

Utjecaj selenija na profil glukozinolata u klicama brokule

Grubišić, Antonio Ćiril

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:688895>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

**UTJECAJ SELENIJA NA PROFIL GLUKOZINOLATA U KLICAMA
BROKULE**

DIPLOMSKI RAD

ANTONIO ĆIRIL GRUBIŠIĆ

372

Split, listopad 2022.

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

UTJECAJ SELENIJA NA PROFIL GLUKOZINOLATA U KLICAMA
BROKULE

DIPLOMSKI RAD

ANTONIO ĆIRIL GRUBIŠIĆ

372

Split, listopad 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
MASTERS IN CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

DIPLOMA THESIS
INFLUENCE OF SELENIUM ON GLUCOSINOLATE PROFILE IN
BROCCOLI SPROUTS

ANTONIO ĆIRIL GRUBIŠIĆ

372

Split, October 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević

Pomoć pri izradi: dr.sc. Azra Đulović.

UTJECAJ SELENIJA NA PROFIL GLUKOZINOLATA U KLICAMA BROKULE

Antonio Ćiril Grubišić

372

Sažetak: Glukozinolati su produkti sekundarnog metabolizma identificirani u preko 16 različitih biljnih porodica od kojih je najznačajnija porodica *Brassicaceae* koja uključuje često korišteno povrće u ljudskoj prehrani. U biljkama se nalaze u odvojenim odjeljcima od enzima mirozinaze koja cijepa ove inače kemijski stabilne spojeve na razgradne produkte poput tiocijanata, izotiocijanata, nitrila i indola. Zbog zabilježenog biološkog djelovanja produkata razgradnje, predmet su mnogih istraživanja u posljednje vrijeme.

Brassica oleracea var. *italica*, poznatija kao brokula, jedno je od najpopularnijih vrsta povrća. Hidroponski uzgojeno povrće u fazi klica za svakodnevnu konzumaciju sve je više u upotrebi.

Predmet istraživanja ovoga radavsu klice brokule uzgajane u čistoj vodi te različitim koncentracijama selenija: 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm i 10 ppm s ciljem praćenja utjecaja na profil glukozinolata. Glukozinolati su izolirani, prevedeni u desulfo-oblik te analizirani UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom. Analizom je utvrđena prisutnost 12 različitih glukozinolata: progoinin, glukonapoleiferin, glucoalisin, glukonapin, glukokohlearin, 4-hidroksiglukobrasicin, glukobrasikanapin, glukobrasicin, glukoberteroin, glukonasturcin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin. Uočena je dominantna količina glukonapina i glukobrasikanapina s maksimumima od 67,31 $\mu\text{mol/g}$ i 36,14 $\mu\text{mol/g}$ pri 5 ppm selenija. Glukoberteroin je uočen samo u tragovima. Povišene koncentracije selenija negativno su utjecale na rast brokule te su također utjecale na profil glukozinolata u različitim uzorcima.

Dva uzorka klica brokule uzgajanih u koncentraciji selenija od 5 ppm i 7,5 ppm podvrgnuta su reakciji s enzimom mirozinazom da bi se dobili razgradni produkti glukozinolata koji su identificirani GC-MS-om. Identificirana su dva nitrila: benzenpropanonitril i 4,5-epitiopentanonitril.

Drugi cilj eksperimenta je bio ispitati hoće li brokula kroz sedam dana apsorbirati dio selenija zbog kemijske sličnosti i obilja u kojem je rasla te ga ugraditi u strukturu svojih glukozinolata. Niti jedan selenoglukozinolot ili selenometionin-izvedeni glukozinolot nije detektiran niti su detektirani njihovi produkti razgradnje.

Ključne riječi: glukozinolati, *Brassica oleracea* var. *italica*, brokula, klice, selenij

Rad sadrži: 52 stranice, 48 slika, 4 tablice, 31 literaturna referenca

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. doc. dr. sc. Franko Burčul – predsjednik
2. prof. dr. sc. Sandra Svilović – član
3. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević - mentor

Datum obrane: 28. listopada 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

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

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 25.

Mentor: PhD Ivica Blažević, Associate professor

Technical assistance: Azra Đulović, PhD

INFLUENCE OF SELENIUM ON GLUCOSINOLATE PROFILE IN BROCCOLI SPROUTS

Antonio Ćiril Grubišić

372

Abstract: Glucosinolates are products of secondary metabolism identified in over 16 different plant families, the most significant of which is the Brassicaceae family, which includes vegetables often used in human nutrition. In plants, glucosinolates are found in special compartments separated from the myrosinase enzyme, which cleaves these otherwise chemically stable compounds into degradation products such as thiocyanate, isothiocyanate, nitrile and indole. Due to the recorded biological activity of degradation products, they have been the subject of many recent researches.

Brassica oleracea var. *italica*, better known as broccoli, is one of the most popular types of vegetables. Hydroponically grown vegetables sprouts for everyday consumption are being increasingly used.

In this work, broccoli sprouts were grown in clean water with different concentrations of selenium: 1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm and 10 ppm to monitor its influence on the glucosinolate profile. Glucosinolates were isolated, converted into desulfo-form and analyzed by UHPLC-DAD-MS/MS technique. The analysis determined the presence of 12 different glucosinolates: progoitrin, gluconapoleiferin, glucoalisin, gluconapin, glucocochlearin, 4-hydroxyglucobrassicin, glucobrassicinapin, glucobrassicin, glucoberteroin, gluconasturtin, 4-methoxyglucobrassicin and neoglucobrassicin. A dominant amount of gluconapin and glucobrassicinapin was observed with maxima of 67.31 $\mu\text{mol/g}$ and 36.14 $\mu\text{mol/g}$, respectively, at a selenium concentration of 5 ppm. Glucoberteroin was observed only in traces. Elevated concentrations of selenium had a negative effect on the growth of broccoli and also affected the profile of glucosinolates in different samples.

Two samples of broccoli sprouts grown in selenium concentrations of 5 ppm and 7.5 ppm were subjected to reaction with the myrosinase enzyme to obtain glucosinolate degradation products that were identified by GC-MS. Two nitriles were identified: benzenepropanonitrile and cyano-3,4-epithiobutane.

The second goal of the experiment was to examine whether the broccoli will absorb part of the selenium in seven days due to the chemical similarity and abundance in which it grew and incorporate it into the structure of its glucosinolates. No selenoglucosinolate or selenomethionine-derived glucosinolates were detected, nor their degradation products.

Keywords: glucosinolates, *Brassica oleracea* var. *italica*, broccoli sprouts, selenium

Thesis contains: 52 pages, 48 figures, 4 tables, 31 references

Original in: Croatian.

Defence committee:

1. PhD Franko Burčul, Assistant Professor – chair person
2. PhD Sandra Svilović, Full Professor – member
3. PhD Ivica Blažević, Associate Professor - supervisor

Defence date: 28th October 2022.

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

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića i neposrednim vodstvom dr. sc. Azre Đulović, u razdoblju od srpnja 2021. do listopada 2022.

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

Zahvalio bih se mentoru profesoru Ivici Blaževiću na prijateljskom pristupu, stručnim savjetima i ukazanoj pomoći tijekom studija i pisanja ovog diplomskog rada.

Isto tako bih se zahvalio asistentici Azri Đulović koja je uvijek bila tu kada je trebalo.

Hvala prijateljima i obitelji na podršci tijekom godina studiranja, hvala Bogu što drži sve pod kontrolom, a pogotovo hvala babi od skoro 100 godina na kvalitetnom presingu da napokon završim svoju školu.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Uzgojiti klice brokule (*Brassica oleracea var. italica*) iz sjemena u otopinama različitih koncentracija selenija tijekom sedam dana (1 ppm – 10 ppm).
2. Izolirati glukozinolate i potencijalne selenoglukozinolate ili selenometionin-izvedene glukozinolate te izvršiti njihovu desulfataciju dodatkom enzima sulfataze. Izolirati hlapljive spojeve iz uzgojenih klica metodom ekstrakcije diklormetanom nakon autolize u trajanju od 24 h.
3. Identificirati glukozinolate i selenoglukozinolate ili selenometionin-izvedene glukozinolate pomoću UHPLC-DAD-MS/MS tehnike te hlapljive spojeve korištenjem GC-MS tehnike.

SAŽETAK

Glukozinolati su produkti sekundarnog metabolizma identificirani u preko 16 različitih biljnih porodica od kojih je najznačajnija porodica Brassicaceae koja uključuje često korišteno povrće u ljudskoj prehrani. U biljkama se nalaze u odvojenim odjeljcima od enzima mirozinaze koja cijepa ove inače kemijski stabilne spojeve na razgradne produkte poput tiocijanata, izotiocijanata, nitrila i indola. Zbog zabilježenog biološkog djelovanja produkata razgradnje, predmet su mnogih istraživanja u posljednje vrijeme.

Brassica oleracea var. *italica*, poznatija kao brokula, jedno je od najpopularnijih vrsta povrća. Hidroponski uzgojeno povrće u fazi klica za svakodnevnu konzumaciju sve je više u upotrebi.

Predmet istraživanja ovoga rada su klice brokule uzgajane u čistoj vodi te različitim koncentracijama selenija: 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm i 10 ppm s ciljem praćenja utjecaja na profil glukozinolata. Glukozinolati su izolirani, prevedeni u desulfo-oblik te analizirani UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom. Analizom je utvrđena prisutnost 12 različitih glukozinolata: progoitrin, glukonapoleiferin, glukotalisin, glukonapin, glukokohlearin, 4-hidroksiglukobrasicin, glukobrasikanapin, glukobrasicin, glukoberteroin, glukonasturcin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin. Uočena je dominantna količina glukonapina i glukobrasikanapina s maksimumima od 67,31 $\mu\text{mol/g}$ i 36,14 $\mu\text{mol/g}$ pri 5 ppm selenija. Glukoberteroin je uočen samo u tragovima. Povišene koncentracije selenija negativno su utjecale na rast brokule te su također utjecale na profil glukozinolata u različitim uzorcima.

Dva uzorka klica brokule uzgajanih u koncentraciji selenija od 5 ppm i 7,5 ppm podvrgnuta su reakciji s enzimom mirozinazom da bi se dobili razgradni produkti glukozinolata koji su identificirani GC-MS-om. Identificirana su dva nitrila: benzenpropanonitril i 4,5-epitiopentanonitril.

Drugi cilj eksperimenta je bio ispitati hoće li brokula kroz sedam dana apsorbirati dio selenija zbog kemijske sličnosti i obilja u kojem je rasla te ga ugraditi u strukturu svojih glukozinolata. Niti jedan selenoglukozinolat ili selenometionin-izvedeni glukozinolat nije detektiran niti su detektirani njihovi produkti razgradnje.

Ključne riječi: glukozinolati, *Brassica oleracea* var. *italica*, brokula, klice, selenij

SUMMARY

Glucosinolates are products of secondary metabolism identified in over 16 different plant families, the most significant of which is the Brassicaceae family, which includes vegetables often used in human nutrition. In plants, glucosinolates are found in special compartments separated from the myrosinase enzyme, which cleaves these otherwise chemically stable compounds into degradation products such as thiocyanate, isothiocyanate, nitrile and indole. Due to the recorded biological activity of degradation products, they have been the subject of many recent researches.

Brassica oleracea var. *italica*, better known as broccoli, is one of the most popular types of vegetables. Hydroponically grown vegetables sprouts for everyday consumption are being increasingly used.

In this work, broccoli sprouts were grown in clean water with different concentrations of selenium: 1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm and 10 ppm to monitor its influence on the glucosinolate profile. Glucosinolates were isolated, converted into desulfo-form and analyzed by UHPLC-DAD-MS/MS technique. The analysis determined the presence of 12 different glucosinolates: progoitrin, gluconapoleiferin, glucoalisin, gluconapin, glucocochlearin, 4-hydroxyglucobrassicin, glucobrassicannapin, glucobrassicin, glucoberteroin, gluconasturtin, 4-methoxyglucobrassicin and neoglucobrassicin. A dominant amount of gluconapin and glucobrassicannapin was observed with maxima of 67.31 $\mu\text{mol/g}$ and 36.14 $\mu\text{mol/g}$, respectively, at a selenium concentration of 5 ppm. Glucoberteroin was observed only in traces. Elevated concentrations of selenium had a negative effect on the growth of broccoli and also affected the profile of glucosinolates in different samples.

Two samples of broccoli sprouts grown in selenium concentrations of 5 ppm and 7.5 ppm were subjected to reaction with the myrosinase enzyme to obtain glucosinolate degradation products that were identified by GC-MS. Two nitriles were identified: benzenepropanonitrile and cyano-3,4-epithiobutane.

The second goal of the experiment was to examine whether the broccoli will absorb part of the selenium in seven days due to the chemical similarity and abundance in which it grew and incorporate it into the structure of its glucosinolates. No selenoglucosinolate or selenomethionine-derived glucosinolates were detected, nor their degradation products.

Key words: glucosinolates, *brassica oleracea* var, *italica*, broccoli, sprouts, myrosinase, selenium

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| UVOD..... | 1 |
| 1. OPĆI DIO..... | 3 |
| 1.1. Brassicaceae..... | 3 |
| 1.1.1. <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> | 3 |
| 1.2. Klice i mikrozelenje..... | 4 |
| 1.3. Glukozinolati..... | 5 |
| 1.3.1. Kemijska struktura glukozinolata..... | 6 |
| 1.3.2. Glukozinolati obično prisutni kod brokule..... | 8 |
| 1.3.3. Biosinteza glukozinolata..... | 8 |
| 1.3.4. Razgradnja glukozinolata..... | 10 |
| 1.4. Selenij..... | 12 |
| 1.4.1. Selenoglukozinolati..... | 12 |
| 1.5. Metode ekstrakcije glukozinolata..... | 14 |
| 1.6. Metode odjeljivanja i identifikacije..... | 15 |
| 1.6.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)..... | 15 |
| 1.6.2. Plinska kromatografija (GC)..... | 16 |
| 1.6.3. Detektori..... | 18 |
| 1.6.3.1 Masena spektrometrija (MS)..... | 18 |
| 1.6.3.2 DAD (Diode array detector)..... | 19 |
| 2. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 21 |
| 2.1. Biljni materijal..... | 21 |
| 2.1.1. Uzgoj klica brokule (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>)..... | 21 |
| 2.1.2. Priprema biljnog materijala za izolaciju glukozinolata i isparljivih spojeva..... | 23 |
| 2.2. Kemikalije i aparatura..... | 25 |
| 2.2.1. Kemikalije..... | 25 |
| 2.2.2. Aparatura..... | 25 |
| 2.3. Ekstrakcija glukozinolata..... | 26 |
| 2.4. Ekstrakcija razgradnih hlapljivih spojeva glukozinolata..... | 29 |
| 2.5. Analiza ekstrahiranih spojeva..... | 31 |
| 2.5.1. UHPLC-DAD-MS/MS analiza..... | 31 |
| 2.5.2. GC-MS analiza..... | 32 |
| 3. REZULTATI I RASPRAVA..... | 34 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Uzgoj i morfologija klica | 34 |
| 3.2. Rezultati UHPLC-DAD-MS/MS analize | 35 |
| 3.3. Rezultati GC-MS analize | 46 |
| 4. ZAKLJUČAK..... | 49 |
| 5. LITERATURA | 50 |

UVOD

Članovi porodice Brassicaceae poznati su po raznovrsnim nehlapljivim spojevima među kojima se posebno ističu glukozinolati. *Brassica oleracea* var. *italica*, u svakodnevnom govoru poznatija kao brokula, jedna je od najkorištenijih biljaka te porodice u prehrani čovjeka.

Glukozinolati su, biokemijski gledano, produkti sekundarnog metabolizma tih biljaka te su stabilna i biološki neaktivna skupina spojeva. Razgradnjom glukozinolata posredovanom enzimom mirozinazom, dolazi do formacije razgradnih produkata koji imaju zabilježeno biološko djelovanje. Formiraju se produkti poput izotiocijanata, nitrila, epitionitrila, tiocijanata, i indola koje je moguće izdvojiti metodama izolacije.

Selenij je kemijski element sličan sumporu kojeg biljke porodice Brassicaceae slučajno ili ciljano često uvode u biosintezu svojih glukozinolata. Pri tome mogu nastati selenoglukozinolati ili selenometionin-izvedeni glukozinolati. Selenoglukozinolati su izvorno definirani kao spojevi u kojima se atom Se zamjenjuje s atomom S u anomernom položaju u glukozinolatnoj strukturi, a koji se enzimskom hidrolizom pretvara u izoselenocijanate. Formiranje izoselenotiocijanata je značajno odstupanje od svojstava glukozinolata. Međutim, prisutnost Se u bočnim lancima je u potpunosti kompatibilna s definicijom glukozinolata i predložena je na temelju identifikacije prividnih produkata hidrolize iz biljaka umjetno hranjenih visokim razinama selenata. Glukozinolati koji sadrže Se u bočnom lancu mogu se prikladno nazvati selenometionin-izvedeni glukozinolati kako bi se izbjegla zabuna sa selenoglukozinolatima. Razgradnjom selenometionin-izvedenih glukozinolata nastaju izotiocijanati, a ne izoselenocijanati kao produkti hidrolize. Zanimljiva je činjenica da izoselenocijanati kao razgradni produkti selenoglukozinolata pokazuju veću biološku aktivnost od običnih izotiocijanata koji se već godinama farmakološki ispituju dok su klice sve popularnije kao povrće nove generacije i sve se više konzumira u restoranima i kod kućne priprave jela.

Za potrebe ovoga eksperimenta uzgajane su klice biljke *Brassica oleracea* var. *italica* u posudama za uzgoj u otopinama različitih koncentracija selenija kroz 7 dana uz referentni uzorak hidroponski uzgajan u čistoj vodi. Uzgajane su u laboratorijskim

uvjetima te se pratio utjecaj selenija na rast i razvoj biljke i analizirao glukozinolatni profil nakon sedmog dana uzgoja.

Provedena je izolacija i kvantizacija glukozinolata iz klica brokule preko odgovarajućih desulfo-oblika. Identifikacija i kvantizacija glukozinolata provedena je primjenom tehnike tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s tandemskim masenim detektorom.

Provedena je analiza hlapljivih razgradnih produkata u svrhu neizravne identifikacije glukozinolata tj. selenometionin -izvedenih glukozinolata i selenoglukozinolata vezanom tehnikom plinske kromatografije i masene spektrometrije

1. OPĆI DIO

1.1. Brassicaceae

Brassicaceae, gorušičina porodica kritosjemenjača (red *Brassicales*), sastavljena je od 338 rodova i oko 3700 vrsta. Porodica uključuje mnoge biljke od gospodarskog značaja koje su ljudi u velikoj mjeri genetski izmijenili i pripitomili, posebno one iz roda *Brassica*, koji uključuje obični kupus, brokulu, prokulicu, kelj, korabicu, napa kupus, repu i rutabagu. Ostale važne poljoprivredne kulture u obitelji uključuju hren, rotkvicu i bijelu gorušicu.

Biljke iz porodice Brassicaceae obično su začinske biljke i mogu biti jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje biljke. Listovi su uglavnom jednostavni i naizmjenično raspoređeni, a mnogi su paprenog okusa. Cvjetovi su u obliku križa s četiri latice, zbog čega se često nazivaju “krstašicama”. Cvjetovi su obično bijeli, žuti ili boje lavande i karakteristično imaju četiri duga i dva kratka prašnika te dvokomornu plodnicu smještenu iznad ostalih dijelova cvijeta. Sjemenke se proizvode u suhim mahunastim plodovima, često s pregradom između polovica; dugi tanki plodovi poznati su kao komuške, a kratki zaobljeni plodovi poznati su kao komuščice. (1)

1.1.1. *Brassica oleracea* var. *italica*

Brokula (*Brassica oleracea* var. *italica*) je dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice kupusnjača (Brassicaceae) (slika 1.1.). Prve godine na zadebljalim stabljikama visine do 100 cm razvijaju se cvjetne, zelene glavice dok tek druge godine biljka daje sjeme.

Latinski naziv roda *Brassica* potječe od grčke riječi „*brassein*“ (kuhati), zbog upotrebe srodnog kupusa. Ime vrste *oleracea* epitet je koji znači da je upotrebljiva u prehrani kao povrće. Jestivi su cvjetovi brokule sa stapkom (zapravo mladi pupoljci prije nego što se počnu otvarati) te manje korišteni njezini listovi. Koriste se, poput ostalih kupusnjača kuhane u obliku variva i juha te na razne druge načine pripreme. (2)



Slika 1.1. *Brassica oleracea* var. *italica* uzgojena u vrtu (2)

1.2. Klice i mikrozelenje

Klice (engl. *sprouts*) su prokljale sjemenke raznog povrća koje se uzgajaju izvan direktne sunčeve svjetlosti u zatvorenom prostoru, najčešće u tami (slika 1.2.). Korištene su kao lako probavljiva hrana bogata vitaminima, mineralima, aminokiselinama, proteinima i fitokemikalijama budući da su te tvari nužne kako bi prokljatala biljka kasnije mogla nastaviti rast i razvoj. Najčešće se jedu sirove, a okus im varira od blagih i nježnih do poprilično ljutih i lagano gorkih. Zbog toga se mogu kombinirati s raznim gurmanskim jelima pa, osim što su nutritivno korisne, korištene su i kao dekoracija. (3)



Slika 1.2. Klice raznog mikrozelenja (3)

Mikrozelenje (engl. *microgreens*) su mlade biljke raznog povrća s tek izraslim pravim listovima koje se za razliku od klica uzgaja u zemlji ili nekom drugom mediju (slika 1.3.). Raznih je boja, veličina, oblika i tekstura pa je idealno za isticanje ljepote, svježine i okusa jela u restoranima. Osim toga okusi mikrozelenja variraju od blagih do intenzivnih i ljutih pa se s njima mogu raditi raznolike salate, mogu se stavljati u smoothieje ili sendviče te se njima mogu ukrašavati razna jela. (3)



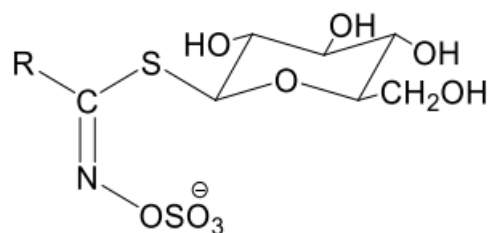
Slika 1.3. Mikrozelenje raznog povrća (3)

1.3. Glukozinolati

Biljni materijali su obično bogati izvori mikronutrijenata i dijetalnih vlakana te također sadrže veliki broj biološki aktivnih sekundarnih metabolita koji biljci daju boju, okus, miris i ostala svojstva. Glukozinolati su velika skupina spojeva koji sadrže sumpor, a možemo ih naći u biljkama reda Capparales koji uključuje porodicu Brassicaceae od kojih su mnoge vrste ekonomski važno povrće. (4) Pronađeni su u 16 različitih biljnih porodica reda Brassicales, od kojih je najznačajnija porodica Brassicaceae (kupusnjače) u koju spadaju kupus, brokula, cvjetača, kelj, rotkva, repa, gorušica i dr. (5)

1.3.1. Kemijska struktura glukozinolata

Glukozinolati su vodotopljivi organski anioni koji dijele iste osnovne strukturne značajke koje uključuju β -D-glukopiranoznu jedinicu, *O*-sulfatiranu anomernu (*Z*)-tiohidroksimatnu funkcijsku skupinu te promjenjivi bočni lanac (slika 1.4.). (6)



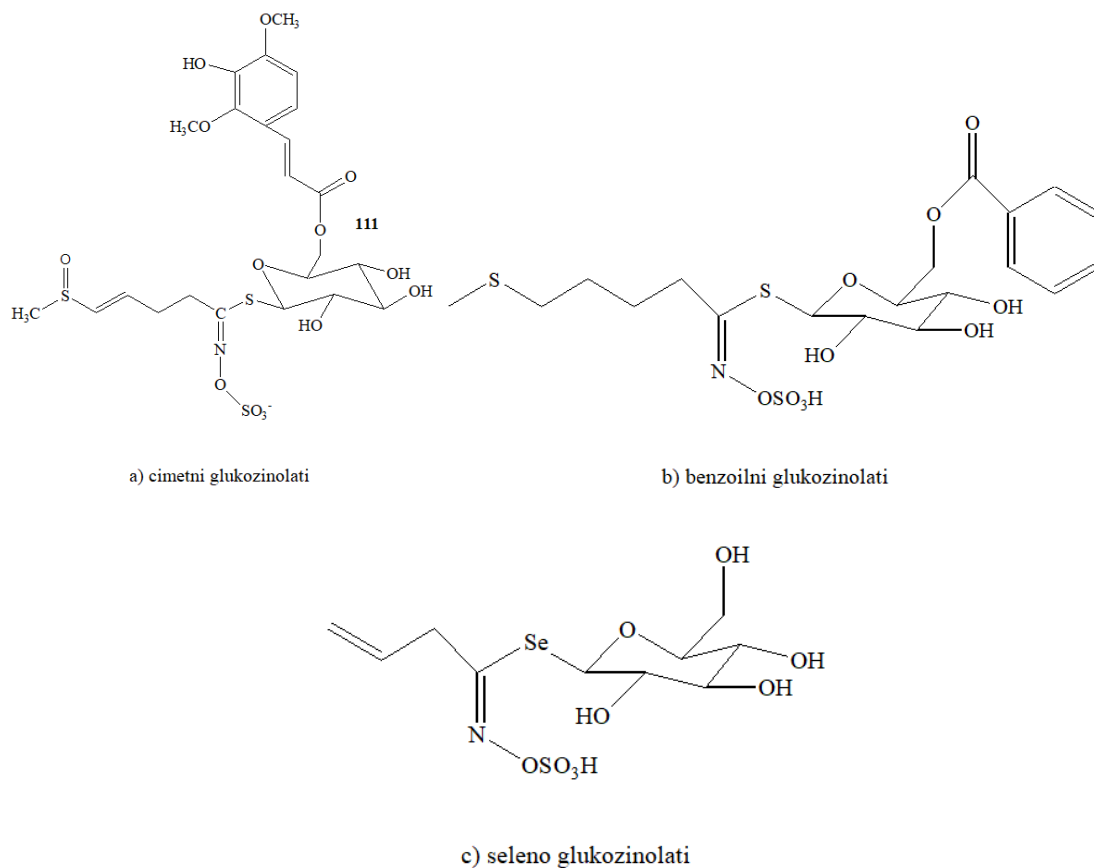
Slika 1.4. Opća struktura glukozinolata.

R predstavlja promjenjivi bočni lanac.

Promjenjivi bočni lanac se sintetizira iz aminokiseline i osnova je njihove strukturne raznolikosti i biološke aktivnosti razgradnih produkata nastalih enzimskom razgradnjom. Na temelju različitih biosintetskih aminokiselinskih prekursora mogu se podijeliti u tri skupine:

- **alifatski** glukozinolati potječu od metionina, izoleucina, leucina, valina ili glutaminske kiseline
- **arilalifatski** potječu od fenilalanina i/ili tirozina
- **indolni** od triptofana (5,6)

Glukozinolati se mogu razlikovati i prema supstituentima koje ponekad imaju i na glukonskom dijelu poput cimernih i benzoilnih glukozinolata. Kod nekih glukozinolata glikonski i aglikonski dio molekule je umjesto sumpora povezan selenijem. Ta vrsta glukozinolata, posebno proučavana u zadnje vrijeme se naziva selenoglukozinolatima (slika 1.5.). (7)



Slika 1.5. Neki primjeri neobičnih glukozinolata: a) cimetni glukozinolati, b) benzoilni glukozinolati, c) selenoglukozinolati

Najbrojniji su alifatski glukozinolati s razgranatim ili nerazgranatim bočnim lancima. U bočnom lancu mogu sadržavati dvostruke veze, hidroksilne ili karbonilne skupine te kovalentno vezani dodatni sumpor. Oko jedne trećine svih glukozinolata u bočnom lancu sadrži atom sumpora različitog oksidacijskog stupnja (primjerice metilialkil-, metilsulfinilalkil- ili metilsulfonilalkil-). Takav sumpor se također može zamijeniti selenijem tokom biosinteze navedenih glukozinolata. (7)

1.3.2. Glukozinolati obično prisutni kod brokule

U prethodnom istraživanju HPLC-DAD-MS/MS metodom iz cvijetova odrasle brokule izolirani su i identificirani prisutni glukozinolati. Istraživanje je provedeno sa svrhom utvrđivanja utjecaja uvjeta skladištenja, odnosno temperature, vremena skladištenja i tretmana zračenjem. Glukozinolati su identificirani preko desulfo- oblika i uočena je prisutnost 8 različitih desulfoglukozinolata nastalih od 8 različitih glukozinolata.

U zrelim cvijetovima odrasle brokule prisutna su 4 alifatska glukozinolata: glukoi berin, glukorafanin, glukoalisin i glucoerucin te 4 indolna glukozinolata: 4-hidroksiglukobrasicin, glukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin.

U tom stadiju biljke kao najzastupljeniji glukozinolati su se pokazali glukobrasicin, neoglukobrasicin i glukorafanin dok su ostali prisutni u manjim količinama. (8)

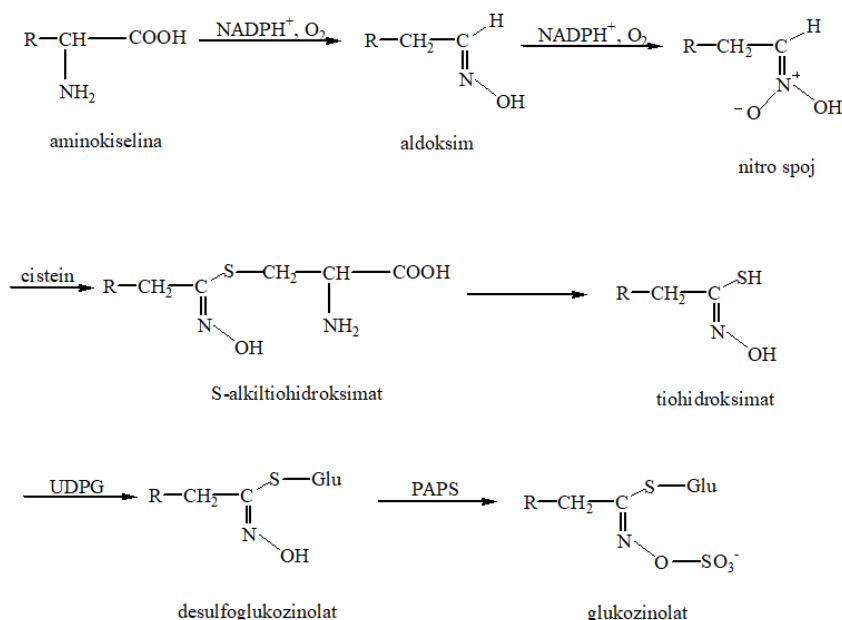
1.3.3. Biosinteza glukozinolata

Od 60-ih godina 20. stoljeća intenzivno se istražuju biosintetski putevi glukozinolata. Danas je poznata velika većina gena, enzima i međuprodukata koji sudjeluju u biosintezi. Veliki napredak u spoznajama biosinteze glukozinolata postignut je kontinuiranim istraživanjima na biljci *Arabidopsis thaliana*. U svojim istraživanjima, Kjaer i Conti su krenuli od pretpostavke da su aminokiseline prekursori aglikonskog dijela molekule glukozinolata. To su temeljili na sličnosti između ugljikovog skeleta nekih aminokiselina i glukozinolata. (9) Aminokiseline alanin, metionin, valin, leucin i izoleucin se smatraju prekursorima alifatskih glukozinolata, fenilalanin i/ili tirozin aromatskih, a triptofan indolnih glukozinolata. (10)

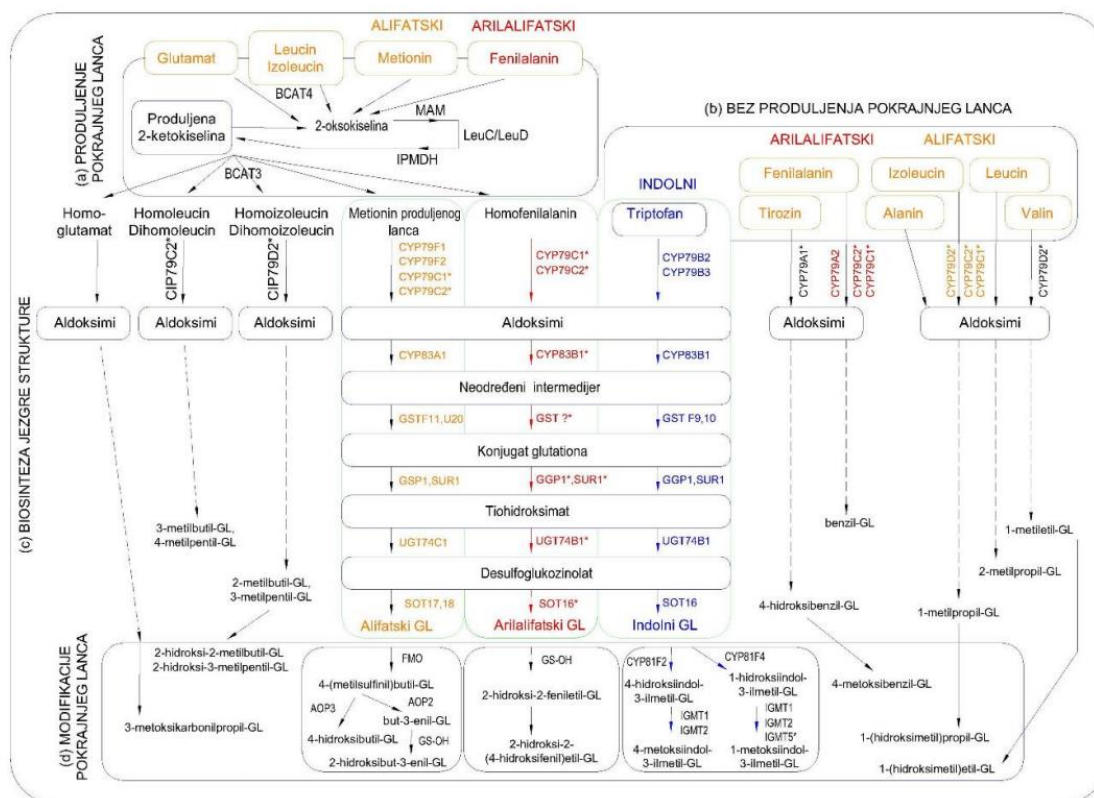
Biosinteza glukozinolata iz aminokiselina može se podijeliti u tri neovisna stupnja. Prvi stupanj biosinteze je modifikacija aminokiseline koja uključuje različite enzime. Sastoji se od produljenja lanca aminokiseline (alifatske ili aromatske) umetanjem metilenske skupine u njihove bočne lance. Prvo se aminokiselina deaminira u odgovarajuću 2-okso kiselinu, a zatim kondenzira s acetyl-CoA. Slijedno dolazi do izomerizacije, oksidacije i dekarboksilacije što daje produženu 2-okso kiselinu s jednom metilenskom skupinom više. Ovi koraci se mogu ponavljati do određene dužine aminokiseline. (11)

Drugi stupanj je metabolička modifikacija aminokiseline. Modifikacija se odvija preko niza međuprodukata identičnih za sve glukozinolate (slika 1.6). Pretvorba aminokiseline u aldoksim prvi je korak tog procesa kataliziran različitim enzimima. Još uvijek nisu definirani međuprodukti između aldoksima i tiohidroksimata, ali se pretpostavlja da je to nitro spoj nastao oksidacijom aldoksima i S-alkiltiohidroksimat kao primatelj sumpora, najvjerojatnije iz cisteina. Reakcija katalizirana enzimom CS-liaza daje tiohidroksimat cijepanjem S-alkiltiohidroksimata. Na kraju drugog koraka biosinteze dolazi do glukozilacije koja daje desulfoglukozinolat koji sulfatacijom daje glukozinolat. (11,12)

U trećem stupnju nastali glukozinolat nadalje podliježe nizu daljnjih sekundarnih modifikacija bočnog lanca. Sukladno ciljanom spoju dolazi do niza reakcija oksidacije, hidroksilacije, alkenilacije, acilacije ili esterifikacije. Bočni lanac podrijetlom od aminokiseline metionina sklon je dodatnim modifikacijama kao što su postupna oksidacija atoma sumpora u metiltioalkilnom bočnom lancu u metilsulfinilalkil ili metilsulfonilalkil. Metilsulfinilalkil bočni lanci nadalje se modificiraju oksidacijskim cijepanjem u hidroksialkenil i alkenil lance. Te reakcije su od izrazite biološke važnosti jer utječu na smjer enzimske razgradnje glukozinolata, a samim time i na aktivnost razgradnih produkata. (11,12)



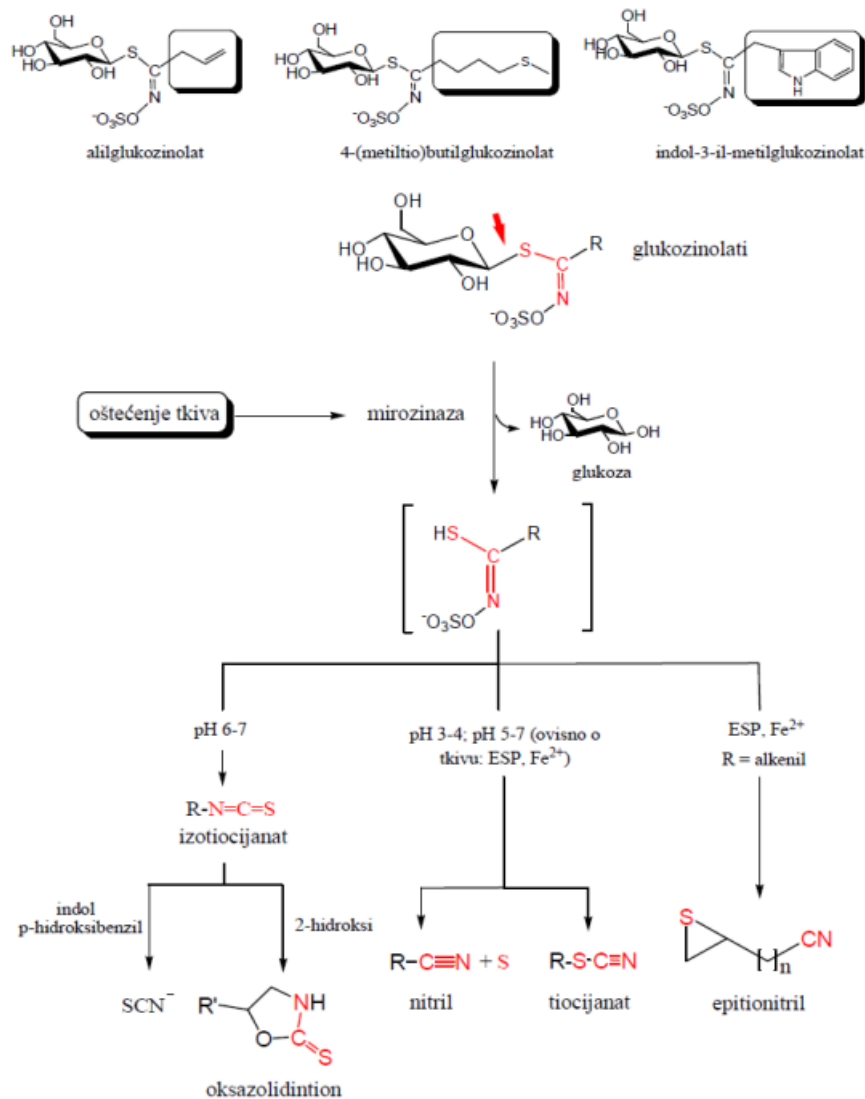
Slika 1.6. Pojednostavljena opća shema 2. stupnja biosinteze glukozinolata (7)
 (R, promjenjivi bočni lanac; NADPH, nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat; UDPG, uridin-difosfat-glukoza; PAPS, 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat)



Slika 1.7. Biosintetski putevi alifatskih, indolnih i arilalifatskih glukozinolata. (13)

1.3.4. Razgradnja glukozinolata

Sami glukozinolati su kemijski stabilni i biološki neaktivni. Oni su izdvojeni unutar podstaničnih odjeljaka u cijeloj biljci, ali nakon oštećenja tkiva uzrokovanih štetnicima, herbom, preradom hrane ili žvakanjem, dovode se u kontakt s endogenim enzimom "mirozinzom" (β -tioglukozid-glukohidrolaza). Neposredna reakcija je hidroliza glukozidne veze, oslobađanje glukoze i nestabilnog aglikona (O-sulfonirani oksim) koji se spontano pregrađuje Lossenovom pregradnjom, tvoreći složenu raznolikost produkata razgradnje čija priroda ovisi o fizikalno-kemijskim uvjetima medija. Ovisno o strukturi bočnog lanca i prisutnosti dodatnih proteina i kofaktora, aglikonski dio se pregrađuje uz gubitak sulfatnog iona i stvara razne razgradne produkte poput izotiocijanata, nitrila, epitionitrila, izotiocijanata, oksazolidintiona i indola. (14,15)



Slika 1.8. Opća shema enzimske razgradnje glukozinolata mirozinazom (16)

Blago kiseli medij, prisutnost željezovih(II) iona i biljnog proteina ESP pogoduje nastanku nitrila. Kada glukozinolatni bočni lanac ima terminalnu dvostruku vezu, ESP potiče reakciju sumpora iz tioglukozidne veze s dvostrukom vezom dajući epitionitrile. Nije poznato da ESP ima katalitičku aktivnost bez mirozinaze. (17,18) Ostali produkti razgradnje uključuju tiocijanate. Stvaranju tiocijanata pogoduje neutralni medij. Do danas je poznato da nastaju iz samo pet glukozinolata: benzil-glukozinolata, alil-glukozinolata i 4-metilsulfanilbutiln-glukozinolata, 4-hidroksibenzil-glukozinolata i 4-metoksibenzil-glukozinolata, od kojih svi stvaraju stabilne katione bočnog lanca. Poput nitrila, stvaranje tiocijanata je također povezano sa specifičnim proteinskim faktorima. (19) U prethodnim istraživanjima, izotiocijanati su dali zanimljive rezultate u vezi njihovog biološkog djelovanja. Zabilježeno je njihovo inhibicijsko djelovanje kod mitoze i stimulacija apoptoze kod stanica raka. (20) Ostalim uvjetima reakcijskog

medija i dodatnim reakcijama nastaju raznoliki produkti enzimske razgradnje (slika 1.8.).

Povrće i začini kao što je senf, hren, kupus, cvjetača i brokula hidrolizom glukozinolata tokom prerade, zbog nastalih razgradnih produkata, dobivaju karakterističan okus, miris i nutritivnu vrijednost. Taj proces je za biljke ključan za kemijsku obranu protiv štetnika i nametnika. (14)

1.4. Selenij

Selenij je element 16. skupine periodnog sustava u kojoj se nalaze kisik i sumpor. U prirodi je rijedak kao zlato. Često je pratilac sumpora s kojim ima slična svojstva. (21)

Biljke iz porodice Brassicaceae su poznate po tome da imaju sposobnost akumulacije selenija. Fizikalna i kemijska sličnost između selenija i sumpora koji se nalazi u sastavu tipičnih glukozinolata uzrokuje da oba elementa dijele zajedničke metaboličke putove. To dovodi do zamjene atoma selenija i atoma sumpora te ugradnje selenija u sastav glukozinolata pri čemu nastaju selenoglukozinolati ili selenometionin-izvedeni glukozinolati. (22)

Upravo zbog sličnih svojstava sa sumporom koji se nalazi u sastavu glukozinolata selenij nam je zanimljiv u ovome istraživanju.

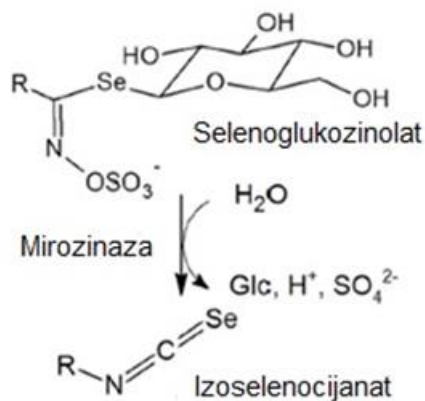
1.4.1. Selenoglukozinolati

U svrhu istraživanja za ovaj rad, brokulu smo uzgajali u mediju koji sadrži različite koncentracije selenija s ciljem apsorpcije selenija i njegove ugradnje u biosintezu svojih glukozinolata

Teoretski, glukozinolati u biljkama roda *Brassica* mogu ugraditi do tri atoma selenija: u sulfat, modificirani aminokiselinski (selenometionin ili metilaza selenocistein) ostatak ili u β -tioglukozu što je jednom zabilježeno u prirodi. (23) Zbog toga, ovisno o tome gdje se atom selenija ugradio u molekuli, hidroliza mirozinazom daje različite produkte sa selenijom. (24)

Prema Bertelsen i sur. (1988) selenoglukozinolati u kojima atom selenija zamjenjuje atom sumpora na anomernoj poziciji ne uklapaju se u definiciju

glukozinolata jer se enzimskom hidrolizom razlažu na izoselenocijanate. (23) U kasnijim istraživanjima, Matich i sur. (2012) su GC-MS analizom detektirali razgradne produkte glukozinolata izoliranih iz cvjetače i brokule koje su zalijevane otopinom selenija tijekom uzgoja. Identificirana su dva nitrila i tri izotiocijanata sa selenijem u bočnom lancu na poziciji sumpora za koje je pretpostavljeno da su nastali hidrolizom u biljci sintetiziranih selenoglukozinolata. Izolirani nitrili su 4-(metilseleno)butanonitril i 5-(metilseleno)pentanonitril dok su izolirani izotiocijanati 3-(metilseleno)propil-izotiocijanat, 4-(metilseleno)butilizotiocijanat i 5-(metilseleno)pentil-izotiocijanat. Položaj atoma selenija u metilselenilnoj skupini i njegova ugradnja u strukturu preko selenometionina potvrđeni su LC-MS/MS analizom. (24) Kako selenij nije ugrađen u sulfatnu ili β -tioglukoznu skupinu nego u bočni lanac, struktura nastalih spojeva je u skladu s općom strukturom glukozinolata prema Bertelsen i sur. (1988) (23)



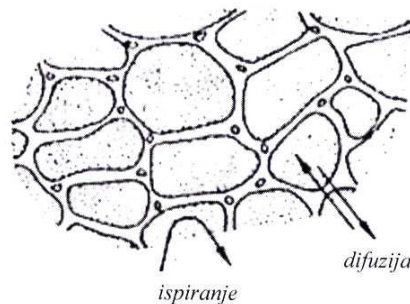
Slika 1.9. Struktura selenoglukozinolata, prekursora izoselenocijanata prema definiciji Bertelsen i sur.(1988)

1.5. Metode ekstrakcije glukozinolata

Ekstrakcija biljnog materijala je proces izdvajanja tvari iz biljnih materijala na temelju različite topljivosti u ekstrakcijskom sredstvu. Biljke predstavljaju složeni matriks za selektivnu ekstrakciju ciljanih tvari jer sadrži razne sekundarne metabolite s različitim funkcijskim skupinama poput voskova, masnih kiselina, poliacetilena, viših terpena, steroida, fenola, alkaloida, glikozida i glukozinolata.

Ekstrakcija biljnog materijala uključuje slijedeće korake:

- pripremu biljnog materijala kao sušenje i usitnjavanje biljnog materijala,
- izbor pogodnog ekstrakcijskog sredstva,
- odabir najpogodnije ekstrakcijske metode,
- difuziju otapala u stanice biljnog materijala,
- otapanje metabolita u otapalu,
- difuziju otapala s otopljenim tvarima izvan stanica,
- ispiranje.



Slika 1.10. Difuzija i ispiranje tijekom ekstrakcije biljnog materijala (25)

Na proces ekstrakcije utječu čimbenici poput temperature, veličine čestica, gibanja otapala i pH-vrijednosti. Kada je biljni materijal usitnjen, ekstrakcijski proces ovisi isključivo o topljivosti u ekstrakcijskom sredstvu dok se topljivost povećava povišenjem temperature. Za otapalo je poželjno da je:

- selektivno za ciljane spojeve,
- ima veliki ekstrakcijski kapacitet,
- ne reagira s ciljanim komponentama,
- sigurno za ljude i opremu,
- lako isparljivo,
- niske cijene. (26)

1.6. Metode odjeljivanja i identifikacije

Najpouzdanije metode za analizu spojeva iz složenih smjesa su vezani sustavi kromatografije i spektrometrije masa. Kromatografija omogućava odvajanje spojeva na temelju različitog afiniteta mobilne i stacionarne faze dok detektori poput spektrometrije masa služe za identifikaciju razdvojenih spojeva koji individualno dolaze na detektor. (27)

1.6.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

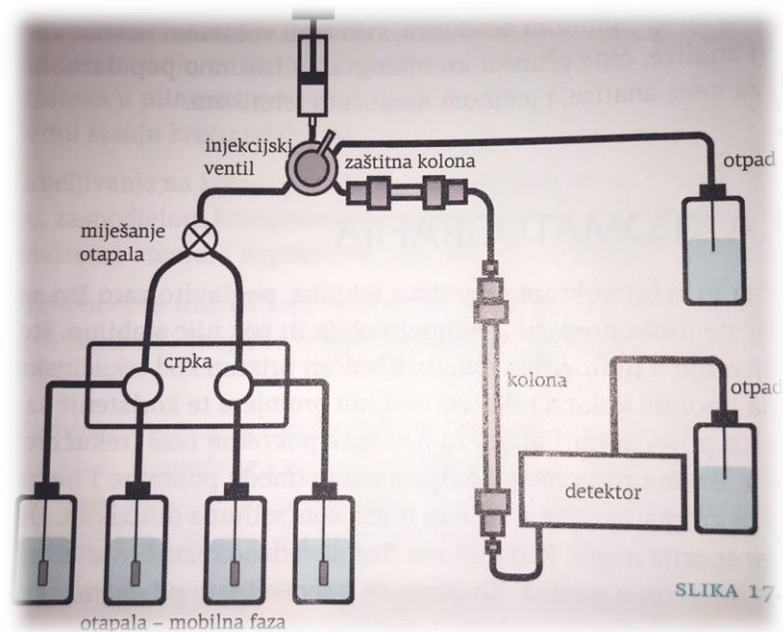
Kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti tekući se uzorak injektira u tekuću pokretnu fazu koja uzorak nosi kroz kolonu gdje se komponente međusobno odjeljuju na temelju njihove raspodjele između pokretne i stacionarne faze. Na osnovi njihove interakcije s pokretnom i nepokretnom fazom određeno je vrijeme zadržavanja. Prema mehanizmu odjeljivanja između faza razlikuju se apsorpcijska, ionsko-izmjenjivačka, afinitetna kromatografija i kromatografija isključenjem.

Instrumentacija se sastoji od 4 osnovna dijela:

- Sustav za opskrbu pokretnom fazom
- Mjesto za injektiranje uzorka (injekcijski ventil)
- Kolona
- Detektor

Sustav za opskrbu mobilnom fazom sadržava crpku koja omogućuje postizanje visokog tlaka te sustav za mješanje otapala. Otapala moraju biti visoke čistoće bez prisutnih mjehurića plina. Na injekcijski ventil se precizno injektira točno određeni volumen uzorka. Volumeni uzorka se kreću od 0,5 μ L do 5,0 μ L.

Kontrola temperature kromatografske kolone nije nužna kod HPLC-a ako se baš ne radi pri povišenim temperaturama iz drugih razloga poput brže elucije, ali navedeni postupak znatno skraćuje vijek trajanja kolone. Ako se radi pri povišenim temperaturama važno je vratiti pokretnu fazu na sobnu temperaturu prije ulaska u detektor. Detektori na kraju kolone pružaju kvalitativan i kvantitativan signal. (27)



Slika 1.11. Shematski prikaz tekućinske kromatografije visoke dijelotvornosti (27)

1.6.2. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija je najpovoljnija metoda za odjeljivanje hlapljivih spojeva poput razgradnih produkata glukozinolata koji su istraživani u ovome radu. Izrazito je primjenjivana instrumentalna tehnika u modernoj kemijskoj analizi, posebno kod organskih kemičara.

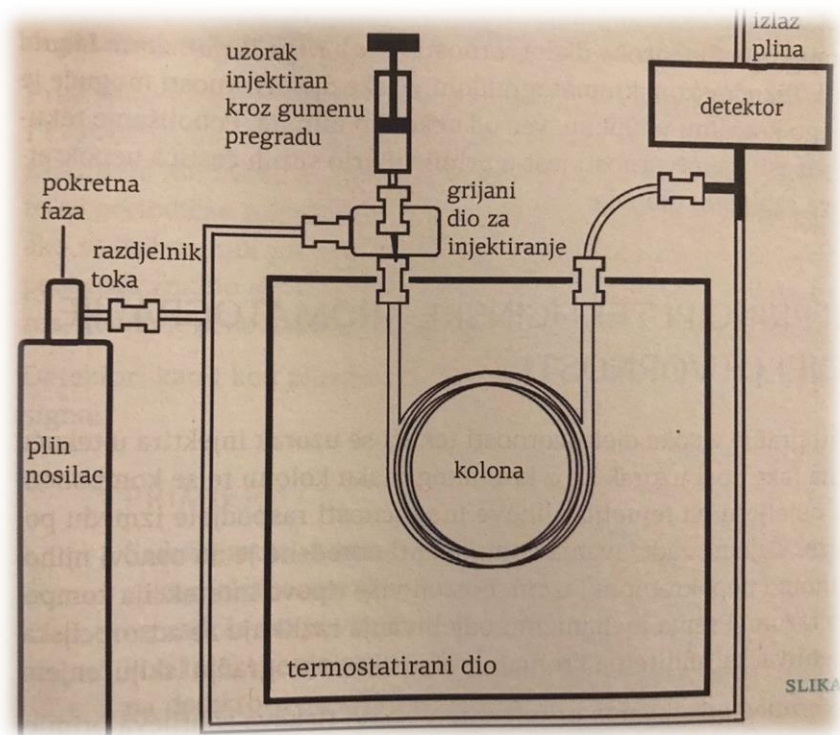
Ukoliko ispitivani uzorak već nije u plinovitom stanju, kod ove kromatografije u njega mora biti preveden. Pokretna faza je kemijski inertan plin poput argona, helija, dušika ili ugljikovog dioksida. Uzorak se injektira kroz gumenu pregradu u kolonu. Mjesto injektiranja uzorka, kolona i detektor zagrijavani su na temperaturi koja omogućuje plinovito stanje uzorka. Volumeni injektiranih uzoraka u plinovitom stanju kreću se od 1 do 10 mL, dok se volumeni uzoraka u tekućem stanju kreću od 0,1 do 1 μL .

Odjeljivanje na koloni plinskog kromatografa odigrava se na principu različitog afiniteta pokretne faze koja je u plinovitom stanju naspram stacionarne faze koja je u tekućem ili čvrstom stanju.

Komponente uzorka koje se eluiraju s kolone određuju se na detektoru koji daje kvalitativne i kvantitativne rezultate.

Usporedbom vremena zadržavanja s vremenom zadržavanja standarda čistih tvari, moguće je dobiti kvalitativnu informaciju detektiranog spoja. Površina ispod kromatografske krivulje predstavlja kvantitativni signal i proporcionalna je koncentraciji razmatrane komponente.

Primjenom plinske kromatografije moguće je odjeljivanje komponenata iz vrlo složenih smjesa. Za analizu je potrebno samo nekoliko minuta jer se plin kao mobilna faza vrlo brzo kreće kroz kromatografsku kolonu, što je vrlo brzo uspoređujući s ostalim kromatografskim tehnikama. (28)

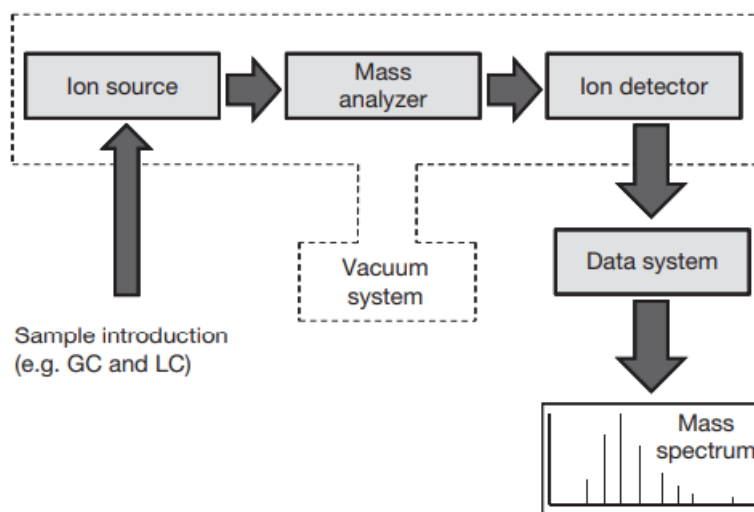


Slika 1.12. Shematski prikaz plinske kromatografije (28)

1.6.3. Detektori

1.6.3.1 Masena spektrometrija (MS)

Masena spektrometrija (MS) široko je korištena instrumentalna tehnika spregnuta s plinskim ili tekućinskim kromatografom. Prvi takav instrument, zvan parabola spektrograf, konstruiran je još 1912. Od tada, uz brojna poboljšanja i napredak ova tehnika postaje nezaobilazna u laboratorijima za fiziku i analitičku kemiju. Princip rada se temelji na ionizaciji i fragmentaciji molekulskog uzorka u plinovitoj fazi. Budući da se molekule fragmentiraju na jedinstven način, tehnika se koristi za dobivanje strukturnih informacija za određenu molekulu. Odvajanje uzorka je postignuto kromatografijom čime je postignuto individualno ulaženje spojeva u maseni spektrometar na ionizaciju, odvajanje i detekciju dobivenih iona. Spajanjem kromatografskog sustava na maseni spektrometar na ovaj način pribavlja dvije informacije za svaku analizu: vrijeme zadržavanja i informacije o masenom spektru za svaki odvojeni spoj. Obje informacije se mogu koristiti za identifikaciju spoja usporedbom sa standardima.



Slika 1.13. Shematski prikaz masenog spektrometra (27)

Tandemska masena spektrometrija (MS/MS) uključuje dvije odvojene faze analize masa i može se koristiti za dobivanje informacije o odnosu iona u masenom spektru ili za identifikaciju spojeva u složenim smjesama koje prethodno nisu bile podvrgnute odvajanju. Iako je dostupno mnogo različitih MS/MS načina snimanja, najčešće korišteno je snimanje produktnih iona (engl. *product ion scan*) koje uključuje izolaciju iona od interesa dok se ostali ioni uklanjaju, fragmentiranje iona, a zatim

prikupljanje nastalog spektra masa. Rezultat je spektar koji sadrži samo ione koji potječu od početnog iona od interesa. (29)

1.6.3.2 DAD (engl. *Diode array detector*)

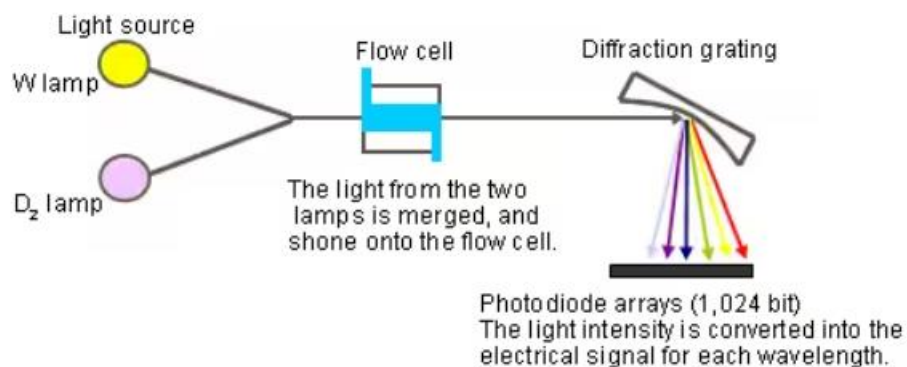
DAD i UV-VIS detektori se najčešće koriste u kombinaciji s tekućinskim kromatografom za identifikaciju komponenti koje pokazuju apsorpcijski maksimum u ultraljubičastom ili vidljivom području.

UV detektor koristi deuterijevu žarulju s izbojem (D2 lampa) kao izvor svjetlosti, valne duljine raspona od 190 nm – 380 nm

Ako se komponente trebaju detektirati na višoj valnoj duljini, koristi se UV-VIS detektor koji koristi dodatnu volframovu žarulju (W lampa).

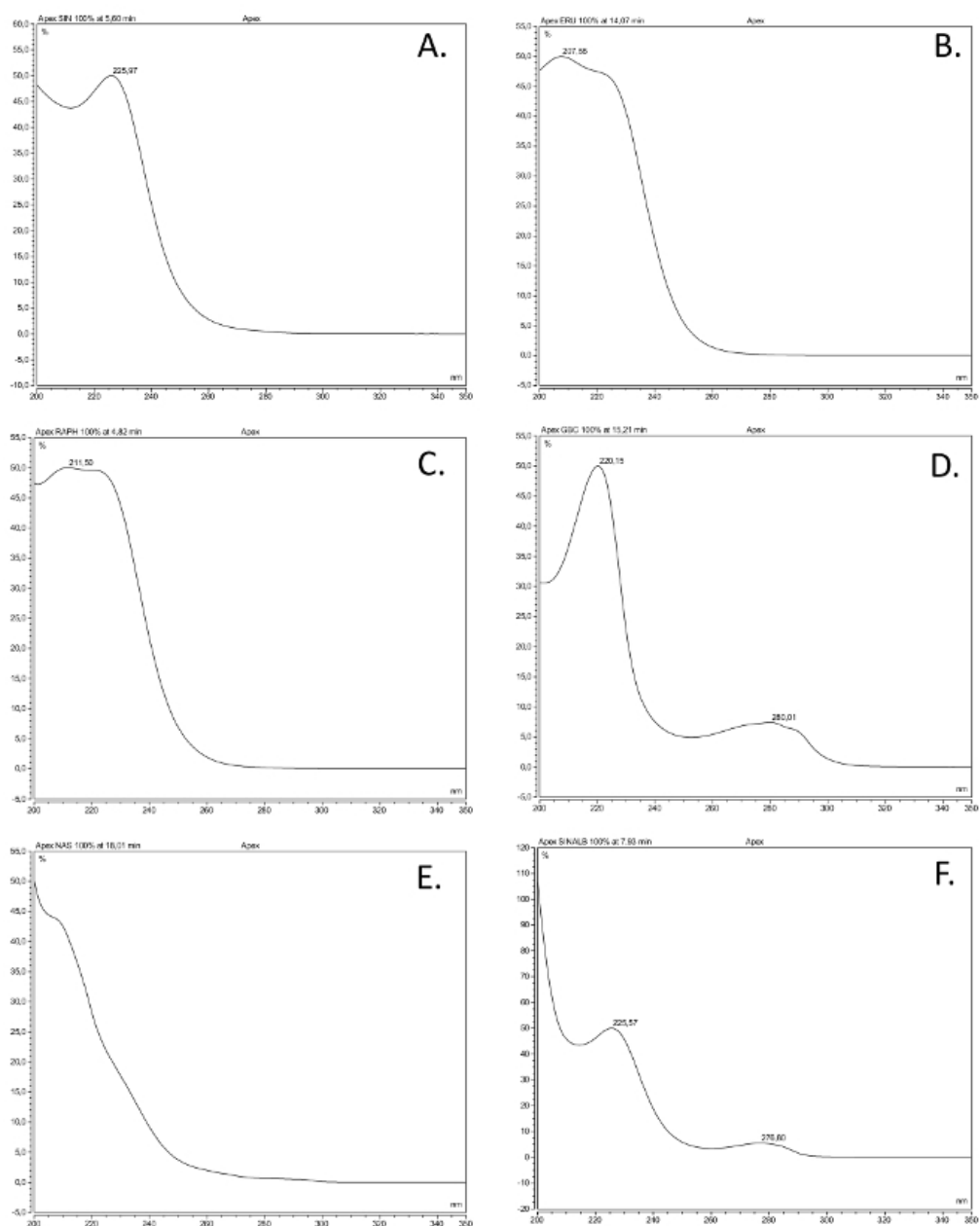
U detekcijskoj jedinici kod DAD-a koriste se nizovi fotodioda (poluvodički uređaji). DAD detektira apsorpciju u UV do VIS području. Dok UV-VIS detektor ima samo jednu sekciju za primanje svjetla na strani uzorka, DAD ima više (1024 za L-2455/2455U) nizova fotodioda za dobivanje informacija u širokom rasponu valnih duljina u jednom trenutku.

Ideja je da se spektri mjere u intervalima od 1 sekunde ili manje tijekom odvajanja HPLC-om uz kontinuiranu isporuku eluata. Ako se mjerenje izvodi na fiksnoj valnoj duljini, komponente se identificiraju samo na temelju njihovog vremena zadržavanja što znači da manje odstupanje u vremenu zadržavanja može otežati identifikaciju komponenti. U takvom slučaju, DAD se može koristiti za identifikaciju komponenti usporedbom UV/VIS spektara. (30)



Slika 1.14. Ilustracija DAD optičkog sustava (30)

Za potvrdu desulfoglukozinolata preko UV spektara dobivenih DAD detektorom korišteni su UV spektri standardnih glukozinolata. UV spektri prikazuju apsorpcijsko područje 200 nm – 350 nm dobiveno od otopina komercijalno dostupnih referentnih glukozinolata ekstrahiranih identičnim postupkom. Korišteni su spektri prema protokolu u radu pod nazivom: *A Straightforward Method for Glucosinolate Extraction and Analysis with High-pressure Liquid Chromatography (HPLC)* (31)



Slika 1.15. UV apsorpcijski spektri (200 nm - 350 nm) šest najčešćih desulfoglukozinolata. (A) sinigrin, (B) glukoerucin, (C) glukorafanin, (D) glukobrasicin, (E) glukonasturcin, (F) sinalbin (31)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

2.1.1. Uzgoj klica brokule (*Brassica oleracea* var. *italica*)

Za uzgoj klica brokule do razine mikrozelenja u laboratoriju korišteno je komercijalno sjeme njemačkog proizvođača Kiepenkerl (slika 2.1.). Sjeme je posijano preko rešetki za kultivaciju, ravnomjerno distribuirano preko rešetke i uzgajano u vodovodnoj vodi u prvom uzorku. U ostalih pet uzoraka, umjesto vode, pripremljeno je 5 otopina selenija različitih koncentracija u kojima je uzgajana biljka. Pripremljene su koncentracije selenija u otopinama koncentracije 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm i 10 ppm (tablica 2.1.).



Slika 2.1. Komercijalno sjeme korišteno za uzgoj brokule

Tablica 2.1. Koncentracije Se po rešetkama izražene su u ppm

| Rešetka 1 | Rešetka 2 | Rešetka 3 | Rešetka 4 | Rešetka 5 | Rešetka 6 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Voda | 1 | 2,5 | 5 | 7,5 | 10 |

Za pripremu otopina selenija u kojima su uzgajane klice brokule korištena je standardna otopina selenija koncentracije 1000 µg/mL.

Biljka je uzgajana hidroponski kroz sedam dana uz održavanje konstantne razine otopine u kojoj je uzgajana. Dakle, uz dolijevanje otopina selenija i čiste vode, rast biljke je redovno praćen do dana berbe. Rasla je u umjereno toplim i osvjetljenim uvjetima u sjeni.

Brokula je uzgajana u atmosferskim uvjetima laboratorija kroz prvu polovicu srpnja 2021. godine.

Kako se može vidjeti na slici petog dana uzgoja biljke u laboratoriju, gdje su koncentracije selenija u otopini poredane od niže prema višoj, porastom koncentracije selenija smanjuje se rast brokule.



Slika 2.2. Na slici je prikazana faza rasta biljke petog dana uzgoja

2.1.2. Priprema biljnog materijala za izolaciju glukozinolata i isparljivih spojeva

Nakon sedmog dana rasta biljke u otopinama različitih koncentracija selenija, biljni materijal je pažljivo pobran laganim čupkanjem klica iz rešetki za uzgoj i zamrznut do liofilizacije (slika 2.3.).

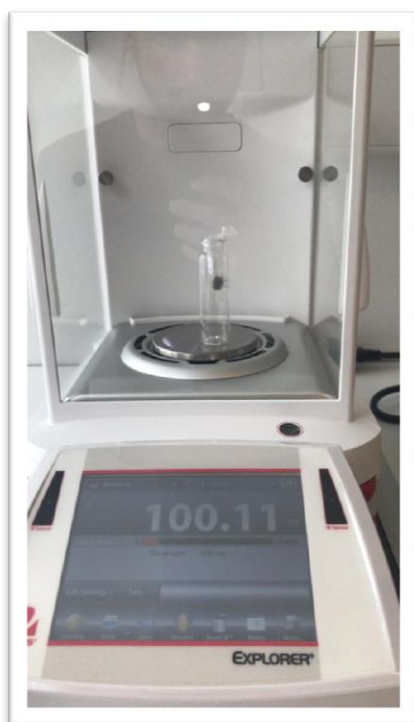


Slika 2.3. Biljni materijal u kadici za sušenje pri standardnim uvjetima

Materijal je stavljen na liofilizaciju (slika 2.4.).



Slika 2.4. Uređaj za liofilizaciju, Labconco Corporation, Kansas, Missouri, SAD



Nakon sušenja biljni materijal je samljeven električnim mlincem za kavu s ciljem usitnjavanja i povećavanja kontaktne površine čvrste faze za ekstrakciju. Odvagano je po 100 mg suhog biljnog materijala u mikroeprevete (slika 2.5.).

Slika 2.5. Vaganje suhog biljnog materijala.

2.2. Kemikalije i aparatura

2.2.1. Kemikalije

- voda
- metanol (MeOH) 70 %, Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- standard selenija u 2 % HNO₃, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
- dekstran (DEAE-sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- natrijev acetat (NaOAc), Merck, Darmstadt, Njemačka
- bezvodni natrijev sulfat (Na₂SO₄, VWR International, Radnor, Pennsylvania, SAD
- sulfataza (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- natrijev klorid (NaCl), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- acetonitril, Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD
- mirozinaza (tioglukozidaza), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- diklormetan (CH₂Cl₂), T.T.T, Sveta Nedjelja, Hrvatska.

2.2.2. Aparatura

- električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- analitička vaga, Explorer® Semi-Micro, OHAUS, Parsippany, New Jersey, SAD
- lijevak za odjeljivanje, Deotto Lab, Zagreb, Hrvatska
- uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, Ethos X; Milestone Srl, Sorisole, Bergamo, Italija
- ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka
- centrifuga, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka
- vorteks, Dragon lab, MX-S
- uređaj za uparavanje strujom dušika, EC-IV-130, VLM, Bielefeld, Njemačka
- uređaj za liofilizaciju, Labconco Corporation, Kansas, Missouri, SAD
- GC-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD
- UHPLC-DAD-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD.

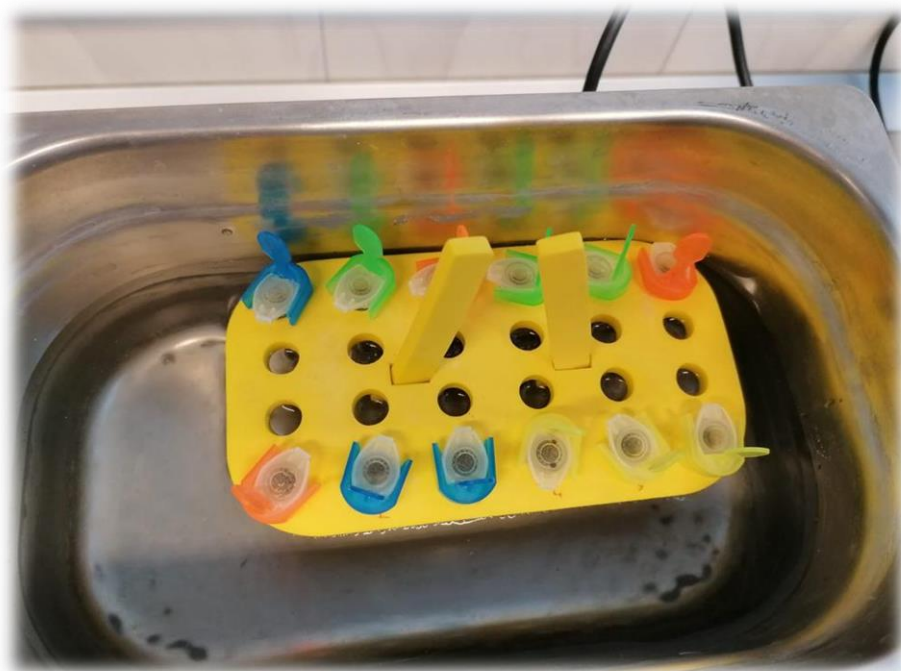
2.3. Ekstrakcija glukozinolata

Za ekstrakciju glukozinolata je prema protokolu korištena otopina 70 %-tnog metanola (MeOH). Prvo je otpipetirano po 1 mL 70 %-tnog MeOH u svaku epruvetu i dobro promiješano. Zatim su se sve epruvete zadržale oko 5 min u vrućoj vodenoj kupelji na temperaturi oko 90 °C da bi se inaktivirao prirodno prisutni enzim mirozinaza. Kako je već prethodno spomenuto, enzim mirozinaza razgrađuje glukozinolate što dovodi do značajnih gubitaka prilikom njihove kvantitativne analize. Inaktivacijom mirozinaze dobiti ćemo realne vrijednosti glukozinolata.



Slika 2.6. Uzorci suhog biljnog materijala u 1 mL 70%-tnom MeOH

Nakon zagrijavanja, uzorci se postavljaju na ultrazvučnu kupelj tijekom 15 minuta kako bi se poboljšala ekstrakcija prisutnih glukozinolata (slika 2.7.).



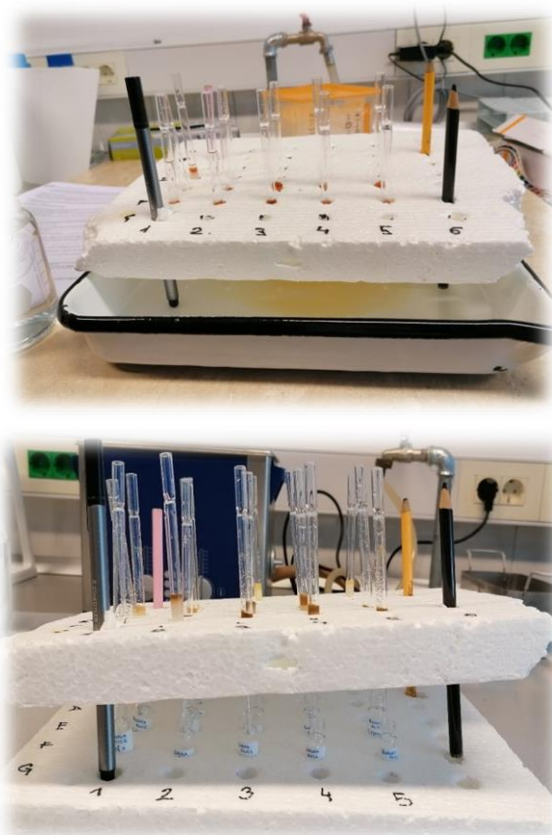
Slika 2.7. Ekstrakcija u MeOH potpomognuta ultrazvukom.

Nakon ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, ekstrakti se centrifugiraju na 6000 okr/min kroz 5 minuta (slika 2.8.).



Slika 2.8. Aparat za centrifugalno odvajanje smjesa

Zatim su se postavile kolone punjene dekstran gelom. Konstrukcija za odvajanje je kućne radinosti prikazana na slici (slika 2.9.).



Slika 2.9. Kolone sa dekstran gelom za pročišćavanje glukozinolata

Ekstrakti su dodani na kolone te je ekstrakcija ponovljena s dodatnih 1 mL 70 % MeOH. Zatim je u svrhu pročišćavanja dodano još dva puta po 1 mL MeOH da bi se uklonile nepolarne komponente iz ekstrakta. MeOH se ispire dodavanjem 1 mL čiste vode u svaku kolonu.

Nakon toga, u svrhu stvaranja optimalnih uvjeta za dodavanje enzima sulfataze, dodano je dva puta po 1 mL natrijevog acetata (NaOAc) u svaku kolonu. Uloga enzima sulfataza je hidroliza sulfatnih estera. Dva kolona su se posušila i ostavila iznad označenih mikroepreveta u koje se hvatala nova otopina. U svaku kolonu je dodano 20 μ L otopine sulfataze i 50 μ L NaOAc koji služi za ravnomjerno raspoređivanje sulfataze. Sve je pokriveno aluminijskom folijom i ostavljeno preko noći.

Sljedećeg jutra, u svrhu elucije nastalih desulfoglukozinolata, kroz kolone je otpipetirano 2 puta po 0,75 mL ultračiste vode. Uzorci su zatim liofizirani i dodano je

po 1 mL čiste vode da bi se dobila vodena otopina desulfoglukozinolata koja je prebačena u zasebne bočice. Uzorci su čuvani u zamrzivaču do analize.

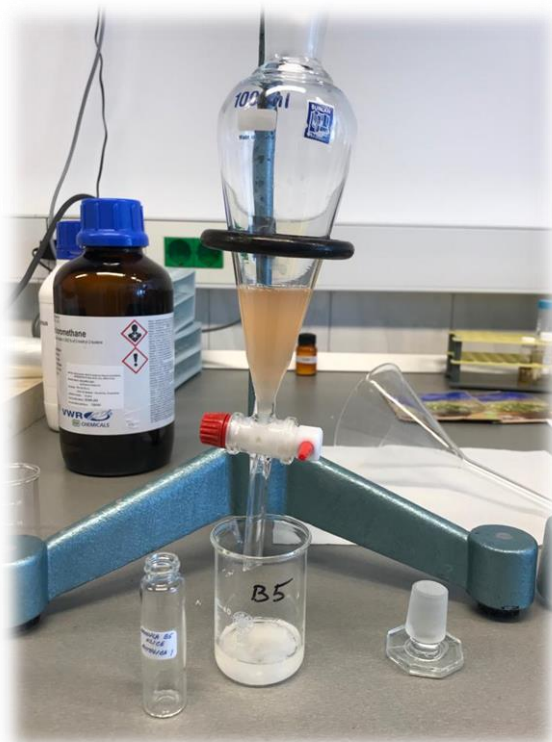
2.4. Ekstrakcija razgradnih hlapljivih spojeva glukozinolata

Za analizu razgradnih spojeva glukozinolata i potencijanih selenoglukozinolata klica brokule odabran je biljni materijal uzgajan u otopinama koncentracije selenija 5 ppm i 7,5 ppm. To su srednje koncentracije otopine selenija u kojoj je biljka rasla tijekom eksperimenta i na tim koncentracijama je bio solidan prinos biljnog materijala. Uzorci su otopljeni u vodi i dodan je po 1 mL otopine enzima mirozinaze (slika 2.10.). Tikvice su prekrivene parafilmom i ostavljene 24 h na autolizu.



Slika 2.10. Uzorci klica brokule stavljeni na autolizu uz dodatak enzima mirozinaze.

Filtrirani sadržaj se sljedećeg dana prenio u lijevak za odjeljivanje (slika 2.11.). Ekstrakcija se provela s diklormetanom koji je gušći od vode. Ekstrakcija se ponovila dva puta sa svježim diklormetanom. Diklormetanski ekstrakt, nakon sušenja s bezvodnim, natrijevim sulfatom skladištilo se na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do GC-MS analize.



Slika 2.11. Ekstrakcija hlapljivih razgradnih produkata glukozinolata diklormetanom.

2.5. Analiza ekstrahiranih spojeva

2.5.1. UHPLC-DAD-MS/MS analiza

UHPLC-DAD-MS/MS Ultimate 3000 RS s TS Quantis MS/MS detektorom na koloni Hypersil GOLD 3.0 mm × 100 mm, promjera čestica 3.0 μm (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, SAD) je uređaj korišten za analizu desulfoglukozinolata dobivenih desulfatacijom glukozinolata i njihovom ekstrakcijom u prethodno opisanom postupku (slika 2.12.).

Korištena mobilna faza je vodena otopina NaCl kao prvo otapalo i 30 %-tni acetonitril kao drugo otapalo uz protok od 0,5 mL/min i temperaturom kolone od 25 °C. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 5 μL. Sukladno svojstvima otapala prvo su izlazile polarnije komponente otopljene u vodenoj otopini NaCl, a zatim nepolarnije komponente topljivije u acetonitrilu. Ukupno vrijeme trajanja analize iznosilo je 15,7 minuta dok je signal snimljen DAD detektorom pri 227 nm. Maseni spektri su snimljeni pri 350 °C u pozitivnom načinu snimanja.



Slika 2.12. Uređaj UHPLC-DAD-MS/MS na KTF-u Split, Sveučilište u Splitu

Za kvantizaciju desulfoglukozinolata korištena je kalibracijska krivulja desulfosinigrina kao eksterni standard za raspon koncentracija od 13,56 μM do 542,50 μM . Literaturne vrijednosti čimbenika odaziva su korištene za izračun pojedinog dobivenog desulfoglukozinolata.

2.5.2. GC-MS analiza

Za kvalitativnu analizu razgradnih hlapljivih produkata glukozinolata dobivenih u reakciji s enzimom mirozinazom i skladištenih na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ korišten je vezani sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC-MS sustav). Korišten je uređaj proizvođača Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD) (slika 2.13.).



Slika 2.13. GC-MS uređaj

Prije analize uzorci su upareni na manji volumen u struji dušika. Proces se izvodio na temperaturi vrenja otapala da bi se izbjegao gubitak ekstrahiranog hlapljivog uzorka (slika 2.12.).



Slika 2.14. Uređaj za uparivanje uzorka u struji dušika EC-IV-130, VLM, Bielefeld, Njemačka

Za analizu je korištena nepolarna kolona HP-5MS UI (30 m x 0.25 mm, Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA). He je korišten kao mobilna faza, s protokom od 1 mL/min. Temperatura injektora je podešena na 250 °C, a volumen injektiranog uzorka na 1 μ L. Kolona je prvotno zagrijala na 60 °C prve 3 minute, a zatim se zagrijavala brzinom od 3°C/min na 246 °C sa konačnim zadržavanjem od 25 min pri toj temperaturi.

Energija ionizacije uzorka u masenom spektrometru iznosila je 70 eV, a temperatura izvora iona je postavljena na 200 °C. Područje skeniranja iznosilo je 40-350 m/z.

Wiley MS library biblioteka spektara masa je poslužila za identifikaciju analiziranih hlapljivih spojeva.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Uzgoj i morfologija klica

Za pripravu uzorka biljnog materijala uzgojene su klice biljke *Brassica oleracea* var. *italica* na rešetkama za uzgoj kroz sedam dana. Uzgoj je izvršen u laboratorijskim uvjetima Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu. Na šest različitih rešetki, ravnomjerno je raspoređena jednaka količina sjemena za uzgoj klica u vodovodnoj vodi ili otopinama različitih koncentracija selenija: 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm i 10 ppm. Tijekom sedam dana koliko je biljci bilo potrebno da dosegne razinu zrelih klica za branje, uočena je razlika u rastu kod različitih koncentracija selenija u vodi. Odnos između koncentracije selenija i stupnja razvoja biljke sedmi dan uzgoja je takav da kako koncentracija selenija raste, više je inhibiran rast biljke što možemo vidjeti na predloženoj fotografiji posudica s biljkama (slika 3.1.).



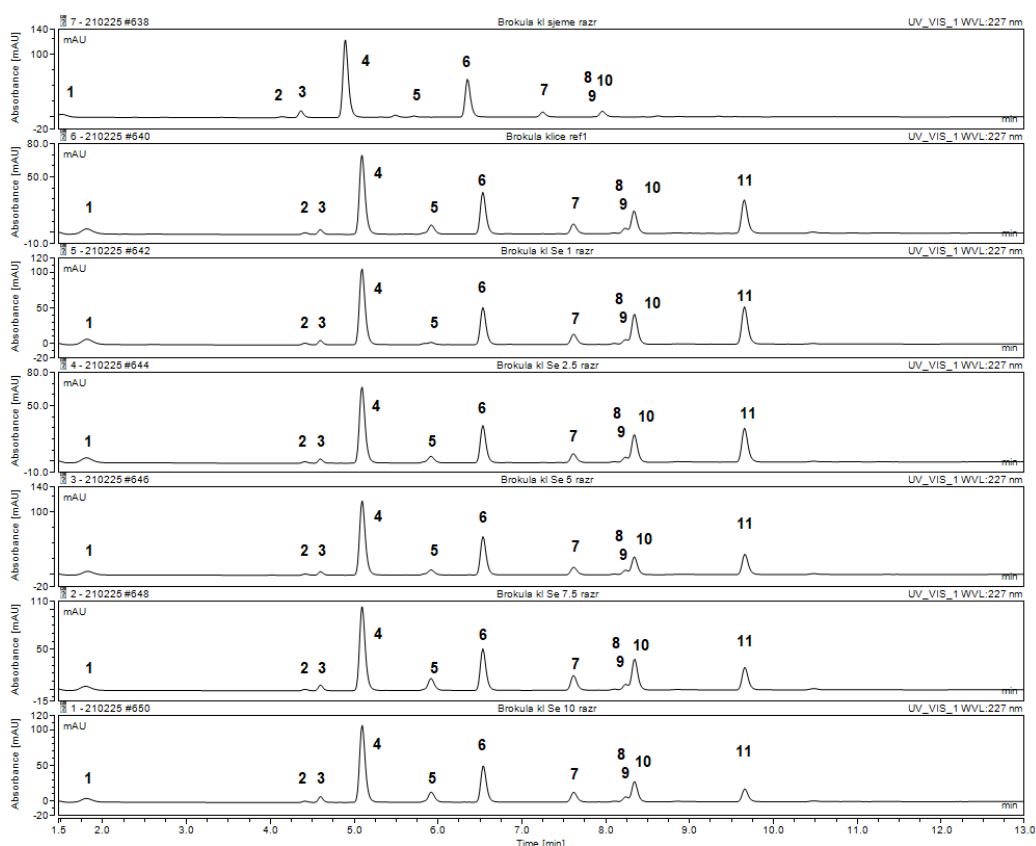
Slika 3.1. *Brassica oleracea* var. *italica* sedmi dan uzgoja u otopinama različitih koncentracija selenija

Očigledno je da povišene koncentracije selenija nisu odgovarale primarnom metabolizmu biljke te da se samim time otežano razvijala prilikom izloženosti višim koncentracijama. Odnos je svakako zanimljiv za proučavanje, a je li biljka za to vrijeme bila opterećena sekundarnim metabolizmom, vidjet ćemo iz rezultata analize sekundarnih metabolita.

Cilj ovoga rada je bio odrediti utjecaj selenija na profil tipičnih glukozinolata nađenih kod brokule. Također, u nadi da će biljka kroz sedam dana apsorbirati selenij i unijeti ga u biosintezu glukozinolata umjesto sumpora zbog velike pristupačnosti samog selenija, a i velike kemijske sličnosti sa sumporom, analiza je provedena s ciljem pronalaska selenoglukozinolata, selenometionin-izvedenih glukozinolata ili njihovih razgradnih produkata selenozocijanata ili metilselenoalkil izotiocijanata.

3.2. Rezultati UHPLC-DAD-MS/MS analize

Prikazani su kromatogrami desulfoglukozinolata nakon UHPLC analize (slika 3.2.). Prvi kromatogram prikazuje glukozinoladni profil sjemena brokule korištenog za uzgoj klica. Drugi kromatogram prikazuje glukozinoladni profil klica brokule uzgajanih u vodi što služi kao referentna vrijednost. Nadalje, sljedeći kromatogrami pripadaju uzorcima uzgajanim u otopinama selenija počevši od najmanje vrijednosti, odnosno 1 ppm do 10 ppm na zadnjem kromatogramu.



Slika 3.2. HPLC kromatogrami desulfoglukozinolata u uzorcima klica brokule.

Identificirano je ukupno **12** različitih desulfoglukozinolata. (tablica 3.1)

Tablica 3.1. Identificirani desulfoglukozinolati s vrijednosti molekuskog iona i vremenom zadržavanja

| IME SPOJA | [M + Na]⁺ | Vrijeme zadržavanja (min) | Čimbenici odziva |
|--|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Desulfoprogoitrin (1) | 332 | 1,68 | 1,09 |
| Desulfoglukonapoleiferin (2) | 346 | 4,32 | 1,00 |
| Desulfoglukoalisin (3) | 394 | 4,54 | 1,07 |
| Desulfoglukonapin (4) | 316 | 5,05 | 1,11 |
| Desulfoglukokohlearin (5) | 318 | 5,87 | 1(arb.) |
| Desulfo-4-hidroksiglukobrasicin (6) | 407 | 5,96 | 0,28 |
| Desulfoglukobrasikanapin (7) | 330 | 6,51 | 1,15 |
| Desulfoglukobrasicin (8) | 391 | 7,61 | 0,29 |
| Desulfoglukoberteroin (9) | 378 | 8,11 | 1(arb.) |
| Desulfoglukonasturcin (10) | 366 | 8,22 | 0,95 |
| Desulfo-4-metoksiglukobrasicin (11) | 421 | 8,35 | 0,25 |
| Desulfoneoglukobrasicin (12) | 421 | 9,64 | 0,20 |

*arb. - arbitrarno

Navedeni desulfoglukozinolati su identificirani na temelju vremena zadržavanja, UV spektara i masenih spektara (MS i MS2) pojedinog spoja. Kod masene spektrometrije prvo je sniman spektar svih masa (engl. *full scan*) za svaki signal da bi dobili karakteristični molekularni ion za svaki signal, odnosno kromatografijom izdvojeni spoj. Zatim je drugim korakom masene spektrometrije snimana karakteristična fragmentacija za detaljnu detekciju strukture spojeva. Zbog dodatka 50 mM natrijeva klorida u mobilnu fazu tijekom analize, u masenim spektrima vrijednosti specifične mase desulfoglukozinolata su uvećane za masu iona Na^+ koja iznosi $A_r=23$. Stoga, svaki signal mase karakterističnog fragmenta ima masu $[M+Na]^+$.

Tablica 3.2. Sadržaj glukozinolata prisutnih u sjemenu i klicama brokule.

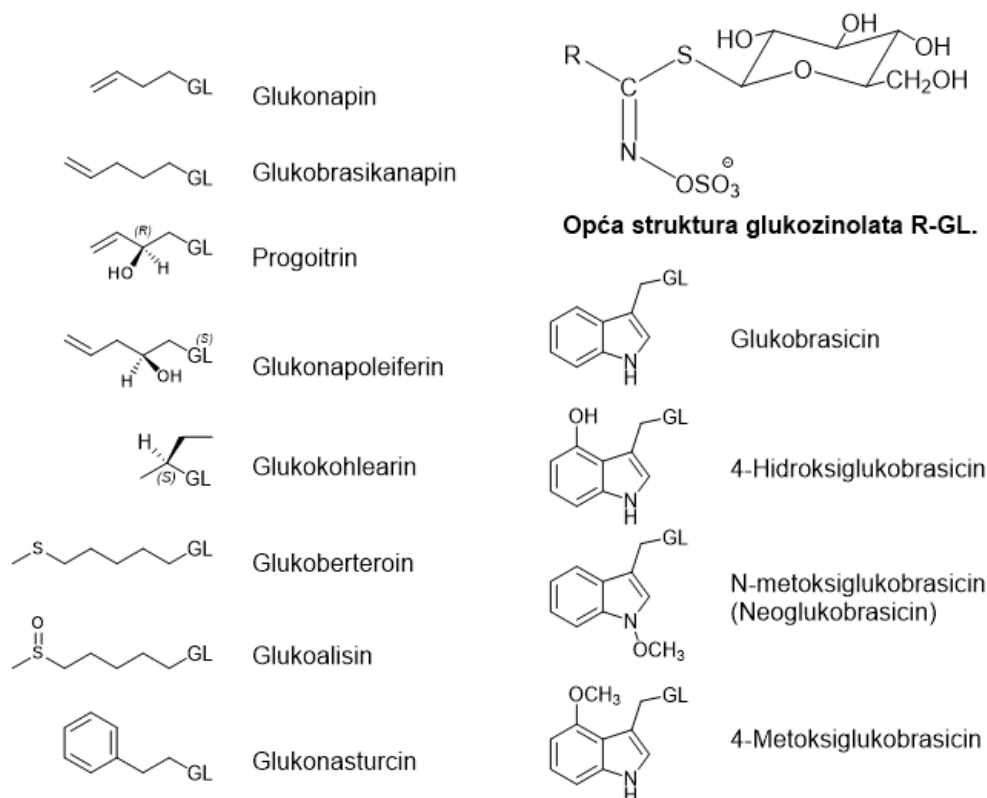
| | IME SPOJA | Sadržaj glukozinolata ($\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala) | | | | | | |
|----|--------------------------------|---|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Sjeme | Ref. uzorak | 1 ppm Se | 2.5 ppm Se | 5 ppm Se | 7.5 ppm Se | 10 ppm Se |
| 1 | Progoitrin | 1,84 | 8,87 | 5,87 | 0,59 | 6,93 | 6,20 | 6,24 |
| 2 | Glukonapoleiferin | 6,08 | 0,94 | Tr | 0,91 | 0,95 | 0,71 | 0,82 |
| 3 | Glukoalisin | 3,11 | 2,82 | 1,11 | 2,32 | 2,51 | 2,85 | 3,79 |
| 4 | Glukonapin | 50,52 | 61,50 | 45,59 | 54,51 | 67,31 | 51,09 | 60,09 |
| 5 | Glukokohlearin | tr | 2,94 | Tr | 0,79 | 0,81 | 0,57 | 1,01 |
| 6 | 4-Hidroksiglukobrasicin | 10,54 | 0,95 | 1,46 | 2,47 | 1,86 | 3,11 | 3,89 |
| 7 | Glukobrasikanapin | 24,69 | 33,80 | 22,32 | 27,88 | 36,14 | 26,45 | 29,84 |
| 8 | Glukobrasicin | 0,98 | 2,19 | 0,48 | 1,85 | 1,81 | 2,58 | 2,26 |
| 9 | Glukoberteroin | tr | tr | Tr | tr | tr | tr | tr |
| 10 | Glukonasturcin | 3,97 | 2,77 | 0,68 | 0,90 | 0,81 | 0,80 | 0,55 |
| 11 | 4-Metoksiglukobrasicin | n.i. | 3,60 | 5,60 | 4,28 | 3,57 | 4,71 | 3,18 |
| 12 | Neoglukobrasicin | 0,07 | 5,24 | 4,19 | 4,83 | 3,55 | 2,81 | 2,03 |
| | UKUPNO | 101,80 | 125,63 | 86,80 | 101,34 | 126,34 | 101,87 | 113,69 |

* n.i. – nije identificiran, tr – tragovi.

U tablici su prikazane kvantitativne vrijednosti glukozinolata u uzorcima dobivenim uzgojem u različitim koncentracijama selenija te ukupni sadržaj glukozinolata (tablica 3.2.). Možemo primjetiti da nema uočljive povezanosti između ukupne koncentracije glukozinolata i povećane koncentracije selenija u uzorku. Očigledan je poremećaj u vrijednostima uzrokovan drugačijim medijem koji utječe na sekundarni metabolizam biljke. Poput individualnih vrijednosti uzoraka koje se mijenjaju, možemo pretpostaviti kako je selenij u mediju doveo do stresa kod biljke. Kao što smo prethodno vidili kod morfoloških osobina klica, biljka nije jednako rasla u svim koncentracijama selenija što je dodatan dokaz kako je neobičan medij doveo do inhibicije rasta i razvoja iste. Uočava se kako je sadržaj glukozinolata veći u referentnoj biljci u odnosu na sjeme što pokrijepljuje njihovu ulogu u svakodnevnoj konzumaciji budući da su glukozinolati prekursori biološki aktivnih izotiocijanata, najpoznatijih po izrazitoj antikancerogenoj aktivnosti.

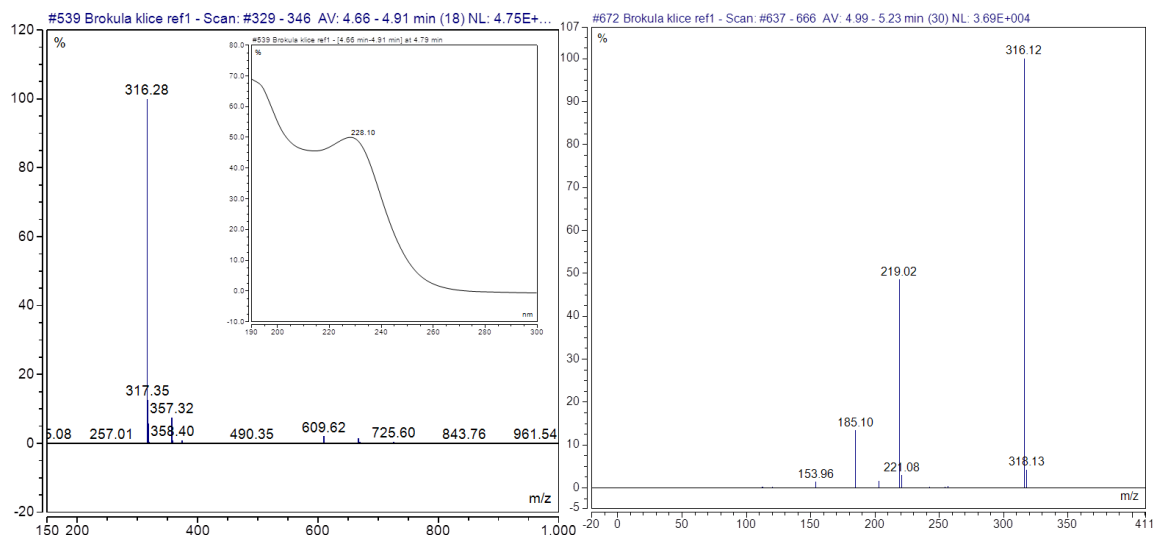
Jedna od pretpostavki ovoga eksperimenta je bila da će klice brokule zbog izloženosti velikoj količini selenija preko transportera sulfata u biosintezu glukozinolata unijeti selenij te biosintetizirati selenoglukozinolate ili selenometionin-izvedene glukozinolate. Nažalost, kako provedenim analizama nismo dobili niti jedan spoj koji bi odgovarao istim u dovoljnim količinama da bi se detektirao, možemo pretpostaviti da do biosinteze u ovim uvjetima uzgoja ne dolazi. Klice brokule su uzgajane samo 7 dana iz sjemena koje je vjerojatno sadržavalo dovoljno sumpora za sintezu sekundarnih metabolita u prvotnoj fazi razvoja. Kako je uz referentnu vrijednost uzorka uzgajanog u vodi ispitana i koncentracija glukozinolata u sjemenu, dobivene su zanimljive vrijednosti glukozinolata povezanih s razvojom. Kao što se uočava u tablici (tablica 3.2.) koncentracije glukonapoleiferina i 4-hidroksiglukobrasicina naglo padaju početkom rasta biljke. U odsutnosti selenija imaju približno istu vrijednost, a zatim porastom njegove koncentracije blago osciliraju. Kod 4-hidroksiglukobrasicina se može uočiti lagani rast koncentracije porastom koncentracije selenija u vodi. Kod glukokohlearina, 4-metoksiglukobrasicina i neoglukobrasicina koncentracija glukozinolata u sjemenu je izrazito mala ili uopće nije prisutna na primjeru 4-metoksiglukobrasicina što znači da biljka te spojeve sintetizira u fazi rasta i razvoja. Kako je rast i razvoj biljke proveden u različitim koncentracijama selenija, vrijednosti blago variraju što je već objašnjeno stresom. Zanimljiva paralela se može povući između glukobrasikanapina i glukonapina koji su najzastupljeniji glukozinolati u

brokuli. Njihove vrijednosti jednako osciliraju promjenom koncentracije selenija u uzorku. To se objasniti zajedničkim biosintetskim putem jer se spojevi razlikuju za jednu metilensku skupinu (slika 3.3.). Bez obzira na sličnost spojeva, zbog uočene međusobne ovisnosti, možemo pretpostaviti da imaju sličnu ulogu kod biljke. Zanimljiva je promjena koncentracije spoja glukonasturcina koji ima najveću koncentraciju u sjemenu. Njegova koncentracija je nešto niža u referentnom uzorku koji je uzgajan u čistoj vodi dok je u prisutnosti selenija značajno snižena što govori da je selenij na neki način inhibirao daljnju sintezu tog spoja u novoizraslim klicama. Ostali spojevi poprilično variraju te dostižu vrhunce na različitim koncentracijama selenija iz čega se mogu pretpostaviti razni mehanizmi i utjecaji. Uglavnom, kako god se koncentracije selenija mijenjale, ukupna koncentracija glukozinolata u uzorku ne odstupa značajno, ali je zanimljivo primjetiti činjenicu da je na 1 ppm-a prisutno najmanje glukozinolata, dok je na 5 ppm-a prisutno najviše.

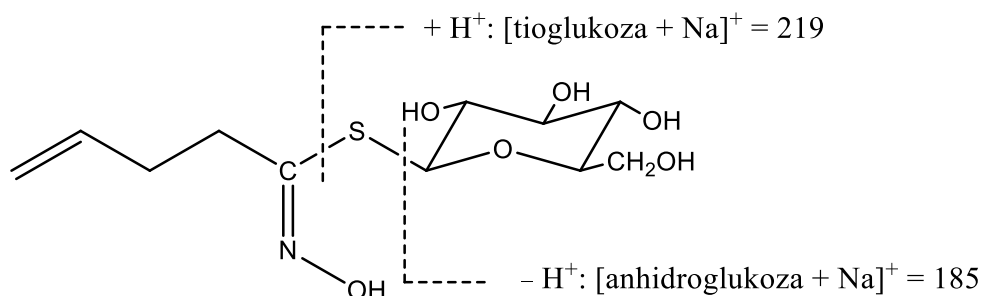


Slika 3.3. Strukture identificiranih glukozinolata u klicama biljke *Brassica oleracea* var. *italica*.

Na sljedećim slikama UV, MS i MS2 spektara, prikazani su signali detektiranih spojeva u obliku desulfoglukozinolata koji su dobiveni kao produkt enzimske reakcije sa sulfatazom.



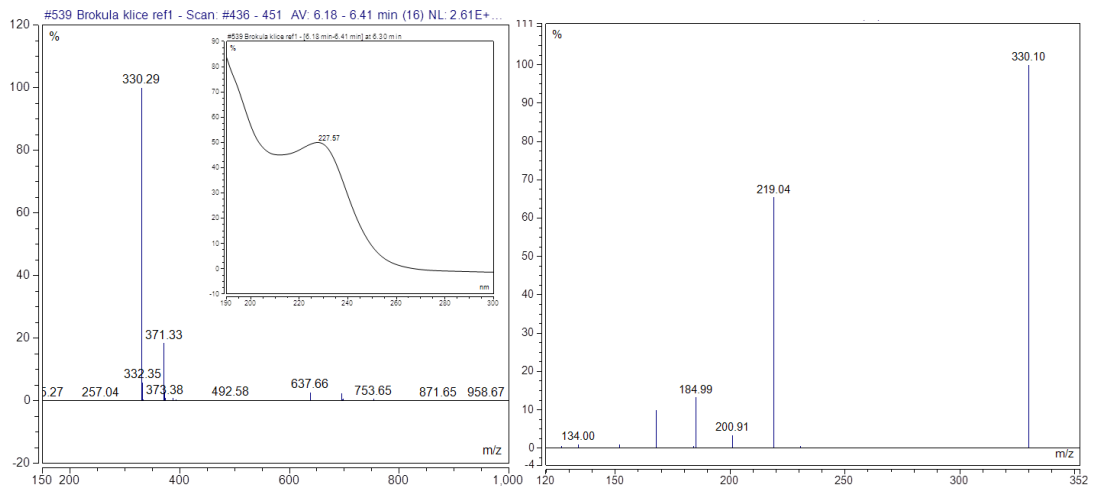
Slika 3.4. UV, MS i MS2 spektar desulfoglukonapina.



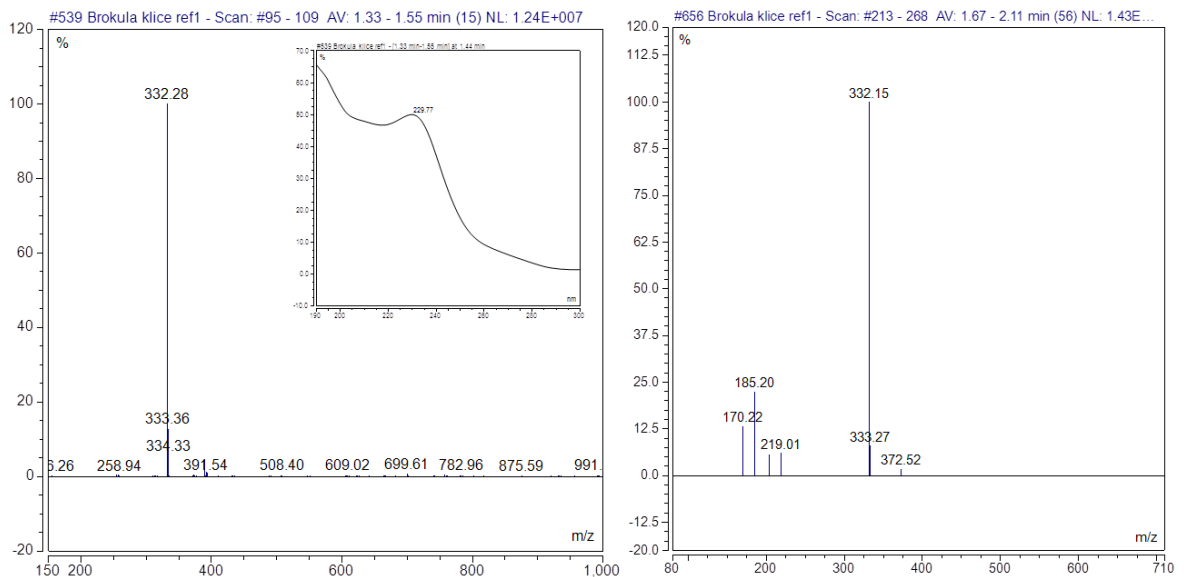
Slika 3.5. Karakteristična fragmentacija desulfoglukonapina.

Identifikacija spoja glukonapina kao najzastupljenijeg glukozinolata u referentnom uzorku klica brokule s vremenom zadržavanja od 5,05 min potvrđena je MS spektrom koji daje vrijednost odnosa mase i naboja (m/z) molekuskog iona $(M+Na)^+$ 316 što odgovara molekulknoj masi natrijeva adukta desulfoglukonapina. Nadalje, vrijednosti masa specifičnih fragmenata nastalih cijepanjem u MS2 spektru daju dodatne dokaze kako se radi o tom spoju (slika 3.5). Fragment mase $m/z=219$ odgovara natrijevom aduktu fragmenta nastalog cijepanjem na tioglukozidnoj vezi pri

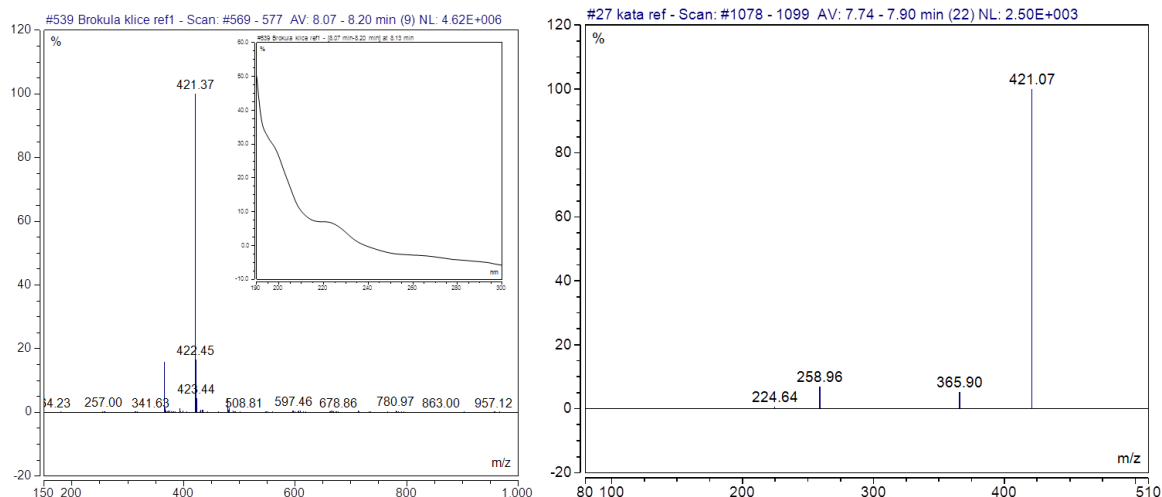
čemu nastaje tioglukozni kation. Fragment mase $m/z=185$ pripada natrijevom aduktu kationa anhidroglukoze koji nastaje drugim karakterističnim cijepanjem za glukozinolate. Glukonapin pripada skupini alifatskih glukozinolata što potvrđuje i izgled apsorpcijske vrpce njegovog UV spektra s jednim apsorpcijskim maksimumom na 228 nm (slika 3.4.).



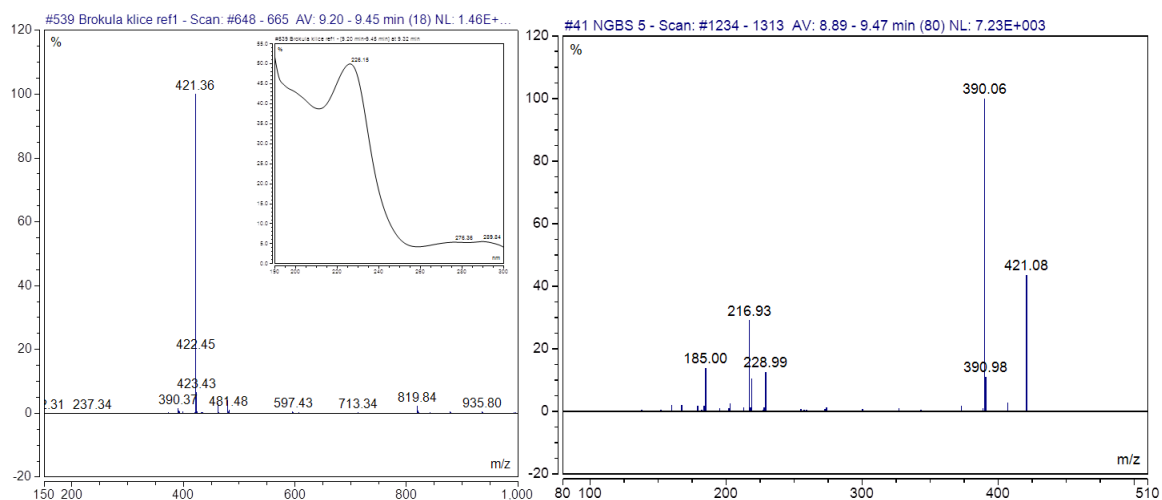
Slika 3.6. UV, MS i MS2 spektar desulfoglukobrasikanapina



Slika 3.7. UV, MS i MS2 spektar desulfoprogoitrina

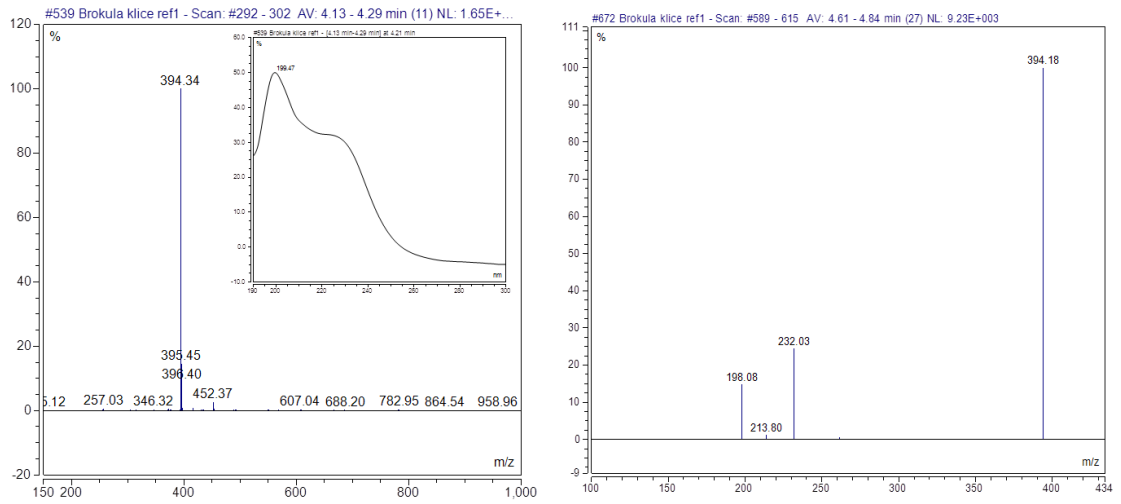


Slika 3.8. UV, MS i MS 2 spektar desulfo-4-metoxisglukobrasicina

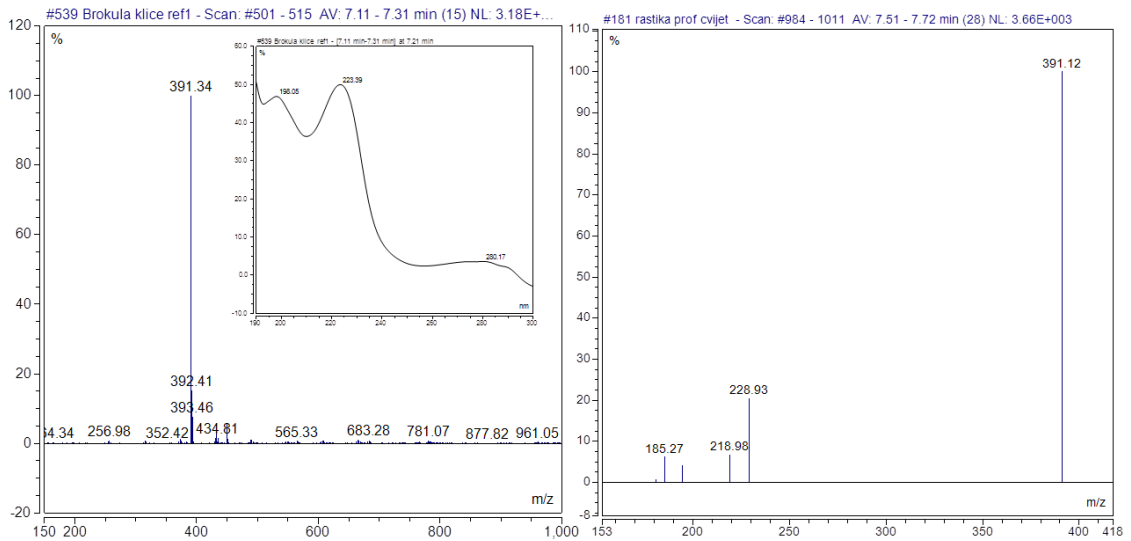


Slika 3.9. UV, MS i MS2 spektar desulfoneoglukobrasicina

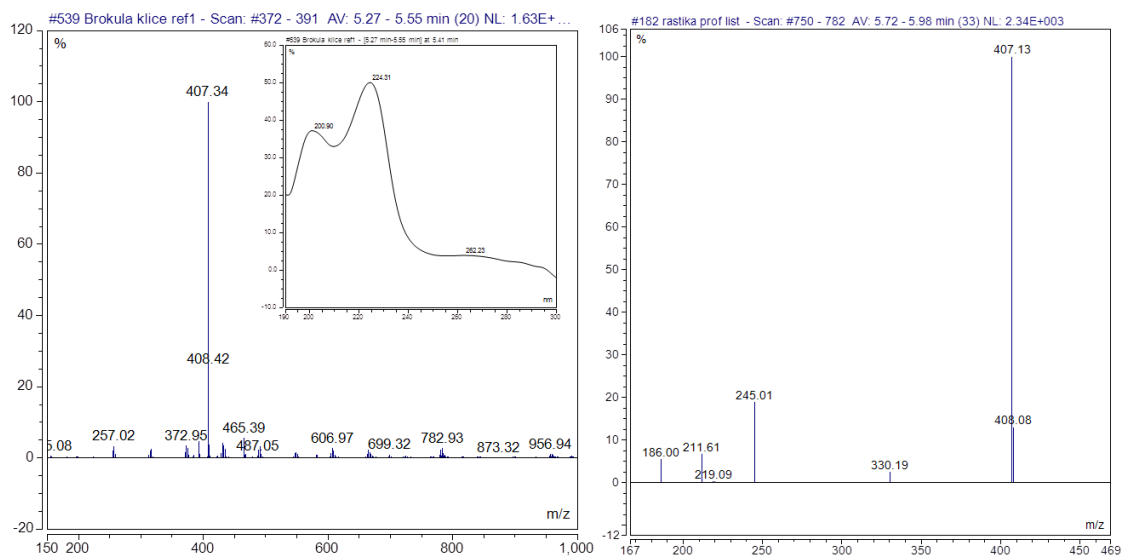
Prisutna su 4 derivata glukobrasicina u značajnijim količinama. Glukobrasicini pripadaju indolnim glukozinolatima s biosintetskim aminokiselinskim prekursorom triptofanom. Specifično za indolne glukozinolate, javljaju se dva apsorpcijska maksimuma na UV spektrima.



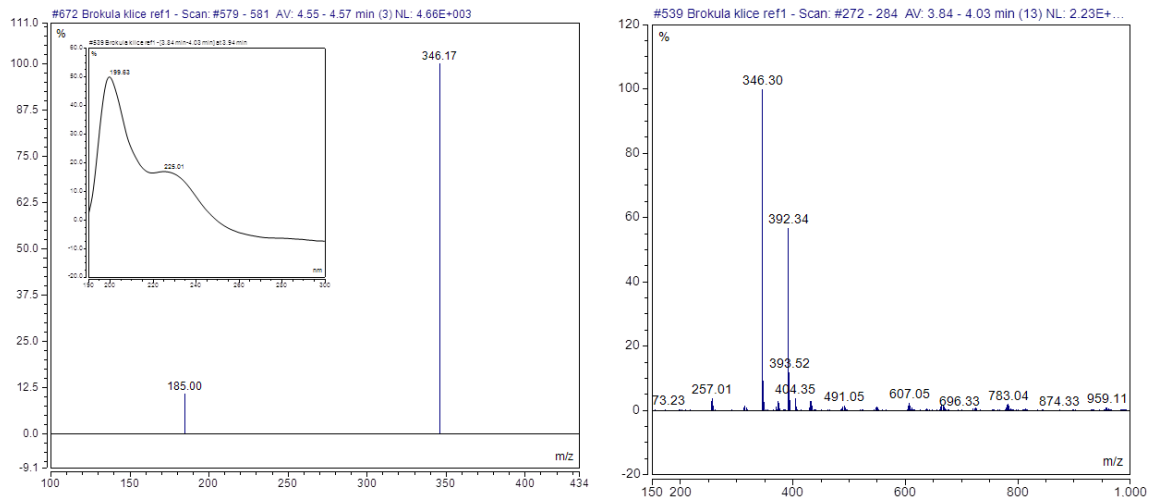
Slika 3.10. UV, MS i MS2 spektar desulfoglukoalisina



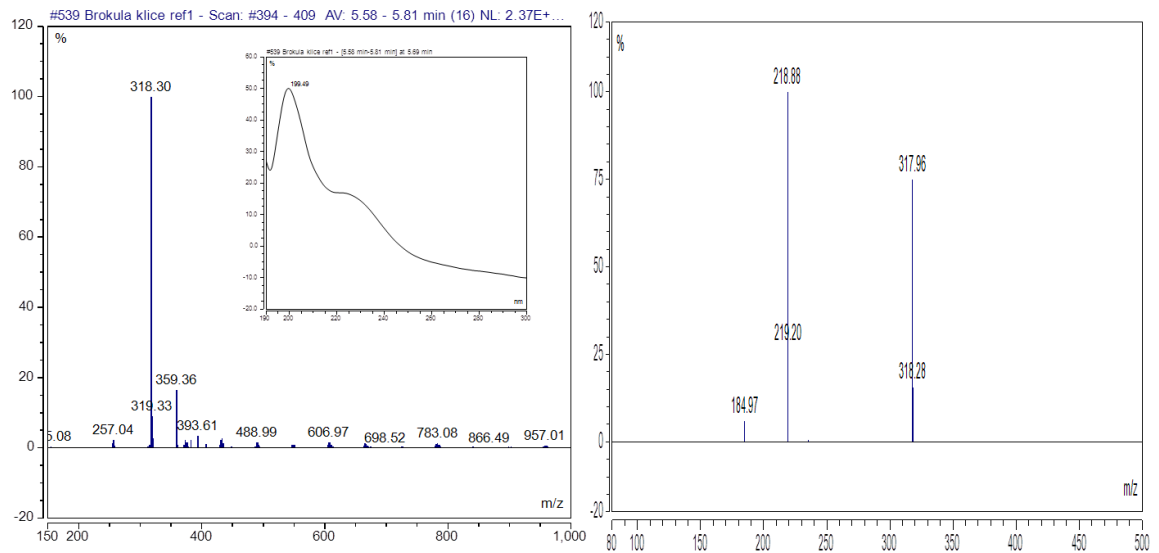
Slika 3.11. UV, MS i MS2 spektar desulfoglukobrasicina



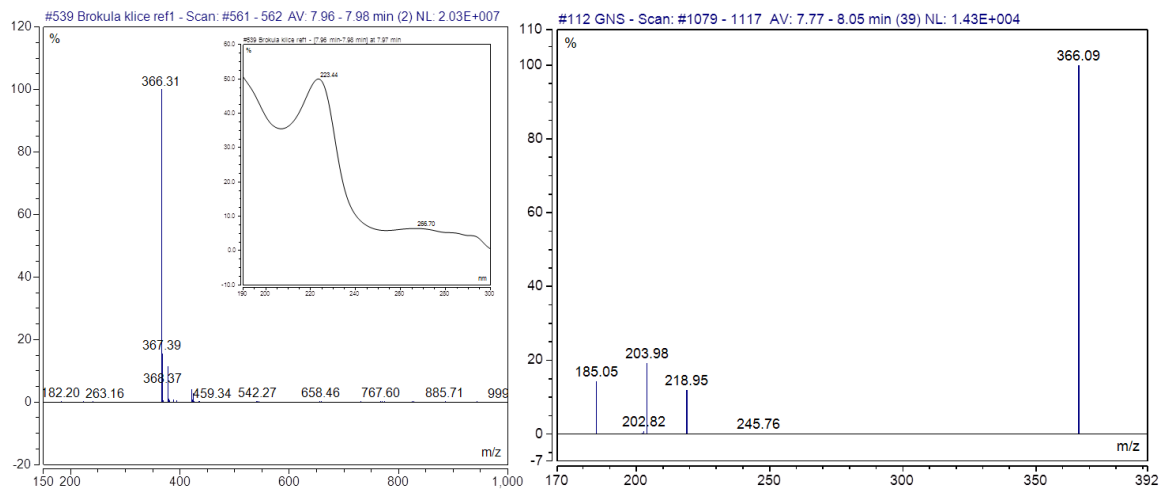
Slika 3.12. UV, MS i MS2 spektar desulfo-4-hidroksiglukobrasicina



Slika 3.13. UV, MS i MS2 spektar desulfoglukonapoleiferina

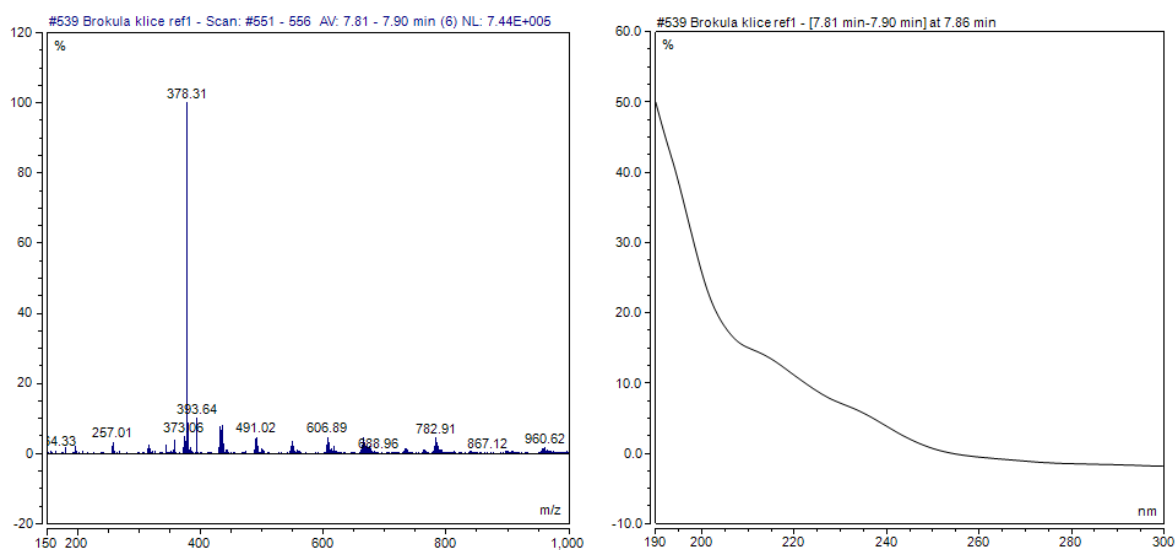


Slika 3.14. UV, MS i MS2 spektar desulfoglukokohlearina



Slika 3.15. UV, MS i MS2 spektar desulfoglukonasturcina

Desulfoglukonasturcin predstavlja spoj glukonasturcin koji je jedini predstavnik arilalifatskih glukozinolata kojemu je biosintetski aminokiselinski prekursor fenilalanin.



Slika 3.16. MS i UV spektar desulfoglukoberteroina

Gukoberteroin je spoj prisutan samo u tragovima kod svih koncentracija selenija, te zbog toga nema signala na MS2.

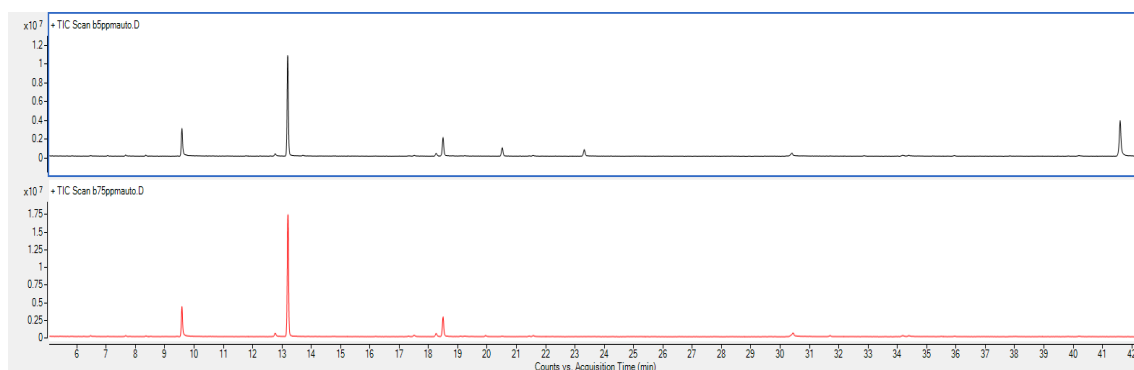
Na sljedećoj listi navedeni su IUPAC nazivi detektiranih glukozinolata:

- (2*R*)-2-hidroksibut-3-enil-glukozinolat (Progoitrin) **1**
- (2*S*)-2-hidroksipent-4-enil-glukozinolat (Glukonapoleiferin) **2**
- (*R*₅)-5-(metilsulfinil)pentil-glukozinolat (Glukoalisin) **3**
- But-3-enil-glukozinolat (Glukonapin) **4**
- (1*S*)-1-metilpropil-glukozinolat (Glukokohlearin) **5**
- 4-hidroksiindol-3-ilmetil-glukozinolat (4-hidroksiglukobrasicin) **6**
- Pent-4-enil-glukozinolat (Glukobrasikanapin) **7**
- Indol-3-ilmetil-glukozinolat (Glukobrasicin) **8**
- 5-(metiltio)pentil-glukozinolat (Glukoberteroin) **9**
- 2-feniletil-glukozinolat (Glukonasturcin) **10**
- 4-metoksiindol-3-ilmetil-glukozinolat (4-metoksiglukobrasicin) **11**
- 1-metoksiindol-3-ilmetil-glukozinolat (Neoglukobrasicin) **12**

3.3. Rezultati GC-MS analize

U svrhu neizravne analize prisutnih glukozinolata, provedena je i GC-MS analiza razgradnih produkata izoliranih ekstrakcijom diklormetanom iz klica brokule uzgajanih u mediju koncentracije selenija 5 ppm-a i 7,5 ppm-a. Pri koncentraciji od 5 ppm-a dobiveni su najveći prinosi glukozinolata u biljci, dok je pri koncentraciji od 7,5 ppm-a selenija i dalje relativno povišena koncentracija svih glukozinolata osim glukonapina i glukobrasikanapina, što predstavlja zanimljiv uzorak za ispitivanje. Uzorci su tretirani enzimom mirozinazom da bi dali hlapljive razgradne produkte koji su identificirani GC-MS sustavom za analizu.

Identificirana su dva razgradna produkta (kromatogrami prikazani na slici 3.7.). Na temelju MS spektara spojevi su identificirani kao benzenpropanonitril i 4,5-epitiopentanonitril. Udjeli spojeva u uzorcima prikazani su u tablici 3.3.

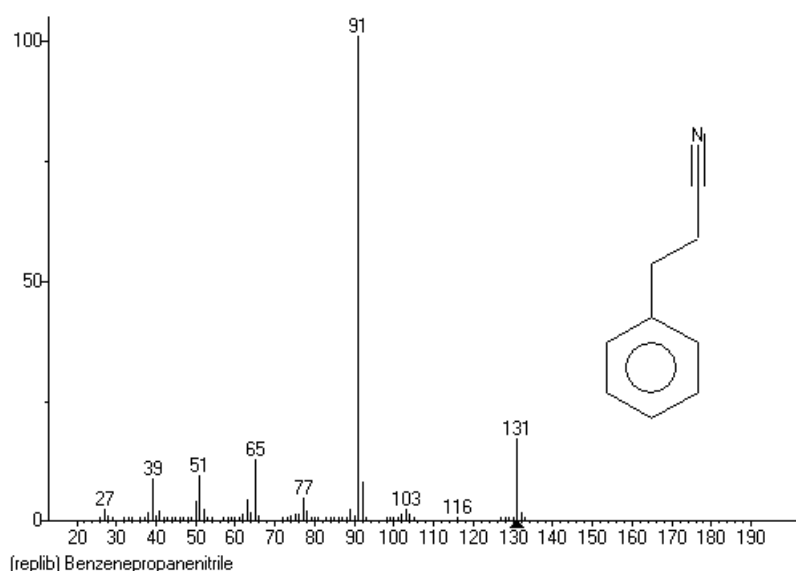


Slika 3.17. Kromatogrami ukupne ionske struje uzoraka klica uzgajanih pri 5ppm-a i 7,5ppm-a selenija

Tablica 3.3. Detektirani spojevi i njihov udio

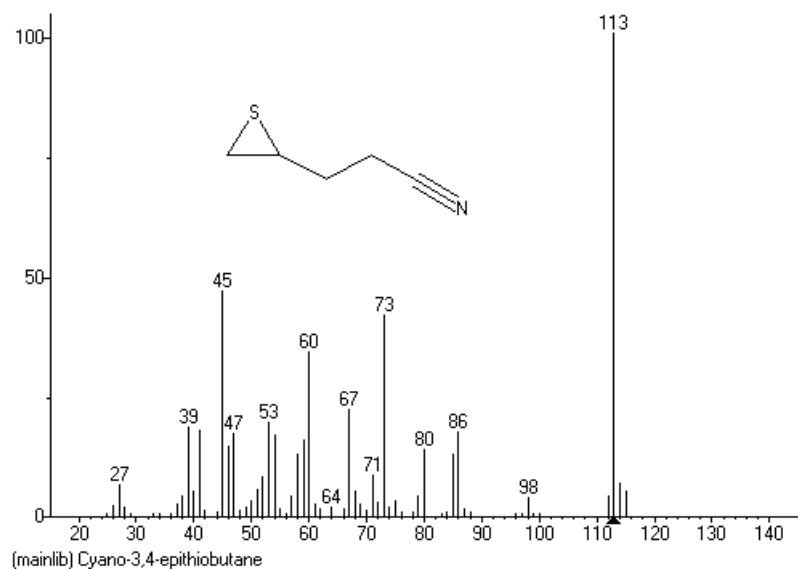
| Ime spoja | Udio (%) | |
|-------------------------|----------|---------|
| | 5 ppm | 7,5 ppm |
| Benzenpropanonitril | 2,08 | 2,22 |
| 4,5-epitiopentanonitril | 61,29 | 68,63 |

Oba detektirana spoja pripadaju nitrilima. Benzenpropanonitril, s vremenom zadržavanja (18,28 min) potječe od glukonasturcina, jedinog arilalifatskog glukozinolata koji sadrži benzenu jezgru. MS spektar benzenpropanonitrila je prikazan na slici (slika 3.18.). 4,5-epitiopentanonitril s vremenom zadržavanja (13,21 min) potječe od alifatskog glukozinolata s metioninom kao biosintetskim aminokiselinskim prekursorom. MS spektar 4,5-epitiopentanonitrila je prikazan na slici (slika 3.19.). Poznato je da razgradnjom nezasićenih glukozinolata, osim izotiocijanata i nitrila, mogu nastati također i epiti spojevi. Tako identificirani 4,5-epitiopentanonitril nastaje razgradnjom glukonapina.



Slika 3.18. MS spektar i struktura benzenpropanonitrila

Na MS spektru se očitaje molekulski pik na 131 m/z što odgovara masi benzenpropanonitrila. Neparna vrijednost molekulskog pika signalizira prisutnost neparnog broja dušikovih atoma u molekuli, tzv. dušikovo pravilo. Osnovni pik na 91 m/z je pik karakterističnog cijepanja β -veze alkil-supstituiranog benzena u odnosu na jezgru, pri čemu nastaje tropilijum ion koji uz eliminaciju molekule acetilena daje ciklopentadienil molekulske mase m/z=65. Signal na m/z=77 je karakterističan pik za benzenski prsten (slika 3.18.).



Slika 3.19. MS spektar i struktura 4,5-epitiopentanonitril.

Kod MS spektra 4,5-epitiopentanonitril uočljiv je neparni molekulski pik na $m/z=113$ s ($M+2$) pikom na $m/z=115$, inteziteta otprilike 4% molekulskog pika. Molekulski pik je ujedno i osnovni pik. Neparna masa signalizira postojanje neparnog dušika po *dušikovu pravilu* dok pik na ($M+2$) signalizira prisustvo sumpora. Ostali pikovi su rezultat raznolike fragmentacije spoja karakteristične za 4,5-epitiopentanonitril (slika 3.19.).

Cilj dodatne GC-MS analize hlapljivih produkata razgradnje mirozinazom je bio dobiti razgradne spojeve sa sumporom poput tiocijanata koji nisu detektirani. Nadalje, u nadi da je brokula apsorbirala dovoljnu količinu selenijevih iona iz otopine i ugradila ih u strukturu svojih sekundarnih metabolita, traženi su selenoizocijanati. Zbog, vjerojatno, nepovoljnih uvjeta rasta i nedovoljnog vremena za brokulu da apsorbira nametnuti selenij, takvi spojevi nisu uočeni prilikom ovog istraživanja. Ovaj rezultat ne isključuje da pri drugim uvjetima nije moguće ugraditi selenij u sintezu glukozinolata kod biljke *Brassica oleracea* var. *italica*.

4. ZAKLJUČAK

- U klicama brokule (*Brassica oleracea* var. *italica*,) UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom identifikirano je 12 različitih glukozinolata i to: progoitrina, glukonapoleiferina, glukoalisina, glukonapina, glukokohlearina, 4-hidroksiglukobrasicina, glukobrasikanapina, glukobrasicina, glukoberteroina, glukonasturcina, 4-metoksiglukobrasicina i neoglukobrasicina.
- Povišene koncentracije selenija su djelovale negativno na rast i razvoj biljke te su prouzročile promjene u sekundarnom metabolizmu i sintezi tipičnih glukozinolata
- Biljka je drugačije reagirala na različite koncentracije selenija pri čemu je prilagođavala sastav glukozinolata. Kod srednje koncentracije selenija od 5 ppm-a zabilježeno je ukupno povišenje količine glukozinolata s vrijednosti od 126.34 $\mu\text{mol/g}$.
- Glukonapin i glukobrasikanapin su nađeni u najvećim količinama kod klica s vrhuncem kod biljke uzgajane u otopini selenija od 5 ppm-a.
- Količina nekih glukozinolata poput progoitrina, glukokohlearina i glukonasturcina naglo pada u prisutnost selenija.
- Biljka nije apsorbirala i unijela selenij u strukturu svojih sekundarnih metabolita, što se vidi iz rezultata analize gdje ne nalazimo na selenoglukozinolate niti njihove razgradne produkte
- GC-MS analizom identificirana su samo 2 produkta razgradnje glukozinolata te niti jedan produkt razgradnje selenoglukozinolata. Identificirani spojevi su benzenpropanonitril i 4,5-epitiopentanonitril.

5. LITERATURA

1. **The Editors of Encyclopedia Britannica.** *Britannica.* URL: <https://www.britannica.com/plant/Brassicaceae>. (24.10.2022.)
2. **Plantea editors.** *Plantea.* URL: <https://www.plantea.com.hr/brokula/>. (24.10.2022.)
3. **OPG Solina.** *Klice Solina.* Solin URL: <https://klice.hr/>. (24.10.2022.)
4. **G.R. Fenwick, R.K. Heaney i W.J. Mullin** *Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants.* **18** Crit. Rev. Food Sci. Nutr., (1983), 123-201.
5. **I. Blažević, S. Montaut, F. Burčul, i P. Rollin** *Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential, u Reference Series in Phytochemistry*(2017), 3-60.
6. **I. Blažević, S. Montaut, F. Burčul, C. E. Olsen, M. Burow, P. Rollin, i N. Agerbirk** *Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants Phytochemistry* **169** (2020)
7. **M. Zekić.** *Glukoziolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae.* Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu. Zagreb, doktorska disertacija (2013)
8. **A. Rybarczyk-Plonska, S. Fiskaa Hagen, Grethe Iren A. Borge, Gunnar B. Bengtsson, M.K. Hansen i Anne-Berit Wold,** *Glucosinolates in broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) as affected by postharvest temperature and radiation treatments, Elsevier* (2015)
9. **A. Kjaer, J. Conti.** *Acta Chem. Scand.* **8** (1954), 295-298.
10. **N. Agerbirk, C.E. Olsen.** *Glucosinolate structures in evolution, Phytochemistry* **77** (2012) 16-45.
11. **R. Verkerk, M. Dekker.** *Glucosinolates in Bioactive Compounds in Foods.* Oxford, Blackwell Publishing (2008), 31-40.
12. **B.A. Halkier** *Glucosinolates in Naturally Occuring Glycosides.* Chichester, John Wiley & Sons, (1999), 193-195.
13. **S. Chhajed, I. Mostafa, Y. He, M. Abou-Hashem, M. El-Domiaty i S. Chen.** *Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense Agronomy-Basel,* **10** (2020)
14. **B.A. Halkier i J. Gershenzon** *Biology and Biochemistry of Glucosinolates* (2006)
15. **F.J. Barba, N. Nikmaran, S. Roohinejad, A. Khelifa, Z. Zhu i M. Koubaa** *Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing.* (2016)

16. **I. Blažević** *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka*. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet (2009)
17. **D.J. Williams, C. Critchley, S. Pun, M. Chaliha, T.J. O'Hare** *Differing mechanisms of simple nitrile formation on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* and *Nasturtium officinale** (2009)
18. **V. Lambrix, M. Reichelt, T. Mitchell-Olds, D.J. Kliebenstein, J. Gershenzon** *The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory* (2001)
19. **X. Hasapis i A.J. MacLeod** *Benzylglucosinolate degradation in heat-treated *Lepidium sativum* seeds and detection of a thiocyanate-forming factor* (1982)
20. **F. Geng, L. Tang, Y. Li, L. Yang, K-S. Choi i A.L. Kazim** *Allyl isothiocyanate arrests cancer cells in mitosis, and mitotic arrest in turn leads to apoptosis via Bcl-2 protein phosphorylation.*(2011)
21. **I. Filipović i S. Lipanović** *Opća i anorganska kemija*. Zagreb, Školska knjiga, X (1995) 730.
22. **A. Đulović** *Strukturna raznolikost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata u različitim biljnim porodicama*. Split, Kemijsko-tehnološki fakultet Split, Sveučilište u Splitu, doktorski rad (2022)
23. **F. Bertelsen, G. Gissel-Nielsen, A. Kjaer, T. Skrydstrup** *Selenoglucosinolates in nature: fact or myth? *Phytochemistry* 27* (1988), 3743–3749.
24. **A.J. Matich, M.J. McKenzie, R.E. Lill, D.A. Brummell, T.K. McGhie, R. K.-Y. Chen i D.D. Rowan** *Selenoglucosinolates and their metabolites produced in *Brassica* spp. fertilised with sodium selenate *Phytochemistry* 75*, (2012)
25. **I. Jerković, I. Blažević** *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja.*: Interna skripta.
26. **International Centre for Science and High technology.** *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste (2008)
27. **Nj. Radić i L. Kukoč Modun** *Uvod u analitičku kemiju*. Zagreb, Školska knjiga, (2016), 656-657.
28. **Nj. Radić i L. Kukoč Modun** *Uvod u analitičku kemiju*. Zagreb, Školska Knjiga, (2016), 654-655.
29. **R.W. Smith** *Mass Spectrometry*. East Lansing, Michigan State University (2013)
30. *Principle and Feature of Various Detection Methods*. **Hitachi High-Tech Global**. <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html>.

31. **K. Grosser i N.M. van Dam** *A Straightforward Method for Glucosinolate Extraction and Analysis with High-pressure Liquid Chromatography (HPLC)*. Leipzig (2017)