

# Raspodjela karnozina u uzorcima pilećeg mesa

---

**Vidović, Elena**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:358135>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-07**

*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku - Odjel za kemiju

Sveučilišni prijediplomski studij kemija

Elena Vidović

**RASPODJELA KARNOZINA U UZORCIMA  
PILEĆEG MESA**

Završni rad

Osijek, 2024. godina

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku - Odjel za kemiju  
Sveučilišni prijediplomski studij kemija

Elena Vidović

**RASPODJELA KARNOZINA U UZORCIMA  
PILEĆEG MESA**

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Olivera Galović

Osijek, 2024. godina

Naziv sveučilišta: **Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju**  
Naziv studija: **Sveučilišni prijediplomski studij Kemija**  
**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti  
**Znanstveno polje:** Kemija  
**Znanstvena grana:** Analitička kemija

## RASPODJELA KARNOZINA U UZORCIMA PILEĆEG MESA

ELENA VIDOVIĆ

**Rad je izrađen na:** Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

**Mentor:** doc. dr. sc. Olivera Galović

### Sažetak:

Sintezom aminokiseline  $\beta$ -alanina i L-histidina nastaje karnozin, dipeptid mnogobrojnih pozitivnih učinaka na zdravlje čovjeka. Karnozin ima ulogu pH pufera, kelatora metalnih iona, antioksidansa, imunomodulatora i neurotransmitera te se zbog toga najviše koristi u medicini ali i sportu te kozmetici. Hrana obogaćena biološkim djelatnim tvarima (nutricinima) ima pozitivan učinak na zdravlje čovjeka pa je određivanje koncentracije nutricina vrlo važno. Ranija istraživanja pokazala su da koncentracija karnozina u mesu ovisi o vrsti mišićnog tkiva pa je koncentracija karnozina u mesu pilećih prsa veća nego u mesu zabatka za prosječno 40 %. U ovom radu određivana je koncentracija karnozina i anserina u uzorcima mesa pilećih prsa kako bi se vidjelo jesu li dipeptidi ravnomjerno raspoređeni u mesu pilećih prsa. Za određivanje koncentracije koristila se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV-VIS detekcijom. Određena je prosječna koncentracija karnozina i iznosila je za lijevi dio prsa (uzorci A) 225,239 mg/kg mesa dok je za desni dio prsa (uzorci B) koncentracija 218,654 mg/kg mesa. Koncentracija anserina za uzorke A iznosila je 852,518 mg/kg mesa a uzorke B 815,616 mg/kg mesa. Dobiveni rezultati pokazali su da nema značajne razlike u raspodjeli karnozina i anserina u mesu pilećih prsa s obzirom na dio mesa koji se analizirao.

**Ključne riječi:** *karnozin, anserin, meso, HPLC, nutricini.*

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Završni rad obuhvaća:** 33 stranice, 14 slika, 9 tablica i 35 literaturnih navoda

**Rad prihvaćen:** 19. rujan 2024.

### Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

1. doc.dr.sc. Ana Amić, predsjednica
2. doc.dr.sc. Olivera Galović, mentorica i članica
3. prof.dr.sc. Igor Đerđ, član
4. izv.prof.dr.sc. Vlatka Gvozdić, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek  
Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University in Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Undergraduate study programme in Chemistry**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific branch:** Analytical chemistry

## DISTRIBUTION OF CARNOSINE IN CHICKEN MEAT

ELENA VIDOVIĆ

**The paper was created on:** Department of Chemistry

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

### Abstract:

Synthesis of the amino acids  $\beta$ -alanine and L-histidine produces carnosine, a dipeptide with numerous positive effects on human health. Carnosine acts as a pH buffer, metal ion chelator, antioxidant, immunomodulator and neurotransmitter, which is why it is mostly used in medicine, sports and cosmetics. Food enriched with biologically active substances (nutricins) has a positive effect on human health, therefore determining the concentration of nutricins is very important. Earlier research showed that the concentration of carnosine in meat depends on the type of muscle tissue, so the concentration of carnosine in chicken breast meat is higher than in thigh meat by 40% on average. In this work, the concentration of carnosine and anserine in chicken breast meat samples was determined in order to see if the dipeptides are evenly distributed in chicken breast meat. High performance liquid chromatography with UV-VIS detection was used to determine the concentration. The average concentration of carnosine was determined, which for the left part of the breast (A samples) was 225,239 mg/kg of meat, while for the right part of the breast (B samples) the concentration was 218,654 mg/kg of meat. The concentration of anserine for samples A was 852,518 mg/kg of meat, and for samples B 815,616 mg/kg of meat. The obtained results showed that there is no significant difference in the distribution of carnosine and anserine in chicken breast meat, considering the part of the meat that was analyzed.

**Keywords:** *carnosine, anserine, meat, HPLC, nutricines.*

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 33 pages, 14 figures, 9 tables and 35 references

**Thesis accepted:** September 19, 2024

### Reviewers:

1. Ana Amić, PhD., assistant prof., chairman
2. Olivera Galović, PhD., assistant prof., mentor and member
3. Igor Đerđ, PhD., full prof., member
4. Vlatka Gvozdić, PhD., associate prof., alternate member

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

## **ZAHVALA**

*Prije svega, najveću zahvalu dugujem svojoj mentorici, doc. dr. sc. Oliveri Galović, koja je svojim znanjem i stručnošću uvelike doprinijela izradi ovog završnog rada i pri tome pokazala veliku količinu strpljenja, razumijevanja i posvećenosti.*

*Također, želim zahvaliti svojim kolegama na pruženoj moralnoj podršci i pomoći tijekom cijelog studija.*

*Posebnu zahvalu dugujem svojim roditeljima koji su uvijek vjerovali u mene i bodrili me, bez njih ne bih bila tu gdje jesam.*

## SADRŽAJ

---

1. UVOD .....	7
2. LITERATURNI PREGLED .....	8
2.1. Građa i sinteza karnozina .....	8
2.2. Svojstva karnozina.....	10
2.2.1. Karnozin kao pufer.....	11
2.2.2. Karnozin kao antioksidans .....	11
2.2.3. Karnozin kao kelator .....	12
2.2.4. Anserin .....	12
2.3. Karnozin u mesu različitih životinja.....	13
2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	14
2.4.1. Dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti .....	14
2.4.2. Princip rada uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti .....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	16
3.1. Pribor .....	16
3.2. Kemikalije .....	17
3.3. Instrumentacija .....	17
3.4. Priprema otopina.....	18
3.5. Uzorci za analizu .....	19
3.5.1. Postupak pripreme uzoraka za analizu tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti .....	21
3.5.2. Priprema uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti.....	23
3.5.3. Analiza rezultata mjerenja koncentracije karnozina .....	24
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	24
4.1. Koncentracija anserina i karnozina u uzorcima pilećeg mesa.....	24
5. ZAKLJUČAK .....	30
6. POPIS LITERATURE .....	31

# 1. UVOD

---

U današnje vrijeme, sjedilački način života i nezdrava prehrana su postali sve veći problem diljem svijeta. Takav stil života ima direktan utjecaj na sve veću pojavnost različitih bolesti. Iz tog razloga brojni znanstvenici svojim istraživanjima nastoje osvijestiti svakog pojedinca o važnosti prehrane, koja osigurava potrebnu količinu tvari neophodnih za normalno funkcioniranje organizma kao i fizičke aktivnosti. Također, brojna istraživanja ističu štetno djelovanje slobodnih radikala na ljudski organizam i ukazuju na važnost unosa antioksidanasa kako bi se štetan utjecaj slobodnih radikala umanjio, koliko god je to moguće. Posljednjih godina, veliku pažnju je privukao karnozin sa svojim antioksidativnim svojstvima.

Karnozin je 1900. godine otkrio ruski kemičar V. S. Gulevich, tijekom proučavanja molekula koje sadrže atom dušika u ekstraktu mesa [1]. To je endogeni dipeptid koji u strukturi sadrži aminokiseline  $\beta$ -alanin i L-histidin. U skeletnim mišićima karnozin je prisutan u većim količinama, no nalazimo ga još u gastrointestinalnom tkivu, tkivu mozga i srca [2,3].

Iako nije velika molekula, zahvaljujući svojoj strukturi posjeduje mnoštvo korisnih svojstava za obranu organizma od raznih štetnih tvari i prevencije razvitka bolesti. Budući da ima ulogu pH pufera, kelatora metalnih iona, antioksidansa, imunomodulatora i neurotransmitera, karnozin ima široku primjenu u medicini [4] ali i sportu [5] te kozmetici [6]. Osim toga, danas je posebno zanimljivo obogaćivanje hrane karnozinom, s naglaskom na zdravstvene dobrobiti za potrošače [4,7,8]. Iz tog razloga se sve češće određuju koncentracije karnozina i njegovih derivata kako bi se dobile informacije o sadržaju karnozina u prehrambenom proizvodu koji se analizira. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je tehnika koja se najčešće koristi za određivanje sadržaja karnozina u realnim uzorcima, a uz nju još se koriste spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR), masena spektroskopija MALDI-TOF MS (engl. *Matrix Asisted Laser Desorption/Ionization, Time-Of-Flight, Mass Spectrometry*), kapilarna elektroforeza i mikročip elektroforeza [4].

Cilj ovog završnog rada bio je odrediti koncentraciju karnozina u uzorcima pilećeg mesa pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, usporediti dobivene rezultate i vidjeti postoji li razlika u raspodjeli karnozina s obzirom na uzorak u kojem se koncentracija određivala.

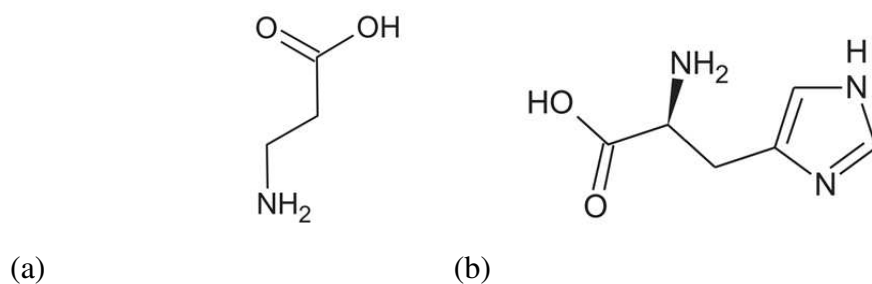


## 2. LITERATURNI PREGLED

---

### 2.1. GRADA I SINTEZA KARNOZINA

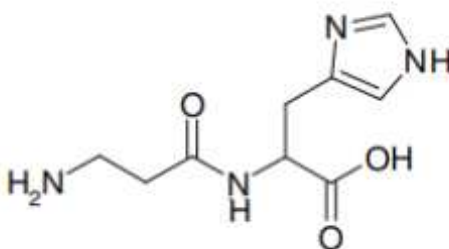
$\beta$ -alanin i L-histidin su aminokiseline koje grade dipeptid karnozin (Slika 1.).  $\beta$ -alanin nastaje u jetri, dok je L-histidin potrebno putem hrane unositi u organizam.



*Slika 1. Kemijska struktura (a)  $\beta$ -alanin i (b) L-histidin*

*(preuzeto i prilagođeno iz: [9])*

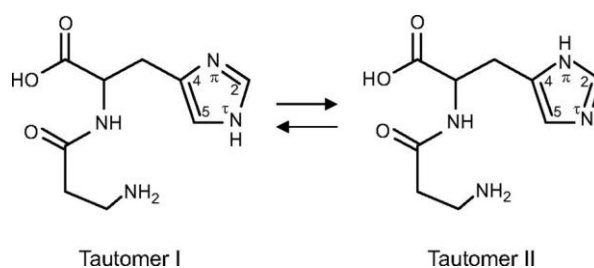
Gulevich-u se pripisuju i zasluge za otkriće strukture karnozina. Najprije je alkalnom hidrolizom kompleksa karnozina sa srebrom izolirao histidin, a zatim je u strukturi otkrio i prisutnost alanina [10]. Dakle, prema kemijskom sastavu i molekularnoj formuli  $C_9H_{14}N_4O_3$ , karnozin je definiran kao  $\beta$ -alanil-L-histidin što se može uočiti iz strukture prikazane na Slici 2.



*Slika 2. Kemijska struktura karnozina [11]*

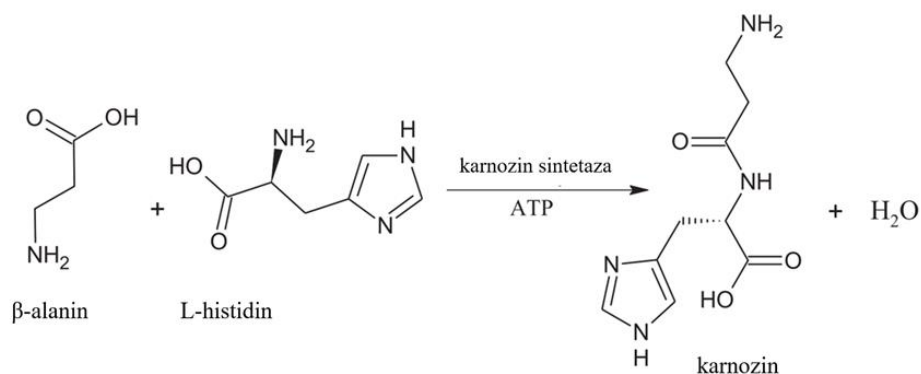
Prema kemijskoj strukturi karnozina, alifatski dio predstavlja  $\beta$ -alanin, neproteinogena aminokiselina koju tijelo može samo sintetizirati. Drugi dio molekule karnozina predstavlja esencijalna proteinogena aminokiselina L-histidin koja u svojoj strukturi sadrži imidazolni prsten. Ove dvije glavne komponente koje grade molekulu karnozina, međusobno su povezane peptidnom vezom. Peptidna veza je nastala povezivanjem  $\alpha$ -karboksilnog kraja aminokiseline  $\beta$ -alanina sa  $\alpha$ -amino krajem L-histidina uz izdvajanje molekule vode. Prema Slici 2., karnozin sadrži tri ionizirajuće skupine: karboksilnu skupinu sa  $pK_a$  vrijednosti 2,76, amino skupinu sa  $pK_a$  vrijednosti 9,32 i imidazolni prsten sa  $pK_a$  vrijednosti 6,72. Karnozin se pri fiziološkom pH, u organizmu najčešće nalazi u obliku zwitteriona [10].

Imidazolni prsten predstavlja najvažniji dio dipeptida karnozina jer je zaslužan za reguliranje njegove puferske aktivnosti [10]. Uz pomoć Ramanove spektroskopije je dokazano da se u neutralnom pH imidazolni prsten karnozina nalazi u dva tautomerna oblika:  $N\tau$  protonirani i  $N\pi$  protonirani oblik (Slika 3.). Tautomer I predstavlja  $N\tau$  protonirani oblik, a sukladno tome tautomer II predstavlja  $N\pi$  protonirani oblik te se oni međusobno razlikuju u položaju protona. U organizmu se oni nalaze u ravnoteži, ali je u neutralnoj otopini veća koncentracija tautomera I te je on ujedno stabilniji oblik u odnosu na tautomer II [3].



**Slika 3.** Tautomerni oblici imidazolnog prstena molekule karnozina prisutni u neutralnom mediju [3]

Što se tiče sinteze karnozina, ona se odvija uz djelovanje enzima smještenog u skeletnim mišićima, karnozin sintetaze. Osim ovog odgovornog enzima, za nastajanje dipeptida karnozina, potrebna je energija sadržana u molekuli ATP-a (Slika 4.).



*Slika 4. Sinteza karnozina iz  $\beta$ -alanina i L-histidina*

*(preuzeto i prilagođeno iz: [9])*

Prema Slici 4., pri procesu sinteze karnozina, aminokiselina  $\beta$ -alanina se povezuje s L-histidinom što omogućava enzim karnozin sintetaza i energijom bogata molekula ATP-a. L-histidin je esencijalna aminokiselina koja pri procesu sinteze karnozina djeluje kao proteinogeni prekursor [12]. S druge strane,  $\beta$ -alanin predstavlja neproteinogeni prekursor koji u reakciji sinteze karnozina ima ulogu limitirajućeg reaktanta te o njemu ovisi brzina nastanka karnozina [13]. Dakle, aminokiseline  $\beta$ -alanina i L-histidina se spajaju tvoreći dipeptid karnozin pri čemu dolazi do izdvajanja molekule vode. Reakciju nastanka karnozina katalizira enzim karnozin sintetaza i molekula ATP-a te se ona uglavnom odvija u mišićima.

## 2.2. SVOJSTVA KARNOZINA

Zahvaljujući vrlo specifičnoj strukturalnoj građi, karnozin posjeduje brojna korisna svojstva i sposobnosti sudjelovanja u različitim procesima u ljudskom organizmu. Osim toga, njegova potencijalna primjenjivost u mnogim područjima ljudskog života također proizlazi iz njegove jedinstvene strukture.

Prema već navedenoj molekularnoj formuli karnozina, njegova relativna molekularna masa iznosi  $226,236 \text{ g mol}^{-1}$  [14]. Što se tiče kemijskih svojstava karnozina, pri sobnoj temperaturi, on je bijela kristalična krutina i tali se pri temperaturi od  $253 \text{ }^\circ\text{C}$  [14]. Osim toga, topljivost ovog dipeptida u vodi je vrlo dobra (1 g u 3,1 mL vode pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

S druge strane, karnozin sadrži nekoliko važnih bioloških svojstava koja uvelike utječu na očuvanje zdravlja i funkcioniranje stanica. Kao najznačajnija biološka svojstva, pokazala su se: djelovanje karnozina kao fiziološki pufer, kao antioksidans i kelator prijelaznih metala [15].

### **2.2.1. Karnozin kao pufer**

Najvažnije biološko svojstvo karnozina, a ujedno i njegova prva otkrivena funkcija je regulacija puferske aktivnosti što mu omogućuje atom dušika prisutan u imidazolnom prstenu [10]. Zahvaljujući povoljnoj  $pK_a$  vrijednosti, imidazolni prsten ima ulogu prihvata  $H^+$  iona nastalih u procesu acidoze uzrokovane mišićnim kontrakcijama [16]. Ovo svojstvo karnozina se pokazalo izuzetno važno pri intenzivnijem mišićnom radu jer on u ulozi prirodnog pufera može spriječiti naglo zakiseljavanje mišićnog tkiva, čime se smanjuje i sam umor mišića.

Također su provedena brojna istraživanja koja su pokazala da suplementiranje karnozinom nakon fizičkih aktivnosti snižava koncentraciju prisutne mliječne kiseline u mišiću za čak 25 % [17]. Međutim, uloga puferiranja mišića karnozinom nije samostalna, njoj uvelike doprinose i drugi spojevi koji sadrže histidin.

### **2.2.2. Karnozin kao antioksidans**

Osim puferskog djelovanja, važno svojstvo karnozina je uloga antioksidansa. Proveden je velik broj istraživanja koja potvrđuju da karnozin sadrži korisna svojstva pri zaštiti organizma od oksidativnog stresa [18]. Njegova uloga antioksidansa proizlazi iz njegove sposobnosti uklanjanja štetnih tvari iz organizma poput reaktivnih kisikovih vrsta, ROS (engl. *reactive oxygen species*), i slobodnih radikala [19]. Osim toga, on ima sposobnost neutralizacije produkata lipidne peroksidacije i glikacije čime sprječava gubitak funkcije i moguća oštećenja staničnih membrana i tkiva.

Karnozin sprječava oksidativne reakcije u stanicama tako što neutralizira slobodne radikale i na taj način štiti biološke molekule od mogućih oksidativnih oštećenja. Posljedično tome, karnozin prevenira razvoj mnogih kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti [20].

Zbog puferskog i antioksidativnog djelovanja, karnozin uvelike utječe na homeostazu stanica i čitavog organizma. Također, djeluje na starenje i općenito zdravstveno stanje

organizma. Zahvaljujući izrazitom antioksidativnom djelovanju, pokazao se važnim čimbenikom u održavanju općeg zdravlja, osobito u kontekstu zaštite mozga i srca.

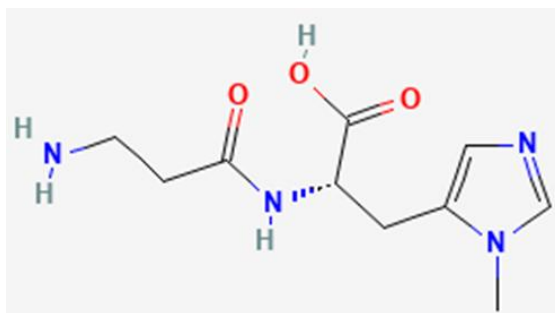
### **2.2.3. Karnozin kao kelator**

Pored antioksidativne i puferske sposobnosti karnozina, poznata je i njegova kelirajuća sposobnost. Karnozin se kao kelator pokazao izrazito važan u obrani organizma protiv oksidativnog stresa. Naime, on ima moć vezanja viška metalnih iona i stvaranja stabilnog kompleksa pri čemu sprječava njihov štetni učinak u organizmu. Karnozin najčešće reagira sa ionima željeza, cinka te bakra, ali i mnogim drugim prijelaznim metalima koji mogu stvoriti slobodne radikale [21]. Najistraženiji su kompleksi karnozina s bakrom i cinkom zbog pokazanog pozitivnog biološkog učinka na zdravlje [22].

Neka istraživanja su čak pokazala da karnozin, zahvaljujući kelirajućoj ulozi, može inhibirati rast tumorskih stanica i spriječiti nastanak raka [23].

### **2.2.4. Anserin**

Anserin je dipeptid građen od  $\beta$ -alanina i 3-metilhistidina [24]. On je najpoznatiji metilirani derivat karnozina. Budući da je metiliran, anserin je metabolički stabilniji od karnozina [25]. Njegova molekulska formula je  $C_{10}H_{16}N_4O_3$ , a strukturna formula je prikazana na Slici 5. Ovaj dipeptid se nalazi u skeletnim mišićima i mozgu nekih sisavaca i ptica [26]. Međutim, obično ga nema u ljudskim tkivima i tjelesnim tekućinama. Anserin je prvi put otkriven 1929. godine u guščjem mišiću. Topljiv je u vodi i ima mogućnost keliranja bakra i drugih prijelaznih metala [27]. Zbog sposobnosti keliranja se pokazao puno jačim antioksidansom u odnosu na karnozin. Osim što je izuzetno dobar antioksidans, anserin se pokazao dobrim u snižavanju koncentracije mokraćne kiseline u krvi. Također se pokazao koristan protiv starenja i pri zaštiti moždanih stanica od oštećenja i smrti.



*Slika 5. Kemijska struktura anserina [28]*

### **2.3. KARNOZIN U MESU RAZLIČITIH ŽIVOTINJA**

Karnozin se smatra glavnom sastavnicom mnogih namirnica životinjskog podrijetla. Kao najbogatiji izvor karnozina smatra se crveno meso, a posebice svinjetina i govedina. Tu činjenicu je potvrdilo istraživanje provedeno pomoću tekućinske kromatografije - spektrometrije masa, LC-MS (engl. *liquid chromatography – mass spectrometry*). Naime, analizirano je 18 mesnih uzoraka: govedina (file), konj (file), svinjetina (lungić), piletina (prsa), puretina (prsa) i kunić (stražnji but). Rezultati istraživanja su pokazali da je udio karnozina od najmanjeg prema najvećem bio: kunić < puretina < piletina < govedina < svinjetina < konj [29]. Dakle, najzastupljeniji udio karnozina nalazio se u fileu konja, dok je najmanji udio bio prisutan u goveđem fileu.

Metode određivanja prisutnosti raznih proteina u hrani, danas su od velike važnosti jer se nastoji pronaći hrana koja osim nutritivne vrijednosti pokazuje i mnoge zdravstvene koristi.

Sadržaj karnozina i ostalih proteina u mesu i mesnim proizvodima se može odrediti brojnim metodama. Pored najčešće korištene metode za određivanje koncentracije proteina u prehrambenim proizvodima, tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*), danas se koriste i spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR), masena spektroskopija, MS (engl. *Mass Spectrometry*) te mikročip elektroforeza i kapilarna elektroforeza.

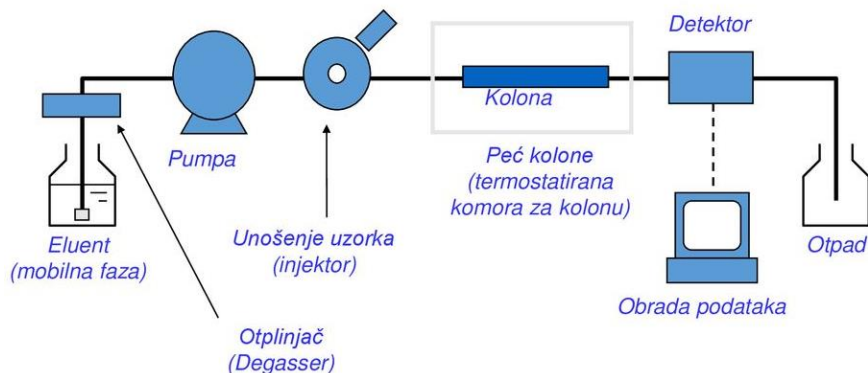
## **2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je tehnika u analitičkoj kemiji koja se koristi za identifikaciju, razdvajanje i kvantifikaciju komponenti sadržanih u različitim uzorcima. Ona se temelji na kemijskim interakcijama između stacionarne faze u koloni i tvari koja se analizira. Sustav ove kromatografske tehnike čine mobilna i stacionarna faza te detektor koji prepoznaje željene analite tijekom analize. HPLC koristi visoki tlak za tjeranje otapala kroz zatvorenu kolonu ispunjenu stacionarnom fazom čiji sastav ovisi o vrsti analita za koji se koristi [30]. U usporedbi s drugim kromatografskim tehnikama, HPLC ima brojne prednosti: osjetljivost, prilagodljivost, analiza termički osjetljivih i nehlapljivih spojeva, široki spektar uzoraka, itd.

HPLC uređaj danas predstavlja neizostavni alat svakog laboratorija koji se bavi preciznim i pouzdanim analizama u različitim znanstvenim disciplinama. Primjenjuje se u farmaceutskoj, prehrambenoj, kemijskoj industriji, forenzici, kliničkim pretragama i zaštiti okoliša. U forenzici se koristi za analiziranje ilegalnih supstanci i alkohola u biološkim uzorcima, u zaštiti okoliša, HPLC služi za analiziranje kontaminanata i drugih zagađivača sadržanih u vodi, tlu i zraku s ciljem što duljeg očuvanja okoliša. U kliničkim pretragama, HPLC uređaj je pronašao svoju primjenu pri analizi lijekova, ispitivanju njihove čistoće i kvantifikaciji pojedine aktivne supstance u određenom lijeku [31,32].

### **2.4.1. Dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti**

Glavni dijelovi HPLC uređaja su spremnik mobilne faze, otplinjač, pumpa, injektor, kolona, peć kolone, detektor, uređaj za obradu podataka i spremnik za otpad (Slika 6.).



**Slika 6.** Shematski prikaz glavnih dijelova HPLC uređaja [33]

Spremnik mobilne faze je najčešće staklena boca koja je otporna na različita organska otapala koja ulaze u sastav mobilne faze. Metanol, voda, acetonitril i izopropanol su najčešća otapala koja se koriste. Otplinjač ima ulogu uklanjanja mjehurića zraka prisutnih u mobilnoj fazi. Pumpa stvaranjem visokog tlaka omogućava kretanje mobilne faze kroz uređaj. Injektor služi za unos uzoraka u tok mobilne faze koja uzorak nosi do kolone u kojoj se odvija separacija. Detektor je smješten iza kolone i on detektira (otkriva) prisutnost analita u mobilnoj fazi. Ovisno o svojstvu analita koriste se različiti detektori kao npr. UV-VIS detektor, fluorescencijski detektor, detektor indeksa loma, maseni detektor, itd. Informacije koje nam daje detektor obrađuju se i rezultati analize se prikazuju na zaslonu uređaja.

#### 2.4.2. Princip rada uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

Princip rada HPLC uređaja se temelji na protoku mobilne faze tjerane visokim tlakom kroz kolonu koja je ispunjena stacionarnom fazom. U tok mobilne faze se injektira mali volumen uzorka. Komponente prisutne u uzorku je moguće odvojiti zbog kemijskih interakcija uzorka (odnosno analita koji se nalaze u uzorku) i stacionarne faze kojom je ispunjena kolona. U trenutku kada injektirani uzorak ulazi u kolonu, dolazi do interakcije analita u uzorku i stacionarne faze a analiti se razdvajaju na osnovu vremena koje im je potrebno za prolazak kroz kolonu. Kako bi razdvajanje komponenti bilo što učinkovitije, potrebno je odabrati kolonu koja je pogodna za razdvajanje odabranog analita, odabrati prikladnu mobilnu fazu (najčešće smjesa



barem dva otapala) kao i podesiti ostale parametre na uređaju koji utječu na uspješno razdvajanje (brzinu protoka mobilne faze, temperaturu pećnice, volumen uzorka koji se injektira) [31].

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

---

#### **3.1. PRIBOR**

Pri eksperimentalnom određivanju raspodjele karnozina u uzorcima pilećeg mesa koristi se sljedeći pribor:

- odmjerne tikvice
- staklene bočice s čepom
- graduirana pipeta
- propipete
- menzura
- boca štrcaljka
- filter za šprice (veličina pora 0,20  $\mu\text{m}$ )
- špatula
- reagens boca
- plastična žlica
- kapalice
- mikropipeta (100-1000  $\mu\text{L}$ )
- plastični nastavci za mikropipete
- kivete za centrifugiranje s čepom (polipropilen, PP)
- laboratorijske čaše
- šprice
- HPLC vijalice s čepom
- mikropipete (polipropilen, PP)

### 3.2. KEMIKALIJE

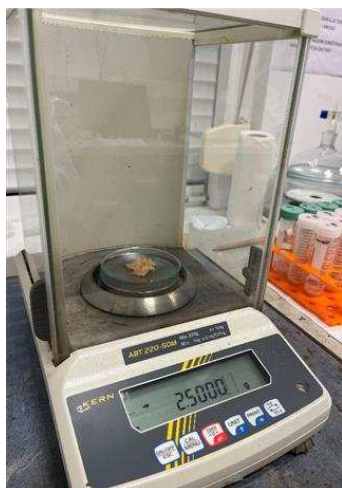
Prilikom eksperimentalnog određivanja raspodjele karnozina u uzorcima pilećeg mesa, potrebne su sljedeće kemikalije:

- natrijev dihidrogenfosfat,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Gram mol)
- acetonitril,  $\text{CH}_3\text{CN}$  (Fisher Scientific)
- trikloroctena kiselina,  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (VWR Chemicals)
- ultračista voda

### 3.3. INSTRUMENTACIJA

Pri određivanju koncentracije karnozina u uzorcima pilećeg mesa, koriste se sljedeći instrumenti:

- analitička vaga (Kern, Njemačka) (Slika 7. (a))
- laboratorijska tresilica, vorteks (lab dancer, IKA, Njemačka) (Slika 7. (b))
- uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC (Shimadzu, Japan) (Slika 7. (c))
- uređaj za ultračistu vodu (Elga, Purelab, Ujedinjeno Kraljevstvo) (Slika 7. (d))
- homogenizator (IKA, Njemačka)
- centrifuga (Hettich, Njemačka) (Slika 7. (e))



(a)



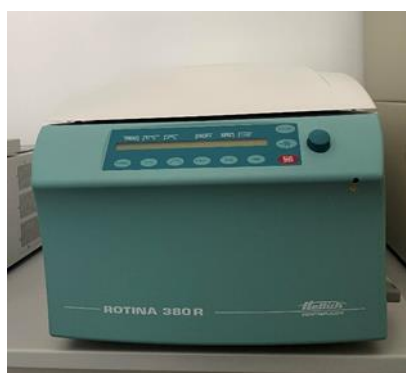
(b)



(c)



(d)



(e)

*Slika 7. (a) Analitička vaga, (b) laboratorijska tresilica, (c) uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, (d) uređaj za ultračistu vodu i (e) centrifuga*

### 3.4. PRIPREMA OTOPINA

#### Priprema 20 %-tne otopine trikloroacetne kiseline:

Za pripremu 20 %-tne otopine trikloroacetne kiseline (engl. *Trichloroacetic acid*, TCA) potrebno je na analitičkoj vagi izvagati 10 g  $\text{Cl}_3\text{CCOOH}$ . Izvagana krutina se prebaci u

odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake. Odmjerna tikvica se začepi te se sadržaj promiješa i potom prebaci u reagens bocu.

#### Priprema 0,1 molarne otopine natrijevog dihidrogenfosfata:

Za pripremu 0,1 molarne otopine natrijevog dihidrogenfosfata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) potrebno je na analitičkoj vagi izvagati 6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Izvagana krutina se prebaci u odmjernu tikvicu od 500 mL i nadopuni ultračistom vodom do oznake. Sadržaj tikvice se dobro promiješa kako bi se sav  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  otopio. Zatim se pripremljena otopina profiltrira kroz filter veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Nakon filtriranja, dobivena otopina se koristi za pripremu mobilne faze.

#### Priprema mobilne faze:

Za pripremu mobilne faze potrebno je pripremiti smjesu 0,1 molarne otopine natrijevog dihidrogenfosfata i acetonitrila (ACN) u omjeru 45:55. Mobilnu fazu je potrebno pripremiti dan prije korištenja ili je sonificirati na dan korištenja kako bi se iz mobilne faze uklonili mjehurići zraka koji smetaju pri radu.

### **3.5. UZORCI ZA ANALIZU**

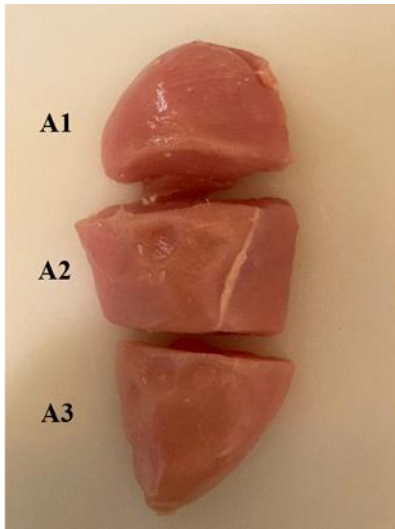
Uzorci mesa pilećih prsa korišteni za analizu, kupljeni su u trgovačkom lancu i do pripreme za analizu čuvani u hladnjaku na temperaturi 4 °C (Slika 8.).



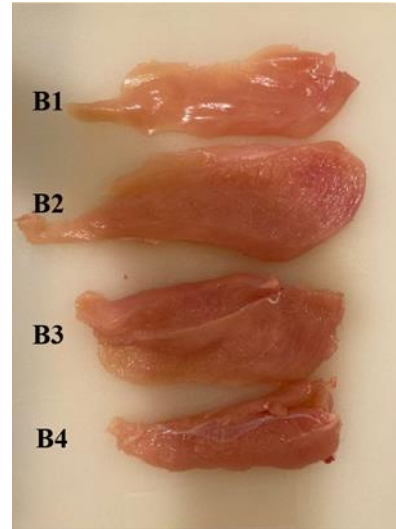
*Slika 8. Uzorak mesa pilećih prsa kupljen za potrebe analize*

Prije pripreme uzoraka za analizu pomoću HPLC-a meso pilećih prsa odvojeno je od kosti i uklonjena je masnoća. Lijevi dio pilećih prsa (A) podijeljen je na 3 dijela (A1, A2, A3) koji

su se dobili rezanjem okomito (Slika 9. (a)). Desni dio pilećih prsa podijeljen je na 4 dijela (B1, B2, B3, B4) koji su se dobili rezanjem vodoravno (Slika 9. (b)).



(a)



(b)

**Slika 9.** (a) Uzorci pilećih prsa A dijela i (b) uzorci pilećih prsa B dijela

Nakon podjele uzorka mesa u uzorke A1, A2, A3, B1, B2, B3 i B4, svaki od uzoraka je dodatno usitnjen prvo pomoću škara te potom štapnim mikserom (Slika 10.). Na taj način veći uzorci su homogenizirani.



(a)



(b)

**Slika 10.** (a) Uzorci usitnjeni škarama i (b) uzorci usitnjeni štapnim mikserom

### 3.5.1. Postupak pripreme uzoraka za analizu tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti

Uzorci su pripremljeni prema ranije opisanim postupcima.

Na analitičkoj vagi odvaži se 2,500 g homogeniziranog uzorka mesa pilećih prsa i prebaci se u kivete za centrifugiranje (Slika 11.).



(a)



(b)

*Slika 11. (a) Uzorci pripremljeni za vaganje i (b) vaganje homogeniziranih uzoraka*

U kivete za centrifugiranje s odvaženim homogeniziranim uzorkom doda se 25 mL ultračiste vode te se sadržaj homogenizira uz pomoć homogenizatora (Slika 12.).



(a)



(b)

*Slika 12. (a) Sadržaj kivete prije homogeniziranja i (b) sadržaj kivete nakon homogeniziranja*

Nakon homogeniziranja dobivena smjesa se centrifugira 20 minuta na 6000 okretaja u minuti (engl. *rotations per minute*, RPM) i temperaturi 4 °C. Dobiveni supernatant se profiltrira pomoću filtera za šprice čija je veličina pora 0,45 μm (Slika 13.). Filtrat se prikupi u mikroepruvetu volumena 2 mL. U drugu mikroepruvetu se prenese 300 μL filtrata uzorka i doda se 50 μL 20 %-tne otopine TCA kako bi proteini prisutni u uzorku istaložili. Sadržaj mikroepruvete se 2 minute miješa na laboratorijskoj tresilici. Zatim se u mikroepruvetu doda 650 μL vode te se sadržaj 1 minutu miješa na laboratorijskoj tresilici. Nakon ovog koraka mikroepruveta s uzorkom se ostavi stajati 5 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorak se zatim centrifugira 6 minuta na 12000 okretaja u minuti i temperaturi 4 °C. Dobiveni supernatant se profiltrira pomoću filtera za šprice čija je veličina pora 0,20 μm. U vijalicu za HPLC analizu prenese se 100 μL ovako pripremljenog uzorka koji se pomiješa sa 400 μL mobilne faze. Smjesa se promiješa i spremna je za analizu pomoću HPLC-a.

Za svaki uzorak iz skupine (A1, A2, A3, B1, B2, B3 i B4) pripremljeno je 5 paralelnih uzoraka.



**Slika 13.** Filtriranje dobivenog supernatanta

### 3.5.2. Priprema uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

Prije same analize, HPLC uređaj je potrebno isprati mobilnom fazom sve dok se ne dobije ravna bazna linija, a tlak bude stabilan.

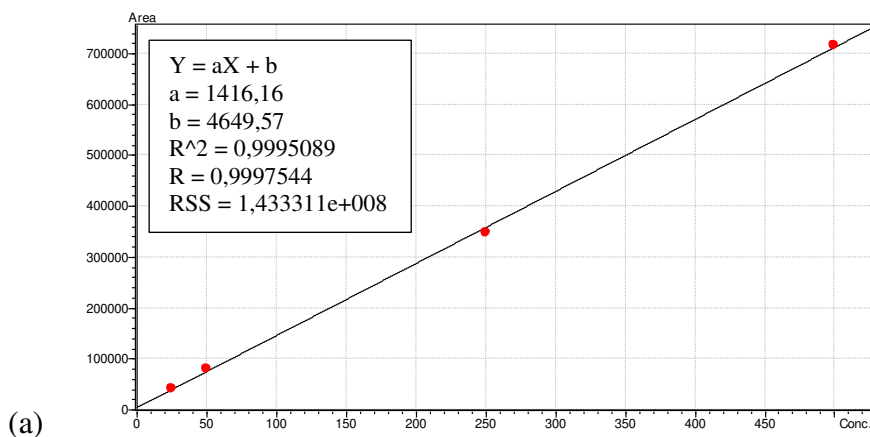
Kolona korištena u analizi je TSKgel NH<sub>2</sub>-100, 3 μm, 4,6 × 150 mm (TOSOH BIOSCIENCE, Japan).

Uvjeti tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC):

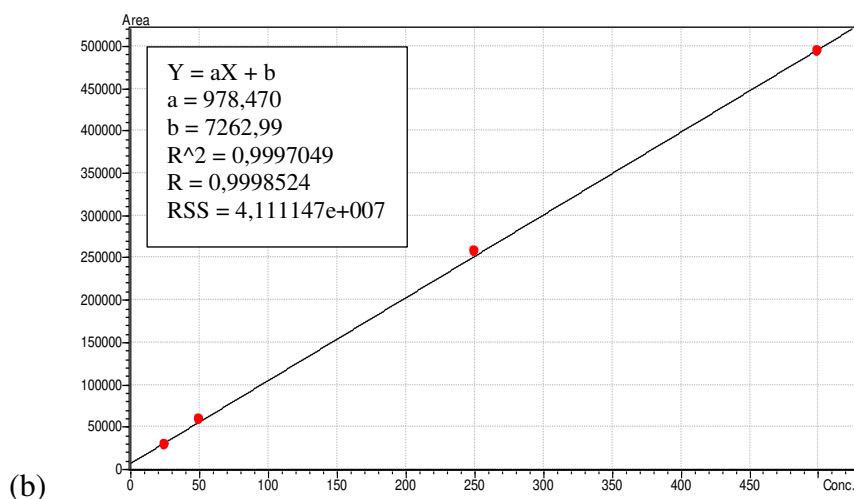
- brzina protoka mobilne faze: 0,7 mL/min.
- mobilna faza: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : ACN = 45:55
- temperatura pećnice: 40 °C
- vrijeme trajanja analize: 30 minuta
- detektor: UV/VIS (210 nm)
- injektirani volumen: 5 μL
- retencijsko vrijeme karnozina: 23 min.
- retencijsko vrijeme anserina: 20 min.

#### 3.5.2.1. Kalibracija

Kalibracija je prema definiciji postupak korekcije mjernog instrumenta na način da se njime mjere veličine čije su vrijednosti već poznate. Postupkom kalibracije smanjuje se sistematska pogreška [34]. Postupak kalibracije proveden je ranije a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 14.







*Slika 14. Kalibracijske krivulje (a) karnozina i (b) anserina*

### 3.5.3. Analiza rezultata mjerenja koncentracije karnozina

Rezultati svih grupa uzoraka pilećih prsa su opisani: standardnom devijacijom (SD), relativnom standardnom devijacijom (RSD) i intervalom pouzdanosti. Rezultati koji se nisu koristili u analizi su rezultati čije vrijednosti značajnije odstupaju od prosječne vrijednosti i ti uzorci su u tablicama označeni crvenom bojom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

---

### 4.1. KONCENTRACIJA ANSERINA I KARNOZINA U UZORCIMA PILEĆEG MESA

U Tablicama 1-3 prikazani su rezultati dobiveni za skupine uzorka A1, A2 i A3. Iz rezultata je vidljivo da su uzorci u sve tri skupine dobro homogenizirani jer se vrijednosti RDS kreću u rasponu od 1,022 do 4,147 % za karnozin i od 0,864 do 3,846 % za anserin. Srednja vrijednost koncentracije karnozina za A uzorke je 225,239 mg/kg mesa a anserina 852,5186 mg/kg mesa (Tablica 4.).

**Tablica 1.** Dobivene koncentracije anserina i karnozina u A1 skupini uzoraka mesa pilećih prsa.

uzorak		mg/L	mg/kg mesa
oznaka			
A1_1	anserin	148,731	743,655
	karnozin	40,795	203,975
A1_2	anserin	179,525	897,625
	karnozin	48,733	243,665
A1_3	anserin	178,401	892,005
	karnozin	49,105	245,525
A1_4	anserin	164,78	823,900
	karnozin	44,749	223,745
A1_5	anserin	174,249	871,245
	karnozin	47,633	238,165
		<b>anserin</b>	<b>karnozin</b>
<b>srednja vrijednost</b>		<b>871,194</b>	<b>237,775</b>
<b>SD</b>		33,508	9,862
<b>RSD (%)</b>		3,846	4,147
<b>interval pouzdanosti (±)</b>		32,838	9,664

**Tablica 2.** Dobivene koncentracije anserina i karnozina u A2 skupini uzoraka mesa pilećih prsa.

uzorak		mg/L	mg/kg mesa
oznaka			
A2_1	anserin	171,186	855,930
	karnozin	45,332	226,660
A2_2	anserin	167,565	837,825
	karnozin	44,924	224,620
A2_3	anserin	167,803	839,015
	karnozin	44,226	221,130
A2_4	anserin	168,864	844,320
	karnozin	44,604	223,020
A2_5	anserin	168,238	841,190
	karnozin	44,31	221,550
		<b>anserin</b>	<b>karnozin</b>
<b>srednja vrijednost</b>		<b>843,656</b>	<b>223,396</b>
<b>SD</b>		7,292	2,282
<b>RSD (%)</b>		0,864	1,022
<b>interval pouzdanosti (±)</b>		6,392	2,000

**Tablica 3.** Dobivene koncentracije anserina i karnozina u A3 skupini uzoraka mesa pilećih prsa.

uzorak		mg/L	mg/kg mesa
oznaka			
A3_1	anserin	164,394	821,970
	karnozin	41,279	206,395
A3_2	anserin	168,05	840,250
	karnozin	43,267	216,335
A3_3	anserin	171,309	856,545
	karnozin	43,302	216,510
A3_4	anserin	168,763	843,815
	karnozin	43,266	216,330
A3_5	anserin	170,19	850,950
	karnozin	43,432	217,160
		<b>anserin</b>	<b>karnozin</b>
<b>srednja vrijednost</b>		<b>842,706</b>	<b>214,546</b>
<b>SD</b>		13,198	4,569
<b>RSD (%)</b>		1,566	2,130
<b>interval pouzdanosti (±)</b>		11,568	4,005

**Tablica 4.** Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije karnozina i anserina u skupinama A1, A2 i A3.

uzorak	mg/kg mesa	
	karnozin	anserin
<b>A1</b>	237,775	871,194
<b>A2</b>	223,396	843,656
<b>A3</b>	214,546	842,706
<b>srednja vrijednost</b>	<b>225,239</b>	<b>852,5186</b>

U Tablicama 5-8 prikazani su rezultati dobiveni za skupine uzoraka B1, B2, B3 i B4. Iz rezultata je vidljivo da su uzorci u tri skupine (B1, B3 i B4) dobro homogenizirani jer se vrijednosti RDS kreću u rasponu od 1,801 do 3,483 % za karnozin i od 1,341 do 3,591 % za anserin dok je za skupinu B2 RSD vrijednost iznosila 10,809 % za karnozin i 7,356 % za anserin što ukazuje da homogenizacija ovog uzorka nije ispravno provedena zbog osobne pogreške pri vaganju uzorka. Srednja vrijednost koncentracije karnozina za B uzorke je 218,6547 mg/kg mesa a anserina 815,6167 mg/kg mesa (Tablica 9.).

**Tablica 5.** Dobivene koncentracije anserina i karnozina u B1 skupini uzoraka mesa pilećih prsa.

uzorak		mg/L	mg/kg mesa
oznaka			
B1_1	anserin	158,928	794,640
	karnozin	41,65	208,250
B1_2	anserin	147,891	739,455
	karnozin	39,015	195,075
B1_3	anserin	157,948	789,740
	karnozin	41,079	205,395
B1_4	anserin	158,966	794,830
	karnozin	41,339	206,695
B1_5	anserin	163,08	815,400
	karnozin	42,998	214,990
		<b>anserin</b>	<b>karnozin</b>
<b>srednja vrijednost</b>		<b>786,813</b>	<b>206,081</b>
<b>SD</b>		28,258	7,177
<b>RSD (%)</b>		3,591	3,483
<b>interval pouzdanosti (±)</b>		24,769	6,291

**Tablica 6.** Dobivene koncentracije anserina i karnozina u B2 skupini uzoraka mesa pilećih prsa.

uzorak		mg/L	mg/kg mesa
oznaka			
B2_1	anserin	154,77	773,850
	karnozin	42,558	212,790
B2_2	anserin	148,955	744,775
	karnozin	36,519	182,595
B2_3	anserin	178,586	892,930
	karnozin	49,156	245,780
B2_4	anserin	166,402	832,010
	karnozin	44,514	222,570
B2_5	anserin	171,211	856,055
	karnozin	46,224	231,120
		<b>anserin</b>	<b>karnozin</b>
<b>srednja vrijednost</b>		<b>819,924</b>	<b>218,971</b>
<b>SD</b>		60,315	23,668
<b>RSD (%)</b>		7,356	10,809
<b>interval pouzdanosti (±)</b>		52,867	20,746

**Tablica 7.** Dobivene koncentracije anserina i karnozina u B3 skupini uzoraka mesa pilećih prsa.

uzorak		mg/L	mg/kg mesa
oznaka			
B3_1	anserin	169,937	849,685
	karnozin	46,124	230,620
B3_2	anserin	174,977	874,885
	karnozin	47,382	236,910
B3_3	anserin	171,358	856,790
	karnozin	45,75	228,750
B3_4	anserin	169,779	848,895
	karnozin	45,306	226,530
B3_5	anserin	169,404	847,020
	karnozin	45,474	227,370
		<b>anserin</b>	<b>karnozin</b>
<b>srednja vrijednost</b>		<b>855,455</b>	<b>230,036</b>
<b>SD</b>		11,476	4,143
<b>RSD (%)</b>		1,341	1,801
<b>interval pouzdanosti (±)</b>		10,059	3,631

**Tablica 8.** Dobivene koncentracije anserina i karnozina u B4 skupini podskupini mesa pilećih prsa.

uzorak		mg/L	mg/kg mesa
oznaka			
B4_1	anserin	155,176	775,880
	karnozin	41,834	209,170
B4_2	anserin	156,21	781,050
	karnozin	42,178	210,890
B4_3	anserin	155,840	779,200
	karnozin	41,237	206,185
B4_4	anserin	150,039	750,195
	karnozin	40,129	200,645
B4_5	anserin	154,206	771,030
	karnozin	41,579	207,895
		<b>anserin</b>	<b>karnozin</b>
<b>srednja vrijednost</b>		<b>771,471</b>	<b>206,957</b>
<b>SD</b>		12,488	3,927
<b>RSD (%)</b>		1,619	1,897
<b>interval pouzdanosti (±)</b>		10,946	3,442

**Tablica 9.** Usporedba rezultata dobivenih mjerenjem koncentracije karnozina i anserina u skupinama B1, B2, B3 i B4.

uzorak	mg/kg mesa	
	karnozin	anserin
<b>B1</b>	206,081	786,813
<b>B2</b>	218,971	819,924
<b>B3</b>	230,036	855,455
<b>B4</b>	206,957	771,471
<b>srednja vrijednost</b>	<b>218,6547</b>	<b>815,6167</b>

Uspoređujući dobivene koncentracije karnozina i anserina za uzorke A i B vidljivo je da se srednje vrijednosti koncentracije karnozina razlikuju za 2,92 % odnosno 4,32 % za anserin. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da nema značajne razlike u koncentraciji karnozina i anserina u uzorcima A i B te da je raspodjela oba analita jednaka u svim dijelovima mesa pilećih prsa. Ranije provedeno istraživanje pokazalo je da koncentracija karnozina i anserina u mesu pilića ne ovisi o genotipu ali ovisi o vrsti mišićnog tkiva, pa je tako u mesu zabatka izmjerena koncentracija karnozina 349,53 mg/kg mesa za genotip Cobb 500 dok je kod genotipa Ross izmjereno 366,14 mg/kg mesa. Koncentracija karnozina u prsima kod genotipa Cobb 500 iznosila je 590,67 mg/kg mesa a kod genotipa Ross 308 560,91 mg/kg mesa. Koncentracija anserina u mesu zabatka za genotip Cobb 500 iznosila je 948,42 mg/kg mesa a za genotip Ross 308 1061,05 mg/kg mesa dok je izmjerena koncentracija anserina u mesu prsa za genotip Cobb 500 iznosila 2112,38 mg/kg mesa i genotip Ross 308 2266,97 mg/kg mesa [35].

## 5. ZAKLJUČAK

---

Današnji svijet se suočava sa sve većim problemima u vezi prehrane i životnih navika. Ta činjenica proizlazi iz nedostatka educiranosti društva, brzog tempa života i sve veće konzumacije prerađene hrane, što uvelike utječe na kvalitetu života. Iz tog razloga, mnogi znanstvenici ukazuju na važnost zdravog načina života. Osim toga, posljednjih nekoliko godina se sve više pozornosti pridodaje funkcionalnoj hrani.

Zahvaljujući svojim biološkim svojstvima, karnozin ima važnu ulogu u ljudskom organizmu. Naime, on štiti organizam od slobodnih radikala i na taj način smanjuje oksidativni stres i sprječava razvoj mnogih neurodegenerativnih i kardiovaskularnih bolesti koje su danas sve zastupljenije u modernom društvu. Također se karnozin pokazao kao izvrstan dodatak prehrani, posebice kod sportaša jer poboljšava izdržljivost mišića i bolju izvedbu pokreta. Zbog širokog spektra korisnih svojstava i jedinstvene strukture, karnozin pronalazi primjenu u mnogim područjima ljudskog života što opravdava sve veću zainteresiranost znanstvenika. Tako se u prehrambenoj industriji nastoji obogatiti proizvode karnozinom pa je podatak o njegovoj koncentraciji u prehrambenih proizvodima važan.

U ovom radu određivan je sadržaj karnozina i anserina u uzorcima mesa pilećih prsa kako bi se vidjelo jesu li oba dipeptida ravnomjerno raspoređena u mesu pilećih prsa. Dobiveni rezultati pokazali su da se srednje vrijednosti koncentracije karnozina i anserina za uzorke A i B razlikuju za 2,92 % za karnozin odnosno 4,32 % za anserin. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti da nema značajne razlike u koncentraciji karnozina i anserina u uzorcima A i B te da je raspodjela oba analita jednaka u svim dijelovima mesa pilećih prsa.

## 6. POPIS LITERATURE

---

- [1] V. S. Gulevitch, S. Amiradzibi, Über der Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextrakten. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1900**, *33*, 1902–1903.
- [2] M. C. Aristoy, F. Toldrá, Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants. *Meat Sci.* **2004**, *67*, 211–217.
- [3] A. A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave, Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 1803–1845.
- [4] I. Jukić, N. Kolobarić, A. Stupin, A. Matic, N. Kozina, Z. Mihaljević i sur., Carnosine, Small but Mighty-Prospect of Use as Functional Ingredient for Functional Food Formulation. *Antioxidants.* **2021**, *107*, 1037.
- [5] B. Saunders, K. Elliott-Sale, G. G. Artioli, P. A. Swinton, E. Dolan, H. Roschel, C. Sale, B. Gualano,  $\beta$ -alanine supplementation to improve exercise capacity and performance: a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* **2017**, *51*, 658–669.
- [6] <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09546634.2010.521812> (18.09.2024.)
- [7] W. Kopec, D. Jamroz, A. Wiliczekiewicz, E. Biazik, A. Pudlo, M. Korzeniowska, T. Hikawczuk, T. Skiba, Antioxidative Characteristics of Chicken Breast Meat and Blood after Diet Supplementation with Carnosine, L-histidine, and  $\beta$ -alanine. *Antioxidants.* **2020**, *9*, 1093-1107.
- [8] 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*, 902-915.
- [9] M. Vraneš, J. Panić, A. Tot, S. Papović, S. Gadžurić, Č. Podlipnik, M. Bešter-Rogač, From amino acids to dipeptide: The changes in thermal stability and hydration properties of  $\beta$ -alanine, L-histidine and L-carnosine. *J. Mol. Liq.* **2021**, *328*, 115250.
- [10] A. A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave, Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 45.
- [11] O. Shemchuk, Optimizing Physicochemical Properties of Natural Antioxidants and Geroprotectors: L-Carnosine and Melatonin. *Disertacija*, Sveučilište u Bologni, **2015**



- [12] W. Derave, I. Everaert, S. Beeckman, A. Baguet, Muscle Carnosine Metabolism and  $\beta$ -Alanine Supplementation in Relation to Exercise and Training. *Sports Med.* **2010**, *40*, 247–263.
- [13] R. C. Harris, M. J. Tallon, M. Dunnett, L. Boobis, J. Coakley, H. J. Kim, et al., The absorption of orally supplied beta-alanine and its effect on muscle carnosine synthesis in human vastus lateralis. *Amino Acids.* **2006**, *30*, 279–89.
- [14] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carnosine#section=Experimental-Properties> (18.08.2024.)
- [15] V. P. Skulachev, Biological role of carnosine in the functioning of excitable tissues. *Biochemistry (Moscow).* **2000**, *65*, 749-750.
- [16] J. Y. Culbertson, R. B. Kreider, M. Greenwood, M. Cooke, *Nutrients* **2010**, *2*, 75–98.
- [17] V. R. Preedy, *Imidazole Dipeptides: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Thomas Graham House, Science Park, Milton Road, Cambridge, 2015. Str. 46–47, 83–98.
- [18] E. A. Decker, S. A. Livisay, S. Zhou, A Re-evaluation of the Antioxidant Activity of Purified Carnosine. *Biochemistry (Moscow).* **2000**, *65*, 76.
- [19] L. V. Chasovnikova, V. E. Formazyuk, V. I. Sergienko, A. A. Boldyrev, S. E. Severin, The antioxidative properties of carnosine and other drugs. *Biochemistry International.* **1990**, *20*, 1097–1103.
- [20] E. A. Decker, S. A. Livisay, S. Zhou, A Re-evaluation of the Antioxidant Activity of Purified Carnosine. *Biochemistry (Moscow).* **2000**, *65*, 766.
- [21] G. Vistoli, V. Straniero, A. Pedretti, L. Fumagalli, C. Bolchi, M. Pallavicini, E. Valoti, B. Testa, Predicting the physicochemical profile of diastereoisomeric histidine-containing dipeptides by property space analysis. *Chirality.* **2012**, *24*, 566–576.
- [22] A. Torreggiani, M. Tamba, G. Fini, Binding of copper(II) to carnosine: Raman and IR spectroscopic study. *Biopolymers.* **2000**, *57*, 149–159.
- [23] M. Kawahara, K. Tanaka, M. Kato-Negishi, *Nutrients* **2018**, *10*, 1–20.
- [24] C. M. Garrett, R. H. Grisham, *Biochemistry (5th ed.)*, Cengage Learning, **2012**, p. 46.
- [25] I. Everaert, G. Baron, S. Barbaresi, E. Gilardoni, C. Coppa, M. Carini, G. Vistoli, T. Bex, J. Stautemas, L. Blancquaert, W. Derave, G. Aldini, L. Regazzoni, Development and validation

of a sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of anserine in human plasma and urine and its application to pharmacokinetic study. *Amino Acids*. **2019**, *51*, 103-114.

[26] L. Blancquaert, S. P. Baba, S. Kwiatkowski, J. Stautemas, S. Stegen, S. Barbaresi, W. Chung, A. A. Boakye, J. D. Hoetker, A. Bhatnagar, J. Delanghe, B. Vanheel, M. Veiga-da-Cunha, W. Derave, I. Everaert, Carnosine and anserine homeostasis in skeletal muscle and heart is controlled by  $\beta$ -alanine transamination. *J. Physiol*. **2016**, *594*, 49-63.

[27] R. Kohen, R. Misgav, I. Ginsburg, The SOD like activity of copper: carnosine, copper: anserine and copper: homocarnosine complexes. *Free Radical Res. Commun*. **1991**, *13*, 79-85.

[28] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=112072&t=1> (17.08.2024.)

[29] P. G. Peiretti, C. Medana, S. Visentin, V. Giancotti, V. Zunino, G. Meineri, Determination of carnosine, anserine, homocarnosine, pentosidine and thiobarbituric acid reactive substances contents in meat from different animal species. *Food Chem*. **2011**, *126*, 1939-1947.

[30] Daniel C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, W. H. Freeman and Company, New York, **2007**.

[31] F. Blum, High performance liquid chromatography. *Br. J. Hosp. Med*. **2014**, *75*, 18–21.

[32] P. K. Sahu, N. R. Ramiseti, T. Cecchi, S. Swain, C. S. Patro, J. Panda, An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2018**, *147*, 590–61.

[33] [https://player.slideplayer.com/89/14267584/slides/slide\\_82.jpg](https://player.slideplayer.com/89/14267584/slides/slide_82.jpg) (12.08.2024.)

[34] <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=kalibracija> (18.09.2024.)

[35] Z. Kralik, G. Kralik, O. Galović, K. Gvozdanović, Ž. Radišić, M. Košević, Utjecaj genotipa pilića i vrste mišićnog tkiva na sadržaj karnozina i anserine. *Krmiva*. **2022**, *64*, 55-60.