

Ispitivanje utjecaja kadmija na profil glukozinolata u klicama *Lepidium sativum* L.

Radelj, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:027413>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ISPITIVANJE UTJECAJA KADMIJA NA PROFIL
GLUKOZINOLATA U KLICAMA *LEPIDIUM SATIVUM* L.

DIPLOMSKI RAD

MATEA RADELJ
MATIČNI BROJ: 303

Split, listopad 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE
ZAŠTITA OKOLIŠA

ISPITIVANJE UTJECAJA KADMIJA NA PROFIL
GLUKOZINOLATA U KLICAMA *LEPIDIUM SATIVUM* L.

DIPLOMSKI RAD

MATEA RADELJ
MATIČNI BROJ: 303

Split, listopad 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
ENVIRONMENTAL PROTECTION

INFLUENCE OF CADMIUM ON GLUCOSINOLATE PROFILE IN
***LEPIDIUM SATIVUM* L. SPROUTS**

DIPLOMA THESIS

MATEA RADELJ
PARENT NUMBER: 303

Split, October 2021.

Sveučilište u Splitu
Kemijско tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemijske tehnologije, smjer: Zaštita okoliša

Znanstveno područje: Prirodne znanosti, Tehničke znanosti
Znanstveno polje: Kemija, Kemijско inženjerstvo
Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević, doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek
Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag. chem.

ISPITIVANJE UTJECAJA KADMIJA NA PROFIL GLUKOZINOLATA U KLICAMA *LEPIDIUM SATIVUM* L.

Matea Radelj, 303

Sažetak:

Glukozinolati su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju iz aminokiselina. Identificirani su u preko 16 biljnih porodica, a najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubraja biljka *Lepidium sativum* L. Glukozinolati su kemijски i biološki neaktivni spojevi te im je zajedničko da su po kemijскоj strukturi β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem. Kres salata (*Lepidium sativum* L.) je jednogodišnja kultura koja sadrži mnoge ljekovite tvari, ali je u ljudskoj prehrani slabo rasprostranjena. Navodi se da je kres salata dobar hiperakumulator teških metala. Biljke nemaju potrebu za kadmijem i uglavnom ne podnose koncentracije veće od 1 ppm, no navedena biljka može akumulirati kadmij u tkivima i tolerirati koncentraciju do 100 ppm.

U ovom radu opisan je uzgoj biljke *Lepidium sativum* L. koji je zalijevan s otopinama kadmija različitih koncentracija od 1 do 50 ppm. Razvoj klica praćen je tijekom 7 dana i jedino pri koncentraciji od 50 ppm došlo je do propadanja biljke. Izolacija glukozinolata se vršila ekstrakcijom uz pomoć 70%-tnog metanola uz desulfataciju, dok se analiza vršila vezanom tehnikom UHPLC-DAD-MS/MS. Identificirani su sljedeći glukozinolati: glukotropeolin koji se nalazi u svim uzorcima i 4-metoksiglukobrasicin koji nije pronađen jedino u sjemenu. Glukotropeolin spada u skupinu arilalifatskih, dok 4-metoksiglukobrasicin pripada skupinu heterocikličnih (indolnih) glukozinolata. Sadržaj glukozinolata, s obzirom na to da su se uzorci zalijevali otopinama kadmija različitih koncentracija, nije se značajno mijenjao. U radu je također opisana priprema biljnog materijala za analizu atomskom apsorpcijskom spektroskopijom. Prije početka analiziranja potrebno je napraviti krivulju umjeravanja, zato što se preko nje iščitavaju koncentracije kadmija u biljnom materijalu. Na temelju dobivenih rezultata izvodi se zaključak da li se biljka *Lepidium sativum* L. može koristiti kao hiperakumulator kadmija.

Ključne riječi: Glukozinolati, *Lepidium sativum* L., hiperakumulator, kadmij, UHPLC-DAD-MS/MS, glukotropeolin, 4-metoksiglukobrasicin, atomski apsorpcijski spektrometar

Rad sadrži: 51 stranica, 43 slike, 8 tablica, 33 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| 1. doc. dr. sc. Lea Kukoč-Modun | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek | član |
| 3. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević | član-mentor |

Datum obrane: 27.10.2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemical Technology, Orientation: Environmental Protection

Scientific area: Natural sciences, Technical sciences

Scientific field: Chemistry, Chemical engineering

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.21.

Mentors: Ivica Blažević, PhD, Associate Professor, Mario Nikola Mužek, PhD, Assistant Professor

Technical assistance: Azra Đulović, MChem

INFLUENCE OF CADMIUM ON GLUCOSINOLATE PROFILE IN *LEPIDIUM SATIVUM* L. SPROUTS

Matea Radelj, 303

Abstract:

Glucosinolates are secondary metabolites that are synthesized from amino acids. They were found in over 16 plant families, the most important being the Brassicaceae family, which includes the plant *Lepidium sativum* L. Glucosinolates are chemically and biologically inactive compounds and have in common that they are chemically β -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with a variable side chain. The *Lepidium sativum* L. plant is an annual crop that contains many medicinal substances, but is poorly used in the human diet. Cress salad is known to be a good hyperaccumulator of heavy metals. Plants do not need cadmium and generally do not tolerate concentrations higher than 1 ppm, but this plant can accumulate cadmium in tissues and tolerate concentrations up to 100 ppm.

This thesis describes the cultivation of the plant *Lepidium sativum* L., which was watered with cadmium solutions of different concentrations from 1 to 50 ppm. Sprouts development was monitored for 7 days and only at a concentration of 50 ppm did the plant decay. Isolation of glucosinolate was performed by extraction with 70% methanol with desulfation, while the analysis was performed using UHPLC-DAD-MS/MS. The following glucosinolates were identified: glucotropeolin was found in all samples and 4-methoxyglucobrassicin which was not found only in seeds. Glucotropeolin belongs to the group of arylaliphatic, while 4-methoxyglucobrassicin belongs to the group of heterocyclic (indole) glucosinolates. The glucosinolate content, since the samples were watered with cadmium solutions of different concentrations, did not change significantly. The thesis also describes the preparation of plant material for analysis by atomic absorption spectroscopy. Before starting the analysis, it is necessary to make a calibration curve because the cadmium concentrations in the plant material are read through it. Based on the obtained results, it was concluded that the plant *Lepidium sativum* L. can be used as a hyperaccumulator of cadmium.

Keywords: Glucosinolates, *Lepidium sativum* L., hyperaccumulator, cadmium, UHPLC-DAD-MS/MS, glucotropeolin, 4-methoxyglucobrassicin, atomic absorption spectroscopy

Thesis contains: 51 pages, 43 figures, 8 tables, 33 references

Original in: Croatian

Defence committee:

| | |
|---|--------------|
| 1. Lea Kukoč-Modun, PhD, Assistant Professor | chair person |
| 2. Mario Nikola Mužek, PhD, Assistant Professor | member |
| 3. Ivica Blažević, PhD, Associate Professor | supervisor |

Defence date: 27.10.2021.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića, te komentorstvom doc.dr.sc. Marija Nikole Mužeka, u razdoblju od travnja do listopada 2021. godine.

Rad je financiran sredstvima HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

Znam da te nisam uvijek slušala i da sam bila tvrdoglava, ali sada više nego ikad prije sjećam se riječi koji si mi znao uputiti.

Beskrajno ti hvala na vremenu i strpljenju koje si uputio prema meni i mom školovanju. Tek sada shvaćam koliko si se žrtvovao.

Volim te tata i ovo je dokaz da se moj i tvoj trud isplatio.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svom profesoru i mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću na stručnim savjetima, strpljenju i svojoj nesebičnoj pomoći koju mi je pružio prilikom realizacije ovog rada. Također se zahvaljujem i komentoru doc. dr. sc. Mariju Nikoli Mužeku na strpljenju, ljubaznosti i uloženom trudu, doc. dr. sc. Lei Kukoč-Modun na korisnim savjetima i analizama na atomskom apsorpcijskom spektrometru te asistentici Azri Đulović, mag. chem. na stručnim i prijateljskim savjetima i izdvojenom vremenu i pomoći.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji na ogromnoj podršci i motivaciji tijekom cijelog školavanja, ali ponajviše svojoj majci na bezuvjetnoj ljubavi i vjeri u mene koje je imala kada mi je bilo najteže.

Veliko hvala svim prijateljima koji su napravili sve ove godine nezaboravnim i zabavnim te stvorili sjećanja koje nikada neću zaboraviti.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Uzgojiti klice kres salate (*Lepidium sativum* L.) iz sjemena te zalijevati otopinama kadmija različitih koncentracija tijekom sedam dana (1 – 50 ppm).
2. Izolirati glukozinolate iz uzoraka pomoću ekstrakcije uz desulfataciju.
3. Identificirati izolirane desulfoglukozinolate pomoću vezanog sustava tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti – spektrometrija masa (UHPLC-DAD-MS/MS).
4. Pripremiti biljni materijal za analizu atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (AAS).
5. Odrediti koncentraciju kadmija u biljnom materijalu korištenjem atomskog apsorpcijskog spektrometra.
6. Izvesti zaključak o mogućoj hiperakumulaciji kadmija.

SAŽETAK

Glukozinolati su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju iz aminokiselina. Identificirani su u preko 16 biljnih porodica, a najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubraja biljka *Lepidium sativum* L. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni spojevi te im je zajedničko da su po kemijskoj strukturi β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem. Kres salata (*Lepidium sativum* L.) je jednogodišnja kultura koja sadrži mnoge ljekovite tvari, ali je u ljudskoj prehrani slabo rasprostranjena. Navodi se da je kres salata dobar hiperakumulator teških metala. Biljke nemaju potrebu za kadmijem i uglavnom ne podnose koncentracije veće od 1 ppm, no navedena biljka može akumulirati kadmij u tkivima i tolerirati koncentraciju do 100 ppm.

U ovom radu opisan je uzgoj biljke *Lepidium sativum* L. koji je zalijevan s otopinama kadmija različitih koncentracija od 1 do 50 ppm. Razvoj klica praćen je tijekom 7 dana i jedino pri koncentraciji od 50 ppm došlo je do propadanja biljke. Izolacija glukozinolata se vršila ekstrakcijom uz pomoć 70%-tnog metanola uz desulfataciju, dok se analiza vršila vezanom tehnikom UHPLC-DAD-MS/MS. Identificirani su sljedeći glukozinolati: glukotropeolin koji se nalazi u svim uzorcima i 4-metoksiglukobrasicin koji nije pronađen jedino u sjemenu. Glukotropeolin spada u skupinu arilalifatskih, dok 4-metoksiglukobrasicin pripada skupinu heterocikličnih (indolnih) glukozinolata. Sadržaj glukozinolata, s obzirom na to da su se uzorci zalijevali otopinama kadmija različitih koncentracija, nije se značajno mijenjao. U radu je također opisana priprema biljnog materijala za analizu atomskom apsorpcijskom spektroskopijom. Prije početka analiziranja potrebno je napraviti krivulju umjeravanja, zato što se preko nje iščitavaju koncentracije kadmija u biljnom materijalu. Na temelju dobivenih rezultata izvodi se zaključak da li se biljka *Lepidium sativum* L. može koristiti kao hiperakumulator kadmija.

Ključne riječi: Glukozinolati, *Lepidium sativum* L., hiperakumulator, kadmij, UHPLC-DAD-MS/MS, glukotropeolin, 4-metoksiglukobrasicin, atomski apsorpcijski spektrometar

SUMMARY

Glucosinolates are secondary metabolites that are synthesized from amino acids. They were found in over 16 plant families, the most important being the Brassicaceae family, which includes the plant *Lepidium sativum* L. Glucosinolates are chemically and biologically inactive compounds and have in common that they are chemically β -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with a variable side chain. The *Lepidium sativum* L. plant is an annual crop that contains many medicinal substances, but is poorly used in the human diet. Cress salad is known to be a good hyperaccumulator of heavy metals. Plants do not need cadmium and generally do not tolerate concentrations higher than 1 ppm, but this plant can accumulate cadmium in tissues and tolerate concentrations up to 100 ppm.

This thesis describes the cultivation of the plant *Lepidium sativum* L., which was watered with cadmium solutions of different concentrations from 1 to 50 ppm. Sprouts development was monitored for 7 days and only at a concentration of 50 ppm did the plant decay. Isolation of glucosinolate was performed by extraction with 70% methanol with desulfation, while the analysis was performed using UHPLC-DAD-MS/MS. The following glucosinolates were identified: glucotropaeolin was found in all samples and 4-methoxyglucobrasicin which was not found only in seeds. Glucotropaeolin belongs to the group of arylaliphatic, while 4-methoxyglucobrasicin belongs to the group of heterocyclic (indole) glucosinolates. The glucosinolate content, since the samples were watered with cadmium solutions of different concentrations, did not change significantly. The thesis also describes the preparation of plant material for analysis by atomic absorption spectroscopy. Before starting the analysis, it is necessary to make a calibration curve because the cadmium concentrations in the plant material are read through it. Based on the obtained results, it was concluded that the plant *Lepidium sativum* L. can be used as a hyperaccumulator of cadmium.

Keywords: Glucosinolates, *Lepidium sativum* L., hyperaccumulator, cadmium, UHPLC-DAD-MS/MS, glucotropaeolin, 4-methoxyglucobrasicin, atomic absorption spectroscopy

Sadržaj

| | |
|---|----|
| UVOD..... | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. <i>Lepidium sativum</i> L. | 3 |
| 1.2. Klice..... | 4 |
| 1.3. Glukozinolati | 4 |
| 1.3.1. Kemijska struktura i vrste glukozinolata..... | 5 |
| 1.3.2. Razgradnja glukozinolata..... | 6 |
| 1.3.2.1. Enzimska razgradnja glukozinolata | 6 |
| 1.4. Bioremedijacija | 7 |
| 1.4.1. Fitoremedijacija..... | 7 |
| 1.4.2. Kadmij..... | 9 |
| 1.5. Metode izolacije..... | 10 |
| 1.5.1. Ekstrakcija | 10 |
| 1.5.1.1. Ekstrakcija glukozinolata | 10 |
| 1.6. Tehnike identifikacije | 11 |
| 1.6.1. Kromatografija | 11 |
| 1.6.1.1. Tekućinska kromatografija | 11 |
| 1.6.1.2. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti..... | 12 |
| 1.6.2. Spektrometrija masa | 14 |
| 1.6.3. Vezani sustav tekućinska kromatografija – spektrometrija masa..... | 15 |
| 1.6.4. Atomska apsorpcijska spektroskopija..... | 16 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO | 18 |
| 2.1. Biljni materijal | 19 |
| 2.2. Kemikalije i aparatura | 23 |
| 2.3. Ekstrakcija glukozinolata uz desulfataciju..... | 24 |
| 2.3. Priprema biljnog materijala za AAS..... | 27 |
| 2.3. Metode analize | 29 |
| 2.3.1. UHPLC-DAD-MS/MS analiza | 29 |
| 2.3.2. AAS analiza | 31 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA | 32 |
| 3.1. Rast i razvoj klica po danima..... | 33 |
| 3.2. Izolacija glukozinolata i UHPLC-DAD-MS/MS analiza | 34 |
| 3.3. Krivulja umjeravanja i koncentracija kadmija u biljci | 39 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 4. ZAKLJUČAK | 46 |
| 5. LITERATURA..... | 48 |

UVOD

Glukozinolati (β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) su spojevi koji se sintetiziraju iz aminokiselina, a potrebni su za rast i razmnožavanje biljaka. Spadaju u skupinu fitokemikalija koje pozitivno djeluju na ljudski organizam u smislu antimikrobnog, antioksidacijskog i antikancerogenog djelovanja. Glukozinolati su sami po sebi kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi. Nalaze se u 16 biljnih porodica, od kojih je najvažnija porodica Brassicaceae, u koju se ubraja biljka *Lepidium sativum* L.

Kres salata (*Lepidium sativum* L.) je jednogodišnja biljka koja potječe iz jugozapadne Azije. Mladi nadzemni dijelovi u svježem stanju imaju ljut okus sličan hrenu. Najčešće se uzgaja u obliku klica na prozorima. Navedena biljka je rijetko zastupljena u ljudskoj prehrani iako je bogata vitaminima i mineralima te ima vrijedna nutritivna i ljekovita svojstva. Za kres salatu se navodi da je hiperakumulator teških metala.

Hiperakumulatori su biljke koje imaju sposobnost akumuliranja teških metala iz tla u visokim koncentracijama. Jedan od primjera teških metala je kadmij. Kadmij je mekan srebrnobijeli metal, dosta je reaktivan te se u okolišu pojavljuje u kombinaciji s cinkom. Toksičan je i danas se upotrebljava u baterijama i nuklearnim reaktorima. Prirodno je prisutan u tlu u koncentracijama od 0,1 do 1 mg Cd kg⁻¹ tla, ali zbog antropogenih izvora koncentracija mu se počela povećavati.

Klice kres salata su tijekom uzgoja zalijevane otopinom kadmija različitih koncentracija te su provedena ispitivanja sadržaja glukozinolata preko odgovarajućih desulfo-oblika i uspješnost hiperakumulacije kres salate na metal kadmij. Dokazivanje i kvantizacija glukozinolata provedena je primjenom vezanog sustava tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti – tandemska spektrometrija masa, dok se za određivanje koncentracije kadmija u biljci koristio atomski apsorpcijski spektrometar. Na temelju dobivenih rezultata izvedeni su zaključci o utjecaju kadmija na sadržaj glukozinolata i o mogućoj hiperakumulaciji.

1. OPĆI DIO

1.1. *Lepidium sativum* L.

Sjetvena grbica ili kres salata (*Lepidium sativum* L.) (slika 1.) je jednogodišnja biljka iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). U narodu je još poznata pod imenima: grbašica, vrtni bobovnjak, vrtni grbak, pitomi kres, kreša.¹ Stabljika je uspravna, tanka, u gornjem dijelu razgranata, visine do 60 cm. Nema klasične listove već male listiće svijetlozelene boje, koji su brojni i uski. Cvjetovi su sitni, bijeli, skupljeni u grozdaste cvatove na vrhovima stabljika. Cvatu od svibnja do srpnja. Najčešće se uzgajaju klice na prozorima, kako bi se biljka zaštitila od nametnika i bolesti, a može se i u vrtovima, ali dosta rjeđe. Sjeme se sije u male tanjuriće te uz redovito prskanje vodom salata za tjedan dana naraste do nekoliko centimetara visine.²



Slika 1. *Lepidium sativum* L.^{2,3}

Sistematika sjetvene grbice:

Carstvo - Plantae

Divizija - Tracheophytes

Razred - Rosids

Red - Brassicales

Porodica - Brassicaceae

Rod – *Lepidium*

Mladi nadzemni dijelovi u svježem stanju imaju ljut okus sličan hrenu. Sjetvena grbica je bogata kalijem, kalcijem, magnezijem, fosforom i željezom te vitaminom C (askorbinska kiselina) i provitaminom A (karotin). Sjetvena grbica sadrži tvari s izrazitim antibiotskim djelovanjem, pomaže pri uklanjanju probavnih smetnji, upali mokraćnog mjehura, astme.⁴

1.2. Klice

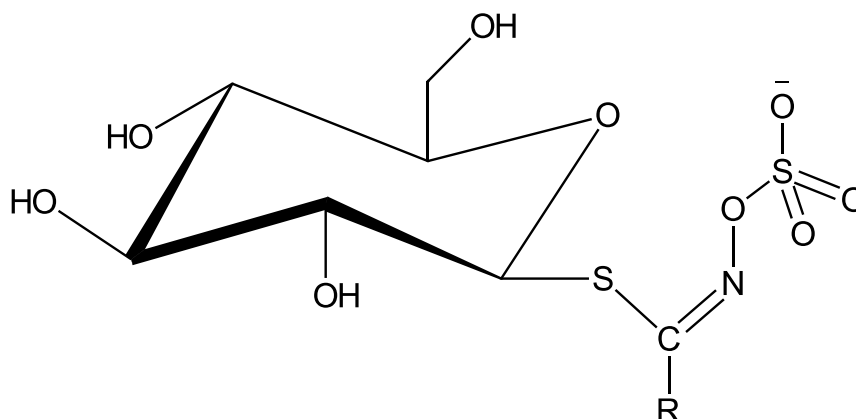
Klice se danas koriste u prehranbenim navikama više nego ikad prije. Radi se o lako probavljivoj namirnici koja obiluje vitaminima i mineralima. Klice imaju značajno veći udio vitamina C od sjemenki, pa čak i od povrća ili žitarica u koje bi se tek trebale pretvoriti. Prednosti su bogati kemijski sastav, visoka hranjiva vrijednost i niža energetska vrijednost od one koju ima zrela biljka. Klice je vrlo jednostavno proizvesti. Nije im potrebna zemlja, već im je samo potrebno stvoriti adekvatne temperature i vlažne uvjete, te je za klijanje potrebno do tjedan dana (ovisno o vrsti sjemenke). Klijanje potiče da se nutrijenti razgrađuju na svoje sastavne dijelove: proteini na aminokiseline, lipidi na esencijalne masne kiseline, škrob u jednostavnije šećere. Procesom klijanja sadržaj vitamina i minerala u klici se znatno povećava, a količina kalorija i ugljikohidrata se smanjuje. Također, novijim istraživanjima dokazano je kako klice spadaju u grupu hiperakumulatora teških metala.^{5, 6}

1.3. Glukozinolati

Glukozinolati (β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) su važna skupina sekundarnih metabolita koje se sintetiziraju iz aminokiselina. Proizvode ih biljke i životinje, ali nisu potrebne za rast i razmnožavanje. Identificirano je preko 130 različitih glukozinolata, a ubrajaju se u specifičnu skupinu kemijskih spojeva tzv. „fitokemikalija“. Fitokemikalije su skupina biološki aktivnih nehranjivih tvari, a djeluju pozitivno na ljudski organizam zbog svojih nutritivnih, antikancerogenih i antibakterijskih svojstava. Glukozinolati osiguravaju karakteristične arome kod određenog povrća i toksični su za neke insekte pa se mogu upotrebljavati i kao prirodni pesticidi. Također, pronađeni su u 16 biljnih porodica, od kojih je najvažnija porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju biljke korištene u svakodnevnoj prehrani kao što su kupus, kelj, cvjetača, brokula, prokulice, hren itd. Koncentracija glukozinolata u svim dijelovima biljke nije ista te ponajviše ovisi o vrsti biljke i načinu uzgoja. Dokazano je da je sjemenje najbogatije glukozinolatima, dok je koncentracija u korijenu, listovima, stabljici i cvijetu znatno niža. Zajednička karakteristika svih glukozinolata je kemijska stabilnost i biološka neaktivnost koja je prisutna sve dok ne nastupi kemijska, mehanička ili termička obrada biljke.⁷⁻⁹

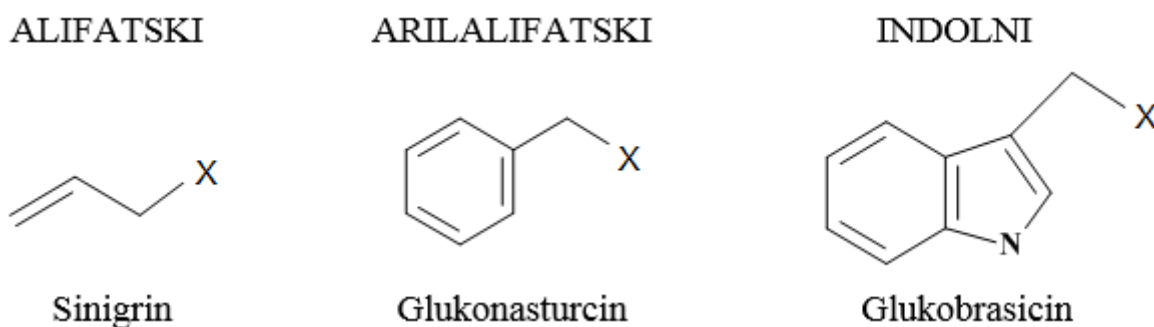
1.3.1. Kemijska struktura i vrste glukozinolata

Glukozinolati su izgrađeni od β -D-tioglukozitnog dijela, sulfatne skupine koja je preko C=N skupine vezana na ostatak molekule (sulfoniranog oksima) te bočnog lanca (koji je označen s R u općoj strukturnoj formuli) po kojemu se glukozinolati međusobno razlikuju (slika 2.). Bočni lanac je jedini promjenjivi dio molekule glukozinolata te on može potjecati od aminokiseline u njenom osnovnom ili modificiranom obliku.⁸



Slika 2. Opća struktura glukozinolata⁸

S obzirom na strukturnu sličnost bočnog lanca (R) glukozinolati se dijele na alifatske, arilalifatske i heterocikličke (indolne) glukozinolate (slika 3.). Ukoliko aglukonski lanac potječe od aminokiseline alanin, leucin, izoleucin, valin ili metionin radi se o alifatskim glukozinolatima. Kod arilalifatskih glukozinolata aglukonski prekursori su aminokiseline fenilalanin ili tirozin, a podrijetlo aglukonskog lanca kod indolnih glukozinolata je aminokiseline triptofan. Najbrojnija skupina je alifatska, dok jedna trećina svih glukozinolata u bočnom lancu sadrži atom sumpora različitih oksidacijskih stupnjeva.¹⁰



Slika 3. Vrste glukozinolata i predstavnici skupina

1.3.2. Razgradnja glukozinolata

U slučaju oštećenja stanične strukture biljaka koje sadrže glukozinolate, dolazi do razgradnje glukozinolata. Razgradnja glukozinolata je neophodna za aktivaciju bioloških utjecaja koje posjeduju njihovi razgradni produkti. Glukozinolati su općenito jako stabilni i biološki neaktivni spojevi, ali mogu se razgraditi na tri načina: enzimskom hidrolizom, termičkom razgradnjom i kemijski (djelovanjem kiseline ili baze). Razgradnjom glukozinolata nastaje čitav niz spojeva, koji uključuju nitrile, izotiocijanate, tiocijanate i epitionitrile koji su odgovorni za brojne biološke utjecaje.^{7, 8}

1.3.2.1. Enzimska razgradnja glukozinolata

Enzimska razgradnja glukozinolata katalizirana je enzimom mirozinazom čije je trivijalno ime za enzim tioglukozid-glukohidrolazu, točnije skupinu enzima, koji kataliziraju hidrolizu glukozinolata. Prilikom mehaničkog oštećenja tkiva dolazi do ostvarivanja kontakta između enzima mirozinaze, koji je smješten u specifičnim „mirozinoznim stanicama“, i glukozinolata, koji su smješteni u vakuolama biljnih stanica. Njihova interakcija uz prisustvo vode rezultira hidrolizom glukozinolata.⁷⁻⁹

Prilikom reakcije hidrolize cijepa se veza sumpor – glukoza (tioglukozidna veza) u molekuli glukozinolata te se oslobađa glukoza, sulfat i međuprodukt aglukon. Pošto je oslobođeni aglukon nestabilan on se spontano pregrađuje dajući različite razgradne produkte kao što su izotiocijanati i indoli, tiocijanati koji sadrže sumpor i nitrili koji nemaju sumpor u svojoj strukturi te su navedeni spojevi odgovorni za karakterističan okus i miris ovih biljaka.⁷

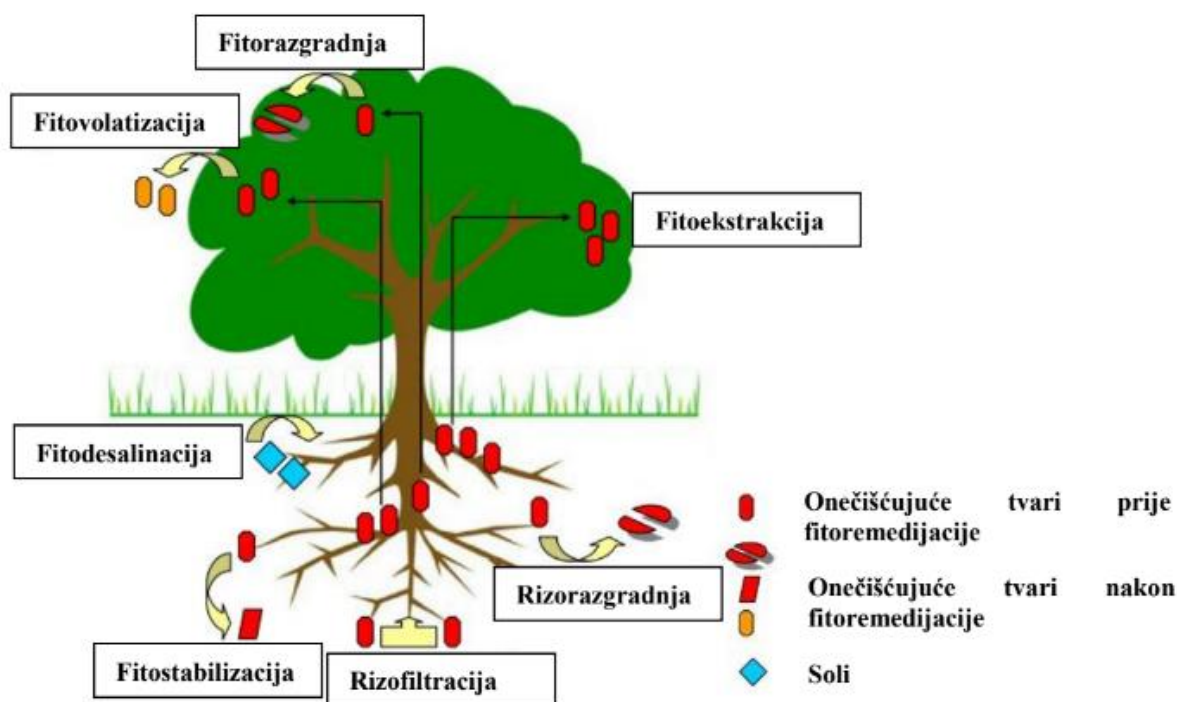
Koji razgradni produkt će se dobiti ovisi o pH, strukturi bočnog lanca, prisutnosti metalnih iona te epitiospecifičnom proteinu (ESP).⁷

1.4. Bioremedijacija

Prekomjerna i nepravilna upotreba sintetskih kemijskih spojeva uzrokuje ozbiljne ekološke probleme na matrice okoliša (zrak, voda, tlo, biotop). Direktni unos zagađivača i/ili prijenos zagađivača prisutnih u drugim matricama doveo je do onečišćenja tla. Korištene tehnike za sanaciju tla su fizikalno – kemijske metode kao što su spaljivanje tla ili iskop, ali njihovi nedostaci su visoki troškovi sanacije, uzrokuju ireverzibilne promjene tla i uništavaju biološku raznolikost. Fizikalno – kemijske metode su uspješne u vraćanju gotovo svih uloga tla osim za poljoprivrednu upotrebu. Zbog svega navedenog počele su se razvijati metode biološke remedijacije tla. Bioremedijacija je proces kojim se zagađivači biološki uklanjaju ili razgrađuju u bezopasno stanje na razinu ispod maksimalno dozvoljene koncentracije. Ovu aktivnost mogu izvesti mikroorganizmi (bakterije i gljivice), koji su sposobni enzimski razgraditi organske tvari, i kopnene ili vodene biljke, koje su sposobne ukloniti onečišćivače iz tla apsorpcijom kroz korijenje i akumulirati ih u lišće.¹¹

1.4.1. Fitoremedijacija

Fitoremedijacija je tzv. zelena tehnologija sanacije onečišćenog tla korištenjem viših biljaka u procesima čišćenja, koje imaju sposobnost uklanjanja, razgradnje ili imobilizacije relativno velikog broja onečišćujućih tvari, posebice metala. Biljke imaju mogućnost akumuliranja esencijalnih metala iz tla koji su potrebni za njihov rast i razvoj (Fe, Mn, Zn, Cu, Mg), dok neke biljke imaju mogućnost akumuliranja teških metala iz tla (Cd, Cr, Pb, Se, Ag) koji nemaju poznatu biološku funkciju u biljkama. Biljke koje toleriraju povišene koncentracije teških metala nazivaju se hiperakumulatorima teških metala. Ovisno o vrsti kontaminanta, mjestu kontaminacije, opsegu potrebne sanacije i tipu biljke, tehnologije fitoremedijacije dijele se na fitoekstrakciju (ili fitoakumulaciju), fitostabilizaciju, fitovolatizaciju, fitorazgradnju, rizadorazgradnju, rizofiltraciju i fitodesalinizaciju. Na slici 4. i u Tablici 1. prikazani su mehanizmi fitoremedijacije te kratak opis svakog od navedenog mehanizama. Fitoremedijacija, kao i svaki postupak, ima neke nedostatke od kojih su najznačajniji sporost procesa, neke vrste ne mogu se saditi na jako zagađenim mjestima, biljke nakon sabiranja i sagorijevanja se odlažu na specijaliziranim odlagalištima otpada.^{11, 12}



Slika 4. Mehanizmi fitoremedijacije¹¹

Tablica 1. Opis tehnika fitoremedijacije^{11, 12}

| Tehnika | Opis |
|---------------------------|---|
| Fitoekstrakcija | Apsorpcija i akumulacija onečišćujućih tvari u biomasi, tj. izdancima. |
| Fitostabilizacija | Ograničavanje mobilnosti i biorasploživosti onečišćujućih tvari u tlo korijenjem biljaka. |
| Fitovolatizacija | Pretvorba onečišćujućih tvari u hlapljivi oblik i njihovo naknadno otpuštanje u atmosferu. |
| Fitorazgradnja | Razgradnja organskih ksenobiotika biljnim enzimima unutar biljnih tkiva. |
| Rizofiltracija | Uklanjanje onečišćujućih tvari iz površinskih ili otpadnih voda adsorpcijom ili taloženjem. |
| Rizorazgradnja | Razgradnja organskih ksenobiotika u rizosferi mikroorganizmima. |
| Fitodesalinizacija | Uklanjanje viška soli iz slanih vrsta tla halofitima. |

1.4.2. Kadmij

Kadmij je mekan srebrnobijeli metal, stabilan pri sobnoj temperaturi. Otapa se u kiselinama koje imaju oksidacijsko djelovanje, ali ne i u lužinama. Koristi se kao prevlaka na drugim metalima, osobito na željezu, zbog stabilnosti prema utjecaju atmosferilija. Dosta je reaktivan te se skoro nikada ne pojavljuje sam u okolišu već u kombinaciji s cinkom. Kadmij se danas upotrebljava u Ni - Cd baterijama (polako se povlače iz potrošnje zbog toksičnosti kadmija) i u nuklearnim reaktorima zato što ima sposobnost apsorpiranja neutrona.¹³



Slika 5. Kadmij^{14, 15}

Svrstava se u skupinu teških metala te je jedan od najotrovnijih elemenata i najvećih onečišćivača okoliša. Teški metali definiraju se kao metali sa specifičnom težinom većom od 5 g cm^{-3} . Kadmij je prirodno prisutan u tlu te normalne koncentracije kadmija u tlu iznose od 0,1 do 1 mg Cd kg^{-1} tla, ali zbog antropogenih izvora koncentracija kadmija u tlu se znatno povećala. Najvažniji i najveći antropogeni izvor kadmija su gnojiva na bazi fosfora i rudnici koji ispuštanjem otpadnih voda dodatno onečišćuju tlo.^{16, 17}

Kadmij ima utjecaj na funkciju ekosustava i svojom toksičnošću djeluje na biljke i organizme u tlu. Koncentracija i toksičnost kadmija se povećava zato što se akumulira u tlu i ima dugo vrijeme raspada. Najvažnija svojstva kadmija u tlu su topljivost i sposobnost adsorpcije. Topljivost kadmija u tlu ovisi o koncentraciji kadmija (što je veća koncentracija to će se više otopiti), pH vrijednosti (pogoduje veća pH vrijednost), količini organske materije i granulometrijskom sastavu tla. Tri najveća adsorbensa kadmija u tlu su organske tvari, željezovi oksidi te minerali gline.¹⁶

1.5. Metode izolacije

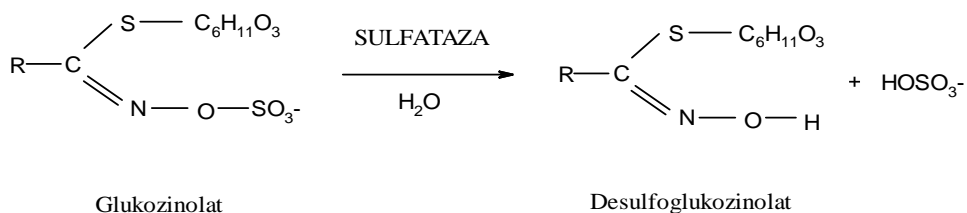
Danas se upotrebljavaju različite metode izolacije da bi se osigurala izolacija točno određenog spoja ili spojeva s minimalnim gubitcima, bez nastanka neželjenih spojeva. Klasične metode koje se inače koriste za izolaciju su destilacija i ekstrakcija, ali se primjenjuju i modernije metode kao što su mikrovalna i ultrazvučna ekstrakcija i destilacija, koje pokazuju brojne prednosti pred klasičnim metodama. Metode izolacije se primjenjuju u svrhu upoznavanja kemijske prirode spojeva koji su prisutni u biljkama.¹⁸

1.5.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je postupak koji omogućava izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Primjenjuje se za izdvajanje željenih tvari bez korištenja visokih temperatura zbog termolabilnih tvari. Temelji se na različitoj topljivosti tvari koju je potrebno izolirati i primjesa s kojima se nalazi pomoću ekstrakcijskog sredstva. Prilikom dodavanja ekstrakcijskog sredstva stvaraju se dvije faze, teža i lakša faza, koje se međusobno ne miješaju. Kao ekstrakcijsko sredstvo mogu se koristiti hlapljiva i nehlapljiva otapala, a to su najčešće voda i organska otapala kao petroleter, pentan, dietil-eter, diklormetan. Danas se ističe mikrovalna ekstrakcija kao primjer zelene kemije zato što nema upotrebe otapala.^{8, 18}

1.5.1.1. Ekstrakcija glukozinolata

Ekstrakcija glukozinolata iz biljnog materijala provodi se uz pomoć 70%-tnog metanola, nakon koje slijedi enzimska desulfatacija (slika 6.) uz pomoć enzima sulfataze i analiza dobivenih desulfoglukozinolata. Enzim sulfataza pripada porodici esteraza i reakcija se provodi na način da dolazi do odcjepljivanja sulfatnog iona iz molekule glukozinolata što dovodi do nastanka desulfoglukozinolata.¹⁹



Slika 6. Desulfatacija glukozinolata¹⁹

1.6. Tehnike identifikacije

Najviše korištene tehnike identifikacije i analize spojeva su kromatografija i spektroskopija. Kod kromatografskih tehnika najčešće se primjenjuju plinska i tekućinska kromatografija, a kod spektroskopskih tehnika to je većinom UV, IR ili NMR spektroskopija. Kromatografija se danas može primjenjivati sama ili u kombinaciji sa spektrometrijom masa.⁸

1.6.1. Kromatografija

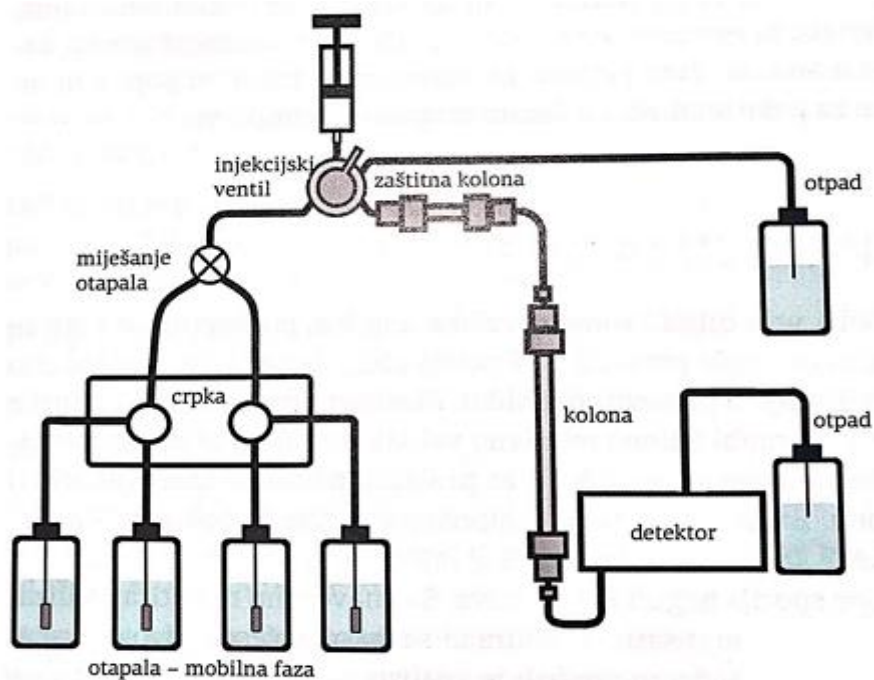
Kromatografija je analitička tehnika za odjeljivanje komponenti smjese te spregnuta sa odgovarajućim detektorom za njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Prednost nad ostalim tehnikama je što omogućuje brzu i potpunu analizu. Princip rada kromatografskog odjeljivanja temelji se na različitom afinitetu komponenata smjese prema stacionarnoj fazi. Stacionarna faza koja je najčešće kruti adsorbens, ali može biti i tekućina, je nepokretna faza, dok je mobilna faza kapljevina ili plin i ona predstavlja pokretnu fazu. Analizirana smjesa se otapa u pogodnom otapalu (mobilna faza) te se prevodi preko stacionarne faze. Komponente u smjesi koje imaju veći afinitet duže se zadržavaju na stacionarnoj fazi, odnosno sporije putuju kroz mobilnu fazu i na taj način se odjeljuju jedan od drugog. Komponente smjese se tijekom putovanja neprestano sorbiraju i desorbiraju. Vrijeme zadržavanja pojedine komponente predstavlja vrijeme koje je proteklo od ulaska do izlaska komponente iz kolone, tj. stacionarne faze i na taj način se analiziraju. Kromatografske tehnike se mogu podijeliti na više načina, ali najjednostavnija podjela je prema agregatnom stanju mobilne faze. S obzirom na agregatno stanje mobilne faze dijele se na plinsku i tekućinsku kromatografiju. Kod plinske kromatografije mobilna faza je inertni plin (najčešće helij), a kod tekućinske kromatografije tekućina male viskoznosti.^{8, 20}

1.6.1.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography - LC*) je tehnika razdvajanja komponenti između čvrste stacionarne faze i tekuće mobilne faze. Koristi se za odjeljivanje termički nestabilnih i biološki aktivnih spojeva. Postoje dvije vrste tekućinske kromatografije, klasična i tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC).²¹

1.6.1.2. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je vrsta kromatografije na stupcu uz upotrebu visokih tlakova zbog postizanja velike brzine protoka. Mobilna faza prolazi pod tlakom kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze te se na taj način postiže odjeljivanje. Na slici 7. prikazani su sastavni dijelovi HPLC uređaja.^{21, 23}



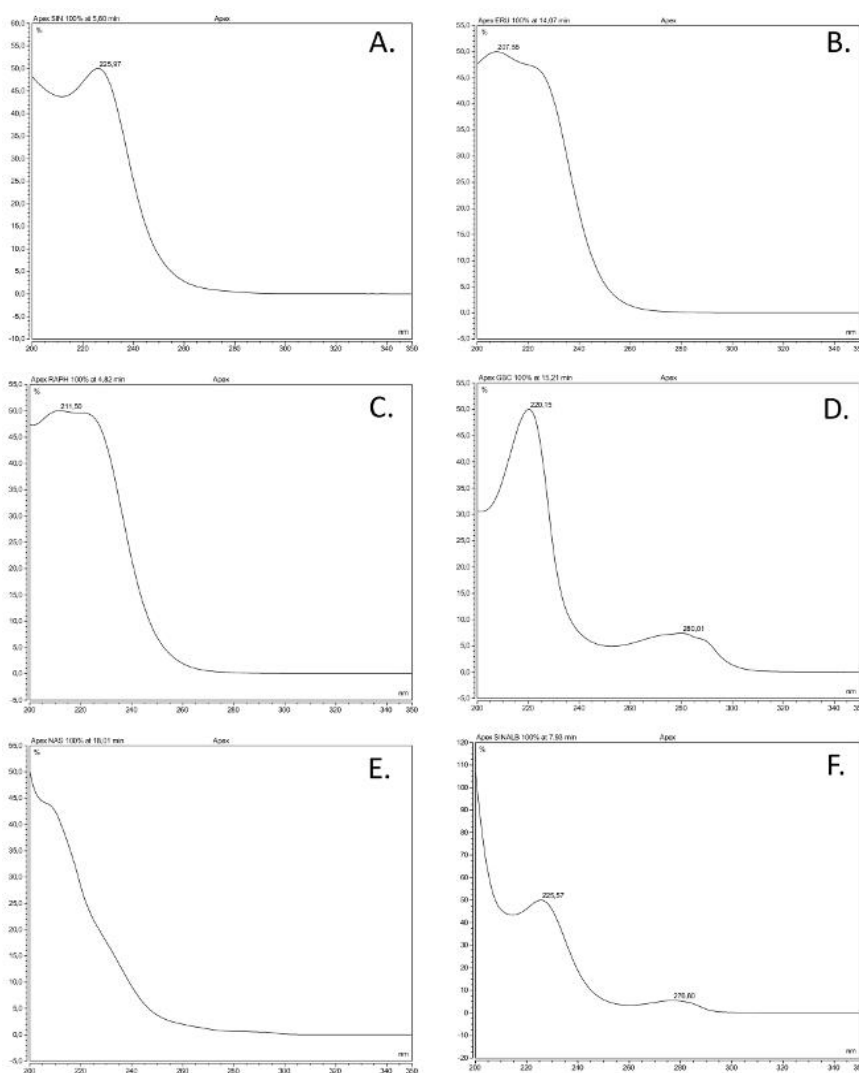
Slika 7. Shematski prikaz HPLC uređaja²³

Otapala koje se koriste kao mobilna faza trebaju biti visoke čistoće bez prisutnosti plinova ili suspendiranih čestica. Crpka unosi mobilnu fazu pod visokim tlakom u kolonu, a uzorak za analizu se unosi mikrolitarskom špricom kroz ventil u sustav za injektiranje. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak u kolonu. Ispred glavne kolone stavlja se zaštitna kolona koja služi kako bi se glavna kolona zaštitila i postiglo bolje razdvajanje. Kao detektori najčešće se koriste UV-VIS, DAD ili MS.^{21, 22}

Na osnovu polarosti stacionarne faze razlikuje se kromatografija na normalnim i obrnutim fazama. Kromatografija u kojima je stacionarna faza polarna (silikagel), a mobilna faza manje polarna ili nepolarna (heksan, metanol) su kromatografije normalnih faza. U kromatografiji normalnih faza polarni spojevi se eluiraju posljednji.^{20, 22}

Kod kromatografije obrnutih faza stacionarna faza je nepolarna (kemijski modificirana površina silikagela), a mobilna faza je polarna (voda, acetonitril). Vrijeme zadržavanja nepolarnih spojeva bit će duže i oni će se posljednji eluirati. Što je veća razlika u polarnosti između stacionarne i mobilne faze to će razdvajanje biti uspješnije.^{20, 22}

Nakon razdvajanja u HPLC-u glukozinolati se mogu identificirati upotrebom različitih detektora (UV-VIS, DAD ili MS), uspoređivanjem vremena zadržavanja spoja te usporedbom UV spektra s poznatim standardima glukozinolata. Na slici 8. prikazan je UV apsorpcijski spektar (200-350 nm) šest komercijalno dostupnih desulfoglukozinolata (dGSL), koji su predstavnici najčešćih strukturnih klasa tih spojeva.²⁴

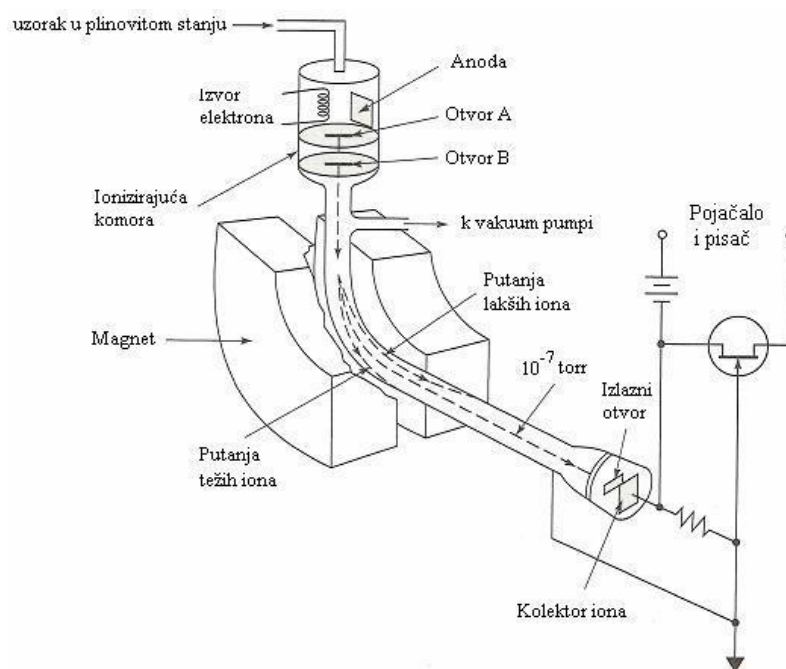


Slika 8. UV spektar najčešćih klasa glukozinolata²⁴

(A) Sinigrin (prop-2-enil GSL), alkan; **(B)** Glukoerucin (4- metilsulfanilbutil GSL), sulfanilalkil; **(C)** Glukorafanin (4-metilsulfinilbutil GSL), sulfinilalkil; **(D)** Glukobrasicin (indol-3-ilmetil), indol; **(E)** Glukonasturcin (2-feniletil GSL), arilalifatski; **(F)** Sinalbin (4-hidroksibenzil GSL), arilalifatski

1.6.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (MS) je tehnika koja se koristi za identifikaciju kemijskih spojeva određivanjem njihovih molekulskih masa, a potom i molekulskih formula. Metoda se zasniva na ionizaciji plinovitog uzorka, fragmentaciji, a potom se fragmenti razdvajaju s obzirom na omjer mase i naboja (m/z odnosu) te bilježe u formi masenog spektra. Ionizator, analizator i detektor su glavne komponente masenog spektrometra koji je prikazan su na slici 9.^{8,25}

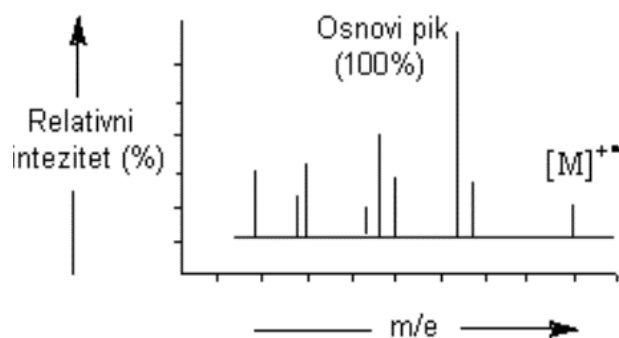


Slika 9. Shema spektrometra masa⁸

Proces ionizacije se provodi u komori za bombardiranje koja na jednoj strani ima užarenu volframu nit (katoda), a na suprotnoj strani pozitivno naelektriziranu ploču (anodu). Na ovaj način se elektroni kreću od katode (izvora) prema anodi. U komori vladaju uvjeti visokog vakuuma kako se stvoreni ioni ne bi sudarili s drugim molekulama i izazvale neutralizaciju. U ionizator se unosi uzorak u plinovitom stanju te se provodi bombardiranje visokoenergetskim elektronima. Dolazi do izbacivanja elektrona iz molekule uzorka te nastaju pozitivno nabijeni molekularni ioni M^+ koji se na kraju fragmentiraju.^{8,25}

U analizatoru se dobiveni ioni razvrstavaju s obzirom na omjer njihove mase i naboja m/z , a razvrstavanje iona vrši se propuštanjem kroz promjenjivo magnetsko ili električno polje. Fragmenti manje mase bit će više otklonjeni, dok će fragmenti veće mase biti manje otklonjeni. Fragmenti nakon prolaska kroz polje dolaze u sakupljač gdje je svaki ion

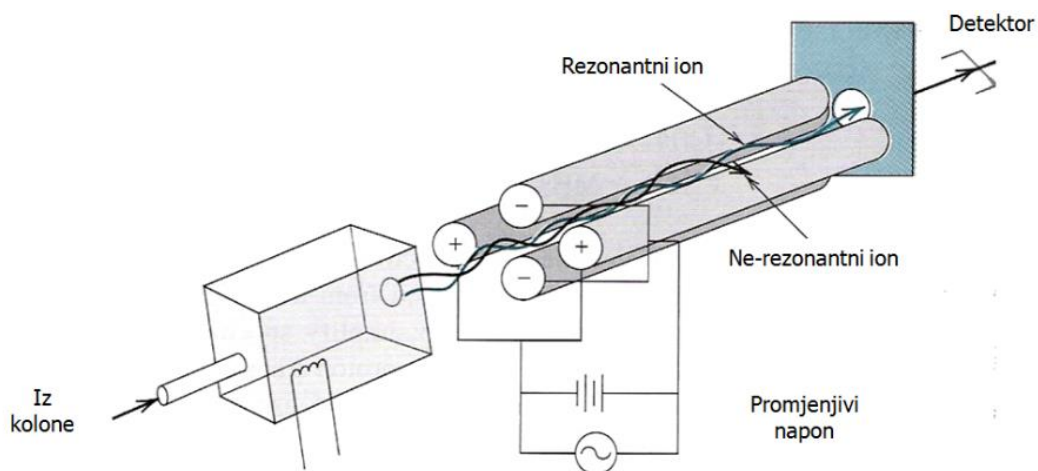
odgovoran za stvaranje elektronskog signala koji se upućuje na računalo koje daje spektar masa. Spektar masa (slika 10.) prikazuje omjer relativnog intenziteta o omjeru mase i naboja svakog pojedinog fragmenta. Najveći signal (osnovni pik) predstavlja standard prema kojem se određuje udio fragmenata koji su formirali ostale signale.^{8, 25}



Slika 10. Spektar masa⁸

1.6.3. Vezani sustav tekućinska kromatografija – spektrometrija masa

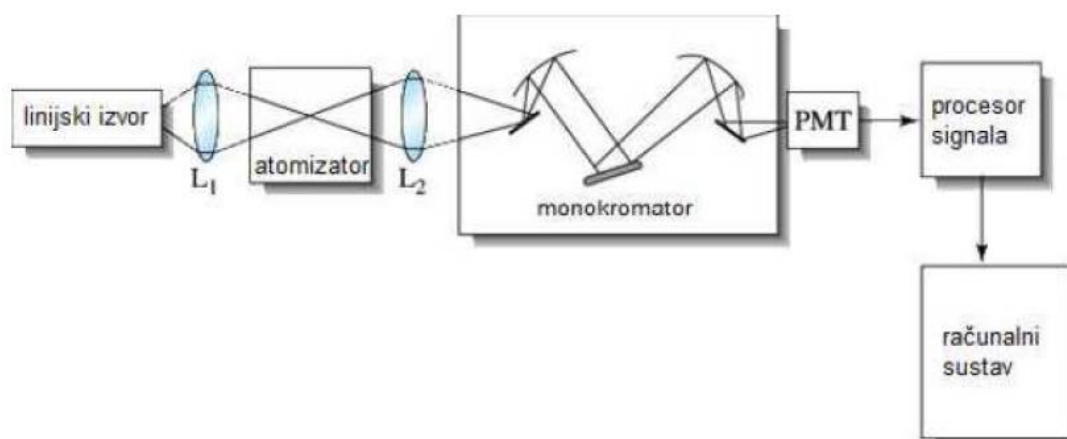
Vezani sustav tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti – tandemski spektrometrija masa (UHPLC-MS/MS) je analitička tehnika koja omogućuje odjeljivanje komponenata smjese te određuje spojeve s visokim stupnjem osjetljivosti i selektivnosti na temelju omjera mase i naboja za svaki spoj od interesa. Kvalitativna analiza se sastoji od snimanja uzorka, određivanja molekulske mase spoja, određivanja prekursora određenog fragmenta te analize fragmentacije određenog molekuskog iona. Navedena tehnika, pored spektrometra masa (slika 11.) koristi često u kombinaciji i DAD detektor koji ima mogućnost izbora do 8 valnih duljina.^{26, 27}



Slika 11. Shema kvadropolnog spektrometra masa²⁸

1.6.4. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) (slika 12.) je analitička tehnika kod koje se određivanje koncentracije analita u uzorku temelji na apsorpciji elektromagnetskog zračenja kojem je proporcionalno. Koristi se za kvalitativno i kvantitativno određivanje približno 70 elemenata. Izvor elektromagnetskog zračenja u osnovi je isti atom kao i analit koji to zračenje apsorbira. AAS tehnika je ograničena samo na ultraljubičasto i vidljivo zračenje zato što su samo te valne duljine pogodne za pobuđivanje elektronskih prijelaza. Elektron u atomu se nalazi u osnovnom stanju, ali apsorpiranjem energije prelazi u pobuđeno stanje. Navedenu tehniku karakteriziraju linijski spektri određene valne duljine, tj. apsorpcija fotona može nastupiti samo ako je njegova energija jednaka razlici između osnovnog i nekog višeg stanja. Na slici 12. prikazana je shema atomskog apsorpcijskog spektrometra koji se sastoji od izvora zračenja, uzorka koji je smješten u prostoru za atomizaciju, disperznog sredstva (monokromatora), detektora te računala za očitavanje signala.^{29, 30}



Slika 12. Shematski prikaz atomskog apsorpcijskog spektrometra³¹

Izvor zračenja kod AAS je žarulja sa šupljom katodom koja se sastoji od zataljene staklene cijevi u kojoj se nalazi volframova anoda i cilindrična katoda te je ispunjena inertnim plinom (argon) pod niskim tlakom. Katoda je napravljena od metala koji se analizira, što ovu metodu čini izrazito selektivnom. Pri velikom potencijalu kationi argona udaraju u katodu dovoljno velikom energijom što dovodi do izbivanja atoma metala s katode te u konačnici dovodi do stvaranja atomskog oblaka. Dio atoma koji je izbijen emitira karakteristično zračenje pri povratku iz pobuđenog u osnovno stanje. Svjetlo koje je nastalo iz izvora prolazi u prostor za atomizaciju u kojem se nalaze atomi analiziranog uzorka koji apsorbiraju dio energije.^{29,30}

Proces atomizacije odvija se u grafitnoj peći, točnije u cilindričnoj grafitnoj kiveri. Grafitna kivera se postavlja na cilindrične grafitne kontakte koji su smješteni u metalnom kućištu koje je hlađeno vodom. Hlađenje vodom omogućava grafitnoj kiveri brz povratak na sobnu temperaturu između mjerenja (sa 2200 °C na 20 °C u 20 sekundi). Idealni atomizator cijeli uzorak pretvara u atomsku paru. Standardni program peći se sastoji od četiri koraka:

1. Sušenje – otopina uzorka isparava
2. Piroliza – uklanja se što je više moguće organskih onečišćenja
3. Atomizacija – uzorak se prevodi u atomski oblak koji se nalazi na putu zrake i apsorbira zračenje
4. Čišćenje – nakon atomizacije povećava se temperatura kako bi se peć pripremila za sljedeći uzorak

Svaka od četiri navedena koraka odvijaju se na drugoj temperaturi, dok se proces atomizacije i čišćenja odvijaju na temperaturama većom od 1200 °C.^{29, 32}

Elektromagnetsko zračenje usmjereno iz žarulje sa šupljom katodom, nakon prolaska kroz atomizirani uzorak u grafitnoj kiveri dolazi do monokromatora. Monokromator je selektor valnih duljina, međutim oni ne dopuštaju izdvajanje jedne valne duljine, već propuštaju skupinu susjednih valnih duljina. U monokromatoru se nalazi disperzno sredstvo koje može biti prizma ili difrakcijska rešetka. Kombinacijom odgovarajuće žarulje i monokromatora izdvaja se zračenje određene valne duljine do detektora koji bilježi signal.²⁹

Detektor je fotomultiplikator koji elektromagnetsko zračenje pretvara u električni napon. Podatak dobiven sa detektora naziva se apsorbancija. Apsorbancija je omjer intenziteta upadnog zračenja i propuštenog zračenja.²⁹

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Biljni materijal korišten u radu je sjeme kres salate (*Lepidium sativum* L.) (slika 13.), njemačkog proizvođača Kiepenkerl, Bruno Nebelung GmbH, Njemačka. Sjeme je prije sadnje potrebno namakati u vodovodnoj vodi 8 sati. Nakon namakanja sjeme se ispire pod mlazom vodovodne vode i prebacuje na rešetke za kultivaciju gdje je uzorak potrebno ravnomjerno raspodijeliti.

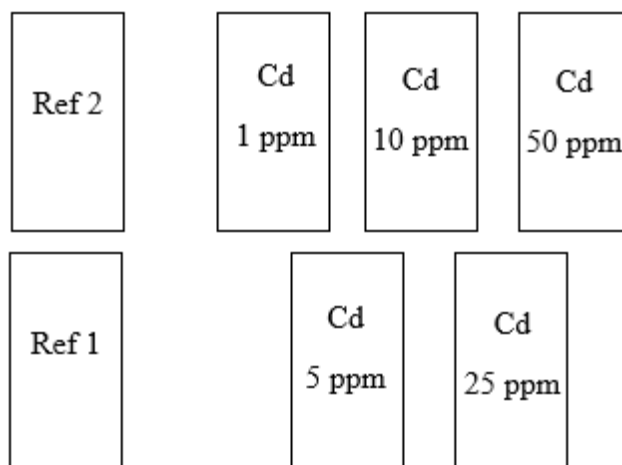


Slika 13. Seme kres salate

Za vrijeme namakanja potrebno je pripremiti otopine metala kadmija (500 mL) koncentracija 1, 5, 10, 25 i 50 mg L⁻¹ Cd (slika 14.) kojima se zalijeva biljni materijal. U svakoj posudici za uzgoj nalazilo se oko 10 g sjemena na 320 mL otopine metala kadmija. Bitno je da sjeme bude vlažno, ali ne i potopljeno. Potrebno je napraviti dva referentna uzorka koja se zalijevaju vodovodnom vodom i po jedna za svaku koncentraciju metala, sveukupno 7 uzoraka. Pripremljene uzorke je potrebno staviti blizu izvora sunca i svakodnevno bilježiti razvoj. Na slici 15. prikazan je razmještaj uzoraka, dok je na slikama 17. – 20. prikazan rast i razvoj klica po danima.



Slika 14. Otopine kadmija različitih koncentracija



Slika 15. Razmještaj uzoraka



Slika 16. Rast i razvoj klica po danima

A) 1. dan (20. travnja 2021.)

B) 2. dan (21. travnja 2021.)

Prvi dan (slika 16. A) sjeme je prebačeno na rešetke za kultivaciju te je ostavljeno blizu izvora sunca i na toplom mjestu. Drugi dan (slika 16. B) u uzorke Cd 1 ppm, Cd 5 ppm i Cd 10 ppm bilo je potrebno nadodati otopinu kadmija odgovarajućih koncentracija zato što su klice „popile“ određeni dio otopine.



Slika 17. Rast i razvoj klica po danima

A) 3. dan (22. travnja 2021.)

B) 4. dan (23. travnja 2021.)

Treći (slika 17. A) i četvrti dan (slika 17. B) bilo je potrebno u sve uzorke nadoliti otopine kadmija odgovarajućih koncentracija te se četvrti dan na uzorku Cd 50 ppm počela razvijati plijesan.



Slika 18. Rast i razvoj klica po danima

A) 5. dan (24. travnja 2021.)

B) 6. dan (25. travnja 2021.)

Peti i šesti dan (slika 18. A i B) nadolijevali su se svi uzorci otopinama kadmija odgovarajućih koncentracija osim uzorka gdje je bio Cd 50 ppm zato što se na njemu već nastala plijesan raširila na cijeli uzorak te on više nije bio pogodan za daljnju obradu.



Slika 19. Rast i razvoj klica po danima

7. dan (26. travnja 2021.)

Uzorci su 7. dan (slika 19.) sabrani i pripremljeni za analizu. Klice su nakon sabiranja isprane destiliranom vodom te sušene na papirnatom ubrusu. Isprane i suhe klice su prebačene u plastične vrećice i obrađene procesom liofilizacije 30 sati (proces uklanjanja vode zamrzavanjem) (slika 20.).



Slika 20. Liofilizator

2.2. Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- metanol (70%), Gram-Mol d.o.o , Zagreb, Hrvatska
- natrijev acetat (>99%), Merck, Darmstadt, Njemačka,
- dekstran (DEAE – sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- sulfataza (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ultračista voda
- klorovodična kiselina (20%), AnalaR® Normapur®, VWR Chemicals, UK

Aparatura:

- uređaj za liofilizaciju, Labconco Corporation, Kansas, Missouri, SAD
- analitička vaga, Explorer® Semi-Micro, OHAUS, Parsippany, New Jersey, SAD
- električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- vortex, DLAB Scientific Co.,Ltd, Peking, Kina
- vodena kupelj, Julabo, Seelbach, Njemačka
- ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka
- centrifuga, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka
- UHPLC-DAD-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
- peć za žarenje, Demiterm Easy 9, Elektrosanitarij, Sv. Nedelja
- atomski apsorpcijski spektrometar, Perkin Elmer Analyst 600

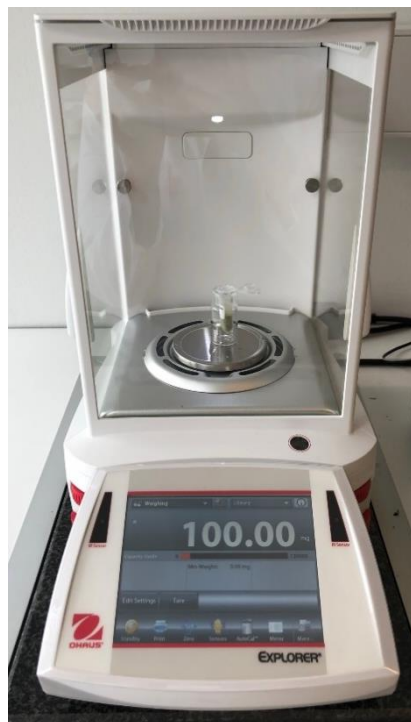
2.3. Ekstrakcija glukozinolata uz desulfataciju

Liofilizirane uzorke potrebno je samljjeti u električnom mlincu. Samljeveni uzorci pakiraju se u plastične spremnike (kivete 50 mL) i imenuju (slika 21.).



Slika 21. Samljeveni uzorci

Osušeni i samljeveni biljni materijal potrebno je pripremiti za proces ekstrakcije. Važe se 100 mg biljnog materijala u reakcijske tube, koje su imenovane kao i plastični spremnici, na analitičkoj vagi (slika 22.).



Slika 22. Analitička vaga

U svaku reakcijsku tubu dodaje se 1 mL 70%-tnog metanola. Metanol se dodaje jer je pogodno otapalo za ekstrakciju glukozinolata. Nakon dodatka metanola biljni materijal ide na vorteks (slika 23.) u trajanju od 1 minute, a potom u vodenu kupelj na 5 minuta. Uzorci se stavljaju u vodenu kupelj na 80 °C da bi se inhibirao enzim mirozinaza, koji cijepa glukozinolate na hlapljive izotiocijanate i nitrile. Ovo se radi zato što je potrebno ekstrahirati glukozinolate koji su nehlapljivi spojevi i na ovaj način se zaustavlja daljnja razgradnja navedenih spojeva.

Na reakcijske tube s biljnim materijalom stavljaju se sigurnosne kapice i prebacuju u ultrazvučnu kupelj (ultrazvučna kupelj potpomaže ekstrakciji glukozinolata) na 30 °C u trajanju od 15 minuta (slika 23.). Nakon ultrazvučne kupelji uzorci se centrifugiraju (slika 23.) da bi se izdvojio supernatant. Centrifugiranje se provodi 10 minuta na 6000 okr. min⁻¹.



Slika 23. Vorteks, ultrazvučna kupelj i centrifuga

Dok su uzorci u ultrazvučnoj kupelji za to vrijeme potrebno je napraviti reakcijske kolone. Reakcijske kolone se prave na način da se u mlincu usitni filter papir koji se koristi kao materijal za punjenje staklenih pipeta, koje služe kao reakcijske kolone. Staklene pipete se pune usitnjenim filter papirom, koji podsjeća na vunu, u visini od 1 cm. Materijal je potrebno stisnuti kako ne bi došlo do istjecanja gela, ali ne i zbiti zato što se kolone onda ne bi mogle isprati. Ovako pripremljene staklene pipete stavljaju se na stalak ispod kojeg se nalazi posuda za prikupljanje otpada prilikom ispiranja kolona. U svaku reakcijsku kolonu dodaje se 0,5 mL dekstrana, ali prije toga je odrezan vrh plastičnog dijela za pipetiranje kako bi se dekstran mogao uzeti zato što je on u formi gela. Na kraju se dodaje 1 mL ultračiste vode.

Nakon procesa centrifugiranja iz reakcijskih tuba izdvaja se supernatant. Prilikom uzimanja supernatanta iz reakcijskih tuba potrebno je pripaziti da nastavak za pipetiranje ne dođe u kontakt s biljnim materijalom. Supernatant se prebacuje u odgovarajuće kolone nakon čega ponovno slijedi proces ekstrakcije. Ovo se radi zato što prema Nerstovom zakonu proces ekstrakcije je bolji kada se radi po dva puta s manjim volumenima. Ponovno se dodaje 1 mL 70%-tnog metanola, nakon čega ide na vortex, ultrazvučnu kupelj na 15 minuta i centrifugiranje 5 minuta. Nije potrebno stavljati u vodenu kupelj zato što se enzim mirozinaza već inhibirao. Nakon ponovnog izdvajanja supernatanta slijedi ispiranje kolona.

Ispiranje kolona se vrši tako da se u svaku reakcijsku kolonu doda 2 puta po 1 mL 70%-tnog metanola u svrhu uklanjanja nepolarnih molekula. Zatim se dodaje 1 mL ultračiste vode kako bi se uklonila obojenja, tj. klorofil i isprao metanol. Na kraju se dodaje 2 puta po 1 mL 20 mM natrijevog acetata (NaOAc) koji služi kao pufer kako bi se postigli optimalni uvjeti za djelovanje enzima sulfataze. Nakon što iscuri pufer, tj. ispiranje kolona završi posuda za otpad se mijenja sa stalkom na kojem se nalaze označene reakcijske tube za ekstrakte (slika 24.). Nakon postavljanja reakcijskih tuba u svaku kolonu se dodaje 20 μ L sulfataze i 50 μ L NaOAc nakon čega se kolone ostavljaju preko noći.

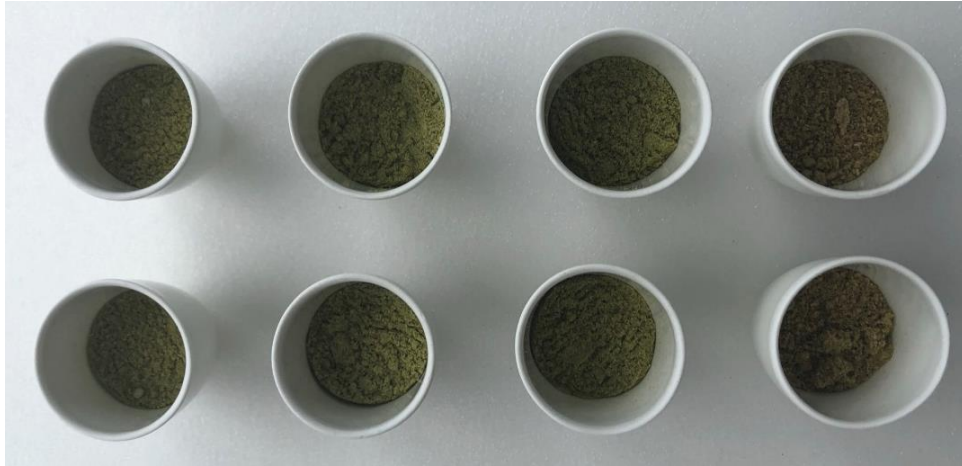
Sljedeći dan se u svaku kolonu dodaju 2 puta po 0,75 mL ultračiste vode kako bi se nastali desulfoglukozinolati eluirali s kolone. Nakon što je sve iscurilo iz kolona reakcijske tube se zatvore i šalju na proces liofilizacije. Uzorci dobiveni nakon liofilizacije prebacuju se u viala za HPLC-DAD-MS/MS i do analize se čuvaju u zamrzivaču.



Slika 24. Reakcijske tube za ekstrakte

2.3. Priprema biljnog materijala za AAS

Prethodno liofilizirani i samljeveni biljni materijal priprema se za analizu atomskom apsorpcijskom spektroskopijom. Potrebno je izvagati 1 g biljnog materijala u označene porculanske lončiče za žarenje (slika 25.).



Slika 25. Porculanski lončići s biljnim materijalom

Nakon vaganja biljni materijal se upućuje na proces žarenja. Žarenje se provodi u peći (slika 26.) na temperaturi od 500 °C u trajanju od 8 sati. Nakon žarenja porculanski lončić se stavlja u eksikator na 24 sata.



Slika 26. Uzorci na žarenju u peći

Žarenje je proces kojim se iz uzorka uklanjaju sve organske tvari te ostaju samo anorganske tvari u obliku pepela, tj. pastila (slika 27.). Ohlađeni pepeo se potom otapa u klorovodičnoj kiselini (HCl) pa se u lončice dodaje 5 mL 20%-tnog HCl-a. Prilikom dodavanja kiseline treba pripaziti zato što u trenu dolazi do razvijanja mjehurića i otapanja uzorka.



Slika 27. Izgled uzorka nakon žarenja

Uzorak s HCl-om se filtrira preko filter papira koji je prethodno ispran kiselinom te se filtrat skuplja u plastičnu kivetu od 50 mL (slika 28.) i nadopunjava ultračistom vodom do oznake.



Slika 28. Filtracija uzoraka

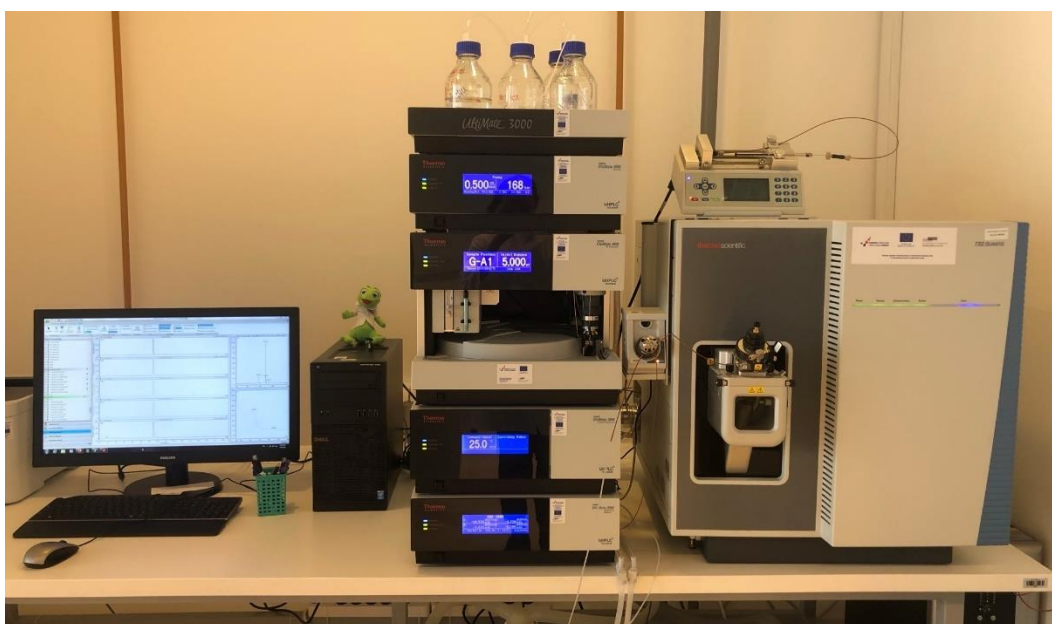
2.3. Metode analize

2.3.1. UHPLC-DAD-MS/MS analiza

Za analizu desulfoglukozinolata dobivenih ekstrakcijom uz desulfataciju korišten je vezani sustav UHPLC-DAD-MS/MS, Ultimate 3000RS s TSQ Quantis MS/MS detektorom (slika 29.). Stacionarnu fazu (slika 30.) predstavlja kolona Hypersil GOLD C-18 (100 mm × 3,0 mm, promjera čestica 3,0 μm), dok je kao mobilna faza korištena smjesa vode i acetonitrila. U navedenoj metodi koristi se manja kolona nego kod klasičnog HPLC-a zato što se primjenjuju veći tlakovi. Na ovaj način analize traju kraće i troši se manje otapala, tj. mobilne faze. Uvjeti rada dani su u Tablici 2.

Tablica 2. Parametri analize

| | |
|-----------------------------|--------------------------|
| Kolona | (100 mm x 3,0 mm) 3,0μm |
| Mobilna faza | Voda, acetonitril |
| Protok | 0,5 mL min ⁻¹ |
| Volumen injektiranja | 5 μL |
| Detektor | DAD |
| Temperatura | Sobna |
| Vrijeme analize | 15,7 min |



Slika 29. UHPLC-DAD-MS/MS

Temperatura kolone se održava na 25 °C, a volumen injektiranja je 5 µL. Spektar snimanja valnih duljina podešen je od 227 do 259 nm, tj. valne duljine na kojoj se apsorbiraju desulfoglukozinolati. Signali su snimani DAD detektorom, a maseni spektri su snimani u pozitivnom modu pri 350 °C. Kao mobilna faza koristi se smjesa ultračiste vode uz dodatak 50 mM natrijevog klorida (povećava osjetljivost na MS detektoru; otapalo A) i 30%-tni acetonitril (otapalo B) uz postavljeni protok od 0,5 mL min⁻¹. Sastav mobilne faze kroz vrijeme prikazan je u Tablici 3. Najprije će izlaziti polarnije komponente zbog većeg postotka otapala A, a nakon toga se izdvajaju nepolarne komponente zbog većeg postotka otapala B. Za kvantizaciju desulfoglukozinolata korišten je desulfosinigrin kao standard, točnije baždarni pravac u rasponu koncentracija od 13,56 do 542,50 µM. Za izračun svakog pojedinog desulfoglukozinolata upotrijebljene su vrijednosti iz literature za faktore odziva.

Tablica 3. Sastav mobilne faze korištene za UHPLC-DAD-MS/MS analizu

| Vrijeme (min) | Voda (%) | Acetonitril (30%) | Gradijent |
|---------------|----------|-------------------|-----------|
| 0 | 100 | 0 | / |
| 0,14 | 96 | 4 | / |
| 7,84 | 14 | 86 | Linearno |
| 8,96 | 14 | 86 | / |
| 9,52 | 5 | 95 | Linearno |
| 13,16 | 5 | 95 | / |
| 13,44 | 96 | 4 | Linearno |
| 15,68 | 96 | 4 | / |
| 15,70 | 0 | 100 | / |



Slika 30. Stacionarna faza (Hypersil GOLD C-18 kolona)

2.3.2. AAS analiza

Za analizu koncentracije kadmija u biljnom materijalu korištena je atomska apsorpcijska spektroskopija na uređaju, Perkin Elmer AAnalyst 600 (slika 32.). Volumen injektiranja je 20 μL i valna duljina koja se koristi za analizu kadmija je 228,8 nm. Piroliza se odvija na temperaturi od 500 °C, dok se atomizacija odvija na 1500 °C. Na slici 31. prikazani su detaljni uvjeti rada.

Setup Data

Wavelength (nm) 228.8
Low Slit (nm) 0.7
Rollover (abs) 0.80
Temperatures (°C): Pyrolysis .. 500 Atomization .. 1500
Atomization Site Pyro/Platform
Chemical Modifier: 0.05 mg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0.003 mg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

Performance Checks

Characteristic Mass: Typical .. 1.3 pg/0.0044 A-s
Sensitivity Check 2.0 ug/L for 0.13 A-s

Slika 31. Uvjeti rada za analizu kadmija



Slika 32. Atomski apsorpcijski spektrometar

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Rast i razvoj klica po danima

Prvi dan uzgoja (slika 16 A.) sjeme je prebačeno na rešetke za kultivaciju te je ostavljeno u prozračnoj prostoriji punoj svjetla. Bitno je da prostorija bude prozračna zato što tijekom rasta i razvoja klica dolazi do oslobađanja karakterističnog neugodnog mirisa.

Drugi dan (slika 16. B) se uočilo da su svi uzorci proklijali, uključujući i uzorak zalijevan otopinom s najvišom koncentracijom kadmija 50 ppm.

Treći dan (slika 17. A) se uočava da uzorak Cd 50 ppm sporije klije u odnosu na ostale uzorke što ukazuje da je koncentracija 50 ppm ipak previsoka i već treći dan je počela biti toksična za biljku. Uzorak Cd 25 ppm je najbolje proklijao treći dan.

Četvrti dan (slika 17. B) svi uzorci su se počeli lijepo razvijati osim uzorka Cd 50 ppm. U navedenom uzorku počela se razvijati i plijesan. Tragovi plijesni su bili vidljivi u donjem lijevom kutu.

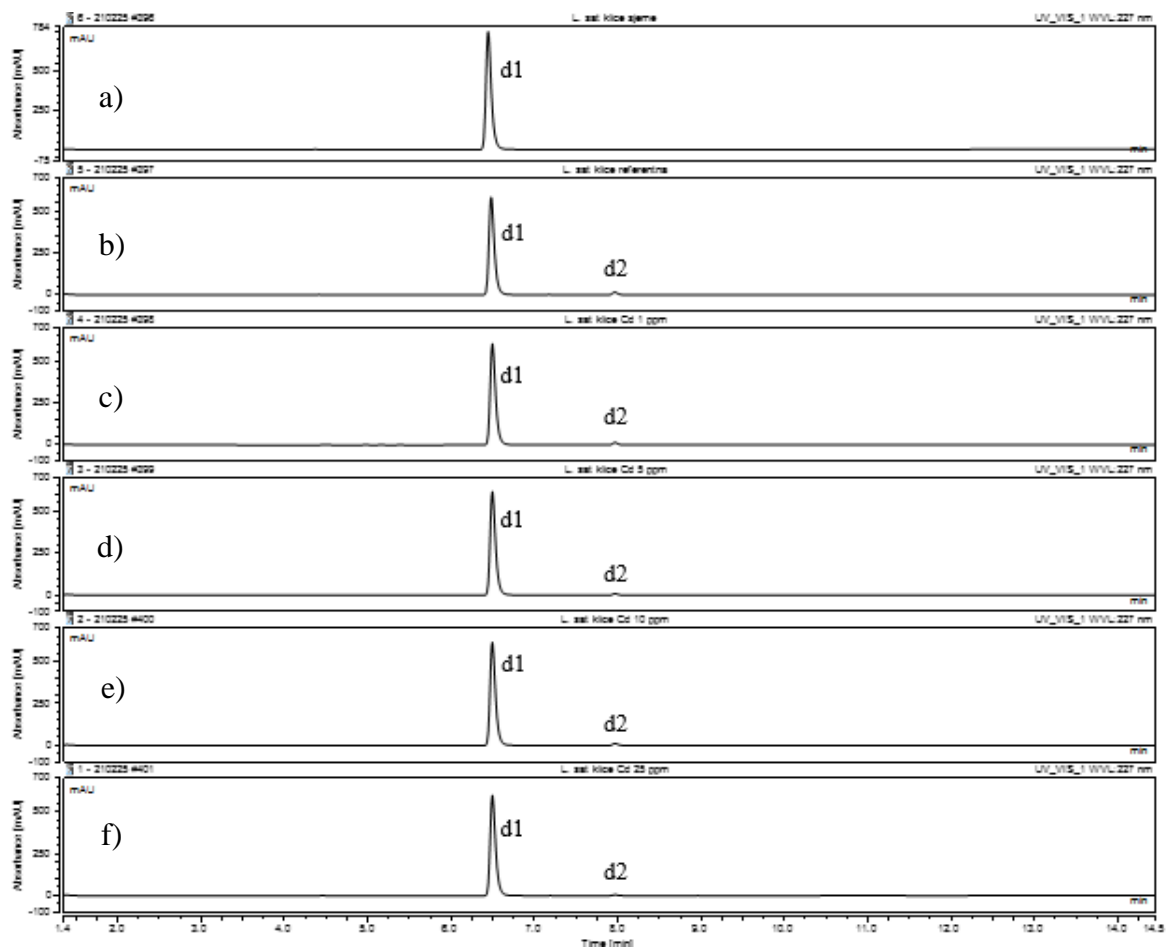
Peti i šesti dan (slika 18. A i B) došlo je do konačnog propadanja uzorka Cd 50 ppm zato što se na njemu već nastala plijesan raširila na cijeli uzorak te on više nije bio pogodan za analiziranje.

Šestog (slika 18. B) i sedmog dana (slika 19.) polako se počinju vidjeti naznake da uzorak Cd 25 ppm počinje propadati. Iako je uzorak na vrhu bujan, detaljnijim pregledom uviđa se da su listovi sa strana počeli opadati i da korijenje nije naraslo u odnosu na peti dan. Ovo sve navodi do činjenice da je koncentracija Cd od 25 ppm počela biti toksična za biljku.

3.2. Izolacija glukozinolata i UHPLC-DAD-MS/MS analiza

Svaka biljna vrsta koja sadrži glukozinolate ima jedinstveni profil, stoga veliku važnost nosi njihova identifikacija te u konačnici kvantizacija. U ovom radu su kvantizirani glukozinolati biljne vrste *Lepidium sativum* L. pomoću UHPLC-DAD-MS/MS. Glukozinolati su ekstrahirani 70%-tnim metanolom iz 100 mg usitnjenog biljnog materijala. Dobiveni ekstrakti su se nanosili na ionsko – izmjenjivačku kolonu koja sadrži dekstran u cilju uklanjanja nepolarnih molekula i obojenja. Na kraju se dodaje enzim sulfataza u cilju provedbe desulfatacije glukozinolata.

Na slici 33. prikazan je kromatogram dobivenih desulfoglukozinolata.



Slika 33. Kromatogrami desulfoglukozinolata sjemena i uzoraka (klica)

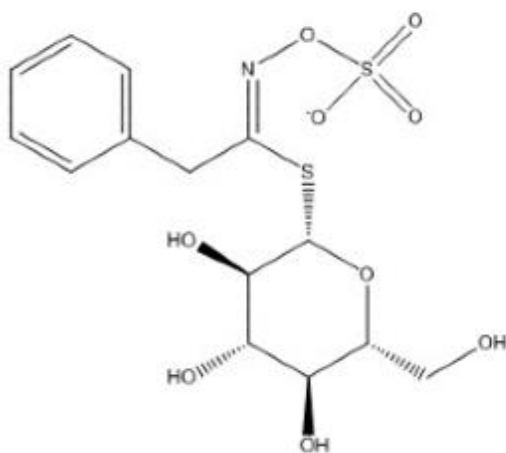
d1) Glukotropeolin

d2) 4-Metoksigliukobrasicin

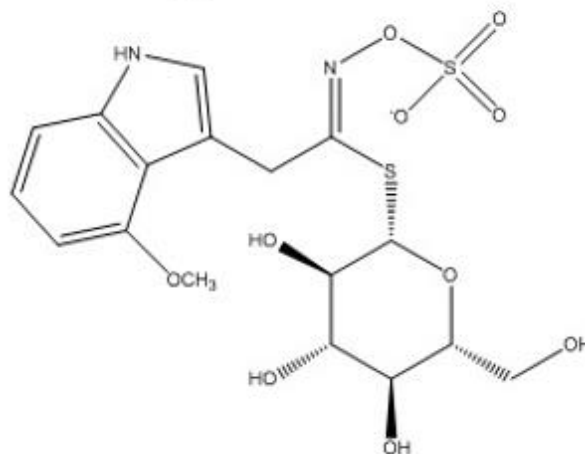
a) sjeme, **b)** referentni uzorak, **c)** klice Cd 1 ppm, **d)** klice Cd 5 ppm, **e)** klice Cd 10 ppm, **f)** klice Cd 25 ppm

Prilikom ekstrakcije glukozinolata uz desulfataciju, osim referentnog uzorka i klica koje su zalijewane otopinama kadmija odgovarajućih koncentracija, pripremao se i uzorak čistog neobrađenog sjemena. Analizom dobivenih kromatograma na UHPLC-DAD-MS/MS uređaju utvrđeno je da se u sjemenu biljke nalazi glukozinolat glukotropeolin, dok se u klicama nalaze glukotropeolin i 4-metoksiglukobrasicin. Na slici 34. prikazana je struktura navedenih glukozinolata koji se nalaze u sjemenu i klicama.

Glukotropeolin

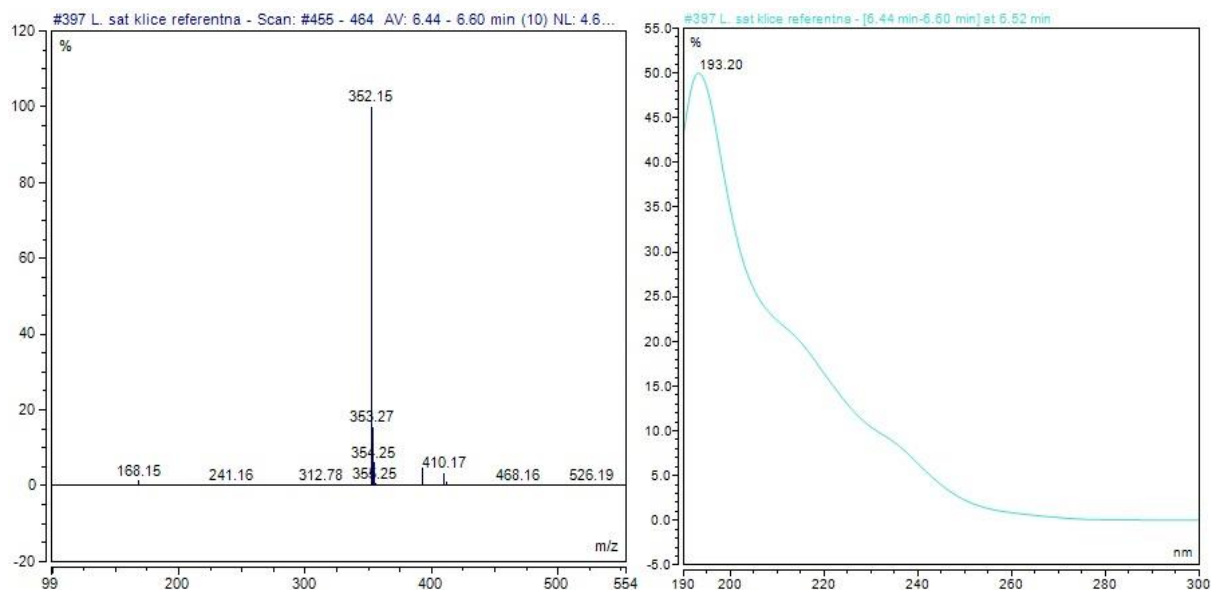


4-Metoksiglukobrasicin



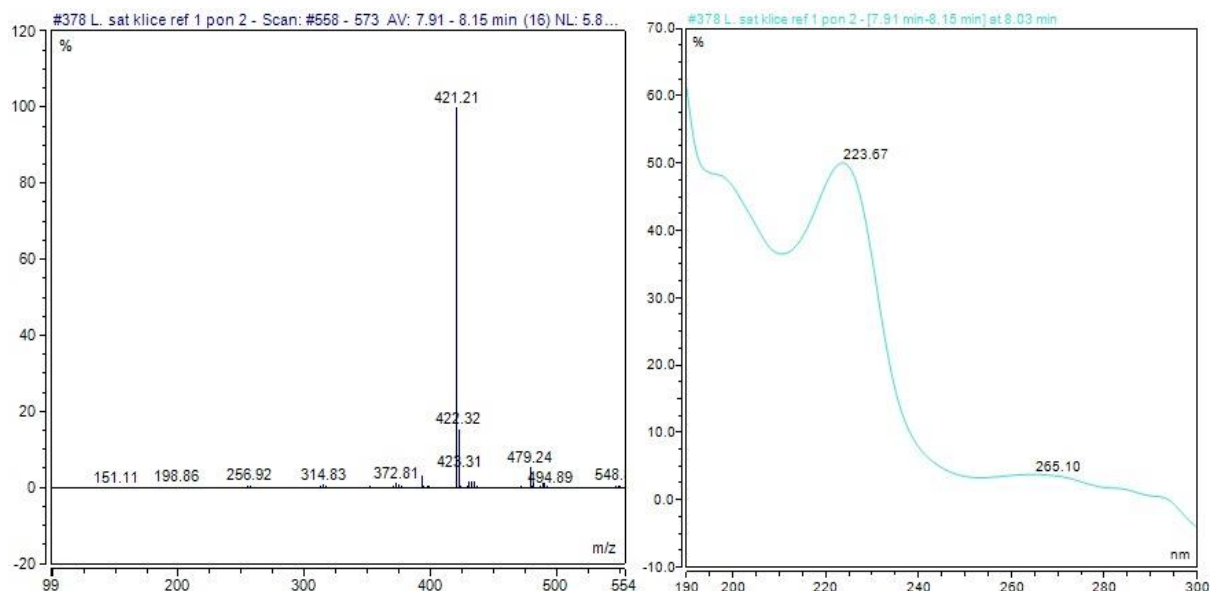
Slika 34. Strukturna formula dobivenih glukozinolata

Njihova identifikacija provedena je preko masenog i UV spektra pojedinog signala (slika 35. i 36.). Pošto se uređaj sastoji od dva masena detektora na prvom detektoru se uzorak ionizira i filtrira ione prema omjeru mase i naboja, dok se na drugom izvlače fragmenti od interesa za analizu. U masenim spektrima molekulskih iona desulfoglukozinolata vrijednosti mase se uvećavaju za masu iona natrija ($A_r=23$) zato što se prije analiziranja u ultračistu vodu (mobilna faza s 30%-tnim acetonitrilom) dodaje 50mM natrijev klorid $[M+Na]^+$ jer se na taj način povećava osjetljivost na masenom detektoru.



Slika 35. MS i UV spektar glukotropeolina

Iz kromatograma (slika 33.) je vidljivo da je najzastupljeniji glukozinolat u svim uzorcima glukotropeolin. Navedeni spoj je identificiran na temelju vremena zadržavanja (6,43 minute) te MS i UV spektra (slika 35.). U MS spektru na 6,43 minuti pojavljuje se pik $m/z = 352$ i uspoređivanjem dobivene vrijednosti s literaturom zaključuje se da se radi o glukotropeolinu. Izgled UV spektra, koji odgovara izgledu karakterističnom za arilalifatske glukozinolate (vidi sliku 8.) također potvrđuje da se radi o navedenom spoju.



Slika 36. MS i UV spektar 4-metoksiglukobrasincina

Iz kromatograma (slika 33.) vidi se da je drugi najzastupljeniji glukozinolat 4-metoksiglukobrasicin. Navedeni spoj se ne nalazi samo u uzorku čistog neobrađenog sjemena. U uzorku klica koje su zalijevane s otopinom kadmija koncentracije 25 ppm može se uočiti da je apsorbancija navedenog glukozinolata manja nego u ostalim uzorcima. Vrijeme zadržavanja navedenog spoja iznosi 7,96 minuta. Također u toj minuti na MS spektru se pojavljuje pik $m/z = 421$. Usporedbom dobivenog UV spektra s UV spektrom najčešćih klasa glukozinolata, koje je opisano u poglavlju 1.6.1. (slika 8.), jasno se vidi da se radi o indolnom glukozinolatu.

U Tablici 4. prikazani su identificirani glukozinolati u uzorcima *Lepidium sativum* L. i srednja vrijednost koncentracija zato što su se pravila 3 ponavljanja, dok se u Tablici 5. nalaze mase pojedinih glukozinolata nađenih u svakom od uzoraka, zajedno s vremenom zadržavanja i faktorom odziva.

Tablica 4. Identificirani glukozinolati i srednja vrijednost koncentracije u uzorcima *Lepidium sativum* L.

| Ime spoja / Koncentracija ($\mu\text{mol g}^{-1}$) | Sjeme | Referentni uzorak | Klice Cd 1 ppm | Klice Cd 5 ppm | Klice Cd 10 ppm | Klice Cd 25 ppm |
|--|--------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Glukotropeolin | 282,08 | 217,04 | 190,96 | 216,77 | 202,24 | 209,03 |
| 4- Metoksiglukobrasicin | / | 1,18 | 0,96 | 0,58 | 0,76 | 0,39 |

Tablica 5. Identificirani glukozinolati u uzorcima *Lepidium sativum* L., masa spojeva, vrijeme zadržavanja i faktor odziva

| Ime spoja | $[M+Na]^+$ (m/z) | Vrijeme zadržavanja (min) | Faktor odziva |
|----------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------|
| Glukotropeolin | 352 | 6,43 | 0,95 |
| 4- Metoksiglukobrasicin | 421 | 7,96 | 0,25 |

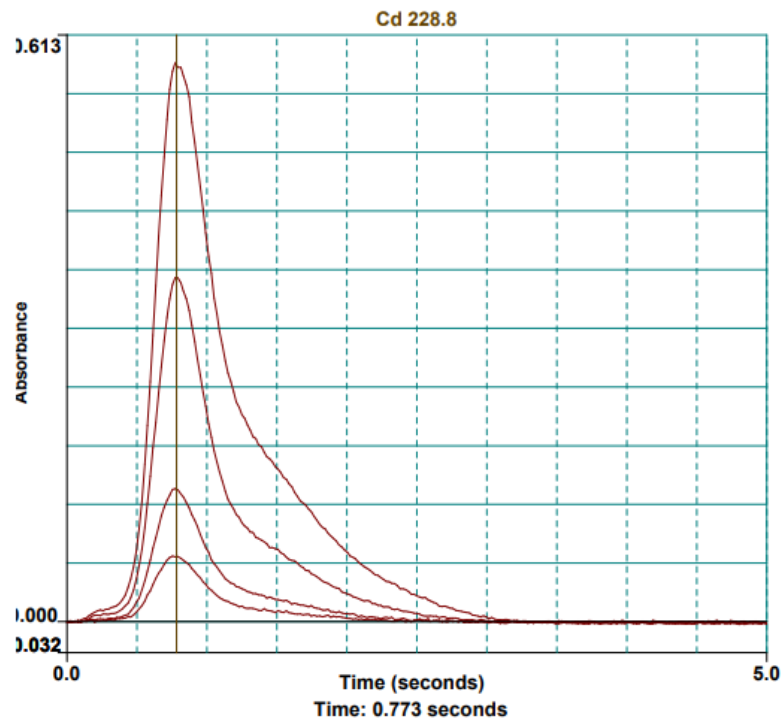
Iz kromatograma dobivenih UHPLC-DAD-MS/MS analizom vidljivo je da je glukotropeolin kvantitativno najzastupljeniji spoj u klicama *Lepidium sativum* L, dok je drugi najzastupljeniji 4-metoksiglukobrasicin. Iz strukturnih formula vidljivo je da glukotropeolin pripada skupini arilalifatskih glukozinolata, a 4-metoksiglukobrasicin pripada skupini heterocikličnih (indolnih). Na temelju vremena zadržavanja u prikazanom kromatogramu vidljivo je da je glukotropeolin polarniji spoj od 4-metoksiglukobrasicina. Pošto je stacionarna faza nepolarna (C-18 kolona) vrijeme zadržavanja nepolarnih spojeva je duže te će se oni posljednji eluirati, dok će polarnije komponente izlaziti prije. Iz kromatograma se vidi da glukotropeolin izlazi u 6,43 minuti, dok 4-metoksiglukobrasicin izlazi 1,5 minute kasnije, tj. u 7,96 minuti što potvrđuje napisanu činjenicu.

U Tablici 4. prikazana je srednja vrijednost koncentracija u biljnim uzorcima *Lepidium sativum* L. Vidljivo je da je spoj glukotropeolin zastupljen u svim uzorcima, dok se spoj 4-metoksiglukobrasicin ne nalazi u sjemenu uzorka što se može objasniti činjenicom da se biljka prilagođava na rast u danim uvjetima te sintetizira samo spojeve koji su joj neophodni za rast. Iz koncentracija je vidljivo da rastom biljke nije nastala veća količina glukotropeolina, ali je zato sjeme kres salate bilo bogato spomenutim glukozinolatom. Također, najveća količina 4-metoksiglukobrasicina detektirana je u referentnom uzorku, koji je zalijevan isključivo vodovodnom vodom, dok je uzorak klica koji je zalijevan otopinom kadmija koncentracije 25 ppm imao najmanju koncentraciju navedenog glukozinolata. Koncentracija glukotropeolina i 4-metoksiglukobrasicina nije opadala linearno s povećanjem koncentracije kadmija, kao što se moglo očekivalo, već je koncentracija u svim uzorcima bila mješovita. Također, dobivene konačne koncentracije glukozinolata su velike pa se koncentracija nije mogla direktno izračunati iz pripremljenih uzoraka nego su se uzorci morali razrijediti 10 puta. Razrjeđenje se vrši na način da se 100 μ L uzorka razrijedi na 900 μ L ultračiste vode. Prvo se računala koncentracija u razrijeđenom uzorku koja pomnožena s 10 daje koncentraciju glukozinolata u nerazrijeđenom biljnom ekstraktu.

Uzorak klica koji je zalijevan otopinom kadmija 50 ppm nije bio pogodan za analizu zato što se razvila plijesan i uzorak svakako nije proključao zato što je koncentracija od 50 ppm bila toksična.

3.3. Krivulja umjeravanja i koncentracija kadmija u biljci

Da bi se odredila koncentracija kadmija u uzorcima prvo je potrebno napraviti krivulju umjeravanja za kadmij. Potrebno je pripremiti 4 standardne otopine kadmija različitih koncentracija. Priprema standarda se vršila pomoću 0,2%-tne HNO_3 (otopina za razrjeđenje). Pripravljene standardne otopine kadmija koncentracija od 1 do 12 ppb analizirane su pomoću atomskog apsorpcijskog spektrometra. Krivulja umjeravanja se konstruira na način da se otopinama kadmija poznatih koncentracija izmjeri apsorbanacija. Pikovi na slici 37. predstavljaju apsorbanaciju za svaki od 4 analizirana uzorka standardnih otopina. Dobivena vrijednost apsorbanacije za svaku od otopina kadmija prikazana je u Tablici 6.

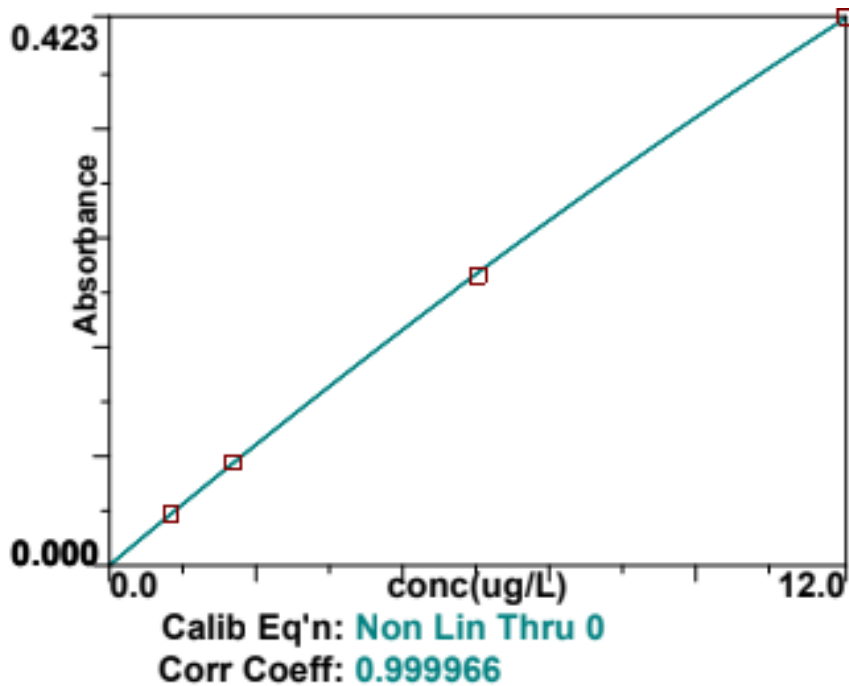


Slika 37. Izmjerene apsorbanacije za pripremljene otopine kadmija

Tablica 6. Vrijednosti apsorbanacije za različite koncentracije standarda

| Otopina kadmija | Koncentracija (ppb) | Apsorbancija |
|-----------------|---------------------|--------------|
| Standard 1 | 1 | 0,06782 |
| Standard 2 | 2 | 0,13813 |
| Standard 3 | 6 | 0,35892 |
| Standard 4 | 12 | 0,58112 |

Krivulja umjeravanja predstavlja ovisnost apsorbancije o koncentraciji (slika 38.). Sa prikazane krivulje umjeravanja vidljiva je visoka korelacija ($R^2 = 0,999966$).



Slika 38. Krivulja umjeravanja za kadmij

Dobivene koncentracije kadmija u biljnom uzorku prikazane su u Tablici 7. Masa u g predstavlja masu uzorka koja se vagala na početku kod pripreme biljnog materijal, dok volumen od 0,05 L predstavlja ukupni volumen na koji su se uzorci razrjeđivali. Koncentracije Cd AAS su koncentracije koje su izmjerene atomskom apsorpcijskom spektroskopijom, ali one se moraju preračunati u odnosu na volumen i masu što je prikazano u daljnjem tekstu. Konačne koncentracije kadmija u biljnom uzorku prikazane se u zadnjem stupcu Cd uzorak.

Tablica 7. Rezultati koncentracija kadmija u uzorcima

| Uzorak | Masa (g) | Volumen (L) | Cd AAS γ (ppb) | Cd uzorak γ (ppm) |
|--------------|----------|-------------|--------------------------|-----------------------------|
| Sjeme | 0,99999 | 0,05 | 6,301 | 0,315 |
| Sjeme | 1,00001 | | 5,154 | 0,258 |
| Referentna 1 | 0,99998 | | 6,027 | 0,301 |
| Referentna 1 | 1,00001 | | 16,98 | 0,849 |
| Cd 1 ppm | 1,00003 | | 1060 | 52,998 |
| Cd 1 ppm | 0,99999 | | 1034 | 51,701 |
| Cd 5 ppm | 0,99999 | | 1167 | 58,351 |
| Cd 5 ppm | 0,99999 | | 980 | 49,000 |
| Cd 10 ppm | 1,00001 | | 1749 | 87,449 |
| Cd 10 ppm | 1,00002 | | 1802 | 90,098 |
| Cd 25 ppm | 1,00005 | | 4966 | 248,288 |
| Cd 25 ppm | 1,00001 | | 4657 | 232,848 |

Izračun koncentracije kadmija u uzorcima na primjeru sjemena:

$$\gamma (\text{Cd uzorak}) = \frac{\gamma (\text{Cd AAS}) * \text{volumen}}{\text{masa}}$$

$$\gamma (\text{Cd uzorak}) = \frac{6,301 \mu\text{g/L} * 0,05\text{L}}{0,99999 \text{ g}}$$

$$\gamma (\text{Cd uzorak}) = 0,315 \mu\text{g/g} = 0,315 \text{ ppm}$$

Pošto su se radila dva ponavljanja za svaki uzorak kao konačna vrijednost koncentracije kadmija u biljnom materijalu uzima se srednja vrijednost prikazana u Tablici 8. Na slici 39. prikazana je ovisnost kadmija prisutnog u biljnom materijalu o koncentraciji otopina kadmija kojom su tretirani uzorci. Referentni uzorci su zalijevani vodovodnom vodom, dok sjeme nije tretirano ničim.

Tablica 8. Srednja koncentracija kadmija u biljnom materijalu

| Uzorak | γ (Cd uzorak), ppm |
|--------------|---------------------------|
| Sjeme | 0,287 |
| Referentna 1 | 0,575 |
| Cd 1 ppm | 52,349 |
| Cd 5 ppm | 53,676 |
| Cd 10 ppm | 88,774 |
| Cd 25 ppm | 240,568 |



Slika 39. Ovisnost koncentracije kadmija u biljnom materijalu o koncentraciji otopina kadmija kojom su tretirani uzorci

Iz Tablice 8. i slike 39. vidljivo je da koncentracije kadmija koje je biljka primila rastu. Koncentracija kadmija narasla je s 52,349 ppm na 240,568 ppm. Iz tablice je također vidljivo da uzorak čistog neobrađenog sjemena ipak sadrži 0,287 ppm kadmija. Iz grafa bi se moglo zaključiti da koncentracija kadmija u biljnom materijalu raste linearno, iako točka dva (uzorak koji je zalijevan otopinom kadmija koncentracije 1 ppm) malo odstupa od navedene činjenice.



Slika 40. Referentni uzorak 1 i 2 na dan sabiranja

Na slici 40. prikazan je izgled referentnih uzoraka na dan sabiranja. Uzorak Ref 2 bolje je razvilo korijenje nego uzorak Ref 1 i sa slike 19. (poglavlje 2.1.) vidljivo je da su uzorci bujni i zeleni.



Slika 41. Uzorak Cd 1 ppm i Cd 5 ppm na dan sabiranja

Sa slike 41. i slike 19. (poglavlje 2.1) vidljivo je da uzorci koji su zalijevani sa otopinom kadmija koncentracije 1 i 5 ppm nisu podlegli trovanju te su u zadovoljavajućem stanju s obzirom na referentni uzorak. Navedena koncentracija kadmija još nije postala toksična i biljka i dalje ima mogućnost upijanja. Također, usporedbom slike 40. i 41. vidljivo je da se kod uzorka Cd 1 bolje i gušće razvilo korijenje nego kod referentnih uzoraka. Uzorak koji je zalijevan sa otopinom kadmija koncentracije 1 ppm uspio je apsorbirati više kadmija nego uzorak koji je zalijevan s koncentracijom 5 ppm. Uzorak Cd 1 apsorbirao je 52,349 ppm kadmija, dok je uzorak Cd 5 upio 53,676 ppm kadmija.



Slika 42. Uzorak Cd 10 ppm i Cd 25 ppm na dan sabiranja

Sa slike 42. vidljivo je da ni uzorak Cd 10 nije podlegao toksičnom djelovanju kadmija, ali korijenje na dnu posudice nije bujno kao kod uzoraka Cd 1 i Cd 5. Uzorak Cd 10 uspio je upiti 88,774 ppm kadmija. Kod uzorka Cd 25 koncentracija otopine kadmija od 25 ppm počela je biti toksična. Sa slike 42. i slike 19. (poglavlje 2.1) vidljivo je da je uzorak na vrhu i dalje bujan, ali kada se pogleda u korijenje očito je da je biljka počela propadat. Također, boljim pregledom slike vidi se da su listovi sa strana polako počeli opadat i sve upućuje na činjenicu da je koncentracija od 25 ppm nakon 7 dana počela biti toksična za biljku. Uzorak Cd 25 uspio je upiti 240,568 ppm kadmija i još nije u potpunosti propao, ali pretpostavlja se da bi daljnjim zalijevanjem otopinom kadmija koncentracije 25 ppm biljka vrlo brzo propala.



Slika 43. Uzorak Cd 50 ppm na dan sabiranja

Za uzorak Cd 50 koncentracija otopine kadmija od 50 ppm već nakon trećeg dana je bila previsoka. Došlo je do propadanja biljke radi toga što biljka nije mogla apsorbirati tako visoku koncentraciju u tako kratkom periodu.

Da bi se biljka smatrala hiperakumulatorom kadmija mora imati sposobnost primiti više od $100 \mu\text{g g}^{-1}$, tj. 100 ppm kadmija.³³ Iz navedenog se vidi da se klice *Lepidium sativum*

L. može smatrati hiperakumulatorom kadmija zbog toga što je uzorak Cd 25 uspio primiti 240,568 ppm kadmija što je više od navedene koncentracije, dok je uzorak Cd 10 uspio primiti 88,774 ppm kadmija što je blizu granične vrijednosti od 100 ppm.

Budući da uzorci Cd 1, Cd 5 i Cd 10 nisu uspjeli apsorbirati koncentraciju od 100 ppm, kao rješenje predlaže se da se vrijeme uzgoja produži za još 7 dana i da se provjeri hoće li biljka i dalje moći izdržati koncentraciju kojom su zalijevane ili će propasti. Iz svega navedenog može se zaključiti da je *Lepidium sativum* L. potencijalni hiperakumulator kadmija.

4. ZAKLJUČAK

- U ovom radu istražen je utjecaj kadmija na glukozinolatni profil biljke *Lepidium sativum* L. iz porodice Brassicaceae kao i sposobnost hiperakumulacije kadmija.
- Glukozinolati su izolirani postupkom ekstrakcije, a potom desulfatizirani pomoću enzima sulfataze. Dobiveni desulfoglukozinolati su analizirani UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom.
- Priprema biljnog materijal koji je išao na AAS analizu se vršila žarenjem u peći i otapanjem u klorovodičnoj kiselini.
- UHPLC-DAD-MS/MS analizom desulfatiziranih produkata identificirani su glukotropeolin i 4-metoksiglukobrasicin. Glukotropeolin pripada grupi arilifatskih glukozinolata i pronađen je u svim uzorcima, dok se 4-metoksiglukobrasicin ubraja u heterociklične glukozinolate i ne nalazi se samo u sjemenu.
- Sjeme je pokazalo najvišu koncentraciju glukotropeolina ($282,08 \mu\text{mol g}^{-1}$), dok uzorak koji je zalijevan s otopinom kadmija 1 ppm ima najmanju koncentraciju ($190,96 \mu\text{mol g}^{-1}$). Koncentracija 4-metoksiglukobrasicina u referentnom uzorku je najveća ($1,18 \mu\text{mol g}^{-1}$), a u uzorku koji je zalijevan s otopinom kadmija koncentracije 25 ppm je najmanja ($0,39 \mu\text{mol g}^{-1}$). Klice zalijevane otopinom kadmija od 50 ppm nisu uspjele zato što je navedena koncentracija bila previsoka za biljku, a došlo je i do razvijanja plijesni.
- Sadržaj glukozinolata se nije značajno mijenjao s promjenom koncentracije otopine kadmija.
- Da bi se biljka smatrala hiperakumulatorom kadmija mora imati sposobnost primiti više od 100 ppm kadmija. Uzorak Cd 25 ppm uspio je apsorbirati 240,568 ppm što je više od tražene koncentracije.
- Uzorci Cd 1, Cd 5 i Cd 10 nisu uspjeli apsorbirati koncentraciju od 100 ppm te se kao rješenje predlaže produljenje vrijeme uzgoja za 7 dana i ponovna analiza.
- Iz navedenog može se zaključiti da se biljka *Lepidium sativum* L. može upotrebljavati kao hiperakumulator kadmija i da je visokotolerantna biljka.

5. LITERATURA

1. Flora Croatica, *Lepidium sativium* L.
URL:<https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=5920&taxon=Lepidium+sativium+L>. (preuzeto: 01.listopada 2021.)
2. Priroda i biljke, Sjetvena grbica – *Lepidium sativium*
URL: <https://www.plantea.com.hr/sjetvena-grbica/> (preuzeto: 02. listopada 2021.)
3. Agroklub, Grbica
URL:<https://www.agroklub.com/povrcarstvo/grbica-lisnato-povrce-koje-mozete-jesti-15-dana-nakon-sijanja/45120/> (preuzeto: 02. listopada 2021.)
4. Grlić Lj., *Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, Drugo izdanje*, August Cesarec Zagreb, 1990, str. 145-146.
5. Kreni zdravo, Klice – kako klijeti i uštedjeti?
URL: <https://www.krenizdravo.hr/prehrana/klice> (preuzeto: 02. listopada 2021.)
6. Vitamininoteka, Klice
URL: <https://vitamini.hr/blog/vitaminoteka/klice-3194/> (preuzeto: 02. listopada 2021.)
7. Zekić M., *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae, Doktorska disertacija*, Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2013.
8. Blažević I., *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae, Doktorska disertacija*, Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
9. Kopjar M., Šubari D., Piližota V., *Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi*, Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno - stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku (2012.) 1 (1) 22-35.
10. Blažević I., Montaut S., Burčul F., Rollin P., *Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential*. s.l. : Springer International Publishing, Switzerland, 2012.
11. Cristaldi A., Oliveri Conti G., Hea Jho E., Zuccarello P., Grasso A., Copat C., Ferrant M., *Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review*, Environmental Technology & Innovation 8 (2017) 309 - 326
12. Ali H., Khan E., Anwar Sajad M., *Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications*, Chemosphere 91 (2013) 869 – 881
13. Filipović I., Lipanović S., *Opća i anorganska kemija, Drugi dio*, Školska knjiga Zagreb, 1995, str. 1101

14. Arc Machines, Inc. (AMI), Cadmium In Welding, Avoiding Long Term Health Risks
URL:<https://resources.arcmachines.com/cadmium-in-welding-avoiding-long-term-health-risks-ami/> (preuzeto: 07. listopada 2021.)
15. California Office of Environmental Health Hazard Assessment, Cadmium
URL: <https://oehha.ca.gov/chemicals/cadmium> (preuzeto: 07. listopada 2021.)
16. Tolić A., *Kadmij kao onečišćivalo okoliša, Završni rad*, Zagreb: Geotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018
17. Vukšić N., Šperanda M., *Raspodjela teških metala (Cd, Pb, Hg, As) i esencijalnih elemenata (Fe, Se) u šumskom tlu i biljnim zajednicama državnog otvorenog lovišta „Krndija II“ XIV/23*, Šumarski list, 3 – 4 (2016): 147 - 153
18. Jerković I., Radonić A., *Interna skripta iz Praktikum iz organske kemije*, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2009.
19. Perković M., *Izolacija i kvantizacija glukozinolata iz biljaka Nasturtium officinale i Iberis umbellata*, *Diplomski rad*, Split: Kemijsko- tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2020.
20. Neseck B., *Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni*, *Diplomski rad*, Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2004.
21. Galić N., Drevenkar V., *Interna skripta iz Kromatografije*, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2006.
22. Luterotti S., *Uvod u kemijsku analizu, IX.1.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)*
23. Radić Nj., Kukoč Modun, L., *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga d.d., Zagreb, 2016.
24. Grosser K., van Dam N. M. A., *Straightforward Method for Glucosinolate Extraction and Analysis with High-pressure Liquid Chromatography (HPLC)*. *J. Vis. Exp.* (121), e55425, doi:10.3791/55425 (2017).
25. Pine S. H., *Organska kemija*. Zagreb : Školska knjiga, Zagreb, 1994.
26. Eurofins, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS)
URL:<https://www.eag.com/techniques/mass-spec/lc-ms-ms/> (preuzeto: 09. listopada 2021.)

27. Institut Ruđer Bošković, Vezani sustav tekućinska kromatografija visokog učinka-spektrometrija mase (hplc-ms/ms)
URL:<https://www.irb.hr/Gospodarstvo/Usluge-i-ekspertize/Vezani-sustav-tekucinska-kromatografija-visokog-ucinka-spektrometrija-mase-hplc-ms-ms>
(preuzeto: 09. listopada 2021.)
28. Wade L. G., ml., *Organska kemija*, Školska knjiga d.d., 7. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko), Zagreb, 2017.
29. Kukoč Modun L., *Spektroskopijske metode elementarne analize*, Interna skripta, Split: Kemijsko- tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2003.
30. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
31. Prirodoslovno matematički fakultet u Zagrebu, Analitička kemija II, Atomska spektroskopija
URL:https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/8_AK2_atom_spektr.pdf
(preuzeto: 10. listopada 2021.)
32. PerkinElmer instruments, The THGA Graphite Furnace – Techniques and Recommended Conditions, Ueberlingen, Federal Republic of Germany
33. Rascio N., Navari – Izzo F., *Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?*, Plant Science 180 (2011) 169 - 181