Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata

Vlajčević, Dina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:167:449282

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

TERMIČKA, ENZIMSKA I MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA RAZGRADNJA GLUKOZINOLATA TE NJIHOVA IDENTIFIKACIJA PREKO RAZGRADNIH I DESULFATIZIRANIH PRODUKATA

DIPLOMSKI RAD

DINA VLAJČEVIĆ

Matični broj: 70

Split, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

TERMIČKA, ENZIMSKA I MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA RAZGRADNJA GLUKOZINOLATA TE NJIHOVA IDENTIFIKACIJA PREKO RAZGRADNIH I DESULFATIZIRANIH PRODUKATA

DIPLOMSKI RAD

DINA VLAJČEVIĆ

Matični broj: 70

Split, srpanj 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

THERMAL, ENZYMATIC AND MICROWAVE ASSISTED DEGRADATION OF GLUCOSINOLATES AND THEIR IDENTIFICATION USING BREAKDOWN AND DESULFATED PRODUCTS

DIPLOMA THESIS

DINA VLAJČEVIĆ

Parent number: 70

Split, July 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević
Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag.chem.

TERMIČKA, ENZIMSKA I MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA RAZGRADNJA GLUKOZINOLATA TE NJIHOVA IDENTIFIKACIJA PREKO RAZGRADNIH I DESULFATIZIRANIH PRODUKATA

Dina Vlajčević, 70

Sažetak: Glukozinolati su sekundarni metaboliti koji su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Capparales, a najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju dobro poznate biljke iz svakodnevne prehrane kao što su kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa, gorušica i druge. Po kemijskoj strukturi to su *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni. Enzimskom, kemijskom ili termičkom razgradnjom nastaje niz biološki aktivnih produkata od kojih su najviše istaživani izotiocijanati. U ovom radu primjenjene su različite metode izolacije uključujući hidrodestilaciju, autolizu te mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju kako bi istražili termičku, enzimsku i mikrovalovima potpomognutu razgradnju glukozinolata. Posebno je zanimljiva mikrovalna ekstrakcija jer predstavlja pravi primjer zelene tehnologije.
Cilj ovoga rada bio je izolirati i identificirati hlapljive sumporove spojeve iz sredozemne rusomače (*Capsella bursa-pastoris* L. Medik.), rotkvice (*Raphanus sativus* var. *radicula* Pers.), bijele rotkve (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L.H. Bailey), čunjastog repušca (*Bunias erucago* L.) i sivkaste ljubičine (*Matthiola inacana* (L.) R. Br.). Za identifikaciju izoliranih spojeva korištene su GC-MS i HPLC-UV tehnike. U izolatima sredozemne rusomače identificiran je samo dimetil trisulfid. U izolatima rotkvice je preko razgradnih produkata identificiran glukodehidroerucin, a u bijeloj rotkvi glukodehidroerucin i glukoberteroin. U izolatima čunjastog repušca su preko desulfatiziranih produkata identificirani glukoerucin, glukonapin i glukotropeolin, a u sivkastoj ljubičini glukorafenin.

Ključne riječi: glukozinolati**,** desulfoglukozinolati, Brassicaceae, GC-MS, HPLC
Rad sadrži: 68 stranica, 59 slika, 11 tablica, 1 prilog, 37 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek - član
3. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević - mentor

Datum obrane: 13. srpnja 2018.

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. 3

Mentor: Ivica Blažević, PhD, Associate professor
Technical assistance: Azra Đulović, MChem

THERMAL, ENZYMATIC AND MICROWAVE ASSISTED DEGRADATION OF GLUCOSINOLATES AND THEIR IDENTIFICATION USING BREAKDOWN AND DESULFATED PRODUCTS

Dina Vlajčević, 70

Abstract: Glucosinolates are secondary metabolites present in 16 botanical families of the Capparales Order, among which the most important is Brassicaceae family, which includes well-known plants of everyday nutrition such as cabbage, broccoli, cauliflower, broomsticks, radis, beets and others. Chemically these are *β*-thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with a variable side chain. Glucosinolates are chemically and biologically inactive. Enzymatic, chemical, and thermal degradation result in formation of series of biologically active products, among which the most studied ones are isothiocyanates. In our study, we used different methods including hydrodistillation, autolysis followed by extraction, and microwave assisted distillation and extraction in order to investigate thermal, enzymatic, and microwave-assisted decomposition of glucosinolates. Microwave extraction is particularly interesting because it represents a true example of green technology.
The aim of this study was to isolate and identify volatile sulfur compounds from the *Capsella bursa-pastoris* L. Medik., *Raphanus sativus* var. *radicula* Pers., *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L. H Bailey, *Bunias erucago* L. and *Matthiola inacana* (L.) R. Br.). GC-MS and HPLC-UV techniques were used to identify the isolated compounds. Only dimethyl trisulfide was identified in the isolates of the *Capsella bursa-pastoris* L. Medik. Glucodehydroerucin has been identified by the breakdown products in *Raphanus sativus* var. *radicula* Pers. and glucodehydroerucin and glucoberteroin in *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L. H Bailey. Glucoerucin, gluconapin and glucotropaeolin in *Bunias erucago* L. and glucoraphenin in *Matthiola inacana* (L.) R. Br. have been identified by their desulfated products.

Keywords: glucosinolates, desulfoglucosinolates, Brassicaceae, GC-MS, HPLC
Thesis contains: 68 pages, 59 figures, 11 tables, 1 supplement, 37 references
Original in: Croatian.

Defence committee:

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

Defence date: July 13th, 2018.

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

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića i neposrednim vodstvom Azre Đulović, mag. chem., u razdoblju od listopada 2017. do svibnja 2018. godine.

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

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću na pruženoj prilici, stručnim savjetima i svom znaju koje je nesebično podijelio sa mnom prilikom izvođenja i pisanja rada.

Zahvaljujem se i asistentici, Azri Đulović mag. chem. na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, a posebno VELIKO HVALA na stručnim i prijateljskim savjetima, posvećenom vremenu i ogromnom trudu.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na neizmjernoj podršci, strpljenju i razumijevanju.

Dina

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Izolirati hlapljive sumporove spojeve iz vrsta *Capsella bursa-pastoris* L. Medik., *Raphanus sativus* var. *radicula* Pers. i *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L.H. Bailey korištenjem mikrovalne ekstrakcije te usporediti s klasičnom ekstrakcijom i hidrodestilacijom.
2. Identificirati hlapljive izolate korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS).
3. Izolirati glukozinolate iz vrste *Bunias erucago* L. i *Matthiola incana* (L.) R. Br. metodom ekstrakcije uz desulfataciju.
4. Identificirati izolirane desulfoglukozinolate korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

SAŽETAK

Glukozinolati su sekundarni metaboliti koji su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Capparales, a najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju dobro poznate biljke iz svakodnevne prehrane kao što su kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa, gorušica i druge. Po kemijskoj strukturi to su *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni. Enzimskom, kemijskom ili termičkom razgradnjom nastaje niz biološki aktivnih produkata od kojih su najviše istaživani izotiocijanati. U ovom radu primjenjene su različite metode izolacije uključujući hidrodestilaciju, autolizu te mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju kako bi istražili termičku, enzimsku i mikrovalovima potpomognutu razgradnju glukozinolata. Posebno je zanimljiva mikrovalna ekstrakcija jer predstavlja pravi primjer zelene tehnologije.

Cilj ovoga rada bio je izolirati i identificirati hlapljive sumporove spojeve iz sredozemne rusomače (*Capsella bursa-pastoris* L. Medik.), rotkvice (*Raphanus sativus* var. *radicula* Pers.), bijele rotkve (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L.H. Bailey), čunjastog repušca (*Bunias erucago* L.) i sivkaste ljubičine (*Matthiola inacana* (L.) R. Br.). Za identifikaciju izoliranih spojeva korištene su GC-MS i HPLC-UV tehnike. U izolatima sredozemne rusomače identificiran je samo dimetil trisulfid. U izolatima rotkvice je preko razgradnih produkata identificiran glukodehidroerucin, a u bijeloj rotkvi glukodehidroerucin i glukoberteroin. U izolatima čunjastog repušca su preko desulfatiziranih produkata identificirani glukoerucin, glukonapin i glukotropeolin, a u sivkastoj ljubičini glukorafenin.

Ključne riječi: glukozinolati**,** desulfoglukozinolati, Brassicaceae, GC-MS, HPLC

SUMMARY

Glucosinolates are secondary metabolites present in 16 botanical families of the Capparales Order, among which the most important is Brassicaceae family, which includes well-known plants of everyday nutrition such as cabbage, broccoli, cauliflower, broomsticks, radis, beets and others. Chemically these are *β*-thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with a variable side chain. Glucosinolates are chemically and biologically inactive. Enzymatic, chemical, and thermal degradation result in formation of series of biologically active products, among which the most studied ones are isothiocyanates. In our study, we used different methods including hydrodistillation, autolysis followed by extraction, and microwave assisted distillation and extraction in order to investigate thermal, enzymatic, and microwave-assisted decomposition of glucosinolates. Microwave extraction is particularly interesting because it represents a true example of green technology.

The aim of this study was to isolate and identify volatile sulfur compounds from the *Capsella bursa-pastoris* L. Medik., *Raphanus sativus* var. *radicula* Pers., *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L. H Bailey, *Bunias erucago* L. and *Matthiola inacana* (L.) R. Br.). GC-MS and HPLC-UV techniques were used to identify the isolated compounds. Only dimethyl trisulfide was identified in the isolates of the *Capsella bursa-pastoris* L. Medik. Glucodehydroerucin has been identified by the breakdown products in *Raphanus sativus* var. *radicula* Pers. and glucodehydroerucin and glucoberteroin in *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L. H Bailey. Glucoerucin, gluconapin and glucotropaeolin in *Bunias erucago* L. and glucoraphenin in *Matthiola inacana* (L.) R. Br. have been identified by their desulfated products.

Keywords: glucosinolates, desulfoglucosinolates, Brassicaceae, GC-MS, HPLC

Sadržaj

UVOD 1
1. **OPĆI DIO** 2
1.1. Hlapljivi sumporovi spojevi 2
1.1.1. Klasifikacija hlapljivih sumporovih spojeva 2
1.2. Glukozinolati 3
1.2.1. Struktura i nomenklatura glukozinolata 3
1.3. Razgradnja glukozinolata 6
1.3.1. Enzimska razgradnja 6
1.3.2. Neenzimska razgradnja 9
1.4. Biološka aktivnost 11
1.5. Metode izolacije hlapljivih spojeva 14
1.5.1. Destilacija 14
1.5.1.1. Vodena destilacija 14
1.5.2. Ekstrakcija 16
1.5.2.1. Mikrovalna ekstrakcija 16
1.5.3. Ekstrakcija glukozinolata 19
1.6. Metode identifikacije hlapljivih spojeva 20
1.6.1. Kromatografija 20
1.6.1.1. Plinska kromatografija 21
1.6.2. Spektrometrija masa 22
1.6.2.1. Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa 23
1.6.3. Tekućinska kromatografija 24
1.6.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti 24
1.7. Brassicaceae 26
1.7.1. Sredozemna rusomača (*Capsella bursa-pastoris* L. Medik.) 26
1.7.2. Rotkvica (*Raphanus sativus* var. *radicula* Pers.) 27
1.7.3. Čunjasti repušac (*Bunias erucago* L.) 28
1.7.4. Sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R. Br.) 29
2. **EKSPERIMENTALNI DIO** 30
2.1. Kemikalije i aparatura 30

2.2. Biljni materijal ... 31
2.2.1. Sredozemna rusomača ... 31
2.2.2. Rotkvica i bijela rotkva ... 32
2.2.3. Čunjasti repušac ... 33
2.2.4. Sivkasta ljubičina ... 34
2.3. Metode izolacije ... 35
2.3.1. Mikrovalna ekstrakcija ... 35
2.3.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće ... 38
2.3.3. Hidrodestilacija ... 39
2.3.4. Ekstrakcija glukozinolata ... 41
2.4. Analiza ... 47
2.4.1. GC-MS analiza ... 47
2.4.2. HPLC analiza desulfoglukozinolata ... 48
3. **REZULTATI I RASPRAVA** ... 50
3.1. Razgradnja glukozinolata i GC-MS analiza ... 50
3.2. Izolacija i identifikacija glukozinolata HPLC tehnikom ... 57
4. **ZAKLJUČAK** ... 63
5. **LITERATURA** ... 64
6. **PRILOZI** ... 67

UVOD

U posljednje vrijeme sve je popularniji trend zdravog života i u skladu s tim biljke porodice Brassicaceae postale su meta brojnih istraživanja kako zbog svoje nutritivne vrijednosti tako i zbog glukozinolata koji se nalaze u ovim biljaka. Glukozinolatima se, između ostaloga, pripisuju i antitumorska svojstva što je u današnje vrijeme vrlo važno.

Po kemijskoj strukturi glukozinolati su *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem. Ovi spojevi su pronađeni u 16 biljnih porodica reda Capparales, od kojih je najvažnija porodica Brassicaceae, a među rodovima se posebno ističe rod *Brassica* koji obuhvaća niz biljaka prisutnih u svakodnevnoj prehrani. Glukozinolati su biološki neaktivni spojevi, međutim uslijed oštećenja biljnog tkiva oslobađa se enzim mirozinaza koji razgrađuje glukozinolate pri čemu nastaju biološki aktivni produkti. Mogu se razgraditi još toplinski i kemijski. Najvažniji razgradni produkti su izotiocijanati, tiocijanati, nitrili i epitionitrili.

1. OPĆI DIO

1.1. Hlapljivi sumporovi spojevi

Hlapljivi sumporovi spojevi su posebna grupa metaboličkih produkata koje se prvenstveno može pronaći u biljkama gdje su rasprostranjeni u 43 biljne porodice i 173 biljna roda. Značajnije biljne porodice koje sadrže ove spojeve su Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae, Phytolaccaceae i Poaceae. U biljkama se nalaze u gotovo svim dijelovima (korijen, stabljika, list, cvijet, sjemenka), a sadržaj ovisi o vrsti i razvojnom stadiju biljke, klimi i načinu uzgoja.[1]

Kemijske strukture hlapljivih sumporovih spojeva variraju od jednostavnih pa do složenih. Primjeri jednostavnih struktura su metantiol i dimetil sulfid. Još složenije strukture mogu sadržavati i drugi heteroatom, npr. dušik.[2]

Nekim od ovih spojeva se pridodaju važna biološka svojstva kao što su antioksidacijska, antitumorska i antibakterijska aktivnost te induciranje apoptoze.[2]

1.1.1. Klasifikacija hlapljivih sumporovih spojeva

Ovi spojevi su klasificirani u 4 grupe s obzirom na broj sumporovih atoma prisutnih u njihovoj strukturi. Prva grupa obuhvaća spojeve koji u svojoj strukturi sadrže jedan atom sumpora (S_1), drugu grupu čine spojevi s dva sumporova atoma u strukturi (S_2), treća grupa je s tri (S_3) i analogno četvrta grupa s četiri sumporova atoma u strukturi (S_4). Navedene grupe su dalje podijeljene s obzirom na prisutnost heteroatoma (dušika i/ili kisika) te s obzirom na oblik molekule. Izotiocijanati i tiocijanati predstavljaju posebnu grupu hlapljivih sumporovih spojeva.[2]

1.2. Glukozinolati

Glukozinolati su važna skupina sekundarnih metabolita u nekim biljnim vrstama. Ubrajaju se u specifičnu skupinu kemijskih spojeva tzv. fitokemikalija koja je zastupljena u 16 botaničkih porodica reda Capparales. Za prehranu ljudi najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju dobro poznate biljke iz svakodnevne prehrane kao što su kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa, gorušica i druge. Glukozinolati su pronađeni u svim dijelovima biljke, a u nekim biljkama je pronađeno čak preko 15 različitih vrsta glukozinolata. Sastav, raspodjela i sadržaj ovise o vrsti biljke, varijetetu unutar iste vrste, dijelu i razvojnom stadiju biljke te o uvjetima razvoja. Pojedine biljke sadrže samo nekoliko vrsta glukozinolata u značajnijim količinama. Sadržaj je općenito visok u sjemenkama, dok je u listu, stabljici i korijenu znatno manji.[3,4]

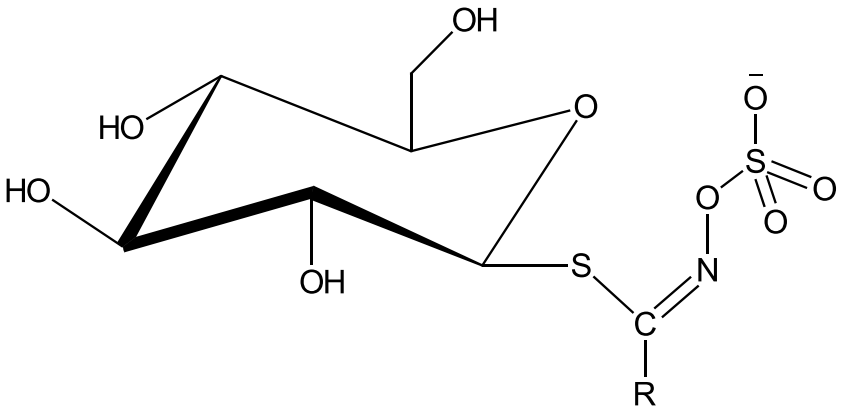
Glukozinolati i njihovi razgradni produkti zanimljivi su zbog svojih nutritivnih, antitumorskih i antibakterijskih svojstava te zbog osiguravanja karakteristične arome određenog povrća. Toksični su za neke insekte tako da se mogu koristiti kao prirodni pesticidi.[3]

Glukozinolati, poznati pod trivijalnim imenima, sinigrin (alilglukozinolat) i sinalbin (4-hidroksibenzilglukozinolat) izolirani su još 1830. godine iz sjemenki crne (*Brassica nigra*) i bijele (*Sinapis alba*) gorušice.[4]

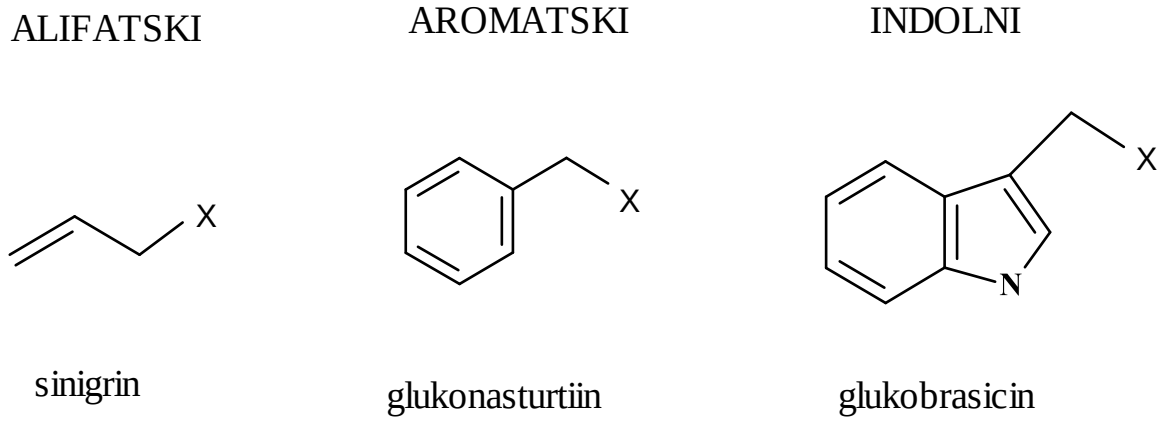
1.2.1. Struktura i nomenklatura glukozinolata

Po kemijskoj strukturi, glukozinolati su *β*-tioglukozid-*N*-hidroksisulfati kod kojih su glukoza i sulfatna skupina vezane na aglukon koji se sintetizira iz aminokiselina i njihovih analoga. Opća strukturna formula prikazana je na Slici 1. Struktura bočnog lanca (R), po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju, određena je aminokiselinom. S obzirom na strukturu bočnog lanca glukozinolati se mogu podijeliti na alifatske, aromatske i indolne (Slika 2.). Ako aglukonski lanac potječe od aminokiselina alanin, leucin, izoleucin, valin ili metionin, riječ je o alifatskim glukozinolatima. Kod aromatskih je aglukonski prekursor fenilalanin ili tirozin, a kod indolnih triptofan. Bočni lanac glukozinolata je promjenjivi dio molekule i osnova je njihove strukturne

raznolikosti te biološke aktivnosti produkata koji nastaju njihovom enzimskom, termičkom ili kemijskom razgradnjom. U prirodi se pojavljuju kao kalijeve soli topljive u vodi i razrijeđenim alkoholima.[3-5]



Slika 1. Opća strukturna formula glukozinolata.



Slika 2. Primjeri struktura glukozinolata (X = glukozinolatni dio).

Ettlinger i Dateo su uveli polusistematsku nomenklaturu glukozinolata. Anion soli se označava kao „glukozinolat“, a ime R-skupine se koristi kao prefiks. Za većinu se glukozinolata koriste trivijalna imena koja su izvedena od latinskog imena biljke iz koje

je spoj prvi put izoliran, s prefiksom „gluko“ i sufiksom „in“. Nekoliko primjera je prikazano u Tablici 1.[4]

Tablica 1. Glukozinolati prirodnog porijekla s ustanovljenim strukturama.[4]

GLUKOZINOLAT	**R-SKUPINA**	**BILJKA**
Glukokaparin	CH_3	*Cleome spinosa*
Glukolepidin	CH_3CH_2	*Lepidium Menziesii*
Glukokohlearin	$CH_3CH_2(CH_3)CH$	*Cochlearin officinalis*
Sinigrin	$CH_2=CHCH_2$	*Brassica nigra*
Glukonapin	$CH_2=CH(CH_2)_2$	*Brassica napus*
Glukoibervirin	$CH_3S(CH_2)_3$	*Iberis sempervirens*
Glukorafenin	$CH_3S(O)CH=CH(CH_2)_2$	*Raphanus sativus*
Sinalbin	*p*-$HOC_6H_4CH_2$	*Sinapis alba*
Glukoeripestrin	$CH_3OOC(CH_2)_3$	*Erysimum rupestre*

1.3. Razgradnja glukozinolata

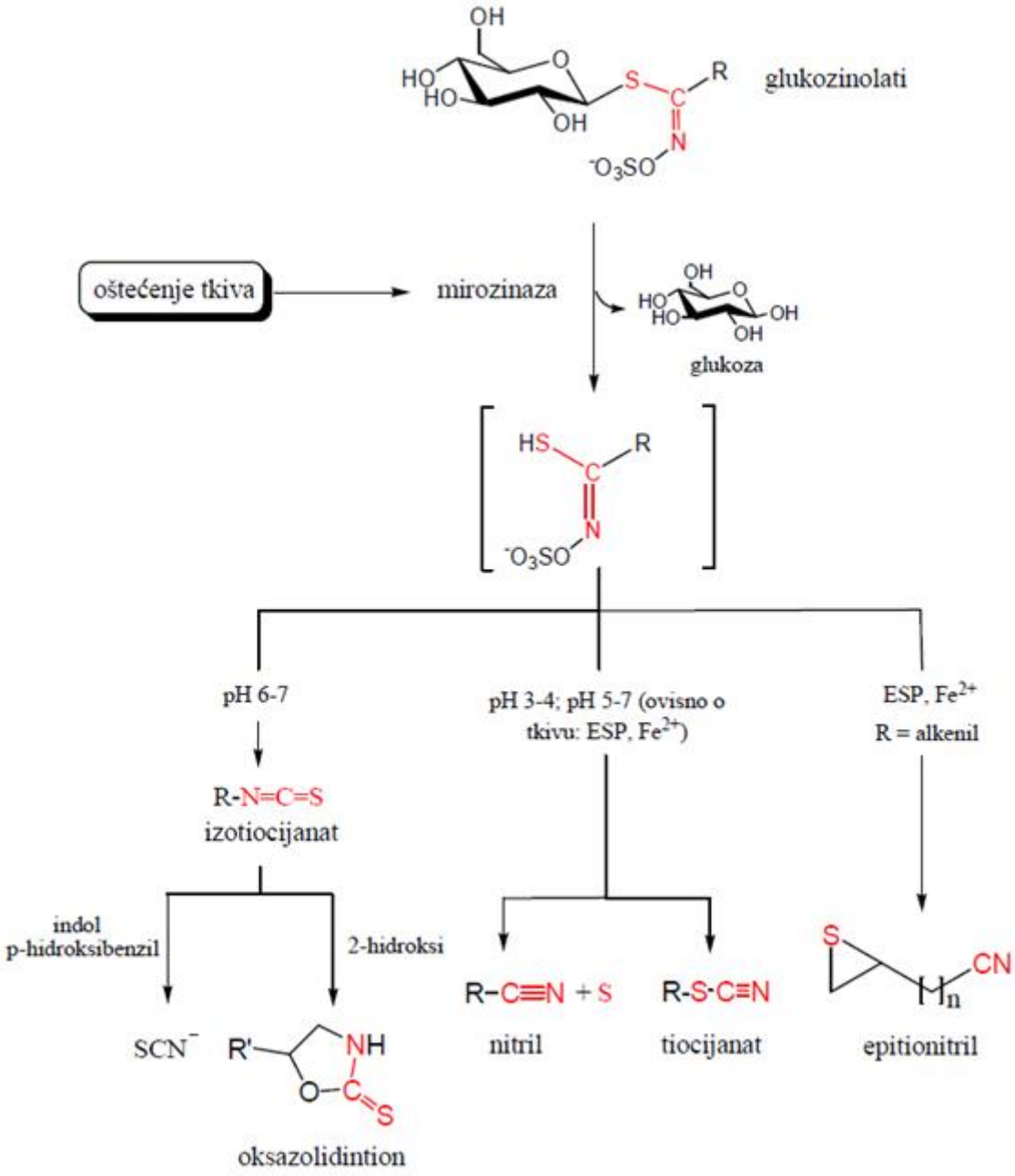
Sami glukozinolati su biološki neaktivni spojevi. Tek oštećenjem biljnog tkiva dolaze u kontakt s endogenim enzimom mirozinazom pri čemu dolazi do enzimske hidrolize i nastaje niz razgradnih produkata koji uključuju tiocijanate, izotiocijanate, nitrile, epitionitrile i vinil-oksazolidintione. Neki od nastalih razgradnih produkata posjeduju antioksidacijska, antibakterijska i antitumorska svojstva, a neki su štetni. Razgradnja glukozinolata se također događa djelovanjem kiseline ili baze.[4,6]

1.3.1. Enzimska razgradnja

Glukozinolati se hidroliziraju enzimom mirozinazom (tioglukohidrolaza; E.C. 3.2.1.147) u različite spojeve (izotiocijanate, nitrile, tiocijanate, epitionitrile, oksazolidintione), čiji sastav ovisi o pH, metalnim ionima i epitiospecifičnom proteinu (ESP) (Slika 3.).[4]

Mirozinaza nije identificirana kao jedan enzim već kao porodica enzima koji među vrstama i unutar jedne biljke imaju sličnu funkciju. Mirozinaza i glukozinolati su odvojeni unutar biljke. Pretpostavka je da se glukozinolati nalaze u vakuolama različitih vrsta stanica, a mirozinaza unutar struktura koje se nazivaju „mirozinskim stanicama“ koje su raspoređene među drugim stanicama biljnog tkiva. Oštećenje staničnog tkiva omogućuje kontakt glukozinolata i mirozinaze, rezultirajući oslobađanjem razgradnih produkata.[4,6]

U reakciji hidrolize cijepa se veza sumpor-glukoza (tioglukozidna veza) u molekuli glukozinolata te se oslobađaju glukoza, sulfat i aglikon. Oslobođeni aglikon je nestabilan te se spontano pregrađuje dajući različite razgradne produkte odgovorne za karakterističan okus i miris biljaka. Krajnji produkti nastaju preko barem jednog nestabilnog međuprodukta, na kojeg utječu reakcijski uvjeti koji daju konačni produkt, a koji uključuju pH, R-skupinu i prisutnost metalnih iona kao što je Fe^{2+} (Slika 3.).[4,6]



Slika 3. Opća shema razgradnje glukozinolata.[4]

1.3.1.1. Razgradni produkti

Izotiocijanati (R-N=C=S) su se tijekom povijesti smatrali "normalnim" produktima hidrolize glukozinolata. Nastajanje izotiocijanata događa se pri neutralnoj pH vrijednosti kada nestabilni aglukonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji u R-N=C=S konfiguraciju. Izotiocijanati koji sadrže *β*-hidroksilnu skupinu su nestabilni i spontanom intramolekulskom reakcijom tvore cikličke tionske spojev-oksazolidintione.

U metabolizmu čovjeka izotiocijanati se vežu na glutation uz pomoć enzima glutation-*S*-transferaze i dalje metaboliziraju do merkaptanske kiseline. Zbog svoje toksičnosti izotiocijanati su razmatrani kao mogući pesticidi.[4,6]

Uvjeti pod kojima nastaju **tiocijanati** (R-S-C≡N) nisu još dovoljno istraženi. Uz mirozinazu, za nastanak tiocijanata potrebno je prisustvo još jednog enzima, tzv. tiocijanat formirajućeg proteina (TFP). Smatra se da tiocijanati nastaju iz glukozinolata koji imaju specifične bočne lance (R) kao što su alil, benzil i 4-(metiltio)butil glukozinolati.

Nastanak SCN^- iz glukozinolata uvjetovan je prisutnošću određenih R-skupina. Dokazi upućuju na to da je, ovisno o okolini, tiocijanatni anion rezonantni hibrid s nabojem lokaliziranim na S atomu ($^-S-C=N$) ili na dušikovom atomu ($S=C=N^-$).[4,6]

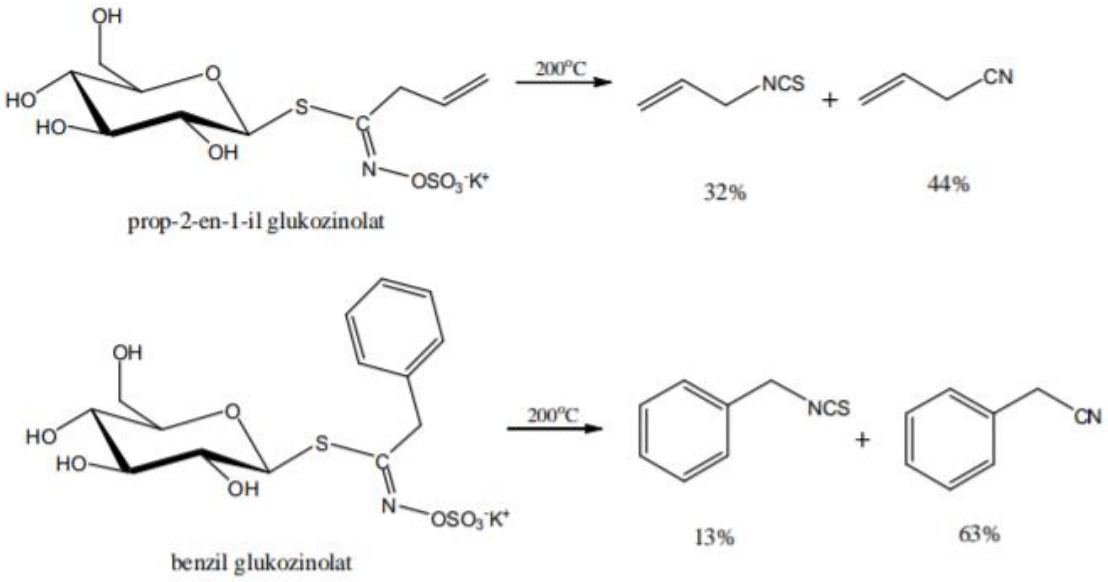
Nastajanje **nitrila** (R-C≡N) ne zahtijeva pregradnju međuprodukta već samo gubitak sumpora iz molekule. Nastajanje nitrila ima prednost nad izotiocijanatima pri nižim pH vrijednostima (< 4), a prisustvo Fe^{2+} ili tiolnih spojeva također povećava mogućnost nastanka nitrila.[4]

Epitonitrili nastaju pri istim uvjetima kao i nitrili, ali samo iz glukozinolata koji imaju terminalnu dvostruku vezu u bočnom lancu i uz prisustvo epitospecifičnog proteina (ESP) i Fe^{2+} iona. ESP usmjerava mirozinazom kataliziranu hidrolizu glukozinolata na način da umjesto izglednog nastajanja izotiocijanata nastaju ili nitrili ili epitionitrili.[4,6]

1.3.2. Neenzimska razgradnja

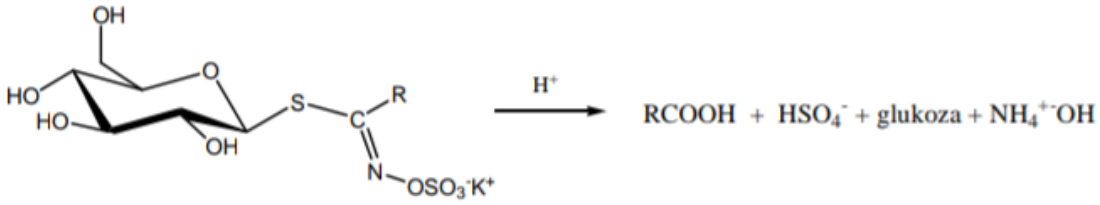
Glukozinolati se, osim enzimski, razgrađuju kemijskom hidrolizom, ali i pod utjecajem povišene temperature.

S obzirom na važnost glukozinolata u ljudskoj prehrani bilo je potrebno istražiti njihovu toplinsku razgradnju. MacLeod i suradnici (1981.) su proučavali toplinsku razgradnju glukozinolata pri različitim temperaturama kolona i injektora plinskog kromatografa. Pronađeno je da se na temperaturi kolone od 200 °C prop-2-en-1-il glukozinolat razgradio dajući 44% nitrila i 32% izotiocijanata, dok se benzil glukozinolat razgradio dajući 63% nitrila i 13% izotiocijanata (Slika 4.). Istraživanjem toplinske razgradnje indolnih glukozinolata (Slominski i Campbell, 1988., 1989.) zabilježeno je uglavnom nastajanje tiocijanata i indolilacetonitrila za razliku od razgradnje endogenom hidrolizom (autolizom) kojom uglavnom nastaju tiocijanati i karbinoli te u maloj količini indolilacetonitrili.[4,6]



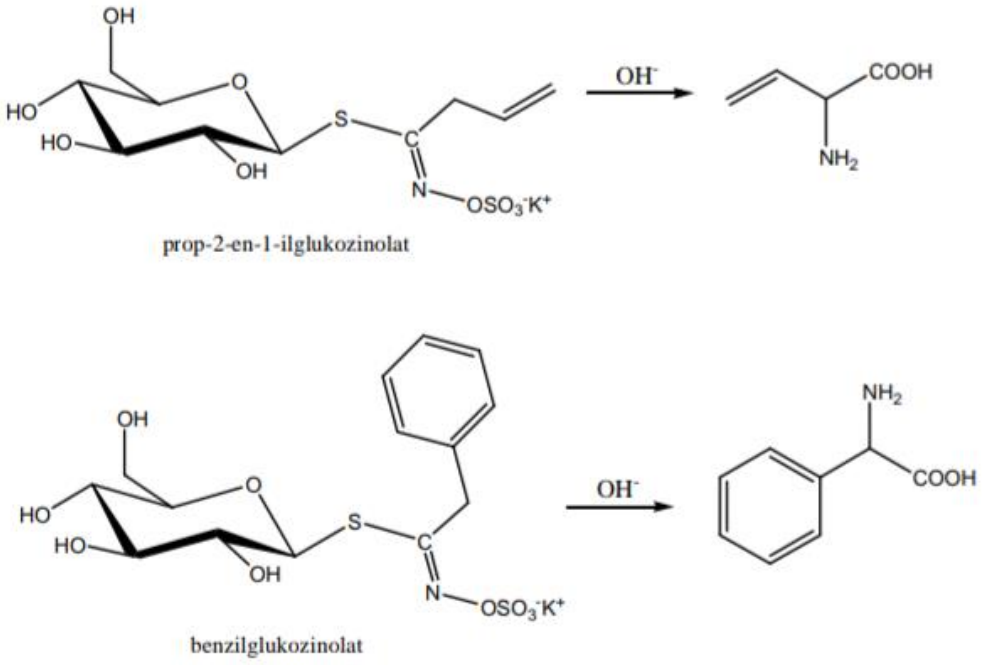
Slika 4. Termička razgradnja prop-2-en-1-il i benzil glukozinolata na 200 °C u GC injektoru.[4]

Kiselom razgradnjom glukozinolata nastaju odgovarajuće karboksilne kiseline s hidroksilamonij ionom (Slika 5.).



Slika 5. Kisela hidroliza glukozinolata.[4]

Baznom hidrolizom može nastati nekoliko produkata. Slika 6. prikazuje baznu hidrolizu prop-2-en-1-il i benzil glukozinolaza pri čemu nastaju odgovarajuće aminokiseline.



Slika 6. Bazna hidroliza glukozinolata.[4]

1.4. Biološka aktivnost

Glukozinolati su kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi. Oštećenjem tkiva dolazi do kontakta između enzima mirozinaze i glukozinolata što dovodi do hidrolize glukozinolata čime nastaje niz već spomenutih biološki aktivnih produkata. Razgradni produkti su posebno zanimljivi zbog svoje biološke aktivnosti i stoga su česti predmet istraživanja.

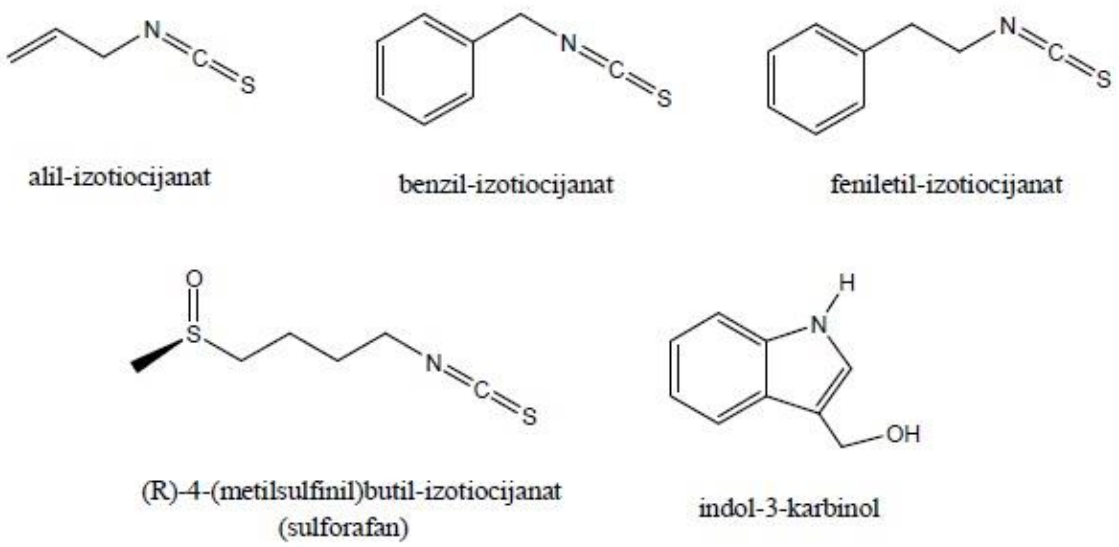
- **Antitumorsko djelovanje**

Mnogobrojna istraživanja su pokazala smanjenu pojavu karcinoma kod ljudi koji konzumiraju kupusnjače, ali mehanizam djelovanja razgradnih produkata glukozinolata još nije potpuno poznat. Istraživanja upućuju na to da razgradni produkti modificiraju aktivnost enzima Faze I i Faze II što predstavlja prvu obrambenu liniju organizma od kancerogenih tvari. Osim toga, inhibiraju rast stanica tumora i stimuliraju apoptozu (programiranu smrt stanica).[6]

Enzimi Faze I (enzimi iz citokrom P450 obitelji) djeluju tako da povećavaju reaktivnost tvari topljivih u mastima stvarajući od toksičnih polaznih molekula još toksičnije. Ovi enzimi mijenjaju prokancerogene molekule, uglavnom reakcijama oksidacije i redukcije, ali i hidrolizom, do hidrofobnih molekula. Tim reakcijama nastaju vrlo reaktivni međuprodukti koji oštećuju DNA i RNA. Razgradni produkti glukozinolata inhibiraju aktivnost ovih enzima.[7]

Enzimi Faze II (glutation-*S*-transferaza, aldehid reduktaza, *S*-metil-transferaza, *N*-acetil-transferaza) povećavaju topljivost u vodi i izlučivanje štetnih molekula iz tijela. Ovi enzimi djeluju tako da konvertiraju kancerogene tvari reakcijama konjugacije s ligandima, pripajanja sulfatnih skupina, acetiliranja i metiliranja u ne reaktivne metabolite koje ljudski organizam lako izluči. Razgradni produkti glukozinolata povećavaju aktivnost enzima Faze II.[8]

Od svih razgradnih produkata glukozinolata, nekoliko ih se posebno ističe po svojim antitumorskim svojstvima. To su sulforafan, feniletil-izotiocijanat, alil-izotiocijanat i indol-3-karbinol (Slika 7.).[4]



Slika 7. Neki razgradni produkti glukozinolata s antitumorskim djelovanjem.[4]

- **Antioksidacijsko djelovanje**

Razgradni produkti glukozinolata se smatraju indirektnim antioksidansima jer se njihova antioksidacijska aktivnost temelji na modificiranju aktivnosti enzima Faze I i Faze II. Geni za enzime Faze II sadrže specifične sekvence DNA koji se nazivaju elementi antioksidacijskog odgovora. Razgradni produkti glukozinolata povećavaju aktivnost enzima Faze II na način da povećavaju transkripciju gena koji sadrže elemente antioksidacijskog odgovora.[6]

- **Antimikrobno i antifungalno djelovanje**

Ispitivanjem glukozinolata i njihovih razgradnih produkata na mikroorganizme (bakterije, gljivice, kvasce) utvrđena je fiziološka neaktivnost glukozinolata te štetna aktivnost njihovih razgradnih produkata. Hlapljivi izotiocijanati su učinkovitiji prema kvascima nego prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama i gljivicama, a produkti razgradnje glukozinolata sa sumporom u bočnom lancu pokazuju izraženije fungitoksične učinke nego alkenilni, hidroksialkenilni i aromatski spojevi.[4]

- **Štetno djelovanje**

Iako većina glukozinolata ima pozitivne biološke učinke određeni ipak pokazuju negativna svojstva kao što su mutagenost, goitrogenost, toksičnost pa čak i karcinogenost. Kod ljudi, prilikom konzumiranja hrane s visokim sadržajem glukozinolata, nije ustanovljen nikakav štetni učinak produkata njihove razgradnje na zdravlje. Viniloksazolidin-2-tion (goitrin) pokazuje određene štetne učinke na štitnjaču i jetru te uzrokuje usporen rast kod životinja, a njegovo djelovanje je povezano s pojavom gušavosti. Tiocijanati djeluju mutageno, a *N*-nitrozo spojevi, koji nastaju reakcijom produkata razgradnje indolnih glukozinolata s nitritima, pokazuju kancerogena svojstva.[4,6]

1.5. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Mirisne biljke sadrže hlapljive spojeve, a neke i eterična ulja koja su smjese hlapljivih spojeva. Klasične metode koje se primjenjuju za izolaciju ovih spojeva su destilacija i ekstrakcija s organskim otapalima. Danas se primjenjuju i neke nove metode koje imaju brojne prednosti pred klasičnim metodama izolacije npr. mikrovalna i ultrazvučna ekstrakcija te ekstrakcija sa superkritičnim otapalima.

1.5.1. Destilacija

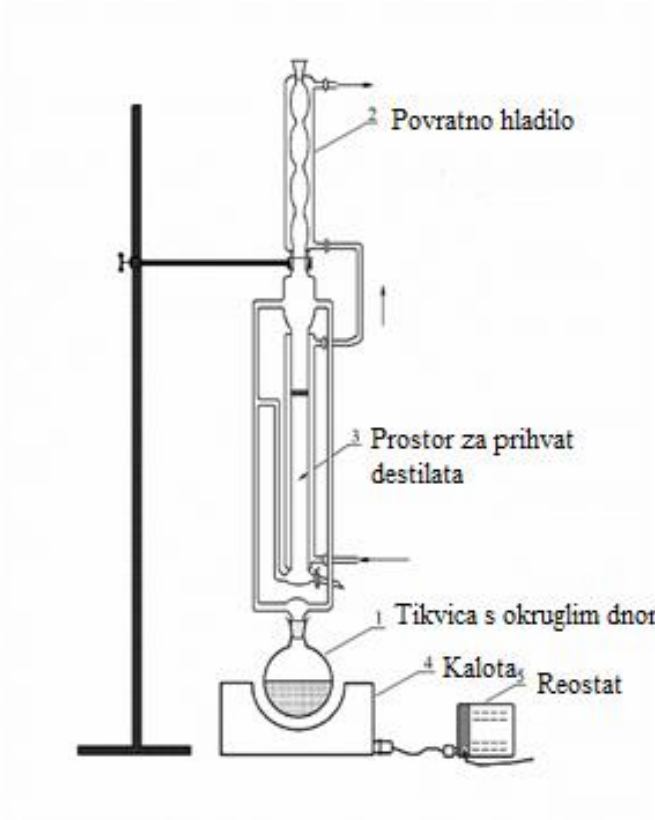
Destilacija je fizikalni proces kojim se homogene smjese odjeljuju s obzirom na razliku u temperaturama vrelišta njihovih komponenti. Razlikuje se vodena, vodeno-parna i parna destilacija. Sve tri metode se zasnivaju na istim principima, a razlika je u kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.[9]

1.5.1.1. Vodena destilacija

Vodena destilacija (hidrodestilacija) se najčešće koristi za izolaciju eteričnih ulja. Prethodno usitnjeni biljni materijal se postavlja u tikvicu s vodom te se zagrijava do vrenja. Većina komponenti eteričnih ulja su organske tvari koje se s vodom ne miješaju, ali isparavaju s vodom jer imaju nižu temperaturu vrenja. Smjesa vode i komponenti eteričnog ulja zajedno dolaze do hladila gdje se kondenziraju i sakupljaju u središnjem dijelu aparature.

Postoje brojne izvedbe aparature za vodenu destilaciju. Modificirana aparatura po Clevengeru (Slika 8.) omogućava odvajanje komponenti eteričnog ulja od vode na temelju razlika u polarnosti, a time i topljivosti. Središnja cijev aparature je u donjem sloju ispunjena destiliranom vodom, a u gornjem organskim otapalom ili smjesom organskih otapala. Prilikom prolaska kondenzirane smjese vode i komponenti eteričnog ulja kroz organsko otapalo, s obzirom na sličnost u polarnosti, komponente eteričnog ulja zaostaju u njemu, dok voda nesmetano prolazi. Na taj način se prikuplja eterično

ulje koje se pipetom uklanja kroz gornji otvor, a voda se ispušta kroz pipac na dnu Clevengerovog nastavka.[10]



Slika 8. Modificirana aparatura po Clevengeru.[4]

1.5.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja omogućava izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Temelji se na različitoj topljivosti tvari u ekstrakcijskom sredstvu. Najčešće se kao otapala koriste voda i organska otapala petroleter, pentan, dietil-eter i diklormetan.[9]

Otapala za ekstrakciju moraju zadovoljavati slijedeće uvjete:

- otapalo mora biti kemijski inertno,
- gustoće matične otopine tvari i korištenog otapala se moraju razlikovati,
- poželjno je da ima što nižu temperaturu vrenja kako bi se lakše uklonilo,
- otapalo mora imati visoku moć otapanja tvari koju je potrebno izolirati,
- važna je i dostupnost te niska cijena korištenog otapala.[9]

Osim klasičnih metoda ekstrakcije iz tekuće ili čvrste faze danas su sve više prisutne moderne metode kao što su ultrazvučna i mikrovalna ekstrakcija te ekstrakcija subkritičnim i superkritičnim otapalima. Posebno se ističe mikrovalna ekstrakcija bez korištenja otapala kao primjer zelene tehnologije.

1.5.2.1. Mikrovalna ekstrakcija

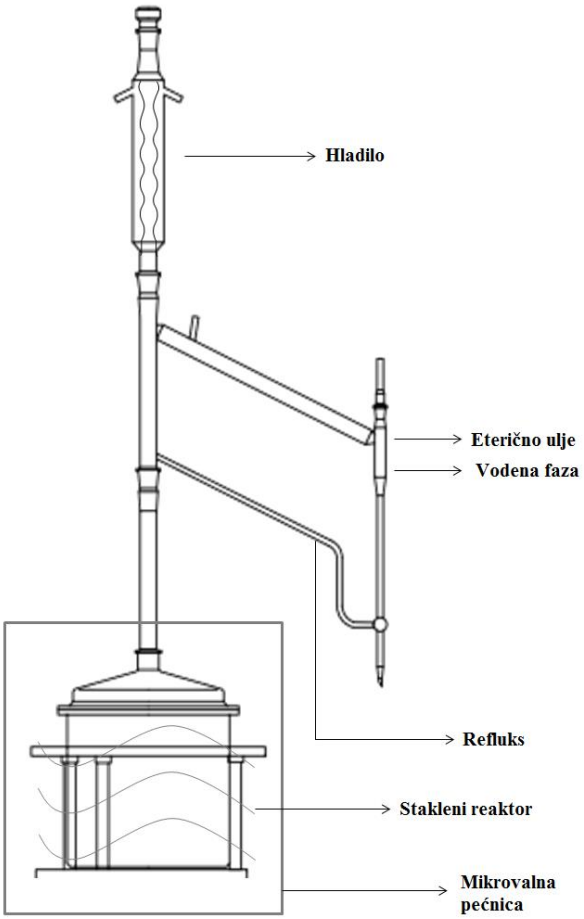
Mikrovalna ekstrakcija (engl. *microwave-assisted extraction*) predstavlja novu metodu ekstrakcije koja ima brojne prednosti u odnosu na klasične metode, a to su kraće vrijeme ekstrakcije i mogućnost ekstrakcije bez korištenja otapala.[10]

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja frekvencije oko 2450 MHz. Imaju sposobnost prodiranja u biološki materijal i utječu na polarne molekule u biološkom materijalu kao što je voda te proizvode toplinu. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava prodiranje otapala u matriks te na taj način potiče otapanje.

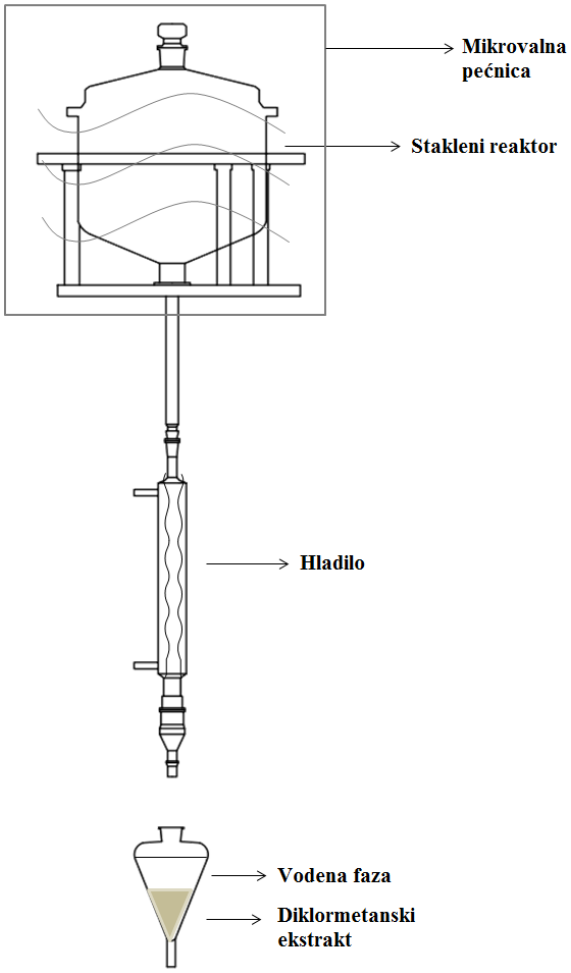
Postoji više izvedbi mikrovalnih sustava za ekstrakciju, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te u mikrovalnim pećnicama pri

atmosferskom tlaku. Kao što je već spomenuto brojne su prednosti mikrovalne ekstrakcije (kraće ekstrakcijsko vrijeme, smanjena uporaba otapala, poboljšani ekstrakcijski prinos), ali potrebno je obratiti pažnju i na negativne učinke kao što je povišena temperatura koja može negativno utjecati na biološki aktivne spojeve.[10-12]

Mikrovalna ekstrakcija bez korištenja otapala (engl. *solvent-free microwave extraction,* SFME) je pravi primjer zelene tehnologije. SFME je kombinacija mikrovalnog zračenja i suhe destilacije, provodi se pri atmosferskom tlaku, bez dodavanja otapala. Na Slici 9. shematski je prikazan gornji dio aparature u kojem se u principu provodi mikrovalna destilacija i dobiva se eterično ulje, odnosno hlapljivi spojevi. Na Slici 10. prikazana je shema donjeg dijela aparature gdje se pod utjecajem hidrodifuzije i gravitacije izdvajaju arome.[10,11]



Slika 9. Sustav za mikrovalnu destilaciju eteričnih ulja.[13]

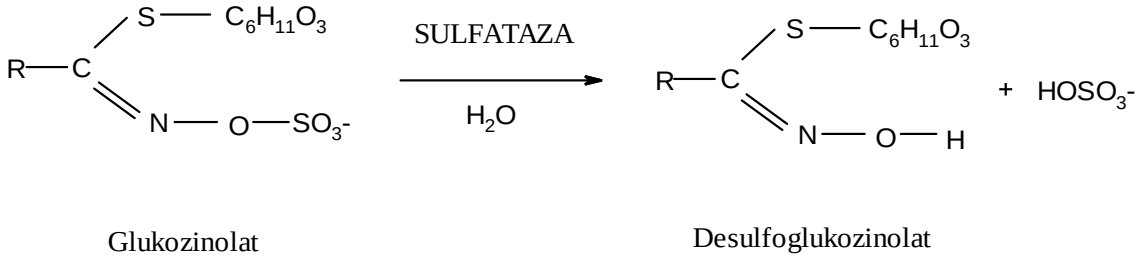


Slika 10. Sustav za mikrovalnu ekstrakciju aroma.[13]

1.5.3. Ekstrakcija glukozinolata

Glukozinolati su u zadnje vrijeme sve više istraživani kako zbog njihovog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje i potencijalnog antitumorskog djelovanja tako i zbog moguće primjene kao pesticidi. U skladu s tim razvijena je metoda ekstrakcije glukozinolata iz biljnog materijala koja uključuje ekstrakciju metanolom, enzimsku desulfatizaciju i HPLC analizu dobivenih desulfoglukozinolata. Metoda uključuje nekoliko koraka, a to su priprema biljnog materijala, liofilizacija, sama ekstrakcija, pročišćavanje ekstrakta, separacija i u konačnici analiza desulfoglukozinolata HPLC metodom.[14,15] Više o cijelom postupku izolacije bit će rečeno u eksperimentalnom dijelu rada.

Desulfatizacija se provodi uz pomoć enzima sulfataze. Sulfataza (EC 3.1.6.1.), izolirana iz *Helix pomatia*, odcjepljuje sulfatni ion iz molekule glukozionata pri čemu nastaje desulfoglukozinolat (Slika 11.).[16]



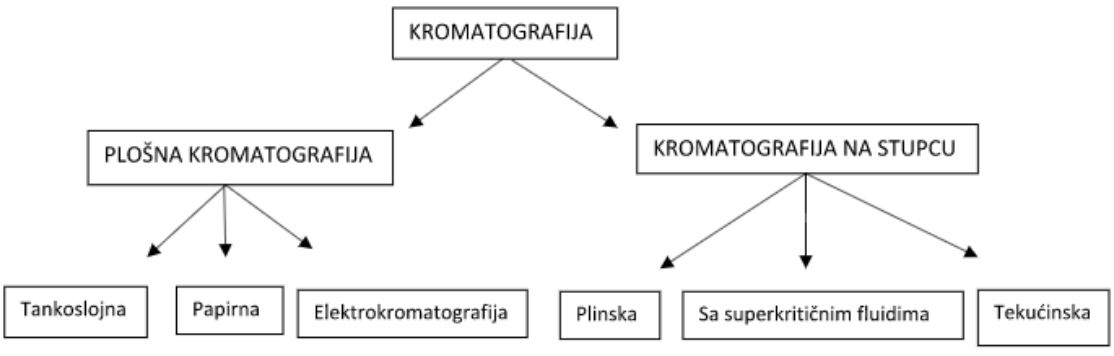
Slika 11. Reakcijska shema desulfatacije glukozinolata.

1.6. Metode identifikacije hlapljivih spojeva

Prilikom analize hlapljivih spojeva i eteričnih ulja mogu se koristiti kromatografske (plinska i tekućinska kromatografija) i spektroskopske tehnike (UV, IR i NMR spektroskopija). Prvenstveno se koristi kromatografija i to najčešće u sprezi sa spektrometrijom masa i kao takva služi za odvajanje komponenti te za njihovo kvantitativno i kvalitativno određivanje u smjesi.

1.6.1. Kromatografija

Kromatografija je metoda odvajanja koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenti uzorka između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna tekuća (tekućinska kromatografija) ili plinovita (plinska kromatografija). Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju.[17] Kromatografske metode se mogu podijeliti u dvije osnovne grupe, a to su plošna kromatografija i kromatografija na stupcu. Detaljnija podjela kromatografskih metoda prikazana je na Slici 12.



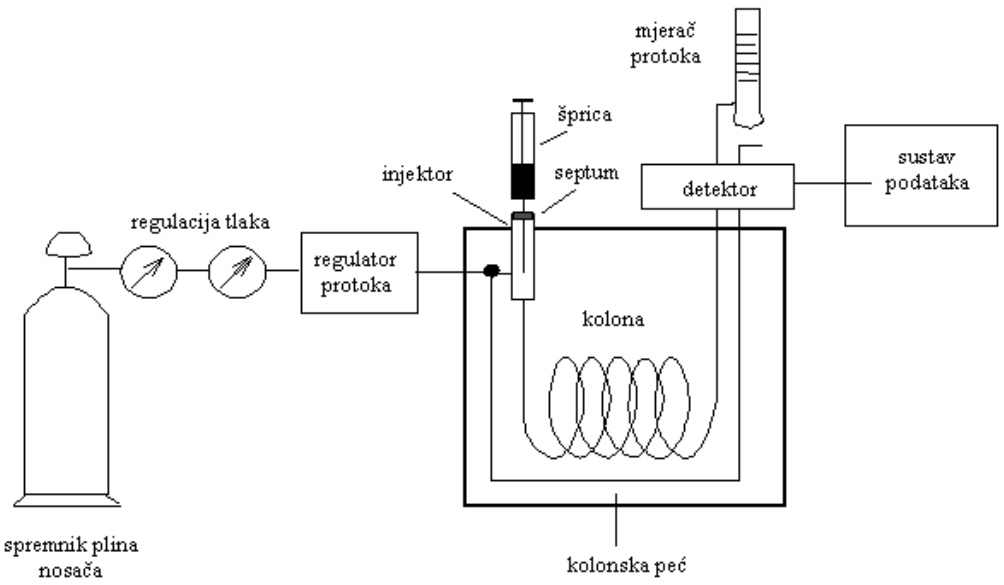
Slika 12. Podjela kromatografskih metoda.[18]

1.6.1.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena tehnika odijeljivanja hlapljivih spojeva. Mobilna faza je inertni plin (He, Ne, Ar), a stacionarna faza je krutina ili kapljevinom presvučena krutina.[10]

Plinski kromatograf se sastoji od spremnika plina, injektora, kromatografske kolone u termostatiranom prostoru i detektora (Slika 13.). Uzorak za analizu mora biti hlapljiv kako bi ispario u injektoru i mora biti stabilan na radnoj temperaturi kolone. Uzorak u injektoru trenutno ispari te ga inertni plin nositelj prenosi preko kromatografske kolone, u kojoj se vrši odijeljivanje, do detektora. Kao detektori se mogu koristiti uređaji koji se temelje na toplinskoj vodljivosti, plamenoj ionizaciji, fotoionizaciji, električnoj vodljivosti i najčešće spektrometriji masa. Najčešća izvedba je vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).[10]

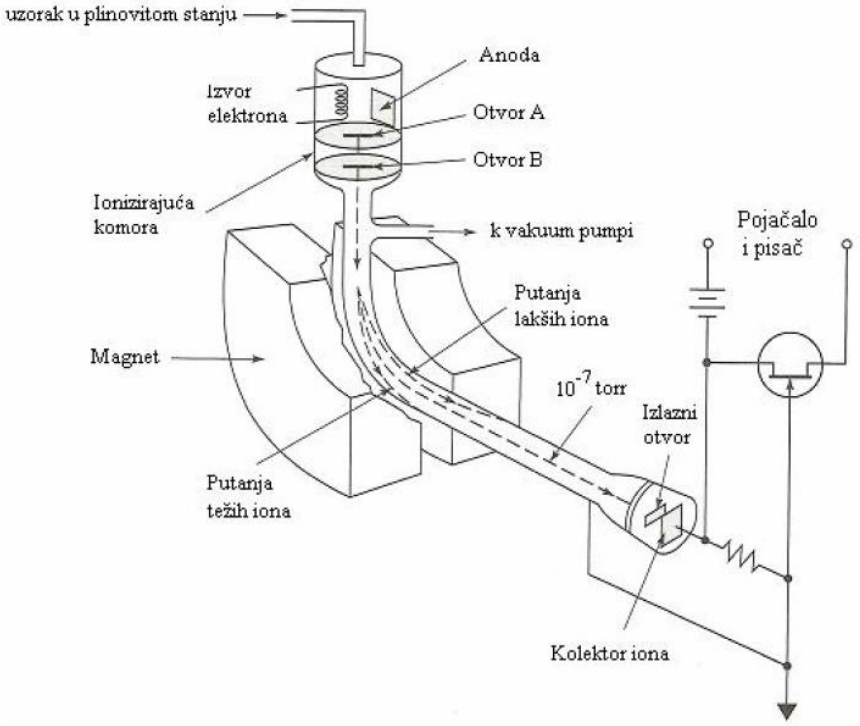
Prednosti plinske kromatografije su velika osjetljivost i mogućnost razdvajanja velikog broja tvari, ali ova metoda ima i neke nedostatke. Na primjer, može doći do nepotpunog odvajanja spojeva, a i sama analiza može biti vremenski duga, ukoliko je cilj identificirati konstituente nižih koncentracija.[10]



Slika 13. Shematski prikaz plinskog kromatografa.[19]

1.6.2. Spektrometrija masa

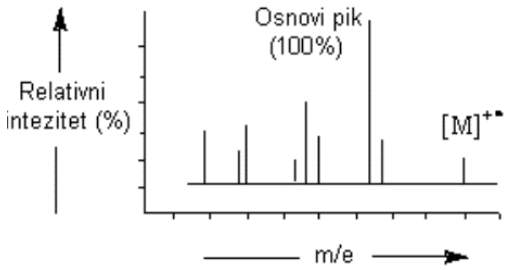
Spektrometrija masa je tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihovog omjera mase i naboja (*m/z*). Glavni dijelovi spektrometra masa su ionizator, analizator i detektor (Slika 14.). Prvi korak pri analizi molekula je ionizacija molekula u ionizatoru. Nastali ioni se provode kroz analizator, koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu. Iz analizatora, ioni idu na detektor gdje proizvode analitički signal koji se registrira na računalu.[20]



Slika 14. Shema spektrometra masa.[4]

Uzorak u plinskoj fazi ulazi u ionizator gdje se u slučaju elektron-ionizacije bombardira elektronima energije 70 eV. Nastaje molekulski kation koji se dalje razlaže na čitav niz fragmenata. O strukturi molekule ovisi koji fragmenti će nastati i u kojem intenzitetu. Na taj se način u ionizatoru stvara ionski snop. Postoje i drugi načini ionizacije, npr. kemijska ionizacija koja se provodi kemijskom reakcijom iona reagensa, koji potječe od plina nositelja, i uzorka. Plin nositelj se ionizira na primarne ione koji s viškom plina nositelja stvaraju sekundarne ione. Ti ioni reagiraju s uzorkom i stvaraju ionski snop.[10]

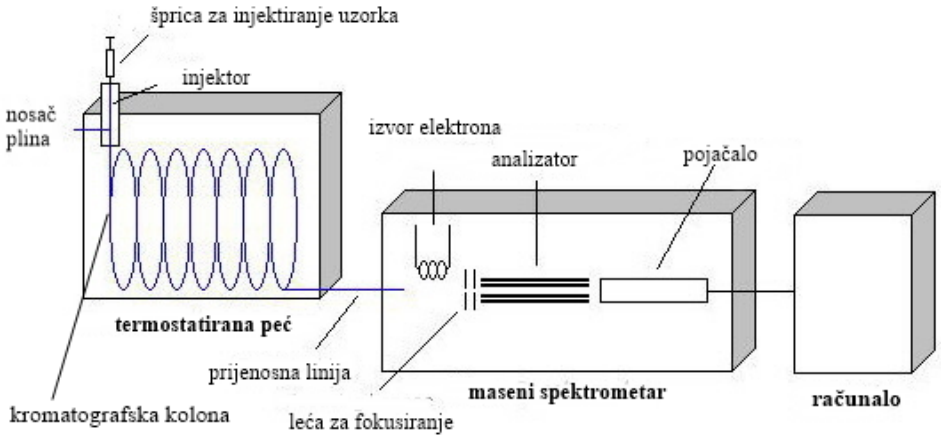
Ionski snop se fokusira kroz leće i dolazi do četveropolnog filtra masa, sastavljenog od 4 elektrode postavljene paralelno s ionskim snopom. Kroz njega mogu proći samo ioni koji postižu stabilnu putanju, a ostali se uklanjaju. Ioni osciliraju i veći broj ih se izgubi udaranjem u jednu od elektroda. Uz određenu kombinaciju potencijala, amplituda oscilacije ostaje mala samo za ione određenog omjera *m/z* pa samo ti ioni prolaze do detektora. Detektor je elektronski multiplikator koji uzrokuje emisiju elektrona zbog udara upadnih iona u katodu. Kao rezultat analize u spektrometru masa dobije se spektar masa s odnosom intenziteta i omjera *m/z* nastalih fragmenata (Slika 15.).[10]



Slika 15. Spektar masa.[4]

1.6.2.1. Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa

Kombinacijom plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS), (Slika 16.), postižu se još bolje mogućnosti analize. Plinska kromatografija je izvrsna metoda za odvajanje i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje pa se za to koristi spektrometrija masa. Obje metode rade s uzorkom u plinovitom stanju, a karakteristični podatci za izdvojeni spoj su njegovo vrijeme zadržavanja i površina pika koja je proporcionalna količini spoja te odgovarajući maseni spektar. Prednost vezanog sustava je brzina snimanja spektra jer četveropolni analizatori omogućavaju snimanje spektra u nekoliko milisekundi te se može postići velika osjetljivost, reda veličine 10^{-12} do 10^{-15} g.[4,10]



Slika 16. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS.[21]

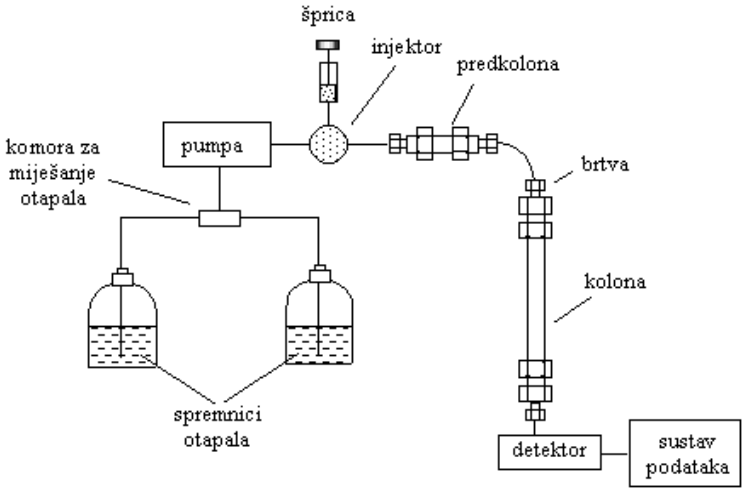
1.6.3. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) temelji se na razdvajanju tvari na osnovi razmještanja između čvrste stacionarne faze i tekuće mobilne faze. Postoje dvije vrste tekućinske kromatografije, klasična i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Klasična koristi velike stupce, duljine kolona i do 50 cm, punjene poroznim materijalom, koji služe kao stacionarna faza, a mobilna faza prolazi gravitacijski pa je stoga mali protok i metoda nije posebno učinkovita. HPLC je suvremena analitička tehnika kod koje se mobilna faza dovodi pomoću pumpe te se postiže puno bolje razdvajanje.[22]

1.6.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti(engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je vrsta tekućinske kromatografije na stupcu kod koje su za postizanje velikih brzina protoka potrebni vrlo visoki tlakovi.[23]

Osnovni dijelovi HPLC-a su spremnik mobilne faze, injektor, kolona, pumpa koja pokreće mobilnu fazu kroz kolonu, detektor i sustav za obradu otpada (Slika 17.).



Slika 17. Shematski prikaz HPLC-a.[24]

Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće i treba ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica. Pumpa služi za unos mobilne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom (0,1-10 mL min^{-1}) u kolonu. Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom kroz ventil u sustav za injektiranje. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u bilo kojoj kombinaciji (npr. voda, metanol, organska otapala, itd.). Kolona je najčešće punjena kuglicama silikagela (promjer 5-10 μm) koje su prevučene tankim organskim slojem. Korištenje visokog tlaka povećava linearnu brzinu i daje komponentama manje vremena za zadržavanje, što poboljšava rezoluciju kromatograma. Od detektora se najčešće koristi UV-VIS ili DAD detektor, ali mogu se koristiti i detektor indeksa loma, fluorescentni, elektrokemijski ili bilo koji drugi detektor.[24]

Vezani sustav tekuća kromatografija-masena spektrometrija (LC-MS) je novija tehnika koja kombinira fizičke sposobnosti razdvajanja tekućinske kromatografije (ili HPLC) s sposobnostima analize masene spektrometrije. Tekućinska kromatografija razdvaja smjese s više komponenata, a masena spektrometrija daje strukturni identitet pojedinih komponenti s visokom molekularnom specifičnošću i osjetljivosti detekcije.[25]

1.7. Brassicaceae

Kupusnjače (lat. *Brassicaceae*) je biljna porodica iz razreda Eudicotiledona, poznata i pod nazivom krstašice (lat. *Cruciferae*). Porodica obuhvaća više od 300 rodova i preko 3000 vrsta. 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. Za cijelu porodicu je karakteristična ljutina koja potječe od glukozinolata, koji djelovanjem enzima mirozinaze daju niz razgradnih produkata odgovornih za gorko-ljuti okus. Novija istraživanja upućuju na mogućnost prevencije raka pomoću glukozinolata. Ova porodica uključuje dobro poznate vrste koje se koriste u svakodnevnoj prehrani kao što su *Brassica oleracea* (brokula, kupus, kelj), *Brassica napus* (uljana repica), *Raphanus sativus* (obična rotkvica) i mnoge druge. Predstavnici rodova *Matthiola*, *Cheiranthus*, *Lobularia* i *Iberis* su cijenjeno ukrasni cvijeće, a kao biljke za dobivanje ulja ističu se *Brassica napus* (uljana repica), *Brassica nigra* (crna gorušica), *Sinapis alba* (bijela gorušica) i *Armoracia rusticana* (hren). Porodica je karakterizirana jedinstvenom građom prostolatičnih, dvospolnih cvjetova, koji se sastoje od 4 lapa čaške, 4 latice vjenčića položene po dvije unakrst, 6 prašnika i tučka s nadraslom plodnicom, iz koje nastaje plod komuška ili komuščica.[4,26]

1.7.1. Sredozemna rusomača (*Capsella bursa-pastoris* L. Medik.)

Sredozemna rusomača (Slika 18.) je jednogodišnja ili dvogodinšnja zeljasta biljka iz porodice Brassicaceae. Prirodno potječe iz istočne Europe i Male Azije no široko je rasprostranjena u umjernom klimatskom pojasu diljem svijeta. Stabljika je uspravna, viskoka 20-50 cm. Prizemni listovi skupljeni su u rozetu, perasto su razdijeljeni i cjelovitih su rubova, a listovi prema vrhu stabljike su rijetki. Cvijetovi su mali, dvospolni, skupljeni u grozdaste cvatove na vrhovima stabljika. Cvate od svibnja do rujna. Plodovi su srcolike komuške koje se nalaze na dužoj stapci.[27] Raste u poljima i na zapuštenom tlu. Mlada je biljka jestiva, dok je biljka u cvatu dugo korištena u narodnoj medicini. [28]



Slika 18. Sredozemna rusomača.[29]

1.7.2. Rotkvica (*Raphanus sativus* var. *radicula* Pers.)

Rotkvica je jednogodišnja biljka iz porodice Brassicaceae (Slika 19.). Porijeklom je iz Južne Azije i uzgaja se kao povrtna kultura. Čini je zadebljani hipokoltil na čijem se dnu nalazi pravi korijen te kratka stabljika s lišćem. Listovi su grubo nazubljeni, urezani na režnjeve i hrapave su površine. Cvijetovi su dvospolni, pravilni i skupljeni u grozdaste cvatove. Cvate u svibnju i lipnju i nakon uspješnog oprašivanja stvaraju se plodovi, male mahune pune crvenkastih sjemenki.[30]

Veći tipovi koji sporije rastu, često duguljastog, valjkastog korijena, obuhvaćaju velike i orijentalne sorte kao što je daikon (Slika 20.) odnosno bijela rotkva (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L.H. Bailey).[31,32]



Slika 19. Rotkvica.[33]



Slika 20. Bijela rotkva.[34]

1.7.3. Čunjasti repušac (*Bunias erucago* L.)

Čunjasti repušac je jednogodišnja ili dvogodišnja biljka iz porodice Brasicaceae (Slika 21.). Rasprostranjena je u južnoj Europi, a u Hrvatskoj je rasprostranjena samo u primorskom području. Raste uglavnom na sunčanim i suhim staništima. Spada u kategoriju samoniklog jestivog bilja. Jestivi su mladi izdanci i listovi i beru se prije nego biljka procvate.[35]

Što se tiče općih karakteristika ima uspravnu razgranatu stabljiku, prekrivenu dlakama, visine do 60 cm. Prizemni listovi su duguljasti, imaju tupo nazubljene rubove i nalaze se na peteljci, a listovi na stabljici su naizmjenični i postupno sve manji. Cvjetovi su žuti, dvospolni, veličine oko 1 cm i nalaze se na stapkama te su na vrhu stabljika skupljeni u grozdove. Biljka cvate od svibnja do kolovoza. Plodovi su nepravilni, dužine 8-12 mm i sadrže sjemenke. Dozrijevaju od srpnja do rujna.[35]



Slika 21. Čunjasti repušac.[35]

1.7.4. Sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R. Br.)

Sivkasta ljubičina (Slika 22.) je jednogodišnja biljka iz porodice Brassicaceae. Kod nas raste u priobalnom području i na otocima. Uzgaja se uglavnom kao ukrasna biljka. Stabljika je dlakava, visine 30-80 cm, listovi mogu biti nazubljeni ili cjelovitih rubova, dugi su 5-12 cm i široki 1-3 cm. Cvijetovi su bijeli, ružičasti ili ljubičasti te su skupljeni u grozdaste cvatove na vrhovima stabljika. Cvate od ožujka do svibnja. Plod je mahuna duga 6-10 cm i široka oko 3 mm.[36]



Slika 22. Sivkasta ljubičina.[37]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- Pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika,
- Diklormetan, T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska,
- Dietil-eter, Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španjolska,
- Bezvodni natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska,
- Natrijev klorid, T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska,
- Metanol (70%),
- Klorovodična kiselina (25%),
- Natrijev acetat, Merck, Darmstadt, Njemačka,
- Dekstran (DEAE – sephadex A-25),
- Ultračista voda,
- Sinigrin,
- Sulfataza (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich,
- Aposlutni etanol.

Aparatura:

- Električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika,
- Tehnička vaga, Kern & Sohn, Njemačka,
- Lijevak za odjeljivanje,
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, Ethos X; Milestone,
- Uređaj za pripravu ultračiste vode,
- Magnetska mješalica, Heidolph MR Hei-End,
- Sito, 500 μm,
- Pehametar, Hanna instruments HI 9321,
- Centrifuga, Nuve, NF 1200R,
- Vortex, Dragon lab, MX-S,

- Ultrazvučna kupelj,
- Vodena kupelj,
- Uređaj za uparavanje strujom dušika, Dri-Block DB100/3, Techne,
- GC-MS,Varian Inc., Lake Forest, CA, USA,
- HPLC-UV, Series 200, PerkinElmer, USA.

2.2. Biljni materijal

2.2.1. Sredozemna rusomača

Biljni materijal (Slika 23.) je prikupljen 4. travnja 2018. na području Gornje Podstrane. Čuvan je na sobnoj temperaturi i obrađen u svibnju. Materijal je usitnjen i odvojen na tri dijela. Prvi dio je obrađen mikrovalnom destilacijom (MW - fragrance), drugi mikrovalnom ekstrakcijom (MW - flavor), a treći dio biljnog materijala iskorišten je za klasičnu ekstrakciju s diklormetanom.
U Tablici 2. prikazane su točne odvage biljnog materijala za pojedinu metodu.

Tablica 2. Mase biljnog materijala sredozemne rusomače.

METODA	MASA (g)
MW DESTILACIJA	303,54
MW EKSTRAKCIJA	304,32
EKSTRAKCIJA (DIKLORMETAN)	51,50



Slika 23. Sredozemna rusomača (sakupljeni biljni materijal).

2.2.2. Rotkvica i bijela rotkva

Biljni materijal rotkvice obrađen je na način da je list odvojen od ploda, zatim je biljni materijal usitnjen (Slika 24.) i podvrgnut mikrovalnoj destilaciji, hidrodestilaciji i ekstrakciji s diklormetanom. U Tablici 3. dane su točne odvage biljnog materijala za pojedinu metodu.



Slika 24. Usitnjeni biljni materijal rotkvice.

Tablica 3. Mase biljnog materijala rotkvice.

METODA	MASA (g)	
	PLOD	**LIST**
MW DESTILACIJA	450,27	256,27
HIDRODESTILACIJA	426,89	137,47
EKSTRAKCIJA (DIKLORMETAN)	46,06	27,45

Biljni materijal bijele rotkve obrađen je na isti način kao i kod rotkvice, s tim da za izolaciju nije korišten list. Točne odvage biljnog materijala dane su u Tablici 4.

Tablica 4. Mase biljnog materijala bijele rotkve.

METODA	MASA (g)
MW DESTILACIJA	367,22
HIDRODESTILACIJA	110,16
EKSTRAKCIJA (DIKLORMETAN)	52,11

2.2.3. Čunjasti repušac

Biljni materijal je prikupljen u travnju 2017. na Marjanu u Splitu. Materijal je osušen i odvojen u dijelove (cvijet, korijen te list i stabljika). Ovaj biljni materijal prvotno je korišten za izolaciju hlapljivih sumporovih spojeva hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru.[18] Ostatak biljnog materijala je naknadno samljeven te korišten za izolaciju glukozinolata metodom ekstrakcije uz desulfataciju. Na Slici 25. prikazan je biljni materijal prije (lijevo) i poslije mljevenja (desno), a u Tablici 5. prikazane su točne odvage pojedinog biljnog dijela.



Slika 25. Osušeni biljni materijal čunjastog repušaca.

Tablica 5. Mase biljnog materijala čunjastog repušaca.

Čunjasti repušac – ekstrakcija glukozinolata	
BILJNI DIO	**MASA (mg)**
Cvijet	100,00
Korijen	100,20

2.2.4. Sivkasta ljubičina

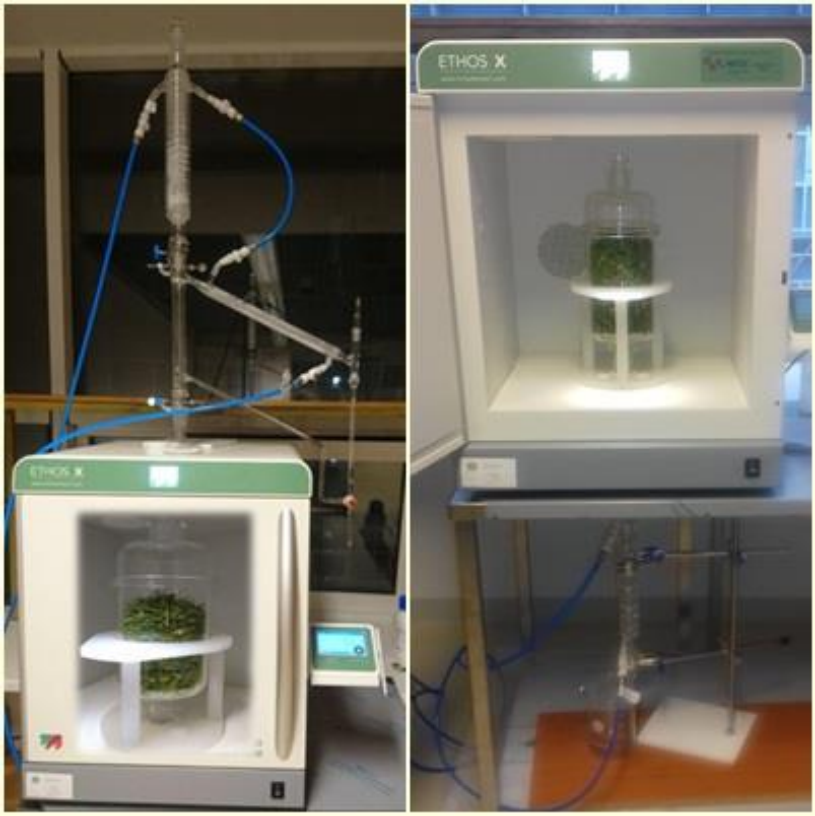
Sjeme ljubičine korišteno je za izolaciju glukozinolata metodom ekstrakcije uz desulfataciju. Sjeme je samljeveno i prosijano te je odvagano 100 mg biljnog materijala.

2.3. Metode izolacije

2.3.1. Mikrovalna ekstrakcija

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju sastoji se od dva dijela i u skladu s tim omogućava dvije vrste izolacije: mikrovalnu destilaciju i mikrovalnu ekstrakciju. Biljni materijal sredozemne rusomače obrađen je na oba načina, a biljni materijal rotkvice i bijele rotkve samo mikrovalnom destilacijom.

Gornji dio aparature (Slika 26. - lijevo) omogućava izolaciju hlapljivih spojeva (engl. *fragrance*). Riječ je zapravo o mikrovalnoj destilaciji i konačni produkt je eterično ulje. Ima 2 velike prednosti pred hidrodestilacijom, a to su znatno kraće vrijeme same destilacije i nema upotrebe organskog otapala.



Slika 26. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju.

Usitnjeni biljni materijal stavi se u staklenu posudu, zatvori se poklopcem te se dalje sastavi aparatura, redom sustav za refluks pa hladilo. U desnu vertikalnu cijev napuni se voda i tu se nakon završetka destilacije doda diklormetan koji će pokupiti hlapljive spojeve. Destilacija se provodila pri snazi od 500 W i temperaturi 98 °C u trajanju od 35 minuta. Nakon završetka destilacije i dodatka diklormetana organski sloj se odvoji u čistu čašu i suši s bezvodnim natrijevim sulfatom te dobiveno eterično ulje prebaci u prethodno izvaganu bočicu. Zaostali dio organskog otapala uklanja se na posebnom uparivaču u struji dušika nakon čega uzorak ide na GC-MS analizu. Uzorak se do analize čuva u zamrzivaču. Na Slici 27. prikazan je biljni materijal sredozemne rusomače prije i poslije „tretmana“ mikrovalovima.



Slika 27. Biljni materijal prije i poslije mikrovalne destilacije.

Donji dio aparature (Slika 26. – desno) omogućava izolaciju aroma (engl. *flavour*). Ovdje se radi o mikrovalnoj ekstrakciji bez dodatka organskog otapala. Uz pomoć mikrovalova i djelovanjem gravitacijske sile, u čaši, koja se postavlja na dno aparature, sakuplja se ekstrakt.

Biljni materijal za mikrovalnu ekstrakciju postavljen je na iste uvjete kao i za mikrovalnu destilaciju (500 W, 35 minuta).

Prilikom izolacije iz biljnog materijala sredozemne rusomače, nakon kratkog vremena temperatura je naglo porasla na 121 °C i došlo je do izgaranja biljnog materijala uslijed nedostatka vode. Ovo ukazuje na to da je za ovakvu vrstu biljnog materijala potrebno primijeniti blaže uvjete. Na Slici 28. prikazan je biljni materijal sredozemne rusomače prije i poslije mikrovalne ekstrakcije.



Slika 28. Biljni materijal prije i poslije mikrovalne ekstrakcije.

Zbog uočenog izgaranja ekstrakcija je zaustavljena (trajanje kraće od 35 minuta) i dobiveno je oko 200 mL ekstrakta. Dobiveni se ekstrakt prelije u lijevak za odijeljivanje i ekstrahira 2 puta s po 10 mL diklormetana (Slika 29.). Diklormetanski sloj se odvoji, suši s bezvodnim natrijevim sulfatom i konačni ekstrakt se prebaci u prethodno izvaganu bočicu. Višak otapala se, kao i kod mikrovalne ekstrakcije, ukloni u struji dušika. Nakon toga dobiveni uzorci su spremni za GC-MS analizu.



Slika 29. Obrada ekstrakta nakon mikrovalne ekstrakcije.

2.3.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Radi usporedbe s mikrovalnom ekstrakcijom napravljena je i klasična ekstrakcija iz biljnog materijala sredozmne rusomače (Slika 30.).

Usitnjeni i prethodno izvagani biljni materijal postavljen je u tikvicu s ravnim dnom i prekriven destiliranom vodom. Tikvica je začepljena i obložena parafilmom te ostavljena 24 sata na sobnoj temperaturi.

Prvih 10 mL diklormetana dodano je direktno u tikvicu s biljnim materijalom, nakon toga smjesa je filtrirana i filtrat prebačen u lijevak za odijeljivanje te ekstrahiran još 2 puta s po 10 mL diklormetana. Diklormetanski sloj se odvoji i suši s bezvodnim natrijevim sulfatom, nakon toga slijedi dekantiranje u prethodno izvaganu bočicu. Višak

organskog otapala uklanja se u struji dušika te je uzorak spreman za GC-MS analizu. Svi dobiveni uzorci su do analize čuvani u zamrzivaču.



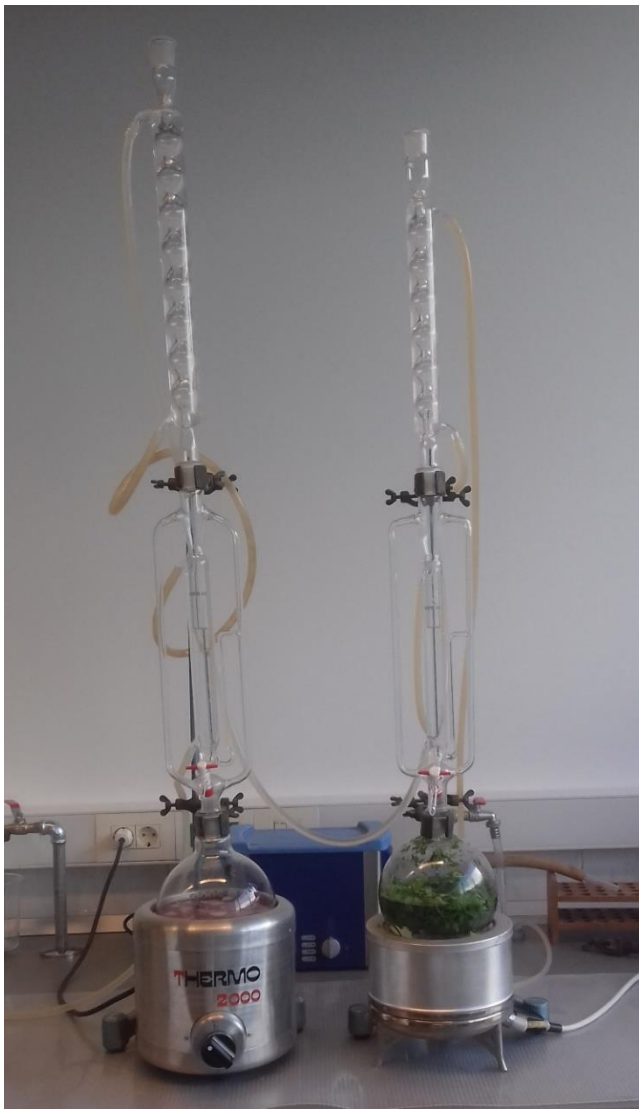
Slika 30. Ekstrakcija s diklormetanom**.**

2.3.3. Hidrodestilacija

Provedena je hidrodestilacija iz biljnog materijala rotkvice i bijele rotkve, a za hidrodestilaciju sredozemne rusomače nije bilo dovoljno biljnog materijala.

Hidrodestilacija se izvodila u modificiranoj aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata. Kao trap je korištena smjesa pentana i dietiletera u omjeru 3:1. Postupak izvođenja hidrodestilacije opisan je prethodno u poglavlju 1.5.1.1. Nakon destilacije eterično ulje je odvojeno od vodenog sloja, višak vode je uklonjen bezvodnim natrijevim sulfatom te je ulje pebačeno u prethodono izvaganu bočicu i čuvano u zamrzivaču do GC-MS analize.

Na Slici 31. prikazana je korištena aparatra za hidrodestilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru).



Slika 31. Hidrodestilacija rotkvice.

2.3.4. Ekstrakcija glukozinolata

1. Priprema otopina potrebnih za ekstrakciju

   - 70%-tni metanol: za pripremu 500 mL 70%-og metanola pomiješano je 350 mL metanola i 150 mL ultračiste vode,
   - natrij acetat (NaOAc, 20 mM, pH = 5,5): 0,8259 g NaOAc otopljeno je u 500 mL ultračiste vode, početna pH vrijednost bila je 7,9, pH je podešen na 5,5 dodatkom klorovodične kiseline (HCl, 25%) uz miješanje na magnetskoj miješalici, otopina je do upotrebe čuvana u hladnjaku,
   - dekstran: 10,0125 g dekstrana (DEAE-Sephadex A-25 chloride form) otopljeno je u 125 mL ultračiste vode, pripremljeni gel je skladišten u hladnjaku na 4 °C.

2. Priprema otopine sulfataze

   - 5000 U sulfataze (tip H-1 iz *Helix pomatia*) otopljeno je u 30 mL ultračiste vode uz dodatak 30 mL apsolutnog etanola i miješanje na magnetskoj miješalici (10-15 minuta, 520 okr/min),
   - dobivena otopina je podijeljena u 2 kivete i podvrgnuta centrifugiranju na 4500 okr/min i pri sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta, u slučajevima kad su se nakon centrifugiranja pojavile čestice tada je otopina dodatno centrifugirana 5 minuta pri istim uvjetima (na Slici 32. prikazana je korištena centrifuga),
   - nakon centrifugiranja supernatant je prebačen u čistu čašu i pomiješan s 90 mL apsolutnog etanola,
   - dobivena otopina je prebačena u 2 kivete i stavljena na centrifugu u trajanju od 15 minuta na 2500 okr/min i pri sobnoj temperaturi,
   - nakon drugog centrifugiranja supernatant je odbačen, a preostali dio otopljen u 25 mL ultračiste vode,

- dobivena otopina je vorteksirana i podijeljena u manje Eppendorf tube te skladištena u zamrzivaču na -20 °C.



Slika 32. Centrifuga korištena za pripremu otopine sulfataze.

3. Priprema referentnih uzoraka sinigrina

- izvagano je 9,00 mg sinigrin monohidrata i otopljeno u 10 mL ultračiste vode (γ = 0,9 mg/mL),
- iz masene koncentracije i molarne mase singrin monohidrata (M = 415 g/mol) izračunata je molarna koncentracija početne (stock) otopine (c = 2,17 mM),
- pripravljeno je 5 referentnih uzoraka sinigrina (Tablica 6.) u 1,5-mL tubama i formirana je baždarna krivulja,
- uzorci su zamrznuti na -20 °C i tek netom prije korištenja izvađeni na sobnu temperaturu.

Tablica 6. Priprava referentnih uzoraka i konačne koncentracije.

	STOCK	**V_{STOCK} / µL**	**V_{H20} / µL**	**c / µM**
S1	5,17 mM	25	975	54,25
S2		75	925	162,75
S3		125	875	271,25
S4		250	750	542,50
S5		300	700	651

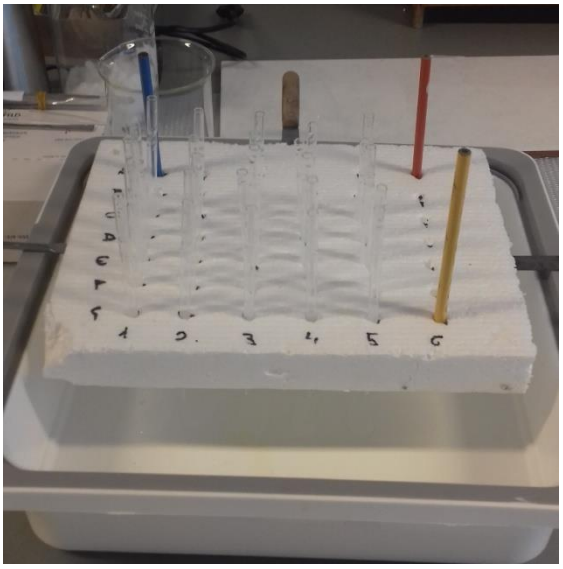
Tablica 7. Razrjeđenja referentnih uzoraka.

		V_{H20} / µL	**c / µM**
R1	**V_{S1} / µL**	500	27,125
	500		
R2	**V_{R1} / µL**		13,562
	500		
R3	**V_{R2} / µL**		6,781
	500		
R4	**V_{S5} / µL**		325,5
	500		

4. Priprema kolona i reakcijskih tuba

- u mlincu je samljeven filtar papir i dobiven vunasti materijal koji se koristi umjesto staklene vune,
- staklene pipete, koje služe kao kolone, napunjene su vunom u visini od 1 cm, vuneni materijal je zbijen kako ne bi došlo do istjecanja gela, tako pripremljene pipete postavljene su na stalak ispod kojeg se nalazi posuda za sakupljanje otpada prilikom ispiranja kolone (Slika 33.),
- pripremljeni dekstran potrebno je neposredno prije upotrebe izvaditi na sobnu temperaturu i protresti prije punjenja kolona,

- u svaku kolonu otpipetira se 0,5 mL dekstrana s tim da je prethodno odrezano prvih 5 mm plastičnog tipa za pipetiranje, kolone kod kojih je došlo do istjecanja gela zamijenjene su novim,
- u svaku kolonu jos je dodan po 1 mL ultračiste vode,
- 2-mL tube za ekstrakte potrebno je prethodno označiti, kapice tuba probijene su iglom za kasniji korak (liofilizacija).



Slika 33. Kolone za ekstrakciju glukozinolata.

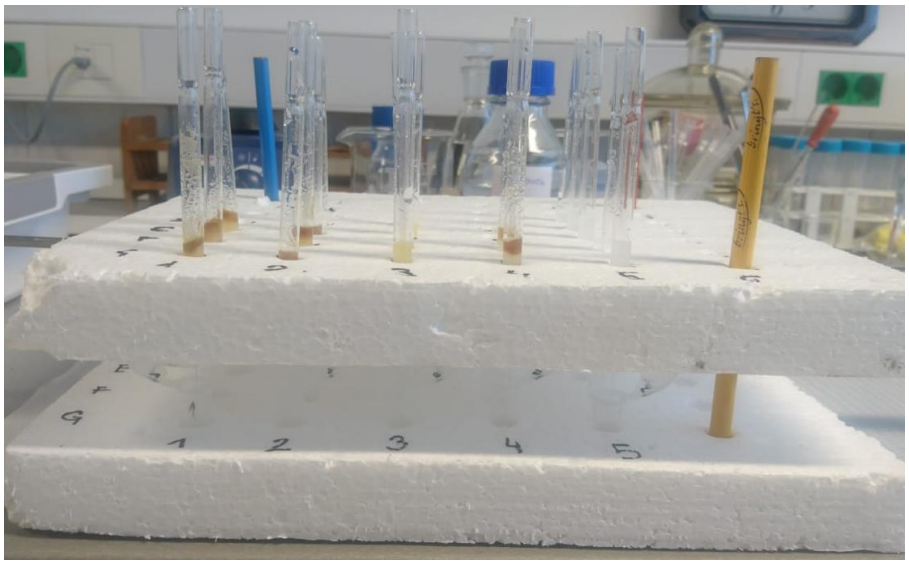
5. Ekstrakcija glukozinolata

- izvagani biljni materijal (odvage oko 100 mg) prebačen je u označene reakcijske tube s okruglim dnom (Slika 34.),
- u svaku reakcijsku tubu dodan je 1 mL 70%-og metanola nakon čega je smjesa vorteksirana, a nakon toga su na tube stavljane sigurnosne kapice te su prebačene u vruću vodenu kupelj (90 °C) gdje su držane nekih 5 minuta tj. do početka vrenja metanola (Slika 34.),

- dalje su tube s uzorcima prebačene na ultrazvučnu kupelj (15 minuta) i nakon toga su centrifugirani na 2700 okr/min u trajanju od 10 minuta (Slika 34.),
- nakon centrifugiranja supernatant je odvojen (bitno je da nastavak za pipetiranje ne dođe u kontakt s biljnim materijalom) i prebačen u odgovarajuće kolone, također u 5 kolona je dodano 5 referentnih uzoraka sinigrina,
- nakon toga je supernatant prebačen, u tube s preostalim biljnim materijalom dodan je još 1 mL 70%-og metanola i postupak je ponovljen te dobiveni supernatant prebačen u odgovarajuće kolone,
- slijedeći korak je ispiranje kolona; prvo je u svaku kolonu dodano 2 puta po 1 mL 70%-og metanola kako bi se uklonile nepolarne molekule, zatim 1 mL ultračiste vode u svaku kolonu u svrhu ispiranja metanola i na kraju je u svaku kolonu dodano 2 puta po 1 mL 20 mM NaOAc kako bi se postigli optimalni uvjeti za djelovanje sulfataze,
- nakon ispiranja kolona posuda za otpad zamijenjena je stalkom u kojem se nalaze označene tube za ekstrakte i iznad tog stalka postavljen je stalak s kolonama na način da svaka kolona odgovara oznaci na tubi (Slika 35.),
- dalje je u svaku kolonu dodano 20 µL otopine sulfataze (prethodno izvađena na sobnu temperaturu) te jos 50 µL NaOAc nakon čega su kolone prekrivene aluminijskom folijom i ostavljene preko noći,
- sljedeći dan je u kolone dodano 2 puta po 0,75 mL ultračiste vode kako bi desulfoglukozinolati eluirali s kolone,
- nakon što je prestalo kapati iz kolone stalak s kolonom je maknut, tube s ekstraktom su začepljene i takve poslane na liofilizaciju (sušenje zamrzavanjem na -80 °C) kako bi se uklonila sva voda,
- nakon liofilizacije preostali talog je otopljen u 1 mL ultračiste vode,
- dobiveni uzorci i 5 referentnih uzoraka sinigrina prebačeni su u vialice za HPLC te do analize čuvani u zamrzivaču na -20 °C.



Slika 34. Koraci prilikom ekstrakcije glukozinolata.



Slika 35. Kolone iznad tuba za ekstrakt.

2.4. Analiza

2.4.1. GC-MS analiza

Za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju hlapljivih sumporovih spojeva korišten je vezani sustav plinske kromatografije (Varian Inc., Lake Foresr, CA, USA model 3900) i spektrometrije masa (Varian Inc. model 2100 T, Slika 36.) Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS (30 m x 0,25 mm., debljina sloja stacionarne faze je 0,25 μm). Plin nositelj je helij, a postavljeni protok je 1 mL/min. Temperatura injektora je postavljena na 250 °C, a volumen injektiranog uzorka iznosi 1 μL. Temperatura kolone je postavljena na slijedeći način: 3 min izotermno na 60 °C, zatim je uslijedilo zagrijavanje na 246 °C brzinom od 3 °C/min te zadržavanje navedene temperature u trajanju 25 min.

Energija ionizacije uzorka u spektrometru masa iznosi 70 eV, temperatura izvora iona je postavljena na 200 °C, a područje skeniranja obuhvaća 40-350 masenih jedinica.



Slika 36. Korištena GC-MS instrumentacija.

2.4.2. HPLC analiza desulfoglukozinolata

Za analizu desulfoglukozinolata korišten je vezani sustav HPLC-UV, Perkin Elmer, NCI 900, USA (Slika 37.) Uvjeti rada dani su u Tablici 8., a sastav mobilne faze u Tablici 9.

Tablica 8. Parametri HPLC analize.

Kolona	C-18 (250mm x 4mm) 5μm
Pokretna faza	Voda, acetonitril
Protok	0,8 mL/min
Volumen injektiranja	20 μL
Detektor	UV (λ=227 nm)
Temperatura	30 °C
Vrijeme analize	56 min

Tablica 9. Sastav mobilne faze korištene za HPLC analizu desulfoglukozinolata.

Vrijeme (min)	Voda (%)	Acetonitril (30%)	Gradijent
Početni uvjeti	100	0	-
0,5	96	4	-
28,0	14	86	Linearno
4,0	14	86	-
2,0	5	95	Linearno
13,0	5	95	-
1,0	96	4	Linearno
8,0	96	4	-
0,0	0	100	-



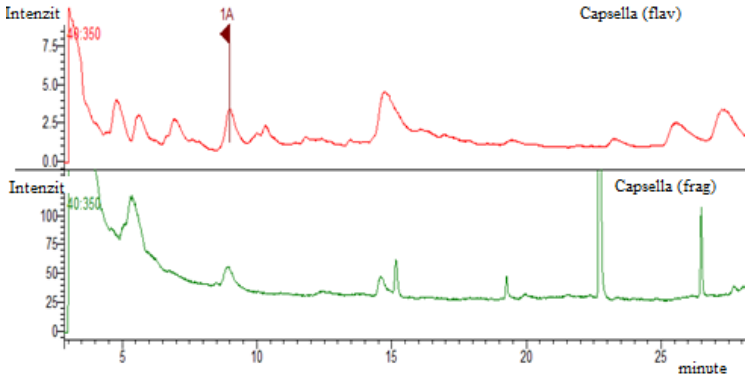
Slika 37. Korištena HPLC instrumentacija.

3. REZULTATI I RASPRAVA

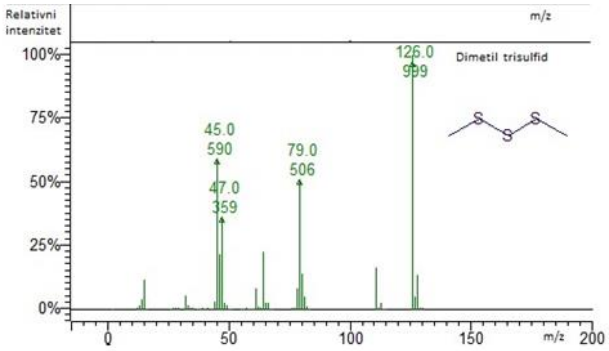
3.1. Razgradnja glukozinolata i GC-MS analiza

Glukozinolati su spojevi kod kojih je poznato da pucanje S-veze, osim s karakterističnim enzimom mirozinazom, se može dogoditi i kemijski i termički. U ovom radu u svrhu istraživanja odabrani su biljni materijali koji sadrže različite glukozinolate i to: sredozemna rusomača (*Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik), crvena rotkvica (*Raphanus sativus* L. var. *radicula* Pers.) te bijela rotkva (*Raphanus sativus* var. *longipinnatus* L.H. Bailey). Enzimska razgradnja provedena je na način da se usitnjeni biljni materijal maceririrao 24 sata u destiliranoj vodi na sobnoj temperaturi (24 °C), nakon čega je provedena ekstrakcija s diklormetanom (CH_2Cl_2). Termička razgradnja uključivala je postupak hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru (2,5 sata, 100 °C) te u sustavu za brzu mikrovalnu destilaciju primjenom snage od 500 W iz svježeg biljnog materijala (98 °C, programirano 35 min). Provedeno je istraživanje utjecaja mikrovalova na razgradnju glukozinolata (snaga mikrovalova 500 W, temperatura 40 °C, programirano 35 min) pri čemu je ekstrakt dobiven djelovanjem sile gravitacije te je odmah nakon dobivanja provedena ekstrakcija s CH_2Cl_2.

GC-MS analizom dobiven je kromatogram hlapljivih spojeva sredozemne rusomače (Slika 38.). Analizom svih hlapljivih izolata nisu identificirani sumporovi spojevi koji potječu od razgradnje glukozinolata što ukazuje na to da je snaga od 500 W prejaka za ovakvu vrstu biljnog matrijala. Tijekom mikrovalne ekstrakcije došlo je do naglog porasta temperature i izgranja biljnog matrijala što objašnjava izostanak razgradnih produkata glukozinolata u ekstraktu. U izolatima dobivenim pod utjecajem mikrovalova identificiran je dimetil trisulfid, dok nakon enzimske razgradnje nije uočen isti. Na Slici 39. prikazan je maseni spektar dimetil trisulfida. Izolacija spojeva iz sredozemne rusomače postupkom hidrodestilacije nije provedena zbog nedovoljno sabranog biljnog materijala.



Slika 38. Kromatogram ukupne ionske jakosti sredozemne rusomače.

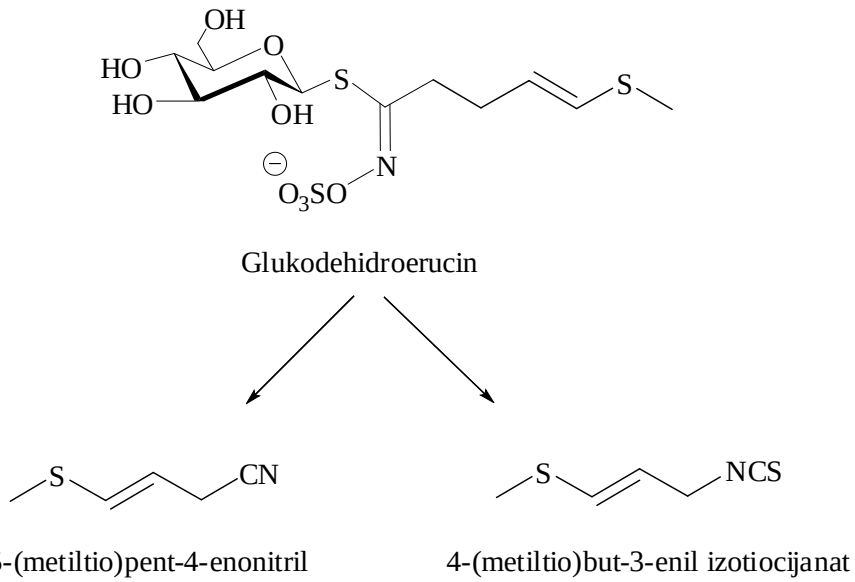


Slika 39. Maseni spektar dimetil trisulfida.

Molekulski pik, koji je ujedno i osnovni ima vrijednost omjera m/z=126. Vidljiv je i karakteristični M+2 pik čiji je intenzitet jednak 4% vrijednosti intenziteta molekulskog pika, a karakterističan je za sumporove spojeve. Fragment m/z=79 nastaje cijepanjem S-S veze i karakterističan je za polisulfidne spojeve.

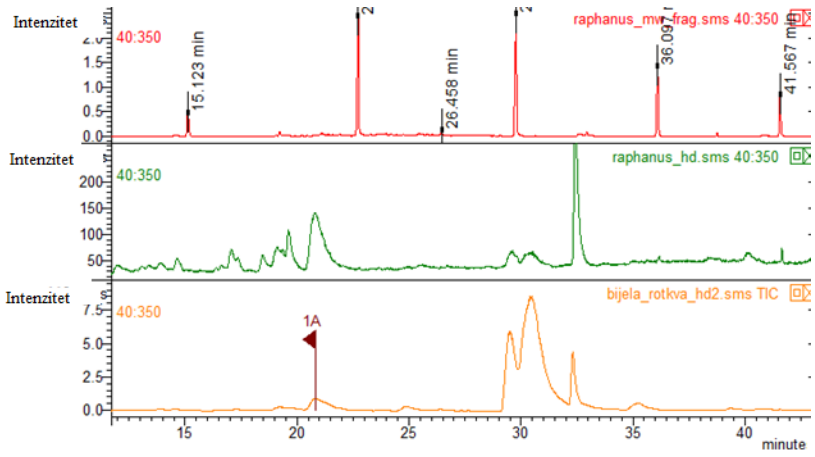
Sulfidi su produkti razgradnje *S*-metil-L-cistein sulfoksida. *S*-metil-L-cistein sulfoksid je karakterističan za biljke *Alllium* vrsta, no njegovi razgradni produkti, kao što je dimetil trisulfid, prisutni su u velikom broju biljnih vrsta porodice Brassicaceae.

U izolatima crvene rotkvice i bijele rotkve identificirani su razgradni produkti glukodehidroerucina (Slika 40.).

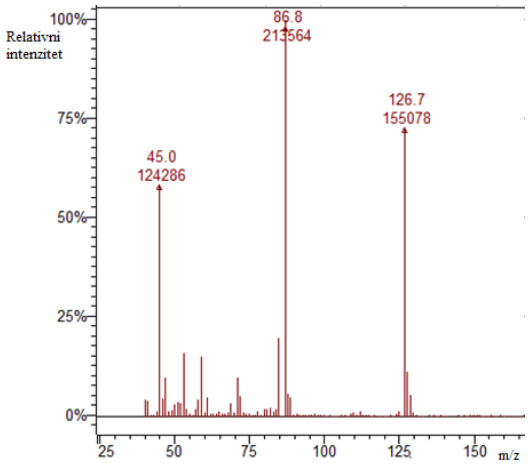


Slika 40. Razgradnja glukodehidroerucina.

Na Slici 41. prikazan je kromatogram ukupne ionske jakosti izolata crvene rotkvice i bijele rotkve, a na Slici 42. maseni spektar 5-(metiltio)pent-4-enonitrila koji potječe od razgradnje glukodehidroerucina. Uočena su 2 identična pika na 19. i 20. minuti što ukazuje na to da se radi o geometrijskim izomerima. Molekulski pik se nalazi na vrijednosti m/z = 127, a osnovni pik na vrijednosti m/z = 87.

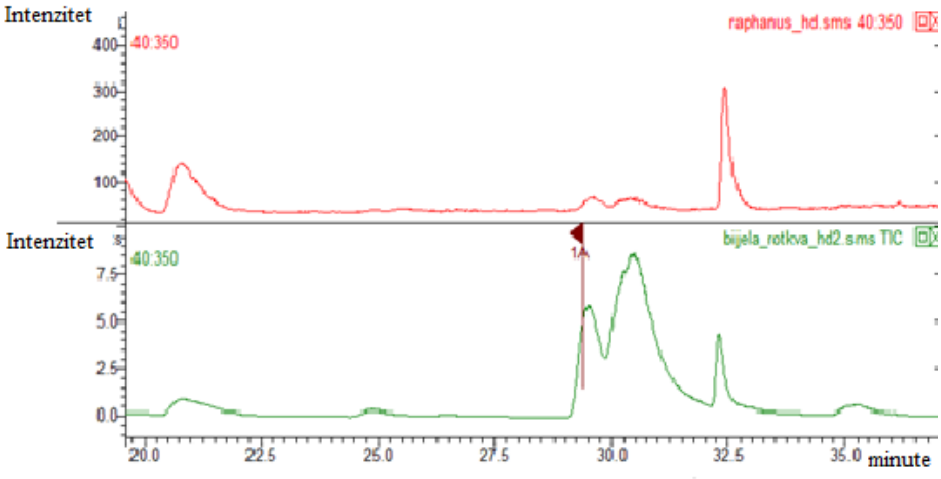


Slika 41. Kromatogram ukupne ionske jakosti izolata rotkvice i bijele rotkve.

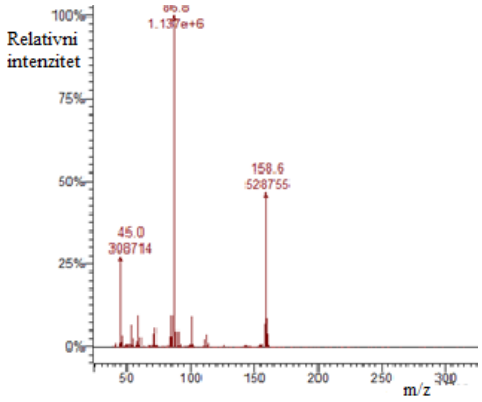


Slika 42. Maseni spektar 5-(metiltio)pent-4-enonitrila.

Na Slici 43. prikazani su kromatogrami ukupne ionske struje destilata crvene rotkvice i bijele rotkve. U destilatu bijele rotkve identificiran je na 29. minuti 4-(metiltio)but-3-enil-izotiocijanat koji potječe od razgradnje istog glukozinolata, glukodehidroerucina (Slika 44.). Molekulski pik se nalazi na vrijednosti m/z = 159, a osnovni pik na vrijednosti m/z = 87.



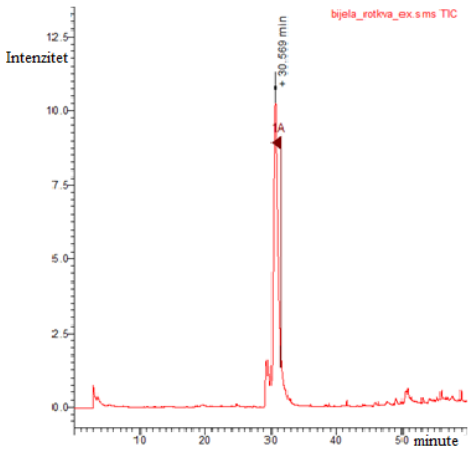
Slika 43. Kromatogram ukupne ionske jakosti destilata rotkvice i bijele rotkve.



Slika 44. Maseni spektar 4-(metiltio)but-3-enil-izotiocijanata.

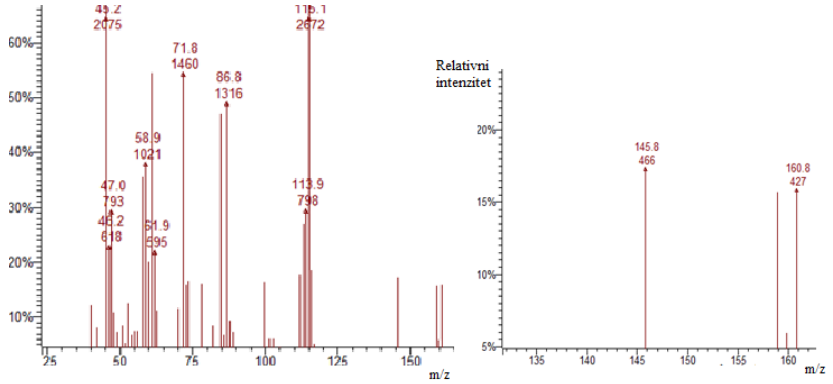
Spomenuti razgradni produkti glukodehidroerucina identificirani su samo u izolatima bijele rotkve, dok u izolatima crvene rotkvice i listova crvene rotkvice isti nisu identificirani.

GC-MS analizom ekstrakta dobivenog nakon autolize bijele rotkve dobiven je pik velikog intenziteta koji odgovara 4-(metiltio)but-3-enil-izotiocijanatu (m/z =159 (M^+), 87 (100%)) koji potječe iz glukodehidroerucina (Slika 45.). Uočena su 2 pika istog masenog spektra na 29,8 i 30,5 minuti što ukazuje na vjerojatno postojanje 2 izomera kao što je to slučaj kod nitrila. Maseni spektar 4-(metiltio)but-3-enil-izotiocijanta prikazan je prethodo na Slici 44.

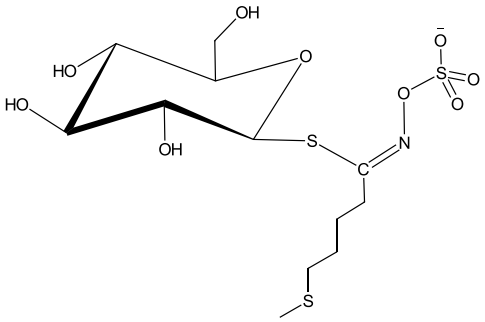


Slika 45. Kromatogram ukupne ionske jakosti ekstrakta bijele rotkve.

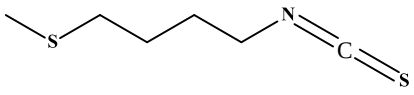
U destilatu crvene rotkvice identificiran je na 30,3 minuti 4-(metiltio)butil-izotiocijanat. Na Slici 46. prikazan je maseni spektar 4-(metiltio)butil-izotiocijanata koji potječe od glukoerucina s karaterističnim molekuskim pikom omjera m/z = 161. Struktura glukoerucina prikazana je na Slici 47., a struktura razgradnog produkta 4-(metiltio)butil-izotiocijanata na Slici 48.



Slika 46. Maseni spektar 4-(metiltio)butil-izotiocijanata.

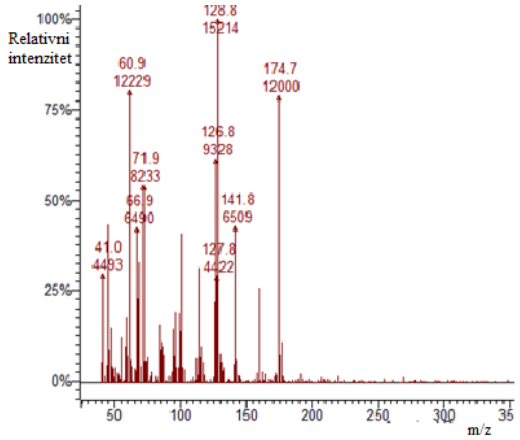


Slika 47. Glukoerucin.

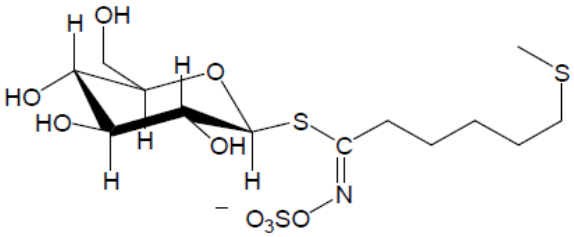


Slika 48. 4-(metiltio)butil-izotiocijanat.

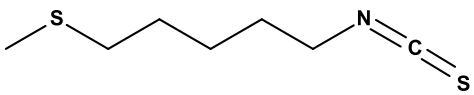
U destilatu bijele rotkve na 35. minuti uočen je pik koji odgovara 5-(metiltio)pentil-izotiocijanatu, razgradnom produktu glukoberteroina. Na Slici 49. prikazan je maseni spektar, a na Slici 51. struktura 5-(metiltio)pentil-izotiocijanata. Molekulski pik se nalazi na vrijednosti m/z = 175, a osnovni pik na vrijednosti m/z = 129. Na Slici 50. prikazana je struktura glukoberteroina iz kojeg potječe spomenuti razgradni produkt.



Slika 49. Maseni spektar 5-(metiltio)pentil-izotiocijanata.



Slika 50. Glukoberteroin.



Slika 51. 5-(metiltio)pentil-izotiocijanat.

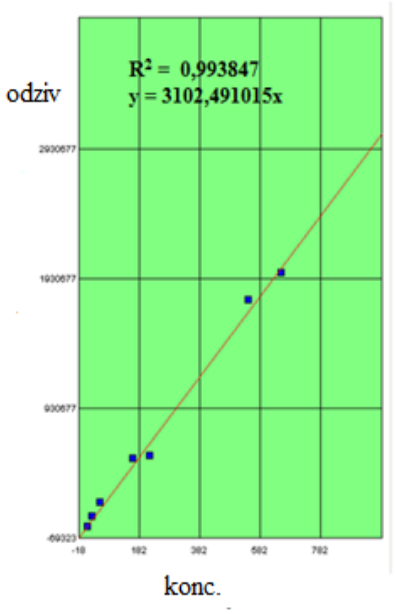
3.2. Izolacija i identifikacija glukozinolata HPLC tehnikom

U diplomskom radu A. Sedlar GC-MS analizom hlapljivih izolata dobivenih hidrodestilacijom čunjastog repušca, utvrđeno je da eterično ulje korijena u najvišem postotku sadrži sljedeće glukozinolate: glukonapin, glukoerucin, glukotropeolin i glukodehidroerucin.[18] Za usporedbu s istim u ovom radu su HPLC analizom izolirani i određeni desulfoglukozinolati dobiveni iz istog biljnog materijala.

Glukozinolatni profil diklormetanskog ekstrakta sivkaste ljubičine obrađen je u diplomskom radu D. Stojanov gdje je dominantni glukozinolat glukorafenin utvrđen identifikacijom sulforafena GC-MS tehnikom, a potvrđen LC-ESI-MS tehnikom.[1] Isto tako za usporedbu, u ovom radu je ekstrakt sjemena sivkaste ljubičine analiziran HPLC-UV tehnikom.

U poglavlju 3.1. opisana je identifikacija glukozinolata preko razgradnih produkata, izoticijanata i nitrila koristeći GC-MS tehniku. U nastavku će biti prikazana druga metoda identifikacije spomenutih spojeva preko desulfatiziranih glukozinolata koristeći HPLC-UV tehniku.

Desulfatacija je provedena dodatkom enzima sulfataze pripravljenim različitim koncentracijama sinigrina kao standarda (Tablica 6. i Tablica 7.) te ekstraktima čunjastog repušca i sivkaste ljubičine, odvaga oko 100 mg. Na Slici 52. prikazana je kalibracijska krivulja sinigrina koja služi za kvantizaciju identificiranih spojeva. Kako je to i vidljivo iz slike koeficijent determinacije R^2 je izrazito visok, tj. postignuta je visoka linearnost i korelacija za različite koncentracije desulfatiziranog sinigrina. Za zaključiti je da je korišteni enzim bio dovoljan za uspješnu desulfataciju.



Slika 52. Kalibracijska krivulja sinigrina.

Za kvantizaciju identificiranih glukozinolata koriste se sljedeće jednadžbe:

$$x = \frac{y-c}{m} \quad (1)$$

$$x_t = \frac{x*M*D}{w} \quad (2)$$

x = količina glukozinolata u ekstraktu,

y = površina ispod pika,

c = odsječak na y-osi,

m = nagib pravca,

x_t = koncentracija glukozinolata u uzorku,

M = faktor odziva,

D = faktor razrijeđenja,

w = masa uzorka.

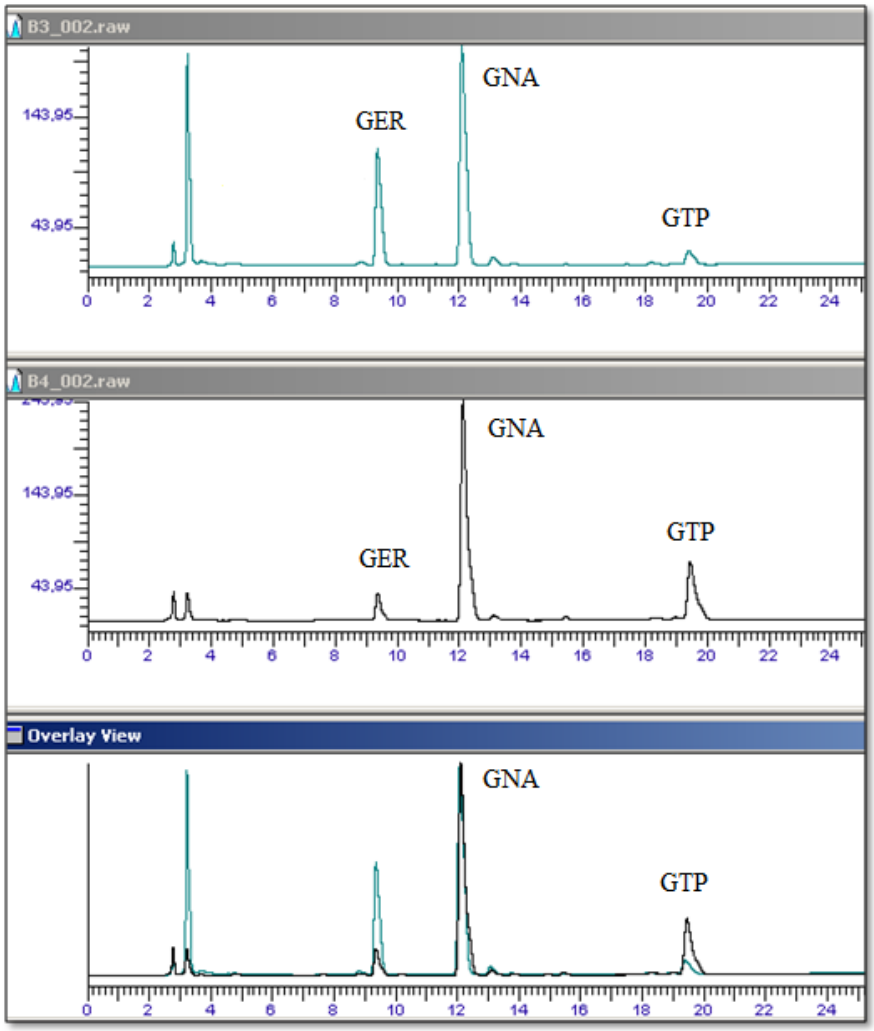
U Tablici 10. prikazani su desulfoglukozinolati identificirani u uljanoj repici kao i njihova vremena zadržavanja na temelju kojih se određuje prisutstvo istih (desulfo)glukozinolata u drugim biljnim vrstama.

Tablica 10. Desulfoglukozinolati identificirani u uljanoj repici.

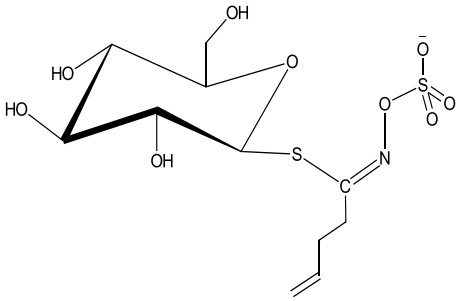
	Vrijeme zadržavanja (min)	**Naziv**
1	6,173	Desulfoglukoiberin
2	7,953	Desulfoprogoitrin
3	8,546	Desulfoepiprogoitrin
4	8,956	Desulfosinigrin
5	11,116	Desulfonapoleiferin
6	12,104	Desulfoglukonapin
7	14,247	Desulfo-4-hidroksiglukobrasicin
8	17,365	Desulfobrasikanapin
9	20,809	Desulfoglukotropeolin
10	22,900	Desulfoglukobrasicin
11	24,429	Desulfoglukonasturcin
12	30,658	Desulfo-4-metoksiglukobrasicin
13	35,349	Desulfoglukoneobrasicin

HPLC analizom ekstrakta cvijeta i korijena čunjastog repušca utvđeno je prisutstvo 3 glukozinolata: glukoerucin (GER), glukonapin (GNA) i glukotropeolin (GTP). Na Slici 53. dani su odgovarajući kromatogrami s karakterističnim vremenima zadržavanja za pojedini glukozinolat, a na Slikama 54. i 55. prikazane su strukture glukonapina i glukotropeolina dok je struktura glukoerucina prikazana prethodno na Slici 47. Navedeni glukozinolati su identificirani preko desulfatiziranih produkata.

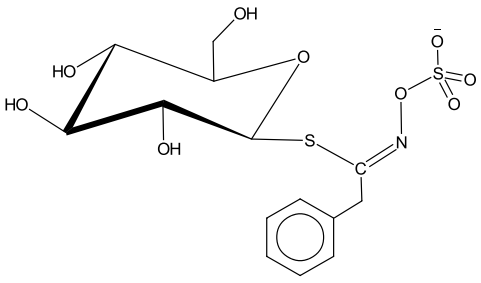
U Tablici 11. sumarno su prikazani rezultati analize izolata čunjastog repušca zajedno s određenim koncentracijama identificiranih glukozinolata. Detaljni proračun koncentracija dan je u prilogu.



Slika 53. HPLC kromatogrami (čunjasti repušac). a) cvijet (B3_002.raw); b) korijen (B4_002.raw); GER, glukoerucin; GNA, glukonapin; GTP, glukotropeolin.



Slika 54. Glukonapin



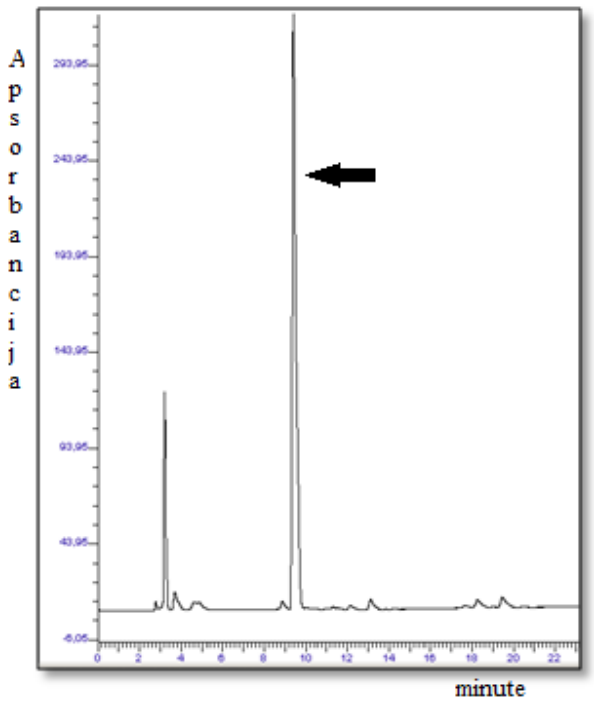
Slika 55. Glukotropeolin.

Tablica 11. Koncentracije identificiranih glukozinolata u ekstraktima čunjastog repušca.

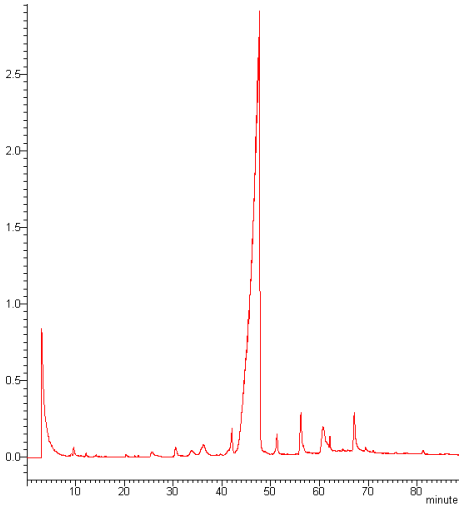
SPOJ	KONAČNA KONCENTRACIJA U UZORKU (µmol/g)	
	KORIJEN	CVIJET
GER	1,794	1,549
GNA	18,411	15,105
GTP	5,278	1,018

U ekstraktu sjemena sivkaste ljubičine HPLC-UV tehnikom identificiran je glukorafenin (Slika 56.). Potvrdu da se zaista radi o glukorafeninu dala je GC-MS analiza sjemena sivkaste ljubičine gdje je isti identificiran preko razgradnog produkta 4-(metilsulfinil)but-3-enil-izotiocijanata, poznatijeg pod imenom sulforafen (Slika 57.) Na Slici 58. prikazana je struktura glukorafenina, a na Slici 59. struktura njegovog razgradnog produkta, sulforafena.

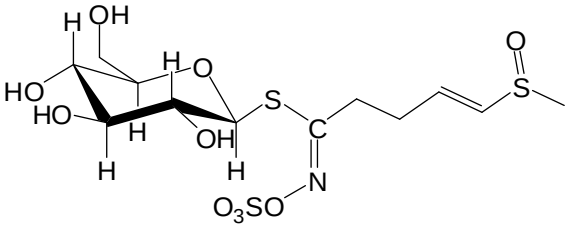
Izračunata je koncentracija glukorafenina u uzorku i izosi 17,022 µmol/g, a detaljni proračun prikazan je u prilogu.



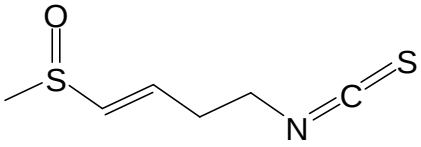
Slika 56. HPLC-UV kromatogram (sivkasta ljubičina).



Slika 57. GC-MS kromatogram ukupne ionske jakosti (sivkasta ljubičina).[1]



Slika 58. Glukorafenin.



Slika 59. Sulforafen.

4. ZAKLJUČAK

- ✓ U izolatima sredozemne rusomače nije identificiran niti jedan razgradni produkt glukozinolata što upućuje na to da je snaga od 500 W prejaka za ovakvu vrstu biljnog materijala.
- ✓ U izolatima sredozemne rusomače dobivenim pod utjecajem mikrovalova identificiran je dimetil trisulfid koji je produkt razgradnje *S*-metil-L-cistein sulfoksida.
- ✓ Hlapljivi spojevi iz crvene rotkvice izolirani su hidrodestilacijom, mikrovalnom destilacijom i ekstrakcijom s CH_2Cl_2; u destilatu je preko razgradnog produkta 4-(metiltio)butil izotiocijanata identificiran glukoerucin, dok u ostalim izolatima nisu identificirani razgradni produkti glukozinolata.
- ✓ Hlapljivi spojevi iz bijele rotkve izolirani su hidrodestilacijom, mikrovalnom destilacijom i ekstrakcijom s CH_2Cl_2; u destilatu je preko razgradnih produkata 5-(metiltio)pent-4-enonitrila i 4-(metiltio)but-3-enil izotiocijanata identificiran glukodehidroerucin, preko razgradnog produkta 5-(metiltio)pentil izotiocijanata identificiran je glukoberteroin, a u diklormetanskom ekstraktu je preko razgradnog produkta 4-(metiltio)but-3-enil izotiocijanata identificiran glukodehidroerucin.
- ✓ U ekstraktu korijena čunjastog repušca preko desulfatiziranih produkata identificirani su glukoerucin, glukonapin i glukotropeolin čije su koncentracije redom 1,794 μmol/g, 18,411 μmol/g i 5,278 μmol/g.
- ✓ U ekstraktu cvijeta čunjastog repušca preko desulfatiziranih produkata identificirani su glukoerucin, glukonapin i glukotropeolin čije su koncentracije redom 1,549 μmol/g, 15,105 μmol/g i 1,018 μmol/g.
- ✓ U ekstraktu sjemena sivkaste ljubičine preko desulfatiziranih produkata identificiran je glukorafenin čija koncentracija u uzorku iznosi 17,022 μmol/g.

5. LITERATURA

1. Stojanov, D. *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama porodice Brassicaceae i Phytolaccaceae i sinteza fenil-izotiocijanata.* Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2015.
2. Iranshahi, M. *A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods*. Journal of Essential Oil Research. 24, 2012, str. 393-434.
3. Kopjar M., Šubari D., Piližota V. *Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi.* Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku. 1, 2012, str. 22-35
4. Blažević, I. *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija.* Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
5. Blažević I., Montaut S., Burčul F., Rollin P. *Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential.* s.l. : Springer International Publishing Switzerland, 2012.
6. Zekić, M. *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija.* Zagreb : Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
7. Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., Arora, S. *Bio-protecive effect of glucosilolates,* LWT: Food Science and Technology 42 (2009), str. 1561-1572
8. Smith, T. K., Mithen, R., Johnson, I. T. *Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts in vivo,* Carcinogenesis 24 (2003), str. 491-495.
9. Jerković, I., Radonić, A. *Praktikum iz organske kemije.* Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2009.
10. Jerković, I. *Predlošci za predavanja iz Kemije i tehnologije aromatičnog bilja*, Split: 2014.
11. Blekić, M., Jambrek, A. R., Chrmant, F. *Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva,* Croatian Journal of Food Science and Technology, 3, 2011., str. 32-47

12. Vujanović, T. *Mikrovalna ekstrakcija polifenola iz cvijet i lista gloga (Crataegus monogyna)*, Završni rad, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet 2015.
13. Đulović, A., Silić, A., Vlajčević, D., Blažević, I. *Diplotaxis tenuifolia (L.) DC: Microwave extraction vs. Hidrodestilation,* KTF Split 2018.
14. Dohney-Adams, T., Redeker, K., Kittipol, V., Bancroft, I., Haetley, S. E. *Development of an efficient glucosinolate extraction method,* Plant Methods 2017.
15. URL:https://www.jove.com/video/55425/a-straightforward-method-for-glucosinolate-extraction-analysis-with (preuzeto 1.6.2018)
16. Perašin, J. *Priprava desulfoglukozinolata iz vodeno metanolnog ekstrakta kupusa za reverzno-faznu tekućinsku koromaografiju,* Diplomski rad, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet 1998.
17. URL:https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=kromatografija (preuzeto 4.6.2018.)
18. Sedlar, A. *Izolacija i identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva odabranih biljaka porodice Brassicaceae,* Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2017.
19. URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm (preuzeto 4.6.2018.)
20. URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Masena_spektrometrija (preuzeto 5.6.2018.)
21. URL: https://cheminfo2012.wikispaces.com/Boris+Kevin+Bayemi+-+Final (preuzeto 5.6.2018.)
22. URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Kromatografija#cite_note-Meyers-5 (preuzeto 6.6.18.)
23. URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/Teku%C4%87inska_kromatografija_visoke_djelotvornosti (preuzeto 6.6.2018.)
24. URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.html (preuzeto 6.6.2018.)
25. URL:https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry (preuzeto 8.7.2018.)
26. URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Brassicaceae (preuzeto 10.6.2018.)
27. URL: https://www.plantea.com.hr/rusomaca/ (preuzeto 11.6.2018)

28. Grlić, Lj. *Enciklopedija samoniklog jestivog bilja*, Delo, Ljubljana, 1986
29. URL:https://www.plantea.com.hr/rusomaca/rusomaca-0010/ (preuzeto 11.6.2018.)
30. URL: https://www.plantea.com.hr/rotkvica/ (preuzeto 3.7.2018.)
31. URL: https://www.plantea.com.hr/daikon/ (preuzeto 3.7.2018)
32. URL: http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/tro-4105774 (preuzeto 3.7.2018.)
33. https://www.gardensonline.com.au/GardenShed/PlantFinder/Show_2030.aspx (preuzeto 3.7.208)
34. http://www.stvarukusa.rs/pojam/bela-rotkva (preuzeto 3.7.2018)
35. URL: https://www.plantea.com.hr/cunjasti-repusac/ (preuzeto 29.6.2018)
36. URL: https://www.plantea.com.hr/ljubicina/ (preuzeto 4.7.2018)
37. URL:https://www.pijanitvor.com/threads/ljubicina-matthiola-incana.9755/ (preuzeto 4.7.2018.)

6. PRILOZI

Izračun konačnih koncentracija identificiranih glukozinolata u čunjastom repuščcu i sivkastoj ljubičini:

- čunjasti repušac – korijen

$$\text{x (GER)} = \frac{356782{,}97}{3102{,}49105} = 114{,}99887\ \mu\text{M} = 0{,}115\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}1\ \text{g}} = \text{faktor } 15$$

$$\text{x}_\text{t}\ \text{(GER)} = 0{,}115\ \mu\text{mol} * 1{,}04 * 15 = 1{,}794\ \mu\text{mol/g}$$

$$\text{x (GNA)} = \frac{3430619{,}66}{3102{,}49105} = 1105{,}76295\ \mu\text{M} = 1{,}10576\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\text{x}_\text{t}\ \text{(GNA)} = \ 1{,}10576\ \mu\text{mol} * 1{,}11 * 15 = 18{,}411\ \mu\text{mol/g}$$

$$\text{x (GTP)} = \frac{114904{,}74}{3102{,}49105} = 370{,}36\ \mu\text{M} = 0{,}37036\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\text{x}_\text{t}\text{(GTP)} = 0{,}37036\ \mu\text{mol} * 0{,}95 * 15 = 5{,}278\ \mu\text{mol/g}$$

Korijen ukupno: (1,794 + 18,711 + 5,278) µmol/g = 25,783 µmol/g

Cvijet ukupno: (1,549 + 15,105 + 1,018) µmol/g = 17,672 µmol/g

- sivkasta ljubičina – sjeme

$$\text{x (GRF)} = \frac{3911814{,}99}{3102{,}49105} = 1260{,}8626\ \mu\text{M}$$

$$\text{x}_\text{t}\ (\text{GRF}) = 1{,}26086\ \mu\text{mol} * 0{,}9 * 15 = 17{,}022\ \mu\text{mol/g}$$