

# Optimizacija postupka pripreme uzorka ribe za detekciju histamina SERS-om

---

Lončar, Daniela

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:159:664826>

*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, lipanj 2017

Daniela Lončar

745/PI

**OPTIMIZACIJA POSTUPKA  
PRIPREME UZORKA RIBE ZA  
DETEKCIJU HISTAMINA SERS-  
OM**

Rad je rađen 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. Tibora Jančija.

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Sanji Vidaček i višem asistentu dr. sc. Tiboru Jančiju na savjetima tijekom rada i pisanja, pomoći te izdvojenom vremenu. Također, zahvaljujem svojoj obitelji, momku i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i ljubavi koju su mi pružali sve ove godine studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

## OPTIMIZACIJA POSTUPKA PRIPREME UZORKA RIBE ZA DETEKCIJU HISTAMINA SERS-OM

*Daniela Lončar, 745/PI*

**Sažetak:** Histamin je najvažniji biogeni amin koji pri povišenoj koncentraciji u hrani morskog podrijetla predstavlja toksikološki rizik. Ramanova spektroskopija se pokazala brzom i invazivnom metodom za detekciju histamina, dok su tradicionalne metode skuplje i složenije te teže primjenjive u industrijskim uvjetima. Cilj ovog istraživanja bio je pročistiti ekstrakte različitim otapalima kako bi se histamin izdvojio iz vodenog sloja i bolje detektirao SERS (površinski pojačano Ramanovo raspršenje) metodom, te time izbjeci dugi postupak uparavanja i skratiti navedenu metodu. Koeficijent koleracije ( $R^2 = 0,9614$ ) i intenzitet vrpce histamina na  $1570\text{ cm}^{-1}$  pokazali su se najboljima kod ekstrakta B1 (ekstrakcija HCl-om), dok je kod ekstrakta B2 (ekstrakcija s izooktanom i vodom) najveća točnost metode (95,45%) kod vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$ . Zbog otežanih uvjeta u radu s ekstraktima B i C (ekstrakcija 0.1 i 0.5M NaOH), te tijekom dodavanja i miješanja isptivanih otapala (HCl, izooktan, cikloheksan), može se zaključiti da te postupke nije preporučljivo primjenjivati.

**Ključne riječi:** *riba, histamin, Ramanova spektroskopija, površinski pojačano Ramanovo raspršenje (SERS), koeficijent koleracije*

**Rad sadrži:** 40 stranica, 18 slika, 3 tablica, 48 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:** *dr.sc. Tibor Janči*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. *Doc.dr.sc. Irena Barukčić*
2. *Izv.prof.dr.sc. Sanja Vidaček*
3. *Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević*
4. *Izv.prof.dr.sc. Ksenija Marković*

**Datum obrane:** 24. srpnja 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### OPTIMIZATION OF FISH PROCESSING PROCESS PREPARATION FOR HISTAMINE DETECTION WITH SERS METHOD

*Daniela Lončar, 745/PI*

**Abstract:** Histamine is the most important biogenic amine which represents a toxicological risk at elevated concentrations in sea food. Raman spectroscopy proved to be a fast and invasive histamine detection method, while traditional methods are more expensive, complex and difficult to apply in industrial conditions. The aim of this study was to purify the extracts with different solvents in order to separate histamine from the aqueous layer and enable better detection by the SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) method. Thus the relatively long evaporation process was to be avoided and the method would shorten. The correlation coefficient  $c$  ( $R^2 = 0.9614$ ) and the histamine band intensity at  $1570 \text{ cm}^{-1}$  were the best for analysing extract B1 (extraction with HCl). The highest method accuracy (95.45%) in extract B2 (extraction with isooctane and water) was achieved by the histamine band at  $1264 \text{ cm}^{-1}$ . Due to difficulties in analysing extracts B and C (extraction with 0.1 and 0.5 M NaOH), and during the addition and mixing with investigated solvents (HCl, isooctane and cyclohexane) such procedures are not recommended for use.

**Keywords:** *fish, histamine, Raman spectroscopy, Surface Enhanced Raman Scattering (SERS), correlation coefficient*

**Thesis contains:** 40 pages, 18 figures, 3 tables, 48 references, 0 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:** *Tibor Janči, PhD*

**Reviewers:**

1. *PhD. Irena Barukčić, Assistant professor*
2. *PhD. Sanja Vidaček, Associate Professor*
3. *PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor*
4. *PhD. Ksenija Marković, Associate Professor (substitute)*

**Thesis defended:** 24<sup>th</sup> July 2017.

<b>Sadržaj:</b>	<b>stranica</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. Histamin.....	2
2.2. Ramanova spektroskopija.....	8
2.2.1. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS).....	10
2.2.2. Obrada i analiza SERS spektara.....	12
2.2.2.1. Korekcija pozadinskog signala.....	13
2.2.2.2. Korekcija šuma (izgladivanje spektra).....	13
2.2.2.3. Normalizacija spektra.....	13
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>15</b>
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Kemikalije.....	15
3.1.2. Uzorci ribe.....	15
3.2. Plan istraživanja.....	16
3.3. METODE RADA.....	17
3.3.1. Priprema ekstrakata ribljeg mišićja.....	17
3.3.2. Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC).....	18
3.3.3. Snimanje i analiza SERS spektara ekstrakata.....	19
3.3.4. Obrada SERS spektara.....	19
3.3.5. Mjerenja provedena na Ramanovom spektrometru.....	19
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>21</b>
4.1. SERS analiza.....	21
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>35</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>36</b>



# 1. UVOD

Riba je jedna od vodećih i nutritivno vrijednijih namirnica u ljudskoj prehrani. Iako je s nutricionističkog stajališta vrijedna, spada u grupu lako kvarljivih namirnica koji uslijed, neadekvatnog rukovanja od ulova do njene prerade, mogu uzrokovati infekcije i intoksikacije kod ljudi.

U novije vrijeme, napretkom tehnologije u ribarstvu, riba je prisutna na globalnom tržištu i brzim kanalima distribucije se u kratkom roku može naći u bilo kojem dijelu svijeta. Međutim, kako se sve veća količina ulova prerađuje u kratkom roku, javljaju se novi izazovi u pogledu osiguravanja kvalitete i zdravstvene ispravnosti proizvoda ribarstva. Zakonski propisi i standardi se stalno unaprjeđuju, no prema svjetskim statistikama se pokazuju određeni rizici, kao što je i histaminsko trovanje, koji su široko rasprostranjeni i stalno prisutni. Kako bi se u ribarskim industrijama velikog kapaciteta prerade mogla provoditi adekvatna metoda javila se potreba za razvojem brzih analitičkih metoda, koje mogu pratiti brzi tempo prerade, te u relativno kratkom roku analizirati veliki broj uzoraka.

U posljednje vrijeme se pojavio veliki interes za brzu i neinvazivnu metodu kao što je Ramanova spektroskopija, jer su se tradicionalne laboratorijske metode poput, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i plinske kromatografije (GC), pokazale skupljim i složenijim, te je potrebno posebno educirati osoblje za provođenje analiza zbog čega su u industrijskim uvjetima teže primjenjive. Ramanova spektroskopija je vibracijska spektroskopska metoda temeljena na Ramanovom efektu. Najveće ograničenje ove metode je što Ramanovo raspršivanje daje slabi signal, te je potrebna visoka koncentracija analita u uzorku. Površinski pojačano Ramanovo raspršenje (SERS) se koristi kako bi se pojačao signal, odnosno postigla visoka osjetljivost metode. Signal je zahvaljujući efektima elektromagnetskog i kemijskog pojačanja dovoljno jak da omogući detekciju samo jedne molekule ispitivane tvari.

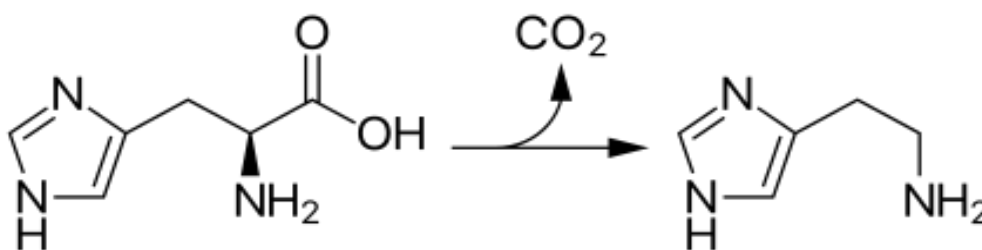
Cilj ovog istraživanja je lakše izdvojiti histamin iz vodenog sloja ekstrakcijom tekuće – tekuće, različitim otapalima kao što su HCl, izooktan i cikloheksan, te time izbjeći dugi postupak uparavanja (10 minuta).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. HISTAMIN

Histamin je bezbojna čvrsta tvar u kristalnom obliku koja se dobro otapa u vodi. Ubraja se u skupinu heterocikličkih biogenih amina koji u hrani morskog podrijetla, u povišenoj koncentraciji, predstavljaju toksikološki rizik. Uz histamin je još nekoliko biogenih amina značajno u toksikološkom smislu, kao što su kadaverin, putrescin, tiramin,  $\beta$ -feniletilamin, agmatin, spermin i spermidin. Navedeni biogeni amini su u svježoj ribi prisutni u niskim koncentracijama i udio im se povećava tijekom skladištenja, te su oni izvrsni pokazatelji svježine ribe. Za kadaverin i putrescin je utvrđeno da potiču toksičnost histamina, no unatoč tome u istraživanjima za parametar sigurnosti i kvalitete ribe i ribljih proizvoda uzima se isključivo histamin (Bulushi i sur., 2009). Sam za sebe, histamin nije odgovarajući pokazatelj indeksa kvarenja ribe, posebice kod onih vrsta (tuna, inćun) s visokim udjelom histidina (Rossi i sur., 2002). Teško ga je utvrditi senzorskim pregledom jer ne mijenja senzorska svojstva ribe, osim u podmaklom stadiju kvarenja.

Histamin nastaje bakterijskom dekarboksilacijom histidina pod djelovanjem enzima L - histidin - dekarboksilaze (Slika 1).



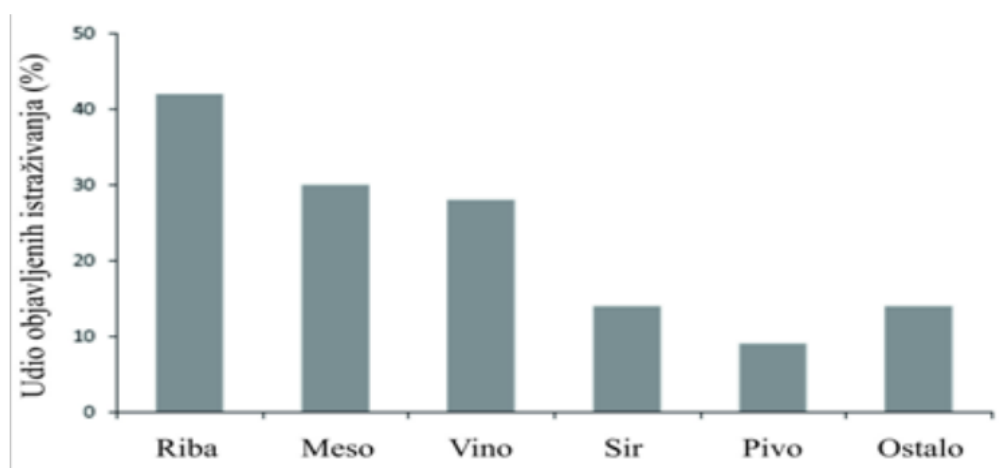
**Slika 1.** Dekarboksilacija slobodne masne kiseline histidina u histamin uz djelovanje histidin-dekarboksilaze (Bogdanović i sur., 2009)

Taj enzim je jedan od najvažniji enzima u metabolizmu proteina, jer sudjeluje u pregradnji jedne od osam esencijalnih aminokiselina, histidina, koji se nalazi u sastavu većine proteinskih namirnica (Vranešić i sur., 2010).

Histidinom je najbogatija plava riba iz porodica *Clupeidae* (srdela) i *Scombridae* u koju osim tune i skuše spada i riba korištena za ovaj rad, palamida. Trovanje tom ribom se često naziva skombrotoksizam, međutim trovanje histaminom nije isključivo povezano s ribom iz porodice

*Scombridae*, jer su zabilježeni slučajevi trovanja i drugim namirnicama kao što su sir, vino, fermentirani mesni proizvodi, pa je ispravniji naziv „histaminsko trovanje“.

Iz pregleda istraživanja biogenih amina u svijetu provedenih u 2011. i 2012. godini vidi se da su najčešće ispitivane namirnice upravo riblji proizvodi, a slijede meso i vino (Erim, 2013) (Slika 2.).



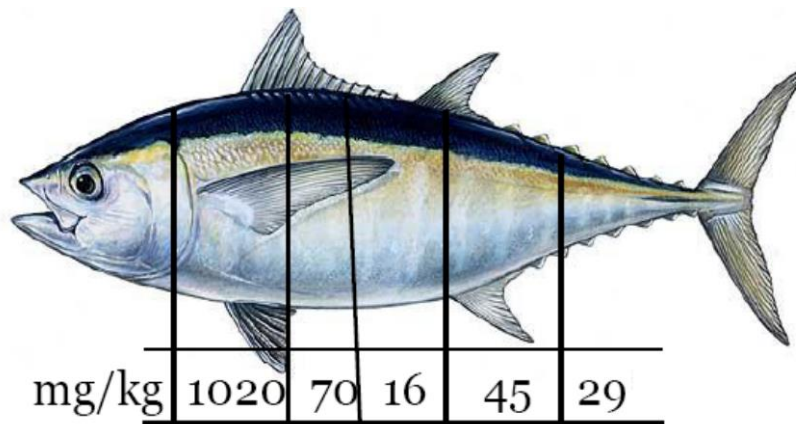
**Slika 2.** Distribucija istraživanja biogenih amina u različitim skupinama namirnica provedenim 2011. i 2012. godine (Erim, 2013)

Rezultati istraživanja su pokazali da histamin konzumiran u namirnici ima izraženiji toksičan učinak od ekvivalentne doze čistog histamina. To upućuje na činjenicu da su u histaminsko trovanje uključeni i neki drugi spojevi (najvjerojatnije drugi biogeni amini) prisutni u namirnici koji pojačavaju djelovanje histamina ili inhibiraju metaboličke mehanizme razgradnje histamina (Taylor i sur., 1984; Taylor, 1986; Lehane i Olley, 2000).

Ukoliko se riba i riblji proizvodi ne skladište adekvatno, histamin može nastati pri temperaturnom rasponu od 20-25 °C kao posljedica aktivnosti mikroorganizama koji su često prisutni i u samoj ribi. Naime, temperatura od +4 °C kroz dulji period skladištenja (3-7 dana) se prema nekim istraživanjima pokazala pogodna za stvaranje veće koncentracije histamina. Nastali histamin je termostabilan i ne može se ukloniti uobičajenim postupcima prerade, čak ga ni temperatura prženja na 170 °C ne uništava.

Istraživanja o biogenim aminima u hrani (najčešće se istražuje histamin u morskoj ribi) se provode s različitim ciljevima. Jedan od ciljeva je definiranje povezanosti koncentracije histamina u ribi i vrste bakterija koje ga mogu producirati (Erim, 2013), dok ostali ciljevi obuhvaćaju razvoj novih ili poboljšanje postojećih analitičkih metoda za detekciju histamina, izvještavanje o sadržaju biogenih amina u proizvodima iz različitih zemalja i regija te

određivanje sadržaja biogenih amina u svrhu kontrole efikasnosti metoda razvijenih u pripremi, skladištenju i pakiranju hrane (Erim, 2013). Histidin-dekarboksilaza se uglavnom inaktivira pri temperaturi iznad 65 °C. Upravo zato je koncentracija biogenih amina prilikom kuhanja 4-10 puta niža nego prilikom soljenja i sušenja (Bogdanović i sur., 2009). Kad histamin jednom nastane nije u jednakoj mjeri raspoređen na svakom mjestu u ribi (Slika 3.).



**Slika 3.** Raspodjela histamina u mesu ribe (Šimat, 2011)

Pretpostavlja se da službene statistike ne prikazuju realan broj slučajeva histaminskog trovanja jer se često puta njegovi simptomi zamjenjuju s preosjetljivošću na morske ribe, rakove, mekušce i druge plodove mora (Singh i sur., 2012; Cuculić i sur., 1984; Lin i sur., 2012). Također se simptomi histaminskog trovanja često mogu zamijeniti s trovanjem vrsta roda *Salmonella sp.* (Yesudhasan i sur., 2013) pa se opravdano pretpostavlja da je prijavljeni broj oboljelih samo “vrh ledene sante” (Mulić i sur., 2004).

Dominantni simptomi histaminskog trovanja vezani su uz kožne manifestacije (crvenilo praćeno žarenjem i znojenjem), glavobolje, mučnine, pritisak u prsima uz smetnje disanja praćeno crvenilom očiju te slabošću (Bakašun i sur., 1985). Inkubacijski period kod histaminskog trovanja je u trajanju od 5 minuta do sat vremena, dok simptomi traju od nekoliko sati do 24 sata.

Jedina učinkovita metoda sprječavanja nastajanja histamina u morskoj ribi je skladištenje ribe na temperaturi nižoj ili jednakoj 4,4 °C u svakom trenutku od ulova do potrošnje (CDC, 2008). To se posebice odnosi na ribu koja je izložena višim temperaturama vode i zraka.

Potrebno je poduzeti određene mjere koje imaju ključnu ulogu u prevenciji nastanka histamina:

- Općenito, ribu staviti na led, u rashlađenu morsku vodu ili salamuru temperature 4,4 °C ili niže unutar 12 sati nakon smrti ili u rashlađenu morsku vodu ili salamuru temperature 10 °C ili niže unutar 9 sati nakon smrti (Smajlović i sur., 2008).

- Ribu, koja je bila izložena zraku ili vodi čija je temperatura bila viša od 28,3 °C, staviti na led, u rashlađenu morsku vodu ili salamuru temperature 4,4 °C ili niže unutar 6 sati nakon smrti.

- Ribu, koja je zamrznuta je potrebno u što kraćem roku preraditi nakon odmrzavanja.

- Kako bi se spriječila rekontaminacija potrebno je provoditi čišćenje i dezinfekciju pogona i opreme, higijenu zaposlenika, izbjegavati križanja putova u proizvodnom pogonu.

- Kontrola sirovine i finalnog proizvoda kako bi se osigurala zdravstvena ispravnost.

Veće koncentracije biogenih amina mogu prouzročiti toksične učinke pa su zbog toga Zakonom o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima hrane NN 81/2013 propisane njihove maksimalne koncentracije u hrani (Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima hrane, 2013)

Prema Uredbi EZ 2073/2005 proizvodi ribarstva od ribljih vrsta i proizvodi od istih ribljih vrsta koji su obrađeni enzimatskim dozrijevanjem u salamuri povezanih sa visokom količinom histidina (Tablica 1.), a 9 uzoraka po šarži moraju udovoljavati slijedećim uvjetima:

- Ustanovljena srednja vrijednost sadržaja histamina  $\leq 100$  mg/kg

- Za 2 od 9 uzoraka dopuštena je dvostruko veća količina histamina, ali ne veća od 200 mg/kg

- Nema ustanovljenih vrijednosti koje prelaze granicu od  $\geq 400$  mg/kg

**Tablica 1.** Histamin - uzorkovanje, metoda određivanja i dozvoljene granice (Uredba EZ o mikrobiološkim kriterijima za hranu, 2005)

Kategorija hrane	Mikroorganizmi /njihovi toksini, metaboliti	Granične vrijednosti		Ispitna referentna metoda	Faza u kojoj se kriterij primjenjuje
		min	max		
Proizvodi ribarstva od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina	<i>Histamin</i>	100 mg kg <sup>-1</sup>	200 mg kg <sup>-1</sup>	HPLC	Proizvodi stavljeni na tržište tijekom njihovog roka trajanja
Proizvodi ribarstva obrađeni enzimskim dozrijevanjem u salamuri, proizvedeni od ribljih vrsta povezanih s visokom količinom histidina	<i>Histamin</i>	200 mg kg <sup>-1</sup>	400 mg kg <sup>-1</sup>	HPLC	Proizvodi stavljeni na tržište tijekom njihovog roka trajanja

Američki ured za kontrolu hrane i lijekove u SAD-u revidirao je kontrolnu točku koncentracije histamina u ribi s visokom količinom histidina na  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  (FDA, 2011).

Potreba za pouzdanim i efikasnim metodama za detekciju i kvantifikaciju histamina i drugih biogenih amina u ribi i proizvodima mora javlja se kako bi se bolje razumjelo i upravljalo nastankom ovih spojeva u ribi i proizvodima mora (Šimat, 2010). Analitičke metode za determinaciju biogenih amina mogu pomoći u identifikaciji bakterija odgovornih za njihov nastanak (Dalgaard i Emborg, 2009).

Senzorska ocjena svježine ribe prema određenim senzorskim parametrima (izgled kože, škrge, očiju, miris, tekstura mesa i tvrdoća, itd.) je najčešće korištena metoda kontrole prilikom prijema ribe na preradu. Prema tim parametrima se riba svrstava u određenu kategoriju kvalitete što određuje njenu prikladnost za preradu. Ova metoda nije pouzdana za procjenu sadržaja histamina, jer se u nekim slučajevima histamin može vrlo brzo razviti, kao kod izlaganja ribe visokim temperaturama, te prije nego se može detektirati kvarenje ribe senzorskim parametrima poput izgleda i mirisa.

Kontrola temperature i vremena od ulova do prijema na preradu je još jedna od metoda koja se često primjenjuje u industriji. No, ni ona ne može poslužiti kao precizan pokazatelj količine histamina u ribi jer daje grube orijentacijske vrijednosti.

Već se dugi niz godina razvija veliki broj laboratorijskih analitičkih metoda za analizu histamina koje se uglavnom temelje na kromatografskim postupcima. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je najčešće primjenjivana metoda. Koristi se za analizu histamina pri kojoj se on ekstrahira iz tkiva ribe pogodnim otapalom nakon čega je potrebno provesti derivatizaciju.

Ionska kromatografija, tankoslojna kromatografija, kapilarna elektroforeza, fluorometrijske metode, plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom (LC-MS) spadaju u ostale skupine laboratorijskih metoda. Njihove prednosti su preciznost, ponovljivost, robusnost i točnost, no primjena im je uglavnom ograničena na analitičke laboratorije, U industrijskim laboratorijima je ograničenje njihove primjene radi izuzetno skupe laboratorijske opreme i instrumenta, te zahtjevnog i skupog održavanja i osoblja koje mora biti posebno educirano za rad na takvoj opremi.

Razvijene su neke brze metode za određivanje histamina koje su bazirane na različitim enzimatskim metodama (ELISA), kako bi se olakšala kontrola sadržaja histamina u industriji.

U opremu potrebnu za provođenje ovih metoda spadaju različiti kvalitativni i kvantitativni kitovi koji sadrže potrebne reagense i spektrofotometar kojim se dobiva podatak o količini histamina u uzorku. Nedostatci ovih metoda su u tom što zahtijevaju različite postupke pripreme uzoraka, smanjena točnost kod određivanja histamina u proizvodima dobivenim soljenjem i dozrijevanjem u salamuri, te kitovi nisu prikladni za analize van laboratorija (Janči, 2016).

U Tablici 2. je prikazana usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina.

**Tablica 2.** Najčešće korištene metode za analizu histamina i njihova usporedba (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 - 2h	1 - 2h	1h	1h	1h
<b>Oprema</b>	Fluorometar	HPLC	Spektrofluorometar	Spektrofotometar	Spektrofotometar
<b>Prag kvatifikacije</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

Novo „brze“ metode za analizu histamina se i dalje intenzivno istražuju. One bi trebale biti jednostavne za primjenu u uvjetima industrijskih laboratorija te uz prihvatljive troškove omogućiti kontrolu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu čime bi se poboljšala kvaliteta i sigurnost finalnog proizvoda.

## 2.2. RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA

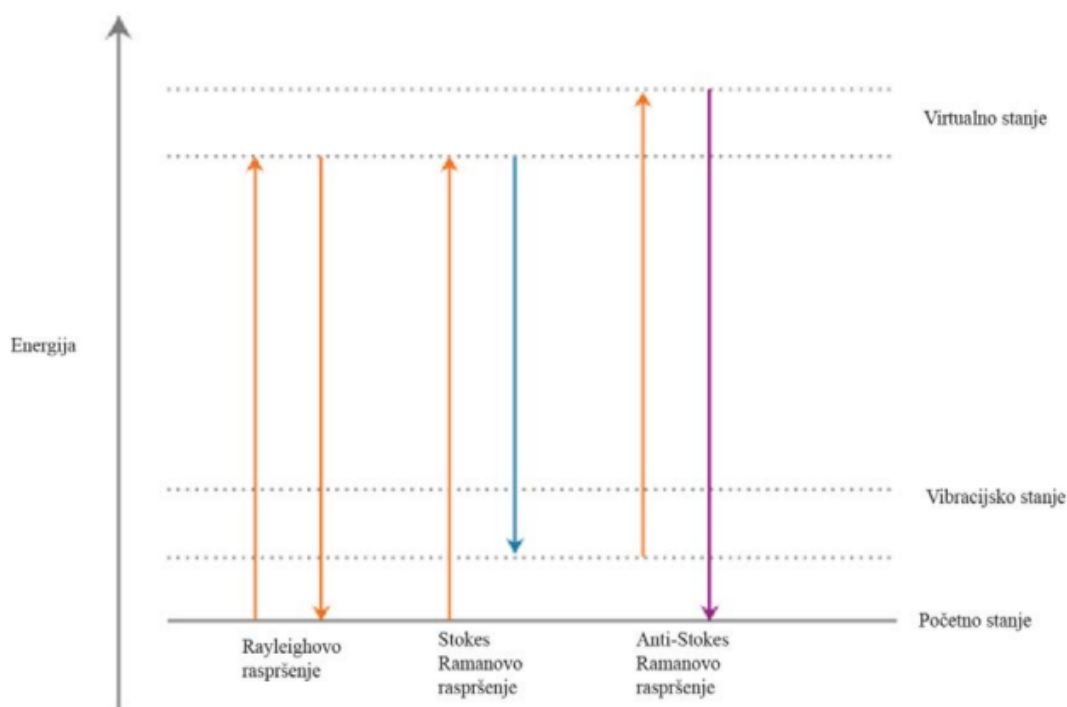
Ramanova spektroskopija se temelji na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja. To se događa uslijed njegove interakcije s vibracijskim modovima molekule. U Ramanovu spektru su molekulske vibracije pri kojima se mijenja polarizabilnost molekule.

Do sada su otkrivene dvije vrste raspršivanja. Najčešći oblik je Rayleighovo raspršenje, dok je Ramanovo raspršenje puno rjeđe. Kod Ramanovog raspršenja, svjetlost tvori kratkoročno stanje koje se naziva „virtualno stanje“, jer reagira s molekulom i polarizira oblak elektrona oko jezgre. Takvo stanje nije stabilno i foton se jako brzo vrati u svoje početno stanje. Ramanovo raspršenje je glavna tehnika kod identifikacije molekula. To je neelastično raspršenje u kojem se razlikuju frekvencije raspršenog i pobuđenog zračenja, dok je Rayleighovo raspršenje elastično raspršenje zračenja pri kojemu su te dvije frekvencije zračenja jednake. Pomoću Ramanovog raspršenja samo jedan od  $10^6 - 10^8$  fotona budu raspršeni, te je zbog toga on manje vjerojatan od Rayleighovog raspršenja (Singh, 2002). Rayleighov proces je najintenzivniji proces jer će se većina fotona raspršiti na takav način (Janči, 2016).

Stokesovo raspršenje je pojava kod koje je početni vibracijski nivo molekule u osnovnom elektronskom stanju niži od onog nakon emisije fotona, prilikom čega je emitirani foton veće valne duljine od pobuđenog fotona. Kod anti-Stokesovog raspršenja pobuđena molekula iz višeg vibracijskog nivoa se vraća u niži nivo osnovnog elektronskog stanja, pri čemu emitirani foton ima manju valnu duljinu od pobudnog. Na slici 4. su prikazani osnovni procesi koji se događaju kod jedne vibracije.

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





**Slika 4.** Mehanizmi različitih procesa raspršenja svjetla (Smith i Dent, 2005).

Ramanova spektroskopija ima prednosti pred drugim tehnikama analize budući da izvor svjetlosti tj. laser penetrira i kroz debelo staklo što otvara mogućnost mjerenja pod velikim pritiskom i visokim temperaturama. Na taj način se mogu analizirati i burne kemijske reakcije, no treba paziti da površina mjerenja spektrometra bude dovoljno velika i obuhvati tako velike uzorke (Cindrić, 2016). Ramanov spektar se može koristiti za identifikaciju, a i u nekim slučajevima kvantifikaciju, pojedinog analita. Brza analiza uzoraka u svim agregatnim stanjima i uz minimalnu pripremu uzoraka je još jedna od mogućnosti koju pruža Ramanova spektroskopija. Razlog što ona nije vodeća tehnika spektroskopijske analize je problem s fluorescencijom koja se ovdje često javlja i ometa analizu (deaktivacija molekule iz pobuđenog u osnovno stanje) jer može u potpunosti zasjeniti Stokesovo raspršenje (Cindrić, 2016). Ramanova spektroskopija zahtijeva visoku koncentraciju analita u uzorku, npr. 0,03 – 0,1 mol L<sup>-1</sup> kod analize proteina ili nukleinskih kiselina (Peticolas, 1995) budući da pojava fluorescencije i fotodegradacija uzorka ograničavaju maksimalnu snagu izvora svjetlosti. Razvojem Fourierove Transformacije Ramanove Spektroskopije (FTRS) se otvara velik broj mogućnosti napretka u tom polju tehnologije.

Slaba osjetljivost metode je jedan od najvećih nedostataka Ramanove spektroskopije. Za povećanje osjetljivosti se koriste specifične tehnike kao što su rezonantna Ramanova

spektroskopija (RRS) i spektroskopija površinski pojačanog raspršenja (SERS) (Janči, 2016). Rezonantno raspršeno zračenje je  $10^2$  do  $10^4$  puta intenzivnije od normalnog Ramanovog raspršenja (Ratkaj, 2013). Koristi se pri istraživanju različitih tvari, među kojima i biološki važnih molekula, virusa i stanica. Za postizanje rezonancije se koriste laseri zračenja manjih valnih duljina od uobičajenog za Ramanovu spektroskopiju, bliskog i vidljivog infracrvenog zračenja. Laseri velike energije (pogotovo one u ultraljubičastom dijelu spektra) mogu uzrokovati raspad uzorka i pojavu fluorescencije (Ratkaj, 2013).

### **2.2.1 Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS)**

Drugi način povećanja osjetljivosti, osim rezonantnog Ramanovog raspršenja, je efekt površinski pojačanog Ramanovog raspršenja koji proizlazi iz efekta pojačanja raspršenog zračenja molekula analita koje se nalaze u neposrednoj blizini površine metalnih nanostrukture. Taj efekt su 1974. godine otkrili Fleischmann, Hendra i McQuillan primjetivši da je Ramanov spektar molekule piridina adsorbirane na srebrnoj elektrodi neobično visokog intenziteta (Fleischmann i sur., 1974).. Ubrzo su ponuđena i teorijska objašnjenja ovog fenomena (Albrecht i Creighton, 1977; Jeanmaire i Van Duyne, 1977), te se istraživanje površinski pojačanog Ramanovog raspršenja proširilo, uz srebro, i na druge metale, kao što su zlato, bakar, platina, aluminijski i alkanski metali. SERS tehnika se može primijeniti u različitim granama prirodnih znanosti, te je to najvažniji razlog za njen razvoj.

Osjetljivost Ramanove spektroskopije povećava se pojačanjem intenziteta raspršenog zračenja molekule na metalnom supstratu i omogućava se strukturna analiza molekula na temelju vibracijskog spektra. Spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja je i idealna detekcijska tehnika za istraživanje različitih kemijskih i bioloških sustava, jer uz izuzetnu osjetljivost pruža i informacije o strukturi molekula. Kao dodatna prednost te spektroskopije je i eliminacija fluorescencije molekula blizu metalne površine, uslijed prijenosa energije s molekule na metal (Etchegoin i Le Ru, 2010).

Elektromagnetski mehanizam i mehanizam prijenosa naboja su dvije opće prihvaćene teorije koje objašnjavaju fenomen pojačanja raspršenja. Smatra se da elektromagnetsko pojačanje značajnije pridonosi ukupnom pojačanju. Osnova teorije elektromagnetskog mehanizma je pojačanje signala koje proizlazi iz pojačanja polja pobuđenog i raspršenog zračenja. On ne zahtijeva direktnu vezu analita i metalne površine kako bi se opazio SERS signal, već

smještanje molekule blizu površine metala (Ratkaj, 2013). Često nije niti moguć direktan kontakt analita i SERS supstrata, zbog molekula receptora koje su primarno vezane na metalni supstrat (Janči, 2016).

SERS supstrat je bilo koja metalna nanostruktura koja omogućuje površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja i do danas su najčešće korišteni i najbolje istraženi SERS supstrati: suspenzije metalnih nanočestica. Pojavile su se ubrzo nakon otkrića SERS efekta na srebrnoj elektrodi. Jednostavnost njihove pripreme, jednostavna oprema, dobar faktor pojačanja te stabilnost su neke od prednosti ovih supstrata. Također, oni i pružaju mogućnost postizanja velikih faktora pojačanja tako da su i neki od najvažnijih pomaka u području SERS spektroskopije, kao što je detekcija jedne molekule, prvi put dokumentirani u pokusima na kolodnim suspenzijama metalnih čestica u vodi (Kneipp i sur., 1997) ili imobiliziranim na krutim podlogama (Nie i Emory, 1997).

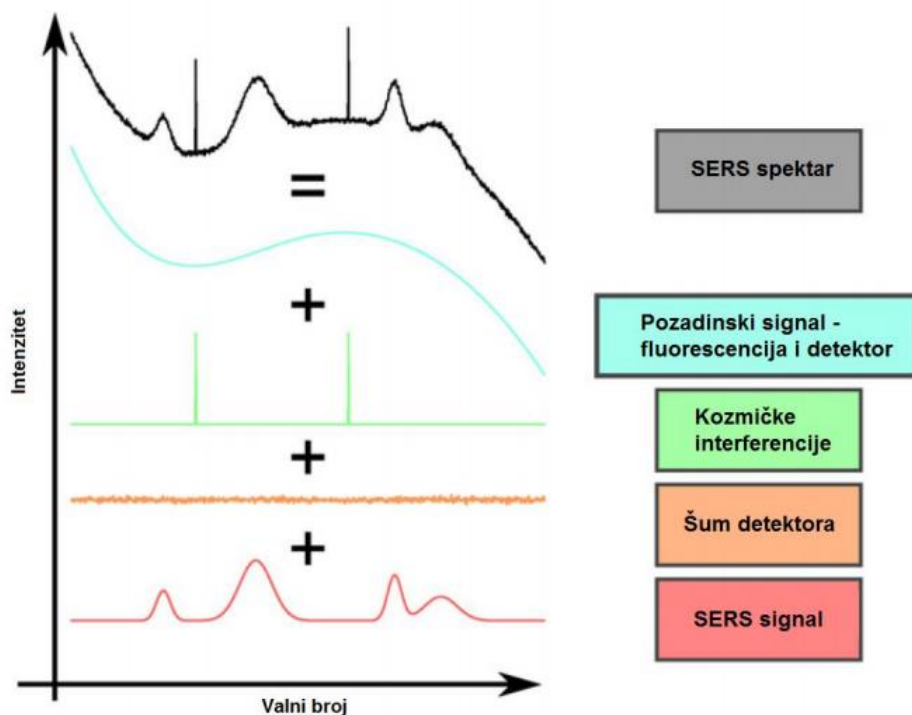
Zbog čestih odstupanja i razlika između SERS i normalnog Ramanovog spektra pojedinog analita, interpretacija SERS spektra i asignacija SERS vrpce pojedinim vibracijskim modovima nije jednostavna ni izravna (Janči, 2016). Kod SERS spektra se često pojavljuju nove vrpce što je karakteristično za molekule koje su adsorbirane direktno na površinu metala. Takve vrpce nisu vidljive u normalnom Ramanovom spektru (Janči, 2016). Neke vrpce koje su vidljive u normalnom Ramanovom spektru mogu nestati ili može doći do drastične promjene relativnih intenziteta pojedinih SERS vrpce. To se događa uslijed različite orijentacije molekula u odnosu na površinu metala (Janči, 2016).

Mehanizam prijenosa naboja ili kemijski mehanizam zahtijeva da molekule budu adsorbirane direktno na površinu metala. Taj mehanizam objašnjava razlike u relativnim intenzitetima i položajima SERS vrpce u odnosu na one u normalnom Ramanovom spektru, kao i razlike u teorijskim i eksperimentalnim faktorima pojačanja i pojavu novih vrpce u SERS spektru (Theophanides i sur., 1993). Kemijski mehanizam doprinosi ukupnom faktoru pojačanja za  $10 - 10^3$  puta. Iako sam mehanizam pojačanja nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da je molekula u blizini metalne površine pod utjecajem znatno snažnijeg električnog polja. Do pojačanja Ramanovog raspršenja od  $10^3$  do  $10^7$  puta dolazi zbog elektromagnetskog mehanizma pojačanja kao i kemijskog mehanizma koji se temelji na promjeni polarizabilnosti zbog interakcije molekule i metalne površine (Yuen i sur., 2008).

Faktor pojačanja (eng. *Enhancement factor*, EF) tj. njegov način izračuna je predložen jer se napretkom znanosti u području SERS spektroskopije i razvoja novih SERS supstrata pojavila potreba za definiranjem učinkovitosti različitih supstrata te njihove usporedbe.

### 2.2.2. Obrada i analiza SERS spektra

Interpretacija i upotreba SERS spektra može biti vrlo složena, pogotovo za kvantitativne analize. SERS spektar sadrži puno informacija o uzorku i ciljanom analitu, no sadrži i brojne interferencije koje potječu o fluorescencije, drugih komponenti prisutnih u uzorku, kozmičkih interferencija koje nastaju od čestica visoke energije koje refistrira detektor te šuma pozadinskog signala samog detektora (Slika 5.). Apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra je uz sve navedeno ovisna o brojnim parametrima kao što su pomicanje elemenata instrumenta uslijed vibracija, oscilacije snage lasera, itd., koje često nije moguće kontrolirati tijekom eksperimenta. Potrebna je predobrada spektara kako bi eliminirali sve navedene faktore i dobili zadovoljavajuće rezultate.



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

### **2.2.2.1. Korekcija pozadinskog signala**

Više je matematičkih metoda eliminacije pozadinskog signala iz SERS spektra uzorka. Temelje se na različitim teoretskim pristupima problemu poput metoda procjene pozadinskog signala SNIP algoritmom, prilagođavanjem polinoma višeg reda spektru, valne transformacije te izračuna prve ili druge derivacije spektra. Ono što je zajedničko ovim metodama je izrazita ovisnost o odabranim parametrima izračuna. Ti parametri se moraju odrediti tako da se u što većoj mjeri eliminiira pozadinski signal uz minimalne promjene SERS signala u snimljenom spektru (Janči, 2016).

Metoda prilagođavanja polinoma spektru čuva izvorni oblik i intenzitet SERS vrpce, te se upravo ta metoda najčešće koristi pri obradi SERS spektara. Tom metodom se odabire određeni broj točaka na spektru koje nisu u području Ramanovih vrpce i prilagođava polinom  $n$ -tog stupnja odabranim točkama. Nedostatak ove metode je u tome što odabir i broj reprezentativnih točaka, te stupanj polinoma iziskuju puno vremena i podložna je subjektivnim pogreškama (Janči, 2016).

### **2.2.2.2. Korekcija šuma (izgladivanje spektra)**

Digitalni filteri ili prozorske funkcije su matematički algoritmi pomoću kojih se obavlja izgladivanje spektra. Izgladivanje se radi kako bi se postigao bolji omjer signala i šuma. Prvo je potrebno definirati funkciju (srednja vrijednost, derivacija, itd.) i veličinu prozora (broj točaka koje funkcija obrađuje u jednom koraku). Što je veći prozor, spektar će biti više izgladjen (Janči, 2016). U slučaju pretjeranog izgladivanja spektra može doći do gubitka vrpce niskog intenziteta te proširivanja ili pomaka SERS vrpce u spektru (Vandenabeele, 2013) pa treba biti vrlo oprezan sa korištenjem digitalnih filtera.

### **2.2.2.3. Normalizacija spektra**

Postupkom normalizacije se eliminiraju oscilacije apsolutnog intenziteta SERS spektra koji intenzitete snimljenih spektara stavlja u relativan odnos. To je posebno važno kod kalibracije i provođenja kvantitativnih analiza. Postoje brojne metode normalizacije spektra. Te metode uključuju normalizaciju prema minimalnoj i maksimalnoj vrijednosti koja maksimalnoj vrijednosti intenziteta daje vrijednost 1, a minimalnoj 0; normalizacije dijeljenjem intenziteta u svakoj točki spektra sa sumom intenziteta svih točaka u spektru, itd.

Normalizacija metodom normalne standardne varijable se često koristi u kemometrijskim proračunima. Ona daje srednjoj vrijednosti intenziteta spektra vrijednost 0. Upotreba internog standarda je poželjna kod kvantitativnih analiza. U tom slučaju je najbolja metoda normalizacija cijelog spektra na osnovu intenziteta vrpci internog standarda (Bocklitz i sur., 2011).

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. MATERIJALI**

#### **3.1.1. Kemikalije**

Srebrov nitrat, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

Natrijev hidroksid, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

Natrijev klorid, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

Histamin dihidroklorid, p.a. (Sigma-Aldrich d.d., St. Louis, SAD)

Pekloratna kiselina, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

Klorovodična kiselina, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

Izooktan, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

Cikloheksan, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

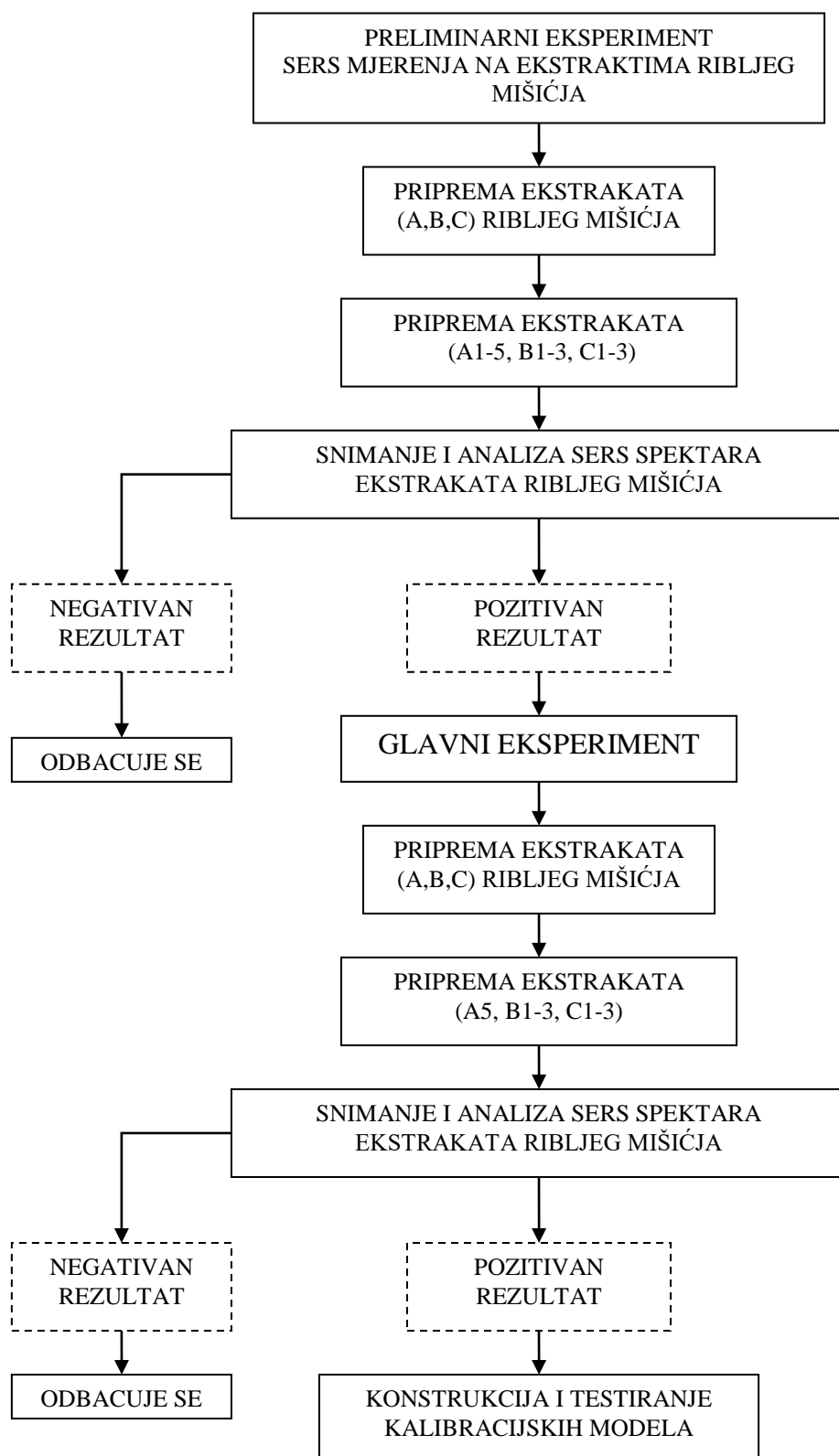
1-butanol, p.a. (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska)

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 svježe palamide (*Sarda sarda*) nabavljeni su na ribarnici te su u poleđenom stanju prevezeni u laboratorij. RIBE su eviscerirane i filetirane te su uklonjene koža i kosti, a mišićno tkivo je usitnjeno i homogenizirano pomoću ručnog sjekača (miksera- HR1611/00, Philips). Na taj način pripremljeni uzorci korišteni su za pripremu ekstrakata za daljnje analize.

### 3.2. Plan istraživanja



**Slika 6.** Plan istraživanja - SERS mjerenja na ekstraktima ribljeg mišićja



### 3.3. METODE RADA

#### 3.3.1. Priprema ekstrakata ribljeg mišićja

U kivete volumena 50 mL odvagano je 5 g usitnjenog ribljeg mišićja kojem je dodan histamin dihidroklorid kako bi se postigle koncentracije od 0, 75, 100, 150, 200, 225, 300, 400 mg kg<sup>-1</sup> ribljeg mišićja. Korišteni su i uzorci za provjeru koji su već sadržavali histamin koji je nastao kvarenjem ribe. Ovako pripremljeni uzorci podvrgnuti su sljedećim postupcima ekstrakcije:

**Ekstrakt A** pripremljen je homogeniziranjem uzorka u 50 mL HClO<sub>4</sub> (0,4 mol L<sup>-1</sup>) na laboratorijskom homogenizatoru (T18 Ultra-Turrax, Ika) tijekom 2 min na maksimalnoj brzini. Homogenat je filtriran kroz Whatman 4 filter papir te je 2 mL filtrata prebačeno u staklenu epruvetu s čepom. Potom je u epruvetu dodano 1,4 g NaCl, 0,4 mL 5 M NaOH i 2 mL 1-butanola, epruveta je začepljena i ekstrakt je miješan na laboratorijskoj tresilici (Vortex 4 basic, Ika) 10 min pri 70 rpm. Po završetku ekstrakcije, uzorak je ostavljen 2 min da se odvoje slojevi.

#### **Priprema ekstrakata A1-5 za pročišćavanje:**

Kod ekstrakta A, samo onog kojem je dodano 200 µL histamina, otpipetirano je 1,5 mL butanolnog bistrog sloja i tako 5 puta u 5 kiveta:

- U kivetu 1 je dodano 300 µL 0,001M HCl
- U kivetu 2 je dodano 300 µL 0,001M HCl i 1,5 mL izooktana
- U kivetu 3 je dodano 300 µL 0,001M HCl i 1,5 mL cikloheksana
- U kivetu 4 je dodano 1,5 mL izooktana i 300 µL vode
- U kivetu 5 je dodano 1,5 mL cikloheksana i 300 µL vode

**Ekstrakt B** pripremljen je homogeniziranjem uzorka u 50 mL NaOH (0,1 mol L<sup>-1</sup>) zasićene s NaCl na laboratorijskom homogenizatoru tijekom 2 min na maksimalnoj brzini. Homogenat je filtriran kroz Whatman 4 filter papir te je 2 mL filtrata prebačeno u staklenu epruvetu s čepom. U epruvetu je dodano 2 mL 1-butanola, epruveta je začepljena i ekstrakt je miješan na laboratorijskoj tresilici 10 min pri 70 rpm. Po završetku ekstrakcije 1-butanolom, uzorak je ostavljen 2 min da se odvoje slojevi.

### **Priprema ekstrakata B1-3 za pročišćavanje:**

Kod ekstrakta B, samo onog kojem je dodano 200  $\mu\text{L}$  histamina, otpipetirano je 1,5 mL butanolnog bistrog sloja i tako 3 puta u 3 kivete:

- U kivetu 1 je dodano 300  $\mu\text{L}$  0,001M HCl
- U kivetu 2 je dodano 1,5 mL cikloheksana i 300  $\mu\text{L}$  vode
- U kivetu 3 je dodano 1,5 mL izooktana i 300  $\mu\text{L}$  vode

**Ekstrakt C** pripremljen je homogeniziranjem uzorka u 50 mL NaOH ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) zasićene sa NaCl na laboratorijskom homogenizatoru tijekom 2 min na maksimalnoj brzini. Homogenat je filtriran kroz Whatman 4 filter papir te je 2 mL filtrata prebačeno u staklenu epruvetu s čepom. U epruvetu je dodano 2 mL 1-butanola, epruveta je začepljena i ekstrakt je miješan na laboratorijskoj tresilici 10 min pri 70 rpm. Po završetku ekstrakcije 1-butanolom, uzorak je ostavljen 2 min da se odvoje slojevi.

### **Priprema ekstrakata C1-3 za pročišćavanje:**

Kod ekstrakta C, samo onog kojem je dodano 200  $\mu\text{L}$  histamina, otpipetirano je 1,5 mL butanolnog bistrog sloja i tako 3 puta u 3 kivete:

- U kivetu 1 je dodano 300  $\mu\text{L}$  0,001M HCl
- U kivetu 2 je dodano 1,5 mL cikloheksana i 300  $\mu\text{L}$  vode
- U kivetu 3 je dodano 1,5 mL izooktana i 300  $\mu\text{L}$  vode

### **3.3.2. Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC)**

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

### **3.3.3. Snimanje i analiza SERS spektara ekstrakata**

Pripremljeni ekstrakti čuvani su u zatvorenim mikrokiveta na temperaturi 4°C do trenutka SERS analize. Neposredno prije analize u mikrokivetu je pipetirano 80 µL AGC koloida, 10 µL otopine NaBH<sub>4</sub> (0,23 mol L<sup>-1</sup>) te je miješano 30 s na laboratorijskoj miješalici nakon čega je uzorak prebačen u staklenu kapilaru. Snimljeno je 10 spektara po uzorku te je za daljnju analizu i izradu kalibracijskih pravaca korišten prosječni spektar od 10 izvršenih mjerenja.

### **3.3.4. Obrada SERS spektara**

Kad se snime, SERS spektre je potrebno i obraditi jer su uz signale analita prisutne i brojne druge tvari u uzorku, šumu, pozadinskom signalu detektora. Apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra ovisi o brojnim parametrima, kao što su npr. oscilacije lasera. Takva je kontrola često zahtjevana tijekom eksperimenta. Optimizacija parametara za korekciju pozadinskog signala, šuma te normalizaciju spektra se provodi kako bi se svi navedeni utjecaji eliminirali. Obrada SERS spektra u programu Labspec 6 (Horiba Scientific) se pokazala kao najbolji način predobrade spektra. "*Baseline correction*" funkcija se koristi za korekciju pozadinskog signala. Radi na principu da je automatski odabrano 40 reprezentativnih točaka u SERS spektru kojima je prilagođen polinom 9. stupnja (eng. *curve fitting*). Procijenjeni pozadinski signal se oduzima od snimljenog spektra, te se zatim SERS spektri izglađe (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. Nakon tog slijedi normalizacija spektra. Kao interni standard je korišten intenzitet vrpce na 1437 cm<sup>-1</sup> prethodno asigniran citratnim ionima prisutnim u AGC koloidu.

### **3.3.5. Mjerenja provedena na Ramanovom spektrometru**

Na Horiba Jobin Yvon T64000 Ramanovom spektrometru (Slika 7.) se provode sva mjerenja. Opremljen je argonskim laserima koji emitiraju zračenje pri valnim duljinama 488 i 514,5 nm, te diodnim laserom valne duljine zračenja 532 nm i baždaren pomoću Ramanove vrpce transverzalnog optičkog moda silicijske pločice površinske orijentacije <111> na 520,7

$\text{cm}^{-1}$ . Mjerenja na tekućim uzorcima provedena su u staklenim kapilarama promjera 2 mm. Staklene kapilare su smještene u „makro“ komori spektrometra.



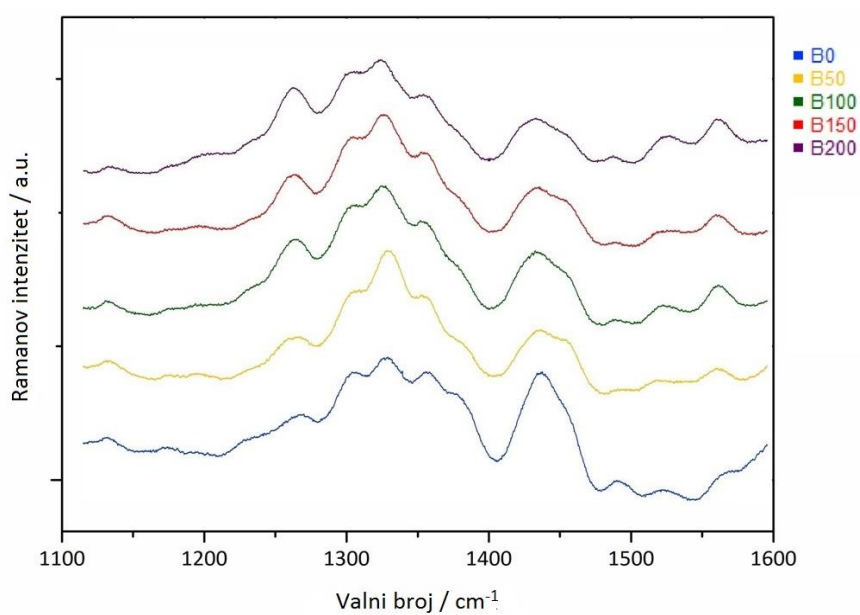
**Slika 7.** Horiba Jobin Yvon T64000 Ramanov spektrometar, Laboratorij za molekulska fiziku Instituta Ruđer Bošković (Janči, 2016)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

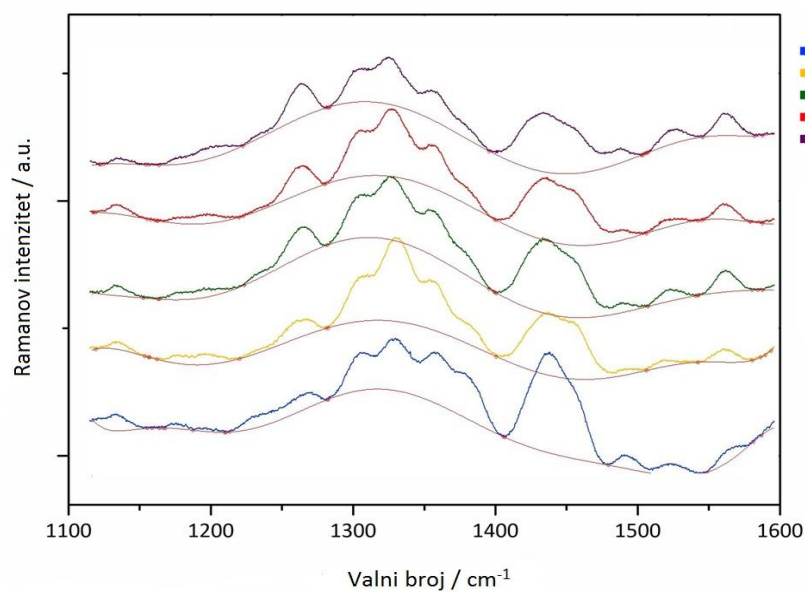
### 4.1. SERS ANALIZA

Nakon snimanja SERS spektara isprobano je više načina predobrade spektara. Najbolje rezultate dala je predobrada s parametrima navedenim u poglavlju Materijali i metode. Svaka predobrada rađena je u programu Labspec 6 (Horiba Scientific). Obrada spektara je prikazana na slici 8.

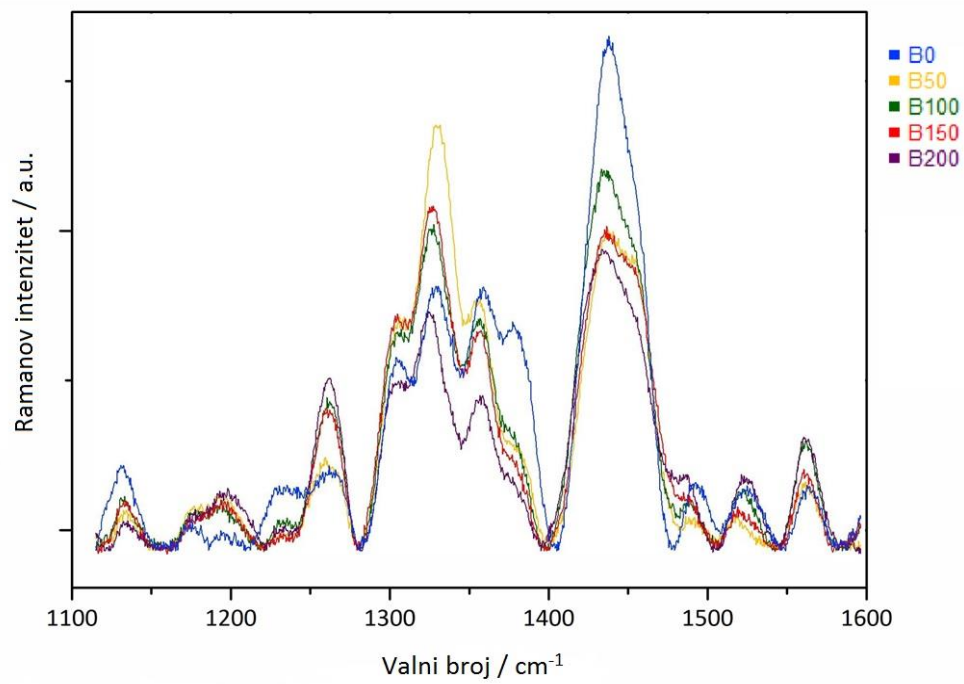
a)



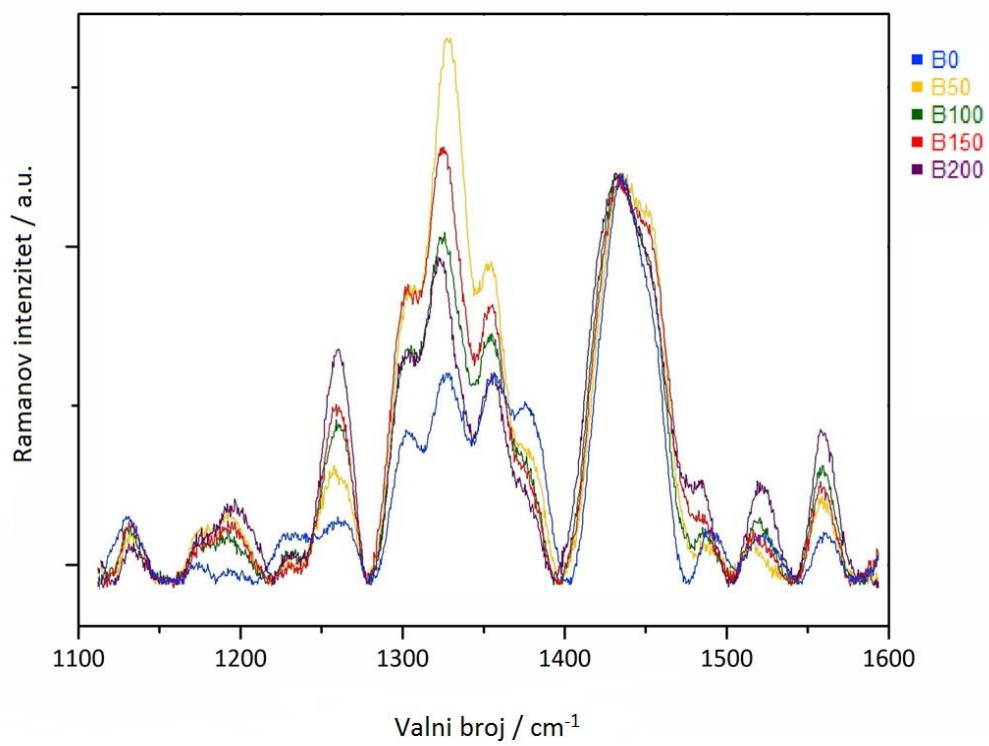
b)



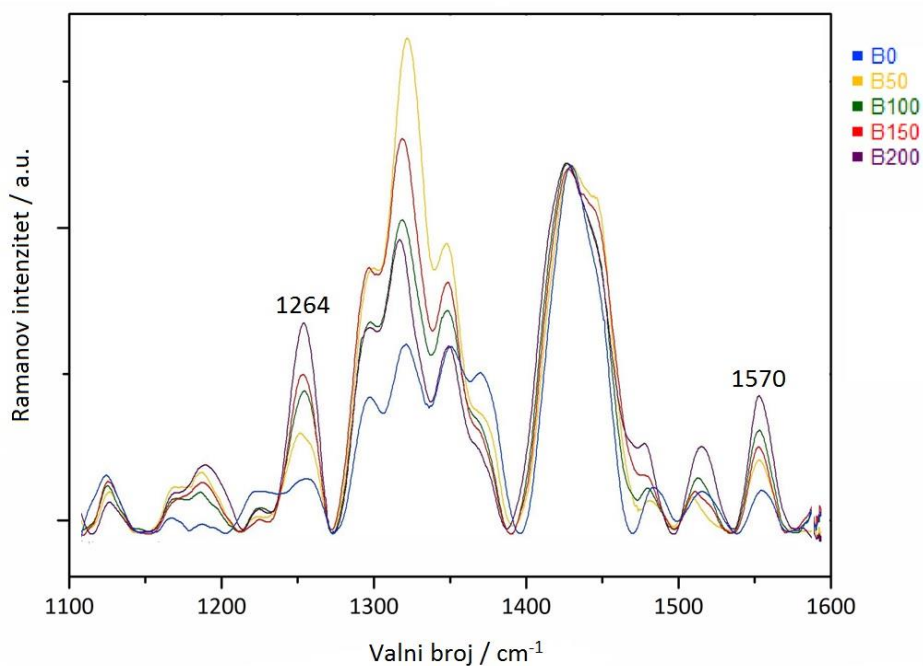
c)



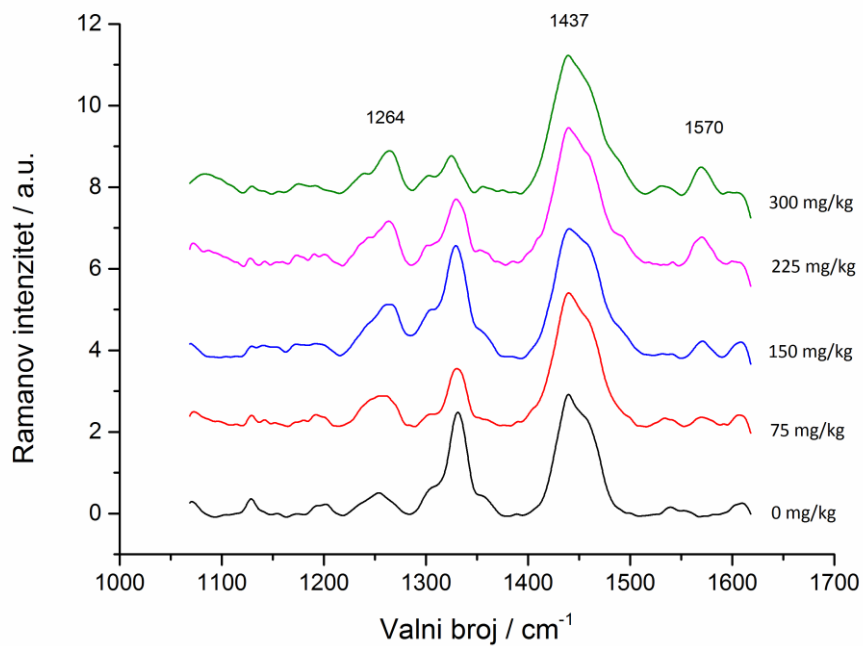
d)



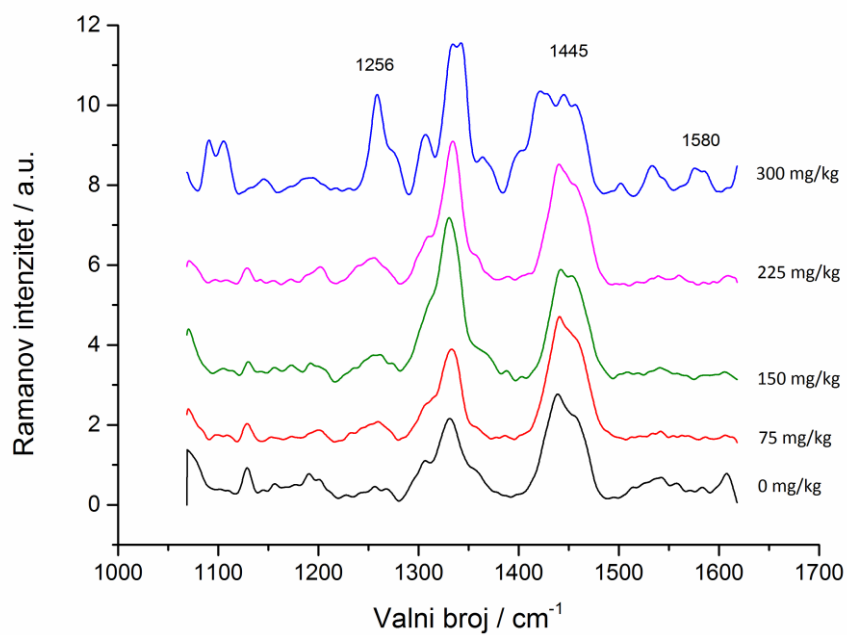
e)



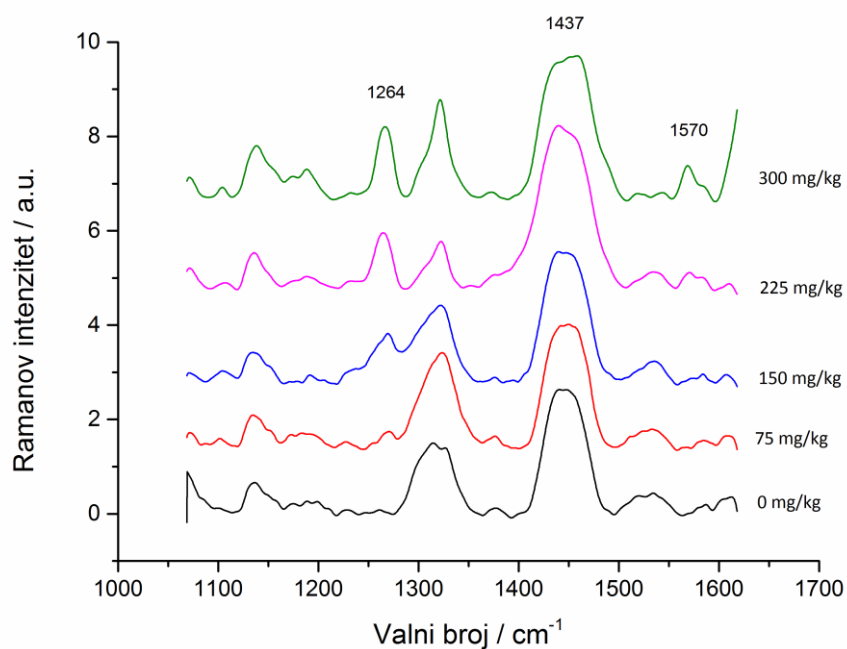
**Slika 8.** Obrada spektara: a) neobrađeni SERS spektar, b) korekcija pozadinskog signala - aproksimacija bazne linije, c) korekcija pozadinskog signala - oduzimanje aproksimiranog pozadinskog signala, d) normalizacija spektra, e) korekcija šuma



**Slika 9.** SERS spektar ekstrakta A u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg<sup>-1</sup>, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm<sup>-1</sup>

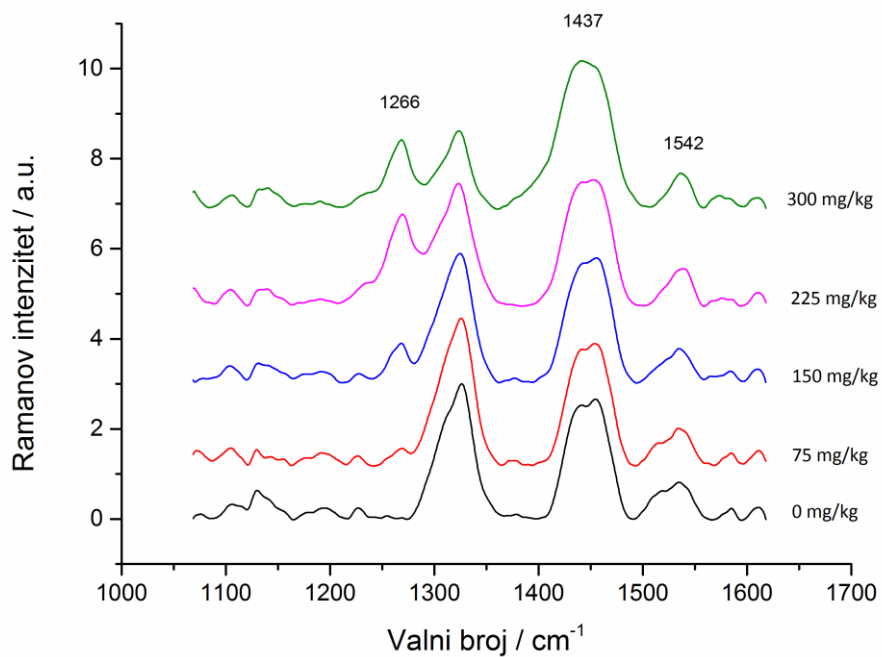


**Slika 10.** SERS spektar ekstrakta A5 u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg<sup>-1</sup>, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm<sup>-1</sup>

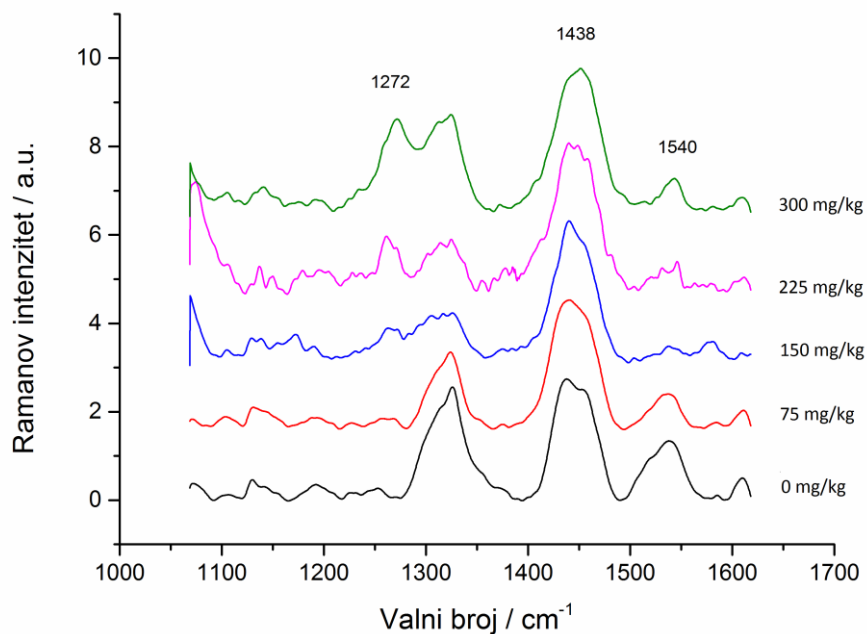


**Slika 11.** SERS spektar ekstrakta B1 u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg<sup>-1</sup>, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm<sup>-1</sup>

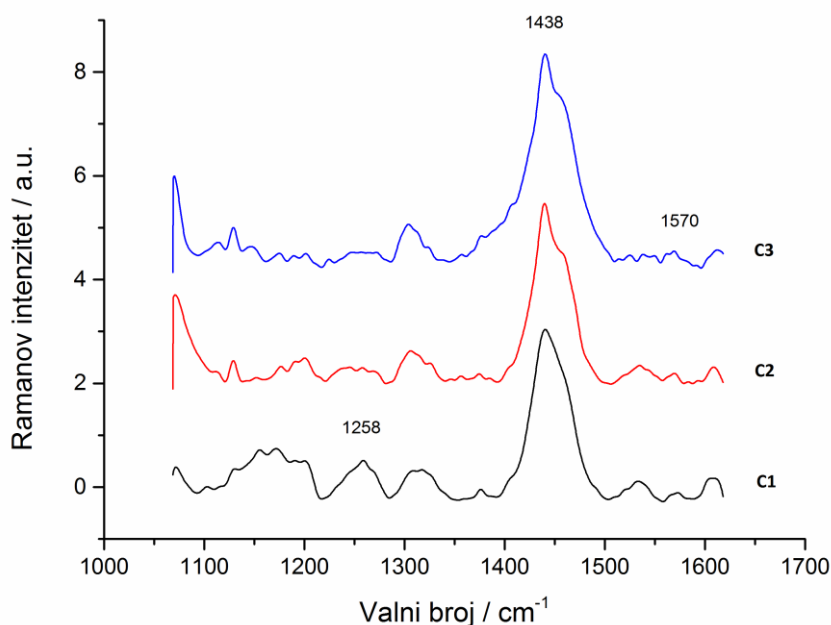




**Slika 12.** SERS spektar ekstrakta B2 u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg<sup>-1</sup>, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm<sup>-1</sup>



**Slika 13.** SERS spektar ekstrakta B3 u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg<sup>-1</sup>, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm<sup>-1</sup>

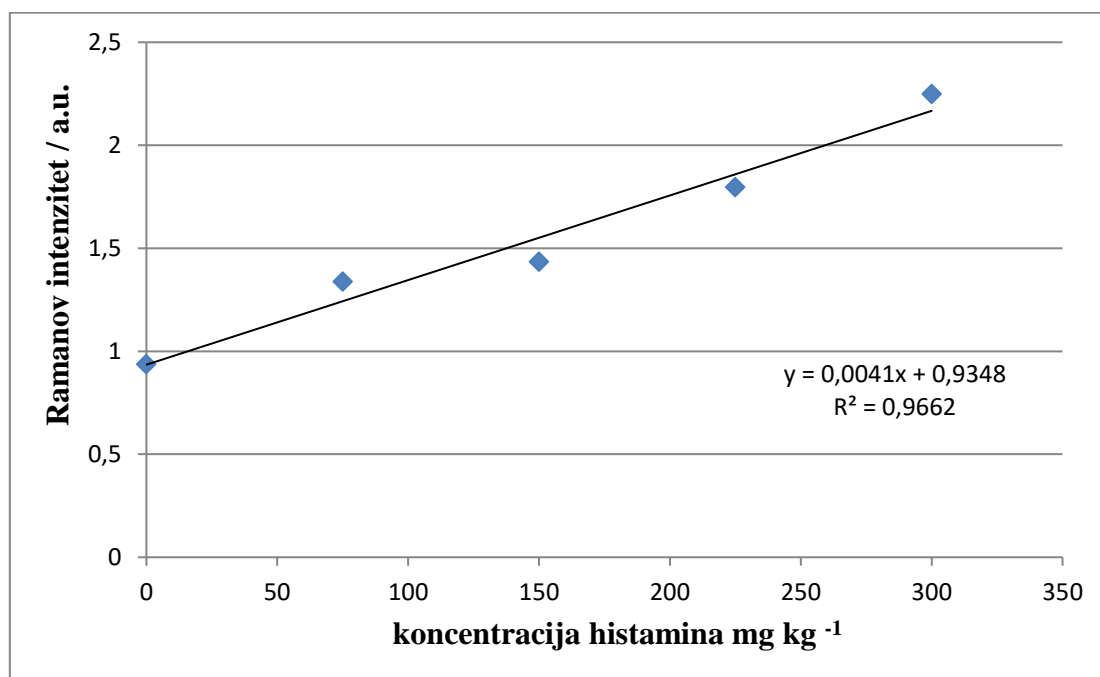


**Slika 14.** SERS spektar ekstrakata C1, C2, C3, s koncentracijom histamina  $300 \text{ mg kg}^{-1}$ , normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na  $1437 \text{ cm}^{-1}$

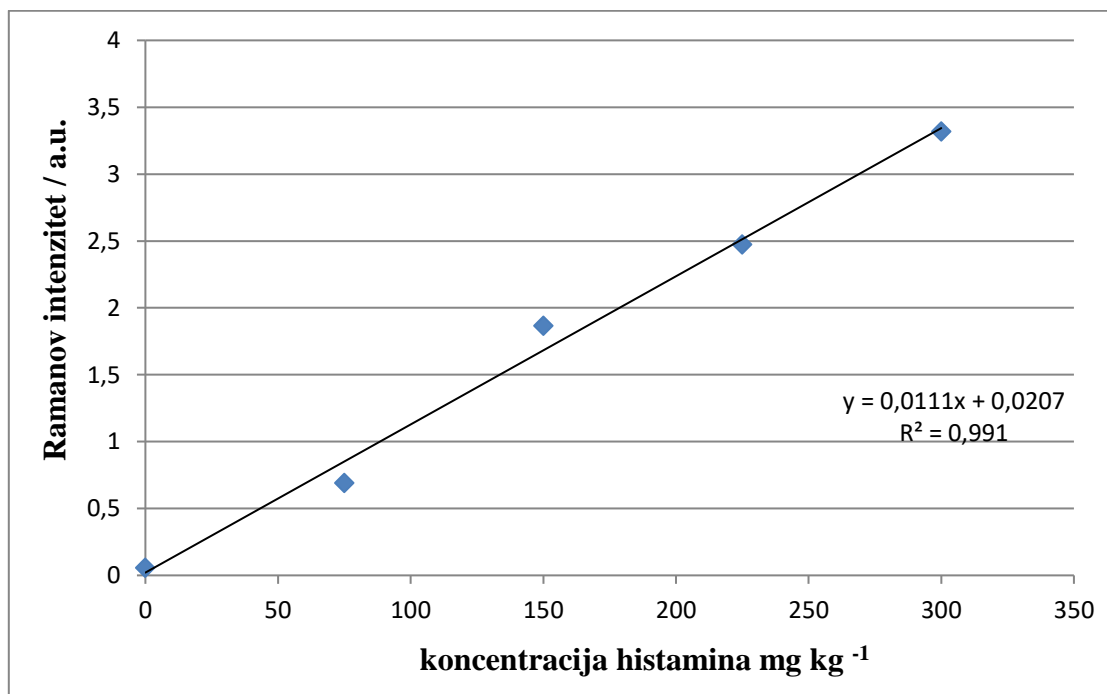
Nakon obrade prikazanih spektara izrađen je baždarni pravac. Dodane koncentracije histamina u baždarnim uzorcima su iznosile 0, 75, 150, 225 i  $300 \text{ mg/kg}$ . Za izradu kalibracijskih modela korištene su srednje vrijednosti (10 mjerenja za svaku koncentraciju) intenziteta vrpce histamina na  $1264$  i  $1570 \text{ cm}^{-1}$  te je baždarni pravac konstruiran metodom linearne regresije. Valjanost kalibracijskih modela procijenjena je na osnovi koeficijenta korelacije ( $R^2$ ). Baždarni pravci prikazani su na slikama 15.-18.

## EKSTRAKT A

a)



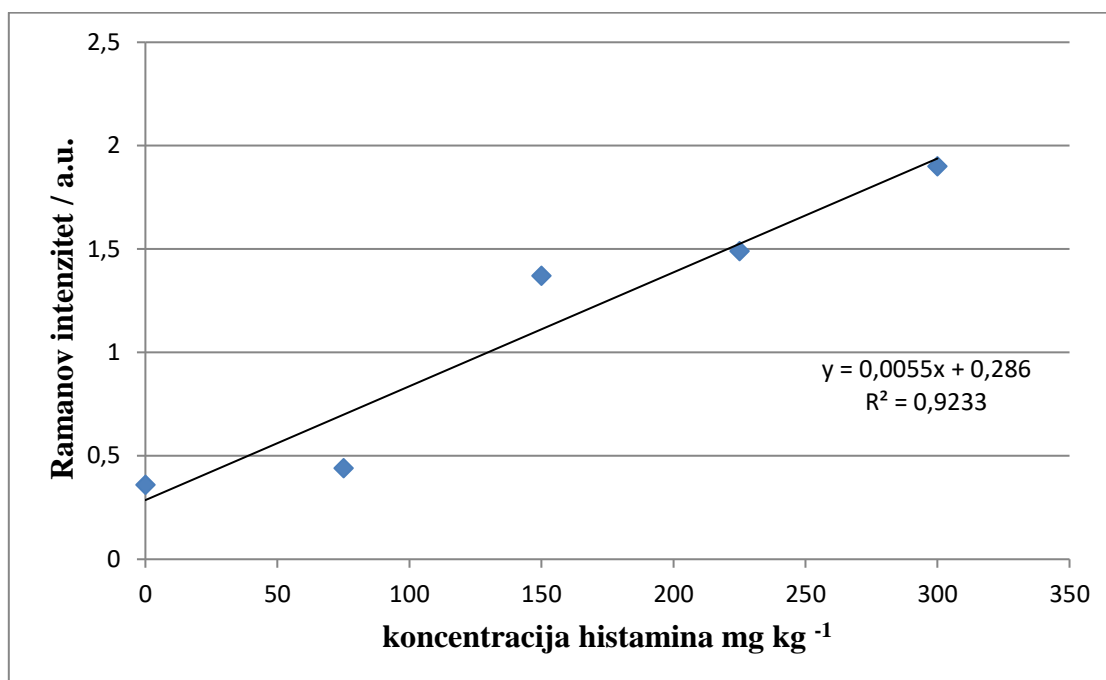
b)



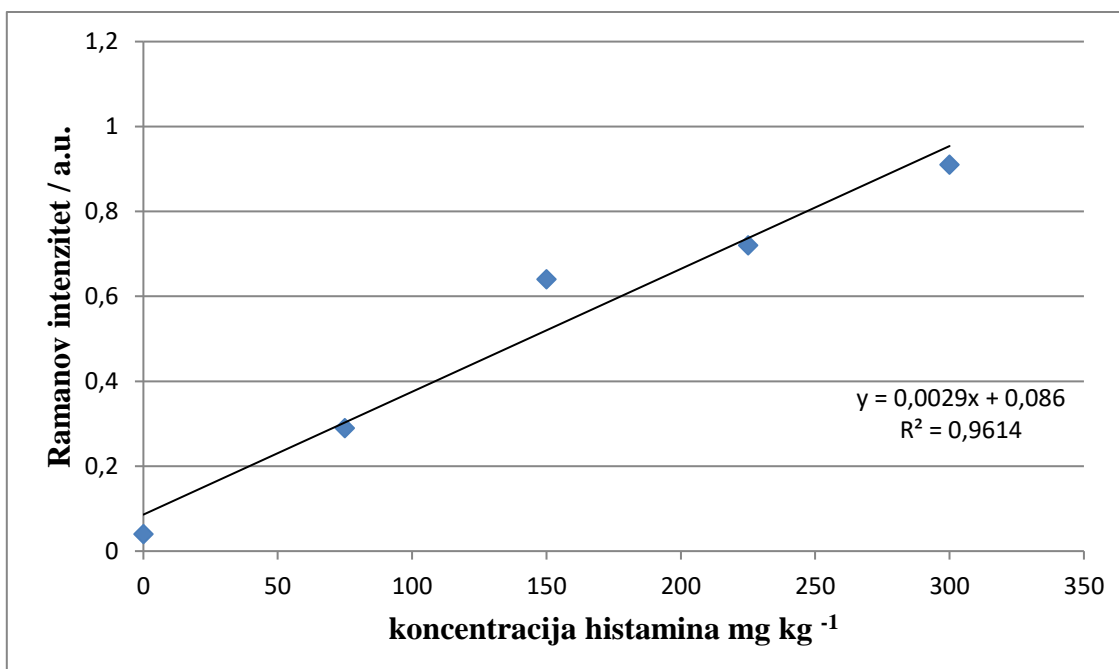
**Slika 15.** Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina (0-300) a) na 1264 cm<sup>-1</sup>;  
b) na 1570 cm<sup>-1</sup>

## EKSTRAKT B1

a)



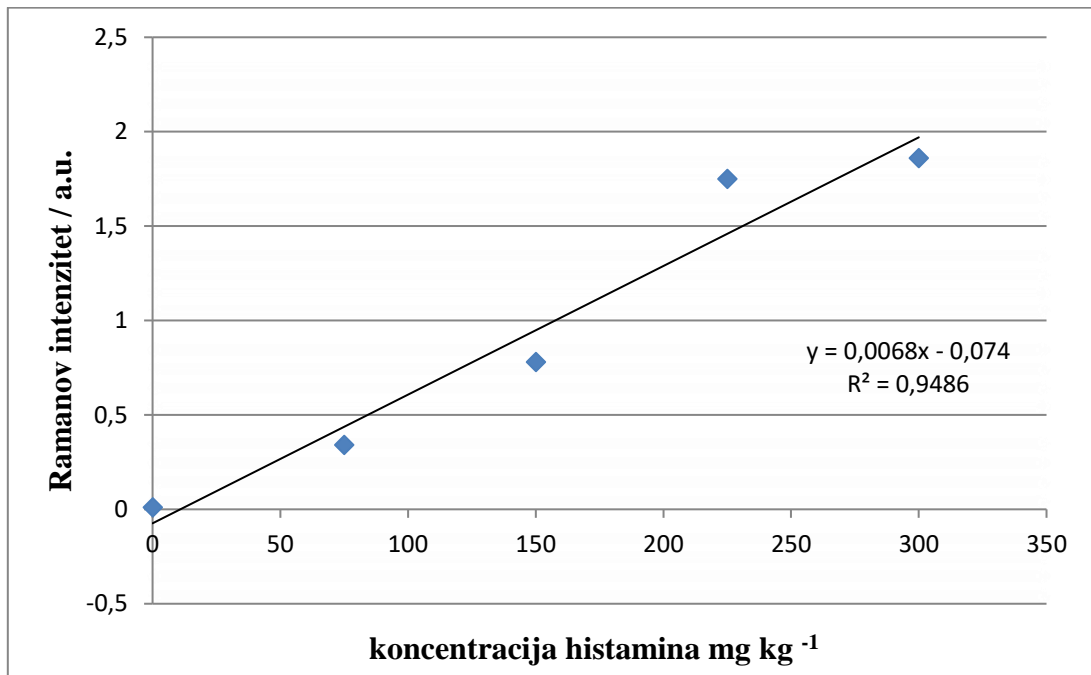
b)



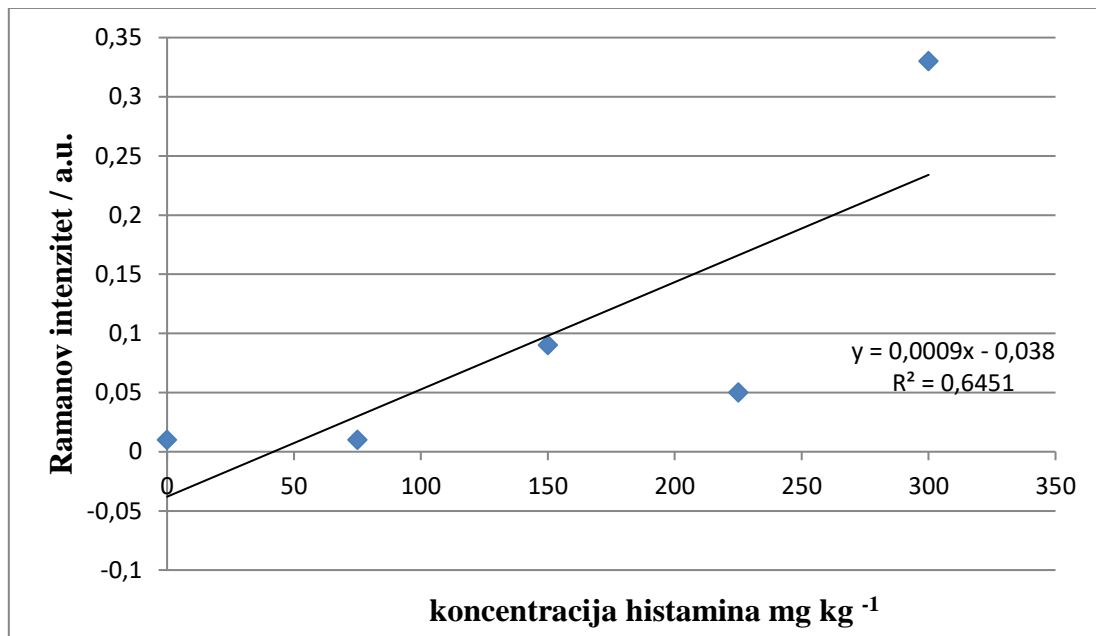
**Slika 16.** Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina (0-300) a) na 1264 cm<sup>-1</sup>;  
b) na 1570 cm<sup>-1</sup>

## EKSTRAKT B2

a)



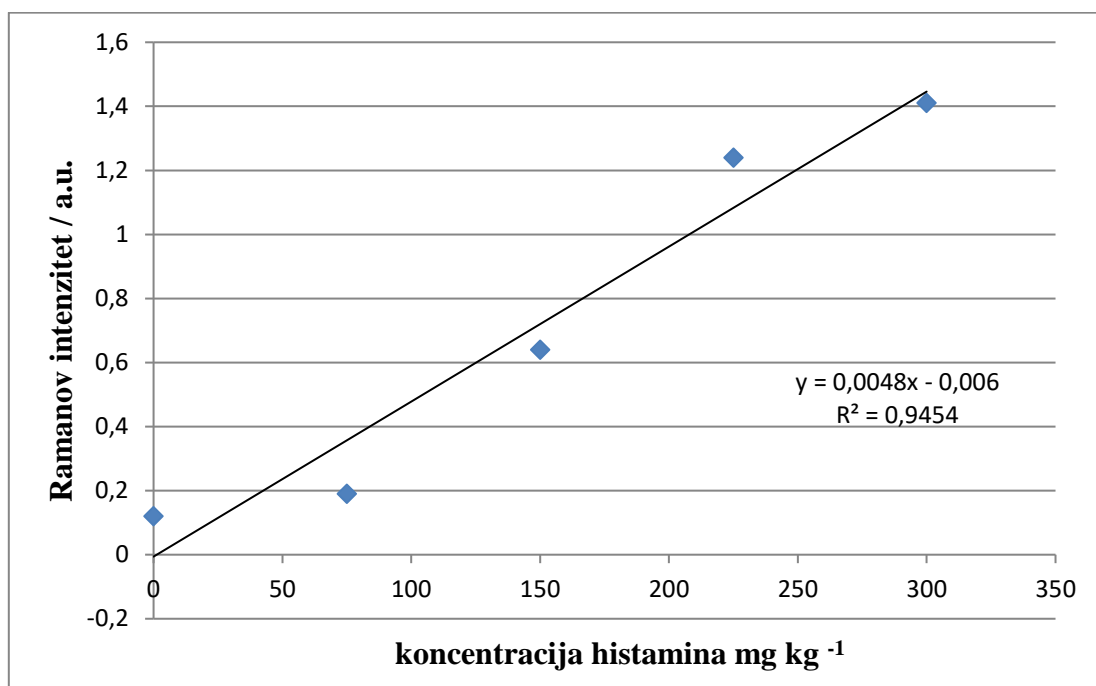
b)



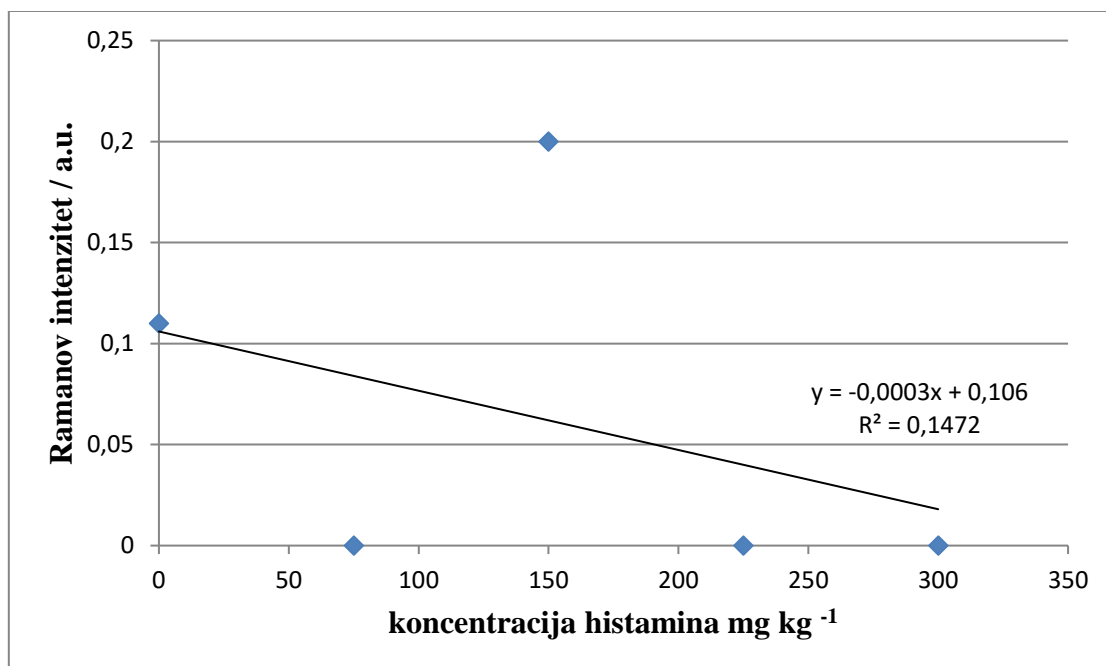
Slika 17. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina (0-300) a) na 1264 cm<sup>-1</sup>;  
b) na 1570 cm<sup>-1</sup>

## EKSTRAKT B3

a)



b)



**Slika 18.** Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina (0-300) a) na 1264 cm<sup>-1</sup>;  
b) na 1570 cm<sup>-1</sup>

**Tablica 3.** Usporedba rezultata određenih parametara postignutih za različite ekstrakte

<b>Ekstrakt</b>	<b>Vrpca histamina (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Koeficijent koleracije (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Rezultati uzorka za provjeru (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Točnost (%)</b>
<b>A</b>	1264	<b>0,9662</b>	<b>37,2</b>	<b>93,94</b>
	1570	<b>0,991</b>	<b>38,7</b>	<b>97,73</b>
<b>A5</b>	1264	-	-	-
	1570	-	-	-
<b>B1</b>	1264	<b>0,9233</b>	<b>33,4</b>	<b>84,34</b>
	1570	<b>0,9614</b>	<b>37,2</b>	<b>93,94</b>
<b>B2</b>	1264	<b>0,9486</b>	<b>37,8</b>	<b>95,45</b>
	1570	<b>0,6451</b>	<b>48,3</b>	<b>121,97</b>
<b>B3</b>	1264	<b>0,9454</b>	<b>35,6</b>	<b>89,9</b>
	1570	<b>0,1472</b>	-	-
<b>C1 - C3</b>	1264	-	-	-
	1570	-	-	-

U preliminarnom eksperimentu je za pripremu ekstrakta A, B i C odabrana metoda ekstrakcije tekuće – tekuće pomoću 1 - butanola koji se uobičajeno koristi za ekstrakciju histamina iz vodenih otopina zahvaljujući činjenici da se histamin ekstrahira u butanolni sloj pri određenom pH i povišenoj ionskoj jakosti uslijed dodatka različitih topivih soli (McIntire i sur., 1947).

Postupci pročišćavanja relativno su složeni i nakon ekstrakcije 1 - butanolom zahtijevaju dodatnu ekstrakciju krutom fazom (McIntire i sur., 1947) ili ispiranje te ponovnu ekstrakciju tekuće - tekuće (Lorenz i sur., 1987) kako bi se histamin vratio u vodenu fazu pogodnu za daljnju analizu.

U glavnom eksperimentu je odabrano pročišćavanje metodom tekuće – tekuće i to dodatkom HCl, izooktana ili cikloheksana u izdvojeni butanolni sloj, prema opisanim postupcima u metodi rada, kako bi se izbjegao postupak uparavanja i skratila SERS metoda, te se histamin uspješno detektirao.

U preliminarnom eksperimentu (rezultati nisu prikazani) uzorci A1 – 4 nisu dali poželjne rezultate, pa se u glavnom eksperimentu koristio samo uzorak A5 (ekstrakcija sa HCl-om i vodom).

Od ostalih ekstrakata iz preliminarnog eksperimenta za daljnje su istraživanje, tj. glavni eksperiment korišteni ekstrakti B1 - B3 i C1 - C3.

Kako bi se dodatno umanjio utjecaj interferencija na pouzdanost kalibracijskih modela, kalibracija je provedena metodom dodanog standarda pri čemu su u uzorke ribe dodane poznate koncentracije histamina u rasponu od 0 – 300 mg kg<sup>-1</sup>. Uzorci su prema postupcima pripreme prikazanim u metodi rada, te su snimljeni njihovi spektri.

Budući da su u spektrima uzoraka jedino vrpce na 1264 i 1570 cm<sup>-1</sup> jasno razdvojene od ostalih prisutnih vrpca, univarijantni modeli temeljeni su na njihovom intenzitetu. Modeli u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg<sup>-1</sup> konstruirani su metodom linearne regresije.

Na temelju spektara ekstrakata A5, B1 - B3 i C1 - C3 se može zaključiti da su najbolji rezultati postignuti kod ekstrakta B1-B3 (Slike 11.-13.), dok se spektar A5 (Slika 10.) i C1 - C3 (Slika 14.) nisu pokazali zadovoljavajućim, jer je došlo do interferencije drugih tvari u uzorku koji su ometali detekciju histamina. Kod ekstrakata B1 - B3 se kao najbolji pokazao ekstrakt B1 (Slika 11.) u kojem su najjasnije vidljive vrpce histamina na 1264 i 1570 cm<sup>-1</sup>, iako je došlo do malog pomaka koji je posljedica prisutnosti drugih tvari u uzorku. Kod ekstrakta B2 (Slika 12.) je vrpca histamina pri 1264 cm<sup>-1</sup> jasnije vidljiva, uz također manji pomak, međutim kod vrpce pri 1570 cm<sup>-1</sup> je došlo do većeg pomaka. To se također može obrazložiti prisutnošću drugih tvari u uzorku. Što se tiče ekstrakta B3 (Slika 13.), vrpca histamina na 1264 cm<sup>-1</sup> je vidljiva, ali uz veće pomake, dok je na 1570 cm<sup>-1</sup> slabije vidljiva zbog prisutnosti drugih tvari u uzorku. U usporedbi uzorka B1 sa ekstraktom A, koji je pripremljen standardnim postupkom sa perkloratnom kiselinom, ekstrakt A se pokazao boljim s jasno vidljivim vrpcama na 1264 i 1570 cm<sup>-1</sup> (Slika 9.) Iz tog se može zaključiti da su ekstrakcija histamina 0.4 M perkloratnom kiselinom i primjena AGC koloida asigiranog citratnim ionima uspješne. U istraživanju Janči i sur. (2017) gdje je provedena optimizacija parametara Raman spektroskopije za određivanje histamina u tkivu skuše uz AGC koloid, zapažen je najveći intenzitet histaminske vrpce na 1268 i 1570 cm<sup>-1</sup>. To autori objašnjavaju vibracijama istezanja imidazolnog prstena histamina.

Kalibracijski modeli su konstruirani metodom linearne regresije te su dobri rezultati postignuti kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce histamina na 1264 cm<sup>-1</sup>, budući da je koeficijent korelacije  $R^2 = 0,9233$  kod ekstrakta B1 (Slika 16a.), dok je isti koeficijent kod



ekstrakta B2, temeljen na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , nešto viši ( $R^2 = 0,9486$ ) (Slika 17a.). Međutim, najveći intenzitet vrpce histamina je postignut na  $1570\text{ cm}^{-1}$  kod ekstrakta B1 ( $R^2=0,9616$ ) (Slika 16b.). U usporedbi ekstrakta B1, gdje je postignut najveći intenzitet vrpce histamina na  $1570\text{ cm}^{-1}$  sa koeficijentom koleracije  $R^2= 0,9616$ , sa ekstraktom A pripremljenim standardnim postupkom, veći koeficijent koleracije i intenzitet vrpce je postignut kod ekstrakta A na  $1570\text{ cm}^{-1}$  sa  $R^2= 0,991$  (Slika 15b.). Ovakvi rezultati suprotni su rezultatima Jančija (2016), gdje je  $R^2$  veći kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , te se takve varijacije mogu objasniti razlikama u pripremi uzoraka.

Iz baždarnih dijagrama (Slike 15. - 18.) je vidljivo da intenzitet vrpce histamina raste s povećanjem koncentracije histamina u uzorku što potvrđuje rezultate istraživanja Jančija (2016).

Na svim spektrima jasno je vidljiva i vrpca citrata na  $1437\text{ cm}^{-1}$  koja je korištena kao interni standard. On je prethodno assigniran citratnim ionima prisutnim u AGC koloidu. Činjenica je da je vrpca jakog intenziteta na  $1437\text{ cm}^{-1}$  prisutna u spektrima. Njen intenzitet ne mijenja se promjenom koncentracije histamina što ukazuje na to da je navedena vrpca karakteristična za AGC koloid čija je koncentracija konstantna u svim provedenim mjerenjima. Budući da su čestice AGC koloida stabilizirane citratnim ionima vrlo je vjerojatno da navedena vrpca potječe od vibracija citratnih iona koji okružuju nanočestice srebra.

U Tablici 3. prikazana je usporedba rezultata određenih parametara postignutih za različite ekstrakte. U ovom poglavlju je već raspravljeno o vrpcama histamina pri  $1264$  i  $1570\text{ cm}^{-1}$  i koeficijentu koleracije ( $R^2$ ) za ekstrakte navedene u tablici.

Za provjeru točnosti različitih metoda tj. postupaka pripreme uzoraka, korišten je kontrolni uzorak koji je ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi došlo do prirodnog formiranja histamina. Kontrolni uzorak je analiziran HPLC metodom kako bi se utvrdio točan sadržaj histamina koji je iznosio  $39,6\text{ mg kg}^{-1}$  (100% točnost). Točnost metode se definira kao stupanj podudaranja između stvarne ( $39,6\text{ mg kg}^{-1}$ ) i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta (Lazarić, 2012).

Rezultati se nisu pokazali pozitivnima kod ekstrakata A5, B3 (vrpca histamina na  $1570\text{ cm}^{-1}$ ) i C1 – C3. Kao najbolji rezultat za određivanje točnosti metode se pokazao ekstrakt B2 kod vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , čija je srednja vrijednost iznosila  $37,8\text{ mg kg}^{-1}$  (95,45 %) što je najbliže točnom sadržaju histamina od  $39,6\text{ mg kg}^{-1}$  (100 %). Usporedbom ekstrakta B2 kod vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$  sa ekstraktom A kod vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , može se

uočiti da ekstrakt A ima manju srednju vrijednost koja iznosi  $37,2 \text{ mg kg}^{-1}$  (93,94%) kod te vrpce, dok isti taj ekstrakt kod vrpce histamina na  $1570 \text{ cm}^{-1}$  ima najveću srednju vrijednost od  $38,7 \text{ mg kg}^{-1}$ , te tim i najveću točnost metode (97,73%) od svih ekstrakata.

Prilikom laboratorijskog rada s ekstraktima B i C te tijekom dodavanja i miješanja sa otapalima kao što su HCl, izooktan i cikloheksan, došlo je do stvaranja vrlo stabilne pjene i strukture nalik gelu što je značajno otežalo razdvajanje faza i rad s navedenim otapalima.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, obrađenih analiza, dobivenih rezultata i provedene rasprave, mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Pripremljeno je 7 ekstrakata od kojih su najbolje rezultate pokazali ekstrakti B1 (ekstrakcija sa HCl) i B2 (ekstrakcija s izooktanom i vodom). U ekstraktu B1 je bio jasnije vidljivi spektar kod vrpce histamina na  $1570\text{ cm}^{-1}$ , te je koeficijent koleracije ( $R^2 = 0,9614$ ) veći, dok je taj koeficijent kod ekstrakta B2 kod vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$  ( $R^2 = 0,9486$ ) manji. Tim se zaključuje da je ekstrakt B1 bolji.
2. Ekstrakt B1, premda vrlo blizu, se pokazao lošijim u odnosu na ekstrakt A koji je pripremljen standardnim postupkom. Koeficijent koleracije kod ekstrakta A je kod vrpce histamina na  $1570\text{ cm}^{-1}$  ( $R^2 = 0,991$ ) veći u odnosu na koeficijent koleracije kod ekstrakta B1 pri istoj vrpce histamina.
3. Na svim spektrima je jasno vidljiva i vrpca citrata na  $1437\text{ cm}^{-1}$  koja je korištena kao interni standard.
4. Točnost metode se pokazala najbolja kod ekstrakta B2 kod vrpce histamina na  $1264\text{ cm}^{-1}$ , gdje je srednja vrijednost iznosila  $37,8\text{ mg kg}^{-1}$  (95,45%) u odnosu na stvarnu vrijednost, odnosno točan sadržaj histamina od  $39,6\text{ mg kg}^{-1}$  (100%). Međutim, usporedbom ekstrakta B2 sa ekstraktom A, dolazi se do zaključka da je kod standardnog postupka najveća točnost metode kod vrpce pri  $1570\text{ cm}^{-1}$ , gdje je srednja vrijednost sadržaja histamina iznosila  $38,7\text{ mg kg}^{-1}$  (97,73%).
5. Budući da je u laboratorijskim uvjetima u radu s ekstraktima B i C, te tijekom dodavanja i miješanja sa HCl-om, izooktanom i cikloheksanom došlo do velikog pjenjenja, što je značajno otežalo razdvajanje faza i rad s navedenim otapalima, dolazi se do zaključka da ovakvi postupci nisu preporučeni za primjenu.

## 6. LITERATURA

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

Bakašun V, Cuculić M, Vučemilović A, Međugorac B, Cezner M (1985) Histaminsko otrovanje plavom morskom ribom-prva zapažanja u prvih sedam epidemija zabilježenih na području subregije Rijeka 1982-1984. *Liječ. Vjes.* **107**, 232-234.

Bocklitz, T., Walter, A., Hartmann, K., Rosch, P., Popp, J. (2011) How to preprocess 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.

Bulushi, I., S. Poole, H. C. Deeth (2009): Biogenic Amines in Fish: Role sin Intoxication, Spoilage, and Nitrosamine Formation-A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **49 (4)**, 369-377.

CDC (2008) Scombroid fish poisoning associated with tuna steaks- Louisiana and Tennessee < <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5632a2.htm> > (pristupljeno: 28.06.2017).

Cindrić, M. (2016) *Ramanova spektroskopija u zaštiti od krivotvorenja*. Doktorski rad. Zagreb: Grafički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Cuculić M, Bakašun V, Labura Č , Mesaroš E (1984) Histaminsko trovanje morskom ribom. *Pomorski zbornik* **22**: 387-400.

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

Erim, B.F. (2013) Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trend. Anal. Chem.* **52**: 239- 247.

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 05.07.2017.

FDA (2011) Scombrototoxin (Histamine) Formation In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance fourth ed. ed., (pp. 113 - 152). 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.

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

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.

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

- Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri*. **1**, 61-65.
- Lee, P. C., Meisel, D. (1982) Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem-US*. **86**, 3391-3395.
- Lehane, L., Olley, J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* **58**, 1–37.
- Lin, C., Liu, F. L., Lee, Y. C., Hwang, C. C., Tsai, Y. H. (2012) Histamine contents of salted seafood products in Taiwan and isolation of halotolerant histamine-forming bacteria. *Food Chem.* **131**: 574- 579.
- Lorenz, W., Thon, K., Neugebauer, E., Stöltzing, H., Ohmann, C., Weber, D., Schmal, A., Hinterlang, E., Barth, H., Kusche, J. (1987) Reliability and practicability of the fluorometric-fluoroenzymatic histamine determination in pathogenetic studies on peptic ulcer: Detection limits and problems with specificity. *Agents and Actions*. **21**, 1-25.
- Nie, S., Emory, S. R. (1997) Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by SurfaceEnhanced Raman Scattering. *Science*. **275**, 1102-1106.
- McIntire, F. C., Roth, L. W., Shaw, J. L. (1947) The Purification of Histamine for Bioassay. *J. Biol. Chem.* **170**, 537-544.
- Mulić, R., Giljanović, S., Ropac, D., Katalinić, V. (2004) Neke epidemiološke osobitosti alimentarnih toksoinfekcija u Hrvatskoj u razdoblju 1992.- 2001. godine. *Acta Med. Croat.* **58**: 421-427..
- Peticolas, W. L. (1995) Raman spectroscopy of DNA and proteins. *Method. Enzymol.* **246**, 389-416.
- Ratkaj, M. (2013) *Primjena spektroskopije površinski pojačanog Ramanovog raspršenja u istraživanju farmaceutski aktivnih tvari*. Doktorski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Rossi, S., C. Lee, P. Ellis, L. Pivarnik (2002): Biogenic Amines Formation in Bigeye Tuna Steaks and Whole Siipjack Tuna. *J.Food Sci.* **67**: 2056-2060.

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

Singh, M., Badrie, N., Neeway-Fyzul, A., Ramsubhag, A. (2012) A prevalence study of histamine producing bacteria in two commercial tropical marine fish sold in Trinidad, West Indies. *J. Nutr. Food Sci.* **2**: 1-6.

Smajlović, A., Baković, A., Mujezinović, I., Muminović, M., Smajlović, M., Kapetanović, O., Hadžijusufović, S. (2008) Utvrđivanje prisustva histamina u uzorcima ribe. *Meso.* **10**: 212-214.

Smith, E., Dent, G. (2005) Surface-Enhanced Raman Scattering and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. John Wiley & Sons, Ltd.

Šimat, V. (2010) Usporedba dva komercijalna testa za kvantitativnu analizu histamina u ribi. *Meso.* **11** (6), 333-341.

Šimat, V. (2011) Parametri kvalitete u proizvodima ribarstva, 5. Konferencija o sigurnosti i kakvoći hrane u RH, HGK, Opatija, 16-18. Svibanj 2011.

Taylor, S.L., Hui, J.Y., Lyons, D.E. (1984) Toxicology of scombroid poisoning. U: *Seafood Toxins*. Ragelis, E.P. (Ured.), Washington, D.C. *J. Am. Chem. Soc.* str. 417–430.

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

Theophanides, T., Anastassopoulou, J., Fotopoulos, N., Cotton, T., Chumanov, G., Wang, J. Y., Uphaus, R. A. (1993) Probing Electron Transfer Reactions in Model Photosynthetic Systems by Raman Spectroscopy. Fifth International Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. Springer Netherlands.

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.

Vranešić, B., D., Verbanac, D., Krznarić, Ž. (2010) Intolerancija na histamin. *Dijetetika*. **86**, 174-178.

Yesuhadson, P., Al-Zidjali, M., Al-Zidjali, A., Al-Busaidi, M., Al-Waili, A., Al-Mazrooei, N., Al-Habsi, S. (2013) Histamine levels in commercially important fresh and processed fish of Oman with reference to international standards. *Food Chem.* **140**: 777-783.

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.