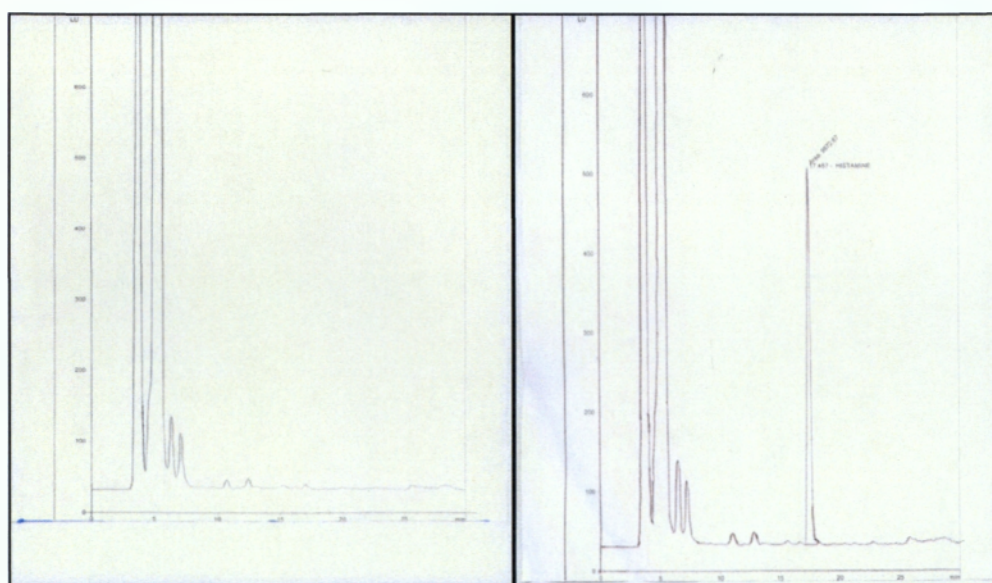


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Τ Ε Ι Κ Α Λ Α Μ Α Τ Α Σ
Τ Μ Η Μ Α
Ε Κ Δ Ο Σ Ε Ω Ν & Β Ι Β Λ Ι Ο Θ Η Κ Η Σ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΣΤΑΜΙΝΗΣ ΣΕ ΙΧΘΥΗΡΑ ΜΕ ΥΓΡΗ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΗPLC**



ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΠΡΟΥΝΤΖΟΥ
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΦΑΡΜΑΚΗΣ ΛΑΜΠΡΟΣ
ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2011

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	σελ.4
Εισαγωγή.....	σελ.5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Γενικά περί ιχθύων	
1.1 Στοιχεία μορφολογίας των ιχθυηρών.....	σελ.6
1.2 Εξωτερικά χαρακτηριστικά των ιχθυηρών.....	σελ.7
1.3 Χημική σύσταση και βιολογική αξία των ιχθυηρών.....	σελ.9
1.3.1Νερό.....	σελ.10
1.3.2 Αζωτούχες εκχυλισματικές ουσίες.....	σελ.10
1.3.3 Πρωτείνες.....	σελ.11
1.3.4 Λιπαρές ύλες.....	σελ.12
1.3.5 Βιταμίνες.....	σελ.12
1.4 Μόλυνση ιχθυηρών.....	σελ.13
1.4.1Προέλευση μολύνσεων.....	σελ.13
1.4.2Μικροχλωρίδα των ιχθυηρών.....	σελ.14
1.5 Ασθένειες ιχθυηρών.....	σελ.15
1.5.1 Ασθένειες που οφείλονται σε ιούς.....	σελ.16
1.5.2 Ασθένειες που οφείλονται σε βακτήρια.....	σελ.16
1.5.3 Ασθένειες που οφείλονται σε μύκητες.....	σελ.17
1.5.4 Ασθένειες που οφείλονται σε πρωτόζωα.....	σελ.17
1.5.5 Ασθένειες που οφείλονται σε έλμινθες.....	σελ.18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Σχηματισμός και δράση ισταμίνης	
2.1Η έννοια της ισταμίνης.....	σελ.19
2.2 Σχηματισμός της ισταμίνης.....	σελ.20
2.3 Σκομβροειδής δηλητηρίαση.....	σελ.20
2.3.1 Αίτια της δηλητηρίασης.....	σελ.21
2.3.2 Συμπτώματα δηλητηρίασης.....	σελ.22
2.3.3 Καταπολέμηση βιογενών αμινών.....	σελ.23
2.4Νομοθετικά όρια της ισταμίνης.....	σελ.23
2.5 Περιστατικά δηλητηρίασης.....	σελ.24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Τεχνικές προσδιορισμού	
3.1 Τεχνικές προσδιορισμού της ισταμίνης.....	σελ.26
3.2 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC.....	σελ.26
3.3 Αέριος χρωματογραφία.....	σελ.28

3.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.....σελ.29	σελ.29
3.4.1 Ανιχνευτές ορατού –υπεριώδους.....σελ.30	σελ.30
3.4.2 Επιλογή στατικής φάσης.....σελ.31	σελ.31
3.4.3 Σύγκριση της HPLC με την TLC.....σελ 31	σελ 31
3.5 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση.....σελ.32	σελ.32
3.6 Ανοσολογική τεχνική ELISA.....σελ.33	σελ.33
3.7 Σύγκριση παραμέτρων μεταξύ των επικρατέστερων τεχνικών προσδιορισμού ισταμίνης στα ψάρια.....σελ.35	σελ.35
3.7.1 Συμπεράσματα σύγκρισης.....σελ.36	σελ.36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Πειραματικό μέρος	
4.1 Προσδιορισμός ισταμίνης με τεχνική HPLC-FLD –POST COLUMN DERIVATIZATION.....σελ.37	σελ.37
4.1.1 Αρχή της μεθόδου.....σελ.37	σελ.37
4.1.2 Προετοιμασία του δείγματος.....σελ.37	σελ.37
4.2 Πειραματικό μέρος.....σελ.39	σελ.39
4.3 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου.....σελ.45	σελ.45
4.4 Χρωματογραφική ανάλυσησελ.45	σελ.45
4.4.1 Ένεση του δείγματος και χρόνος παραμονής.....σελ.46	σελ.46
4.4.2 Παραλαβή χρωματογραφημάτων.....σελ.47	σελ.47
4.5 Ποσοτικοί υπολογισμοί χρωματογραφήματος-ταυτοποίηση ισταμίνης.....σελ.54	σελ.54
4.6 Ασφάλεια εργαστηρίου.....σελ 55	σελ 55
Επίλογος.....σελ.56	σελ.56
Βιβλιογραφία.....σελ.57	σελ.57

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «**Προσδιορισμός της ισταμίνης σε ιχθυηρά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC**» εκπονήθηκε από την φοιτήτρια Κατερίνα Προύντζου του τμήματος Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Καλαμάτας

Η εργασία έχει ως σκοπό, την ενημέρωση γύρω από το πρόβλημα της ισταμίνης, η οποία παράγεται στη σάρκα των αλλοιωμένων ιχθυηρών, κάτω υπό ορισμένες συνθήκες και παράλληλα περιγράφεται ο τρόπος λειτουργίας της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, ως μέθοδος ταυτοποίησης και προσδιορισμού της ισταμίνης, σε εξεταζόμενα είδη ιχθυηρών και προϊόντα αυτών.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον εισηγητή καθηγητή μου κύριο Φαρμάκη Λάμπρο που με βοήθησε στην πραγματοποίηση της εργασίας μου καθώς και την Ά Χημική Υπηρεσία Πειραιά του Γενικού Χημείου του Κράτους για την πολύτιμη βοήθειά της στη συλλογή των πληροφοριών αλλά και στις πειραματικές διαδικασίες που συμμετείχα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το μεγαλύτερο τμήμα της επιφάνειας του πλανήτη μας καλύπτεται από το υγρό στοιχείο. Οι ωκεανοί, οι θάλασσες, τα γλυκά και υφάλμυρα νερά σκεπάζουν τα 7/10 περίπου της γήινης επιφάνειας αποτελώντας το φυσικό περιβάλλον μιας μεγάλης ποικιλίας φυτικών και ζωικών οργανισμών μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και τα ιχθυηρά.

Η αλιεία ως κλάδος οικονομικής δραστηριότητας εντάσσεται στον πρωτογενή τομέα και αποτελεί κύρια δραστηριότητα και βασική πηγή εισοδήματος για τους κατοίκους των νησιών και πολλών παράκτιων περιοχών. Τα ιχθυηρά καταλαμβάνουν σπουδαίο ρόλο στη διατροφή του ανθρώπου λόγω της υψηλής βιολογικής και θρεπτικής τους αξίας, της πληθώρας των πρωτεϊνών, των ιχνοστοιχείων και των λιπαρών υλών που περιέχονται στη σάρκα τους. Ωστόσο, καθώς υπάγονται στην κατηγορία των τροφίμων, που είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, καθίστανται και ευαλλοίωτα, γι' αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι και συστήματα επιθεώρησης και έλεγχου των τροφίμων με στόχο την βελτίωση της ποιότητας των ιχθυηρών που διακινούνται στην Ελληνική αγορά και την απομάκρυνση των κινδύνων από τον καταναλωτή. Η ισταμίνη αποτελεί έναν από τους παράγοντες που υποβαθμίζουν την ποιότητα των ψαριών όταν η ποσότητα της ανέρχεται πάνω από τα όρια που έχουν θεσπιστεί για την υγεία του καταναλωτή και έτσι ο συστηματικός έλεγχος των εισαγόμενων ιχθυηρών αλλά και της εσωτερικής αγοράς αποτελεί βασικό αναγκαίο παράγοντα.

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων προσδιορισμού και ταυτοποίησης της ισταμίνης, τα τελευταία χρόνια, η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), η οποία αποτελεί μια βελτιωμένη μορφή χρωματογραφίας στήλης, έχει καθιερωθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού των βιογενών αμινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Στοιχεία μορφολογίας των ιχθυηρών

Με τον όρο αλιεύματα χαρακτηρίζονται όλοι οι υδρόβιοι ζωικοί οργανισμοί τους οποίους χρησιμοποιεί ο άνθρωπος για την διατροφή του, την διατροφή των αγροτικών ζώων καθώς και για άλλους σκοπούς. Τα αλιεύματα διακρίνονται σε βρώσιμα και μη-βρώσιμα και περιλαμβάνουν πολυάριθμα είδη τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές ζωικές ομάδες όπως ψάρια, εχινόδερμα, μαλάκια, μαλακόστρακα, ερπετά, αμφίβια, θηλαστικά, σφουγγάρια και ανθόζωα. Μεταξύ αυτών, από οικονομική άποψη, σημαντικότερα θεωρούνται τα ψάρια τα οποία ανήκουν στο φύλο των χορδωτών και το υπόφυλο των σπονδυλωτών.

Πίνακας 1.1: Ομάδες ψαριών που ζουν σήμερα

Κλάση	Είδη
Άγναθοι	Λάμπραινες, πετρόχελα κ.α.
Χονδριχθύες	Καρχαρίες, Βάτοι, Σκυλόψαρα, Γαλέοι κ.α.
Οστειχθύες	Πέρκες, Κυπρίνοι, Πέστροφες κ.α.

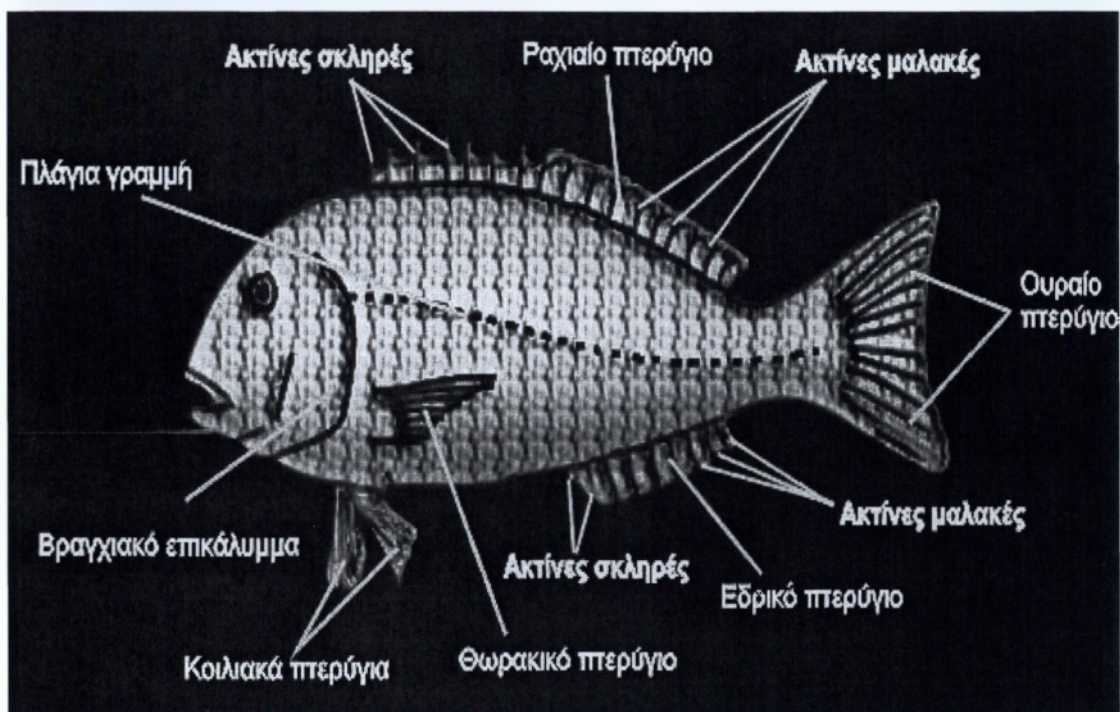
Πηγή: Parker, 1990

Τα ψάρια είναι υδρόβια σπονδυλωτά τα οποία αναπνέουν με βράγχια, δεν έχουν άκρα και κινούνται με πτερύγια στηριζόμενα σε ακτίνες. Το σώμα τους παρουσιάζει αμφίπλευρη συμμετρία και περιβάλλεται από δέρμα που φέρει πολυάριθμους βλεννογόνους αδένες και αστεροειδή χρωμοφόρα και ιριδοφόρα κύτταρα. Το σώμα στα περισσότερα είδη καλύπτεται με μικρούς οστεοποιημένους δερμικούς σχηματισμούς, τα λέπια. Η θερμοκρασία τους επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν καθώς

δεν διαθέτουν εσωτερικούς θερμορυθμιστικούς μηχανισμούς. Είναι δηλαδή ζώα ψυχρόαιμα ή ποικιλόθερμα. Η καρδιά των ψαριών είναι δύχωρη, με τέσσερα ζεύγη αορτικών τόξων και σφαιρικά εμπύρηντα ερυθρά αιμοσφαίρια. Τα όργανα αναπαραγωγής τους είναι κατά ζεύγη, γεννούν αυγά και η γονιμοποίηση είναι συνήθως εξωτερική, εκτός από κάποιες εξαιρέσεις όπως τα είδη των οικογενειών Poeciliidae και Carcharinidae. (Λουγκοβόης, 2002)

1.2 Εξωτερικά χαρακτηριστικά των ιχθυερών

Το σώμα των ψαριών είναι κατάλληλα διαμορφωμένο ώστε να κινείται με ταχύτητα μέσα στο νερό το οποίο είναι 800 φορές πιο πυκνό από τον αέρα. Αποτελείται από την κεφαλή, τον κορμό και την ουρά. Είναι κυλινδρικό, πεπιεσμένο στις δύο πλευρές ενώ το κεφάλι είναι σχετικά μυτερό όπως και η περιοχή της ουράς για να αποκτά υδροδυναμικό σχήμα που να του εξασφαλίσει τη μικρότερη αντίσταση μέσα στο νερό.



Εικόνα 1.1: Εξωτερικά χαρακτηριστικά του ψαριού (Λουγκοβόης, 2002)

Κεφαλή

Αρχίζει από το στοματικό άνοιγμα και φτάνει μέχρι το οπίσθιο άκρο του βραγχιακού επικαλύμματος. Περιλαμβάνει τα μάγουλα, τους οφθαλμούς, το πηγούνι και τα ρουθούνια.

Κορμός

Αντιπροσωπεύει το τμήμα του σώματος από την βάση της κεφαλής μέχρι το σημείο όπου βρίσκεται η έδρα, περιλαμβάνοντας την κοιλιά και τα σπλάχνα. Καθώς ο κορμός λεπτύνεται προς τα πίσω απολήγει στην ουρά.

Ουρά

Αποτελεί το τμήμα μεταξύ της έδρας και του ακραίου τμήματος του ουραίου πτερυγίου.

Πτερόνια

Πρόκειται για μεμβρανώδεις προεξοχές του σώματος οι οποίες συγκρατούνται από ακτίνες σκληρές ή μαλακές που συνδέονται μεταξύ τους με νηκτική μεμβράνη. Χρησιμεύουν ως όργανα για την κίνηση των ψαριών και την ισορροπία τους μέσα στο νερό. Παράλληλα όμως είναι και όργανα που εκπέμπουν την διάθεση των ψαριών και έτσι η κίνηση και η στάση τους μέσα στο νερό είναι χαρακτηριστική όταν για παράδειγμα θέλουν να ζευγαρώσουν ή όταν δείχνουν επιθετικότητα. Τα πτερύγια χωρίζονται σε μονά, ζυγά ή συζυγή.

Δέρμα

Περιλαμβάνει την επιδερμίδα και ένα βαθύ συνδετικό δέρμα, το χορίο. Τα επιδερμικά κύτταρα συγκρατούνται από μεσοκυτταρική βλεννώδη ουσία, ενώ ορισμένα εκκρίνουν την γλοιώδη ουσία που περιβάλλει το σώμα του ψαριού κάνοντας το ολισθηρό

(γλυκοπρωτεΐνη). Η βλέννα προστατεύει το ψαρί από παράσιτα και παθογόνους μικροοργανισμούς, απομακρύνει τα αιωρούμενα σωματίδια του νερού από τα βράγχια και το δέρμα και παράλληλα επιβραδύνει την ανταλλαγή αλάτων μεταξύ των υγρών του σώματος και του περιβάλλοντος. Το δέρμα καλύπτεται από λέπια και ταυτόχρονα αστεροειδή χρωμοφόρα και ιριδοφόρα κύτταρα ευθύνονται για τους εντυπωσιακούς χρωματισμούς του δέρματος.

Πλάγια γραμμή

Βρίσκεται κατά μήκος των πλευρών του σώματος και οφείλεται στην παρουσία μιας σειράς διάτρητων λεπιών οι διαδοχικές οπές των οποίων σχηματίζουν σωλήνα. Ο σωλήνας αυτός σχετίζεται με έναν αγωγό βλέννας που βρίσκεται κάτω από την επιδερμίδα και επικοινωνεί με το περιβάλλον μέσω των πόρων του δέρματος. Μέσα στον αγωγό υπάρχουν αισθητήρια όργανα που μεταδίδουν στον εγκέφαλο τα ερεθίσματα. Η λειτουργία της πλάγιας γραμμής είναι πολλαπλή. Δίνει πληροφορίες για τις κινήσεις του νερού, τη θερμοκρασία και τη θολερότητα του, επιτρέπει στο ψαρί να αντιλαμβάνεται την ύπαρξη αντικειμένων, να κολυμπά σε σκοτεινά νερά και να βρίσκει την τροφή του και το βοήθα να παραμένει στο κοπάδι αποφεύγοντας τους εχθρούς για αυτό το λόγο χαρακτηρίζεται και ως έκτη αίσθηση.

1.3 Χημική σύσταση και βιολογική αξία των ιχθυερών

Η χημική σύσταση και η θρεπτική αξία του κρέατος των ψαριών δεν έχει σημαντικές διαφορές από την αντίστοιχη του κρέατος των θηλαστικών και των πτηνών. Συστηματικές έρευνες που άρχισαν από το 1918 πάνω σε λευκώματα ιχθύων απέδειξαν ότι είναι πλούσια πηγή ιωδίου, ασβεστίου και φθορίου. Τα ψάρια αποτελούν μια κατεξοχήν πρωτεϊνική τροφή λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες, περιέχουν ποικιλία λιπών και ελάχιστους υδατάνθρακες. (Παπαναστασίου, 1990)

Πίνακας 1.2: Βασικά συστατικά φιλέτου ψαριού

Συστατικό	Φιλέτο ψαριού (διακύμανση)
Πρωτεΐνη	16-21%
Λίπος	0.2-25%
Υγρασία	66-81%
Υδατάνθρακες	<0.5%
Τέφρα	1.2-1.5%

Πηγή: Huss,1988

1.3.1 Νερό

Η περιεκτικότητα σε νερό είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη λιποπεριεκτικότητα και ποικίλει ανά είδος. Κυμαίνεται από 28% μέχρι 90% και το περιεχόμενο νερό είναι «βιολογικό».

1.3.2 Αζωτούχες εκχυλισματικές ουσίες

Πρόκειται για μικρού μοριακού βάρους υδατοδιαλυτές αζωτούχες ενώσεις μη πρωτεϊνικής φύσεως που βρίσκονται στο σαρκόπλασμα και στο μεσοκυτταρικό υγρό. Περιλαμβάνονται πτητικές βάσεις, οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO), κρεατίνη, κρεατινίνη, ελεύθερα αμινοξέα, νουκλεοτίδια, νουκλεοζίτες, πουρινικές βάσεις, βεταίνες και χολίνη. Λόγω της μικρής αναλογίας τους δεν επηρεάζουν σημαντικά την θρεπτική αξία του ψαριού, ωστόσο προσδίδουν στη σάρκα τα ιδιαίτερα γευστικά χαρακτηριστικά του είδους και επηρεάζουν την έκκριση γαστρικών υγρών, διεγείρουν τη λειτουργία της πέψης και ευνοούν την αφομοίωση. Αποτελούν εύκολα αφομοιώσιμο υπόστρωμα για τη δράση των βακτηριδίων γι'αυτό η μορφή της αλλοίωσης διαφόρων ιχθύων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αναλογία και τη φύση των αζωτούχων εκχυλισματικών ουσιών της σάρκας.

1.3.3 Πρωτεΐνες

Αποτελούν το πολυτιμότερο συστατικό της σάρκας. Ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό την ισορροπία του νερού μέσα στους ιστούς των ψαριών, ιδιαίτερα οι γλοβουλίνες και οι αλβουμίνες που κατακρατούν τις μεγαλύτερες ποσότητες νερού. Ανάλογα με τη διαλυτότητα τους στους 0 °C, σε διαλύσεις αυξανόμενης ιονικής ισχύος οι πρωτεΐνες ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες :

Πρωτεΐνες του σαρκοπλάσματος

Περιλαμβάνουν την μυοαλβουμίνη, τη γλοβουλίνη και τα ενζυμα. Αντιπροσωπεύουν το 20-30% του συνόλου των πρωτεϊνών του μυϊκού ιστού των ψαριών. Απαντούν στο σαρκοπλασματικό υγρό, τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσωμάτια και συνιστούν ενζυμα του μεταβολισμού των ιστών.

Πρωτεΐνες των μυϊκών ινών

Αντιπροσωπεύονται από την τροπομυοσίνη, ακτίνη, μυοσίνη και ακτινομυοσίνη. Είναι πρωτεΐνες που δίνουν στους μυς την ισχύ της συστολής και αποτελούν το 65% περίπου των πρωτεϊνών των μυών των ψαριών.

Πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού

Αποτελούν το συνδετικό ιστό των μυών. Αντιπροσωπεύονται κυρίως από το κολλαγόνο, την ελαστίνη και τις κερατίνες. Δεν διαλύονται στο νερό ούτε σε διάλυμα αλάτων. Η περιεκτικότητα του κρέατος των ψαριών σε πρωτεΐνες επηρεάζεται από την περιεκτικότητα σε λίπη και νερό. Κυμαίνεται από 6% μέχρι 28%. Η λιποπεριεκτικότητα επηρεάζει αρνητικά την περιεκτικότητα των πρωτεϊνών και η περιεκτικότητα σε νερό είναι περίπου αντιστρόφως ανάλογη προς την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες.

1.3.4 Λιπαρές ύλες

Το λίπος των ψαριών αποτελείται κυρίως από τριγλυκερίδια και σε μικρότερη αναλογία περιλαμβάνει ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφατίδια, στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες και χρωστικές. Χαρακτηριστικό των λιπαρών οξέων των λιπών των ψαριών είναι ο μεγαλύτερος βαθμός ακόρεστου. Άλλο χαρακτηριστικό είναι η απουσία του λινελαϊκού και λινολενικού οξέος. Τα λίπη των ψαριών λόγω της ρευστής τους κατάστασης καλούνται και ιχθυέλαια και ανάλογα την προέλευση τους διακρίνονται σε:

- α. Ιχθυέλαια θαλασσινών ψαριών
- β. Ιχθυέλαια ψαριών του γλυκού νερού

Τα ιχθυέλαια περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που μπορούν να θεραπεύσουν τις δερματοπάθειες όπως το λινολεικό και το αραχιδονικό οξύ. Τα οξέα αυτά (ω-3 λιπαρά οξέα) ανήκουν στην οικογένεια του λινολενικού οξέος και ευνοούν την ανάπτυξη των νεαρών οργανισμών. Ειδικότερα το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (C20:5ω3) αποτελεί ισχυρό αντιθρομβωτικό παράγοντα ο οποίος εμποδίζει την αρτηριοσκλήρωση. Η κυριότερη στερόλη των ιστών ψαριών είναι η χοληστερόλη η οποία απαντά σε αναλογία των 100mg%. (Παπαναστασίου, 1990)

1.3.5 Βιταμίνες

Η σάρκα των ψαριών αποτελεί καλή πηγή βιταμινών του συμπλέγματος Β, ενώ στα λιπαρά ψάρια και στο ηπατέλαιο ορισμένων ειδών - όπως ο μπακαλιάρος - απαντούν και μεγάλες ποσότητες βιταμινών Α και D. Αντιθέτως, η σάρκα των άπαχων ψαριών είναι εξαιρετικά φτωχή στις βιταμίνες αυτές. Στη σάρκα των ψαριών απαντούν επίσης ποσότητες ατοκοφερόλης (βιταμίνη Ε), αντιαιμορραγικής βιταμίνης Κ και παντοθενικό οξύ. Το φολικό οξύ και η βιταμίνη C απαντούν σε μικρές συγκεντρώσεις. Θεωρούνται καλή πηγή ανόργανων συστατικών, φωσφόρου, χαλκού, ιωδίου, μαγνησίου καλίου, νάτριου. (Παπαναστασίου, τόμος Α)

1.4 Μόλυνση των ιχθυηρών

Τα ψάρια, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε πρωτεΐνη, μπορούν να αλλοιωθούν πολύ εύκολα πρώτον επειδή υποστηρίζουν την ανάπτυξη πολλών ειδών μικροβίων και δεύτερον επειδή με την αποικοδόμηση τους αποδεσμεύουν δύσσομα παράγωγα που μειώνουν τους οργανοληπτικούς τους χαρακτήρες και τα καθιστούν μη αποδεκτά από τον καταναλωτή.

Τα θαλασσινά είναι ξενιστές των περισσότερων από τα παθογόνα αίτια του ανθρώπου (βακτήρια - ιοί - παράσιτα) με αποτέλεσμα να αποτελούν συχνό αίτιο τροφογενούς νόσου. Τα τροφιμογενή νοσήματα αποτελούν ένα σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο και τα θαλασσινά ευθύνονται για το 10,5% των επιδημικών εξάρσεων.

1.4.1 Προέλευση των μολύνσεων

Οι ιστοί των ιχθυηρών έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και περιέχουν μικρή οξύτητα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα ιχθυηρά να είναι περισσότερο ευαλλοίωτα από ότι άλλα τρόφιμα φυτικά ή ζωικά. Η αλλοίωση πραγματοποιείται είτε μέσω αυτολύσεως, είτε μέσω της μικροβιακής ανάπτυξης.

Οι ιστοί των ιχθυηρών είναι στείροι σε αντίθεση με τα σπλάχνα και τα βράγχια τα οποία έρχονται σε άμεση επαφή με το περιβάλλον. Η μόλυνση των ιχθυηρών είναι συνάρτηση του βαθμού μολύνσεως του νερού μέσα στο οποίο ζουν τα ψάρια, οπότε τα μικρόβια τα οποία βρίσκονται στο νερό θα είναι τα ίδια με αυτά που απαντούν στο εξωτερικό των ψαριών, στα σπλάχνα και στα βράγχια τους. Ο πληθυσμός παρουσιάζει εποχιακές διακυμάνσεις και ως προς τον αριθμό αλλά και ως προς το είδος των μικροβίων που συμμετέχουν στη μικροχλωρίδα.

Στα σημεία των παραλίων που καταλήγουν οι αγωγοί αποχετεύσεως των αστικών κέντρων το μικροβιακό φορτίο είναι βαρύ. Επίσης κοντά στο βυθό λόγω καθιζήσεως υπάρχουν περισσότερα μικρόβια

απ' ότι στην επιφάνεια του νερού. Στις ακτές των θαλασσών υπάρχει μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο απ' ότι στους ωκεανούς ή τα ανοικτά πελάγη, γι' αυτό και τα πελαγίσια ψάρια είναι λιγότερο μολυσμένα από τα ψάρια των ακτών. Ένας άλλος παράγοντας που ευθύνεται για την μόλυνση των ιχθυηρών είναι και τα ρεύματα που δημιουργούνται στις θάλασσες από την επιφάνεια προς τον πυθμένα και αντίστροφα ανάλογα την εποχή και τα οποία μεταφέρουν μαζί τους εκατοντάδες μικρόβια.

Η μόλυνση των ακτών με βοθρολύματα είναι η αιτία της ύπαρξης Σαλμονελλών και εντεροπαθογόνων στα ιχθυηρά. Μόλυνση των ψαριών μπορεί να επέλθει και κατά την τοποθέτησή τους στις ξύλινες κασέλες, τα τοιχώματα των οποίων είναι σοβαρή πηγή μικροβίων. Οι ιστοί των επίπεδων ψαριών μολύνονται από μικρόβια της εξωτερικής επιφάνειας, ενώ των κυλινδρικών ψαριών με μικρόβια των σπλάχνων.

Το στρες στο οποίο υποβάλλονται τα ψάρια κατά την σύλληψη τους, όταν καταπονούνται ή όταν υποβάλλονται σε ασφυξία επιτρέπει στα μικρόβια από τα βράγχια να περνούν στους ιστούς. Η απόδειξη της συνεχούς μόλυνσης και σήψεως των ψαριών είναι η βαρεία μυρωδιά τριαιθυλαμίνης σε όλες τις παραγορές κατά την έκθεσή τους στις βιτρίνες, μέσα στις ξύλινες κασέλες ή μέσα σε πλαστικά κιβώτια. (Μπαλατσούρας, 2006)

1.4.2 Μικροβιακή χλωρίδα των ιχθυηρών

Ο πληθυσμός και η σύνθεση της μικροχλωρίδας των αλιευμάτων επηρεάζεται από την εποχή, τη θερμοκρασία της θάλασσας, τις συνθήκες υγιεινής κατά την αλίευση, τη μεταφορά, την επεξεργασία ακόμα και από την τροφή που λαμβάνει. Η μικροβιακή χλωρίδα των νωπών ιχθύων αποτελείται κατά κύριο λόγο από ψυχρότροφους και ψυχρόφιλους οργανισμούς. Πρόκειται για αερόβια ή προεραϊτικά αναερόβια Gram(-) βακτήρια που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Vibrio*,

Flavobacterium, και Cytophaga αντιπροσωπεύοντας το 95% της χλωρίδας. Ακόμη βρίσκονται Gram(+) βακτήρια όπως τα Bacillus, Micrococcus, Clostridium Lactobacillus και Corynebacterium. Η μικροβιακή χλωρίδα του εντερικού σωλήνα περιλαμβάνει υψηλότερα ποσοστά στελεχών του γένους Vibrio (μέχρι 10^7 cfu/g) αντικατοπτρίζοντας τις ανοξικές συνθήκες που επικρατούν στο έντερο.

Κάτω από αερόβιες συνθήκες και σε χαμηλές θερμοκρασίες διατήρησης (0°C-5°C) επικρατεί ψυχρότροφη μικροχλωρίδα αποτελούμενη από τα είδη Shewanella putrefaciens, Photobacterium photosphoreum, Aeromonas spp, προκαλλώντας αλλοιώσεις στα νωπά αλιεύματα. Αντιθέτως, σε θερμοκρασίες διατήρησης 15°C-30°C ευνοείται η ταχεία ανάπτυξη των αλλοιωτικών Vibrionaceae, Enterobacteriaceae και Gram(+) μικροοργανισμών. Μετά από παρατεταμένη αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης τα είδη Pseudomonas και Shewanella αποτελούν το 80% της τελικής μικροχλωρίδας. Η Shewanella putrefaciens είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη τριμεθυλαμίνης, ινδόλης, πουτρεσκίνης, καδαβερίνης και χαμηλών λιπαρών οξέων ενώ οι Ps. Group I spp., Ps. Fragil και Moraxella spp παράγουν οσμές φρουτώδεις και μούχλας. (Αρβανιτογιάννης, 2001, Μπαλατσούρας, 2006)

1.5 Ασθένειες των ιχθυερών

Οι ασθένειες των ψαριών ανάλογα με το παθογόνο αίτιο που τις προκαλεί διακρίνονται σε ασθένειες που οφείλονται :

- α) σε ιούς, β) σε βακτήρια, γ)σε μύκητες, δ) σε πρωτόζωα ε)σε ελμίνθες

1.5.1 Ασθένειες που οφείλονται σε ιούς

α. Λοιμώδης αιμορραγική σηψαιμία: Οφείλεται σε ιό και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση οίδημάτων στο σώμα και την σήψη της σάρκας.

β. Λοιμώδης νεκρωτική παγκρεάτιτις: Οφείλεται σε ιό, προκαλεί έως 90% θανάτους στα νεαρά ψάρια με συμπτώματα όπως δυσκινησία, τυμπανισμός και νέκρωση του παγκρέατος. Η ασθένεια μεταδίδεται με τα αυγά μολύνοντας νέες εκτροφές.

γ. Νεφρική υπερτροφία: Παρατηρείται υπερτροφία του νεφρού και νέκρωση των ουροφόρων σωλήνων. Εκδηλώνεται με διόγκωση της κοιλίας στο ύψος των επιγαστρικών πτερυγίων. (Μέλφος, 1981)

1.5.2 Ασθένειες που οφείλονται σε βακτήρια

- Φυματίωση: Οφείλεται στον *Mycobacterium Piscium* και χαρακτηρίζεται από φυμάτια διάφορου μεγέθους.
- Επιζωοτική εξοφθαλμία: Οφείλεται στον *Bacillus Collogenes* που προσβάλλει την πέρκα, το λυθρίνι, την κουτσομούρα. Χαρακτηρίζεται από διόγκωση της κοιλίας και από αναιμία των σπλάχνων και των βραγχίων.
- Ερυθρά πανώλη των χελιών: Είναι άγνωστη η αιτία της ασθένειας και εκδηλώνεται με την εμφάνιση ερυθρών ζωνών γύρω από τα πτερύγια και την ουρά.
- Ερυθρά πανώλη των Κυπρίνων: Οφείλεται στον *Pseudomonas Plehniae* που προσβάλλει το γριβάδι και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ερυθρών πλακών στην κοιλιά.
- Γαγγραινώδης σηψαιμία: Οφείλεται στο βακτήριο *Aeromonas Salmonicida*. Χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση οζιδίων που καταστρέφουν τις μυϊκές μάζες. (Μέλφος, 1981)

1.5.3 Ασθένειες που οφείλονται σε μύκητες

- Βραγχιομυκητίαση: Οφείλεται στο μύκητα *Branchiomyces Sanguinis* που αναπτύσσεται στα βράγχια με συνέπεια να τα φράσει και να σχηματίζονται καστανόλευκες κηλίδες.
- Σαπρολεγνίαση: Προσβάλλει τα ψάρια του γλυκού νερού και εκδηλώνεται με κηλίδες στο δέρμα που οφείλονται στο μυκητόλιο.
- Ιχθυοφονιάση: Οφείλεται στο μύκητα *Ichthyophonus Hoferi* διαταράσσοντας την ισορροπία κατά την πλεύση. Η σάρκα των ψαριών αυτών είναι τοξική για τον άνθρωπο.
(Μέλφος, 1981)

1.5.4 Ασθένειες που οφείλονται σε πρωτόζωα

- Μυξοβολίαση: Οφείλεται στο μυξοσπορίδιο *Myxobolus Cyprini* με εμφάνιση μικρών όγκων στα εσωτερικά όργανα ενώ η σάρκα γίνεται μαλακή, κίτρινη, ζελατινώδης.
- Λεοντοσποριδίαση: Οφείλεται στο *Lentospora Cerebralis* που εντοπίζεται στα οστά του κρανίου φτάνοντας στον εγκέφαλο και προκαλώντας νευρικά συμπτώματα στην πέστροφα και τον μπακαλιάρο.
- Χλωρομύξωση: Οφείλεται σε πολλά είδη του γένους *Chloromyxum* που παρασιτούν στις μυϊκές μάζες και την νηκτική κύστη της πέστροφας και του γριβαδιού.
- Κοστίαση: Οφείλεται στο *Costia Necatrix*. Εκδηλώνεται με κυανόλευκες κηλίδες στο δέρμα και στα θωρακικά πτερύγια.
- Ιχθυοφθειρίαση: Οφείλεται στο *Ichthyophthirius Multifilis*, σχηματίζοντας μικρές φαιόλευκες φυσαλίδες που μετά την ρήξη δημιουργούν εξελκώσεις.
- Χειλοδοντίαση: Οφείλεται στο *Chilodon Cyprini*. Παρατηρούνται λευκές κηλίδες στο δέρμα.
- Κυκλοχαιτίαση: Οφείλεται στο *Cyclochaeta Pediculus* και παρατηρούνται λευκές κηλίδες στο δέρμα των σολομών.

1.5.5 Ασθένειες που οφείλονται σε ελμίνθες

- Ασκαριδίαση: Είναι παράσιτο του πεπτικού συστήματος που προσβάλλει τον μπακαλιάρo, την ζαργάνα, την πέστροφα και παρασιτεί στις μυϊκές ίνες του ψαριού, στους γεννητικούς αδένες και στο στομάχι.
- Τετράρρυγχωση: Οφείλεται στον *Tetrarhynchus Erinaceus* ο οποίος σχηματίζει μελανά οζίδια.
(Μέλφος,1981)

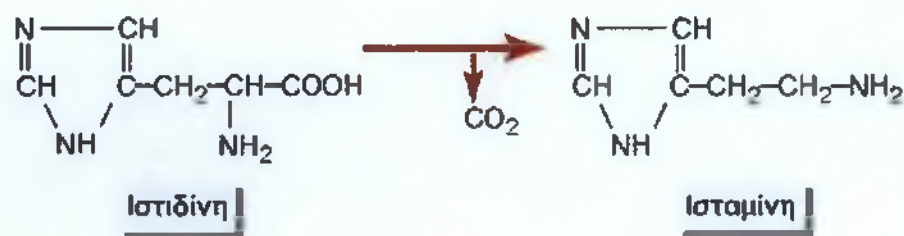
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Η έννοια της ισταμίνης

Η ισταμίνη κατατάσσεται στις βιογενείς αμίνες, οι οποίες είναι απλές αζωτούχες ενώσεις οι οποίες προκύπτουν από την αποκαρβοξυλίωση των αντιστοιχών αμινοξέων ή την τρανσαμίνωση αλδεϋδών και κετονών. Με βάση τη χημική τους δομή οι βιογενείς αμίνες διακρίνονται στις αλειφατικές, τις αρωματικές και τις ετεροκυκλικές. Όλα τα τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες είναι δυνατόν να περιέχουν και βιογενείς αμίνες. Οι παράγοντες που ευνοούν την παραγωγή βιογενών αμινών από τα βακτήρια είναι η επάρκεια του αντίστοιχου αμινοξέος, ο κατάλληλος ενζυμικός εξοπλισμός του βακτηρίου και οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες που επιτρέπουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, την παραγωγή βακτηριακών καρβοξυλασών και την αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων. Ωστόσο, η ισταμίνη υπάρχει σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα, καθώς εμπλέκεται σε αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος, ρυθμίζει τη λειτουργία του εντέρου και δρα ως νευροδιαβιβαστής. Επίσης, πρόκειται και για μια βιογενή, μη πτητική τοξική αμίνη η οποία αναπτύσσεται υπό ορισμένες προϋποθέσεις σε αλιεύματα, τα οποία δεν έχουν συντηρηθεί σωστά, προκαλώντας έναν ειδικό τύπο δηλητηρίασης, γνωστό ως Scombroid poisoning. Τα ψάρια μπορεί, εκτός από την ισταμίνη, να περιέχουν και άλλα αμινοξέα όπως Cadaverine, πουτρεσίνη, τυραμίνη και σπερμίνη και τα βακτηρίδια μπορούν να δώσουν συνέχεια σε αυτές τις αμίνες για την παραγωγή άλλων βιογενών αμινών οι οποίες αποτελούν σημαντικό παράγοντα για την ασφάλεια των ψαριών και της ποιότητάς τους. Ωστόσο πιστεύεται πως η ισταμίνη από μόνη της δεν επαρκεί για να προκαλέσει τοξικότητα στα τρόφιμα ενώ αντιθέτως η Cadaverine και η πουτρεσίνη έχουν προταθεί για ενίσχυση της τοξικότητας της ισταμίνης.

2.2 Σχηματισμός της ισταμίνης

Η παρουσία βιογενών αμινών στα ψάρια αποτελεί δείκτη ανεπιθύμητης βακτηριακής ανάπτυξης, δεν είναι όμως πάντα ανάλογη του μεγέθους της βακτηριακής ανάπτυξης. Αυτό συμβαίνει επειδή η σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας δεν είναι πάντα η ίδια και τα βακτήρια που αναπτύσσονται δεν έχουν την ίδια δυνατότητα παράγωγης αποκαρβοξυλασών. Η ισταμίνη προέρχεται από την αποκαρβοξυλίωση του αμινοξέος ιστιδίνης. Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο L-ιστιδίνη αποκαρβοξυλάσης η οποία χρησιμοποιεί ως συνένζυμο την φωσφορική πυριδοξάλη.



Εικόνα 2.1: Μετατροπή της ιστιδίνης σε ισταμίνη από ιστιδίνη αποκαρβοξυλάση

2.3 Σκομβροειδής δηλητηρίαση (Scombroid poisoning)

Η σκομβροειδής δηλητηρίαση είναι ο δεύτερος πιο κοινός τύπος δηλητηρίασης στα θαλασσινά μετά από την σιγκουατοξίνη. Τα εμπλεκόμενα είδη ψαριών ανήκουν στην οικογένεια Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfaenidae και Scomberesocidae που περιλαμβάνουν το σκουμπρί, την παλαμίδα, τον τόνο, τη σαρδέλα, το γαύρο και άλλα είδη που έχουν υποστεί ανεπαρκή ψύξη ή καθίστανται δηλητηριώδη όταν εκτεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες (15-20°C) για μεγάλο χρονικό διάστημα εμφανίζοντας έντονη γεύση πιπεριού.

2.3.1 Αίτια της δηλητηρίασης

Τα ακριβή αίτια, αν και δεν είναι απολύτως γνωστά, φαίνεται να σχετίζονται με τις υψηλές συγκεντρώσεις ισταμίνης και άλλων βιογενών αμινών που βρίσκονται στη σάρκα των αλλοιωμένων ψαριών.

Τα σκομβροειδή χαρακτηρίζονται από μεγάλη αναλογία του αμινοξέος ιστιδίνη, η αποκαρβοξυλίωση του οποίου από βακτηριακά ένζυμα οδηγεί στο σχηματισμό ισταμίνης ως αποτέλεσμα υπέρβασης των χρονικών ορίων διατήρησης ή της θερμοκρασίας και λόγω μη υγιεινών πρακτικών κατά την αλίευση, αποθήκευση, μεταποίηση και μεταφορά των αλιευτικών προϊόντων. Η μετατροπή πραγματοποιείται κυρίως από Gram(-) βακίλους της οικογενείας Enterobacteriaceae. Τα βακτήρια αυτά παρουσιάζουν ελαχίστη θερμοκρασία ανάπτυξης γύρω στους 8 °C και αναπτύσσονται ταχύτατα σε θερμοκρασίες >15 °C. Κατά την συντήρηση των ψαριών σε πάγο σχηματίζονται μικρές συγκεντρώσεις ισταμίνης $\leq 3 - 4 \text{ mg\%}$. Αντίθετα σε θερμοκρασίες 15-20 °C παράγονται γρήγορα μεγάλες συγκεντρώσεις της βιογενούς αμίνης, που καθιστούν το ιχθυηρό τοξικό ακόμα και αν κρίνεται αποδεκτό από τον καταναλωτή. Αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης προκαλούν και ορισμένα Clostridium και Vibrio spp, όπως και τα Proteus morganii, P.mirabilis, P.vulgaris, Escherichia coli, Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumonia, Clostridium perfringens, Vibrio alginolyticus και Hafnia alvei. Η ισταμίνη δεν αποτελεί το μόνο αίτιο εμφάνισης της νόσου, καθώς λαμβανομένη από το στόμα δεν δρα τοξικά στον οργανισμό. Είναι πολύ πιθανό για την εμφάνιση της νόσου να ευθύνεται ο συνδυασμός βιογενών αμινών, κυρίως ισταμίνης - καδαβερίνης. Δηλητηρίαση από ισταμίνη έχει αναφερθεί και από την κατανάλωση μαλακών τυριών, αλκοολούχων ποτών, χοιρομεριού και ξινολάχανου. (Λουγκοβόης, 2002)

2.3.2 Συμπτώματα δηλητηρίασης

Η ασθένεια αρχικά εκδηλώνεται ως αλλεργική αντίδραση. Μέσα σε 30 λεπτά ή σε 1-2 ώρες από την κατανάλωση των ψαριών αρχίζει να δημιουργείται έξαψη και αίσθηση ζεστασιάς. Αναπτύσσεται εξάνθημα στο λαιμό, την πλάτη, το στήθος με κόκκινο χρώμα οδηγώντας σε έντονο κνησμό. Άλλα χαρακτηριστικά είναι η ζάλη, χαμηλή αρτηριακή πίεση, ναυτία, πονοκέφαλος, δυσκολία στην αναπνοή και κάψιμο στο στόμα.

Σπάνια παρατηρούνται σοβαρότερες επιπλοκές, οι οποίες αφορούν ασθενείς με προϋπάρχουσα νόσο αναπνευστικού ή καρδιαγγειακού συστήματος. Πρόκειται για μια ήπια νόσο που σπάνια έχει θανατηφόρα αποτελέσματα.

Για τη θεραπεία χορηγούνται τα αντιισταμινικά, που δρουν μέσα σε 10-15 λεπτά από τη λήψη. Τα φάρμακα επιλογής είναι οι H1 αναστολείς όπως η διφενυδραμίνη και η χλωροφενυραμίνη αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθούν και H2 αναστολείς όπως η σιμετιδίνη. Αν δεν υπάρχει άμεση βελτίωση στα συμπτώματα, είναι απαραίτητη η ιατρική φροντίδα. Τα λεγόμενα H2 αναστολείς, όπως η σιμετιδίνη και η ρανιτιδίνη, μπορούν να μειώσουν τα οξέα του στομάχου. (Οικονόμου, Παπαδοπούλου, 2007)



Εικόνα 2.1: Εξάνθημα δηλητηρίασης (<http://www.healthline.com>)



Εικόνα 2.2: Εξάνθημα δηλητηρίασης (<http://www.healthline.com>)

2.3.3 Καταπολέμηση βιογενών αμινών

Οι περισσότερες από τις βιογενείς αμίνες δεν καταστρέφονται κατά την εμπορική αποστείρωση. Η κατάψυξη, το αλάτισμα, το κάπνισμα, το μαγείρεμα και η κονσερβοποίηση δεν μπορούν να μειώσουν τα επίπεδα της ισταμίνης και επομένως η παρουσία της στο τελικό κονσερβοποιημένο προϊόν αποτελεί σοβαρή ένδειξη ότι η πρώτη ύλη έχει αλλοιωθεί πριν υποβληθεί σε θερμική επεξεργασία. Παράλληλα, απουσία βιογενών αμινών από την πρώτη ύλη ή το κονσερβοποιημένο προϊόν δε σημαίνει ότι το ιχθυηρό δεν έχει υποστεί αλλοίωση.

2.4 Νομοθετικά όρια της ισταμίνης

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ορίσει ως όριο για τα επίπεδα ισταμίνης τα 100 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό. Συγκέντρωση ισταμίνης 20 mg% σε κονσέρβες τόνου υποδηλώνει κακές συνθήκες συντήρησης του ιχθυηρού κατά την επεξεργασία, ενώ τιμές άνω των 50 mg% καθιστούν το τρόφιμο επικίνδυνο για την δημόσια υγεία. Η τιμή των 20 mg% αποτελεί την ανώτερη επιτρεπόμενη συγκέντρωση ισταμίνης για τα κονσερβοποιημένα σκωμβροειδή. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η απουσία βιογενών αμινών από το κονσερβοποιημένο προϊόν ή την πρώτη ύλη δεν αποδεικνύει ότι το προϊόν δεν έχει υποστεί αλλοίωση. (Farn & Sims, 1987)

Για την εκτίμηση της ποιότητας του κονσερβοποιημένου τόνου ο ακόλουθος δείκτης έχει επισημανθεί για την συγκέντρωση βιογενών αμινών στη σάρκα του ιχθυοφύλου (Mietz & Karmas, 1977):

$$\text{Δείκτης ποιότητας} = \frac{(\text{ppm ισταμίνης} + \text{ppm πουτορεσίνη} + \text{ppm καδαβερίνης})}{(1 + \text{ppm σπερμιδίνης} + \text{ppm σπερμίνης})}$$

2.5 Περιστατικά δηλητηρίασης

Η πρώτη αναφορά δηλητηρίασης από κατανάλωση σκομβροειδών έγινε από τον Henderson το 1828. Στις αρχές της δεκαετίας του 1950 Ιάπωνες επιστήμονες κατέγραψαν 14 μαζικά περιστατικά δηλητηρίασης σκομβροειδών ψαριών που αφορούσαν 1215 άτομα. Από το 1970 μέχρι σήμερα, οι χώρες με τις περισσότερες αναφορές περιστατικών δηλητηρίασης από ισταμίνη είναι η Ιαπωνία, οι ΗΠΑ, η Βρετανία ενώ λιγότερα περιστατικά αφορούν την Ν.Ζηλανδία, τον Καναδά, τη Γαλλία, τη Σουηδία, τη Σρι Λάνκα, τη Τσεχία, Αυστραλία και την Αίγυπτο.

Στην Ελλάδα το ποσοστό των προβληματικών δειγμάτων φτάνει το 14,5%. Από έρευνα, ανιχνεύθηκε ισταμίνη σε όλα τα δείγματα τόνου και κυμαινόταν μεταξύ 3,1 και 23,5 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό.

Στις Ελληνικές σαρδέλες τα επίπεδα ισταμίνης βρέθηκαν χαμηλά στο ποσοστό 3-22 χιλιοστογραμμάρια ανά κιλό. Απο μελέτη του εργαστηρίου μικροβιολογίας τροφίμων της ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων η οποία δημοσιεύτηκε στο επιστημονικό έντυπο «Food Additives and Contaminants», δείχνει ότι το 14, 5% των δειγμάτων ψαριών που αναλύθηκαν υπερέβαινε το όριο.

Στο μικροσκόπιο των ελλήνων μελετητών μπήκαν φιλέτα αντσούγιας, αντσούγια σε κονσέρβα, ρέγκες παστές, καπνιστές και κονσέρβας, σαρδέλες φρέσκες και κονσέρβας, τόνος σε κονσέρβα, κατεψυγμένος ξιφίας και διάφοροι τύποι σκουμπριού. Οι συγκεντρώσεις ισταμίνης ήταν υψηλότερες στα δείγματα παστής

ρέγκας και φιλέτων αντσούγιας και έφταναν τα 220 και 165 mg/kg αντίστοιχα. Στην Ιαπωνία σε σαρδέλες βρέθηκε ποσοστό ισταμίνης πάνω από 50 έως 3.400 mg/kg.

Στην Ταϊβάν, έπειτα από ξέσπασμα δηλητηριάσεων, βρέθηκαν σε ξιφία συγκεντρώσεις από 859 έως 2.937 mg/kg.

Στην Τουρκία το 7,7 % των δειγμάτων περιείχε την τοξίνη σε συγκεντρώσεις πάνω από 1.000 mg/kg.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Τεχνικές προσδιορισμού της ισταμίνης

Κατά καιρούς έχουν εφαρμοστεί πολλές τεχνικές για τον προσδιορισμό των βιογενών αμινών και συγκεκριμένα για την ισταμίνη. Η χρωματογραφική ανάλυση είναι μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ουσιών στα συστατικά τους με βάση την κατανομή των συστατικών ανάμεσα σε δύο φάσεις, μια στατική (ακίνητη φάση) και μια κινητή (κινούμενη φάση). Τα συστατικά του μίγματος μετακινούνται με τη βοήθεια της κινητής φάσης πάνω στην ακίνητη φάση με διαφορετική ταχύτητα και έτσι προκαλείται ο διαχωρισμός τους. Οι κύριες τεχνικές ταυτοποίησης και προσδιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την ισταμίνη είναι η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC), η αέρια χρωματογραφία (GC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE) και η ανοσολογική τεχνική (ELISA). (<http://sciencedirect.com>)

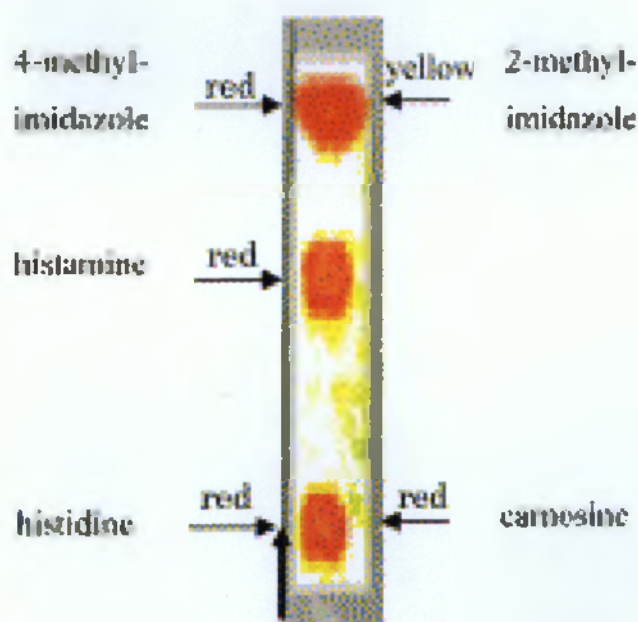
3.2 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε από τον Stahl το 1958 και εφαρμόζεται μέχρι και σήμερα σε μεγάλη κλίμακα γιατί είναι απλή, γρήγορη, εύχρηστη και δίνει αναπαραγωγικά αποτελέσματα, είναι ευαίσθητη, εμφανίζει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, δεν απαιτεί πολύπλοκο εξοπλισμό και δεν είναι καταστροφική για τα δείγματα. Το μετρούμενο μέγεθος στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι ο παράγοντας επιβράδυνσης, R_f , ο οποίος εκφράζει το βαθμό συγκράτησης της ουσίας στη στατική φάση και δίνεται από τη σχέση:

R_f = απόσταση που κινήθηκε η ουσία / απόσταση που κινήθηκε ο διαλύτης

Ο παράγοντας σε καθορισμένες συνθήκες είναι χαρακτηριστικός για κάθε ουσία και χρησιμοποιείται ως μέσο ταυτοποίησης. Όλη η διαδικασία γίνεται μέσα σε γυάλινο δοχείο που καλείται δοχείο ανάπτυξης, το οποίο φέρει κάλυμμα για να μην εξατμίζεται ο διαλύτης ανάπτυξης στο περιβάλλον και έτσι η ατμόσφαιρα εντός του δοχείου είναι κορεσμένη σε ατμούς του διαλύτη. Ο διαλύτης ανάπτυξης τοποθετείται σε τέτοιο ύψος εντός του δοχείου ώστε να μην ξεπερνά την γραμμή εκκίνησης.

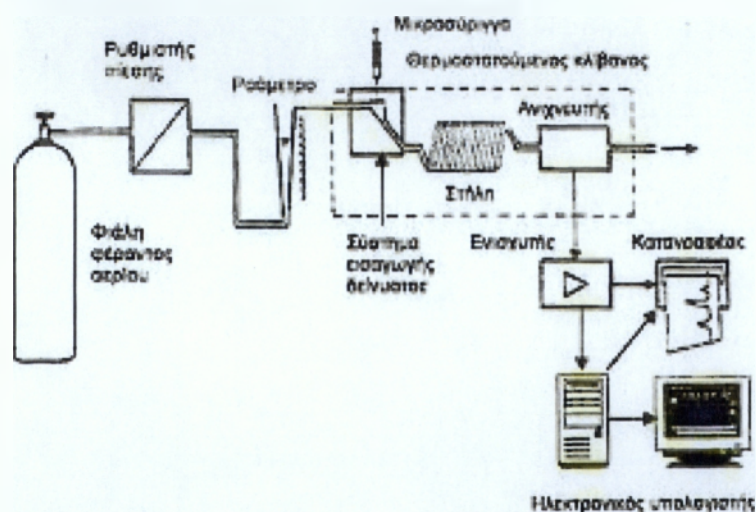
Όταν τα συστατικά του μίγματος είναι έγχρωμα τότε οι σχηματιζόμενες κηλίδες είναι έγχρωμες και ο συντελεστής R_f μετριέται εύκολα. Στην περίπτωση όμως που οι κηλίδες είναι άχρωμες χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές για την εμφάνιση τους χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια όπως ατμούς ιωδίου, θειικό οξύ, νινυδρίνη, χρήση λυχνιών υπεριώδους ή συνδυασμό φθορίζουσών χρωματογραφικών πλακών και λυχνίας υπεριώδους. (Ξαπλαντέρη, Καπόλος, 2008)



Εικόνα 3.1: Σχέδιο διαχωρισμού ισταμίνης και ιστιδίνης με TLC πάνω σε πλάκα κυτταρίνης (<http://sciencedirect.com>)

3.3 Αέριος χρωματογραφία

Στην αεριοχρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η απελευθέρωση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Υπάρχουν δυο τύποι αεριοχρωματογραφίας: η χρωματογραφία αερίου-στερεού (gas-solid chromatography GSC) και η χρωματογραφία αερίου-υγρού (gas liquid chromatography GLC), η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στους κλάδους των θετικών επιστημών, όπως και στην περίπτωση της ισταμίνης, και συχνότερα αναφέρεται ως αεριοχρωματογραφία (gas chromatography). Η χρωματογραφία αερίου-υγρού βασίζεται στην κατανομή του αναλυτή μεταξύ της αέριας κινητής φάσης και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στέρεου. Το 1955 εμφανίστηκε στην αγορά το πρώτο εμπορικό σύστημα χρωματογραφίας αερίου-υγρού



Εικόνα 3.2: Τα κυριότερα μέρη ενός αερίου χρωματογράφου (<http://chimikoergastirio.blogspot.com>)

Το φέρον αέριο είναι συνήθως He, N₂, Ar ή συνθετικός αέρας και περιέχεται σε χαλύβδινους κυλίνδρους υπό μεγάλη πίεση 200-250 atm. Γι'αυτό απαιτείται ρυθμιστής της πίεσης εξόδου του αερίου και

βαλβίδα βελόνης για λεπτή ρύθμιση της ταχύτητας ροής του μέσω της χρωματογραφικής στήλης. Το φέρον αέριο πριν εισέρθει στην στήλη ξεραίνεται με την παρεμβολή ενός σωλήνα γεμάτο με μοριακό ηθμό επειδή η τυχόν υγρασία που μπορεί να περιέχει το φέρον αέριο μπορεί να προκαλέσει απενεργοποίηση του στέρεου προσροφητή ή διάσπαση της υγρής στατικής φάσης με την οποία είναι καλυμμένος. Η πίεση εισόδου του αερίου στη στήλη μετράται με ανοικτό μανόμετρο υδραργύρου ή άλλο μετρητή πίεσεως. Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος με αεριοχρωματογραφία στηρίζεται σε αλληλάλληλες κατανομές των συστατικών αυτών μεταξύ της στατικής φάσης και του κινούμενου αερίου γι'αυτό η χρωματογραφική στήλη διατηρείται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από του περιβάλλοντος 50-500 °C με τη βοήθεια κλιβάνου σταθερής θερμοκρασίας ώστε οι ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν να βρίσκονται σε κατάσταση ατμών επί ένα μέρος του χρόνου κατά τη δίοδο τους από τη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με ένεση του δείγματος σε ειδικό χώρο ο οποίος θερμαίνεται με τη βοήθεια μικρού κλιβάνου ώστε να εξασφαλίζεται άμεση εξαέρωση του δείγματος. (Ξαπλαντέρη, Καπόλος, 2008)

3.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, καθώς αυτή ανήκει στις χρωματογραφικές τεχνικές, ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της συνδυαστικής δράσης μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης.

Ένα σύστημα HPLC περιλαμβάνει τα κατώτερο μέρη:

- Αντλία HPLC ανάμειξης διαλυτών
- Συσκευή απαέρωσης της κινητής φάσης
- Φθορισμομετρικό ανιχνευτή
- Αυτόματο δειγματολήπτη
- Θερμοστατούμενο θάλαμο στηλών HPLC
- Ανιχνευτή διόδων ορατού-υπεριώδους φωτός
- Σύστημα δημιουργίας παραγώγων των εκλούόμενων από τη στήλη ουσιών, με φιάλη 1 lit για το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης και ρυθμιζόμενη παροχή He και με θερμοστατούμενο θάλαμο στηλών HPLC
- Κατάλληλες στήλες HPLC, κατά περίπτωση ανάλυσης
- Υάλινες φιάλες διαλυτών έκλουσης όγκου 1lit με κατάλληλης διάταξης πώμα για την επίτευξη σταθερών συνθηκών διατήρησης του διαλύτη έκλουσης καθώς και φιάλη συλλογής των απόβλητων του συστήματος
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής για τον έλεγχο και την λειτουργία των παραπάνω οργάνων καθώς και για τη λήψη και επεξεργασία του σήματος του ανιχνευτή.

(εγχειρίδιο λειτουργίας HPLC)

3.4.1 Ανιχνευτές Ορατού-Υπεριώδους

Η απορρόφηση ακτινοβολίας από μια χημική ένωση εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τις ομάδες της χημικής ένωσης. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, ανάλογα με την ενέργεια (συχνότητα) που αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια, προκαλεί τη διέγερση και μεταφορά τους σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, ή ακόμα προκαλεί δόνηση ή περιστροφή μοριακών δεσμών ορισμένων ομάδων της ένωσης.

3.4.2 Επιλογή στατικής φάσης

Η επιλογή της στατικής φάσης και της κατάλληλης αναλυτικής στήλης είναι σημαντικά για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου και καθορίζεται από τις επιμέρους παραμέτρους:

i. Το μέγεθος των μορίων του υλικού πληρώσεως και τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης

ii. Η φύση της ομάδας που είναι δεσμευμένη στο υπόστρωμα, η οποία καθορίζει και την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης

iii. Η διάμετρος των πόρων του υλικού πληρώσεως

α. Ο τύπος του υποστρώματος το οποίο πρέπει να είναι χημικά αδρανές.

ν. Η περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα υδροξύλια. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό τους, τόσο πιο πολική (όξινη) είναι η στήλη και τόσο ασθενέστερη είναι η συγκράτηση των μη πολικών ενώσεων.

(Καπόλος, 2007-2008)

3.4.3 Σύγκριση της HPLC με την TLC

Η μέθοδος HPLC προσφέρει μία καλή γραμμικότητα 500-100ng, είναι ευαίσθητη μέθοδος με επαναληψιμότητα <3%. Απαιτεί πολύ εξεζητημένο τεχνολογικό εξοπλισμό, υψηλό λειτουργικό κόστος, χρόνο και τεχνική δεξιότητα. Αντίθετα, η TLC, αν και εμφανίζει απώλεια στην γραμμικότητα 20-300ng και επαναληψιμότητα <8%, αποδείχθηκε πιο γρήγορη μέθοδος και λιγότερο δαπανηρή. Επιπλέον, η TLC είναι κατάλληλη για την ταχεία και ταυτόχρονη εξέταση διαφόρων δειγμάτων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στον τομέα της αλείας για την ανίχνευση βιογενών αμινών, ιδιαίτερα για την τοξική ισταμίνη, πουτρεσίνη και

καθαβερίνη, οι οποίες ενισχύουν την τοξικότητα της ισταμίνης στα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα.

3.5 Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

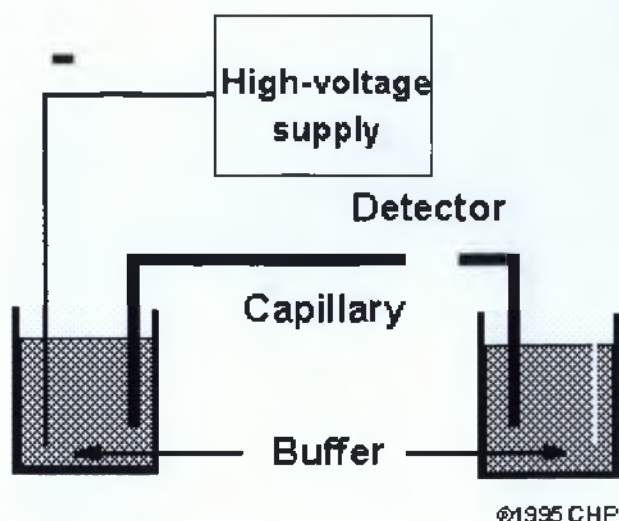
Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση είναι μια μοντέρνα τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης, φιλική προς το περιβάλλον, με μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, δεν απαιτεί μεγάλη ποσότητα δείγματος και η κατανάλωση τοξικών διαλυτών είναι ελαχίστη, αφού απαιτούνται όγκοι της τάξης του μικρόλιτρου. Χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στενής διαμέτρου που περιέχουν μονό το διάλυμα λειτουργίας. Ο διαχωρισμός των ιοντικών ειδών βασίζεται στο φορτίο και το μέγεθός τους, καθώς η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήκτωμα. Το πήκτωμα είναι μικρό τρισδιάστατο πλέγμα μακρομορίων που δρα ως μοριακό κόσκινο και παρασκευάζεται από αгарόζη, άμυλο ή πολυακρυλαμίδιο. Τα μικρά μόρια κινούνται πιο γρήγορα μέσα από τους πόρους του πηκτώματος ενώ τα μεγάλα επιβραδύνονται.

Τα κύρια μέρη του συστήματος είναι :

- ένα φιαλίδιο δείγματος
- ένα φιαλίδιο προορισμού
- τα τριχοειδή
- ηλεκτρόδια
- υψηλής τάσης τροφοδοσία
- ένας ανιχνευτή
- μία έξοδος δεδομένων
- μια συσκευή διακίνησης

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση έχει να επιδείξει ισχυρή ικανότητα για την ανάλυση των συνθέτων δειγμάτων και στην περίπτωση του

προσδιορισμού της ισταμίνης στα ψάρια αποτελεί μια ταχεία ευαίσθητη μέθοδο (Καπόλος 2007-2008) (<http://sciencedirect.com>)



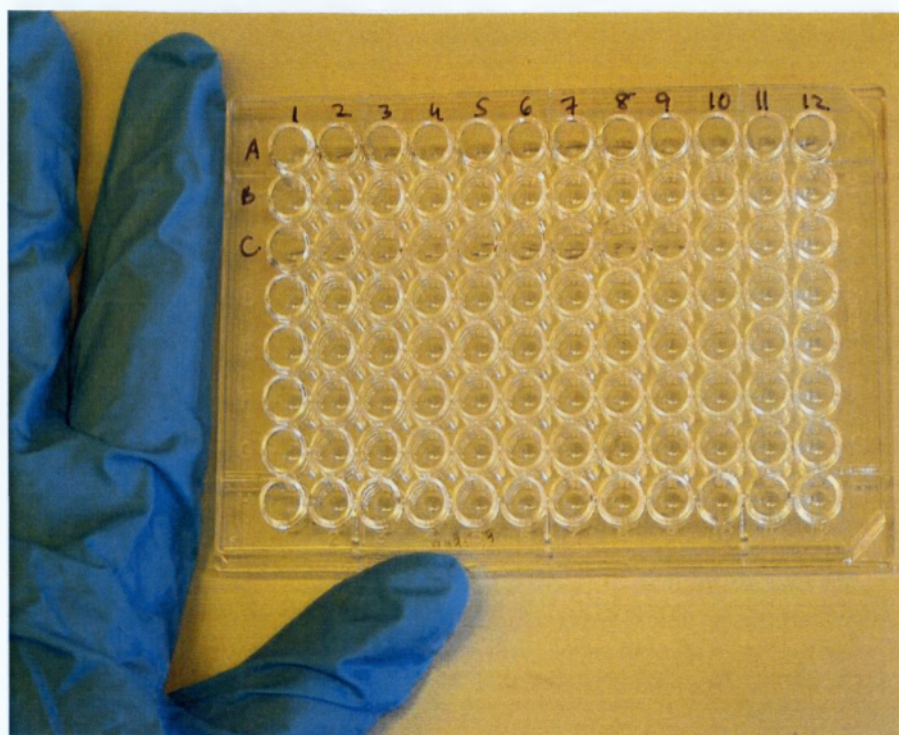
Εικόνα 3.3: Σύστημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (<http://sciencedirect.com>)

3.6 Ανοσολογική τεχνική ELISA

Η μεγάλη εξειδίκευση των ανοσολογικών δοκιμών όπου γίνεται χρήση των πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων κατέστησε εφικτή την εφαρμογή τους στην μικροβιολογία τροφίμων. Το χαρακτηριστικό όλων των ανοσολογικών μεθόδων είναι η σύνδεση του αντισώματος με το αντιγόνο.

Στην ELISA το αντίσωμα ακινητοποιείται σε μια στερεή επιφάνεια. Το δείγμα που περιέχει το αντιγόνο, προστίθεται στην επιφάνεια που υπάρχουν τα αντισώματα, αναμιγνύεται με αυτά και στη συνέχεια απομακρύνεται η περίσσεια του. Η ανίχνευση των αντιγόνων που συνδέθηκαν με τα αντισώματα γίνεται με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος που είναι συζευγμένο με ένα ένζυμο. Το αντίσωμα θα συνδεθεί επίσης με το αντιγόνο και η δέσμευση τους ανιχνεύεται με τη βοήθεια ενός χρωμοφόρου υποστρώματος ώστε το ένζυμο να συνδεθεί με το δεύτερο αντίσωμα και να μετρηθεί η

ένταση του χρώματος που αναπτύσσεται και η ένταση του χρώματος είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του αντίγονου. Ανάλογα η ELISA χρησιμοποιείται και στον προσδιορισμό αλλεργιογόνων ουσιών. Συγκεκριμένα στην περίπτωση της ισταμίνης χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7,2 για την εξαγωγή ισταμίνης από 2g ομογενοποιημένου δείγματος. (Αρβανιτογιάννης, Βαρζάκας, 2007)



Εικόνα 3.4: πλάκα μικροτιτλοδότησης που χρησιμοποιείται στην ELISA

3.7 Σύγκριση παραμέτρων μεταξύ των επικρατέστερων τεχνικών προσδιορισμού ισταμίνης στα ψάρια

Από τις ανωτέρω τεχνικές πιο δημοφιλείς και αποτελεσματικές στον προσδιορισμό της ισταμίνης στα ψαριά αναδείχθηκαν οι: ELISA, CE και HPLC

Πίνακας 3.1: Σύγκριση παραμέτρων μεταξύ των ELISA, CE και HPLC

Παράμετροι	HPLC	CE	ELISA
Μέση τιμή(10 προσδιορισμοί σε πραγματικό δείγμα)	20,3 ± 0,8	19,2 ± 1,1	42,6 ± 4,1
CV%	3,3%	5,8%	9,6%
Ακρίβεια του μέσου ορού % για ανακτήσεις για τρία επίπεδα εμβολιασμένων δειγμάτων: 100-150-200mg/kg	80,7 ± 1,4	88,7 ± 3,8	11,5 ± 6,6
Γραμμικότητα r^2	0,999	0,997	-
Εύρος μέτρησης mg/kg στο δείγμα	10-200	10-200	2,5-200
Όριο ανίχνευσης mg/kg	10	10	2,5
Απαιτούμενος χρόνος για την ανάλυση	1h	25 min	2h+40 min
Προβλήματα	Όχι παρεμβολές	Όχι παρεμβολές	Πιθανές παρεμβολές

Πηγή: M.Muscarella, 2005

3.7.1 Συμπεράσματα σύγκρισης

Τα όρια ανίχνευσης μεταξύ των τεχνικών προσδιορισμού εμφανίζονται ισοδύναμα. Η ELISA παρουσιάζει υψηλή αξία της $cn\% = 9,6\%$ σε σχέση με την HPLC όπου $cn\% = 3,3\%$ και την CE όπου $cn\% = 5,8\%$. Η ακρίβεια εκτιμήθηκε με την βοήθεια των συντελεστών ανάκτησης επί τοις εκατό. Οι ανακτήσεις για την ELISA είναι 115%, για την CE είναι 88,7% και για την HPLC είναι 80,7%. Οι παράμετροι είναι οι βέλτιστες για την HPLC και CE. Επίσης παρουσιάζουν υψηλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια. Η ELISA, ενώ φαίνεται να παρουσιάζει υψηλές συγκεντρώσεις (42,6mg/kg) στην περιεχομένη ισταμίνη που προσδιορίζεται δεν διαφέρει σημαντικά από τα ποσοστά που λαμβάνονται με την HPLC (20,3 mg/kg) και την CE (19,2 mg/kg). Η ELISA είναι πολύ απλή σαν μέθοδος και εμφανίζει υψηλή ευαισθησία (0,05 mg/kg) όμως για δείγματα με συγκέντρωση ισταμίνης πάνω από το νομοθετικό όριο απαιτεί την επιβεβαίωση της μεθόδου HPLC. Οι HPLC και CE μπορούν να αυτοματοποιηθούν, δε χρησιμοποιούν χρονοβόρες και πολύπλοκες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος, παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία όταν συνδυάζονται με ακτινοβολία UV-DAD ή φασματομετρία μάζας. Η CE αποτελεί μια εναλλακτική λύση για τον προσδιορισμό της ισταμίνης. Είναι πολύ αποτελεσματική για τακτικές αναλύσεις, ταχεία και φθηνότερη από την HPLC. Αντικαθιστά τους οργανικούς διαλύτες με υδατικά διαλύματα. Μέσα από μακροχρόνιες επιστημονικές έρευνες και αλληπάλληλα εργαστηριακά πειράματα και ελέγχους, η HPLC έχει αναδειχθεί πλέον ως η πιο ασφαλής, ακριβής και αποτελεσματική μέθοδος προσδιορισμού της ισταμίνης των ψαριών, γι' αυτό και η παρουσίαση της τεχνικής αυτής που ακολουθεί έχει τεράστιο ενδιαφέρον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Προσδιορισμός της ισταμίνης με τεχνική HPLC - FLD – POST COLUMN DERIVATIZATION

Το 2002 αναπτύχθηκε αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης της ισταμίνης με τεχνική HPLC-FLD μετά από παραγωγοποίηση κατόπιν έκλουσης από την αναλυτική στήλη. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε ορισμένα είδη ψαριών, δηλαδή σε ψάρια των οικογενειών Scombridae, Clupeidae, Engraulidae και Coryphaenidae, όπως πρότεινε η σύσταση της επιτροπής 2003/10/EK, L 7/76, 11/01/2003. Σκοπός της εφαρμογής του έλεγχου ήταν ο προσδιορισμός της ισταμίνης σε ιχθυηρά και σε σκευάσματα ιχθυηρών, η μή υπέρβαση των ορίων ισταμίνης που ορίζονταν από την Κοινοτική Νομοθεσία (Οδηγία 91/493/ΕΟΚ, Π.Δ. 412/94, ΦΕΚ 232^Α 27/12/94 του Συμβουλίου) και παράλληλα η προστασία του καταναλωτή από κακής ποιότητας αλιεύματα.

4.1.1 Αρχή της μεθόδου

Πραγματοποιείται εκχύλιση της ισταμίνης από το δείγμα με υπερχλωρικό οξύ και στη συνέχεια το εκχύλισμα εισάγεται προς ανάλυση σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, η οποία διαθέτει σύστημα δημιουργίας παραγώγων των εκλουόμενων από τη στήλη ουσιών και φθορισμομετρικό ανιχνευτή.

4.1.2 Προετοιμασία του δείγματος

Από ολόκληρη τη ποσότητα του υπό εξέταση δείγματος απομακρύνονται τα μη εδώδιμα μέρη, η σπονδυλική στήλη, αιχμηρά οστά μεγάλων ιχθυηρών, κεφαλές, εντόσθια και πτερύγια μεγάλων ιχθυηρών, τμήματα υλικών και μέσων συσκευασίας. Το υπόλοιπο δείγμα αλέθεται σε ηλεκτρικό μπλέντερ οικιακού τύπου. Στην περίπτωση που το δείγμα είναι τόνος σε κονσέρβα, το δείγμα δεν χρειάζεται προετοιμασία και απλά αλέθεται στο μπλέντερ.

Δείγματα τα οποία διατηρούνται υπό ψύξη πρέπει να αφήνονται πρώτα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί μία έως μιάμιση ώρα πριν την ομογενοποίησή τους. Ένα μέρος από το ομογενοποιημένο δείγμα χρησιμοποιείται άμεσα για ανάλυση, ενώ το υπόλοιπο φυλάσσεται στην κατάψυξη. Σε περίπτωση απόψυξης ήδη ομογενοποιημένων δειγμάτων, η υγρασία η οποία πιθανόν έχει επικαθίσει στα εσωτερικά τοιχώματα του περιέκτη του δείγματος, παραλαμβάνεται με τη βοήθεια μικρής ποσότητας δείγματος, επανεισάγεται στην κύρια μάζα του δείγματος και ακολουθεί ανάμειξη. Η έναρξη της ανάλυσης πρέπει να γίνει το αργότερο εντός τεσσάρων ωρών από την αρχική ομογενοποίηση του δείγματος ή από την απόψυξη και ανάμειξη της.



Εικόνα 4.1: Ομογενοποίηση δείγματος τόνου

4.2 Πειραματικό μέρος

Η πραγματοποίηση της μεθόδου απαιτεί η θερμοκρασία περιβάλλοντος να μην υπερβαίνει τους 30°C. Από το αρχικό ομογενοποιημένο προϊόν λαμβάνονται εννέα υποδείγματα. Μέσα σε γυάλινη αρμυρισμένη κωνική φιάλη, ζυγίζεται σε ζυγό με ένδειξη δευτέρου δεκαδικού ψηφίου ποσότητα ομογενοποιηθέντος δείγματος $m=5\text{g}$ ($\pm 0,05\text{g}$). Προστίθεται με την ελεγμένη γυάλινη προχοίδα υπερχλωρικό οξύ $V=50\text{ml}$ ($\pm 1\text{ml}$), $\text{HClO}_4 \approx 0,6\text{ M}$, το οποίο παρασκευάζεται από αραίωση πυκνού υπερχλωρικού οξέος με αποσταγμένο νερό. Στην συνέχεια η φιάλη πωματίζεται, ανακινείται ισχυρά επί 1-2 λεπτά και αφήνεται σε ηρεμία 10-15 λεπτά. Έπειτα από το χρονικό όριο ηρεμίας του δείγματος, η φιάλη ανακινείται ισχυρά και πάλι επί 2-3 λεπτά και το μείγμα διηθείται από χάρτινο πτυχωτό ηθμό. Το διήθημα υποβάλλεται σε νέα διήθηση από μικροφίλτρο νάυλον 0,2 μm , με τη βοήθεια πλαστικής σύριγγας μιας χρήσης των 10ml. Οι διηθήσεις μπορούν να γίνουν και ταυτόχρονα εάν τοποθετήσουμε το χάρτινο ηθμό στην είσοδο της πλαστικής σύριγγας, στην έξοδο της οποίας θα πρέπει να τοποθετηθεί και το μικροφίλτρο. Από τα νέα διηθήματα λαμβάνονται 1,5ml από το κάθε ένα και τοποθετούνται μέσα σε εννέα φιαλίδια πάνω στα οποία αναγράφεται ο αριθμός του δείγματος, πωματίζονται και εισάγονται στο σύστημα χρωματογραφικής ανάλυσης HPLC/PCD/FLD .



Εικόνα 4.2: Απαιτείται συνεχώς ανακάτεμα του ομογενοποιημένου δείγματος ώστε η ποσότητα που λαμβάνεται να αντιπροσωπεύει το αρχικό δείγμα.



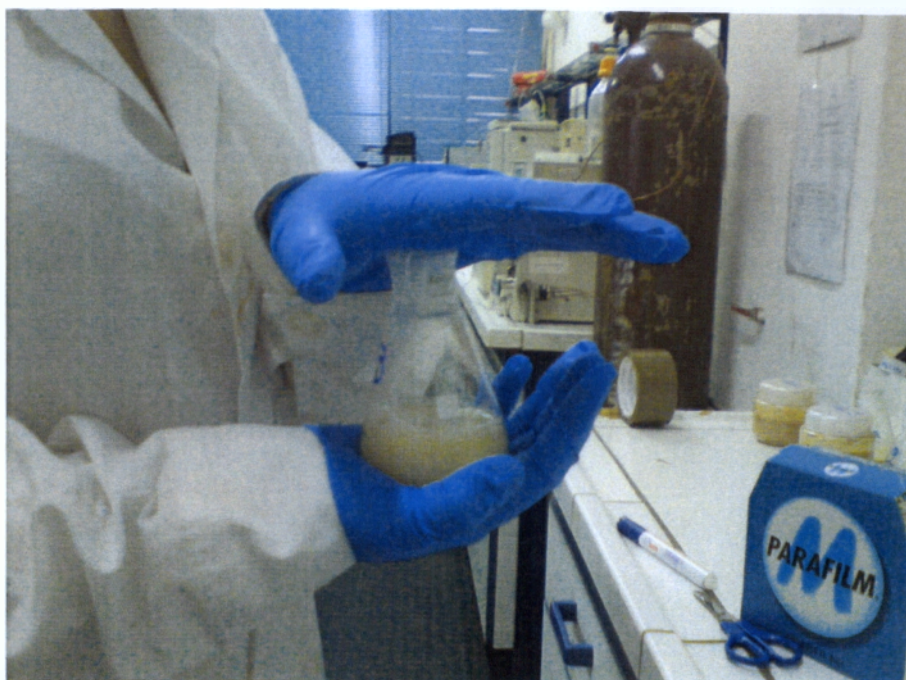
Εικόνα 4.3: Προσθέτονται μέσα στην εσφυρισμένη κωνική ποσότητα ομογενοποιηθέντος δείγματος $m=5\text{gr}$



Εικόνα 4.4: Προσθήκη υπερχλωρικού οξέος



Εικόνα 4.5: Προσθήκη υπερχλωρικού οξέος στο δείγμα



Εικόνα 4.6: Σκεπάζεται το άνοιγμα της κωνικής φιάλης και αναδεύεται. Τα χέρια ασκούν πίεση και στις δυο πλευρές προς αποφυγή προβλημάτων λόγω της πίεσης από τα αέρια που αναπτύσσονται μέσα στο μείγμα.



Εικόνα 4.7: Ο Κανονισμός απαιτεί τη δημιουργία εννέα δειγμάτων στα οποία αναγράφεται ο αριθμός του δείγματος και του υποδείγματος



Εικόνα 4.8: Προετοιμασία του εργαστηριακού εξοπλισμού



Εικόνα 4.9: Διπλή διήθηση του δείγματος. Το δείγμα αρχικά αφού αναδευτεί περνά από πτυχωτό ηθμό και στη συνέχεια από μικροφίλτρο.



Εικόνα 4.10: Στη βάση του μικροφίλτρου τοποθετείται το φιαλίδιο το οποίο γεμίζει με την πίεση που ασκείται από την σύριγγα η οποία αναγκάζει το δείγμα σε δεύτερη διήθηση. Το φιαλίδιο πωματίζεται και οδηγείται στον αυτόματο δειγματολήπτη.



Εικόνα 4.11: Θέσεις του αυτόματου δειγματολήπτη

4.3 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Η μέγιστη επαναληψιμότητα στην ποσοτική χρωματογραφική ανάλυση λαμβάνεται με τη χρήση εσωτερικών προτύπων. Έτσι αποφεύγονται οι αβεβαιότητες οι οποίες εισάγονται κατά την έγχυση του δείγματος. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή μια προσεκτικά μετρημένη ποσότητα μιας ουσίας που αποτελεί εσωτερικό πρότυπο προστίθεται σε κάθε πρότυπο διάλυμα και σε κάθε δείγμα. Ως αναλυτική παράμετρος χρησιμοποιείται ο λόγος της επιφάνειας της κορυφής του αναλυτή προς την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου. Για να είναι επιτυχής η μέθοδος, απαραίτητο είναι η κορυφή του εσωτερικού προτύπου να διαχωρίζεται καλά από τις κορυφές των άλλων συστατικών του δείγματος αλλά ταυτόχρονα δεν θα πρέπει να απέχει πολύ από την κορυφή του αναλυτή.

4.4 Χρωματογραφική ανάλυση

Τα φιαλίδια τα οποία περιέχουν τα προς ανάλυση δείγματα τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη σε καθορισμένες θέσεις και στη συνέχεια δηλώνονται παράμετροι όπως το όνομα του χρηστή και τα στοιχεία της ανάλυσης, όπως το όνομα της μεθόδου για τη λειτουργία του συστήματος HPLC, καταγράφεται ο αριθμός των ενέσεων που θα γίνουν από κάθε δείγμα καθώς και ο όγκος της ένεσης και τέλος δηλώνεται αν πρόκειται για πρότυπο δείγμα ελέγχου ποιότητας ή για άγνωστο δείγμα. Σε περίπτωση δειγμάτων με υψηλή περιεκτικότητα ισταμίνης, το προς ανάλυση διάλυμα αραιώνεται κατάλληλα με HClO_4 ώστε η συγκέντρωση του αραιωμένου διαλύματος σε ισταμίνη να εμπίπτει στην περιοχή επιβεβαιωμένης γραμμικής απόκρισης του ανιχνευτή. Ανά πέντε ενέσεις δειγμάτων γίνεται ένεση προτύπου διαλύματος ισταμίνης. Στο τέλος της ανάλυσης γίνεται εκτύπωση του χρωματογραφήματος με το τελικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 4.12: Σύστημα υγρής χρωματογραφίας HPLC

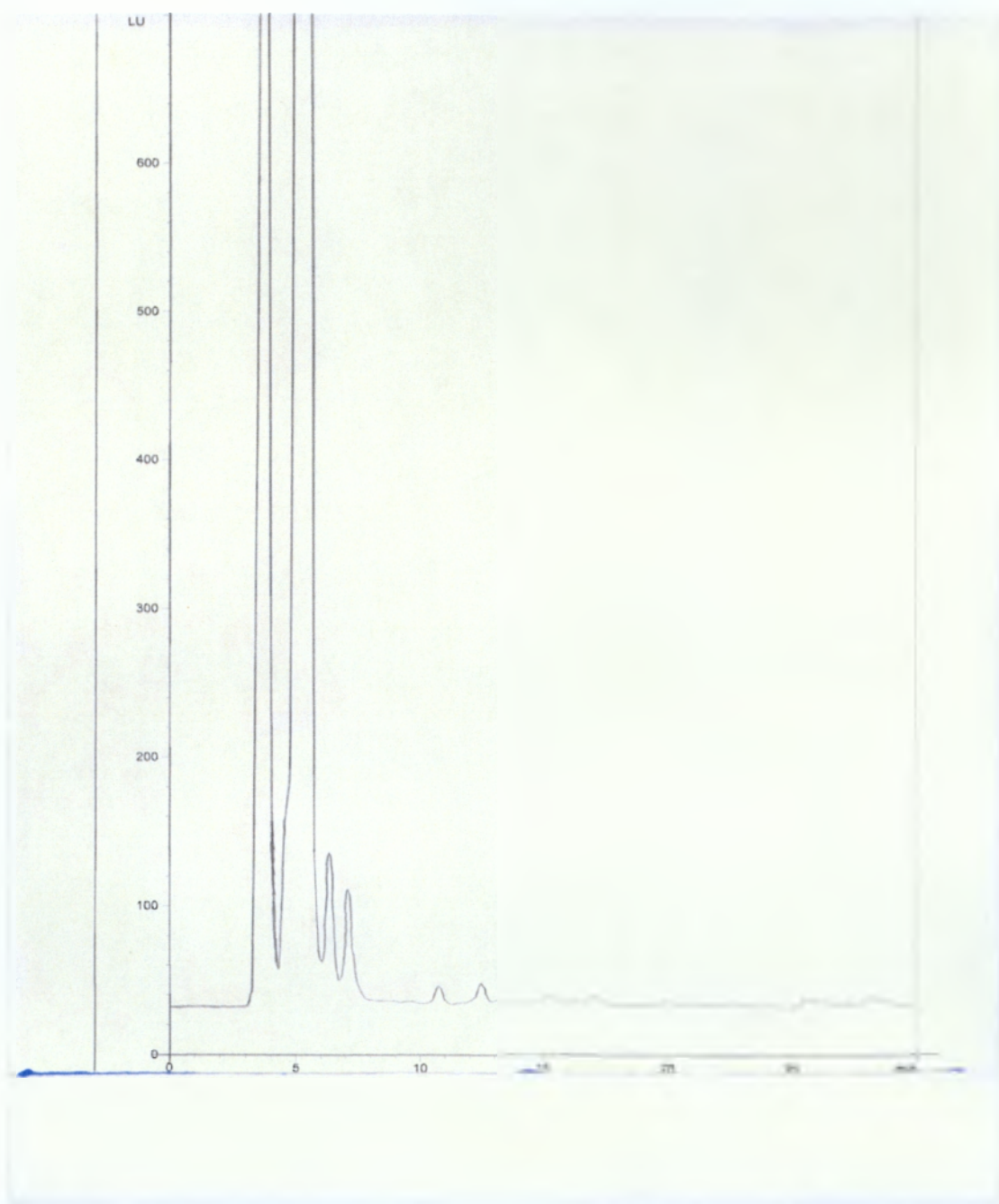
4.4.1 Ένεση του δείγματος και χρόνος παραμονής

Η ένεση του δείγματος είναι μια ενέργεια αυτοματοποιημένη. Ως χρόνος παραμονής ορίζεται ο χρόνος που απαιτείται ώστε μια συγκεκριμένη ένωση να οδηγηθεί μέσω της στήλης στον ανιχνευτή. Δεν έχουν όλες οι χημικές ενώσεις ίδιους χρόνους κατακράτησης και ο χρόνος παραμονής για μια συγκεκριμένη ένωση ποικίλλει ανάλογα με :

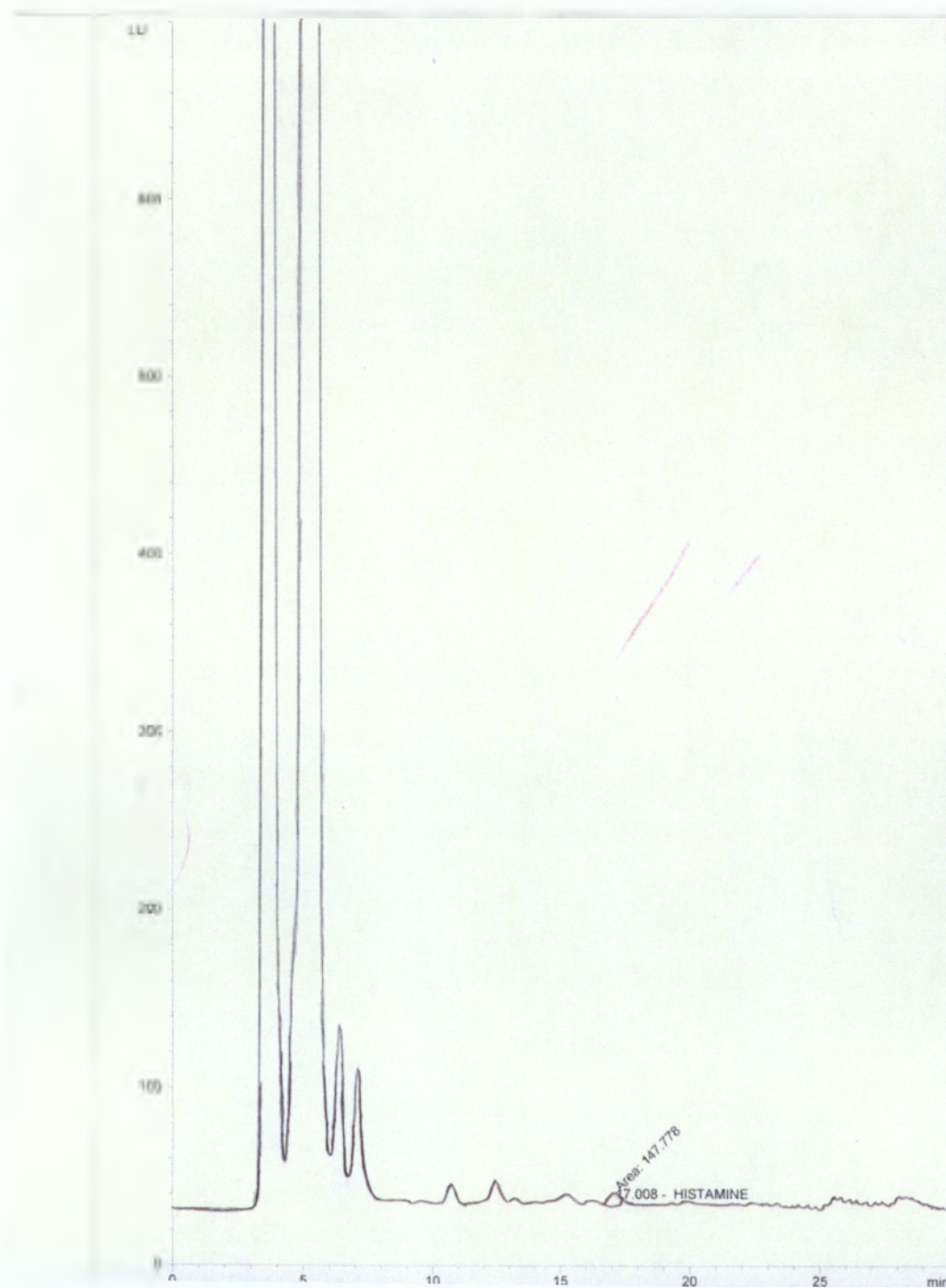
- Την πίεση που χρησιμοποιείται και η οποία επηρεάζει τη ροή του διαλύτη
- Τη φύση της στατικής φάσης
- Την ακριβή σύνθεση του διαλύτη
- Τη θερμοκρασία της στήλης

4.4.2 Παραλαβή χρωματογραφημάτων

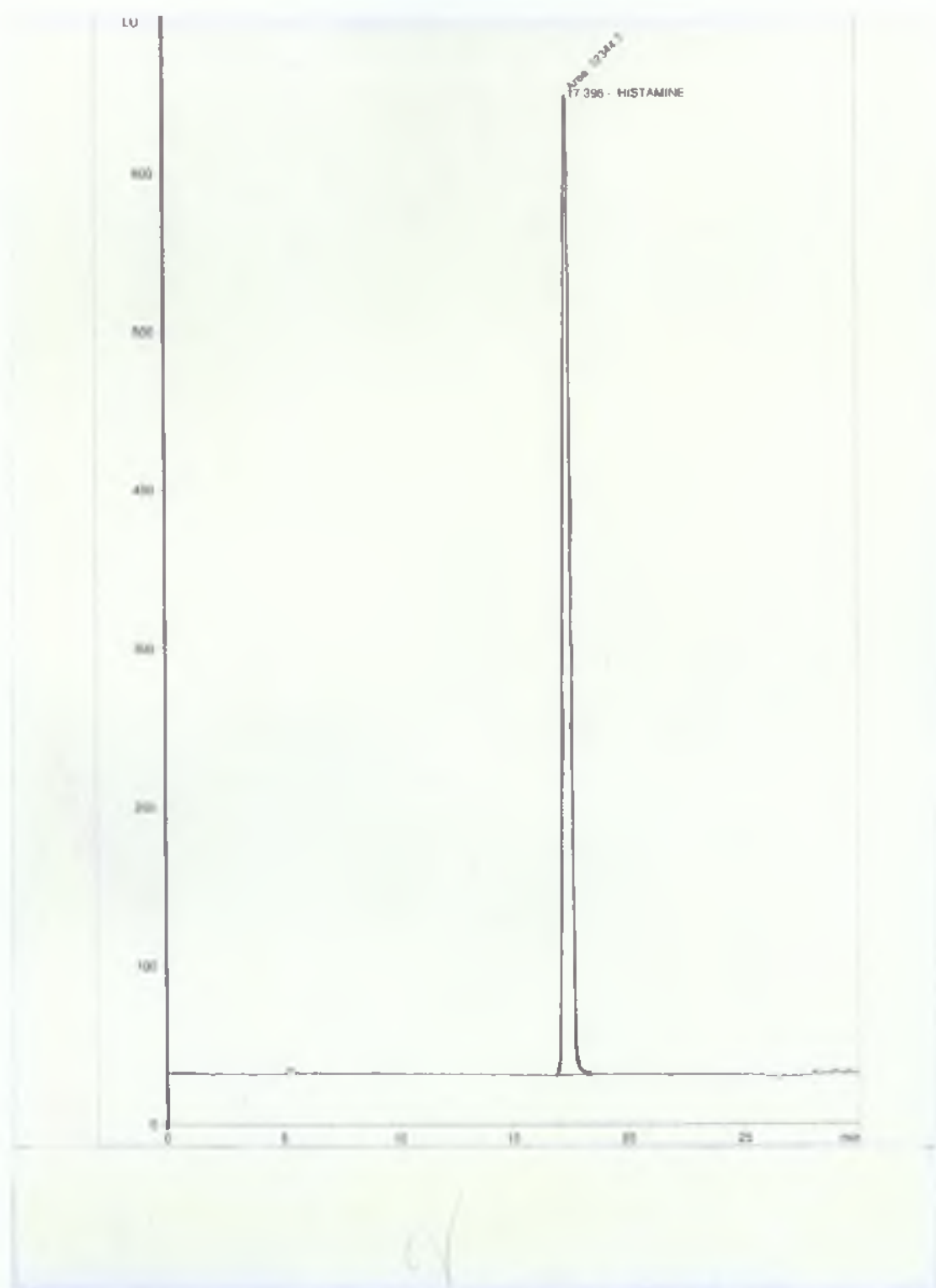
Για την κατανόηση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης που διεξάγουμε γίνεται σύγκριση των φασματογραφημάτων που ανήκουν στα φιαλίδια στα οποία μαζί με το δείγμα έχουμε προσθέσει και μια συγκεκριμένη ποσότητα πρότυπου διαλύματος ισταμίνης και των υπό εξέταση δειγμάτων που περιέχονται στα αριθμημένα φιαλίδια. Γίνεται σύγκριση των χρόνων έκλουσης των ουσιών και στη συνέχεια ταυτοποίηση της ισταμίνης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της ισταμίνης γίνεται είτε αυτόματα μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή είτε με υπολογιστικό τύπο. Στον κάθετο άξονα του χρωματογραφήματος αναγράφονται οι μονάδες ανίχνευσης (LU) Στον οριζόντιο άξονα του χρωματογραφήματος αναγράφεται η μονάδα του χρόνου (min)



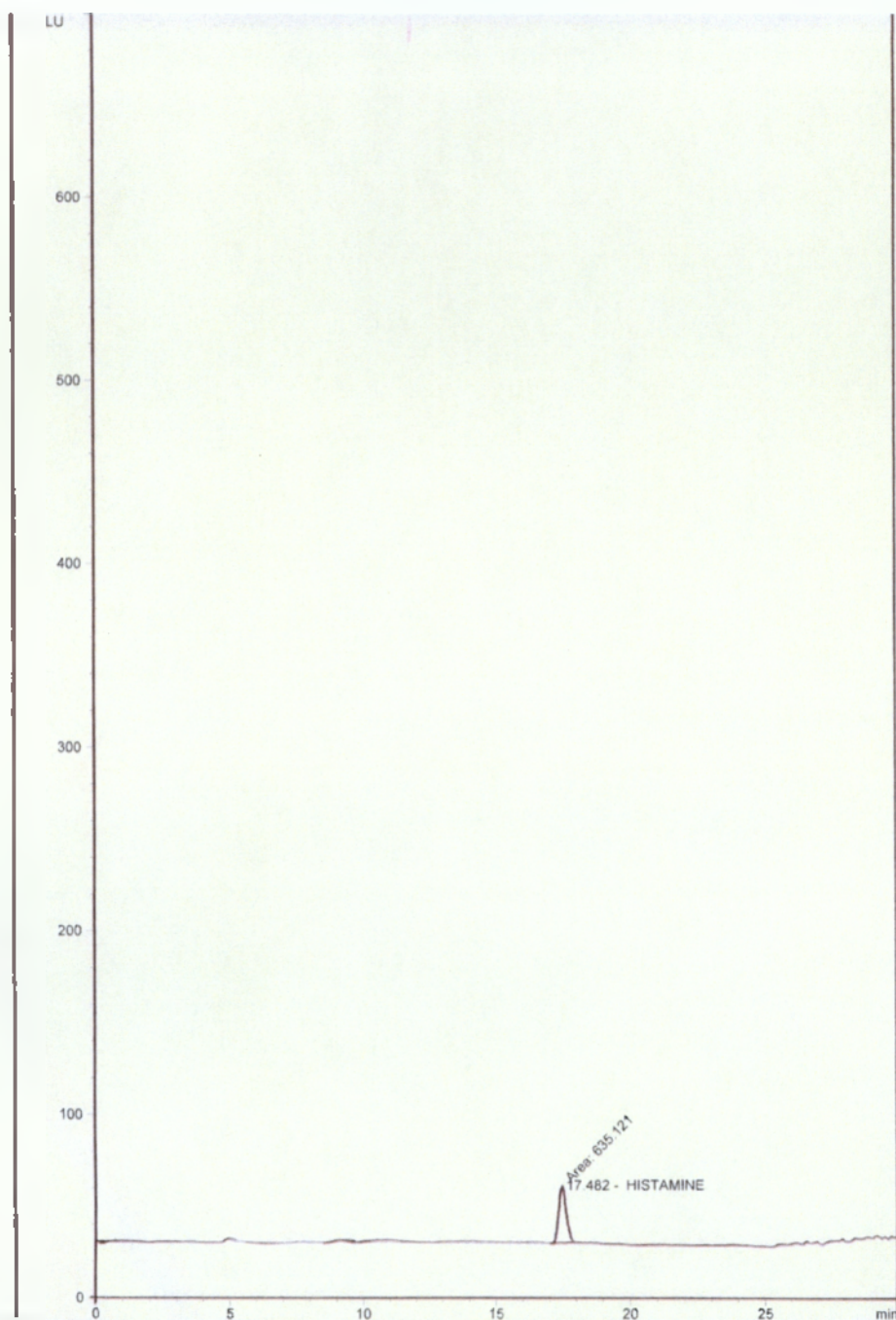
Χρωματογράφημα 4.1: Δείγμα τόνου χωρίς την παρουσία ισταμίνης. Οι υπάρχουσες κορυφές αναφέρονται σε άλλες ουσίες που υπάρχουν στο δείγμα (Γενικό Χημείο του Κράτους)



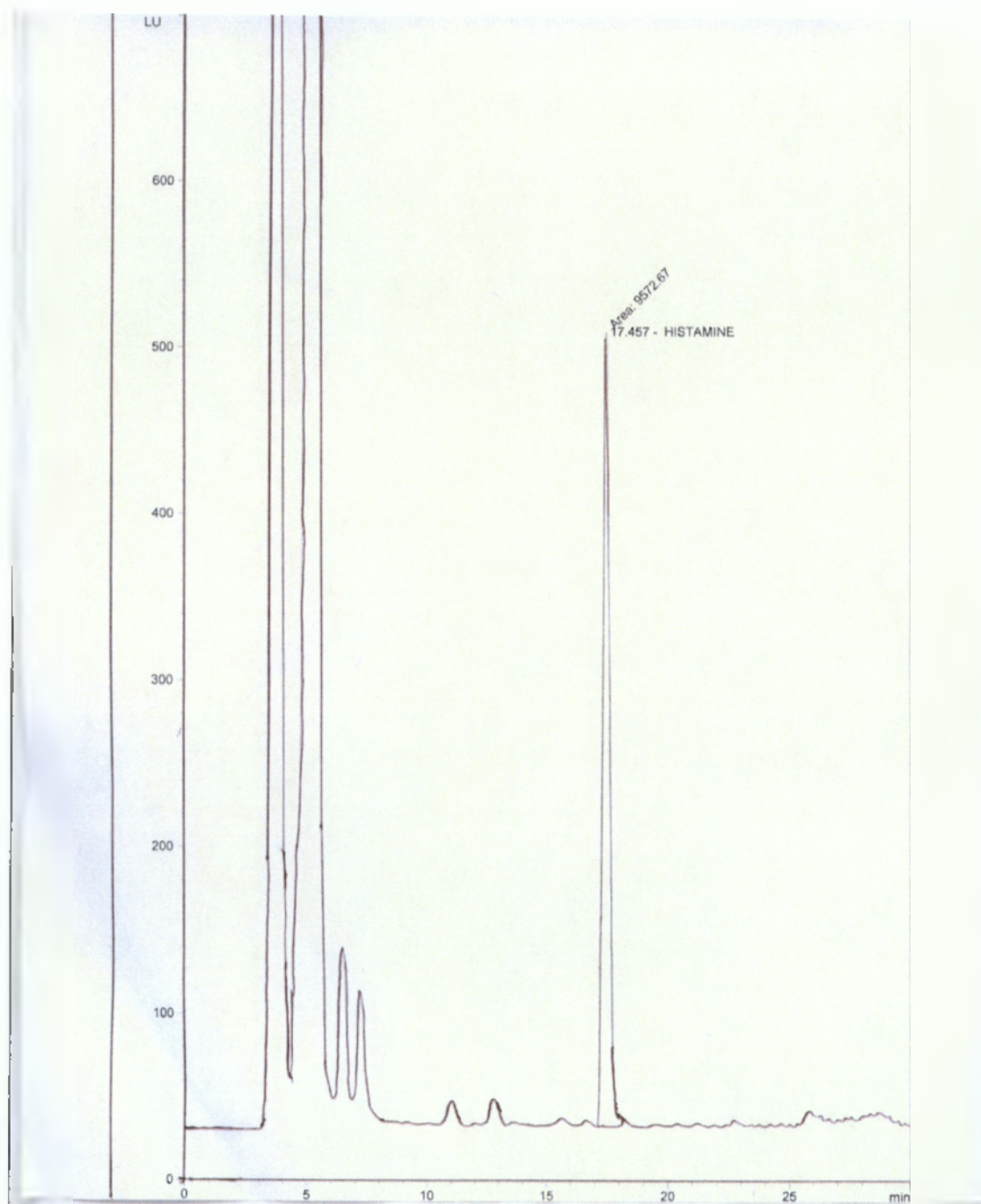
Χρωματογράφημα 4.2: Δείγμα τόνου με ελάχιστα ποσοστά ισταμίνης εντός των νομοθετικών ορίων (Γενικό Χημείο του Κράτους)



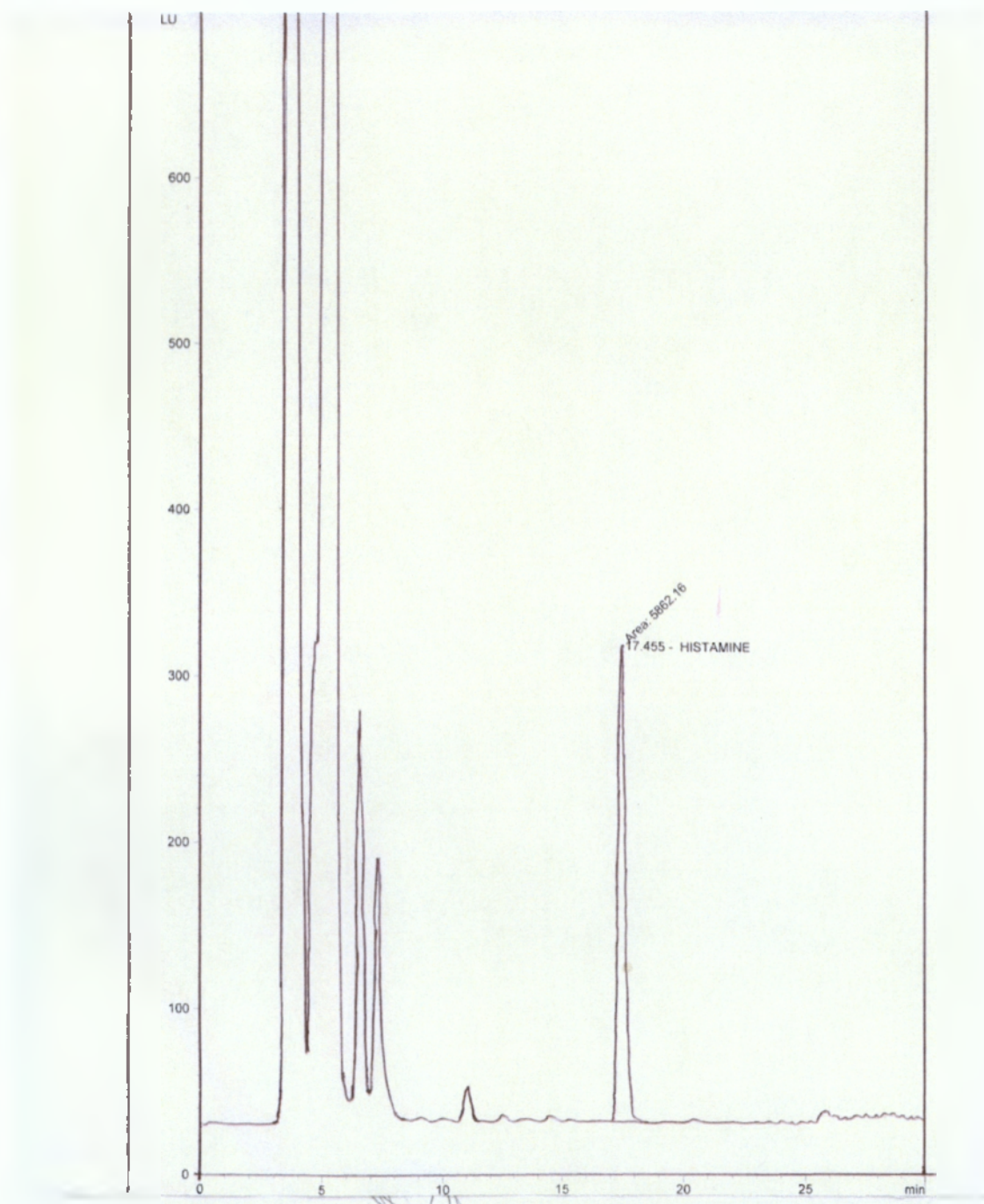
Χρωματογράφημα 4.3: Πρότυπο δείγμα με συγκεκριμένη ποσότητα ισταμίνης εκτός των νομοθετικών ορίων (Γενικό Χημείο του Κράτους)



Χρωματογράφημα 4.4: Πρότυπο διάλυμα ισταμίνης μικρής συγκέντρωσης (Γενικό Χημείο του Κράτους)



Χρωματογράφημα 4.5: Πραγματικό δείγμα ψαριού με ποσοστά ισταμίνης άνω των νομοθετικών ορίων (Γενικό Χημείο του Κράτους)



Χρωματογράφημα 4.6: Πραγματικό δείγμα ψαριού με ποσοστά ισταμίνης άνω των νομοθετικών ορίων (Γενικό Χημείο του Κράτους)

4.5 Ποσοτικοί υπολογισμοί χρωματογραφήματος ταυτοποίηση ισταμίνης

Στο χρωματογράφημα του δείγματος παρουσιάζονται αρκετές κορυφές, οι οποίες υποδεικνύουν διάφορα συστατικά του ιχθυηρού, μεταξύ των οποίων και η κορυφή της ισταμίνης. Για την αναγνώριση της κορυφής της ισταμίνης στο χρωματογράφημα ενός δείγματος, συγκρίνεται ο χρόνος ανάσχεσης στο χρωματογράφημα του δείγματος με τον αντίστοιχο χρόνο ανάσχεσης στα χρωματογραφήματα των προτύπων. Ως ισταμίνη ταυτοποιείται μια κορυφή όταν ο χρόνος ανάσχεσης της δεν διαφέρει περισσότερο από 0,5 min από τον χρόνο ανάσχεσης της ισταμίνης στα χρωματογραφήματα των προτύπων.

Η περιεκτικότητα του δείγματος σε ισταμίνη υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$C = (V/m)[(A_x - a)/b] \cdot (f_{dil}) \cdot (100/rec)$$

όπου:

C = η περιεκτικότητα του δείγματος σε mg ισταμίνης/kg δείγματος
 a, b = είναι αντίστοιχα η υποτέμνουσα και η κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων, με την οποία συσχετίζεται το εμβαδόν των κορυφών της ισταμίνης στα χρωματογραφήματα των προτύπων διαλυμάτων με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις ισταμίνης στα πρότυπα διαλύματα

A_x = είναι το εμβαδόν της κορυφής της ισταμίνης στο χρωματογράφημα του δείγματος

V = είναι ο όγκος του HClO_4

f_{dil} = είναι ο συντελεστής αραιώσης

m = είναι η αναλυθείσα μάζα του δείγματος

rec = είναι το επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης της ισταμίνης

4.6 Ασφάλεια εργαστηρίου

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τοξικά, γι'αυτό και απαιτείται η λήψη μέτρων ασφάλειας κατά την εργασία.

- Η διαδικασία συνίσταται να διεξάγεται εντός επαγωγού εστίας.
- Απαιτείται ο εργαζόμενος χημικός να φορά εργαστηριακή μπλούζα, η οποία πρέπει να παραμένει στον χώρο του εργαστηρίου. Το ύφασμά της να είναι από 100% βαμβάκι και μετά το τέλος της εργασίας να κρεμιέται πίσω από την πόρτα του εργαστηρίου και πάντα μακριά από τα προσωπικά είδη και ρούχα. Δε πρέπει να μεταφέρεται στο σπίτι για να πλυθεί.
- Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στη χρήση φακών επαφής, οι οποίοι παρεμποδίζουν την απομάκρυνση χημικών ουσιών ή λοιμογόνων παραγόντων με το δάκρυ.
- Μερικές φορές, εάν υπάρχουν τοξικά αέρια ή ακτινοβολία, κρίνεται απαραίτητη η χρήση προστατευτικών γυαλιών για τα μάτια ή διάφανης μάσκας για το πρόσωπο.
- Τα μακριά μαλλιά δεν πρέπει να αφήνονται ελεύθερα και οι εκδορές να καλύπτονται επιμελώς.
- Πρέπει να φοράμε κλειστά παπούτσια και όχι πέδιλα ή σανδάλια.
- Τα χρησιμοποιούμενα γάντια είναι διαφόρων ειδών, ανάλογα με την εκτελούμενη εργασία, όπως χειρουργικά για το χειρισμό του αίματος ή ανθεκτικά στα οξέα ή στη θερμότητα.
- Απαγορεύεται το κάπνισμα.
- Απαγορεύεται η κατανάλωση τροφίμων και ποτών στο εργαστήριο, όπως και η διατήρησή τους στο ίδιο ψυγείο με αντιδραστήρια ή βιολογικά δείγματα.
- Επίσης, απαγορεύεται η χρησιμοποίηση καλλυντικών στο χώρο του εργαστηρίου στο πρόσωπο και ιδίως στα χείλη. Η κρέμα χεριών αποτελεί εξαίρεση.

Επίλογος

Ο προσδιορισμός της ισταμίνης με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας HPLC-FLD εφαρμόζεται από το 2002 από το Γενικό Χημείο του Κράτους με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα τόσο για την μέθοδο HPLC όσο και για τα ποσοστά ταυτοποιημένης ισταμίνης που προσδιορίζονται.

Οι συστηματικοί έλεγχοι των τροφίμων, και κυρίως των ευαλλοίωτων όπως είναι και τα ψάρια, είναι απαραίτητοι ώστε ο καταναλωτής να είναι σίγουρος για το προϊόν που φτάνει στο πιάτο του και ταυτόχρονα οι επιχειρήσεις να αποκτούν την αξιοπιστία τους απέναντι στον καταναλωτή.

Το RASFF (rapid alert system for food and feed) είναι ένα σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές και λειτουργεί ως ένα αποτελεσματικό μέσο ανταλλαγής πληροφοριών μεταξύ των αρχών ελέγχου των κρατών-μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα μέτρα τα οποία πρέπει να ληφθούν για την διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων. Παράλληλα, λειτουργεί και ως Ευρωπαϊκός συναγερμός προειδοποιώντας για επιβλαβείς παρτίδες τροφίμων που διακινούνται στην αγορά με σκοπό την άμεση απομάκρυνση τους.

Ο ΕΦΕΤ ως ενιαίος φορέας ελέγχου τροφίμων πραγματοποιεί έλεγχους στα προϊόντα διαφόρων επιχειρήσεων και στη συνέχεια γίνεται ανάρτηση στην ηλεκτρονική σελίδα της υπηρεσίας των ακατάλληλων προϊόντων και των προστίμων που δέχεται η εκάστοτε επιχείρηση.

Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αρβανιτογιάννης Ι.Σ. & Σάνδρου Δ. & Κούρτης Λ. Θεσσαλονίκη 2001, *Ασφάλεια τροφίμων, Εφαρμογή της Ανάλυσης Επικινδυνότητας και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου(HACCP) στις Βιομηχανίες Τροφίμων και Ποτών*, Εκδόσεις Universal studio press

Αρβανιτογιάννης Ι.Σ, Βαρζάκας Θ., Καλαμάτα 2007, *Ποιοτικός Έλεγχος Τροφίμων*, εκδόσεις των Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας

Λουγκοβόης Βλαδίμηρος, Αθήνα 2002, *Τεχνολογία και Ποιότητα Ιχθυηρών*, εκδόσεις των Τ.Ε.Ι. Αθήνας

Μέλφου Α, Αθήνα 1981, *Ποιοτικός Έλεγχος Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης*, Οργανισμός εκδόσεως διδακτικών βιβλίων

Μπαλατσούρας, Αθήνα 2006, *Μικροβιολογία Τροφίμων*, εκδόσεις ΈΜΒΡΥΟ

Νεοφύτου, Θεσσαλονίκη 1990, *Ιχθυοπονία*, εκδόσεις Universal studio press

Ξαπλαντέρη Μαρία, Καπόλος Ιωάννης, Καλαμάτα 2007-2008, *Φυτικοχημική και ενόργανη ανάλυση γεωργικών προϊόντων*, έκδοση των Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας

Ξαπλαντέρη Μαρία, Καπόλος Ιωάννης, Καλαμάτα 2008, *Χημεία και βιοχημεία γεωργικών προϊόντων*, εκδόσεις των Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας

Παπαναστασίου, Αθήνα 1990, *Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Αλιευμάτων*, Εκδόσεις ΙΩΝ

Κανονισμός (Ε.Κ) αριθμός 2073/2005 της επιτροπής περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα

Εγχειρίδιο λειτουργίας του συστήματος υγρής χρωματογραφίας HPLC

Ξερόνλωση Βιβλιογραφία

H.A. Frank, Rome 1985, *Histamine forming bacteria in tuna and other marine fish*, publisher FAO, fisheries technical paper, Vol. no 252

Mietz J.L. & Karmas E, 1977, Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography, *Journal of food science*, *Journal of Food Science*, Volume 42, Issue 1, pages 155-158

Farn, G.& Sims, G.G, Amsterdam 1987, *Chemical indices of decomposition in tuna. In: seafood quality determination*, edited by D.E. Kramer & J. Liston, Elsevier Science Publishers, pages 175-183.

M. Muscarella, 1977, *Measurement of Histamine in Seafood by HPLC, CE, and ELISA: Comparison of Three Techniques*, *Veterinary Research Communications*, Volume 29, supplement 2, pages 343-346

Bejaars et al. <<*Liquid Chromatographic Determination of Histamine in Fish, Sauerkraut and Wine, Interlaboratory study*>> *Journal of AOAC International*, Vol.81, No5, 1998, pages 991-998

Ιστότοποι

www.google.gr (17/3/2011)

www.sciencedirect.com (5/4/2011)

www.aoac.org (10/4/2011)

en.wikipedia.org (20/3/2011)

www.healthline.gr (20/3/2011)

www.efet.gr (27/4/2011)