

Određivanje udjela histamina u tkivu palamide HPLC-om i Raman spektroskopijom

Česi, Lidija

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:159:191001>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Lidija Česi

766/PI

**ODREĐIVANJE UDJELA
HISTAMINA U TKIVU PALAMIDE
HPLC-OM I RAMAN
SPEKTROSKOPIJOM**

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

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE UDJELA HISTAMINA U TKIVU PALAMIDE HPLC-OM I RAMAN SPEKTROSKOPIJOM

Lidija Česi, 766/PI

Sažetak: Histamin je najvažniji biogeni amin koji uzrokuje trovanje kod ljudi, a u organizam se unosi konzumacijom proizvoda ribarstva. Tradicionalne instrumentalne metode za detekciju histamina nisu adekvatne za primjenu u industriji pa se iz tog razloga istražuju nove metode poput Raman spektroskopije kako bi se osigurala kvaliteta i zdravstvena ispravnost proizvoda ribarstva. U ovom istraživanju, određivan je udio histamina u tkivu palamide s ciljem validacije razvijene SERS metode (spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja). Kao referentna metoda uzima se HPLC (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti). Snimljeni SERS spektri su obrađeni radi uklanjanja interferencija te su histaminske vrpce vidljive na 1264 i 1570 cm^{-1} . Koeficijent korelacije (R^2) za kalibracijski model koji se temelji na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} iznosi 0,951, a za model na 1570 cm^{-1} iznosi 0,990 te se isti pokazao kao bolji model.

Ključne riječi: histamin, Raman spektroskopija, SERS, HPLC, koeficijent korelacije

Rad sadrži: 40 stranica, 15 slika, 2 tablice, 47 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:

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

Datum obrane: 11. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

DETERMINATION OF HISTAMINE CONTENT IN ATLANTIC BONITO TISSUE BY HPLC AND RAMAN SPECTROSCOPY

Lidija Česi, 766/PI

Abstract: Histamine is the most important biogenic amine which is ingested by eating seafood products. It causes human intoxication. Traditional methods for analysis of histamine are not acceptable in industry use so new methods like Raman spectroscopy are being investigated to insure quality and health standards of seafood products. In this study, histamine content in Atlantic bonito tissue has been determined to validate the developed SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) method. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) is the reference method. Recorded spectra have been processed to remove interferences and histamine bands are observed at 1264 cm^{-1} and 1570 cm^{-1} . Correlation coefficient (R^2) for calibration model based on intensity of histamine band at 1264 cm^{-1} is $0,951\text{ cm}^{-1}$ and $0,990$ for model at 1570 cm^{-1} . Based on given results, the last one is determined to be the more accurate model.

Keywords: *histamine, Raman spectroscopy, SERS, HPLC, correlation coefficient*

Thesis contains: 40 pages, 15 figures, 2 tables, 47 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: Tibor Janči, PhD

Reviewers:

1. PhD. *Ksenija Marković*, Associate Professor
2. PhD. *Sanja Vidaček*, Associate Professor
3. PhD. *Leo Gracin*, Assistant Professor
4. PhD. *Klara Kraljić*, Assistant Professor (substitute)

Thesis defended: 11 July 2017

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Biogeni amini.....	2
2.2. Histamin u plavoj ribi.....	3
2.3. Histaminsko trovanje	5
2.4. Kontrola i prevencija nastanka histamina u proizvodima ribarstva	7
2.5. Metode detekcije histamina.....	8
2.6. Raman spektroskopija	11
2.6.1. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS).....	13
2.6.1.1. SERS supstrati.....	15
2.6.2. Primjena Raman spektroskopije u određivanju histamina.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Uzorci ribe	18
3.1.2. Reagensi	18
3.1.3. Laboratorijska oprema.....	19
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Određivanje sadržaja histamina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)	19
3.2.1.1. Priprema otopine standarda.....	19
3.2.1.2. Priprema uzoraka.....	20
3.2.1.3. Priprema mobilne faze.....	21
3.2.1.4. Kromatografska analiza.....	21
3.2.2. Određivanje histamina Raman spektroskopijom	22
3.2.2.1. Priprema uzoraka.....	22
3.2.2.2. Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC).....	23
3.2.2.3. Obrada SERS spektara.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. HPLC analiza.....	24
4.2. SERS analiza	26
4.3. Usporedba SERS i HPLC metode.....	31
5. ZAKLJUČCI	35
6. LITERATURA.....	36

Plava riba, iako nutritivno vrijedna namirnica, spada u skupinu lako kvarljivih namirnica, pogodnih za rast bakterija što posljedično može dovesti do pojave različitih infekcija i intoksikacija kod ljudi. Kvaliteta i zdravstvena ispravnost ribe ovise o staništu ribe jer se u ribljem tkivu mogu akumulirati različiti kontaminanti iz okoliša te o načinu rukovanja ribom u lancu od "ulova do stola".

Danas je prisutna globalizacija tržišta ribom zbog napretka tehnologije ulova, prerade i distribucije različitih proizvoda ribarstva te se riba u vrlo kratkom roku nađe u bilo kojem dijelu svijeta. Kako bi se odgovorilo na izazove koji se javljaju kod opskrbe tržišta velikim količinama ribe, potrebno je osigurati kvalitetu i zdravstvenu ispravnost proizvoda ribarstva.

Iako dolazi do napretka u zakonskim propisima i sustavima osiguranja kvalitete, prema statistikama, određeni rizici, poput trovanja histaminom, se ne smanjuju nego su stalno prisutni u svijetu. Kako bi se adekvatno kontrolirala kvaliteta sirovine i proizvoda u industrijskim uvjetima velikog kapaciteta prerade, javlja se potreba za brzim instrumentalnim metodama kojima bi se moglo u relativno kratkom vremenu analizirati velik broj uzoraka. Tradicionalne laboratorijske metode analize poput HPLC-a (tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ili GC-a (plinska kromatografija) zahtijevaju složenu i dugotrajnu pripremu uzoraka, upotrebu skupe opreme i educirano osoblje pa nisu prihvatljive za industrijske uvjete. Posljedično, pojavio se velik interes za primjenu metode poput Raman spektroskopije. Ova metoda je brza, minimalna je priprema uzorka i moguća je analiza tvari u svima agregatnim stanjima. Raman spektroskopija je vibracijska spektroskopska metoda koja se temelji na Ramanovom efektu te se snimanjem dobiva Ramanov spektar koji je karakterističan za određenu molekulu. Međutim, u uzorku je potrebna visoka koncentracija analita jer signal koji se dobiva je slab. Da bi se postigla visoka osjetljivost metode, odnosno pojačanje signala, koristi se površinski pojačano Ramanovo raspršenje (SERS).

U ovom radu, istražit će se mogućnost primjene Raman spektroskopije za detekciju histamina u tkivu palamide s ciljem validacije metode kako bi se olakšala kontrola ribe tijekom prerade budući da je histamin najvažniji biogeni amin te uzrokuje skombroidno trovanje kod ljudi nakon konzumacija riba u kojima se razvio histamin u dovoljnoj koncentraciji. Kao SERS supstrat koristi se kombinacija srebrnog koloida reduciranog citratnim ionima i otopine NaBH_4 (0,23 M) kao agregirajućeg sredstva, a kao referentna metoda koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

2.1. BIOGENI AMINI

Plava riba obuhvaća sitne (srdela, inćun, papalina, skuša, lokarda i dr.) i krupne (tuna, palamida i dr.) ribe. Izvor je biološki vrijednih bjelančevina, joda i selen. Ima nizak udio masti i kolesterola. Bogata je višestruko nezasićenim masnim kiselinama iz skupine n-3 masnih kiselina (eikozapentaenska - EPA i dokozaheksaenska - DHA) kojima se pripisuju brojni pozitivni učinci na zdravlje (Nosić i Krešić, 2015). Palamida (*Sarda sarda*) pripada porodici skušovki (*Scombridae*). Široko je rasprostranjena u sjevernom Atlantiku, na Mediteranu i u Crnom moru. Tradicionalno se izlovljava za ljudsku prehranu te se konzumira kao svježa ili prerađena (Nottestad, 2012).

Proizvodi ribarstva pa tako i palamida mogu imati visok udio biogenih amina.

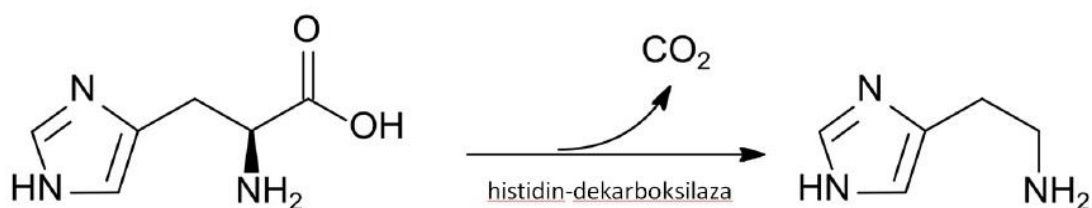
Biogeni amini su po kemijskoj strukturi nehlapljive organske baze niske molekularne mase koje se mogu sintetizirati u mikroorganizmima, životinjama i biljkama (Mendes, 2009). Biogeni amini su kemijski spojevi zajedničkog podrijetla koji imaju prisutnu barem jednu amino grupu. S obzirom na kemijsku strukturu, biogeni amini dijele se na alifatske diamine (putrescin, kadaverin), alifatske poliamine (agmatin, spermin, spermidin), aromatske amine (tiramin, feniletilalanin) i heterocikličke amine (histamin, triptamin). U organizmu ribe sudjeluju u regulaciji različitih biokemijskih i fizioloških procesa, poput sinteze bjelančevina, stabilizaciji staničnih membrana, posredovanju u djelovanju hormona i čimbenika rasta (Halasz i sur., 1994; Santos i sur., 1986).

U tkivu su prisutni u malim količinama neopasnima za ljudsko zdravlje, međutim, povećane koncentracije histamina, kadaverina i putrescina mogu se javiti postmortalno kao posljedica enzimatske dekarboksilacije specifičnih aminokiselina prisutnih u ribi. Endogeni enzimi kao i egzogeni (enzimi mikrobiološke flore povezane s procesom kvarenja) kataliziraju reakciju dekarboksilacije (Rawles i sur., 1996). Postmortalna produkcija biogenih amina ovisi o dostupnosti slobodnih aminokiselina, prisutnosti mikroorganizama koji imaju sposobnost dekarboksilacije aminokiselina, povoljnim uvjetima za razvoj mikroorganizama i mikrobiološku aktivnost. Reakciju dekarboksilacije mogu provoditi brojne bakterije kvarenja iz specifičnih rodova ili porodica koje su izolirane iz hrane morskog porijekla. Te bakterije su normalno prisutne u morskom okolišu pa se i nalaze na koži i škrgama ribe kao i u probavnom traktu. Vrsta bakterije unutar pojedinog roda i povoljni uvjeti (temperatura, pH) za razvoj tih bakterija diktiraju sposobnost i intenzitet nastanka jednog ili više biogenih amina (Takahashi i

sur., 2003; Dalgaard i sur., 2006; Emborg i Dalgaard, 2006). Na konačni sadržaj različitih amina utječu vrsta proizvoda, uvjeti skladištenja (posebice temperatura) te prisutnost mikroorganizama. Način procesiranja hrane također utječe na sadržaj biogenih amina. Fermentirana hrana (sirevi, pivo, vino, suhomesnati proizvodi) i hrana podvrgnuta enzimatskom zrenju u salamuri (soljena riba, kiselo povrće) zahtjeva djelovanje određenih mikroorganizama u svojoj pripremi pa posljedično nastaju biogeni amini. Histamin, kadaverin, putrescin, tiramin, triptamin, agmatin, spermin i spermidin su najznačajniji biogeni amini hrane morskog porijekla. Izvršni su pokazatelji svježine ribe jer su u svježoj ribi prisutni u niskim koncentracijama, a tijekom skladištenja se njihov udio povećava. Nadalje, mogu ukazati na neadekvatno rukovanje ribom od ulova do prerade ili na neadekvatan proces prerade odnosno na činjenicu da je između ulova i konzumacije došlo do razvoja bakterija koje svojim djelovanjem mogu sintetizirati biogene amine i druge produkte razgradnje tkive kao što su trimetilamin i hlapive baze dušika (Dalgaard i Emborg, 2009).

2.2. HISTAMIN U PLAVOJ RIBI

Toksikološki gledano, histamin je najznačajniji biogeni amin. Sintetizira se postmortalno iz slobodne aminokiseline histidina djelovanjem bakterijskog enzima histidin–dekarboksilaze (Slika 1) u tkivu riba poput incuna, haringe, palamide, skuše, lokarde, srdele, papaline i tune koje sadrže visoku razinu slobodnog histidina (Kanki i sur., 2004; Nosić i Krešić, 2015).



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

Kako bi nastale značajne količine histamina u tkivu ribe, nužna je prisutnost određenih mikroorganizama koji imaju sposobnost tvorbe histidin-dekarboksilaze (Nosić i Krešić, 2015), a to su najčešće pojedine bakterije iz rodova *Morganella* i *Raoutella* koje sintetiziraju više od 1000 mg histamina/kg 6 uzorka (Takahashi i sur., 2003; Dalgaard i sur., 2006; Emborg i Dalgaard, 2006) te neke vrste iz porodice *Enterobacteriaceae* (Dalgaard i Emborg, 2009). Te bakterije su prirodno prisutne na škrgama i u crijevima živih riba te kod normalnog rada ribljeg metabolizma ne ugrožavaju riblju jedinku. Međutim, nakon uginuća, smanjuje se obrambena sposobnost organizma ribe, inhibicija rasta bakterija je smanjena i posljedično se bakterije razmnožavaju i produciraju histamin (Nosić i Krešić, 2015). Do 2004. godine bilo je uvriježeno mišljenje da samo mezofilne bakterije mogu proizvoditi histamin, čime se nije moglo objasniti nastajanje histamina na temp. nižim od 7 – 10 °C. Rezultati kasnijih istraživanja ukazali su i na psihofilne bakterije (*Photobacterium phosphoreum* i *Morganella psychrotolerans*) kao proizvođače histamina u ribi skladištenoj na 0°C (Emborg i sur., 2006; Dalgaard i Emborg, 2009).

Općenito, histamin nastaje kao posljedica neadekvatnog rukovanja ribom. Temperatura 20 – 25 °C optimalna je temperatura za sintezu histamina, ali postoje i brojna istraživanja koja su utvrdila da koncentracija histamina raste i pri temperaturama do +4 °C kroz dulji period skladištenja (3 – 7 dana) (Kanki i sur., 2004; Emborg i Dalgaard, 2006).

Kod smrzavanja i odmrzavanja te nedovoljne termičke obrade, histamin može nastati i u slučaju izostanka mikrobiološke aktivnosti, budući da histidin–dekarboksilaza nije u potpunosti inaktivirana. Nadalje, u slučaju rekontaminacije proizvoda, npr. nakon otvaranje konzerve može nastati histamin iz razloga što prerađena riba i dalje sadrži velike količine slobodnog histidina. Budući da je histamin termostabilan, jednom kada se sintetizira, ne može se ukloniti iz namirnice uobičajenim tehnološkim postupcima prerade (Kanki i sur., 2004; Emborg i Dalgaard, 2006). Histidin-dekarboksilaza se inaktivira na temperaturi iznad 65°C pa je koncentracija histamina, prilikom kuhanja, 4-10 puta niža nego prilikom soljenja i sušenja (Nosić i Krešić, 2015).

2.3. HISTAMINSKO TROVANJE

Histamin je biogeni amin koji je najčešći uzrok trovanja povezanog s konzumacijom proizvoda ribarstva, a tu se ubraja i plava riba (Hungerford, 2010). Incun, haringa, skuša, lokarda, srdela, papalina, palamida i tunjevina sadrže visoku razinu slobodnog histidina te predstavljaju rizik za histaminsko trovanje (Nosić i Krešić, 2015). Budući da su ribe iz porodice *Scombridae* najčešće povezane s ovim tipom trovanja, ovaj zdravstveni problem još se naziva i „skombroidno trovanje“ ili skombrotoksizam (Hungerford, 2010). Međutim, trovanje histaminom veže se i uz konzumaciju sira, vina i fermentiranih mesnih proizvoda pa je ispravniji naziv „histaminsko trovanje“.

Bitno je naglasiti rezultate istraživanja koji nisu dokazali jasan odnos između toksičnog učinka kod konzumacije čistog histamina i iste količine histamina u određenoj namirnici odnosno histamin iz namirnice ima jači toksični učinak od ekvivalentne doze čistog histamina što govori o činjenici da su u proces trovanja histaminom uključeni i drugi spojevi, najvjerojatnije drugi biogeni amini prisutni u namirnici koji reguliraju metabolizam histamina tako da pojačavaju njegovo djelovanje ili inhibiraju njegovu razgradnju (Taylor i sur., 1984; Taylor, 1986; Lehane i Olley, 2000). Nedvojbeno je da je histamin zaslužan za toksičan učinak što potvrđuju prisutnost visokih koncentracija histamina u namirnicama koje su uzrokovale trovanja, prisutnost visokih količina histidina u tim ribljim vrstama, smanjenje i nestanak simptoma trovanja nakon davanja antihistaminika te prisutnost metabolita histamina u mokraći pacijenata.

Histamin je prirodno prisutan u ljudskom tijelu gdje je uključen u lokalni imunološki odgovor, regulira fiziološke funkcije crijeva i djeluje kao neuroprijenosnik. Većina histamina u tijelu se sintetizira u granulama koje se nalaze u mastocitima ili bazofilnim stanicama i u određenim skupinama neurona. Proizvedeni histamin se skladišti i otpušta prema potrebi organizma ili se brzo deaktivira djelovanjem histamin-N-metiltransferaze i diamin oksidaze. Histamin se spaja na određene stanične histaminske receptore (H1 – H4) i na taj način regulira brojne procese u tijelu. Prilikom konzumacije namirnica koje sadrže visoku koncentraciju histamina, poput proizvoda ribarstva, zbog suviška histamina, organizam ne uspijeva metabolizirati histamin dovoljno brzo te se on veže na histaminske receptore i remeti procese koji su regulirani tim staničnim receptorima.

Postoje 3 teorije koje pokušavaju razjasniti mehanizam toksičnog djelovanja histamina. Prva govori da postoje drugi biogeni amini kao inhibitori enzima koji razgrađuju histamin (histamin-N-metiltransferaze i diamin oksidaze), te djeluju sinergistički. Druga ukazuje da su prisutne tvari koje uzrokuju degranulaciju mastocita te oslobađanje histamina iz njih, a prema trećoj teoriji su prisutne tvari koje se vežu na histaminske receptore i aktiviraju ih (Hungerford, 2010).

Prema određenim studijama, na histamin su osjetljivi pojedinci kojima u sluznici tankog crijeva nedostaje enzim diamin oksidaza zbog čega je smanjena razgradnja i povećana apsorpcija histamina u gastrointestinalnom sustavu. Nadalje, neki lijekovi mogu blokirati ili potaknuti aktivnost histamin-N-metiltransferaze i diamin oksidaze (Nosić i Krešić, 2015). Simptomi trovanja histaminom obično se javljaju 10 min do 1 h nakon konzumacije namirnica bogatih histaminom, a uključuju papren ili „metalni“ okus, utrućće u području usta, glavobolju, vrtoglavicu, drhtanje, poremećaje srčanog ritma, snižavanje krvnog tlaka, teškoće pri gutanju i žeđ. Prisutni su i simptomi nalik alergijama koji su vezani uz kožne manifestacije, a uključuju difuzno crvenilo lica, osip, svrbež i oticanje lica. Rjeđe se javljaju simptomi koji pogađaju središnji živčani sustav kao što je anksioznost te nespecifični simptomi koji uključuju mučninu, povraćanje, grčeve i dijareju (Lehane i Olley, 2000). Raznolikost simptoma ovisi o količini konzumiranih namirnica, tjelesnoj masi potrošača i osjetljivosti organizma pojedinca. Liječenje se provodi uglavnom kod težih slučajeva trovanja primjenom antihistaminika ili blokatora histaminskih receptora (Nosić i Krešić, 2015).

S obzirom na to da se riba konzumira na globalnoj razini, trovanje histaminom je vrlo čest problem u svijetu koji jednako zahvaća sve dobne skupine, spolove i rase pri čemu je važno napomenuti da tu nisu isključene ni najrazvijenije zemlje koje imaju najviše higijenske standarde i sustave osiguranja kvalitete u proizvodnji hrane (Dalgaard i sur., 2008). Karakteristično je da nema korelacije između ukupne potrošnje ribe i stope trovanja histaminom, već je važniji faktor vrste ribe koje se uobičajeno konzumiraju u određenim državama (EC, 2013). Simptomi trovanja histaminom se često puta zamjenjuju s preosjetljivošću na morske ribe, rakove, mekušce i druge plodove mora ili sa simptomima salmoneloze pa službene statistike ne prikazuju realan broj slučajeva histaminskog trovanja (Nosić i Krešić, 2015). Trovanje histaminom bilo je zaslužno za 32% svih trovanja povezanih s konzumacijom proizvoda ribarstva tijekom 1990 – ih, dok je u SAD – u ta brojka iznosila 38%, čime SAD zauzima prvo mjesto na listi problema sa zdravstvenom ispravnošću proizvoda

ribarstva (Dalgaard i sur., 2008). U Hrvatskoj je zabilježen samo jedan slučaj epidemije u razdoblju od 1993. do 2003., a obuhvaćao je 17 ljudi (Capak i sur., 2006). U zemljama u razvoju stvaran broj je vjerojatno mnogo veći od dokumentiranog broja incidenata (Vidaček, 2014).

2.4. KONTROLA I PREVENCIJA NASTANKA HISTAMINA U PROIZVODIMA RIBARSTVA

Kako je već spomenuto, histamin koji se jednom sintetizira u namirnici, ne može se odstraniti uobičajenim tehnološkim postupcima pa se provođenjem stroge i učestale kontrole sirovine i proizvoda, poštivanjem načela dobre proizvođačke prakse i uvođenjem odgovarajućeg HACCP plana sprječava njegov nastanak (Janči, 2016). Budući da su biogeni amini termički stabilni, uzimaju se u obzir kod procjene higijensko-sanitarne ispravnosti svježe ribe, ali i proizvoda koji su prošli toplinsku obradu (npr. sterilizirane konzerve). Loša kvaliteta sirovine, neadekvatno procesiranje i nepovoljno skladištenje dovode do nastanka biogenih amina u konzerviranim proizvodima.

Dakle, da bi se spriječilo nastajanje histamina, potrebno je, ribu, neposredno nakon ulova, brzo ohladiti na 0-4 °C, održavati hladni lanac tijekom cijelog procesa prerade i distribucije pri čemu temperatura treba biti što bliža točki zamrzavanja, ribu, nakon odmrzavanja treba, preraditi u što kraćem roku, strogo poštivati rok trajanja ako se riba skladišti iznad temperature zamrzavanja, adekvatno provesti čišćenje i dezinfekciju pogona i opreme, educirati zaposlenike o higijenskim mjerama i izbjegavati križanje puteva u proizvodnom pogonu. Nadalje, postojeće zakonske propise je, osim globalnog usklađivanja, potrebno doraditi, kako bi se obuhvatile sve sirovine i drugi biogeni amini što bi posljedično dovelo do povećane razine sigurnosti proizvoda ribarstva prilikom stavljanja na tržište.

2.5. METODE DETEKCIJE HISTAMINA

Među biogenim aminima, najčešće se istražuje histamin, naročito u morskoj ribi. Ciljevi takvih istraživanja su definiranje odnosa koncentracije histamina u ribi i vrste bakterija koje ga mogu producirati, razvijanje novih ili poboljšanje postojećih analitičkih metoda za detekciju histamina, pregled biogenih amina u različitim zemljama i regijama te, konačno, određivanje sadržaja biogenih amina u svrhu kontrole efikasnosti metoda koje su razvijene u svim koracima prerade ribe, od ulova do skladištenja (Nosić i Krešić, 2015).

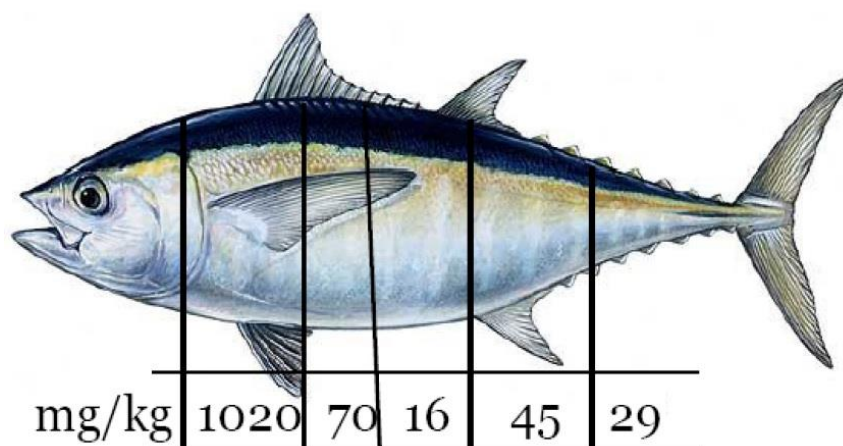
Prema Uredbi Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu, proizvodi od ribljih vrsta koje sadrže visoke koncentracije slobodnog histidina za 9 uzoraka po šarži moraju udovoljavati sljedećim uvjetima:

- Ustanovljena srednja vrijednost sadržaja histamina ≤ 100 mg/kg
- Maksimalno 2 uzorka smiju imati vrijednost sadržaja histamina između 100 i 200 mg/kg
- Niti jedan uzorak ne smije imati ustanovljenu vrijednost ≥ 200 mg/kg

Proizvodi od istih ribljih vrsta koji su obrađeni enzimatskim dozrijevanjem u salamuri imaju dvostruko veće dozvoljene vrijednosti od navedenih.

Da bi se odredila koncentracija histamina, vrlo je bitan adekvatan plan uzorkovanja iz razloga što histamin nije homogeno raspoređen u cijeloj šarži ili ulovu ribe. Primjerice, kod velikih ulova sitne plave ribe, riba koja je poleđena odmah nakon ulova, imat će izvrsnu kvalitetu, dok će riba koja provede nekoliko sati na temperaturi okoliša (koja ljeti može biti 20-30 °C što je optimalno za sintezu histamina), odnosno poleđena je posljednja, imati narušenu kvalitetu. Pravilno uzorkovanje (relativno velik broj uzoraka) će dati reprezentativan rezultat za cijelu šaržu te će se analizom utvrditi točna koncentracija histamina.

Također, histamin nije jednoliko raspoređen niti u tkivu ribe (Slika 2) zato što se najveći broj bakterija nalazi na škragama i u probavnom traktu ribe pa kvarenje i sinteza histamina prvo započinje i najbrže se odvija u tim dijelovima. Dakle, nepravilno uzorkovanje može dati pogrešan rezultat pa šarža proizvoda, od iste ribe, sadrži zdravstveno ispravne proizvode kao i one koji sadrže visoke količine histamina (Janči, 2016).



Slika 2. Koncentracija histamina u određenom dijelu ribe (Frank i sur., 1981)

Prilikom prijema ribe, prije prerade, provodi se senzorska ocjena svježine ribe, odnosno riba se prema određenim senzorskim parametrima (izgled kože, očiju, škrge, miris, tvrdoća i tekstura mesa, itd.) svrstava u određenu kategoriju kvalitete koja govori o prikladnosti ribe za preradu. Ova metoda kontrole je uobičajena i najčešće korištena kod prijema, ali nije pouzdana za utvrđivanje količine histamina jer se npr. kod izlaganja ribe visokim temperaturama, histamin brzo razvija, a miris i okus ribe još nisu intenzivni i ne ukazuju na kvarenje. Sljedeća metoda koja se često primjenjuje, obuhvaća kontrolu temperature i vremena od ulova do prijema. Pregledom dokumentacije, množe se vrijednosti temperature i vremena koje je riba provela na toj temperaturi. Ako je $t \times T$ vrijednost $< 150 \text{ h}^\circ\text{C}$, riba je prikladna za preradu. Dobivene vrijednosti su orijentacijske, odnosno ovom metodom se ne može precizno odrediti količina histamina u ribi.

Kako bi se kontrola histamina mogla provoditi u realnim uvjetima (proizvodnja) i što učestalije na što većem broju uzoraka, potrebno je unaprijediti postojeće analitičke metode. Razvijen je velik broj analitičkih metoda za detekciju histamina (Slika 3), ali svaka ima svoje prednosti i nedostatke primjene u industriji.

Laboratorijske analitičke metode za detekciju histamina se uglavnom temelje na kromatografskim postupcima. Tu se ubraja i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) koja se najčešće primjenjuje za analizu histamina. Nakon ekstrakcije histamina iz tkiva ribe pogodnim otapalom, provodi se derivatizacija, odnosno reakcija s reagensom pri čemu nastaje kompleks koji ima izraženu apsorpciju svjetlosti u UV dijelu spektra, a taj kompleks se nakon separacije na kromatografskoj koloni može detektirati pomoću DAD ili UV detektora. U

ovu skupinu spada i metoda Malle i sur. (1996), a uredba EZ 2073/2005 ju navodi kao referentnu metodu za određivanje udjela histamina u proizvodima ribarstva.

Prema istraživanju, Rzepka i sur. (2013), određivan je udio biogenih amina HPLC metodom u tkivu palamide koja je prethodno marinirana, pakirana u vakuum atmosferi i pohranjena na 7 °C, 6 tjedana. Nakon pripreme uzorka, uslijedila je HPLC analiza te su rezultati pokazali da je koncentracija histamina 355 mg/kg na kraju skladištenja, što premašuje zakonsku granicu od 100 - 200 mg/kg. S trajanjem skladištenja, rasla je i koncentracija histamina što se i očekivalo, budući da palamida spada u porodicu *Scombridae* za koju je karakteristično da ima visok udio histidina. Zaključeno je da temperatura pohrane fileta palamide mora biti ispod 7°C da bi se smanjio rizik od trovanja histaminom.

Ostale metode su fluorometrijske metode, ionska kromatografija, kapilarna elektroforeza, tankoslojna kromatografija, plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom (LC-MS). Sve ove metode su robusne, ponovljive, precizne i točne, ali su ograničene na analitičke laboratorije jer je za njihovu provedbu potrebna skupa laboratorijska oprema i instrumenti koji zahtijevaju skupo održavanje te educirano osoblje. Nadalje, postupak pripreme uzorka 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 pa se ne koriste često u industrijskim kontrolnim laboratorijima.

Dakle, da bi kontrola sadržaja histamina u industriji bila relevantna, razvijeno je nekoliko brzih metoda koje se temelje na različitim enzimatskim metodama (ELISA). Oprema na tržištu obuhvaća različite kvalitativne i kvantitativne kitove sa svim potrebnim reagensima i spektrofotometrom kojim se očitava intenzitet obojenja nastalog nakon reakcije te se dobiva podatak o količini histamina u uzorku. Prednost kitova je niža cijena u usporedbi s cijenom opreme potrebne za provedbu laboratorijskih metoda, ali sva oprema, osim spektrofotometra je predviđena za jednokratnu upotrebu pa troškovi mogu biti veliki kod velikog broja analiza, različiti su postupci pripreme uzorka te kitovi nisu prikladni za analize van laboratorija. Također, ako se određuje količina histamina u proizvodima dobivenima soljenjem i dozrijevanjem u salamuri, enzimatske metode imaju smanjenu točnost (Janči, 2016).

	AOAC metoda	HPLC metode	Spektrofluorometrijske metode	ELISA	Kolorimetrijske metode
Vrijeme potrebno za 1 test	1 – 2 h	1 – 2 h	1 h	1 h	1 h
Oprema	Fluorometar	HPLC	Spektrofluorometar	Spektrofotometar	Spektrofotometar
Prag kvantifikacije	1 – 5 ppm	1.5 – 5 ppm	1.5 ppb	2 – 5 ppm	20 ppm
Raspon	1 – 150 ppm	5 – 2500 ppm	1.5 ppb – 100 ppm	0 – 500 ppm	0.8 – 300 ppm
Prednosti metode	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

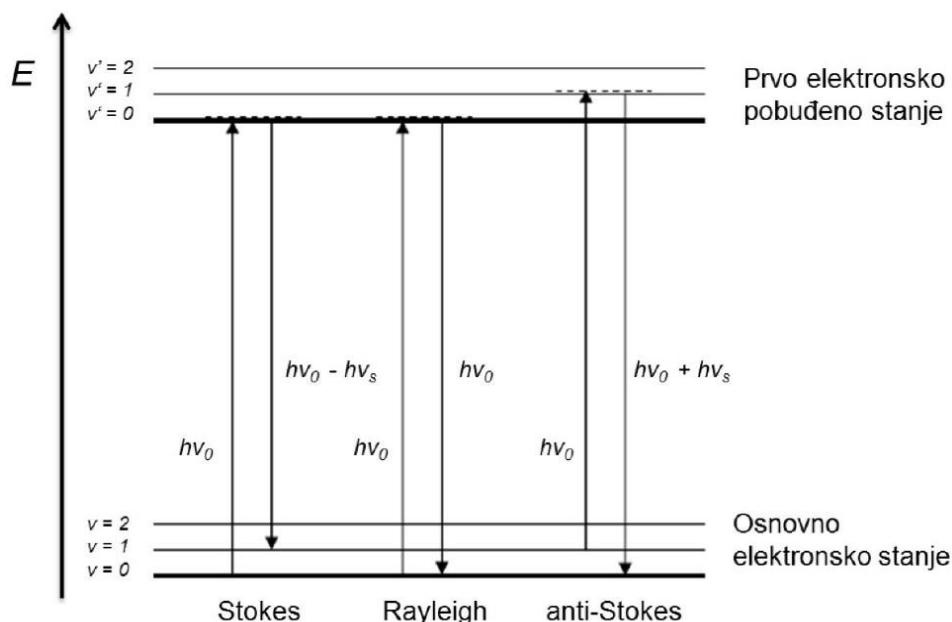
Slika 3. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina (Janči, 2016)

2.6. RAMAN SPEKTROSKOPIJA

Postojeće tradicionalne metode analize nisu u potpunosti adekvatne za upotrebu u industriji pa se javila potreba za brzim metodama analize kako bi se olakšala kontrola tijekom prerade te osigurala zdravstvena ispravnost i visoka kvaliteta proizvoda na tržištu. Jedna od takvih metoda je i Raman spektroskopija koja pruža mogućnost brze analize uzoraka bez obzira na agregatno stanje uz minimalnu pripremu.

Raman spektroskopija je vibracijska spektroskopska metoda koja se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije fotona i vibracijskih modova molekula ispitivane tvari. Posljedica takvog raspršenja je pomak u valnoj duljini ili frekvenciji raspršene zrake svjetlosti, odnosno Ramanov efekt. Pritom, molekulske vibracije koje su aktivne u Ramanovom spektru su one pri kojima dolazi do promjene polarizabilnosti molekule pa uslijed interakcije fotona i molekule, javlja se polarizacija elektronskog oblaka, odnosno atomi prelaze u pobuđeno stanje (višu energetska razinu) nakon čega se molekula u vrlo kratkom vremenu (10-14 s) vraća u osnovno stanje i pritom emitira foton. Dakle, Ramanovo raspršenje je neelastično raspršenje pri kojem je valna duljina raspršenog zračenja različita od valne duljine pobudnog zračenja, a emitirani foton može imati manju ili veću valnu duljinu od pobudnog fotona. Ako molekula, koja je u osnovnom elektronskom stanju, ima niži početni vibracijski nivo od vibracijskog nivoa koji molekula ima nakon emisije fotona, emitirani foton je veće valne duljine od pobudnog fotona. Ovaj efekt se naziva Stokesovo raspršenje. S druge

strane, ako se molekula pobudi iz višeg vibracijskog nivoa, a vrati u niži vibracijski nivo osnovnog energetskeg stanja, emitirani foton ima manju valnu duljinu od pobudnog fotona. Sukladno tome, efekt se naziva anti-Stokevoso raspršenje. Ako ne dolazi do promjene energije tj. valne duljine pobudnog i raspršenog zračenja (elastično raspršenje) efekt se naziva Rayleighovo raspršenje (Janči, 2016) (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz različitih tipova raspršenja svjetlosti na molekuli pobuđenoj fotonom (Vandenabeele, 2013)

Ramanovo raspršenje je manje vjerojatno od Rayleighovog raspršenja, a o tome govori činjenica da je 1 od 107 raspršenih fotona Stokes raspršen dok je 1 od 104 fotona Rayleigh raspršen. Iz tog razloga, intenzitet Ramanovog raspršenja je vrlo slab (Singh, 2002). Prema Boltzmanovoj raspodjeli, većina molekula je u osnovnom energetskeg stanju pri sobnoj temperaturi, tj. vrlo mali broj se nalazi u višim energetskeg nivoima pa je intenzitet anti - Stokesovog raspršenja još manji. Dakle, može se zaključiti da je pojava Ramanovog raspršenja temeljena na Stokesovom raspršenju vjerojatnija od anti - Stokesovog raspršenja, ako se proces odvija pri sobnoj temperaturi. U Ramanovoj spektroskopiji uobičajeno se prikazuje samo Stokesova polovica spektra jer je pomak u valnim duljinama Stokesovog i anti - Stokesovog raspršenja, koji je jednak, usmjeren na suprotne strane u odnosu na Rayleighovo raspršenje. Pritom su Stokesov i anti-Stokesov spektar molekule simetrični u odnosu na valnu duljinu pobudnog zračenja pri čemu je anti-Stokesov spektar manjeg intenziteta.

Ramanov spektar karakterističan je za određenu molekulu (jedinostveni vibracijski spektar = *fingerprint* molekule), a dobiva se snimanjem intenziteta raspršene svjetlosti u odnosu na valnu duljinu ili frekvenciju. Svaki vibracijski mod molekule daje karakterističan pomak frekvencije, a broj modova molekule sa N atoma izračunava se pomoću izraza $n = 3N - 6$ za nelinearne molekule te $n = 3N - 5$ za linearne molekule. Slabije Ramanovo raspršenje se javlja kod vibracije polarnih veza (N-O, C-O, O-H) jer se promjenom njezine duljine, tijekom vibracije, ne povećava značajno efekt promjene polarizacije budući da takve veze imaju same po sebi jaku polarizaciju. Ali što je veza manje polarna, tijekom vibracije doživljava veću promjenu polarizabilnosti pa je i raspršenje jače (Janči, 2016).

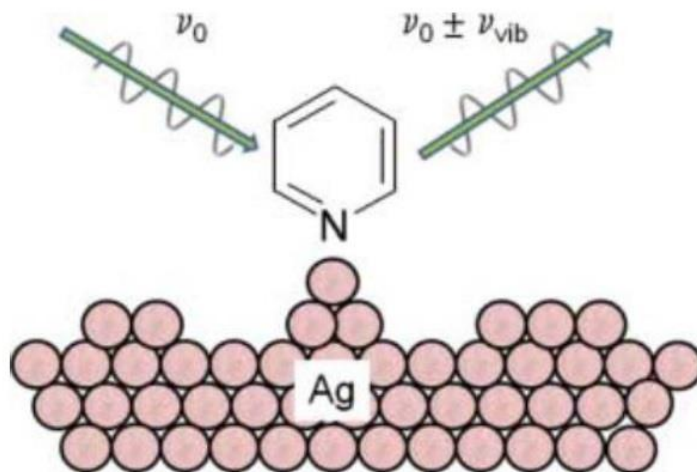
Ramanov spektar se može koristiti za identifikaciju i u određenim slučajevima, kvantifikaciju pojedinog analita, ali Ramanovo raspršenje daje slab signal pa je potrebna velika snaga izvora svjetlosti koja vrlo često dovodi do degradacije uzorka te onemogućava njegovu analizu. Osim toga, može doći do apsorpcije zračenja, ukoliko je energija pobudnog zračenja dovoljna za prijelaz između elektronskih stanja molekula. Ta apsorbirana energija se, pri povratku u osnovno elektronsko stanje, otpušta u obliku topline i/ili zračenja. Fluorescencija je vrlo česta pojava u Raman spektroskopiji te ometa analizu jer može u potpunosti zasjeniti Stokesovo raspršenje. Zbog pojave fotodegradacije uzorka i fluorescencije koji ograničavaju maksimalnu snagu izvora svjetlosti, Raman spektroskopija zahtjeva relativno visoku koncentraciju analita u uzorku kod analize proteina ili nukleinskih kiselina (Peticolas, 1995).

Rezonantna Ramanova spektroskopija (RRS) i spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) su specifične tehnike koje se koriste za povećanje intenzita signala odnosno osjetljivosti Ramanove spektroskopije (Mathies, 1995).

2.6.1. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS)

1974. godine je primijećeno da je Ramanov spektar molekule piridina koja je adsorbirana na srebrnu elektrodu neobično visokog intenziteta te je otkriven efekt površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (Fleischmann i sur., 1974; McQuillan, 2009) (Slika 5). Daljnja istraživanja su se proširila i na primjenu zlata, platine, bakra, aluminija i alkalijskih metala (Janči, 2016). Efekt se temelji se na tome da je ispitivana molekula adsorbirana na ili se nalazi u neposrednoj blizini površine metalne nanočestice - SERS supstrata. Iako sam mehanizam pojačanja nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da je molekula u blizini metalne površine pod utjecajem znatno snažnijeg električnog polja pa zbog elektromagnetskog

mehanizma pojačanja kao i kemijskog mehanizma koji se temelji na promjeni polarizabilnosti zbog interakcije molekule i metalne površine dolazi do pojačanja Ramanovog raspršenja od 10^3 do 10^7 puta (Yuen i sur., 2008).



Slika 5. Prikaz SERS efekta na primjeru molekule piridina adsorbirane na srebro (McQuillan, 2009)

SERS spektar je potrebno obraditi budući da uz signale analita, sadrži i brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, fluorescencije, kozmičkih interferencija, šuma i pozadinskog signala samog detektora. Dakle, interpretacija i upotreba spektra je vrlo složena, naročito za kvantitativne analize (Janči, 2016).

Budući da SERS tehnika ima visoku osjetljivost, odnosno može se detektirati analit u vrlo niskim koncentracijama, široko se primjenjuje u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti. Također, primjenom SERS spektroskopije, eliminira se fluorescencija zbog prijenosa energije s molekula na metal (Etchegoin i Le Ru, 2010). Iz tog razloga, mogu se analizirati različiti kemijski i biološki uzorci. Ograničavajući faktori kod primjene SERS spektroskopije su optimizacija parametara pripreme uzorka i samog mjerenja, točno određeni supstrati koji su prilagođeni ciljanom analitu te osiguravaju visoku osjetljivost i ponovljivost mjerenja i smanjenje interferencija drugih komponenti u uzorku.

2.6.1.1. SERS supstrati

Prema definiciji, SERS supstrat je bilo koja metalna struktura koja omogućuje površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja (Fleischmann i sur., 1974). Najčešće su izrađeni od zlata, srebra i bakra, a u grubo se mogu podijeliti na metalne nanočestice u suspenziji (npr. koloidne otopine), metalne elektrode, planarne metalne nanostrukture na krutoj podlozi (Janči, 2016). Metalne nanočestice u suspenziji spadaju u najviše korištene i najbolje istražene SERS supstrate jer njihova priprema ne zahtjeva složenu opremu te su troškovi niski, daju dobar faktor pojačanja i stabilnost (Kneipp i sur., 1997). Koloidne suspenzije metalnih nanočestica nastaju redukcijom metalnih soli u otopini uz dodatak redukcijskog i stabilizacijskog sredstva pri čemu metalne nanočestice imaju različit oblik i dimenzije ovisno o uvjetima i metodi pripreme, a parametri koji se uzimaju u obzir su vrsta metala, redukcijsko sredstvo, temperatura i koncentracija metalnih iona. Također, ovisno o veličini, obliku i dielektričnim svojstvima korištenog metala, sintetizirane nanočestice imat će različito područje plazmonske rezonancije (Aroca i sur., 2005). Srebrov nitrat ili sulfat ulaze u reakciju redukcije ako se sintetiziraju srebrni koloidi, dok se za sintezu zlatnih koloida najčešće reduciraju vodikov ili kalijev tetrakloraurat, a kao redukcijska sredstva se uglavnom koriste natrijev citrat i natrijev borhidrid. Tijekom skladištenja može doći do agregacije i sedimentacije koloidnih nanočestica pa se u reakcijsku smjesu dodaju i različita stabilizirajuća sredstva koja elektrostatski ili sterički stabiliziraju koloidnu otopinu (O'Brien i sur., 1990).

Kod snimanja SERS spektra, nestabilna koloidna suspenzija kod koje se javlja agregacija i sedimentacija SERS supstrata dovodi do slabe ponovljivosti zbog rezultata koji se mijenjaju tijekom vremena. Međutim, mali agregati nanočestica daju veće faktore pojačanja od faktora pojedinih nanočestica pa se neposredno prije SERS analize izaziva agregacija koloida pri optimalnim i kontroliranim uvjetima kako ne bi došlo do potpune precipitacije (Le Ru i Etchegoin, 2009). Kruti SERS supstrati su razvijeni iz razloga da se uklone nedostaci koloidnih SERS supstrata vezani uz stabilnost i ponovljivost mjerenja jer bi njihova kruta struktura trebala dati stabilnije uvjete SERS analize te bolju ponovljivost. Depozicijom koloidnih čestica iz suspenzije na krutu podlogu nastaje najjednostavniji tip krutih SERS supstrata pri čemu se kapi koloidne suspenzije mogu sušiti na krutoj podlozi, podloga se namače u koloidnoj suspenziji ili se nanočestice imobiliziraju na filterskim membranama (Yu i White, 2012). Postoji još i ink-jet printanje (Yu i White, 2010) i sitotisak (Qu i sur., 2012).

Kod postupaka depozicije, nanočestice se mogu nasumično rasporediti što dovodi do nejednolike strukture površine krutog supstrata, a budući da faktor pojačanja ovisi o geometriji površine supstrata i nastalim žarištima, tako dobiveni supstrati ne daju ponovljiva mjerenja. Metode samoorganizacije i usmjerene organizacije nanočestica na površini krute podloge daju bolje rezultate (Kho i sur., 2005; Tao i sur., 2007). Sličan problem nastaje i kod elektroda koje se koriste kao SERS supstrati, jer one moraju imati hrapavu površinu što se postiže različitim elektrokemijskim procesima, pri čemu ukupna hrapavost ovisi o uvjetima elektrokemijskog postupka obrade. Pritom, hrapavost može značajno varirati duž površine elektrode što dovodi do varijabilnosti rezultata (Sauer i sur., 2000).

Naparavanjem tankog sloja metala na nanostrukturiranu krutu podlogu dobivaju se različiti supstrati koji daju bolje rezultate u pogledu ponovljivosti, na primjer "otoci metalnih filmova", koji dovode do pojačanja raspršenja, ali je faktor pojačanja manji nego kod koloidnih SERS supstrata. Da bi faktor pojačanja bio velik, a ponovljivost dobra, koriste se supstrati dobiveni naparavanjem metalnog filma na površinu uređene nanostrukture izrađene na bazi polimera, aluminijska, silicijeva. Budući da je moguće kontrolirati strukturu, veličinu i oblik mikro i nano struktura na koje se potom naparava sloj metala, izrađuju se SERS supstrati prilagođeni određenoj valnoj duljini pobude koji daju reproducibilne rezultate (Kahl i sur., 1998; Dou i sur., 2013). Međutim, sam proces dugo traje i visoki su troškovi izrade (Janči, 2016).

2.6.2. Primjena Raman spektroskopije u određivanju histamina

Janči (2016) u svojem istraživanju ispituju mogućnost primjene Raman spektroskopije za detekciju različitih spojeva u mesu ribe, između ostalog, i histamina. Istraživanje je obuhvaćalo nekoliko faza, pri čemu je početna faza bila usmjerena na sintezu različitih tipova SERS supstrata te je pripremljeno 6 koloidnih suspenzija nanočestica srebra, 11 krutih supstrata tipa „srebrni film preko nanosfera“ (AgFON) te 11 AgFON supstrata funkcionaliziranih slojem metalo-organske mreže.

U drugoj fazi istraživanja, SERS supstrati su ispitani analizama provedenima na analitičkom standardu histamina uz optimirane parametre mjerenja (vrsta i koncentracija agregirajućeg sredstva, pH, vrijeme snimanja spektra, valna duljina pobudnog zračenja). Utvrđeno je da se kombinacijom srebrnog koloida reduciranog citratnim ionima i otopinom NaBH_4 (0,23 M) kao

agregirajućim sredstvom postižu najbolji rezultati za histamin pri valnoj duljini pobude od 514,5 nm.

Daljni tijek istraživanja je obuhvatio mjerenja na uzorcima ribe uz dodatak histamina te je razvijeno nekoliko postupaka pripreme uzorka koji omogućuju snimanje SERS spektra histamina u ekstraktima ribljeg mišićja. Najbolji rezultati su dobiveni kod ekstrakcije histamina perkloratnom kiselinom uz pročišćavanje ekstrakata butan-1-olom pri $\text{pH} > 12,5$ i uz naknadno uparavanje jer se smanjio utjecaj ostalih komponenti prisutnih u uzorku i omogućena je detekcija histamina u uzorku ribe pri koncentraciji od 10 mg/kg. Koncentracije histamina u analiziranim uzorcima iznosile su 0 - 400 mg/kg te su na temelju toga konstruirani kalibracijski modeli. Spektralno područje koje obuhvaća histamin iznosi od 1139,9 - 1643,7 cm^{-1} za koncentraciju histamina od 0 - 200 mg/kg.

Zadnja faza istraživanja je provedena na realnim uzorcima ribe u kojima se histamin formirao prirodnim putem. Uzorci su paralelno analizirani razvijenom SERS metodom te HPLC-om i usporedbom dobivenih rezultata zaključeno je da se najveća točnost postiže primjenom modela dobivenog linearnom regresijom na temelju intenziteta SERS vrpce histamina na 1264 cm^{-1} . Razvojem ove metode, značajno su smanjeni troškovi kemikalija i opreme te je skraćeno vrijeme potrebno za analizu (30 min) u usporedbi s referentnom HPLC metodom (140 min).

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci ribe

Svježi fileti palamide (*Sarda sarda*) nabavljeni su u ribarnici te su nakon dopremanja u laboratorij usitnjeni kuhinjskim nožem. Usitnjeni fileti podijeljeni su u 5 grupa i ostavljeni na sobnoj temperaturi tijekom 6, 12, 18, 24, 30 sati kako bi došlo do prirodnog formiranja histamina. Po isteku određenog vremena čuvanja na sobnoj temperaturi, uzorci su zamrznuti na -18°C i čuvani do daljnje analize.

3.1.2. Reagensi

- otopina dansil-klorida (98 %): otopi se 50 mg dansil-klorida u 10 ml acetona, koristi se svježja otopina, Acros organics, New Jersey, USA
- *stock* otopina histamina: otopi se 82 mg histamin-dihidroklorida u 100 ml vode (82,8 mg histamin-dihidroklorida je ekvivalent 50 mg histamina), Sigma chemical Co., Saint Louise, SAD
- interni standardi: otopi se 50 mg imidazola (99 %) i 1,7-diaminoheptana u 10 ml vode, Acros organics, New Jersey, USA
- otopina L-prolina (99 %): otopi se 1 g L-prolina u 10 ml vode, Acros organics, New Jersey, USA
- perkloratna kiselina (0,4 mol/L): pipetira se 17,2 ml 70% HClO_4 (ili 19,5 ml 65% HClO_4) u odmjernu tikvicu od 500 ml i dopuni vodom do oznake, Carlo Erba reagents, Francuska
- zasićena otopina Na_2CO_3 : otopi se cca 16 g Na_2CO_3 u 50 ml vode, Gram- mol, Hrvatska
- toluen
- NaOH (5 M), J. T. Baker, Nizozemska
- NaCl, Kemika, Hrvatska
- butan-1-ol, Kemika, Hrvatska
- srebrov nitrat, Kemika, Hrvatska
- trinatrijev citrat dihidrat, Kemika, Hrvatska
- natrijev borhidrid (0,23 M), Carlo Erba, Francuska

3.1.3. 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 1100 Series LC (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany)
- analitička vaga Kern, Njemačka
- homogenizator Ultra turax T-18, IKA-Labortechnik, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje sadržaja histamina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Određivanje udjela histamina provedeno je prema metodi Malle i sur. (1996)

3.2.1.1. Priprema otopine standarda

Histamin-dihidroklorid otopljen je u vodi, u odmjerne 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 interni standard. Dobiveni rezultati korišteni su za izradu baždarne krivulje.

3.2.1.2. Priprema uzoraka

U kivetu je odvagano 5 g uzorka, dodano je 500 μ l otopine internog standarda. Uzorak je homogeniziran s 20 ml 0.4 M HClO₄ na Ultraturax-u, 2 min na maksimalnoj brzini. Homogenizirani uzorak je preliven u odmjernu tikvicu od 50 ml, dopunjen do oznake s HClO₄, vraćen nazad u plastičnu kivetu i stavljen u centrifugu na 3500 x g/3 min. U kivetu je otpipetirano 100 μ l supernatanta, dodano je 200 μ l zasićene otopine Na₂CO₃ i 500 μ l otopine dansil-klorida. Nakon intenzivnog mješanja na vortexu, svaki uzorak je ostavljen preko noći. Idući dan je u kivetu dodano 100 μ l otopine L-prolina, dobro je promiješano na vortexu i ostavljeno da stoji 30 min u mraku. Nakon toga je dodano 500 μ l toluena, promiješano na vortexu i ostavljeno da se odvoje slojevi. Iz gornjeg sloja je uzeto 200 μ l i prebačeno u vialku. Vialke s uzorcima su uparene u struji dušika do suhog, a zatim je suhi uzorak otopljen u 200 μ l acetonitrila, dobro promiješan te prebačen u insert za vialku i stavljen u instrument.

Provjera baždarnog dijagrama provedena je pomoću otopina B1, B2, B3 i slijepa probe. Pripremljene otopine tretirane su na isti način kao i uzorci – 100 μ l otopine, 200 μ l Na₂CO₃ i 500 μ l dansil-klorida promiješano je na vortexu i ostavljeno u mraku preko noći.

Otopina B1: 200 μ l 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 μ l otopine internog standarda pipetirano je u odmjernu tikvicu od 50 ml i dopunjeno vodom do oznake.

Slijepa proba: 50 μ l otopine internog standarda pipetirano je i dopunjeno do 5 ml sa HClO₄

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%.

3.2.1.3. 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.

3.2.1.4. Kromatografska analiza

Kolona: Zorbax ODS (C18), 5 μm (250 x 4,6 mm I.D.)

Mobilne faze: **A** - voda:acetonitril 40:60 (v:v)

B - acetonitril

Eluiranje: gradijentno

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, wavelength 254 nm, Ref. Value 550 nm, Bw 80 nm

Temperatura kolone: 25 °C

Injektirani volumen: 20 μL

3.2.2. Određivanje histamina Raman spektroskopijom

Određivanje histamina Raman spektroskopijom provedeno je prema Janči i sur., 2017.

3.2.2.1. Priprema uzoraka

5 grama uzorka odvagano je u plastičnu kivetu, dodano je 20 ml 0.4 M HClO₄ te je sve dobro homogenizirano na Ultraturax-u 2 min na maksimalnoj brzini. Smjesa je zatim prebačena u odmjernu tikvicu od 50 ml, dopunjena do oznake perkloratnom kiselinom i vraćena nazad u plastičnu kivetu. Uslijedila je filtracija preko filter papira. 2 ml filtrata je otpipetirano u staklenu epruvetu u koju je prethodno odvagano 1,4 g NaCl, a zatim je dodano 0,4 ml 5M NaOH i 2 ml 1-butanola. Staklene epruvete su stavljene na tresilicu na 70 rpm/10 min. Nakon odvajanja slojeva, iz gornjeg sloja je otpipetirano 100 µl 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 NaBH₄). Nakon miješanja, a prije same SERS analize (Slika 6), uzorci su stajali 4 minute.



Slika 6. Horiba Jobin Yvon T64000 Ramanov spektrometar (Janči, 2016)

3.2.2.2. Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC)

Koloidna suspenzija srebra AGC pripravljena 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. Otopina je potom ostavljena da se hladi do sobne temperature uz konstantno miješanje.

3.2.2.3. Obrada SERS spektara

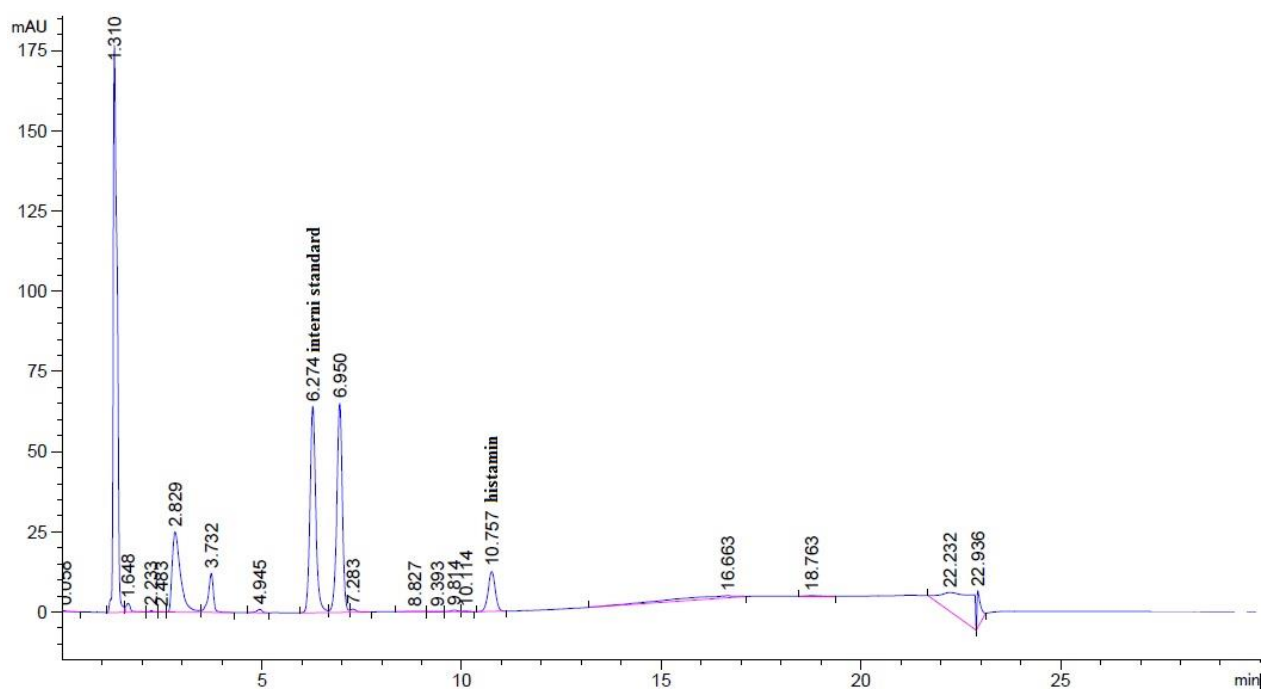
Snimljene SERS spektre je potrebno obraditi. SERS spektar, uz signale analita, sadrži i brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, šuma, fluorescencije te pozadinskog signala samog detektora. Nadalje, apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra ovisi o brojnim parametrima čija je kontrola često zahtjevna tijekom eksperimenta, a to su primjerice oscilacije lasera. Kako bi se navedeni utjecali eliminirali, provodi se optimizacija parametara za korekciju pozadinskog signala, šuma te normalizaciju spektra. Postoji više načina predobrade spektara, međutim kao najbolji način se pokazala obrada SERS spektra u programu LabSpec 6 (Horiba Scientific). "*Baseline correction*" funkcija se koristi za korekciju pozadinskog signala na način da je automatski odabrano 40 reprezentativnih točaka u SERS spektru kojima je prilagođen polinom 9. stupnja (eng. *curve fitting*). Procijenjeni pozadinski signal oduzima se od snimljenog spektra. Zatim su SERS spektri izglađeni (eng. *spectral smoothing*) primjenom Savitzky Golay algoritma sa širinom prozora $W = 20$ i redom interpolacijskog polinoma $M = 2$ s ciljem povećanja omjera signala i šuma. Slijedi normalizacija spektra pri čemu je kao interni standard korišten intenzitet vrpce na 1437 cm^{-1} prethodno asigniran citratnim ionima prisutnim u AGC koloidu.

Cilj ovog istraživanja je validacija metode Raman spektroskopije za određivanje udjela histamina u ribi koju su razvili Janči i sur. (2017). Provedena je HPLC i SERS analiza baždarnih

uzoraka i realnih uzoraka palamide (uzorci ribe u kojima se histamin formirao prirodnim putem). Dobiveni rezultati su obrađeni u MS Excel programu te su konstruirani baždarni dijagrami za HPLC i SERS analizu prema mjerenjima baždarnih uzoraka, a rezultati mjerenja realnih uzoraka su uspoređeni na način da se HPLC metoda uzima kao referentna. Prikaz dobivenih rezultata slijedi u nastavku.

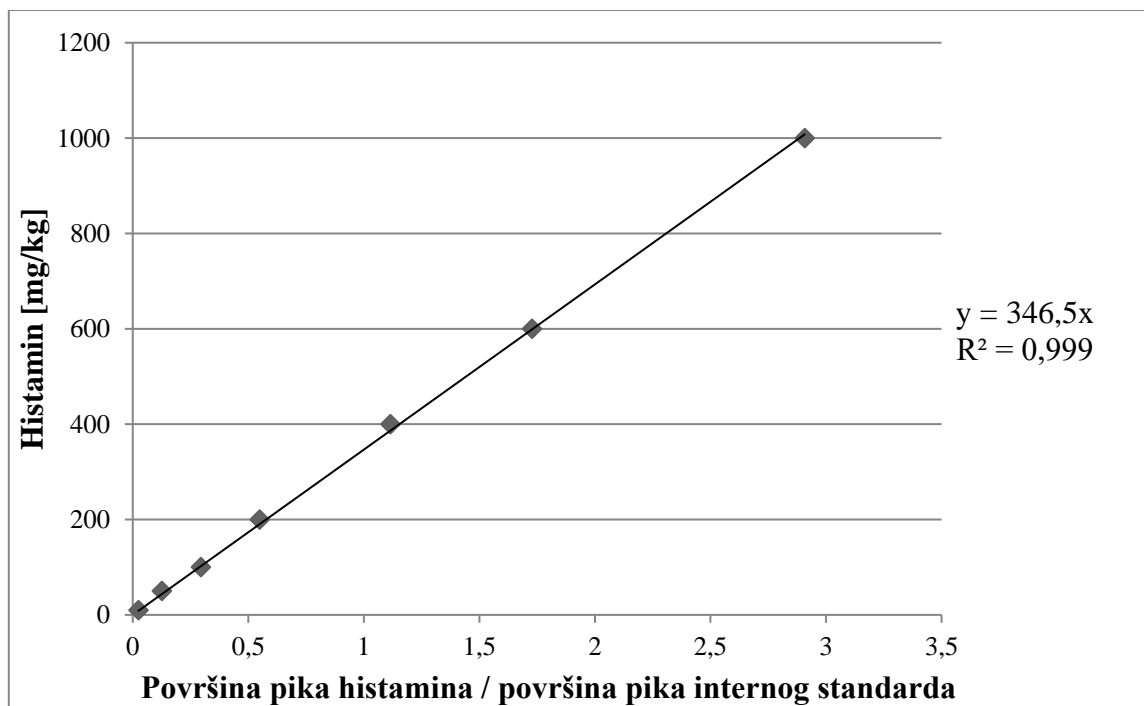
4.1. HPLC ANALIZA

Baždarni pravac je konstruiran pomoću otopine histamina različitih koncentracija uz dodatak internog standarda te su spojevi identificirani na temelju retencijskog vremena (Slika 7).



Slika 7. Kromatogram otopine internog standarda i histamina koncentracije 100 mg/kg

Baždarni pravac je konstruiran linearnom regresijom iz odnosa koncentracije histamina i omjera površine pikova histamina i internog standarda (Slika 8).



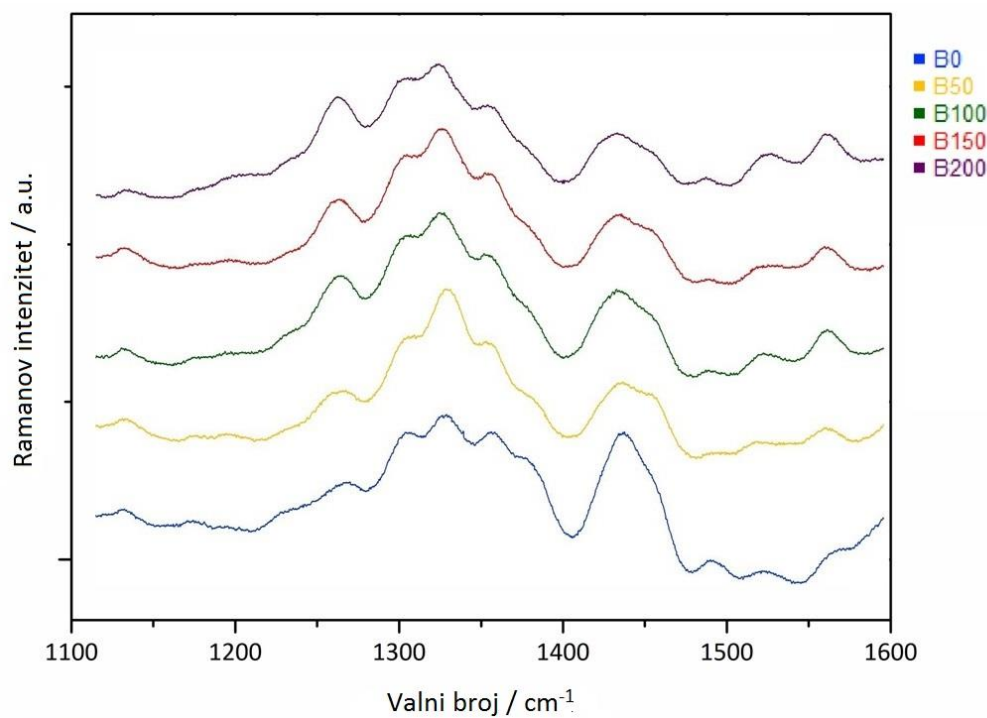
Slika 8. Ovisnost koncentracije histamina o omjeru površina histamina i internog standarda

Tablica 1. Podaci za baždarni pravac za HPLC metodu

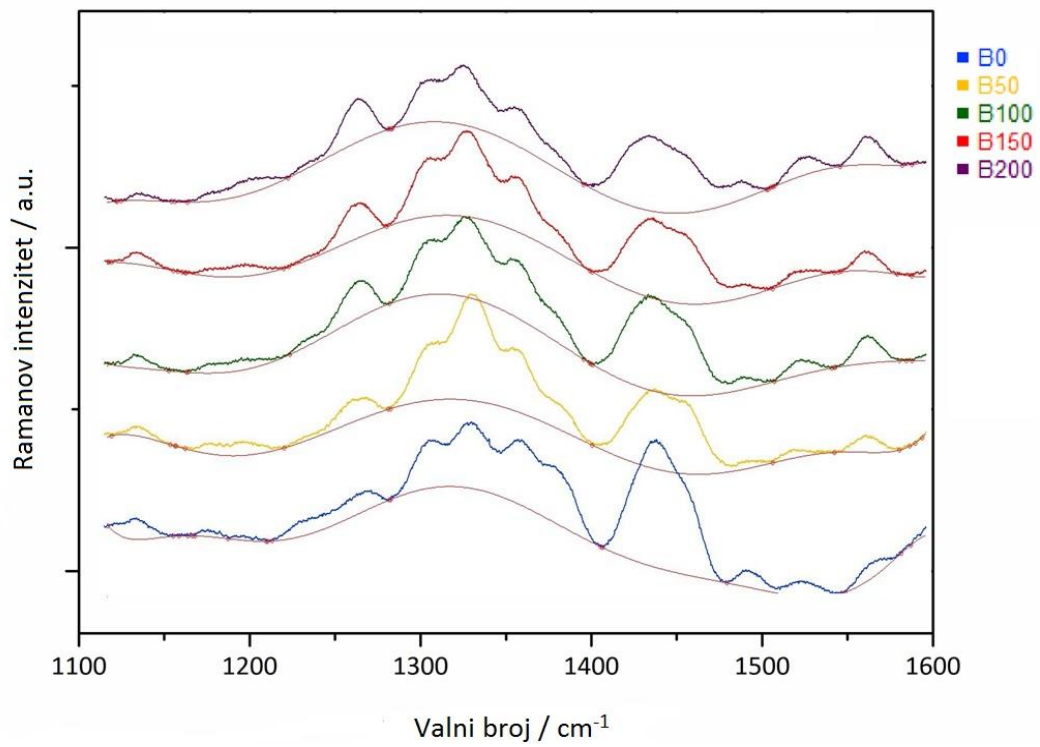
Jednadžba pravca	$y = 346,5x$
Nagib	346,5
Odsječak	0
Broj mjerenja	5
Koeficijent korelacije	0,999

4.2. SERS ANALIZA

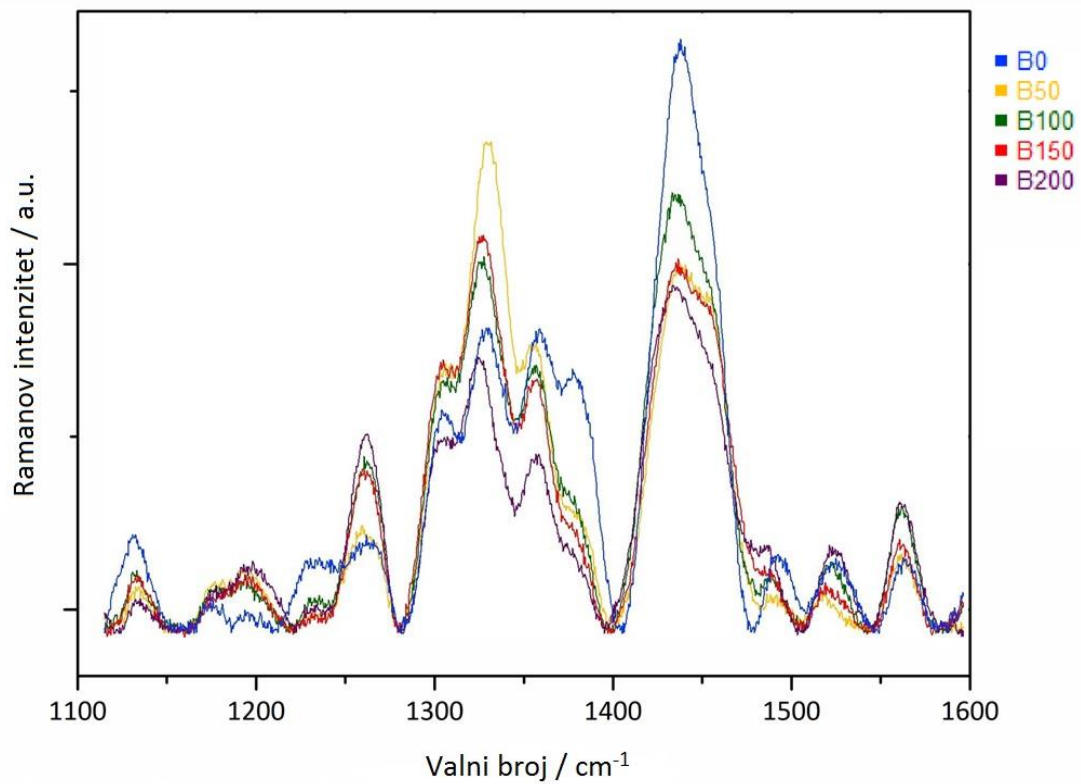
Nakon snimanja SERS spektara, isprobano je više načina predobrade spektara, međutim kao najbolji način se pokazala obrada SERS spektra u programu Labspec 6 (Horiba Scientific). Obrada spektara je prikazana na slikama 9a, 9b, 9c, 9d, 9e.



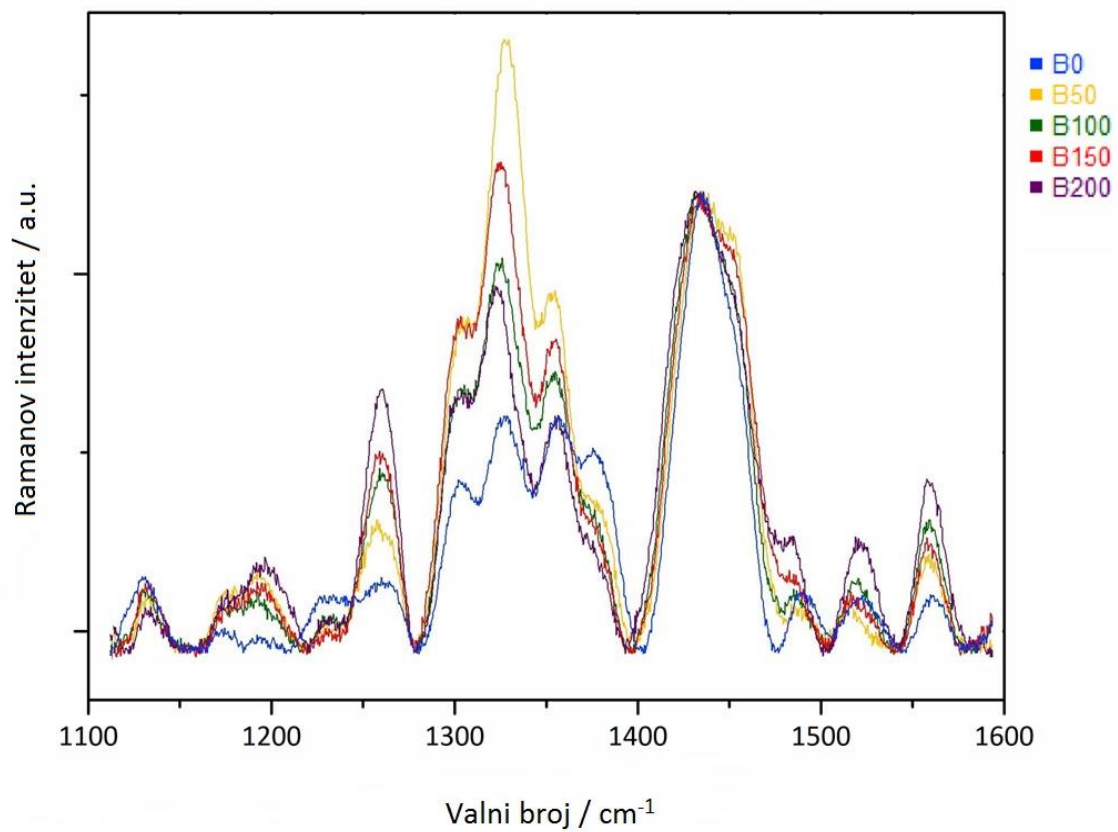
Slika 9a. Neobrađeni SERS spektar



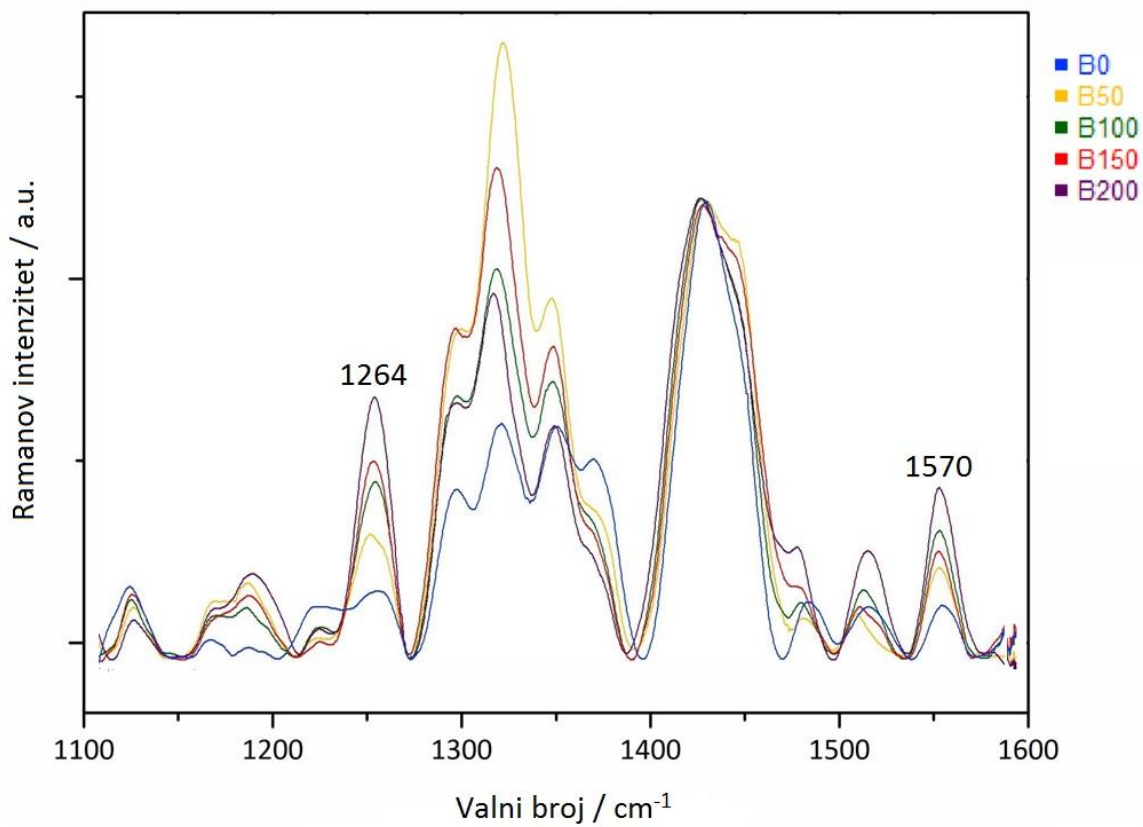
Slika 9b. Korekcija pozadinskog signala - aproksimacija bazne linije



Slika 9c. Korekcija pozadinskog signala - oduzimanje aproksimiranog pozadinskog signala

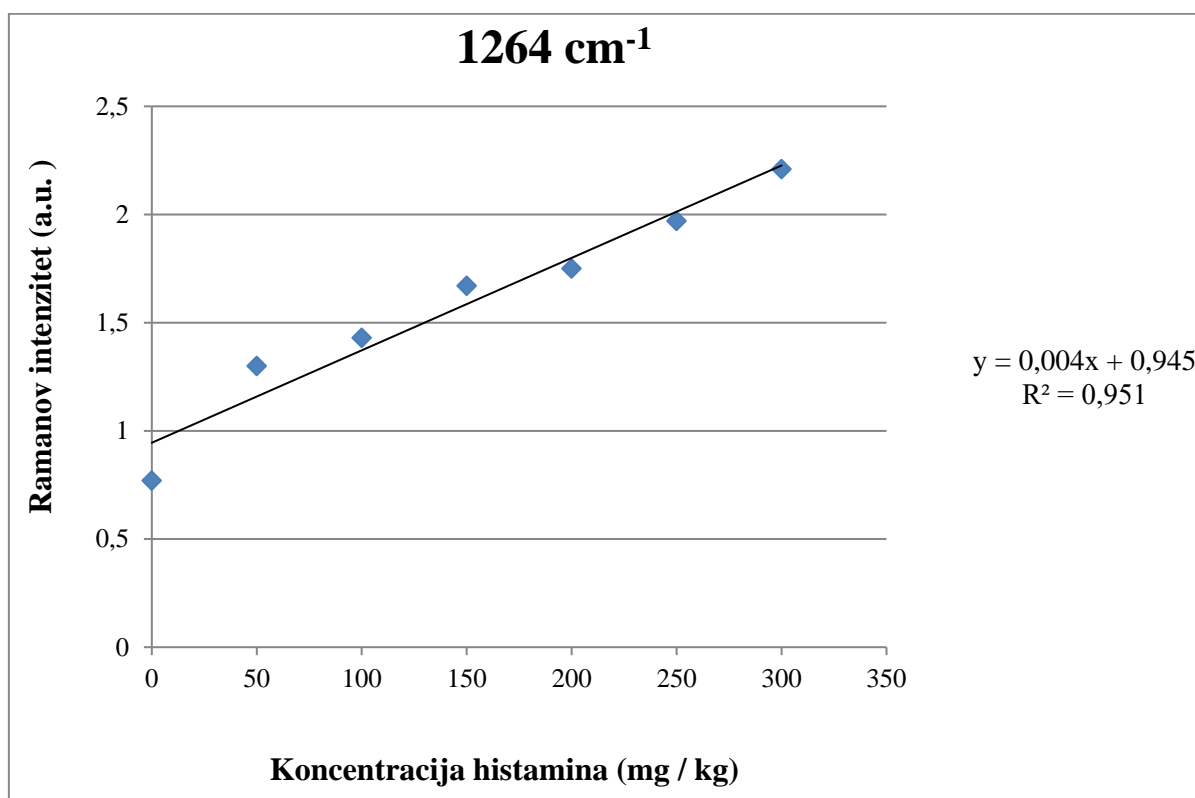


Slika 9d. Normalizacija spektra

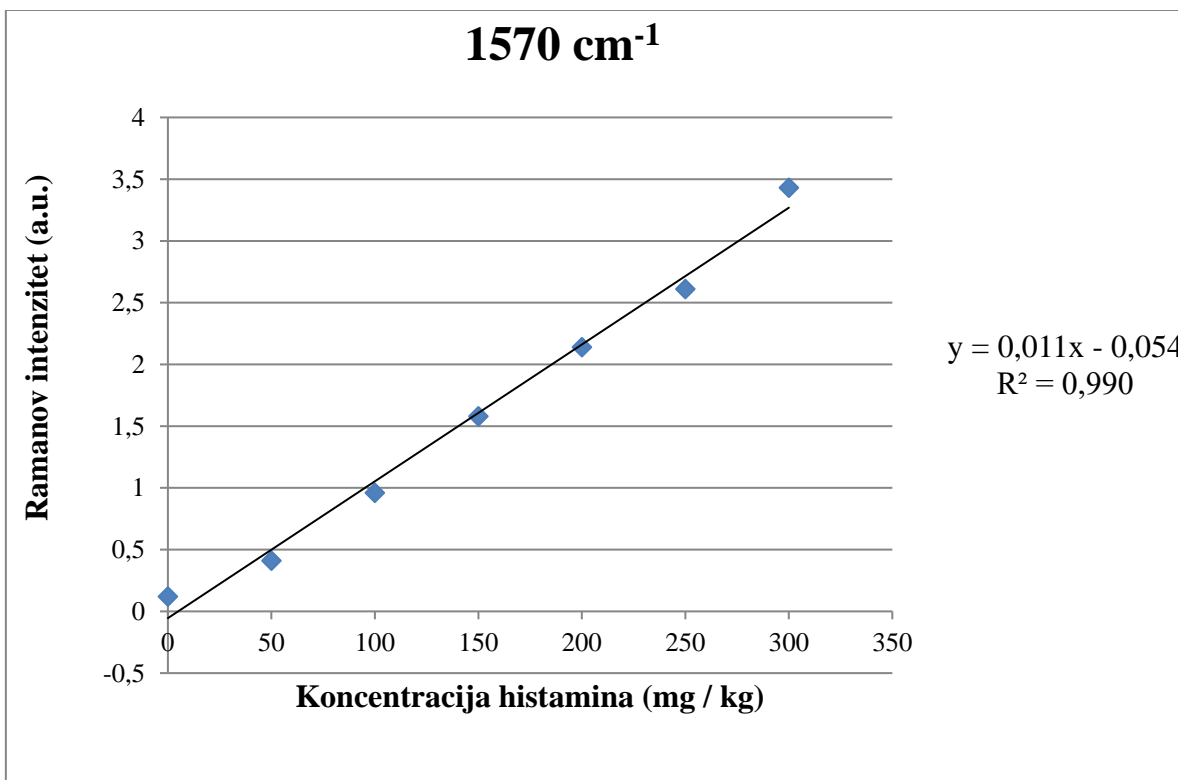


Slika 9e. Korekcija šuma

Nakon obrade prikazanih spektara, izradio se baždarni pravac. Dodane koncentracije histamina u baždarnim uzorcima su iznosile 0, 50, 100, 150, 200, 250 i 300 mg/kg. Za izradu kalibracijskih modela korištene su srednje vrijednosti (10 mjerenja za svaku koncentraciju) intenziteta vrpce histamina na 1264 cm^{-1} te je baždarni pravac konstruiran metodom linearne regresije. Valjanost kalibracijskih modela procijenjena je na osnovi koeficijenta korelacije (R^2). Baždarni pravci prikazani su na slikama 10a i 10b.



Slika 10a. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina na 1264 cm^{-1}



Slika 10b. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina na 1570 cm⁻¹

S obzirom na dobivene R² vrijednosti, bolji model je onaj koji ima već koeficijent korelacije (1570 cm⁻¹), međutim u nastavku će se prikazati rezultati za oba modela. Za provjeru kalibracijskih modela pripremljeni su realni uzorci palamide u kojima je histamin nastao prirodnim putem (kvarenjem palamide). 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 vrpca histamina na 1264 i 1570 cm⁻¹. Spektri su obrađeni na isti način kao i spektri baždarnih uzoraka. Kao referentne vrijednosti za koncentraciju histamina, uzimaju se vrijednosti iz HPLC-a. U Tablici 2 prikazani su rezultati za realne uzorke.

Tablica 2. Rezultati HPLC i SERS analize realnih uzoraka

Uzorak	Metoda	Broj mjerjenja	Srednja vrijednost	RSD (%)	Točnost (%)
UZ 1	HPLC	4	33,59± 0,61	1,81	100
	SERS 1264	4	31,20± 6,23	19,97	92,87
	SERS 1570	4	36,07± 3,50	9,71	107,35
UZ 2	HPLC	4	41,11± 1,03	2,50	100
	SERS 1264	4	43,65± 12,64	28,95	106,18
	SERS 1570	4	45,41± 3,39	7,48	110,45
UZ 3	HPLC	4	76,13± 0,45	0,59	100
	SERS 1264	4	88,91± 9,56	10,76	116,79
	SERS 1570	4	73,9± 3,43	4,64	97,12
UZ 4	HPLC	4	136,18± 0,36	0,26	100
	SERS 1264	4	146,96± 1,39	0,95	107,92
	SERS 1570	4	142,48± 5,02	3,52	104,63
UZ 5	HPLC	4	184,89± 0,59	0,32	100
	SERS 1264	4	179,28± 10,29	5,74	96,96
	SERS 1570	4	181,18± 10,22	5,64	97,99

4.3. USPOREDBA SERS I HPLC METODE

Nakon snimanja i obrade dobivenih spektara, jasno su vidljive vrpce histamina na 1264 i 1570 cm^{-1} (Slika 9e) iz čega se može zaključiti da su primjena AGC koloida asigniranog citratnim ionima i ekstrakcija histamina 0.4 M perkloratnom kiselinom uspješne. Rezultati su u skladu s istraživanjem Janči i sur. (2017) gdje se provodi optimizacija parametara Raman spektroskopije, koristeći AGC koloid, za određivanje histamina u tkivu skuše. Oni u svojem radu također zapažaju najveći intenzitet histaminske vrpce na 1268 i 1570 cm^{-1} . Tu činjenicu pripisuju vibracijama istezanja imidazolnog prstena histamina. Janči (2016) u svojem

istraživanju uspoređuje spektre mješavine AGC koloida, NABH_4 i otopine molekula histamina sa spektrom mješavine AGC koloida, NABH_4 i vode (slijepa proba) te uočava vrpce izrazito jakog intenziteta na 1268 , 1320 i 1570 cm^{-1} .

Kalibracijski modeli su konstruirani metodom linearne regresije te su vrlo dobri rezultati postignuti kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1570 cm^{-1} , budući da je koeficijent korelacije $R^2 = 0,99$, dok je isti koeficijent kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} niži ($R^2 = 0,951$). Ovakvi rezultati suprotni su rezultatima Jančija (2016), gdje je R^2 veći kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} . Varijacije se mogu objasniti razlikama u pripremi uzoraka. Iz baždarnih dijagrama (Slika 10a. i 10b.) vidljivo je da intenzitet vrpce histamina raste s povećanjem koncentracije histamina u uzorku što potvrđuje rezultate Jančija, 2016.

Kako je svrha ovog istraživanja validacija metode za određivanje histamina u ribi koju su razvili Janči i sur. (2017) usporedbom dobivenih rezultata za HPLC i SERS analizu (Tablica 2) u nastavku će se raspraviti o preciznosti i ponovljivosti te točnosti obje metode. Nadalje, prikazat će se prednosti jedne i druge metode.

Validacija analitičke metode uključuje određivanje i optimizaciju parametara te metode s ciljem utvrđivanja njezine prikladnosti za dobivanje željenih informacija.. Postupci validacije se razlikuju ovisno o analitu te svaka metoda zahtjeva individualan pristup. Preciznost se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. U ovom slučaju, uvjeti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu i kratko razdoblje pa se govori o preciznosti pod uvjetima ponovljivosti ili o ponovljivosti (Lazarić, 2012).

U Tablici 2. mogu se uočiti vrijednosti za izmjerene koncentracije histamina koje su u opsegu od $33,59 \text{ mg/kg}$ do $181,18 \text{ mg/kg}$ što je unutar zadanih parametara razvijene metode od $0 - 200 \text{ mg/kg}$. Standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD) govore o preciznosti HPLC odnosno SERS metode. Standardna devijacija za sve uzorke manja je kod HPLC-a nego kod SERS metode. Nadalje, RSD vrijednosti za HPLC metodu se kreću u rasponu od $0,26 \%$ ($136,18 \pm 0,36 \text{ mg/kg}$) do $2,50 \%$ ($41,11 \pm 1,03 \text{ mg/kg}$) pri čemu uzorci 4 i 5 imaju RSD vrijednost manju od RSD vrijednosti unutar zadanih granica prihvatljivosti - $0,5 \%$ što znači da je preciznost HPLC metode dobra, ne izrazito visoka. S obzirom na R^2 vrijednost baždarnih pravaca za SERS analizu, zaključeno je da je bolji kalibracijski model onaj koji se

temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1570 cm^{-1} pa su sukladno tome RSD vrijednosti manje nego kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1264 cm^{-1} osim kod uzorka 4. Ako se usporede uzorci 1, 2, 3, 4, povećanjem koncentracije histamina, povećava se i preciznost metode kod kalibracijskog modela na 1570 cm^{-1} budući da RSD vrijednosti padaju. Ista pojava, javlja se i kod kalibracijskog modela na 1264 cm^{-1} ako se usporede uzorci 2, 3 i 4.

Gledajući RSD vrijednosti za obje metode, HPLC metoda ima puno veću preciznost od SERS metode budući da su RSD vrijednosti za oba modela (1264 i 1570 cm^{-1}) relativno visoke. Slično zapaža i Janči, 2016. koji u svojem istraživanju zaključuje da HPLC ima izrazito visoku preciznost prema SERS metodi. Razlog zbog kojeg HPLC ima veću preciznost kao i ostale kromatografske tehnike je taj da se tijekom kromatografske analize komponente uzorka razdvajaju na kromatografskoj koloni i zasebno detektiraju nakon izlaska iz kolone, dok s druge strane, SERS supstrati nisu toliko selektivni i u spektru su vidljive komponente složenog sustava koji se sastoji od uzorka, supstrata i agregirajućeg sredstva.

Točnost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referencijske vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta (Lazarić, 2012). Istinitost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina, a u ovom radu procjena se temelji na usporedbi rezultata ispitivane metode (SERS) s rezultatima dobivenim uhodanom referencijskom metodom (HPLC).

U Tablici 2 prikazani su rezultati za točnost obje metode, a dobiveni su na način da se izračuna omjer (analitički prinos) srednjih vrijednosti izmjerenih koncentracija histamina dobivenih SERS analizom i srednjih koncentracija histamina izmjerenih HPLC metodom te se izrazi kao postotak. Odstupanja od referentne vrijednosti (vrijednosti dobivenih HPLC metodom) se kreću od 3 % do 16, 8 % kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1264 cm^{-1} te 2 % do 10, 44 % kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} odnosno ovi rezultati su točniji (manja su odstupanja od referentne vrijednosti za pojedine uzorke). Pritom treba razjasniti da vrijednosti za uzorke 1 i 2 na 1264 cm^{-1} imaju manja odstupanja od odstupanja vrijednosti za uzorke 1 i 2 na 1570 cm^{-1} odnosno te vrijednosti su točnije. Sukladno tome, vrijednosti za uzorke 3, 4, 5 na 1570 cm^{-1} imaju manja odstupanja od referentne vrijednosti nego odstupanja vrijednosti za uzorke 3, 4, 5 na 1264 cm^{-1} pa se može reći da je ovaj model točniji ako se gleda ukupni broj uzoraka.

Ako se usporede odstupanja vrijednosti za uzorke 3, 4 i 5 s odstupanjima vrijednosti za uzorke 1 i 2 na 1570 cm^{-1} primijećuje se da su odstupanja manja kod većih koncentracija histamina odnosno može se očekivati povećanje točnosti pri višim koncentracijama. Janči (2016) iznosi istu činjenicu za model konstruiran linearnom regresijom temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} .

Iz svega navedenog, proizlazi da je HPLC metoda preciznija i točnija od SERS metode, međutim, primjenom SERS metode za analizu i kvantifikaciju histamina u tkivu ribe se također mogu dobiti dobri rezultati budući da su određene RSD vrijednosti niske te je točnost blizu 100 %. Kod razvijene SERS metode je značajno pojednostavljen postupak analize te je potrebno manje vremena za analizu jednog uzorka (~30 min) u odnosu na HPLC metodu (~140 min) iz razloga što SERS metoda ne zahtijeva postupak derivatizacije histamina te reakciju s L-prolinom koja traje ukupno 90 min.

Nadalje, sam postupak analize, tj. snimanja SERS spektra traje 1 min, dok kod HPLC-a traje 30 min. Da bi se provela SERS analiza, potreban je manji broj jednostavnih i lako dostupnih kemikalija, dok s druge strane, kod HPLC analize se koristi veći broj kemikalija pri čemu trošak nabave može biti velik jer je potrebno nabaviti interni standard i sredstvo za derivatizaciju. Danas su na tržištu dostupni mali Ramanovi spektrometri, s cijenom značajno nižom od cijene tekućinskih kromatografa pa iz toga proizlazi da je trošak SERS analize po uzorku značajno manji od troška HPLC analize ako se u obzir uzmu troškovi nabave analitičkih instrumenata i potrošnog materijala. Iako SERS metoda prednjači u ovim karakteristikama, najvažnije je osigurati preciznu i točnu analizu u realnim uvjetima (npr. industrijskim).

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

1. Upotrebom srebrnog koloida reduciranog citratnim ionima u kombinaciji s otopinom NaBH_4 koncentracije $0,23 \text{ mol L}^{-1}$ kao agregirajućim sredstvom, nakon snimanja spektara, jasno su vidljive vrpce histamina na 1264 i 1570 cm^{-1} .
2. Baždarni pravci su konstruirani metodom linearne regresije za HPLC i SERS metodu.
3. Usporedbom dobivenih rezultata SERS i HPLC analize, uočeno je da je najveća točnost postignuta primjenom modela koji se temelji na intenzitetu SERS vrpce histamina na 1570 cm^{-1} budući da je koeficijent korelacije ($R^2 = 0,990$) veći za ovaj model od koeficijenta korelacije za model na 1264 cm^{-1} ($R^2 = 0,951$).
4. S obzirom na zadane parametre, metoda je uspješno validirana.

Aroca, R. F., Alvarez-Puebla, R. A., Pieczonka, N., Sanchez-Cortez, S., Garcia-Ramos, J. V. (2005) Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures. *Adv. Colloid Interfac.* **116**, 45-61.

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“, Šibenik, str. 222.

Dalgaard, P., Emborg, J. (2009) Histamine fish poisoning – new information to control common seafood safety issue. U: Foodborne pathogens – Hazards, risk analysis and control. (Blackburn, C.W., McClure, P.J., ured.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, str. 292-324.

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

Dalgaard, P., Madsen, H.L., Samieian, N., Emborg, J. (2006) Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 80-95.

Dou, X., Chung, P.-Y., Sha, H., Lin, Y.-C., Jiang, P. (2013) Large-scale fabrication of nanodimple arrays for surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 12680-12687.

EC (2013) *The Rapid Alert System for Food and Feed: 2012 Annual Report*, EC - European commission, Luxembourg, <http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf>. Pristupljeno 6. travnja, 2017.

EC (2016) *The Rapid Alert System for Food and Feed: 2012 Annual Report*, EC - European commission, Luxembourg
<http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf>. Pristupljeno 6. travnja, 2017.

Emborg, J., Dalgaard, P. (2006) Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna – an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *J. Food Prot.* **69**, 897-906.

Emborg, J., Dalgaard, P., Kjolby, A., Sorensen, N.D., Ballin, N.Z., Larsen, I.K. (2006) Biogenic amine concentrations, microflora and product characteristics of seafood implicated in incidents of histamine fish poisoning (HFP). SEAFOODplus. Danish Institute for Fisheries Research, str. 1-22.

Etchegoin, P. G., Le Rue, E. C. (2010) Basic Electromagnetic Theory of SERS. U: Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications (S. Schlücker, ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, str. 1-37.

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

Frank, H. A., Yoshinaga, D. H., Nip, W.-K. (1981) Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures. *Mar. Fish. Rev.* **43**, 9-14.

Halasz, A., Barath, A., Simons-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994) Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends. Food Sci. Tech.* **5**, 42-48.

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

Janči, T. (2016) *Mogućnost primjene Raman spektroskopije pri kontroli kvalitete ribe*. Doktorski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Janči, T., Valinger, D., Gajdoš Kljusurić, J., Mikac, L., Vidaček, S., Ivanda, M. (2017) *Food Chem.* **224**, (2017) 48–54

Kahl, M., Voges, E., Kostrewa, S., Viets, C., Hill, W. (1998) Periodically structured metallic substrates for SERS. *Sensor. Actuat. B- Chem.* **51**, 285-291.

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

Kho, K. W., Shen, Z. X., Zeng, H. C., Soo, K. C., Olivo, M. (2005) Deposition Method for Preparing SERS-Active Gold Nanoparticle Substrates. *Anal. Chem.* **77**, 7462-7471.

Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R. R., Feld, M. S. (1997) Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **78**, 1667-1670.

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

Le Ru, E. C., Etchegoin, P. G. (2009) Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects, Elsevier B.V. , Amsterdam.

Lee, P. C., Meisel, D. (1982) Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem-US.* **86**, 3391-3395.

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

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

Mathies, R. A. (1995) Biomolecular vibrational spectroscopy. *Method. enzymol.* **246**, 377-389.

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

Mendes, R. (2009) Biogenic amines. U: Fishery products Quality, Safety and Authenticity. (Rehbein, H., Oehlenschlager, J., ured.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, str. 42-67.

Nosić, M., Krešić, G. (2015) Plava riba – prednosti ali i neki rizici konzumiranja. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* **4**, 16-27.

Nottestad, L. (2012, 27. travnja) Atlantic Bonito. Institute of Marine Research, <
http://www.imr.no/temasider/fisk/stripet_pelamide/en>. Pristupljeno 4. travnja 2017.

O'Brien, R. W., Midmore, B. R., Lamb, A., Hunter, R. J. (1990) Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **90**, 301-312.

Peticolas, W. L. (1995) Raman spectroscopy of DNA and proteins. *Method. Enzymol.* **246**, 389-416.

Rawles, D.D., Flick, G.J., Martin, R.E. (1996) Biogenic amines in fish and shellfish. *Adv. Food. Nutr. Res.* **39**, 329-365.

Rzepka, M., Ozogul, F., Surowka, K., Michalczyk, M. (2013) Freshness and quality attributes of cold stored Atlantic bonito (*Sarda sarda*) gravad. *Int. J. Food Sci. Tech.* **48**, 1318–1326.

Qu, L. L., Li, D. W., Xue, J. Q., Zhai, W. L., Fossey, J. S., Long, Y. T. (2012) Batch fabrication of disposable screen printed SERS arrays. *Lab Chip.* **12**, 876-81.

Santos, C., Marine, A., Rivas, J.C. (1986) Changes of tyramine during storage and spoilage of anchovies. *J. Food Sci.* **51**, 512-515.

Sauer, G., Nickel, U., Schneider, S. (2000) Preparation of SERS-active silver film electrodes via electrocrystallization of silver. *J. Raman Spectrosc.* **31**, 359-363.

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

Takahashi, H., Kimura, B.Y., Oshikawa, M., Fujii, T. (2003) Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection of these organisms in fish. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2568-2579.

Tao, A., Sinsermsuksakul, P., Yang, P. (2007) Tunable plasmonic lattices of silver nanocrystals. *Nat Nano*, **2**, 435-440.

Taylor, S.L. (1986) Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* **17**, 91–128.

Taylor, S.L., Hui, J.Y., Lyons, D.E. (1984) Toxicology of scombroid poisoning. U: Seafood Toxins (Ragelis, E.P., ured.), American Chemical Society, Washington, DC, str. 417–430.

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

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

Vidaček, S. (2014) Seafood. U: Food Safety Management (Motarjemi, Y., Lelieveld, H., ured.), Academic Press, San Diego, str. 189-212.

Yu, W. W., White, I. M. (2010) Inkjet Printed Surface Enhanced Raman Spectroscopy Array on Cellulose Paper. *Anal. Chem.* **82**, 9626-9630.

Yu, W. W., White, I. M (2012) A simple filter-based approach to surface enhanced Raman spectroscopy for trace chemical detection. *The Analyst*, **137**, 1168-1173.

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.