

WORKSHOP ON OFFICIAL SAMPLING AND ANALYSES OF FISHERY PRODUCTS AND LBM

Split, 18.10.2012.

**Službeno uzorkovanje proizvoda
ribarstva i školjkaša
Zdravstveni uvjeti i fizikalno-kemijske
metode određivanja za žive školjkaše
i proizvode ribarstva**

**Dr. sc. Tanja Bogdanović
Hrvatski veterinarski institut,
Veterinarski zavod Split**

Uzimanje uzoraka i analiza u svrhu provedbe službene kontrole

uzimanje uzoraka i analiza

- Način uzimanja uzoraka i analitičke metode koje se koriste kod službenih kontrola moraju udovoljavati odredbama posebnih propisa; ili
 - (a) biti u skladu s međunarodno priznatim pravilima ili protokolima, npr. onima koje je Europski odbor za normizaciju (CEN) prihvatio; ili
 - (b) biti u skladu s drugim metodama prikladnima za predviđenu svrhu ili razvijene u skladu sa znanstvenim protokolima.

analitičke metode moraju zadovoljavati sljedeće kriterije učinkovitosti:

- (a) točnost;
 - (b) primjenjivost (vrsta uzorka i raspon koncentracije);
 - (c) granica otkrivanja;
 - (d) granica određivanja;
 - (e) preciznost;
 - (f) ponovljivost;
 - (g) obnovljivost;
 - (h) stupanj iskorištenja;
 - (i) selektivnost;
 - (j) osjetljivost;
 - (k) linearnost;
 - (l) mjerna nesigurnost;

SLUŽBENO UZORKOVANJE I FIZIKALNO-KEMIJSKO ISPITIVANJE ŠKOLJAKA I PROIZVODA RIBARSTVA

- Službeno uzorkovanje može se provoditi zbog različitih razloga, npr. monitoring, nadziranje i provjera sukladnosti s propisanim zahtjevima. Kako bi od uzorkovanja i fiz.-kem. ispitivanja hrane bilo koristi, uzorkovanje mora biti dobro isplanirano, uzimajući također u obzir i naznačenu svrhu uzorkovanja.
- Osnova u odredbama slijedećih propisa:
 - Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla NN 99/07, NN 28/10, NN 45/11)
 - Pravilnik o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla (NN 99/07, NN 28/10)
 - Pravilnik o službenim kontrolama koje se provode radi verifikacije postupanja u skladu s odredbama propisa o hrani i hrani za životinje, te propisa o zdravlju i dobrobiti životinja (NN99/07; NN 74/08)

Pravilnik o službenim kontrolama hrane životinjskog podrijetla

NN 99/07 NN 28/10; NN 94/11; NN 51/12

• ŠKOLJKAŠI

- analize toksina u školjkašima
- provjere prisutnosti kemijskih onečišćivača (teški metali,



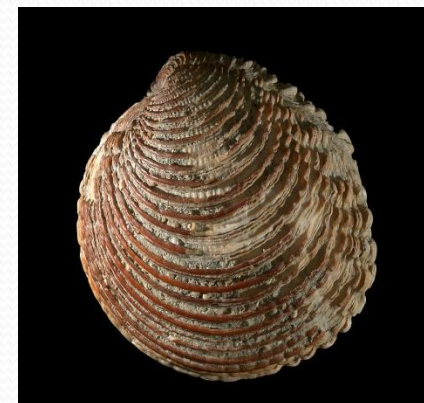
• PROIZVODI RIBARSTVA

- Organoleptička ispitivanja
- Pokazatelji svježine (TVB-N, TMA)
- Histamin (biogeni amini)
- Zaostale tvari (rezidue) kontaminanti (teški metali, avermektini)



Parametri, plan i način uzorkovanja školjaka

Fiz. kemijske analize mesa školjaka	učestalost
Benzo(a)piren	polugodišnje
Metali (As, Cd, Hg, Pb)	polugodišnje
Biotoksini (PSP, DSP, ASP)	tjedno



Uzorkovanje školjkaša za određivanje biotoksina

Vrsta školjkaša	Stanište/Vrsta uzgoja	Način i količina uzorkovanja
Dagnje (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) Kamenice (<i>Ostrea edulis</i>)	Uzgojeni na vertikalnim linijama (pergolarima) i košarama	uzorkuju se na tri razine (vrh, sredina i dno); uzorci se pomiješaju kako bi se dobio jedan reprezentativan uzorak
Prnjavice (<i>Venus veruscosa</i>) Male kape – kanestrele (<i>Chlamis varia</i>) Jakopske kape (<i>Pecten jacobaeus</i>)	Morsko dno, u pijesku, ispod šljunčanog dna	izlovljavanje specifičnim ribolovnim alatima smještenim na ribarskim brodovima (ramponi, mušulari, dredže), obavlja se horizontalnim povlačenjem alata po izlovnom području (kontrolna točka u sredini površine obuhvaćene povlačenjem)
Reprezentativan uzorak	Morsko dno	izlovljavanje ronjenjem i skupljanjem po morskom dnu u radijusu do 50 m od kontrolne točke.
	4 kg iste vrste školjkaša	
Pakiranje uzoraka	Mrežice sitnog oka, plastične vrećice, onemogućena vanjska kontaminacija i ispuštanje međuljušturine tekućine; jednoznačna oznaka i pohrana u hladnjak te doprema u najkraćem roku do laboratorija	

Uzorkovanje školjaka za određivanje teških metala

- Brojni biotski i abiotski čimbenici združeno utječu na koncentraciju teških metala u školjkama (najčešće sezonske varijacije tkivnih koncentracija metala u školjkaša)
- Ovisno o vrsti školjaka uzorkuje se 25-50 jedinki približno jednake dužine ljuštura i sprema u čiste plastične vrećice
- jednoznačno označavanje i pohrana u hladnjak te doprema u kratkom roku do laboratorija

Biotoksini, referentne metode određivanja, NDK

- **Biotoksini, produkt fitoplanktonskih algi** koji se u školjkašima akumuliraju tijekom procesa filtriranja morske vode ; **termostabilni** (termičkom obradom se ne sprječava toksikacija konzumenta)
- Cilj monitoringa: utvrditi količine biotoksina koje mogu prouzročiti simptome toksikacije prilikom konzumacije školjkaša, odnosno PSP (*Paralytic Shellfish Poison*), DSP (*Diarrhetic Shellfish Poison*) i ASP (*Amnesic shellfish poison*)
- **PSP skupina toksina**: 28 različitih toksina, glavni je saxitoxin-STX (proizvode ga mikroalge iz skupine dinoflagelata), najteži oblik trovanja (simptomi: mučnina, vrtoglavica, pareza ličnog živca, ukočenost udova, paraliza dišnih mišića-gušenje)
- **DSP skupina toksina**: okadaična kiselina i DTX toksin (fitoplanktonske alge roda *Dynophysis* proizvode toksične metabolite)- najčešći oblik trovanja školjkašima u Jadranu (simptomi: probavne smetnje)
- **ASP trovanje**, izaziva domoična kiselina (simptomi: mučnina povraćanje, proljevi unutar 24 h; unutar 48 h simptomi CNS: dezorijentiranost, konfuznost, **gubitak pamćenja**, epileptički napadi)

BIOTOKSIN

REFERENTNA METODA (NN
37/10; NN 154/08, 78/12)

NDK (NN 99/07, 28/10,
45/11; NN 154/08)

PSP

Test na miševima – Mouse
bioassay, AOAC (1990)

800 µg/kg

POZITIVAN REZULTAT:

uginuće 2 miša unutar 60 min-
>računanje toksičnosti temeljem
standardizacije

DSP

Test na miševima –
Mouse bioassay, Sar et.
al.(2002)

**tekućinska kromatografija s
masenom spektrometrijom
(LC-MS/MS) (EU-RL)**

1. Skupina okad. kis.=OA DTX1
DTX2

DTX3+esteri+pektenotok.=PTX1

PTX2: **160 µg ekvivalenta OKA/kg**

2. YESOTOKSIN (YTX ,45 OH YTX,
homo YTX i 45 OH homo YTX): **1 mg
ekv YES/kg**

3. AZASPIRACIDI: : **160 µg ekvivalenta
AZA/kg**

POZITIVAN REZULTAT:

uginuće 3 miša ili uginuće 2 od 3 miša
unutar 24 h

ASP

HPLC, Quilliam et.al.
(1995).

20 mg/kg

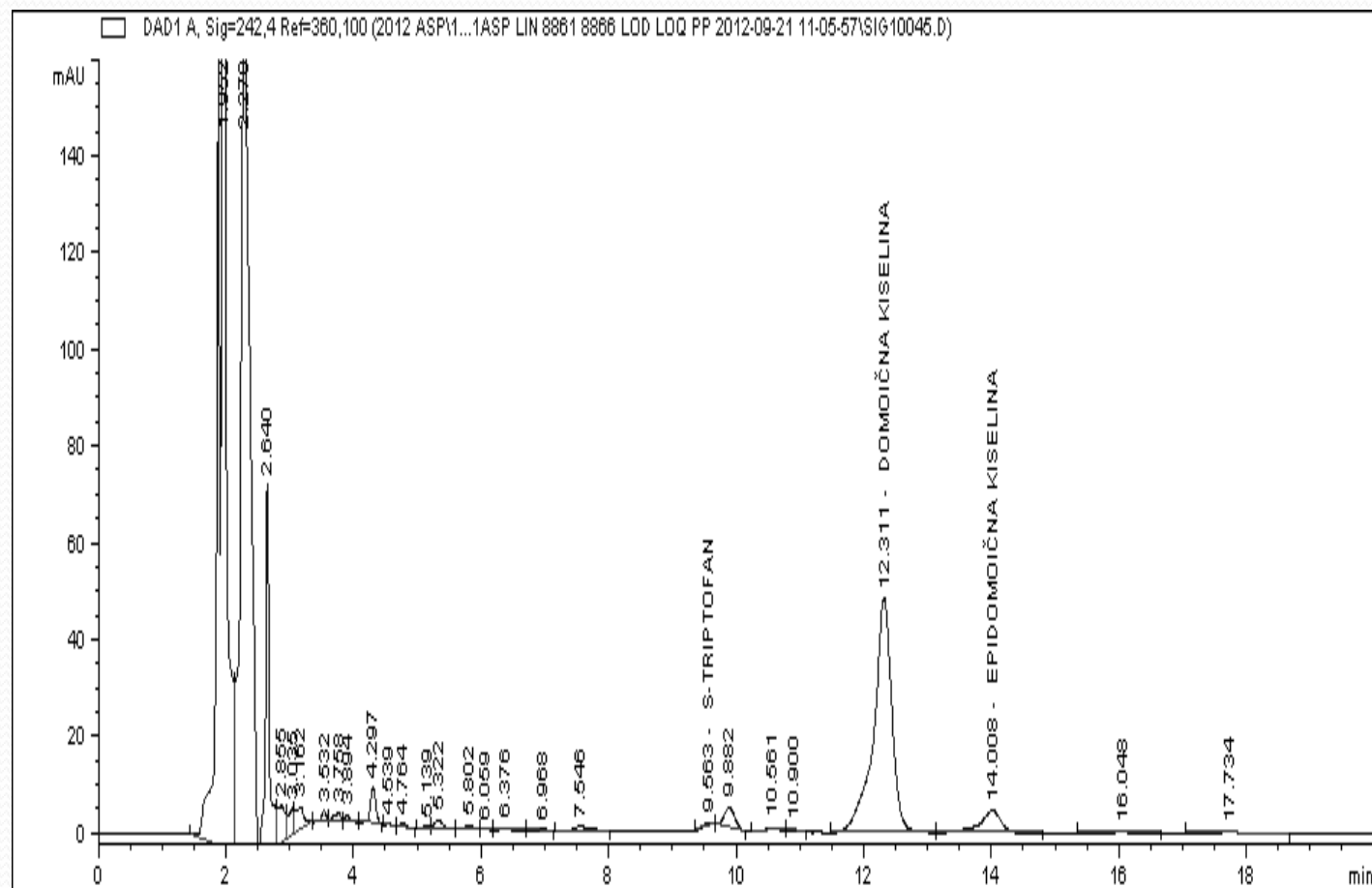
Biopokus i instrumentalna (HPLC-DAD) metoda

Biopokus (određivanje PSP i DSP biotoksina)

- Osnova: ekstrahiranje, tj. izolacija eventualno prisutnih toksina u tkivu školjkaša (**100 g tkiva**) u obliku prigodnom za cijepljenje laboratorijskih miševa i njihovo promatranje (u peritoneum pokusnih životinja injektira se **1 mL** pripremljenog ekstrakta; miševi težine 17-23 g)

HPLC-DAD metoda (DOM+epiDOM kiselina, ASP)

- Osnova: **4 g** homogenata tkiva ekstrahira se, centrifugura i filtrira-> nanovo ekstrahira na čvrstoj fazi->2 mL ekstrakta
- 20 μ L ekstrakta injektira se u HPLC-DAD



Kromatogram certificiranog referentnog materijala NRC CRM-ASP-Mus-c lot200310-1462

Teški metali: Pb, Cd, Hg, As; metode, NDK

- teškoće u dobivanju reprezentativnih uzoraka prikladnih za analizu anorganskih i organskih kontaminanata (teških metala, benzo(a)pirena) u morskoj vodi
- monitoring program je usmjeren na organizme koji apsorbiraju štetne tvari, odnosno biotu
- dvoljušturni mekušci (dagnje, kamenice, prnjavice, kape male, jakobove kape) koriste i kao kvantitativni pokazatelji onečišćenja okoliša

TEŠKI METAL	Metoda određivanja	NDK (NN 154/08, 78/11)
Pb	AAS (GFAAS)	1,5 mg/kg
Cd	AAS (GFAAS)	1,0 mg/kg
THg	AAS-FIAS	0,5 mg/kg
TAs	AAS (GFAAS)	-(do 2012.god 8 mg/kg)

AAS (GFAAS i FIAS tehnike)

- **Priprava uzoraka za GFAAS i FIAS tehnike:** 0,5 g **podvrgava se** mokrom spaljivanju pomoću uređaja za mikrovalnu razgradnju Anton-Paar- Multiwave 3000.

FIAS tehnika: princip **određivanja THg** temelji se na njezinoj sposobnosti tvorbe metalnih hidrida

GFAAS tehnika: pripremljeni uzorak atomizira se u grafitnoj kivetu, a na temelju apsorpcije svjetla na odgovarajućoj valnoj duljini određuje se **koncentracija Cd, Pb i TAs** u uzorku.

Kontrola rezultata analize

Element	QTM082BT – UZORAK ŠKOLJAKA		Iskorištenje (%)
	Potvrđena vrijednost	Utvrđena vrijednost	
Ukupni As	2.43 0.9	2.29 0.3	95.0
Cd	163 30.3	173.3 8.8	106.3
Ukupna Hg	11.7 11.5	12.5 4.1	106.5
Pb	137 19.6	131.1 2.95	95.7

Parametri i način uzorkovanja proizvoda ribarstva

- **Parametri kvalitete**

- Ukupni hlapljivi bazni dušik (TVB-N)

- Biogeni amini – histamin

- Organoleptički parametri senzorske procjene kvalitete sirove ribe

- **Histamin** u proizvodima ribarstva od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina:

$$N = 9, C = 2$$

$$m = 100 \text{ mg/kg}$$

$$M = 200 \text{ mg/kg}$$

- m i M dvostruko veći kod proizvoda ribarstva dobivenih enz. dozrijevanjem u salamuri

NN 154/08;
78/12

NN 74/08; NN 156/08;
NN 89/10; NN 155/11

NN 67/09

Preporučene smjernice za uzorkovanje proizvoda ribarstva pri procjeni parametara kvalitete

Uzorkovanje pri istovaru proizvoda ribarstva

Quantity landed or to be sold (Tons)	Minimal sample size (kg)
< 5	8
5 to 15 excluded	20
15 to 40 excluded	40
40 to 60 excluded	60
60 to 80 excluded	80
80 to 100 excluded	100
100 and more excluded	120 or more*

Uzorkovanje u objektu u kojem se rukuje proizvodima ribarstva

Number of fish in the lot N	Number of fish in the sample n	Maximum acceptable level of defective units c
2 to 15	2	0
16 to 25	3	0
26 to 90	5	0
91 to 150	8	1
151 to 500	13	1
501 to 1200	20	2
1201 to 10000	32	3
10001 to 35000	50	5
35001 to 500000	80	7
500001 and more	125	10

Codex Alimentarius: Opće smjernice za uzorkovanje, CAC/GL 50-2004

Uzorkovanje prerađenih proizvoda ribarstva (AQL=6,5%)

N Number of containers per lot	Sample size n	C Maximal number of acceptable defective units
1- Containers with ≤ 1 kg		
N = 4800 or less	n= 6	C = 1
4801 to 24000	13	2
24001 to 48000	21	3
48001 to 84000	29	4
84001 to 144000	48	6
144001 to 240000	84	9
>240000	126	13
2- Containers with 1 to 4.5 kg		
N = 2400 or less	n=6	C = 1
2401 to 15000	13	2
15001 to 24000	21	3
24001 to 42000	29	4
42001 to 72000	48	6
72001 to 120000	84	9
> 120000	126	13
3- Containers > 4.5 kg		
N = 600 or less	n=6	C = 1
601 to 2000	13	2
2001 to 7200	21	3
7201 to 15000	29	4
15001 to 24000	48	6
24001 to 42000	84	9
> 24000	126	13

Codex Alimentarius: Opće smjernice za uzorkovanje, CAC/GL 50-2004

- Ponavljanje uzorkovanja prerađenih proizvoda ribarstva (AQL=6,5%), sporni uzorci

N Number of containers per lot	Sample size n	C Maximal number of acceptable defective units
4- Containers with ≤ 1 kg		
N = 4800 or less	n= 13	C = 2
4801 to 24000	21	3
24001 to 48000	29	4
48001 to 84000	48	6
84001 to 144000	84	9
144001 to 240000	126	13
>240000	200	19
5- Containers with 1 to 4.5 kg		
N = 2400 or less	n=13	C = 2
2401 to 15000	21	3
15001 to 24000	29	4
24001 to 42000	48	6
42001 to 72000	84	9
72001 to 120000	126	13
> 120000	200	19
6- Containers > 4.5 kg		
N = 600 or less	n=13	C = 2
601 to 2000	21	3
2001 to 7200	29	4
7201 to 15000	48	6
15001 to 24000	84	9
24001 to 42000	126	13
> 24000	200	19

TVB-N

AMONIJAK

DIMETILAMIN

TMA-N

- Jedan je od prvih kemijskih testova ocjene svježine proizvoda ribarstva i školjkaša
- Spojevi odgovorni za stvaranje mirisa i okusa karakterističnih za kvarenje riba, školjaka i ribljih proizvoda, koji su razlog senzorskog odbijanja ribe ili proizvoda
- Količine TVB-N promjenjive su i različite ovisno o vrsti ribe ili proizvoda, sezoni ulova te načinu i dužini skladištenja, ali i među jedinkama iste vrste ovisno o starosti, spolu i kondiciji ribe



IVERAK

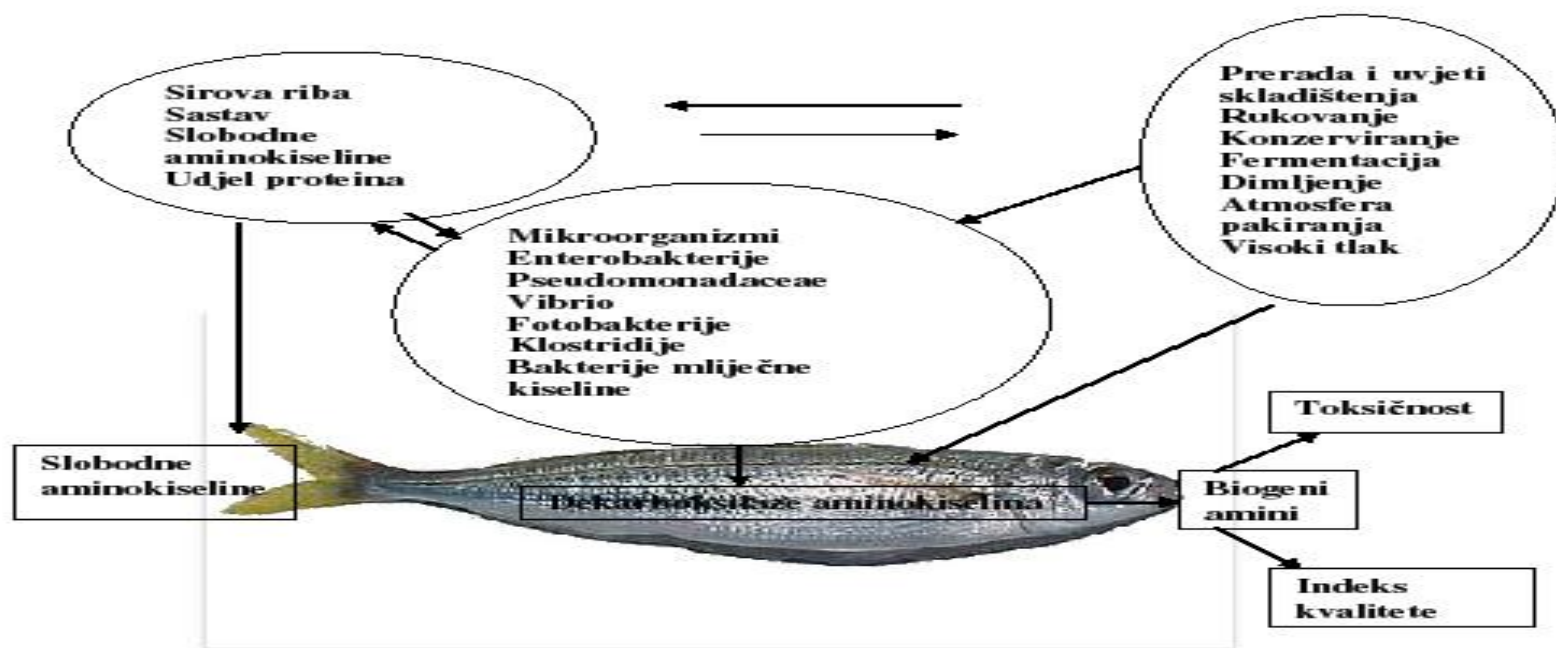


Uzorkevanje, metoda određivanja TVB-N i dozvoljene granice za propisane riblje vrste

- Uzorak se mora sastojati od oko 100 g ribljeg mesa uzetog s najmanje tri različita mjesta, koje se pomiješa zajedno mljevenjem
- Referentna metoda koja se koristi za kontrolu granične vrijednosti TVB-N-a uključuje destilaciju ekstrakta koji je deproteiniziran perklornom kiselinom

RIBLJE VRSTE	NDK (NN 154/08; 78/12)
Sebastes spp. (bodečnjaci), Helicolenus dactylopterus (bodečnjak veliki), Sebastichthys capensis	25 mg N/100 g
Pleuronectidae (plosnatice) (osim Hyppoglossus spp.)	30 mg N/100 g
Salmo salar (losos), vrste koje pripadaju porodici Merlucciidae (oslići), vrste koje pripadaju porodici Gadidae (tovarke)	35 mg N/100 g
Cijeli proizvod ribarstva koji se koristi za pripremu ribljeg ulja za ljudsku prehranu	60 mg N/100 g

Čimbenici koji utječu na nastanak biogenih amina u proizvodima ribarstva



Histamin

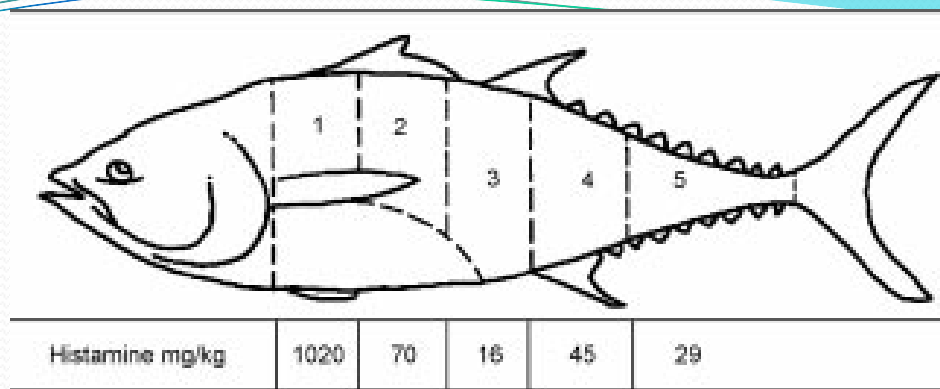
Uzorkovanje, metoda određivanja i dozvoljene granice



Kategorija hrane	Mikroorganizmi/njihovi toksini, metaboliti	Plan uzimanja uzoraka ¹		Granične vrijednosti ²		Ispitna referentna metoda ³	Faza u kojoj se kriterij primjenjuje
				m	M		
1.26. Proizvodi ribarstva od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina ¹⁷	Histamin	918	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC ¹⁹	Proizvodi stavljeni na tržište tijekom njihovog roka trajanja
1.27. Proizvodi ribarstva obrađeni enzimskim dozrijevanjem u salamuri, proizvedeni od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina ¹⁷	Histamin	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg	HPLC ¹⁹	Proizvodi stavljeni na tržište tijekom njihovog roka trajanja

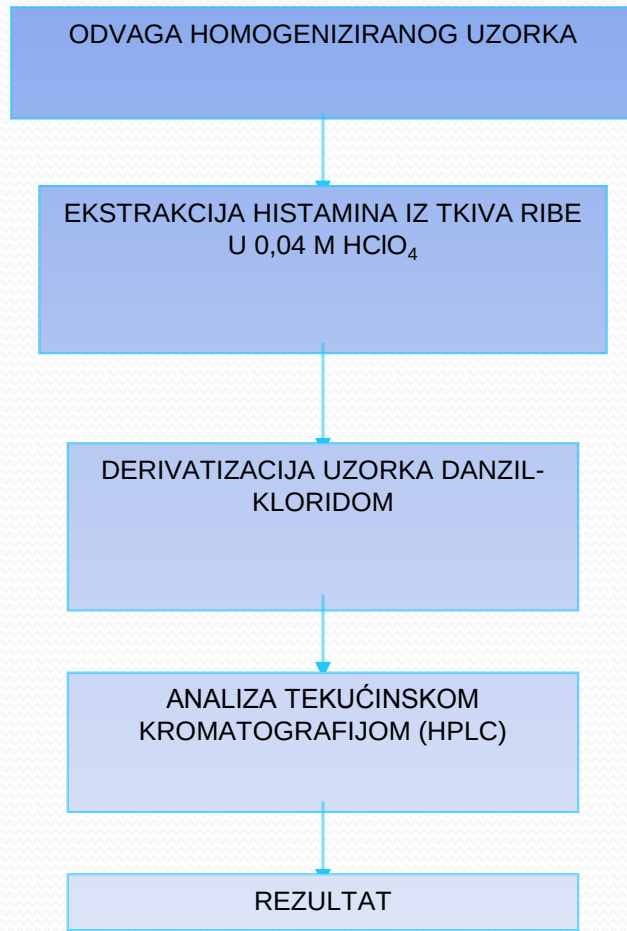
¹⁷ Posebno riblje vrste sljedećih porodica: ***Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombresosidae***

¹⁹ Metoda: 1. Malle P., Valle M., Bouquelet S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. AOAC Internat. 1996., 79, 43-49.

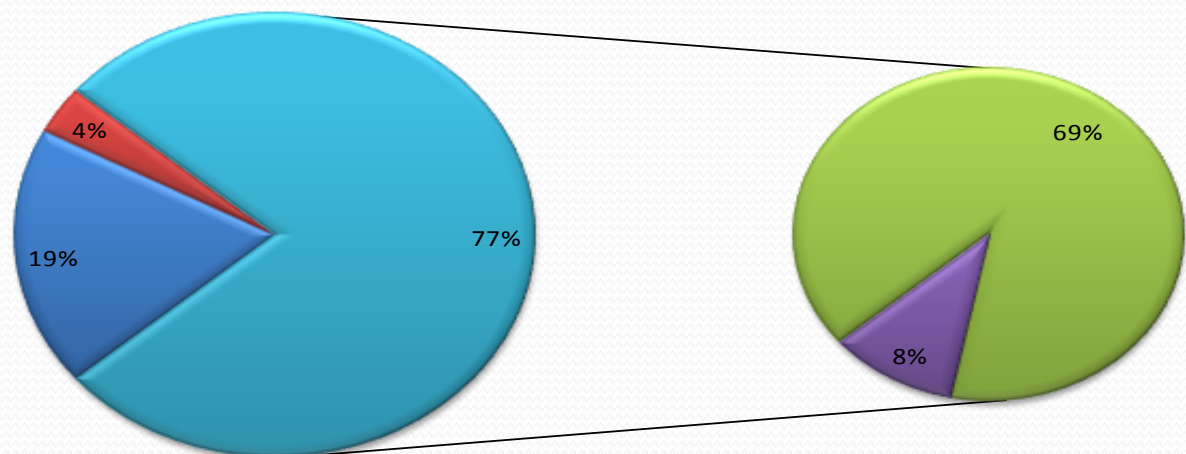


- **Seriya ili lot** je grupa ili skup proizvoda koji se mogu identificirati i koji su dobiveni određenim proizvodnim procesom pod određenim gotovo identičnim okolnostima te koji su proizvedeni na određenom mjestu unutar jednog definiranog proizvodnog razdoblja
- **Uzorak** je sastavljen od jedne ili nekoliko elementarnih jedinica, ili dijela tvari odabranih različitim načinima iz populacije ili iz značajne količine tvari, a namijenjen je za dobivanje podataka o određenom obilježju proučavane populacije ili tvari te za dobivanje osnove za donošenje odluke o toj populaciji ili tvari, ili o procesu u kojem je proizveden;
- **Reprezentativni uzorak** je uzorak koji održava obilježja serije iz koje je uzet, a osobito u slučaju kod nasumičnog uzorka kod kojeg svaka od elementarnih jedinica i/ili dijelova serije ima istu vjerojatnost odabira u uzorak

Postupak određivanja histamina u proizvodima ribarstva



UČESTALOST POJAVLJIVANJA SADRŽAJA HISTAMINA U 633 ISTRAŽENA PROIZVODA RIBARSTVA – PREGLED STANJA TIJEKOM pregled stanja u razdoblju od 2008. do 2012. godine primjenom referentne analitičke HPLC metode



■ PROIZVODI RIBARSTVA UTVRĐENOG SADRŽAJA HISTAMINA KOJI UDOVOLJAVAJU KRITERIJIMA SIGURNOSTI HRANE

■ PROIZVODI RIBARSTVA KOJI NE UDOVOLJAVAJU KRITERIJIMA SIGURNOSTI HRANE

■ PROIZVODI RIBARSTVA PROPISANI KRITERIJIMA SIGURNOSTI HRANE KOD KOJIH NIJE UTVRĐEN SADRŽAJ HISTAMINA

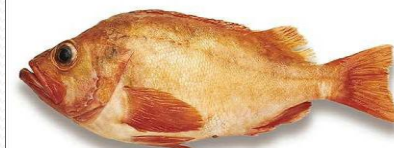
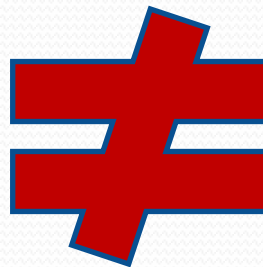
■ OSTALI PROIZVODI RIBARSTVA KOJI NISU PROPISANI KRITERIJIMA SIGURNOSTI HRANE KOD KOJIH NIJE UTVRĐEN SADRŽAJ HISTAMINA

Značaj i metodologija senzorske ocjene ribe

- Pri **ocjenjivanju svježe ribe** uzimaju se u obzir:
- **OPĆI IZGLED**: površinska sluz, miris ribe, izgled kože, analni otvor
- **OČI**: izgled i oblik
- **ŠKRGE**: izgled, miris i boja
- **MESO**: tekstura
- **TRBUŠNA ŠUPLJINA**: izgled, miris i konzistencija organa
- **Ocjenjivanje kuhane ribe**: miris, okus, tekstura
- **EU shema**, gradirajuća shema za cijelu ribu, razlikuje 3 kategorije, stupnja kvarenja ribe (E, A, B i <B za ribu neprikladnu za konzumaciju)
- **QIM** (eng. Quality Index Method), sustav negativnih bodova (0-3) pojedinačnih svojstava, zbroj svih svojstava daje indeks kvalitete
- **Torry shema** za kuhanu ribu (skala 0-10)

Nedostaci službene metode senzorske ocjene (EU shema) i prednosti QIM

- Nekoliko različitih senzorskih svojstava klasificira se u istu senzorsku kategoriju
- Senzorska svojstva nisu u skladu s ostalim podopisima koji karakteriziraju istu senzorsku kategoriju što ocjenjivača dovodi u nedoumicu, dodatno oduzima vrijeme i smanjuje objektivnost
- Procjena nije specifična za riblju vrstu
- Procjenjuju se sva bitna senzorska svojstva, a bodovi im se određuju prema značaju
- Ocjenitelj procjenjuje svako svojstvo
- Manje razlike u ocjeni jednog svojstva ne utječu bitno na konačan indeks tj. zbirnu ocjenu svježine ribe
- Prikladna za obuku neiskusnih ocjenjivača, te za obuku i harmonizaciju inspektora
- Linearan odnos između indeksa kvalitete i vremena skladištenja tijekom pohrane na ledu



Hvala na pažnji!