

Izolacija i kvantizacija glukozinolata iz biljaka *Nasturtium officinale* i *Iberis umbellata*

Perković, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:167:456163>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

IZOLACIJA I KVANTIZACIJA GLUKOZINOLATA IZ BILJAKA
Nasturtium officinale I Iberis umbellata

DIPLOMSKI RAD

MATEA PERKOVIĆ
Matični broj: 118

Split, srpanj 2020.

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

IZOLACIJA I KVANTIZACIJA GLUKOZINOLATA
IZ BILJAKA *Nasturtium officinale* I *Iberis umbellata*

DIPLOMSKI RAD

MATEA PERKOVIĆ

Matični broj: 118

Split, srpanj 2020.

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

DIPLOMA THESIS
ISOLATION AND QUANTIZATION OF GLUCOSINOLATES
FROM *Nasturtium officinale* AND *Iberis umbellata* PLANTS

MATEA PERKOVIĆ
Parent number: 118

Split, July 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

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

Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag.chem.

IZOLACIJA I KVANTIZACIJA GLUKOZINOLATA IZ BILJAKA *Nasturtium officinale* I *Iberis umbellata*

Matea Perković, 118

Sažetak: Glukozinolati su sekundarni metaboliti identificirani u preko 16 različitih biljnih porodica, a najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju dobro poznate biljke iz svakodnevne prehrane. Glukozinolati su fiziološki neaktivni i kemijski stabilni i tek njihovom razgradnjom djelovanjem enzima mirozinaze dolazi do oslobađanja raznovrsnih spojeva. Smatraju se fitokemikalijama s potencijalom prevencije različitih bolesti u ljudskom organizmu.

U ovom diplomskom radu izolirani su i analizirani glukozinolati iz odabranih dijelova biljaka *Nasturtium officinale* i *Iberis umbellata*. Glukozinolati su identificirani UHPLC-DAD-MS/MS analizom desulfatiranih glukozinolata. Isti su kvantificirani u različitim dijelovima biljke prema službenoj ISO 9167-1 metodi koja se zasniva na HPLC analizi desulfoglukozinolata. Izolacija glukozinolata iz navedenih biljnih materijala je napravljena metodom ekstrakcije glukozinolata uz desulfataciju. Kod *Nasturtium officinale* izolirani su i kvantizirani sljedeći glukozinolati: metilsulfinilalkilni glukozinolati i to glukoheperin, 7-(metilsulfinil)heptil-glukozinol, glukohirsutin, zatim glukonasturcin koji je aril-alkilni glukozinolati te glukobrasicin i 4-metoksiglukobrasicin koji spadaju u skupinu indolnih glukozinolata. U sjemenu *Iberis umbellata* kvantizirani su spojevi: glucoiberin, sinigrin, glukonapin, glucoibervirin i glukotropeolin, dok su iz tog sjemena uzgojenoj biljci *Iberis umbellata* identificirani sljedeći spojevi: glucoiberin, sinigrin, glucoibervirin, glukotropeolin i 4-metoksiglukobrasicin. U uzgojenoj biljci *Iberis umbellata* nije prisutan glukonapin kojeg nalazimo u sjemenu, ali je identificiran 4-metoksiglukobrasicin koji nije pronađen u sjemenu.

Ključne riječi: glukozinolati, Brassicaceae, *Nasturtium officinale*, *Iberis umbellata*, UHPLC-DAD-MS/MS

Rad sadrži: 37 stranica, 30 slika, 5 tablica, 25 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 24. srpnja 2020.

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. 28.

Mentor: Ivica Blažević, PhD, Associate professor

Technical assistance: Azra Đulović, MChem

ISOLATION AND QUANTIZATION OF GLUCOSINOLATES FROM *Nasturtium officinale* AND *Iberis umbellata* PLANTS

Matea Perković, 118

Abstract: Glucosinolates are secondary metabolites identified in over 16 different plant families, among which the most important is Brassicaceae family, which includes well known plants of everyday nutrition. Glucosinolates are physiologically inert and chemically stable upon activation of the enzyme myrosinase leads to the degradation of glucosinolates and formation of various compounds. They are considered as phytochemicals which have potential to protect the human body from various diseases.

In this diploma thesis, glucosinolates from selected parts of *Nasturtium officinale* and *Iberis umbellata* plants were isolated and analysed. Glucosinolates were identified by UHPLC-DAD-MS/MS analyzing desulfated glucosinolates. The same were quantified in different plant parts according to the official ISO 9167-1 method based on the HPLC analysis of desulphoglucosinolates. Isolation of glucosinolates from used plant material was performed using the method of glucosinolate extraction by desulphation. The following glucosinolates were isolated and quantized from *Nasturtium officinale*: methylsulfinylalkyl glucosinolates i.e. glucohesperin, 7-(methylsulfinyl)heptylglucosinolate, glucohirsutin, than gluconasturcin which is arylalkyl glucosinolate, and glucobrassicin and 4-methoxyglucobrassicin which belong indole glucosinolates group. The following compounds were quantized in *Iberis umbellata* seeds: glucoiberin, sinigrin, gluconapin, glucoibervirin and glucotropeolin. While from *Iberis umbellata* plant cultivated using the same seed following compounds were indentified: glucoiberin, sinigrin, glucoibervirin, glucotropeolin and 4-methoxyglucobrassicin. Although present in seeds, gluconapin was not found in cultivated *Iberis umbellata* plant; on the other hand 4-methoxyglucobrassicin was identified in the plant while being absent in the seeds.

Keywords: glucosinolates, Brassicaceae, *Nasturtium officinale*, *Iberis umbellata*, UHPLC-DAD-MS/MS

Thesis contains: 37 pages, 30 figures, 5 tables, 25 references

Original in: Croatian.

Defence committee:

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

Defence date: July 24th 2020

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

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića i neposrednim vodstvom Azre Đulović, mag. chem., u razdoblju od listopada 2019. do srpnja 2020.

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

Zahvaljujem se svom profesoru i mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću na srdačnosti, stručnom vodstvu i ukazanoj pomoći tijekom izrade rada.

Također se zahvaljujem asistentici mag.chem. Azri Đulović na strpljenju, savjetima, pomoći pri pripremi uzoraka i posvećenom vremenu tijekom izrade rade.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Izolirati i desulfatirati glukozinolate prisutne u biljkama porodice Brassicaceae (*Nasturtium officinale* i *Iberis umbellata*).
2. Izvršiti identifikaciju izoliranih desulfoglukozinolata korištenjem tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detekciju tandemskim masenim spektrometrom (UHPLC-MS/MS).
3. Kvantificirati glukozinolate biljne vrste *Nasturtium officinale* i *Iberis umbellata*.

SAŽETAK

Glukozinolati su sekundarni metaboliti identificirani u preko 16 različitih biljnih porodica, a najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju dobro poznate biljke iz svakodnevne prehrane. Glukozinolati su fiziološki neaktivni i kemijski stabilni i tek njihovom razgradnjom djelovanjem enzima mirozinaze dolazi do oslobađanja raznovrsnih spojeva. Smatraju se fitokemikalijama s potencijalom prevencije različitih bolesti u ljudskom organizmu.

U ovom diplomskom radu izolirani su i analizirani glukozinolati iz odabranih dijelova biljaka *Nasturtium officinale* i *Iberis umbellata*. Glukozinolati su identificirani UHPLC-DAD-MS/MS analizom desulfatiranih glukozinolata. Isti su kvantificirani u različitim dijelovima biljke prema službenoj ISO 9167-1 metodi koja se zasniva na HPLC analizi desulfoglukozinolata. Izolacija glukozinolata iz navedenih biljnih materijala je napravljena metodom ekstrakcije glukozinolata uz desulfataciju. Kod *Nasturtium officinale* izolirani su i kvantificirani sljedeći glukozinolati: metilsulfinilalkilni glukozinolati i to glukohesperin, 7-(metilsulfinil)heptil-glukozinolat, glukohirsutin, zatim glukonasturcin koji je aril-alkilni glukozinolat te glukobrasicin i 4-metoksiglukobrasicin koji spadaju u skupinu indolnih glukozinolata. U sjemenu *Iberis umbellata* kvantificirani su spojevi: glukoiberin, sinigrin, glukonapin, glukoibervirin i glukotropeolin, dok su iz tog sjemena uzgojenoj biljci *Iberis umbellata* identificirani sljedeći spojevi: glukoiberin, sinigrin, glukoibervirin, glukotropeolin i 4-metoksiglukobrasicin. U uzgojenoj biljci *Iberis umbellata* nije prisutan glukonapin kojeg nalazimo u sjemenu, ali je identificiran 4-metoksiglukobrasicin koji nije pronađen u sjemenu.

Ključne riječi: glukozinolati, Brassicaceae, *Nasturtium officinale*, *Iberis umbellata*, UHPLC-DAD-MS/MS

SUMMARY

Glucosinolates are secondary metabolites identified in over 16 different plant families, among which the most important is Brassicaceae family, which includes well known plants of everyday nutrition. Glucosinolates are physiologically inert and chemically stable upon activation of the enzyme myrosinase leads to the degradation of glucosinolates and formation of various compounds. They are considered as phytochemicals which have potential to protect the human body from various diseases.

In this diploma thesis, glucosinolates from selected parts of *Nasturtium officinale* and *Iberis umbellata* plants were isolated and analysed. Glucosinolates were identified by UHPLC-DAD-MS/MS analyzing desulfated glucosinolates. The same were quantified in different plant parts according to the official ISO 9167-1 method based on the HPLC analysis of desulphoglucosinolates. Isolation of glucosinolates from used plant material was performed using the method of glucosinolate extraction by desulphation. The following glucosinolates were isolated and quantized from *Nasturtium officinale*: methylsulfinylalkyl glucosinolates i.e. glucohesperin, 7-(methylsulfinyl)heptylglucosinolate, glucohirsutin, than gluconasturcin which is arylalkyl glucosinolate, and glucobrasicin and 4-methoxyglucobrasicin which belong indole glucosinolates group. The following compounds were quantized in *Iberis umbellata* seeds: glucoiberin, sinigrin, gluconapin, glucoibervirin and glucotropeolin. While from *Iberis umbellata* plant cultivated using the same seed following compounds were identified: glucoiberin, sinigrin, glucoibervirin, glucotropeolin and 4-methoxyglucobrasicin. Although present in seeds, gluconapin was not found in cultivated *Iberis umbellata* plant; on the other hand 4-methoxyglucobrasicin was identified in the plant while being absent in the seeds.

Keywords: glucosinolates, Brassicaceae, *Nasturtium officinale*, *Iberis umbellata*, UHPLC-DAD-MS/MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. Brassicaceae	2
1.1.1. <i>Nasturtium officinale</i> W. T. Aiton	3
1.1.2. <i>Iberis umbellata</i> L.	4
1.2. Glukozinolati	5
1.2.1. Hlapljivi sumporovi spojevi	6
1.3. Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata	7
1.4. Biosinteza glukozinolata	8
1.5. Razgradnja glukozinolata	10
1.5.1. Razgradni produkti glukozinolata	10
1.5.2. Enzimska razgradnja	11
1.6. Metode izolacije	12
1.6.1. Ekstrakcija	12
1.6.2. Ekstrakcija glukozinolata	13
1.7. Kromatografija	14
1.7.1. Tekućinska kromatografija	14
1.7.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	14
1.7.1.2. Vezani sustav tekućinska kromatografija-masena spektrometrija	16
2. EKSPERIMENTALNI DIO	18
2.1. Kemikalije i aparatura	18
2.2. Biljni materijal	18
2.3. Ekstrakcija glukozinolata i desulfatacija	20
2.3.1. Otopine potrebne za ekstrakciju	20
2.3.2. Kolone i centrifugalne mikroepruvete – priprema	20
2.3.3. Biljni materijal	21
2.3.4. UHPLC-DAD-MS/MS analiza	22
3. REZULTATI I RASPRAVA	24
3.1. <i>Nasturtium officinale</i>	24
3.2. <i>Iberis umbellata</i>	31
4. ZAKLJUČAK	36
5. LITERATURA	37

UVOD

Biljke porodice Brassicaceae sadrže brojne nehlapljive spojeve velike raznovrsnosti. Među važnijim spojevima koji se nalaze u većini biljaka ove porodice su glukozinolati.

Glukozinolati su jedinstvena i važna skupina sekundarnih metabolita u nekim vrstama biljaka. Glukozinolati su sami po sebi vrlo stabilni i biološki neaktivni spojevi, te je njihova razgradnja nužna za aktivaciju brojnih bioloških utjecaja koje posjeduju njihovi razgradni produkti. Najvažniji produkti su izotiocijanati, tiocijanati, nitrili i indoli. Destilacijom i ekstrakcijom moguće je vršiti izolaciju ovih hlapljivih komponenti.

U ovom radu provedena je izolacija i kvantizacija glukozinolata iz biljaka *Nasturtium officinale* i *Iberis umbellata* preko odgovarajućih desulfo-oblika. Dokazivanje i kvantizacija glukozinolata provedena je primjenom tehnike tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti s tandemskim masenim detektorom.

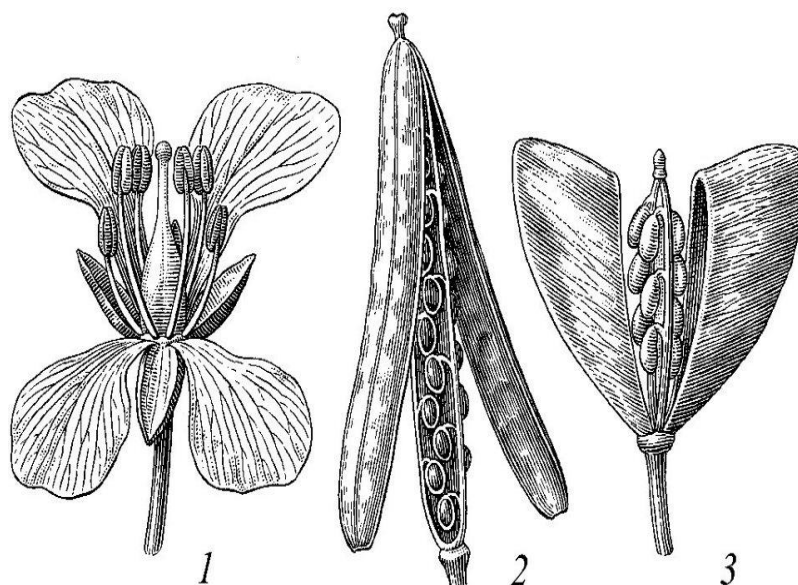
1. OPĆI DIO

1.1. Brassicaceae

Brassicaceae, kupusnjače ili porodica cvjetnica (Angiospermae) imenovane su prema tipskom rodu *Brassica*. Stari naziv Cruciferae su dobile prema rasporedu latica u cvjetovima. Ovo je jedna od osam biljnih porodica sa sufiksom *-aceae* što je potvrđeno kao alternativno ime, prema ICBN (članci 18.5 i 18.6 Bečkog koda), tako su u upotrebi oba naziva: Cruciferae i Brassicaceae. Brassicaceae su biljna porodica jednogodišnjih i trajnih zeleni, rjeđe grmolikih dvosupnica (u tropima), kojoj pripada više od 350 rodova s oko 3000 vrsta. Cvjetovi su krstašica prostolatični (slobodnih latica), dvospolni, a imaju 4 lapa čaške, 4 latice vjenčića, 2 vanjska (kraća) i 4 unutarnja (duža) prašnika i tučak s nadraslom plodnicom. Plod je najčešće komuška ili komuščica, rjeđe cijepavac, koji se raspada na jednosjemene članke ili je plod nepucavac. Porodici pripadaju mnoge biljke koje se upotrebljavaju za hranu, u gospodarstvu, industriji i ljekarništvu.

Kao povrće i krmno bilje poznate su različite sorte vrtnih (*Brassica oleracea*: kupus, kelj, koraba, cvjetača), vrste repice (*Brassica napus*), bijele repe (*Brassica rapa*), rotkve (*Raphanus sativus*), biljke uljarice su bijela gorušica (*Sinapis alba*), slačica ili crna gorušica (*Brassica nigra*), a mnoge se krstašice koriste i kao ljekovite biljke. Vrste različitih rodova npr. šeboja (*Cheiranthus*), ljubičine (*Matthiola*), večernice (*Hesperis*) i dr., uzgajaju se kao ukrasne biljke. Mnoge su krstašice široko rašireni korovi i biljke smetištarke, kao što su dvoredac (*Diploaxis*), oranž (*Sisymbrium*), rusomača (*Capsella*), češnjača (*Alliaria*), grbica (*Lepidium*) i dr. U hrvatskoj flori zastupljeno je oko 60 rodova, od kojih su s 10 ili više vrsta zastupljeni rodovi gromotulja (*Alyssum*), gušarka (*Arabis*), vrzina (*Brassica*), režuha (*Cardamine* incl. *Dentaria*).¹

Biljke porodice Brassicaceae sadrže brojne nehlapljive spojeve velike raznovrsnosti. Među važnijim spojevima koji se nalaze u većini biljaka ove porodice su glukozinolati. Glukozinolati su β -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati (poznati još i kao *Z-N*-hidroksiminosulfatni esteri ili *S*-glukopiranozil tiohidroksimati) s varijabilnim bočnim lancem. Ovi spojevi su pronađeni u čak 16 biljnih porodica reda Capparales.²



Slika 1.

Kupusnjače: 1. Cvijet, 2. Plod komuška, 3. Plod komuščica³

U ovom radu su obrađene dvije biljne vrsta imena *Nasturtium officinale* i *Iberis umbellata* iz porodice Brassicaceae, čije su karakteristike opisane u nastavku.

1.1.1. *Nasturtium officinale* W. T. Aiton

Latinsko ime roda *Nasturtium officinale* potječe od latinske riječi *nasitortium* (frknuti nosom, *nasus* – nos, *torquere* – zavnuti) zbog izraženog mirisa biljke i soka biljke koji stavljen na nosnu sluznicu izaziva kihanje ili osjećaj prženja. Hrvatski naziv biljke je potočarka, brzorastuća poluvodena biljka iz porodice Brassicaceae. Biljka je udomaćena u Europi, sjevernoj Africi i Aziji te je jedno od najstarijih vrsta povrća koje je čovjek koristio. Stručak (stabljika) biljke je šupalj pliva na vodi te naraste i do 70 cm visine. Cvjetovi su sitni i bijele boje, skupljeni u grozdaste cvatove na vrhu stabljike. Cvate od svibnja do rujna. Plod je oko 1 cm duga komuška koja sadrži male sjemenke. Nalazimo je kao samoniklu biljku u potocima, izvorima, plitkim rijekama. Indikator je kvalitetne pitke vode, pa je rijetka u stajaćicama. Biljka se koristi i u narodnoj medicini. Stari Rimljani i Perzijanci koristili su potočarku kao hranu za mozak, svojevrsni tonik za živce, ali i kao afrodisijak. Ljekovita potočarka smatra se hranom koja usporava starenje te je jednako dobra, a po nekima i bolja od mnogih drugih namirnica koje se primjenjuju u tu svrhu. U današnje vrijeme često se koristi samo kao dekoracija jelu, no njezina nutritivna vrijednost je tolika da ovi listovi oštrog gorkog okusa zaslužuju da ih

se jede neprokuhane. Sirovi listovi imaju najveću nutritivnu vrijednost. Sadrže mnogo luteina, koji poboljšava ili održava oči zdravima unatoč starenju. Potočarka sadrži i velike količine joda, te se ne preporučuje ljudima koji pate od hipertireoze. Visoka količina joda potočarki daje prednost u odnosu na ostale biljke iz porodice krstašica. Biljka sadrži hranjive tvari koje u svom sastavu imaju sumpor. Osim gorušičinog eteričnog ulja koje biljci daje poseban miris i okus, ona sadrži i bjelančevine, ugljikohidrate, masti, vitamine i minerale. ⁴



Slika 2.

Biljka *Nasturtium officinale*⁵

1.1.2. *Iberis umbellata* L.

Iberis umbellata je jednogodišnja biljka iz porodice Brassicaceae, jednostavna za uzgoj. Biljke se šire tako da tvore lišće visine oko 30 cm s gustim grozdovima od 5 cm te cvjeta više tjedana. Izuzetno su otporne na toplinu i sušu, rastu na plodnom kao i na siromašnom tlu. Jedna je od najlakših biljaka za uzgoj i uspijeva gotovo u svim sredinama. Epitet vrste dolazi od latinske riječi za kišobran „umbel“. Biljke tvore gustu prostirku, najbolje rastu na suncu, a u polusjeni biljke ne cvjetaju obilno. Listovi *I. umbellata* su nerazdvojeni i jednostavni, cvjetovi bijeli, rozi i nježno ljubičasti,

dvostrano simetrični. Cvijet čine 4 latice. Omiljena je biljka u vrtu i često se sadi uz šetnice.⁶



Slika 3.

Biljka Iberis umbellata⁷

1.2. Glukozinolati

Glukozinolati su jedinstvena i važna skupina sekundarnih metabolita u nekim vrstama biljaka. Ispravnu strukturu glukozinolata predložili su 1956. godine Ettlinger i Lundeen te opisali prvu sintezu glukozinolata. Ubrajaju se u specifičnu skupinu kemijskih spojeva tzv. „fitokemikalija“ koji su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Capparales. Za prehranu ljudi najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa, gorušica i drugi. Glukozinolati su kemijski stabilni sve dok ne dođu u kontakt s enzimom mirozinazom (β -tioglukozid glukohidrolaza). Hidroliziraju se u niz biološki aktivnih tvari, kao što su izotiocijanati, indol-3-karbinol.⁸

Osim što se konzumira svježe, povrće se vrlo često prerađuje te ovisno o uvjetima prerade, prisutni glukozinolati se mogu razgraditi što može imati za posljedicu promjenu njihove biološke aktivnosti. Mnogobrojna epidemiološka istraživanja dokazala su i potvrdila pozitivan učinak konzumiranja povrća iz porodice Brassicaceae, a time i unos glukozinolata u ljudski organizam. Osim što imaju pozitivan učinak u ljudskom organizmu, glukozinolati i njihovi razgradni produkti mogu imati i antinutritivni učinak. Obično jedna biljka sadrži do pet (najčešće dva do pet) različita glukozinolata, dok se čak 15 različitih glukozinolata može naći u istoj biljci. U najvećoj

koncentraciji nalaze se u sjemenu.⁹ Glukozinolati su kemijski stabilni i biološki neaktivni sve dok se nalaze odvojeni u stanicama biljaka od enzima mirozinaze. Istraživanja su potvrdila da su glukozinolati smješteni u vakuolama, a mirozinaza u specifičnim „mirozinaznim stanicama“. Oštećenjem tkiva koje mogu uzrokovati štetočine ili se oštećenja mogu dogoditi tijekom branja, obrade, dolazi do kontakta između enzima mirozinaze i glukozinolata što vodi ka hidrolizi glukozinolata te se oslobađaju aktivni spojevi kao što su izotiocijanati, nitrili, cijanidi te oskazolidintioni.^{10,11}

1.2.1. Hlapljivi sumporovi spojevi

Posebna grupa metaboličkih proizvoda su hlapljivi sumporovi spojevi. Oni se mogu naći u biljkama i životinjama. Koncentracija ovih spojeva je različita u pojedinim dijelovima biljke (korijen, stabljika, list, cvijet ili plod) te varira i ovisi o brojnim čimbenicima (vrsta biljke, razvojni stadij, klima, način uzgoja). Rasprostranjeni su u brojnim biljnim porodicama i rodovima, od kojih su najvažnije porodice Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae, Phytolaccaceae i Poaceae.

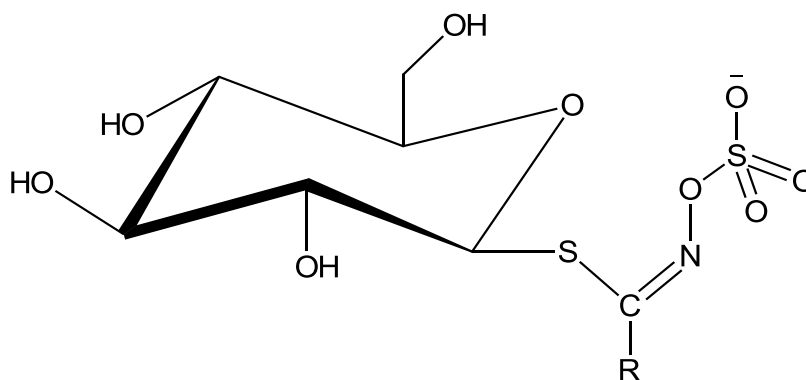
Imaju veliki biološki značaj te su često predmet istraživanja u cilju dokazivanja tog značaja (efekti kemoprevencije raka, antioksidacijska svojstva, antibakterijska aktivnost i induciranje apoptoze – sulforafen, alicin, dialil-disulfid i dr.). Sumporovi spojevi su uglavnom spojevi u tragovima i doprinose formiranju mirisa eteričnih ulja, iako mogu biti i dominantne komponente pojedinih ulja.

Kemijske strukture pojedinih sumporovih spojeva su različite te 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 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 biljnim porodicama su izotiocijanati, razgradni produkti glukozinolata. Postoji nekoliko načina klasifikacije hlapljivih sumporovih spojeva, a jedan od njih je na temelju broja sumporovih atoma koji su prisutni u njihovoj strukturi. S obzirom na ovaj kriterij razlikujemo četiri grupe hlapljivih spojeva ovisno da li u strukturi imaju jedan, dva, tri ili četiri sumporova atoma (S1- S4) te posebnu petu skupinu koju čine izotiocijanati i tiocijanati (SCN tj.

NSC). Unutar samih grupa postoje podjele pa se grupe S1 i S2 dijele dalje prema broju prisutnih heteroatoma (kisik ili dušik). Grupa S3 dijeli se na tri podgrupe prema broju prisutnih atoma (S_3O), podgrupu spojeva s linearnom (S_3L) i cikličkom (S_3C) strukturom. Grupa S4 dijeli se na podgrupu s linearnom (S_4L) i cikličkom (S_4C) strukturom.¹⁰

1.3. Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata

Glukozinolati su grupa organskih aniona koji se iz biljaka izoliraju kao kalijeve i natrijeve soli.¹¹



Slika 4.

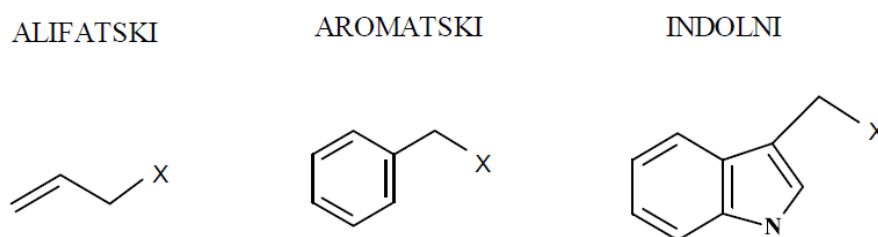
Opća struktura glukozinolata

Po kemijskoj strukturi glukozinolati su β -tioglukozid-*N*-hidroksisulfati kod kojih je glukoza i sulfatna skupina vezana na aglikon koji se sintetizira iz aminokiselina i njihovih analoga.¹²

Bočni lanac kod glukozinolata je promjenjiv, određen je aminokiselinom, a po njemu se glukozinolati međusobno razlikuju. Opća struktura glukozinolata je prikazana na slici 4. Obzirom na bočni lanac, glukozinolati se mogu podijeliti na alifatske, arilalifatske i heterocikličke (indolne) glukozinolate koji su najviše istraženi. Ako aglukonski lanac potječe od aminokiseline alanin, leucin, vanilin, izoleucin ili metionin tada se radi o alifatskim glukozinolatima.

Kod aromatskih (arilalifatskih) glukozinolata, aglukonski prekursori su aminokiseline fenilalanin ili tirozin, dok je kod indolnih aminokiselina triptofan. Najbrojniji

glukozinolati su oni koji sadrže nerazgranate ili razgranate alifatske bočne lance. Mnogi od njih u bočnom lancu sadrže dvostruke veze (olefini), hidroksilne ili karbonilne skupine te kovalentno vezani sumpor. Najveća pojedinačna grupa (jedna trećina svih glukozinolata) u bočnom lancu sadrži atom sumpora različitih oksidacijskih stanja, kao npr. metiltioalkil, metilsulfinilalkil ili metilsulfonilalkil. Osim podjele s obzirom na aminokiselinu koja je vezana na bočni lanac, glukozinolati se mogu razlikovati i prema supstituentima na glukonskom dijelu npr. cimetni, benzolni.¹¹



Slika 5.

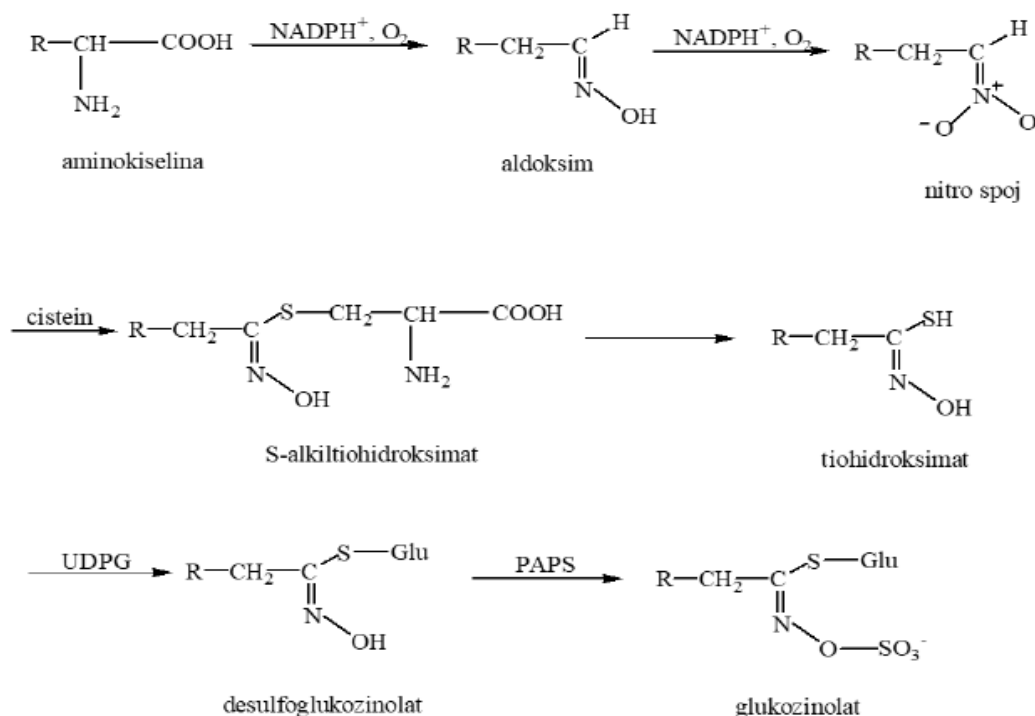
Primjeri struktura glukozinolata (X = glukozinolatni dio)

Pri imenovanju glukozinolata često se koriste trivijalna imena, ali i polusistematska nomenklatura koju su uveli Ettliger i Dateo 1961. godine. Trivijalna nomenklatura se temelji na dodavanju prefiksa „gluko“ i sufiksa „in“ latinskom imenu biljke iz koje je određeni glukozinolat prvi put izoliran. Ime dobiveno primjenom polusistematske nomenklature se sastoji od sufiksa „glukozinolat“ i prefiksa koji odgovara nomenklaturi bočnog lanca (R). Postoje i glukozinolati prirodnog porijekla s ustanovljenim grupama. Razlikuju se glukozinolat glukokaparin s R-skupinom CH₃ koji je prisutan u biljci *Cleome spinosa* ili pak glukozinolat sinigrin sa skupinom CH₂=CHCH₂ prisutan u biljci *Brassica nigra*.

1.4. Biosinteza glukozinolata

Znanstvenici Conti i Kjaer su na temelju sličnosti ugljikovog skeleta nekih aminokiselina i glukozinolata pretpostavili da su prirodni prekursori aglukonskog dijela glukozinolata aminokiseline. Poznato je samo osam aminokiselinskih prekursora od kojih potječu glukozinolati, dok ostatak nastaje modificiranjem produljenog bočnog lanca aminokiselina. Biosinteza glukozinolata temelji se na tri zasebna koraka. Prvi

korak biosinteze je produljenje bočnog aminokiselinskog lanca umetanjem metilenske grupe uz prisutnost brojnih enzima. Uključuje reakcije oksidacije, kondenzacije s acetil-CoA, izomerizacije, oksidacije i dekarboksilacije. Kao posljedica navedenih reakcija nastaje 2-okso kiselina s jednom metilenskom skupinom više u odnosu na početnu aminokiselinu. Ovaj korak biosinteze se može ponavljati mnogo puta, a svaki sljedeći put rezultira nastankom okso kiseline s jednom metilenskom skupinom više.¹¹ Metabolička modifikacija aminokiseline ili njenog derivata produljenog bočnog lanca je drugi korak biosinteze. Oksidacija aminokiseline u aldoksim je početna reakcija ovoga koraka koja uključuje brojne enzime (citokrom P₄₅₀ monooksigenaze, flavin ovisne monooksigenaze i peroksidaze). Aldoksim se potom pretvara u tiohidroksimat metaboličkim putem koji još uvijek u potpunosti nije poznat. Tiohidroksimat se glukozilira u desulfoglukoziolat koji se potom sulfatira do glukozinolata. Posljednji, treći korak biosinteze uključuje niz sekundarnih modifikacija bočnog lanca osnovnog glukozinolata. Aminokiselinski bočni lanac čiji je prekursor metionin sklon je modifikacijama poput postupne oksidacije atoma sumpora u metiltioalkilnom bočnom lancu u metilsulfinilalkil ili metilsulfonilalkil. Metilsulfinilalkil bočni lanci oksidacijskim cijepanjem pretvaraju se u alkenil i hidroksialkenil lance.^{11,13}



Slika 6.

Pojednostavljena shema drugog koraka biosinteze glukozinolata¹¹

1.5. Razgradnja glukozinolata

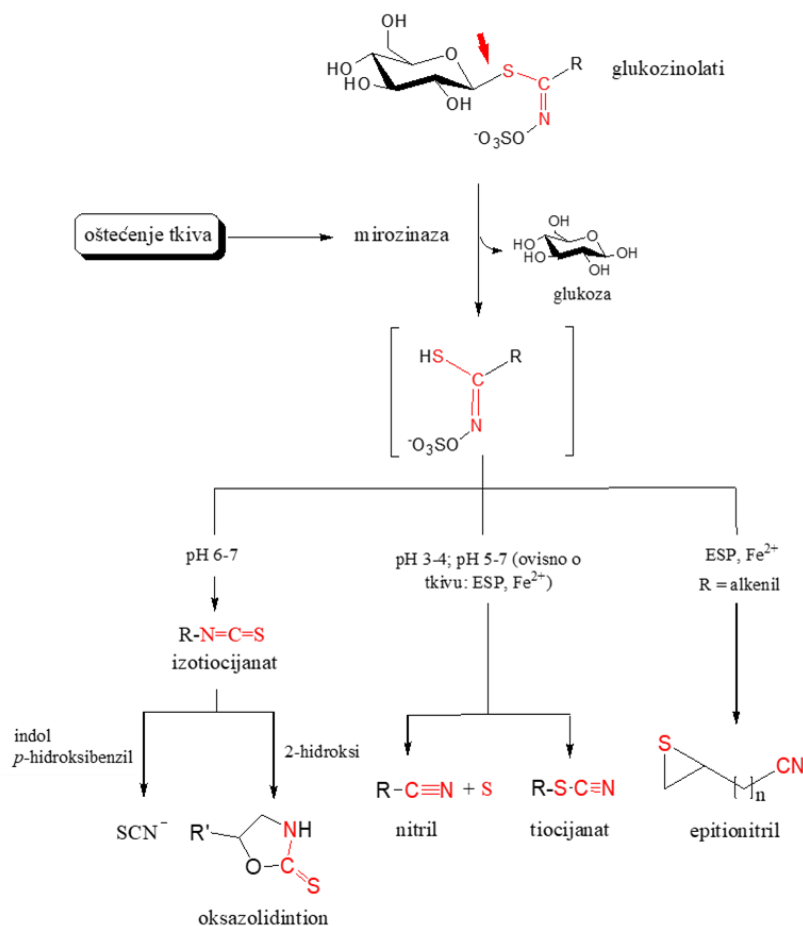
Glukozinolati su sami po sebi vrlo stabilni i biološki neaktivni spojevi te je njihova razgradnja nužna za aktivaciju brojnih bioloških utjecaja koje posjeduju njihovi razgradni produkti. Pri razgradnji bilo enzimskoj, djelovanjem enzima mirozinaze ili kemijskoj djelovanjem kiseline ili baze, dobiva se čitav niz razgradnih produkata koji uključuju nitrile, izotiocijanate, tiocijanate, epitionitrile i indole.¹¹ Neki od nastalih razgradnih produkata glukozinolata posjeduju antioksidacijska, antibakterijska i antitumorska svojstva, a neki su i štetni.

1.5.1. Razgradni produkti glukozinolata

Izotiocijanati su hlapljivi spojevi izuzetno jakog mirisa i arome, tako je za aromu gorušice i hrena zaslužan prop-2-enil-izotiocijanat, navedeni izotiocijanat se često naziva i „gorušičinim uljem“. Nastaju pri neutralnom pH kada nestabilni aglukonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji. Smatraju se „normalnim“ produktima razgradnje glukozinolata. Vrlo se reaktivni i upotrebljavaju se kao pesticidi zbog svog toksičnog djelovanja na pojedine vrste insekata. To su spojevi kemijske formule $R-N=C=S$. Određeni izotiocijanati koji sadrže β -hidroksilnu skupinu u bočnom lancu imaju sposobnost da spontanom intramolekulskom reakcijom tvore cikličke tionske spojeve, odnosno oksazolidin-2-tione, glavne produkte uljane repice. Količine izotiocijanata koji nastaju iz glukozinolata u hrani su promjenjive. Nitrili ili organski cijanidi su spojevi kemijske formule $R-C\equiv N$ nastaju gubitkom sumpora iz glukozinoladne molekule pri kiselim uvjetima hidrolize. Epitionitrili, osim kiselog pH, za nastanak zahtijevaju i prisutnost epitiospecifičnog proteina (ESP) te Fe^{2+} iona. Nastaju samo uz navedene uvjete te isključivo iz glukozinolata koji sadrže terminalnu dvostruku vezu u bočnom (R) lancu. Tiocijanati su spojevi kemijske formule $R-S-C\equiv N$ i o njihovom nastanku se zna vrlo malo i kao produkti nastaju samo ponekad. Nastajanje tiocijanata zahtjeva prisutnost enzima mirozinaze i tiocijanat-formirajućeg proteina (TFP). Smatra se da tiocijanati nastaju iz glukozinolata koji imaju specifične bočne lance (R) kao što su alil-, benzil- i 4-(metiltio)butil-glukozinolat.²

1.5.2. Enzimaska razgradnja

Enzim tioglukozid-glukohidrolaza katalizira hidrolizu glukozinolata, a u biljci je prvi put otkriven 1840. godine. Trivijalno ime enzima je mirozinaza. Nalazi se odvojena od glukozinolata, vjerojatno u biljnim tvorevinama koje nazivamo „mirozinskim stanicama“. Mirozinaza predstavlja skupinu odnosno porodicu enzima sličnih funkcija. Aktivnost mirozinaze je dokazana kod svih biljaka koje sadrže glukozinolate. Osim u biljkama, identificirana je i u nekim bakterijama i gljivama. Oštećenjem biljnog tkiva, dolazi do miješanja glukozinolata i mirozinaze, što rezultira brzim otpuštanjem produkata nastalih enzimskom hidrolizom glukozinolata. Tijekom hidrolize nastaju različiti spojevi (izotiocijanati, tiocijanati, epitionitili, nitrili i oksazolidintioni). U reakciji hidrolize dolazi do cijepanja tioglukozidne veze odnosno do pucanja veze između sumpora u glukoze u molekuli glukozinolata. Mirozinaza odcjepljuje glukozu, a zatim se s nestabilnog aglukona eliminira sulfat Lossenovom pregradnjom. Struktura nastalih produkata ovisi o različitim čimbenicima: strukturi bočnog lanca, prisustvu kofaktora i uvjetima hidrolize. Kod utjecaja uvjeta u kojima se hidroliza odvija, posebno je važna pH vrijednost. Pri pH=7 obično nastaju izotiocijanati. Oni su poprilično reaktivni, hlapljivi i mirisni. U kiselim uvjetima, pri pH<4, glavni produkti razgradnje su nitrili.^{2,11}



Slika 7.

Opća shema razgradnje glukozinolata te vrste razgradnih produkata²

1.6. Metode izolacije

Metode izolacije odabiru se na način da se osigura izolacija određenog spoja ili spojeva s minimalnim gubitcima i bez nastanka artefakata. Različite metode izolacije se upotrebljavaju kako bi se upoznala kemijska priroda spojeva koji su u biljkama. Najčešće korištene metode izolacije su destilacija i ekstrakcija. Ipak, danas se upotrebljavaju i modernije metode kao što su mikrovalna i ultrazvučna ekstrakcija.¹⁴

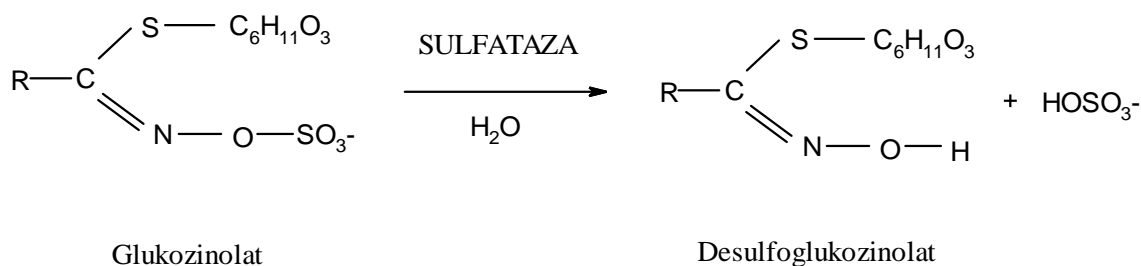
1.6.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja omogućava izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Omogućuje ravnotežno odvajanje jedne ili više komponenti pomoću otapala koja se međusobno ne miješaju. Najčešće korištena

otapala su voda, dietil-eter, diklormetan, pentan. Ekstrakcija se primjenjuje za izdvajanje željenih komponenti bez korištenja visokih temperatura zbog prisutnosti termolabilnih tvari, za biljni materijal koji sadrži male količine hlapljivih sastojaka, za sastojke dobro topive u vodu, kao u za cvjetove koji sadrže vrlo fine mirisne komponente. Uz klasične metode ekstrakcije, danas su sve više u upotrebi i moderne metode poput ultrazvučne i mikrovalne ekstrakcije te ekstrakcije superkritičnim i subkritičnim otapalima.^{2,14}

1.6.2. Ekstrakcija glukozinolata

Posljednjih godina se sve više povećava svijest nutricionista, kemičara i drugih kao i potrošača o utjecaju glukozinolata na zdravlje ljudi. Glukozinolati i njegovi razgradni produkti su vrlo važni zbog svojih nutritivnih, antikancerogenih, antifungalnih, antibakterijskih svojstava te toksičnosti za neke vrste insekata. Danas je poznata i metoda ekstrakcije glukozinolata iz biljnog materijala, koja uključuje ekstrakciju 70% metanolom, enzimsku desulfatizaciju i HPLC analizu dobivenih desulfoglukozinolata. Desulfataciju kataliziraju enzimi sulfataze koje spadaju u porodicu esteraza, na način da odcjepljuju sulfatni ion iz molekule glukozinolata što dovodi do nastanka desulfoglukozinolata.^{15,16}



Slika 8.

Shema desulfatacije glukozinolata⁹

1.7. Kromatografija

Kromatografija je fizikalno-kemijska tehnika i analitička metoda odjeljivanja tvari u smjesi na temelju njihove razdiobe između dviju faza, pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne). Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevina, dok je mobilna faza kapljevina ili plin. Osnovni princip kromatografske metode temelji se na različitom afinitetu komponenata smjese prema stacionarnoj fazi. One koje imaju veći afinitet duže se zadržavaju na stacionarnoj fazi, odnosno sporije putuje kroz mobilnu fazu.¹⁷ Vrijeme zadržavanja pojedine komponente uzorka je vrijeme koje je proteklo od ulaska do izlaska komponente iz kolone. Kromatografija omogućuje odjeljivanje i identifikaciju složenih smjesa organskih spojeva te omogućava brzu i potpuniju analizu. Poznato je nekoliko podjela kromatografskih metoda. Osnovna podjela je prema agregatnom stanju mobilne faze na plinsku i tekućinsku kromatografiju. Kod plinske kromatografije mobilna faza je inertni plin, a kod tekućinske tekućina male viskoznosti. Plinska kromatografija se dalje dijeli na kromatografiju plin-tekuće (GLC) i plin-kruto (GSC). Tekućinska kromatografija se prema načinu ostvarivanja kontakta između pokretne i nepokretne faze dijeli na plošnu i kromatografiju na stupcu.^{17,18}

1.7.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je analitička tehnika za razdvajanje tvari na osnovi razmještanja između čvrste stacionarne i tekuće mobilne faze. Dvije su vrste tekućinske kromatografije, klasična i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Za većinu slučajeva koristi se suvremenija analitička tehnika HPLC kod koje je pumpa zadužena za dovođenje mobilne faze i radi toga se postiže bolje razdvajanje komponenti.

1.7.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

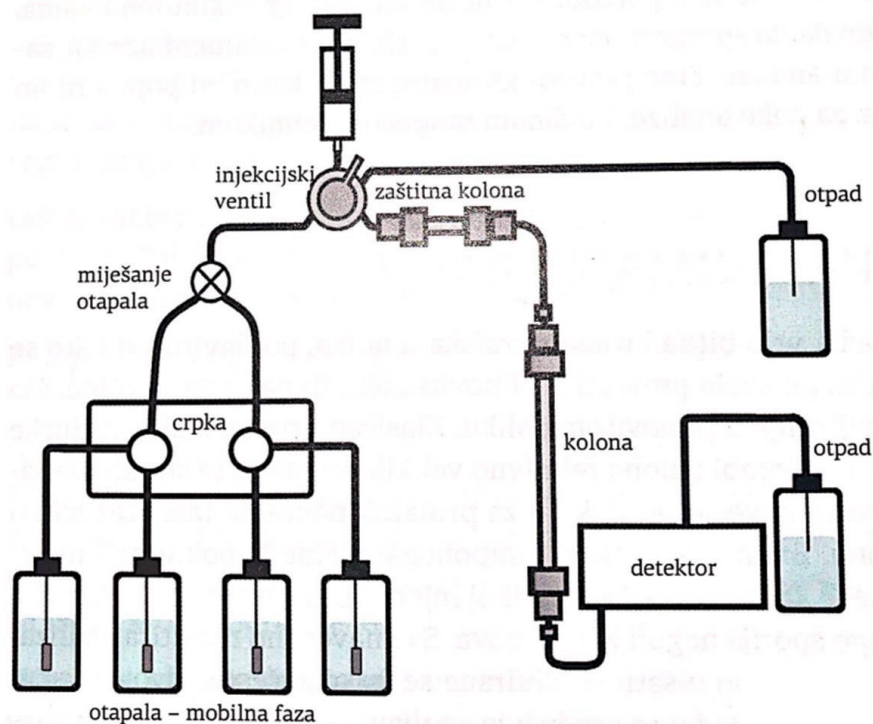
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je kromatografija na stupcu uz upotrebu visokih tlakova zbog postizanja velike brzine protoka. Odjeljivanje se postiže prolaskom tekuće mobilne faze pod tlakom kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama

stacionarne faze noseći sastavnice uzorka. Razlikujemo više vrsta odjeljivanja čiji mehanizam ovisi o vrsti stacionarne faze.¹⁹

Tablica 1. *Mehanizam odjeljivanja s obzirom na vrstu stacionarne faze*²⁰

Mehanizam odjeljivanja	Stacionarna faza	Uzorak
Razdioba	Tekućina adsorbirana na čvrstoj tvari ili organski spojevi vezani na čvrsti nosač	Nepolarne i slabo polarne tvari
Adsorpcija	Polarna (silikagel)	Polarne tvari
Ionska izmjena	Ionski izmjenjivač (polimeri sa sulfonskim i karboksilnim kiselim skupinama ili s bazičnim aaminskim funkcijskim skupinama)	Tvari ionskog karaktera
Raspodjela prema veličini čestica	Polimerni gelovi različitih veličina pora	Smjesa tvari s razlikama u veličini čestica
Stereokemijske interakcije	Celulozni derivati, proteini, peptidi, ciklodekstrini	Enantiomeri

Više od 80% odjeljivanja čini kromatografija obrnutih faza koja uz kromatografiju normalnih faza pripada razdjelnoj kromatografiji. Kromatografije u kojima je stacionarna faza polarna (silikagel), a mobilna faza manje polarna ili nepolarna (heksan, diklormetan, metanol) su kromatografije normalnih faza. Kod kromatografije obrnutih faza kemijski modificirana površina silikagela je stacionarna, nepolarna faza, a voda, acetonitril, metanol je mobilna, polarna faza. Odjeljivanje treba optimizirati izborom prikladne stacionarne faze te dodatno sustavom mobilne faze pri čemu mobilna faza treba biti znatno različite polarnosti. U tekućinskoj kromatografiji normalnih faza polarni spojevi se eluiraju posljednji. Što je mobilna faza nepolarnija, vrijeme zadržavanja je dulje. U kromatografiji obrnutih faza polarni spojevi se eluiraju prvi, a što je mobilna faza nepolarnija jače se zadržavaju nepolarni spojevi.^{19,21}

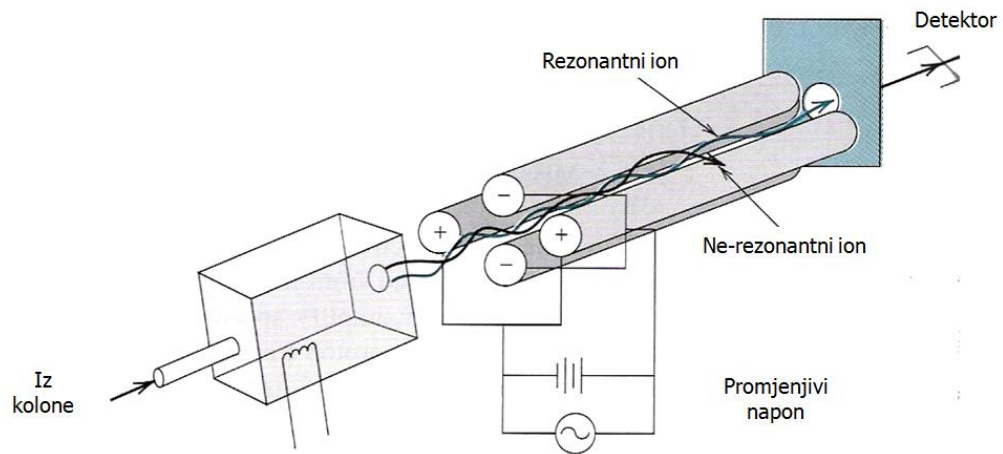


Slika 9.

Shematski prikaz HPLC uređaja²²

1.7.1.2. Vezani sustav tekućinska kromatografija-masena spektrometrija

Vezani sustav tekućinska kromatografija visokog učinka- spektrometrija masa (HPLC-DAD-MS/MS) je sustav koji omogućava odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica. Ovom metodom moguće je izvršiti kvalitativnu analizu koja se sastoji od snimanja uzorka, određivanja molekulske mase spoja, određivanja prekursora određenog fragmenta te analize fragmentacije određenog molekuskog iona. Prednost ovog sustava je istovremeno praćenje analize korištenjem dvaju detektora: DAD (engl. *diode array detektor*) koji ima mogućnost izbora do 8 valnih duljina i spektrometra mase (do 3000 Da).^{23,24}



Slika 10.

Shema kvadropolnog spektrometra masa²⁵

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Kemikalije i aparatura

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.

Aparatura:

- Električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- Analitička vaga, Explorer® Semi-Micro, OHAUS, SAD,
- Vortex, Dragon lab, MX- S,
- Homogenizator, Omni International, Kennesaw, Georgia, SAD
- 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,
- UHPLC-DAD-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, SAD.

2.2. Biljni materijal

Biljka *Nasturtium officinale* je pripremljena, samljevena i dobivena iz Poljske. Sjeme biljke *Iberis umbellata* komercijalno je pribavljeno u Bauhausu, proizvođača Tuinplus b. v. Heerenveen, Nizozemska, dok je druga korištena biljka *Iberis umbellata* uzgojena

na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu u travnju 2018. godine, a sabrana je nakon četrdeset dana.



Slika 11.

Pripremljeni uzorci biljnog materijala (*Nasturtium officinale*)

Točne mase biljnog materijala upotrebljene za izolaciju glukoziolata metodom ekstrakcije uz desulfataciju prikazane su u tablici 2.

Tablica 2.: Masa biljnog materijala biljke za izolaciju glukoziolata ekstrakcijom uz desulfataciju

Uzorak biljnog materijala	Metoda izolacije	Masa (mg)
<i>Nasturtium officinale</i>	Ekstrakcija glukoziolata	100,03
<i>Iberis umbellata</i> sjeme	Ekstrakcija glukoziolata	58,36
<i>Iberis umbellata</i> uzgojena biljka	Ekstrakcija glukoziolata	100,00

2.3. Ekstrakcija glukozinolata i desulfatacija

Postupak izolacije glukozinolata opisan je u diplomskom radu *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata*.¹⁷

2.3.1. Otopine potrebne za ekstrakciju

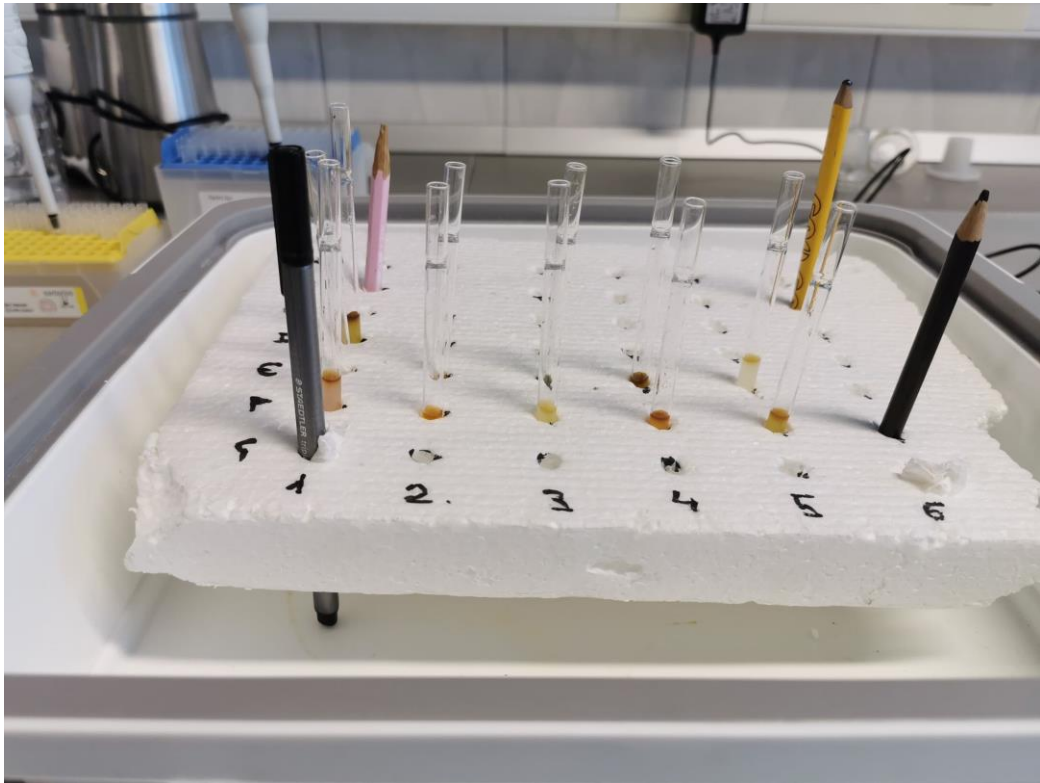
Za ekstrakciju glukozinolata pripravljeno je 100 mL otopine 70% metanola, koja se dobije miješanjem 70 mL metanola i 30 mL ultračiste vode.

Pored navedene otopine korištene su i sljedeće otopine:

- Natrijev acetat (NaOAc)
- Dekstran
- Sulfataza

2.3.2. Kolone i centrifugalne mikroepruvete – priprema

Kao kolone služe staklene pipete napunjene mljevenim filter papirom u visini od 1 cm, kako ne bi došlo do istjecanja gela. U tako pripravljenu kolonu otpipetira se 0,5 mL dekstrana te po 1 mL ultračiste vode.



Slika 12.

Kolone za ekstrakciju

2.3.3. Biljni materijal

Nasturtium officinale i *Iberis umbellata* su korištene kao biljni materijal (oko 100 miligrama). Navedena masa biljnog materijala raspoređena je u centrifugalne mikroepruvete te je u svaku dodan 70% metanol (1 mL). Centrifugalna mikroepruvete su zatvorene sigurnosnim kapticama, stavljene na vorteks, potom homogenizirane i prebačene u vruću vodenu kupelj do 5 minuta, a nakon toga su stavljene na ultrazvučnu kupelj (10 min) te potom centrifugirane na 2700 okr/min. Po završetku, supernatant je odvojen pipetiranjem te prebačen u prethodno pripremljene kolone. U centrifugalnu mikroepruvetu s biljnim materijalom ponovno je dodan 1 mL 70% otopine metanola te je postupak ponovljen.



Slika 13.

Homogenizator, ultrazvučna kupelj i vruća vodena kupelj

Zatim je u svaku kolonu dodano 2 puta po 1 mL 70% metanola s ciljem da se uklone nepolarne molekule te 1 mL ultračiste vode radi ispiranja metanola. Na kraju je u svaku kolonu dodano 2 puta po 1 mL NaOAc za postizanje optimalnih uvjeta za djelovanje enzima sulfataze. Potom se posuda za otpad zamijenila stalkom s označenim centrifugalnim mikroeprevetama za ekstrakte iznad kojeg je postavljen stalak s kolonama (kolona 1 odgovara centrifugalnoj mikroepreveti 1). U tako postavljene kolone dodano je 20 μ L otopine sulfataze te 50 μ L NaOAc te su ostavljene preko noći prekrivene aluminijskom folijom. Sutradan je u kolone dodano 2 puta po 0,75 mL ultračiste vode kako bi s kolone eluirali desulfoglukozinolati. Dobiveni uzorci su prebačeni u bočice i do analize čuvani u zamrzivaču.

2.3.4. UHPLC-DAD-MS/MS analiza

Za analizu desulfoglukozinolata dobivenih ekstrakcijom uz desulfataciju korišten je uređaj UHPLC-DAD-MS/MS Ultimate 3000RS s TSQ Quantis MS/MS detektorom (Thermo Fischer Scientific, SAD) na koloni Hypersil GOLD 3.0 mm \times 100 mm, promjera čestica 3.0 μ m (Thermo Fischer 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. Temperatura kolone je održavana na 25 °C, a injektirani volumen uzorka je održavan 5 µL. Signali su snimani DAD detektorom pri 227 nm, a maseni spektri su snimani u pozitivnom modu pri 350 °C. Za kvantizaciju desulfoglukozinolata korišten je desulfosinigrin kao eksterni standard, točnije baždarni pravac za raspon koncentracija od 13,56 do 542,50 µM. Za izračun svakog pojedinog desulfoglukozinolata upotrijebljene su literaturne vrijednosti za faktore odziva.



Slika 14.

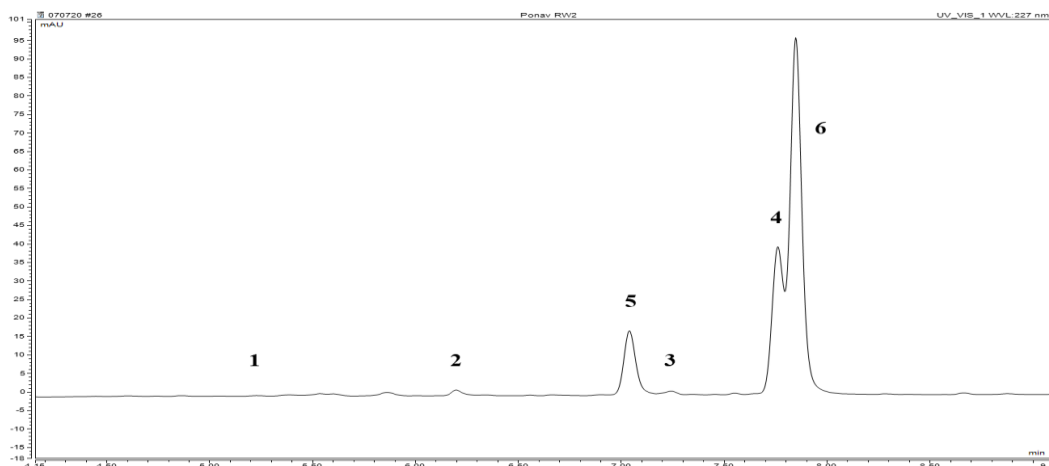
UHPLC-DAD-MS/MS uređaj

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu su kvantizirani glukozinolati biljnih vrsta *Nasturtium officinale* i *Iberis umbellata* pomoću vezanog sustava tekućinska kromatografija-masena spektrometrija. Kao biljni materijal korišteni su uzorci biljke *Nasturtium officinale* koji su dopremljeni iz Poljske te sjeme *Iberis umbellata* koje je komercijalno pribavljeno i biljka *Iberis umbellata* uzgojena na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu.

3.1. *Nasturtium officinale*

HPLC analiza



Slika 15.

Kromatogram desulfoglukozinolata (dGSL) iz uzorka potočarke.

- 1) 6-(metilsulfinil)heksil-dGSL, 2) 7-(metilsulfinil)heptil-dGSL,
- 3) 8-(metilsulfinil)oktil-dGSL, 4) 2-feniletil-dGSL, 5) indol-3-ilmetil-dGSL,
- 6) 4-metoksiindol-3-ilmetil-dGSL

Ekstrakcija glukozinolata u njihovom desulfo-obliku provedena je iz uzorka biljnog materijala *Nasturtium officinale*. Analizom dobivenog pročišćenog ekstrakta na UHPLC-DAD-MS/MS uređaju utvrđeno je da ovaj ekstrakt sadrži šest desulfoglukozinolata (slika 15.). Njihova identifikacija provedena je preko masenih spektara svakog od signala. Prvotno je na masenom spektrometru namješteno snimanje svih masa (engl. *full scan*) kako bi se moglo vidjeti koji molekularni ioni su

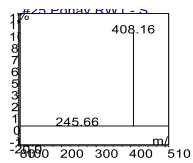
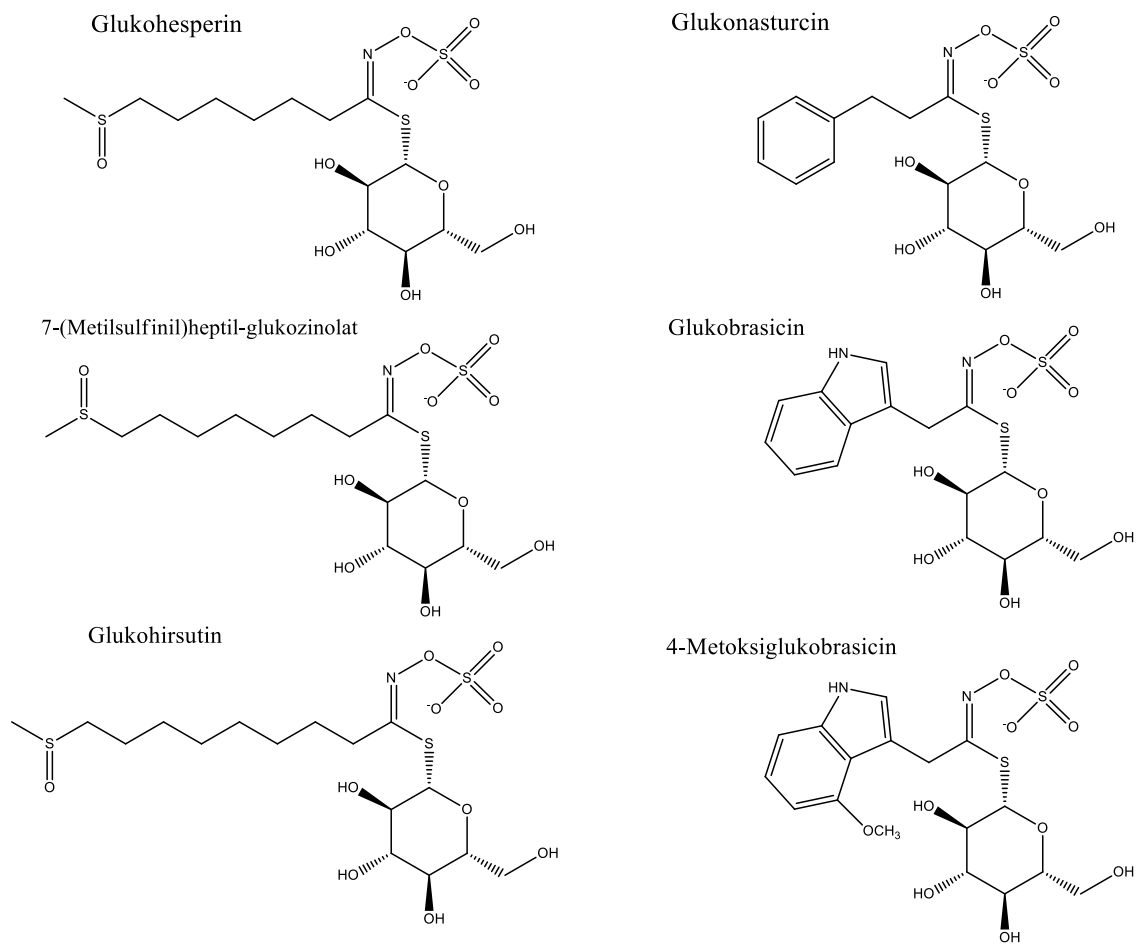
karakteristični za pojedini signal. Prilikom procesa desulfatacije dodaje se pufer (natrijev acetat), tako da u konačnici, u masenim spektrima molekulskih iona desulfoglukozinolata, vrijednosti mase se uočavaju uvećane za masu iona natrija ($A_r=23$) tj. $[M-H+Na]^+$, detektirane u pozitivnom načinu snimanja.

Na 5,20 min uočena je masa 408, a usporedbom s literaturom pretpostavljeno je da je riječ o desulfoglukoheperinu. Minutu nakon pojavljuje se 7-(metilsulfinil)heptilglukozinolat s masom 422, a još minutu nakon desulfoglukohirsutin s masom 436. Zaključuje se da je ovdje riječ o homolognom nizu (+14 za jednu CH_2 skupinu). Pri vremenu zadržavanja 7,70 min uočava se karakterističan 366 koji odgovara desulfoglukonasturcinu. UV spektar ovog arilalkilnog glukozinolata je uspoređen s literaturnim te je to bila dodatna potvrda da je riječ o ovom desulfoglukozinolatu. Šesti desulfoglukozinolat identificiran je pri vremenu zadržavanja od 7,8 min, a masa 421 je odgovarala 4-metoksidesulfoglukobrasicinu. Riječ je o indolnom glukozinolatu čiji UV spektar odgovara literaturnom (tablica 3).

Tablica 3. Glukozinolati identificirani u ekstraktu biljnog materijala potočarke

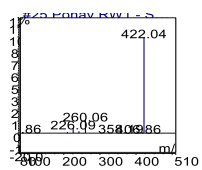
Ime spoja	Trivijalno ime	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoglukozinolata + Natrij	Količina ($\mu\text{mol/g}$)
6-(Metilsulfinil)heksilglukozinolat	Glukoheperin	5,20	408	tr*
7-(Metilsulfinil)heptilglukozinolat		6,20	422	tr
8-(Metilsulfinil)oktilglukozinolat	Glukohirsutin	7,20	436	tr
2-Feniletilglukozinolat	Glukonasturcin	7,70	366	1,33
4-Metoksiindol-3-ilmetilglukozinolat	4-metoksiglukobrasicin	7,80	421	1,04
Indol-3-ilmetilglukozinolat	Glukobrasicin	7,00	391	0,17

*tr – tragovi; $<0,1 \mu\text{mol/g}$



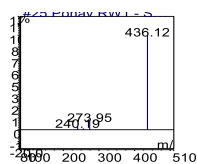
Slika 16.

Spektar masa 6-(metilsulfinil)heksil-desulfoglukozinolata (desulfoglukohesperin)



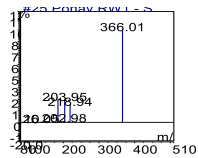
Slika 17.

Spektar masa 7-(metilsulfinil)heptil-desulfoglukozinolata



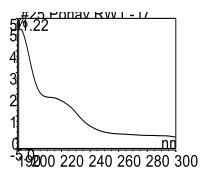
Slika 18.

Spektar masa 8-(metilsulfinil)oktil-desulfoglukozinolata (desulfoglukohirsutin)



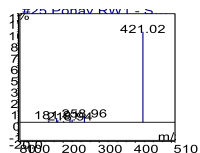
Slika 19.

Spektar masa 2-feniletil-desulfoglukoziolata (desulfoglukonasturcin)



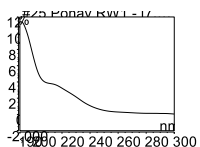
Slika 20.

UV spektar 2-feniletil-desulfoglukoziolata (desulfoglukonasturcin)



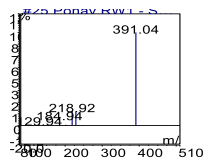
Slika 21.

Spektar masa 2-metoksiindol-3-ilmetil-desulfoglukoziolata (desulfo-4-metoksiglukobrasicin)



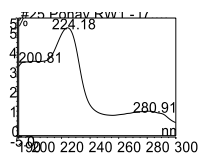
Slika 22.

UV spektar 2-metoksiindol-3-ilmetil-desulgoglukouinolata (desulfo-4-metoksiglukobrasicin)



Slika 23.

Spektar masa indol-3-ilmetil-desulfoglukozinolata (desulfoglukobrasicin)



Slika 24.

UV spektar indol-3-ilmetil-desulfoglukozinolata (desulfoglukobrasicin)

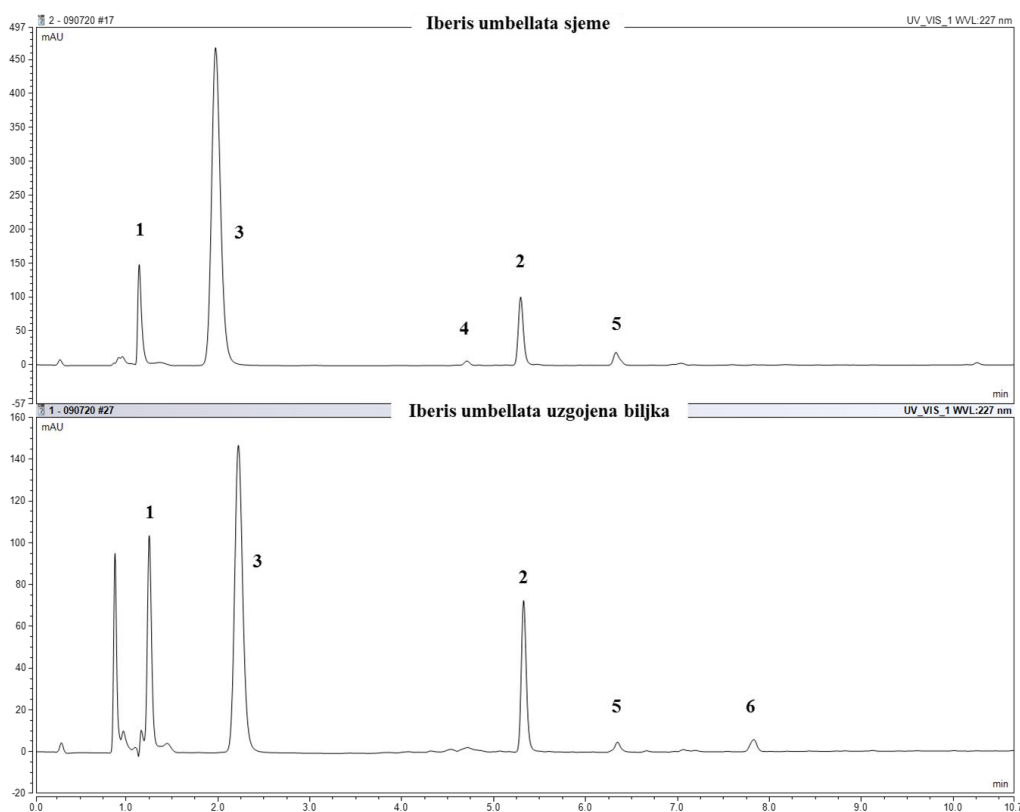
Kvantizacija je napravljena preko kalibracijske krivulje sinigrina uz primjenu faktora odziva za svaki od pojedinih spojeva

- glukoheperin 1,0
- 7-(metilsulfinil)heptil-glukozinolat 1,0
- glukohirsutin 1,1
- glukonasturcin 0,95

- glukobrasicin 0,29
- 4-metoksiglukobrasicin 0,25

U uzorku *Nasturtium officinale* uočena je najveća količina glukonasturciuma od 1,33 $\mu\text{mol/g}$. Glukonasturcium je glukozinolat koji je prvi put detektiran kod biljne vrste *Nasturtium officinale* po kojem je vrsta i dobila ime. Metilsulfonilglukozinolati su detektirani preko MS/MS detektora, ali površinu nije bilo moguće integrirati tj. kvantizacija nije bila moguća jer je vrijednost ispod 0,01 $\mu\text{mol/g}$. Također su utvrđena i dva indolna glukozinolata, od kojih je 4-metoksiglukobrasicina (1,04 $\mu\text{mol/g}$) bilo znatno više od glukobrasicina (0,17 $\mu\text{mol/g}$).

3.2. *Iberis umbellata*

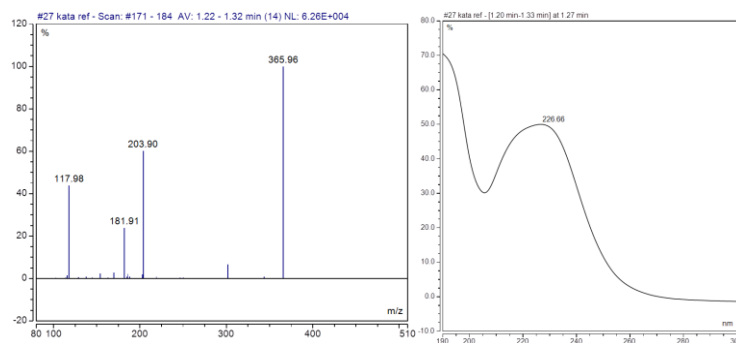


Slika 25.

Kromatogrami desulfoglukozinolata: gornji iz uzorka sjemena *Iberis umbellata* i donji iz uzorka uzgojene biljke *Iberis umbellata*

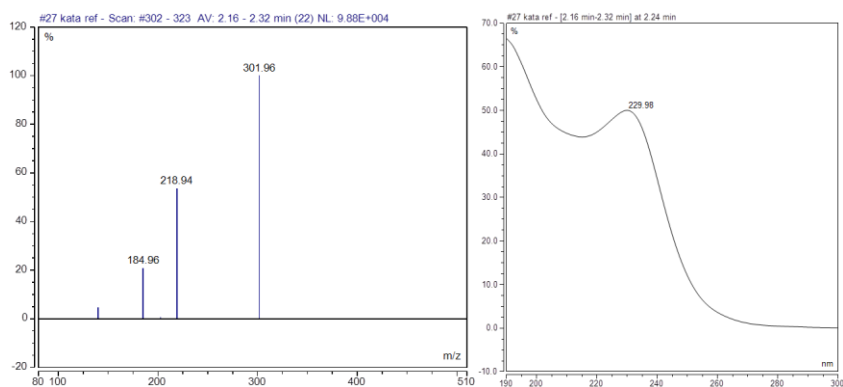
1 – glukoiberin, 2 – glukoibervirin, 3 – sinigrin, 4 – glukonapin, 5 – glukotropeolin, 6 – 4-metoksiglukobrasicin

Ekstrakcijom glukozinolata u njihovom desulfo-obliku provedena je iz uzorka biljnog materijala *Iberis umbellata*. Analizom pročišćenog ekstrakta na UHPLC-MS/MS uređaju utvrđeno je da ekstrakt iz sjemena *Iberis umbellata* sadrži 5 glukozinolata (Slika 25. gornji kromatogram).



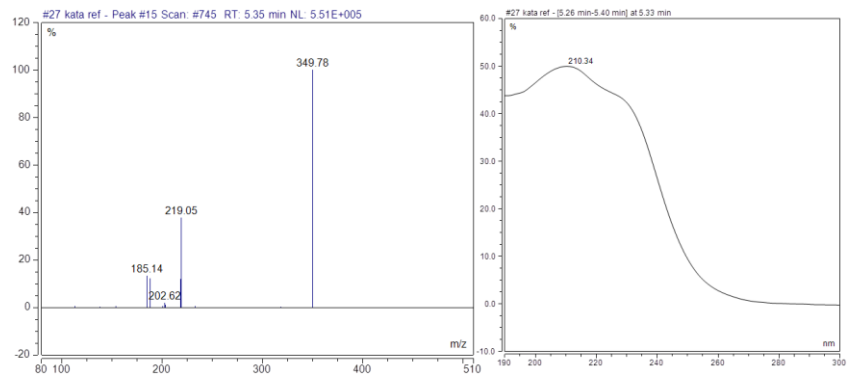
Slika 26.

Spektar masa i UV spektar desulfoglukoiberina



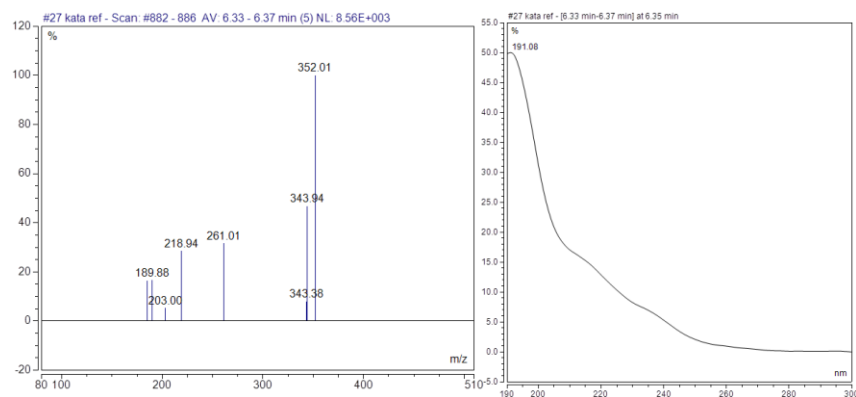
Slika 27.

Spektar masa i UV spektar desulfosinigrina



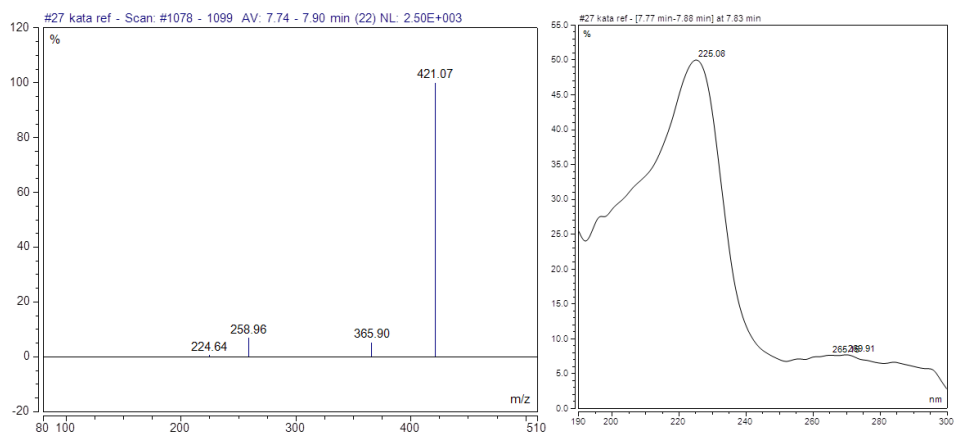
Slika 28.

Spektar masa i UV spektar desulfoglukoibervirina



Slika 29.

Spektar masa i UV spektar desulfoglukotropeolina



Slika 30.

Spektar masa i UV spektar desulfo-4-metoksiglukobrasicina

Iberis umbellata je također kvantizirana preko kalibracijske krivulje sinigrina. Svaki detektirani spoj ima faktor odziva u odnosu na sinigrin. Faktor odziva za:

- Glukoiberin 1,07
- Glukoibervirin 0,8
- Glukotropeolin 0,95
- 4-Metoksiglukobrasicin 0,25
- Glukonapin 1,11

U sjemenu je pronađen glukozinolat glukonapin kojeg nema u uzgojenoj biljci vrste *Iberis umbellata*. 4-metoksiglukobrasicin je pronađen u uzgojenoj biljci i nema ga u sjemenu, što znači da se biljka prilagođava trenutnim uvjetima i sintetizira sebi potrebne glukozinolate kako bi preživjela nepovoljne uvjete i stres. Biljka je uslijed svoga preživljavanja sintetizirala 4-metoksiglukobrasicin, dok je izbacila glukozinolat glukonapin koji joj nije bio neophodan za život. Iz navedenih kromatograma vidljivo je da uzgojena biljka vrste *Iberis umbellata* ima puno manje glukozinolata u odnosu na sjeme iste vrste.

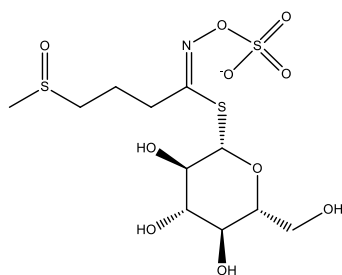
Tablica 4. Razgradni produkti glukozinolata dobiveni ekstrakcijom biljnog materijala iz sjemena *Iberis umbellata*

Ime spoja	Trivijalno ime	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoglukozinolata + Natrij	Količina glukozinolata $\mu\text{mol/g}$
3-Metilsulfinilpropil-glukozinolat	Glukoiberin	1,15	366	7,45
2-Propenil-glukozinolat	Sinigrin	2,00	302	58,96
3-Butenil-glukozinolat	Glukonapin	4,72	316	0,11
3-Metilsulfanilpropil-glukozinolat	Glukoibervirin	5,30	350	5,23
Benzil-glukozinolat	Glukotropeolin	6,35	352	0,71

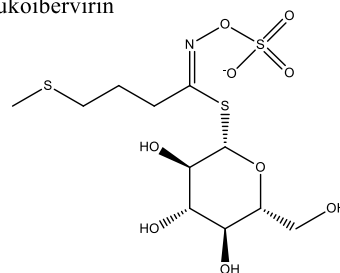
Tablica 5. Razgradni produkti glukozinolata dobiveni ekstrakcijom biljnog materijala iz uzgojene biljke *Iberis umbellata*

Ime spoja	Trivijalno ime	Vrijeme zadržavanja (min)	M+ Natrij	Količina gl. $\mu\text{mol/g}$
3-Metilsulfinilpropil-glukozinolat	Glukoiberin	1,15	366	4,62
Prop-2-enil-glukozinolat	Sinigrin	2,00	302	12,04
3-Metilsulfanilpropil-glukozinolat	Glukoibervirin	5,30	350	2,65
Benzil-glukozinolat	Glukotropeolin	6,35	352	0,04
4-Indol-3-ilmetil-glukozinolat	4-Metoksiglukobrasicin	7,80	421	0,03

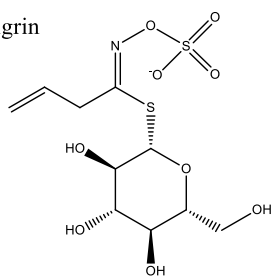
Glukoiberin



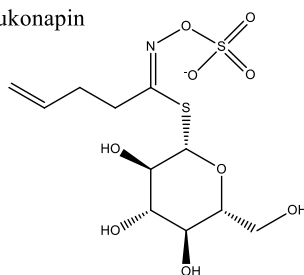
Glukoibervirin



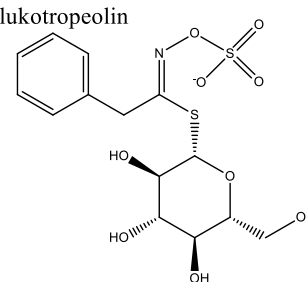
Sinigrin



Glukonapin



Glukotropeolin



4. ZAKLJUČAK

- Analizom biljke *Nasturtium officinale* UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom potvrđena je prisutnost metilsulfinilglukozinola koji čine homolgni niz: 6-(metilsulfinil)heksil, 7-(metilsulfinil)heptil, 8-(metilsulfinil)oktil, zatim glukonasturcium iz skupine arilalkila te dva idnolna glukozinolata: 4-metoksiglukobrasicin i glukobrasicin.
- U uzorku *Nasturtium officinale* preko desulfatiziranih glukozinolata kvantificirani su: 6-(metilsulfinil)heksil (manje od 0,01 $\mu\text{mol/g}$), 7-(metilsulfinil)heptil (manje od 0,01 $\mu\text{mol/g}$), 8-(metilsulfinil)oktil (manje od 0,01 $\mu\text{mol/g}$), glukonasturcin (1,33 $\mu\text{mol/g}$), 4-metoksiglukobrasicin (1,04 $\mu\text{mol/g}$) i glukobrasicin (0,17 $\mu\text{mol/g}$).
- Analizom sjemena *Iberis umbellata* UHPLC-MS/MS tehnikom utvrđena je prisutnost sljedećih glukozinolata: glukoiberin, sinigrin, glukonapin, glukoibervirin i glukotropeolin.
- U uzorku sjemena *Iberis umbellata* preko desulfatiziranih glukozinolata kvantificirani su: glukoiberin (7,45 $\mu\text{mol/g}$), sinigrin (58,96 $\mu\text{mol/g}$), glukonapin (0,11 $\mu\text{mol/g}$), glukoibervirin (5,23 $\mu\text{mol/g}$), glukotropeolin (0,71 $\mu\text{mol/g}$).
- Analizom uzgojene biljke *Iberis umbellata* UHPLC-MS/MS tehnikom potvrđeno je 5 glukozinolata: glukoiberin, sinigrin, glukoibervirin, glukotropeolin i 4-metoksiglukobrasicin.
- U uzorku uzgojene biljke *Iberis umbellata* preko desulfatiziranih glukozinolata kvantificirani su: glukoiberin (4,62 $\mu\text{mol/g}$), sinigrin (12,04 $\mu\text{mol/g}$), glukoibervirin (2,65 $\mu\text{mol/g}$), glukotropeolin (0,04 $\mu\text{mol/g}$), 4-metoksiglukobrasicin (0,03 $\mu\text{mol/g}$).

5. LITERATURA

1. Campbell N. A.; *et al.* (2008). *Biology. 8th Ed. Person International Edition, San Francisco. ISBN 978-0-321-53616-7*
2. Blažević, I. *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija*. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
3. https://www.google.com/search?q=nasturtium+officinale+enciklopedija&tbm=isch&ved=2ah#imgrc=FI_NkE_dZwLwwM (2. srpanj.2020.)
4. Flora Croatica, *Nasturtium officinale* (L.) R Br. URL: <https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=6753> (1. srpanj 2020.)
5. <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=34206> (2. srpanj 2020.)
6. Flora Croatica, *Iberis umbellata* (L.) R Br. URL: <https://hirc.botanic.hr/fcd/DetailFrame.aspx?IdVrste=5388> (2. srpanj 2020.)
7. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=IBUM> (14. srpanj 2020.)
8. Kopjar M., Šubarić D., Piližota V. Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi. *Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 1, 2012, Sves. 22-35
9. Verkerk R., Dekker M. Glucosinolates. u: *Bioactive compounds in Foods*, Blackwell Publishing Ltd., 2008.
10. Stojanov, D. *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama porodice Brassicaceae i Phytolaccaceae i sinteza fenil-izotiocijanata*. Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet, 2015.
11. Zekić M. *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
12. Fahey J. W., Zalczman A. T., Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 2001, str. 5-52
13. 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
14. Jerković, I. i Radonić, A. *Praktikum iz organske kemije*. Split: Kemijsko-tehnološki

fakultet u Splitu, 2009.

15. Dohney-Adams, T., Redeker, K., Kittipol, V., Bancroft, I., Haetley, S. E. *Development of an efficient glucosinolate extraction method*, Plant Methods 2017.

16. Perašin, J. *Priprava desulfoglukozinolata iz vodeno metanolnog ekstrakta kupusa za reverzno-faznu tekućinsku koromaografiju*, Diplomski rad, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet 1998.

17. Vlajčević D. *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata*, Diplomski rad, Split: Kemijsko- tehnološki fakultet, 2018.

18. Brzović, P. *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama Lepidium spp. (Brassicaceae) i Moringa oleifera (Moringaceae)*, Diplomski rad, Split: Kemijsko- tehnološki fakultet 2018.

19. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm (7. srpanj.2020.)

20. Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R., Introduction to analytical Separations. U: Fundamentals of analytical chemistry, 9th edition, Brooks/Cole, 2014, str. 861-863

21. Neseck, B. *Razvoj matematičkog modela procesa gel-filtracije u kromatografskoj koloni/diplomski rad*. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2004.

22. Radić, Nj., Kukoč Modun, L. *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga d.d., Zagreb, 2016.

23. Mellon, F.A. *Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation*, Encyclopedia of Food Science and Nutrition (Second Edition), 2003, str. 3739-3749

24. <https://www.irb.hr/eng/Industry/Services/High-performance-liquid-chromatography-mass-spectrometry-hplc-ms-ms> (9.srpanj 2020.)

25. Wade L. G., ml., *Organska kemija*, Školska knjiga d.d., 7. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko), Zagreb, 2017.

