

Brza metoda za detekciju glukozinolata u samoniklim biljkama porodice Brassicaceae

Žilić, Ljilja

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:242721>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

BRZA METODA ZA DETEKCIJU GLUKOZINOLATA U SAMONIKLIM
BILJKAMA PORODICE BRASSICACEAE

DIPLOMSKI RAD

LJILJA ŽILIĆ
Matični broj: 122
Split, srpanj 2021.

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

BRZA METODA ZA DETEKCIJU GLUKOZINOLATA U SAMONIKLIM
BILJKAMA PORODICE BRASSICACEAE

DIPLOMSKI RAD

LJILJA ŽILIĆ
Matični broj: 122
Split, srpanj 2021.

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

**RAPID METHOD FOR SCREENING OF GLUCOSINOLATES FROM WILD-
GROWING BRASSICACEAE PLANTS**

DIPLOMA THESIS

LJILJA ŽILIĆ
Parent number: 122
Split, July 2021.

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

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

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Marina Zekić i doc. dr. sc. Zvonimir Marijanović

**BRZA METODA ZA DETEKCIJU GLUKOZINOLATA U SAMONIKLIM BILJKAMA
PORODICE BRASSICACEAE
Ljilja Žilić, 122**

Sažetak:

U ovom radu proučavani su razgradni produkti glukozinolata šest samoniklih biljnih vrsta porodice Brassicaceae i to: *Aurinia sinuata* (L.) Griseb. (izverugana gromotulja), *Aurinia leucadea* (Guss.) K. Koch (jadranska rumenica), *Bunias erucago* (L.) (čunjasti repušac), *Capsella rubella* Reut. (sredozemna rusomača), *Cardaria draba* (L.) Desv. (streličasta grbica) i *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. (strižuša). Ove biljne vrste rasprostranjene su u mediteranskom dijelu Hrvatske pa tako i na području park-šume Marjan (Split, Hrvatska). Razgradnja glukozinolata provedena je pomoću endogenog enzima mirozinaze. Izolacija razgradnih produkata glukozinolata (hlapljivih spojeva) provedena je HS-SPME metodom, a kemijski sastav i udio razgradnih produkata glukozinolata, kao i ostalih hlapljivih spojeva, određen je vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Primjenom indirektna metode analize - HS-SPME/GC-MS, preko izolacije i identifikacije hlapljivih hidrolitičkih produkata, identificirani su glukozinolati u odabranim biljkama porodice Brassicaceae. Glavni glukozinolati jadranske rumenice su glukonapin i glukobrasikanapin. Glavni glukozinolati izverugane gromotulje su glukobrasikanapin i glukoberteroin. Broj, kao i udio razgradnih produkata glukozinolata, u vršnim parama čunjastog repušca je vrlo mali. Ipak, temeljem HS-SPME/GC-MS analize može se zaključiti da čunjasti repušac sadrži četiri glukozinolata, glukodehidroerucin, glukonapin, gluukoerucin i glukokaparin. Glavni sastojci vršnih para sredozemne rusomače su alil-izotiocijanati i alil-tiocijanati, dakle glavni glukozinolat sredozemne rusomače je sinigrin. U vršnim parama streličaste grbice dominira 4-(metiltio)butil-izotiocijanati te se sa sigurnošću može zaključiti da je glavni glukozinolat streličaste grbice gluukoerucin. S obzirom na najzastupljenije spojeve u vršnim parama strižuše, izopropil-izotiocijanati i *sec*-butil-izotiocijanati, može se zaključiti da su glavni glukozinolati strižuše glukoputranjivin i glukokohlearin.

Ključne riječi: Brassicaceae, glukozinolati, razgradni produkti glukozinolata, HS-SPME/GC-MS metoda

Rad sadrži: 68 stranica, 39 slika, 14 tablica, 20 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

- | | |
|-----------------------------------|-------------|
| 1. Doc. dr. sc. Marina Zekić | predsjednik |
| 2. Prof. dr. sc. Vesna Sokol | član |
| 3. Izv. prof. dr. sc. Ani Radonić | član-mentor |

Datum obrane: 16. srpnja 2021.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology
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. VI.

Mentor: Ani Radonić, PhD, Associate professor

Technical assistance: Marina Zekić, PhD, Assistant Prof. and Zvonimir Marijanović, PhD, Assistant Prof.

RAPID METHOD FOR SCREENING OF GLUCOSINOLATES FROM WILD-GROWING BRASSICACEAE PLANTS

Ljilja Žilić, 122

Abstract:

This work included research of glucosinolate degradation products from six wild-growing Brassicaceae plants: *Aurinia sinuata* (L.) Griseb., *Aurinia leucadea* (Guss.) K. Koch, *Bunias erucago* (L.), *Capsella rubella* Reut., *Cardaria draba* (L.) Desv. and *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. These plant species are widespread in the Mediterranean part of Croatia as well as in the area of the Marjan Forest Park (Split, Croatia). Degradation of glucosinolates was performed using the endogenous enzyme myrosinase. Isolation of glucosinolate degradation products (volatile compounds) was performed by headspace solid-phase microextraction method (HS-SPME), and the chemical composition and content of glucosinolate degradation products, as well as other volatile compounds, was performed by gas chromatography-mass spectrometry technique (GC-MS).

Using indirect analysis method, namely HS-SPME/GC-MS, via isolation and identification of volatile hydrolytic products, glucosinolates from selected wild-growing Brassicaceae plants were identified. The main glucosinolates of *Aurinia leucadea* are gluconapin and glucobrassicinapin. The main glucosinolates of *Aurinia sinuata* are glucobrassicinapin and glucoberteroin. Number and content of glucosinolate degradation products in headspaces from *Bunias erucago* is rather small. However, according to HS-SPME/GC-MS analysis, it can be assumed that *Bunias erucago* contain four glucosinolates, glucodehydroerucin, gluconapin, glucoerucin and glucocaparin. The main constituents in headspaces from *Capsella rubella* are allyl-isothiocyanate and allyl-thiocyanate, so the main glucosinolate of *Capsella rubella* is sinigrin. Dominant compound in headspaces from *Cardaria draba* is 4-(methylthio)butyl-isothiocyanate so it can be concluded that the main glucosinolate in *Cardaria draba* is glucoerucin. Considering that the most abundant compounds in headspaces of *Sisymbrium officinale* are isopropyl-isothiocyanate and *sec*-butyl-isothiocyanate, it can be concluded that the main glucosinolates from *Sisymbrium officinale* are glucoputranjivin and glucocohlearin.

Keywords: Brassicaceae, glucosinolates, glucosinolate degradation products, HS-SPME/GC-MS method

Thesis contains: 68 pages, 39 figures, 14 tables, 20 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Marina Zekić – PhD, Assistant Prof. | chair person |
| 2. Vesna Sokol – PhD, Full Prof. | member |
| 3. Ani Radonić – PhD, Associate Prof. | supervisor |

Defence date: July 16th, 2021.

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

Diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, u razdoblju od travnja do lipnja 2021. godine.

**„We must believe that we are gifted for something,
and that this thing, at whatever cost, must be attained.”**

Marie Curie

Zahvaljujem se:

- *mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na pomoći i stručnim savjetima prilikom izrade diplomskog rada,*
- *doc. dr. sc. Marini Zekić i doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći i suradnji pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada,*
- *obitelji i kolegama s fakulteta na potpori, nesebičnom razumijevanju i podršci tijekom studiranja.*

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Istražiti mogućnost primjene metode izolacije hlapljivih spojeva, mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), u kombinaciji s metodom analize, plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS) u istraživanju glukozinolata samoniklih biljaka iz porodice Brassicaceae.
- U tu svrhu treba:
 - ❖ razgraditi glukozinolate iz odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae pomoću endogenog enzima mirozinaze,
 - ❖ izolirati hlapljive spojeve (razgradne produkte glukozinolata) metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) i
 - ❖ analizirati dobivene uzorke hlapljivih spojeva, tzv. vršne pare, vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS).

SAŽETAK

U ovom radu proučavani su razgradni produkti glukozinolata šest samoniklih biljnih vrsta porodice Brassicaceae i to: *Aurinia sinuata* (L.) Griseb. (izverugana gromotulja), *Aurinia leucadea* (Guss.) K. Koch (jadranska rumenica), *Bunias erucago* (L.) (čunjasti repušac), *Capsella rubella* Reut. (sredozemna rusomača), *Cardaria draba* (L.) Desv. (streličasta grbica) i *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. (strižuša). Ove biljne vrste rasprostranjene su u mediteranskom dijelu Hrvatske pa tako i na području park-šume Marjan (Split, Hrvatska). Razgradnja glukozinolata provedena je pomoću endogenog enzima mirozinaze. Izolacija razgradnih produkata glukozinolata (hlapljivih spojeva) provedena je HS-SPME metodom, a kemijski sastav i udio razgradnih produkata glukozinolata, kao i ostalih hlapljivih spojeva, odrađen je vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Primjenom indirektna metode analize - HS-SPME/GC-MS, preko izolacije i identifikacije hlapljivih hidrolitičkih produkata, identificirani su glukozinolati u odabranim biljkama porodice Brassicaceae. Glavni glukozinolati jadranske rumenice su glukonapin i glukobrasikanapin. Glavni glukozinolati izverugane gromotulje su glukobrasikanapin i glukoberteroin. Broj, kao i udio razgradnih produkata glukozinolata, u vršnim parama čunjastog repušca je vrlo mali. Ipak, temeljem HS-SPME/GC-MS analize može se zaključiti da čunjasti repušac sadrži četiri glukozinolata, glukodehidroerucin, glukonapin, glucoerucin i glukokaparin. Glavni sastojci vršnih para sredozemne rusomače su alil-izotiocijanat i alil-tiocijanat, dakle glavni glukozinolat sredozemne rusomače je sinigrin. U vršnim parama streličaste grbice dominira 4-(metiltio)butil-izotiocijanat te se sa sigurnošću može zaključiti da je glavni glukozinolat streličaste grbice glucoerucin. S obzirom na najzastupljenije spojeve u vršnim parama strižuše, izopropil-izotiocijanat i *sec*-butil-izotiocijanat, može se zaključiti da su glavni glukozinolati strižuše glukoputranjivin i glukokohlearin.

Ključne riječi: Brassicaceae, glukozinolati, razgradni produkti glukozinolata, HS-SPME/GC-MS metoda

SUMMARY

This work included research of glucosinolate degradation products from six wild-growing Brassicaceae plants: *Aurinia sinuata* (L.) Griseb., *Aurinia leucadea* (Guss.) K. Koch, *Bunias erucago* (L.), *Capsella rubella* Reut., *Cardaria draba* (L.) Desv. and *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. These plant species are widespread in the Mediterranean part of Croatia as well as in the area of the Marjan Forest Park (Split, Croatia). Degradation of glucosinolates was performed using the endogenous enzyme myrosinase. Isolation of glucosinolate degradation products (volatile compounds) was performed by headspace solid-phase microextraction method (HS-SPME), and the chemical composition and content of glucosinolate degradation products, as well as other volatile compounds, was performed by gas chromatography-mass spectrometry technique (GC-MS).

Using indirect analysis method, namely HS-SPME/GC-MS, via isolation and identification of volatile hydrolytic products, glucosinolates from selected wild-growing Brassicaceae plants were identified. The main glucosinolates of *Aurinia leucadea* are gluconapin and glucobrassicinapin. The main glucosinolates of *Aurinia sinuata* are glucobrassicinapin and glucoberteroin. Number and content of glucosinolate degradation products in headspaces from *Bunias erucago* is rather small. However, according to HS-SPME/GC-MS analysis, it can be assumed that *Bunias erucago* contain four glucosinolates, glucodehydroerucin, gluconapin, glucoerucin and glucocaparin. The main constituents in headspaces from *Capsella rubella* are allyl-isothiocyanate and allyl-thiocyanate, so the main glucosinolate of *Capsella rubella* is sinigrin. Dominating compound in headspaces from *Cardaria draba* is 4-(methylthio)butyl-isothiocyanate so it can be concluded that the main glucosinolate in *Cardaria draba* is glucoerucin. Considering that the most abundant compounds in headspaces of *Sisymbrium officinale* are isopropyl-isothiocyanate and *sec*-butyl-isothiocyanate, it can be concluded that the main glucosinolates from *Sisymbrium officinale* are glucoputranjivin and glucocohlearin.

Keywords: Brassicaceae, glucosinolates, glucosinolate degradation products, HS-SPME/GC-MS method

POPIS KRATICA

Acetil-CoA	acetil koenzim A
CoA ili CoASH	koenzim A
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
ESP	epitiospecifični protein
GC-MS	plinska kromatografija-spektrometrija masa (engl. <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>)
GLS ili GL	glukozinolat
HS-SPME	mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. <i>headspace solid-phase microextraction</i>)
ITC	izotiocijanat
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat
NIT	nitril
PAPS	3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat
R	promjenjivi bočni lanac aglukonskog dijela glukozinolata
RNK	ribonukleinska kiselina
TFP	tiocijanat formirajući protein
UDPG	uridin-difosfat-glukoza

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	3
1.1. Glikozidi.....	3
1.1.1. Podjela glikozida	3
1.2. Glukozinolati.....	4
1.2.1. Struktura i nomenklatura glukozinolata	5
1.2.2. Biosinteza glukozinolata	7
1.2.3. Razgradnja glukozinolata	10
1.2.4. Razgradni produkti glukozinolata	13
1.2.5. Glukozinolati i aroma	15
1.2.6. Sadržaj glukozinolata u biljkama	17
1.2.7. Biološka aktivnost glukozinolata	17
1.3. Metode izolacije razgradnih produkata glukozinolata	20
1.3.1. Destilacija	20
1.3.2. Ekstrakcija	21
1.3.3. Headspace tehnike	22
1.3.4. Sorpcijske tehnike	22
1.4. Metode analize razgradnih produkata glukozinolata	24
1.4.1. Kromatografske metode	24
1.4.2. Spektrometrija masa	27
1.4.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa.....	29
1.5. Porodica Brassicaceae	31
1.5.1. Opće karakteristike biljaka roda <i>Aurinia</i>	31
1.5.2. Opće karakteristike vrste <i>Bunias erucago</i> (L.), čunjasti repušac	33
1.5.3. Opće karakteristike vrste <i>Capsella rubella</i> Reut., sredožemna rusomača	33
1.5.4. Opće karakteristike vrste <i>Cardaria draba</i> (L.) Desv., streličasta grbica	34
1.5.5. Opće karakteristike vrste <i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop., strižuša.....	35
2. EKSPERIMENTALNI DIO	36
2.1. Biljni materijal	36
2.2. Aparatura.....	36
2.3. Razgradnja glukozinolata i izolacija hlapljivih spojeva.....	37

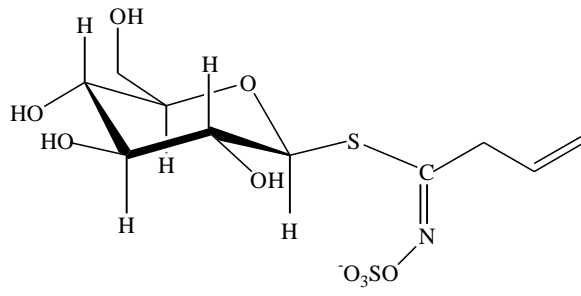
2.3.4. Enzimska hidroliza-autoliza	37
2.3.5. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi.....	37
2.4. GC-MS analiza vršnih para	40
3. REZULTATI	42
3.1. GC-MS analiza vršnih para	42
4. RASPRAVA	49
4.1. Vršne pare jadranske rumenice	50
4.2. Vršne pare izverugane gromotulje	53
4.3. Vršne pare čunjastog repušca	56
4.4. Vršne pare sredozemne rusomače	58
4.5. Vršne pare streličaste grbice	60
4.6. Vršne pare strižuše	62
5. ZAKLJUČAK	65
6. LITERATURA	67

UVOD

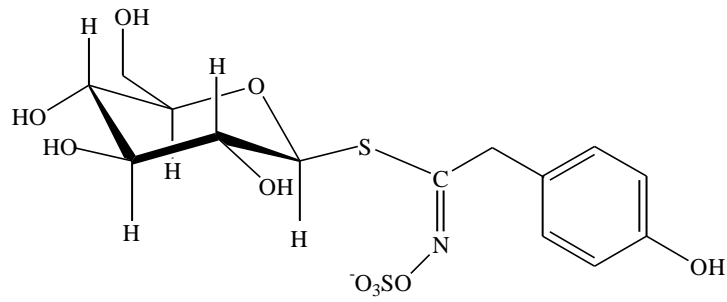
Glukozinolati su sekundarni metaboliti vrlo raznolikih struktura, a neprestano se otkrivaju novi. Pronađeni su u 16 različitih biljnih porodica reda *Capparales*, od kojih je najznačajnija porodica Brassicaceae. Postoji brojna literatura o glukozinolatima te biljne porodice. Porodica Brassicaceae obuhvaća više od 350 rodova i 3000 vrsta, od kojih je najznačajniji rod *Brassica* jer uključuje čitav niz biljaka koje se svakodnevno upotrebljavaju u ljudskoj prehrani (uljana repica, gorušica, kupus, kelj, cvjetača, brokula, prokulica, raštika, hren).¹

Među prvim glukozinolatima izolirani su spojevi poznati pod imenima sinigrin (prop-2-en-1-il- ili alil-glukozinolat) (slika 1) i sinalbin (4-hidroksibenzil-glukozinolat) (slika 2). Sinigrin i sinalbin izolirani su 1830. godine iz sjemena crne (*Brassica nigra*) i bijele (*Sinapis alba*) gorušice. Otkriće velikog broja do danas poznatih glukozinolata može se zahvaliti danskim istraživačima sa Sveučilišta u Kopenhagenu čija su rana otkrića opisana u dva pregledna rada. U radu iz 1960. godine Kjær je naveo 30 izotiocijanata koji su razgradni produkti 30 glukozinolata, a Ettlinger i Kjær su u svom radu (1968.) naveli 50 glukozinolata koji su izravno ili neizravno okarakterizirani. U sljedeća tri desetljeća nisu objavljeni temeljiti pregledi struktura glukozinolata. U tom smislu je pregledni rad Faheya i sur. (2001.) bio prekretnica. U tom radu je dan detaljni popis glukozinolata identificiranih u raznim biljnim vrstama. Od tada se broj glukozinolatnih struktura povećao na oko 130 iako sve strukture još uvijek nisu u potpunosti rasvijetljene primjenom odgovarajućih tehnika identifikacije, kao što su masena spektrometrija (MS) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Štoviše, Clarke (2010.) je u svojem preglednom radu sugerirao postojanje oko 200 glukozinolata. U radu je predviđeno da će se u prirodi pronaći još 180 glukozinolata.¹

Rad objavljen 2020. godine u suradnji znanstvenika s Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu (Hrvatska), Sveučilišta u Kopenhagenu (Danska), Sveučilišta u Orléansu (Francuska) i Sveučilišta Laurientien (Kanada) daje pregled literature na temu glukozinolati do sredine 2018. godine. U njemu je utvrđeno da broj glukozinolata pronađenih u biljkama, a čije su strukture potvrđene modernim spektroskopskim metodama (NMR i MS), iznosi 88. Osim toga, djelomično je okarakterizirano još oko 47 glukozinolata, što ukupno daje broj dokumentiranih glukozinolata između 88 i 135.¹



Slika 1. Sinigrin

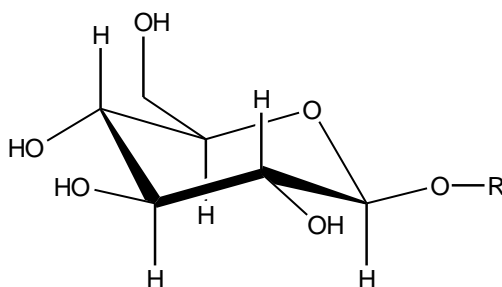


Slika 2. Sinalbin

1. OPĆI DIO

1.1. Glikozidi

Glikozidi su raznolika i velika grupa biljnih produkata koji se uglavnom nalaze u višim biljkama, ali su pronađeni i kod nekih nižih vrsta. Ovi složeni spojevi mogu se razgraditi na sastavne dijelove hidrolizom s kiselinom ili djelovanjem specifičnih hidrolitičkih enzima (glikozidaza). Razgradni produkti glikozida su ugljikohidrat-glikon i neugljikohidrat-aglikon. Glikon i aglikon su u molekuli glikozida povezani glikozidnom vezom. Glikonski dio molekule je najčešće monosaharid (glukoza, fruktoza ili galaktoza), ali aglikon može biti vezan i s više molekula ugljikohidrata međusobno vezanih u molekulu disaharida, trisaharida pa čak i tetrasaharida.² Postoji α - i β -glikozidna veza, tj. α -glikozidi i β -glikozidi (slika 3). α - i β -Glikozidi nisu u međusobnoj ravnoteži jer se ne mogu spontano anomerizirati (bez katalizatora).



Slika 3. Opća strukturna formula β -D-O-glukozida

1.1.1. Podjela glikozida

Najčešća podjela glikozida je na *O*-glikozide, *N*-glikozide, *S*-glikozide i *C*-glikozide. Najbrojniji glikozidi u biljnom svijetu su *O*-glikozidi. *O*-glikozidi nastaju vezivanjem ugljikohidrata s alkoholima, karboksilnim kiselinama i fenolnim hidroksilnim skupinama. To su većinom bezbojni, nehlapljivi, kristalični, optički aktivni spojevi topljivi u vodi, alkoholu, acetonu i etil-acetatu. *N*-glikozidi nastaju odcjepljenjem vode između poluacetalnog hidroksila i neke NH-grupe, *S*-glikozidi imaju C-S vezu te *C*-glikozidi imaju kovalentnu C-C vezu. Kemijska i biokemijska svojstva aglikonskog dijela molekule kod glikozida mnogo su važnija od svojstava ugljikohidratnog dijela.³

Postoje i drugi načini klasificiranja glikozida:

1. Prema ugljikohidratnom dijelu molekule.

Glikozidi koji sadrže glukozu kao glikon zovu se glukozidi. Slično tome, kad je ugljikohidrat fruktoza ili galaktoza glikozidi se zovu fruktozidi odnosno galaktozidi.

2. Prema aglikonskom dijelu molekule.

Glikozidi se mogu klasificirati prema strukturi aglikonskog dijela molekule. Npr. kod flavonoidnih glikozida aglikonski dio molekule je flavonoid, dok kod iridoidnih ili steroidnih glikozida aglikonski dio molekule je iridoid ili steroid.

3. Prema svojstvima i funkciji glikozida.

Glikozidi koji izazivaju pjenjenje vodenih otopina (glikozidi koji imaju "sapunaste" osobine) zovu se saponini, dok glikozidi koji oslobađaju cijanovodičnu kiselinu (HCN) pri hidrolizi zovu se cijanogeni glikozidi, a glikozidi koji utječu na rad srčanog mišića zovu se srčani glikozidi.³

1.2. Glukozinolati

Glukozinolati (*S*-glukozidi) su rasprostranjeni u 16 porodica reda *Capparales* u kojem je porodica Brassicaceae najznačajnija za čovjeka. Tu spadaju različite vrste kupusa (*Brassica oleracea*) npr. kupus, kelj, koraba cvjetača, brokula, zatim uljana repica (*Brassica napus*), bijela repa (*Brassica rapa*), rotkva (*Raphanus sativus*) te začinske i ljekovite biljke kao što su gorušica (*Sinapis alba*), slačica (*Brassica nigra*) i hren (*Armoracia rusticana*). Glukozinolati su vodotopljivi ionski spojevi koji se sastoje od glukonskog dijela, β -D-glukoze, i aglukonskog dijela s R skupinom koja uključuje alkilni, arilni ili indolni bočni lanac. Pokrajnji (bočni) lanac i sulfatna grupa imaju *anti* ili *Z* konfiguraciju ugljik-dušik dvostruke veze. Do danas je identificirano više od stotinu glukozinolata.⁴

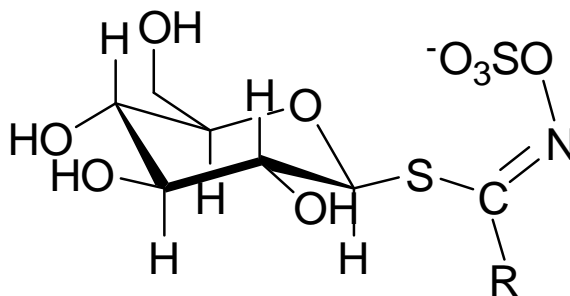
Glukozinolati se u biljkama nalaze odijeljeni od enzima mirozinaze koja ih hidrolizira na glukozu, KHSO_4 i isparljive produkte sa sumporom i/ili dušikom. Produkti hidrolize glukozinolata su odgovorni za ljuti okus i karakteristični miris gore navedenog povrća. Prema kemijskom sastavu mogu biti različiti spojevi što ovisi o uvjetima hidrolize (pH, prisutvu Fe^{3+} , prisustvo epitiospecifičnog proteina (ESP), temperaturi i sl.), a uključuju izotiocijanate, nitrile, tiocijanate, epitionitrile i vinil-oksazolidintione.⁴

Posljednjih godina glukozinolati i njihovi razgradni produkti postaju vrlo interesantni istraživačima zbog svojih nutritivnih i antinutritivnih svojstava, karakteristične arome koju daju povrću te biološke aktivnosti koju pokazuju njihovi razgradni produkti. Sami glukozinolati su biološki neaktivni spojevi. Tek oštećenjem biljnog tkiva prouzrokovanog raznim štetnicima, žetvom, industrijskom obradom hrane, sjeckanjem i žvakanjem, glukozinolati dolaze u kontakt s endogenim enzimom mirozinazom pri čemu dolazi do njihove hidrolize i nastaje niz biološki aktivnih spojeva kao što su izotiocijanati, nitrili, tiocijanati i oksazolidintioni. Neki od nastalih razgradnih produkata su štetni dok neki posjeduju antioksidacijska, antimikrobna, antifugalna pa čak i antikancerogena svojstva.⁵

1.2.1. Struktura i nomenklatura glukozinolata

Prvi poznati glukozinolati, sinigrin i sinalbin (glukosinalbin), izolirani su iz sjemena crne i bijele gorušice 1830. godine, što je označilo početak istraživanja ove skupine prirodnih organskih spojeva. Na osnovu elementne analize te analize produkata njihove razgradnje, Gadamer je (1897.) predložio opću strukturnu formulu glukozinolata. Iako netočna, predložena struktura se zadržala do 1956. godine kada su Ettlinger i Lundeen predložili novu, točnu strukturu (slika 4) i opisali prvu sintezu glukozinolata.⁵

Glukozinolati su grupa organskih aniona koji se iz biljnog materijala izoliraju u obliku kalijevih ili natrijevih soli. Zajednička strukturna karakteristika glukozinolata je prisustvo β -D-tioglukoznog dijela za koji su preko C=N skupine vezane sulfatna skupina i bočni lanac (označen s R u općoj strukturnoj formuli) po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju.⁶



Slika 4. Opća struktura glukozinolata⁶

Kod imenovanja glukozinolata najčešće se koriste trivijalna imena nastala od latinskog imena biljke, iz koje je glukozinolat prvi put izoliran, kojem je dodan prefiks "gluko" , i sufiksa "in". 1961. Godine Ettlinger i Dateo predložili su današnju polusustavnu nomenklaturu po kojoj se nazivu "glukozinolat" dodaje prefiks koji se odnosi na sustavnu nomenklaturu bočnog lanca R (npr. benzil-glukozinolat).⁷

Bočni lanac glukozinolata (R) je promjenjiv i osnova je njihove strukturne raznolikosti te biološke aktivnosti produkata koji nastaju enzimskom ili kemijskom razgradnjom glukozinolata. S obzirom na strukturne sličnosti bočnog lanca glukozinolati se dijele na alifatske, aromatske i heterocikličke (indolne) glukozinolate (tablica 1).⁸

Tablica 1. Uobičajeni glukozinolati u povrću roda *Brassica*¹⁰

Trivijalno ime	Kemijsko ime (bočni lanac R)
Alifatski glukozinolati	
Glukoiberin	3-(metilsulfinil)propil
Progoitrin	2-hidroksibut-3-enil
Sinigrin	prop-2-enil
Glukonapoleiferin	2-hidroksi-pent-4-enil
Glukorafanin	4-(metilsulfinil)butil
Glukoalisin	5-(metilsulfinil)pentil
Glukokaparin	metil
Glukobrasikanapin	pent-4-enil
Glukokeirolin	3-(metilsulfonyl)propil
Glukoiberiverin	3-(metiltio)propil
Glukonapin	but-3-enil
Indolni glukozinolati	
4-Hidroksiglukobrasicin	4-hidroksi-3-indolilmetil
Glukobrasicin	3-indolilmetil
4-Metoksiglukobrasicin	4-metoksi-3-indolilmetil
Neoglukobrasicin	1-metoksi-3-indolilmetil
Aromatski glukozinolati	
Glukosinalbin	<i>p</i> -hidroksibenzil
Glukotropaeolin	benzil
Glukonasturtin	2-feniletil

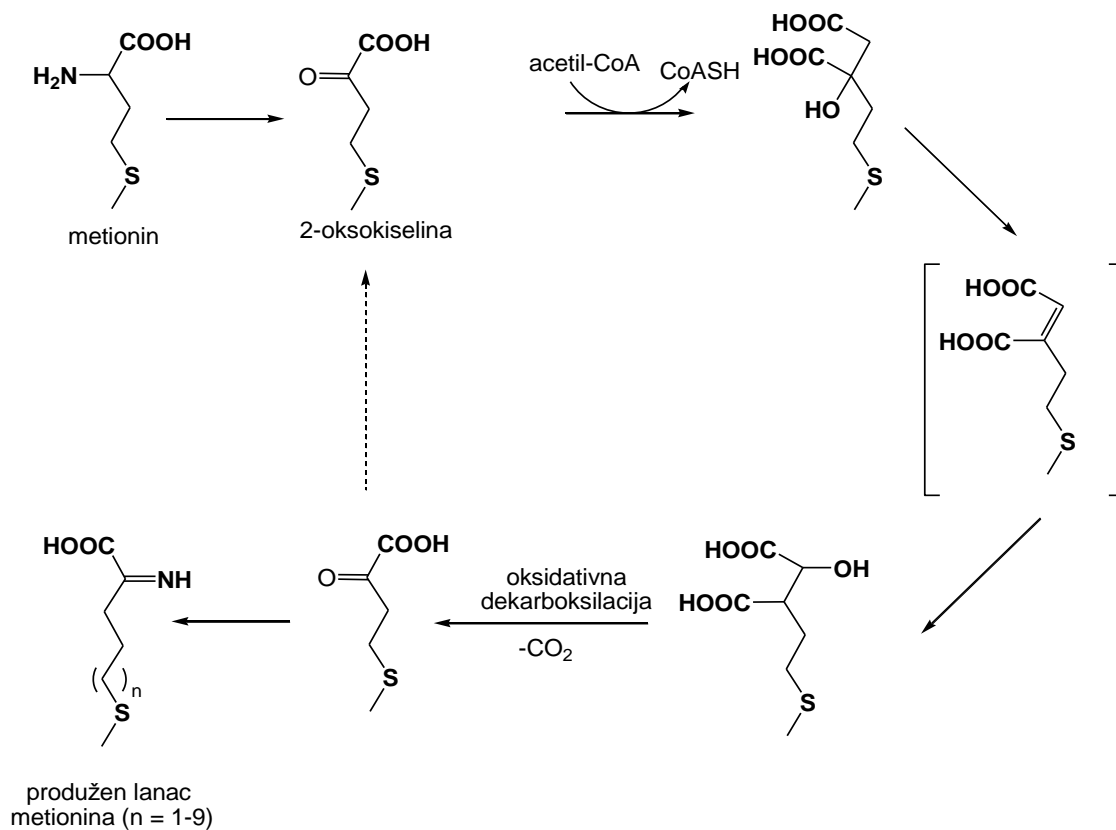
1.2.2. Biosinteza glukozinolata

Biosinteza glukozinolata se istražuje od 60-tih godina 20. stoljeća i do danas je poznata većina međuprodukata i enzima koji sudjeluju u biosintezi. Istraživanja provedena na model biljci *Arabidopsis thaliana* omogućila su napredak i olakšala istraživanja. Kjaer i Conti su pretpostavili da su aminokiseline prekursori (preteče) aglikonskog dijela molekule glukozinolata, što su temeljili na sličnosti između ugljikovog skeleta nekih aminokiselina i glukozinolata. Njihova pretpostavka dokazana je korištenjem različitih, radioaktivnim izotopima obilježenih, spojeva (^1H , ^{14}C , ^{15}N ili ^{35}S).⁶

Smatra se da su prekursori alifatskih glukozinolata proteinske aminokiseline alanin, metionin, valin, leucin i izoleucin, dok su fenilalanin i tirozin prekursori aromatskih glukozinolata, a triptofan indolnih glukozinolata. Veoma veliki broj glukozinolata nastaje brojnim metaboličkim transformacijama metionina kao aminokiselinskog prekursora ovih spojeva. Biosinteza glukozinolata iz aminokiselina može se podijeliti u tri neovisna stupnja.⁶

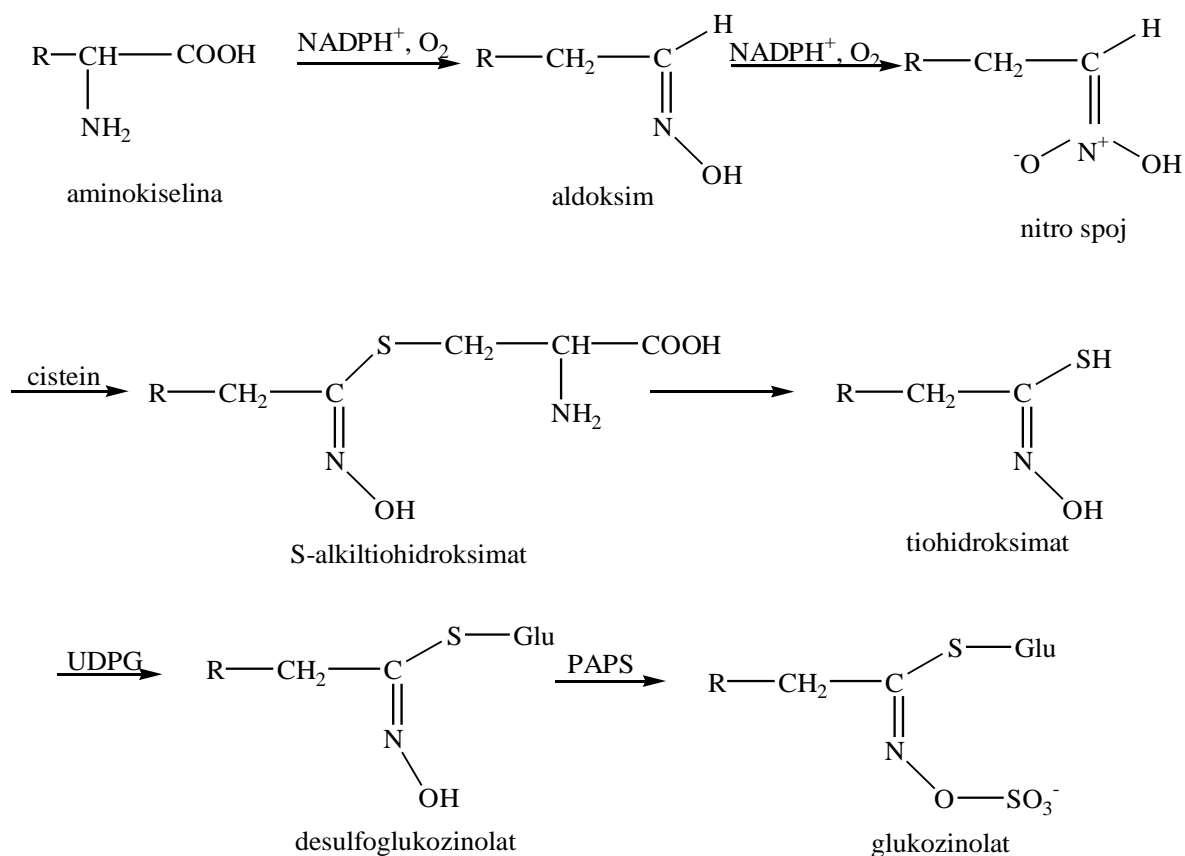
Glukozinolati se obzirom na biosintetsko podrijetlo mogu podijeliti na glukozinolate nastale iz uobičajenih aminokiselina i glukozinolate nastale iz aminokiselina modificiranih produljenjem bočnog lanca. Modifikacija aminokiseline sastoji se od:

1. Produljenja (elongacije) lanca alifatske ili aromatske aminokiseline umetanjem metilenske skupine u njihove bočne lance, što predstavlja prvi stupanj u biosintezi. U modifikaciju aminokiselina su uključeni različiti enzimi. Početna aminokiselina se deaminira stvarajući odgovarajuću 2-oksokiselinu. Slijedi kondenzacija s acetil-CoA, izomerizacija i na kraju oksidacija i dekarboksilacija pri čemu nastaje 2-okso kiselina s jednom metilenskom skupinom više od početne aminokiseline. Ovi koraci se mogu ponavljati, a rezultat svakog, dodatnog, elongacijskog kruga je oksokiselina s jednom metilenskom skupinom više (slika 5).¹⁰



Slika 5. Produženje lanca metionina u biosintezi glukozinolata⁴

2. Drugi stupanj je metabolička modifikacija aminokiseline, ili njenog derivata s produljenim lancem, koja se odvija preko niza međuprodukata koji su identični za sve glukozinolate. Prvi korak u tom procesu je pretvorba aminokiseline u aldoksim koju kataliziraju različiti enzimi (npr. citokrom P450 monooksigenaze, flavin ovisne monooksigenaze i peroksidaze). Međuprodukti između aldoksima i tihidroksimata još uvijek nisu identificirani. Predpostavlja se da su to nitro spoj (nastao oksidacijom aldoksima) i S-alkiltihidroksimat (akceptor sumpora najvjerojatnije iz cisteina). S-alkiltihidroksimat se cijepa i nastaje tihidroksimat, a reakciju katalizira enzim CS liaza. Konačni korak drugog stupnja biosinteze je glukozilacija i nastajanje desulfoglukozinolata te sulfatacija do glukozinolata (slika 6).¹⁰



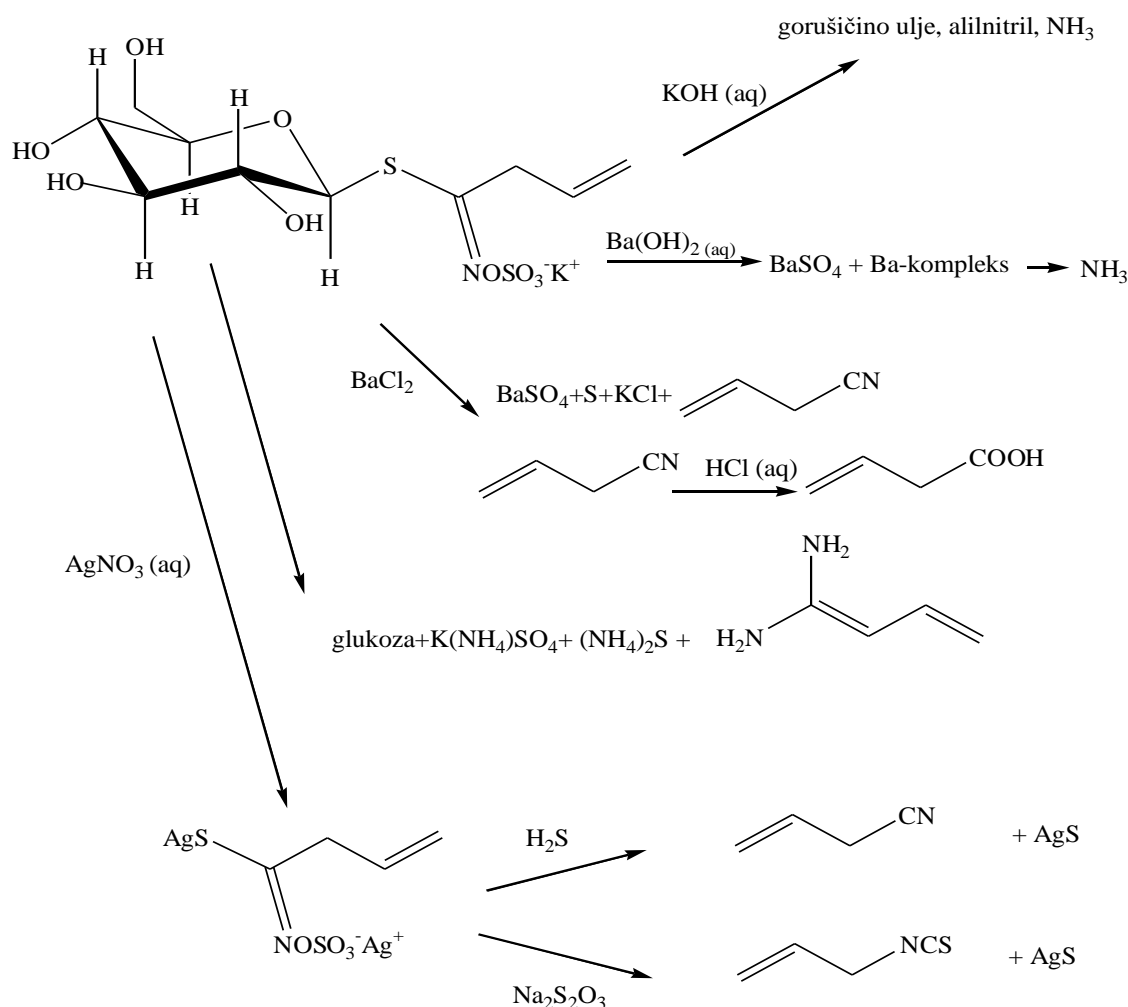
Slika 6. Pojednostavljena opća shema drugog stupnja biosinteze glukozinolata⁶

3. Nastali osnovni glukozinolat podliježe nizu daljnjih sekundarnih modifikacija bočnog lanca (R) koje uključuju reakcije oksidacije, hidroksilacije, alkenilacije, acilacije ili esterifikacije. Bočni lanac glukozinolata (R) koji potječu od aminokiseline metionina posebno je sklon daljnim modifikacijama kao što su postupna oksidacija atoma sumpora u metiltioalkilnom bočnom lancu u metilsulfinilalkil ili metilsulfonylalkil. Metilsulfinilalkil bočni lanci mogu se dalje modificirati oksidacijskim cijepanjem u alkenil i hidroksialkenil lance. Ove reakcije su biološki i biokemijski važne jer utječu na smjer hidrolize glukozinolata i aktivnost razgradnih produkata hidrolize.⁶

1.2.3. Razgradnja glukozinolata

1.2.3.1. Neenzimska razgradnja glukozinolata

Glukozinolati se razgrađuju na sastavne dijelove hidrolizom, enzimskom ili kemijskom, ali i pod utjecajem povišene temperature (toplinski). Kemijskom (neenzimskom) razgradnjom glukozinolata nastaju različiti produkti ovisno o uvjetima. Tako, pri povišenoj temperaturi i u jako kiselim uvjetima, glukozinolati se razgrađuju na karboksilnu kiselinu i glukozu, a u lužnatim uvjetima nastaju aminokiseline i tioglukoza. Gadamer (1897.) je bio jedan od prvih znanstvenika koji je na prop-2-en-1-il-glukozinolat (sinigrin) istraživao kemijsku razgradnju glukozinolata (slika 7).⁶



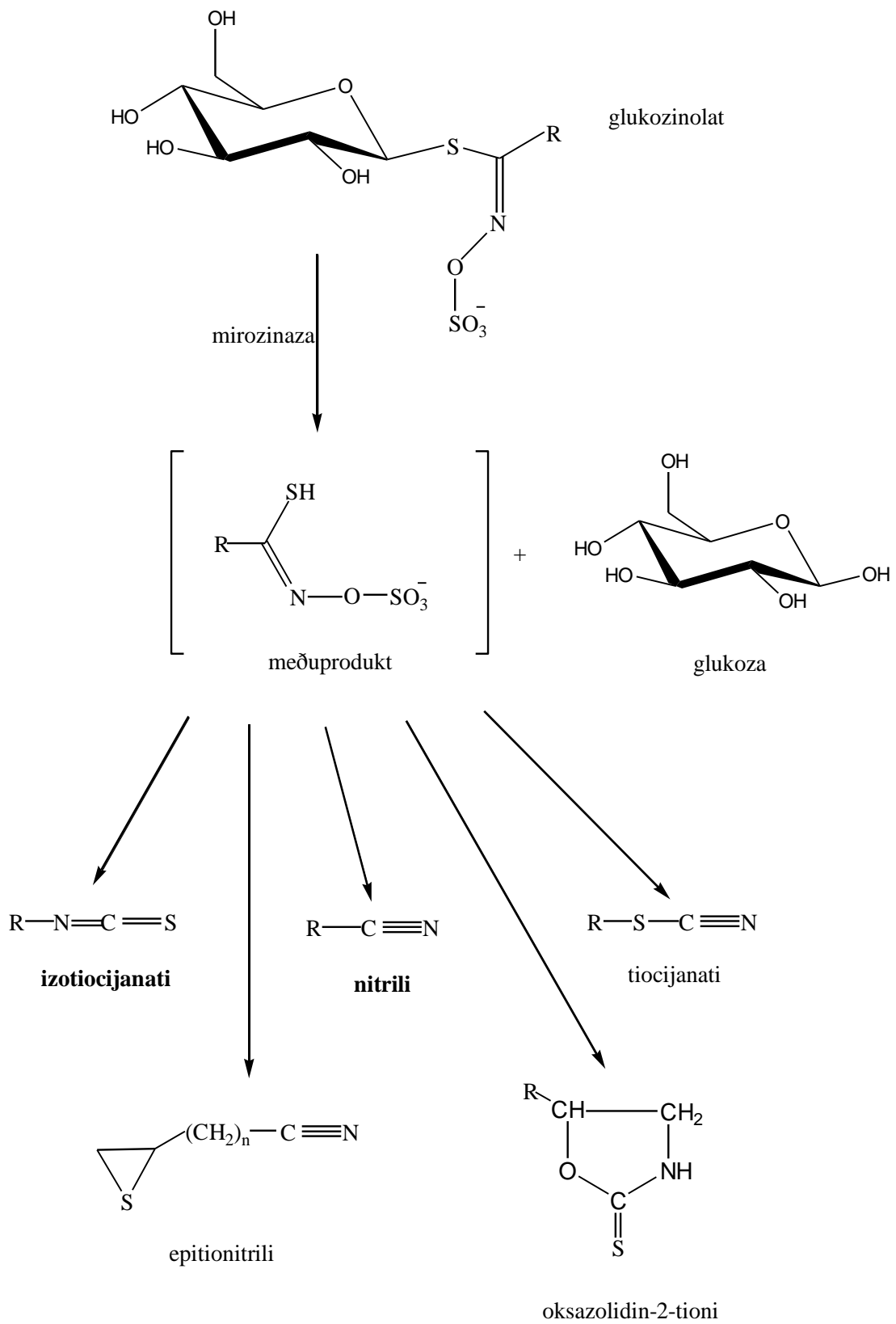
Slika 7. Kemijska razgradnja prop-2-en-1-il-glukozinolata
(preuzeto i prilagođeno iz Bones & Rositer, 2006.)⁶

1.2.3.2. Enzimska razgradnja glukozinolata

Hidrolizu glukozinolata katalizira enzim tioglukozid-glukohidrolaza poznata po trivijalnom imenu mirozinaza. Mirozinaza nije jedan enzim već porodica ili grupa enzima sličnog djelovanja, stoga je pravilnije govoriti o tioglukozid-glukohidrolazama odnosno mirozinazama. Prisustvo mirozinaze u biljkama ustanovljeno je 1840. godine kada je A. Bussy proučavajući glukozinolate biljke *B. nigra* otkrio "albuminu sličnu" supstancu koja sudjeluje u hidrolizi glukozinalata sinigrina. Od tada je aktivnost mirozinaze detektirana u svim istraživanim biljkama koje sadrže glukozinolate.⁹

Mirozinaza je široko rasprostranjena u biljnim stanicama, posebno u stanicama sjemena, ali i lišća, stabljike i korijena. Smatra se da je njena aktivnost veća u mladom biljnom tkivu. Aktivnost mirozinaze ovisi o biljnoj vrsti, organu te o razvojnom stadiju biljke. Na aktivnost također utječu i sezonski uvjeti i klimatski faktori.⁸

Enzimskom razgradnjom glukozinolata nastaju glukoza-glukon i nestabilni međuprodukt-aglukon. Aglukon se spontano pregrađuje pri čemu nastaju različiti razgradni produkti (slika 8). Vrsta razgradnih produkata ovisi o strukturi bočnog lanca, prisustvu kofaktora i uvjetima hidrolize. Pri pH 7 dolazi do Lossenove pregradnje i kao glavni razgradni produkti nastaju reaktivni, hlapljivi i mirisni izotiocijanati. Pri pH < 4 glavni razgradni produkti su nitrili. U prisustvu fero-iona (Fe^{2+}) nitrili su glavni razgradni produkti pri svim pH vrijednostima. Nastajanje tiocijanata je također moguće, a ono ovisi o strukturi bočnog lanca aglukona (npr. alil, benzil). Ako je u bočnom lancu aglukona prisutna terminalna dvostruka veza, u prisustvu Fe^{2+} -iona i epitiospecifičnog proteina (ESP), nastaju epitionitrili. Alifatski glukozinolati koji imaju sumpor u bočnom lancu hidrolizom daju izotiocijanate i nitrile.⁶



Slika 8. Opća shema hidrolize glukozinolata i strukture glavnih razgradnih produkata
(Preuzeto i prilagođeno iz Rask i sur., 2000.)⁶

1.2.4. Razgradni produkti glukozinolata

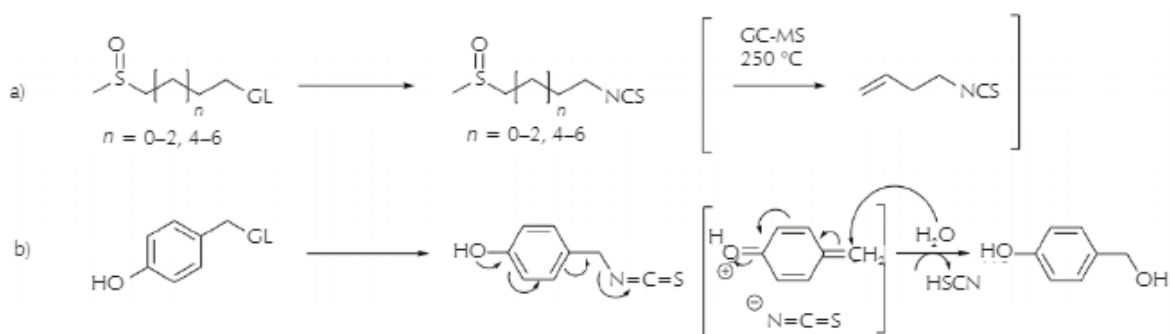
Iz glukozinolat-mirozinaza reakcija nastaju različiti razgradni produkti (npr. izotiocijanati, tiocijanati i nitrili) koji imaju širok spektar bioloških aktivnosti. Neki od razgradnih produkata su štetni dok se neki smatraju antikancerogenima. Dakle, glukozinolati su prekursori izotiocijanata i tiocijanata, spojeva koji sadrže sumpor te nitrila i indola, spojeva koji ne sadrže sumpor u svojoj strukturi.³

- Izotiocijanati

Izotiocijanati (ITC; $R-N=C=S$) su se tijekom povijesti smatrali "normalnim" produktima hidrolize glukozinolata. Riječ je o hlapljivim spojevima, jakog mirisa i okusa. Primjerice, propenil-izotiocijanati su odgovorni za karakterističnu aromu gorušice i hrena pa se ponekad navedeni izotiocijanati nazivaju "gorušičinim uljem". Nastajanje izotiocijanata zahtijeva trenutnu Lossenovu pregradnju nestabilnog aglukonskog međuprodukta u $R-N=C=S$ konfiguraciju.

Izotiocijanati koji sadrže β -hidroksilnu skupinu su nestabilni i spontanom intramolekulskom reakcijom tvore cikličke tionske spojeve - oksazolidin-2-tione.

Količina izotiocijanata nastalih iz glukozinolata varira i djelomično ovisi o pripremi i postupanju s biljkom (slika 9). Zbog svoje toksičnosti izotiocijanati su mogući kandidati za upotrebu kao pesticidi.⁶



Slika 9. Razgradnja glukozinolata (GL) u odgovarajuće izotiocijanate koji pokazuju nestabilnost: a) u uvjetima GC-MS analize zbog visoke temperature; b) zbog hidrolize¹

- Nitrili

Nastajanje nitrila ($R-C\equiv N$, poznatih i kao organski cijanidi) ne zahtijeva pregradnju međuprodukta već samo gubitak sumpora iz molekule. Nastajanje nitrila favorizirano je nad izotiocijanatima pri nižim pH vrijednostima (< 4), a prisustvo Fe^{2+} ili tiolnih spojeva također povećava mogućnost nastanka nitrila.⁶

- Epitioitrili

Epitioitrili nastaju pri istim uvjetima kao i nitrili, ali samo iz glukozinolata koji imaju terminalnu dvostruku vezu u bočnom (R) lancu i uz prisustvo epitospecifičnog proteina (ESP) i Fe^{2+} -iona. Kada je prisutan, ESP usmjerava hidrolizu glukozinolata na način da umjesto nastajanja izotiocijanata nastaju ili nitrili ili epitioitrili. Točan mehanizam nije još poznat. Epitiospecifični proteini (ESP) su izolirani, pročišćeni i identificirani iz različitih vrsta porodice Brassicaceae kao što su *B. napus*, *B. oleracea* i *A. thaliana*.⁶

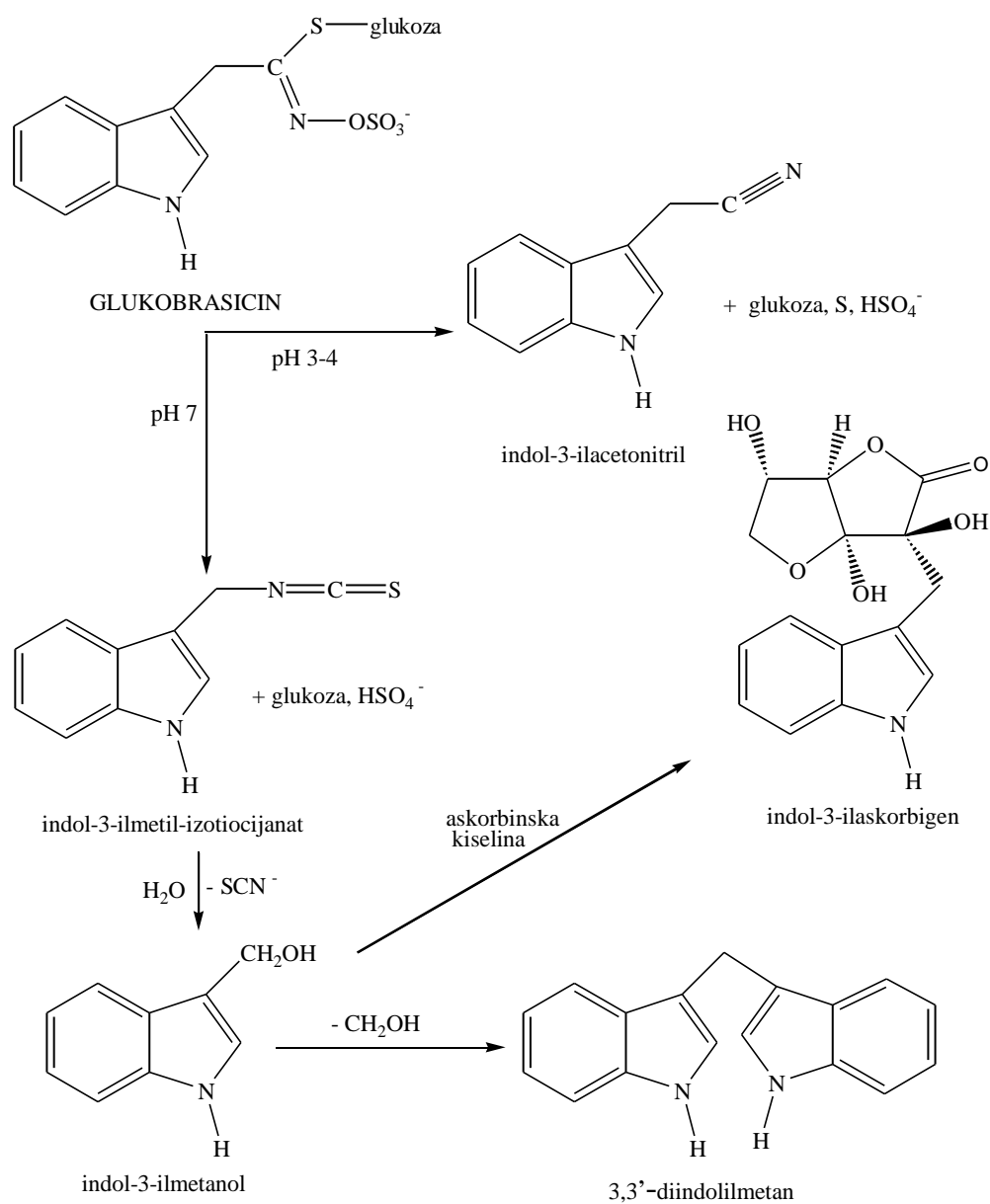
- Tiocijanati

Faktori koji kontroliraju nastajanje tiocijanata ($R-S-C\equiv N$) nisu dovoljno istraženi. Smatra se da je za nastajanje tiocijanata uz mirozinazu potrebno prisustvo još jednog enzima, tzv. tiocijanat formirajućeg proteina (TFP). Poznato je da tiocijanati nastaju iz glukozinolata koji imaju specifične bočne lance (R) kao što su prop-2-enil-, benzil- i 4-(metiltio)butil-glukozinolati. Nastajanje tiocijanata iz glukozinolata zabilježeno je samo u nekoliko biljaka i ograničeno je na tri glukozinolata - erucin, glukotropeolin i sinigrin. Nedavno je TFP identificiran u vrsti *Lepidium sativum*, ali su informacije o njegovom načinu djelovanja i lokalizaciji još uvijek vrlo ograničene.⁶

- Indoli

Indolni spojevi nastaju, zajedno s tiocijanatima, hidrolizom indolnih glukozinolata. Glukobrasicin (indol-3-ilmetil-glukozinolat) je najzastupljeniji indolni glukozinolat u povrću roda *Brassica*. Shema enzimske hidrolize glukobrasicina

predstavlja model za opću shemu razgradnje indolnih glukozinolata (Gmelin i Vitanen 1959.,1962.) (slika 10).⁶



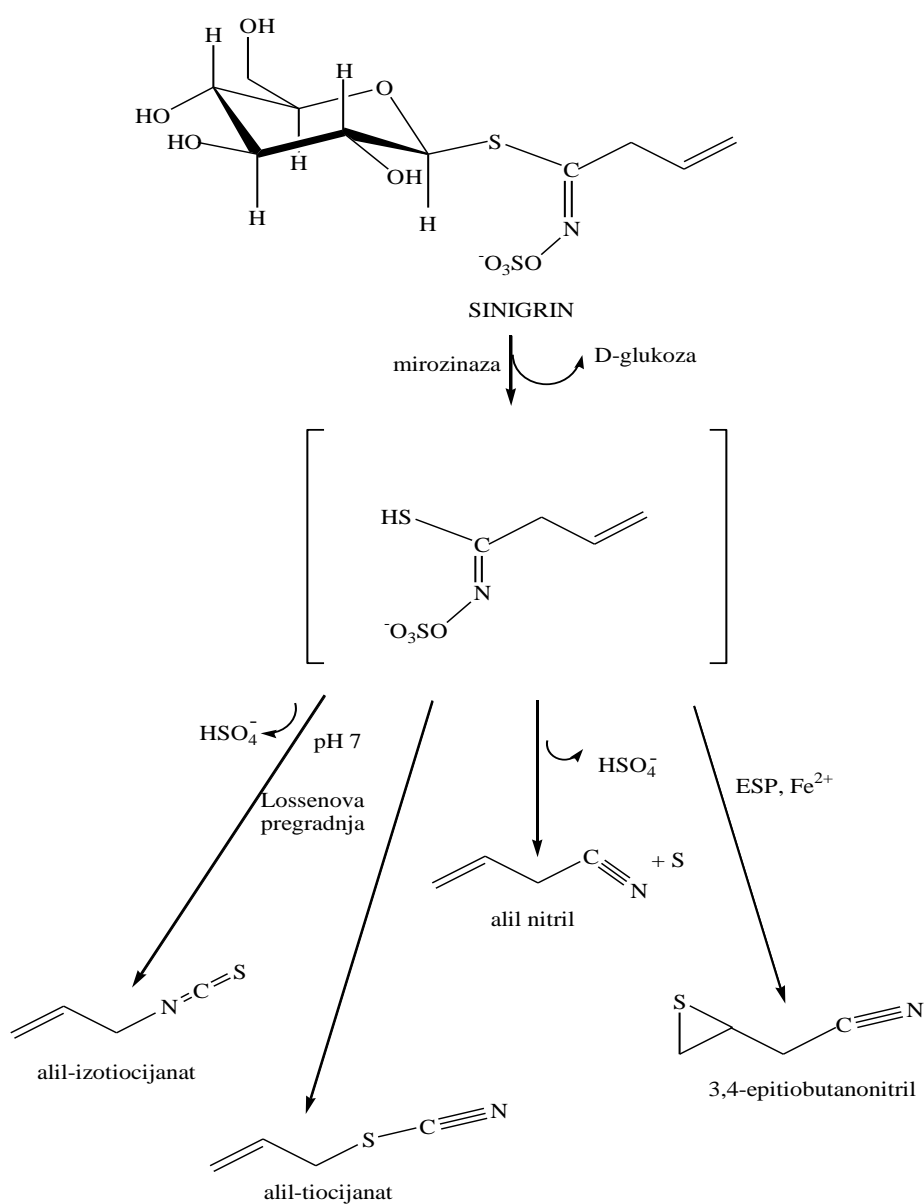
Slika 10. Shema enzimske hidrolize indolnog glukozinolata glukobrasicina⁶

1.2.5. Glukozinolati i aroma

Glukozinolati su spojevi bez arome, odnosno mirisa i okusa. Međutim njihovom razgradnjom (hidrolizom te kemijskom ili toplinskom razgradnjom) nastaju spojevi koji daju specifičan miris i okus povrću koje sadrži glukozinolate. Najrašireniji među

razgradnim produktima glukozinolata su izotiocijanati poznati i kao „senf ulja“. Chin i sur. (1996.) uočili su da u svježem kupusu alil-izotiocijanat nastaje iz glukozinolatnog prekursora, sinigrina, i ima karakterističan miris sličan senfu i hrenu (slika11). Alil-izotiocijanat ima gorak, prodoran okus i uzrokuju suženje očiju.¹⁰

Na okus biljaka iz porodice Brassicaceae ne utječu samo razgradni produkti glukozinolata već i drugi spojevi. Npr. *cis*-heks-3-enol i *trans*-heks-2-enal su spojevi koju su pronađeni u lišću kupusa. Poznati su i kao „alkohol listova“ i „aldehid listova“ jer su uobičajeni hlapljivi spojevi nositelji arome zelenog lisnatog povrća. Navedeni spojevi nastaju oksidacijom lipida (MacLeod, 1976.).¹⁰



Slika 11. Shematski prikaz razgradnje sinigrina⁶

1.2.6. Sadržaj glukozinolata u biljkama

Glukozinolati se nalaze u kultiviranim i samoniklim biljkama iz porodice Brassicaceae. Dominantni su u oko 16 botaničkih obitelji reda *Capparales*. Koncentracija i vrsta glukozinolata u biljci ovise obiljnoj vrsti, starosti biljke, dijelu biljke iz kojeg su izolirani, prisutnosti štetnika, nutrijentima, klimi i ostalim uvjetima za vrijeme rasta biljke. Sve vrste glukozinolata ne možemo pronaći u svakom vrstu povrća. U tablici 2 prikazana je količina prisutnih glukozinolata u najčešće konzumiranom povrću iz porodice Brassicaceae.¹⁰

Tablica 2. Sadržaj glukozinolata (mg/100g) u različitom povrću iz porodice Brassicaceae (preuzeto i prilagođeno iz McNaughton i Marks 2003)¹⁰

Povrće iz porodice Brassicaceae	Sadržaj glukozinolata (mg/100 g)
Brokula (<i>Brassica oleracea</i> var.italica)	19,3-127,5
Kelj pupčar (<i>Brassica oleracea</i> var.gemmifera)	80,1-445,5
Kupus (<i>Brassica oleracea</i> var.kapitata)	42,7-108,9
Kupus , crveni	26,5-76,5
Kupus, kineski ((<i>Brassica chinensis</i>)	17,3-54,8
Kelj (<i>Brassica oleracea</i> var.sabauda)	59,5-209,0
Cvjetača (<i>Brassica oleracea</i> var.botrytis)	11,7-78,6
Hren (<i>Armoracia lapathifolia</i> Gilib)	106,1
Gorušica (<i>Brassica juncea</i>)	118,1-544,5
Repa (<i>Brassica rapa</i>)	20,4-140,5

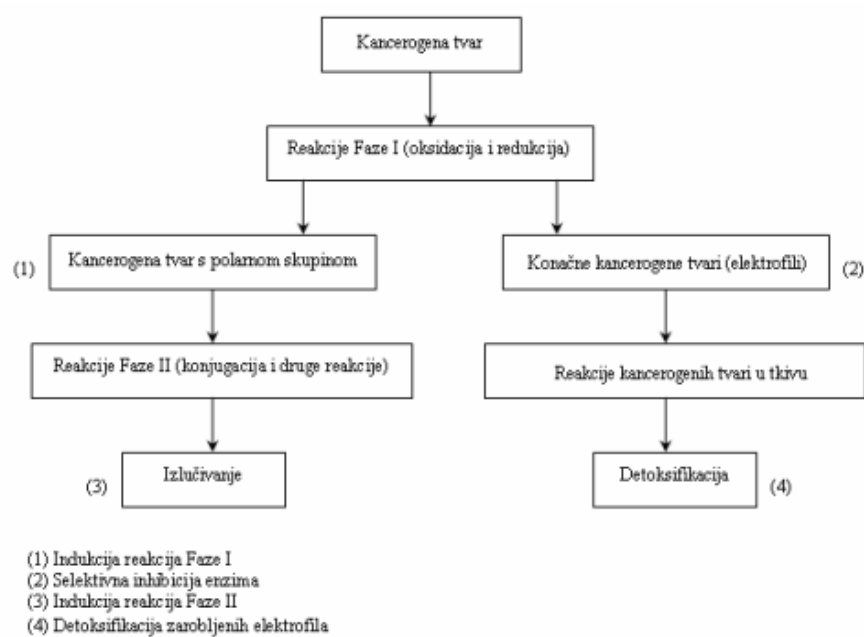
1.2.7. Biološka aktivnost glukozinolata

Zbog velikog broja različitih glukozinolata kao i različitih putova hidrolize postoji širok raspon hidrolitičkih produkata. Prisutnost glukozinolata u kupusnjačama znatno ih razlikuje od drugih vrsta povrćajer oni imaju blagotvoran učinak na ljudsko zdravlje zbog svojih nutritivnih i antinutritivnih svojstava, antifugalnih, antibakterijskih i antikancerogenih svojstava te zbog karakteristične arome koje daju povrću. Pretpostavlja se da zaštitni učinak kupusnjača protiv raka dijelom proizlazi iz visokog sadržaja glukozinolata koje to povrće sadrži.^{5,11}

- Antikancerogeno djelovanje

U proteklih 20 godina istaknuto je da konzumiranjem voća i povrća, posebice povrća iz porodice Brassicaceae, dolazi do smanjenja pojave karcinoma za otprilike

50% . Mehanizam djelovanja razgradnih produkata glukozinolata još nije u potpunosti razjašnjen, ali istraživanja pokazuju da razgradni produkti modificiraju aktivnost enzima Faze I i Faze II (slika 12). Ovi enzimi inhibiraju rast stanica tumora i stimuliraju apoptozu, programiranu staničnu smrt, ali važnija činjenica je da pokazuju prvu obrambenu liniju ljudskog organizma od kancerogenih tvari. Enzimi Faze I povećavaju reaktivnost tvari topljivih u vodi tako da stvaraju toksičnije molekule od polaznih molekula, oni reakcijama oksidacije i redukcije mijenjaju prokancerogene molekule, a rezultat je nastanak vrlo reaktivnih intermedijera koji vrlo lako oštećuju DNK, RNK i proteine. Enzimi Faze II povećavaju topljivost u vodi i stimuliraju izlučivanje štetnih molekula iz tijela. Razgradni produkti glukozinolata povećavaju aktivnost enzima Faze II. Procesi kancerogeneze koji su regulirani enzimima Faze I i Faze II, uglavnom se odvijaju u jetri i mukozi crijeva.¹⁰



Slika 12. Mehanizam metabolizma kancerogenih tvari
 (preuzeto i prilagođeno iz Das i sur., 2000.)¹⁰

- Antioksidacijsko djelovanje

S obzirom da ne blokiraju slobodne radikale direktno, već se njihova antioksidacijska aktivnost temelji na modificiranju aktivnosti enzima metabolizma (enzimi Faze I i Faze II), razgradni produkti glukozinolata se smatraju indirektnim

antioksidansima. Naime, razgradni produkti glukozinolata povećavaju aktivnost enzima Faze II tako što povećavaju transkripciju gena koji sadrže elemente antioksidacijskog odgovora.⁶

Zbog reaktivnosti centralnog ugljikovog atoma $N=C=S$ skupine, koji može brzo reagirati sa sumporovim, dušikovim i kisikovim nukleofilima, izotiocijanati predstavljaju snažne elektrofile. Unatoč tome, vrlo je malo radova koji pokazuju da ovi spojevi djeluju kao direktni antioksidansi.⁶

- Antimikrobno i antifugalno djelovanje

U velikom broju radova ispitivan je učinak intaktnih glukozinolata i produkata njihove razgradnje na različite mikroorganizme: bakterije, kvasce i gljivice. U svim je radovima potvrđena fiziološka neaktivnost glukozinolata, ali štetna pa i čak toksična aktivnost produkata njihove razgradnje.⁶

Uočeno je da su hlapljivi izotiocijanati učinkovitiji prema kvascima nego prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama i gljivicama te da produkti razgradnje glukozinolata sa sumporom u bočnom lancu pokazuju izraženije fungitoksične učinke nego alkenilni, hidroksialkenilni i aromatski spojevi.⁶

- Toksičnost i antinutritivan učinak glukozinolata

U početku su glukozinolati istraživani zbog svojih potencijalno štetnih učinaka. Mnogo je pozornosti posvećeno uklanjanju glukozinolata iz ljudske hrane i hrane za životinje kontroliranim uzgojem i preradom biljnog materijala. Kada se govori o hrani za životinje poznato je da hrana koja sadrži velike količine uljane repice također i sadrži visoku razinu glukozinolata što u konačnici može rezultirati toksičnim učinkom na štitnjaču i jetru kao i na usporen rast životinja.¹⁰

Sami glukozinolati nisu odgovorni za štetni učinak na zdravlje ljudi, no njihovi razgradni produkti jesu. Toksični utjecaj se može pripisati izotiocijanatima koji mogu ometati dostupnost joda, zatim nitrilima koji imaju utjecaj na funkciju jetra i bubrega i 5-vinil-oksazoldin-2-tionu koji su odgovorni za morfološke i fiziološke promjene štitnjače. U načelu može se zaključiti da glukozinolati imaju i potencijalno toksičan i antinutritivan utjecaj na zdravlje.¹⁰

1.3. Metode izolacije razgradnih produkata glukozinolata

Za razliku od glukozinolata koji su nehlapljivi, njihovi razgradni produkti su hlapljivi spojevi te se za njihovu izolaciju koriste uobičajene metode za izolaciju hlapljivih spojeva. Metode za izolaciju hlapljivih spojeva općenito se dijele na:

- destilacijske metode,
- ekstrakcijske metode,
- sorpcijske tehnike i
- tehnike vršnih para.

Klasične metode koje se inače primjenjuju za izolaciju hlapljivih spojeva su destilacije (produkt je smjesa hlapljivih spojeva koja se naziva eterično ulje) i ekstrakcije (produkti su druge smjese aromatičnih spojeva, npr. konkreći, apsoluti...), a u novije vrijeme razvijene su tehnike uzorkovanja tzv. vršnih para (engl. *headspace techniques*) i sorpcijske tehnike (engl. *sorptive techniques*).¹²

1.3.1. Destilacija

Za izolaciju hlapljivih spojeva najčešće se koriste tri vrste destilacije:

- vodena destilacija (hidrodestilacija)
- vodeno-parna destilacija,
- destilacija vodenom parom.

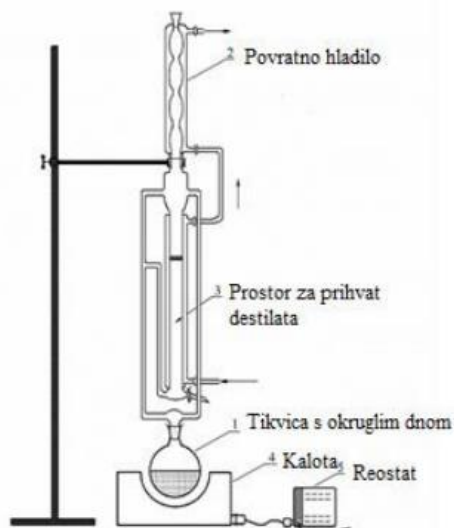
Sve tri metode zasnivaju se na istim teorijskim principima, a razlika je u međusobnom kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.¹²

Vodena destilacija je najjednostavnija i u laboratoriju najčešće korištena metoda za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala. Za izolaciju hlapljivih spojeva vodenom destilacijom u laboratoriju se koriste različite aparature, a neke od uobičajenih su:

- modificirana aparatura po Clevengeru (slika 13),
- aparatura po Ungeru,
- aparatura po Europskoj farmakopeji, itd.³

U aparaturi po Clevengeru usitnjeni biljni materijal je u direktnom kontaktu s vrijućom vodom. Hlapljivi spojevi isparavaju zajedno s vodenom parom. Pare se kondenziraju u hladilu, hlapljivi spojevi (eterično ulje) se sakupljaju u središnjoj cijevi

aparature, a destilacijska voda se vraća u tikvicu za destilaciju.³ Smjesa hlapljivih spojeva (često otopljena u organskom otapalu) odvaja se od vodenog sloja nakon hlađenja kondenzata. Dodatkom sredstva za sušenje (npr. bezvodni Na₂SO₄ ili MgSO₄) iz smjese hlapljivih spojeva uklanja se zaostala (otopljena ili emulgirana) voda.



Slika 13. Modificirana aparatura po Clevengeru⁶

Metoda istovremene destilacije-ekstrakcije (tj. destilacija s vodenom parom uz istovremenu ekstrakciju organskim otapalom) se koristi za onaj biljni materijal koji sadrži manju količinu glukozinolata odnosno njihovih razgradnih produkata.¹²

1.3.2. Ekstrakcija

Destilacija je neprikladna metoda za izolaciju hlapljivih spojeva iz biljnog materijala kojisadrži male količine hlapljivih sastojaka ili sastojke dobro topljive u vodi, za takve biljne materijale najčešće se primjenjuju tehnike ekstrakcije. Ekstrakcija je metoda za izolaciju neke tvari ili smjese tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Čimbenici koji utječu na proces ekstrakcije su temperatura, veličina čestica, gibanje otapala i pH-vrijednost. Ekstrakcija se može olakšati usitnjavanjem (tada ekstrakcijski proces ovisi isključivo otopljivosti), a povećanje temperature pogoduje topljivosti. Najčešće korištene ekstrakcije su:

1. Ekstrakcija hlapljivim nevodenim otapalima:

- ekstrakcija etanolom,
 - ekstrakcija organskim otapalima izuzev etanola,
2. ekstrakcija mastima-anfleriranje,
3. ekstrakcija superkritičnim fluidima.¹²

1.3.3. Headspace tehnike

Uzorkovanje (prikupljanje) vršnih para (engl. *headspace collection*) je najjednostavniji način za uzorkovanje i detekciju aromatičnih spojeva jer se oni nalaze u prostoru iznad uzorka. Headspace tehnike ili tehnike uzorkovanja vršnih para (engl. *headspace techniques*) su jednostavne i pogodne metode za izolaciju aromatičnih spojeva iz različitih materijala. Posebno su korisne za materijale koji intenzivno mirišu, kao što su cvijeće i voće. Uzorkovanje vršnih para provodi se pri sobnoj temperaturi, ali može se primijeniti i blago zagrijavanje uzorka radi otpuštanja hlapljivih spojeva u prostor iznad uzorka. Headspace tehnike mogu biti statičke ili dinamičke.¹³

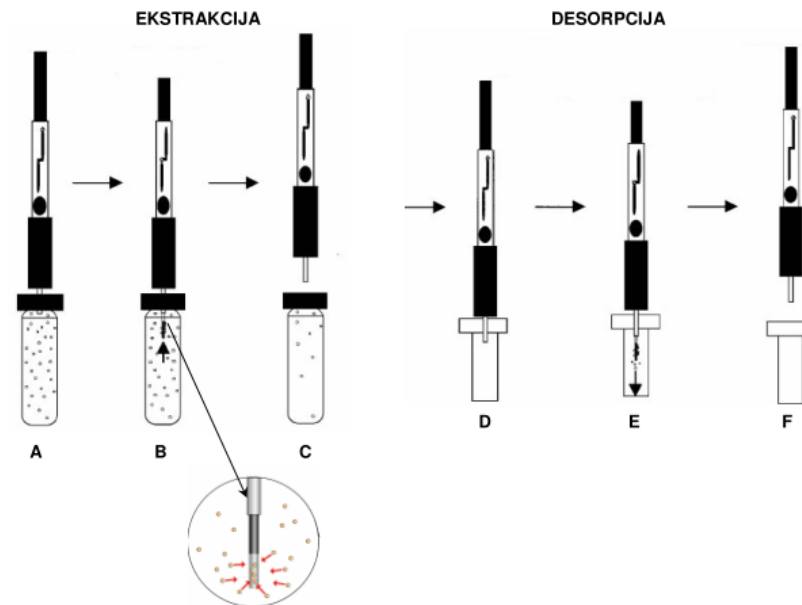
1.3.4. Sorpcijske tehnike

Sorpcijske tehnike su tehnike koje omogućuju brzu ekstrakciju aromatičnih spojeva bez korištenja otapala. Temelje se na raspodjeli organskih spojeva između vodene ili parne faze i tankog polimernog filma. U ove tehnike ubrajaju se mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME), headspace sorpcijska ekstrakcija (engl. *headspace sorptive extraction*, HSSE) i sorpcijska ekstrakcija na miješajućem štapiću (engl. *stirbar sorptive extraction*, SBSE).¹³

- Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (engl. *headspace solid-phase microextraction*, HS-SPME) je tehnika koja se često upotrebljava za izolaciju i analizu aromatičnih spojeva. Ova tehnika koristi silikonsko vlakno (1 ili 2 cm dugo) presvučeno polimernim filmom za sakupljanje (adsorpciju) hlapljivih spojeva iz uzorka. Vlakno se nalazi unutar igle koja je postavljena na SPME držač koji služi za uzorkovanje i desorpciju. Ekstrakcija aromatičnih spojeva iz uzorka se provodi tako da se uzorak stavi

u posudu koja se hermetički zatvori sa tzv. septom i zagrijava pri čemu dolazi do otpuštanja hlapljivih spojeva u prazni prostor (tzv. *headspace*) iznad uzorka. Nakon zagrijavanja u *headspace* se uvodi vlakno na koje se adsorbiraju hlapljivi spojevi tzv. vršne pare. Potom se vlakno uvlači, a vršne pare se odmah desorbiraju direktnim umetanjem vlakna u injektor plinskog kromatografa. SPME vlakno se rekondicionira zagrijavanjem u injektoru plinskog kromatografa (slika14).^{12,13}



Slika 14. Koraci ekstrakcije i desorpcije kod mikroekstrakcije na krutoj fazi: A - bušenje septe, B - ekstrakcija hlapljivih spojeva adsorpcijom na SPME vlaknu, C - povlačenje vlakna u iglu, D - umetanje vlakna u GC injektor, E - desorpcija vršnih para, F - uvlačenje vlakna u iglu¹²

Prednosti ove tehnike su:

- brza i laka uporaba,
- ne koristi se otapalo i
- dobra tehnika za brzu usporedbu uzoraka ili identifikaciju nepoželjnih spojeva.

Mane ove tehnike su:

- profil hlapljivih spojeva ovisan je o vrsti, debljini i dužini korištenog vlakna kao i temperaturi i vremenu uzorkovanja.

Ako se HS-SPME koristi za usporedbu uzoraka najbolji rezultati se dobivaju upotrebom istog vlakna na svim uzorcima.^{12,13}

1.4. Metode analize razgradnih produkata glukozinolata

Kao što je prethodno navedeno, razgradni produkti glukozinolata su hlapljivi spojevi pa se za njihovu analizu koriste uobičajene metode analize hlapljivih spojeva. Najpogodnija i najčešća instrumentna metoda analize hlapljivih spojeva je plinska kromatografija s masenim spektrometrom kao detektorom.

Analiza izotiocijanata i nitrila, glavnih produkata razgradnje glukozinolata, provodi se plinskom kromatografijom (GC) najčešće u kombinaciji s spektrometrijom masa kao metodom detekcije (vezani sustav GC-MS). Iako je GC-MS metoda vrlo osjetljiva, poteškoće u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi može uzrokovati slaba hlapljivost nekih spojeva ili njihova nestabilnost pri povišenim temperaturama. Primjerice, 4-(metilsulfinil)butil-izotiocijanat (sulforafan) je podložan toplinskoj razgradnji u but-3-enil-izotiocijanat.⁶

1.4.1. Kromatografske metode

Razne kromatografske metode koriste se za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje sastojaka složenih smjesa spojeva. Kromatografija je fizikalna metoda razdvajanja homogenih smjesa u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza: nepokretne ili stacionarne i pokretne ili mobilne faze. Kromatografski proces rezultat je ponavljane sorpcije i desorpcije tijekom kretanja sastojaka uzorka po stacionarnoj fazi. Najčešće korištene kromatografske metode su:

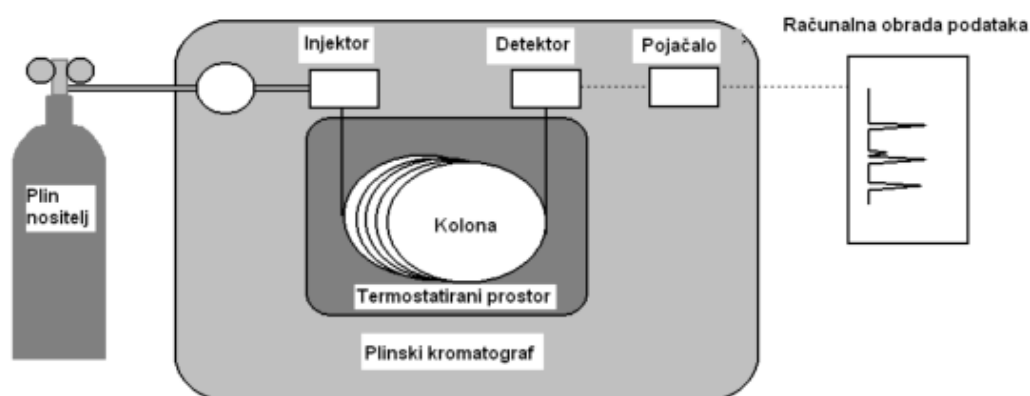
- kromatografija na tankom sloju (tankoslojna kromatografija; TLC),
- kromatografija na stupcu (kromatografija u koloni; CC)
- plinska kromatografija (GC) i
- visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC).

Kromatografske metode dijele se prema fizikalno-kemijskim procesima koji se događaju prilikom razdvajanja na:

- adsorpcijsku kromatografiju (AC),
- razdjelnu kromatografiju (PC) i
- kromatografiju na ionskim izmjenjivačima (ionska kromatografija; IC).^{14,15}

- Plinska kromatografija

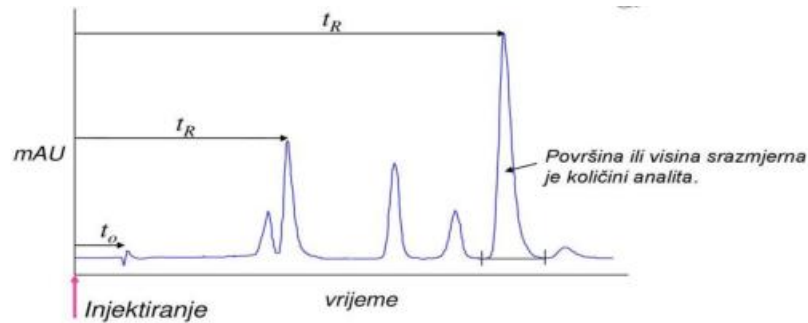
Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) spada u najčešće korištene kromatografske metode, a koristi se za odjeljivanje hlapljivih komponenata u smjesama. Služi za kvantitativno i kvalitativno analiziranje većine sastojaka u složenim smjesama, a znatno je brža nego li ostale analitičke tehnike. Uređaj za plinsku kromatografiju, plinski kromatograf, sastoji se od injekcijskog bloka, kromatografske kolone koja je smještena u termostatiranom prostoru, tzv. peći, detektora i računala (slika 15).¹⁶



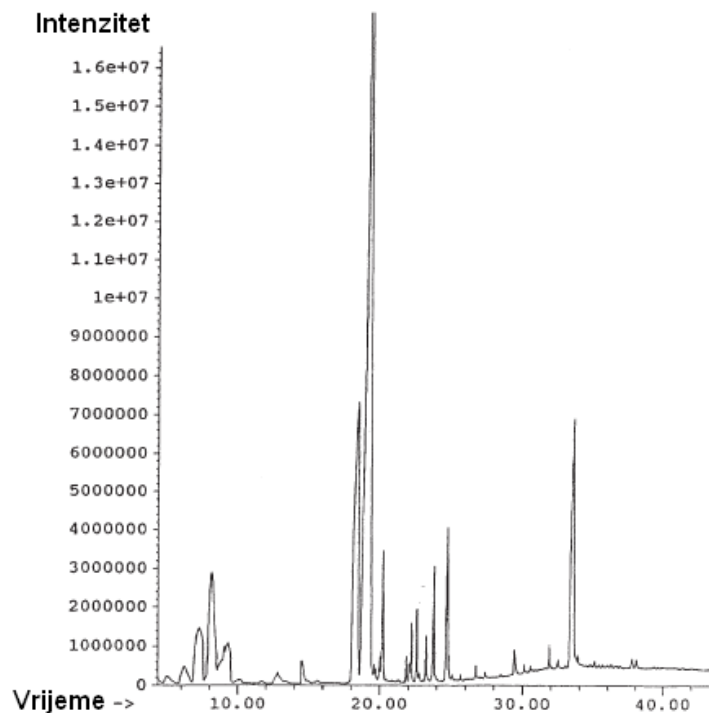
Slika 15. Shematski prikaz plinskog kromatografa⁸

Uzorci za plinsku kromatografiju moraju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi grijanja kromatografske kolone. Mobilna faza je inertni plin (helij, argon, dušik) koji ne reagira sa spojevima uzorka. Stacionarna faza je tekućina nanosena na kruti nosač (punjene kolone) ili unutrašnju stijenku kapilarne kolone (kapilarne kolone). Danas se koriste isključivo kapilarne kolone od izvučenog kvarca duljine 10-100 m i unutrašnjeg promjera od 0,15-4 mm. U injektor se unosi uzorak koji tu trenutno ispari. Inertni plin, plin nositelj, prenosi pare uzorka od injekcijskog bloka preko kolone, gdje se odijele sastojci smjese, do detektora. Budući da se u koloni nalaze sastojci različitih temperatura vrenja, proces se programira tako da temperatura linearno raste. Za odjeljivanje sastojaka primjenjuje se postupak eluiranja ili ispiranja. Na taj način se sastojci smjese mogu potpuno odvojiti, a po izlasku iz kolone pomiješani su samo s plinom nositeljem.¹⁶

Karakterističan podatak za svaki eluirani sastojak je njegovo vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme, t_R (slika 16). Retencijsko vrijeme je vrijeme između pobude (injektiranja uzorka) i odziva (pojave signala na detektoru). Ono se mjeri od trenutka injektiranja uzorka do pojave maksimuma pika dotičnog sastojka. Taj podatak ne ovisi samo o prirodi eluiranog sastojka i stacionarne faze, već i o protoku i vrsti plina nositelja, temperaturi i dr. (slika 17).¹⁶



Slika 16. Kromatogram sa prikazom mrtvog vremena t_0 i retencijskog vremena t_R ¹⁶



Slika 17. Primjer kromatograma eteričnog ulja biljke *Salvia sclarea*⁴

Kao detektor u plinskoj kromatografiji služi svaki uređaj koji može na osnovu neke fizikalne ili kemijske promjene registrirati prisutnost odijeljene komponente. U plinskoj kromatografiji najčešće se upotrebljavaju detektori:

- detektor toplinske vodljivosti,
- plameno ionizacijski detektor i
- detektor apsorpcije elektrona.

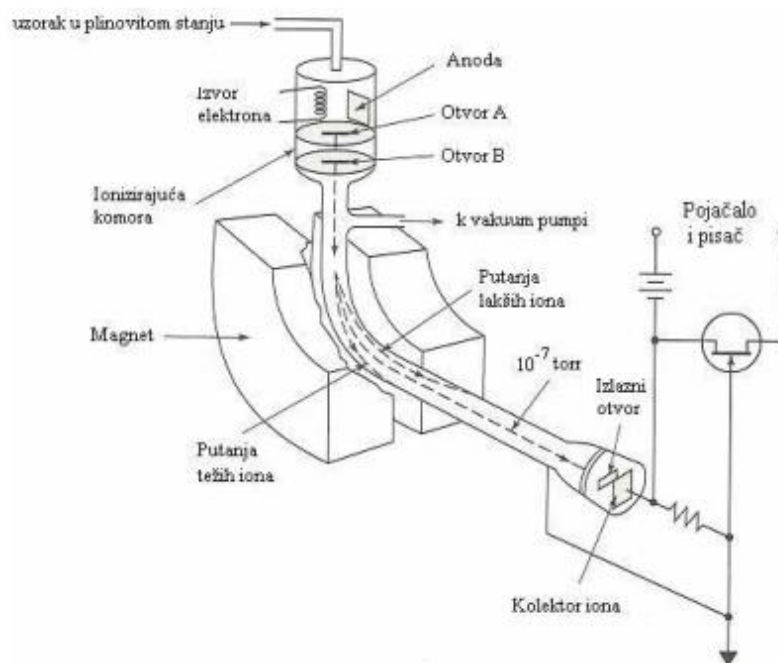
Plinska kromatografija često se vezuje sa spektroskopskim metodama kao što su:

- nuklearna magnetska rezonancija (NMR),
- infracrvena spektroskopija (IR) i
- masenaspektroskopija (MS).

Tako nastaju kombinirane (vezane, spregnute) tehnike koje spajaju sposobnost odjeljivanja kromatografije s mogućnošću kvalitativne i kvantitativne analize koje imaju spektroskopske metode.¹⁶

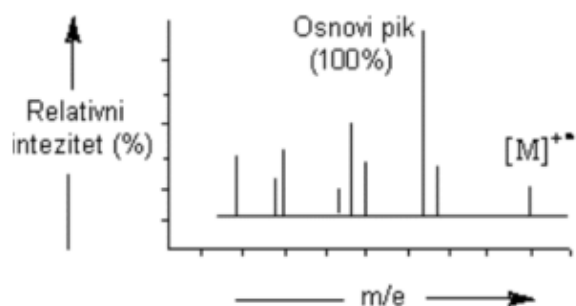
1.4.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika koja omogućuje identifikaciju kemijskih spojeva određivanjem njihovih molekulskih masa, a potom i molekulskih formula. Ova se metoda zasniva na ionizaciji plinovitog uzorka, njegovoj fragmentaciji, razdvajanju fragmenata s obzirom na omjer njihove mase i naboja (m/z odnosu) te obradi pojedinih podataka dobivenih u obliku masenih spektara. Glavni dijelovi svakog masenog spektrometra su ionizator, analizator i detektor (slika 18).¹⁷



Slika 18. Shema spektrometra masa¹⁷

U ionizator se unosi mala količina uzorka u plinovitom stanju te se uzorak bombardira elektronima energije (50-70 eV) pri čemu se molekule ioniziraju i nastaje pozitivan ion M^+ (molekulski ion) koji se fragmentira. Način fragmentiranja u spektrima masa organskih spojeva u bliskoj je vezi s kidanjem veza u kemijskim reakcijama. Tumačenje načina fragmentiranja važno je za dokazivanje strukture spoja. Molekulski ion teži fragmentiranju, a način fragmentiranja često ovisi o stabilnosti nastalih karbokationa. U analizatoru se dobiveni ioni razvrstavaju prema intenzitetu i veličini m/z . Razvrstavanje se vrši propuštanjem kroz promjenjivo magnetsko ili električno polje. Ionski snop se fokusira kroz leće i dolazi do četveropolnog filtra masa koji se sastoji od četiri elektrode koje su paralelne s ionskim snopom. Elektrode čas privlače, čas odvlače ione i na taj način oblikuju njihovu putanju. Ioni koji imaju stabilnu putanju mogu proći kroz filter masa, dok se ostali uklanjaju (filtriraju). Osciliranjem iona, većina ih se izgubi udaranjem u jednu od elektroda gdje se izbijaju. Preostali ioni određenog omjera m/z usmjeravaju se do detektora spektrometra masa. Kao rezultat analize u spektrometru masa dobije se spektar masa koji prikazuje odnos intenziteta i omjera mase i naboja (m/z) nastalih fragmenata (slika 19). Dogovorno, najviši signal (osnovni signal), predstavlja standard prema kojem se određuje udio fragmenata koji su formirali ostale signale.¹⁷

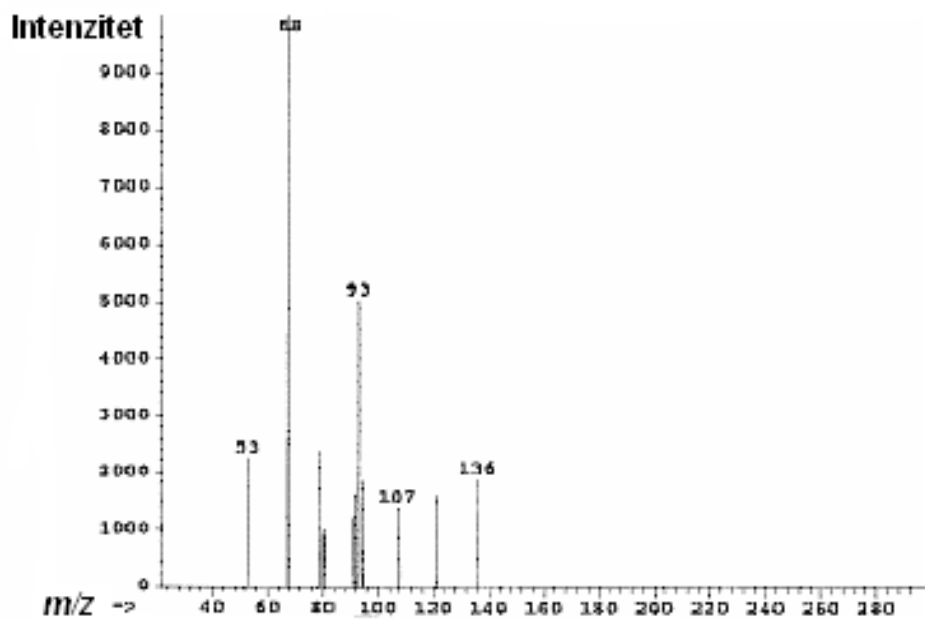
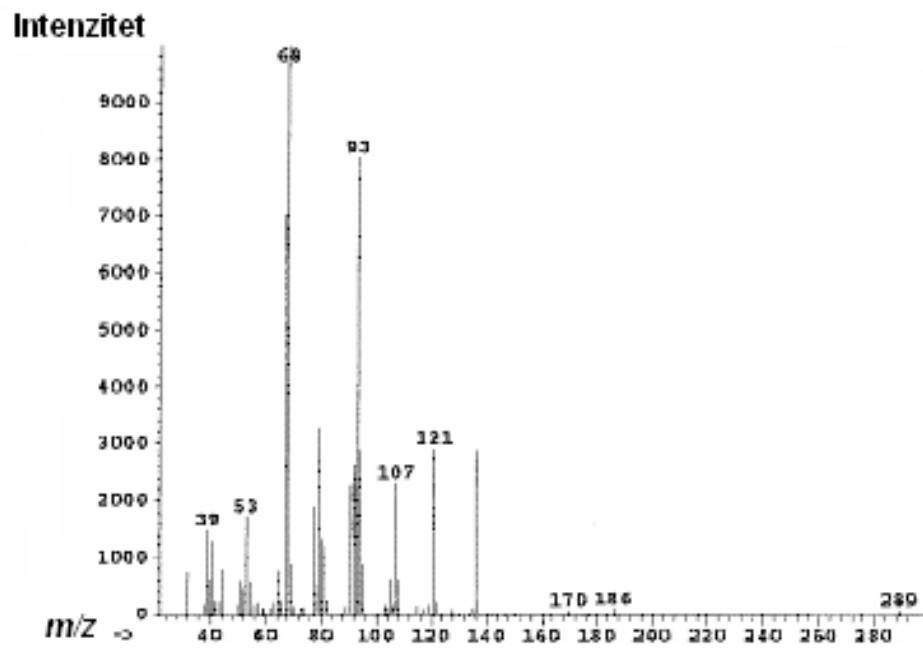


Slika 19. Spektar masa¹⁷

1.4.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Plinska kromatografija i spektrometrija masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) su dvije metode idealne za povezivanje jer se vrlo dobro nadopunjuju. Plinska kromatografija vrlo je uspješna metoda za odjeljivanje i kvantizaciju smjesa, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje, dok je spektrometrija masa vrlo pogodna za kvalitativnu analizu pa spektrometar masa služi kao vrlo osjetljiv detektor za plinski kromatograf. Obje metode su vrlo osjetljive te se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost instrumenata u redu pikogramskih, pa čak i femtogramskih količina uzoraka (10^{-12} - 10^{-15} g). Ova kombinacija tehnika zauzima posebno mjesto među analitičkim tehnikama koje se koriste za istraživanje hlapljivih spojeva.²

Obje metode rade s uzorkom u plinskoj fazi tako da ono što je odvojeno u plinskom kromatografu može biti lako analizirano u spektrometru masa. Spektrometar masa je vrlo osjetljiv detektor za plinski kromatograf. Kao rezultat analize u spektrometru masa dobije se spektar masa s odnosom intenziteta i omjera mase i naboja (m/z) nastalih fragmenata. Za poznate spojeve, čiji su spektri masa pohranjeni u računalnim bankama podataka (npr. *Willey library*), snimljeni spektri se uspoređuju sa spektrima u banci podataka, računalo određuje postotak slaganja spektara, a time i pouzdanost identifikacije. Na slici 20 gornji spektar predstavlja spektar uzorka, donji spektar je iz *Willey* datoteke, a postotak slaganja ovih spektara je 98% .⁴



Slika 20. Identifikacija limonena usporedbom snimljenog spektra sa spektrom u *Willey* bazi masenih spektara; vjerojatnost slaganja je 98% ⁴

1.5. Porodica Brassicaceae

Porodica Brassicaceae broji oko 3500 biljnih vrsta prirodno rasprostranjenih u umjerenim klimatskim područjima sjeverne polutke i to pretežno na Sredozemlju. Unutar porodice postoji velik broj endemičnih rodova i biljnih vrsta. Biljke porodice Brassicaceae su jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, a rjeđe polugrmovi i grmovi. Imaju pravilne dvospolne cvjetove građene na osnovi broja 4: 4 lapa, 4 latice, 4 duža (unutrašnja) te 2 kraća (vanjska) prašnika (slika 21). Plod se naziva komuščica ili komuška. Biljke iz ove porodice bogate su spojevima koji sadrže sumpor, posebno stanice korijena i sjemenki, što im je važna kemijska značajka. Također predstavljaju vrijedan izvor vitamina C, sadrže i eterična ulja, aromatske spojeve te glikozide. U prirodi ih nalazimo samonikle na pašnjacima i livadama, kao korovne, ljekovite i začinske vrste. Također se uzgajaju jer su vrijedne povrtne, ratarske i ukrasne kulture.³



Slika 21. Analiza dijelova cvijeta biljke koja pripada porodici Brassicaceae¹⁸

1.5.1. Opće karakteristike biljaka roda *Aurinia*

Biljke roda *Aurinia* su busenaste, sivo do bijelo pustenaste zeljaste trajnice ili polugrmovi. Cvjetovi su veliki, žuti do zlatnožuti, na dužim ili kraćim stapkama. Plod je okruglasta, eliptična ili obrnuto jajasta komuščica.¹⁹

Izverugana gromotulja (*Aurinia sinuata* (L.) Griseb.) je busenasti, sivopustenasti polugrm. Jednogodišnje cvjetne stabljike mogu biti do 60 cm visoke. Zlatnožuti cvjetovi su skupljeni u grozdove. Komuščica je kuglastog oblika s po 4-12 sjemenki (slika 22).¹⁹

Jadranska rumenica (*Aurinia leucadea* (Guss.) K. Koch) je polugrmovita biljka, busenasta i bijelo pustenasta, razgranatih i odrvenjelih izdanaka na čijim se vršcima nalaze čuperci listova (slika 23). Stabljike su visoke do 30 cm s više izmjeničnih listova i cvjetova koji čine grozdove. Na kratke stapke nastavljaju se veliki, zlatnožuti cvjetovi. Čaška je otvorena, lapovi su dugi i strše, a latice su klinaste. Sjemenke su okruglaste, spljoštene i crvenosmeđe. Ova endemična biljka raste na obalnom području Apeninskog te Balkanskog poluotoka. U Hrvatskoj je rasprostranjena uz obalu i na većini otoka, a raste uglavnom u pukotinama stijena.¹⁹



Slika 22. *Aurinia sinuata* (L.) Griseb., izverugana gromotulja



Slika 23. *Aurinia leucadea* (Guss.) K. Koch, jadranska rumenica

1.5.2. Opće karakteristike vrste *Bunias erucago* (L.), čunjasti repušac

Čunjasti repušac je do 60 cm visoka dvogodišnja krstašica (slika 24). Stabljika joj je uspravna i razgranjena, u donjem dijelu hrapava i ljubičasto nahukana. Žuti cvjetovi stoje na dugim drščima u dosta rahlim grozdovima na krajevima stabljike i ogranaka. Plodovi su nepravilnog oblika sa 3-4 pretinca te 4 brida na kojima se nalaze zupčasto izrezana krilca.²⁰



Slika 24. *Bunias erucago* (L.), čunjasti repušac

1.5.3. Opće karakteristike vrste *Capsella rubella* Reut., sredozemna rusomača

Sredozemna rusomača je dvogodišnja, rjeđe jednogodišnja krstašica, 20–50 cm visoka (slika 25). Stabljika joj je uspravna, ponekad u gornjem dijelu slabo razgranjena. Na stabljici su listovi malobrojni, naizmjenični, uski i sjedeći; oni pri vrhu su čitavog ruba, a donji većinom nepravilno nazubljeni, te ušastom bazom obuhvaćaju stabljiku. Ova biljna vrsta jedna je od najraširenijih korova, nalazimo je posvuda, osobito na ruderalnom tlu, uz puteve i livade. U sjevernoj Dalmaciji ova se biljka jede. Zovu je „šurlin“, a kuhaju je sa slaninom.²⁰



Slika 25. *Capsella rubella* Reut., sredozemna rusomača

1.5.4. Opće karakteristike vrste *Cardaria draba* (L.) Desv., streličasta grbica

Streličasta grbica je biljna vrsta iz roda *Cardaria*, porodica Brassicaceae (slika 26). To je trajna i snažna zeljasta biljka koja naraste 20–50 cm u visinu. Ima izdužen i pri vrhu jako razgranjeni korjen. Cvjetovi su joj sitni s bijelim laticama, ugodna mirisa, oblikovani u zbijene prividno štitaste cvatove, koji se kasnije izduže. Ova biljna vrsta raste na suhim i toplim neobrađenim mjestima, uz puteve, po korovištima i željezničkim nasipima. U planinama dopire i do 2000 m nadmorske visine. Raširena je u svim krajevima naše zemlje.²⁰



Slika 26. *Cardaria draba* (L.) Desv., streličasta grbica

1.5.5. Opće karakteristike vrste *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., strižuša

Strižuša je jednogodišnja biljka koja dosegne visinu do 70 cm (slika 27). Listovi s peteljkom krpasto su razdjeljeni sa 2-3 para duguljastih nazubljenih postranih dijelova i suličastim nejednakim nazubljenim vršnim dijelom. Cvjetovi su mali i žuti, a smješteni su u grozdasti cvat na krajevima izdanaka. Duge komuške su uspravne, zašiljene i položene prema stabljici. Čitava biljka, kao i cvjetovi, ima veliku sličnost s ostalim krstašicama. Strižuša je bila veoma cijenjena ljekovita biljka koja se koristila za liječenje bolesti grla i prsiju, a u Francuskoj se nazva "biljka za pjevače". Preporuča se kod žutice, katara mjehura, kod bubrežnih kamenaca i skorbuta.³



Slika 27. *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., strižuša

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

U radu su istraživani glukozinolati prisutni u šest samoniklih biljaka porodice Brassicaceae. Biljni materijal je sabran na području park-šume Marjan (Split, Hrvatska) u proljeće 2021. godine. U istraživanju je korišten svježi biljni materijal i to svi nadzemni dijelovi biljke: list, stabljika, cvijeti sjeme.

Korištene su sljedeće biljke:

Redni br.	Latinski naziv	Hrvatski naziv	Slika br.
1.	<i>Aurinia sinuata</i> (L.) Griseb.	izverugana gromotulja	22
2.	<i>Aurinia leucadea</i> (Guss.) K. Koch	jadranska rumenica	23
3.	<i>Bunias erucago</i> (L.)	čunjasti repušac	24
4.	<i>Capsella rubella</i> Reut.	sredozemna rusomača	25
5.	<i>Cardaria draba</i> (L.) Desv.	streličasta grbica	26
6.	<i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop.	strižuša	27

Neposredno prije izolacije hlapljivih spojeva (razgradnih produkata glukozinolata) biljni materijal je isjeckan nožem na sitne komadiće. Tako pripremljen biljni materijal stavljen je u staklene bočice, vijalice, sa destiliranom vodom ili bez destilirane vode i hermetički je zatvoren sa teflonskom septom.

2.2. Aparatura

Pri izradi diplomskog rada korištene su sljedeće aparature:

- aparatura za mikroekstrakciju vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) sa sivim vlaknom (divinilbenzen/carboxen/polidimetilsiloksan, DVB/Carboxen/PDMS), sve Supelco, SAD,
- magnetska miješalica model EKT 3001, s termostatom model MR Hei-Standard, Heidolph, Njemačka,
- vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa, Agilent Technologies, SAD: plinski kromatograf model 8890 i spektrometar masa model 5977E.

2.3. Razgradnja glukozinolata i izolacija hlapljivih spojeva

Kako je cilj ovog rada bio istražiti glukozinolate u odabranim samoniklim biljkama porodice Brassicaceae preko njihovih hlapljivih hidrolitičkih produkata, prije izolacije hlapljivih spojeva provedena je hidroliza eventualno prisutnih glukozinolata endogenim enzimom-mirozinazom. Uobičajeni naziv za hidrolizu endogenim enzimom je autoliza. Nakon autolize oslobođeni hlapljivi hidrolitički produkti glukozinolata zajedno s ostalim hlapljivim spojevima, izolirani su metodom mikroekstrakcije vršnih para na krutoj (čvrstoj) fazi, HS-SPME. Uzorci hlapljivih spojeva dobiveni ovom metodom nazivaju se vršnim parama.

2.3.4. Enzimska hidroliza-autoliza

Biljni materijal pripremljen je za autolizu usitnjavanjem, odnosno isjeckan je nožem. Na taj način stvoren je kontakt glukozinolati-enzim mirozinaza pri čemu dolazi do hidrolize (razgradnje) glukozinolata na razgradne produkte, odnosno hlapljive spojeve odgovorne za karakterističan miris i okus ovih biljaka. Tako isjeckan biljni materijal stavljen je u staklene bočice, vijale, sa ili bez destilirane vode, a bočice su hermetički zatvorene s teflonskom septom. Autoliza je provedena tako da su pripremljeni uzorci biljnog materijala ostavljeni pri sobnoj temperaturi 1, odnosno 24 sata. Po završetku autolize, nakon 1, odnosno 24 sata, oslobođeni hlapljivi hidrolitički produkti glukozinolata, kao i ostali hlapljivi spojevi, izolirani su HS-SPME metodom. Za svaku biljku pripremljena su tri uzorka za autolizu i, potom ekstrakciju vršnih para:

1. biljni materijal bez dodane vode - autoliza u trajanju od 1 sat,
2. biljni materijal bez dodane vode - autoliza u trajanju od 24 sata i
3. biljni materijal uz dodatak vode - autoliza u trajanju od 24 sata.

2.3.5. Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi

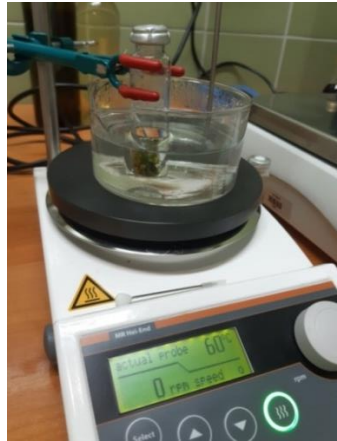
Kao što je prethodno navedeno, po završetku autolize, nakon 1, odnosno 24 sata, oslobođeni hlapljivi hidrolitički produkti glukozinolata, kao i ostali hlapljivi spojevi, izolirani su HS-SPME metodom. Za mikroekstrakciju vršnih para korišteno je sivo vlakno čiji je adsorpcijski sloj polimerni film sastava

divinilbenzen/carboxen/polidimetilsiloksan, debljine 50/30 μm . Prije ekstrakcije vlakno je kondicionirano prema uputama proizvođača, 60 min pri temperaturi od 270 $^{\circ}\text{C}$ postavljanjem SPME igle u injektor plinskog kromatografa (slika 28).

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi provedena je za sve uzorke biljnog materijala na isti način: bočica s uzorkom stavljena je u vodenu kupelj zagrijanu na 60 $^{\circ}\text{C}$; vodena kupelj zagrijavana je preko magnetske miješalice. Tijekom 15 minutnog termostiranja hlapljivi spojevi iz uzorka, tzv. vršne pare, ispare u prazni prostor iznad uzorka, tzv. *headspace* prostor (slika 29). U prazni prostor iznad uzorka potom je uvedena SPME igla s vlaknom radi adsorpcije vršnih para. Adsorpcija vršnih para vršena je 40 minuta (slika 30). Nakon adsorpcije SPME vlakno vraćeno je u iglu, igla je izvučena iz bočice sa uzorkom i odmah umetnuta u GC-MS injektor gdje je provedena toplinska desorpcija (10 minuta) ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu (slika 31).



Slika 28. Kondicioniranje vlakna



Slika 29. 15 minutno termostatiranje



Slika 30. Adsorpcija vršnih para



Slika 31. Desorpcija vršnih para

2.4. GC-MS analiza vršnih para

Analiza dobivenih uzoraka hlapljivih spojeva (vršnih para) provedena je plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa (GC-MS). Korišten je vezani sustav GC-MS proizvođača Agilent Technologies (SAD). Uređaj se sastoji od plinskog kromatografa model 8890 i spektrometra masa model 5977E. Sastavni dio GC-MS aparature je i računalo s odgovarajućim softverskim programom (slika 32).



Slika 32. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) u Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu

Analize vršnih para izvršene su na koloni s nepolarnom stacionarnom fazom (HP-5MS), proizvođača Agilent Technologies čiji je kemijski sastav 5 % difenil i 95 % dimetilpolisiloksan. Dimenzije kolone su 30 m x 0,25 mm, a debljina sloja stacionarne faze je 0,25 μm . Plin nositelj je helij protoka od 1 ml/min. Omjer cijepanja je 1:50, temperatura injektora iznosila je 250 °C, temperatura detektora 280 °C, a energija ionizacije 70 eV. Temperatura peći je programirana kako slijedi: zadržavanje 3,5 min na 70 °C, potom 70 do 200 °C brzinom od 3 °C/min i zadržavanje od 20 min na 200 °C.

Identifikacija pojedinačnih spojeva provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja s vremenima zadržavanja već poznatih spojeva iz eteričnih ulja ili drugih smjesa hlapljivih spojeva prethodno analiziranih GC-MS sustavom u Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu. Osim navedenoga identifikacija je provedena i usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim

spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara Wiley 9 (*Wiley MS library*) i NIST17 (*National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD*) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature. Za svaki analizirani uzorak, kao rezultat GC-MS analize dobiveni su sljedeći podaci:

- kromatogram ukupne ionske struje (TIC),
- naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najbliži spektru nepoznatog spoja koji je predstavljen pikom na kromatogramu,
- vrijeme zadržavanja pojedinog sastojka,
- relativni udio pojedinog sastojka izražen u postocima.

Udio pojedinih sastojaka u smjesi izračunat je iz površine pikova na kromatogramu koristeći metodu normalizacije bez korekcijskih faktora i izražen je u postocima (%).

3. REZULTATI

3.1. GC-MS analiza vršnih para

Izolacija hidrolitičkih produkata glukozinolata i ostalih hlapljivih spojeva prisutnih u odabranim samoniklim biljkama porodice Brassicaceae provedena je mikroekstrakcijom vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME). Za mikroekstrakciju vršnih para korišteno je vlakno presvučeno polimernim slojem divinilbenzen/carboxen/polidimetilsiloksan (DVB/Carboxen/PDMS), tzv. sivo vlakno (poglavlje 2.3.5.). Dobiveno je osamnaest uzoraka vršnih para. Svi uzorci analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa, GC-MS (poglavlje 2.4.). Rezultati analiza prikazani su tablicama 3 - 8, a spojevi identificirani u vršnim parama poredani su po redoslijedu eluiranja, odnosno vremenu zadržavanja, s kolone HP-5MS. Maseni udio pojedinog sastojka vršnih para izražen je u postotcima, %, i predstavlja udio površine pika tog sastojka u ukupnoj površini svih pikova. Značenje simbola u tablicama je:

t_R – vrijeme zadržavanja u minutama

VP1 – vršne pare biljnog materijala bez dodane vode, autoliza u trajanju od 1 sat

VP2 – vršne pare biljnog materijala bez dodane vode, autoliza u trajanju od 24 sata

VP3 – vršne pare biljnog materijala uz dodatak vode, autoliza u trajanju od 24 sata

- – spoj nije identificiran u uzorku

tr. – spoj prisutan u tragovima (< 0,1 %)

* – točan izomer nije određen

^a – identifikacija usporedbom masenog spektra sa spektrima iz Wiley9 i/ili NIST17 biblioteka masenih spektara

Tablica 3. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama biljke
Aurinia leucadea

Redni Broj	Ime spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			VP1	VP2	VP3
1.	ugljikov disulfid	1,572	-	-	1,2
2.	3-metilbut-3-enonitril	2,472	0,3	0,4	0,5
3.	(<i>E</i>)-heks-3-en-1-ol*	3,523	0,2	0,1	0,2
4.	heks-5-enonitril	3,628	0,4	0,5	0,7
5.	<i>sec</i> -butil-izotiocijanat	4,997	4,6	5,5	4,8
6.	but-3-enil-izotiocijanat	6,361	51,2	53,8	56,2
7.	pent-4-enil-izotiocijanat	9,597	40,2	32,3	29,6
8.	4,5-epitiopentanonitril	10,956	-	-	2,4
9.	2-fenilacetonitril	11,574	-	-	0,3
10.	(<i>Z</i>)-heks-3-enil-3-metilbutanoat*. ^a	15,550	1,2	0,6	-
11.	5,6-epitioheksanonitril	15,918	-	-	1,5
12.	6-(metiltio)heksanonitril	18,892	tr.	-	0,3
13.	eugenol	20,600	-	-	0,7
14.	benzil-izotiocijanat	20,877	0,3	0,8	0,3
15.	(<i>Z</i>)-heks-3-enil-(<i>E</i>)-heks-2-enoat*. ^a	21,143	0,3	-	-
16.	5-(metiltio)pentil-izotiocijanat	28,217	0,4	0,7	0,4
Ukupno identificirano (%)			99,1	94,7	99,1

Tablica 4. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama biljke
Aurinia sinuata

Redni Broj	Ime spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			VP1	VP2	VP3
1.	ugljikov disulfid	1,572	-	0,9	3,2
2.	pent-4-enal ^a	1,965	-	0,7	-
3.	(<i>E</i>)-heks-3-en-1-ol*	3,523	2,2	6,3	1,5
4.	heks-5-enonitril	3,628	2,0	10,6	2,1
5.	sec-butil-izotiocijanat	4,997	1,4	0,9	1,2
6.	benzaldehyd	5,696	-	0,6	-
7.	but-3-enil-izotiocijanat	6,361	1,9	0,8	0,9
8.	heks-3-en-1-ol-acetat ^a	6,893	1,5	1,2	-
9.	pent-4-enil-izotiocijanat	9,597	73,6	53,0	45,2
10.	nonanal	10,235	-	0,8	-
11.	butil-metil-sulfid ^a	10,982	-	0,9	-
12.	(<i>Z</i>)-heks-3-enil-2-metilbutanoat ^a	15,369	0,6	1,5	-
13.	(<i>Z</i>)-heks-3-enil-3-metilbutanoat ^a	15,550	3,6	10,2	2,2
14.	5,6-epitioheksanonitril	15,918	-	-	2,6
15.	6-(metiltio)heksanonitril	18,892	1,9	2,6	24,5
16.	(<i>Z</i>)-heks-3-enil-(<i>E</i>)-heks-2-enoat* ^a	21,143	0,9	0,7	-
17.	5-(metiltio)pentil-izotiocijanat	28,217	9,3	3,1	13,8
Ukupno identificirano (%)			98,9	94,8	97,2

Tablica 5. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama biljke
Bunias erucago

Redni Broj	Ime spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			VP1	VP2	VP3
1.	ugljikov disulfid	1,572	-	-	1,7
2.	metil-tiocijanat ^a	2,145	1,3	-	1,8
3.	dimetil-disulfid	2,357	-	-	2,2
4.	pent-2-en-1-ol ^{*,a}	2,483	-	-	1,1
5.	heksanal	2,609	0,2	-	1,5
6.	(<i>Z</i>)-heks-3-en-1-ol*	3,465	20,0	23,9	-
7.	(<i>E</i>)-heks-3-en-1-ol*	3,523	10,8	16,2	29,7
8.	(<i>Z</i>)-heks-2-en-1-ol*	3,610	6,9	8,9	-
9.	(<i>E</i>)-heks-2-en-1-ol*	3,642	19,5	24,8	40,5
10.	benzaldehyd	5,696	tr.	1,9	-
11.	dimetil-trisulfid	5,978	-	-	1,2
12.	but-3-enil-izotiocijanat	6,361	2,7	1,3	2,7
13.	heks-3-en-1-ol-acetat*	6,893	2,3	1,5	-
14.	(<i>E,E</i>)-hepta-2,4-dienal ^{*,a}	7,043	-	0,6	-
15.	2-fenilacetaldehyd	8,119	-	1,3	-
16.	nonanal	10,235	tr.	1,2	-
17.	dekanal	14,228	1,0	1,4	-
18.	β -ciklocitral	14,901	-	1,2	-
19.	dekan-1-ol	17,012	1,2	0,8	-
20.	undekanal	18,483	9,5	7,0	-
21.	4-(metiltio)butil-izotiocijanat	23,662	1,7	-	-
22.	4-(metiltio)but-3-enil-izotiocijanat ^{*,a}	23,842	10,2	0,6	-
23.	(<i>E</i>)- β -jonon*	25,831	tr.	1,0	-
24.	dioktil-eter ^a	31,682	5,1	-	-
Ukupno identificirano (%)			92,4	93,6	82,4

Tablica 6. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama biljke
Capsella rubella

Redni Broj	Ime spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			VP1	VP2	VP3
1.	alil-izocijanat ^a	1,789	0,3	0,2	-
2.	dimetil-disulfid	2,357	0,2	4,4	1,6
3.	(Z)-heks-3-en-1-ol*	3,465	0,6	0,6	0,6
4.	(E)-heks-3-en-1-ol*	3,523	0,8	0,6	-
5.	alil-tiocijanat	3,680	11,0	8,8	9,0
6.	alil-izotiocijanat	3,940	79,3	67,2	70,9
7.	dimetil-trisulfid	5,978	3,0	10,3	13,5
8.	but-3-enil-izotiocijanat	6,361	0,5	0,5	-
9.	3-metilbutil-izotiocijanat	8,616	1,4	1,7	1,1
10.	4-metilpentil-izotiocijanat	12,514	1,0	1,1	0,5
11.	dimetil-tetrasulfid ^a	14,658	-	0,4	0,9
Ukupno identificirano (%)			98,1	95,8	98,1

Tablica 7. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama biljke
Cardaria draba

Redni Broj	Ime spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			VP1	VP2	VP3
1.	(Z)-heks-3-en-1-ol*	3,465	1,0	0,6	1,3
2.	heksanal	3,616	0,3	-	-
3.	sec-butyl-izotiocijanat	4,997	0,2	0,2	-
4.	izobutil-izotiocijanat	5,452	0,4	0,4	0,3
5.	benzaldehyd	5,696	-	0,2	-
6.	heks-3-en-1-ol-acetat*	6,893	2,6	0,5	-
7.	heksil-acetat ^a	7,045	0,6	0,4	-
8.	izobutil-metil-sulfid ^a	13,716	0,4	0,4	-
9.	metil-salicilat	13,816	0,3	-	0,4
10.	5-(metil)pentanonitril	14,098	1,0	-	0,5
11.	(Z)-heks-3-enil-2-metilbutanoat ^a	15,369	0,4	-	-
12.	3-(metil)propil-izotiocijanat	18,683	0,2	0,2	0,2
13.	(Z)-heks-3-enil-(E)-2-metilbut-2-enoat ^{*,a}	19,244	0,2	2,6	-
14.	benzil-izotiocijanat	20,877	-	0,3	-
15.	4-(metil)butil-izotiocijanat	23,847	91,4	94,2	86,7
16.	(E)- β -jonon*	25,831	-	0,2	-
Ukupno identificirano (%)			99,0	100	89,4

Tablica 8. Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama biljke
Sisymbrium officinale

Redni Broj	Ime spoja	t_R (min)	Udio (%)		
			VP1	VP2	VP3
1.	ugljikov disulfid	1,572	-	1,0	5,5
2.	2-metilpropanonitril	1,726	0,2	0,4	3,4
3.	metil-tiocijanat^a	2,145	-	-	2,3
4.	izopropil-izotiocijanat	3,256	80,7	81,4	72,4
5.	(<i>E</i>)-heks-3-en-1-ol*	3,523	1,5	-	1,0
6.	sec-butil-izotiocijanat	4,997	10,8	11,0	10,2
7.	izobutil-izotiocijanat	5,452	0,3	0,6	-
8.	heks-3-en-1-ol-acetat*	6,893	0,7	-	-
9.	α -farnezen	26,734	0,3	-	-
Ukupno identificirano (%)			94,5	94,4	94,8

4. RASPRAVA

U ovom radu brza i jednostavna metoda izolacije hlapljivih spojeva - mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi, HS-SPME, upotrijebljena je za utvrđivanje prisustva glukozinolata u samoniklim biljkama iz porodice Brassicaceae. Poznato je da su karakteristični sastojci kultiviranih ali i samoniklih biljaka iz ove porodice spojevi iz skupine glukozinolata. Glukozinolati spadaju u glikozide, točnije oni su *S*-glukozidi. Glukozinolati su nehlapljivi spojevi koji se, kao i svi glikozidi, razgrađuju na glikon i aglikon enzimatski ili kemijski. Osim toga glukozinolati su i toplinski nestabilni spojevi, odnosno razgrađuju se i pri povišenim temperaturama. Glikon u molekuli glukozinolata je uvijek monosaharid D-glukoza, dok su aglikoni strukturno različiti spojevi. Aglikoni su, za razliku od intaktnih glukozinolata, hlapljivi spojevi i oni su odgovorni za različite biološke aktivnosti glukozinolata.

Mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) je metoda koja se često upotrebljava za izolaciju, a u kombinaciji sa plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS), i analizu raznih klasa hlapljivih spojeva. Uobičajena skraćenica za navedenu kombinaciju izolacije i analize hlapljivih spojeva je HS-SPME/GC-MS. Kombinacija HS-SPME/GC-MS se najčešće koristi za izolaciju i analizu jako aromatičnih spojeva npr. iz cvijeća ili u istraživanju spojeva arome. Sama HS-SPME metoda je brza i jednostavna, a velika prednost je i što se za izolaciju hlapljivih spojeva ne koriste organska otapala.

Kao što je prethodno navedeno, u ovom radu kombinacija HS-SPME/GC-MS je upotrijebljena za istraživanje glukozinolata u samoniklim biljkama porodice Brassicaceae preko izolacije i analize njihovih hlapljivih, hidrolitičkih produkata. Odabrano je šest samoniklih biljaka iz porodice Brassicaceae i to: *Aurinia sinuata* (L.) Griseb. (izverugana gromotulja), *Aurinia leucadea* (Guss.) K. Koch (jadranska rumenica), *Bunias erucago* (L.) (čunjasti repušac), *Capsella rubella* Reut. (sredozemna rusomača), *Cardaria draba* (L.) Desv. (streličasta grbica) i *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. (strižuša). Ove biljke rasprostranjene su u mediteranskom dijelu Hrvatske pa tako i na području park-šume Marjan (Split, Hrvatska) gdje su i ubrane.

Razgradnja glukozinolata provedena je autolizom, što je uobičajeni naziv za hidrolizu endogenim enzimom. Autoliza je provedena pri sobnoj temperaturi u trajanju od jednog (1), odnosno dvadeset četiri (24) sata. Po završetku autolize provedena je

mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi. Vršne pare, koje čine razgradni produkti glukozinolata i ostali hlapljivi spojevi prisutni u biljnom materijalu, analizirane su vezanom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Za svaku biljku dobivena su tri uzorka vršnih para (poglavlje 3.1.).

4.1. Vršne pare jadranske rumenice

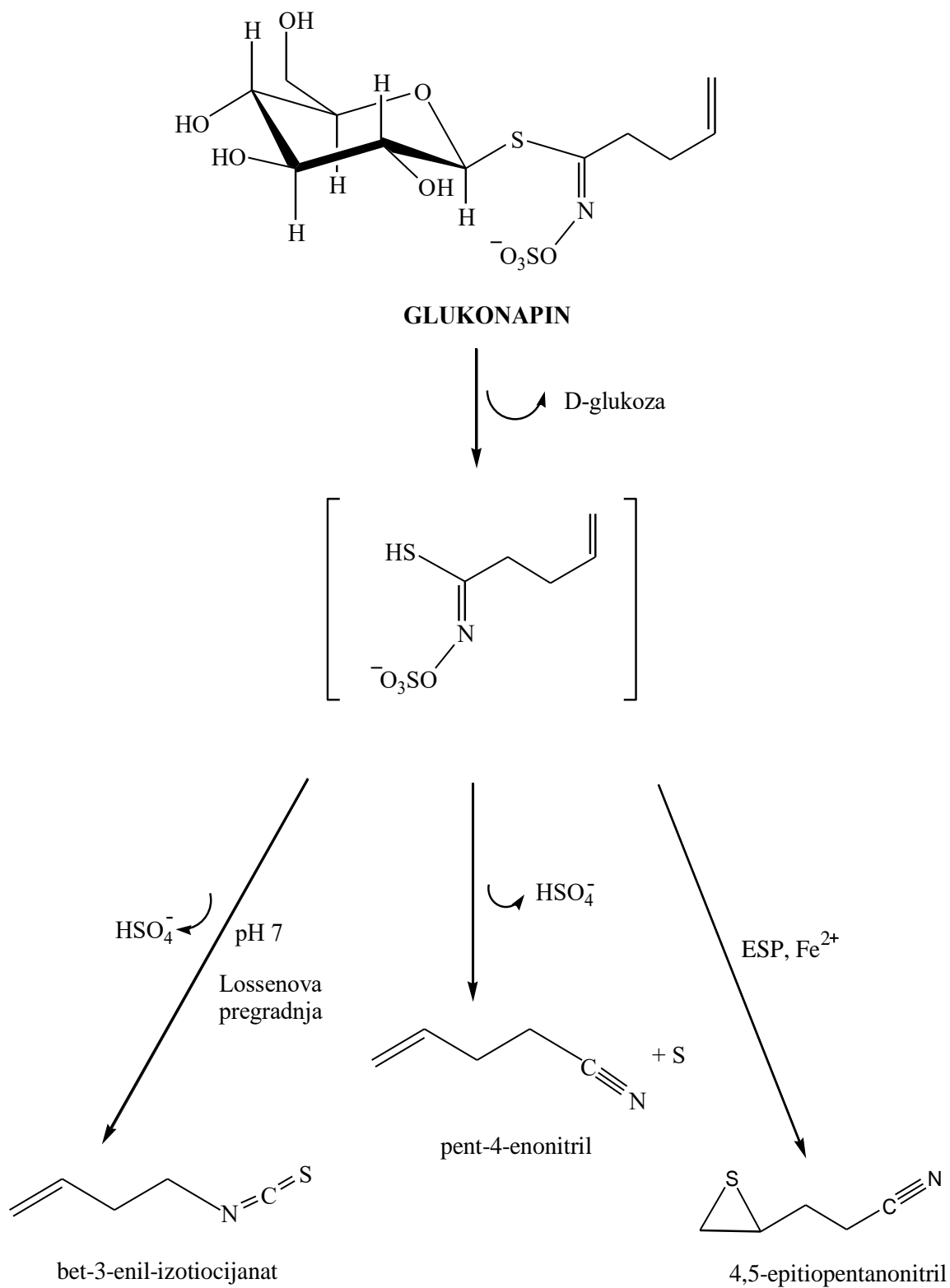
Jadranska rumenica, *Aurinia leucadea*, je endemična biljka koja raste na obalnom području Apeninskog i Balkanskog poluotoka, a u Hrvatskoj je rasprostranjena uz obalu i na otocima.

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama prikazan je u tablici 3. U uzorku VP1, vršne pare biljnog materijala u koji nije dodana voda, a autoliza je trajala 1 sat, identificirano je 11 sastojaka, odnosno 99,1 % od ukupnih hlapljivih spojeva. U vršnim parama prevladavaju razgradni produkti glukozinolata, identificirano ih je osam s ukupnim udjelom od 97,4 %. Glavni sastojci VP1 su but-3-enil-izotiocijanat (51,2 %) i pent-4-enil-izotiocijanat (40,2 %). Ovi spojevi su razgradni produkti dvaju glukozinolata, glukonapina i glukobrasikanapina (slike 33 i 34). *sec*-Butil-izotiocijanat (4,6 %) je razgradni produkt glukokohlearina. Ostali razgradni produkti glukozinolata prisutni su znatno manjim količinama, < 1 %.

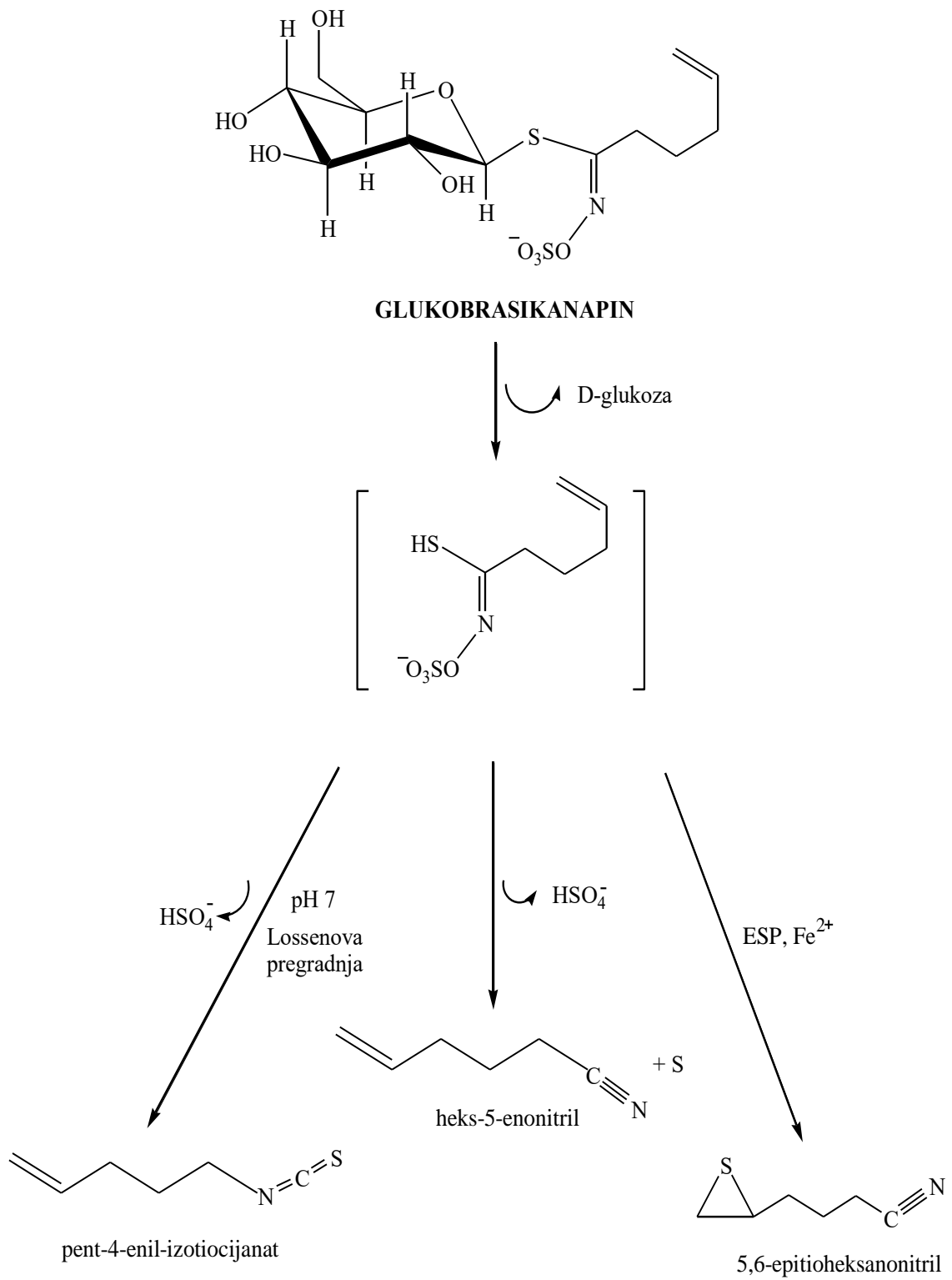
U uzorku vršnih para VP2 (24 sata autolize) identificirano je 9 spojeva, od kojih su 7 razgradni produkti glukozinolata. Od 94,7 % identificiranih hlapljivih spojeva 94,0 % su razgradni produkti glukozinolata. I u ovom uzorku glavni sastojci su razgradni produkti glukonapina i glukobrasikanapina, but-3-enil-izotiocijanat (53,8 %) i pent-4-enil-izotiocijanat (32,3 %), a slijedi razgradni produkt glukodiabutina, *sec*-butil-izotiocijanat (5,5 %).

U vršnim parama biljnog materijala u koji je na početku autolize dodana voda, a autoliza je trajala 24 sata, identificirano je četrnaest spojeva koji čine 99,1 % od ukupnih hlapljivih spojeva. Među njima je 11 razgradnih produkata glukozinolata s ukupnim udjelom od 97,0 %. Isto kao i u VP1 i VP2, glavni sastojci su razgradni produkti glukonapina i glukobrasikanapina, but-3-enil-izotiocijanat (56,2 %) i pent-4-enil-izotiocijanat (29,6 %), a slijedi *sec*-butil-izotiocijanat (4,8 %), razgradni produkt glukodiabutina. Jedino u ovom uzorku vršnih para su identificirani epitionitrili, 4,5-

epitiopentanonitril (2,4 %) koji je razgradni produkt glukonapina i 5,6-epitioheksanonitril (1,5 %) koji je razgradni produkt glukobrasikanapina.



Slika 33. Shematski prikaz razgradnje glukonapina



Slika 34. Shematski prikaz razgradnje glukobrasikanapina

Dakle, u svim uzorcima vršnih para jadranske rumenice, bez obzira na uvjete autolize (bez dodane vode ili uz dodatak vode, 1 sat ili 24 sata trajanja autolize) prevladavaju razgradni produkti glukozinolata. Na temelju analize razgradnih produkata glukozinolata, glavni glukozinolati jadranske rumenice su glukonapin i glukobrasikanapin. Glukozinolati identificirani ovom brzom indirektnom metodom, preko svojih hlapljivih hidrolitičkih produkata, prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Glukozinolati jadranske rumenice

Glukozinolat	Identificirani razgradni produkti glukozinolata (%)
glukonapin	but-3-enil-izotiocijanat 4,5-epitiopentanonitril
glukobrasikanapin	pent-4-enil-izotiocijanat heks-5-enonitril 5,6-epitioheksanonitril
glukokohlearin	<i>sec</i> -butil-izotiocijanat
glukotropeolin	benzil-izotiocijanat 2-fenilacetonitril
glukoberteroin	5-(metiltio)pentil- izotiocijanat 6-(metiltio)heksanonitril
2-metilprop-2-enil-glukozinolat	3-metilbut-3-enonitril

4.2. Vršne pare izverugane gromotulje

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama izverugane gromotulje (*Aurinia sinuata*) dan je u tablici 4. U vršnim parama izverugane gromotulje identificirano je jedanaest (VP1), šesnaest (VP2), odnosno deset (VP3) sastojaka, što predstavlja 98,9, 94,8, odnosno 97,2 % od ukupnih hlapljivih spojeva. Glavni sastojak u sva tri uzorka vršnih para je pent-4-enil-izotiocijanat, razgradni produkt glukobrasikanapina (slika 34). Taj spoj je dominantan sastojak VP1 (73,6 %), a njegov udio u VP2 je 53,0 % i u VP3 45,2 %. Kvantitativno značajan sastojak uzorka VP2 je heks-5-enonitril (10,6 %), također razgradni produkt glukobrasikanapina. U uzorcima

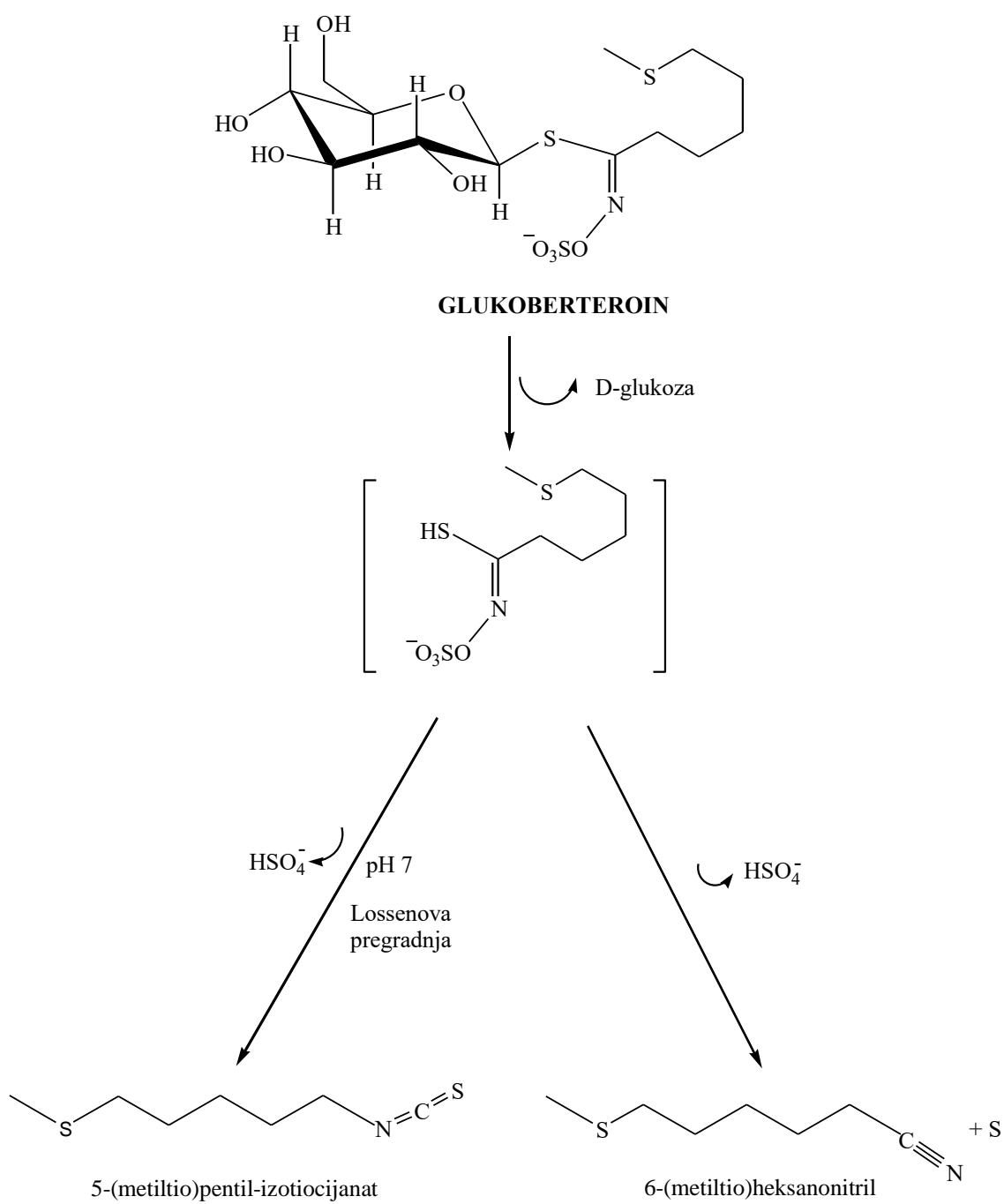
VP1 i VP3 taj spoj je također identificiran, ali u manjim količinama (2,0 % i 2,1 %). Interesantno je da je treći razgradni produkt glukobrasikanapina, 5,6-epitioheksanonitril identificiran samo u uzorku VP3 (2,6 %).

Kvantitativno značajni sastojci uzorka VP3 su 6-(metiltio)heksanonitril (24,5 %) i 5-(metiltio)pentil-izotiocijanat (13,8 %). Ovi spojevi su hidrolitički produkti glukozinolata glukoberteroina (slika 35). Oba navedena spoja identificirana su i u uzorcima VP1 i VP2: 5-(metiltio)pentil-izotiocijanat (9,3 %, odnosno 3,1 %) i 6-(metiltio)heksanonitril (1,9 %, odnosno 2,6 %).

U vršnim parama izverugane gromotulje prevladavaju razgradni produkti glukozinolata. Njihov udio u uzorcima VP1 i VP3 je 90,1 %, odnosno 90,3 %, a najmanji je u uzorku VP2, 71,0 % .Glavni glukozinolati izverugane gromotulje identificirani brzom indirektnom metodom, preko svojih hlapljivih hidrolitičkih produkata, su glukobrasikanapin i glukoberteroin. Svi glukozinolati izverugane gromotulje identificirani HS-SPME/GC-MS metodom prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Glukozinolati izverugane gromotulje

Glukozinolat	Identificirani razgradni produkti glukozinolata (%)
glukobrasikanapin	pent-4-enil-izotiocijanat heks-5-enonitril 5,6-epitioheksanonitril
glukoberteroin	5-(metiltio)pentil- izotiocijanat 6-(metiltio)heksanonitril
glukonapin	but-3-enil-izotiocijanat
glukokohlearin	<i>sec</i> -butil-izotiocijanat



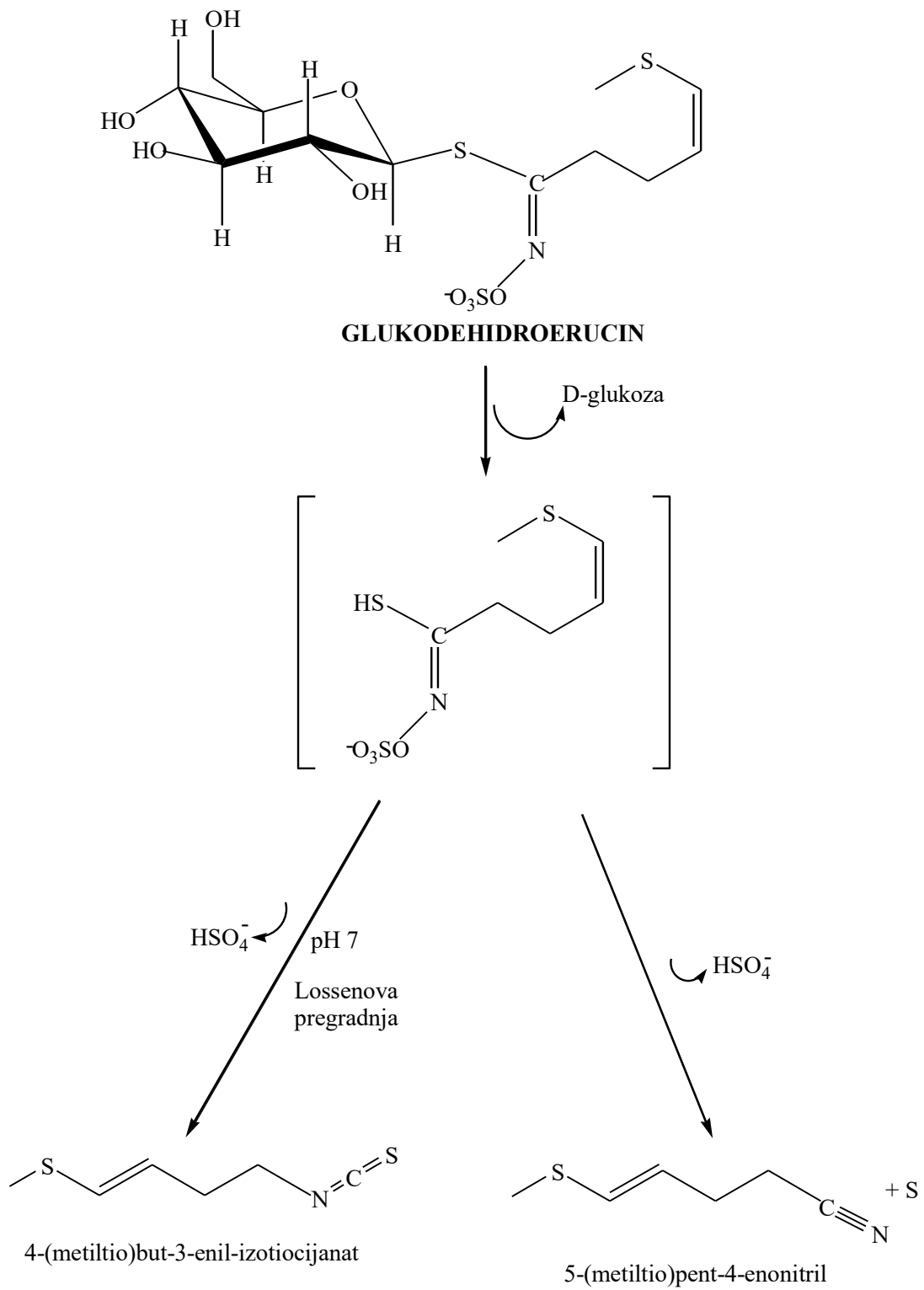
Slika 35. Shematski prikaz razgradnje glukoberteroina

4.3. Vršne pare čunjastog repušca

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama čunjastog repušca (*Bunias erucago*) dan je u tablici 5. U uzorku VP1 identificirano je sedamnaest hlapljivih spojeva koji čine 92,4 % od ukupnih hlapljivih spojeva. Glavni sastojci vršnih para su alifatski alkoholi: (*Z*)-heks-3-en-1-ol, tzv. lisni alkohol (20,0 %), (*E*)-heks-2-en-1-ol (19,5 %), (*E*)-heks-3-en-1-ol (10,8 %) i (*Z*)-heks-2-en-1-ol (6,9 %). Ukupni udio ovih spojeva je 64,4 %. U VP1 su identificirana samo četiri (4) razgradna produkta glukozinolata, s ukupnim udjelom od 15,9 %. Najzastupljeniji razgradni produkt glukozinolata je 4-(metiltio)but-3-enil-izotiocijanat (10,2 %), razgradni produkt glukodehidroerucina (slika 36). Ostali razgradni produkti glukozinolata su but-3-enil-izotiocijanat (2,7 %), 4-(metiltio)butil-izotiocijanat (1,7 %) i metil-tiocijanat (1,3 %).

U vršnim parama čunjastog repušca VP2 (biljni materijal bez dodane vode, autoliza 24 sata) također prevladavaju alifatski alkoholi (*E*)-heks-2-en-1-ol (24,8 %), (*Z*)-heks-3-en-1-ol (23,9 %), (*E*)-heks-3-en-1-ol (16,2 %) i (*Z*)-heks-2-en-1-ol (8,9 %). Njihov ukupni udio je još i veći nego u uzorku VP1 i iznosi 73,8 %. U ovim vršnim parama identificirana su samo dva razgradna produkta glukozinolata i to but-3-enil-izotiocijanat (1,3 %) i 4-(metiltio)but-3-enil-izotiocijanat (0,6 %). U uzorku VP3, vršnim parama biljnog materijala u koji je na početku autolize dodana voda, a autoliza je trajala 24 sata, identificirano je devet spojeva koji čine 82,4 % od ukupnih hlapljivih spojeva. Glavni sastojci vršnih para VP3 su alifatski alkoholi (*E*)-heks-2-en-1-ol (40,5 %) i (*E*)-heks-3-en-1-ol (29,7 %). Identificirana su samo dva razgradna produkta glukozinolata, but-3-enil-izotiocijanat (2,7 %) i metil-tiocijanat (1,8 %).

U vršnim parama čunjastog repušca, bez obzira na uvjete autolize (biljni materijal bez dodane vode ili uz dodatak vode, 1 sat ili 24 sata trajanja autolize) prevladavaju alifatski alkoholi sa 6 C atoma. Broj, kao i udio razgradnih produkata glukozinolata, u svim uzorcima vršnih para je vrlo mali. Temeljem ovakve indirektna analize, identifikacijom hlapljivih hidrolitičkih produkata, može se zaključiti da čunjasti repušac sadrži četiri glukozinolata, glukodehidroerucin, glukonapin, glucoerucin i glukokaparin (tablica 11). Samo u VP1 identificirani su hidrolitički produkti svih navedenih glukozinolata.



Slika 36. Shematski prikaz razgradnje glukodehidrerucina

Tablica 11. Glukozinolati čunjastog repušca

Glukozinolat	Identificirani razgradni produkti glukozinolata (%)
glukodehidroerucin	4-(metiltio)but-3-enil-izotiocijanat
glukonapin	but-3-enil-izotiocijanat
glukoerucin	4-(metiltio)butil-izotiocijanat
glukokaparin	metil-tiocijanat

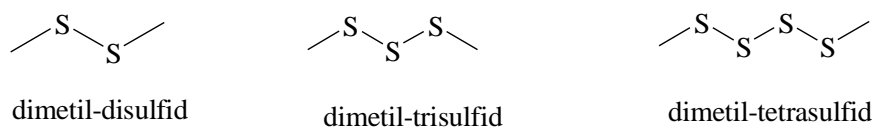
4.4. Vršne pare sredozemne rusomače

Sredozemna rusomača (*Capsella rubella*) je jedan od najraširenijih korova, raste posvuda, osobito na ruderalnom tlu, uz puteve i livade, a u nekim dijelovima Dalmacije se i jede.

Kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama sredozemne rusomače prikazan je u tablici 6. U vršnim parama rusomače koja je podvrgnuta autolizi u trajanju od 1 sat (VP1) identificirano je deset sastojaka, odnosno 98,1 % od ukupnih hlapljivih spojeva. U uzorku dominira alil-izotiocijanat (79,3 %), razgradni produkt glukozinolata sinigrina. Kvantitativno značajan sastojak ovih vršnih para je i drugi hidrolitički produkt sinigrina, alil-tiocijanat (11,0 %). Ukupni udio hidrolitičkih produkata sinigrina u uzorku VP1 je 90,3 %. Na slici 11 shematski je prikazana razgradnja sinigrina. Ostali hidrolitički produkti glukozinolata, prisutni u vršnim parama u znatno manjim udjelima, su 3-metilbutil-izotiocijanat (1,4 %), 4-metilpentil-izotiocijanat (1,0 %) i but-3-enil-izotiocijanat (0,5 %).

U vršnim parama sredozemne rusomače koja je podvrgnuta autolizi u trajanju od 24 sata (VP2) identificirano je jedanaest spojeva koji čine 95,8 % od ukupnih hlapljivih spojeva. Glavni sastojak vršnih para je alil-izotiocijanat (67,2 %). U uzorku je identificiran i alil-tiocijanat (8,8 %) tako da je ukupni maseni udio dvaju razgradnih produkata sinigrina 76,0 %. U ovom uzorku su također identificirani 3-metilbutil-izotiocijanat (1,7 %), 4-metilpentil-izotiocijanat (1,1 %) i but-3-enil-izotiocijanat (0,5 %). Posebnost ovog uzorka vršnih para rusomače je visoki sadržaj spojeva sa sumporom, dimetil-trisulfida (10,3 %), dimetil-disulfida (4,4 %) i dimetil-tetrasulfida (0,4 %), slika 37.

Vršne pare sredozemne rusomače koja je podvrgnuta autolizi u trajanju od 24 sata uz dodatak vode na početku autolize (VP3) sadrže osam sastojaka koji čine 98,1 % od ukupnih hlapljivih spojeva. U uzorku prevladavaju razgradni produkti sinigrina, alil-izotiocijanata (70,9 %), koji je glavni sastojak vršnih para, i alil-tiocijanata (9,0 %). Ovaj uzorak također karakterizira visoki udio spojeva sa sumporom, dimetil-trisulfida (13,5 %), dimetil-disulfida (1,6 %) i dimetil-tetrasulfida (0,9 %), ukupno 16,0 %.



Slika 37. Spojevi sa sumporom

U vršnim parama sredozemne rusomače prevladavaju razgradni produkti glukozinolata sinigrina, alil-izotiocijanata i alil-tiocijanata. Sa sigurnošću se može zaključiti da je glavni glukozinolat sredozemne rusomače sinigrin. Glukozinolati sredozemne rusomače identificirani HS-SPME/GC-MS metodom, odnosno preko svojih hlapljivih hidrolitičkih produkata, su prikazani u tablici 12.

Tablica 12. Glukozinolati sredozemne rusomače

Glukozinolat	Identificirani razgradni produkti glukozinolata (%)
sinigrin	alil-izotiocijanat alil-tiocijanat
3-metilbutil-glukozinolat	3-metilbutil-izotiocijanat
4-metilpentil-glukozinolat	4-metilpentil-izotiocijanat
glukonapin	but-3-enil-izotiocijanat

4.5. Vršne pare streličaste grbice

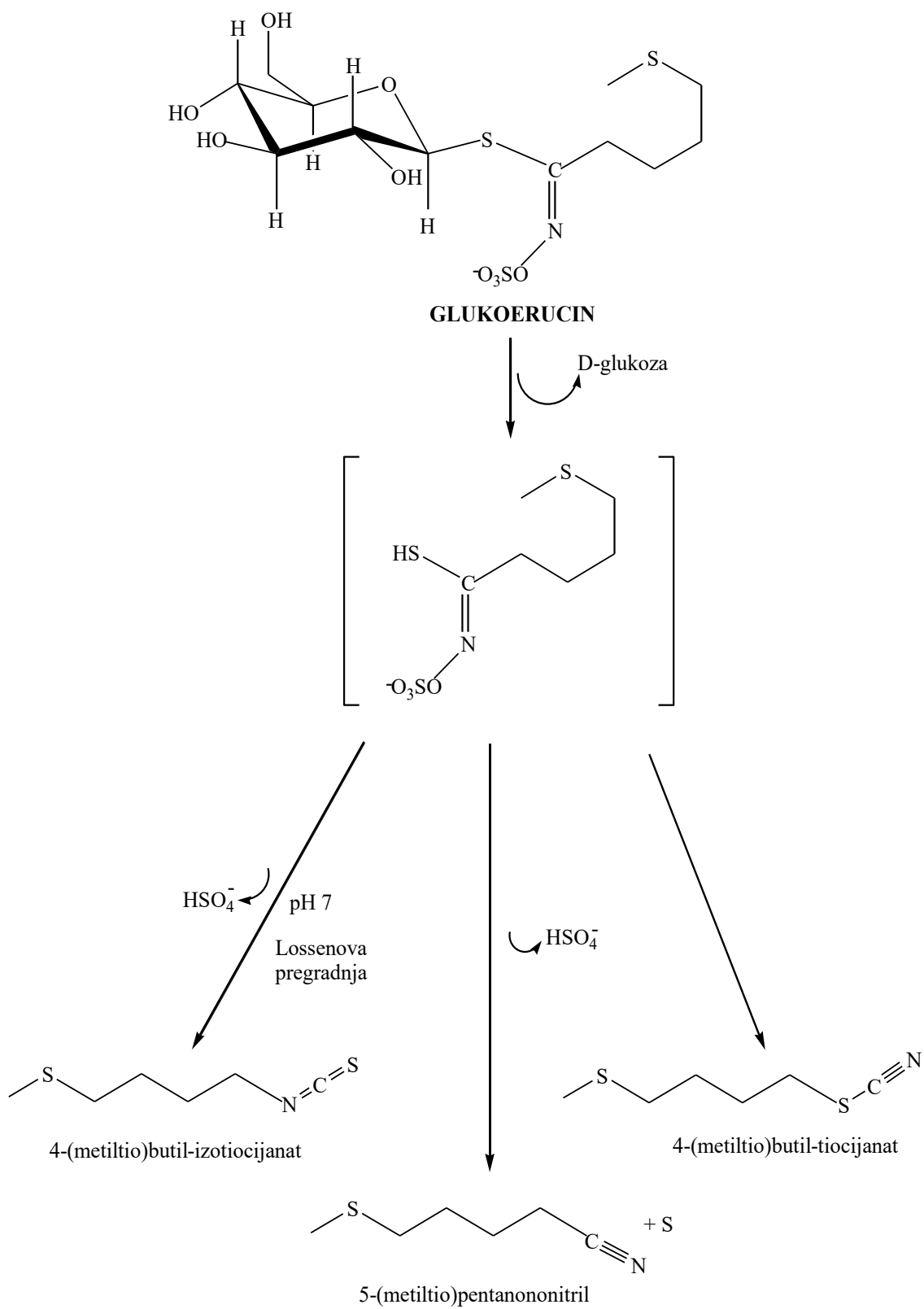
Streličasta grbica (*Cardaria draba*) raste na suhim i toplim neobrađenim mjestima, uz puteve, po korovištima i željezničkim nasipima, a rasprostranjena po cijeloj Hrvatskoj.

U tablici 7 dan je kemijski sastav i udio hlapljivih spojeva u vršnim parama streličaste grbice. U uzorku VP1 (autoliza 1 sat) identificirano je trinaest spojeva (99,0 % od ukupnih hlapljivih spojeva), a od toga su pet razgradni produkti glukozinolata. U uzorku dominira 4-(metiltio)butil-izotiocijanat (91,4 %), razgradni produkt glukozinolata glukoerucina (slika 38). Odgovarajući nitril – razgradni produkt glukoerucina, 5-(metiltio)pentanonitril (1,0 %) je također identificiran u uzorku VP1. Ostali razgradni produkti glukozinolata identificirani su u količinama manjim od 1 %, a to su: izobutil-izotiocijanat (0,4 %), *sec*-butil-izotiocijanat (0,2 %) i 3-(metiltio)propil-izotiocijanat (0,2 %).

U uzorku VP2 (autoliza 24 sata) identificirani su svi hlapljivi spojevi (100 %). U uzorku dominira 4-(metiltio)butil-izotiocijanat (94,2 %), a odgovarajući nitril - 5-(metiltio)pentanonitril nije identificiran. Kao i u uzorku VP1, ostali razgradni produkti glukozinolata identificirani su u količinama manjim od 1 %, a to su: izobutil-izotiocijanat (0,4 %), *sec*-butil-izotiocijanat (0,2 %), benzil-izotiocijanat (0,3 %) i 3-(metiltio)propil-izotiocijanat (0,2 %).

Vršne pare streličaste grbice koja je podvrgnuta autolizi u trajanju od 24 sat uz dodatak vode na početku autolize (VP3) sadrže najmanji broj sastojaka, šest spojeva, a i identifikacija je najlošija (89,4 %). I u ovom uzorku prevladava 4-(metiltio)butil-izotiocijanat (86,7 %), a identificiran je i 5-(metiltio)pentanonitril (0,5 %). Pored navedenih spojeva identificirana su još dva hidrolitička produkta glukozinolata, 3-(metiltio)propil-izotiocijanat (0,2 %) i izobutil-izotiocijanat (0,3 %).

S obzirom da u sva tri uzorka vršnih para streličaste grbice dominira 4-(metiltio)butil-izotiocijanat sa sigurnošću se može zaključiti da je glavni glukozinolat streličaste grbice glukoeucin. Svi glukozinolati identificirani indirektnim putem, preko svojih hlapljivih hidrolitičkih produkata, odnosno primjenom HS-SPME/GC-MS metode, prikazani su u tablici 13.



Slika 38. Shematski prikaz razgradnje glukoerucina

Tablica 13. Glukozinolati streličaste grbice

Glukozinolat	Identificirani razgradni produkti glukozinolata (%)
glukoerucin	4-(metiltio)butil-izotiocijanat 5-(metiltio)pentanonitril
glukoiberberin	3-(metiltio)propil-izotiocijanat
izobutil-glukozinolat	izobutil-izotiocijanat
glukokohlearin	<i>sec</i> -butil-izotiocijanat
glukotropeolin	benzil-izotiocijanat

4.6. Vršne pare strižuše

Za razliku od prethodnih samoniklih biljaka iz porodice Brassicaceae, strižuša (*Sisymbrium officinale*) je nekoć bila veoma cijenjena ljekovita biljka koja se koristila za liječenje bolesti grla i prsiju, a preporučavala se i kod žutice, katara mjehura, bubrežnih kamenaca i skorbuta.

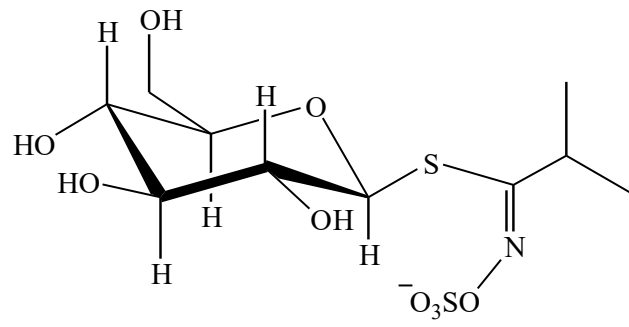
U vršnim parama strižuše, bez obzira na uvjete autolize, identificiran je relativno mali broj sastojaka: sedam u VP1 (94,5 % identificirano), pet u VP2 (94,4 % identificirano) i šest u VP3 (94,8 % identificirano). U svim uzorcima prevladavaju hidrolitički produkti glukozinolata, u kvalitativnom i kvantitativnom smislu. Udio tih spojeva u vršnim parama je: 92,0 % u VP1, 93,4 % u VP2 i 88,3 % u VP3. Izopropil-izotiocijanat je glavni sastojak svih uzoraka vršnih para. Njegov udio u VP1 je 80,7 %, u VP2 je 81,4 %, a u VP3 72,4 %. U sva tri uzorka slijedi *sec*-butil-izotiocijanat s udjelima 10,8 % (VP1), 11,0 % (VP2) i 10,2 % (VP3). Izopropil-izotiocijanat je razgradni produkt glukozinolata glukoputranjivina (slika 39). Nitril koji nastaje hidrolizom glukoputranjivina, 2-metilpropanonitril, je također identificiran u svim uzorcima vršnih para (0,2 %, 0,4 % i 3,4 %). *sec*-Butil-izotiocijanat je razgradni produkt glukozinolata glukokohlearina. U uzorcima VP1 i VP2 identificiran je još i izobutil-izotiocijanat (0,3 % i 0,6 %). Metil-tiocijanat (3,4 %), razgradni produkt glukokaparina, identificiran je samo u uzorku VP3.

Dakle, u svim uzorcima vršnih para strižuše, bez obzira na uvjete autolize (bez dodane vode ili uz dodatak vode, 1 sat ili 24 sata trajanja autolize) prevladavaju

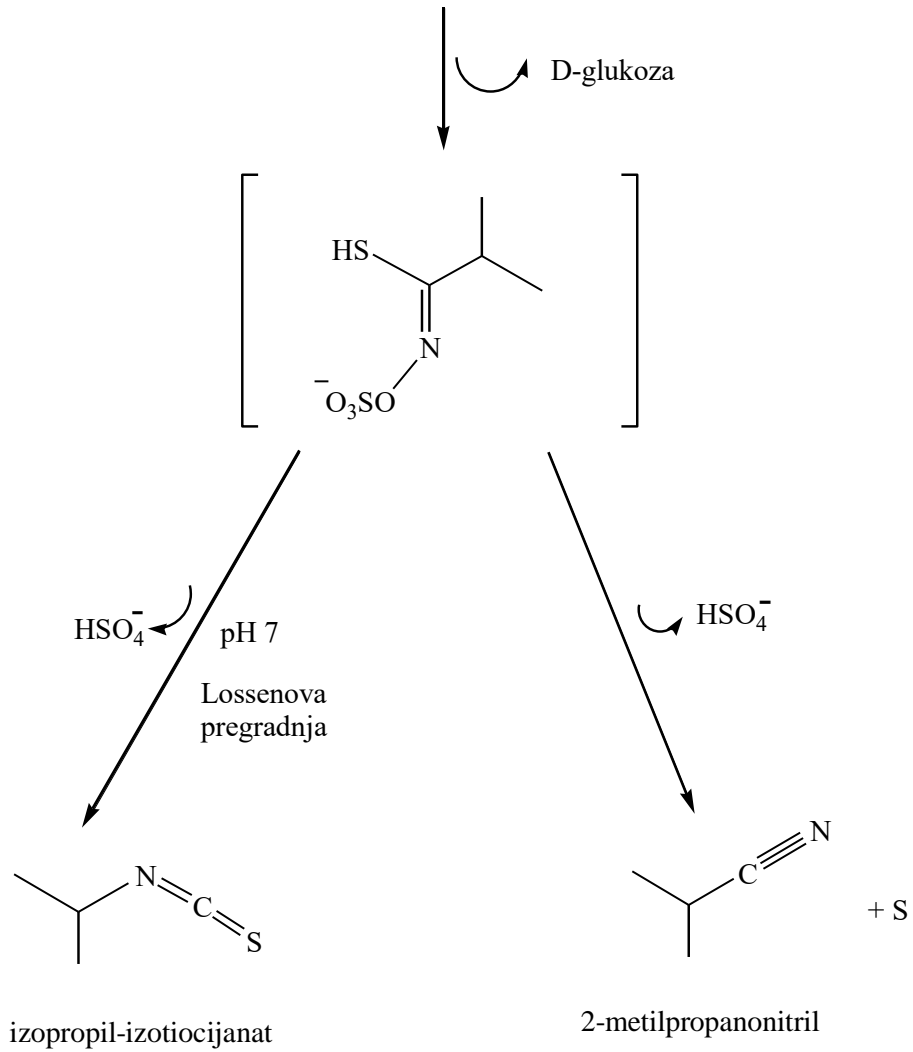
razgradni produkti glukozinolata. S obzirom na najzastupljenije spojeve sa velikom vjerojatnošću se može zaključiti da su glavni glukozinolati strižuše glukoputranjivin i glukokohlearin. Glukozinolati strižuše identificirani HS-SPME/GC-MS metodom, odnosno preko svojih hlapljivih hidrolitičkih produkata, su prikazani u tablici 14.

Tablica 14. Glukozinolati strižuše

Glukozinolat	Identificirani razgradni produkti glukozinolata (%)
glukoputranjivin	izopropil-izotiocijanat 2-metilpropanonitril
glukokohlearin	<i>sec</i> -butil-izotiocijanat
izobutil-glukozinolat	izobutil-izotiocijanat



GLUKOPUTRANJIVIN



Slika 39. Shematski prikaz razgradnje glukoputranjivina

5. ZAKLJUČAK

◆ Cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene brze i jednostavne metode izolacije hlapljivih spojeva, mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME), u kombinaciji s metodom analize hlapljivih spojeva, plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom (GC-MS) u istraživanju glukozinolata samoniklih biljaka iz porodice Brassicaceae.

◆ U svim uzorcima vršnih para jadranske rumenice (*Aurinia leucadea*), bez obzira na uvjete autolize prevladavaju razgradni produkti glukozinolata. Glavni sastojci vršnih para su but-3-enil-izotiocijanat i pent-4-enil-izotiocijanat. Na temelju analize razgradnih produkata glukozinolata može se zaključiti da su glavni glukozinolati jadranske rumenice glukonapin i glukobrasikanapin.

◆ U vršnim parama izverugane gromotulje (*Aurinia sinuata*) prevladavaju razgradni produkti glukozinolata. Dominantan sastojak u sva tri uzorka vršnih para je pent-4-enil-izotiocijanat, a slijedi heks-5-enonitril, oba razgradni produkti glukozinolata glukobrasikanapina. Glavni glukozinolati izverugane gromotulje identificirani brzom indirektnom metodom (HS-SPME/GC-MS), preko svojih hlapljivih hidrolitičkih produkata, su glukobrasikanapin i glukoberteroin.

◆ U vršnim parama čunjastog repušca (*Bunias erucago*), bez obzira na uvjete autolize prevladavaju alifatski alkoholi sa 6 C atoma. Broj, kao i udio razgradnih produkata glukozinolata, u svim uzorcima vršnih para je vrlo mali. Ipak, temeljem HS-SPME/GC-MS analize može se zaključiti da čunjasti repušac sadrži četiri glukozinolata, glukodehidroerucin, glukonapin, glucoerucin i glukokaparin.

◆ Glavni sastojci vršnih para sredozemne rusomače (*Capsella rubella*) su razgradni produkti glukozinolata sinigrina, alil-izotiocijanat, koji je i dominantan sastojak vršnih para, i alil-tiocijanat. Vršne pare rusomače karakterizira i prisustvo spojeva sa sumporom, dimetil-trisulfida, dimetil-disulfida i dimetil-tetrasulfida.

◆ U vršnim parama streličaste grbice (*Cardaria draba*) prevladavaju razgradni produkti glukozinolata. U svim uzorcima vršnih para dominira 4-(metiltio)butil-izotiocijanat, a ostali razgradni produkti glukozinolata identificirani su u znatno manjim količinama, < 1 %. S obzirom na navedeno sa sigurnošću se može zaključiti da je glavni glukozinolat streličaste grbice glukozinolat glukoerucin.

◆ U svim uzorcima strižuše (*Sisymbrium officinale*) prevladavaju hidrolitički produkti glukozinolata, u kvalitativnom i kvantitativnom smislu. Glavni sastojak vršnih para je izopropil-izotiocijanat, a slijedi *sec*-butil-izotiocijanat. S obzirom na najzastupljenije spojeve sa velikom vjerojatnošću se može zaključiti da su glavni glukozinolati strižuše glukoputranjivin i glukokohlearin.

◆ Primjenom brze, indirektna metode analize - HS-SPME/GC-MS, koja se sastoji od izolacije i identifikacije hlapljivih hidrolitičkih produkata, a prethodi joj hidroliza glukozinolata endogenim enzimom, mogu se identificirati glukozinolati u biljkama porodice Brassicaceae. Ova metoda analize može poslužiti kao početna točka u istraživanju glukozinolata jer je brza, jednostavna i učinkovita, a i ne zahtijeva upotrebu kemikalija.

6. LITERATURA

1. I. Blažević, *Kem. Ind.* **69** (2020) 541-555.
2. A. Radonić, *Izolacija i identifikacija slobodnih i glikozidno vezanih hlapljivih spojeva iz smreke (Juniperus oxycedrus L.)*, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2000.
3. M. Popović, *Razgradni produkti glukozinolata strižuše (Sisymbrium officinale (L) Scop.)*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2008.
4. I. Jerković, I. Blažević: *Eterična ulja i mirisni ekstrakti aromatičnog bilja*, nerecenzirana skripta za internu upotrebu, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, 2010., pp. 11-92.
5. J. W. Fahey, A. T. Zalcmann, P. Talalay, *Phytochemistry* **56** (2001) pp. 5-51.
6. M. Zekić, *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
7. B. A. Halkier, *Glucosinolates*, in: R. Ikan (ed.), *Naturally Occurring Glycosides*, John Wiley & Sons, Chichester, 1999, pp. 193-195.
8. R. Verkerk, M. Dekker, *Glucosinolates*, in: J. Gilbert, H. Z. Senyuva (eds.), *Bioactive compounds in Foods*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2008. pp. 31-47.
9. L. Rask, E. Andreasson, B. Ekbom, S. Eriksson, B. Pontoppidan, J. Meijer, *Plant Mol. Biol.* **42** (2000) pp. 93-113.
10. I. Kurečić, *Stabilnost glukozinolata tijekom procesiranja*, Završni rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku, 2014.
11. R. E. Mithen, M. Dekker, R. Verkerk, S. Rabot, I. T. Johnson, *J. Sci. Food Agr.* **80** (2000) pp. 967-984.
12. I. Jerković, *Kemija aroma*, recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, 2011, pp.131-140.
13. N. C. Da Costa, S. Eri, *Identification of Aroma Chemicals*, in: D.J.Rowe (Ed.), *Chemistry and Technology of Flavors and Fragrances*, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, pp. 20-25.
14. J. Mastelić, S. Krka, *Primjena plinske kromatografije-spektrometrije u analizi složenih uzoraka*, skripta za internu upotrebu, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 1994.

15. R. Čempuh, *Alifatski glukozinolati sa sumporom u bočnom lancu u bijelom kupusu (Brassica oleracea var. capitata)*, Diplomski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2003.
16. Lj. Žilić, *Hlapljivi spojevi smilja*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2019.
17. 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 Sveučilišta u Splitu, 2018.
18. A. Sedlar, *Izolacija i identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva odabranih biljaka porodice Brassicaceae*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2017.
19. A. Šahini, *Istraživanje flavonoida u vrstama Aurinia leucadea (Guss.) C. Koch i Aurinia sinuata (L.) Griseb.*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2001.
20. Lj. Grlić, *Enciklopedija samoniklog jestivog bilja*, Delo, Ljubljana, 1986.