

# Utjecaj selena na profil glukozinolata u klicama rikule

---

Grmuša, Luana

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:338463>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**UTJECAJ SELENA NA PROFIL GLUKOZINOLATA U KLICAMA  
RIKULE**

**DIPLOMSKI RAD**

**LUANA GRMUŠA**

**133**

**Split, rujan 2021.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**  
**Organska kemija i biokemija**

**UTJECAJ SELENA NA PROFIL GLUKOZINOLATA U KLICAMA RIKULE**

**DIPLOMSKI RAD**

**LUANA GRMUŠA**

**133**

**Split, rujan 2021.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**  
**Organic Chemistry and Biochemistry**

**INFLUENCE OF SELENIUM ON GLUCOSINOLATE PROFILE IN ROCKET  
SPROUTS**

**DIPLOMA THESIS**

**LUANA GRMUŠA**

**133**

**Split, September 2021.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij kemije: Organska kemija i biokemija

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta.

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

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

### UTJECAJ SELENA NA PROFIL GLUKOZINOLATA U KLICAMA RIKULE

Luana Grmuša, 133

**Sažetak:** Glukozinolati ( $\beta$ -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) su velika grupa sekundarnih metabolita koji daju karakterističan gorki i oštri okus kupusnjačama te su njihovi razgradni produkti biološki aktivni spojevi. Razgradnja može biti termička, enzimska ili kemijska pri čemu nastaju brojni razgradni produkti kao što su tiocijanati i izotiocijanati. Klice rikule su nutritivno bogate, a prednost im je vrlo laki uzgoj. Klijanjem se nutrijenti u sjemenci razgrađuju na sastavne dijelove, razvija se klorofil i povećava se količina proteina, minerala i elemenata u tragovima. Dodatna prednost je da su bogate vitaminima, čiji se sadržaj povećava klijanjem, esencijalnim masnim kiselinama i vlaknima te imaju pozitivan učinak na organizam. Biljke nemaju potrebu za selenom i uglavnom ne podnose koncentracije veće od 10-100  $\mu\text{g/g}$  suhe mase u tkivima, no vrste koje pripadaju obitelji Brassicaceae mogu akumulirati selen u tkivima i tolerirati koncentracije do 1000  $\mu\text{g/g}$  suhe mase. Na taj način, biljke proizvode razne seleno metabolite koji mogu imati ulogu kao sredstva za sprječavanje raka. Istraživanja su pokazala da se u bočni lanac glukozinolata umjesto sumpora može ugraditi atom selena. U ovom diplomskom radu uzgojene su klice rikule te zalijevane otopinama selena različitih koncentracija (1; 2,5; 5; 7,5; 10 ppm). Razvoj biljaka praćen je tijekom 7 dana i jedino pri najvišoj koncentraciji selena nije došlo do razvoja biljke. Nakon sabiranja glukozinolati su izolirani ekstrakcijom 70%-tnim metanolom te analizirani UHPLC-DAD-MS/MS, a njihovi hlapljivi razgradni produkti su izolirani ekstrakcijom diklormetanom i identificirani GC-MS tehnikom. Identificirana su 4 glukozinolata: glukorafanin, glukroerucin, dimer glukosativina i 4-metoksiglukobrasicin, dok je GC-MS tehnikom identificiran erucin kao razgradni produkt glukroerucina.

**Ključne riječi:** glukozinolati, *Eruca vesicaria*, rikula, klice, selen, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

**Rad sadrži:** 41 stranica, 33 slika, 4 tablica, 22 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

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

**Datum obrane:** 17. rujna 2021.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate Study of Chemistry: Organic Chemistry and Biochemistry

**Scientific area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no.6

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

**Technical assistance:** Azra Đulović, MChem

### INFLUENCE OF SELENIUM ON GLUCOSINOLATE PROFILE IN ROCKET SPROUTS

Luana Grmuša, 133

**Abstract:** Glucosinolates ( $\beta$ -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates) are a large group of secondary metabolites that give a characteristic bitter and pungent taste to cabbages and their degradation products are biologically active compounds. Degradation can be thermal, enzymatic, or chemical and it forms several degradation products such as thiocyanates and isothiocyanates. Rocket sprouts are nutritionally rich, and their advantage is very easy cultivation. By germination, the nutrients in the seed are broken down into their main components, chlorophyll develops and the amount of proteins, minerals and trace elements increases. An additional advantage is that they are rich in vitamins whose content increases with germination, essential fatty acids and fiber and have a positive effect on the body. Plants do not need selenium and generally do not tolerate concentrations higher than 10-100  $\mu\text{g/g}$  dry weight in tissues, but species belonging to the Brassicaceae family can accumulate selenium in tissues and tolerate concentrations up to 1000  $\mu\text{g/g}$  dry weight. In this way, plants produce various selenium metabolites that can play a role as a means of preventing cancer. Studies have shown that a selenium atom can be incorporated into the side chain of glucosinolates instead of sulfur. In this diploma thesis, rocket sprouts were grown and watered with selenium solutions of different concentrations (1; 2.5; 5; 7.5; 10 ppm). The development of the plants was monitored for 7 days, and only at the highest concentration of selenium the plant did not develop. After collection, glucosinolates were isolated by extraction with 70% methanol and analyzed by UHPLC-DAD-MS / MS, and their volatile degradation products were isolated by extraction with dichloromethane and identified by GC-MS technique. 4 glucosinolates were identified: glucoraphanin, glucoerucine, glucosatin dimer and 4-methoxyglucobrassicin, while GC-MS technique identified erucin which originate from degradation of glucoerucin.

**Key words:** glucosinolates, *Eruca vesicaria*, rocket, sprouts, selenium, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

**Thesis contains:** 41 pages, 33 figures, 4 tables, 22 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Assistant Professor Franko Burčul, PhD   | chair person |
| 2. Assistant Professor Lea Kukoč-Modun, PhD | member       |
| 3. Associate Professor Ivica Blažević, PhD  | supervisor   |

**Defence date:** September 17<sup>th</sup> 2021

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

*Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića i neposrednim mentorstvom mag. chem. Azre Đulović, u razdoblju od srpnja do rujna 2021. godine.*

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



*Zahvaljujem se svom profesoru i mentoru, izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću na uputama i savjetima, stručnom znanju, pristupačnosti i susretljivosti koji su mi olakšali izvođenje diplomskog rada. Također se i zahvaljujem na zanimljivim predavanjima i objašnjenjima tijekom studiranja koji su me i potakli da ga izaberem kao mentora.*

*Također se zahvaljujem asistentici mag. chem Azri Đulović, na nesebičnoj pomoći tijekom izvođenja rada, na strpljivosti, posvećenoj pažnji, vremenu i uloženom trudu.*

*Pogotovo se zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je uvijek bila spremna pomoći na ogromnoj podršci tijekom cijelog mog školovanja, na bezuvjetnoj ljubavi, motivaciji i vjeri u mene jer bez njih ne bih mogla postići sve što sam htjela.*

## **ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

1. Uzgojiti klice rikule (*Eruca vesicaria*) iz sjemena te zalijevati različitim koncentracijama otopine selena tijekom sedam dana (1 – 10 ppm).
2. Izolirati glukozinolate, selenoglukozinolate te izvršiti njihovu desulfataciju dodatkom enzima sulfataze. Izolirati hlapljive spojeve iz uzgojenih klica metodom ekstrakcije diklormetanom nakon autolize 24 h.
3. Identificirati hlapljive spojeve korištenjem GC-MS tehnike te glukozinolate i selenoglukozinolate pomoću UHPLC-DAD-MS/MS tehnike.

## SAŽETAK

Glukozinolati ( $\beta$ -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati) su velika grupa sekundarnih metabolita koji daju karakterističan gorki i oštri okus kupusnjačama te su njihovi razgradni produkti biološki aktivni spojevi. Razgradnja može biti termička, enzimska ili kemijska pri čemu nastaju brojni razgradni produkti kao što su tiocijanati i izotiocijanati. Klice rikule su nutritivno bogate, a prednost im je vrlo laki uzgoj. Klijanjem se nutrijenti u sjemenci razgrađuju na sastavne dijelove, razvija se klorofil i povećava se količina proteina, minerala i elemenata u tragovima. Dodatna prednost je da su bogate vitaminima, čiji se sadržaj povećava klijanjem, esencijalnim masnim kiselinama i vlaknima te imaju pozitivan učinak na organizam. Biljke nemaju potrebu za selenom i uglavnom ne podnose koncentracije veće od 10-100  $\mu\text{g/g}$  suhe mase u tkivima, no vrste koje pripadaju obitelji Brassicaceae mogu akumulirati selen u tkivima i tolerirati koncentracije do 1000  $\mu\text{g/g}$  suhe mase. Na taj način, biljke proizvode razne seleno metabolite koji mogu imati ulogu kao sredstva za sprječavanje raka. Istraživanja su pokazala da se u bočni lanac glukozinolata umjesto sumpora može ugraditi atom selena. U ovom diplomskom radu uzgojene su klice rikule te zalijevane otopinama selena različitih koncentracija (1; 2,5; 5; 7,5; 10 ppm). Razvoj biljaka praćen je tijekom 7 dana i jedino pri najvišoj koncentraciji selena nije došlo do razvoja biljke. Nakon sabiranja glukozinolati su izolirani ekstrakcijom 70%-tnim metanolom te analizirani UHPLC-DAD-MS/MS, a njihovi hlapljivi razgradni produkti su izolirani ekstrakcijom diklormetanom i identificirani GC-MS tehnikom. Identificirana su 4 glukozinolata: glukorafanin, glukoerucin, dimer glukosativina i 4-metoksiglukobrasicin, dok je GC-MS tehnikom identificiran erucin kao razgradni produkt glukoerucina.

**Ključne riječi:** glukozinolati, *Eruca vesicaria*, rikula, klice, selen, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

## SUMMARY

Glucosinolates ( $\beta$ -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates) are a large group of secondary metabolites that give a characteristic bitter and pungent taste to cabbages and their degradation products are biologically active compounds. Degradation can be thermal, enzymatic, or chemical and it forms several degradation products such as thiocyanates and isothiocyanates. Rocket sprouts are nutritionally rich, and their advantage is very easy cultivation. By germination, the nutrients in the seed are broken down into their main components, chlorophyll develops and the amount of proteins, minerals and trace elements increases. An additional advantage is that they are rich in vitamins whose content increases with germination, essential fatty acids and fiber and have a positive effect on the body. Plants do not need selenium and generally do not tolerate concentrations higher than 10-100  $\mu\text{g/g}$  dry weight in tissues, but species belonging to the Brassicaceae family can accumulate selenium in tissues and tolerate concentrations up to 1000  $\mu\text{g/g}$  dry weight. In this way, plants produce various selenium metabolites that can play a role as a means of preventing cancer. Studies have shown that a selenium atom can be incorporated into the side chain of glucosinolates instead of sulfur. In this diploma thesis, rocket sprouts were grown and watered with selenium solutions of different concentrations (1; 2.5; 5; 7.5; 10 ppm). The development of the plants was monitored for 7 days, and only at the highest concentration of selenium the plant did not develop. After collection, glucosinolates were isolated by extraction with 70% methanol and analyzed by UHPLC-DAD-MS / MS, and their volatile degradation products were isolated by extraction with dichloromethane and identified by GC-MS technique. 4 glucosinolates were identified: glucoraphanin, glucoerucine, glucosatin dimer and 4-methoxyglucobrassicin, while GC-MS technique identified erucin which originate from degradation of glucoerucin.

**Key words:** glucosinolates, *Eruca vesicaria*, rocket, sprouts, selenium, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

## SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. <i>Eruca vesicaria</i> (L.) Cav. ....	2
1.2 Glukozinolati .....	3
1.2.1. Vrste i strukture glukozinolata .....	4
1.2.2. Strukture odabranih glukozinolata .....	5
1.2.3. Razgradnja glukozinolata .....	7
1.3. Selen.....	8
1.4. Metode izolacije hlapljivih spojeva.....	9
1.4.1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva .....	9
1.5. Metode odjeljivanja i identifikacije .....	10
1.5.1. Kromatografija.....	10
1.5.2. Visoko učinkovita tekućinska kromatografija (HPLC).....	11
1.5.3. Vezani sustav plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS) .....	14
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
2.1. Biljni materijal .....	15
2.1.1. <i>Eruca vesicaria</i> (L.) Cav. ....	15
2.2. Kemikalije i aparatura .....	18
2.3. Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom .....	19
2.4. Ekstrakcija glukozinolata.....	20
2.5. Metode analize.....	22
2.5.1. GC-MS analiza .....	22
2.5.2. UHPLC-DAD-MS/MS analiza .....	24
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
3.1. UHPLC-DAD-MS/MS analiza .....	25
3.2. GC-MS analiza .....	34
4. ZAKLJUČAK.....	38
5. LITERATURA .....	39

## UVOD

Glukozinolati su velika grupa sekundarnih metabolita te su njihovi razgradni produkti biološki aktivni spojevi. Nalaze se u pojedinim biljkama, kao što je porodica Brassicaceae, u koju primjerice spadaju brokula (*Brassica oleracea var. italica*), kupus (*B. oleracea var. capitata f. alba*), cvjetača (*B. oleracea var. botrytis*), repica (*Brassica napus*), gorušica (*Brassica nigra*), hren (*Armoracia rusticana*) i mnoge druge.

Studije su pokazale da geni prisutni u rikuli i u *Brassica* sp. su sličniji nego što su odgovarajuće sekvence iz *Arabidopsis thaliane* (tzv. Talijin uročnjak).

Glukozinolati su veoma zanimljivi iz razloga što njihovi razgradni produkti posjeduju izražena antikancerogena, antiinflamatorna i antibakterijska svojstva.

Selen je veoma važan u prehrani, pogotovo kod ljudi sa kroničnim bolestima povezanih s oksidativnim stresom, a očekuje se da će ga biljka apsorbirati i unijeti u biosintezu umjesto sumpora dajući selenoglukozinolate, što zasigurno donosi mnoge koristi kod ljudi s njegovim deficitom. Jedan od primjera asimilacije selena u biljkama je aminokiselina selenometionin, analog metionina, koja može biti izvor uskladištenog selena u ljudskom tijelu.

Glukozinolati se razgrađuju termičkom razgradnjom ili enzimskom ili kemijskom hidrolizom te daju brojne razgradne produkte kao što su izotiocijanati, nitrili, epitionitrili i tiocijanati.

## 1. OPĆI DIO

### 1.1. *Eruca vesicaria* (L.) Cav.

Rikula (sin. riga, rokula) je dvogodišnja biljka koja spada u porodicu kupusnjača (Brassicaceae) (slika 1.1). Podrijetlom je s Mediterana, a može se naći i u Turskoj i Indiji gdje raste na suhom tlu. Biljka cvate od travnja do lipnja. Ime roda *Eruca* dolazi od grčke riječi *ereugomai* što znači „povraćam“, zbog ljutkastog okusa biljke, dok ime vrste *sativa* znači „kultiviran, koji se često uzgaja“.

Stabljika joj je uspravna i u gornjem dijelu razgranata, visine do 1 m. Listovi su varijabilni i izduženi i dugi do 15 cm i imaju peteljke. Cvjetovi se nalaze na peteljicama, bijeli su ili tamnoljubičasti i skupljeni u cvatove. Plod je uspravna ljuska prilegnuta uz stabljiku koja sadrži sjemenke.<sup>1</sup>



**Slika 1.1** *Eruca sativa*<sup>2</sup>

Klice rikule su nutritivno bogate, a prednost je vrlo laki uzgoj. Klice se namoče u vodi čime se aktiviraju enzimi u sjemenci. Također su bogate vitaminima čiji se sadržaj povećava klijanjem, esencijalnim masnim kiselinama i vlaknima te imaju pozitivan učinak na organizam. Klijanjem se u sjemenci razgrađuju nutrijenti na sastavne dijelove, razvija se klorofil i povećava se količina proteina, minerala i elemenata u tragovima.<sup>3</sup>

## Taksonomija rikule:<sup>1</sup>

**Carstvo:** Plantae

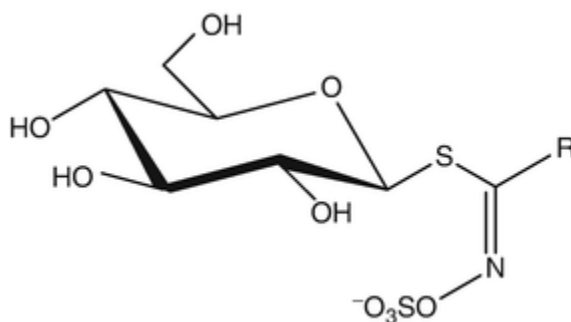
**Red:** Brassicales

**Rod:** *Eruca*

**Vrsta:** *Eruca vesicaria* (L.) Cav. (sin. *Eruca sativa* Mill.)

### 1.2 Glukozinolati

Glukozinolati su  $\beta$ -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati, vodotopljivi organski anioni koji daju karakterističan gorki i oštri okus kupusnjačama (slika 1.2). Oni su sekundarni metaboliti, što znači da ih biljke ili životinje proizvode, ali nisu potrebni za rast, razvoj ili razmnožavanje. Sastoje se od specifičnog  $\beta$ -D-tioglukozidnog dijela, sulfatne skupine koja je preko C=N skupine vezana na ostatak molekule (sulfonirani oksim) te varijabilnog bočnog lanca R koji može biti alkilni, alkenilni, arilalkilni, indolni i dr. C=N dvostruka veza može potencijalno postojati u 2 konfiguracije, no dokazano je da dvostruka veza ima Z-konfiguraciju.<sup>5,6</sup>



**Slika 1.2.** Opća strukturna formula glukozinolata (R skupina je varijabilna).<sup>8</sup>

Glukozinolati se nalaze u biljnim vakuolama odvojeno od mirozinaze, endogenog enzima, koja se nalazi u citosolu i prisutna je u visokim razinama u specijaliziranim mirozinskim stanicama. Tijekom oštećenja tkiva, glukozinolati postaju izloženi mirozinazi te se formira glukoza i nestabilni međuprodukt koji se dalje razgrađuje i daje sulfatni ion i spojeve poput izotiocijanata, tiocijanata i nitrila. Produkti hidrolize ovise o samom glukozinولاتu, ali i uvjetima reakcije, poput pH, prisutnosti  $\text{Fe}^{2+}$  te epitiospecifičnom



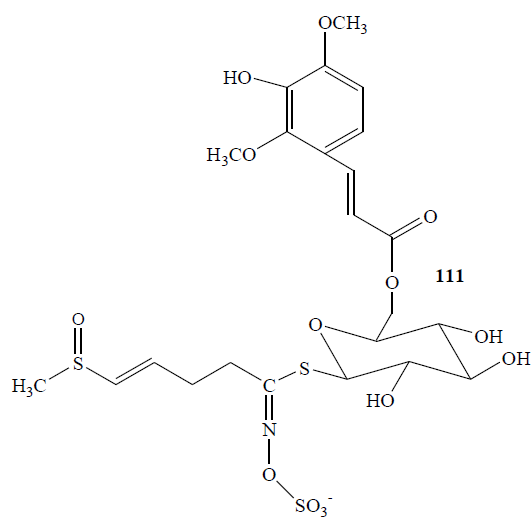
proteinu (ESP). ESP usmjerava kataliziranu mirozinazu alkenil glukozinolata prema nastajanju epitonitrila.<sup>9,10</sup>

### 1.2.1. Vrste i strukture glukozinolata

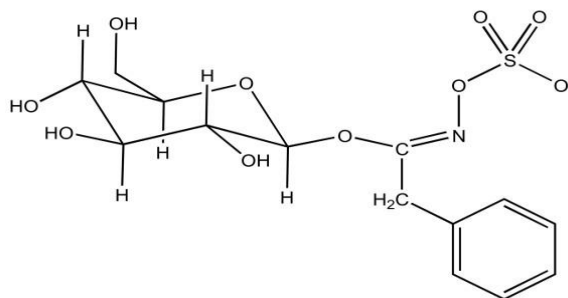
Prve glukozinoladne strukture sinigrina (prop-2-enil glukozinolat) su prikazane 1956. godine. Od tada, više od 135 bočnih lanaca su identificirani, a njihova brojnost se može pripisati raznim sekundarnim modifikacijama, poput oksidacije, desaturacije, hidroksilacije, metoksilacije, sulfoniranja i glukozilacije. R lanac je izveden od jedne od 8 aminokiselina, a može biti:

- alifatski (alanin, leucin, izoleucin, metionin ili valin)
- arilalifatski (fenilalanin ili tirozin)
- indolni (triptofan)<sup>5</sup>

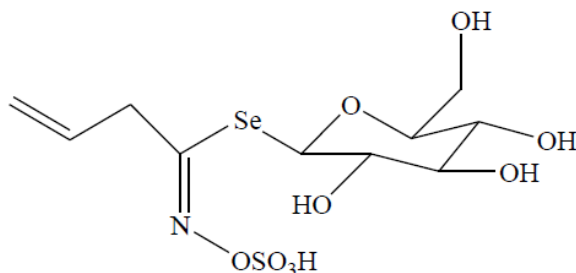
Glukozinolati se mogu podijeliti također i prema supstituentima na glukonskom dijelu (primjerice cimetni glukozinolati i benzoilni glukozinolati), a u posljednje vrijeme se istražuju i tzv "seleno-glukozinolati" koji su specifični zato što je glukonski i aglukonski dio molekule povezan selenom, umjesto sumporom (slika 1.3)<sup>8</sup>



a) cimetni glukozinolati



b) benzoilni glukozinolati (glukotropaeolin)

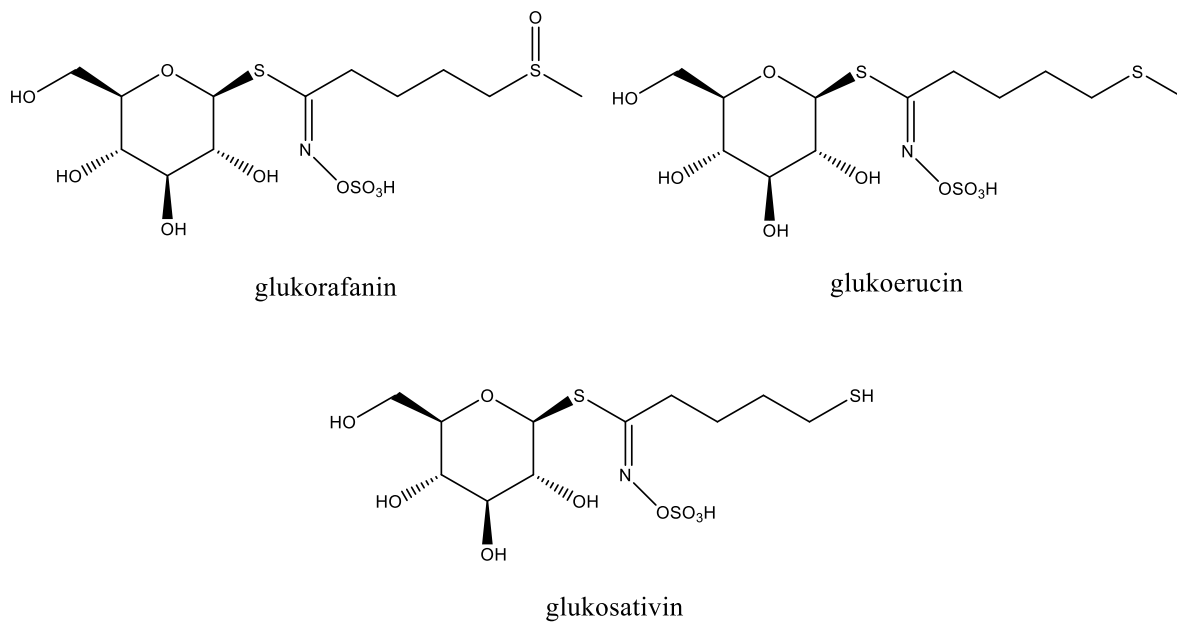


c) seleno glukozinolati

**Slika 1.3.** Primjeri glukozinoala: a) cimetni; b) benzoilni; c) seleno glukozinolati

### 1.2.2. Strukture odabranih glukozinolata

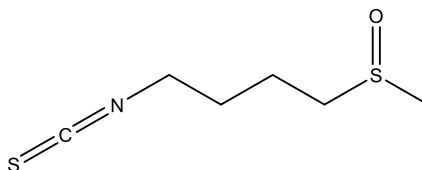
*Eruca vesicaria* obiluje glukozinolatima, a dosadašnja istraživanja<sup>12</sup> su pokazala da obiluje spojevima poput glukorafanina (4-metillsulfinilbutil glukozinolat), glukoerucina (4-metillsulfanilbutil glukozinolat) i glukosativina (4-merkaptobutil glukozinolat), koji je ujedno i najvećim udjelom prisutan u rikuli (slika 1.4).



**Slika 1.4** Strukture glukozinolata identificiranih u rikuli.

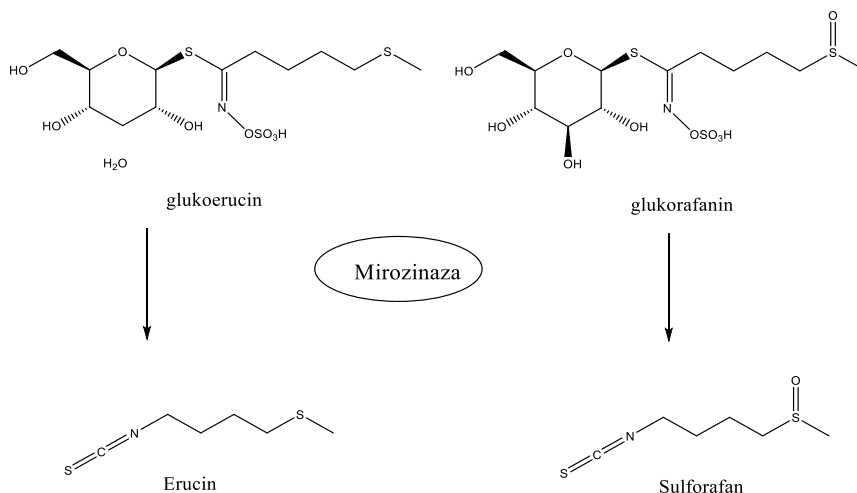
Hidrolizom glukosativina nastaje sativin, hlapljivi spoj koji daje oštar i specifičan miris rikuli.

Razgradni produkti glukozinolata, izotiocijanati mogu djelovati kao regulatori oksidativnog stresa u stanici. Također je sulforafan (4-metilsulfinilbutil-izotiocijanat), izveden iz glukorafanina (4-metilsulfinilbutil glukozinolat), spoj koji ima antikancerogeno djelovanje (slika 1.5.)<sup>6</sup>



**Slika 1.5.** Sulforafan

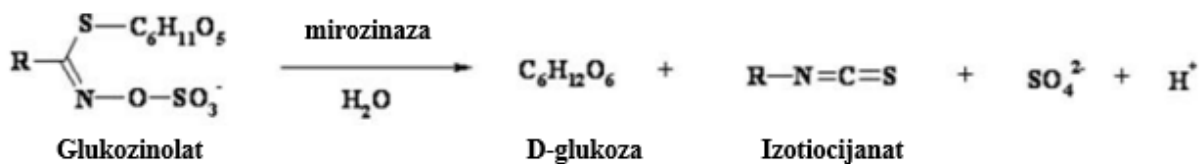
Nadalje, otkriveno je da je jedna od glavnih hlapljivih sumporno/dušikovih komponenta 4-metilbutil-izotiocijanat (erucin), dobiven razgradnjom glukoerucina. Također u manjoj količini se može i pronaći glukorafanin (4-metilsulfinilbutil glukozinolat) (slika 1.6.)



**Slika 1.6.** Razgradnja glukoerucina i glukorafanina.

### 1.2.3. Razgradnja glukozinolata

Glukozinolati se mogu razgraditi enzimskom hidrolizom i termičkom razgradnjom. Oni su stabilne molekularne strukture u biljnoj stanici i generalno se smatraju netoksičnima. No, kada se biljni dio koji sadrži frakciju glukozinolata razbije (primjerice, žvakanjem, zagrijavanjem ili napadom insekta),  $\beta$ -tioglukozidaza (nazvana mirozinaza) se ispušta. Nakon oštećenja tkiva, mirozinaze razgrađuju glukozinolate proizvodeći  $\beta$ -D-glukozu i nestabilni aglukon (tiohidroksimat-*O*-sulfonat) (slika 1.7).



**Slika 1.7.** Razgradnja glukozinolata u prisutstvu mirozinaze<sup>19</sup>

Mirozinaza je skladištena odvojeno od glukozinolata u različitim stanicama, ili u različitim unutarstaničnim odjeljcima. Također, mogu se razgraditi i kemijski, djelovanjem kiseline ili baze.<sup>5</sup> Mirozinaza katalizira enzimsku razgradnju te nastaje glukon (glukoza) i aglukon (nestabilni međuprodukt). Aglukon se dalje može pretvoriti u biološki aktivne i/ili toksične molekule, poput izotiocijanata, tiocijanata, epitonitrila, oksazolidin-2-tiona i nitrila.

Sastav ovisi o pH, strukturi bočnog lanca, prisustvu metalnih iona (npr.  $\text{Fe}^{2+}$ ) i uvjetima hidrolize.<sup>8</sup>

Ovisno o pH vrijednosti, nastat će različiti spojevi. Primjerice, pri neutralnom pH (pH=7), nastat će izotiocijanati Loosen pregradnjom, dok će u kiselim uvjetima nastati nitrili. Ukoliko su prisutni fero-ioni ( $\text{Fe}^{2+}$ ), nastat će nitrili neovisno o pH vrijednostima.

Produkti koji nastaju neenzimskom (kemijskom) razgradnjom ovise o različitim uvjetima te će pri povišenoj temperaturi i kiselim uvjetima razgraditi na karboksilnu kiselinu i glukozu, dok će u lužnatim uvjetima nastati aminokiseline i tiogluukoza. Osim kemijske razgradnje, glukozinolati se mogu razgraditi i toplinski.<sup>8</sup>

### 1.3. Selen

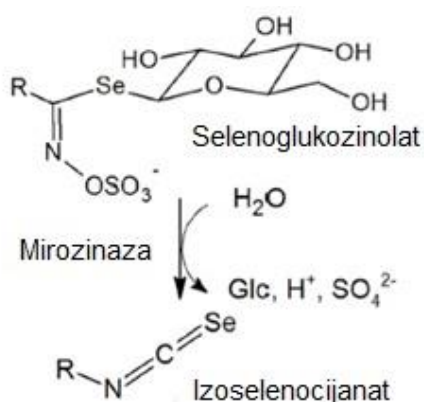
Selen (Se), kao i selenoaminokiseline i selenoproteini su neophodni za ljudsko zdravlje te utječu na čovjekove fiziološke funkcije, kao što su redoks homeostaza i stimulacija imunološkog sustava da bi se povećala proizvodnja antitijela i tireoidni hormonski metabolizam. Preporučene dnevne doze selena se razlikuju u različitim zemljama, no ono što im je zajedničko je da je ljudski unos manji od preporučenog te se selen mora koristiti u obliku dodatka prehrani. Određene studije dokazuju da bi optimalna količina selena mogla prevenirati rak, kardiovaskularne bolesti i dijabetes tip 2.<sup>13,14,15</sup>

Biljke nemaju potrebu za selenom i uglavnom ne podnose koncentracije veće od 10-100  $\mu\text{g/g}$  suhe težine u tkivima, no vrste koje pripadaju obitelji Brassicaceae mogu akumulirati selen u tkivima i tolerirati koncentracije do 1000  $\mu\text{g/g}$  suhe težine. Na taj način, biljke proizvode razne seleno metabolite koji mogu imati ulogu kao sredstva za sprječavanje raka, primjerice Se-metilselenocistein (SeMetCys). Se-aminokiseline mogu zamijeniti S-analoge poput aminokiselina cisteina i metionina u proteinima, čime se narušava njihov stanični metabolizam.<sup>4</sup>

Jedan od primjera asimilacije selena u biljkama je selenometionin, analog metionina, koji može biti izvor uskladištenog selena u ljudskom tijelu. Sintetski proizvedeni izotiocijanati koji sadrže selen, selenosulforafan, 4-(metilsulfinil)butil-izoselenocijanat i fenilalkil-izoselenocijanti su snažni inhibitori rasta stanica raka i tumora nego što su to njihovi analozi sumpora. Dokazano je da se umjesto sumpora u pokranjem lancu

glukozinolata može ugraditi atom selena. Pri razgradnji istih hidrolizom će nastati različiti produkti.<sup>16</sup>

Prema definiciji Bertelsen i dr. (1988) selenoglukozinolati s pretostavljenim selenom na anomernoj poziciji nisu glukozinolati jer na istom nastaju izoselenocijanati (slika 1.8). Međutim, prisutnost selena u bočnom lancu koja je dokazana o biljkama brokuli i rikuli u potpunosti odgovara definiciji glukozinolata jer razgradnjom nastaju selenoizotiocijanati, te se koristi naziv selenometionin derivirani glukozinolati, a kako bi se izbjeglo miješanje s selenoglukozinolatima prema Bertelsen i dr. (slika 1.8).<sup>6</sup>



**Slika 1.8.** Selenoglukozinolat, odnosno prekursor izoselenocijanata prema istraživanju Bertelsen et al (1988)<sup>6</sup>

#### 1.4. Metode izolacije hlapljivih spojeva

Glukozinolati su vodotopljive komponente te je prije izolacije potrebno poznavati biljni materijal, kao i spojeve koji su potencijalno prisutni. Odabrana metoda mora biti prikladna sa što manjim gubicima hlapljivih spojeva i bez nastanka artefakata. Također, metoda ne bi trebala uzrokovati promjenu pH, termičku degradaciju aromatičnih spojeva niti oksidaciju ili redukciju. Hlapljivi spojevi se izoliraju korištenjem metoda koje se razlikuju po njihovoj učinkovitosti i selektivnosti, a neke od najčešćih metoda su ekstrakcija tekuće-tekuće, ultrazvučna ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija i mikroekstrakcija vršnih para na čvrstoj fazi.<sup>17</sup>

##### 1.4.1. Ekstrakcija hlapljivih spojeva

Ekstrakcija je prvi korak u analizi biljke zato što je potrebno izdvojiti komponente iz biljnog materijala za daljnju izolaciju i karakterizaciju. Koristi se za izravnu izolaciju prirodnih

spojeva iz biološkog materijala te se uglavnom koristi ekstrakcija otapalom. Najčešća otapala su diklormetan, smjesa pentana i dietil-etera, heksan, aceton, etanol i dr. Otapalo je važno izabrati na temelju niske temperature vrenja, da se što lakše ukloni bez da se izgube hlapljivi spojevi, a također je i važno odabrati otapalo pogodno za ekstrakciju polarnih i nepolarnih spojeva. Prednosti metode su jednostavnost i kvantitativnost, dok su neke od mana da uklanjanjem otapala možemo izazvati gubitak najisparljivijih spojeva, otapala mogu biti toksična i/ili zapaljiva, potrebna je veća količina uzorka da bi se dobio koncentrirani ekstrakt, može se pojaviti emulzija te na kromatogramu pik otapala može prekriti rano izlazeće isparljive spojeve.<sup>17</sup>

### **1.5. Metode odjeljivanja i identifikacije**

Instrumentne metode najčešće korištene u identifikaciji hlapljivih spojeva su vezani sustav plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS). Plinska kromatografija osigurava odjeljivanje spojeva iz smjese, dok se masena spektrometrija koristi za identifikaciju individualnih komponenti. Nehlapljive spojeve možemo razvojiti visokoučinkovitom tekućinskom kromatografijom (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), dok iza identifikaciju se često koriste UV/Vis ili DAD, te MS detektori.<sup>17</sup>

#### **1.5.1. Kromatografija**

Kromatografija je metoda odjeljivanja komponenti između 2 faze, stacionarne i mobilne. Time se razdvajaju antibiotici, hormoni, vitamini, terpeni, alkaloidi i drugi srodni spojevi. Mobilna faza je kapljevina ili plin, dok je stacionarna faza krutina ili kapljevina. Mobilna faza pod utjecajem kapilarnih sila, sile teže ili razlike tlakova putuje preko ili uzduž stacionarne faze te se uspostavlja dinamička ravnoteža spoja između mobilne i stacionarne faze. Različiti spojevi zbog specifične interakcije reagiraju sa stacionarnom i mobilnom fazom, putuju različitim brzinama i na taj način se odjeljuju.

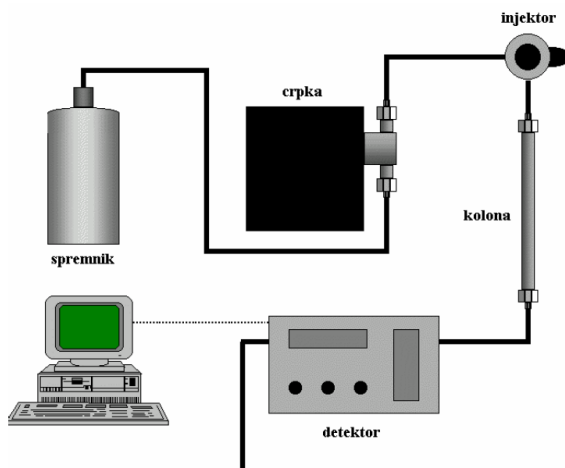
Proces odjeljivanja smjese se temelji raznim načelima, poput adsorpcije, razdjeljenja, difuzije, ionskoj izmjeni, kiralnosti i dr. Prednost metode je da uslijed ponavljanja postupka, ponavlja se i uzastopno uspostavljanje ravnoteže i dolazi do dobrog odjeljivanja tvari.<sup>17</sup>

### 1.5.2. Visoko učinkovita tekućinska kromatografija (HPLC)

Visoko učinkovita tekućinska kromatografija je analitička metoda koja služi za odvajanje i identifikaciju glukozinolata od biljnog ekstrakta, a na uspješnost kromatografije utječu čimbenici poput brzine mobilne faze, temperature sustava, omjera mase tvari koja se odjeljuje i stacionarne faze, veličine i oblika čestice stacionarne faze i dr. (slika 1.9).

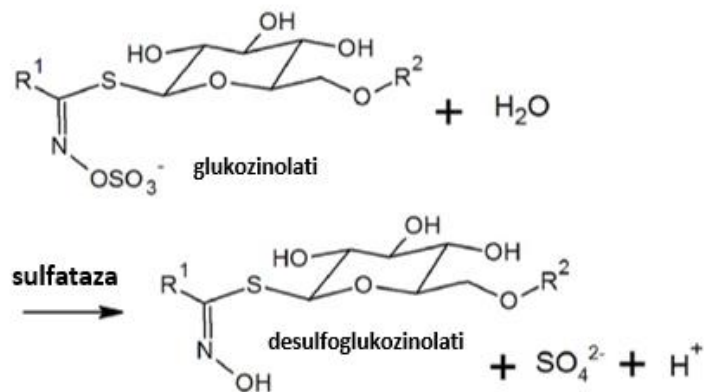
Glukozinolati se određuju preko svojih desulfo oblika te je za njihovo određivanje vrlo često korištena HPLC tehnika u kombinaciji s DAD i MS detektorom (HPLC-DAD-MS/MS).

Enzimaska desulfatacija je razvijena metoda kojom se omogućuje polukvantitativna analiza velikog broja glukozinolata. Analiza se sastoji od izdvajanja glukozinolata u uvjetima koji inaktiviraju mirozinazu te propuštaju ekstrakt kroz anionsko izmjenjivačku kolonu za vezanje svih aniona, zatim se dodaje enzim sulfataza kako bi se omogućila enzimaska hidroliza esterskih sulfatnih veza u glukozinolatima te da bi nastali desulfoglukozinolati (slika 1.10). Na kraju se eluiraju nenabijeni desulfoglukozinolati s kolone. Nedostatak metode je da se neki glukozinolati ne mogu odrediti ovom metodom, poput glukozinolata s negativno nabijenim bočnim lancem (izvedeni iz alanina i triptofana) te se njihovi desulfo derivati neće eluirati iz materijala za zamjenu aniona koji se koristi za desulfataciju. Unatoč problemima povezanih s desulfatacijom u analizi glukozinolata, prednosti metode su jednostavno tumačenje zbog jednostavnijih kromatograma, dobro utvrđena kvantifikacija i jednostavno povećanje za izolaciju i NMR.<sup>6</sup>



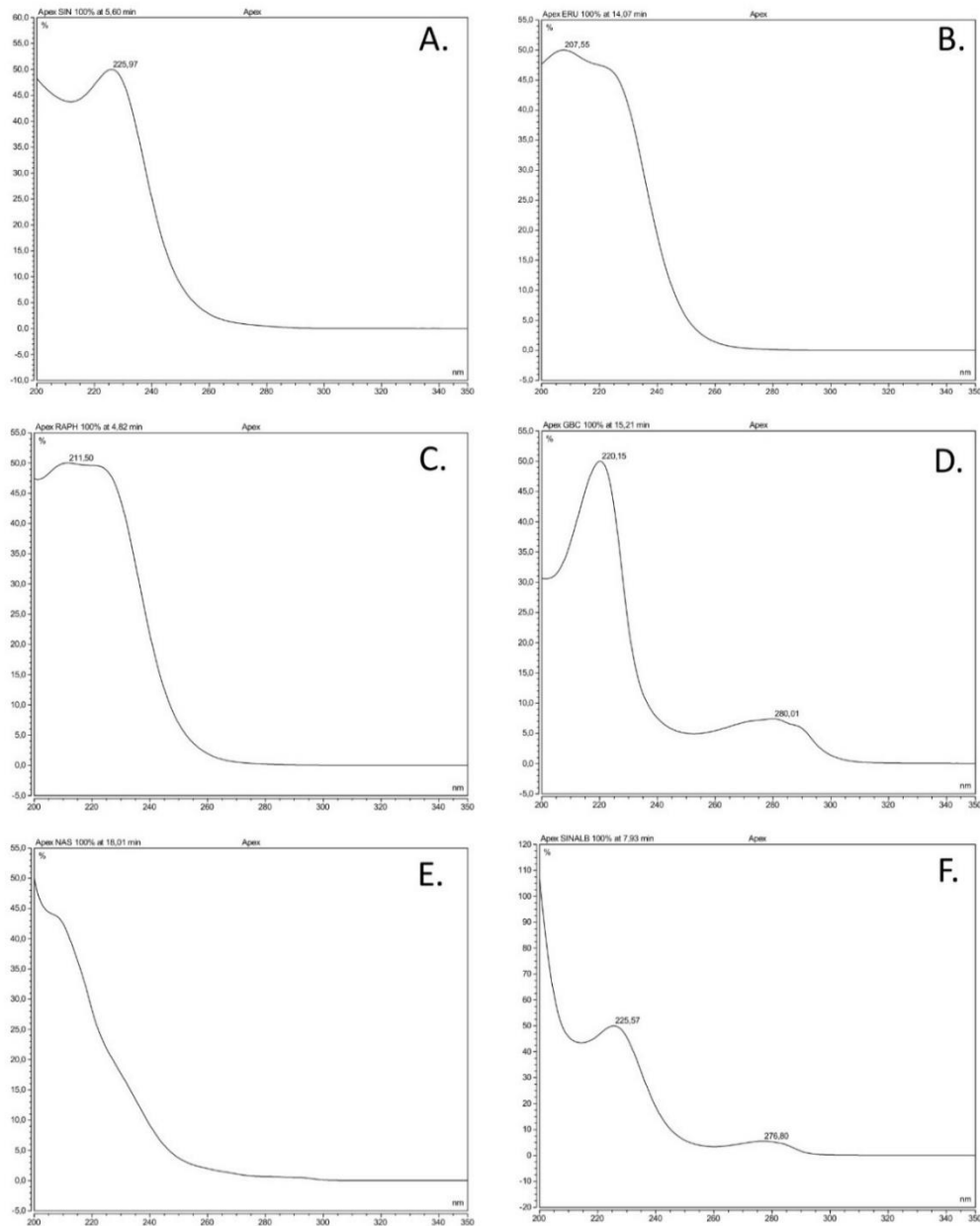
**Slika 1.9.** Shematski prikaz visoko učinkovite tekućinske kromatografije<sup>18</sup>





**Slika 1.10.** Reakcija desulfatacije katalizirana sulfatazom<sup>6</sup>

DAD (engl. *diode array detector*) služi za snimanje UV-VIS apsorpcijskog spektra uzorka koji prolaze kroz HPLC uređaj. Prednost DAD je u tome što je svjetlo usmjereno izravno na protočnu kivetu, prolazi kroz nju i raspršuje se difrakcijskom rešetkom, a količina raspršene svjetlosti se procjenjuje za svaku valnu duljinu u fotodiodnom polju.<sup>21</sup> Na slici 1.11. su prikazani spektri najčešćih klasa glukozinolata.



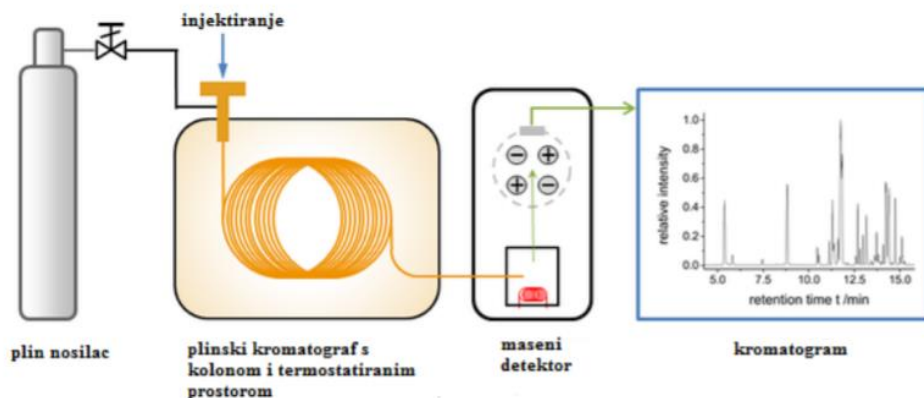
**Slika 1.11.** UV spektri najčešćih klasa glukozinolata. UV apsorpcijski spektri (200-350 nm) šest najčešćih desulfoglukozinolata (dGSL). **(A)** Sinigrin (prop-2-enil dGSL), alkenil; **(B)** glukoerucin (4-metiltiobutil dGSL), tioalkenil; **(C)** glukorafanin (4-metilsulfinilbutil dGSL), sulfinil; **(D)** glukobrasicin (indol-3-ilmetil dGSL); **(E)** glukonasturtiin (2-feniletil dGSL), aromatski; **(F)** sinalbin (4-hidroksibenžil dGSL), aromatski.<sup>20</sup>

### 1.5.3. Vezani sustav plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)

Plinska kromatografija se koristi za odjeljivanje hlapljivih spojeva i to je najčešće korištena tehnika. Uzorci za analizu trebaju biti hlapljivi i stabilni na temperaturi zagrijavanja kromatografske kolone. Kao mobilna faza se koristi inertni plin nositelj (uglavnom je to inertni plin poput He, Ar, N<sub>2</sub>), dok je stacionarna faza nehlapljiva kapljevina ili čvrsta tvar velike specifične površine.

Princip rada spektrometrije masa (engl. *mass spectrometry*, MS) se temelji na ionizaciji spoja dovođenjem energije molekuli. Time se iz molekule izbacuje 1 ili više elektrona te nastaje molekulski kation (M<sup>+</sup>) koji ovisno o strukturi i dovedenoj energiji može dodatno fragmentirati. Informacije o strukturi molekule dobivamo iz različitih fragmenta molekulskog kationa (M<sup>+</sup>), preuređenih iona s različitim intezitetima te iz omjera m/z. Iz spektra mase možemo odrediti strukturu molekule na temelju pojave intenzivnih pikova na određenim m/z te povezati empirijski s određenim strukturnim elementima. Drugi način je poznavanje načela fragmentiranja iona, gdje se slabe veze najlakše kidaju te nastaju stabilni fragmenti, ioni, prateći radikali i male molekule.<sup>17</sup>

Analiza glavnih produkata razgradnje glukozinolata, izotiocijanata i nitrila, provodi se vezanim sustavom GC-MS (slika 1.12). Metoda je veoma osjetljiva, no kvalitativna i kvantitativna analiza ima i određene poteškoće, poput slabe hlapljivosti nekih spojeva ili nestabilnost određenih spojeva pri povišenim temperaturama.



**Slika 1.12.** Shematski prikaz vezanog sustava plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS)<sup>18</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni materijal

#### 2.1.1. *Eruca vesicaria* (L.) Cav.

U eksperimentu su korištene sjemenke rikule (slika 2.1.), njemačkog proizvođača Kiepenkerl. Biljke su posađene na rešetke za kultivaciju i uzgajane u laboratoriju tijekom 7 dana u običnoj vodi. U vodu je također dodana otopina selena u različitim koncentracijama (1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm i 10 ppm).

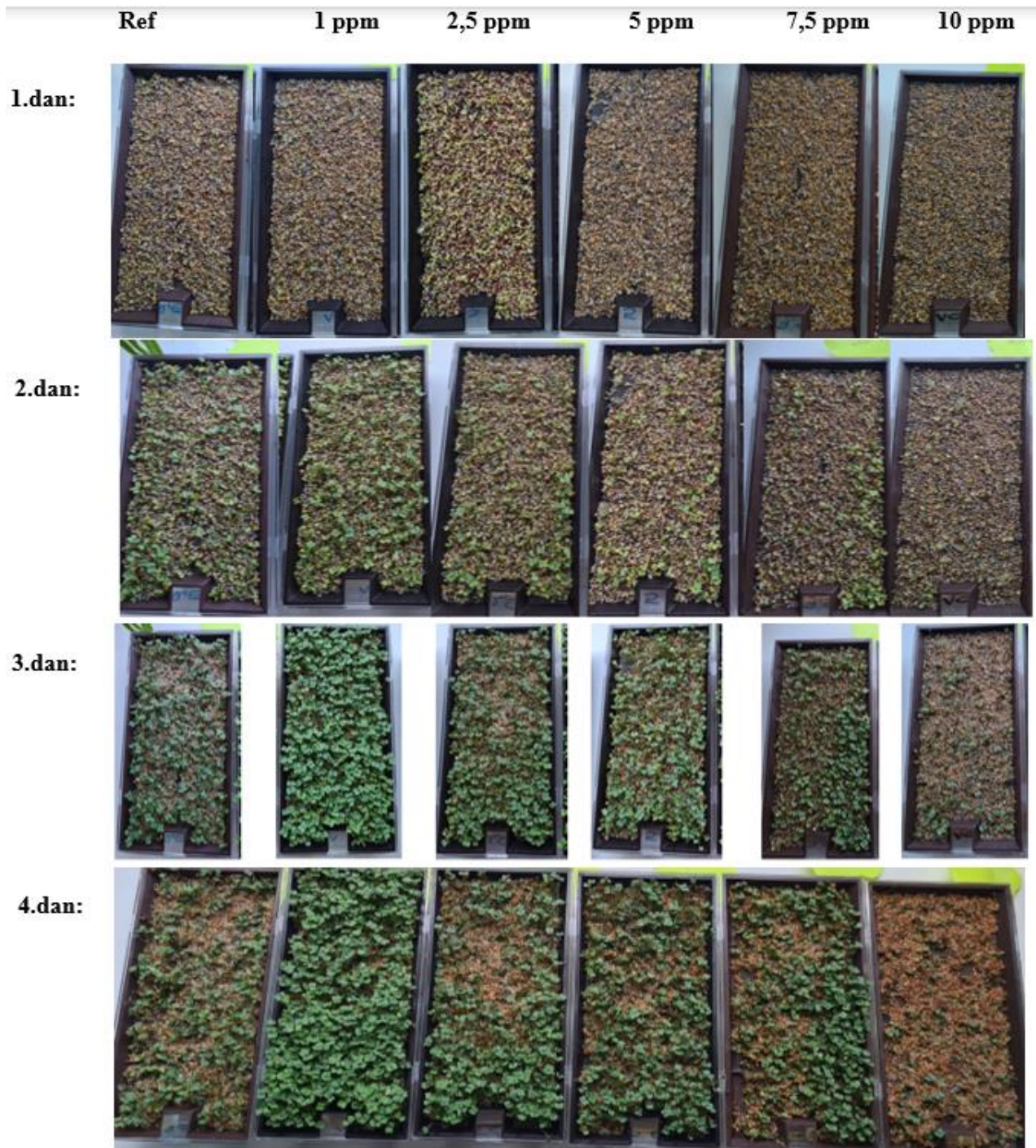


Slika 2.1. Sjemenske rikule

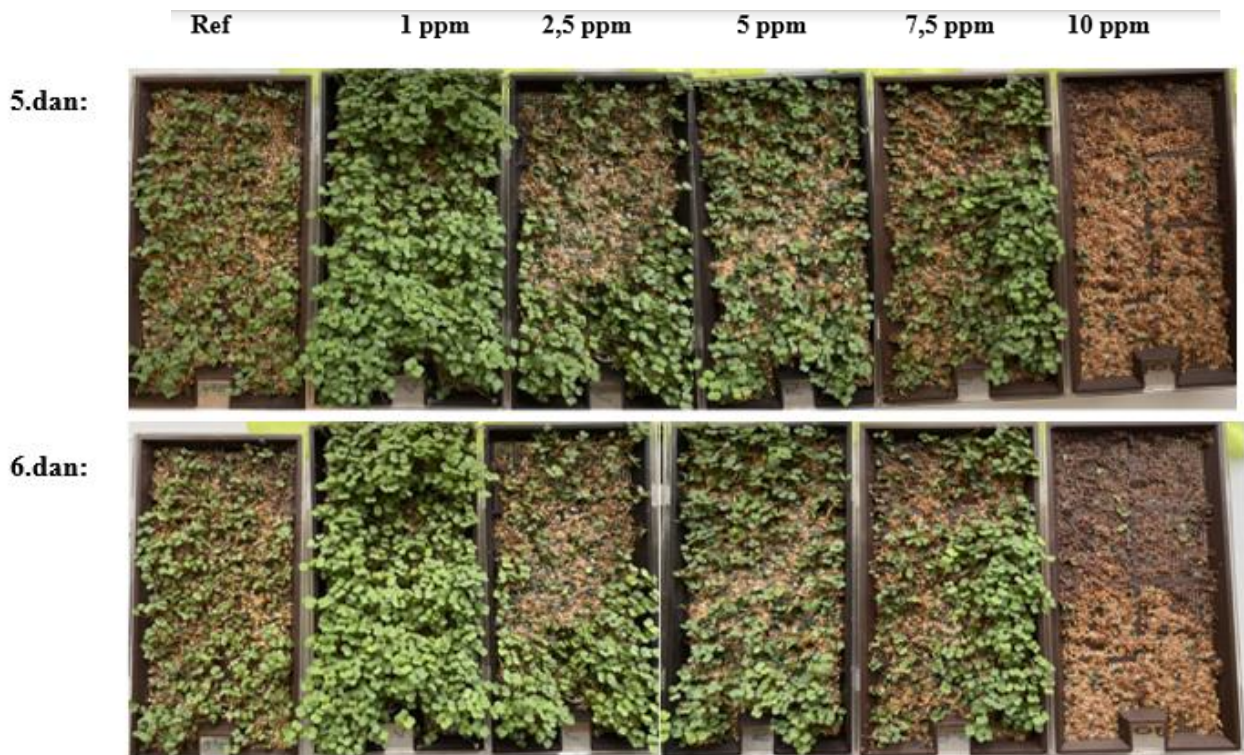
Korištena je otopina selena kao standard (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) za pripremu otopina koncentracija 1; 2,5; 5, 7,5 i 10 ppm kojim su zalijevane klice. Klijanje i rast klica praćeni su po danima (slika 2.2.). Nulti dan sjeme je postavljeno na rešetke i dodana je vodovodna voda kao referentna, a ostale su zalivene pripremljenim otopinama selena. Prvi dan se može uočiti da su klice zalijevane otopinom selena koncentracije 2,5 ppm najbolje proklijale, ali su se zato 2. dan klice Se 1 ppm vidno poboljšale i naglo proklijale. Referentna rikula je bila lošija od očekivane i nije rasla sukladno očekivanju. Niže koncentracije Se nisu znatno ometale rast klice, dok su veće koncentracije uzrokovale trovanje i propadanje klica.

Materijal se izdvojio sa korijenjem, osušio i samlio (slika 2.3).









**Slika 2.2.** Razvoj klica rikule po danima tretiranih različitim koncentracijama otopine Se



**Slika 2.3.** Osušeni biljni materijal za ekstrakciju.

Mase biljnog materijala korištene za ekstrakciju glukozinolata i ekstrakciju hlapljivih razgradnih produkata prikazane su u tablici 1.

**Tablica 1.a** Mase uzoraka rikule za ekstrakciju glukozinolata.

Rikula klice Ref 1	$m= 100,00$ mg
Rikula klice Ref 2	$m= 99,99$ mg
Rikula klice 1 ppm (1)	$m= 100,00$ mg
Rikula klice 1 ppm (2)	$m= 100,03$ mg
Rikula klice 2,5 ppm (1)	$m= 100,05$ mg
Rikula klice 2,5 ppm (2)	$m= 99,99$ mg
Rikula klice 5 ppm (1)	$m= 100,05$ mg
Rikula klice 5 ppm (2)	$m= 100,03$ mg
Rikula klice 7,5 ppm (1)	$m= 100,05$ mg
Rikula klice 7,5 ppm (2)	$m= 100,01$ mg
Rikula klice 10 ppm (1)	$m= 100,04$ mg
Rikula klice 10 ppm (2)	$m= 100,07$ mg
Rikula sjeme (1)	$m= 100,00$ mg
Rikula sjeme (2)	$m= 100,00$ mg

**Tablica 1.b** Mase uzoraka rikule za ekstrakciju hlapljivih razgradnih produkata

Rikula 5 ppm	$m= 1124,27$ mg
Rikula 7,5 ppm	$m= 700,43$ mg

## 2.2. Kemikalije i aparatura

### Kemikalije:

- metanol (MeOH) 70%, Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- ultračista voda
- standard selena u 2% HNO<sub>3</sub>, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD
- dekstran (DEAE-sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- natrijev acetat (NaOAc), Merck, Darmstadt, Njemačka
- bezvodni natrijev sulfat (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, VWR International, Radnor, Pennsylvania, SAD

- sulfataza (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- natrijev klorid (NaCl), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska
- acetonitril, Honeywell, Charlotte, Sjeverna Karolina, SAD
- enzim tioglukozidaza (mirozinaza), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- diklormetan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), T.T.T, Sveta Nedjelja, Hrvatska.

#### **Aparatura:**

- električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- analitička vaga, Explorer® Semi-Micro, OHAUS, Parsippany, New Jersey, SAD
- lijevak za odjeljivanje, Deotto Lab, Zagreb, Hrvatska
- uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, Ethos X; Milestone Srl, Sorisole, Bergamo, Italija
- ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka
- centrifuga, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka
- vorteks, Dragon lab, MX-S
- uređaj za uparavanje strujom dušika, EC-IV-130, VLM, Bielefeld, Njemačka
- uređaj za liofilizaciju, Labconco Corporation, Kansas, Missouri, SAD
- GC-MS, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD
- UHPLC-DAD-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD.

### **2.3. Izolacija hlapljivih spojeva ekstrakcijom**

Za kvalitativnu analizu, uzgojene klice rikule tretirane otopinom selena koncentracije 5 ppm i 7,5 ppm i dodan je 1 mL enzima mirozinaze (slika 2.4.) te je prekriveno parafilmom i ostavljeno preko noći. Sadržaj tikvice se filtrirao pomoću filter papira u lijevak za odjeljivanje (slika 2.5.) te je dodan diklormetan. S obzirom da je gustoća diklormetana veća u odnosu na vodu, on se nalazi na dnu lijevka. Ekstrakcija se izvodi 2 puta te se diklormetanski sloj izdvaja u suhu čašu nakon čega se suši sa bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Uzorak se čuva na -20 °C do GC-MS analize.





Slika 2.4. Uzorci rikule tretirani sa 1 ml mirozinaze.



Slika 2.5. Ekstrakcija hlapljivih spojeva iz uzorka *Eruca vesicaria*

#### 2.4. Ekstrakcija glukozinolata

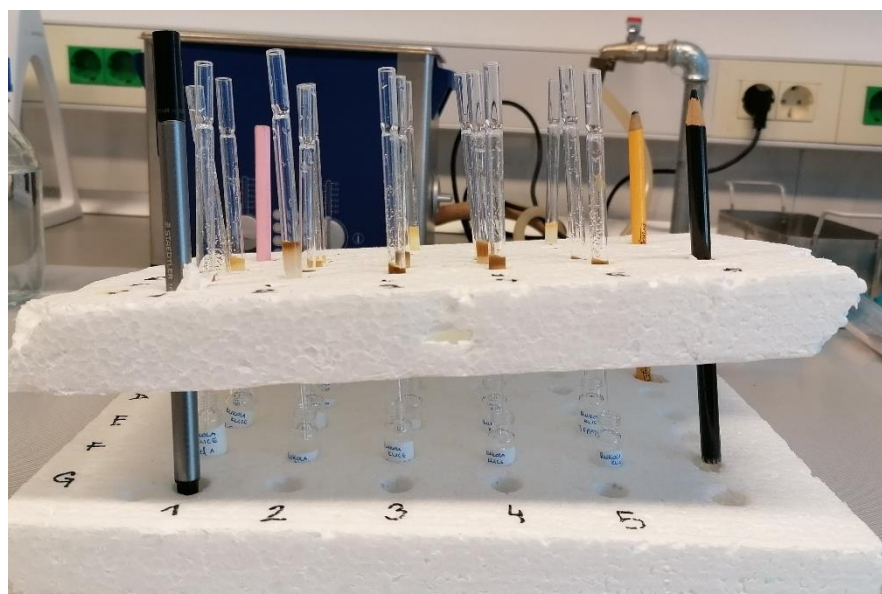
Osušeni biljni materijal je usitnjen u mlincu za kavu i ~100 mg je prebačeno u mikroeprevete. S obzirom da je metanol pogodno otapalo za ekstrakciju glukozinolata, pipetirano je 1 mL

70%-tnog MeOH u svaku epruvetu i stavljeno je na miješanje. Mikroeprevete se stavljaju u vruću vodenu kupelj na  $\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min kako bi se inaktivirala mirozinaza koja bi inače razgradila glukozinolate, a to je nepoželjna reakcija. Zatim se prebaci u ultrazvučnu kupelj na  $\sim 15$  minuta i centrifugira na 6000 rpm 10 minuta (slika 2.6).



**Slika 2.6.** Uzorci rikule i centrifuga

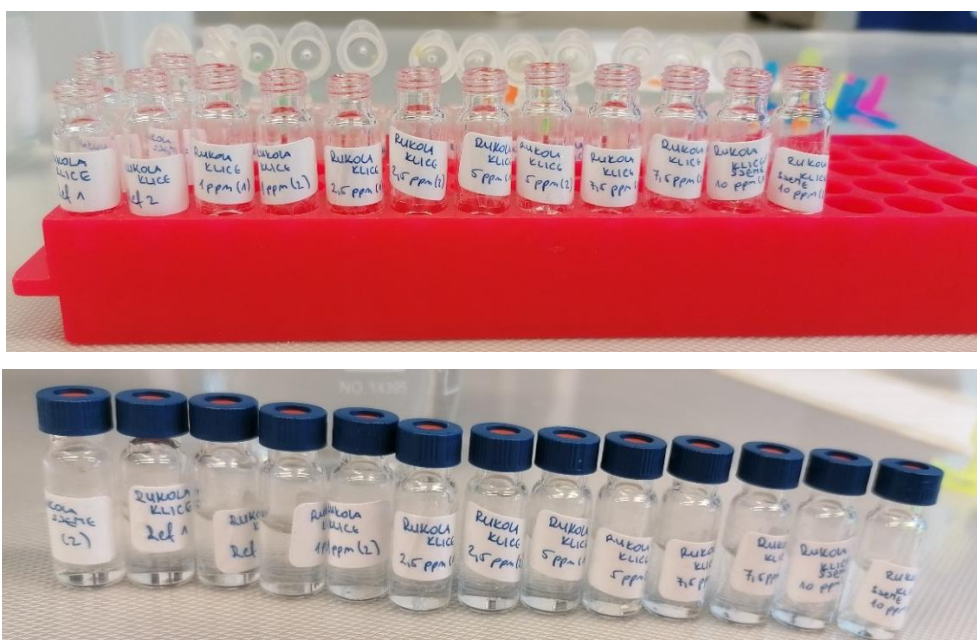
Odvoji se supernatant od biljnog materijala te se dodaje na kolonu u kojoj se nalazi mljeveni filter papir koji zadržava dekstran gel (slika 2.7).



**Slika 2.7.** kolona za pročišćavanje glukozinolata

Ekstrakcija je ponovljena dodatkom novog obroka metanola. Supernatant je opet dodan na kolonu te je u svrhu pročišćavanja glukozinolata na svaku kolonu dodano 2 puta po

1 mL MeOH da bi se uklonile apolarne komponente iz ekstrakta. MeOH se ispere dodavanjem 1 mL ultračiste vode u svaku kolonu. Zatim je dodano 2 puta po 1 mL NaOAc pufera u svaku kolonu da bi se stvorili optimalni uvjeti za dodavanje enzima sulfataze čija je uloga hidroliza sulfatnih estera. Dno kolone se osuši i postavi iznad označenih cetrifugalnih mikropruveta za ekstrakte. U svaku kolonu je dodano 20  $\mu$ L otopine sulfataze i 50  $\mu$ L NaOAc pufera (za ravnomjerno raspoređivanje sulfataze) te je prekriveno aluminijskom folijom i ostavljeno preko noći. U kolone je zatim dodatno 2 puta po 0,75 mL ultračiste vode da bi se eluirali desulfoglukozinolati. Uzorci su liofilizirani te je dodano 1 mL ultračiste vode da bi se suha tvar otopila, zatim su prebačeni u bočice za HPLC i čuvani u zamrzivaču do analize (slika 2.8).



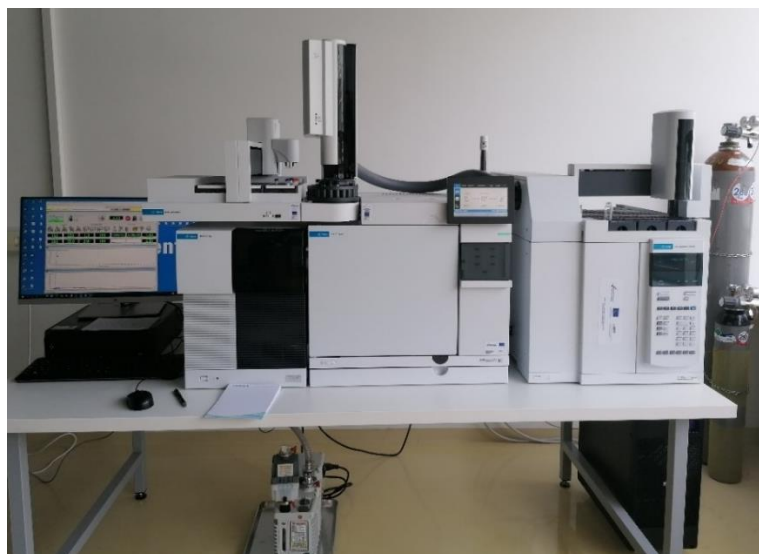
**Slika 2.8.** Uzorci pripremljeni za liofilizaciju (gornja slika) i uzorci pripremljeni za HPLC analizu (donja slika)

## 2.5. Metode analize

### 2.5.1. GC-MS analiza

Korišten je uređaj vezani sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC-MS sustav) Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornija, SAD) za kvalitativnu identifikaciju hlapljivih spojeva (slika 2.9).





**Slika 2.9.** GC-MS uređaj

Uzorci su prvo upareni u struji dušika na manji volumen na temperaturi vrenja otapala kako bi bio izbjegnuta nepoželjni gubitak hlapljivih spojeva (slika 2.10) te su zatim analizirani u GC-MS uređaju.



**Slika 2.10.** Uređaj za uparavanje u struji dušika

Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni HP-5MS UI (30 m x 0.25 mm, Agilent Inc., Santa Clara, CA, USA). Plin nositelj je helij, protok je postavljen na 1 mL/min, zadana temperatura injektora 250 °C te je volumen injektiranog uzorka 1  $\mu$ L. Temperatura kolone je

iznosila 3 min po 60 °C, zatim se zagrijavalo na 246 °C brzinom od 3°C/min te se ta temperatura zadržavala 25 min. Energija ionizacije uzorka u spektrofotometru iznosi 70 eV te je temperatura izvora iona postavljena na 200 °C, a područje skeniranja iznosi 40-350 masenih jedinica.

Pomoću biblioteke spektara masa (Wiley MS library) uspoređeni su spektri masa iz biblioteke sa dobivenim spektrima masa hlapljivih spojeva.

### 2.5.2. UHPLC-DAD-MS/MS analiza

UHPLC-DAD-MS/MS je uređaj za analizu desulfoglukozinolata dobivenih ekstrakcijom glukozinolata (UHPLC-DAD-MS/MS Ultimate 3000 RS s TS Quantis MS/MS detektorom) na koloni Hypersil GOLD 3.0 mm × 100 mm, promjera čestica 3.0 μm (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, SAD) (slika 2.11.). Korištena mobilna faza je voda i NaCl (otapalo A) i 30%-tni acetonitril (otapalo B), dok je protok 0,5 mL/min i temperatura kolone 25 °C. Injektirani volumen uzorka je iznosio 5 μL. Najprije izlaze polarnije komponente zbog većeg postotka otapala A te onda slijede nepolarne komponente zbog sve većeg postotka acetonitrila. Metoda traje 15,7 minuta. Signal je sniman DAD detektorom pri 227 nm dok su maseni spektri snimani pri 350 °C u pozitivnom modu.

Kao eksterni standard za kvantizaciju desulfoglukozinolata je korištena kalibracijska krivulja desulfosinigrina za raspon koncentracija od 13,56 do 542,50 μM. Prilikom izračuna pojedinog dobivenog desulfoglukozinolata korištene su literaturne vrijednosti za faktore odaziva.



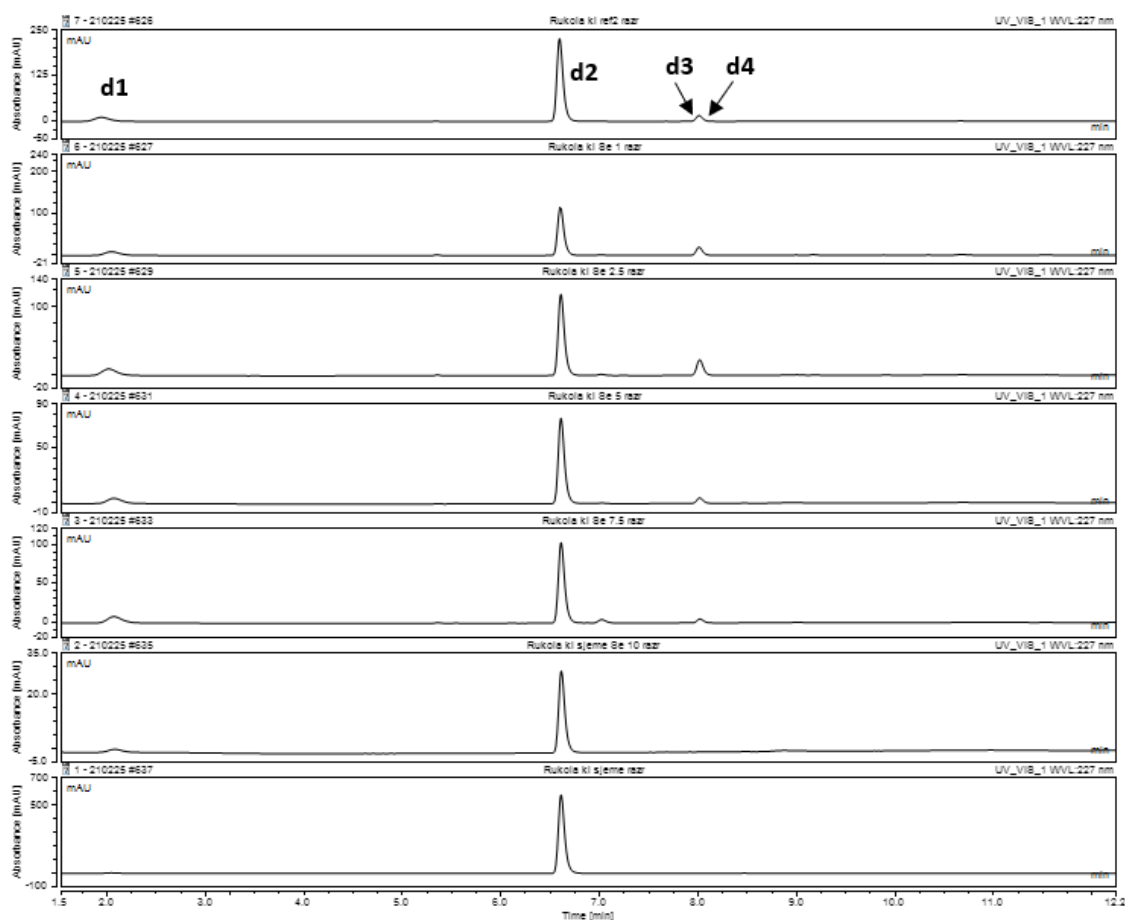
Slika 2.11. Uređaj UHPLC-DAD-MS/MS

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

Kao biljni materijal korišteno je sjeme *Eruca vesicaria* (L.) Cav. koje je uzgojeno na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu tijekom 7 dana. Biljka je uzgojena na rešetci za uzgoj. Rešetka je postavljena iznad posude te su sjemenke ravnomjerno raspoređene po njoj i dodana je voda do vrha posude toliko da dodiruje rešetku odozdo. Posuda je stajala na svijetlom mjestu, ali ne na direktnoj sunčevoj svjetlosti. Kao što je prethodno opisano, najpogodnije su bile niže koncentracije otopine selena za rast klica ( 1 ppm i 2,5 ppm). Veće koncentracije su uzrokovale propadanje klica čime je pokazano da veće koncentracije selena nisu pogodne za biljku. Cilj ovog rada bio je odrediti hlapljive spojeve biljne vrste *Eruca vesicaria* pomoću GC-MS sustava te odrediti je li biljka apsorbirala i unijela u biosintezu selen umjesto sumpora.

#### **3.1. UHPLC-DAD-MS/MS analiza**

Slika 3.1 prikazuje kromatograme uzoraka desulfoglukozinolata tretiranih različitim koncentracijama selena.



**Slika 3.1.** Kromatogrami uzoraka *Eruca vesicaria* (L.) Cav.

d1- desulfoglukorafanin; d2- desulfoglukoerucin; d3- 4-metoksiglukobrasicin; d4- dimer glukosativina

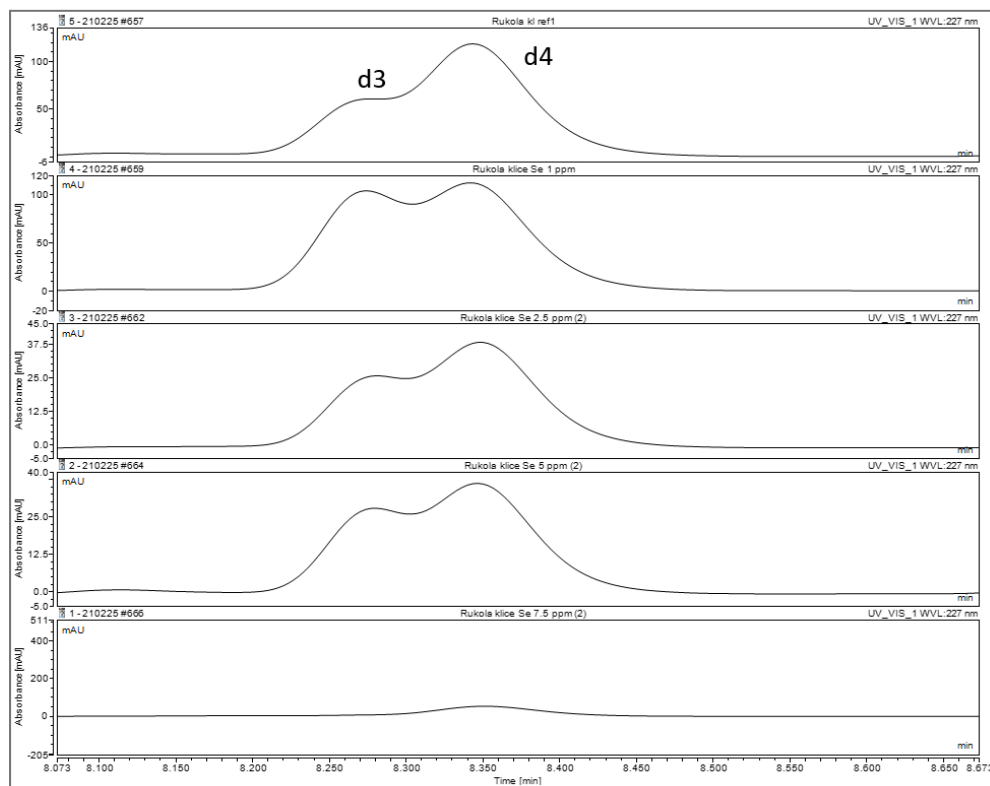
Analizom je utvrđeno da uzorci sadrže 4 desulfoglukozinolata: desulfoglukorafanin, desulfoglukoerucin, 4-metoksiglukobrasicin i dimer glukosativina. Identifikacija navedenih spojeva je provedena preko masenih spektara pojedinog signala. Prvo je sniman cijeli spektar (engl. *full scan*), odnosno spektar svih masa za karakteriziranje molekulskih iona za svaki signal. Tijekom analize u mobilnu fazu je dodan 50 mM natrijev klorid, stoga možemo uočiti da su u masenim spektrima vrijednosti mase desulfoglukozinolata uvećane za masu iona natrija ( $Ar=23$ ), točnije  $[M+Na]^+$ .

U 2,12 min uočen je  $m/z=380$  što usporedbom s literaturnim vrijednostima odgovara desulfoglukorafaninu. Na 6,7 min se pojavljuje spoj  $m/z=364$  za koji se može zaključiti da

je to desulfoglukoerucin što potvrđuje i literaturna vrijednost. Spoju  $m/z=421$  i vremenu zadržavanja 8,34 min odgovara spoj 4-metoksiglukobrasicin koji se preklapa sa dimerom glukosativina  $m/z=675$ , čije je vrijeme zadržavanja 8,28 min. Dimer glukosativina se obično nalazi u odraslim biljkama gdje se glukozinolati međusobno spajaju preko disulfidnog mosta te je iz tog razloga veća masa od ostalih spojeva. Kako bismo provjerili da se radi o glukozinolatu, radi se detaljniji scan (engl. *product ion scan*) koji pokazuje karakteristične pikove za glukozinolate na  $m/z=219$  i  $m/z=185$  što će biti kasnije prikazano. Vrijednost pri  $m/z=185$  odgovara fragmentu heksozida,  $C_6H_{10}O_5$ , dok  $m/z=219$  odgovara fragmentu tioglukoze.<sup>22</sup> 4-Metilglukobrasicin i dimer glukosativina nisu uočeni u sjemenu rikule, što možemo objasniti činjenicom da se biljka prilagođava na rast u danim uvjetima te sintetizira samo spojeve koji su joj neophodni za rast (slika 3.2.).

Na temelju masenog spektra uočeno je preklapanje signala 4-metoksiglukobrasicina i dimera glukosativina stoga se ponovila analiza pri nižoj temperaturi kolone (15 °C) kako bi se signali odvojili i time omogućila točnija kvantizacija. Uzorak zalijevan s otopinom Se koncentracije 10 ppm nije proključao upravo zbog visoke koncentracije.





**Slika 3.2.** Kromatogram glukozinolata 4-metoksiglukobrasicina i dimera glukosativina

U tablici 2. i 3. su prikazane mase pojedinih glukozinolata nađenih u svakom od uzoraka, zajedno sa srednjim vrijednostima koncentracija, faktorom odziva i vremenom zadržavanja. Pokazalo se da rastom biljke nije nastala veća količina glukoerucina, ali je zato sjeme rikule bilo bogato njime. No, sjeme je ostalo siromašno drugim glukozinolatima, detektirane su vrlo male količine glukorafanina, dok ostali glukozinolati nisu identificirani u sjemenu. Također se količina ostalih glukozinolata smanjivala s povećanjem koncentracije selena.

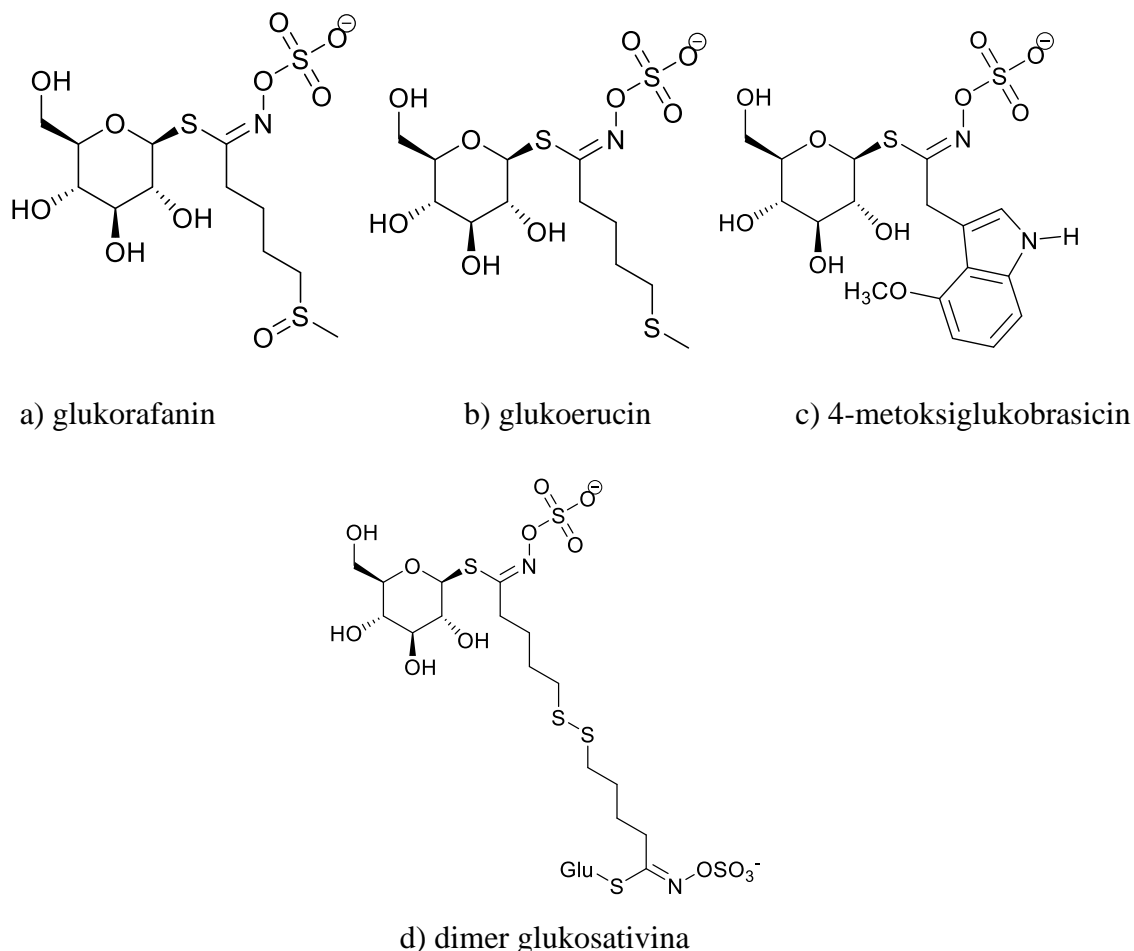
**Tablica 2.** Glukozinolati identificirani u uzorcima *Eruca vesicaria* i srednja vrijednost koncentracije

Ime spoja	Sjeme ( $\mu\text{mol/g}$ )	Ref. Biljka ( $\mu\text{mol/g}$ )	Se 1 ppm ( $\mu\text{mol/g}$ )	Se 2,5 ppm ( $\mu\text{mol/g}$ )	Se 5 ppm ( $\mu\text{mol/g}$ )	Se 7,5 ppm ( $\mu\text{mol/g}$ )	Se 10 ppm ( $\mu\text{mol/g}$ )
Glukorafanin	3,57	9,83	6,60	8,76	4,59	7,10	1,42
Glukoerucin	220,79	84,17	38,59	44,36	30,53	38,61	22,85
Dimer glukosativina	n.a	1,83	2,83	2,79	0,57	0,30	n.a
4- metoksiglukob rasicin	n.a	1,13	0,93	1,55	0,34	0,47	n.a

**Tablica 3.** Glukozinolati identificirani u uzorcima *Eruca vesicaria* i njihovo vrijeme zadržavanja

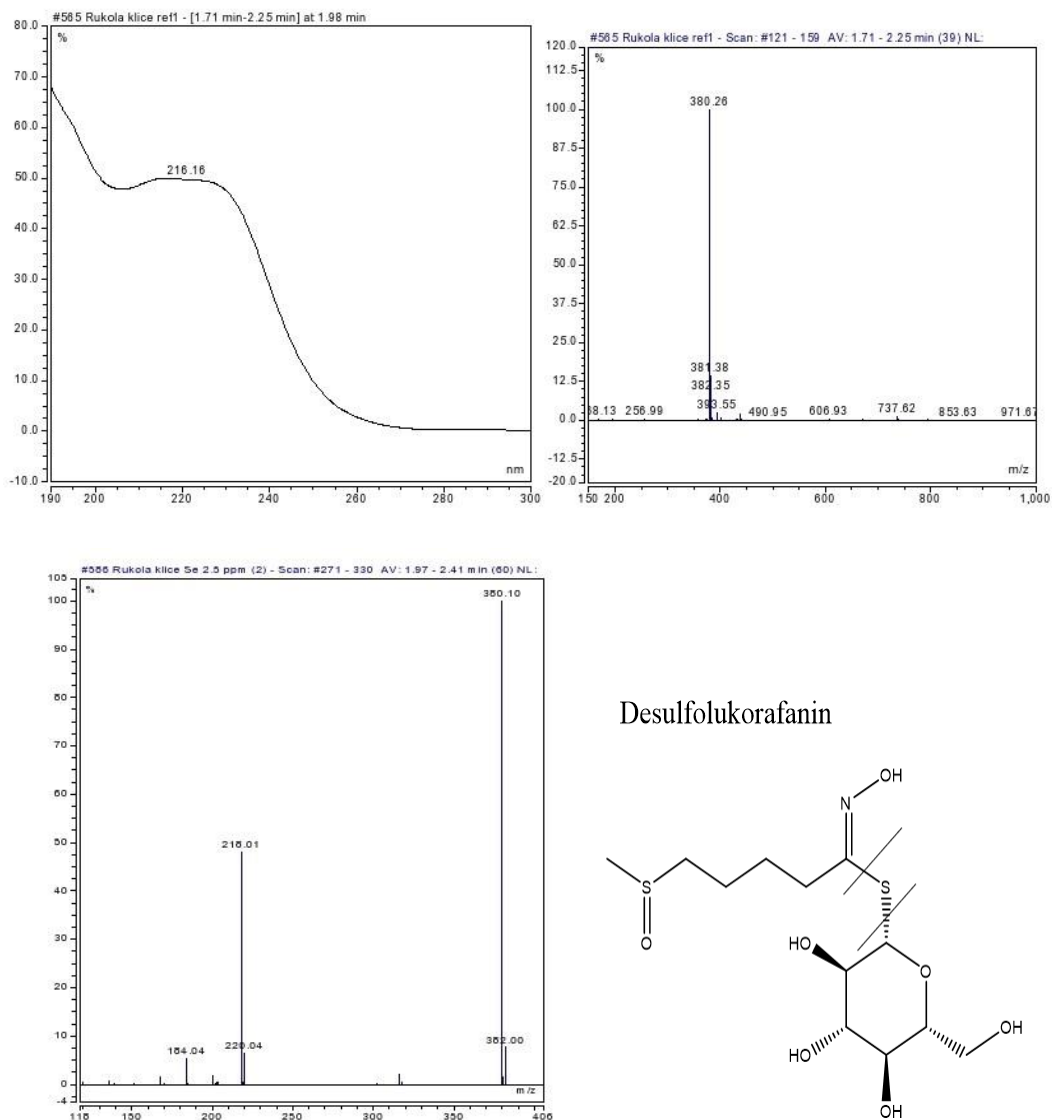
Ime spoja	[M+Na] <sup>+</sup> (m/z)	Vrijeme zadržavanja (min)	Faktor odziva
Glukorafanin	380	2,12	1,07
Glukoerucin	364	6,58	1,04
Dimer glukosativina	675	8,28	1
4-metoksiglukobrasicin	421	8,34	0,25

Na slici 3.3. prikazani su desulfoglukozinolati detektirani na HPLC-DAD-MS/MS uređaju.



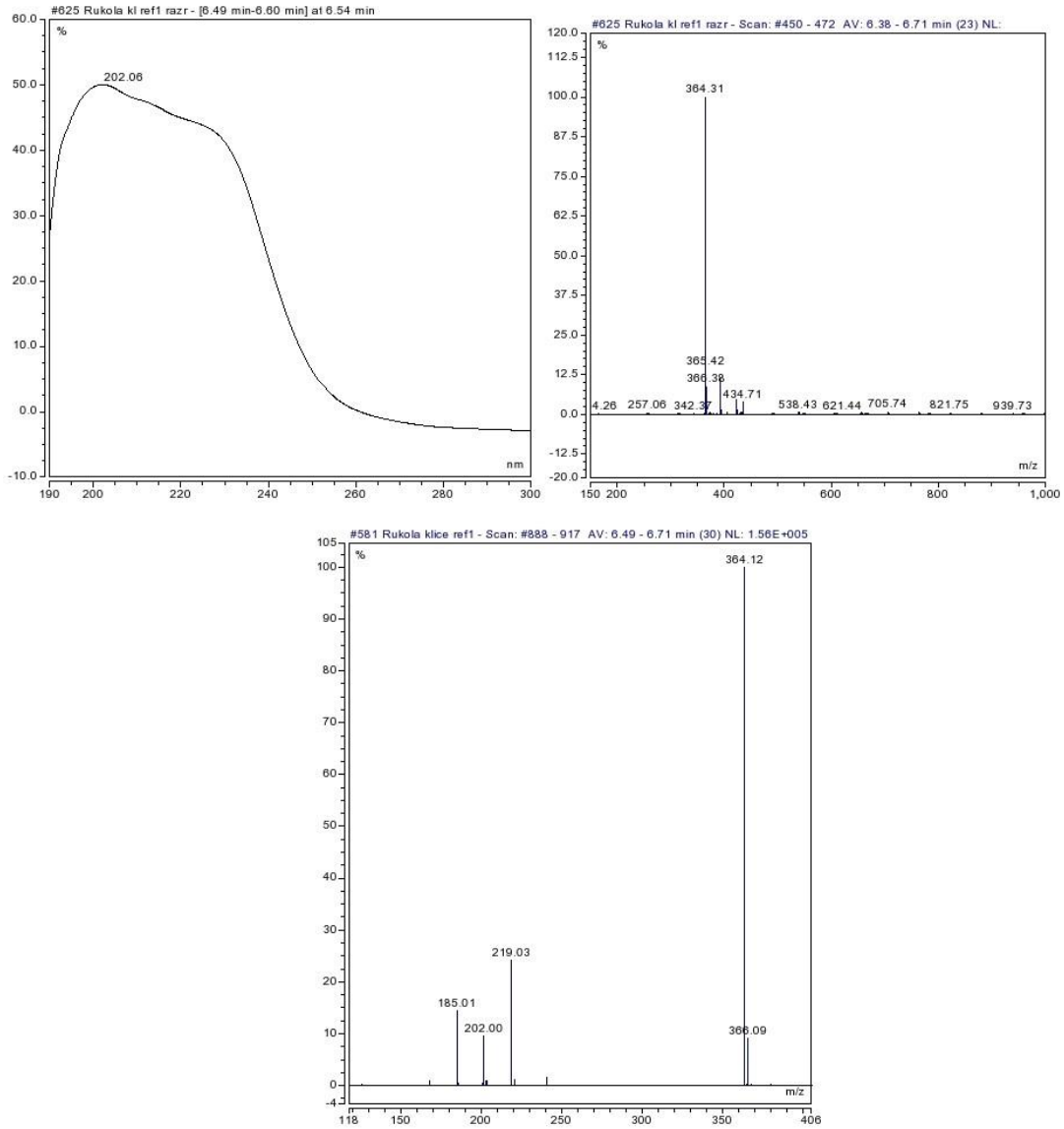
**Slika 3.3.** Detektirani glukozinolati u uzorku *Eruca vesicaria*

Maseni spektar desulfoglukorafanina pokazuje signal  $m/z=380$ . Napravljeno je snimanje produktnih iona (MS2) koji prikazuje karakteristične fragmente  $m/z=219$  i  $m/z=185$ , a to potvrđuje da se radi o glukozinolatima (slika 3.4). Signal  $m/z=219$  odgovara fragmentaciji na tioglukozidnoj vezi i nastaje tioglukoza i ostatak molekule, dok signal  $m/z=185$  odgovara fragmentaciji s druge strane sumpora u desulfoglukorafaninu. Usporedbom dobivenog UV spektra zaključuje se da izgledom odgovara literaturnom budući da je riječ o glukozinolatu sa sulfinilnom skupinom u strukturi što daje karakterističan izgled apsorpcijske vrpce. Također je prikazano na slici i karakteristična mjesta cjepanja glukozinolata na primjeru desulfoglukorafanina.

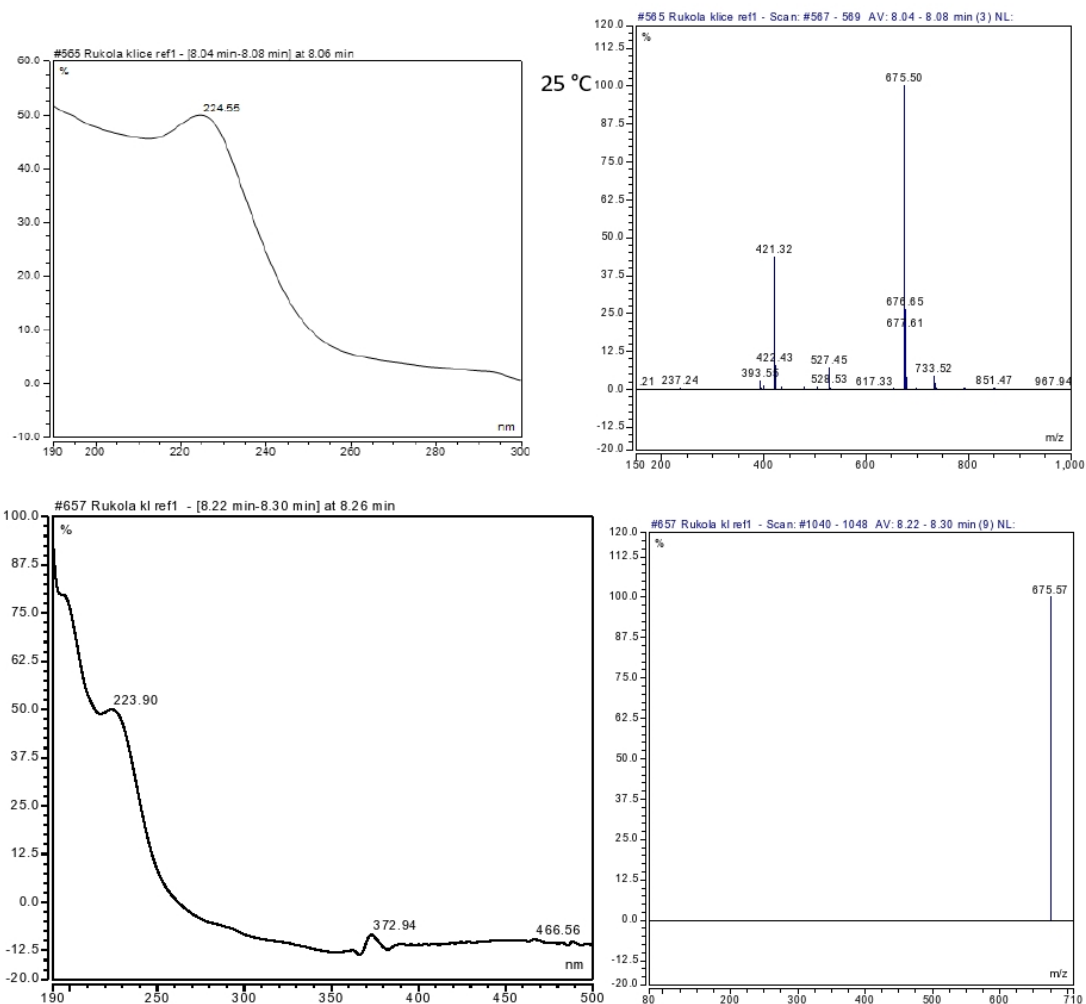


**Slika 3.4.** UV i MS spektar desulfoglukorafanina (gornja slika); MS2 spektar i cijepanje desulfoglukorafanina (donja slika)

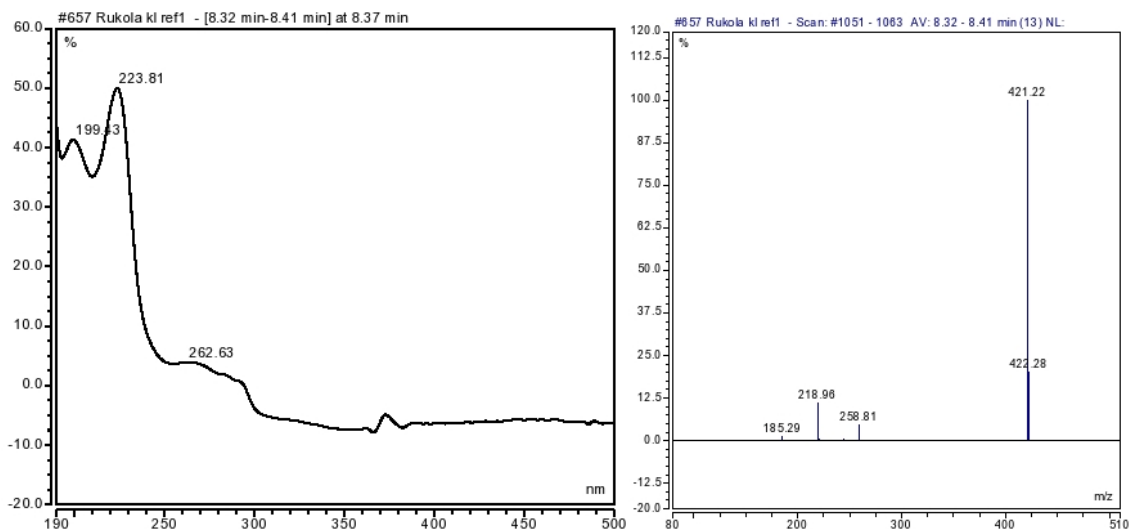
Nadalje, na slici 3.5 su prikazani UV i maseni spektar glukoerucina. Izgled apsorpcijske vrpce UV spektra odgovara strukturi s neoksidiranim sumporom. MS2 prikazuje karakteristične signale za glukozinolate  $m/z=185$  i  $m/z=219$ . Na 8,28 min smo zaključili da se radi o dimeru glukosativina, a na 8,34 min o 4-metoksiglikobrasicinu, no na UV i MS spektrima je vidljivo preklapanje ta 2 spoja te je temperatura kolone snižena sa 25 °C na 15 °C i ponovnim snimanjem pospješilo se razdvajanje (slika 3.6. i 3.7.).



**Slika 3.5.** UV, MS i MS2 spektar desulfoglucorucina



**Slika 3.6.** UV i MS spekter desulfo-4-metoxisuglucobrasicina i dimera desulfoglukosativina pri 25 °C (gornja slika) te UV i MS2 spekter dimera desulfoglukosativina pri 15 °C (donja slika)

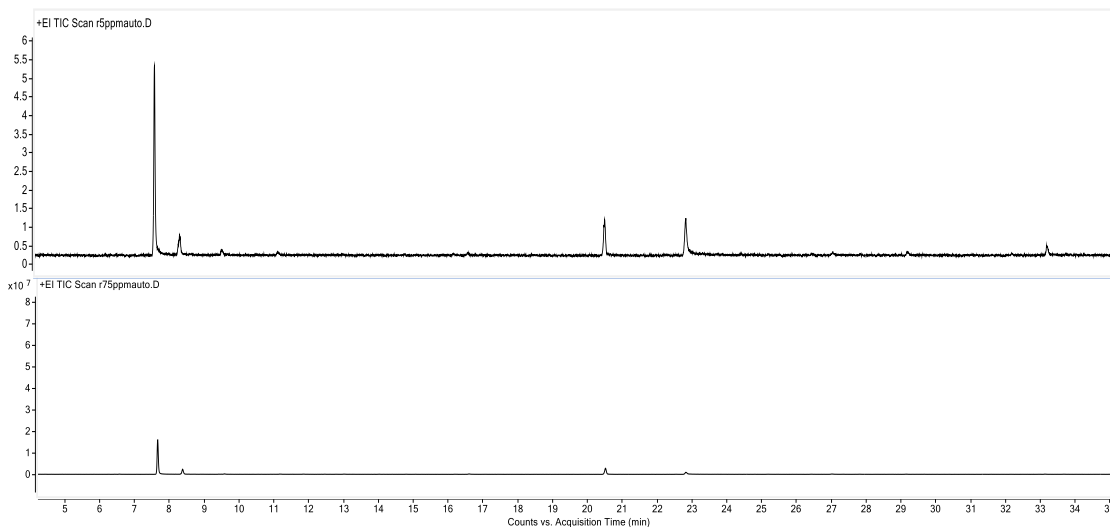


**Slika 3.7.** UV i MS2 spektar desulfo-4-metoksiglukobrasicina

Analizom spektra nije pronađen niti jedan selenoglukozinolat. Da bi se selenoglukozinolati biosintetizirali, očigledno je potreban drugačiji pristup. Primjerice, trebalo bi utjecati na prekursore, odnosno na aminokiseline poput metionina i cisteina. Također, trovanje biljke različitim koncentracijama otopine selena uzrokovalo je propadanje biljke, čime se pokazuje da je potreban drugačiji način tretiranja biljke s prilagođenim koncentracijama.

### 3.2. GC-MS analiza

GC-MS analizom je dobiven kromatogram koji prikazuje hlapljive spojeve klica rikule tretirane koncentracijama selena od 5 ppm i 7,5 ppm-a (slika 3.8). Spektri masa dobivenih spojeva su uspoređeni sa spektrima masa iz Wiley MS library biblioteke spektra masa. U tablici su prikazani identificirani razgradni produkti sa njihovim vremenom zadržavanja.



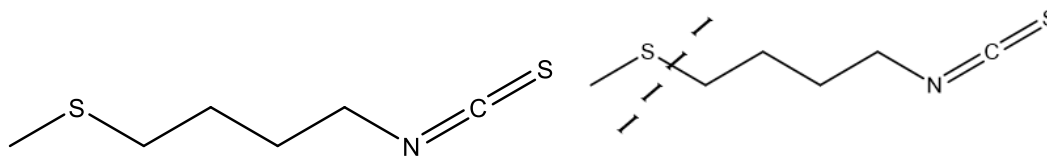
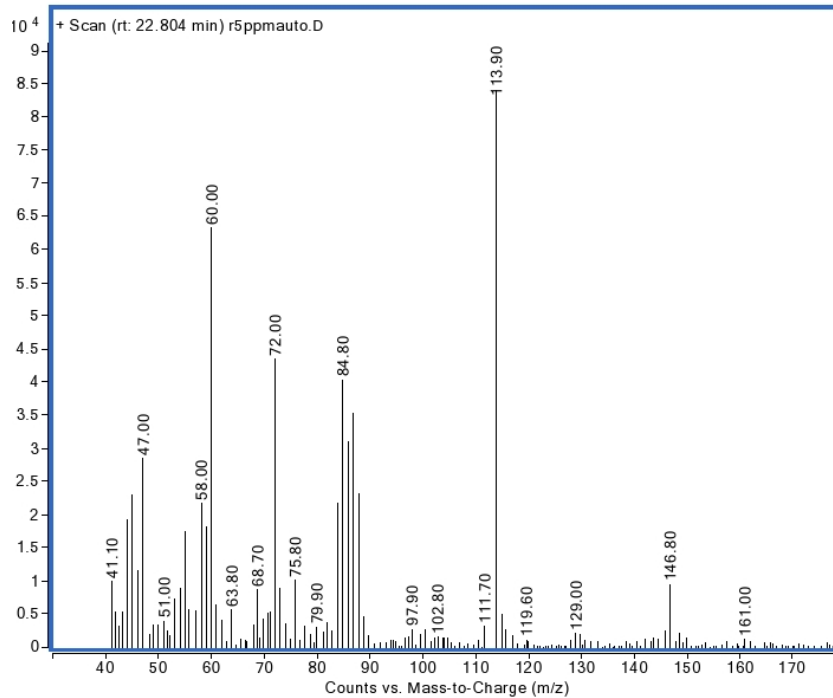
**Slika 3.8.** Kromatogram ukupne ionske struje ekstrakta klica rikule tretirane koncentracijom od 5 ppm i 7,5 ppm-a

**Tablica 4.** GC-MS analiza razgradnih produkata

Naziv spoja	Vrijeme zadržavanja (min)
erucin	20,50
indol	22,80

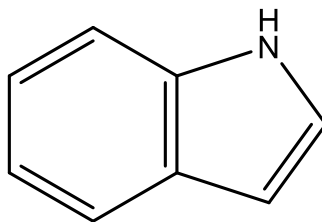
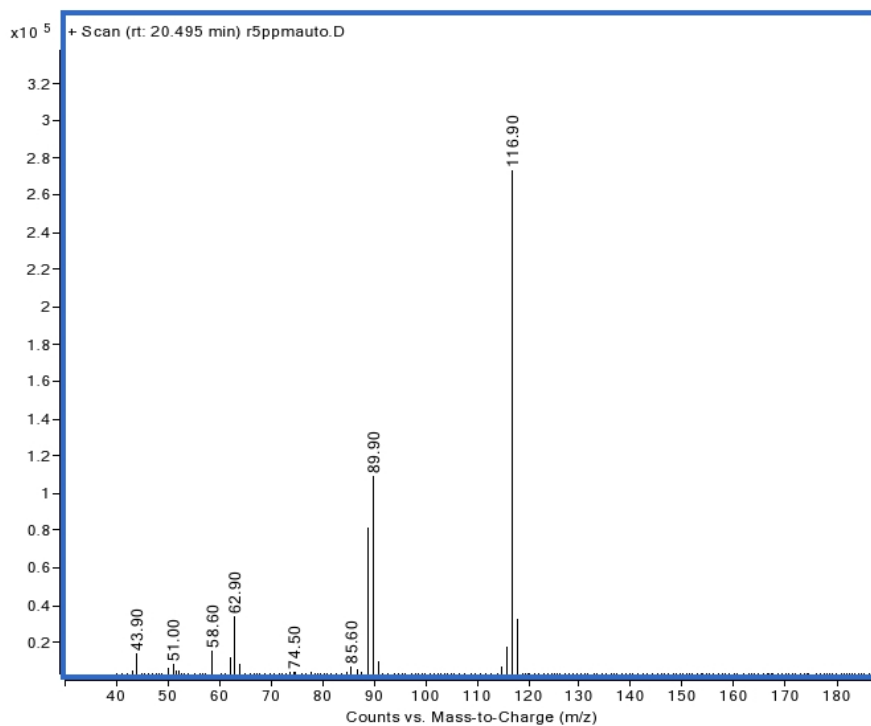
Prilikom analize pronađena su samo 2 spoja, produkti razgradnje glukozinolata. Prvi spoj je izotiocijanat erucin koji potječe od glucoerucina i njega možemo detektirati na 20,50 min. Drugi spoj je indol identificiran na 22,80 min, a koji može potjecati od raspada 4-metoksiindol-3-il-izotiocijanata koji nastaje od prisutnog 4-metoksiglukobrasicina. Na slici 3.9 prikazan je MS spektar erucina, dok je na slici 3.10 prikazan MS spektar indola.





**Slika 3.9.** MS spektar, struktura erucina i cijepanje fragmenata na osnovni pik

Na MS spektru možemo vidjeti da je molekularni pik vrijednosti  $m/z=161$ , što odgovara masi erucina, dok osnovni pik ima vrijednost  $m/z=113,90$  što odgovara cijepanju -SCH<sub>3</sub> fragmenta i nastanku  $[S=C=N-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2]^+$ . Izocijanati su specifični zato što imaju u svojoj strukturi sumporove i dušikove atome. Prema tzv. *Dušikovom pravilu*, spojevi s neparnim brojem dušikovih atoma u molekuli daju neparnu molekulsku masu, čime se dodatno može olakšati identifikacija spoja. Za sumporove spojeve je karakteristično  $M+2$  cijepanje, čiji je intezitet 4% od molekulskog pika, no u ovom spektru to nije moguće razlučiti zato što je pik premali. Također je za alifatske izotiocijanate specifičan pik na  $m/z=72$  što odgovara cijepanju C-C veze u blizini heteroatoma zato što heteroatom (dušik) stabilizira pozitivan naboj bolje nego ugljikov atom.



**Slika 3.10.** MS spektar i struktura indola

MS spektar prikazuje molekularni pik na  $m/z=117$  (točnije, na  $m/z=116,90$ ) i time možemo potvrditi da masa odgovara indolu. Indoli sadrže u svojoj strukturi atom dušika stoga molekula ima neparnu masu. Molekulski pik je ujedno i osnovni pik zato što benzenska jezgra stabilizira naboj. Također GC-MS analizom nije identificiran niti jedan selenoizotiocijanat.

#### 4. ZAKLJUČAK

- Analizom klica biljke *Eruca vesicaria* UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom identificirana su 4 glukozinolata: glukorafanin, glukoerucin, dimer glukosativina i 4-metoksiglukobrasicin.
- Analizama nisu identificirani selenoglukozinolati kao ni njihovi razgradni produkti, što ukazuje da biljka nije iskoristila apsorbirani selen u biosintezi glukozinolata.
- Sjeme rikule je pokazalo najvišu koncentraciju glukoerucina (220,79  $\mu\text{mol/g}$ ), dok je neproklijalo sjeme tretirano koncentracijama selena od 10 ppm pokazalo vrijednost 10 puta manju (22,85  $\mu\text{mol/g}$ ). Također je koncentracija glukoerucina u klicama tretiranih selenom koncentracijama 1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm i 7,5 ppm znatno veća od koncentracija ostalih identificiranih glukozinolata. Klice tretirane Se 10 ppm nisu proklijale zato što je to bila previsoka koncentracija za biljku.
- GC-MS analizom je identificirano samo 2 produkta razgradnje glukozinolata: izotiocijanat erucin koji potječe od glukoerucina i indol koji može potjecati od raspada 4-metoksiindol-3-il-izotiocijanata koji nastaje razgradnjom 4-metoksiglukobrasicina.

## 5. LITERATURA

1. URL: <https://www.plantea.com.hr/rikula/> (25.07.2021)
2. URL: <https://www.dearplants.com/how-to-plant-edible-rocket-arugula-eruca-sativa/> (25.07.2021.)
3. URL: <https://www.krenizdravo.hr/prehrana/klice> pristupljeno 10.09.2021.
4. Dall'Acqua, S., Ertani, A., Pilon-Smits, E., Fabrega-Prats, M. and Schiavon, M., 2019. Selenium biofortification differentially affects sulfur metabolism and accumulation of phytochemicals in two rocket species (*Eruca sativa* Mill. and *Diplotaxis tenuifolia*) grown in hydroponics. *Plants*, 8(3), p.68.
5. Prieto, M., López, C. and Simal-Gandara, J., 2019. Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. *Advances in Food and Nutrition Research*, pp.305-350.
6. Blažević I., Montaut S., Burčul F., Olsen C. E., Burow M., Rollin P., Agerbirk N., Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants, *Phytochemistry*, 2020., 169, 112100.
7. Fahey, J., Zalcmann, A. and Talalay, P., 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), pp.5-51.
8. Zekić, M. *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae / doktorska disertacija*. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu. 2013
9. Bennett, R., Carvalho, R., Mellon, F., Eagles, J. and Rosa, E., 2006. Identification and quantification of glucosinolates in sprouts derived from seeds of wild *Eruca sativa* L. (Salad Rocket) and *Diplotaxis tenuifolia* L. (Wild Rocket) from diverse geographical locations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1), pp.67-74.
10. Matusheski, N., Swarup, R., Juvik, J., Mithen, R., Bennett, M. and Jeffery, E., 2006. Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) inhibits formation

of the anticancer agent sulforaphane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), pp.2069-2076.

11. URL: [https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-sulforaphane-SFN\\_fig1\\_235691286](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-sulforaphane-SFN_fig1_235691286) (27.07.2021.)

12. Bell, L., Oruna-Concha, M. and Wagstaff, C., 2015. Identification and quantification of glucosinolate and flavonol compounds in rocket salad (*Eruca sativa*, *Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*) by LC–MS: Highlighting the potential for improving nutritional value of rocket crops. *Food Chemistry*, 172, pp.852-861.

13. Reid, M., Duffield-Lillico, A., Slate, E., Natarajan, N., Turnbull, B., Jacobs, E., Combs, G., Alberts, D., Clark, L. and Marshall, J., 2008. The Nutritional Prevention of Cancer: 400 Mcg Per Day Selenium Treatment. *Nutrition and Cancer*, 60(2), pp.155-163.

14. Fernando Reyes, L., Emilio Villarreal, J. and Cisneros-Zevallos, L., 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry*, 101(3), pp.1254-1262.

15. Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Sánchez-Martínez, M., Pérez-Corona, M., Madrid, Y., Cámara, C. and Vidal-Valverde, C., 2012. Se improves indole glucosinolate hydrolysis products content, Se-methylselenocysteine content, antioxidant capacity and potential anti-inflammatory properties of sauerkraut. *Food Chemistry*, 132(2), pp.907-914.

16. Matich, A., McKenzie, M., Lill, R., Brummell, D., McGhie, T., Chen, R. and Rowan, D., 2012. Selenoglucosinolates and their metabolites produced in Brassica spp. fertilised with sodium selenate. *Phytochemistry*, 75, pp.140-152.

17. Jerković I., Kemija aroma, interna recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2011.

18. Jerković, I. i Radonić, A. *Praktikum iz organske kemije*. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2009.

19. Śmiechowska, A., Bartoszek, A. and Namieśnik, J., 2010. Determination of glucosinolates and their decomposition products—indoles and isothiocyanates in cruciferous vegetables. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(3), pp.202-216.

20. Grosser, K. and van Dam, N., 2017. A straightforward method for glucosinolate extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography (HPLC). *Journal of Visualized Experiments*, (121).

21. URL: <https://www.hitachi-hightech.com/global/products/science/tech/ana/lc/basic/course7.html> (21.08.2021.)

22. Olsen, C., Huang, X., Hansen, C., Cipollini, D., Ørgaard, M., Matthes, A., Geu-Flores, F., Koch, M. and Agerbirk, N., 2016. Glucosinolate diversity within a phylogenetic framework of the tribe Cardamineae (Brassicaceae) unraveled with HPLC-MS/MS and NMR-based analytical distinction of 70 desulfoglucosinolates. *Phytochemistry*, 132, pp.33-56.