

# Određivanje udjela histamina u srdeli HPLC metodom i Raman spektroskopijom

---

Ćavar, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:146223>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2017

Ana Čavar, 764/PI

**ODREĐIVANJE UDJELA  
HISTAMINA U SRDELI HPLC  
METODOM I RAMAN  
SPEKTROSKOPIJOM**

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

## **ZAHVALA**

*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 svima koji su bili uz mene, a posebna hvala ocu Vladi, majci Snježani, te braći Bariši i Jerki na neizmjernoj podršci, beskonačnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za kemiju i tehnologiju mesa i ribe

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

## ODREĐIVANJE UDJELA HISTAMINA U SRDELI HPLC METODOM I RAMAN SPEKTROSKOPIJOM

*Ana Čavar, 764/PI*

**Sažetak:** Budući da razvitak histamina u ribi predstavlja veliku opasnost za ljude koji ju konzumiraju, godinama su se nastojale razviti nove i brze metode za detekciju histamina, a među njima se posebno istakla metoda Raman spektroskopije. U ovom radu prikazana je usporedba spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršivanja (SERS) sa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Nakon analize, histaminske vrpce su bile vidljive na 1264 i 1570  $\text{cm}^{-1}$  te je na osnovu analitičkog prinosa, odnosno manjeg odstupanja od referentne HPLC metode zaključeno da je SERS metoda temeljena na intenzitetu vrpce na 1264  $\text{cm}^{-1}$  bolja u odnosu na SERS metodu temeljenu na intenzitetu vrpce na 1570  $\text{cm}^{-1}$ . Također usporedbom RSD vrijednosti i odstupanja SERS i HPLC metode, uočeno je da je HPLC metoda točnija i preciznija, no rezultati SERS analize su prihvatljivi, te SERS metoda ne odudara puno od standardnog modela te može biti korištena za analizu i kvantifikaciju histamina.

**Ključne riječi:** histamin, SERS metoda, HPLC metoda, RSD vrijednost, analitički prinos

**Rad sadrži:** 42 stranica, 14 slika, 4 tablice, 54 literaturnih navoda, 0 priloga

**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:** *Tibor Janči*, dr. sc.

### Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

**Datum obrane:** 26. rujan 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 SARDINE USING RAMAN SPECTROSCOPY AND HPLC METHOD

*Ana Čavar, 764/PI*

**Abstract:** Given the fact that the development of histamine in the fish brings grave danger to the people who eat it, new and fast histamine detection methods were developed during the years, the most significant of which is Raman spectroscopy. This paper compares the procedures of Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) with High-performance liquid chromatography (HPLC). The analysis has shown that histamine ribbons were visible at 1264 and 1570  $\text{cm}^{-1}$ . Based on the analytical production i.e. smaller deviation from the referent HPLC method it is safe to conclude that SERS method based on the intensity of the ribbon visible at 1264  $\text{cm}^{-1}$  is better than the SERS method based on the intensity of the ribbon visible at 1570  $\text{cm}^{-1}$ . Also, comparison between RSD values and the deviations of SERS and HPLC method has shown that HPLC method is more accurate and precise, but the results of SERS analysis are acceptable, as well. Thus, SERS method is not significantly different from the standard model and is free to be used for analysis and quantification of histamine.

**Keywords:** histamine, SERS method, HPLC method, RSD values, analytical production

**Thesis contains:** 42 pages, 14 figures, 4 tables, 54 references, 00 supplements

**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. *Leo Gracin*, / Associate professor
2. PhD. *Sanja Vidaček* / Associate professor
3. PhD. *Sandra Albino* / Associate professor
4. PhD. *Ksenija Marković* Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** 26. September 2017.

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. Histamin .....	3
2.1.1. Sinteza i metabolizam histamina.....	3
2.1.2. Histaminsko trovanje .....	4
2.1.3. Metode za analizu histamina.....	6
2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	8
2.2.1. Uređaji za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti .....	8
2.2.2. Način rada HPLC sustava .....	9
2.3. Ramanova spektroskopija.....	10
2.3.1. Aktivni vibracijski modovi u Ramanovoj spektroskopiji .....	12
2.3.2. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) .....	13
2.3.3. SERS supstrati .....	14
2.3.4. Obrada i analiza SERS spektara .....	15
2.3.4.1. Korekcija pozadinskog signala i šuma .....	15
2.3.4.2. Normalizacija spektra .....	16
2.3.5. Primjena Ramanove i SERS spektroskopije u analizi namirnica.....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
3.1. Materijali .....	18
3.1.1. Uzorci ribe .....	18
3.1.2. Kemikalije .....	18
3.1.3. Laboratorijska oprema.....	19
3.2. Plan istraživanja .....	20
3.3. Metode rada .....	21
3.3.1. Određivanje sadržaja histamina tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) .....	21
3.3.1.1. Priprema otopine standarda .....	21
3.3.1.2. Priprema uzorka.....	21
3.3.1.3 Kromatografska analiza.....	22
3.3.1.4. Priprema mobilne faze .....	23
3.4. Određivanje sadržaja histamina Raman spektroskopijom .....	24
3.4.1. Priprema uzorka .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	25
4.1. HPLC analiza .....	25
4.2. SERS metoda .....	26
4.2.1. SERS spektri .....	26
4.2.2. Kalibracijski modeli .....	29
4.3. Usporedba HPLC i SERS metode .....	31
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	36
<b>6. LITERATURA</b> .....	37



## 1. UVOD

Zbog visokog udjela esencijalnih aminokiselina, visoke probavljivosti proteina ribljeg mesa i prehrambeno vrijednih polinezasićenih  $\Omega$ -3 masnih kiselina riba spada u vodeću namjernicu sa nutricionističkog stajališta. No, upravo iz istih navedenih razloga spada i u grupu lako kvarljivih namjernica te u slučaju neadekvatnog rukovanja može biti izvor različitih infekcija i intoksikacija. Također na kvalitetu i zdravstvenu ispravnost ribe može utjecati i stanište budući da se u tijelu ribe mogu akumulirati kontaminanti iz okoliša.

Najveći problem predstavlja trovanje histaminom koji se u ribi formira post-mortem bakterijskom dekarboksilacijom aminokiseline histidina uz pomoć bakterijskog enzima histidin-dekarboksilaze. Upravo zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, histamin je jedan od najproučavanijih biogenih amina. Da bi kontrola bila adekvatna nužan je razvoj brzih analitičkih metoda koje mogu pratiti tempo prerade te u relativno kratkom vremenskom periodu analizirati velik broj uzoraka. Tradicionalne laboratorijske metode poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) ili plinske kromatografije (GC) zahtijevaju složenu i dugotrajnu pripremu uzoraka, upotrebu izrazito skupih analitičkih instrumenata te posebno educirano osoblje što ih čini teško primjenjivima u opisanim industrijskim uvjetima.

Važnost kontrole zdravstvene ispravnosti ribe i ribljih proizvoda rezultirala je primjenom novih i brzih metoda za analizu histamina i drugih biogenih amina u ribi koje omogućuju jednostavnu primjenu i brzu analizu uzoraka uz prihvatljive troškove. Tu se ističe Ramanova spektroskopija odnosno vibracijska spektroskopska tehnika čije su glavne prednosti minimalna priprema uzoraka, brza analiza te mogućnost analize tvari u svim agregatnim stanjima. Najveći nedostatak ove metode slab signal Ramanovog raspršivanja što zahtijeva visoku koncentraciju analita u ispitivanom uzorku. Metoda se zasniva na tzv. Ramanovom efektu, tj. na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s molekulom ispitivane tvari. Visokoj osjetljivosti metode pridonosi spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (eng. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS), koja

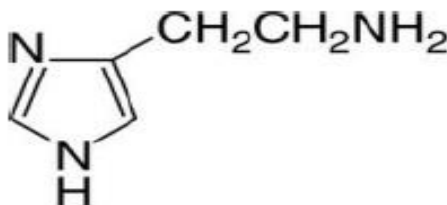
zahvaljujući upravo svojoj osjetljivosti pronalazi sve veću primjenu u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti.

Cilj ovog istraživanja je usporediti djelovanje HPLC metode i Raman spektroskopije za detekciju histamina, geosmina i 2-metilizoborneola kao spojeva koji značajno utječu na kvalitetu i zdravstvenu ispravnost proizvoda od ribe. Također ovo istraživanje temeljeno je na istraživanju koje su proveli Janči i sur. (2017), a opisano je u radu „Mogućnost primjene Raman spektroskopije pri kontroli kvalitete ribe“.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. HISTAMIN

Histamin ( $\beta$ -imidazol-etilamin) je jedan od najčešće promatranih biogenih amina jer je najčešći uzročnik trovanja povezanih s konzumacijom ribe i proizvoda ribarstva koje je posljedica neadekvatnog rukovanja odnosno skladištenja ribe (Slika 1). Histaminsko trovanje naziva se još i „skombroidno trovanje“ jer je se trovanje histaminom najviše vezalo za ribe iz porodice Scombridae gdje spadaju tuna i skuša. S vremenom, kako su se provodila daljnja istraživanja pokazalo se da se trovanje histaminom javlja i kod drugih riba kao što su srdele (*Sardina pilchardus*), haringe (*Clupea spp.*), lampuge (*Coryphaena spp.*), inćuni (*Engraulis spp.*), gofovi (*Seriola spp.*), igluni (*Xiphias gladius*), te kod nekih vrsta lososa koji su bogati velikom količinom slobodnog histidina (Hungerford, 2010).

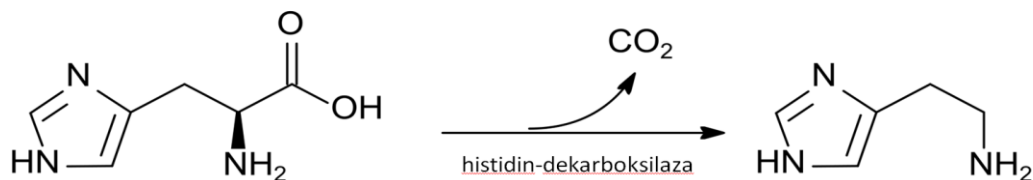


**Slika 1.** Kemijska struktura histamina (Flamini, 2008)

#### 2.1.1. Sinteza i metabolizam histamina

Histamin u tkivu ribe nastaje iz slobodne aminokiseline histidina uz pomoć bakterijskog enzima histidin – dekarboksilaze i predstavlja jedan od najvažnijih enzima u metabolizmu proteina (Slika 2). Iako je optimalna temperatura za nastanak histamina 20 – 25 °C, brojna istraživanja su pokazala da se koncentracija histamina može povećati i na temperaturu od +4°C kroz period skladištenja od 3 – 7 dana (Kanki i sur., 2004; Emborg i Dalgaard, 2006). Nastanak histamina moguć je i kod smrzavanja, odmrzavanja te kod

termičke obrade ukoliko je u namjernici prisutan enzim histidin-dekarboksilaza. Histamin također može nastati i prilikom rekontaminacije proizvoda, termostabilan je te se ne može lako ukloniti iz namjernice uobičajenim postupcima prerade. Veliki razvoj koncentracije histamina je zabilježen na temperaturi od 32,2 °C pa se može zaključiti da će histamin prije nastati kao rezultat nepravilnog skladištenja na povišenoj temperaturi, nego dugotrajnog skladištenja na nižoj temperaturi (Mendes, 2009). Temperatura sterilizacije ne može uništiti histamin jer prema nekim autorima histamin izdržava temperature i do 200 °C. Zbog post-mortalnog stvaranja histamina u ribi, stvaranje histamina bi trebalo moći biti kontrolirano, no situacija u svijetu je suprotna jer najčešći uzročnik intoksikacija uslijed konzumacije ribe je upravo histamin (Vidaček, 2013).



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

### 2.1.2. Histaminsko trovanje

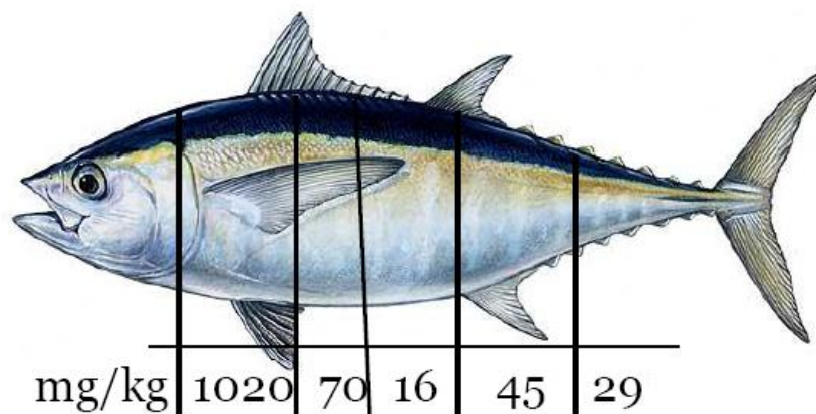
Trovanje histaminom uključuje širok spektar simptoma koji se razlikuju kako o količini unesenog histamina, tako i o osjetljivosti organizma konzumenta, a obično se javljaju 10 min do 1 h nakon konzumacije namjernica u kojima se nalazi histamin. Neki od simptoma su: papren ili „metalni“ okus, otrnuće u području usta, glavobolja, drhtanje, poremećaji srčanog ritma, sniženje krvnog tlaka, teškoće pri gutanju, žeđ, difuzno crvenilo lica, osip, svrbež, oticanje lica i drugo. Također se mogu javiti i simptomi koji uzrokuju anksioznost, mučninu, povraćanje, grčeve i dijareju (Lehane i Olley, 2000).

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>

Budući da histamin kod većine slučajeva nastaje kao rezultat mikrobiološke aktivnosti, prevencija njegovog nastanka postiže se poštovanjem dobre proizvođačke prakse, implementacijom odgovarajućeg HACCAP plana te stroge i učestale kontrole sirovine i proizvoda.

Najveća količina histamina nastaje kod sitne plave ribe koja se ne može dovoljno brzo polediti i rashladiti na ribarskom brodu na temperaturi okoliša koja ljeti doseže i do 30 °C, a koja predstavlja idealnu temperaturu za nastanak histamina. Zbog toga je veoma bitan plan uzorkovanja zbog nehomogene raspoređenosti histamina u šarži, ulovu ribe, a ni u samom tkivu ribe. Naime, nastanak histamina prvo započinje i najbrže se odvija na škragama i u probavnom traktu jer se na tim mjestima nalazi najveći broj mikroorganizama (Slika 3). Pravilno uzorkovanje je veoma bitno i zbog reprezentativnosti rezultata za cijelu šaržu jer se može dogoditi da npr. konzerve tune proizvedene od iste ribe sadrže proizvode koji su zdravstveno ispravni zajedno sa onima koji sadrže visoke količine histamina. Široka rasprostranjenost histaminskog trovanja diljem svijeta vjerojatno je posljedica neusklađenosti zakonske regulative na svjetskom nivou te relativno složenim metodama kontrole sadržaja histamina u proizvodima ribarstva.



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

### 2.1.3. Metode za analizu histamina

Najčešće korištena metoda kontrole prilikom prijema ribe na preradu je senzorska ocjena svježine ribe gdje se ocjenjuju izgled kože, očiju, škrga, miris, tvrdoća i tekstura mesa i na osnovu toga se riba svrstava u određenu kategoriju kvalitete. Najveći nedostatak ove metode je nepouzdanost jer se u određenim slučajevima, npr. kod izlaganja ribe visokim temperaturama histamin može razviti u vrlo kratkom vremenskom periodu odnosno može se razviti prije nego senzorski parametri poput mirisa i izgleda mogu detektirati kvarenje ribe.

Postoji još jedna metoda koja se često primjenjuje u industriji ribe, a to je kontrola temperatura i vremena od ulova do prijema ribe na preradu gdje se pregledom termografskih lista i evidencije ulova množe vrijednost temperatura i vremena koje je riba provela na određenoj temperaturi. Smatra se da je riba prikladna za preradu ukoliko je  $t \times T$  vrijednost  $< 150 \text{ h}^\circ\text{C}$ . nedostatak ove metode je to što daje grube orijentacijske vrijednosti te se zbog toga ne koristi kao precizan pokazatelj količine histamina u ribi.

Zbog trovanja histaminom, koje predstavlja veliki problem u svijetu tijekom dugog niza godina razvijen je izuzetno veliki broj laboratorijskih analitičkih metoda za analizu histamina koje se uglavnom temelje na kromatografskim postupcima. Najčešće primjenjivana metoda za analizu histamina je kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Kod te metode histamin se ekstrahira iz tkiva ribe pogodnim otapalom nakon čega je potrebno provesti derivatizaciju. Derivatizacija je reakcija sa 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. Ostale skupine laboratorijskih metoda su ionska kromatografija, kapilarna elektroforeza, fluorometrijska metoda, plinska kromatografija s masenom spektroskopijom (GC-MS) te tekućinska kromatografija s masenom spektroskopijom (LC-MS).

Neke od prednosti laboratorijskih metoda su robusnost, ponovljivost, preciznost i točnost, ali najveći nedostatak je njihova ograničenost na analitičke laboratorije u znanstvene ili regulatorne svrhe. Također značajan nedostatak tih metoda je taj što je za njihovu provedbu potrebna izrazito skupa laboratorijska oprema, instrumenti koji zahtijevaju skupo održavanje, osoblje koje mora biti specifično educirano za rad na takvoj opremi, složen i dugotrajan postupak pripreme uzoraka te nemogućnost analize dovoljnog broja uzoraka u realnom vremenu kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu ribe. Svi navedeni nedostaci predstavljaju veliku prepreku kod njihove primjene u industrijskim kontrolnim laboratorijima.

Da bi se olakšala kontrola sadržaja histamina u industriji bilo je potrebno razviti nekoliko brzih metoda za određivanje histamina. Te metode su uglavnom bazirane na različitim enzimatskim metodama (ELIZA). Opremu za provođenje ovih metoda moguće je nabaviti na tržištu u obliku različitih kvalitativnih i kvantitativnih kitova koji sadrže sve potrebne reagentse. Također se tu još nalazi i spektrofotometar kojim se po završetku reakcije može očitati intezitet boje na osnovu čega se dobiva podatak o količini histamina u uzorku. Cijene ovakvih kitova su niže od cijene opreme potrebne za provedbu laboratorijskih metoda, no sva oprema osim spektrofotometra je predviđena za jednokratnu upotrebu te u slučaju velikog broja analiza troškovi mogu postati veliki problem. Glavni nedostaci navedenih metoda je smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenim soljenjem i dozrijevanjem u salamuri, različiti postupci pripreme uzoraka, te neprikladnost za analize van laboratorija. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina prikazana je u Tablici 1.

**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>
<b>Vrijeme potrebno za 1 test</b>	1 – 2 h	1 – 2 h	1 h	1 h	1 h
<b>Oprema</b>	Fluorometar	HPLC	Spektrofluorometar	Spektrofotometar	Spektrofotometar
<b>Prag kvantifikacije</b>	1 – 5 ppm	1.5 – 5 ppm	1.5 ppb	2 – 5 ppm	20 ppm
<b>Raspon</b>	1 – 150 ppm	5 – 2500 ppm	1.5 ppb – 100 ppm	0 – 500 ppm	0.8 – 300 ppm

<b>Prednosti metode</b>	Robusnost, ponovljivost, točnost, preciznost	Analiza svih biogenih amina, točnost, preciznost	Točnost, preciznost, cijena	Jednostavnost (kit), cijena, više testova istovremeno	Jednostavnost, cijena, više testova istovremeno, jednostavna kalibracija
-------------------------	--	--	-----------------------------	---	--

Osim navedenih metoda također se javlja potreba za novim i "brzim" metodama za analizu histamina koje bi bile jednostavne za primjenu i koje bi omogućile bolju kontrolu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu uz prihvatljive troškove.

## 2.2 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI ( HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti predstavlja jednu od najučinkovitijih metoda u analitičkoj kemiji s kojom se separiraju, identificiraju i kvantificiraju spojevi prisutni u tragovima (ppt) u bilo kojem uzorku koji se može otopiti u tekućini. Široku primjenu je našla u farmaceutici, forenzici, analizi hrane, kozmetike, nutraceutika te industrijskih kemikalija. Zbog svoje jednostavnosti rukovanja spada pod najčešće primjenjivane metode za analizu histamina.

HPLC metoda se sastoji od mobilne faze koja djeluje kao nosač za tekući uzorak. Injektirani uzorak prolazi kroz stacionarnu fazu uz povišeni tlak koji služi za dodatno povećanje efikasnosti odvajanja. Proces odvajanja započinje unošenjem uzorka u tok mobilne faze te dolazi do razdvajanja smjese na komponente koji se zadržavaju u koloni i na temelju vremena zadržavanja odnosno vremena potrebnog da pojedina komponenta prođe kroz kolonu, identificira se pojedina komponenta. Vrijeme zadržavanja (retention time, Rt) ovisi o prirodi komponente koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze.

### 2.2.1. Uredaji za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti



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

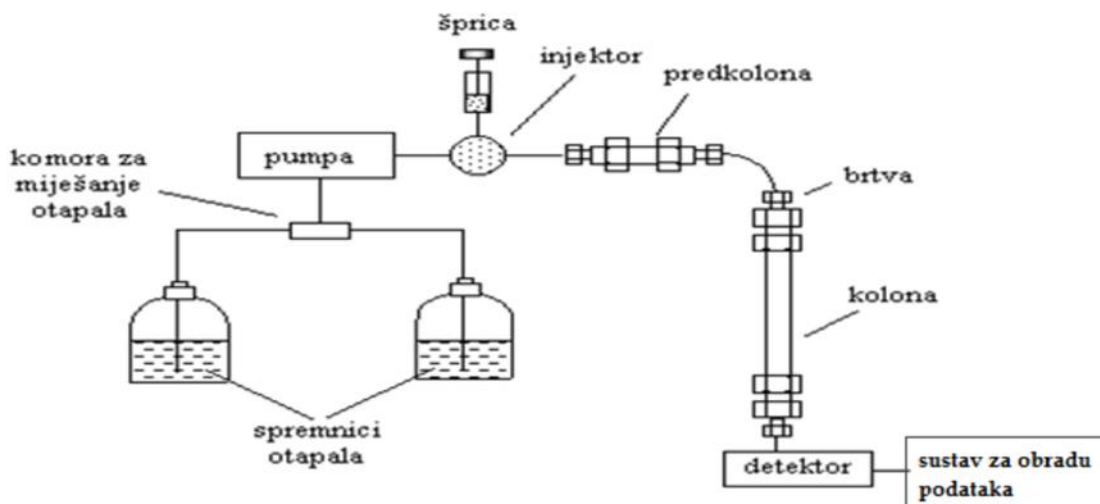
Osim spremnika mobilne faze u HPLC sustavu se može nalaziti i sustav za otplinjavanje u kojem se otopljeni plinovi uklanjaju iz otapala, nošeni inertnim plinom. Otopljeni plinovi iz otapala se uklanjaju iz razloga što mogu prouzročiti širenje zone eluiranih sastojaka i time mogu ometati rad detektora. Razdvajanje supstanci provodi se izokratnom ili gradijentnom eluacijom. Razlika između ova dva načina razdvajanja supstanci je ta da se u većini slučajeva gradijentnom eluacijom pri kojoj se za razliku od izokratne gdje se koristi samo jedno otapalo, koriste dva ili više otapala različite polarnosti što pridonosi mijenjanju odnosa njihove zapremnine na točno utvrđen način.

Za stvaranje i mjerenje specifične brzine protoka u HPLC sustavu koristi se pumpa. Najčešće korištene pumpe su recipročne pumpe koje se sastoje od cilindrične komore koja se puni i prazni pomicanjem klipa, čime se stvara pulsirajući protok.

### **2.2.2. Način rada HPLC sustava**

Uzorak se u kolonu unosi protokom mobilne faze preko sustava za unošenje uzorka kojeg obično čini plinski ventil s više izmjenjivih petlji. Kolone se najčešće izrađuju od čeličnih ili staklenih cijevi koje su punjene zrcima odnosno silikagelom promjera 3-10  $\mu\text{m}$ . Osim silikagela mogu se koristiti i glinica, porozni polimeri i ionski izmjenjivači. Dimenzije HPLC kolona su između 20 mm i 500 mm duljine te 1 – 100 mm unutarnjeg promjera.

Detektorski sustav u HPLC-u nije univerzalan te ovisno o prirodi uzorka i svojstvima analiziranog spoja koriste se UV, fluorescentni ili ELSD detektor. Do detektorskog sustava dolazi nakon što uzorak nošen mobilnom fazom prođe kroz kolonu. Detektor je spojen s računalom koji prima električni signal i bilježi ga u obliku kromatograma (Skoog i sur., 1999). Na slici 4. shematski je prikazana građa HPLC uređaja, s njegovim glavnim dijelovima.



**Slika 4.** Shematski prikaz HPLC uređaja (Luterotti, 2009)

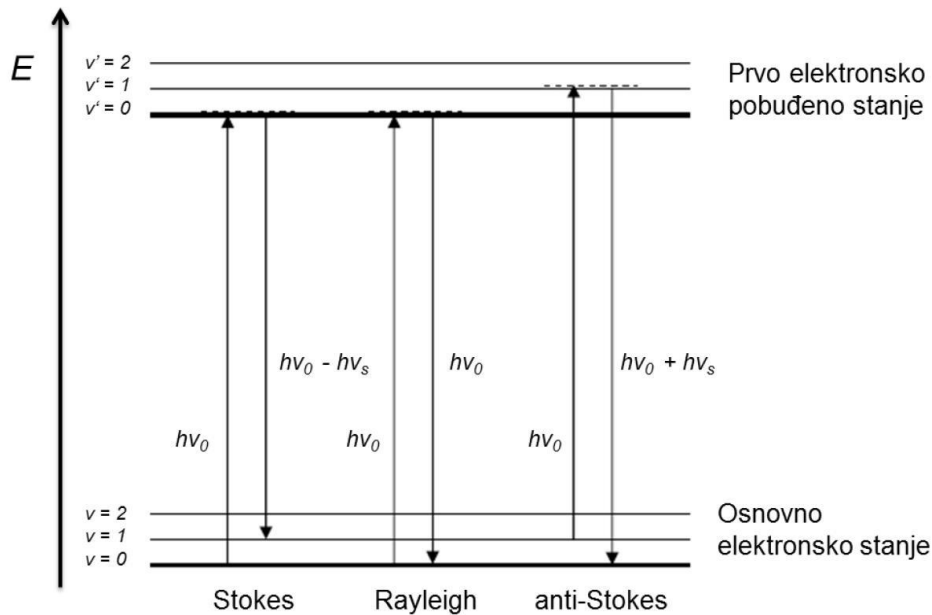
Kromatogram je zapisak koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzorka (KaštelanMacan, 2003). Odaziv detektora je ovisan o koncentraciji sastojaka u uzorku i bilježi se kao funkcija vremena zadržavanja. Na osnovu toga se na kromatogramu dobivaju pikovi različite površine odnosno visine i položaja na vremenskoj osi i predstavljaju odaziv detektora za drugačiji spoj. Položaj pika na vremenskoj osi služi za identifikaciju sastojka dok se pomoću visine dobiva kvantitativna procjena sastojaka u uzorku (Skoog i sur., 1999)

### 2.3.RAMANOVA SPEKTROKOPIJA

Ramanova spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika koja se zasniva na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenje uslijed interakcije s vibracijskim modovima molekule (Long, 2002; Ferraro, 2003).

Elastično raspršenje u kojem ne dolazi do promjene energije tj. valne duljine pobudnog i raspršenog zračenja naziva se Rayleighovo raspršenje, dok se kod Ramanovog raspršivanja podrazumijeva neelastično raspršenje pri kojemu se valna duljina raspršenog zračenje razlikuje od valne duljine pobudnog zračenja. Kod Ramanovog raspršenja, emitirani foton može imati ili veću ili manju valnu duljinu od pobudnog fotona i ukoliko je početni vibracijski nivo molekule u osnovnom elektronskom stanju niži od vibracijskog nivoa u koji

se molekula vraća nakon emisije fotona, emitirani foton će biti veće valne duljine od pobudnog fotona. Taj efekt se naziva Stokesovo raspršenje. Za razliku od Stokesovog raspršenja, postoji i Anti – Stokesovo raspršenje koje se temelji na pobudi molekule iz višeg vibracijskog nivoa nakon čega molekulu opet vraća u niži vibracijski nivo osnovnog elektronskog stanja. Prilikom toga emitirani foton ima manju valnu duljinu od pobudnog fotona (Janči, 2016). Svi oblici raspršenja shematski su prikazana na slici 5.



**Slika 5.** Shematski prikaz različitih tipova raspršenja svjetlosti na molekuli pobuđenoj fotonom (Vandenabeele, 2013)

Prema Boltzmanovoj raspodjeli većina molekula na sobnoj temperaturi se nalazi u osnovnom elektronskom stanju, dok se veoma mali broj molekula nalazi u višem nivou osnovnog elektronskog stanja. Na osnovu toga se može zaključiti da je pri sobnoj temperaturi Ramanov proces temeljen na Stokesovom raspršenju vjerojatniji od anti – Stokesovog raspršenja. No, važno je naglasiti da je pojava Ramanovog raspršenja veoma slabog inteziteta i da je Ramanovo raspršenje manje vjerojatno od Rayleighovog raspršenja. Razlog tomu je što je kod Ramanovog raspršenja tek jedan od 107 raspršenih fotona Stokes raspršen, dok je kod Rayleighovog raspršenja jedan od 104 fotona raspršen (Singh, 2002). Intezitet anti – Stokesovog raspršenja je još i manji. Stokesovo i anti – Stokesovo raspršenje imaju jednak pomak u valnim duljinama ali razlika je u tome što su ti pomaci usmjereni na suprotne strane za razliku od Rayleighovog raspršenja, odnosno spektri molekula Stokesovog i anti – Stokesovog raspršenja su simetrični u odnosu na

valnu duljinu pobudnog zračenja. Zbog toga se u Ramanovoj spektroskopiji obično prikazuje samo Stokesova polovica spektra.

### 2.3.1. Aktivni vibracijski modovi u Ramanovoj spektroskopiji

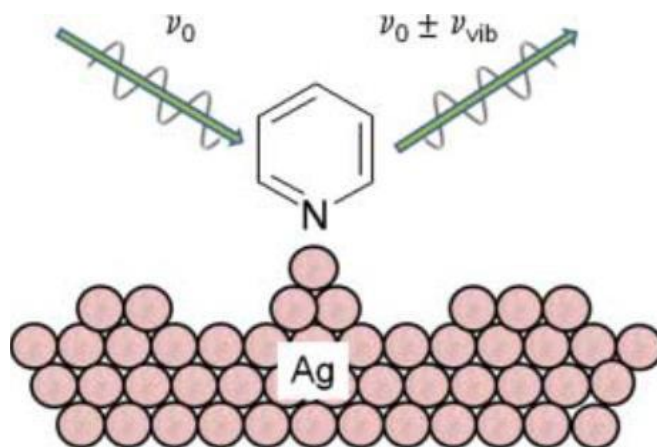
Prikaz pomaka u valnoj duljini raspršenog zračenja u odnosu na njegov intenzitet naziva se Ramanov spektar. Svaki vibracijski mod molekule daje karakterističan pomak frekvencije, a stvaran broj Ramanovih pomaka u neelastičnom procesu raspršenja veći je od broja osnovnih vibracijskih modova uslijed višestrukih pobuđenja drugog reda i kombinacijskih modova. To rezultira jedinstvenim vibracijskim spektrom (tzv. otiskom prsta, eng. fingerprint) određene molekule. Svaki vibracijski mod molekule daje karakterističan pomak frekvencije, a broj modova molekule sa  $N$  atoma definiran je izrazom  $n = 3N - 6$  za nelinearne molekule te  $n = 3N - 5$  za linearne molekule. Da bi određeni vibracijski mod molekule bio Raman aktivan, mora doći do promjene polarizabilnosti molekule. Komplementarna tehnika Ramanovoj spektroskopiji je infracrvena spektroskopija (IR). Kod molekula sa centrom simetrije vibracija dolazi do međusobnog isključenja te vibracije koje su Raman aktivne nisu IR aktivne i obratno. Slabije Ramanovo raspršenje javlja se kod vibracije polarnih veza (N-O, C-O, O-H) jer se promjenom njezine duljine tijekom vibracije ne povećava značajno efekt promjene polarizacije. Razlog tomu je što takve veze same po sebi imaju jaku polarizaciju. Raspršenje je jače što je veza manje polarna jer tijekom vibracije doživljava veću promjenu polarizabilnosti (Janči, 2016).

Ramanov spektar se inače koristi za identifikaciju, no u određenim slučajevima može se koristiti i za kvantifikaciju pojedinog analita ali kod primjene Ramanove spektroskopije mora se koristiti relativno visoka koncentracija analita u uzorku, pogotovo prilikom analize proteina ili nukleinskih kiselina (Peticolas, 1995).

Ramanova spektroskopija postala je veoma važna metoda s primjenom u mnogim područjima, a u odnosu na druge metode, ističe se jednostavnošću pripreme uzoraka te mogućnosti *in situ* analize. Za povećanje inteziteta signala, odnosno osjetljivosti Ramanove spektroskopije koriste se rezonantna Ramanova spektroskopija (RRS) te spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) (Mathies, 1995).

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

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje (eng. *Surface-Enhanced Raman Scattering*, SERS) je metoda kod koje dolazi do povećanja presjeka Ramanovog raspršenja na molekulama adsorbiranim na ili u neposrednoj blizini metalnih nanostrukture (SERS supstrati), što ima za posljedicu pojačanje Ramanovog signala (Slika 6).



**Slika 6.** Shematski prikaz SERS efekta na primjeru molekule piridina adsorbirane na srebru (McQuillan, 2009)

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje prvi put je primjenjeno 1974. godine na molekulu piridina adsorbiranu na srebrenu elektrodu i tada je primjećen i neobično visoki intenzitet Ramanovog spektra (Fleischmann i sur., 1974, McQuillan, 2009). Istraživanja su se primjenila i na druge metale poput zlata, platine, aluminijske i alkalijske metale. Tijekom godina SERS tehnika se intenzivno razvijala zahvaljujući osjetljivosti koja pruža mogućnost detekcije analita u vrlo niskim koncentracijama, njena primjena u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti, te eliminacija fluorescencije uslijed prijenosa energije s molekule na metal (Etchegoin i Le Ru, 2010).

Do pojačanja Ramanovog signala dolazi zbog povećanja presjeka Ramanovog raspršenja na molekulama koje su adsorbirane ili se nalaze u neposrednoj blizini metalnih nanostrukture odnosno SERS supstrata (Fleischmann i sur., 1974; Jeanmaire i Van Duyne, 1977) (Slika 6). Sam mehanizam pojačanja Ramanovog raspršenja još uvijek nije u potpunosti razjašnjen ali je prihvaćeno objašnjenje da je pojačanje posljedica elektromagnetskog mehanizma pojačanja kod kojeg je molekula u blizini metalne površine pod utjecajem znatno

snažnijeg električnog polja te kemijskog mehanizma temeljenog na promjeni polarizabilnosti zbog interakcije molekule i metalne površine (Yuen i sur., 2008).

Moguće je proizvesti i funkcionalizirane SERS supstrate zahvaljujući tome što elektromagnetski mehanizam ne zahtijeva direktnu vezu analita i metalne površine kako bi se opazio SERS signal, ali zahtijeva smještanje molekule u neposrednu blizinu površine metala. Funkcionalizirani SERS supstrati na svojoj površini imaju vezane receptore i njihova funkcija je specifično vezanje molekula analita i smještanje u neposrednu blizinu SERS supstrata (Dick i sur., 2000).

### **2.3.3. SERS supstrati**

Razvojem SERS spektroskopije razvijale su se u različite tehnike pripreme pogodnih metalnih SERS supstrata. SERS supstrat je bilo koja metalna nanostruktura koja omogućava površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja, a od vremena otkrića SERS efekta do danas ravijan je veliki broj različitih supstrata koji se dijele na:

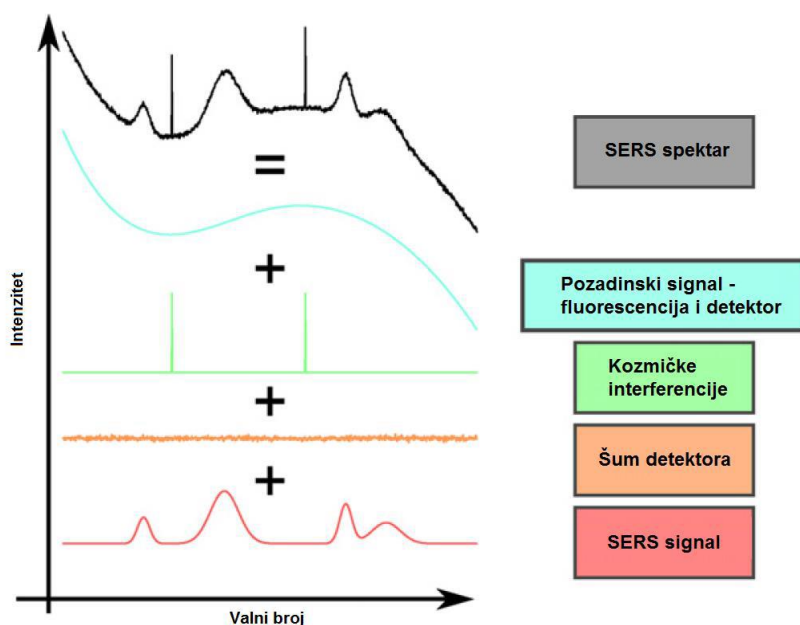
- Metalne nanočestice u suspenziji (npr. koloidne otopine)
- Metalne elektrode
- Planarne metalne nanostrukture na krutoj podlozi

Najčešće korišteni i najbolje istraženi SERS supstrati su suspenzije metalnih nanočestica zbog jednostavnosti svoje pripreme, relativno niskih troškova pripreme, jednostavnosti opreme te dobrog pojačanja i stabilnosti. Njihov najveći nedostatak je što nisu visoko sofisticirani. Navedene suspenzije nastaju redukcijom metalnih soli u otopini uz dodatak redukcijskog i stabilizacijskog sredstva gdje ovisno o uvjetima i metodi pripreme nastaju metalne nanočestice različitog oblika i dimenzija.

Ukoliko se tijekom snimanja SERS spektra koristi nestabilna koloidna suspenzija doći će do slabe ponovljivosti uslijed rezultata koji se mijenjaju tijekom vremena zbog agregacije i sedimentacije SERS supstrata. Zbog toga se neposredno prije SERS analize provodi agregacija koloida koja zahtijeva pažljivo optimiziranje uvjeta i kontrolu samog procesa da bi se izbjegli pogrešni rezultati i potpuna precipitacija koloida (Le Ru i Etchegoin, 2009).

### 2.3.4. Obrada i analiza SERS spektra

Unatoč tome što SERS spektar sadrži veliku količinu informacija o uzorku i ciljanom analitu, njegova interpretacija i upotreba može biti vrlo složena. To posebno vrijedi za kvantitativne analize jer SERS spektar osim signala analita sadrži i brojne interferencije koje potječu od fluorescencije, drugih komponenti prisutnih u uzorku te kozmičkih interferencija koje nastaju od čestica visoke energije koje registrira detektor šuma i pozadinskog signala samog detektora (slika 7.). Također postoje i drugi parametri koje nije moguće kontrolirati tijekom eksperimenta kao što su pomicanje optičkih elemenata instrumenta uslijed vibracija, oscilacije lasera i dr. Zbog svega navedenog sve navedene faktore je potrebno eliminirati predobradom spektra kako bi se dobili zadovoljavajući rezultati.



Slika 7. Komponente SERS spektra (Bocklitz i sur., 2011)

#### 2.3.4.1. Korekcija pozadinskog signala i šuma

Da bi se postigao što bolji omjer signala i šuma, spektar je potrebno izglatiti primjenom tzv. digitalnih filtera ili prozorske funkcije (eng. *window functions*). Prvi korak tog procesa je definiranje funkcije koja ovisno o namjeni može biti srednja vrijednost, prilagodba polinoma, derivacija itd., te definiranje broja točaka koje funkcija obrađuje u jednom koraku tj. definiranje veličine prozora. Pokretanjem algoritma, funkcija na temelju vrijednosti izračunava novu vrijednost unutar prozora te ju pripisuje centralnoj točki prozora izglađenog

spektra iz čega proizlazi da što je prozor veći, to je spektar izglađeniji. U slučaju pretjeranog izglađivanja spektra može doći do gubitka vrpce niskog intenziteta te proširivanja ili pomaka SERS vrpce u spektru (Vandenabeele, 2013).

#### **2.3.4.2. Normalizacija spektra**

Postupak kojim se eliminiraju oscilacije apsolutnog intenziteta SERS spektra naziva se normalizacija spektra. Metoda normalizacije spektra uključuju normalizaciju prema minimalnoj i maksimalnoj vrijednosti gdje se pri maksimalnoj vrijednosti intenziteta pridodaje vrijednost 1. a pri minimalnoj vrijednosti se pridodaje 0. Također se još uključuje i normalizacija dijeljenjem intenziteta u svakoj točki spektra sa sumom intenziteta svih točaka u spektru i ostale. Najbolja metoda kod kvantitativnih analiza je normalizacija cijelog spektra na osnovu intenziteta vrpce internog standarda (Bocklitz i sur., 2011).

#### **2.3.5. Primjena Ramanove i SERS spektroskopije u analizi namirnica**

Do popularizacije, te intezivnog istraživanja Ramanove i SERS spektroskopije došlo je zbog njihove potencijalne brze, neinvazivne i osjetljive analize namjernica te zbog mogućnosti brze analize namjernica uz minimalnu pripremu uzoraka. Svemu tome je pridonio i razvoj tehnologije mjernih uređaja što je dovelo do različitih izvedbi prijenosnih Ramanovih spektrometara koji se ističu cijenom, prijenosnošću, mogućnošću brze analize na licu mjesta i implementacije u proizvodne linije, te „in line“ analize velikog broja uzoraka u kratkom vremenu. Najveći problem kod SERS analize u proizvodne linije predstavlja složenost implementacije, no budući da se radi na razvoju različitih SERS sondi i senzora baziranih na suvremenim tehnologijama, u budućnosti bi moglo doći do njezine šire primjene.

Upravo zbog navedenih nedostataka, istraživanja Ramanove spektroskopije usmjerena su na analize makrokomponentata hrane kao što su proteini (Herrero, 2008), ugljikohidrati (Chylińska i sur., 2014) i masti (Muik i sur., 2005) te promjene na njima s ciljem predviđanja senzorskih i tehnoloških karakteristika poput teksture (Beattie i sur., 2004), sposobnosti vezanja vode (Pedersen i sur., 2003), te dokazivanja porijekla i patvorenja hrane (Nedeljković i sur., 2016; Zou i sur., 2009; Ellis i sur., 2005). Zbog efekta rezonantnog pojačanja Ramanovog raspršenja, omogućuje se primjena Raman spektroskopije za analizu tvari koje imaju izraženu apsorpciju svjetlosti u vidljivom dijelu spektra, npr. astaksantin u mesu lososa



(Wold i sur., 2004), likopen i  $\beta$ -karoten u rajčicama (Baranska i sur., 2006) i različiti drugi fenolni pigmenti (Schulz i Baranska, 2007).

U posljednjih dvadeset godina SERS spektroskopija se počela primjenjivati za mnogo širu primjenu u analitici namirnica, a to je posljedica njezine izrazito visoke osjetljivosti i mogućnosti detekcije izrazito niskih koncentracija analita. Široku primjenu doživila je u detekciji različitih kontaminanata poput ftalata iz ambalažnih materijala (Peng i sur., 2013), ostataka veterinarskih lijekova (Zhang i sur., 2012; He i sur., 2010), pesticida (Liu i sur., 2013; Shende i sur., 2010), aditiva (Xie i sur., 2012), mikotoksina (Ko i sur., 2015) i različitih nedozvoljenih tvari (Betz i sur., 2012; Gao i sur., 2015b). Unatoč brojnim prednostima koje nudi Raman spektroskopija, postoje i brojni izazovi poput optimizacije parametara pripreme uzoraka i samog mjerenja, korištenja SERS supstrata prilagođenih ciljanom analitu koji osiguravaju visoku osjetljivost i ponovljivost mjerenja te smanjenje interferencija drugih komponenti uzoraka koje je potrebno riješiti kako bi se mogla uspješno primijeniti u analitici namirnica.

Kontrola kvalitete i zdravstvene ispravnosti namirnica mogla bi se značajno olakšati uspješnim razvojem primjenjivih SERS metoda budući da su tradicionalne metode analize navedenih analita zbog svoje dugotrajnosti, složenosti i upotrebe najsvremenijih i izrazito skupih analitičkih instrumenata. Zbog navedenih razloga, tradicionalne metode analize nisu baš primjenjive u industrijskim kontrolnim laboratorijima.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci ribe

Uzorci svježe srdele (*Sardina pilchardus*) kupljeni su na ribarnici te su u poleđenom stanju prevezeni u laboratorij. Da bi se uklonile koža i kosti riba se najprije morala eviscerirati i filetirati, a izdvojeno mišićno tkivo je usitnjeno i homogenizirano ručnim sjekačem (mikserom). Usitnjeni i homogenizirani fileti podijeljeni su u 5 uzoraka, te je prvi uzorak smrznut neposredno nakon usitnjavanja, dok su ostali smrzavani nakon 8, 16, 24 i 32 sata čuvanja na sobnoj temperaturi. Na taj način se željelo postići prirodno formiranje histamina. Nakon isteka određenog vremena skladištenja na sobnoj temperaturi, uzorci su stavljani na smrzavanje na -18 °C, te su kao takvi korišteni za pripremu ekstrakta za daljnje analize. . Pripremljeni uzorci analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) te SERS metodom.

#### 3.1.2. Kemikalije

- 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<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
- 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
- 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

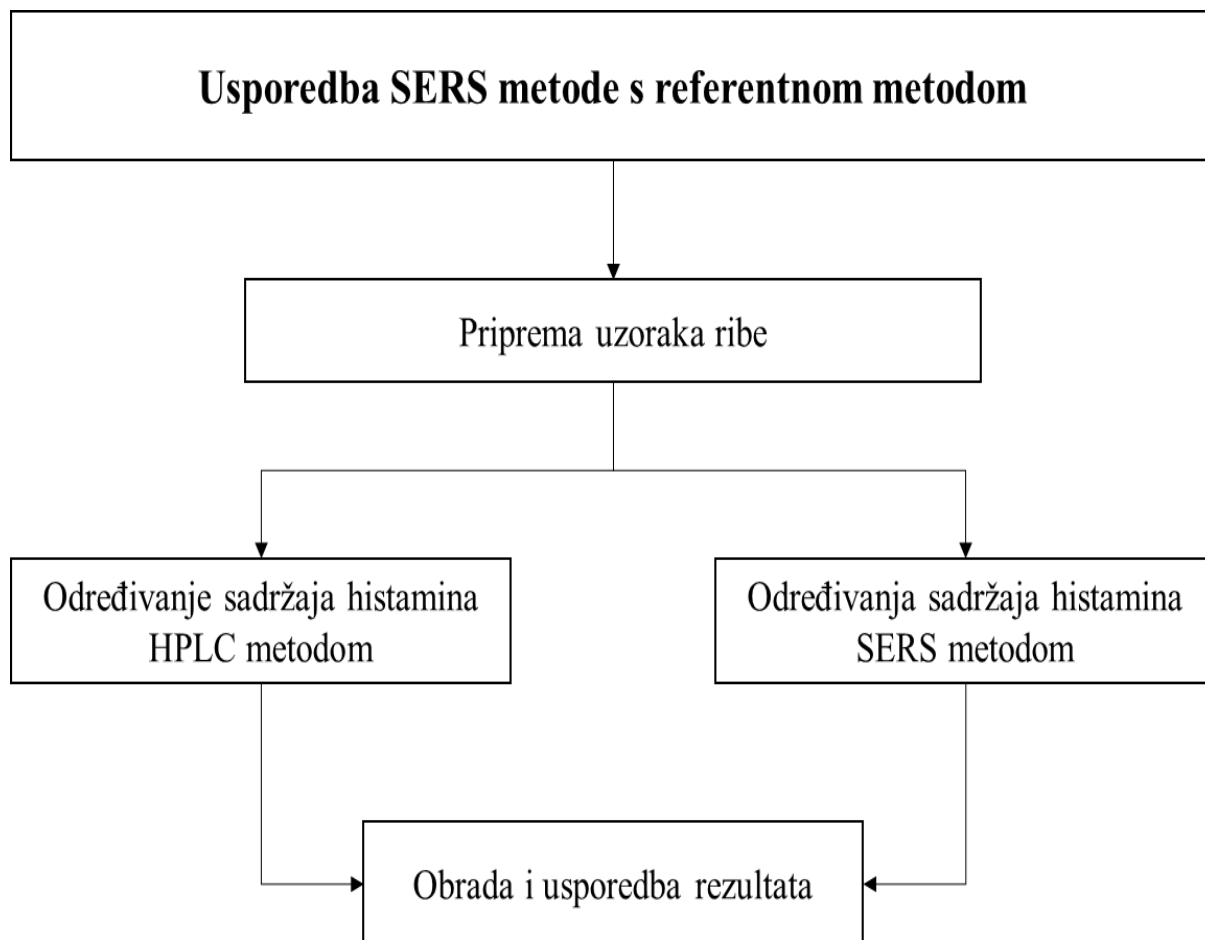
Sve korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. U svim pokusima korištena je deionizirana voda otpornosti 18 MΩcm.

### **3.1.3. Laboratorijska oprema**

Laboratorijsko posuđe:

- plastične kivete, Hrvatska
- propipetor, Brand, Njemačka
- mikropipetori od 100 – 1000 µl, Brand, Njemačka
- staklene bočice (vial) za HPLC - 20 ml, Agilent, Njemačka
- odmjerna tikvica 50 mL, Hrvatska
- plastične vial
- laboratorijske čašice – 10 ml i 50 ml, Hrvatska
- staklena pipeta 20 mL, Hrvatska
- filter papir, Whatman nr.4
- sustav za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) Agilent 1100 Series LC (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany)
- analitička vaga Kern, Njemačka
- homogenizator Ultra turax T-18, IKA-Labortechnik, Njemačka

### 3.2. PLAN ISTRAŽIVANJA



**Slika 8.** Plan istraživanja – Usporedba SERS metode s referentnom metodom

### 3.3. METODE RADA

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

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

##### 3.3.1.1. Priprema otopine standarda

Histamin-dihidroklorid otopljen je u vodi, u odmjernoj tikvici od 100 mL. Dobivena stock otopina je razrijeđena da bi se dobile otopine s koncentracijama histamina 0, 10, 50, 100, 200, 400, 600 i 1000 mg/kg uzorka. U svaki uzorak je dodan interni standard, a dobiveni rezultati su korišteni za izradu baždarne krivulje.

##### 3.3.1.2. Priprema uzoraka

U kivetu je odvagano 2,5 g uzorka, nakon toga je dodano 500  $\mu\text{L}$  otopine internog standarda odnosno imidazola ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) nakon čega se uzorak homogenizirano s 20 mL  $\text{HClO}_4$  ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) na laboratorijskom homogenizatoru (2 minute, max. brzina). Homogenizirani uzorak preliven je zatim u odmjernu tikvicu od 50 mL, dopunjen do oznake s  $\text{HClO}_4$  i promiješan. Nakon miješanja uzorak je vraćen nazad u kivetu te centrifugiran na  $3500 \times g$  kroz 3 minute. U mikrokivetu je zatim otpipetirano 100  $\mu\text{L}$  supernatanta volumena 1,5 mL, te je dodano 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). Uzorci su se prvo morali promiješati te su 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) te su uzorci nakon toga dobro promiješani na miješalici i ostavljeni da stoje 30 minuta u mraku. Nakon miješanja i odležavanja u mraku u uzorak je dodano 500  $\mu\text{L}$  toluena, promiješano na laboratorijskoj miješalici i mikrokiveta je ostavljena da se odvoje slojevi. Nakon nekoliko minuta nakon što su se slojevi izdvojili, iz gornjeg sloja odpipetirano je 200  $\mu\text{L}$  u vialu i

upareno u struji dušika do suhog. Suhi uzorak je zatim 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.

Provjera baždarnog dijagrama provedena je pomoću otopina B1, B2, B3 i slijepa probe.

Pripremljene otopine tretirane su na isti način kao i uzorci – 100  $\mu\text{l}$  otopine, 200  $\mu\text{l}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  i 500  $\mu\text{l}$  dansil-klorida promiješano je na vortexu i ostavljeno u mraku preko noći.

Otopina B1: 200  $\mu\text{l}$  stock otopine histamina i 1 ml otopine internog standarda pipetirano je u odmjernu tikvicu od 100 ml i dopunjeno vodom do oznake.

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

Otopina B3: 2 ml stock otopine histamina i 500  $\mu\text{l}$  otopine internog standarda pipetirano je u odmjernu tikvicu od 50 ml i dopunjeno vodom do oznake.

Slijepa proba: 50  $\mu\text{l}$  otopine internog standarda pipetirano je i dopunjeno do 5 ml sa  $\text{HClO}_4$ . Prilikom analize uzoraka pripremljen je još jedan uzorak više i u njega je dodano 2 ml stock otopine histamina te je nakon analize izračunat „recovery“ koji treba biti u granicama  $R\% = 80 - 120\%$ .

### **3.3.1.3. Kromatografska analiza**

Analiza je vršena na tekućinskom kromatografu Agilent 1200 series HPLC sa kolonom Zorbax ODS (C18), 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm I.D. (Merck, Njemačka) što je prikazano na slici 8. Temperatura kolone bila je 25  $^\circ\text{C}$  uz protok mobilne faze od 1 mL min<sup>-1</sup>. 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 9.** Tekućinski kromatograf Agilent 1200 series HPLC, Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe Prehrambeno-bioteknološkog 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

#### 3.3.1.4. Priprema mobilne faze

Tijekom kromatografske analize, kao mobilna faza koristila se mješavina acetonitrila i destilirane vode, gdje je u mobilnoj fazi A, njihov omjer bio 60:40, dok je mobilnu fazu B činio čisti acetonitril. Radi prevencije mogućeg oštećenje kromatografske kolone i povećanja preciznosti rezultata, otopine su prije upotrebe deaerirane u ultrazvučnoj kupelji 20 minuta.

### 3.4. Određivanje sadržaja histamina Raman spektroskopijom

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

#### 3.4.1. Priprema uzoraka

Najprije je odvagano 2,5 grama uzorka u plastičnu kivetu, te je dodano 20 ml 0.4 M  $\text{HClO}_4$ . Nakon toga uzorci su se dobro homogenizirali na Ultraturax-u 2 min na maksimalnoj brzini te je tako pripremljena smjesa prebačena u odmjernu tikvicu, dopunjena do oznake perkloratnom kiselinom ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) i vraćena nazad u plastičnu kivetu. 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, te nakon što su se odvojili slojevi 100  $\mu\text{L}$  gornjeg sloja otpipetirano je u mikrokivetu volumena 1,5 mL. Zatim je tretirani uzorak uparen do suhog u struji dušika pri temperaturi od  $60^\circ\text{C}$ . Dobiveni suhi uzorci su ponovno otopljeni u 80  $\mu\text{L}$  AGC koloida, 10  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 10  $\mu\text{L}$  agregirajućeg sredstva ( $0,23 \text{ mol/L NaBH}_4$ ), te su nakon miješanja, odnosno prije same SERS analize (Slika 10), stajali 4 minute.



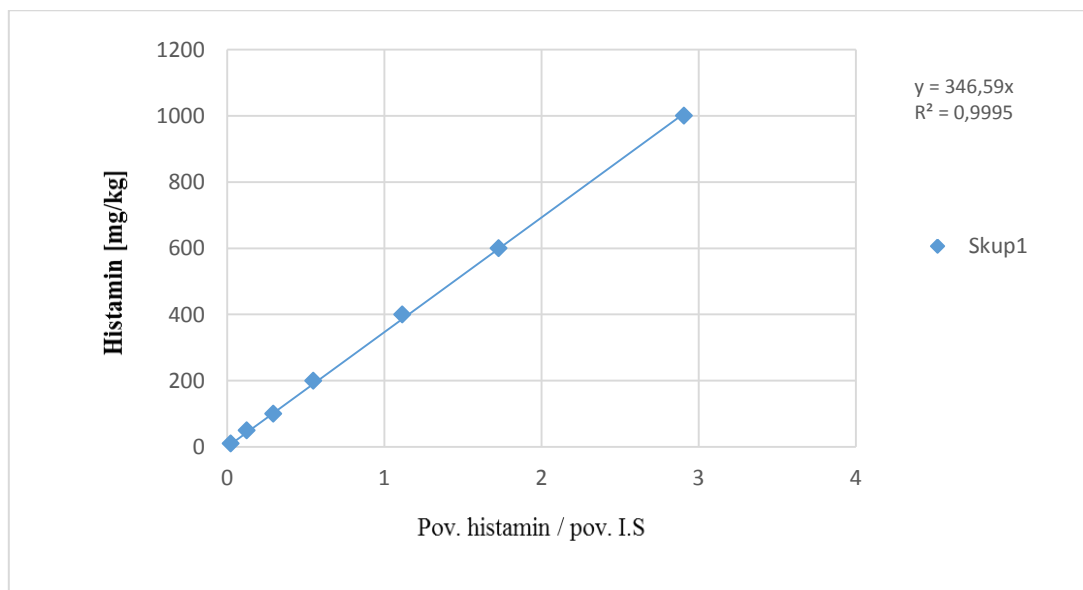
**Slika 10.** Horiba Jobin Yvon T64000 Ramanov spektrometar (Janči, 2016)



## 4.REZULTATI I RASPRAVA

Ovo istraživanje provedeno je s ciljem validacije metode Raman spektroskopije kod određivanja udjela histamina koju su razvili Janči i sur, 2017. Za ovo istraživanje koristila se svježa srdela, dok za istraživanje koje su proveli Janči i sur, 2017. koristila se svježa skuša. Nakon provedene HPLC i SERS analize, dobiveni rezultati su obrađeni u MS Excel programu, te su konstruirani baždarni dijagrami za HPLC i SERS analizu. Rezultati mjerenja realnih uzoraka uspoređeni su tako da se HPLC metoda uzela kao referentna metoda.

### 4.1. HPLC ANALIZA



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

**Tablica 3.** Podaci za baždarni pravac za HPLC metodu

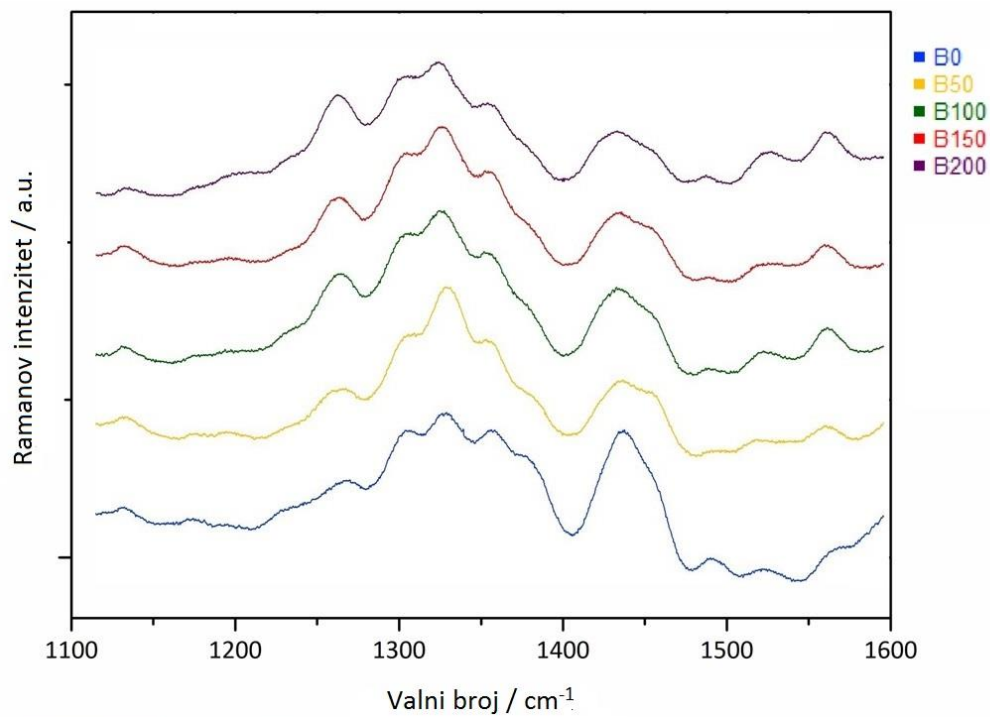
Jednadžba pravca	$y = 346,5x$
Nagib	346,5
Odsječak	0
Broj mjerenja	5
Koeficijent korelacije	0,999

## **4.2. SERS METODA**

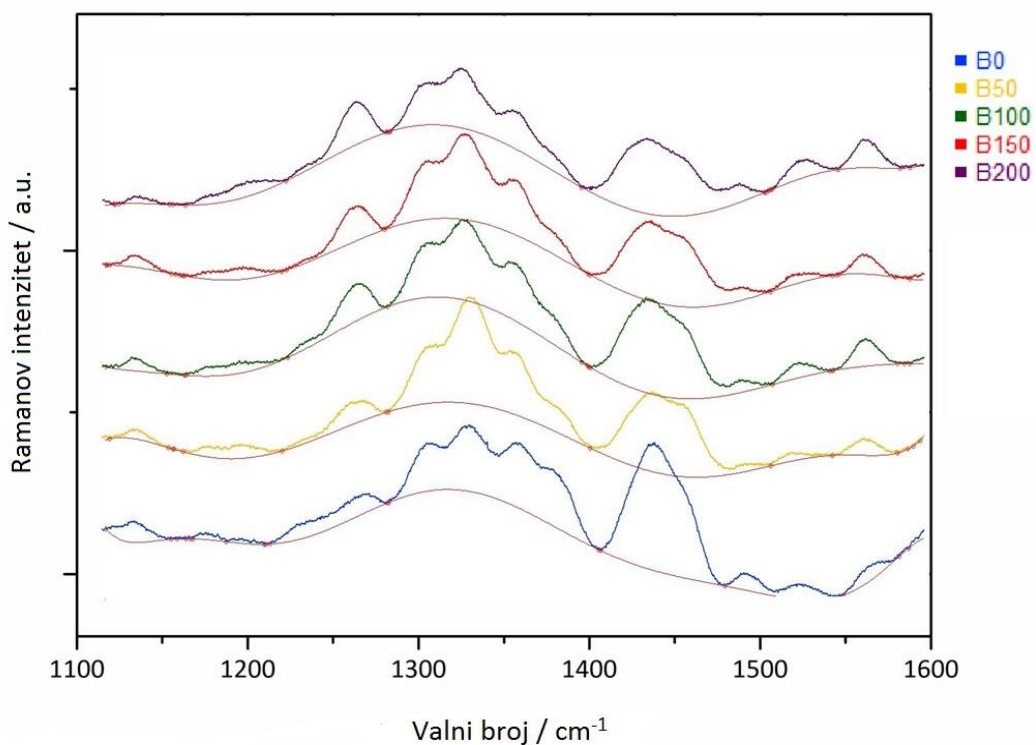
U ovom poglavlju bit će obrađeni SERS spektri, kalibracijski modeli SERS analize, te će se detaljno raspraviti o dobivenim rezultatima za HPLC metodu, te kalibracijske modele temeljene na intenzitetu karakterističnih SERS vrpci histamina na 1264 cm<sup>-1</sup> i 1570 cm<sup>-1</sup>.

### **4.2.1. SERS spektri**

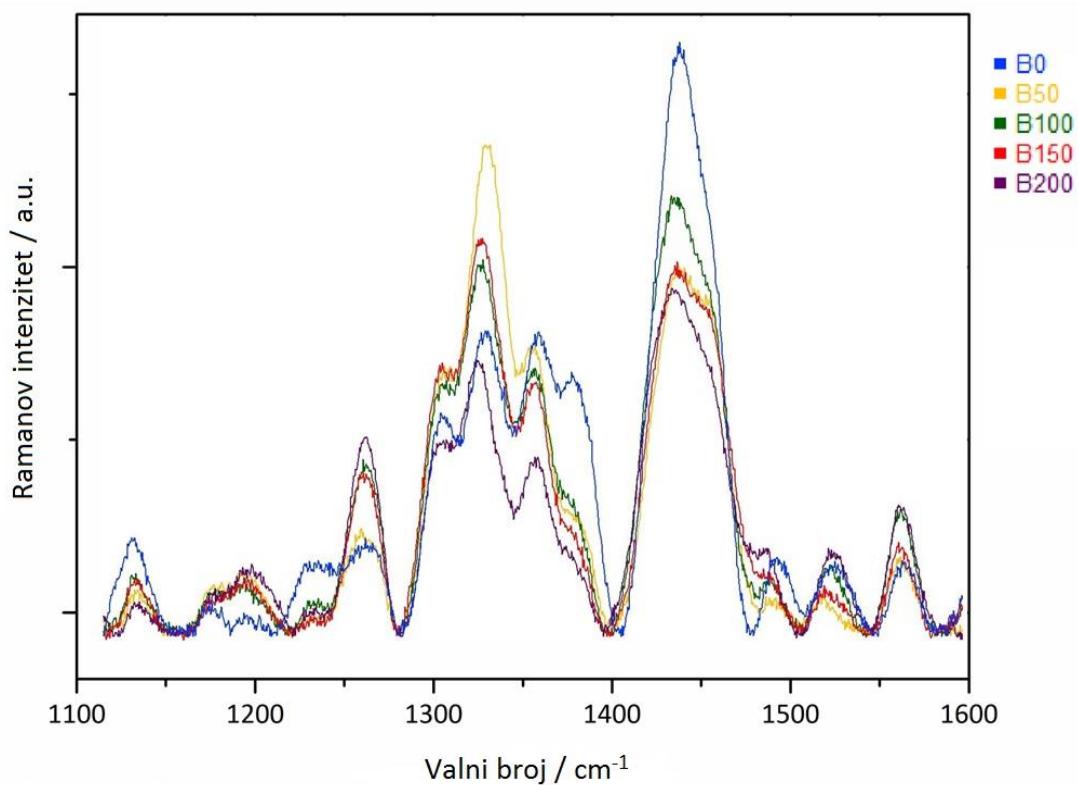
Da bi se izradili kalibracijski modeli, najprije je bilo potrebno obraditi SERS spektre iz razloga što SERS spektri osim signala analita sadrže i brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, fluorescencije, šuma, pozadinskog signala detektora, ali i oscilacije lasera čija je kontrola jako zahtjevna. Upravo zbog svih navedenih nedostataka, potrebno je provesti optimizaciju parametara za korekciju pozadinskog signala, šuma, te normalizaciju spektra što će biti prikazano u nastavku na slikama 12a, 12b, 12c, 12d, 12e.



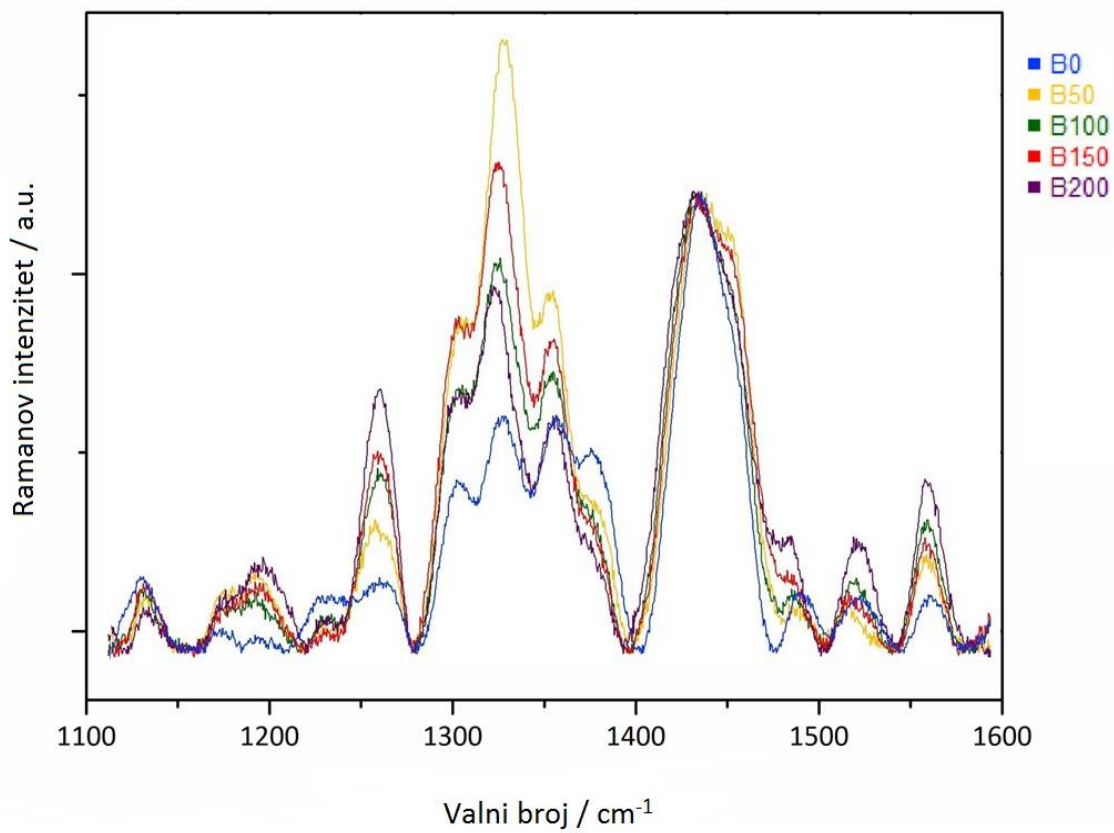
**Slika 12a.** Neobrađeni SERS spektar



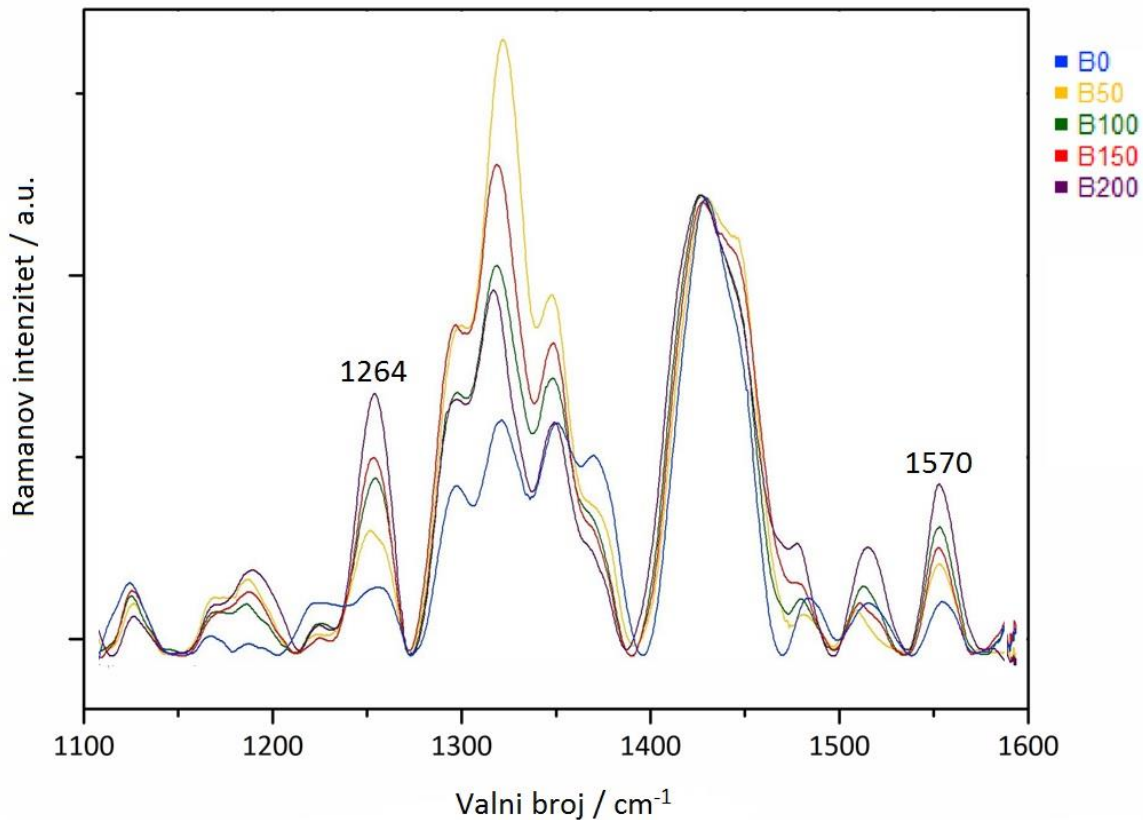
**Slika 12b.** Korekcija pozadinskog signala - aproksimacija bazne linije



**Slika 12c.** Korekcija pozadinskog signala - oduzimanje aproksimativnog signala



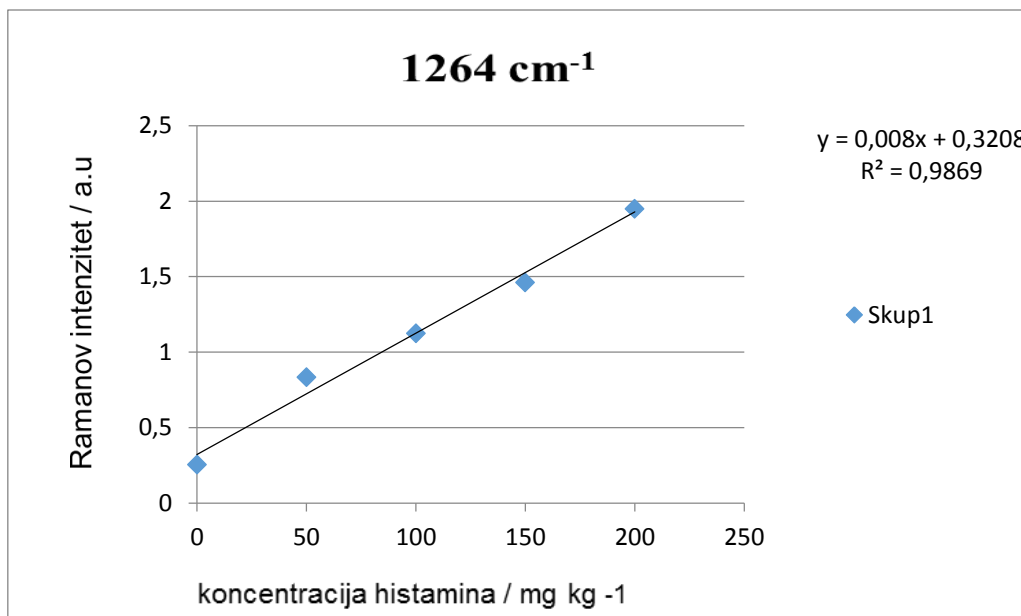
**Slika 12d.** Korekcija šuma



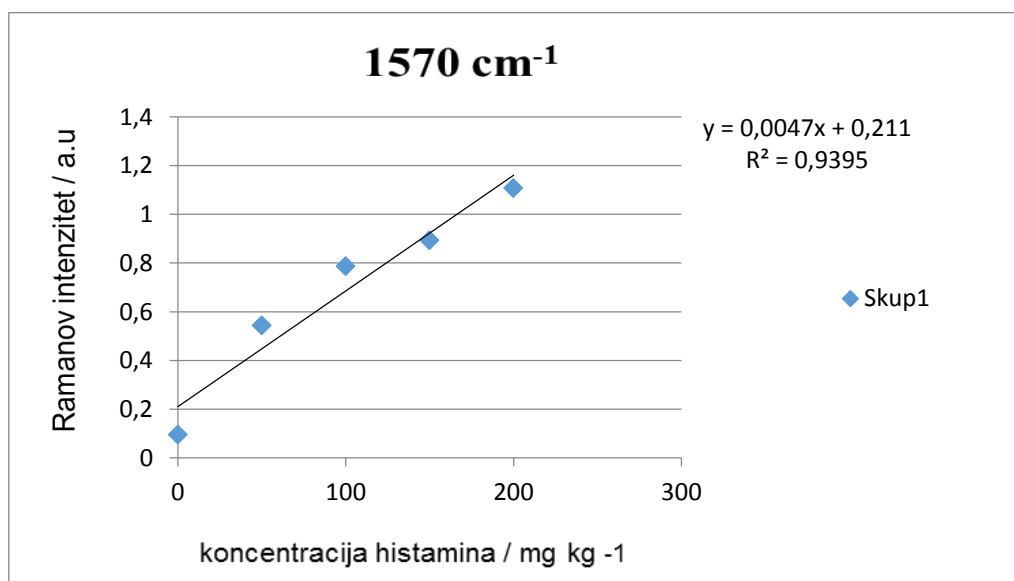
**Slika 12e.** Normalizacija spektra

#### 4.2.2. Kalibracijski modeli

Nakon što je završen postupak obrade spektara, izrađuju se baždarni pravci gdje su koncentracije histamina iznosile 0, 50, 100, 150, 200 i 300 mg/kg, dok su za izradu kalibracijskih modela korištene srednje vrijednosti intenziteta vrpce histamina na 1264 i 1570  $\text{cm}^{-1}$ . Kalibracijski modeli su konstruirani kako bi se najbolje opisale spektralne karakteristike pojedinog uzorka kao funkcija koncentracije histamina. Temeljeni su na intenzitetima vrpce na 1264  $\text{cm}^{-1}$  i 1570  $\text{cm}^{-1}$  metodom linearne regresije. Učinkovitost pojedinog kalibracijskog modela pokazuje koeficijent korelacije ( $R^2$ ), a najbolji model je onaj koji ima veći koeficijent korelacije.



**Slika 13a.** Baždarni model temeljen na intenzitetu karakterističnih SERS vrpce histamina na 1264 cm<sup>-1</sup>



**Slika 13b.** Baždarni model temeljen na intenzitetu karakterističnih SERS vrpce histamina na 1570 cm<sup>-1</sup>

Na slici 13a i 13b može se vidjeti da je koeficijent korelacije veći kod kalibracijskog modela koji je temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm<sup>-1</sup> gdje je  $R^2 = 0,9869$ , nego kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm<sup>-1</sup> kod kojeg je  $R^2 = 0,9395$ . Također se iz baždarnih dijagrama (Slika 13a. i 13b.) može vidjeti da intenzitet vrpce histamina raste povećanjem koncentracije histamina u uzorku.

Budući da su uzorci pripremljeni na isti način kao i kod istraživanja koje su proveli Janči i sur. (2017), dobiveni rezultati su u skladu s navedenim istraživanjem, odnosno dobiveno je da je koeficijent korelacije veći kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , što je bilo i za očekivati.

### 4.3. Usporedba HPLC i SERS metode

**Tablica 4.** Rezultati HPLC i SERS analize realnih uzoraka

Uzorak	Metoda	Broj mjerjenja	Srednja vrijednost	RSD (%)	Točnost (%)
UZ 1	HPLC	2	25,1± 0,6	2,6	100
	SERS 1264	4	35,4± 4,8	13,5	141,0
	SERS 1570	4	33,3± 9,9	29,6	132,8
UZ 2	HPLC	2	33,1± 0,7	2,0	100
	SERS 1264	4	41,3± 2,5	6,0	122,3
	SERS 1570	4	53,1± 5,4	10,1	157,2
UZ 3	HPLC	2	84,9± 1,2	1,4	100
	SERS 1264	4	89,2± 4,0	4,5	105,0
	SERS 1570	4	104,2± 7,2	6,9	122,7
UZ 4	HPLC	2	182,0± 0,2	0,1	100
	SERS 1264	4	184,3± 8,2	4,4	101,3
	SERS 1570	4	184,1± 14,1	7,7	101,2
UZ 5	HPLC	2	240,6± 1,1	0,5	100
	SERS 1264	4	204,4± 16,1	7,9	85,0
	SERS 1570	4	220,3± 15,6	7,1	91,5

Svrha ovog istraživanja bila je validacija metode za određivanje histamina u srdeli, a validacija analitičke metode uključuje određivanje i optimizaciju parametara te metode s ciljem utvrđivanja njezine prikladnosti za dobivanje željenih informacija. Sami postupci validacije se razlikuju ovisno o analitu te svaka metoda zahtjeva individualan pristup. Preciznost se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima, u ovom slučaju, 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. prikazana je usporedba rezultata analize uzoraka srdele primjenom kalibracijskih modela temeljenih na intenzitetu vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$  i  $1570\text{ cm}^{-1}$  dobivenih linearnom regresijom u odnosu na očekivane koncentracije histamina koje su dobivene HPLC metodom.

Da se preciznost metode povećava s povećanjem koncentracije histamina može se zaključiti na temelju rezultata kvantitativne analize primjenom kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$ . Standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD) govore o preciznosti HPLC odnosno SERS metode. Iz tablice 3. također se može vidjeti da je standardna devijacija za sve uzorke manja kod HPLC-a nego kod SERS metode.

Relativne standardne devijacije (RSD) kod primjene kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$  kreću se u rasponu od 13,5% ( $25,1\text{ mg kg}^{-1}$ ) do 7,9% ( $204,4\text{ mg kg}^{-1}$ ), gdje je najmanja standardna devijacija kod uzorka 4, kod kojega RSD iznosi 4,4% ( $184,3\text{ mg kg}^{-1}$ ). Svi uzorci, osim uzorka 5, nalaze se unutar zadanih parametara razvijene metode od 0 – 200 mg/kg i na osnovu toga se mogu uočiti mali nedostaci SERS metode, barem kad je u pitanju preciznost same metode. Razlog tomu može biti i taj što tijekom same analize može nastati i velik broj različitih produkata uz nastanak histamina zbog brojnih kemijskih i enzimskih reakcija koje nastaju na ribljem mišićju tijekom post-mortalnog razdoblja.

Iz prikazanih rezultata mogu se uočiti veća odstupanja kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$  u odnosu na kalibracijski model temeljen na  $1264\text{ cm}^{-1}$ . RSD vrijednosti se kreću od 29,6 % ( $9,8\text{ mg kg}^{-1}$ ) do 6,9 % ( $104,20\text{ mg kg}^{-1}$ ), no iz tablice 3. se može vidjeti da RSD vrijednost pada od uzorka 1 do uzorka 3, i da se ponovno povećava kod



uzoraka 4 i 5. Može se reći da je to također posljedica kemijskih i enzimskih reakcija koje nastaju na ribljem mišićju tijekom post-mortalnog razdoblja kao što je već navedeno kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce  $1264\text{ cm}^{-1}$ .

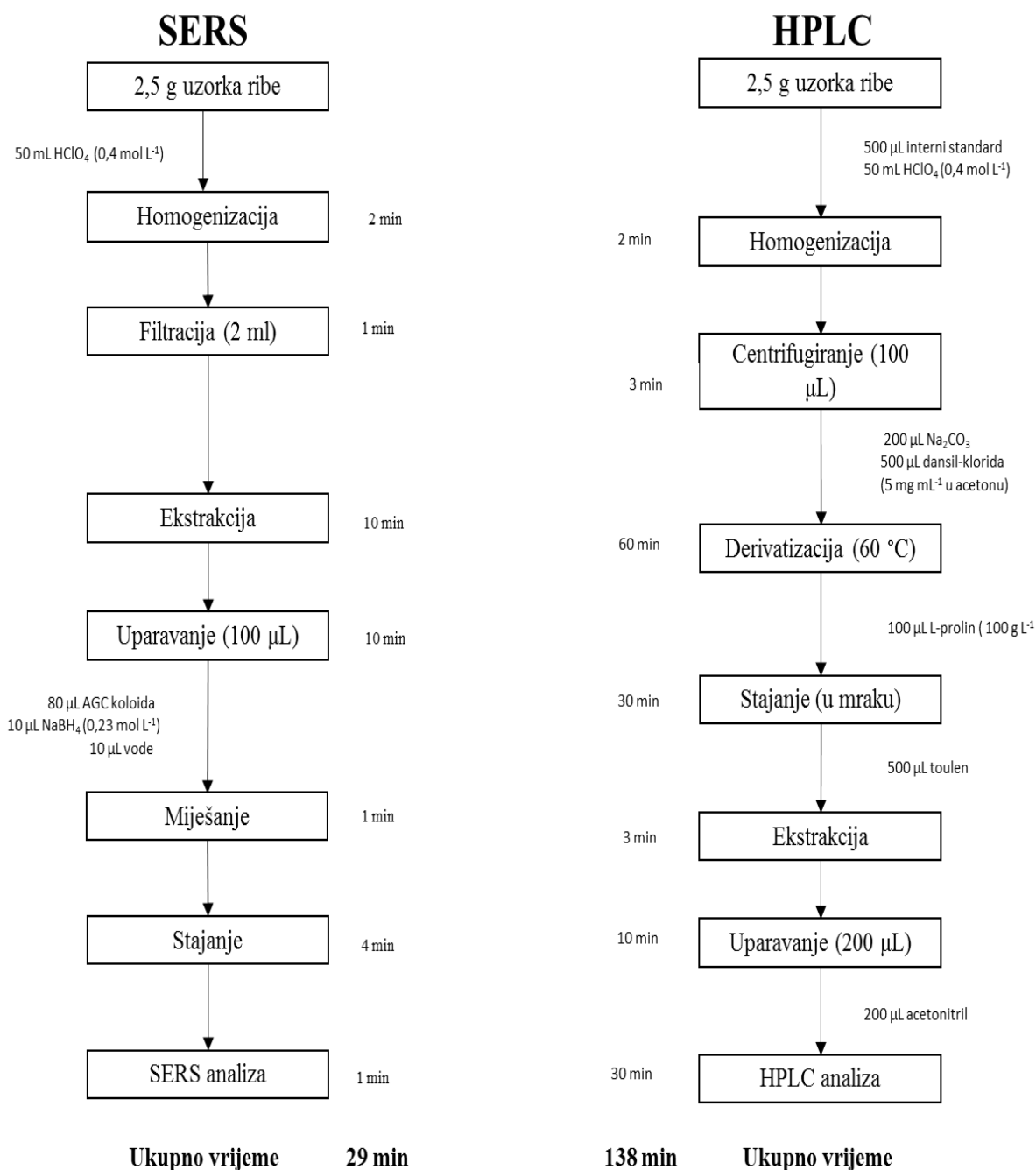
Ako se usporede uzorci 1, 2, 3, povećanjem koncentracije histamina, povećava se i preciznost metode kod kalibracijskog modela na  $1570\text{ cm}^{-1}$  budući da RSD vrijednosti padaju. Ista pojava, javlja se i kod kalibracijskog modela na  $1264\text{ cm}^{-1}$  ako se usporede uzorci 1, 2, 3 i 4.

Analitički prinos je definiran kao omjer izmjerene i stvarne vrijednosti koncentracije histamina u uzorku odnosno očekivane koncentracije histamina izmjerene HPLC metodom, te je bolji kod uzoraka s većom koncentracijom histamina. Izražava se u postocima. Rezultati HPLC metode uzimaju se kao 100 % točni iz razloga što dobiveni koeficijent korelacije baždarnog pravca iznosi 0,999 čime se utvrđuje dobra točnost odnosno referentnost HPLC metode.

U ovom istraživanju analitički prinos kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$  kreće se u rasponu od 141,0 ( $35,4\text{ mg kg}^{-1}$ ) do 85,0 ( $204,4\text{ mg kg}^{-1}$ ). Vrijednosti analitičkog prinosa kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$  kreću se od 132,8% ( $33,3\text{ mg kg}^{-1}$ ) do 91,5 % ( $220,3\text{ mg kg}^{-1}$ ). Problem kod ovog kalibracijskog modela su izrazite varijacije kod uzoraka.

Odstupanja od referentne odnosno HPLC vrijednosti kreću se od 1,3 % do 41,0 % kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , te od 1,20% do 57,2 kod modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$ . Iz navedenog možemo zaključiti da je SERS metoda temeljena na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$  točnija zbog manjih odstupanja od referentne vrijednosti te također usporedbom odstupanja svih 5 uzoraka na  $1264\text{ cm}^{-1}$  primjećuje se da su odstupanja manja kod većih koncentracija histamina. Rezultati se podudaraju s rezultatima Janči (2017).

Usporedbom relativnih standardnih devijacija (RSD) mogu se uočiti razlike između dva ispitana modela. Glavna razlika je manja preciznost modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$  koja je posljedica varijabilnosti uzoraka s istom koncentracijom histamina. Na temelju vrijednosti analitičkog prinosa može se zaključiti da je preciznija HPLC metoda od SERS metode.



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

Na slici 14. su prikazane prednosti SERS metode u odnosu na referentnu HPLC metodu kod određivanja udjela histamina u ribi. Iz slike se može vidjeti jednostavnost SERS analize, te za razliku od HPLC-a, kod SERS metode je značajno skraćeno vrijeme analize, ne zahtijeva se postupak derivatizacije histamina niti reakcija s L-prolinom koje traju 90 minuta. Sam

postupak analize odnosno snimanja SERS spektra traje 1 minutu, a kod HPLC za takav postupak je potrebno čak 30 minuta. Općenito postupak analize jednog uzorka kod SERS metode traje puno kraće (oko 30 min), za razliku od HPLC metode, gdje je za analizu jednog uzorka potrebno i do 140 minuta.

Još jedna prednost SERS metode je i ta da je za provođenje analize potreban puno manji broj jednostavnih ali i lako dostupnih kemikalija, dok postupak HPLC analize zahtijeva veći broj kemikalija što dovodi do visokog troška nabave nekih od tih kemikalija (npr. interni standard, sredstvo za derivatizaciju).

Najveća prednost HPLC metode je njena visoka preciznost koja se zasniva na tome da se tijekom kromatografske analize komponente uzoraka razdvajaju na kromatografskoj koloni, te kada se definiraju odgovarajući parametri, zasebno detektiraju po izlasku iz kolone. Problem kod SERS metode je taj što supstrati koje se koriste u toj metodi nisu toliko selektivni te spektru doprinose sve komponente složenog sustava, a taj sustav se sastoji od uzorka, supstrata i agregirajućeg sredstva. Na temelju svega navedenog realno je za očekivati da će preciznost takvih metoda kao što je SERS biti manja.

U današnje vrijeme, razvojem tehnologije, tržište nudi i male Ramanove spektrometre, koji su cjenovno dosta prihvatljivi, što nije slučaj kod tekućinskih kromatografa. Visokoj cijeni HPLC metode pridonosi i velik trošak nabave analitičkih instrumenata i potrošnog materijala i zbog svih navedenih razloga došlo je do razvitka SERS metode koja je postala jako poželjna metoda za ispitivanje sastojaka hrane. Temeljni uvjet za primjenu SERS metode je mogućnost precizne i točne analize u realnim uvjetima.

Nakon usporedbe HPLC metode sa SERS metodom temeljenom na intenzitetu vrpce i na  $1264\text{ cm}^{-1}$  i na  $1570\text{ cm}^{-1}$  može se zaključiti da je HPLC metoda puno preciznija, no unatoč tome i dalje se za detekciju histamina više koristi SERS metoda. Razlog tomu je prvenstveno taj što se sa tom metodom značajno smanjuju troškovi i vrijeme potrebno za analizu, a mogu se postići približno dobri rezultati kao i s HPLC metodom.

## 5. ZAKLJUČCI

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

1. Usporedbom analize histamina SERS metodom i referentnom HPLC metodom uočeno je da se SERS metoda odlikuje jednostavnošću postupka analize, kraćim vremenom analize pojedinog uzorka (30 min), te znatno nižim troškovima analize po uzorku u odnosu na HPLC metodu, dok se HPLC metoda odlikuje boljom preciznošću.
2. Koeficijent korelacije najveći je kod kalibracijskog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , a iznosi  $R^2=0,9869$ . Kod istog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na  $1570\text{ cm}^{-1}$  koeficijent korelacije iznosi  $R^2=0,9395$ . 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 te može pokazati veoma dobre rezultate za analizu i kvantifikaciju histamina.
3. U ovom radu istinitost metode temeljila se na usporedbi rezultata ispitivane metode (SERS) s rezultatima dobivenim referentnom metodom (HPLC), te s obzirom na dobivene rezultate SERS metoda temeljena na intenzitetu vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$  zbog svojih manjih odstupanja od referentne vrijednosti je bila točnija.
4. Usporedbom dobivenih rezultata SERS analize, uočeno je da je najveća točnost postignuta primjenom modela koji se temelji na intenzitetu SERS vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , te na temelju svih navedenih činjenica može se zaključiti da se unatoč manjoj preciznosti u odnosu na HPLC metodu, SERS metodom analize i kvantifikacije histamina u uzorcima ribe mogu postići jako dobri rezultati.

## 6.LITERATURA

Baranska, M., Schütze, W., Schultz, H. (2006) Determination of Lycopene and  $\beta$ Carotene Content in Tomato Fruits and Related Products: Comparison of FT-Raman, ATR-IR, and NIR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 78, 8456-8461.

Beattie, R. J., Bell, S. J., Farmer, L. J., Moss, B. W., Patterson, D. (2004) Preliminary investigation of the application of Raman spectroscopy to the prediction of the sensory quality of beef silverside. *Meat Sci*, 66, 903-13.

Betz, J. F., Cheng, Y., Rubloff, G. W. (2012) Direct SERS detection of contaminants in a complex mixture: rapid, single step screening for melamine in liquid infant formula. *Analyst*, 137, 826-828.

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.

Chylinska, M., Szymanska-Chargot, M., Zdunek, A. (2014) Imaging of polysaccharides in the tomato cell wall with Raman microspectroscopy. *Plant Methods*, 10, 14-14.

Dick, L. A., Haes, A. J., Van Duyne, R. P. (2000) Distance and Orientation Dependence of Heterogeneous Electron Transfer: A Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Study of Cytochrome c Bound to Carboxylic Acid Terminated Alkanethiols Adsorbed on Silver Electrodes. *J. Phys. Chem B* **104**, 11752-11762.

Ellis, D. I., Broadhurst, D., Clarke, S. J., Goodacre, R. (2005) Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. *Analyst*, 130, 1648-1654.

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/agms/news\\_events/Histamine\\_Final\\_Report.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agms/news_events/Histamine_Final_Report.pdf)>  
Pristupljeno 26.07.2017.

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.

He, L., Lin, M., Li, H., Kim, N.-J. (2010) Surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with dendritic silver nanosubstrate for detection of restricted antibiotics. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41, 739-744.

Gao, F., Hu, Y., Chen, D., Li-Chan, E. C., Grant, E., Lu, X. (2015b) Determination of Sudan I in paprika powder by molecularly imprinted polymers-thin layer chromatography-surface enhanced Raman spectroscopic biosensor. *Talanta*, 143, 344-52.

Herrero, A. M. (2008) Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 48, 512-23.

Hungerford, J. M. (2010) Scombroid poisoning: A review. *Toxicol.* **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.

Ko, J., Lee, C., Choo, J. (2015) Highly sensitive SERS-based immunoassay of aflatoxin B1 using silica-encapsulated hollow gold nanoparticles. *Journal of hazardous materials*, 285, 11-17.

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

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

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

Liu, B., Zhou, P., Liu, X., Sun, X., Li, H., Lin, M. (2013) Detection of Pesticides in Fruits by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Coupled with Gold Nanostructures. *Food and Bioprocess Technology*, **6**, 710-718.

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.

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

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

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.

Muik, B., Lendl, B., Molina-Diaz, A., Ayora-Canada, M. J. (2005) Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chemistry and physics of lipids*, **134**, 173-182.



Nedeljković, A., RÖSCH, P., Popp, J., Miočinović, J., Radovanović, M., Pudja, P. (2016) Raman Spectroscopy as a Rapid Tool for Quantitative Analysis of Butter Adulterated with Margarine. *Food Analytical Methods*, 9, 1315-1320.

Pedersen, D. K., Morel, S., Andersen, H. J., Balling Engelsen, S. (2003) Early prediction of water-holding capacity in meat by multivariate vibrational spectroscopy. *Meat Sci*, 65, 581-92.

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

Peng, B., Li, G., Li, D., Dodson, S., Zhang, Q., Zhang, J., Lee, Y. H., Demir, H. V., Yi Ling, X., Xiong, Q. (2013) Vertically Aligned Gold Nanorod Monolayer on Arbitrary Substrates: Self-Assembly and Femtomolar Detection of Food Contaminants. *ACS Nano*, 7, 5993-6000.

Schulz, H., Baranska, M. (2007) Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43, 13-25.

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.

Shende, C., Inscore, F., Sengupta, A., Stuard, J., Farquharson, S. (2010) Rapid extraction and detection of trace Chlorpyrifos-methyl in orange juice by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 4, 101107.

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.

Vusilović, R., Cvrtila Fleck, Ž., Zdolec, N., Filipović, I., Kozačinski, L., Njari, B., Hadžiosmanović, M. (2008) Higijensko značenje histamina u ribi, *Meso* **10 (1)**, 40-45.

Wold, J. P., Marquardt, B. J., Dable, B. K., Robb, D., Hatlen, B. (2004) Rapid Quantification of Carotenoids and Fat in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) by Raman Spectroscopy and Chemometrics. *Applied Spectroscopy*, 58, 395-403.

Xie, Y., Li, Y., Niu, L., Wang, H., Qian, H., Yao, W. (2012) A novel surface-enhanced Raman scattering sensor to detect prohibited colorants in food by graphene/silver nanocomposite. *Talanta*, 100, 32-37.

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.

Zhang, Y., Huang, Y., Zhai, F., Du, R., Liu, Y., Lai, K. (2012) Analyses of enrofloxacin, furazolidone and malachite green in fish products with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 135, 845-850.

Zou, M.-Q., Zhang, X.-F., Qi, X.-H., Ma, H.-L., Dong, Y., Liu, C.-W., Guo, X., Wang, H. (2009) Rapid Authentication of Olive Oil Adulteration by Raman Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6001-6006

