

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH
SUMPOROVIH SPOJEVA ODABRANIH BILJAKA
PORODICE BRASSICACEAE

DIPLOMSKI RAD

ANDREA SEDLAR

Matični broj: 57

Split, srpanj 2017.

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

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH
SUMPOROVIH SPOJEVA ODABRANIH BILJAKA
PORODICE BRASSICACEAE

DIPLOMSKI RAD

ANDREA SEDLAR

Matični broj: 57

Split, srpanj 2017.

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

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE
SULPHUR COMPOUNDS FROM SELECTED
BRASSICACEAE FAMILY PLANTS

DIPLOMA THESIS

ANDREA SEDLAR

Parent number: 57

Split, July 2017.

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija, smjer Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.
Mentor: Doc. dr. sc. Ivica Blažević
Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag.chem

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH SUMPOROVIIH SPOJEVA ODABRANIH BILJAKA PORODICE BRASSICACEAE

Andrea Sedlar, 57

Sažetak: Hlapljivi sumporovi spojevi čine veliku grupu različitih vrsta koje su pronađene u čak 43 biljne porodice i 173 biljna roda, među kojima je najvažnija porodica Brassicaceae. Glukozinolati, β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem su sekundarni metaboliti identificirani u preko 16 različitih biljnih porodica. Ovim spojevima posebno obiluju biljke porodice Brassicaceae među kojima se ističe rod *Brassica*. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni, dok su komponente koje nastaju razgradnjom istih poznate po brojnim antikancerogenim, antimikrobnim i antioksidacijskim djelovanjima. Izolacija razgradnih produkata glukozinolata vrši se destilacijom i ekstrakcijom. Identifikacija glukozinolata se provodi indirektnom metodom, kojom se GC-MS analizom utvrđuje prisustvo produkata njihove razgradnje djelovanjem enzima mirozinaze. U ovom radu obrađene su dvije vrste spomenutog roda, *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L. (koraba) i *Bunias erucago* L. (čunjasti repušac). Rezultati analize *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L. pokazali su prisutnost sinigrina, glukotropeolina, glukolimnantina, glukoerucina, glukonasturcina, ali i *S*-metil-L-cistein sulfoksida karakterističnog za *Allium* vrste. Uzorci *Bunias erucago* L. su prikupljeni s dva lokaliteta; Marjan u Splitu i otok Brač (Škrip). Analizom *Bunias erucago* L. s otoka Brača ustanovljena je prisutnost samo dvije vrste glukozinolata: glukotropeolina i glukodehidroerucina dok je u biljnom materijalu *Bunias erucago* L. s Marjana prisutno pet vrsta glukozinolata: glukonapin, glukotropeolin, heptil glukozinolat, glukodehidroerucin te glukoerucin.

Ključne riječi: glukozinolati, Brassicaceae; *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L., koraba; *Bunias erucago* L., čunjasti repušac; GC-MS

Rad sadrži: 73 strane, 46 slika, 10 tablica, 0 priloga, 30 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Franko Burčul	predsjednik
2. dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur.	član
3. doc. dr. sc. Ivica Blažević	član-mentor

Datum obrane: 14. srpnja 2017.

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, orientation Organic Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.
Mentor: Ivica Blažević, PhD, Assistant professor
Technical assistance: Azra Đulović, MChem

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE SULPHUR COMPOUNDS FROM SELECTED BRASSICACEAE FAMILY PLANTS

Andrea Sedlar, 57

Abstract:

Volatile sulphur compounds make up a large group of different species found in a 43 plant families and 173 plant genera, including the most important family, Brassicaceae. Glucosinolates, β -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with variable side chains are secondary metabolites identified in over 16 different plant families. These compounds are found particularly in the Brassicaceae family, among which *Brassica* stands out. Isolation of the degraded glucosinolate products is performed by distillation and extraction. The glucosinolate identification is carried out by an indirect method by which is determined the presence of degradation products by the action of the myrosinase enzyme using GC-MS method. In this paper two different species of *Brassica* genus are processed, *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L. (kohlrabi) and *Bunias erucago* L. (crested warty cabbage). Glucosinolates are chemically and biologically inactive, while components that are formed by their degradation are known by numerous anticancer, antimicrobial and antioxidant activities. Analysis results of *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L. showed the presence of sinigrin, glucotropaeolin, glucolimnantin, glucoerucin, gluconasturitiin, but also *S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide characteristic for the *Allium* species. Samples of *Bunias erucago* L. are collected from two different locations; Marjan in Split and island Brač (Škrip). Analysis results of *Bunias erucago* L. from island Brač had shown the presence of glucotropaeoline and glucodehydroerucin while in the same plant taken from Marjan had been identified five types of glucosinolates: gluconapin, glucotropaeolin, heptyl glucosinolate, glucodehydroerucin and glucoerucin.

Keywords: Glucosinolates; Brassicaceae; *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L., kohlrabi; *Bunias erucago* L., crested warty cabbage; GC-MS

Thesis contains: 73 pages, 46 figures, 10 tables, 0 supplements, 30 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Franko Burčul, PhD, Assistant professor	chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD	member
3. Ivica Blažević, PhD, Assistant professor	supervisor

Defence date: July 14, 2017

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivice Blaževića i neposrednim voditeljstvom Azre Đulović, mag.chem., u razdoblju od ožujka do lipnja 2017. godine.

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

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Ivici Blaževiću koji mi je omogućio izvođenje diplomskog rada na Zavodu za organsku kemiju, strpljivo me vodio u procesu izrade te mi pomogao svojim stručnim savjetima. Zahvaljujem se i asistentici, Azri Đulović mag. chem. na nesebičnoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog rada, svakodnevnom dijalogu i diskusijama, a povrh svega na prijateljski posvećenom vremenu.

Posebno se želim zahvaliti svojim roditeljima, sestrama te dečku i prijateljima na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju tokom cijelog školovanja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Izolirati isparljive sumporove spojeve prisutne u biljkama porodice Brassicaceae (*Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* (L.) Janch. i *Bunias erucago* L.) korištenjem hidrodestilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i ekstrakcijom s diklormetanom.
2. Identifikaciju hlapljivih izolata napraviti korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS). Poseban naglasak je na indirektnoj identifikaciji prisutnih glukozinolata u dijelovima biljaka utvrđenoj preko njihovih razgradnih produkata.

SAŽETAK

Hlapljivi sumporovi spojevi čine veliku grupu različitih vrsta koje su pronađene u čak 43 biljne porodice i 173 biljna roda, među kojima je najvažnija porodica Brassicaceae. Glukozinolati, β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem su sekundarni metaboliti identificirani u preko 16 različitih biljnih porodica. Ovim spojevima posebno obiluju biljke porodice Brassicaceae među kojima se ističe rod *Brassica*. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni, dok su komponente koje nastaju razgradnjom istih poznate po brojnim antikancerogenim, antimikrobnim i antioksidacijskim djelovanjima. Izolacija razgradnih produkata glukozinolata vrši se destilacijom i ekstrakcijom. Identifikacija glukozinolata se provodi indirektnom metodom, kojom se GC-MS analizom utvrđuje prisustvo produkata njihove razgradnje djelovanjem enzima mirozinaze. U ovom radu obrađene su dvije vrste spomenutog roda, *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L. (koraba) i *Bunias erucago* L. (čunjasti repušac). Rezultati analize *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L. pokazali su prisutnost sinigrina, glukotropeolina, glukolimnantina, gluukoerucina, glukonasturcina, ali i *S*-metil-L-cistein sulfoksida karakterističnog za *Allium* vrste. Uzorci *Bunias erucago* L. su prikupljeni s dva lokaliteta; Marjan u Splitu i otok Brač (Škrip). Analizom *Bunias erucago* L. s otoka Brača ustanovljena je prisutnost samo dvije vrste glukozinolata: glukotropeolina i glukodehidroerucina dok je u biljnom materijalu *Bunias erucago* L. s Marjana prisutno pet vrsta glukozinolata: glukonapin, glukotropeolin, heptil glukozinolat, glukodehidroerucin te gluukoerucin.

Ključne riječi: glukozinolati, Brassicaceae; *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L., koraba; *Bunias erucago* L., čunjasti repušac; GC-MS

SUMMARY

Volatile sulphur compounds make up a large group of different species found in a 43 plant families and 173 plant genera, including the most important family, Brassicaceae. Glucosinolates, β -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with variable side chains are secondary metabolites identified in over 16 different plant families. These compounds are found particularly in the Brassicaceae family, among which *Brassica* stands out. Isolation of the degraded glucosinolate products is performed by distillation and extraction. The glucosinolate identification is carried out by an indirect method by which is determined the presence of degradation products by the action of the myrosinase enzyme using GC-MS method. In this paper two different species of *Brassica* genus are processed, *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L. (kohlrabi) and *Bunias erucago* L. (crested warty cabbage). Glucosinolates are chemically and biologically inactive, while components that are formed by their degradation are known by numerous anticancer, antimicrobial and antioxidant activities. Analysis results of *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L. showed the presence of sinigrin, glucotropaeolin, glucolimnantin, glucoerucin, gluconasturitiin, but also *S*-methyl-L-cysteine sulfoxide characteristic for the *Allium* species. Samples of *Bunias erucago* L. are collected from two different locations; Marjan in Split and island Brač (Škrip). Analysis results of *Bunias erucago* L. from island Brač had shown the presence of glucotropaeoline and glucodehydroerucin while in the same plant taken from Marjan had been identified five types of glucosinolates: gluconapin, glucotropaeolin, heptyl glucosinolate, glucodehydroerucin and glucoerucin.

Keywords: glucosinolates; Brassicaceae; *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* L., kohlrabi; *Bunias erucago* L., crested warty cabbage; GC-MS

Sadržaj

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. HLAPLJIVI SPOJEVI ZASTUPLJENI U BILJKAMA	2
1.2. HLAPLJIVI SUMPOROVI SPOJEVI.....	2
1.3. KLASIFIKACIJA HLAPLJIVIH SUMPOROVIH SPOJEVA.....	3
1.4. GLUKOZINOLATI.....	4
1.4.1. Struktura i nomenklatura glukozinolata.....	6
1.4.2. Vrste glukozinolata	7
1.5. BIOSINTEZA GLUKOZINOLATA	10
1.6. RAZGRADNJA GLUKOZINOLATA.....	12
1.6.1. Enzimska razgradnja glukozinolata	12
1.6.2. Razgradni produkti	14
1.6.3. Neenzimska razgradnja glukozinolata	17
1.7. BIOLOŠKI ZNAČAJ GLUKOZINOLATA.....	18
1.7.1. Antikancerogeno djelovanje	18
1.7.2. Antioksidacijsko djelovanje.....	19
1.7.3. Antimikrobno i antifugalno djelovanje.....	20
1.7.4. Štetno djelovanje.....	20
1.8. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA	21
1.8.1. Destilacija	21
1.8.2. Ekstrakcija	23
1.9. METODE IDENTIFIKACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA	24
1.9.1. Kromatografija.....	24
1.9.2. Podjela kromatografskih metoda	24
1.9.3. Plinska kromatografija.....	26
1.10. SPEKTROMETRIJA MASA.....	28

1.10.1.	Ionizacija.....	28
1.10.2.	Razdvajanje i određivanje.....	28
1.11.	GC-MS	30
1.12.	BRASSICACEAE	32
1.12.1.	Koraba (<i>Brassica rupestris</i> Raf. ssp. <i>gongyloides</i> (L.) Janch.)	34
1.12.2.	Čunjasti repušac (<i>Bunias erucago</i> L.).....	35
2.	EKSPERIMENTALNI DIO	36
2.1.	KEMIKALIJE I APARATURA	36
2.2.	PRIPREMA BILJNOG MATERIJALA	37
2.2.1.	Koraba (<i>Brassica rupestris</i> Raf. ssp. <i>gongyloides</i> (L.) Janch.)	37
2.2.2.	Čunjasti repušac (<i>Bunias erucago</i> L.).....	39
2.3.	DESTILACIJA.....	40
2.4.	UPARAVANJE U STRUJI DUŠIKA	42
2.5.	EKSTRAKCIJA	43
2.6.	GC-MS ANALIZA	44
3.	REZULTATI I RASPRAVA	45
3.1.	REZULTATI GC-MS ANALIZE HLAPLJIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U UZORCIMA KORABE	46
3.1.1.	Kromatogram i tablični prikaz identificiranih hlapljivih spojeva.....	46
3.1.2.	Maseni spektri izotiocijanata	51
3.1.3.	Maseni spektri nitrila	54
3.1.4.	Maseni spektri sulfida	57
3.2.	REZULTATI GC-MS ANALIZE HLAPLJIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U UZORCIMA <i>BUNIAS ERUCAGO</i> L.....	59
3.2.1.	Kromatogram i tablični prikaz svih identificiranih hlapljivih spojeva pronađenih kod biljke <i>Bunias erucago</i> L. s otoka Brača.....	60
3.2.2.	Maseni spektri nitrila	62

3.2.3.	Kromatogram i tablični prikaz svih identificiranih hlapljivih spojeva identificiranih u biljci <i>Bunias erucago</i> L. s Marjana u Splitu	63
3.2.4.	Maseni spektri izotiocijanata	66
4.	ZAKLJUČAK.....	69
5.	LITERATURA.....	71

UVOD

Biljke porodice Brassicaceae sadrže brojne hlapljive spojeve velike raznolikosti. Među važnijim spojevima koji se nalaze u većini biljaka ove porodice su glukozinolati. Glukozinolati su β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati (poznati još i kao *Z-N*-hidroksiminosulfatni esteri ili *S*-glukopiranozil tihidroksimati) s varijabilnim bočnim lancem. Ovi spojevi su pronađeni u čak 16 biljnih porodica reda Capparales, od kojih je najvažnija porodica Brassicaceae koja sadrži više od 350 rodova i 3000 vrsta. Među brojnim rodovima posebno se ističe rod *Brassica* koji obuhvaća niz biljaka prisutnih u svakodnevnoj prehrani. Glukozinolati se biosintetiziraju iz aminokiselina te su klasificirani ovisno o prekursoru u biosintezi te strukturnim značajkama. Oni su biološki neaktivni i inertni sve dok ne dođe do mehaničke, kemijske ili toplinske destrukcije biljnih stanica u kojima se isti nalaze prilikom čega zahvaljujući oslobađanju enzima mirozinaze dolazi do razgradnje glukozinolata na isparljive, biološki aktivne produkte. Najvažniji produkti su izotiocijanati, tiocijanati, nitrili i indoli. Izolaciju spomenutih hlapljivih komponenti je moguće vršiti destilacijom i ekstrakcijom, a njihovo dokazivanje i identifikaciju primjenom preciznih metoda poput vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS). (1-3)

1. OPĆI DIO

1.1. HLAPLJIVI SPOJEVI ZASTUPLJENI U BILJKAMA

Proučavanjem hlapljivih spojeva oslobođenih iz biljke, utvrđena je njihova velika raznolikost. Smjesa biljnih isparljivih spojeva može sadržavati i nekoliko stotina različitih vrsta. Neke od njih su prisutne kod većine biljaka dok postoje i one koje karakteriziraju točno određenu biljnu porodicu. Većina pronađenih hlapljivih spojeva ima određene biološke značajke koje su čest predmet istraživanja. Veliki dio takvih spojeva je klasificiran u četiri glavne skupine, a to su: terpenoidi, derivati masnih kiselina, benzenoidi i spojevi koji sadrže dušik i/ili sumpor. Terpenoidi mogu nastati preko dva biosintetska puta- mevalontni i metileritritol-4-fosfatni put. (1) Njihova struktura obuhvaća međusobno povezane izoprenske (C₅) jedinice, prema izoprenskom pravilu, a klasificirani su po veličini. (4) Derivati masnih kiselina obuhvaćaju brojne alifatske alkohole, aldehide i estere koji su često nazvani hlapljivim spojevima zelenog lišća, a nastaju oksidacijom lipida. Benzenoidi nastaju biosintezom iz fenilalanina preko benzojeve kiseline, a najčešće se oslobađaju iz biljnih cvjetova. Spojevi s dušikom i/ili sumporom obuhvaćaju veliki broj spojeva koji nastaju biosintezom iz aminokiselina. (1)

1.2. HLAPLJIVI SUMPOROVİ SPOJEVI

Hlapljivi sumporovi spojevi čine veliku grupu različitih vrsta koje su pronađene u čak 43 biljne porodice i 173 biljna roda, među kojima su najvažnije porodice Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae, Phytolaccaceae i Poaceae. Različito su koncentrirani u svim biljnim dijelovima, a njihov ukupan sadržaj u određenoj biljci ovisi o njenoj vrsti te uvjetima rasta. Prema kemijskoj strukturi, sumporovi hlapljivi spojevi obuhvaćaju niz jednostavnih, do poprilično složenih vrsta. S obzirom na njihovu veliku zastupljenost u biljnim vrstama, često su predmet istraživanja u svrhu ispitivanja njihovog biološkog značaja. (5)

1.3. KLASIFIKACIJA HLAPLJIVIH SUMPOROVIH SPOJEVA

Spojevi su klasificirani s obzirom na broj sumporovih atoma prisutnih u njihovoj strukturi. Na taj način su formirane četiri glavne grupe hlapljivih sumporovih spojeva. Prva grupa obuhvaća one spojeve koji u svojoj strukturi sadrže po jedan atom sumpora (S_1), druga grupa je sačinjena od niza spojeva s dva sumporova atoma u strukturi (S_2), treća s tri (S_3) i analogno četvrta grupa s četiri sumporova atoma u strukturi (S_4). Navedene glavne grupe su dalje podijeljene s obzirom na prisutnost heteroatoma (dušika i kisika) te s obzirom na oblik molekule. Izotiocijanati i tiocijanati predstavljaju posebnu grupu sumporovih hlapljivih spojeva. (5)

1.4. GLUKOZINOLATI

Glukozinolati su β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati (poznati još i kao *Z-N*-hidroksiminosulfatni esteri ili *S*-glukopiranozil tiohidroksimati) s varijabilnim bočnim lancem. (2) Predstavljaju skupinu β -tioglukozidnih sekundarnih metabolita koji se uz brojne druge spojeve ubrajaju u grupu cijanogenih glukozida. (1) Prva istraživanja glukozinolata obavljena su još u 17. stoljeću u pokušaju objašnjenja oštrog okusa gorušice. Kasnije, 1959. godine, istraživanjima je pojašnjena uloga enzima mirozinaze kod pretvorbe glukozinolata u izotiocijanate. Prva struktura glukozinolata predložena je od strane Gadamera 1897., a tek je 1956. dokazana neispravnost njegove teorije kada su glukozinolatu strukturu točno, ali još ne u cijelosti objasnili Ettlinger i Lundeen. Nepotpunost njihove teorije krila se u nemogućnosti objašnjenja geometrije izomerizacije C=N veze, za koju je 1970. ustanovljeno da se radi o *Z*-konformaciji. Glukozinolati, trivijalnih imena sinigrin (prop-2-en-1-il ili alilglukozinolat) i sinalbin (4-hidroksibenzilglukozinolat) izolirani su još 1830. iz sjemena crne (*Brassica nigra*) i bijele (*Sinapis alba*) gorušice. (2)

Glukozinolati su pronađeni u čak 16 biljnih porodica reda Capparales, od kojih je najvažnija porodica Brassicaceae. Ova porodica 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 osim o njihovoj vrsti, ovisi i o vrsti uzgoja, klimi te agronomskoj praksi. Razlike u sadržaju glukozinolata se javljaju i među parcijalnim djelovima pojedine 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. (1)

Studije su pokazale kako je kod povrća roda *Brassica* visoka koncentracija indolnih glukozinolata, glukobrasicina i neoglukobrasicina te alifatskih glukozinolata sa sumporom u bočnom lancu, glukoiiberina i glukorafanina. (1)

Karakteristika svih glukozinolata je kemijska stabilnost i biološka neaktivnost koja je prisutna sve dok ne nastupi kemijska, mehanička ili termička obrada biljke. Opsežnim istraživanjima je potvrđeno kako su glukozinolati smješteni u vakuolama biljnih stanica, dok su mirozinaze stacionirane u specifičnim „mirozinskim stanicama“

čije vakuole ne sadrže glukozinolate. Time je pokazano kako su glukozinolati i mirozinaze odvojeni te da je za njihovu interakciju potrebna određena destrukcija biljnih stanica. Mehaničkom obradom biljke pa čak i branjem i žvakanjem dolazi do ostvarivanja kontakta između enzima i glukozinolata. (1, 6, 3) Njihova interakcija uz prisustvo vode rezultira hidrolizom glukozinolata prilikom čega se oslobađaju brojni biološki aktivni spojevi poput nitrila, izotiocijanata, cijanida te oksazolidintiona. (3)

Priroda produkata hidrolize ovisi o brojnim faktorima poput pH vrijednosti okoline, temperature, prisutnosti metalnih iona, prisutnosti specifičnih proteina te o svojstvima glukozinolatnog bočnog lanca. (7) Upravo su ti razgradni produkti odgovorni za brojna antioksidacijska, antikancerogena, antimikrobna i antifugalna svojstva. Osim pozitivnih bioloških učinaka, pojedini produkti razgradnje glukozinolata pokazuju i toksična svojstva poput karcinogenih svojstava te štetnog učinka na štitnjaču i jetru, a često su povezani i s pojavom gušavosti. Enzim mirozinaza u kontakt s glukozinolatima dolazi često i djelovanjem različitih štetočina na biljku. (6, 3)

Svi glukozinolati imaju određene zajedničke strukturne osobine, a dosad je otkriveno preko 120 različitih vrsta koje su klasificirane prema strukturi bočnog lanca koji je individualan kod svake od njih. (1, 2)

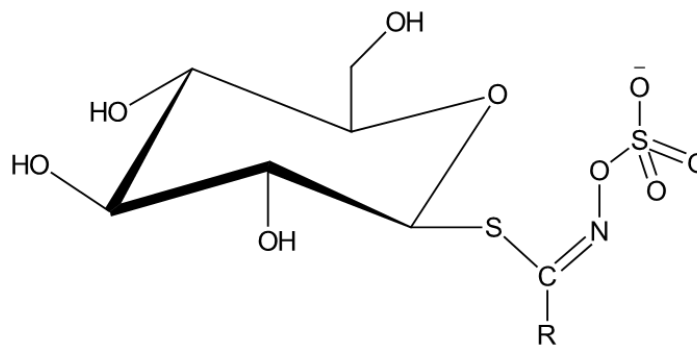
1.4.1. Struktura i nomenklatura glukozinolata

Glukozinolati su topljivi u vodi organski anioni koji u svojoj strukturi imaju prepoznatljive zajedničke skupine, ali i skupinu prema kojoj su individualizirani. Tako se struktura glukozinolata (Slika 1.1.) može sažeti u tri komponente:

- 1) β -D-glukopiranska jedinica
- 2) O-sulfonirana anomerna Z-tiohidroksimatska funkcijska skupina
- 3) Varijabilni aglukonski bočni lanac.

Većina glukozinolata sadrži ravni ili razgranati ugljikovodični lanac. Često su u strukturi prisutne i dvostruke veze, hidroksilne i karbonilne skupine te kovalentno vezani sumpor. Čak jedna trećina glukozinolata u svojoj strukturi sadrži atom sumpora u raznim oksidacijskim stanjima. Također određeni dio benzilnih glukozinolata u strukturi posjeduju šećere ramnozu i arabinozu koje su glikozidnom vezom povezane s aromatskim prstenom. (8)

Glukozinolati se u prirodi pojavljuju u obliku kalijevih i natrijevih soli koje su topljive u vodi što omogućava izolaciju. (1)



Slika 1.1. Opća struktura glukozinolata

Pri imenovanju glukozinolata koriste se trivijalna imena, ali i polusistematska nomenklatura koju su uveli Ettliger i Dateo 1961. godine. Trivijalna nomenklatura se zasniva na dodavanju prefiksa „gluko“ i sufiksa „in“ latinskom imenu biljke iz koje je pojedini glukozinolat prvi put izoliran. Ime dobiveno primjenom polusistematske nomenklature se sastoji od sufiksa „glukozinolat“ i prefiksa koji odgovara nomenklaturi bočnog lanca (R). (1, 3)

1.4.2. Vrste glukozinolata

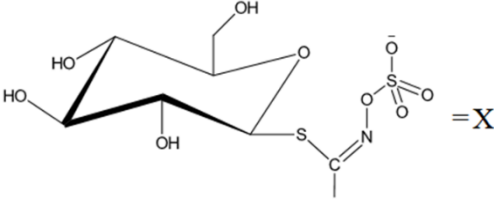


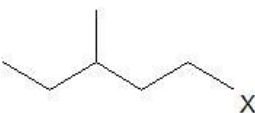


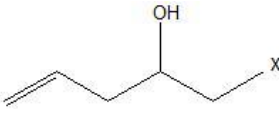
S obzirom da svi glukozinolati u svojoj strukturi imaju β -D-glukopiranozni prsten povezan preko sumpora s *Z-N*-hidroksiminosulfatnim esterom, razlikuju se s obzirom na strukturu bočnog lanca. Bočni lanac može potjecati od aminokiseline u njenom osnovnom ili modificiranom obliku. Tako su glukozinolati podijeljeni s obzirom na biosintetski prekursor, ali i s obzirom na strukturnu sličnost. (9)

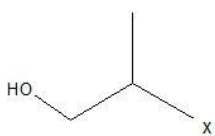


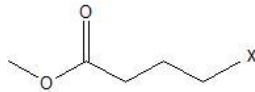
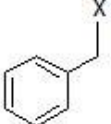
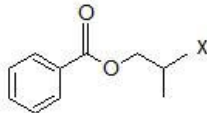
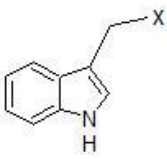
Ovisno o prekursoru aglukonskog lanca, glukozinolati su klasificirani na alifatske, arilalifatske i indolne. Varijabilnost aglukonskog lanca ovisi o vrsti aminokiseline od koje isti potječe. Ako aglukonski lanac potječe od aminokiselina alanin (Ala), leucin (Leu), izoleucin (Ile), valin (Val) ili metionin (Met), riječ je o alifatskim glukozinolatima. Kod aril alifatskih je aglukonski prekursor fenilalanin (Phe) ili tirozin (Tyr), a podrijetlo aglukonskog lanca kod indolnih glukozinolata je aminokiselina triptofan (Trp). (8)

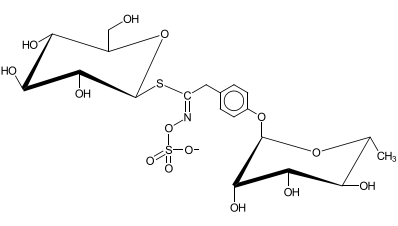
Veliki broj dosad identificiranih glukozinolata je grupiran u različite skupine s obzirom na njihova zajednička strukturna svojstva. Najčešće proučavani su alifatski, ω -metiltioalkilni, aromtanski i heterolitični glukozinolati. (2)

Klasifikacija glukozinolata obzirom na zajednička strukturna obilježja pojedinih vrsta, s po jednim primjerom, prikazana je niže u tablici 1. (3)

Tablica 1. Klasifikacija glukozinolata s obzirom na strukturne značajke

ZAJEDNIČKI DIO STRUKTURE ZA SVE GLUKOZINOLATE		
		
KLASIFIKACIJSKA GRUPA	NAZIV SPOJA	STRUKTURA
Glukozinolati sa sumporom u bočnom lancu	Glukoerucin	
Glukozinolati s alifatskim nerazgranatim bočnim lancem	Pentil-glukozinolat	
Glukozinolati s alifatskim razgranatim bočnim lancem	3-metilpentil-glukozinolat	
Glukozinolati s nerazgranatim olefinskim bočnim lancem (nerazgranati)	Sinigrin	
Glukozinolati s razgranatim olefinskim bočnim lancem	3-metil-3-butenil glukozinolat	
Glukozinolati s olefinskim bočnim lancem (alkoholi)	2-hidroksi-4-pentenil glukozinolat	
Glukozinolati s		

alifatskim bočnim lancem (razgranati alkoholi)	1-metil-2-hidroksietil glukozinolat	
Glukozinolati s alifatskim bočnim lancem (nerazgranati alkoholi)	3-hidroksipropil glukozinolat	
Glukozinolati s alifatskim bočnim lancem (keton)	5-Oksuheptil glukozinolat	
Glukozinolati s alifatskim bočnim lancem (ester)	3-metoksikarbonilpropil glukozinolat	
Glukozinolati s aromatskim bočnim lancem	Glukotropeolin	
Glukozinolati s benzoatima kao bočnim lancima	Benziloksi-1-metiletil glukozinolat	
Glukozinolati s indolnim bočnim lancem	indol-3-ilmetil glukozinolat	

<p>Glukozinolati s glikoziliranim bočnim lancem</p>	<p>Glukomoringin</p>	
--	----------------------	--

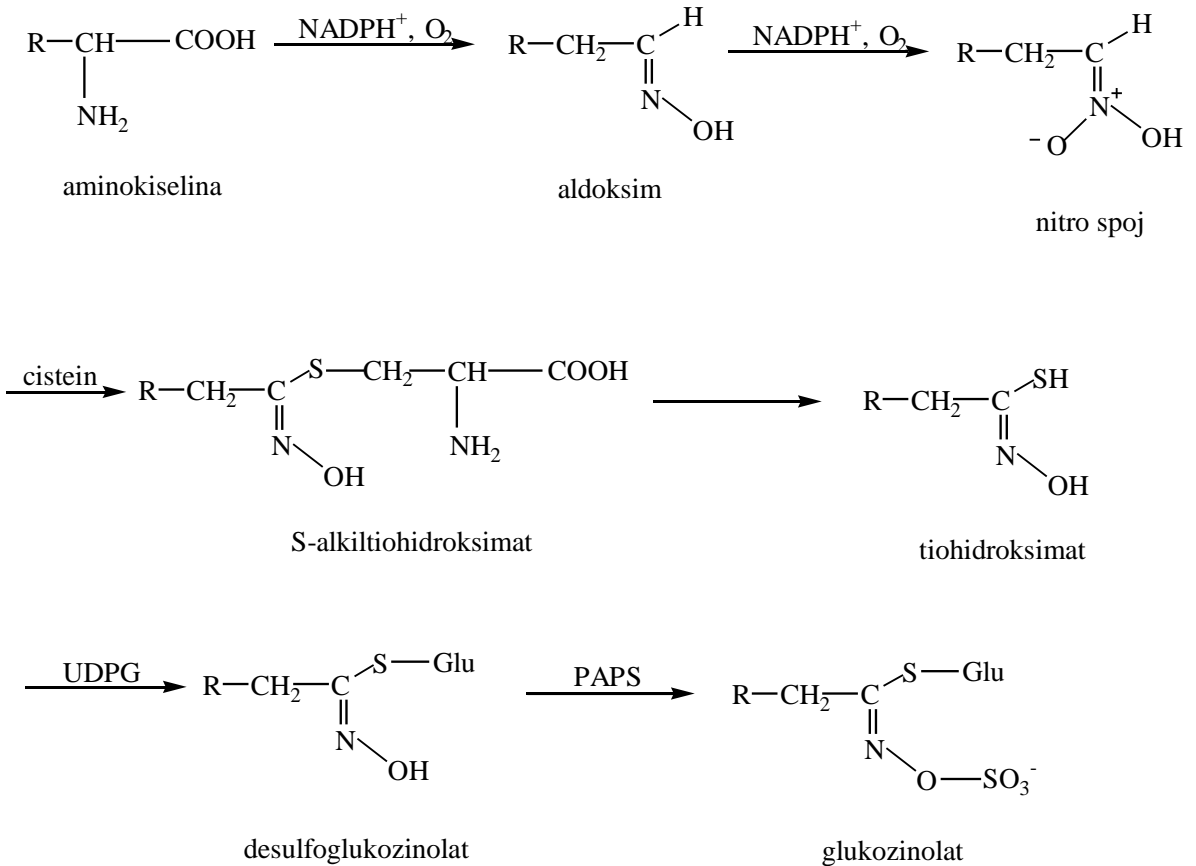
1.5. BIOSINTEZA GLUKOZINOLATA

Kjaer i Conti su 1954. godine na temelju prethodnih istraživanja te na temelju sličnosti ugljikovog skeleta između nekih aminokiselina i glukozinolata, pretpostavili da su aminokiseline prirodni prekursori aglukonskog dijela glukozinolata. (1) Međutim, aminokiselinske prekursore ima samo osam glukozinolata (1), a ostatak ih nastaje iz aminokiselina modificiranih produljenjem bočnog lanca. (3) Biosinteza glukozinolata je reakcija koja uključuje tri faze:

- 1) Elongaciju
- 2) Pretvorbu aminokiseline u glukozilatnu strukturu
- 3) Modifikaciju bočnog lanca. (3)

Elongacija podrazumijeva reakciju produljenja aminokiselinskog lanca ugradnjom dodatnih metilenskih grupa u bočni lanac. Prvi korak biosinteze je oksidacija aminokiseline koja se odvija uz pomoć brojnih enzima. Nakon oksidacije, slijedi kondenzacija s acetil-CoA, izomerizacija, oksidacija te dekarboksilacija. Posljedica nabrojanih reakcija je 2-okso kiselina s jednom metilenskom skupinom više u odnosu na početnu aminokiselinu. (3) Pretvorba aminokiseline u glukozilatnu strukturu (Slika 1.2.) započinje pretvorbom aminokiseline u aldoksim. Oksidacijom aldoksima, nastaje još neidentificirani nitro spoj koji u reakciji s cisteinom daje *S*-alkiltiohidroksimat. Enzim C-S liaza potom katalizira cijepanje *S*-alkiltiohidroksimata te nastaje tiohidroksimat. U posljednjem stupnju ovog koraka odvija se glukozilacija pomoću uridin-difosfat (UDP) glukoze čime nastaje desulfoglukozinolat te njegova sulfatacija do glukozinolata pomoću visokoenergetskog sulfatnog donora, 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfata (PAPS). (1, 3) Zadnji stupanj biosinteze uključuje niz modifikacija bočnog lanca osnovnog glukozinolata. Modifikacije podrazumijevaju niz reakcija poput oksidacije, hidroksilacije, alkenilacije, acilacije i esterifikacije. Aminokiselinski bočni

lanac koji potječe od metionina je posebno sklon daljnjim modifikacijama poput postupne oksidacije atoma sumpora u metiltioalkilnom bočnom lancu u metilsulfinilalkil ili metilsulfonilalkil. Oksidacijsko cijepanje metilsulfinilalkil bočnog lanca rezultira dobivanjem alkenilskih i hidroksialkenilskih lanaca. (3)



Slika 1.2. Pojednostavljena shema drugog biosintetskog stupnja (3)

1.6. RAZGRADNJA GLUKOZINOLATA

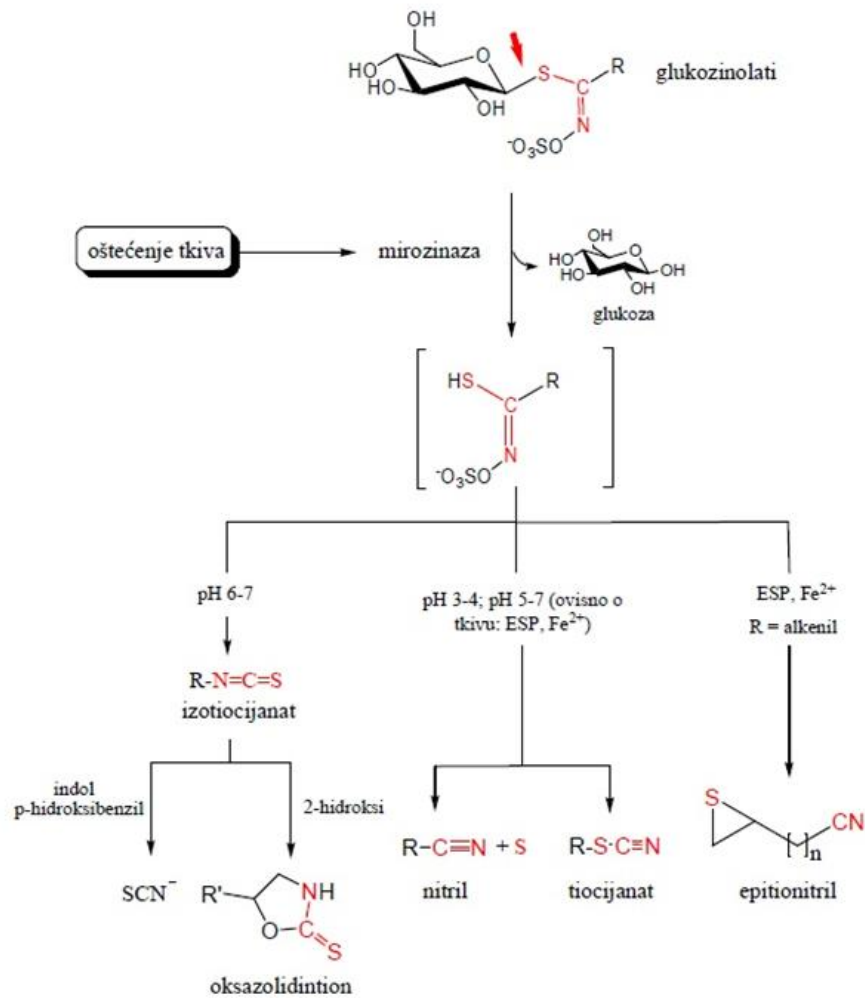
Razgradnja glukozinolata je nužna za aktivaciju brojnih bioloških utjecaja koje posjeduju njihovi razgradni produkti. Naime, kako je već spomenuto, glukozinolati su u svom osnovnom obliku jako stabilni i biološki beznačajni. Međutim, ostvarivanjem kontakta s enzimom mirozinazom te hidrolizom glukozinolata nastaju određeni produkti koji imaju iznimno veliko biološko i farmakološko značenje. Osim enzimske razgradnje, glukozinolati se mogu razgraditi i kemijski i to pod utjecajem kiselina ili baza. (3)

1.6.1. Enzimska razgradnja glukozinolata

Mirozinaza (tioglukozid-glukohidrolaza) je u biljci prvi put otkrivena 1840. godine kada je A. Bussy prilikom proučavanja biljke *B. nigra* otkrio supstancu koja sudjeluje u hidrolizi glukozinolata singrina te je opisao kao „albuminu sličnu“. Kasnije je dokazana aktivnost mirozinaze kod svih biljaka koje sadrže glukozinolate. (3) Iako postoji veliki broj vrsta ovih enzima, koje se mogu razlikovati čak i unutar jedne biljke, svi imaju sličnu funkciju. Tako mirozinaza zapravo predstavlja skup enzima koji sudjeluju u hidrolizi glukozinolata prema kojima pokazuju izrazitu specifičnost. (1, 3) Osim u biljkama, one su identificirane i u nekim bakterijama i gljivama. (1) Enzimi su lokalizirani u unutrašnjosti mirozinskih zrnaca, a glukozinolati u proteinskim tijelima (vakuolama) nemirozinskih stanica. Kao što je već spomenuto, enzimi i glukozinolati su u svom osnovnom obliku fizički odvojeni. (3)

Enzimska razgradnja (Slika 1.3.) pod utjecajem mirozinaze rezultira nastankom glukoze-glukona i nestabilnog međuprodukta, aglukona. Aglukon daljnjom pregradnjom daje razne razgradne produkte čija vrsta ovisi o strukturi bočnog lanca, prisustvu kofaktora i uvjetima hidrolize. Najpoznatiji biološki aktivni spojevi koji nastaju hidrolizom glukozinolata su izotiocijanati i indoli, a osim njih, glukozinolati su često deklarirani kao prekursori tiocijanata, spojeva koji sadrže sumpor te nitrila koji nemaju sumpor u svojoj strukturi. Kod utjecaja uvjeta u kojima se hidroliza odvija, posebno je važna pH vrijednost. Naime, pri pH=7 dolazi do Lossenove pregradnje te su glavni razgradni produkti izotiocijanati. Oni 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 Fe²⁺. Tako će u uvjetima prisutnosti fero iona nastati nitrili bez obzira na pH vrijednost. Nastajanje

tiocijanata ovisi o strukturi bočnog lanca aglukona. Ukoliko je u njegovom bočnom lancu prisutna terminalna dvostruka veza te se u njenoj okolini nađe ferio ion i epitiospecifični protein, nastaju epitionitri. Izotiocijanati i nitrili također nastaju hidrolizom alifatskih glukozinolata koji imaju sumpor u bočnom lancu. (3)



Slika 1.3. Opća shema enzimske razgradnje glukozinolata (1)

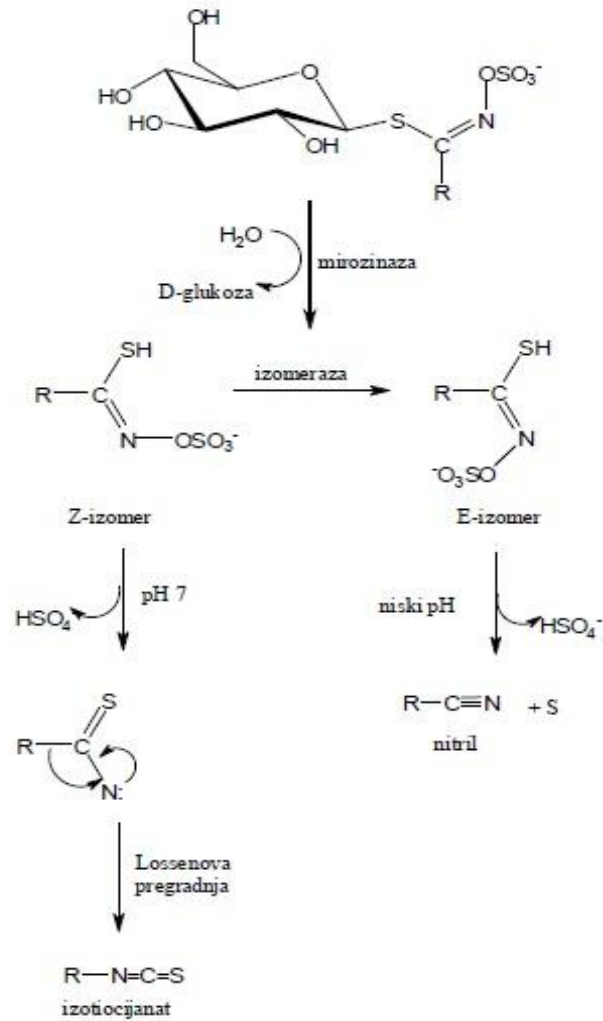
1.6.2. Razgradni produkti

- *Izotiocijanati*

Izotiocijanati ($R-N=C=S$), su hlapljivi spojevi izuzetno jakog mirisa i arome. Tako su upravo oni, konkretno propenil-izotiocijanati odgovorni za karakterističnu aromu gorušice. Nastaju trenutnom Lossenovom pregradnjom (Slika 1.4.) nestabilnog aglukonskog međuprodukta, pri neutralnom pH. Izotiocijanati koji sadrže β -hidroksilnu skupinu su nestabilni te kod njih dolazi do spontane intramolekulske reakcije čime nastaju ciklički tionski spojevi- oksazolidin-2-tioni. Kvantitativnost nastanka izotiocijanata ovisi o pripremi uzorka te postupanju s biljkom. Izotiocijanati su toksični te se zbog toga mogu upotrebljavati kao pesticidi. (3)

- *Nitrili*

Nitrili, ($R-C\equiv N$), 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. Epitonitrili, osim kiselog pH, za nastanak zahtijevaju i prisutnost epitospecifičnog proteina (ESP) te Fe^{2+} iona. Ova vrsta nitrila može nastati samo uz navedene uvjete te isključivo iz glukozinolata koji imaju terminalnu dvostruku vezu u bočnom (R) lancu. Epitospecifični protein djeluje na način da usmjeri hidrolizu glukozinolata koja je pokrenuta djelovanjem mirozinaze ka nastanku nitrila umjesto izotiocijanata. Sam mehanizam još nije u potpunosti poznat. ESP ne pokazuje aktivnost kod svih biljnih vrsta. Ona je do sada potvrđena kod različitih Brassicaceae vrsta kao što su *B. napus*, *B. oleracea* i *A. thaliana*. Međutim, različiti ekotipovi jedne biljne vrste mogu pokazati različitu funkcionalnost ESP-a. Tako je potvrđeno kako kod nekih ekotipova *A. thaliana* vrste ne postoji ESP aktivnost. (3)



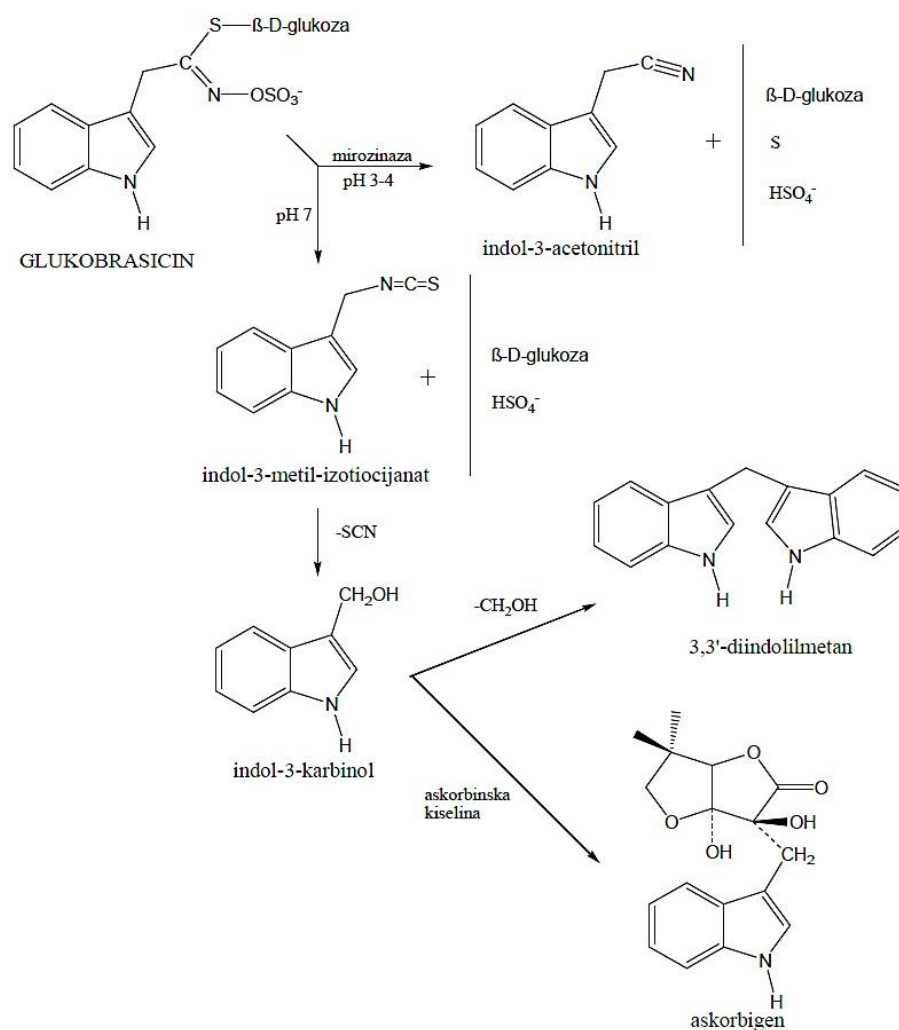
Slika 1.4. Shema nastanka izotiocijanata i nitrila (1)

- *Tiocijanati*

Tiocijanati ($\text{R-S-C}\equiv\text{N}$) 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. (1, 3) Tiocijanatni anion je rezonantni hibrid s nabojem lokaliziranim na S ili N atomu. (3) Nastajanje tiocijanata je zabilježeno kod samo nekoliko biljaka, najčešće kod pripadnica Alyssum, Coronopus, Lepidium, i Thlaspi porodica. (1)

- *Indoli*

Indoli zajedno s tiocijanatima nastaju hidrolizom indolnih glukozinolata. Najzastupljeniji predstavnik ove glukozinolatne grupe jest glukobrasicin (3-indolilmetil glukozinolat), najvećom mjerom zastupljen u povrću roda *Brassica*. Slika 1.5. prikazuje shemu enzimske hidrolize glukobrasicina, koja je prihvaćena kao model za opću shemu razgradnje indolnih glukozinolata. U uvjetima neutralne pH vrijednosti, nastaje tiocijanatni ion kao posljedica pregradnje nestabilnog izotiocijanata. U kiselim uvjetima nastaju indol-3-acetonitril i sumpor. Uz prisustvo askorbinske kiseline, kao produkti hidrolize glukobrasicina se javljaju 3,3'-diindolilmetan i askorbigen. (1, 3)



Slika 1.5. Shema enzimske hidrolize glukobrasicina (1)

- *Ostali spojevi*

Od ostalih identificiranih produkata hidrolize glukozinolata, ističu se bisizotiocijanat (1,2-bis(4-izotiocijanatobutil)disulfan) koji je važan kao dio arome rokule (*Eruca sativa*), *p*-hidroksibenzilni alkohol koji nastaje raspadom nestabilnog izotiocijanata nastalog hidrolizom 4-hidroksibenzil glukozinolata kod bijele gorušice. Ostali identificirani spojevi su di-(*p*-hidroksibenzil)-disulfid, tiocijanat i pod kiselim uvjetima *p*-hidroksibenzilnitril. (1)

1.6.3. Neenzimska razgradnja glukozinolata

Osim pod utjecajem djelovanja mirozinaze, glukozinolati se razgrađuju i kemijski te pod utjecajem visoke temperature. Kemijskom razgradnjom glukozinolata mogu nastati različiti produkti koji ovise o temperaturi i pH vrijednosti okoline u kojoj se ista odvija. (3) Proučavanjem utjecaja temperature, Lanzani i sur. (1) (1976, 1978) utvrdili su da grijanje (*R*)-2-hidroksibut-3-enilglukozinolata pri 100 °C tijekom 3 h rezultira njegovom potpunom razgradnjom na produkte: pent-2,3-dienska kiselina (35 %), sumpor i amonijak, a 50 % se pretvara u 1-aminobutadien, 1-amino-2-hidroksibut-3-en, sumporovodik i ugljikov dioksid. Gronowitz i sur. (1) (1978.) su istražujući razgradnju (*R*)-2-hidroksibut-3-enilglukozinolata i but-3-enilglukozinolata u vodi, uz različite uvjete pH vrijednosti i temperature, primjetili kako je nakon 5 sati refluksiranja u vodi 36 % glukozinolata ostalo nepromijenjeno, a razgradnjom su dobiveni odgovarajući nitrili u 60 %-tnom iskorištenju. Promjenom pH vrijednosti, smanjilo se vrijeme razgradnje glukozinolata pa je pri pH=5 i temperaturi od 100 °C čak 87 % glukozinolata razgrađeno u samo 30 minuta. (1)

Masheshwari i sur. (1) su istraživali termičku stabilnost prop-2-en-1-ilglukozinolata njegovim izlaganjem konvencionalnom i mikrovalnom zračenju. Ustanovili su kako je mikrovalno zračenje povoljnije za razgradnju glukozinolata. MacLeod i sur. (1) proučavali su utjecaj temperature te razgradne produkte glukozinolata koji nastaju u plinskom kromatografu. Praćeni su produkti koji nastaju u koloni i injektoru uz različite temperaturne uvjete. Tako su uočili da je u kromatografskoj koloni pri temperaturi od 200 °C prop-2-en-1-ilglukozinolat razgrađen na 44 % nitrila, 32 % izotiocijanata, a benzilglukozinolat se razgradio dajući 63 % nitrila i 13 % izotiocijanata. Ovim istraživanjem je po prvi puta dokazan nastanak izotiocijanata neenzimski. Produkti razgradnje glukozinolata uvelike ovise o pH

vrijednosti otopine u kojoj se ona odvija. Tako kiselom razgradnjom glukozinolata kao produkti nastaju karboksilne kiseline i hidrosilamonijev ion. (1) Baznom hidrolizom nastaje nekoliko produkata, a najčešće dolazi do nastanka aminokiseline i tioglukoze. (3)

1.7. BIOLOŠKI ZNAČAJ GLUKOZINOLATA

Kao što je već spomenuto, razgradnja glukozinolata pomoću enzima mirozinaze rezultira nizom produkata koji su čest predmet istraživanja zbog svojih bioloških i farmakoloških značajki. Glukozinolatima i njihovim razgradnim produktima se pripisuju određena antikancerogena, antioksidacijska, antimikrobna te nutritivna i antinutritivna svojstva. Zaslužni su i za specifičnu aromu povrća i zaštitu biljaka od kukaca i fitopatogena. (1, 3) S obzirom da biljke roda *Brassica* imaju visoke koncentracije glukozinolata, brojni znanstvenici, primjetivši kako ljudi koji u prehrani više konzumiraju kupusnjače, zapravo imaju smanjen rizik oboljenja od raka, pripisuju te zasluge glukozinolatima i njihovim razgradnim produktima. (1) Mirozinaza potiče hidrolizu glukozinolata pri čemu najčešće nastaju izotiocijanati, nitrili i tiocijanati, a osim u biljkama ovaj enzim je prisutan i u mikroflori ljudskog probavnog sustava. Glavni mehanizam njihovog djelovanja krije se u selektivnoj inhibiciji citokrom P450 enzima (faza I) te aktivaciji enzima Faze II (glutation-S-transferaze i UDP-glukuronil transferaze), čije djelovanje ima važnu ulogu u obrani, odnosno uzrokovanju raka. (1, 3)

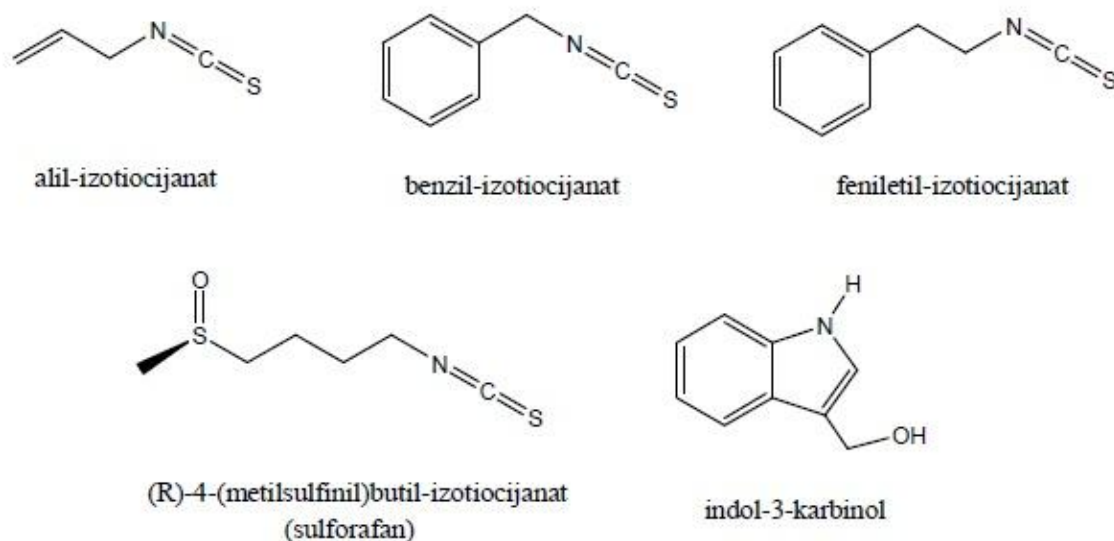
1.7.1. Antikancerogeno djelovanje

Od svih potencijalnih razgradnih produkata glukozinolata, nekoliko ih se posebno ističe po svojim antikancerogenim svojstvima. To su: sulforafan, fenilet-ilizotiocijanati, alil-izotiocijanati i indol-3-karbinol te mnogi drugi izotiocijanati (Slika 1.6). (1)

Enzimi faze I i faze II, osim što imaju važnu ulogu u obrani od kancerogenih tvari, inhibiraju rast tumora, stimuliraju apoptozu, odnosno utječu na procese kancerogeneze koji se većinom odvijaju u jetri i mukozi crijeva. (3) Enzimi faze I (enzimi citokrom P450) povećavaju toksičnost određenih molekula mijenjajući prokancerogene molekule reakcijama oksidacije i redukcije te hidrolizom u hidrofobne molekule. Navedenim reakcijama nastaju izuzetno reaktivni intermedijeri koji oštećuju DNA i RNA. Razgradni produkti glukozinolata imaju mogućnosti inhibicije opisanog enzima. (3)

S druge strane, ti isti produkti aktiviraju djelovanje enzima faze II (glutation-*S*-transferaza, aldehid reduktaza, *S*-metil-transferaza, *N*-acetil-transferaza). Ovi enzimi reakcijama konjugacije s ligandima, pripajanja sulfatnih skupina, acetiliranja i metiliranja pretvaraju kancerogene tvari u nereaktivne metabolite, nakon čega se oni izlučuju iz ljudskog organizma. (3)

- *Sulforafan* ((*R*)-4-(metilsulfinil)butil-izotiocijanat) potječe od glukorafanina te je značajan zbog uloge u obrani od raka dojke kao i destruktivnosti prema bakteriji *Helicobacter pylori* koja može izazvati pojavu raka i čira želuca. (1)
- *2-Feniletil-izotiocijanat*, aromatski izotiocijanat koji nastaje razgradnjom glukonasturcina, utječe na sprječavanje pojave tumora pluća izazvanog nitrozaminom, sastavnim dijelom duhana. (1)
- *Alil-izotiocijanat* je razgradni produkt sinigrina, a njegovo farmakološko djelovanje se krije u antibakterijskim i anestetičkim učincima koje posjeduje.
- *Indol-3-karbinol*, koji nastaje razgradnjom indolnog glukozinolata glukobrasicina je inhibitor HPV virusa, vrlo čestog uzročnika raka maternice te inhibira razvoj raka dojke i prostate. (1)



Slika 1.6. Neki razgradni produkti glukozinolata s antikancerogenim djelovanjem (1)

1.7.2. Antioksidacijsko djelovanje

Razgradni produkti glukozinolata su indirektni antioksidansi jer ne blokiraju slobodne radikale direktno. Antioksidacijsko djelovanje je također povezano s enzimima faze I i II. Posebno su važni enzimi faze II koji sadrže specifične sekvence DNA koji se

nazivaju elementima antioksidacijskog odgovora. Produkti razgradnje glukozinolata povećavaju aktivnost enzima faze II povećavajući transkripciju gena koji sadrže elemente antioksidacijskog odgovora. (3)

1.7.3. Antimikrobno i antifugalno djelovanje

Prilikom proučavanja učinka glukozinolata i produkata njihove razgradnje na mikroorganizme poput bakterija, kvasca i gljiva, potvrđena je njihova fiziološka neaktivnost te štetna aktivnost produkata njihove razgradnje. Izotiocijanati imaju značajniji učinak prema kvascima nego bakterijama i gljivicama dok produkti razgradnje glukozinolata sa sumporom u bočnom lancu imaju izraženu fungitoksičnost. (3)

1.7.4. Štetno djelovanje

Unatoč korisnim učincima većine glukozinolata, određeni ipak pokazuju mutagenost / goitrogenost, toksičnost pa čak i karcinogenost. (1) Kod ljudi, prilikom pravilne konzumacije prehrane s visokim sadržajem glukozinolata, nije potvrđen nijedan štetni učinak produkata njihove razgradnje na zdravlje. Međutim, prilikom unosa prevelikih doza u obliku nadomjestaka ili dodataka prehrani, određeni produkti razgradnje mogu imati štetan utjecaj. Od posebnog je značaja viniloksazolidin-2-tion (goitrin) koji pokazuje određene štetne i toksične učinke na štitnjaču i jetru te uzrokuje usporen rast kod životinja, a njegovo djelovanje je često povezano s pojavom gušavosti. (3) Osim viniloksazolidin-2-tion-a, mutagenost pokazuju i tiocijanati, a kancerogeni *N*-nitroso spojevi nastaju reakcijom produkata razgradnje indolnih glukozinolata s nitritima. (1, 3)

1.8. METODE IZOLACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

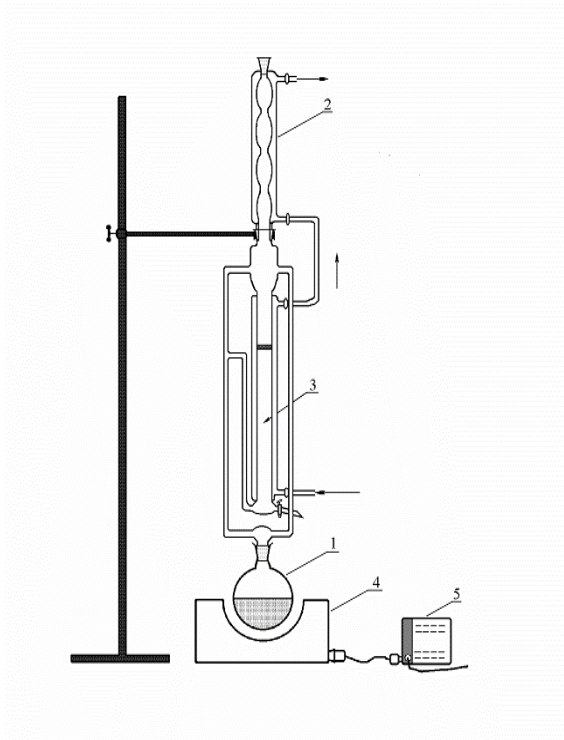
1.8.1. Destilacija

Destilacija je metoda odjeljivanja homogene smjese s obzirom na razliku u temperaturama vrelišta njenih komponenti. Hidrodestilacija obuhvaća vodenu, vodeno parnu i parnu destilaciju koje se međusobno razlikuju samo prema vrsti kontakta ostvarenog između biljnog materijala i vode, odnosno pare. (1)

1.8.1.1. Vodena destilacija s modificiranom aparaturom po Clevengeru

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

Postoje brojne izvedbe aparature za hidrodestilaciju, a među važnijima je aparatura po Clevengeru i njene brojne modifikacije. (1) Modificirana aparatura po Clevengeru prikazana na slici 1.7. omogućava odvajanje komponenti eteričnog ulja od vode na temelju razlika u polarnosti, a time i topljivosti. Naime, središnja cijev aparature je u donjem sloju ispunjena destiliranom vodom, a u gornjem organskim otapalom (ili smjesom organskih otapala) koja u ovakvoj aparaturi predstavljaju „trap“. Prilikom prolaska kondenzirane smjese vode i komponenti eteričnog ulja kroz organsko otapalo, s obzirom na sličnost u polarnosti, komponente eteričnog ulja zaostaju u njemu, dok voda nesmetano prolazi. Na taj način nastaje eterično ulje koje se pipetom uklanja kroz gornji otvor, a voda ispušta kroz pipac na dnu Clevenger nastavka.



1. tikvica s okruglim dnom
2. povratno hladilo
3. prostor za prihvata destilata
4. kalota za zagrijavanje
5. reostat

Slika 1.7. Modificirana aparatura po Clevengeru (3)

1.8.1.2. Vodeno parna destilacija

Kod vodeno-parne destilacije biljni materijal ostvaruje kontakt samo sa zasićenom vodenom parom niskog tlaka. Vodena para je uvijek zasićena, vlažna te nikad pregrijana, a ostvarujući kontakt s biljnim materijalom odnosi pare komponenti eteričnog ulja. (1)

1.8.1.3. Parna destilacija

Za izvođenje parne destilacije koristi se generator pare koji je spojen na tikvicu u kojoj se nalazi biljni materijal. Kod ovog tipa destilacije, nužno je prethodno usitnjavanje biljnog materijala. Parnu destilaciju je moguće provoditi pri višim i nižim temperaturama ovisno o tlaku pare i prirodi biljnog materijala. (1)

1.8.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja omogućava izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Temelji se na različitoj topljivosti tvari koju je potrebno izolirati i primjesa koje je prate u otapalima koja se međusobno ne miješaju. Prilikom izvođenja ekstrakcije najčešće se kao otapala koriste voda i neko organsko otapalo te dolazi do različite particije tvari među njima. (1, 10)

Otapala koja se koriste kod ekstrakcije moraju zadovoljavati slijedeće uvjete:

- otapalo mora biti kemijski inertno
- gustoće matične otopine tvari i korištenog otapala se moraju razlikovati
- pogodnija otapala za ekstrakciju su ona s niskom temperaturom vrenja kako bi se nesmetano uklonila
- otapalo mora imati visoku moć otapanja tvari koju je potrebno izolirati
- važna je i dostupnost te niska cijena korištenog otapala. (10)

Glavna prednost ekstrakcije je mogućnost izdvajanja željenih komponenti bez korištenja visokih temperatura zbog eventualno prisutnih termolabilnih tvari. Osim toga, pogodnija je od destilacije u slučajevima kada su prisutne male količine eteričnog ulja u biljnom materijalu. Može se provoditi hlapljivim ili nehlapljivim otapalima. Najčešće korištena otapala su petroleter, pentan, dietil-eter, diklormetan, i sl. (1) Moderne metode ekstrakcije koje se danas sve više koriste su ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija te ekstrakcija subkritičnim i superkritičnim otapalima. (4)

1.8.2.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Ekstrakcija tekuće-tekuće, poznata još i kao izmučkivanje, provodi se u lijevku za odjeljivanje koji omogućava veliku dodirnu površinu nemiješajućih otapala te na taj način visoku uspješnost ekstrakcije. (10)

1.8.2.2. Isoljavanje

Isoljavanje je metoda koja se koristi prilikom stvaranja emulzija ili nepotpunog odvajanja slojeva otapala. Isoljavanje se temelji na principu dodavanja visoko topljive tvari u otapalo čime se manje topljiva tvar iz iste izolira. (10)

1.9. METODE IDENTIFIKACIJE HLAPLJIVIH SPOJEVA

1.9.1. Kromatografija

Kromatografija je analitička metoda koja se koristi za odvajanje komponenti smjese te njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Osnovni princip rada kromatografske metode se krije u različitoj raspodjeli komponenti analizirane smjese između stacionarne i mobilne faze. Stacionarna faza predstavlja prevlaku na nosaču preko koje različite komponente uzorka putuju različitim brzinama, a mobilna faza omogućava prenošenje uzorka preko stacionarne. S obzirom na različitu brzinu putovanja svake pojedine komponente analizirane smjese, one u različitim vremenskim intervalima izlaze iz kromatografske kolone te se na taj način odvajaju. Retencijsko vrijeme pojedine komponente uzorka, predstavlja vrijeme proteklo od ulaska do izlaska komponente iz kolone. (1, 11)

1.9.2. Podjela kromatografskih metoda

U osnovi, kromatografske metode se mogu podijeliti u dvije osnovne grupe:

- Plošna kromatografija
- Kromatografija na stupcu.

Plošna kromatografija funkcionira tako da je stacionarna faza nanosena na ravnu plohu ili u pore papira. Mobilna faza prolazi kroz stacionarnu djelovanjem kapilarnih sila ili gravitacije. Kod kromatografije na stupcu stacionarna faza ispunjava usku cijev kroz koju se mobilna faza kreće pod utjecajem tlaka ili gravitacije. (11)

Plošna kromatografija se dijeli na:

- tankoslojnu
- papirnu
- elektrokromatografiju.

Kromatografija na stupcu, s obzirom na različita agregacijska stanja stacionarne i mobilne faze, može se podijeliti na:

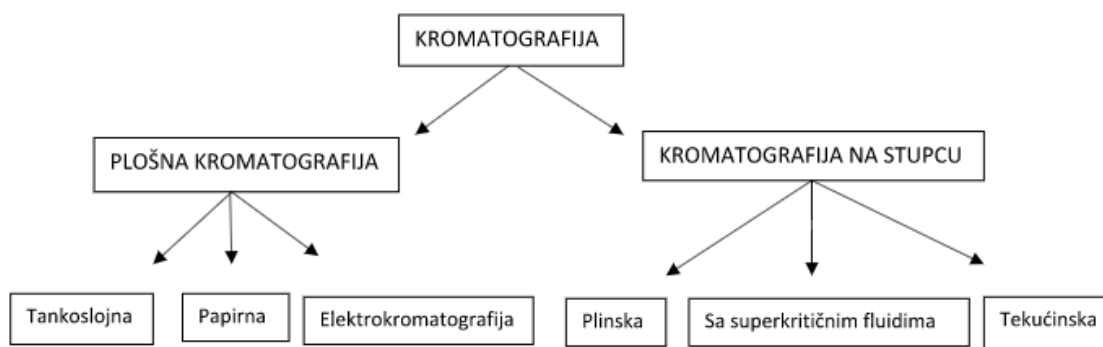
- Plinsku - mobilna faza je inertni plin, a stacionarna krutina ili kapljevinom presvučena krutina
- Tekućinsku - mobilna faza je tekućina, stacionarna krutina
- Kromatografiju sa superkritičnim fluidima. (11)

S obzirom na fizikalno-kemijske procese koji se odvijaju prilikom spomenutog odvajanja, kromatografske metode su podijeljene na:

- adsorpcijsku kromatografiju
- razdjelnu kromatografiju
- kromatografiju na ionskim izmjenjivačima. (1)

Adsorpcijska kromatografija se zasniva na odvajanju pojedinih komponenti uzorka na temelju njihove različite adsorpcije na stacionarnu fazu. Nužno je da je stacionarna faza selektivna prema tvarima koje se adsorbiraju te da se otapalo slabo adsorbira na adsorbensu. Na taj način, stacionarna faza je odgovorna za zadržavanje komponenti uzorka, a mobilna faza za njihovo putovanje te se odjeljuju na temelju različitih vremena izlaska komponenti iz kolone. (1) Razdjelna kromatografija se temelji na razlici koeficijenata razdjeljenja pojedinih komponenata između dva otapala koja se ne mješaju. Jedno otapalo predstavlja stacionarnu, a drugo mobilnu fazu.

Kromatografija s ionskim izmjenjivačima se temelji na ionskoj izmjeni te je pogodna za razdvajanje iona. Ionski izmjenjivači predstavljaju stacionarnu fazu, a metoda se zasniva na razdvajanju komponenti smjese zbog djelovanja kulonovih (ionskih) sila. Stacionarna faza ima ionske funkcionalne grupe koje reagiraju s ionima suprotnog naboja iz analizirane smjese. (1)



Slika 1.8. Podjela kromatografskih metoda

1.9.3. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija omogućava razdvajanje različitih plinskih komponenti iz smjese u kojoj se nalaze. Osnovne prednosti ove metode su brzina, jednostavnost i visoka osjetljivost. Uređaj za plinsku kromatografiju (Slika 1.9.) se sastoji od sljedećih komponenti:

- injekcijski blok
- kromatografska kolona
- termostat
- detektor
- pislač.

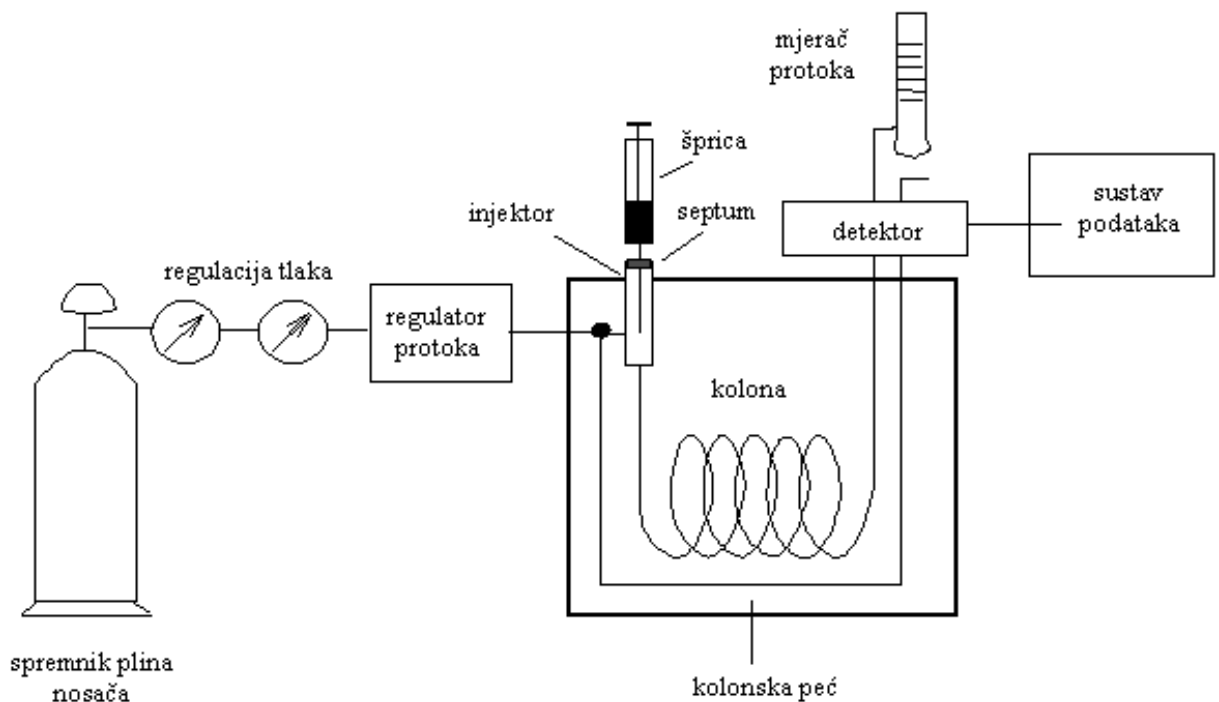
Uzorak se injektira pomoću injekcijske šprice, a samo injektiranje mora biti provedeno brzo te uzorak mora brzo i potpuno ispariti. Mobilna faza kod plinske kromatografije je inertni plin kojem je zadaća odjeljivanje hlapljivih spojeva te njihovo iznošenje iz kolone. Vrlo je bitno da je mobilna faza u potpunosti inertna kako ne bi došlo do reakcije s uzorkom ili stacionarnom fazom. Najčešće korišteni plinovi za mobilnu fazu su helij, dušik, vodik ili argon. Stacionarna faza je nehlapljiva tekućina koja je vezana za stijenke ili sorbens. (1) Kromatografske kolone su smještene u termostatu kojem se ovisno o prirodi uzorka kontrolira temperatura, a mogu biti izrađene od metala, stakla ili plastike. Plinska kromatografija zahvaljujući svojoj visokoj osjetljivosti omogućava razdvajanje vrlo malih koncentracija smjese. Ovom metodom se može odvajati veliki broj tvari, uključujući širok raspon njihovih vrelišta. Za primjenu plinske kromatografije u obradi uzorka jedini je uvjet odgovarajući tlak para pri temperaturi pogodnoj za odvajanje komponenti uzorka te njegova stabilnost pri istoj.

Međutim, postoje i neki nedostaci ove metode:

- 1) Razdvajanje komponenti smjese može biti nepotpuno.
- 2) Prilikom injektiranja cijelog ulja potrebno je voditi računa o razrijeđenosti. Naime, pri visokoj razrijeđenosti manje konstituente nije moguće detektirati, a visoka koncentriranost uzorka dovodi do preplavlivanja kolone glavnim konstituentima što uzrokuje maskiranje pikova manjih konstituenata te njihovu otežanu identifikaciju.

- 3) Može biti vremenski duga ukoliko je cilj postupka izolacija manjih konstituenata.
- 4) Ako uzorak ulja sadrži komponente visokog vrelišta potrebno je više vremena na postavljenoj temperaturi da bi došlo do njihove izolacije. Često se dogodi da se visoko vrijuće tvari dugo zadržavaju u koloni te je na taj način oštete.

Detektor za identifikaciju izoliranih spojeva kod plinske kromatografije može biti bilo koji uređaj koji na osnovu određenog fizikalnog ili kemijskog svojstva detektira prisutnost određene komponente. (1)



Slika 1.9. Shema plinskog kromatografa (12)

1.10. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa je analitička metoda koja omogućava identifikaciju kemijskih spojeva određivanjem njihovih molekulskih masa, a potom i molekulskih formula. Ova se metoda temelji na ionizaciji plinovitog uzorka, fragmentaciji, razdvajanju fragmenata s obzirom na omjer njihove mase i naboja te obradi podataka dobivenih u obliku masenih spektara. Glavne komponente masenog spektrometra su ionizator, analizator i detektor (Slika 1.10.). (13)

1.10.1. Ionizacija

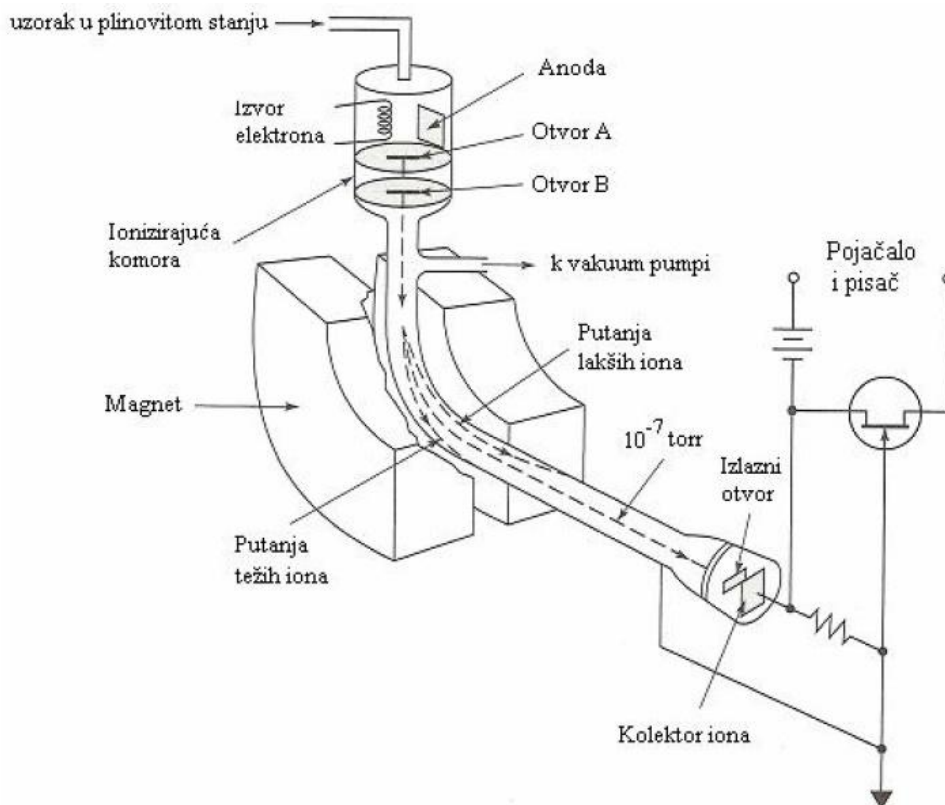
Ionizacija se provodi u komori za bombardiranje koja je omeđena s jedne strane volframovom niti-katodom, a s druge, pozitivno naelektriziranom pločom-anodom koje omogućavaju stalan protok elektrona od izvora (katode) ka anodi. U komori su postavljeni uvjeti visokog vakuuma kako bi stvoreni ioni prešli put od izvora do senzora bez sudara s drugim molekulama koje bi izazvale neutralizaciju. Nakon unošenja plinovitog uzorka u komoru, slijedi njegova ionizacija. Ona se provodi bombardiranjem molekula uzorka visokoenergetskim elektronima, čime dolazi do izbacivanja elektrona iz molekule uzorka te tako nastaju pozitivno nabijeni molekulski ioni. Nakon formiranja molekuskog kationa, obično dolazi do fragmentiranja, čime nastaju manji ioni. Ionizacija se osim bombardiranjem elektronima može provesti i kemijskom ionizacijom te bombardiranjem brzim atomima. Kemijska ionizacija predstavlja postupak u kojem ioni nastaju kemijskom reakcijom molekule uzorka s nekim drugim, prethodno pripremljenim ionom. Bombardiranje brzim atomima podrazumijeva izlaganje molekula uzorka visokoenergetskim atomima poput argona ili ksenona. Prednost ove metode je u mogućnosti analize uzorka u čvrstom stanju. (1,13)

1.10.2. Razdvajanje i određivanje

Razdvajanje nastalih iona, s obzirom na omjer njihove mase i naboja, odvija se u analizatoru. Odvajanje iona potpomognuto je djelovanjem magnetnog ili električnog polja. Instrumenti s magnetskim sektorom unatoč dugovječnosti upotrebe se i danas često koriste, a noviji instrumenti za razdvajanje iona koriste kvadrupolni analizator masa. Kod magnetskih sektora, odvajanje iona se provodi na način da ioni prilikom prolaska kroz magnetsko polje dobivaju otklon razmjeran njihovoj masi, brzini i naboju. Točnije, veličina otklona je obrnuto proporcionalna masi fragmenta što znači da su fragmenti manje mase više, a veće mase manje otklonjeni. Fragmenti nakon prolaska

kroz magnetsko polje dolaze u sakupljač gdje je svaki ion odgovoran za stvaranje elektronskog signala. Kod kvadrupolnog analizatora masa se dio u kojem se razdvajaju ioni sastoji od četiri štapića koji stvaraju oscilirajuće električno polje. Ioni nastali u ionizacijskoj komori se dovode u evakuirani prostor između štapića te samo ioni s odgovarajućim omjerom mase i naboja prilikom prolaska kroz električno polje rezoniraju s kvadrupolnom frekvencijom. Ostali ioni nemaju stabilnu putanju te neće biti usmjereni prema detektoru. Kvadrupolni analizator masa je jeftiniji, jednostavniji i brži od magnetskog odvajanja iona, ali mu je nedostatak opadanje moći razdvajanja iona kod uzoraka s relativnom molekulskom masom većom od 1000.

S obzirom da svaki fragment izaziva određeni elektronski signal, podatci se obično upućuju na izravno priključeno računalo koje daje spektar masa u digitalnom ili analognom obliku. Spektar masa prikazuje omjer mase i naboja s obzirom na relativan intenzitet svakog pojedinačnog fragmenta. Dogovorno, najviši signal (osnovni signal), predstavlja standard prema kojem se određuje udio fragmenata koji su formirali ostale signale. (1, 13)



Slika 1.10. Shema masenog spektrometra (1)

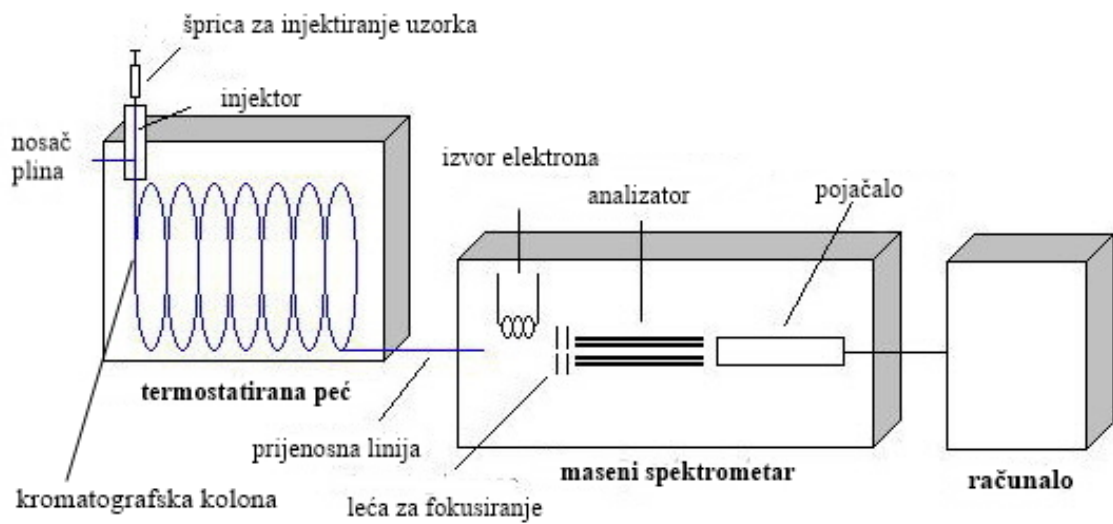
1.11. GC-MS

Vežani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa omogućava dobivanje brzih i pouzdanih rezultata (Slika 1.11.). Plinski kromatograf je efektivan u razdvajanju smjese uzorka na njegove komponente, ali ne i u njihovoj identifikaciji. Za točnu identifikaciju komponenti, odgovorna je spektrometrija masa. Ovako organizirani sustav se često koristi za potvrdu prisutnosti određenih tvari u uzorku pa je primjenu našao kod obavljanja brojnih testova na drogu, testova kvalitete proizvodnje te brojnih drugih. Konačna identifikacija određene komponente se provodi na temelju rezultata dobivenih objema metodama. Karakteristični podatci za pojedinu komponentu dobiveni njihovom separacijom tehnikom plinske kromatografije su retencijsko vrijeme i površina pika koja je proporcionalna količini sastojka.

Masenom spektrometrijom su dobivene informacije o relativnoj molekularnoj masi, na temelju čega se izvodi zaključak o molekularnoj formuli svake komponente. (1) U GC-MS sustavu se najčešće koristi kvadrupolni analizator masa koji brzo snima spektre svake komponente koja izađe iz kromatografske kolone. Prilikom obrade podataka, snimljeni spektri se uspoređuju sa spektrom dotičnog spoja koji se nalazi u Wileyjevoj banci masenih spektara. (1) Velika prednost GC-MS sustava je mogućnost provođenja analize i dobivanja pouzdanih rezultata uz vrlo male količine uzorka čime se ostvaruje osjetljivost reda veličine od 10^{-12} do 10^{-15} g. (1)

Osim brojnih prednosti, ipak i ova metoda ima određena ograničenja:

- Ako se plinskom kromatografijom ne odvije potpuna separacija komponenti, maseni spektar neće biti dovoljno jasan.
- Banka spektara sadrži otprilike 5000 spektara, što znači da ostalih 200 000 poznatih kemijskih spojeva nije spektrometrijski opisano. (14)

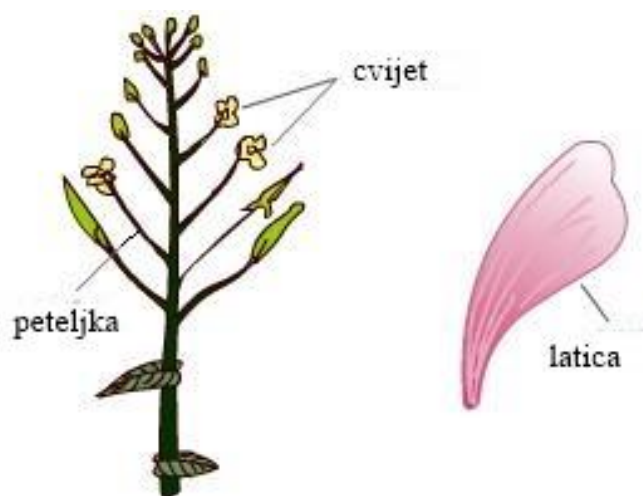


Slika 1.11. Shema vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (15)

1.12. BRASSICACEAE

Brassicaceae (kupusnjače, ranije Crucifereae-krstašice), predstavljaju biljnu porodicu kojoj pripada preko 350 rodova i oko 3000 vrsta. Riječ je o zeljastim, rijetko grmolikim dvosupnicama koje su većinom rasprostranjene u umjerenom klimatskom području sjeverne polutke, posebno na području Sredozemlja. Glavna karakteristika ove porodice (Slike 1.12. i 1.13.) su slobodni listovi ocvijeća, dvospolni cvjetovi koji se sastoje od 4 lapa, 4 latice položenih po dvije unakrst u obliku vjenčića, 4 duža (unutarnja) i 2 kraća (vanjska) prašnika te tučka s nadraslom plodnicom iz koje nastaje plod komuška ili komuščica. Cvjetovi se pojavljuju skupljeni u cvatove ili pojedinačni. Ocvijeće je dvostruko ili jednostavno, a plodnica jednogradna ili dvogradna s većim brojem sjemenih zametaka.

Brassicaceae obuhvaćaju veliki broj biljaka sa širokim spektrom upotrebe u prehrani, gospodarstvu, industriji i medicini. Kao povrće i krmno bilje su poznate različite odlike vrtne vrzine (*Brassica oleracea*, npr. kupus, kelj, koraba cvjetača), vrzine repice (*Brassica napus*), bijele repe (*Brassica rapa*), rotkva (*Raphanus sativus*), dragušac (*Nasturtium officinale*). Za dobivanje ulja se najčešće koriste uljana repica (*Brassica napus*), crna gorušica (*Brassica nigra*), bijela gorušica (*Sinapis alba*) i hren (*Armoracia rusticana*). U ljekarstvu su upotrebu našle neke vrste rodova grbak (*Lepidium*), žličnjak (*Cochlearia*), češnjača (*Alliaria*) i dr. Neke od endemičnih krstašica koje pripadaju ovoj porodici su pojedine vrste gromotulje (*Alyssum*), degenija (*Degenia velebitica*) i dr. (1, 3)



Slika 1.12. Karakteristike biljke koja pripada porodici Brassicaceae (16)



Slika 1.13. Analiza dijelova cvijeta biljke koja pripada porodici Brassicaceae (16)

U radu su obrađene dvije biljne vrste iz roda *Brassica*, koraba (*Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* (L.) Janch.) te čunjasti repušac (*Brassica erucago* L.) čije su karakteristike opisane u nastavku.

1.12.1. Koraba (*Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* (L.) Janch.)

Koraba (slika 1.14.) je višegodišnja zeljasta biljka iz porodice kupusnjača. Dobila je ime od njemačkih riječi „Kohl“ („kopus“) i „Rübe“ („repa“). Stabljika joj može narasti do 40 cm visine te je u prvoj godini nerazgranata. U drugoj godini dolazi do formiranja cvjetova koji su skupljeni u produžene rahle grozdove. Listovi se nalaze na dugim peteljkaama te na zadebljalom dijelu stabljike čiji promjer može doseći 40 cm. Korabini cvjetovi su dvospolni i pravilni, a građeni su od 4 žute latice i 6 prašnika. Plod joj je komuška koja sadrži brojne okruglaste, crvenkaste, male sjemenke. Koraba je nastala umjetnom selekcijom lateralnog meristema rasta te se uzgaja radi zadebljale stabljike. Ovisno o kultivaru, postoje zelene, ljubičaste i bijele sorte. Koraba se najčešće sije za proljetnu ili jesensku berbu te joj odgovara vlažna i plodna rahla zemlja. Često se koristi u prehrani, posebno stabljika i listovi koji se mogu konzumirati u sirovom ili kuhanom obliku. (17, 18)



Slika 1.14. *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* (L.) (preuzeto i prilagođeno od:
(19) autor: Beppe Di Gregorio)

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

Bunias erucago L. (slika 1.15.) je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka koja pripada porodici kupusnjača. Može narasti do 60 cm visine, a stabljika joj je uspravna, prekrivena dlakama i razgranata. Listovi su joj duguljasti, perasto razdijeljeni, tupo nazubljenih rubova te se nalaze na petaljkama. Cvjetovi su pozicionirani na dužim stapkama na vrhu stabljika gdje su skupljeni u rahle grozdaste cvatove. Iako su veliki oko samo 1 cm, primjetni su zahvaljujući intenzivnoj žutoj boji. Vjenčić je sastavljen od 4 žute latice i 6 prašnika. Plodovi su nepravilnog oblika te sadrže sjemenke u 3-4 odjeljka. Vrijeme dozrijevanja je od srpnja do rujna. *Bunias erucago* L. je poprilično rasprostranjena u južnoj Europi, a kod nas je pronađena samo u primorskom području. Za rast joj pogoduju sunčana i suha staništa te neobrađena i siromašna zemljišta. Osim sirovog korijena, jestivi dijelovi biljke su također i mladi izdanci i listovi i to kuhani ili u sirovom obliku. (20)



Slika 1.15. *Bunias erucago* L. (preuzeto i prilagođeno od: (21))

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. KEMIKALIJE I APARATURA

- **KORIŠTENE KEMIKALIJE:**

- 1) Pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
- 2) Diklormetan, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- 3) Dietil-eter, Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španjolska
- 4) Bezvodni natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 5) Natrijev klorid, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska.

- **KORIŠTENA APARATURA**

- 1) Električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- 2) Tehnička vaga, Kern & Sohn, Njemačka
- 3) Modificirana aparatura po Clevengeru
- 4) Kalote za zagrijavanje
- 5) Lijevak za odjeljivanje
- 6) Tresilica, Tehnica, Slovenija
- 7) Uparivač dušikom, Techne
- 8) GC-MS, Varian Inc., Lake Foresr, CA, USA.

2.2. PRIPREMA BILJNOG MATERIJALA

2.2.1. Koraba (*Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* (L.) Janch.)

Tablica 2. Taksonomija *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* (L.) Janch. (22)

Red	Brassicales Bromhead
Porodica	Brassicaceae (krstašice (Hr), Schlosser, J.C.K.; Vukotinović, Lj.)
Rod	<i>Brassica</i> (vrzina (Hr), Domac, R., repa (Hr), Schlosser, J.C.K.; Vukotinović, Lj.)
Vrsta	<i>Brassica rupestris</i> Raf. ssp. <i>gongyloides</i> (L.) Janch
Sinonimi	<i>Brassica caulorapa</i> (DC.) Pasquale, <i>Brassica rupestris</i> var. <i>gongyloides</i> (L.) Janch
Narodna imena	koraba (Hr), Hirc, D ., korabica (Hr), Dubravec, K.; Dubravec, I., kupus repasti (Hr), Šulek, B.

Biljni materijal je sabran početkom travnja 2017. godine na području Gata u okolici grada Omiša. Sušen je u sjeni, na prozračnom mjestu pri sobnoj temperaturi te obrađen krajem mjeseca. Cjelovita biljka je podijeljena na parcijalne dijelove: korijen, gomolj, stabljiku i list te cvijet. Svaki dio posebno je mljeven i vagan. Korijen, stabljika i list te cvijet su obrađeni hidrodestilacijom korištenjem modificirane aparature po Clevengeru, dok je dio ukupne izvagane količine gomolja podvrgnut ekstrakciji, a dio destilaciji.

U tablici 3. su iskazane odvagane mase svakog pojedinačnog dijela biljke uz naznaku metode kojoj su namijenjeni.

Tablica 3. Odvage biljnog materijala uz naznaku korištene metode

	Destilacija	Ekstrakcija
Masa korijena	82,14 g	/
Masa gomolja	55,72 g	41,45 g
Masa stabljike i lišća	51,47 g	/
Masa cvijeta	4,85 g	/



Slika 2.1. *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides*

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

Tablica 4. Taksonomija *Bunias erucago* L. (23)

Red	Brassicales Bromhead
Porodica	Brassicaceae (krstašice (Hr), Schlosser, J.C.K.; Vukotinović, Lj.)
Rod	<i>Bunias</i> (repušac (Hr), Domac, R.)
Vrsta	<i>Bunias erucago</i> L.
Sinonimi	<i>Bunias arvensis</i> Jord., <i>Bunias aspera</i> Retz., <i>Bunias brachyptera</i> Jord., <i>Bunias tricornis</i> Lange.
Narodna imena	čunjasti repušac (Hr), Domac, R., pakoleć (Hr), Šulek, B., repušac verugana (Hr), Schlosser, J.C.K

Bunias erucago L. je sabran u travnju 2017. godine. Odvojeno su obrađivane biljke s dva različita lokaliteta. Biljka sabrana na Marjanu u Splitu je obrađena prva, a potom *Bunias erucago* L. s područja otoka Brača (Škrip). Obe su biljke nakon sušenja podijeljene na dijelove: korijen, stabljika i list te cvijet. Svaki dio zasebno je odvagano i obrađen postupkom hidrodestilacije korištenjem modificirane aparature po Clevengeru.

U tablici 5. su prikazane vrijednosti korištenih masa pojedinačnih dijelova biljaka *Bunias*.

Tablica 5. Mase biljnih dijelova s naznačenim podrijetlom biljke

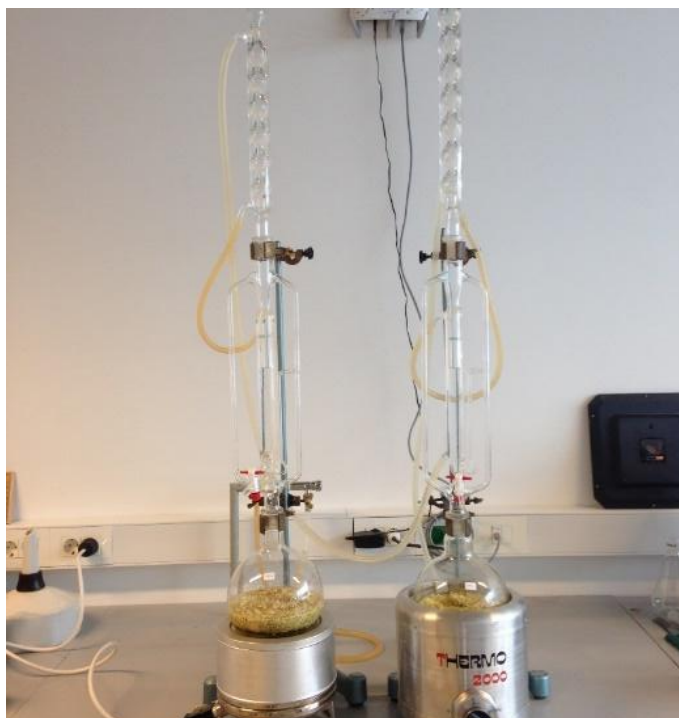
	<i>Bunias erucago</i> L. s Marjana	<i>Bunias erucago</i> L. s Brača
Masa korijena	12,94 g	7,78 g
Masa stabljike i lista	51,42 g	27,12 g
Masa cvijeta	3,32 g	2,95 g



Slika 2.2. Osušeni parcijalni dijelovi *Bunias erucago* L.

2.3. DESTILACIJA

Za izolaciju hlapljivih spojeva osušenih dijelova biljke, korištena je metoda hidrodestilacije s modificiranom aparaturom po Clevengeru (slika 2.3.). Nakon sušenja biljnog materijala, isti je podijeljen na dijelove, tj. korijen, gomolj, stabljiku i cvijet. Svaki dio pojedinačno je samljeven kako bi došlo do oštećenja biljnih stanica i oslobođenja mirozinaze. Nakon vaganja, biljni materijal je stavljen u tikvicu s okruglim dnom koja je potom napunjena destiliranom vodom otprilike do pola, kako bi biljni materijal bio u cijelosti natopljen. Nakon postavljanja aparature po Clevengeru na tikvicu, njegova središnja cijev je ispunjena određenom količinom destilirane vode. Voda je nadodavana sve dok nije započelo prelijevanje vode iz postranih cijevi aparature. Nakon dodavanja vode, uslijedilo je dodavanje trapa. Trap je u ovom slučaju smjesa dietil-etera i pentana u omjeru 1:3. Tako je za veću količinu biljnog materijala, koja je smještena u tikvicu od 500 mL dodano sveukupno 8 mL trapa, a za biljni materijal u maloj tikvici (250 mL), 4 mL. Osnovna zadaća trapa jest da otapa eterično ulje na temelju sličnosti u polarnosti. Naime, vrenjem vode u destilacijskoj tikvici, komponente eteričnog ulja isparavaju zajedno s vodom. Isparavanjem, smjesa vode i ulja dolazi do hladila smještenog iznad nastavka Clevengera te se kondenzira i prolazi kroz njegovu središnju cijev. Eterično ulje zaostaje u trapu, a voda zbog razlike u polarnosti nesmetano prolazi. Destilacija se provodi 2,5 sata te je cijelo vrijeme potrebno kontrolirati vrijući biljni materijal da ne dođe do pjenjenja. Prilikom pjenjenja uzorka postoji opasnost da se pjena otopi u ulju koje je izolirano u središnjoj cijevi aparature, što se ne smije dogoditi jer pjena sadrži visokomolekularne nepolarne površinski aktivne komponente koje bi se otopile u pentanu te na taj način kontaminirale eterično ulje. Po završetku destilacijskog procesa, hladilo i aparatura po Clevengeru se ispiru pentanom kako bi se otopile komponente ulja koje su se zadržale na stjenkama aparature. Nakon ispiranja, pipetom se uklanja eterično ulje, a vodeni ostatak se ispusti kroz pipac aparature po Clevengeru. Eterično ulje se nakon pipetiranja stavlja u suhu čašu te se doda bezvodni Na_2SO_4 . Nakon sušenja, ulje se dekantira u prethodno izvaganu bočicu.



Slika 2.3. Aparatura za destilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru)

2.4. UPARAVANJE U STRUJI DUŠIKA

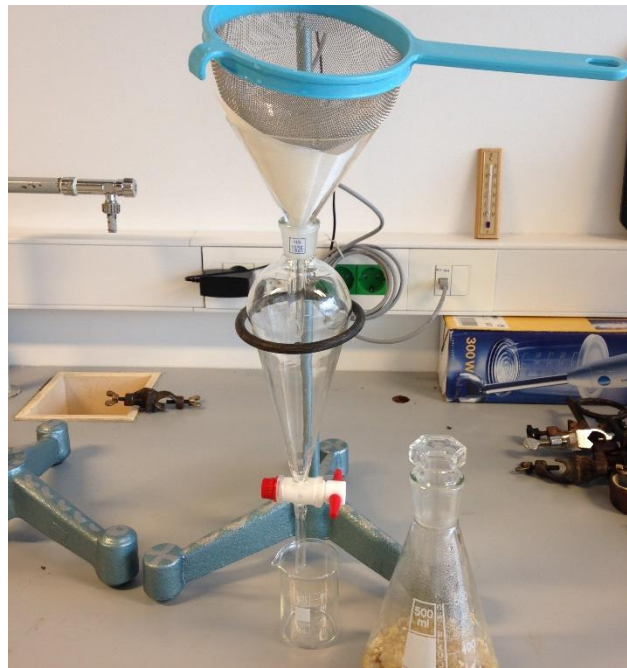
Nakon izolacije eteričnog ulja, slijedi uparavanje otapala. Uparavanje se provodi u struji dušika. Hlapljivi izolat se zagrijava pri temperaturi od 47,2 °C (približna temperatura vrenja otapala), a zahvaljujući propuhivanju inertnim dušikom, proces uparavanja je ubrzan. Velika prednost ovakvog načina uparavanja je izlaganje uzorka niskim temperaturama zbog eventualne prisutnosti termolabilnih komponenti. Nakon uparavanja potrebno je ostaviti barem 1 µL uzorka za GC-MS analizu. Uzorak se do analize čuva u zamrzivaču.



Slika 2.4. Aparatura za uparavanje u struji dušika

2.5. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcijom je obrađen samo gomolj korabe. Odvagani biljni materijal je ostavljen natopljen u destiliranoj vodi 24 sata, na temperaturi od otprilike 30 °C. Nakon 24 sata, smjesi vode i biljnog materijala je dodano 10 mL diklormetana te je tikvica sa sadržajem stavljena na tresilicu nekoliko minuta. Ekstrakcija je obavljena uz simultanu filtraciju na način da je na lijevak za odjeljivanje postavljen stakleni lijevak s filter papirom preko kojeg je filtriran biljni materijal. Na lijevku s filter papirom je postavljeno sito kako bi se na njemu zadržali krupni komadi biljnog materijala (slika 2.5.). Komponente eteričnog ulja su ekstrahirane u diklormetanu, potresanjem u lijevku za odjeljivanje. S obzirom da je prilikom ekstrakcije nastala nepoželjna emulzija, izvršeno je isoljavanje pomoću NaCl-a. Isoljavanje se provodi u svrhu izdvajanja teže topljive tvari iz vode dodatkom lako topljive soli. Nakon odjeljivanja diklormetanskog sloja od vodenog, organski sloj se izdvaja u suhu čašicu sa sredstvom za sušenje, bezvodnim Na₂SO₄. Nakon sušenja, provodi se dekantiranje ulja u prethodno izvaganu bočicu te uparavanje u struji dušika.



Slika 2.5. Ekstrakcija uz simultanu filtraciju

2.6. GC-MS ANALIZA

Za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju produkata razgradnje glukozinolata korišten je vezani sustav plinske kromatografije proizvođača Varian Inc., Lake Forest, CA, USA model 3900 i spektrometrije masa proizvođača Varian Inc. model 2100 T. Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS (30 m x 0,25 mm i.d., debljina sloja stacionarne faze je 0,25 μm). Plin nositelj je helij, a postavljeni protok je 1 mL min^{-1} . Temperatura injektora je postavljena na 250 $^{\circ}\text{C}$, a volumen injektiranog uzorka iznosi 1 μL . Temperatura kolone je postavljena na slijedeći način: 3 min po 60 $^{\circ}\text{C}$, zatim je uslijedilo zagrijavanje na 246 $^{\circ}\text{C}$ brzinom od 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ te zadržavanje navedene temperature 25 min.

Energija ionizacije uzorka u spektrometru masa iznosi 70 eV, temperatura izvora iona je postavljena na 200 $^{\circ}\text{C}$, a područje skeniranja obuhvaća 40-350 masenih jedinica. (9)



Slika 2.6. Korištena GC-MS instrumentacija

3. REZULTATI I RASPRAVA

Hlapljivi sumporovi spojevi čine veliku grupu različitih vrsta koje su pronađene u čak 43 biljne porodice i 173 biljna roda, među kojima su najvažnije porodice Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae, Phytolaccaceae i Poaceae. Glukozinolati su pronađeni u čak 16 biljnih porodica reda Capparales, od kojih je najvažnija porodica Brassicaceae. Ova porodica sadrži više od 350 rodova i 3000 vrsta od kojih je zbog široke dostupnosti i visoke konzumacije posebno važan rod *Brassica*. U radu su obrađene dvije biljne vrste iz roda *Brassica*, koraba (*Brassica rupestris* Raf. ssp. *gongyloides* (L.) Janch.) iz domaćeg uzgoja te samonikli čunjasti repušac (*Brassica erucago* L.), sabran na dvije lokacije, Split (brdo Marjan) i Škrip (otok Brač). Cilj je bio izolirati prisutne hlapljive sumporove spojeve. Eterična ulja su dobivena hidrodestilacijom biljnog materijala u modificiranoj aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 do 3 h, a ekstrakcijom s diklormetanom dobivena je hlapljiva smjesa.

Svi hlapljivi izolati analizirani su korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa. Analizom kromatograma utvrđena je kvantitativnost prisutnih spojeva, a interpretacijom masenih spektara, svi detektirani hlapljivi sumporovi spojevi su identificirani. Analizom kromatograma dobivena su vremena zadržavanja pojedinih komponenti, a integracijom površine ispod formiranog pika, dobivene su informacije o relativnom udjelu svake od njih. Osim kromatograma, GC-MS analizom su dobiveni i određeni maseni spektri pomoću kojih se obavlja potpuna identifikacija svakog prisutnog hlapljivog spoja. Svaki fragment dolaskom na detektor formira specifičan signal. Interpretacijom niza formiranih pikova, dobivene su informacije o osnovnom i molekulskom piku na temelju kojih se vrši identifikacija. Dobiveni maseni spektar se uspoređuje s dostupnim spektrima iz Wileyove baze.

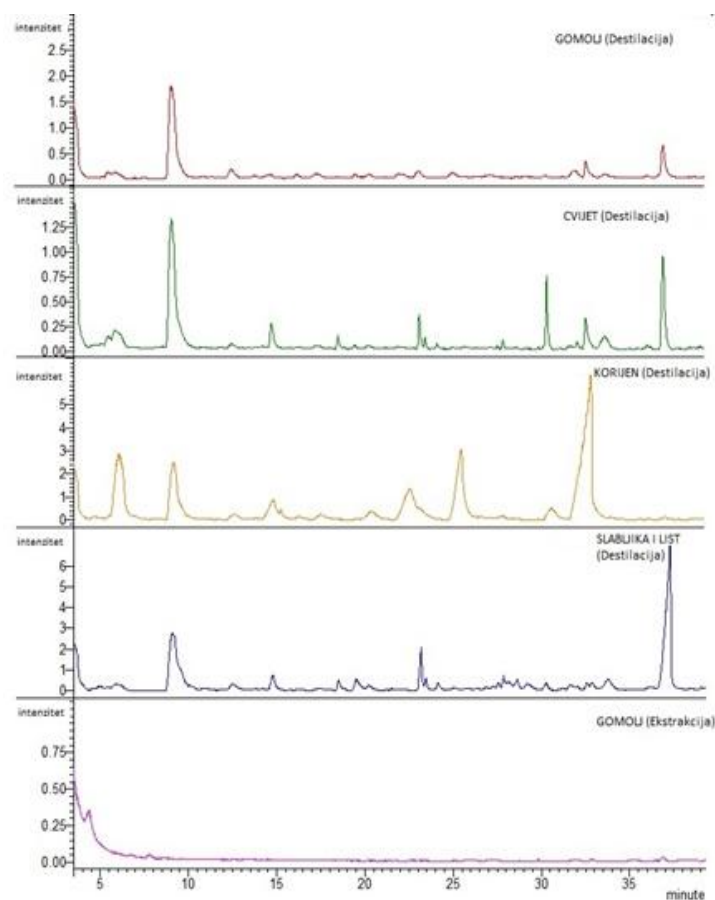
3.1. REZULTATI GC-MS ANALIZE HLAPLJIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U UZORCIMA KORABE

Brassica rupestris Raf. ssp. *gongyloides* (koraba) je zeljasta biljka koja pripada porodici kupusnjača. S obzirom da se često koristi u prehrani, u velikim se količinama uzgaja te se sije za proljetnu i jesensku berbu. Najčešće se konzumiraju listovi i stabljika u kuhanom ili sirovom obliku.

U prethodnim istraživanjima biljke *B. rupestris* Raf. ssp. *gongyloides*, potvrđena je prisutnost glukorafanina, glukoalisina, glukotropeolina, 4-hidroksiglukobrasicina, gluukoerucina, 4-metoksiglukobrasicina te neoglukobrasicina. (24)

3.1.1. Kromatogram i tablični prikaz identificiranih hlapljivih spojeva

Slika 3.1. prikazuje kromatograme uzoraka parcijalnih dijelova biljke s naznačenom metodom obrade. U tablici 6. i 7. prikazani su identificirani razgradni produkti s naznačenim prekursorom, vremenima zadržavanja te postotkom zastupljenosti u različitim biljnim dijelovima.



Slika 3.1. Kromatogrami ukupne ionske struje za korabu

Analizom kromatograma, uočava se kako destilati sadrže hlapljive sumporove spojeve, dok u diklormetanskom ekstraktu gomolja nije uspješno identificiran nijedan hlapljivi spoj od interesa. U tablicama 6. i 7. su prikazani rezultati GC-MS analize destilata.

Tablica 6. Identificirani produkti razgradnje glukozinolata s vremenima zadržavanja i masenim udjelima u uzorcima različitih dijelova biljke *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gonglyoides*

<i>Brassica rupestris</i> Raf. ssp. <i>gonglyoides</i>			
Dio biljke	GLUKOZINOLATI identificirani razgradni produkti	Vrijeme zadržavanja (min)	Maseni udio (%)
GOMOLJ	Sinigrin Alil-izotiocijanat	6,00	0,28
	Glukotropeolin Benzenacetonitril	17,30	0,16
	Benzenpropanonitril	21,94	0,25
	Glukolimnantin 2-Metoksifenil acetonitril	22,90	0,25
	Glukonasturcin 2-Feniletil izotiocijanat	31,89	0,32
KORIJEN	Sinigrin Alil-izotiocijanat	6,00	11,50
	Glukotropeolin Benzenacetonitril	17,30	0,86
	Benzenpropanonitril	21,94	7,07
	Glukoerucin 4-(Metilsulfanil)butil izotiocijanat	30,50	1,76
	Glukonasturcin 2-Feniletil izotiocijanat	31,89	1,64
STABLJIKA I LIŠĆE	Sinigrin Alil-izotiocijanat	6,00	0,44
	Glukotropeolin Benzenacetonitril	17,30	0,13
CVIJET	Sinigrin Alil-izotiocijanat	6,00	2,45
	Glukotropeolin Benzenacetonitril	17,30	0,32

Tablica 7. Identificirani produkti razgradnje *S*-alk(en)il-*L*-cistein sulfoksida s vremenima zadržavanja i masenim udjelima u različitim dijelovima biljke *Brassica rupestris* Raf. ssp. *gonglyoides*

<i>Brassica rupestris</i> Raf. ssp. <i>gonglyoides</i>			
Dio biljke	PREKURSORI Identificirani razgradni produkti	Vrijeme zadržavanja (min)	Maseni udio (%)
GOMOLJ	Metiin		
	Dimetil trisulfid	8,87	4,24
	Metil(metiltio)metil disulfid	16,24	0,10
	Dimetil tetrasulfid	20,30	0,16
KORIJEN	Metiin		
	Dimetil trisulfid	8,87	7,92
	Metil(metiltio)metil disulfid	16,24	0,38
	Dimetil tetrasulfid	20,30	1,41
STABLJIKAI LIŠĆE	Metiin		
	Dimetil trisulfid	8,87	4,26
	Metil(metiltio)metil disulfid	16,24	0,06
	Dimetil tetrasulfid	20,30	0,26
CVIJET	Metiin		
	Dimetil trisulfid	8,87	15,46
	Metil(metiltio)metil disulfid	16,24	0,02
	Dimetil tetrasulfid	20,30	0,16

Obradom podataka dobivenih analizom utvrđena je prisutnost produkata razgradnje glukozinolata, ali i *S*-metil-*L*-cistein sulfoksida. S obzirom da koraba pripada Brassicaceae porodici, rezultati koji dokazuju prisutnost glukozinolatnih vrsta (slike 3.2.-3.6.) u svim parcijalnim dijelovima biljaka su očekivani. Ipak, postoje određene razlike u vrsti i koncentraciji prisutnih glukozinolata među različitim biljnim dijelovima. Analizom rezultata utvrđen je najveći postotak udjela sulfida, zatim izotiocijanata te na kraju nitrila.

Alil-izotiocijanat je identificiran u destilatima svih biljnih dijelova. Razgradni je produkt sinigrina, a kao što je već spomenuto, njegovo farmakološko djelovanje se krije u antibakterijskim i anestetičkim učincima koje posjeduje. Osim alil-izotiocijanata, identificirani su još i 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanat te 2-feniletil-izotiocijanat.

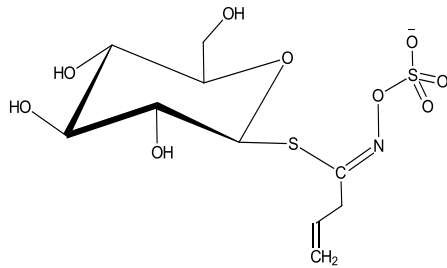
4-(Metilsulfanil)butil-izotiocijanat, razgradni produkt glukoerucina je identificiran samo u korijenu biljke dok je 2-feniletil-izotiocijanat koji nastaje razgradnjom glukonasturcina osim u korijenu identificiran i u gomolju. Nastanku izotiocijanata pogoduje prisutna pH vrijednost 7 pri kojoj isti nastaju Lossenovom pregradnjom. (1) Izlaganje biljnog materijala temperaturi od 100 °C prilikom obrade istog destilacijom utječe na aktivnost mirozinaze koja je odgovorna za razgradnju glukozinolata. Tako su dosadašnje studije pokazale kako je na temperaturi višoj od 70 °C njena aktivnost maksimalno usmjerena k razgradnji glukozinolata na izotiocijanate. (27)

Osim izotiocijanata, kao produkti razgradnje glukozinolata identificirani su i nitrili. Benzenacetonitril i benzenpropanonitril nastaju razgradnjom glukotropeolina, a 2-metoksifenilacetonitril razgradnjom glukolimnantina. Benzenacetonitril je prisutan u svim biljnim dijelovima, benzenpropanonitril u gomolju i korijenu, a 2-(metoksifenil)acetonitril samo u gomolju. Ukupna koncentracija identificiranih nitrila je manja u odnosu na sulfide i izotiocijanate što se može objasniti ovisnošću aktivnosti eventualno prisutnog epitiospecifičnog proteina o temperaturi. Naime, dosadašnjim istraživanjima je dokazana prisutnost ovog proteina u nekim podvrstama *B. oleracea* te je kod njih očekivana visoka koncentracija nitrila. (28) Međutim, prilikom izlaganja biljnog materijala temperaturama iznad 70 °C, osim što se mijenja aktivnost mirozinaze, aktivnost ESP-a je svedena na minimum te je time smanjena favorizacija razgradnje glukozinolata na nitrile. (27)

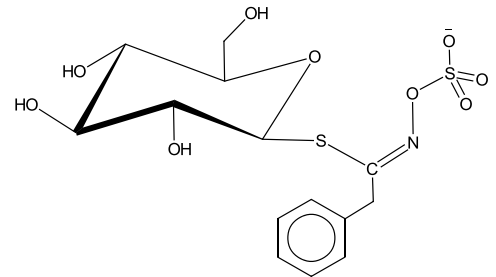
Kao što je već objašnjeno, svi glukozinolati nastaju od aminokiselina u njihovom osnovnom ili modificiranom obliku. Tako sinigrin i glukoerucin nastaju iz metionina dok je fenilalanin prekursor glukotropeolinu i glukonasturcinu.

Sulfidi su produkti razgradnje *S*-metil-*L*-cistein sulfoksida. *S*-metil-*L*-cistein sulfoksid je karakterističan za biljke *Allium* vrsta te je zanimljivo kako su upravo njegovi razgradni produkti (dimetil trisulfid, metil(metiltio)metil disulfid, dimetil tetrasulfid) u velikom postotku prisutni u svim biljnim dijelovima. Prema literaturi, alkenizacijom cisteina koji, kao što je već objašnjeno, sudjeluje u biosintezi glukozinolata, nastaje *S*-metil-*L*-cistein. Očito je da se dio ukupne koncentracije prisutnog cisteina alkilira čime ulazi u biosintetski put nastanka *S*-metil-*L*-cisteina, a dio reagirajući s nitro- međuproduktom sudjeluje u biosintezi glukozinolata. *S*-alkenil-*L*-cistein se oksidira te nastaje *S*-metil-*L*-cistein sulfoksid. Enzim alinaza katalizira hidrolizu *S*-metil-*L*-cistein sulfoksida prilikom čega nastaju

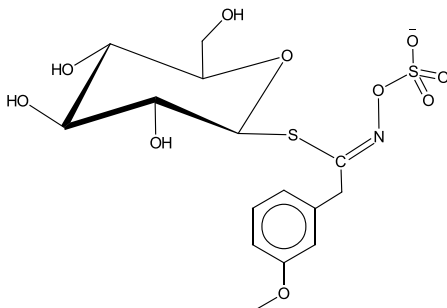
sulfenska kiselina, amonijak i piruvat. Kondenzacijom sulfenske kiseline nastaju termolabilni tiosulfinati. Oni se na temperaturi od 100 °C razlažu na polisulfide dok disulfidi nastaju također razgradnjom tiosulfinata, ali prilikom mehaničkog oštećenja biljnog tkiva. (5, 25) Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, dimetil trisulfidi su identificirani u velikom broju biljnih porodica dok su neki polisulfidi poput dimetil tetrasulfida karakteristični za *Allium*, *Brassica*, *Ferula*, *Raphanus* i *Sinapis* vrste. (26)



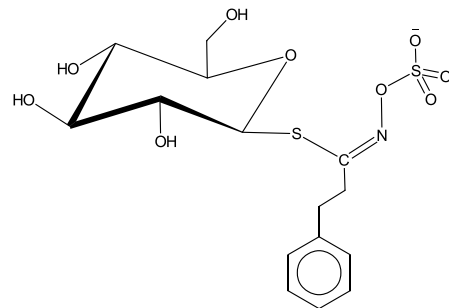
Slika 3.2. Sinigrin



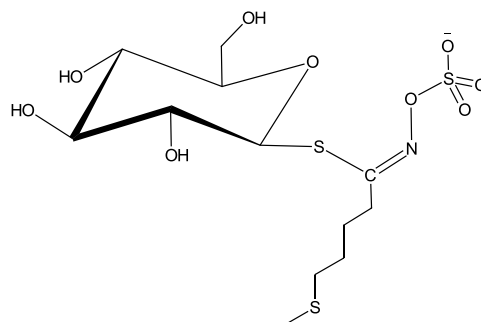
Slika 3.3. Glukotropeolin



Slika 3.4. Glukolimnantin



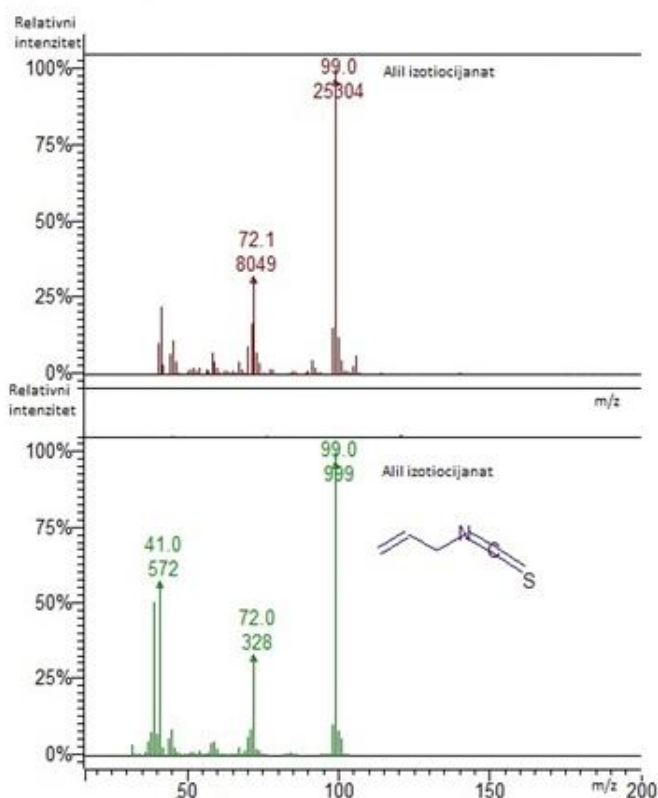
Slika 3.5. Glukonasturcin



Slika 3.6. Glukoerucin

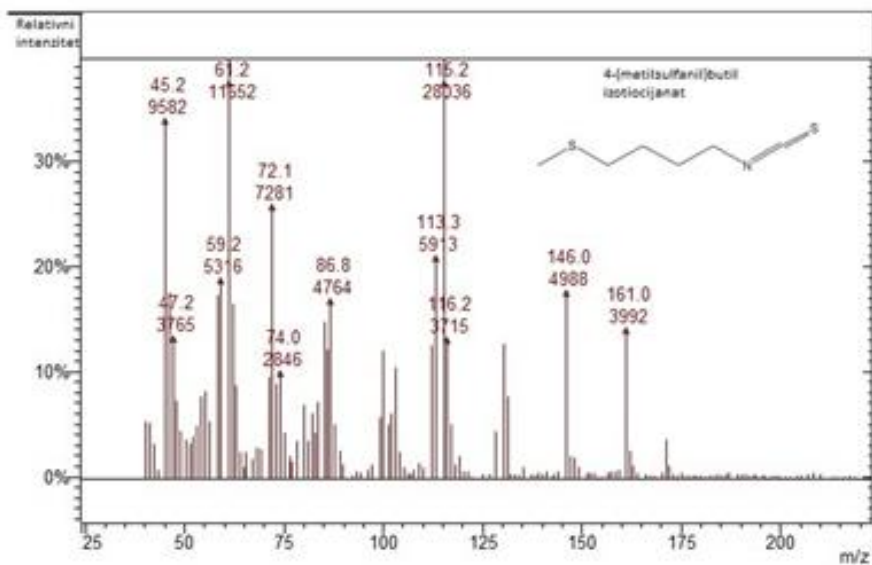
3.1.2. Maseni spektri izotiocijanata

Slike (3.7.-3.9.) prikazuju masene spektre redom alil-izotiocijanata, 4-(metilsulfanil)-butil-izotiocijanata te 2-feniletil-izotiocijanata. S obzirom da izotiocijanati sadrže atom dušika i sumpora, sukladno "dušikovom pravilu" zbog prisustva neparnog broja dušikovih atoma u funkcijskoj skupini, imaju karakterističnu neparnu molekulsku masu. Zbog sumporovog atoma očekivana je prisutnost M+2 pika čiji je intenzitet 4% intenziteta M⁺ signala. Za izotiocijanate je karakterističan pik m/z=71.



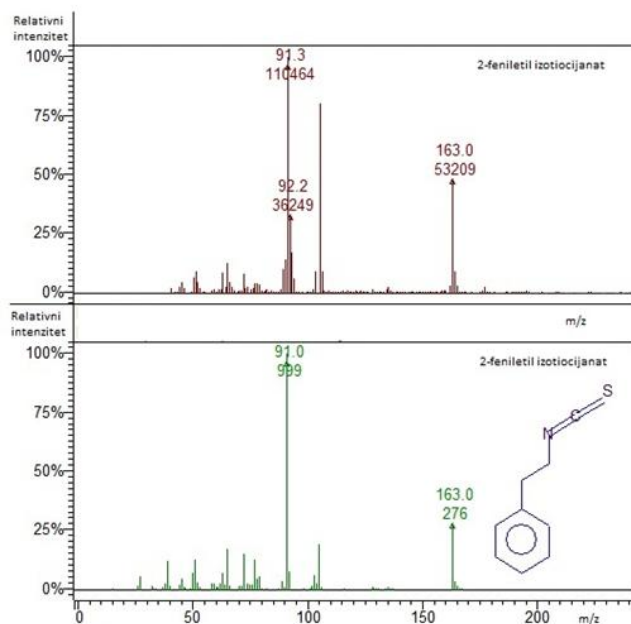
Slika 3.7. Maseni spektar alil-izotiocijanata

Kod masenog spektra alil-izotiocijanata, najzastupljeniji fragment (osnovni pik) je ujedno i molekulski pik i to na vrijednosti m/z=99. Pik vrijednosti m/z=72 je karakterističan za alifatske izotiocijanate te je najvjerojatnije posljedica cijepanja C-C veze u blizini heteroatoma (dušika), budući da heteroatom obično bolje stabilizira pozitivan naboj od ugljikova atoma. Pik m/z=41 je posljedica stvaranja alilnog karbokationa.



Slika 3.8. Maseni spektar 4-(metilsulfanil)butil izotiocijanata

Vrijednost molekuskog pika je 161, vidljiv je i pik karakterističan za izotiocijanate koji je posljedica stvaranja $(\text{CH}_2=\text{NCS})^+$ kationa te mu je vrijednost jednaka $m/z=72$. Pik $m/z=61$ je formiran od strane $(\text{CH}_3\text{S}=\text{CH}_2)^+$ kationa te je njegova zastupljenost jako visoka. Visoku stabilnost ima i fragment $m/z=115$ kojeg izaziva formiranje 3,4,5,6-tetrahidropiridin-2-tiolnog kationa.

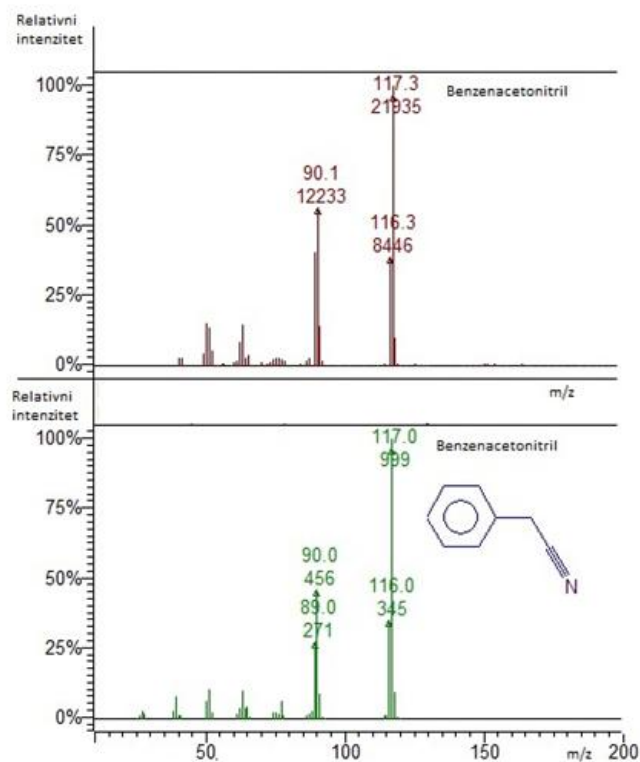


Slika 3.9. Maseni spektar 2-fenilet-il-izotiocijanata

Na masenom spektru 2-fenil-izotiocijanata pažnju posebno odvlači osnovni pik čija je m/z vrijednost jednaka 91. Ovaj pik je posljedica stvaranja tropilium iona koji nastaje kidanjem β -veze u odnosu na prsten kod alkil-supstituiranih aromatskih spojeva. Tropilium ion je zapravo sedmeročlani prsten visoke stabilnosti ($(C_7H_7)^+$). Molekulski pik je na vrijednosti $m/z=163$.

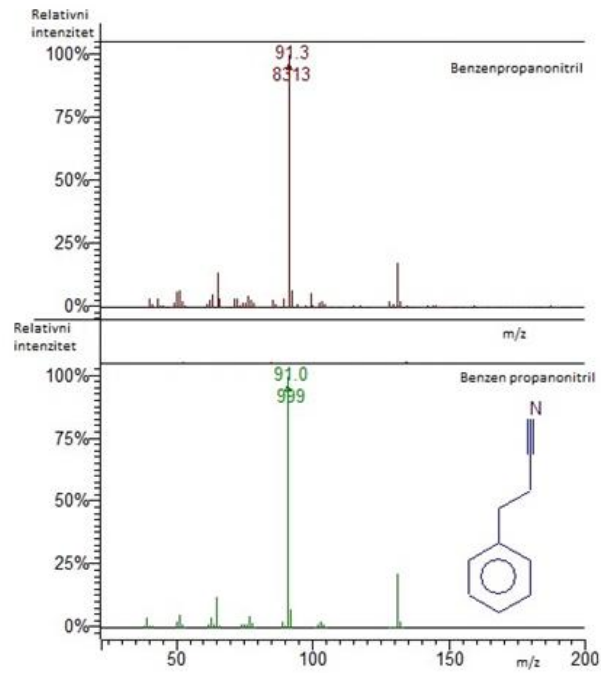
3.1.3. Maseni spektri nitrila

Slike (3.10.-3.12.) prikazuju masene spektre identificiranih nitrila. S obzirom na prisustvo dušika, nitrili imaju neparnu m/z vrijednost molekulskog pika.



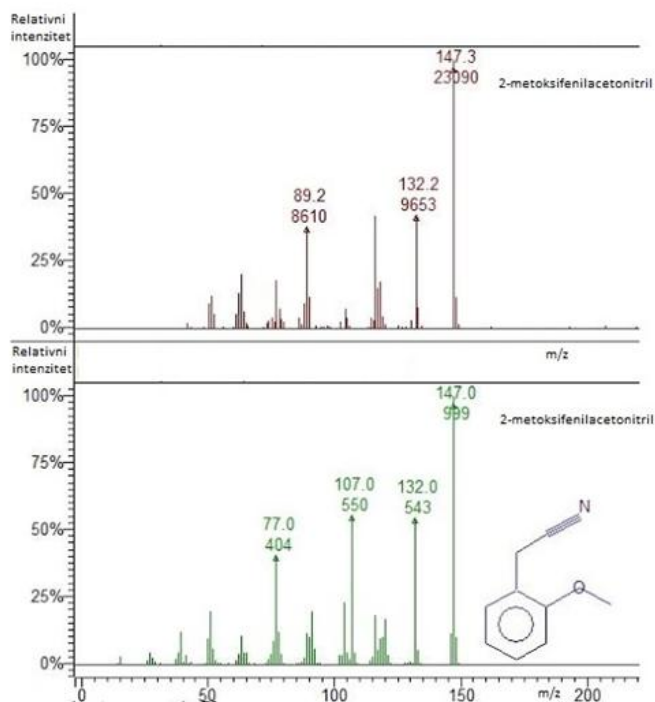
Slika 3.10. Maseni spektar benzenacetonitrila

Molekulski kation je identificiran pikom m/z vrijednosti 117. S obzirom da je molekulski pik ujedno i osnovni, to može biti posljedica visoke stabilnosti benzenske jezgre. Kod benzenacetonitrila se također kao i kod 2-fenilet-il-izotiocijanata pojavljuje pik karakterističan za tropilijev ion.



Slika 3.11. Maseni spektar benzenopropanitrila

Najstabilniji i najzastupljeniji fragment benzenopropanitrila je tropilijev ion koji stvara karakterističan signal $m/z=91$. Molekulski pik je na vrijednosti $m/z=131$.

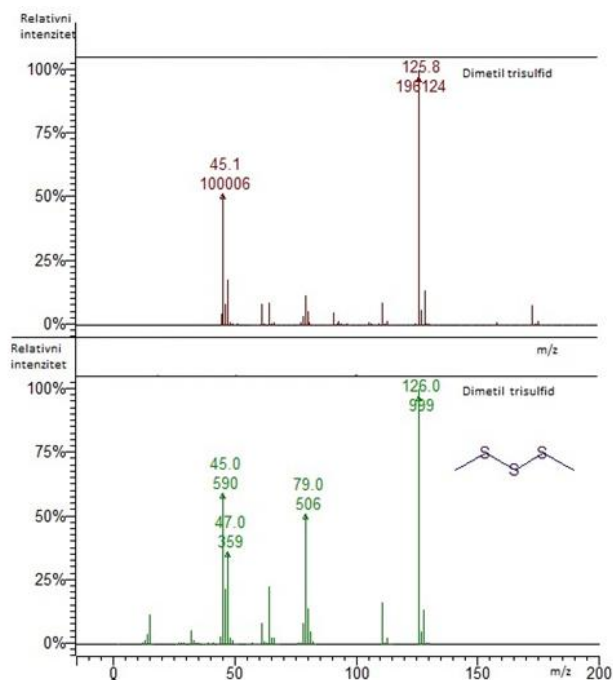


Slika 3.12. Maseni spektar 2-metoksifenilacetonitrila

Spektar 2-metoksifenilacetonitrila okarakteriziran je pikom čija je m/z vrijednost jednaka 147. Ovaj pik predstavlja ujedno i molekulski i osnovni pik, što je posljedica stabilizacije benzenske jezgre.

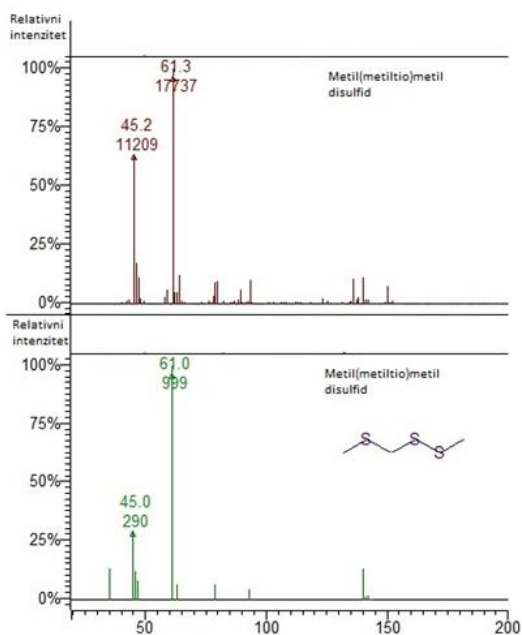
3.1.4. Maseni spektri sulfida

Svaki od navedenih sulfida je identificiran u svim biljnim dijelovima. Kod svih masenih spektara vidljiv je fragment $m/z=79$ koji nastaje cijepanjem S-S veze i karakterističan je za polisulfidne spojeve. Spomenuti pik je najistaknutiji na spektru dimetil tetrasulfida. Njihovi spektri masa su prikazani redom na slikama (3.13.-3.15.).



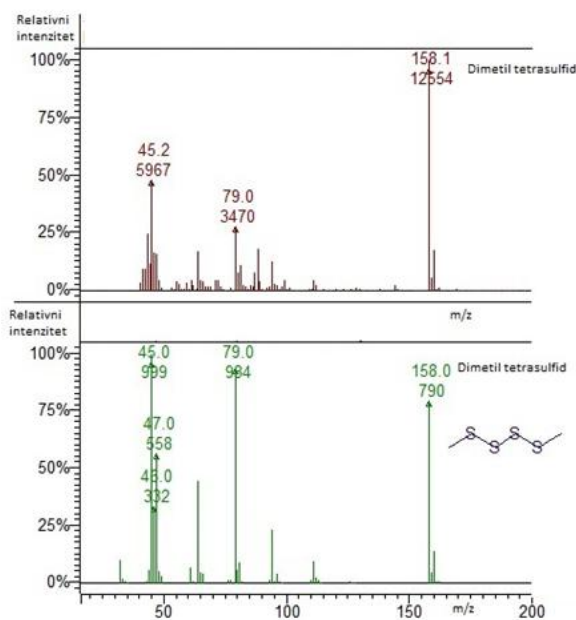
Slika 3.13. Maseni spektar dimetil-trisulfida

Molekulski pik, koji je ujedno i osnovni ima vrijednost omjera mase i naboja jednaku 126. Vidljiv je i karakteristični M+2 pik čiji je intenzitet jednak 4 % vrijednosti intenziteta molekulskog pika, a karakterističan je za sumporove spojeve.



Slika 3.14. Maseni spektar metil(metiltio) disulfida

Molekulski pik ima vrijednost $m/z=140$, vidljiv je i $M+2$ pik. Osnovni pik se nalazi na $m/z = 61$ a odgovara nastanku $(\text{CH}_3\text{-S-CH}_2)^+$ fragmenta.



Slika 3.15. Maseni spektar dimetil tetrasulfida

Vrijednost molekulskoga pika je $m/z=158$, a osnovnog $m/z=45$. Osnovni pik predstavlja fragment koji može nastati odcjepljenjem $(\text{CH}_3\text{-S})$ te nastanka $(\text{CH}_3\text{-S})^+$ kationa.

3.2. REZULTATI GC-MS ANALIZE HLAPLJIVIH SPOJEVA PRISUTNIH U UZORCIMA *BUNIAS ERUCAGO* L.

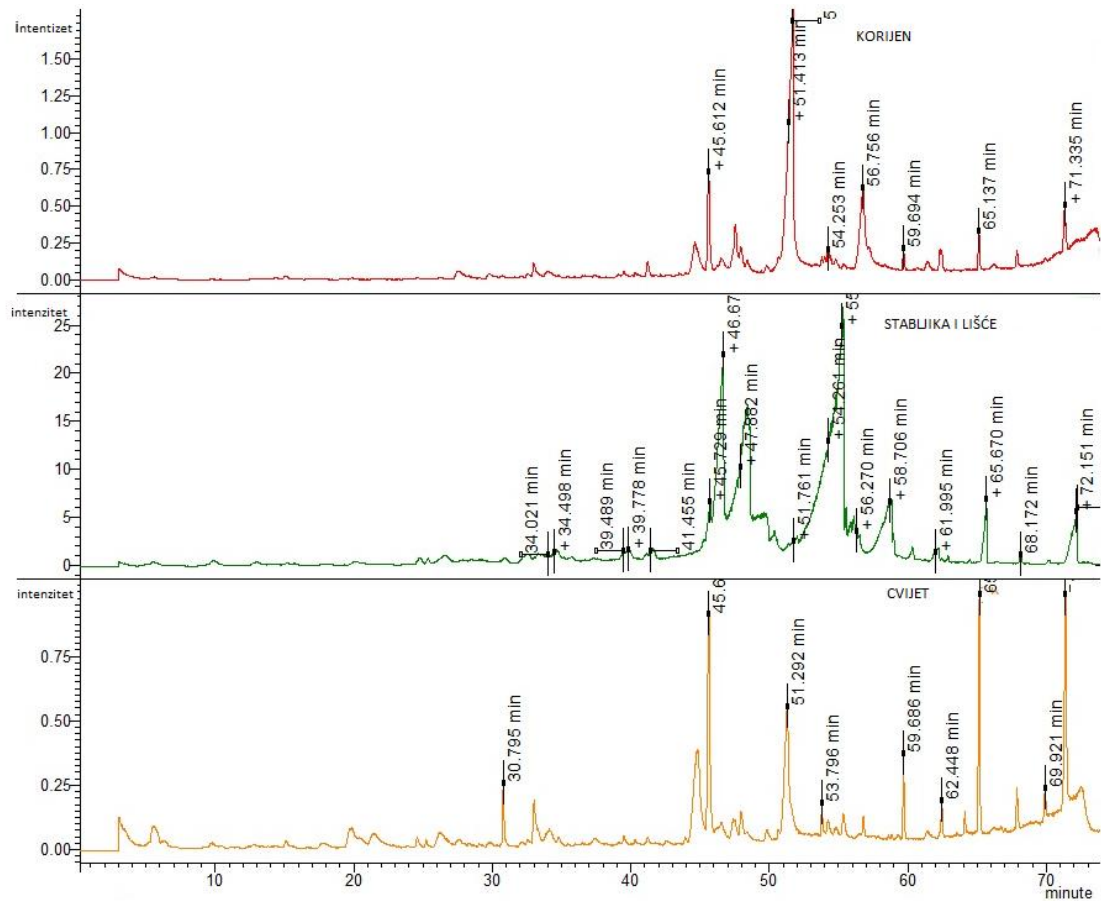
Bunias erucago L. je slabo istražena biljna vrsta. Postoje samo dvije priznate vrste roda *Bunias* (*Bunias erucago* i *Bunias orientalis*) čiju su genetsku raznolikost proučavali Greilhuber i Obermayer (3) Daxenbichler i suradnici su prilikom proučavanja sjemena *Bunias orientalis* dokazali prisutnost glukorafanina, glukorafenina, glukosinalbina i glukoputranjivina. (3) Bennet i sur. su dokazali dominantnost 4-hidroksibenzil glukozinolata (glukosinalbin) i 4-metilsulfinilbut-3-enil glukozinolata (glukorafenin). (27)

Bunias erucago L. je još poznata i pod nazivom „čunjasti repušac“, a pripada porodici kupusnjača. Kod nas je pronađena samo u primorskim krajevima što je posljedica zahtjeva za suhim i sunčanim staništima.

U dosadašnjim istraživanjima sadržaja glukozinolata preko njihovih razgradnih produkata, u biljci *Bunias erucago* L. ih je identificirano osam: glukodehidroerucin, glukoerucin, glukolepidiin, glukosinalbin, glukodiabutin, heksilglukozinolot, glukonapin i glukotropeolin. (3)

3.2.1. Kromatogram i tablični prikaz svih identificiranih hlapljivih spojeva pronađenih kod biljke *Bunias erucago* L. s otoka Brača

Slika 3.16. prikazuje kromatograme destilata analiziranih uzoraka svakog pojedinog dijela biljke.



Slika 3.16. Kromatogram ukupne ionske struje za parcijalne dijelove biljke *Bunias erucago* L. sabrane na otoku Braču.

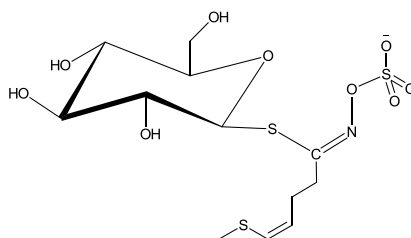
U tablici 8. prikazani su glukozinolatni prekursori identificiranih hlapljivih produkata njihove razgradnje.

Tablica 8. Identificirani produkti s naznačenim vremenima zadržavanja i masenim udjelima u uzorcima različitih dijelova biljke *Bunias erucago* L. s otoka Brača

<i>Bunias erucago</i> L. s otoka Brača			
Dio biljke	GLUKOZINOLATI Identificirani razgradni produkti	Vrijeme zadržavanja (min)	Maseni udio (%)
KORIJEN	/	/	/
STABLJICA I LIŠĆE	Glukotropeolin Benzenacetonitril	17,50	0,01
CVIJET	Glukotropeolin Benzenacetonitril	17,50	0,03
	Glukodehidroerucin 5-(Metilsulfanil)pent-4-enonitril*	19,90	1,29
	5-(Metilsulfanil)pent-4-enonitril*	21,50	1,21

*-izomer nije identificiran

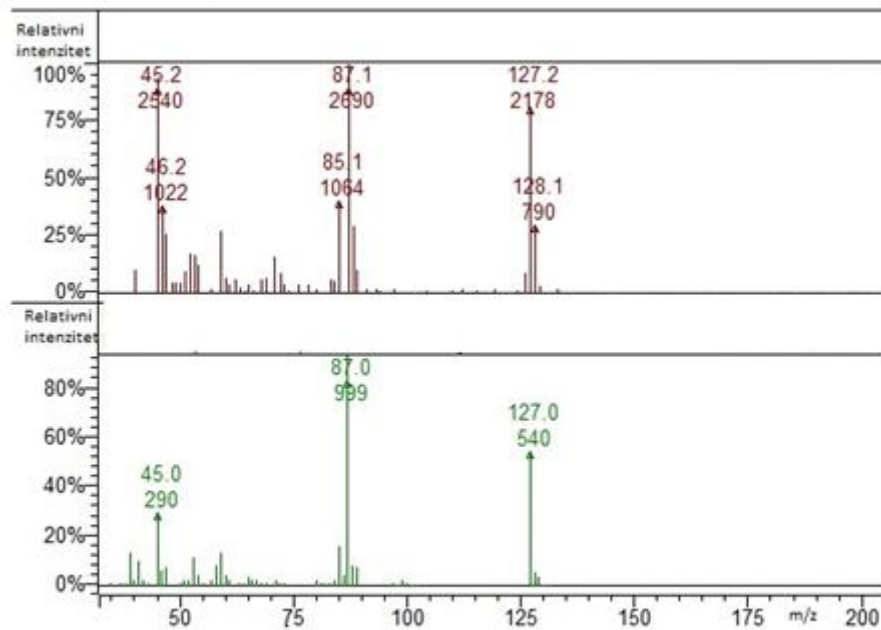
Proučavanjem rezultata vidljivo je kako su glukozinolati u ovoj biljci prisutni samo u tragovima. Maseni udio identificiranog benzenacetonitrila u stabljici i lišću je samo 0,01 % te u cvijetu 0,03 %. Kao što je već spomenuto, on nastaje kao produkt razgradnje glukotropeolina, a jedini je detektiran u uzorku lišća i stabljike. U cvijetu je identificiran još i 5-(metilsulfanil)pent-4-enonitril koji nastaje razgradnjom glukodehidroerucina (slika 3.17.). U korijenu nije uspješno detektiran nijedan hlapljivi sumporov spoj od interesa. Također, važno je naglasiti kako nije detektirano prisustvo nijednog izotiocijanata.



Slika 3.17. Glukodehidroerucin

3.2.2. Maseni spektri nitrila

Slika 3.18. prikazuje maseni spektar identificiranog 5-(metilsulfanil)pent-4-enonitrila. Maseni spektar benzenacetonitrila prethodno je prikazan (slika 3.5.).

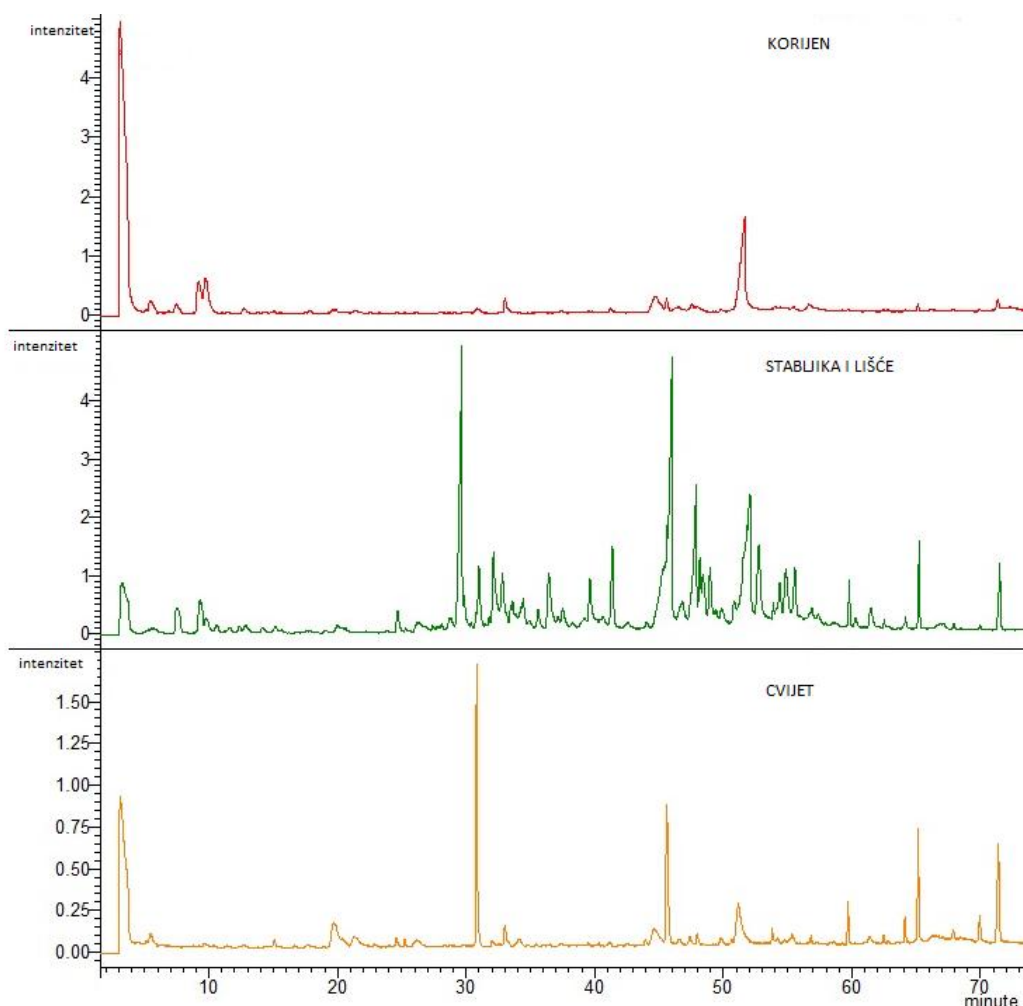


Slika 3.18. Maseni spektar 5-(metilsulfanil)pent-4-enonitrila

Molekulski pik se nalazi na $m/z = 127$, dok je osnovni pik na vrijednosti $m/z=87$.

3.2.3. Kromatogram i tablični prikaz svih identificiranih hlapljivih spojeva identificiranih u biljci *Bunias erucago* L. s Marjana u Splitu

Slika 3.19. prikazuje kromatograme dobivene analizom uzoraka korijena, stabljike i lišća te cvijeta biljke *Bunias erucago* L. koja je pribavljena s područja Marjana u Splitu. Tablica 9. prikazuje sve identificirane hlapljive spojeve, pripadajuće vrijeme zadržavanja svake komponente te postotak zastupljenosti u svakom od tri analizirana dijela biljke. Maseni spektri određenih identificiranih komponenti prikazani su na slikama (3.22.-3.25.) dok su spektri ostalih prikazani prethodno (slike: 3.8.,3.10.,3.13.,3.14.)



Slika 3.19. Kromatogram uzoraka parcijalnih dijelova biljke *Bunias erucago* L. s Marjana u Splitu

Tablica 9. Identificirani produkti s naznačenim retencijskim vremenom i postotkom zastupljenosti u uzorcima različitih dijelova biljke

<i>Bunias erucago</i> L. s Marjana u Splitu				
Dio biljke	GLUKOZINOLATI Identificirani razgradni produkti	Vrijeme zadržavanja (min)	Maseni udio (%)	
KORIJEN	Glukonapin But-3-enil izotiocijanat	9,70	6,61	
	Glukotropeolin Benzenacetnitril Benzil izotiocijanat	17,50 27,90	0,52 tr	
	Glukodehidroerucin 5-(Metilsulfanil)pent-4-enonitril* 5-(Metilsulfanil)pent-4-enonitril* 4-(Metilsulfanil)but-3-enil izotiocijanat	19,90 21,50 29,90	0,47 0,38 0,13	
	Heptil glukozinolat Heptil izotiocijanat	22,50	0,08	
	Glukoerucin 4-Metilsulfinalbutil izotiocijanat (erucin)	30,60	6,20	
	STABLJIKA I LIŠĆE	/	/	/
	CVIJET	Glukonapin But-3-enil izotiocijanat	9,70	0,27
		Glukotropaeolin Benzenacetnitril	17,50	3,16
Glukodehidroerucin 5-(Metilsulfanil)-pent-4-enonitril* 5-(Metilsulfanil)-pent-4-enonitril* 4-(Metilsulfanil)but-3-enil izotiocijanat		19,90 21,50 29,90	3,16 2,22 0,10	

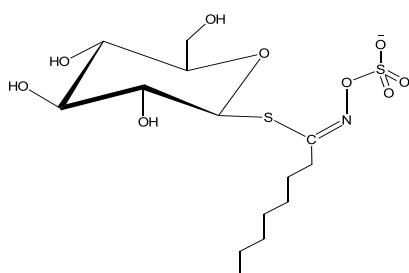
tr-komponenta pronađena u tragovima

*-izomer nije identificiran

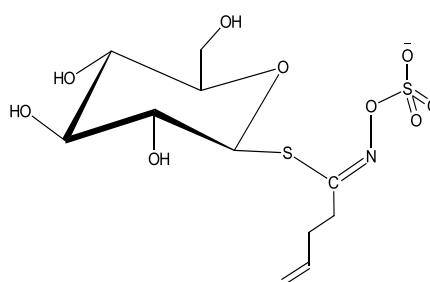
Tablica 10. Identificirani produkti s naznačenim retencijskim vremenom i postotkom zastupljenosti u uzorcima različitih dijelova biljke

<i>Bunias erucago</i> L. s Marjana u Splitu			
Dio biljke	PREKURSORI Identificirani razgradni produkti	Vrijeme zadržavanja (min)	Maseni udio (%)
KORIJEN	Metiin		
	Dimetil trisulfid	9,06	4,49
	Dimetil tetrasulfid	20,07	0,15
STABLJICA I LIŠĆE	/	/	/
CVIJET	/	/	/

Prema tabličnim podacima, najbogatiji dio biljke hlapljivim spojevima koji potječu od glukozinolata ili *S*-metil-L-cistein sulfoksida je korijen. Samo u korijenu su identificirani dimetil trisulfid i dimetil tetrasulfid koji potječu od *S*-metil-L-cistein sulfoksida, zatim produkti razgradnje heptil glukozinolata (slika 3.20.), glukocerucina (slika 3.6.) i glukotropeolina (slika 3.3.). Osim u korijenu i u cvijetu su identificirani 4-metilsulfanilbut-3-enil izotiocijanat kao produkt razgradnje glukonapina (slika 3.21.), benzenacetonitril koji nastaje razgradnjom glukotropeolina te 5-(metilsulfanil)-pent-4-enonitril i 4-(metilsulfanil)but-3-enil izotiocijanat nastali razgradnjom glukodehidroerucina (slika 3.22.). U stabljici i lišću nijedan od navedenih spojeva nije identificiran.



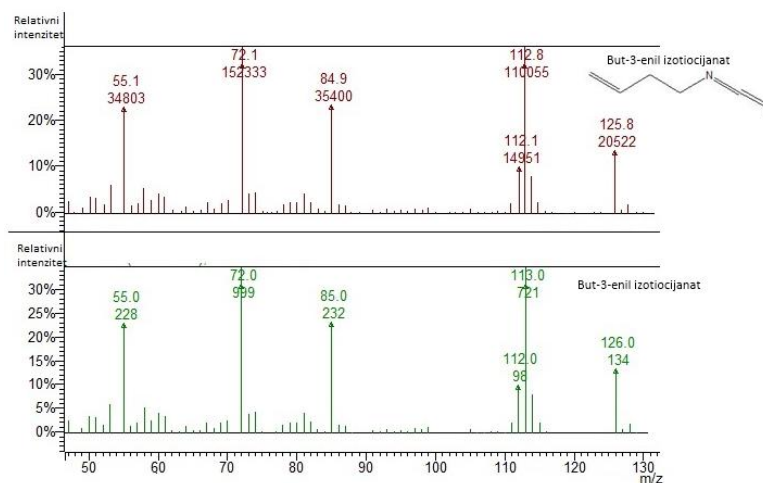
Slika 3.20. Heptil glukozinolat



Slika 3.21. Glukonapin

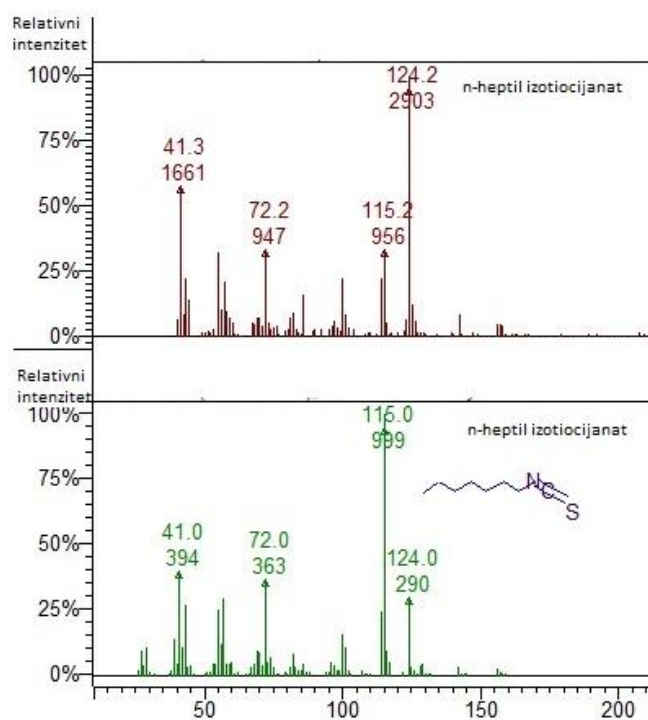
3.2.4. Maseni spektri izotiocijanata

Maseni spektri but-3-enil izotiocijanata, n-heptil izotiocijanata, benzil izotiocijanata te 4-(metilsulfanil)but-3-enil izotiocijanata su redom prikazani na slikama 3.22.-3.25.



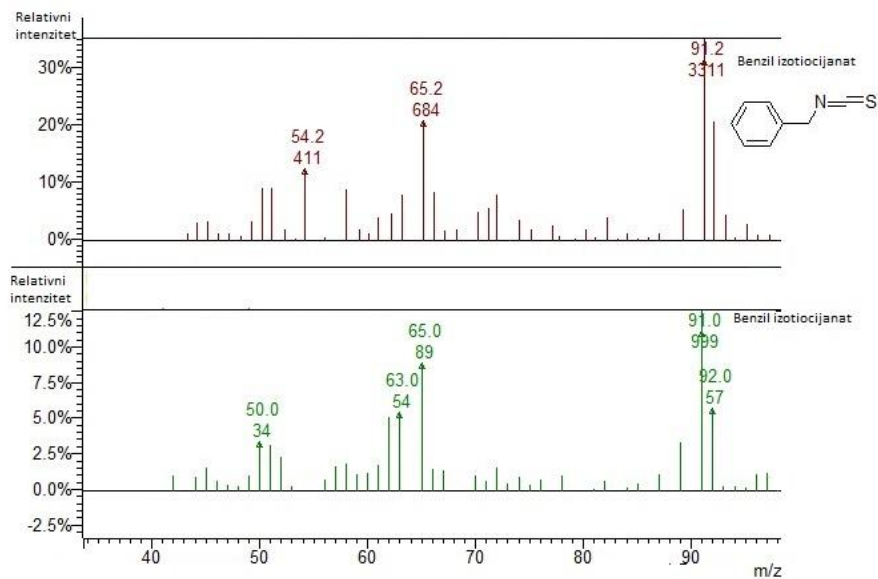
Slika 3.22. Maseni spektar but-3-enil izotiocijanata

Molekulski pik but-3-enil izotiocijanata je na vrijednosti 125.



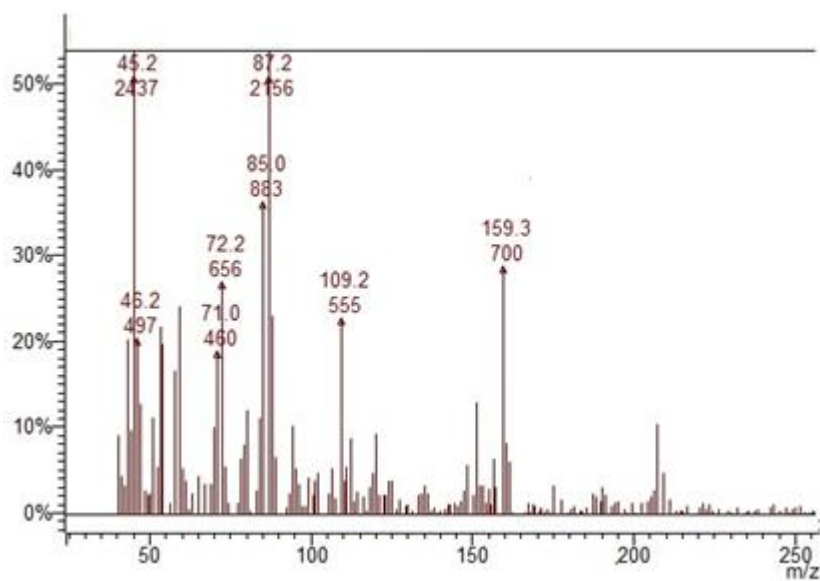
Slika 3.23. Maseni spektar n-heptil izotiocijanata

Molekulski pik je detektiran na vrijednosti 124, a osnovni na vrijednosti 41.



Slika 3.24. Maseni spektar benzil izotiocijanata

Posebno se ističe osnovni pik na $m/z=91$ koji je posljedica formiranja stabilnog tropilijevog iona.



Slika 3.25. Maseni spektar 4-(metilsulfanil)but-3-enil izotiocijanata

Usporedbom rezultata dobivenih analizom *Bunias erucago* L. s dva različita lokaliteta, postoje brojne razlike. Analizom uzorka korijena *Bunias erucago* L. s Brača nije uspješno identificiran nijedan hlapljivi spoj dok je upravo korijen *Bunias erucago* L. s Marjana njima najbogatiji. Osim razlika u koncentraciji hlapljivih spojeva među biljnim djelovima, postoji razlika i u vrsti identificiranih hlapljivih spojeva. Rezultati su kod *Bunias erucago* L. s Brača pokazali nulti postotak koncentracije izotiocijanata i sulfida te iznimno mali postotak zastupljenosti nitrila dok je kod *Bunias erucago* L. s Marjana detektirana najveća koncentracija izotiocijanata zatim sulfida te nitrila. Indirektna identifikacija prisutnih glukozinolata u analiziranim biljkama je pokazala kako je njima znatno bogatija biljka sabrana na području Marjana u kojoj ih je identificirano pet dok su u *Bunias erucago* L. s Brača identificirane samo dvije vrste. Navedene razlike u koncentracijama glukozinolata među ovim dvjema biljkama mogu biti posljedica velikih razlika u masi obrađenih uzoraka (tablica 5.).

4. ZAKLJUČAK

- Analizom hlapljivih produkata nastali mehaničkom i termičkom obradom biljnog materijala uspješno su identificirani prisutni glukozinolati i/ili cisteinsulfoksidi u biljkama *Brassica rupestris* Raf.ssp. *gongyloides* L. (koraba) i *Bunias erucago* L. (čunjasti repušac) koje pripadaju porodici Brassicaceae
- Analizom korijena, gomolja, stabljike i lišća te cvijeta korabe koristeći GC-MS metodu identificirani su izotiocijanati od kojih je najzastupljeniji alil izotiocijanat (12,22 %), nitrili među kojima je u najvećoj koncentraciji benzenpropanonitril (7,32 %) te sulfidi. Potvrđena je prisutnost sljedećih glukozinolata: sinigrina, glukotropeolina, glukolimnantina, glukouerucina te glukonasturcina.. Uvjeti kojima je izložen biljni materijal prilikom izolacije hlapljivih spojeva su pH=7 te temperatura od 100 °C što pogoduje nastanku izotiocijanata. Izlaganjem biljnog materijala temperaturama iznad 70 °C aktivnost eventualno prisutnog ESP-a čija bi aktivnost vodila ka razgradnji glukozinolata na nitrile, u potpunosti oslabi. Osim izotiocijanata i nitrila identificirana je visoka koncentracija sulfida i to dimetil trisulfida, metil(metiltio)metil disulfida i dimetil tetrasulfida čiji je prekursor S-metil-L-cistein sulfoksid karakterističan za *Allium* vrste.
- Biljka *Bunias erucago* L. je sabrana na dva različita lokaliteta (Škrip na otoku Braču i Marjan u Splitu) te su obje analizirane odvojeno, ali pri jednakim uvjetima. Obradom i interpretacijom dobivenih rezultata, uočene su određene razlike u sastavu glukozinolata među navedenim biljkama. Kod biljke *Bunias erucago* L. sa područja otoka Brača najzastupljeniji identificirani hlapljivi spoj je izomer 5-(metilsulfanil)pent-4-enonitrila kojem je vrijeme zadržavanja 19,90 min, a maseni udio mu je 1,29 %. Kod ove biljke je potvrđena prisutnost samo dvije vrste glukozinolata; glukotropeolina i glukodehidroerucina. GC-MS analizom biljnog materijala s područja Marjana identificirani su brojni izotiocijanati među kojima je najzastupljeniji but-3-enil izotiocijanat (6,88 %) te nitrili među kojima je najveći maseni udio benzenacetonitrila u iznosu od 3,68 %. U ovoj biljci je dokazano čak pet različitih glukozinolata i to glukonapina, glukotropeolina, heptil glukozinolata, glukodehidroerucina i glukouerucina. Osim razlika u sastavu glukozinolata, velike su razlike i u

lokaliziranosti identificiranih hlapljivih spojeva u biljnim dijelovima. Tako analizom korijena biljke *Bunias erucago* L. s Brača nije uspješno identificiran nijedan razgradni produkt glukozinolata, dok je njima najbogatiji upravo korijen *Bunias erucago* L. s Marjana. *Bunias erucago* L. s Marjana je okarakteriziran visokom prisutnošću izotiocijanata te manjom koncentracijom nitrila i sulfida, dok kod *Bunias erucago* L. s Brača nije identificiran nijedan izotiocijanat, a postotak nitrila je iznimno nizak.

5. LITERATURA

1. Blažević, I. *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija*. Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
2. Fahey J.W., Zalczman A. T., Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 2001, str. 5-51.
3. Zekić, M. *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija*. Zagreb : Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
4. Jerković, I. *Kemija aroma*. Split : Kemijsko-tehnološki fakultet, 2011.
5. Stojanov, D. *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama porodice Brassicaceae i Phytolaccaceae i sinteza fenil-izotiocijanata*. Split : Kemijsko-tehnološki fakultet, 2015.
6. Kopjar M., Šubari D., Piližota V. Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 1, 2012, Sves. 22-35, 1.
7. Bennet R.N., Mellon F.A., Kroon P.A. Screening Crucifer Seeds as Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. 52, 2004, Sves. 428-438, 52.
8. Blažević I., Montaut S., Burčul F., Rollin P. *Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential*. s.l. : Springer International Publishing Switzerland, 2012.
9. Cvjetković, K. *Glukozinolati tornjaste gušarke (Arabisnurrta L.): Termička, enzimska i kemijska hidroliza /završni rad*. Split : Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2014.
10. Jerković, I. i Radonić, A. *Praktikum iz organske kemije*. Split : Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2009.
11. Neseck, B. *Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni/diplomski rad*. Zagreb : Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2004.

12. Mandarić, M. *Analitičke metode za određivanje parabena u kozmetici*. Zagreb : Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, 2016.
13. Pine, S. H. *Organska kemija*. Zagreb : Školska knjiga, Zagreb, 1994.
14. Douglas, F. scientific testimony, an online journal. *GC/MS Analysis*. [Mrežno] [Citirano: 22. svibanj 2017.] <http://www.scientific.org/tutorials/articles/gcms.html>.
15. Bayemi, B. K. cheminfo2012 - Boris Kevin Bayemi - Final. *cheminfo2012*. [Mrežno] [Citirano: 02. lipanj 2017.] <https://cheminfo2012.wikispaces.com/Boris+Kevin+Bayemi+-+Final>.
16. Family Brassicaceae | Cruciferae | Tutorvista.com. *TutorVista.com*. [Mrežno] [Citirano: 02. Lipanj 2017.] <http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iii/angiosperm-families/family-brassicaceae.php>.
17. Koraba – Wikipedija. *wikipedija*. [Mrežno] [Citirano: 18. svibanj 2017.] <https://hr.wikipedia.org/wiki/Koraba>.
18. Priroda i biljke. *Priroda i biljke*. [Mrežno] [Citirano: 18. svibanj 2017.] <http://www.plantea.com.hr/koraba/>.
19. Brassica rupestris Raf. subsp. rupestris-Forum Acta Plantarum. *Forum Acta Plantarum*. [Mrežno] <http://www.floraitaliae.actaplantarum.org/viewtopic.php?t=23816>.
20. *Priroda i biljke*. [Mrežno] [Citirano: 18. svibanj 2017.] <http://www.plantea.com.hr/cunjasti-repusac/>.
21. *Parco Regionale di Montevicchia e della Valle del Curone*. [Mrežno] [Citirano: 18. svibanj 2017.] <http://www.parcocurone.it/ambiente/flora/scheda.php?id=1027&i=4>.
22. *Flora croatica database*. [Mrežno] [Citirano: 18. svibanj 2017.] <http://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=1826>.
23. *flora croatica database*. [Mrežno] [Citirano: 18. svibanj 2017.] <http://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=1938>.
24. Park, W.T., i dr. Metabolic Profiling of Glucosinolates, Anthocyanins, Carotenoids, and Other Secondary Metabolites in Kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*). *Journal of agricultural and food chemistry*. 60, 2012, Sves. 8111-8116.

25. Rose, P., i dr. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *NPR*. 2005, Svez. 1892 to 2004.
26. Iranshahi, M. A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods. *Journal of Essential Oil Research*. 24, 2012, Sves. 393-434.
27. Bennet, R. N., i dr. Ontogenic Profiling of Glucosinolates, Flavonoids, and Other Secondary Metabolites in *Eruca sativa* (Salad Rocket), *Diplotaxis eruroides* (Wall Rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (Wild Rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish Rocket). *Journal of agricultural and food chemistry*. 54, 2006, Sves. 4005-4015.
28. Velasco, L. i Becker, H. C. Variability for seed glucosinolates in a germplasm collection of the genus *Brassica*. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 47, 2000, Sves. 231-238.
29. Williams, D.J., i dr. Differing mechanisms of simple nitrile formation on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* and *Nasturtium officinale* seeds. *Phytochemistry*. 70, 2009, Sves. 1401-1409.
30. Matusheski, N.V., Juvik, J.A. i Jeffery, E.H. Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli. *Phytochemistry*. 65, 2004, Sves. 1273-1281, 65.