

# Određivanje biogenih amina u hrvatskim vinima

---

**Rohtek, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, University Department for Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:227:795943>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-15**

SVEUČILIŠTE  
U  
SPLITU



SVEUČILIŠNI  
ODJEL ZA  
FORENZIČNE  
ZNANOSTI

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**SVEUČILIŠNI ODJEL ZA**  
**FORENZIČNE ZNANOSTI**

**FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA**

**DIPLOMSKI RAD**

**ODREĐIVANJE BIOGENIH AMINA U HRVATSKIM VINIMA**

**NIKOLINA ROHTEK**

Split, listopad 2018.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**SVEUČILIŠNI ODJEL ZA**  
**FORENZIČNE ZNANOSTI**

**FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA**

**DIPLOMSKI RAD**

**ODREĐIVANJE BIOGENIH AMINA U HRVATSKIM VINIMA**

**Mentor: DOC. DR. SC. IVICA LJUBENKOV**

**NIKOLINA ROHTEK**

**Matični broj: 352/2016.**

**Split, listopad 2018.**

Rad je izrađen u: Laboratoriju za kromatografske analize kemijskog odjela Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

pod nadzorom: doc. dr. sc. Ivice Ljubenkova

u vremenskom razdoblju od: 26.02 do 23.04.2018

Datum predaje diplomskog rada: 24. listopada 2018.

Datum prihvatanja rada: 7. studenog 2018.

Datum obrane rada: 14. studenog 2018.

Povjerenstvo: 1. Doc. dr. sc. Željana Bašić

2. Dr. sc. Ivana Mitar

3. Doc. dr. sc. Ivica Ljubenkov

## *Zahvala*

*Od srca hvala roditeljima Branku i Anici, sestri Dijani i bratu Ivici jer ovaj rad ne bi nastao bez njihove moralne i financijske podrške. Veliko hvala mentoru doc. dr. sc. Ivici Ljubenkovu i dr. sc. Ivani Mitar na svim uputama, strpljenju, pomoći i podršci prilikom odrađivanja rada. Zahvaljujem se i svim donatorima uzoraka, a posebno vinariji Stina Bol i njihovom voditelju Ivi Kraljeviću.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Vino i podjela vina .....	1
1.2. Vino u Republici Hrvatskoj .....	2
1.3. Kemijske i senzorne karakteristike vina .....	4
1.4. Opća svojstva biogenih amina .....	4
1.4.1. Definicija i kemijska svojstva biogenih amina .....	4
1.4.2. Nastanak biogenih amina u vinima .....	7
1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	8
1.5.1. Derivatizacija i metoda određivanja biogenih amina u vinima .....	10
2. CILJ RADA .....	11
2.1. Hipoteze .....	11
3. MATERIJALI I METODE .....	12
3.1. Uzorci .....	12
3.2. Priprema uzoraka .....	13
3.3. Kemikalije .....	16
3.4. Uređaj i programi .....	16
4. REZULTATI .....	18
5. RASPRAVA .....	25
6. ZAKLJUČAK .....	27
7. LITERATURA .....	28
8. SAŽETAK .....	31
9. ABSTRACT .....	32
10. ŽIVOTOPIS .....	33

# 1.UVOD

## 1.1. Vino i podjela vina

Prema zakonu o vinu (1), vino je prehrambeni proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem mošta svježeg ili za preradu pogodnog grožđa. Vina se dijele po boji na: bijela, ružičasta (rose, opol) i crna (crvena). Po sadržaju neprevrelog šećera dijele se na: mirna vina (suha, polusuha, slatka i poluslatka) i pjenušava vina (vrlo suha, suha, polusuha). Kvalitetom, mirna vina dijele se na stolna vina, kvalitetna vina i vrhunska vina. Stolno vino je vino proizvedeno od jedne ili više sorti grožđa i ne može nositi naziv sortno vino. Stolno vino oznake kontroliranog zemljopisnog podrijetla proizvedeno je od jedne ili više sorti grožđa koje potječu iz jedne vinogradarske regije. Kvalitetno vino oznake kontroliranog zemljopisnog podrijetla proizvedeno je od jedne ili više sorti grožđa koje potječu iz jedne vinogradarske regije s izraženim kvalitetnim organoleptičkim svojstvima značajnim za ekološke uvjete i sorte određene vinogradarske regije, vinogorja ili položaja čiju oznaku nosi. Vrhunsko vino oznake kontroliranog zemljopisnog podrijetla je vino proizvedeno od određene sorte ili grupe sorti grožđa koje potječu iz jednog ili više vinogradarskih položaja u okviru jednog vinogorja s osobito izraženim kvalitetnim, posebnim organoleptičkim i kemijskim svojstvima značajnim za ekološke uvjete položaja i sorte, odnosno grupe sorti grožđa. To vino mora biti punjeno u boce u vinogradarskom vinogorju koje obuhvaća određeni zemljopisni položaj (2).

Proizvodnja vina uključuje mnogobrojne procese (*Slika 1*). Kvaliteta vina, odnosno organoleptička svojstva, ovise o tehnološkim i kemijskim procesima u proizvodnji.



*Slika 1. Vino - krajnji produkt proizvodnje (2)*

## **1.2. Vino u Republici Hrvatskoj**

U Hrvatskoj su upisana oko 41 000 gospodarstava koja posjeduju vinograd s ukupno oko 83 500 parcela pod vinogradima. Zbog različitosti klimatskih i zemljopisnih uvjeta vinogradarska područja Hrvatske dijele se na dvije regije:

1. Kontinentalna Hrvatska i
2. Primorska Hrvatska.

Prema najnovijim izvorima, ukupne površine pod vinogradima u Hrvatskoj iznose 20 712.79 ha. Površine vinograda po regijama prikazane su u Tablici 1 (3). Vinogradarske regije dijele se na više podregija. Podregije su šira vinogradarska područja određena pedoklimatskim uvjetima te ostalim uvjetima nužnim za uspješan uzgoj vinove loze. Kontinentalnoj vinskoj regiji Hrvatske pripadaju podregije: 1. Podunavlje, 2. Slavonija, 3. Moslavina, 4. Prigorje-Bilogora, 5. Plešivica, 6. Pokuplje, 7. Hrvatsko Zagorje i 8. Međimurje.

Primorskoj vinskoj regiji pripadaju: 1. Istra, 2. Hrvatsko primorje, 3. Sjeverna Dalmacija, 4. Dalmatinska Zagora te 5. Srednja i Južna Dalmacija (3).



*Tablica 1. Površina vinograda po vinogradarskim regijama*

Regija	Površina (ha)
Kontinentalna Hrvatska	11 026.85
Primorska Hrvatska	9 685.93
Ukupno:	20 712.79

Prema članku 7. i 8. Zakona o vinu (1), u Tablici 2 nalaze se preporučene i dopuštene sorte podregija Hrvatskog Zagorja (Kontinentalna regija) i Dalmacije (Primorska regija).

*Tablica 2. Preporučene i dopuštene sorte vina Hrvatskog Zagorja i Dalmacije*

<b>Hrvatsko Zagorje</b>	<b>Dalmacija</b>
<b>Preporučene sorte</b>	
Rajnski rizling	Lasina
Traminac	Plavina
Graševina	Plavac mali
Sauvignon	Kujundžuša
Pinot sivi	Pošip
Chardonnay	Sauvignon
Muškat žuti	Merlot crni
Portugizac	Bogdanuša
Pinot crni	Babić
Maraština	
Debit	
<b>Dopuštene sorte</b>	
Frankovka	

### **1.3. Kemijske i senzorne karakteristike vina**

Fizikalno-kemijski parametri koji određuju kvalitetu vina su relativna gustoća, udio alkohola, ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, ekstrakt bez šećera, pepeo, ukupna kiselost, hlapiva kiselost, pH, koncentracija sumpornog dioksida, ugljičnog dioksida, glicerola i glukonske kiseline (4).

Vinarstvo ili vinifikacija je djelatnost koja se bavi proizvodnjom vina i proizvoda od grožđa i vina, od odabira grožđa do punjenja gotovog proizvoda u boce (4).

Na senzorne karakteristike vina utječe: udio alkohola, koncentracije organskih kiselina, šećera, estera, terpena, antocijana, katehina, flavonola, polifenola te biogenih amina. Organske kiseline najvažniji su čimbenik okusa i stabilnosti vina. Najvažnije kiseline u vinu su jabučna kiselina, limunska te jantarna kiselina. Šećeri reduciraju okus kiselosti te tako indirektno utječu na aromu vina. Esteri utječu na aromu vina zahvaljujući voćnom mirisu. Polifenoli su glavni prirodni konzervansi u vinima. Starenjem vina reagiraju s pigmentima i kiselinama stvarajući nove spojeve koji pojačavaju okus vina ili se talože na dnu boce .

Terpeni predstavljaju primarnu grožđanu aromu. Tijekom dozrijevanja grožđa, terpeni se oslobađaju kao posljedica pucanja glikozidnih veza i tako intenziviraju aromu vina. Antocijani su nositelji crvenog pigmenta bobica grožđa. Katehini utječu na gorčinu vina. Flavonoli su žuti pigmenti, apsorbiraju UV zrake tijekom dozrijevanja grožđa pa definiraju kvalitetu vina u odnosu na izloženost suncu. Realna kiselost ima veliki utjecaj na kakvoću vina, kao i na niz biokemijskih i fizikalno-kemijskih procesa tijekom sazrijevanja i starenja vina. Kiselija vina imaju pH vrijednost ispod 3.5, a nedovoljno kisela do 4.0 (3).

Biogeni amini također utječu na aromu i okus vina. Daju blaži i mekši okus i kompleksniju aromu.

### **1.4. Opća svojstva biogenih amina**

#### **1.4.1. Definicija i kemijska svojstva biogenih amina**

Po kemijskoj strukturi biogene amine dijelimo na (5):

- alifatske (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin),
- aromatske (tiramin, feniletilamin) i

- heterociklične (histamin, triptamin, serotonin).

Prema broju amino skupina dijele se na:

- monoamine (tiramin, feniletilamin),
- diamine (histamin, serotonin, triptamin, putrescin, kadaverin) i
- poliamine (spermidin, spermin) (5).

Histamin, tiramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin te feniletilamin najučestaliji su biogeni amini pronađeni u vinima (6). Biogeni amini su dušikovi spojevi koji nastaju dekarboksilacijom aminokiselina. Izvor su dušika i prekursori za sintezu hormona, alkaloida i nukleinskih kiselina. Biogeni amini u ljudskom organizmu reguliraju tjelesnu temperaturu te krvni tlak.

Osim u vinima, biogeni amini mogu se naći i u drugoj hrani i pićima koja fermentiraju, pr. sir, kobasice, meso, riba, kupus, pivo i mlijeko. Biogeni amini izazivaju veliki interes jer mogu izazvati simptome trovanja ako su zastupljeni u koncentracijama višim od dozvoljenih (7). Histamin, tiramin i feniletilamin su biogeni amini čija povećana koncentracija ima toksikološki učinak na ljudsko zdravlje (8). Konzumiranje biogenih amina u niskim koncentracijama ne predstavlja neposrednu opasnost za zdravlje, budući da ljudski organizam posjeduje nekoliko kontrolnih mehanizama za vlastitu sintezu biogenih amina, ali i za amine koji se unose konzumacijom hrane i pića. Biogeni amini predstavljaju zaštitu mikroorganizmima kod kiselog okruženja (9). U malim koncentracijama esencijalni su za fiziološke aktivnosti poput održavanja pH želuca, aktivnost mozga i regulaciju temperature. No unosom viših koncentracija biogenih amina pod određenim uvjetima dolazi do zakazivanja kontrolnih mehanizama, što dovodi do neželjenih učinaka na zdravlje organizma, pr. mučnine i glavobolje. Dokazano je da je histamin odgovoran za većinu zdravstvenih tegoba, no u kombinaciji s većim udjelom alkohola i povišenom koncentracijom ostalih amina. Uobičajeni simptomi koji se javljaju nakon konzumiranja hrane koja sadrži visoke koncentracije biogenih amina su hipertenzija, mučnina i glavobolja.

Biogeni amini su važni indikatori pokvarene hrane (10). Poliamini i diamini se uglavnom povezuju s kvarenjem hrane ili su pokazatelji loših higijenskih uvjeta proizvodnje, posebno putrescin i kadaverin. U literaturi se mogu naći podaci za dopuštene razine putrescina u vinu. Prema razini putrescina u vinu, u nekim zemljama se vrednuje kvaliteta vina. Vina s koncentracijom putrescina ispod 10 mg/kg su kvalitetna vina. Vina koja sadrže putrescin od

10 do 20 mg/kg prihvatljive su kvalitete te vina iznad 20 mg/kg putrescina nisu prihvatljiva za konzumaciju.

Metoda proizvodnje vina, enološko tretiranje vina i soj kvasca u fermentaciji utječu na konačnu koncentraciju biogenih amina u vinu (6). Osim navedenog, na nastajanje biogenih amina utječu i uvjeti u vinariji.

Zbog utjecaja na ljudsko zdravlje i u svrhu kontrole kvalitete, provode se mnogobrojna istraživanja određivanja biogenih amina u vinu.

Prema važećem Zakonu o vinu (1), u Republici Hrvatskoj ne postoje regulative koje određuju dopuštene koncentracije biogenih amina, bilo kao parametar kvalitete ni u svrhu kontrole zdravstvene ispravnosti. Samo nekoliko zemalja u svijetu ima propise vezane za sadržaj biogenih amina u vinu, pr. Kanada, Švicarska i Južnoafrička Republika. Njihovi propisi i zakonske regulative uglavnom su povezani s prihvatljivom razinom histamina od maksimalno  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Znanstvenici provode mnogobrojna istraživanja biogenih amina u svrhu kontrole razine biogenih amina u vinu, a samim time i kvalitete vina. Većina istraživanja rađena je na komercijalno dostupnim vinima proizvedenim u najvažnijim svjetskim vinogradarskim zemljama, pr. turska crna vina (6), grčka crna vina (11), kineska crna vina (12), čileanska vina (13), brazilska vina (14), portugalska (15) te španjolska crna i bijela vina (16). Navedene studije analizirale su uzorke iz lokalnih trgovina s ciljem praćenja ili određivanja sadržaja biogenih amina u svrhu određivanja kvalitete vina. Postoje istraživanja sadržaja biogenih amina s ciljem određivanja podrijetla i sorte vina. Dokazano je da su biogeni amini pr. putrescin, spermidin, histamin i tiramin prirodno prisutni u grožđu (17), te etanolamin, tiramin, putrescin, kadaverin, feniletilamin i spermidin u moštu (18). Del Prete i sur. su otkrili u grožđu etanolamin, etilamin i putrescin (19), dok su Landete i sur. otkrili da razine putrescina mogu odrediti sortu grožđa. Ove studije pokazuju da su koncentracije biogenih amina prirodno prisutnih u moštu direktno povezane sa sortom grožđa i tipom tla, odnosno podrijetlom grožđa (20). U spomenutim istraživanjima identificirano je više od 20 biogenih amina. Marques i sur. objasnili su vezu između biogenih amina i sorte grožđa na uzorcima crnih vina proizvedenih u tri različite portugalske regije (17). Talijanski istraživači su u uzorcima crnih vina zaključili da sastav biogenih amina određuje geografski položaj (16,18). Na uzorcima bijelih vina obavlja se znatno manji broj studija budući da su crna vina bogatija sadržajem biogenih amina. Hrvatska, kao i mnoge druge mediteranske zemlje poput Španjolske, Francuske, Italije, Grčke i Turske ima dugogodišnju tradiciju proizvodnje vina. U Hrvatskoj postoji veliki broj malih proizvođača pa je hrvatsko tržište poznato kao tržište velikog broja sortnih vina (2). U posljednjih desetak godina i hrvatski znanstvenici su

prepoznali važnost određivanja biogenih amina u vinima. Kovačević-Ganić i sur. ispitali su sadržaj biogenih amina u uzorcima crnog vina iz vinogorja Slavonije i usporedili promjene sadržaja biogenih amina tijekom procesa proizvodnje vina i sazrijevanja. Otkrili su prisutnost 10 biogenih amina u istraživanim uzorcima: triptamin, hidroksilamin, feniletilamin, putrescin, kadaverin, histamin, tiramin, serotonin, spermin i spermidin (18). Jeromec i sur. ispitali su koncentraciju biogenih amina u crnim vinima iz sjeverozapadne Hrvatske s ciljem usporedbe koncentracija biogenih amina u vinima proizvedenim klasičnom i hladnom maceracijom. U toj studiji najbrojniji biogeni amini su: histamin, triptamin i 2-feniletilamin, dok su u značajno nižim koncentracijama pronađeni tiramin, putrescin, kadaverin, spermidin, spermin i serotonin (18).

#### 1.4.2. Nastanak biogenih amina u vinima

Tri su moguća podrijetla biogenih amina u vinu:

- prisutni su u moštu odnosno grožđu,
- nastaju djelovanjem kvasca tijekom alkoholne fermentacije (primarna fermentacija) i
- nastaju djelovanjem bakterija uključenih u malolaktičku fermentaciju (sekundarna fermentacija) (6).

Vinifikacija je skup postupaka koji se koriste u proizvodnji vina, a sastoji se od dva glavna tehnološka procesa: alkoholne i malolaktične fermentacije. Alkoholna fermentacija mošta uglavnom se provodi pomoću kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, a uključuje pretvorbu groždanog šećera u etanol i CO<sub>2</sub>. U alkoholnoj fermentaciji (primarna fermentacija) sudjeluju različite vrste autohtonih kvasaca ili komercijalni sojevi *Saccharomyces cerevisiae*. Postoje istraživanja o utjecaju kvasaca na stvaranje biogenih amina u vinu u kojima su se uspoređivale različite vrste kvasaca tijekom alkoholne fermentacije. Dokazano je da ne dolazi do značajnog porasta koncentracije biogenih amina tijekom alkoholne fermentacije, odnosno da kvasci nisu odgovorni za produkciju veće koncentracije amina pronađene u vinima (21). Malolaktična fermentacija provodi se uglavnom u crnim vinima i u manjem postotku u bijelim vinima. Bakterije mliječne kiseline omogućavaju pretvorbu jabučne kiseline u mliječnu te osiguravaju određeni stupanj mikrobiološke stabilnosti te tako modificiraju

senzorne karakteristike vina. Biogene amine nazivamo sekundarnim produktima fermentacije jer uglavnom nastaju sekundarnom (malolaktičnom) fermentacijom (22). Nastanak biogenih amina u vinu može biti spriječen inhibicijom autohtonih bakterija mliječne kiseline i ostalih mikroorganizama koji mogu uništiti njihovu aktivnost (23).

Koncentracija biogenih amina ovisi, osim o načinu proizvodnje vina, i o sorti vina, vrsti tla, stupnju zrelosti, klimatskim uvjetima, sadržaju alkohola, raznolikosti mikroorganizama te fermentacijskim uvjetima poput temperature skladištenja, pH vrijednosti, prisutnosti kisika, sumporovog dioksida i koncentraciji natrijevog klorida u vinu (23,24,25,26,27,28). Svi navedeni uvjeti djeluju sinergistički te neke kombinacije mogu dovesti do povišenja ili do sniženja sadržaja biogenih amina u vinu.

Bertrand i sur. (24) i Pogorzelski (25) utvrdili su da crna vina sadrže velike količine histamina iznad pH 3.7 pokazavši da pH znatno utječe na nastanak biogenih amina tijekom proizvodnje vina. Što je niži pH, manja je aktivnost mikroorganizama dok viši pH uzrokuje raznoliku bakterijsku mikrofloru čime se povećava proizvodnja biogenih amina (29,30,26).

## **1.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)**

Postoji velik broj metoda za određivanja biogenih amina u vinima. Među njima su: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), kapilarna elektroforeza te plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (28). Navedene metode nisu sve kompetentne za određivanje svih biogenih amina (27,31).

Kromatografija je metoda kemijske analize koja služi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje sastojaka u smjesi. Svim kromatografskim tehnikama je zajedničko postojanje stacionarne i mobilne faze te pojave razdiobe analita između te dvije faze. Kromatografija je metoda odjeljivanja koja se temelji na različitim brzinama putovanja uzoraka kromatografskim sustavom. Zbog različite snage međudjelovanja sastojaka smjese sa stacionarnom fazom, tekuća faza ih različitim brzinama nosi kroz kromatografski sustav. Sastojci koji se jače vežu za stacionarnu fazu provode duže vremena u koloni za razliku od sastojaka koji se pretežno zadržavaju u mobilnoj fazi i koji kroz kromatografski sustav prolaze brže. Kako sastojci smjese eluiraju različitim brzinama može ih se identificirati i odrediti odgovarajućim detektorom ili sakupljati za daljnju analizu. Vrijeme zadržavanja, retencijsko vrijeme ( $t_R$ ), koristi se za identifikaciju pojedinog sastojka u smjesi. Apsolutno

retencijsko vrijeme je vrijeme potrebno da uzorak bude eluiran iz kolone. Mrtvo vrijeme ( $t_M$ ) je vrijeme potrebno da mobilna faza prođe kroz uređaj i kolonu te dođe do detektora (27).

Prema fizikalnom stanju faza, kromatografija se dijeli na plinsko-tekućinsku kromatografiju, plinsko-čvrstu i tekućinsko-čvrstu kromatografiju. S obzirom na fizikalno stanje pokretne faze dijeli se na plinsku, tekućinsku i kromatografiju pri superkričnim uvjetima. Mehanizmi separacije u kromatografiji se razlikuju. Prema mehanizmu kromatografija može biti:

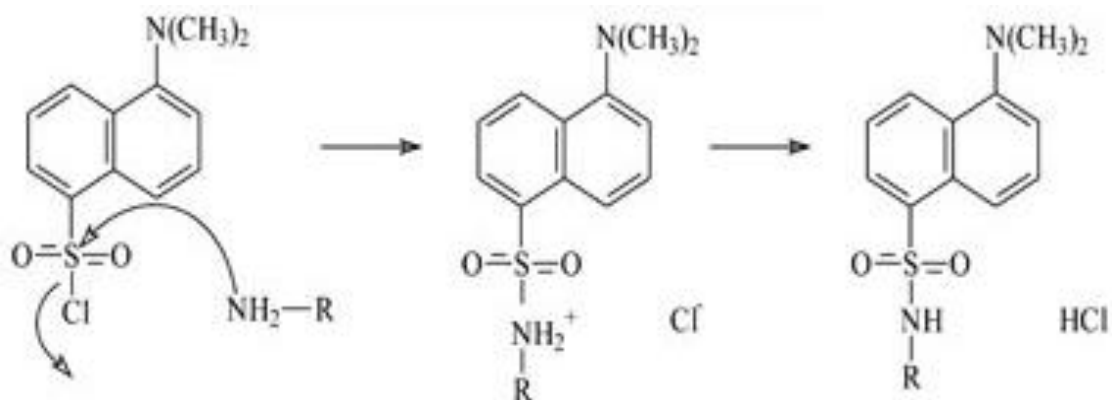
- adsorpcijska (razdvajanje temeljeno na različitim afinitetima sastojaka uzorka prema adsorpciji na površini aktivne čvrste tvari),
- razdjelna kromatografija (kod plinske kromatografije temelji se na razlici topljivosti sastojaka uzorka u nepokretnoj fazi, a kod tekućinske na razlikama topljivosti u pokretnoj i nepokretnoj fazi),
- kromatografija na ionskim izmjenjivačima (različiti afiniteti sastojaka uzorka prema ionskoj izmjeni),
- kromatografija isključenja (do razdvajanja dolazi radi isključenja zbog razlika u veličini, obliku ili naboju čestica) te
- afinitetna kromatografija (za mehanizam razdvajanja koristi se vezivanje analita i liganda) (32).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC, je tehnika koja je razvijena krajem 20. stoljeća. Ova vrsta kromatografije koristi tekućinu kao mobilnu fazu i stacionarnu fazu koja se sastoji od finih čestica krutine koje su najčešće kemijski modificirane. Da bi se dobili odgovarajući protoci kroz sloj sitnih čestica, potrebni su visoki tlakovi (100-200 atm). Manje čestice poboljšavaju razdvajanje, ali povećavaju i radne tlakove uređaja. Kromatografsko odvajanje temeljeno je na razlici u polarnosti sastavnica uzorka. Tijekom kromatografije dolazi do višestrukih adsorpcija i desorpcija komponenti smjese između stacionarne i mobilne faze pa se ovisno o građi stacionarne faze i polarnosti otapala pojedine komponente uzorka zadržavaju duže ili kraće na koloni.

HPLC za razliku od klasične kolonske kromatografije sadrži kolone od nehrđajućeg čelika malog promjera (2-5 mm), a punilo kolone su čestice jednolične veličine (3.5-10  $\mu\text{m}$ ). Koristi relativno visoke radne tlakove s kontroliranim protokom tekuće faze i potrebna je mala količina uzorka. Analiza je relativno brza i ima visoku moć razdvajanja. Najviše se koriste spektroskopski detektori. Konstrukciju ovih detektora omogućavaju protočne ćelije malih volumena (~10  $\mu\text{l}$ ) koji tako omogućavaju brzu izmjenu tekuće faze u njima (32).

### 1.5.1. Derivatizacija i metoda određivanja biogenih amina u vinima

Iako su brojne analitičke metode zabilježene za određivanje biogenih amina u vinima i drugim pićima ili uzorcima hrane, većina znanstvenika ističe uporabu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (32,19). Kako bi se biogeni amini mogli kvantitativno odrediti ovom metodom, potrebno je vršiti derivatizaciju uzorka (32,12). Derivatizacija je postupak kojim, uz pomoć odgovarajućih reagensa, nastaju stabilni derivati aminokiselina koji se mogu detektirati u UV-Vis području spektra. Postoje razlike u postupcima derivatizacije uzoraka prije mjerenja HPLC metodom te različiti reagensi za derivatizaciju. Najčešće korišteni reagensi su o-ftalalhid (OPA), dabsil klorid (DABS-Cl) i dansil-klorid (DNS-Cl). Slika 2. prikazuje mehanizam derivatizacijske reakcije s dansil kloridom (11). Dansil klorid je derivatizacijsko sredstvo koje pretvara enantiomer u diastereomerni derivat kako bi se poboljšala detekcija u UV-Vis spektru. Iako znanstvenici obično koriste OPA kao reagens derivatizacije, u ovom radu korišten je dansil klorid zbog njegove stabilnosti u UV-Vis području spektra. Također, OPA reagira samo sa primarnim aminima, te se ne mogu određivati poliamini kao što su spermin i spermidin.



Slika 2. Mehanizam derivatizacijske reakcije s dansil kloridom



## **2. CILJ RADA**

Cilj rada je odrediti koncentraciju biogenih amina u crnim i bijelim vinima proizvedenih od autohtonih sorti grožđa u dvije hrvatske vinske regije: Dalmaciji (Primorska vinska regija) i Hrvatskom Zagorju (Kontinentalna vinska regija).

### **2.1. Hipoteze**

- Koncentracija biogenih amina hrvatskih vina je niska.
- Koncentracija biogenih amina pokazatelj je zemljopisnog podrijetla vina.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorci

U ovom radu korišteno je 48 uzoraka crnih i bijelih vina Kontinentalne regije (Hrvatsko Zagorje) te Primorske regije (Dalmacija).

U tablicama 3 i 4 navedeni su podatci o sorti, podrijetlu i boji uzoraka podregija Hrvatsko Zagorje te Dalmacija.

*Tablica 3. Uzorci bijelih i crnih sorti vina podregije Hrvatsko Zagorje*

<b>Broj</b>	<b>Oznaka uzorka</b>	<b>Sorta vina</b>	<b>Podrijetlo</b>	<b>Boja vina</b>
1.	1ZB	Graševina	Beretinec	Bijelo
2.	2ZB	Pinot	Moslavec	Bijelo
3.	3ZB	Rajnski rizling	Varaždin	Bijelo
4.	4ZB	Graševina	Varaždin	Bijelo
5.	5ZB	Muškat žuti	Varaždin	Bijelo
6.	6ZB	Sivi pinot	Varaždin	Bijelo
7.	7ZB	Manzoni	Beretinec	Bijelo
8.	8ZB	Graševina	Varaždin	Bijelo
9.	9ZB	Traminac	Beretinec	Bijelo
10.	14ZB	Sauvignon	Cestica	Bijelo
11.	1ZC	Frankovka	Beretinec	Crno
12.	2ZC	Isabella+Farber	Kneginec	Crno
13.	3ZC	Shiraz	Varaždin	Crno
14.	4ZC	Frankovka+Plavac	Ludbreg	Crno
15.	5ZC	Frankovka	Cestica	Crno
16.	6ZC	Frankovka	Ledinec	Crno
17.	7ZC	Merlot+Frankovka	Beretinec	Crno
18.	8ZC	Portugizac	Ivanec	Crno
19.	10ZC	Isabella	Ledinec	Crno
20.	11ZC	Frankovka	Beretinec	Crno
21.	12ZC	Frankovka+Merlot	Beretinec	Crno
22.	13ZC	Isabella	Beretinec	Crno
23.	14ZC	Isabella	Ledinec	Crno
24.	15ZC	Frankovka	Beretinec	Crno

Tablica 4. Uzorci bijelih i crnih sorti vina podregije Dalmacija

Broj	Oznaka uzorka	Sorta vina	Podrijetlo	Boja vina
1.	1DB	Debit	Drniš	Bijelo
2.	2DB	Pošip	Bol, Brač	Bijelo
3.	3DB	Pošip barrique	Bol, Brač	Bijelo
4.	4DB	Kujundžuša	Rogoznica	Bijelo
5.	5DB	Maraština	Kaštela	Bijelo
6.	6DB	Maraština	Bol, Brač	Bijelo
7.	7DB	Chardonnay	Kaštela	Bijelo
8.	8DB	Pošip Barrique	Kaštela	Bijelo
9.	9DB	Kujundžuša +Graševina	Imotski	Bijelo
10.	10DB	Debit	Sinj	Bijelo
11.	11DB	Debit	Šibenik	Bijelo
12.	1DC	Plavina+Lasin+Shiraz	Drniš	Crno
13.	2DC	Bogondon	Bol, Brač	Crno
14.	3DC	Tribidrag	Bol, Brač	Crno
15.	4DC	Plavac	Rogoznica	Crno
16.	5DC	Plavac	Kaštela	Crno
17.	6DC	Plavac	Bol, Brač	Crno
18.	7DC	Crljenak	Kaštela	Crno
19.	8DC	Plavac	Kaštela	Crno
20.	9DC	Crljenak	Bol, Brač	Crno
21.	10DC	Crljenak	Imotski	Crno
22.	11DC	Plavac	Sinj	Crno
23.	12DC	Plavac	Šibenik	Crno
24.	13DC	Plavac	Knin	Crno

### 3.2. Priprema uzoraka

Sadržaj biogenih amina određen je pomoću HPLC metode koju su opisali Manetta i sur. (20) uz manje izmjene.

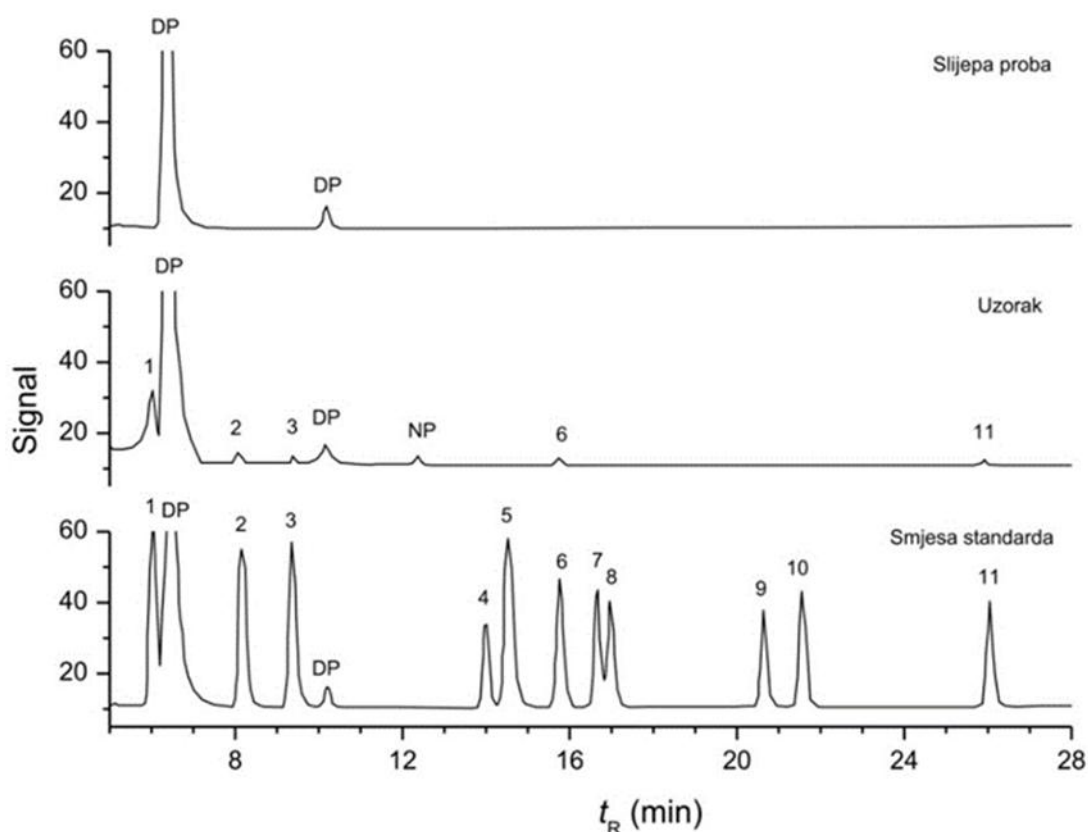
Derivatizacija se izvodila bez prethodne obrade uzoraka kako slijedi: 0,25 ml standardne otopine amina ili uzorka vina pomiješano je sa 70  $\mu$ L zasićene otopine natrijevog hidrogenkarbonata i 65  $\mu$ L 0,1 M otopine kalijevog hidroksida. Zatim je dodano 1 ml dansil klorida (0.5% u acetonu) te je smjesa inkubirana 45 minuta pri 40 °C u termobloku uz povremeno miješanje. Potom je u smjesu dodano 100  $\mu$ L otopine amonijaka (25% w/v) i nakon snažnog miješanja vorteksom, reakcijska smjesa ostavljena je u mraku 30 minuta. Volumen uzoraka nadopunjen je do 5 mL acetonitrilom, filtriran i spremljen za analizu. Kontrolni uzorci (slijepa proba) pripremljeni su istim postupkom, ali umjesto standarda ili uzoraka vina, korištena je ultračista voda. Svi uzorci su pripremljeni i analizirani dva puta, a

podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Gradijentna elucija je provedena korištenjem acetonitrila (otapalo A) i ultračiste vode (otapalo B) prema programu prikazanom u Tablici 5.

Tablica 5. Program gradijentne elucije HPLC metode

Vrijeme (min)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0.5	40	60
25	80	20
30	95	5
34	95	5
35	40	60
43	40	60

Primijenjena brzina protoka je 1 mL/min, temperatura kolone 25 °C te volumen ubrizgavanja uzorka 10  $\mu$ L. Mjerenje je rađeno pri valnoj duljini od 254 nm. Identifikacija biogenih amina provedena je uspoređivanjem vremena retencije standarda svakog biogenog amina ponaosob i u smjesi standarda što je prikazano na *Slika 3*. Signali koji se pojavljuju u kromatogramu (*Slika 3*.) koji ne odgovaraju signali standarda, a detektirani su i u slijepoj probi identificirani su kao signali produkta derivatizacije (DP) ili kao nepoznati signali (NP). Kvantifikacija je provedena korištenjem kalibracijskih pravaca napravljenih za svaki analizirani biogeni amin. Etanolamin, etilamin i metilamin su nabavljeni kao hidrokloridne soli te su njihove koncentracije u standardnim otopinama izračunate kao odgovarajuće baze.



Slika 3. Kromatogrami slijepa probe, otopine smjese standarda biogenih amina i uzorka  
Brojevi odgovaraju aminima u Tablici 6, DP-derivatizacijski pik, NP-nepoznati pik

Tablica 6. Analitički parametri kromatografske metode

Broj	Naziv amina (kratica)	$t_R$ (min) $\pm$ RSD n=3	LOD mg L <sup>-1</sup>	LOQ mg L <sup>-1</sup>	$R^2$
1.	Etanolamin (ETA)	5.79 $\pm$ 0.04	0.85	2.50	0.9983
2.	Metilamin (MA)	7.92 $\pm$ 0.05	0.14	0.41	0.9997
3.	Etilamin (ETIL)	9.07 $\pm$ 0.04	0.20	0.59	0.9997
4.	Triptamin (TRP)	14.05 $\pm$ 0.04	0.03	0.06	0.9981
5.	Izopentilamin (IPA)	14.49 $\pm$ 0.04	0.22	0.66	0.9992
6.	Putrescin (PUT)	15.81 $\pm$ 0.05	0.03	0.09	0.9982
7.	Kadaverin (KAD)	16.71 $\pm$ 0.04	0.03	0.10	0.9986
8.	Histamin (HIS)	16.97 $\pm$ 0.04	0.04	0.10	0.9988
9.	Tiramin (TIR)	20.66 $\pm$ 0.04	0.03	0.13	0.9999

10.	Spermidin (SPD)	21.60±0.03	0.03	0.09	0.9987
11.	Spermin (SPM)	26.12±0.02		0.10	0.9982

Granice detekcije (LOD) i granice određivanja (LOQ) određene su omjerom signal-šum, engl. *signal to noise*, (S/N) od 3:10 za svaki standard. *Tablica 6* prikazuje izračunate analitičke parametre za primijenjenu metodu.

### 3.3. Kemikalije

Sve korištene kemikalije su analitičke čistoće. Dansil klorid, standardi svih amina (izopentilamina, etanolamina, metilamina, etilamina, spermidina, spermina, putrescina, tiramina, histamina, kadaverina i triptamina), klorovodična kiselina (37%, w/w), natrijev hidrogenkarbonat i acetonitril nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka). Ultračista voda pripravljena je u laboratoriju ELGA Purelab flex sustavom.

### 3.4. Uređaj i programi

*Slika 4* prikazuje korišteni Perkin Elmer Series 200 HPLC sustav opremljen autosamplernom, binarnom pumpom i UV/Vis detektorom, upravljan TotalChrom Navigator programom. Kromatografsko odvajanje provedeno je Restek Ultra IBD C18 kolonom (5 µm veličina čestice, 250×4.6 mm i.d.) s Ultra IBD predkolonom (5 µm veličina čestice, 10×4 mm i.d.), proizvođača Restek, Bellefonte, SAD.



*Slika 4. HPLC sustav*

## 4. REZULTATI

U 48 uzoraka hrvatskih crnih i bijelih vina iz podregija Hrvatskog Zagorja i Dalmacije određeno je 11 biogenih amina (triptamin, putrescin, kadaverin, histamin, tiramin, spermidin, spermin, izopentilamin, etanolamin, metilamin i etilamin) (*Tablica 7*). Uzorci se mogu podijeliti u četiri skupine: dalmatinska bijela vina (11 uzoraka), dalmatinska crna vina (13 uzoraka), bijela vina Hrvatskog Zagorja (10 uzoraka) te crna vina Hrvatskog Zagorja (14 uzoraka). Rezultati su prikazani u Tablici 7 kao prosječna vrijednost  $\pm$  RSD (%) svih uzoraka. RSD ili relativna standardna devijacija (koeficijent varijacije) (znak V) omjer je standardne devijacije i aritmetičke sredine ( $\bar{x}$ ) pomnožen sa 100, tj.  $V = (\sigma/\bar{x}) 100$  (33).



Tablica 7. Sadržaj biogenih amina ( $\text{mg L}^{-1}$ ) u 48 uzoraka

Uzorak	TRP	IPA	PUT	KAD	HIS	TIR	SPD	SPM	ETA	MA	ETIL
1DB	nd	nd	1.21±0.04	nd	nd	nd	nd	nd	24.32±8.05	nd	*
2DB	nd	0.29±0.21	1.19±0.02	nd	nd	nd	nd	0.19±0.09	10.42±0.09	nd	nd
3DB	nd	nd	0.99±0.04	nd	*	0.39±0.04	nd	0.39±0.21	12.08±0.83	1.40±0.01	nd
4DB	0.49±0.38	nd	0.41±0.03	nd	nd	nd	*	*	9.09±0.24	nd	nd
5DB	nd	nd	1.06±0.00	nd	nd	nd	*	nd	6.71±0.00	nd	nd
6DB	0.42±0.13	nd	0.86±0.53	nd	nd	nd	nd	nd	2.87±0.45	nd	nd
7DB	1.22±1.12	nd	1.15±0.01	nd	nd	nd	nd	0.11±0.01	7.83±0.33	nd	nd
8DB	0.68±0.04	nd	1.25±0.01	nd	0.56±0.03	0.40±0.01	nd	*	4.22±0.91	nd	nd
9DB	0.27±0.18	nd	0.72±0.02	nd	nd	nd	nd	nd	*	nd	nd
10DB	0.38±0.25	nd	2.10±0.06	*	nd	nd	*	nd	nd	nd	*
11DB	nd	nd	1.58±0.02	*	nd	nd	nd	*	9.68±0.04	nd	*
1DC	nd	nd	1.58±0.03	nd	nd	nd	nd	nd	4.85±0.25	nd	nd
2DC	nd	1.13±0.16	7.50±0.17	nd	2.33±0.08	2.00±0.00	0.18±0.04	0.31±0.15	13.24±0.13	nd	nd
3DC	0.54±0.15	nd	1.76±0.04	*	0.89±0.05	1.57±0.01	nd	0.27±0.13	14.00±0.38	nd	nd
4DC	1.20±0.01	nd	1.31±0.00	nd	nd	nd	nd	*	nd	nd	nd

<b>5DC</b>	0.43±0.21	nd	1.35±0.02	nd	nd	nd	0.09±0.00	nd	*	nd	nd
<b>6DC</b>	0.43±0.18	nd	3.47±0.09	nd	1.64±0.01	1.88±0.04	0.14±0.05	0.24±0.20	8.77±0.50	nd	nd
<b>7DC</b>	0.23±0.04	nd	0.78±0.04	1.75±0.03	0.89±0.02	0.32±0.03	nd	0.14±0.03	5.11±0.07	nd	nd
<b>8DC</b>	0.71±0.04	nd	1.45±0.02	nd	0.52±0.01	*	nd	nd	*	nd	nd
<b>9DC</b>	0.34±0.15	nd	0.78±0.00	1.98±0.09	1.17±0.01	*	0.46±0.25	*	9.22±0.06	nd	nd
<b>10DC</b>	0.43±0.35	nd	1.91±0.11	nd	nd	nd	nd	0.17±0.08	nd	nd	nd
<b>11DC</b>	nd	nd	1.77±0.01	0.12±0.06	nd	nd	0.12±0.01	nd	10.75±0.45	nd	nd
<b>12DC</b>	0.46±0.30	nd	2.77±0.07	nd	nd	*	*	*	6.58±0.17	nd	nd
<b>13DC</b>	0.66±0.04	nd	0.89±0.03	1.01±0.14	0.36±0.04	nd	nd	nd	6.36±0.03	nd	*
<b>1ZB</b>	0.68±0.02	1.29±0.04	0.27±0.01	0.40±0.00	nd	nd	nd	*	4.07±0.28	nd	nd
<b>2ZB</b>	nd	0.87±0.49	1.49±0.67	0.82±0.31	nd	nd	nd	nd	17.96±0.01	nd	nd
<b>3ZB</b>	nd	1.32±0.00	0.62±0.01	nd	nd	nd	nd	nd	4.80±0.51	nd	nd
<b>4ZB</b>	nd	1.47±0.32	1.19±0.01	nd	nd	nd	nd	*	8.61±1.19	nd	nd
<b>5ZB</b>	nd	0.50±0.09	1.08±0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>6ZB</b>	nd	0.82±0.21	*	nd	nd	nd	nd	nd	3.80±0.00	nd	nd
<b>7ZB</b>	nd	0.42±0.46	1.42±0.01	nd	nd	nd	nd	nd	4.61±0.01	nd	nd
<b>8ZB</b>	nd	0.31±0.22	0.83±0.04	nd	nd	nd	0.12±0.02	*	4.16±0.14	nd	nd

<b>9ZB</b>	0.33±0.00	1.00±0.80	1.16±0.02	nd	*	nd	nd	*	7.19±0.08	nd	nd
<b>14ZB</b>	nd	nd	0.94±0.01	*	nd	nd	*	nd	nd	nd	*
<b>1ZC</b>	0.75±0.87	nd	0.17±0.01	nd	nd	*	0.21±0.05	nd	*	nd	nd
<b>2ZC</b>	1.82±0.06	0.79±0.32	2.06±0.04	0.47±0.05	1.06±0.04	*	0.75±0.04	3.55±0.04	15.41±0.02	nd	*
<b>3ZC</b>	3.31±0.33	1.19±0.01	3.75±0.06	*	9.63±0.13	*	0.26±0.13	0.74±0.04	4.10±0.23	1.28±0.01	*
<b>4ZC</b>	4.89±0.27	0.50±0.06	0.39±0.04	*	0.35±0.08	0.45±0.01	0.15±0.01	0.67±0.07	8.04±0.16	nd	nd
<b>5ZC</b>	3.61±0.45	0.87±0.04	3.17±0.11	0.10±0.00	0.50±0.01	0.50±0.04	0.22±0.02	1.81±0.01	16.80±0.23	1.57±0.04	*
<b>6ZC</b>	0.88±0.22	3.71±0.14	0	*	0	0.31±0.08	2.51±0.21	nd	95.84±0.20	0.99±0.55	0
<b>7ZC</b>	0.39±0.31	2.44±0.18	0.66±0.78	0.21±0.01	0.98±0.02	2.10±0.14	0.57±0.07	nd	63.96±0.20	0	0
<b>8ZC</b>	0.09±0.01	2.97±2.44	*	0	*	0.78±0.71	0.33±0.00	nd	31.14±0.17	0.65±0.03	0
<b>10ZC</b>	0.67±0.37	1.81±0.02	0.16±0.09	0.44±0.20	0	2.31±0.05	0.15±0.00	nd	51.79±3.21	0	0
<b>11ZC</b>	9.18±0.07	2.14±0.48	*	*	0	1.45±0.22	6.05±1.22	nd	35.19±10.47	0.56±0.15	*
<b>12ZC</b>	0.87±0.61	3.27±0.35	*	0.27±0.32	2.01±0.14	2.97±0.09	1.97±0.20	nd	46.03±12.33	*	1.17±0.21
<b>13ZC</b>	nd	1.55±1.27	1.00±0.04	nd	0.35±0.06	0.13±0.03	nd	*	23.78±1.50	nd	nd
<b>14ZC</b>	nd	0.33±0.32	0.24±0.02	*	nd	nd	*	*	5.22±0.28	nd	nd
<b>15ZC</b>	nd	0.70±0.10	nd	nd	nd	nd	nd	*	4.37±0.20	nd	nd

Tablica sadrži kratice biogenih amina koji odgovaraju njihovom punom imenu u tablici 6.

DB= uzorci dalmatinskih bijelih vina, DC= uzorci dalmatinskih crnih vina, ZB= uzorci zagorskih bijelih vina, ZC= uzorci zagorskih crnih vina

\*= ispod granica kvantifikacije,

nd= nije detektirano

## 5. RASPRAVA

Visoke koncentracije poliamina i diamina (putrescina, kadaverina, spermidina i spermina) obično su povezane s nehigijenskim uvjetima u vinariji (34). U analiziranim uzorcima koncentracije poliamina zastupljene su u malim koncentracijama. Kod većine bijelih vina kadaverin, spermidin i spermin nisu detektirani, dok su kod crnih vina najveće koncentracije bile 1,98 mg L<sup>-1</sup> za kadaverin, 2,51 mg L<sup>-1</sup> za spermidin i 3,55 mg L<sup>-1</sup> za spermin. Iz navedenog zaključujemo da su sanitarni uvjeti svih uzoraka bili zadovoljavajući. Histamin je najtoksičniji amin, iako je toksičnost uzrokovana kombinacijom histamina i visokim ukupnim sadržajem ostalih amina, etanola te acetaldehida u vinu (34). Dopushtene koncentracije histamina u vinu su različite po zakonima u zemljama. Prema dostupnim referencama, najveća koncentracija histamina od 10 mg L<sup>-1</sup> dopuštena je u Švicarskoj (35). U uzorku 3ZC zabilježena je najveća koncentracija histamina od 9,63 mg L<sup>-1</sup>. Sadržaj histamina ostalih uzoraka crnih vina je relativno nizak (od 0,35 do 2,01 mg L<sup>-1</sup>). Kod uzoraka bijelih vina Kontinentalne i Primorske regije, određena koncentracija histamina je ispod granice detekcije, osim za uzorak 8DB gdje je histamin pronađen u koncentraciji od 0,56 mg L<sup>-1</sup>.

U analiziranim uzorcima vina dokazano je da su najrasprostranjeniji amini putrescin i etanolamin, bez obzira na boju i geografsko podrijetlo vina.

Prema nađenim referencama, Bover-Cid i sur. (36), Glória i sur. (37) i Kiss i sur. (38), putrescin, spermin i spermidin prirodno su prisutni u grožđu i njihova prisutnost može biti pokazatelj geografske regije ili sorte vina. U navedenim studijama nađene koncentracije putrescina su neznatno više u crnih vina što se može objasniti činjenicom da je malolaktička fermentacija učestalija kod proizvodnje crnih vina (36).

U ispitivanim uzorcima najveća koncentracija putrescina pronađena je u uzorku 2DC (7,5 mg L<sup>-1</sup>). U usporedbi s literarnim podacima, navedena koncentracija je relativno niska (18,20,35,38). U citiranom radu, Landete i sur., koncentracija putrescina navodi se u rasponu od 30 do 50 mg L<sup>-1</sup> (23). U ispitivanim uzorcima crnih vina podregije Hrvatsko Zagorje određene su koncentracije putrescina u rasponu od 0,16 do 3,75 mg L<sup>-1</sup> što je vrlo nižih vrijednosti nego u literaturi. Spermidin nije detektiran u bijelim vinima Hrvatskog Zagorja, osim u uzorku 8ZB gdje je njegova koncentracija 0,12 mg L<sup>-1</sup>. Spermidin je određen u koncentracijama od 0,09 do 0,46 mg L<sup>-1</sup> u dalmatinskim crnim vinima te od 0,15 do 6,05 mg

L<sup>-1</sup> u uzorcima zagorskih crnih vina. Spermidin je svojim koncentracijama pokazatelj zemljopisnog podrijetla odnosno karakterizira dalmatinska crvena vina.

Spermin je pronađen u niskim koncentracijama u četiri uzorka bijelih vina Dalmacije (u rasponu od 0,11 do 0,39 mg L<sup>-1</sup>) dok u bijelim vinima Hrvatskog Zagorja nije detektiran. Ako usporedimo rezultate spermina u crnim vinima, u uzorcima Hrvatskog Zagorja otkrivene su nešto veće koncentracije nego u dalmatinskim vinima, ali konačne koncentracije odgovaraju onima opisanim u literaturi (22).

Del Prete i sur. potvrdili su prisutnost etanolamina, etilamina i putrescina u grožđu (39). Etanolamin je detektiran u gotovo svim ispitivanim uzorcima u značajnim koncentracijama, a posebno u crnim vinima Hrvatskog Zagorja. Koncentracije etanolamina odgovaraju onima opisanim u drugim istraživanjima mediteranskih vina, pr. uzorcima iz Italije (18), Portugala (40) i Grčke (11). Iako se u literaturi rijetko navode istraživanja sadržaja etanolamina, u ispitivanim uzorcima obiju regija Hrvatske utvrđene su značajne koncentracije etanolamina.

Etilamin je detektiran samo u uzorku 12ZC i to u vrlo niskoj koncentraciji od 1,17 mg L<sup>-1</sup>, kao i metilamin koji je pronađen u uzorku 3DB i u nekoliko uzoraka crnih vina Hrvatskog Zagorja u rasponu koncentracija od 0,99 do 1,57 mg L<sup>-1</sup>. Jeromel i sur. (41) također su istraživali sadržaj biogenih amina u hrvatskim crnim vinima, ali u njihovoj studiji nisu ispitivani etilamin i metilamin, dok su histamin i triptamin bili narasprostranjeniji amini.

U ovom istraživanju triptamin je otkriven u koncentracijskom rasponu od 0,2 do 1,2 mg L<sup>-1</sup> u vinima Dalmacije, dok je u uzorcima crnog vina Hrvatskog Zagorja pronađen u znatno većim koncentracijama, od 0,09 do 9,18 mg L<sup>-1</sup>.

Izopentilamin je u uzorcima Hrvatskog Zagorja nađen u koncentracijama od 0,3 do 1,5 mg L<sup>-1</sup> u bijelim vinima i od 0,33 do 3,71 mg L<sup>-1</sup> u crnim vinima, dok su među dalmatinskim uzorcima samo 2DB i 2DC sadržavali izopentilamin u koncentraciji od 0,29 i 1,13 mg L<sup>-1</sup>.

Tiramin je pronađen u dvije sorte bijelog vina iz Dalmacije u vrlo niskim koncentracijama, ali nije otkriven u bijelim vinima Hrvatskog Zagorja. Kao što se očekivalo, uzorci crnih vina sadržavali su veće količine tiramina, ali još uvijek znatno niže od onih opisanih u literaturi (17,18).

## 6. ZAKLJUČAK

Biogeni amini su dušikovi spojevi koji se mogu pronaći u hrani te predstavljaju mogući rizik za ljudsko zdravlje, budući da u većim koncentracijama imaju toksični učinak. Mnoge institucije provode istraživanja u svrhu kontrole kvalitete hrane i ljudskog zdravlja. Biogeni amini su spojevi koji nastaju kao produkti malolaktične fermentacije u vinu. Najčešći amini u vinima, opisani u literaturnim podacima, su histamin, putrescin, kadaverin i feniletilamin.

Ovaj rad pokazao je da sadržaj biogenih amina može biti pokazatelj sorte grožđa i zemljopisnog podrijetla vina. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da su dalmatinska bijela vina karakterizirana triptaminom, putrescinom i etanolaminom. Sadržaj navedenih amina u uzorcima bijelih vina Dalmacije nađen je u rasponu: za triptamin od 0,23 do 1,22 mg L<sup>-1</sup>, putrescin od 0,41 do 7,5 mg L<sup>-1</sup> i etanolamin od 2,87 do 24,32 mg L<sup>-1</sup>. Bijela vina Hrvatskog Zagorja karakterizirana su sadržajem izopentilamina (od 0,31 do 1,47 mg L<sup>-1</sup>), putrescina (od 0,27 do 1,49 mg L<sup>-1</sup>) i etanolamina (od 3,80 do 17,96 mg L<sup>-1</sup>). U crnim vinima Hrvatskog Zagorja pronađeni su svi biogeni amini, osim etilamina.

Ovim radom dokazano je da prisutnost, odnosno rasprostranjenost pojedinih biogenih amina može biti pokazatelj pojedine geografske regije i dokaz sortnosti vina.

## 7. LITERATURA

- (1) Zakon o vinu (pročišćeni tekst, Narodne novine, br.96/03),
- (2) Marić B, Tandija I. Podjela vina [internet]; 2010 [pristupljeno 2018 listopad 3]. Dostupno na: "<http://hrcak.srce.hr/163394>" .
- (3) Alpeza I, Mirošević N. Vinogradarstvo i vinarstvo republike Hrvatske u okviru svijeta [internet].; 2016 [pristupljeno 2018 listopad 3]. Dostupno na: "<https://hrcak.srce.hr/162627>".
- (4) Alpeza I. Temelji kemijskog sastava vina. Glasnik zaštite bilja. 2008: p. 1-10.
- (5) Silla-Santos M. Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *Int. J. Food Microbiol.* 1996; 29(1): p. 213-231.
- (6) Anli R, Bayram M. Biogenic amines in wines. *Food Rev Int.* 2009; 25(1): p. 86-102.
- (7) Villalba Rodriguez A, Fernandez Fernandez J, Martinez Cutillas A. Study of different biogenic amines in wines from two protected designations of origin (PDOs) in Murcia (Spain) multivariate classification. *Int. Sci. J.* 2012; 45(2): p. 111-119.
- (8) Vaughan A, O' Sullivan T, Sindere D. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer — A Review. *J. Inst. Brew.* 2005; 111(4): p. 355-371.
- (9) Arena M, Manca de Narda M. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 90(2): p. 9-13.
- (10) De Borba B, Rohrer J. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr.* 2007; 1155(1): p. 50-62.
- (11) Proestos C, Loukatos P, Komaitis M. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chem.* 2008; 106(3): p. 1218-1224.
- (12) Zhijun L, Yongning W, Gong Z. A survey of biogenic amines in Chinese red wines. *Food Chem.* 2007; 105(4): p. 1530-1535.
- (13) Puneda A, Carasco J. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean young varietal wines by HPLC. *Food Control.* 2012; 23(1): p. 251-257.
- (14) Souza S, Theodoro K, Souza E, Da Motta S. Bioactive amines in Brazilian wines: Types, levels and correlation with physico-chemical parameters. *Bra. Biotechnol.* 2005; 48(1): p. 53-62.



- (15) Fernandez J FM. Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in port wine and grape juice. *J. Chromatogr.* 2000; 886(2): p. 183-195.
- (16) Romero R, Sanchez Vinas M, Gazquez D. Characterization of selected spanish table wine samples according to their biogenic amine content from liquid chromatographic determination. *Food Chem.* 2002; 50(16): p. 4713-4717.
- (17) Marques AP, Leitao MC, Romao MVS. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chem.* 2008; 107(2): p. 853-860.
- (18) Galgano F, Caruso M, Perretti G, Favati F. Authentication of Italian red wines on the basis of the polyphenols and biogenic amines. *Food Chem.* 2011; 232(5): p. 889-897.
- (19) Ganić Kovačević K, Komes D, Lovrić T, Čurko N, Gracin L. Changes of the content of biogenic amines during winemaking of Sauvignon wines. *Croat, J. Food Sci. Tech.* 2009; 1(2): p. 21:27.
- (20) Manetta A, Di Giuseppe L, Tofalo R, Martuscelli M, Schirone M. Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC - PDA method. *Food Control.* 2016; 62: p. 351-356.
- (21) König H, Uden G, Frohlich J. *Biology of microorganisms on grapes, must and in wine.* 2nd ed. König H, editor. Berlin: Springer; 2009.
- (22) Granchi L, Romano P, Mangani S, Vincenzini M. Production of biogenic amines by wine microorganisms. *Bulletin.* 2005; 117(3): p. 595.
- (23) Landete J, De las Rivas B, Marcobal A. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *Int. J. Food Microbiol.* 2007; 117(3): p. 258-269.
- (24) De Revel G, Martin N. Contribution to the Knowledge of Malolactic Fermentation Influence on Wine Aroma. *J. Agric. Food Chem.* 1989; 47(10): p. 265-280.
- (25) Pogorzelski E. Studies on the formation of histamine in must and wines from elderberry fruit. 1992; 60(2): p. 239-244.
- (26) Lonvaud Funel A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Microbiology.* 2001; 76(4): p. 9-13.
- (27) Garcia-Villar N, Saurina J, Hernandez Cassou S. High performance liquid chromatographic determination of biogenic amines with an experimental design optimization procedure. *Anal. Chim. Acta.* 2006; 575(1): p. 97-105.
- (28) Marcobal A, De Rivas B, Munoz B. Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods. *J. Food Saf.* 2006; 1(3): p. 187-197.

- (29) Lonvaud-Funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 199(1): p. 9-13.
- (30) Arrieta M, Prats-Moya M. Free amino acids and biogenic amines in Alicante Monastrell. *Food Chem.* 2012; 135(3): p. 1511-1519.
- (31) Smit A, Toit W, Toit M. Biogenic Amines in Wine: Understanding the Headache. *South African Journal for enology and Viticulture.* 2008; 29(2): p. 2.
- (32) Stefanović Cerjan Š, Drevenkar V, Jurišić B. Kromatografsko nazivlje: IUPAC preporuke 1993. i 1998. 2nd ed. Cerjan-Stefanović Š, Drevenkar V, Jurišić B, Zagreb: HINUS I Sekcija za kromatografiju HDKI; 1999.
- (33) Benšić, M, Šuvak N. Primijenjena statistika. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera, Odjel za matematiku, 2013; 28-29.
- (34) Garcia-Marino M, Trigueros A, Escribano-Bailon T. Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *J. Food Compos. Anal.* 2010; 23(5): p. 455-462.
- (35) Lehtonen P. Determination of Amines and Amino Acids in Wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 1996; 47(2): p. 127-133.
- (36) Bover-Cid S, Iquierdo-Pulido M, Marine-Font A, Vidal-Carou MC. Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food chem.* 2006; 96(1): p. 43-47.
- (37) Gloria MBA, Watson BT, Simon-Sarkadi L, Daeschel MA. A Survey of Biogenic Amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 1998; 49(3): p. 279-282.
- (38) Sass-Kiss A, Kiss J, Havadi B, Adanyi N. Multivariate Statistical Analysis of Botrytised Wines of Different Origin. *Food chem.* 2008; 110(3): p. 742-750.
- (39) Prete Vd, Costantini A, Cecchini F, Morassut M, Garcia-Moruno E. Occurrence of Biogenic Amines in Wine: The Role of Grapes. *Food chem.* 2009; 112(2): p. 474-481.
- (40) Mafra I, Herbert P, Santos L, Barros P, Alves A. Evaluation of Biogenic Amines in Some Portuguese Quality Wines by HPLC Fluorescence Detection of Opa Derivatives. *Am. J. Enol. Vitic.* 1999; 50(1): p. 128-132.
- (41) Jeromel A, Kovačević GK, Herjavec S, Mihaljević M. Concentration of Biogenic Amines in 'Pinot Noir' wines Produced in Croatia. *Agric. Consp. Scient.* 2012; 77(1): p. 37-40.

## 8. SAŽETAK

### Određivanje biogenih amina u hrvatskim vinima

**Cilj:** Odrediti koncentraciju biogenih amina u 48 uzoraka hrvatskih domaćih vinia vinskih podregija, Hrvatsko Zagorje (Kontinentalna regija) i Dalmacije (Primorska regija).

**Metode:** Uzorci vina domaćih proizvođača iz kontinentalne regije (Hrvatsko zagorje) te iz primorske regije (Dalmacija). Uzorci su određivani HPLC metodom, prethodno derivatizirani s dansil kloridom.

**Rezultati:** Metoda je primijenjena za otkrivanje i određivanje koncentracija 11 biogenih amina u uzorcima. Utvrđeno je da su dalmatinska crna i bijela vina karakterizirana triptaminom (0,23-1,22 mg L<sup>-1</sup>), putrescinom (0,41-7,5 mg L<sup>-1</sup>) i etanolaminom (2,87-24,32 mg L<sup>-1</sup>). Bijela vina iz Hrvatskog Zagorja bogata su sadržajem izopentilamina (0,31-1,47 mg L<sup>-1</sup>), putrescina (0,27-1,49 mg L<sup>-1</sup>) i etanolamina (3,80-17,96 mg L<sup>-1</sup>). Za razliku od bijelih vina iz Hrvatskog Zagorja, u crnim vinima podjednako su zastupljeni svi biogeni amini osim etilamina.

**Zaključak:** Ovaj rad je pokazao da sadržaj biogenih amina može biti faktor diferencijacije za sortu grožđa i zemljopisno podrijetlo crnih vina.

**Ključne riječi:** hrvatska vina; biogeni amini; HPLC; zemljopisno podrijetlo

## 9. ABSTRACT

### **The Content of Biogenic Amines in Croatian Wines of Different Geographical Origins**

**Goals:** Determine the concentration of biogenic amines in Croatian domestic wines in 48 samples from the region of Zagorje and Dalmatia.

**Methods:** 24 samples of native Zagorje black and white wines, 24 domestic Dalmatian black and white wines were used. The samples were passed through the HPLC system.

**Results:** The method was applied to detect and quantify 11 biogenic amines in 48 red and white wines. It was found that both Dalmatian red and white wines are characterized by tryptamine (0.23-1.22 mg L<sup>-1</sup>), putrescine (0.41-7.5 mg L<sup>-1</sup>) and ethanolamine (2.87-24.32 mg L<sup>-1</sup>). White wines from Hrvatsko zagorje region are characterized by a content of isopentylamine (0.31-1.47 mg L<sup>-1</sup>), putrescine (0.27-1.49 mg L<sup>-1</sup>) and ethanolamine (3.80-17.96 mg L<sup>-1</sup>). In contrast to white wines from Hrvatsko Zagorje region, in red wines were found and equally presented all biogenic amines except ethylamine.

**Conclusion:** This work showed that biogenic amines content can be a differentiation factor for a grape variety and geographical origin for red wines.

**Key words:** Croatian wines; biogenic amines; HPLC; geographical origin

## 10. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Nikolina Rohtek

**Datum i mjesto rođenja:** 19. prosinca 1994., Varaždin

**Obrazovanje:**

2009. – 2013.: Prva gimnazija Varaždin, jezični smjer

2013. – 2016.: Preddiplomski studij, Odjel za studije mora, Sveučilište u Splitu

2016. – 2018.: Diplomski studij, Odjel za forenzične znanosti, Sveučilište u Splitu

**Znanstveni radovi:**

Diplomski rad na temu „Određivanje biogenih amina u hrvatskim vinima“, Split 2018.

Mitar I., Ljubenkov I., Rohtek N., Prkić A., Anđelić I., Vuletić N. *The Content of Biogenic Amines in Croatian Wines of Different Geographical Origins*. *Molecules* 2018; 23(10): 2570.

**Sudjelovanje na konferencijama:**

Sudjelovanje na 10. ISABS konferenciji, Dubrovnik 2017.

Sudjelovanje na 2. Međunarodnoj konferenciji „Sigurnost povijesnih gradova – izazovi turizma“

Mitar I., Ljubenkov I., Rohtek N., Prkić A., Anđelić I., Vuletić N. *The Content of Biogenic Amines in Croatian Wines of Different Geographical Origins*. 11. Međunarodni znanstveno-stručni skup Hranom do zdravlja, Split, Hrvatska, Listopad 18-19, 2018.

## **SVEUČILIŠTE U SPLITU**

### **Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

#### **Izjava o akademskoj čestitosti**

Ja, Nikolina Rohtek, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom “Određivanje biogenih amina u hrvatskim vinima“ rezultat mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava. Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u ijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi. Sadržaj mogega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split, \_\_\_\_\_

Potpis studenta/studentice: \_\_\_\_\_

