

Ispitivanje utjecaja željeza u uzgajanim klicama *Lepidium sativum* L. na sadržaj metala određenih atomskom apsorpcijom spektroskopijom i profil glukozinolata kvantificiranih tekućinskom kromatograf ...

Dujmović, Tea

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:167:109331>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**ISPITIVANJE UTJECAJA ŽELJEZA U UZGAJANIM KLICAMA *LEPIDIUM*
SATIVUM L. NA SADRŽAJ METALA ODREĐENIH ATOMSKOM
APSORPCIJSKOM SPEKTROSKOPIJOM I PROFIL GLUKOZINOLATA
KVANTIFICIRANIH TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE
DJELOTVORNOSTI**

DIPLOMSKI RAD

TEA DUJMOVIĆ

Matični broj: 121

Split, studeni 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

**ISPITIVANJE UTJECAJA ŽELJEZA U UZGAJANIM KLICAMA *LEPIDIUM*
SATIVUM L. NA SADRŽAJ METALA ODREĐENIH ATOMSKOM
APSORPCIJSKOM SPEKTROSKOPIJOM I PROFIL GLUKOZINOLATA
KVANTIFICIRANIH TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE
DJELOTVORNOSTI**

DIPLOMSKI RAD

TEA DUJMOVIĆ

Matični broj: 121

Split, studeni 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF IRON IN CULTIVATED BEAN
SPROUTS OF *LEPIDIUM SATIVUM* L. ON THE CONTENT OF METALS
DETERMINED BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY AND THE
PROFILE OF GLUCOSINOLATES QUANTIFIED BY HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY

DIPLOMA THESIS

TEA DUJMOVIĆ

Parent number: 121

Split, November 2021.

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada: je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun

Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag. chem.

ISPITIVANJE UTJECAJA ŽELJEZA U UZGAJANIM KLICAMA BILJKE *LEPIDIUM SATIVUM* L. NA SADRŽAJ METALA ODREĐENIH ATOMSKOM APSORPCIJSKOM SPEKTROSKOPIJOM I PROFIL GLUKOZINOLATA KVANTIFICIRANIH TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

Tea Dujmović, 121

Sažetak: Biljka *Lepidium sativum* L. je jednogodišnja kultura koja se na zapadu često koristi u ljudskoj prehrani radi dobrih svojstava, izdržljivosti i lakog uzgoja. U ovom radu je prikazan uzgoj klica biljke *Lepidium sativum* L. na vodenim otopinama željeza različitih koncentracija te je praćen njihov razvoj tijekom dva tjedna, a zatim je prikazana metoda pripreme biljnog materijala za analizu atomskim apsorpcijskim spektrometrom. Koristeći se navedenom tehnikom, određena je koncentracija željeza u klicama. Uočen je porast koncentracije željeza u uzgajanim klicama, u skladu s povećanjem koncentracije željeza u vodenim otopinama na kojima su biljke uzgajane.

U ovome radu izolirani su glukozinolati iz sjemena uzgojenih klica *Lepidium sativum* L. metodom ekstrakcije 70 %-tnim metanolom uz desulfataciju enzimom sulfataza te određeni UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom.

U uzorku klica obogaćenih vodenom otopinom željeza od 1 ppm u odnosu na referentni uzorak uočava se pad koncentracije glukotropeolina i povećanje 4-metoksiglukobrasicina. Nadalje, kod klica koje su uzgajane na vodenim otopinama željeza koncentracije 5 ppm i 10 ppm uočen je pad glukotropeolina kao i pad koncentracije 4-metoksiglukobrasicina. Kod klica uzgajanim na vodenoj otopini željeza koncentracije 25 ppm uočen je pad koncentracije glukotropeolina u odnosu na referentni uzorak kao i povećanje koncentracije 4-metoksiglukobrasicina.

Ključne riječi: Željezo, klice, *Lepidium sativum* L., atomska apsorpcijska spektroskopija, glukozinolati, UHPLC-DAD-MS/MS

Rad sadrži: 60 stranica, 44 slike, 7 tablica, 45 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 17.11.2021.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6.

Mentor: Lea Kukoč Modun, PhD, Assistant Professor

Technical assistance: Azra Đulović, MChem

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF IRON IN CULTIVATED BEAN SPROUTS OF *LEPIDIUM SATIVUM* L. ON THE CONTENT OF METALS DETERMINED BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY AND THE PROFILE OF GLUCOSINOLATES QUANTIFIED BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Tea Dujmović, 121

Abstract: The plant *Lepidium sativum* L. is an annual crop that is often used in the human diet in the West for its good properties, durability and ease of cultivation. In this paper, the cultivation of *Lepidium sativum* L. bean sprouts on aqueous solutions of iron of different concentrations is presented and their development is monitored for two weeks. The method of preparation of plant material for analysis by atomic absorption spectrometer is presented. Using the above mentioned technique the concentration of iron in the bean sprouts was determined. An increase in the concentration of iron in the grown bean sprouts was observed, in line with the increase in the concentration of iron in the aqueous solutions on which the plants were grown.

In this work, glucosinolates were isolated from the seeds of cultivated bean sprouts of *Lepidium sativum* L. by the method of extraction with 70% methanol with desulfation with the enzyme sulfatase and determined by UHPLC-DAD-MS / MS technique.

In a sample of bean sprouts grown on an aqueous solution of iron of 1 ppm compared to the reference sample, a decrease in the concentration of glucotropeolin and an increase in 4-methoxyglucobrasicin was observed. Furthermore, in bean sprouts grown on aqueous iron solutions with concentrations of 5 ppm and 10 ppm, a decrease in glucotropeolin as well as a decrease in the concentration of 4-methoxyglucobrasicin was observed. In bean sprouts grown on aqueous iron solution with a concentration of 25 ppm, a decrease in the concentration of glucotropeolin compared to the reference sample was observed, as well as an increase in the concentration of 4-methoxyglucobrasicin.

Keywords: Iron, bean sprouts, *Lepidium sativum* L., atomic absorption spectroscopy, glucosinolates, UHPLC-DAD-MS/MS

Thesis contains: 60 pages, 44 figures, 7 tables, 45 references

Original in: Croatian

Defence committee:

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

Defence date: 17.11.2021.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju i u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Lee Kukoč Modun, i neposrednim voditeljstvom Azre Đulović, mag. chem. u razdoblju od lipnja 2021. do listopada 2021. godine.

Rad je financiran od strane HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316)

ZAHVALA:

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Lei Kukoč Modun na strpljenju, pomoći i stručnim savjetima. Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Mariu Nikoli Mužeku i Azri Đulović, mag. chem. na pomoći pri izradi diplomskog rada te uloženom trudu i vremenu.

Na nezaboravnim trenucima tijekom studiranja zahvaljujem kolegama koji su ih takvima učinili.

Za kraj, hvala mojoj majci Ivani, braći Roku i Duji te Ljilji i Filipi koji su bili moja najveća podrška i oslonac za vrijeme studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA:

1. Uzgojiti klice biljke *Lepidium sativum* L., na vodenim otopinama željeza različitih koncentracija
2. Pripremiti biljni materijal za analizu na atomskom apsorpcijskom spektrometru
3. Odrediti sadržaj željeza u uzorcima biljke atomskom apsorpcijskom spektrometrijom
4. Izvesti zaključke o mogućoj hiperakumulaciji željeza u razmatranoj biljci *Lepidium sativum* L.
5. Pripremiti biljni materijal za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti
6. Kvantificirati glukozinolate u biljnom materijalu korištenjem HPLC-DAD-MS/MS
7. Razmotriti utjecaj bogaćenja klica željezom na sadržaj (profil) glukozinolata

SAŽETAK

Biljka *Lepidium sativum* L. je jednogodišnja kultura koja se na zapadu često koristi u ljudskoj prehrani radi dobrih svojstava, izdržljivosti i lakog uzgoja. U ovom radu je prikazan uzgoj klica biljke *Lepidium sativum* L. na vodenim otopinama željeza različitih koncentracija te je praćen njihov razvoj tijekom dva tjedna, a zatim je prikazana metoda pripreme biljnog materijala za analizu atomskim apsorpcijskim spektrometrom. Koristeći se navedenom tehnikom, određena je koncentracija željeza u klicama. Uočen je porast koncentracije željeza u uzgajanim klicama, u skladu s povećanjem koncentracije željeza u vodenim otopinama na kojima su biljke uzgajane.

U ovome radu izolirani su glukozinolati iz sjemena uzgojenih klica *Lepidium sativum* L. metodom ekstrakcije 70 %-tnim metanolom uz desulfataciju enzimom sulfataza te određeni UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom.

U uzorku klica obogaćenih vodenom otopinom željeza od 1 ppm u odnosu na referentni uzorak uočava se pad koncentracije glukotropeolina i povećanje 4-metoksiglukobrasicina. Nadalje, kod klica koje su uzgajane na vodenim otopinama željeza koncentracije 5 ppm i 10 ppm uočen je pad glukotropeolina kao i pad koncentracije 4-metoksiglukobrasicina. Kod klica uzgajanim na vodenoj otopini željeza koncentracije 25 ppm uočen je pad koncentracije glukotropeolina u odnosu na referentni uzorak kao i povećanje koncentracije 4-metoksiglukobrasicina.

Ključne riječi: Željezo, klice, *Lepidium sativum* L., atomska apsorpcijska spektroskopija, glukozinolati, UHPLC-DAD-MS/MS

SUMMARY

The plant *Lepidium sativum* L. is an annual crop that is often used in the human diet in the West for its good properties, durability and ease of cultivation. In this paper, the cultivation of *Lepidium sativum* L. bean sprouts on aqueous solutions of iron of different concentrations is presented and their development is monitored for two weeks. The method of preparation of plant material for analysis by atomic absorption spectrometer is presented. Using the above mentioned technique the concentration of iron in the bean sprouts was determined. An increase in the concentration of iron in the grown bean sprouts was observed, in line with the increase in the concentration of iron in the aqueous solutions on which the plants were grown.

In this work, glucosinolates were isolated from the seeds of cultivated bean sprouts of *Lepidium sativum* L. by the method of extraction with 70% methanol with desulfation with the enzyme sulfatase and determined by UHPLC-DAD-MS / MS technique.

In a sample of bean sprouts grown on an aqueous solution of iron of 1 ppm compared to the reference sample, a decrease in the concentration of glucotropeolin and an increase in 4-methoxyglucobrasicin was observed. Furthermore, in bean sprouts grown on aqueous iron solutions with concentrations of 5 ppm and 10 ppm, a decrease in glucotropeolin as well as a decrease in the concentration of 4-methoxyglucobrasicin was observed. In bean sprouts grown on aqueous iron solution with a concentration of 25 ppm, a decrease in the concentration of glucotropeolin compared to the reference sample was observed, as well as an increase in the concentration of 4-methoxyglucobrasicin.

Keywords: Iron, bean sprouts, *Lepidium sativum* L., atomic absorption spectroscopy, glucosinolates, UHPLC-DAD-MS/MS

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO	2
1.1 Brassicaceae	2
1.2. <i>Lepidium sativum</i> L. (Kres salata).....	3
1.2.1. Općenito o klicama i njihovom uzgoju	5
1.2.2. Hranjiva vrijednost	6
1.3. Glukozinolati.....	8
1.3.1. Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata.....	9
1.4. Metode izolacije	10
1.4.1. Ekstrakcija.....	10
1.4.2. Ekstrakcija glukozinolata.....	10
1.5. Kromatografija	11
1.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	13
1.5.2. HPLC-MS	14
1.6. Identifikacija glukozinolata.....	16
1.7. Spektroskopija.....	17
1.7.1. Elektromagnetski spektar	17
1.7.2. Apsorpcija zračenja	18
1.7.3. Odnos između apsorpcije i koncentracije: Lambert Beerov zakon	19
1.7.4. Atomska apsorpcijska spektroskopija.....	20
1.7.4.1. Elektrotoplinska atomska apsorpcijska spektrometrija (ET AAS).....	21
1.7.5. Instrumenti u atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji	23
1.7.6. Priprema uzorka za analizu	27
1.8. Željezo	28
1.8.1. Željezo u biljkama	28
2. EKSPERIMENTALNI DIO – MATERIJALI I METODE.....	30
2.1. Protokol uzgoja biljke <i>Lepidium sativum</i> L. – Hidroponski	30
2.2. Priprema biljnog materijala za analizu	32
2.2.1. Ekstrakcija glukozinolata uz desulfataciju.....	34
2.2.1.1. Priprema kolona i reakcijskih tuba	34
2.2.1.2. Ekstrakcija glukozinolata iz biljnog materijala	35
2.2.1.3. UHPLC-DAD-MS/MS analiza.....	36

2.3. Spaljivanje uzoraka-protokol	38
2.4. Analiza atomskim apsorpcijskim spektrometrom	40
2.4.1. Priprema standardnih otopina željeza atomskom apsorpcijskom spektroskopijom	40
3. REZULTATI I RASPRAVA	43
3.1. UHPLC-DAD-MS/MS analiza	44
3.1.1. Spektri masa i UV spektri	47
3.2. Krivulja umjeravanja za određivanje koncentracije željeza atomskom apsorpcijskom spektroskopijom.....	51
3.2.1. Koncentracije željeza u uzgojenim klicama.....	53
4. ZAKLJUČAK	56
5. LITERATURA.....	58

UVOD

Biljka *Lepidium sativum* L. pripada porodici kupusnjača (Brassicaceae). Među važnijim spojevima koji se nalaze u većini biljaka ove porodice su glukozinolati. Glukozinolati su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju iz aminokiselina, biološki su stabilni i neaktivni spojevi, a njihovom razgradnjom nastaju hlapljivi sumporovi spojevi koji imaju niz ljekovitih djelovanja. Dokazivanje i određivanje glukozinolata provedeno je primjenom analitičke tehnike, tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti s tandemskim masenim detektorom.

Klice *Lepidium sativum* L., poznate su po svojim svojstvima pročišćavanja i intenzivnom, ljutom okusu. Razna istraživanja pokazuju da se usporedbom nutritivnih vrijednosti jednake količine sjemenki, klica i povrća odnosno žitarica dolazi do spoznaja kako klice imaju znatno viši udio vitamina C od sjemenki, pa čak i od povrća ili žitarica u koje bi tek trebale izrasti. Njihova je energetska vrijednost niža nego sjemenki. Ujedno, sadrže viši udio proteina, vitamina B skupine i željeza od povrća ili žitarica.

Ranijim istraživanjima je utvrđeno da *Lepidium sativum* L. ima mogućnost akumuliranja teških metala. Problematičnost ovog akumuliranja je u samoj toksičnosti teških metala te radi njene konzumne vrijednosti, utjecaja na ljudski organizam.

Željezo, kemijske oznake Fe, spada u prijelazne metale osme skupine periodnog sustava elemenata. Željezo, kada je potpuno čisto, srebrenkastog je sjaja i mekano. Željezo hrđa na vlažnom zraku i otapa se u razrijeđenim kiselinama. U prirodi najčešće dolazi kao mineral magnetit.

Željezo ispunjava ključnu ulogu u metabolizmu biljke, bitno je za proizvodnju klorofila. Biljka ga može pravilno apsorbirati samo u određenim oblicima i pod pravim uvjetima. Sadržaj željeza u uzgojenim klicama biljke *Lepidium sativum* L. određen je atomskom apsorpcijskom spektroskopijom.

1. OPĆI DIO

1.1 Brassicaceae

Porodica Brassicaceae obuhvaća više od 300 rodova i više od 3000 vrsta u svijetu. Većina uspijeva na području umjerene klime, ali ih ima i u tropskom i u suptropskom području. Najveći dio vrsta iz ove porodice su povrtne kulture, osim toga ima uljarica, začinskih i ukrasnih biljaka. Najvažniji je rod *Brassica* s oko 40 vrsta među kojima je brojno lisnato i korjenasto povrće. Za cijelu porodicu je karakteristična ljutina koja dolazi od glukozinolata, koji djelovanjem enzima mirozinaza daje gorško-ljuti okus.[1]

Podrijetlo:

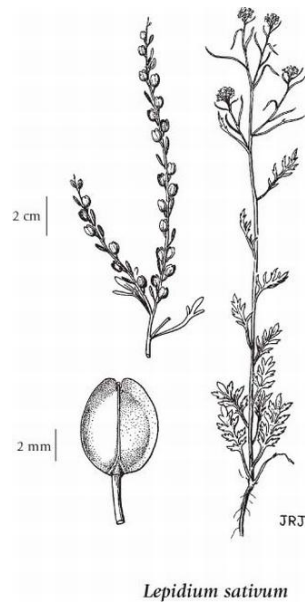
Većina vrsta iz roda *Brassica* potječe iz Sredozemlja, Kine i Japana. Vrste su dvogodišnje, iznimno jednogodišnje zeljaste biljke, vjerojatno nastale mutacijama, prilagodbama ekološkim uvjetima i djelovanjem čovjeka.[1]

Zajedničke karakteristike:

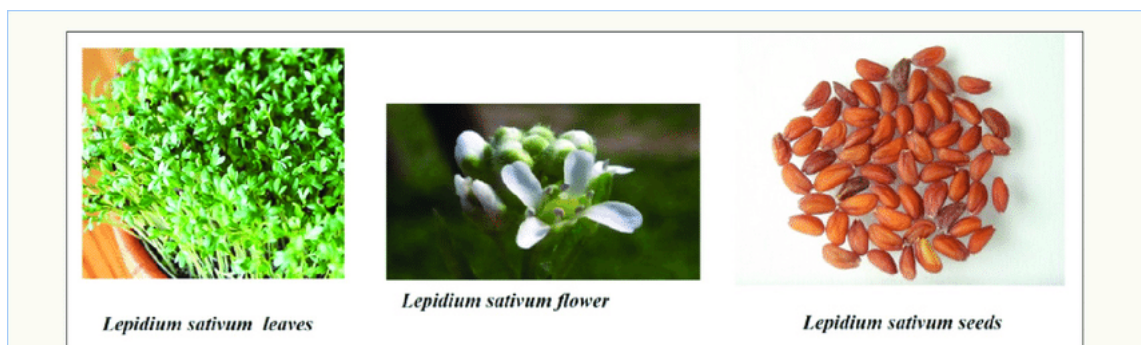
Cvjetovi imaju:

- 4 lapa,
- 4 žute latice,
- 6 prašnika (2 vanjska kraća i 4 unutrašnja duža),
- dvogradnu plodnicu.

Plod je komuška s unutrašnjom pregradom, sjeme je sitno (220 000 - 350 000 sjemenki u 1 kg sjemeni), okruglog oblika i sivo-smeđe boje. U početku vegetativne faze formira se rozeta krupnog debelog lišća prekrivenog voštanom prevlakom, a u generativnoj fazi razgranata cvjetna stabljika, koja na vrhovima grana nosi grozdaste cvatove. Biljke iz porodice Brassicaceae sadrže brojne nehlapljive spojeve velike raznovrsnosti. Važni spojevi koji se nalaze u svim biljkama ove porodice su glukozinolati.[1]



Slika 1.1. Izgled biljke *Lepidium sativum* L.[2]



Slika 1.2. Izgled biljke i sjemena.[3]

1.2. *Lepidium sativum* L. (Kres salata)

CARSTVO: Plantae

RED: Brassicales

PORODICA: Brassicaceae

ROD: *Lepidium*

VRSTA: *Lepidium sativum* L.

DIMENZIJE: 15-45 cm visine

NARODNA IMENA: sitna grbašica, vrtna grbica, grbanj, grbač, poljska kreša...

UPOTREBA: nadzemni dio biljke, listovi, nedozreli plodovi, sjemenke

Kres salata (*Lepidium sativum* L.) brzo je rastuća jednogodišnja biljka porijeklom iz Egipta i zapadno od Azije, a trenutno u novije vrijeme se uzgaja u cijelom svijetu.[4] Kres salata (*Lepidium sativum* L.) iz obitelji kupusnjača (Brassicaceae) široko se uzgaja u Indiji, Europi i Sjedinjenim Državama. Koristi se kao ljekovita biljka još od vedskog doba. Njeno sjeme, ulje i prah sadrže značajnu količinu proteina, masti, minerala, vlakana i fitokemikalija, koji su ugrađeni u mnoga funkcionalna pića i hranu.[5]

Biljka je uspravna, gola, zeljasta i raste do visine od 15–45 cm (slika 1.1.). Ima male bijele cvjetove u dugim grozdovima, a mahune su široke ili jajolike, zaobljene, eliptične, isturene, na vrhu zarezane i krilate. Vrtne kreše može se sijati i brati nekoliko puta tijekom godine, iako su siječanj, veljača i studeni najprikladniji mjeseci u godini za sjetvu u mediteranskoj klimi.[6]

Sjeme vrtne kreše posjeduje antioksidativno djelovanje.[7]



Slika 1.3. Kres salata (*Lepidium sativum* L.).[8]

Izotiocijanati su važni biokemijski agensi sa stajališta ljudskog zdravlja, a benzil-izotiocijanat je prisutan u dovoljnoj količini u vrtnoj kreši.[9]

Sjeme se od davnina u Indiji koristi u tradicionalnoj medicini.[10] Različite bolesti poput astme, kašlja s iskašljavanjem, proljeva, dizenterije, gube, kožnih bolesti, dispepsije, lumbaga, leukoreje, skorbuta i slabosti sjemena liječili su se sjemenom vrtne kreše. Dodaje se prehrani dojilja kako bi se povećalo lučenje mlijeka tijekom postnatalnog razdoblja, a također se koristi za liječenje proljeva i dizenterije.[11, 12]

Ulje sjemenki vrtne kreše ima uravnoteženu količinu polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) (46,8%) i mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) (37,6%). Sadrži prirodne antioksidanse poput vitamina A, E i eugenola koji pomažu u zaštiti stanica od oštećenja slobodnim radikalima.[13]

Eugenol štiti ulje od oksidacije i izazivanja užeglosti. Prijavljeno je da sjemenke sadrže 22,5% proteina, 27,5% masti, 30% prehrambenih vlakana i 1193 mg/100 g kalija.[14] Stoga se potencijalno može koristiti kao funkcionalna hrana.



Slika 1.4. Sjeme kres salate [15]

1.2.1. Općenito o klicama i njihovom uzgoju

U vrijeme klijanja, u zdravoj sjemenci aktiviraju se različiti metabolički putevi. Dio sadržaja šećera pretvara se u vitamin C, koji služi kao antioksidans i štiti od štetnih utjecaja koji prijete u okolišu. Također, započinje sinteza različitih enzima, od kojih su mnogi nužni u metabolizmu kisika koji je klici važan u svijetu nad zemljom. Usporedbom nutritivnih vrijednosti iste količine sjemenki, klica i povrća došlo se do zaključka da klice imaju znatno viši udio vitamina C. Njihova je energetska vrijednost niža nego sjemenki. Ujedno, sadrže viši udio proteina, vitamina B skupine i željeza od povrća.

Postoje povijesni zapisi o korištenju klica u zdravstvene svrhe upravo zbog visoke koncentracije vitamina C.[16]

Za klijanje treba osigurati određene uvjete – prikladnu temperaturu i odgovarajuću razinu vlage. Temperatura bi trebala biti između 19 i 25 °C. Uobičajeno namakanje nije potrebno, sjeme je dovoljno navlažiti i ujednačeno rasprostrijeti po željenoj površini podalje od izravne svjetlosti do pojave prvih listića. Klice su spremne za 5 do 6 dana te se mogu držati u hladnjaku idućih tjedan dana do konzumacije.[16]

Budući da su klice ugrožene od opasnosti iz okoliša, u trenutku klijanja sintetiziraju kemijske spojeve koji im služe u svrhu obrane, te se stoga nazivaju tvornicama fitokemikalija.

1.2.2. Hranjiva vrijednost

Bogati kemijski sastav i visoka hranjiva vrijednost su odlučujući čimbenici odgovorni za zdravstvene prednosti kres salate. U 100 grama salate nalazi se najviše kalija (550 mg), zatim slijedi kalcij (250 mg), magnezij (40 mg), fosfor (38 mg) i željezo (2,9 mg). Uz navedene minerale, u kres salati se mogu naći i razni vitamini kao što su: vitamin B, vitamin B2, vitamin B3 i vitamin C.[17]

Tablica 1.1. Nutritivni sastav klica *Lepidium sativum* L. u 100 g [17]

ENERGETSKA VRIJEDNOST	134 kJ (32 kcal)
Ugljikohidrati	5,5 g
Šećeri	4,4 g
Proteini	2,6 g
Vlakna	1,1 g
Beta karoten	4150 µg
Leutin i zeakasantin	12500 µg
Vitamin A	346 µg
Vitamin B1	0,08 mg
Vitamin B2	0,26 mg
Vitamin B3	1 mg
Vitamin B5	0,247 mg
Folna kiselina	80 µg
Vitamin B6	0,247 mg
Vitamin C	67 mg
Vitamin E	0,7 mg
Vitamin K	541,9 µg
Kalij	606 mg
Kalcij	81 mg
Fosfor	76 mg
Magnezij	38 mg
Željezo	1,3 mg
Mangan	0,553 mg

U ovom radu klice biljke *Lepidium sativum* L. uzgajane su na vodenim otopinama različitih koncentracija željeza (1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm i 50 ppm), te je promatran rast klica, određivana koncentracija željeza u biljnom materijalu i ispitan profil glukozinolata.

1.3. Glukozinolati

Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka koji sadrže sumpor i dušik uobičajeni u *Brassicaceae* i srodnim biljnim obiteljima. Strukturu glukozinolata predložili su Ettliger i Lundeen godine 1956. U biljkama su to stabilni spojevi sve dok ne dođu u kontakt s endogenom β -tioglukozidazom (EC 3.2.3.1) naziva **mirozinaza**. Kada dođe do poremećaja tkiva, glukozinolati se oslobađaju i na mjestu oštećenja postaju hidrolizirani mirozinazom. Kemijska priroda produkata hidrolize ovisi o strukturi bočnog lanca glukozinolata, biljnim vrstama i uvjetima djelovanja.[18]

Biosinteza glukozinolata sastoji se od tri faze:

1. Produženje lanca aminokiselina, pri čemu su dodatne metilenske skupine uvučene u bočni lanac
2. Pretvaranje aminokiselinskog dijela u strukturu jezgre glukozinolata
3. Naknadne izmjene bočnog lanca

Biodostupnost glukozinolata:

Razumijevanje i poznavanje biodostupnosti, transporta i metabolizma glukozinolata nakon konzumiranja povrća iz porodice *Brassicaceae* neophodno je za razumijevanje mehanizma njihovog zaštitnog, antioksidacijskog djelovanja. Da bi imale određenu aktivnost mnoge tvari moraju biti apsorbirane u ljudskom tijelu i moraju doći do ciljanog tkiva u određenoj dozi i u aktivnom obliku, odnosno moraju biti biodostupne u tijelu. "Biodostupnost nutrijenta" se definira kao dio probavljenog nutrijenta koji udovoljava funkcionalnim zahtjevima u određenom tkivu. Brojni vanjski i unutarnji parametri utječu na oslobađanje iz matice hrane, apsorpciju, distribuciju, metabolizam i izlučivanje bioaktivnih tvari kao što su glukozinolati i njihovi razgradni produkti.[19]

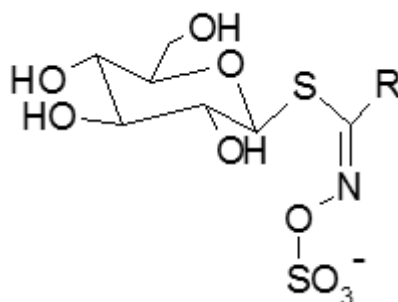
Prvi važan korak u biodostupnosti je oslobađanje aktivnog sastojka i otapanje u kompleksnoj matici hrane i probavnim sokovima. Kao što je već istaknuto za biološki utjecaj važniji su produkti hidrolize nego sami glukozinolati.[19]

Kada je mirozinaza prisutna u hrani, glukozinolati se vrlo brzo hidroliziraju u tankom crijevu čovjeka. Ako se mirozinaza deaktivira, npr. kuhanjem povrća prije same konzumacije, može se očekivati da će ionizirani glukozinolati doći do debelog crijeva gdje se mogu metabolizirati uz pomoć bakterijskih enzima. Djelovanjem mirozinaze se oslobađa glukoza i drugi razgradni produkti, uključujući i tiocijanate. Glukozinolati se

razgrađuju pomoću mirozinaze iz povrća u tankom crijevu ili djelovanjem bakterijske mirozinaze u debelom crijevu. Metaboliti nastali razgradnjom se mogu dokazati u urinu 2-3 sata nakon konzumacije povrća iz porodice Brassicaceae.[20]

1.3.1. Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata

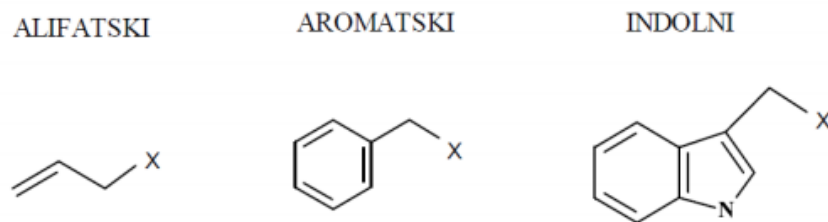
Glukozinolati su grupa organskih aniona koji se iz biljaka izoliraju kao kalijeve i natrijeve soli.[21]



Slika 1.5. Opća struktura glukozinolata

Po kemijskoj strukturi glukozinolati su β -tioglukozid-N-hidroksisulfati kod kojih je glukoza i sulfatna skupina vezana na aglukon koji se sintetizira iz aminokiselina i njihovih analoga. Bočni lanac kod glukozinolata je promjenjiv, određen je aminokiselinom, a po njemu se glukozinolati međusobno razlikuju.

Opća struktura glukozinolata je prikazana na slici 1.5. Obzirom na bočni lanac, glukozinolati se mogu podijeliti na alifatske, arilalifatske i heterocikličke (indolne) glukozinolate. Ako aglukonski lanac potječe od aminokiseline alanin, leucin, vanilin, izoleucin ili metionin tada se radi o alifatskim glukozinolatima. Kod aromatskih (arilalifatskih) glukozinolata, aglukonski prekursori su aminokiseline fenilalanin ili tirozin, dok je kod indolnih aminokiselina triptofan. Najbrojniji glukozinolati su oni koji sadrže nerazgranate ili razgranate alifatske bočne lance. Mnogi od njih u bočnom lancu sadrže dvostruke veze (olefini), hidroksilne ili karbonilne skupine te kovalentno vezani sumpor. Najveća pojedinačna grupa (jedna trećina svih glukozinolata) u bočnom lancu sadrži atom sumpora različitih oksidacijskih stanja, kao npr. metilsulfanilalkil, metilsulfinilalkil ili metilsulfonilalkil. Osim podjele s obzirom na aminokiselinu koja je vezana na bočni lanac, glukozinolati se mogu razlikovati i prema supstituentima na glukonskom dijelu npr. cimetni, benzolni.[21]



Slika 1.6. Primjeri struktura glukozinolata (x = glukozinolatni dio)

1.4. Metode izolacije

Metode izolacije odabiru se tako da se osigura izolacija određenog spoja ili spojeva s minimalnim gubitcima i bez nastanka artefakata. Različite metode izolacije se upotrebljavaju kako bi se upoznala kemijska priroda spojeva koji su u biljkama. Najčešće korištene metode izolacije su destilacija i ekstrakcija. Ipak, bitno je naglasiti da se danas upotrebljavaju i modernije metode kao što su mikrovalna i ultrazvučna ekstrakcija.[22]

1.4.1. Ekstrakcija

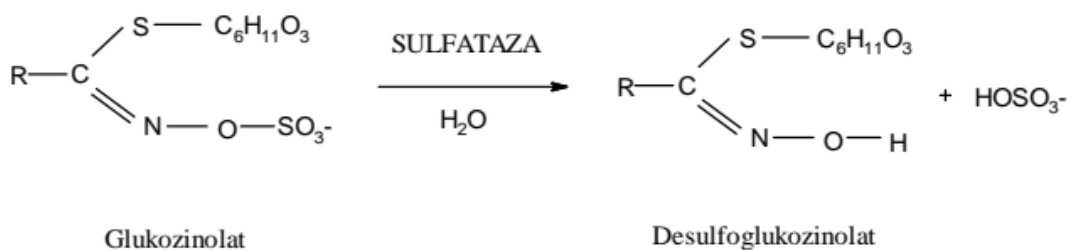
Ekstrakcija je analitička metoda razdjeljivanja komponenti uzorka (vodena otopina, suspenzija, emulzija, ili smjesa krutna) uz pomoć otapala različite polarnosti. Najčešće korištena otapala su voda, dietil-eter, diklormetan, pentan. Ekstrakcija se primjenjuje za izdvajanje željenih komponenti bez korištenja visokih temperatura zbog prisutnosti termolabilnih tvari, za biljni materijal koji sadrži male količine hlapljivih sastojaka, za sastojke dobro topive u vodu, kao i za cvjetove koji sadrže vrlo fine mirisne komponente.[22, 23]

Uz klasične metode ekstrakcije, danas su sve više u upotrebi i moderne metode poput ultrazvučne i mikrovalne ekstrakcije te ekstrakcije superkritičnim i subkritičnim otapalima.[22]

1.4.2. Ekstrakcija glukozinolata

Danas je poznata i metoda ekstrakcije glukozinolata iz biljnog materijala, koja uključuje ekstrakciju 70%-tnim metanolom, enzimsku desulfatizaciju i HPLC analizu dobivenih desulfoglukozinolata. Desulfatizaciju kataliziraju enzimi **sulfataze** koji spadaju u

porodicu esteraza, na način da odcjepljuju sulfatni ion iz molekule glukozinolata što dovodi do nastanka desulfoglukozinolata.[24, 25]



Slika 1.7. Shema desulfatacije glukozinolata [26]

1.5. Kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja komponenata smjese na temelju različite raspodjele komponenata između dviju faza, nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne).

Najraniju povijest kromatografije zadužio je ruski botaničar i biokemičar Mihail Semjonovič Cvet, koji je 1906. godine objavio rad u kojemu je opisao prvi kromatografski eksperiment. U prvom kromatografskom eksperimentu Cvet je razdvojio različito obojene pigmente iz biljnih ekstrakata. Koristio se staklenom kolonom, napunjenom kalcijevim karbonatom koji je činio nepokretnu (stacionarnu) fazu, a za pokretnu (mobilnu) fazu koristio se eterom.[27]

Cvet je tehniku, čiji je razvoj započeo, nazvao kromatografijom, a od grčkih riječi *chroma* (boja) i *graphein* (pisati) sastavio je vrlo opisan naziv – „ispis bojama“, što je njegov prvi eksperiment uistinu i bio.[27]

Postoji više podjela kromatografskih tehnika. Jedna od osnovnih podjela jest s obzirom na način ostvarivanja kontakta između stacionarne i mobilne faze, prema kojemu se razlikuju kolonska i plošna kromatografija.[27]

- U kolonskoj kromatografiji nepokretna se faza nalazi u uskoj cjevčici (koloni) kroz koju prolazi pokretna faza djelovanjem gravitacije ili pod utjecajem primijenjenog tlaka.
- Pri plošnoj kromatografiji nepokretna je faza kromatografski papir ili sloj sorbensa nanesen na čvrsti nosač (staklenu, metalnu ili plastičnu pločicu).

Česta je i podjela s obzirom na agregacijsko stanje pokretne faze. Kod plinske kromatografije pokretna faza je inertni plin, a kod tekućinske kromatografije pokretna je faza tekućina male viskoznosti. Razlikuje se još i fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima kod koje je pokretna faza gusti plin (fluid) iznad svoje kritične temperature i tlaka.[27]

S obzirom na prirodu ravnoteže između mobilne i stacionarne faze, kromatografske se tehnike mogu podijeliti na: razdjelnu kromatografiju, adsorpcijsku kromatografiju, afinitetnu kromatografiju, kromatografiju isključenjem i kromatografiju ionskom izmjenom.[27]

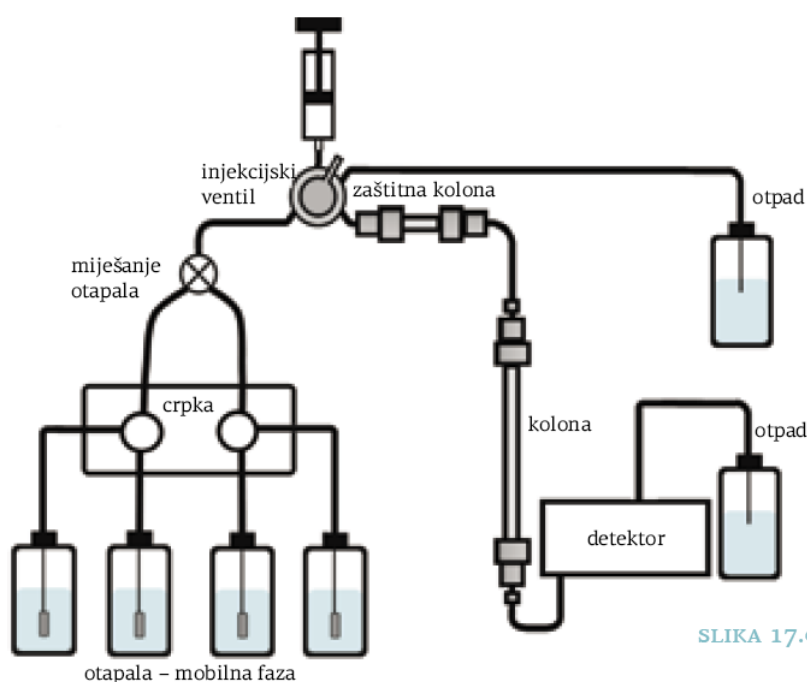
- Pri razdjelnoj kromatografiji, ravnoteža se uspostavlja između dviju tekućina, što znači da je i nepokretna faza tekućina vezana na inertni čvrsti nosač. S druge strane, pokretna faza može biti i plin pa se ravnoteža uspostavlja između plina i tekućine. Postoje dva tipa razdjelne kromatografije: kromatografija normalnih faza i kromatografija obratnih faza. Pri kromatografiji normalnih faza nepokretna je faza polarnija od pokretne faze te služi za zadržavanje polarnih komponenata uzorka, dok se nepolarne komponente eluiraju s kolone. Kod kromatografije obratnih faza pokretna je faza polarnija od nepokretne faze, zbog čega se nepolarne komponente duže zadržavaju, dok se polarne brzo eluiraju s kolone.
- Pri adsorpcijskoj kromatografiji ravnoteža se uspostavlja između tekućine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu za površinu adsorbensa.
- Kod afinitetne kromatografije na površini čvrste faze nalaze se različite funkcijske skupine s definiranim prostornim rasporedom. Do vezanja dolazi zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze.
- Pri kromatografiji isključenjem nepokretna je faza materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženih adsorpcijskih svojstava, a naziva se molekulskim sitom. Odjeljivanje molekula temelji se na razlikama u molekulskim masama i volumenu.
- Kod kromatografije ionskom izmjenom na nepokretnoj fazi kovalentno su vezane električno nabijene funkcijske skupine. Suprotno nabijene čestice iz

uzorka vezuju se za funkcijske skupine elektrostatskim silama. Pokretna je faza u ovom slučaju tekućina.[27]

1.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, tekući se uzorak injektira u tekuću pokretnu fazu. Pokretna faza nosi uzorak kroz kromatografsku kolonu te se komponente uzorka međusobno odjeljuju na temelju njihove mogućnosti raspodjele između pokretne i nepokretne faze. Vrijeme zadržavanja komponenti određeno je na osnovi njihove interakcije s pokretnom i nepokretnom fazom. Prema mehanizmu odjeljivanja razlikuju se adsorpcijska, razdjelna, ionsko-izmjenjivačka, afinitetna kromatografija i kromatografija isključenjem.[27]

Instrumentacija se sastoji od četiri osnovna dijela: sustava za opskrbu pokretnom fazom, dijela za injektiranje uzorka, kolone i detektora (slika 1.8.).



SLIKA 17.9. Shematski prikaz tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

Slika 1.8. Shematski prikaz HPLC uređaja [27]

1.5.2. HPLC-MS

Kombinacija kromatografije sa spektrometrijom je prvi put prijavljena 1967. godine, a prvi LC-MS sustav uveden je 1980-ih. LC-MS je analitička kemijska tehnika koja kombinira mogućnosti razdjeljivanja korištenjem tekućinske kromatografije s kvalitativnom i kvantitativnom analizom masenom spektrometrijom. LC-MS sadrži sklop tekućinske kromatografije, jedinicu za generiranje iona / izvor ionizacije, analizator mase i uređaj za prikupljanje podataka.

Komponente uzorka su razdvojene na koloni tekućinske kromatografije te su raspršene u izvor iona pri atmosferskom tlaku, gdje se prevode u ione u plinskoj fazi. Analizator mase se potom koristi za odabir u skladu s omjerom mase i naboja iona. Detektor broji ione koji izlaze iz masenog analizatora, a također može pojačati signal. Maseni spektar (prikaz ionskog signala u funkciji omjera mase i naboja), koristi se za određivanje elementarne prirode uzorka, mase čestica i molekula te za razjašnjenje kemijske strukture molekula.[28, 29]

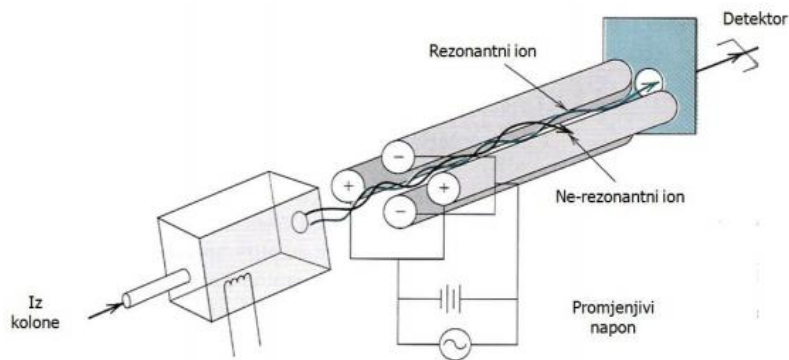


Slika 1.9. UHPLC-DAD-MS/MS uređaj

Kvadropolni analizator mase:

Kvadropol (slika 1.10.) i trostruki kvadropoli su najčešće korišteni maseni analizatori jer su jednostavni za rad i pokrivaju široki raspon masa (10 do 4000 A.M.U./ jedinica atomske mase). Kvadropol daje dobru linearnost za kvantitativni rad i dobru razlučivost (do 4000), kvalitetu spektra mase, brzinu skeniranja (5000 A.M.U u sekundi) i točnost mase (0,1 do 0,2 A.M.U.)

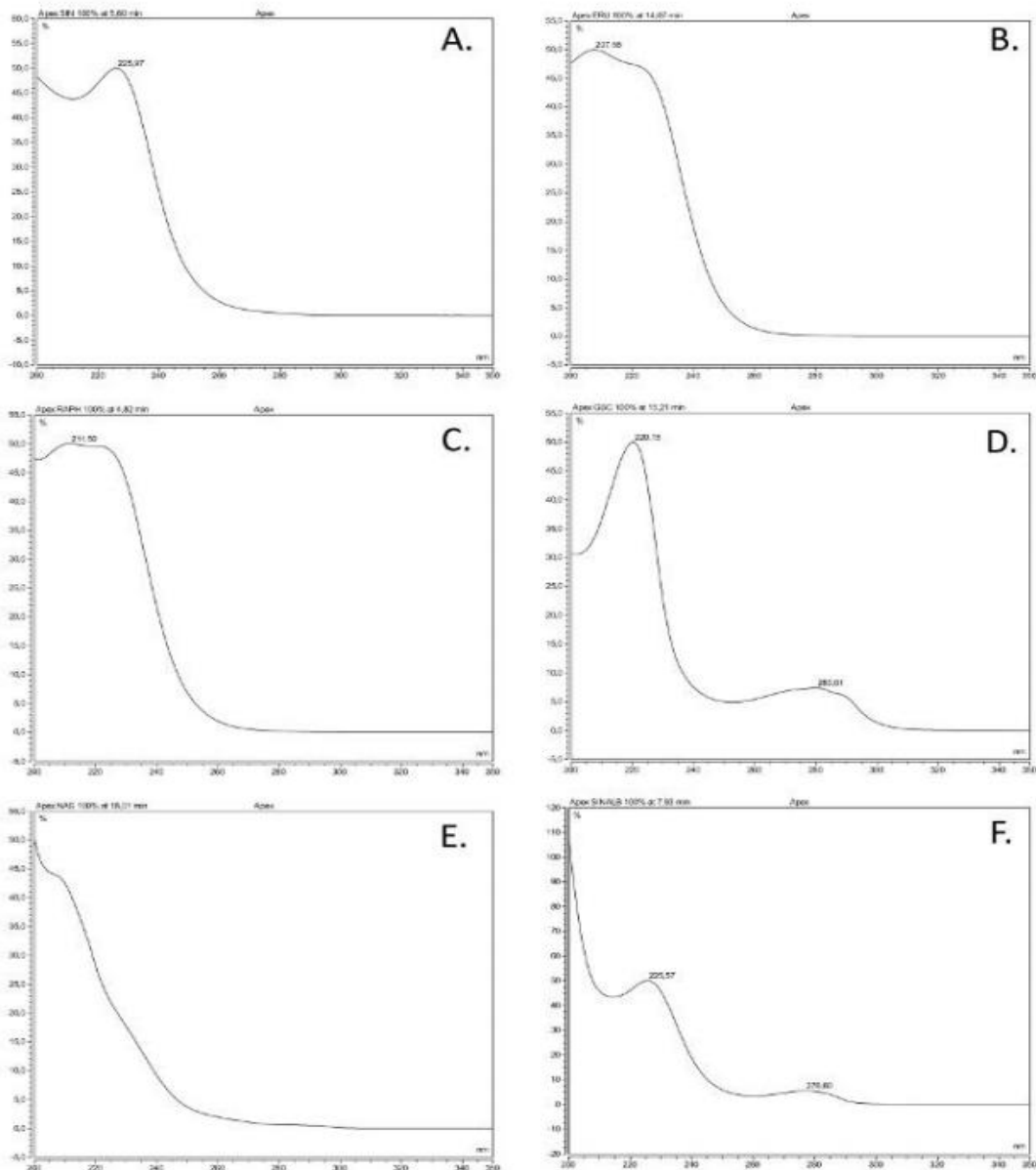
Princip rada uključuje korištenje električnih polja za odvajanje iona na temelju omjera mase i naboja kada oni prolaze duž središnje osi četiri paralelne jednako udaljene šipke. Ioni su odvojeni u kvadropolu na temelju stabilnosti njihovih putanja u oscilirajućem električnom polju koje se primjenjuje na šipke. Kvadropol se sastoji od dva para metalnih šipki. Svaki suprotni par šipki električno je spojen, a između se primjenjuje radiofrekvencijski (RF) napon. Istosmjerni napon je zatim superponiran na RF napon. Ioni putuju niz kvadropol između šipki. Samo ioni određenog omjera mase i naboja (m/z) doći će do detektora za zadani omjer napona. Ostali ioni imaju nestabilne putanje i stoga se sudaraju sa šipkama. To omogućuje odabir iona s određenim m/z i omogućuje operateru skeniranje raspona od m/z -vrijednosti stalnim mijenjanjem primijenjenog napona.[30]



Slika 1.10. Shema kvadropolnog spektrometra masa [31]

1.6. Identifikacija glukozinolata

Nakon razdvajanja u HPLC-u glukozinolati se mogu identificirati uspoređivanjem vremena zadržavanja spoja i UV spektra s poznatim standardima glukozinolata. Na slici 1.11. prikazan je UV apsorpcijski spektar (200-350 nm) šest komercijalno dostupnih desulfoglukozinolata, koji su predstavnici najčešćih strukturnih klasa tih spojeva. Dano je najčešće ime, strukturno ime (u zagradama) i ime strukturne klase.[32]



Slika 1.11. UV spektar najčešćih klasa glukozinolata [32]

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

1.7. Spektroskopija

Spektroskopske analitičke tehnike temelje se na mjerenju količine zračenja koje emitiraju ili apsorbiraju molekulske ili atomske vrste od interesa. Primjer emisijske tehnike je plamena emisijska spektrometrija (PES). Primjeri apsorpcijskih tehnika su atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS) i atomska fluorescentna spektrometrija (AFS).

1.7.1. Elektromagnetski spektar

U atomu postoje unutarnji i vanjski elektroni. Prijelaz unutarnjih elektrona u više energijsko stanje mogu izazvati zračenja visokih energija (x-zračenja) dok prijelaz vanjskih elektrona u više energijsko stanje izaziva zračenje ultraljubičastog i vidljivog dijela spektra. Apsorpcijom u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra (190-860 nm), dolazi do prijelaza valentnih elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje. Prilikom prolaska svjetlosti kroz uzorak, atomi u uzorku apsorbiraju dio ulaznih fotona te se broj fotona koji se propuštaju smanjuje. Broj apsorbiranih fotona predstavlja analitički signal, a naziva se apsorbanacija. Pri tome energija ulaznog fotona, $h\nu$, mora biti jednaka razlici energija, ΔE , između osnovnog i pobuđenog stanja kao preduvjet da bi došlo do apsorpcije.[33]

$$\Delta E = h \times \nu \quad (1.1.)$$

h = Planckova konstanta ($h = 6,63 \times 10^{-34}$ Js).

1.7.2. Apsorpcija zračenja

Proces u kojem neka kemijska vrsta, prisutna u propusnoj sredini, selektivno prigušuje frekvencije elektromagnetskog zračenja naziva se apsorpcija. Osnovnim stanjem naziva se najniže energijsko stanje atoma ili molekule. Apsorpcija fotona može nastati samo ako je energija fotona jednaka energetskej razlici između osnovnog i nekog od viših energijskih stanja čestice. Pritom energija fotona prelazi u atom, ion ili molekulu prevodeći je u više energijsko, pobuđeno stanje. Pobuđivanje vrste M u ekscitiranu vrstu M* može se opisati jednađbom:

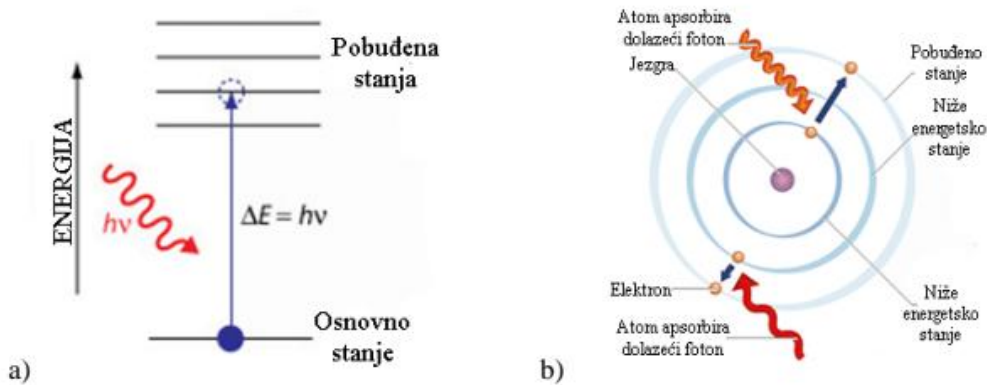


Nakon kratkog vremena ($10^{-5} - 10^{-8}$ s) pobuđena se čestica vraća u niže energijsko stanje. U tom procesu pobuđena vrsta otpušta suvišak energije u obliku topline, relaksira se. Taj proces uzrokuje zanemarivo malo povišenje temperature u okolini, a opisuje se jednađbom:



Čestice u pobuđenom stanju vrlo se brzo vraćaju u osnovno stanje, koncentracija pobuđenih čestica u bilo kojem trenutku može se smatrati zanemarivom. Također, količina toplinske energije otpuštene tijekom relaksacije je vrlo mala pa se ne može ni detektirati.[34]

Atomske apsorpcijske spektre karakteriziraju uski linijski spektri koji su posljedica razlike između osnovnog energijskog stanja i pobuđenog energijskog stanja atoma, te su specifični za određene atome.



Slika 1.12. a) Linijski apsorpcijski spektar; b) Elektroni apsorbiraju EM zračenje (fotone)[35]

1.7.3. Odnos između apsorpcije i koncentracije: Lambert Beerov zakon

Odnos između apsorpcije i koncentracije je linearno proporcionalan. U ovom slučaju analit je apsorbirajuća vrsta. Prema Beerovom zakonu signal je stoga apsorpcija (A) i proporcionalna je koncentraciji apsorbirajuće vrste.[36]

Beerov zakon prikazuje kvantitativno kako količina prigušenja zračenja ovisi o koncentraciji apsorbirajućih molekula i duljini puta kroz koji se apsorpcija događa. Prema Beerovom zakonu, apsorpcija je izravno proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste (c) i duljini puta (b) apsorbirajućeg medija.

$$A = a \times b \times c \quad (1.4.)$$

A = apsorpcija

a = apsorptivnost

b = duljina puta zračenja kroz uzorak

c = koncentracija

Veličina „ a “ je konstanta za određeni element i odabranu valnu duljinu, a „ b “ je konstanta određena instrumentom.[36]

Apsorbancija je veličina bez dimenzije, a jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju se uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska. Ako je koncentracija izražena u mol/L, a duljina puta zračenja u cm, konstanta proporcionalnosti je izražena u L/cmmol te se naziva molarna apsorptivnost, ϵ . Tada vrijedi:

$$A = \epsilon \times b \times c \quad (1.5.)$$

Molarna apsorptivnost, ϵ , iskazuje broj litara u kojima treba otopiti jedan mol neke tvari da bi apsorbcija bila 1 uz duljinu optičkog puta od 1 cm.[36]

1.7.4. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Suvremena atomska apsorpcijska spektroskopija uvedena je 1955. godine kao rezultat neovisnog rada A. Walsha i C. T. J. Alkemadea. Temelji se na ultraljubičastom i vidljivom zračenju, te se primjenjuje za kvantitativnu analizu.[36]

Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) je analitička tehnika temeljena na sposobnosti atoma da apsorbiraju elektromagnetsko zračenje (svijetlost). Svijetlost je dualne prirode odnosno opisuje se valnim svojstvima (gibanje kroz prostor) i čestičnim svojstvima (prijenos energije). Atomska apsorpcijska spektroskopija je zbog osjetljivosti u području ppm (dijelova na milijun) i ppb (dijelova na milijardu) široko primjenjiva tehnika za kvalitativno i kvantitativno određivanje približno 70 elemenata u tragovima koji se mogu naći u različitim tvarima kao što su hrana, voda te biološki uzorci. Prvi korak svih atomskih spektroskopskih tehnika je **atomizacija**, proces pri kojemu se uzorak isparava i razgrađuje uz nastajanje atomske pare. Učinkovitošću i reproducibilnošću koraka atomizacije bitno je određena osjetljivost, preciznost i točnost metode.[36]

Atomske spektroskopske tehnike mogu biti kategorizirane prema načinu atomiziranja analita. Postoji više vrsta atomizacije, a odabir ovisi o potrebama analize i vrsti analita u uzorku.[36]

- plamenom;
- elektrotoplinski;
- tehnikom hladnih para;
- induktivno spregnutom plazmom.

Obzirom na odabrani postupak atomizacije kod atomske apsorpcijske spektrometrije razlikuju se četiri AAS tehnike:

- Plamena AAS (P AAS);
- Elektrotoplinska (ET AAS);
- Hladne pare (*Cold Vapour*, CV AAS);
- Hidridna AAS (H AAS).

1.7.4.1. Elektrotoplinska atomska apsorpcijska spektrometrija (ET AAS)

U ovom radu korištena je elektrotoplinska atomizacija. Elektrotoplinski atomizator koristi grafitnu kivetu u kojoj se nalazi podložak na koji se nanosi uzorak. Grafitna kiveta otvorena je na oba kraja, a u njenom središtu nalazi se šupljina koja služi za unošenje uzorka uz pomoć mikropipete. Kiveta se postavlja na cilindrične grafitne kontakte unutar metalnog kućišta. Metalno kućište se hladi vodom što mu omogućava brzo hlađenje sa 2200 °C na 20 °C u vremenskom periodu od 20 sekundi. Kiveta je građena od elektrografita visoke gustoće te je prekrivena dodatnim slojem pirolitičkog grafita. Takve kivete imaju vijek trajanja i do nekoliko stotina mjerenja, ovisno o vremenu atomizacije, temperaturi, protoku plina kao i o tipu uzorka.

Unutar grafitne kivete, ispod otvora za unošenje uzorka, nalazi se L'vovljev podložak koji onemogućava da se uzorak atomizira odmah pri povišenju temperature. Upravo taj podložak smanjuje interferencije i omogućava ponovljivost mjerenja.

Ova tehnika ima dva do tri puta veću osjetljivost od plamene te se stoga smatra pogodnom za određivanje elemenata u tragovima i kompleksnim maticama.[36]

U elektrotoplinskom atomizatoru nekoliko mikrolitara (20 µL) uzorka prolazi slijedećim programom:

1. Sušenje na temperaturama do 120°C. Navedeni volumen zahtijeva vrijeme od 30 – 40 s. Pri tome je određeni i stalni protok plina nosioca (Ar).

2. Spaljivanje (piroliza) se vrši na temperaturama od 200 °C do 700 °C. Protok plina zadan je programom.

3. Atomizacija za koju se temperatura postiže trenutno. Struja naglo jača do nekoliko stotina ampera što uzrokuje postizanje temperature od 2000 °C ili 3000 °C. Atomizacija

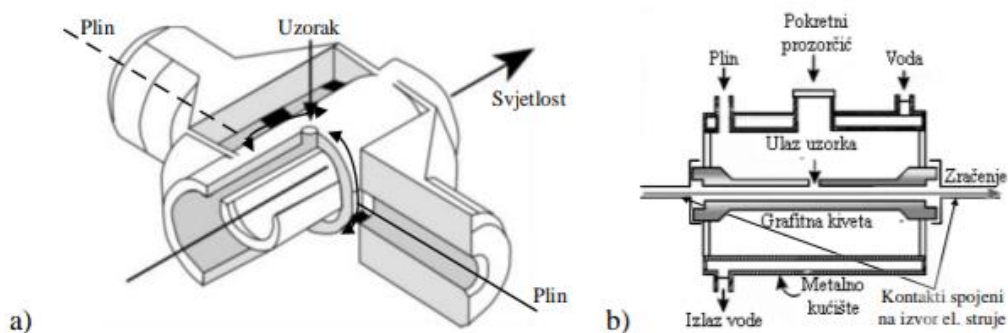
se dogodi u vremenu od nekoliko milisekundi. Visoka osjetljivost elektrotoplinske metode je svojstvo atomizacije i zadržavanja analita u području mjerenja. Brzina stvaranja slobodnih atoma mora biti jednaka ili viša od brzine nestanka iz optičkog puta. Upravo zbog zadržavanja atomiziranog uzorka u području optičkog puta nužno je zaustaviti protok plina nosioca.

4. Čišćenje se vrši podizanjem temperature do maksimalne uz protok plina nosioca koji ujedno i štiti grafitnu kivetu.

5. Hlađenje se provodi protokom plina i rashladne vode. Temperatura u roku od 20 sekundi pada s 2400 °C na 20 °C.[36]

Prilikom korištenja grafitne peći potrebna je inertna atmosfera. Inertni plinovi prolaze oko grafitne kivete, što predstavlja vanjski protok, kao i kroz nju, što predstavlja unutarnji protok.[37]

Vanjski protok inertnog plina (argon) štiti kivetu od vanjskih utjecaja (kisika), dok se unutarnji protok inertnog plina koristi da bi se uklonili svi mogući međuprodukti prilikom razgradnje uzorka.



Slika 1.13. a) Grafitna kiveta; b) Prikaz grafitne kivete u peći [38]

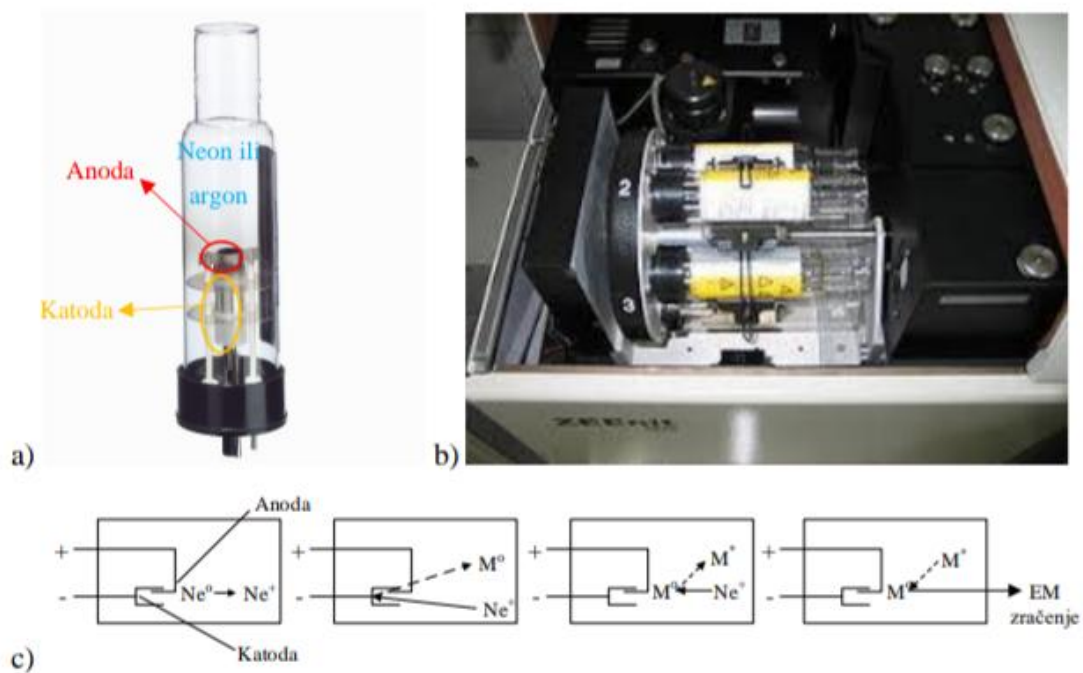
1.7.5. Instrumenti u atomskoj apsorpcijskoj spektrometriji

Neovisno o načinu atomizacije, preostali dijelovi instrumentacije su za atomske tehnike slični. Postoji pet osnovnih dijelova spektroskopskih uređaja:

1. stabilni izvor zračenja;
2. selektor valnih duljina koji omogućuje izdvajanje određenog valnog područja;
3. atomizator;
4. detektor zračenja ili pretvornik energije zračenja u mjerljiv signal;
5. procesor signala i uređaj za njegovo očitavanje.

Izvor elektromagnetskog zračenja:

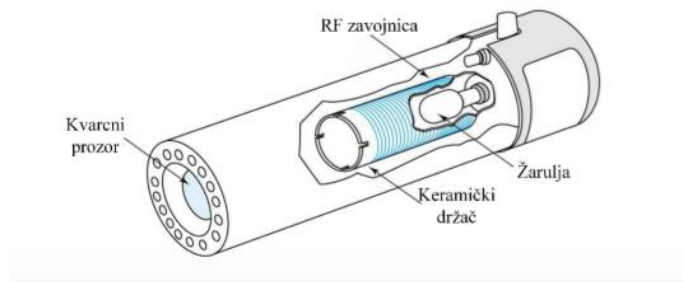
A.C. Walsh, australski znanstvenik, predložio je upotrebu žarulje sa šupljom katodom kao izvor zračenja. Žarulja sa šupljom katodom sastoji se od staklenog omotača duljine 15 cm i promjera 5 cm, ispunjenog inertnim plinom pod niskim tlakom, 100-600 Pa, (npr: neon ili argon) u kojem se nalazi anoda od volframa i katoda izrađena od elementa (metala) koji se određuje. Katoda je u obliku valjka i visine 1 cm dok je anoda u obliku šipke. Prozor žarulje kroz koji prolazi svjetlost napravljen je od kvarca. Primjenom razlike potencijala između anode i katode (300-400V), dolazi do ionizacije plemenitog plina i migracije elektrona i iona prema elektrodama. Dakle, elektroni sa katode kreću se prema pozitivnoj anodi. Na svom putu sudaraju se sa atomima inertnog plina i ioniziraju ih. Nastale ione privlači katoda. Putujući prema katodi, ioni inertnog plina dobivaju veliku kinetičku energiju koja je dovoljno velika da sa površine katode izbije veći broj atoma. Jedan dio ovih atoma se ekscitira te povratkom u osnovno stanje emitira karakterističan linijski spektar. Nakon povratka u osnovno stanje ti atomi se vraćaju na katodu ili se talože na staklenoj stijenci.[39]



Slika 1.14. a) Žarulja sa šupljom katodom; b) Sustav sa više žarulja u jednom uređaju; c) Princip rada i emitiranja žarulje sa šupljom katodom [40]

Za metale koji se ne mogu kovati, žarulja sa šupljom katodom ne predstavlja dobar izvor zračenja. Kod ovakvih metala potrebno je koristiti bezelektrodnu žarulju uz izbijanje (engl. Electrodeless Discharge Lamp, EDL).

Žarulja se sastoji od zataljene kvarcne cijevi koja sadrži inertan plin (Ar), pri tlaku od nekoliko stotina Pa, te malu količinu metala koji se analizira ili njegove soli. Žarulja ne sadrži elektrode već umjesto toga koristi energiju jakog polja radiofrekvencijskog ili mikrovalnog zračenja. Argon se u tom polju ionizira, ioni se ubrzavaju visokofrekvencijskom komponentom polja dok ne postignu dovoljnu energiju za pobuđivanje atoma metala (kolizijom), čiji nam je spektar potreban.[40]

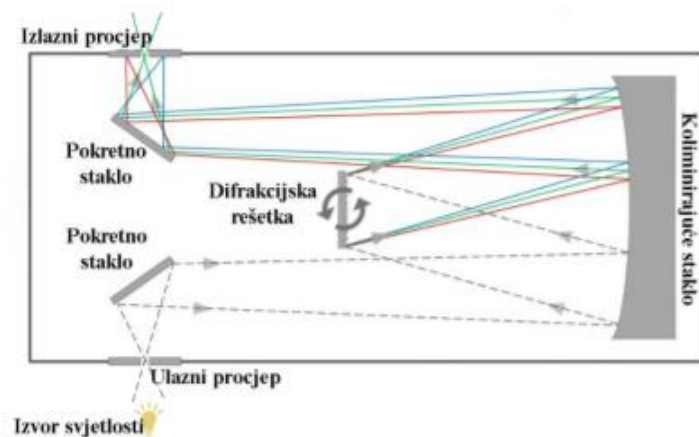


Slika 1.15. Bezelektrodna žarulja [40]

Optički sustav:

Svrha optičkog sustava je fokusiranje i filtriranje zračenja prije i poslije prolaska kroz uzorak. Najvažnija komponenta je monokromator.

Dva najčešća tipa disperznih sustava u monokromatorima su prizma i difrakcijska rešetka. Prizma od kvarca vrijedi za područje valnih duljina većih od 170 nm. Prizma od borosilikatnog stakla ne propušta UV zračenje i koristi se za valne duljine veće od 340 nm. Refleksijska rešetka sastoji se od velikog broja paralelnih, blizu smještenih ureza na tvrdj ulštenoj podlozi. Rezolucija ovisi o broju ureza (2000-3000 1/mm). Raspršenje je konstantno kroz sve valne duljine.[41]

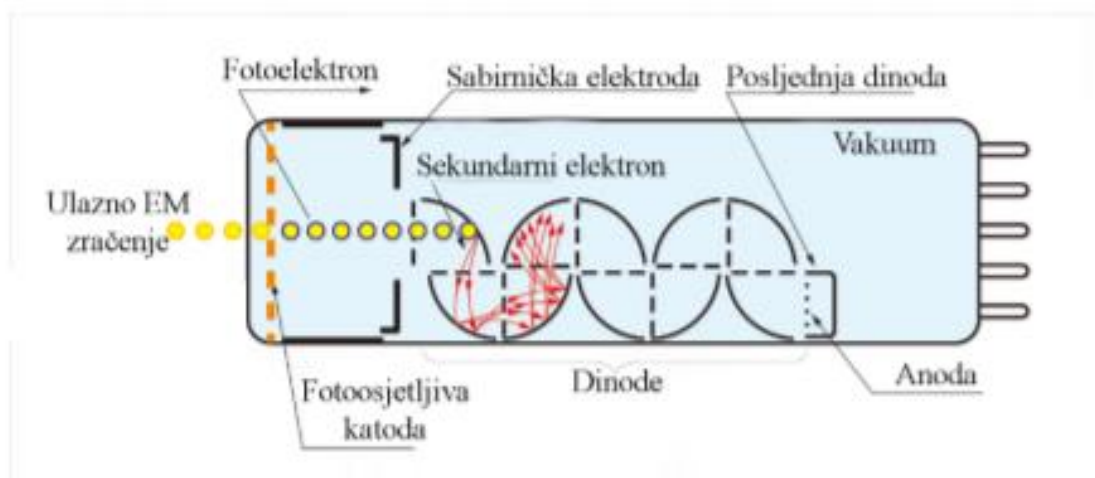


Slika 1.16. Shematski prikaz monokromatora [41]

Za mjerenje apsorpcije služe detektori. U njima se svjetlosna energija pretvara u električni signal koji se pojačava i registrira. Izbor detektora ovisi o osjetljivosti i granicama detekcije ispitivanog elementa. Danas najčešće korišteni detektor je fotomultiplikator koji je u osnovi elektronska cijev. Njegova glavna svrha je pojačavanje i pretvaranje elektromagnetskog zračenja u električni signal. Sastoji se od fotoosjetljive katode koja pri izloženosti svjetlosnom tj. elektromagnetskom zračenju, emitira snop elektrona proporcionalan jačini zračenja koje pada na fotoosjetljivu katodu. Elektroni se ubrzavaju i njihov se broj povećava preko niza dinoda te se struja mjeri na kolektorskoj anodi. Struja je i dalje proporcionalna intenzitetu zračenja, ali pojačana do milijun puta.

Površina katode premazana je slojem fotoosjetljiva materijala kao što su alkalijski metali ili metalni oksidi koji ozračivanjem emitiraju elektrone. Emitirani elektroni ubrzavaju se prema dinodi čiji je potencijal za 90 V pozitivniji od onoga katode. Udarom na površinu dinode svaki ubrzani fotoelektron proizvodi nekoliko dodatnih elektrona koji se akceleriraju prema drugoj dinodi, a koja je za 90 V pozitivnija od prve. Tu se opet elektroni umnožavaju.

Nakon završenog procesa koji se ponavlja u svakoj od preostalih dinoda, svaki je elektron proizveo 10^6 - 10^7 elektrona, koji se trajno skupljaju na anodi. Nastala se struja dalje elektronski pojačava i mjeri.[41]



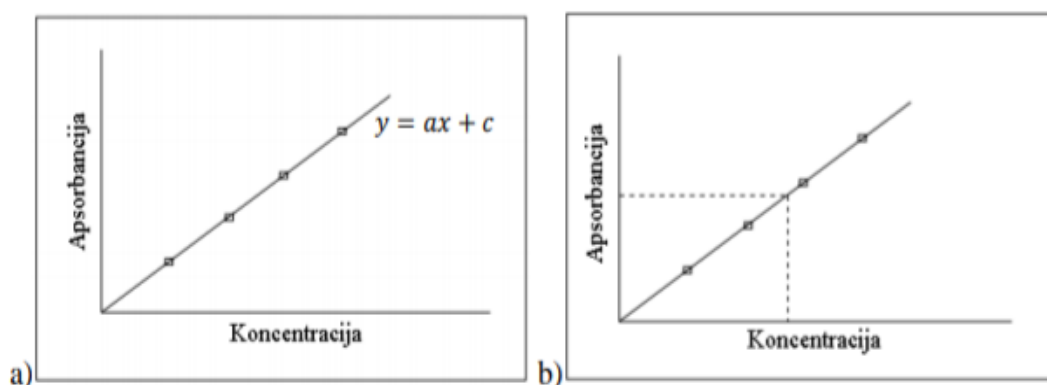
Slika 1.17. Shematski prikaz fotomultiplikatora [42]

1.7.6. Priprema uzorka za analizu

Za određivanje koncentracije analita u uzorku, potrebno je signal uzorka nepoznate koncentracije usporediti sa signalom točno poznate koncentracije (standardna otopina). Taj postupak naziva se umjeravanje i moguće ga je izvesti na tri moguća načina:

- Metodom vanjskog standarda
- Metodom dodatka standarda
- Metodom unutarnjeg standarda.

Najčešća je metoda umjeravanja vanjskim standardom. Za provedbu umjeravanja metodom vanjskog standarda, potrebno je pripremiti standardne otopine različitih, točno poznatih koncentracija i za njih izmjeriti apsorbanciju. Zatim se grafički interpretira ovisnost apsorbancije o koncentraciji i izračuna jednadžba pravca koji najbolje opisuje eksperimentalne točke. Dobiveni grafički prikaz naziva se krivulja umjeravanja. Unutar krivulje umjeravanja odabire se područje linearne ovisnosti (pravac). Nakon izrade krivulje umjeravanja, izmjeri se apsorbancija za uzorak nepoznate koncentracije te se na temelju krivulje umjeravanja (jednadžbe pravca) izračuna koncentracija.[43]



Slika 1.18. a) Krivulja umjeravanja; b) Određivanje nepoznate koncentracije analita

[43]

1.8. Željezo

Željezo je kemijski element atomskog (rednog) broja 26 i atomske mase 55,845. U periodnom sustavu elemenata predstavlja ga simbol Fe te pripada kemijskoj skupini prijelaznih metala.

Simbol Fe dolazi od *ferrum*, latinskog naziva za željezo. U zdravom ljudskom tijelu prisutna su samo otprilike 2,5 do 4 grama željeza. Željezo u ljudski organizam najčešće dolazi putem probavnog sustava, ali moguće je i inhalacijom te putem kože. Smatra se esencijalnim elementom iz razloga što sudjeluje u staničnim procesima disanja, redoks reakcija, energetskog metabolizma, DNA sinteze i regulacije gena. Pomanjkanje ili pak preopterećenje organizma željezom može imati fatalne posljedice, a one uključuju široki spektar bolesti od anemije do neurodegenerativnih poremećaja.

Toksičnost:

Toksični unos: 200 mg

Smrtonosna doza: 7 – 35 g

Željezo (II) spojevi su toksičniji od željezo (III) spojeva. [44]



Slika 1.19. Željezo [44]

1.8.1. Željezo u biljkama

Željezo je teški metal, u tlima i biljkama nalazi se kao dvovalentan i trovalentan kation ili u odgovarajućim spojevima. Može graditi kompleksne spojeve, u biljkama je uglavnom trovalentan iako vrlo lako mijenja valentno stanje. U tlu potječe iz primarnih i sekundarnih minerala. Kada se oni raspadaju, željezo se oslobađa te u kiseloj sredini gradi iznova sekundarne minerale. Tada su, u vidu amorfnih klorida, pristupačni za ishranu bilja.

Koncentracija željeza u biljkama najčešće je unutar granice 50 i 1000 ppm, a 80-90% željeza u biljkama je čvrsto vezano pa mu je pokretljivost osrednja do loša.

Željezo je mikroelement i biljkama je potreban u manjim količinama, ali njegov nedostatak može jako utjecati na prinos i kvalitetu biljaka.

Željezo (Fe) ima važnu ulogu u životnim procesima biljaka. Neophodno je za sintezu klorofila, proces fotosinteze, asimilaciju elementarnog dušika, redukciju nitrata i sulfata te metabolizam ugljikohidrata.

Usljed nedostatka željeza dolazi do pojave željezne kloroze, koja se javlja na alkalnim ili jako kiselim tlima.

Simptomi nedostatka željeza prvo se očituju na najmlađim listovima, tako da mjesta unutar žila požute, a ponekad izbljede do bijele boje. Kod većeg nedostatka ovog elementa, dolazi do preranog otpadanja lišća. Također rast biljaka i cvjetnih pupova je smanjen, a plodovi ostaju sitni.

Suficit željeza se rijetko događa, a očituje se u inhibiciji vegetacijskog rasta, plavozelenom lišću i mrkoj boji korijena.[45]



Slika 1.20. Željezna kloroza vinove loze i masline [45]

2. EKSPERIMENTALNI DIO – MATERIJALI I METODE

2.1. Protokol uzgoja biljke *Lepidium sativum* L. – Hidroponski

MATERIJAL:

- Sjeme kres salate (Kiepenkerl, Bruno Nebelung GmbH, Njemačka)
- Vodovodna voda
- Destilirana voda
- Posudice za uzgoj
- AAS standard, 1000 mg/L u 2% HCl, VWR Chemicals, BHD Prolabo, UK



Slika 2.1. Sjeme kres salate (*Lepidium sativum* L.), proizvođač „Kiepenkerl“ i posudica za uzgoj

Uzgoj biljke *Lepidium sativum* L. -PROTOKOL:

Sjeme (u ovom diplomskom radu *Lepidium sativum* L.) se prvo namače otprilike 8 sati u vodovodnoj vodi. Nakon namakanja stavlja se otprilike 5 g sjemena po posudici za uzgoj.



Slika 2.2. Namakanje i raspoređivanje sjemena na posudicu za uzgoj

Sljedeći korak je priprava otopine metala željeza (500 mL) u vodovodnoj vodi. Pripravljeno je pet različitih koncentracija: 1, 5, 10, 25 i 50 mg/L.

Nakon što su pripravljene željene otopine željeza namočeno sjeme je isprano (na samoj posudi za uzgoj) te je ravnomjerno raspodijeljeno na površini sita. Svaka je posudica označena redom: dvije referentne (A i B) i po jedna za svaku koncentraciju metala.

U svaku posudicu je ulivena odgovarajuća otopina (cca 320 mL) tako da sjeme bude vlažno, ali ne potopljeno.

Posudice sa sjemenom ostavljene su u prozračnoj prostoriji sa dosta svjetlosti. Bilježen je rast i promjene klica kroz 14 dana.



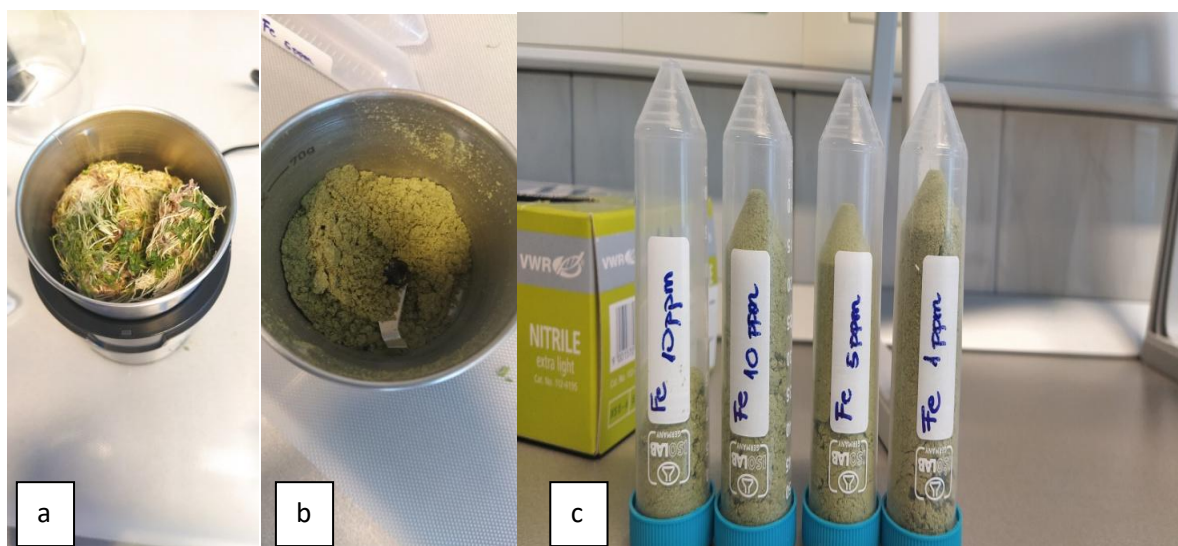
Slika 2.3. Hidroponski uzgoj klica *Lepidium sativum* L.

2.2. Priprema biljnog materijala za analizu

Nakon 14 dana zalijevanja i nadgledanja, klice su isprane, te ostavljene preko noći da se sasuše. Suhi biljni materijal je usitnjen uz pomoć mlinca, gotovo do praškastog stanja. Nakon usitnjavanja spremljen je u odgovarajuće posude.



Slika 2.4. Uzgojene klice nakon 14 dana



Slika 2.5. a) Osušeni biljni materijal; b) Usitnjeni biljni materijal; c) Spremljeni biljni materijal nakon usitnjavanja

2.2.1. Ekstrakcija glukozinolata uz desulfataciju

Kemikalije:

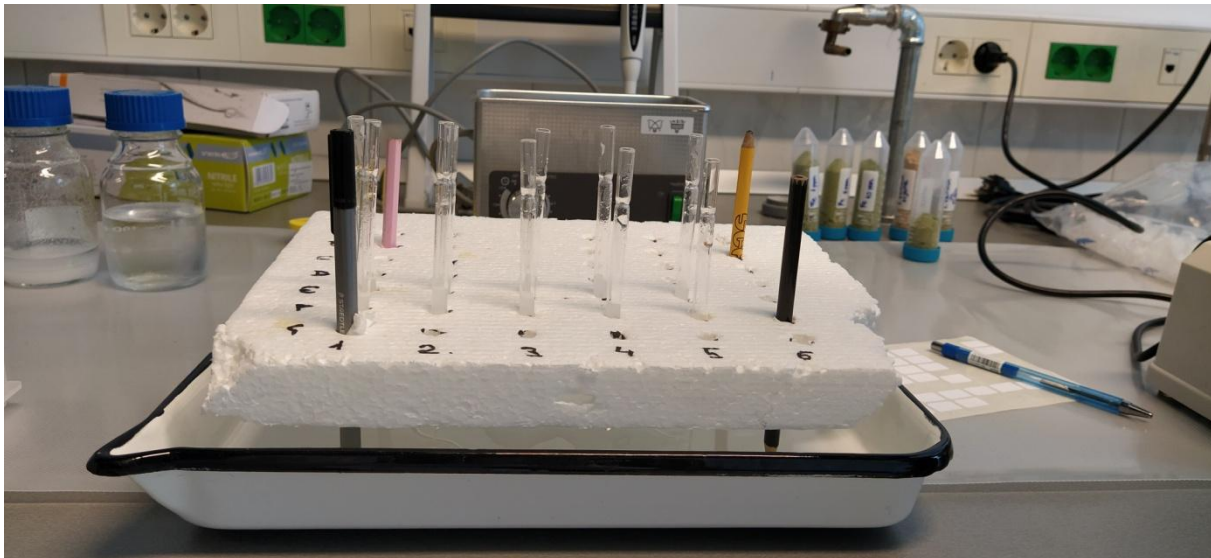
- Metanol (70%), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev acetat, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Dekstran (DEAE-sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Ultračista voda
- Sulfataza (tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Natrijev klorid (NaCl), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska

Aparatura:

- Analitička vaga, Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, SAD
- Električni mlinac, 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
- Uređaj za liofilizaciju, Labconco Corporation, Kansas, Missouri, SAD
- Laboratorijsko staklo i plastika

2.2.1.1. Priprema kolona i reakcijskih tuba

Staklene pipete napunjene su mljevenim filter papirom u visini od 1 cm. U svaku pipetu (kolonu) otpipetirano je 0,5 mL dekstrana i 1 mL ultračiste vode. Ispod kolona je bila postavljena posuda za skupljanje otpada prilikom ispiranja kolone.



Slika 2.6. Kolone za ekstrakciju

2.2.1.2. Ekstrakcija glukozinolata iz biljnog materijala

Biljni materijal, *Lepidium sativum* L. (oko 100 mg raspoređen je u centrifugalne mikropruvete te je u svaku dodan 70% metanol (1 mL). Centrifugalne mikropruvete su zatvorene sa sigurnosnim kapticama, stavljene na vorteks, potom homogenizirane i prebačene u vruću vodenu kupelj (5 minuta), a nakon toga su stavljene na ultrazvučnu kupelj (10 minuta) te potom centrifugirane na 2700 okretaja po minuti. Po završetku, supernatant je odvojen pipetiranjem te prebačen u prethodno pripremljene kolone. U centrifugalnu mikropruvetu s biljnim materijalom ponovno je dodan 1 mL 70% otopine metanola te je postupak ponovljen.

Zatim je u svaku kolonu dodano dva puta po 1 mL 70%-tnog metanola s ciljem da se uklone nepolarne molekule te 1 mL ultračiste vode radi ispiranja metanola. Na kraju je još u svaku kolonu dodano dva puta po 1 mL NaOAc za postizanje optimalnih uvjeta za djelovanje enzima sulfataze.

U sljedećem koraku, nakon ispiranja, ispod kolona su stavljene tubice za ekstrakte. Svaka tubica koja se nalazila ispod ekstrakta je odgovarajuće označena (kolona 1 odgovara centrifugalnoj mikropruveti 1). U kolone je dodano po 20 μ L otopine sulfataze i po 50 μ L NaOAc te su kolone ostavljene preko noći.

Tablica 2.1. Odvaga biljnog materijala (*Lepidium sativum* L.)

Referentni uzorak	Masa	Ponavljjanje	Masa
Fe 1 ppm	99,96 mg	Fe 1 ppm	99,99 mg
Fe 5 ppm	100 mg	Fe 5 ppm	100,05 mg
aFe 10 ppm	99,99 mg	Fe 10 ppm	100,08 mg
Fe 25 ppm	99,96 mg	Fe 25 ppm	100,09 mg
Sjeme	99,99 mg	Sjeme	100,06 mg



Slika 2.7. a) Centrifuga; b) Ultrazvučna kupelj; c) Vortex

Sutradan se u kolone dodalo dva puta po 0,75 mL ultračiste vode u svrhu eluiranja desulfoglukozinolata s kolone te su ekstrakti smrznuti i liofilizirani. Suha tvar otopljena je u točnom volumenu od 1 mL.

2.2.1.3. UHPLC-DAD-MS/MS analiza

Kemikalije:

- Acetonitril, Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD
- Voda

Aparatura:

- UHPLC-DAD-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD

Nakon ekstrakcije uz desulfataciju, dobiveni desulfoglukozinolati analizirani su korištenjem uređaja UHPLC-DAD-MS/MS Ultimate 3000RS s TSQ Quantis MS/MS detektorom (Thermo Fischer Scientific, SAD) na koloni Hypersil GOLD 3,0 mm x 100 mm, promjera čestica 3,0 μm (Thermo Fischer Scientific, SAD). Za mobilnu fazu korištena je smjesa otapala: voda (otapalo A; polarno otapalo) i 30% acetonitril (otapalo B) uz protok od 0,5 mL/min kako slijedi:

Tablica 2.2. Sastav mobilne faze korištene za UHPLC-DAD-MS/MS analizu desulfoglukozinolata

Vrijeme / min	Voda / %	Acetonitril / %
0,14	96	4
7,84	14	86
8,96	14	86
9,52	5	95
13,16	5	95
13,44	96	4
15,68	96	4

Tijekom analize temperatura kolone je održavana na 25 °C, a injektirani volumen uzorka je održavan na 5 μL . Dobiveni signali snimani su DAD detektorom pri 227 nm, a maseni spektri su snimani u pozitivnom modu pri 350 °C. Za određivanje desulfoglukozinolata korišten je desulfosinigrin kao eksterni standard, točnije krivulja umjeravanja za raspon koncentracija od 13,56 do 542,50 μM . Za izračun svakog pojedinog desulfoglukozinolata upotrijebljene su literaturne vrijednosti za faktore odziva.



Slika 2.8. UHPLC-DAD-MS/MS uređaj

2.3. Spaljivanje uzoraka-protokol

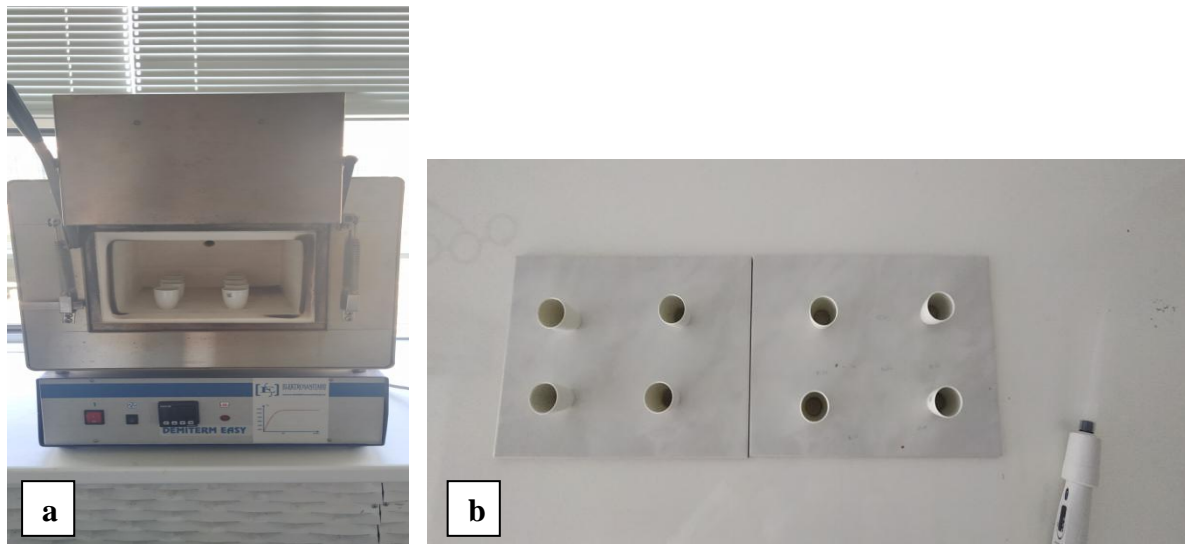
Kemikalije:

- Osušeni i usitnjeni biljni materijal
- HCl
- Ultračista voda

Aparatura:

- Analitička vaga, Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, SAD
- Žarna (mufolna) peć
- Porculanski lončići
- Lijevak
- Stakleno posuđe
- Filter papir

Nakon što je biljni materijal osušen i usitnjen, slijedi procedura spaljivanja suhog uzorka AY-4 kako bi se mogla provesti analiza teških metala (Fe). Uzima se približno 1 g usitnjenih osušenih klica i stavlja u porculanske lončice, te se bilježi točna odvaga. Izvagnani lončići s biljnim materijalom se stavljaju u žarnu (mufolnu) peć podešenu na 500 °C te se ostave 8 sati. Nakon osam sati, ohlađeni pepeo se otapa u 5 mL HCl. Zatim se otopina propusti kroz kiselinom zasićeni filter papir u tikvicu od 50 mL te se razrijedi ultračistom vodom do oznake.



Slika 2.9. a) Žarna peč sa porculanskim lončićima koji sadrže odvagu usitnjenih klica; b) Uzorci nakon spaljivanja



Slika 2.10. a) Korišteni filter papir; b) Filtracija uzoraka nakon spaljivanja

Tablica 2.2. Mase uzoraka za razaranje

UZORAK	MASA UZORKA
1 A (1 ppm)	1033,20 mg
1 B (1 ppm)	1000,68 mg
5 A (5 ppm)	1016,69 mg
5 B (5 ppm)	1014,11 mg
10 A (10 ppm)	1005,02 mg
10 B (10 ppm)	1008,58 mg
25 A (25 ppm)	1015,69 mg
25 B (25 ppm)	1040,71 mg

2.4. Analiza atomskim apsorpcijskim spektrometrom

Kemikalije:

- AAS standard, 1000 mg/L u 2% HCl, VWR Chemicals, BHD Prolabo, UK
- 0,2% HNO₃

Aparatura:

- Odmjerna tikvica
- Mikropipeta
- Atomski apsorpcijski spektrometar

2.4.1. Priprema standardnih otopina željeza atomskom apsorpcijskom spektroskopijom

Krivulja umjeravanja kod atomske apsorpcijske spektroskopije određena je osjetljivošću instrumenta, koji pak ovisi o apsorptivnosti svakog određivanog elementa. Za svaki element zadana je vrijednost osjetljivosti (S) te se krivulja umjeravanja konstruira korištenjem standarda slijedećih koncentracija: ½ S, S, 3S i 6S. Za željezo, vrijednost S iznosi 20 ppb te se krivulja umjeravanja konstruira korištenjem slijedećih koncentracija: 10 ppb, 20 ppb, 60 ppb i 120 ppb. S obzirom da uređaj kroz program ima mogućnost napraviti određena razrjeđenja, dostatno je pripremiti samo dvije standardne otopine, primjerice koncentracije 10 ppb i 120 ppb.

Početna standardna otopina željeza ima koncentraciju od 1000 ppm te je od nje pripremljena otopina koncentracije 100 ppm na način da je 100 µL otopine od 1000 ppm preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL te potom razrijeđeno do oznake (0,2% HNO₃). Za pripravu otopine koncentracije 100 ppb uzeto je 100 µL dobivene otopine, preneseno u odmjernu tikvicu od 10 mL te razrijeđeno do oznake.

Navedeni postupak može se prikazati proračunom:

$$c_s \times V_s = c_{s1} \times V_k \quad (2.1.)$$

Pri čemu je $c_s = 1000$ ppm, V_s predstavlja potrebni volumen standardne otopine željeza, c_{s1} predstavlja željenu koncentraciju, a V_k predstavlja volumen odmjerne tikvice u kojoj se vrši razrjeđenje (10 mL).

Potrebni volumen se izračunava iz sljedećeg izraza:

$$V_s = \frac{c_1 \times V_k}{c_s} = \frac{10 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \text{ ppm}} = 100 \text{ } \mu\text{L} \quad (2.2.)$$

Nadalje, za dobivanje otopine $c_{s2} = 100$ ppb, potrebni volumen otopine koncentracije $c_{s1} = 10$ ppm se izračunava:

$$V_{s2} = \frac{c_1 \times V_k}{c_{s1}} = \frac{100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}}{1000 \times 10 \text{ ppm}} = 100 \text{ } \mu\text{L} \quad (2.3.)$$

Od tako pripravljene otopine, koncentracije 100 ppb, se nadalje pripravlja otopina koncentracije $c_1 = 20$ ppb. Potrebni volumen otopine koncentracije 100 ppb se dobije:

$$V_{s2} = \frac{c_1 \times V_k}{c_{s2}} = \frac{20 \text{ ppb} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppb}} = 2 \text{ mL} = 2000 \text{ } \mu\text{L} \quad (2.4.)$$

Otopina koncentracije $c_2 = 120$ ppb se pripravlja također koristeći otopinu koncentracije $c_{s2} = 100$ ppb, a potrebni volumen te otopine izračunava se kao i za otopinu koncentracije 20 ppb:

$$V_{s2} = \frac{c_2 \times V_k}{c_{s2}} = \frac{120 \text{ ppb} \times 10 \text{ mL}}{100 \text{ ppb}} = 12 \text{ mL} = 12000 \text{ } \mu\text{L} \quad (2.5.)$$

Ranije pripravljeni uzorci i standardne otopine analiziraju se korištenjem atomskog apsorpcijskog spektrofotometra koji atomizaciju uzorka provodi u grafitnoj peći. Uzorak se mikropipetom injektira u grafitnu kivetu. Elektrotoplinskom atomizacijom, koju primjenjuje ovaj uređaj, povećana je osjetljivost određivanja analita u uzorku.



Slika 2.11. Atomski apsorpcijski spektrometar

Temperaturni program za željezo izrađen je u skladu s preporučenim uvjetima. Program je napisan kroz pet koraka, te je definirano vrijeme u sekundama potrebno da se pojedini korak postigne, te vrijeme koje uzorak provodi na određenoj temperaturi. Prvi i drugi korak odnose se na sušenje, odnosno uklanjanje otapala. Treći korak je piroliza, četvrti korak predstavlja atomizaciju. Vrijeme postizanja temperature atomizacije jest 0

sekunda. Peti korak je čišćenje, nakon čega opet počinje ciklus od početka. Temperaturni program prikazan je na slici 2.12.

Step	Temp (°C)	Ramp Time	Hold Time	Internal Flow	Gas Type
1	110	1	30	250	Normal
2	130	15	30	250	Normal
3	1400	10	20	250	Normal
4	2100	0	5	0	Normal
5	2450	1	3	250	Normal

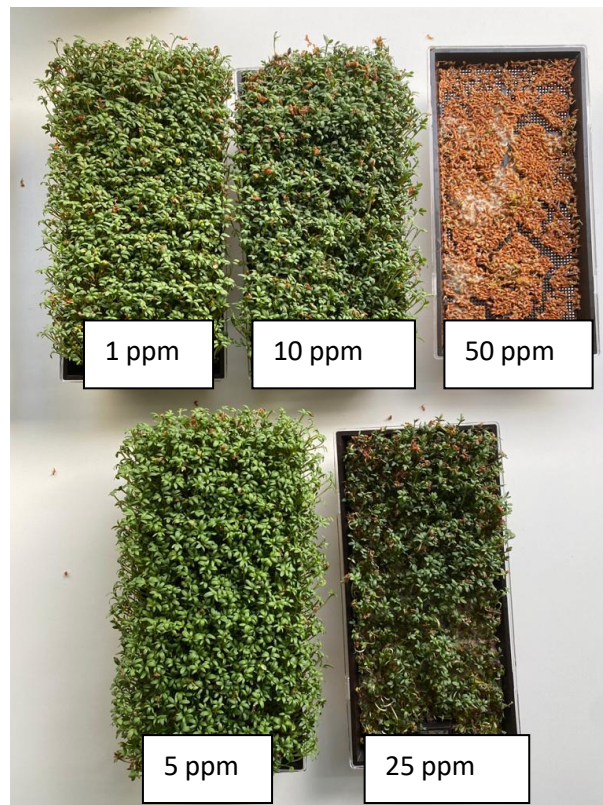
Read Step : 4 Injection Temperature(°C) : 20

Slika 2.12. Temperaturni program za određivanje željeza

Na osnovu izmjerenih apsorbancija standardnih otopina konstruirana je krivulja umjeravanja, a tek nakon toga provedena je analiza samih uzoraka, u kojoj se koncentracije svakog uzorka morala dovesti u linearno dinamičko područje korištene metode, razrjeđenjem s 0,2% HNO₃.

3. REZULTATI I RASPRAVA

Uzgajane su klice *Lepidium sativum* L. na vodenim otopinama različitih koncentracija željeza (1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm i 50 ppm) te uspoređene sa klicama uzgajanim na vodovodnoj vodi. Nakon 14 dana kada je sabiran biljni materijal za daljnju analizu utvrđeno je da biljka uzgajana na vodenoj otopini željeza koncentracije 50 ppm nije proključala, a neproključale sjemenke zahvatila je plijesan. Također na slici je vidljivo da je i nešto slabije izrasla pri koncentraciji željeza od 25 ppm odnosno počela je venuti. Najbolje su izrasle klice na vodenoj otopini željeza koncentracije 5 ppm, zatim slijede klice na vodenoj otopini željeza koncentracije 1 ppm te one uzgajane na vodenoj otopini željeza koncentracije 10 ppm.



Slika 3.1. Uzgojene klice *Lepidium Sativum* L. nakon 14 dana

3.1. UHPLC-DAD-MS/MS analiza

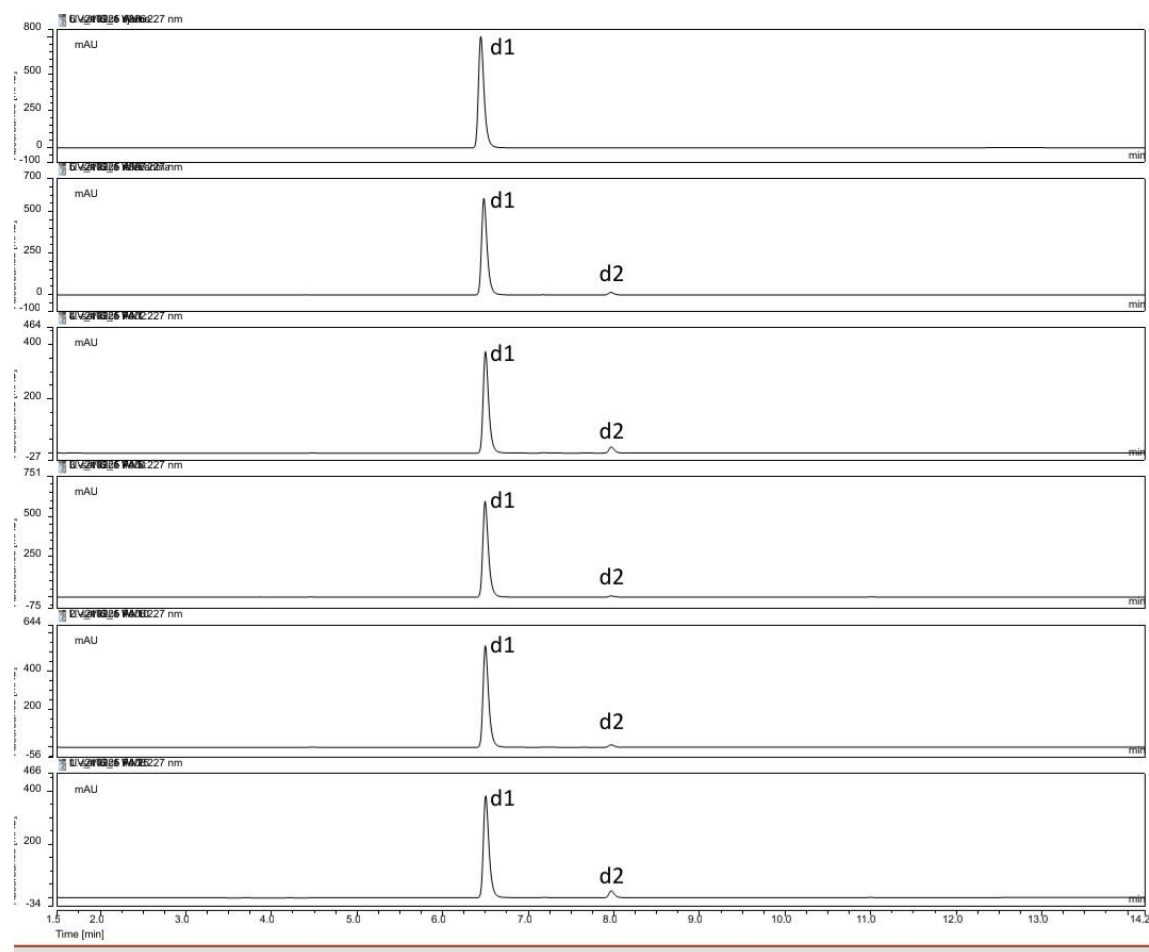
Jedan od ciljeva ovoga rada bio je ispitivanje utjecaja različitih koncentracija željeza na razvoj glukozinolata u klicama kres salate. Kako bi se odredili glukozinolati navedene biljne vrste korištena je tehnika spregnutog sustava tekućinska kromatografija – tandemska masena spektrometrija.

Ekstrakcija glukozinolata provedena je na šest uzoraka (sjeme, referentni uzorak zalijevan vodom, te klice zalijevane s koncentracijama Fe 1 ppm, Fe 5 ppm, Fe 10 ppm i Fe 25 ppm). Analizom dobivenih pročišćenih ekstrakta iz uzorka klica korištenjem UHPLC-DAD-MS/MS tehnike utvrđeno je da ovi ekstrakti sadrže dva desulfoglukozinolata (slika 3.2.). Njihova identifikacija provedena je na temelju vremena zadržavanja, UV i masenih spektara svakog od signala.

Na masenom spektrometru je bilo namješteno snimanje svih masa (engl. *Full scan*) kako bi se moglo vidjeti koji molekularni ioni su karakteristični za pojedini signal. U mobilnu fazu dodan je natrijev klorid koji pojačava odziv te su vrijednosti mase uvećane za masu iona natrija ($A_r = 23$) tj. $[M - H + Na]^+$, detektirane u pozitivnom načinu snimanja.

Na 6,43 min uočena je masa 352, a usporedbom s literaturom pretpostavljeno je da je riječ o glukotropeolinu (slika 3.3.). Slijedeći signal od interesa bio je na 7,96 min kada se pojavio 4-metoksigliukobrasicin s masom 421 (slika 3.5.).

Ono što je također bitno naglasiti jest da se u analiziranom sjemenu biljke *Lepidium sativum* L. pojavio samo jedan desulfoglukozinolat – glukotropeolin.



Slika 3.2. Kromatogram desulfoglukozinolata identificiranih u ekstraktu sjemena i uzgojenih klica kres salate.

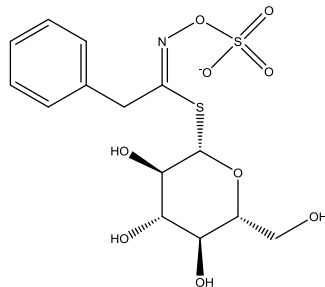
d1- desulfoglukotropeolin; d2 – 4- desulfometoksiglukobracicin

Tablica 3.1. Identificirani glukozinolati u pojedinim uzorcima

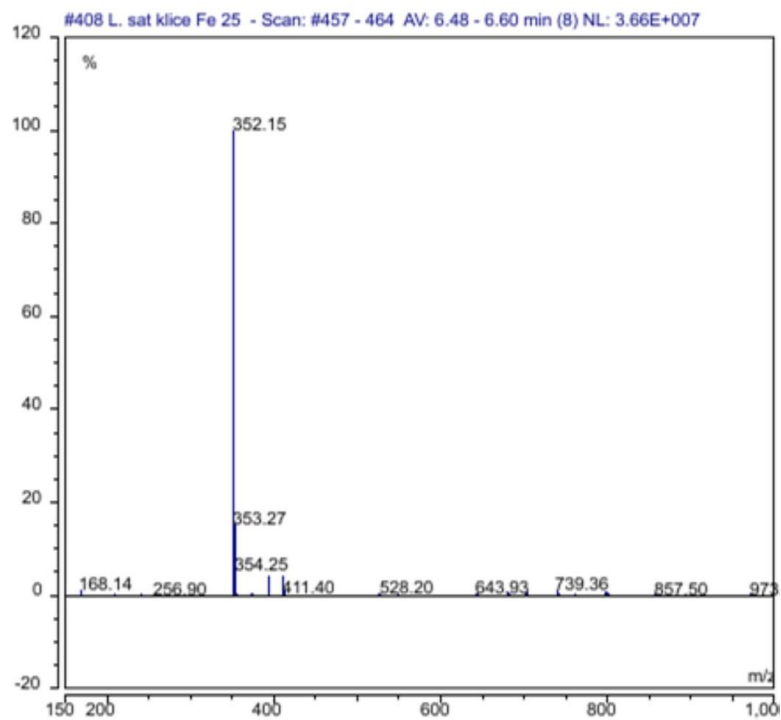
Uzorak	Ime spoja	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoglukozinolata + Natrij	Količina (μmol/g suhog materijala)
SJEME	Glukotropeolin	6,43	352	282,0770
REFERENTNI UZORAK	Glukotropeolin	6,43	352	217,0359
	4-metoksiglukobrasicin	7,96	421	1,1773
Fe (1 ppm)	Glukotropeolin	6,43	352	116,8814
	4-metoksiglukobrasicin	7,96	421	1,4241
Fe (5 ppm)	Glukotropeolin	6,43	352	207,4313
	4-metoksiglukobrasicin	7,96	421	0,4048
Fe (10 ppm)	Glukotropeolin	6,43	352	179,3980
	4-metoksiglukobrasicin	7,96	421	0,8986
Fe (25 ppm)	Glukotropeolin	6,43	352	114,7947
	4-metoksiglukobrasicin	7,96	421	2,3296

3.1.1. Spektri masa i UV spektri

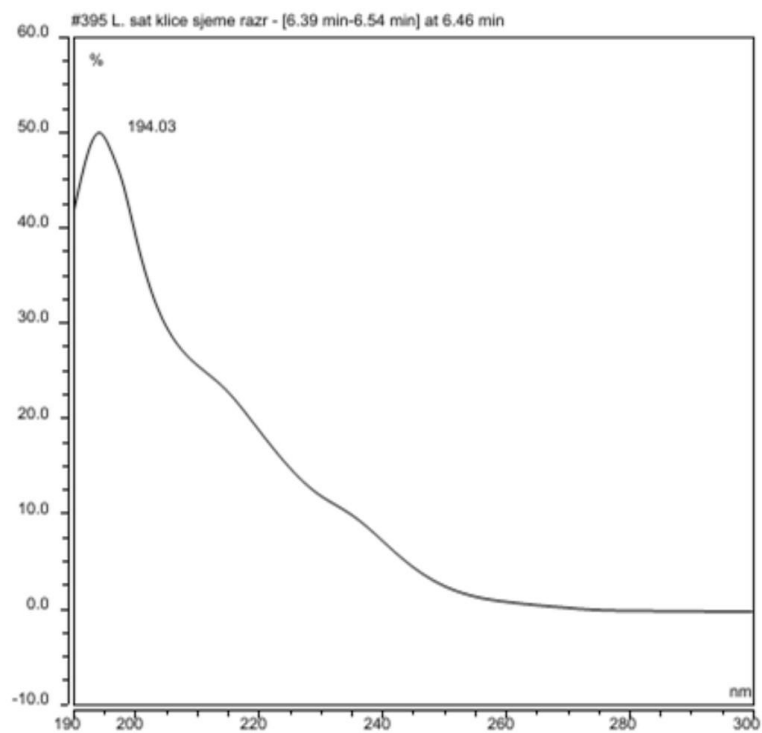
Glukotropeolin



Glukotropeolin (benzilglukozinolat) je glukozinolat koji se nalazi u povrću krstašica, osobito u vrtnoj kreši. Usporedbom UV spektra ovog desulfoglukozinolata s literaturnim potvrđeno je da se radi o arilalifatskom glukozinolatu.

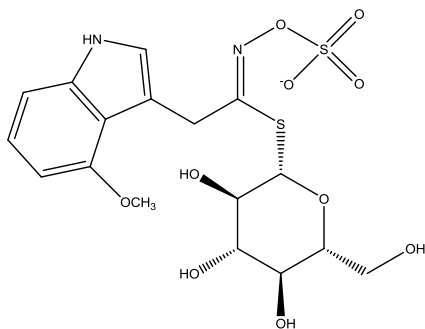


Slika 3.3. Spektar masa desulfoglukotropeolina

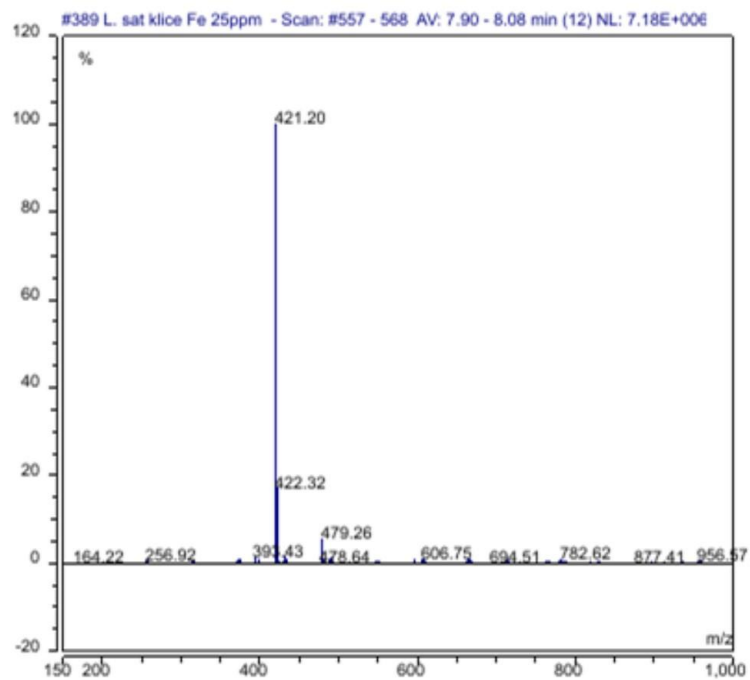


Slika 3.4. UV spektar desulfoglukotropeolina

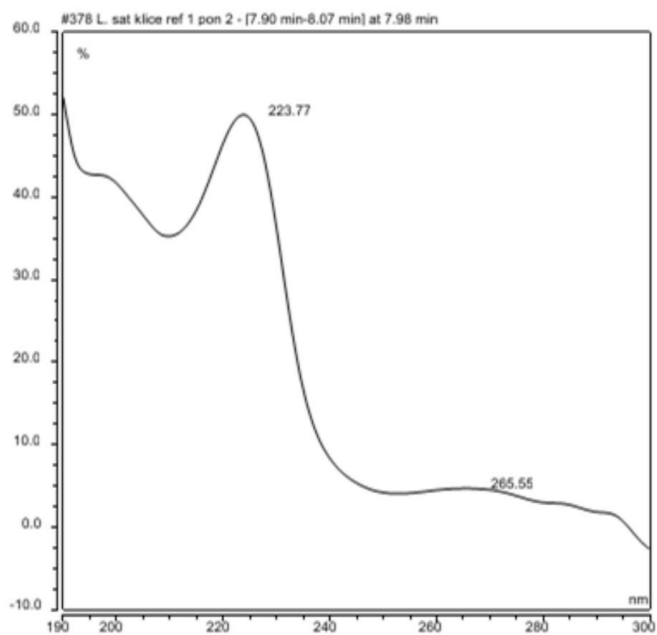
4-Metoksiglukobrasicin



Na temelju usporedbe dobivenog i literarnog UV spektra potvrđeno je da je riječ o indolnom glukozinolatu, 4-metoksiglukobrasicinu.



Slika 3.5. Spektar masa 4-metoksiglukobracicina



Slika 3.6. UV spektar 4-metoksiglukobracicina

Određivanje je napravljeno korištenjem krivulje umjeravanja sinigrina uz primjenu faktora odziva za svaki od pojedinih spojeva. Faktor odziva predstavlja omjer između signala koji stvara analit i koncentracije analita koja proizvodi signal. Kod kromatografije, signal predstavlja područje vrha na kromatogramu te stoga izraz za faktor odziva glasi:

$$\text{faktor odziva} = \text{vršna površina} / \text{koncentracija}$$

Faktori odziva za spojeve određene tehnikom spregnutog sustava tekućinska kromatografija – masena spektrometrija su sljedeći:

- Glukotropeolin; 0,95
- 4-Metoksiglukobrasicin; 0,25

U sjemenu biljke roda *Lepidium sativum* L. pronađen je samo arilalifatski glukozinolat naziva glukotropeolin koji se biosintetizira iz aminokiseline fenilalanina, dok je u uzgajanim klicama obogaćenim željezom u različitim koncentracijama pronađen navedeni glukozinolat uz jedan dodatni, indolni 4-metoksiglukobrasicin koji potječe od aminokiseline triptofana. Iz navedenog može se zaključiti da se biljka prilagođava trenutnim uvjetima i sintetizira sebi potrebne glukozinolate kako bi preživjela nepovoljne uvjete i stres. Iz navedenih kromatograma vidljivo je da uzgojene klice vrste *Lepidium sativum* L. imaju značajno manje glukozinolata u odnosu na sjeme iste vrste.

U sjemenu je određen glukotropeolin u količini od 282,0770 $\mu\text{mol/g}$ suhog materijala. Analizom **referentnog uzorka** određeni su glukotropeolin u koncentraciji od **217,0359** $\mu\text{mol/g}$ suhog materijala i 4-metoksiglukobrasicin u koncentraciji od **1,1773** $\mu\text{mol/g}$ suhog materijala.

U uzorku klica uzgajanih na vodenoj otopini željeza koncentracije 1 ppm u odnosu na referentni uzorak uočava se pad koncentracije glukotropeolina (116,8814 $\mu\text{mol/g}$) i povećanje 4-metoksiglukobrasicina (1,4241 $\mu\text{mol/g}$). Nadalje kod klica uzgajanih na vodenim otopinama željeza koncentracija 5 ppm i 10 ppm uočen je pad koncentracije glukotropeolina (207,4313 $\mu\text{mol/g}$ i 179,3980 $\mu\text{mol/g}$ kao i pad koncentracije 4-metoksiglukobrasicina (0,4048 $\mu\text{mol/g}$ i 0,8986 $\mu\text{mol/g}$). Kod klica uzgajanih na vodenoj otopini željeza koncentracije 25 ppm uočen je pad koncentracije glukotropeolina (114,7947 $\mu\text{mol/g}$) u odnosu na referentni uzorak kao i povećanje koncentracije 4-metoksiglukobrasicina (2,3296 $\mu\text{mol/g}$). Povezujući glukozinolate s uspješnošću rasta klica, može se zaključiti da su kod klica koje su uzgajane na vodenoj otopini željeza koncentracije 25 ppm (klice su slabije izrasle od ostalih) prisutne najmanje količine glukotropeolina ali i najviše količine 4-metoksibrasicina.

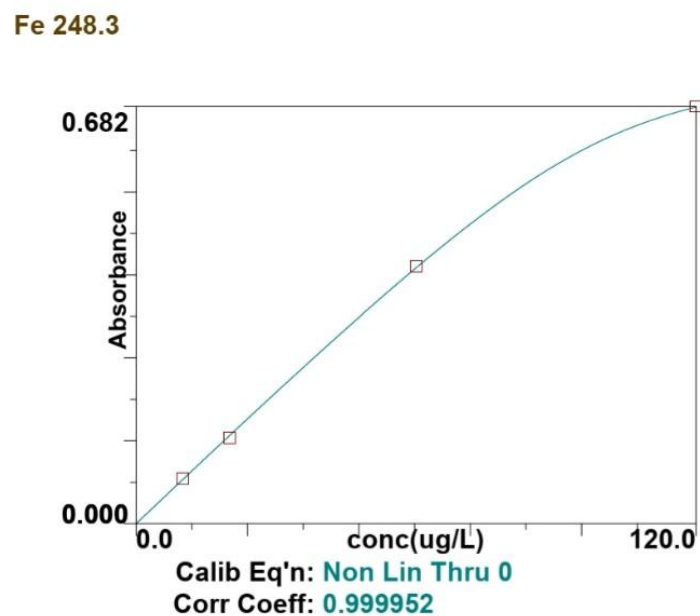
3.2. Krivulja umjeravanja za određivanje koncentracije željeza atomskom apsorpcijskom spektroskopijom

Analizom prethodno pripremljenih standardnih otopina željeza koncentracije od 10 do 120 ppb korištenjem atomskog apsorpcijskog spektrometra konstruirana se krivulja umjeravanja. Apsorbancija za željezo mjeri se na valnoj duljini od 248,3 nm.

Calibration Standard Concentrations

	ID	Concentration	A/S	Loc	Stock (uL)	Diluent (uL)
Calib Blank	0,2%HNO3			3	20	
Standard 1	Calib Std 1	10	1	1	10	10
Standard 2	Calib Std 2	20	1	1	20	0
Standard 3	Calib Std 3	60	2	1	10	10
Standard 4	Calib Std 4	120	2	2	20	0

Slika 3.7. Analizirane standardne otopine željeza za izradu krivulje umjeravanja, program samouzorkivača



Slika 3.8. Krivulja umjeravanja za određivanje koncentracije željeza

Korišteni uvjeti za analizu željeza navedeni su u tablici:

Tablica 3.3. Preporučeni uvjeti za analizu željeza

Element	Fe
Valna duljina	248,3 nm
Temperatura pirolize	1400 °C
Temperatura atomizacije	2100 °C
Karakteristična masa	12 pg/0,0044 A s ⁻¹
Osjetljivost (S)	20 µg/L za 0,22 A s ⁻¹
Otapalo	0,2% HNO ₃
Vrijeme atomizacije	3 s

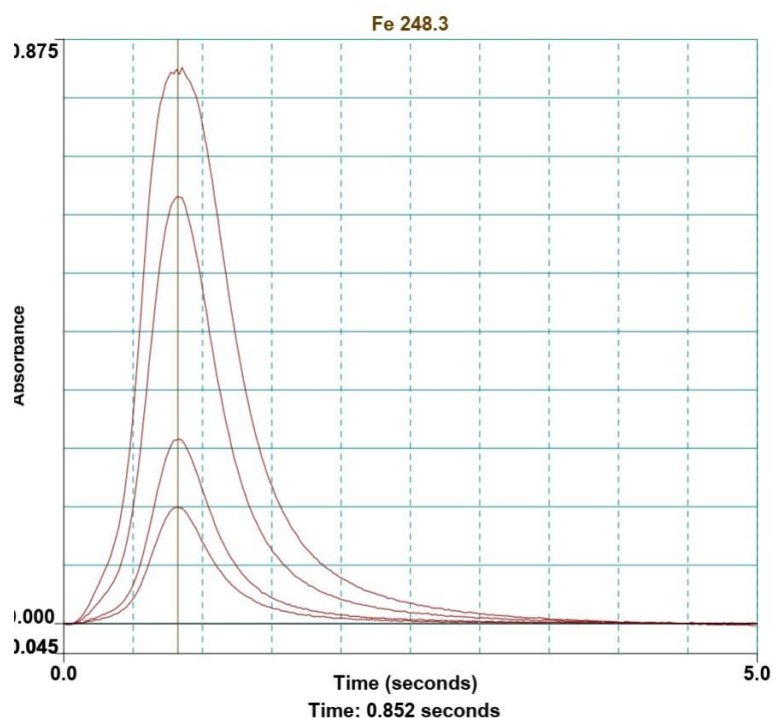
Za ispitivani element, željezo, izrađen je program u skladu s preporučenim uvjetima. Programi su napisani kroz pet koraka, te je definirano vrijeme u sekundama potrebno da se pojedini korak postigne, te vrijeme koje uzorak provodi na određenoj temperaturi.

Step	Temp (°C)	Ramp Time	Hold Time	Internal Flow	Gas Type
1	110	1	30	250	Normal
2	130	15	30	250	Normal
3	1400	10	20	250	Normal
4	2100	0	5	0	Normal
5	2450	1	3	250	Normal

Read Step : 4 Injection Temperature (°C) : 20

Slika 3.9. Temperaturni program za određivanje željeza

Izrađena je krivulja umjeravanja za određivanje analita od interesa u analiziranim uzorcima, temeljem preporučenih uvjeta i korištenjem prikazanih programa. U nastavku je prikazan instrumentni zapis i iz njega konstruirana krivulja umjeravanja za analit od interesa.



Slika 3.10. Instrumentni zapis ovisnosti apsorbancije o proteklom vremenu (atomizacija) za različite koncentracije standardnih otopina željeza

Sample ID	Absorbance
AA: Calib Std 1-Fe	0.17377
AA: Calib Std 2-Fe	0.27549
AA: Calib Std 3-Fe	0.63906
AA: Calib Std 4-Fe	0.82638

Slika 3.11. Tabela prikaz zabilježenih apsorbancija

3.2.1. Koncentracije željeza u uzgojenim klicama

Korištenjem konstruirane krivulje umjeravanja i jednadžbe pravca za linearni dio krivulje (koji su izračunati metodom najmanjih kvadrata), te signala zabilježenih za svaki uzorak, određene su koncentracije elementa u mjernoj otopini. Potrebno je uzeti u obzir postupak pripreme mjerne otopine, te izvaganu masu uzorka, za konačni proračun mase elementa (željeza) u biljnom materijalu.

Masenu koncentraciju elementa u mjernoj otopini (γ) koja je izražena u ppb ili $\mu\text{g/L}$ potrebno je podijeliti sa volumenom mjerne otopine (50 mL), da bi se izračunala masa elementa u uzorku. Dobivenu masu elementa potrebno je podijeliti sa masom izvaganog

biljnog materijala (m), kako bi se izračunao maseni udio elementa u analiziranom uzorku.

Tablica 3.4. Prikaz rezultata koncentracije željeza u uzorku

Oznaka uzorka	Masa / g	Volumen / L	Fe AAS γ /ppb	Fe uzorak/ ppm
RA	1,001	0,05	1395	69,680
RB	1,001	0,05	1273	63,586
1A TD	1,0332	0,05	1718	83,140
1B TD	1,0007	0,05	1651	82,492
5A TD	1,0167	0,05	2682	131,897
5B TD	1,0141	0,05	2287	112,760
10A TD	1,005	0,05	4571	227,413
10B TD	1,0086	0,05	4508	223,478
25A TD	1,0157	0,05	10050	494,733
25B TD	1,0407	0,05	10820	519,842

Primjer proračuna za željezo prikazan je za uzorak oznake „1B TD“:

Potrebno je izračunati koncentraciju željeza u početnoj otopini:

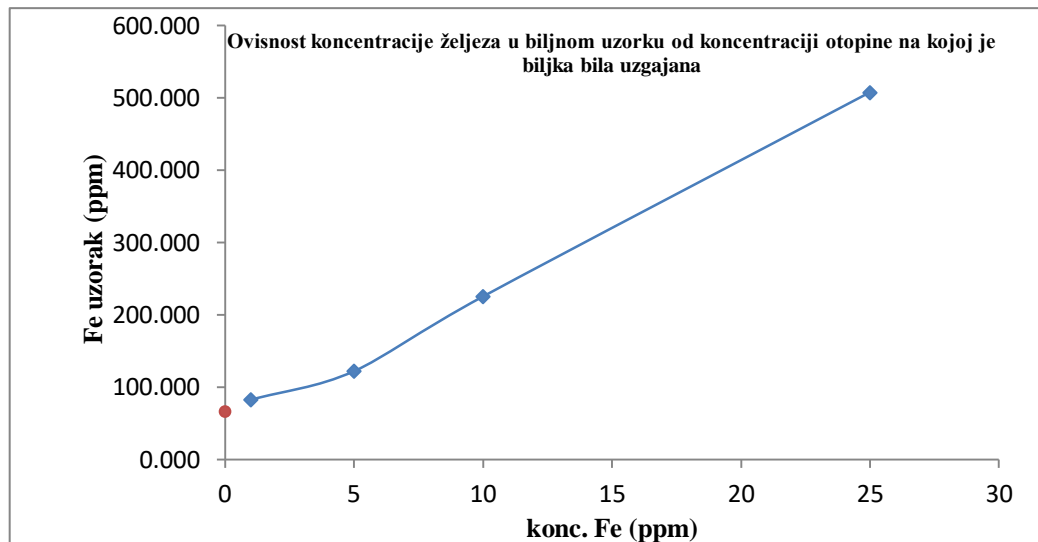
$$\gamma(\text{Fe AAS}) = \frac{m(\text{Fe})}{V} \quad (3.1.)$$

$$m(\text{Fe}) = \gamma(\text{Fe AAS}) \times V = 1651 \text{ ppb} \times 0,05 \text{ L} = 82,55 \text{ } \mu\text{g} \quad (3.2.)$$

Za dobivanje masenog udjela željeza u uzorku potrebno je izračunatu masu podijeliti s vaganom masom biljnog materijala:

$$\omega(\text{Fe uzorak}) = \frac{m(\text{Fe})}{m(\text{odvaga})} = \frac{82,55}{1,0007} \times 100 = 82,492 \text{ ppm} \quad (3.3.)$$

Iz izračunanih podataka može se izraditi grafički prikaz ovisnosti koncentracije željeza prisutne u biljnom materijalu o koncentraciji otopina željeza kojom su tretirane klice za uzgoj.



Slika 3.12. Ovisnost koncentracije željeza u biljnom uzorku o koncentraciji vodene otopine željeza na kojoj je biljka uzgajana

Iz zabilježenih rezultata mjerenja, prikazanih u tablici 3.4. i na slici 3.12., vidljivo je da sposobnost akumulacije željeza u klicama ne opada povećanjem koncentracije željeza, odnosno da nije postignuto zasićenje.

Prateći rast i razvoj klica, zapažen je slabiji rast u posudicama koje su bile obogaćene željezom koncentracije 25 ppm. Kod koncentracije 25 ppm došlo je do sušenja i propadanja klica dok kod koncentracije 50 ppm klice nisu niti izrasle. Dakle može se zaključiti da koncentracija željeza viša od 25 ppm obustavlja rast klica i potiče njihovo propadanje.

4. ZAKLJUČAK

- Iz vizualnog aspekta promatranja uzgojenih klica, uočeno je sušenje i propadanje klica uzgajanih na vodenim otopinama koncentracije Fe 25 ppm. Klice uzgajane na vodenim otopinama koncentracije Fe 50 ppm nisu proklijale. S druge strane, najbolje su izrasle klice uzgajane na vodenim otopinama koncentracije Fe 5 ppm, zatim slijede one uzgajane na vodenim otopinama koncentracije Fe 1 ppm i 10 ppm.
- U uzorku klica biljke *Lepidium sativum* L. preko desulfatiziranih glukozinolata određeni su: glukotropeolin i 4-metoksiglukobrasicin dok je u uzorku sjemena *Lepidium sativum* L., određen samo glukotropeolin.
- Sjeme biljke *Lepidium sativum* L. je sadržavalo najvišu koncentraciju glukotropeolina (282,0770 $\mu\text{mol/g}$), dok su klice uzgajane na vodenim otopinama sa koncentracijom željeza od 25 ppm sadržavale najnižu koncentraciju (114,7947 $\mu\text{mol/g}$). Koncentracije glukotropeolina u klicama uzgajanim na vodenim otopinama željeza koncentracije 1 ppm, 5 ppm i 10 ppm su niže od koncentracije navedenog glukozinolata u sjemenu (116,8814 $\mu\text{mol/g}$, 207,4313 $\mu\text{mol/g}$ i 179,3980 $\mu\text{mol/g}$). Klice uzgajane na vodenim otopinama koncentracije željeza 50 ppm nisu proklijale zato što je to bila previsoka koncentracija za biljku.
- Kod klica uzgajanih na vodenim otopinama željeza uz glukotropeolin, određen je i 4-metoksiglukobrasicin. Najviša koncentracija 4-metoksiglukobrasicina uočena je kod klica uzgajanih na vodenim otopinama željeza od 25 ppm (2,3296 $\mu\text{mol/g}$), dok je najniža koncentracija zabilježena kod klica uzgajanih na vodenim otopinama željeza od 5 ppm (0,4048 $\mu\text{mol/g}$).
- Koristeći se atomskim apsorpcijskim spektrometrom, određena je koncentracija željeza u uzorcima biljnog materijala pri čemu su dobiveni sljedeći rezultati:

Referentni uzorak $\rightarrow \gamma(\text{Fe}) = 66,633 \text{ ppm}$

Uzorak 1 (1 ppm) $\rightarrow \gamma(\text{Fe}) = 82,816 \text{ ppm}$

Uzorak 2 (5 ppm) $\rightarrow \gamma(\text{Fe}) = 122,329 \text{ ppm}$

Uzorak 3 (10 ppm) $\rightarrow \gamma(\text{Fe}) = 225,446 \text{ ppm}$

Uzorak 4 (25 ppm) $\rightarrow \gamma(\text{Fe}) = 507,288 \text{ ppm}$

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da i referentni uzorak koji nije bio bogaćen željezom sadrži ispitivani metal u koncentraciji od 66,633 ppm. Sukladno tome,

povećavanjem koncentracije vodenih otopina željeza na kojima su klice bile uzgajane, povećavala se i koncentracija akumuliranog željeza u biljci.

- Iz izračunatih podataka, navedenih prethodno, izrađen je grafički prikaz ovisnosti koncentracije željeza prisutne u biljnom materijalu o koncentraciji otopina željeza kojom je tretirana biljka za uzgoj. Iz grafičkog prikaza i zabilježenih rezultata, vidljivo je da sposobnost akumulacije željeza u biljci ne opada povećanjem koncentracije željeza u otopini, odnosno da nije postignuto zasićenje. S druge strane, promatrajući izgled biljke, uočeno je sušenje i propadanje klica uzgajanih na vodenoj otopini koncentracije 25 ppm i više, što ukazuje da će koncentracija željeza viša od 25 ppm uništiti biljku.

5. LITERATURA

1. URL: [Skripta specijalni dio.pdf \(veleri.hr\)](#) (01.07.2021.)
2. URL: [E-Flora BC Atlas Page \(ubc.ca\)](#) (17.08.2021.)
3. URL: <https://www.sunbeltsport.com/ntnf/pdf/NTNF.000562.pdf> (17.08.2021.)
4. Tiwari, P. N., and G. S. Kulmi. "Performance of Chandrasur (*Lepidium sativum*) under different levels of nitrogen and phosphorus." *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 26.3 (2004): 479-481.
5. URL: [Sjetvena grbica \(*Lepidium sativum*\) \(plantea.com.hr\)](#) (01.07.2021.)
6. Eşiyok, Dursun. "Yield and quality of garden cress affected by different nitrogen sources and growing period." *African Journal of Agricultural Research* 6.3 (2011): 608-617.
7. Vohora, S. B., and M. S. Khan. "Pharmacological studies on *Lepidium sativum*, Linn." *Indian journal of physiology and pharmacology* 21.2 (1977): 118-120.
8. URL: [\(Italiano\) *Lepidium sativum*: Sistematica, Etimologia, Habitat, Coltivazione ... \(antropocene.it\)](#) (17.08.2021.)
9. Williams, David J., et al. "Differing mechanisms of simple nitrile formation on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* and *Nasturtium officinale* seeds." *Phytochemistry* 70.11-12 (2009): 1401-1409.
10. Mali, Ravindra G., Shailaja G. Mahajan, and Anita A. Mehta. "*Lepidium sativum* (Garden cress): a review of contemporary literature and medicinal properties." *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 7.4 (2007): 331-335.
11. Sahasrabuddhe, M. B., and N. N. De. "Estrogen therapy of the Indian cress oil." *Current Science* 12.1 (1943): 23-24.
12. Kirtikar, K. "R. and Basu, BD: Indian Medicinal Plants, Vol. 1." *Lalit Mohan Basu, Allahabad* (1933): 83.
13. Raghavendra, R. H., and K. Akhilender Naidu. "Eugenol and n-3 rich garden cress seed oil as modulators of platelet aggregation and eicosanoids in Wistar albino rats." *The Open Nutraceuticals Journal* 4.1 (2011).
14. Moser, Bryan R., et al. "Composition and physical properties of cress (*Lepidium sativum* L.) and field pennycress (*Thlaspi arvense* L.) oils." *Industrial Crops and Products* 30.2 (2009): 199-205.

15. URL: <https://www.dreamstime.com/seeds-lepidium-sativum-l-white-background-image122726872> (17.08.2021.)
16. URL: <https://vitamini.hr/blog/vitaminoteka/klice-3194/>(17.08.2021.)
17. URL: [FoodData Central \(usda.gov\)](https://www.ams.usda.gov/food-data-central) (10.07.2021.)
18. Radojčić Redovniković, Ivana, et al. "Glucosinolates and their potential role in plant." *Periodicum biologorum* 110.4 (2008): 297-309.
19. Kopjar, Mirela, Drago Šubarić, and Vlasta Piližota. "Glucosinolates: Bioavailability and influence on human health." *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku* 1.1 (2012): 22-35.
20. Fahey J. W., Zalcmán A. T., Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 2001, str. 5-52
21. Zekić M. Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
22. Jerković, I. i Radonić, A. Praktikum iz organske kemije. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2009.
23. Blažević I., Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae, Doktorska disertacija, Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
24. Dohney-Adams, T., Redeker, K., Kittipol, V., Bancroft, I., Haetley, S. E. Development of an efficient glucosinolate extraction method, *Plant Methods* 2017.
25. Perašin, J. Priprava desulfoglukozinolata iz vodeno metanolnog ekstrakta kupusa za reverzno-faznu tekućinsku kromatografiju, Diplomski rad, Zagreb: Prehrambenobiotehnološki fakultet 1998.
26. Verkerk R., Dekker M. „Glucosinolates.“ *Bioactive compounds in Foods*, Blackwell Publishing Ltd., (2008): 31-47
27. Radić, Nj., Kukoč Modun, L. Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga d.d., Zagreb, 2016.
28. Korfmacher WA. „Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery.“ *Drug Discovery Today* 2005; 10(20): 1357-1367.
29. Lim CK, Lord G. „Current development in LC-MS for pharmaceutical analysis.“ *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 2002; 25(5): 547-57

30. LC/MS booklet. Available in [http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Waters%20 LC-MS%20primer.pdf](http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Waters%20LC-MS%20primer.pdf)
31. Kumar, Kalaimani Jayaraj, and Venugopal Vijayan. "An overview of liquid chromatography-mass spectroscopy instrumentation." (2014).
32. Grosser, Katharina, and Nicole M. van Dam. "A straightforward method for glucosinolate extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography (HPLC)." *Journal of visualized experiments: JoVE* 121 (2017).
33. D. Harvey, Analytical Chemistry 2.0, 2009
34. Kukoč Modun L. Interna skripta za pripremu vježbe: Molekulska apsorpcijska spektrometrija. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2003.
35. URL: [Atomic Absorption Spectrometry \(AAS\) Information | Thermo Fisher Scientific - HR](#) (25.07.2021.)
36. L. Kukoč, Spektrometrijske metode elementne analize, interna skripta, Split, 2003.
37. Perkin-Elmer. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy, The PerkinElmer Corporation, USA, 1996.
38. URL: <http://www.liskeard.cornwall.sch.uk/images/Liskeard-Sixth-Form/Atomic-Absorption-Spectrometry.pdf> (17.08.2021)
39. P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole, M. Miró, Encyclopedia of Analytical Science, 3rd Edition, Elsevier, Amsterdam, 2019
40. URL: <https://kinesis-usa.com/hollow-cathode-lamp-hcl-hollow-cathode-lamp-37mm-uncoded-hcl-cuzn-37.html> (17.08.2021.)
41. URL: https://www.ucg.ac.me/skladiste/blog_42064/objava_65756/fajlovi/instrumentalne_metode.pdf (25.07.2021.)
42. URL: https://www.hamamatsu.com/preview/en/images/xx_pmt_01/img03.png (17.08.2021.)
43. Franjo Plavšić, Irena Žuntar Uvod u analitičku toksikologiju, Zagreb, 2006. str. 69.-78.
44. URL: [Iron Element Facts \(thoughtco.com\)](#) (20.08.2021.)
45. URL: [Kloroza željeza: definicija, prevencija i liječenje \(useful-plants.net\)](#) (20.08.2021.)