

# Utjecaj ultrazvuka na ekstrakciju karnozina iz realnih uzoraka

---

**Bivolčević, Ivana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:826480>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer**

**Ivana Bivošević**

**Utjecaj ultrazvuka na ekstrakciju karnozina iz realnih**

**uzoraka**

**Diplomski rad**



**Osijek, 2023.**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer**

**Ivana Bivolčević**

**Utjecaj ultrazvuka na ekstrakciju karnozina iz realnih**

**uzoraka**

**Diplomski rad**



**Mentorica: Doc. dr. sc. Olivera Galović**

**Osijek, 2023.**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku****Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****UTJECAJ ULTRAZVUKA NA EKSTRAKCIJU KARNOZINA IZ REALNIH  
UZORAKA****Ivana Bivolčević****Rad je izrađen na Odjelu za kemiju Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku****Mentorica: doc. dr. sc. Olivera Galović****Sažetak:**

Karnozin je dipeptid koji je građen od dvije aminokiseline  $\beta$ -alanina i L-histidina. Karnozin i njegovi analozi u prirodi su prisutni kod životinja, a postoji velika rasna koncentracija u ukupnom sadržaju između različitih sisavaca. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je metoda jednostavna za korištenje, relativno jeftina, povećava prienos mase i kinetiku reakcija, te je prikladna za široki spektar otapala i uzoraka. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) koristi manje čestice u kolonama, ima veću brzinu i kraće vrijeme razdvajanja, veću rezoluciju i veći vršni kapacitet. U radu je ispitivan utjecaj direktnog i indirektnog djelovanja ultrazvuka na ekstrakciju karnozina iz mesa pilećih prsa u odnosu na ekstrakciju koja koristi homogenizator. Za određivanje sadržaja karnozina i anserina korištena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti. Kod metode koja koristi homogenizator, najmanje PSD vrijednost dobivena je za uzorke kojima je sadržaj karnozina i anserina određen nakon 60 s. Ekstrakcija indirektnim ultrazvukom pokazala je da se produljenjem vremena ekstrakcije povećava sadržaj karnozina i anserina što ukazuje na poboljšanje ekstrakcije. Najbolje rezultate dala je direktna ultrazvučna ekstrakcija kontinuirano 60 s u odnosu na isto vrijeme ekstrakcije prilikom upotrebe homogenizatora. Također je ispitivana razlika između ekstrakcije karnozina i anserina u usitnjenim i neusitnjenim uzorcima. Veći sadržaj karnozina i anserina određen je u neusitnjenim uzorcima što znači da uzorci mesa ne moraju, prije ekstrakcije direktnim ultrazvukom, biti usitnjeni.

**Diplomski rad obuhvaća: 47 stranica, 16 slika, 6 tablica, 49 literaturnih navoda****Jezik izvornika: Hrvatski****Ključne riječi: karnozin, anserin, pileća prsa, ultrazvučna ekstrakcija, UPLC analiza****Rad prihvaćen:****Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. izv.prof.dr.sc. Martina Medvidović-Kosanović, predsjednica
2. doc.dr.sc. Olivera Galović, mentorica i članica
3. izv.prof.dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik, članica
4. doc.dr.sc. Ana Amić, zamjena člana

**Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**  
**Department of Chemistry**  
**Graduate Study of Chemistry**  
**Scientific Area: Natural Sciences**  
**Scientific Field: Chemistry**

**THE INFLUENCE OF ULTRASOUND ON THE EXTRACTION OF CARNOSINE  
FROM REAL SAMPLES**

**Ivana Bivolčević**

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Olivera Galović, Ph. D., assistant prof.

**Abstract:**

Carnosine is a dipeptide made of two amino acids  $\beta$ -alanine and L-histidine. Carnosine and its analogues are naturally present in animals, and there is a wide range of concentrations in the total content between different mammals. Ultrasound-assisted extraction method is easy to use, relatively inexpensive, increases mass transfer and reaction kinetics, and is suitable for a wide range of solvents and samples. Ultra high performance liquid chromatography (UPLC) uses smaller particles in the column, has faster speed and shorter separation time, higher resolution and higher peak capacity. In this thesis the influence of direct and indirect ultrasound on the extraction of carnosine from chicken breast meat was investigated and obtained results were compared with the results obtained by extraction with homogenizer. Ultra high performance liquid chromatography was used to determine the carnosine and anserine content. In the method that uses a homogenizer, the lowest RSD value was obtained for samples whose carnosine and anserine content was determined after 60 s. Extraction using indirect ultrasound showed that extending the extraction time increases the content of carnosine and anserine, which indicates an improvement in extraction. The best results were obtained by direct ultrasonic extraction continuously for 60 s compared to the same time of using the method with a homogenizer. The difference between the extraction of carnosine and anserine in the minced meat samples and samples where meat was not minced was also investigated. The higher content of carnosine and anserine was determined in samples where meat was not minced, which means that the meat samples do not have to be minced before extraction by direct ultrasound.

**Thesis includes:** 47 pages, 10 figures, 6 tables, 49 references

**Original in:** Croatian

**Keywords:** carnosine, anserine, chicken breast, ultrasonic extraction, UPLC analysis

**Thesis accepted:**

**Reviewers:**

1. Martina Medvidović-Kosanović, PhD., associate prof., chairmen
2. Olivera Galović, PhD., assistant prof., mentor and member
3. Martina Šrajer Gajdošik, PhD., associate prof., member
4. Ana Amić, PhD., assistant prof., alternate member

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

## Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. Kemijska svojstva karnozina .....	2
2.2. Uloga karnozina u organizmu.....	4
2.3. Metode određivanja karnozina.....	4
2.3.1. Određivanje karnozina u realnim uzorcima .....	6
2.4. Ekstrakcija .....	10
2.5. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom .....	10
2.5.1. Kavitacija .....	11
2.5.2. Izravna i neizravna primjena ultrazvuka .....	14
2.5.3. Ultrazvučna sonda.....	15
2.5.4. Ultrazvučna kupelj .....	17
2.6. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) .....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. Kemikalije.....	22
3.2. Pribor i instrumentacija.....	22
3.3. Uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC) .....	27
3.3.1. Uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom .....	27
3.3.2. Uvjeti tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC) .....	27
3.4. Kalibracija.....	27
3.5. Priprema uzoraka za analizu .....	28
3.5.1. Ekstrakcija karnozina iz uzoraka pilećeg mesa.....	28
3.5.1.1. Ekstrakcija homogenizatorom .....	28
3.5.1.2. Ekstrakcija indirektnim ultrazvukom .....	28
3.5.1.3. Ekstrakcija direktnim ultrazvukom .....	28
3.5.1.3.1. Ekstrakcija direktnim ultrazvukom usitnjenih i neusitnjenih uzoraka..	29

3.6. Provjera prikladnosti metode .....	29
4. REZULTATI I RASPAVA .....	30
4.1. Kalibracijski pravac .....	30
4.2. Provjera prikladnosti metode pripreme uzoraka .....	31
4.3. Rezultati analize uzoraka pilećeg mesa .....	31
4.3.1. Ekstrakcija homogenizatorom.....	31
4.3.2. Ekstrakcija indirektnim ultrazvukom .....	32
4.3.3. Ekstrakcija direktnim ultrazvukom .....	32
4.3.3.1. Ekstrakcija direktnim ultrazvukom usitnjenih i neusitnjenih uzoraka .....	33
5. ZAKLJUČAK.....	34
6. LITERATURA .....	35
7. ŽIVOTOPIS .....	40



# 1. UVOD

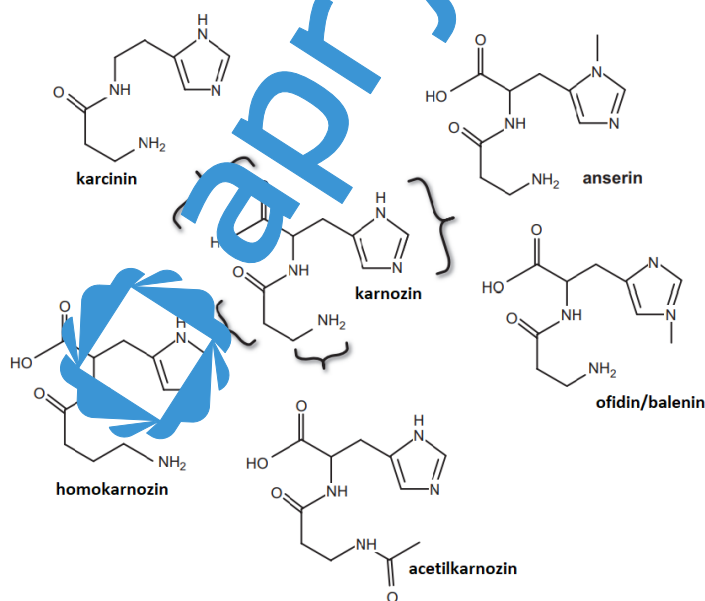
Karnozin je otkrio ruski kemičar V. S. Gulewitch [1] 1900. godine tijekom svoje potrage za neidentificiranim neproteinskim spojevima koji sadrže dušik u Liebigovom mesnom ekstraktu. Istraživanjima je uočio da većina ptičjih mišića nije sadržavala karnozin. Međutim, identificiran je novi spoj koji je nazvan anserin i nalazio se u mišićima guske i kokoši te je nazvan po prvoj životinji u kojoj je otkriven (lat. *anser* znači guska). Pronađen je još jedan metilirani analog karnozina u mišiću zmije i mišiću kita te su nazvani ofidin i balenin. U prirodi su karnozin i njegovi analozi, anserin i ofidin, prisutni samo kod životinja i postoji veliki raspon u ukupnom sadržaju karnozina, anserina i ofidina između različitih sisavaca, a neke od najviših vrijednosti zabilježene su kod valabija i plavog kita, dok su najniže koncentracije zabilježene kod miševa i oposuma. Sve ovo svi sisavci sadrže karnozin i uz njega još jedan od metiliranih analoga karnozina (anserin ili ofidin). Jedina vrsta sisavaca za koju se zna da nema niti jedan od dva analoga metiliranog karnozina zapravo je *Homo sapiens*. [2] Koncentracije karnozina, anserina i njihovih analoga često se mjere kako bi se dobile informacije o sastavu prehrambenih proizvoda. Također, izvor mesa (piletina, svinjetina, govedina) može se pratiti omjerom karnozina i anserina u mesnom proizvodu. S obzirom na mnoštvo potencijalnih učinaka na poboljšanje zdravlja, karnozin je identificiran kao jedan od obećavajućih bioaktivnih tvari u mesu. Može se razviti nekoliko pristupa kako bi se iskoristila ova karakteristika. Funkcionalni ili obogaćeni pristup mesu ima za cilj povećati ukupni sadržaj karnozina, anserina i ofidina u mesu. Različite prehrambene strategije, kao što su dodaci karnozina i L-histidina, trenutno se istražuju kod domaćih životinja kako bi se povećala kvaliteta mesa s potencijalnim zdravstvenim dobrobitima za potrošače. Alternativno, postupci ekstrakcije mogu se primijeniti na mesne proizvode kako bi se dobio ekstrakt bogat karnozinom, anserinom i ofidinom kao što je pileća esencija kao funkcionalna hrana. Metoda za određivanje karnozina koja se najčešće koristi je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.



## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kemijska svojstva karnozina

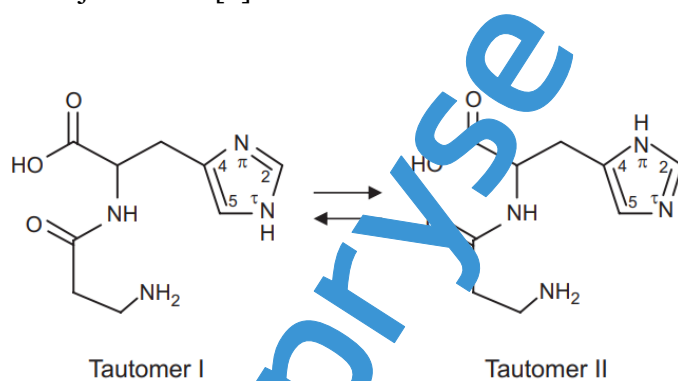
Karnozin se smatra pretečom prirodnih derivata (*Slika 1.*). Po kemijskom sastavu je dipeptid sastavljen od aminokiselina  $\beta$ -alanina i L-histidina. Postoje različite varijante ovog dipeptida, a najčešće su to metilirani analozi, anserin i ofidin (balenin) u kojima je imidazolni prsten L-histidina metiliran na atomu dušika koji se nalazi najbliže bočnom lancu (Npi) i dalje od bočnog lanca (Ntau). Postoji znatna zabuna u pogledu nomenklature metiliranih atoma dušika, sa starijom literaturom [2] koja označava anserin (Npi metiliran) kao  $\beta$ -alanil-N1-metil-histidin, dok prema IUPAC-u to je  $\beta$ -alanil-N3-metil-histidin (i obrnuto za ofidin). Drugi analog karnozina je homokarnozin u kojem je  $\beta$ -alanin zamijenjen GABA-om (engl.  $\gamma$ -Aminobutyric acid). Mogući su i ostali analozi koji su srodni spojevi te uključuju acetilirani oblik karnozina (acetilkarnozin), gdje je  $\beta$ -alanin acetiliran. Postoji i spoj koji se zove karcinin u kojem je L-histidinski ostatak karnozina zamijenjen histaminom.



*Slika 1.* Kemijska struktura karnozina i njegovih prirodnih derivata. [2]

Topivost karnozina u vodi pri 25 °C je 1 g u 3,1 mL vode što bi značilo da je dobro topiv. Molekulu karnozina karakteriziraju tri ionizirajuće skupine: amino skupina alaninskog ostatka ( $pK_a= 9,32$ ), karboksilna skupina ( $pK_a= 2,76$ ) i dušikovi prstenovi imidazola ( $pK_a= 6,72$ ). Pri fiziološkom pH, gledajući  $pK_a$  vrijednost, karnozin je najčešće u zwitter-ionskom obliku te sadrži karboksilnu i amino skupinu  $\beta$ -alanina koje su u ioniziranom stanju.

Imidazolski prsten u karnozinu vrlo je zanimljiv i regulira pufersku aktivnost karnozina. [2] Korištenjem Ramanove spektroskopije, Tor-reggiani et al. [3] izvijestili su da su pri pH 7 trake uzrokovane pozitivno nabijenim i neutralnim oblikom imidazolskog prstena vidljive, što ukazuje da su pri ovoj pH vrijednosti prisutna oba oblika molekule. Dva tautomerna oblika imidazolskog prstena karnozina u njegovom neutralnom obliku su N protonirani (tautomer I) i N protonirani (tautomer II) (*Slika 2.*). Ramanove studije pokazuju da oba tautomera postoje pri neutralnom pH, što ukazuje na ravnotežu između dva tautomerna oblika. Pri pH 7 i 9 tautomer I je najdominantnija vrsta (75%), sukladno tome tautomer II je energetski manje stabilan od tautomera I. Na tautomernu ravnotežu utječe kelacija metala. Vežanje Cu (II) iona i formiranje dimernog kompleksa čini da tautomer II dominira budući da je N uključen u kelaciju metala. [2]



*Slika 2.* Tautomerni oblici imidazolskog prstena karnozina. [2]



## 2.2. Uloga karnozina u organizmu

Karnozin je prvi puta otkriven u skeletnim mišićima [1] u kojima ga ima znatno više nego u drugim tkivima. Također se nalazi u većim koncentracijama u srcu, mozgu i gastrointestinalnom tkivu ljudi. Ovaj dipeptid je sastavni dio raznih tkiva kralježnjaka, dok ga s druge strane biljke uopće ne sadrže. [2,4] Fiziološka se uloga karnozina u organizmu još uvijek proučava, smatra se neenzimskim hvatačem slobodnih radikala, prirodnim antioksidansom [5], djeluje protuupalno i neuroprotektivno [6,7], ima pH-pufersku aktivnost [8] u koju su uključeni atomi dušika u imidazolnom prstenu koji imaju visoki kapacitet vezanja protona zbog  $pK_a$  vrijednosti karnozina i anserina koja je blizu 7,0. [2] Karnozin ima svojstvo keliranja teških metala [3], posjeduje antiglikacijsku aktivnost uključenu u proces starenja, nastanak i širenje bolesti temeljenih na oksidativnom stresu, to su dijabetes, ateroskleroza i Alzheimerova bolest. [9,10] Karnozin također smanjuje peroksidaciju lipida, inhibira oksidativnu modifikaciju proteina izloženog hidroksilnim radikalima [11] i poboljšava antioksidativni kapacitet. [12]

## 2.3. Metode određivanja karnozina

Najraširenija tehnika za provođenje analitičkih ispitivanja proteina u hrani je masena spektrometrija (engl. *mass spectrometry*, MS). Kvaliteta i preciznost dobivanja kvalitativnih i kvantitativnih rezultata karakteristike su ove jedne od najmoćnijih analitičkih tehnika. Zbog odličnih navedenih karakteristika ova metoda se koristi za određivanje karnozina i njegovih derivata iz različitih izvora.

Nuklearna magnetska rezonancija (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR) također je jedna od često korištenih metoda za određivanje karnozina [13], ali se odlikuje manjom osjetljivošću od masene spektroskopije. U ovoj metodi se koriste veće količine uzoraka, dok masena spektrometrija također nudi bolju granicu detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) u usporedbi sa nuklearnom magnetskom rezonancijom. NMR je svestrana, ponovljiva, ne destruktivna tehnika koja se primjenjuje na tekuće i na čvrste matrice bez derivatizacije, ne oslanja se na korake ionizacije ili kondicioniranje kolone te daje jednoznačno određivanje metabolita. [14, 15]

Karnozin se može odrediti u tkivima neinvazivnom magnetskom rezonancijom (engl. *magnetic resonance imaging*, MRI) i metodom spektroskopske protonske magnetske

rezonancije (engl. *proton magnetic resonance spectroscopy*,  $^1\text{H-MRS}$ ). Za određivanje koncentracije karnozina u mišićima koristi se metoda spektroskopske protonske magnetske rezonancije. Dobiveni signal rezultat je protona koji se nalazi u histidinskom imidazolnom prstenu. Otkriveno je da u mišićima izlazni signal uglavnom potječe od karnozina i da u mozgu prevladava homokarnozin. [16] U radu Özdemiir i sur. [17] određena je koncentracija karnozina u ljudskim mišićima *in vivo* spektroskopijom protonske magnetske rezonancije. Izmjerene su srednje koncentracije u širokom listolikom mišiću (lat. *musculus soleus*) i trbušastom mišiću lista (lat. *musculus gastrocnemius*) koje su iznosile  $2,81 \pm 0,57/4,8 \pm 1,59$  mM (srednja vrijednost  $\pm$  SD) za sportaše, odnosno  $2,58 \pm 0,65/3,3 \pm 0,32$  mM za dobrovoljce koji nisu trenirali. [17]

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje karnozina. Karakteristike metode su selektivnost, odgovarajuća separacija, osjetljivost i veliki izbor metoda detekcije. Često se kod ove metode zahtijeva korištenje predkolone zato što tijekom analize (u ovom slučaju karnozina) u složenijim uzorcima može doći do mehaničkih onečišćenja u uzorku. [18]

Danas su kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*, CE) i kapilarna elektrokromatografija (engl. *capillary electrochromatography*, CEC) priznati analozi HPLC/UHPLC i nano-LC metoda. Veća ograničenje kapilarne elektroforeze je ograničena osjetljivost zbog malog volumena ubrizganog uzorka. [19] Karnozin se iz bioloških materijala također može odrediti kapilarnom elektroforezom s UV detekcijom [20], laserski induciranom fluorescencijom (engl. *laser-induced fluorescence*, LIF) masenom spektrometrijom [21] i mikročip elektroforezom (engl. *microchip electrophoresis*, ME) s kemiluminiscencijom [22] ili kapacitivno povezanom beskontaktnom detekcijom vodljivosti  $\text{C}^4\text{D}$  (engl. *capacitively-coupled contactless conductivity detectors*). [23] Elektroforeza s mikročipom je minijaturizirani način kapilarne elektroforeze. [24] Kemiluminescentna detekcija korištena je za određivanje karnozina, anserina i homokarnozina u biološkim materijalima. [25] Masena spektrometrija s matricom potpomognutom laserskom desorpcijskom ionizacijom laserskom desorpcijom s vremenom preleta (engl. *matrix assisted LASER desorption/ionization time of flight mass spectrometry*, MALDI-TOF-MS) je moćna tehnika za ispitivanje bioloških uzoraka i ima značajnu ulogu u modernim znanostima o životu. [26] Pisarev i sur. [27] izvijestili su o ultra osjetljivoj metodi za

određivanje karnozina čija je granica detekcije u pikomolarnom području, a koncentracija se može odrediti izravno na mjestu uzorka tkiva bez ekstrakcije karnozina. Još su osjetljivije metode razvijene kombinacijom odvajanja s elektrosprejanjem (engl. *electrospray ionization*, ESI) i detekcijom pomoću MS (ESI-MS). [28] Elektrokemijske metode u određivanju karnozina nisu često korištene, ali se mogu koristiti prilikom karakterizacije aminokiselina i peptida. [29]

HPLC je metoda kod koje su veličine čestica stacionarne faze između 3  $\mu\text{m}$  i 5  $\mu\text{m}$  i unutarnji promjer kolone od 3- 4,6 mm. Unaprjeđenjem ove metode razvijena je tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC) kao rezultat poboljšanja materijala za pakiranje koji se koriste za kromatografske separacije. Prednost tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti su kolone manjeg unutarnjeg promjera (2,1 mm) koje su punjene česticama manje veličine (najčešće 1,7  $\mu\text{m}$ ). Rezultat ove promjene je povećanje brzine, veća razlučivost i osjetljivost u odnosu na HPLC. [30,31]

### 2.3.1. Određivanje karnozina u realnim uzorcima

Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti može se koristiti za praćenje prijevera (patvorenje) kuhanih govedjih proizvoda s mesom različitih vrsta. Mjeri se omjer histidinskog oblika dipeptida anserina i karnozina koji su prisutni u skeletnim mišićima, a koncentracija varira kod različitih vrsta kao što su ovce, goveda, konj i klokan te se otkrivanje krivotvorenja može brzo otkriti kromatografijom na koloni Partisil-10 SCX s 0,2 M litijevim formatom, pH 9. HPLC i elektroforetske metode mogu se koristiti u praćenju krivotvorenja govedine u kuhanim mesnim proizvodima, ali potreba za korištenjem relativno sporog elektroforetskog postupka je ograničenje ove metode. [32]

HPLC postupak temeljen na hidrofilnoj interakcijskoj kromatografiji (engl. *hydrophilic interaction chromatography*, HILIC) koristi se za istovremeno određivanje karnozina, anserina, balenina, kreatina i kreatinina u mesu, a prednost ove metode je što ne zahtijeva složene postupke pročišćavanja i/ili derivatizacije uzoraka. Kromatografsko odvajanje razvijeno je pomoću kolone silicijevog dioksida (4,6  $\times$  150 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), a predložena metodologija je jednostavna, pouzdana i brza (<13 min po uzorku). Metoda je validirana u smislu linearnosti, ponovljivosti, obnovljivosti i iskorištenja te predstavlja zanimljivu alternativu metodama koje se koriste za određivanje spomenutih spojeva i drugih

polarnih tvari. Za razvoj metode korišteni su svinjski lungić i pileća prsa. U radu [33] su dobiveni rezultati koncentracije anserina koji je prevladavao kod vrsta koje nisu sisavci, poput piletine, dok je svinjetina bila jedna od vrsta s višim sadržajem balenina. [33]

Karnozin i anserin se mogu odrediti postupkom čiste micelarne tekućinske kromatografije pomoću micelarne mobilne faze od 0,10 M natrijevog dodecil sulfata puferiranog na pH 7, amino kolone i pomoć UV detektora. Granice detekcije (ng/mL) bile su 71 odnosno 53 za anserin i karnozin. Uzorci mesa peradi, svinjetine i govedine ubrizgani su izravno u kromatografski sustav nakon ekstrakcije u otopini natrijevog dodecil sulfata i filtracije. Prednost ove metode je smanjenje troškova, smanjuje se vrijeme analize i izvorne pogreške zbog smanjenog rizika od gubitaka i smanjenih kemijskih promjena u analitima. Korištenje čiste mobilne faze natrijevog dodecil sulfata pruža ovom postupku razne prednosti uključujući netoksičnost, nezapaljivost, biorazgradivost i nižu cijenu. Njegova jednostavnost ga čini dobrim kandidatom za primenu rutinskim analizama u području kontrole i kvalitete hrane. [34]

Utvrđeno je da anserin i karnozin tvore s *o*-furalnim aldehydom obojene produkte reakcije identičnog molarnog koeficijenta apsorpcije na 640 nm. Stoga je razvijena jednostavna i brza metoda za spektrofotometrijsko određivanje ovih dipeptida. Metoda je primijenjena za određivanje ukupnog anserina i karnozina u mišićima odraslih gusaka. Karnozin je određen enzimskom metodom. Omjer koncentracija anserina i karnozina varira između dobi životinje (niži kod gusaka starih jednu godinu nego kod gusaka starih 2 i 3 godine), ovisi o vrsti mišića koji se analizira (u mišićima nogu je niži u usporedbi s prsnim mišićima). Utvrđena je koncentracija karnozina i razine anserina koja se razlikovala u uzorcima ovisno o starosti gusaka i vrsti mišića. [35]

Razvijena je metoda za kvantificiranje ovih imidazolnih dipeptida u uzorcima mesa pomoću tekućinske kromatografije spregnute ionizacijskom tehnikom elektroraspršenja — tandem masene spektrometrije trostrukog kvadrupolnog masenog spektrometra (LC-ESI-MS/MS). Poboljšano je odvajanje imidazolskih peptida tekućinskom kromatografijom primjenom kolone miješanog načina rada, koja omogućuje odvajanje normalne faze i ionske izmjene, a metoda se uspješno može primijeniti za kvantifikaciju dipeptida imidazola u biološkim uzorcima bez derivatizacije. Šest uzoraka piletine i šest uzoraka govedine dobiveno iz japanskih supermarketa korišteno je za analizu. Također je upotrijebljen uzorak mesa kita Sei (lat. *Balaenoptera borealis*) ulovljenog kitolovom u znanstvene svrhe tijekom

ljetne sezone u sjeverozapadnom Pacifiku 2017. godine uz dopuštenje Nacionalne uprave za oceane i atmosferu/Nacionalne službe za morsko ribarstvo. [36]

Provedeno je ispitivanje koje je imalo za cilj ispitati učinak starosti ptice na sadržaj endogenih bioaktivnih spojeva, uključujući karnozin, anserin, kreatin, betain i karnitin, u mesu certificiranog komercijalnog korejskog domaćeg soja piletine (engl. *korean native chicken*, KNC). U metodi je korištena HPLC kolona s vodenom 1525 pumpom i vodenim 717 plus autosamplrom (Millipore Co-Operative, Milford, MA) i Atlantis HILIC silika kolona ( $4,6 \times 150$  mm,  $3 \mu\text{m}$ , Millipore), te detektor s nizom dioda (Millipore). Dodatno su ispitivani učinci vrste mesa (meso prsa ili buta) i stanje mesa (sirovo ili kuhano). Meso prsa KNC-a imalo je veće količine karnozina i anserina, ali imalo je manje količine betaina i karnitina od mesa buta. KNC meso izgubilo je značajne količine svih bioaktivnih spojeva tijekom kuhanja. Meso buta imalo je visok postotak zadržavanja karnozina i anserina nakon kuhanja, dok je meso prsa pokazalo gotovo potpuno zadržavanje betaina i karnitina. Rezultati ove studije daju korisne i rijetke informacije o prisutnosti, količinama endogenih bioaktivnih spojeva u KNC mesu, koji mogu biti korisni u selekcijskim i uzgojnim programima, ali i za popularizaciju autohtonog pilećeg mesa. [37]

Elektroforeza s mikročipom primijenjena je za odvajanje dvaju fiziološki važnih imidazolnih dipeptida karnozina i anserina. Kapacitivno spregnuti beskontaktni detektor vodljivosti ( $C^4D$ ) korišten je za kvantifikaciju obaju dipeptida nakon odvajanja u novoj ME jedinici kućne izrade. Parametri odvajanja (vrijeme ubrizgavanja, napon ubrizgavanja i napon razdvajanja) optimizirani su kako bi se omogućilo kvantitativno, osnovno odvajanje obaju dipeptida. Poznata metoda dodavanja primijenjena je za ispitivanje točnosti mjerenja imidazolnih dipeptida u složenom uzorku. Ova metoda primijenjena je i na stvarnim biološkim uzorcima. Rezultati su pokazali zadovoljavajuće slaganje sa standardnom HPLC metodom. Predložena ME metoda predstavlja jeftinu, brzu i jednostavnu alternativu postojećim, kompliciranijim i skupljim HPLC metodama. Ova metoda ne zahtijeva optičke detektore niti derivatizaciju uzorka, što je neizbježno u HPLC metodama. Metoda se uspješno primjenjuje za određivanje vrste životinja u nedefiniranim uzorcima mesa te koristi omjer karnozin/anserin, a može se koristiti kao prevencija mogućih prijevara s hranom. [38]

LC- MS/MS tehnologija korištena je za istraživanje prisutnosti karnozina, anserina i homokarnozina u skeletnim mišićima u vodenim vrstama prikupljenim na ribolovnom

području Zhoushan u Istočnom kineskom moru. [39] Istraživanje je uključivalo 38 vodenih vrsta (26 teleosta, 6 mekušaca i 6 rakova) i u pilećim prsima. Od 38 ispitanih vodenih vrsta, 24 vrste (23 teleosta i 1 mekušac) sadržavale su značajne količine ( $> 5$  ng/g) ovih spojeva, a anserin je bio glavna komponenta u njihovim skeletnim mišićima. Samo 5 teleosta sadržavalo je homokarnozin. Većina beskralješnjaka, s izuzetkom sepije (lat. *Uroteuthis chinensis*), nije sadržavala ove spojeve. Sadašnji nalazi uvelike proširuju podatke o distribuciji karnozina, anserina i homokarnozina i daju uvid u razumijevanje uloga ovih spojeva kod različitih životinja i procjenu nutritivne vrijednosti za morske vodene vrste. [39]

Provedena je studija [40] koja je identificirala anserin i omjer anserin/karnozin u pilećim prsima tajlandske izvorne piletine (engl. *thai native chickens*, TNC; piletina 100% tajlandsog porijekla), tajlandske sintetičke piletine (engl. *thai synthetic chicken*, TSC; 50% genetskog udjela tajlandske piletine) i tajlandske domaće križane kokoši (engl. *thai native chickens*, TNC križane; 25% genetskog udjela tajlandske piletine) uspoređujući ih s komercijalnim brojerskim pilićima (engl. *commercial broiler chicken*, BR; koji nisu porijeklom iz Tajlanda). Korištena je NMR metoda i učinak na antioksidacijsku aktivnost korištenjem 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil testa (engl. *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*, DPPH). Relativna koncentracija i antioksidativna svojstva među skupinama analizirani su analizom varijance (engl. *analysis of variance* ANOVA) korištenjem općeg linearnog modela (engl. *generalized linear model*, GLM). Ova studija otkrila je sedam metabolita: alanin, inozitol monofosfat, inozin i anserin/karnozin, laktat, anserin i kreatin. Laktat, anserin i kreatin bili su metaboliti s najvećom koncentracijom. Analizom je utvrđeno da su anserin i anserin/karnozin u pilećim prsima bili značajno viši u TNC, TSC i TNC križancima nego BR prema njihovim relativnim koncentracijama i antioksidativnim svojstvima. Stoga bi TNC i njihovi križanci mogli imati potencijal da budu komercijano upotrebljivi izvori mesa. [40]

Također je provedena analiza anserina i karnozina u mesnom i koštanom brašnu (engl. *meat and bone meal*, MBM) (goveđe, podrijetlom od ovaca, svinja i peradi). Kako bi se uzorci pročistili, prethodna obrada uzorka je od ključne važnosti prije UHPLC-MS/MS analize. Ova metoda omogućila je određivanje karnozina i anserina u kratkom vremenu analize (18 min po uzorku). Granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) dvaju analita u četiri vrste MBM uzoraka bile su u rasponu od 0,41–3,07 ng/g odnosno 0,83–5,71 ng/g. Ova brza, učinkovita i robusna metoda uspješno je



primijenjena za kvantitativnu detekciju karnozina i anserina u uzorcima MBM. Utvrđeno je da je omjer karnozin/anserin u padajućem redoslijedu: svinjski > goveđi > ovčji > perad MBM. Ova predložena metodologija nedavno je primijenjena za identifikaciju biomarkera (omjer karnozin/anserin) za identifikaciju MBM specifične za vrstu. [41]

## 2.4. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda odjeljivanja tvari iz smjese koja se temelji na različitoj topljivosti tvari. Tvar koju želimo izdvojiti je topljiva u otapalu koje se koristi, dok su ostale prisutne tvari netopljive u njemu. U ekstrakciji se za odjeljivanje koriste dvije faze koje se međusobno ne miješaju (npr. ulje i voda). Vrste ekstrakcije s obzirom na agregatno stanje dviju faza su: ekstrakcija tekuće-tekuće i ekstrakcija čvrsto-tekuće. [42] U procesu ekstrakcije čvrsto-tekuće izdvaja se željena tvar iz čvrste smjese s otapalom (u tekućem stanju) u kojemu se tvar otapa selektivno ili djelomično selektivno. Ekstrakcija započinje difuzijom otapala koje prodire u čvrstu tvar i dolazi do otapanja tvari koja je u njemu topiva. Zatim se odvija prijenos otopljene tvari na površinu čvrste čestice i na kraju dolazi do prijenosa otopljene tvari iz sloja koji se nalazi na granici u glavnu masu otopine. Utjecaj na sastav aktivnih spojeva i koncentraciju u ekstraktu imaju: otapala, priprema uzorka, vrijeme izvođenja, omjer uzorka i otapala u ekstrakciji, veličina čestica, temperatura i miješanje. Preporuča se izvođenje ekstrakcije na nižim temperaturi zbog manje vjerojatnosti nestanka/gubitka tvari iz ekstrakta. Veću ukupnu površinu imaju čestice manje veličine, a veličina je bitna zbog kontakta otapala s čvrstom tvari pa se smanjenjem veličine čestica ubrzava proces ekstrakcije jer dolazi do bržeg prijenosa mase iz čvrste tvari. [43] Soxhlet ekstrakcija i ostale klasične ekstrakcije koriste veće količine štetnih organskih otapala i dugo traju. Metode zelenih ekstrakcija ne koriste organska otapala ili su količine smanjene, koriste manje energije, smanjuju troškove i vrijeme trajanja ekstrakcije. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasound assisted extraction*, UAE) smatra se zelenom ekstrakcijom. [44]

## 2.5. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

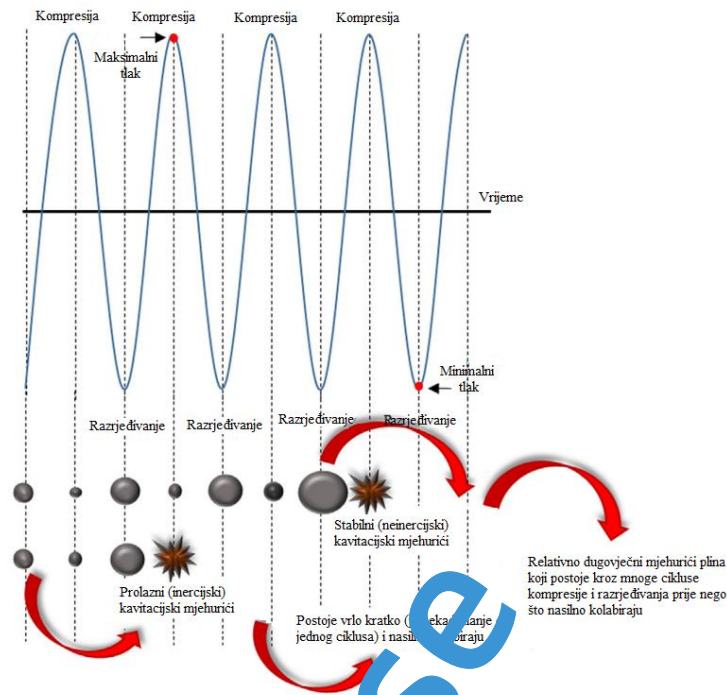
Ultrazvuk je izvor energije, longitudinalni mehanički val iznad razine čujnosti ljudskog sluha i frekvencije veće od 20 000 Hz. Opisuju ga: snaga, frekvencija i valna duljina. Intenzitet ultrazvuka se računa prema iznosu navedenih parametara te se prema njemu klasificiraju načini na koje će se koristiti ultrazvuk. Prema intenzitetu dijelimo ga u

dvije kategorije: ultrazvuk snage i dijagnostički ultrazvuk. Ultrazvuk snage je ultrazvuk visokog intenziteta koji ima nisku frekvenciju raspona 16- 100 kHz ( $I = 10 -1000 \text{ W/cm}^2$ ) i uključen je u aplikacije obrade i ekstrakcije uzoraka. Dijagnostički ultrazvuk je karakteriziran niskim intenzitetom i visokom frekvencijom raspona 100 kHz do 1 MHz ( $I = \text{W/cm}^2$ ) i primjenjuje se najčešće u nerazornoj analizi za osiguranje kvalitete i u kontroli procesa. [44]

U postupku ekstrakcije potpomognute ultrazvukom dolazi do urušavanja mjehurića plina koji nastaju u slučaju dovoljno visokog intenziteta ultrazvuka u ekspanzijskom ciklusu. Nakon urušavanja mjehurića nastaju udarni valovi koji dovode do pucanja stanične stijenke te time dolazi do oslobađanja unutarstaničnog sadržaja i pospješuje se oslobađanje ciljanih spojeva. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ima brojne prednosti: jednostavna je za korištenje, pristupačna cijena (jeftina), povećava prijenos mase i kinetiku reakcija i prikladna je za široki spektar otapala za primjenu u industriji. Na djelotvornost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom utječu: temperatura otapala, tlak, vrijeme djelovanja ultrazvuka i učestalost ultrazvučnih valova/energije. [45]

### 2.5.1. Kavitacija

Učinci uzrokovani ultrazvukom povezani su s fenomenom kavitacije. Kada ultrazvučni val prolazi kroz medij dolazi do nastajanja uzdužnih pomaka s nizom kompresija i razrjeđivanja u česticama medija. U područjima promjenjivog tlaka uočava se učinak kavitacije i stvaranje mjehurića plina. Mjehurići koji nastaju tijekom vala, odnosno procesa sonikacije, mogu mijenjati svoj oblik i veličinu u procesu ciklusa razrjeđivanja i prilikom kompresije (*Slika 3*). Mjehurići će rasti tijekom razdoblja od nekoliko ciklusa dok dosegnu takozvanu „kritičnu“ veličinu, a zatim nasilno kolabiraju i dolazi do oslobađanja značajne količine energije. Proces kojim se u tekućinama na koje djeluje ultrazvuk stvaraju mikromjehurići, šire i implozivno kolabiraju, naziva se "akustična kavitacija". [44]



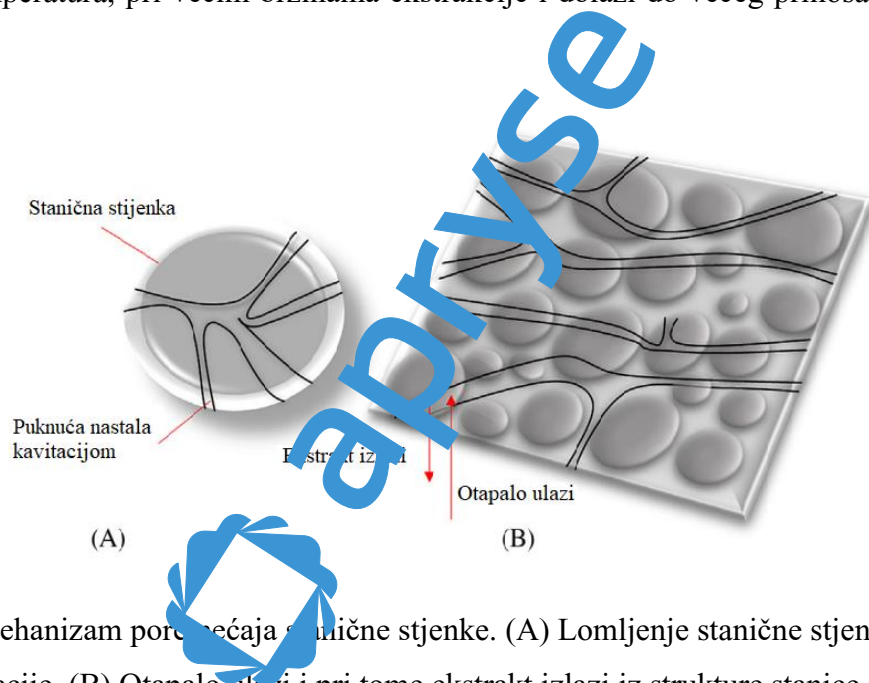
**Slika 3.** Akustična kavitacija. [44]

Kolaps (raspad) mikromjehurića izaziva izrazite lokalne uvjete, koji uključuju: temperaturu od oko 5000 K i tlak od oko 50-1000 atm. Područja visoke temperature i s uvjetima visokog tlaka zovu se vruće točke koje imaju sposobnost drastično povećati kemijsku reaktivnost u određenom mediju. Kavitacijski mjehurići koji nastaju dijele se u dvije skupine, na prolaznu (inercijsku) i stabilnu (neinercijalnu) kavitaciju. Prolaznom kavitacijom nastaju kavitacijski mjehurići koji imaju kratki vijek trajanja koji je ponekad kraći od samog ciklusa. S druge strane, postoji stabilna kavitacija prilikom koje će nastati vrlo neuništivi mjehurići plina koji postoje kroz mnoge cikluse razrjeđivanja i kompresije. Urušavanjem kavitacijskih mjehurića dolazi do promjene tlaka i temperature i te promjene uzrokuju smicanje, stanični poremećaj i smanjenje debljine staničnih membrana. Rezultat urušavanja mjehurića je pojačano prodiranje otapala u stanicu i pojačani prijenos mase željenih spojeva direktno u otapalo (**Slika 4.**). Raspad kavitacijskih mjehurića na mikroskopskoj razini uzrokuje još i stvaranje turbulencija, a u raspadu dolazi do postizanja velikih brzina međučestičnih sudara i diverzije u mikroporoznim česticama matrice i rezultat svega toga je ubrzana difuzija. Dakle, mehanički i kavitacijski učinci koji su odgovorni za ekstrakciju sastojaka mogu se opisati u dva koraka [44]:

1. Ulazak otapala u matricu, smanjenje veličine čestica i mehanički učinci će omogućiti bolje prodiranje otapala

2. Oslobađanje ekstrakta iz matrice (veća površina kontakta između faza čvrsto-tekuće).

Pritom stanični sadržaj brzo i lako difundira iz matrice u ekstrakcijski medij. Osim učinaka fenomena akustične kavitacije na kidanje staničnih stijenki time se povećava i propusnost krutih materijala za otapala, mikromlaznice i udarni valovi mogu znatno povećati koeficijent prijenosa mase čvrsto-tekuće zbog učinaka mikrorazmjera u sustavu. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pridonosi: povećanju prijenosa mase, manjoj potrošnji toksičnih otapala, boljem prodiranju otapala, a također i proces ekstrakcije se može provoditi u nižem rasponu temperatura, pri većim brzinama ekstrakcije i dolazi do većeg prinosa proizvoda. [44]



**Slika 4.** Mehanizam povećanja površine stanične stijenke. (A) Lomljenje stanične stijenke uslijed kavitacije. (B) Otapalo ulazi i pri tome ekstrakt izlazi iz strukture stanice. [44]

Fizikalni parametri koji imaju bitni utjecaj na proces akustične kavitacije i ekstrakcije su: snaga, frekvencija ultrazvuka, amplituda mehaničkog vala, te dizajn reaktora i oblik sonde. [44] Intenzitet sonikacije proporcionalan je amplitudi vibracije ultrazvučnog izvora i povećanje amplitude vibracije dovodi do povećanja intenziteta vibracije i povećanja sonokemijskih učinaka. Da bi se postigao prag kavitacije neophodan je minimalni intenzitet. Što zapravo znači da povećanje amplitude nije nužno za postizanje željenih rezultata. Amplitudu je potrebno povećati u slučaju kada imamo uzorke visoke viskoznosti, primjerice kada je uzorak krv. To je zato što se s povećanjem viskoznosti uzorka povećava i otpor uzorka prema kretanju ultrazvučnog vala na primjer vrha ultrazvučne sonde. Stoga je

potreban visok intenzitet (tj. velika amplituda) kako bi se ultrazvučni uređaj podesio da dobije neophodne mehaničke vibracije da bi se pospješila kavitacija u uzorku. [46]

Nužno je pažljivo izabrati otapalo koje će se koristiti za ultrazvučnu obradu. Voda se koristi kao najčešće otapalo, ali se mogu koristiti i druge manje polarne tekućine, organske tvari, a izbor otapala ovisi o samoj namjeni ekstrakcije. Površinska napetost i viskoznost otapala dovode do inhibicije kavitacije, a kada se povećaju prirodne kohezijske sile, koje djeluju unutar tekućine, dolazi do težeg postizanja kavitacije. Temperatura otapala ima dvije različite uloge u ultrazvuku. Pri visokoj temperaturi dolazi do narušavanja jake interakcije između matrice i otopljene tvari, a rezultat je brža difuzija. Dok s druge strane, porastom temperature primjećuje se porast tlaka para otapala. Dakle, kada temperatura otapala raste, raste i njegov tlak pare, pri tome dolazi do toga da viš para otapala puni kavitacijske mjehuriće, a oni tada imaju tendenciju manjeg kolapsa, odnosno učinci sonikacije su manje intenzivni od očekivanog. Zbog toga je važan kompromis između temperature i kavitacije za dobivanje očekivanih učinaka i prinosa prilikom provođenja ekstrakcije. Vanjski tlak također ima utjecaj na sonokemijske učinke. Povećanjem vanjskog tlaka potrebna je ultrazvučna energija većeg intenziteta da bi se došlo do izazivanja kavitacije i da se razbiju molekularne sile otapala. Svaka frekvencija uz određeni vanjski tlak će osigurati odgovarajuću sonokemijsku reakciju. [46]

Kada se ultrazvuk koristi kao predtretman obrade namirnice potencijalno se povećava ekstrakcija određenih komponenti, skraćuje se vrijeme određivanja elemenata, ubrzava se ekstrakcija organskih komponenti i smanjuje se korištenje organskih otapala. Također se ubrzavaju električna mjerenja povećanjem učinkovitosti prijenosa mase, ubrzavaju se enzimске reakcije, ubrzava se tehnika ekstrakcije tekuće-tekuće, poboljšavaju se performanse u ekstrakciji čvrste faze u mikroekstrakciji i povećava se točnost u tehnici disperzije čvrste matrice. [46]

### **2.5.2. Izravna i neizravna primjena ultrazvuka**

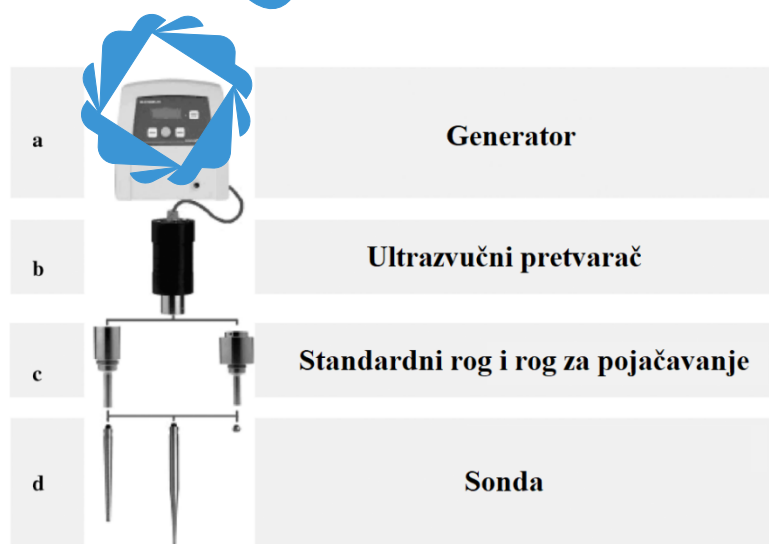
U analitičkoj kemiji ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom može se primijeniti na dva različita načina. Na uzorak se može djelovati izravno i neizravno, kroz stjenke spremnika uzorka. Izravna primjena ultrazvuka postiže se ultrazvučnim sondama koje se uranjaju direktno u uzorak te se na taj način ultrazvučna obrada izvodi direktno preko otopine bez ikakve prepreke koju bi ultrazvučni val morao prijeći osim same otopine. Neizravna

primjena ultrazvuka provodi se korištenjem ultrazvučne kupelji. U ovom slučaju ultrazvučni val prvo prolazi kroz tekućinu (u ultrazvučnom uređaju), zatim prolazi kroz stjenku posude u kojoj se nalazi uzorak i tek onda kroz sami uzorak. Zbog ovakvog načina primjene intenzitet ultrazvuka unutar posude s uzorkom manji je od očekivanog i manje je invazivan. [46]

### 2.5.3. Ultrazvučna sonda

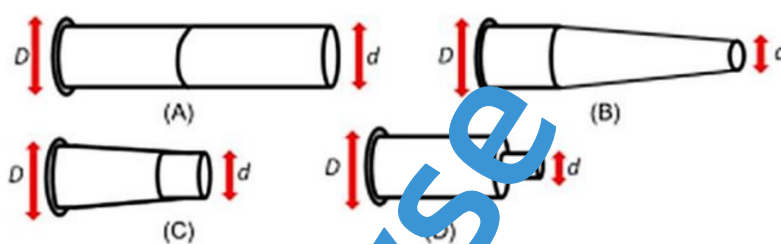
U ovoj metodi ultrazvučna sonda uronjena je izravno u spremnik uzorka i može isporučiti puno veći intenzitet ultrazvuka od ultrazvučne kupelji (100 puta veći). Sonda se općenito koristi za postizanje učinaka koji se ne mogu postići s ultrazvučnom kupelji, na primjer, određivanje žive i arsena u ljudskom urinu ili uzorcima plodova mora. Nedostatak ove metode je moguća kontaminacija uzorka metalim poput kroma ili aluminija koji se mogu odvojiti od sonde i korištenje ultrazvučnih sondu u otvorenim sustavima pri čemu može doći do gubitka hlapljivih analita. [46]

Dijelovi ultrazvučne sonde su: generator koji pretvara mrežni napon u električnu energiju visoke frekvencije (općenito 20 kHz), ultrazvučni pretvarač koji pretvara električnu energiju u mehaničke vibracije fiksne frekvencije, standardni rog i rogovi za pojačavanje koji povisuju amplitudu sonikacije i sonde koje prenose ultrazvučnu energiju u uzorak (*Slika 5.*). [46]



*Slika 5.* Osnovni dijelovi ultrazvučne sonde. [46]

Postoje namjenske sonde za određeni raspon volumena i stoga se moraju izbjegavati pogreške poput korištenja malih sondi za velike volumene ili velikih sondi za male volumene. Najvažniji dio cijelog sustava je sonda koja omogućuje prijenos vibracije kroz daljnu duljinu metala na takav način da se isporučena snaga povećava. Snaga povećanja ovisi o obliku sonde (**Slika 6.**). Prema obliku razlikujemo tri vrste sondi, a to su [46]: stepenasta sonda koja nudi veliko povišenje amplitude od prikazanih oblika, eksponencijalni oblik sonde (težak za proizvodnju) koji nudi male promjere na svom radnom kraju, što ga čini posebno prikladnim za mikro-aplikacije, te cilindrična i linearna sonda.



**Slika 6.** Raznovrsni oblici sondi: (A) cilindrična, (B) eksponencijalna, (C) linearna, (D) stepenasta. [46]

Ultrazvučne sonde se najčešće izrađuju od legura titana (termootporne), također se mogu tretirati u autoklavu i nisu osjetljive na korozivne medije. Volumen uzorka koji se tretira zajedno s vrstom uzorka ključni su u određivanju odabira jedinice i tipa sonde. Što je veća amplituda koju daje sonda, to je sonikacija intenzivnija. Sonde izrađene od legure titana mogu kontaminirati otopine u kojima se koriste metalima kao što su Al ili Cr. Iz tog razloga, istraživači koji rade na analizi legova metala dugo su zahtijevali razvoj ultrazvučnih sondi izrađenih od nekontaminiranog materijala. Tako je razvijena tzv. silika ultrazvučna sonda koja je napravljena od silicijevog dioksida. Ova vrsta sonde ima prednost ulaska metala bez čestica u uzorak. Osim toga, izbjegnuta je tipična kontaminacija metala od titanskih sondi. Silikatne sonde su visoko otporne na kemijske i temperature udare i nemaju svojstvo električne vodljivosti. Nedostatak je što je čvrstoća kavitacije silicijevog stakla relativno niska i amplituda se mora ograničiti. Spiralne sonde su izrađene od Ti, Al i V, omogućuju blagu ultrazvučnu obradu vodenih medija u epruветama i drugim tankim laboratorijskim spremnicima. Za razliku od tradicionalnih sondi, ultrazvučna je snaga raspoređena cijelom površinom spiralne sonde, čime je raspodjela jačine (intenziteta) sonikacije homogenija u cijeloj duljini sonde. Nedostaci se odnose na kontaminaciju metala, kao i kod svih sondi

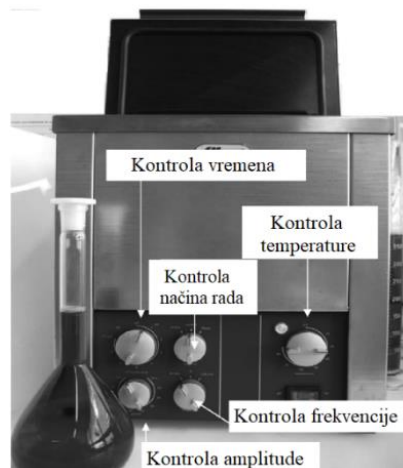
izrađenih od titana. Višestruke sonde proizvode se kako bi se omogućila uporaba dvije ili više sonda u isto vrijeme. Glavna prednost ove vrste sonikatora je propusnost, koja je znatno povećana. [46]

#### 2.5.4. Ultrazvučna kupelj

Ultrazvučna kupelj sadrži spremnik napravljen od nehrđajućeg čelika i koji sadrži jednu ili više ultrazvučnih sonda. Ultrazvuk u ultrazvučnoj kupelji raspodjeljuje se heterogeno, te se zbog toga reakcijski spremnik smješta na mjestu gdje se postiže najveći intenzitet sonikacije. Za postizanje dobrih rezultata i da bi se postigla minimalna refleksija ultrazvuka, najbolji izbor oblika spremnika (posude) je spremnik s ravnim dnom, poput stožaste tikvice, te su preporuke da i debljina spremnika bude minimalna. [44]

Postoje tri klase u koje se kategoriziraju ultrazvučne kupelji. Klasična je uobičajena ultrazvučna kupelj, koja se može pronaći u većini laboratorija, a radi sa samo jednom frekvencijom, obično 40 kHz, i može se isporučiti s kontrolom temperature. Drugi tip je multifrekventna jedinica koja radi koristeći u isto vrijeme ultrazvučnu sondu s različitim frekvencijama, na primjer 25 i 40 kHz, na dnu odnosno sa strane, a prednost toga je jednolika ultrazvučna raspodjela snage. Treći model je najnapredniji u smislu tehnologije i uključuje sljedeće značajke: dvostruku frekvenciju sonikacije, izbor između 25/45 ili 35/130 kHz (kupelji su dizajnirane za rad s jednom od dvije frekvencije odjednom), regulaciju snage, intenzitet sonikacije može se kontrolirati kontrolom amplitude (10–100%), tri načina rada [46]: sweep (u ovom načinu rada frekvencija će se razlikovati unutar određenog raspona, na ovaj način je učinkovitost ultrazvuka homogenije raspodijeljena u kadi u usporedbi sa standardnim radom), standard, degas (struja se zaustavlja na kratko da ultrazvučne sile ne zadržavaju mjehuriće), te grijanje i programator za vrijeme. *Slika 7* prikazuje takvu modernu ultrazvučnu kupelj. [46]





**Slika 7.** Moderna ultrazvučna kupelj koja uključuje sljedeća poboljšanja: dvostruka frekvencija sonikacije, promjenjiva amplituda sonikacije i tri različita načina sonikacije.

[46]

Većina primjena ultrazvučne kupelji izvodi se duže od 30 minuta i, kao posljedica kontinuirane ultrazvučne obrade, tekućina u spremniku se zagrijava. Endotermne reakcije mogu iskoristiti ovo zagrijavanje. Čim toga, kinetika mnogih reakcija se ubrzava kada se temperatura poveća. Međutim, mogu se pojaviti neki problemi u pogledu učinkovitosti i ponovljivosti dobivenih sonokemijskih rezultata. Većina ultrazvučnih kupelji koristi se bez kontrole temperature, budući da je zagrijavanje tekućine spor proces, konačna temperatura postignuta za dano vrijeme sonikacije ovisi o temperaturi laboratorija (tj. ljeti ili zimi). Stoga je općenito prihvaćeno da je potrebno odrediti maksimalnu temperaturu koju kupelj doseže i održava, tako zvanu temperaturu ravnoteže, kada kontinuirano radi u uvjetima okoline. Većina reakcija mora se izvesti pri ravnotežnoj temperaturi jednostavnim punjenjem kupelji vodom koja je prethodno zagrijana na tu temperaturu. Alternativno, problem se može riješiti kupnjom ultrazvučne kupelji s grijačem. Međutim, prije izvođenja ultrazvučnog tretmana, preporuča se pričekati da se postigne radna temperatura. Kada je rad na sobnoj temperaturi obavezan, kontrola se može postići jednostavnim recirkulacijskim sustavom vodenog hlađenja priključenim na ultrazvučnu kupelj. [46]

Oblik reakcijske posude je bitan za ispravnu primjenu ultrazvučne kupelji. To je zbog toga što, kao i kod bilo kojeg drugog vala, kada ultrazvučni val udari u bilo koju čvrstu površinu dio energije se reflektira. Ako je baza posude ravna, kao što je u konusnoj tikvici, reflektirani ultrazvuk je minimalan. Obrnuto, kada je baza spremnika sferična, ultrazvučni val pogađa spremnik pod kutom, a veliki dio ultrazvučnog vala se odbija. Intenzitet

ultrazvuka se smanjuje kako prolazi kroz medij. Opseg prigušenja obrnuto je proporcionalan frekvenciji. Stoga debljina stjenke spremnika posude treba biti minimalna kako bi se izbjeglo intenzivno prigušenje. Ovaj se problem također mora imati na umu kada je cilj favorizirati čvrsto-tekuću ekstrakciju analita iz krutih tvari taloženih na stupcu jer unutar stupca učinkovitost ultrazvučnog vala se smanjuje dok prolazi kroz krutinu do unutarnjeg dijela stupca. Posljedično, veliki i tanki stupci su poželjniji od kratkih i širokih za primjene ultrazvučne kupelji u stupcu. [46]



## 2.6. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) dominantna je tehnologija koja se koristi u laboratorijima diljem svijeta posljednjih 30 godina. Evolucija materijala za pakiranje čestica unutar kolone, koje se koriste za odvajanje, značajno je pridonijela unaprjeđenju HPLC metoda. Temeljni principi tih materijala vode se van Deemterovom jednadžbom [47] u kojoj empirijska formula opisuje odnos između linearne brzine (brzine protoka) i visine ploče (engl. *height equivalent to a theoretical plate*, HETP ili učinkovitost stupca). Veličina čestica je jedna od varijabli i zato se van Deemterova krivulja može koristiti za ispitivanje kromatografske učinkovitosti. "Potreba za brzinom" potaknula je korištenje manjih stupaca i veće brzine protoka, povišenjem temperature, koja ima dvostruku prednost snižava viskoznost i povećava prijenos mase povećanjem difuzije analita. Istraživanjima je utvrđeno [48] kako smanjenjem veličine čestica punila kolone na manje od 2,5 mm dolazi do značajnog poboljšanja u učinkovitosti koja se povećava pri povećanom protoku ili linearnim brzinama. Korištenjem manjih čestica, brzina i vršni kapacitet (gornja granica razlučivosti i mjera kvalitete odvajanja) proširuju se do novih granica koje su nazvane UPLC. [48]

Iako su visoke učinkovitosti, neporozne čestice od 1,5 mm komercijalno dostupne, nedostaci su slaba nosivost i zadržavanje zbog male površine. Kako bi održao zadržavanje i kapacitet sličan HPLC-u, UPLC može koristiti nove porozne čestice koje mogu izdržati visoke tlakove. Čestice na bazi silicijevog dioksida imaju dobru mehaničku čvrstoću, ali mogu imati niz nedostataka, koji uključuju ograničen pH raspon i zaostatak bazičnih analita. Polimerne kolone mogu prevladati pH ograničenja, ali imaju svoje probleme, uključujući nisku učinkovitost i ograničene kapacitete. [48]

Godine 2000. proizvedene su kolone korištenjem klasične sol-gel sinteze koja uključuje ugljik u obliku metilnih skupina, te su kolone mehanički jake, s visokom učinkovitošću i rade u proširenom pH rasponu. Kako bi se osigurala vrsta poboljšane mehaničke stabilnosti potrebne za UPLC razvijena je druga generacija premoštene etanske hibridne tehnologije (engl. *ethylene bridged hybrid*, BEH). Ove čestice od 1,7 mm dobivaju svoju poboljšanu mehaničku stabilnost premoštavanjem metilnih skupina u matrici silicijevog dioksida. [48]

Ujednačenost nabijenog sloja također je kritična, posebno ako kraći stupci žele održati rezoluciju uz postizanje cilja bržeg odvajanja. Osim toga, pri visokim tlakovima, frikcijsko zagrijavanje mobilne faze može biti prilično značajno i mora se uzeti u obzir. S promjerima stupaca koji se obično koriste u HPLC-u (3,0 do 4,6 mm), posljedica zagrijavanja trenjem je gubitak performansi zbog temperaturno induciranog nejednolikog protoka. Kako bi se smanjili učinci zagrijavanja trenjem, za UPLC se obično koriste stupci manjeg promjera (1– 2,1 mm). [48]

Injekcije malog volumena s minimalnim prijenosom također su potrebne kako bi se ostvarile prednosti povećane osjetljivosti. S česticama od 1,7 mm dobivaju se vršne širine polovice visine manje od jedne sekunde, što predstavlja značajan izazov za detektor. Kako bi se precizno i reproducibilno integrirao vrh analita, stopa uzorkovanja detektora mora biti dovoljno visoka da uhvati dovoljno podatkovnih točaka preko vrha. Osim toga, ćelija detektora mora imati minimalnu disperziju (volumen) kako bi se očuvala učinkovitost odvajanja. Konceptualno, povećanje osjetljivosti za UPLC detekciju trebalo bi biti 2– 3 puta veće nego kod HPLC odvajanja, ovisno o tehnici detekcije koja se koristi. Korištenjem UPLC-a moguće je u potpunosti iskoristiti kromatografske principe za izvođenje separacija korištenjem kraćih stupaca i/ili viših brzina protoka za povećanu brzinu, uz vrhunsku rezoluciju i osjetljivost. Za neke analize brzina je od sekundarne važnosti, a vršni kapacitet i rezolucija zauzimaju središnje mjesto. [48]

Brža UPLC odvajanja veće rezolucije mogu skratiti vrijeme razvoja metode s dana, na sate ili čak minute. Detekciju spektrometrije mase znatno poboljšava UPLC jer povećanje vršne koncentracije i smanjenje kromatografske disperzije pri manjim brzinama protoka dovodi do povećane učinkovitosti ionizacije izvora. Dokazano je da se veća kromatografska učinkovitost, koja proizlazi iz upotrebe UPLC-a, prevodi u bolju rezoluciju i veći vršni kapacitet, što je osobito važno za analizu peptida i proteina. [48]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije

- ultračista voda
- metanol (metilni alkohol, CH<sub>3</sub>OH)
- natrijev acetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)
- acetonitril (CH<sub>3</sub>CN)
- ledena octena kiselina (CH<sub>3</sub>COOH)
- 2-merkptoetanol (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)
- natrijev tetraborat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>10</sub>)
- apsolutni etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)
- *o*-phthaldialdehide (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CHO)<sub>2</sub>)

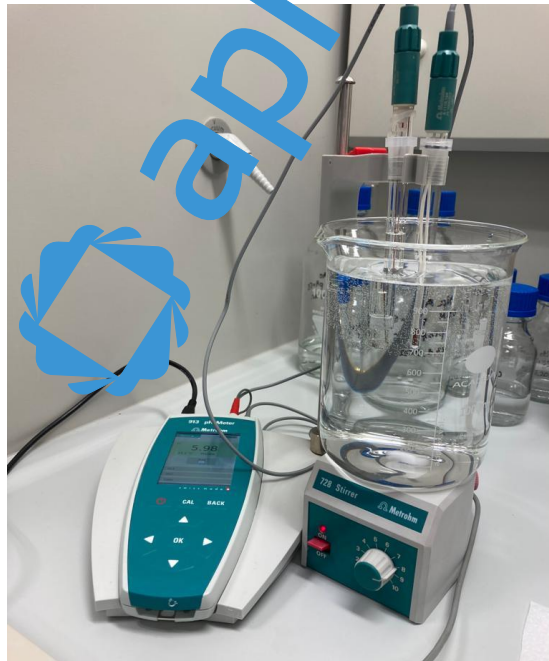
Priprema OPA reagensa: 5 mL natrijev tetraborat (>99,5 %), 500 µL apsolutni etanol (>99%), 50 µL 2-merkptoetanol (≥99 %), 50 µL *o*-phthaldialdehide (≥99 %).

#### 3.2. Pribor i instrumentacija

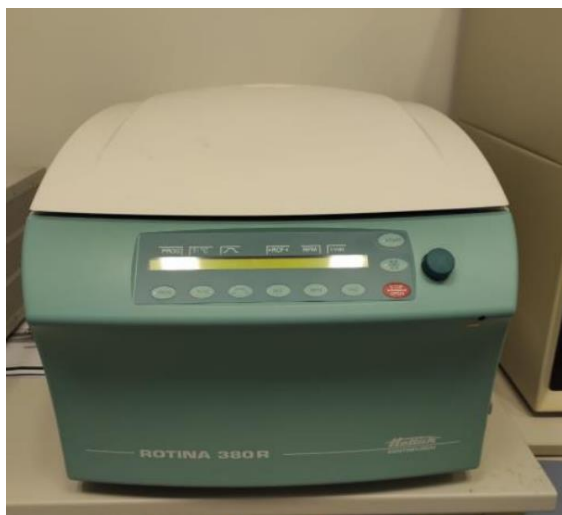
- kivete za centrifugiranje (polipropilen, PP)
- vijalice 1,5 mL
- graduirana pipeta
- mikropipeta
- laboratorijske čaše
- šprice
- odmjerne tikvice
- analitička vaga (Sartorius, Njemačka) (*Slika 8.*)
- laboratorijska tresilica (vorteks) (IKA, Njemačka)
- pH metar i magnetska miješalica (Metrohm, Švicarska) (*Slika 9.*)
- centrifuga (Hettich, Njemačka) (*Slika 10.*)
- homogenizator (IKA, Njemačka) (*Slika 11.*)
- ultrazvučna kupelj s regulatorom temperature (Bandelin, Njemačka) (*Slika 12.*)
- sustav za ultrazvučnu homogenizaciju (Sonoplus 3100, Njemačka) (*Slika 13.*)
- uređaj za kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (UPLC) (Shimadzu, Japan) (*Slika 14.*)



*Slika 8.* Analitička vaga



*Slika 9.* pH metar i magnetska miješalica.



*Slika 10.* Centrifuga.



*Slika 11.* Homogenizator.



*Slika 12.* Ultrazvučna kupelj s regulatorom temperature.



*Slika 13.* Sustav za ultrazvučnu homogenizaciju.





*Slika 14.* Uređaj za kromatografiju ultra visoke djelotvornosti.



### **3.3. Uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC)**

#### **3.3.1. Uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom**

##### **Ekstrakcija potpomognuta direktnim ultrazvukom (UZVS)**

- Amplituda: 70 %
- Interval pulsa: 0-120 s
- Interval pauze: 0-2 s
- Ukupno vrijeme trajanja: 60-180 s

##### **Ekstrakcija potpomognuta indirektnim ultrazvukom**

- RF snaga: 80/320 W
- HF frekvencija: 35 kHz
- Interval ultrazvuka: kontinuirano
- Ukupno vrijeme trajanja: 30-60 min

#### **3.3.2. Uvjeti tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti (UPLC)**

- Protok: 0,4 mL/min
- Temperatura pećnice: 52 °C
- Vrijeme trajanja analize: 20 min
- Valna duljina: ekscitacija: 370 nm  
emisijska: 375 nm
- Injektirani volumen: 20 µL
- Mobilna faza: natrijev acetat (≥98,5 %) (pH=5,5): metanol (≥99,9 %): acetonitril (≥99,95 %) = 75: 15: 10
- Retencijsko vrijeme karnozina: 6,7 min
- Retencijsko vrijeme anserina: 6,3 min

### **3.4. Kalibracija**

Kalibracija je postupak kojim utvrđujemo baznu krivulju. Ovim postupkom vršimo korekciju mjernog instrumenta s ciljem smanjivanja systemske pogreške. Kalibraciju izvodimo s mjernim veličinama čije su vrijednosti poznate.

Kalibracija je provedena na način da je pripremljen niz standardnih otopina karnozina i anserina u rasponu koncentracija 12,5 – 200 mg/L. Nakon mjerenja intenziteta zračenja konstruirana se kalibracijska krivulja.

### **3.5. Priprema uzoraka za analizu**

Uzorci pilećih prsa su za analizu pripremani prema kasnije opisanom protokolu.

Korišteni su uzorci pilećih prsa kupljenih u trgovačkom lancu. Ekstrakcija je provedena na uzorcima koji su usitnjeni u sjeckalici za kućnu upotrebu ili koji nisu bili prethodno usitnjeni. Prikupljeni uzorci su čuvani u hladnjaku na temperaturi -20 °C. [49]

#### **3.5.1. Ekstrakcija karnozina iz uzoraka pilećeg mesa**

Uspoređivani su i optimirani parametri 3 metode ekstrakcije karnozina iz pilećeg mesa. Nakon ekstrakcije, svi uzorci su centrifugirani 20 minuta na 6000 rpm i temperaturi 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je profiltriran kroz filtre za špricu 0,20 µm, i prenesen u PP epruvete od 2 mL. Tako pripremljeni uzorci čuvani su u hladnjaku na -20 °C do analize.

##### **3.5.1.1. Ekstrakcija homogenizatorom**

2,5 grama uzorka mesa pilećih prsa odvagano je u PP kivetama za centrifugu, dodano je 25 mL ultračiste vode i homogenizirano uz optimiranje vremena homogenizacije. Vrijeme homogenizacije je bilo 20, 60 i 120 sekundi.

Ova metoda je uz vrijeme ekstrakcije 60 s odabrana kao standardna metoda ekstrakcije.

##### **3.5.1.2. Ekstrakcija indirektnim ultrazvukom**

2,5 grama uzorka mesa pilećih prsa odvagano je u PP kivetama za centrifugu, dodano je 25 mL ultračiste vode i homogenizirano u ultrazvučnoj kupelji bez podešavanja temperature. Vrijeme ekstrakcije je bilo 30 odnosno 60 minuta.

##### **3.5.1.3. Ekstrakcija direktnim ultrazvukom**

2,5 grama uzorka mesa pilećih prsa odvagano je u PP kivetama za centrifugu, dodano je 25 mL ultračiste vode i homogenizirano ultrazvučnim homogenizatorom sa sondom. Parametri koji su optimirani su vrijeme trajanja pulsa, vrijeme trajanja pauze i ukupno vrijeme ekstrakcije (**Tablica 1.**).

**Tablica 1.** Optimirani parametri ekstrakcije direktnim ultrazvukom.

	<b>vrijeme trajanja pulsa (s)</b>	<b>vrijeme trajanja pauze (s)</b>	<b>ukupno vrijeme ekstrakcije (s)</b>
1	60	0	60
2	120	0	120
3	3	2	180

### 3.5.1.3.1. Ekstrakcija direktnim ultrazvukom usitnjenih i neusitnjenih uzoraka

Prema istom, ranije opisanom postupku, ekstrahiran je karnozin iz uzoraka koji su prije ekstrakcije usitnjeni i koji nisu bili usitnjeni (odvaženo je 2,5 grama uzorka pilećeg mesa u komadu). Ekstrakcija je napravljena u pulsnoj načinu rada u ukupnom vremenu ekstrakcije od 180 s, s trajanjem pulsa 3 s i pauze 2 s.

### 3.6. Provjera prikladnosti metode

Provjera prikladnosti metode pripreme uzoraka i parametara UPLC analize, provedena je mjerenjem sljedećih uzoraka:

Uzorak 1: 100  $\mu\text{L}$  uzorka + 300  $\mu\text{L}$  ultračiste vode

Uzorak 2: 100  $\mu\text{L}$  standarda karnozina + 100  $\mu\text{L}$  standardna anserina + 200  $\mu\text{L}$  ultračiste vode

Uzorak 3: 100  $\mu\text{L}$  uzorka + 100  $\mu\text{L}$  standarda karnozina + 100  $\mu\text{L}$  standardna anserina + 100  $\mu\text{L}$  ultračiste vode

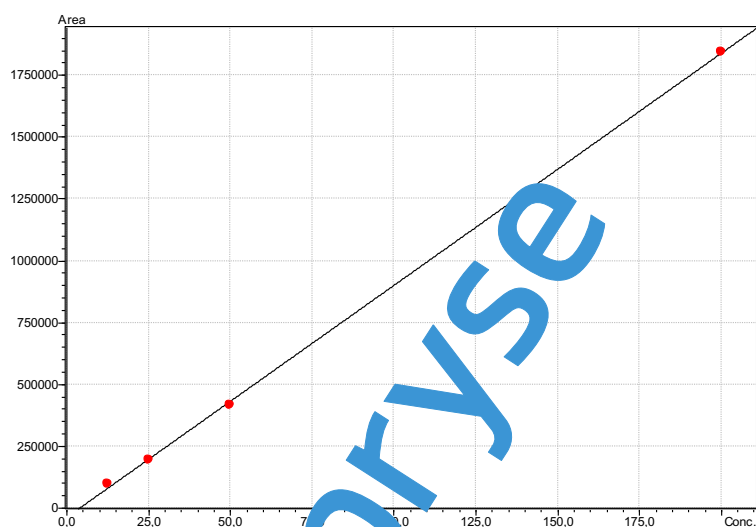
Svim uzorcima je neposredno prije UPLC analize dodano 400  $\mu\text{L}$  OPA reagensa, uzorci su zatim miješani na vorteksu 30 s. Tako pripremljen uzorak je analiziran pomoću UPLC-a.

Sva mjerenja realnih uzoraka su provedena na 5 paralelnih uzoraka. Svi uzorci su pripremljeni iz istog uzorka mesa pilećih prsa.

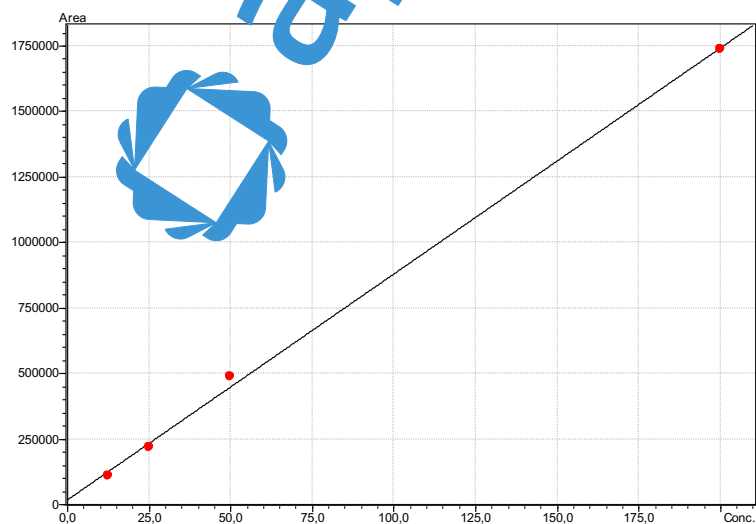
## 4. REZULTATI I RASPAVA

### 4.1. Kalibracijski pravac

Nakon mjerenja intenziteta zračenja pripremljenoj seriji standardnih otopina karnozina i anserina, konstruirana je kalibracijska krivulja. Kalibracijske krivulje za karnozin i anserin prikazane su na *slici 15. i 16.* Dobivena vrijednost koeficijenta determinacije za karnozin je 0,9997 a za anserin 0,9987.



*Slika 15.* Kalibracijska krivulja za karnozin.



*Slika 16.* Kalibracijska krivulja za anserin.

## 4.2. Provjera prikladnosti metode pripreme uzoraka

Provjera prikladnosti standardne metode ispitana je na ranije opisani način. Dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 2**.

**Tablica 2.** Rezultati dobiveni provjerom prikladnosti metode.

oznaka uzorka	mg/L	
	karnozin	anserin
1	22.0752	29.5263
2	61.7575	129.201
3	83.7332	154.717
teoretski	83.833	158.727
iskorištenje %	<b>99.881</b>	<b>97.474</b>

Dobiveni rezultati, iskorištenje 99,881 % za karnozin i 97,474 % za anserin pokazuju da je standardna metoda pripreme uzorka (ekstrakcija homogenizatorom u trajanju od 60 s) i odabrani parametri UPLC analize prikladni za određivanje sadržaja karnozina i anserina u uzorcima pilećeg mesa.

## 4.3. Rezultati analize uzoraka pilećeg mesa

### 4.3.1. Ekstrakcija homogenizatorom

Rezultati dobiveni ekstrakcijom homogenizatorom uz optimiranje vremena ekstrakcije prikazani su u **tablici 3**. Kako je kao standardna metoda uzeta metoda ekstrakcije homogenizatorom u trajanju od 60 s, vidimo da je smanjenjem vremena ekstrakcije na 20 s određeni sadržaj karnozina i anserina značajno manji, 66,6 % za karnozin i 60,8 % za anserin. Produljenjem vremena ekstrakcije za 120 s, određeni sadržaj karnozina je veći za 5,9 %, a anserina za 5,4 % u odnosu na standardnu metodu. Najmanja RSD vrijednost dobivena je za uzorke kojima je sadržaj karnozina i anserina određen nakon 60 s ekstrakcije homogenizatorom.

**Tablica 3.** Sadržaj karnozina i anserina određen nakon ekstrakcije homogenizatorom uz optimiranje vremena ekstrakcije.

vrijeme ekstrakcije	20 s		60 s		180 s	
	mg/kg mesa		mg/kg mesa		mg/kg mesa	
	anserin	karnozin	anserin	karnozin	anserin	karnozin
srednja vrijednost	1146.99	491.05	1886.905	737.252	1989.30	781.25
SD	155.89	65.14	4.253	4.171	157.61	51.69
RSD (%)	13.59	13.27	0.225	0.566	7.92	6.62
interval pouzdanosti ( $\pm$ )	136.64	57.10	3.727	4.087	154.46	50.65

#### 4.3.2. Ekstrakcija indirektnim ultrazvukom

Ekstrakcija indirektnim ultrazvukom provedena je u trajanju od 30 i 60 min. Dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 4**. Dužim vremenom ekstrakcije povećao se sadržaj karnozina za 11,7 % i anserina za 10,7 % pa možemo zaključiti da se produljenjem vremena ekstrakcije indirektnim ultrazvukom poboljšava ekstrakcija karnozina i anserina.

**Tablica 4.** Sadržaj karnozina i anserina određen nakon ekstrakcije indirektnim ultrazvukom uz optimiranje vremena ekstrakcije.

vrijeme ekstrakcije	30 min.		60 min.	
	mg/kg mesa		mg/kg mesa	
	anserin	karnozin	anserin	karnozin
srednja vrijednost	1755.48	681.55	1925.41	761.41
SD	145.90	48.66	37.13	14.82
RSD (%)	8.41	7.14	1.93	1.95
interval pouzdanosti ( $\pm$ )	142.98	47.68	36.38	14.53

#### 4.3.3. Ekstrakcija direktnim ultrazvukom

Rezultati dobiveni optimiranjem parametara ekstrakcije (vrijeme pulsa, vrijeme pauze, vrijeme trajanja ekstrakcije) prikazani su u **tablici 5**. Uz kontinuirano djelovanje ultrazvuka, ne značajno veći sadržaj karnozina (1,4 %) i anserina (0,64 %) određen je za vrijeme ekstrakcije 60 s u odnosu na 120 s. Vremenski najdulja ekstrakcija, 180 s, provedena je u pulsnom načinu rada uz 3 s pulsa i pauzu između dva pulsa u trajanju od 2 s. Ekstrakcijom sa pulsni načinom rada određen je najmanji sadržaj karnozina i anserina i to 8,3 % za karnozin i 11,4 % za anserin u odnosu na najuspješniju ekstrakciju direktnim ultrazvukom (ekstrakcija 60 s, kontinuirano). Najmanja RSD vrijednost za oba određivana analita dobivena je kontinuiranom direktnom ekstrakcijom u trajanju od 120 s.

**Tablica 5.** Sadržaj karnozina i anserina određen nakon ekstrakcije direktnim ultrazvukom uz optimiranje parametara ekstrakcije.

vrijeme ekstrakcije	180 s (3 s puls + 2 s pauza)		120 s (kontinuirano)		60 s (kontinuirano)	
	mg/kg mesa		mg/kg mesa		mg/kg mesa	
	anserin	karnozin	anserin	karnozin	anserin	karnozin
srednja vrijednost	1905.23	756.43	2108.62	807.86	2122.24	819.02
SD	283.361	107.436	66.76	21.60	104.18	34.74
RSD (%)	14.873	14.203	3.17	2.67	4.91	4.24
interval pouzdanosti ( $\pm$ )	248.372	105.285	58.52	18.93	91.32	30.45

#### 4.3.3.1. Ekstrakcija direktnim ultrazvukom usitnjenih i neusitnjenih uzoraka

Pulsnim načinom rada ekstrahirani su karnozin i anserin iz usitnjenih i neusitnjenih uzoraka pilećeg mesa a dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 6.** Sadržaj karnozina je 7,2 %, a anserina 6,2 % veći u neusitnjenim uzorcima što ukazuje da uzorci mesa ne moraju prije ekstrakcije direktnim ultrazvukom biti usitnjeni.

**Tablica 6.** Sadržaj karnozina i anserina određen nakon ekstrakcije direktnim ultrazvukom u prethodno usitnjenim i neusitnjenim uzorcima

vrijeme ekstrakcije	neusitnjeni uzorci		usitnjeni uzorci	
	3 min. (3 s puls + 2 s pauza)		3 min. (3 s puls + 2 s pauza)	
	anserin	karnozin	anserin	karnozin
srednja vrijednost	2024.163	810.710	1905.227	756.432
SD	283.361	115.159	283.361	107.436
RSD (%)	12.179	14.205	14.873	14.203
interval pouzdanosti ( $\pm$ )	216.091	100.940	248.372	105.285



## 5. ZAKLJUČAK

Karnozin je po kemijskom sastavu dipeptid sastavljen od aminokiselina  $\beta$ -alanina i L-histidina. Najčešće varijante su metilirani analozi, anserin i ofidin (balenin). Karnozin (i analozi) se pojavljuje u životinjama i koncentracije se razlikuju između različitih sisavaca. U ovom radu ispitan je utjecaj direktne i indirektno ultrazvučne metode na ekstrakciju karnozina iz mesa pilećih prsa (kupljenih u trgovačkom lancu) u odnosu na standardnu metodu koja koristi homogenizator. Kod metode s homogenizatorom najmanja RSD vrijednost dobivena je za uzorke kojima je sadržaj karnozina i anserina određen nakon 60 s ekstrakcije homogenizatorom i ta je metoda izabrana kao standardna. Ekstrakcija indirektnim ultrazvukom provedena je u trajanju od 30 i 60 min te iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da se produljenjem vremena ekstrakcije povećava sadržaj karnozina i anserina i poboljšava ekstrakcija. Prilikom ekstrakcije indirektnim ultrazvukom sa pulsnom načinom rada određen je najmanji sadržaj karnozina i anserina u odnosu na najuspješniju ekstrakciju direktnim ultrazvukom kontinuirano 60 s. Najmanja RSD vrijednost za oba određivana analita dobivena je kontinuirano i direktno ekstrakcijom u trajanju od 120 s. Ispitana je i razlika u koncentraciji karnozina i anserina između usitnjenih i neusitnjenih uzoraka pilećih prsa te su dobivene veće vrijednosti u neusitnjenim uzorcima što govori da uzorci ne moraju nužno prije ekstrakcije direktnim ultrazvukom biti usitnjeni. Na kraju možemo zaključiti da ultrazvukom poboljšana ekstrakcija u realnim uzorcima poboljšava ekstrakciju, skraćuje vrijeme trajanja ekstrakcije i nema štetan utjecaj na okoliš što ju čini zelenom metodom u kulinariji. Dok s druge strane UPLC analiza omogućuje rad pri višim tlakovima, bolju separaciju prištedom kraćim stupaca i/ili većim brzinama protoka, veću brzinu odvajanja, bolju rezoluciju i osjetljivost.

## 6. LITERATURA

- [1] V. S. Gulewitch, S. Amiradzibi: Uber das carnosin, eine neue organische Base des Fleischextraktes, *Ber Deutsch Chem Ges*, B33 (1900), 1902-1903.
- [2] A. A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave: Physiology and pathophysiology of carnosine, *Physiol Rev*, 93 (2013), 1803–1845.
- [3] A. Torreggiani, M. Tamba, G. Fini, Binding of copper(II) to carnosine: Raman and IR spectroscopic study, *Biopolymers*, 57 (2000), 149 –159.
- [4] M. C. Aristoy, F Toldrá: Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants, *Meat Science*, 67 (2004), 211–217.
- [5] L. V. Chasovnikova, V. E. Formazyuk, V. I. Sergienko, A. A. Boldyrev, S. E. Severin: The antioxidative properties of carnosine and other dipeptides, *Biochemistry International*, 20 (1990), 1097–1103.
- [6] F. Bellia, G. Vecchio, S. Cuzzocrea, V. Calabrese, E. Rizzarelli: Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases, *Molecular Aspects of Medicine*, 32 (2011), 258–266.
- [7] L. Xing, M. E. Chee, H. Zhang, Y. Zhang, Y. Mine: Carnosine—a natural bioactive dipeptide: Bioaccessibility, bioavailability and health benefits, *Journal of Food Bioactives*, 5 (2019), 8–17.
- [8] G. Vistoli, V. Straniero, A. Perletti, L. Fumagalli, C. Bolchi, M. Pallavicini, E. Valoti, B. Testa: Predicting the physicochemical profile of diastereoisomeric histidine-containing dipeptides by property space analysis, *Chirality*, 24 (2012), 566–576.
- [9] A. R. Hipkiss: Carnosine and Its Possible Roles in Nutrition and Health, *Advances in Food and Nutrition Research*, 57 (2009), 87–154.
- [10] R. Ghodsi, S. Kheirouri: Carnosine and advanced glycation end products: A systematic review, *Amino Acids*, 50 (2018), 1177–1186.
- [11] M. Y. Kim, E. J. Kim, Y.-N. Kim, C. Choi, B.-H. Lee: Effects of  $\alpha$ -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats, *Nutrition Research and Practice*, 5 (2011), 421.

- [12] X. Y. Ma, Z. Y. Jiang, Y. C. Lin, C. T. Zheng, G. L. Zhou: Dietary supplementation with carnosine improves antioxidant capacity and meat quality of finishing pigs, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94 (2010), 286–295.
- [13] U. Andjelković, M. Š. Gajdošik, D. Gašo-Sokač, T. Martinović, D. Josić: Foodomics and food safety: where we are, *Food Technol Biotechnol*, 55 (2017), 290-307.
- [14] M. F. Marcone, S. Wang, W. Albabish, S. Nie, D. Somnarain, A. Hill: Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology, *Food Research International*, 51 (2013), 729-747.
- [15] J. E. d. N. Fontes, M. Y. Rodriguez-Caturla, A. S. Sant’Ana, T. I. B. Lopes, A. J. Marsaioli: Foodomics and storage monitoring of three meat cuts by  $^1\text{H}$  NMR, *Concepts Magn. Reson, Part A*, 47A (2018), 21474.
- [16] M. Y. Solis, S. Cooper, R. M. Hobson, G. G. Artioli, M. C. Otaduy, H. Roschel, J. Robertson, D. Martin, V. S. Painelli, R. C. Marris, et al., Effects of Beta-Alanine Supplementation on Brain Homocarnosine/Carnosine Signal and Cognitive Function: An Exploratory Study, *PLoS ONE*, 10 (2015), e0123857.
- [17] M. S. Özdemir, H. Reyngoudt, Y. De Deene, H. S. Sazak, E. Fieremans, S. Delputte, Y. D’Asseler, W. Derave, I. Lemahieu, E. Achten, Absolute quantification of carnosine in human calf muscle by proton magnetic resonance spectroscopy, *Physics in Medicine & Biology*, 52 (2007), 6781–6794.
- [18] S. D. Noblitt, L. C. Naicu, C. Mackerson, C. S. Henry, Sensitive, Selective Analysis of Selenium Oxoanions Using Microchip Electrophoresis with Contact Conductivity Detection, *Analytical Chemistry*, 86 (2014), 8425–8432.
- [19] S. Fekete, D. Guillarme, P. Sandra, K. Sandra, Chromatographic, Electrophoretic, and Mass Spectrometric Methods for the Analytical Characterization of Protein Biopharmaceuticals, *Analytical Chemistry*, 88 (2016), 480–507.
- [20] Y. Huang, J. Duan, J. Zhang, G. Chen, Online Sample Stacking for Determination of Carnosine-Related Peptides by Capillary Electrophoresis, *Chinese Journal of Chromatography*, 25 (2007), 326–332.
- [21] A. Staňová, J. Marák, M. Reželi, C. Páger, F. Kilár, D. Kaniansky, Analysis of therapeutic peptides in human urine by combination of capillary zone electrophoresis-

electrospray mass spectrometry with preparative capillary isotachopheresis sample pretreatment, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011), 8701–8707.

[22] S. Zhao, Y. Huang, M. Shi, J. Huang, Y.-M. Liu: Quantification of carnosine-related peptides by microchip electrophoresis with chemiluminescence detection, *Analytical Biochemistry*, 393 (2009), 105–110.

[23] M. Jozanović, M. Hajduković, O. Galović, G. Kralik, Z. Kralik, N. Sakač, M. Medvidović-Kosanović, M. Sak-Bosnar: Determination of anti-oxidative histidine dipeptides in poultry by microchip capillary electrophoresis with contactless conductivity detection, *Food Chemistry*, 221 (2017), 1658–1665.

[24] M. A. A. Ragab, E. I. El-Kimary: Recent Advances and Applications of Microfluidic Capillary Electrophoresis: A Comprehensive Review (2017–Mid 2019), *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (2020), 1–33.

[25] F. J. Lara, D. Airado-Rodríguez, D. Moreno-González, J. F. Huertas-Pérez, A. M. García-Campaña: Applications of capillary electrophoresis with chemiluminescence detection in clinical, environmental and food analysis: A review, *Analytica Chimica Acta*, 913 (2016), 22–40.

[26] A. E. Clark, E. J. Kaleta, A. A. D. M. Wolk: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: A Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology, *Clinical Microbiology Reviews*, 26 (2013), 547–603.

[27] D. Pisarev, O. Novikov, C. Vasiliev, O. Selyutin: Experience in using the MALDI/TOF/MS method in pharmaceutical analysis, *Sci. Rep. Belgorod State Univ. Ser. Med. Pharmacy*, 18 (2012), 1–11.

[28] R. Uenoyama, M. Miyazaki, T. Miyazaki, Y. Shigeno, Y. Tokairin, H. Konno, T. Yamashita: LC-ESI-MS/MS quantification of carnosine, anserine, and balenine in meat samples, *Journal of Chromatography B*, 1132 (2019), 121826.

[29] I. Jukić, N. Kolobarić, A. Stupin, A. Matic, N. Kozina, Z. Mihaljević, M. Mihalj, P. Šušnjara, M. Stupin, Ž. Breškić Curić, K. Selthofer-Relatić, A. Kibel, A. Lukinac, L. Kolar, G. Kralik, Z. Kralik, A. Széchenyi, M. Jozanović, O. Galović, M. Medvidović-Kosanović, I. Drenjančević: Carnosine, Small but Mighty—Prospect of Use as Functional Ingredient for Functional Food Formulation, *Antioxidants*, 10 (2021), 1037.

- [30] M. E. Swartz: Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction, LC-GC North America, 23 (2005), 8–14.
- [31] M. E. Swartz: UPLC™: An Introduction and Review, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 28 (2005), 1253-1263.
- [32] P. R. Carnegie, M. Z. Ilic, M. O. Etheridge, S. Stuart: Use of histidine dipeptides and myoglobin to monitor adulteration of cooked beef with meat from other species, Australian Veterinary Journal, 62(8), 272–276.
- [33] L. Mora, M. A. Sentandreu, F. Toldrà: Hydrophilic Chromatographic Determination of Carnosine, Anserine, Balenine, Creatine, and Creatinine, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(12), 4664–4669.
- [34] M. Gil-Agustí, J. Esteve-Romero, S. Carda-Roca: Anserine and carnosine determination in meat samples by pure micellar liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1189(1-2), 444–450.
- [35] A. Wołos, K. Piekarska, T. Pilecka, A. Czereszko, M. Jablonowska: A new rapid method for determination of anserine and carnosine in muscles, Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 74(3), 623–626.
- [36] R. Uenoyama, M. Miyazaki, T. Miyazaki, Y. Shigeno, Y. Tokairin, H. Konno, T. Yamashita: LC-ESI-MS/MS quantification of carnosine, anserine, and balenine in meat samples, Journal of Chromatography B, 121826.
- [37] D. D. Jayasena, S. Jun, Y. S. Bae, S. H. Kim, S. K. Lee, J. H. Lee, C. Jo: Changes in endogenous bioactive compounds of Korean native chicken meat at different ages and during cooking, Poultry Science, 93(7), 1842–1849.
- [38] M. Jozanović, N. Sakač, M. Sak-Bosnar, E. Carrilho: A simple and reliable new microchip electrophoresis method for fast measurements of imidazole dipeptides in meat from different animal species, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410(18), 4359–4369.
- [39] C. Wang, Y. Li, C. Pan, J. Chen, W. Jiang, W. Li, et al.: Quantitative analysis of carnosine, anserine, and homocarnosine in skeletal muscle of aquatic species from east China sea, Biochemistry and Biophysics Reports, 25, 100880.

- [40] S. Charoensin, B. Laopaiboon, W. Boonkum, J. Phetcharaburanin, M. O. Villareal, H. Isoda, M. Duangjinda: Thai Native Chicken as a Potential Functional Meat Source Rich in Anserine, Anserine/Carnosine, and Antioxidant Substances, *Animals* 2021,11, 902.
- [41] Y. Han, B. Gao, S. Zhao, M. Wang, L. Jian, L. Han, X. Liu: Simultaneous Detection of Carnosine and Anserine by UHPLC-MS/MS and Its Application on Biomarker Analysis for Differentiation of Meat and Bone Meal, *Molecules*, 24(2), 217.
- [42] <https://www.chemicool.com/definition/extraction.html> (21.6.2023.)
- [43] J. M. Coulson, J. F. Richardson, J. R. Backhurst, J. H. Hurker: *Chemical Engineering*, Pergamon Press, New York, 1978.
- [44] M. Rutkowska, J. Namieśnik and P. Konieczka: Ultrasound-Assisted Extraction, The Application of Green Solvents in Separation Processes, (2015), 301-324.
- [45] A. Mohammed Awad , P. Kumar, M. Rashedi, M. Al-Fitry , S. Jusoh , M. Faris Ab Aziz and A. Qurni Sazili: Green Extraction of Bioactive Compounds from Plant Biomass and Their Application in Meat as Natural Antioxidant, *Antioxidants* 10 (2021), 2-39.
- [46] H. M Santos, C. Lodeiro and J.L. Capelo-Martne: *The Power of Ultrasound*, (2009), 1-16 .
- [47] J. J. Van Deemter, F. Zuideveld, A. Klinkenberg: Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science*, 5 (1959), 271-289.
- [48] M. E. Swartz: UPLC™: An Introduction and Review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28 (2005), 1253–1263.
- [49] M. Concepcion Aristoy, Fidel Toldra: Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants, *Meat Science* 67 (2004) 211–217.

## 7. ŽIVOTOPIS

<b>Osobni podaci</b>	
Ime i prezime	<b>Ivana Bivolčević</b>
Datum i mjesto rođenja	16.11.1999., Nova Gradiška
Adresa	Kralja Tomislava 57 A, Vrbje
e-mail	<a href="mailto:ivanab681@gmail.com">ivanab681@gmail.com</a>
<b>Obrazovanje</b>	
2021.- 2023.	Diplomski sveučilišni studij kemije; istraživački smjer  Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A 31000 Osijek
2018.- 2021.	Preddiplomski sveučilišni studij kemije  Sveučilište Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za kemiju, Ulica cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek  Završni rad: Pregled naprednih teorijskih metoda za izračunavanje molekularnih svojstava temeljenih na molekularnoj strukturi Mentor: Doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji
2014.- 2018.	Medicinska škola Osijek, Vukovarska cesta 209, 31000 Osijek Farmaceutska tehničarka

<b>Osobne vještine</b>	
Materinski jezik	Hrvatski jezik
Strani jezici	Engleski jezik- aktivno u govoru i pismu
Računalne vještine	MS Office sustav, služenje internetom i mailom
<b>Sudjelovanje na kongresima</b>	2022. sudjelovanje na 2. međunarodnoj studentskoj Green konferenciji
<b>Stručna praksa</b>	4 radna dana (32 sata) Inspecto d.o.o. Vukovarska cesta 239 b 31000 Osijek
<b>Ostale aktivnosti</b>	2023. sudjelovanje na Danu otvorenih vrata Sveučilišta J.J. Strossmayera



apryse