

Glukozinolatni profil biljke *Alliaria petiolata*

Rašić, Andreja

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:547248>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

GLUKOZINOLATNI PROFIL BILJKE *Alliaria petiolata*
DIPLOMSKI RAD

ANDREJA RAŠIĆ
Matični broj: 144

Split, lipanj 2023.

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

GLUKOZINOLATNI PROFIL BILJKE *Alliaria petiolata*
DIPLOMSKI RAD

ANDREJA RAŠIĆ
Matični broj: 144

Split, srpanj 2023.

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

GLUCOSINOLATES PROFILE OF THE PLANT *Alliaria petiolata*
DIPLOMA THESIS

ANDREJA RAŠIĆ

Parent number: 144

Split, July 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Mentor: prof. dr. sc. Ivica Blažević
Komentor: dr. sc. Azra Đulović, znanstv. sur.

GLUKOZINOLATNI PROFIL BILJKE *Alliaria petiolata* Andreja Rašić, 144

Sažetak: U ovom radu izolirani su i analizirani glukozinolati ljekovite češnjače (*Alliaria petiolata*). Cilj rada bio je istražiti glukozinolatan profil u različitim biljnim dijelovima. Analiza je provedena prema službenoj ISO 9167-1 metodi u kojoj se analiza provodi preko desulfoglukozinolata korištenjem UHPLC-MS/MS instrumenta. Također UHPLC-MS/MS tehnika je korištena za analizu intaktnih glukozinolata prisutnih u listu. Analizirani su i razgradni produkti glukozinolata nakon autolize biljnog materijala korištenjem GC-MS. UHPLC-MS analiza desulfoglukozinolata pokazala je da su u svim biljnim dijelovima (korijen, stabljika, list, cvijet i komuška) prisutni sinigrin (1,5840–97,5028 $\mu\text{mol/g}$) i glukotropeolin (0,0373–1,3406 $\mu\text{mol/g}$). U komuški, cvijetu i stabljici pronađen je i 4-hidroksiglukobrasicin (0,0078–1,4868 $\mu\text{mol/g}$), dok je u korijenu pronađen i 4-metoksiglukobrasicin (0,16501 $\mu\text{mol/g}$) i glukosinabin u tragovima. UHPLC-MS tehnika korištena je i za analizu metanol-vodenog ekstrakta lista. Identificirana su 3 spoja, sinigrin, izoviteksin-6"-O- β -D-glukopiranozid i aliarinozid koji je pronađen samo u biljci *Alliaria petiolata*. GC-MS tehnika korištena je za analizu diklormetanskog ekstrakta biljnog materijala nakon autolize. Identificirano je 12 različitih spojeva među kojima nisu pronađeni razgradni produkti glukozinolata.

Ključne riječi: glukozinolati, Brassicaceae, *Alliaria petiolata*, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

Rad sadrži: 42 stranicu, 30 slika, 2 tablice, 22 literaturne reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | | |
|----|------------------------------------|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. Sandra Svilović | predsjednik |
| 2. | dr. sc. Azra Đulović, znanst. sur. | član/komentor |
| 3. | prof. dr. sc. Ivica Blažević | mentor |

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

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

Supervisor: Ivica Blažević, PhD, Full Professor

Co-supervisor: Azra Đulović, PhD, Research Assist.

GLUCOSINOLATES PROFILE OF THE PLANT *Alliaria petiolata* **Andreja Rašić, 144**

Abstract: In this work, glucosinolates from *Alliaria petiolata* were isolated and analyzed. The aim of the work was to investigate the profile of glucosinolates in different parts of the plant. The analysis was made according to the official ISO 9167-1 method based on the UHPLC-MS/MS analysis of desulfoglucosinolate. The UHPLC-MS/MS technique was also used for the analysis of intact glucosinolates present in the leaf. GC-MS technique was used for analyze of glucosinolate degradation products after autolysis.

Sinigrin (1.5840-97.5028 mol/g) and glucotropeolin (0.0373-1.3406 mol/g) were found in all plant parts of *A. petiolata* using UHPLC-MS/MS analysis of desulfoglucosinolates. 4-Hydroxyglucobrassicin (0.0078-1.4868 mol/g) was found in the siliquae, flower and stem, whereas 4-methoxyglucobrassicin (0.16501 mol/g) and glucosinabin (in traces) were found in the root.

The UHPLC-MS technique was also used for the analysis of the methanol-water leaf extract. Three (3) compounds were identified sinigrin, isovitexin-6"-O- β -D-glucopyranoside and alliarinoside, which was found only in *Alliaria petiolata* plant.

The GC-MS technique was used to analyze the dichloromethane extract of the plant sample after autolysis. There were twelve (12) distinct substances found, but none of them were glucosinolate's breakdown products.

Keywords: glucosinolates, Brassicaceae, *Alliaria petiolata*, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

Thesis contains: 42 pages, 30 figures, 2 tables, 22 references

Original in: Croatian.

Defence committee:

- | | | |
|----|---|----------------------|
| 1. | Sandra Svilović, PhD, Assistant Professor | chair person |
| 2. | Azra Đulović, PhD, Research Assist. | member/co-supervisor |
| 3. | Ivica Blažević, PhD, Full Professor | supervisor |

Defence date:

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivice Blaževića i komentorstvom dr. sc. Azre Đulović, znanstv. sur., u razdoblju od listopada 2022. do srpnja 2023.

Zahvale

Zahvaljujem se svom profesoru i mentoru prof. dr.sc. Ivici Blažević i komentorici dr. sc. Azri Đulović na susretljivosti, utrošenom vremenu i stručnom vodstvu prilikom izrade rade.

Zahvaljujem se i svim prijateljima i kolegama s kojima sam dijelila sve uspone i padove tijekom studija.

Najveću zahvalnost upućujem svojoj obitelji na ljubavi i potpori koju su mi pružili tijekom svih ovih godina.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Izolirati i desulfatirati glukozinolate prisutne u biljci *Alliaria petiolata*
2. Izvršiti identifikaciju izoliranih desulfoglukozinolata korištenjem tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detekciju tandemskim masenim spektrometrom (UHPLC-MS/MS).
3. Kvantificirati glukozinolate biljke *Alliaria petiolata*
4. Izolirati glukozinolate lista biljke *Alliaria petiolata*
5. Izvršiti identifikaciju izoliranih intaktnih glukozinolata korištenjem tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detekciju tandemskim masenim spektrometrom (UHPLC-MS/MS).
6. Izolirati hlapljive spojeve iz vrste *Alliaria petiolata* ekstrakcijom diklormetanom nakon autolize uz djelovanje enzima mirozinaze.
7. Izvršiti identifikaciju hlapljivih izolata korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS).

SAŽETAK

U ovom radu izolirani su i analizirani glukozinolati ljekovite češnjače (*Alliaria petiolata*). Cilj rada bio je istražiti glukozinoladni profil u različitim biljnim dijelovima. Analiza je provedena prema službenoj ISO 9167-1 metodi u kojoj se analiza provodi preko desulfoglukozinolata korištenjem UHPLC-MS/MS instrumenta. Također UHPLC-MS/MS tehnika je korištena za analizu intaktnih glukozinolata prisutnih u listu. Analizirani su i razgradni produkti glukozinolata nakon autolize biljnog materijala korištenjem GC-MS.

UHPLC-MS analiza desulfoglukozinolata pokazala je da su u svim biljnim dijelovima (korijen, stabljika, list, cvijet i komuška) prisutni sinigrin (1,5840–97,5028 $\mu\text{mol/g}$) i glukotropeolin (0,0373–1,3406 $\mu\text{mol/g}$). U komuški, cvijetu i stabljici pronađen je i 4-hidroksiglukobrasicin (0,0078–1,4868 $\mu\text{mol/g}$), dok je u korijenu pronađen i 4-metoksiglukobrasicin (0,16501 $\mu\text{mol/g}$) i glukosinabin u tragovima.

UHPLC-MS tehnika korištena je i za analizu metanol-vodenog ekstrakta lista. Identificirana su 3 spoja, sinigrin, izoviteksin-6"-*O*- β -D-glukopiranozid i aliarinozid koji je pronađen samo u biljci *Alliaria petiolata*.

GC-MS tehnika korištena je za analizu diklormetanskog ekstrakta biljnog materijala nakon autolize. Identificirano je 12 različitih spojeva među kojima nisu pronađeni razgradni produkti glukozinolata.

Ključne riječi: glukozinolati, Brassicaceae, *Alliaria petiolata*, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

SUMMARY

In this work, glucosinolates from *Alliaria petiolata* were isolated and analyzed. The aim of the work was to investigate the profile of glucosinolates in different parts of the plant. The analysis was made according to the official ISO 9167-1 method based on the UHPLC-MS/MS analysis of desulfoglucosinolate. The UHLPC-MS/MS technique was also used for the analysis of intact glucosinolates present in the leaf. GC-MS technique was used for analyze of glucosinolate degradation products after autolysis.

Sinigrin (1.5840-97.5028 mol/g) and glucotropeolin (0.0373-1.3406 mol/g) were found in all plant parts of *A. petiolata* using UHLPC-MS/MS analysis of desulfoglucosinolates. 4-Hydroxyglucobrassicin (0.0078-1.4868 mol/g) was found in the siliquae, flower and stem, whereas 4-methoxyglucobrassicin (0.16501 mol/g) and glucosinabin (in traces) were found in the root.

The UHPLC-MS technique was also used for the analysis of the methanol-water leaf extract. Three (3) compounds were identified sinigrin, isovitexin-6"-O- β -D-glucopyranoside and alliarinoside, which was found only in *Alliaria petiolata* plant.

The GC-MS technique was used to analyze the dichloromethane extract of the plant sample after autolysis. There were twelve (12) distinct substances found, but none of them were glucosinolate's breakdown products.

Keywords: glucosinolates, Brassicaceae, *Alliaria petiolata*, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.2. Glukozinolati	2
1.1.1. Bisinteza glukozinolata.....	3
1.1.2. Razgradnja glukozinolata	6
1.1.3. Biološka aktivnost.....	7
1.1.4. Analiza glukozinolata	8
1.2. Brassicaceae	9
1.3. <i>Alliaria petiolata</i>	11
1.4. Kromatografske tehnike	12
1.4.1. Plinska kromatografija.....	13
1.4.2. Tekućinska kromatografija.....	15
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
2.1. Aparatura i kemikalije.....	17
2.2. Biljni materijal	18
2.3. Izolacija desulfoglukozinolata	18
2.4. Izolacija intaktnih glukozinolata.....	21
2.5. Izolacija razgradnih produkata glukozinolata	22
2.8. UHPLC-DAD-MS/MS analiza	23
2.9. GC-MS analiza	24
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
3.1. UHPLC-MS/MS analiza	25
3.2. GC-MS analiza.....	36
4. ZAKLJUČAK.....	38
5. POPIS KRATICA I SIMBOLA	39
6. LITERATURA.....	40

UVOD

Glukozinolati su klasa kemijskih spojeva koja je zastupljena u mnogim porodicama reda Brassicales, među kojima je najvažnija Brassicaceae (kupusnjače). U ovu skupinu ubrajamo brojno povrće koje je sastavni dio ljudske prehrane, poput kupusa, brokule, prokulica, rukole, kelja, cvjetače i sl..¹

Glukozinolati su predmet istraživanja brojnih znanstvenika što proizlazi iz činjenice da imaju brojne zdravstvene učinke poput antimikrobnog, protuupalnog, antioksidativnog i antikancerogenog djelovanja. Točnije rečeno, glukozinolati su biološki inaktivni, ali njihovi metabolički produkti pokazuju navedene biološke aktivnosti. U procesu stvaranja metabolički aktivnih spojeva važnu ulogu ima enzim mirozinaza, koji se nalazi u biljkama ove porodice, ali i u nekim bakterijama. Mirozinaza omogućuje hidrolizu glukozinolata pri čemu nastaju izotiocijanati, nitrili, tiocijanati, oksozolidin-2-tioni i epitionitrili.²

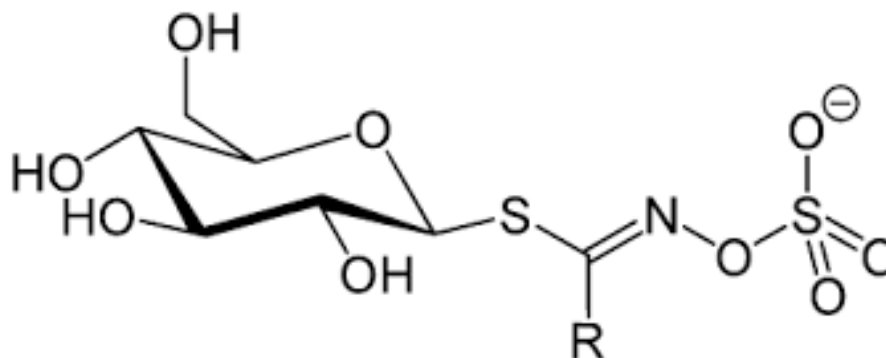
U ovom radu provedena je izolacija i kvantizacija glukozinolata iz biljke *Alliaria petiolata*. Analiza je provedena preko odgovarajućih desulfo-oblika glukozinolata iz svih biljnih dijelova, kao i intaktnih glukozinolata iz lista. Primijenjena tehnika je tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s tandemskim masenim detektorom.

Također su izolirani i analizirani produkti razgradnje glukozinolata korištenjem tehnike plinska kromatografija s masenim detektorom.

1. OPĆI DIO

1.2. Glukozinolati

Glukozinolati su klasa kemijskih spojeva koja se ubraja u specijalizirane metabolite. Strukturno gledano glukozinolati su anioni izgrađeni od tihidroksimata koji na sebi ima vezane 3 skupine: *S*-vezani glukopirazolni ostatak, *O*-vezani sulfatni ostatak te varijabilni bočni lanac koji potječe od aminokiseline.³



Slika 1. Opća strukturna formula glukozinolata⁴

Modernim spektroskopskim metodama, nuklearna magnetska rezonanca i masena spektrometrija, do 2018. godine utvrđeno je da broj glukozinolata pronađenih u biljkama iznosi 88. Postoji i oko 47 djelomično okarakteriziranih predloženih glukozinolatnih struktura te se predviđa da će broj potvrđenih glukozinolata značajno porasti.⁵

Glukozinolate možemo klasificirati u podskupine. Jedna od podjela temelji se na biokemijskom prekursoru. Prekursori glukozinolata su aminokiseline alanin, valin, leucin, izoleucin, metionin, fenilalanin, tirozin i triptofan. Problem ovakve klasifikacije proizlazi iz činjenice da nisu svi biosintetski putevi razjašnjeni zbog čega se češće koristi klasifikacija na alifatske, aromatske i indolne glukozinolate. No i ova klasifikacija nije u potpunosti smisljena s obzirom na to da su indoli također aromatski spojevi.³

Pri imenovanju glukozinolata najčešće se koriste trivijalna imena nastala od latinskog imena biljke iz koje je glukozinolat prvi put izoliran i dodavanjem prefiksa "gluko" i sufiksa "in". Pored trivijalnih imena koristi se i polusustavna nomenklatura koja je uvelike

pojednostavljena. Nazivu glukozinolat dodaje se prefiks koji odgovara imenu bočnog lanca prema IUPAC-u, npr. benzil-glukozinolat.³

Prisustvo sulfatne skupine i tioglukoznog dijela čine glukozinolate nehlapljivima i hidrofiličnim. Sulfatna skupina također daje kiseli karakter glukozinolatnim spojevima.

Glukozinolati u svojem izvornom obliku su fiziološki neaktivni. Tek njihovom razgradnjom, koja može biti enzimski ili neenzimski (kemijski, toplinski), oslobađaju se raznovrsni hlapljivi spojevi koji pokazuju čitav niz bioloških aktivnosti: djeluju kao antioksidansi, antibakterijski, antivirusni, protuupalni, jačaju imunološki sustav i omogućavaju stanični popravak.²

1.1.1. Biosinteza glukozinolata

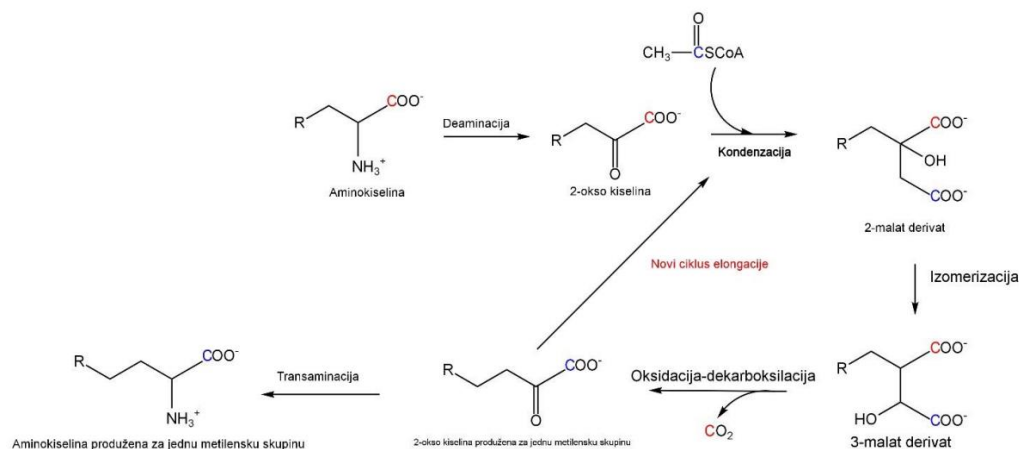
Polazna točka za proučavanje mogućih biosintetskih puteva je bila *Arabidopsis thaliana*. Ova biljka je odabrana zbog svog kratkog genoma i kratkog životnog ciklusa. Sekvenciranjem njezinog genoma omogućilo je identifikaciju gena uključenih u biosintezu glukozinolata, tj gena koji kodiraju informacije potrebne za sintezu enzima koji kataliziraju različite korake u biosintetskom putu. Analiza prisutnih glukozinolata u ovoj biljci omogućila je detekciju biosintetskog puta. Biosintetski put se može predstaviti u 3 odvojena stupnja:²

- A) produljenje bočnog lanca prekursora aminokiselina
- B) formiranje osnovne glukozinolatne strukture (dodatak glukoze i sumpora)
- C) sekundarna modifikacija

A) Produljenje bočnog lanca prekursora aminokiselina

Jedine aminokiseline čiji se bočni lanac može elongirati prije ulaza u drugi stupanj biosintetskog puta su metionin i fenilalanin. Metionin se može modificirati dodatkom 1-9 dodatnih metilnih skupina pomoću različitih enzima. Početna reakcija je transaminacija u kojoj nastaje 2-okso kiselina. Nakon toga slijede tri uzastopne reakcije: kondenzacija s acetilkoenzimom A, izomerizacija i oksidativna dekarboksilacija. Kao produkt ovih reakcija nastaje 2-okso kiselina s jednom metilenskom skupinom više od početne aminokiseline.

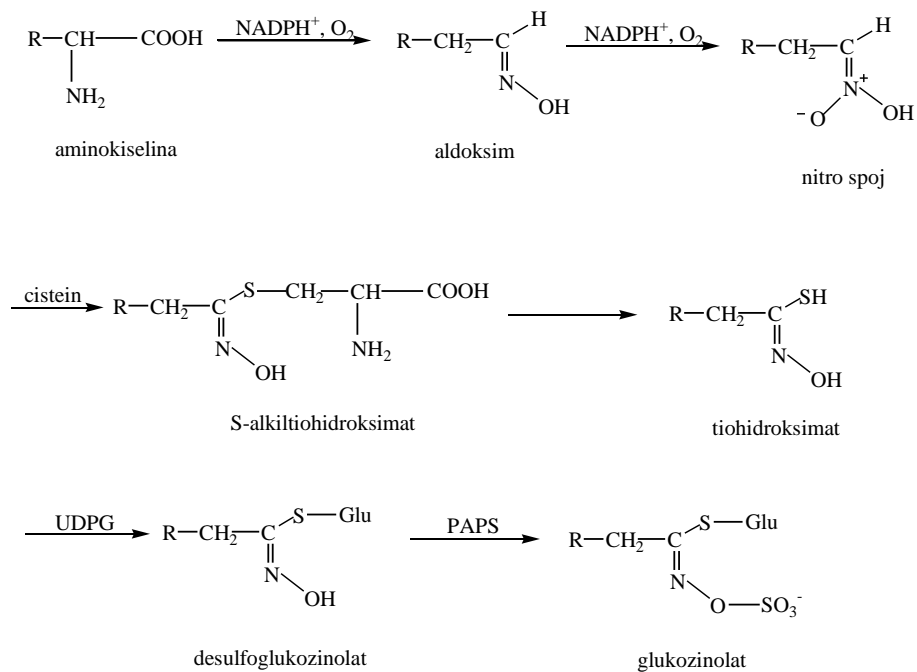
Nastali produkt može se istim biosintetskim putem ponovno elongirati ili ući u sljedeći stupanj biosintetskog puta.⁶



Slika 2. Shema elongacije bočnog ogranka aminokiseline prilikom sinteze glukozinolata⁷

B) Formiranje osnovne glukozinolatne strukture

Izgradnja glukozinolatne jezgre sastoji se od pet različitih biokemijskih koraka koje katalizira 13 različitih enzima. Važnu ulogu ima citokrom P450 koji katalizira dva početna koraka, pretvorbu prekursorne aminokiseline u aldoksim te oksidaciju aldoksima u nitrilne okside ili acil-nitro spojeve. Nakon navedenih reakcija slijedi kondenzacija s donatorom sumpora (glutation) pri čemu nastaje s-alkil tihidroksimat koji se cijepa u tihidroksimate. Tihidroksimati se vežu na glukozu te nastaju desulfoglukozinolat koji se u konačnici sulfatiraju u glukozinolate.⁶



Slika 3. Opća shema 2. stupnja biosinteze glukoziolata ⁸

C) Sekundarna modifikacija

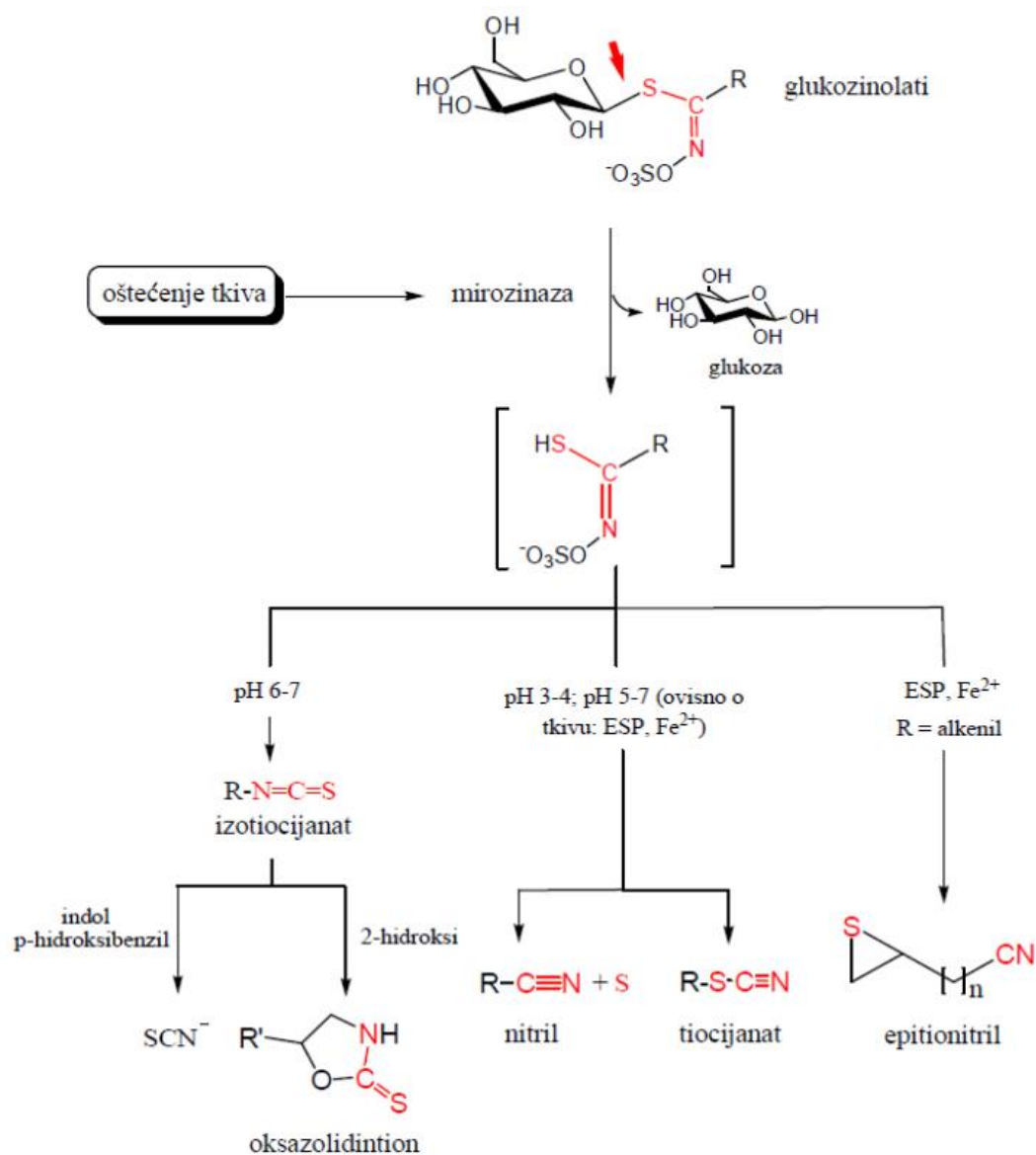
Nakon formiranja osnovne strukture, brojni glukoziolati podliježu nizu sekundarnih modifikacija pri čemu nastaje široki spektar ovih spojeva. Modificirati se može bočni lanac ali i glukoza skupina u reakcijama oksidacije, hidroksilacije, esterifikacije itd.⁹

1.1.2. Razgradnja glukozinolata

Glukozinolati su stabilni, netoksični spojevi. Biološki aktivni spojevi se oslobađaju razgradnjom glukozinolata u reakcijama kataliziranim mirozinazom (β -tioglukozidaza). Mirozinaza i glukozinolati se nalaze u odvojenim biljnim tkivima, a u kontakt dolaze oštećenjem biljnog tkiva primjerice žvakanjem, grijanjem, napadom insekata i sl. Produkt razgradnje je β -D-glukoza i tihidroksimat-*O*-sulfonat. Tihidroksimat-*O*-sulfonat je nestabilan intermedijer koji podliježe daljnjim reakcijama, pri čemu kao produkti nastaju biološki aktivni spojevi.²

Nestabilni intermedijer podliježe različitim reakcijama ovisno o kemijskim uvjetima. Kemijski uvjeti koji su od velikog značaja su pH, dostupnost iona željeza te prisutnost kofaktora koji djeluju na mirozinazu. Mogući produkti su izotiocijanati, oksazolidin-2-tioni, nitrili, epitionitrili i tiocijanati.⁹

Pri neutralnim pH uvjetima glavni produkt hidrolize je izotiocijanat. Ako izvorni glukozinolat na bočnom lancu u položaju C-2 ima hidroksilnu skupinu nastali izotiocijanat ciklizira u oksazolidin-2-tion. Pri kiselim uvjetima formiraju se nitrili. Ako je prisutan željezov (II) ion, bez obzira na pH vrijednost, glavni produkti su nitrili. U prisustvu epitiospecifičnog proteina (ESP) kao produkt može nastati epitionitril ako glukozinolat ima terminalnu dvostruku vezu. Prilikom hidrolize benzil-, alil-, 4-(metilsulfanil)butil-, 4-(metoksifenil)metil- i 4-(hidroksifenil)metil-glukozinolata produkti mogu biti i tiocijanati. Produkti hidrolize indolnih glukozinolata su indol-metanoli, konjugati askorbinske kiseline i oligomerne smjese.⁹



Slika 4. Shema razgradnje glukozinolata ¹⁰

1.1.3. Biološka aktivnost

Kao što je već spomenuto biološka aktivnost ove klase spojeva potječe od produkata nastalih hidrolizom glukozinolata. Produkti hidrolize su raznoliki pa je isto tako i njihova biološka aktivnost raznolika. Mogu imati pozitivne učinke (antikancerogeno), ali i potencijalno

toksično djelovanje. Hidrolizu glukozinolata u biljnom materijalu katalizira enzim mirozinaza, dok je u ljudskom organizmu hidroliza katalizirana mikrobima crijevne flore. Uloga produkata razgradnje glukozinolata u biljkama je višestruka ali se svodi na zaštitu biljaka od biljojeda, patogena i drugih stresnih situacija.²

Glukozinolatni metaboliti imaju veliki spektar svojstava, uključujući antifungalna, antimikrobna, herbicidna i insekticidna svojstva. Primjerice sulforafan, izoliran iz brokule, pokazuje potencijal za liječenje *Helicobacter pylori*, bakterije odgovorne za gastritis, koja je povezana s izraženim povećanjem rizika od raka želuca.

Dokazano je da glukozinolati i njegovi metabolički produkti inhibiraju enzim citokroma P450 koji aktivira mnoge kancerogene tvari. Konzumiranje povrća iz porodice Brassicaceae smanjuje rizik od raka pluća, želuca, dojke, prostate i sl.²

Istaknuti primjer biološki aktivnih produkata su izotiocijanati. Ovi spojevi se apsorbiraju iz tankog i debelog crijeva, a njihovi metaboliti su detektirani u ljudskom urinu nakon konzumiranja povrća iz reda kupusnjača. Izotiocijanati potiču apoptozu kancerogenih stanica te mogu selektivno inhibirati rast tumorskih stanica. Izotiocijanati djeluju i antimutageno pri čemu djeluju neposredno na inaktivaciju mutagena ili njegovih prekursora. Ne djeluju na proces popravka i replikacije mutagenog gena. Izotiocijanati se mogu ponašati kao modulatori upalnih procesa, pri čemu utječu na regulaciju ekspresije citogeneze 2. To je protuupalni enzim odgovoran za povišenu razinu prostaglandina, ključnog induktora upalnog procesa.²

Primjenom koja odgovara maksimalnom dnevnom unosu, glukozinolati nisu toksični.²

1.1.4. Analiza glukozinolata

Glukozinolati su stabilni spojevi ali pri visokim temperaturama ili u enzimskim uvjetima postaju nestabilni, odnosno podliježu reakcijama razgradnje. Ovakvo ponašanje glukozinolatnih spojeva predstavlja problem pri njihovoj ekstrakciji, izolaciji i kvantizaciji. Posljednjih godina razvijene su brojne metode za detekciju i kvantizaciju glukozinolata.¹¹

Ekstrakcija glukozinolata iz biljnog materijala uglavnom se provodi pomoću aprotinskih otapala, obično su to mješavine metanola i vode. Danas se sve češće koriste napredne tehnike ekstrakcije, poput ekstrakcije superkričnim fluidom, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), itd. Prednosti ovih tehnika su što se smanjuje količina ekstrakcijskog otapala i vrijeme ekstrakcije, a povećava se prinos analita u ekstraktu. Za ekstrakciju fitokemikalija, uključujući glukozinolate, najčešće se koristi ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.¹¹

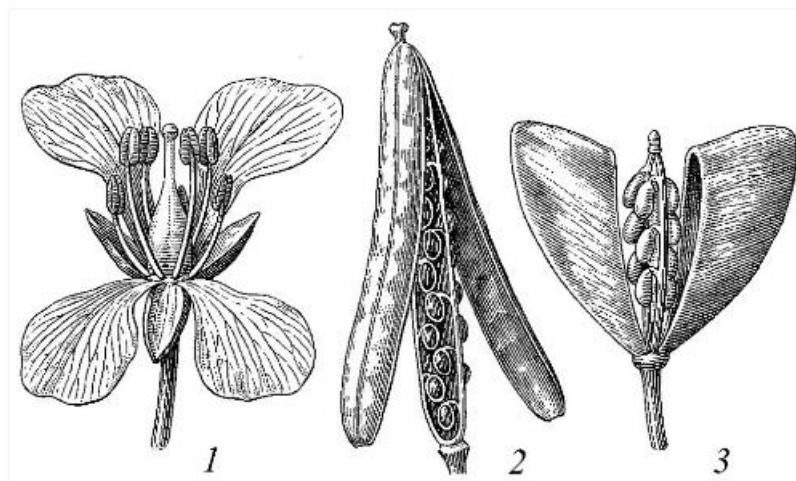
Detekcija, kvantifikacija i analiza glukozinolata provodi se korištenjem kromatografskih tehnika. Analiza se može provesti preko razgradnih produkata glukozinolata primjenom plinske kromatografije ili preko intaktnih i desulfo-oblika korištenjem tekućinske kromatografije. U počecima istraživanja glukozinolata identifikacija se provodila primjenom GC-MS tehnika preko razgradnih produkata glukozinolata. Poteškoće koje se javljaju pri analizi glukozinolata preko razgradnih produkata proizlaze iz činjenice da je broj dostupnih masenih spektara u komercionalno dostupnim bazama podataka nizak. Još jedna od problematika proizlazi iz činjenice da su neki razgradni produkti nestabilni u uvjetima u kojima se određuju ili su njihovi bočni lanci nehlapljivi. Zbog navedene problematike češće se koristi tekućinska kromatografija u kombinaciji s detektorom s nizom dioda DAD i MS detektorom. Pri analizi jednostavnih uzoraka, u kojima dominira jedan glukozinolat, moguće je provesti analizu preko intaktnog glukozinolata dok kod složenih uzoraka glukozinolati se određuju preko odgovarajućih desulfo-oblika.⁵

1.2. Brassicaceae

Porodica Brassicaceae (kupusnjače) je jedna od većih porodica iz carstva biljaka koja pripada redu Brassicales. Ova porodica se sastoji od 338-360 rodova i nešto više od 3700 vrsta. Rasprostranjenost ove porodice je velika te se može naći na svim kontinentima izuzev Antarktiku.¹²

Jedna od osnovnih zajedničkih karakteristika ove porodice je unikatni cvijet. Cvijet je izgrađen od četiri latice koje tvore križ. Vrste iz ove porodice najčešće imaju šest prašnika

pri čemu su četiri unutarnja dulja od dva vanjska. Plod je najčešće komuška ili komuščica. Većina biljnih vrsta su zeljaste biljke koje mogu imati različit životni vijek. Listovi su uglavnom naizmjenični i perasto urezani. Još jedna od karakteristika ove porodice je list koji nakon što se zdrobi ima ljut okus.¹²



Slika 5. Izgled biljnih dijelova iz porodice Brassicaceae (1) Cvijet; (2) plod komuška; (3) plod komuščica ¹³

Ova porodica uključuje veliki broj biljnih vrsta koje imaju ekonomski, agronomski, ali i znanstveni značaj. Vrste iz rodova *Brassica* i *Arabidopsis* uvelike su pridonijele razvoju moderne biologije biljaka. Poput razvoja generičkih sustava, razumijevanja interakcije biljka-kukac i biljka-patogen. Također su korištena u istraživanjima tolerancije i hiperakumulacije metala u tragovima. Nekoliko predstavnika ove porodice ima važnu ulogu i u postizanju održivosti okoliša.¹⁴

Pored navedenog važno je i naglasiti nutritivni značaj ove porodice. Vrste povrća koje pripadaju ovoj porodici smatraju se jednom od prvih kultiviranih biljnih skupina. Razlog leži u činjenici da su one bogat izvor fitokemikalija i bioaktivnih spojeva. Također predstavljaju dobar izvor minerala i elemenata u tragovima poput selenija, nikla, kalcija i cinka. Navedeni spojevi su biopristupačni zbog niskog sadržaja kelirajućih agensa poput oksalne kiseline i fitinske kiseline. Također ova porodica predstavlja najvažniji izvor glukozinolata. Glukozinolati su prisutni u različitim koncentracijama ovisno o biljnoj vrsti te proučavanom dijelu biljke. Također njihov udio ovisi o genotipu, uvjetima uzgoja i skladištenja.¹⁴

1.3. *Alliaria petiolata*

Alliaria petiolata (ljekovita češnjača) je dvogodišnja biljna vrsta iz porodice Brassicaceae. Visine je do 1 metar. Stabljika je uspravna i rebrasta te u gornjem dijelu blago razgranata. Biljka može rasti kao jedna stabljika ili kao više stabljika. Listovi su srcoliki ili trokutasti s tupo nazubljenim rubovima. List i stabljika ispuštaju karakterističan miris češnjaka kada se zgnječe. Cvjetovi rastu na vrhu biljke i sastoje se od četiri odvojene bijele latice križastog oblika. Plodovi su duguljaste, tanke komuščice dužine 2-8 cm u kojima se nalaze crnosmeđe sjemenke. Pojedinačna biljka može proizvesti 350 do 7900 sjemenki koje mogu preživjeti i do 5 godina.¹⁵



Slika 6. Ljekovita češnjača (*Alliaria petiolata* (M. Bieb.) Cavara et Grande)¹⁶

Podrijetlo ove vrste je Europa, a danas je rasprostranjena diljem svijeta. Biljka uobičajeno raste na blago zasjenjenim područjima duž rubova šuma, živica, staza i obalnih područja. Preferira alkalna tla dok ne podnosi jako kisela tla.

Alliaria petiolata ima tradicionalnu prehrambenu primjenu, koristila se kao začin tj. za aromatizaciju umaka, kao salata i kao dodatak mesu i kruhu. Lišće je bogat izvor vitamina A

i C. Povijesno se koristila i u medicinske svrhe, kao lijek za poticanje znojenja i otvaranja pora te kao lokalni antiseptik za liječenje rana.

Lišće biljke je bogato sekundarnim metabolitima koji biljku štite od predatora. Glukozinolati daju gorak okus koji odvraća predatore. Glavni prisutni glukozinolat koji je rasprostranjen u cijeloj biljci je sinigrin. Pored glukozinolata bogat je izvor peroksidaza, cijanida i inhibitora tripsina.¹⁵

1.4. Kromatografske tehnike

Kromatografija je separacijska tehnika u kojoj se sastojci smjese razdvajaju između dvije faze, nepokretna odnosno stacionarne i pokretne odnosno mobilne faze. Stacionarna faza može biti krutina ili tekućina vezana na nosač, a mobilna faza je fluid.¹⁷

Uzorak se otapa u mobilnoj fazi koja se zatim kreće preko stacionarne faze koja može biti u koloni ili plohi. Različite komponente uzorka imaju različitu interakciju sa stacionarnom fazom. One tvari koje imaju slabiju interakciju sa stacionarnom fazom putuju brže od onih s jakom interakcijom, što rezultira odvajanjem ovih tvari. Kao rezultat provedene analize dobivamo kromatogram, zapis analitičkog signala u funkciji vremena ili volumena eluata. Pored toga što se kromatografija koristi za separaciju, odnosno izolaciju određenog spoja, može se koristiti i za identifikaciju i kvantizaciju ukoliko se koristi zajedno s detektorom.¹⁷

Kromatografske tehnike možemo podijeliti s obzirom na prirodu ravnoteže između dvaju faza, pokretne i nepokretne. Razlikujemo sljedeće kromatografske tehnike:

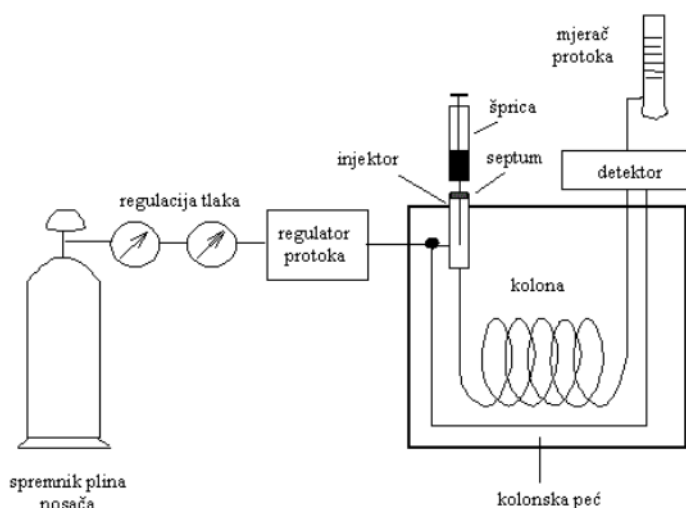
1. Razdjelna kromatografija - kao stacionarna faza se koristi tekućina vezana na čvrsti nosač
2. Adsorpcijske kromatografija – kao stacionarna faza se koristi čvrsta tvar na čiju površinu se analit adsorbira

3. Afinitetna kromatografija – stacionarnu fazu čine imobilizirane molekule na nosaču koje ostvaruju selektivnu interakciju s molekulama iz uzorka. Primjerice vezanje enzima s njegovom supstratom, protutijela s antigenom i sl.
4. Kromatografija isključenjem – stacionarna faza je takozvano molekulsko sito, odnosno materijal koji sadrži pore
5. Kromatografija ionske izmjene- stacionarna faza na svojoj površini ima nabijene funkcijske skupine.¹⁸

Glavna kategorizacija ovih tehnika je na temelju agregatnog stanja mobilne faze. Ako je mobilna faza plin govorimo o plinskoj kromatografiji, odnosno ako je mobilna faza tekućina govorimo o tekućinskoj kromatografiji. Obe tehnike se mogu dalje podijeliti u potkategorije na temelju njihovog mehanizma odvajanja.¹⁷

1.4.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je tehnika u kojoj se kao mobilna faza koristi plin. Analiti koji se mogu analizirati moraju biti hlapljivi i temperaturno stabilni. Glavne komponente ovog sustava su izvor plina, sustav injektiranja uzorka, kolona smještena u peći i detektor.



Slika 7. Shematski prikaz plinskog kromatografa¹⁹

Mobilna faza se uobičajeno naziva plin nositelj, a plinovi koji se često koriste su vodik, helij, dušik i argon. Ovi plinovi su jeftini, lako ih je nabaviti, inertni su (osim vodika) te su sigurni za uporabu. Prednosti korištenja plina kao mobilne faze su što on ne reagira s komponentama uzorka, mogu se odrediti male količine analita te se može separirati velik broj spojeva u jednom ciklusu.¹⁷

Kod složenih uzoraka, sadrže analite sa širokim spektrom hlapljivosti, koriste se promjenjivi uvjeti rada. Najčešće se koristi metoda temperaturnog programiranja, gdje se tijekom analize mijenja temperatura sustava. Na početku se koriste niske temperature pri kojima eluiraju najhlapljiviji spojevi. Zatim se temperatura povećava kako bi se i manje hlapljivi spojevi odvojili i eluirali s kolone. Druga metoda se sastoji od promjene protoka plina nositelja tijekom analize. Smanjen protok omogućuje bolju interakciju analita sa stacionarnom fazom, odnosno njegovo zadržavanje u koloni. Nakon nekog vremena se protok povećava što omogućuje eluiranje analita koji ostvaruju jaku interakciju sa stacionarnom fazom. Korištenje ovako programiranih sustava daju bolju rezoluciju i kraće vrijeme analize.¹⁷

Kolone u GC sustavima mogu se svrstati u dvije glavne kategorije; punjene kolone i otvorene kapilarne kolone. Punjene kolone su izgrađene od staklene ili metalne cijevi koja je duga 1-2 m s promjerom od nekoliko milimetara, cijev je ispunjena malim česticama nosača koje djeluju kao adsorbensi ili su obložene stacionarnom fazom. Otvorene kapilarne kolone su znatno duže, 10-100 m s manjim unutarnjim promjerom. Stacionarna faza se nalazi pričvršćena na unutarnju površinu kapilare. Ove kolone daju bolju rezoluciju, imaju nižu granicu detekcije i bolje razdvajanje zbog čega se češće primjenjuju.¹⁷

Detektori koji se koriste mogu se općenito podijeliti u dvije skupine, na opće i selektivne detektore. Primjer općih detektora su TCD (detektor toplinske vodljivosti) i FID (plamenoionizacijski detektor), dok je NPD (detektor dušika i fosfora) primjer selektivnog detektora. Često korišten detektor je maseni spektrometar (MS). Analiza uzoraka u ovako spregnutom sustavu omogućuje identifikaciju spojeva i njihovu kvantizaciju. Uobičajene metode ionizacije koje se koriste u GC/MS su ionizacija udarom elektrona i kemijska ionizacija. Nastali ioni odvajaju se prema njihovoj masi i/ili naboju pomoću uređaja kao što je kvadropolni analizator mase. Kao rezultat analize dobivaju se dva grafa, maseni

kromatogram (broj iona izmjerenih u svakom vremenu eluiranja) i maseni spektar (vide se svi ioni koji eluiraju u određenom vremenu). Iz masenog spektra možemo dobiti informaciju o molekulskoj masi spoja i njegovoj strukturi.¹⁷

1.4.2. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (LC) je kromatografska tehnika u kojoj se kao mobilna faza koristi tekućina. Najčešće se koristi stacionarna faza koja se nalazi unutar kolone. Uvjet koji analit mora ispuniti da bi se mogao analizirati LC-om je da mora biti topljiv u mobilnoj fazi. Ova tehnika je pogodnija za termolabilne spojeve jer je radna temperatura znatno manja u usporedbi s GC-om. Zadržavanje analita u koloni ovisi o njegovoj interakciji s obje faze. Kolone koje koriste u LC su znatno kraće što je posljedica korištenja tekućine kao mobilne faze. Tekućine imaju veću gustoću i viskoznost u usporedbi s plinom što znači da su potrebni viši tlakovi kako bi se mobilna faza dovela u kolonu.¹⁷

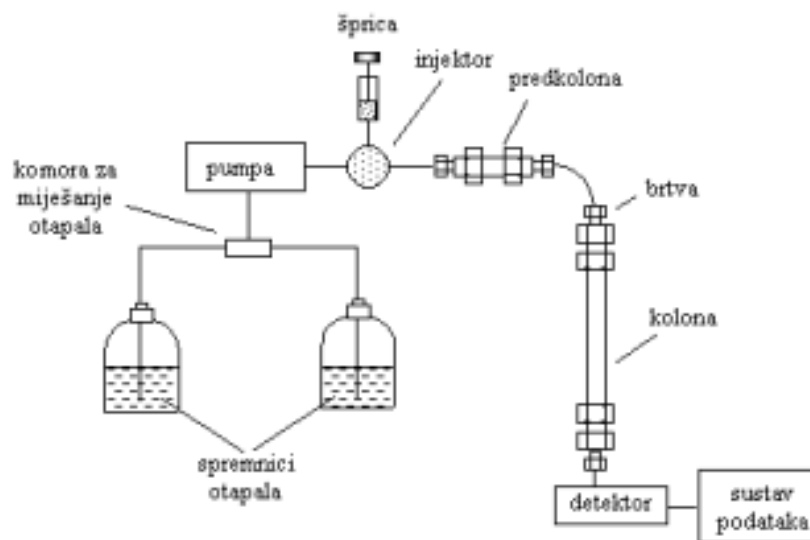
Tzv. klasični LC koristi nosače napravljene od relativno velikih čestica nepravilnog oblika. Korištenje manjih, jednoličnijih i krućih nosača dovelo je do boljeg odjeljivanja i nižih granica detekcije. Tehnika u kojoj se koriste ovakvi nosači naziva se tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC).¹⁷

Mobilnu fazu možemo klasificirati na jaku i slabu mobilnu fazu. Jaka mobilna faza je ona koja brzo eluira otopljenu tvar iz kolone što se događa kada su mobilna i stacionarna faza slične, odnosno ostvaruju sličnu interakciju s analitom. Slaba mobilna faza je ona koja otopljenu tvar sporo eluira iz kolone što je posljedica velike razlike u interakciji mobilne i stacionarne fazi s otopljenom tvari. Posljedično stacionarna faza određuje hoće li tekućina biti slaba ili jaka mobilna faza.¹⁷

Postoje različite vrste detektora koji se koriste u tekućinskoj kromatografiji. Često korišteni detektori su UV/Vis detektor, detektor indeksa loma, fluorescentni detektor, detektor vodljivosti i elektrokemijski detektor. Često se kao detektor koristi maseni

spektrometar. Upotreba masene spektrometrije s LC-om može se koristiti za kvantitativnu i kvalitativnu analizu.

Instrumentacija HPLC instrumenta sastoji se od sljedećih dijelova: spremnik mobilne faze, cijev za dovod mobilne faze, sustav za otplinjavanje, pumpe, injektora uzorka, kolone i detektora.¹⁶



Slika 8. Shematski prikaz HPLC uređaja¹⁹

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Aparatura i kemikalije

Kemikalije:

- Metanol (70 %), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska,
- Natrijev acetat, Merck, Darmstadt, Njemačka,
- Dekstran (DEAE-sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Ultračista voda
- Sulfataza, (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Tioglukozidaza (iz Sinapisalba), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Diklormetan, T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska

Aparatura:

- Električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- Analitička vaga, Explorer® Semi-Micro, OHAUS, SAD,
- Vortex, Domel, Železniki, Slovenija
- Ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka,
- Vodena kupelj, Julabo, Seelbach, Njemačka,
- Centrifuga, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka
- Laboratorijske čaše,
- Centrifugalne mikropruvete,
- Kapalice,
- Lijevak
- Lijevak za odjeljivanje
- Mikropipete, Sartorius AG, Göttingen, Njemačka
- Erlenmeyerova tikvica
- Liofilizator, Labconco, Kansas City, SAD
- Filtri za šprice, Macherey-nagel, Düren, Njemačka

- Uređaj za uparavanje strujom dušika, VLM, Bielefeld, Njemačka
- UHPLC-DAD-MS/MS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
- GC-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD

2.2. Biljni materijal

Biljni materijal (korijen i nadzemni dio – stabljika, list, cvijet i komuška) je prikupljen u Žrnovnici (okolica Splita) 24.4.2022. nakon čega je sušen na suhom i tamnom mjestu do analize.



Slika 9. Ljekovita češnjača (*Alliaria petiolata* (M. Bieb.) Cavara et Grande)

2.3. Izolacija desulfoglukozinolata

Prvi korak u izolaciji desulfoglukozinolata je priprema kolona. Kao kolone su korištene staklene pipete napunjene filter papirom, koji je prethodno smljeven u mlincu, visine oko 1 cm. Mljeveni filter papir je zbijen kako ne bi došlo do istjecanja gela. Tako pripremljene kolone stavljaju se na stalak ispod kojeg stavljamo posudu za otpad. Zatim se u kolonu dodaje 0,5 mL dekstrana i 1 mL ultračiste vode.

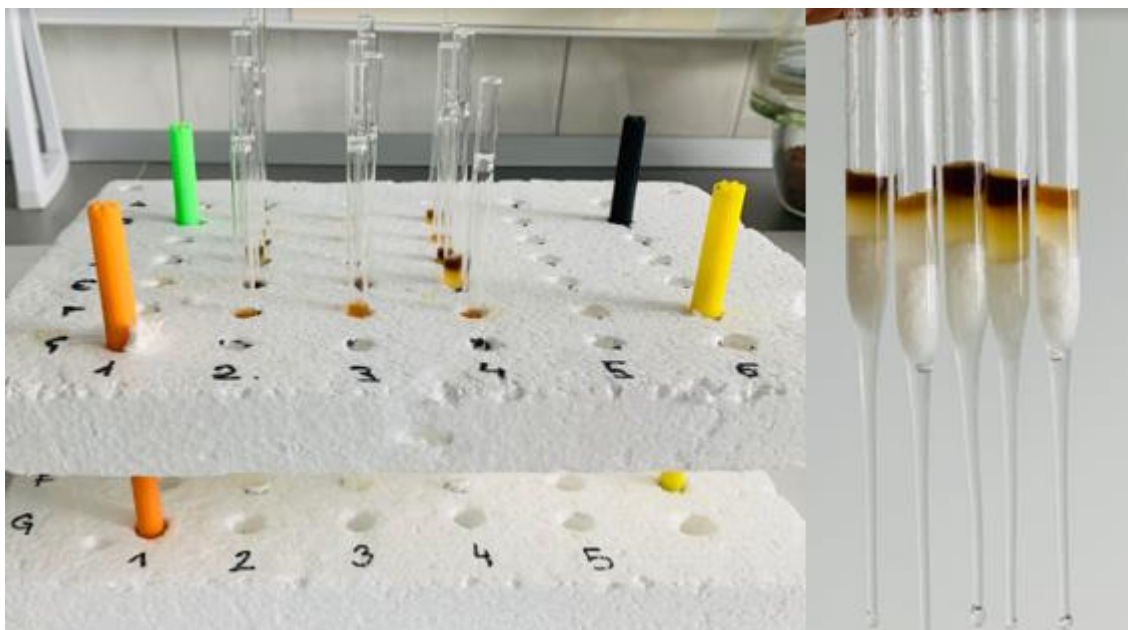
Sljedeći korak je priprema bilnog materijala. Osušeni biljni materijal se najprije separira na pojedine biljne dijelove nakon čega se usitni u mlincu. Analizirani biljni dijelovi su stabljika, cvijet, komuška, korijen i list. Zatim usitnjeni biljni materijal važno na analitičkoj vagi u mikroepruvete. Važe se 100 mg uzorka s odstupanjem $\pm 0,1\%$. U izvagani uzorak dodajemo 1 mL metanola nakon čega je smjesa homogenizirana. Na mikroepruvete se stavlja sigurnosna kapica, nakon čega smjesu stavljamo u vodenu kupelj, s ciljem inaktivacije mirozinaze, na 90 °C na 5 minuta. Poboľšanje ekstrakcije postiže se stavljanjem uzorka u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta. Zatim uzorak stavljamo na centrifugu nakon čega slijedi odvajanje supernatanta pipetiranjem te se on stavlja na kolonu. U mikroepruvetu s biljnim materijalom dodajemo novi obrok metanola te ponavljamo postupak.



Slika 10. Pripremljeni uzorci bilnog materijala

Sljedeći korak je ispiranje, najprije se dodaje 2 puta po 1 mL metanola s ciljem uklanjanja nepolarnih molekula. Zatim se ispiru metanol dodatkom 1 mL ultračiste vode. Nakon čega se dodaje natrijev acetat, 2 puta po 1 mL, kako bi se postigli optimalni uvjeti za djelovanje sulfataze.

Posudu za otpad zamjenjujemo mikroepruvetama u koje skupljamo odgovarajuće ekstrakte. Iznad mikroepruveta stavljamo kolone u koje dodajemo 20 μL otopine sulfataze i 50 μL natrijevog acetata. Ovako pripremljene uzorke ostavljamo preko noći kako bi enzim u potpunosti djelovao. Desufoglukozinolate eluiramo s kolone dodatkom 2 puta do 0,75 mL ultračiste vode.



Slika 11. Kolone korištene za ekstrakciju desulfoglukozinolata

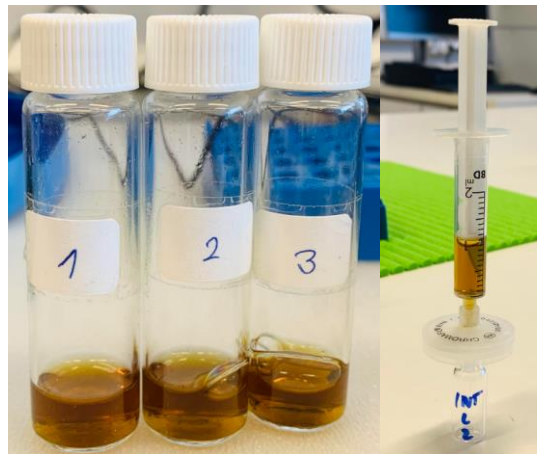
Mikropruvete koje sadrže ekstrakt stavljene su na liofilizaciju tijekom 24 sata na -52°C. Nakon liofilizacije u uzorak dodajemo 1 mL ultračiste vode. Tako pripremljen uzorak prebacimo u bočice za HPLC analizu te čuvamo u zamrzivaču (-18 °C) do analize.



Slika 12. Liofilizator

2.4. Izolacija intaktnih glukozinolata

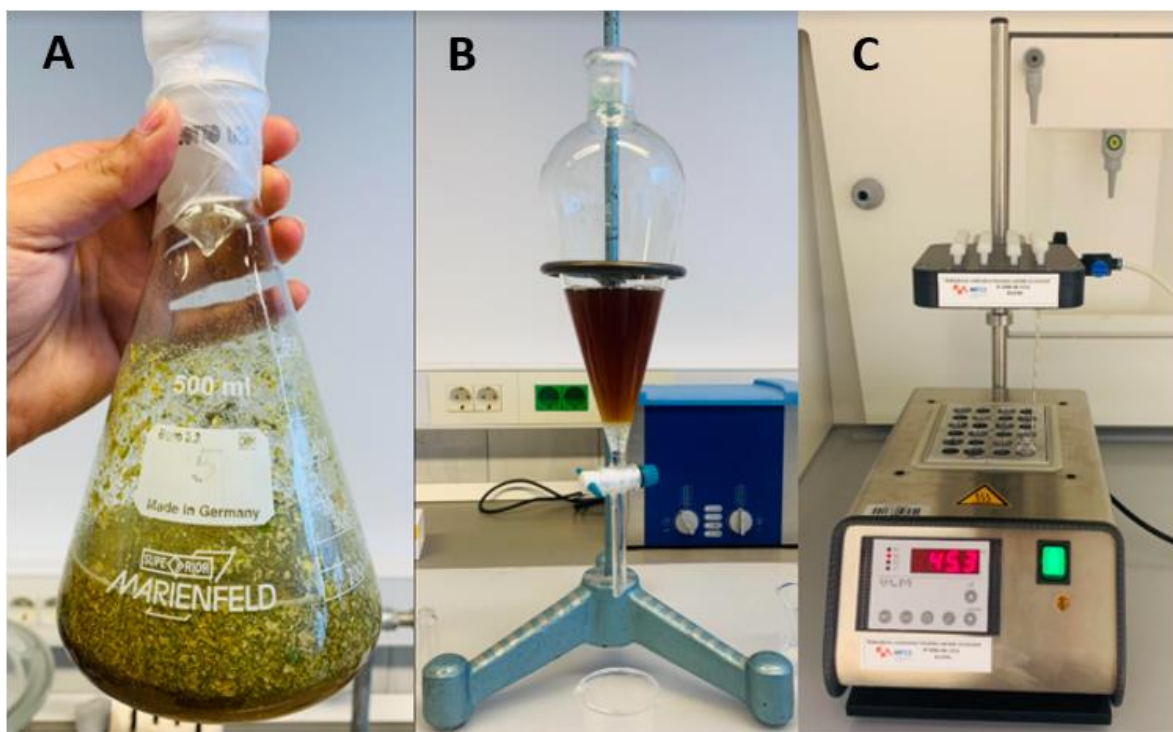
Postupak izolacije jednak je izolaciji desulfo-oblika, ali se uzorak ne nanosi na kolonu te se ne desulfatira. Također nije analizirana cijela biljaka, nego samo list. Ekstrakt je pročišćen korištenjem filtra promjera pora $0,45 \mu\text{m}$, nakon čega slijedi njegova analiza na UHPLC-DAD-MS/MS uređaju.



Slika 13. Uzorak intaktnih glukozinolata i njihova filtracija

2.5. Izolacija razgradnih produkata glukozinolata

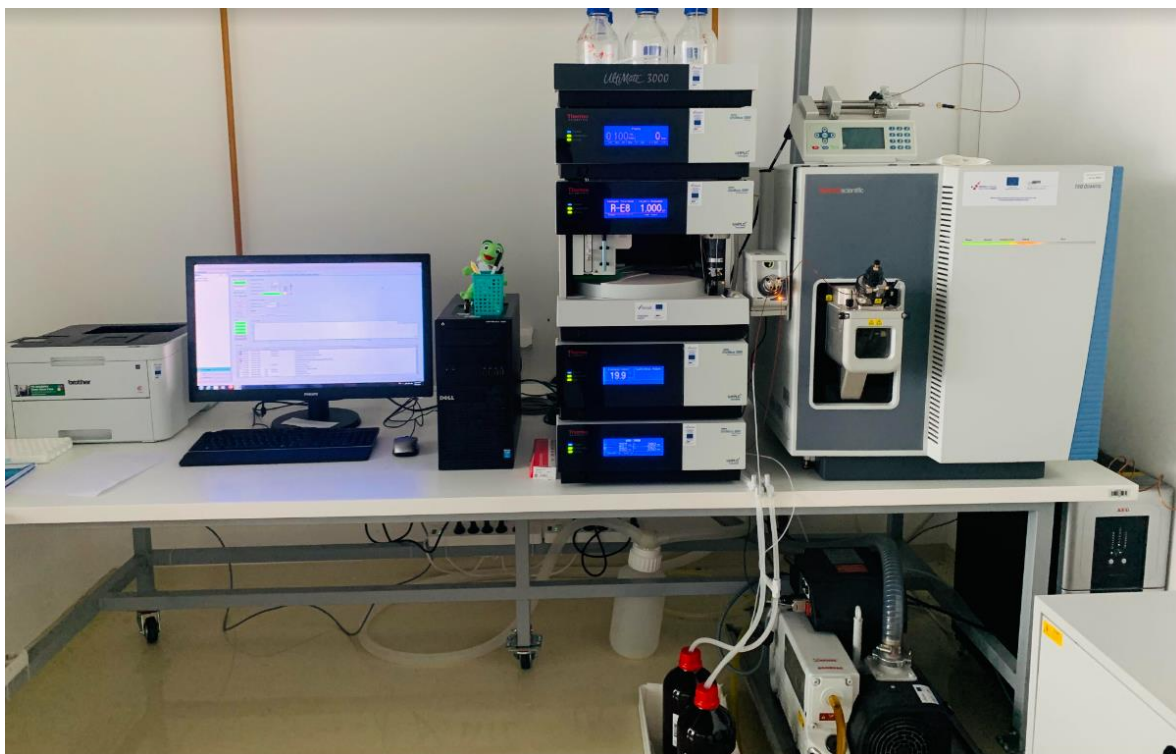
Za postupak izolacije razgradnih produkata glukozinolata korištena je suhi biljni materijal lista i stabljike. Biljni materijal je usitnjen, izvagan (11,85 g), prebačen u tikvicu te mu je dodana voda. S obzirom na to da je tkivo biljnog materijala oštećeno dolazi do oslobađanja mirozinaze i posljedično hidrolize glukozinolata. Kako bi se osigurala potpuna hidroliza dodan je i egzogeni enzim mirozinaza. Tako pripremljen uzorak ostavljen je 24 sata, nakon čega je filtriran, a hlapljivi spojevi te filtrat ekstrahirali pomoću diklormetana. Prije analize uklonjen je višak otapala.



Slika 14. Koraci pri izolaciji razgradnih produkata glukozinolata: A-autoliza; B-ekstrakcija; C-uparavanje u struji dušika

2.8. UHPLC-DAD-MS/MS analiza

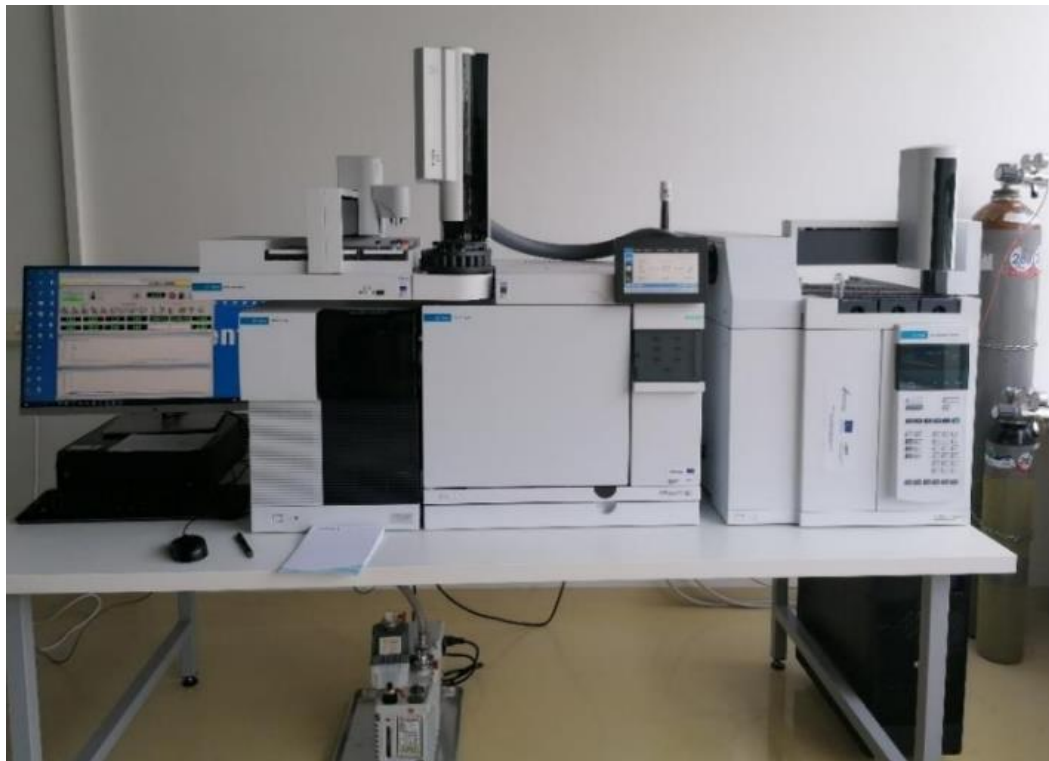
Za analizu desulfoglukozinolata i intaktnih glukozinolata korišten je uređaj UHPLC-DAD-MS/MS Ultimate 3000RS s TSQ Quantis MS/MS detektorom (Thermo Fisher Scientific, SAD) na koloni Hypersil GOLD 3.0 mm × 100 mm, promjera čestica 3.0 μm (Thermo Fisher Scientific, SAD). Kao mobilna faza korišteni su voda (otapalo A) i 30% acetonitril (otapalo B) uz protok od 0.5 mL/min kako slijedi: 0,14 min 96% A i 4% B; 7,84 min 14% A i 86% B; 8,96 min 14% A i 86% B; 9,52 min 5% A i 95% B; 13,16 min 5% A i 95% B; 13,44 min 96% A i 4% B; 15,68 min 96% A i 4% B. Volumen uzorka je 5 μL, a temperatura kolone 25 °C. Signali su snimani DAD detektorom pri 227 nm, a maseni spektri su snimani u pozitivnom načinu pri 350 °C. Kao standard za kvantizaciju desulfoglukozinolata korišten je desulfosinigrin, pri čemu su se za izračun koncentracije pojedinog desulfoglukozinolata koristile literaturne vrijednosti za čimbenike odziva.



Slika 15. UHPLC-DAD-MS/MS instrument

2.9. GC-MS analiza

Uzorci su analizirani pomoću plinskog kromatografa sa spektrometrom masa s trostrukim kvadropolom (8890 GC-7000D GC/TQ, Agilent Technologies, SAD) na nepolarnoj koloni HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Agilent Inc., SAD). Plin nositelj je helij, protok je postavljen na 1 mL/min, temperatura injektora iznosila je 250 °C te je volumen injektiranog uzorka 1 μ L. Temperatura kolone postavljena je 3 min na 60 °C, zatim zagrijavanje na 246 °C brzinom od 3°C / min te se ta temperatura zadržavala 25 min. Energija ionizacije iznosi 70 eV, temperatura izvora iona postavljena je na 200 °C, a m/z raspon je bio postavljen na 40 – 350.



Slika 16. GC-MS instrument

3. REZULTATI I RASPRAVA

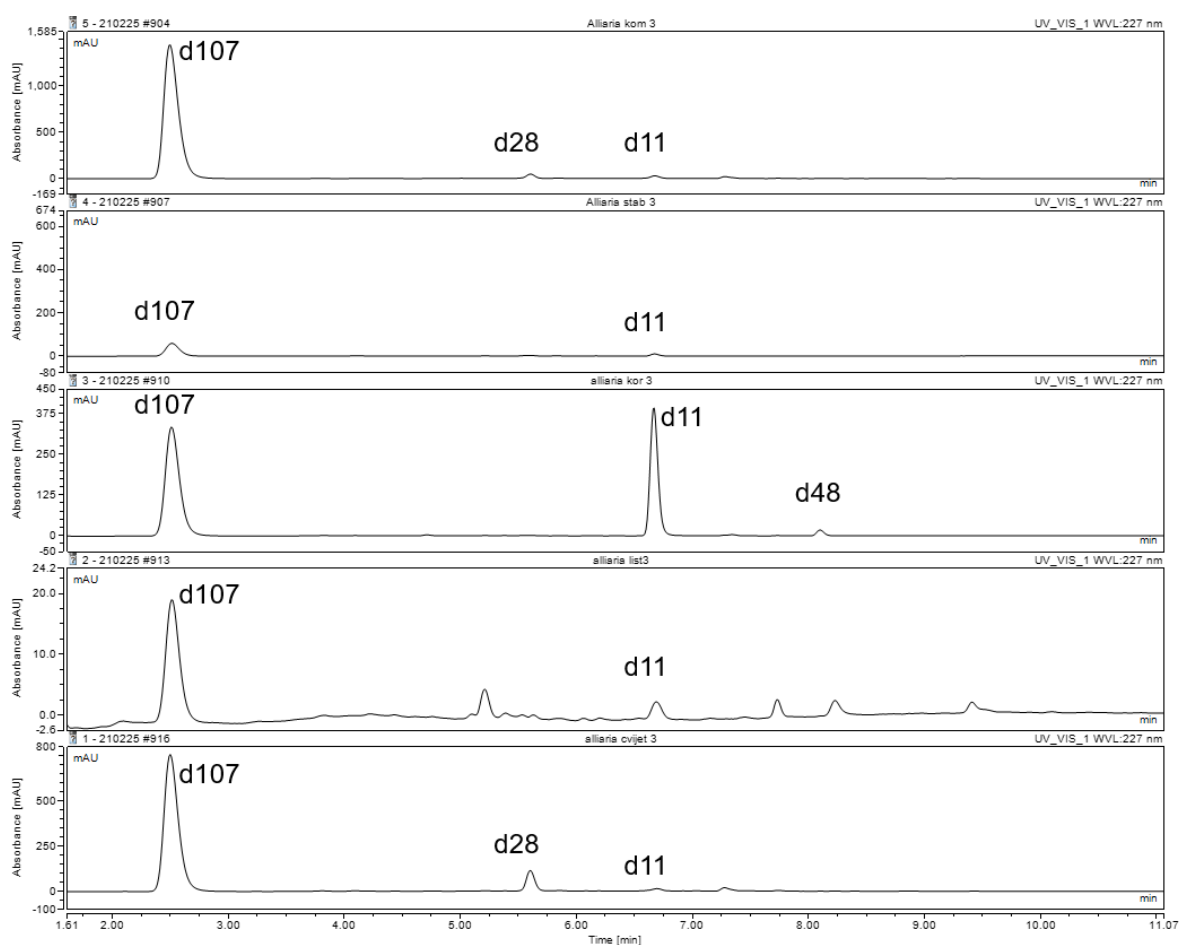
U ovom radu su izolirani i kvantizirani glukozinolati iz biljke *Alliaria petiolata* korištenjem vezanog sustava tekućinska kromatografija-masena spektrometrija. Provedena je analiza desulfoglukozinolata, ali i intaktnih glukozinolata. Također je analiziran i diklormetanski ekstrakt nakon provedene autolize korištenjem vezanog sustava plinska kromatografija-masena spektrometrija.

3.1. UHPLC-MS/MS analiza

Analizom desulfoglukozinolata provedenoj na UHPLC-MS/MS instrumentu utvrđeno je prisustvo šest signala za koje su dobiveni podaci (vrijeme zadržavanja, UV spektar, masa osnovnog pika i njegova fragmentacija) omogućili identifikaciju i kvantizaciju prisutnih glukozinolata. Na masenom spektru najprije je namješteno snimanje svih masa sa svrhom identifikacije molekulskih iona. Molekulski ion odgovara masi desulfoglukozinolata uvećanoj za masu natrija. Pored snimanja svih masa provedeno je i pretraživanje produktnih iona nakon fragmentacije. Molekulski ion podvrgnut je fragmentaciji u drugom kvadropolu, korištenjem plina argona, a dobiveni spektri omogućili su dodatnu potvrdu strukture glukozinolata. Također su snimljeni i UV-spektri koji imaju karakteristične vrpce u ovisnosti je li glukozinolat alifatski, aromatski ili indolni.

Iz dobivenih kromatograma (slika 17) uočena su 6 različitih signala koja odgovaraju desulfoglukozinolatima. Usporedbom retencijskog vremena i mase natrijevog adukta desulfoglukozinolata (tablica 1.) s literaturnim podacima omogućilo je identifikaciju glukozinolata. Na vremenu zadržavanja od 1 min uočen je veliki signal koji sadrži masu $m/z = 302$ koja odgovara masi natrijeva adukta desulfosinigrina ($m/z 302, [M+Na]^+$). Na vremenu zadržavanja 5,5 min uočen je pik koji sadrži masu $m/z = 407$ koja odgovara masi natrijeva adukta desulfo-4-hidroksiglukobrasicina. Na vremenu zadržavanja 7 min uočen je pik koji sadrži masu $m/z = 352$ koja odgovara masi natrijeva adukta desulfoglukotropeolina. U

korijenu na vremenu 8,1 min zadržavanja uočen je pik koji sadrži masu $m/z = 421$ koja odgovara masi natrijeva adukta desulfo-4-metoksiglukobracicina te je u korijenu na vremenu 4,6 min zadržavanja uočen pik koji sadrži masu $m/z = 421$ koja odgovara masi natrijeva adukta desulfoglukosinabina. U komuški je detektiran još jedan glukozinolat na vremenu 5,3 min zadržavanja s masom $m/z = 421$ koja odgovara masi natrijeva adukta desulfoizobutil-GL.



Slika 17. UHPLC kromatogrami desulfoglukozinolata: a) komuška b) stabljika c) korijen d) list e) cvijet. Oznake na kromatogramu: d107 – desulfosinigrin; d28 – desulfo-4-hidroksiglukobracicin; d11- desulfoglukotropeolin; d48 - desulfo-4-metoksiglukobracicin

Kvantizacija je napravljena preko krivulje umjeravanja sinigrina uz primjenu faktora odziva za svaki od pojedinih spojeva:

1. 4-hidroksiglukobrasicin 0,28
2. 4-metoksiglukobrasicin 0,25
3. glukotropeolin 0,95

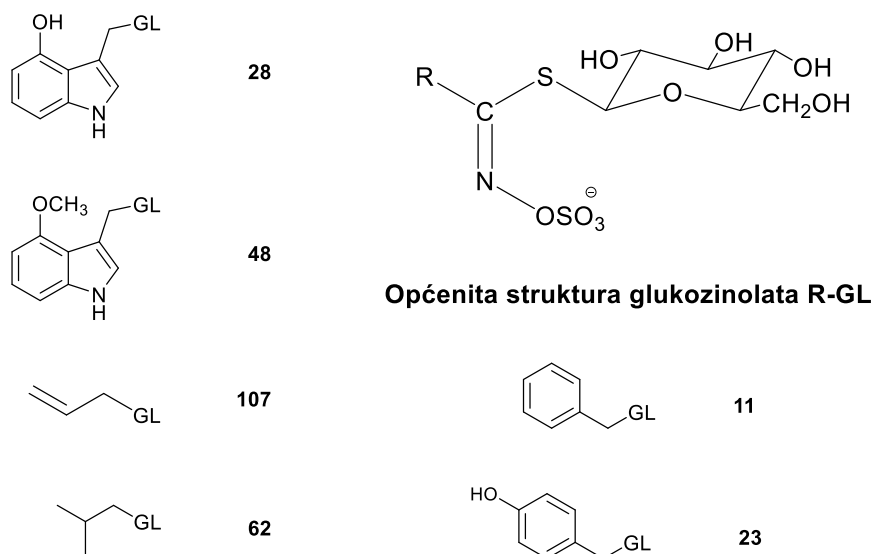
Tablica 1: UHPLC analiza desulfoglukozinolata ljekovite češnjače (*A. petiolata*)

Kомушка			
Ime spoja	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoglukozinolata + Natrij	Količina glukozinolata $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala
Sinigrin	1,0	302	97,5028
Izobutil-GL	5,3	318	tr
4-Hidroksiglukobrasicin	5,5	407	0,7309
Glukotropeolin	7,0	352	1,3406
Stabljika			
Ime spoja	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoglukozinolata + Natrij	Količina glukozinolata $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala
Sinigrin	1,0	302	4,0347
4-Hidroksiglukobrasicin	5,5	407	0,0078
Glukotropeolin	7,0	352	0,2873
List			
Ime spoja	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoglukozinolata + Natrij	Količina glukozinolata $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala
Sinigrin	1,0	302	1,5840
4-Hidroksiglukobrasicin	5,5	407	n.i.
Glukotropeolin	7,0	352	0,0373
Cvijet			
Ime spoja	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoglukozinolata + Natrij	Količina glukozinolata $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala
Sinigrin	1,0	302	58,4037
4-Hidroksiglukobrasicin	5,5	407	1,4868
Glukotropeolin	7,0	352	0,9763
Korijen			
Ime spoja	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoglukozinolata + Natrij	Količina glukozinolata $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala
Sinigrin	1,0	302	25,4001
Glukosinabin	4,6	368	tr
4-Hidroksiglukobrasicin	5,5	407	n.i.
Glukotropeolin	7,0	352	14,2210
4-Metoksiglukobrasicin	8,1	421	0,1650

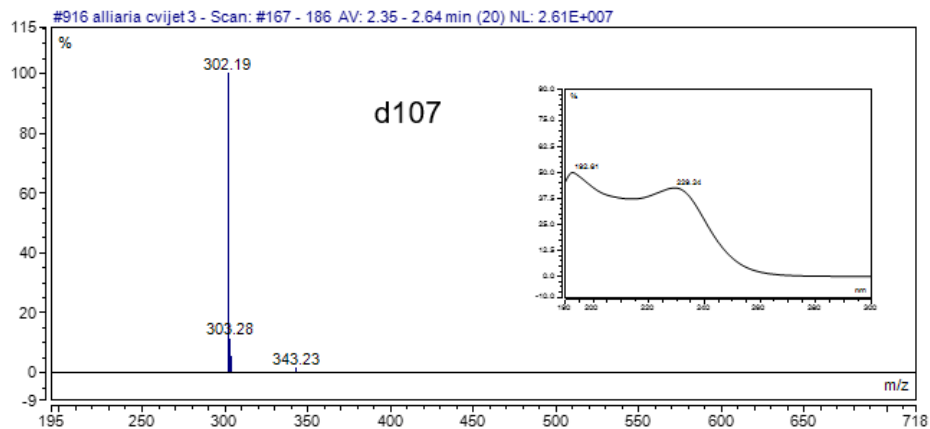
*tr – tragovi; $<0,1 \mu\text{mol/g}$

*n.i. – nije identificiran

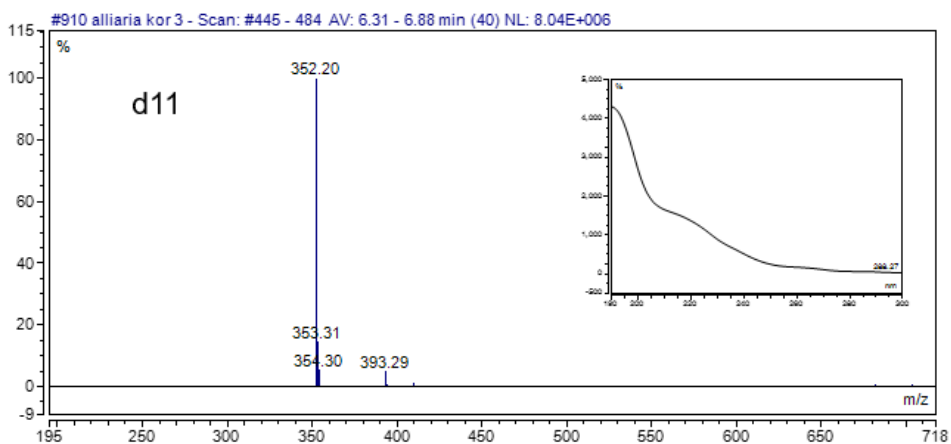
Iz tablice je vidljivo da je u ovoj biljnoj vrsti glavni glukozinolat sinigrin koji je prisutan u svim biljnim dijelovima i u najvećoj koncentraciji. Sinigrina najviše ima u komuški (97,5028 $\mu\text{mol/g}$) zatim u cvijetu (58,4037 $\mu\text{mol/g}$) i korijenu (25,4001 $\mu\text{mol/g}$), dok je u listu i stabljici manje zastupljen. Nadalje u svim biljnim dijelovima pronađen je glukotropeolin u znatno manjim koncentracijama u odnosu na sinigrin. Najveća količina glukotropeolina pronađena je u korijenu (14,2210 $\mu\text{mol/g}$), zatim redom u komuški, cvijetu, stabljici te najmanje u listu. 4-hidroksiglukobrasicin je pronađen u komuški, cvijetu i stabljici dok nije prisutan u listu i korijenu. U korijenu su nađena još dva glukozinolata 4-metoksiglukobrasicin (0,1650 $\mu\text{mol/g}$) i glukosinabin u tragovima.



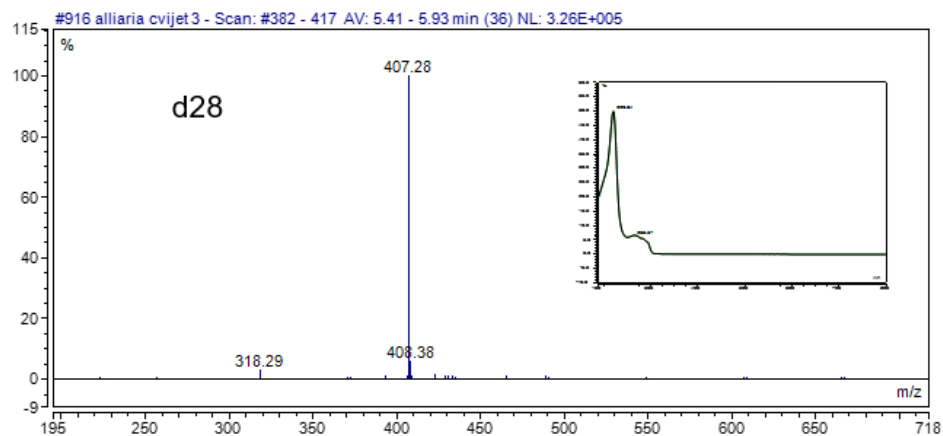
Slika 18. Struktura identificiranih glukozinolata (28- 4-hidroksiglukobrasicin ; 48 - 4-Metoksiglukobrasicin ; 107 - Sinigrin; 62- Izobutil-glukozinolat; 11- Glukotropeolin; 23 - Glukosinalbin)



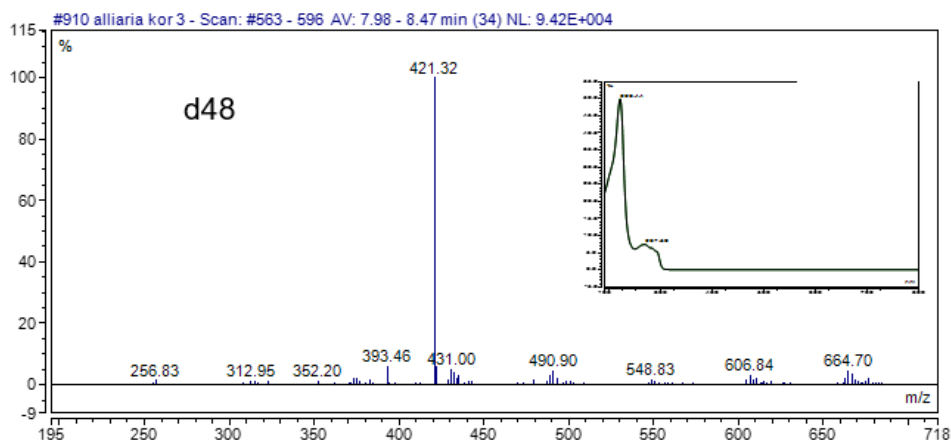
Slika 19. Spektar masa i UV spektar desulfosinigrina



Slika 20. Spektar masa i UV spektar desulfoglukotropeolina

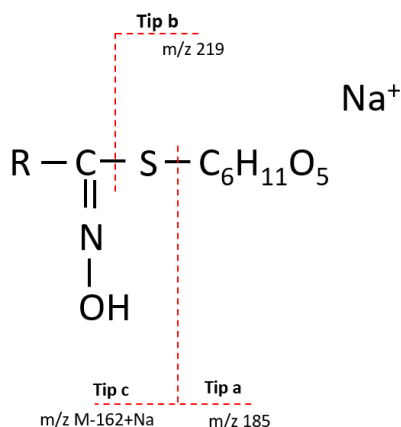


Slika 21. Spektar masa i UV spektar desulfo 4-hidroksiglukobrasicin

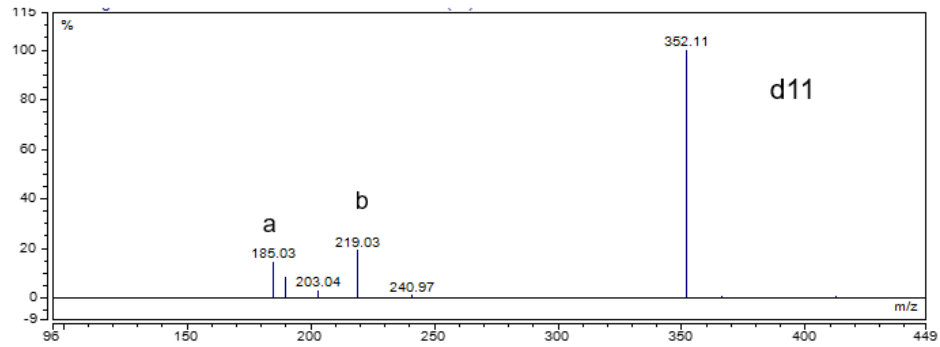


Slika 22. Spektar masa i UV spektar desulfo 4-metoksiglukobrasicin

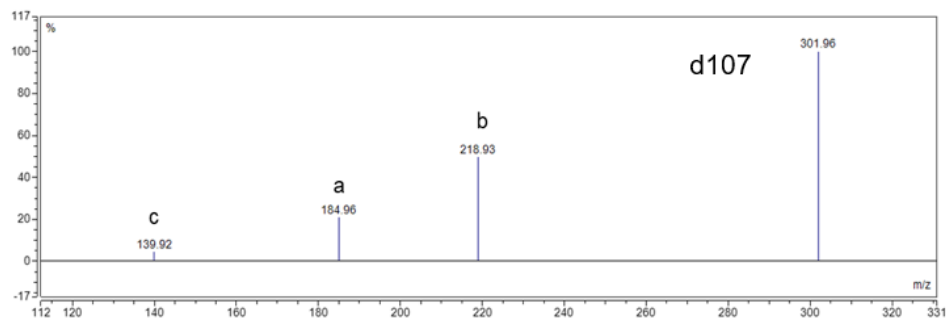
Pored snimanja svih masa provedeno je i snimanje produktnih iona. Molekulski ion podvrgnut je fragmentaciji u drugom kvadropolu, korištenjem plina argona, a dobiveni spektri omogućili su dodatnu potvrdu strukture glukozinolata. Natrijevi adukti desulfoglukozinolata fragmentiraju se na specifičan način i s obzirom na način fragmentacije nazvani su fragmentacija tipa a, b i c (slika 23). Ovi specifični fragmenti nastaju pucanjem veze s lijeve ili desne strane sumpora. Može doći do pucanja tioglukozidne veze pri čemu može nastati pik na m/z 185 [anhidroglukoza + Na^+] (tip a) ili može doći do gubitka anhidroglukoze [$M-162 + \text{Na}^+$] (tip c). veza može puknuti i s druge strane u odnosu na sumpor pri čemu nastaje karakterističan pik $m/z = 219$ [tioglukoza + Na^+] (tip b).



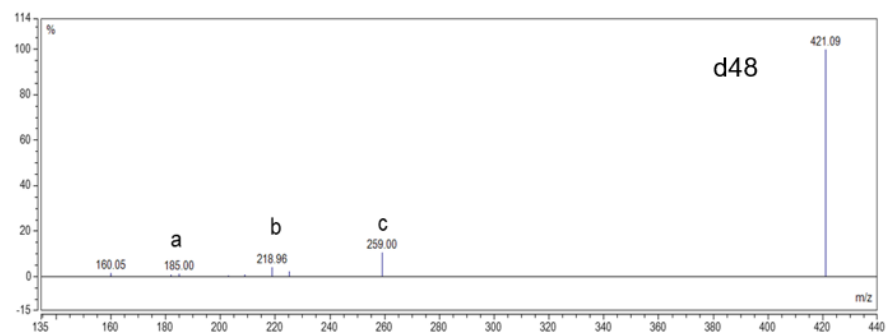
Slika 23. Shema tipova fragmentacije natrijevog adukta desulfoglukozinolata



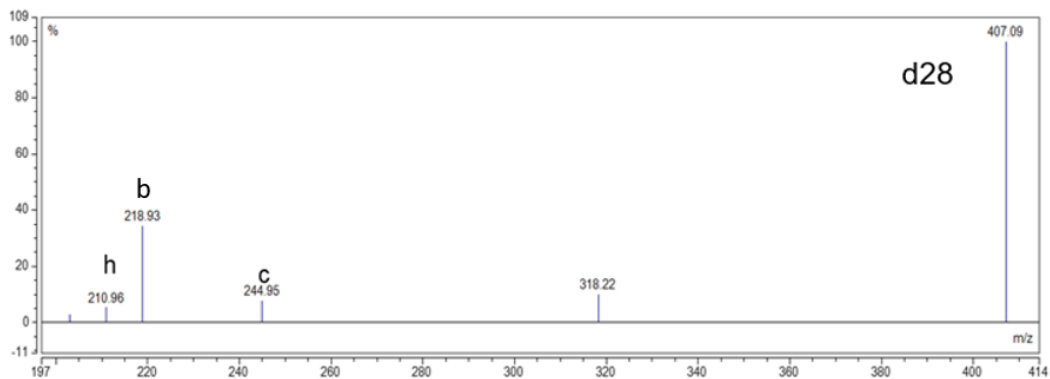
Slika 24. MS2 spektar glukotropolina
 a-[anhidroglikoza + Na]⁺; b- [tioglikoza + Na]⁺



Slika 25. MS2 spektar sinigrina
 a-[anhidroglikoza + Na]⁺; b- [tioglikoza + Na]⁺; c- [M-162 + Na]⁺



Slika 26. MS2 spektar 4-metoksigliukobrasicina
 a-[anhidroglikoza + Na]⁺; b- [tioglikoza + Na]⁺; c- [M-162 + Na]⁺

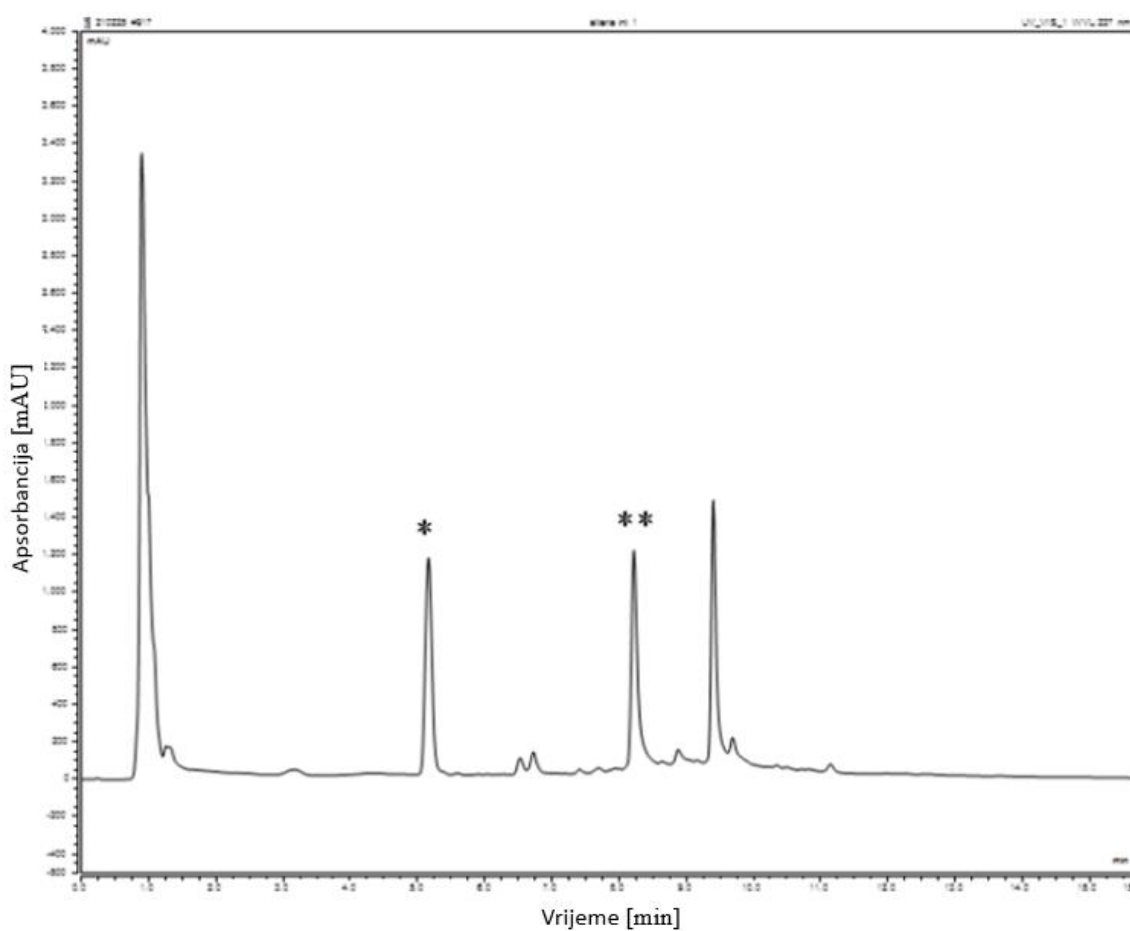


Slika 27. MS2 spektar 4-hidroksiglukobrasicina

b- [tioglukoza + Na]⁺; c- [M-162 + Na]⁺; h- [M-tioglukoza + Na]⁺

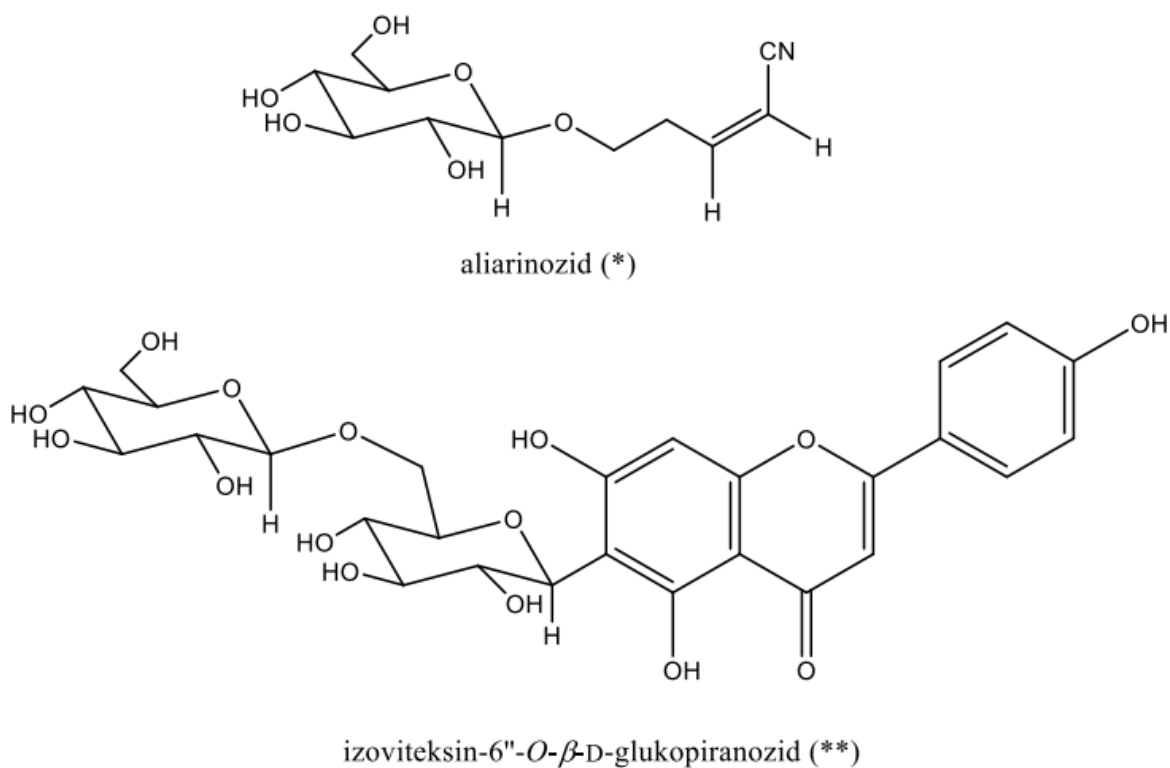
Alliaria petiolata je biljka koje je relativno slobodna od biljojeda što proizlazi iz činjenice da je bogata sekundarnim metabolitima. Iako glukozinolati imaju primarnu ulogu u obrani biljke od insekata postoje i drugi glikozidi koji imaju značajnu ulogu u zaštiti biljke. U prijašnjim radovima prijavljen je karakterističan glikozid, aliarionozid, koji je pronađen samo u ovoj biljnoj vrsti. Pored navedenog glikozida u biljnim ekstraktima su pronađeni i brojni flavonoidni glikozidi, među kojima je pronađen i izoviteksin-6''-*O*- β -D-glukopiranozid.^{21,22}

Metanol-vodeni ekstrakt lista prije desulfatacije je također analiziran korištenjem UHPLC-MS tehnike (slika 28).



Slika 28. UHPLC kromatogram metanol/vodenog ekstrakta * aliarinozid; ** izoviteksin-6''-*O*- β -D-glukopiranozid

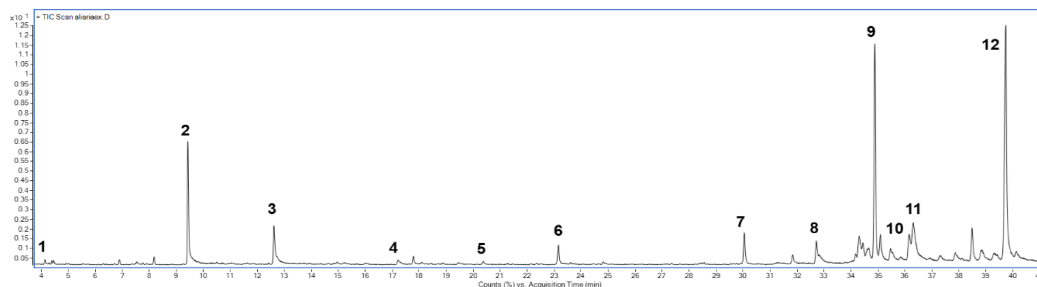
Na vremenu 1 min zadržavanja uočen je veliki pik koji sadrži veliki broj masa među kojima se nalazi i $m/z = 381$ koja odgovara masi natrijeva adukta intaktnog sinigrina (m/z 381, $[M+Na]^+$). U svrhu potvrde analiziran je intaktni sinigrin, čije vrijeme zadržavanja je odgovaralo signalu u ekstraktu. Pik „*“ na slici 28 na vremenu zadržavanja 5,2 min ima masu 268 koja odgovara spoju aliarinozidu koji je pronađen samo u biljci *Alliaria petiolata* (slika 29). Pikovi na 8,2 min i 9,5 min imaju UV spektre koji ukazuju na flavonoide. Spoj na 8,2 min (slika 28, označen s **) ima masu m/z 617, koja odgovara masi izoviteksin-6"-*O*- β -D-glukopiranozid (slika 29) također prethodno identificiranog u ovoj biljci, dok spoj na 9,5 min ima masu m/z 823.



Slika 29. Strukture identificiranih spojeva u metanol-vodenom ekstraktu. Oznake u zagradama odgovaraju signalima na slici 28

3.2. GC-MS analiza

Nakon autolize uzorka lista i stabljike u trajanju 24 sata, uz dodatak mirozinaze iz *Sinapis alba* analiziran je diklormetanski ekstrakt korištenjem GC-MS tehnike (tablica 2).



Slika 30. Kromatogram ukupne ionske struje diklormetanskog ekstrakta.

Tablica 2. GC-MS analiza diklormetanskog ekstrakta ljekovite češnjake (*A. petiolata*). Brojevi odgovaraju slici 30.

	Ime spoja	Kovatsov indeks	Postotak (%)
1.	Toluen	857	0,28
2.	Benzilni alkohol	1031	11,23
3.	Feniletilni alkohol	1109	4,53
4.	3-Etil-4-metil-1 <i>H</i> -pirol-2,5-dion	1231	0,08
5.	Indol	1289	0,21
6.	Eugenol	1356	1,99
7.	5,6,7,7a-Tetrahidro-4,4,7a-trimetil-2(4 <i>H</i>)benzofuranon	1524	3,06
8.	Dietilftalat	1591	2,57
9.	3-Okso- α -jonon	1651	23,45
10.	3-Hidroksi-5,6-epoksi- β -jonon	1682	3,51
11.	3-Hidroksi-7,8-dihidro- β -jonol	1688	7,79
12.	4-Hidroksi-4-(3-oksobut-1-enil)-3,5,5-trimetilcikloheks-2-en-1-on	1784	36,04
	Ukupno		94,74

Kako je vidljivo iz tablice, nisu pronađeni razgradni produkti prisutnih glukozinolata. Iz prijašnjih studija, poznato je da alil-izotiocijanat, produkt razgradnje sinigrina, u vodenoj otopini podliježe reakcijama s prisutnim nukleofilima (voda, amini, tioli i sl.) pri čemu nastaju nehlapljivi produkti.

4. ZAKLJUČAK

- Analizom ekstrakta ljekovite češnjače UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom potvrđena je prisutnost šest glukozinolata: sinigrin, glukotropeolin, 4-hidroksiglukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin, glukosinabin i izobutil glukozinolat
- Najzastupljeniji glukozinolat je sinigrin koji je prisutan u svim biljnim dijelovima. Sinigrina ima najviše u komuški (97,5028 $\mu\text{mol/g}$) zatim u cvijetu (58,4037 $\mu\text{mol/g}$) i korijenu (25,4001 $\mu\text{mol/g}$). Glukotropeolin je također zastupljen u svim biljnim dijelovima ali u manjim količinama, najviše ga ima u korijenu (14,2210 $\mu\text{mol/g}$). 4-hidroksiglukobrasicin je pronađen u komuški, cvijetu i stabljici. U korijenu su nađena još dva glukozinolata 4-metoksiglukobrasicin (0,1650 $\mu\text{mol/g}$) i glukosinabin u tragovima. U listu je pronađen i izobutilglukozinolat u tragovima.
- Analizom metalno-vodenog ekstrakta lista prije desulfacije UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom utvrđena je prisutnost sinigrina, aliarinozida te jednog flavonoida, izoviteksin-6"- *O*- β -D-glukopiranozida.
- Analizom diklormetanskog ekstrakta GC-MS tehnikom potvrđena je prisustvo 12 različitih spojeva, među kojima je najzastupljeniji 4-hidroksi-4-(3-oksobut-1-enil)-3,5,5-trimetilcikloheks-2-en-1-on (36,04%) ,zatim 3-okso- α -jonon (23,45%) i benzilni alkohol (11,23%)
- Analizom diklormetanskog ekstakta GC-MS tehnikom nisu pronađeni razgradni produkti prisutnih glukozinolata

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

GL – glukozinolat (engl. *glucosinolate*)

dGL – desulfoglukozinolat (engl. *desulfoglucosinolate*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)

GC – plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*)

MS – spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*)

UHPLC – tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *ultra-high-performance liquid chromatography*)

DAD – detektor s nizom dioda (engl. *diode array detector*)

MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (engl. *microwave assisted extraction*)

UAE – ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasound assisted extraction*)

TCD – detektor toplinske vodljivosti (eng. *thermal conductivity detector*)

FID – plamenoionizacijski detektor (engl. *flame ionization detector*)

NPD – detektor dušika i fosfora (engl. *nitrogen–phosphorus detector*)

ESP – epitiospecifičnog proteina (engl. *epithiospecifier protein*)

6. LITERATURA

1. *Z. T. Shakour, N. G. Shehab, A. S. Gomaa, L. A. Wessjohann, M. A. Farag*, Metabolic and biotransformation effects on dietary glucosinolates, their bioavailability, catabolism and biological effects in different organisms, *Biotech. Adv.* **54** (2022) 107784, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107784>
2. *M. A. Prietoab, C. J. Lópezab, J. Simal-Gandara* , *Advances in food and nutrition research*, Academic Press, Cambridge 2019, str. 305-350
3. *N. Agerbirk, C. E. Olsen*, Glucosinolate structures in evolution, *Phytochem.* **77**, (2012) 16-45, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.005>
4. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Glucosinolate#/media/File:Glucosinolate-skeletal.png> (pristupljeno 27.9.2022.)
5. *I. Blažević*, Doprinos istraživanju glukozinolata (2005. – 2020.): Strukturna raznolikost, razgradnja i biološki potencijal, , *Kem. Ind.* **69** (2020) 541–555, doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.045>
6. *I. E. Sønderby, F. Geu-Flores, B. A. Halkier*, Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond, *Trends. Plant. Sci.* **15** (2010) 283–290 doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.005>
7. *T. Žeželj Vidoša*, Biološke uloge glukozinolata, završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2022.
8. *M. Zekić*, Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae, doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
9. *I. Radojčić Redovniković, T. Glivetić, K. Delonga, J. Vorkapić-Furač*, Glucosinolates and their potential role in plant, *Period. Biol.* **110** (2008), 297-309, preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/35929>

10. *A. Dulović*, Strukturna raznolikost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata u različitim biljnim porodicama, doktorski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2022.
11. *A. S. Silva, S. F. Nabavi, M. Saeedi, S. M. Nabavi*, Recent advances in natural products analysis, 1st Edition, Elsevier, 2020, str 651-661
12. *N. A. Anjum, S. S. Gill, I. Ahmad, M. Pacheco, A. C. Duarte, S. Umar, M. E. Pereira*, The plant family Brassicaceae: contribution towards phytoremediation, Vol. 21, Environmental Pollution, 2012, str. 1-33
13. URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=34206> (pristupljeno 27.9.2022.)
14. *F. Cámara-Martos, S. Obregón-Cano, O. Mesa-Plata, M. E. Cartea-González, A. de Haro-Bailón*, Quantification and in vitro bioaccessibility of glucosinolates and trace elements in Brassicaceae leafy vegetables, Food Chem. **339** (2020) 127860, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127860>
15. *J. D. Ogle*, *Alliaria petiolata* (M.Bieb.) Cavara & Grande [Brassicaceae], an invasive herb in the Southern Ozark plateaus: A comparison of species composition and richness, soil properties, and earthworm composition and biomass in invaded versus non-invaded sites, diplomski rad, 2015., preuzeto sa: <https://scholarworks.uark.edu/etd/1185>
16. URL:[https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=735&taxon=Alliaria+petiolata+\(M.+Bieb.\)+Cavara+et+Grande](https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=735&taxon=Alliaria+petiolata+(M.+Bieb.)+Cavara+et+Grande) (pristupljeno 27.9.2022.)
17. *W. Clarke, M. Marzinke*, Contemporary practice in clinical chemistry, 4th Edition, Academic Press, 2020 , str. 135-149
18. *Nj. Radić, L. Kukoč Modun*, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016. str. 628-654
19. *A. Silić*, Glukozinolatni profil u biljkama *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC i *Matthiola incana* (L.) R.BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima, diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018.

20. URL: <https://tech-publish.com/hplc-guide-history-definition-principle-types-instrumentation/> (pristupljeno: 29.9.2022.)
21. *M. Haribal, J. Alan, A. Renwick*, Seasonal and population variation in flavonoid and alliarinoside content of *Alliaria petiolate*, *Chem. Ecol.* **27** (2001) 1585–1594, doi: <https://doi.org/10.1023/a:1010406224265>
22. *J. A. Renwick, W. Zhang, M. Haribal, A. B. Attygalle, K. D. Lopez*, Dual chemical barriers protect a plant against different larval stages of an insect, *Chem. Ecol.* **27**, (2001) 1575–1583, doi: <https://doi.org/10.1023/a:1010402107427>