Određivanje udjela histamina u slanim inćunima primjenom Raman spektroskopije i HPLC metode

Cvitković, Nikolina

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:159:274843

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017.

Nikolina Cvitković
777/PI

ODREĐIVANJE UDJELA HISTAMINA U SLANIM INĆUNIMA PRIMJENOM RAMAN SPEKTROSKOPIJE I HPLC METODE

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. Tibor Janči.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Sanji Vidaček na pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Tiboru Janči na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada

Od srca hvala mojim roditeljima, sestri i bratu na velikoj podršci , ljubavi , strpljenju tijekom mog studiranja.

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 SLANIM INĆUNIMA PRIMJENOM RAMAN SPEKTROSKOPIJE I HPLC METODE

Nikolina Cvitković, 777/PI

Sažetak: Zbog svoje izuzetne toksičnosti histamin je jedan od najproučavanijih biogenih amina. Kako bi se spriječilo histaminsko trovanje od velike važnosti je rana detekcija histamina. Samim time došlo je do sve intenzivnijeg razvoja novih metoda za ranu detekciju histamina. Jedna od njih je Raman spektroskopija. U ovom radu prikazana je usporedba HPLC metode i Raman spektroskopije na uzorcima slanih inćuna. HPLC metoda se koristila kao referentna metoda a uspoređeni su koeficijenti kalibracijskih modela temeljenih na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} i na 1570 cm^{-1} s koeficijentom korelacije standardnog modela dobivenog HPLC mjerenjem. Dobivenim rezultatima vidljivo je da model temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} nema velika odstupanja, te se ta metoda može koristiti za analizu i detekciju histamina.

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

Rad sadrži: 40 stranica, 14 slika, 4 tablice, 32 literaturna 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. Irena Barukčić*
4. *doc.dr.sc. Leo Gracin* (zamjena)

Datum obrane: 26. rujna 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 SALTY ANCHOVIES USING RAMAN SPECTROSCOPY AND HPLC METHOD

Nikolina Cvitković, 777/PI

Abstract: Histamine is one of the most investigated biogenic amines, primarily beacuse of its toxicity. In order to prevent histamine poisoning, early detection of histamine is of great importance. There is an increasing need for the development of new methods for early detection of histamine. One of them is Raman spectroscopy. In this study is presented a comparison of the HPLC method and the Raman spectroscopy on salty anchovy samples. The HPLC method was used as a reference method. We compared coefficients of calibration models based on the intensity of the tape at 1264 cm-1 and at 1570 cm-1 with the correlation coefficient of the standard model obtained by HPLC measurement. The obtained results showed that the model based on the intensity of the tape at 1264 cm-1 does not have large deviations, and this method can be used for analysis and detection of histamine.

Keywords: histamine, Raman spectroscopy, HPLC, SERS, correlation coefficient
Thesis contains: 40 pages, 14 figures, 4 tables, 32 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. *Ksenija Marković, Associate professor*
2. PhD. *Sanja Vidaček, Associate professor*
3. PhD. *Irena Barukčić, Assistant professor*
4. PhD. *Leo Gracin, Assistant professor* (substitute)

Thesis defended: 26 September 2017

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. HISTAMIN 2
2.1.1 Sinteza i metabolizam histamina 2
2.1.2. Histaminsko trovanje 3
2.1.3. Metode detekcije histamina 5
2.2. RAMAN SPEKTROSKOPIJA 7
2.3. SPEKTROSKOPIJA POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA (SERS) 9
2.3.1. Faktor pojačanja 10
2.3.2. SERS supstrati 11
2.3.3. Obrada i analiza SERS spektra 11
2.3.3.1. Korekcija šuma (izglađivanje spektra) 12
2.3.3.2. Korekcija pozadinskog signala 12
2.3.3.3. Normalizacija spektra 13
2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) 14
2.4.1. Uređaji za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC) 14
3. EKSPERIMENTALNI DIO 17
3.1. MATERIJALI 17
3.1.1. Reagensi 17
3.1.2. Laboratorijska oprema 18
3.1.3. Uzorci ribe 18
3.3. METODE RADA 19
3.3.1. Priprema uzoraka ribe 19
3.3.2. Određivanje sadržaja histamina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) 19
3.3.2.1. Provjera baždarnog dijagrama 20
3.3.2.2. Priprema mobilne faze 20
3.3.2.3. Kromatografska analiza 20
3.3.3. Priprema uzoraka za SERS mjerenja 21
3.3.2.1. Snimanje i analiza SERS spektra uzoraka 22

4. REZULTATI I RASPRAVA 23
4.2. SERS ANALIZA 24
4.2.1. Kalibracijski modeli 28
4.3. USPOREDBA SERS I HPLC METODE 31
5. ZAKLJUČCI 36
6. LITERATURA 37

1. UVOD

Riba je jedna od vodećih namirnica u ljudskoj prehrani. Zbog svog nutritivnog značenja i sve većih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje počelo je sve češće konzumiranje ribe, a posebice plave ribe. Ribu svrstavamo u skupinu lako kvarljivi namirnica radi svog visokog udjela esencijalnih visoke probavljivosti proteina i prehrambeno vrijednih polinezasićenih Ω-3 masnih kiselina. Najveći problem predstavlja neadekvatno rukovanje s ribom neposredno nakon ulova ribe te njenim daljnjim rukovanjem i skladištenjem zbog čega najčešće dolazi do histaminskog trovanja.

Histamin je jedan od najčešćih uzročnika trovanja. Tradicionalne metode kao što su HPLC ili plinska kromatografija pokazale su se kao dosta složene te zahtijevaju dugotrajnu pripremu uzoraka. Do danas se razvio veliki broj različitih metoda za detekciju i kvantifikaciju histamina te drugih biogenih amina koje se nalaze u ribi i proizvodima od ribe.

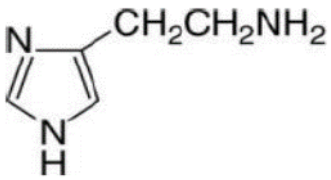
U posljednje vrijeme sve se češće koristi metoda Ramanove spektroskopije. Ramanova spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika koja se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s vibracijskim modovima molekule. Zahvaljujući vrlo visokoj osjetljivosti, spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (eng. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) sve više nalazi primjenu u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti. Omogućuje pojačanje signala zahvaljujući efektima elektromagnetskog i kemijskog pojačanja.

Cilj ovog rada je istražiti mogućnosti primjene SERS analize koja se koristi za bržu detekciju histamina u ribi i proizvodima od ribe. Za istraživanje koristit će se uzorci slanih inćuna. Zatim će se raditi usporedba svih rezultata dobivenih SERS metodom sa rezultatima dobivenih HPLC metodom koja se u ovom slučaju koristila kao referentna metoda.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HISTAMIN

Histamin (β-imidazol-etilamin) je biogeni amin, najčešći uzročnik trovanja povezanih s konzumacijom ribe i proizvoda ribarstva (Slika 1). Njihova prisutnost u mesu ribe smatra se pokazateljem kvarenja, budući su zastupljeni u vrlo malim količinama u svježoj ribi, a tijekom vremena skladištenja i pod nepovoljnim uvjetima skladištenja, količina im se povećava (Šimat, 2010). Biogeni amini su prije pokazatelji kvarenja nego svježine ribe, jer pokazuju kasnije promjene na ribljem tkivu, što je slučaj i kod ukupnog hlapivog baznog dušika. Histamin je jedan od najproučavanijih biogenih amina, zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Trovanje histaminom spada u trovanja hranom uzrokovana konzumacijom hrane s visokim količinama histidina, a još je odavno poznato pod nazivom skombroidno trovanje (skombrotoksizam), te se vezivalo uz konzumaciju riba iz porodice *Scombridae*. Najčešće vrste riba koje su povezane sa trovanjem histaminom dolaze iz porodica poput lampuge (*Coryphaena spp.*), srdele (*Sardina pilchardus*), inćuna (*Engraulis spp.*), haringe (*Clupea spp.*), gofa (*Seriola spp.*), igluna (*Xiphias gladius*) i nekih vrsta lososa koje također sadrže visoke količine slobodnog histidina Obzirom da su zabilježeni slučajevi u kojima je trovanje uzrokovano konzumacijom drugih vrsta riba, kao i drugim namirnicama, kao što su sir, vino i fermentirani mesni proizvodi, naziv skombrotoksizam izmijenjen je u poremećaj uzrokovan konzumacijom histamina iz hrane, odnosno "histaminskim trovanjem".

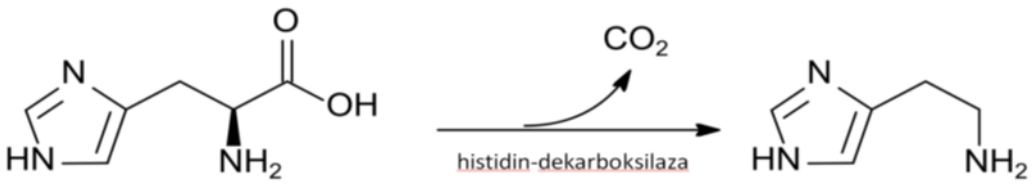


Slika 1. Kemijska struktura histamina (Flamini,2008)

2.1.1 Sinteza i metabolizam histamina

U tkivu ribe histamin nastaje bakterijskom dekarboksilacijom slobodne aminokiseline histadina pod djelovanjem bakterijskog enzima histidin-dekarboksilaze (Slika 2). Ovaj enzim je jedan od najvažnijih enzima u metabolizmu proteina, jer sudjeluje u pregradnji jedne od osam esencijalnih aminokiselina, histidina, koji se nalazi u sastavu većine

proteinskih namirnica. Najčešći uzroci nastanka histamina posljedice su neadekvatnog rukovanja ribom te skladištenje u uvjetima u kojim dolazi do pojačane mikrobiološke aktivnosti. Optimalna temperatura za njegov nastanak je 20 - 25 °C, no brojna istraživanja zabilježila su porast koncentracije histamina i pri temperaturama do +4°C kroz dulji period skladištenja (3 – 7 dana) (Kanki i sur., 2004; Emborg i Dalgaard, 2006). Pojava histamina moguća je čak i u slučajevima kada je mikrobiološka aktivnost smanjena ili skroz elimirana, ako je u namirnici prisutan enzim histidin-dekarboksilaza koji nije u potpunosti inaktivan. To se najčešće događa kod odmrzavanja i smrzavanja te nedovoljne termičke obrade. Zbog svoje termostabilnosti ,histamin jednom kad se formira u namirnici iz nje se ne može ukloniti uobičajenim postupcima prerade. Stvaranje histamina kod riba uvijek post-mortalno, stoga bi trebalo moći biti potpuno kontrolirano. No, situacija u svijetu je upravo suprotna jer je histamin najčešći uzrok intoksikacija uslijed konzumacije riba (Vidaček, 2013).



Slika 2. Metabolički put nastajanja histamina djelovanjem histidin – dekarboksilaze (Bogdanović i sur., 2009)

2.1.2. Histaminsko trovanje

Trovanje histaminom javlja se vrlo brzo, otprilike 15 min do 1h nakon konzumacije. Količine koje uzrokuju trovanje vrlo su individualne, a osjetljivost pojedinca pripisuje se smanjenim aktivnostima enzima monoamino-oksidaze (MAO), diamino-oksidaza (DAO) i histamin-N-metil transferaza (HMT) odgovornih za intoleranciju na histamin. Ljudsko tijelo je u stanju metabolizirati veći dio histamina iz gastrointestinalnog trakta, međutim, u nekim slučajevi ma (kada pojedinac ima smanjene aktivnosti enzima) ovi mehanizmi su nedostatni, te u situacijama visokog unosa histamina (200-500 mg/kg) dolazi do njihovog ulaska u krvotok i otrovanja (Vidaček, 2013).

Najčešći simptomi su crvenilo kože, obično na gornjem dijelu tijela, osip, glavobolja, povraćanje, dijareja, abdominalni grčevi, vrtoglavica. Moguće je da se osjeti jaki

metalni, gorki ili papreni okus na ribu ubrzo nakon konzumacije. Povišeni udjeli histamina u urinu i ribljem tkivu potvrđuju histamin kao uzrok trovanja. Antihistaminici se koriste za uklanjanje simptoma. Međutim histaminsko trovanje uglavnom je blagog tijeka, te i bez tretiranja lijekovima prolazi samo od sebe već za nekoliko sati ne ostavljajući nikakve teže posljedice. Kako bi se spriječilo formiranje histamina u namirnici odnosno pojava histaminskog trovanja preporučuje se poštivanje načela dobre proizvođačke prakse i implementacija odgovarajućeg HACCP plana te stroga i učestala kontrola sirovine i proizvoda.

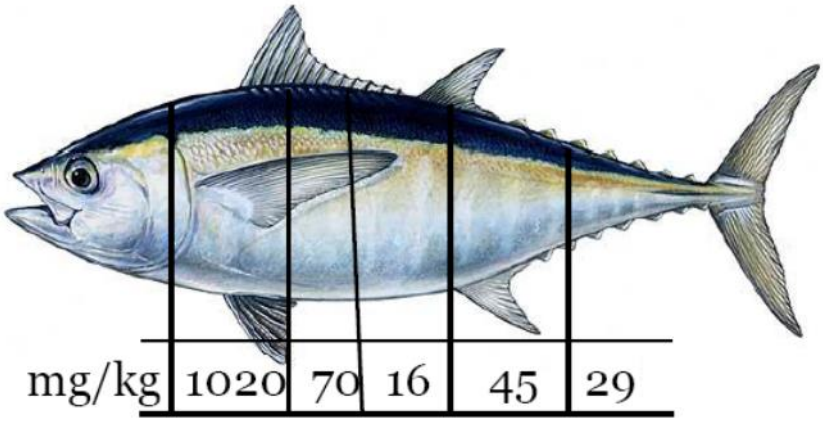
Od 15. studenoga 2005-te godine na snagu stupa Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Službeni list Europske unije, 2005), prema kojoj proizvodi od ribljih vrsta koje sadrže visoke koncentracije slobodnog histidina za 9 uzoraka po šarži moraju udovoljavati sljedećim uvjetima:

- Ustanovljena srednja vrijednost sadržaja histamina ≤ 100 mg kg^{-1}
- Maksimalno 2 uzorka smiju imati vrijednost sadržaja histamina između 100 i 200 mg kg^{-1}
- Niti jedan uzorak ne smije imati ustanovljenu vrijednost ≥ 200 mg kg^{-1}

Pokazalo se da proizvodi od istih ribljih vrsta koji su obrađeni enzimatskim dozrijevanjem u salamuri imaju dvostruko veće dozvoljene vrijednosti od navedenih. Zakonska regulativa na području SAD-a je stroža pa njihov ured za kontrolu hrane i lijekova dopušta maksimalnu količinu od 50 mg kg^{-1} histamina, pri čemu se dodatno preporučuje primjena znanstvenih podataka za procjenu svježine ribe kao što je prisutnost drugih biogenih amina povezanih s kvarenjem ribe (FDA, 2011).

Kod određivanja količine histamina izuzetno je bitan adekvatan plan uzorkovanja, razlog je taj što histamin nije homogeno raspoređen u cijeloj šarži ili ulovu ribe. To je najčešći slučaj kod vrlo velikih ulova sitne plave ribe koji se ne mogu dovoljno brzo polediti i rashladiti na ribarskom brodu. Tu je za očekivati da će riba koja je poleđena netom nakon ulova biti izvrsne kvalitete dok riba koja je poleđena posljednja može provesti i nekoliko sati na temperaturi okoliša koja se ljeti može kretati u rasponu od 20 - 30°C koji je optimalan za nastanak histamina. Zbog toga je potrebno pravilno uzorkovanje koje će dati reprezentativan rezultat za cijelu šaržu što zahtjeva relativno velik broj uzoraka i analiza. Osim toga, histamin nije homogeno raspoređen niti u tkivu ribe što pogotovo dolazi do izražaja kod velikih riba poput tune ili igluna. Veliki broj

mikroorganizama nalazi se na škrgama i u probavnom traktu ribe gdje prvo započinje i najbrže dolazi do kvarenja i nastanka histamina, tako da nepravilno uzorkovanje može dati pogrešan rezultat. Za primjer možemo uzeti konzerve tune koje su proizvedene od iste ribe a mogu sadržavati proizvode koji su zdravstveno ispravni zajedno s onima koji sadrže velike količine histamina.



Slika 3. Raspoređenost histamina u tijelu ribe (Frank i sur., 1981)

2.1.3. Metode detekcije histamina

U području analize histamina do danas otkriven je veliki broj analitički metoda. Svaka od tih metoda ima svoje prednosti ali i mane koje otežavanju njenu primjenu u prehrambenoj industriji.

Najčešća korištena metoda za kontrolu ribe je senzorska procjena svježine ribe. Različitim senzorskim parametrima kao što su izgled kože, škrga, očiju, miris ,tvrdoća te tekstura mesa riba se stavlja u posebne kategorije za njenu preradu. No senzorska procjena ribe nije pouzdana metoda kod određivanja sadržaja histamina. Na osnovu pregleda termografskih lista i evidencije ulova množe se vrijednosti temperature i vremena koje je riba provela na određenoj temperaturi. Ako je npr t x T vrijednost < 150 h°C smatra se da je riba prikladna za preradu.

Danas je razvijen i veliki broj laboratorijskih analitičkih metoda određivanja histamina koje se većinom temelje na kromatografskim postupcima zbog problema histaminskog trovanja koji je sve više izraženiji. Metoda koja se najčešće koristi prilikom određivanja histamina je tekućinska kromatogrfija visoke djelotvornosti (HPLC) pri kojoj se histamin ekstrahira iz tkiva ribe pogodnim otapalom nakon čega je potrebno provesti

derivatizaciju (reakcija s reagensom pri čemu nastaje kompleks koji ima izraženu apsorpciju svjetlosti (u UV dijelu spektra) koji se nakon separacije na kromatografskoj koloni može detektirati pomoću DAD ili UV detektora.

Metoda koju su razvili Malle i sur. (1996) također pripada ovoj skupini metoda, a uredba EZ 2073/2005 ju navodi kao referentnu metodu za određivanje udjela histamina u proizvodima ribarstva. Osim ovih metoda u skupinu laboratorijskih metoda ubrajaju se i ionsku kromatografiju, kapilarnu elektroforezu, tankoslojnu kromatografiju, flourometrijske metode plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinska kromatografiju s masenom spektrometrijom (LC-MS). Glavne prednosti laboratorijskih metoda su preciznost, ponovljivost, robusnost i točnost. Postupak pripreme uzoraka vrlo je složen i dugotrajan te u realnom vremenu nije moguće analizirati dovoljan broj uzoraka kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu ribe. Njihovu primjenu u industrijskim kontrolnim laboratorijima uvelike ograničavaju 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. Kako bi se olakšale kontrole sadržaja histamina u industriji, razvijeno je nekoliko "brzih" metoda za određivanje histamina koje se uglavnom baziraju na različitim enzimatskim metodama (ELISA). Oprema potrebna za provođenje ovih metoda podrazumijeva različite kvalitativne i kvantitativne kitove sa potrebnim reagensima i spektrofotometar kojim se po završetku reakcije može očitati intenzitet boje na osnovu čega se dobiva podatak o količini histamina u uzorku.

Glavni nedostaci ovih metoda su različiti postupci pripreme uzoraka unatoč prijenosnim kitovima, smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenim soljenjem i dozrijevanjem u salamuri kao i neprikladnost za analize van laboratorija. U Tablici 1. prikazana je usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina. 1-2 h.

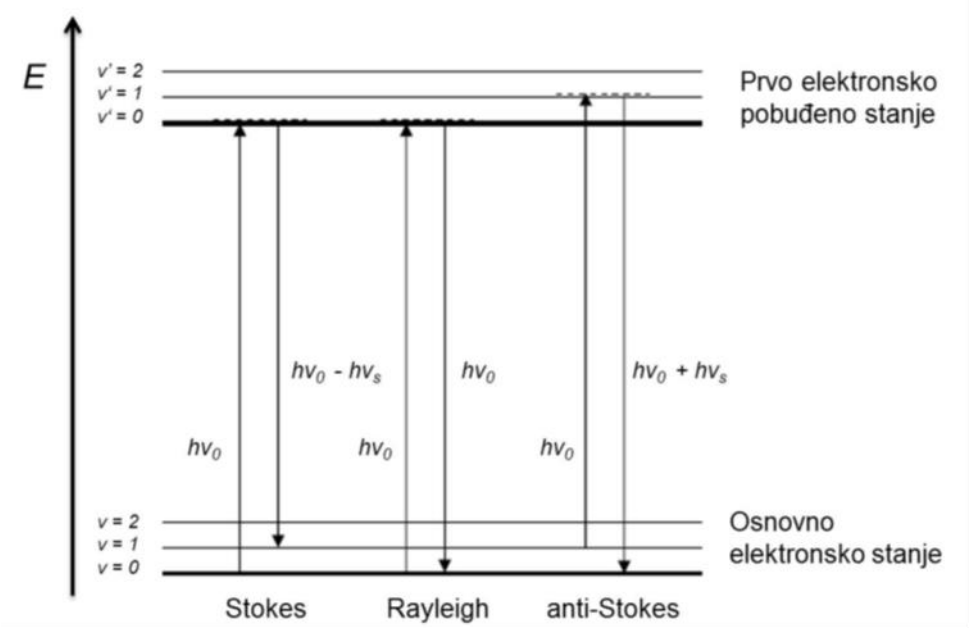
U novije vrijeme sve se više javljaju potrebe za novim i još bržim metodama kako bi se omogućila što jednostavnija primjena i analiza većeg broja uzoraka u kraćem vremenskom periodu. Istražuje se mogućnost primjene Raman spektroskopije za analizu ribe i proizvoda od ribe.

Tablica 1. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina (FAO/WHO,2013)

	AOAC metoda	**HPLC metode**	**Spektrofluorom-etrijske metode**	**ELISA**	**Kolorimetrijske metode**
Vrijeme potrebno za 1 test	1-2 h	1-2 h	1 h	1 h	1 h
Oprema	Fluorometar	HPLC	Spektrofluoro-metar	Spektofotometar	Spektofotometar
Prag kvantifikacije Raspon	1 – 5 ppm 1– 150 ppm	1.5.-5 ppm 5-2500 ppm	1.5 ppb 1.5 ppb- 100 ppm	2-5 ppm 0-500 ppm	20 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

2.2. 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). Aktivne molekulske vibracije u Ramanovom spektru su one pri kojima dolazi do promjene polarizabilnosti molekule. Interakcijom fotona i molekule dolazi do polarizacije elektronskog oblaka tj. pobude u virtualna energetska stanja nakon čega se u vrlo kratkom vremenu (10-14 s) molekula vraća u osnovno stanje emitirajući foton. Elastično raspršenje zračenja pri kojem ne dolazi do promjene energije tj. valne duljine pobudnog i raspršenog zračenja naziva se Rayleighovo raspršivanje. Ramanovo raspršenje podrazumijeva neelastično raspršenje pri kojem se valna duljina raspršenog zračenja razlikuje od valne duljine pobudnog zračenja. Emitirani foton može imati manju ili veću valnu duljinu od pobudnog fotona. Ako je početni vibracijski nivo molekule u osnovnom elektronskom stanju niži od vibracijskog nivoa u koji se molekula vraća nakon emisije fotona, emitirani foton je veće valne duljine od pobudnog fotona. Takav efekt naziva Stokesovo raspršenje (Janči, 2016) (Slika 4).



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

Dok anti – Stokesovo raspršenje podrazumijeva pobudu molekule iz višeg vibracijskog nivoa te vraćanje u niži vibracijski nivo osnovnog elektronskog stanja, prilikom čega emitirani foton ima manju valnu duljinu od pobudnog. Treba naglasiti da je pojava Ramanovog raspršenja vrlo slabog intenziteta budući da je proces Ramanovog raspršenja manje vjerojatan od Rayleighovog raspršenja te je tek jedan od 107 raspršenih fotona Stokes raspršen, dok se u pravilu 1 od 104 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 čega slijedi 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 jednak je, 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 pri čemu je anti-Stokesov spektar manjeg intenziteta. Iz ovog razloga, u Ramanovoj spektroskopiji uobičajeno se prikazuje samo Stokesova polovica spektra.

Ramanov spektar karakterističan je za određenu molekulu (jedinstveni vibracijski spektar = *fingerprint* molekule). 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 s N atoma izračunava se pomoću izraza n = 3N – 6 za nelinearne molekule te n = 3N – 5 za linearne molekule. Kod vibracije polarnih veza (N-O, C-O, O-H) javlja se slabije Ramanovo raspršenje jer se promjenom njezine duljine, tijekom vibracije, ne povećava značajno efekt promjene polarizacije iz razloga što takve veze imaju same po sebi jaku polarizaciju. Princip je taj da što je veza manje polarna, tijekom vibracije doživljava veću promjenu polarizabilnosti pa je samim time i raspršenje jače (Janči, 2016).

Osim gore navedenog Ramanov spektar može se upotrijebiti za identifikaciju, u određenim slučajevima i za kvantifikaciju pojedinog analita. Ramanovo raspršenje daje slab signal pa je potrebna velika snaga izvora svjetlosti koja vrlo često dovodi do degradacije uzorka te onemogućava njegovu analizu. Česta pojava kod Raman spektroskopije je fluorescencija koja ometa analizu jer može u potpunosti zasjeniti Stokesovo raspršenje. Tu dolazi do pojave fotodegradacije uzorka i fluorescencije koji ograničavaju maksimalnu snagu izvora svjetlosti. Kod analize proteina ili nukleinskih kiselina Raman spektroskopija zahtjeva relativno visoku koncentraciju analita u uzorku (Peticolas, 1995).

Ramanova spektroskopija postala je vrlo važna metoda s mnogim područjima primjene čije su glavne prednosti jednostavna priprema uzoraka te mogućnost *in situ* analize.

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

2.3. SPEKTROSKOPIJA POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA (SERS)

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje otkriveno je 1974. godine. Za razvoj ove tehnike zaslužena je njena visoka osjetljivost koja pruža mogućnost detekcije analita u vrlo niskim koncentracijama te njena primjenjivost u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti. Dodatna prednost SERS spektroskopije je i eliminacija fluorescencije uslijed prijenosa energije s molekule na metal (Etchegoin i Le Ru, 2010)

što ju čini gotovo idealnom tehnikom za istraživanje i analizu različitih kemijskih i bioloških uzoraka.

Pojačanje Ramanovog signala posljedica je povećanja presjeka Ramanovog raspršenja na molekulama koje su adsorbirane ili se nalaze u neposrednoj blizini metalnih nanaostruktura (SERS supstrata) (Fleischmann i sur., 1974; Jeanmaire i Van Duyne, 1977). Već 1974-te godine otkriven je efekt površinski pojačanog Ramanovog raspršenja. Ponuđena su teorijska objašnjenja ovog fenomena (Albrecht i Creighton, 1977; Jeanmaire i Van Duyne, 1977), a istraživanja su se proširila i na primjenu drugih metala kao što su zlato, platina, bakar, aluminij i alkalijski metali u ove svrhe. Daljnjim istraživanjem povećanje Ramanovog presjeka molekule pripisalo se pobudi površinskih plazmona na hrapavoj površini elektrode (Moskovits, 1978). Glavne prednosti ove tehnike su mogućnost detekcije analita u vrlo niskim koncentracijama te primjena u različitim područjima tehničkih i prirodnih znanosti. Sve to čini je idealnom metodom za analizu i istraživanje.

Ograničavajući faktori primjene su optimizacija parametara, priprema uzorka i samog mjerenja, točno određeni supstrat koji su prilagođeni cijenom analitu te osiguravaju visoku osjetljivost i ponovljivost mjerenja, te smanjenu interferenciju komponenti u uzorku. Postoji dosta teorija no dvije su opće prihvaćene i objašnjavaju fenomen pojačanja raspršenja: elektromagnetski mehanizam i mehanizam prijenosa naboja, pri čemu se smatra da elektromagnetsko pojačanje značajnije doprinosi ukupnom pojačanju (McNay i sur., 2011). Kod elektromagnetskog mehanizma pojačanja molekula je u blizini metalne površine pod utjecajem znatno snažnijeg električnog polja, dok se kemijski mehanizam temelji na promjeni polarizabilnosti zbog interakcije molekule i metalne površine (Yuen i sur., 2008).

2.3.1. Faktor pojačanja

Istraživanjem SERS spektroskopije i razvojem novih SERS supstrata javila se potreba za definiranjem učinkovitosti različitih supstrata i njihove usporedbe, te je iz tog razloga predložen način izračuna faktora pojačanja (eng. enhacement factor, EF) (Kleinman i sur., 2013). Često se primjenjuje eksperimentalno određivanje faktora pojačanja, koje je za razliku od teorijskog izračuna puno jednostavnije. Pojednostavljeni prikaz faktora pojačanja određenog SERS sustava prikazujemo sljedećom jednadžbom:

$$EF_{SERS} = \frac{I_{SERS} / N_{SERS}}{I_{NRS} / N_{NRS}} \qquad \textbf{(1)}$$

gdje su I_{SERS} i I_{NRS} intenziteti u SERS i normalnoj Ramanovoj spektroskopiji, N_{SERS} broj molekula na površini SERS supstrata, a N_{NRS} broj molekula u mjernom volumenu analita (Kleinman i sur., 2013).

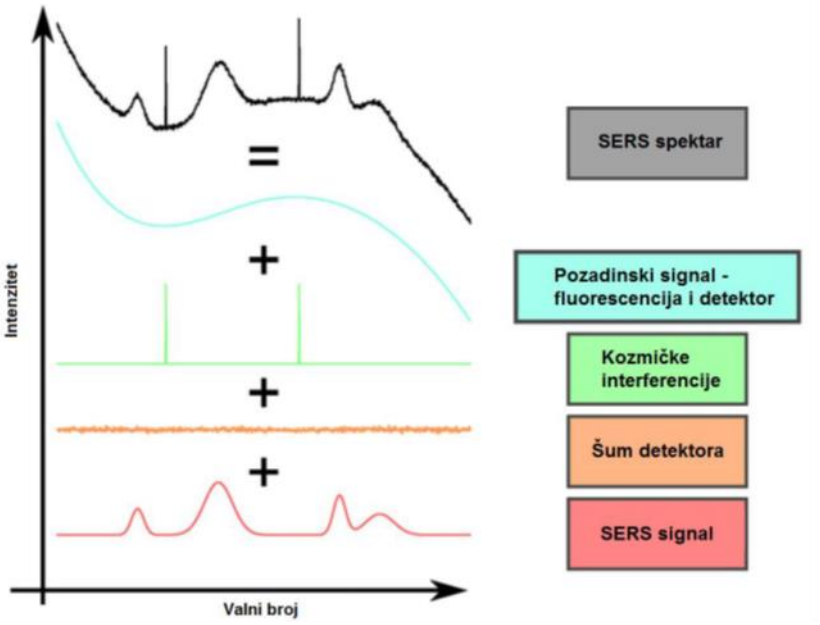
2.3.2. SERS supstrati

SERS supstratima smatramo bilo koja metalna nanostruktura koja omogućava površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja. Postoje različite tehnike pripreme pogodnih metalnih SERS supstrata koje su se razvijale paralelno s razvojom SERS spektroskopije. Od prvog SERS supstrata, srebrene elektrode nepravilne površine pripremljene cikličkom voltametrijom (Fleischmann i sur., 1974), do danas razvijen je veliki broj različitih supstrata koji se mogu podijeliti na:

- metalne nanočestice u suspenziji (npr. koloidne otopine)
- metalne elektrode
- planarne metalne nanostrukture na krutoj podlozi

2.3.3. Obrada i analiza SERS spektra

Osim signalnih analita SERS spektar sadrži i brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, fluoresencije, kozmičkih interferencija nastalih od čestica visoke energije koje registrira detektor, te šuma i pozadinskog signala samog detektora (Slika 5). Apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra ovisna je o brojnim faktorima kao što su pomicanje optičkih elemenata instrumenta uslijed vibracija,oscilacije snage lasera itd. Navedene faktore tijekom izvođenja eksperimenta često nije moguće kontrolirati, te ih je potrebno predobradom spektra eliminirati,kako bi se dobili zadovoljavajući rezultati.



Slika 5. Komponente SERS spektra (Bocklitz i sur., 2011)

2.3.3.1. Korekcija šuma (izglađivanje spektra)

Kako bi se postigao bolji omjer signala i šuma , potrebno je spektar izgladiti primjenom tkz. Digitalnih filtera ili prozorske funkcije (eng. *window functions*) Najprije je potrebno definirati funkciju koja ovisno o namjeni može biti srednja vrijednost, prilagođavanje polinoma, derivacija itd., zatim veličinu prozora, točnije broj točaka koje funkcija obrađuje u jednom koraku. Pokretanjem algoritma, funkcija na temelju vrijednosti unutar prozora izračunava novu vrijednost koju pripisuje centralnoj točki prozora izglađenog spektra. Na taj način pomiče se za jedno mjesto dalje, sve do kraja spektra. U pravilu vrijedi što je veći prozor to će spektar biti više izglađen. Upotrebom digitalnih filtera treba biti oprezan, jer u slučaju pretjeranog izglađivanja spektra može doći do gubitka vrpci niskog intenziteta te proširivanja ili pomaka SERS vrpci u spektru (Vandenabeele, 2013).

2.3.3.2. Korekcija pozadinskog signala

Za eliminaciju pozadinskog signala iz SERS spektra uzorka postoji više matematičkih modela koje se temelje na različitim teoretskim pristupima problemu (Schulze i sur., 2005). Neke od tih metoda su procjena pozadinskog signala SNIP algoritmom, prilagođavanje polinoma višeg reda spektru, valne transformacije te izračun prve ili druge derivacije spektra. Zajedničko svim ovim metodama je izrazita ovisnost o

odabranim parametrima izračuna koji se moraju odrediti tako da se uz minimalne promjene SERS signala u snimljenom spektru eliminira pozadinski signal. Jedna od najučinkovitijih metoda eliminacije pozadinskog signala bez sustavne pogreške je derivacija spektra, ali zahtjeva složene matematičke algoritme, te može dovesti do promijene oblika SERS vrpci (Mosier-Boss i sur., 1995). Najčešće korištena metoda pri obradi SERS spektra je metoda prilagođavanja polinoma spektru iz razloga što ne utječe na intenzitet i oblik SERS vrpci.

2.3.3.3. Normalizacija spektra

Postupak kojim se eliminiraju oscilacije apsolutnog intenziteta SERS spektra naziva se normalizacija spektra. Poznate su brojne metode normalizacije spektra, a neke od njih su normalizacija prema minimalnoj i maksimalnoj vrijednosti, pri čemu se maksimalnoj vrijednosti intenziteta pridodaje vrijednost 1, a minimalnoj 0, normalizacija dijeljenjem intenziteta u svakoj točki spektra sa sumom intenziteta svih točaka u spektru i dr. u kemometrijskim proračunima najčešće se koristi normalizacija metodom normalne standardne varijable koja srednjoj vrijednosti intenziteta spektra daje vrijednost 0, a normalizirani intenzitet definira formulom:

$$I_{norm} = \frac{I_{original} - \mu_I}{SD_I} \qquad \textbf{(2)}$$

gdje je μ_1 srednja vrijednost originalnog spektra, a SD_1 standardna devijacija intenziteta u spektru. Metoda normalizacije cijelog spektra na osnovu intenziteta vrpci internog standarda poželjna je kod kvantitativnih analiza (Bocklitz i sur., 2011).

2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl.*High performance liquid chromatography*- HPLC) je oblik kromatografije na stupcu koji se često koristi u analitičkoj kemiji. HPLC se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Pojavila se 1960.-ih godina, a nagli razvoj doživjela je 1980.-ih, te je danas jedna od najučinkovitijih metoda u analitičkoj kemiji sa širokom primjenom u forenzici,farmaceutici, analizi hrane , nutraceutika i industrijskih kemikalija. Tom metodom mogu se separirati, identificirati i kvantificirati spojevi prisutni u tragovima (ppt) u bilo kojem uzorku koji se može otopiti u tekućini i zbog jednostavnosti rukovanja je našla široku primjenu te je najčešće primjenjivana metoda za analizu histamina.

Princip rada ove metode je injektiranje malog volumena tekućeg uzorka u tok mobilne faze, te pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom dolazi do premještanja uzoraka kroz kromatografsku kolonu ispunjenu stacionarnom fazom. Prolaskom uzorka kroz kromatografsku kolonu dolazi do razdvajanja smjese na sastavne komponente, te na temelju vremena zadržavanja (vremena potrebnog da pojedina komponenta prođe kroz kolonu) identificira se pojedina komponenta. Vrijeme zadržavanja (eng. retention time, Rt) ovisi o prirodi komponente koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Komponente uzorka razdvajaju se na temelju različitih kemijskih ili fizikalnih interakcija između molekula uzorka i čestica kojima je ispunjena kromatografska kolona. Razdijeljene komponente uzorka detektiraju se na izlasku iz kolone na detektoru.

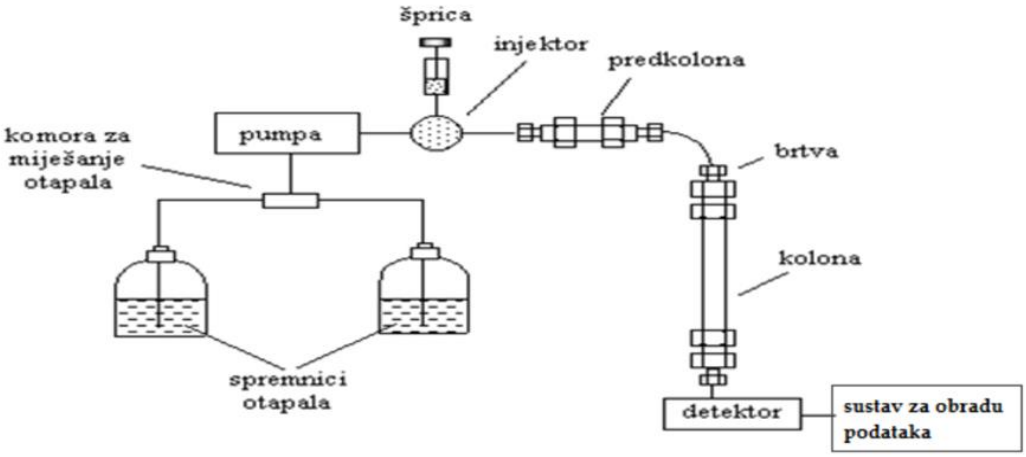
2.4.1. Uređaji za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Osnovni dijelovi HPLC uređaja su spremnik mobilne faze (otapala), crpka, sustav za unošenje uzorka, kolona, detektor i računalo. Pored spremnika mobilne faze često se nalazi i sustav za otplinjavanje u kojem se otopljeni plinovi uklanjaju iz otapala, nošeni inertnim plinom. Glavni razlog otplinjavanja je taj što plinovi, zbog stvaranja mjehurića, mogu prouzročiti širenje zone eluiranih sastojaka i ometati rad detektora. Razdvajanje supstanci može se provoditi izokratnom ili gradijentnom eluacijom. U

pravilu se bolji kromatogram dobiva gradijentnom eluacijom gdje se koriste dva ili više otapala različite polarnosti, a odnos njihove zapremine mijenja se na unaprijed utvrđen način. Za razliku od gradijente eluacije, kod izokratne eluacije koristi se samo jedno otapalo.

Pumpa u HPLC sustavu služi za stvaranje i mjerenje specifične brzine potoka i za uspostavu visokog tlaka pod čijim utjecajem uzorak nošen mobilnom fazom prolazi kroz kolonu . U HPLC sustavima najčešće se koriste recipročne pumpe koje se sastoje od cilindrične komore koja se puni i prazni pomicanjem klipa, čime se stvara pulsirajući protok. Ovisno o metodi pumpa osigurava protok mobilne faze čiji je sastav stalan i ne mijenja se tijekom vremena, odnosno tzv. izokratno eluiranje ili protok mobilne faze u slučaju kada se njen sastav mijenja s vremenom, odnosno tzv. gradijentno eluiranje.

Uzorak se u kolonu unosi protokom mobilne faze preko sustava za unošenje uzorka kojeg obično čini plinski ventil s više izmjenjivih petlji. Kolone su najčešće izrađene od čeličnih ili staklenih cijevi koje su punjene zrncima punila, tj. česticama stacionarne faze malih dimenzija ali velike aktivne površine, promjera od 3-10 μm. Kao punilo najčešće se upotrebljava silikagel, ali se u tu svrhu koriste i glinica, porozni polimeri i ionski izmjenjivači. Dimenzije HPLC kolona se kreću između 20 mm i 500 mm duljine i 1-100 mm unutarnjeg promjera. Nakon što uzorak nošen mobilnom fazom prođe kroz kolonu, dolazi do detektorskog sustava koji u HPLC-u nije univerzalan, već se ovisno o prirodi uzorka i svojstvima analiziranog spoja koriste se spektorfotometrijski, spektrofluorimetrijski (flurescentni) ili detektori koji mjere indeks loma (eng. Refractive index, RI). Detektor je spojen s računalom koje prima električni signal i bilježi ga u obliku kromatograma (Skoog i sur., 1999).



Slika 6.Shematski prikaz HPLC uređaja (Luterotti, 2009)

Kromatogram je zapis koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzorka (Kaštelan-Macan, 2003). Na kromatogramu dobivamo pikove različite površine, odnosno visine i položaja na vremenskoj osi, ovisno o koncentraciji sastojaka u uzorku i vremenu zadržavanja tj. retencijskom vremenu. Svaki pik predstavlja odziv detektora za drugačiji spoj. Položaj pika na vremenskoj osi služi za identifikaciju sastojka, odnosno, dokazivanje kvalitativnog sastava uzorka, dok se na temelju površine ispod pika ili njegove visine dobiva kvantitativna procjena sastojka u uzorku (Skoog i sur., 1999).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Reagensi

- otopina dansil-klorida (98 %): otopi se 50 mg dansil-klorida u 10 mL acetona, koristi se svježa 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 cca16 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

Sve korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. U svim pokusima korištena je deionizirana voda otpornosti 18 MΩcm.

3.1.2. Laboratorijska oprema

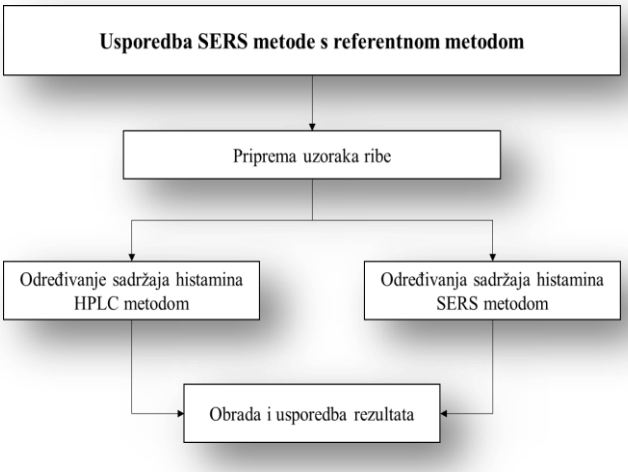
Laboratorijsko posuđe:

- 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 viale
- 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 Technolgies Inc., Waldbronn, Germany)
- analitička vaga Kern, Njemačka
- homogenizator Ultra turax T-18, IKA-Labortechnik, Njemačka

3.1.3. Uzorci ribe

Uzorci slanih inćuna kupljeni su u trgovini i doneseni u laboratorij. Inćuni su izvađeni iz svoga pakiranja, te su usitnjeni i homogenizirani ručnim sjekačem (mikserom). Ovako pripremljeni uzorci korišteni su za daljnje analize.

3.2. PLAN ISTRAŽIVANJA



Slika 7. Plan istraživanja – Usporedba SERS metode s referentnom metodom

3.3. METODE RADA

3.3.1. Priprema uzoraka ribe

Nakon što su uzorci slanih inćuna usitnjeni ručnim sjekačem, podijeljeni su u 8 grupa. Uzorcima korištenima za konstrukciju kalibracijskih modela dodana je odgovarajuća količina histamina kako bi se postigle finalne koncentracije od 0, 50, 100, 150 i 200 mg/kg. Ostalim uzorcima dodane su nasumično odabrani volumeni stock otopine histamina koncentracije 0,5 mg/mL te su uzorci usporedno analizirani HPLC i SERS metodom

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

Određivanje sadržaja histamina u uzorcima ribe provedeno je referentnom metodom prema Malle i sur. (1996).

U kivetu je odvagano 2,5 g uzorka, nakon toga je dodano 250 µL otopine internog standarda (imidazol, 5 mg mL^{-1}) i homogenizirano s 20 mL $HClO_4$ (0,4 mol L^{-1}) na laboratorijskom homogenizatoru 2 minute na maksimalnoj brzini. Homogenizirani uzorak preliven je u odmjernu tikvicu od 50 mL, dopunjen do oznake s $HClO_4$ i promiješan. Uzorak je vraćen nazad u kivetu i centrifugiran na 3500 x g kroz 3 minute. 100 µL supernatanta odpipetirano je u mikrokivetu volumena 1,5 mL, dodano je 200 µL zasićene otopine Na_2CO_3 i 500 µL otopine dansil-klorida (50 mg u 10 mL acetona). Nakon 30 s miješanja na laboratorijskoj miješalici uzorci su ostavljeni u mraku preko noći.

Idući dan u mikrokivetu je dodano 100 µL otopine L-prolina (1 g u 10 mL vode), dobro je promiješano na miješalici i ostavljeno da stoji 30 minuta u mraku. Nakon toga je dodano 500 µL toluena, promiješano je na laboratorijskoj miješalici i mikrokiveta je ostavljena nekoliko minuta da se odvoje slojevi. Iz gornjeg sloja odpipetirano je 200 µL u vialu i upareno u struji dušika do suhog. Suhi uzorak je otopljen u 200 µL acetonitrila, promiješan da se u potpunosti otopi te je 20 µL uzorka injektirano i podvrgnuto kromatografskoj analizi.

3.3.2.1. Provjera baždarnog dijagrama

Provjera baždarnog dijagrama provedena je pomoću otopina B1, B2, B3 i slijepe probe. Pripremljene otopine tretirane se na isti način kao i uzorci – 100 µL otopine + 200 µL Na_2CO_3 + 200 µL dansil-klorida promiješano je na vortexu i ostavljeno u mraku preko noći.

Otopina B1: pipetirano je 200 µL stock otopine histamina i 1 mL otopine internog standarda u odmjenu tikvicu od 100 mL i dopunjeno vodom do oznake

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

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

Slijepa proba: pipetirano je 50 µL otopine internog standarda i dopunjeno do 5 mL sa $HClO_4$

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

3.3.2.2. 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 mobilna faza B bio čisti acetonitril. Prije upotreba obje otopine se deaerirane u ultrazvučnoj kupelji kroz 20 min kako bi se izbjeglo moguće oštećenje kromatografske kolone i povećala preciznost rezultata.

3.3.2.3. Kromatografska analiza

Analiza je vršena na tekućinskom kromatografu Agilent 1200 series HPLC sa kolonom Zorbax ODS (C18), 5 µm (250 x 4,6 mm I.D) (Merck, Njemačka) (Slika 8). Temperatura kolone bila je 25 °C uz protok mobilne faze od 1 mL/min. Kao mobilne faza A korištena je mješavina voda:acetonitril 40:60 (v:v), a mobilna faza B čisti acetonitril. Program gradijentnog eluiranja prikazan je u tablici 2, a histamin je detektiran pomoću DAD detektora pri valnoj duljini 254 nm.

Slika 8. Tekućinski kromatograf Agilent 1200 series HPLC, Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta

Tablica 2. Program gradijentnog eluiranja pri HPLC analizi histamina

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

3.3.3. Priprema uzoraka za SERS mjerenja

U kivetu volumena 50 mL odvagano je 2,5 g usitnjenog ribljeg mišićja te je dodana odgovarajuća količina histamin dihidroklorida kako bi se postigle koncentracije histamina od 0, 50, 100, 150 i 200 mg kg^{-1}. Ovako pripremljeni uzorci podvrgnuti su postupku ekstrakcije i pročišćavanja prema metodi Janči i sur. (2016). Pripremljeni

uzorci su homogenizirani u 50 mL perkloratne kiseline (0,4 mol L^{-1}) na laboratorijskom homogenizatoru tijekom 2 minute na maksimalnoj brzini. Homogenizirani uzorak je filtriran kroz Whatman 4 filter papir te je 2 mL filtrata prebačeno u staklenu epruvetu sa čepom. Zatim je u epruvetu dodano 1,4 g NaCl, 0,4 mL 5M NaOH i 2 mL 1-butanola. Epruveta je začepljena i ekstrakt je miješan na laboratorijskoj tresilici 10 minuta pri 70 rpm. Po završetku ekstrakcije 1-butanolom uzorak je ostavljen 2 min da se odvoje slojevi. Nakon odvajanja slojeva 100 µL gorenjeg sloja otpipetirano je u mikrokivetu volumena 1,5 mL te je zatim upareno do suhog u struji dušika pri temperaturi od 60°C.

3.3.2.1. Snimanje i analiza SERS spektra uzoraka

Pripremljeni uzorci čuvani su u zatvorenim mikrokivetama na temperaturi 4°C do trenutka SERS analize. Neposredno prije analize u mikrokivetu je pipetirano 80 µL AGC koloida, 10 µL otopine $NaBH_4$ (0,23 mol L^{-1}) i 10 µL vode te miješano 30 s na laboratorijskoj miješalici nakon čega je uzorak prebačen u staklenu kapilaru. SERS spektri uzoraka s koncentracijama histamina od 0, 50, 100, 150 i 200 mg kg^{-1} snimani su u području 1050 – 1650 cm^{-1} s vremenom ekspozicije 30 s u razmaku od 1 min tijekom prvih 6 min do završetka miješanja svih komponenti.

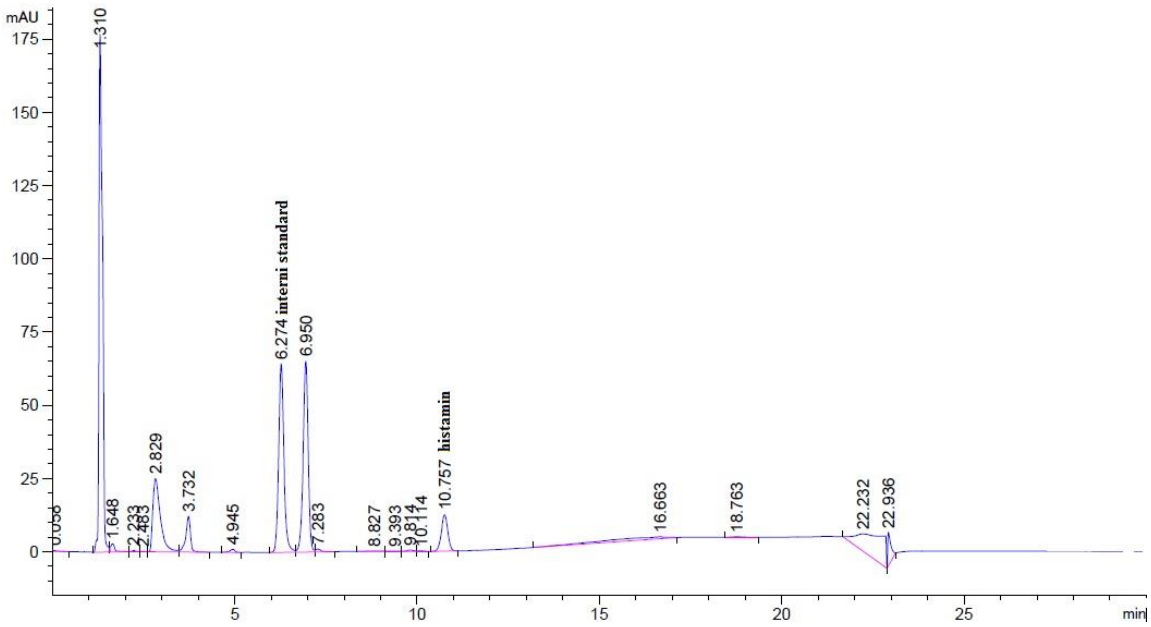
Slika 9. Horiba Jobin Yvon T640000 Ramanov spektrometar (Janči, 2016)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja je validacija metode Raman spektroskopije za određivanje udjela histamina koju su razvili Janči i sur. (2017). na skuši. Provedena je HPLC i SERS analiza baždarnih uzoraka i realnih uzoraka slanih inćuna (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, odnosno dobivene vrijednosti su 100 % točne. Prikaz dobivenih rezultata slijedi u nastavku.

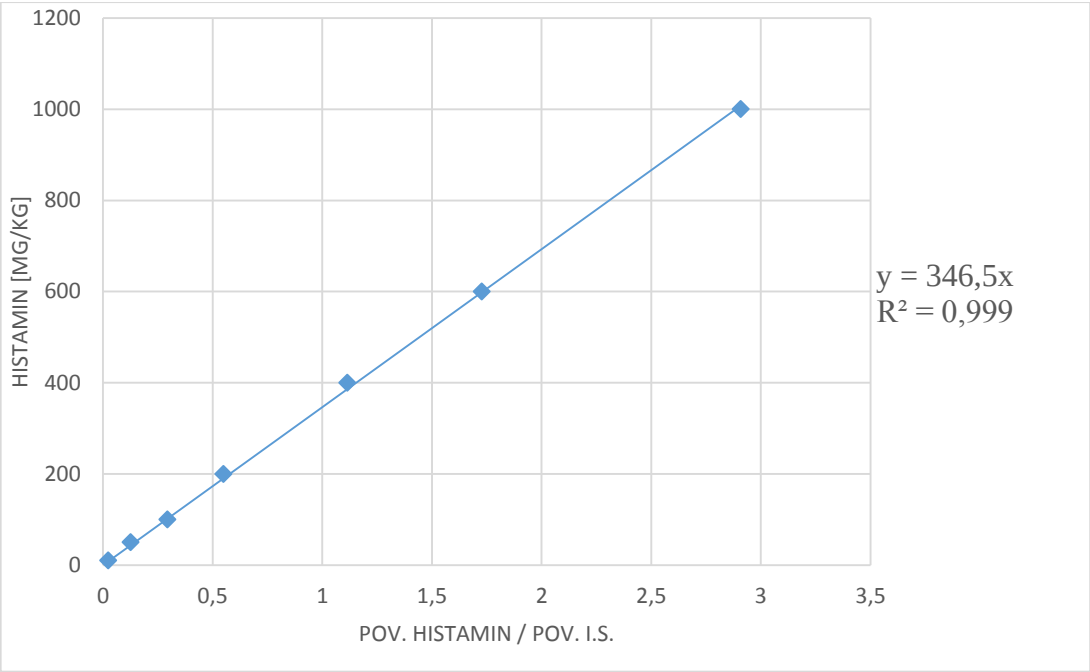
4.1. HPLC ANALIZA

Baždarni pravac je konstruiran pomoću otopine histamina različitih koncentracija uz dodatak internog standarda te su spojevi identificirani na temelju retencijskog vremena (Slika 10).



Slika 10. Kromatogram otopine internog standarda i histamina koncentracije 100 $mgkg^{-1}$

Baždarni pravac je konstruiran linearnom regresijom iz odnosa koncentracije histamina i omjera površine pikova histamina i internog standarda (Slika 11).



Slika 11. Ovisnost koncentracije histamina o omjeru površina histamina i internog standarda

Tablica 3. Podaci za baždarni pravac za HPLC metodu

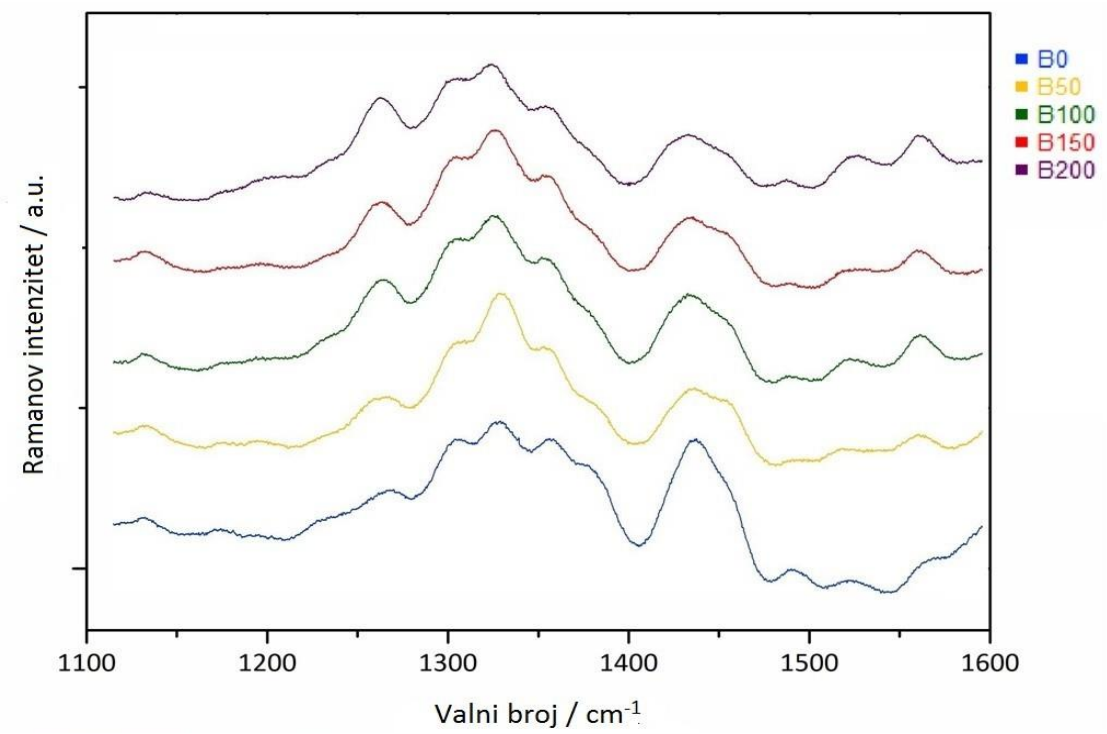
Jednadžba pravca	**y = 346,5x**
Nagib	346,5
Odsječak	0
Broj mjerenja	5
Koeficijent korelacije	0,999

4.2. SERS ANALIZA

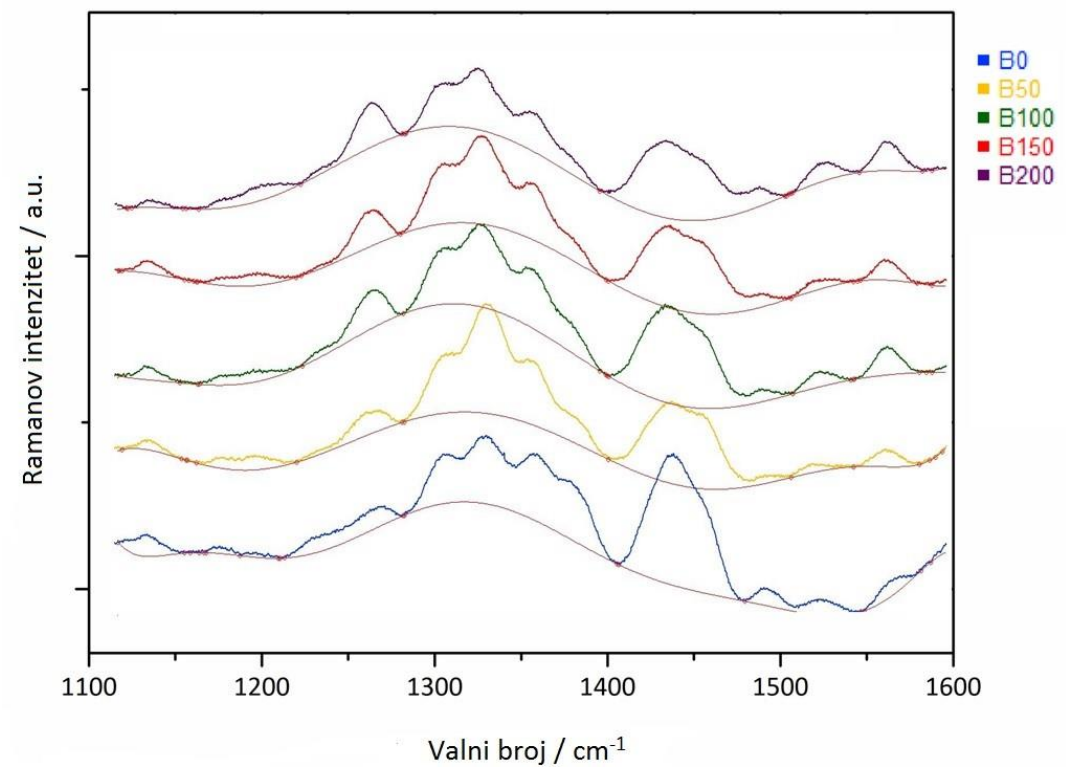
Kako bi izradili kalibracijske modele, potrebno je prije toga obraditi SERS spektre. SERS spektar, osim signalnih analita, sadrži i brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, šuma, fluorescencije te pozadinskog signala samog detektora. Apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra ovisi o brojnim parametrima čija je kontrola često zahtjevna tijekom eksperimenta, a to su primjerice oscilacije lasera. Kako bi se navedeni utjecaji eliminirali, provedena je optimizacija parametara za korekciju pozadinskog signala, šuma te normalizaciju spektra. Od svih

načina predobrade spektra, najbolja 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. Nakon toga 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.

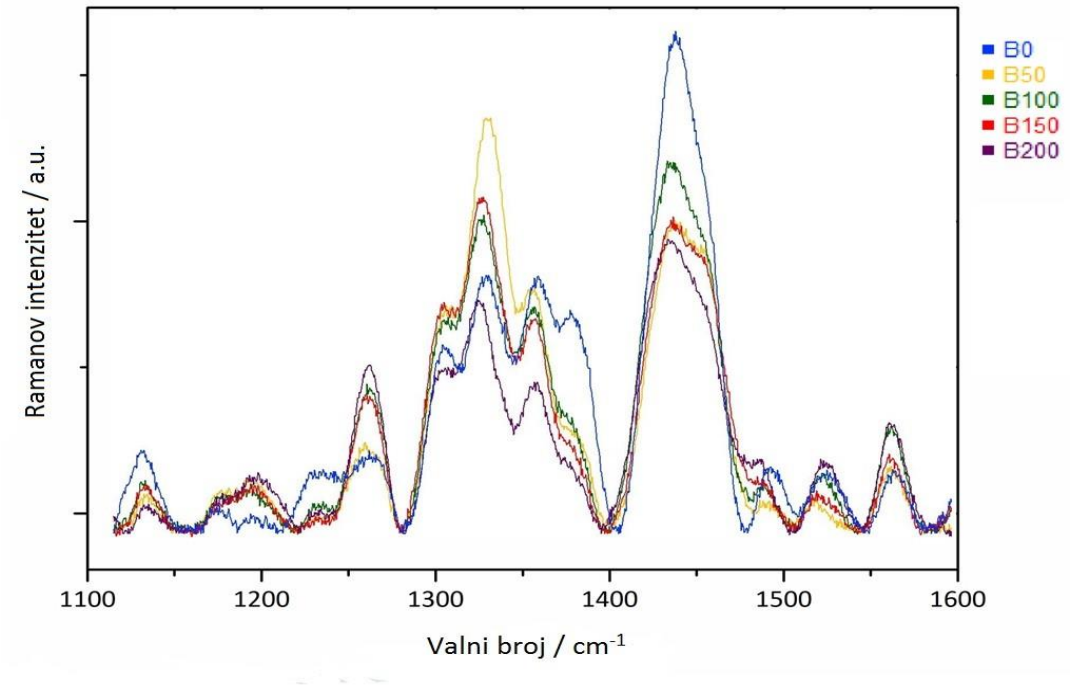
a)



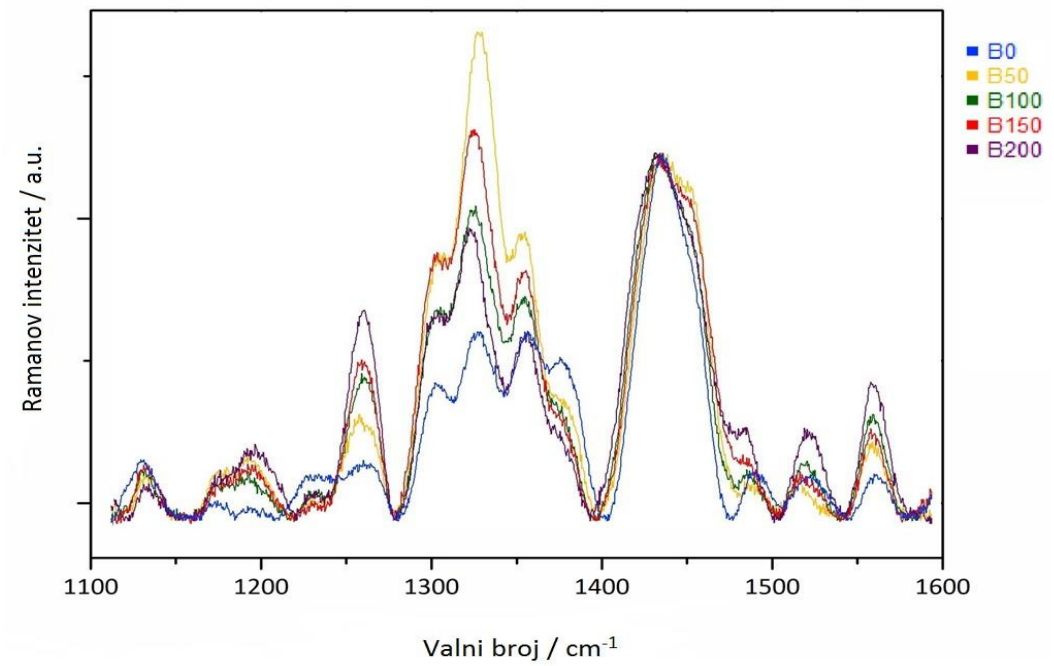
b)


B0
B50
B100
B150
B200
Ramanov intenzitet / a.u.
1100
1200
1300
1400
1500
1600
Valni broj / cm-1

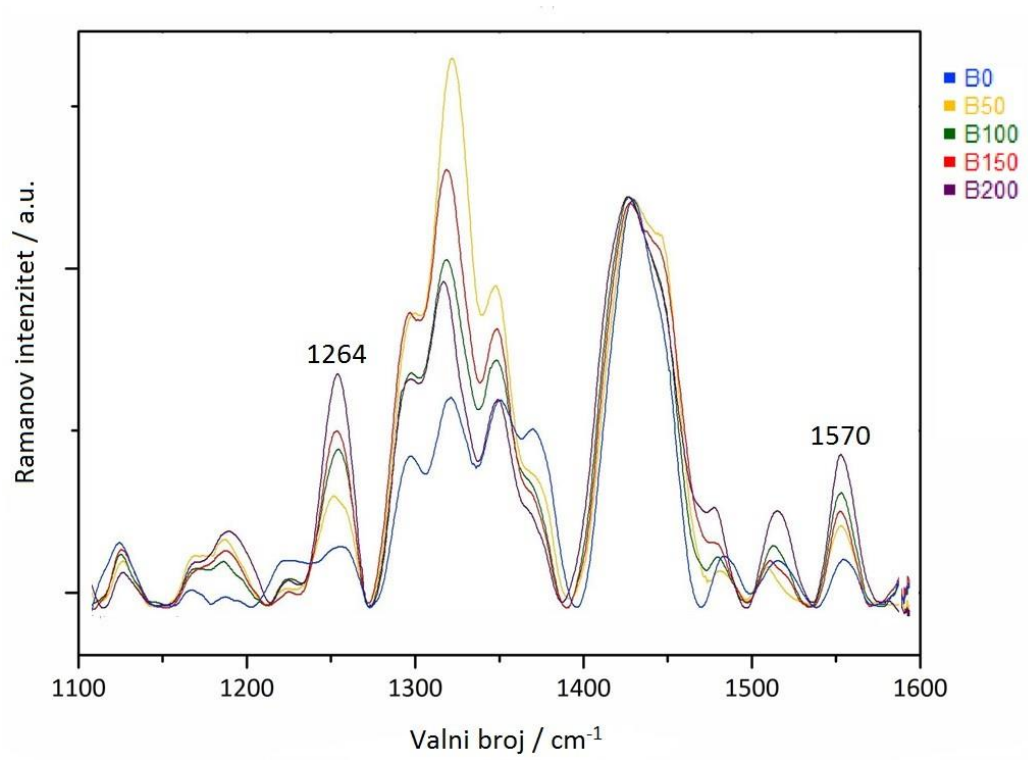
c)


B0
B50
B100
B150
B200
Ramanov intenzitet / a.u.
1100
1200
1300
1400
1500
1600
Valni broj / cm-1

d)



e)

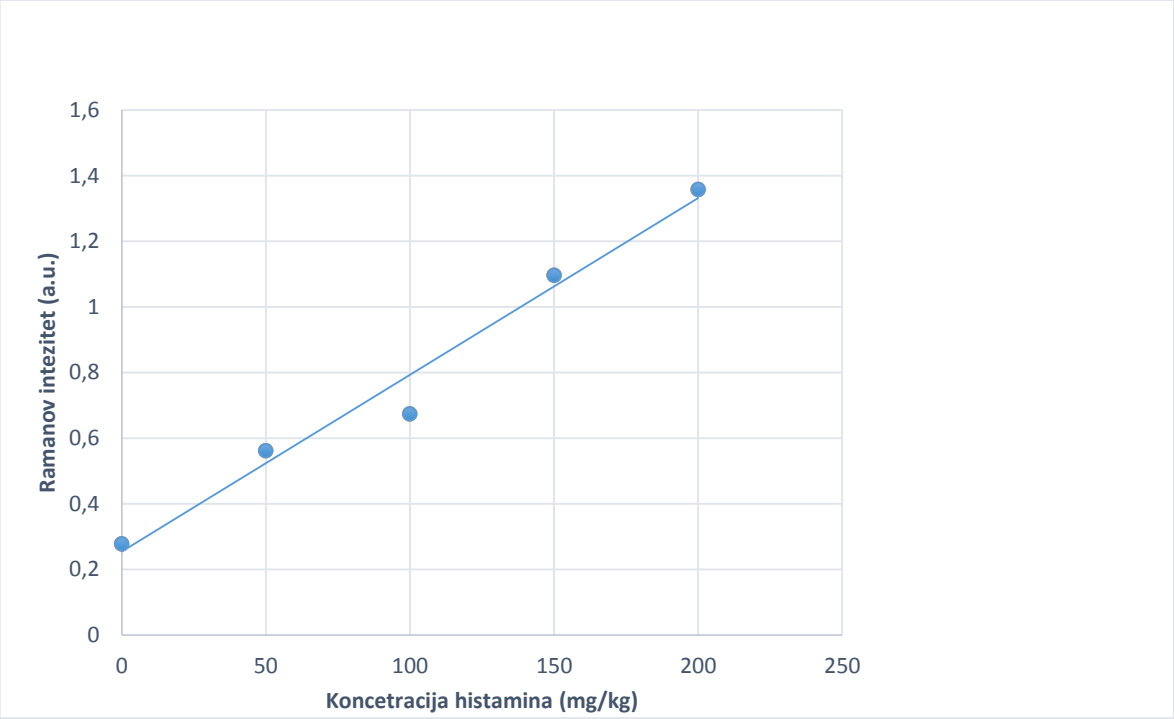


Slika 12. Obrada spektara: a) Neobrađeni SERS spektar; b) Korekcija pozadinskog signala – aproksimacija bazne linije; c) Korekcija pozadinskog signala – oduzimanje aproksimativnog signala; d) Korekcija šuma; e) Normalizacija spektra

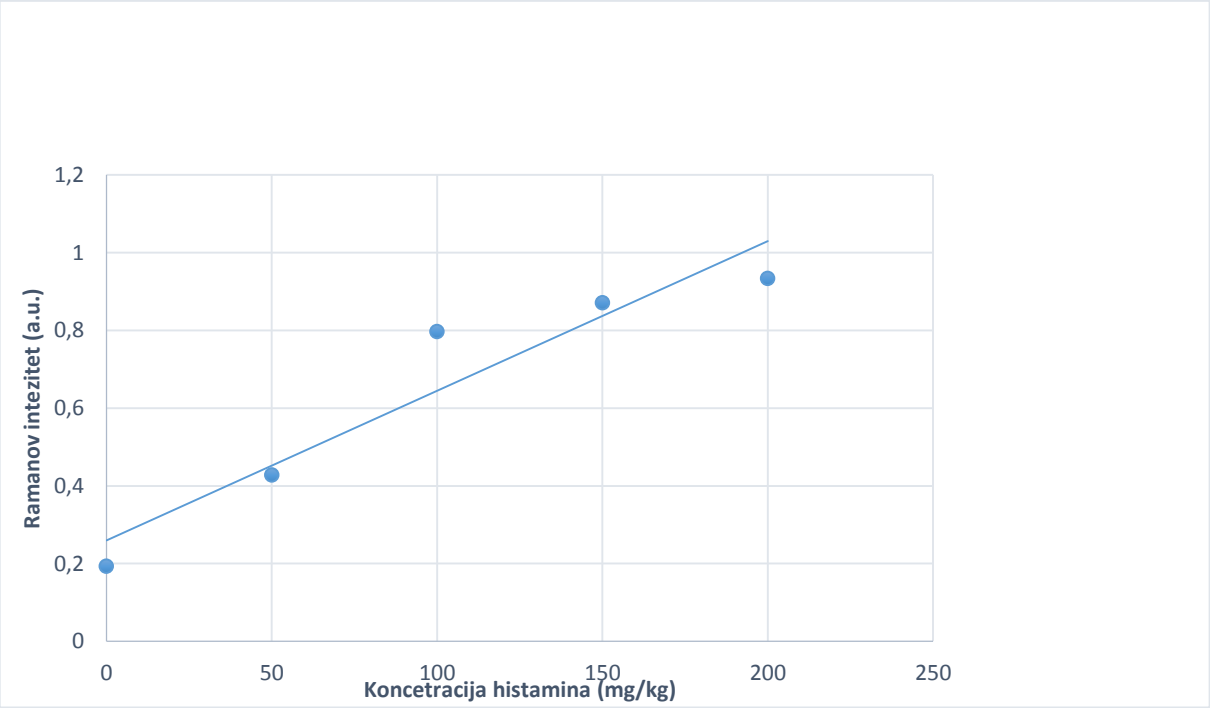
4.2.1. Kalibracijski modeli

Nakon obrade spektra, slijedi izradi se baždarni pravac. Za izradu kalibracijskih modela korištene su srednje vrijednosti (10 mjerenja za svaku koncentraciju) intenziteta vrpci histamina na 1264 i 1570 cm^{-1} te je baždarni pravac konstruiran metodom linearne regresije. Valjanost kalibracijskih modela procijenjena je na osnovi koeficijenta korelacije (R^2).

a)



b)



Slika 13. a) Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina na 1264 cm^{-1}; b) Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina na 1570 cm^{-1}

Kako bi se konstruirao kalibracijski model koji najbolje opisuje spektralne karakteristike pojedinog uzorka kao funkciju koncentracije histamina konstruirani su kalibracijski modeli temeljeni na intenzitetima vrpce na 1264 i 1570 cm^{-1} metodom linearne regresije.

Koeficijent korelacije (R^2) pokazuje učinkovitost pojedinog kalibracijskog modela, odnosno bolji model je onaj koji ima veći koeficijent korelacije. Dobivene vrijednosti koeficijenta korelacije prikazane su na baždarnim dijagramima na slikama 13a. i 13b. iz čega vidimo da je koeficijent korelacije veći kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} gdje je R^2=0,9757, dok je kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} R^2=0,9058.

Rezultati koje smo dobili u skladu su s istraživanjem koje su proveli Janči i sur. (2016), te je i kod njih koeficijent korelacije (R^2) veći kod modela koji se temelje na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1}. S obzirom da su uzorci pripremljeni na isti način kao i u navedenom istraživanju ovakav ishod rezultata bio je i očekivan.

Iz baždarnih dijagrama (Slika 13a, 13b) vidljivo je da intenzitet vrpce histamina raste s povećanjem koncentracije histamina u uzorku što potvrđuje rezultate Jančija i sur. (2016)

U tablici 4. prikazani su rezultati za realne uzorke slanih inćuna.

Tablica 4. Rezultati HPLC i SERS analize realnih uzoraka (n=?)

Uzorak	Metoda	Broj mjerenja	Srednja vrijednost	RSD (%)	Točnost (%)
UZORAK 1 (75 µL dodanog histamina)	HPLC	2	16,31 ± 0,11	0,75	100
	SERS 1264 cm^{-1}	4	17,07 ± 4,43	25,95	105,26
	SERS 1570 cm^{-1}	4	17,66 ± 4,60	26,08	95,48
UZORAK 2 (132 µL dodanog histamina)	HPLC	2	27,43 ± 0,17	0,62	100
	SERS 1264 cm^{-1}	4	25,03 ± 3,87	15,49	91,27
	SERS 1570 cm^{-1}	4	26,19 ± 4,35	16,63	95,48
UZORAK 3 (220 µL dodanog histamina)	HPLC	2	43,52 ± 0,72	1,65	100
	SERS 1264 cm^{-1}	4	42,21 ± 3,69	8,75	96,98
	SERS 1570 cm^{-1}	4	51,12 ± 6,55	12,80	117,47
UZORAK 4 (380 µL dodanog histamina)	HPLC	2	77,41 ± 1,77	2,29	100
	SERS 1264 cm^{-1}	4	80,26 ± 3,07	3,82	103,68
	SERS 1570 cm^{-1}	4	83,820± 4,27	5,09	108,26
UZORAK 5 (540 µL dodanog histamina)	HPLC	2	109,46 ± 1,51	1,38	100
	SERS 1264 cm^{-1}	4	114,15 ± 7,26	6,36	104,28
	SERS 1570 cm^{-1}	4	108,43± 7,03	6,48	99,06
UZORAK 6 (714 µL dodanog histamina)	HPLC	2	143,02± 0,43	0,30	100
	SERS 1264 cm^{-1}	4	144,80± 10,85	7,49	101,24

	SERS 1570 cm^{-1}	4	154,65± 5,91	3,82	108,13
UZORAK 7 (984 µL dodanog histamina)	HPLC	2	196,62± 1,22	0,62	100
	SERS 1264 cm^{-1}	4	208,74± 6,41	3,07	106,16
	SERS 1570 cm^{-1}	4	188,82± 12,46	6,59	96,03

4.3. USPOREDBA SERS I HPLC METODE

Snimanjem i obradom dobivenih spektara na zadnjoj slici kod koje imamo normaliziran spektar (Slika 12e) jasno su vidljive vrpce histamina na 1264 cm^{-1} i na 1570 cm^{-1}. Možemo zaključiti da su primjena AGC koloida asigniranog citratnim ionima i ekstrakcija histamina 0,4 M perkloratnom kiselinom uspješne. Rezultati su u skladu s istraživanjem koje su proveli 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}.

Kalibracijski modeli su konstruirani metodom linearne regresije, a vrlo dobri rezultati postignuti su kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1264 cm^{-1}Vrijedosti koeficijenata korelacije koje smo dobili prikazane su na baždarnim dijagramima (Slika 13a,13b) gdje je vidljivo da je koeficijent korelacije veći kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} gdje je (R^2 = 0,9757), dok je kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} nešto niži (R^2=0,9058). Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem koje su proveli Janči i sur. (2017), te je i kod njih koeficijent korelacije (R^2) veći kod modela koji se temelje na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1}. S obzirom da su uzorci pripremljeni na isti način kao i u navedenom istraživanju ovakav ishod rezultata bio je i očekivan. Iz baždarnih dijagrama (Slika 13a,13b) vidljivo je da intenzitet vrpce histamina raste s povećanjem koncentracije histamina u uzorku što potvrđuje rezultate Jančija (2016).

Sama svrha ovog istraživanja je validacija metode za određivanje histamina u ribi koju su razvili Janči i sur. (2017). Usporedbom rezultata HPLC i SERS analize (Tablica 4),

raspravit će se o preciznosti, ponovljivosti i točnosti obje metode, te prednostima i nedostacima 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. 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 4. mogu se uočiti vrijednosti za izmjerene koncentracije histamina za SERS metodu i HPLC metodu, standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD), broj mjerenja i točnost metode. Uočljivo je da se vrijednost izmjerene koncentracije histamina kod HPLC metode kreću u rasponu od 16,314 do 196,622 $mgkg^{-1}$, dok se kod SERS metode, temeljena na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1}, kreću u rasponu od 17,074 do 208,740 $mgkg^{-1}$, a kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} izmjerene vrijednosti kreću se od 17,666 do 188,820 $mgkg^{-1}$. Iz navedenog vidimo da je najveće odstupanje od zadanih parametara razvijene metode, koji se kreću od 0 – 200 $mgkg^{-1}$, kod rezultata SERS analize temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1}.

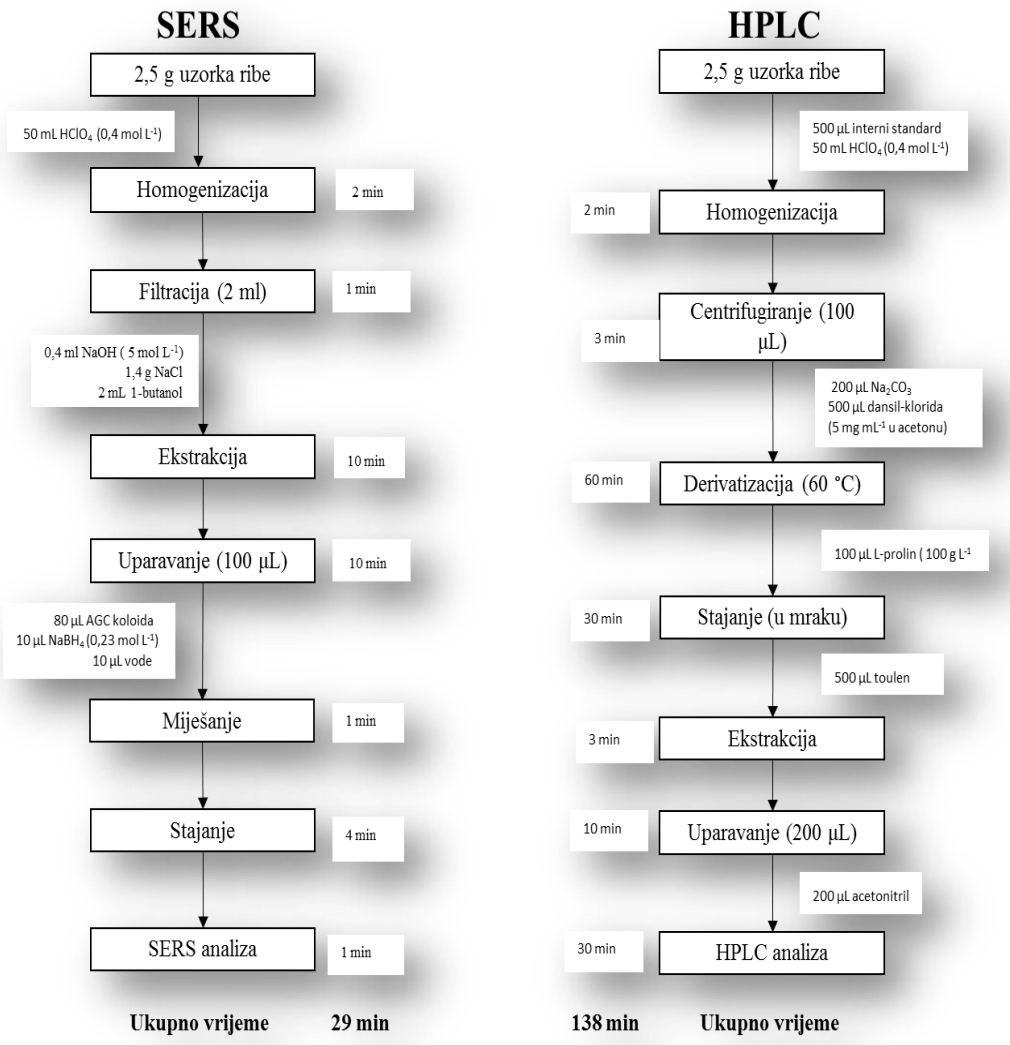
Standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD) govore o preciznosti HPLC odnosno SERS metode. Standardna devijacija za sve uzorke manja kod HPLC-a nego kod SERS metode. RSD vrijednost za HPLC metodu kreće se u rasponu od 0,30 % (16,314 ± 0,11) do 2,29 % (77,53 ± 1,77) što znači da je preciznost HPLC metode dobra i povećava se s povećanjem koncentracije histamina. Na osnovu vrijednosti koeficijenta korelacije (R^2) baždarnih pravaca za SERS analizu zaključeno je da je bolji kalibracijski model onaj koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1264 cm^{-1}, te su s obzirom na to i RSD vrijednosti manje nego kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce histamina na 1570 cm^{-1}.

Uspoređujući RSD vrijednosti za obje metode vidimo da HPLC metoda ima puno veću preciznost od SERS metode iz razloga što su RSD vrijednosti za oba modela relativno visoke. Slična zapažanja su i kod Janči, 2016. koji u svojem istraživanju zaključuje da HPLC ima izrazito visoku preciznost prema SERS metodi. Razlog visoke preciznost

HPLC metode 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. Kod SERS metode supstrati nisu toliko selektivni te spektru doprinose sve komponente složenog sustava koji se sastoji od uzorka, supstrata i agregirajućeg sredstva. Saamim time za očekivati je da će preciznost ove metode biti manja. Točnost metode tj. stupanj podudaranja između stvarne i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta može se procijeniti na nekoliko načina. Stvarna (referencijska) vrijednost uzimaju se rezultati dobiveni HPLC metodom, a samim time točnost metode temeljena je na usporedbi rezultata ispitivane SERS metode s rezultatima dobivenim referencijskom HPLC metodom. Rezultati HPLC analize uzimaju se kao apsolutno točni (100 %) tj. kao referentne vrijednosti jer dobiveni koeficijent korelacije baždarnog pravca iznosi 0.9995 što ukazuje na dobru točnost te metode. Prikaz rezultata točnosti obje metode nalazi se u tablici 4.

Rezultati su dobiveni izračunom omjera (analitičkog prinosa) srednjih vrijednosti izmjerenih koncentracija histamina dobivenih SERS analizom i srednjih vrijednosti koncentracija histamina izmjerenih referentnom HPLC metodom izraženih kao postotak. Odstupanja od referentne vrijednosti kreću se od 1,2 % do 6,1% kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1}, a kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} od 8,1 % do 17,47 %.

Vidljivo je da je SERS metoda temeljena na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} točnija zbog manjih odstupanja od referentne vrijednosti. Također usporedbom odstupanja svih 7 uzoraka na 1264 cm^{-1} primjećuje se da su odstupanja manja kod većih koncentracija histamina što dovodi do zaključka da se točnost metode povećava pri višim koncentracijama histamina. Rezultati se podudaraju s rezultatima Janči (2016).



Slika 14. Usporedba postupaka analize histamina zavijenom SERS metodom i referentnom HPLC metodom te vremena potrebnog za analizu jednog uzorka

Na slici 14. prikazana je usporedna postupaka analize histamina SERS metodom i referentnom HPLC metodom (Malle i sur., 1996) kako bi se usporedno prikazale neke prednosti SERS metode u odnosu na HPLC metodu. Iz prikazanog je vidljivo da je razvijenom SERS metodom u velikoj mjeri pojednostavljen postupak analize, te da je značajno skraćeno vrijeme analize u odnosu na HPLC metodu. SERS metoda ne zahtjeva postupak derivatizacije histamine te reakciju s L-prolinom koje traju ukupno 90 min, te uz to sam postupak analize tj. snimanje SERS spektra traje 1 min, dok je za HPLC analizu potrebno 30 minuta. Zbog svega navedenog postupak analize jednog uzorka kod SERS metode zahtjeva puno manje vremena (oko 30 min), dok je kod HPLC metode potrebno oko 140 min za analizu jednog uzorka. Također se može

primijetiti da je za provođenje SERS analize potreban manji broj jednostavnih i lako dostupnih kemikalija, dok postupak HPLC analize zahtjeva veći broj kemikalija, a sam trošak nabave nekih od tih kemikalija (interni standard, sredstvo za derivatizaciju) može biti dosta visok.

Danas su na tržištu dostupni mali Ramanovi spektrometri, čija je cijena dosta prihvatljivija i niža od tekućinskih kromatografa, te se može zaključiti da je trošak SERS analize po uzorku značajno manji od troška HPLC analize. Razlog tome je veli trošak nabave analitičkih instrumenta i potrošnog materijala kod HPLC metode. Zbog svih navedenih razloga razvijena SERS metoda ima mnoge prednosti poželjne kod svake analitičke metode, no temeljni uvjet za primjenu je mogućnost precizne i točne analize u realnim uvjetima.

Iz tablice 4. vidljiva je usporedba rezultata analize uzoraka ribe boljeg SERS modela odnosno SERS modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} u odnosu na rezultate dobivene referentnom metodom odnosno HPLC metodom. Iz rezultata u tablici se odmah može zaključiti da je najveća razlika između ove dvije metode vidljiva iz rezultata relativne standardne devijacije (RSD) koja pokazuje odstupanja. HPLC metoda ima visoki stupanj preciznosti koji se može 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. Dok kod SERS metode supstrati nisu toliko selektivni te spektru doprinose sve komponente složenog sustava koji se sastoji od uzorka, supstrata i agregirajućeg sredstva, pa je za očekivati da će preciznost ovakvih metoda biti manja.

Preciznost SERS modela temelji se na intenzitetu karakteristične vrpce histamina na 1264 cm^{-1} pripisuje se činjenici da je ta vrpca bolje razdvojena od ostalih vrpci prisutnih u spektru uzorka.

Nakon što smo usporedili SERS metode, odnosno dva SERS modela, s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) vidimo da je HPLC metoda dosta preciznija od SERS metode. No ipak SERS metodom analize i kvantifikacije histamina u uzorcima ribe mogu se postići vrlo dobri rezultati i dosta se koristi, a tome pridodaju prednosti SERS metode kao što su manji troškovi te smanjeno vrijeme koje je potrebno za analizu uzoraka.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja, dobivenih rezultata te same rasprave mogu se izvesti sljedeći zaključci :

1. Uspoređujući dva SERS modela utvrđena je veća preciznost SERS modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} nego na modelu temeljenom na intenzitetu vrpce 1570 cm^{-1}. Zatim usporedbom referentne HPLC metode sa SERS metodom, HPLC metoda je u odnosu na SERS metodu pokazala mnoge prednosti, kao što su skraćeno vrijeme koje je potrebno za analizu uzoraka, pojednostavljen postupak analize, te manji troškovi analize.
2. Koeficijent korelacije najveći je kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1}, a iznosi R^2=0,9757. Kod istog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} koeficijent korelacije iznosi R^2=0,9058. Koeficijent korelacije standardnog modela dobivenog HPLC mjerenjem iznosi R^2=0.995, te možemo zaključiti da model temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} ne odudara puno od standardnog modela te može pokazati veoma dobre rezultate za analizu i kvantifikaciju histamina.
3. RSD odnosno srednja vrijednost relativnih standardnih devijacija za SERS model temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} iznosi 10,13 %, za model temeljen na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} iznosi 11,078 %, dok za referentnu HPLC metodu iznosi 1,08 %. Iz toga zaključujemo da su kod SERS modela veća odstupanja, te da je preciznost metode niža od referentne HPLC metode.
4. Srednja vrijednost analitičkog prinosa za SERS model temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} iznosi 101,264 %, za model temeljen na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} iznosi 102,84 %, dok za HPLC metodu iznosi 99,92 %. Razlika između SERS modela i HPLC metode je minimalna, te je stoga i točnost rezultata dobivenih SERS modelima veoma blizu onima dobivenih HPLC metodom.
5. Razvojem SERS metode omogućena je analiza histamina u ribi, te se ta metoda u odnosu na svoje prednosti nad referentnom HPLC metodom pokazala jako dobra , i njenim korištenjem mogu se dobiti pouzdani rezultati.

6. LITERATURA

Albrecht, M. G., Creighton, J. A. (1977) Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **99,** 5215-5217.

Bocklitz, T., Walter, A., Hartmann, K., Rosch, P., Popp, J. (2011) How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models? *Anal. Chim. Acta* **704**, 47-56.

Bogdanović, T., S. Lelas, E. Listeš, V. Šimat (2009) Histamini i biogeni amini kao indikatori svježine ribe i ribljih proizvoda. *Meso* **11 (5)**, 291-294.

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.

Etchegoin, P. G., Le Ru, 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.

FAO/WHO (2013) *Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report*. <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/news_events/Histamine_Final_Report.pdf>Pristupljeno 15.07.2017.

FDA (2011) Scombrotoxin (Histamine) Formation. *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance* 4. izd. 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. (2003) *Introductory raman spectroscopy*, Academic press.

Flamini, R. (2008) *Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

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.

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) 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. *J. Electroanal. Chem.* **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.

Kaštelan-Macan, M. (2003) Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb.

Kleinman, S. L., Frontiera, R. R., Henry, A.-I., Dieringer, J. A., Van Duyne, R. P. (2013) Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 21-36.

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*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

Luterotti, S. (2009) Uvod u kemijsku analizu, 3. izd., Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, str. 223.

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

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

McNay, G., Eustace, D., Smith W.E., Faulds, K., Graham, D (2011) Surface-enhanced raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance raman scattering (SERS): a review of applications. *Appl. Spectrosc*. **65**, 825-837.

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

Moskovits, M. (1978) Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *J. Chem. Phys.* **69**, 4159-4161.

Mosier-Boss, P. A., Lieberman, S. H., Newbery, R. (1995) Fluorescence Rejection in Raman Spectroscopy by Shifted-Spectra, Edge Detection, and FFT Filtering Techniques. *Appl. Spectrosc.* **49**, 630-638.

Nosić, M., Greta Krešić., G. (2015) Plava riba – prednosti ali i neki rizici konzumiranja. *Hrana u zdravlju i bolesti*. **4**, 16-27.

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

Schulze, G., Jirasek, A., Yu, M. M., Lim, A., Turner, R. F., Blades, M. W. (2005) Investigation of selected baseline removal techniques as candidates for automated implementation. *Appl. Spectrosc.* **59**, 545-74.

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

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, H.F. (1999) *Osnove analitičke kemije*, prvo izd. (preveli

Kujundžić, N., Živčić-Alegratti, V., Živković, A.), Školska knjiga, Zagreb.

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.

Vidaček S. (2013) Tehnologija ribe, Konzerviranje proizvoda ribarstva hlađenjem. str. 50-77.

Yuen, C., Zheng, W., Huang, Z. (2008) Surface-enhanced Raman scattering: principles, nanostructures, fabrications, and biomedical applications. *J. Innov. Opt. Health Sci.* **01**, 267-284.