

# Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama *Lepidium* spp. (Brassicaceae) i *Moringa oleifera* (Moringaceae)

---

**Brzović, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*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:167:042213>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-30**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**HLAPLJIVI SUMPOROVI SPOJEVI U BILJKAMA**  
***Lepidium* spp. (BRASSICACEAE) I *Moringa oleifera***  
**(MORINGACEAE)**

**DIPLOMSKI RAD**

**Petra Brzović**

**Matični broj: 56**

**Split, srpanj 2017.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
Diplomski studij Kemija  
Smjer: Organska kemija i biokemija

**HLAPLJIVI SUMPOROVI SPOJEVI U BILJKAMA *Lepidium* spp.  
(BRASSICACEAE) I *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)**

**DIPLOMSKI RAD**

Petra Brzović

56

Split, srpanj 2017.

**UNIVERSITY OF SPLIT**

**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**

Graduate study of Chemistry

Orientation: Organic Chemistry and Biochemistry

**VOLATILE SULPHUR COMPOUNDS IN *Lepidium* spp. PLANTS  
(BRASSICACEAE) AND *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)**

**DIPLOMA THESIS**

Petra Brzović

56

Split, July 2017.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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.

### HLAPLJIVI SUMPOROVI SPOJEVI U BILJKAMA *Lepidium* spp. (BRASSICACEAE) I *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)

Petra Brzović, 56

**Sažetak:** Hlapljivi sumporovi spojevi su metabolički produkti izrazite biološke aktivnosti, koji se mogu pronaći u biljkama, životinjama i mikroorganizmima, a posebnu raznolikost pokazuju oni koji se nalaze u biljkama. Neki od hlapljivih sumporovih spojeva su ujedno i razgradni produkti glukozinolata. Glukozinolati su biološki neaktivni i nehlapljivi spojevi, koji se mogu pronaći u 16 porodica reda Brassicales. Njihovom termičkom, enzimskom ili kemijskom razgradnjom nastaju hlapljivi spojevi poznati po svojoj biološkoj aktivnosti.

U ovom radu izolirani su i analizirani hlapljivi sumporovi spojevi iz odabranih dijelova četiri biljke roda *Lepidium* (porodica Brassicaceae): *L. graminifolium*, *L. latifolium*, *L. meyenii* i *L. sativum*, te konjske rotkvice (*Moringa oleifera*) iz porodice Moringaceae. Određen je i sastav glukozinolata ovih biljaka indirektnom metodom preko njihovih razgradnih produkata. Hlapljivi izolati dobiveni hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i ekstrakcijom diklormetanom, analizirani su plinskom kromatografijom spregnutom s spektrometrom masa (GC-MS) i infracrvenom spektroskopijom s Fourirerovom transformacijom (FTIR).

Analizom je utvrđeno da je najzastupljeniji glukozinolat u biljkama roda *Lepidium* glukotropeolin, koji je pronađen u sve četiri biljke. Osim glukotropeolina, identificirani su još i glukolimnantin, glukonasturcin, sinigrin, glukokohlearin i fenil glukozinolat. Od hlapljivih sumporovih spojeva koji nisu glukozinolatno vezani, pronađen je diizopropil disulfid u destilatu *L. sativum*. GC-MS analizom destilata i ekstrakta biljke *M. oleifera* nisu pronađeni razgradni produkti glukozinolata ni ostali hlapljivi sumporovi spojevi, ali je FTIR analiza pokazala prisustvo neidentificiranih spojeva.

**Ključne riječi:** glukozinolati, *Lepidium*, *Moringa oleifera*, GC-MS

**Rad sadrži:** 86 stranica, 54 slike, 5 tablica, 2 priloga, 39 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - predsjednik
2. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član
3. doc. dr. sc. Ivica Blažević - mentor

**Datum obrane:** 05. 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**

**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

### **VOLATILE SULPHUR COMPOUNDS IN *Lepidium* spp. PLANTS (*BRASSICACEAE*) AND *Moringa oleifera* (*MORINGACEAE*)**

Petra Brzović, 56

**Abstract:** Volatile sulphur compounds are metabolites with particular biological activity found in plants, animals, and microorganisms, but the most varieties of these compounds have been found in plants. Some of the volatile sulphur compounds are also degradation products of glucosinolates. Glucosinolates are biologically inactive and non-volatile compounds found in 16 families of the Brassicales order. Volatile compounds known for their biological activity are formed by thermal, enzymatic or chemical degradation of glucosinolates.

Volatile sulphur compounds from selected parts of four *Lepidium* spp. (Brassicaceae family) plants: *L. graminifolium*, *L. latifolium*, *L. meyenii* and *L. sativum*; and horseradish tree (*Moringa oleifera*) of the Moringaceae family were isolated and analysed. Glucosinolate compositions of these plants were determined by an indirect method using their degradation products. The volatile isolates collected by hydrodistillation in Clevenger-type apparatus, and extraction with dichloromethane after the hydrolysis with exogenous enzyme myrosinase were analysed with gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Analysis showed that the most widespread glucosinolate in the *Lepidium* spp. plants was glucotropaeolin, which had been found in all four plants. Besides glucotropaeolin, glucolimnanthin, gluconasturtiin, sinigrin, glucocohlearin and n-phenyl glucosinolate were identified. Regarding the free volatile sulphur compounds, only one was identified: diisopropyl disulphide in *L. sativum*. Neither glucosinolates nor free volatile sulphur compounds were found using GC-MS analysis of the distillate and the extract of the *M. oleifera* plant, but FTIR analysis showed a presence of unidentified compounds.

**Keywords:** glucosinolates, *Lepidium*, *Moringa oleifera*, GC-MS

**Thesis contains:** 86 pages, 54 figures, 5 tables, 2 supplements, 39 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Olivera Politeo - PhD, associate prof. - chair person
2. Lea Kukoč Modun - PhD, assistant prof. - member
3. Ivica Blažević - PhD, assistant prof. - supervisor

**Defence date:** July 05 2017.

**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 doc. dr. sc. Ivice Blaževića i neposrednim mentorstvom Azre Đulović, mag. chem. u razdoblju od ožujka do lipnja 2017. godine.

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



*Kako je teško bez tebe biti, u duši plakati, a nasmijan biti...*

Ovaj rad posvećujem mojoj majci, mojoj zvijezdi vodilji, koja mi je uvijek bila najveća podrška. Hvala ti za sve, moj dobri Anđele.

*Iskreno se zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Ivici Blaževiću na pomoći, uputama i savjetima tijekom izrade rada. Zahvaljujem se i asistentici Azri Đulović, mag. chem. na strpljenju i pomoći, posebno pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada, kao i svojim kolegama i prijateljima koji su mi pomagali i bili uz mene.*

*Posebno se zahvaljujem mome ocu i ostaloj obitelji, čija mi je bezuvjetna podrška mnogo značila tijekom obrazovanja, i koja mi još uvijek mnogo znači.*

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Zadatak ovog rada je odrediti sastav hlapljivih sumporovih spojeva i kvalitativni sastav glukozinolata biljaka porodica Brassicaceae (*Lepidium* spp.: *L. graminifolium*, *L. latifolium*, *L. meyenii* i *L. sativum*) i Moringaceae (*Moringa oleifera*) dobivenih na dva različita načina: termičkom razgradnjom i enzimskom hidrolizom. Za određivanje glukozinolata koristiti indirektnu metodu preko hlapljivih razgradnih produkata.
2. Za istraživanje biljaka roda *Lepidium* koristiti odabrane dijelove biljaka: korijen, stabljiku, list i prah iz komercijalne upotrebe, a za biljku *M. oleifera* prah iz komercijalne upotrebe.
3. Za termičku razgradnju koristiti hidrodestilaciju u modificiranoj aparaturi po Clevengeru, a za enzimsku hidrolizu enzim mirozinazu iz bijele gorušice (*Sinapis alba*).
4. Za karakterizaciju kvalitativnog sastava nastalih hlapljivih sumporovih spojeva i razgradnih produkata glukozinolata koristiti vezani sustav plinska kromatografija-spektrometar masa (GC-MS).

## SAŽETAK

Hlapljivi sumporovi spojevi su metabolički produkti izrazite biološke aktivnosti, koji se mogu pronaći u biljkama, životinjama i mikroorganizmima, a posebnu raznolikost pokazuju oni koji se nalaze u biljkama. Neki od hlapljivih sumporovih spojeva su ujedno i razgradni produkti glukozinolata. Glukozinolati su biološki neaktivni i nehlapljivi spojevi, koji se mogu pronaći u 16 porodica reda Brassicales. Njihovom termičkom, enzimskom ili kemijskom razgradnjom nastaju hlapljivi spojevi poznati po svojoj biološkoj aktivnosti.

U ovom radu izolirani su i analizirani hlapljivi sumporovi spojevi iz odabranih dijelova četiri biljke roda *Lepidium* (porodica Brassicaceae): *L. graminifolium*, *L. latifolium*, *L. meyenii* i *L. sativum*, te konjske rotkvice (*Moringa oleifera*) iz porodice Moringaceae. Određen je i sastav glukozinolata ovih biljaka indirektnom metodom preko njihovih razgradnih produkata. Hlapljivi izolati dobiveni hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i ekstrakcijom diklormetanom, analizirani su plinskom kromatografijom spregnutom s spektrometrom masa (GC-MS) i infracrvenom spektroskopijom s Fourirerovom transformacijom (FTIR).

Analizom je utvrđeno da je najzastupljeniji glukozinolat u biljkama roda *Lepidium* glukotropeolin, koji je pronađen u sve četiri biljke. Osim glukotropeolina, identificirani su još i glukolimnantin, glukonasturcin, sinigrin, glukokohlearin i fenil glukozinolat. Od hlapljivih sumporovih spojeva koji nisu glukozinolatno vezani, pronađen je diizopropil disulfid u destilatu *L. sativum*. GC-MS analizom destilata i ekstrakta biljke *M. oleifera* nisu pronađeni razgradni produkti glukozinolata ni ostali hlapljivi sumporovi spojevi, ali je FTIR analiza pokazala prisustvo neidentificiranih spojeva.

**Ključne riječi:** glukozinolati, *Lepidium*, *Moringa oleifera*, GC-MS, FTIR

## SUMMARY

Volatile sulphur compounds are metabolites with particular biological activity found in plants, animals, and microorganisms, but the most varieties of these compounds have been found in plants. Some of the volatile sulphur compounds are also degradation products of glucosinolates. Glucosinolates are biologically inactive and non-volatile compounds found in 16 families of the Brassicales order. Volatile compounds known for their biological activity are formed by thermal, enzymatic or chemical degradation of glucosinolates.

Volatile sulphur compounds from selected parts of four *Lepidium* spp. (Brassicaceae family) plants: *L. graminifolium*, *L. latifolium*, *L. meyenii* and *L. sativum*; and horseradish tree (*Moringa oleifera*) of the Moringaceae family were isolated and analysed. Glucosinolate compositions of these plants were determined by an indirect method using their degradation products. The volatile isolates collected by hydrodistillation in Clevenger-type apparatus, and extraction with dichloromethane after the hydrolysis with exogenous enzyme myrosinase were analysed with gas chromatography paired with mass spectrometry (GC-MS) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Analysis showed that the most widespread glucosinolate in the *Lepidium* spp. plants was glucotropaeolin, which had been found in all four plants. Besides glucotropaeolin, glucolimnanthin, gluconasturtiin, sinigrin, glucocohlearin and n-phenyl glucosinolate were identified. Regarding the free volatile sulphur compounds, only one was identified: diisopropyl disulphide in *L. sativum*. Neither glucosinolates nor free volatile sulphur compounds were found using GC-MS analysis of the distillate and the extract of the *M. oleifera* plant, but FTIR analysis showed a presence of unidentified compounds.

**Keywords:** glucosinolates, *Lepidium*, *Moringa oleifera*, GC-MS

# SADRŽAJ

<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1. OPĆI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Hlapljivi sumporovi spojevi .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Klasifikacija hlapljivih sumporovih spojeva .....	3
<b>1.2. Glukozinolati.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Vrste i strukture glukozinolata.....	6
1.2.2. Strukture odabranih glukozinolata.....	13
1.2.3. Biosinteza glukozinolata.....	16
1.2.4. Razgradnja glukozinolata .....	18
1.2.4.1. Enzimska razgradnja .....	18
1.2.4.2. Razgradni produkti enzimske hidrolize glukozinolata .....	20
1.2.5.1. Neenzimska razgradnja glukozinolata.....	22
<b>1.3. Metode izolacije hlapljivih spojeva .....</b>	<b>23</b>
1.3.1. Destilacija.....	23
1.3.1.1. Vodena destilacija .....	24
1.3.2. Ekstrakcija hlapljivih spojeva.....	26
<b>1.4. Metode identifikacije hlapljivih spojeva.....</b>	<b>27</b>
1.4.1. Kromatografija .....	27
1.4.1.1. Plinska kromatografija .....	28
1.4.2. Spektrometrija masa .....	30
1.4.3. Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometar masa (GC-MS) .....	32
1.4.2. IR spektroskopija .....	33
1.4.2.1. FTIR .....	33
<b>1.5. Opće karakteristike biljnih porodica.....</b>	<b>35</b>
1.5.1. Porodica Brassicaceae .....	35
1.5.1.1. <i>Lepidium</i> spp. ....	36
1.5.2. Porodica Moringaceae .....	37
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1. Biljni materijal.....</b>	<b>38</b>
2.1.1. <i>Lepidium graminifolium</i> L. ssp. <i>graminifolium</i> .....	38
2.1.2. Grbica širolistna ( <i>Lepidium latifolium</i> L.) .....	40

2.1.3. Maca ( <i>Lepidium meyenii</i> Walp.).....	42
2.1.4. Sjetvena grbica ( <i>Lepidium sativum</i> L.).....	44
2.1.5. Konjska rotkvica ( <i>Moringa oleifera</i> Lam.).....	46
<b>2.2. Izolacija hlapljivih spojeva .....</b>	<b>48</b>
2.2.1. Izolacija hlapljivih spojeva destilacijom.....	48
2.2.1.1. Kemikalije i aparatura .....	48
2.2.1.2. <i>Lepidium graminifolium</i> .....	48
2.2.1.3. <i>Lepidium latifolium</i> .....	50
2.2.1.4. <i>Lepidium meyenii</i> .....	50
2.2.1.5. <i>Lepidium sativum</i> .....	51
2.2.1.6. <i>Moringa oleifera</i> .....	52
2.2.2. Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom .....	52
2.2.2.1. Kemikalije i aparatura .....	52
2.2.2.2. Autoliza .....	54
2.2.2.3. Ekstrakcija hlapljivih spojeva .....	54
2.2.3. GC-MS analiza hlapljivih spojeva .....	56
2.2.4. FTIR .....	57
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>58</b>
<b>3.1. <i>Lepidium</i> spp.....</b>	<b>58</b>
3.1.1. Analiza destilata.....	58
3.1.2. Analiza ekstrakata.....	72
<b>3.2. <i>Moringa oleifera</i> .....</b>	<b>76</b>
<b>4. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>79</b>
<b>5. LITERATURA .....</b>	<b>81</b>
<b>6. PRILOZI.....</b>	<b>85</b>

## UVOD

Sumporovi spojevi spadaju u grupu spojeva rasprostranjenih u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Najviše ih možemo naći u biljkama, čak u 43 biljne porodice. Pronalazimo ih u različitim dijelovima biljaka, a njihov sastav ovisi o vrsti i dijelu biljke, načinu uzgoja, klimi i dr. S obzirom na broj atoma sumpora u strukturi ovi spojevi se klasificiraju u četiri grupe, koje se dalje dijele na podgrupe ovisno o strukturi molekule i prisustvu drugih heteroatoma u molekuli. Uglavnom su u biljkama prisutni u tragovima, ali su poznati i slučajevi gdje sumporovi spojevi dominiraju, primjerice eterično ulje češnjaka.

Ova grupa spojeva je poznata po svojoj raznolikoj biološkoj aktivnosti. Neka od svojstava koja im se pripisuju su antikancerogena, antioksidacijska i antibakterijska svojstva, a pokazalo se da imaju utjecaj i na imunološki sustav. Isto tako, istraživanja su pokazala da imaju i značajnu ulogu u sprječavanju globalnog zatopljenja. S obzirom na svoj izrazito velik biološki potencijal, ova grupa spojeva spada među najzanimljivije predmete znanstvenih istraživanja.

Od svih spojeva koji spadaju u hlapljive sumporove spojeve, poseban interes se pokazuje za razgradne produkte glukozinolata, kao što su tiocijanati i izotiocijanati. Glukozinolati se mogu pronaći u 16 biljnih porodica reda Brassicales, a identificirano je preko 130 različitih vrsta glukozinolata. Poznato je da su glukozinolati biološki neaktivni i nehlapljivi spojevi, ali termičkom, kemijskom ili enzimskom hidrolizom daju produkte koji su vrlo aktivni i stoga, predmet brojnih istraživanja.



# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Hlapljivi sumporovi spojevi

Hlapljivi sumporovi spojevi su posebna grupa metaboličkih produkata koja se može pronaći u morskim i kopnenim biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Ipak, najveća raznolikost hlapljivih sumporovih spojeva može se pronaći u biljkama, gdje su rasprostranjeni u 43 biljne porodice i 173 biljna roda. Najznačajnije porodice koje sadrže ove spojeve su Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae, Phytolaccaceae i Poaceae. U biljkama mogu biti raspoređeni u različitim dijelovima: korijenu, stabljici, listu, cvijetu ili sjemenkama, a sadržaj sumporovih spojeva može varirati ovisno o vrsti biljke, klimi i načinu uzgoja. Isto tako, sadržaj sumporovih spojeva varira i unutar iste biljne vrste, ovisno o dijelu biljke, razvojnom statusu i dr. <sup>1</sup>

Posljednjih godina, nekim od hlapljivih sumporovih spojevima su pridodana važna biološka svojstva, kao što su efekti kemoprevencije raka, antioksidacijska svojstva, antibakterijska aktivnost i induciranje apoptoze, primjerice sulforafen, alicin, dialil disulfid i ostali. Ovi spojevi imaju i važnu ulogu u zaustavljanju globalnog zatopljenja, budući da izazivaju privremeno hlađenje atmosfere pridonoseći, među ostalim, formiranju oblaka. Sumporovi spojevi su uglavnom spojevi u tragovima i služe za zaokruživanje mirisa eteričnih ulja, iako mogu biti i dominantne komponente pojedinih ulja.<sup>1</sup>

Kemijske strukture pojedinih sumporovih spojeva variraju od jednostavnih pa sve do jako složenih struktura. Kao primjer jednostavne strukture ističe se dimetil-sulfid, dok složene strukture u sebi mogu sadržavati i druge heteroatome, kao što su kisik i dušik. Dok se neki spojevi u biljkama nalaze u samo malom broju biljnih vrsta (kao etilni-disulfidi i ciklički polisulfidi), drugi su izrazito rasprostranjeni u biljnom svijetu. Primjer sumporovih spojeva koji su široko rasprostranjeni u brojnim biljnim porodicama su izotiocijanati, razgradni produkti glukozinolata, o kojima će više biti riječi u daljnjem tekstu.<sup>1</sup>

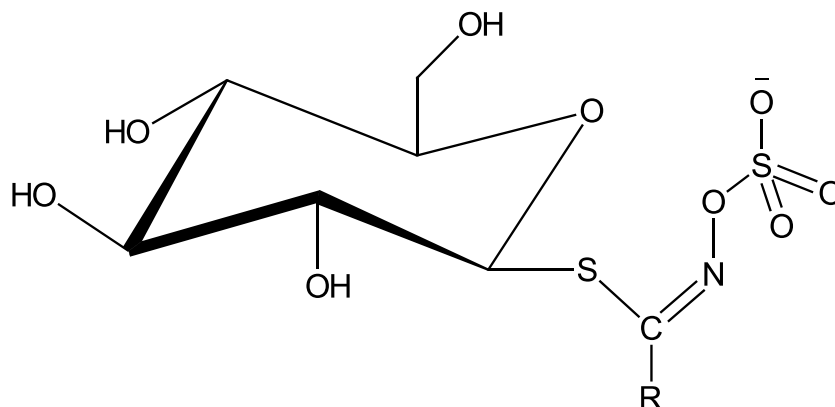
### 1.1.1. Klasifikacija hlapljivih sumporovih spojeva

Postoji više načina na koji se hlapljivi sumporovi spojevi mogu klasificirati, a jedan od njih je na temelju broja sumporovih atoma u strukturi spojeva. Uzimajući u obzir broj sumporovih atoma u strukturi, razlikujemo četiri grupe sumporovih spojeva: hlapljivi spojevi koji sadrže samo jedan sumporov atom ( $S_1$ ), spojevi koji sadrže dva sumporova atoma ( $S_2$ ), spojevi koji sadrže tri sumporova atoma ( $S_3$ ) i spojevi koji sadrže četiri sumporova atoma ( $S_4$ ) u strukturi. Grupe  $S_1$  i  $S_2$  se još dijele s obzirom na broj atoma kisika i dušika u strukturi. Grupa  $S_3$  se dijeli u tri podgrupe: podgrupu spojeva koji imaju kisik u strukturi ( $S_3O$ ), podgrupu spojeva s linearnom ( $S_3L$ ) i cikličkom ( $S_3C$ ) strukturom. Također, grupa  $S_4$  se dijeli na podgrupu s linearnom ( $S_4L$ ) i cikličkom ( $S_4C$ ) strukturom. Izotiocijanati se klasificiraju kao posebna skupina hlapljivih sumporovih spojeva - ( $SCN$ ).<sup>1</sup>

## 1.2. Glukozinolati

Glukozinolati ( $\beta$ -tioglukozid-N-hidroksisulfati) su sekundarni biljni metaboliti prisutni u 16 porodica reda Brassicales (Capparales, kaparolike). Identificirano je preko 130 različitih glukozinolata, iako blisko povezane taksonomske grupe u sebi sadrže samo mali broj ovih spojeva. Najveće količine glukozinolata nalaze se u tri porodice reda Brassicales: Resedaceae, Capparaceae i Brassicaceae. Najznačajniji rod je *Brassica*, koji sadrži čitav niz biljaka svakodnevno korištenih u ljudskoj prehrani.<sup>2,3</sup>

Jedinstvena svojstva glukozinolata su se počela opažati na početku 17. stoljeća, u nastojanju da se objasni kemijsko podrijetlo oštrog okusa sjemenja gorušice. Glukozinolati poznati pod trivijalnim nazivima sinigrin (prop-2-enil ili alil glukozinolat) i sinalbin (4-hidroksibenzil glukozinolat) izolirani su 1830. godine iz sjemena crne (*Brassica nigra*) i bijele (*Sinapis alba*) gorušice. Prvu strukturnu formulu predložio je Gadamer 1897. godine. Unatoč brojnim nedostacima, ova struktura bila je prihvaćena do 1956. godine, kada su Ettliger i Lundeen predložili novu, ispravnu strukturu (**Slika 1.1.**) i opisali prvu sintezu glukozinolata.<sup>4</sup>



**Slika 1.1.** Opća strukturna formula glukozinolata.

Strukturne karakteristike zajedničke svim glukozinolatima su da su izgrađeni od  $\beta$ -D-tioglukozidnog dijela, sulfatne skupine koja je preko C=N skupine vezana za ostatak molekule (sulfoniranog oksima), te bočnog lanca (koji je označen s R u općoj strukturnoj formuli) po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju (**Slika 1.1.**). Bočni lanac glukozinolata jedini je promjenjivi dio molekule i osnova je njihove strukturne raznolikosti te biološke aktivnosti produkata koji nastaju njihovom enzimskom, termičkom ili kemijskom razgradnjom.<sup>3</sup>

Glukozinolati se mogu pronaći u svim dijelovima biljke, a česti su slučajevi biljaka koje imaju više različitih glukozinolata u sebi, neke čak i preko petnaest. Sastav, raspodjela i sadržaj glukozinolata određuje vrsta biljke, varijetet unutar iste vrste, dio biljke i razvojni status, kao i uvjeti razvoja. Općenito, sadržaj glukozinolata je visok u sjemenu, dok je u listu, stabljici i korijenu znatno manji.<sup>5</sup> Posljednjih godina, predmet su intenzivnih istraživanja zbog svojih antikancerogenih, kemoprotektivnih svojstava. Iako su poznati po nutritivnim svojstvima, nekim glukozinolatima se prepisuju i antinutritivna svojstva, posebno goitrogena svojstva kod nekih domesticiranih povrtnica.<sup>4</sup>

Ettlinger i Dateo su 1961. godine predložili današnju polusustavnu nomenklaturu prema kojoj se nazivu "glukozinolat" dodaje prefiks koji se odnosi na sustavnu nomenklaturu bočnog lanca (R; npr. benzil glukozinolat). Kod imenovanja glukozinolata najčešće se koriste trivijalna imena koja su nastala od latinskog imena biljke iz koje je glukozinolat prvi put izoliran, te dodavanjem prefiksa "gluko" i sufiksa "in" (**Tablica 1.1.**).<sup>3,5</sup>

**Tablica 1.1.** Glukozinolati prirodnog porijekla s ustanovljenim strukturama.<sup>5</sup>

GLUKOZINOLATI	Bočni lanci (R)	Botanički izvori
Glukokaparin	CH <sub>3</sub>	<i>Cleome spinosa</i>
Glukolepedin	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub>	<i>Lepidium Menziesii</i>
Glukokohlearin	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )CH	<i>Cochlearin officinalis</i>
Sinigrin	CH <sub>2</sub> =CHCH <sub>2</sub>	<i>Brassica nigra</i>
Glukonapin	CH <sub>2</sub> =CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Brassica napus</i>
Glukoibervirin	CH <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	<i>Iberis sempervirens</i>
Glukobeteroin	CH <sub>3</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	<i>Beteroa incana</i>
Glukorafenin	CH <sub>3</sub> S(O)CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Raphanus sativus</i>
Glukotropeolin	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	<i>Tropaeolum majus</i>
Sinalbin	<i>p</i> -HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub>	<i>Sinapis alba</i>
Glukosisimbrin	HOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )	<i>Sisymbrium austriaceum</i>

Glukozinolati su nehlapljivi i biološki neaktivni spojevi. Oštećenjem biljnog tkiva glukozinolati dolaze u kontakt s endogenim enzimom mirozinazom, pri čemu nastupa njihova hidroliza i nastaje niz hlapljivih i biološki aktivnih spojeva, među kojima su izotiocijanati, nitrili, tiocijanati i oksazolidintioni. Neki od nastalih razgradnih produkata mogu pokazivati štetna svojstva dok neki posjeduju antioksidacijska, antimikrobna, antifungalna pa čak i antikancerogena svojstva. <sup>3</sup>

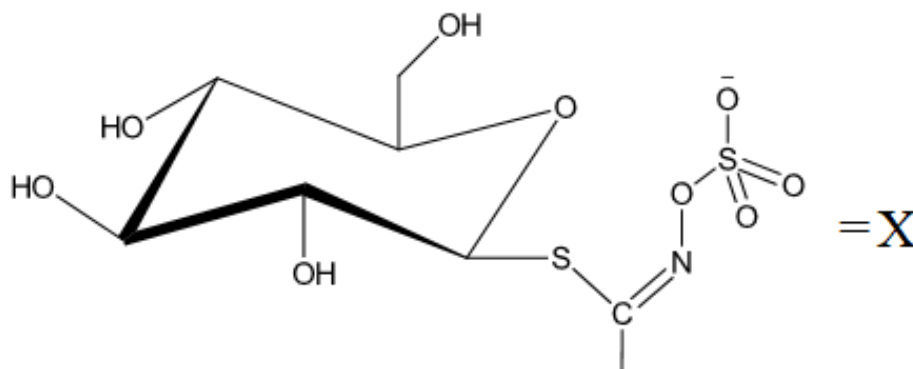
### 1.2.1. Vrste i strukture glukozinolata

Glukozinolati su u vodi topljivi organski anioni koji dijele osnovne strukturne karakteristike. U prirodi se pojavljuju kao kalijeve soli topljive u vodi i razrijeđenim alkoholima pa se stoga voda koristi pri njihovoj izolaciji. Sadrže bočni lanac koji je, ovisno o vrsti biljke, jedina varijabla u strukturi. Glukozinolatna struktura se sastoji od:

- $\beta$ -D-glukopiranozne strukture
- O-sulfatirani anomerni (Z)-tiohidroksimat
- varijabilni aglukonski bočni lanac.<sup>2</sup>

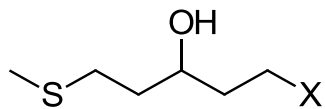
Aglukonski dio (R-skupina) može biti alkilni, alkenilni, hidroksialkilni, metiltoalkilni, metilsulfinil alkilni, metilsulfonylalkilni, arilalkilni, indolni bočni lanac i dr. Najbrojniji su glukozinolati nerazgranatog ili razgranatog alifatskog lanca s dvostrukom vezom, hidroksilnom ili karboksilnom skupinom te sumporom različitih oksidacijskih stupnjeva. Trećina svih do sada identificiranih glukozinolata sadrže sumpor u bočnom lancu. <sup>5</sup>

Na sljedećih nekoliko stranica prikazane su strukture odabranih bočnih lanaca, s tim da je:

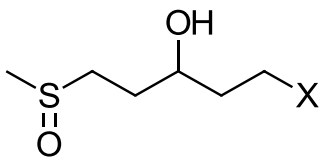


**A: Glukozinolati sa sumporom u bočnom lancu**

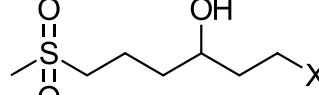
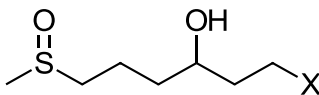
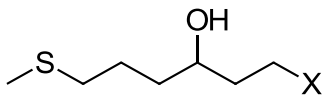
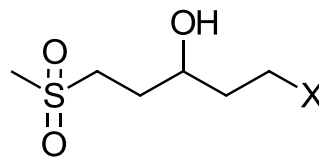
**sulfanilhidroksialkil-**



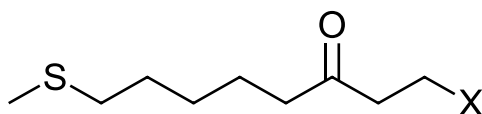
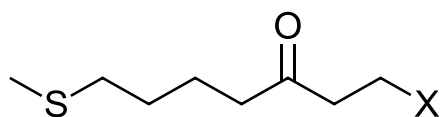
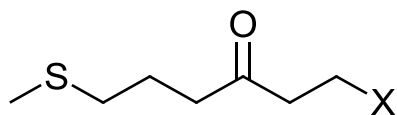
**sulfinilhidroksialkil-**



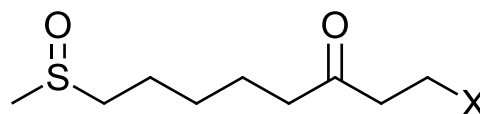
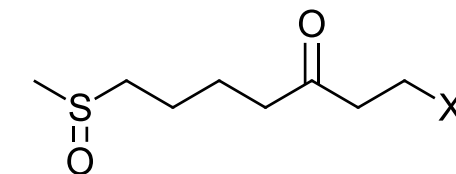
**sulfonhidroksialkil-**



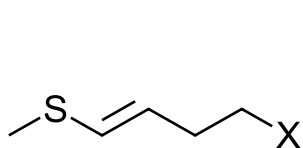
**sulfaniloksoalkil-**



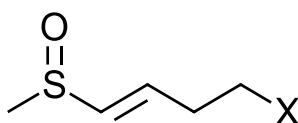
**sulfiniloksoalkil-**



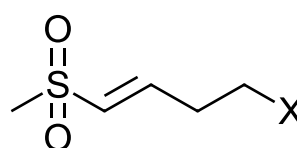
**tioalken-**



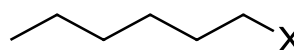
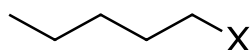
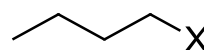
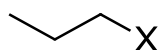
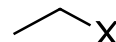
**sulfinilalken-**



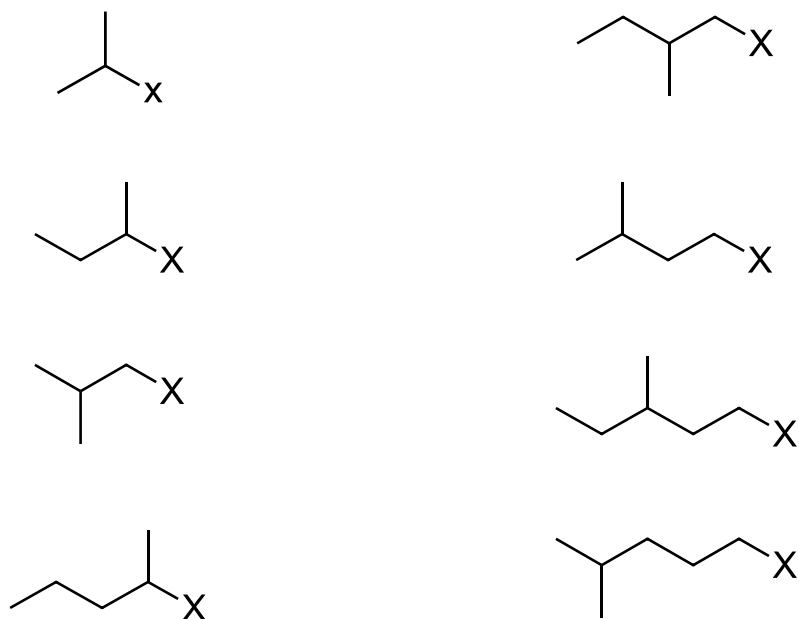
**sulfonilalken-**



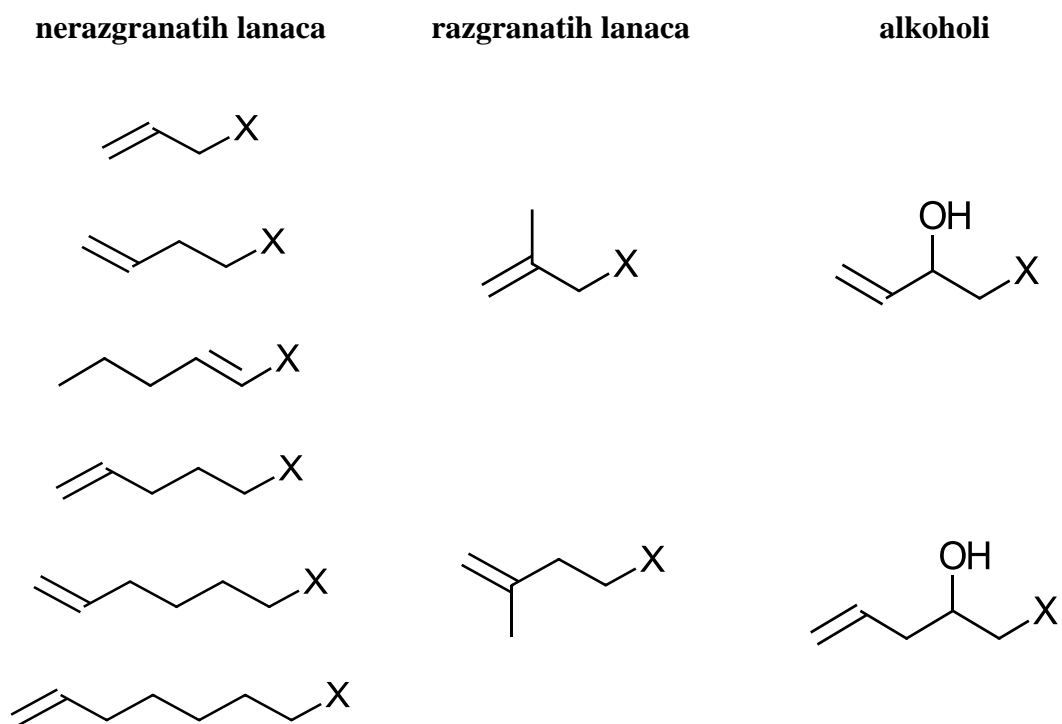
**B: Alifatski glukozinolati, s nerazgranatim bočnim lancima**



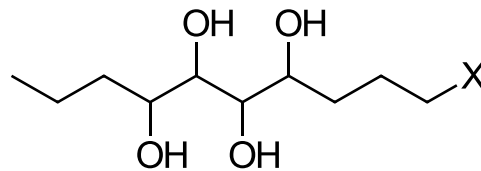
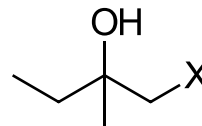
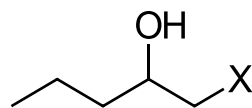
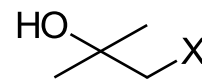
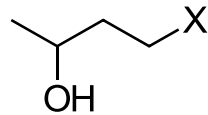
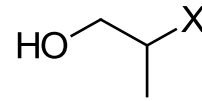
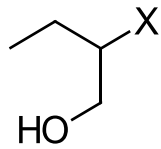
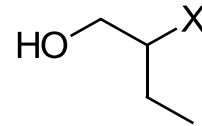
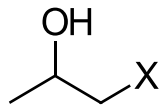
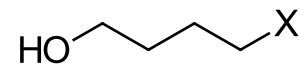
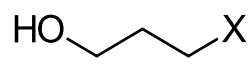
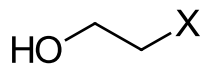
**C: Alifatski glukozinolati, s razgranatim bočnim lancima**



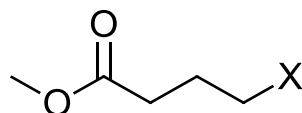
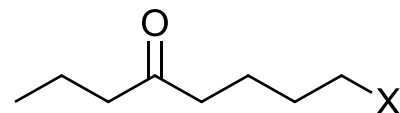
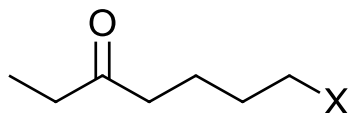
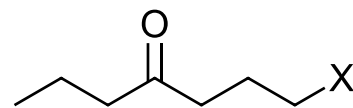
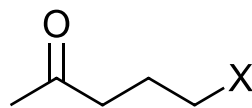
**D: Olefinski glukozinolati**



### E: Alifatski nerazgranati i razgranati alkoholi

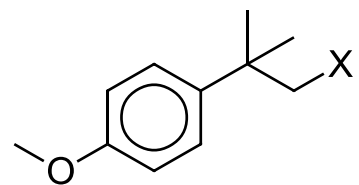
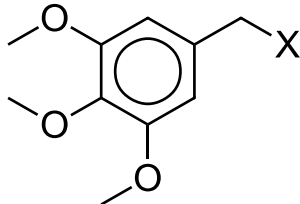
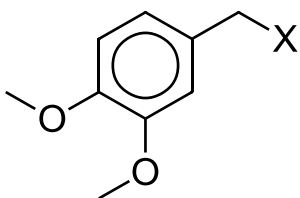
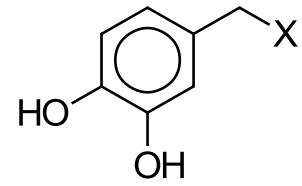
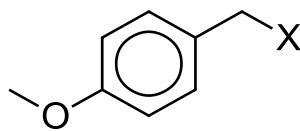
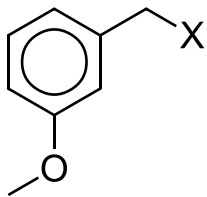
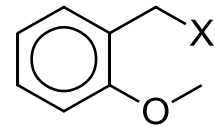
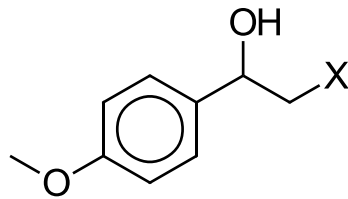
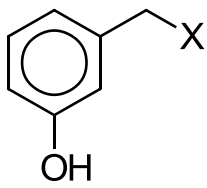
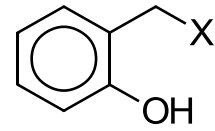
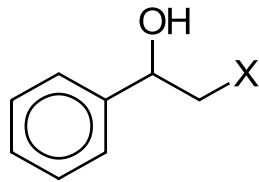
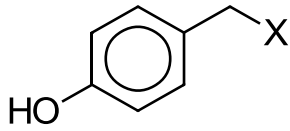
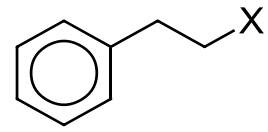
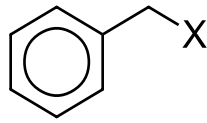
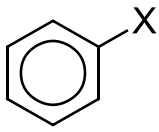


### F: Alifatski ketoni i esteri

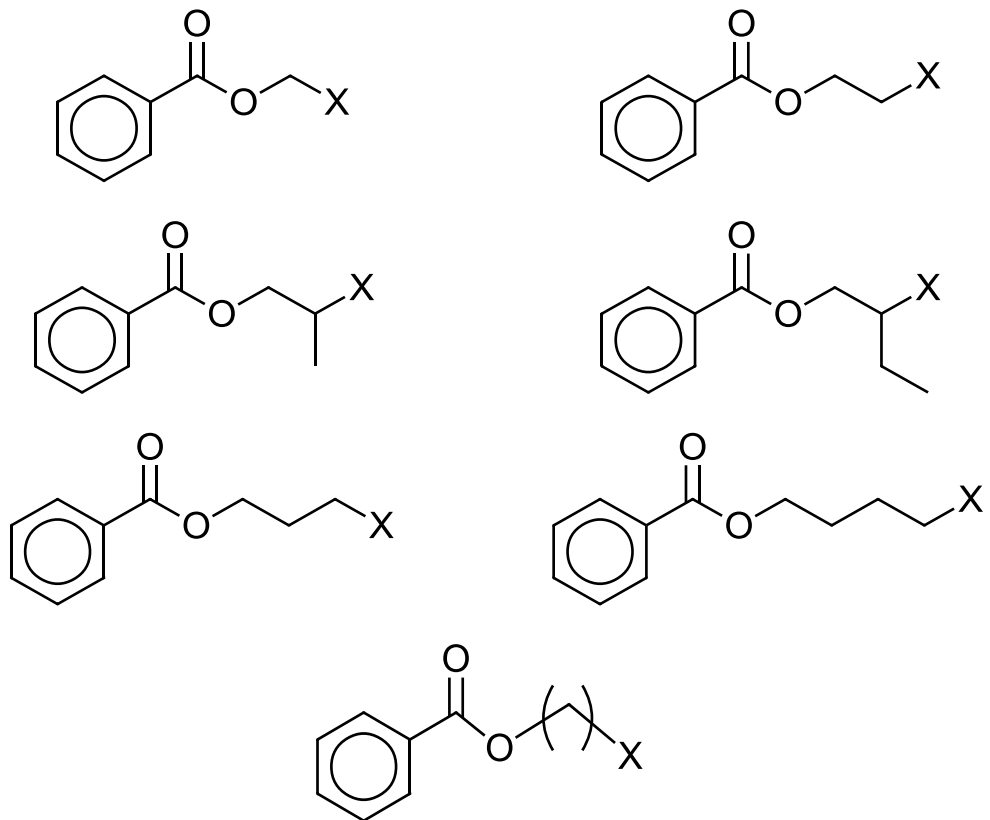




**G: Aromatski glukozinolati**

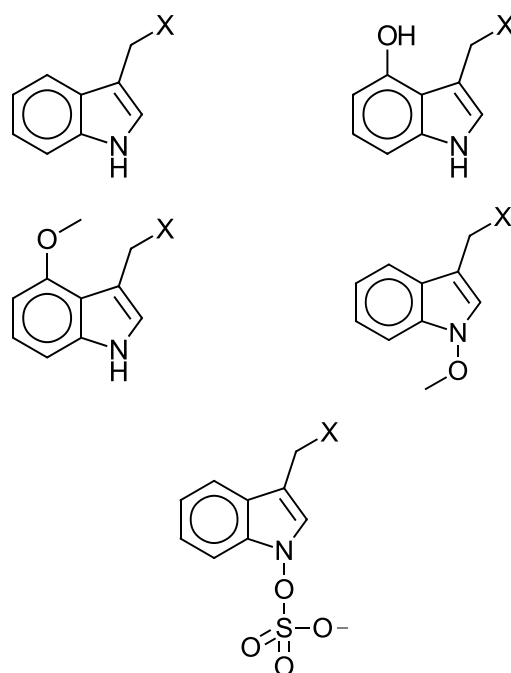


## H: Benzoati

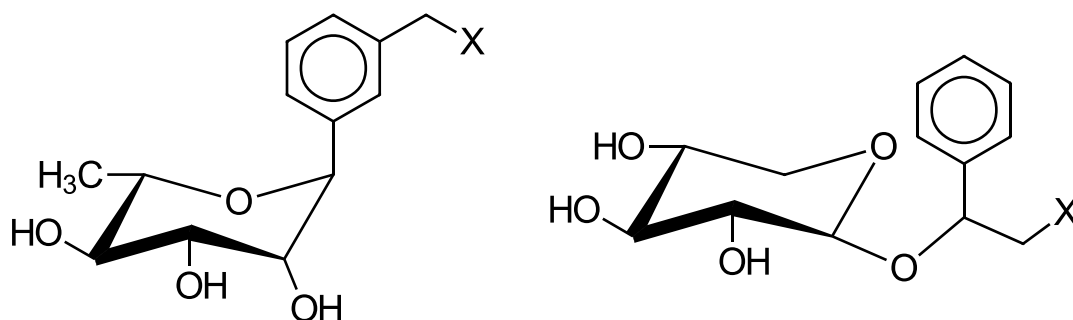


\*n = 1 - 8

## I: Indolni glukozinolati

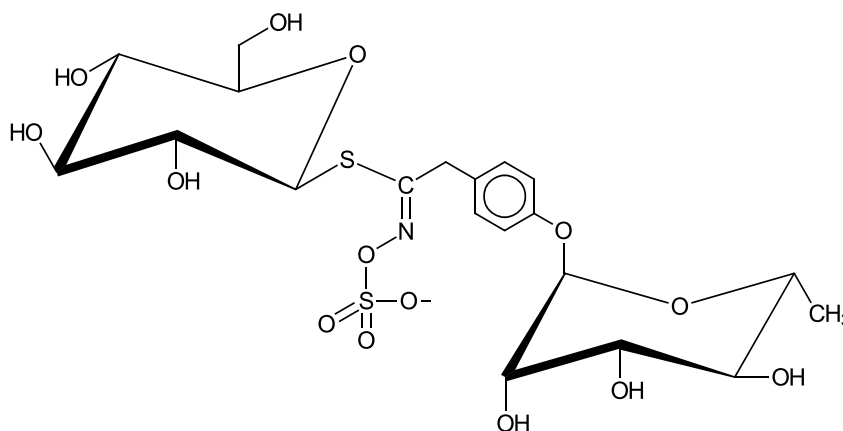


## J: Glikozilirani glukozinolati



Osim podjele na temelju razlike u bočnim lancima, glukozinolati se mogu razlikovati i prema supstutentima na glukonskom dijelu (npr. cimetni i benzoilni glukozinolati). U novije vrijeme sve se više istražuju i tzv. „seleno glukozinolati“ kod kojih je glukonski i aglukonski dio molekule umjesto sumporom povezan selenom.<sup>3</sup>

Postoji i manja skupina benzilnih glukozinolata s dodatnom šećernom jedinicom (ramnoza ili arabinoza) vezanom na aromatski prsten. Karakteristični su za biljne porodice Moringaceae i Resedaceae kojima pripadaju određeni rodovi biljaka široko korištenih zbog svojih izrazito povoljnih farmakoloških osobina. Na **Slici 1.2.** prikazana je struktura jednog takvog glukozinolata: *O*-ramnozilirani oblik glukosinalbina pronađen u *Moringa oleifera* (Moringaceae). Spoj prikazan na slici je predstavnik grupe glukozinolata čiji aglikon nosi *O*-glikoziliranu hidroksilnu grupu.<sup>5</sup>

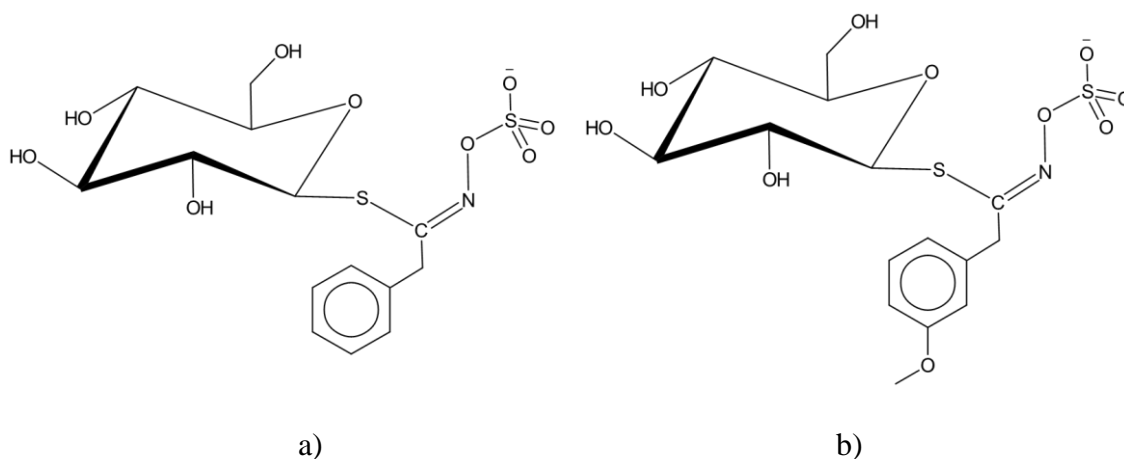


**Slika 1.2.** 4-( $\alpha$ -L-ramnopiranoziloksi)benzil glukozinolat (glukomoringin) iz biljke *Moringa oleifera*.

## 1.2.2. Strukture odabranih glukozinolata

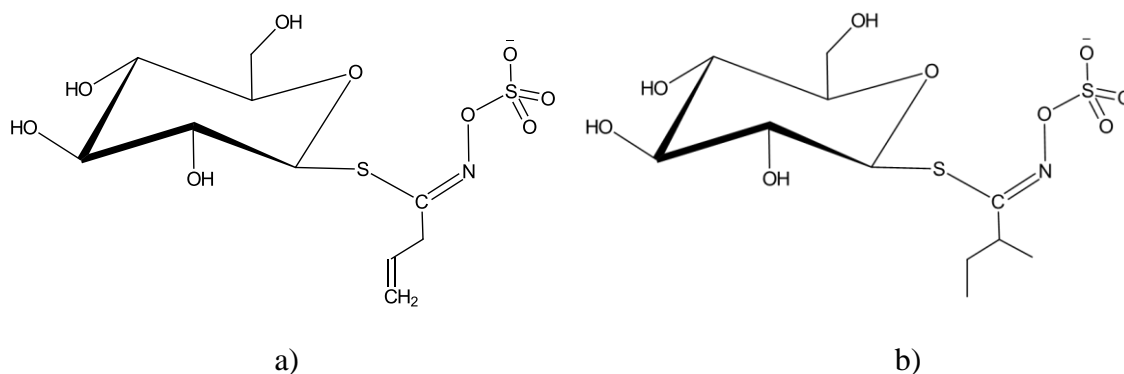
Poznato je da biljke koje pripadaju rodu *Lepidium* i *Moringa* sadrže velik broj glukozinolata, štoviše brojna svojstva koja im se pridodaju potječu upravo od razgradnih produkata glukozinolata. Zbog toga se ove biljke sve više istražuju, posebno u svrhu kvalitativnog određivanja njihova glukozinolatnog sastava. Dosadašnja istraživanja su vrlo korisna za predviđanje glukozinolata u biljkama koje istražujemo.

I. Dini i sur.<sup>7</sup> su u studiji objavljenoj 2002. godine pronašli da su glavni glukozinolati u biljci *L. meyenii* benzil glukozinolat (glukotropeolin) i njegov 3-metoksi derivat glukolimnantin, prikazani na **Slici 1.3**.



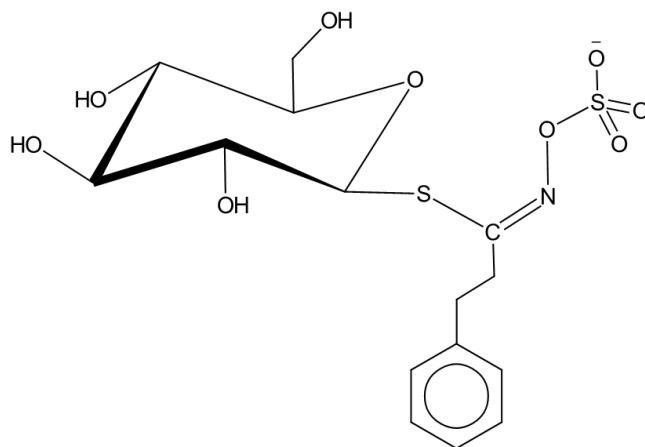
**Slika 1.3.** a) glukotropeolin; b) glukolimnantin.

U *L. latifolium* su, osim glukotropeolina, pronađeni i prop-2-enil glukozinolat (sinigrin) i 1-metilpropil glukozinolat (glukokohlearin).<sup>6</sup> Sinigrin i glukokohlearin su prikazani na **Slici 1.4**.



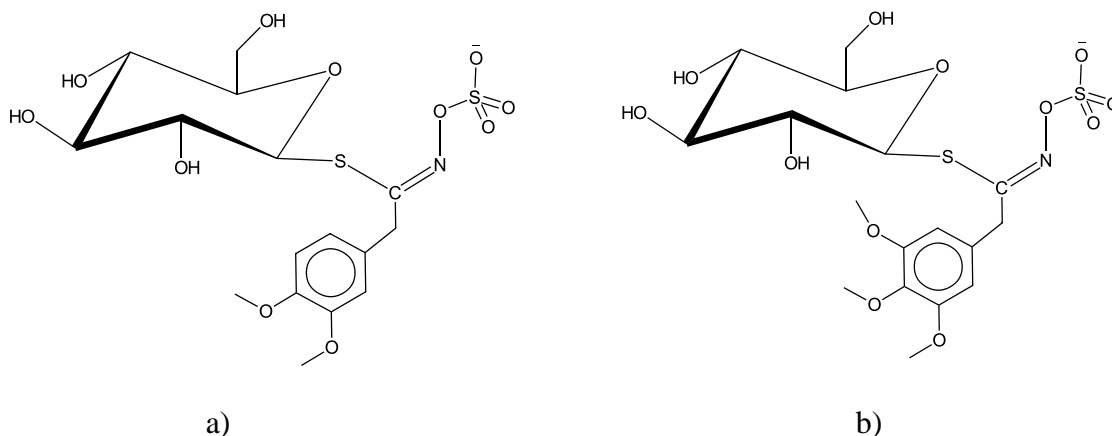
**Slika 1.4.** a) sinigrin; b) glukokohlearin

U radu objavljenom 1980. godine, Victor Gil i Alexander J. McLeod<sup>8</sup> su kao glavne glukozinolate u *L. sativum* identificirali glukotropeolin i 2-feniletil glukozinolat (glukonasturcin), **Slika 1.5**.



**Slika 1.5.** Glukonasturcin.

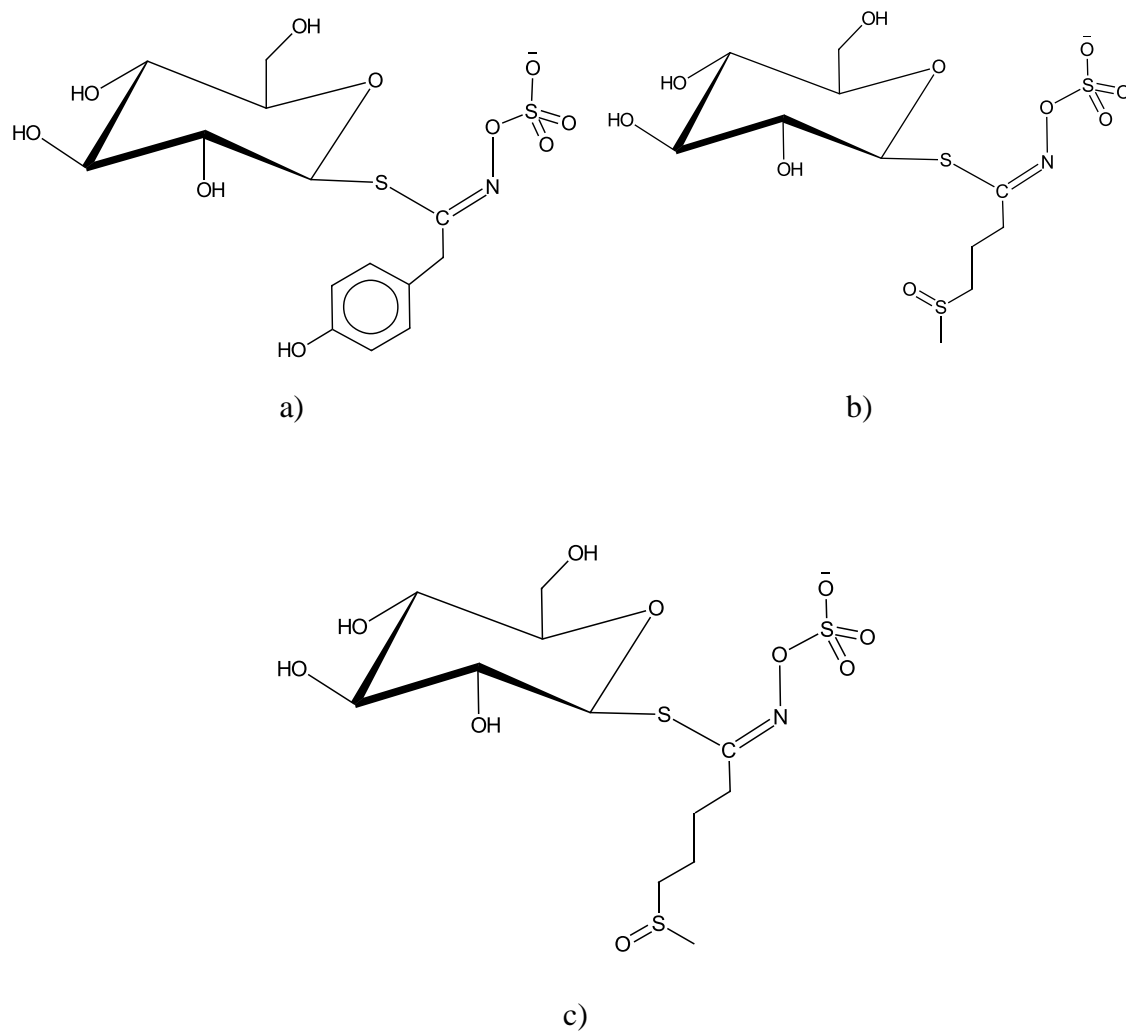
Fahey i suradnici<sup>4</sup> su u radu objavljenom 2001. godine su naveli glukozinolate koji se javljaju u *L. graminifolium*, među kojima su glukotropeolin i glukolepigramin. Zanimljivo je da se u ovoj vrsti javljaju i 3,4-dimetoksi glukozinolat i 3,4,5-trimetoksi glukozinolat, koji su ograničeni samo na tri roda: *Coronopus*, *Lepidium*, and *Matthiola*.<sup>2</sup> 3,4-dimetoksi i 3,4,5-trimetoksi glukozinolati su prikazani na **Slici 1.6**.



**Slika 1.6.** a) 3,4-dimetoksi glukozinolat; b) 3,4,5-trimetoksi glukozinolat.

U članku iz 2014. godine, Mariateresa Maldini i sur.<sup>9</sup> su kao glavni višestruko glikozilirani glukozinolati u *M. oleifera* identificirali glukomoringin (prikazan na **Slici 1.2.**), a od ostalih glukozinolata glukotropeolin, 4-hidroksibenzil glukozinolat (glukosinalbin), 3-metilsulfinilpropil glukozinolat (glukoiberin) i 4-metilsulfinilbutil

glukozinolat (glukorafanin). Strukture glukosinalbina, glukoiberina i glukorafanina su prikazane na **Slici 1.7.**



**Slika 1.7.** a) glukosinalbin; b) glucoiberin; c) glukorafanin.

### 1.2.3. Biosinteza glukozinolata

Znanstvenici istražuju biosintezu glukozinolata još od 60-ih godina 20. stoljeća. Underhill i suradnici prvi su opisali složeni biosintetski put nastajanja glukozinolata, koji je nadopunjen novim saznanjima dobivenim genetskim istraživanjima od strane Mithena i suradnika. Iako je identificirana većina enzima, međuprodukata i gena koji sudjeluju u biosintezi glukozinolata u biljkama, još uvijek nisu poznati svi koraci i međuprodukti.<sup>3,5</sup>

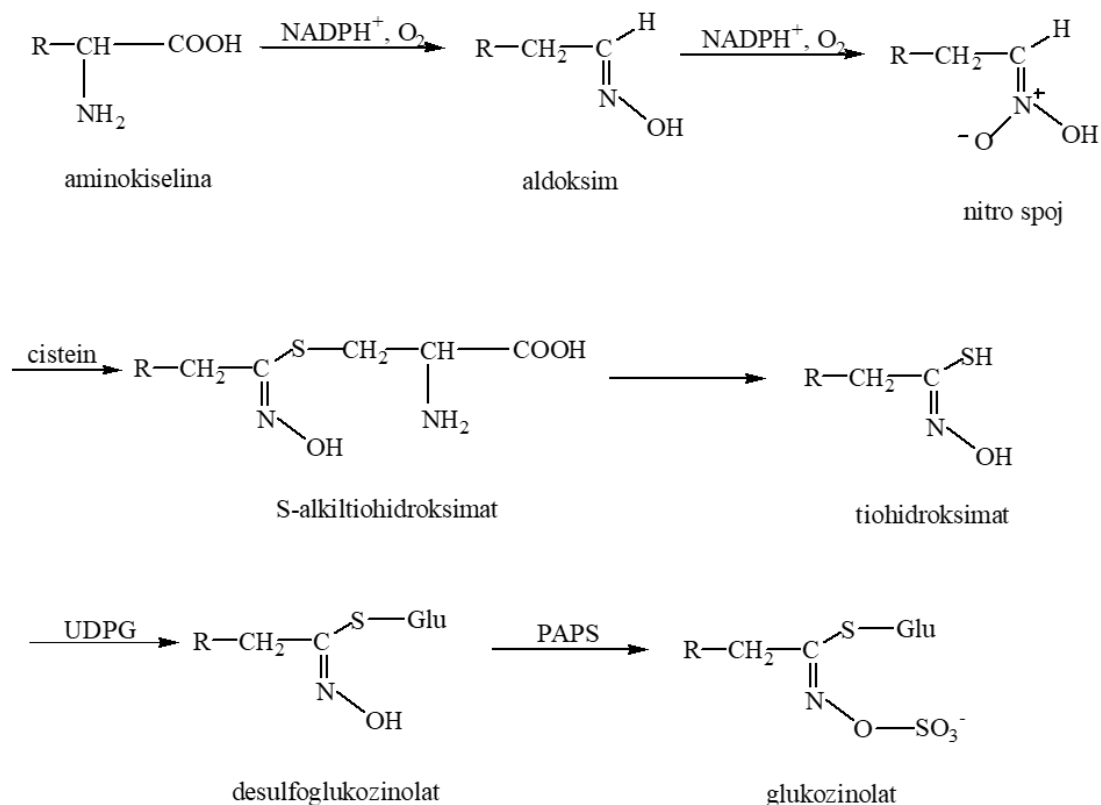
Na temelju sličnosti ugljikovog skeleta nekih aminokiselina i glukozinolata, Kjaer i Conti su iznijeli pretpostavku da aglikoni nekih glukozinolata potječu od odabranih aminokiselina. Ova pretpostavka je potvrđena istraživanjima u kojima su u biljke unošeni radioaktivnim izotopima obilježeni spojevi.<sup>3</sup>

Aglikonski dio glukozinolata može potjecati od osam aminokiselina, na temelju čega se glukozinolati dijele u tri skupine po svome biosintetskom podrijetlu: alifatski, aromatski i indolni glukozinolati. Prekursori alifatskih glukozinolata su alifatske aminokiseline: alanin, leucin, izoleucin, valin i metionin (ili homolog metionina s produženim lancem, dihomometionin). Aromatski glukozinolati potječu od fenilalanina (odnosno, homologne aminokiseline s produženim lancem – homofenilalanina) ili tirozina, a indolni glukozinolati od triptofana. Međutim, u biosintezi brojnih glukozinolata dolazi i do sekundarnih modifikacija aglikonskih bočnih lanaca, kao što su: hidroksilacije, metilacije, oksidacije i aciliranje.<sup>2, 10</sup>

Biosinteza glukozinolata iz aminokiselina odvija se u tri zasebna koraka. Prvi korak biosinteze sastoji se od elongacije (produljenja) lanca alifatske ili aromatske aminokiseline; produljenje se odvija umetanjem metilenske skupine u bočne lance aminokiselina uz prisustvo raznih enzima. Od početne aminokiseline deaminacijom nastaje 2-okso kiselina, koja se zatim kondenzira s acetil-CoA, izomerizira, a potom oksidira i dekarboksilira dajući pritom 2-okso kiselinu s jednom metilenskom skupinom više od početne aminokiseline. Prvi korak biosinteze može se ponavljati više puta, a svakom elongacijom nastaje okso kiselina s jednom metilenskom skupinom više.<sup>3</sup>

Drugi korak sastoji se od metaboličke modifikacije aminokiseline ili njenog derivata produljenog lanca. Ovaj korak odvija se preko niza međuprodukata koji su zajednički za sve glukozinolate, što je prikazano na **Slici 1.8**. Početna reakcija drugog koraka biosinteze glukozinolata je oksidacija aminokiseline u aldoksim. U ovoj reakciji

sudjeluju brojni enzimi, kao što su citokrom P<sub>450</sub> monooksigenaze, flavin ovisne monooksigenaze i peroksidaze. Nastali se aldoksim, zatim, pretvara u tihidroksimat metaboličkim putem koji još uvijek nije do kraja razjašnjen i međuprodukti kojeg još nisu identificirani. Na posljertku, tihidroksimat se glukozilira, dajući pritom desulfoglukozinolat koji se sulfatira do glukozinolata.<sup>3</sup>



**Slika 1.8.** Pojednostavljena shema drugog koraka biosinteze glukozinolata.<sup>3</sup>

(R - promjenjivi bočni lanac; NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat; UDPG - uridin-difosfat-glukoza; PAPS - 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat)

U trećem koraku nastali, osnovni glukozinolat može podlijeći nizu sekundarnih modifikacija bočnog lanca, s tim da je bočni lanac koji potječe od metionina posebno sklon modifikacijama, kao što su postupna oksidacija atoma sumpora u metiltioalkilnom bočnom lancu u metilsulfinilalkil ili metilsulfonilalkil. Nadalje, metilsulfinilalkil bočni lanci se mogu dalje oksidacijski cijepati u alkenil i hidroksialkenil lance. Proučavanje sekundarnih modifikacija bočnih lanaca važno je i s biokemijskog i biološkog gledišta, s obzirom da modifikacije utječu na smjer hidrolize glukozinolata i aktivnost njihovih razgradnih proizvoda.<sup>3</sup>



## 1.2.4. Razgradnja glukozinolata

U slučaju oštećenja stanične strukture biljaka koje sadrže glukozinolate, dolazi do razgradnje glukozinolata. Glukozinolati se mogu razgraditi na dva načina: enzimskom hidrolizom i termičkom razgradnjom. Razgradnja glukozinolata dovodi do nastajanja čitavog niza spojeva, koji uključuju nitrile, izotiocijanate, tiocijanate, epitionitrile i vinil-oksazolidintione. Osim gore navedenih načina razgradnje, glukozinolati se mogu razgraditi i kemijski, djelovanjem kiseline ili baze.<sup>5</sup>

### 1.2.4.1. Enzimska razgradnja

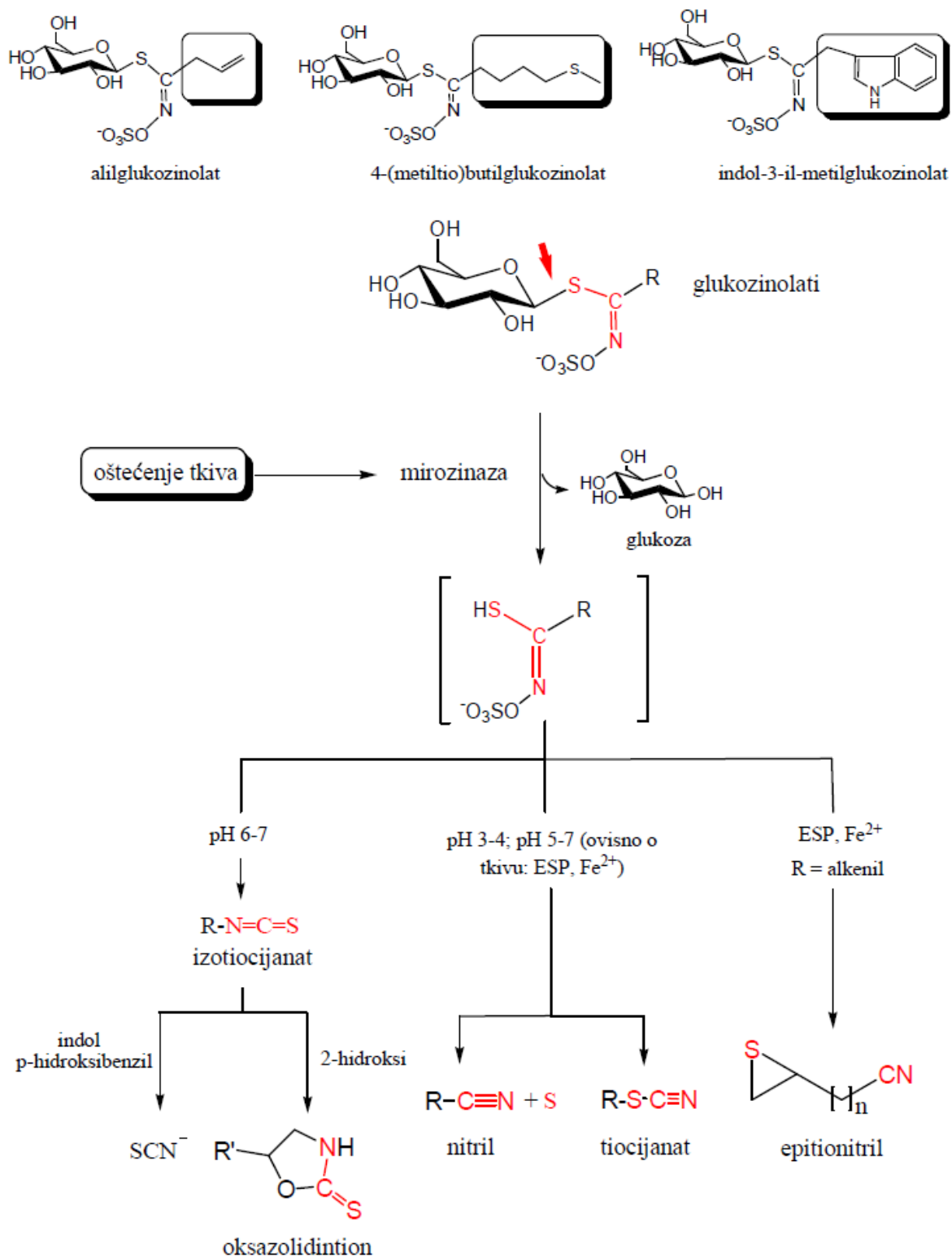
Enzimska razgradnja glukozinolata katalizirana je enzimom mirozinazom (tioglukohidrolaza), a produkti razgradnje su mogu biti izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, epitionitrili, oksazolidintioni i dr. Sastav ovih spojeva ovisi o pH, prisustvu metalnih iona te epitiospecifičnom proteinu (ESP).<sup>5</sup>

Pojam mirozinaza označava skupinu, odnosno porodicu enzima sličnog djelovanja koji se razlikuju ne samo među različitim biljnim vrstama, već i u različitim dijelovima biljke. Mirozinaze spadaju u jedine poznate *S*-glukozidaze. Iako su genetski slične drugim  $\beta$ -glukozidazama, pokazuju specifičnost prema glukozinolatima. Nalaze se odvojene od glukozinolata (glukozinolati su vjerojatno sadržani u vakuolama), dok se mirozinaze nalaze u „mirozinskim stanicama“ koje su nađene u sjemenu, parenhinskom tkivu, epidermu i zaštitnim stanicama.<sup>3,5</sup>

Oštećenjem biljnog tkiva, dolazi do miješanja glukozinolata i mirozinaze, što rezultira brzim otpuštanjem produkata nastalih enzimskom hidrolizom glukozinolata. Kod hladno prešanih materijala, očuvana je mirozinazna aktivnost i glukozinolati, iako nisu fizički odvojeni, a dodatkom vode odmah dolazi do nastajanja hidrolitičkih produkata.<sup>5</sup>

U prisustvu vode, enzimskom hidrolizom nastaju glukoza, sulfat i aglukonski produkt od preostalih N, C, S, i R grupa (**Slika 1.9.**). Aglukon se spontano pregrađuje, i to preko barem jednog nestabilnog međuprodukta. Krajnji produkt pregradnje aglukona ovisi o strukturi bočnog lanca, uvjetima hidrolize (npr. pH vrijednost) i prisustvu

kofaktora, kao što su ioni  $\text{Fe}^{2+}$ . Na oblik produkta utječu i manji proteini (koenzimi) koji se nalaze uz mirozinazu. Neki od produkata enzimske hidrolize glukozinolata su i biološki aktivni spojevi, a najznačajniji su izotiocijanati i indoli.<sup>3,5</sup>



Slika 1.9. Opća shema razgradnje glukozinolata.<sup>5</sup>

#### 1.2.4.2. Razgradni produkti enzimske hidrolize glukozinolata

##### Izotiocijanati

Izotiocijanati, spojevi opće kemijske formule  $R-N=C=S$ , su se smatrali „normalnim“ produktima razgradnje glukozinolata. To su hlapljivi spojevi, jakog okusa i arome koji nastaju pri neutralnom pH kada nestabilni aglukonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji. Količina izotiocijanata koja će nastati razgradnjom glukozinolata ovisi ponajprije o načinu pripreme, ali i postupanju s biljkom. Izotiocijanati su vrlo reaktivni, a zbog toksičnosti se smatraju pogodnim kandidatima za pesticidnu aktivnost. Alil-izotiocijanat (prop-2-enil-izotiocijanat) je uglavnom odgovoran za okus i miris hrena ili gorušice pa se izotiocijanati još nazivaju i „gorušičinim uljem“.<sup>3,5</sup>

##### Nitrili

Za nastanak nitrila ( $R-C\equiv N$ , organski cijanidi) kao razgradnih produkata glukozinolata nije potrebna pregradnja, već gubitak sumpora iz molekule. Iako je nastajanje nitrila, u odnosu na izotiocijanate, favorizirano pri nižim pH vrijednostima, poznati su i slučajevi njihova nastajanja kod pH vrijednosti gdje je favoriziran nastanak izotiocijanata. Isto tako, vjerojatnost nastanka nitrila se povećava u prisustvu  $Fe^{2+}$  iona i tiola. Epitio-nitrili nastaju u istim uvjetima kao i nitrili, uz prisustvo terminalne nezasićene skupine u bočnom lancu (R) i epitiospecifičnog proteina te iona  $Fe^{2+}$ .<sup>3,5</sup>

U prošlosti je smatrano da za nastanak nitrila nisu potrebni enzimi, odnosno da reakcija nastajanja nitrila ovisi samo o željeznim ionima i protonima. Iako je mehanizam još uvijek nerazjašnjen, otkriveno je da je epitiospecifični protein odgovoran za nastajanje nitrila. Nitrili, ali i epitio-nitrili nastaju djelovanjem epitiospecifičnog proteina na tiohidroksimat, koji je nestabilni produkt razgradnje glukozinolata.<sup>5</sup>

## Tiocijanati

Tiocijanati (RSCN) mogu ponekad nastati, posebno u biljkama roda *Lepidium*. Nastaju samo iz glukozinolata koji imaju specifične bočne lance, kao što su prop-2-enil, benzil i 4-(metilsulfanil)butil glukozinolati, zato što samo ove R-skupine imaju svojstvo stvaranja stabilnog kationskog međuprodukta (Luthy i Benn), a faktori koji utječu na njihovo nastajanje još uvijek nisu dovoljno istraženi.<sup>3</sup>

Za nastajanje tiocijanata je, osim mirozinaze, potreban još jedan enzim. Taj enzim naziva se tiocijanat-formirajući protein (TFP), a njega su identificirali Burow i sur. (2007) dok su istraživali hidrolizu glukozinolata u *Lepidium sativum*.<sup>5\*</sup> Istraživanja su pokazala da taj enzim, osim što katalizira reakcije nastajanja tiocijanata i nitrila iz benzil glukozinolata, katalizira i reakcije nastajanja jednostavnih nitrila i epitionitrila iz alifatskih glukozinolata.<sup>5</sup>

Nastanak tiocijanata je kontroliran prisutnošću određenih R-skupina, a dokazi pokazuju da je tiocijanatni anion rezonantni hibrid kod kojeg naboj može biti lokaliziran, ovisno o okolini, na atomu sumpora ( $\text{S-C}\equiv\text{N}$ ) ili na atomu dušika ( $\text{S=C=N}^-$ ). Tiocijanati nastaju razgradnjom indol i 4-hidroksibenzil glukozinolata, i to preko izrazito nestabilnog izotiocijanatnog međuprodukta. Tiocijanati nastaju iz indolnih glukozinolata u širokom rasponu pH vrijednosti, dok je za 4-hidroksibenzil glukozinolate reakcija nastajanja tiocijanata favorizirana samo u lužnatom pH.<sup>5</sup>

## Indoli

Indolni spojevi nastaju hidrolizom indolnih glukozinolata, paralelno s nastankom tiocijanata. Indoli mogu nastati i pod uvjetima koji pogoduju nastanku nitrila, a mogu nastati i reakcijskim putevima u biljci koji nisu vezani za razgradnju glukozinolata. Indoli su poznati po tome što sprječavaju rast tumora, posebno tumora dojke.<sup>3, 5</sup>

### **1.2.5.1. Neenzimska razgradnja glukozinolata**

Glukozinolati se mogu razgraditi na sastavne dijelove pod utjecajem povišene temperature, toplinski. Toplinsku razgradnju glukozinolata proučavali su MacLeod i suradnici 1981. godine pri različitim temperaturama kolona i injektora plinskog kromatografa. Ovo istraživanje je jedno od prvih koje je ukazalo na mogućnost da se glukozinolati mogu razgrađivati i neenzimski.<sup>3</sup>

Osim toplinskom razgradnjom, glukozinolati se mogu razgraditi i kemijskom hidrolizom. Ovisno o uvjetima, nastaju različiti produkti: pri povišenoj temperaturi i u jako kiselim uvjetima glukozinolati se razgrađuju na karboksilnu kiselinu i glukozu, a u lužnatim uvjetima nastaju aminokiseline i tioglukoza. Gadamer je bio jedan od pionira koji su istraživali kemijsku razgradnju glukozinolata na sinigrinu.<sup>3</sup>

## 1.3. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Poznato je da mirisne biljke sadrže isparljive spojeve, a mnoge od njih i eterična ulja. Eterična ulja i isparljivi spojevi se mogu izolirati iz različitih dijelova biljaka: korijen, stabljika, list, cvijet, sjeme i dr. Različite metode izolacije i koncentracije se koriste kako bi se upoznala kemijska priroda isparljivih spojeva koji se nalaze u biljkama. U organskim laboratorijima najčešće metode izolacije hlapljivih spojeva su destilacija i ekstrakcija s organskim otapalima.<sup>5</sup>

Važno je naglasiti da su isparljivi spojevi biljaka više ili manje kompleksne smjese koje mogu sadržavati i do nekoliko stotina različitih sastojaka. Budući da su u biljkama isparljivi spojevi često prisutni u malim koncentracijama, potrebno ih je koncentrirati kako bi se na njima mogle vršiti fizikalno-kemijske analize. To se može ostvariti metodom simultane destilacije-ekstrakcije, gdje se hlapljivi spojevi i eterična ulja izolirana destilacijom istovremeno koncentriraju ekstrakcijom s organskim otapalom ili smjesom organskih otapala.<sup>5, 11</sup>

Eterična ulja i spojevi od interesa u biljkama se nalaze u žlijezdama i žljezdanim dlakama. Eterična ulja do površine dolaze jako sporim procesom koji se naziva hidrodifuzija, a koji se ubrzava usitnjavanjem materijala. Vrlo je važan i način skladištenja materijala prije usitnjavanja, jer nepovoljno skladištenje može dovesti do značajnih gubitaka u prinosu isparljivih spojeva, ali i do njihovih kemijskih promjena. Cvjetovi, lišće i travnati dijelovi kod dužeg skladištenja gube više eteričnog ulja od sjemenki, korijenja i drvenastih dijelova, a nakon sušenja, način skladištenja pakiranjem u vreće ili povezivanjem je mnogo povoljniji od rasipanja po tlu.<sup>5</sup>

### 1.3.1. Destilacija

Pojam destilacija označava proces kojim se vrši odvajanje hlapljivih od nehlapljivih komponenti ili razdvajanje sastojaka smjese prema temperaturi vrenja. Destilacija je jedna od metoda koja se koristi za izolaciju eteričnih ulja iz biljnog materijala. Zasniva se na Daltonovom zakonu parcijalnih tlakova, što znači da će organske tvari koje se inače

ne miješaju s vodom (većina komponenti eteričnih ulja), isparavati zajedno s vodenom parom na temperaturi nižoj od njihova vrelišta, odnosno nižoj od 100 °C.<sup>12</sup>

Destilacija kao metoda izdvajanja hlapljivih spojeva ima niz prednosti naspram ostalih metoda izolacije, budući da ne sadrži neisparljive spojeve koje mogu interferirati kod analiza. Postoje tri vrste destilacije koje se zasnivaju na istim principima, ali se razlikuju s obzirom na kontakt između biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare:

- vodena destilacija (hidrodestilacija),
- vodeno-parna destilacija, i
- parna destilacija.

Dva procesa imaju važnost za vrijeme destilacije, a to su hidrodifuzija i hidroliza. Difuzija je glavni fizikalni proces koji se odvija za vrijeme destilacije. Ako je biljni materijal prije destilacije usitnjen, dio eteričnog ulja koji se nalazi na površini će odmah destilirati, a dio će destilirati tek kad dođe do površine difuzijom. Isto tako, pri povišenoj temperaturi dolazi do hidrolize nestabilnih komponenti eteričnih ulja i nastajanja artefakata.<sup>5, 12</sup>

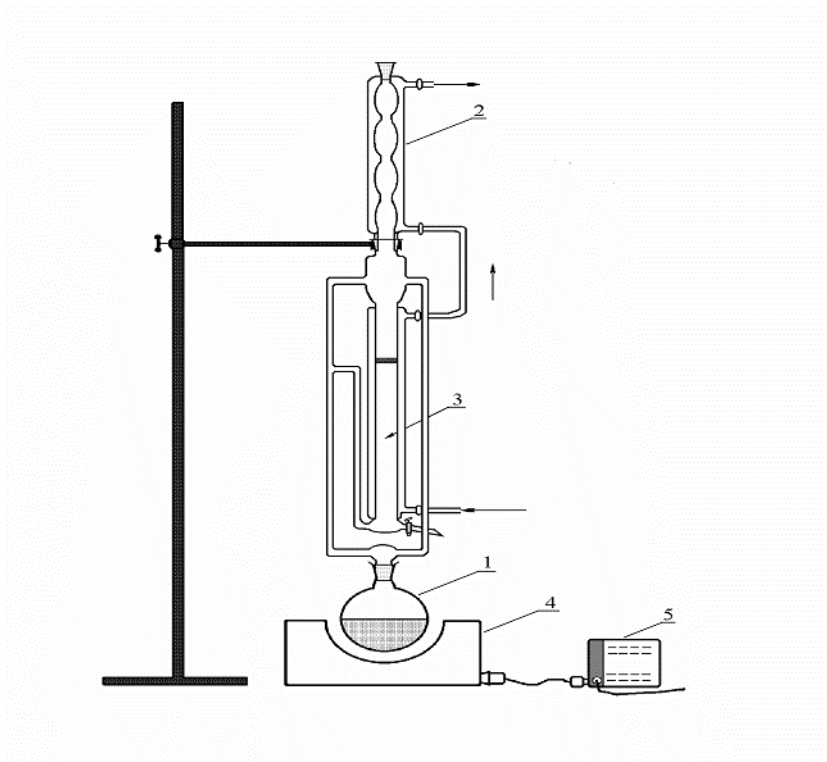
#### **1.3.1.1. Vodena destilacija**

Hidrodestilacija je najstarija metoda za dobivanje eteričnih ulja, a koristi se za obradu materijala (npr. listova i cvijeća) u slučaju da eterična ulja nisu topljiva u vodi. To je ujedno i najčešće korištena metoda izolacije eteričnih ulja.<sup>5</sup>

Kod vodene destilacije pripremljeni biljni materijal se pomiješa s vodom i zagrijava do vrenja, najčešće pri atmosferskom tlaku. Pare koje izlaze kondenziraju se u hladilu te se destilat nakuplja u predlošci u kojoj se eterično ulje odvaja od vode na temelju netopljivosti ulja i razlika u gustoći. Važno je naglasiti da se pri usitnjavanju materijala mora paziti na granulaciju, dakle materijal ne smije biti ni previše ni premalo usitnjen. Prekrupan materijal može povećati vrijeme destilacije, a presitan može dovesti do nastajanja artefakata.<sup>5</sup>

U današnje vrijeme se koriste različite izvedbe aparatura. Aparature se mogu razlikovati na više načina, a jedna od najznačajnijih razlika je u tome koriste li se za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode. Standardne laboratorijske aparature koje

se koriste za izolaciju eteričnih ulja vodenom destilacijom su: aparatura po Ungeru, aparatura prema europskoj farmakopeji (engl. „European Pharmacopoeia”), aparatura po Clevenger-u. U ovom radu je korištena modificirana aparatura po Clevengeru prikazana na **Slici 1.10.**<sup>5</sup>



**Slika 1.10.** Modificirana aparatura po Clevengeru.<sup>3</sup>

(1. tikvica s okruglim dnom; 2. povratno hladilo; 3. prostor za prihvat destilata; 4. kalota za zagrijavanje, 5. reostat)



### 1.3.2. Ekstrakcija hlapljivih spojeva

Ekstrakcija bilja je postupak u kojemu se odjeljuju tvari iz biljnih materijala na temelju njihove različite topljivosti u ekstrakcijskom sredstvu. Ovaj postupak je poznat još od 19. st., a koristi se za izolaciju eteričnih ulja osjetljivih na visoke temperature i kada nema dovoljno biljnog materijala na raspolaganju. Može se koristiti za direktnu izolaciju eteričnog ulja iz biljnog materijala ili za izdvajanje hlapljivih spojeva iz razrijeđene vodene otopine dobivene nekom od metoda destilacije.<sup>5, 11</sup>

Otapalo (ekstrakcijsko sredstvo) ispire sadržaj iz oštećenih biljnih stanica. Za razliku od oštećenih biljnih stanica, kod neoštećenih stanica dolazi do bubrenja smežuranih staničnih membrana što dovodi do stvaranja međustaničnih prostora koji omogućavaju ulazak otapala u stanicu. Bubrenjem protoplazme, otapa se sadržaj stanice i difundira u otopinu kroz membranu, sve dok se ne uspostavi koncentracijska ravnoteža unutar i izvan stanica.<sup>5, 11</sup>

Za ekstrakciju se koriste hlapljiva i nehlapljiva otapala, a moraju zadovoljavati sljedeće uvjete:

- moraju biti selektivni, što znači potpuno otapati mirisne sastojke, a što je moguće manje pigmente, lipide, proteine i slično,
- moraju se lako uklanjati, tj. moraju imati nisku i jedinstvenu točku vrenja,
- ne smiju otapati vodu,
- moraju biti kemijski inertna,
- moraju biti jeftina i po mogućnosti nezapaljiva.

Najčešće korištena otapala su pentan, petroleter, dietil-eter, diklormetan i dr., dok se nehlapljiva otapala (masti i ulja) koriste za ekstrakciju finih mirisnih tvari iz cvijeća. Nedostatak ekstrakcije jest u tome što dobiveni ekstrakt sadrži i masne kiseline i njihove metilne estere, voskove i druge visokomolekularne, nehlapljive spojeve, što znači da je potrebna daljnja obrada ekstrakata.<sup>5</sup>

U današnje vrijeme se sve više koriste moderne metode ekstrakcije, kao što su ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija (s otapalom i bez otapala), ekstrakcija subkritičnim i superkritičnim fluidima i dr.<sup>11</sup>

## 1.4. Metode identifikacije hlapljivih spojeva

U današnje vrijeme koriste se mnoge tehnike za ispitivanje sastava eteričnih ulja, među kojima su i: plinska kromatografija, IR-spektroskopija, UV-spektroskopija i NMR spektroskopija. Od navedenih metoda, najviše se koristi plinska kromatografija, sama ili spregnuta sa spektrometrom masa.<sup>5</sup>

### 1.4.1. Kromatografija

Kromatografija je analitička metoda koja služi za odvajanje komponenti, te njihovo kvantitativno i kvalitativno određivanje u smjesi.<sup>5</sup> Naziv kromatografija potječe od ruskog kemičara Mihaila Semjonoviča Cveta (Tswett) koji ju je uveo 1906. godine za odjeljivanje biljnih boja.<sup>12</sup> Ova metoda ima prednost nad ostalim metodama zato što omogućava brzu i potpuniju analizu. Kromatografija se vrši otapanjem smjese u pogodnom otapalu (mobilna faza) te njenim provođenjem preko nepokretne (stacionarne) faze.<sup>5, 12</sup>

Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevinna, a mobilna faza kapljevinna ili plin. Mobilna faza se kreće preko ili uzduž stacionarne faze pod utjecajem kapilarnih sila, sile teže, razlike tlakova i dr. Kromatografski proces se temelji na uspostavljanju ravnoteže nekog spoja između mobilne i stacionarne faze, a kako se mobilna faza kreće dolazi do narušavanja ravnoteže i gibanja spoja u smjeru mobilne faze. Budući da svaki spoj ima specifičnu interakciju s mobilnom i stacionarnom fazom, različiti spojevi će putovati različitim brzinama i tako se odjeljivati.<sup>5, 12</sup>

Proces odjeljivanja temelji se na više različitih načela, kao što su: adsorpcija, razdjeljenje, difuzija, ionskoj izmjena, kiralnosti i dr. Velika moć razlučivanja kromatografskih metoda potječe od uzastopnog ponavljanja primarnog postupka razdjeljivanja neke tvari između mobilne i stacionarne faze. Uspostavljanje ravnoteže se neprestano ponavlja, pa i male razlike u razdjeljivanju između stacionarne i mobilne faze dovode do dobrog odjeljivanja tvari.<sup>5, 12</sup>

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti na više načina: prema agregatnom stanju mobilne i stacionarne faze, prema fizikalno-kemijskim procesima tijekom

razdvajanja i prema izvedbenim tehnikama. Uzimajući u obzir sva tri načina podjele, razlikujemo:

- **adsorpcijsku kromatografiju** kod koje je stacionarna faza kruti adsorbens, a mobilna može biti kapljevina (tekućinska adsorpcijska kromatografija, Liquid Solid Chromatography, LSC), ili plin (plinska adsorpcijska kromatografija, Gas Solid Chromatography, GSC);
- **razdjelnu kromatografiju** kod koje je stacionarna faza kapljevina nanjena u tankom sloju na sorbens ili fino zrnatu inertnu krutinu, a mobilna faza može biti kapljevina (tekućinska razdjelna kromatografija, Liquid Liquid Chromatography, LLC) ili plin (plinska razdjelna kromatografija, Gas Liquid Chromatography, GLC),
- **ionsko-izmjenjivačka kromatografija** koja se temelji na interakciji naboja između molekula uzorka i naboja stacionarne faze. Stacionarna faza je ionski izmjenjivač, a ova tehnika se koristi za pročišćavanje proteina, peptida, aminokarboksilnih kiselina, oligonukleotida i drugih molekula s nabojem.

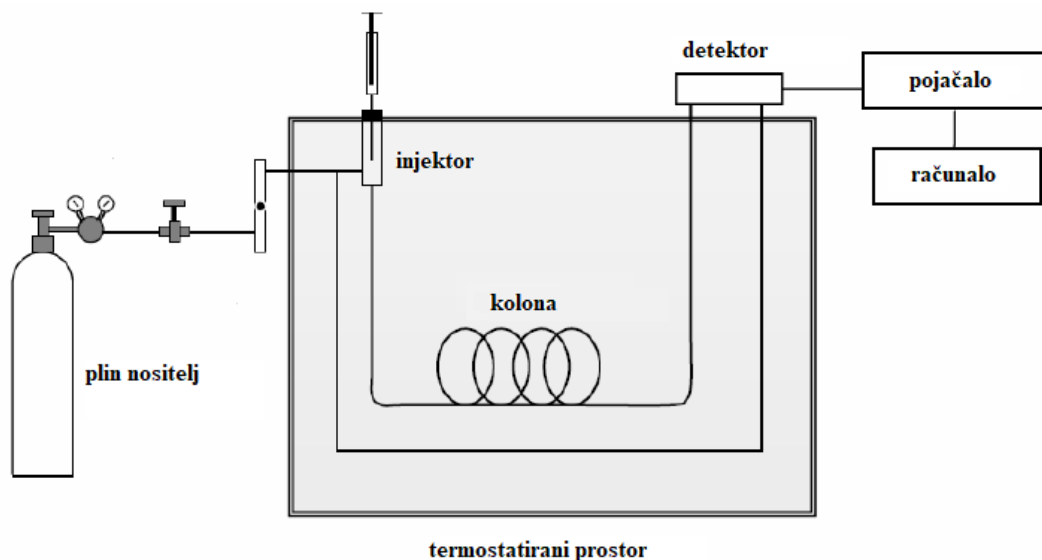
U gore navedenu podjelu, spadaju još i afinitetna kromatografija, kromatografija isključenjem i kiralna kromatografija.<sup>5, 12</sup>

#### 1.4.1.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešća metoda odvajanja smjesa isparljivih spojeva. Ova metoda predstavlja vrlo brzu metodu odjeljivanja, s obzirom da nisu potrebne nikakve prethodne operacije, a pogodna je i u situacijama kad je dostupna vrlo mala količina uzorka.<sup>5, 12</sup>

Plinski kromatograf sastoji se od plina nositelja, injekcijskog bloka, kromatografske kolone sa stacionarnom fazom u termostatiranom prostoru, detektora i pisara (Slika 1.11.). Uzorci za analizu moraju biti lako hlapljivi, kako bi trenutno isparili u injektoru, ali i stabilni na radnoj temperaturi kolone. Cijeli uzorak se, pomoću injekcijske šprice, mora unijeti odjednom u injekcijsku kolonu. Inertni plin nositelj (koji je mobilna faza) eluira sastojke smjese do kromatografske kolone gdje se odjeljuju i

odlaze do detektora. Stacionarna faza je nehlapljiva kapljevina nanjena na stijenke kolone ili sorbens.<sup>5, 12</sup>



**Slika 1.11.** Shematski prikaz plinskog kromatografa.<sup>12</sup>

Funkcija plina nositelja jest da provede kromatografsko odjeljivanje hlapljivih spojeva i njihovo iznošenje do detektora. Budući da plin nositelj mora biti kemijski inertan kako ne bi došlo do reakcije s uzorkom i materijalom kojim je punjena kolona, za plin nositelj najčešće se koriste inertni plinovi kao helij, dušik, argon ili vodik. Protok mobilne faze mora biti konstantan, a temperatura se mora pažljivo odabrati i programirati. Kromatografske kolone, koje su smještene u termostiranom prostoru, se izrađuju od metalnih, staklenih ili plastičnih cijevi koje se pune stacionarnom fazom. Kod kapilarnih kolona, stacionarna faza je vezana direktno na stjenku kolone.<sup>5, 12</sup>

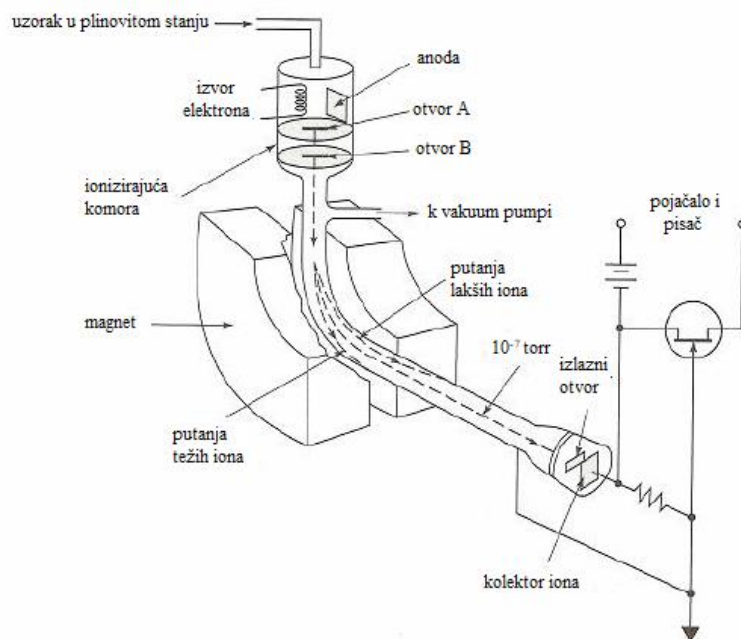
Prednosti plinske kromatografije su njena velika osjetljivost i mogućnost korištenja za razdvajanje velikog broja tvari, od plinova niskog vrelišta do organskih tvari jako visokog vrelišta. Međutim, ova metoda ima i neke nedostatke. Na primjer, može doći do nepotpunog odvajanja spojeva. Isto tako, pri injektiranju cijelog ulja u kromatograf, manji konstituenti mogu biti prerazrijeđeni da bi se detektirali, a kod većih koncentracija glavni bi konstituenti preplavili kolonu i maskirali manje komponente. Analiza može biti vremenski duga, ukoliko nam je cilj identificirati manje konstituente. Ukoliko ulja sadrže komponente visokog vrelišta, potrebno je dugo vremensko razdoblje pri visokim temperaturama da bi ti spojevi izašli iz kolone, a mogu je i oštetiti.<sup>5, 12</sup>

Kao detektori kod plinske kromatografije mogu se koristiti bilo koji uređaji koji na osnovi fizikalne ili kemijske promjene može detektirati prisutnost eluirane komponente. Detekcija se zasniva na mjerenjima koja se temelje na toplinskoj vodljivosti, radioaktivnoj ionizaciji, fotoionizaciji i spektrometriji masa. Najčešće korišteni detektori su plamenoionizacijski detektor, detektor toplinske vodljivosti, plamenofotometrijski detektor, fotoionizacijski detektor, detektor apsorpcije elektrona i spektrometar masa.<sup>5, 12</sup>

## 1.4.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je tehnika koja se koristi za ispitivanje kemijskih vrsta. Ova tehnika se temelji na prevođenju uzorka čistog spoja u plinovito stanje, njegovoj ionizaciji i fragmentaciji, razdvajanju dobivenih iona prema njihovoj masi, odnosno omjeru mase i naboja ( $m/z$  odnosu), te registriranju pojedinih ionskih vrsta u formi masenog spektra.<sup>5</sup>

Uređaj se sastoji od komore za bombardiranje koja na jednoj strani ima užarenu volframovu nit – *katodu*, a na suprotnoj pozitivno naelektrizirana ploča – *anoda*. Elektroni, koje emitira užarena katoda, su privučeni prema pozitivnom naboju, odnosno anodi.<sup>5</sup>

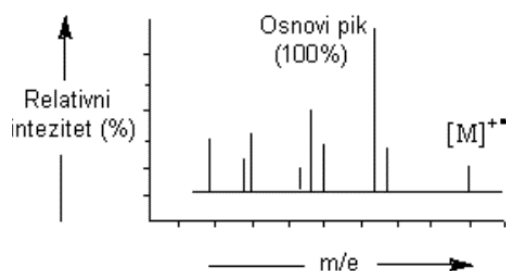


Slika 1.12. Shematski prikaz rada spektrometra masa.<sup>5</sup>

Mala količina čistog spoja u plinovitom stanju se unosi u komoru, gdje se uzorak bombardira elektronima visoke energije (50-70 eV) pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivan ion  $M^+$  (molekulski ion) koji se fragmentira. Struktura molekule i iznos energije elektrona kojima se bombardira molekula određuju koji će ion nastati i u kojem intenzitetu. Kako bi se izbjegli sudari iona s drugim česticama i njihova neutralizacija, u komori je prisutan visoki vakuum, što omogućava ionima neometano putovanje od izvora iona do senzora.<sup>5</sup>

Dobiveni ioni se razvrstavaju u analizatoru na temelju intenziteta i veličine  $m/z$ , a razvrstavanje se vrši propuštanjem kroz promjenjivo magnetsko ili električno polje. Nakon odvajanja pojedine ionske vrste (mase), potrebno ju je i detektirati. Poznate su različite izvedbe detektora, ali najraširenija je upotreba tzv. *elektronskog multiplikatora*. Pozitivni ion  $M^+$  velikom brzinom udara o metalnu površinu katode i izaziva emisiju određenog broja sekundarnih elektrona. Razlika u naponu između katode i sljedeće elektrode (koja se naziva dinoda) ubrzava emitirane elektrone koji zatim udaraju o površinu dinode. Rezultat tog sudara je emisija određenog broja elektrona s dinode, ali ovog puta u količini većoj nego u sudaru s katodom. Ovaj proces se ponavlja s ostalim dinodama (kojih može biti desetak i više), gdje se elektroni ubrzavaju, sudaraju s dinodom i izbijaju određen broj elektrona, opet veći od prethodnog. Posljedica je stalno povećavanje broja elektrona – „efekt lavine“. Na kraju, izbijeni elektroni dolaze do posljednje elektrode, anode na kojoj izazivaju električni impuls.<sup>5</sup>

Na ovaj način se dobiva mjerljivi signal na anodi za svaki pozitivan ion koji stiže na katodu. Veličina signala je proporcionalna broju iona koji dolaze na katodu, a signal se preko pojačala prenosi do pisaača. Ovako se dobiva spektar masa, koji se obično daje kao linijski dijagram s odnosom intenziteta i omjera  $m/z$  fragmenta, a snimljeni spektri masa se uspoređuju s bankom podataka te računalo određuje postotak slaganja spektara, odnosno pouzdanost identifikacije.<sup>5</sup>

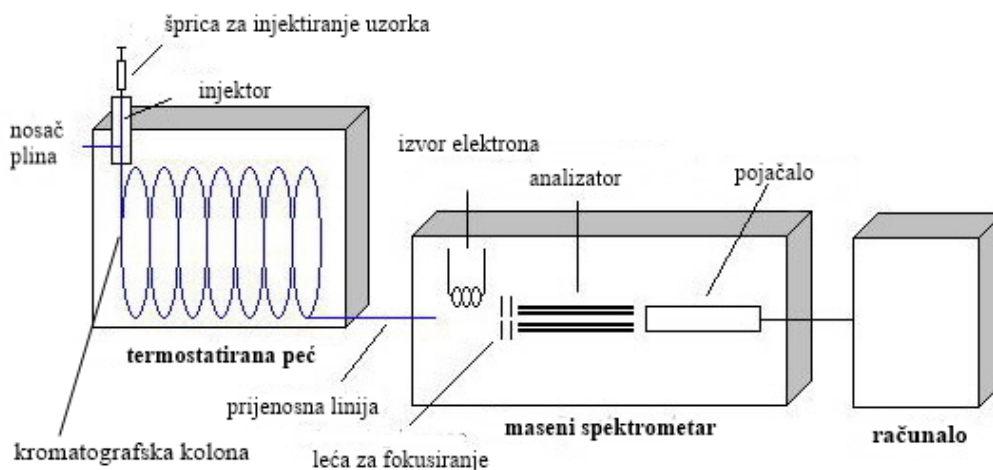


**Slika 1.13.** Spektar masa.<sup>5</sup>

### 1.4.3. Vezani sustav plinska kromatografija - spektrometar masa (GC-MS)

Vezana tehnika plinska kromatografija- spektrometar masa omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine uzorka. Plinska kromatografija je izvrsna metoda za odvajanje i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje pa se za to koristi spektrometrija masa koja odlično nadopunjuje plinsku kromatografiju. Obje metode rade s uzorkom u plinovitom stanju, a karakteristični podatci za izdvojeni spoj su njegovo retencijsko vrijeme i površina pika koja je proporcionalna količini spoja. Pri identifikaciji određenog spoja, važnost ima i njegov maseni spektar.<sup>5</sup>

U sustavu se najčešće koristi četveropolni analizator masa koji brzo snima spektre i prati spojeve na izlazu iz kromatografske kolone. U kolektoru nastaje elektronski signal koji se prije zabilježavanja pojačava, a podaci odlaze u računalo koje skuplja snimke masenih spektara tijekom cijelog kromatografskog procesa. Za identifikaciju pomoću spektra masa može se odabrati spektar masa s različitog dijela pika, a dobiveni maseni spektar se uspoređuje sa masenim spektrom dotičnog spoja koji se nalazi u Wileyevoj banci masenih spektara. Ovim vezanim sustavom može se postići velika osjetljivost, reda veličine  $10^{-12}$  do  $10^{-15}$  g.<sup>5</sup>



**Slika 1.14.** Shema vezanog sustava plinska kromatografija- spektrometar masa (GC-MS).<sup>13</sup>

## 1.4.2. IR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija (IR) je spektroskopija koja se zasniva na mjerenju u infracrvenom području elektromagnetskog spektra, točnije području između vidljivog i mikrovalnog zračenja. IR spektroskopija se najviše koristi u organskoj i anorganskoj kemiji za determinaciju funkcijskih skupina, a mogu se koristiti uzorci u krutom, tekućem ili plinovitom stanju. Interakcija infracrvenog zračenja i molekule može se analizirati na tri načina, i to mjerenjem apsorpcije, emisije ili refleksije.<sup>14, 15</sup>

Infracrveno zračenje, koje se nalazi u području od 4000 do 200  $\text{cm}^{-1}$ , nema energiju potrebnu za pobuđivanje elektrona, ali izaziva vibracije, savijanja i rotacije kovalentno vezanih atoma ili skupina. Svaka veza u određenoj molekuli ima specifičnu energiju vibracije, što znači da će apsorbirati infracrveno zračenje točno određene valne duljine. Instrument (infracrveni spektrofotometar) bilježi energije vibracija, savijanja ili rotacija svake veze u molekuli, na temelju čega se dobiva spektar za određenu molekulu koji može poslužiti za određivanje njene strukture. Budući da je IR spektar jedinstven za svaku molekulu, infracrvena spektroskopija je pogodna za različite vrste analiza.<sup>14, 15</sup>

### 1.4.2.1. FTIR

FTIR (engl. *Fourier Transform InfraRed*) je metoda koja se najčešće koristi kod infracrvene spektroskopije. Ova metoda je zamijenila disperzivne metode korištene u prošlosti, a koje su se zasnivale na izdvajanju pojedinih frekvencija infracrvenog zračenja uz pomoć prizme. Disperzivne metode kod kojih se spektar za svaku valnu duljinu mjerio zasebno su bile jako spore. Javila se potreba za bržim načinom mjerenja, odnosno bilo je potrebno osmisliti metodu kod koje se vrše simultana mjerenja za sve valne duljine.<sup>16</sup>

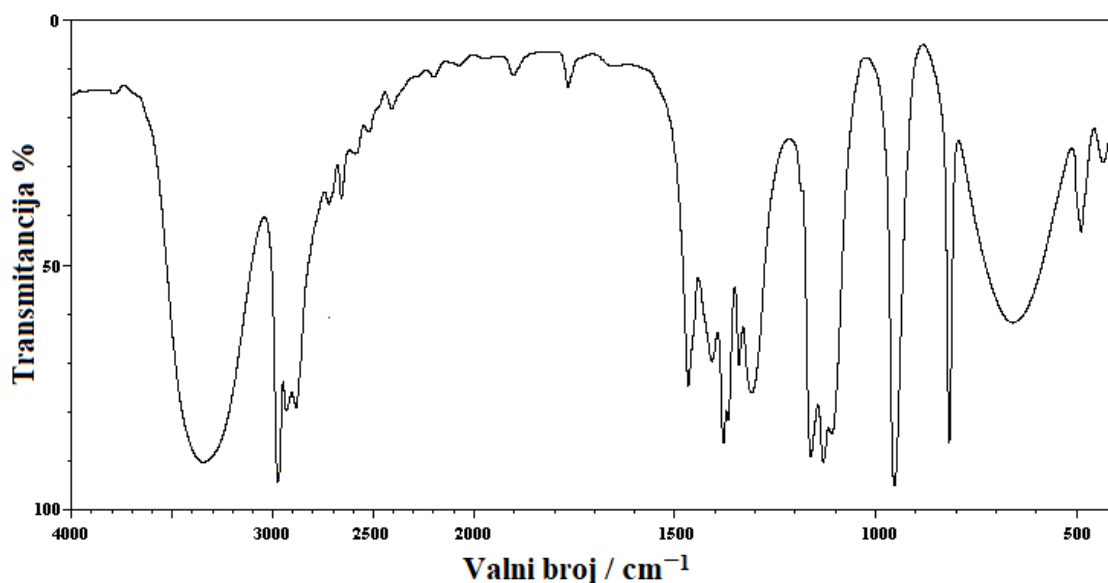
Rješenje je postignuto upotrebom uređaja koji se naziva interferometar. Većina interferometara u sebi sadrži uređaj za razdvajanje snopa zračenja (engl. *beamsplitter*), koji nadolazeće infracrveno zračenje dijeli u dvije zrake. Jedna se zraka reflektira na nepomičnom zrcalu, a druga na zrcalu koje se stalno pomiče za male udaljenosti ( u mm). Reflektirane zrake se ponovo spajaju u uređaju za razdvajanje snopa. S obzirom na to da se valna duljina druge zrake neprestano mijenja, zraka koja izlazi iz interferometra je



zraka koja nastaje interferencijom dvaju reflektiranih zraka. Rezultantni signal, interferogram, u sebi nosi informaciju o svakoj valnoj duljini koja izlazi iz izvora, što znači da, kako se mjeri interferogram, tako se istovremeno mjere i sve frekvencije infracrvenog zračenja koje izlazi iz izvora.<sup>16</sup>

Za analizu su potrebni frekvencijski spektri, odnosno za identifikaciju pojedine molekule potrebno je znati intenzitet apsorpcije (emisije ili refleksije) za svaku pojedinu frekvenciju. Zbog toga se interferogram ne može direktno interpretirati, već ga je potrebno „dekodirati“ što se postiže poznatom matematičkom tehnikom koja se zove Fourierova transformacija. Transformaciju obavlja računalo koje, u konačnici, korisniku prikazuje željeni spektar.<sup>16</sup>

FTIR spektar prikazuje postotak apsorpcije (ili transmitancije) određene veze pri određenoj frekvenciji. Frekvencije se prikazuju u  $\text{cm}^{-1}$ , a često se nazivaju i valnim brojevima (**Slika 1.15.**). Valne duljine, koje su recipročne vrijednosti frekvencija, su obično dane u mikrometrima.<sup>16, 17</sup>



**Slika 1.15.** FTIR spektar.<sup>18</sup>

## 1.5. Opće karakteristike biljnih porodica

### 1.5.1. Porodica Brassicaceae

Porodica kupusnjača ili krstašica (Brassicaceae, stariji naziv Cruciferae) je velika biljna porodica zeljastih, rjeđe grmolikih dvosupnica (u tropima) kojoj pripada oko 3700 vrsta grupiranih u oko 350 rodova. Biljne vrste koje pripadaju ovoj porodici rasprostranjene su gotovo po čitavoj Zemlji, a najviše u izvan-tropskim područjima sjeverne hemisfere. Naseljavaju najraznovrsnija staništa, a u planinskim pojasevima dopiru i do gornje granice vegetacije.<sup>19</sup>

Biljke koje pripadaju porodici Brassicaceae su jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, a u rjeđim slučajevima, polugrmovi i grmovi. Odlikuju se stabljikom koja može biti uspravna, polegnuta ili različito usmjerena u odnosu na tlo; neke vrste na stabljikama imaju jednostavne listove naizmjeničnog rasporeda i različitih oblika, sa i bez peteljke. Cvjetovi biljaka ove porodice su pravilni i dvospolni, a građeni su na osnovi broja četiri: sastoje se od 4 lapa, 4 latice, 4 duža, unutarnja prašnika i 2 kraća, vanjska prašnika. Također, cvjetovi mogu biti dvostruki (časka i vjenčić) ili jednostavni te skupljeni u cvatove ili pojedinačni. Kod ovih biljaka, plodnica je jednogradna ili dvogradna, a plodovi su najčešće komuške različitog oblika.<sup>3</sup>

Porodica Brassicaceae sadrži veliki broj biljnih vrsta koje se upotrebljavaju u različite svrhe: u prehrani, gospodarstvu, industriji i medicini. Sadrže aromatične spojeve, eterična ulja, izvor su vitamina C, a činjenica da sadrže spojeve sa sumporom (posebno glukozinolate) ih čini predmetima brojnih istraživanja. U prehrani ljudi, ali i životinja koristi se veliki broj odlika i sorti vrtno-vrzdine (*B. oleracea*). Brojne vrste se koriste za dobivanje ulja (npr. uljana repica – *B. napus*). U ljekarstvu, osobito pučkom, koriste se vrste rodova *Lepidium*, *Cochlearia* i *Alliaria*, a mnogi se rodovi koriste kao ukrasne biljke. Odlike i sorte određenih rodova su ograničene na određena područja; tu spadaju i neke biljke koje su endemične u Hrvatskoj, kao npr. velebitska degenija (*Degenia velebitica*).<sup>5</sup>

### 1.5.1.1. *Lepidium* spp.

Rod grbica (*Lepidium*), jedan od najvećih rodova porodice Brassicaceae, sadrži oko 175 različitih vrsta biljaka. Biljke koje pripadaju rodu *Lepidium* rasprostranjene su diljem Zemlje, uglavnom u umjerenim i subtropskim klimama; u tropskim klimama rastu u planinama, dok ih gotovo nema u arktičkim klimama.<sup>20</sup>

Biljke roda *Lepidium* su godišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, a u nekim slučajevima drvenaste, dobro razgranate biljke sa ili bez jednostavnih dlačica. Listovi ovih biljaka su linearni ili eliptični, cijeli, nazubljeni ili perasti. Imaju male, bijele cvjetove, rjeđe žute ili ružičaste. Redukcija u broju cvjetnih organa je poznata kod biljaka roda *Lepidium*, tako da više od pola biljnih vrsta ima samo dva do četiri prašnika, četvrtina biljnih vrsta uopće nema latice, a u većini biljaka cvjetovi su jako maleni i bez mirisa, što promovira samooplodnju (autogamiju). Srebrnkasti plod biljaka ovog roda je karakterističan po tome što ima široku, ravnu kapsulu sabijenu ravnim septumom, a kad sazrije puca po urođenoj slaboj liniji u strukturi, koja služi za izbacivanje sadržaja.<sup>20</sup>

Biljne vrste roda *Lepidium* su poznate po svojoj nutritivnoj vrijednosti i koriste se, među ostalim, kao dodaci prehrani. Popularni dodatak prehrani je i maca (*L. meyenii*), koja spada u tzv. superhranu, odnosno suplemente koji imaju mnogobrojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje. Poznata je još i sjetvena grbica (*L. sativum*), samonikla biljka bogata mineralima i vitaminima, koja se najviše konzumira u svježem stanju, kao salata. Grbica širolistna (*Lepidium latifolium*) je biljka koja se može konzumirati u kuhanom obliku, ali se najčešće upotrebljava kao dodatak prehrani. Neke vrste roda *Lepidium* su poznate i kao trave kotrljarke, odnosno biljke čiji se nadzemni dio u jesen odlomi od korijena i nošen vjetrom se kotrlja preko polja.<sup>20</sup>

## 1.5.2. Porodica Moringaceae

Moringaceae je porodica biljaka sa samo jednim rodom - *Moringa* koji sadrži 13 biljaka. Biljke ove porodice su rasprostranjene u tropskim i suptropskim klimama (u sušnim područjima); rastu na Madagaskaru, u sjeveroistočnoj i jugozapadnoj Africi i Arabiji, a tri vrste su se proširile i u Indiju.<sup>21</sup>

Biljke porodice Moringaceae su drvenaste biljke; grmovi sa krupnim stabljikama ili stabla. S obzirom da preferiraju sušna područja, neke od biljnih vrsta mogu pohraniti velike količine vode u deblima ili imaju podzemni dio koji može podnijeti duga sušna razdoblja. Porodica je prepoznatljiva po spiralno poredanim listovima sa zadebljanjima na bazama koja im omogućavaju kretanje nevezano uz rast. Cvjetovi im izgledaju kao cvjetovi graška, ali se razlikuju u tome što imaju pet prašnika smještenih na jednoj strani cvijeta. Plodovi su im izduženi i sastoje se od tri dijela, a kad sazriju, eksplozivno pucaju otpuštajući pritom sjemenke s krilcima.<sup>21, 22</sup>

Biljne vrste porodice Moringaceae su poznate po svom pozitivnom utjecaju na zdravlje. Listovi, plodovi i korijenje biljke *Moringa oleifera* se mogu konzumirati. Isto tako, prah te biljke koji se u današnje vrijeme uzima za superhranu, se koristi kao dodatak prehrani koji služi za povećanje energije i poboljšanje zdravstvenog stanja. *Moringa drouhardii*, kao i većina drugih biljaka ove porodice, se koristi u medicinske svrhe.<sup>21, 22</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni materijal

#### 2.1.1. *Lepidium graminifolium* L. ssp. *graminifolium*

**Red:** Brassicales Bromhead

**Porodica:** Brassicaceae (krstašice)

**Rod:** *Lepidium* (grbac)

**Vrsta:** *Lepidium graminifolium* L. ssp. *graminifolium*

**Sinonimi:** *Lepidium iberis* L.



**Slika 2.1.** *Lepidium graminifolium* L. ssp. *graminifolium*.<sup>23</sup>

*Lepidium graminifolium* L. ssp. *graminifolium* je višegodišnja biljka koja raste u području Mediterana do Bliskog Istoka. Naraste do 10 cm, a preferira suha i vlažna tla. Dobro raste u kiselim, lužnatim i neutralnim tlima. Cvjeta od lipnja do srpnja, a cvjetovi su dvospolni i oprašuju se insektima. Plodovi sazrijevaju od srpnja do kolovoza. Mladi listovi biljke su jestivi, sirovi ili kuhani, a imaju blago papren okus.<sup>24</sup>

U ovom radu korišteni su na sobnoj temperaturi osušeni korijen i nadzemni dio biljke *L. graminifolium* L. ssp. *graminifolium*. Biljku je sabrao i identificirao botaničar doc. dr. sc. Mirko Ruščić (Prirodoslovno-matematički fakultet u Splitu) 22. listopada 2016. godine na otoku Rabu.



**Slika 2.2.** Osušena biljka *L. graminifolium* L. ssp. *graminifolium*.

### 2.1.2. Grbica širolistna (*Lepidium latifolium* L.)

**Red:** Brassicales Bromhead

**Porodica:** Brassicaceae (krstašice)

**Rod:** *Lepidium* (grbac)

**Vrsta:** *Lepidium latifolium* L.

**Sinonimi:** *Cardaria latifolia* (L.) Spach

**Narodna imena:** grbica širolistna



**Slika 2.3.** Grbica širolistna (*Lepidium latifolium* L.).<sup>25</sup>

Grbica širolistna je razgranata, višegodišnja biljka čije je prirodno stanište južna Europa i zapadna Azija, ali se proširila i na druga područja nakon što je slučajno uvedena kao kontaminant sjemenja drugih biljaka. Biljke rastu iz korijena koji je gust i minimalno razgranat, a nadzemni dio tvori rozetu nekoliko tjedana prije nego što stabljika počne rasti. S porastom biljke, rozeta i bazalni listovi polako odumiru, a cijeli nadzemni dio

počinje odumirati pred kraj ljeta i u ranu jesen. Biljka cvjeta u rano ljeto, a plodovi se razvijaju krajem ljeta i u ranu jesen.<sup>26, 27</sup>

Grane i listovi su voštano sivo-zelene boje bez dlačica, iako ih ponekad mogu imati. Listovi rozete su dugi 30 cm i široki 8 cm s nazubljenim krajevima, a listovi na stabljikama su značajno reducirani. Cvjetovi su gusto skupljeni u terminalne grozdove, a sastoje se od 4 mala ovalna lapa, 4 bijele klinaste latice i 6 tučaka. Plod je okrugla kapsula s jednom, djelomično spljoštenom, crveno-smeđom sjemenkom u svakom odjeljku. Biljka se lako prilagođava različitim ekološkim uvjetima, zbog čega se, u posljednje vrijeme, eksplozivno proširila. Izrazito je kompetitivna, što znači da potiskuje ugrožene vrste. Isto tako, mijenja i ekosistem u kojem raste. Npr., ponaša se kao „solna pumpa“ koja pumpa ione soli duboko iz tla i deponira ih na površinu, što dovodi do promjena u biljnom sastavu i raznolikosti.<sup>26, 27</sup>

*L. latifolium* ima miris i okus po hrenu, a koristi se kao hrana za ljude i životinje. Upotrebljava se i u medicinske svrhe, posebno kao diuretik. Istraživanja su pokazala da je među učinkovitijim herbalnim diureticima. U nekim državama se koristi za liječenje bubrežnih i želučanih bolesti te kod problema s prostatom.<sup>26</sup>

U izradi ovog rada korišteno je osušeno lišće i korijenje kultivirane biljke *L. latifolium* prikupljeno od strane opata u opatiji „Notre Dame de Maylis“, smještene na sjeverozapadu Francuske (grad Maylis). Također, izolirani su i analizirani hlapljivi spojevi iz sadržaja ručno rađenih kapsula „Plante de Maylis“, također iz opatije.



Slika 2.4. Kapsule „Plante de Maylis“ i njihov sadržaj.



### 2.1.3. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.)

**Red:** Brassicales Bromhead

**Porodica:** Brassicaceae (krstašice)

**Rod:** *Lepidium* (grbac)

**Vrsta:** *Lepidium meyenii* Walp.

**Sinonimi:** *Lepidium peruvianum*

**Narodna imena:** maca-maca, maino, ayak chichira, ayak willku



**Slika 2.5.** Gomolj *Lepidium meyenii* Walp.<sup>28</sup>

*L. meyenii* je višegodišnja, nisko rastuća biljka koja raste na ograničenom području u Andama, na nadmorskim visinama od 3500 do 4500 m. Biljka naraste do visine od 10-20 cm, u roku od 8 mjeseci nakon sadnje.<sup>29</sup>

Listovi *L. meyenii* tvore nisko rastući nadzemni dio u obliku rozete, a cvjetovi rastu u obliku grozdova na bazi biljke. Korijenje je tvrdo i pojavljuje se u čitavom rasponu boja, od žute, bijele, crvenkaste, crvene, svijetlo sive, crne do ljubičaste. Korijenje je ujedno i jestivi dio biljke. Biljka je jako otporna i raste na intenzivnom suncu, jakim vjetrovima, te temperaturama ispod nule na izrazito nepovoljnom tlu. Sjeme se sadi na

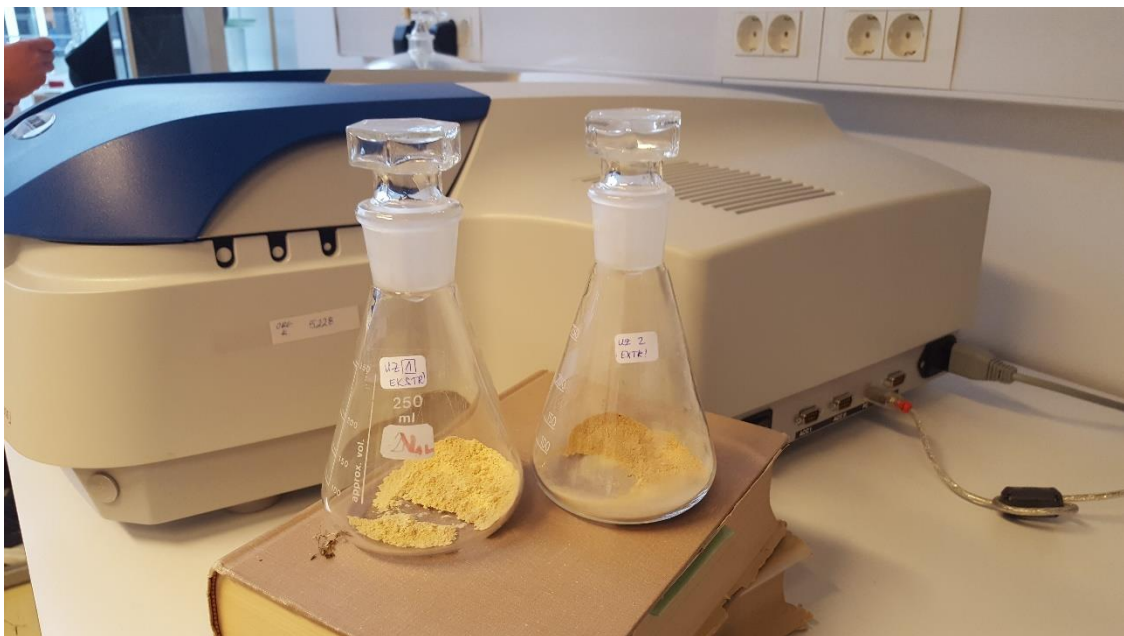
početku kišne sezone (rujan – listopad), a za dozrijevanje je potrebno oko 8 mjeseci. Nakon vađenja, korijenje se suši na suncu 10-15 dana, s tim da se noću pokriva kako bi se spriječio doticaj s kišom ili oštećenje ledom.<sup>29</sup>

Maca se već stoljećima u Andama koristi za prehranu i povećanje plodnosti kod ljudi i životinja. Izrazito je bogata aminokiselinama, vitaminima i mineralima pa se u današnje vrijeme naziva i superhranom. Smatra se i adaptogenom, odnosno podržava i doprinosi zdravlju i snazi organizma. Pripisuje joj se i pomoć kod balansiranja hormona, kao što su hormoni štitnjače, ali i poboljšanje imuniteta.<sup>29</sup>

U izradi ovog rada korišten je komercijalno dostupan maca prah dvaju različitih proizvođača:

- ORGONA superfood maca prah, kupljen u Bio&bio trgovini, zemlja podrijetla: Peru
- Bio&bio SUPERFOODS maca prah, kupljen u Bio&bio trgovini, zemlja podrijetla: Peru

NAPOMENA: maca prah ORGONA superfood izgledom je bio svjetliji od Bio&bio SUPERFOODS praha.



**Slika 2.6.** Maca prahovi pripremljeni za izolaciju.  
(lijevo: ORGONA superfoods, desno Bio&bio SUPERFOODS)

#### 2.1.4. Sjetvena grbica (*Lepidium sativum* L.)

**Red:** Brassicales Bromhead

**Porodica:** Brassicaceae (krstašice)

**Rod:** *Lepidium* (grbac)

**Vrsta:** *Lepidium sativum* L.

**Sinonimi:** *Nasturtium crispum* Medik.

**Narodna imena:** sjetvena grbica, bobovnjak vrtni, garbać vrtni, grbak vrtni, kres pitomi, kreša, cress salad



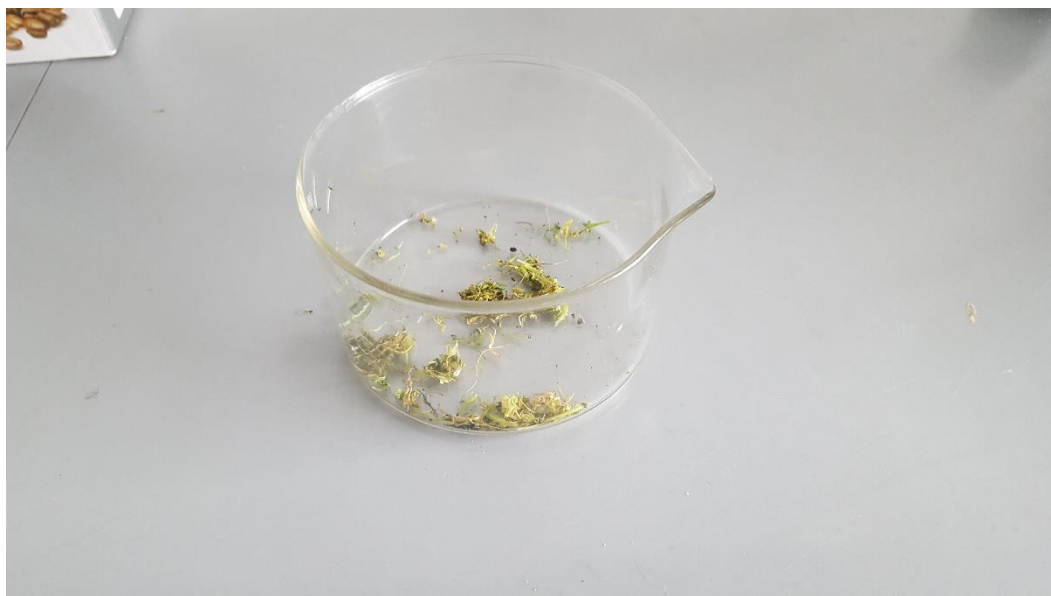
**Slika 2.7.** *Lepidium sativum* L.<sup>30</sup>

Sjetvena grbica ili kres salata (*L. sativum* L.) je jednogodišnja biljka porijeklom iz jugozapadne Azije, koja se proširila na Europu, Sjevernu i Južnu Ameriku i Australiju. Koristi se u ljudskoj prehrani pa se uzgaja, ali raste i samoniklo uz ceste, rijeke i na travnjacima.<sup>31</sup>

Stabljika *L. sativum* je uspravna, tanka i u gornjem dijelu razgranata, a naraste do 60 cm visine. Listovi su nepravilno perasti, a čine ih brojni uski, svijetlozelene listići raznih oblika koji se razvijaju u rozetu promjera 15-20 cm. Biljka cvate od svibnja do srpnja, a cvjetovi su dvospolni, sitni, bijeli ili svijetloružičasti i skupljeni u grozdove na vrhu stabljika. Plodovi su komuške koje sadrže sitne, svijetlosmeđe sjemenke.<sup>31, 32</sup>

Uzgaja se kao jestiva biljka, a najčešće se u prehrani koriste klice. Mladi, nadzemni dijelovi biljke su jestivi, blago ljutkastog okusa i beru se prije cvatnje. Sjemenke se mogu koristiti kao začini. Bogat je izvor minerala i vitamina<sup>32</sup> te povoljno utječe na zdravlje. Poznato je da otvara apetit, a sadrži i neke tvari s antibiotskim djelovanjem.<sup>31</sup>

*L. sativum* korišten u eksperimentalnom dijelu ovog rada uzgojen je od strane izv. prof. dr. sc. Sandre Svilović, a ubran je 18. svibnja 2017. godine. Za izolaciju je korišten svježiji biljni materijal.



**Slika 2.8.** *L. sativum* – uzorak za destilaciju.

### 2.1.5. Konjska rotkvica (*Moringa oleifera* Lam.)

**Red:** Brassicales Bromhead

**Porodica:** Moringaceae

**Rod:** *Moringa*

**Vrsta:** *Moringa oleifera* Lam.

**Sinonimi:** *M. pterygosperma* Gaertn.

**Narodna imena:** konjska rotkvica



Slika 2.9. *Moringa oleifera* Lam.<sup>33</sup>

*M. oleifera* je najpoznatija i najrasprostranjenija vrsta porodice *Moringaceae*, koja se može pronaći divlja i kultivirana. Rasprostranjena u tropima i subtropima, autohtona je vrsta Indije, Pakistana, Afrike i Arabije. Drvo naraste do visine od 5 do 10 m, a izvrsno raste u vlažnim i sušnim područjima; može preživjeti u područjima s osiromašenim tlom i suša ima jako mali utjecaj na njega.<sup>34</sup>

*M. oleifera* je vrlo važna prehrambena namirnica u tropima. Plodovi, listovi i cvijeće se koriste kao visoko nutritivne namirnice, posebno u Indiji. Listovi su izvrstan izvor vitamina C, minerala i antioksidanata. Važna je i medicinska primjena ove vrste. Skoro svi dijelovi: korijen, kora, deblo, listovi, sjemenje i ulje sjemenki, voće i cvijeće se koriste za liječenje određenih bolesti u narodnoj medicini na jugu Azije. *M. oleifera* pokazuje antikancerogena, antibakterijska, antivirusna, antifungalna, antihipertenzivna, antidijabetička i dr. svojstva, primjenjuje se za liječenje upala, infekcija, gastrointestinalnih, hepatorenalnih, kardiovaskularnih i hematoloških bolesti. Osim medicinskih primjena, ova biljka ima i važnu ulogu u pročišćavanju vode. Naime, sušene sjemenke služe kao prirodni koagulanti u procesu pročišćavanja.<sup>34</sup>

U ovom radu korištena je komercijalno dostupna Encian Superfoods Bio Moringa u prahu, podrijetlom iz Indije.



**Slika 2.10.** Moringa u prahu.

## 2.2. Izolacija hlapljivih spojeva

### 2.2.1. Izolacija hlapljivih spojeva destilacijom

#### 2.2.1.1. Kemikalije i aparatura

##### **Kemikalije:**

- dietil-eter: dietil eter stabiliziran s 6 ppm BHT, Panreac, Španjolska
- pentan: Pentan p.a., lach:ner (Lach-ner), Češka
- bezvodni Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: AnalR Normapur, VWR (International), Pennsylvania, SAD
- destilirana voda (pripravljena u destilatoru Boeco WS 4000, Njemačka)

##### **Aparatura:**

- mlinac za kavu: Sencor, Japan
- tehnička vaga KERN 572: KERN & SOHN GmbH, Njemačka
- tikvice s okruglim dnom različitih volumena (2 L, 1 L, 500 mL, 200 mL)
- modificirani nastavci po Clevengeru
- kuglasta hladila
- kalote za zagrijavanje (Thermo 2000)
- staklene čaše
- bočice

#### 2.2.1.2. *Lepidium graminifolium*

Prije početka destilacije, korijen je odvojen od nadzemnog dijela biljke. I korijen i nadzemni dio biljke su nasjeckani na manje komade, a zatim usitnjeni u mlincu za kavu. Po dva uzorka korijena ( $m_1 = m_2 = 20$  g) i nadzemnog dijela ( $m_1 = 138.53$  g;  $m_2 = 137.13$  g) su stavljena u tikvice volumena 2 L, 1 L i 500 mL, koje su nadopunjene destiliranom vodom do pola. Na tikvice su postavljeni modificirani nastavci po Clevengeru koji su napunjeni destiliranom vodom dok se voda nije počela prelijevati, a nakon toga se dodao i trap. Trap služi za skupljanje isparljivih spojeva, u slučaju njihove male koncentracije.

Kao trap je poslužila smjesa pentana i dietil-etera u omjeru 3:1 (7.5 mL pentana i 2.5 mL dietil-etera). Na nastavke su postavljena kuglasta hladila, a dvije aparature su serijski spojene gumenim crijevima. Smjese su zagrijavane kalotama i destilirale 2.5 h od početka destilacije (kad padne prva kap). Po završetku destilacije, trap je izvađen pipetom s vrha modificiranog nastavka po Clevengeru, a aparatura je ispirana pentanom kako bi se pokupili zaostali spojevi. Trap s hlapljivim spojevima je prenesen u suhu čašu u koju se stavilo malo bezvodnog  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Na kraju je odekantiran u bočice i spremljen u zamrzivač do analize.

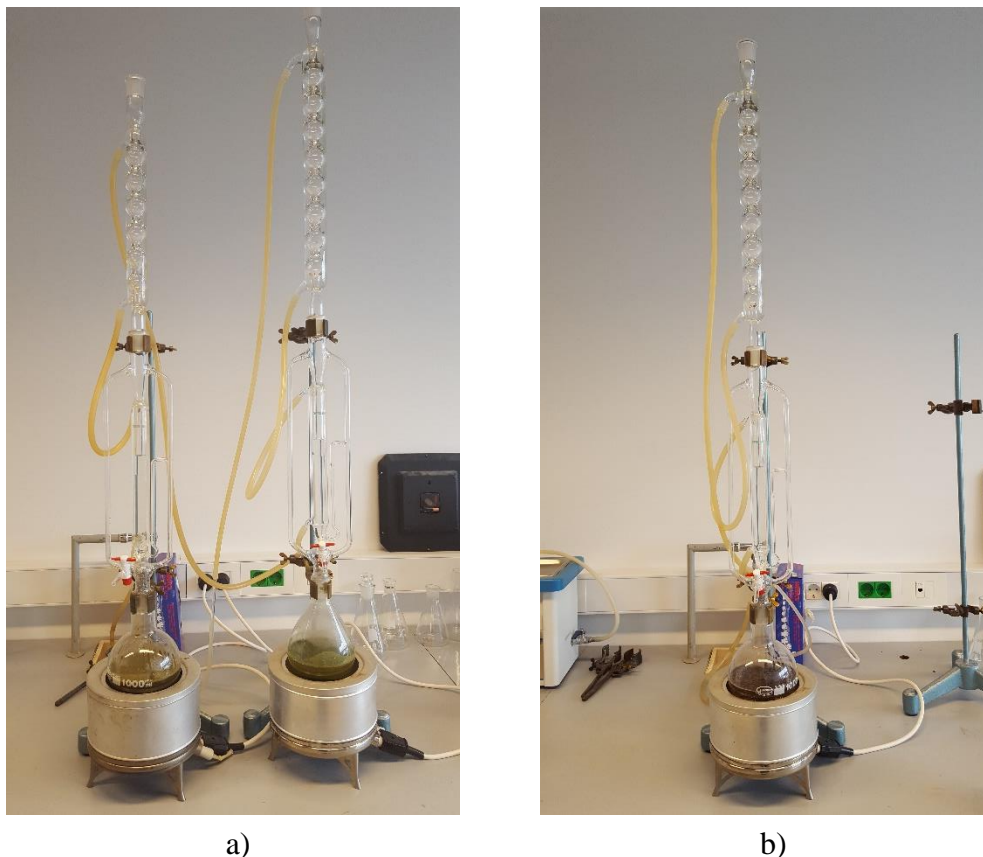


**Slika 2.11.** Hidrodestilacija korijena i nadzemnog dijela biljke *L. graminifolium*.



### 2.2.1.3. *Lepidium latifolium*

Prije početka destilacije je izvađen sadržaj iz kapsula, a lišće i korijen biljke su nasjeckani, dodatno usitnjeni u tarioniku i samljeveni u mlincu za kavu. Uzorci kapsula ( $m = 17.9$  g), korijena ( $m = 13.82$  g) i lišća ( $m = 24.39$  g) su stavljeni u tikvice volumena 1 L, koje su nadopunjene destiliranom vodom do pola. Kao trap korištena je smjesa pentana i dietil-etera u omjeru 3:1 (6 mL pentana i 2 mL dietil-etera).



**Slika 2.12.** Hidrodestilacija a) lišća i sadržaja kapsula i b) korijena *L. latifolium*.

### 2.2.1.4. *Lepidium meyenii*

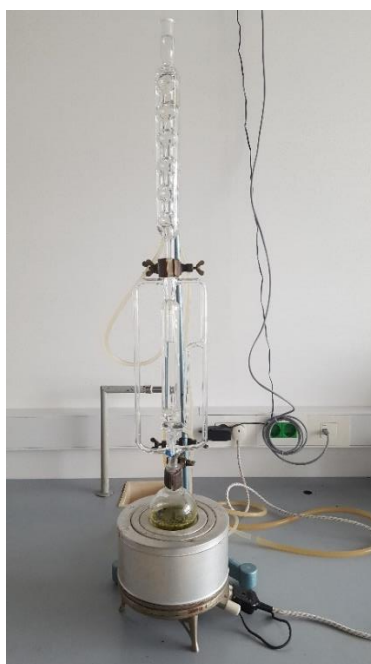
Uzorci maca praha ( $m_1 = 52.69$  g i  $m_2 = 52.68$  g) stavljeni su u tikvice volumena 2 L, koje su nadopunjene destiliranom vodom do pola. Kao trap korištena je smjesa pentana i dietil-etera u omjeru 3:1, gdje je volumen pentana iznosio 7.5 mL, a dietil-etera 2.5 mL.



**Slika 2.13.** Hidrodestilacija *L. meyenii*.

#### **2.2.1.5. *Lepidium sativum***

Uzorak biljke *L. sativum* ( $m = 1.61$  g) prenesen je u tikvicu volumena 250 mL, koja je nadopunjena destiliranom vodom do pola. Smjesa je destilirana 2.5 h, a kao trap je korištena smjesa pentana i dietil-etera u omjeru 3:1 ( $V_{\text{pentan}} = 3$  mL;  $V_{\text{dietil-eter}} = 1$  mL).



**Slika 2.14.** Hidrodestilacija *L. sativum*.

### 2.2.1.6. *Moringa oleifera*

Uzorak biljke *M. oleifera* ( $m = 90.02 \text{ g}$ ) stavljen je u tikvicu od 2 L, koja je nadopunjena destiliranom vodom do pola. Destilacija je vršena 2.5 h, a kao trap je korištena smjesa koja se je sastojala od 6 mL pentana i 2 mL dietil-etera.



Slika 2.15. Hidrodestilacija praha biljke *M. oleifera*.

## 2.2.2. Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom

### 2.2.2.1. Kemikalije i aparatura

#### Kemikalije:

- enzim tioglukozidaza: mirozinaza izolirana iz sjemenja bijele gorušice (*Sinapis alba*), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Njemačka
- diklormetan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): diklormetan stabiliziran s 2-metilbutenom, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska

- natrijev klorid (NaCl): NaCl p.a., T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- bezvodni Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: AnalR Normapur, VWR (International), Pennsylvania, SAD
- destilirana voda (pripravljena u destilatoru Boeco WS 4000, Njemačka)

#### Aparatura:

- analitička vaga KERN ABJ: KERN & SOHN GmbH, Njemačka
- ultrazvučna kupelj
- potresajuća vodena kupelj Julabo SW22: Julabo GmbH, Njemačka
- tresilica Tehnica VIBROMIX 314 EVT
- aparature za ekstrakciju (lijevak, lijevak za odjeljivanje)
- čaše i bočice
- uređaj za uparavanje strujom dušika Techne Dri-Block DB100/3

**Tablica 2.1.** Mase pojedinih uzoraka korištene za ekstrakciju.

UZORAK	Muzorka / g
<i>L. latifolium</i> (kapsule)	5.06
<i>L. latifolium</i> (lišće)	5.03
<i>L. latifolium</i> (korijen)	5.02
<i>L. graminifolium</i> (uzorak 1)	5.01
<i>L. graminifolium</i> (uzorak 2)	5.05
<i>L. graminifolium</i> (korijen)	10.00
<i>L. meyenii</i> (uzorak 1)	5.03
<i>L. meyenii</i> (uzorak 2)	5.02
<i>L. sativum</i>	0.67
<i>M. oleifera</i>	10.18

### 2.2.2.2. Autoliza

Prije ekstrakcije, uzorci su stavljeni na autolizu. Uzorci odgovarajućih masa (Tablica 2) su stavljeni u tikvice u koje je dodana mala količina destilirane vode i alikvot otopine enzima mirozinaze. Otopina enzima za uzorke *L. sativum* i *M. oleifera* je pripravljena otapanjem 0,0023 g enzima u 5 mL destilirane vode uz pomoć ultrazvučne kupelji. Alikvot od 2,5 mL je prenesen u svaku tikvicu. Za ostale uzorke otopina enzima je pripravljena otapanjem 0,0056 g enzima u 20 mL destilirane vode uz pomoć ultrazvučne kupelji, a u svaku tikvicu stavljen je alikvot od 1 mL (osim u uzorak korijena *L. graminifolium* gdje su stavljeni dva alikvota). Na tako pripravljene tikvice su stavljeni čepovi koji su učvršćeni parafilmom, kako bi se spriječio gubitak nastalih hlapljivih spojeva. Tikvice su postavljene u potresujuću vodenu kupelj na temperaturu 27 °C ( $\pm$  2°C) na 24 h. Za *L. sativum* i *M. oleifera* temperatura je iznosila 37°C ( $\pm$  2 °C).

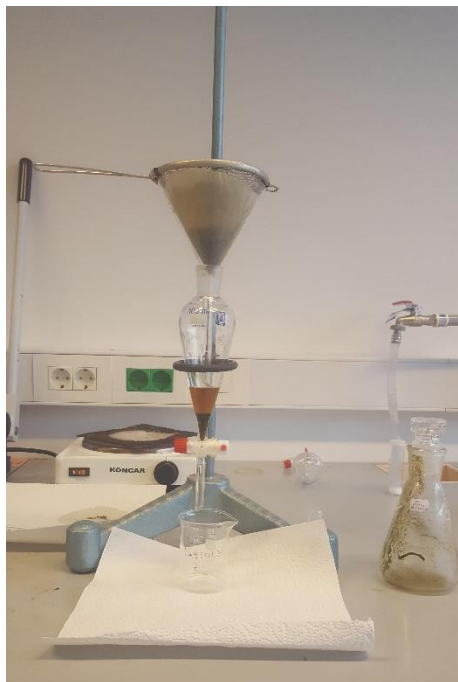


**Slika 2.16.** Vodena kupelj Julabo SW22.

### 2.2.2.3. Ekstrakcija hlapljivih spojeva

Po završetku autolize, u svaki uzorak je dodano po 10 mL organskog otapala (diklormetan). Uzorci u tikvici, omotani parafilmom, su stavljeni na tresilicu oko 10 minuta. Po završetku, sadržaj tikvica je profiltriran preko cjediljke (ovisno o finoći materijala) i filter papira u ljevak za odjeljivanje. Sadržaj lijevka za odjeljivanje je promućkan, a donji sloj je, nakon odvajanja, odliven u čašu u koju je stavljen bezvodni natrijev sulfat za adsorpciju zaostale vode. Biljni materijal se dodatno ispiri s malom

količinom diklormetana, a postupak odjeljivanja se ponavlja. Odvojeni ekstrakti se spremaju u bočice koje se čuvaju u hladnjaku do analize.



a)



b)

**Slika 2.17.** Ekstrakcija hlapljivih spojeva iz uzorka a) *L. latifolium* i b) *L. sativum*.

### 2.2.3. GC-MS analiza hlapljivih spojeva

Prije same analize, svi ekstrakti su podvrgnuti uparavanju u struji dušika pri pri temperaturama vrenja otapala, kako bi se minimalizirao gubitak hlapljivih spojeva.



**Slika 2.18.** Uparavanje strujom dušika.

Hlapljivi spojevi koji su izolirani iz određenih dijelova biljaka roda *Lepidium* i biljke *M. oleifera* analizirani su vezanim sustavom GC-MS proizvođača Varian Inc., Lake Forest, CA, SAD, model 3900 u kombinaciji sa spektrometrom masa proizvođača Varian Inc. model 2100 T. Svi uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., gdje je debljina sloja stacionarne faze 0.25 μm).<sup>19</sup>

Kao plin nositelj korišten je helij protoka 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura injektora iznosila je 250 °C, injekcijski volumen 1 μL, a omjer cijepanja 1:20. Temperatura kolone programirana je na sljedeći način: 3 minute pri 60 °C, a zatim slijedi zagrijavanje od 60 do 246 °C brzinom 3 °C/min i na kraju, 25 minuta izotermno pri 246 °C. Uvjeti spektrometra masa: energija ionizacije 70 eV; temperatura izvora iona 200 °C; područje skeniranja 40 - 350 masenih jedinica.<sup>19</sup>

Identifikacija pojedinačnih, nepoznatih spojeva napravljena je usporedbom dobivenih spektara masa tih spojeva sa spektrima masa iz komercijalne biblioteke spektara masa (Wiley MS library) i usporedbom sa spektrima masa dostupnih u literaturi.



**Slika 2.19.** Vezani sustav plinska kromatografija- spektrometar masa (GC-MS) korišten za identifikaciju hlapljivih spojeva.

#### 2.2.4. FTIR

Infracrveni transmisijski spektri su dobiveni na instrumentu IRAffinity-1 spektrofotometar, tvrtke Shimadzu, Japan. Spektri su snimljeni korištenjem KBr transmisijske ćelije, duljine puta 0,1 mm, s 16 snimanja svakog uzorka rezolucijom od  $4\text{ cm}^{-1}$ , u spektralnom području od  $4000\text{ do }400\text{ cm}^{-1}$ .



**Slika 2.20.** Infracrveni spektrofotometar s Fourirerovom transformacijom (IRAffinity-1, Shimadzu, Japan).



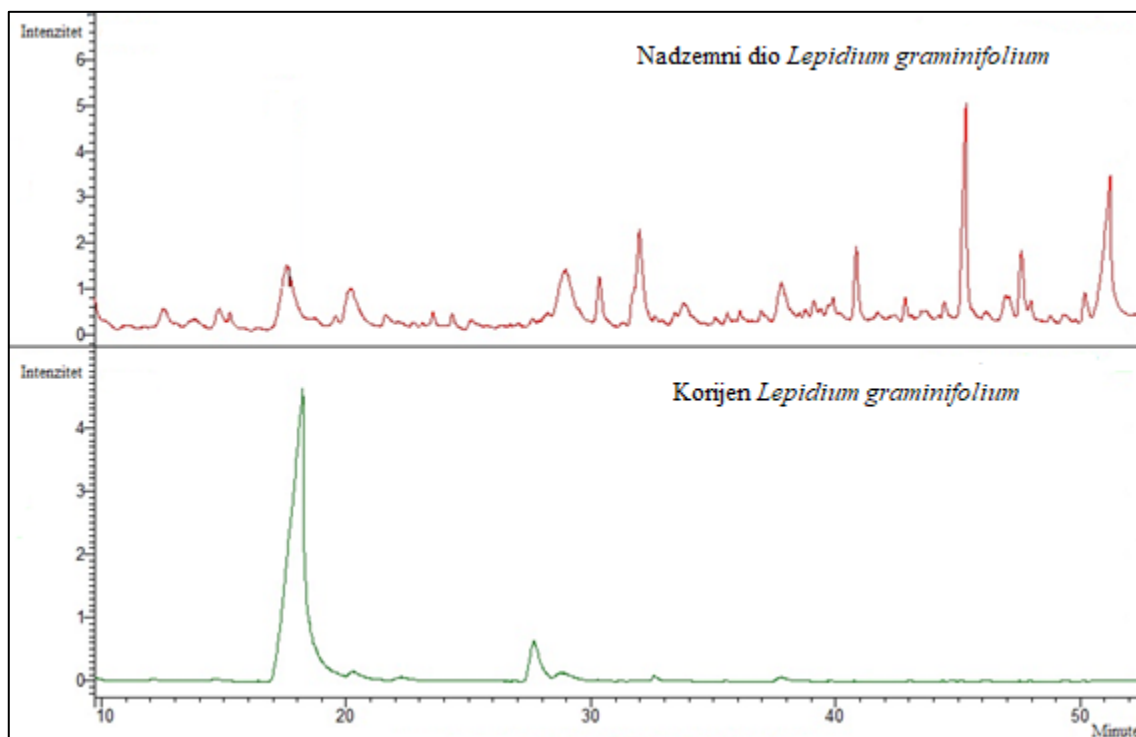
## 3. REZULTATI I RASPRAVA

### 3.1. *Lepidium* spp.

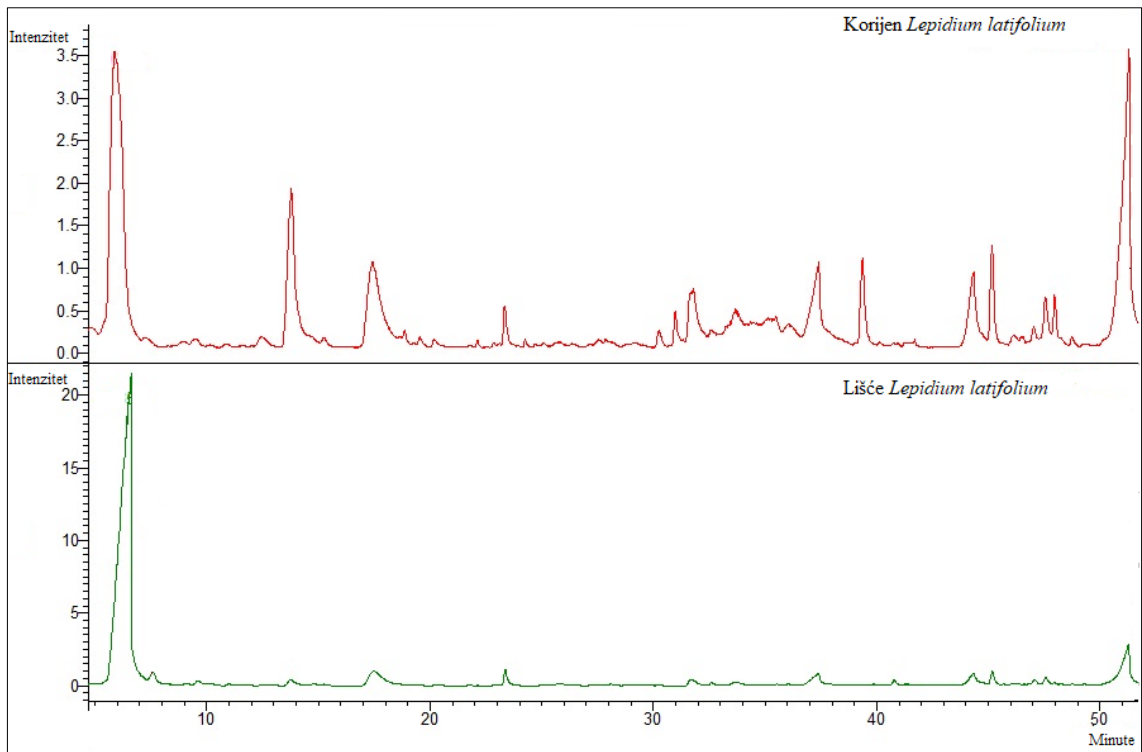
#### 3.1.1. Analiza destilata

Uzorci dobiveni termičkom hidrolizom analizirani su vezanim sustavom GC-MS i na taj način su dobiveni kromatogrami ukupne ionske struje za svaki uzorak (**Slika 3.1.** – **Slika 3.4.**). Analizom kromatograma dobiveni su: vremena zadržavanja svake komponente od interesa, relativni udjeli pojedinih komponenti izraženi u postocima te nazivi spojeva čiji su spektri masa najbliži spektrima masa nepoznatih komponenti.

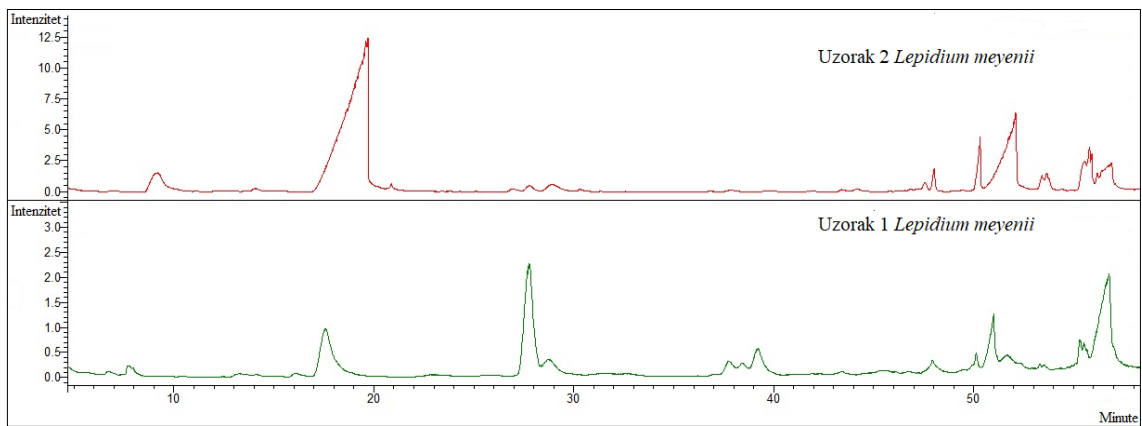
Razgradni produkti glukozinolata koji su uspješno identificirani usporedbom spektara masa pojedinih komponenti sa spektrima masa iz biblioteke po Wiley-u te glukozinolati od kojih potječu su prikazani u **Tablici 3.1.** U **Tablici 3.2.** su prikazani hlapljivi sumporovi spojevi koji u biljci nisu glukozinolatno vezani.



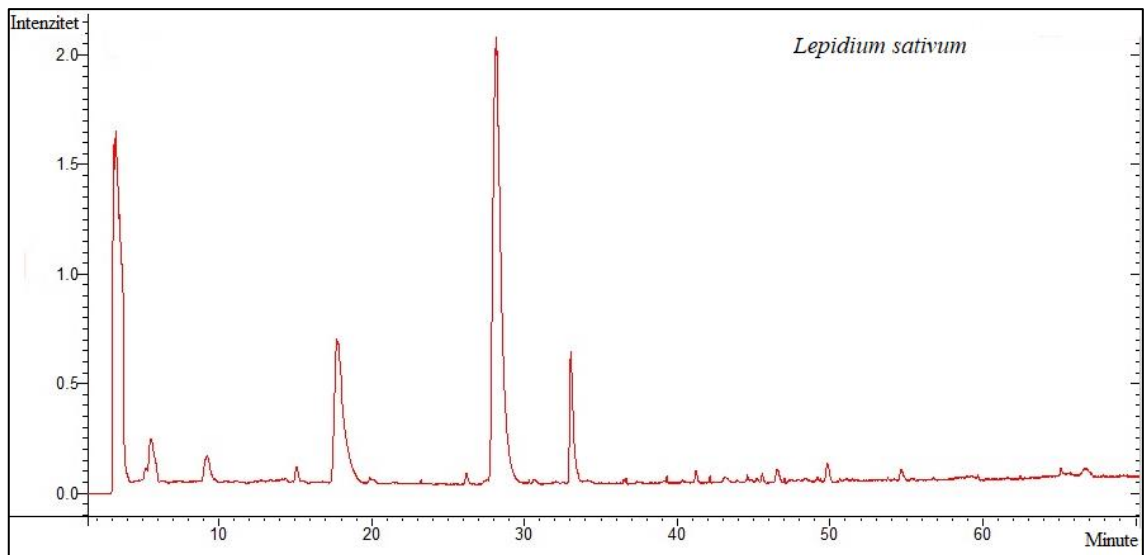
**Slika 3.1.** Kromatogram ukupne ionske struje destilata nadzemnog dijela i korijena *L. graminifolium*.



**Slika 3.2.** Kromatogrami ukupne ionske struje destilata korijena i lišća *L. latifolium*.



**Slika 3.3.** Kromatogram ukupne ionske struje destilata *L. meyenii*.



**Slika 3.4.** Kromatogram ukupne ionske struje destilata *L. sativum*.

**Tablica 3.1.** GC-MS analiza razgradnih produkata u destilatima biljaka roda *Lepidium*.

Biljna vrsta/ dio biljke	Glukozinolat/ identificirani produkt razgradnje	Vrijeme zadržavanja (min)	Maseni udio (%)
<b><i>L. graminifolium</i></b>			
KORIJEN	<b>Glukotropeolin</b>		
	Fenilacetonitril	17.52	6.0
	Benzil-izotiocijanat	27.60	0.4
	<b>Glukonasturcin</b>		
	Fenilpropanonitril	22.50	0.6
	2-Feniletil-izotiocijanat	31.96	0.4
	<b>Glukolimnantin</b>		
	3-Metoksifenilacetonitril	28.99	5.8
	3-Metoksibenzil-izotiocijanat	37.80	3.3
	<b>Glukotropeolin</b>		
NADZEMNI DIO	Fenilacetonitril	17.52	6.0
	Benzil-izotiocijanat	27.60	0.4
	<b>Glukolimnantin</b>		
	3-Metoksifenilacetonitril	28.99	5.8
	3-Metoksibenzil-izotiocijanat	37.80	3.3
<b><i>L. latifolium</i></b>			
KORIJEN	<b>Sinigrin</b>		
	Alil-izotiocijanat	6.54	17.9
	<b>Glukokohlearin</b>		
	<i>sec</i> -Butil-izotiocijanat	7.58	0.4
	<b>Glukotropeolin</b>		
	Fenilacetonitril	17.52	6.7
	Benzil-izotiocijanat	27.60	Tr
LIŠĆE	<b>Sinigrin</b>		
	Alil-izotiocijanat	6.54	65.6
	<b>Glukokohlearin</b>		
	<i>sec</i> -Butil-izotiocijanat	7.58	0.3

	<b>Glukotropeolin</b>		
	Fenilacetonitril	17.52	4.3
	Benzil-izotiocijanat	27.60	Tr
<b><i>L. meyenii</i></b>			
	<b>Glukotropeolin</b>		
KORIJEN	Fenilacetonitril	17.52	54.4
	Benzil-izotiocijanat	27.60	0.8
	<b>Glukolimnantin</b>		
	3-Metoksifenilacetonitril	28.99	1.5
<b><i>L. sativum</i></b>			
	<b>Fenil glukozinolat</b>		
	Fenil-izotiocijanat	20.26	0.06
	<b>Glukotropeolin</b>		
	Fenilacetonitril	17.52	11.3
	Benzil-izotiocijanat	27.60	31.1

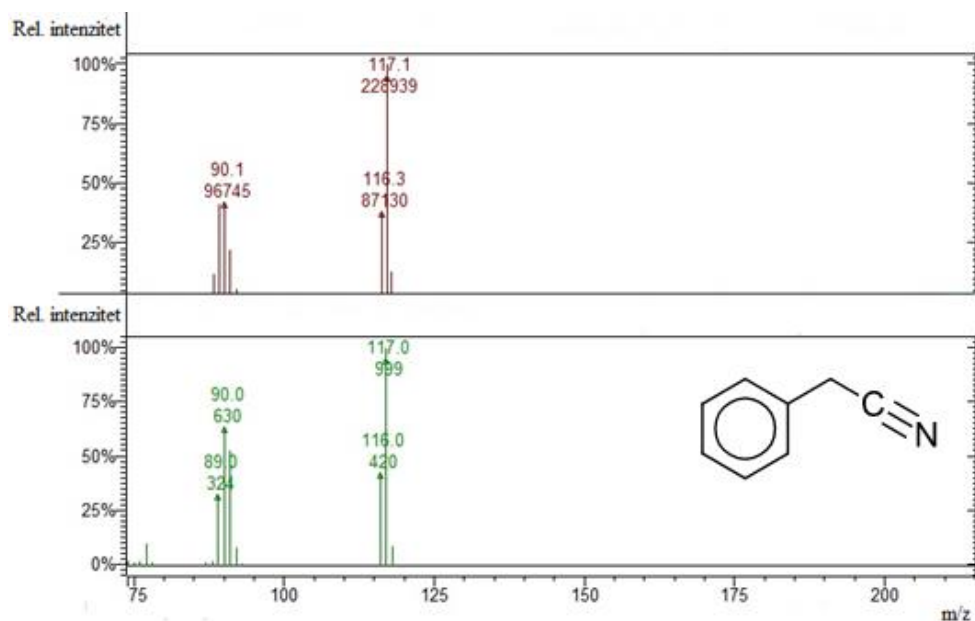
\*Tr - u tragovima

**Tablica 3.2.** GC-MS analiza hlapljivih sumporovih spojeva neglukozinolatnog podrijetla.

Biljna vrsta/ dio biljke	Hlapljivi sumporov spoj	Vrijeme zadržavanja (min)	Maseni udio (%)
<b><i>L. sativum</i></b>			
	Diizopropil disulfid	11.22	0.02

Cilj ovog rada je bio ispitivanje sastava hlapljivih sumporovih spojeva izabranih biljaka roda *Lepidium* (*L. graminifolium*, *L. latifolium*, *L. meyenii* i *L. sativum*). Naglasak je bio na indirektnom ispitivanju njihova glukozinolatnog sastava određivanjem sastava i udjela njihovih razgradnih produkata, od kojih se neki svrstavaju u hlapljive sumporove spojeve. Hlapljivi spojevi su izolirani iz odabranih dijelova biljaka (korijena, nadzemnog dijela, lišća te praha iz komercijalne upotrebe) hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. Analiza destilata provedena je GC-MS tehnikom. Identificirani razgradni produkti glukozinolata, kao i njihovi prekursori, navedeni su u **Tablici 3.1.**, a u **Tablici 3.2.** su navedeni identificirani hlapljivi sumporovi spojevi koji nisu glukozinolatnog podrijetla.

Analiza kromatograma ukupne ionske struje za destilat korijena biljke *L. graminifolium*, i identifikacija pikova od interesa, pokazala je da je u destilatu najzastupljeniji spoj fenilacetonitril s masenim udjelom od 6.0 %. Na **Slici 3.5.** je prikazan maseni spektar fenilacetonitrila (zelenom bojom je označen spektar iz biblioteke po Wiley-u).



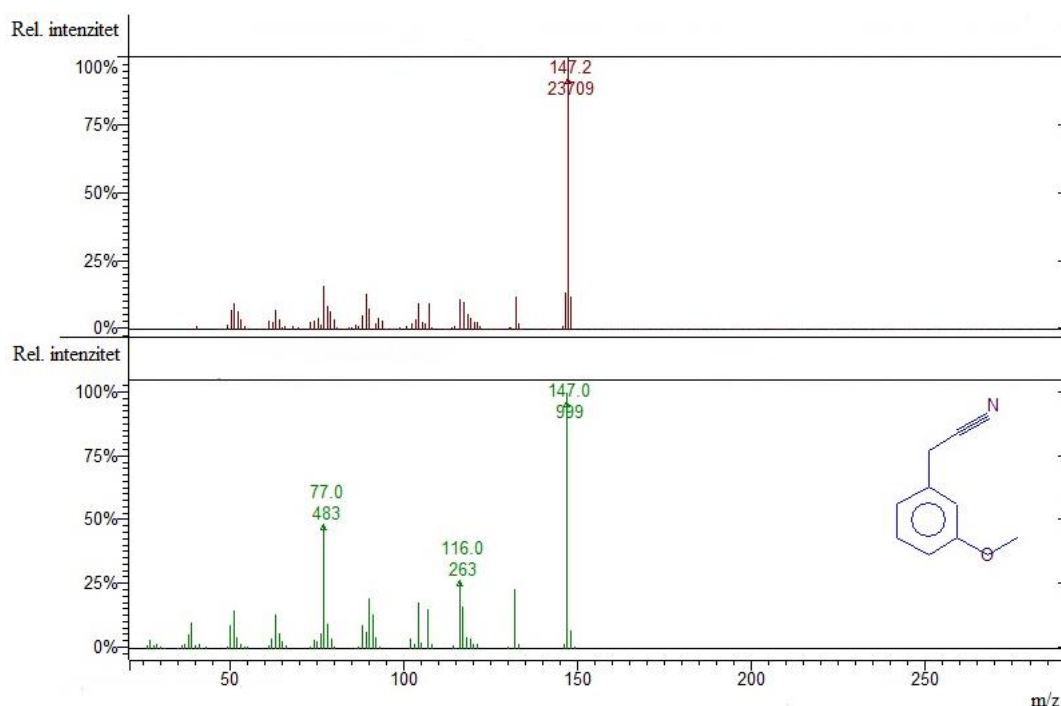
**Slika 3.5.** Spektar masa fenilacetonitrila, razgradnog produkta glukotropeolina.

Na spektru masa je fenilacetonitrila vidljiv je molekularni ion, što je uobičajeno za spektre aromatskih nitrila, ali i izotiocijanata. Sukladno s „dušikovim pravilom“ za spojeve s neparnim brojem atoma dušika, molekularni ion ima neparnu masu ( $m/z = 117$ ). Molekularni ion ujedno je i osnovni ion, što se može objasniti činjenicom da je nastali

molekulski ion stabiliziran rezonancijom. Budući da kod alkil-aromatskih spojeva dolazi do kidanje  $\beta$  – veze u odnosu na aromatski prsten pri čemu dolazi do stvaranja veoma stabilnog tropilijevog iona, uočljiv je i pik pri  $m/z = 90(91)$ .

Budući da je fenilacetonitril razgradni produkt benzil glukozinolata (glukotropeolin, **Slika 1.3.**), može se zaključiti da je glukotropeolin najzastupljeniji glukozinolat u korijenu biljke *L. graminifolium*. Osim benzenacetonitrila, u destilatu je identificiran benzil-izotiocijanat (masenog udjela 0.4 %), kao drugi razgradni produkt glukotropeolina.

Nakon fenilacetonitrila, spoj s najvećim udjelom u destilatu korijena *L. graminifolium* je 3-metoksifenilacetonitril masenog udjela 5.8 %, koji je razgradni produkt 3-metoksibenzil glukozinolata (glukolimnatin, **Slika 1.3.**). Maseni spektar 3-metoksifenilacetonitrila prikazan je na **Slici 3.6.** Kao razgradni produkt glukolimnatina, identificiran je i 3-metoksibenzil-izotiocijanat, čiji je maseni udio u destilatu iznosio 3.3 %.

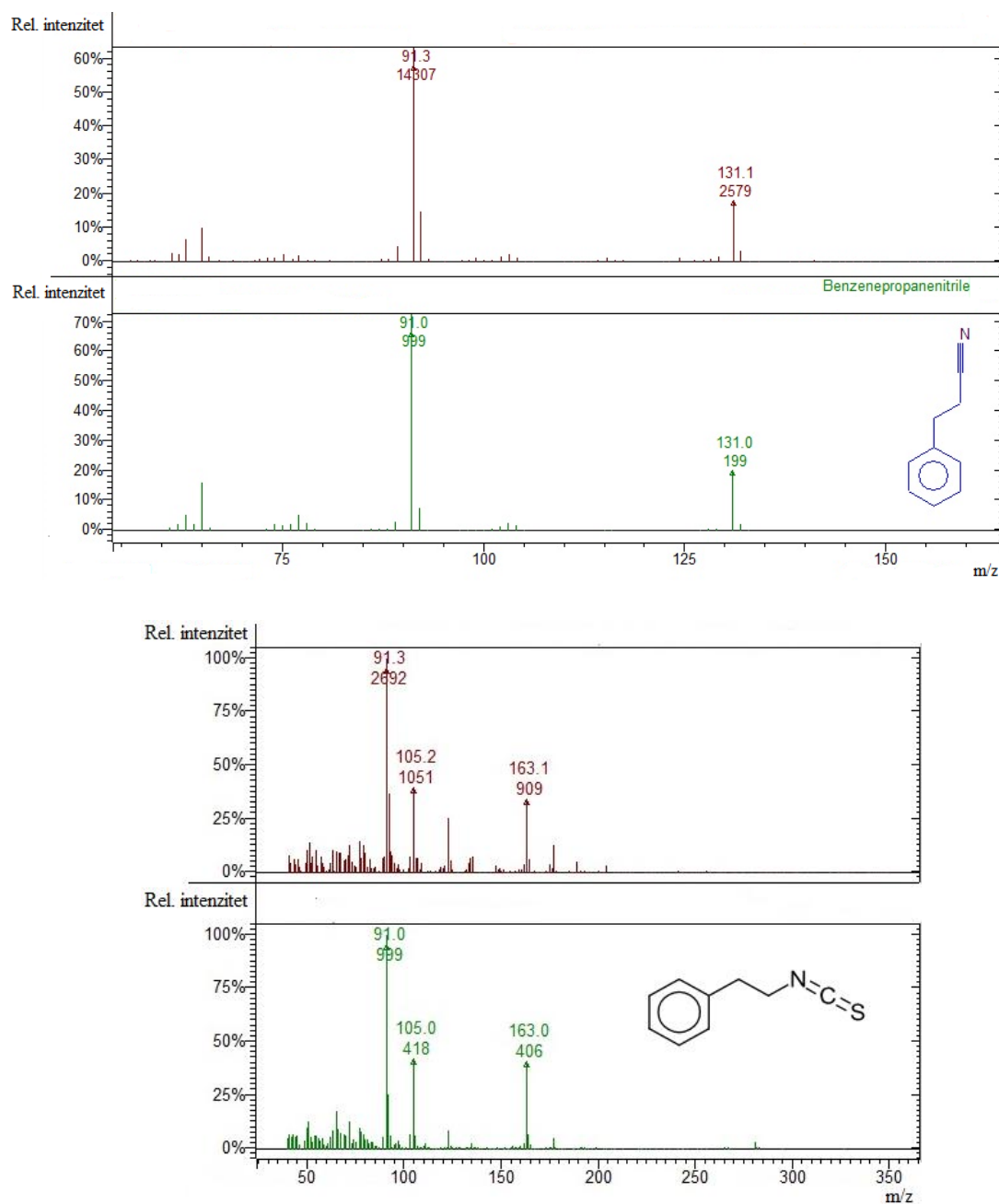


**Slika 3.6.** Maseni spektar 3-metoksifenilacetonitrila, razgradnog produkta glukolimnatina.

Na spektru 3-metoksifenilacetonitrila uočljiv je molekulski ion ( $m/z = 147$ ), koji je neparan zbog jednog atoma dušika u strukturi. Molekulski ion je ujedno i osnovni ion, što je vjerojatno posljedica rezonancije unutar molekulskog iona. Osim molekulskog

iona, na spektru je uočljiv i ion  $m/z = 116$ , koji vjerojatno potječe od gubitka metoksi-skupine ( $\Delta m = 31$ ). Vidljiv je i pik  $m/z = 77$ , koji potječe od iona  $C_6H_5^+$  i dobar je indikator benzenskog prstena.

U destilatu korijena *L. graminifolium* identificirani su još i fenilpropanonitril (maseni udio 0.6 %) i 2-feniletil-izotiocijanat, čiji je maseni udio iznosio 0.4 %. Oba spoja su razgradni produkti 2-feniletil glukozinolata (glukonasturcin, **Slika 1.5.**). Maseni spektri fenilpropanonitrila i 2-feniletil-izotiocijanata prikazani su na **Slici 3.7.**

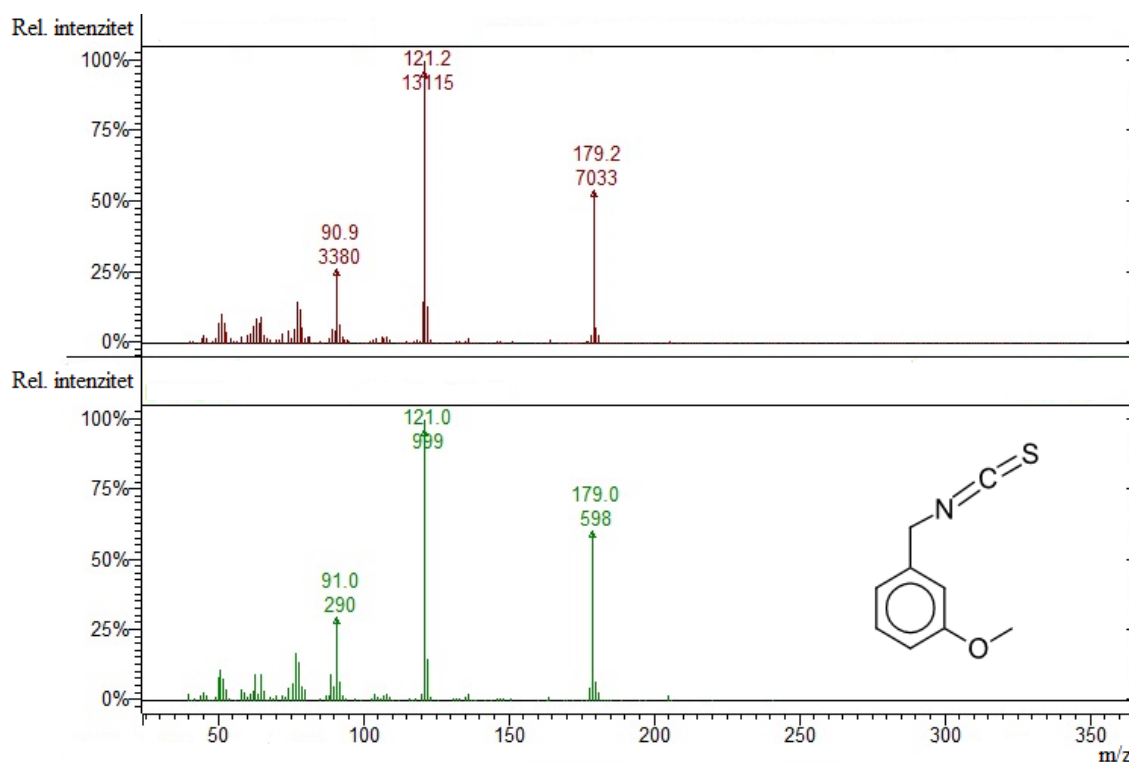


**Slika 3.7.** Spektri masa fenilpropanonitrila i 2-feniletil-izotiocijanata, razgradnih produkata glukonasturcina.



Molekulski ion na spektru masa za 2-feniletilizotiocijanat je vidljiv i ima neparnu masu ( $m/z = 163$ ), budući da molekula u strukturi sadrži jedan atom dušika. Osnovni ion je  $C_7H_7^+$  (tropilium ion,  $m/z = 91$ ), što je karakteristika za alkil-supstituiranih aromatskih spojeva.<sup>5</sup> Na spektru je uočljiv i ion  $m/z = 105$ , koji potječe od gubitka  $NCS^{\cdot}$  ( $m/z = 58$ ).

Analizom destilata nadzemnog dijela *L. graminifolium* utvrđeno je da su najzastupljeniji razgradni produkti glukozinolata fenilacetonitril i 3-metoksifenilacetonitril masenih udjela, redom, 6.0 % i 5.8 %. Kao razgradni produkt glukotropeolina, osim fenilacetonitrila, identificiran je i benzil-izotiocijanat masenog udjela 0.4 %. A kao razgradni produkt glukolimnantina, uz 3-metoksifenilacetonitril, identificiran je i 3-metoksibenzil-izotiocijanat (maseni udio 3.3 %), čiji je maseni spektar prikazan na **Slici 3.8**. Za razliku od destilata korijena, u destilatu nadzemnog dijela *L. graminifolium* nije identificiran nijedan razgradni produkt glukonasturcina.

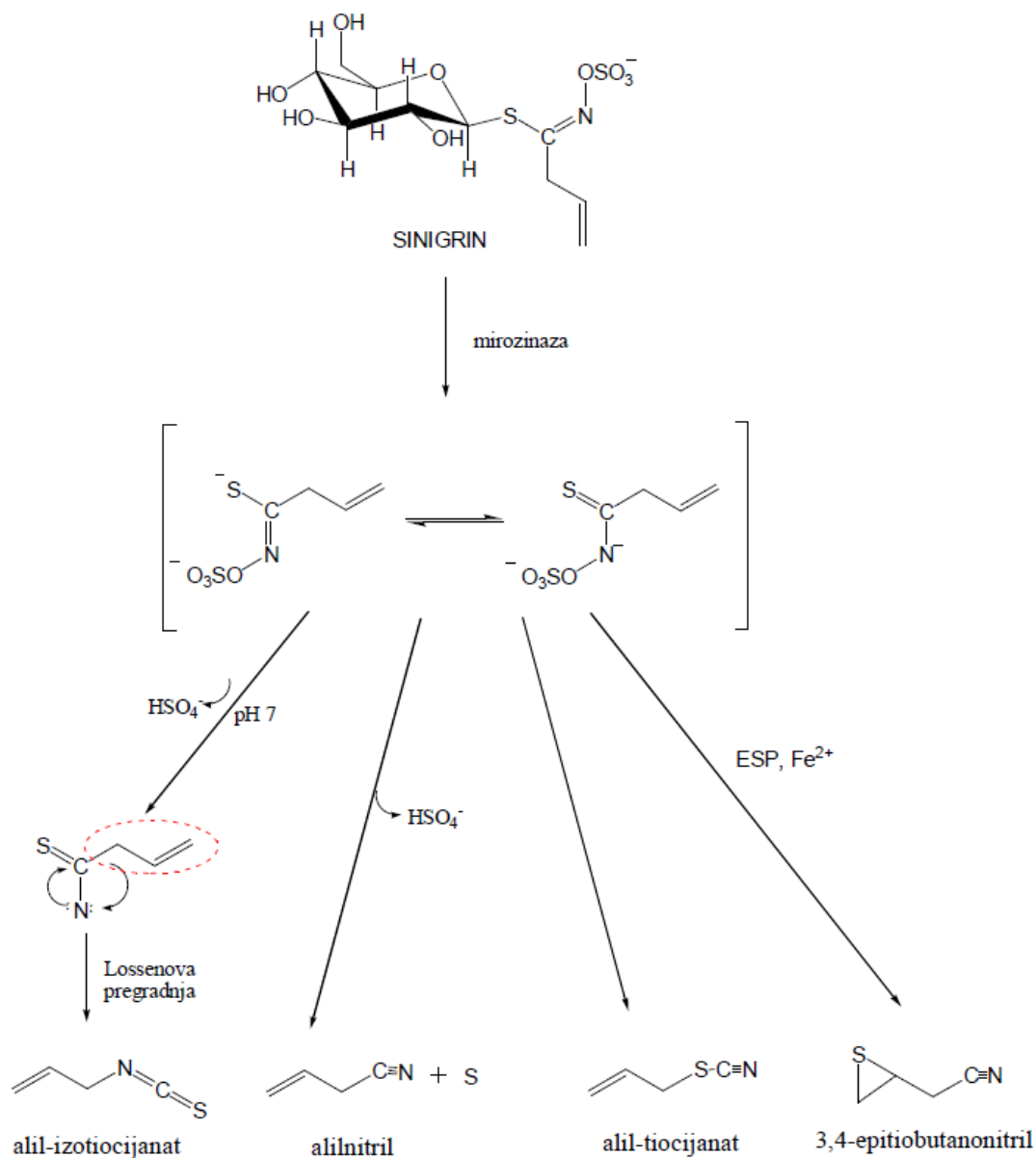


**Slika 3.8.** Spektar masa 3-metoksibenzil-izotiocijanata, razgradnog produkta glukolimnantina.

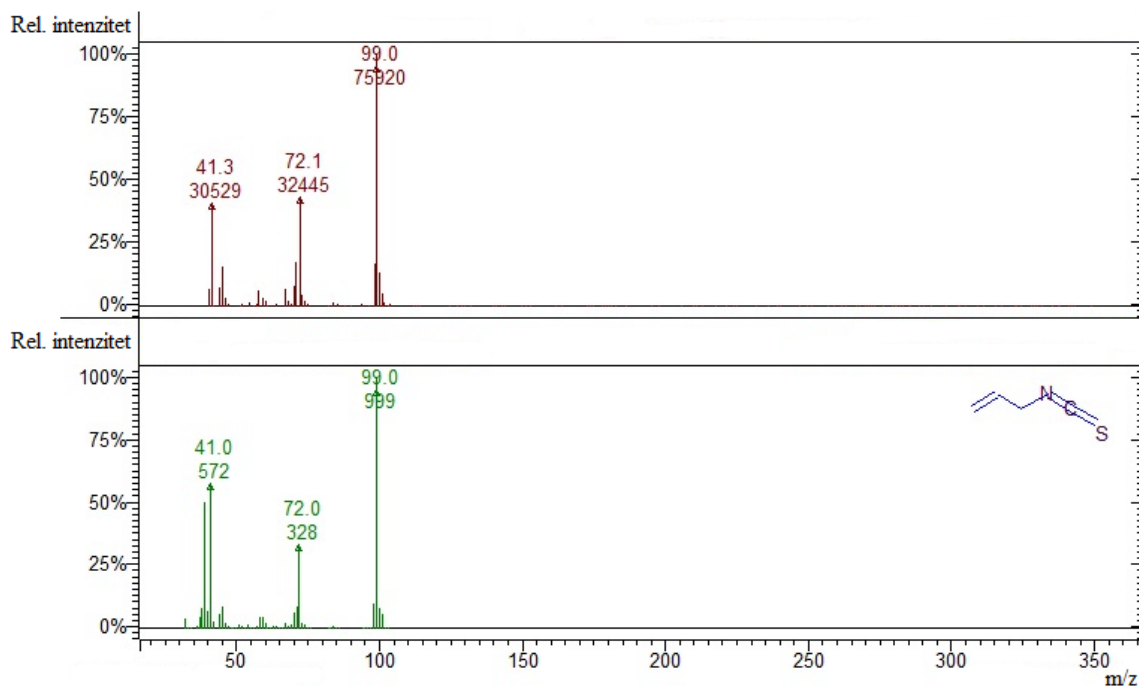
Kao što je to karakteristično za sve aromatske izotiocijanate, na spektru je vidljiv molekulski pik  $m/z = 179$ . Negativna masa potječe od jednog dušikovog atoma u strukturi. Osnovni ion ( $m/z = 121$ ) je nastao gubitkom  $NCS^{\cdot}$  skupine.<sup>5</sup> Naposljetku, može

se uočiti i ion  $m/z = 91$ , koji odgovara tropilium ionu, karakterističnom za sve alkil-supstituirane aromatske spojeve.<sup>5</sup>

Analizom destilata korijena biljke *L. latifolium* utvrđeno je da je u njemu najzastupljeniji alil-izotiocijanat s molekulskim udjelom od 17.9 %. Alil-izotiocijanat je razgradni produkt alil glukozinolata (sinigrin, **Slika 1.4.**), čija je razgradnja prikazana na **Slici 3.9.**



**Slika 3.9.** Razgradnja sinigrina.<sup>5</sup>



**Slika 3.10.** Spektar masa alil-izotiocijanata, razgradnog produkta sinigrina.

Vidljiv je molekulski ion alil-izotiocijanata ( $m/z = 99$ ), koji je ujedno i osnovni ion. Neparan je zbog prisustva jednog atoma dušika u molekuli. Cijepanje C-C veze do NCS skupine u alil-izotiocijanatu dovodi do stvaranja karakterističnog iona za fragmentaciju izotiocijanata:  $m/z = 72$   $[\text{CH}_2\text{NCS}]^+$ .<sup>5</sup> Uočljiv je i pik na  $m/z = 41$ , koji vjerojatno potječe od alilnog karbokationa nastalog cijepanjem C-N veze – veliki intenzitet je posljedica stabilnosti karbokationa (stabilizran je rezonancijom).

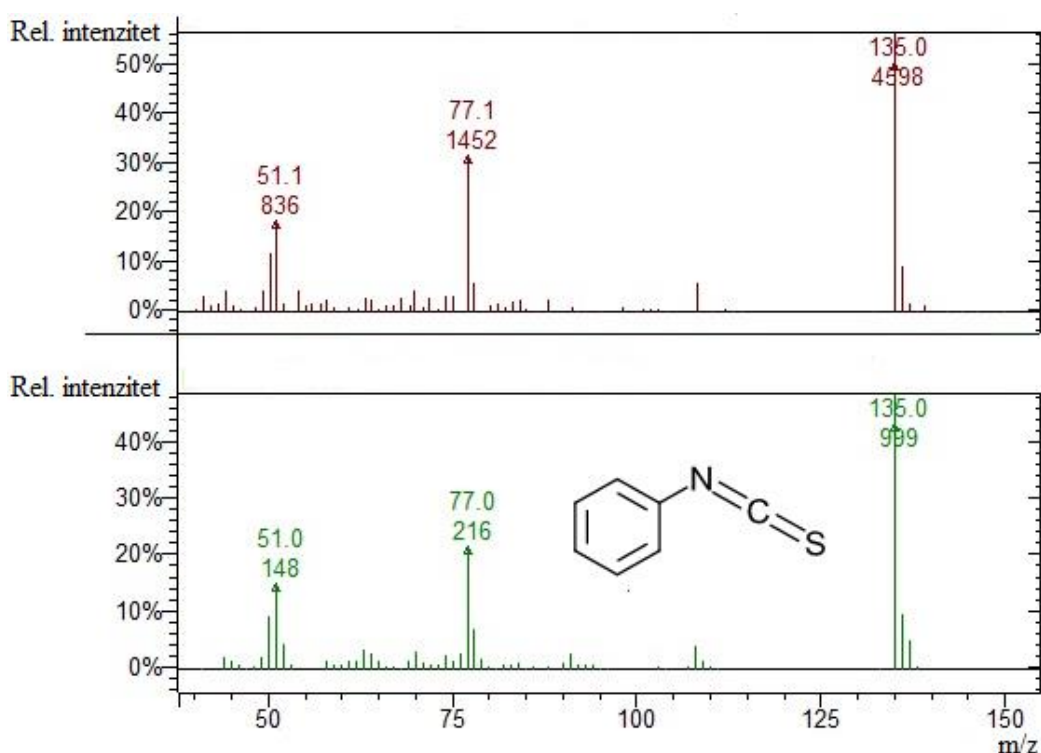
U destilatu korijena *L. latifolium*, pronađeni su još i *sec*-butil-izotiocijanat masenog udjela 0.4 % , razgradni produkt 1-metilpropil glukozinolata (glukokohlearina, **Slika 1.4.**), te razgradni produkti glukotropeolina: fenilacetonitril (maseni udio 6.7 %) i benzil-izotiocijanat u tragovima.

Analiza destilata lišća *L. latifolium* pokazala je da se destilat lišća sastoji od istih razgradnih produkata glukozinolata, odnosno da se u lišću nalaze isti glukozinolati kao i u korijenu, ali u različitim masenim udjelima. Tako je u destilatu lišća maseni udio alil-izotiocijanata iznosio 65.6 %, *sec*-butil-izotiocijanata 0.3 %, fenilacetonitrila 4.3 %, dok je benzil-izotiocijanat opet pronađen samo u tragovima.

Analizom destilata korijena biljke *L. meyenii* utvrđeno je da je najzastupljeniji spoj u destilatu fenilacetonitril masenog udjela 54.4 %, razgradni produkt glukotropeolina. U destilatu je pronađen i benzil-izotiocijanat (maseni udio 0.8 %), kao drugi razgradni

produkt glukotropeolina. I naposljetku, identificiran je i 3-metoksifenilacetonitril s masenim udjelom od 1.5 %, koji potječe od glukolimnantina.

U destilatu biljke *L. sativum* pronađena se dva razgradna produkta glukotropeolina: benzil-izotiocijanat masenog udjela 31.1% i fenilacetonitril masenog udjela 11.3%. S obzirom na udio u uzorku možemo zaključiti da je glukotropeolin dominantno prisutan glukozinolat u biljci. U hlapljivom uzorku identificiran je i razgradni produkt fenil glukozinolata: fenil-izotiocijanat masenog udjela 0.06 %. Fenil glukozinolat je rijedak glukozinolat pronađen u još jednoj biljci porodice Brassicaceae: *Armoracia lapathifolia*.<sup>35</sup> Spektar masa fenil-izotiocijanata prikazan je na **Slici 3.11**.



**Slika 3.11.** Spektar masa fenil-izotiocijanata, razgradnog produkta glukotropeolina.

Na spektru je vidljiv molekularni ion ( $m/z = 135$ ), neparan zbog jednog dušikovog atoma u molekuli. Molekularni ion ujedno je i osnovni ion, vjerojatno zato što je ion stabiliziran rezonancijom. Uočljiv je i ion  $m/z = 77$  ( $C_6H_5^+$ ), koji je karakterističan za spojeve s benzenskim prstenom.

Usporedbom rezultata za rod *Lepidium* uočava se da je najzastupljeniji glukozinolat u biljkama ovog roda glukotropeolin, a najviše ga ima, sudeći po masenim udjelima njegovih razgradnih produkata, u *L. meyenii*. Zanimljiva je činjenica da u biljkama *L. graminifolium*, *L. latifolium* i *L. meyenii* od razgradnih produkata glukotropeolina

prevladavaju nitrili (fenilacetonitril), čiji maseni udio varira od 4.3 % u lišću *L. latifolium* do 54.4 % u korijenu *L. meyenii*; dok u *L. sativum* prevladavaju izotiocijanati (fenil-izotiocijanat masenog udjela 0.06 % i benzil-izotiocijanat masenog udjela 33.1 %). Važno je napomenuti da je za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljaka *L. graminifolium*, *L. latifolium* i *L. meyenii* korišten suhi biljni materijal, a za izolaciju iz *L. sativum* korišten je svježi biljni materijal.

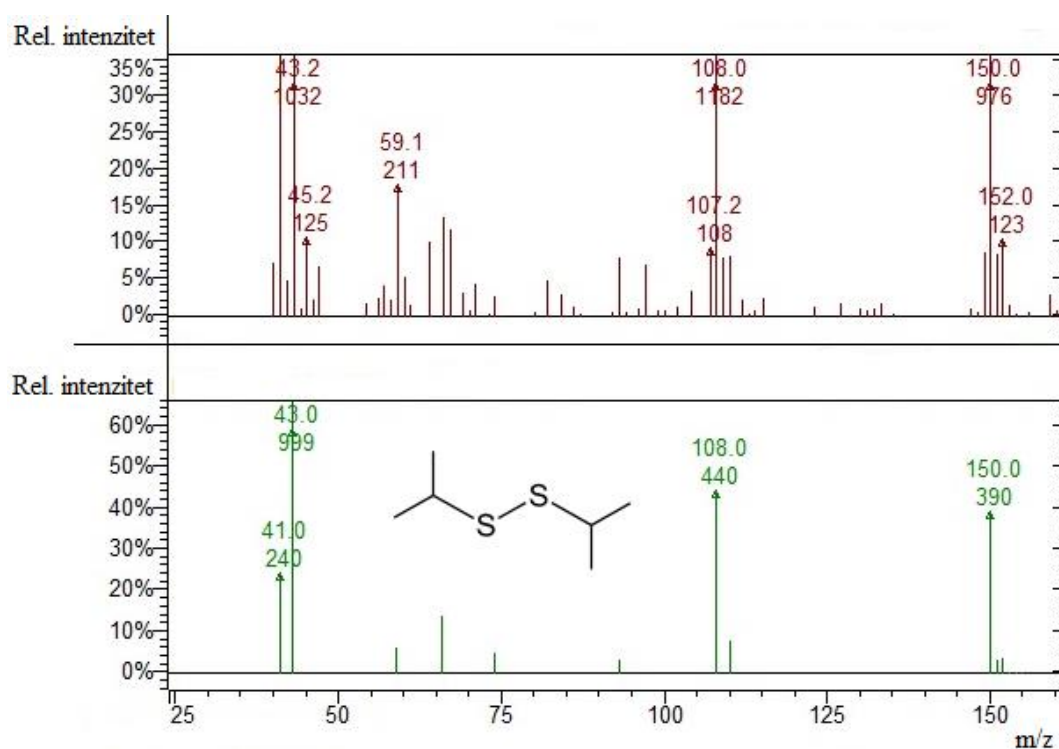
Poznato je da izotiocijanati nastaju iz glukozinolata Lossenovom pregradnjom, a da je za formiranje nitrila (uz epitionitrile i tiocijanate) potreban epitiospecifični protein (ESP) koji na sebe veže sumpor i tako onemogućava Lossenovu pregradnju.<sup>36</sup> ESP je rasprostranjen u biljkama porodice Brassicaceae. Dokazano je još da nitrili mogu nastati iz glukozinolata i nespecificiranim, ne-enzimskim putem u prisustvu  $Fe^{2+}$ . 2004. godine je Matusheski sa suradnicima<sup>37</sup> objavio da zagrijavanje cvjetova brokule na 70 °C na 20 minuta dovodi do gubitka aktivnosti epitiospecifičnog proteina (ESP), uz istovremeno dokazivanje da je enzim mirozinaza iz biljaka porodice Brassicaceae otporniji na toplinsku deaktivaciju. Pri temperaturi od 70 °C došlo je do deaktivacije ESP i jednog dijela mirozinaze, dok je preostali dio enzima uzrokovao da se reakcija razgradnje glukozinolata vodi u smjeru maksimalnog nastajanja izotiocijanata. Naposljetku, povećanjem temperatura dolazi do potpune deaktivacije mirozinaze i termičke hidrolize glukozinolata u nitrile. Williams i sur.<sup>36</sup> su u radu objavljenom 2009. godine proučavali učinak  $Fe^{2+}$ , tiocijanat-formirajućeg proteina (TFP) i topline na sastav razgradnih produkata glukozinolata u *L. sativum*. Otkrili su da se aktivnost TFP (koji pripada porodici epitiospecifičnih proteina) i enzima mirozinaze značajno smanjila prilikom zagrijavanja na temperature više od 120 °C. U destilatu dobivenom zagrijavanjem na temperature preko 120 °C prevladavali su izotiocijanati.<sup>36, 37</sup>

Budući da su svi biljni materijali zagrijavani na temperaturu vrenja vode (100 °C), može se pretpostaviti da je došlo do inaktivacije TFP (budući da i on pripada porodici epitiospecifičnih proteina) u *L. sativum*, što je dovelo do usmjerenja mirozinazne aktivnosti prema maksimalnom nastanku izotiocijanata (fenil- i benzil-izotiocijanata). Prisustvo fenilacetonitrila u destilatu se može objasniti termičkom razgradnjom glukotropeolina, nakon inaktivacije TFP i mirozinaze, ili nastajanjem nespecificiranim, ne-enzimskim putem uz prisustvo  $Fe^{2+}$ , budući da biljka u sebi sadrži dovoljne količine željeza za odvijanje te reakcije.<sup>36</sup> Veliki postotak nitrila (fenilacetonitrila) u *L. meyenii* može se objasniti prisustvom željezovih(II) kationa<sup>38</sup>, odnosno nitrili vjerojatno nastaju

nespecificiranim, ne-enzimskim putem za koji je potrebna mala količina  $\text{Fe}^{2+}$ . Zbog nedostatka literaturnih podataka, moglo bi se pretpostaviti da fenilacetonitril u *L. graminifolium* i *L. latifolium* nastaje termičkom razgradnjom glukotropeolina, a mala količina benzil-izotiocijanata je posljedica enzimske aktivnosti.

Osim glukotropeolina, u biljkama *Lepidium* spp., pronađene su još i male količine razgradnih produkata glukonasturcina (*L. graminifolium*) i glukolimnantina (*L. graminifolium* i *L. meyenii*). Zanimljivo je i da je u *L. latifolium* prevladavao alil-izotiocijanat (do 65.6 % u lišću), razgradni produkt sinigrina, dok je razgradni produkt glukokohlearina bio zastupljen u jako malim količinama.

Od hlapljivih sumporovih spojeva koji nisu razgradni produkti glukozinolata, pronađen je samo jedan u biljci *L. sativum*: diizopropil disulfid s masenim udjelom od 0.02 %.



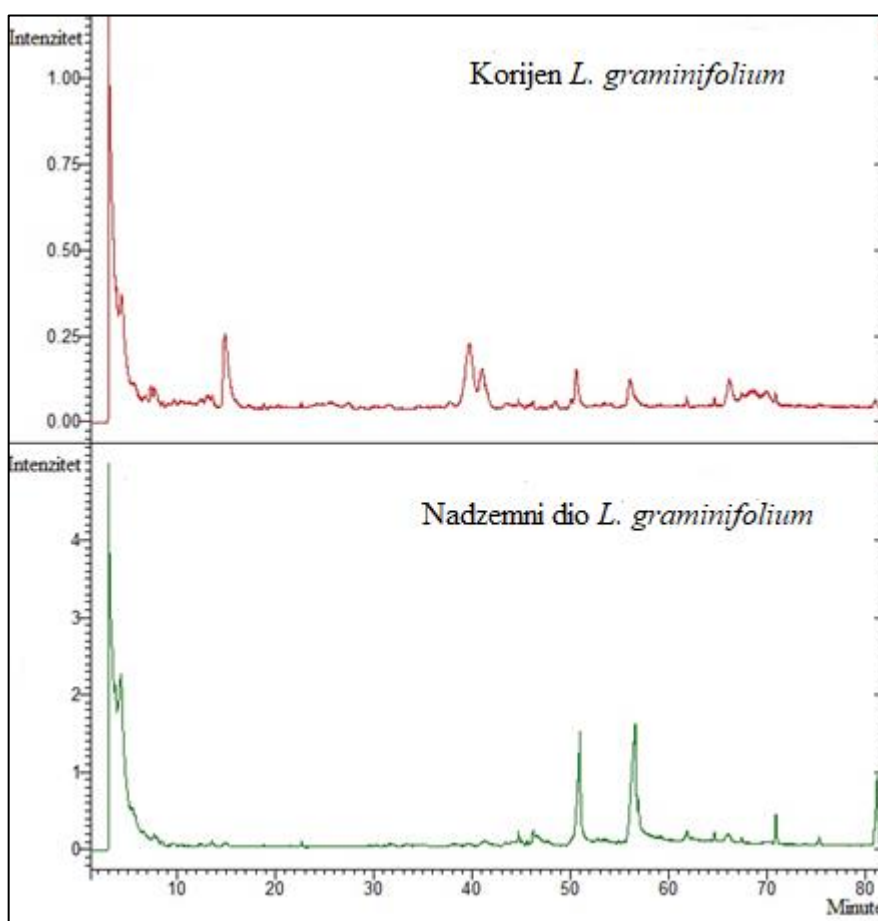
**Slika 3.12.** Spektar masa diizopropil disulfida.

Na spektru je uočljiv molekularni ion ( $m/z = 150$ ), te pik  $M+2$  ( $m/z = 152$ ), koji je karakterističan za spojeve sa sumporom. Veći intenzitet pika  $M+2$  je vjerojatno posljedica 2 atoma sumpora u strukturi. Pik na  $m/z = 43$  vjerojatno potječe od izopropil kationa  $[(\text{CH}_3)_2\text{CH}^+]$  koji nastaje cijepanjem C-S veze; intenzitet ovog pika se može pripisati stabilnosti sekundarnih karbokationa.

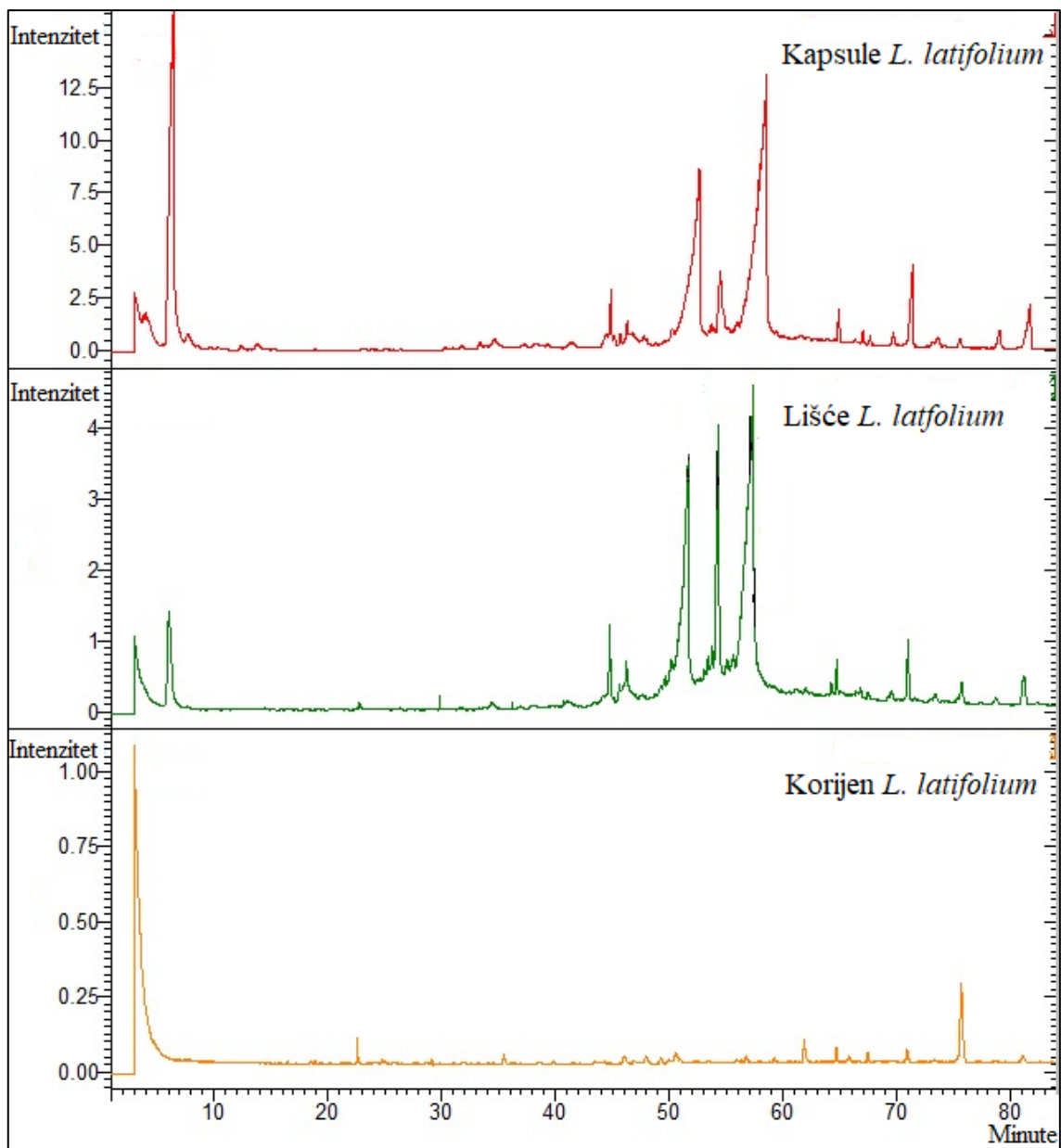
Budući da je rod *Lepidium* jedan od rodova čija je karakteristika prisustvo velikih količina glukozinolata, činjenica da ima jako malo ostalih hlapljivih spojeva sumpora nije iznenađujuća. Prisustvo malih količina diizopropil disulfida može se objasniti metaboličkim putevima koji uključuju aminokiselinu cistein. Naime, poznato je da cistein sudjeluje u biosintezi glukozinolata, ali to nije jedini metabolički put u kojem može sudjelovati. Vjerojatno je mala količina cisteina iskorištena za biosintezu nehlapljivog prekursora *S*-alk(en)il-L-cistein sulfoksida od kojeg potječe diizopropil disulfid.<sup>11</sup>

### 3.1.2. Analiza ekstrakata

Uzorci dobiveni hidrolizom egzogenim enzimom mirozinazom i ekstrakcijom diklormetanom, analizirani su vezanim sustavom GC-MS, i na taj način su dobiveni kromatogrami ukupne ionske struje za svaki uzorak (Slika 3.13. – 3.16.).

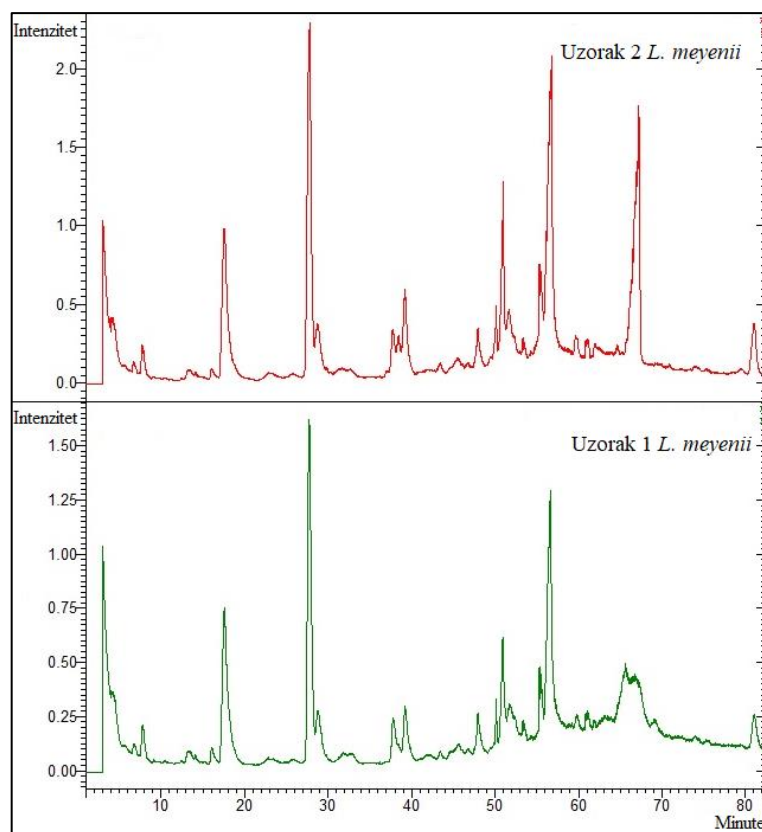


**Slika 3.13.** Kromatogram ukupne ionske struje za ekstrakte korijena i nadzemnog dijela biljke *L. graminifolium*.

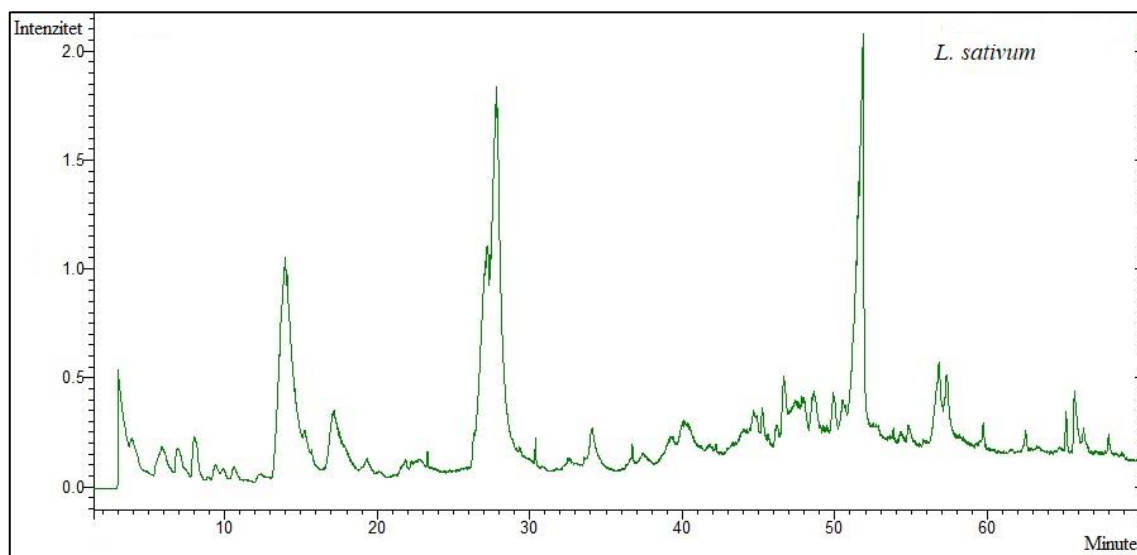


**Slika 3.14.** Kromatogrami ukupne ionske struje za ekstrakte kapsula, lišća i korijena biljke *L. latifolium*.





**3.15.** Kromatogrami ukupne ionske struje za ekstrakte biljke *L. meyenii*.



**Slika 3.16.** Kromatogram ukupne ionske struje ekstrakta biljke *L. sativum*.

Razgradni produkti glukozinolata koji su uspješno identificirani usporedbom spektara masa pojedinih komponenti sa spektrima masa iz biblioteke po Wiley-u te glukozinolati od kojih potječu su prikazani u **Tablici 3.3**.

**Tablica 3.3.** GC-MS analiza razgradnih produkata u ekstraktima biljaka roda *Lepidium*.

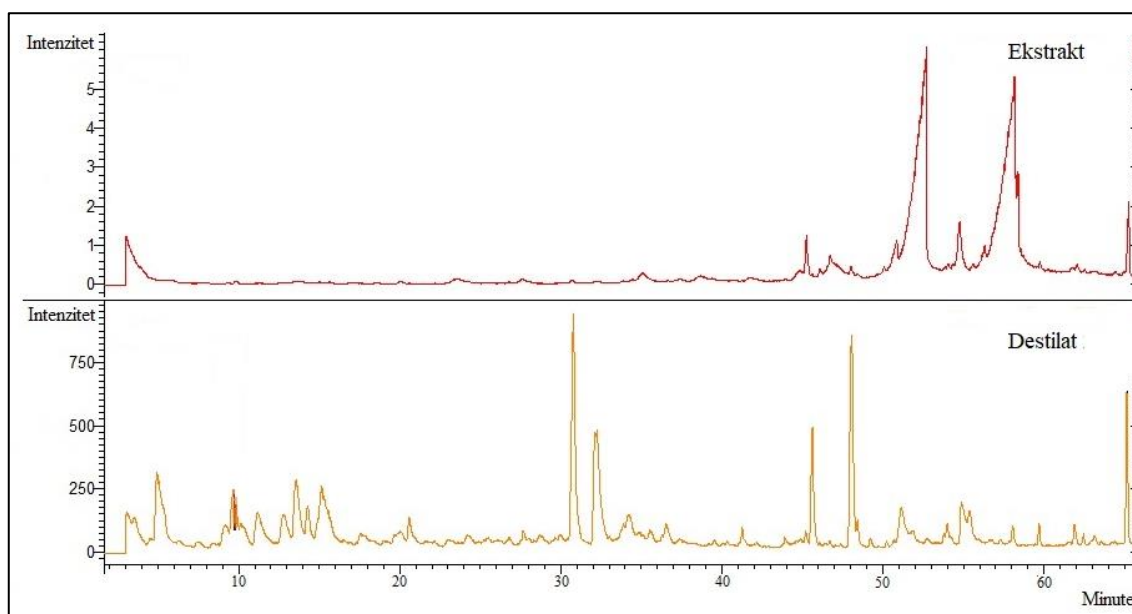
Biljna vrsta/ dio biljke	Glukozinolat/ identificirani produkt razgradnje	Vrijeme zadržavanja (min)	Maseni udio (%)
<i>L. latifolium</i>			
LIŠĆE	<b>Sinigrin</b>		
	Alil-izotiocijanat	6.54	21.5
<i>L. meyenii</i>			
KORIJEK	<b>Glukotropeolin</b>		
	Fenilacetonitril	17.52	7.3
	Benzil-izotiocijanat	27.60	10.5
	<b>Glukolimnantin</b>		
	3-Metoksifenilacetonitril	28.99	2.3
	3-Metoksibenzil-izotiocijanat	37.80	1.2

GC-MS analizom u ekstraktu lišća biljke *L. latifolium* pronađen je alil-izotiocijanat, masenog udjela 21.54 %, što je bilo za očekivati, s obzirom da su i u destilatu pronađene velike količine ovog razgradnog produkta sinigrina. U ekstraktu korijena biljke *L. meyenii* pronađena su dva razgradna produkta glukotropeolina: fenilacetonitril (masenog udjela 7.3 %) i benzil-izotiocijanat (masenog udjela 10.5 %). Osim razgradnih produkata glukotropeolina, pronađena su i dva razgradna produkta glukolimnantina: 3-metoksifenilacetonitril (2.3 %) i 3-metoksibenzil-izotiocijanat (1.2 %), koji nije pronađen u destilatu.

U ekstraktima biljaka *L. graminifolium* i *L. sativum* nisu pronađeni razgradni produkti glukozinolata, ali ni hlapljivi sumporovi spojevi neglukozinolatnog podrijetla. S obzirom da su i u destilatima *L. graminifolium* pronađene jako male količine razgradnih produkata, nije iznenađujuće što ih nismo pronašli u ekstraktima. Što se tiče biljke *L. sativum*, bila je dostupna jako mala količina biljnog materijala za ekstrakciju (**Tablica 2.1.**), što je vjerojatno razlog odsustva hlapljivih spojeva u ekstraktu.

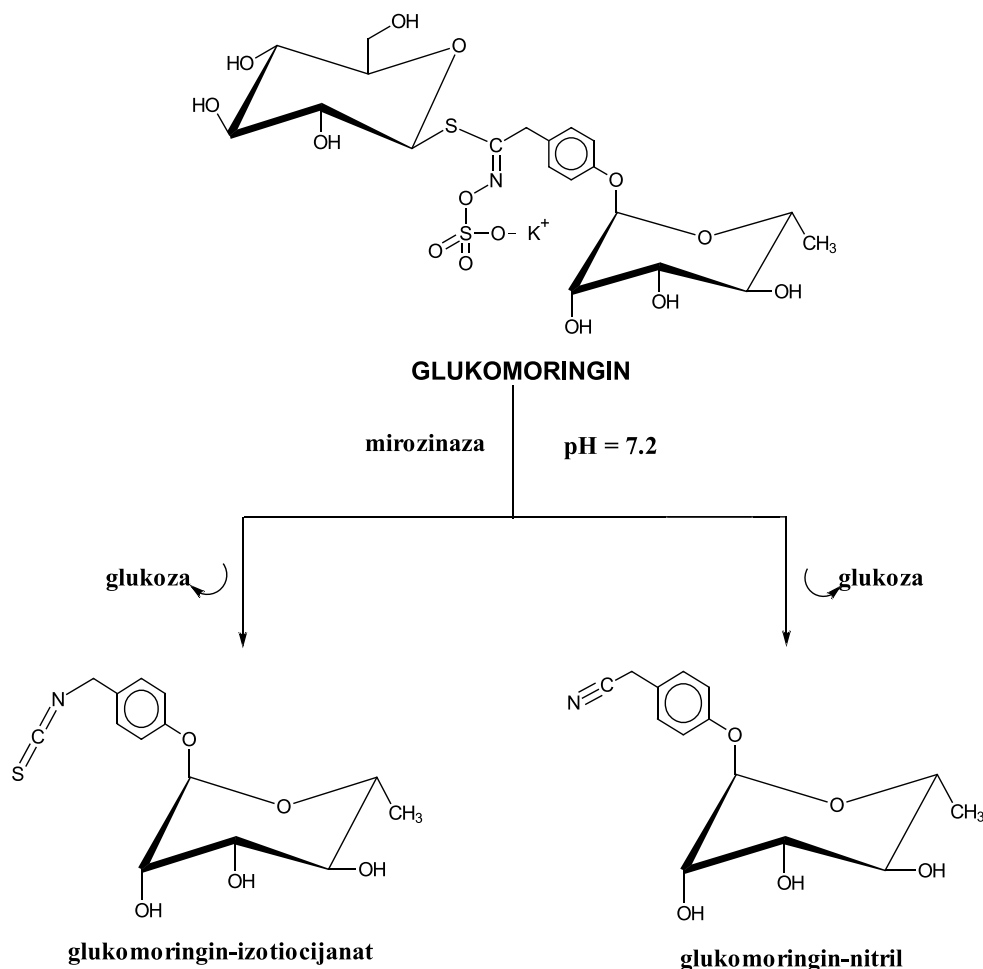
### 3.2. *Moringa oleifera*

Cilj ovog rada bio je i ispitivanje sastava hlapljivih sumporovih spojeva biljke *M. oleifera*, poznate po svom glukozinolatnom sastavu, koja je posebno bogata višestruko glikoziliranim glukozinolatima. Naglasak je bio na indirektnom određivanju glukomoringina preko njegovih razgradnih produkata, s obzirom da ova biljka obiluje tim glukozinolatom (u različitim dijelovima biljke može ga se pronaći u rasponu masenih koncentracija od 28.5 do 462.3  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ).<sup>2</sup> Hlapljivi spojevi su izolirani iz komercijalno dostupnog praha hidrodestilacijom u modificiranoj aparaturi po Clevengeru, te autolizom s enzimom mirozinazom i ekstrakcijom diklormetanom. Dobiveni hlapljivi izolati analizirani su vezanim sustavom GC-MS, i na taj način su dobiveni kromatogrami ukupne ionske struje za svaki uzorak (**Slika 3.17.**).



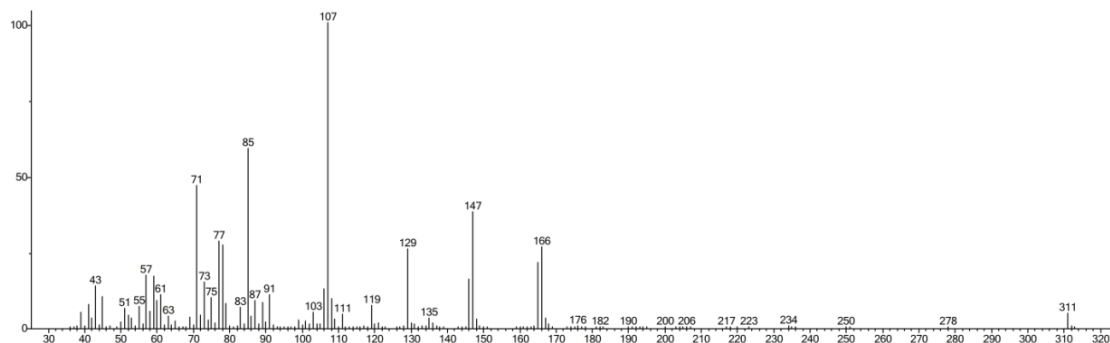
**Slika 3.17.** Kromatogrami ukupne ionske struje ekstrakta i destilata biljke *M. oleifera*.

Poseban fokus je bio usmjeren na izolaciji razgradnih produkata glukomoringina i dokazivanju tog glukozinolata preko razgradnog produkta.



**Slika 3.18.** Shema razgradnje glukomoringina.

Radulović i sur.<sup>39</sup> su u svome radu objavljenom 2014. godine uspješno izolirali razgradni produkt 2-( $\alpha$ -L-ramnospiranozilokso)benzil glukozinolata iz autolizata nadzemnog dijela biljke *Reseda lutea* i identificirali ga GC-MS tehnikom.



**Slika 3.19.** Maseni spektar 2-( $\alpha$ -L-ramnospiranozilokso)benzil izotiocijanata.<sup>39</sup>

Kod uvjeta GC-MS analize za korištene uvjete dane u **poglavlju 2.2.3.** nisu pronađeni hlapljivi sumporovi spojevi ni razgradni produkti glukozinolata u destilatima i ekstraktu uzorka biljke *M. oleifera*. Stoga su uvjeti analize progarmirani 3 minute pri 70 °C, a zatim slijedi zagrijavanje od 70 do 290 °C brzinom 5 °C/min i na kraju, 10 minuta izotermno pri 290 °C (kromatogram nije prikazan). Nažalost, analiza je pokazala iste spojeve, tj. očekivani razgradni produkt glukomoringina nije identificiran.

Osim kromatograma, snimljeni su i FTIR spektri za destilat i ekstrakt (**Slike 6.1. i 6.2., poglavlje 6.**). Široki pikovi koji odgovaraju istezanju O-H veze su na oba spektra bili u području  $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ , što odgovara O-H istezanju u alkoholima. Pik na  $\sim 1265\text{ cm}^{-1}$  (C-O istezanje) bio je neobično jakog intenziteta, što vjerojatno ukazuje na velik broj C-O veza, kao što je to u šećerima. Pikovi pronađeni u području od 1600 do 1400  $\text{cm}^{-1}$  mogli bi biti posljedica istezanja C=C veza u benzenskom prstenu. Pronađeni su i pikovi na  $\sim 2054\text{ cm}^{-1}$  koji vjerojatno proizlaze od izotiocijanatne skupine. Naime, Radulović i sur.<sup>39</sup> za FTIR razgradnog produkta 2-( $\alpha$ -L-ramnopiranozilokso)benzil glukozinolata navode pik -NCS skupine na  $2080\text{ cm}^{-1}$ . Isto tako, uočljiv je i pik na  $\sim 2304\text{ cm}^{-1}$  čija oštrina upućuje na nitrilnu skupinu. Nastajanje nitrila vjerojatno je posljedica korištenja suhog biljnog materijala. Analiza FTIR spektara destilata i ekstrakta *M. oleifera* ukazala je da su u njima prisutni spojevi koji vjerojatno sadrže šećernu jedinicu, benzenski prsten te izotiocijanatnu ili nitrilnu skupinu, a koji nisu identificirani.

Zbog velikog broja vodikovih veza, nije za očekivati da će se spojevi koji sadrže šećernu jedinicu moći analizirati i identificirati GC-MS metodom. Međutim, Radulović i suradnici su uspješno identificirali razgradni produkt glukozinolata iz *R. lutea*. Glukozinolat iz *R. lutea* se razlikuje od glukomoringina po položaju ramnopiranoze: u glukomoringinu ramnopiranoza je u *para*-položaju, dok je u glukozinolatu iz *R. lutea* ramnopiranoza u *orto*-položaju benzenskog prstena. Razgradnjom glukozinolata iz *R. lutea* nastao je izotiocijanat kod kojeg je ramnopiranozni supstituent bio u *orto*-položaju u odnosu na izotiocijanatnu skupinu, dok iz glukomoringina nastaju *para*-supstituirani izotiocijanat i nitril. Razlika u položaju ramnopiranoznih skupina vjerojatno je razlog zašto je razgradni produkt glukozinolata iz *R. lutea* uspješno identificiran, dok razgradni produkti glukomoringina nisu identificirani korištenom metodom identifikacije.

## 4. ZAKLJUČAK

- U ovom radu su istraženi hlapljivi sumporovi spojevi biljaka roda *Lepidium* (*L. graminifolium*, *L. latifolium*, *L. meyenii* i *L. sativum*) iz porodice Brassicaceae i biljke *Moringa oleifera*, koja spada u porodicu Moringaceae. Ispitan je i sastav glukozinolata indirektnom metodom preko njihovih razgradnih produkata. Hlapljivi spojevi su izolirani korištenjem dviju metoda: hidrodestilacije u modificiranoj aparaturi po Clevengeru i ekstrakcijom diklormetanom nakon hidrolize egzogenim enzimom mirozinazom. Dobiveni destilati i ekstrakti su analizirani korištenjem plinske kromatografije spregnute s spektrometrom masa (GC-MS) i infracrvenog spektrofotometra s Fourirerovom transformacijom (FTIR).
- GC-MS analiza destilata korijena biljke *L. graminifolium* pokazala je da je glavna komponenta u njemu fenilacetonitril masenog udjela 6 %. Osim fenilacetonitrila, u destilatu korijena su pronađeni i 3-metoksifenilacetonitril (5.8 %), 3-metoksibenzil-izotiocijanat (3.3 %), fenilpropanonitril (0.6 %), benzil-izotiocijanat (0.4 %) i 2-feniletil-izotiocijanat (0.4 %). U destilatu nadzemnog dijela biljke pronađeni su fenilacetonitril, 3-metoksifenilacetonitril, 3-metoksibenzil-izotiocijanat i benzil-izotiocijanat istih udjela kao i u korijenu. U ekstraktima biljke *L. graminifolium* nisu pronađeni razgradni produkti glukozinolata, što je vjerojatno posljedica malih količina u biljci prisutnih glukozinolata.

Analiza destilata korijena *L. latifolium* pokazala je sljedeći sastav: alil-izotiocijanat (17.9 %), fenilacetonitril (6.7 %), *sec*-butil-izotiocijanat (0.4 %) i benzil-izotiocijanat u tragovima. U destilatu lišća pronađeni su: alil-izotiocijanat (65.6 %), fenilacetonitril (4.3 %), *sec*-butil-izotiocijanat (0.3 %) i benzil-izotiocijanat u tragovima. Analizom ekstrakta lišća *L. latifolium* pronađen je alil-izotiocijanat (21.5 %).

Destilat korijena *L. meyenii* sadržavao je fenilacetonitril (54.4 %), 3-metoksifenilacetonitril (1.5 %) i benzil-izotiocijanat (0.8 %). Ekstrakti korijena biljke *L. meyenii* sadržavali su fenilacetonitril (7.3 %), benzil-izotiocijanat (10.5

%), 3-metoksifenilacetonitril (2.3 %) i 3-metoksibenzil-izotiocijanat (1.2 %), koji nije pronađen u destilatu.

U destilatu *L. sativum* su pronađeni benzil-izotiocijanat (31.14 %), fenilacetonitril (11.32 %) i fenil-izotiocijanat (0.061 %). Zbog male količine biljnog materijala korištenog za ekstrakciju, GC-MS analizom ekstrakta biljke *L. sativum* nisu pronađeni spojevi od interesa.

Sudeći po razgradnim produktima, najzastupljeniji glukozinolat u biljkama roda *Lepidium* je glukotropeolin koji se nalazi u svim ispitivanim biljkama, a glavni je glukozinolat u *L. graminifolium*, *L. meyenii* i *L. sativum*. Osim glukotropeolina, u *L. graminifolium* se nalaze još i glukonasturcin (u korijenu) i glukolimnantin (u korijenu i nadzemnom dijelu), koji se nalazi i u *L. meyenii*. Glavni glukozinolat u *L. latifoliumu* je sinigrin, a biljka, uz glukotropeolin, sadrži i glukokohlearin. *L. sativum* u sebi sadrži i male količine fenil glukozinolata.

Od razgradnih produkata glukotropeolina, u *L. sativum* prevladavaju izotiocijanati, a u ostalim biljkama nitrili. Veća koncentracija izotiocijanata u *L. sativum* vjerojatno je posljedica korištenja svježeg biljnog materijala za izolaciju hlapljivih spojeva, ali i prisustvo tiocijanat-formirajućeg proteina i  $Fe^{2+}$  iona u biljci. Nitrili u *L. meyenii* vjerojatno nastaju nespecificiranim, neenzimskim putem u prisustvu  $Fe^{2+}$  iona, a u *L. graminifolium* i *L. latifolium* termičkom razgradnjom glukotropeolina.

Od hlapljivih sumporovih spojeva, identificiran je samo diizopropil disulfid (0.02 %) u destilatu *L. sativum*.

- Biljke roda *Lepidium* su bogati izvor hlapljivih sumporovih spojeva, koji su većinom razgradni produkti glukozinolata. Istraživani spojevi su poznati po svojoj raznolikoj biološkoj aktivnosti, što ove biljke čini iznimno pogodnim za daljnja istraživanja njihovih biokemijskih i farmakoloških svojstava.
- GC-MS analizom destilata i ekstrakta biljke *Moringa oleifera* nisu identificirani razgradni produkti glukozinolata, kao ni drugi hlapljivi sumporovi spojevi. Snimljeni FTIR spektri destilata i ekstrakta ukazali su na prisustvo spojeva koji nisu identificirani korištenom tehnikom.

## 5. LITERATURA

1. Iranshahi M., A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods, *Journal of Essential Oil Research*, 2012, 24, 394-434
2. Blažević I., Montaut S., Burčul F., Rollin P., *Glucosinolates: Novel sources and biological potential*, u: Jean-Michel Mérillion and Kishan Gopal Ramawat *Glucosinolates*, Eds., Springer International Publishing, New York, 2016, 1-58
3. Zekić M., Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
4. Fahey J. W., Zalcmann A. T., Talalay P., The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochemistry*, 2012, 56, 5-51
5. Blažević I., Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2009., \*: str. 25
6. Afsharypuor S., Sepehrnejad S., Analysis of the volatile constituents of the seeds, roots, leaves and whole flowering plant of *Lepidium latifolium* L., *Journal of Essential Oil Research*, 2006, 18, 106-17
7. Dini I., Tenore G. C., Dini A., Glucosinolates from maca (*Lepidium meyenii*), *Biochemical Systematics and Ecology*, 2002, 30, 1087–1090
8. Gil V., MacLeod A. J., Glucosinolates of *Lepidium sativum* and ‘Garden Cress’, *J. Sci. Food Agric.*, 1980, 31, 739-741
9. Maldini M., Maksoud S. A., Natella F., Montoro P., Petretto G. L., Foddai M., De Nicola G. R., Chessa M., Pintore G., *Moringa oleifera*: study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 2014, 49, 900-910
10. Halkier B. A., Du L., The biosynthesis of glucosinolates, *Trends Plants Sci.*, 1997, 2, 425-431
11. Jerković I., Kemija aroma, interna recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2011.

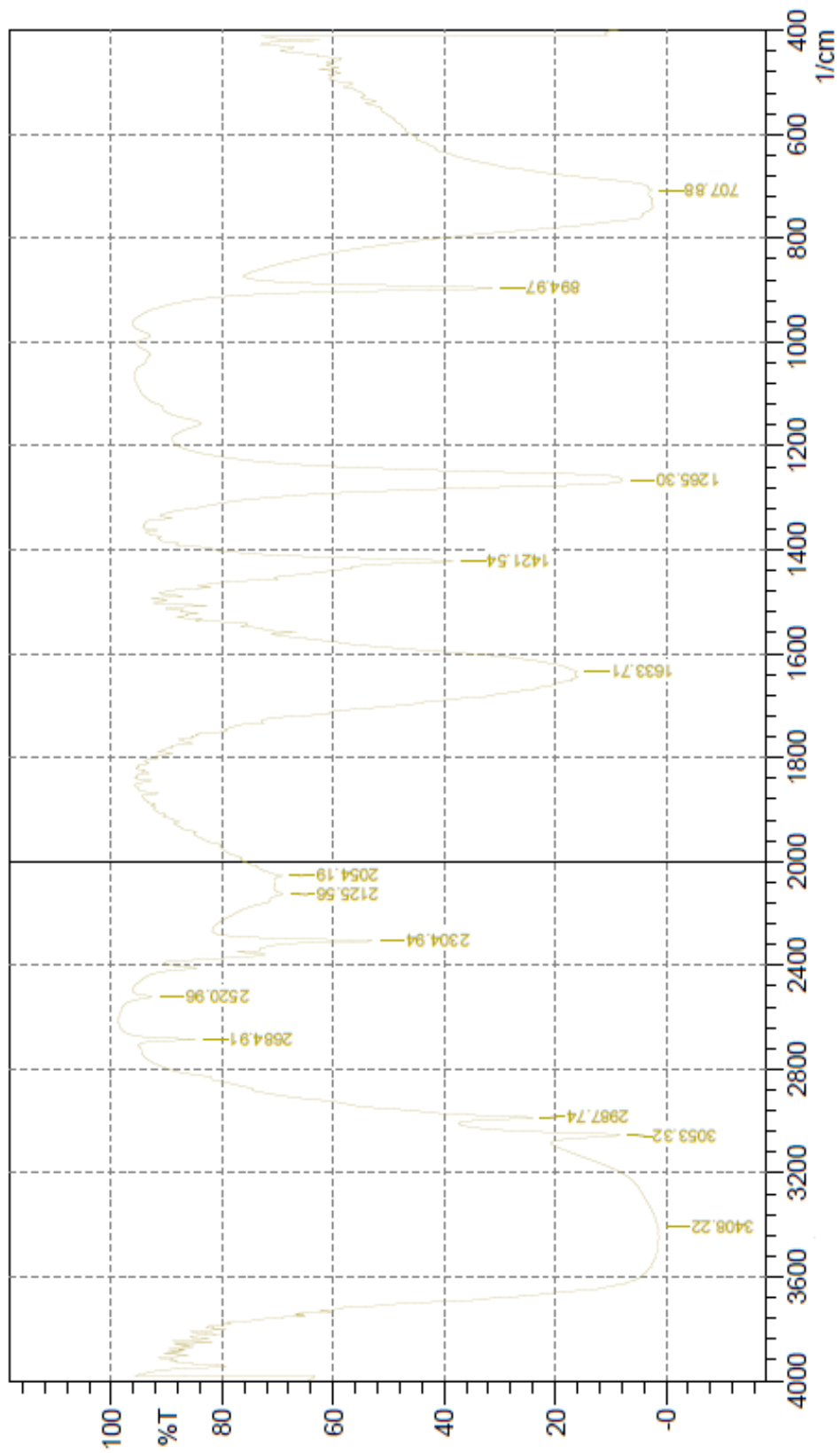


12. Jerković I., Radonić A., Praktikum iz organske kemije, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2009.
13. <https://cheminfo2012.wikispaces.com/Boris+Kevin+Bayemi+-+Final>, 28. lipnja 2017.
14. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>, 11. lipnja 2017.
15. [https://chem.libretexts.org/Core/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational\\_Spectroscopy/Infrared\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy), 11. lipnja 2017.
16. Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry, Thermo Nicolet Corporation, 2001.
17. Brekalo J., Synthesis of glucosinolates: gluconasturtiin (2-Phenylethyl glucosinolate) and glucomoringin analogue (4'-O-( $\alpha$ -D-Mannopyranosyl) glucosinalbin), Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
18. <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/350/Carey5th/Ch13/ch13-ir-4.html>, 30. lipnja 2017.
19. Cvjetković K., Glukozinolati tornjaste gušarke (*Arabis turrita* L.): termička, enzimska i kemijska hidroliza, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
20. Mummenhoff K., Brüggemann H., Bowman J. L., Chloroplast DNA phylogeny and biogeography of *Lepidium* (Brassicaceae), American Journal of Botany, 2001, 88, 2051-2063
21. <https://www.britannica.com/plant/Brassicales#ref992311>, 23. svibnja 2017.
22. [https://toptropicals.com/cgi-bin/garden\\_catalog/cat.cgi?family=Moringaceae](https://toptropicals.com/cgi-bin/garden_catalog/cat.cgi?family=Moringaceae), 23. svibnja 2017.
23. Autor: Moro A., Department of Life Sciences, University of Trieste [http://www.blumeninschwaben.de/Zweikeimblaettrige/Kreuzbluetler/lepi\\_ei.htm](http://www.blumeninschwaben.de/Zweikeimblaettrige/Kreuzbluetler/lepi_ei.htm), 5. lipnja 2017.
24. <http://www.pfaf.org/User/Plant.aspx?LatinName=Lepidium+graminifolium>, 5. lipnja 2017.

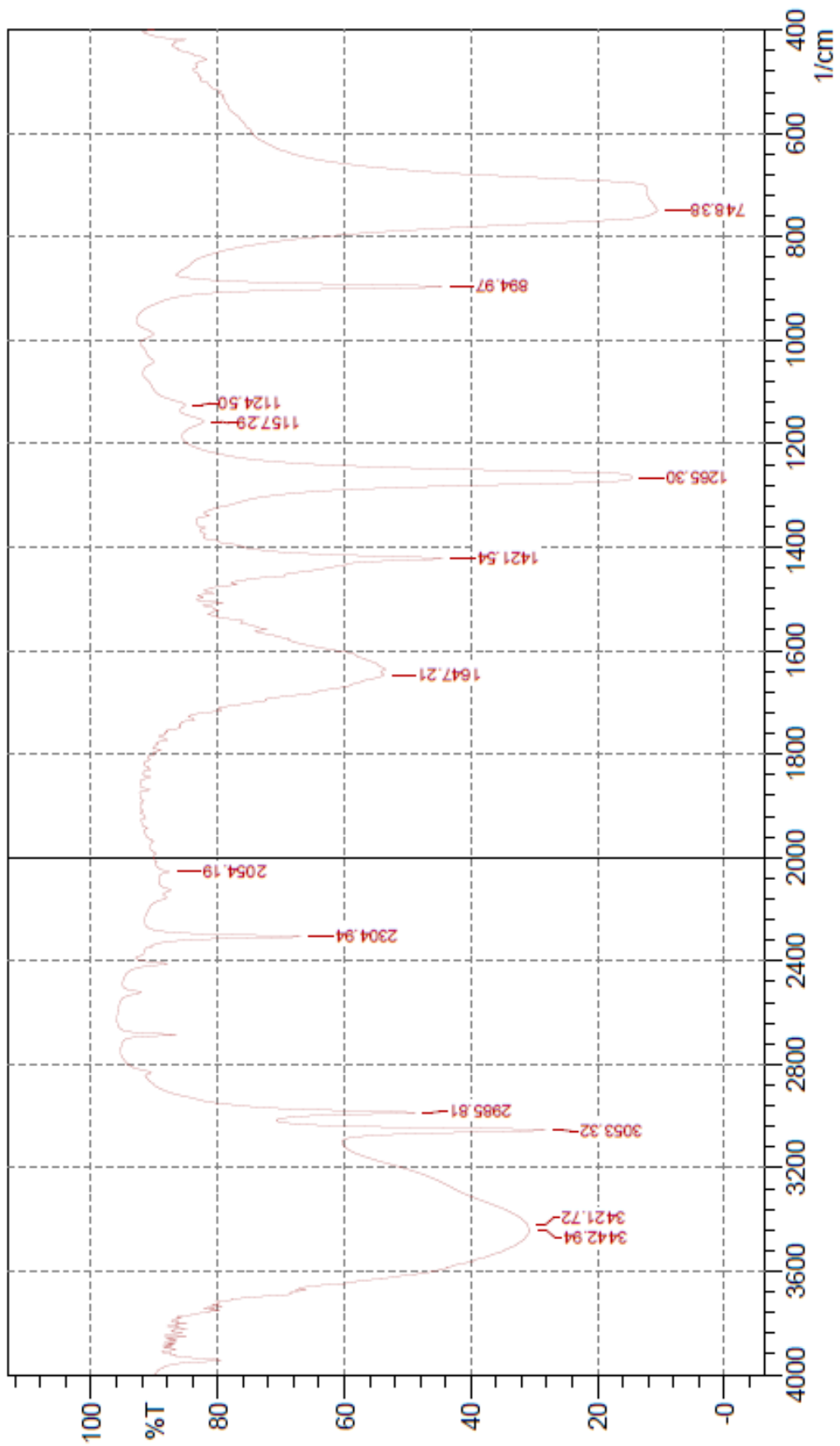
25. Autor: Mehrhoff L. J., University of Connecticut, Bugwood.org, 2004, <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5477926>
26. [https://www.eddmaps.org/ipane/ipanespecies/herbs/Lepidium\\_latifolium.htm](https://www.eddmaps.org/ipane/ipanespecies/herbs/Lepidium_latifolium.htm), 24. svibnja 2017.
27. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/115209>, 24. svibnja 2017.
28. <https://www.goldenlotusherbs.com/index.php?pageid=2&itemid=223>, 28. lipnja 2017.
29. <https://www.themacateam.com/maca-lepidium-meyenii>, 25. svibnja 2017.
30. Autor: Hassler M., 2014, <https://gobotany.newenglandwild.org/species/lepidium/sativum/>
31. <https://www.agroklub.com/sortna-lista/povrce/vrtni-borovnjak-kres-salata-205/>, 26. svibnja 2017.
32. <http://www.plantea.com.hr/sjetvena-grbica/>, 26. svibnja 2017.
33. Autori Starr F., Starr K., Starr Enviromental, <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Moringa+oleifera>
34. Anwar F., Latif S., Ashraf M., Gilani A. H., *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses, *Phytotherapy Research*, 2007, 21, 17-25
35. [http://www.genome.jp/db/pcidb/kna\\_cpds/7854](http://www.genome.jp/db/pcidb/kna_cpds/7854), 30. lipnja 2017.
36. Williams D. J., Critchley C., Pun S., Chaliha M., O'Hare T. J., Differing mechanisms of simple nitrile formation on glucosinolate degradation in *Lepidium sativum* and *Nasturtium officinale* seeds, *Phytochemistry*, 2009, 70, 1401-1409
37. Matusheski N., Juvik J. A., Jeffery E., Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli, *Phytochemistry*, 2004, 65, 1273-1281
38. Dini A., Migliuolo G., Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O., Chemical composition of *Lepidium meyenii*, *Food Chemistry*, 1994, 49, 347-349

39. Radulović N. S., Zlatković D. B., Ilić-Tomić T., Senerović L., Nikodinovic-Runic S., Cytotoxic effect of *Reseda lutea* L.: A case of forgotten remedy, Journal of Ethnopharmacology, 2014, 153, 125-132

## 6. PRILOZI



Slika 6.1. FTIR spektar destilata biljke *M. oleifera*.



Slika 6.2. FTIR spektar ekstrakta *M. oleifera*.