Glukozinolatni profil u biljkama Diplotaxis tenuifolia (L.) DC i Matthiola incana (L.) R.BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima

Silić, Ana

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:167:445788

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

GLUKOZINOLATNI PROFIL U BILJKAMA *DIPLOTAXIS TENUIFOLIA* (L.) DC. I *MATTHIOLA INCANA* (L.) R. BR. TE NJIHOVA RAZGRADNJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

DIPLOMSKI RAD

ANA SILIĆ

Matični broj: 82

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

GLUKOZINOLATNI PROFIL U BILJKAMA *DIPLOTAXIS TENUIFOLIA* (L.) DC. I *MATTHIOLA INCANA* (L.) R. BR. TE NJIHOVA RAZGRADNJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

DIPLOMSKI RAD

ANA SILIĆ
Matični broj: 82

Split, listopad 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

GLUCOSINOLATE PROFILE OF *DIPLOTAXIS TENUIFOLIA* (L.) DC. AND *MATTHIOLA INCANA* (L.) R. BR. AND THEIR MICROWAVE-ASSISTED DEGRADATION

DIPLOMA THESIS

ANA SILIĆ

Parent number: 82

Split, October 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.

GLUKOZINOLATNI PROFIL U BILJKAMA *DIPLOTAXIS TENUIFOLIA* (L.) DC. I *MATTHIOLA INCANA* (L.) R. BR. TE NJIHOVA RAZGRADNJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

Ana Silić, 82

Sažetak: Glukozinolati, *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju iz aminokiselina. Pronađeni su u 16 porodica reda Capparales. Ovim spojevima posebno obiluju biljke porodice Brassicaceae kojoj pripada većina biljaka iz svakodnevne prehrane kao što su brokula, kupus, cvjetača, repa, rotkvica i druge. Ovi spojevi su kemijski stabilni i biološki neaktivni. Oštećenjem tkiva dolazi do kontakta između enzima mirozinaze i glukozinolata što vodi ka njihovoj hidrolizi čime nastaje niz različitih biološki aktivnih razgradnih produkata.

U ovom diplomskom radu istražene su dvije biljne vrste uskolisni dvoredac (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) i sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R.Br.). Cilj rada bio je istražiti glukozinolatni profil u različitim dijelovima biljaka *D. tenuifolia* i *M. incana*. Glukozinolati su identificirani GC-MS analizom njihovih razgradnih produkata te HPLC-DAD-MS/MS analizom desulfatiziranih glukozinolata. Isti su kvantificirani u različitim dijelovima biljaka prema službenoj ISO 9167-1 metodi koja se zasniva na HPLC analizi desulfoglukozinolata. U svim biljnim dijelovima *D. tenuifolia* (sjeme, list, stabljika, cvijet) identificirana su dva glukozinolata glukoerucin (5,62-15,85 μmol/g) i glukorafanin (0,63-2,83μmol/g). U svim biljnim dijelovima *M. incana* (komuška, list, stabljika, cvijet) su identificirani glukorafenin (1,53-21,03 μmol/g) i glukorafanin (tr-0,08 μmol/g), dok je u cvijetu potvrđen i indolni glukozinolat glukobrasicin (0,39 μmol/g).

U ovom radu istražena je i termička razgradnja glukozinolata biljke *D. tenuifolia* korištenjem različitih metoda izolacije: hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (100 °C, 150 min), te destilacijom i ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (500 W, 98 °C, 35 min). Hlapljivi spojevi analizirani GC-MS-om ukazuju da se glavni glukozinolat glukoerucin razlaže različito, tj. 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanat je bio glavni produkt dobiven hidrodestilacijom, dok je 5-(metilsulfanil)pentanonitril bio dominanatan razgradni produkt dobiven izolacijom potpomognutom mikrovalovima.

Ključne riječi: glukozinolati, desulfoglukozinolati; *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., uskolisni dvoredac; *Matthiola incana* (L.) R.Br., sivkasta ljubičina; GC-MS, HPLC-UV, LC-MS/MS
Rad sadrži: 82 stranice, 64 slike, 14 tablica, 1 prilog, 34 literaturne reference
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:

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

GLUCOSINOLATE PROFILE OF DIPLOTAXIS TENUIFOLIA (L.) DC. AND MATTHIOLA INCANA (L.) R. BR. AND THEIR MICROWAVE-ASSISTED DEGRADATION

Ana Silić, 82

Abstract: Glucosinolates, *β*-thioglucoside-N-hydroxysulfates with variable side chains are secondary metabolites that are synthesized from amino acids. They were found in 16 families of Capparales. These compounds particularly belong to Brassicaceae family, which includes the most plants of everyday nutrition such as broccoli, cabbage, cauliflower, turnip, radish and others. These compounds are chemically stable and biologically inactive. Damage to the tissue results in contact between the enzymes myrosinase and glucosinolates leading to their hydrolysis which creates a variety of biologically active breakdown products.
In this diploma thesis, two plant species were studied *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. and *Matthiola incana* (L.) R.Br. The aim of the study was to investigate the glucosinolate profile in various parts of *D. tenuifolia* and *M. incana*. Glucosinolates were identified by GC-MS analysis of their breakdown products and HPLC-DAD-MS/MS by analyzing desulfated glucosinolates. The same were quantified in different parts of plants according to the official ISO 9167-1 method based on the HPLC analysis of desulphoglucosinolates. Glucosinolates glucoerucin (5.62-15.85 μmol/g) and glucoraphanin (0.63-2.83μmol/g) were identified in all plant parts of *D. tenuifolia* (seed, leaf, stem, flower) identified. In all plant parts of *M. incana* (mussel, leaf, stem, flower), glucoraphenin (1.53-21.03 μmol/g) and glucoraphanin (tr-0.08 μmol/g) were identified, while indole glucosinolate glucobrassicin was confirmed in flower (0.39 μmol/g).
In this study, the thermal decomposition of the glucosinolates of the *D. tenuifolia* plant was investigated using various isolation methods: hydrodistillation in a modified apparatus by Clevenger (100 ° C, 150 min) and distillation and extraction with microwaves (500 W, 98 ° C, 35 min). Volatile compounds analyzed by GC-MS indicate that the main glucosinolate glucoerucine is differently dissociated. 4- (methylsulfanyl) butyl isothiocyanate was the main product obtained by hydrodestillation, while 5- (methylsulfanyl) pentanonitrile was a dominant breakdown product obtained by micro-assisted isolation .

Keywords: glucosinolates, desulphoglucosinolates, *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Matthiola incana* (L.) R.Br., GC-MS, HPLC-UV, LC-MS/MS
Thesis contains: 82 pages, 64 figures, 14 tables, 1 supplement, 34 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:

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 svom mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću na pruženoj prilici, svim uputama i savjetima prilikom izrade rada.

Iskreno se zahvaljujem i asistentici Azri Đulović, mag. chem. na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te na stručnim i prijateljskim savjetima, a ponajviše na utrošenom vremenu i ogromnom trudu.

Također se želim zahvaliti i svim dragim prijateljima i ljudima bez kojih ovo iskustvo ne bih bilo nezaboravno.

Hvala ti V., što si bio uz mene!

Za kraj, najveće HVALA mojoj obitelji, majci Nerini, ocu Ivanu i bratu Anti na bezuvjetnoj podršci i ljubavi tokom cijelog mog studiranja i života!

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Izolirati hlapljive sumporove spojeve iz vrste *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. korištenjem ekstrakcije i destilacije potpomognute mikrovalovima te usporediti s hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru.
2. Izvršiti identifikaciju hlapljivih izolata korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS).
3. Izolirati glukozinolate iz vrste *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. i *Matthiola incana* (L.) R.Br. metodom ekstrakcije uz desulfataciju.
4. Izvršiti identifikaciju izoliranih desulfoglukozinolata korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-UV i HPLC-MS/MS).
5. Odrediti kvantitativni sastav glukozinolata biljnih vrsta *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. i *Matthiola incana* (L.) R.Br.

SAŽETAK

Glukozinolati, *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju iz aminokiselina. Pronađeni su u 16 porodica reda Capparales. Ovim spojevima posebno obiluju biljke porodice Brassicaceae kojoj pripada većina biljaka iz svakodnevne prehrane kao što su brokula, kupus, cvjetača, repa, rotkvica i druge. Ovi spojevi su kemijski stabilni i biološki neaktivni. Oštećenjem tkiva dolazi do kontakta između enzima mirozinaze i glukozinolata što vodi ka njihovoj hidrolizi čime nastaje niz različitih biološki aktivnih razgradnih produkata.

U ovom diplomskom radu istražene su dvije biljne vrste uskolisni dvoredac (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) i sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R.Br.). Cilj rada bio je istražiti glukozinolatni profil u različitim dijelovima biljaka *D. tenuifolia* i *M. incana*. Glukozinolati su identificirani GC-MS analizom njihovih razgradnih produkata te HPLC-DAD-MS/MS analizom desulfatiziranih glukozinolata. Isti su kvantificirani u različitim dijelovima biljaka prema službenoj ISO 9167-1 metodi koja se zasniva na HPLC analizi desulfoglukozinolata. U svim biljnim dijelovima *D. tenuifolia* (sjeme, list, stabljika, cvijet) identificirana su dva glukozinolata glukoerucin (5,62-15,85 μmol/g) i glukorafanin (0,63-2,83μmol/g). U svim biljnim dijelovima *M. incana* (komuška, list, stabljika, cvijet) su identificirani glukorafenin (1,53-21,03 μmol/g) i glukorafanin (tr-0,08 μmol/g), dok je u cvijetu potvrđen i indolni glukozinolat glukobrasicin (0,39 μmol/g).

U ovom radu istražena je i termička razgradnja glukozinolata biljke *D. tenuifolia* korištenjem različitih metoda izolacije: hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (100 °C, 150 min), te destilacijom i ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (500 W, 98 °C, 35 min). Hlapljivi spojevi analizirani GC-MS-om ukazuju da se glavni glukozinolat glukoerucin razlaže različito, tj. 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanat je bio glavni produkt dobiven hidrodestilacijom, dok je 5-(metilsulfanil)pentanonitril bio dominanatan razgradni produkt dobiven izolacijom potpomognutom mikrovalovima.

Ključne riječi: glukozinolati, desulfoglukozinolati; *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., uskolisni dvoredac; *Matthiola incana* (L.) R.Br., sivkasta ljubičina; GC-MS, HPLC-UV, LC-MS/MS

SUMMARY

Glucosinolates, *β*-thioglucoside-N-hydroxysulfates with variable side chains are secondary metabolites that are synthesized from amino acids. They were found in 16 families of Capparales. These compounds particularly belong to Brassicaceae family, which includes the most plants of everyday nutrition such as broccoli, cabbage, cauliflower, turnip, radish and others. These compounds are chemically stable and biologically inactive. Damage to the tissue results in contact between the enzymes myrosinase and glucosinolates leading to their hydrolysis which creates a variety of biologically active breakdown products.

In this diploma thesis, two plant species were studied *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. and *Matthiola incana* (L.) R.Br. The aim of the study was to investigate the glucosinolate profile in various parts of *D. tenuifolia* and *M. incana*. Glucosinolates were identified by GC-MS analysis of their breakdown products and HPLC-DAD-MS/MS by analyzing desulfated glucosinolates. The same were quantified in different parts of plants according to the official ISO 9167-1 method based on the HPLC analysis of desulphoglucosinolates. Glucosinolates glucoerucin (5.62-15.85 μmol/g) and glucoraphanin (0.63-2.83μmol/g) were identified in all plant parts of *D. tenuifolia* (seed, leaf, stem, flower) identified. In all plant parts of *M. incana* (mussel, leaf, stem, flower), glucoraphenin (1.53-21.03 μmol/g) and glucoraphanin (tr-0.08 μmol/g) were identified, while indole glucosinolate glucobrassicin was confirmed in flower (0.39 μmol/g).

In this study, the thermal decomposition of the glucosinolates of the *D. tenuifolia* plant was investigated using various isolation methods: hydrodistillation in a modified apparatus by Clevenger (100 ° C, 150 min) and distillation and extraction with microwaves (500 W, 98 ° C, 35 min). Volatile compounds analyzed by GC-MS indicate that the main glucosinolate glucoerucine is differently dissociated. 4- (methylsulfanyl) butyl isothiocyanate was the main product obtained by hydrodestillation, while 5-(methylsulfanyl) pentanonitrile was a dominant breakdown product obtained by micro-assisted isolation .

Keywords: glucosinolates, desulfoglucosinolates, *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC., *Matthiola incana* (L.) R.Br., GC-MS, HPLC-UV, LC-MS/MS

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 Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata 4

1.3 Razgradnja glukozinolata 5

1.3.1 Enzimska razgradnja glukozinolata 6

1.3.2 Kemijska razgradnja glukozinolata 9

1.4 Biološka aktivnost glukozinolata 11

1.4.1 Antikancerogeno djelovanje 11

1.4.2 Antioksidacijsko djelovanje 12

1.4.3 Antimikrobno i antifungalno djelovanje 13

1.4.4 Štetno djelovanje 13

1.5 Metode izolacije hlapljivih spojeva 14

1.5.1 Destilacija 14

1.5.2 Ekstrakcija 15

1.5.3 Ekstrakcija glukozinolata 18

1.6 Metode identifikacije hlapljivih spojeva 18

1.6.1 Kromatografija 19

1.6.2 Spektrometrija masa 21

1.6.3 Vezani sustav plinska kromatografija- spektrometrija masa 22

1.6.4 Tekućinska kromatografija 23

1.7 Brassicaceae 26

1.7.1 Uskolisni dvoredac *(Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) 27

1.7.2 Sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R.Br.) 28
2. **EKSPERIMENTALNI DIO** 29
2.1 Kemikalije i aparatura 29
2.2 Biljni materijal 31
2.2.1 Uskolisni dvoredac 31
2.2.2 Sivkasta ljubičina 33
2.3 Metode izolacije 34
2.3.1 Mikrovalna ekstrakcija 34
2.3.2 Hidrodestilacija 38
2.3.3 Ekstrakcija glukozinolata uz desulfataciju 40
2.4 Metode analize 48
2.4.1 GC-MS analiza 48
2.4.2 HPLC 49
2.4.3 LC-MS-MS analiza 50
3. R**EZULTATI I RASPRAVA** 52
3.1 GC- MS analiza 52
3.2 Izolacija glukozinolata i HPLC analiza 60
3.2.1 Uskolisni dvoredac (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) 62
3.2.2 Sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R.B.) 67
4. **ZAKLJUČAK** 72
5. **LITERATURA** 73
6. **PRILOG** 76
6.1 Izračun konačnih koncentracija identificiranih glukozinolata 76
6.1.1 Sivkasta ljubičina 79
6.1.2 Uskolisni dvoredac 77
6.2 Uv spektri potvrđenih glukozinolata 81

UVOD

Interes za glukozinolate i njihove razgradne produkte raste iz godine u godinu zbog njihovih nutritivnih i antinutritivnih svojstava, a ponajviše zbog mogućih antikancerogenih svojstava. Stoga su biljne vrste porodice Brassicaceae čest predmet znanstvenih istraživanja u svrhu identifikacije glukozinolata i razgradnih produkata pojedinih biljaka ove porodice te njihovog biološkog djelovanja bilo antimikrobnog, antifungalnog, antioksidacijskog ili antikancerogenog.

Glukozinolati su *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem. Ovi spojevi su kemijski stabilni i biološki neaktivni sve dok su odvojeni u stanicama biljaka od ostalih sastojaka. Oštećenjem tkiva dolazi do kontakta između enzima mirozinaze i glukozinolata što vodi ka njihovoj hidrolizi. Hidrolizom glukozinolata nastaje niz različitih biološki aktivnih razgradnih produkata kao što su izotiocijanati, nitrili, indoli, tiocijanati i epitionitrili. Izolaciju spomenutih razgradnih produkata glukozinolata je moguće provesti destilacijom i ekstrakcijom, dok se njihovo dokazivanje i identificiranje vrši primjenom tehnika kao što su vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS) te tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).

1. OPĆI DIO

1.1 Hlapljivi sumporovi spojevi

Hlapljivi sumporovi spojevi su posebna grupa metaboličkih produkata koje se prvenstveno može pronaći u biljkama, ali i u životinjama i mikroorganizmima. Rasprostranjeni u 43 biljne porodice i 173 biljna roda, od kojih su najbitnije porodice Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae, Phytolaccaceae i Poaceae. Koncentracija hlapljivih sumporovih spojeva u biljnim dijelovima je različita, a mogu se nalaziti u korijenu, stabljici, listu, cvijetu ili sjemenkama te može varirati ovisno o čimbenicima kao što su vrsta biljke, razvojni stadij biljke, klima i način uzgoja.[1]

Kemijske strukture pojedinih sumporovih spojeva razlikuju se od jednostavnih pa sve do složenih struktura. Kao primjer jednostavne strukture ističe se dimetil-sulfidimetantiol, dok složene strukture mogu sadržavati i druge heteroatome, kao što su kisik i dušik te su takav primjer β-mintsulfid i 4,5-epitiokariofilen.[2]

S obzirom na njihovu zamjetnu zastupljenost u biljnim vrstama, često su predmet istraživanja u svrhu ispitivanja njihovog biološkog značaja. Ovi spojevi imaju važnu fiziološku ulogu s različitim djelovanjima kao što su antibakterijska aktivnost alicina, inhibicijski efekt dialil-disulfida na proliferaciju tumorskih stanica i induciranje apoptoze kod HL-60 stanica te antioksidacijska aktivnost tiosulfina. Također spojevi koji pokazuju antikancerogena svojstva su izotiocijanati koji tvore veliku skupinu hlapljivih sumporovih spojeva.[2]

1.1.1 Klasifikacija hlapljivih sumporovih spojeva

Postoji više načina klasifikacije hlapljivih sumporovih spojeva, a jedan od njih je na temelju broja sumporovih atoma prisutnih u njihovoj strukturi. Uzimajući u obzir broj sumporovih atoma u strukturi, razlikuje se pet grupa sumporovih spojeva: hlapljivi spojevi koji u svojoj strukturi imaju samo jedan sumporov atom (S1), spojevi koji imaju dva sumporova atoma (S2), spojevi koji imaju tri sumporova atoma (S3) i spojevi koji imaju četiri sumporova atoma (S4) u strukturi. Nadalje, unutar samih grupa postoje

podjele tako da se grupe jedan i dva dodatno dijele prema broju prisutnih heteroatoma kao što su dušik i kisik. Grupa tri je, također, podijeljena na tri podgrupe prema broju prisutnih atoma kisika (S_3O) i prema obliku molekule na linearne spojeve (S_3L) i cikličke spojeve (S_3C). Na isti način je podijeljena grupa četiri na dvije podgrupe prema obliku molekula na linearne spojeve (S_4L) i cikličke spojeve (S_4C). Predstavnici pete, zasebne, grupe su izotiocijanati i tiocijanati (SCN tj. NSC).[1]

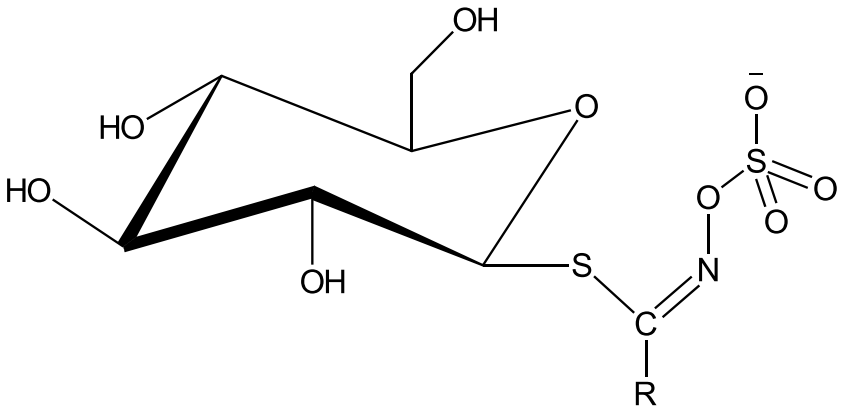
1.2 Glukozinolati

Glukozinolati (*β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) su sekundarni metaboliti koji se u živim organizmima sintetiziraju iz aminokiselina. Pronađeni su u 16 porodica reda Capparales. Najveće količine glukozinolata nalaze su u biljkama iz tri porodice ovog reda: Resedaceae, Capparaceae i Brassicaceae.[3] Porodica Brassicaceae, koja je za čovjeka najznačajnija, sadrži više od 350 rodova i 3000 vrsta od kojih je zbog široke dostupnosti i visoke konzumacije posebno važan rod *Brassica*. Rod *Brassica* uključuje čitav niz biljaka koje se koriste u svakodnevnoj prehrani poput uljane repice, gorušice, kupusa, kelja, cvjetače, brokule, prokulice, raštike i hrena. Sadržaj glukozinolata u biljkama ne ovisi samo o njihovoj vrsti, također ovisi i o vrsti uzgoja, klimi te agronomskoj praksi. Razlike u sadržaju glukozinolata se javljaju i među pojedinim dijelovima same biljke. Istraživanja su pokazala kako je najčešće sjemenje najbogatije glukozinolatima (čak 10% suhog materijala), dok je u korijenu, listovima, stabljici i cvijetu njihova koncentracija znatno niža.[4]

Još na početku 17. stoljeća izvršena su prva istraživanja svojstava glukozinolata u nastojanju da se objasni kemijsko podrijetlo oštrog okusa sjemenja gorušice. Prvi poznati glukozinolati, trivijalnih naziva sinigrin (prop-2-enil ili alil glukozinolat) i sinalbin (4-hidroksibenzil glukozinolat) izolirani su 1830. godine iz sjemena crne (*Brassica nigra*) i bijele (*Sinapis alba*) gorušice. Prvu strukturnu formulu predložio je Gadamer 1897. godine. Iako nepravilna, ova struktura bila je prihvaćena sve do 1956. godine, kada su Ettlinger i Lundeen predložili novu, ispravnu strukturu i opisali prvu sintezu glukozinolata.[5]

1.2.1 Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata

Strukturne karakteristike zajedničke svim glukozinolatima su da se sastoje od -D-tioglukozidnog dijela, sulfatne skupine koja je preko C=N skupine vezana za ostatak molekule (sulfoniranog oksima), te bočnog lanca (koji je označen s R u općoj strukturnoj formuli) po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju (Slika 1.). Bočni aglukonski lanac glukozinolata je varijabilan i osnova je njihove strukturne raznolikosti te biološke aktivnosti produkata koji nastaju njihovom enzimskom ili neenzimskom razgradnjom. Glukozinolati se u prirodi pojavljuju u obliku kalijevih i natrijevih soli koje su topljive u vodi i razrijeđenim alkoholima što omogućava izolaciju istih.[4]



Slika 1. Opća struktura glukozionalata.

S obzirom na strukturne sličnosti bočnog lanca (R) glukozinolati se najjednostavnije mogu podijeliti na alifatske, aromatske i heterocikličke (indolne) glukozinolate, koji su i najviše istraživani. Ukoliko aglukonski lanac potječe od aminokiselina alanin, leucin, izoleucin, valin ili metionin, tada se radi o alifatskim glukozinolatima. Kod aromatskih je aglukonski prekursori su aminokiseline fenilalanin ili tirozin, a kod indolnih je aminokiselina triptofan. Najbrojniji glukozinolati su oni koji sadrže nerazgranate ili razgranate alifatske bočne lance. Mnogi od njih u bočnom lancu sadrže dvostruke veze (olefini), hidroksilne ili karbonilne skupine te kovalentno vezani sumpor. Najveća pojedinačna grupa (jedna trećina svih glukozinolata) u bočnom lancu sadrži atom sumpora različitih oksidacijskih stupnjeva, kao naprimjer metiltioalkil-,

metilsulfinilalkil- ili metilsulfonilalkil-.[3]

Kod imenovanja glukozionalata većinom se koriste trivijalna imena nastala od latinskog imena biljke iz koje je glukozinolat prvi puta izoliran na način da se dodaje prefiks "gluko" i sufiks "in" (Tablica 1.). Također su 1961. godine Ettlinger i Dateo uveli polusistematsku nomenklaturu glukozinolata označavanjem aniona soli kao "glukozinolat", a ime R-skupine se koristi kao prefiks.[4]

Tablica 1. Glukozinolati prirodnog porijekla s ustanovljenim R-skupinama.[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*
Glukotropeolin	$C_6H_5CH_2$	*Tropaeolum majus*
Glukosisimbrin	$HOCH_2CH(CH_3)$	*Sisymbrium austriaceum*
Glukoeripestrin	$CH_3OOC(CH_2)_3$	*Erysimum rupestre*

1.3 Razgradnja glukozinolata

Glukozinolati su sami po sebi vrlo stabilni i biološki neaktivni spojevi te je njihova razgradnja nužna za aktivaciju brojnih bioloških utjecaja koje posjeduju njihovi razgradni produkti. Pri razgradnji, bilo enzimskoj djelovanjem enzima mirozinaze ili kemijskoj djelovanjem kiseline ili baze, dobiva se čitav niz razgradnih produkata koji uključuju nitrile, izotiocijanate, tiocijanate, epitionitrile i indole. Neki od nastalih razgradnih produkata glukozinolata posjeduju antioksidacijska, antibakterijska i antitumorska svojstva, dok su neki štetni.[3,4]

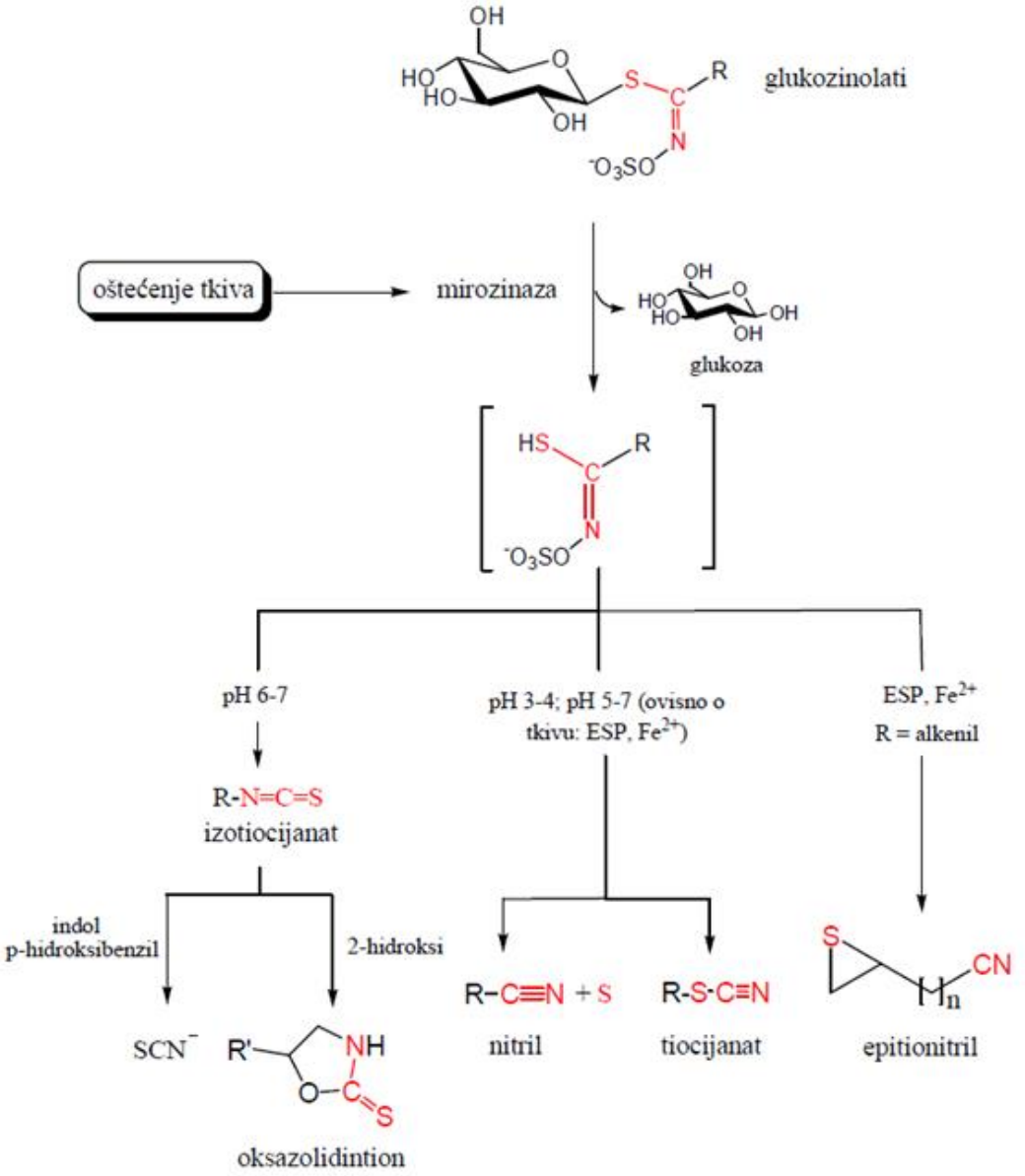
1.3.1 Enzimska razgradnja glukozinolata

Glukozinolati se hidroliziraju enzimom mirozinazom u različite spojeve kao što su izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, epitionitrili, indoli, čiji sastav ovisi o pH, metalnim ionima i epitiospecifičnom proteinu (ESP) (Slika 2.).[4]

Mirozinaza je trivijalno ime za tioglukozid-glukohidrolazu (EC 3.2.3.1) enzim, točnije skupinu enzima, koji kataliziraju hidrolizu glukozinolata. Kinetika enzimske reakcije razlikuje se od vrste do vrste pa čak i unutar pojedine vrste (budući da se i u istoj vrsti može naći više formi ovog enzima). Prisustvo mirozinaza u biljkama ustanovljeno je prvi put 1840. godine kada je A. Bussy proučavajući glukozinolate biljke *B. nigra* otkrio "albuminu sličnu" supstancu koja sudjeluje u hidrolizi glukozinolata sinigrina. Nakon toga je aktivnost mirozinaze detektirana u svim istraživanim biljkama koje sadrže glukozinolate. Uz biljke, ovi enzimi su otkriveni u bakteriji *Enterobacter cloacae* i gljivi *Aspergillus sydowi*.[3,4]

Mirozinaza i glukozinolati se nalaze odvojeno unutar biljnog tkiva, međutim točnu lokalizaciju nije lako odrediti. Glukozinolati se vjerojatno nalaze u vakuolama različitih vrsta stanica dok se mirozinaza nalazi samo unutar struktura, koje se nazivaju "mirozinskim stanicama" koje su raspoređene među drugim stanicama biljnog tkiva.

Oštećenjem biljnog staničnog tkiva, dolazi do oslobađanja te miješanja glukozinolata i mirozinaze, što rezultira brzim otpuštanjem produkata nastalih enzimskom hidrolizom glukozinolata.[4] 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 ovih biljaka. Najpoznatiji biološki aktivni spojevi koji nastaju hidrolizom glukozinolata su izotiocijanati i indoli, a osim njih, glukozinolati su često klasificirani kao prekursori tiocijanata, spojeva koji sadrže sumpor te nitrila koji nemaju sumpor u svojoj strukturi.[3]



Slika 2. Opća shema razgradnje glukozinolata te vrste razgradnih produkata.[7]

Kao što je prethodno rečeno vrsta razgradnog produkta ovisi o strukturi bočnog lanca, prisustvu kofaktora i uvjetima hidrolize. Na slici 3. prikazana je shema enzimske razgradnje glukozinolata te je u daljnjem tekstu objašnjenje utjecaja uvjeta u kojima se hidroliza odvija. Kod utjecaja uvjeta u kojima se hidroliza odvija, posebno je važna pH vrijednosti. Naime, pri pH=7 tj. neutralnim uvjetima, dolazi do Lossenove pregradnje te su glavni razgradni produkti izotiocijanati. Takvi spojevi su poprilično reaktivni, hlapljivi i mirisni. U kiselim uvjetima, pri pH < 4, glavni produkti razgradnje su nitrili.

Osim pH vrijednosti, na vrstu razgradnih produkata utječe i prisutnost fero iona Fe^{2+} te će u takvim uvjetima prisutnosti fero iona nastati nitrili bez obzira koja je pH vrijednost. Nastajanje tiocijanata ovisi o strukturi bočnog lanca aglukona. U slučaju da se u njegovom bočnom lancu nalazi terminalna dvostruka veza te su u njegovoj okolini prisutni fero ion i epitiospecifični protein, nastaju epitionitrili. Izotiocijanati i nitrili također nastaju hidrolizom alifatskih glukozinolata koji sadrže sumpor u bočnom lancu.[3,7]

1.3.1.1 Razgradni produkti glukozinolata

Izotiocijanati (R-N=C=S) su spojevi koji su se nekad u prošlosti smatrali "normalnim" produktima razgradnje glukozinolata. Nastaju pri neutralnoj pH vrijednosti Lossenovom pregradnjom nestabilnog aglukonskog međuprodukta u R-N=C=S konfiguraciju. Takvi spojevi su hlapljivi, jakog okusa i arome. Izotiocijanati su vrlo reaktivni, a zbog toksičnosti se mogu upotrebljavati kao pesticidi.[3,4]

Tiocijanati (R-S-C≡N) su razgradni produkti glukozinolata koji nisu uvijek prisutni, a o faktorima koji potiču njihov nastanak se zna vrlo malo. Mogu nastati isključivo iz glukozinolata koji imaju specifične bočne lance poput 2-propenila, benzila i 4-(metilsulfanil)butil glukozinolata, jer samo ove R skupine imaju mogućnost stvaranja stabilnog kationskog međuprodukta. Također uz mirozinazu, za nastanak tiocijanata potrebno je prisustvo još jednog enzima, tzv. tiocijanat formirajućeg proteina (TFP).[3,4]

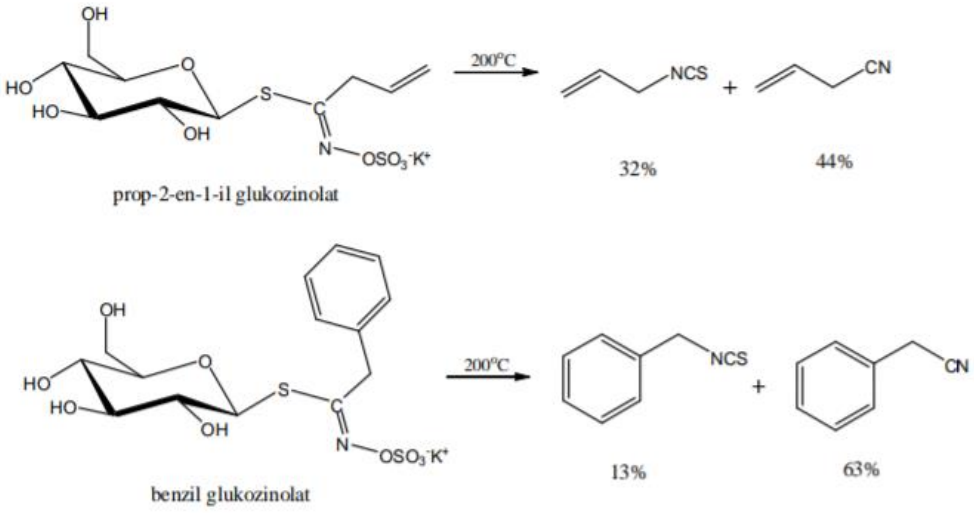
Indoli su spojevi koji nastaju, zajedno s tiocijanatima, hidrolizom indolnih glukozinolata. Mogu nastati i pod uvjetima koji pogoduju nastanku nitrila, a mogu nastati i reakcijskim putevima u biljci koji nisu vezani za razgradnju glukozinolata. Najzastupljeniji predstavnik ove glukozinolatne grupe jest glukobrasicin (3-indolilmetil glukozinolat), najvećom mjerom zastupljen u povrću roda *Brassica*.[3,4]

Nitrili (R-C≡N), poznati još i kao organski cijanidi, nastaju gubitkom sumpora iz glukozinolatne molekule. Nastanak nitrila pospješuju kiseli uvjeti hidrolize (pH<4), prisustvo Fe^{2+} ili tiolnih spojeva. Pri niskim pH vrijednostima, njihov nastanak je favoriziran u odnosu na nastanak izotiocijanata iako postoje u nekim biljkama slučajevi favoriziranja izotiocijanata nad nitrilom.[4]

Epitionitrili nastaju pri istim uvjetima kao i nitrili, ali samo iz glukozinolata koji imaju terminalnu dvostruku vezu u bočnom (R) lancu te uz prisustvo epitiospecifičnog proteina (ESP) i Fe^{2+}iona. Kada je prisutan, ESP alosterički usmjerava mirozinazom kataliziranu hidrolizu glukozinolata na način da umjesto izglednog nastajanja izotiocijanata nastaju drugi produkti kao što su nitrili ili epitionitrili.[4,7]

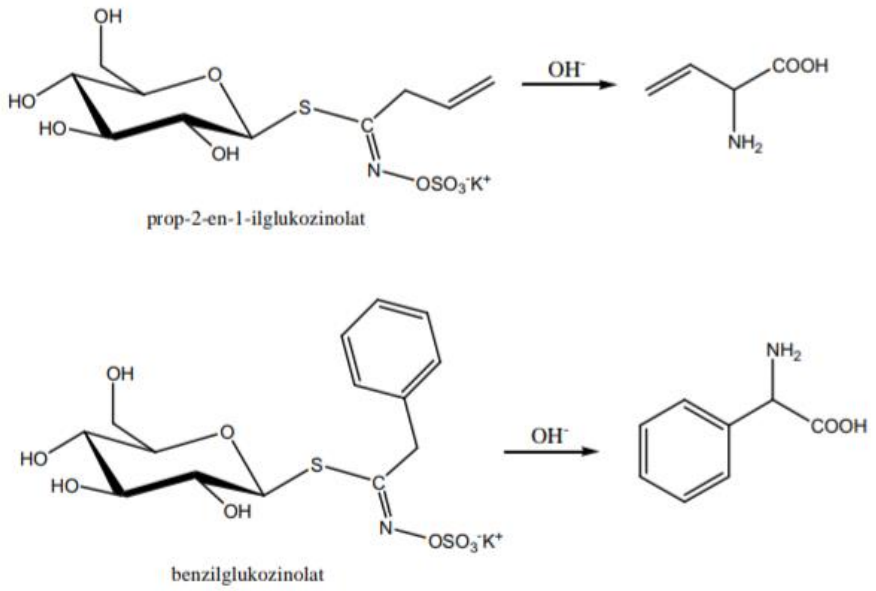
1.3.2 Kemijska razgradnja glukozinolata

Jedno od prvih istraživanje koje je ukazalo na mogućnost da se glukozinolati mogu razgrađivati i neenzimski je bilo istraživanje 1981. godine kada su MacLeod i suradnici proučavali toplinsku razgradnju glukozinolata pri različitim temperaturama kolona i injektora plinskog kromatografa. Pronašli su da se na temperaturi kolone od 200 °C prop-2-en-1-il glukozinolat razgrađuje na razgradne produkte: nitrile (44%) te izotijocijanate (32%) dok se benzil glukozinolat razgradio na nitrile (63%) i izotiocijanate (13%).[3,4]



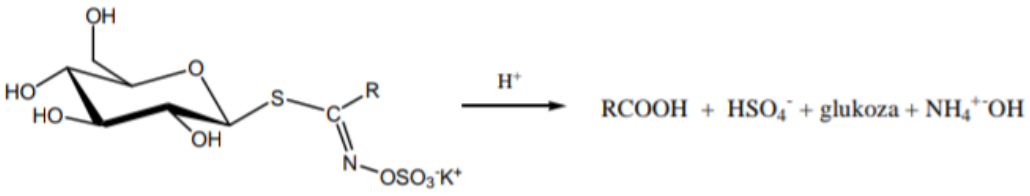
Slika 3. Termička razgradnja prop-2-en-1-il i benzil glukozinolata na 200 °C u GC injektoru.[4]

Baznom hidrolizom može nastati nekoliko različitih produkata kao što su aminokiseline, tioglukoza, tiocijanati, amonijak. Slika 4. prikazuje baznu hidrolizu prop-2-en-1-il i benzil glukozinolata pri čemu nastaju pripadajuće aminokiseline.[4]



Slika 4. Bazna hidroliza glukozinolata.[4]

Kiselom razgradnjom glukozinolata nastaju odgovarajuće karboksilne kiseline s hidroksilamonij ionom (Slika 5.). [4]



Slika 5. Kisela hidroliza glukozinolata.[4]

1.4 Biološka aktivnost glukozinolata

U zadnjih nekoliko desetaka godina, glukozinolati su predmet interesa i istraživanja zbog svoje uloge u obrani od kukaca i fitopatogena, okusa i mirisa povrća, ali pogotovo zbog širokog spektra bioloških aktivnosti. Glukozinolati su, kao što je prethodno rečeno, biološki neaktivni spojevi, međutim, njihova razgradnja rezultira nizom razgradnih produkata kojima se pripisuju određena antikancerogena, antioksidacijska, antimikrobna te nutritivna i antinutritivna svojstva.[4]

1.4.1 Antikancerogeno djelovanje

U današnje vrijeme, svakako najistraživanija biološka aktivnost glukozinolata je antikancerogeno djelovanje glukozinolata i produkata njihove razgradnje. Mnogi znanstvenici povezuju značajno smanjenje rizika oboljenja od raka s povećanim konzumiranjem Brassicaceae biljaka tj. kupusnjača u prehrani. Mehanizam djelovanja razgradnih produkata glukozinolata nije još u potpunosti razriješen.

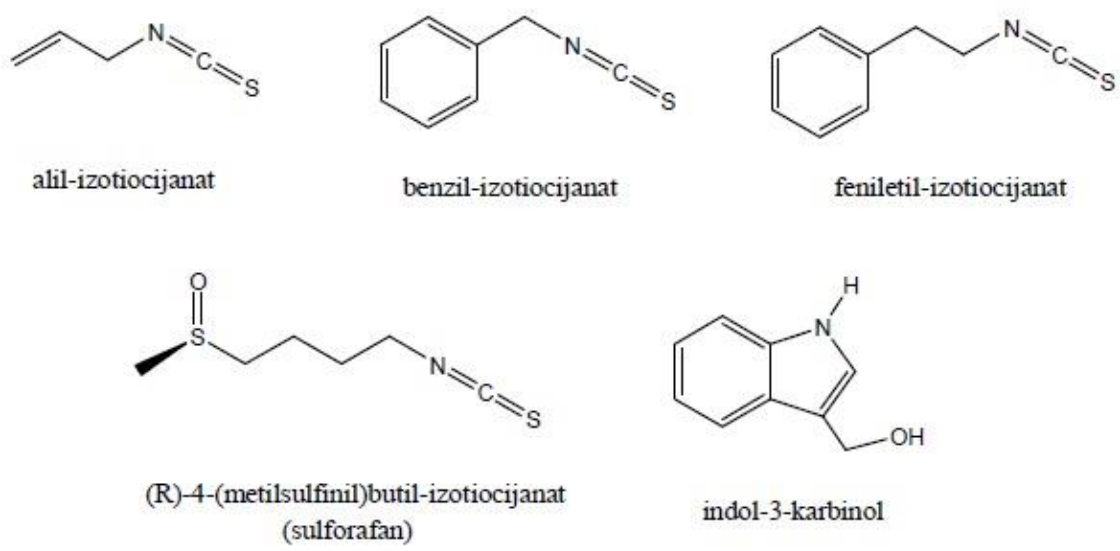
Istraživanja ukazuju na djelovanje razgradnih produkata glukozinolata na modifikaciju aktivnosti enzima Faze I i Faze II kojima su procesi kancerogeneze regulirani. Enzimi Faze I i Faze II predstavljaju prvu obrambenu liniju organizma od kancerogenih tvari. Uostalom, inhibiraju rast stanica tumora i stimuliraju apoptozu (programiranu smrt stanica).[8]

Svojim djelovanjem enzimi Faze I (enzimi citokrom P450) povećavaju reaktivnost tvari topljivih u mastima povećavanjem toksičnost određenih molekula na način da mijenjaju prokancerogene molekule reakcijama oksidacije i redukcije te hidrolizom u hidrofobne molekule. Navedenim reakcijama nastaju vrlo reaktivni intermedijeri koji oštećuju DNA i RNA. Razgradni produkti glukozinolata omogućuju inhibiciju ovih enzima.

Također, ti isti razgradni produkti aktiviraju djelovanje enzima Faze II (glutation-*S*-transferaza, aldehid reduktaza, *S*-metil-transferaza, *N*-acetil-transferaza) koji povećavaju topljivost u vodi i izlučivanje štetnih molekula iz tijela. Ovi enzimi

reakcijama konjugacije s ligandima, pripajanja sulfatnih skupina, acetiliranja i metiliranja pretvaraju kancerogene tvari u nereaktivne metabolite koji se potom lako izlučuju iz ljudskog organizma.[9]

Među najpoznatijim razgradnim produktima glukozinolata koji pridonose antikancerogenim svojstvima su sulforafan, feniletil-izotiocijanat, alil-izotiocijanat, benzil-izotiocijanat i indol-3-karbinol (Slika 6.).[4]



Slika 6. Neki razgradni produkti glukozinolata s antikancerogenim djelovanjem.[4]

1.4.2 Antioksidacijsko djelovanje

Glukozinolati i njihovi razgradni produkti se smatraju indirektnim antioksidansima iz razloga što ne djeluju direktno na slobodne radikale, već se njihova antioksidacijska aktivnost temelji na modificiranju aktivnosti enzima metabolizma (enzimi Faze I i Faze II). Posebno su bitni enzimi Faze II čiji geni sadrže specifične sekvence DNA nazvane elementima antioksidacijskog odgovora. Produkti razgradnje glukozinolata povećavaju aktivnost enzima Faze II povećavajući transkripciju gena koji sadrže elemente antioksidacijskog odgovora.[9]

1.4.3 Antimikrobno i antifungalno djelovanje

Tokom raznih ispitivanja učinka samih glukozinolata te njihovih razgradnih produkata na mikroorganizme poput bakterija, kvasaca i gljivica, potvrđena je njihova fiziološka neaktivnost, ali i štetna aktivnost njihovih razgradnih produkata. Hlapljivi izotiocijanati izraženije su učinkoviti prema kvascima nego prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama te gljivicama, dok produkti razgradnje glukozinolata sa sumporom u bočnom lancu pokazuju izraženu fungitoksičnost.[3]

1.4.4 Štetno djelovanje

Usprkos pozitivnim fiziološkim učincima glukozinolata i njihovih razgradnih produkata, određeni razgradni produkti pokazuju negativna svojstva kao što su mutagenost/goitrogenost, toksičnost pa čak i karcinogenost. Kod ljudi, prilikom konzumiranja hrane s visokim sadržajem glukozinolata, nije ustanovljen nijedan štetni učinak produkata njihove razgradnje na zdravlje iako prilikom unosa prevelikih doza može doći do štetnih učinaka. Tako, viniloksazolidin-2-tion (goitrin) pokazuje određene štetne učinke na štitnjaču i jetru dok kod životinja uzrokuje usporen rast. Također, njegovo djelovanje se može povezati s pojavom gušavosti. Tiocijanatni ion, koji također predstavlja produkt razgradnje glukozinolata, je konkurentan jodu u tiroidnoj žlijezdi te djeluje mutageno i njegova mutagenost ovisna je o količini joda u obroku. Kancerogena svojstva pokazuju *N*-nitrozo spojevi, koji nastaju reakcijom produkata razgradnje indolnih glukozinolata s nitritima.[3,4]

1.5 Metode izolacije hlapljivih spojeva

Sve mirisne biljke sadrže hlapljive spojeve, dok neke od njih sadrže i eterična ulja koja su smjese hlapljivih spojeva. Ovisno o vrsti biljke, različiti dijelovi biljke se mogu koristiti za izolaciju eteričnih ulja, primjerice cvjetovi, listovi, plodovi i sjeme. Klasične metode koje se inače koriste za izolaciju hlapljivih spojeva su destilacija i ekstrakcija s organskim otapalima. Danas se sve češće primjenjuju nove modernije metode koje pokazuju 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 vrši odvajanje hlapljivih od nehlapljivih komponenti ili razdvajanje sastojaka smjese prema temperaturi vrelišta njenih komponenata. Prednost destilacije kod izoliranja eteričnih ulja je u tome što je destilat smjesa isključivo hlapljivih spojeva.[4] Zasniva se na Daltonovom zakonu parcijalnih tlakova, što znači da će organske tvari koje se inače ne miješaju s vodom (većina komponenti eteričnih ulja), isparavati zajedno s vodenom parom na temperaturi nižoj od njihova vrelišta, odnosno nižoj od 100 °C. Razlikuje se tri vrste destilacije, a to su: vodena, vodeno-parna i parna destilacija, koje se zasnivaju na istim principima, a razlika je u kontaktu između biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.[7,10]

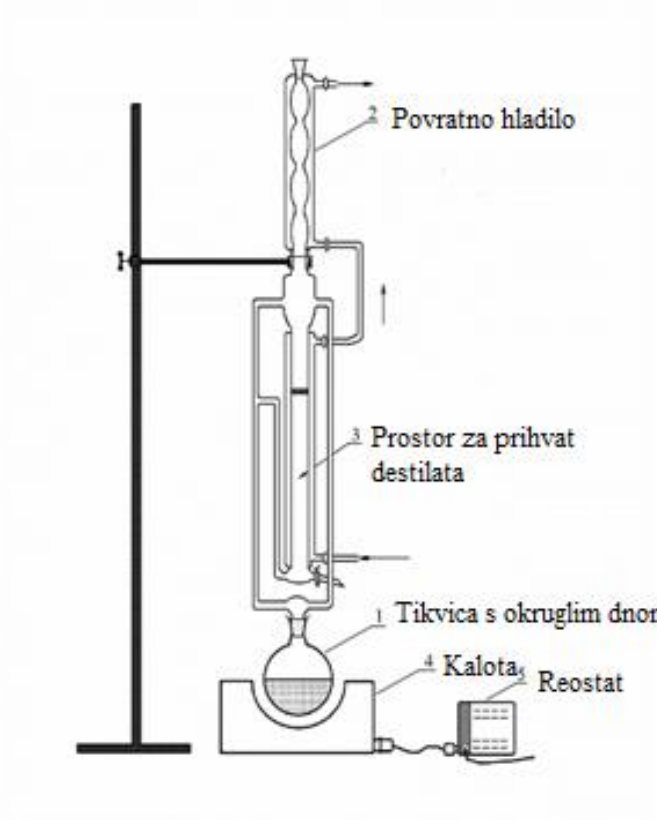
1.5.1.1 Vodena destilacija

Vodena destilacije (hidrodestilacija) je najstarija i najčešće korištena metoda izolacije eteričnih ulja. Ova metoda podrazumijeva miješanje usitnjenog biljnog materijala s vodom uz zagrijavanje do vrenja, najčešće na atmosferskom tlaku. Pare koje izlaze ukapljuju se u hladilu, a destilat se skuplja u predlošci gdje se ulje i voda odvajaju na temelju netopljivosti ulja i razlike u gustoći.[4]

Danas postoje brojne različite izvedbe aparature za vodenu destilaciju. Standardne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura po Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*), aparatura po Clevenger-u.[7]

Modificirana aparatura po Clevengeru (Slika 7.) koja je korištena u ovom radu

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 koje se naziva "trap". S obzirom na sličnost u polarnosti, prilikom prolaska kondenzirane smjese vode i komponenti eteričnog ulja kroz organsko otapalo, komponente eteričnog ulja se zadržavaju u njemu, dok voda nesmetano prolazi. Tako se prikuplja eterično ulje koje se, po završetku destilacije, pipetom uklanja kroz gornji otvor, dok se voda ispušta kroz pipac koji se nalazi na dnu Clevengerovog nastavka.[7]



Slika 7. Modificirana aparatura po Clevengeru.[3]

1.5.2 Ekstrakcija

Ekstrakcija je proces koji omogućava izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Temelji se na različitoj topljivosti tvari u ekstrakcijskom sredstvu. Za ekstrakciju se koriste hlapljiva i nehlapljiva otapala, a najčešće je to voda te organska otapala kao što su petroleter, pentan, dietil-eter i diklormetan.[4,10]

U današnje vrijeme sve su više prisutne moderne metode ekstrakcije, kao što su ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija (s otapalom i bez otapala), ekstrakcija subkritičnim i superkritičnim fluidima i dr.[7] Kao primjer zelene kemije posebno se ističe mikrovalna ekstrakcija bez korištenja otapala.

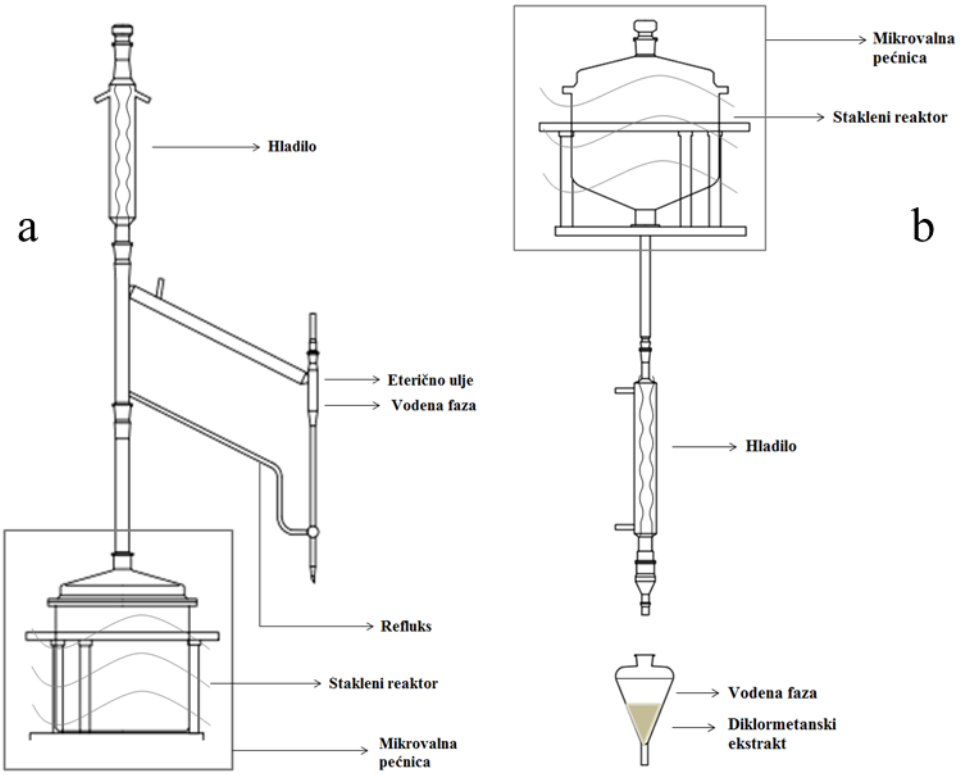
1.5.2.1 Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalna ekstrakcija (engl. *microwave-assisted extraction*) omogućava ekstrakciju topljivih tvari u otapalo uz pomoć mikrovalne energije Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja frekvencije 0,3 - 300 GHz (obično imaju frekvenciju 2,45 GHz). Mogu prodirati u biološki materijal i utjecati na polarne molekule kao što je voda u biološkim materijalima te proizvode toplinu. Mikrovalna ekstrakcija omogućava brzu raspodjelu energije u čitavom volumenu otapala i krutog uzorka i njihovo učinkovito i jednoliko zagrijavanje čitavog materijala. Zbog toga što voda u biljnom matriksu apsorbira mikrovalno zračenje, raspadanje stanica je potaknuto unutarnjim pregrijavanjem što olakšava desorpciju komponenata iz matriksa. Mehanizam mikrovalnog zagrijavanja djeluje na dva simultana načina. Prvi je rotacija dipola uslijed djelovanja elektromagnetskog zračenja, a drugi je ionska vodljivost, tj. zamjena iona između biljnog materijala i otapala. Učinak mikrovalova je ovisan o dielektričnoj konstanti otapala i čvrstog biljnog uzorka. Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih mikrovalnih sustava: zatvorene ekstrakcijske posude s kontroliranim tlakom i temperaturom te ciljane mikrovalne peći na atmosferskom pritisku.[7,10,12]

Ova metoda ekstrakcije ima brojne prednosti u odnosu na klasične metode, a to su kraće vrijeme ekstrakcije, poboljšani ekstrakcijski prinos te mogućnost ekstrakcije bez korištenja otapala. Uz brojne pozitivne, potrebno je obratiti pažnju i na negativne učinke kao što je povišena temperatura koja može negativno utjecati na biološki aktivne spojeve.[7,12]

Mikrovalna ekstrakcija bez otapala (engl. *solvent free microwave extraction,* SFME) je kombinacija mikrovalnog grijanja i suhe destilacije na atmosferskom tlaku bez ikakvog dodavanja otapala ili vode. Izolacija i koncentriranje se obavljaju u jednom stupnju. Kao takva, primjer je "zelene tehnologije" te se uzima kao dobar izbor za ekstrakciju eteričnih ulja aromatičnih biljaka.[11,13]

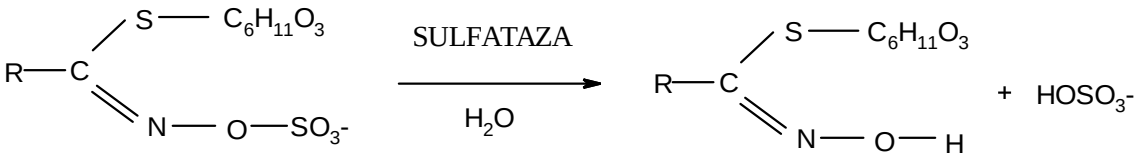
Slika 8a. prikazuje shemu gornjeg dijela aparature u kojem se provodi mikrovalna destilacija te se dobiva eterično ulje, odnosno hlapljivi spojevi. Shema donjeg dijela aparature gdje se pod utjecajem hidrodifuzije i gravitacije izdvajaju arome prikazana je na Slici 8b. Ova dva postupka razlikuju se faktorom kolekcije ekstrahiranih tvari: u prvom slučaju (Slika 8a.), vrši se kondenzacija s vodenim hladilom za što se moraju utrošiti energija i vrijeme. S druge strane (Slika 8b.), tu je nova metoda primjene mikrovalne energije u ekstrakciji gdje se sakupljanje ekstrakta vrši korištenjem sile gravitacije. Znači jednostavnim postupkom bez utroška energije i vremena, ekstrahirana tvar se skuplja na dno uređaja u posudu.[11]



Slika 8. a) Sustav za mikrovalnu destilaciju eteričnih ulja; b) Sustav za mikrovalnu ekstrakciiu aroma.[14]

1.5.3 Ekstrakcija glukozinolata

Metoda ekstrakcije glukozinolata iz biljnog materijala se sastoji od ekstrakcije 70 % metanolom, separacije, desulfatacije enzimom sulfatazom i kvantizacije HPLC analizom dobivenih desulfoglukozinolata.[15,16] Sulfataze su enzimi koji spadaju u porodicu esteraza i kataliziraju hidrolizu sulfatnih estera. Sulfataza (EC 3.1.6.1.), izolirana iz puža vinogradnjaka (*Helix pomatia* L.), odcjepljuje sulfatni ion iz molekule glukozinolata pri čemu nastaje desulfoglukozinolat (Slika 9.).[17,18]



Glukozinolat Desulfoglukozinolat

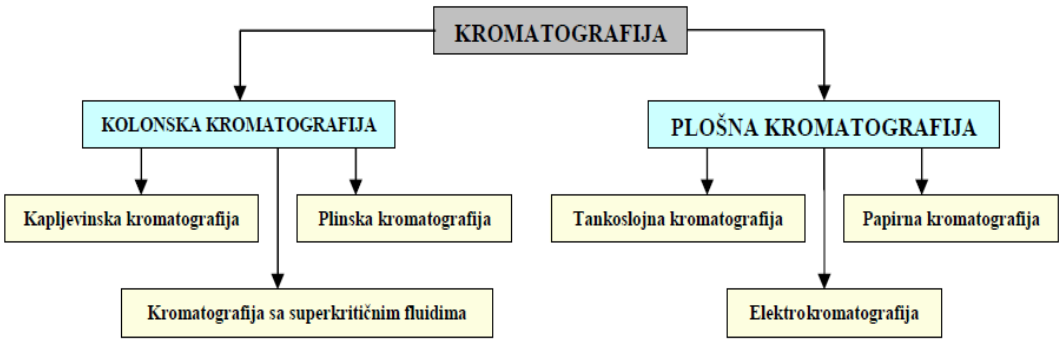
Slika 9. Reakcijska shema desulfatacije glukozinolata.[18]

1.6 Metode identifikacije hlapljivih spojeva

Kod analize i identifikacije hlapljivih spojeva i eteričnih ulja mogu se koristiti kromatografske (plinska i tekućinska kromatografija) i spektroskopske tehnike (UV, IR i NMR spektroskopija). Danas se najviše koristi kromatografija i to sama ili u sprezi sa spektrometrijom masa. Kromatografija je analitička tehnika koja služi za odvajanje komponenti te njihovo kvantitativno i kvalitativno određivanje u smjesi. Prednost ove analitičke tehnike ispred ostalih je u brzini i potpunijoj analizi.

1.6.1 Kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika koja se koristi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih komponenata, prisutnih u složenim smjesama, u kojoj se komponente smjese odjeljuju ovisno o brzinama kojima ih pokretna (mobilna) faza nosi kroz nepokretnu (stacionarnu) fazu. Stacionarna faza je nepokretna, najčešće kruti adsorbens ili tekućina nanesena na kruti nosač, a mobilna faza je fluid (tekućina, plin) koja prolazi kroz stacionarnu fazu. Pri procesu kromatografije postoji reverzibilno međudjelovanje između komponenata smjese (mobilne faze) i sorbensa (stacionarne faze). Mobilna faza nosi komponente smjese i kreće se iznad sorbensa. Prilikom svog putovanja molekule sastojaka smjese neprestano se sorbiraju i desorbiraju. Stacionarna faza mora biti tako odabrana da je zadržavanje na njoj selektivno pa različiti sastojci putuju različitom brzinom i tako se jedan od drugog odjeljuju.[7,19]



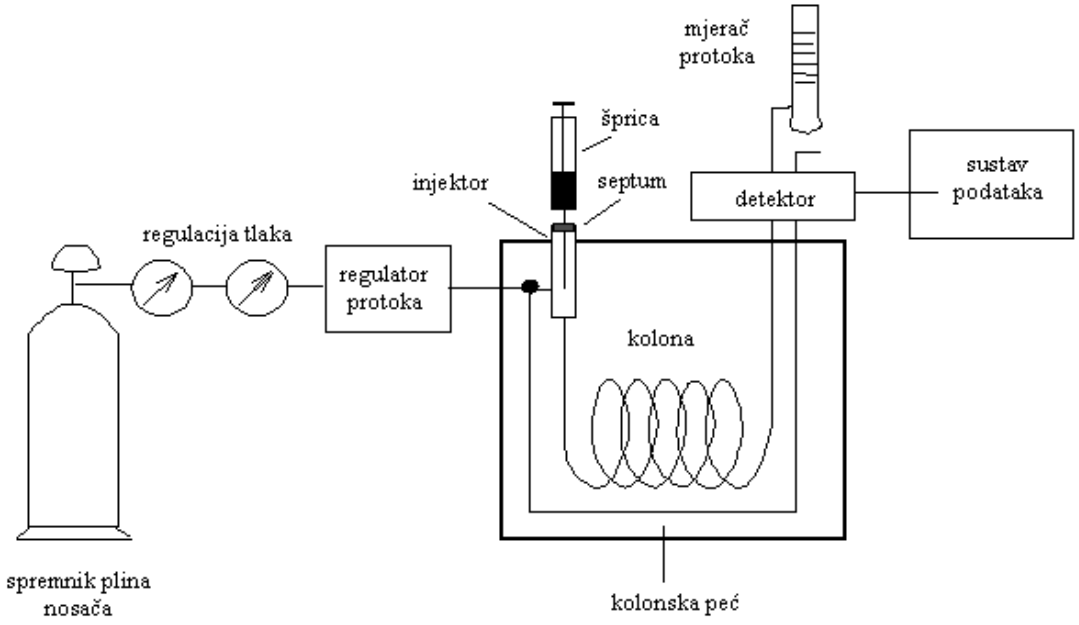
Slika 10. Podjela kromatografskih tehnika prema obliku sustavu.[19]

1.6.1.1 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je tehnika koja se najčešće koristi kod odjeljivanja smjesa hlapljivih spojeva. Ova tehnika predstavlja vrlo brzu tehniku odjeljivanja, s obzirom da nisu potrebne nikakve prethodne operacije, a predstavlja i dobar izbor u situacijama kad je dostupna vrlo mala količina uzorka. Mobilna faza je inertni plin kao što su helij, neon ili argon, a stacionarna faza je krutina ili kapljevinom presvučena krutina.[4,7]

Uređaj za plinsku kromatografiju (Slika 11.) se sastoji od sljedećih komponenti:

- injekcijski blok
- kromatografska kolona s stacionarnom fazom
- termostat
- detektor
- pisač.[7]



Slika 9. Shematski prikaz plinskog kromatografa.[20]

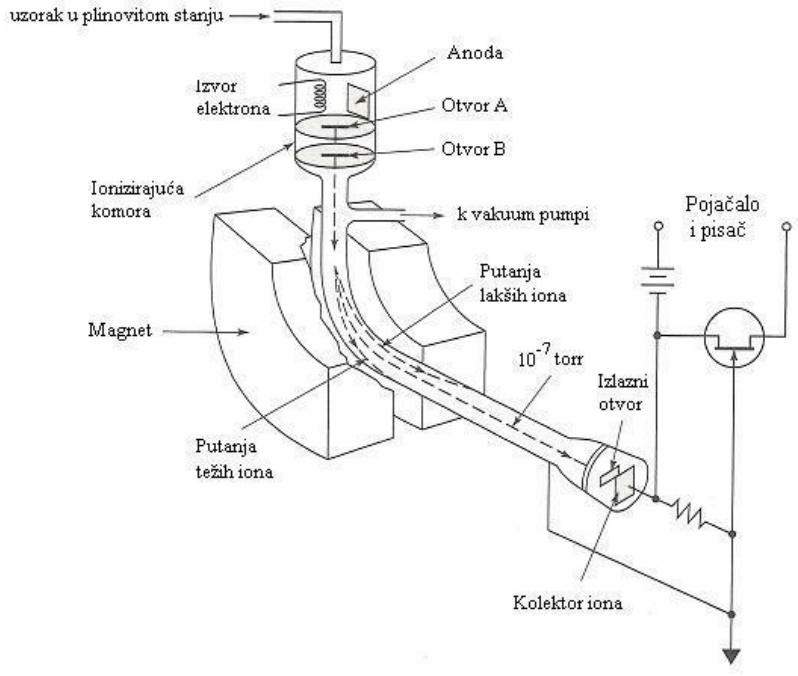
Unos uzorka za analizu obavlja se u injekcijskom bloku pomoću injekcijskih šprica. Uzorci za analizu moraju biti lako hlapljivi, kako bi trenutno isparili u injektoru, ali i stabilni na radnoj temperaturi kolone. Uzorak se u maloj količini mora unijeti odjednom i brzo te mora brzo i potpuno ispariti. Osnovna zadaća plina nositelja (mobilne faze) je da provede kromatografsko odjeljivanje hlapljivih spojeva i njihovo iznošenje do detektora. Plin nositelj mora biti kemijski inertan da ne dođe do reakcije s uzorkom i materijalom kojim je punjena kolona. Protok plina nositelja mora biti konstantan, a temperatura kolone mora biti pažljivo odabrana i programirana. Sama detekcija se temelji na mjerenjima koja se zasnivaju na toplinskoj vodljivosti, radioaktivnoj ionizaciji, fotonizaciji i spektrometriji masa. Najčešće korišteni detektori

u analizi su plameno-ionizacijski detektor (engl. *Flame Ionisation Detector*, FID) i spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS).[4,7]

Tehnika plinske kromatografije ima prednosti kao što su velika osjetljivost i mogućnost razdvajanja velikog broja tvari, međutim ova tehnika također ima nedostataka. Na primjer, može doći do nepotpunog odvajanja spojeva. Također analiza može biti vremenski duga, ukoliko je cilj identificirati komponente nižih koncentracija. Osim toga pri injektiranju cijelog ulja u kromatograf, manje komponente mogu biti prerazrijeđene da bi se detektirale, a kod većih koncentracija glavne bi komponente preplavile kolonu i "maskirale-sakrile" manje komponente.[4]

1.6.2 Spektrometrija masa

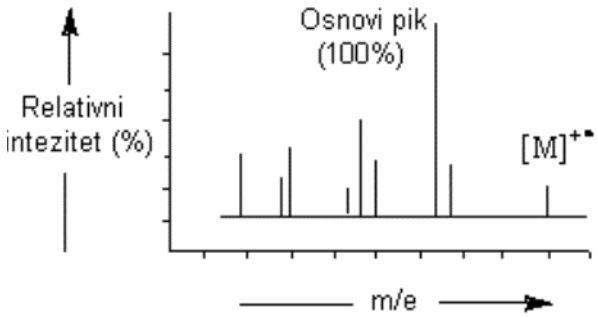
Spektrometrija masa je analitička tehnika koja omogućava identifikaciju kemijskih spojeva određivanjem njihovih molekulskih masa, a potom i molekulskih formula. Ova se metoda zasniva na ionizaciji plinovitog uzorka, njegovoj fragmentaciji, razdvajanju fragmenata s obzirom na omjer njihove mase i naboja (m/z odnosu) te obradi pojedinih podataka dobivenih u obliku masenih spektara. Glavne komponente svakog masenog spektrometra su ionizator, analizator i detektor (Slika 12.).[4,21]



Slika 10. Shema spektrometra masa.[4]

U ionizator se unosi mala količina uzorka u plinovitom stanju te se uzorak bombardira elektronima energije (50-70 eV) pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivan ion M^+ (molekulski ion) koji se fragmentira.[7]

U analizatoru se dobiveni ioni razvrstavaju prema intenzitetu i veličini m/z. Razvrstavanje se vrši propuštanjem kroz promjenjivo magnetsko ili električno polje. Ionski snop se fokusira kroz leće i dolazi do četveropolnog filtra masa koji se sastoji od četiri elektrode koje su paralelne s ionskim snopom. Elektrode čas privlače, čas odvlače ione i na taj način oblikuju njihovu putanju. Ioni koji imaju stabilnu putanju mogu proći kroz filter masa, dok se ostali uklanjaju (filtriraju). Osciliranjem iona, većina ih se izgubi udaranjem u jednu od elektroda gdje se izbijaju. Preostali ioni određenog omjera m/z usmjeravaju se do detektora spektrometra masa. Kao rezultat analize u spektrometru masa dobije se spektar masa koji prikazuje odnos intenziteta i omjera mase i naboja (m/z) nastalih fragmenata (Slika 13.). Dogovorno, najviši signal (osnovni signal), predstavlja standard prema kojem se određuje udio fragmenata koji su formirali ostale signale.[4,7,21]



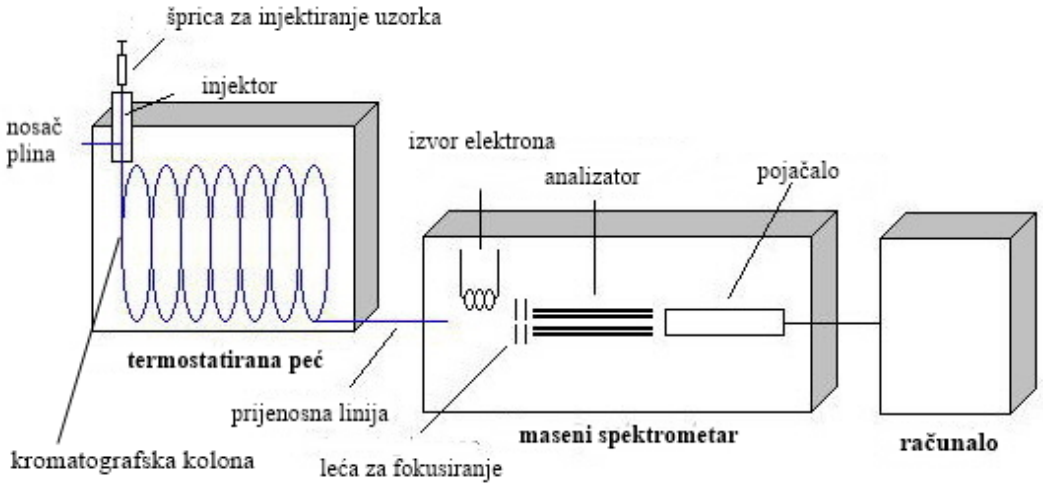
Slika 13. Spektar masa.[4]

1.6.3 Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometrija masa

Kombinacija tehnika plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala (Slika 14.). Plinska kromatografija je izvrsna tehnika za odvajanje i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje. Za kvalitativno određivanje se stoga koristi masena spektrometrija. Kod obiju tehnika, uzorci su u plinovitom stanju, a karakteristični podatci dobiveni za izdvojeni spoj su njegovo retencijsko vrijeme i površina pika koja je proporcionalna količini spoja te maseni spektar kojim se identificira odgovarajući spoj.

Dobiveni maseni spektar se uspoređuje s masenim spektrom dotičnog spoja koji se nalazi u Wileyevoj banci masenih spektara.

Važan čimbenik u radu ovog vezanog sustava je brzina snimanja spektra masa zahvaljujući četveropolnom analizatoru masa koji omogućava snimanje spektra u nekoliko milisekundi. Također ovim vezanim GC-MS sustavom može se postići velika osjetljivost, reda veličine 10^{-12} do 10^{-15} g. Iako je GC/MS tehnika vrlo osjetljiva, poteškoće u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi može izazvati slaba hlapljivost nekih spojeva ili njihova nestabilnost pri povišenim temperaturama.[3,4,7]



Slika 14. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS.[22]

1.6.4 Tekućinska kromatografija

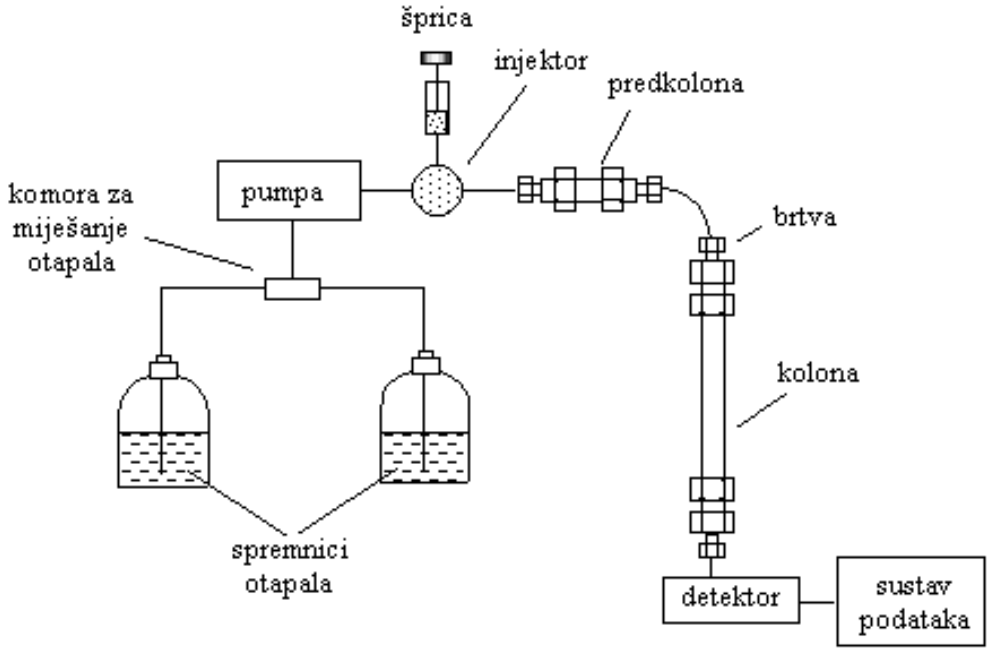
Tekućinska kromatografija (*eng. Liquid Chromatography - LC*) je analitička tehnika koja služi za razdvajanje tvari na osnovi razmještanja između čvrste stacionarne faze i tekuće mobilne faze. Prikladna je za odjeljivanje analita male i velike molekulske mase, termički nestabilnih spojeva i biološki aktivnih spojeva. Postoje dvije vrste tekućinske kromatografije, klasična i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Kod klasične kromatografije se koriste veliki stupci (kolone) punjeni poroznim materijalom koji predstavlja stacionarnu fazu, dok mobilna faza prolazi gravitacijski čime je protok malen pa tehnika nije posebno učinkovita, stoga se u većini slučajeva koristi suvremenija analitička tehnika HPLC kod koje se dovođenjem mobilne faze pomoću

pumpe postiže kvalitetnije razdvajanje komponenti.[23]

1.6.4.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je vrsta tekućinske kromatografije na stupcu uz upotrebu visokih tlakova zbog postizanja velike brzine protoka.

Sastavni dijelovi HPLC-a su spremnik mobilne faze, injektor, kolona, pumpa koja pokreće mobilnu fazu kroz kolonu, detektor i sustav za obradu otpada (Slika 15.).[24]



Slika 15. Shematski prikaz HPLC kromatograma.[26]

Otapala koja se koriste kao tekuća mobilna faza trebaju biti visoke čistoće te ih je potrebno "očistiti" od otopljenih plinova ili suspendiranih čestica pomoću filtra malih pora ("millipore") uz pomoć vakuuma. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u nekom omjeru (npr. voda, metanol, organska otapala, itd). Pumpa unosi pokretnu fazu pod visokim tlakom do 15 MPa stalnom brzinom od 0,1-10 ml/min u kolonu. Uzorak za analizu se unosi mikrolitarskom špricom kroz ventil u sustav za injektiranje tj. petlju u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektori na taj način sa sobom odnosi uzorak na kolonu. Kolona, promjera između 2,1 i 4,6 mm te dužine od 30 do 300 mm, punjena je česticama veličine od 2-50 μm različitog kemijskog

karkatera. Ispred glavne kolone se postavljaju kratke pretkolone kako bi se zaštitila glavna kolona i postiglo bolje razdvajanje komponenata. Kao detektori najčešće se koristi UV-VIS, UV-VIS-DAD ili spektrometar masa (MS) detektor, no mogu se koristiti i detektor indeksa loma, fluorescentni, elektrokemijski i dr.[23,24]

Na osnovi polarnosti razlikuje se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti na normalnim i obrnutim fazama. Razdvajanje na normalnim fazama podrazumijeva da je stacionarna faza polarna (npr. silikatna), a mobilna faza nepolarna (npr. heksan) te je u ovom slučaju jačina adsorpcije veća što je veća polarnost tvari, a samim time duže je i vrijeme zadržavanja. Kod razdvajanja na obrnutim fazama stacionarna faza je nepolarna (npr. C-18 ugljikovodici), a mobilna faza polarna (npr. voda i metanol) te je vrijeme zadržavanja dulje za manje polarne tvari.[24]

1.6.4.2 Vezani sustav tekućinska kromatografija-masena spektrometrija

Vezani sustav tekućinska kromatografija-spektrofotometrija s poljem dioda-spektrometrija masa s trostrukim kvadropolom (LC-UV-Vis-DAD-MS/MS, *liquid chromatography-ultraviolet-visible photo diode array -triple quadropole mass spectrometry*) omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestice, baš kao i GC-MS, međutim prednost u odnosu je ostale sustave je mogućnost istovremenog praćenja analize korištenjem dvaju detektora: DAD (*diode array detector*) s mogućnošću izbora do 8 valnih duljina) i spektrometra masa (do 1650 Da). Ova analitička metoda izvršava kvalitativnu analizu koja uključuje snimanje spektra uzorka, određivanje molekulske mase spoja, analize fragmentacije određenog molekulskog iona (engl. *product ion*) te određivanje prekursora određenog fragmenta (engl. *precursor ion*). Dvojna spektrometrija funkcionira na principu udruženih masenih spektrometara. Prvi MS uređaj ionizira uzorak i filtrira ione prema omjeru mase i naboja. Odabrani ion od interesa se dalje fragmentira u kolizijskoj ćeliji te se njegovi fragmenti analiziraju na drugom masenom spektrometru. Također je moguća i kvantitativna analiza koristeći standardne otopine analita i interni standard te se MRM tehnikom izradi kalibracijska krivulja na temelju koje se odredi koncentracija u uzorcima.[25,26]

1.7 Brassicaceae

Kupusnjače (Brassicaceae) ili stariji naziv krstašice (Cruciferae) su porodica biljnih vrsta koje spadaju u razred dvosupnica (Eudicotiledona). Porodica obuhvaća više od 300 rodova sa preko 3000 vrsta koje su prirodno rasprostranjene u umjerenom klimatskom području sjeverne polutke i to posebno na Sredozemlju, no moguće ih je pronaći gotovo po čitavoj Zemlji.[4]

Biljke koje pripadaju porodici Brassicaceae su jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, dok rijetko polugrmovi i grmovi. Odlikuju se stabljikom koja može biti uspravna, polegnuta ili različito usmjerena u odnosu na tlo. Cvjetovi biljaka ove porodice su pravilni i dvospolni, a građeni su od 4 lapa, 4 latice, 4 duža, unutarnja prašnika i 2 kraća, vanjska prašnika. Također, cvjetovi mogu biti skupljeni u cvatove ili pojedinačni. Ocvijeće može biti dvostruko (čaška i vjenčić) ili jednostavno. Kod ovih biljaka, plodnica je jednogradna ili dvogradna, a plodovi su uglavnom komuške različitog oblika.[3]

Porodici pripadaju mnoge biljke, široke primjene u gospodarstvu, industriji i medicini. Tako su kao povrće i krmno bilje koriste *Brassica oleracea* L. (npr. kupus, kelj, koraba cvjetača), *Brassica napus* L. (uljana repica), *Brassica rapa* L. (bijela repa), *Raphanus sativus* L. (rotkva). Brojne vrste ove porodice se upotrebljavaju za dobivanje ulja: *B. napus* (uljana repica), *Brassica nigra* L. (crna gorušica), *Sinapis alba* L. (bijela gorušica) i *Armoracia rusticana* G.Gaertn., B.Mey. & Scherb. (hren). U ljekarstvu, osobito pučkom, koriste se vrste rodova *Lepidium*, *Cochlearia* i *Alliaria*, a mnogi se rodovi koriste kao ukrasne biljke kao što su rodovi *Matthiola*, *Cheiranthus*, *Lobularia* i *Iberis.*[4,2]

U ovom radu su obrađene dvije biljne vrste iz porodice Brassicaceae, uskolisni dvoredac (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) i sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R.Br.) čije su karakteristike opisane u nastavku.

1.7.1 Uskolisni dvoredac *(Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.)

Diplotaxis tenuifolia (L.) DC. (Slika 16.) je trajna zeljsta biljka grmolikog oblika iz porodice Brassicaceae. Kod nas raste u priobalnom području i na otocima. Stabljika je uspravna, glatka, pri osnovi drvenasta. Listovi su duguljasti, plavkastozeleni, duboko perasto razdijeljeni, a korijen biljke je jako razgranat i snažan. Cvjetovi su mirisni, jarkožute boje skupljeni u grozdaste cvatove na vrhovima stabljike. Plod je komuška u kojoj se nalazi mnogo sitnih sjemenki. Zimzelena je biljka te listove najčešće mijenja u proljeće. Pokazatelj je tala s osrednjom količinom humusa te suhih tala. U narodu je poznata pod imenima: riga divja, rikula divja, razgranjeni drvoredac, divlja riga i dr. Pošto su listovi uskolisnog dvoredca jestivi, beru se u proljeće i rano ljeto. Mirisu su slični rikuli (*Eurca sativa* Mill.) te su ljutkastopaprena okusa. Bogati su vitaminom C i karotinom. Također su jestive i sjemenke koje se mogu koristiti u izradi senfa.[30,31]



Slika 116. *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.[30,31]

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

Matthiola incana (L.) R.Br. (Slika 17.) je višegodišnja biljka iz porodice Brassicaceae. Rasprostranjena je u priobalju i na otocima. Stabljika je u osnovi drvenasta, prekrivena kratkim bjelkastim dlačicama. Listovi su duguljasto lancetasti cjelovita ruba dok su cvjetovi bijeli, ružičasti, ljubičasti sakupljeni u grozdaste cvatove. Plod je mahuna duga 6-10 cm. Pokazatelj je staništa siromašnih dušikom te staništa ekstremne topline. Smatra se gotovo ugroženom vrstom te je stoga zaštićena (Crvena knjiga Hrvatska). Poznata je još pod imenima: ljubica, vihojla biela, vihojla crljena, ljubičina jednoljetna i dr. Sivkasta ljubičina se uzgaja kao ukrasna biljka. Nadzemni dijelovi kao što su cvijet, list, komuška su jestivi. Cvijet se koristi u prehrani kao povrće ili za ukrašavanje, osobito slatkih deserta. Poznata su i ljekovita svojstva tako sjeme ima afrodizijačka, diuretička i okrepljujuća svojstva, potiče iskašljavanje i stimulira probavu. Iz cvjetova se dobiva tamnoplava ili ljubičasta boja.[1,32,33]



Slika 17. *Matthiola incana* (L.) R.Br.[32,33]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1 Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- Pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika,
- Diklormetan, T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska,
- Dietil-eter, PanreacQuimica 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 hidrat, Sigma
- 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,
- Modificirana aparatura po Clevengeru,
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, Ethos X; Milestone,
- Uređaj za pripravu ultračiste vode,

- Magnetska mješalica, Heidolph MR Hei-End,
- Sito, 500 μm,
- Pehametar, Hannainstruments 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,VarianInc., Lake Forest, CA, USA,
- HPLC-UV, Series 200, PerkinElmer, USA.
- HPLC-PDA-MS/MS-8050, Shimadzu, Kyoto, Japan.

2.2 Biljni materijal

2.2.1 Uskolisni dvoredac

Biljni materijal (Slika 18.) je sakupljen 20. listopada 2017. na području Splita, točnije kod zgrade Tri Fakulteta. Čuvan je na sobnoj temperaturi potom je obrađen nakon nekoliko dana. Materijal je obrađen na način da je usitnjen te podijeljen na četiri dijela. Prvi dio je obrađen mikrovalnom destilacijom (MW - "fragrance"), drugi mikrovalnom ekstrakcijom (MW - "flavuor"), a treći i četvrti dio biljnog materijala iskorišteni su za klasičnu hidrodestilaciju u modificiranoj aparaturi po Clevengeru.



Slika 18. *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.

Točne odvage biljnog materijala koje su korištene u određenim metodama izolacije prikazane su u Tablici 2.

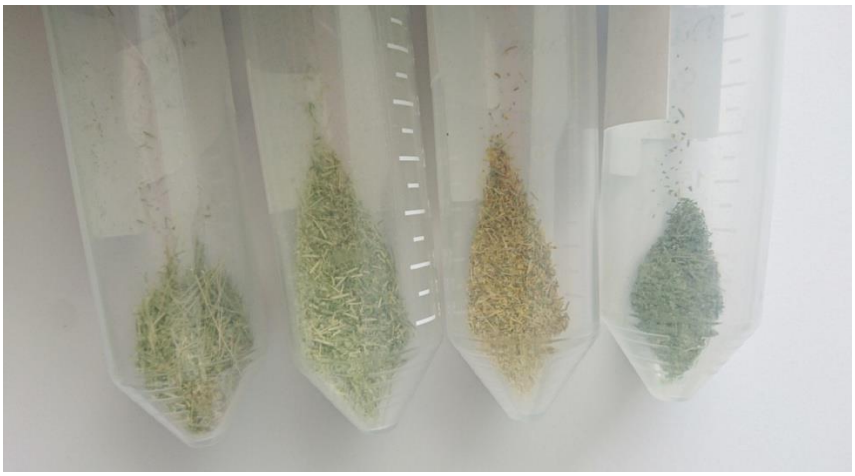
Tablica 2. Masa biljnog materijala uskolisnog dvoredca.

METODA	MASA (g)
MW Destilacija	301,74
MW Ekstrakcija	300,22
Hidrodestilacija 1	173,97
Hidrodestilacija 2	174,31

Također, dio sabranog materijala je osušen te podijeljen na četiri dijela (sjeme, stabljika, list i cvijet). Kao takav obrađen je u svibnju 2018. na način da je samljeven i prosijan (Slika 19.) te upotrebljen za izolaciju glukozinolata metodom ekstrakcije uz desulfataciju. U Tablici 3. se nalaze točne odvage pojedinih dijelova biljnog materijala.

Tablica 3. Masa biljnog materija uskolisnog dvoredca za izolaciju glukozinolata ekstrakcijom uz desulfataciju.

Uskolisni dvoredac- Ekstrakcija glukozinolata	
BILJNI DIO	**MASA (mg)**
Sjeme	89,60
Stabljika	95,70
List	99,90
Cvijet	96,50



Slika 19. Uzorci biljnog materijala nakon mljevenja i prosijavanja.

2.2.2 Sivkasta ljubičina

Uzorci biljnog materijala sivkaste ljubičine (Slika 20.) korišteni su za izolaciju glukozinolata metodom ekstrakcije uz desulfataciju. Materijal je osušen i odvojen po biljnim dijelovima (cvijet, list, stabljika i komuška). Svaki dio biljnog materijala je samljeven i prosijan. U Tablici 4. prikazane su točne odvage pojedinih dijelova biljnog materijala.

Tablica 4. Mase biljnog materijala sivkaste ljubičine.

Sivkasta ljubičina- Ekstrakcija glukozinolata	
BILJNI DIO	**MASA (mg)**
Cvijet	26,80
Stabljika	59,50
List	80,10
Komuška	17,10



Slika 20. Uzorci sivkaste ljubičine nakon mljevenja.

2.3 Metode izolacije

2.3.1 Mikrovalna ekstrakcija

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju se sastoji od dva dijela čime su omogućene dvije vrste izolacije biljnog sadržaja. Biljni materijal uskolisnog dvoredca je obrađen na oba načina, mikrovalnom destilacijom i mikrovalnom ekstrakcijom.

Gornji dio aparature (Slika 21.) omogućava izolaciju hlapljivih spojeva (engl. *fragrance*). Radi se o procesu mikrovalne destilacije čiji je konačni produkt eterično ulje. Za razliku od hidrodestilacije, destilacija potpomognuta mikrovalovima ima znatno kraće vrijeme destilacije i nema upotrebe organskog otapala.



Slika 21. Uređaj za mikrovalnu destilaciju (gornji dio, engl. *fragrance*).

Usitnjeni biljni materijal se stavi u staklenu posudu koja se zatvori poklopcem. Na posudu se poveže sustav za refluks te hladilo. U desnu vertikalnu cijev se napuni voda. Voda će poslužiti kao medij u kojem će se prikupiti hlapljivi spojevi koje će se po završetku destilacije odvojiti pomoću male količine pentana. Uvjeti pri kojim se izvodi destilacija: snaga od 500 W i temperatura 98 °C u trajanju od 35 minuta. Nakon završetka destilacije, sloj pentana i hlapljvih spojeva se odvoji propipetom i prebaci u čistu čašu, a ostatak vode ispusti preko pipca. Sadržaj čaše se posuši s bezvodnim natrijevim sulfatom u slučaju da ima zaostale vode. Zatim se eterično ulje prebaci u prethodno izvaganu bočicu. Dio organskog otapala zaostalog u uzorku se uklanja uparivačem u struji dušika nakon čega ide na GC-MS analizu. Uzorak se do analize čuva u zamrzivaču.



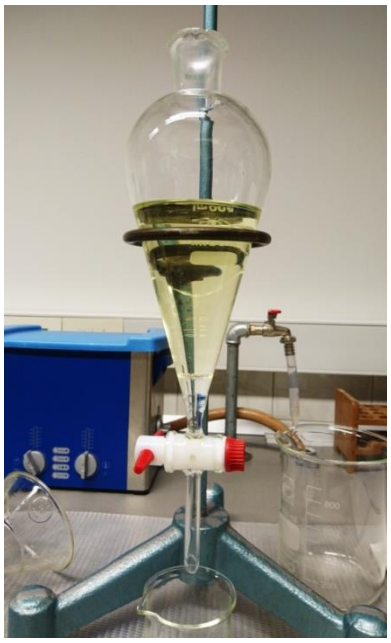
Slika 22. Biljni materijal prije i poslije mikrovalne destilacije.

Donji dio aparature (Slika 23.) omogućava izolaciju aroma (engl. *flavour*). Ovdje je slučaj mikrovalne ekstrakcije bez dodatka organskog otapala. Uz pomoć mikrovalova i djelovanjem gravitacijske sile, u čaši postavljenoj na dnu aparature, sakuplja se ekstrakt. Uvjeti za mikrovalnu ekstrakciju su identični onima za mikrovalnu destilaciju (500 W, 35 minuta).



Slika 23. Mikrovalna ekstrakcija uz gravitacijsku silu (donji dio, engl. *flavour*)

Po završetku ekstrakcije dobiveno je oko 250 mL ekstrakta koji se prelije u lijevak za odijeljivanje te se ekstrahira s 10 mL diklormetana 3 puta. Diklormetanski sloj se odvoji, ispusti preko pipca te suši bezvodnim natrijevim sulfatom. Konačni ekstrakt se prebaci u prethodno izvaganu bočicu te se višak organskog otapala otkloni uparivanjem u struji dušika kao i u slučaju mikrovalne destilacije. Tako dobiveni uzorci se čuvaju u frižideru i spremni su za GC-MS analizu.



Slika 24. Obrada ekstrakta nakon mikrovalne ekstrakcije.

2.3.2 Hidrodestilacija

Zbog usporedbe s mikrovalnom destilacijom provedena je i klasična hidrodestilacija iz biljnog materijala uskolisnog dvoredca.

Hidrodestilacija (Slika 25.) biljnog materijala se odvijala u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata. Kao trap korištena je smjesa organskih otapala pentana i dietiletera u omjeru 3:1 (6 mL+ 2 mL). Proces hidrodestilacije je prethodno opisan u općem dijelu rada pod poglavljem 1.5.1.1. Eterično ulje dobiveno nakon destilacije je odvojeno od vodenog sloja pomoću propipete te je posušeno bezvodnim natrijevim sulfatom u svrhu uklanjanja viška vode. Zatim je eterično ulje prebačeno u prethodno odvaganu bočicu i spremljeno u zamrzivač do analize na GC-MS-u.



Slika 25. Hidrodestilacija uskolisnog dvoredca.

2.3.3 Ekstrakcija glukozinolata uz desulfataciju

Protokol za izolaciju glukozinolata uz desulfataciju korišten u ovom radu je identičan onom u diplomskom radu kolegice Dine Vlajčević pod nazivom *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata.*[34]

1. Priprema otopina potrebnih za ekstrakciju

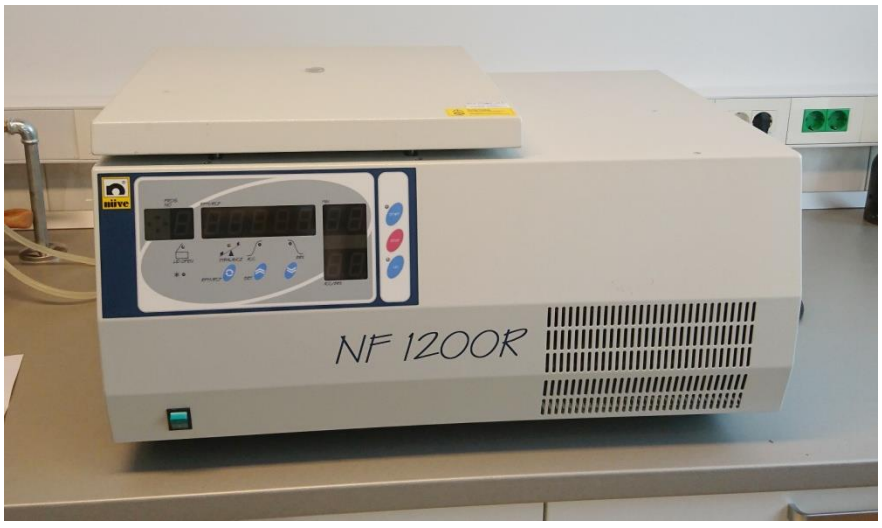
- 70%-tni metanol: za pripremu 500 mL 70%-og metanola pomiješano je 350 mL metanola i 150 mL ultračiste vode,
- natrij acetat (NaOAc, 20 mM, pH = 5,5): 0,8259 g NaOAc otopljeno je u 500 mL ultračiste vode, početna pH vrijednost bila je 7,9, pH je podešen na 5,5 dodatkom klorovodične kiseline (HCl, 25%)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



Slika 26. Pripravljene otopine potrebne za ekstrakciju glukozinolata.

2. Priprema otopine sulfataze

- 5000 U sulfataze (iz *Helix pomatia*, tip H-1) otopljeno je u 30 mL ultračiste vode uz dodatak 30 mL apsolutnog etanola te 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 27. 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 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 čuvana u zamrzivaču na -20 °C.



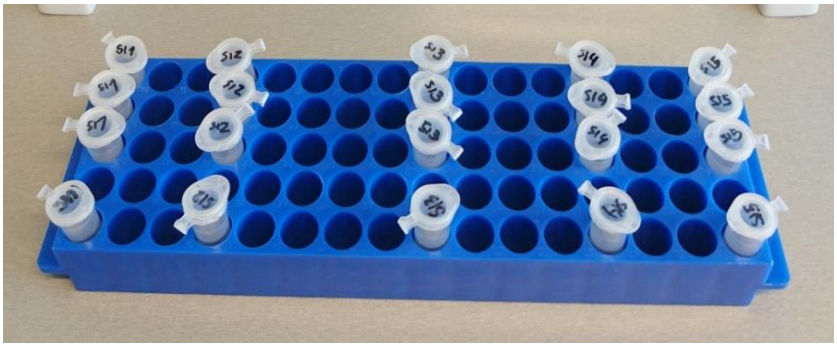
Slika 27. Centrifuga korištena za pripravu otopine sulfataze.

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 sinigrin monohidrata (M = 415 g/mol) izračunata je molarna koncentracija početne ("stock") otopine (c = 2,17 mM),
- pripravljeno je 5 referentnih uzoraka sinigrina (Tablica 5.) u 1,5-mL tubama i formirana je baždarna krivulja,
- uzorci (Slika 28.) su zamrznuti na -20 °C i tek netom prije korištenja izvađeni na sobnu temperaturu.
- zbog potrebe detekcije nižih koncentracija glukozinolata, pripravljena su dodatna razrjeđenja referentih uzoraka sinigrina čije su koncentracije prikazane u Tablici 6.

Tablica 5. Priprava referentnih uzoraka te konačne koncentracije sinigrina.

	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



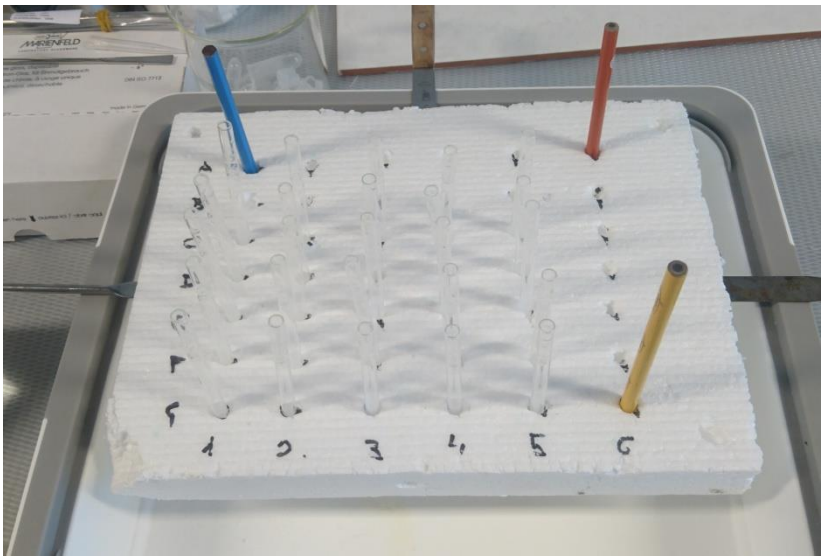
Slika 28. Pripravljeni referentni uzorci sinigrina.

Tablica 6. Razrjeđenje referentnih uzoraka sinigrina.

		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

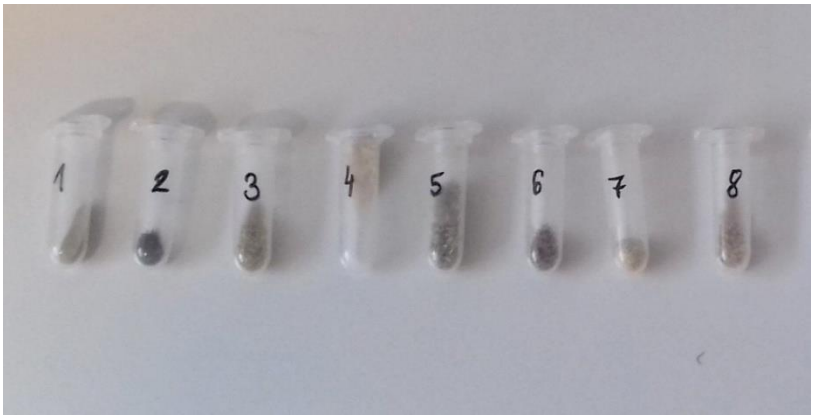
- filter papir je smljeven u mlincu i tako je dobiven vunasti materijal koji se koristi umjesto staklene vune,
- staklene pipete, koje služe kao kolone, napunjene su vunom u visini od 1 cm, vuneni materijal je zbijen kako ne bi došlo do istjecanja gela, tako pripremljene pipete postavljene su na stalak ispod kojeg se nalazi posuda za sakupljanje otpada prilikom ispiranja kolone (Slika 29.),
- pripremljeni dekstran potrebno je neposredno prije upotrebe izvaditi na sobnu temperaturu i protresti prije upotrebe tj. punjenja kolona,
- u svaku kolonu otpipetira se 0,5 mL dekstrana s tim da je prethodno odrezano prvih 5 mm plastičnog tipa za pipetiranje kako bi dekstran u formi gela mogao prolaziti kroz tip, kolone kod kojih je došlo do istjecanja gela zamijenjene su novim,
- u svaku kolonu još 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 29. Kolone za ekstrakciju glukozinolata.

5. Ekstrakcija glukozinolata

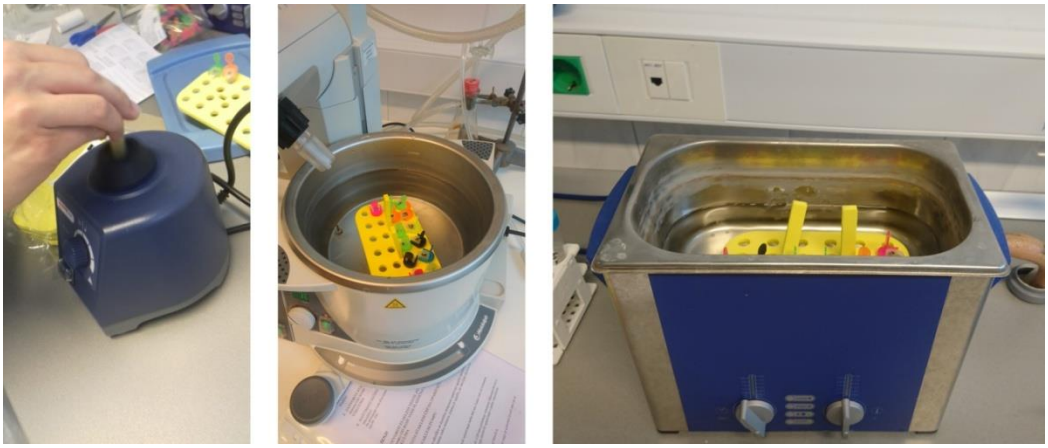
- izvagani biljni materijal (odvage oko 100 mg) prebačen je u označene reakcijske tube s okruglim dnom (Slika 30.),



Slika 30. Biljni uzorci prije ekstrakcije.

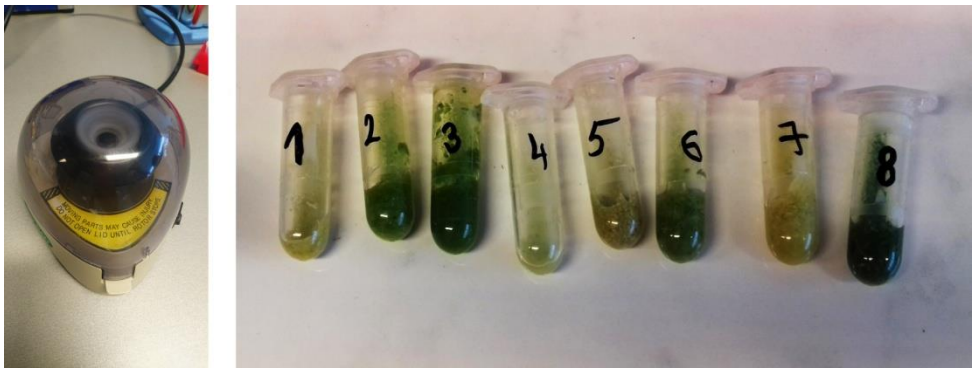
- u svaku reakcijsku tubu dodan je 1 mL 70 %-og metanola nakon čega je smjesa vorteksirana, a nakon toga su na tube stavljane sigurnosne kapice te su prebačene u vruću vodenu kupelj (90 °C) nekih 5 minuta tj. do početka vrenja metanola (Slika 31.),

- 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. 31.),



Slika 31. Vortex, vruća vodena kupelj i ultrazvučna kupelj.

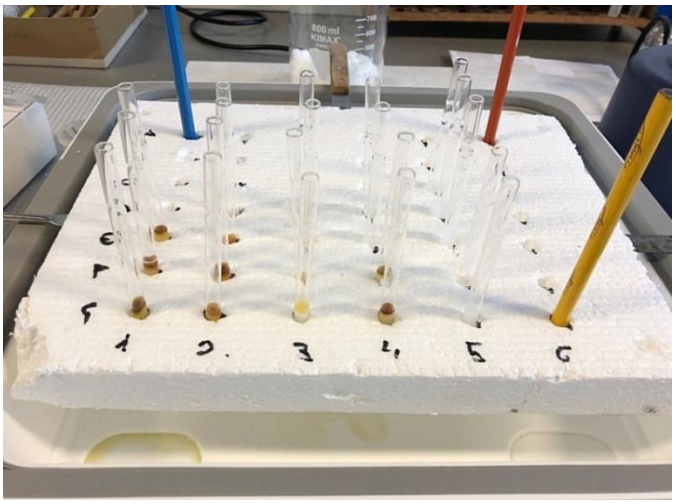
- nakon centrifugiranja (Slika 32.) supernatant je odvojen (posebno paziti da nastavak za pipetiranje ne dođe u kontakt s biljnim materijalom) i prebačen u odgovarajuće kolone, također u 5 kolona je dodano 5 referentnih uzoraka sinigrina,



Slika 32. Biljni uzorci nakon centrifugiranja.

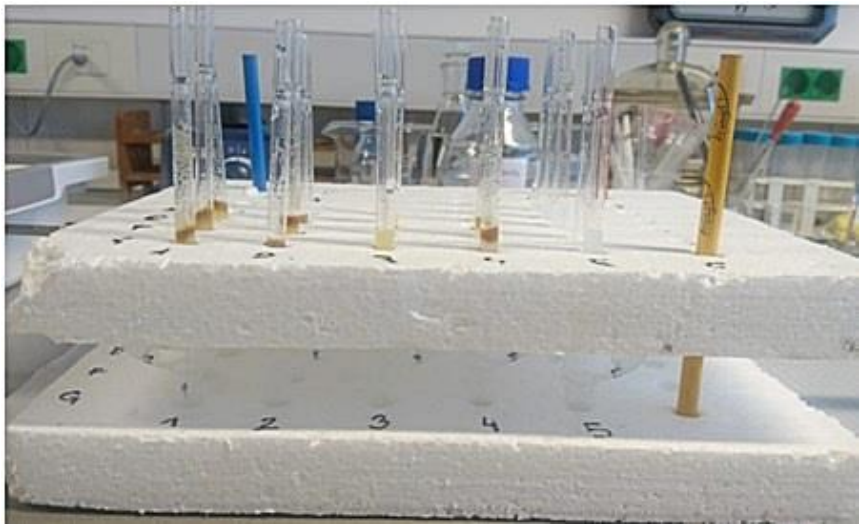
- nakon toga je supernatant prebačen, u tube s preostalim biljnim materijalom dodan je još 1 mL 70 %-og metanola i postupak je ponovljen te dobiveni supernatant prebačen u odgovarajuće kolone,

- sljedeći 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 enzima sulfataze (Slika 33.),



Slika 33. Kolone s posudom za otpad.

- 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 34.),
- dalje je u svaku kolonu dodano 20 µL otopine sulfataze koja je prethodno izvađena na sobnu temperaturu te još 50 µL NaOAc nakon čega su kolone prekrivene aluminijskom folijom i ostavljene preko noći,



Slika 34. Kolone s pripadajućim tubama za ekstrakte.

- 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,
- tako dobiveni uzorci te 5 referentnih uzoraka sinigrina prebačeni su u vialice za HPLC te do analize čuvani u zamrzivaču na -20 °C.

2.4 Metode analize

2.4.1 GC-MS analiza

Za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju hlapljivih sumporovih spojeva korišten je vezani sustav plinske kromatografije (Varian model 3900) i spektrometrije masa (Varian model 2100 T, Slika 35.) proizvođača VarianInc., Lake Forest, CA, USA. Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS (30 m x 0,25 mm) sa slojem stacionarne faze debljine 0,25 μm. Plin nosioc je helij, dok je protok postavljen na 1 mL/min. Zadana temperatura injektora je 250 °C, a volumen injektiranog uzorka iznosi 1 μL. Temperatura kolone je postavljena na sljedeći način: 3 min izotermno na 60 °C, zatim je uslijedilo zagrijavanje do 246 °C brzinom od 3 °C/min te zadržavanje na navedenoj temperaturi u trajanju 25 min.

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



Slika 35. GC-MS uređaj (Varian, USA).

2.4.2 HPLC

Za analizu desulfoglukozinolata dobivenih ekstrakcijom uz desulfataciju korišten je vezani sustav HPLC-UV, PerkinElmer, NCI 900, USA (Slika 36.). Korištena je kolona C-18 (250 mm x 4 mm) sa promjerom čestica 5μm. Kao pokretna faza korištena je smjesa vode i acetonitrila uz postavljen protok od 0,8 mL/min. Volumen injektiranog uzorka iznosi 20 μL. Za detekciju pojedinih spojeva koji izlaze iz kromatografske kolone korišten je UV detektor (λ=227 nm). Radna temperatura je zadana na 30 °C, a vrijeme trajanja analize iznosilo je 56 minuta. U tablici 7. prikazan je sastav mobilne faze korištene za analizu HPLC-om.

Tablica 7. 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 36. HPLC uređaj (PerkinElmer, USA).

2.4.3 HPLC-MS/MS analiza

Za analizu desulfoglukozinolata dobivenih ekstrakcijom uz desulfataciju, također je korišten vezani sustav HPLC- PDA-MS/MS-8050, Shimadzu, Japan (Slika 37.). Vezani sustav se sastoji od HPLC uređaja združenog s trostrukim četveropolnim masenim spektrometrom. Spektar snimanja valnih duljina podešen je od 250 do 350 nm. Korištena je kolona C-18 (250 mm x 4 mm) sa slojem stacionarne faze debljine 5µm. Kao pokretna faza korištena su dva otapala: otapalo A voda uz dodatak 50 mM natrijevog klorida, a otapalo B je bio 30 % acetonitril uz postavljen protok od 0,8 mL/min. Radna temperatura postavljena je na 30 °C, a trajanje analize iznosilo je 47 minuta. Volumen injektiranog uzorka iznosi 10 µL. Desulfoglukozinolati su analizirani praćenjem MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) prijelaza koji su dobiveni korištenjem kolizijske energije -25 eV. Temperatura izvora iona je postavljena na 300 °C, a MRM prijelazi skenirani su u pozitivnom načinu.

Tablica 8. Sastav mobilne faze korištene za HPLC-DAD-MS/MS analizu desulfoglukozinolata.

Vrijeme (min)	Voda (%)	Acetonitril (30%)	Gradijent
Početni uvjeti	100	0	-
0,02	96	4	-
28,0	14	86	Linearno
32,0	14	86	-
34,0	5	95	Linearno
38,0	5	95	-
39,0	96	4	Linearno
46,80	96	4	-
47,0	0	100	-

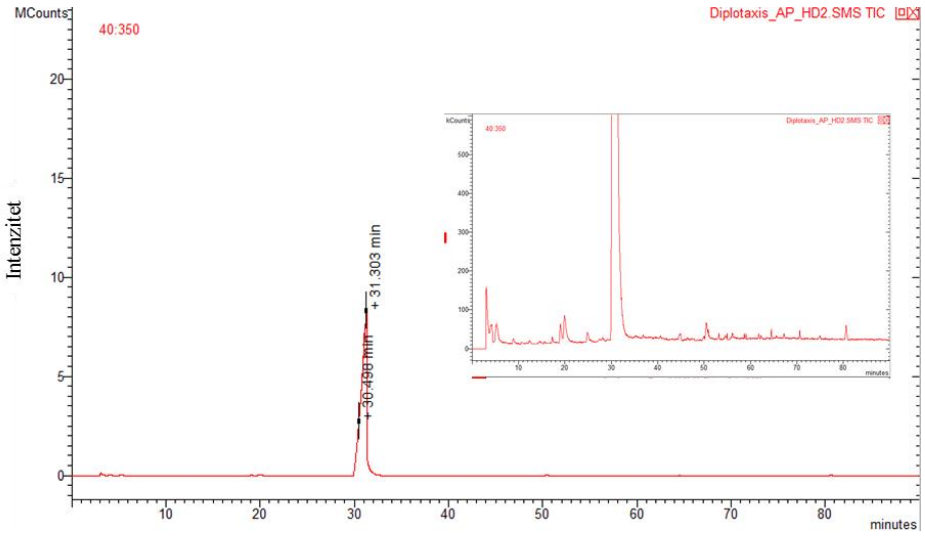


Slika 37. HPLC-DAD-MS/MS uređaj (Shimadzu, Japan).

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1 GC- MS analiza

U ovom radu istraživani su glukozinolati biljne vrste uskolisni dvoredac (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) pri čemu je za njihovu identifikaciju korištena indirektna metoda koja se sastoji od termičke ili enzimske razgradnje glukozinolata, izolacije hlapljivih razgradnih produkata hidrodestilacijom, destilacijom ili ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima te njihove identifikacije spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Termička razgradnja provedena je postupkom hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata na temperaturi od 100 °C te postupkom destilacije potpomognutom mikrovalovima snage 500 W, trajanja 35 minuta na temperaturi od 98 °C. Također je izvršena mikrovalna ekstrakcija primjenom snage mikrovalova od 500 W pri temperaturi od 40 °C u trajanju 35 minuta. Ovim postupkom je dobiven ekstrakt koji je djelovanjem sile gravitacije sakupljen te je provedena ekstrakcija s diklormetanom. Svi uzorci dobiveni u ovom dijelu istraživanja podvrgnuti su GC-MS analizi.

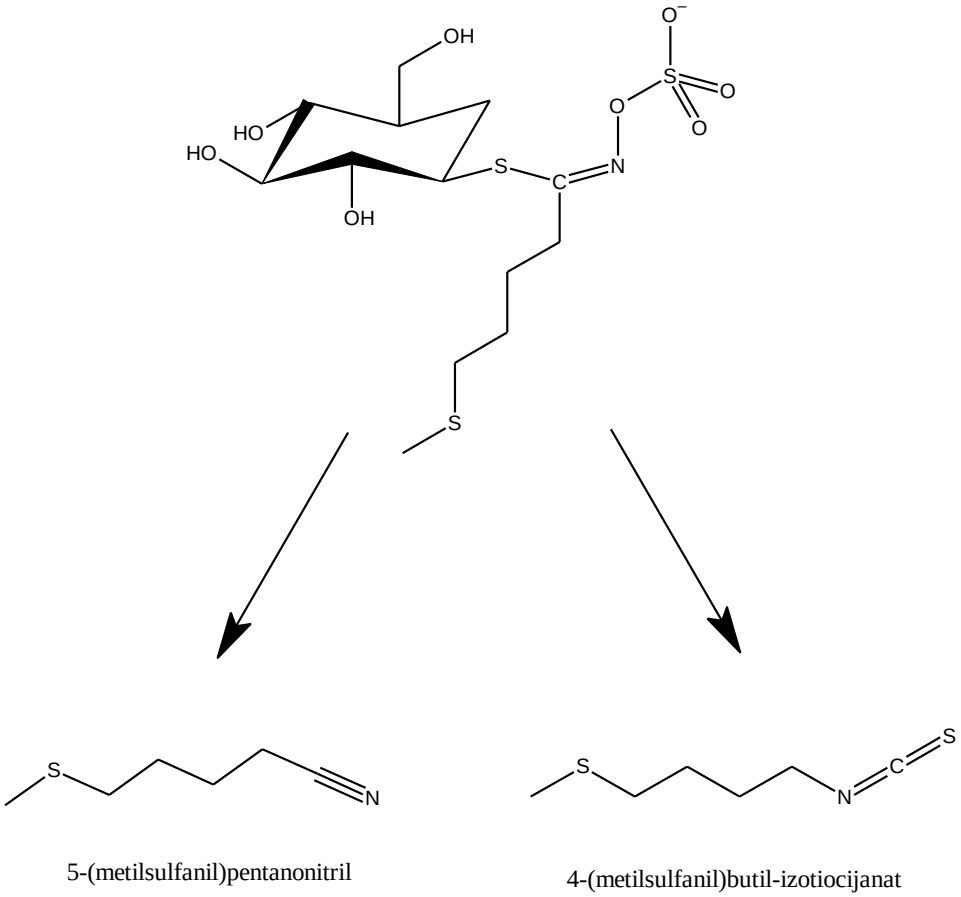


Slika 38. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja uskolisnog dvoredca dobivenog hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru.

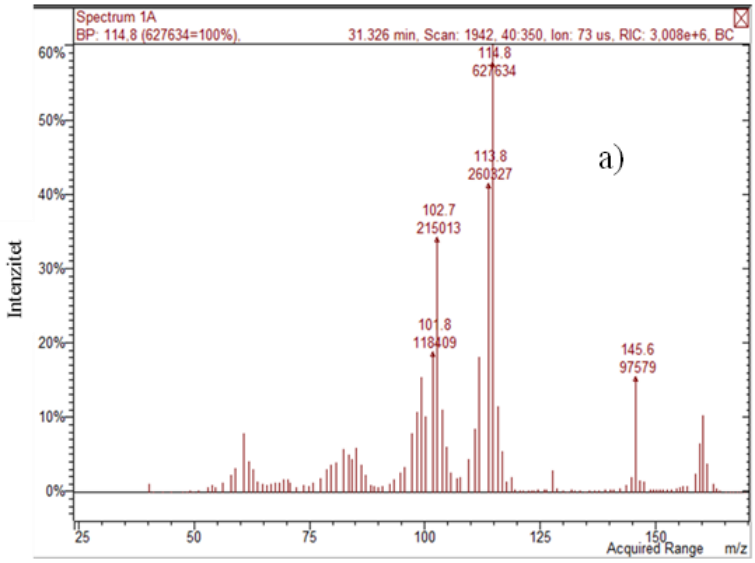
Tablica 9. Razgradni produkti glukozinolata dobiveni hidrodestilacijom biljnog materijala uskolisnog dvoredca.

Hidrodestilacija			
Glukozinolati	**Razgradni produkti**	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**w/w (%)**
4-Metilpentil-glukozinolat	4-metilpentil-izotiocijanat	17,3	0,1
Glukoerucin	5-(metilsulfanil)pentanonitril	20,0	0,7
	4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanat	30,5	88,2
Glukoiberverin	3-(metilsulfanil)propil-izotiocijanat	24,9	tr
Glukotropeolin	Benzil-izotiocijanat	27,4	tr
Iskorištenje: 0.003 %			

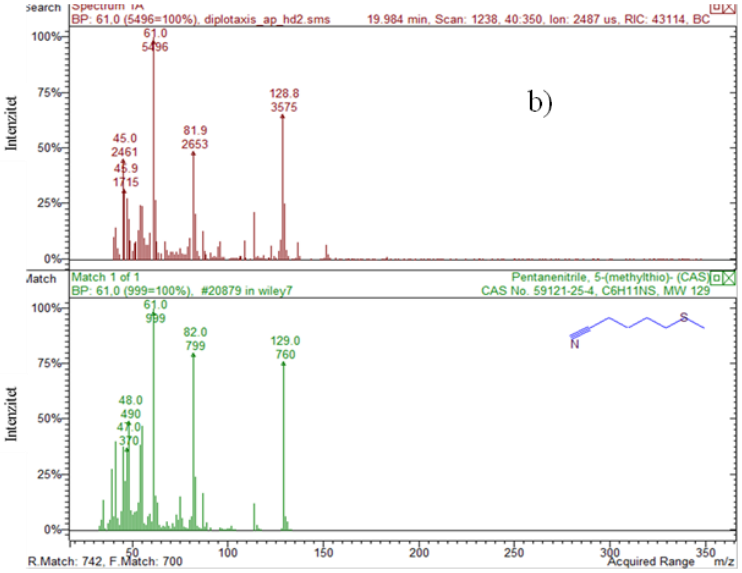
Na Slici 38. prikazan je kromatogram ukupne ionske struje za uskolisni dvoredac. Najveći pik na kromatogramu na 30,5 minuta, pregledom masenog spektra, zaključeno je da pripada 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanatu (Slika 40.). Uočava se osnovni pik m/z=115, kao i m/z=114, 103 i 146 koji su nižeg intenziteta. Ovaj izotiocijanat potječe od razgradnje glukoerucina (Slika 39.). Kao potvrdu prisustva spomenutog glukozinolata, pronađen je i njegov pripadajući nitril na 20,0 minuta. Maseni spektar 5-(metilsulfanil)pentanonitrila (Slika 41.) kao molekulski pik ima m/z=129, a osnovni pik je m/z=61 što odgovara fragmentu $[CH_3\text{-}S\text{-}CH_2]^+$.



Slika 39. Razgradnja glukoerucina.

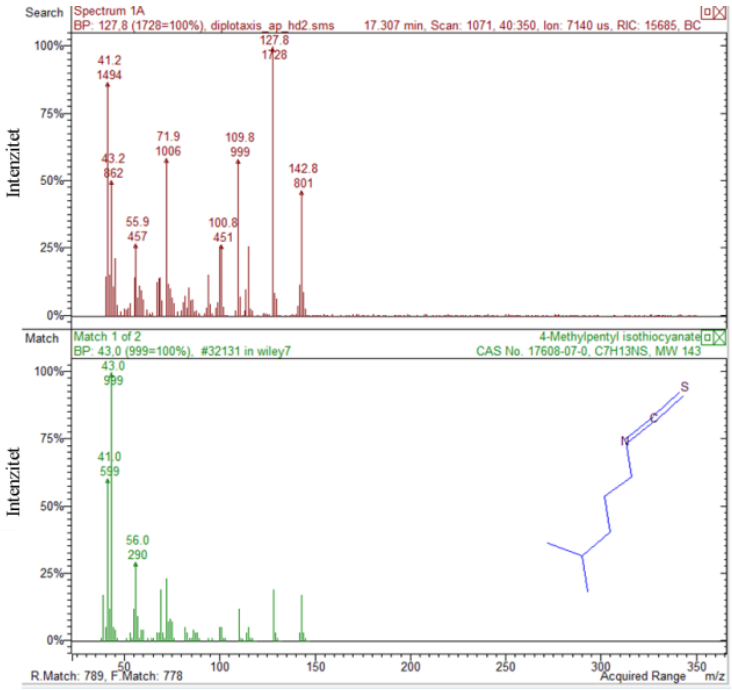


Slika 40. Maseni spektar 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanata.

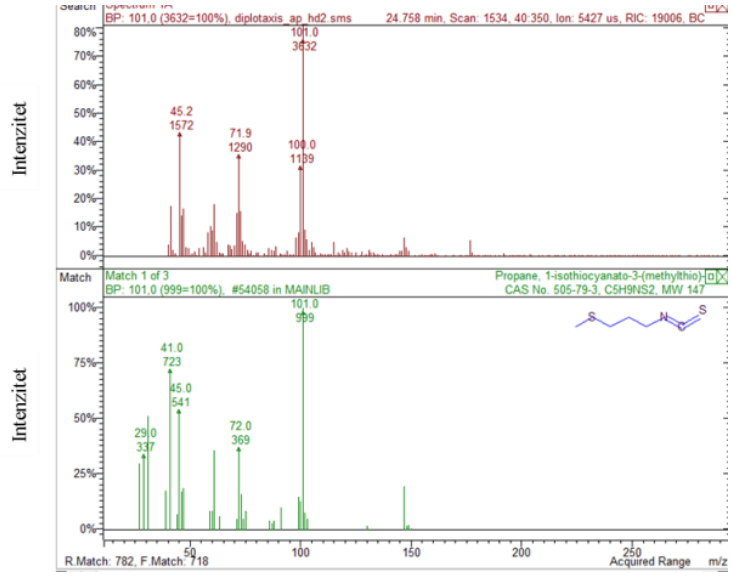


Slika 41. Maseni spektar 5-(metilsulfanil)pentanonitrila.

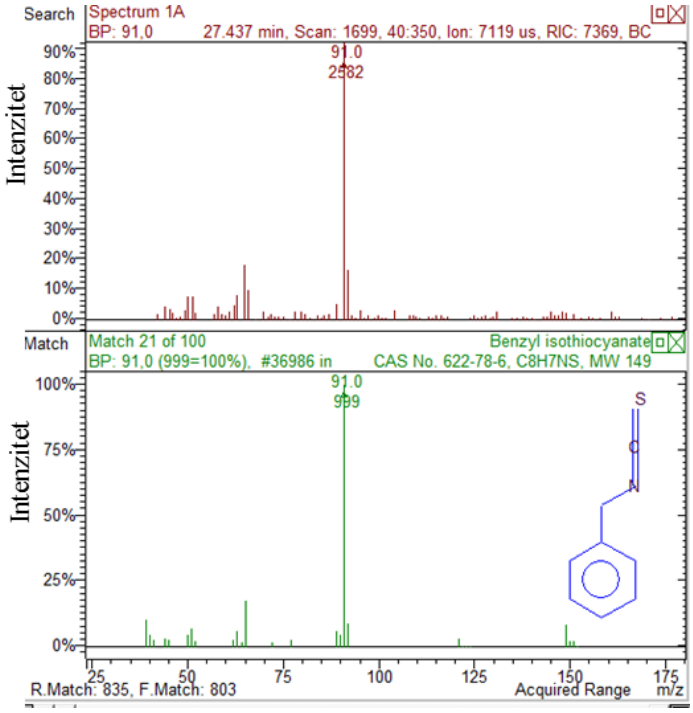
U manjem postotku zastupljeni su izotiocijanati kao razgradni produkti sljedećih triju glukozinolata: 4-metilpentil glukozinolat, glukoiberverin i glukotropeolin. Maseni spektri hlapljivih produkata dani su na Slikama 42 - 44.



Slika 42. Maseni spektar 4-metilpentil-izotiocijanata.

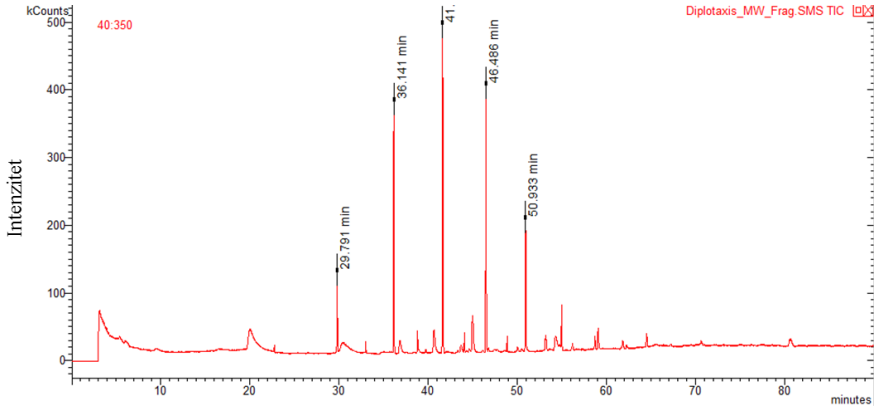


Slika 43. Maseni spektar 3-(metilsulfanil)propil-izotiocijanata.



Slika 44. Maseni spektar benzil-izotiocijanata.

Dobivena masa eteričnog ulja nakon hidrodestilacije je iznosila 5,9 mg, a iskorištenje 0,003 %.



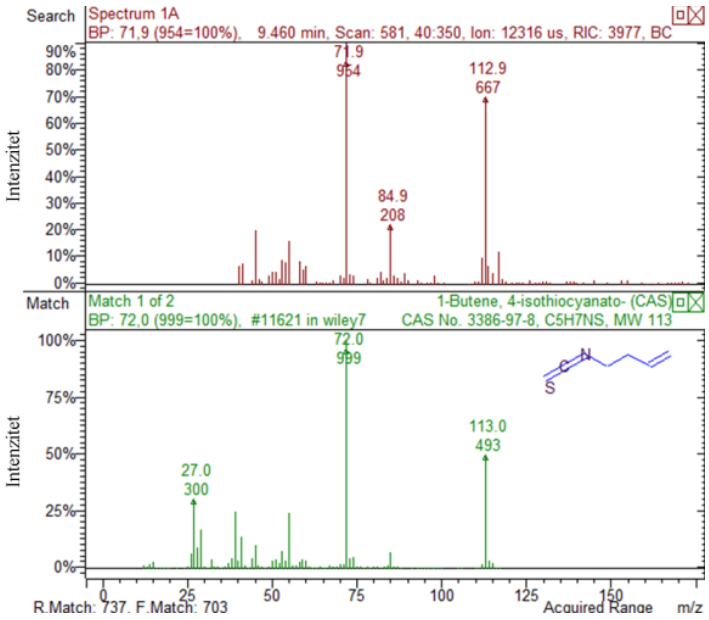
Slika 45. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja uskolisnog dvoredca dobivenog destilacijom uz primjenu mikrovalova.

Tablica 10. Razgradni produkti glukozinolata dobiveni mikrovalnom destilacijom biljnog materijala uskolisnog dvoredca.

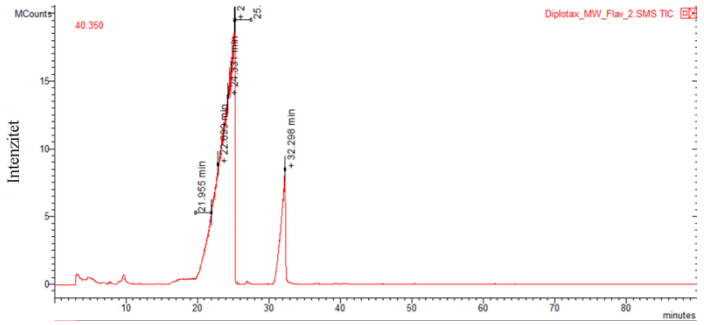
Destilacija potpomognuta mikrovalovima (fragrance)			
Glukozinolati	**Razgradni produkti**	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**w/w (%)**
Glukonapin	But-3-enil-izotiocijanat	9,5	tr
Glukoerucin	5-(metilsulfanil)pentanonitril	20,0	3,0
	4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanat	30,5	1,9
Iskorištenje: 0,001 %			

Iz kromatograma za eterično ulje dobiveno destilacijom primjenom mikrovalova, može se zaključiti kako su kao i kod hidrodestilacije dobiveni razgradni produkti glukoerucina, izotiocijanat i nitril, ali u puno manjem postotku. But-3-enil-izotiocijanat se pojavljuje kao vrlo mali pik na 9,5 minuta, a potječe od razgradnje glukonapina. Maseni spektar prikazan je na Slici 46., gdje je vidljiv osnovni pik m/z=72 (odgovara fragmentu $[SCN\text{-}CH_2]^+$ koji je najvjerojatnije posljedica cijepanja C-C veze u blizini heteroatoma (dušika), budući da heteroatom obično bolje stabilizira pozitivan

naboj od ugljikova atoma) te molekulski m/z=113. Masa eteričnog ulja iznosila je 3,6 mg, odnosno iskorištenje je bilo 0,001%.



Slika 46. Maseni spektar but-3-enil-izotiocijanata.



Slika 47. Kromatogram ukupne ionske struje hlapivog izolata uskolisnog dvoredca dobivenog mikrovalnom ekstrakcijom.

Tablica 11. Razgradni produkti glukozinolata dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom biljnog materijala uskolisnog dvoredca.

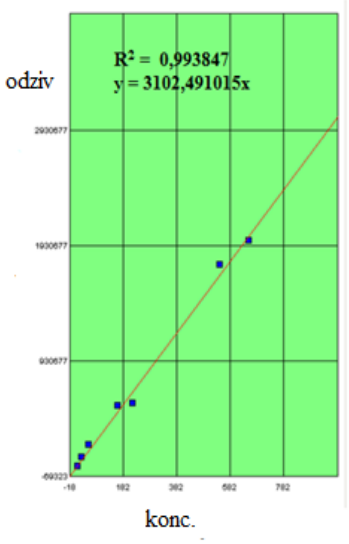
Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (flavour)			
Glukozinolati	**Razgradni produkti**	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**w/w (%)**
Glukonapin	But-3-enil-izotiocijanat	9,5	0,1
Glukoerucin	5-(metilsulfanil)pentanonitril	20,0	85,0
	4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanat	30,5	12,0
Iskorištenje: 0,014 %			

GC-MS analizom izolata dobivenog mikrovalnom ekstrakcijom dobiveni su isti razgradni produkti glukozinolata kao i kod mikrovalne destilacije. Masa izolata je iznosila 42,1 mg, što daje najveći postotak iskorištenja od 0,014 % u odnosu na ostale metode izolacije.

Razgradnja glukoerucina tijekom mikrovalne ekstrakcije usmjerena je formiranju nitrila (85 %) u usporedbi s hidrodestilacijom gdje je favoriziran nastanak izotiocijanata (88 %). Ujedno, iskorištenje se pokazalo znatno većim kod metode mikrovalne ekstrakcije, dok je mikrovalna destilacija dala manje iskorištenje u odnosu na hidrodestilaciju. Temperatura koja se postiže pri 500 W kod mikrovalne destilacije iznosi 98 °C, kao i kod hidrodestilacije, dok kod mikrovalne ekstrakcije, ta temperatura je znatno niža, oko 40 °C što vjerojatno vodi razgradnju glukozinolata u nitrile te smanjuje gubitke uzrokovane termičkom razgradnjom.

3.2 Izolacija glukozinolata i HPLC analiza

Svaka biljna vrsta koja sadrži glukozinolate ima jedinstveni profil, stoga veliku važnost nosi njihova identifikacija te u konačnici kvantizacija. U 3.1. poglavlju opisan je profil glukozinolata uskolisnog dvoredca dobiven indirektnom metodom preko GC-MS analize razgradnih produkata, izotiocijanata i nitrila. U svrhu kvantizacije glukozinolata, pristupilo se njihovoj izolaciji. Intaktni glukozinolati su ekstrahirani iz dviju biljnih vrsta *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. i *Matthiola incana* (L.) R.Br., iz različitih biljnih tkiva. Ekstrakcija smjesom metanola i vode je izvršena iz 100,0 mg usitnjenog biljnog materijala pri 92 °C s ciljem inhibicije mirozinaze. Nanošenjem dobivenih ekstrakta na ionsko-izmjenjivačku kolonu koja sadrži dekstran, a potom ispiranjem ultračistom vodom, 70 % metanolom i puferom uklonjene su nepolarne komponente, kao što je klorofil. Dodatkom sulfataze, ekstrahirani glukozinolati su desulfatizirani. Usporedno, pripravljene su različite koncentracije desulfosinigrina za kalibracijsku krivulju. Svi uzorci su analizirani HPLC-UV tehnikom. Kalibracijska krivulja prikazana je na Slici 48., odakle je vidljiva visoka korelacija i linearnost (R^2=0,993847).



Slika 48. Kalibracijska krivulja desulfosinigrina.

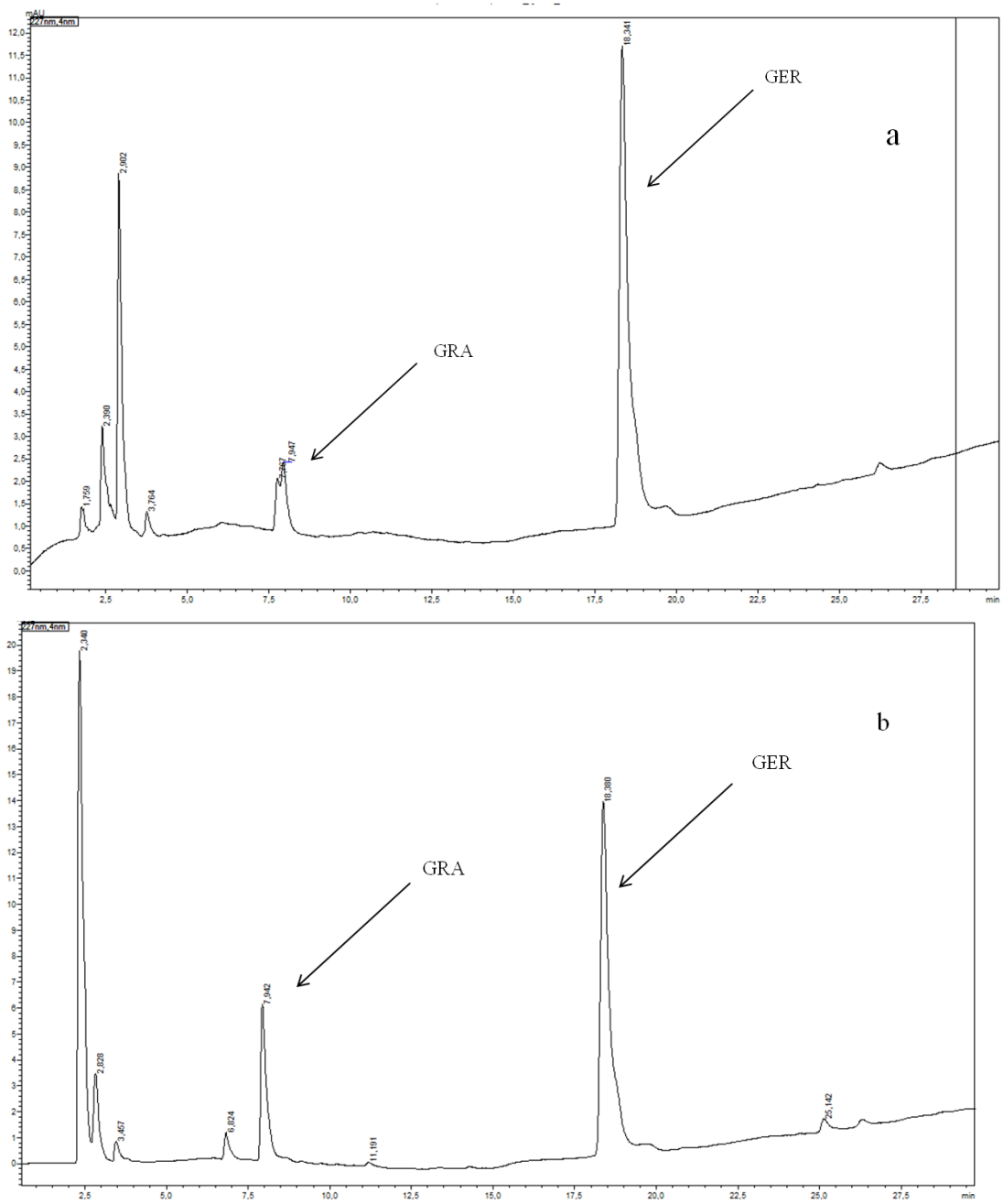
U Tablici 12. navedeni su desulfoglukozinolati identificirani u uljanoj repici zajedno s pripadajućim vremenima zadržavanja na temelju kojih se određuje prisustvo istih (desulfo)glukozinolata u drugim biljnim vrstama.

Tablica 12. Desulfoglukozinolati identificirani u uljanoj repici.

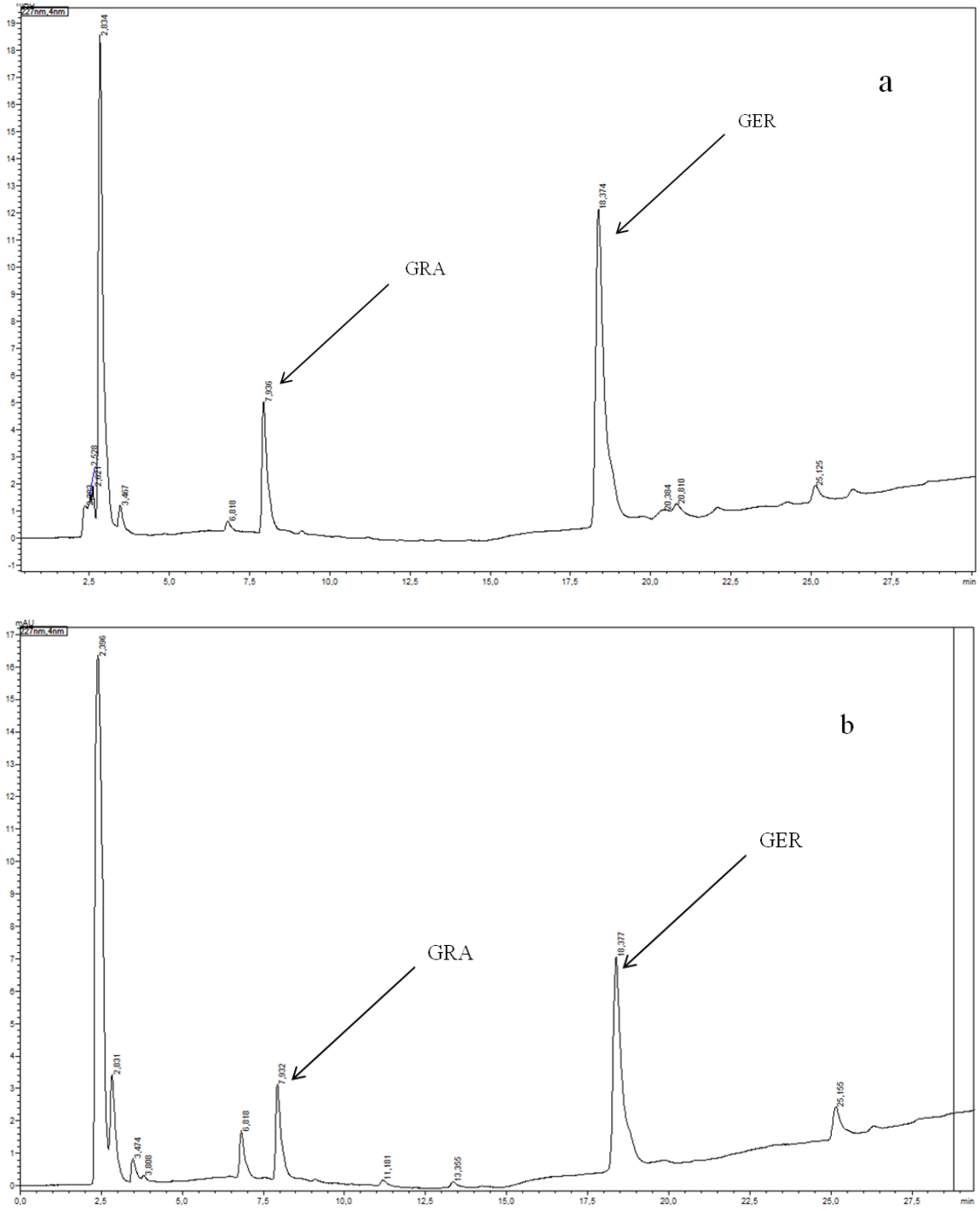
	Vrijeme zadržavanja (min)	**Naziv**
1	6,173	Desulfoglukoiberin
2	7,953	Desulfoprogoitrin
3	8,546	Desulfoepiprogoitrin
4	8,956	Desulfosinigrin
5	11,116	Desulfonapoleiferin
6	12,104	Desulfoglukonapin
7	14,247	Desulfo-4-hidroksiglukobrasicin
8	17,365	Desulfobrasikanapin
9	20,809	Desulfoglukotropeolin
10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

3.2.1 Uskolisni dvoredac (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.)

HPLC kromatogrami različitih biljnih dijelova uskolisnog dvoredca prikazani su na Slikama 49. i 50. Izračun kvantizacije identificiranih glukozinolata u biljnoj vrsti uskolisni dvoredac nalazi se u prilogu pod poglavljem 6.1.



Slika 49. HPLC kromatogrami uskolisnog dvoredca: a) sjeme, b) stabljika.



Slika 50. HPLC kromatogrami uskolisnog dvoredca: a) cvijet, b) list.

Kao najzastupljeniji glukozinolat u biljnoj vrsti uskolisni dvoredac, HPLC analizom identificiran je glukozinolat glukoerucin. Sljedeći glukozinolat koji je identificiran je glukorafanin, no u vrlo malim količinama. Glukorafanin ima vrijeme zadržavanja 7,5 minuta, dok glukoerucin 18,8 minuta. Pregledom UV spektara svih na

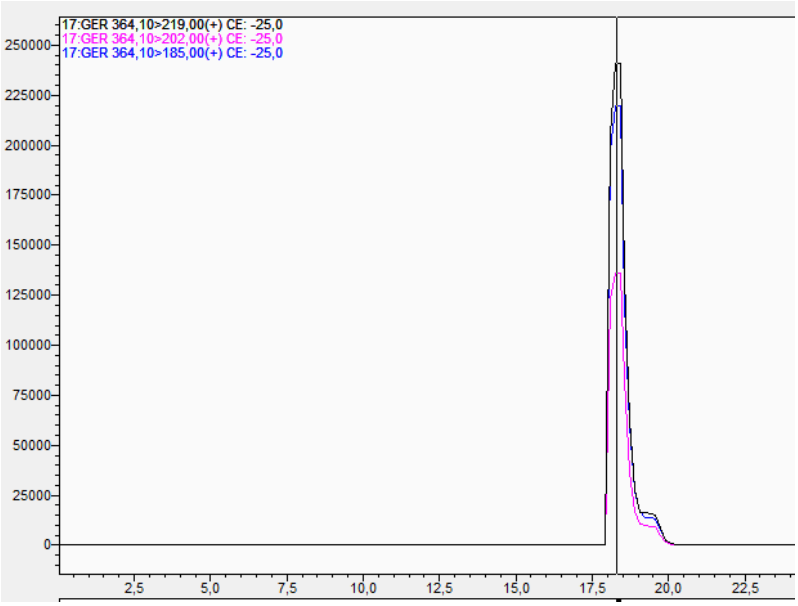
slikama nenaznačenih pikova, zaključeno je da se ne radi o glukozinolatu budući da apsorpcijske vrpce pri 227 nm nisu odgovarale onim karakterističnim za skupine glukozinolata (alifatski, aromatski, indolni).[35]

Tablica 13. Sadržaj glukozinolata u pojedinim dijelovima biljke uskolisni dvoredac; GRA, glukorafanin; GER, glukoerucin.

	Glukozinolati (μmol/g)		
Biljni dio	**GRA**	**GER**	**Ukupno**
Sjeme	0,63	15,85	16,48
Stabljika	2,49	12,28	14,77
Cvijet	2,83	12,07	14,90
List	1,43	5,62	7,05

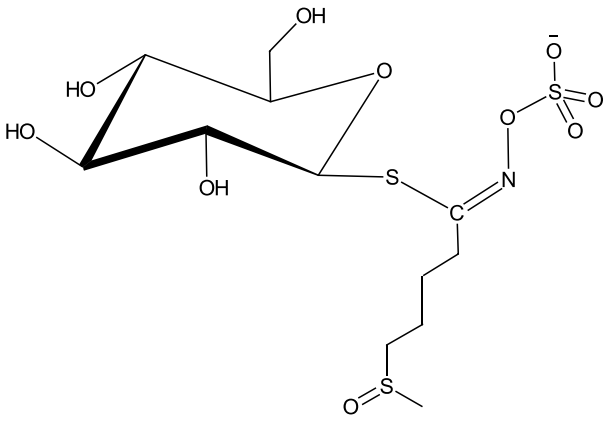
HPLC i HPLC-MS/MS kao direktne metode određivanja glukozinolata pokazale su prisustvo glukoerucina i glukorafanina. S druge strane, indirektnom metodom preko GC-MS analize razgradnih produkata, osim glukoerucina, utvrđeni su dodatni glukozinolati: hidrodestilacija (4-metilpentil-glukozinolat, glukoiberverin i glukotropeolin) te mikrovalna ekstrakcija i destilacija (glukonapin). Moguće objašnjenje je nastanak različitih izotiocijanata i nitrila prilikom same analize u GC uređaju. Kako bi se potvrdila pretpostavka, HPLC-PDA-MS/MS analiza je napravljena uz zadane MRM prijelaze za glukozinolate[36] koje je trebalo potvrditi.

Glukoerucin kao najzastupljeniji glukozinolat, potvrđen je i na MS/MS-u (Slika 51.) primjenom literaturno dostupnih MRM prijelaza za desulfoglukoerucin s vezanim natrijevim kationom (364,10 > 219; 202; 185).

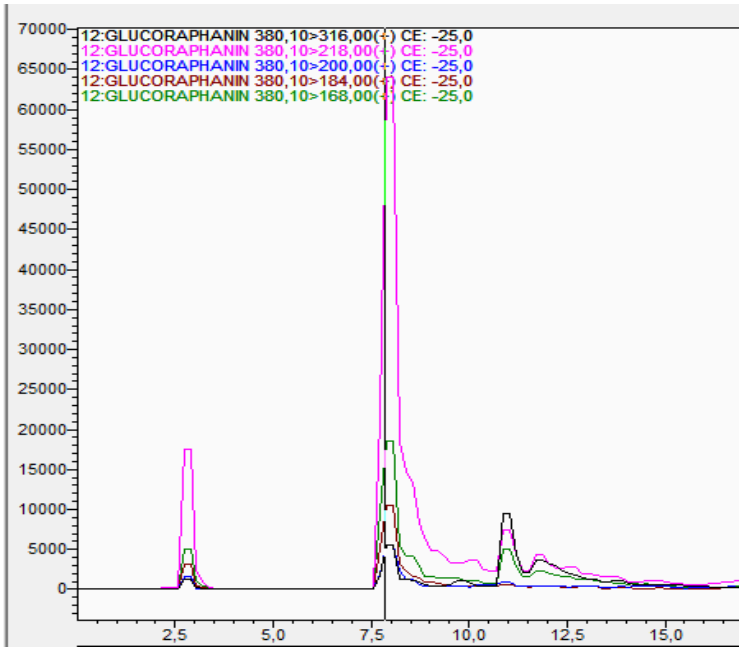


Slika 51. MRM prijelaz za desulfoglukoerucin s vezanim natrijevim kationom.

Sljedeći MRM prijelazi za desulfoglukorafanin s vezanim natrijevim kationom uneseni su u MS bazu podataka: 380,10 > 316; 218; 200; 184; 168. Na slici 53. prikazan je maseni kromatogram za potvrđene dane prijelaze. Razgradni produkti ovog glukozinolata, sulforafan i sulforafan nitril nisu stabilni prilikom hidro i mikrovalne destilacije (temperatura 100 °C), a ni prilikom mikrovalne ekstrakcije zbog primjene veće snage mikrovalnog zračenja (500 W), stoga nisu ni očekivani kod GC-MS analize hlapljivih spojeva.

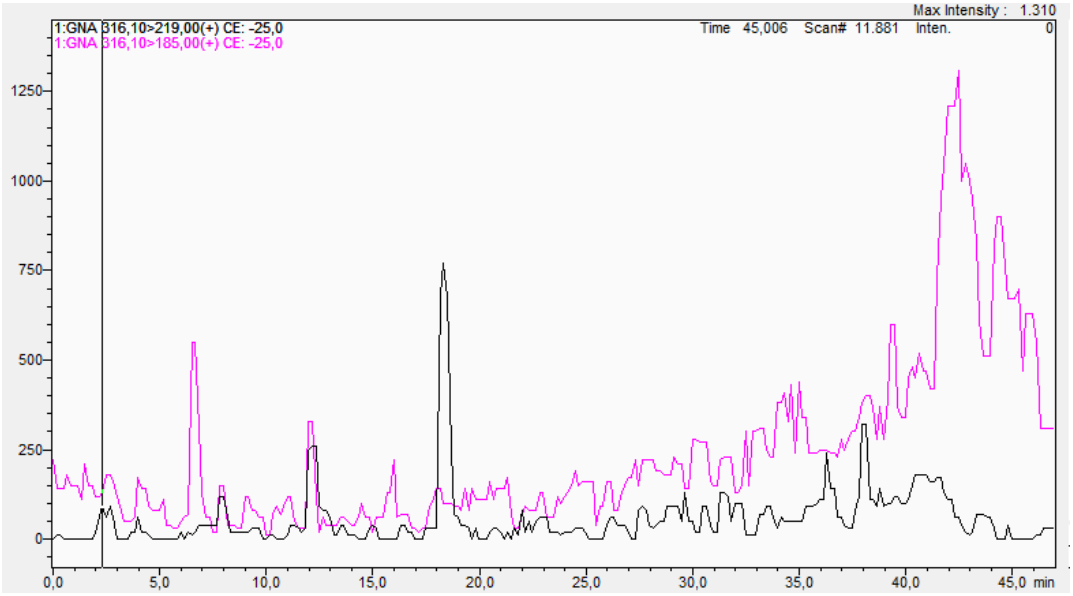


Slika 52. Glukorafanin.



Slika 53. MRM prijelaz za desulfoglukorafanin s natrijevim kationom.

Tako, upotrebom literature, utvrđen je MRM prijelaz za desulfoglukonapin, točnije dva (316,10>219; 316,10>185) te u konačnici maseni spektar nije potvrdio prisutnost ovog glukozionalata u ekstraktu (Slika 54.).

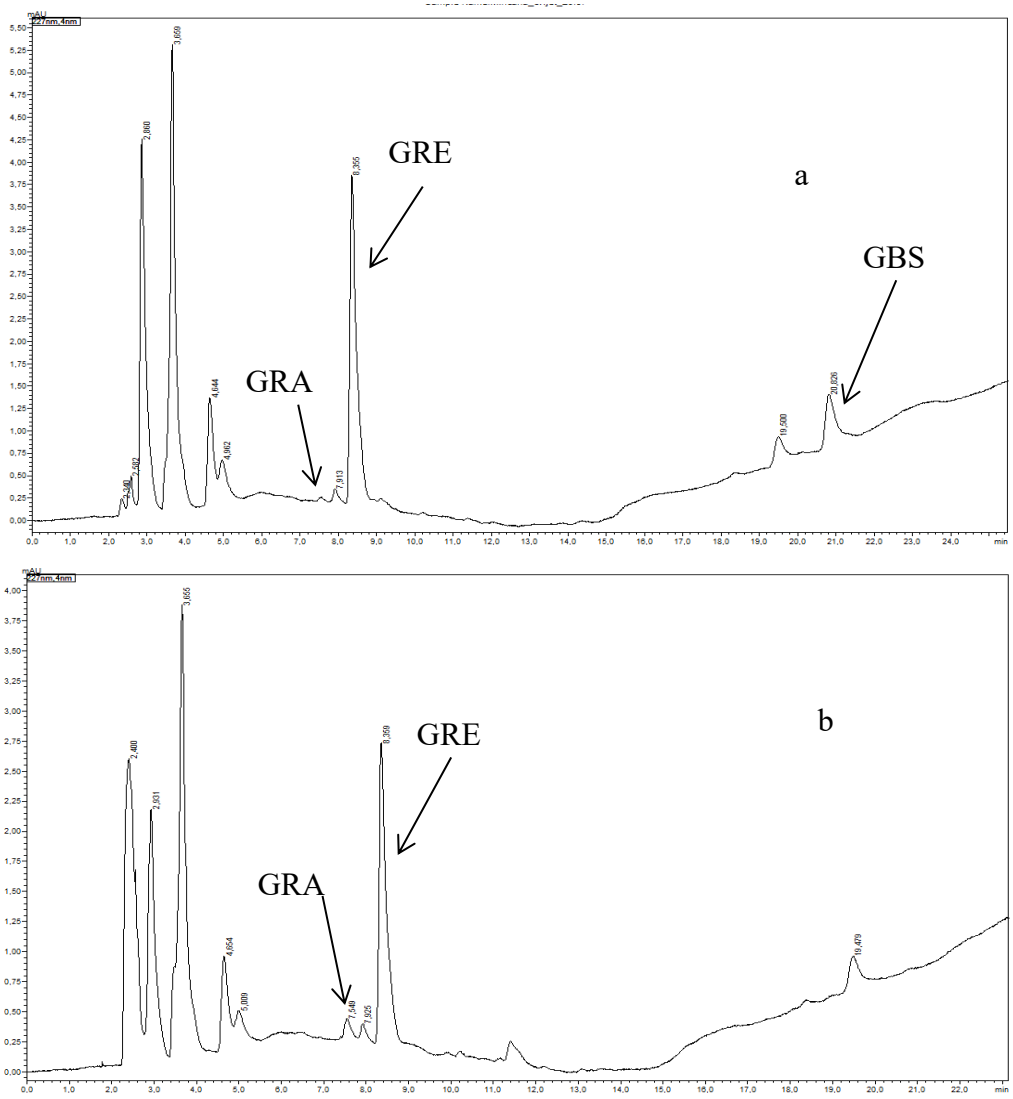


Slika 54. MRM prijelaz desulfoglukonapina s vezanim natrijevim kationom.

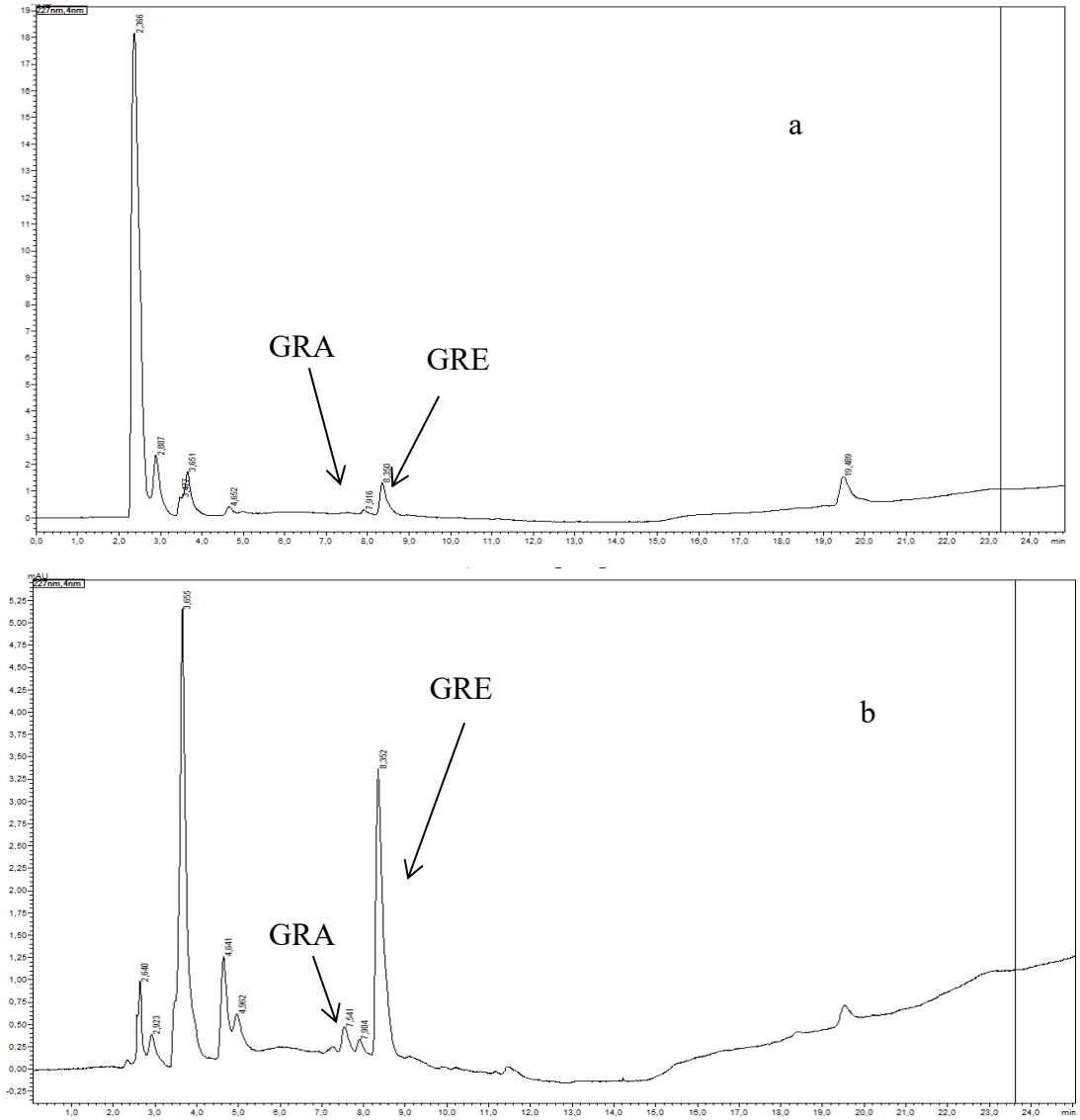
Osim glukonapina, provjereni su MRM prijelazi za glukotropeolin (352,10 > 219; 185) te spomenuti glukozinolat također nije pronađen u ekstraktu nakon desulfatacije.

3.2.2 Sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R.B.)

HPLC kromatogrami različitih biljnih dijelova sivkaste ljubičine prikazanisu na Slikama 55. i 56. Izračun kvantizacije identificiranih glukozinolata nalazi se u prilogu pod poglavljem 6.1.



Slika 55. HPLC kromatogrami sivkaste ljubičine: a) cvijet; b) stabljika.



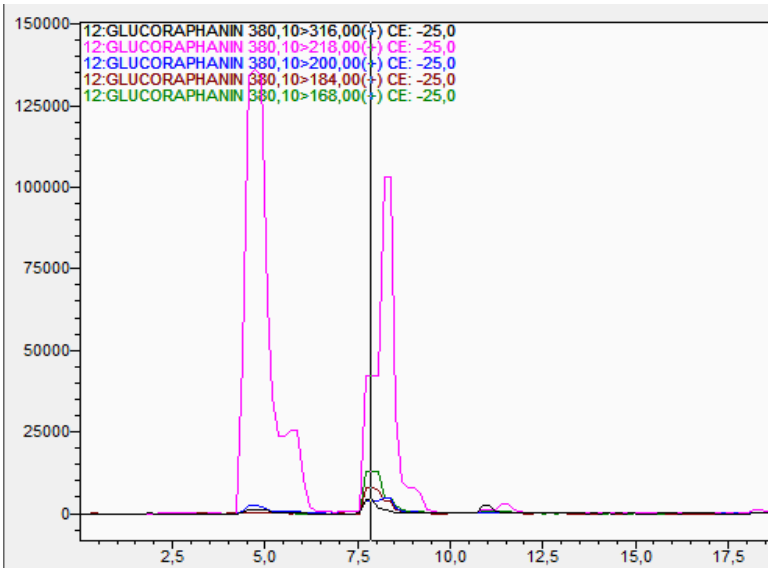
Slika 56. HPLC kromatogrami sivkaste ljubičine. a) list; b) komuška.

HPLC analizom utvrđeno je da je u svim dijelovima biljke najzastupljeniji nezasićeni glukozinolat glukorafenin, a slijedi ga zasićeni glukorafanin. Vrijeme zadržavanja glukorafenina je 8,4 minuta, a glukorafanin izlazi nešto ranije, na 7,5 minuta. Najveći sadržaj glukorafenina prisutan je u cvijetu sivkaste ljubičine (15,80 μmol/ g). Ovaj biljni organ jedini sadrži i treći indolni glukozinolat glukobrasicin (pik pri 20,8 minuta). Kao i kod uskolisnog dvoredca, ostali pikovi nisu odgovarali izgledom apsorpcijske vrpce glukozinolata pri 227 nm.[35]

Tablica 13. Sadržaj glukozinolata u pojedinim dijelovima biljke sivkasta ljubičina; GRA, glukorafanin; GRE, glukorafenin; GBS, glukobrasicin.

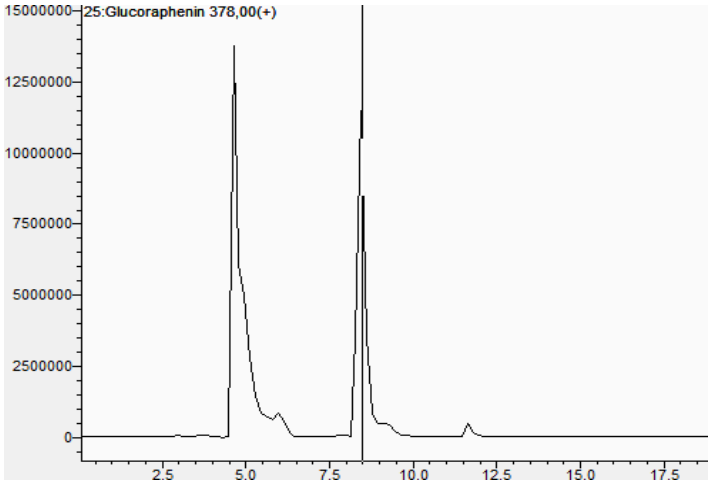
	Glukozinolati (μmol/g)			
Biljni dio	**GRA**	**GRE**	**GBS**	**Ukupno**
Cvijet	0,08	15,80	0,39	16,27
Stabljika	tr	5,21	-	5,21
List	tr	1,53	-	1,54
Komuška	0,05	21,03	-	21,08

U dvojnoj spektrometriji masa, primjenom praćenja višestrukih reakcija (MRM prijelazi) potvrđeni su izdvojeni glukozinolati. Praćeni MRM za desulfoglukorafanin s vezanim natrijevim kationom su: 380,10 > 316; 218; 200; 184; 168.[36] Na Slici 57. je prikazan kromatogram gdje su vidljiva dva pika koja bi mogla odgovarati MRM prijelazima, no usporedbom vremena zadržavanja kod LC kromatograma, zaključeno je da pik pri 7,5 minuta pripada traženom glukozinolatu.

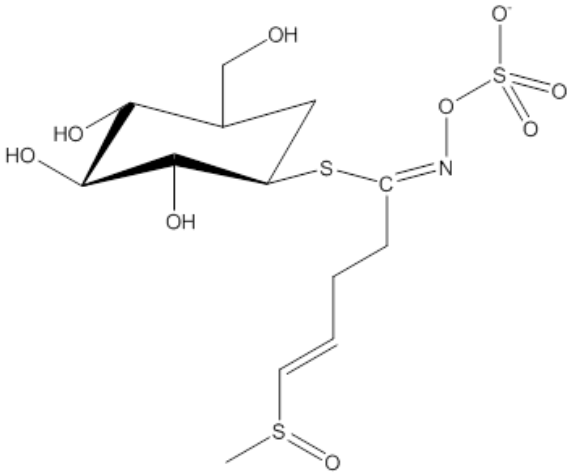


Slika 57. MRM prijelaz za desulfoglukorafanin s vezanim natrijevim kationom.

Kod potvrde desulfoglukorafenina s natrijevim kationom, primjenjeno je samo praćenje njegovog molekulskog iona, m/z = 378, čime su dobivena dva pika (Slika 58.), ali pik nižeg vremena zadržavanja nije prisutan na HPLC kromatogramu, a pri 8,4 minuta prisutan je u oba slučaja što potvrđuje ciljani glukozinolat.

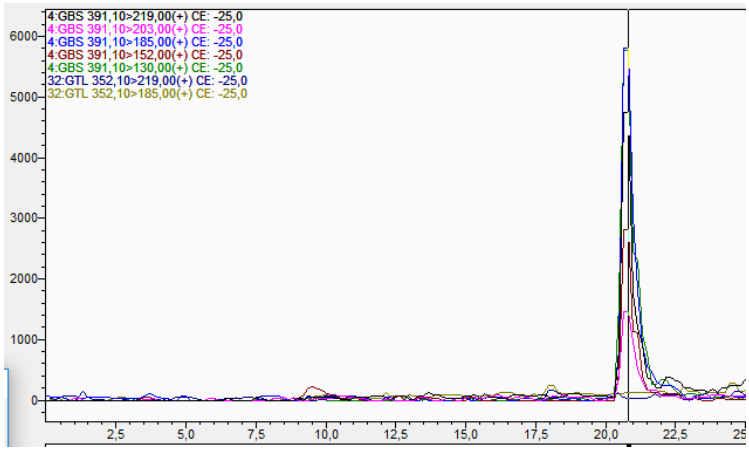


Slika 58. MRM prijelaz desulfoglukorafenin s vezanim natrijevim kationom.



Slika 59. Glukorafenin.

Iako u manjoj količini, u cvijetu sivkaste ljubičine jedino je pronađen glukobrasicin, čiji su praćeni MRM prijelazi: 391,10 > 219; 203; 185; 152; 130 (Slika 60.). Vrijeme zadržavanja podudara se na oba kromatograma (Slika 55. a) te iznosi 20,8 min.



Slika 60. MRM prijelaz desulfoglukobrasicin s vezanim natrijevim kationom.

4. ZAKLJUČAK

- U izolatima uskolisnog dvoredca dobivenog hidrodestilacijom u aparturi po Clevengeru, GC-MS analizom preko razgradnih produkata identificirani su hlapljivi produkti koji mogu potjecati od prisutnih sljedećih glukozinolata: 4-metilpentil glukozinolata, glukoerucina, glukoiberverina i glukotropeolina.
- Analizom s HPLC-PDA-MS/MS tehnikom potvrđena je prisutnost glukoerucina, dok je identificiran i glukorafanin, čiji razgradni produkti nisu identificirani GC-MS tehnikom, vjerojatno zbog njihove termičke nestabilnosti.
- GC-MS analiza hlapljivih izolata uskolisnog dvoredca dobivenih destilacijom i ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima, ukazuju da se glavni glukozinolat glukoerucin razlaže različito tj. 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanat je bio glavni produkt dobiven hidrodestilacijom, dok je 5-(metilsulfanil)pentanonitril bio dominantan razgradni produkt dobiven izolacijom potpomognutom mikrovalovima.
- U sjemenu uskolisnog dvoredca preko desulfatiziranih glukozinolata identificirani i kvantificirani su: glukorafanin (0,63 μmol/g) i glukoerucin (15,85 μmol/g); u stabljici glukorafanin (2,49 μmol/g) i glukoerucin (12,28 μmol/g); u cvijetu glukorafanin (2,83 μmol/g) i glukoerucin (12,07 μmol/g); te listu glukorafanin (1,43 μmol/g) i glukoerucin (5,62 μmol/g).
- Analizom s HPLC-PDA-MS/MS tehnikom desulfoglukozinolata utvrđena je prisutnost glukorafenina kao glavnog glukozinolata te glukorafanin i glukobrasicina u izolatima sivkaste ljubičine.
- U cvijetu sivkaste ljubičine preko desulfatiziranih glukozinolata identificirani i kvantificirani su: glukorafanin (0,08 μmol/g), glukorafenin (15,80 μmol/g) i glukobrasicin (0,39 μmol/g); u stabljici glukorafanin (u tragovima) i glukorafenin (5,21 μmol/g); u listu glukorafanin (u tragovima) i glukorafenin (1,35 μmol/g); u komušci glukorafanin (0,05 μmol/g), glukorafenin (21,03 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. *J Essent Oil Res* **24** (2012) str. 393-434.
3. Zekić M., *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae, Doktorska disertacija* Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2013.
4. Blažević, I. *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae, doktorska disertacija* Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
5. Fahey J. W., Zalcmann A. T., Talalay P., *Phytochemistry* **56** (1) 2012 str. 5-51.
6. Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., & Rollin, P. (2016). Glucosinolates: Novel sources and biological potential. U *Reference Series in Phytochemistry. Glucosinolates,* 1st edition K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (ur)., Springer International Publishing, Cham (CH), str. 3-60.
7. Jerković, I. *Interna recenzirana skripta iz Kemije i tehnologije aromatičnog bilja*, Split: 2014.
8. Smith, T. K., Mithen, R., Johnson, I. T. *Carcinogenesis* **24** (2003) str. 491-495.
9. Vig, A. P., Rampal, G., Thind, T. S., Arora, S. *LWT*. **42** (2009) str. 1561-1572.
10. Jerković, I., Radonić, A. *Praktikum iz organske kemije*. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2009.
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. Lucchesi, M. E., Chemat, F., Smadja, J. J. *Chromatogr. A* **1043** (2004) str. 323–327.
14. Đulović, A., Silić, A., Vlajčević, D., Blažević, I. *Diplotaxis tenuifolia (L.) DC: Microwave extraction vs. Hidrodestilation* Vrsaljko, Domagoj ; Dejanović, Igor

; Žižek, Krunoslav (ur.)., Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, 2018. str. 149-149.

15. Dohney-Adams, T., Redeker, K., Kittipol, V., Bancroft, I., Haetley, S. E. *Development of an efficient glucosinolate extraction method,* Plant Methods 2017.
16. URL: https://www.jove.com/video/55425/a-straightforward-method-for-glucosinolate-extraction-analysis-with (preuzeto29.8.2018.)
17. URL: https://pfam.xfam.org/family/Sulfatase (preuzeto 29.8.2018.)
18. Perašin, J. *Priprava desulfoglukozinolata iz vodeno metanolnog ekstrakta kupusa za reverzno-faznu tekućinsku koromaografiju,* Diplomski rad, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet 1998.
19. Nesek, B. *Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni,* Diplomski rad.Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2004.
20. Mandarić, M. *Analitičke metode za određivanje parabena u kozmetici.* Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2016.
21. Pine, S. H. *Organska kemija.* Zagreb : Školska knjiga, Zagreb, 1994.
22. Bayemi, B. K. cheminfo2012 - Boris Kevin Bayemi- Final. *cheminfo2012.* URL: https://cheminfo2012.wikispaces.com/Boris+Kevin+Bayemi+-+Final (preuzeto 29.8.2018)
23. Galić, N., Drevenkar, V. *Interna skripta iz Kromatografije,* Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 2006.
24. Luterotti, S. *Uvod u kemijsku analizu, IX.1.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC),* URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/ (preuzeto 28.8.2018.)
25. URL:https://www.irb.hr/eng/Industry/Services/High-performance-liquid-chromatography-mass-spectrometry-hplc-ms-ms
26. Mellon, F.A. *Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation,* Encyclopedia of Food Science and Nutrition (Second Edition), 2003; str. 3739-3749.
27. Enciklopedija.hr, Krstašice URL: http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=34206 (preuzeto 31.8.2018.).

28. Priroda i biljke, Uskolisni dvoredac (Diplotaxis tenuifolia (L.) DC.) URL: https://www.plantea.com.hr/uskolisni-dvoredac/
29. Flora Croatica, *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. URL: https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=3641(preuzeto 31.8.2018.)
30. Priroda i biljke, Sivkasta ljubičina (*Matthiola incana* (L.) R. Br.) URL: https://www.plantea.com.hr/ljubicina/ (preuzeto)
31. Flora Croatica, Matthiola incana (L.) R. Br. URL: https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=6310(preuzeto)
32. Vlajčević D. *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata,* Diplomski rad, Split: Kemijsko- tehnološki fakultet, 2018.
33. Iori, R.,Wathelet, J.P., Leoni, O.,Rollin, P., Quinsac, A., Palmieri, S. *Agroindustria* **Vol.3** (2004) str. 257-266.
34. Zimmermann, N., Gerendas, J., Krumbien, A. *Mol Nutr Food Res* **51** (2007) str. 1537-1546.

6. PRILOG

6.1 Izračun konačnih koncentracija identificiranih glukozinolata

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.

6.1.1 Uskolisni dvoredac

- Uskolisni dvoredac-sjeme:

$$\text{x (GRA)} = \frac{108589{,}82}{3102{,}49105} = 35{,}01\ \mu\text{M} = 0{,}03501\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0896\ g} = \text{faktor } 16{,}74$$

$$\text{x}_t\text{(GRA)} = 0{,}03501\ \mu\text{mol} * 1{,}07 * 16{,}74 = 0{,}63\ \mu\text{mol/g}$$

$$\text{x (GER)} = \frac{2824398{,}32}{3102{,}49105} = 910{,}4\ \mu\text{M} = 0{,}9104\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0896\ g} = \text{faktor } 16{,}74$$

$$\text{x}_t\text{(GER)} = 0{,}9104\ \mu\text{mol} * 1{,}04 * 16{,}74 = 15{,}85\ \mu\text{mol/g}$$

- Uskolisni dvoredac-stabljika:

$$\text{x (GRA)} = \frac{473974{,}17}{3102{,}49105} = 152{,}77\ \mu\text{M} = 0{,}1528\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0957\ g} = \text{faktor } 15{,}67$$

$$\text{x}_t\text{(GRA)} = 0{,}1528\ \mu\text{mol} * 1{,}04 * 15{,}67 = 2{,}49\ \mu\text{mol/g}$$

$$\text{x (GER)} = \frac{2338358{,}82}{3102{,}49105} = 753{,}7\ \mu\text{M} = 0{,}7537\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0957\ g} = \text{faktor } 15{,}67$$

$$\text{x}_t\text{(GER)} = 0{,}7537\ \mu\text{mol} * 1{,}04 * 15{,}67 = 12{,}28\ \mu\text{mol/g}$$

- Uskolisni dvoredac- cvijet:

$$\text{x (GRA)} = \frac{546232{,}56}{3102{,}49105} = 176{,}06\ \mu\text{M} = 0{,}1761\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0999\ g} = \text{faktor } 15{,}02$$

$$x_t(\text{GRA}) = 0{,}1761\ \mu\text{mol} * 1{,}07 * 15{,}02 = 2{,}83\ \mu\text{mol/g}$$

$$x\ (\text{GER}) = \frac{2522633{,}61}{3102{,}49105} = 813{,}10\ \mu\text{M} = 0{,}8131\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0999\ g} = \text{faktor } 15{,}02$$

$$x_t(\text{GER}) = 0{,}8131\ \mu\text{mol} * 1{,}04 * 15{,}02 = 12{,}07\ \mu\text{mol/g}$$

- Uskolisni dvoredac- list:

$$x\ (\text{GRA}) = \frac{266240{,}54}{3102{,}49105} = 85{,}82\ \mu\text{M} = 0{,}0858\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0965\ g} = \text{faktor } 15{,}54$$

$$x_t(\text{GRA}) = 0{,}0858\ \mu\text{mol} * 1{,}07 * 15{,}54 = 1{,}43\ \mu\text{mol/g}$$

$$x\ (\text{GER}) = \frac{1079568{,}59}{3102{,}49105} = 347{,}97\ \mu\text{M} = 0{,}34797\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0965\ g} = \text{faktor } 15{,}54$$

$$x_t(\text{GER}) = 0{,}34797\ \mu\text{mol} * 1{,}04 * 15{,}54 = 5{,}624\ \mu\text{mol/g}$$

Sjeme ukupno: (0,63+15,85) µmol/g = 16,48 µmol/g

Stabljika ukupno: (2,49+12,28) µmol/g = 14,77 µmol/g

Cvijet ukupno: (2,83+12,07) µmol/g = 14,90 µmol/g

List ukupno: (1,43+5,62) µmol/g = 7,05 µmol/g

6.1.2 Sivkasta ljubičina

- Sivkasta ljubičina- cvijet:

$$\text{x (GRA)} = \frac{4029{,}06}{3102{,}49105} = 1{,}299\text{µM} = 0{,}001299\ \text{µmol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0268\ g} = \text{faktor } 55{,}97$$

$$\text{x}_t\text{(GRA)} = 0{,}001299\ \text{µmol} * 1{,}07 * 55{,}97 = 0{,}0778\ \text{µmol/g}$$

$$\text{x (GRE)} = \frac{972882{,}63}{3102{,}49105} = 313{,}58\ \text{µM} = 0{,}31358\ \text{µmol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0268\ g} = \text{faktor } 55{,}97$$

$$\text{x}_t\text{(GRE)} = 0{,}31358\ \text{µmol} * 0{,}9 * 55{,}97 = 15{,}80\ \text{µmol/g}$$

$$\text{x (GBS)} = \frac{74256{,}54}{3102{,}49105} = 23{,}934\ \text{µM} = 0{,}023934\ \text{µmol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0268\ g} = \text{faktor } 55{,}97$$

$$\text{x}_t\text{(GBS)} = 0{,}023934\ \text{µmol} * 0{,}29 * 55{,}97 = 0{,}3885\ \text{µmol/g}$$

- Sivkasta ljubičina- stabljika:

$$\text{x (GRE)} = \frac{712462{,}80}{3102{,}49105} = 229{,}6\ \text{µM} = 0{,}2296\ \text{µmol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0595\ g} = \text{faktor } 25{,}21$$

$$\text{x}_t\text{(GRE)} = 0{,}2296\ \text{µmol} * 0{,}9 * 25{,}21 = 5{,}209\ \text{µmol/g}$$

- Sivkasta ljubičina- list:

$$\text{x (GRE)} = \frac{283382{,}03}{3102{,}49105} = 91{,}34\ \text{µM} = 0{,}09134\ \text{µmol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0804\ g} = \text{faktor } 18{,}66$$

$$x_t(\text{GRE}) = 0{,}09134\ \mu\text{mol} * 0{,}9 * 18{,}66 = 0{,}0778\ \mu\text{mol/g}$$

- Sivkasta ljubičina- komuška:

$$x\ (\text{GRA}) = \frac{1787{,}4}{3102{,}49105} = 0{,}576\ \mu\text{M} = 0{,}000576\ \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0171\ g} = \text{faktor } 87{,}72$$

$$x_t(\text{GRA}) = 0{,}000576\ \mu\text{mol} * 1{,}07 * 87{,}72 = 0{,}0541\ \mu\text{mol/g}$$

$$x\ (\text{GRE}) = \frac{826351{,}87}{3102{,}49105} = 266{,}4\ \mu\text{M} = 0{,}2664\ \mu\text{mol/mL}$$

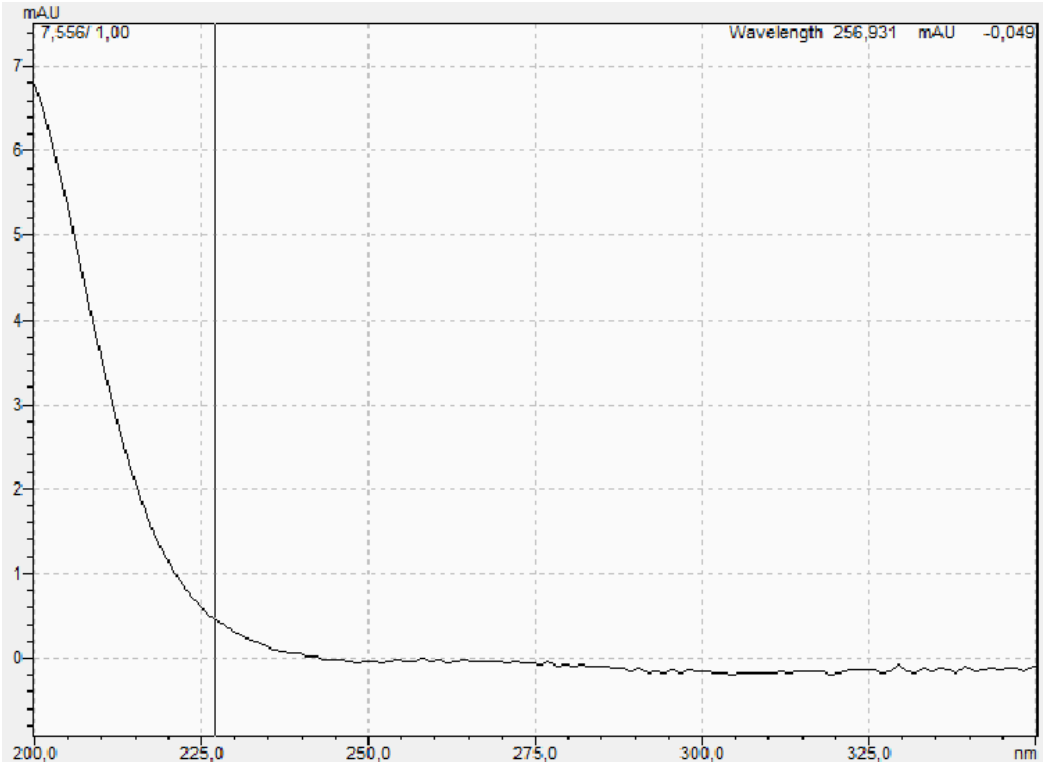
$$\frac{1{,}5\ \text{mL (voda za ispiranje)}}{0{,}0171g} = \text{faktor } 87{,}72$$

$$x_t(\text{GRE}) = 0{,}2664\ \mu\text{mol} * 0{,}9 * 87{,}72 = 21{,}03\ \mu\text{mol/g}$$

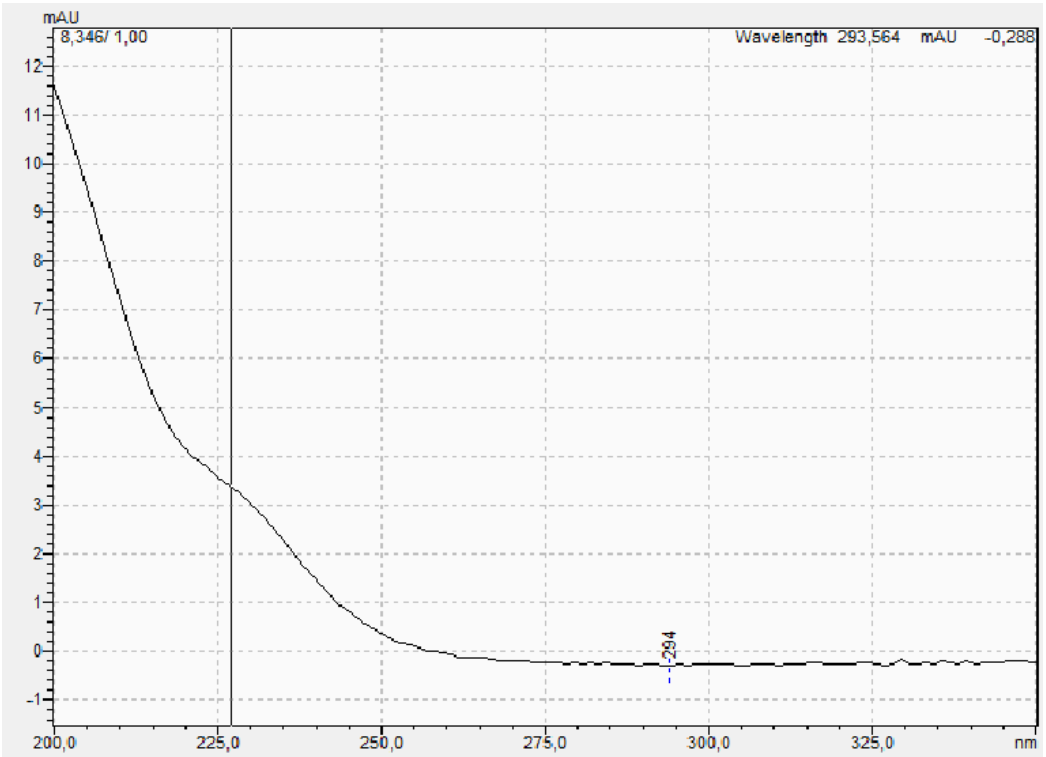
Cvijet ukupno: (0,0778+15,80) µmol/g = 16,578 µmol/g

Komuška ukupno: (0,0541+21,03) µmol/g = 21,0841 µmol/g

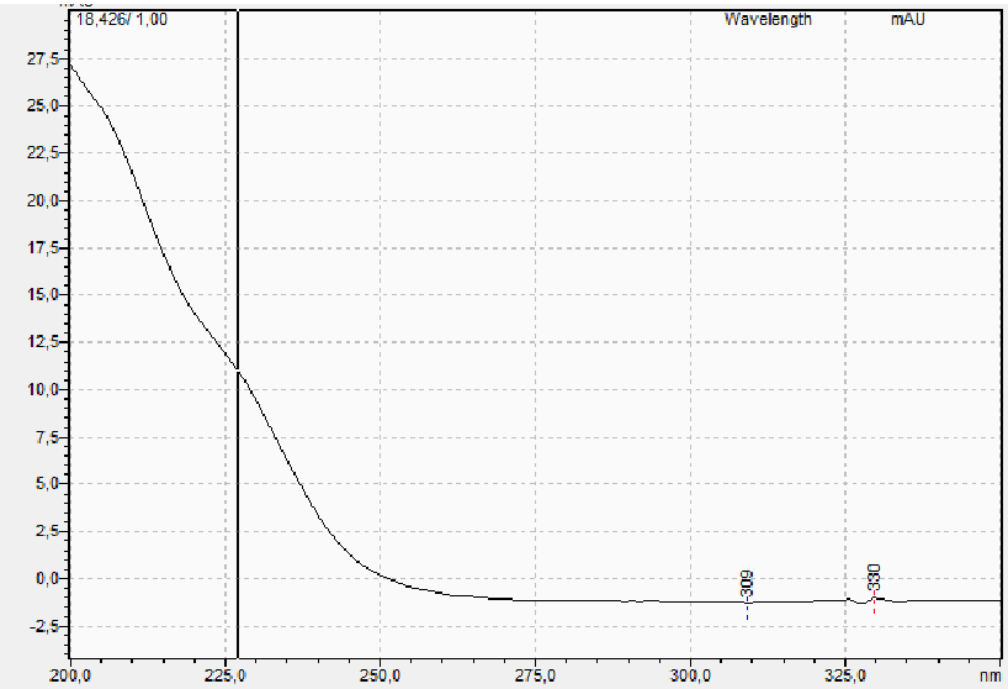
6.2 UV spektri potvrđenih glukozinolata



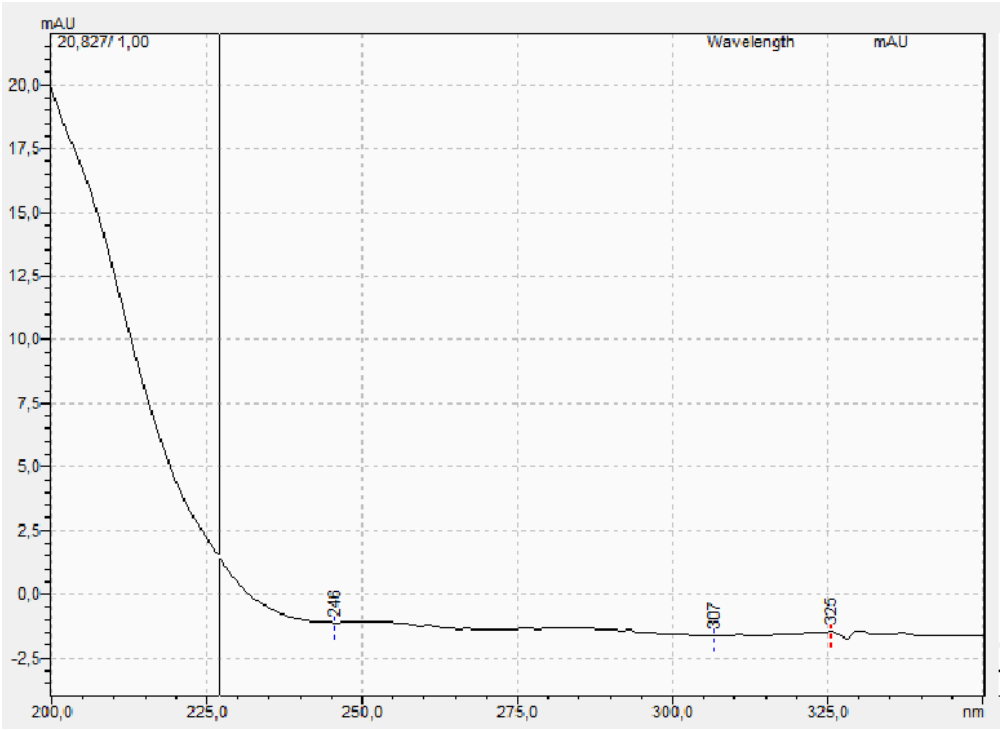
Slika 61. UV spektar karakterističan za glukorafanin pri 227 nm.



Slika 62. UV spektar karakterističan za glukorafenin pri 227 nm.



Slika 63. UV spektar karakterističan za glukoerucin pri 227 nm.



Slika 64. UV spektar karakterističan za glukobrasicin pri 227 nm.