

# Određivanje histamina u tuni primjenom Raman spektroskopije

---

**Borko, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:970438>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-03**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Ana Borko

774/PI

**ODREĐIVANJE HISTAMINA U  
TUNI PRIMJENOM RAMAN  
SPEKTROSKOPIJE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sanje Vidaček te uz pomoć asistenta dr. sc. Tibora Janči.

## **ZAHVALA**

Hvala mentorici izv.prof.dr.sc. Sanji Vidaček te asistentu dr.sc. Tibor Janči na profesionalnosti, vremenu i trudu uloženom u vođenje ovog rada.

Hvala obitelji što su me ustrajno poticali na pravi put.

Hvala prijateljima što su bili podrška u uspjesima i padovima.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### ODREĐIVANJE HISTAMINA U TUNI PRIMJENOM RAMAN SPEKTROSKOPIJE

*Ana Borko, 774/PI*

**Sažetak:** Žutoperjana tuna se zajedno sa svojom podoricom *Scombridae* smatra glavnim uzročnikom skombroidnih trovanja tj. otrovanja histaminom. Taj biogeni amin nastaje neprikladnim skladištenjem svježe ribe te se nakon formiranja ne može ukloniti niti jednom metodom toplinske obrade. Stoga je cilj ovog istraživanja validirati metodu detekcije histamina spektroskopijom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) na uzorku tune te time omogućiti njegovo jednostavno, brzo i precizno određivanje. Rezultati su pokazali da se tom metodom mogu postići zadovoljavajući no ne i vrlo precizni rezultati u odnosu na referentnu HPLC metodu. Ipak, ističu se brojne prednosti SERS metode koje prvenstveno uključuju značajno smanjenje troškova i vremena potrebnog za analizu.

**Ključne riječi:** histamin, žutoperajna tuna, Raman spektroskopija, SERS, HPLC

**Rad sadrži:** 44 stranica, 11 slika, 6 tablica, 35 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *Izv.prof.dr.sc. Sanja Vidaček*

**Pomoć pri izradi:** *dr. sc. Tibor Janči*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu rada:**

1. Doc.dr.sc. *Marina Krpan*
2. *Izv.prof. dr.sc. Sanja Vidaček*
3. Doc.dr.sc. *Klara Kraljić*
4. Doc.dr.sc. *Leo Gracin* (zamjena)

**Datum obrane:** 20. srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Technology and Engineering  
Laboratory for Chemistry and Technology of Meat and Fish

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### DETERMINATION OF HISTAMINE IN TUNA USING RAMAN SPECTROSCOPY

*Ana Borko, 774/PI*

**Abstract:** Yellowfin tuna along with her family *Scombridae* is considered as a main cause of scombroid poisoning, ie. histamine poisoning. That biogenic amine will appear during unproperly storage of fish and once it is formed, it can't be removed by any method of heat treatment. According to that, purpose of this research is to validate method for detection of histamine using surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) on tuna samples and enable his simple, fast and precise determination. Results have shown that using this method it is possible to achieve satisfying results, but not so precise according to reference HPLC method. However, there are a lot od advantages of SERS method like significant lowering of cost and time necessary for analysis.

**Keywords:** histamine, yellowfin tuna, Raman spectroscopy, SERS, HPLC

**Thesis contains:** 44 pages, 11 figures, 6 tables, 35 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *PhD. Sanja Vidaček, Associate professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Tibor Janči*

**Reviewers:**

1. PhD. *Marina Krpan*, Assistant professor
2. PhD. *Sanja Vidaček*, Associate professor
3. PhD. *Klara Kraljić*, Assistant professor
4. PhD. *Leo Gracin*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 20<sup>th</sup> July, 2017.

## **SADRŽAJ:**

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. HISTAMIN .....	3
2.2. SKOMBROIDNO TROVANJE .....	3
2.3. SIMPTOMI I LIJEČENJE SKOMBROIDNOG TROVANJA .....	5
2.4. MIKROBIOLOŠKI ASPEKT PRODUKCIJE HISTAMINA .....	5
2.5. PREVENCIJA NASTANKA HISTAMINA .....	7
2.6. HISTAMIN U <i>Thunnus albacares</i> .....	8
2.7. METODE DETEKCIJE HISTAMINA.....	10
2.7.1. Raman spektroskopija.....	12
2.7.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS).....	13
2.7.3. Detekcija histamina primjenom SERS-a .....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	16
3.2. MATERIJALI.....	16
3.2.1. Uzorci ribe.....	16
3.2.2. Kemikalije .....	16
3.2.3. Reagensi .....	17
3.2.4. Mobilna faza .....	17
3.2.5. Laboratorijska oprema .....	18
3.3. METODE RADA.....	19
3.3.1. Određivanje histamina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).....	19
3.3.2. Određivanje histamina Raman spektroskopijom.....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	23
4.1. REZULTATI KROMATOGRFSKE ANALIZE .....	24
4.2. REZULTATI ANALIZE RAMAN SPEKTROSKOPIJE .....	26
4.2.1. Obrada SERS rezultata.....	27
4.3. USPOREDBA HPLC I RAMAN REZULTATA .....	31
4.3.1. Preciznost SERS metode .....	34
4.3.2. Istinitost SERS metode.....	35
4.3.3. Prednosti SERS metode.....	37
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	39
<b>6. LITERATURA</b> .....	40



## 1. UVOD

Poznata je činjenica kako je tuna riba bogata proteinima i cijenjenim omega 3 masnim kiselinama. Dostupna je u širokom spektru proizvoda – svježa, konzervirana, kao pašteta ili sushi. U Hrvatskoj se u razdoblju od 2008. do 2010. godine u prosjeku konzumiralo 19 kilograma ribe i školjkaša po stanovniku što odgovara prosječnoj svjetskoj potrošnji (18,5 kilograma po osobi) u istom razdoblju (NOAA Fisheries, 2014). Kao i za svaki segment ljudske prehrane, i ovdje je nužno osigurati kvalitetnu namirnicu koja je sigurna za konzumaciju kako bi se izbjegle moguće zdravstvene smetnje. Kao jedan od mogućih problema predstavlja se histamin. On je biogeni amin koji bi mogao znatno narušiti zdravstvenu ispravnost ribe (Hungerford, 2010). Ako osoba konzumira ribu bogatu histaminom, razvija se skombroidno trovanje s nizom gastrointestinalnih i neuroloških simptoma. Prilikom nepravilnog skladištenja ribe u razdoblju od ulova do konzumacije, bakterijskom dekarboksilacijom se razvija histamin, stoga je održavanje hladnog lanca tijekom transporta ključno za prevenciju nastanka ovog sastojka. Riba bogata aminokiselinom histidin ima veću tendenciju produkcije histamina, a baš su takve vrste ribe iz porodice *Scombridae*, gdje spadaju tuna i skuša (Lehane i Olley, 2000).

Kako bi se osigurala maksimalna zaštita potrošača, histamin se u ribi može detektirati raznim laboratorijskim metodama kod kojih su kromatografske tehnike najčešće. Njihova je mana dugotrajna priprema uzoraka stoga se teži k razvoju novijih, suvremenijih metoda detekcije histamina kako bi se što brže i kvalitetnije došlo do jednako pouzdanih rezultata. Raman spektroskopija se pokazala vrlo dobrim izborom u svakom segmentu, preciznije spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS). Sam mehanizam pojačanja Ramanovog raspršenja nije u potpunosti razjašnjen ali je općenito prihvaćeno da je to pojačanje posljedica elektromagnetskog mehanizma pojačanja kod kojeg je molekula u blizini metalne površine pod utjecajem znatno snažnijeg električnog polja, ali i kemijskog mehanizma koji se temelji na promjeni polarizabilnosti zbog interakcije molekule i metalne površine (Yuen i sur., 2008). Kao navedena metalna površina najčešće se koristi srebro, ali uz njega i zlato, bakar, platina, aluminij i alkalijski metali. Za intenzivan razvoj ove tehnike zaslužna je njena visoka osjetljivost koja omogućava detekciju analita u vrlo niskim koncentracijama. Osim toga, ova metoda je široko primjenjiva u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti (Etchegoin i Le Ru, 2010). Separacija histamina iz tune pomoću

molekulski otisnutih polimera te detekcija SERS metodom pokazala se učinkovitim za detekciju histamina u tuni u rasponu 3 do 90 ppm (Gao i sur., 2015). No imajući u vidu da je SERS metoda razvijena na uzorcima skuše omogućila detekciju histamina u rasponu 0-200 mg/kg uz značajan utjecaj matriksa na sami SERS spektar uzoraka (Janči i sur., 2016), cilj ovog rada bio je navedenom metodom detektirati histamin u uzorcima druge vrste ribe, točnije žutoperajne tune (*Thunnus albacares*).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. HISTAMIN

Histamin je prirodno prisutna supstanca u fiziologiji sisavaca koja ima ulogu prenositelja informacija, pomaže u kontroli sekrecije želučane kiseline, sudjeluje u posredovanju vaskularne propusnosti, imunomodulaciji, hematopoezi te zacjeljivanju rana (Hungerford, 2010). Nalazi se u masnim stanicama i bazofilima, a njegov biološki učinak vidljiv je kao alergijska reakcija tek nakon otpuštanja u velikim količinama. Djeluje tako da se veže na receptore koji se nalaze na celularnim membranama respiratornog, kardiovaskularnog, gastrointestinalnog i imunološkog sustava te kože (Lehane i Olley, 2000). U organizam se najčešće unosi putem ribe i ribljih proizvoda no s obzirom da je topljiv u vodi, ne očekuje se pronaći ga u značajnim količinama u proizvodima kao riblje ulje s obzirom da takvi proizvodi nemaju vodenu komponentu. Međutim, histamin može biti prisutan u proizvodima kao što je koncentrat proteina ribe, ako je takav proizvod dobiven iz ribljeg tkiva bogatog vodom (FDA, 2011).

### 2.2. SKOMBROIDNO TROVANJE

Histamin je prvi puta zabilježen kao toksin 1940. godine (Morrow i sur., 1991), a skombroidna otrovanja, tj. otrovanja histaminom iz ribe su tip trovanja hranom sa simptomima i liječenjem sličnim kao kod alergijskih reakcija na morsku hranu. Naziv „skombroidno trovanje“ dolazi od riba iz porodice *Scombridae* u koju spadaju tuna i skuša i baš su one najčešće povezane s histaminskim trovanjem. Osim njih, mogući uzročnici trovanja iz iste porodice su srdela i haringa no zabilježena su i trovanja histaminom konzumacijom riba koje nisu iz porodice *Scombridae* kao npr. zapadnoaustralski losos, crveni losos te gof stoga se nameće zaključak da je termin „skombroidno trovanje“ netočan (Lehane i Olley, 2000). Otrovanja histaminom su vrlo česta te se događaju u različitim dijelovima svijeta, a na jednak način zahvaćaju sve dobne skupine, spolove i rase. U Sjedinjenim Američkim Državama i Ujedinjenom Kraljevstvu preko 30 % trovanja hranom morskog

porijekla opada na histaminsko trovanje (Dalgaard i sur., 2008), dok je u Hrvatskoj zabilježen samo jedan slučaj epidemije, koji je obuhvaćao 17 ljudi, u razdoblju od 1993. do 2003. (Capak i sur., 2006). Karakteristično je da nema korelacije između ukupne potrošnje ribe i stope otrovanja histaminom, već je važniji faktor vrsta ribe koje se najviše konzumiraju u određenim državama. Iz tog je razloga u državama kao što su Havaji, Japan ili Danska, u kojima je povećana konzumacija ribe s visokim udjelom slobodnog histidina (*Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresosidae*) zabilježena viša stopa trovanja histaminom (Dalgaard i sur., 2008).

Osim u ribi, histamin se može naći i u drugoj hrani i piću no histamin iz fermentiranih proizvoda (sir, vino, riblji umak) produciran je pomoću gram-pozitivnih bakterija mliječne kiseline dok je histamin iz svježe ribe produciran pomoću gram-negativnih enterobakterija (Hungerford, 2010). Morrow i sur. (1991) su na temelju usporedbe rezultata dobivenih detekcijom histamina i metahistamina u urinu osoba koje su konzumirale svježu ribu i osoba koje su konzumirale ribu impliciranu na trovanje zaključili da je histamin toksin odgovoran za skombroidno trovanje. Tim je vrstama zajedničko što u mišićnom tkivu imaju visok udio slobodne aminokiseline histidina (Hungerford, 2010). Udio histidina varira od 1 g/kg u haringi pa sve do 15 g/kg u tuni. Ipak, u svježoj ribi nalaze se zanemarive količine histamina tj. manje od 0.1 mg/100 g (Lehane i Olley, 2000). Osim o udjelu slobodnog histidina, produkcija histamina ovisi i o bakterijskom enzimu histidin dekarboksilazi te o okolišnim uvjetima.

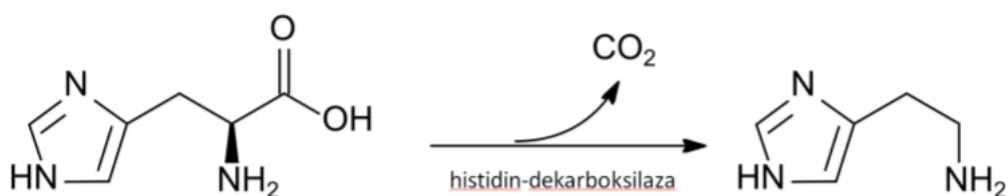
Obzirom da je slobodan histidin u mišićnom tkivu ribe supstrat u reakciji mikrobiološke dekarboksilacije u histamin, razlike u udjelu histidina između pojedinih vrsta ribe imaju veliku ulogu u ukupnoj potencijalnoj opasnosti prilikom konzumacije istih. Mišićje masnih, aktivnih i nomadskih vrsta je puno bogatije slobodnim histidinom nego mišićje bijele ribe koja je sporija. Kod aktivne ribe, slobodne aminokiseline ponašaju se kao pufer te štite tkivo od naglog porasta mliječne kiseline. Histidin deaminaza i urokanaza koje sudjeluju u prva dva koraka degradacijskog procesa, reguliraju nivo histidina u živoj ribi. U sirovoj ribi, najveće su koncentracije histamina u tkivu koje se nalazi uz škrge i iznutrice. Kod pokvarene tune zabilježene su velike varijacije u distribuciji histamina pa tako na području od 3 cm udio histamina varira i preko 4 puta te je znatno viši u blizini crijevne šupljine nego bilo gdje drugdje (Lehane i Olley, 2000).

## 2.3. SIMPTOMI I LIJEČENJE SKOMBROIDNOG TROVANJA

Otrovanje histaminom iz ribe je vrlo učestala pojava, ali zbog sličnih simptoma, često se zamjenjuje s alergijom na hranu ili trovanje *Salmonellom*, a ponekad trovanja prođu nezabilježeno zbog blagih simptoma. Prvi simptomi skombroidnog trovanja javljaju se u rasponu od nekoliko minuta do nekoliko sati nakon ingestije ribe bogate toksinom. Bolest obično traje nekoliko sati ali se može nastaviti i do nekoliko dana. Prvi znakovi trovanja histaminom vidljivi su na koži kao osip, otekline, urtikarija, zatim se javljaju gastrointestinalni simptomi kao vrtoglavica, povraćanje, dijareja te neurološki simptomi kao glavobolja, lupanje srca, žarenje, trnci i svrbež (Lehane i Olley, 2000). Kako bi se ublažili navedeni simptomi, pacijentima s dijagnozom trovanja histaminom daju se antihistaminici. U ljudskom tijelu nalaze se dva tipa receptora za histamin: histamin1 (H1) i histamin2 (H2), koji potaknutim histaminom oštećuju ciljana tkiva, te je u osnovi uloga antihistaminika blokiranje histamin1 receptora dok se blokeri histamin2 receptora (H2 blokeri) koriste kod liječenja peptičkih vriedova (rana) želuca i žgaravice (Anonymus, 2004).

## 2.4. MIKROBIOLOŠKI ASPEKT PRODUKCIJE HISTAMINA

Tijekom procesa kvarenja, određene bakterije točnije, enterobakterije *Morganella morganii* i *Klebsiella pneumoniae* smatraju se najvažnijim producentima histamina. Dekarboksilacijom provode slobodan histidin u histamin kako je prikazano na slici 1. Te bakterije su sposobne producirati histamin u širokom temperaturnom rasponu, ali ipak je zabilježena veća koncentracija histamina kod povišenih temperatura (21.2 °C i više) nego kod umjerenih temperatura (7.2 °C) dok je pri 32.2 °C zabilježen rapidni porast koncentracije histamina (Kanki i sur., 2004).



Slika 1. Metabolički put nastajanja histamina djelovanjem histidin – dekarboksilaze  
(prema Kaanki i sur., 2004)

Jednom kada je enzim histidin dekarboksilaza prisutan u ribi, on može nastaviti producirati histamin čak i ako bakterija nije više aktivna. Taj enzim može biti aktivan na temperaturi hlađenja te ostaje stabilan tijekom zamrzavanja i ponovno se aktivira nakon odmrzavanja. Jedini način da se bakterija i enzim inaktiviraju je toplinska obrada (FDA, 2011). Samo brzo hlađenje ribe ne sprječava stvaranje histamina i ostalih biogenih amina zbog rasta psihotropnih bakterija koje produciraju histamin. Jednom kada je histamin formiran u ribljem tkivu, ne može se uništiti zamrzavanjem, konzerviranjem niti dimljenjem (Bjornsdottir-Butler i sur. 2015).

Histidin dekarboksilacijske bakterije čine čak 31 % izolirane mikroflore iz pokvarenog trup prugavca *Katsuwonus pelamis*. Najviše bakterija koje mogu producirati histidin dekarboksilazu pripada obitelji *Enterobacteriaceae* te rodovima *Clostridium* i *Lactobacillus*. Enterobakterije, točnije *Morganella morganii* te pojedini sojevi *Klebsiella pneumoniae* i *Hafnia alvei* su izrazito proflitični producenti histamina kod riba koje su čuvane na temperaturama višim od 4° C. Ti sojevi bakterija su gotovo uvijek povezani za skombrotoksičnim ribama. Pojedini sojevi *Photobacterium spp.* i *Vibrio spp.* odgovorni su za produkciju histamina pri niskim temperaturama (Lehane i Olley, 2000). *Photobacterium phosphoreum* je pokazala veću sposobnost produciranja histamina na temperaturama od 4° C do 12° C nego *Morganella morganii*, što je uzrok velikog trovanja histaminom zbog konzumacije suhe sardine u Osaki 2002. godine. Taj incident je ujedno prvi zabilježen slučaj trovanja histaminom produciranim prvenstveno zbog *P. Phosphoreum* te predstavlja veliki problem kod ribe bogate slobodnim histidinom pošto se može razmnožavati na proizvodima pakiranim u modificiranoj atmosferi te hladno-dimljenim proizvodima (Kanki i sur., 2004). Zamrzavanje uvelike umanjuje bakterijsku mogućnost produkcije histamina, posebice u slučaju *P. Phosphoreum*, Kanki i sur. (2007) pretpostavljaju da su trovanja histaminom iz hrane uzrokovana histidin dekarboksilazom koja potječe iz histamin producirajućih bakterijskih stanica koje prolaze kroz autolizu tijekom zamrzavanja čak i kada bakterije prežive zamrzavanje.

Rezultati istraživanja Bjornsdottir-Butler i sur. (2016) pokazali su da su bakterije *P. kishitanii* i *P. angustum* sposobne producirati histamin pri temperaturama između 5 ° C i 34° C u koncentracijama većim od dozvoljenih. Navede vrste su autohtone ribama te je brzo hlađenje nakon ulova nužno u prevenciji proizvodnje histamina. Štoviše, ove bakterije mogu rasti i proizvoditi histamin u nekim ribama prije izlova što je vrlo značajno u tehnikama lova

gdje smrt nastupa puno prije samog vađenja ribe iz mora. Također, sposobne su rasti i producirati histamin na temperaturama nižim od 5° C. Slično njima, histamin producirajuće psihrotrofne bakterije *M. psychrotolerans* i *P. Phosphoreum* mogu rasti i producirati histamin na temperaturama nižim od 2° C odnosno 4° C.

## 2.5. PREVENCIJA NASTANKA HISTAMINA

Brzo hlađenje nakon smrti ribe koja se smatra skombrotoksičnom je najvažniji faktor u prevenciji nastanka histamina. Ovo je posebno važno za ribu koja proizlazi iz toplih voda te za tunu koja je sposobna generirati toplinu u svom mišićju.

Neke od preporuka FDA (2011) su:

- riba izložena zraku ili vodi temperature iznad 28.3° C treba biti na ledu ili u slanoj vodi, ledenoj kaši ili rasolu temperature do 4.4° C, što je prije moguće nakon ulova ali ne više od 6 sati nakon smrti
- riba izložena zraku ili vodi temperature niže od 28.3° C treba biti na ledu ili u slanoj vodi, ledenoj kaši ili rasolu temperature do 4.4° C što je prije moguće nakon ulova ali ne više od 9 sati nakon smrti
- riba koja je očišćena i eviscirana prije hlađenja treba biti na ledu ili u slanoj vodi, ledenoj kaši ili rasolu temperature do 4.4° C što je prije moguće nakon ulova ali ne više od 12 sati nakon smrti
- riba koja je ulovljena pod uvjetom da je mrtva riba izložena vodi temperature 18.3° C ili niže kroz 24 sata ili manje, treba biti na ledu ili u slanoj vodi, ledenoj kaši ili rasolu temperature do 4.4° C što je prije moguće nakon ulova ali ne više od prethodno navedenog vremena počevši sa vremenom kad se riba izvadi iz okoliša temperature 18.3° C ili niže.

Osim o temperaturi čuvanja ribe nakon ulova, vrijeme potrebno da se postignu te temperature je još jedan važan faktor u osiguravanju sigurnosti, a to vrijeme ovisi o:

- metodi ulova (odgađanje vađenja ribe iz vode nakon ulova te velike količine ribe ulovljene u jednoj šarži povećavaju vrijeme potrebno za hlađenje ribe)

- veličini ribe
- metodi hlađenja (ledu kao takvom treba više vremena da ohladi ribu nego što to treba ledenoj kaši.

Ovisnost formiranja histamina o temperaturi i vremenu je dokazana, no Bjornsdottir-Butler i sur. (2015) nameću pitanje ovisnosti formiranja histamina o pH te mogućnosti kontrole istog tretiranjem ribe fosfatima. Ispitivan je utjecaj pH na rast i formiranje histamina u tuni a rezultati su prikazali da je producirano manje histamina od strane svih bakterijskih vrsta pri pH 8.5 nego pri pH 5.5 Povišen pH zbog upotrebe fosfata značajno je reducirao formiranje histamina kroz 4 dana na temperaturi 10° C no nije imao utjecaja na rast histamin-producirajućih bakterija. Stoga se povlači zaključak da tretiranje fosfatima može poslužiti kao sekundarna barijera u kontroli produkcije histamina uz već preporučene faktore vremena i temperature od strane FDA.

## 2.6. HISTAMIN U *Thunnus albacares*

Guizani i sur. (2004) proveli su studiju utjecaja temperature skladištenja na valjanost i sigurnost žutoperajne tune *Thunnus albacares*. Istraživanje se temeljilo na proučavanju promjena mikrobioloških, kemijskih i organoleptičkih atributa. Rok trajanja žutoperajne tune određen je pomoću promjene ukupnog broja mezofilnih i psihotropnih bakterija, *K* vrijednosti i organoleptičke procjene na uzorcima koji su skladišteni na 0, 8 i 20° C. S obzirom na *K* vrijednost, rok trajanja prilikom skladištenja tune na 0° C iznosi 12 dana, na 8° C iznosi 5 dana a na 20° C iznosi 1 dan, no senzorski panel odbacio je tunu prije vrijednosti koje su dobivene na temelju *K* vrijednosti. Koncentracija histamina određena je HPLC metodom, derivacijom s O-ftalaldehid. Rezultati su pokazali kako je koncentracija u uzorcima čuvanim na 0° C kroz 17 dana niža od granica propisanih od strane FDA dok su uzorci čuvani na 8° C postali neprihvatljivi nakon 4 dana, a oni čuvani na 20° C nakon jednog dana. Što se tiče bakterijske mikroflore, aerobne mezofilne bakterije su prvotno dominirale uzorcima no kako je vrijeme skladištenja odmicalo, aerobne psihotropne bakterije su postale dominantne, ali ipak nisu premašile dozvoljenih 10<sup>7</sup> cfu/g propisanih od strane International Commission of Microbiological Specifications for Foods. U tablici 1. prikazan je odnos formiranja



histamina u žutoperajnoj tuni na temperaturama 25° C i 31° C kroz određeno vrijeme inkubacije.

Tablica 1. Formiranje histamina u žutoperajnoj tuni (FAO/WHO, 2013)

Vrijeme inkubacije [h]	Temperatura skladištenja [°C]	Histamin [mg/kg]
0	25	0,7
0	25	0,7
10	25	1,2
10	25	1,7
12	25	3,7
12	25	7,1
3	31	3,3
4	31	0,2
6	31	2,6
6	31	9,6
9.5	31	97
10.5	31	131

Vežu između formiranja histamina i oštećenja ribljeg tkiva proučavali su Garcia-Tapia i sur. (2013). Mjeren je udio histamina u oštećenom i neoštećenom odmrznutom mišićju s ciljem determiniranja utjecaja fizičkog oštećenja na mikrobiološki aspekt i samo formiranje histamina tijekom procesa konzerviranja. Također je provedena izolacija i identifikacija mikroorganizama zaslužnih za formiranje histamina u žutoperajnoj tuni. Rezultati su pokazali da fizički oštećena tuna nema veću mikrobiološku kontaminaciju od neoštećene tune. Kao najaktivniji histamin-producirajući mikroorganizam pokazao se *Morganella morganii*, a prisutni su još *Enterobacter agglomerans* i *Enterobacter cloacae*. Zaključeno je kako fizičko oštećenje tune tijekom ulova i rukovanja ne povećava količinu histamina već se povećava broj prisutnih mikroorganizama što utječe na mikrobiološku kontaminaciju. Zadovoljavajući je podatak da se broj histamin-producirajućih bakterija nije promijenio tijekom transporta na ledu. Međutim, postoji rizik od rasta histamin-producirajućih bakterija tijekom procesiranja.

## 2.7. METODE DETEKCIJE HISTAMINA

Obzirom da je histamin globalan problem, a trovanja uzrokovana njime predstavljaju veliki problem, detekcija samog spoja u proizvodima ribarstva je intenzivno istraživana. Nužno je razvijen izuzetno velik broj analitičkih metoda za analizu histamina literaturno prikazanih od strane Lehane i Olley (2000), Hungerford (2010) te FAO/WHO (2013.), a te metode temelje se na kromatografskim postupcima. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) najčešće je primjenjivana metoda za analizu histamina. Temelji se na ekstrakciji histamina iz tkiva ribe odgovarajućim otapalom. Nakon ekstrakcije, nužno je provesti derivatizaciju tj. reakciju s reagensom kako bi nastao kompleks koja ima izraženu apsorpciju svjetlosti u UV dijelu spektra. Nastali kompleks se zatim odvaja na kromatografskoj koloni te se imidazolni prsten histamina detektira pomoću DAD ili UV detektora. Metoda koju su razvili Malle i sur. (1996) spada u ovu skupinu metoda, a uredba EZ 2073/2005 ju navodi kao referentnu metodu za određivanje udjela histamina u proizvodima ribarstva. Nedavna studija od strane Europske Unije usporedila je metode detekcije histamina preporučene od strane Codexa i same Unije te naišla na podcijenjene tj. precijenjene rezultate. Kako bi se riješio taj problem, Evangelista i sur. (2016) ispitivali su jednostavnu metodu detekcije histamina primjenom HPLC metode u kombinaciji s derivatizacijom poslije separacije na kromatografskoj koloni te fluorimetrijskom detekcijom. Metoda je optimirana i validirana za određivanje histamina u ribi te zadovoljava kriterije Europske Komisije. Primijenjena je na slatkovodnoj ribi, svježoj i konzerviranoj tuni. Opisana metoda pokazala se pogodnom u svrhu kvantifikacije histamina u laboratorijskim uvjetima te osiguravanju kvalitete i sigurnosti ribe prilikom trgovine.

Osim primjene HPLC-a, ostale skupine laboratorijskih metoda za detekciju histamina uključuju ionsku kromatografiju, kapilarnu elektroforezu, tankoslojnu kromatografiju, fluorometrijske metode, plinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom (LC-MS) no zadnje dvije nisu široko primjenjive zbog toga što se isti rezultati mogu ostvariti mnogo jeftinijim instrumentima. Prednosti laboratorijskih metoda su robusnost, ponovljivost, preciznost i točnost, no njihova primjena je uglavnom ograničena na analitičke laboratorije (u znanstvene ili regulatorne svrhe). Problem njihove primjene u industrijskim kontrolnim laboratorijima predstavljaju činjenice da je za njihovu provedbu potrebna izrazito skupa laboratorijska oprema i instrumenti koji zahtijevaju skupo održavanje te osoblje koje je specifično educirano za rad na

takvoj opremi. Osim toga, postupak pripreme uzoraka za sve ove metode je vrlo složen i dugotrajan (nekoliko sati) te nije moguće u realnom vremenu analizirati dovoljan broj uzoraka kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu ribe.

S ciljem rješavanja navedenog problema kontrole sadržaja histamina u industriji, razvijeno je nekoliko brzih metoda za određivanje histamina koje su uglavnom bazirane na različitim enzimatskim metodama (ELISA). Opremu potrebnu za provođenje ovih metoda može se nabaviti na tržištu u obliku različitih kvalitativnih i kvantitativnih kitova koji sadrže sve potrebne reagense i spektrofotometar kojim se može očitati intenzitet boje na osnovu čega se kvantificira histamin u uzorku. Cijene ovakvih kitova su itekako niže od cijena opreme potrebne za provedbu laboratorijskih metoda, ali imaju nedostatak jer je sva oprema osim spektrofotometra predviđena za jednokratnu upotrebu, a u slučaju velikog broja analiza ukupni troškovi mogu postati značajni. Međutim, najbitniji nedostaci ovih metoda su smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenima soljenjem i dozrijevanjem u salamuri te činjenica da i ove metode zahtijevaju različite postupke pripreme uzoraka. Kitovi za ove analize su prijenosni ali nisu prikladni za analize van laboratorija. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina prikazana je u Tablici 2.

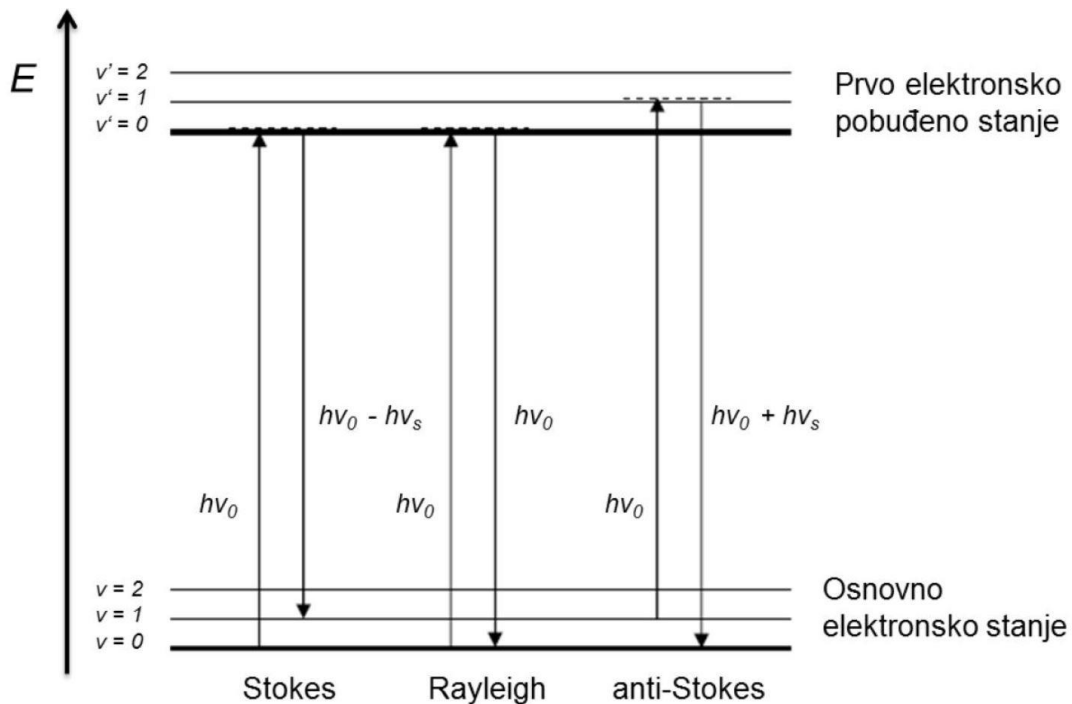
Tablica 2. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina (FAO / WHO, 2013)

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

### 2.7.1. Raman spektroskopija

Ramanova spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika koja se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s vibracijskim modovima molekule (Long, 2002; Ferraro, 2003). Molekulske vibracije aktivne u Ramanovom spektru su one pri kojima dolazi do promjene polarizabilnosti molekule. Kada foton stupa u interakciju s molekulom analita, dolazi do polarizacije elektronskog oblaka tj. pobuda u virtualna energetska stanja. U vrlo kratkom vremenu nakon toga (10-14 s), molekula se vraća u osnovno stanje emitirajući foton. U tom procesu razlikuju se tri načina raspršenja koja su prikazana na slici 2:

- Rayleighovo raspršenje je elastično raspršenje zračenja pri kojem ne dolazi do promjene energije tj. valne duljine pobuđenog i raspršenog zračenja
- Stokesovo raspršenje je pojava kada je početni vibracijski nivo molekule u osnovnom elektronskom stanju niži od vibracijskog nivoa u koji se molekula vraća nakon emisije fotona, a emitirani foton je veće valne duljine od pobudnog fotona
- Anti – Stokesovo raspršenje obuhvaća pobudu molekule iz višeg vibracijskog nivoa te njezino vraćanje u niži vibracijski nivo osnovnog elektronskog stanja, prilikom čega emitirani foton ima manju valnu duljinu od pobudnog



Slika 2. Shematski prikaz različitih tipova raspršenja svjetlosti na molekuli pobuđenoj fonom (Vandenabeele, 2013)

Za razliku od navedenih, Ramanovo raspršenje podrazumijeva neelastično raspršenje pri kojem se valna duljina raspršenog zračenja razlikuje od valne duljine pobudnog zračenja a emitirani foton može imati manju ili veću valnu duljinu od pobuđenog fotona. Ova pojava Ramanovog raspršenja je vrlo slabog intenziteta budući da je takav proces manje vjerojatan od Rayleighovog raspršenja te je tek jedan od  $10^7$  raspršenih fotona Stokes raspršen, dok je u pravilu 1 od  $10^4$  fotona Rayleigh raspršen (Singh, 2002). Intenzitet anti – Stokesovog raspršenja još je manji, budući da se prema Boltzmanovoj raspodjeli većina molekula pri sobnoj temperaturi nalazi u osnovnom elektronskom stanju dok se vrlo mali broj nalazi u višim nivoima osnovnog elektronskog stanja. Iz te činjenice se povlači zaključak da je pri sobnoj temperaturi Ramanov proces temeljen na Stokesovom raspršenju vjerojatniji od anti – Stokesovog raspršenja. Pomak u valnim duljinama Stokesovog i anti - Stokesovog raspršenja je jednak ali usmjeren na suprotne strane u odnosu na Rayleighovo raspršenje te su Stokesov i anti-Stokesov spektar molekule simetrični u odnosu na valnu duljinu pobudnog zračenja. Ipak je anti-Stokesov spektar manjeg intenziteta pa se zato u Ramanovoj spektroskopiji uobičajeno se prikazuje samo Stokesova polovica spektra.

### 2.7.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS)

Zbog slabe osjetljivosti metode Raman spektroskopije, Albrecht i Creighton (1977) te Jeanmaire i Van Duyne (1977) su teorijski objasnili navedeni problem ali i efekt površinski pojačanog Ramanovog raspršenja, koji je otkriven 1974. godine kada je primijećeno da je Ramanov spektar molekule piridina adsorbirane na srebrnu elektrodu visokog intenziteta što se smatra neobičnim (Fleischmann i sur., 1974, McQuillan, 2009). Istraživanje površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS-a) proširilo se uz srebro, i na druge metale - zlato, bakar, platinu, aluminij i alkalijske metale, te se zajedno sa srodnom granom plazmonike značajno razvilo. Pojačanje Ramanovog signala javlja se zbog povećanja presjeka Ramanovog raspršenja na molekulama koje su adsorbirane ili se nalaze u neposrednoj blizini metalnih nanostrukture (SERS supstrata) (Fleischmann i sur., 1974; Jeanmaire i Van Duyne, 1977). Sam mehanizam pojačanja Ramanovog raspršenja nije u potpunosti razjašnjen ali su Yuen i sur. (2008) opisali kako je općenito prihvaćeno da je to pojačanje posljedica elektromagnetskog mehanizma pojačanja kod kojeg je molekula u blizini metalne površine

pod utjecajem znatno snažnijeg električnog polja, ali i kemijskog mehanizma koji se temelji na promjeni polarizabilnosti zbog interakcije molekule i metalne površine. Za intenzivan razvoj SERS tehnike koji je uslijedio, prvenstveno je zaslužna njena visoka osjetljivost koja omogućava detekciju analita u vrlo niskim koncentracijama. Osim toga, ova metoda je široko primjenjiva u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti, a dodatna prednost SERS spektroskopije očituje se u eliminaciji fluorescencije zbog prijenosa energije s molekule na metal (Etchegoin i Le Ru, 2010). Iz ovih razloga, SERS metoda je idealna tehnika za istraživanje i analizu različitih kemijskih i bioloških uzoraka.

### 2.7.3. Detekcija histamina primjenom SERS-a

Zbog strukturne sličnosti između histidina i histamina, klasične fluorimetrijske metode korištene za detekciju histamina smatraju se slabo selektivnima za histamin, čak i uz pomoć HPLC. Metode bazirane na enzimskim reakcijama (ELISA) zahtijevaju korištenje nestabilnih enzima i skupih test kitova. Imajući u vidu visoku osjetljivost SERS metode, Gao i sur. (2015) predstavili su brzu, isplativu i povjerljivu metodu detekcije histamina u tuni. Molekulski otisnuti polimeri (MIP) sintetizirani su kao umjetna antitijela histaminu na temelju interakcije histamina i funkcionalnog monomera (metakrilna kiselina). Polivinil klorid (PVC) je korišten kao imobilizator MIP-a, a dobiveni film MIP-PVC ima svrhu separacije histamina iz tune. Nakon toga, histamin se otpušta na temelju ionske izmjene kako bi stupio u interakciju sa SERS supstratom. Kao SERS supstrat (nanočestice plemenitog metala ili nanostupanjska hrapavost površine) korištena je koloidna otopina zlata. Opisani postupak pokazao se brzim i pouzdanim za detekciju histamina u tuni u rasponu od 3 do 90 ppm. Slično opisanoj metodi, Janči i sur. (2017) detektirali su histamin u ribi pomoću SERS-a ali korištenjem srebra koloida kao SERS supstrata. Histamin je ekstrahiran 0.4M perkloratnom kiselinom, pročišćen 1-butanolom čime je priprema uzoraka svedena na vrijeme od 30 min, a dobiven je jasan SERS spektar s karakterističnim Raman vrpcama histamina. Ovom metodom omogućena je detekcija histamina u svježoj ribi u rasponu 0-200 mg/kg.

Davis i sur. (1992) objašnjavaju kako SERS spektar histamina pri -0.8 i -0.5 V upotrebom Ag/AgCl elektrode ne ovisi o pH. Vibracijski spektar pokazuje da je histamin adsorbiran u svojoj neutralnoj formi pri navedenim potencijalima. Imidazolni prsten je orijentiran okomito na površinu elektrode pri -0.8 V i počinje naginjati prema više paralelnom

pri -0.5 V. Histamin je pri ovim potencijalima u obliku tautomera 1 te vjerojatno funkcionira kao bidentatni ligand koordiniran prema srebru kroz piridinski dušik N3 i bočni lanac etilamina. Pri -0.3 V prsten postaje paralelno orijentiran te se etilamin bočni lanac približava površini elektrode. U neutralnim i lužnatim otopinama, histamin ostaje nenabijen i koordiniran je kroz terminalni amin. Kod pH 4.3, terminalni amin postaje protoniran što rezultira malom promjenom orijentacije bočnog etilamin lanca na površini elektrode.

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Janči i sur. (2017) razvili su brzu i osjetljivu metodu detekcije histamina u ribi. Ta metoda temeljena je na spektroskopiji površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) prilikom koje se koristi jednostavan i široko dostupan srebrni koloid kao supstrat. SERS spektar prikazao je karakteristične Raman vrpce koje pripadaju histaminu. Imajući u vidu kratko vrijeme pripreme uzoraka za analizu, cilj ovog istraživanja je validirati metodu na uzorku tune te time omogućiti jednostavno, brzo i precizno određivanje histamina u tuni.

### **3.2. MATERIJALI**

#### 3.2.1. Uzorci ribe

Svježi fileti žutoperajne tune (*Thunnus albacares*) nabavljeni su na ribarnici te su nakon dopremanja u laboratorij usitnjeni ručnim sjekačem. Usitnjeni fileti podijeljeni su u 10 grupa i ostavljeni na sobnoj temperaturi tijekom 0, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40, 48 i 50 sati kako bi došlo do prirodnog formiranja histamina. Po isteku određenog vremena čuvanja na sobnoj temperaturi, uzorci su zamrznuti na  $-18^{\circ}\text{C}$  i čuvani do daljnje analize.

#### 3.2.2. Kemikalije

Standard histamina:

- Histamin- dihidroklorid (Histamine dihydrochloride), Sigma chemical Co., Saint Louise, SAD



### 3.2.3. Reagensi

- Dansyl-klorid, 98%, Acros organics, New Jersey, SAD
- Imidazol, 99%, Acros organics, New Jersey, SAD
- Zasićena  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Gram- mol, Hrvatska
- 0,4 M perkloratna kiselina ,Carlo Erba reagents, Francuska
- L-prolin, 99%, Acros organics, New Jersey, SAD
- Toluen, HPLC grade, J.T. Baker, Nizozemska
- NaCl, Kemika, Hrvatska
- 5 M NaOH, J. T. Baker, Nizozemska
- 1-butanol, Kemika, Hrvatska
- Srebrov nitrat, Kemika, Hrvatska
- Trinatrijev citrat dihidrat, Kemika, Hrvatska
- Natrijev borhidrid, Carlo Erba, Francuska

### 3.2.4. Mobilna faza

- Acetonitril - ACN, Kemika, Hrvatska
- Destilirana voda

Sve korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. U svim pokusima korištena je deionizirana voda otpornosti 18 M $\Omega$ cm.

### 3.2.5. Laboratorijska oprema

Laboratorijsko posuđe:

- plastične kivete, Hrvatska
- propipetor, Brand, Njemačka
- mikropipetori od 100 – 1000 µl, Brand, Njemačka
- staklene bočice (vial) za HPLC - 20 ml, Agilent, Njemačka
- odmjerna tikvica 50 mL, Hrvatska
- plastične vial
- laboratorijske čašice – 10 ml i 50 ml, Hrvatska
- staklena pipeta 20 mL, Hrvatska
- filter papir, Whatman nr.4
- sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) Agilent 2500 Series LC (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, SAD)
- analitička vaga Kern, Njemačka
- homogenizator Ultra turax T-18, IKA-Labortechnik, Njemačka

### 3.3. METODE RADA

#### 3.3.1. Određivanje histamina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Određivanje biogenih amina provedeno je po metodi Malle i sur., 1996.

##### Priprema otopine standarda

Određena masa standarda histamina tj. histamin-dihidroklorid otopljen je u vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL. Dobivena stock otopina je razrijeđena kako bi se dobile otopine s koncentracijama histamina 0, 10, 50, 100, 200, 400, 600 i 1000 mg/kg uzorka. U svaki uzorak je dodan imidazol kao interni standard. Dobiveni rezultati korišteni su za izradu baždarne krivulje.

##### Priprema mobilne faze

Prilikom kromatografske analize, kao mobilna faza korištena je mješavina acetonitrila i destilirane vode. U mobilnoj fazi A, omjer destilirane vode i acetonitrila bio je 40:60, dok je mobilnu fazu B činio čisti acetonitril. Kako bi se izbjeglo moguće oštećenje kromatografske kolone i povećala preciznost rezultata, otopine su prije upotrebe deaerirane u ultrazvučnoj kupelji kroz 20 minuta.

##### Kromatografski uvjeti

Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) koristeći HPLC sustav Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany). Uvjeti kromatografije su sljedeći:

Stacionarna faza	LiChrospher 100 RP-18, 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm I.D. (Merck, Njemačka)
Mobilne faza	A- voda:acetonitril 40:60 (v:v) B- acetonitril
Eluiranje	gradijentno

Gradijent je prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Odnos dviju mobilnih faza tijekom gradijentnog eluiranja

Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
0	100	0
6	62,5	37,5
8	62,5	37,5
13	12,5	87,5
20	12,5	87,5
20,01	100	0
30	100	0

Protok 1 ml/min

Detektor DAD, valna duljina 254 nm, ref. vrijednost 550 nm, Bw 80 nm

Temperatura kolone 25<sup>0</sup> C

Injektirani volumen 20 µL

Kvalitativna analiza histamina provedena je usporedbom retencijskog vremena Rt (vrijeme zadržavanja na koloni) analiziranog spoja s retencijskim vremenom standarda. Kvantitativna analiza je provedena pomoću baždarne krivulje koja prikazuje ovisnost stvarne koncentracije histamina o omjeru površine ispod pikova histamina i internog standarda. Prikazana je i jednadžba pravca čiji koeficijent determinacije iznosi 0.9995.

### Priprema uzoraka

5 grama uzorka odvagano je u plastičnu kivetu pa mu je dodano 500 µl internog standarda i 20 ml 0.4 M HClO<sub>4</sub>. Sve zajedno je homogenizirano na Ultraturax-u kroz 2 min na maksimalnoj brzini. Zatim je homogenizirani uzorak prebačen u odmjernu tikvicu od 50 ml, nadopunjen do oznake kiselinom i vraćen u plastičnu kivetu. Uzorak je filtriran preko filter papira a 100 µl supernatanta je odpipetirano u plastičnu vialu te mu je dodano 200 µl zasićene otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 500 µl otopine dansil-klorida koji je prethodno svježe pripremljen. Smjesa je dobro promiješana na vortexu i ostavljena u mraku preko noći. Idući dan je dodano 100 µl L-prolina, promiješano na vortex-u i ostavljeno pola sata u mraku. Zatim je dodano 500 µl toluena, ponovo promiješano na vortexu i ostavljeno da se odvoje slojevi. 200 µl gornjeg sloja je odpipetirano u vialu te upareno do suha u struji dušika, a takav suhi uzorak otopljen je u 200 µl acetonitrila, promiješan, prebačen u insert za vialu i stavljen na kromatograf.

Provjera baždarnog dijagrama provedena je pomoću otopina B1, B2, B3 i slijepa probe. Pripremljene otopine tretirane su na isti način kao i uzorci – 100 µl otopine, 200 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i 500 µl dansil-klorida promiješano je na vortexu i ostavljeno u mraku preko noći.

Otopina B1: 200 µl stock otopine histamina i 1 ml otopine internog standarda pipetirano je u odmjernu tikvicu od 100 ml i dopunjeno vodom do oznake.

Otopina B2: 2 ml stock otopine histamina i 1 ml otopine internog standarda pipetirano je u odmjernu tikvicu od 100 ml i dopunjeno vodom do oznake.

Otopina B3: 2 ml stock otopine histamina i 500 µl otopine internog standarda pipetirano je u odmjernu tikvicu od 50 ml i dopunjeno vodom do oznake.

Slijepa proba: 50 µl otopine internog standarda pipetirano je i dopunjeno do 5 ml sa HClO<sub>4</sub>

Prilikom analize uzoraka pripremljen je još jedan uzorak više i u njega je dodano 2 ml stock otopine histamina te je nakon analize izračunat „recovery“ koji treba biti u granicama R% = 80 – 120 %.

### 3.3.2. Određivanje histamina Raman spektroskopijom

#### Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC)

Koloidna suspenzija srebra AGC pripremljena je redukcijom srebrovog nitrata s trinatrijevim citratom prema modificiranom Lee - Meiselovom postupku (Lee i Meisel, 1982). 90 mg srebrovog nitrata otopljeno je u 500 mL deionizirane vode i zagrijano do vrenja (120 °C) u trogloj tikvici koja se nalazila na uljnoj kupelji. U vruću otopinu dodana je 50 mL 1%-tne otopine trinatrijevog citrata te je reakcijska smjesa intenzivno miješana 90 minuta uz refluks i propuhivanje dušikom. Otopine je potom ostavljena da se hladi do sobne temperature uz konstantno miješanje.

#### Priprema uzoraka

Priprema uzoraka za analizu Raman spektroskopijom opisana je u radu Janči i sur. (2016).

5 grama uzorka odvagano je u plastičnu kivetu, dodano je 20 ml 0.4 M HClO<sub>4</sub> te je sve dobro homogenizirano na Ultraturax-u kroz 2 min na maksimalnoj brzini. Smjesa je prebačena u odmjernu tikvicu od 50 ml, dopunjena do oznake kiselinom i vraćena nazad u plastičnu kivetu pa je filtrirana preko filter papira. 2 ml filtrata je odpipetirano u staklenu epruvetu u kojoj je prethodno odvagano 1,4 g NaCl, a zatim je dodano 0,4 ml 5M NaOH i 2 ml 1-butanola. Sve je miješano na tresilici na 70 rpm kroz 10 min a nakon što su se slojevi odvojili, iz gornjeg sloja je 100 µl odpipetirano u plastičnu vialu te upareno do suhog u struji dušika. Dobiveni suhi uzorak je ponovno otopljen u 80 µl AGC koloida, 10 µl destilirane vode i 10 µl agregirajućeg sredstva (0,23 mol/L NaBH<sub>4</sub>).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U području kontrole sigurnosti hrane kod određivanja udjela histamina ima još mnogo prostora za unaprjeđenje kako bi se sama kontrola mogla vršiti u realnim uvjetima proizvodnje što češće i na što većem broju uzoraka. Značajan doprinos realizaciji tog cilja daje Raman spektroskopija točnije, spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS).

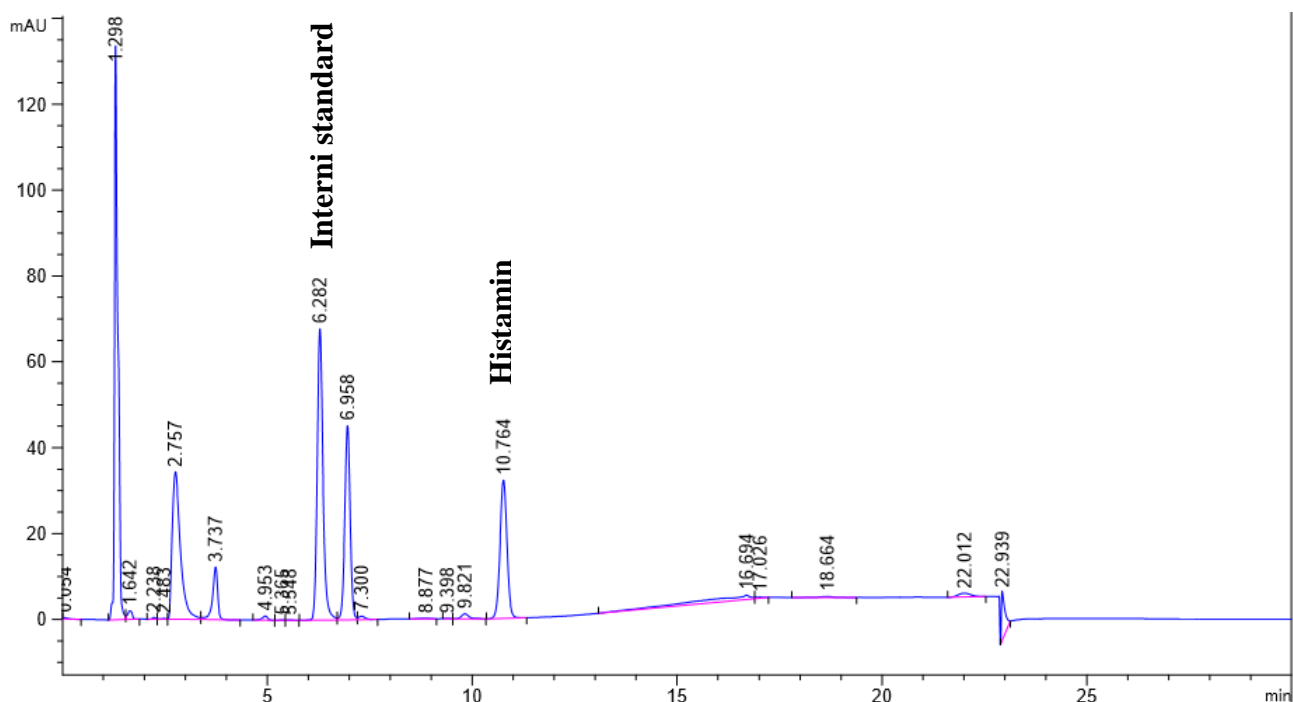
Ovaj rad proveden je u sklopu istraživanja mogućnosti primjene Raman spektroskopije za analizu histamina u ribi i proizvodima od ribe. Nakon zadovoljavajućih rezultata dobivenih prilikom analize skuše, željelo se validirati korištenu metodu na uzorku žutoperajne tune. Stoga je svrha ovog rada bila utvrditi udio histamina u uzorcima žutoperajne tune nakon 0, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40, 48 i 50 sati kvarenja na sobnoj temperaturi te dobivene rezultate usporediti s referentnom HPLC metodom pa na taj način utvrditi točnost nove metode.

U ovom poglavlju prikazani su rezultati analize Raman spektroskopijom čiji protokol je opisan ranije u poglavlju 3.3.2. te su prikazani kao srednja vrijednost dvaju paralelnih određivanja  $\pm$  standardna devijacija.

Eksperimentalni podaci dobiveni mjerenjem obrađeni su u MS Excel programu te pomoću tih rezultata su dobivene vrijednosti za odstupanje Raman rezultata od rezultata dobivenih referentnom metodom (HPLC).

#### 4.1. REZULTATI KROMATOGRFSKE ANALIZE

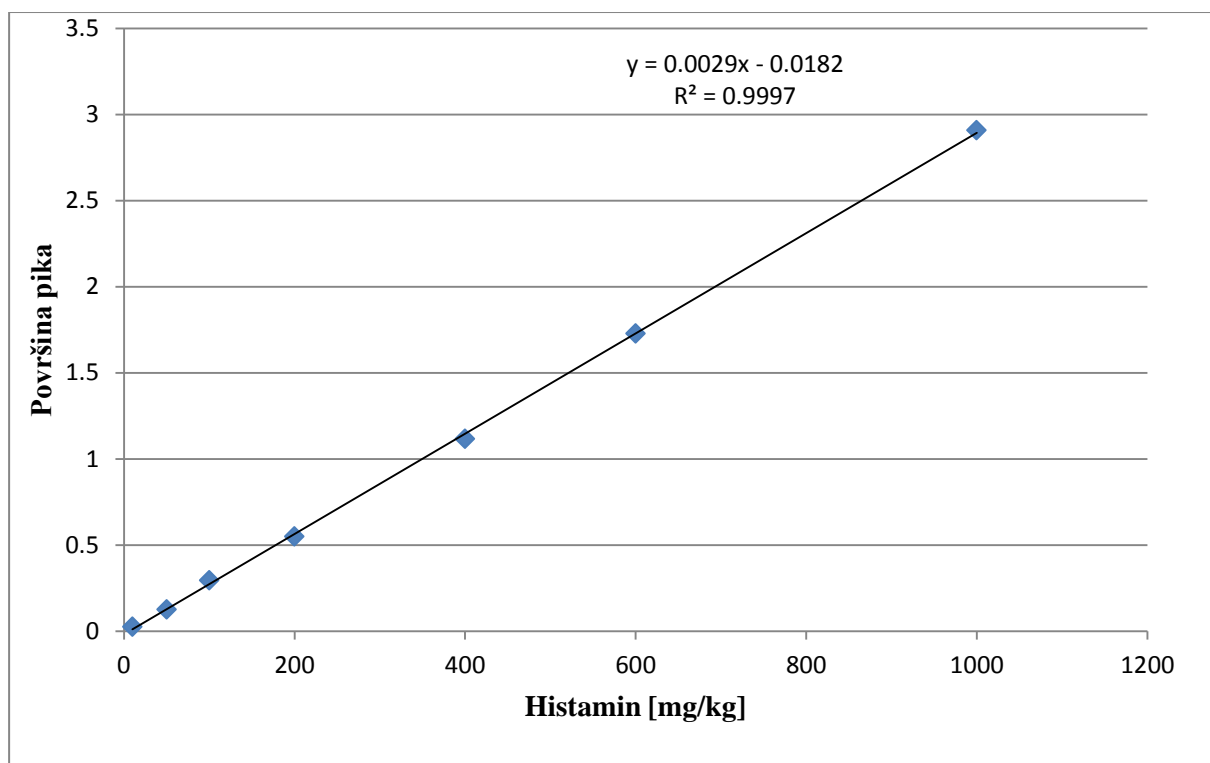
Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti započeta je pripremom standardnih otopina histamina različitih koncentracija kojima je dodan imidazol, interni standard s ciljem izrade baždarnog pravca. Spojevi su identificirani na temelju retencijskog vremena. Na slici 3 prikazano je retencijsko vrijeme internog standarda koje iznosi 6,282 min te retencijsko vrijeme histamina  $R_t = 10,764$  min



Slika 3. Kromatogram otopine internog standarda (imidazola) i histamina koncentracije 250 mg/kg

Sama baždarna linija konstruirana je primjenom linearne regresije iz odnosa koncentracije histamina i omjera površine pikova histamina i internog standarda te je prikazana na slici 4 dok su rezultati krivulje prikazani u tablici 3.





Slika 4. Baždarna krivulja histamina dobivena HPLC metodom

Tablica 3. Rezultati ovisnosti površine pika histamina o koncentraciji pripremljene otopine dobiveni regresijskom analizom

Jednadžba pravca	$y = 0,0029x - 0,0182$
Nagib	0,0029
Odsječak	-0,0182
Broj mjerenja	7
Koeficijent linearne regresije	0,9997

## 4.2. REZULTATI ANALIZE RAMAN SPEKTROSKOPIJE

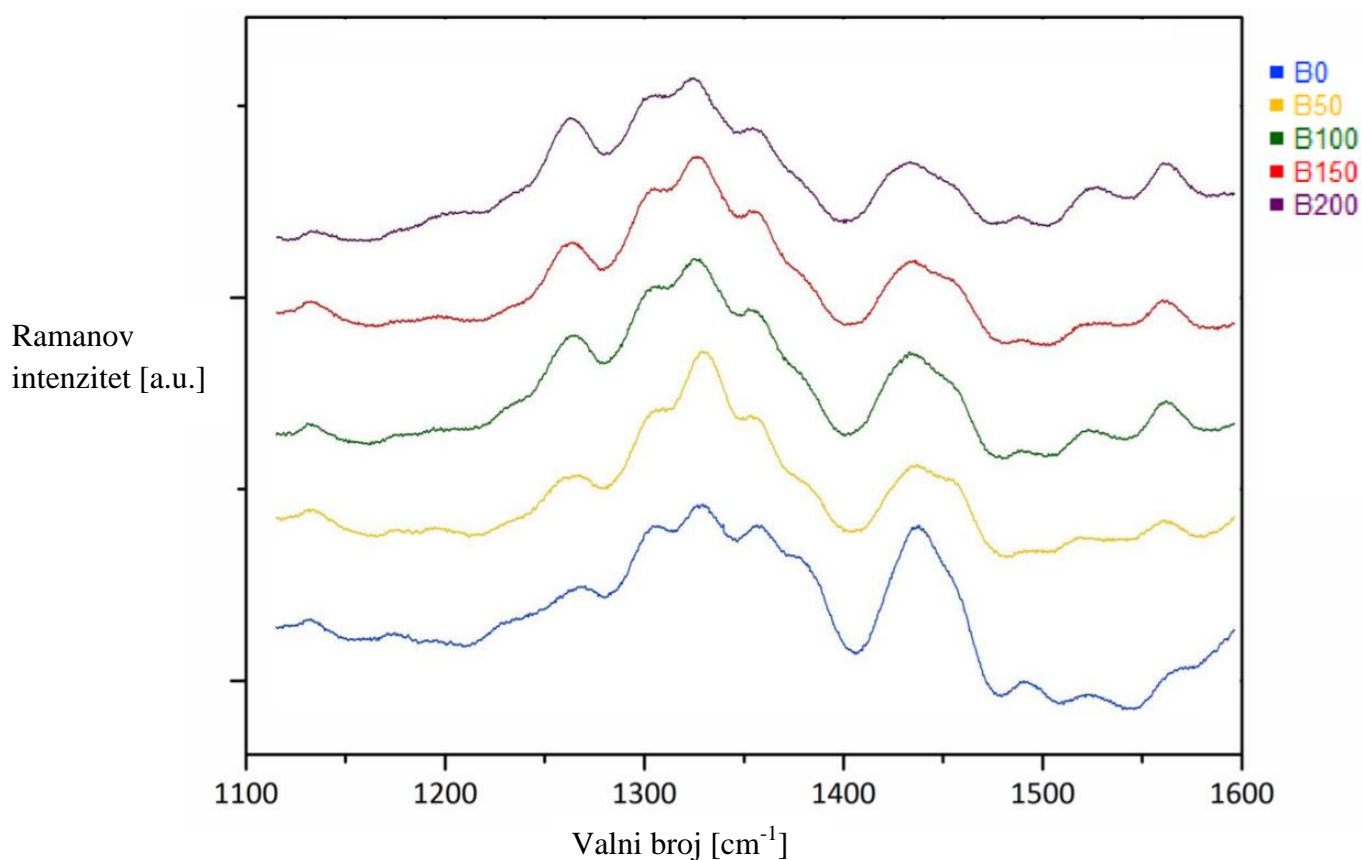
Analiza je započeta pripremom baždarnih uzoraka s dodanim koncentracijama histamina kako je prikazano u tablici 4. Za izradu kalibracijskih modela korištene su srednje vrijednosti (10 mjerenja za svaku koncentraciju) intenziteta vrpce histamina na 1264 i 1570  $\text{cm}^{-1}$  te je baždarni pravac konstruiran metodom linearne regresije. Valjanost kalibracijskih modela procijenjena je na osnovi koeficijenta linearne regresije ( $R^2$ ). Za provjeru (ili validaciju) kalibracijskih modela pripremljeni su realni uzorci tune u kojima je histamin nastao prirodnim putem. Za svaki uzorak provedena su 4 paralelna mjerenja pri čemu je kod svakog mjerenja snimljeno 5 spektara te je kao rezultat uzeta srednja vrijednost intenziteta karakterističnih vrpce histamina na 1264 i 1570  $\text{cm}^{-1}$ . U navedenim spektrima mogu se uočiti jasne vrpce histamina čiji intenzitet raste proporcionalno koncentraciji histamina u uzorku.

Tablica 4. Koncentracije histamina za izradu baždarne krivulje SERS metodom

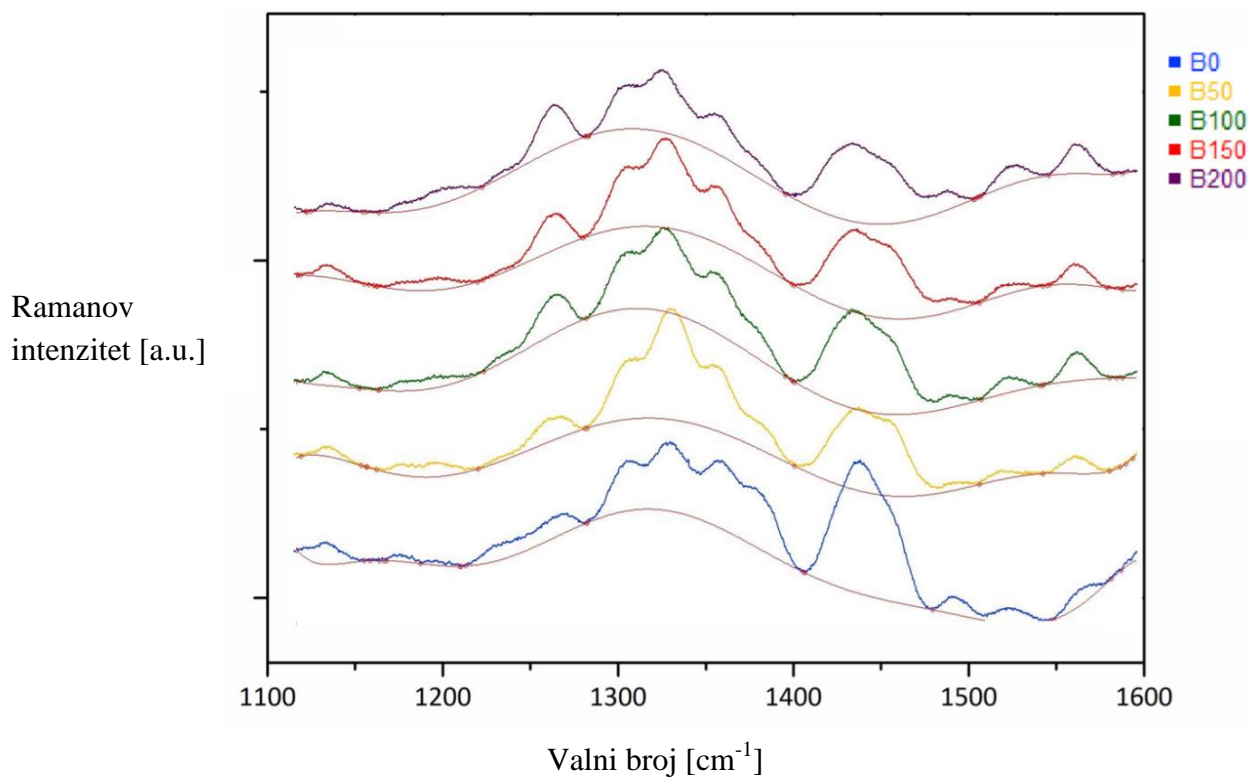
<b>Uzorak</b>	Histamin [mg/kg]
<b>B0</b>	0
<b>B25</b>	25
<b>B50</b>	50
<b>B75</b>	75
<b>B100</b>	100
<b>B125</b>	125
<b>B150</b>	150
<b>B175</b>	175
<b>B200</b>	200
<b>B250</b>	250
<b>B300</b>	300

#### 4.2.1. Obrada SERS rezultata

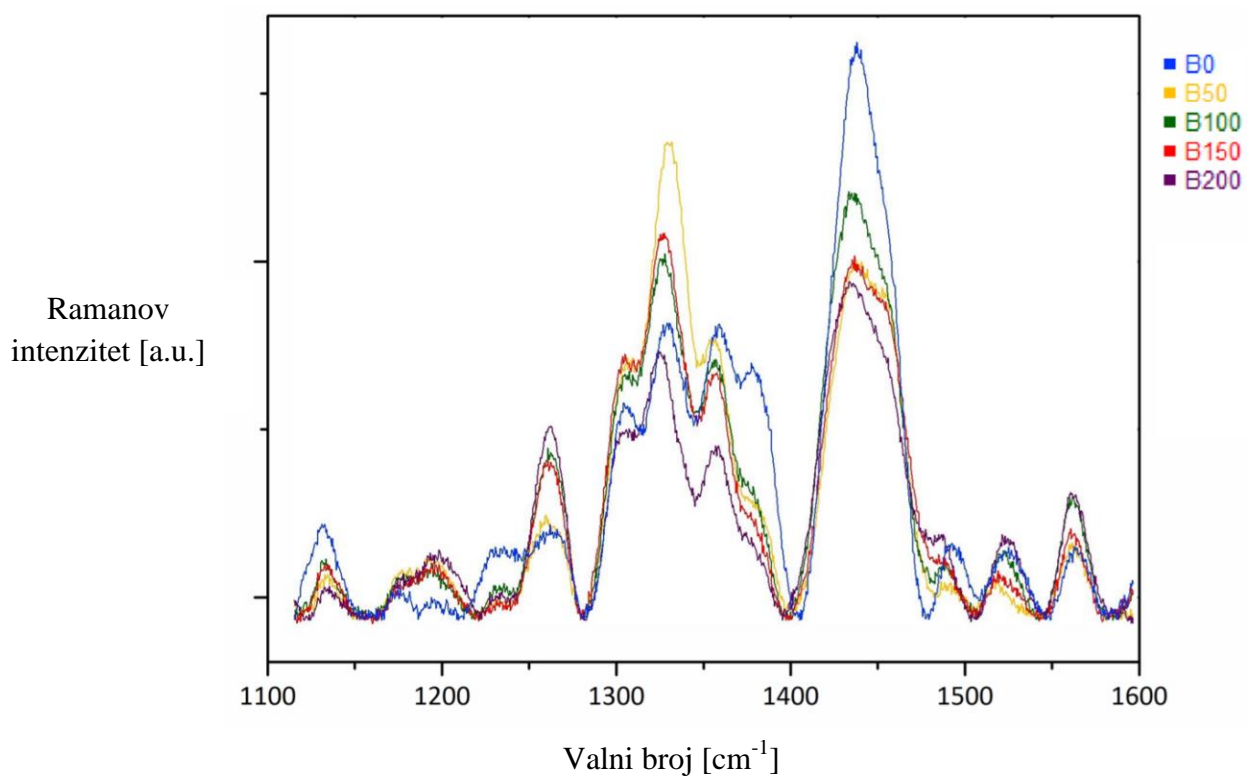
Prije izrade kalibracijskih modela snimljeni SERS spektri obrađeni su u programu LabSpec 6 (Horiba Scientific). Korekcija pozadinskog signala provedena je „baseline correction“ funkcijom programa na način da je automatski odabrano 40 reprezentativnih točaka u SERS spektru kojima je prilagođen polinom 9. stupnja (eng. curve fitting). Procijenjeni pozadinski signal oduzet je od snimljenog spektra. Kako bi se povećao omjer signala i šuma, SERS spektri su izgladeni (eng. spectral smoothing) primjenom Savitzky – Golay algoritma sa širinom prozora  $W = 20$  i redom interpolacijskog polinoma  $M = 2$ . Ovako obrađeni spektri normalizirani su pri čemu je kao interni standard korišten intenzitet vrpce na  $1437\text{ cm}^{-1}$ , prethodno asigniran citratnim ionima prisutnim u AGC koloidu. Isprobano je više načina predobrade spektara ali su najbolji rezultati dobiveni upravo opisanom obradom koja je grafički prikazana na slikama 5 do 9.



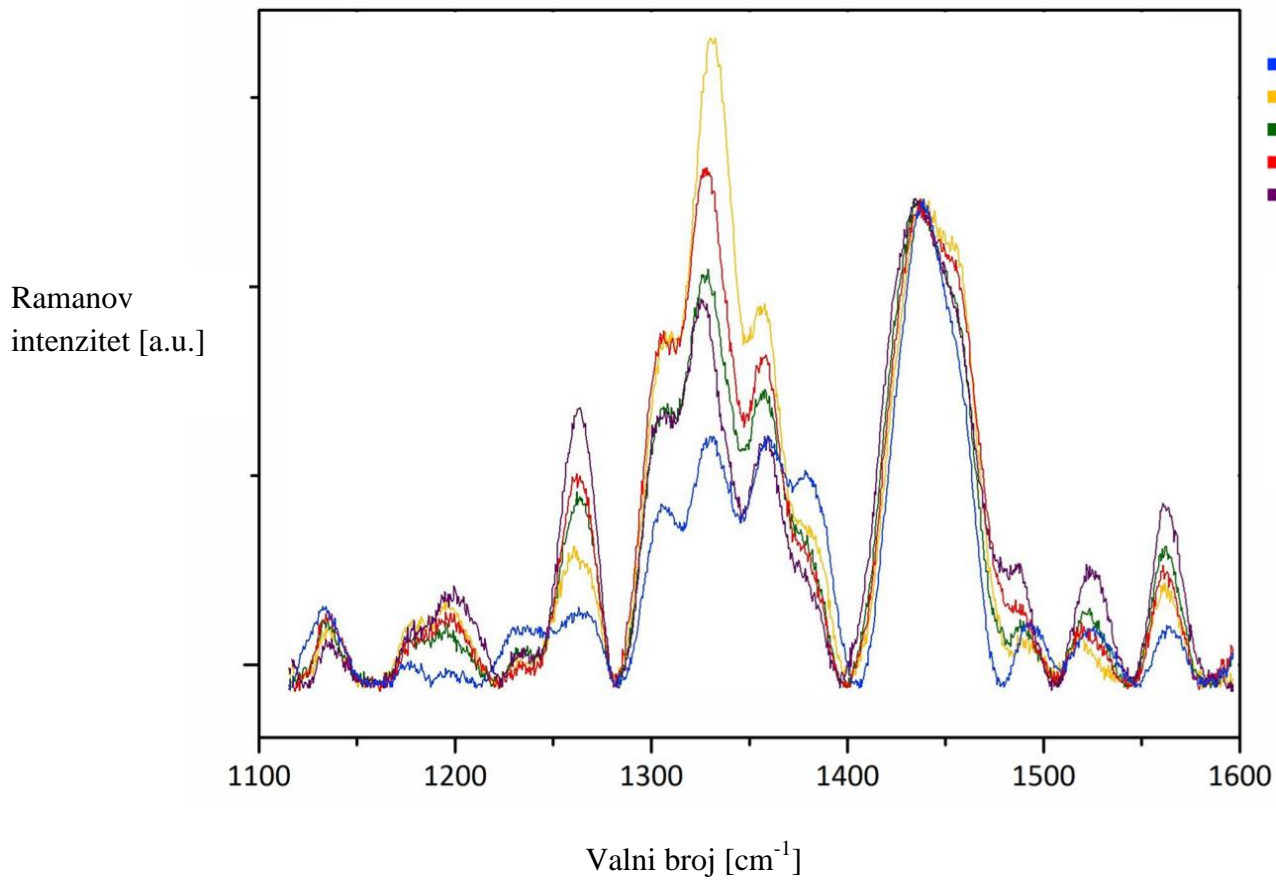
Slika 5. Neobrađeni SERS spektar



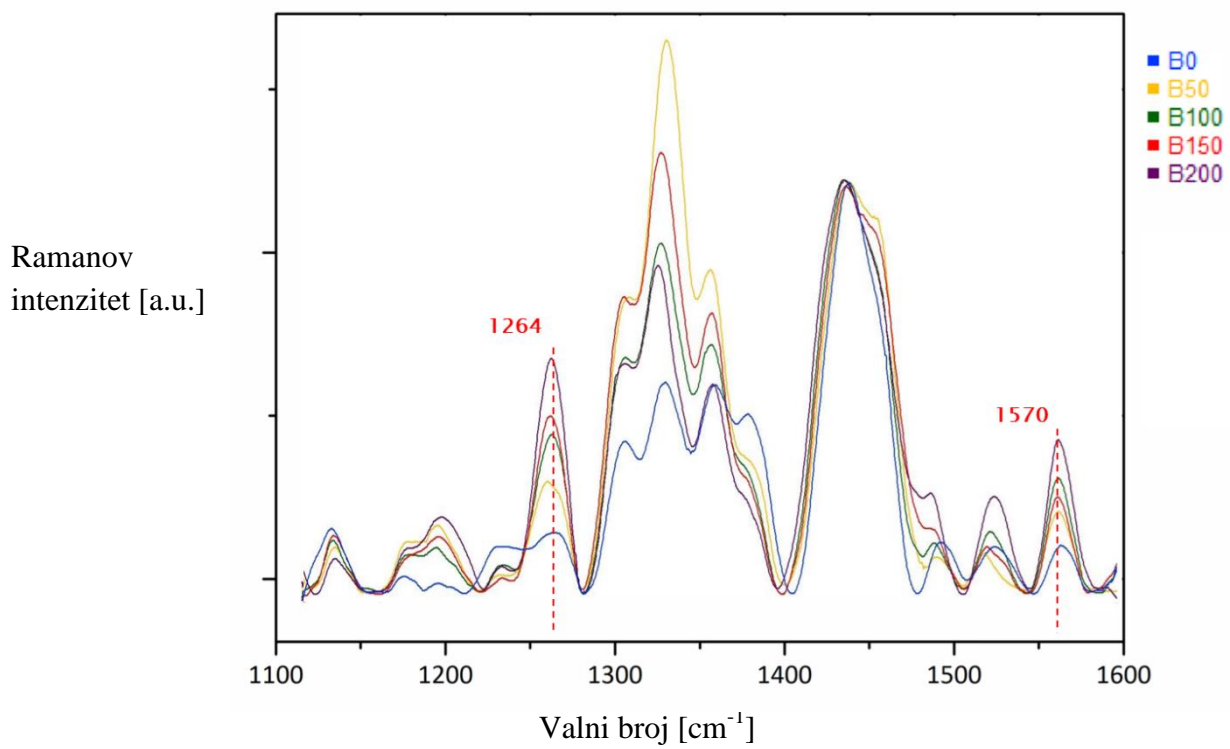
Slika 6. Korekcija pozadinskog signala - aproksimacija bazne linije



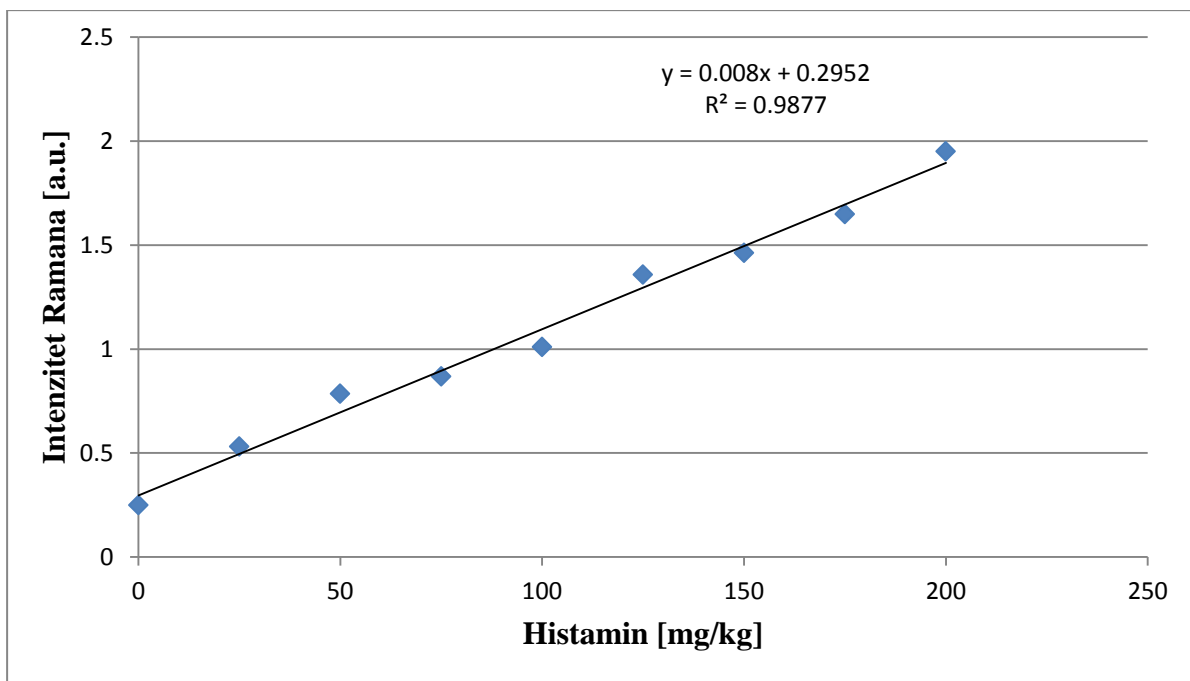
Slika 7. Korekcija pozadinskog signala - oduzimanje aproksimiranog signala



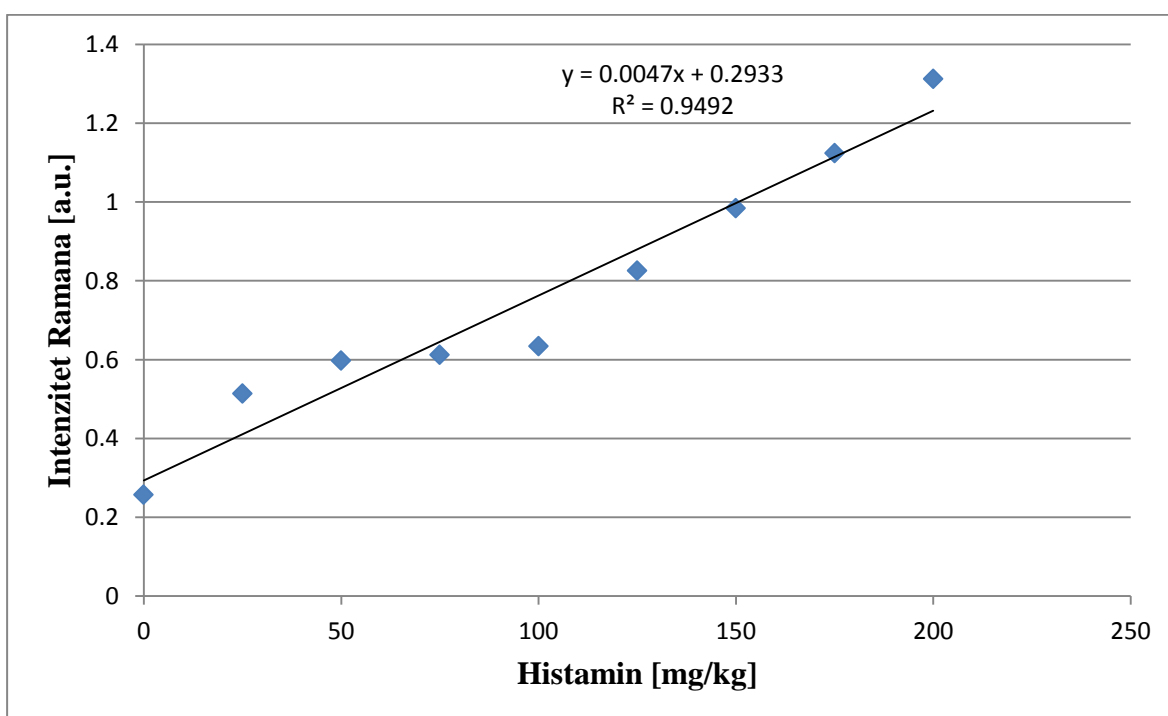
Slika 8. Normalizacija spektra



Slika 9. Korekcija šuma



Slika 10. Baždarni model konstruiran na temelju intenziteta karakteristične vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$



Slika 11. Baždarni model konstruiran na temelju intenziteta karakteristične vrpce histamina na  $1570\text{ cm}^{-1}$

Budući da su u SERS spektru histamina vrpce na 1264 i 1570  $\text{cm}^{-1}$  najvećeg intenziteta, navedene vrpce su odabrane za daljnja ispitivanja i konstrukcije kalibracijskih modela koji su prikazani na slikama 12 i 13. Iz tog razloga su sva naknadna mjerenja provedena na spektralnom području od 1050 – 1650  $\text{cm}^{-1}$  čime je značajno skraćeno vrijeme potrebno za snimanje SERS spektara te je umanjen utjecaj ovisnosti intenziteta spektra o vremenu mjerenja. Kako bi se u potpunosti eliminirale oscilacije intenziteta spektara u ovisnosti o vremenu, vrpca na 1437  $\text{cm}^{-1}$  korištena je kao interni standard za normalizaciju spektara. Nakon obrade rezultata, koeficijent linearne regresije  $R^2$  pokazao je kako je kalibracijski model na 1264  $\text{cm}^{-1}$  vjerodostojniji jer je  $R^2 = 0,9877$  dok je za 1570  $\text{cm}^{-1}$   $R^2 = 0,9492$ . Ipak, u nastavku će biti prikazani rezultati za oba modela.

### 4.3. USPOREDBA HPLC I RAMAN REZULTATA

Uzorci žutoperajne tune kvarili su se na sobnoj temperaturi kroz 0, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40, 48 i 50 sati kako bi se formirao histamin koji se zatim detektirao HPLC i SERS metodama, a dobiveni rezultati su prikazani u tablici 5. Rezultati HPLC analize pokazali su neznatne količine histamina u uzorcima nakon 0 i 4 sata kvarenja, a zatim je uslijedio proporcionalan porast koncentracije histamina s vremenom kvarenja. Takav slučaj podudara se s rezultatima literature FAO/WHO (2013) gdje su također nakon kratkog vremena kvarenja dobiveni varijabilni rezultati no s porastom vremena, koncentracija histamina proporcionalno i stabilno raste. Slično ovome, rezultati SERS modela na 1570  $\text{cm}^{-1}$  variraju do 16 sati kvarenja kada počinju kontinuirano rasti. Rezultati modela na 1264  $\text{cm}^{-1}$  pokazali su proporcionalan rast koncentracije histamina od 0 do 50 sati. U istraživanju Janči i sur. (2016) pokazalo se da linearni modeli imaju vrlo dobru predikciju količine histamina u rasponu koncentracija 0 – 200 mg/kg. Budući da je SERS intenzitet ovisan o zasićenju površine koloidnog supstrata pri većim koncentracijama histamina, moguća su dva slučaja. U prvom slučaju kada je koncentracija analita značajno ispod koncentracije zasićenja površine SERS supstrata, odnos intenziteta i koncentracije može biti linearan, no u drugom slučaju pri većim koncentracijama, porast intenziteta nije linearan s koncentracijom već ga najbolje opisuje Langmuirova adsorpcijska izoterma. Ona opisuje prekrivenost površine tj. SERS intenzitet kao funkciju tlaka ili koncentracije analita. SERS intenzitet dostiže maksimalnu vrijednost pri formiranju zasićenog monosloja na površini metalne nanočestice tj. u trenutku kada i prekrivenost

površine postiže svoj maksimum te se kalibracijska krivulja može objasniti Langmuirovom adsorpcijskom izotermom definiranom jednadžbom:

$$I = \frac{I_{max} \cdot K \cdot c}{1 + K \cdot c}$$

gdje su  $I$ ,  $I_{max}$ ,  $K$  i  $c$  redom Ramanov intenzitet analita, maksimalna vrijednost SERS intenziteta, adsorpcijska konstanta i koncentracija analita (Schmidt i sur., 2004). Pri niskim koncentracijama, kada je faktor  $K \times c$  mnogo manji od 1, navedena jednadžba ima linearan oblik s nagibom  $K \times I_{max}$ :

$$I \approx I_{max} \cdot K \cdot c$$

Iako se ovakvim načinom mogu razviti dobri i pouzdani kalibracijski modeli u nekim slučajevima, njihov glavni nedostatak je korištenje jedne informacije (odabrane vrpce) iz spektra koji sadrži velik broj informacija o ciljanom analitu. Budući da gotovo svaki analit ima više karakterističnih SERS vrpce koje ne moraju biti jasno odvojene ili uopće vidljive okom, ali mogu utjecati na karakteristike ukupnog spektra uzorka, često se bolji rezultati postižu korištenjem metoda multivarijatne kalibracije.

HPLC analiza pokazala je da uzorci 48 i 50 h sadrže  $248,12 \pm 58,27$  mg/kg te  $1029,83 \pm 40,24$  mg/kg histamina što je više od područja linearnosti SERS metode te su vrijednosti dobivene SERS metodom značajno manje od vrijednosti dobivenih HPLC analizom. Iako je moguće da navedene vrijednosti odgovaraju modelu Langmuirove adsorpcijske izoterme, modeli temeljeni na Langmuirovoj adsorpcijskoj izotermi ispitani u prethodnim istraživanjima (Janči i sur., 2016) nisu se pokazali pouzdani. Iz tog razloga uzorci 48 i 50 neće biti uzeti u obzir u daljnjoj analizi rezultata i raspravi.

Sve analitičke metode trebaju proći proces validacije kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analitičkih podataka. To je postupak kojim se dokazuje da željena metoda služi svrsi koja joj je namijenjena. Parametri koji će biti korišteni prilikom validacije SERS metode za određivanje histamina na uzorku žutoperajne tune su preciznost i ponovljivost te točnost.



Tablica 5. Rezultati HPLC i SERS metode za određivanje histamina

Vrijeme [h]	Metoda	Broj paralela	Prosječna vrijednost±STD [mg/kg]	RSD [%]	Točnost [%]
0	HPLC	2	1,52±2,14	141,42	100
	SERS 1264	4	0,86±1,02	117,87	56,58
	SERS 1570	4	5,08±5,14	101,28	334,21
4	HPLC	2	0±0	0	100
	SERS 1264	4	0,95±1,09	115,13	-
	SERS 1570	4	4,82±6,84	141,68	-
8	HPLC	2	8,59±4,31	50,20	100
	SERS 1264	4	11,13±9,44	84,84	129,60
	SERS 1570	4	16,76±7,49	44,68	195,11
12	HPLC	2	9,59±1,37	14,34	100
	SERS 1264	4	19,05±10,38	54,50	198,64
	SERS 1570	4	12,22±3,61	29,56	127,42
16	HPLC	2	23,03±6,35	27,59	100
	SERS 1264	4	21,31±2,99	14,05	92,53
	SERS 1570	4	29,57±6,34	21,44	128,40
24	HPLC	2	33,32±0,78	2,34	100
	SERS 1264	4	32,92±1,84	5,60	98,80
	SERS 1570	4	35,69±6,15	17,23	107,11
32	HPLC	2	81,80±6,28	7,68	100
	SERS 1264	4	80,57±3,50	4,35	98,50
	SERS 1570	4	78,51±5,82	7,41	95,98
40	HPLC	2	173,67±10,69	6,15	100
	SERS 1264	4	167,41±9,63	5,75	96,40

48	SERS 1570	4	175,57±11,54	6,57	101,09
	HPLC	2	248,12±58,27	23,48	100
	SERS 1264	4	207,23±18,75	9,05	83,52
50	SERS 1570	4	243,18±6,54	2,69	98,01
	HPLC	2	1029,83±40,24	3,91	100
	SERS 1264	4	442,70±18,84	4,26	42,99
	SERS 1570	4	530,43±20,17	3,80	51,51

#### 4.3.1. Preciznost SERS metode

Preciznost pokazuje slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri istim uvjetima. Obično se provodi pet ili više mjerenja na 2-3 različite koncentracije. Izražava se kao standardno odstupanje (SD), relativno standardno odstupanje (RSD) ili interval pouzdanosti oko srednje vrijednosti. Može biti iskazana kao repetabilnost (ponovljivost), međupreciznost i obnovljivost (reproducibilnost) (Lazarić, 2012).

HPLC metoda ima najbolju preciznost i ponovljivost zbog niskih vrijednosti standardne devijacije i relativnih standardnih odstupanja te je iz tog razloga uzeta kao referentna metoda prilikom validacije SERS metode. Uspredbom relativnih standardnih odstupanja (omjer standardne devijacije i aritmetičke sredine pomnožen sa 100) rezultata dobivenih SERS-om, uočljivo je kako su rezultati modela 1570  $\text{cm}^{-1}$  precizniji jer je srednja vrijednost njihovih RSD-a manja od prosječne RSD vrijednosti modela na 1264  $\text{cm}^{-1}$ . Ipak, uočeno je kako s porastom koncentracije histamina u uzorcima raste i preciznost oba SERS modela jer manja RSD vrijednost znači veću preciznost.

Ponovljivost je podudaranje rezultata dobivenih uzastopnim mjerenjem istog uzorka istom metodom pod istim uvjetima (isti analitičar, instrument i laboratorij) u kratkom vremenskom periodu (Lazarić, 2012). Dobru ponovljivost pokazuje RSD vrijednost koja se smanjuje s porastom koncentracije histamina u uzorku što upućuje da je ponovljivost metode veća pri višoj koncentraciji histamina. Tablica 6 prikazuje kriterije prihvatljivosti za

iskorištenje i ponovljivost iz čega je vidljivo kako je RSD za uzorke nakon 16 h unutar zadanih granica prihvatljivosti ( $\leq 15\%$ ) za model  $1264\text{ cm}^{-1}$  dok kod modela  $1570\text{ cm}^{-1}$  uzorci nakon 16 i 24 h imaju RSD izvan granica prihvatljivosti.

Tablica 6. Kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje i ponovljivost (AOAC, 2011)

<b>Udio analita (%)</b>	<b>Omjer analita</b>	<b>Srednja vrijednost iskorištenja (%)</b>	<b>Ponovljivost, RSD (%)</b>
<b>100</b>	1	98 – 102	1,3
<b>10</b>	$10^{-1}$	98 – 102	1,9
<b>1</b>	$10^{-2}$	97 – 103	2,7
<b>0,1</b>	$10^{-3}$	95 – 105	3,7
<b>0,01</b>	$10^{-4}$	90 – 107	5,3
<b>0,001</b>	$10^{-5}$	80 – 110	7,3
<b>0,0001</b>	$10^{-6}$	80 – 110	11
<b>0,00001</b>	$10^{-7}$	80 – 110	15
<b>0,000001</b>	$10^{-8}$	60 – 115	21
<b>0,0000001</b>	$10^{-9}$	40 – 120	30

#### 4.3.2. Istinitost SERS metode

Istinitost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referencijske vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta. Istinitost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina:

- usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim uhodanom referentnom metodom
- analizom uzorka poznate koncentracije, npr. certificiranoga referencijskog materijala i usporedbom izmjerenih rezultata i certificiranih vrijednosti
- cijepljenjem matrice ili uzorka poznatom koncentracijom referencijskog materijala (Lazarić, 2012).

Korišteni način procjene istinitosti je prvi od navedenih. Kao uhodana referentna metoda korišten je HPLC (Malle i sur, 1996) te je njegova točnost definirana kao 100%-tna.

Varijabilnost uzoraka za posljedicu ima visoke RSD vrijednosti dobivene SERS metodom za uzorke s nižim koncentracijama histamina (0-16 sati kvarenja). Rezultati SERS  $1264\text{ cm}^{-1}$  modela pokazali su široki raspon točnosti, od minimalnih 56,58 % do maksimalnih 198,64 % što zapravo prikazuje da je greška SERS rezultata 98,64 % veća od prave vrijednosti.

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 5., može se zaključiti da je točnost SERS modela  $1264\text{ cm}^{-1}$  kod uzoraka 0, 4, 8, 12 h relativno niska (56,58 % do 198,64 %) kao što je i niska koncentracija histamina. S porastom koncentracije histamina iznad 20 mg/kg (uzorci 16, 24, 32, 40) točnost se kreće u rasponu 92,53 % do 98,80 % uz srednju vrijednost od 96,56%. Iz toga se može zaključiti da je točnost SERS metode pri zakonski važnim i definiranim vrijednostima od maksimalnih 100 mg/kg za svježu ribu i 200 mg/kg za zamrznutu ribu, polukonzerve i konzerve (Pravilnik, 1994) izrazito visoka.

Iz rezultata prikazanih u tablici 5., također se može primjetiti da je preciznost i točnost modela  $1264\text{ cm}^{-1}$  veća tj. bolja u usporedbi s modelom temeljenim na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$ . Navedene razlike prvenstveno su posljedica načina predobrade spektara tj. aproksimacije pozadinskog signala. Prilikom odabira parametara predobrade spektara odabrani su parametri funkcije za aproksimaciju pozadinskog signala koji su općenito dali najbolje rezultate iako je već u toj fazi istraživanja primjećena varijabilnost aproksimacije u spektralnom području  $1450 - 1600\text{ cm}^{-1}$ , ovisno o malim razlikama između ostatka promatranog spektralnog područja.

Točnost pri vrlo niskim koncentracijama histamina ( $< 20\text{ mg/kg}$ ) nije od primarnog značaja jer Uredba iz 2005. definira minimalnu dozvoljenu koncentraciju histamina od 100 mg/kg do maksimalnih 200 mg/kg u svježoj ribi. S obzirom da je SERS metoda razvijana kako bi se omogućila što brža i efikasnija kontrola histamina u industrijskim kontrolnim laboratorijima gdje je važno u kratkom vremenu obraditi što veći broj uzoraka, može se zaključiti da obrađena metoda ima dobru točnost pri određivanju koncentracije histamina u rasponu od 20 - 200 mg/kg.

#### 4.3.3. Prednosti SERS metode

Varijabilnost SERS rezultata u odnosu na HPLC rezultate uzrokovana je činjenicom da je riba vrlo heterogen i kompleksan uzorak čiji kemijski sastav mesa jedinki može znatno varirati unutar iste vrste. Razlog tih varijacija su spol, hranidba, sezonske varijacije, uvjeti i način rukovanja ribom nakon ulova te još brojni drugi. Štoviše, kemijski sastav mesa značajno varira i unutar jednog primjerka ribe, ovisno o mjestu gdje se uzorkuje. Osim toga, post-mortalne promjene na ribljem mišićju uključuju brojne kemijske i enzimske reakcije pod utjecajem endogenih i egzogenih enzima što za posljedicu ima nastanak izrazito velikog broja različitih produkata. S obzirom na složenost uzorka i samog sustava na kojem se provodi SERS mjerenje, nije moguće niti teoretski pretpostaviti koje kemijske komponente imaju najveći doprinos varijabilnosti. Razlike u preciznosti ispitivanih metoda mogu se dobro objasniti razlikama u analitičkim tehnikama te metodama kalibracije.

Iako rezultati SERS metode nisu pokazali zadovoljavajuću točnost u odnosu na HPLC metodu kroz široki raspon koncentracija, SERS metoda pokazala je značajne prednosti pred referentnom metodom. Sam postupak pripreme uzoraka je jednostavniji jer analiza ne zahtjeva derivatizaciju histamina niti reakciju s L-prolinom koje prilikom referentne metode traju 90 minuta. Time se vrijeme analize skрати s približno 140 min koliko je potrebno za HPLC metodu na približno 30 minuta, ovisno o brzini analitičara. Također, snimanje SERS spektra je vrlo kratko, svega 1 min dok HPLC zahtjeva vrijeme od 30 min. Osim navedenog, još jedna prednost SERS analize je korištenje malog broja kemikalija koje su lako dostupne i jednostavne za korištenje. Suprotno tome, kod HPLC analize koristi se više kemikalija kao što su interni standard i sredstvo za derivatizaciju, a cijena tih kemikalija nije zanemariva. Kako se tržište laboratorijske opreme intenzivno razvija, danas su dostupni mali Ramanovi spektrometri čija je cijena višestruko niža od cijene tekućinskih kromatografa pa se može zaključiti da je trošak SERS analize po uzorku značajno manji od troška HPLC analize zbog manjih troškova nabave analitičkih instrumenata i potrošnog materijala. Navedene prednosti imaju izuzetno važnu ulogu kod svake analitičke metode ali ipak su visoka preciznost i točnost analize najvažniji uvjeti za njihovu uspješnu primjenu u laboratorijskim i inudstrijskim uvjetima rada. Željena visoka preciznost, koja je karakteristika većine kromatografskih tehnika, može se pripisati činjenici da se tijekom kromatografske analize komponente uzorka razdvajaju na kromatografskoj koloni te se, u slučaju adekvatno odabranih parametara metode, zasebno detektiraju nakon izlaska iz kolone. Budući da SERS

supstrati nisu toliko selektivni te da spektru doprinose sve komponente složenog sustava koji se sastoji od uzorka, supstrata te agregirajućeg sredstva, realno je očekivati da će preciznost ovakvih metoda biti manja.

Unatoč opisanim problemima, rezultati ovog istraživanja pokazuju da se SERS metodom analize i kvantifikacije histamina u uzorcima ribe mogu postići zadovoljavajući rezultati uz brojne prednosti koje prvenstveno uključuju značajno smanjenje troškova i vremena potrebnog za analizu. Ovo saznanje uvelike doprinosi prevenciji skomroidnih otrovanja ljudi jer omogućuje analizu velikog broja uzoraka ribe u kratkom vremenu te daje zadovoljavajuće rezultate prilikom detekcije nedozvoljenih koncentracija histamina u svježoj ribi, a to su koncentracije iznad 100 mg/kg.

## 5. ZAKLJUČCI

Pripremljeni uzorci žutoperajne tune kvarili su se 0, 4, 8, 12, 16, 24, 32, 40, 48 i 50 sati na sobnoj temperaturi te su podvrgnuti HPLC i SERS analizi sa svrhom detekcije i kvantifikacije histamina u ribljem mišićju.

Na temelju izvršenih analiza, dobivenih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

1. HPLC metoda ima najbolju preciznost i ponovljivost zbog niskih vrijednosti standardne devijacije (STD= 3,99) i relativnih standardnih odstupanja (RSD= 24,97).
2. SERS spektru doprinose sve komponente složenog sustava koji se sastoji od uzorka, supstrata te agregirajućeg sredstva.
3. Pojačanje signala ciljanih analita prvenstveno ovisi o afinitetu molekule analita za adsorpciju na površinu supstrata te usklađenosti područja plazmonske rezonancije supstrata i valne duljine pobudnog zračenja.
4. SERS intenzitet ovisi o zasićenju površine koloidnog supstrata: kada je koncentracija analita značajno ispod koncentracije zasićenja površine SERS supstrata, odnos intenziteta i koncentracije može biti linearan, no pri većim koncentracijama, porast intenziteta nije linearan s koncentracijom.
5. Analiza realnih uzoraka razvijenom SERS metodom i referentnom HPLC metodom te usporedba dobivenih rezultata pokazala je da je najveća točnost postignuta primjenom modela dobivenog linearnom regresijom na temelju intenziteta SERS vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$ .
6. Zbog koeficijenta linearne regresije  $R^2= 0,9877$ , prosječne RSD vrijednosti 7,44 te točnosti 96,56 %, preciznost i točnost modela  $1264\text{ cm}^{-1}$  kod koncentracija 20-200 mg/kg je veća u usporedbi s modelom temeljenim na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$  što omogućuje vrlo točnu detekciju koncentracija histamina koje su zakonski nedozvoljene (iznad 100 mg/kg).
7. Razvijena SERS metoda omogućila je analizu histamina u uzorcima ribe uz značajno smanjene troškove te skratila vrijeme potrebno za analizu (30 min) u usporedbi s referentnom HPLC metodom (140 min).

## 6. LITERATURA

AOAC (2011) Standard Format and Guidance for AOAC Standard Method Performance Requirement (SPMR) Documents, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg

Albercht, M. G., Creighton, J. A. (1977) Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, **99**, 5215-5217.

Anonymus (2004) Alergijske reakcije, <<http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-zapacijente/poremecaji-imunoloskog-sustava/alergijske-reakcije>>. Pristupljeno 20. ožujka 2017.

Bjornsdottir-Butler, K., Green, D.P., Bolton, G.E., McClellan-Green P.D. (2015) Control of Histamine-Producing Bacteria and Histamine Formation in Fish Muscle by Trisodium Phosphate. *J Food Sci.* **80** (6), 1253-1258.

Bjornsdottir-Butler, K., McCarthy, S.A., Dunlap, P.V., Benner Jr., R.A. (2016) *Photobacterium angustum* and *Photobacterium kishitanii*, Psychrotrophic High-Level Histamine-Producing Bacteria Indigenous to Tuna. *Appl. Environ. Microb.* **82** (7), 2167-2176.

Capak, K., Barišin, A., Petrović, G., Jeličić, P. (2006) Rezultati 10-godišnjeg praćenja karakteristika trovanja hranom u Hrvatskoj. Zbornik radova 31. stručnog skupa „Zdravstvena ekologija u praksi“, 10.-12. svibnja 2006, Šibenik, Hrvatska, str. 222.



Dalgaard, P., Emborg, J., Kjølbj, A., Sørensen, N.D., Ballin, N.Z. (2008) Histamine and biogenic amines – formation and importance in seafood. U: Improving Seafood Products for the Consumer, (Børresen, T., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, str. 292-324.

Davis, K.L., McGlashen, M.L., Morris, M.D. (1992) Surface-enhanced Raman scattering of histamine at silver electrodes. *Langmuir*, **8**, 1654-1658.

Etchegoin, P. G., Le Ru, E. C. (2010) Basic Electromagnetic Theory of SERS, in Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications (Schlücker, S., ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Njemačka. doi: 10.1002/9783527632756.ch1

Evangelista, P.W., Silva, T.M., Guidi, L.R., Tette, P.A.S., Byrro, R., Santiag-Silva, P., Fernandes, C., Gloria, M.A. (2016) Quality assurance of histamine analysis in fresh and canned fish. *Food Chem*, **211**, 100-106.

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization] (2013) Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meetin report. [www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/news.../Histamine\\_Final\\_Report.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/news.../Histamine_Final_Report.pdf), pristupljeno: 27.03.2017.

FDA (2011) Scombrotxin (Histamine) Formation. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance 4. ed. Washington, DC, USA: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutr., Office of Food Safety.

Ferraro, J.R., Nakamoto, K., Brown, C.W. (2003) Introductory raman spectroscopy, 2. izd. [online], Academic Press, San Diego, <<http://www.fulviofrisone.com/attachments/article/406/introductory%20raman%20spectroscopy.pdf>>. Pristupljeno 3. travnja 2017.

Fleischmann, M., Hendra, P.J., McQuillan, A.J. (1974) Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163-166.

Gao, F., Grant, E., Lu, X. (2015) Determination of histamine in canned tuna by molecularly imprinted polymers-surface enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chim. Acta.* **901**, 68-75.

García-Tapia, G., Barba-Quintero, G., Gallegos-Infante, J.A., Pacheco Aguilar, R., Ruíz-Cortés, J.A., Ramírez, J.A. (2013) Influence of physical damage and freezing on histamine concentration and microbiological quality of yellowfin tuna during processing. *Food Sci. Technol.* **33** (3), 463-467.

Guizani, N., Al-Busaidy, M.A., Al-Belushi, A.M., Mothershaw, A., Rahman, M.S. (2004) The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Res. Int.* **38**, 215-222.

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

Janči, T., Mikac, L., Ivanda, M., Marušić Radovčić, N., Medić, H., Vidaček, S. (2016) Optimization of parameters for histamine detection in fish muscle extracts by surface-enhanced Raman spectroscopy using silver colloid SERS substrates. *J. Raman Spectrosc.* doi: 10.1002/jrs.4991.

Janči, T., Valinger, D., Gajdoš Kljusurić, J., Mikac, L., Vidaček, S., Ivanda, M. (2017) Determination of histamine in fish by Surface Enhanced Raman Spectroscopy using silver colloid SERS substrates. *Food Chem.* **224**, 48-54.

Jeanmaire, D. L., Van Duyne, R. P. (1977) Surface raman spectroelectrochemistry. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **84**, 1-20.

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

Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela, *Svijet po mjeri* **1**, 61-65.

Lee, P. C., Meisel, D. (1982) Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, **86**, 3391-3395.

Lehane, L., Olley, J. (2000) Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 1-37.

Long, D. A. (2002) *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, Wiley, Chicester, Engleska.

Malle P., Valle M., Bouquelet S. (1996) Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC. Internat.* **79**, 43-49.

McQuillan, A.J. (2009) The discovery of surface-enhanced Raman scattering. *Notes Rec. Roy. Soc.* **63**, 105-109.

Morrow, D.J, Margolies, R., Gary, Rowland, J., Jackson Roberts, L. (1991) Evidence that histamine is the causative toxin of scombroid-fish poisoning. *New Engl. J. Med.* **324** (11), 716-720.

NOAA Fisheries (2013) *Per capita*, National Oceanic and Atmospheric Administration, <<http://www.st.nmfs.noaa.gov/Assets/commercial/fus/fus12/FUS2012.pdf>>. Pristupljeno 13. travnja 2017.

Schmidt, H., Bich Ha, N., Pfannkuche, J., Amann, H., Kronfeldt, H. D., Kowalewska, G. (2004) Detection of PAHs in seawater using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Marine Pollution Bulletin*, **49**, 229-234.

Singh, R. (2002) C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect. *Physics in Perspective*, **4**, 399-420.

UREDBA KOMISIJE (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Službeni list Europske unije, L 338/1, Bruxelles.

Vandenabeele, P. (2013) *Practical Raman spectroscopy - an introduction*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.

Yuen, C., Zheng, W., Huang, Z. (2008) Surface-enhanced Raman scattering: principles, nanostructures, fabrications, and biomedical applications. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, **01**, 267-284.

