
Miloš Selaković

Ispitivanje uticaja olova(II) na primarni i sekundarni metabolizam kukuruza primenom HPLC/MS i GC/MS metode

Ispitivan je uticaj olova(II) na primarni i sekundarni metabolizam kukuruza (Zea Mays) primenom HPLC/MS i GC/MS metode. Ispitivanje je rađeno tako što su sadnice kukuruza tretirane rastvorima olovo(II)-nitrata koncentracija u opsegu 5-50 mg/L tokom 30 dana i praćen je sadržaj fenolnih jedinjenja i drugih biomolekula u biljnim ekstraktima nakon tretiranja. Uočeno je da se koncentracija fenolnih jedinjenja i aminokiselina povećava prilikom tretiranja biljaka rastvorom olova(II) koncentracije 5 mg/L u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe koncentracija ove dve klase jedinjenja postepeno se smanjuje sa povećanjem koncentracije rastvora olovo(II)-nitrata kojim su biljke tretirane.

Uvod

Jone teških metala, sa kojima dođe u kontakt, biljka najviše apsorbuje korenom, zajedno sa vodom, dok manji deo apsorbuje listovima kroz pore. Apсорbovani, ovi joni izazivaju štetne efekte po biljku, poput smanjene reprodukcije i smanjene sinteze hranljivih materija. Štetna dejstva teških metala mogu se podeliti na: (1) stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, (2) supstituciju esencijalnih metalnih jona jonima teških metala i (3) vezivanje za funkcionalne grupe biomolekula kao što su proteini i nukleinske kiseline, čime se narušava njihova struktura i smanjuje ili u potpunosti zaustavlja njihiva aktivnost.

Objašnjeno je nekoliko mehanizama kojima se biljka brani od stresa izazvanog jonima teških metala. Na primer, povećana sinteza fenolnih jedinjenja u ćelijskom zidu ćelija korena čime se smanjuje apsorpcija teških metala zajedno sa vodom; zatim kompleksacija teških metala u ćeliji (npr. pomoću cisteina, raznih fenolnih jedinjenja) ili biosinteza enzima i antioksidanasa koji smanjuju broj reaktivnih kiseoničnih vrsta (Michalak 2006).

*Miloš Selaković
(1996), Užice, Dr
Veselina
Marinkovića 4,
učenik 2. razreda
Užičke gimnazije*

*MENTOR: Gordana
Krstić, master
hemičar,
istraživač-pripravnik
IHTM*

U ovom radu su ispitivani odbrambeni mehanizmi kukuruza (*Zea Mays*) na prisustvo povećane koncentracije olova(II) u zemljištu. Biljke kukuruza tretirane su rastvorom olovo(II)-nitrata, a potom je praćena koncentracija fenolnih jedinjenja i drugih biomolekula u biljkama. Promena koncentracije fenolnih jedinjenja praćena je Folin-Ciocalteu-ovom metodom, dok je promena koncentracije ostalih metabolita praćena primenom HPLC/MS i GC/MS tehnika. Takođe, u biljnom materijalu je određen i sadržaj olova atomskom apsorpcionom spektrometrijom.

Materijal i metode

Semena kukuruza postavljena su na vlažnu vatu u Petrijevim šoljama i tokom 72 h puštena da klijaju u mraku. Iskljajala semena preneti su u 18 posuda za gajenje sa zemljom, tako da se u svakoj posudi nalazilo po sedam semena. Biljke su zalivane svakog trećeg dana od dana presađivanja (ukupno šest puta) sa po 200 mL Hoagland-ovog rastvora (Hoagland *et al.* 1950). Na ovaj način biljkama su obezbeđeni svi potrebni nutritienti kako bi se eliminisao poremećaj metabolizma usled nedostatka nekog osnovnog nutritienta.

Počev od desetog do tridesetog dana od dana presađivanja, sadnice su zalivane svakog trećeg dana sa po 200 mL rastvora olovo(II)-nitrata određene koncentracije, odnosno destilovanom vodom kod kontrolne probe. Jednu probu (uzorak) činilo je 7 sadnica biljaka koje su se nalazile u istoj posudi za gajenje. Uzorci su tretirani sa ukupno 5 različitih koncentracija rastvora olova(II) i to: 5, 10, 20, 30 i 50 mg/L. Nakon tridesetog dana od dana presađivanja nadzemni deo biljnog materijala je uzorkovan i sušen na vazduhu 14 dana. Potom je osušeni biljni materijal samleven.

Za određivanje sadržaja olova(II) odmereno je 0.1 g suvog biljnog uzorka za mokru digestiju. Mokro spaljivanje je vršeno na sledeći način: odmerenoj masi biljnog materijala dodato je 12 mL smeše koncentrovane HNO₃ i 71% HClO₄ (u odnosu 2 : 1). Dobijena smeša je zagrevana na temperaturi ne većoj od 210°C. Nakon zaostajanja belog peskovitog taloga, uzorci su ohlađeni i profiltrirani. Filtrat je prenet u normalni sud od 50 mL i sud je dopunjen do crte destilovanom vodom (Allan 1971). Na ovaj način pripremljeni su uzorci u kojima je određivana koncentracija olova pomoću atomskog apsorpcionog spektrometra Thermo Electron corporation S Series AA Spectrometar.

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola, kao i analizu ostalih metabolita odmereno je 0.1 g suvog biljnog materijala i iz njega su ekstrahovana jedinjenja rastvorna u vodi i etanolu. Ekstrakcija je raćena 30%-nim vodenim rastvorom etanola (15 mL) uz refluktovanje od sat vremena. Dobijeni ekstrakt je proćeden, a rastvarać uparen na rotacionom vakuum uparivaću.

Deo suvog ekstrakta uzoraka rastvoren je u odgovarajućoj zapremini metanola tako da je koncentracija dobijenih rastvora bila 10 g/L. Dobijeni rastvori razdvajani su na HPLC-u (Agilent Technologies 1260 Infinity). Korišćeni su detektori DAD (tok hromatografisanja je praćen na talasnim dužinama od 210, 240, 254, 280 i 340 nm), kao i maseni spektrometar (Agilent Technologies 6130 Quadrupole). Kao mobilna faza korišćena je

smeša 0.2% rastvora sirćetne kiseline u vodi (A) i acetonitrila (B) po sledećoj metodi: 0-5 min 90-70% A, 5-12 min 70-10% A, 12-14 min 10-0% A, 14-15 min 0-90% A (post time 5 min). Temperatura kolone je 30°C, a protok 1 mL/min. Razdvajanje je rađeno na koloni Zorbax Eclipse XDB C18 (50 × 4.6 mm, 1.8 µm).

Deo suvog ekstrakta uzorka koji su tretirani rastvorima olova(II) koncentracije 5, 10, 20, 30 i 50 mg/L i kontrolne probe, rastvoren je u odgovarajućoj zapremini dihlormetana tako da je koncentracija rastvora iznosila 10 g/L. Dobijeni rastvori su procedeni kroz filtere (RC 0.45 µm, Agilent). U 100 µL dobijenog filtrata dodato je 50 µL smeše za silanizovanje – BSTFA (N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroetanamid) i 0.1% TMCS (Trimetilsililhlorid). Rastvor je potom termostatiran 30 minuta na 60°C. Uzorak je ohlađen do sobne temperature i analiziran gasnom hromatografijom spregnutom sa masenom spektrometrijom. Razdvajanje je rađeno na uređaju Agilent Technologies 7890A GC system: inicijalna temperatura pećnice bila je 60°C, zatim se temperatura povećavala brzinom od 3°C/min do 315°C, i na toj temperaturi je zadržana 10 min. Ukupno vreme analize iznosilo je 100 min. Razdvajanje je urađeno na HP-5 koloni (dužina kolone 30 m, prečnik kolone 0.20 mm, debljina filma 0.10 µm). Maseni spektri razdvojenih jedinjenja snimani su pomoću uređaja Agilent Technologies 7890A GC system 7890A GC/240 MS ION TRAP system.

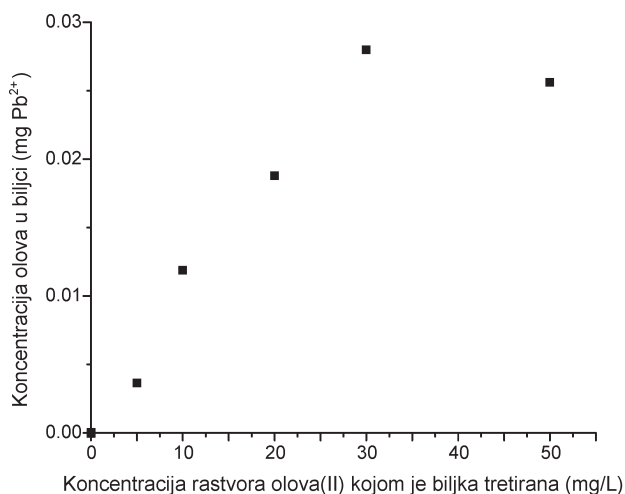
Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima određivan je u uzorcima rastvoranim u etanolu po proceduri Folin-Ciocalteu-a. Po 0.1 mL ekstrakta ili standarda galne kiseline (koncentracije 50-500 µg/mL) dodato je 7.9 mL destilovane vode. Slepa proba umesto ekstrakta sadržala je ukupno 8 mL destilovane vode. U rastvor uzoraka dodat je Folin-Ciocalteu-ov reagens za fenole (0.5mL), a zatim nakon 5 minuta i 1.5 mL 20 % Na₂CO₃ (Gorunović 1995). Smeša se energično meša i nakon inkubacije (120 minuta) na sobnoj temperaturi izmerena je absorbanca na 750 nm pomoću spektrofotometra Iskra AM5923. Korišćena je staklena kiveta optičkog puta 1 cm. Ukupni fenoli se izražavaju kao ekvivalent galne kiseline (GKE) po masi suvog ekstrakta.

Za pripremu Hoagland-ovog rastvora korišćeni su kalcijum-nitrat, kalijum-nitrat, kalijum-dihidrogenfosfat, magnezijum-sulfat, borna kiselina, mangan(II)-hlorid tetrahidrat, cink-sulfat heptahidrat, bakar(II)-sulfat pentahidrat, natrijum-molibdat, natrijum-EDTA, gvožđe(II)-sulfat. Za tretiranje biljaka korišćen je rastvor olovo(II)-nitrata. Takođe u eksperimentalnom radu korišćene su i sledeće hemikalije i reagensi: Folin-Ciocalteu-ov reagens, galna kiselina, natrijum-karbonat, etanol, azotna kiselina, perhlorna kiselina, dihlormetan, reagens za silanizaciju (BSTFA + 0.1% TMCS, GC čistoće), metanol (HPLC čistoće), acetonitril (HPLC čistoće) i voda (HPLC čistoće). Sve navedene hemikalije su p.a. čistoće, sa izuzetkom reagenasa za HPLC i GC analize.

Rezultati i diskusija

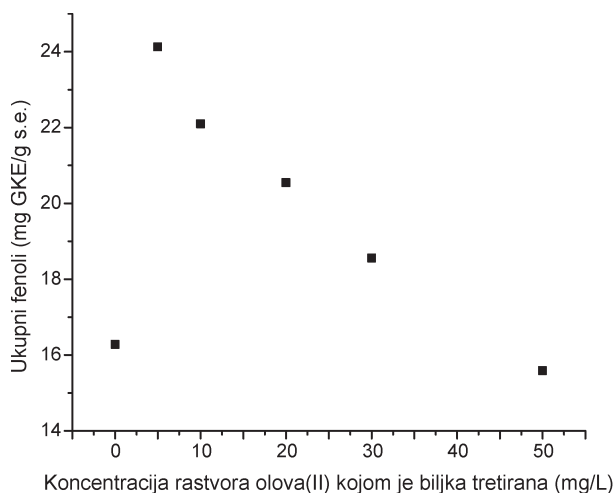
Dobijeni rezultati za koncentracije olova u biljkama i za koncentraciju ukupnih fenola predstavljaju prosečnu vrednost uzoraka tretiranih na isti način. Vrednosti koncentracija olova u biljkama prikazane su na slici 1.

Iz dobijenih rezultata može se videti da se koncentracija olova u biljka linearno povećava sa povećanjem koncentracije rastvora olovo(II)-nitrata kojim je biljka tretirana do koncentracije rastvora od 30 mg/L. Nakon ove vrednosti, zbog malog broja tačaka, ne može se pratiti trend promene koncentracije olova u biljkama u zavisnosti od koncentracije prisutnog olova u zemljištu. Ako se koncentracija usvojenog olova ustalila pri tretiranju biljaka rastvorima većih koncentracija to bi se moglo objasniti oštećenjem sprovodnih sudova koji transportuju jone iz korena u nadzemne delove.



Slika 1. Zavisnost koncentracije olova(II) u biljkama od koncentracije rastvora olova(II) kojom su biljke tretirane

Figure 1. Concentration of lead(II) in plants dependence on concentration of solutions of lead(II) which was used for plants' treatments



Slika 2. Zavisnost koncentracija fenolnih jedinjenja u biljkama od koncentracije rastvora olova(II) kojima su biljke tretirane

Figure 2. Concentration of phenolic compounds in plants dependence on concentration of solutions of lead(II) which was used for plants' treatments

Ukupni fenoli u uzorcima računati su kao ekvivalent galne kiseline prema sledećoj jednačini:

$$A_{750} = 0.00093 \cdot c(\text{GK}) - 0.02055$$

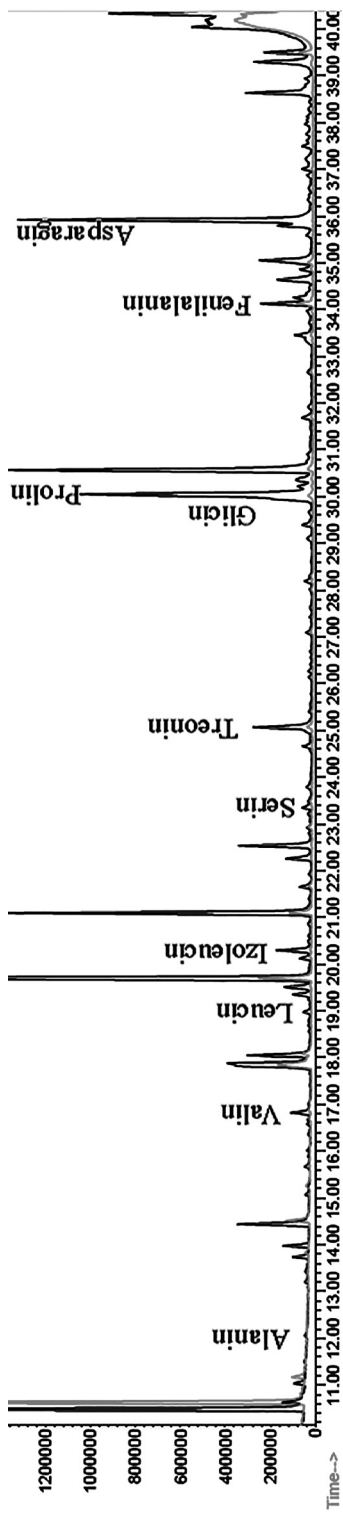
Data jednačina dobijena je na osnovu kalibracione krive za galnu kiselinu kao standarda za fenolna jedinjenja. Vrednosti ukupnih fenola u biljkama prikazani su na slici 2.

Dobijeni rezultati pokazuju da se koncentracija fenolnih jedinjenja u biljkama povećala u odnosu na kontrolnu grupu pri tretiranju biljaka sa početnom koncentracijom rastvora olovo(II)-nitrata. Međutim ako se koncentracija rastvora olova(II) kojim su biljke tretirane poveća iznad 5 mg/L, dolazi do pada koncentracije fenolnih jedinjenja u biljkama. Ovo se može objasniti time što pri većim koncentracija dostupnog olova(II) u biljne ćelije dolazi do degradacije ili blokiranja enzima koje katalizuju sintezu fenolnih jedinjenja. Takođe, smanjenje fenolnih komponenti može značiti i to da ova jedinjenja reaguju sa nusproizvodima (kao što su slobodni radikali i sl.) koji nastaju prilikom dejstva olova(II) pa se koncentracija fenolnih jedinjenja smanjuje.

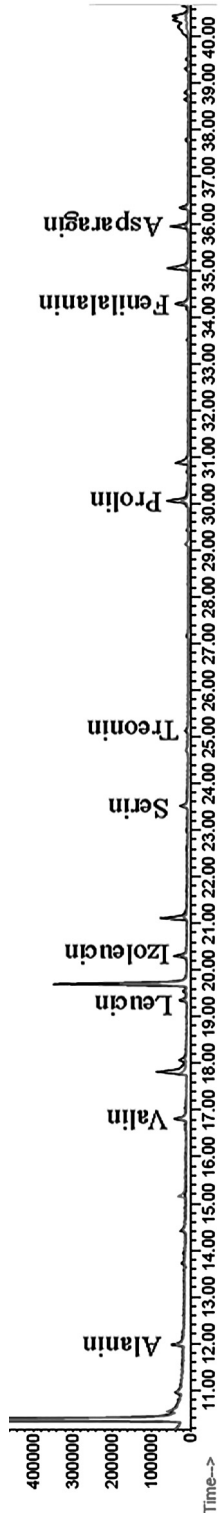
Za poređenje profila ekstrahovanih jedinjenja rastvornih u vodenom rastvoru etanola korišćena je HPLC tehnika. Na osnovu izgleda hromatograma dobijenog sa DAD detektora proizilazi da su uzorci tretirani najmanjom koncentracijom rastvora olovo(II)-nitrata (kao i kontrolne grupe), veoma složene smeše sa velikim brojem različitih klasa organskih jedinjenja, a da se pri povećanju koncentracije rastvora olovo(II)-nitrata kojim su uzorci tretirani broj komponenta i različitih klasa jedinjenja smanjuje.

Na osnovu gasnih hromatograma identifikovan je veliki broj metabolita ekstrahovanih iz biljnog materijala. Preklapanjem hromatograma za različite uzorke može se uočiti promena koncentracije metabolita u ekstraktu. Na slici 3 prikazani su delovi hromatograma (od 10. do 40. min) za uzorke tretirane koncentracijama 5 i 50 mg/L (slika 3a), uzorke tretirane koncentracijama 10 i 20 mg/L (slika 3b) i uzorke tretirane koncentracijama 20 i 30 mg/L (slika 3c).

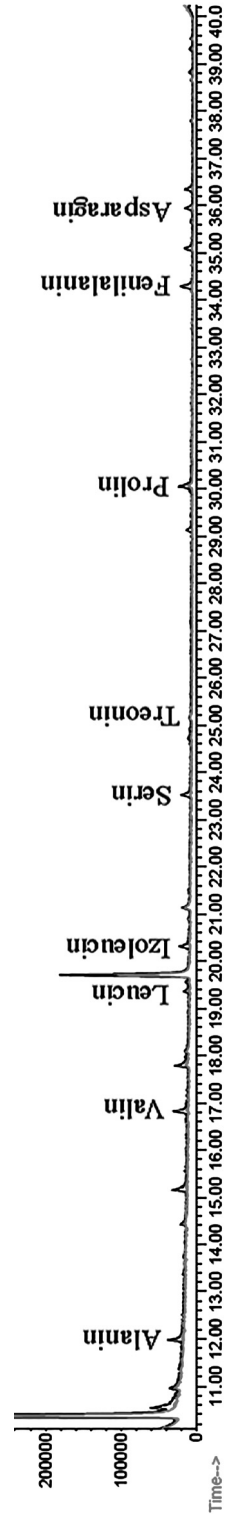
Na osnovu dobijenih hromatograma može se uočiti da se koncentracija svih ekstrahovanih aminokiselina povećala u uzorku tretiranog sa najmanjom koncentracijom rastvora olova(II) (5 mg/L) u odnosu na kontrolnu grupu. Ovo se može objasniti činjenicom da su za sintezu enzima i proteina potrebne aminokiseline, i da se neki od enzima koriste za sintezu fenolnih jedinjenja koji su potrebni biljci za vezivanje nusprodukata nastalih dejstvom jona olova u ćeliji. Takođe možemo primetiti i da se koncentracija aminokiselina postepeno smanjuju pri povećanju koncentracije rastvora olovo(II)-nitrata kojim su biljke tretirane. Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da je uzrok smanjenja koncentracije aminokiselina povećana sinteza potrebnih enzima za sintezu fenolnih jedinjenja ili blokiranje određenih enzima koji su potrebni za sintezu aminokiselina.



a



b



c

Slika 3 (naspramna strana). Deo hromatograma za uzorke kukuruza tretiranih rastvorima olova(II) koncentracija: a) 5 mg/L (crna linija) i 50 mg/L (siva linija); b) 10 mg/L (crna linija) i 20 mg/L (siva linija); c) 20 mg/L (crna linija) i 30 mg/L (siva linija)

Figure 3 (opposite page). Part of chromatograms of corns' samples which was treated with solution of lead(II) of concentration: a) 5 mg/L (black) and 50 mg/L (gray); b) 10 mg/L (black) and 20 mg/L (gray); c) 20 mg/L (black) and 30 mg/L (gray)

Zaključak

Na osnovu dobijenih odnosa fenolnih komponenti i aminokiselina može se zaključiti da se biljna vrsta *Zea Mays* pri manjim koncentracijama olova koje apsorbuje brani povećanom sintezom fenolnih jedinjenja ili aminokiselina. Pri koncentracijama rastvora olova(II) većim od 5 mg/L biljka nije sposobna da se odbrani od štetnog dejstva olova, jer joni olova(II) najverovatnije denaturišu ili blokiraju enzime koji su potrebni za sintezu fenolnih jedinjenja i aminokiselina zamenom njihovog esencijalnog metalnog jona jonom olova(II) ili vezivanjem SH-grupa.

Praćenje promena koncentracija biljnih metabolita uzrokovanih dejstvom zagađivača primenom HPLC/MS i GC/MS metoda pokazalo se kao vrlo praktičano, jer se za relativno kratko vreme dobijaju koncentracije velikog broja jedinjenja prisutnih u biljnom materijalu. Klasične i spektrofotometrijske u poređenju sa HPLC/MS i GC/MS metodama ne daju dovoljno selektivne rezultate i ne mogu se koristiti za određivanje veoma malih koncentracija jedinjenja u uzorku.

Literatura

- Allan J. E. 1971. *The preparation of agricultural samples for analysis by atomic absorption spectroscopy*. Hamilton: Varion Techton
- Folin O., Ciocalteu V., 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of biological chemistry*, **73**: 627.
- Gorunović M. 1995. *Praktikum iz farmakognozije (hemijsko ispitivanje droga)*. Beograd: Jugohemija
- Hoagland D. R., Arnon D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Circular*, **347**: 1.
- Michalak A. 2006. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, **15** (4): 523.
- Wojdy A., Oszmianski J., Czemyers R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105**: 940.

Miloš Selaković

Study of Influence Lead(II) on Primary and Secondary Metabolism of *Zea Mays* Using HPLC/MS and GC/MS Method

In this research corn's defense mechanisms of presence of increase concentration of lead(II) in soil was studied. The research was carried out the plant treated with solutions of different concentration of lead(II)-nitrate and after that followed by absorption lead using method of atomic absorption spectroscopy; concentration of all phenolic compounds by Fonic-Ciocalte method and concentration of other biomolecules in plant by HPLC/MS and GC/MS method.

Research has shown that plant species *Zea Mays* defend of lead's harmful action increasing the synthesis of phenolic compounds and amino acids. Phenolic compounds are probably used to eliminate by-products like reactive oxygen species which was generated by lead(II). Amino acids are probably used to synthesis of enzymes which catalyze synthesis of phenolic compounds. Also it should be noted that modern methods like HPLC and GC allow monitoring of changes in very small concentration of compounds which is included in primary and secondary metabolism, therefore there are very selective.

