

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2017

Dalia Cvitanović

765/PI

**ODREĐIVANJE UDJELA  
HISTAMINA U KONZERVIRANOJ  
TUNI 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 izv. prof. dr. sc. Sanje Vidaček, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Tibor Janči.

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 mojoj obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci i ljubavi.

## 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 KONZERVIRANOJ TUNI PRIMJENOM RAMAN SPEKTROSKOPIJE I HPLC METODE

*Dalia Cvitanović, 765/PI*

**Sažetak:** Histamin je jedan od najproučavanijih biogenih amina ponajprije zbog svoje toksičnosti. Veoma je bitno na vrijeme detektirati histamin u ribi i proizvodima od ribe kako bi se na vrijeme spriječilo histaminsko trovanje. Zbog toga se nastoje razviti nove, brže metode za detekciju histamina, a jedna od tih metoda je i Raman spektroskopija. U ovom radu prikazana je usporedba postupka analize histamina primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS). Utvrđeno je da SERS metoda ima neke prednosti pred HPLC metodom, a to su značajno pojednostavljenje postupka analize, skraćivanje vremena potrebnog za analizu jednog uzorka i smanjenje troškova analize. Usporedbom koeficijenta korelacije ( $R^2$ ) kalibracijskih modela temeljenih na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$  (0,9784) i na  $1570\text{ cm}^{-1}$  (0,9273), s koeficijentom korelacije standardnog modela dobivenog HPLC mjerenjem (0,995) vidljivo je da model temeljen na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$  ne odudara puno od standardnog modela te može biti korišten za analizu i kvantifikaciju histamina.

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

**Rad sadrži:** 45 stranica, 14 slika, 5 tablice, 39 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. dc. Sanja Vidaček

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

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

1. Doc.dr.sc. Dubravka Novotni
2. Izv.prof.dr.sc. Sanja Vidaček
3. Doc.dr.sc. Tomislava Vukušić
4. Doc.dr.sc. Marina Krpan (zamjena)

**Datum obrane:** 29. 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 CANNED TUNA USING RAMAN SPECTROSCOPY AND HPLC METHOD

*Dalia Cvitanović, 765/PI*

**Abstract:** Histamine is one of the most investigated biogenic amines, primarily because of its toxicity. It is very important to detect histamine early in fish and fish products to prevent histamine poisoning on time. This is why new methods are being developed to detect histamine, and Raman spectroscopy is one of those methods. In this study is presented a comparison of the histamine analysis using the reference HPLC method and SERS method. It has been established that the SERS method has some advantages over HPLC method, which is a significant simplification of the analytical procedure, shortening the time required for single sample analysis and reducing the cost of the analysis. By comparing the correlation coefficient ( $R^2$ ) of the calibration models based on intensity of histamine band at  $1264\text{ cm}^{-1}$  (0,9784) and at  $1570\text{ cm}^{-1}$  (0,9273) with the correlation coefficient of the standard model obtained by HPLC method (0,995) shows that the model based on intensity of histamine band at  $1264\text{ cm}^{-1}$  does not differ much from the standard model and can be used for analysis and quantification of histamine.

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

**Thesis contains:** 45 pages, 14 figures, 5 tables, 39 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. *Dubravka Novotni*, Associate professor
2. PhD. *Sanja Vidaček*, Associate professor
3. PhD. *Tomislava Vukušić*, Assistant professor
4. PhD. *Marina Krpan*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 29 September 2017

<b>Sadržaj</b>	<b>stranica</b>
<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. HISTAMIN.....	2
2.1.1. Sinteza i metabolizam histamina .....	2
2.1.2. Trovanje histaminom.....	3
2.1.3. Metode za analizu histamina .....	6
2.2. RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA .....	8
2.3. SPEKTROSKOPIJA POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA (SERS).....	10
2.3.1. Faktor pojačanja (EF).....	11
2.3.2. SERS supstrati.....	12
2.3.3. Obrada i analiza SERS spektra.....	12
2.3.3.1. Korekcija šuma (izgladivanje spektra).....	13
2.3.3.2. Korekcija pozadinskog signala .....	13
2.3.3.3. Normalizacija spektra.....	13
2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI (HPLC) .....	14
2.4.1. Uređaji za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	17
3.1. MATERIJALI.....	17
3.1.1. Reagensi .....	17
3.1.2. Uzorci ribe.....	18
3.1.3. Laboratorijska oprema .....	18
3.2. PLAN ISTRAŽIVANJA.....	19
3.3. METODE RADA .....	20
3.3.1. Priprema uzoraka ribe.....	20
3.3.2. Određivanje sadržaja histamina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti .....	20
3.3.2.1. Provjera baždarnog dijagrama.....	20
3.3.2.2. Priprema mobilne faze .....	21
3.3.2.3. Kromatografska analiza.....	21
3.3.3. Određivanje histamina Raman spektroskopijom .....	23
3.3.3.1. Snimanje i analiza SERS spektra .....	23
3.3.4. Metoda linearne regresije .....	24
3.3.5. Usporedba rezultata HPLC i SERS metode.....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	26
4.1. HPLC ANALIZA .....	26
4.2. SERS ANALIZA .....	27
4.3. USPOREDBA HPLC I SERS METODE .....	34
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	41
<b>6. LITERATURA</b> .....	42





# 1. UVOD

U posljednje vrijeme sve se više ističe značaj konzumacije ribe u prehrani zbog njezinog nutritivnog značaja i pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi. Međutim, zbog visokog udjela esencijalnih aminokiselina, prehrambene vrijednosti polinezasićenih  $\Omega$ -3 masnih kiselina i visoke probavljivosti proteina ribljeg mesa riba se svrstava u grupu lako kvarljivih namirnica. Zbog svega navedenog u slučaju neadekvatnog rukovanja s ribom tijekom ulova, prerade ili distribucije mogu se javiti potencijalni rizici koji mogu umanjiti zdravstvenu ispravnost ribe i samim tim negativno utjecati na zdravlje potrošača, a jedan od najčešće prisutnih rizika je histaminsko trovanje. Biogeni amin, histamin, glavni je uzročnik histaminskog trovanja, a formira se u ribi post-mortem bakterijskom dekarboksilacijom aminokiseline histidina uz pomoć bakterijskog enzima histidin-dekarboksilaze. Zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje i brojnih simptoma koje uzrokuje, histamin je najproučavaniji biogeni amin, te se pokušava razviti što veći broj metoda za brzu detekciju i kvantifikaciju histamina. Globalizacijom tržišta ribe, napretkom tehnologije ulova, prerade i distribucije, suvremene industrije su najčešće velikog kapaciteta, te je nužan razvoj brzih analitičkih metoda koje u relativno kratkom roku mogu analizirati veliki broj uzoraka. Tradicionalne laboratorijske metode analize poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) zahtijevaju složenu i dugotrajnu pripremu uzoraka, skupe analitičke instrumente i posebno educirano osoblje, te su često teško primjenjive u industrijskim uvjetima.

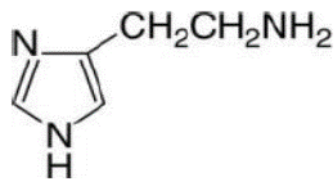
Raman spektroskopija je jedna od brzih, neinvazivnih metoda za analizu kvalitete i sigurnosti hrane. To je vibracijska spektroskopska tehnika čija je glavna prednost brza priprema uzoraka i *in situ* analiza. Najveće ograničenje kod primjene ove tehnike je činjenica da Ramanovo raspršenje samo po sebi daje slab signal što zahtjeva relativno visoku koncentraciju analita u ispitivanom uzorku. Visoka osjetljivost metode može se postići primjenom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (eng. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS). Ova metoda sve više nalazi primjenu u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti, a omogućuje pojačanje signala zahvaljujući efektima elektromagnetskog i kemijskog pojačanja.

Cilj ovoga rada bio je validirati SERS metodu za određivanje udjela histamina koju su razvili Janči i sur. (2017) te ispitati mogućnost primjene SERS analize za bržu detekciju histamina u konzerviranoj tuni, a usporedba svih rezultata vršena je s obzirom na HPLC kao referentnu metodu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. HISTAMIN

Histamin ( $\beta$ -imidazol-etilamin) je biogeni amin, te se smatra najčešćim uzročnikom trovanja povezanih s konzumacijom ribe i proizvoda ribarstva (Slika 1). S toksikološkog stajališta histamin je najznačajniji biogeni amin. Zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, jedan je od najproučavanijih biogenih amina. Trovanje histaminom spada u trovanja hranom uzrokovana konzumacijom hrane s visokim sadržajem slobodne aminokiseline histidina čijom dekarboksilacijom nastaje histamin. Trovanje histaminom još je poznato pod nazivom skombroidno trovanje ili skombrotoksizam, te se vezivalo uz konzumaciju riba iz porodice *Scombridae* poput skuše i tune. Obzirom da su zabilježeni slučajevi u kojima je trovanje uzrokovano konzumacijom drugih vrsta riba poput srdele (*Sardina pilchardus*), incuna (*Engraulis spp.*) i haringe (*Clupea spp.*), te 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)

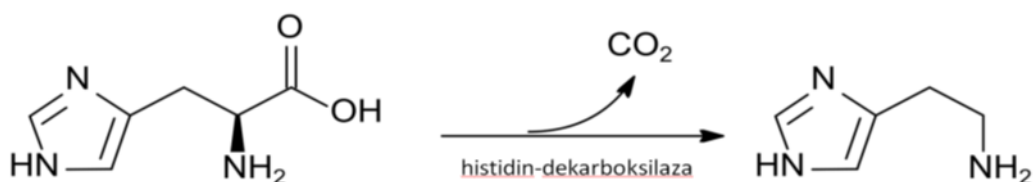
#### 2.1.1. Sinteza i metabolizam histamina

Histamin u tkivu ribe nastaje postmortalno bakterijskom dekarboksilacijom slobodne aminokiseline histidina pod djelovanjem enzima histidin-dekarboksilaze (Slika 2). Karakterističan je za plavu ribu kao što je tuna, skuša, srdela, incun zbog visokog sadržaja slobodnog histidina, dok bijela riba (npr. oslić) sadrži tek neznatne količine slobodnog histidina. Razine slobodnog histidina variraju od 1 g/kg u haringama do 15 g/kg u mesu tune (Nosić i Krešić, 2015).

Njegov nastanak posljedica je neadekvatnog rukovanja ribom točnije skladištenja u neadekvatnim uvjetima koji omogućuju mikrobiološku aktivnost. Kako bi nastale značajne količine histamina u tkivu ribe nužna je prisutnost određenih mikroorganizama koji imaju sposobnost tvorbe histidin-dekarboksilaze, a najčešće su to pojedine bakterije iz rodova

*Morganella* i *Raoutella*, te neke vrste iz porodice *Enterobacteriaceae* (Nosić i Krešić, 2015). Bakterije stvaraju histamin u širokom temperaturnom rasponu, no optimalna temperatura za nastanak histamina je 20 - 25 °C. 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).

Nastanak histamina moguć je i u slučajevima kada je aktivnost mikroorganizama smanjena ili eliminirana, ukoliko je u namirnici prisutan enzim histidin-dekarboksilaza koji nije u potpunosti inaktiviran, što je slučaj kod smrzavanja i odmrzavanja te nedovoljne termičke obrade. U slučaju rekontaminacije proizvoda npr. nakon otvaranja konzerve može nastati histamin iz razloga što prerađena riba sadrži i dalje velike količine slobodnog histidina. Histamin je termostabilan te se, jednom formiran ne može ukloniti iz namirnice uobičajenim postupcima prerade (Kanki i sur., 2004) (Emborg i Dalgaard, 2006). Prema nekim istraživanjima dokazano je da histamin izdržava temperaturu od 200°C, što znači da preživljava i temperaturu sterilizacije (Bogdanović i sur., 2009). Kontrola temperature ribe tijekom prerade, skladištenja i transporta je glavna preventivna mjera stvaranja histamina. Za sprečavanje nastanka histamina svježi proizvodi ribarstva moraju se održavati na temperaturi koja je približna temperaturi otapajućeg leda (Vidaček, 2013).



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

### 2.1.2. Trovanje histaminom

S obzirom na činjenicu da se riba konzumira globalno, ne iznenađuje podatak da je trovanje histaminom vrlo čest problem koji se javlja širom svijeta, čak i u najrazvijenijim zemljama u kojima je kontrola kvalitete i sigurnosti hrane na najvišoj razini. Često se trovanje histaminom naziva i „skombroidno trovanje” ili skomborotoksizam iz razloga što su ribe iz porodice *Scombridae* najčešće povezane s ovim tipom trovanja (Hugerford, 2010).

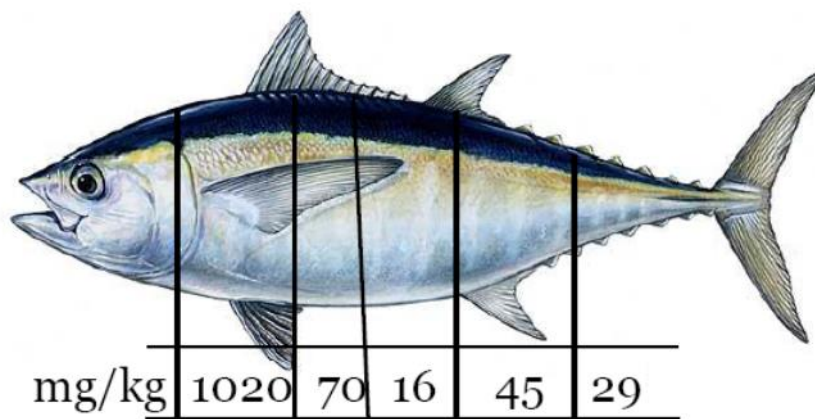
Prema podacima iz literature osjetljivost konzumenta prema histaminu je izrazito individualna. Osjetljivost pojedinca pripisuje se smanjenim aktivnostima enzima monoamino-oksidge (MAO), diamino-oksidge (DAO) i histamin-N-metil transferaza (HMT) odgovornih za intoleranciju na histamin. Prema određenim istraživanjima, nedostatak enzima diamin oksidge u sluznici tankog crijeva smanjuje razgradnju i povećava apsorpciju histamina u gastrointestinalnom sustavu pojedinca. Ljudsko tijelo je u stanju metabolizirati veći dio histamina iz gastrointestinalnog trakta, međutim u slučajevima kada pojedinac ima smanjene aktivnosti ovih 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). Trovanje histaminom javlja se vrlo brzo, otprilike 15 do 60 minuta nakon konzumacije ribe bogate histaminom, te uključuje široki spektar simptoma koji se mogu razlikovati ovisno o količini unesenog histamina, osjetljivosti organizma konzumenta i drugim parametrima. Uobičajeni simptomi uključuju papren ili „metalni“ okus, utruće u području usta, glavobolju, vrtoglavicu, drhtanje, poremećaje srčanog ritma, snižavanje krvnog tlaka, teškoće pri gutanju i žeđ. Vrlo su često prisutni i simptomi nalik alergijama koji uključuju difuzno crvenilo lica, osip, svrbež i oticanje lica. Rijetko se javljaju simptomi koji pogađaju središnji živčani sustav i nespecifični simptomi koji uključuju povraćanje, grčeve, dijareju i mučninu (Lehane i Olley, 2000). Histaminsko trovanje uglavnom nije opasno, te i bez tretiranja lijekovima prolazi samo od sebe već za nekoliko sati ne ostavljajući posljedice. Kod težih slučajeva liječenje se provodi primjenom antihistaminika ili blokatora histaminskih receptora (Nosić i Krešić, 2015). Kako bi se spriječio njegov nastanak naglasak se stavlja na poštivanje načela dobre proizvođačke prakse i implementacijom odgovarajućeg HACCP plana te strogu i učestalu kontrolu sirovine i proizvoda.

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

- Ustanovljena srednja vrijednost sadržaja histamina  $\leq 100$  mg kg<sup>-1</sup>
- Maksimalno 2 uzorka smiju imati vrijednost sadržaja histamina između 100 i 200 mg kg<sup>-1</sup>
- Niti jedan uzorak ne smije imati ustanovljenu vrijednost  $\geq 200$  mg kg<sup>-1</sup>

Proizvodi od istih ribljih vrsta koji su obrađeni enzimskim dozrijevanjem u salamuri imaju dvostruko veće dozvoljene vrijednosti od navedenih. Zakonska regulativa na području SAD je stroža te dopušta maksimalnu količinu od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  histamina, pri čemu se dodatno preporuča primjena znanstvenih podataka za procjenu svježine ribe kao što je prisutnost drugih biogenih amina povezanih s kvarenjem ribe (FDA, 2011).

Izuzetno je bitan adekvatan plan uzorkovanja prilikom određivanja količine histamina, prvenstveno iz razloga što histamin nije homogeno raspoređen u cijeloj šarži ili ulovu ribe (Slika 3). To najviše dolazi do izražaja kod velikih ulova sitne plave ribe koji se ne mogu ravnomjerno i dovoljno brzo polediti na ribarskom brodu, te se može očekivati da će riba koja je poleđena netom nakon ulova biti izvrsne kvalitete dok riba koja je poleđena posljednja uslijed izloženosti temperaturi okoliša, optimalnoj za nastanak histamina, postaje kontaminirana. Iz tog razloga potrebno je pravilno uzorkovanje koje će dati reprezentativan rezultat za cijelu šaržu što iziskuje relativno velik broj uzoraka i analiza. Histamin nije homogeno raspoređen niti u tkivu ribe što pogotovo dolazi do izražaja kod velikih riba poput tune ili igluna (Frank i sur., 1981). Najveći broj mikroorganizama nalazi se na škrgama i u probavnom traktu ribe gdje kvarenje i nastanak histamina prvo započinje i gdje se najbrže odvija tako da nepravilno uzorkovanje može dati pogrešan rezultat. U nekim slučajevima kao što su na primjer konzerve tune proizvedene od iste ribe mogu sadržavati proizvode koji su zdravstveno ispravni zajedno sa onima koji sadrže visoke količine histamina.



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

### 2.1.3. Metode za analizu histamina

Histamin je jedan od najvažnijih toksičnih biogenih amina prisutan u ribi, te postoji velika potreba za pouzdanim i efektivnim metodama za detekciju i kvantifikaciju histamina ali i drugih biogenih amina. Do sada je razvijen veliki broj analitičkih metoda za određivanje histamina od kojih svaka ima svoje prednosti, ali i nedostatke koji otežavaju njenu primjenu u industriji.

Uobičajena i najčešće korištena metoda kontrole prilikom prijema ribe na preradu je senzorska analiza svježine ribe. Riba se svrstava u određenu kategoriju kvalitete s obzirom na određene senzorske parametre kao što su izgled kože, škruga, očiju, miris, tvrdoća i struktura mesa, na osnovu čega se određuje njena prikladnost za preradu. Navedena metoda nije pouzdana za procjenu sadržaja histamina jer se u određenim slučajevima, kao npr. kod izlaganja ribe visokim temperaturama, histamin može razviti prije nego senzorski parametri poput mirisa i izgleda mogu detektirati kvarenje ribe.

Metoda koja se često primjenjuje u industriji je kontrola temperature i vremena od ulova do prijema ribe na preradu. Na osnovu termografskih lista i evidencije ulova množe se vrijednosti temperature i vremena koje je riba provela na određenoj temperaturi. Ukoliko je npr.  $t \times T$  vrijednost  $< 150 \text{ h}^\circ\text{C}$  smatra se da je riba prikladna za preradu. Glavni nedostatak ove metode je taj što daje grube orijentacijske vrijednosti te ne može poslužiti za precizno određivanje količine histamina u ribi (Janči, 2016).

S obzirom na činjenicu da se trovanje histaminom javlja širom svijeta, te da je svake godine zabilježen veliki broj slučajeva otrovanja razvijen je veliki broj analitičkih metoda za analizu i detekciju histamina. Većina tih metoda zasniva se na kromatografskim postupcima, a najčešće primjenjivana metoda za analizu histamina je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Metoda se temelji na ekstrakciji histamina iz tkiva ribe pogodnim otapalom nakon čega se provodi derivatizacija tj. 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 spada u ovu vrstu metoda, a uredba EZ 2073/2005 ju navodi kao referentnu metodu za određivanje udjela histamina u proizvodima ribarstva.

U ostale skupine laboratorijskih metoda spadaju ionska kromatografija, kapilarna elektroforeza, tankoslojna kromatografija, fluorometrijske metode, plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinska kromatografija sa masenom spektrometrijom (LC-MS). Prednosti laboratorijskih metoda su robusnost, ponovljivost, preciznost i točnost. Njihova primjena je uglavnom ograničena na analitičke laboratorije, iz razloga što je za njihovu provedbu potrebna skupa laboratorijska oprema, osoblje educirano za rad, a ponajviše iz razloga što je postupak pripreme uzoraka za sve ove metode vrlo složen i dugotrajan, te nije moguće u realnom vremenu analizirati dovoljan broj uzoraka kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu ribe. Zbog navedenih razloga i s ciljem lakše kontrole histamina u industriji razvijeno je nekoliko brzih metoda koje se uglavnom baziraju na različitim enzimskim metodama (ELISA). Oprema za provođenje ovih metoda uključuje 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. Smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenim soljenjem i dozrijevanjem u salamuri, različiti postupci pripreme uzoraka, te neprikladnost za analizu izvan laboratorija glavni su nedostaci ovih metoda.

Osim već navedenih metoda za analizu histamina u velikoj mjeri se istražuje mogućnost primjene Raman spektroskopije. Kako bi se omogućila bolja kontrola velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu javlja se potreba za novim, brzim metodama za analizu histamina. U tablici 1. prikazana je usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina, a u nastavku rada pobliže su objašnjene dvije metode tj. HPLC metoda i Raman spektroskopija jer je cilj samog rada usporedba tih dviju metoda i validacija metode Raman spektroskopije za analizu histamina.

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

	<b>AOAC metoda</b>	<b>HPLC metode</b>	<b>Spektrofluorometrijske metode</b>	<b>ELISA</b>	<b>Kolorimetrijske metode</b>
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

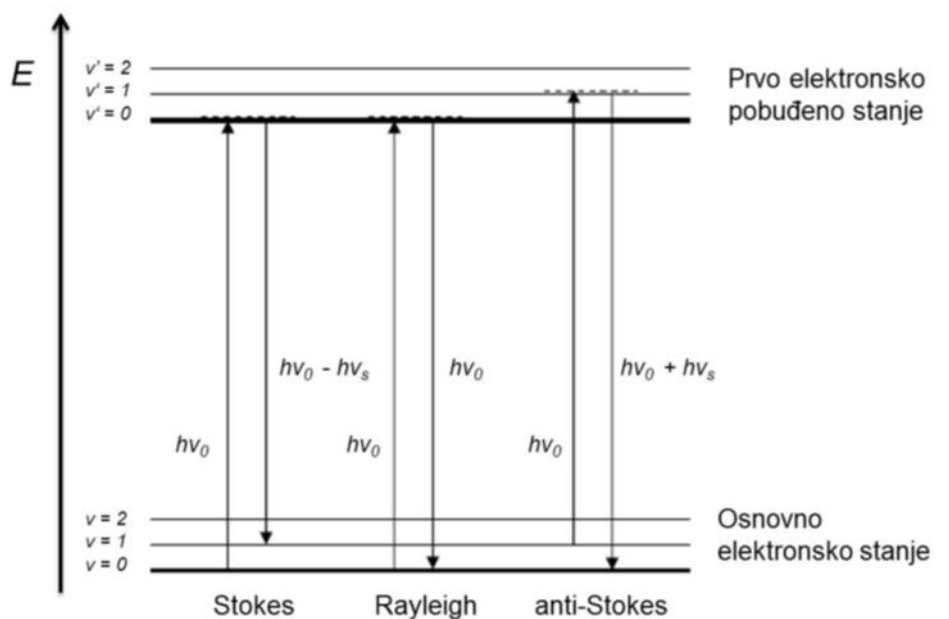
## 2.2. RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA

Ramanova spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika koja se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s vibracijskim modovima molekule (Long, 2002; Ferraro, 2003). Molekulske vibracije aktivne u Ramanovom spektru su one pri kojima dolazi do promjene polarizabilnosti molekule.

Interakcijom fotona i molekule dolazi do polarizacije elektronskog oblaka tj. pobude u virtualna energetska stanja. Molekula se nakon toga u vrlo kratkom vremenu ( $10^{-14}$  s) vraća u osnovno stanje otpuštajući foton. Elastično raspršenje zračenja pri kojem ne dolazi do promjene energije tj. valne duljine pobudnog i raspršenog zračenja naziva se Rayleighovo zračenje. Ramanovo raspršenje podrazumijeva neelastično raspršenje pri kojem se valna duljina raspršenog zračenja razlikuje od valne duljine pobudnog zračenja. Kod Ramanovog raspršenja, emitirani foton može imati manju ili veću valnu duljinu od pobudnog fotona.



Ukoliko 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 što se naziva Stokesovo raspršenje. Ukoliko je molekula već na početku u višem vibracijskom stanju, a nakon raspršivanja se vraća u osnovno stanje, raspršeni foton ima veću energiju a time i manju valnu duljinu, te se ovaj efekt naziva anti-Stokesovo raspršenje (Janči, 2016) (Slika 4).



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

Pojava Ramanovog raspršenja vrlo je slabog intenziteta i manje vjerojatna od Rayleighovog raspršenja. U pravilu tek je jedan od  $10^7$  fotona Stokes raspršen, dok je na svakih  $10^4$  upadnih fotona jedan foton Rayleigh raspršen (Singh, 2002). Intenzitet anti - Stokesovog raspršenja još je manji, jer se većina molekula pri sobnoj temperaturi nalazi u osnovnom elektronskom stanju, a vrlo mali broj u višim nivoima osnovnog elektronskog stanja. Zbog jačeg intenziteta u Ramanovoj spektroskopiji prikazuje se samo Stokesova polovica spektra.

Ramanov spektar je prikaz pomaka u valnoj duljini raspršenog zračenja u odnosu na njegov intenzitet. Svaki vibracijski mod molekule daje karakterističan pomak frekvencije, a broj modova molekule sa  $N$  atoma računa se pomoću izraza  $n = 3N - 6$  za nelinearne molekule, te  $n = 3N - 5$  za linearne molekule. Zbog višestrukih pobuđenja drugog reda i kombinacijskih modova stvaran broj Ramanovih pomaka u neelastičnom procesu raspršenja veći je od broja

osnovnih vibracijskih modova što rezultira jedinstvenim vibracijskim spektrom određene molekule tzv. otiskom prsta (*fingerprint*) (Janči, 2016).

Budući da je Ramanov spektar karakterističan za pojedinu molekulu, može se upotrijebiti za identifikaciju te ponekad i za kvantifikaciju pojedinog analita. Primjenom Raman spektroskopije moguća je brza analiza uzoraka u svim agregatnim stanjima uz minimalnu pripremu uzorka. Ramanovo raspršenje je efekt slabog intenziteta te zahtijeva relativno visoku koncentraciju analita u uzorku ili veliku snagu izvora svjetlosti kako bi se signal mogao detektirati. Jedan od nedostataka Raman spektroskopije je taj što velika snaga izvora svjetlosti često dovodi do degradacije uzorka čime onemogućava njegovu analizu. Također, može doći do apsorpcije zračenja, ukoliko je energija pobudnog zračenja dovoljna za prijelaz između elektronskih stanja molekule. Fluoresencija je vrlo česta pojava u Raman spektroskopiji čime ometa analizu i može u potpunosti zasjeniti Stokesovo raspršenje. Zbog pojave fotodegradacije uzorka i fluoresencije ograničena je maksimalna snaga izvora svjetlost (Peticolas, 1995).

Zbog jednostavnosti pripreme uzoraka Ramanova spektroskopija postala je vrlo važna metoda u mnogim područjima primjene. Kako bi se povećao intenzitet signala tj. osjetljivost Ramanove spektroskopije koriste se rezonantna Ramanova spektroskopija (RRS) i spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) (Mathies, 1995).

### **2.3. SPEKTROSKOPIJA POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA (SERS)**

Metoda kod koje dolazi do povećanja presjeka Ramanovog raspršenja na molekulama adsorbiranim na ili u neposrednoj blizini metalnih nanostrukture (SERS supstrati) što za posljedicu ima pojačanje Ramanovog signala naziva se površinski pojačano Ramanovo raspršenje (eng. *Surface Enhanced Raman Scattering*). Efekt je otkriven 1974. godine kada je primijećeno da je Ramanov spektar molekule piridina adsorbirane na srebrnu elektrodu neobično visokog intenziteta (Fleischmann i sur., 1974, McQuillan, 2009). U idućih nekoliko godina 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 poput zlata, platine, bakra, aluminijskih metala u ove svrhe. SERS metoda pored povećanja Ramanovog raspršenja ima i sposobnost eliminacije fluorescencije uslijed prijenosa energije s molekule na metal (Etchegoin i Le Ru, 2010).

Za intenzivan razvoj SERS tehnike prvenstveno je zaslužna njena visoka osjetljivost koja pruža mogućnost detekcije analita u vrlo niskim koncentracijama.

Zbog svih navedenih prednosti, kao što su povećanje Ramanovog raspršenja, sposobnost eliminacije fluorescencije, mogućnost detekcije analita u vrlo niskim koncentracijama, te primjenjivost u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti, čine je gotovo idealnom tehnikom za istraživanje i analizu različitih kemijskih i bioloških uzoraka.

Ograničavajući faktori kod primjene SERS spektroskopije su optimizacija parametara pripreme uzoraka 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.

SERS spektroskopija se istražuje već dugi niz godina i vrlo je aktivno područje istraživanja, no međutim sam mehanizam pojačanja Ramanovog raspršenja nije u potpunosti razjašnjen. Od velikog broja teorija koje objašnjavaju fenomen pojačanja raspršenja dvije su opće prihvaćene: elektromagnetski mehanizam pojačanja i kemijski mehanizam pojačanja (ili mehanizam prijenosa naboja) (McNay i sur., 2011). Kod elektromagnetskog mehanizma pojačanja, molekula je u blizini metalne površine pod utjecajem znatno snažnijeg električnog polja, dok se kemijski mehanizam pojačanja temelji na promjeni polarizabilnosti zbog interakcije molekule i metalne površine (Yuen i sur., 2008).

### 2.3.1. Faktor pojačanja (EF)

Daljnijim 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. enhancement factor, EF) (Kleinman i sur., 2013). U praksi se često primjenjuje eksperimentalno određivanje faktora pojačanja, jer je za razliku od teorijskog izračuna puno jednostavnije. Pojednostavljeni prikaz faktora pojačanja određenog SERS sustava može se prikazati sljedećom jednadžbom:

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

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.

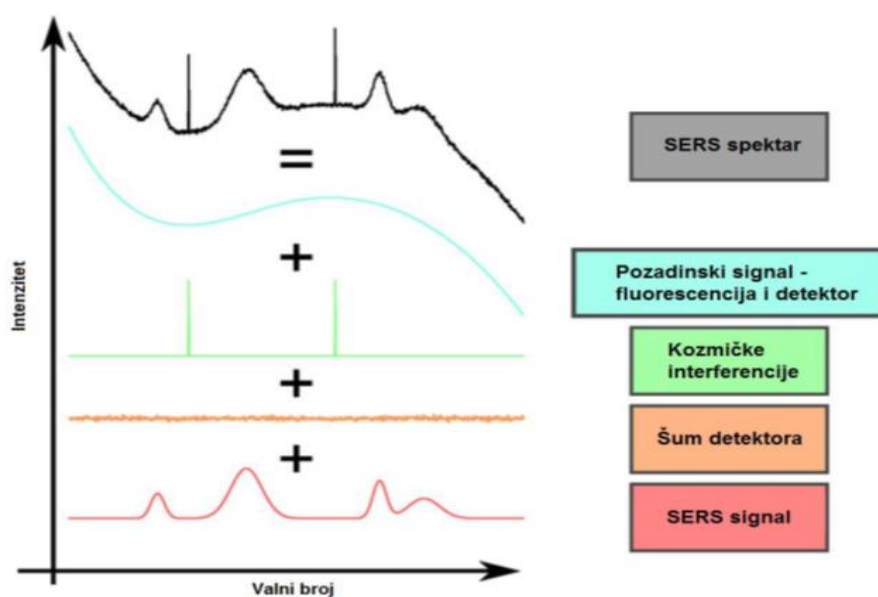
### 2.3.2. SERS supstrati

Pod pojmom SERS supstrat podrazumijeva se bilo koja metalna nanostruktura koja omogućuje površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja. Različite tehnike pripreme pogodnih metalnih SERS supstrata razvijale su se paralelno s razvojem SERS spektroskopije. Od prvog SERS supstrata, srebrne 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

SERS spektar uz signale analita sadrži i brojne interferencije koje potječu od drugih tvari prisutnih u uzorku, fluorescencije, kozmičkih interferencija nastalih od čestica visoke energije koje registrira detektor, te šuma i pozadinskog signala samog detektora (Slika 5) (Bocklitz i sur., 2011). Zbog navedenih interferencija analiza i upotreba SERS spektra može biti vrlo složena, posebice za kvantitativne analize. Apsolutna vrijednost SERS spektra ovisi o brojnim faktorima kao što su pomicanje optičkih elemenata instrumenta uslijed vibracija, oscilacije snage lasera i dr. tijekom izvođenja eksperimenta navedene faktore nije moguće kontrolirati, te ih je potrebno eliminirati predobradom spektra kako bi se dobili zadovoljavajući rezultati.



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

#### 2.3.3.1. Korekcija šuma (izgladivanje spektra)

Primjenom matematičkih algoritama poznatih kao digitalni filteri ili prozorske funkcije (eng. *window functions*) moguće je izgladiti spektar kako bi se postigao bolji omjer signala i šuma. Najprije je potrebno definirati funkciju koja ovisno o namjeni može biti srednja vrijednost, prilagođavanje polinoma 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 izgladenog 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 izgladen. Upotrebom digitalnih filtera treba biti oprezan, jer u slučaju pretjeranog izgladivanja spektra može doći do gubitka vrpce niskog intenziteta te proširivanja ili pomaka SERS vrpce 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 promjene oblika SERS vrpce (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 vrpce.

#### 2.3.3.3. Normalizacija spektra

Normalizacija spektra je postupak kojim se eliminiraju oscilacije apsolutnog intenziteta SERS spektra. Postoje 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:

$$I_{norm} = \frac{I_{original} - \mu_1}{SD_1} \quad (2)$$

gdje je  $\mu_1$  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 (HPLC) jedan je od oblika tekućinske kromatografije, a glavna karakteristika ove metode je mogućnost razdvajanja najsloženijih smjesa. HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography or High Pressure Liquid Chromatography*) 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.

HPLC metoda uključuje injektiranje malog volumena tekućeg uzorka u tok mobilne faze, te pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom dolazi do premještanja uzorka 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

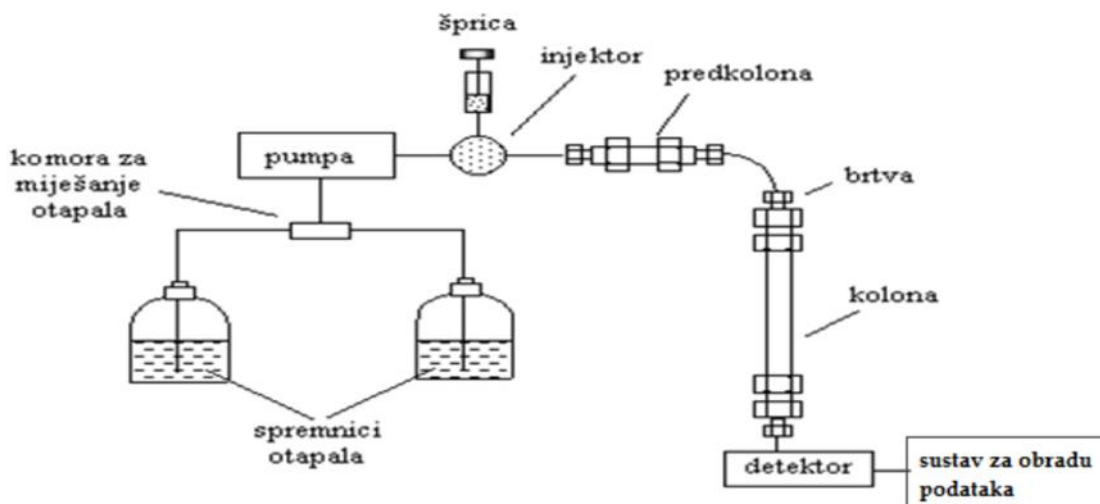
Osnovni dijelovi HPLC uređaja su spremnik mobilne faze (otapala), crpka, sustav za unošenje uzorka, kolona, detektor i računalo (Slika 6).

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 (Lindsay, 1992).

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 zrcima punila, tj. česticama stacionarne faze malih dimenzija ali velike aktivne površine, promjera od 3-10  $\mu\text{m}$ . 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 spektrofotometrijski, spektrofluorimetrijski (flourescentni) 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 se dobivaju pikovi 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

- Perkloratna kiselina (0,4 mol/L): pipetira se 17,2 mL 70% HClO<sub>4</sub> (ili 19,5 mL 65% HClO<sub>4</sub>) u odmjernu tikvicu od 500 mL i dopuni vodom do oznake (Carlo Erba reagents, Francuska)
- Stock otopina histamina: otopi se 82 g histamin-dihidroklorida u 100 mL vode (82,8 mg histamin-dihidroklorida je ekvivalent 50 mg histamina) (Sigma chemical Co., Saint Louise, SAD)
- Zasićena otopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: otopi se cca 16 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 50 mL vode (Gram-mol, Hrvatska)
- Otopina L-prolina (99 %): otopi se 1 g L-prolina u 10 mL vode (Acros organics, New Jersey, USA)
- Interni standard: otopi se 50 mg imidazola (99 %) i 1,7-diaminoheptana u 10 mL vode (Acros organics, New Jersey, USA)
- Otopina dansil-klorida (98 %): otopi se 50 mg dansil-klorida u 10 mL acetona, koristi se svježa otopina (Acros organics, New Jersey, USA)
- 1-butanol, p.a. (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev klorid, p.a. (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev borhidrid, p.a. (Carlo Erba, Francuska)
- Toluen (Gram-mol, Hrvatska)
- Acetonitril (Kemika, Hrvatska)
- Srebrov nitrat (Kemika, Hrvatska)
- Trinatrijev citrat dihidrat (Kemika, Hrvatska)

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. Uzorci ribe

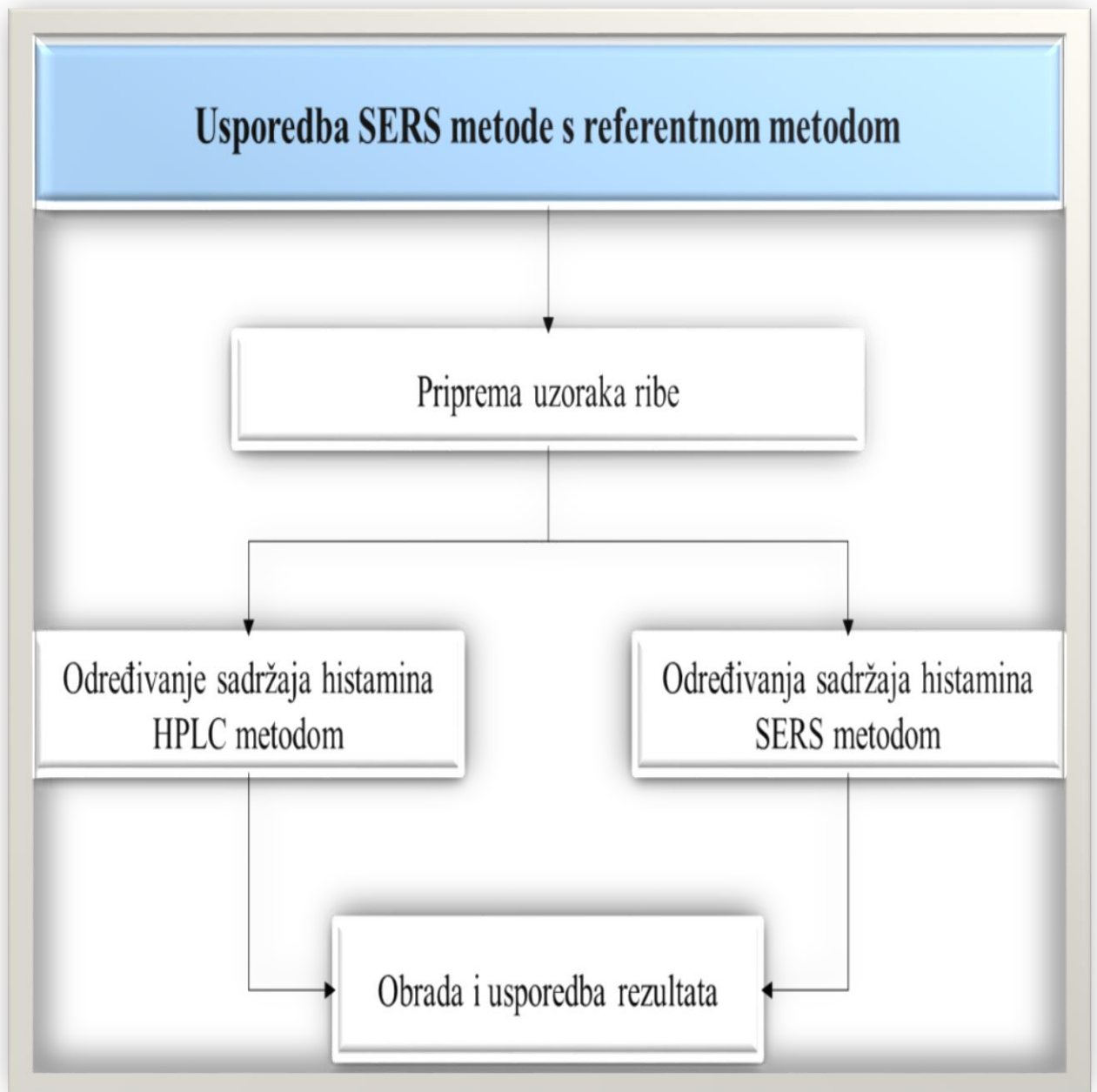
Uzorci konzervirane tune (*Scorridae*) kupljeni su u trgovini. Tuna je izvađena iz konzerve, uklonjeno je dodano maslinovo ulje, te je usitnjena i homogenizirana ručnim sjekačem (mikserom). Ovako pripremljeni uzorci korišteni su za daljnje analize.

### 3.1.3. Laboratorijska oprema

Laboratorijsko posuđe i uređaji:

- plastične kivete (Hrvatska)
- propipetor (Brand, Njemačka)
- mikropipetori od 100 – 1000  $\mu$ L (Brand, Njemačka)
- plastične vialice
- odmjerna tikvica 50 mL (Hrvatska)
- laboratorijske čašice (Hrvatska)
- staklene bočice (vial) za HPLC – 20mL (Agilent, Njemačka)
- staklena pipeta (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)
- Ramanov spektrometar Horiba Jobin Yvon T640000 (Horiba, Ltd., Japan)
- homogenizator Ultra turax T-18 (IKA-Labortechnik, Njemačka)
- analitička vaga (Kern, Njemačka)

### 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 konzervirane tune usitnjeni ručnim sjekačem podijeljeni su u 6 grupa i ostavljeni na sobnoj temperaturi kako bi došlo do prirodnog formiranja histamina tijekom 6, 12, 18, 24, 30 i 36 sati. Svako 6 sati jedan je uzorak zamrznut na  $-18^{\circ}\text{C}$  i čuvan do daljnje analize. Pripremljena je još jedna grupa uzoraka u koju je dodana odgovarajuća količina histamin dihidroklorida kakao bi se postigle koncentracije histamina od 0, 50, 100, 150 i 200  $\text{mg kg}^{-1}$ , te su tako pripremljeni uzorci korišteni kao baždarni uzorci. Pripremljeni uzorci analizirani su SERS metodom te tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

#### 3.3.2. Određivanje sadržaja histamina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

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  $\mu\text{L}$  otopine internog standarda (imidazol, 5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) i homogenizirano s 20 mL  $\text{HClO}_4$  ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) na laboratorijskom homogenizatoru 2 minute na maksimalnoj brzini. Homogenizirani uzorak prelijevan je u odmjernu tikvicu od 50 mL, dopunjen do oznake s  $\text{HClO}_4$  i promiješan. Uzorak je vraćen nazad u kivetu i centrifugiran na  $3500 \times g$  kroz 3 minute. 100  $\mu\text{L}$  supernatanta odpipetirano je u mikrokivetu volumena 1,5 mL, dodano je 200  $\mu\text{L}$  zasićene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i 500  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  toluena, promiješano je na laboratorijskoj miješalici i mikrokiveta je ostavljena nekoliko minuta da se odvoje slojevi. Iz gornjeg sloja odpipetirano je 200  $\mu\text{L}$  u vialu i upareno u struji dušika do suhog. Suhi uzorak je otopljen u 200  $\mu\text{L}$  acetonitrila, promiješan da se u potpunosti otopi te je 20  $\mu\text{L}$  uzorka injektirano i podvrgnuto kromatografskoj analizi.

##### 3.3.2.1. Provjera baždarnog dijagrama

Provjera baždarnog dijagrama provedena je pomoću otopina B1, B2, B3 i slijepa probe. Pripremljene otopine tretirane se na isti način kao i uzorci – 100  $\mu\text{L}$  otopine + 200  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 200  $\mu\text{L}$  dansil-klorida promiješano je na vortexu i ostavljeno u mraku preko noći.

Otopina B1: pipetirano je 200  $\mu$ L 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  $\mu$ L otopine internog standarda u odmjernu tikvicu od 50 mL i dopunjeno vodom do oznake

Slijepa proba: pipetirano je 50  $\mu$ L otopine internog standarda i dopunjeno do 5 mL sa HClO<sub>4</sub>

Prilikom analize uzoraka pripremljen je još jedan uzorak više i njega je dodano 2 mL stock otopine histamina te je nakon analize izračunato iskorištenje („recovery”, R) koje treba biti u granicama od 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 su odzračene 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  $\mu$ m (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 faze 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 (vlastita fotografija)

Tablica 2. Program gradijentnog eluiranja pri HPLC analizi histamina

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

### 3.3.3. Određivanje histamina Raman spektroskopijom

Određivanje histamina Raman spektroskopijom provedeno je prema metodi Janči i sur. (2017).

U kivetu volumena 50 mL odvagano je 2,5 g uzorka. Pripremljeni uzorci su homogenizirani u 50 mL perkloratne kiseline ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) 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  $\mu\text{L}$  gornjeg sloja otpipetirano je u mikrokivetu volumena 1,5 mL te je zatim upareno do suhog u struji dušika pri temperaturi od  $60^\circ\text{C}$ .

#### 3.3.3.1. Snimanje i analiza SERS spektra

Pripremljeni uzorci čuvani su u zatvorenim mikrokivetama na temperaturi  $4^\circ\text{C}$  do trenutka SERS analize. Neposredno prije analize u mikrokivetu je pipetirano 80  $\mu\text{L}$  AGC koloida, 10  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{NaBH}_4$  ( $0,23 \text{ mol L}^{-1}$ ) i 10  $\mu\text{L}$  vode te miješano 30 s na laboratorijskoj miješalici nakon čega je uzorak prebačen u staklenu kapilaru. SERS spektri uzoraka snimani su u području  $1050 - 1650 \text{ cm}^{-1}$  s vremenom ekspozicije 30 s u razmaku od 1 min tijekom prvih 6 min do završetka miješanja svih komponenti na Raman-ovu spektrometru (Slika 9).



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

Snimljeno je 10 spektara po uzorku te je za daljnju analizu i izradu kalibracijskih pravaca korišten prosječan spektar od 10 izvršenih mjerenja.

Interpretacija i upotreba SERS spektra može biti vrlo složena, posebice za kvantitativne analize. Snimljeni SERS spektri zahtijevaju daljnju obradu, jer uz signale analita sadrže i brojne interferencije. Predobrada SERS spektara prikazana je u nastavku rada u podpoglavlju 4.2.

#### 3.3.4. Metoda linearne regresije

Metoda linearne regresije korištena je za izradu kalibracijskih modela. To je metoda koja proučava linearnu ovisnost između varijabli i predstavlja najčešće upotrebljavanu statističku metodu. Neovisna varijabla ( $x$ ) je varijabla kojoj se unaprijed odredi vrijednost, a ovisna varijabla ( $y$ ) je varijabla čija vrijednost ovisi o vrijednosti neovisne varijable. Pretpostavka je da postoje koeficijenti  $a$  i  $b$  takvi da za svaku vrijednost neovisne varijable  $x_i$ , ovisna varijabla se može napisati kao:

$$y_i = bx_i + a + \epsilon_i \quad (3)$$

gdje je pogreška  $\epsilon$  slučajna varijabla s normalnom raspodjelom i očekivanom vrijednošću 0, a koeficijenti  $a$  i  $b$  najčešće se određuju metodom najmanjih kvadrata koja minimizira vrijednosti kvadrata udaljenosti između opažanih podataka i regresijske krivulje (pravca). Linearni koeficijent korelacije ( $R$ ) govori o korelaciji i smjeru linearne povezanosti između dvije varijable (Dobre i Marcano, 2007).

#### 3.3.5. Usporedba rezultata HPLC i SERS metode

Provedena je HPLC analiza baždarnih uzoraka i realnih uzoraka konzervirane tune (tj. uzoraka 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 uspoređeni su na način da se HPLC metoda uzima kao referentna, tj. dobivene vrijednosti su 100 % točne. Dobiveni rezultati prikazani su u nastavku.

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 u nastavku će se raspraviti o preciznosti i ponovljivosti te točnosti obje metode. Validacija



analitičke metode uključuje određivanje i optimizaciju parametara te metode s ciljem utvrđivanja njezine prikladnosti za dobivanje željenih informacija. 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. Točnost metode definirana je kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referentne vrijednosti, i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta (Lazarić, 2012).

Standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD) govore o preciznosti HPLC odnosno SERS metode. U tablici 3 prikazani su kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje i ponovljivost prema AOAC International (Association of Official Analytical Chemists).

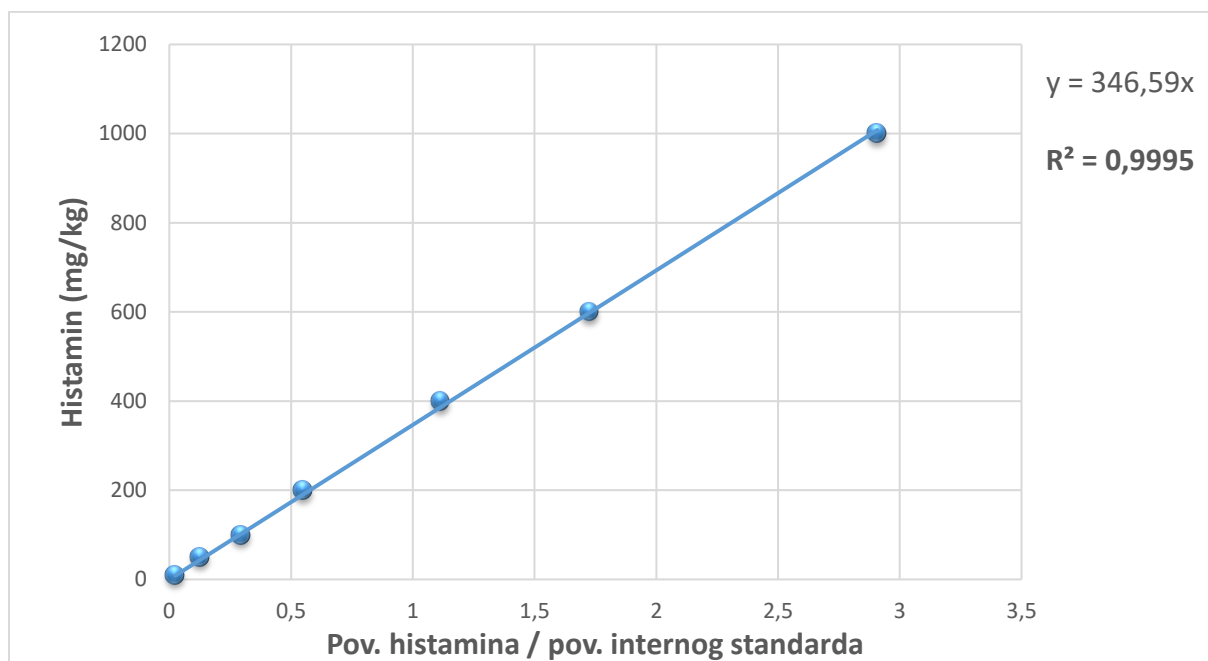
Tablica 3. Kriterij prihvatljivosti za iskorištenje i ponovljivost (AOAC, 2011)

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

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. HPLC ANALIZA

Baždarni pravac za HPLC konstruiran je linearnom regresijom iz odnosa koncentracije histamina i omjera površine pikova histamina i internog standarda (Slika 10).

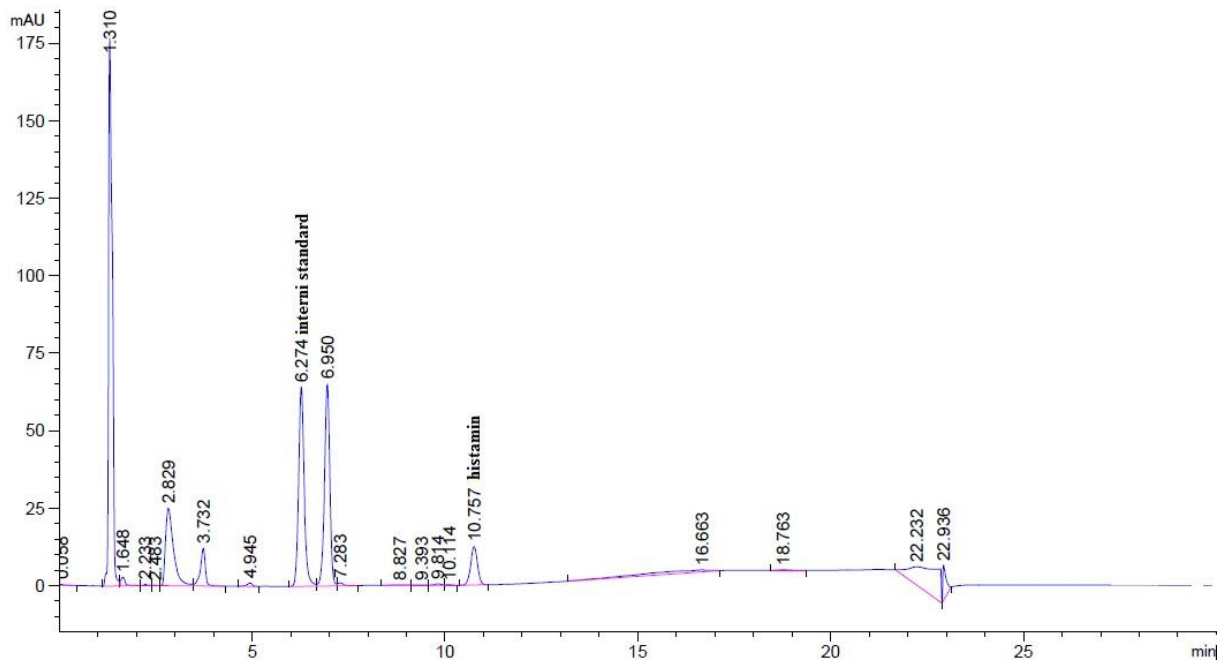


Slika 10. Ovisnost koncentracije histamina o omjeru površina histamina i internog standarda

Tablica 4. Podaci za baždarni pravac za HPLC metodu

<b>Jednadžba pravca</b>	<b><math>y = 346,59</math></b>
<b>Nagib</b>	346,59
<b>Odsječak</b>	0
<b>Broj mjerenja</b>	5
<b>Koeficijent korelacije</b>	0,9995

Kromatogram je dobiven pomoću otopine histamina različitih koncentracija uz dodatak internog standarda, a spojevi su identificirani na temelju retencijskog vremena (Slika 11).



Slika 11. Kromatogram otopine internog standarda i histamina koncentracije 100 mg/kg

## 4.2. SERS ANALIZA

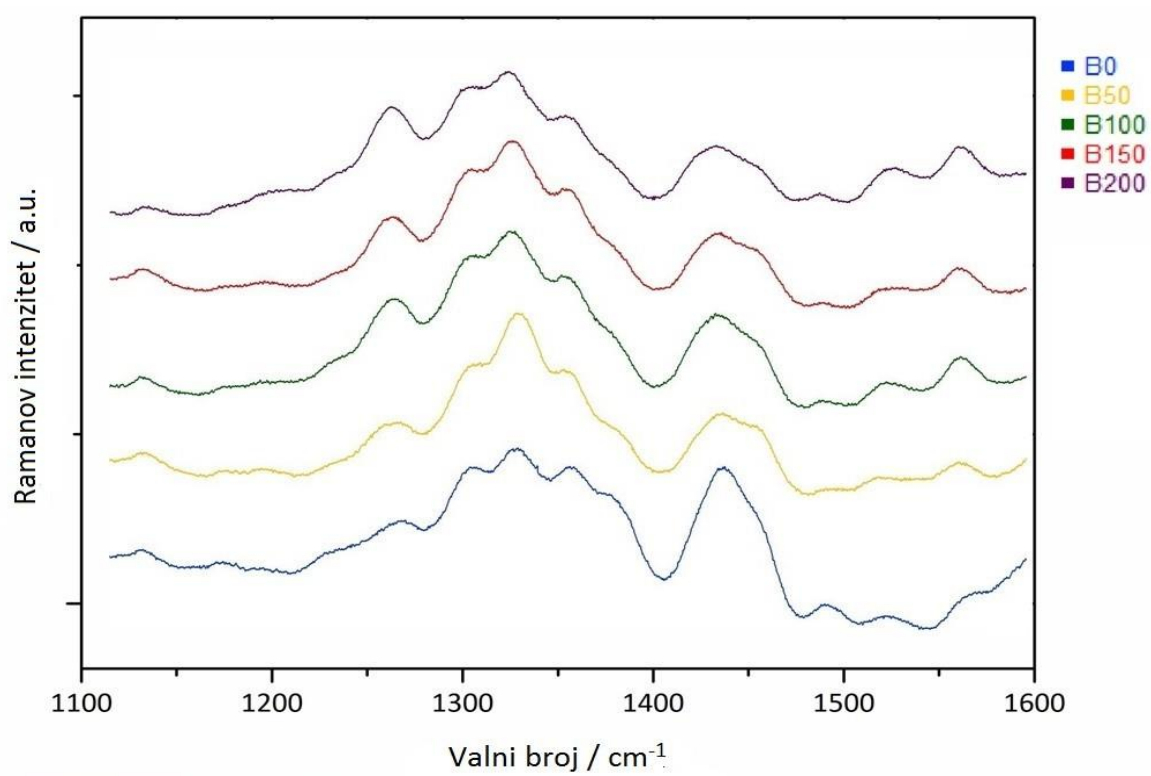
Snimljene SERS spektre potrebno je obraditi prije same izrade kalibracijskih modela. U podpoglavlju 2.3.3. već je spomenuto da SERS spektar uz signale analita sadrži i brojne interferencije. Interferencije potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, šuma, fluorescencije i pozadinskog signala samog detektora. Apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra ovisi o brojnim faktorima, kao što su oscilacije snage lasera i pomicanje optičkih elementa instrumenta uslijed vibracije, koje tijekom eksperimenta nije moguće kontrolirati te ih je potrebno eliminirati predobradom spektra kako bi se dobili zadovoljavajući rezultati.

Zbog navedenih interferencija i smetnji, provedena je optimizacija parametara za korekciju pozadinskog signala, šuma i normalizaciju spektra kako bi se navedeni utjecaji eliminirali (Slika 12).

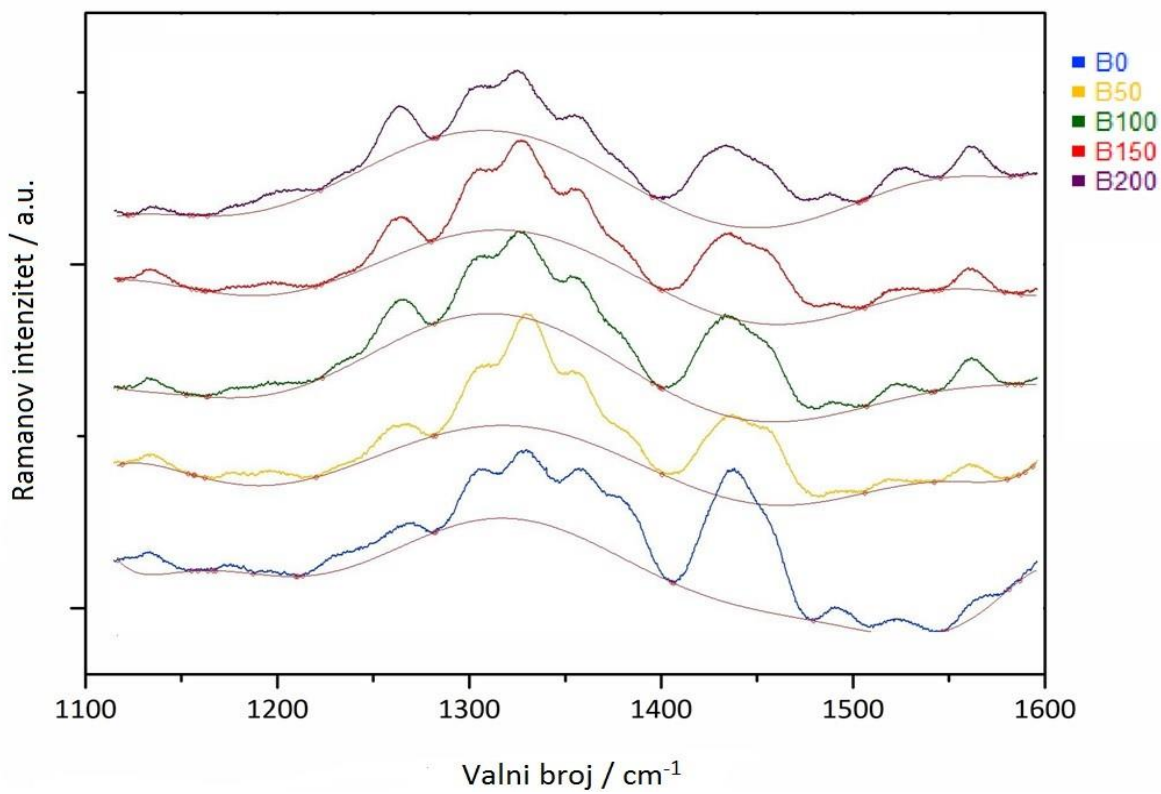
Isprobano je više načina predobrade spektra, a kao najbolji način predobrade spektra pokazala se obrada SERS spektra u programu LabSpec 6 (Horiba Scientific). "*Baseline correction*" funkcija se koristi za korekciju pozadinskog signala na način da je automatski odabrano 40

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 izgladeni (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. Na kraju slijedi normalizacija spektra pri čemu je kao interni standard korišten intenzitet vrpce na  $1437\text{ cm}^{-1}$  prethodno asigniran citratnim ionima prisutnim u AGC koloidu.

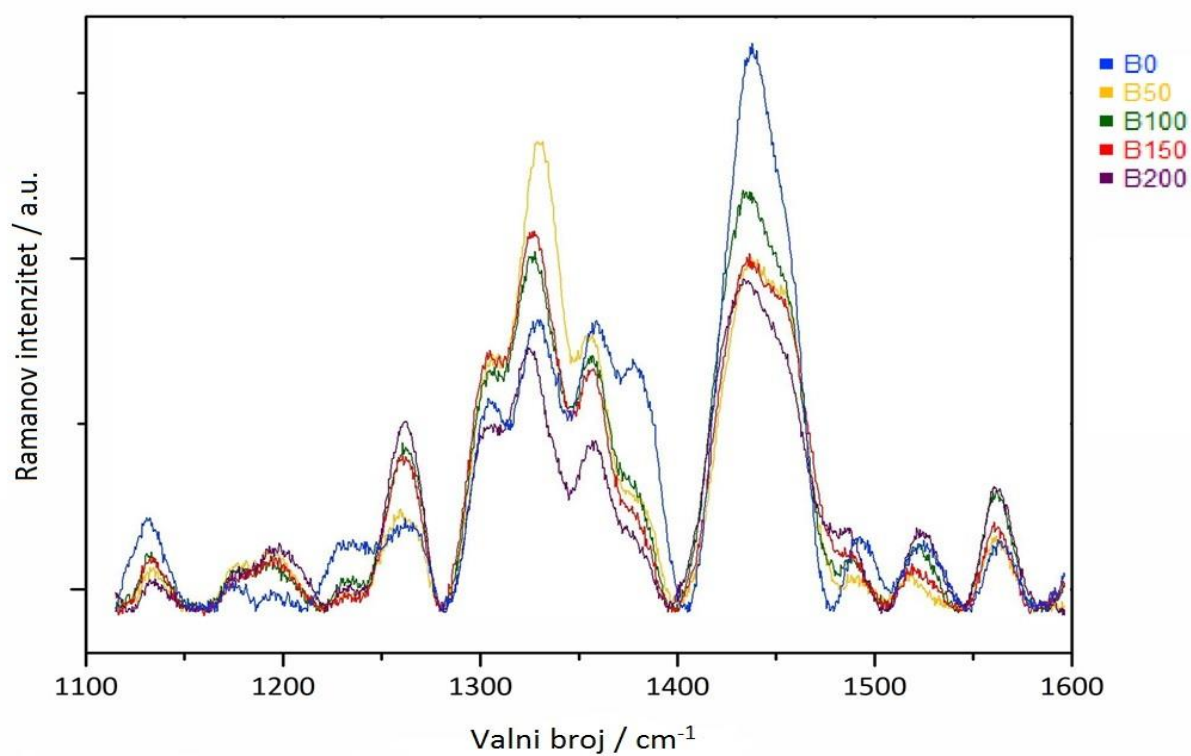
a)



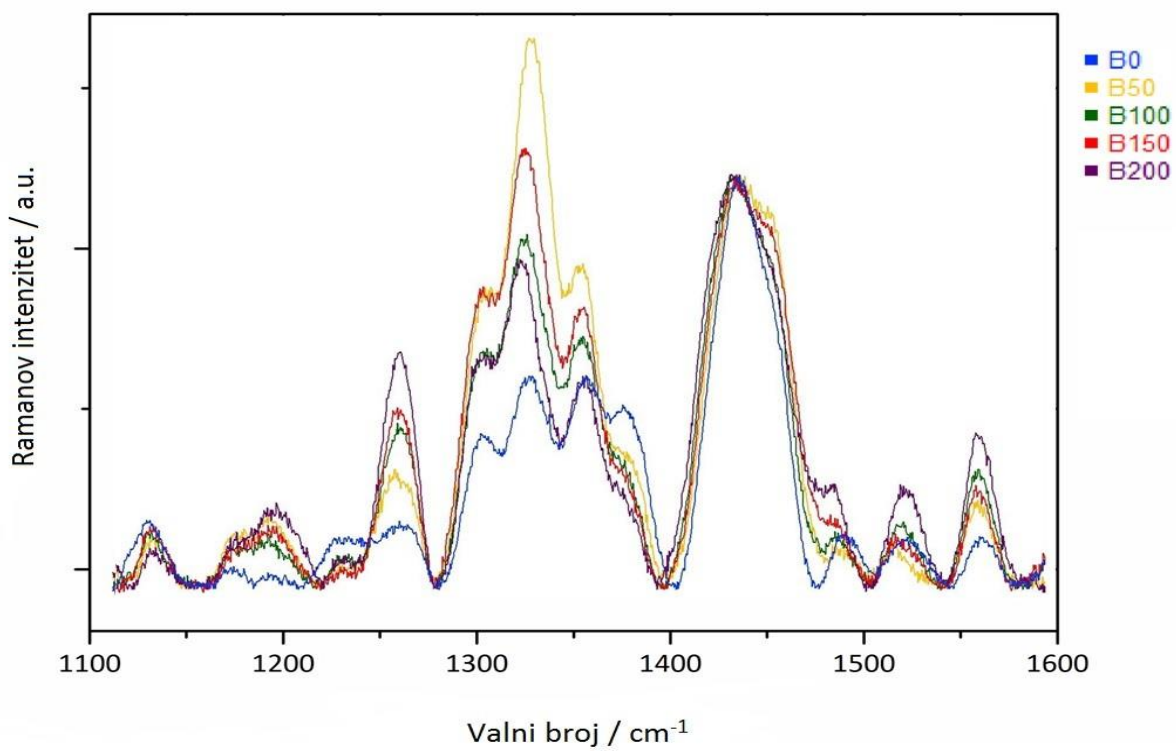
b)



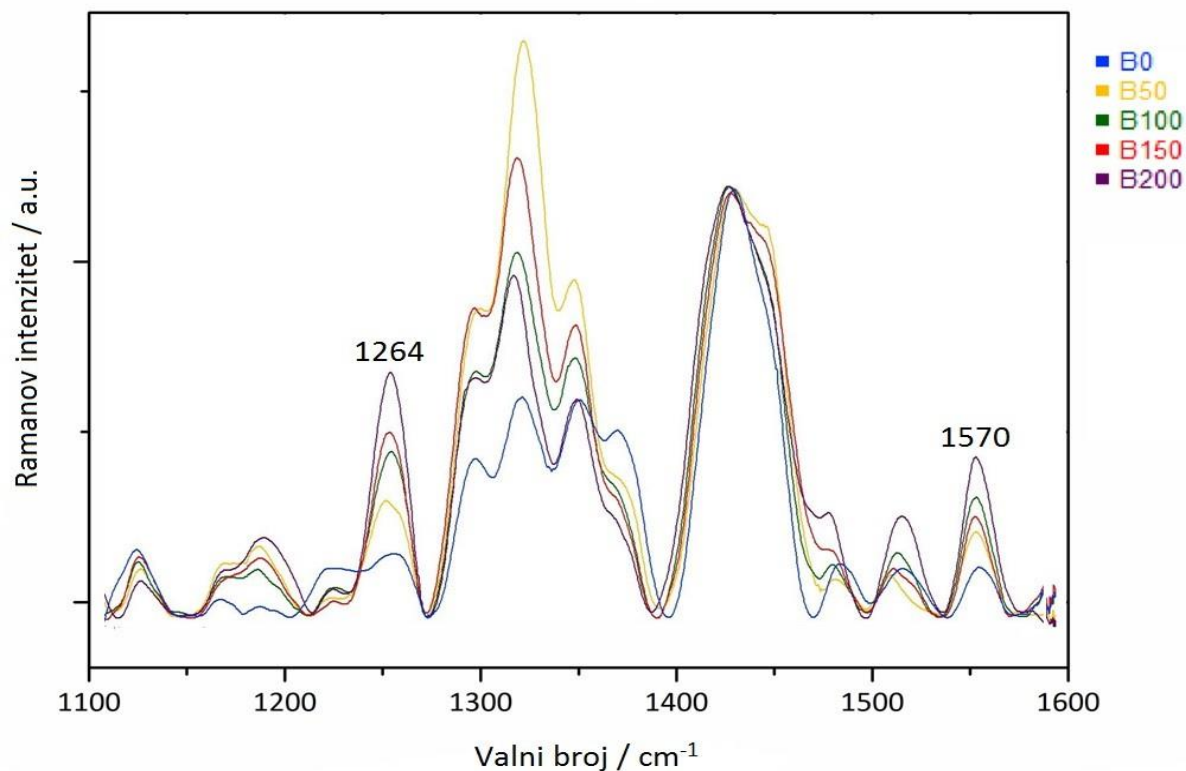
c)



d)



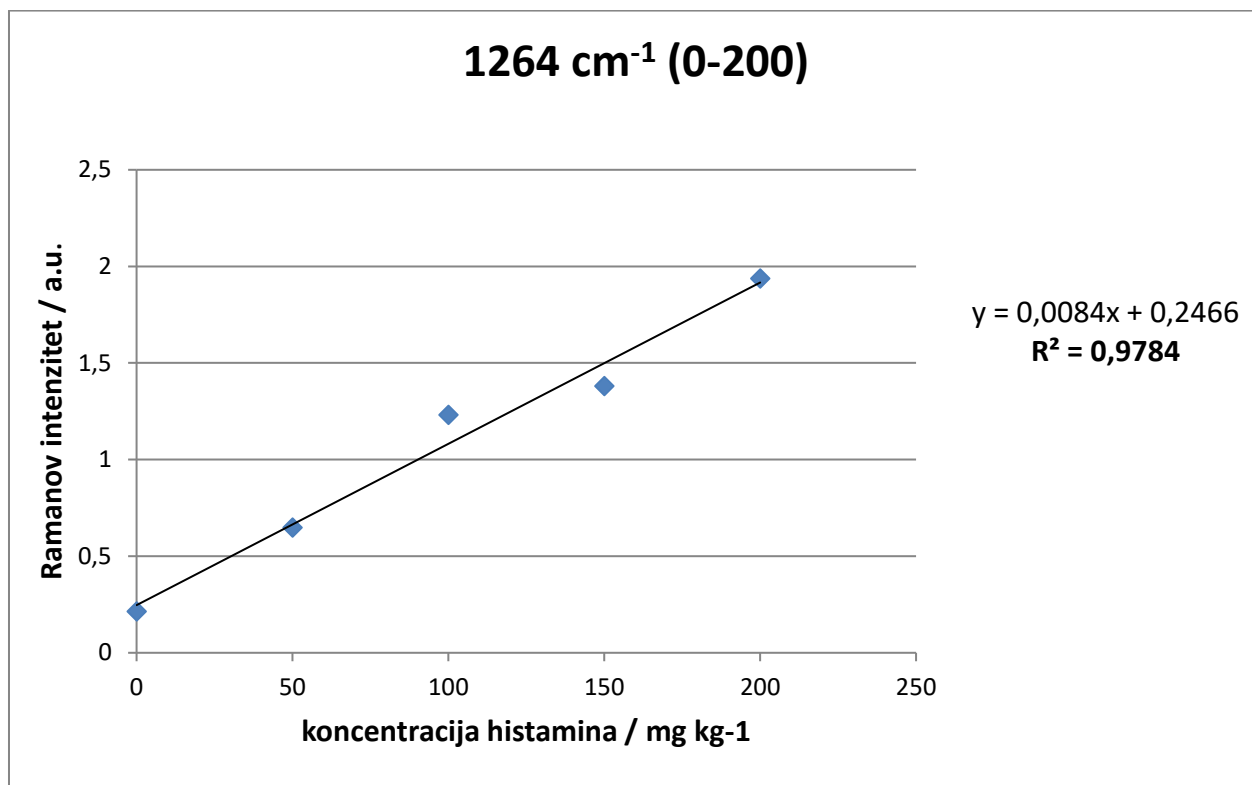
e)



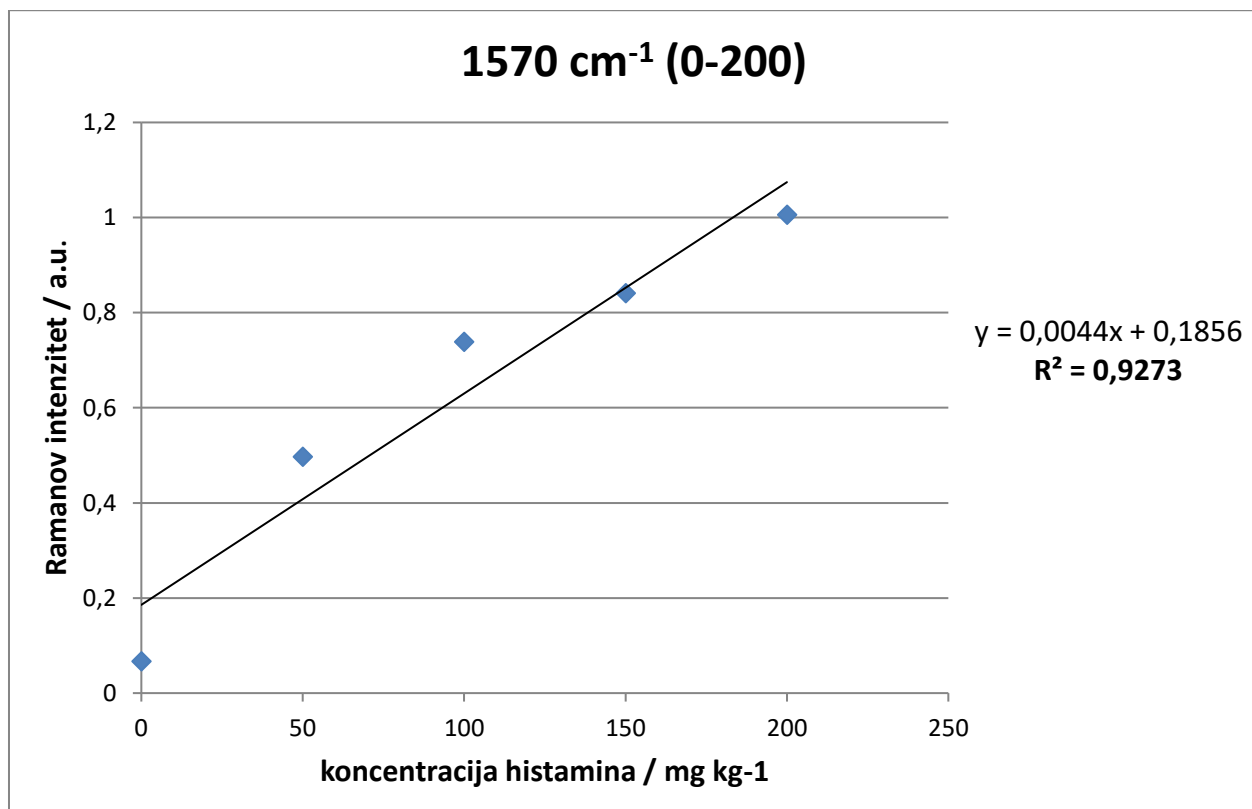
Slika 12. Obrada spektra: a) neobrađeni SERS spektar; b) korekcija pozadinskog signala – aproksimacija bazne linije; c) korekcija pozadinskog signala - oduzimanje aproksimiranog pozadinskog signala; d) korekcija šuma; e) normalizacija spektra

Nakon obrade spektara koji su prikazani na prethodnim slikama (Slika 12) izrađeni su baždarni pravci. Dodane koncentracije histamina u baždarnim uzorcima iznosile su 0, 50, 100, 150 i 200 mg/kg. Baždarni pravac konstruiran je metodom linearne regresije, te su za izradu kalibracijskih modela korištene srednje vrijednosti intenziteta vrpci histamina na 1264 cm<sup>-1</sup> i na 1570 cm<sup>-1</sup> u rasponu koncentracije histamina od 0 do 200 mg/kg. Valjanost kalibracijskih modela procijenjena je na osnovu koeficijenta korelacije ( $R^2$ ), a izrađeni baždarni pravci prikazani su na slici 13.

a)



b)



Slika 13. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina a) na 1264 cm<sup>-1</sup>; b) na 1570 cm<sup>-1</sup>



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 slici 13 iz čega vidimo da je koeficijent korelacije veći kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$  gdje je  $R^2 = 0,9784$ , dok je kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$   $R^2 = 0,9273$ . Za provjeru kalibracijskih modela pripremljeni su realni uzorci konzervirane tune u kojima je histamin nastao prirodnim putem, tako što su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi i podvrgnuti kvarenju. Za svaki uzorak provedena su 4 paralelna mjerenja te je kao rezultat uzeta srednja vrijednost intenziteta karakterističnih vrpca histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$  i na  $1570\text{ cm}^{-1}$ . Spektri su obrađeni na isti način kao i spektri baždarnih uzoraka. Kao referentne vrijednosti za koncentraciju histamina uzimaju se vrijednosti dobivene HPLC mjerenjem. U nastavku u tablici 5. prikazani su rezultati za analizirane uzorke konzervirane tune.

### 4.3. USPOREDBA HPLC I SERS METODE

Nakon snimanja i obrade dobivenih spektara na slici 12 e prikazan je normalizirani spektar gdje su jasno vidljive vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$  i na  $1570\text{ cm}^{-1}$ . Iz navedenog može se 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) u kojem se provodi optimizacija parametara Raman spektroskopije koristeći AGC koloid za određivanje histamina u tkivu skuše.

Kalibracijski modeli su konstruirani metodom linearne regresije, a vrlo dobri rezultati postignuti su kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$ . Dobivene vrijednosti koeficijenta korelacije prikazane su na baždarnim dijagramima (Slika 13) iz čega vidimo da je koeficijent korelacije veći kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$  gdje je  $R^2 = 0,9784$ , dok je kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$  nešto niži ( $R^2 = 0,9273$ ). 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  $1264\text{ cm}^{-1}$ . 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 13) vidljivo je da intenzitet vrpce histamina raste s povećanjem koncentracije histamina u uzorku što potvrđuje rezultate Jančija (2016).

Tablica 5. Rezultati HPLC i SERS analize realnih uzoraka

Uzorak	Metoda	Broj mjerenja	Srednja vrijednost (mg kg <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Točnost (%)
UZORAK 1	HPLC	2	42 ± 1	3,19	100
	SERS 1264 cm <sup>-1</sup>	4	45,4 ± 6	13,99	107,88
	SERS 1570 cm <sup>-1</sup>	4	38 ± 11	27,68	90,07
UZORAK 2	HPLC	2	71,8 ± 0,5	0,69	100
	SERS 1264 cm <sup>-1</sup>	4	72 ± 4	5,65	100,57
	SERS 1570 cm <sup>-1</sup>	4	66 ± 5	6,98	92,15
UZORAK 3	HPLC	2	116 ± 0,1	0,05	100
	SERS 1264 cm <sup>-1</sup>	4	120 ± 5	4,44	102,75
	SERS 1570 cm <sup>-1</sup>	4	113 ± 6	5,51	97,36
UZORAK 4	HPLC	2	185 ± 0,6	0,35	100
	SERS 1264 cm <sup>-1</sup>	4	191 ± 11,7	6,18	102,86
	SERS 1570 cm <sup>-1</sup>	4	200 ± 11,8	5,92	108,23
UZORAK 5	HPLC	2	205 ± 0,8	0,41	100
	SERS 1264 cm <sup>-1</sup>	4	199 ± 19	9,61	97,05
	SERS 1570 cm <sup>-1</sup>	4	241,8 ± 26	10,89	117,77

U tablici 5. prikazane su srednje vrijednosti izmjerene koncentracije histamina za SERS metodu i HPLC metodu, standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD), broj mjerenja i točnost metode. Može se uočiti da se vrijednost izmjerene koncentracije histamina kod HPLC metode kreću u rasponu od 42,12 do 205,36 mg kg<sup>-1</sup>, dok se kod SERS metode, temeljena na intenzitetu vrpce na 1264 cm<sup>-1</sup>, kreću u rasponu od 45,44 do 199,31 mg kg<sup>-1</sup>, a kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm<sup>-1</sup> izmjerene vrijednosti kreću se od 37,93 do 241,85 mg kg<sup>-1</sup>. Iz navedenog vidimo da je najveće odstupanje od zadanih parametara razvijene metode, koji se kreću od 0 – 200 mg kg<sup>-1</sup>, kod rezultata SERS analize temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm<sup>-1</sup>.

Standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD) govore o preciznosti HPLC odnosno SERS metode. U tablici 3 prikazani su kriteriji prihvatljivosti za iskorištenje i ponovljivost prema AOAC International (Association of Official Analytical Chemists). Omjer analita u uzorcima 1 i 2 je 10<sup>-5</sup>, a iz tablice 3 vidimo da je granična vrijednost RSD za taj omjer 7,3 %. Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 5 možemo zaključiti da RSD vrijednost uzorka 1 za oba SERS modela nije u granicama prihvatljivosti. Kod uzoraka 3, 4 i 5 omjer analita je 10<sup>-4</sup> te iz tablice 3 vidimo da je granična vrijednost RSD-a za taj omjer 5,3 %. Prema dobivenim rezultatima prikazanim u tablici 5 vidimo da je RSD vrijednost uzoraka 4 i 5 za oba SERS modela veća od granične vrijednosti. Iz navedenog možemo zaključiti da pri nižim koncentracijama histamina, kao što je slučaj kod uzorka 1 gdje je koncentracija histamina za model temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm<sup>-1</sup> 45,4 mg kg<sup>-1</sup>, a za model temeljen na intenzitetu vrpce na 1570 cm<sup>-1</sup> 38 mg kg<sup>-1</sup>, SERS metoda ne može poslužiti kao precizna metoda za kvantifikaciju jer su velika odstupanja od granične vrijednosti za RSD. Kod uzorka 4 odstupanja su minimalna, dok kod uzorka 5 opet imamo veća odstupanja što se može objasniti činjenicom da post-mortalne promjene na ribljem mišićju uključuju brojne kemijske i enzimske reakcije što rezultira nastankom velikog broja različitih produkata koji utječu na varijabilnost uzorka.

Iz rezultata prikazanih u tablici 5. vidimo da je standardna devijacija za sve uzorke manja kod HPLC-a nego kod SERS metode. RSD vrijednost za HPLC metodu kreće se u rasponu od 0,05 % (116,39 ± 0,06) do 3,19 % (42,12 ± 1,34) što znači da je preciznost HPLC metode dobra i povećava se s povećanjem koncentracije histamina. Na osnovu vrijednosti koeficijenta korelacije (R<sup>2</sup>) baždarnih pravaca za SERS analizu zaključeno je da je bolji kalibracijski model onaj koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1264 cm<sup>-1</sup>, te su s obzirom na to i RSD vrijednosti manje nego kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce histamina na 1570

$\text{cm}^{-1}$ , a jedina iznimka je kod uzorka broj 4. gdje je vrijednost manja kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570 \text{ cm}^{-1}$ . Usporedbom RSD vrijednosti uzoraka 1, 2 i 3 kod kalibracijskog modela na  $1264 \text{ cm}^{-1}$  vidimo da vrijednost pada s povećanjem koncentracije histamina čime se povećava preciznost metode. Također i kod kalibracijskog modela na  $1570 \text{ cm}^{-1}$  RSD vrijednosti padaju kod uzoraka 1, 2 i 3.

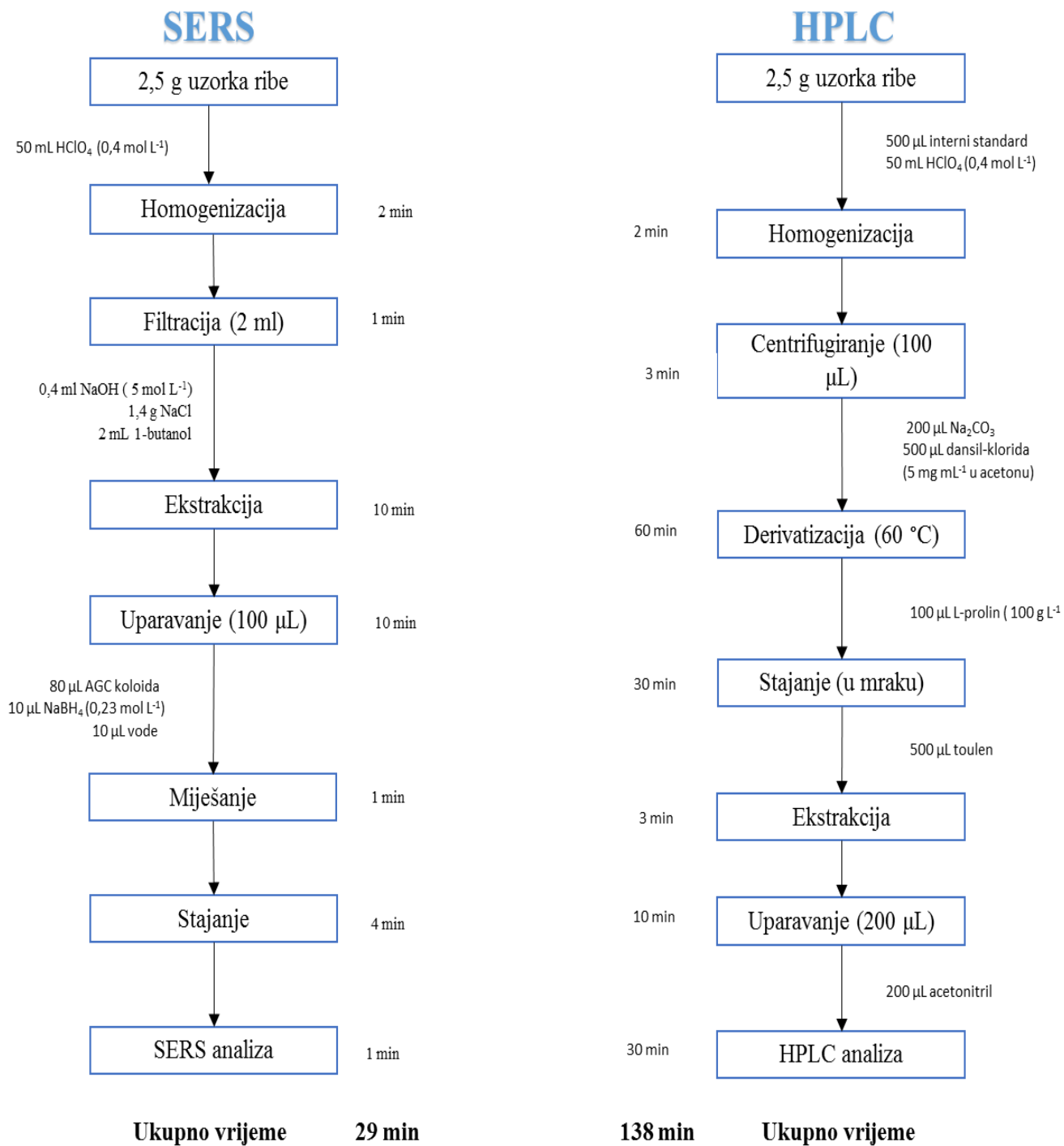
Usporedbom RSD vrijednosti za obje metode vidimo da HPLC metoda ima puno veću preciznost od SERS metode iz razloga što su RSD vrijednosti za oba modela relativno visoke. Rezultati i opažanja slična su kao i kod Janči (2016) jer i on u svom istraživanju dolazi do zaključka da HPLC metoda ima izrazito visoku preciznost u odnosu na SERS metodu. Visoka 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. Za razliku od HPLC metode SERS supstrati nisu toliko selektivni te spektru doprinose sve komponente složenog sustava koji se sastoji od uzorka, supstrata i agregirajućeg sredstva, te je s obzirom na sve navedene činjenice realno očekivati da će preciznost ovakvih metoda biti manja.

Točnost metode tj. stupanj podudaranja između stvarne i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta može se procijeniti na nekoliko načina. U ovom istraživanju kao stvarna (referentna) vrijednost uzimaju se rezultati dobiveni HPLC metodom, te je točnost metode temeljena na usporedbi rezultata ispitivane SERS metode s rezultatima dobivenim referentnom 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. U tablici 5 prikazani su rezultati točnosti obje metode.

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 0,6 % do 7,9 % kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce na  $1264 \text{ cm}^{-1}$ , a kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570 \text{ cm}^{-1}$  od 2,6 % do 17,8 %. Iz navedenog vidimo da je SERS metoda temeljena na intenzitetu vrpce na  $1264 \text{ cm}^{-1}$  točnija zbog manjih odstupanja od referentne vrijednosti. Također usporedbom odstupanja svih 5 uzoraka na  $1264 \text{ cm}^{-1}$  primjećuje se da su odstupanja manja kod većih koncentracija histamina, s iznimkom uzorka 2 gdje je najmanje odstupanja, 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 razvijenom SERS metodom i referentnom HPLC metodom te vremena potrebnog za analizu jednog uzorka

Na slici 14. prikazana je usporedba 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 histamina 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 velik trošak nabave analitičkih instrumenta i potrošnog materijala kod HPLC metode.

Nakon usporedbe svih parametara SERS metode, točnije dva SERS modela, s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) vidimo da je HPLC metoda dosta preciznija i točnija od SERS metode. No bez obzira na to SERS metodom analize i kvantifikacije histamina u uzorcima ribe mogu se postići vrlo dobri rezultati s obzirom da je točnost metode kod većine uzoraka bila blizu 100 %, a pored toga glavne prednosti SERS metode s obzirom na HPLC metodu su značajno smanjenje troškova i vremena potrebnog za analizu. 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



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Glavne prednosti SERS metode su značajno pojednostavljenje postupka analize, te skraćeno vrijeme potrebno za analizu jednog uzorka (30 min) u odnosu na standardnu HPLC metodu (140 min).
2. Koeficijent korelacije najveći je kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , a iznosi  $R^2=0,9784$ . Kod istog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$  koeficijent korelacije iznosi  $R^2=0,9273$ . Koeficijent korelacije standardnog modela dobivenog HPLC mjerenjem iznosi  $R^2=0,9995$ , te možemo zaključiti da model temeljen na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$  ne odudara puno od standardnog modela i može pokazati veoma dobre rezultate za analizu i kvantifikaciju histamina.
3. Usporedbom 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 SERS metode relativno visoke.
4. Točnost rezultata pri različitim koncentracijama histamina prikazana je vrijednošću analitičkog prinosa koji je definiran kao omjer izmjerene i stvarne vrijednosti koncentracije histamina u uzorcima. S obzirom na dobivene rezultate SERS metoda temeljena na intenzitetu vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$  je točnije zbog manjih odstupanja od referentne vrijednosti određene HPLC metodom.
5. Iz svega navedenog možemo zaključiti da razvijenom SERS metodom analize i kvantifikacije histamina u uzorcima ribe mogu se postići vrlo dobri rezultati posebno kod uzoraka s višim koncentracijama histamina ( $\geq 70\text{ mg kg}^{-1}$ ). S obzirom na zadane parametre metoda je uspješno validirana.

## 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.

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

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.

Dobre, T.G., Marcano, S.J.G. (2007) *Chemical Engineering: Modelling, Simulation and Similtude*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

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](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/news_events/Histamine_Final_Report.pdf)>

Pristupljeno 15.07.2017.

FDA (2011) Scombrototoxin (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.
- Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri.* **1**, 61-65
- Lehane, L., Olley, J., (2000) Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 1–37.
- Lindsay, S., (1992) *High Performance Liquid Chromatography*, 2. izd., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester/ New York/ Brisbane/ Toronto/Singapore
- 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.

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.