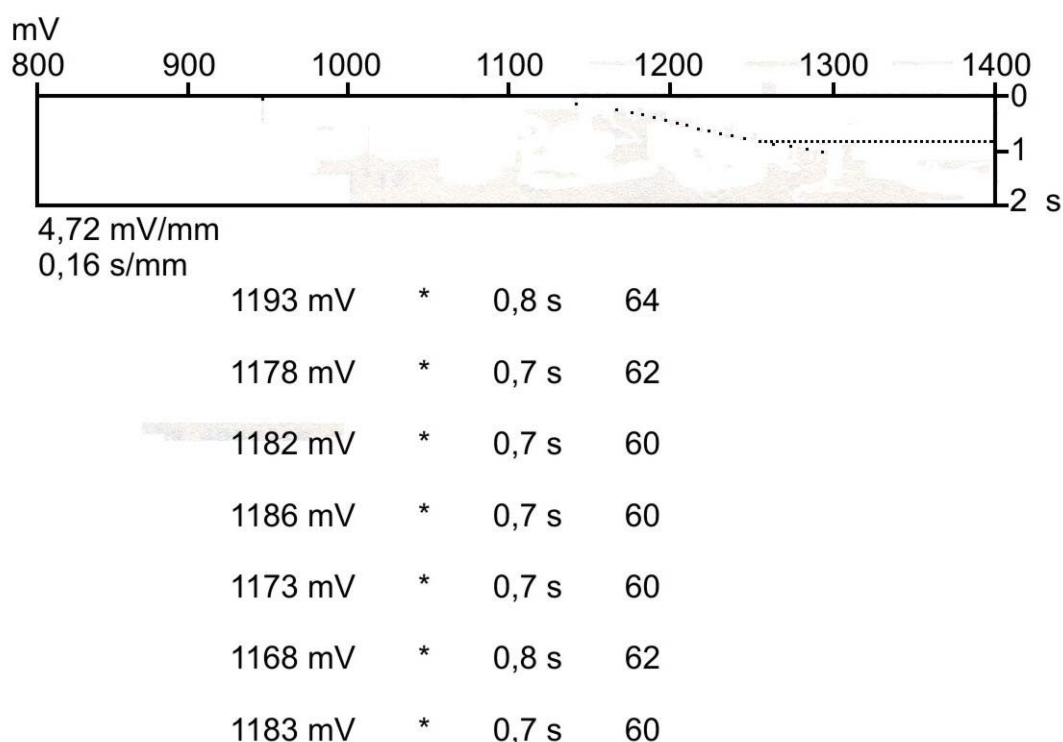
^b SD_b, standardna devijacija nagiba (n = 5).

^c SD_a, standardna devijacija odsečka (n = 5).

Kao i u slučaju tankoslojne živine elektrode, odsecci na osi τ nisu bili zanemarljivi, zbog čega se i u ovom slučaju preporučuje primena metode kalibracione krive za kvantifikaciju histamina.

4.1.2.6 Ponovljivost i reproduktivnost

Ponovljivost i reproduktivnost su određene u rastvorima sadržaja 5 mg/dm^3 i 50 mg/dm^3 histamina. Struje oksidacije su iznosile $9 \text{ } \mu\text{A}$ i $47 \text{ } \mu\text{A}$ za niži i viši sadržaj, redom. Ponovljivost je određena na osnovu rezultata sedam uzastopnih analiza istog rastvora, dok je reproduktivnost određena na osnovu rezultata pet analiza različitih rastvora istog sadržaja histamina. Između analiza, zlatna elektroda je mehanički čišćena filter-hartijom nakvašenom bidestilovanom vodom. Nakon toga je sledilo elektrohemijsko čišćenje cikličnom promenom potencijala konstantnom stujom. Originalni zapis analizatora pri određivanju ponovljivosti u rastvoru sadržaja histamina 5 mg/dm^3 je prikazan na slici 24.



Slika 24. Ponovljivost određivanja sa kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama na čvrstoj zlatnoj elektrodi. $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg/dm}^3$; $i = 9 \text{ } \mu\text{A}$.

Relativne standardne devijacije analitičkog signala histamina su u slučaju ponovljivosti iznosile 2,58% za niži sadržaj, i 1,73% za viši sadržaj histamina. Histamin se na zlatnoj elektrodi oksidovao pri potencijalima od $\sim 1180 \text{ mV}$. Relativne standardne devijacije

potencijala oksidacije histamina su redom, za niži i viši sadržaj histamina, iznosile 0,70% i 2,20%.

U slučaju reproduktivnosti, RSD su iznosile 3,57% i 6,89% za niži i viši sadržaj histamina, redom. Izračunate vrednosti RSD su ukazale na veoma dobru ponovljivost i reproduktivnost određivanja histamina na čvrstoj zlatnoj elektrodi.

4.1.2.7 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije i granica kvantifikacije su određene pri prethodno definisanim optimalnim uslovima, koristeći isti kriterijum kao kod tankoslojne živine elektrode. Primenjena struja oksidacije je iznosila 6 μA . Ostvarena granica detekcije je, u slučaju čvrste zlatne elektrode iznosila 0,27 mg/dm^3 , dok je granica kvantitativnog određivanja iznosila 0,48 mg/dm^3 .

4.1.2.8 Interferencije

Selektivnost čvrste zlatne elektrode u pogledu oksidacije histamina je ispitana u prisutvu istih aminokiselina kao i kod ispitivanja selektivnosti tankoslojne živine elektrode.

Dvokomponentni standardni rastvori sa histaminom i ispitivanom aminokiselinom su analizirani pri prethodno definisanim optimalnim uslovima zasebno za svaku aminokiselinu. Analizom smeše histamina i aminokiselina utvrđeno je da pri primenjenim uslovima hronopotenciometrijske analize dolazi pored oksidacije histamina i do oksidacije aminokiselina. U slučaju čvrste zlatne elektrode, uticaj aminokiselina na analitički signal histamina je bio znatan. Zapravo, u prisustvu aminokiselina dobijeni signali su bili znatno veći u poređenju sa signalima dobijenim u model rastvoru koji je sadržao samo histamin. Za razliku od tankoslojne živine elektrode, gde su se pri nižim koncentracija aminokiselina i histamina dobijali radvojeni platoi pojedinih komponenti, u slučaju čvrste zlatne elektrode to nije bio slučaj. S obzirom na mehanizam generisanja signala u slučaju ove elektrode, nije se ni očekivalo razdvajanje platoa histamina i aminokiselina. Naime, elektrogenerisani hlor, kao jako oksidaciono sredstvo, je imao podjednaku sposobnost oksidacije kako aminokiselina tako i histamina, tako da je uvećan signal u suštini bio zbirni signal histamina i aminokiseline, a poticao je od istovremene oksidacije histamina i aminokiselina pri istim vrednostima potencijala radne elektrode.

4.1.2.9 Ispitivanje tačnosti definisane metode

U cilju potvrde tačnosti definisane posredovane hronopotenciometrijske metode na zlatnoj elektrodi, analizirani su standardni rastvori histamina pripremljeni u pomoćnom elektrolitu. Određeni sadržaji i izračunate vrednosti „*recovery*“ testa prikazani su u tabeli 11.

Tabela 11. Rezultati određivanja histamina u standardnim rastvorima primenom posredovane hronopotenciometrije sa čvrstom zlatnom elektrodom.

Histamin dodat (mg/dm ³)	Histamin određen (mg/dm ³)
1,5	1,57 ± 0,01 ^a (104,67) ^b
5,0	5,06 ± 0,10 (101,20)
7,0	7,11 ± 0,34 (101,57)
10,0	10,42 ± 0,52 (104,20)
20,0	21,08 ± 0,77 (105,4)

^a Srednja vrednost ± 2 SD, n=5.

^b Vrednosti u zagradi predstavljaju srednju vrednost „*recovery*“ testa u %, n=5.

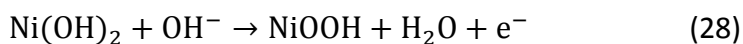
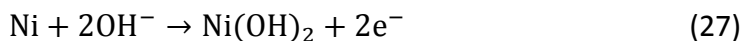
Reproduktivnost određivanja, izražena kao relativna standardna devijacija se kretala do 2,50%. Vrednosti „*recovery*“ testa su se kretale od 101,20% do 105,4%, tako da se može zaključiti da definisana metoda, pored dobre reproduktivnosti, poseduje i zadovoljavajuću tačnost određivanja.

4.1.3 Tankoslojna niklova elektroda

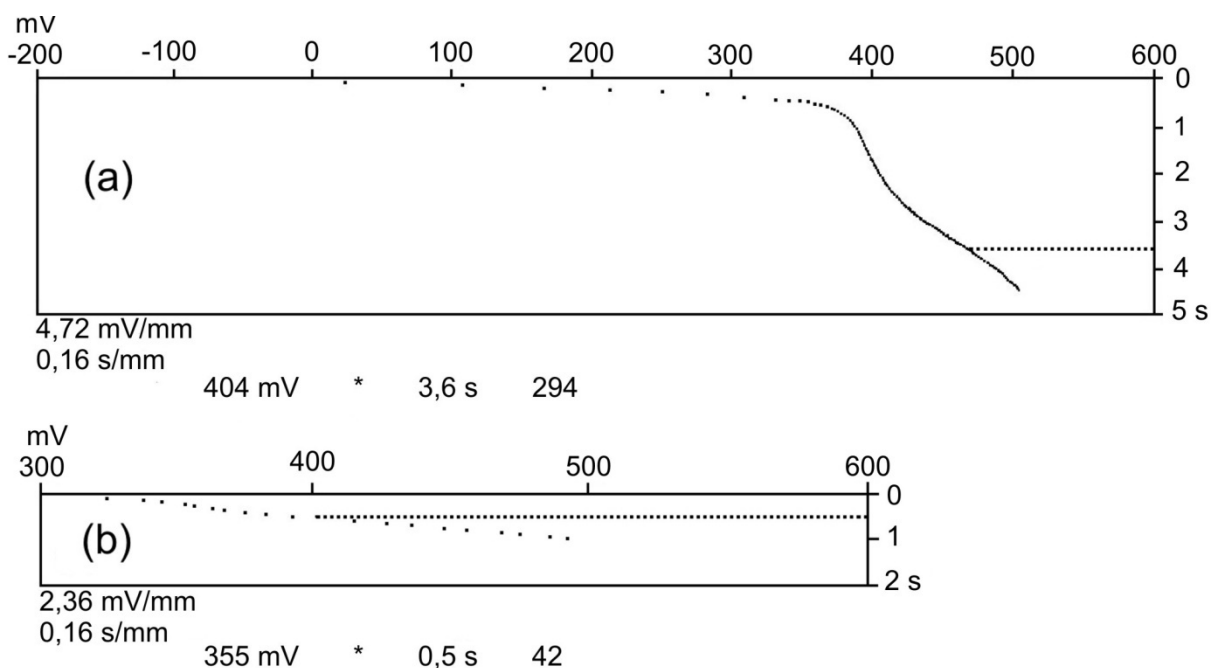
Anodnom oksidacijom elektroda na bazi nikla u baznoj sredini stvara se tanak sloj metalnog hidroksida i oksihidroksida koji deluju kao katalizatori pri prenosu elektrona i doprinose da se elektrodne reakcije odvijaju pri mnogo blažim uslovima (Yi et al., 2007; Huang, Zheng & Li, 2007; Wu, 2007). Zbog veoma efikasnog elektrokatalitičkog efekta redoks para Ni(OH)₂/NiOOH, mnoge organske supstance mogu da se elektrooksiduju pri umerenim potencijalima ovih elektroda (Deo, Lawrence & Wang, 2004; Fleischmann, Korinek & Plecher, 1971; Giovanelli et al., 2003).

U cilju formiranja katalitičkog redoks sistema nikel-hidroksid/nikel-oksihidroksid (Ni(OH)₂/NiOOH), pre hronopotenciometrijskog određivanja histamina bilo je neophodno tankoslojnu niklovu elektrodu podvrgnuti cikličnim promenama potencijala od -0,4 V do 0,5

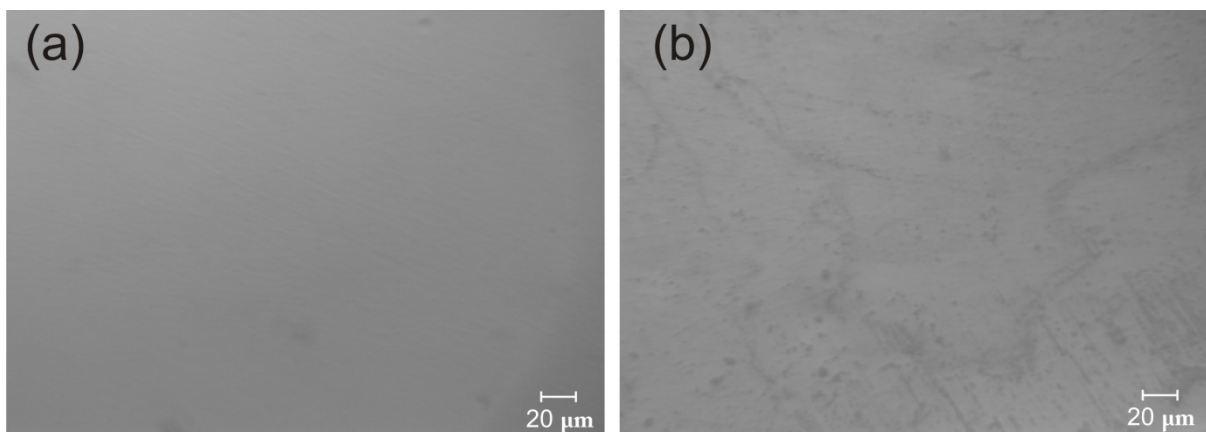
V, uz konstantnu struju od 20 μA u rastvoru 0,5 mol/dm³ NaOH. Ovaj proces je u suštini predstavljao aktivaciju niklove elektrode. Tokom ciklične promene potencijala dešavale se elektrodne reakcije. Elektrohemijske reakcije koje odgovaraju prvom ciklusu promene potencijala (Slika 25a) i stacionarnim uslovima (Slika 25b) na površini elektrode mogu se opisati sledećim jednačinama:



Primenjena konstantna anodna struja u prvom ciklusu je izrokovala oksidaciju elementarnog nikla (Slika 25a). U baznim rastvorima oksidacijom nikla je nastajao Ni(OH)₂ što se manifestovalo veoma oštrim signalom na potencijalu od ~ 0,4 V. Sledeće ciklične promene potencijala su uzrokovale formiranje Ni(OH)₂/NiOOH sloja. Formiranje Ni(OH)₂/Ni(OOH) se moglo uočiti i na mikrofotografijama prikazanim na slici 26, gde je jasno uočljiva morfološka razlika između neaktivirane (Slika 26a) i aktivirane (Slika 26b) površine elektrode. Reproductivnost nikl redoks para je ostvarena nakon 20 ciklusa, što se manifestovalo pojavom stabilnog i reproductivnog hronopotenciometrijskog signala. Stabilan i reproductivan signal nakon 20 cikličnih promena potencijala i na potencijalu od ~ 0,36 V, je odgovarao prelazu Ni(OH)₂ u NiOOH (Jednačina 28) (Slika 25b).

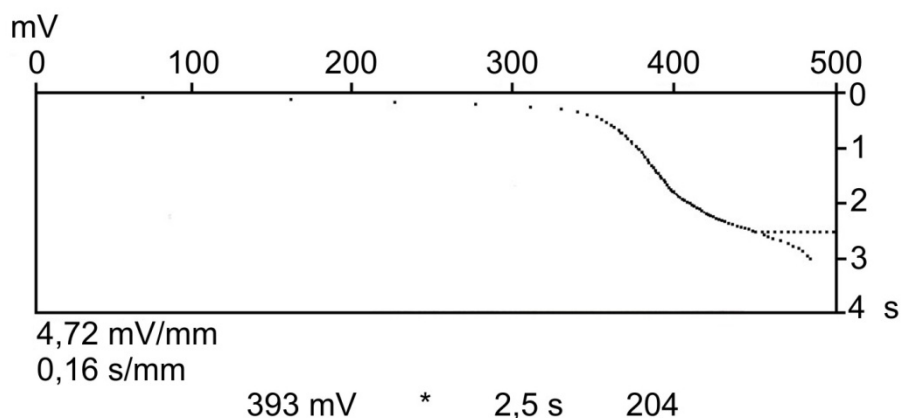


Slika 25. Hronopotenciogram tankoslojne niklove elektrode u 0,5 mol/dm³ NaOH; $i = 20 \mu\text{A}$; hronopotenciogrami prvog ciklusa (a) i dvadesetog ciklusa (b).



Slika 26. Mikrofotografije tankoslojne niklove elektrode (a) pre i (b) posle aktiviranja u 0,5 mol/dm³ NaOH.

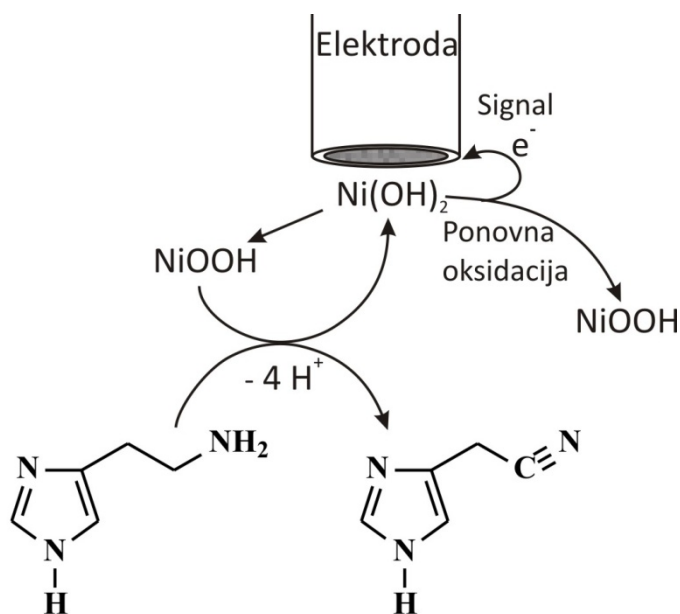
Nakon formiranja stabilnog Ni(OH)₂/NiOOH sloja, ispitano je hronopotenciometrijsko ponašanje histamina na aktiviranoj niklovoj elektrodi. Na slici 27 je prikazan hronopotenciogram dobijen analizom 10 mg/dm³ histamina u 0,5 mol/dm³ NaOH. Povećanje signala u rastvoru sa 10 mg/dm³ histamina u odnosu na slepu probu (0,5 mol/dm³ NaOH) je ukazalo na oksidaciju histamina uz povećanje signala. Analitički signal histamina na potencijalu od ~ 0,4 V koji je bio blizak potencijalu Ni(OH)₂/NiOOH prelaza ukazivao je na katalitički efekat nikla u elektron transfer mehanizmu.



Slika 27. Hronopotenciogram rastvora histamina u 0,5 mol/dm³ NaOH na tankoslojnoj niklovoj elektrodi. C_{HIS} = 10 mg/dm³; i = 20 µA.

Oksidacioni mehanizam histamina na niklovoj elektrodi se može opisati kao što su Fleischmann i sadradnici predložili gde se N-kraj molekula (-CH₂-NH₂) prevodi u nitril grupu (-CN) u 4-elektron transfer reakciji (Slika 28). Elektrohemijski procesi na elektrodi uključuju prvo oksidaciju Ni(OH)₂ do NiOOH na površini elektrode pri potencijalu od ~ 0,36 V. Elektrodnu reakciju prati reakcija redukcije NiOOH do Ni(OH)₂ adsorbovanim histaminom, i

nakon toga elektrohemijaska re-oksidacija $\text{Ni}(\text{OH})_2$ konstantnom strujom (Švarc-Gajić & Stojanović, 2010). Hemijaska redukcija NiOOH i indirektni prenos elektrona između elektrode i histamina preko NiOOH su mogući nakon elektrohemijaskog formiranja NiOOH . U prisustvu histamina, potencijal $\text{Ni}(\text{OH})_2/\text{NiOOH}$ prelaza je pomeren prema nešto pozitivnijim vrednostima potencijala ($\sim 0,4$ V) zbog transfera elektrona između histamina i NiOOH . Predloženi mehanizam oksidacije histamina odgovara ECE mehanizmu. Nakon elektrodne reakcije oksidacije nikel-hidroksida do nikel-oksihidroksida, sledi hemijaska reakcija oksidacije histamina nikel-oksihidroksidom, a nastali nikel-hidroksid ponovnom elektrodnom reakcijom doprinosi povećanju analitičkog signala.



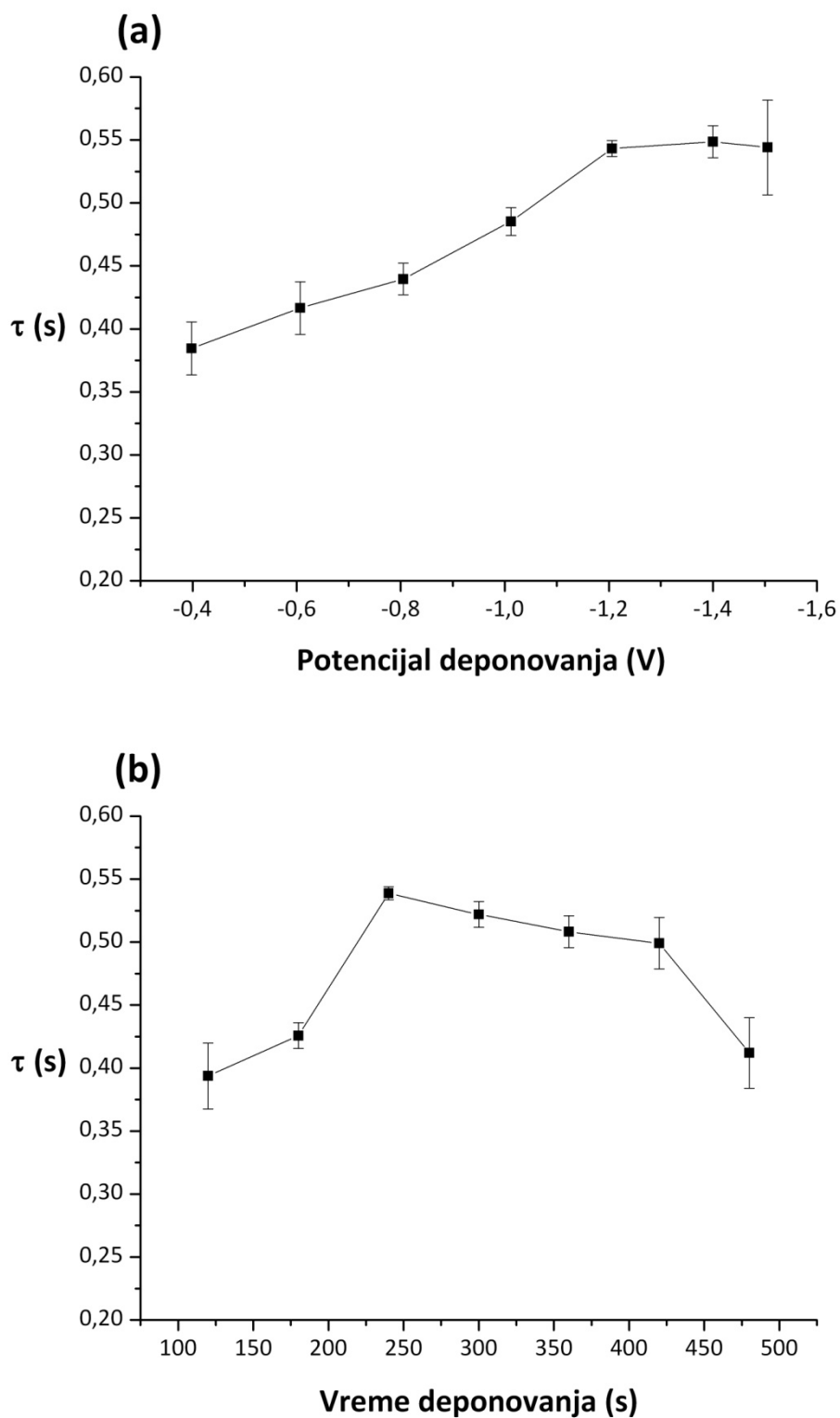
Slika 28. Mehanizam oksidacije histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi (Švarc-Gajić & Stojanović, 2010).

Ukoliko bi se u obzir uzela i elektrodna reakcija aktiviranja niklove elektrode gde se dešava elektro-oksidacija nikla do nikel-hidroksida u alkalnoj sredini, onda bi mehanizam generisanja signala odgovarao EECE mehanizmu. Međutim izjednačavanje sa EECE mehanizmom nije adekvatno jer se prve dve elektrodne reakcije ne dešavaju sukcesivno. Naime, prva elektrodna reakcija se odigrava pri aktiviranju elektrode cikličnim promenama potencijala konstantnom strujom.

Predloženi mehanizam se može uporediti sa mehanizmima generisanja signala koji su karakteristični za bioelektrohemijske metode (biosenzori) gde se, na primer, upotrebom diamino-oksidge (Keow *et al.*, 2007) ili monoamino-oksidge (Hasebe *et al.*, 1997), elektrohemijski prati i meri utrošak kiseonika ili generisanje H_2O_2 u enzimskoj reakciji. U tim slučajevima, imobilizovani enzimi slično kao i $\text{Ni}(\text{OH})_2/\text{NiOOH}$ par, igraju ulogu posrednika.

4.1.3.1 Optimizacija eksperimentalnih parametara koji utiču na aktivnost niklove elektrode

U cilju formiranja tankoslojne niklove elektrode koja pruža najveću efikasnost u pogledu oksidacije histamina, bilo je neophodno ispitati uticaj debljine sloja nikla i potencijala formiranja elektrode na analitički signal histamina. U cilju optimizacije uslova formiranja tankoslojne niklove elektrode, poređeni su veličina i reproduktivnost analitičkog signala histamina ($C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$) na elektrodama formiranim pri različitim potencijalima i vremenima deponovanja. Potencijal formiranja tankoslojne niklove elektrode je variran u intervalu od -0,4 do -1,5 V, dok je vreme deponovanja varirano od 120 s do 480 s. Sva elektrohemijska merenja su izvedena u pet ponavljanja, a dobijeni rezultati ($\tau_{\text{srednje}} \pm 2\text{SD}$) su prikazani na slici 29.



Slika 29. Uticaj potencijala formiranja (a) i vremena deponovanja (b) tankoslojne niklove elektrode na analitički signal histamina. $C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$.

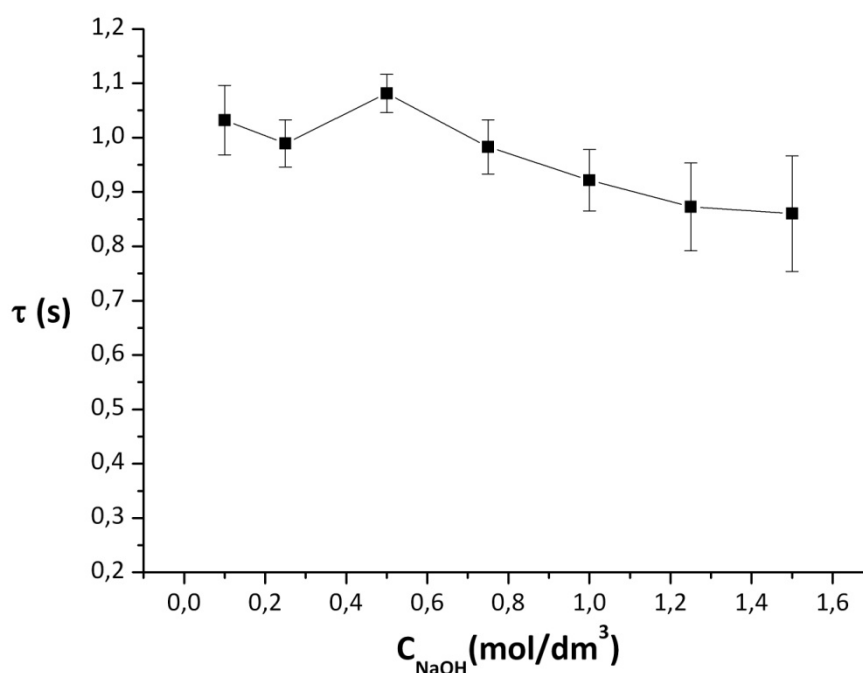
Analitički signal histamina je bio relativno konstantan u intervalu potencijala deponovanja od -1,2 V do -1,5 V (Slika 29a), sa najmanjom relativnom standardnom

devijacijom (RSD = 1,20%) pri potencijalu deponovanja od -1,2 V. Najveći signal histamina sa najboljom reproduktivnošću (RSD = 0,90%) je zabeležen pri vremenu formiranja elektrode od 240 s (Slika 29b). Pri dužim vremenima deponovanja formirali su se deblji i kompaktniji filmovi nikla na kojima se histamin u manjoj meri adsorbovao, i zbog toga je analitički signal histamina opadao. Manja poroznost filma nikla je za rezultat imala manji broj aktivnih centara dostupnih za adsorpciju histamina i njegovu oksidaciju. Pored toga, prenos elektrona kod debljih filmova nikla je bio otežan. Pri formiranju debljih slojeva dolazilo je do odvajanja nikla od staklastog ugljenika. Zbog svega navedenog, formiranje tankoslojne niklove elektrode za potrebe određivanja histamina je obuhvatalo deponovanje nikla pri konstantnom potencijalu od -1,2 V u toku 240 s. Niklova tankoslojna elektroda formirana na ovaj način je bila stabilna tokom ~ 30 analiza.

4.1.3.2 Uticaj vrste i koncentracije pomoćnog elektrolita na analitički signal histamina

Preliminarna ispitivanja uticaja vrste pomoćnog elektrolita na analitički signal histamina su izvedena u kiselim i alkalnim medijumima. Ova ispitivanja su pokazala da je alkalni medijum preduslov za anodnu detekciju histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi usled neophodnosti formiranja $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ redoks para. U cilju odabira odgovarajućeg pomoćnog elektrolita, poređeni su analitički signali histamina (5 mg/dm^3) u NaOH, KOH, NH_3 i NaCO_3 . Koncentracija svih ispitanih elektrolita je iznosila $0,5 \text{ mol/dm}^3$. Takođe su poređeni signali analita dobijeni u ekvimolarnim smešama NaOH i KOH, NaOH i NH_3 , KOH i NH_3 , NaOH i NaCO_3 , KOH i NaCO_3 ukupne koncentracije $0,5 \text{ mol/dm}^3$, kao i u Britton-Robinson puferima (pH 9, pH 10 i pH 12). Hronopotenciometrijsko merenje je izvođeno na prethodno aktiviranoj tankoslojnoj niklovoj elektrodi u opsegu potencijala od -0,4 V do 0,5 V, uz primenu struje oksidacije od $18,1 \text{ } \mu\text{A}$. Uzimajući u obzir veličinu i oštrinu dobijenih analitičkih signala histamina, NaOH je izabran kao odgovarajući pomoćni elektrolit.

Uticaj koncentracije NaOH na vreme oksidacije histamina je ispitan u opsegu koncentracija od $0,1 \text{ mol/dm}^3$ do $1,5 \text{ mol/dm}^3$ NaOH. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 30. S obzirom da je signal histamina u $0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaOH bio najviši uz najbolju reproduktivnost, ova koncentracija natrijum-hidroksida je izabrana za sva dalja ispitivanja.



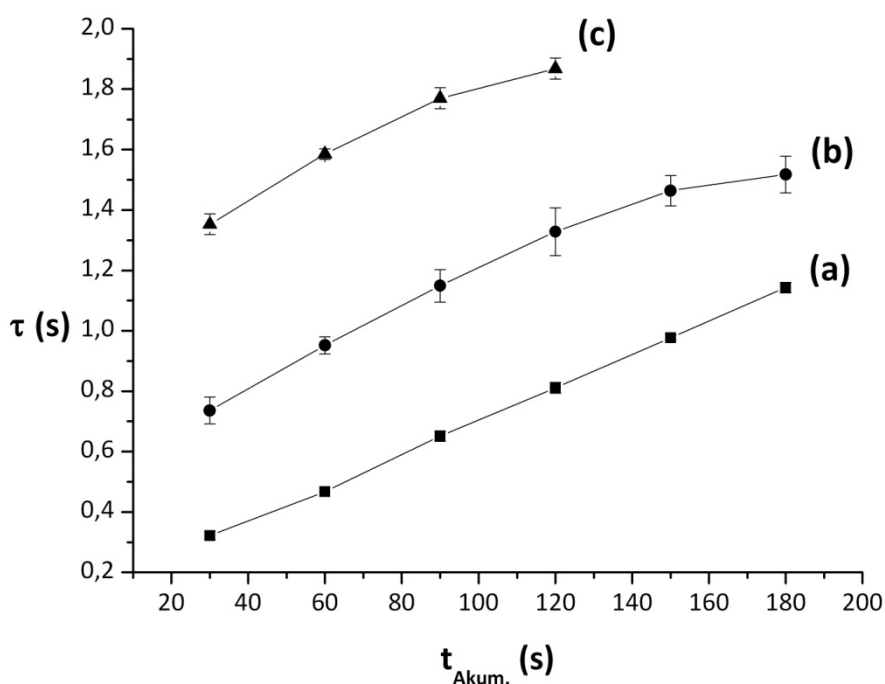
Slika 30. Uticaj koncentracije NaOH na analitički signal histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi. $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg/dm}^3$, $i = 18,1 \text{ } \mu\text{A}$.

4.1.3.3 Uticaj vremena akumulacije na analitički signal histamina

Tokom ispitivanja je uočeno da je analitički signal histamina bio mnogo veći ukoliko je pre hronopotenciometrijskog merenja radna elektroda bila tokom izvesnog vremena u kontaktu sa ispitivanim rastvorom. Ovo može biti posledica adsorpcije i koncentrovanja analita na radnoj elektrodi pre analize. Da bi se ispitao uticaj adsorpcije na analitički signal histamina, merenja su izvedena u rastvorima različitih sadržaja histamina (2 mg/dm^3 , 5 mg/dm^3 i 20 mg/dm^3) pri vremenima adsorptivne akumulacije od 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s i 180 s. Tokom akumulacije, potencijal radne elektrode je iznosio 0 V, a ispitivani rastvori su intenzivno mešani. Radnoj elektrodi nije bio saopštavan potencijal jer se pretpostavilo da se radi o nespecifičnj adsorpciji. Nakon isteka vremena akumulacije, pre hronopotenciometrijskog ciklusa merni rastvori su umirivani u trajanju od 15 s. Struja oksidacije u analitičkom koraku je iznosila $30 \text{ } \mu\text{A}$. Sva ispitivanja su izvedena u pet ponavljanja.

Na slici 31 je prikazan uticaj vremena akumulacije ($t_{\text{Akum.}}$) na analitički signal histamina (τ). Prikazane su srednje vrednosti vremena oksidacije analita, a reproduktivnost je iskazana kao 2SD. Kao što se može videti na slici 31, za sve tri ispitane koncentracije vreme adsorpcije je značajno doprinosilo povećanju analitičkog signala. Krive zavisnosti vremena oksidacije od

vremena akumulacije za sadržaje histamina od 5 mg/dm^3 i 20 mg/dm^3 imale su karakterističan oblik koji je tipičan za adsorptivnu akumulaciju. Pri višim koncentracijama histamina, dolazilo je do zasićenja površine radne elektrode adsorbovanim histaminom što se manifestovalo zakrivljenjem krivi zavisnosti $\tau = f(t_{\text{Akum.}})$. U rastvoru histamina sadržaja 5 mg/dm^3 , do zasićenja je dolazilo pri vremenu akumulacije od 140 s , dok je u rastvoru sadržaja histamina 20 mg/dm^3 do zasićenja dolazilo pri vremenu od $\sim 90 \text{ s}$ (Slika 31 b i c). U posljednjem slučaju, vremena akumulacije duža od 120 s su dovela do značajnog razvlačenja hronopotenciograma i problema sa određivanjem prevojne tačke. Pri nižim sadržajima histamina, adsorpciona kriva je bila manje zakrivljena (Slika 31a) što se moglo objasniti nepotpunim zasićenjem površine elektrode prisutnim histaminom pri ispitanim vremenima adsorpcije.



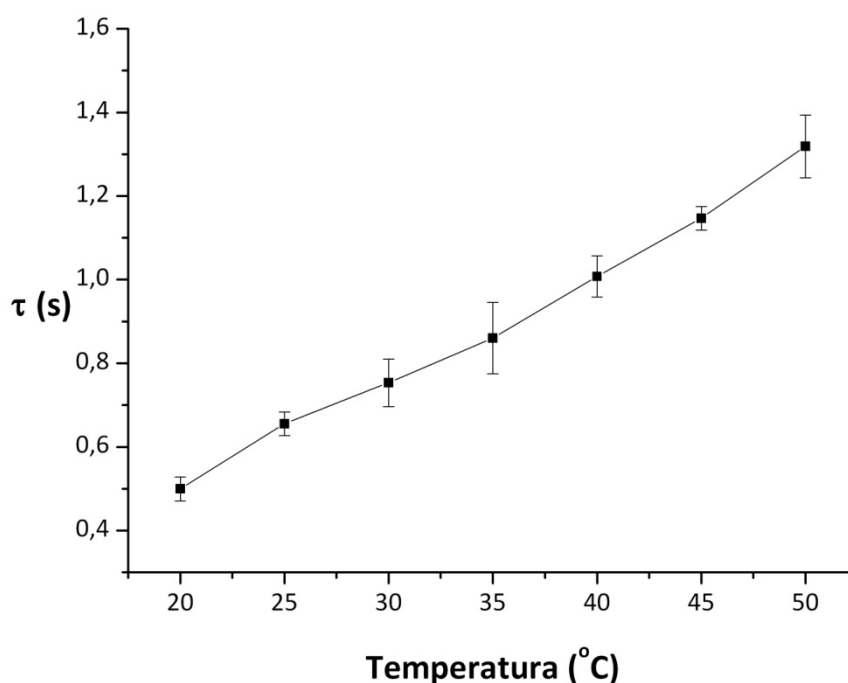
Slika 31. Uticaj vremena akumulacije na analitički signal histamina. $i = 30 \mu\text{A}$; (a) $C_{\text{His}} = 2 \text{ mg/dm}^3$; (b) $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg/dm}^3$; (c) $C_{\text{His}} = 20 \text{ mg/dm}^3$; tankoslojna niklova elektroda.

Na osnovu dobijenih rezultata moglo se zaključiti da odabir odgovarajućeg vremena akumulacije zavisi od opsega koncentracije histamina rastvora koji se analiziraju. Za ispitivanja u ovom radu vreme akumulacije od 30 s je primenjeno u većini analiza. Međutim pri analizi rastvora sa nižim sadržajem histamina (do 2 mg/dm^3) preporučuje se svakako deponovanje pri dužim vremenima ($\sim 240 \text{ s}$) radi ostvarivanja odgovarajuće osetljivosti.

4.1.3.4 Uticaj temperature na analitički signal histamina

Uticaj temperature na analitički signal histamina je ispitan u opsegu od 20°C do 55°C. Ispitivani rastvori su termostetirani zagrejanom vodom koja je strujala kroz dvostruki zid procesnih posuda (Slika 10, Slika 12b). Vreme termostetiranja pre analize je iznosilo 5 minuta. Hronopotenciometrijsko merenje je izvedeno pri vremenu akumulacije od 30 s i struji oksidacije od 30 μA , u model rastvoru histamina sadržaja 5 mg/dm^3 .

Rezultati ispitivanja su prikazani na slici 32. Svaka tačka na dijagramu predstavlja srednju vrednost pet uzastopnih analiza, dok vertikalne crtice na tačkama označavaju reproduktivnost izraženu kao 2SD.



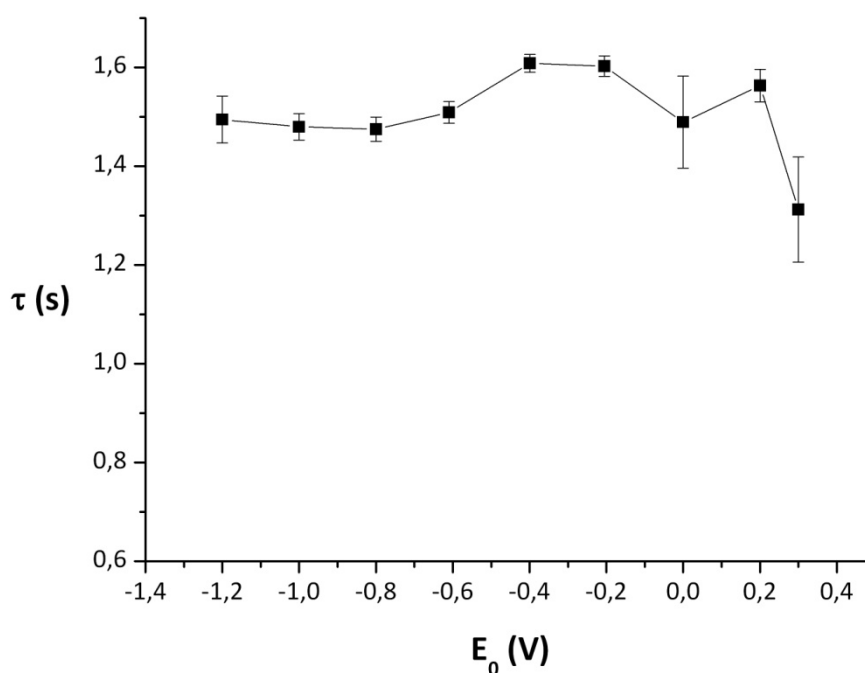
Slika 32. Uticaj temperature na analitički signal histamina. $i = 30 \mu\text{A}$; $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg}/\text{dm}^3$; tankoslojna niklova elektroda.

U skoro celokupnom ispitivanom temperaturnom opsegu (do 50°C) uočeno je linearno povećanje vremena oksidacije histamina sa temperaturom. Povećanje signala je ukazalo na ubrzanje kinetike oksidacije histamina pri višim temperaturama. Temperature više od 50°C su uzrokovale mehaničku nestabilnost filma nikla, koja se manifestovala odvajanjem sloja nikla od staklastog ugljenika. Predpostavlja se da je porast temperature dovodio do promene energetskog stanja (ΔG^0) sloja metala, pri čemu se narušavala njegova stabilnost (Brainina & Neyman, 1993).

Iako temperatura negativno utiče na adsorpcionu akumulaciju analita, ukupni efekat povišene temperature pri hronopotenciometrijskom određivanju histamina uz prethodnu adsorptivnu akumulaciju je bio znatno povećanje signala histamina. Uzimajući u obzir suprotne efekte temperature na adsorpciju histamina na površini elektrode i na elektrohemijsku reakciju, od velike važnosti je izabrati onu temperaturu koja će ubrzati reakciju prenosa elektrona a da pri tome ne utiče značajno na adsorptivnu akumulaciju. Za niže sadržaje histamina, više temperature su svakako povoljnije jer omogućavaju veću osetljivost određivanja. Za koncentracije histamina niže od 2 mg/dm^3 , preporučuje se temperatura od 45°C . Za više sadržaje histamina, temperature u intervalu od 20°C do 25°C su prihvatljive zbog bolje reproduktivnosti analitičkog signala. Sva dalja ispitivanja su izvedena pri sobnoj temperaturi ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), ukoliko drugačije nije navedeno.

4.1.3.5 Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina

Uticaj početnog potencijala na analitički signal je ispitan u intervalu od $-1,2 \text{ V}$ do $0,3 \text{ V}$, u model rastvoru histamina sadržaja 10 mg/dm^3 . Struja oksidacije je iznosila $30 \mu\text{A}$, dok je akumuliranje izvođeno u trajanju od 30 s . Vreme umirenja rastvora nakon akumulacije je iznosilo 15 s . Dobijeni rezultati su prikazani na slici 33, na kojoj svaka tačka predstavlja srednju vrednost pet analiza, dok vertikalne crte oko tačke predstavljaju reproduktivnost izraženu kao 2SD.

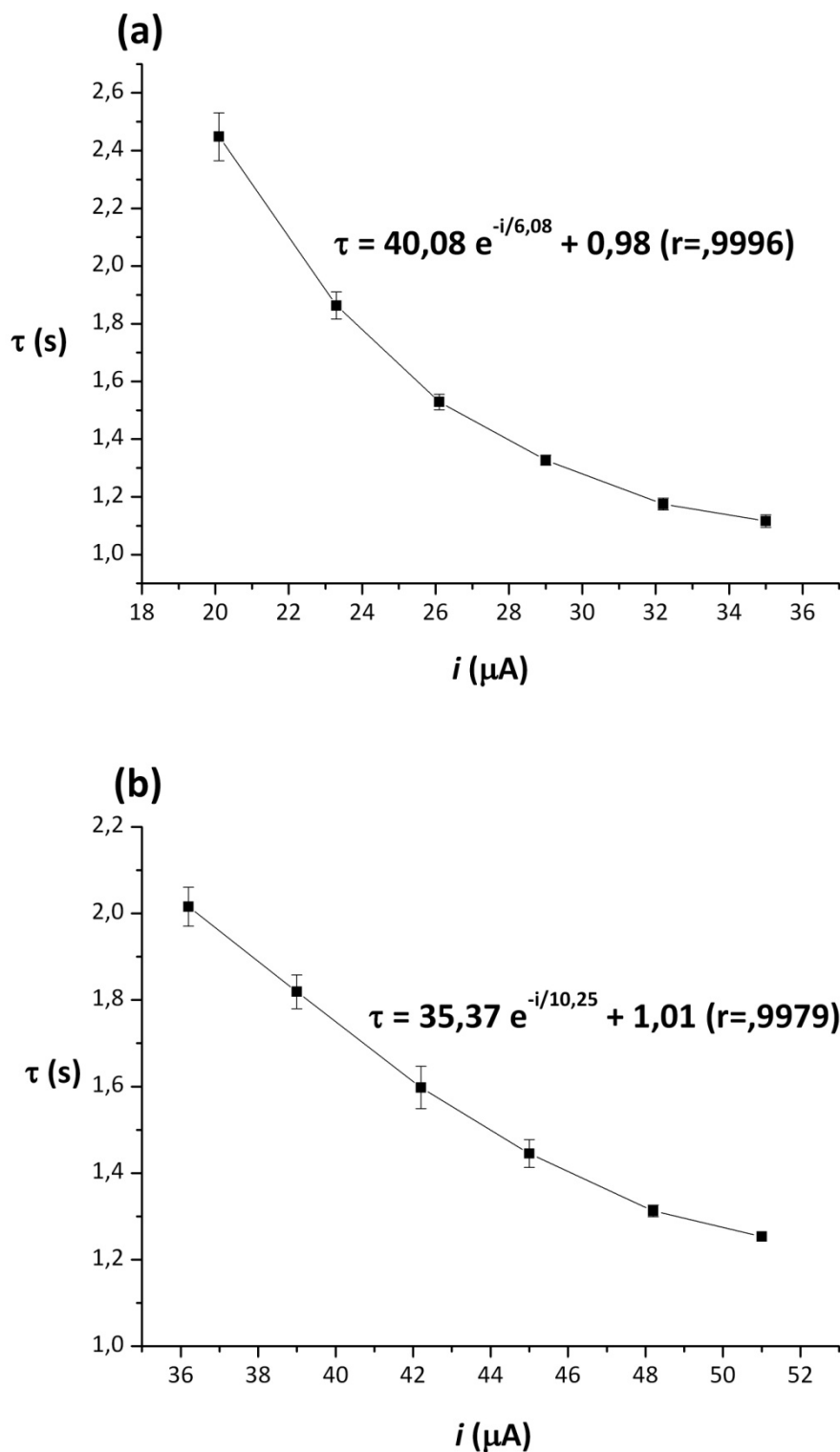


Slika 33. Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina. $C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$; $t_{\text{Akum.}} = 30 \text{ s}$; tankoslojna niklova elektroda.

Kao što se na slici 33 može videti, početni potencijal nije značajno doprinio promeni vremena oksidacije histamina. Početni potencijali pozitivniji od $-0,2 \text{ V}$ su međutim bili odgovorni za smanjenje reproduktivnosti određivanja. S obzirom na veličinu analitičkog signala i dobru reproduktivnost ($\text{RSD} = 2,11\%$), početni potencijal od $-0,4 \text{ V}$ je izabran kao odgovarajući u svim narednim određivanjima.

4.1.3.6 Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina

Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina uz primenu tankoslojne niklove elektrode je ispitan u rastvorima sadržaja 10 mg/dm^3 i 50 mg/dm^3 . Vreme akumulacije je iznosilo 30 s u oba slučaja, a vreme *umirenja* rastvora 15 s . Ispitivanjem su bile obuhvaćene struje od $20,1 \text{ } \mu\text{A}$ do $35 \text{ } \mu\text{A}$ za niži sadržaj histamina, i struje od $36,2 \text{ } \mu\text{A}$ do $51 \text{ } \mu\text{A}$ za viši sadržaj histamina. Na slici 34 su prikazani dobijeni rezultati izraženi kao srednje vrednosti pet analiza. Reproductivnost je prikazana vertikalnim crticama oko svake tačke izražena kao 2SD .



Slika 34. Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina. $t_{\text{Akum.}} = 30$ s; (a) $C_{\text{His}} = 10$ mg/dm^3 ; (b) $C_{\text{His}} = 50$ mg/dm^3 ; tankoslojna niklova elektroda.

Sa povećanjem struje oksidacije, vreme oksidacije histamina je opadalo po eksponencijalnoj funkciji u oba slučaja. Za niži sadržaj histamina, pad analitičkog signala histamina sa strujom je bio oštiji. Reproductivnost analitičkog signala histamina je bila znatno bolja primenom većih struja, usled dobijanja oštijih signala. Potencijal oksidacije histamina se neznatno pomerao ka pozitivnijim vrednostima pri primeni nižih struja oksidacije, što je bila posledica dobijanja razvučenijih hronopotenciograma.

U tabeli 12 su sumarno prikazani optimalni eksperimentalni uslovi za hronopotenciometrijsko određivanje histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi (Švarc-Gajić & Stojanović, 2010).

Tabela 12. Optimalni eksperimentalni uslovi hronopotenciometrijskog određivanja histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi.

Parametar	Optimalni uslovi
Pomoćni elektrolit	NaOH
Koncentracija pomoćnog elektrolita (mol/dm ³)	0,5
Aktivacija elektrode	20 ciklusa (-0,4 ÷ 0,5 V; i = 20 µA)
E_0 (V)	- 0,4
$E_{završna}$ (V)	0,5
I_{opseg} (µA)	18 - 50
Vreme akumulacije (s)	30 - 240
Temperatura (°C)	25

4.1.3.7 Uticaj koncentracije na analitički signal histamina

Karakter zavisnosti analitičkog signala od koncentracije je ispitan za tri opsega sadržaja histamina: od 0,5 mg/dm³ do 3 mg/dm³, od 5 mg/dm³ do 30 mg/dm³, i od 10 mg/dm³ do 110 mg/dm³. Vreme akumulacije je iznosilo 240 s, 30 s i 10 s za niži, srednji i viši opseg, redom, pri čemu su eksperimenti izvođeni u pet ponavljanja za svaki od ispitanih opsega koncentracija. Dobra linearna zavisnost analitičkog signala od sadržaja je dobijena za sva tri ispitana opsega sadržaja histamina. Pri koncentracijama histamina višim od 110 mg/dm³ histamina, dolazilo je do zakrivljenja krive $\tau = f(C_{His})$. Odstupanje od linearne zavisnosti pri višim sadržajima histamina se javljalo verovatno kao posledica zasićenja aktivnih centara

elektrode. Vrednosti nagiba, odsečka, standardne devijacije nagiba i odsečka, kao i koeficijenti korelacije su prikazani u tabeli 13. Na osnovu prikazanih rezultata se može videti da su odsecci na τ osi bili značajni, tako da se za kvantitativnu analizu preporučuje metoda kalibracione krive kao i kod prethodno razmatranih radnih elektroda.

Tabela 13. Zavisnost vremena oksidacije od sadržaja histamina (tankoslojna niklova elektroda).

Opseg sadržaja (mg/dm ³)	t _{Akum.} (s)	Zavisnost ^a	SD _b ^b	SD _a ^c	Koeficijent korelacije
0,5 – 3	240	$\tau = 0,154 \times C_{\text{His}} + 0,929$	0,005	0,007	0,9985
5 – 30	30	$\tau = 0,0398 \times C_{\text{His}} + 0,871$	0,002	0,101	0,9988
10 – 110	10	$\tau = 0,010 \times C_{\text{His}} + 0,668$	0,001	0,024	0,9916

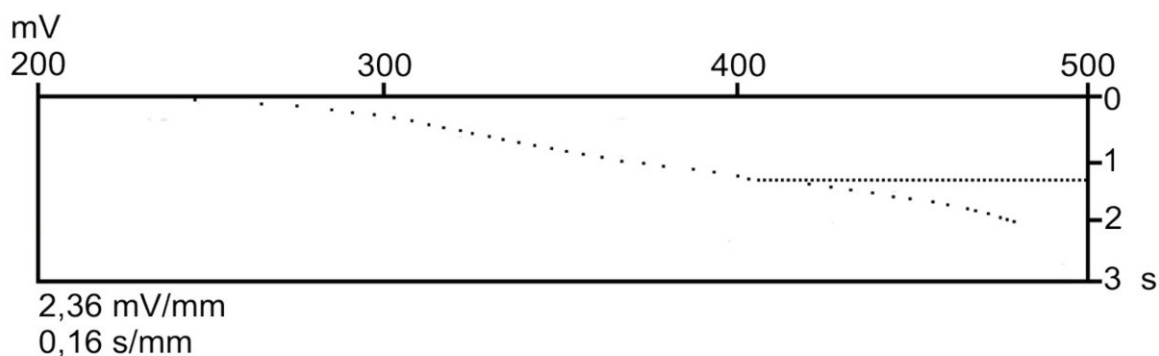
^a τ , vreme oksidacije u sekundama; C_{His} , sadržaj histamina u mg/dm³.

^b SD_b, standardna devijacija nagiba (n = 5)

^c SD_a, standardna devijacija odsečka (n = 5).

4.1.3.8 Ponovljivost i reproduktivnost

Ponovljivost (analitička reproduktivnost) je određena na osnovu sedam uzastopnih analiza rastvora histamina sadržaja 5 mg/dm³ i 50 mg/dm³, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima. Pre svake analize, elektroda je elektrohemijski čišćena cikličnim promenama potencijala konstantnom strujom (10 ciklusa). Primenjene struje oksidacije su iznosile 30 μ A i 47 μ A, dok je vreme akumulacije iznosilo 30 s. Nakon akumulacije, sledio je korak umirenja rastvora u trajanju od 15 s. Relativna standardna devijacija za niži sadržaj histamina je iznosila 3,71%, dok je za viši sadržaj iznosila 4,44%. Pri datim eksperimentalnim uslovima, histamin se na tankoslojnoj niklovoj elektrodi oksidovao pri relativno reproduktivnim vrednostima potencijala od \sim 380 mV. Relativne standardne devijacije potencijala oksidacije histamina na niklovoj elektrodi su iznosile 1,50% za sadržaj histamina od 5 mg/dm³ i 3,88% za rastvore histamina sadržaja 50 mg/dm³. Originalni zapis analizatora pri određivanju ponovljivosti u rastvoru sadržaja 5 mg/dm³ histamina je prikazan na slici 35. Reprodktivnost dobijena analizom pet različitih rastvora određenog sadržaja, izkazana kao relativna standardna devijacija je iznosila 0,85% za sadržaj histamina od 5 mg/dm³ i 2,95% za sadržaj histamina od 50 mg/dm³.



385 mV	*	1,2 s	98
386 mV	*	1,2 s	98
392 mV	*	1,1 s	92
396 mV	*	1,3 s	104
388 mV	*	1,2 s	96
378 mV	*	1,2 s	98
384 mV	*	1,2 s	96

Slika 35. Ponovljivost određivanja sa kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama na tankoslojnoj niklovoj elektrodi. $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$.

4.1.3.9 Granica detekcije i granica kvantifikacije

Nakon optimizacije uslova hronopotenciometrijskog određivanja histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi, za određivanje granice detekcije i granice kvantifikacije primenjeni su isti kriterijum kao u predhodnim ispitivanjima. Struja oksidacije je iznosila 18,1 μA , dok je temperatura rastvora slepe probe iznosila 45°C. Pri primenjenom vremenu akumulacije od 240 s, ostvarena granica detekcije je iznosila 0,11 mg/dm^3 histamina, dok je granica kvantitativnog određivanja iznosila 0,29 mg/dm^3 histamina. Duža vremena akumulacije nisu doprinosila značajno povećanju osetljivosti određivanja i nisu uzimana u obzir zbog znatno lošije reproduktivnosti analitičkog signala u slepoj probi. Granica detekcije i granica kvantifikacije su na sobnoj temperaturi, a pri istim svim ostalim eksperimentalnim uslovima, bile više i iznosile su 0,16 mg/dm^3 i 0,43 mg/dm^3 , redom.

4.1.3.10 Interferencije

Uticaj prisustva aminokiselina na analitički signal histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi je ispitan na isti način kao i kod predhodne dve elektrode. Rezultati analize rastvora

koji su pored histamina sadržali i određenu aminokiselinu su pokazali da pri istim uslovima hronopotenciometrijskog merenja na niklovoj elektrodi dolazi do istovremene oksidacije histamina i aminokiselina. U prisustvu aminokiselina dobijeni signali su bili znatno veći u poređenju sa signalima dobijenim u model rastvoru histamina. Kao i kod čvrste zlatne elektrode, ni u ovom slučaju nisu dobijeni radvojeni platoi pojedinih komponenti. Kod tankoslojne niklove elektrode mehanizam generisanja signala nije dozvoljavao razdvajanje platoa pojedinih komponenti na hronopotenciogramu, s obzirom da je NiOOH, koji se generisao u prvoj elektrodnoj reakciji ECE mehanizma, imao podjednaku sposobnost oksidacije i aminokiselina i histamina. Istovremena oksidacija histamina i aminokiselina pomoću elektrogeniranog nikel-oksihidroksida se dešavala pri približnim vrednostima potencijala uzrokujući pojavu samo jednog analitičkog signala.

4.1.3.11 Ispitivanje tačnosti definisane metode

U cilju ispitivanja tačnosti definisane metode za elektrohemijsko određivanje histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi, pri prethodno utvrđenim optimalnim uslovima su analizirani standardni rastvori histamina pripremljeni u pomoćnom elektrolitu. Određene koncentracije i vrednosti „recovery“ testa su prikazani u tabeli 14.

Tabela 14. Rezultati određivanja histamina u standardnim rastvorima primenom adsorpcione hronopotenciometrije sa tankoslojnom niklovom elektrodom.

Histamin dodat (mg/dm ³)	Histamin određen (mg/dm ³)
1,5	1,53 ± 0,01 ^a (101,80) ^b
3,0	2,99 ± 0,10 (99,93)
7,0	6,91 ± 0,34 (98,67)
10,0	10,11 ± 0,45 (101,10)
20,0	20,56 ± 0,77 (102,82)

^a Srednja vrednost ± 2 SD, n=5.

^b Vrednosti u zagradi predstavljaju srednju vrednost „recovery“ testa u %; n=5.

Na osnovu vrednosti „recovery“ testa (98,67 ÷ 102,82%) može se zaključiti da definisana adsorpciona hronopotenciometrija sa katalitičkim efektima tankoslojne niklove elektrode, pored toga što poseduje odgovarajuću tačnost, pokazuje i veoma dobru reproduktivnost određivanja (RSD = 0,33 ÷ 2,46%).

4.1.4 Poređenje elektrohemijskih metoda

U toku ispitivanja i na osnovu dobijenih rezultata je utvrđeno da je elektrohemijsko ponašanje histamina različito na elektrodnim materijalima koji su korišćeni. Na tankoslojnoj živinoj elektrodi se odigravala direktna oksidacija histamina pri umerenim potencijalima radne elektrode. Kod čvrste zlatne i tankoslojne niklove elektrode, oksidacija histamina je zapravo bila posredovana i u oba slučaja se odvijala po ECE mehanizmu. Kod čvrste zlatne elektrode, na osnovu prethodno objašnjelog mehanizma generisanja signala se može zaključiti da se radi o hronopotencimetriji uz katalitičke efekte generisanog hlora. U slučaju tankoslojne niklove elektrode radi se o kombinovanoj adsorpciono-katalitičkoj hronopotencimetriji.

Pomoćni elektroliti u kojima je bilo moguće određivanje histamina su se razlikovali kod svake od tri primenjene elektrode. Uticaj potencijala na analitički signal histamina je imao sličan karakter zavisnosti, bez obzira na korišćeni elektrohemijski sistem. Porast struje oksidacije je uzrokovao eksponencijalno smanjenje signala histamina u sva tri slučaja. Primenjeni intervali struje oksidacije kod zlatne i tankoslojne niklove elektrode su bili znatno širi u odnosu primenjenju struje kod tankoslojne živine elektrode. Dobra linearnost analitičkog signala od koncentracije je ostvarena za približno iste opsege sadržaja histamina na sve tri radne elektrode.

Na osnovu rezultata istraživanja se može jasno uočiti da se osetljivost određivanja histamina razlikovala na različitim elektrodama. Najveća osetljivost je ostvarena primenom tankoslojne niklove elektrode, zatim sledi čvrsta zlatna elektroda i na kraju tankoslojna živina elektroda. Ipak treba istaći da, u poređenju sa uobičajeno primenjivanim biosenzorima za određivanje histamina, čak i tankoslojna živina elektroda je obezbeđivala zadovoljavajuću osetljivost (Zeng *et al.*, 2000). Po pitanju ponovljivosti i reproduktivnosti analitičkog signala, primenjene elektrode se nisu značajno razlikovale.

Bez obzira na najmanju osetljivost određivanja na tankoslojnoj živinoj elektrodi, ona je pokazala najbolje osobine u praktičnom smislu. Pri određivanju histamina na tankoslojnoj živinoj elektrodi, nakon jednostavne elektrodepozicije žive na staklastom ugljeniku, odmah se moglo pristupiti hronopotencimetrijskom merenju. Poliranje staklastog ugljenika na kome se formirala ova elektroda je u proseku izvođeno jednom mesečno. S druge strane čvrstu zlatnu elektrodu je bilo neophodno pre svake analize mehanički čistiti filter-hartijom nakvašenom bidestilovanom vodom, a i potrebe za poliranjem su bile češće (najmanje jednom dnevno). U slučaju tankoslojne niklove elektrode, nakon deponovanja sloja nikla, sledila je aktivacija elektrode. Pored toga, nakon svake urađene analize na ovoj elektrodi bilo

je potrebno elektrodu elektrohemijski čistiti cikličnim promenama potencijala. Otežavajuća okolnost pri primeni tankoslojne niklove elektrode je bila i ta da je poliranje staklastog ugljenika moralo da se izvodi pre svakog formiranja radne elektrode. Svi ovi dodatni koraci pri primeni čvrste zlatne i tankoslojne niklove elektrode su produžavali ukupno vreme analize i komplikovali samo određivanje. Po pitanju tačnosti, definisane metode se nisu značajno razlikovale i rezultati „recovery“ testova su bile približno isti i zadovoljavajući za sve tri primenjene elektrohemijske metode.

4.2 Definisane postupka pripreme uzoraka

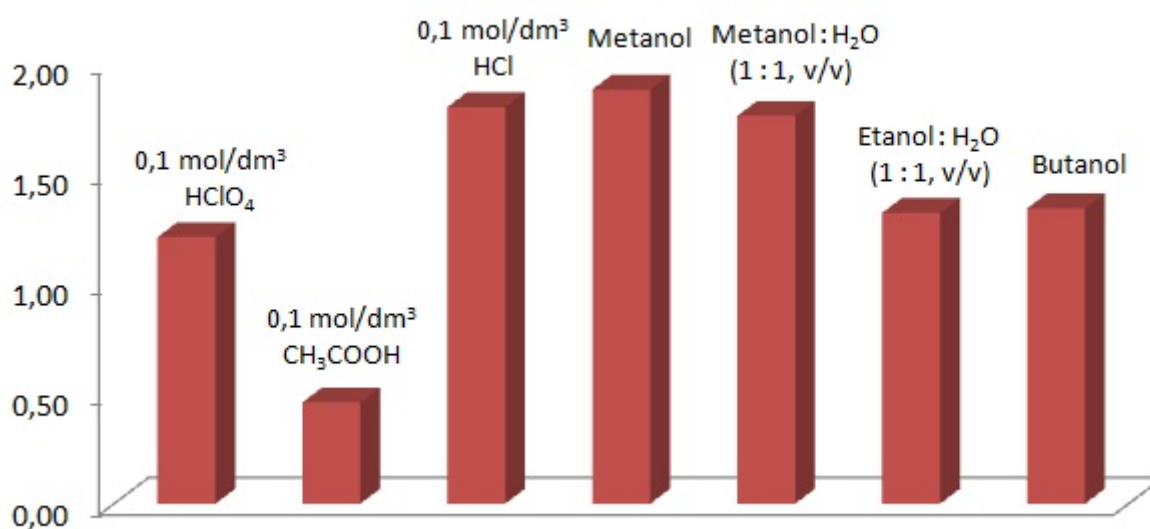
Priprema uzoraka za analizu je kritičan korak u svakom analitičkom postupku. Pri razvoju odgovarajućeg postupka pripreme uzoraka mora se voditi računa da primenjena tehnika omogući kvantitativno izolovanje analita iz matriksa ispitivanog uzorka i da ne dođe do kontaminacije uzorka, niti do gubitka analita. Kada je reč o ekstrakcionim tehnikama, one su nedovoljno selektivne, tako da se u toku ekstrakcije najčešće istovremeno odvija i izdvajanje velikog broja drugih organskih jedinjenja koja mogu ometati analizu. Zbog toga je veoma često nakon ekstrakcije neophodan i korak prečišćavanja ekstrakta. Prečišćavanje ekstrakta treba da omogući kvantitativno izdvajanje analita od ostalih koekstrahovanih supstanci. U cilju pripreme uzoraka za određivanje histamina primenom prethodno definisanih elektrohemijskih metoda, bilo je neophodno optimizovati uslove ekstrakcije i izdvojiti histamin usled nedovoljne selektivnosti elektrohemijskog određivanja.

4.2.1 Optimizacija uslova ekstrakcije

U cilju optimizacije postupka ekstrakcije prvo je ispitana ekstrakciona moć različitih ekstragenasa u pogledu izdvajanja histamina iz uzoraka. Ispitivanja su obuhvatila sledeće ekstragense: $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HClO}_4$, $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ CH}_3\text{COOH}$, $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$, metanol, metanol : H_2O (1 : 1, v/v), etanol : H_2O (1 : 1, v/v) i butanol. Efikasnost različitih rastvarača je ispitana na uzorcima samlevegog sira i samlevene konzervirane ribe. Pri ispitivanju ekstrakcione moći različitih rastvarača, u uzorke je prethodno bila dodata poznata količina histamina. Za ekstrakciju su primenjene klasična refluks ekstrakcija i ultrazvučna ekstrakcija (poglavlje 3.5.1.1). Nakon ekstrakcije, dobijeni ekstrakti su uparavani do suva, a suvi ostatak je pripreman za hronopotenciometrijsku analizu rastvaranjem u pomoćnom elektrolitu. Elektrohemijska merenja su izvedene na tankoslojnoj živinoj elektrodi i pri istim uslovima za

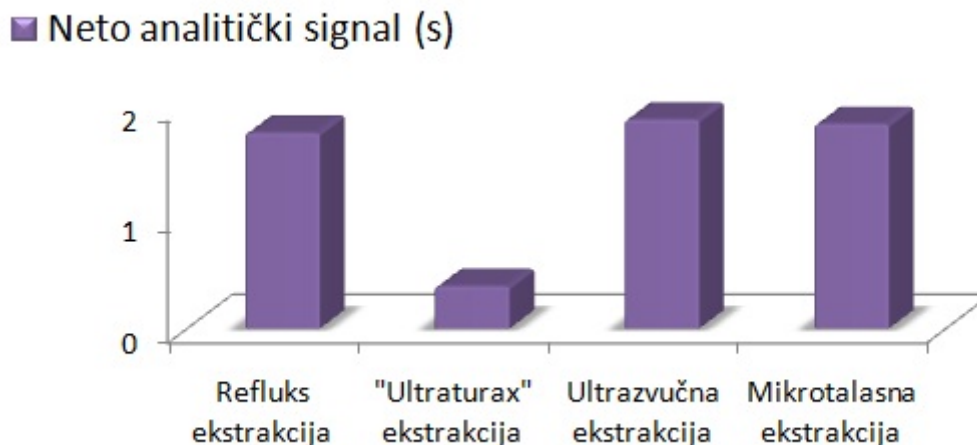
sve dobijene ekstrakte. Nakon urađenih analiza, poređeni su neto analitički signali. Neto analitički signali izmereni u ekstraktima dobijenim metanolom, smešom metanol : H₂O (1 : 1, v/v) i 0,1 mol/dm³ HCl, u poređenju sa neto analitičkim signalima ostalih ekstrakata, su bili znatno veći, dok se međusobno nisu značajno razlikovali (Slika 36). Međutim, nešto viši signali su izmereni u ekstraktima dobijenim metanolom. Pored toga, metanolni ekstrakt je bilo veoma jednostavno upariti do suva, zbog niže tačke ključanja metanola, pa je zbog toga za sva dalja ispitivanja metanol izabran kao odgovarajući rastvarač za ekstrakciju.

■ Neto analitički signal (s)



Slika 36. Efikasnost različitih rastvarača za ekstrakciju histamina iz konzervirane ribe uz primenu ultrazvučne ekstrakcije.

Kada su u pitanju ekstrakcione tehnike, rezultati ispitivanja su pokazali da je ekstrakcija uz intenzivno mešanje pokazala najmanju efikasnost. Neto analitički signali se nisu značajno razlikovali pri primeni klasične refluks ekstrakcije, ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije (Slika 37). Nešto veći signali su dobijeni u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom. Niže frekvencije ultrazvuka koje su primenjene (30 kHz) omogućavale su da mehanički efekti kavitacije budu dominantni, što je doprinosilo povećanju prinosa ekstrakcije a samim tim i porast neto analitičkog signala pri elektrohemijском merenju. Takođe, prednost ultrazvučne ekstrakcije se ogledala u znatno reproduktivnijim rezultatima, tj. standardna devijacija dobijenih rezultata je bila mnogo manja nego u slučaju refluks ekstrakcije i mikrotalasne ekstrakcije. Za sva dalja ispitivanja odabrana je ultrazvučna ekstrakcija sa metanolom kao ekstragensom.



Slika 37. Poređenje efikasnosti ekstrakcije primenom različitih ekstrakcionih tehnika.

4.2.2 Preparativna tankoslojna hromatografija

Pri optimizaciji hromatografskog razdvajanja komponenti model smeše na tankom sloju (poglavlje 3.5.1.2.), posmatrane su R_f vrednosti (retencioni faktori) histamina i ostalih aminokiselina. R_f vrednost je računata kao odnos rastojanja koje je prešla posmatrana supstanca i rastojanja koje je prešao front rastvarača od startnog mesta. Optimalni uslovi su odabrani na osnovu najveće razlike između R_f vrednosti histamina i ostalih aminokiselina, ukazujući na najbolje razdvajanje komponenti.

Uobičajeno primenjuvane mobilne faze (etil-acetat : metanol : NH_3 (4 : 3 : 2, v/v/v), hlороform : metanol : NH_3 (2 : 2 : 1, v/v/v), metanol : NH_3 (20 : 1, v/v), aceton : NH_3 (95 : 5, v/v)) (Leieber & Taylor, 1978) i jednodimenzioni postupak hromatografisanja nisu dali zadovoljavajuće rezultate pri razdvajanju histamina od aminokiselina. Naime, komponente model smeše su bile razdvojene ali razlike u R_f vrednostima nisu bile dovoljne da bi se ovi postupci primenili u preparativne svrhe. Pri primeni dvodimenzionalnog postupka hromatografisanja, razdvajanje komponenti model smeše je bilo mnogo bolje. Pri poređenju retencionih faktora dobijenih hromatografisanjem posmatranim mobilnim fazama, nešto veće razlike R_f vrednosti supstanci iz smeše su dobijene kada je kao mobilna faza korišćena smeša rastvarača etil-acetat : metanol : NH_3 (4 : 3 : 2, v/v/v) u oba razvijanja. Zbog toga je dvodimezionalni postupak hromatografisanja sa ovom mobilnom fazom u oba razvijanja usvojen kao odgovarajući postupak izdvajanja histamina. Za prečišćavanje ekstrakata sireva je primenjena preparativna tankoslojna hromatografija (poglavlje 3.5.1.2).

U cilju potvrde ispravnosti usvojenog postupka prečišćavanja ekstrakta, na tanak sloj je nanošena model smeša sa poznatim sadržajem histamina (0,1 mg, 0,2 mg i 0,3 mg histamina) a nakon hromatografisanja je izvođeno eluiranje komponente sa adsorbensa pomoćnim elektrolitom. Nakon centrifugiranja, količina histamina u supernatantu je određena elektrohemijski, primenom tankoslojne živine elektrode pri prethodno definisanim optimalnim uslovima hronopotenciometrijskog merenja. Ispitivanja su izvođena u pet ponavljanja za svaku od ispitanih količina histamina, dok su vrednosti „recovery“ testa računane na opisan način po formuli 22.

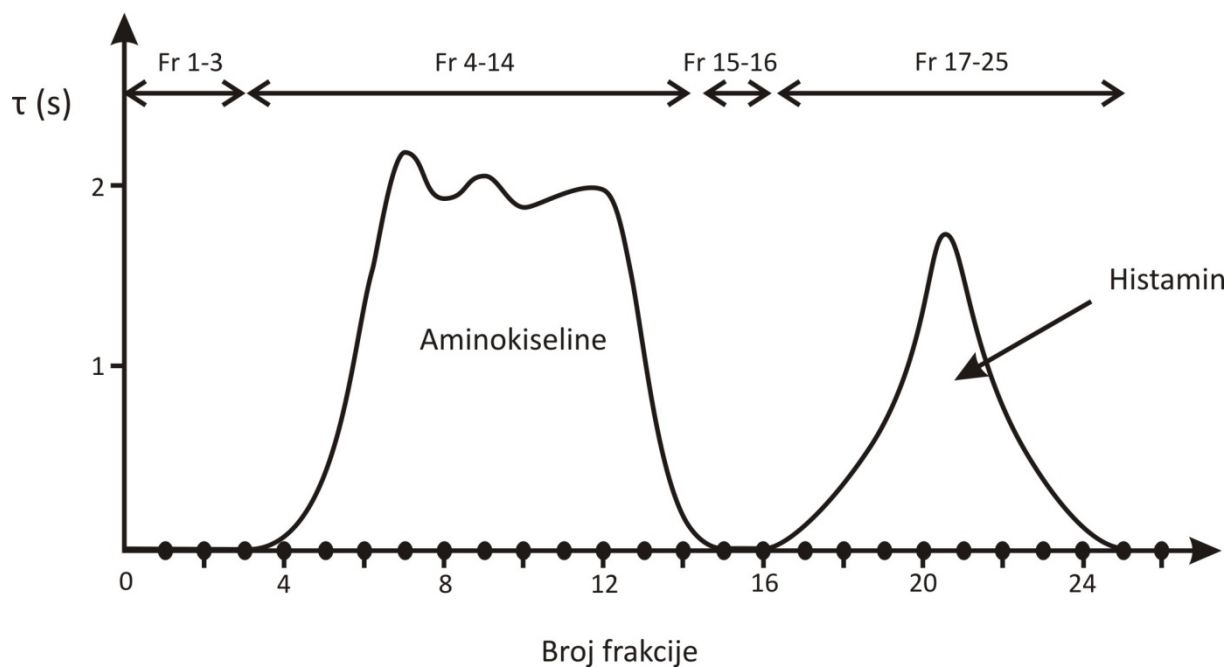
Srednja vrednost „recovery“ testa je iznosila 98%, što je potvrdilo ispravnost definisanog postupka pripreme uzoraka za analizu. Reproductivnost rezultata je takođe bila zadovoljavajuća (RSD = 3,80 - 5,85%).

4.2.3 Preparativna kolonska hromatografija

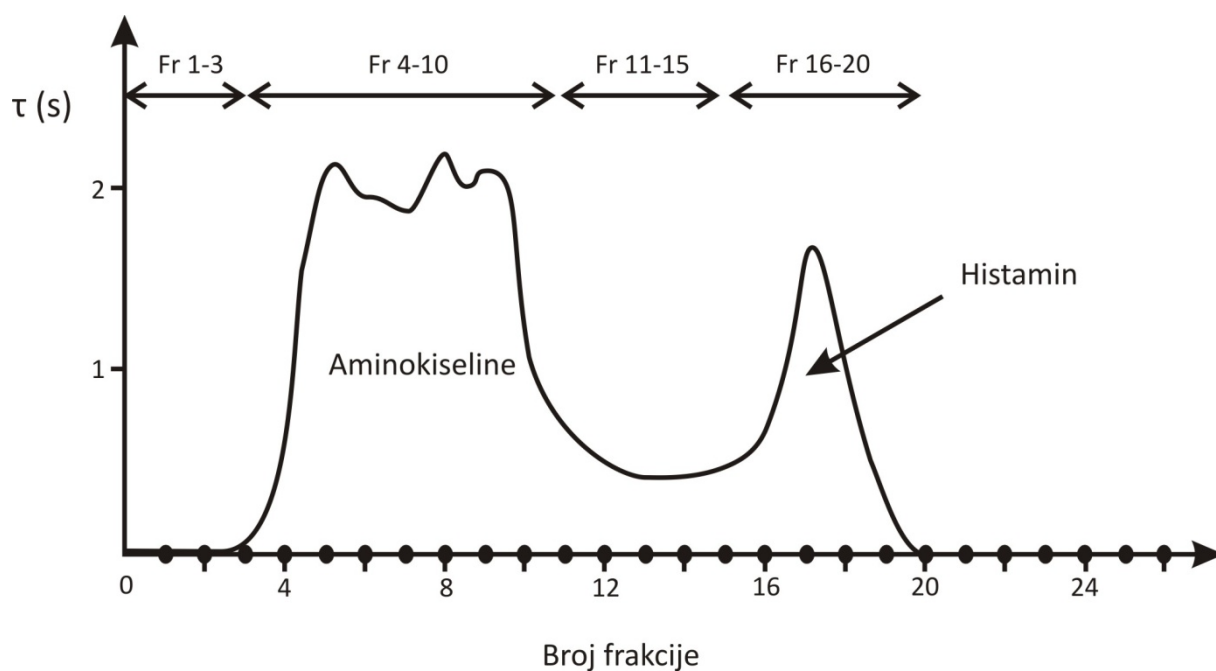
Optimizacija kolonske preparativne hromatografije je obuhvatila ispitivanje i poređenje efikasnosti odvajanja histamina od ostalih komponenti model smeše primenom različitih sistema stacionarna – mobilna faza (Tabela 5). Kvalitativnom TLC analizom frakcija dobijenih nakon razdvajanja na koloni praćeni su sastavi pojedinih frakcija. Nakon utvrđivanja kvalitativnog sastava, analizirane histaminske frakcije dobijene različitim sistemima stacionarna - mobilna faza, za koje je utvrđeno da imaju najbolju efikasnost razdvajanja. Frakcije su analizirane hronopotencijometrijom na tankoslojnoj živinoj elektrodi, pri optimalnim uslovima i struji od 12,2 μ A, nakon uparavanja mobilne faze i rastvaranja u pomoćnom elektrolitu.

Na osnovu TLC hromatografije utvrđeno je da je dobro razdvajanje postignuto sa sistemom silikagel/etil-acetat : metanol : NH_3 (2 : 6 : 2, v/v/v). Prihvatljivo razdvajanje je postignuto sa sistemima: silikagel/etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 3 : 4, v/v/v), silikagel/ etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 5 : 3, v/v/v) i silikagel/ etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 5,5 : 1,5, v/v/v). Međutim u ovim slučajevima pojedine frakcije su sadržale pored histamina i neku od aminokiselina. Ostali sistemi nisu pokazali zadovoljavajuće razdvajanje, s obzirom da se zajedno sa više aminokiselina eluirao i histamin.

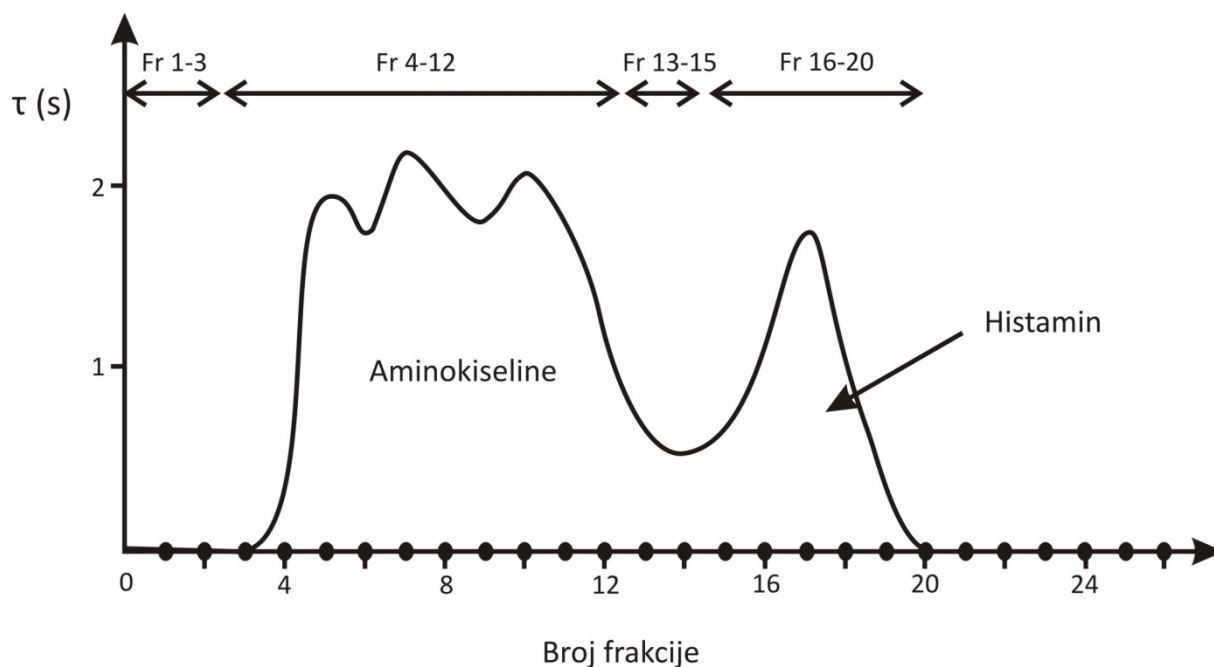
Na slikama 38, 39, 40 i 41 su prikazane raspodele histamina u frakcijama za različite sisteme stacionarna – mobilna faza.



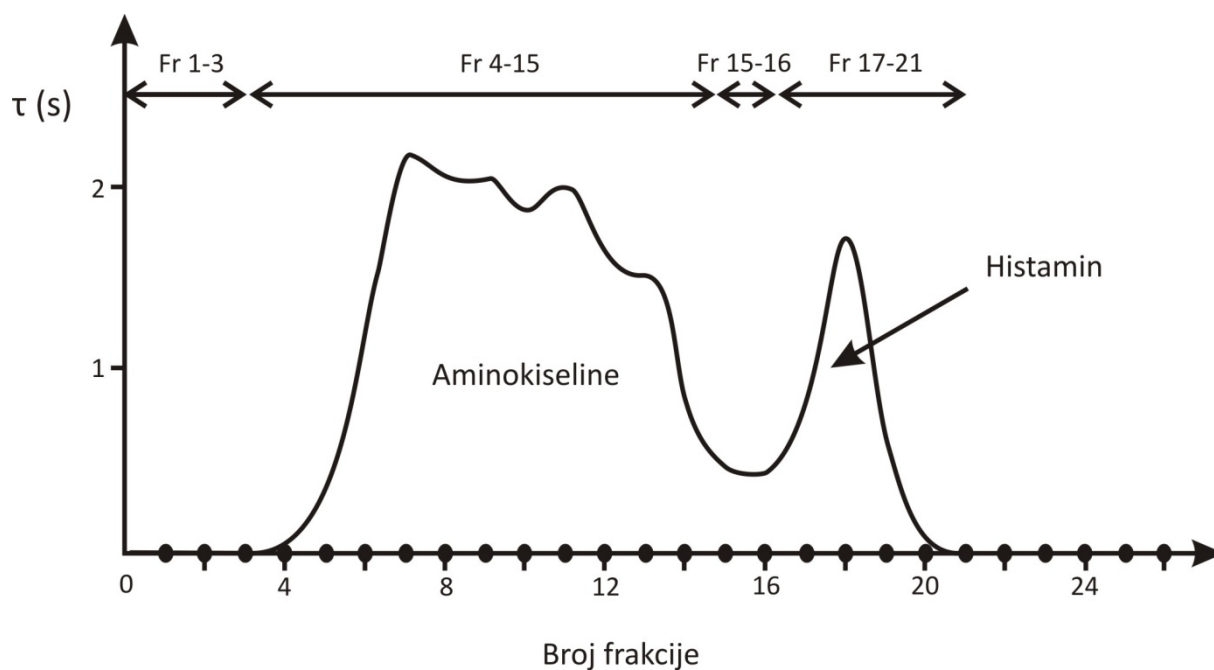
Slika 38. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza: silikagel, mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (2 : 6 : 2, v/v/v).



Slika 39. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza: silikagel, mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 3 : 4, v/v/v).



Slika 40. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza : silikagel, mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 5 : 3, v/v/v).

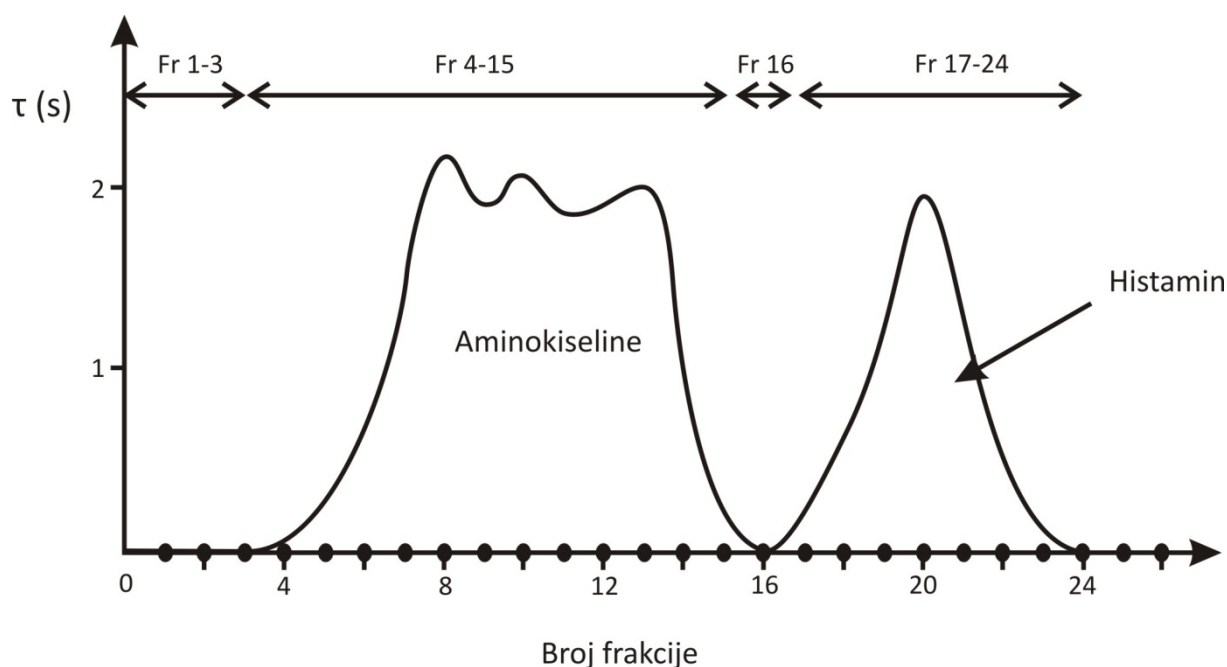


Slika 41. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza: silikagel, mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 5,5 : 1,5, v/v/v).

Na slici 38 se jasno može videti da je, sa sistemom silikagel/etil-acetat : metanol : NH_3 (2 : 6 : 2, v/v/v), u prvim frakcijama dolazilo do eluiranja aminokiseline (Fr 4-14). Nakon eluiranja aminokiseline (Fr 4-14), sledile su dve frakcije bez ijedne komponente (Fr 15 i

Fr 16) i nakon toga se eluirao histamin (Fr 17-25). S obzirom da je u ovom slučaju postignuto veoma dobro razdvajanje histamina, ovaj sistem je usvojen kao odgovarajući.

Pri ispitivanju kapaciteta kolone za hromatografiju, zapremine model smeše ($c_{AK} = 1000 \text{ mg/dm}^3$ i $c_{His} = 400 \text{ mg/dm}^3$) od 1 cm^3 do 10 cm^3 nisu značajno uticale na efikasnost i rezoluciju razdvajanja histamina od ostalih aminokiselina. Naime, bez obzira na aplikovanu zapreminu model smeše, zona histamina je bila dobro odvojena od zone ostalih aminokiselina (Slika 38). Pri aplikovanim zapreminama većim od 12 cm^3 rezolucija hromatografisanja je bila lošija (Slika 42). Sa povećanjem ukupne količine supstanci dolazilo je do proširenja njihovih zona, što je uslovalo da su se frakcije histamina eluirale odmah po eluiranju aminokiselina, uz jednu praznu frakciju između. Uzimajući u obzir nepoznat sastav realnih uzoraka i zahteve sigurne preparativne hromatografije, može se smatrati da je pri primenjenim koncentracijama, zapremina uzorka od 12 cm^3 bila granična.



Slika 42. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza: silikagel; mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (2 : 6 : 2, v/v/v); zapremina model smeše nanešena na kolonu: 12 cm^3 .

Na osnovu izloženog se može sumirati da je definisan postupak preščavanja preparativnom hromatografijom obuhvatio kondicioniranje kolone sa 30 cm^3 mobilne faze, aplikaciju 10 cm^3 prethodno pripremljenog metanolnog ekstrakta i eluiranje pri protoku mobilne faze od $3,3 \text{ cm}^3/\text{min}$. Prvih 64 cm^3 eluata se odbacuje, dok ostalih 32 cm^3 eluata koji sadrži histamin se sakuplja. Eluat sa histaminom se uparava, a suvi ostatak se rastvara u odgovarajućem pomoćnom elektrolitu za potrebe elektrohemijskog određivanja histamina.

U cilju potvrde tačnosti definisanog postupka pripreme uzoraka za analizu preparativnom kolonskom hromatografijom, na kolonu je nanošena model smeša sa poznatim sadržajem histamina (10 mg/dm^3 , 20 mg/dm^3 i 30 mg/dm^3) i nakon opisanog načina hromatograisanja, prikupljan je eluat sa histaminom. Nakon uparavanja i rastvaranja u pomoćnom elektrolitu ($0,02 \text{ mol/dm}^3 \text{ H}_2\text{SO}_4$), histamin je određivan hronopotenciometrijski na tankoslojnoj živinoj elektrodi. Ispitivanja su izvođena u pet ponavljanja za svaki od ispitivanih model rastvora histamina, dok su vrednosti „recovery“ testa računane na opisan način po formuli 22.

Vrednosti „recovery“ testa su se kretale od 98,6% do 100,04%. Reproductivnost određivanja histamina je bila veoma dobra ($\text{RSD} = 1,32 \div 1,48\%$). Dobijene vrednosti „recovery“ testa su pokazale da je definisani postupak pripreme uzoraka u potpunosti ispravan i prihvatljiv za analizu realnih uzoraka u kojima se očekuju niže koncentracije interferirajućih komponenti.

4.3 Određivanje histamina u prehrambenim proizvodima

Nakon definisanja postupaka pripreme uzoraka za analizu, razvijene elektrohemijske metode su primenjene za određivanje histamina u realnim uzorcima (Tabela 4). Preparativna tankoslojna hromatografija je korišćena za prečišćavanje metanolnih ekstrakata sireva, dok je preparativna kolonska hromatografija korišćena za prečišćavanje uparenih uzoraka vina i metanolnih ekstrakata fermentisanih kobasica i konzerviranih riba. Eksperimenti su pokazali da je preparativna tankoslojna hromatografija zadovoljavala uslove za prečišćavanje ekstrakata sireva, zbog nešto jednostavnijeg matriksa ovih uzoraka. Preparativna kolonska hromatografija je primenjena za sve ostale uzorke, s obzirom na njihov nešto složeniji matriks, ali i zbog jednostavnosti pri njenom korišćenju.

U slučaju sireva, sadržaj histamina je određen elektrohemijski na tankoslojnoj živinoj elektrodi, dok su ostali uzorci analizirani na sve tri elektrode. Određivanje sadržaja histamina je izvedeno metodom kalibracione krive. Analize su izvedene u tri ponavljanja i određeni sadržaji histamina su prikazani u tabelama 15, 16, 17 i 18. Paralelno sa analizom uzorka izvođen je i „recovery“ test u cilju potvrđivanja tačnosti definisanih metoda, uključujući pripremu uzoraka i elektrohemijsko određivanje histamina. U ovom slučaju su eksperimenti izvođeni tako što je na usitnjene čvrste uzorke pre ekstrakcije dodata određena količina histamina, a rezultati računati na osnovu formule 23. Pri analizi vina, standardni rastvor histamina je direktno dodavan u uzorke, pre uparavanja.

U tabeli 15 dati su rezultati određivanja histamina u sirevima (srednja vrednost tri ponavljanja), reproduktivnost određivanja ($\pm 2SD$) i vrednosti „recovery“ testa.

Tabela 15. Sadržaj histamina u sirevima.

Broj uzorka	Sadržaj histamina (mg/kg) ^a	Recovery (%)
1	128,54 \pm 16,09	113,88
2	71,15 \pm 7,84	103,12
3	54,23 \pm 10,69	85,37
4	244,08 \pm 32,95	86,00
5	65,99 \pm 12,35	105,82
6	27,91 \pm 5,08	106,97
7	229,16 \pm 15,03	93,16
8	48,36 \pm 6,91	96,54
9	61,93 \pm 6,90	102,45
10	107,31 \pm 17,15	104,00

^a Srednja vrednost $\pm 2SD$ (n=3).

Tankoslojna živina elektroda, preparativna tankoslojna hromatografija.

Sadržaj histamina u sirevima se kretao od 27,91 mg/kg do 244,08 mg/kg, dok se relativna standardna devijacija kretala u intervalu od 3,28 % do 9,86 %. S obzirom da u našoj zemlji ne postoji standard koji propisuje maksimalan sadržaj u ovom tipu uzoraka, na osnovu propisanog maksimalno dozvoljenog sadržaja histamina u ribi i proizvodima od ribe („Sl. list SRJ“, br. 5/92, 11/92 – ispr. i 32/2002) može se zaključiti da, od ukupno 10 analiziranih uzoraka sireva, dva ne zadovoljavaju ovaj Pravilnik. Ipak treba istaći da su ovi zaključci izvedeni na bazi kriterijuma definisanih za drugu kategoriju prehrambenih proizvoda. Nešto lošije vrednosti „recovery“ testa se mogu objasniti time što se kod preparativne tankoslojne hromatografije izvode komplikovanije operacije. Ovo se uglavnom odnosi na operacije struganja i sakupljanja silika gela sa histaminom, koje su najčešći uzrok grešaka pri primeni tankoslojne hromatografije u preparativne svrhe. Međutim, u analitičkoj praksi vrednosti „recovery“ testa u intervalu od 86,00 % do 113,88 % se smatraju zadovoljavajućim.

Rezultati određivanja sadržaja histamina u konzerviranim ribama su prikazani u tabeli 16. Ispitivanja su izvedena na sve tri radne elektrode, a prikazani rezultatu predstavljaju srednju vrednost tri ponavljanja za svaki uzorak. Reproductivnost određivanja je izražena kao 2SD, dok je prikazana vrednost „recovery“ testa srednja vrednost tri ponovljene analize.

Tabela 16. Sadržaj histamina u konzerviranoj ribi.

Broj uzorka	Sadržaj histamina (mg/kg) ^a		
	Tankoslojna živina elektroda	Čvrsta zlatna elektroda	Tankoslojna niklova elektroda
1	140,40 ± 1,94 (95,44) ^b	111,65 ± 15,52 (97,51)	114,95 ± 18,98 (103,04)
2	117,17 ± 4,74 (93,32)	106,75 ± 8,93 (90,24)	112,02 ± 19,32 (97,97)
3	164,90 ± 4,51 (90,70)	171,38 ± 16,00 (103,73)	168,36 ± 16,63 (92,65)
4	154,04 ± 16,00 (99,62)	152,40 ± 10,93 (97,54)	168,56 ± 14,54 (90,78)
5	60,02 ± 4,38 (92,52)	59,30 ± 9,21 (101,92)	61,43 ± 10,32 (92,48)
6	55,74 ± 4,60 (97,80)	55,54 ± 8,03 (97,33)	53,12 ± 3,98 (91,89)
7	13,16 ± 1,91 (94,60)	12,68 ± 1,79 (98,43)	15,28 ± 3,11 (92,96)
8	25,25 ± 3,16 (99,33)	24,01 ± 3,42 (93,15)	23,48 ± 3,96 (91,66)
9	95,36 ± 11,11 (98,67)	94,90 ± 9,02 (91,18)	92,48 ± 5,85 (91,18)
10	123,16 ± 4,01 (94,90)	121,49 ± 7,23 (93,35)	124,52 ± 15,61 (97,61)
11	32,64 ± 2,87 (94,32)	34,48 ± 3,32 (95,26)	32,24 ± 2,38 (98,32)
12	56,78 ± 3,32 (96,56)	55,36 ± 3,55 (97,68)	56,92 ± 3,02 (92,48)

^a Srednja vrednost ± 2SD (n = 3).

^b Vrednosti u zagradi predstavljaju srednje vrednosti „recovery“ testa (n = 3).

Svi uzorci konzervirane ribe sadržali su manje od 200 mg/kg histamina, što je u skladu sa Pravilnikom o maksimalno dozvoljenom sadržaju histamina („Sl. list SRJ“, br. 5/92, 11/92 – ispr. i 32/2002). Srednje vrednosti sadržaja histamina dobijene na različitim elektrodnim materijalima međusobno su upoređene primenom Studentovog *t*-testa uparenih vrednosti uz 95% verovatnoću. Nulta hipoteza je bila da se primenom različitih radnih elektroda ne dobijaju različiti rezultati, odnosno da razlike između posmatranih elektrohemijskih metoda nisu značajne. Izračunate *t* - vrednosti su upoređene sa teorijskim vrednostima pri $\alpha = 0,05$. S obzirom da su izračunate vrednosti bile manje od teorijskih vrednosti, nulta hipoteza je prihvaćena, odnosno sadržaji histamina određeni na različitim elektrodama nisu se statistički značajno razlikovali uz verovatnoću od 95%. Reproductivnost određivanja je bila dobra na sve tri radne elektrode ($RSD_{Hg} = 0,69 - 7,26\%$, $RSD_{Au} = 2,98 - 7,76\%$ i $RSD_{Ni} = 3,17 - 8,62\%$). Vrednosti „recovery“ testa su bile znatno bolje (90,24 – 103,73%) u poređenju sa vrednostima „recovery“ testa uzoraka sireva, što potvrđuje ne samo ispravnost primenjenih postupka pripreme uzoraka, već i tačnost definisanih elektrohemijskih metoda.

Sadržaj histamina u fermentisanim kobasicama je određen elektrohemijski na sve tri radne elektrode. U tabeli 17 su prikazane srednje vrednosti sadržaja histamina (n = 3), reproductivnost određivanja (2SD) i srednje vrednosti „recovery“ testa (n = 3).

Tabela 17. Sadržaj histamina u fermentisanim kobasicama.

Broj uzorka	Sadržaj histamina (mg/kg) ^a		
	Tankoslojna živina elektroda	Čvrsta zlatna elektroda	Tankoslojna niklova elektroda
1	175,54 ± 2,46 (92,43) ^b	181,70 ± 5,37 (92,71)	174,07 ± 3,45 (94,48)
2	101,68 ± 2,71 (94,68)	105,72 ± 11,88 (96,83)	104,66 ± 3,45 (90,36)
3	101,69 ± 4,48 (94,74)	100,90 ± 18,74 (101,60)	103,32 ± 7,73 (91,28)
4	41,48 ± 3,21 (90,36)	39,91 ± 4,25 (104,80)	39,87 ± 1,86 (89,64)
5	67,21 ± 3,89 (90,45)	65,48 ± 4,60 (96,00)	69,08 ± 6,79 (93,73)
6	97,31 ± 5,59 (91,57)	98,30 ± 6,33 (103,78)	100,36 ± 3,48 (95,62)
7	194,33 ± 4,98 (96,34)	194,86 ± 22,02 (102,67)	193,22 ± 9,45 (101,28)
8	81,08 ± 7,04 (90,22)	83,22 ± 7,70 (98,02)	84,28 ± 3,34 (94,22)
9	116,49 ± 7,31 (91,64)	113,66 ± 11,94 (101,86)	115,75 ± 5,56 (93,98)
10	56,46 ± 5,08 (90,51)	54,22 ± 4,52 (93,45)	57,32 ± 3,49 (91,34)
11	134,26 ± 7,96 (93,69)	138,68 ± 7,33 (104,69)	132,78 ± 7,63 (97,44)
12	75,70 ± 2,93 (91,05)	75,11 ± 2,99 (102,47)	77,75 ± 3,38 (93,35)

^a Srednja vrednost ± 2SD (n=3).

^b Vrednosti u zagradi predstavljaju srednje vrednosti „recovery“ testa (n = 3).

Sadržaj histamina u fermentisanim kobasicama se kretao od 41,48 mg/kg do 194,33 mg/kg. Reproductivnost određivanja je bila zadovoljavajuća u slučaju sve tri primenjene elektrohemijske metode ($RSD_{Hg} = 0,70 - 4,50\%$, $RSD_{Au} = 1,48 - 5,65\%$ i $RSD_{Ni} = 0,94 - 5,75\%$). Za meso i proizvode od mesa zakonski nije regulisan maksimalno dozvoljeni sadržaj histamina, mada neke zemlje preporučuju između 100 - 200 mg/kg (Karovičová & Kohajdová, 2005). S obzirom da u analiziranim fermentisanim kobasicama sadržaj histamina nije bio viši od 200 mg/kg, može reći da ovi proizvodi ne predstavljaju rizične namirnice koje bi dovele do pojave netolerancije i neželjenih reakcija na histamin. Upoređivanjem srednjih vrednosti sadržaja histamina u analiziranim uzorcima primenom Studentovog *t*-testa uparenih vrednosti uz 95% verovatnoću, izračunate *t*-vrednosti su bile manje od teorijskih. Na osnovu toga se može zaključiti da se sadržaji histamina pojedinačnih uzoraka određeni različitim elektrohemijskim metodama nisu značajno razlikovali, uz verovatnoću od 95%. U slučaju fermentisanih kobasica, određene vrednosti „recovery“ testa su bile veoma indikativne kao potvrda tačnosti definisanih metoda.

Rezultati određivanja sadržaja histamina u uzorcima vina su prikazani u tabeli 18. Prikazani rezultati predstavljaju srednju vrednost tri ponovljene analize. Reproductivnost rezultata je prikazana kao 2SD, dok vrednosti u zagradi predstavljaju srednju vrednost „recovery“ testa tri ponovljene analize.

Tabela 18. Sadržaj histamina u vinu.

Broj uzorka	Sadržaj histamina (mg/dm ³) ^a		
	Tankoslojna živina elektroda	Čvrsta zlatna elektroda	Tankoslojna niklova elektroda
1	4,68 ± 0,46 (102,33) ^b	4,78 ± 0,15 (97,59)	4,72 ± 0,36 (96,56)
2	5,25 ± 0,42 (101,97)	5,47 ± 0,79 (97,21)	5,42 ± 0,55 (94,48)
3	1,93 ± 0,29 (96,26)	2,14 ± 0,25 (93,78)	1,99 ± 0,28 (94,05)
4	5,55 ± 0,35 (101,45)	5,37 ± 0,98 (92,92)	5,48 ± 0,56 (96,78)
5	4,21 ± 0,63 (101,39)	4,34 ± 0,54 (96,74)	4,29 ± 0,60 (98,25)
6	0,96 ± 0,19 (92,78)	1,01 ± 0,20 (96,62)	0,99 ± 0,17 (92,86)
7	1,49 ± 0,28 (92,82)	1,18 ± 0,22 (95,08)	1,32 ± 0,23 (95,04)
8	4,45 ± 0,77 (104,12)	4,64 ± 0,87 (94,65)	4,52 ± 0,84 (94,62)
9	2,49 ± 0,27 (100,10)	2,79 ± 0,12 (92,98)	2,55 ± 0,44 (98,63)
10	1,95 ± 0,38 (92,67)	2,03 ± 0,21 (93,54)	1,96 ± 0,36 (98,42)
11	3,45 ± 0,25 (94,68)	3,78 ± 0,65 (97,31)	3,48 ± 0,69 (93,95)
12	1,25 ± 0,24 (93,54)	1,38 ± 0,23 (93,54)	1,32 ± 0,25 (94,57)

^a Srednja vrednost ± 2SD (n = 3).

^b Vrednosti u zagradi predstavljaju srednje vrednosti „recovery“ testa (n = 3).

Sadržaj histamina u vinima kretao se od 0,96 mg/dm³ do 5,55 mg/dm³. Iako zakonski nije regulisan maksimalno dozvoljen sadržaj histamina u vinima i drugim alkoholnim pićima, na osnovu vrednosti koje neke zemlje preporučuju (5-6 mg/dm³ u Belgiji, 8 mg/dm³ u Francuskoj i 10 mg/dm³ u Švajcarskoj) (Vidal-Carou *et al.*, 2003), sva analizirana vina su sadržala prihvatljivu količinu histamina, ispod preporučenih vrednosti. Reproductivnost određivanja je bila zadovoljavajuća (RSD_{Hg} = 3,15 – 9,90%, RSD_{Au} = 1,57 – 9,90% i RSD_{Ni} = 3,81 – 9,91%). Kada se srednje vrednosti sadržaja histamina u vinima, određenih na različitim elektrodnim materijalima uporede primenom Studentovog t-testa uparenih vrednosti uz 95% verovatnoću, dolazi se do zaključka da su izračunate t - vrednosti manje od teorijskih. Na osnovu toga se može zaključiti da se sadržaji histamina pojedinačnih uzoraka određeni različitim elektrohemijским metodama nisu značajno razlikovali, uz verovatnoću od 95%. Vrednosti „recovery“ testa su potvrdile ispravnost definisanih metoda, kao i opravdanost za njihovu primenu pri određivanju sadržaja histamina i u uzorcima vina.

5 ZAKLJUČCI

1. Razvijene su elektrohemijske metode i postupci za određivanje histamina primenom hronopotencijometrije. Ispitano je elektrohemijsko ponašanje histamina na tankoslojnoj živinoj elektrodi, čvrstoj zlatnoj elektrodi i tankoslojnoj niklovoj elektrodi. Poređeni su mehanizmi generisanja signala na ove tri elektrode.
2. U cilju definisanja optimalnih uslova, za svaki sistem je ispitan uticaj najznačajnijih eksperimentalnih faktora, uključujući vrstu i koncentraciju pomoćnog elektrolita, početni potencijal i struju oksidacije. Pored toga, za svaki elektrohemijski sistem definisana je osetljivost i reproduktivnost, selektivnost, kao i karakter zavisnosti analitičkog signala od koncentracije.
3. Primenom tankoslojne niklove elektrode uočena je pojava adsorpcionog koncentrovanja analita, te su u slučaju ovog elektrohemijskog sistema ispitani i uticaji vremena adsorpcije i temperature ispitivanog medijuma na analitički signal histamina.
4. Za svaki od primenjenih elektrohemijskih sistema, objašnjen je mehanizam generisanja signala. Na tankoslojnoj živinoj elektrodi, analitički signal je bio rezultat direktne elektrohemijske oksidacije histamina primenom konstantne struje. Oksidacija histamina na ostale dve elektrode je pored elektrodnih reakcija uključivala i hemijske reakcije, tako da se u oba slučaja odigravala po ECE mehanizmu (elektrodna – hemijska – elektrodna reakcija). Na čvrstoj zlatnoj elektrodi, posredovani mehanizam je uključivao oksidaciju histamina elektrogenerisanim hlorom, dok je u slučaju tankoslojne niklove elektrode mehanizam oksidacije histamina mogao biti objašnjen kao kombinovana katalitičko - adsorpciona hronopotencijometrija.
5. Za sistem sa tankoslojnom živinom elektrodom, ostvarena je granica detekcije od $1,31 \text{ mg/dm}^3$, pri struji oksidacije od $12,2 \text{ } \mu\text{A}$. Primenom ove radne elektrode, za širok opseg sadržaja, i to od $1,5 \text{ mg/dm}^3$ do $10,5 \text{ mg/dm}^3$, zatim od 5 mg/dm^3 do 30 mg/dm^3 i od 20 mg/dm^3 do 90 mg/dm^3 , utvrđena je linearna zavisnost analitičkog signala od koncentracije. Selektivnost određivanja je bila dobra pri koncentracijama aminokiselina i histamina nižim od 5 mg/dm^3 . Sa povećanjem koncentracije bilo koje komponente binarnog sistema histamin - aminokiselina, dolazilo je do preklapanja analitičkih signala ovih supstanci.
6. Granica detekcije u slučaju sistema sa čvrstom zlatnom elektrodom je iznosila $0,27 \text{ mg/dm}^3$, pri primenjenoj struji oksidacije od $6 \text{ } \mu\text{A}$. Dobro slaganje eksperimentalnih rezultata sa predpostavljenim linearnim funkcijama je utvrđeno za širok opseg sadržaja, od 2 mg/dm^3 do 10 mg/dm^3 , od 10 mg/dm^3 do 50 mg/dm^3 i od 20 mg/dm^3 do 100 mg/dm^3 . Selektivnost određivanja histamina nije bila zadovoljavajuća, s obzirom na mehanizam generisanja signala. Elektrogenerisani hlor je pokazao jednaku sposobnost oksidacije histamina i ostalih aminokiselina, i prouzrokovao je

pojavu kombinovanog signala koji je poticao od svih komponenti sa amino-grupom koje su bile prisutne u analiziranom rastvoru.

7. Primenom tankoslojne niklove elektrode ostvarena je granica detekcije od 0,11 mg/dm³ histamina, pri struji oksidacije od 18,1 μ A, vremenu akumuliranja od 240 s i na temperaturi od 45°C. Na sobnoj temperaturi a istim ostalim uslovima, ostvarena granica detekcije je iznosila 0,16 mg/dm³. Za opsege sadržaja histamina od 0,5 mg/dm³ do 3 mg/dm³, od 5 mg/dm³ do 30 mg/dm³ i od 10 mg/dm³ do 110 mg/dm³ utvrđena je dobra linearna zavisnost analitičkog signala od koncentracije histamina. U prisustvu aminokiselina, tankoslojna niklova elektroda nije pokazala odgovarajuću selektivnost, a dobijeni signal je bio posledica istovremene oksidacije histamina i aminokiselina.
8. Definisan je pouzdan postupak za pripremu različitih vrsta uzoraka za elektrohemijsko određivanje histamina. Najbolju ekstrakcionu moć pokazao je metanol, dok su najbolji prinosi postignuti primenom ultrazvučne ekstrakcije. U okviru rada su definisana i predložena dva postupka prečišćavanja ekstrakata uzoraka, u cilju odvajanja histamina od ostalih koekstrahovanih supstanci. Predloženi su postupci prečišćavanja ekstrakata primenom preparativnih hromatografskih tehnika, i to na tankom sloju i stubu adsorbensa, a izračunate vrednosti ponovljivosti rezultata i vrednosti „*recovery*“ testa su potvrdile njihovu pouzdanost.
9. Definisane metode za određivanje histamina primenjene su uspešno u analizi različitih vrsta sireva, fermentisanih kobasica, konzervirane ribe i vina. Poređenje sadržaja određenih primenom različitih radnih elektroda je pokazalo dobro slaganje, a izračunate vrednosti „*recovery*“ testa su potvrdile tačnost definisanih elektrohemijških metoda.

6 LITERATURA

- Achilli, G., Callerino, G. P., Melzi d'Erville, G. (1994). Determination of amines in wines by high-performance liquid chromatography with electrochemical coulometric detection after precolumn derivatization. *Journal of Chromatography A* 661, 201-205.
- Adamou, R., Coly, A., Douabalé, S., Saleck, M. L. O. C. O., Gaye-Seye, M. D., Tine, A. (2005). Fluorimetric determination of histamine in fish using micellar media and fluorescamine as labelling reagent. *Journal of Fluorescence* 15, 679-688.
- Amorim, C. G., Souza, R. C., Araújo, A. N., Montenegro, M. C. B. S. M., Silva, V. L. (2010). SI lab-on-valve analysis of histamine using potentiometric detection for food quality control. *Food Chemistry* 122, 871-876.
- Antoine, F. R., Wei, C., Otwell, W. S., Sims, C. A., Littell, R. C., Hogle, A. D., Marshall, M. R. (2002). Gas chromatographic analysis of histamine in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*). *Journal of Agricultural and Food chemistry* 50, 4754-4759.
- AOAC (2002). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.), AOAC International, Maryland, USA.
- ASC. (1980). Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Analytical Chemistry* 52, 2242-2249.
- Auerswald, L., Morren, C., Lopata, A. L. (2006). Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood. *Food Chemistry* 98, 231-239.
- Aygün, O., Schneider, E., Scheuer, R., Usleber, E., Gareis, M., Mätlbauer, E. (1999). Comparison of ELISA and HPLC for the determination of histamine in cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1961-1964.
- Bao, L., Sun, D., Tachikawa, H., Davison, V. L. (2002). Improved sensitivity of a histamine sensor using an engineered methylamine dehydrogenase. *Analytical Chemistry* 74, 1144-1148.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R. (2001). *Electrochemical Methods: fundamentals and applications*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, INC., USA
- Barger, G., Dale, H. H. (1910). The presence in ergot and physiological activity of β -iminazolyethylamine. *Journal of Physiology* 40, 38-40.
- Bateman, R. C. J. R., Eldrige, D.B., Wade, S., McCoy-Messer, J., Jester, E.L.E., Mowdy, D.E. (1994). Copper chelation assay for histamine in tuna. *Journal of Food Science* 59, 517-518.
- Ben-Gigirey, B., Craven, C., An, H. (1998). Histamine formation in albacore muscle analyzed by AOAC and enzymatic methods. *Journal of Food Science* 63, 210-214.
- Berzins, T., Delahay, P. (1953). Theory of electrolysis at constant current in unstirred solution. II. Consecutive electrochemical reactions. *Journal of American Chemical Society* 75, 4205-4213.
- Bodmer, S., Imark, C., Kneubuohl, M. (1999). Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Research* 48, 296-300.

- Brainina, Kh., Neyman, E. (1993). *Electroanalytical Stripping Methods*, Vol. 126, Wiley, New York.
- Campo, G., Gallego, B., Berregi, I. (2006). Fluorimetric determination of histamine in wine and cider by using an anion-exchange column-FIA system and factorial design study. *Talanta* 68, 1126–1134.
- Cará, M., Lopes-Martins, R. A. B., Antunes, E., Nahoum, C. R. D., de Nucci, G. (1995). The role of histamine in human penile erection. *British Journal of Urology* 75, 220-224.
- Carralero, V., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J. M. (2005). Pulsed amperometric detection of histamine at glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles. *Electroanalysis* 17, 289-297.
- Casella, I. G., Gatta, M., Desimoni, E. (2001). Determination of histamine by high-pH anion-exchange chromatography with electrochemical detection. *Food Chemistry* 73, 367-372.
- Cinquina, A. L., Longo, F., Calí, A., Santis, de L., Baccelliere, R., Cozzani, R. (2004). Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples. *Journal of Chromatography A* 1032, 79-85.
- Cortacero-Ramírez, S., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2007). Determination of biogenic amines in beers and brewing-process samples by capillary electrophoresis coupled to laser induced fluorescence detection. *Food Chemistry* 100, 383-389.
- Dadáková, E., Křížek, M., Pelikánová, T. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry* 116, 365–370.
- Delahay, P., Berzins, T. (1953). Theory of electrolysis at constant current with partial or total control by diffusion - application to the study of complex ions. *Journal of American Chemical Society* 75, 2486-2493.
- Delahay, P., Mamantov, G. (1955). Voltammetry at constant current. Review of theoretical principles. *Analytical Chemistry* 27, 478-483.
- Deo, R., Lawrence, N., Wang, J. (2004). Electrochemical detection of amino acids at carbon nanotube and nickel-carbon nanotube modified electrodes. *Analyst*, 129, 1076-1081.
- 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 1, S87-S88.
- Douabalé, S. E., Dione, M., Coly, A., Tine, A. (2003). Contributions to the determination of histamine rate by measuring out the histamine - orthophthalaldehyde complex in the absorption and fluorescence. *Talanta* 60, 581-590.
- Draisici, R., Giannetti, L., Boria, P., Lucentini, L., Palleschi, L., Cavalli, S. (1998). Improved ion chromatography – integrated pulsed amperometric detection method for the evaluation of biogenic amines in food of vegetable or animal origin and in fermented foods. *Journal of Chromatography A* 798, 109-116.

- Dy, M., Schneider, E. (2004). Histamine–cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15, 393–410.
- Ekici, K., Coskun, H. (2004). Histamine contents of some commercial vegetable pickles. *Pakistan Journal of Nutrition* 3, 197-198.
- Ekici, K., Şekeroğlu, R., Sancak, Y. C., Noyan, T. (2004). A note on histamine levels in Turkish style fermented sausages. *Meat Science* 68, 123-125.
- EU. (2005). Commission regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbial criteria for food stuffs. *Official Journal of the European Union* L338, 1-26.
- Farmer, L. (1940). Histamine in anaphylaxis and allergy. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 16, 618-630.
- Favaro, G., Pastore, P., Sacconi, G., Cavalli, S. (2007). Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode. *Food Chemistry* 105, 1652-1658.
- Fernandes, J. O., Judas, I. C., Oliveira, M. B., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Ferreira, M. A. (2001). A GC-MS method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. *Chromatographia Supplement* 53, S327-S331.
- Fleischmann, M., Korinek, K., Pletcher, D. (1971). The oxidation of organic compounds at a nickel anode in alkaline solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 31, 39-49.
- Frébort, I., Skoupá, L., Peč, P. (2000). Amine oxidase-based flow biosensor for the assessment of fish freshness. *Food Control* 11, 13-18.
- Galus, Z. (1994). *Fundamentals of Electrochemical Analysis*, 2nd Edition, transl. Eds. R.A. Chalmers & W.A.J. Bryce., Ellis Horwood, Chichester, England and Polish Scientific Publishers, Warsaw, Poland.
- 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.
- Gierst, L., Juliard, A. (1953). Non-steady state electrolysis under constant current. *Journal of Physical Chemistry* 57, 701-706.
- Giovanelli, D., Lawrence, N., Jiang, L., Jones, T., Compton, R. (2003). Electrochemical determination of sulphide at nickel electrodes in alkaline media: a new electrochemical sensor. *Sensors and Actuators B* 88, 320-328.
- Grandi, D., Morini, G. (2006). Histamine H3 receptors and the gastric mucosa: A link between protection and epithelial proliferation?. *Current Anaesthesia & Critical Care* 17, 37-42.
- Haas, H. L., Sergeeva, O. A., Selbach, O. (2008). Histamine in the nervous system. *Physiological Reviews* 88, 1183-1241.

- Hall, M., Eldridge D.B., Saunders R.D., Fairclough D.L., Bateman JR, R.C. (1995). A rapid dipstick test for histamine in tuna. *Food Biotechnology* 9, 39-57.
- Harsing, L. G., Nagashima, H., Duncalf, D., Vizi, E. S., Goldiner, P. L. (1986). Determination of histamine concentrations in plasma by liquid chromatography/electrochemistry. *Clinical Chemistry* 32, 1823-1827.
- Hasebe, Y., Toda, S., Aoki, K., Tonobe, H., Uchiyama, S. (1997). Specific and Amplified Current Responses to Histidine and Histamine Using Immobilized Copper–Monoamine Oxidase Membrane Electrode, Based on Novel Ascorbate Oxidase Activity Induced by Exogenous Ligands. *Analytical Biochemistry* 251, 32-38.
- Hoekstra, C. J., Johnson, D. C. (1998). Comparison of potential-time waveforms for the detection of biogenic amines in complex mixtures following their separation by liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 70, 83-88.
- Huang, W., Zheng, J., Li, Z. (2007). New Oscillatory Electrocatalytic Oxidation of Amino Compounds on a Nanoporous Film Electrode of Electrodeposited Nickel Hydroxide Nanoflakes. *The Journal of Physical Chemistry C* 111, 16902-16908.
- Huang, X-J., Silvester, D. S., Streeter, I., Aldous, L., Hardacre, C., & Compton, R. G. (2008). Electroreduction of chlorine gas at platinum electrodes in several room temperature ionic liquids: Evidence of strong adsorption on the electrode surface revealed by unusual voltammetry in which currents decrease with increasing voltage scan rates. *Journal of Physical Chemistry C* 112, 19477-19483.
- 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. S. (2010). Scromboid poisoning: A review. *Toxicon* 56, 231-243.
- Hwang, B-S., Wang, J-T., Choong, Y-M. (2003). A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products. *Food Chemistry* 82, 329-334.
- Innocente, N., Biasutti, M., Padovese, M., Moret, S. (2007). Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry* 101, 1285-1289.
- Izquierdo-Pulido, M., Hernández-Jover, T., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M. C. (1996). Biogenic amines in european beers. *Journal of Agricultural Chemistry* 44, 3159-3163.
- Jensen, T. B., Marley, P. D. (1995). Development of an assay for histamine using automated high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* 670, 199-207.
- Jovanović, M. S. (1978). *Elektroanalitička hemija*. Zavod za grafičku tehniku. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
- Jutel, J., Watanabe, T., Akdis, M., Blaser, K., Akdis, C. A. (2002). Immune regulation by histamine. *Current Opinion in Immunology* 14, 735-740.
- Kalač, P., Švecová, S., Pelikánova, T. (2002). Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chemistry* 77, 349-351.

- Karovičová, J., Kohajdová, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chemical Papers* 59, 70-79.
- Katsu, T., Hirodo, H. (1999). Determination of histamine release from mast cells using a histamine-sensitive membrane electrode. *Analytica Chimica Acta* 396, 189-193.
- Keow, C. M., Bakar, F. A., Salleh, A. B., Heng, L. Y., Wagiran, R., Bean, L. S. (2007). An amperometric biosensor for the rapid assessment of histamine level in tiger prawn (*Penaeus monodon*) spoilage. *Food Chemistry* 105, 1636-1641.
- Keow, C.M., Bakar, F. A., Salleh, A. B., Heng, L. Y., Wagiran, R., Bean, L. S. (2007). An amperometric biosensor for rapid assesment of histamine level in tiger prawn (*Penaeus monodon*) spoilage. *Food Chemistry* 105, 1636-1641.
- Kim, S. H., An, H., Price, R. J. (1999). Histamine Formation and Bacterial Spoilage of Albacore Harvested off the U.S. Northwest Coast. *Journal of Food Science* 64, 340-343.
- Klocker, J., Mätzler S.A. Huetz, G-N., Drasche, A., Kolbitsch, C., Schwelberger, H. G. (2005). Expression of histamine degrading enzymes in porcine tissues. *Inflammation Research* 54, Supplement 1, S54–S57.
- Köse, S., Hall, G. (2000). Modification of a colorimetric method for histamine analysis in fish meal. *Food research International* 33, 839-845.
- Kotiaho, T., Hayward, M. J., Cooks, R. G. (1991). Direct determination of chlorination products of organic amines using membrane introduction mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 63, 1794-1801.
- Landete, J. M., Ferrer, S., Pardo, I. (2004). Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. *Food Additives & Contaminants* 21, 1149-1154.
- Lapa-Guimarães, J., Pickova, J. (2004). New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A* 1045, 223-232.
- Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, T., Vidal-Carou, M. C. (2009). Thin-layer chromatography for the identifikation and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteri. *Journal of Chromatography A* 1216, 4128-4132.
- Lehane, L., Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revised. *International Journal of Food Microbiology* 58, 1-37.
- Lieber, E. R., Taylor, S. L. (1978). Thin-layer chromatographic screeneng methods for histamine in tuna fish. *Journal of Chromatography A* 153, 143-152.
- Leszczyńska, J., Więdołcha, M., Pytasz, U. (2004) The histamine content in some samples of food products. *Czech Journal of Food Science* 22, 81-86.
- Lieberman, P., Anderson, J. A. (2007). *Allergic Diseases, Diagnosis and Treatment*. Third Edition, Editors: P. Lieberman, J. A. Anderson. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Linda, O. (2003). *Menopause without medicine*. Hunter House Inc., Alamenda, CA, USA.

- López-Sabater E.I., Rodríguez-Jerez J.J., Roig-Sagues A.X., Mora-Ventura M.T. (1993). Determination of histamine in fish using an enzymic method. *Food Additives and Contaminants* 10, 593-602.
- MacGlashan, D. (2003). Histamine: A mediator of inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112, S53-S59.
- Mahendradatta, M., Schwedt, G. (1998). Sample preparation for photometric determination of histamine in foodstuffs compared to capillary electrophoresis. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A* 206, 246-250.
- Maintz, L., Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition* 85, 1185-1196.
- Male K.B., Bouvrette P., Luong J.H.T., Gibbs B.F. (1996). Amperometric biosensor for total histamine, putrescine and cadaverine using diamine oxidase. *Journal of Food Science* 61, 1012-1016.
- Marcobal, A., Polo, M. C., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. (2005). Biogenic amine content of red Spanish wines: comparison of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Research International* 38, 387-394.
- Marjanović, N. (1979). Kinetičko-katalitička određivanja metodom brze anodne polarizacije. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Muscarella, M., Iammarino, M., Centonze, D., Palermo, C. (2005). Measurement of histamine in seafood by HPLC, CE, and ELISA: Comparison of three techniques. *Veterinary Research Communications* 29, Supplement 2, 343-346.
- Naguib, K., Ayesh, A. M., Shalaby, A. R. (1995). Studies on the determination of biogenic amines in foods. 1. Development of a TLC method for the determination of eight biogenic amines in fish. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 43, 134-139.
- Niculescu, M., Frébort, I., Peč, P., Galuszka, P., Mattiasson, B., Csöregi, E. (2000). Amine oxidase based amperometric biosensors for histamine detection. *Electroanalysis* 12, 369-375.
- Novakov, V. (2010). Određivanje vitamina B₂ hronopotenciometrijskom striping analizom u čajnom pecivu. Specijalistički rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Oguri, S., Enami, M., Soga, N. (2007). Selective analysis of histamine in food by means of solid-phase extraction cleanup and chromatographic separation. *Journal of Chromatography A* 1139, 70-74.
- Ojeda, L. (2003). *Menopause without medicine*. 5 edition, Hunter House Inc., Alameda, CA, USA.
- Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* 103, 1475-1486.
- Ortolani, C., Pastorello, E. A. (2006). Food allergies and food intolerances, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 20, 467-483.

- Parsons, M. E., Ganellin, R. C. (2006). Histamine and its receptors. *British Journal of Pharmacology* 147, S127–S135.
- Passani, M. B., Giannoni, P., Bucherelli, C., Baldi, E., Blandina, P. (2007). Histamine in the brain: Beyond sleep and memory. *Biochemical Pharmacology* 73, 1113-1122.
- Pastore, P., Favaro, G., Badocco, D., Tapparo, A., Cavalli, S., Saccani, G. (2005). Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode. *Journal of Chromatography A* 1098, 111-115.
- Patange, S. B., Mukundan, M. K., Ashok Kumar, K. (2005). A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food Control* 16, 465-472.
- Pletcher, D. (2009). *A first course in electrode processes*. 2rd Edition, RSC Cambridge, UK.
- 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.
- Rauscher-Gabernig, E., Grossgut, R., Bauer, F., Paulsen, P. (2009) Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. *Food Control* 20, 423-429.
- Reilley, C. N., Everet, G. W., Johns, R. H. (1955). Voltammetry at constant current. Experimental evaluation. *Analytical Chemistry* 27, 483-491.
- Rossano, R., Mastrangelo, L., Ungaro, N., Riccio, P. (2006). Influence of storage temperature and freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1785): A study by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 830, 161-164.
- Sand, H.J.S. (1901). On the concentrations on the electrodes in a solution with special reference to the liberation of hydrogen by electrolysis of a mixture of copper sulphate and sulphuric acid. *Phil. Mag.* 1, 45-79.
- Sarada, B. V., Rao, T. N., Tryk, D. A., Fujishima, A. (2000). Electrochemical oxidation of histamine and serotonin at highly boron-doped diamond electrodes. *Analytical Chemistry* 72, 1632-1638.
- Savić, B. (2010). Hronopotenciometrijsko određivanje vitamina C na staklastom ugljeniku. Diplomski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Schneider, E. Rolli-Derkinderen, M., Arock, M., Dy, M. (2002). Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends in Immunology* 23, 255-263.
- Schwelberger, H. G., Hittmair, A., Kohlwein, S. D. (1998). Analysis of tissue and subcellular localization of mammalian diamine oxidase by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Inflammation Research* 47, Supplement 1, S60–S61.
- Serrar, D., Brebant, R., Bruneau, S., Denoyel, G. A. (1995). The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLC assay. *Food Chemistry* 54, 85-91.

- Shakila, R. J., Vasundhara, T. S., Kumudavally, K. V. (2001). A comparison of the TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. *Food Chemistry* 75, 255-259.
- Shalaby, A. R. (1994). Separation, identifikacija and estimation of biogenic amines in foods by thin layer chromatography. *Food Chemistry* 49, 305-310.
- Shalaby, A. R. (1995). Multidetekcija, semikvantitativna metoda za određivanje biogenih amina u hrani. *Food Chemistry* 52, 367-372.
- Shalaby, A. R. (1999). Simple, rapid and valid thin layer chromatographic method for određivanje biogenih amina u hrani. *Food Chemistry* 65, 117-121.
- Silla Santos, M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal Food Microbiology* 29, 213-231.
- „Sl. list SRJ“, br. 5/92, 11/92 – ispr. i 32/2002. Pravilnik o količinama pesticida, metala i metaloida i drugih otrovnih supstanci, hemioterapeutika, anabolika i drugih supstancija koje se mogu nalaziti u namirnicama.
- Stojanović, Z. (2007). Hronopotenciometrijsko određivanje α -tokoferola u kozmetičkim proizvodima. Diplomski rad - master rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Stojanović, Z., Švarc-Gajić, J. (*In press*). A simple and rapid method for histamine determination in fermented sausages by mediated chronopotentiometry. *Food Control*, 10.1016/j.foodcont.2011.05.022
- Suzzi, G., Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* 88, 41-54.
- Švarc-Gajić, J. (2006). Hronopotenciometrijska striping analiza žive na staklastom ugljeniku. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
- Švarc-Gajić, J. (2009). *General Toxicology*, Nova Science Publishers, Inc., New York, USA.
- Švarc-Gajić, J., Stojanović, Z. (2010). Electrocatalytic determination of histamine on a nickel-film glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 24, 2931-2939.
- Švarc-Gajić, J., Stojanović, Z. (2011). Determination of histamine in cheese by chronopotentiometry on a thin film mercury electrode. *Food Chemistry* 124, 1172-1176.
- Švarc-Gajić, J., Stojanović, Z., Suturović, Z., Marjanović, N., Kravić, S. (2008). Determination of α -tocopherol in cosmetic products by chronopotentiometry. *Analytical Letters* 41, 2153-2161.
- Tang, T., Shi, T., Qian, K., Li, P., Li, J., Cao, Y. (2009). Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 877, 507-512.
- 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.

- Thomas, F. G., Henze, G. (2001). Introduction to voltammetric analysis. Theory and practise, Csiro Publishing, Collingwood, Australia.
- Tombelli, S., Mascini, M. (1998). Electrochemical biosensors for biogenic amines: a comparison between different approaches. *Analytica Chimica Acta* 358, 277-284.
- Toyo'oka, T. (2008). Separation assay of histamine and its metabolites in biological specimens. *Biomedical Chromatography* 22, 919-930.
- Tsai, Y-H., Kung, H-F., Lee, T-M., Chen, H-C., Chou, S-S., Wei, C-I., Hwang, D-F. (2005). Determination of histamine in canned mackerel implicated in a food borne poisoning. *Food Chemistry* 16, 579-585.
- Valsamaki, K., Michaelidou, A., Polychroniadou, A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry* 71, 259-266.
- Varagić, M. V., Milošević M. P. (2004). *Farmakologija*, Elit-Medica, Beograd.
- Vidal-Carou, M. C., Lahoz-Portolés, F., Bover-Cid, S., Mariné-Font, A. (2003). Ion-pair high-performance chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A* 998, 235-241.
- Wang, J. (2000). *Analytical Electrochemistry*, 2nd Edition, Wiley-VCH, New York, USA.
- Weng, Q., Xia, F., Jin, W. (2001). Determination of histamine by capillary zone electrophoresis with end column amperometric detection at a carbon fiber microdisc array electrode. *Electroanalysis* 13, 1459-1461.
- Wimmerová, M., Macholán, L. (1999). Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilisation. *Biosensors & Bioelectronics* 14, 695-702.
- Wöhrl, S., Hemmer, W. Focke, M., Rappersberger, K., Jarisch, R. (2004). Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. *Allergy and Asthma Proceedings* 25, 305-311.
- Wu, T-N. (2007). Electrocatalytic oxidation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) in aqueous solution at a nickel electrode. *Chemosphere* 69, 271-278.
- Yamamoto, K., Takagi, K., Kano, K., Ikeda, T. (2001). Bioelectrocatalytic detection of histamine using quinohemoprotein amine dehydrogenase and the native electron acceptor cytochrome c-550. *Electroanalysis* 13, 375-379.
- Yi, Q., Zhang, J., Huang, W., Liu, X. (2007). Electrocatalytic oxidation of cyclohexanol on a nickel oxyhydroxide modified nickel electrode in alkaline solutions. *Catalysis Communications* 8, 1017-1022.
- Yongmei, L., Xiaohong, C., Mei, J., Xin, L., Rahman, N., Mingsheng, D., Yan, G. (2009). Biogenic amines in Chinese soy sauce. *Food Control* 20, 593-597.

- You, J., Zhang, Y. (2002). Determination of biogenic amines by RPHPLC with fluorescent detection after derivatization with 2-(9-Carbazole)ethyl Chloroformate (CEOC). *Chromatographia* 56, 43-50.
- Zeng K., Tachikawa, H., Zhu, Z., Davidson, V. L. (2000). Amperometric Detection of Histamine with a Methylamine Dehydrogenase Polypyrrole-Based Sensor. *Analytical Chemistry* 72, 2211-2215.
- Zhang, L-Y., Sun, M-X. (2004). Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1040, 133-140.

7 PRILOG

7.1 Spisak slika

Slika 1. Strukturna formula histamina.....	6
Slika 2. Tautomeri neutralnog oblika histamina.	6
Slika 3. Sinteza histamina.	7
Slika 4. Razgradnja histamina u organizmu.	8
Slika 5. Imunološko oslobađanje histamina.	10
Slika 6. Hronopotenciogram.	28
Slika 7. Reakcioni mehanizam katalitičkog ECE procesa.....	37
Slika 8. Reakcioni mehanizam katalitičkog CEC procesa.....	38
Slika 9. Sistem za elektrohemijisku analizu.	40
Slika 10. Šema aparature za hronopotencimetrijsko merenje pri konstantnoj temperaturi.	42
Slika 11. Šema aparature za mikrotalasnu ekstrakciju u otvorenom sistemu.	42
Slika 12. Procesne posude za elektrohemijiska merenja: a) klasična procesna posuda; b) procesna posuda sa dvostrukim zidom.	43
Slika 13. (a) Tankoslojna živina elektroda; (b) Čvrsta zlatna elektroda; (c) Tankoslojna niklova elektroda.	46
Slika 14. Prečišćavanje ekstrakta kolonskom hromatografijom.	51
Slika 15. Uticaj koncentracije H_2SO_4 na analitički signal histamina. $C_{His} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 18,1 \mu\text{A}$; tankoslojna živina elektroda.....	56
Slika 16. Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina. $C_{His} = 20 \text{ mg/dm}^3$; $i = 18,2 \mu\text{A}$; tankoslojna živina elektroda.....	57
Slika 17. Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina (a) $C_{His} = 10 \text{ mg/dm}^3$ i (b) $C_{His} = 50 \text{ mg/dm}^3$; tankoslojna živina elektroda.....	59
Slika 18. Ponovljivost određivanja sa kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama na tankoslojnoj živinoj elektrodi. $C_{His} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 12,3 \mu\text{A}$	62
Slika 19. Hronopotenciogram rastvora koji sadrži 5 mg/dm^3 histamina i 5 mg/dm^3 cisteina; tankoslojna živina elektroda.	63
Slika 20. Hronopotenciogram $0,0025 \text{ mol/dm}^3$ HCl (a) bez histamina i (b) sa 5 mg/dm^3 histamina. $i = 10,2 \mu\text{A}$; zlatna elektroda.	65
Slika 21. Mehanizam oksidacije histamina na čvrstoj zlatnoj elektrodi (Stojanović & Švarc-Gajić, <i>in press</i>). ..	67
Slika 22. Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina. $C_{His} = 20 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30,3 \mu\text{A}$; zlatna elektroda.	68
Slika 23. Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina (a) $C_{His} = 10 \text{ mg/dm}^3$ i (b) $C_{His} = 50 \text{ mg/dm}^3$; zlatna elektroda.	70
Slika 24. Ponovljivost određivanja sa kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama na čvrstoj zlatnoj elektrodi. $C_{His} = 5 \text{ mg/dm}^3$; $i = 9 \mu\text{A}$	72
Slika 25. Hronopotenciogram tankoslojne niklove elektrode u $0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaOH; $i = 20 \mu\text{A}$; hronopotenciogrami prvog ciklusa (a) i dvadesetog ciklusa (b).....	75
Slika 26. Mikrofotografije tankoslojne niklove elektrode (a) pre i (b) posle aktiviranja u $0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaOH.	76
Slika 27. Hronopotenciogram rastvora histamina u $0,5 \text{ mol/dm}^3$ NaOH na tankoslojnoj niklovoj elektrodi. $C_{His} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 20 \mu\text{A}$	76

Slika 28. Mehanizam oksidacije histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi (Švarc-Gajić & Stojanović, 2010).	77
Slika 29. Uticaj potencijala formiranja (a) i vremena deponovanja (b) tankoslojne niklove elektrode na analitički signal histamina. $C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$	79
Slika 30. Uticaj koncentracije NaOH na analitički signal histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi. $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg/dm}^3$, $i = 18,1 \text{ } \mu\text{A}$	81
Slika 31. Uticaj vremena akumulacije na analitički signal histamina. $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$; (a) $C_{\text{His}} = 2 \text{ mg/dm}^3$; (b) $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg/dm}^3$; (c) $C_{\text{His}} = 20 \text{ mg/dm}^3$; tankoslojna niklova elektroda.	82
Slika 32. Uticaj temperature na analitički signal histamina. $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$; $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg/dm}^3$; tankoslojna niklova elektroda.	83
Slika 33. Uticaj početnog potencijala na analitički signal histamina. $C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$; $t_{\text{Akum.}} = 30 \text{ s}$; tankoslojna niklova elektroda.	85
Slika 34. Uticaj struje oksidacije na analitički signal histamina. $t_{\text{Akum.}} = 30 \text{ s}$; (a) $C_{\text{His}} = 10 \text{ mg/dm}^3$; (b) $C_{\text{His}} = 50 \text{ mg/dm}^3$; tankoslojna niklova elektroda.	86
Slika 35. Ponovljivost određivanja sa kvalitativnim i kvantitativnim karakteristikama na tankoslojnoj niklovoj elektrodi. $C_{\text{His}} = 5 \text{ mg/dm}^3$; $i = 30 \text{ } \mu\text{A}$	89
Slika 36. Efikasnost različitih rastvarača za ekstrakciju histamina iz konzervirane ribe uz primenu ultrazvučne ekstrakcije.....	93
Slika 37. Poređenje efikasnosti ekstrakcije primenom različitih ekstrakcionih tehnika.....	94
Slika 38. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza: silikagel, mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (2 : 6 : 2, v/v/v).	96
Slika 39. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza: silikagel, mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 3 : 4, v/v/v).	96
Slika 40. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza : silikagel, mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 5 : 3, v/v/v).	97
Slika 41. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza: silikagel, mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (3 : 5,5 : 1,5, v/v/v).....	97
Slika 42. Raspodela histamina u frakcijama eluata. Stacionarna faza: silikagel; mobilna faza: etil-acetat : metanol : NH_3 (2 : 6 : 2, v/v/v); zapremina model smeše nanešena na kolonu: 12 cm^3	98

7.2 Spisak tabela

Tabela 1. Vrste histaminskih receptora i biološki efekti histamina (Lieberman & Anderson, 2007; Jutel et al., 2002; Dy & Schneider, 2004).....	11
Tabela 2. Efekti histamina u zavisnosti od njegove koncentracije u plazmi.	12
Tabela 3. Kombinovani elektrohemijski mehanizmi (Wang, 2000; Bard & Faulkner, 2001).	35
Tabela 4. Pregled analiziranih vrsta uzoraka po grupama.	47
Tabela 5. Ispitani sistemi stacionarnih i mobilnih faza u preparativnoj kolonskoj hromatografiji.	50
Tabela 6. Optimalni eksperimentalni uslovi hronopotenciometrijskog određivanja histamina na tankoslojnoj živinoj elektrodi.	60
Tabela 7. Zavisnost vremena oksidacije od sadržaja histamina (tankoslojna živina elektroda).	61

Tabela 8. Rezultati određivanja histamina u standardnim rastvorima primenom hronopotencimetrije sa tankoslojnom živinom elektrodom.	64
Tabela 9. Optimalni eksperimentalni uslovi hronopotencimetrijskog određivanja histamina na čvrstoj zlatnoj elektrodi.	71
Tabela 10. Zavisnost vremena oksidacije od sadržaja histamina (zlatna elektroda).	71
Tabela 11. Rezultati određivanja histamina u standardnim rastvorima primenom posredovane hronopotencimetrije sa čvrstom zlatnom elektrodom.	74
Tabela 12. Optimalni eksperimentalni uslovi hronopotencimetrijskog određivanja histamina na tankoslojnoj niklovoj elektrodi.	87
Tabela 13. Zavisnost vremena oksidacije od sadržaja histamina (tankoslojna niklova elektroda).	88
Tabela 14. Rezultati određivanja histamina u standardnim rastvorima primenom adsorpcione hronopotencimetrije sa tankoslojnom niklovom elektrodom.	90
Tabela 15. Sadržaj histamina u sirevima.	100
Tabela 16. Sadržaj histamina u konzerviranoj ribi.	101
Tabela 17. Sadržaj histamina u fermentisanim kobasicama.	102
Tabela 18. Sadržaj histamina u vinu.	103