

# Određivanje udjela bakra, cinka i selena u grahoricama metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom

---

Drinovac, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:128845>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Lucija Drinovac**

**Određivanje udjela bakra, cinka i selena u  
grahoricama metodom induktivno spregnute  
plazme s masenom spektrometrijom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u laboratorijima tvrtke Sample Control d.o.o. pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Donatelle Verbanac i suvoditeljstvom dipl. ing. Anamarije Ilijaš.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	2
3. MATERIJALI I METODE .....	3
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	6
4.1. Soja .....	6
4.2. Grah .....	9
4.3. Slanutak.....	12
4.4. Leća.....	15
4.5. Elementi u tragovima.....	17
4.5.1. Bakar .....	17
4.5.1.1. Metabolizam bakra .....	18
4.5.1.2. Uloga bakra u imunosnom sustavu .....	20
4.5.1.3. Bakar kao kofaktor enzima .....	21
4.5.1.4. Udio bakra u grahoricama .....	23
4.5.2. Cink.....	24
4.5.2.1. Metabolizam cinka .....	25
4.5.2.2. Uloga cinka u oksidativnom stresu .....	26
4.5.2.3. Uloga cinka u imunosnom sustavu.....	27
4.5.2.4. Udio cinka u grahoricama.....	29
4.5.3. Selen.....	30
4.5.3.1. Metabolizam selena .....	30
4.5.3.2. Selenoproteini .....	32
4.5.3.3. Udio selena u grahoricama .....	34
5. ZAKLJUČCI .....	35
6. LITERATURA .....	37
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	42
8. PRILOZI .....	44

# 1. UVOD

Naša je prehrana od velike važnosti za procese koji obuhvaćaju osnovu biokemijskih i fizioloških zbivanja u stanicama i organizmu općenito. Pravilnom prehranom može se održati zdravlje, prevenirati nastanak mnogih bolesti, te utjecati na njihov tijek ili ublažiti njihov štetan učinak na organizam. Hrana koja se unosi ne predstavlja trenutni lijek, već postaje saveznik u borbi za zdravlje kroz duži vremenski period. Stoga je važno poznavati osnove pravilne prehrane, kako bismo postali aktivni sudionici u održavanju našeg zdravlja i borbi protiv nastanka bolesti, a ne samo pasivni promatrači koji nisu u mogućnosti djelovati na tijek same bolesti.

Trenutno, 70% smrtnih slučajeva diljem svijeta uzrokovano je kroničnim bolestima, a incidencija je u porastu. Jedan od glavnih faktora rizika koji uzrokuju njihov nastanak upravo jest neuravnotežena prehrana. Prekomjerman unos kalorija, a sa druge strane nedovoljan unos ključnih nutritivnih komponenti koreliraju sa dramatičnim porastom u pretilosti stanovništva i s njome povezanim kroničnim bolestima (Didinger i Thompson, 2021).

Jedna od izrazito nutritivno bogatih skupina namirnica, kako ugljikohidratima, proteinima te prehranbenim vlaknima, tako i vitaminima i mineralima, jesu grahorice. U ljudskoj prehrani najviše se koriste grah i soja, ali su i sve ostale biljke iz ove skupine (grašak, bob, leća, slanutak) bogate nutritivno vrijednim elementima. U usporedbi s primjerice kukuruzom, grahorice su bolji izvor proteina (20 – 30%), bogatije su mikronutrijentima, odnosno vitaminima i mineralima, kao što su folna kiselina, niacin, tiamin, kalcij, željezo te elementima u tragovima kao što je primjerice cink (de Jager i sur., 2019).

Nadalje, grahorice su dobar izvor esencijalnih aminokiselina, posebice lizina (de Jager i sur., 2019). Esencijalne aminokiseline su one aminokiseline koje naš organizam ne može samostalno sintetizirati kako bi zadovoljio svoje potrebe, već ih je potrebno unijeti prehranom. U skupini grahorica metionin i cistein su često limitirajuće aminokiseline. Limitirajuća aminokiselina je esencijalna aminokiselina koja je u proteinu namirnice sadržana

u najmanjoj količini u odnosu na istu aminokiselinu u referentnom proteinu (prirodnom visokokvalitetnom proteinu – proteini jajeta ili mlijeka).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

U ovom je radu poblize opisan nutritivni sastav grahorica na uzorcima soje, graha, slanutka i leće, s naglaskom na elemente u tragovima – cink, bakar i selen. Njihov je udio izmjeren u uzorcima koji imaju oznaku BIO proizvoda, kao i u uzorcima koji nemaju tu oznaku te uspoređen s podacima u literaturi. Određivanje udjela se provelo metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS), koja ima izvrsnu izvedbu pri mjerenju u uzorcima niskih koncentracija. Nadalje, opisana je i važnost ispitivanih mikroelementa u održavanju homeostaze organizma, a samim time i sprječavanju nastanka bolesti.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### UZORCI ZA ANALIZU

BIO proizvodi: - soja, grah, slanutak, leća

- kupljeni u „bio&bio“ trgovini
- proizvođač: Biovega d.o.o.

Proizvodi koji nisu deklarirani kao BIO: - grah, slanutak, leća

- kupljeni u „Konzum“ trgovini
- proizvođač: EuroCompany99 d.o.o.

#### PRIPREMA UZORAKA ZA ANALIZU

Uzorci soje, graha, slanutka i leće su najprije samljeveni pomoću mehaničkog mlina. Potom je od svakog uzorka na analitičkoj vagi odvagano po 2 grama. Plastične čašice u kojima su uzorci vagani su prije postupka vaganja, zajedno s kivetama u kojima se provodi spaljivanje, pripremljene postupkom čišćenja s 5 mL koncentrirane dušične kiseline i 5 mL destilirane vode uz zagrijavanje u mikrovalnoj peći. Čašice s izvaganim uzorcima postavljene su u prethodno očišćene kivete te se u svaku od njih dodaje po 3 mL TraceSELECT  $\geq 69\%$ -tne dušične kiseline te po 1 mL 30%-tnog vodikovog peroksida. Tako pripremljene kivete s uzorcima postavljene su u mikrovalnu peć, gdje se pokreće program spaljivanja koji traje 40 minuta, pod tlakom od 35 bara i zagrijavanje do 190 °C. Nakon postupka spaljivanja i hlađenja, uzorci se iz kivete prebacuju u Falcon kivete volumena 50 mL. U svaku od njih dodaje se 250  $\mu$ L standarda zlata, 700  $\mu$ L TraceSELECT 34-37%-tne klorovodične kiseline, a ostatak do volumena od 50 mL se nadopuni destiliranom vodom. Uzorci su nakon ovog postupka spremni za mjerenje na analizatoru.

## KEMIKALIJE I REAGENSI

- koncentrirana dušična kiselina (LabExpert)
- TraceSELECT  $\geq 69\%$ -tna dušična kiselina (Honeywell)
- 30%-tni vodikov peroksid (Lach-Ner)
- standard zlata – 1000  $\mu\text{g/mL}$  Au u 20% HCl (Agilent Technologies)
- TraceSELECT 34-37%-tna klorovodična kiselina (Honeywell)

## INSTRUMENTI

- mehanički mlin (Cemotec 1090)
- analitička vaga (Sartorius Croatia)
- mikrovalna peć Speedwave Xpert (Berghof)
- Inductive Coupled Plasma Mass Spectrometer Agilent 7800

## PRINCIP METODE

Za mjerenje koncentracije cinka, bakra i selena u uzorcima grahorica korištena je metoda masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS). Uzorak se najprije nanosi u raspršivač koji pretvara tekućinu u aerosol pomoću jake struje argona u tzv. sprej komori. Prolazeći kroz komoru uklanjaju se veće kapljice, a one manje su nošene argonom do izvora plazme. Plazma koja se koristi predstavlja ionizirani argon koji nastaje kada se primjenom generatora oslobodi energija koja omogućuje oscilaciju slobodnih elektrona, njihovu koliziju s atomima argona i konačno otpuštanje elektrona. Novonastali ioni argona i elektroni dovode do daljnjih kolizija i ionizacije te do distribucije energije kroz tok plina koji formira plazmu. Gustoća energije u ioniziranom argonu je iznimno velika, a postignuta temperatura može iznositi i do 10 000 °C. Kapljice aerosola nošene su centrom plazme gdje se suše i disociraju na pojedinačne atome koji se tada ioniziraju. Argon je odličan plin za upotrebu u ovoj metodi jer je njegova prva energija ionizacije viša od većine ostalih elemenata te ispod njihove druge energije ionizacije koja bi bila potrebna za otpuštanje dva elektrona. Ovo svojstvo argona omogućuje ionizaciju gotovo svih elemenata u  $1^+$  katione, sa samo malim postotkom dvostruko nabijenih kationa. Tako nastali ioni odvajaju se metodom masene spektrometrije. Odvajanje se temelji na omjeru mase i naboja te se za to najčešće



koristi kvadrupol filter masa. Zatim ioni dolaze do detektora te nastaje signal koji detektirane ione zabilježava u jedinicama counts per second (CPS). CPS je broj iona koji detektor zabilježi u jednoj sekundi. Ta se vrijednost prevodi u jedinicu koncentracije. Za to je potrebno prethodno napraviti kalibraciju standarda, iz koje se izvodi kalibracijska krivulja iz koje je moguće očitati dobivene koncentracije elemenata u uzorku.

## MJERENJE I DOBIVENI REZULTATI

U Microsoft Excel tablicu, koja je povezana sa softwareom ICP-MS analizatora, najprije se upisuju pozicije uzoraka. Zatim se uzorci postave na autosampler, pusti se argon koji omogućuje ionizaciju uzoraka te se pokreće kalibracija standarda. Nakon kalibracije standarda, koja je potrebna kako bi se dobila kalibracijska krivulja, moguće je izvršiti mjerenje. Mjerenja za sva tri elementa u tragovima (cink, bakar i selen) u grahoricama (soja, grah, slanutak, leća) su napravljena u triplikatu.

Rezultati su dobiveni u jedinicama counts per second (CPS), a konačni rezultat je izražen kao mg/100 g, odnosno mcg/100 g. S obzirom da se mjerenje vršilo u triplikatu, određena je srednja vrijednost kao i standardna devijacija.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. SOJA

Soja (*Glycine max*) je grahorica koja pripada porodici *Fabaceae*, redu *Fabales* te razredu *Magnoliopsida*. Podrijetlo ove biljke je poprilično nepoznato, ali se vjeruje da se najprije počela uzgajati u centralnoj Kini i to čak 7000. g.pr.Kr. Koristila se u Kini, Japanu i Koreji tisućama godina kao namirnica, ali i kao dio lijekova. Stanovnici Sjedinjenih Američkih Država su ju počeli koristiti tek 1804., a posebice je postala popularna na jugu i Midwestu sredinom 20. stoljeća. Danas, veliki proizvođači jesu i Brazil te Argentina.

Soja sadrži približno 35-40% proteina, 20% lipida te 9% prehrambenih vlakana. Dva glavna skladišna proteina jesu  $\beta$ -konglicinin ( $\beta$ -CG, 7S) i glicinin (11S) koji čine 80-90% ukupnih proteina soje. Proteini soje s različitim omjerima  $\beta$ -konglicinina i glicinina imaju različite nutritivne i fiziološke učinke. Bioaktivni peptidi su fragmenti od 2-20 aminokiselina koji su inaktivni i dio su prekursorskog proteina. Oni su inaktivni sve dok su dio sekvence prekursorskog proteina, ali se aktiviraju otpuštanjem djelovanjem enzima, digestijom, procesiranjem hrane ili fermentacijom. Uglavnom se radi o slijedu od dvije do dvadeset aminokiselina koji se apsorbiraju putem probavnog trakta u cirkulaciju i na taj način dopijevaju do ciljanih tkiva. Bioaktivni peptidi na organizam imaju brojne pozitivne učinke. Smanjuju ukupnu koncentraciju kolesterola i triglicerida, na način da suprimiraju sintezu kolesterola inhibicijom 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA reduktaze. Također, povećavaju unos LDL-a u stanicu. Djeluju i antidijabetski jer potpomažu unos glukoze u stanicu i povećavaju sekreciju inzulina. Sudjeluju u regulaciji krvnog tlaka inhibirajući angiotenzin konvertirajući enzim (ACE) koji regulira renin-angiotenzin sustav. Imaju i protuupalno i antioksidativno djelovanje, a samim time i antikancerogeno jer ti faktori dovode do abnormalnog rasta tkiva (Chatterjee i sur., 2018).

Osim bioaktivnih peptida, biološki važne komponente jesu izoflavoni i saponini. Izoflavoni su vrsta fitoestrogena, a tako se nazivaju zbog njihove strukturne sličnosti s  $17\beta$ -estradiolom. Mogu se vezati i na  $\alpha$  i na  $\beta$  estrogenske receptore, ali imaju veći afinitet za  $\beta$  receptore. To su glikozidi (genistin, diazin i glicetin) koji se djelovanjem  $\beta$ -glukozidaze konvertiraju u svoj aktivni oblik aglikona (genistein, diazein i glicetein) (Chatterjee i sur., 2018). Izoflavoni blagotvorno djeluju na naše zdravlje. Diazein i njegovi metaboliti imaju najbolji antiaterogeni učinak među izoflavonima te preveniraju nastanak koronarne bolesti srca. S obzirom da se najveći dio njihove biološke aktivnosti ispoljava preko estrogenskih receptora, njihov glavni učinak je upravo na karcinome uvjetovane hormonskim promjenama, odnosno karcinom dojke i prostate, kao i osteoporozi te proces menopauze. Nadalje, izoflavoni imaju i snažno antioksidativno djelovanje. Smanjuju razinu oksidiranog LDL kolesterola koji igra esencijalnu ulogu u nastanku ateroskleroze, kao i razinu  $F_2$ -izoprostana koji je zlatni standard među biomarkerima oksidativnog stresa (Sekikawa i sur., 2019). Saponini su triterpenski glikozidi koji se sastoje od polarnih lanaca šećera konjugiranih s nepolarnim pentacikličkim prstenima. Djeluju protuupalno, antikarcinogeno, antibakterijski te imaju protektivan učinak na jetru i kardiovaskularni sustav (Chatterjee i sur., 2018). Imaju veći antioksidativni kapacitet od superoksid dismutaze, međutim njihova djelotvornost ovisi o njihovoj biodostupnosti. Naime, oni se u soji nalaze u glikozidnom obliku te se poput izoflavona moraju konvertirati u svoj aktivni oblik aglikona koji se nazivaju saponogenoli (Rizzo, 2020).

Uz proteine, izoflavone, saponine i prehrambena vlakna bogatom nutritivnom sastavu soje doprinose i mikronutrijenti. Sadrži visok udio vitamina B skupine i minerale kao npr. kalij, magnezij, kalcij, fosfor te željezo. Od elemenata u tragovima ističu se cink, bakar i mangan. (Szostak, 2020). Mjerenje koncentracije elemenata u tragovima (cinka, bakra i selen) u BIO uzorku soje provedeno je metodom masene spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom. Mjerenje je provedeno u triplikatu, a dobiveni rezultati su prikazani kao srednja vrijednost sa pripadnom standardnom devijacijom i uspoređeni s podacima iz literature (Tablica 1.).

Tablica 1. Udio cinka, bakra i selena u BIO uzorku soje i literaturni podaci  
([www.nutritiondata.self.com](http://www.nutritiondata.self.com))

	BIO soja	Soja (literatura)
<b>Cink (Zn)/(mg/100g)</b>	3,88 ± 0,59	4,8 ± 0,0
<b>Bakar (Cu)/(mg/100g)</b>	1,54 ± 0,30	1,1 ± 0,0
<b>Selen (Se)/(µg/100g)</b>	11,07 ± 3,33	19,3 ± 0,0

Izmjereni udio cinka na 100 g u BIO uzorku soje je neznatno niži (3,88 mg/100g) od podataka navedenih u literaturi (4,8 mg/100g), dok je udio bakra nešto viši (1,54 mg/100g) od literaturnih podataka. Za razliku od cinka i bakra, udio selena je značajnije niži (11,07 µg/100g) od udjela u literaturi (19,3 µg/100g).

## 4.2. GRAH

Grah (*Phaseolus vulgaris*) pripada porodici *Fabaceae*, redu *Fabales* i razredu *Magnoliopsida*. Najprije se počeo uzgajati u Peruu i Meksiku i to čak prije 8000 godina, a danas se uzgaja u cijelom svijetu. U novije doba zemlje s najvećom proizvodnjom jesu Mijanmar, Brazil, SAD, Meksiko, Tanzanija i Kina. Grah ima vitalnu ulogu u vegetarijanskoj prehrani jer predstavlja povoljnu namirnicu s bogatom nutritivnom vrijednošću. Naime, bogat je proteinima, prehrambenim vlaknima, vitaminima, mineralima te ima nizak udio zasićenih masti (Ganesan i Xu, 2017).

Sadržaj proteina u grahu varira između 15-35%, što gotovo odgovara sadržaju proteina u mesu. Primarne proteinske frakcije jesu globulini (50-70 %) i albumini (10 %). U sastavu globulina ističu se fazeolin, zatim glutelin, a u manjoj količini je prisutan i prolamin. Od aminokiselina najviše se ističu lizin (6,5 – 7,5 g/100g proteina), tirozin te fenilalanin, esencijalne aminokiseline koje moramo unijeti prehranom. Lizin je limitirajuća aminokiselina u žitaricama, stoga je konzumacija graha idealan dodatak prehrani. Nadalje, 100 g graha sadrži 9 -25 g proteina što je skoro 20% preporučenog dnevnog unosa za odraslu osobu. Osim proteina, sadrži i 55 -75 g ugljikohidrata na 100g namirnice i to najviše škroba (Ganesan i Xu, 2017). Osim škroba prisutna su i brojna prehrambena vlakna. To su većinom netopljiva prehrambena vlakna hemiceluloza, celuloza i lignin, dok je od topljivih prisutan pektin. Prehrambena vlakna podliježu procesu fermentacije u debelom crijevu te nastaju kratkolančane masne kiseline, kao npr. butirična kiselina, koje smanjuju rizik od nastanka kolorektalnog karcinoma (Vega i sur., 2013). Lipidna frakcija čini 1,5 - 6,5 g na 100g namirnice i uglavnom se radi o mono i polinezasićenim masnim kiselinama kao što je linolna kiselina (Ganesan i Xu, 2017). Redovna konzumacija graha smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti na način da se snižava razina LDL kolesterola, a povećava razina HDL kolesterola. Osim toga, snižava postprandijalnu hiperglikemiju te povećava sitost. Bitno je naglasiti da svojom mogućnošću fiksacije dušika iz tla, simbiozom s bakterijama roda *Rhizobia*, smanjuje potrebu dodatnih gnojiva i poboljšava sveukupno stanje zemlje (Winham i sur., 2019)

Osim svih prethodno spomenutih nutrijenata, grah je bogat i polifenolima. Njihov sadržaj iznosi 145 mg/g i čini 11% ukupne mase. Oni spadaju u skupinu antinutrijenata jer zajedno s inhibitorima proteaza, lektinima, fitatima i oksalatima smanjuju probavljivost proteina, apsorpciju nutrijenata kao i biodostupnost minerala. Međutim, polifenoli (flavoni, monomeri i oligomeri flavanola, flavanoni, izoflavoni, antocijanini, tanini) imaju i brojne pozitivne učinke na naš organizam. Primjerice, fenolna kiselina, flavoni i tanini imaju odlična antioksidativna svojstva. Njihove glavne uloge jesu neutralizacija slobodnih radikala, supresija lipidne peroksidacije te keliranje metala. Antidijabetski učinak se očituje u inhibiciji  $\alpha$ -amilaze,  $\alpha$ -glukozidaze i dipeptidil peptidaze-IV, snižavanju koncentracije glukoze i glikiranog hemoglobina i povećanja razine inzulina za koju su zaduženi flavoni te glukozidi antocijanina. Polifenoli djeluju i kardioprotektivno na način da snižuju ukupnu koncentraciju kolesterola i koncentraciju LDL kolesterola, a povećavaju HDL kolesterola. Osim toga, polifenoli djeluju antimutageno inhibirajući mutagene agense kao što su policiklički aromatski ugljikovodici, nitrozamini i mikotoksini na način da inhibiraju njihove aktivacijske enzime ili aktiviraju detoksifikacijske enzime (Ganesan i Xu, 2017).

S obzirom na sastav mikronutrijenata najzastupljeniji su folati (vitamin B<sub>9</sub>), vitamin C te minerali kalcij, kalij, magnezij i željezo (Winham i sur., 2019; Ganesan i Xu, 2017). Od elemenata u tragovima izmjerena je koncentracija cinka, bakra i selena ICP-MS metodom u dva uzorka graha, jednome s oznakom BIO i jednome bez te oznake. Da bi uzorak dobio oznaku BIO, mora biti uzgajan bez upotrebe pesticida, u ekološkim uvjetima i ne smije sadržavati teške metale. Mjerenja su provedena u triplicatu, a dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost i pripadajuća standardna devijacija te su uspoređeni s podacima iz literature (Tablica 2.).

Tablica 2. Udio cinka, bakra i selena u uzorcima graha i literaturni podaci

([www.nutritiondata.self.com](http://www.nutritiondata.self.com))

	<b>BIO grah</b>	<b>Grah</b>	<b>Grah (literatura)</b>
<b>Cink (Zn)/(mg/100g)</b>	1,78 ± 0,05	2,30 ± 0,12	2,8 ± 0,0
<b>Bakar (Cu)/(mg/100g)</b>	0,52 ± 0,02	0,87 ± 0,02	1,0 ± 0,0
<b>Selen (Se)/(µg/100g)</b>	0,95 ± 0,61	4,25 ± 3,5	3,2 ± 0,0

Udio cinka je manji od literaturnih navoda i u uzorku graha s BIO oznakom i u uzorku koji nema tu oznaku. Izmjereni udio bakra je približno isti u oba uzorka, 0,52 mg/100g u BIO uzorku, a 0,87 mg/100g u drugom uzorku, što je u oba slučaja manje od podataka u literaturi (1,0 mg/100g). Udio selena u BIO uzorku graha je manji (0,95 µg/100g) dok je u drugom uzorku udio selena veći (4,25 µg/100g) od podataka u literaturi (3,2 µg/100g).

### 4.3. SLANUTAK

Slanutak (*Cicer arietinum*) je grahorica koja pripada porodici *Fabaceae*, redu *Fabales* razredu *Magnoliopsida*. Jedina je vrsta roda *Cicer* koja se uzgaja u današnje vrijeme, a ukupno ih ima oko četrdeset. Njegov progenitor je *Cicer reticulatum*. Najprije se počeo uzgajati na području današnje jugoistočne Turske i Sirije i to čak 7500 godina prije Krista. Iz tog dijela svijeta se njegova proizvodnja proširila po Mediteranu prije otprilike 6000 godina, zatim prije 4000 godina u Indiji, a zatim i u ostatku svijeta. Danas, najveći proizvođači slanutka na svijetu jesu Indija, Australija, Pakistan, Turska i Meksiko (Camargo i sur., 2019). Postoje dva različita tipa slanutka koji se uzgajaju, *desi* i *kabuli*, koji se razlikuju po morfologiji sjemenke. *Desi* tip ima roze cvjetove, pigmente na stabljici koji potječu od antocijanina i obojenu i debelu sjemenku. Sa druge strane, *kabuli* tip ima bijele cvjetove, nema pigmenta na stabljici te svijetlu, tanku i glatku sjemenku. *Desi* tip predstavlja 80-85 % ukupno proizvedenog slanutka i uglavnom se uzgaja u Aziji i Africi. *Kabuli* tip se uglavnom uzgaja u zapadnoj Aziji, sjevernoj Africi, Sjevernoj Americi i Europi. Način pripreme slanutka uvelike ovisi o etničkim i regionalnim faktorima. Primjerice, u Indiji se melje i pretvara u brašno, tzv. *besan*, koji se koristi u pripremi različitih grickalica. U Aziji i Africi se uglavnom koristi u varivima, juhama, salatama, može se peći, kuhati itd. (Jukanti i sur., 2012).

Bogata nutritivna vrijednost slanutka čini ovu grahoricu izrazito popularnom, posebice u krajevima u kojima prevladava polupustinjska klima, kod stanovništva koje ne može priuštiti mesne proizvode, kao i kod stanovništva koje preferira vegetarijansku prehranu. Slanutak je dobar izvor ugljikohidrata i proteina, koji zajedno čine 80% ukupne mase sjemenke u usporedbi s drugim grahoricama. Ne sadrži kolesterol, a osim ugljikohidrata i proteina, dobar je izvor prehrambenih vlakana, vitamina i minerala. Sadrži više ugljikohidrata u usporedbi s drugim grahoricama, a pojedine frakcije monosaharida, disaharida te oligosaharida variraju među *kabuli* i *desi* tipovima, ali ne značajno. Najviše su zastupljeni  $\alpha$ -galaktozidi koji čine oko 62% ukupnog sadržaja ugljikohidrata u slanutku, a među njima se najviše ističu ciceritol i stahioza.  $\alpha$ -galaktozidi se ne probavljaju niti apsorbiraju u gornjem dijelu gastrointestinalnog trakta zbog nedostatka  $\alpha$ -galaktozidaze. Tako neprobavljeni oligosaharidi nakupljaju se u debelom crijevu gdje se djelovanjem crijevne mikroflore oslobađaju vodik, metan i ugljikov dioksid. Ovaj proces je razlog nadimanja prilikom konzumacije slanutka, koji sadrži više ugljikohidrata nego druge grahorice. Rezistentni škrob



čini oko 35% ukupnog sadržaja škroba i zajedno s ostalim neprobavljivim komponentama kao što su poli- i oligosaharidi te lignin čini skupinu prehrambenih vlakana (Jukanti i sur., 2012). Ona snižavaju postprandijalnu koncentraciju glukoze ili inzulina u krvi, snižavaju razinu ukupnog ili LDL kolesterola u krvi te povećavaju motilitet crijeva.

Slanutak je odličan izvor esencijalnih aminokiselina, osim metionina, jer su metionin i cistein limitirajuće aminokiseline u grahoricama (Jukanti i sur., 2012). Sadržaj lipida je veći u usporedbi s ostalim grahoricama i uglavnom je riječ o skladišnim i membranskim lipidima. Od skladišnih treba istaknuti triacilglicerole, koji pohranjuju većinu masnih kiselina, a od membranskih lipida fosfolipide, sfingolipide, glikolipide te fitosterole. U ukupnom sastavu lipida čak 66% predstavljaju polinezasićene masne kiseline poput linolne ( $\omega$ -6) i  $\alpha$ -linolenske ( $\omega$ -3) koje spadaju u esencijalne masne kiseline koje naš organizam ne može sintetizirati. Nadalje, 19% čine mononezasićene masne kiseline poput oleinske ( $\omega$ -9), koje predstavljaju prekursore u sintezi polinezasićenih masnih kiselina. Linolna kiselina se metabolizira to arahidonske kiseline, a  $\alpha$ -linolenska do eikozapentanoične i dokosaheksanoične kiseline. Arahidonska i eikozapentanoična kiselina podliježu daljnjem metabolizmu do prostanoida i leukotriena. Metaboliti s  $\omega$ -6 podrijetlom potiču agregaciju trombocita, a oni s  $\omega$ -3 djeluju protuupalno. Omjer  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3 masnih kiselina je izrazito bitan parametar u kontroli bolesti. Optimalan omjer iznosi 1-4:1 ili 1-5:1, a u pretilih osoba bi trebao iznositi 1-2:1. Osim prethodno spomenutih učinaka, prehrana bogata slanutkom ima pozitivan učinak u vidu prevencije dijabetesa tipa II i ateroskleroze. Naime, potiče se otpuštanje adiponektina koji povećava inzulinsku osjetljivost, smanjuje se koncentracija glukoze i triglicerida u krvi, snižava se koncentracija LDL i ukupnog kolesterola, a  $\alpha$ -linolenska kiselina pospješuje inhibiciju angiotenzin konvertirajućeg enzima te na taj način djeluje antihipertenzivno (Madurapperumage i sur., 2021). Slanutak sadrži i dosta već prethodno spomenutih flavona, posebice diazeina i genisteina, njihovih biološki aktivnih aglikona te je kao takav odlična zamjena za soju (Camargo i sur., 2019).

Od mikronutrijenata, slanutak je bogat vitaminima B skupine kao što su primjerice folna kiselina (B<sub>9</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>), pridoksin (B<sub>6</sub>) i pantotenska kiselina (B<sub>5</sub>). Nadalje možemo izdvojiti tokoferole (vitamin E) i beta-karoten koji su odlični antioksidansi (Madurapperumage i sur., 2021). U sastavu minerala ističu se magnezij, kalcij, kalij, fosfor i željezo, a od elemenata u tragovima sadrži selen, cink i bakar (Madurapperumage i sur., 2021; Jukanti i sur., 2012). Udio cinka, bakra i selena u slanutku određen je ICP-MS metodom u

triplikatu. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost uz pripadnu standardnu devijaciju i uspoređeni s podacima iz literature (Tablica 3.).

Tablica 3. Udio cinka, bakra i selena u uzorcima slanutka i literaturni podaci

([www.nutritiondata.self.com](http://www.nutritiondata.self.com))

	<b>BIO slanutak</b>	<b>Slanutak</b>	<b>Slanutak (literatura)</b>
<b>Cink (Zn)/(mg/100g)</b>	2,49 ± 0,14	2,55 ± 0,03	3,4 ± 0,0
<b>Bakar (Cu)/(mg/100g)</b>	0,70 ± 0,05	0,82 ± 0,01	0,8 ± 0,0
<b>Selen (Se)/(µg/100g)</b>	5,93 ± 2,68	6,73 ± 4,24	8,2 ± 0,0

Izmjereni udio cinka u oba uzorka je gotovo isti (2,49 mg/100g te 2,55 mg/100g) te je manji od podataka navedenih u literaturi. Udio bakra u uzorku koji nema BIO oznaku je istovjetan onome u literaturi (0,8 mg/100g), dok je udio u BIO uzorku nešto manji (0,7 mg/100g). Udio selena je i u BIO i u uzorku koji nema tu oznaku manji od literaturnih podataka.

## 4.4. LEĆA

Leća (*Lens culinaris*) je grahorica koja pripada porodici *Fabaceae*, redu *Fabales* te razredu *Magnoliosipida*. Jedna je od starijih vrsta koja se počela uzgajati prije otprilike 9000 godina na području jugoistočne Turske i dijelovima Sirije kao njezin progenitor *Lens culinaris orientalis*. Četvrta je najvažnija grahorica na svijetu nakon graha, graška i slanutka. Danas se uzgaja u više od 40 svjetskih zemalja, uglavnom na području Mediterana i Bliskog Istoka, jer su za njezin uzgoj potrebni tropski ili suptropski uvjeti. Postoje dva biotipa leće – s malom sjemenkom (mikrosperma) i onaj sa većom (makrosperma) (Karaköy i sur., 2012). Boje sjemenke leće variraju od žute, narančaste, crvene, zelene, smeđe pa sve do crne. Crvena leća se uglavnom uzgaja na području Mediterana, dok je primarno tržište zelene leće Europa, dijelovi Bliskog Istoka te Južne Amerike. Velika globalna potražnja ove grahorice je posljedica njezine brze pripreme, unatoč visokoj cijeni u odnosu na druge vrste, kao i visokog sadržaja proteina (Khazaei i sur., 2019). Studije su pokazale da uvođenje leće u prehranu vodi ka smanjenju incidencije degenerativnih bolesti, uključujući dijabetes, kardiovaskularne bolesti i karcinome (Ganesan i Xu, 2017).

Kao i već prethodno spomenuti soja, grah i slanutak, leća je bogata visokokvalitetnim proteinima. Sadržaj proteina u leći iznosi oko 26%, a ističu se globulini i albumini. Globulini su zastupljeniji i mogu se podijeliti u dva razreda, 7S i 11S ovisno o njihovom koeficijentu sedimentacije. Omjer 7S/11S je bitno svojstvo koje opisuje nutritivnu vrijednost sjemenke, a kod leće ovaj omjer iznosi približno 3. U sastavu aminokiselina ističu se arginin, aspartat, glutamat te esencijalne aminokiseline leucin i lizin. Leća je, kao i ostale grahorice, siromašna aminokiselinama koje sadrže sumpor, odnosno metionin i cistein su limitirajuće aminokiseline. Osim aminokiselina potrebno je spomenuti i bioaktivne peptide koji imaju brojne pozitivne učinke. Djeluju antihipertenzivno, antioksidacijski i antifungalno (Khazaei i sur., 2019). U sastavu ugljikohidrata ističu se prehrambena vlakna i ugljikohidrati smanjene probavljivosti kao što su šećerni alkoholi, fruktooligosaharidi i rezistentni škrob (Johnson i sur., 2021). Nadalje, u sastavu leće su prisutni i prethodno spomenute biološki aktivne komponente kao što su izoflavoni, fitati te saponini koji djeluju antioksidativno, antidijabetski, antimikrobno, kardioprotektivno te inhibiraju proliferaciju kolorektalnog karcinoma (Ganesan i Xu, 2017).

U sastavu mikronutrijenata ističu se minerali - kalcij, magnezij, fosfor, kalij i natrij, vitamini topljivi u vodi – tiamin (B<sub>1</sub>), niacin (B<sub>3</sub>), pantotenska kiselina (B<sub>5</sub>), piridoksin (B<sub>6</sub>), folna kiselina (B<sub>9</sub>) te vitamini topivi u mastima – vitamin E i K (Ganesan i Xu, 2017; Karaköy i sur. 2012). Vitamin E prisutan u obliku  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ - tokoferola, kao i vitamin K u obliku polikinona djeluju antioksidativno.  $\alpha$ - tokoferol ima najizraženija antioksidativna svojstva. Vitamin E je posebice zaslužan za inhibiciju lipidne peroksidacije jer je smješten u membrani stanice. Naime,  $\alpha$ - tokoferol djeluje na lipidni peroksilni radikal (LOO•), na način da donira jedan vodik, te tako sam postaje radikal ( $\alpha$ -Toc•), istovremeno neutralizirajući lipidni peroksilni radikal u lipidni hidroperoksid (LOOH) (Miyazawa i sur., 2019; Ganesan i Xu, 2017). Od elemenata u tragovima prisutni su cink, bakar, selen, mangan, aluminij, krom, nikal, olovo, kobalt i molibden (Karaköy i sur., 2012). U tablici (Tablica 4.) prikazane su vrijednosti izmjerenih udjela elemenata u tragovima dobivene ICP-MS metodom, kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Korištena su dva uzorka leće, jedan koji ima oznaku BIO i jedan koji ju nema.

Tablica 4. Udio cinka, bakra i selena u uzorcima leće i literaturni podaci

([www.nutritiondata.self.com](http://www.nutritiondata.self.com))

	<b>BIO leća</b>	<b>Leća</b>	<b>Leća (literatura)</b>
<b>Cink (Zn)/(mg/100g)</b>	3,13 ± 0,07	3,39 ± 0,18	4,8 ± 0,0
<b>Bakar (Cu)/(mg/100g)</b>	0,74 ± 0,03	0,85 ± 0,01	0,5 ± 0,0
<b>Selen (Se)/(µg/100g)</b>	2,07 ± 2,37	49,77 ± 29,58	8,3 ± 0,0

Izmjereni udjeli cinka i bakra su u oba uzorka podjednaki, međutim udio cinka u uzorcima leće je manji (3,13 mg/100g te 3,39 mg/100g) od literaturnih podataka (4,8 mg/100g), dok je udio bakra veći (0,74 g/100g te 0,85 g/100g) od podataka u literaturi (0,5 g /100g). Udio selena je manji (2,07 µg/100g) u BIO uzorku, a znatno veći u drugom uzorku leće (49,77 µg/100g) s obzirom na podatke u literaturi (8,3 µg/100g).

## 4.5. ELEMENTI U TRAGOVIMA

Minerali su sastavni dio ljudskog tijela, no čine tek 5% ljudske prehrane i u tijelu su prisutni s manje od 50 mikrograma po kilogramu tjelesne težine. Željezo jedino premašuje tu granicu. Ovisno o tome koliko je koji mineral potreban za funkcioniranje ljudskog tijela, možemo ih podijeliti u makroelemente, elemente u tragovima, te ultraelemente u tragovima. Osim željeza, u elemente u tragovima spadaju bakar, cink, fluorid, jod, krom, mangan, molibden i selen. Navedeni elementi u tragovima, iako su prisutni u tijelu u vrlo malim količinama, vrlo su bitni za pravilan perinatalni i postnatalni rast i razvoj, te normalno funkcioniranje stanica i održavanje tjelesne homeostaze.

### 4.5.1. BAKAR

Bakar je kemijski element 11. skupine periodnog sustava elemenata, te spada u prijelazne metale. U spojevima koje tvori je jednovalentan ili dvovalentan. Bakrov (I) cijanid je jedan od spojeva koji se koristi za dobivanje masti za liječenje konjuktivitisa, te je sastavni dio fungicida. Osim što je sastavni dio fungicida, te se koristi u medicini i tehnici, od iznimne je važnosti za pravilno funkcioniranje ljudskog tijela. Procjenjuje se kako ga u kemijskom obliku u ljudskom tijelu ima otprilike 150 mg, i to najviše u kostima, mozgu, srcu, jetri i bubrezima (Collins i Klevay, 2011). Bakar je bitan kofaktor za pravilan rad mnogih enzima, kao što su to kofaktor citokrom -c oksidaze oksidativne fosforilacije, kofaktor enzimima koji su bitni za eliminaciju slobodnih radikala, kao i kofaktor ceruloplazmina za apsorpciju željeza (Tapiero i sur., 2003). Stoga koncentraciju bakra u tijelu možemo mjeriti indirektnom metodom mjerenja glikoproteina ceruloplazmina. Ceruloplazmin veže 6 atoma bakra (Kirsipuu i sur., 2020), zbog čega i blagi porast ceruloplazmina u serumu dovodi do izraženog porasta koncentracije bakra. Nadalje, ceruloplazmin je i protein akutne faze, te se pretpostavlja kako prenosi bakar na mjesto upale, do pojedinih tkiva i limfocita koji sadrže receptore za ceruloplazmin preko kojih bakar ulazi u stanicu (Besold i sur., 2016).

#### 4.5.1.1. Metabolizam bakra

Bakar dobivamo konzumacijom tipične prehrane industrijaliziranog svijeta (Wapnir, 1998). 55-75% unesenog bakra se apsorbira (Tapiero i sur., 2003) u proksimalnom dijelu tankog crijeva (Bost i sur. 2016) i manjim dijelom preko želuca, pasivnim transportom preko CTR1 (copper membrane transporter 1) membranskog protein nosača ili pasivnom difuzijom (Tapiero i sur., 2003). CTR1 unosi bakar u stanicu, gdje se vezan za metalotionein prenosi do Golgijeve mreže. Potom, uslijed povećane koncentracije bakra, enzim ATP7A (tzv. Menkesov protein) propusti višak bakra u portalni krvotok koji ga nosi do jetre, gdje se uz pomoć ATP7B enzima bakar veže na ceruloplazmin i pušta ga u periferni krvotok ili izlučuje suvišak u žuč (de Bie, 2007). Brojni faktori utječu na apsorpciju bakra, kao što su spol i dob, te vrsta hrane i upotreba raznih lijekova, kao što su oralni kontraceptivi kod žena. Kod starijih osoba je primjećena veća koncentracija bakra kao i kod žena, gdje se u prosjeku apsorbira 10% više bakra, nego kod muškaraca (Wapnir, 1998; Bost i sur., 2016). Veći udio proteina, organskih kiselina i topivih ugljikohidrata u prehrani, povećavaju topljivost bakra i intestinalni protok, te uzrokuju veću apsorpciju (Wapnir, 1998). Isti membranski protein nosač je odgovoran i za apsorpciju cinka, te su cink i bakar kompetitivni antagonisti, te se natječu za apsorpciju. U slučaju pojačane konzumacije cinka, može dovesti do snižene koncentracije bakra. Također, povećana konzumacija vitamina C, može sniziti koncentraciju bakra, budući vitamin C reducira bakar koji se slabije apsorbira od oksidiranog oblika. Krvlju se bakar prenosi vezan na proteine, kao što su ceruloplazmin, albumin,  $\alpha$ 2-makroglobulin, te manjim dijelom vezan za aminokiselinu histidin (Kirsipuu i sur., 2020). Nakon apsorpcije, portalnom venom odlazi do jetre gdje se veći dio veže za transportni protein ceruloplazmin i odlazi perifernom cirkulacijom u druge organe, a manji dio se vraća u gastrointestinalni trakt. Glavni put izlučivanja bakra je putem žuči, no ima ga i u slini i želučanim sokovima (Bost i sur., 2016).

Poremećaj homeostaze bakra može dovesti do raznih smetnji, kao što su neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove bolesti, Wilsonove bolesti, ateroskleroze i progresivne upale, te čak i razvoja karcinoma (Kirsipuu i sur., 2020). Hipobakremija je rijetkost, no ljudi često imaju suboptimalne količine bakra. Deformacije lokomotornog sustava i vezivnog tkiva, pogoršana funkcija živčanog sustava, promjene u kvaliteti kose i pigmentaciji kože, samo su neke od posljedica hipobakremije.

Menkesov sindrom je X-vezana recesivna nasljedna bolest, uzrokovana poremećenim metabolizmom bakra. Tip nasljeđivanja je odgovoran za to što je bolest učestalija kod muškaraca nego kod žena. Manjak bakra u organizmu uzrokovan je mutacijom ATP7A gena, koji kodira transportni protein ATP7A odgovoran za transport bakra kroz staničnu membranu epitelnih stanica crijeva, te za održavanje homeostaze bakra unutar stanice. Sindrom dovodi do progresivne neurodegeneracije i poremećaja vezivnog tkiva (Tapiero i sur., 2003), te ga karakterizira kovrčava britka i krhka kosa, epileptični napadaji, osteoporoza, otežano napredovanje rasta novorođenčeta, krhke krvne žile, itd. Ovisno o intenzitetu simptoma, sindrom još u ranom djetinjstvu može biti smrtonosan, djeca sa sindromom najčešće umru unutar prve 3 godine života, dok je kod blažih oblika u početku bolesti primjenjiva terapija bakrom vezanog na histidin (Tümer i Møller, 2010). Blaži oblik Menkesovog sindroma je sindrom okcipitalnog roga, kojeg karakteriziraju kalficikati okcipitalnih kostiju baze lubanje, gruba kosa te poremećaj kože i zglobova.

Hiperbakremija nastaje kada se bakar počinje nakupljati u organizmu, što prvenstveno utječe na jetru, eritrocite, te je praćena općom slabosti i mučninom. Wilsonova bolest je autosomna recesivna bolest uzrokovana mutacijom ATP7B gena na 13. kromosomu, koji je odgovoran za ekskreciju bakra u žuč i ugradnju bakra na ceruloplazmin, te uzrokuje nakupljanje bakra u organizmu. Simptomi Wilsonove bolesti su mučnina, povraćanje, slabost, žuta koža, te neurološki simptomi poput tremora, distonija, psihoza, promjene osobnosti, poteškoće u govoru, poremećaji koordinacije, itd. Patognomičan znak Wilsonove bolesti su Kayser-Fleischer krugovi u oku, što označava talog suviška bakra u Descementnoj membrani oko kornee oka. Dijagnoza Wilsonove bolesti se postavlja nakon napravljene biopsije jetre koja potvrđuje naslage bakra. Liječi se promjenom prehrambenih navika i redukcijom unosa bakra, uzimanje suplemenata cinka, d-penicilamina ili trientina. Najteže posljedice Wilsonove bolesti su akutno zatajenje jetre i hepatocelularni karcinom.

#### 4.5.1.2. Uloga bakra u imunskom sustavu

Fentonovom reakcijom suvišak bakra reducira kisik i uzrokuje nastanak reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), to jest slobodne radikalske čestice kisika s jednim ili više nesparenih elektrona, koje su nestabilne i vrlo reaktivne. Neke od reaktivih kisikovih vrsta su peroksidi, superoksidi, hidroksilni radikali, te ionizirani kisik. Ove molekule traže druge molekule, preuzimajući njihove elektrone te stvaraju nove radikale. Nastaju kao nusprodukt metabolizma kisika, ili nakon izloženosti zračenju. Važni su u staničnoj signalizaciji, kod citotoksičnosti, održavanju citoskeleta djelujući na stanične proteine, lipide i nukleinske kiseline, te imaju antimikrobni učinak koji pridonosi radu urođenog imunskog odgovora (Bost i sur., 2016; Tapiero i sur., 2003). Makrofagi su mononuklearne imunske stanice urođenog imunskog sustava, nastale sazrijevanjem monocita. U središnjem živčanom sustavu se zovu mikroglija, u jetri Kupferove stanice, a u koži histioci. Imaju sposobnost pinocitoze i makrocitoze, odgovorne su za regulaciju upale i cijeljenja lučenjem raznih citokina, te su baktericidne i imunske stanice, koje limfocitima prezentiraju patogene antigene. Nakon što makrofag prepozna neželjeni mikroorganizam ili patogen, on isti fagocitozom opkoli, te sjedinjavanjem fagocita i lizosoma, staničnog mjehurića koji sadrži ROS i hidrolitičke enzime, nastane fagolizosom. U fagolizosomu se nadalje nizom oksidativnih i neoksidativnih reakcija, probavlja i razgrađuje neželjeni patogen. Makrofagi akumuliraju višak bakra unošenjem bakra preko CTR1 transportera i aktivacijom ATP7A bakar ovisne ATP-aze. Međutim, mikroorganizmi su razvili mehanizme rezistencije, točnije nastoje ukloniti višak bakra iz stanice preko ATP-aza ili potaknuti vezanje na metalotioneine što će smanjiti toksičan učinak. Jedan od pokazatelja infekcije bila ona virusna, bakterijska ili gljivična je progresivni porast serumske koncentracije bakra. Ovaj porast uglavnom nastaje uglavnom zbog povećane koncentracije ceruloplazmina (Besold i sur., 2016). Stoga koncentraciju bakra u tijelu možemo mjeriti indirektnom metodom mjerenja glikoproteina ceruloplazmina. Ceruloplazmin veže 6 atoma bakra (Kirsipuu i sur., 2020), zbog čega i blagi porast ceruloplazmina u serumu dovodi do izraženog porasta koncentracije bakra. Nadalje, ceruloplazmin je i protein akutne faze, te se pretpostavlja kako prenosi bakar na mjesto upale, do pojedinih tkiva i limfocita koji sadrže receptore za ceruloplazmin preko kojih bakar ulazi u stanicu (Besold i sur., 2016).



#### 4.5.1.3. Bakar kao kofaktor enzima

Bakar je jedan od glavnih kofaktora u brojnim enzimima i tjelesnim reakcijama. Bitan je u oksidativnoj fosforilaciji, procesu stvaranja energije, kao i u enzimima koji djeluju antioksidativno, ali i u sintezi kolagena kao kofaktor enzimima proil i lizil hidroksilazama (Tümer i Møller, 2010). Citokrom-c oksidaza (kompleks IV) je enzim koji se nalazi na kraju lanca prijenosa elektrona u procesu oksidativne fosforilacije i katalizira redukciju molekularnog kisika do vode (Srinivasan i Avadhani, 2012). Sadrži 4 aktivna redoks centra na koja su vezani metali koji imaju redoks svojstva. Dva mjesta zauzimaju hem  $\alpha$  i hem  $\alpha_3$  koji vežu željezo i dva mjesta za bakar  $Cu_A$  i  $Cu_B$  (Konstantinov, 2011).

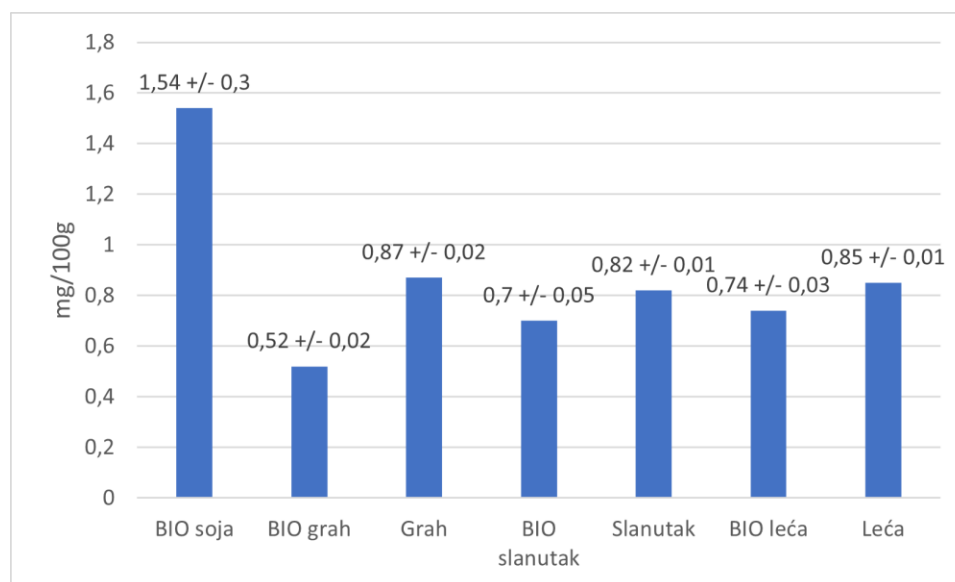
Nadalje, bakar ima važnu ulogu i u djelovanju enzima bakar/cink superoksid dismutaze (Cu/Zn-SOD) koja superoksidne anione prevodi u vodikov peroksid kako bi se dalje mogli podvrgnuti procesu katalize od strane katalaze i glutation peroksidaze (Tapiero i sur., 2003). Ovaj enzim se nalazi u jezgri, citoplazmi i prostoru između vanjske i unutrašnje membrane mitohondrija kao homodimer. Bakar je taj koji osigurava katalitičku aktivnost enzima, a cink održava stabilnost enzima (Miao i St. Clair, 2009). Mutacija ovog enzima u 20-25% pacijenata dovodi do pojave amiotrofične lateralne skleroze, bolesti koja rezultira degeneracijom motornih neurona, paralizom i neizbježnom smrću unutar dvije do pet godina od postavljanja dijagnoze (Trumbuli i Beckman, 2009).

Potrebno je istaknuti i metalotionein te ceruloplazmin. Metalotionein je skladišni protein dvovalentnih iona, osim željeza, u slučaju kada su prisutni u suvišku. Takav primjer je Wilsonova bolest ukoliko je riječ o bakru, a metalotionein skladišti i višak kadmija. Oni su dobri agonisti metalotioneina, kao i glukagon i kortizol te upalni faktori. Bakar ima najveći afinitet vezanja od svih dvovalentnih kationa te može istisnuti druge ione, što je odlično s obzirom da on potiče stvaranje štetnih reaktivnih kisikovih spojeva. Ceruloplazmin veže bakar i dostavlja ga do ciljnih stanica, međutim on je i feroksidaza koja oksidira željezo iz  $Fe^{2+}$  u  $Fe^{3+}$  oblik što pomaže vezanju na njegov transportni protein transferin. U slučaju značajnijeg deficita bakra ceruloplazmin nije aktivan kao feroksidaza te se višak željeza nakuplja u jetri (Tapiero i sur., 2003).

Uz prethodno spomenute enzime, bakar ima ključnu ulogu u djelovanju još dvije oksidaze – lizil oksidaze i diamin oksidaze. Lizil oksidaza je enzim koji ima važnu ulogu u formiranju, sazrijevanju i stabilizaciji vezivnog tkiva kao dio izvanstaničnog matriksa raznih organa i tkiva, uključujući hrskavicu i kosti (Tapiero i sur., 2003). Ekspimirana je u raznim stanicama – keratinocitima, fibroblastima, adipocitima, osteoblastima, glatkim mišićnim i endotelnim stanicama, a glavna uloga je stvaranje križnih veza unutar kolagena i elastina. Ovakva modifikacija strukturnih komponenti izvanstaničnog matriksa stabilizira fibrozne depozite i doprinosi integritetu vezivnog tkiva (Wang i sur., 2016). Katalitička domena lizil oksidaze sadrži bakar-vezujuću domenu, koja je nužna za njezinu aktivnost, kao i kovalentno vezani lizil tirozin kinon (LTQ) (Liburkin-Dan i sur., 2022). Diamin oksidaza je o bakru ovisna amin oksidaza koja procesom oksidativne deaminacije katalizira proces oksidativne deaminacije mono-, di-, i poliamina, uglavnom egzogenog histamina. Svoju aktivnost eksprimira u tankom crijevu, kolonu, placenti i bubrezima (Schnedl i Enko, 2021). Histamin je biogeni amin koji je prisutan u mnogim prehrambenim proizvodima. Do intolerancije na histamin dolazi prilikom disbalansa između unosa i razgradnje histamina diamin oksidazom, koja može nastati zbog deficita bakra ili već postoji mutacija u genu za enzim koja smanjuje njegovu aktivnost. Simptomi su slični alergijskoj reakciji te dolazi do dijareje, glavobolje, rinokonjuktivitisa, astme, hipotenzije, aritmije, urtikarije, pruritusa (Manzotti i sur., 2016).

#### 4.5.1.4. Udio bakra u grahoricama

Udio bakra u uzorcima grahorica izmjeren je ICP-MS metodom. Usporedba srednjih vrijednosti rezultata mjerenih u triplikatu je prikazana je stupčastim dijagramom (Slika 1.). Najmanji udio bakra je izmjeren u BIO uzorku graha, odnosno 0,52 mg/100 g. BIO uzorak soje sadrži najveći udio bakra na 100 g, točnije 1,54 mg/100 g. Preporučeni dnevni unos bakra je 1,6 mg za muškarce, a 1,3 mg za žene. BIO uzorci imaju nešto niži udio bakra.



Slika 1. Usporedba udjela bakra u grahoricama (mg/100g)

## 4.5.2. CINK

Cink je kemijski element 12. skupine periodnog sustava elemenata, te spada u skupinu prijelaznih metala. Iako su cink i njegovi spojevi otrovni za ljude, jedan je od najvažnijih i najzastupljenijih kemijskih elemenata koji se u ljudskom tijelu nalazi u tragovima. Prijeko je potreban za normalno funkcioniranje, te već umjereni deficit cinka može imati veliki utjecaj na tjelesnu homeostazu, kao i nepovoljan utjecaj na normalan rast i razvoj. Prema zastupljenosti u ljudskom tijelu je odmah iz željeza (Read i sur., 2019; Jarosz i sur., 2017). Ukupan cink u tijelu iznosi 2-3 g, a koncentracija u krvi iznosi 13,8-22,9  $\mu\text{mol/L}$  (Jarosz i sur., 2017). Dugotrajno uzimanje većih dnevnih količina cinka (više od 40 mg po danu) može dovesti do nedostatka bakra, zbog antagonističkog transporta u tankom crijevu ta dva elementa (Villagomez i Ramtekkar, 2014). Namirnice bogate cinkom su morski plodovi, posebice kamenice, crveno meso, jaja, mlijeko, te cjelovite žitarice, grahorice i sjemenke.

Kada tvori spojeve je dvovalentan te se kao takav koristi u tehnici i medicini. Neki od spojeva koji se upotrebljavaju u medicini su cinkov peroksid i cinkov sulfat u dezinficijensima i liječenju želučanih čireva. U ljudskom tijelu kao kemijski element, cink nalazimo najviše u mišićima i kostima, kao i u koži, središnjem živčanom sustavu gdje sudjeluje u regulaciji sna i pamćenja te u jetri, prostati, gušterači, srcu, itd. (Wessels i sur., 2017; Jarosz i sur., 2017; Cherasse i Uradete, 2017). Nadalje, prisutan je kao kofaktor u preko 300 enzima te je neophodan za normalan rast i razvoj te integritet i elastičnost kože, živčani i imunski sustav te pokazuje antioksidativno i antikancerogeno djelovanje. Kao kofaktor dio je brojnih enzima i transkripcijskih faktora koji služe u regulaciji proliferacije, diferencijacije i apoptoze stanica, sintezi i popravku DNA i RNA, održavanju integriteta stanične membrane i izvanstaničnog matriksa, cijeljenju rana, smanjuje razinu kolesterola, te smanjuje apsorpciju i taloženje teških metala kao što su olovo i kadmij (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019, Lin i sur., 2017)

#### 4.5.2.1. Metabolizam cinka

Cink se većinski apsorbira u jejunumu, te se njegova koncentracija regulira pomoću dva tipa transportera - ZIP transportera, koji povisuje intracelularnu koncentraciju cinka te ZnT koji ju snizuje. U jejunumu se apsorbira preko ZIP4 transportera, dok se u ostatku gastrointestinalnog trakta apsorbira pasivnom difuzijom ili vezan na metalotionein na apikalnoj membrane enterocita, nakon čega se portalnom cirkulacijom prenosi do jetre. Krvlju se do tkiva i periferije prenosi vezan za proteine. Najveći afinitet za cink iskazuje transferin, pa  $\alpha$ 2-makroglobulin, te albumin. U stanici se većina cinka nalazi pohranjena u posebnim vezikulima, cinkosomima, a ostatak je vezan za metalotioneine u jezgri i drugim staničnim organelima.

Cink je bitan u urođenom i stečenom imunom odgovoru, u prezentiranju antigena, smanjuje razinu oksidativnog stresa i proinflamatorni odgovor, te pogoduje radu T-stanica i NK stanica (Haase i Rink, 2009). Suplementacija cinkom smanjenje duljine trajanja prehlade za 33%. (Hemilä, 2017). Također, budući je bitan u sintezi kolagena, pomaže u cijeljenju rana, opekotina, ulceracija i drugih ekzorijacija kože te deficit cinka uzrokuje slabo zarastanje istih. Čak 5% ukupne količine cinka u tijelu je u koži (Lin i sur., 2017). Manjak cinka uzrokuje širok spektar simptoma, od blagih do životno inkapacitirajućih. Ukoliko se manjak cinka dogodi tijekom fetalnog razvoja, može doći do sporijeg rasta i razvoja fetusa, mentalne retardacije, nerazvijenosti živčanog sustava te odgođenog fizičkog i psihičkog spolnog sazrijevanja. U odraslih se manjak cinka manifestira raznim kožnim promjenama, smanjenom kvalitetom i britkošću kose, gubitkom apetita, kroničnim proljevastim stolicama, što dovodi do kronične dehidriranosti; smanjenim kapacitetom zarastanja rana, imunokompromitiranošću i podložnošću infekcijama, smanjenom reproduktivnosti i plodnosti, te psihičkim promjenama. Dolazi do imunokompromitiranosti uslijed narušavanja imunološkog sustava zbog limfopenije, smanjene aktivnosti NK-stanica i citotoksičnosti monocita (Wessels i sur., 2017). Acrodermatitis Enteropathica, nasljedna autosomalno recesivna bolest, nastala uslijed mutacije transportnog proteina ZIP4, karakterizirana malapsorpcijskim sindromom dovodi do najtežeg oblika manjka cinka. Simptomi su dermatitis, kronične proljevaste stolice, gubitak apetita i na težini, loša kvaliteta kože i kose, te rekurentne bakterijske i virusne infekcije i neurološki simptomi (Wessels i sur., 2017; Shankar i Prasad, 1998). Najčešći uzroci manjka cinka su malapsorpcija cinka u crijevima uzrokovana kroničnim proljevastim stolicama,

lijekovima, kao što je penicilamin, te pretjerana konzumacija alkohola. Procjenjuje se kako godišnje u svijetu preko 450,000 djece mlađe od 5 godina umre zbog manjka cinka (Fischer Walker i sur., 2009).

Za razliku od deficita, suvišak cinka je vrlo rijedak te je uglavnom povezan s deficitom bakra ili prekomjernom suplementacijom samog cinka (Jarosz i sur., 2017). Simptomi ovise o količini cinka. Simptomi intoksikacije cinkom su mučnina, povraćanje, osjećaj nedostatka zraka, povišena tjelesna temperatura, umor, letargija, bol u epigastriju, manjak bakra uz popratnu neutropeniju, te poremećen omjer LDL i HDL kolesterola, što dovodi do niza kardiovaskularnih simptoma. Trovanje cinkom se može ublažiti ukoliko se popije mlijeko, jer kalcij i fosfor iz mlijeka vežu cink i sprječavaju njegovu apsorpciju.

#### **4.5.2.2. Uloga cinka u oksidativnom stresu**

Oksidativni stres nastaje prilikom povećanog nastanka reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (ROS i RNS), poznatijih kao prooksidansi, a sa druge strane deficita enzimskih i neenzimskih antioksidansa koji služe detoksifikaciji ROS i RNS. Iako je prisutnost oksidativnih specija u organizmu sasvim normalna, u slučaju kada se premaši antioksidativni kapacitet doći će do promjena u strukturi i funkciji DNA, lipida i proteina što izaziva mutagenezu i oksidativni stres stanice. Na ovaj način dolazi do nastanka mnogih bolesti, uključujući rak, kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, dijabetes, bolesti bubrega (Lee, 2018).

Metalotioneini su proteini koji vežu elemente u tragovima, posebice cink i bakar. Imaju ulogu akceptora kao i ulogu donora te na taj način reguliraju koncentraciju cinka. Protein ima strukturu klastera s dvije domene koje sadrže cink vezan na cistein. Cink/sumpor klaster ima nizak redoks potencijal i vrlo je osjetljiv na promjenu redoks stanja. Naime, sulfhidrilne skupine su podložne oksidaciji nakon koje slijedi otpuštanje cinka, a reducirajući uvjeti potiču vezanje cinka. Osim što će vezati cink u suvišku i na taj način spriječiti toksičan učinak, metalotioneini mogu direktno vezati reaktivne kisikove i dušikove vrste. Dokazano je da veže hidroksilne radikale čak do 300 puta većim afinitetom od glutaciona, najzastupljenijeg antioksidansa u citosolu. Nadalje, cink stabilizira protein tako da sprječava oksidaciju tiolne skupine na tri načina: direktnim vezanjem na skupinu, vezanjem u blizini čime sterički ometa

reaktivnost te mijenja konformaciju proteina vežući se na nekom drugom mjestu u proteinu (Jarosz i sur., 2017).

Cink potiče i ekspresiju nuklearnog eritroidnog faktora 2 (Nrf2) koji regulira ekspresiju gena za antioksidanse kao što su glutation (GSH), superoksid dismutaza (SOD), glutation-S-transferaza (GST) te hem-oksigenaza (HO) (Jarosz i sur., 2017). Superoksid dismutaza katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnog aniona do vodikovog peroksida te tako sprječava generiranje slobodnih radikala. Postoji u tri izoforme – Cu/Zn SOD u citosolu, mangan superoksid dismutaza (MnSOD) koja se nalazi u mitohondrijima te izvanstanična superoksid dismutaza (EC-SOD). Cink i bakar čine prostetsku skupinu koja pruža otpor fizikalnoj i kemijskoj denaturaciji te stabilizira tercijernu strukturu enzima, a vezani su na aminokiselinu histidin (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019).

#### **4.5.2.3. Uloga cinka u imunosnom sustavu**

Utjecaj cinka na urođeni i stečeni imunosni odgovor je nepobitan. Ključan je u održavanju funkcije i strukture stanične membrane, iz razloga što njegov deficit uzrokuje oštećenje epidermisa i sluznice gastrointestinalnog i dišnog sustava te olakšava ulazak patogena u organizam (Jarosz i sur., 2017).

Prve stanice koje prepoznaju i sudjeluju u eliminaciji patogena su stanice urođenog imunosnog sustava, odnosno polimorfonukleari (neutrofili), makrofagi i NK (natural killer) stanice. Deficit cinka dovodi do smanjene kemotaksije neutrofila kao i smanjenja fagocitoze, dok će suvišak imati suprotan efekt. Osim fagocitoze, na patogene djeluje i NADPH (nikotinamid dinukleotid fosfat) kojeg inhibira i deficit i višak cinka. Nadalje, deficit cinka potiče sintezu proupalnih citokina IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  što dovodi do disbalansa između pro- i protuupalnog odgovora (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019; Jarosz i sur., 2017). Narušena homeostaza cinka ima utjecaj i na NK-stanice. Naime, deficit cinka smanjuje citotoksično djelovanje ovih stanica, odnosno sposobnost lize membrane patogena (Jarosz i sur., 2017).

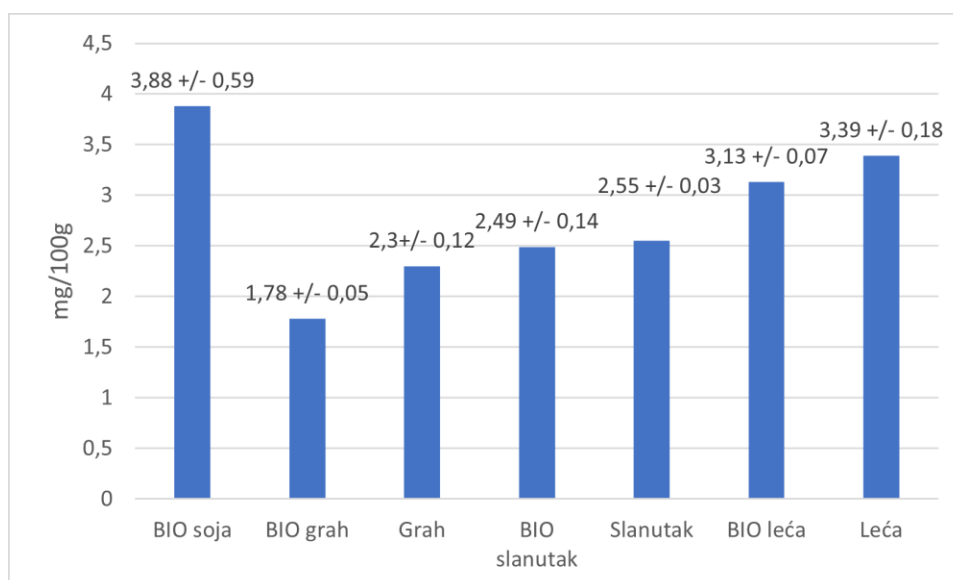
Međutim, cink naj snažnije iskazuje svoj učinak na imunski sustav djelovanjem na stečeni imunski odgovor, odnosno T limfocite. Deficit cinka remeti balans između Th1 i Th2 limfocita u korist Th2 limfocita. Ovaj odnos mora biti uravnotežen, kako bi se osigurao pravi imunski odgovor. Naime, Th1 limfociti su usmjereni na unutarstanične, a Th2 limfociti na izvanstanične patogene. Suplementacija cinka uravnotežuje ovaj disbalans, na način da potiče lučenje IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ), koji je glavni inducirajući faktor Th1 odgovora (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Nadalje, deficit cinka uzrokuje atrofiju timusa, a samim time i T-limfopeniju, kao i smanjenje broja B-limfocita što utječe na proizvodnju antitijela (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019; Jarosz i sur., 2017).

Koncentracija cinka utječe direktno i indirektno i na brojne signalne puteve koji su uključeni u regulaciju imunskog sustava (Wessels i sur., 2017). Modulacija ovih puteva je nužna kako bi organizam mogao pružiti adekvatan odgovor različitim stimulusima, uključujući stres, citokine, slobodne radikale, oksidirani LDL kolesterol te bakterijske ili virusne antigene. NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) signalizira jedan od glavnih proinflammatoryh puteva, koji regulira procese kao što su: apoptoza, adhezija i proliferacija stanica, remodeliranje tkiva, remodeliranje tkiva, urođeni i stečeni imunski odgovor, upalne procese i odgovor stanice na stres (Jarosz i sur., 2017). Potiče ekspresiju proupalnih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  i MCP-1), kemokina, proteina akutne faze kao što su CRP i fibrinogen, metaloproteinaze matriksa (MMP), adhezijskih molekula, faktora rasta i ostalih faktora uključenih u upalni odgovor kao što su COX-2 i iNOS (Jarosz i sur., 2017). Prisutan je u citoplazmi kao inaktivni kompleks nekovalentno vezan na inhibitorne proteine I $\kappa$ B, čija inhibitorna podjedinica prevenira migraciju NF- $\kappa$ B u jezgru. Dakle, cilj je prevenirati prijenos NF- $\kappa$ B do jezgre kako ne bi imao pristup proinflammatorym genima koje regulira (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019). Utjecaj cinka na aktivnost ovog transkripcijskog faktora, prema znanstvenim spoznajama, može biti i inhibitoran i aktivacijski raznim indirektnim mehanizmima (Skrajnowska i Bobrowska-Korczak, 2019; Jarosz i sur., 2017).



#### 4.5.2.4. Udio cinka u grahoricama

Udio cinka u uzorcima grahorica izmjeren je ICP-MS metodom. Usporedba srednjih vrijednosti mjerenja napravljenih u triplicatu je prikazana stupčastim dijagramom (Slika 2.). BIO uzorak graha sadrži najmanji udio cinka na 100 g – 1,78 mg na 100g, dok je uzorak s najvećim udjelom cinka na 100 g BIO uzorak soje koji sadrži 3,88 mg/100g. Preporučeni dnevni unos cinka je 10,1 mg za muškarce, a za žene 8,3 mg. BIO uzorci imaju nešto niži udio cinka.



Slika 2. Usporedba udjela cinka u grahoricama (mg/100g)

### **4.5.3. SELEN**

Selen je kemijski element 16. skupine periodnog sustava elemenata, te pripada nemetalima. Njegove pare i spojevi su otrovni, no u malim količinama je prisutan u ljudskom tijelu u obliku selenoproteina, te je neophodan za pravilno funkcioniranje (pogotovo u kostima, zubima i mlijeku) (Roman i sur., 2014). Tijelo sadrži 120-123 mg selena. Meso, orašasti plodovi, pogotovo brazilski oraščići i gljive imaju najveći udio selena u prehrambenim namirnicama. Selenometionin je učestaliji u hrani biljnog podrijetla, dok je izvor selenocisteina hrana životinjskog podrijetla, anorganske spojeve selena nalazimo ponajviše u kvascu i povrću (Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2000)

#### **4.5.3.1 Metabolizam selena**

Selen se dobro apsorbira, te se 70-90 % apsorbira u proksimalnom dijelu duodenuma, dok se manji dio apsorbira u ileumu i jejunumu (Roman i sur., 2014). Učinkovitost apsorpcije je zavisna od spoja i sastava, te se tako anorganski oblici selena se absorbiraju pasivnim putem, dok organski oblici apsorbiraju na različite direktne i indirektne načine. Selenometionin se može apsorbirati na tri načina; transportom ovisnim o natriju, putem membranskih transportnih proteina tako da se prvo transformira u selenocistein, a zatim u selenid, te ugradnjom u proteinski lanac albumina i hemoglobina u krvi, umjesto metionina. Anorganski selenit se može apsorbirati direktni i indirektno. Većinski se apsorbira indirektno, putem glutathiona, reagirajući s tiolnim skupinama pri čemu nastaje selenodiglutation, koji se uz enzim glutathion reduktazu postepeno razgrađuje do krajnjeg produkta selenida. Direktna apsorpcija je slična kao i indirektna apsorpcija, osim što se reakcije odvijaju na eritrocitima, ili putem tioredoksin reduktaze direktnom redukcijom do selenida. Selenat se apsorbira pasivnom difuzijom (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). Apsorpcija selenometionina i selenata je veća od 90%, dok je anorganskog oblika selenita 80%. Također, biološka dostupnost je ovisna o spoju i izvoru selena; tako je biološka raspoloživost selena iz gljiva vrlo mala, tek 5%, dok iz plave ribe iznosi 50%. Također, većina selenata se gubi izlučivanjem urinom, prije no što dospije do tkiva. Nadalje, prisutnost reduciranog glutathiona i određenih vitamina, kao što su vitamini A, C i E poboljšavaju apsorpciju selena, dok teški

metali, poput žive, istu inhibiraju. (Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, 2000)

Nakon apsorpcije portalnom cirkulacijom produkti odlaze do jetre, gdje se selen dalje metabolizira i tvori različite spojeve, od kojih je jedan selenoprotein-P koji veže do 60% apsorbiranog selena, te se tako vezan prenosi krvlju do različitih tkiva. Selenoprotein-P povezan je s patofiziologijom Alzheimerove bolesti, gdje se u mozgu patološki  $\beta$ -amiloidni plakovi zamjenjuju selenoprotein P (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). Najviše selena se pohranjuje u obliku selenometionina u jetri i mišićima i u ostalim organima (Mehdi i sur., 2013). Izlučivanje selena se vrši preko urina. U slučaju suviška selena, višak se metilira te se izlučuje kao trimetilselenid, te dimetilselenid, koji se izlučuje izdisanjem. (Roman i sur., 2014).

U ljudskom tijelu sa proteinima tvori preko 25 otkrivenih selenoproteina ljudskog tijela, a sa aminokiselinama selenoamino kiseline, kao što su selenometionin, selenocistein i metilirani oblik, metilselenocistein (Avery i Hoffmann, 2018). Također se još može pronaći i kao anorganski selen u obliku selenita i selenata. U tipičnoj preharni industrijaliziranog doba, ponajviše ga možemo naći u obliku selenometionina i selenocisteina, te selenata i selenita. Ima važnu ulogu u održavanju imunološke, endokrinološke, metaboličke i stanične homeostaze. U ljudskom tijelu je neophodan za fiziološko odvijanje brojnih redoks reakcija, kao antioksidans i protuupalni faktor, te u imunskom i reproduktivnom sustavu (Avery i Hoffmann, 2018). Sastavni je dio enzima hormona štitnjače, kao što su glutaciona peroksidaza, tioredoksna reduktaza i dejodinaza, te je dio enzima odgovornih za unutarstaničnu razgradnju peroksida (Roman i sur., 2014). Kancerogen je ukoliko ga ima previše u organizmu, te uzrokuje bolest selenozu.

### 4.5.3.2. Selenoproteini

Selenoproteini igraju veliku ulogu u transportu i skladištenju selena u organizmu, te su dio imunomodulacije, antioksidativne obrane organizma, regulacije transkripcijskih faktora redukcijско-oksidacijskim procesa, te su bitni u regulaciji hormona štitnjače, apoptoze i sinteze monomera deoksiribonukleozid trifosfata (dNTP), jednog od bitnih faktora u sintezi DNA (Roman i sur., 2014).

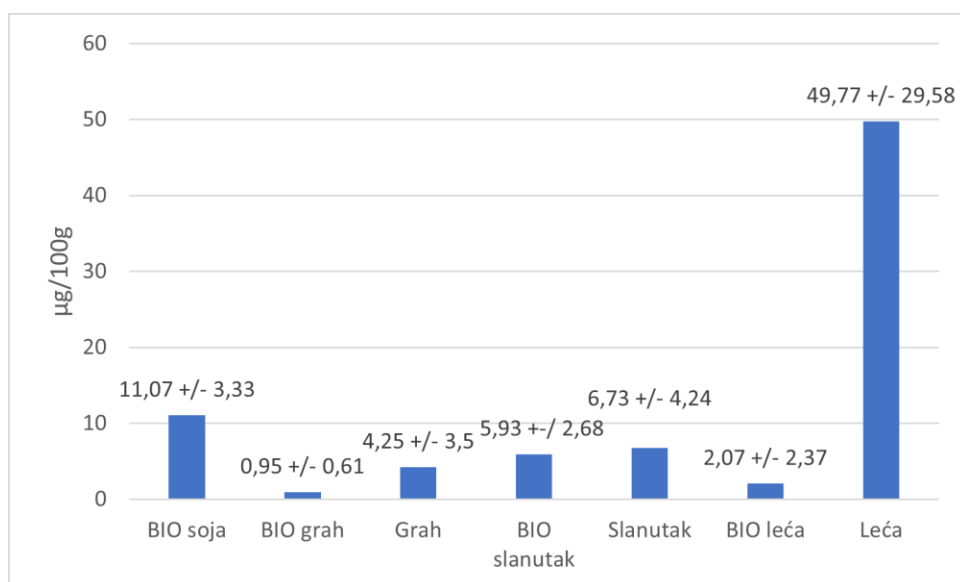
Glutation peroksidaza (GPx), antioksidacijski enzim koji se sastoji od osam izoformi enzima, od kojih pet sadrži ogranak selenocisteina, zbog čega se ubrajaju u skupinu selenoproteina (Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). GPx redukcijom neutraliziraju unutarstanični i izvanstanični vodikov peroksida, lipidne i druge organske hidroperoksida (Roman i sur., 2014). Selen služi kao stabilizator i katalitički aktivator GPx (Roman i sur., 2014). GPx je rasprostranjen po cijelom organizmu, najviše u eritrocitima, bubrezima, plućima, te jetri. Aktivnost GPx direktno ovisi o koncentraciji selena. Svaki izomer GPx je rasprostranjen drugdje i ima različitu ulogu. U gastrointestinalnom traktu najzastupljeniji su GPx2 i GPx3 gdje štite crijevni mukozni epitel i skvamozni epitel jednjaka od oksidativnog stresa uzrokovanog slobodnim radikalima. GPx6 je aktivan u embrijima i olfaktornom epitelu (Roman i sur., 2014). GPx4 je najprisutniji u citoplazmi, mitohondrijima i jezgri stanica testisa, gdje je odgovoran za sazrijevanje, kretanje i funkcioniranje spermija. (Mistry HD, i sur.; 2012) Također ima antioksidativnu ulogu. (Mehdi i sur., 2013) Kao supstrat koristi vodikov peroksid i lipidne hidroperokside, te pomoću glutaciona reducira spojeve kao što su fosfolipidniperoksid, kolesterolperoksid, kolesteril esterhidroperoksid, vodikov peroksid i tiaminhidroperoksid. (Roman i sur., 2014). Istovremeno s redukcijom vodikovog peroksida se događa oksidacija ogranka selenocisteina (selenoatnog aniona – selenola) u kiselinu. Nastala kiselina zatim reagira s reduciranim oblikom glutaciona te nastaje selenosulfidni adukt (E-Se-SG). U zadnjem koraku dolazi do regeneracije aktivnog oblika enzima, kada druga molekula reduciranog glutaciona razdvoji adukt na disulfidni glutation (GS-SG) i aktivni oblik enzima (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). Od svih pet izoformi glutation peroksidaze, najviše je izoforme GPx1 (Mangiapane i sur., 2014). GPx1 je homotetramerni enzim koji je aktivan u citosolu, te manjim dijelom u mitohondriju. GPx3 je marker koncentracije ukupnog selena u plazmi unesenog prehranom te sadrži 10-30% ukupnog selena u plazmi (Mangiapane i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013).

Tioredoxin reduktaze (TrxR) su homodimeri. Pripadaju u skupinu piridin nukleotid disulfid reduktaze (skupina oksidoreduktaza) (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). Sadrže selenocistein u aktivnom središtu (Brown i Arthur, 2001). Djeluje u tri izoforme – TrxR1, TrxR2 i TrxR3 (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014; Mehdi i sur., 2013). TrxR1 se nalazi u citoplazmi i u jezgri stanice, TrxR2 u mitohondriju i to pretežito u stanicama prostate, jetre i tankog crijeva, dok je tioredoksin-glutation reduktaza (TrxR3) specifična za testise (Mnagiapane i sur., 2014). Sadrže FAD prostetičku skupinu, stoga prema strukturi pripadaju u skupinu flavoproteina. FAD služi kao posrednik u prijenosu elektrona s NADPH na aktivno mjesto enzima prilikom njegove aktivacije (Roman i sur., 2014). Aktivirani enzim zatim reducira oksidirani oblik tioredoksina (Mangiapane i sur., 2014; Roman i sur., 2014). Tioredoksini su skupina proteina male molekulske mase (10-12 kDa) koji su uključeni u djelovanje nekoliko enzima kao što su ribonukleotid reduktaza, tioredoksin peroksidaza te određenih transkripcijskih faktora (Roman i sur., 2014). Osim što djeluju na tioredoksine, imaju ulogu faktora rasta u sintezi DNA te inhibiraju apoptozu (Mehdi i sur., 2013). Treba napomenuti i da se povećana aktivnost TrxR se povezuje s nekoliko vrsta tumora i tumorskih staničnih linija (Mangiapane i sur., 2014).

Jodotironin dejodinaze su skupina membranskih oksidoreduktaza štitnjače te sadrže selenocistein u središtu (Roman i sur., 2014), te sudjeluju u razvoju fetalnog mozga, te u regulaciji raznih metaboličkih procesa kao što su termoregulacija i termogeneza, metabolizam lipida (Roman i sur., 2014). Osim u štitnjači, nalaze se i u drugim tkivima, kao što su jetra, bubrezi, smeđe adipozno tkivo, središnji živčani sustav, skeletni mišići, te u tkivu fetusa (Mehdi i sur., 2013).

### 4.5.3.3. Udio selena u grahoricama

Udio selena u uzorcima grahorica izmjeren je ICP-MS metodom. Dobivene srednje vrijednosti mjerenja u triplikatu prikazane su stupčastim dijagramom (Slika 3.). Uzorak s najmanjim udjelom selena je BIO uzorak graha koji sadrži 0,95  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , dok je onaj s najvećim uzorak leće i to čak 49,77  $\mu\text{g}/100\text{g}$ . Preporučeni dnevni unos je 70  $\mu\text{g}$ . U usporedbi s udjelima bakra i cinka, razlike u udjelu selena u pojedinim uzorcima su puno veće, BIO uzorci imaju niži udio selena.



Slika 3. Usporedba udjela selena u grahoricama ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )

## 5. ZAKLJUČCI

1. Raznovrsna i kvalitetna prehrana osnovni je mehanizam održavanja homeostaze organizma, a samim time i borbe protiv nastanka bolesti. Takav način prehrane podrazumijeva optimalan unos makronutrijenata – ugljikohidrata, proteina i masti, kao i mikronutrijenata – vitamina i minerala. Jedna od takvih namirnica jesu grahorice (soja, grah, slanutak, leća), koje osim obilja mikro- i makronutrijenata sadrže i još poneke biološki aktivne spojeve kao što su polifenoli i saponini.

2. Metoda koja je korištena za određivanje udjela mikroelemenata bakra, cinka i selena jest induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (ICP-MS). Ova metoda ima izvrsnu izvedbu, osobito pri mjerenju uzoraka pri niskim koncentracijama kao što je slučaj u određivanju mikroelemenata. U ispitivanim uzorcima izmjerena je značajna količina bakra, cinka i selena, a njihov deficit kao i suvišak izazivaju poremećaj homeostaze te posljedično dovode do razvoja bolesti.

3. Bakra najviše ima u kostima, mozgu, srcu, jetri i bubrezima. Bitan je kofaktor za pravilan rad mnogih enzima, kao što su to kofaktor citokrom c oksidaze oksidativne fosforilacije, kofaktor enzima koji su bitni za eliminaciju slobodnih radikala, kao i kofaktor ceruloplazmina za apsorpciju željeza. Isti membranski protein nosač je odgovoran i za apsorpciju cinka, te su cink i bakar kompetitivni antagonisti, te se natječu za apsorpciju. Također, povećana konzumacija vitamina C, može sniziti koncentraciju bakra. Poremećaj homeostaze bakra može dovesti do razvoja bolesti, primjerice Menkesovog sindroma i Wilsonove bolesti. Preporučeni dnevni unos bakra je 1,6 mg za muškarce, a 1,3 mg za žene. Izmjereni udio bakra u uzorcima grahorica iznosi od 0,52 do 1,54 mg na 100 g uzorka. BIO uzorci imaju nešto manji udio bakra.

4. Cink nalazimo najviše u mišićima i kostima, kao i u koži, središnjem živčanom sustavu gdje sudjeluje u regulaciji sna i pamćenja te u jetri, prostati, gušterači, srcu. Kao kofaktor dio je brojnih enzima i transkripcijskih faktora koji služe u regulaciji proliferacije, diferencijacije i apoptoze stanica, sintezi i popravku DNA i RNA, održavanju integriteta stanične membrane i izvanstaničnog matriksa, cijeljenju rana. Cink je bitan u urođenom i stečenom imunom odgovoru, u prezentiranju antigena, smanjuje razinu oksidativnog stresa i proinflamatorni

odgovor, te pogoduje radu T-stanica i NK stanica. Acrodermatitis Enteropathica predstavlja najteži oblika manjka cinka. Za razliku od deficita, suvišak cinka je vrlo rijedak te je uglavnom povezan s deficitom bakra ili prekomjernom suplementacijom samog cinka. Preporučeni dnevni unos cinka je 10,1 mg za muškarce, a za žene 8,3 mg. Izmjereni udio cinka u grahoricama je od 1,78 do 3,88 mg na 100 g uzorka. BIO uzorci imaju nešto manji udio cinka.

5. Pare seleno kao i njegovi spojevi su otrovni, no u malim količinama je prisutan u ljudskom tijelu u obliku selenoproteina, te je neophodan za pravilno funkcioniranje organizma. Prisutnost reduciranog glutaciona i određenih vitamina, kao što su vitamini A, C i E poboljšavaju apsorpciju seleno, dok teški metali, poput žive, istu inhibiraju. Neophodan je za fiziološko odvijanje brojnih redoks reakcija, kao antioksidans i protuupalni faktor, te u imunskom i reproduktivnom sustavu. Sastavni je dio enzima hormona štitnjače, kao što su glutacion peroksidaza, tioredoksna reduktaza i dejodinaza, te je dio enzima odgovornih za unutarstaničnu razgradnju peroksida. Preporučeni dnevni unos je 70 µg. Izmjereni udio seleno u uzorcima grahorica je od 0,95 do 49,77 µg na 100 g uzorka. BIO uzorci imaju manji udio seleno.



## 6. LITERATURA

A Beginner's Guide to ICP-MS, Mass Spectrometry basics, <https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/inductively-coupled-plasma-mass-spectrometry-icp-ms/what-is-icp-ms-icp-ms-faqs>, pristupljeno 13.1.2023.

ATP7A gene, <https://medlineplus.gov/genetics/gene/atp7a/>, pristupljeno 25.2.2023.

Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins and Immunity. *Nutrients*, 2018, 10(9): 1203.

Besold AN, Culbertson EM, Culotta, VC The Yin and Yang of copper during infection. *J Biol Inorg Chem*, 2016, 21(2), 137–144.

Bost M, Houdartb S, Oberlib M, Kalonji E, Huneauc JF, Margaritis I. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*, 2016, 35: 107-115.

Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr*, 2001, 4(2b), 593–599.

Campos-Vega R, Oomah BD, Loarca-Piña G, Vergara-Castañeda HA. Common Beans and Their Non-Digestible Fraction: Cancer Inhibitory Activity—An Overview. *Foods*, 2013, 2(3), 374–392.

Chatterjee C, Gleddie S, Xiao CW. Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients*, 2018, 10(9), 1211.

Cherasse Y, Urade Y. Dietary Zinc Acts as a Sleep Modulator. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2334.

Collins JF, Klevay LM. Copper. *Adv Nutr*, 2011, 2: 520-522.

de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J. Med. Genet.* 2007, 44 (11): 673–88.

de Camargo AC, Favero BT, Morzelle MC, Franchin M, Alvarez-Parrilla E, de la Rosa LA, Geraldi MV, Maróstica Júnior MR, Shahidi F, Schwember AR. Is Chickpea a Potential Substitute for Soybean? Phenolic Bioactives and Potential Health Benefits. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11), 2644.

De Jager I, Borgonjen-van den Berg KJ, Giller KE, Brouwer ID. Current and potential role of grain legumes on protein and micronutrient adequacy of the diet of rural Ghanaian infants and young children: using linear programming. *Nutr J*, 2019, 18(1).

Didinger C, Thompson HJ. Defining Nutritional and Functional Niches of Legumes: A Call for Clarity to Distinguish a Future Role for Pulses in the Dietary Guidelines for Americans, *Nutrients*, 2021, 13(4), 1100.

Dietary Reference Values for nutrients, <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/e15121>, pristupljeno 4.3.2022.

Fischer Walker CL, Ezzati M, Black RE. Global and regional child mortality and burden of disease attributable to zinc deficiency. *Eur Jour Clin Nutr*, 2009, 63(5), 591–597

Ganesan K, Xu, B. Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11), 2331.

Ganesan K, Xu B. Polyphenol-Rich Lentils and Their Health Promoting Effects. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11), 2390.

Haase H, Rink L. The immune system and the impact of zinc during aging. *Immun Ageing*, 2009, 6(1).

Hemilä H. Zinc lozenges and the common cold: a meta-analysis comparing zinc acetate and zinc gluconate, and the role of zinc dosage. *JRSM Open*, 2017, 8(5).

Jarosz M, Olbert M, Wyszogrodzka G, Młyniec K, Librowski T. Antioxidant and antiinflammatory effects of zinc. Zinc-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Inflammopharmacol*, 2017, 25(1): 11-24.

Johnson N, Boatwright JL, Bridges W, Thavarajah P, Kumar S, Shipe E, Thavarajah D. Genome-wide association mapping of lentil (*Lens culinaris* Medikus) prebiotic carbohydrates toward improved human health and crop stress tolerance. *Sci Rep*, 2021, 11(1).

Jukanti AK, Gaur PM, Gowda CL, Chibbar RN. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review. *Br J Nutr*, 2012, 108(S1), S11–S26.

Karaköy T, Erdem H, Baloch FS, Toklu F, Eker S, Kilian B, Özkan H. Diversity of Macro- and Micronutrients in the Seeds of Lentil Landraces, *Scientific World Journal*, 2012, 1–9.

Khazaei H, Subedi M, Nickerson M, Martínez-Villaluenga C, Frias J, Vandenberg A. Seed Protein of Lentils: Current Status, Progress, and Food Applications. *Foods*, 2019, 8(9), 391.

Kirsipuu T, Zadorožnaja A, Smirnova J, Friedemann M, Plitz T, Tõugu V, Palumaa P. Copper(II)-binding equilibria in human blood. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5686.

Konstantinov AA. Cytochrome *c* oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion. *FEBS Lett*, 2012, 586(5), 630–639.

Lee SR. Critical Role of Zinc as Either an Antioxidant or a Prooxidant in Cellular Systems. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 1–11.

Liburkin-Dan T, Toledano S, Neufeld G. Lysyl Oxidase Family Enzymes and Their Role in Tumor Progression. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11), 6249.

Lin PH, Sermersheim M, Li H, Lee PHU, Steinberg SM, Ma J. Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*, 2017, 10(1), 16.

Madurapperumage A, Tang L, Thavarajah P, Bridges W, Shipe E, Vandemark G, Thavarajah D. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as a Source of Essential Fatty Acids – A Biofortification Approach. *Front Plant Sci*, 2021, 12.

Mangiapane E, Pessione A, Pessione E. Selenium and Selenoproteins: An Overview on Different Biological Systems. *Curr Protein Pept Sci*, 2014, 15(6), 598–607.

Manzotti G, Breda D, Di Gioacchino M, Burastero SE. Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2016, 29(1), 105–111.

Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules*, 2013, 18(3), 3292–3311.

Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(4), 344–356.

Mistry HD, Broughton Pipkin F, Redman CWG, Poston L. Selenium in reproductive health. *Am J Obstet Gynecol*. 2012, 206 (1): 21–30.

Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, Nakagawa K, Miyazawa T. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *Iubmb Life*, 2019, 71(4), 430–441.

Nutrition Data, <https://nutritiondata.self.com/>, pristupljeno 5.1.2023.

Read SA, Obeid S, Ahlenstiel C, Ahlenstiel G. The Role of Zinc in Antiviral Immunity. *Adv Nutr*, 2019, 10(4): 696-710.

Rizzo G. The Antioxidant Role of Soy and Soy Foods in Human Health. *Antioxidants*, 2020, 9(7), 635.

Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics*, 2014, 6: 25-54.

Schnedl WJ, Enko D. Histamine Intolerance Originates in the Gut. *Nutrients*, 2021, 13(4), 1262.

Sekikawa A, Ihara M, Lopez O, Kakuta C, Lopresti B, Higashiyama A, Aizenstein H, Chang YF, Mathis C, Miyamoto Y, Kuller L, Cui C. Effect of S-equol and Soy Isoflavones on Heart and Brain. *Curr Cardiol Rev*, 2019, 15(2), 114–135.

Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68(2), 447S-463S.

Skrajnowska D, Bobrowska-Korczak B. Role of Zinc in Immune System and AntiCancer Defense Mechanisms. *Nutrients*, 2019, 11(10): 2273.

Soybean, <https://www.britannica.com/plant/soybean>, pristupljeno 3.2.2023.

Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress, *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(6), 1252–1263.

Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, Selenium and Carotenoids. National Academy Press, Washington, 2000

Szostak B, Głowacka A, Klebaniuk R, Kiełtyka-Dadasiewicz A. Mineral Composition of Traditional Non-GMO Soybean Cultivars in relation to Nitrogen Fertilization. *Scientific World Journal*, 2020.

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed Pharmacother*, 2003, 57(9): 399-411.

Trumbull KA, Beckman JS. A Role for Copper in the Toxicity of Zinc-Deficient Superoxide Dismutase to Motor Neurons in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(7), 1627–1639.

Tümer Z, Møller LB. Menkes Disease. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18: 511-588.

Villagomez A, Ramtekkar UP. Iron, Magnesium, Vitamin D, and Zinc Deficiencies in Children Presenting with Symptoms of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Children (Basel)*, 2014, 1(3), 261–279.

Wang TH, Hsia SM, Shieh TM. Lysyl Oxidase and the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 2016, 18(1), 62.

Wapnir RA. Copper absorption and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67(5):1054S-1060S.

Wessels I, Maywald M, Rink L. Zinc as a Gatekeeper of Immune Function. *Nutrients*, 2017, 9(12): 1286.

Winham DM, Tisue ME, Palmer SM, Cichy KA, Shelley MC. Dry Bean Preferences and Attitudes among Midwest Hispanic and Non-Hispanic White Women. *Nutrients*, 2019, 11(1), 178.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Grahorice su izrazito nutritivno vrijedna skupina namirnica. Osim ugljikohidrata, među kojima se ističu prehrambena vlakna koja smanjuju rizik nastanka bolesti probavnog trakta, posebno kolorektalnog karcinoma te kardiovaskularnih bolesti kao i dijabetesa, u svom sastavu imaju i visok udio proteina koji predstavljaju izvrstan izvor esencijalne, bazične aminokiseline lizina. Uz makronutrijente, grahorice su bogate polifenolima (izoflavonima) i saponinima. Izoflavoni su vrsta fitoestrogena, a saponini triterpenski glikozidi koji djeluju protuupalno, antikarcinogeno, antibakterijski te imaju protektivan učinak na jetru i kardiovaskularni sustav. U sastavu mikronutrijenata ističu se vitamini B skupine, vitamin C i E te elementi u tragovima – cink, bakar i selen. Njihov udio u uzorcima grahorica soje, graha, slanutka i leće određen je metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS). Cink, bakar i selen su kofaktori brojnih enzima, djeluju kao antioksidansi, dio su imunskog odgovora te je njihov odgovarajući unos nužan za održavanje homeostaze organizma. Svako odstupanje (smanjenje ili uvećanje) od preporučenog unosa ovih esencijalnih mikroelemenata može u konačnici rezultirati metaboličkom neravnotežom i razvojem različitih bolesti i stanja.

Legumes are an exceptionally nutritionally valuable group of food. In addition to carbohydrates, among which dietary fibers stand out and reduce the risk of colorectal cancer, cardiovascular diseases, and diabetes, they also contain a high proportion of proteins, an excellent essential amino acid lysine source. In addition to macronutrients, legumes are rich in polyphenols (isoflavones) and saponins. Isoflavones are a type of phytoestrogen, and saponins are triterpene glycosides, which have an important anti-inflammatory, anticarcinogenic, and antibacterial role and have a protective effect on the liver and cardiovascular system. Some of the micronutrients that stood out were B complex vitamins, vitamins C and E, as well as trace elements - zinc, copper and selenium. Their share in the samples of soybeans, beans, chickpeas, and lentils was determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) method. Zinc, copper, and selenium are cofactors of numerous enzymes, and together with acting as antioxidants, they have an essential part in the immune system response. Adequate intake of the aforementioned micronutrients is necessary to maintain the homeostasis of the organism. However, excessive, as well as insufficient intake of these micronutrients leads to the development of various diseases.



## 8. PRILOZI

Tablica 5. Dobiveni rezultati mjerenja udjela bakra (mg/100g) u grahoricama ICP-MS metodom u triplikatu, pripadajuće srednje vrijednosti i standardne devijacije

	<b>BIO soja</b>	<b>BIO grah</b>	<b>Grah</b>	<b>BIO slanutak</b>	<b>Slanutak</b>	<b>BIO leća</b>	<b>Leća</b>
<b>1.</b>	1,88	0,54	0,84	0,68	0,83	0,77	0,84
<b>2.</b>	1,31	0,49	0,88	0,65	0,81	0,71	0,86
<b>3.</b>	1,44	0,52	0,88	0,76	0,81	0,73	0,85
$\bar{x}$	1,54	0,52	0,87	0,70	0,82	0,74	0,85
<b>SD</b>	0,30	0,02	0,02	0,05	0,01	0,03	0,01

Tablica 6. Dobiveni rezultati mjerenja udjela cinka (mg/100g) u grahoricama ICP-MS metodom u triplikatu, pripadajuće srednje vrijednosti i standardne devijacije

	<b>BIO soja</b>	<b>BIO grah</b>	<b>Grah</b>	<b>BIO slanutak</b>	<b>Slanutak</b>	<b>BIO leća</b>	<b>Leća</b>
<b>1.</b>	4,55	1,79	2,17	2,38	2,54	3,15	3,18
<b>2.</b>	3,48	1,72	2,32	2,44	2,54	3,06	3,54
<b>3.</b>	3,61	1,82	2,41	2,65	2,58	3,19	3,44
$\bar{x}$	3,88	1,78	2,30	2,49	2,55	3,13	3,39
<b>SD</b>	0,59	0,05	0,12	0,14	0,03	0,07	0,18

Tablica 7. Dobiveni rezultati mjerenja udjela selena ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) u grahoricama ICP-MS metodom u triplikatu, pripadajuće srednje vrijednosti i standardne devijacije

	<b>BIO soja</b>	<b>BIO grah</b>	<b>Grah</b>	<b>BIO slanutak</b>	<b>Slanutak</b>	<b>BIO leća</b>	<b>Leća</b>
<b>1.</b>	9,4	0,4	1,5	2,9	3,4	0,8	15,9
<b>2.</b>	14,9	1,5	7,0	6,9	5,3	4,8	62,9
<b>3.</b>	8,9	<0,5	0,5	8,0	11,5	0,6	70,5
<b><math>\bar{x}</math></b>	11,07	0,95	4,25	5,93	6,73	2,07	49,77
<b>SD</b>	3,33	0,61	3,5	2,68	4,24	2,37	29,58

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Određivanje udjela bakra, cinka i selena u grahoricama metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom

Lucija Drinovac

#### SAŽETAK

Grahorice su izrazito nutritivno vrijedna skupina namirnica. Osim ugljikohidrata, među kojima se ističu prehrambena vlakna koja smanjuju rizik nastanka bolesti probavnog trakta, posebno kolorektalnog karcinoma te kardiovaskularnih bolesti kao i dijabetesa, u svom sastavu imaju i visok udio proteina koji predstavljaju izvrstan izvor esencijalne, bazične aminokiseline lizina. Uz makronutrijente, grahorice su bogate polifenolima (izoflavonima) i saponinima. Izoflavoni su vrsta fitoestrogena, a saponini triterpenski glikozidi koji djeluju protuupalno, antikarcinogeno, antibakterijski te imaju protektivan učinak na jetru i kardiovaskularni sustav. U sastavu mikronutrijenata ističu se vitamini B skupine, vitamin C i E te elementi u tragovima – cink, bakar i selen. Njihov udio u uzorcima grahorica soje, graha, slanutka i leće određen je metodom induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS). Cink, bakar i selen su kofaktori brojnih enzima, djeluju kao antioksidansi, dio su imunosnog odgovora te je njihov odgovarajući unos nužan za održavanje homeostaze organizma. Svako odstupanje (smanjenje ili uvećanje) od preporučenog unosa ovih esencijalnih mikroelemenata može u konačnici rezultirati metaboličkom neravnotežom i razvojem različitih bolesti i stanja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 46 stranica, 3 grafička prikaza, 7 tablica i 57 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Bakar, cink, selen, ICP-MS, grahorice, soja, grah, slanutak, leća

Mentor: **Dr. sc. Donatella Verbanac**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lovorka Vujić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Roberta Petlevski**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: travanj 2023.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of medical biochemistry and hematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Determination of copper, zinc and selenium in legumes by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry method

Lucija Drinovac

#### SUMMARY

Legumes are an exceptionally nutritionally valuable group of food. In addition to carbohydrates, among which dietary fibers stand out and reduce the risk of colorectal cancer, cardiovascular diseases, and diabetes, they also contain a high proportion of proteins, an excellent essential amino acid lysine source. In addition to macronutrients, legumes are rich in polyphenols (isoflavones) and saponins. Isoflavones are a type of phytoestrogen, and saponins are triterpene glycosides, which have an important anti-inflammatory, anticarcinogenic, and antibacterial role and have a protective effect on the liver and cardiovascular system. Some of the micronutrients that stood out were B complex vitamins, vitamins C and E, as well as trace elements - zinc, copper and selenium. Their share in the samples of soybeans, beans, chickpeas, and lentils was determined by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) method. Zinc, copper, and selenium are cofactors of numerous enzymes, and together with acting as antioxidants, they have an essential part in the immune system response. Adequate intake of the aforementioned micronutrients is necessary to maintain the homeostasis of the organism. However, excessive, as well as insufficient intake of these micronutrients leads to the development of various diseases.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 46 pages, 3 figures, 7 tables and 57 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Copper, zinc, selenium, ICP-MS, legumes, soybean, bean, chickpea, lentil

Mentor: **Donatella Verbanac, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lovorka Vujić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Roberta Petlevski, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2023.