

# Glukoziolatni profil dvoredca (*Diplotaxis eruroides*). Konvencionalna vs. mikrovalovna potpomognuta izolacija hlapljivih spojeva

---

Roković, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:167:316478>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**GLUKOZINOLATNI PROFIL DVOREDCA (*Diplotaxis  
erucoides*). KONVENCIONALNA vs. MIKROVALOVIMA  
POTPOMOGNUTA IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**IVANA ROKOVIĆ  
Matični broj: 1076**

**Split, rujan 2019.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKA TEHNOLOGIJA**  
**SMJER: KEMIJSKO INŽENJERSTVO**

**GLUKOZINOLATNI PROFIL DVOREDCA (*Diplotaxis  
erucoides*). KONVENCIONALNA vs. MIKROVALOVIMA  
POTPOMOGNUTA IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**IVANA ROKOVIĆ**  
**Matični broj: 1076**

**Split, rujan 2019.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY**  
**ORIENTATION: CHEMICAL ENGINEERING**

**GLUCOSINOLATE PROFILE OF WHITE WALL  
ROCKET (*Diplotaxis eruroides*). CONVENTIONAL vs.  
MICROWAVE ASSISTED ISOLATION OF VOLATILES**

**BACHELOR THESIS**

**IVANA ROKOVIĆ**

**Parent number: 1076**

**Split, September 2019.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij Kemijska tehnologija: Kemijsko inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

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

**Pomoć pri izradi:** Azra Đulović, mag.chem.

### GLUKOZINOLATNI PROFIL DVOREDCA (*Diplotaxis erucooides*). KONVENCIONALNA vs. MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA IZOLACIJA HLAPLJIVIH SPOJEVA

Ivana Roković, 1076

**Sažetak:** Glukozinolati su sekundarni metaboliti koji su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Capparales, a najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju dobro poznate biljke iz svakodnevne prehrane kao što su kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa, gorušica i druge. Po kemijskoj strukturi to su  $\beta$ -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni. Njihovom enzimskom, kemijskom ili termičkom razgradnjom nastaje niz biološki aktivnih produkata od kojih su najviše istaživani izotiocijanati. U ovom radu primjenjene su različite metode izolacije uključujući hidrodestilaciju, autolizu te mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju kako bi se istražila termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata. Posebno je zanimljiva mikrovalna ekstrakcija jer predstavlja pravi primjer uporaba zelene tehnologije.

Cilj ovoga rada bio je izolirati i identificirati hlapljive sumporove spojeve iz dvoredca (*Diplotaxis erucooides*). Biljni materijal sakupljen je u Splitu u travnju 2019. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je hidrodestilacijom po Clevengeru, autolizom te mikrovalnom destilacijom i ekstrakcijom bez dodatka otapala. Za identifikaciju izoliranih hlapljivih spojeva korištena je GC-MS tehnika. U listu i kumuški dvoredca preko razgradnog produkta alil-izotiocijanata identificiran je sinigrin, dok je u korijenu, cvijetu i stabljici identificiran sinigrin preko alil-izotiocijanata te glukonasturcin preko 2-feniletil-izotiocijanata. HPLC-DAD tehnikom preko desulfoglukozinolata potvrđeno je njihovo prisustvo te su navedeni spojevi i kvantizirani. Koncentracija sinigrina u listu bila je 12,0996  $\mu\text{mol/g}$ , u stabljici 10,4135  $\mu\text{mol/g}$ , u kumuški 28,8295  $\mu\text{mol/g}$ , u korijenu 2,6966  $\mu\text{mol/g}$  i u cvijetu je 16,3358  $\mu\text{mol/g}$ . Koncentracija glukonasturcina u stabljici bila je 0,7765  $\mu\text{mol/g}$ , u korijenu 16,4398  $\mu\text{mol/g}$  i u cvijetu je 0,2485  $\mu\text{mol/g}$ .

**Ključne riječi:** *Diplotaxis erucooides*, glukozinolati, desulfoglukozinolati, Brassicaceae, GC-MS, HPLC

**Rad sadrži:** 57 stranica, 48 slika, 5 tablica, 1 prilog, 18 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Sandra Svilović - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić - član
3. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević - mentor

**Datum obrane:** 25.09.2019.

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

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate study Chemical Tehnology: Chemical Engineering

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19

**Mentor:** Ivica Blažević, PhD, Associate professor

**Technical assistance:** Azra Đulović, MChem.

**GLUCOSINOLATE PROFILE OF WHITE WALL ROCKET (*Diplotaxis erucooides*). CONVENTIONAL vs. MICROWAVE ASSISTED ISOLATION OF VOLATILES**

Ivana Roković, 1076

**Abstract:** Glucosinolates are secondary metabolites present in 16 botanical families of the Capparales order, among which the most important is Brassicaceae family, which includes well-known plants of everyday nutrition such as cabbage, broccoli, cauliflower, broomsticks, radis, beets and others. Chemically these are  $\beta$ -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with a variable side chain. Glucosinolates are chemically and biologically inactive. Their enzymatic, chemical, and thermal degradation result in formation of series of biologically active products, among which the most studied ones are isothiocyanates. In our study, we used different methods including hydrodistillation, autolysis followed by extraction, and microwave assisted distillation and extraction in order to investigate thermal, enzymatic, and microwave-assisted decomposition of glucosinolates. Microwave extraction is particularly interesting because it represents a true example of green technology.

The aim of this study was to isolate and identify volatile sulfur compounds from white wall rocket (*Diplotaxis erucooides*). Plant material was collected in Split in April 2019. The isolation of volatile compounds was performed by hydrodistillation in Clevenger type apparatus, autolysis and microwave distillation and extraction without solvent addition. GC-MS technique was used to identify the isolated volatiles. The leaf and siliquae volatile extracts contained allyl-isothiocyanate, the breakdown product of sinigrin, while the root, flower and stem next to allyl-isothiocyanate also contained 2-phenylethyl-isothiocyanate, which originated from gluconasturtiin. Glucosinolates were also confirmed and quantified by HPLC-DAD technique. Leaf contained 12,0996  $\mu\text{mol/g}$  of sinigrin, stem 10,4135  $\mu\text{mol/g}$ , siliquae 28,8295  $\mu\text{mol/g}$ , root 2,6966  $\mu\text{mol/g}$  and flower 16,3358  $\mu\text{mol/g}$ . Gluconasturtiin concentration in stem was 0,7765  $\mu\text{mol/g}$ , in root 16,4398  $\mu\text{mol/g}$  and in flower 0,2485  $\mu\text{mol/g}$ .

**Keywords:** *Diplotaxis erucooides*, glucosinolates, desulfoglucosinolates, Brassicaceae, GC-MS, HPLC

**Thesis contains:** 57 pages, 48 figures, 5 tables, 1 supplement, 18 references

**Original in:** Croatian.

**Defence committee:**

1. Sandra Svilović, PhD, Associate Professor – chair person
2. Ivana Generalić Mekinić, PhD, Assistant Professor - member
3. Ivica Blažević, PhD, Associate Professor - supervisor

**Defence date:** 25.09.2019.

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

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

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



*Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću na pruženoj prilici, stručnim savjetima i svom znanju koje je nesebično podijelio sa mnom prilikom izvođenja i pisanja rada.*

*Zahvaljujem se i asistentici, Azri Đulović mag. chem. na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, a posebno VELIKO HVALA na stručnim i prijateljskim savjetima, posvećenom vremenu i ogromnom trudu.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na neizmjernoj podršci, strpljenju i razumijevanju.*

*Ivana*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. Izolirati hlapljive sumporove spojeve iz dvoredca (*Diplotaxis erucoides* (L.) DC.) korištenjem mikrovalovima potpomognute izolacije te ih usporediti s metodama klasične ekstrakcije i hidrodestilacije.
2. Identificirati hlapljive izolate korištenjem vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS).
3. Izolirati glukozinolate iz odabrane vrste metodom ekstrakcije uz desulfataciju.
4. Identificirati i kvantificirati izolirane desulfoglukozinolate korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

## SAŽETAK

Glukozinolati su sekundarni metaboliti koji su zastupljeni u 16 botaničkih porodica reda Capparales, a najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju dobro poznate biljke iz svakodnevne prehrane kao što su kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa, gorušica i druge. Po kemijskoj strukturi to su  $\beta$ -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni. Njihovom enzimskom, kemijskom ili termičkom razgradnjom nastaje niz biološki aktivnih produkata od kojih su najviše istaživani izotiocijanati. U ovom radu primjenjene su različite metode izolacije uključujući hidrodestilaciju, autolizu te mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju kako bi se istražila termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata. Posebno je zanimljiva mikrovalna ekstrakcija jer predstavlja pravi primjer uporaba zelene tehnologije.

Cilj ovoga rada bio je izolirati i identificirati hlapljive sumporove spojeve iz dvoredca (*Diplotaxis eruroides*). Biljni materijal sakupljen je u Splitu u travnju 2019. Izolacija hlapljivih spojeva provedena je hidrodestilacijom po Clevengeru, autolizom te mikrovalnom destilacijom i ekstrakcijom bez dodatka otapala. Za identifikaciju izoliranih hlapljivih spojeva korištena je GC-MS tehnika. U listu i komuški dvoredca preko razgradnog produkta alil-izotiocijanata identificiran je sinigrin, dok je u korijenu, cvijetu i stabljici identificiran sinigrin preko alil-izotiocijanata te glukonasturcin preko 2-feniletil-izotiocijanata. HPLC-DAD tehnikom preko desulfoglukozinolata potvrđeno je njihovo prisustvo te su navedeni spojevi i kvantizirani. Koncentracija sinigrina u listu bila je 12,0996  $\mu\text{mol/g}$ , u stabljici 10,4135  $\mu\text{mol/g}$ , u komuški 28,8295  $\mu\text{mol/g}$ , u korijenu 2,6966  $\mu\text{mol/g}$  i u cvijetu je 16,3358  $\mu\text{mol/g}$ . Koncentracija glukonasturcina u stabljici bila je 0,7765  $\mu\text{mol/g}$ , u korijenu 16,4398  $\mu\text{mol/g}$  i u cvijetu je 0,2485  $\mu\text{mol/g}$ .

**Ključne riječi:** *Diplotaxis eruroides*, glukozinolati, desulfoglukozinolati, Brassicaceae, GC-MS, HPLC.

## SUMMARY

Glucosinolates are secondary metabolites present in 16 botanical families of the Capparales order, among which the most important is Brassicaceae family, which includes well-known plants of everyday nutrition such as cabbage, broccoli, cauliflower, broomsticks, radis, beets and others. Chemically these are  $\beta$ -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with a variable side chain. Glucosinolates are chemically and biologically inactive. Their enzymatic, chemical, and thermal degradation result in formation of series of biologically active products, among which the most studied ones are isothiocyanates. In our study, we used different methods including hydrodistillation, autolysis followed by extraction, and microwave assisted distillation and extraction in order to investigate thermal, enzymatic, and microwave-assisted decomposition of glucosinolates. Microwave extraction is particularly interesting because it represents a true example of green technology.

The aim of this study was to isolate and identify volatile sulfur compounds from white wall rocket (*Diplotaxis eruroides*). Plant material was collected in Split in April 2019. The isolation of volatile compounds was performed by hydrodistillation in Clevenger type apparatus, autolysis and microwave distillation and extraction without solvent addition. GC-MS technique was used to identify the isolated volatiles. The leaf and siliquae volatile extracts contained allyl-isothiocyanate, the breakdown product of sinigrin, while the root, flower and stem next to allyl-isothiocyanate also contained 2-phenylethyl-isothiocyanate, which originated from gluconasturtiin. Glucosinolates were also confirmed and quantified by HPLC-DAD technique. Leaf contained 12,0996  $\mu\text{mol/g}$  of sinigrin, stem 10,4135  $\mu\text{mol/g}$ , siliquae 28,8295  $\mu\text{mol/g}$ , root 2,6966  $\mu\text{mol/g}$  and flower 16,3358  $\mu\text{mol/g}$ . Gluconasturtiin concentration in stem was 0,7765  $\mu\text{mol/g}$ , in root 16,4398  $\mu\text{mol/g}$  and in flower 0,2485  $\mu\text{mol/g}$ .

**Keywords:** *Diplotaxis eruroides*, glucosinolates, desulfoglucosinolates, Brassicaceae, GC-MS, HPLC.

# SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Hlapljivi sumporovi spojevi.....	2
1.1.1. Klasifikacija hlapljivih sumporovih spojeva.....	2
1.2. Glukozinolati .....	3
1.2.1. Struktura glukozinolata .....	3
1.3. Razgradnja glukozinolata .....	5
1.3.1. Enzimska razgradnja .....	5
1.3.1.1. Razgradni produkti.....	7
1.3.2. Neenzimska razgradnja .....	8
1.4. Metode izolacije hlapljivih spojeva .....	10
1.4.1. Destilacija.....	10
1.4.1.1. Vodena destilacija.....	10
1.4.2. Ekstrakcija.....	12
1.4.2.1. Mikrovalna ekstrakcija.....	12
1.4.3. Ekstrakcija glukozinolata .....	15
1.5. Metode identifikacije hlapljivih spojeva.....	15
1.5.1. Kromatografija .....	15
1.5.1.1. Plinska kromatografija .....	16
1.5.2. Spektrometrija masa.....	16
1.5.2.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa.....	17
1.5.3. Tekućinska kromatografija.....	18
1.5.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	18
1.6. Brassicaceae .....	19
1.6.1. Dvoredac ( <i>Diplotaxis erucoides</i> ) .....	20
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	22
2.1. Biljni material .....	22
2.1.1. Dvoredac .....	22
2.2. Metode izolacije.....	24
2.2.1. Mikrovalna destilacija i ekstrakcija.....	24

2.2.2.	Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	29
2.2.3.	Hidrodestilacija .....	31
2.2.4.	Ekstrakcija glukozinolata .....	33
2.3.	Analiza .....	36
2.3.1.	GC-MS analiza.....	36
2.3.2.	HPLC analiza desulfoglukozinolata.....	36
3.	REZULTATI I RASPRAVA .....	38
3.1.	Razgradnja glukozinolata i GC-MS analiza .....	38
3.1.1.	GC-MS analiza.....	39
3.2.	Izolacija glukozinolata i HPLC analiza .....	43
3.2.1.	List .....	45
3.2.2.	Stabljika .....	46
3.2.3.	Komuška .....	46
3.2.4.	Korijen .....	47
3.2.5.	Cvijet.....	48
4.	ZAKLJUČAK.....	50
5.	LITERATURA .....	51
6.	PRILOG .....	53
6.1.	Izračun konačnih koncentracija identificiranih glukozinolata.....	53
6.1.1.	List .....	54
6.1.2.	Stabljika .....	54
6.1.3.	Komuška .....	54
6.1.4.	Korijen .....	55
6.1.5.	Cvijet.....	55
6.1.6.	UV spektri desulfoglukozinolata.....	56

## UVOD

U posljednje vrijeme sve je popularniji trend zdravog života pa su u skladu s tim biljke iz porodice Brassicaceae postale fokus brojnih istraživanja kako zbog svoje nutritivne vrijednosti tako i zbog prisutnosti glukozinolata. Glukozinolatima se, između ostaloga, pripisuju i različita antitumorska svojstva što se u današnje vrijeme smatra osobito važnim.

Po kemijskoj strukturi glukozinolati su  $\beta$ -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfatis varijabilnim bočnim lancem. Pronađeni u 16 biljnih porodica reda Capparales, od kojih je najvažnija porodica Brassicaceae, a među rodovima se posebno ističe rod *Brassica* koji obuhvaća niz biljaka prisutnih u svakodnevnoj ljudskoj prehrani. Glukozinolati su biološki neaktivni spojevi, međutim uslijed oštećenja biljnog tkiva i oslobađanja enzima mirozinaze dolazi do hidroliziranja glukozinolata pri čemu nastaju biološki aktivni produkti kao što su izotiocijanati, nitrili, indoli, tiocijanati i epitionitrili. Glukozinolati se izoliraju ekstrakcijom i analiziraju tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC), dok se njihovi razgradni produkti analiziraju plinskom kromatografijom u kombinaciji sa spektrometrijom masa (GC-MS).

# 1.OPĆI DIO

## 1.1. Hlapljivi sumporovi spojevi

Hlapljivi sumporovi spojevi su posebna grupa metaboličkih produkata koje prvenstveno možemo pronaći u biljkama 43 biljne porodice i 173 biljna roda. Značajnije biljne porodice koje sadrže ove spojeve su Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae, Phytolaccaceae i Poaceae.<sup>1</sup> Kemijske strukture hlapljivih sumporovih spojeva variraju od jednostavnih pa do složenih. Primjeri jednostavnih struktura su metantioi i dimetil-sulfid dok složenije strukture mogu sadržavati i drugi heteroatom, npr. dušik i kisik.<sup>2</sup>

Nekim od ovih spojeva se pridodaju važna biološka svojstva kao što su antioksidacijska, antitumorska i antibakterijska aktivnost te induciranje apoptoze. Također, izotiocijanati koji tvore veliku skupinu hlapljivih sumporovih spojeva pokazuju antikancerogena svojstva.<sup>2</sup>

### 1.1.1. Klasifikacija hlapljivih sumporovih spojeva

Postoji više načina klasifikacije hlapljivih sumporovih spojeva, a jedan od njih je prema broju sumporovih atoma u njihovoj strukturi pri čemu se klasificiraju u 4 grupe. Prva grupa obuhvaća spojeve koji u svojoj strukturi sadrže jedan atom sumpora ( $S_1$ ), drugu grupu čine spojevi s dva sumporova atoma u strukturi ( $S_2$ ), treća grupa je s tri ( $S_3$ ) i četvrta grupa s četiri sumporova atoma u strukturi ( $S_4$ ). Navedene grupe se dalje dijele obzirom na prisutnost heteroatoma (dušika i/ili kisika) te s obzirom na oblik molekule. Izotiocijanati i tiocijanati predstavljaju posebnu grupu hlapljivih sumporovih spojeva koje pronalazimo u gotovo svim dijelovima biljke (korijen, stabljika, list, cvijet, sjemenka), a čija koncentracija ovisi o vrsti i razvojnom stadiju biljke, klimi i načinu uzgoja.<sup>1</sup>



## 1.2. Glukozinolati

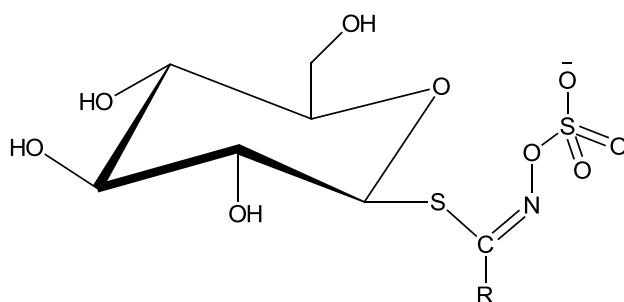
Glukozinolati ( $\beta$ -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) su važna skupina sekundarnih metabolita u nekim pojedinim biljnim vrstama koja se sintetizira iz aminokiselina. Ubrajaju se u specifičnu skupinu kemijskih spojeva tzv. fitokemikalija koja je zastupljena u 16 botaničkih porodica reda Capparales. Najveće količine glukozinolata pronađene su u biljkama iz tri porodice ovog reda i to Resedaceae, Capparaceae i Brassicaceae. Za prehranu ljudi najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju ubrajamo dobro poznate biljke iz svakodnevne prehrane kao što su kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvice, repa, gorušica i druge. Glukozinolati se pronalaze u svim dijelovima biljke, u nekim biljkama je pronađeno čak preko 15 različitih vrsta glukozinolata, dok pojedine biljke sadrže samo njih nekoliko u značajnijim količinama. Sastav, raspodjela i sadržaj glukozinolata u biljkama ovise o vrsti, varijetetu unutar iste vrste, dijelu i razvojnom stadiju biljke te o uvjetima uzgoja. Koncentracija glukozinolata je općenito visoka u sjemenkama, dok je u listu, stabljici i korijenu znatno manja.<sup>3,4</sup>

Glukozinolati i njihovi razgradni produkti zanimljivi su zbog svojih nutritivnih, antitumorskih i antibakterijskih svojstava te zbog osiguravanja karakteristične arome određenog povrća. Današnja istraživanja potvrđuju da se velikim unosom glukozinolata u ljudski organizam smanjuje rizik od nastanka raka jetre, debelog crijeva, mliječnih žlijezdi itd. Toksični su za neke insekte tako da se mogu koristiti kao prirodni pesticidi.<sup>3</sup> Glukozinolati, poznati pod trivijalnim imenima, sinigrin (alilglukozinolat) i sinalbin (4-hidroksibenzilglukozinolat) izolirani su još 1830. godine iz sjemenki crne (*Brassica nigra*) i bijele (*Sinapis alba*) gorušice.<sup>4</sup>

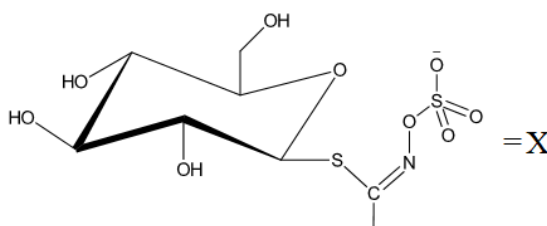
### 1.2.1. Struktura glukozinolata

Strukturno svaki glukozinolat sadrži središnji ugljikov atom koji je vezan preko atoma sumpora na glukoznu skupinu i preko atoma dušika na sulfatnu skupinu te bočni ostatak R koji potječe od aminokiseline. Po kemijskoj strukturi, glukozinolati su  $\beta$ -tioglukozid-*N*-hidroksisulfati kod kojih su glukoza i sulfatna skupina vezane na aglikon koji se sintetizira iz aminokiselina i njihovih analoga. Opća strukturna formula prikazana je na Slici 1. Struktura bočnog lanca, po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju,

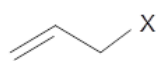
određena je aminokiselinom. Obzirom na strukturu bočnog lanca glukozinolati se dijele na alifatske, aromatske i indolne (slika 2.). Bočni lanac glukozinolata je varijabilni dio molekule i osnova je njihove strukturne raznolikosti kao biološke aktivnosti produkata koji nastaju njihovom enzimskom, termičkom ili kemijskom razgradnjom.<sup>3</sup>



Slika1. Opća strukturna formula glukozinolata

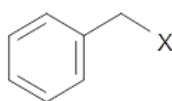


Alifatski



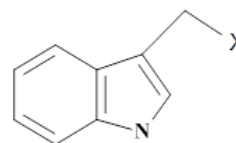
sinigrin

Arilalifatski



glukonasturcin

Indolni



glukobrasicin

Slika 2. Primjeri struktura glukozinolata

### 1.3. Razgradnja glukozinolata

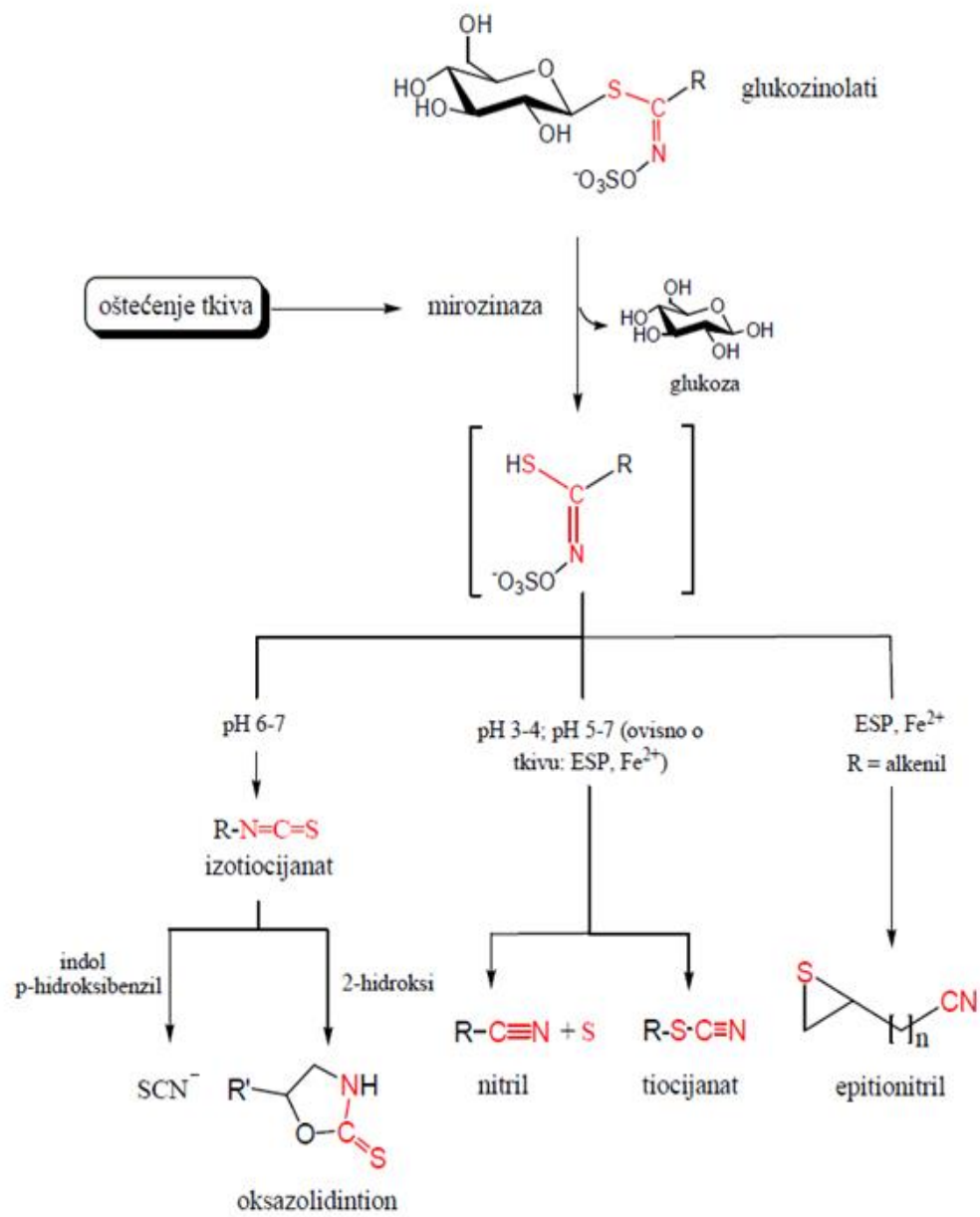
Glukozinolati su u pravilu stabilni i biološki neaktivni spojevi. U slučaju oštećenja stanične strukture biljaka koje sadrže glukozinolate, dolazi do njihove razgradnje i to na dva načina, hidrolizom (enzimskom ili djelovanjem kiseline/baze) ili termičkom razgradnjom. Pri njihovoj razgradnji nastaje niz razgradnih produkata koji uključuju tiocijanate, izotiocijanate, nitrile, epitionitrile i vinil-oksazolidintione. Neki od nastalih produkata posjeduju antioksidacijska, antibakterijska i antitumorska svojstva, dok su neki štetni.<sup>4,5</sup>

#### 1.3.1. Enzimska razgradnja

Glukozinolati se hidroliziraju uslijed djelovanja enzima mirozinaze (tioglukohidrolaza; E.C. 3.2.1.147) u različite spojeve (izotiocijanate, nitrile, tiocijanate, epitionitrile, oksazolidintione), čiji sastav ovisi o pH, metalnim ionima i epitiospecifičnom proteinu (ESP) (slika 3.).<sup>4</sup>

Pojam mirozinaza označava skupinu enzima sličnog djelovanja koji se međusobno razlikuju ne samo među različitim biljnim vrstama, već i u različitim dijelovima biljke. Mirozinaze spadaju u jedine poznate *S*-glukozidaze. Iako su genetski slične drugim  $\beta$ -glukozidazama, pokazuju specifičnost prema glukozinolatima. Mirozinaze nalazimo u „mirozinskim stanicama“ koje su nađene u sjemenu, parenhinskom tkivu, epidermu i zaštitnim stanicama, odvojene od glukozinolata koji su vjerojatno sadržani u vakuolama.<sup>4,5</sup>

U reakciji hidrolize cijepa se veza sumpor-glukoza (tioglukozidna veza) u molekuli glukozinolata te se oslobađaju glukoza, sulfat i aglikon. Oslobođeni aglikon je nestabilan te se spontano pregrađuje dajući različite razgradne produkte odgovorne za karakterističan okus i miris biljaka. Krajnji produkti nastaju preko barem jednog nestabilnog međuprodukta, na kojeg utječu reakcijski uvjeti kao što su pH, R-skupina i prisutnost metalnih iona kao što je  $\text{Fe}^{2+}$  (slika 3.).<sup>4,5</sup>



Slika 3. Opća shema razgradnje glukozinolata.<sup>4</sup>

### 1.3.1.1. Razgradni produkti

**Izotiocijanati** ( $R-N=C=S$ ) su se tijekom povijesti smatrali "normalnim" produktima hidrolize glukozinolata. Izotiocijanati nastaju pri neutralnom pH kada nestabilni aglukonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji u  $R-N=C=S$  konfiguraciju. Izotiocijanati koji sadrže  $\beta$ -hidroksilnu skupinu su nestabilni i spontanom intramolekulskom reakcijom tvore cikličke tionske spojeve-oksazolidintione.

U metabolizmu čovjeka izotiocijanati se vežu na glutation uz pomoć enzima glutation-S-transferaze i dalje metaboliziraju do merkaptanske kiseline. Zbog svoje toksičnosti izotiocijanati su razmatrani kao mogući pesticidi.<sup>4,5</sup>

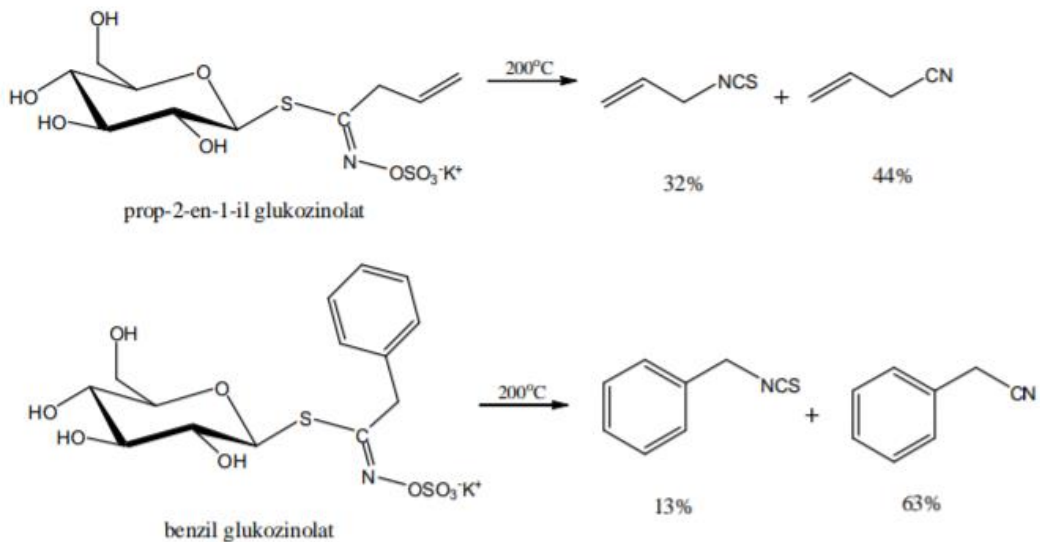
**Tiocijanati** ( $R-S-C\equiv N$ ) su razgradni produkti glukozinolata koji mogu nastati isključivo iz glukozinolata koji imaju specifične bočne lance poput prop-2-enil, benzil i 4-(metilsulfanil)butil glukozinolata, jer samo ove R skupine imaju mogućnost stvaranja stabilnog kationskog međuprodukta. Također uz mirozinazu, za nastanak tiocijanata potrebno je prisustvo još jednog enzima, tzv. tiocijanat formirajućeg proteina (TFP).<sup>4,5</sup> Uvjeti pod kojima nastaju tiocijanati nisu još dovoljno istraženi.

**Indoli** su spojevi koji nastaju, zajedno s tiocijanatima, hidrolizom indolnih glukozinolata. Mogu nastati i pod uvjetima koji pogoduju nastanku nitrila, kao reakcijskim putevima u biljci koji nisu vezani za razgradnju glukozinolata. Najzastupljeniji predstavnik ove glukozinolatne grupe jest glukobrasicin (indol-3-ilmetil glukozinolat), najvećom mjerom zastupljen u povrću roda *Brassica*.<sup>4,5</sup> Indoli su poznati po tome što sprječavaju rast tumora, posebno tumora dojke.<sup>4</sup>

**Nitrili** ( $R-C\equiv N$ ), poznati još i kao organski cijanidi, nastaju cijepanjem sumpora iz glukozinolatne molekule. Nastanak nitrila pospješuju kiseli uvjeti hidrolize ( $pH < 4$ ), prisustvo  $Fe^{2+}$  ili tiolnih spojeva. Pri niskim pH vrijednostima, njihov nastanak je favoriziran u odnosu na nastanak izotiocijanata iako u nekim biljkama su poznati slučajevi favoriziranja izotiocijanata pred nitrilima.<sup>4</sup>

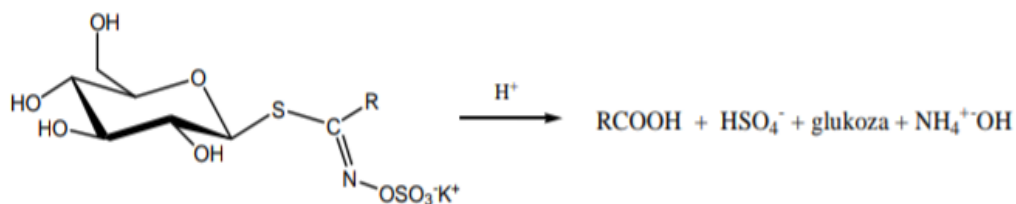
### 1.3.2. Neenzimska razgradnja

Glukozinolati se, osim enzimski, mogu razgraditi kemijskom hidrolizom, ali i pod utjecajem povišene temperature. Na temperaturi 200 °C prop-2-en-1-il glukozinolat razgradio se dajući 44% nitrila i 32% izotiocijanata, dok se benzil glukozinolat razgradio dajući 63% nitrila i 13% izotiocijanata (slika 4.). Istraživanjem toplinske razgradnje indolnih glukozinolata zabilježeno je uglavnom nastajanje tiocijanata i indolilacetonitrila za razliku od razgradnje endogenom hidrolizom (autolizom) kojom uglavnom nastaju tiocijanati i karbinoli te u maloj količini indolilacetonitrili.<sup>4,5</sup>



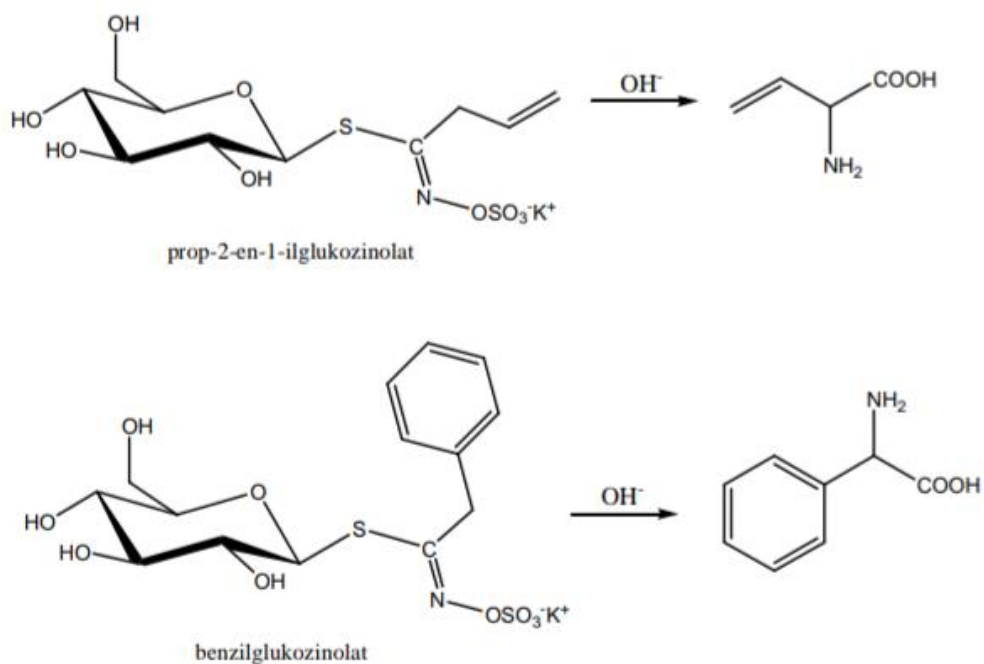
Slika 4. Termička razgradnja prop-2-en-1-il i benzil glukozinolata pri 200°C u GC injektoru.<sup>4</sup>

Kiselom razgradnjom glukozinolata nastaju odgovarajuće karboksilne kiseline s hidrosilamonij ionom (slika 5.).



**Slika 5.** Kisela hidroliza glukozinolata.<sup>4</sup>

Baznom hidrolizom može nastati nekoliko produkata. slika 6. prikazuje baznu hidrolizu prop-2-en-1-il i benzil glukozinolata pri čemu nastaju odgovarajuće aminokiseline.



**Slika 6.** Bazna hidroliza glukozinolata.<sup>4</sup>

## **1.4. Metode izolacije hlapljivih spojeva**

Poznato je da mirisne biljke sadrže isparljive spojeve, a mnoge od njih i eterična ulja. Ovisno o vrsti, različiti dijelovi biljke se mogu koristiti za izolaciju eteričnih ulja, primjerice cvjetovi, listovi, plodovi i sjeme. Klasične metode koje se koriste za izolaciju hlapljivih spojeva su destilacija i ekstrakcija s organskim otapalima, ali danas se sve češće primjenjuju nove, modernije metode koje imaju brojne prednosti pred klasičnim metodama izolacije kao što su npr. mikrovalna i ultrazvučna ekstrakcija te ekstrakcija sa superkritičnim otapalima. Metode istovremene destilacije-ekstrakcije tj. destilacija vodenom parom uz istovremenu ekstrakciju organskim otapalom, koristi se za biljni materijal s nižim sadržajem glukozinolata odnosno njihovih razgradnih produkata.<sup>6</sup>

### **1.4.1. Destilacija**

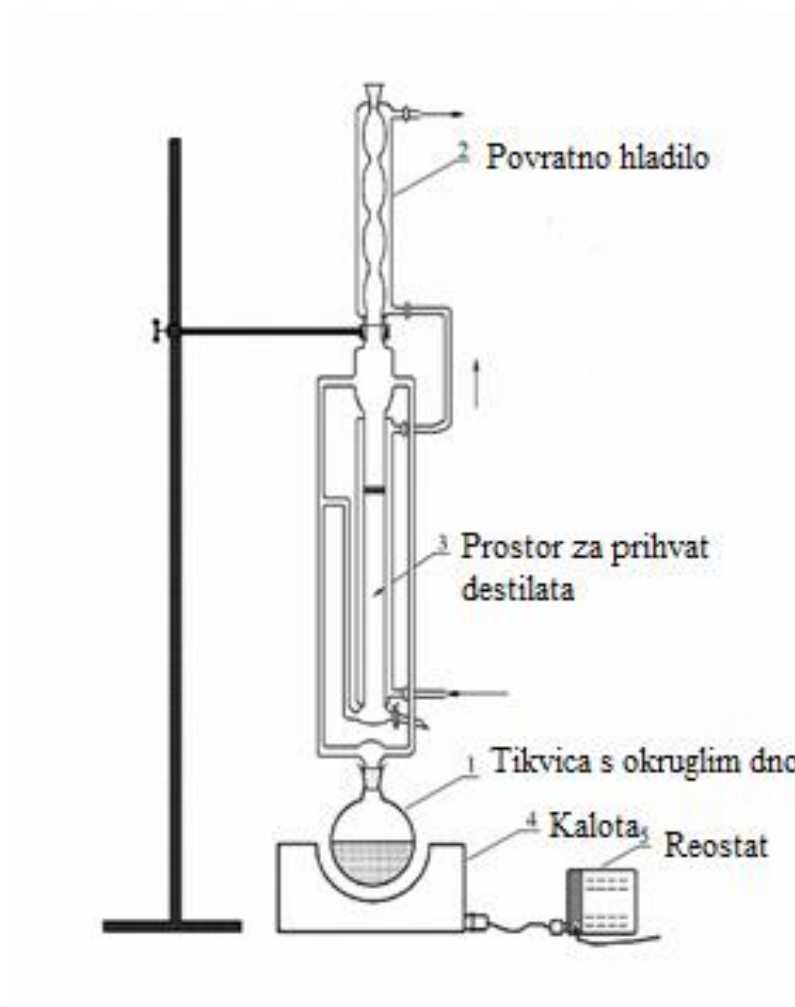
Destilacija je fizikalni proces kojim se homogene smjese odjeljuju s obzirom na razliku u temperaturama vrelišta njihovih komponenti. Razlikuje se vodena, vodeno-parna i parna destilacija. Sve tri metode se zasnivaju na istim principima, a razlika je u kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.<sup>7</sup> Destilacija kao metoda izdvajanja hlapljivih spojeva ima niz prednosti naspram ostalih metoda izolacije, budući da ne sadrži neisparljive spojeve koje mogu interferirati kod analiza.<sup>4</sup>

#### **1.4.1.1. Vodena destilacija**

Vodena destilacija (hidrodestilacija) se najčešće koristi za izolaciju eteričnih ulja. Prethodno usitnjeni biljni materijal se postavlja u tikvicu s vodom te se zagrijava do vrenja. Većina komponenti eteričnih ulja su organske tvari koje se s vodom ne miješaju, ali isparavaju s vodom jer imaju nižu temperaturu vrenja. Smjesa vode i komponenti eteričnog ulja zajedno dolaze do hladila gdje se kondenziraju i sakupljaju u središnjem dijelu aparature. Modificirana aparatura po Clevengeru (slika 7.) koja je korištena u ovom radu, omogućava odvajanje komponenti eteričnog ulja od vode na temelju razlika u polarnosti, a time i topljivosti. Središnja cijev aparature je u donjem dijelu ispunjena destiliranom vodom, a u gornjem organskim otapalom ili smjesom organskih otapala. Prilikom prolaska kondenzirane smjese vode i komponenti eteričnog ulja kroz organsko otapalo, s obzirom na sličnost u polarnosti, komponente eteričnog ulja zaostaju u njemu, dok voda neometano prolazi. Na taj način se prikuplja eterično ulje koje se pipetom uklanja kroz gornji otvor, a voda se ispušta kroz pipac na dnu aparature.<sup>8</sup> Važno je



naglasiti da se pri usitnjavanju materijala mora paziti na granulaciju, dakle materijal ne smije biti ni previše ni premalo usitnjen. Prekrupan materijal može povećati vrijeme destilacije, dok onaj presitan može dovesti do nastajanja artefakata.<sup>4</sup>



**Slika 7.** Modificirana aparatura po Clevengeru.<sup>4</sup>

## 1.4.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koja omogućava izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Temelji se na topljivosti tvari u ekstrakcijskom otapalu. Najčešće se kao otapala koriste voda i organska otapala petroleter, pentan, dietil-eter i diklormetan.<sup>7</sup>

Otapala za ekstrakciju moraju zadovoljavati slijedeće uvjete:

- otapalo mora biti kemijski inertno,
- gustoće matične otopine tvari i korištenog otapala se moraju razlikovati,
- poželjno je da ima što nižu temperaturu vrenja kako bi se lakše uklonilo,
- otapalo mora imati visoku moć otapanja tvari koju je potrebno izolirati,
- važna je i dostupnost te niska cijena korištenog otapala.<sup>7</sup>

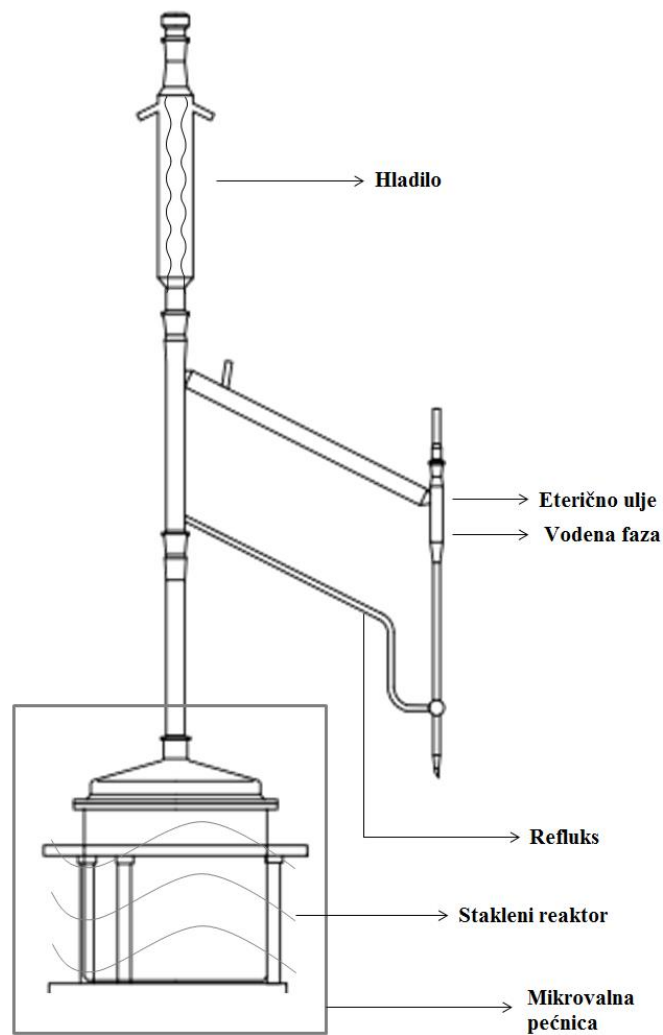
Osim klasičnih metoda ekstrakcije iz tekuće ili čvrste faze danas su sve više prisutne moderne metode kao što su ultrazvučna i mikrovalna ekstrakcija (s otapalom i bez) te ekstrakcija subkritičnim i superkritičnim otapalima.<sup>9</sup>

### 1.4.2.1. Mikrovalna ekstrakcija

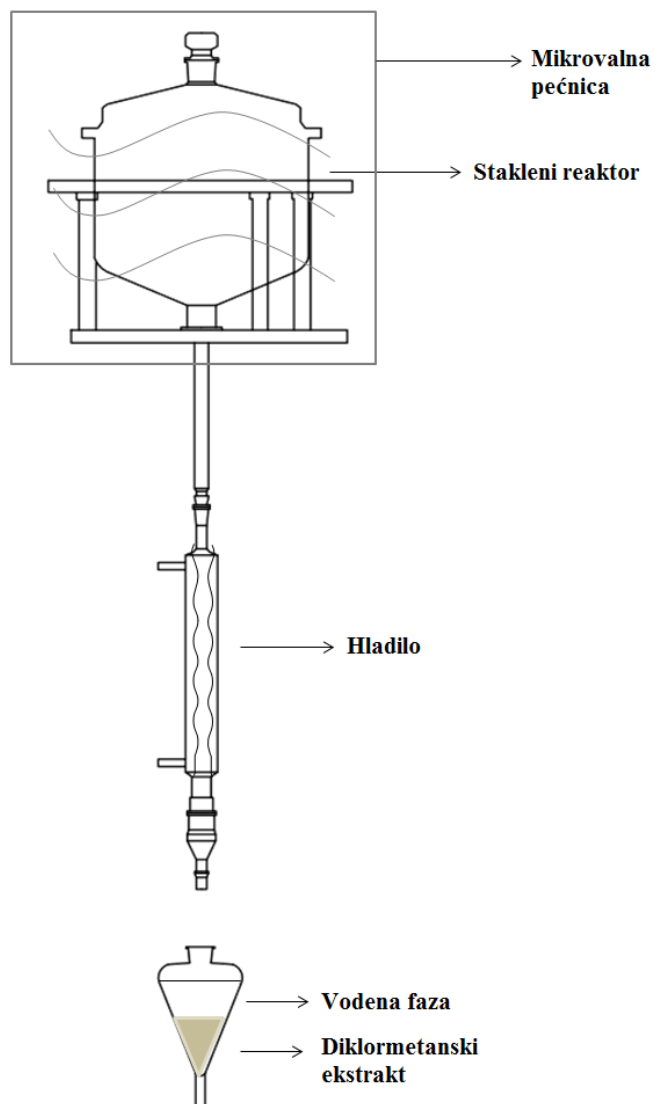
Mikrovalna ekstrakcija (engl. *Microwave-assisted extraction, MAE*) je nova metoda ekstrakcije koja ima brojne prednosti u odnosu na klasične metode, a to su kraće vrijeme ekstrakcije, mogućnost ekstrakcije bez korištenja otapala i poboljšani ekstrakcijski prinos. Uz brojne pozitivne, potrebno je obratiti pažnju i na negativne učinke kao što je povišena temperatura koja može negativno utjecati na termolabilne, biološki aktivne spojeve.<sup>9</sup>

Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja frekvencije oko 2450 MHz. Imaju sposobnost prodiranja u biološki materijal i utječu na polarne molekule u biološkom materijalu kao što je voda te proizvode toplinu. Postoji više izvedbi mikrovalnih sustava za ekstrakciju, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi te u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Mikrovalna ekstrakcija bez korištenja otapala (engl. *Solvent free microwave extraction, SFME*) je pravi primjer zelene tehnologije. SFME je kombinacija mikrovalnog zračenja i suhe destilacije, provodi se pri atmosferskom tlaku, bez dodatka otapala. Na slici 8.

shematski je prikazan gornji dio aparature u kojem se u principu provodi mikrovalna destilacija i dobiva se eterično ulje, odnosno hlapljivi spojevi. Na slici 9. prikazana je shema donjeg dijela aparature gdje se pod utjecajem hidrodifuzije i gravitacije izdvajaju arome.<sup>9,10</sup>



**Slika 8.** Sustav za mikrovalnu destilaciju eteričnih ulja.<sup>6</sup>



**Slika 9.** Sustav za mikrovalnu ekstrakciju aroma.<sup>6</sup>

### 1.4.3. Ekstrakcija glukozinolata

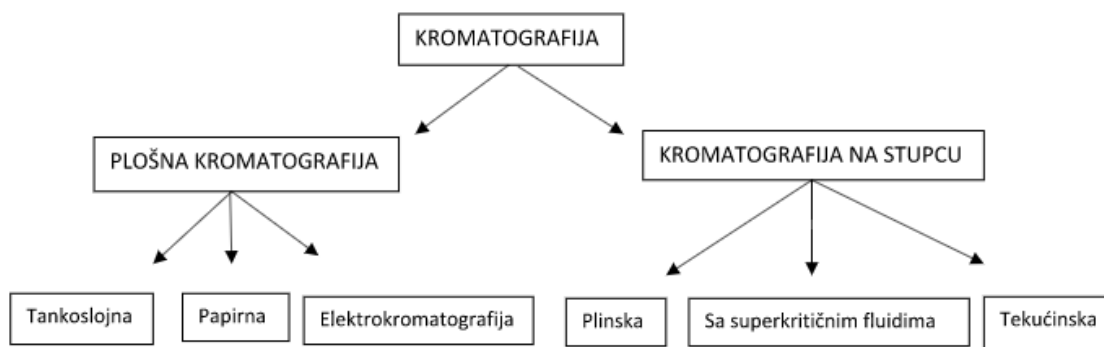
Metoda ekstrakcije glukozinolata iz biljnog materijala se sastoji od postupka ekstrakcije 70% metanolom, separacije, desulfatacije enzimom sulfatazom i kvantizacije dobivenih desulfoglukozinolata HPLC analizom.<sup>11</sup> Sulfataze su enzimi koji spadaju u skupinu esteraza i kataliziraju hidrolizu sulfatnih estera. Sulfataza (EC 3.1.6.1.), izolirana iz puža vinogradnjaka (*Helix pomatia* L.), odcjepljuje sulfatni ion iz molekule glukozinolata pri čemu nastaje desulfoglukozinolat.<sup>12,13</sup>

### 1.5. Metode identifikacije hlapljivih spojeva

Prilikom analize hlapljivih spojeva i eteričnih ulja mogu se koristiti kromatografske (plinska i tekućinska kromatografija) i spektroskopske tehnike (ultraljubičasta, UV; infracrvena, IR i nuklearna magnetska rezonanca, NMR). Prvenstveno se koristi plinska kromatografija i to najčešće u sprezi sa spektrometrijom masa i kao takva služi za odvajanje komponenti te za njihovo kvantitativno i kvalitativno određivanje u smjesi. Prednost ove analitičke tehnike ispred ostalih je u brzini i potpunijoj analizi.<sup>6</sup>

#### 1.5.1. Kromatografija

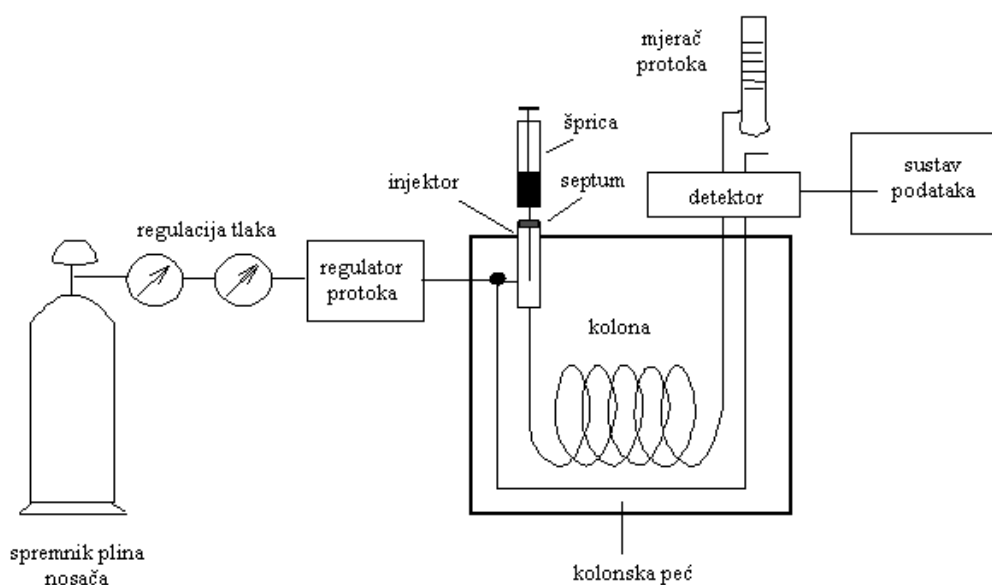
Kromatografija je metoda odvajanja koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenti uzorka između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna tekuća (tekućinska kromatografija) ili plinovita (plinska kromatografija). Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju.<sup>2</sup> Kromatografske metode se mogu podijeliti u dvije osnovne grupe, a to su plošna kromatografija i kromatografija na stupcu. Detaljnija podjela kromatografskih metoda prikazana je na slici 10.



Slika 10. Podjela kromatografskih metoda.<sup>8</sup>

### 1.5.1.1. Plinska kromatografija

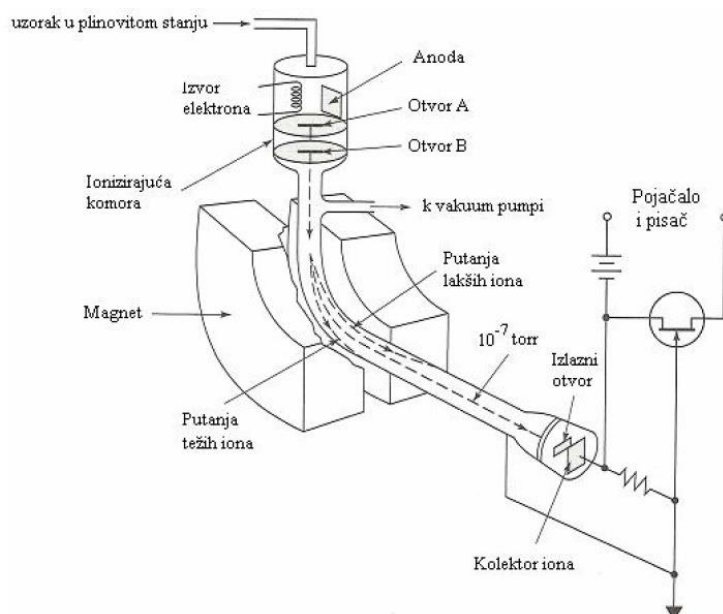
Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena tehnika odijeljivanja hlapljivih spojeva. Mobilna faza je inertni plin (He, Ne, Ar), a stacionarna faza je krutina ili kapljevinom presvučena krutina. Plinski kromatograf se sastoji od spremnika plina, injektora, kromatografske kolone u termostatiranom prostoru i detektora (slika 11.). Kao detektori se mogu koristiti uređaji koji se temelje na toplinskoj vodljivosti, plamenoj ionizaciji, fotoionizaciji, električnoj vodljivosti i najčešće spektrometriji masa. Najčešća izvedba je vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Prednosti plinske kromatografije su velika osjetljivost i mogućnost razdvajanja velikog broja tvari.<sup>9</sup>



Slika11. Shematski prikaz plinskog kromatografa.<sup>14</sup>

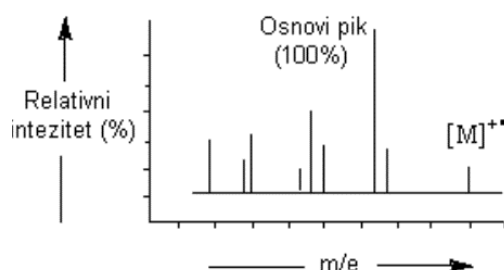
### 1.5.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je tehnika kojom se analiziraju molekule na temelju njihovog omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Glavni dijelovi spektrometra masa su ionizator, analizator i detektor (slika 12.). Prvi korak pri analizi molekula je ionizacija molekula u ionizatoru. Nastali ioni se provode kroz analizator, koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu. Iz analizatora, ioni idu na detektor gdje proizvode analitički signal koji se registrira na računalu.<sup>6</sup>



**Slika 12.** Shema spektrometra masa.<sup>4</sup>

Uzorak u plinskoj fazi ulazi u ionizator gdje se u slučaju elektron-ionizacije bombardira elektronima energije 70 eV. Nastaje molekularni kation koji se dalje razlaže na čitav niz fragmenata. O strukturi molekule ovisi koji fragmenti će nastati i u kojem intenzitetu. Kao rezultat analize u spektrometru masa dobije se spektar masa s odnosom intenziteta i omjera  $m/z$  nastalih fragmenata (slika 13.).<sup>9</sup>

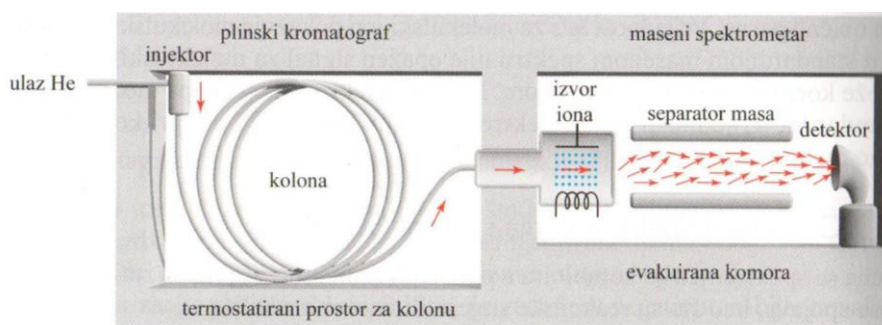


**Slika 13.** Spektar masa.<sup>4</sup>

### 1.5.2.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Kombinacijom plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS), (slika 14.), postižu se još bolje mogućnosti analize (dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala). Plinska kromatografija je izvrsna metoda za odvajanje i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje pa se za to koristi spektrometrija masa. Obje metode rade s uzorkom u plinovitom stanju, a karakteristični podaci za izdvojeni spoj su njegovo vrijeme zadržavanja i površina pika koja je proporcionalna količini spoja te odgovarajući maseni spektar. Prednost vezanog sustava

je brzina snimanja spektra te velika osjetljivost. Dobiveni maseni spektar se uspoređuje s masenim spektrom dotičnog spoja koji se nalazi u Wileyevoj banci masenih spektara. Iako je GC/MS tehnika vrlo osjetljiva, poteškoće u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi može izazvati slaba hlapljivost nekih spojeva ili njihova nestabilnost pri povišenim temperaturama.<sup>4,9</sup>



**Slika 14.** Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS.<sup>15</sup>

### 1.5.3. Tekućinska kromatografija

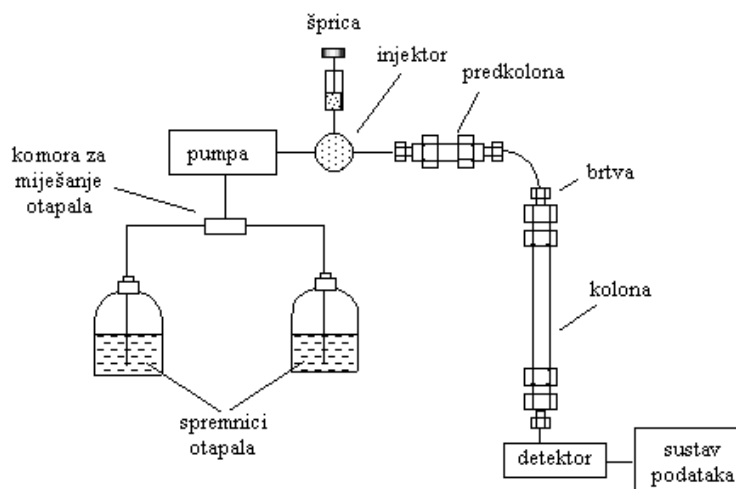
Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) temelji se na razdvajanju tvari na osnovi razmjesta između čvrste stacionarne faze i tekuće mobilne faze. Prikladna je za odjeljivanje analita male i velike molekulske mase, termički nestabilnih i biološki aktivnih spojeva. Postoje dvije vrste tekućinske kromatografije, klasična i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Kod klasične kromatografije se koriste veliki stupci (kolone) punjeni poroznim materijalom koji predstavlja stacionarnu fazu, dok mobilna faza prolazi pod utjecajem gravitacije. Ipak u većini slučajeva koristi se suvremenija analitička tehnika HPLC kod koje se dovođenjem mobilne faze pomoću pumpe postiže kvalitetnije razdvajanje komponenti.<sup>9</sup>

#### 1.5.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je vrsta tekućinske kromatografije kod koje su za postizanje velikih brzina protoka potrebni vrlo visoki tlakovi.<sup>6</sup>



Osnovni dijelovi HPLC-a su spremnik mobilne faze, injektor, kolona, pumpa koja pokreće mobilnu fazu kroz kolonu, detektor i sustav za obradu otpada (slika 15.).



**Slika 15.** Shematski prikaz HPLC-a.<sup>11</sup>

Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće (bez otopljenih plinova ili suspendiranih čestica). Uzorak se unosi u sustav za injektiranje mikrolitarskom špricom kroz ventil. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u bilo kojoj kombinaciji (npr. voda, metanol, organska otapala, itd.). Korištenje visokog tlaka povećava linearnu brzinu i daje komponentama manje vremena za zadržavanje, što poboljšava rezoluciju kromatograma. Od detektora se najčešće koristi UV-VIS (engl. *Ultraviolet-visible*) ili DAD (engl. *Diode Array Detector*) detektor, ali mogu se koristiti i detektor indeksa loma, fluorescentni, elektrokemijski ili neki drugi detektor.<sup>11</sup>

## 1.6. Brassicaceae

Kupusnjače (lat. *Brassicaceae*) je biljna porodica iz razreda Eudicotiledona, poznata i pod nazivom krstašice (lat. *Cruciferae*). Porodica obuhvaća više od 300 rodova i preko 3000 vrsta od kojih većina uspijeva na području umjerene klime, ali i u tropskom i u suptropskom području. Mnoge kupusnjače uzgajaju se od najranijih početaka ljudske civilizacije, čak i otprije 8000 godina i važne su gospodarske biljke. Najznačajnije povrće i krmne biljke porodice jesu pojedine svojte *Brassica* s golemim brojem varijeteta, no i mnoge druge. Za cijelu porodicu je karakteristična ljutina koja potječe od glukozinolata, koji djelovanjem enzima mirozinaze daju niz razgradnih produkata odgovornih za gorke-ljuti okus. Porodica je karakterizirana jedinstvenom građom prostolatičnih, dvospolnih cvjetova, koji se sastoje od 4 lapačaške, 4 latice vjenčića

položene po dvije unakrst, 6 prašnika i tučka s nadraslom plodnicom, iz koje nastaje plod komuška ili komuščica.<sup>4</sup>

### 1.6.1. Dvoredac (*Diplotaxis erucooides*)

*Diplotaxis erucooides* (slike 16. i 17.), poznata još kao dvoredac, nalazimo na pješčanom tlu ilovače i gline (neutralna i alkalna tla). U Hrvatskoj je rasprostranjena samo u srednjoj Dalmaciji, premda je vrsta podrijetlom iz sredozemnog bazena (sjeverna Amerika, Azija i zapadna Europa). Cvjetovi se sastoje od 4 lapa duga 3-4 mm te bijelih latica. Cvijet ima 6 prašnika, od kojih su dva vanjska kraća od 4 unutarnja. Cvjetovi su grupirani u grozdove. Cvijeta tijekom cijele godine. Naraste do pola metra. Plod je stršeća komuška široka do 3 mm i duga do 50 mm. Jestivi dio je najčešće lišće.<sup>16</sup>



Slika 16. *Diplotaxis erucooides*<sup>17</sup>.



**Slika 17.** *Diplotaxis erucoides* (cvijet)<sup>17</sup>.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni material

#### 2.1.1. Dvoredac

Biljni materijal (slika 18.) prikupljen je 1. travnja 2019. na području Grippa, Split. Materijal je usitnjen i odvojen na 5 dijelova (korijen, cvijet, komuške, list i stabljika) za autolizu te ekstrakciju i kvantizaciju glukozinolata. Cjeloviti biljni materijal korišten je za mikrovalnu destilaciju (MW - "*fragrance*") i mikrovalnu ekstrakciju (MW - "*flavour*") te za klasičnu hidrodestilaciju modificiranoj aparaturi po Clevengeru. U tablici 1. prikazane su točne odvage biljnog materijala koje su korištene u pojedinoj metodi.

**Tablica 1.** Mase biljnog materijala dvoredca.

<b>METODA</b>	<b>MASA (g)</b>
Mikrovalna destilacija	140,42
Mikrovalna ekstrakcija	137,55
Hidrodestilacija 1	97,00
Hidrodestilacija 2	78,00
Ekstrakcija glukozinolata:	
<i>Korijen</i>	0,10004
<i>Cvijet</i>	0,10010
<i>Komuška</i>	0,09990
<i>List</i>	0,10000
<i>Stabljika</i>	0,10009
Autoliza:	
<i>Korijen</i>	10,50
<i>Cvijet</i>	5,60
<i>Komuška</i>	9,92
<i>List</i>	7,86
<i>Stabljika</i>	12,70



Slika 18. Dvoredac na mjestu sabiranja.



Slika 19. Uzorci dvoredca nakon mljevenja.

## 2.2. Metode izolacije

### 2.2.1. Mikrovalna destilacija i ekstrakcija

Kemikalije:

- pentan (97%), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
- diklormetan (99,9%), T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- bezvodni natrijev sulfat (99,8%), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- destilirana voda

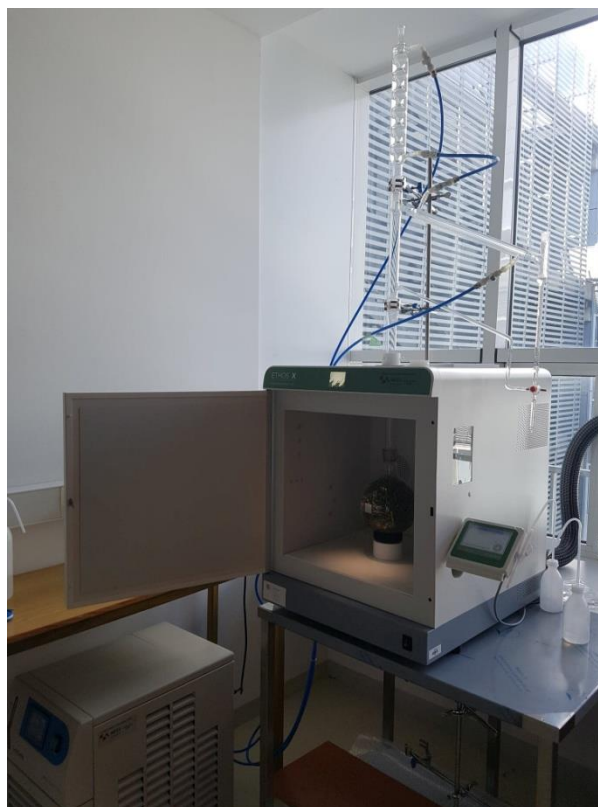
Aparatura:

- tehnička vaga, Kern&Sohn, Njemačka
- tikvica s okruglim dnom
- staklena posuda s poklopcem
- uređaj za mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju, Ethos X; Milestone
- modificirani nastavci za mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju
- kuglasta hladila
- staklene čaše
- bočice

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju sastoji se od dva dijela i u skladu s tim omogućava dvije vrste izolacije: mikrovalnu destilaciju i mikrovalnu ekstrakciju. Biljni materijal dvoredca je obrađen na oba načina.

Gornji dio aparature (slika 20.) omogućava izolaciju hlapljivih spojeva (engl. *fragrance*). Radi se o procesu mikrovalne destilacije čiji je konačni produkt eterično ulje. Za razliku od hidrodestilacije, destilaciju potpomognutu mikrovalovima odlikuje znatno kraće vrijeme destilacije i kod nje nema upotrebe organskog otapala.





**Slika 20.** Uređaj za mikrovalnu destilaciju (gornji dio, engl. *fragrance*).

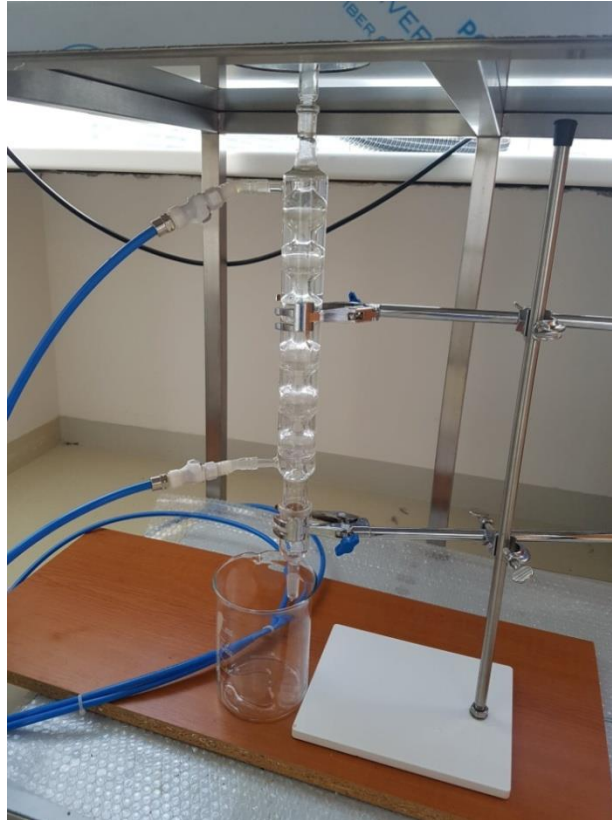
Usitnjeni biljni materijal se stavi u staklenu posudu koja se zatvori poklopcem. Na posudu se poveže sustav za refluks te hladilo. U desnu vertikalnu cijev se napuni voda te se doda mala količina pentana kao “*trap*” za hlapljive spojeve. Uvjeti pri kojim se izvodi destilacija su bili snaga od 500 W i temperatura 98 °C u trajanju od 35 minuta. Nakon završetka destilacije, sloj pentana i hlapljivih spojeva se odvoji propipetom i prebaci u čistu čašu, a ostatak vode ispusti preko pipca. Sadržaj čaše suši se s bezvodnim natrijevim sulfatom u slučaju da ima zaostale vode, nakon čega se eterično ulje prebaci u prethodno izvaganu bočicu. Dio organskog otapala zaostalog u uzorku se uklanja uparivačem u struji dušika, a uzorak se do analize čuva u zamrzivaču pri -22 °C. Na slici 21. prikazan je biljni materijal dvoredca prije i poslije izlaganja mikrovalovima.



**Slika 21.** Biljni materijal prije i poslije mikrovalne destilacije.

Donji dio aparature (slika 22.) omogućava izolaciju aroma (engl. *flavour*). Riječ je o mikrovalnoj ekstrakciji bez dodatka organskog otapala., pri čemu se djelovanjem mikrovalova i pod utjecajem gravitacijske sile, u čaši postavljenoj na dnu aparature, sakuplja ekstrakt. Uvjeti primjenjeni za ovaj tip ekstrakcije su su bili identični navedenima (500 W, 98 °C, 35 minuta).





**Slika 22.** Mikrovalna ekstrakcija uz gravitacijsku silu (donji dio, engl. *flavour*).



**Slika 23.** Biljni materijal prije i poslije mikrovalne ekstrakcije.

Zbog uočenog izgaranja (slika 24.) ekstrakcija je zaustavljena nakon 7 min zbog naglog porasta temperature na 97 °C što je rezultiralo pougljenjem biljnog materijala. U tom vremenu sakupljeno je oko 200 mL ekstrakta. Dobiveni se ekstrakt prelije u lijevak za odijeljivanje te se hlapljivi spojevi ekstrahiraju 2 puta s po 10 mL diklormetana (slika 25.). Diklormetanski sloj se odvoji, suši s bezvodnim natrijevim sulfatom i konačni ekstrakt se prebaci u prethodno izvaganu bočicu. Višak otapala se, kao i kod mikrovalne ekstrakcije, ukloni u struji dušika, a uzorci se skladište na -22°C do GC-MS analize.



**Slika 24.** Pougljenje biljnog materijala tijekom mikrovalne ekstrakcije pri 97 °C.



**Slika 25.** Obrada ekstrakta nakon mikrovalne ekstrakcije<sup>6</sup>.

## 2.2.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Kemikalije:

- diklormetan (99,9%), T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- bezvodni natrijev sulfat (99,8%), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- destilirana voda

Aparatura:

- tehnička vaga, Kern&Sohn, Njemačka
- električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- Erlenmeyerova tikvica s brušenim čepom
- lijevak za odjeljivanje
- staklene čaše
- bočice

Usitnjeni i prethodno izvagani biljni materijal postavljen je u tikvicu s ravnim dnom i prekriven destiliranom vodom. Tikvice su začepljene i obložene parafilmom te ostavljene 24 sata pri sobnoj temperaturi (slika 26.). Nakon toga je napravljena ekstrakcija diklormetanom (slika 27.). Prvih 10 mL diklormetana dodano je direktno u tikvicu s biljnim materijalom te se smjesa miješala desetak minuta, nakon čega je filtrirana. Filtrat je prebačen u lijevak za odijeljivanje te je ekstrakcija ponovljena još 2 puta s obrocima od 10 mL diklormetana. Diklormetanski sloj se odvoji i suši s bezvodnim natrijevim sulfatom, nakon čega slijedi dekantiranje u prethodno izvaganu bočicu. Višak organskog otapala uklanja se u struji dušika, a svi dobiveni uzorci su do analize čuvani u zamrzivaču.



**Slika 26.** Autoliza pojedinog biljnog dijela (24 h).



**Slika 27.** Ekstrakcija diklormetanom.

### 2.2.3. Hidrodestilacija

Kemikalije:

- dietil-eter (99,7%), PanreacQuimica S.L.U., Barcelona, Španjolska
- pentan (97%), Lach-Ner, Neratovice, Češka Republika
- bezvodni natrijev sulfat (99,8%), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- destilirana voda

Aparatura:

- tehnička vaga, Kern&Sohn, Njemačka
- tikvica s okruglim dnom, Deotto lab d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- modificirana aparatura po Clevengeru, Deotto lab d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- kuglasta hladila, Deotto lab d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- kalote za zagrijavanje, Witeg, Wertheim, Njemačka
- staklene čaše
- bočice

Provedena je hidrodestilacija iz biljnog materijala drvoredca u modificiranoj aparaturi po Clevengeru (slika 28.) u trajanju od 2,5 sata. Kao “*trap*” je korištena smjesa pentana i dietiletera u omjeru 3:1. Nakon destilacije eterično ulje je odvojeno od vodenog sloja, višak vode je uklonjen bezvodnim natrijevim sulfatom te je ulje pebačeno u prethodono izvaganu bočicu i čuvano u zamrzivaču do GC-MS analize. Na slici 29. prikazan je biljni materijal nakon provedene hidrodestilacije.



**Slika 28.** Hidrodestilacija dvoredca.



**Slika 29.** Biljni materijal nakon provedene hidrodestilacije.



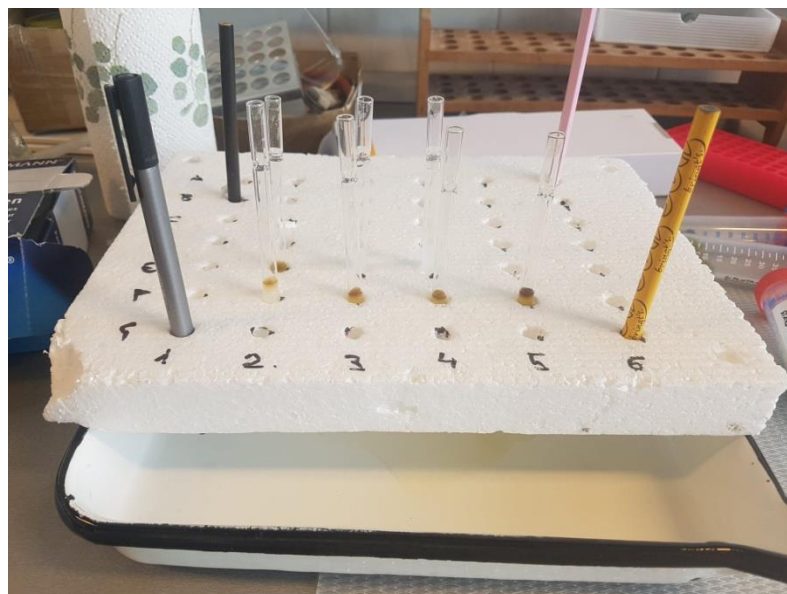
#### 2.2.4. Ekstrakcija glukozinolata

Kemikalije:

- metanol (70%), Gram-Mol d.o.o , Zagreb, Hrvatska
- natrijev acetat (>99%), Merck, Darmstadt, Njemačka
- dekstran (DEAE – sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- sulfataza (*iz Helixpomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- ultračista voda

Aparatura:

- analitička vaga, Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, SAD
- električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- homogenizator, OMNI Int. Kennesaw GA, SAD
- vortex, DLAB Scientific Co., Ltd, Peking, Kina
- vodena kupelj, Julabo, Seelbach, Njemačka
- ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka
- centrifuga, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka



**Slika 30.** Kolonice za ekstrakciju glukozinolata



**Slika 31.** Koraci prilikom ekstrakcije glukozinolata

Protokol za izolaciju glukozinolata uz desulfataciju korišten u ovom radu je identičan onom u diplomskom radu kolegice Dine Vlajčević (2018.) pod nazivom *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata*.<sup>6</sup>



Odvaže se po 100 mg prethodno na zraku osušenog i samljevenog lista, cvijeta, korijena, komuške i stabljike (slika 19.) te se u svaku tubicu doda po 1 mL metanola kao ekstrakcijskog otapala. Pomoću homogenizatora (15000 okretaja u 1 min) smjesa se homogenizira kako bi se biljni materijal još više ošteti jer se time povećava ekstrakcijska učinkovitost. Tako homogenizirana otopina u tubicama kratko (5 min) se zagrijava na 90 °C kako bi metanol provrio čime se inaktivira mirozinaza i sprječava razgradnja glukozinolata. Da bi se ekstrakcija još dodatno poboljšala, tubice se stavljaju u ultrazvučnu kupelj tijekom 15 minuta. Slijedi centrifugiranje i odvajanje dobivenog supernatanta od istaloženog biljnog materijala mikropipetom. Postupak se ponovi još jednom dodatom novog obroka metanola u zaostali biljni materijal. Ovako tretiran biljni materijal zahtjeva pročišćavanje i desulfataciju. Nakon toga uzorci su spremni za HPLC analizu.

Pročišćavanje se provodi na kolonicama (slika 30.) koje čine staklene kapaljke napunjene samljevenim filter papirom i slojem dekstran gela. Ovako združeni ekstrakti nanose se na kolonice, dodaje se metanol koji uklanja različite polarne tvari, a zatim se dodaje ultračista voda kojom se uklanja metanol. Djelovanje enzima sulfataze ostvaruje se nanošenjem pufera. Nakon dodatka enzima, kolonice pokrivene aluminijskom folijom ostavljaju se preko noći na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Dobiveni uzorci i referentni uzorci sinigrina prebačeni su u vialice za HPLC te su do analize čuvani u zamrzivaču na -22 °C.

## 2.3. Analiza

### 2.3.1. GC-MS analiza

Za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju hlapljivih sumporovih spojeva korišten je vezani sustav plinske kromatografije (Varian Inc., Lake Forest, CA, USA model 3900) i spektrometrije masa (Varian Inc. model 2100 T, slika 32.). Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS (30 m × 0,25 mm., debljina sloja stacionarne faze je 0,25 μm). Plin nositelj je helij, a postavljeni protok je 1 mL/min. Temperatura injektora je postavljena na 250 °C, a volumen injektiranog uzorka iznosi 1 μL. Temperatura kolone je postavljena na slijedeći način: 3 min izotermno na 60 °C, zatim je uslijedilo zagrijavanje na 246 °C brzinom od 3 °C/min te zadržavanje navedene temperature u trajanju 25 min. Energija ionizacije uzorka u spektrometru masa iznosi 70 eV, temperatura izvora iona je postavljena na 200 °C, a područje skeniranja obuhvaća 40-350 masenih jedinica.



**Slika 32.** Korišteni GC-MS<sup>6</sup>.

### 2.3.2. HPLC analiza desulfoglukozinolata

Za analizu desulfoglukozinolata dobivenih ekstrakcijom uz desulfataciju korišten je vezani sustav HPLC-DAD, Hewlett Packard 1090 Series II (slika 33.). Stacionarnu fazu predstavlja C-18 kolona (250 mm × 4 mm, 5 μm), dok je mobilna faza smjesa vode i acetonitrila. Uvjeti rada dani su u tablici 2., a sastav mobilne faze u tablici 3.

**Tablica 2.** Parametri HPLC analize.

<b>Kolona</b>	C-18 (250mm × 4mm) 5µm
<b>Pokretna faza</b>	Voda, acetonitril
<b>Protok</b>	0,8 mL/min
<b>Volumen injektiranja</b>	20 µL
<b>Detektor</b>	UV-DAD
<b>Temperatura</b>	Sobna
<b>Vrijeme analize</b>	60 min

**Tablica 3.** Sastav mobilne faze korištene za HPLC analizu desulfoglukozinolata.

<b>Vrijeme / min</b>	<b>Voda</b>	<b>Voda-Acetonitril (70%/30%)</b>	<b>Gradijent</b>
0	100	0	/
0,5	96	4	/
28,0	14	86	Linearno
32,0	14	86	/
34,0	5	95	Linearno
47,0	5	95	/
48,0	96	4	Linearno
60,0	100	0	/



**Slika 33.** Korišteni HPLC-DAD.

### **3. REZULTATI I RASPRAVA**

U ovom radu istraživani su glukozinolati biljne vrste dvoredac (*Diplotaxis eruroides* L. DC.) sabranog na području Splita. Identifikacija ovih spojeva izvršena je na dva načina: indirektnom i direktnom metodom. Korištena indirektna metoda se sastoji od termičke ili enzimske razgradnje glukozinolata, izolacije njihovih hlapljivih razgradnih produkata hidrodestilacijom, destilacijom ili ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima. Hlapljivi izolati analizirani su spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS). Direktna metoda podrazumijeva ekstrakciju glukozinolata iz sušenog biljnog materijala, pročišćavanje ekstrakta i desulfataciju uz enzim sulfatazu kao pripremu za analizu tekućinskom kromatografijom.

#### **3.1. Razgradnja glukozinolata i GC-MS analiza**

Termička razgradnja provedena je konvencionalnom metodom hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata na temperaturi od 100 °C prilikom čega je biljni materijal bio uronjen u vodu. U svrhu usporedbe s opisanom metodom, pristupilo se i novijoj, nekonvencionalnoj metodi destilacije primjenom mikrovalnog zračenja snage 500 W, tijekom 35 minuta i pri temperaturi 98 °C. Za razliku od hidrodestilacije, kod ove metode biljni materijal nije uronjen u vodu, već se destilacija temelji na apsorpciji mikrovalova od strane vode sadržane u biljnom materijalu.

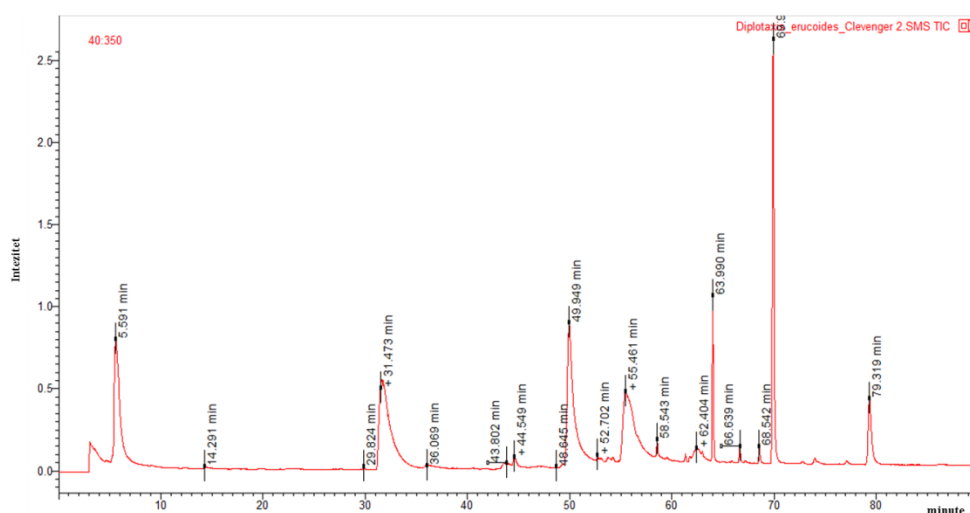
Provedena je i autoliza svih dijelova biljnog materijala pojedinačno tijekom 24 h pri sobnoj temperaturi te su hlapljivi spojevi ekstrahirani diklormetanom u lijevku za odijeljivanje. Kao i kod destilacije, i ovdje je konvencionalna ekstrakcija uspoređena s mikrovalnom hidrofuzijom uz gravitaciju (mikrovalna ekstrakcija) primjenom snage mikrovalova od 500 W, a zadano je vrijeme od 35 minuta. Budući da je biljni materijal prilikom sabiranja već bio djelomično suh, ubrzo nakon početka primjene mikrovalnog zračenja temperatura je dosegla 97 °C, prisutna voda je nestala i došlo je do pougljenjivanja uzorka zbog čega je postupak prekinut nakon 7 minuta. Ekstrakcija je ponovljena s novom količinom biljnog materijala prethodno namakanom u destiliranoj vodi, ali i ovog puta je bilo nužno ranije od predviđenog prekinuti zbog visoke temperature u sustavu. Kod destilacije ovakav scenarij je izbjegnuto zbog toga što tijekom destilacije kondenzacijom dolazi do povratka vode u tikvicu te je materijal neprekidno vlažan. Mikrovalnom ekstrakcijom je dobiven ekstrakt koji je smjesa različitih spojeva, a za izolaciju hlapljivih potrebno je dodatno napraviti ekstrakciju

diklormetanom u lijevku za odijeljivanje. Svi uzorci dobiveni u ovom dijelu istraživanja podvrgnuti su GC-MS analizi.

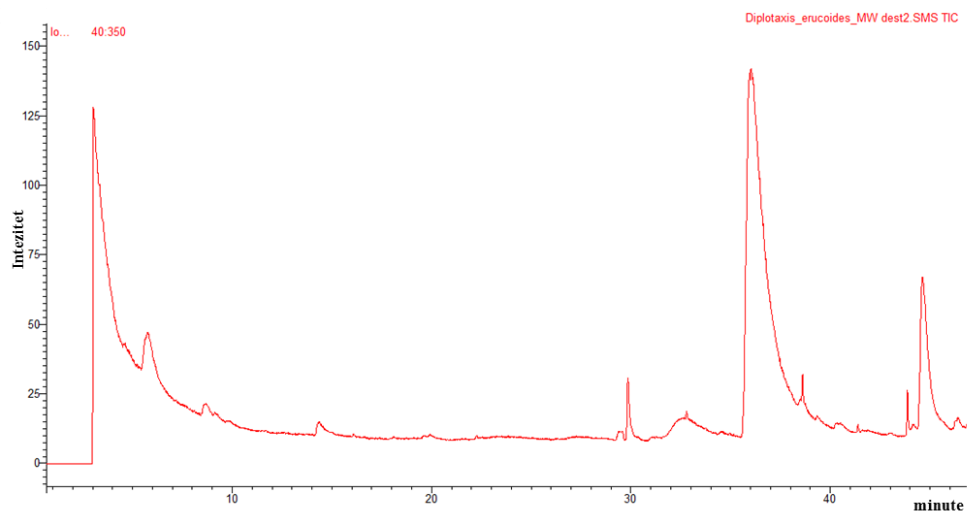
### 3.1.1. GC-MS analiza

Uzorci dobiveni termičkom hidrolizom analizirani su GC-MS tehnikom i na taj način su dobiveni kromatogrami (slika 34.-37.) ukupne ionske struje za svaki uzorak. Analizom kromatograma dobiveni su: vremena zadržavanja svake komponente od interesa, relativni udjeli pojedinih komponenti izraženi u postotcima te identifikacija spojeva čiji su spektri masa najbližnji spektrima masa nepoznatih komponenti sadržanih u našim uzorcima.

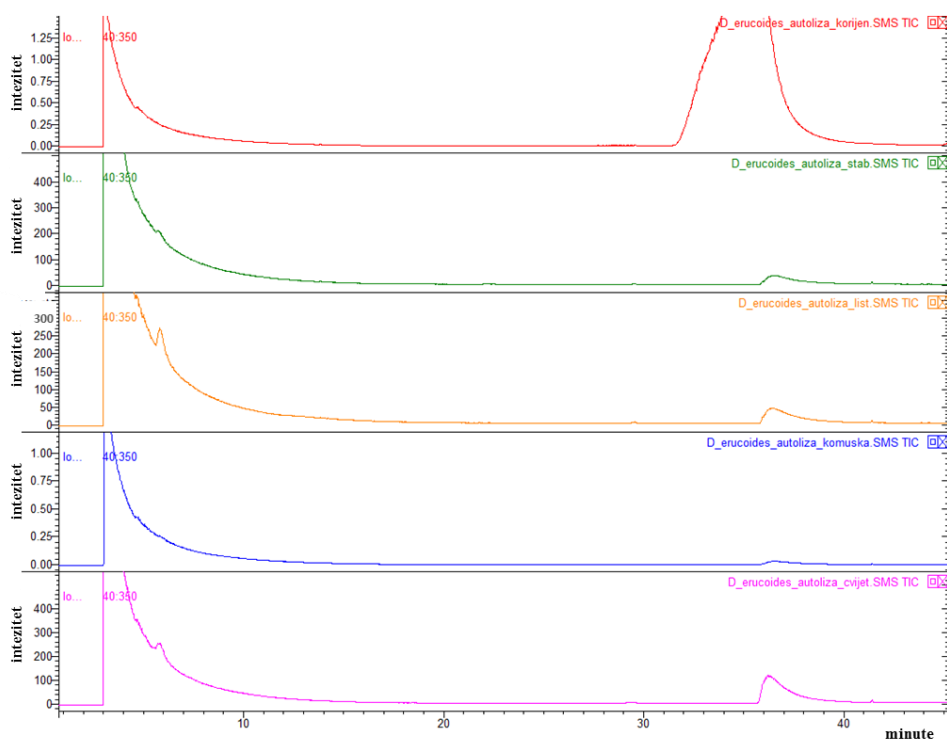
Razgradni produkti glukozinolata koji su uspješno identificirani usporedbom spektara masa pojedinih komponenti sa spektrima masa iz biblioteke po Wiley-u te glukozinolati od kojih potječu su prikazani u tablici 4.



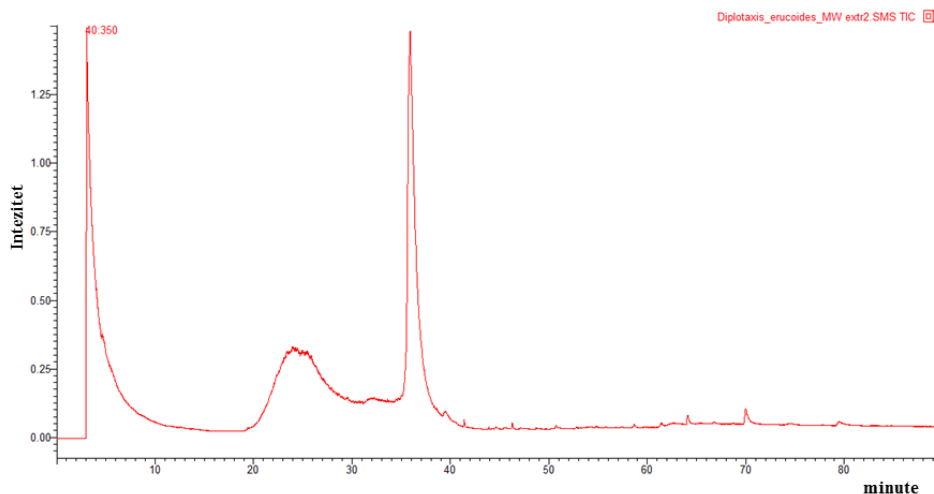
**Slika 34.** Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja dvoredca dobivenog hidrodestilacijom.



**Slika 35.** Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja dvoredca dobivenog mikrovalnom destilacijom.



**Slika 36.** Kromatogram ukupne ionske struje diklormetanskog ekstrakta nakon autolize.



**Slika 37** . Kromatogram ukupne ionske struje ekstrakta dobivenog mikrovalnom hidrodifuzijom uz gravitaciju.

**Tablica 4.** GC-MS analiza razgradnih produkata dvoredca dobivenih različitim metodama izolacije.

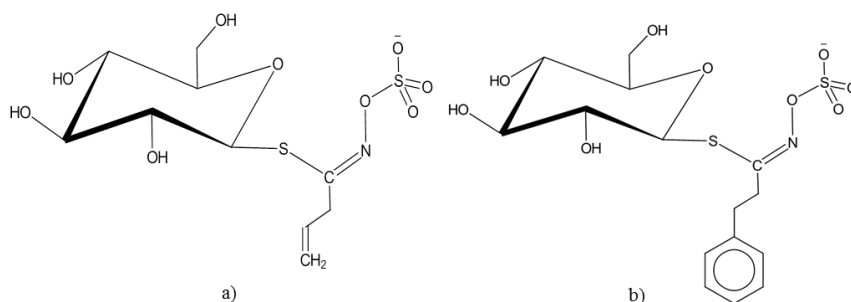
Glukozinolat / Identificirani razgradni product	Rt (min)	HD (%)	MWD (%)	MWE (%)	Autoliza (%)				
					Korijen	Cvijet	Komuška	List	Stabljika
<b>Sinigrin</b> / Alil-izotiocijanat	5,8	21,60	0,29	-	-	6,68	0,52	7,75	1,98
<b>Glukonasturcin</b> / 2-Fenilet-il- izotiocijanat	31,7	29,50	0,79	Tr	-				

Rt, vrijeme zadržavanja; -, nije identificiran.; Tr, tragovi.

HD, hidrodestilat; MWD, mikrovalni destilat; MWE, mikrovalni ekstrakt dobiven iz cijelog biljnog materijala (korijen, cvijet, komuška, list, stabljika)

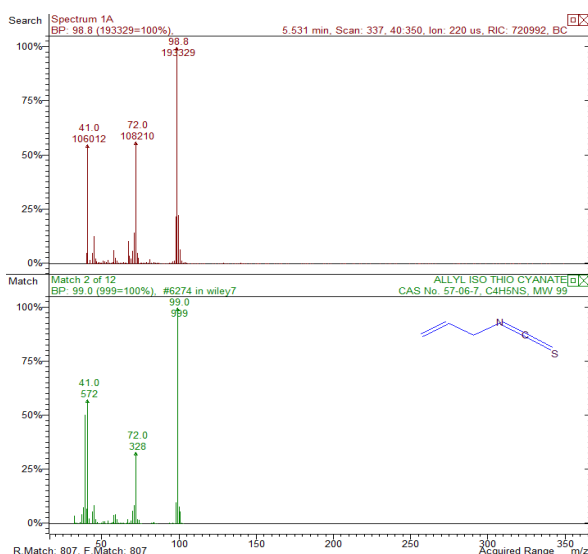
Analiza kromatograma ukupne ionske struje za destilate i identifikacija pikova od interesa, pokazala je da su najzastupljeniji hlapljivi spojevi alil-izotiocijanat (razgradni produkt sinigrina, slika 38.a)) i 2-fenilet-il-izotiocijanat (razgradni produkt glukonasturcina, slika 38.b)). Udio oba spoja je bio veći kod hidrodestilacije što je vjerojatno posljedica duljeg trajanja izolacije (2,5 h) u odnosu na mikrovalnu destilaciju gdje postupak traje samo 35 minuta. Zanimljivo je da je autoliza rezultirala razgradnim produktom sinigrina, dok razgradni produkt glukonasturcina nije identificiran, dok je kod mikrovalne ekstrakcije slučaj obrnut.

Napomena: Na kromatogramu ekstrakta dobivenog mikrovalnom hidrodifuzijom uz gravitaciju uočava se veliki pik na 37. minuti, a analizom je utvrđeno da pripada ftalatu koji ulazi u sastav gume injekcijskog bloka, stoga nije uvršten u izračun površine.



**Slika 38.** a) Sinigrin; b) Glukonasturcin.

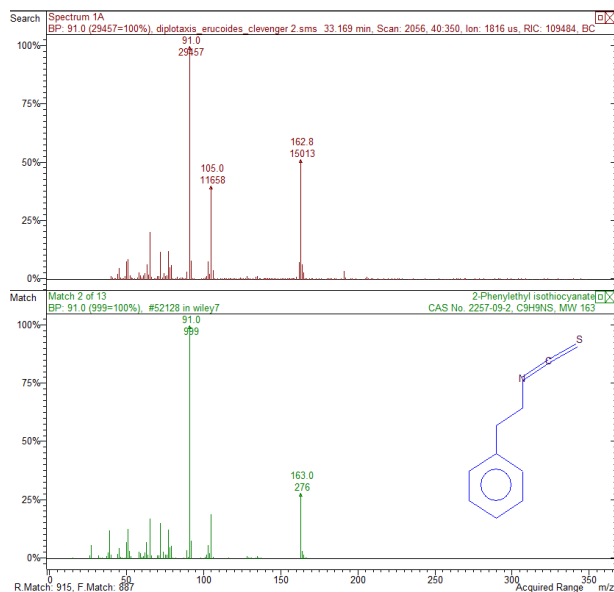
Na slici 39. je prikazan maseni spektar alil-izotiocijanata (zelenom bojom je označen spektar iz biblioteke po Wiley-u).



**Slika 39.** Spektar masa alil-izotiocijanata, razgradnog produkta sinigrina.

Na masenom spektru vidljiv je molekulski ion alil-izotiocijanata ( $m/z = 99$ ), koji ujedno predstavlja i osnovni ion (intenzitet 100%). Neparan je zbog prisustva jednog atoma dušika u molekuli. Ion karakterističan za fragmentaciju izotiocijanata je  $m/z = 72$   $[\text{CH}_2\text{NCS}]^+$  i uočava se u spektru. Vidljiv je i pik na  $m/z = 41$ , koji vjerojatno potječe od alilnog karbokationa  $[\text{CH}_2=\text{CHCH}_2]^+$ , a veći intenzitet je posljedica stabilizacije karbokationa rezonancijom.





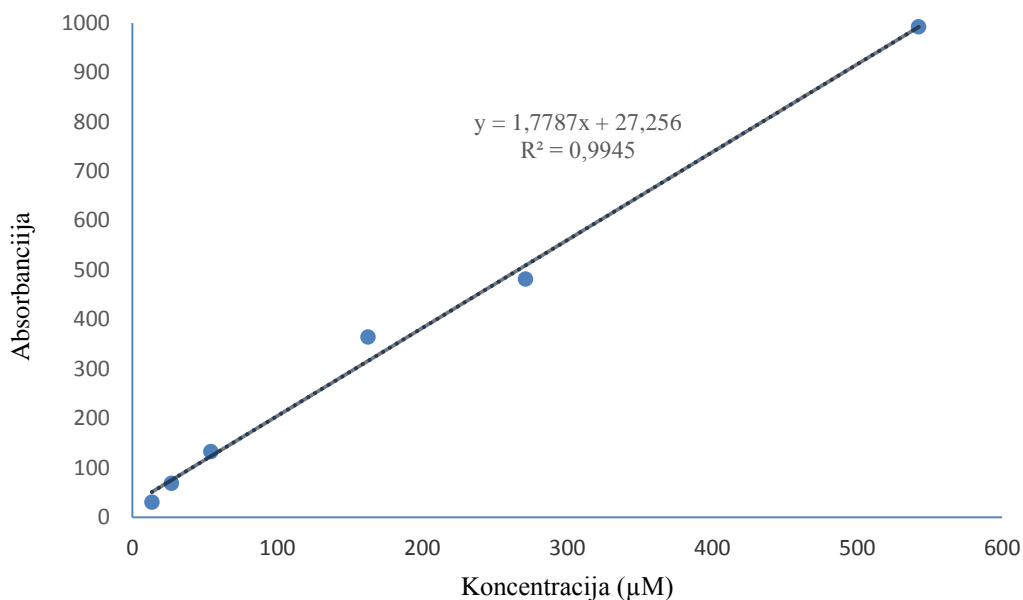
**Slika 40.** Spektar masa 2-feniletil-izotiocijanata, razgradnog produkta glukonasturcina.

Molekulski ion na spektru masa 2-feniletil-izotiocijanata je vidljiv i ima neparnu masu ( $m/z = 163$ ). Osnovni ion je  $m/z = 91$  što pripada  $C_7H_7^+$  (tropolium ion) karakterističnom za alkil-supstituirane benzenske spojeve. Na spektru je uočljiv i ion  $m/z = 105$ , koji potječe od gubitka  $NCS$  ( $m/z = 58$ ).

### 3.2. Izolacija glukozinolata i HPLC analiza

Glukozinolatni profil karakterističan je kako za određenu biljnu vrstu, tako i za pojedini biljni organe vrste, stoga njihova identifikacija te u konačnici kvantizacija u istraživanju daje iznimnu važnost. U poglavlju 3.1. opisan je profil glukozinolata biljke *Diplotaxis erucoides* koji je dobiven indirektnom metodom preko GC-MS analize razgradnih produkata, izotiocijanata. Kako je uočeno, produkti ovise o načinu izolacije, što vodi zaključku da cjelokupna analiza biljnog materijala zahtijeva izolaciju glukozinolata kao dodatnu potvrdu. Glukozinolati su ekstrahirani iz sušene biljke dvoredca, iz različitih biljnih tkiva. Ekstrakcija smjesom metanola i vode je izvršena iz 100,0 mg usitnjenog biljnog materijala pri 92 °C s ciljem inhibicije mirozinaze. Nanošenjem dobivenih ekstrakta na ionsko-izmjenjivačku kolonu koja sadrži dekstran, a potom ispiranjem ultračistom vodom, 70% metanolom i puferom uklonjene su nepolarne komponente, kao što je klorofil. Dodatkom sulfataze, ekstrahirani glukozinolati su desulfatizirani. Usporedno, pripravljene su različite koncentracije

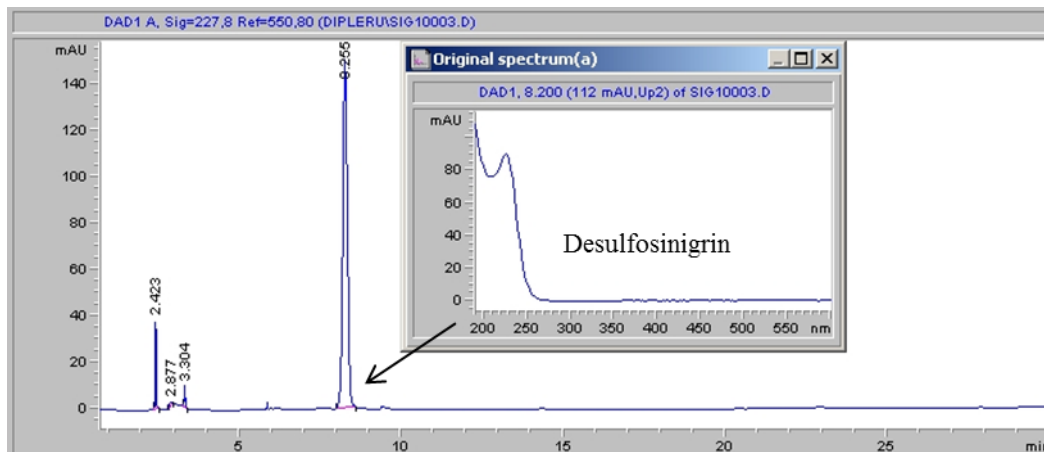
desulfosinigrina za kalibracijsku krivulju. Svi uzorci su analizirani HPLC-UV tehnikom. Baždarna krivulja prikazana je na slici 41. odakle je vidljiva visoka korelacija i linearnost za različite koncentracije desulfatiziranog sinigrina ( $R^2=0,9945$ ).



**Slika 41.** Baždarna krivulja sinigrina.

Na slici 48. u poglavlju 6.1.6. prikazani su UV apsorpcijski spektri (200-350 nm) šest komercijalno dostupnih desulfoglukozinolata (dGSL), koji su predstavnici najčešćih strukturnih klasa tih spojeva. Dano je najčešće ime, strukturno ime (u zagradama) i ime strukturne klase.<sup>18</sup>

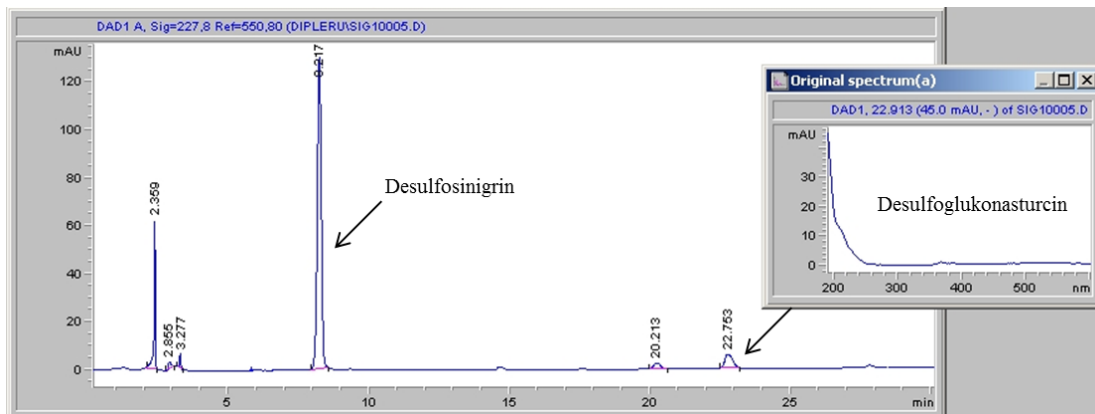
### 3.2.1. List



**Slika 42.** HPLC kromatogram ekstrakta lista *Diplotaxis eruroides* te UV spektar desulfosinigrina.

Na slici 42. prikazan je HPLC kromatogram ekstrakta iz lista *Diplotaxis eruroides*. Identificiran je pik pri 8,2. minuti koji odgovara desulfosinigrinu. Osim vremena zadržavanja, njegovo prisustvo potvrđeno je pregledom pripadajućeg UV spektra pri 227 nm koji odgovara alkenilnim glukozinolatima. Ostali pikovi ranijih vremena zadržavanja pripadaju nečistoćama koje nisu u potpunosti uklonjene postupkom pročišćavanja ekstrakta. Dodatna potvrda prisustva sinigrina je prethodno urađena GC-MS analiza gdje je identificiran razgradni produkt ovog glukozinolata, alil-izotiocijanat. Izračunata koncentracija (prema 6.1.1.) desulfosinigrina je iznosila 12,0996  $\mu\text{mol/g}$ .

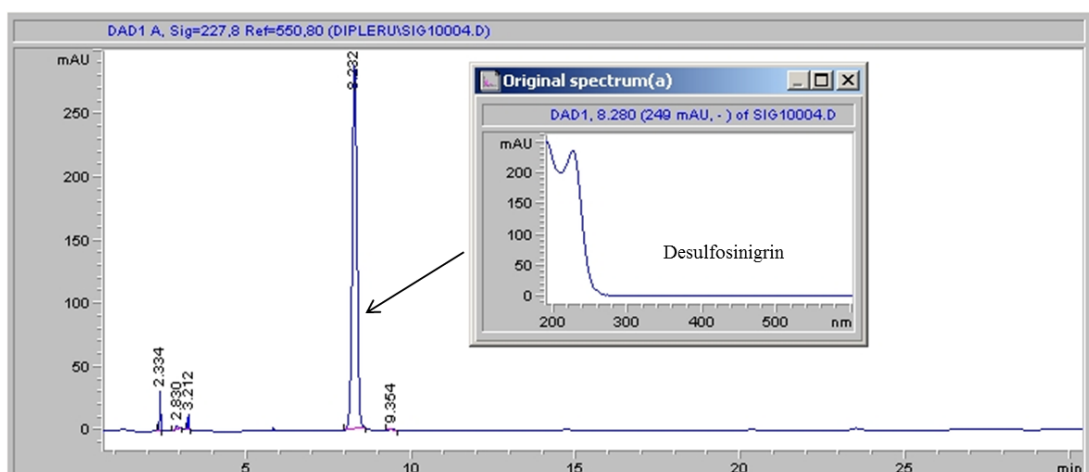
### 3.2.2. Stabljika



**Slika 43.** HPLC kromatogram ekstrakta stabljike *Diplotaxis erucoides* te UV spektar desulfoglukonasturcina.

Ekstrakt stabljike sadržava dva desulfoglukozinolata. Prvi s nižim vremenom zadržavanja je desulfosinigrin, a za razliku od lista, u ovom slučaju prisutan na 22,8. minuti je i jedan alkilaromatski desulfoglukozinolat, desulfoglukonasturcin. UV spektar odgovara onome aromatskih glukozinolata, a GC-MS analiza utvrdila je prisustvo njegovog razgradnog produkta, feniletil-izotiocijanata. Koncentracija desulfosinigrina iznosila je 10,4135  $\mu\text{mol/g}$ , a desulfoglukonasturcina je bila manja, 0,7765  $\mu\text{mol/g}$ .

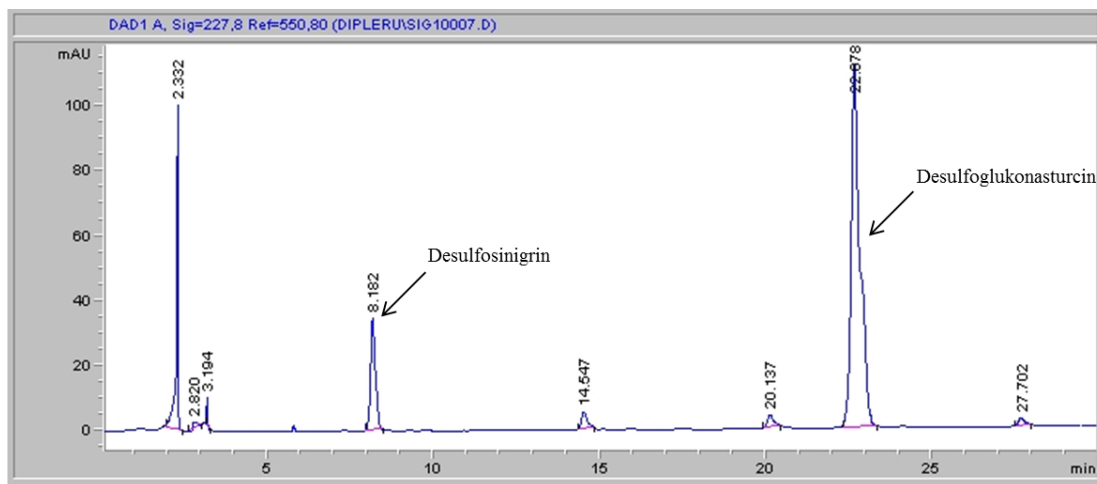
### 3.2.3. Komuška



**Slika 44.** HPLC kromatogram ekstrakta komuške *Diplotaxis erucoides* te UV spektar desulfosinigrina.

Jedini veliki pik na kromatogramu kumuške koja sadržava veliku količinu sjemena odgovara desulfosinigrinu. Izračunata je koncentracija 28,8295  $\mu\text{mol/g}$  što je najviša koncentracija ovog desulfoglukozinolata među svim analiziranim tkivima ove biljne vrste.

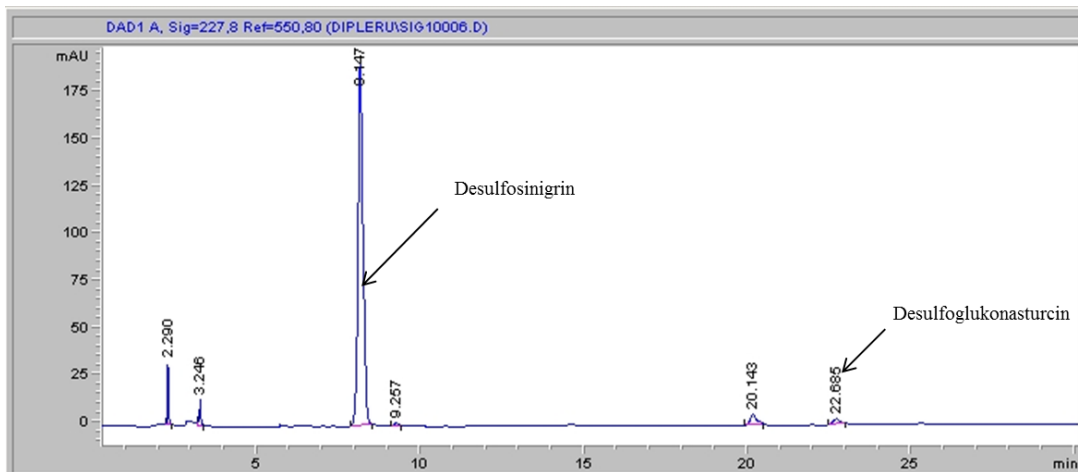
### 3.2.4. Korijen



**Slika 45.** HPLC kromatogram ekstrakta korijena *Diplotaxis eruroides*.

Iz kromatograma ovog biljnog tkiva uočava se veći pik desulfoglukonasturcina u odnosu na onaj desulfosinigrina. Izračunom je utvrđeno da je koncentracija desulfosinigrina 2,6966  $\mu\text{mol/g}$ , a desulfoglukonasturcina 16,4298  $\mu\text{mol/g}$ . Pregledom UV spektara ostalih pikova utvrđeno je da ti spojevi nemaju glukozinolatu strukturu.

### 3.2.5. Cvijet



**Slika 46.** HPLC kromatogram ekstrakta cvijeta *Diplotaxis erucoides*.

Koncentracija desulfosinigrina je u ovom slučaju iznosi 16,3359  $\mu\text{mol/g}$ , dok je desulfoglukonasturcina znatno manja 0,2485  $\mu\text{mol/g}$ .

**Tablica 5.** Koncentracije glukozinolata u pojedinim djelovima biljnog materijala.

Glukozinolat	Minuta	Koncentracija ( $\mu\text{mol/g}$ )				
		List	Stabljika	Komuška	Korijen	Cvijet
desulfosinigrin	8,2	12,0996	10,4135	28,8295	2,6966	16,3358
desulfoglukonasturcin	22,8	-	0,7765	-	16,4398	0,2485

„-“ – Nije identificiran.



**Slika 47.** Usporedba HPLC kromatograma ekstrakata desulfoglukozinolata lista, komuške, stabljike, cvijeta i korijena ( $\lambda = 227$  nm).

## 4. ZAKLJUČAK

- Hlapljivi sumporovi spojevi izolirani su iz biljnog materijala dvoredca pomoću četiri postupka te analizirani GC-MS uređajem. Analiza je pokazala da je najuspješnija metoda izolacije bila hidrodestilacija u aparaturi po Clevengeru zbog dužeg trajanja izolacije u odnosu na mikrovalnu destilaciju. Proces mikrovalne ekstrakcije je bio najmanje uspješan zbog pougljenjivanja biljnog materijala nakon kratkog vremena izlaganja mikrovalovima.
- Autolizom je pronađeno da cvijet, komuška, list i stabljika sadrže alil-izocijanat koji potječe od razgradnje sinigrina dok u korijenu nije pronađen niti jedan hlapljivi izolat.
- HPLC analizom desulfatiziranih produkata (desulfoglukozinolata) identificirani su desulfosinigrin i desulfoglukonasturcin. U listu i komušci pronađen je samo desulfosinigrin, dok u stabljici, korijenu i cvijetu pronađen desulfosinigrin i desulfoglukonasturcin.
- Koncentracije sinigrina su bile u rasponu od 2,6966  $\mu\text{mol/g}$  do 28,8295  $\mu\text{mol/g}$  pri čemu najmanja koncentracija odgovara sadržaju u korijenu, a najveća u komušci.
- Koncentracije glukonasturcina su bile u rasponu od 0,2485  $\mu\text{mol/g}$  do 16,4398  $\mu\text{mol/g}$  pri čemu najmanja koncentracija odgovara sadržaju u cvijetu, a najveća u korijenu.



## 5. LITERATURA

1. Stojanov, D. *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama porodice Brassicaceae i Phytolaccaceae i sinteza fenil-izotiocijanata*. Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2015.
2. Iranshahi, M. *A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods*. Journal of Essential Oil Research. 24, 2012, str. 393-434.
3. Kopjar M., Šubarić D., Piližota V. *Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi*. Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku. 1, 2012, str. 22-35.
4. Blažević, I. *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija*. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
5. Zekić, M. *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija*. Zagreb : Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2013.
6. Vlajčević D., *Termička, enzimaska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata*, Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.
7. Jerković, I., Radonić, A. *Praktikum iz organske kemije*. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2009.
8. Sedlar, A. *Izolacija i identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva odabranih biljaka porodice Brassicaceae*, Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2017.
9. Silić, A, *Glukozinolatni profil u biljkama *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. i *Matthiola incana* (L.) R. BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima*, Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.
10. Blekić, M., Jambrek, A. R., Chrmant, F. *Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva*, Croatian Journal of Food Science and Technology, 3, 2011., str. 32-47.
11. URL:[http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/09131.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm) (preuzeto 16.8.2019.)
12. URL: <https://pfam.xfam.org/family/Sulfatase> (preuzeto 22.8.2019.)

13. Perašin, J. *Priprava desulfoglukozinolata iz vodeno metanolnog ekstrakta kupusa za reverzno-faznu tekućinsku kromatografiju*, Diplomski rad, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet 1998.
14. URL:[http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana\\_Luterotti/09/091/0912.htm](http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm) (preuzeto 25.8.2019.).
15. Wade L. G., ml., *Organska kemija*, Školska knjiga, d.d., 7. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko), Zagreb, 2017., 542. str.
16. Nikolić T., Mitić B., Boršić I. (2014): *Flora hrvatske: invazivne biljke*. ALFA, Zagreb
17. URL:<http://herbarivirtual.uib.es/en/general/1132/especie/diplotaxis-erucoides-l-dc-> (preuzeto 2.9.2019.).
18. Grosser K., van Dam N. M. *A Straight forward Method for Glucosinolate Extraction and Analysis with High-pressure Liquid Chromatography (HPLC)*., *Journal of Visualized Experiments*, **121**, 2017.

## 6. PRILOG

### 6.1. Izračun konačnih koncentracija identificiranih glukozinolata

Za kvantizaciju identificiranih glukozinolata koriste se sljedeće jednadžbe:

$$x = \frac{y-c}{m} \quad (1)$$

$$x_t = \frac{x \cdot M \cdot D}{w} \quad (2)$$

$x$  = količina glukozinolata u ekstraktu,

$y$  = površina ispod pika,

$c$  = odsječak na y-osi,

$m$  = nagib pravca,

$x_t$  = koncentracija glukozinolata u uzorku,

$M$  = faktor odziva,

$D$  = faktor razrijeđenja,

$w$  = masa uzorka.

### 6.1.1. List

$$x(\text{sinigrin}) = \frac{1460,47 - 28,3695}{1,7747} = 806,9624 \mu\text{M} = 0,8069624 \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1,5 \text{ mL (voda za ispiranje)}}{0,1004 \text{ g}} = \text{faktor } 14,994$$

$$x_t(\text{sinigrin}) = 0,8069624 \mu \frac{\text{mol}}{\text{mL}} * 1 * 14,994 \text{ mL/g} = 12,09959 \mu\text{mol/g}$$

### 6.1.2. Stabljika

$$x(\text{sinigrin}) = \frac{1260,91 - 28,3695}{1,7747} = 694,5140 \mu\text{M} = 0,6945140 \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1,5 \text{ mL (voda za ispiranje)}}{0,1004 \text{ g}} = \text{faktor } 14,994$$

$$x_t(\text{sinigrin}) = 0,6945140 \mu \frac{\text{mol}}{\text{mL}} * 1 * 14,994 \text{ mL/g} = 10,4135 \mu\text{mol/g}$$

### 6.1.3. Komuška

$$x(\text{sinigrin}) = \frac{2848,82 - 28,3695}{1,7747} = 1589,2723 \mu\text{M} = 1,5892723 \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1,5 \text{ mL (voda za ispiranje)}}{0,1004 \text{ g}} = \text{faktor } 14,994$$

$$x_t(\text{sinigrin}) = 1,5892723 \mu \frac{\text{mol}}{\text{mL}} * 1 * 14,994 \text{ mL/g} = 28,8295 \mu\text{mol/g}$$

#### 6.1.4. Korijen

$$x(\text{sinigrin}) = \frac{347,529 - 28,3695}{1,7747} = 179,8406 \mu\text{M} = 0,1798406 \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1,5 \text{ mL (voda za ispiranje)}}{0,1004 \text{ g}} = \text{faktor } 14,994$$

$$x_t(\text{sinigrin}) = 0,1798406 \mu \frac{\text{mol}}{\text{mL}} * 1 * 14,994 \text{ mL/g} = 28,8295 \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{glukonasturcin}) = \frac{1972,99 - 28,3695}{1,7747} = 1095,7581 \mu = 1,0957581 \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1,5 \text{ mL (voda za ispiranje)}}{0,1004 \text{ g}} = \text{faktor } 14,994$$

$$x_t(\text{glukonasturcin}) = 1,0957581 \mu \frac{\text{mol}}{\text{mL}} * 1 * 14,994 \text{ mL/g} = 16,4298 \mu\text{mol/g}$$

#### 6.1.5. Cvijet

$$x(\text{sinigrin}) = \frac{1961,87 - 28,3695}{1,7747} = 1089,4922 \mu\text{M} = 1,0894922 \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1,5 \text{ mL (voda za ispiranje)}}{0,1004 \text{ g}} = \text{faktor } 14,994$$

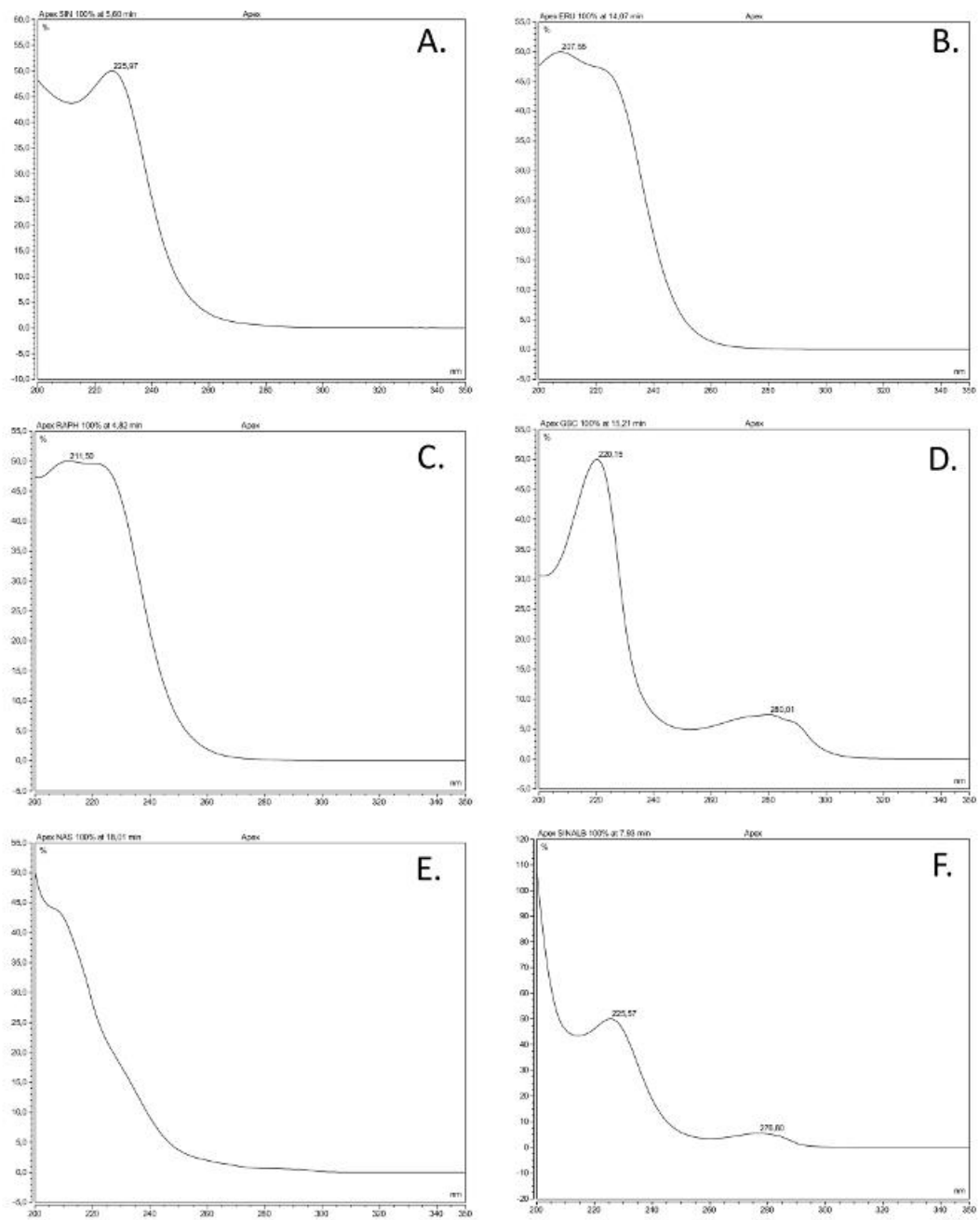
$$x_t(\text{sinigrin}) = 1,0894922 \mu \frac{\text{mol}}{\text{mL}} * 1 * 14,994 \text{ mL/g} = 16,3358 \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{glukonasturcin}) = \frac{57,781 - 28,3695}{1,7747} = 16,5729 \mu\text{M} = 0,0165729 \mu\text{mol/mL}$$

$$\frac{1,5 \text{ mL (voda za ispiranje)}}{0,1004 \text{ g}} = \text{faktor } 14,994$$

$$x_t(\text{glukonasturcin}) = 0,0165729 \mu \frac{\text{mol}}{\text{mL}} * 1 * 14,994 \text{ mL/g} = 0,2485 \mu\text{mol/g}$$

### 6.1.6. UV spektri desulfoglukozinolata



Slika 48. UV spektra najčešćih klasa glukozinolata<sup>18</sup>

- A) Sinigrin (prop-2-enil GSL), alkan
- B) Glukoerucin (4-metilsulfanilbutil GSL), sulfanilalkil
- C) Glukorafanin (4-metilsulfinilbutil GSL), sulfinilalkil
- D) Glukobrasicin (indol-3-ilmetil), indol
- E) Glukonasturcin (2-feniletilGSL), arilalifatski
- F) Sinalbin (4-hidroksibenzil GSL), arilalifatski