

Strukturna raznolikost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata u različitim biljnim porodicama

Đulović, Azra

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:167:300203>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT

The logo for 'dabar', featuring a stylized red and black graphic above the word 'dabar' in a lowercase, sans-serif font.

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Azra Đulović

**STRUKTURNA RAZNOLIKOST
GLUKOZINOLATA I NJIHOVIH
RAZGRADNIH PRODUKATA U RAZLIČITIM
BILJNIM PORODICAMA**

DOKTORSKI RAD

Split, 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Azra Đulović

**STRUCTURAL DIVERSITY OF
GLUCOSINOLATES AND THEIR
BREAKDOWN PRODUCTS IN
DIFFERENT PLANT FAMILIES**

DOCTORAL THESIS

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Azra Đulović

**STRUKTURNA RAZNOLIKOST
GLUKOZINOLATA I NJIHOVIH
RAZGRADNIH PRODUKATA U
RAZLIČITIM BILJNIM PORODICAMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević

Split, 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

Azra Đulović

**STRUCTURAL DIVERSITY OF
GLUCOSINOLATES AND THEIR
BREAKDOWN PRODUCTS IN
DIFFERENT PLANT FAMILIES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:

Assoc. Prof. Ivica Blažević, PhD

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Kandidatkinja Azra Đulović, mag. chem. predala je dana 2. svibnja 2022. doktorsku disertaciju izrađenu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića s Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Povjerenstvo u sastavu:

izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu;
doc. dr. sc. Franko Burčul, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu;
izv. prof. dr. sc. Marin Roje, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

povoljno je ocijenilo disertaciju, a Fakultetsko vijeće Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu je na svojoj 30. sjednici održanoj dana 15. srpnja 2022. prihvatilo ocjenu i odobrilo obranu pred povjerenstvom u sastavu:

izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu;
doc. dr. sc. Franko Burčul, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu;
izv. prof. dr. sc. Marin Roje, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Zamjenski član: doc. dr. sc. Marina Zekić, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu.

Obrana disertacije zakazana je za 22. srpnja 2022.

Dekan:

Prof. dr. sc. Matko Erceg

UDK: 582.683.2(043.3)

Znanstveno područje: prirodne znanosti

Znanstveno polje: kemija

Znanstvena grana: organska kemija

Institucija: Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Zavod za organsku kemiju

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

Broj stranica: 164

Broj slika: 56

Broj tablica: 20

Broj literaturnih referenci: 150

Datum obrane: 22. srpnja 2022.

Sastav povjerenstva za obranu:

izv. prof. dr. sc. Ani Radonić, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu;

doc. dr. sc. Franko Burčul, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu;

doc. dr. sc. Marina Zekić, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu

Rad je pohranjen u knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35; Sveučilišnoj knjižnici u Splitu, Ruđera Boškovića 31; Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4.

Tema rada prihvaćena je na 24. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu održanoj dana 17. ožujka 2022. godine.

Zahvala

Ne mogu, ne mogu, ne mogu se dovoljno zahvaliti svojem mentoru, izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću, na stručnom vođenju tijekom doktorskog studija i izrade doktorske disertacije. Hvala na uloženom trudu, podijeljenom znanju, strpljenju, razumijevanju i bezuvjetnoj podršci. Sretna sam što sam u jednoj osobi imala uzor u poštenju, znanosti, struci i prijateljstvu. Hvala mu što je prepoznao moj trud i uvijek ga nagrađivao, vjerovao u mene čak i kada ja nisam. Veselim se svim novim glukozinolatima koji nas čekaju!

Neizmjernu zahvalnost dugujem i doc. dr. sc. Franku Burčulu na vrlo detaljnom pregledu doktorske disertacije, stručnim savjetima, satima rasprave i pomoći pri uređivanju teksta. Hvala na svemu čemu me podučio u laboratoriju još od dana diplomskog rada i što spašava kad ništa ne radi. Hvala što probleme činiš jednostavnim!

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Ani Radonić na posvećenosti i korisnim savjetima prilikom pregleda ovoga rada što je pridonijelo kvaliteti doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Marinu Roji na pristupačnosti i sugestijama koji su ovaj rad učinili potpunijim.

Je remercie le professeur émérite Patrick Rollin pour son coup de main, ses conseils utiles et ses merveilleux moments dans Les becs à vin.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Zoranu Grubaču na savjetima i iskrenoj podršci tijekom studija.

Velika hvala izv. prof. dr. sc. Lei Kukoč Modun na pomoći pri sadnji biljaka i zlatnim rukama koje su ih održavale na životu. Hvala na prijateljskom pristupu i podršci.

Hvala kolegama sa Zavoda za organsku kemiju što su me primili i što su im vrata uvijek bila otvorena za moja pitanja. Hvala laborantici Editi Jelinčić, ing. koja mi je puno pomogla u prvim koracima vođenja vježbi.

Hvala mojoj dragoj cimerici dr. sc. Sanji Radman na UHPLC-QTOF analizi kao i našim razgovorima koji me uvijek oraspolože.

Hvala prof. dr. sc. Sandri Svilović, izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić i doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek na prijateljstvu i motivaciji.

Hvala mojoj dragoj dr. sc. Marijani Popović na potpori, razgovorima, vedrom duhu, dugim destilacijama i najboljim kongresima.

Hvala i svim kolegama i prijateljima na KTF-u koji su izravno i neizravno pomogli u izradi ove doktorske disertacije i riječima podrške koje su olakšale ovo putovanje.

Hvala i izv. prof. dr. sc. Mirku Ruščiću na pribavljanju i identifikaciji biljnih materijala.

Zahvaljujem se Hrvatskoj zakladi za znanost na financiranju ovog istraživanja u okviru istraživačkog projekta IP-06-2016-1316 pod nazivom “Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala (BioSMe)“. Izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća ni bez dostupnosti vrijedne opreme pribavljene u okviru projekta „Funkcionalna integracija Sveučilišta u Splitu, PMF-ST, PFST te KTF-ST kroz razvoj znanstveno-istraživačke infrastrukture u Zgradi tri fakulteta“ (KK.01.1.1.02.0018).

Hvala mojim dragim prijateljicama Miji, Petri, Damiri, Sanji, Ivani na godinama druženja, suza i smijeha. Hvala što ste slušale i kad vam se možda nije slušalo.

Mojoj obitelji hvala na ljubavi i potpori. Hvala mojoj sestri, mojem vjernom navijaču, koja je uvijek tu da smiri moje nemire. Hvala mom dragom Josipu na svim ovim godinama ljubavi i bezgraničnog razumijevanja. Moja si snaga i sigurna luka.

Ovaj rad posvećujem mojoj majci, mojoj dobroj vili bez čije bezuvjetne ljubavi i odricanja ne bih bila osoba kakva sam danas... Sretna!

Azra

SAŽETAK

Raspodjela glukozinolata unutar biljnih porodica reda Brassicales istražena je UHPLC-DAD-MS/MS analizom desulfoglukozinolata na temelju određenih kvalitativnih i kvantitativnih informacija i to u različitim biljnim tkivima četrdeset osam (48) biljaka iz pet (5) biljnih porodica (Brassicaceae, Capparidaceae, Moringaceae, Resedaceae, Tropaeolaceae) koje rastu u Republici Hrvatskoj i šire. Razvijena je baza MS2 spektara desulfoglukozinolata korištenjem komercijalno dostupnih standarda kao i glukozinolata izoliranih iz prirodnih izvora.

Biljna porodica Brassicaceae je sadržavala najraznolikije glukozinolate koje potječu od sedam (7) aminokiselinskih prekursora, i to najčešće od metionina, praćeno s glukozinolatima koji potječu od triptofana te fenilalanina i/ili tirozina, dok su razgranati alifatski glukozinolati koji potječu od valina, leucina i izoleucina zastupljeni tek u rijetkim vrstama. Jedini poznati glukozinolat, glukokaparin, koji potječe od aminokiseline alanina identificiran je samo u porodici Capparidaceae i to kao glavni u svim istraženim vrstama, dok su ostali glukozinolati u većoj mjeri potjecali od triptofana. *Moringa oleifera* (porodica Moringaceae) sadržavala je 4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat te u manjim količinama tri (3) *O*-acetilirana izomera istog glukozinolata čiji aminokiselinski prekursor je fenilalanin i/ili tirozin. U vrstama *Reseda lutea* i *R. phyteuma* (porodica Resedaceae) identificiran je izomer 4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolata, 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat karakterističan za biljnu porodicu Resedaceae, koji potječe od fenilalanina, dok je u *R. alba* kao glavni glukozinolat identificiran 2-hidroksi-2-metilpropil-glukozinolat koji potječe od izoleucina. *Tropaeolum majus* je sadržavao arilalifatski benzil-glukozinolat kao glavni, praćen sa 3-metoksibenzil-glukozinolatom, a oba potječu od fenilalanina, jedinog poznatog aminokiselinskog prekursora glukozinolata u porodici Tropaeolaceae.

Uvidom u kvantitativni sastav glukozinolata odabrane su biljne vrste kao dobri izvori glukozinolata koji su izolirani u obliku desulfoglukozinolata i potvrđeni spektroskopskim tehnikama (MS2, ^1H , ^{13}C , COSY i HSQC NMR). 3-(Metilsulfinil)propil-glukozinolat je izoliran iz biljke *Anastatica hierochuntica* (porodica Brassicaceae), 4-hidroksibenzil-glukozinolat iz vrste *Sinapis alba* (porodica Brassicaceae), metil-glukozinolat iz *Capparis orientalis* (porodica Capparidaceae), 2-hidroksi-2-metilpropil-glukozinolat iz biljke *Reseda alba* (porodica Resedaceae) te

benzil-glukozinolat iz *Tropaeolum majus* (porodica Tropaeolaceae). Također, na temelju MS2 spektara i biosintetskih karakteristika identificirana su 4 nova glukozinolata: *orto* ili *meta* hidroksi-4-(α -L-ramnospiranoziloksi)benzil-glukozinolat (*Moringa oleifera*), 4'-*O*-(β -D-apiofuranoziloksi)benzil-glukozinolat (*Hesperis laciniata* i *Thlaspi perfoliatum*), 4-hidroksi-1-metoksiindol-3-ilmetil-glukozinolat (*Thlaspi perfoliatum*) te 3-hidroksi-(4-metilsulfonyl)butil-glukozinolat (*Barbarea vulgaris*) čije strukture trebaju dodatnu potvrdu NMR-om.

Stabilnost desulfo-4-(metilsulfinil)but-3-enil-glukozinolata izoliranog iz biljke *Matthiola incana* ispitivana je tijekom jednomjesečnog razdoblja te je utvrđena njegova nestabilnost u vodenoj otopini, odnosno drastičan pad sadržaja (do 80 %) praćen spontanom konverzijom u cikličke tioimidatne *N*-okside. Korištenjem konvencionalnih (enzimska hidroliza i hidrodestilacija) te modernih metoda (mikrovalna destilacija te hidrodifuzija i gravitacija) ispitan je enzimski i termički utjecaj na razgradnju glukozinolata. U uvjetima termičke razgradnje potpomognute mikrovalovima dobiveni su manji prinosi razgradnih produkata u odnosu na termičku razgradnju tijekom hidrodestilacije te enzimsku hidrolizu. Izotiocijanati kao razgradni produkti glukozinolata su se pokazali nestabilnim pri uvjetima GC-MS mjerenja i to za ω -metilsulfinilne C3, C5 i C6 izotiocijanate čiji je raspad rezultirao nastankom odgovarajućih olefinskih izotiocijanata. Dodatno, zbog prisutnosti elektron-donirajuće hidroksilne skupine u *para* položaju na benzenskom prstenu, kod 4-hidroksibenzil-izotiocijanata i 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-izotiocijanata, utvrđena je nestabilnost koja vodi ka nastanku artefakata tijekom GC-MS mjerenja. Također, razgradni produkti indolnih glukozinolata nisu identificirani. Ovime je istaknut nedostatak neizravne metode identifikacije glukozinolata preko razgradnih produkata u biljnim vrstama.

U biljci *Eruca vesicaria* biofortificiranoj selenijem iz natrijevog selenata identificiran je 4-(metilselena)butil-glukozinolat izveden iz selenometionina na temelju MS2 spektra koji je po prvi puta prikazan. Utvrđeno je da hidroponski uzgojene klice pet (5) odabranih biljaka iz porodice Brassicaceae imaju visoki sadržaj karakterističnih glukozinolata zbog čega predstavljaju dobar izvor za njihovu izolaciju.

KLJUČNE RIJEČI: glukozinolati, mikrovalovima potpomognuta izolacija, izotiocijanati, biofortifikacija, glukoselenoerucin, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS, NMR

ABSTRACT

Distribution of glucosinolates within plant families of the order Brassicales was investigated using qualitative and quantitative UHPLC-DAD-MS/MS analysis of desulfoglucosinolates in different plant tissues of forty-eight (48) plants from five (5) plant families (Brassicaceae, Capparidaceae, Moringaceae, Resedaceae, Tropaeolaceae) growing in the Republic of Croatia and worldwide. A database of MS2 spectra of desulfoglucosinolates was developed using commercially available standards as well as glucosinolates isolated from natural sources.

The Brassicaceae plant family contained a wide variety of glucosinolates derived from seven (7) different amino acid precursors, most commonly from methionine, followed by glucosinolates derived from tryptophan, phenylalanine and/or tyrosine, while branched aliphatic glucosinolates deriving from valine, leucine and isoleucine were scarce. Glucocapparin, the only known glucosinolate derived from the amino acid alanine, was identified solely in the Capparidaceae family as the main one in all the species studied, while the other glucosinolates largely derived from tryptophan. *Moringa oleifera* (family Moringaceae) contained 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl glucosinolate and, in less amount, three *O*-acetylated isomers of the same glucosinolate derived from phenylalanine and/or tyrosine. In the species *Reseda lutea* and *R. phyteuma* (family Resedaceae) an isomer of 4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl glucosinolate, 2-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl glucosinolate, was identified characteristic for the plant family Resedaceae, originating from phenylalanine. On the other hand, 2-hydroxy-2-methylpropyl glucosinolate derived from isoleucine was the major glucosinolate identified in *R. alba*. The main glucosinolate in *Tropaeolum majus* was arylaliphatic benzyl glucosinolate followed by 3-methoxybenzyl glucosinolate, both derived from phenylalanine, the only known amino acid precursor of glucosinolates in the Tropaeolaceae family.

Insight into the quantitative composition of glucosinolates enabled the selection of the plant species as the sources of glucosinolates for their isolation in the form of desulfoglucosinolates and confirmation by spectroscopic techniques (MS2, ^1H , ^{13}C , COSY and HSQC NMR). 3-(Methylsulfinyl)propyl glucosinolate was isolated from *Anastatica hierochuntica* (family Brassicaceae), 4-hydroxybenzyl glucosinolate from *Sinapis alba* (family Brassicaceae), methyl glucosinolate from *Capparis orientalis* (family Capparidaceae), 2-hydroxy-2-methylpropyl glucosinolate from *Reseda alba*

(family Resedaceae) and benzyl glucosinolate from *Tropaeolum majus* (family Tropaeolaceae). Also, based on MS2 spectra and biosynthetic characteristics, four (4) new glucosinolates were identified: *ortho* or *meta* hydroxy-4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzyl glucosinolate (*Moringa oleifera*), 4'-O-(β -D-apiofuranosyloxy)benzyl glucosinolate (*Hesperis laciniata* and *Thlaspi perfoliatum*), 4-hydroxy-1-methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate (*Thlaspi perfoliatum*) and 3-hydroxy-(4-methylsulfonyl)butyl glucosinolate (*Barbarea vulgaris*) whose structures need further confirmation by NMR.

The stability of desulfo-4-(methylsulfinyl)but-3-enyl glucosinolate isolated from *Matthiola incana* was studied over a one-month period and its instability in aqueous solution was observed, showing a significant drop in the content (up to 80%) followed by spontaneous conversion to cyclic thioimidate *N*-oxides. The enzymatic and thermal degradation of glucosinolates was studied by using conventional (enzymatic hydrolysis and hydrodistillation) and modern methods (microwave distillation and hydrodiffusion and gravity). Under microwave-assisted thermal decomposition conditions, lower yields of decomposition products were obtained compared to thermal decomposition during hydrodistillation and enzymatic hydrolysis. Isothiocyanates as degradation products of glucosinolates showed to be unstable at GC-MS conditions for ω -methylsulfinyl C3, C5 and C6 isothiocyanates, which decomposition resulted in the formation of the corresponding olefinic isothiocyanates. Additionally, due to the presence of an electron-donating hydroxyl group in the *para* position on the benzene ring, in 4-hydroxybenzyl isothiocyanate and 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzyl isothiocyanate, instability lead to formation of artifacts found during GC-MS analysis. Also, degradation products of indole glucosinolates have not been identified. This highlights the disadvantage of an indirect method for the identification of glucosinolates via their degradation products in plant species.

In the *Eruca vesicaria* biofortified by selenium from sodium selenate, 4-(methylseleno)butyl glucosinolate derived from selenomethionine was identified based on the MS2 spectrum shown for the first time. Hydroponically grown sprouts of the five (5) selected plants of Brassicaceae family were found to have a high content of characteristic glucosinolates presenting a good source for their isolation.

KEY WORDS: glucosinolates, microwave assisted isolation, isothiocyanates, biofortification, glucoselenoerucin, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS, NMR

SADRŽAJ

1. UVOD	17
2. OPĆI DIO	18
2.1. Glukozinolati	18
2.2. Pregled dosadašnjih istraživanja	19
2.3. Strukture glukozinolata	20
2.4. Biosinteza glukozinolata i selenoglukozinolata	35
2.5. Razgradnja glukozinolata	39
2.5.1. Metode analize glukozinolata.....	43
3. MATERIJALI I METODE	46
3.1. Biljni materijal	46
3.1.1. Hidroponski uzgoj klica	49
3.2. Izolacija glukozinolata	50
3.2.1. Priprema otopina	50
3.2.3. Priprema krivulja umjeravanja	51
3.2.4. Priprema kolona i centrifugalnih mikroepreveta	51
3.2.5. Ekstrakcija glukozinolata	52
3.2.6. Pročišćavanje ekstrakta i desulfatacija	52
3.3. Izolacije razgradnih produkata	53
3.3.1. Konvencionalne metode izolacije	53
3.3.2. Moderne metode izolacije	55
3.3.3. Stabilnost alil-izotiocijanata u vodenoj otopini.....	58
3.4. Analiza glukozinolata i razgradnih produkata	58
3.4.1. Tekućinski kromatograf sa spektrometrom masa u tandemu (UHPLC-DAD-MS/MS)	58
3.4.2. Tekućinski kromatograf sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (UHPLC-ESI-HRMS)	59

3.4.3. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa (GC-MS).....	60
3.4.4. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR).....	61
3.5. Biofortifikacija selenijem.....	62
4. REZULTATI I RASPRAVA	64
4.1. Brassicaceae	65
4.1.1. Kvalitativna analiza glukozinolata	65
4.1.2. Kvantitativna analiza glukozinolata	85
4.2. Capparidaceae	99
4.3. Moringaceae.....	105
4.4. Resedaceae	109
4.5. Tropaeolaceae	116
4.6. Stabilnost i reaktivnost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata... 120	
4.6.1. <i>Matthiola incana</i> (L.) R. Br.: Stabilnost glukorafenina i glukorafasatina	120
4.6.2. Razgradni produkti glukozinolata	125
4.7. Biofortifikacija selenijem.....	139
4.8. Klice	145
5. ZAKLJUČCI.....	149
6. LITERATURA.....	154
7. POPIS OZNAKA I KRATICA.....	162
8. PRILOG.....	164
9. ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Glukozinolati su specijalizirani biljni metaboliti čiji broj struktura potvrđenih modernim spektroskopskim tehnikama (MS i NMR), iznosi 90, dok je još 49 glukozinolatnih struktura djelomično okarakterizirano s vrlo varijabilnim dokazima. Sveprisutni su u biljkama reda Brassicales, od kojih je najznačajnija porodica Brassicaceae (kupusnjače). Kupusnjače su porodica agronomski i ekonomski vrlo važnih vrsta koje se uzgajaju te su u velikoj mjeri zastupljene u ljudskoj prehrani zahvaljujući pozitivnim učincima na organizam. Predmet su detaljnih evolucijskih istraživanja čija osnova uključuje precizno utvrđivanje strukture ovih spojeva. Ograničavajući čimbenik uvida u strukturnu raznolikost predstavlja dostupnost referentnih spojeva što otežava pouzdanu identifikaciju glukozinolata. S druge strane, dobro istražene biljke predstavljaju pouzdani referentni materijal kao jedini izvor vrlo specifičnih glukozinolata. Stoga jedan od ciljeva ovog istraživanja su slabo istražene i neistražene biljne vrste pet (5) biljnih porodica reda Brassicales: Brassicaceae, Capparidaceae, Moringaceae, Resedaceae i Tropaeolaceae. Naglasak je na identifikaciji vrsta koje sadrže visoke koncentracije jednog glukozinolata u svrhu izolacije i potvrde spektroskopskim tehnikama (MS2, 1D i 2D NMR). Uzgojem odabranih klica kupusnjača vrednovan je hidroponski uzgoj klica kao izvor glukozinolata.

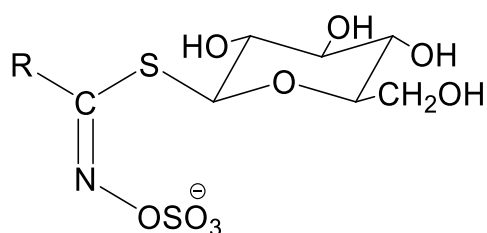
Transformacija glukozinolata započinje hidrolizom tioglukozidne veze kataliziranom enzimom mirozinaza nakon oštećenja biljnog tkiva. Poznate su značajne varijacije u reakcijama hidrolize glukozinolata uzrokovane specifičnim proteinima u biljkama, samim strukturnim karakteristikama pojedinačnih glukozinolata ili općim uvjetima reakcije, što rezultira nastankom različitih razgradnih produkata od kojih su najznačajniji izotiocijanati zbog istaknute biološke aktivnosti. Korištenjem konvencionalnih (enzimska hidroliza i hidrodestilacija) te modernih metoda (mikrovalna destilacija te hidrodifuzija i gravitacija) ispitan je enzimski i termički utjecaj na razgradnju glukozinolata te razmotrena stabilnost desulfoglukozinolata i izotiocijanata tijekom njihove izolacije i analize.

Biljke iz porodice Brassicaceae su poznate po sposobnosti akumulacije selenija te kemijska i fizička sličnost između selenija i sumpora uzrokuje da oba elementa dijele zajedničke metaboličke putove pri čemu selenij može zamijeniti atom sumpora. Stoga je istražen kvalitativni i kvantitativni sastav glukozinolata u biljkama rukole i brokule biofortificiranim selenijem.

2. OPĆI DIO

2.1. Glukozinolati

Glukozinolati su specijalizirani biljni metaboliti ^[1] čije su strukture raznolike te se neprestano otkrivaju nove.^[2] Pronađeni su u 16 različitih biljnih porodica reda Brassicales, od kojih je najznačajnija porodica Brassicaceae (kupusnjače), u koju spadaju kupus, brokula, cvjetača, kelj, rotkva, repa, gorušica i dr.^[3] Glukozinolati su vodotopljivi organski anioni koji dijele iste osnovne strukturne značajke koje uključuju β -D-glukopiranoznu jedinicu, *O*-sulfatiranu anomernu (*Z*)-tiohidroksimatnu funkcijsku skupinu te promjenjivi bočni lanac (slika 2.1.1.).^[4] Na temelju različitih biosintetskih aminokiselinskih prekursora mogu se podijeliti u tri skupine: alifatski glukozinolati potječu od metionina, izoleucina, leucina ili valina; arilalifatski potječu od fenilalanina i/ili tirozina te indolni od triptofana.^[3, 4] U nedovoljno okarakterizirane, još uvijek hipotetske glukozinolate, ubrajaju se ravnolančani alkilni glukozinolati (etil-, butil-, pentil-, heksil-glukozinolat) i glukozinolati izvedeni iz leucina produljenjem lanaca (3-metilbutil-, 3-metilbut-3-enil-, 4-metilpentil-glukozinolat).^[3, 5]



Slika 2.1.1. Opća struktura glukozinolata. R predstavlja promjenjivi bočni lanac.

Glukozinolati su smješteni u biljnim vakuolama, odvojeno od endogenog enzima mirozinaze (β -tioglukozidaze). Mehaničkim oštećenjem stanice, koje se događa primjerice prilikom rezanja ili žvakanja, mirozinaza se dovodi u doticaj s glukozinolatima pri čemu dolazi do njihove hidrolize što rezultira stvaranjem niza različitih razgradnih spojeva, najčešće izotiocijanata.^[6] Konzumacija kupusnjača se usko povezuje sa sniženom pojavnošću raka, upravo zahvaljujući izotiocijanatima.^[7] Iako se ova važna biološka svojstva primarno povezuju s $-N=C=S$ funkcijskom skupinom, bočni lanac također ima važan utjecaj na svojstva kao što su lipofilnost spoja i elektrofilnost ugljikovog atoma u funkcijskoj skupini.^[4, 5] Međutim, osim izotiocijanata koji su po prirodi reaktivni spojevi, razgradnjom glukozinolata mogu nastati i nitrili, epitionitrili, tiocijanati, itd., čija biološka aktivnost nije posebno izražena, a neki od njih su poznati

goitrogeni.^[7, 8] Stoga, spoznaje o spojevima koji nastaju tijekom obrade i konzumacije namirnica predstavljaju temelj razumijevanja bioaktivnosti glukozinolata.

2.2. Pregled dosadašnjih istraživanja

Rana istraživanja glukozinolata opisana su u pionirskom radu iz 1960. u kojem je Kjær naveo 30 do tada okarakteriziranih prirodnih izotiocijanata porijeklom iz 30 različitih glukozinolata.^[9] Već 1968. Ettlinger i Kjær su opisali 50 izravno i neizravno okarakteriziranih glukozinolata.^[10] Važnu prekretnicu predstavlja pregledni rad Faheya i sur. iz 2001. u kojem se navodi 120 glukozinolata zabilježenih u do tada istraženim biljnim vrstama.^[6] Veliki broj tih struktura ni do danas nije potvrđen ni spektrometrijom masa (MS) ni nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) što je ograničilo vrijednost ovog rada. Clarke je 2010. godine u svom radu predložio strukture, formule i molekulske mase čak 200 glukozinolata pretpostavljajući postojanje homolognih nizova glukozinolata čije strukture do tada nisu otkrivene.^[11] Agerbirk i Olsen dvije godine nakon nastavljaju Faheyev rad i uvrstavaju još 26 novootkrivenih glukozinolata.^[2] U narednim godinama postojala je potreba za ponovnom procjenom struktura glukozinolata navedenih u prethodnim preglednim radovima što je rezultiralo jednim sveobuhvatnim, kritičkim pregledom strukturne raznolikosti glukozinolata u kojem je utvrđeno da je do sredine 2018. g. samo 88 struktura od 137 pronađenih u biljkama, potvrđeno modernim spektroskopskim tehnikama (MS, NMR).^[4] Do danas su još dva nova glukozinolata potpuno okarakterizirana, i to 4'-*O*- β -D-apiofuranozilglukomatronalin, izoliran iz biljaka *Hesperis laciniata* All. i *Hesperis matronalis* L. (Brassicaceae)^[12] te 2'-*O*-(α -L-arabinopiranoziloksi)benzil-glukozinolat (glukoohradenin), izoliran iz pustinjske biljke *Ochradenus baccatus* Delile (Resedaceae).^[13]

Osim već spomenutog mirozinaza-glukozinolat sustava, važni su i reakcijski uvjeti tijekom razgradnje glukozinolata. Kemijski uvjeti kao što su pH vrijednost, prisutnost Fe²⁺ iona, vitamina C, epitiospecifičnog proteina i dr. određuju smjer reakcije razgradnje pri čemu nastaju različiti spojevi.^[14] Bones i Rossiter (2006.) su dali pregled enzimskih i neenzimskih procesa pri razgradnji glukozinolata. U radu su opisali strukturu enzima mirozinaze te njegovu aktivaciju askorbatom. Neenzimski procesi uključuju kemijsku razgradnju, gdje je opisana kiselinom katalizirana razgradnja određenih glukozinolata do karboksilnih kiselina i šećera, odnosno bazična hidroliza do aminokiselina i 1- β -D-tioglucoze, dok su za indolne glukozinolate ove razgradnje nešto

složenije. Termička razgradnja je od iznimne važnosti za razumijevanje stabilnosti ovih spojeva prilikom kuhanja, budući da se brojne biljne vrste koriste u svakodnevnoj prehrani. Poznato je primjerice da su indolni glukozinolati termički osjetljiviji u odnosu na alifatske glukozinolate.^[8] Također, poznato je i da su izotiocijanati podložni termičkoj razgradnji te se mogu razgraditi na različite hlapljive i nehlapljive spojeve.

2.3. Strukture glukozinolata

Naziv glukozinolat je izveden iz grčke riječi “σιναν-ελαιον” (“*sinap elaiou*”) što u prijevodu znači gorušičino ulje. Naziv "glukozinolat" označava glukoziliran, sulfatiran prekursor ulja gorušice, pri čemu "sinol" označava gorušično ulje, "gluko" (tio)glukozid i "at" oksianion (sulfatna skupina).^[2, 15] Univerzalno prihvaćena nomenklatura glukozinolata potječe od interpretacije različitih glukozinolata kao derivata glukozinolatnih aniona.^[16] Numeriranje pozicija u strukturi glukozinolata uključuje prvi ugljik u pokrajnjem lancu kao broj 1, što znači da tihidroksimatni ugljik ima broj 0. To je praktično kada se radi o razgradnim produktima izotiocijanata, budući da su i struktura pokrajnjeg lanca, a samim time i numeriranje identični u glukozinolatu i odgovarajućem izotiocijanatu. U ovoj doktorskoj disertaciji imena slobodnih glukozinolatnih aniona bit će pisana u dvije riječi povezane crticom, odražavajući trenutnu praksu modernije literature.^[5] Ista praksa koristit će se i za izotiocijane. Rane otkrivene strukture dobivale su trivijalna imena koja se i danas koriste. Većina ovih naziva predložena je 1950-ih i 1960-ih, a osmišljeni su kao kombinacija prefiksa "gluko" sa zajedničkim imenom odgovarajućeg izotiocijanata izvedenog iz imena prve biljke u kojoj je identificiran. Tako je primjerice glukoiberin (**73**, 3-(metilsulfinil)propil-glukozinolat) dobio ime po njegovom razgradnom produktu, 3-(metilsulfinil)propil-izotiocijanatu, odnosno iberinu prvi put izoliranom iz *Iberis amara* L.^[9] U slučajevima kada izotiocijanati nisu poznati, onda su glukozinolati nazivani po biljci, kao što je glukobrasicin (**43**, indol-3-ilmetil-glukozinolat) koji je izoliran i nazvan po rodu *Brassica*.

Začetnici istraživanja botaničke raznolikosti glukozinolata razvili su sustav numeriranja koji je korišten i u četiri važna pregledna rada objavljena u časopisu *Phytochemistry* ^[2, 4, 6, 17], a on je preuzet i u ovoj doktorskoj disertaciji. Brojevi se koriste u tablicama (tablica 2.3.1.), slikama (strukture na slici 2.3.1.) i tekstu. Prema tom sustavu brojevi bez zagrada odgovaraju glukozinolatima čije su strukture potvrđene odgovarajućim spektroskopskim tehnikama. Brojevi u uglatim zagradama odnose se na

nepotpuno okarakterizirane strukture, točnije strukture za koje ne postoji NMR karakterizacija. Desulfoglukozinolati označavaju se dodatkom slova “d” ispred odgovarajućeg broja, primjerice **d107**.

Tablica 2.3.1. Zadovoljavajuće okarakterizirani glukozinolati koji se biosintetiziraju u biljkama (brojevi podebljani i bez zagrada), kao i neke djelomično okarakterizirane strukture [u zagradama] s razumnim dokazima te nekoliko umjetno dobivenih, označenih „Umj“.^[4]

Broj	Amino kiselinski prekursor	Semisistematski naziv(i)	Trivijalni naziv
[1]	Glu	3-Metoksikarbonilpropil-GL	Glukoeripestrin
[2]	Trp	1-Acetilindol-3-ilmetil-GL, N-Acetilindol-3-ilmetil-GL	N-Acetilglukobrasicin
[3]^a	Phe	4-(4'-O-Acetil- α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-GL	4-Acetilglukomoringin
4	Phe	2-(α -L-Arabinopiranoziloksi)-2-feniletil-GL	
5	Met	4-(Benzoiloksi)butil-GL	
[6]	Met	2-(Benzoiloksi)etil-GL	
[7]	Ile	(1R)-1-(Benzoiloksimetil)propil-GL	Glukobenzsisaustricin
8		Br. "8" naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] se ukida, budući da citat Daxenbichler i sur. (1991.) ^[18] “benzoiloksimetil-GL” nema temelja u radu. Moguće pogrešno tumačenje Pr kao Ph u formuli PrCO ₂ Me.	
[9]	Val	(1R)-2-Benzoiloksi-1-metiletil-GL	Glukobenzsisimbrin
[10]	Met	3-(Benzoiloksi)propil-GL	Glukomalkolmin
11	Phe	Benzil-GL	Glukotropeolin
12	Met	But-3-enil-GL	Glukonapin

[13]	?	<i>n</i> -Butil-GL	
[14]	Phe/Tyr	3,4-Dihidroksibenzil-GL	Glukomatronalin
15	Phe/Tyr	3,4-Dimetoksibenzil-GL	
16	?	Etil-GL	Glukolepidin
17	Br. “ 17 ” naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] ukinut je u Agerbirk i Olsen, 2012. ^[2] , budući da je bio sinonim za 30 .		
18	Br. “ 18 ” naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] (“hept-6-enil-GL”) ukinut je u Agerbirk i Olsen, 2012. ^[2] zbog nedovoljnih dokaza.		
19	Br. “ 19 ” naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] (“heks-6-enil-GL”) ukinut je u Agerbirk i Olsen, 2012. ^[2] zbog nedovoljnih dokaza.		
[20]	?	<i>n</i> -Heksil-GL	
21	Br. “ 21 ” naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] (“2-hidroksibenzil-GL”) je ukinut jer nije pronađeno izvješće o njegovom postojanju. Kasniji polusintetski pripravak (Bennett i sur., 2004.) ^[19] iz 109 nastao tretiranjem glikozidazom ne predstavlja prirodni GL. Postojanje 21 kao biosintetskog intermedijera 109 čini se mogućim.		
22	Phe	3-Hidroksibenzil-GL	Glukolepigramin
23	Phe/Tyr	4-Hidroksibenzil-GL	Glukosinalbin, Sinalbin
24R	Met	(2R)-2-Hidroksibut-3-enil-GL	Progoitrin
24S	Met	(2S)-2-Hidroksibut-3-enil-GL	Epiprogoitrin
[25]	Met	3-Hidroksibutil-GL	
[26]	Met	4-Hidroksibutil-GL	
27	Met	2-Hidroksietil-GL	
28	Trp	4-Hidroksiindol-3-ilmetil-GL	4-Hidroksiglukobrasicin
29S	Ile	(2S)-2-Hidroksi-2-metilbutil-GL	Glukokleomin

30	Ile	(1 <i>R</i>)-1-(Hidroksimetil)propil-GL	Glukosisaustričin
31	Leu	2-Hidroksi-2-metilpropil-GL	Glukokonringin
[32]	Met	3-Hidroksi-6-(metilsuflinil)heksil-GL	
[33]	Met	3-Hidroksi-5-(metilsulfinil)pentil-GL	
[34]	Met	3-Hidroksi-6-(metilsulfonil)heksil-GL	
[35]	Met	3-Hidroksi-5-(metilsulfonil)pentil-GL	
[36]	Met	3-Hidroksi-6-(metilsulfanil)heksil-GL	
[37]	Met	3-Hidroksi-5-(metilsulfanil)pentil-GL	
38S	Met	(2 <i>S</i>)-2-Hidroksipent-4-enil-GL	Glukonapoleiferin
39	Br. "39" naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] ("2-hidroksipentil-GL") obustavljen je zbog nedovoljnih dokaza (Agerbirk i Olsen, 2012.) ^[2] Spomenuti izotiocijanat neočekivan; oksazolidintion bi bio očekivan.		
40R	Phe	(2 <i>R</i>)-2-Hidroksi-2-feniletil-GL	Epiglukobarbarin
40S	Phe	(2 <i>S</i>)-2-Hidroksi-2-feniletil-GL	Glukobarbarin
41	Br. "41" naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] ("2-hidroksipropil-GL") obustavljen je zbog nedovoljnih dokaza (Agerbirk i Olsen, 2012.) ^[2] Spomenuti izotiocijanat neočekivan; oksazolidintion bi bio očekivan.		
[42]	Met	3-Hidroksipropil-GL	
43	Trp	Indol-3-ilmetil-GL	Glukobrasicin

44		Br. "44" naveden u Fahey i sur. (2001) ^[6] ("2-metoksibenzil-GL") je ukinut jer točan položaj OCH ₃ skupine na fenilnom prstenu nije naveden u citiranim radovima. Kasnija tvrdnja (Bennett i sur., 2004.) ^[19] temeljila se samo na MS-u, koji također ne pruža dovoljne dokaze o ovom GL-u.	
45	Phe	3-Metoksibenzil-GL	Glukolimnantin
46	Phe/Tyr	4-Metoksibenzil-GL	Glukoaubrietin
47	Trp	1-Metoksiindol-3-ilmetil-GL, N-Metoksiindol-3-ilmetil-GL	Neoglukobrasicin
48	Trp	4-Metoksiindol-3-ilmetil-GL	4-Metoksiglukobrasicin
[49]	?	2-(4-Metoksifenil)-2,2-dimetiletil-GL	
50R	Phe/Tyr	(2R)-2-Hidroksi-2-(4-metoksifenil)etil-GL	
51	Ala	Metil-GL	Glukokaparin
[52]	Leu	3-Metilbut-3-enil-GL	
53		Br. "53" naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] se ukida, budući da je citat Daxenbichler i sur. (1991) ^[18] "1-metilbutil-GL" nema temelja u radu.	
54	Ile	(2S)-2-Metilbutil-GL	Glukojiaputin
[55]	Leu	3-Metilbutil-GL	
56	Val	1-Metiletil-GL	Glukoputranjivin
57R	Val	(1R)-1-Metil-2-hidroksietil-GL, (1R)-1-(Hidroksimetil)etil-GL	Glukosisimbrin
58	Ile	3-Metilpentil-GL	
[59]	Leu	4-Metilpentil-GL	

60		Br. "60" naveden u Fahey i sur. (2001.). ^[6] ("2-metilprop-2-enil-GL") je izostavljen zbog nedokumentirane tvrdnje ili pogrešno upisane kratica ("MePren") (Daxenbichler i sur., 1991.). ^[18] Novija tvrdnja (Yang i Quiros, 2010.) temelji se samo na HPLC-UV i vremenu zadržavanja (!). ^[20]	
61	Ile	(1 <i>S</i>)-1-Metilpropil-GL, <i>sec</i> -Butil-GL	Glukokohlearin
62	Leu	2-Metilpropil-GL, Izobutil-GL	
63	Met	(<i>R</i> _S ,3 <i>E</i>)-4-(metilsulfinil)but-3-enil-GL	Glukorafenin
64	Met	(<i>R</i> _S)-4-(Metilsulfinil)butil-GL	Glukorafanin
65	Met	(<i>R</i> _S)-10-(Metilsulfinil)decil-GL	Glukokamelinin
66	Met	(<i>R</i> _S)-7-(Metilsulfinil)heptil-GL	
67	Met	(<i>R</i> _S)-6-(Metilsulfinil)heksil-GL	Glukohesperin
68	Met	(<i>R</i> _S)-9-(Metilsulfinil)nonil-GL	Glukoarabin
69	Met	(<i>R</i> _S)-8-(Metilsulfinil)oktil-GL	Glukohirsutin
70		Br. "70" naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] je ukinut jer nije naveden izvor za "7-metilsulfinil-3-oksoheptil-GL".	
[71]	Met	(<i>R</i> _S)-8-(Metilsulfinil)-3-oksooktil-GL	
72	Met	(<i>R</i> _S)-5-(Metilsulfinil)pentil-GL	Glukoalisin
73	Met	(<i>R</i> _S)-3-(Metilsulfinil)propil-GL	Glukoiberin
[74]	Met	(<i>R</i> _S)-11-(Metilsulfinil)undecil-GL	
75		Br. "75" ("4-(metilsulfonyl)but-3-enil GSL") naveden u Fahey i sur. (2001) ^[6] je prekinut, budući da m/z vrijednost za izotiocijanat (Cole, 1980) ^[21] nije dovoljan dokaz za postojanje prirodnog glukozinolata.	
[76]	Met	4-(Metilsulfonyl)butil-GL	Glukoerisolin

77	Met	10-(Metilsulfonil)decil-GL	
[78]	Met	6-(Metilsulfonil)heksil-GL	
79	Met	9-(Metilsulfonil)nonil-GL	
80	Met	8-(Metilsulfonil)oktil-GL	
81		Br. "81" ("5-(Metilsulfonil)pentil-GL") naveden u Fahey i sur. (2001) ^[6] je ukinut. Odnosilo se samo na derivat tiouree koju je Rodman (1976.) ^[22] uočio na papirnoj kromatografiji i "uslovno" sugerira da je to zbog spomenutog glukozinolata.	
82	Met	3-(Metilsulfonil)propil-GL	Glukokeirolin
83	Met	(3E)-4-(Metilsulfanil)but-3-enil-GL, (3E)-4-(Metitio)but-3-enil-GL	Dehidroglukoerucin (preporučeno)
84	Met	4-(Metilsulfanil)butil-GL, (Metiltio)butil-GL	4- Glukoerucin
[85]	Met	10-(Metilsulfanil)decil-GL, 10-(Metiltio)decil-GL	
86		Br. „86” naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] ("2-(metiltio)etil-GL") obustavljen je zbog nedovoljnih dokaza (Agerbirk i Olsen, 2012.) ^[2] Kasnija tvrdnja temeljila se na uočenom manjem signalu u HPLC-UV desulfoglukozinolata. ^[23]	
87	Met	7-(Metilsulfanil)heptil-GL, 7-(Metiltio)heptil-GL	
88	Met	6-(Metilsulfanil)heksil-GL, 6-(Metiltio)heksil-GL	Glukoleskverelin
[89]	Met	9-(Metilsulfanil)nonil-GL, 9-(Metiltio)nonil-GL	
90 91		Br. "90" i "91" navedeni u Fahey i sur. (2001.) ^[6] obustavljeni su jer nisu navedeni izvori za "7-metilsulfanil-3-oksoheptil-" i "6-metilsulfanil-3-oksoheksil-" GL.	

92	Met	8-(Metilsulfanil)oktil-GL, 8-(Metiltio)oktil-GL	
[93]	Met	8-(Metilsulfanil)-3-oksooktil- GL, 8-(Metiltio)-3-oksooktil- GL	
94	Met	5-(Metilsulfanil)pentil-GL, 5-(Metiltio)pentil-GL	Glukoberteroin
95	Met	3-(Metilsulfanil)propil-GL, 3-(Metiltio)propil-GL	Glukoibervirin
[96]	?	4-Oksoheptil-GL	Glukokapangulin
[97]	?	5-Oksoheptil-GL	Glukonorkapasalin
[98]	?	5-Oksooktil-GL	Glukokapasalin
99		Br. "99" naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] ("4-oksopentil-GL") obustavljen je zbog nedostatka bilo kakvog izvješća (Agerbirk i Olsen, 2012.) ^[2] Kasnija tvrdnja (Al-Gendy et al., 2010.) ne predstavlja dovoljan dokaz. ^[24]	
100		Br. "100" naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] ("pent-1-enil-GL") obustavljen je zbog nedostatka izvješća. Možda je riječ o pogrešnom čitanju kratice Pten (= 101) u Daxenbichler i sur. (1991). ^[18]	
101	Met	Pent-4-enil-GL	Glukobrasikanapin
[102]	?	<i>n</i> -Pentil	
[103]	?	Fenil-GL	
[104]	Phe	4-Fenilbutil-GL	
105	Phe	2-Feniletil-GL, Fenetil-GL	Glukonasturcin
[106]	Phe	3-Fenilpropil-GL	
107	Met	Prop-2-enil-GL, Alil-GL	Sinigrin
108		Br. "108" naveden u Fahey i sur. (2001.) ^[6] (" <i>n</i> -propil GSL") je ukinut jer nije prijavljen ni u jednoj biljci te je bio uključen isključivo na temelju Fenwicka i sur. ^[14, 25] , koji je pogrešno upisao "propil" GL umjesto "izopropil" GL, pronađenog u <i>Capparis</i> spp. ^[26]	

109	Phe	2-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzil-GL	
110	Phe/Tyr	4-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzil-GL	Glukomoringin
111	Met	(<i>R</i> _s ,3 <i>E</i>)-6'-Sinapoil-4-(metilsulfinil)but-3-enil-GL	6'-Sinapoilglukorafenin
112	Trp	1-Sulfoindol-3-ilmetil-GL, <i>N</i> -sulfoindol-3-ilmetil-GL	Glukobrasicin- <i>N</i> -sulfonat, <i>N</i> -sulfoglukobrasicin
[113]	?	4,5,6,7-Tetrahidroksidecil-GL	
114	Phe/Tyr	3,4,5-Trimetoksibenzil-GL	
115 116		br. "115" i "116" navedeni u Fahey i sur. (2001.) ^[6] ("izo"-heptil-GL; "izo"-heksil-GL) ukinuto je (Agerbirk i Olsen, 2012.) ^[2] , budući da takvi nazivi ne odgovaraju jasno definiranim strukturama.	
117	Met	5-(Benziloksi)pentil-GL	
[118]	Met	6-(Benziloksi)heksil-GL	
119 120		Br. "119" i "120" navedeni u Fahey i sur. (2001.) ^[6] (apiozil i acil derivati od [14]) ukinuti su (Agerbirk i Olsen, 2012.) ^[2] , budući da je zaključeno da ove tvrdnje (Larsen i sur., 1992.) ^[27] nisu dokumentirane.	
121R	Met	2',3'-Dihidro-2'-oksoindol-3'-ilacetatni ester na 2-OH od (<i>R</i>)-2-hidroksibut-3-enil-GL	Glukoisatisin
121S	Met	2',3'-Dihidro-2'-oksoindol-3'-ilacetatni ester na 2-OH od (<i>S</i>)-2-hidroksibut-3-enil-GL	Epiglukoisatisin
122R	Met	2',3'-Dihidro-3'-Hidroksi-2'-oksoindol-3'-ilacetatni ester na 2-OH od (<i>R</i>)-2-hidroksibut-3-enil-GL	(<i>R</i>)-3'-Hidroksiglukoisatisin

122S	Met	2',3'-Dihidro-3'-Hidroksi-2'-oksoindol-3'-ilacetatni ester na 2-OH od (S)-2-hidroksibut-3-enil-GL	(S)-Hidroksiepiglucoisatin	3'-
[123S]	Met	(2S)-2-Benzoiloksibut-3-enil-GL	2-O-Benzoilepiprogoitrin	
[124]	Met	3-Sinapoiloksipropil-GL		
125	Met	6'-Benzoil-4-benzoiloksibutil-GL		
126	Met	6'-Benzoil-4-(metilsulfinil)butil-GL	6'-Benzoilglukorafanin	
127	Met	6'-Benzoil-4-(metilsulfanil)butil-GL	6'-Benzoilglukoerucin	
128	Br. "128" naveden u Agerbirk i Olsen (2012.) ^[2] izostavili su Agerbirk i Olsen (2013.) ^[28] jer su NMR spektralni dokazi o "6'-(<i>p</i> -kumaroil)glukorafaninu" (Survay et al., 2010) ^[29] bili nejasni, a kasnije je izvješće istih autora povučeno.			
129	Phe	6'-Izoferuloil-2-feniletal-GL, 6'-Izoferuloilfenetal-GL	6'-Izoferuloilglukonasturcin	
130	Trp	6'-Izoferuloilindol-3-ilmetil-GL	6'-Izoferuloilglukobrasicin	
131R	Phe	6'-Izoferuloil-(2R)-2-hidroksi-2-feniletal-GL	6'-Izoferuloilepiglukobarbarin	
131S	Phe	6'-Izoferuloil-(2S)-2-hidroksi-2-feniletal-GL	6'-Izoferuloilglukobarbarin	
132R	Phe/Tyr	6'-Izoferuloil-(R)-2-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)etal-GL		
133	Met	4-Merkaptobutil-GL		
134	Met	Dimer 4-Merkaptobutil-GL-a ili Dimerni 4-Merkaptobutil-GL		

135	Met	4-(β -D-Glukopiranozildisulfanil)butil-GL, 4-(β -D-Glukopiranozilditio)butil-GL	Diglukotiobeinin
136	Met	(<i>R</i>)-4-(Cistein- <i>S</i> -il)butil-GL	Glukorukolamin
137	Met	2-Metilsulfinitetil-GL	
138	Trp	1,4-Dimetoksiindol-3-ilmetil-GL	1,4-Dimetoksiglukobrasicin
139R	Phe/Tyr	(<i>2R</i>)-2-Hidroksi-2-(4-hidroksifenil)etil-GL	<i>p</i> -Hidroksiepiglukobarbarin
139S	Phe/Tyr	(<i>2S</i>)-2-Hidroksi-2-(4-hidroksifenil)etil-GL	<i>p</i> -Hidroksiglukobarbarin
140	Phe/Tyr	2-(4-Hidroksifenil)etil-GL, <i>p</i> -Hidroksifenetil-GL	Homosinalbin
141	Ile	3-(Hidroksimetil)pentil-GL	
142R	Phe	(<i>2R</i>)-2-Hidroksi-2-(3-hidroksifenil)etil-GL	<i>m</i> -Hidroksiepiglukobarbarin
143	Phe/Tyr	2-(4-Metoksifenil)etil-GL, <i>p</i> -Metoksifenetil-GL	
[144] Umj	Se-Met	3-(Metilseleno)propil-GL	Glukoselenoibervirin
[145] Umj	Se-Met	4-(Metilseleno)butil-GL	Glukoselenoerucin
[146] Umj	Se-Met	4-(Metilseleno)pentil-GL	Glukoselenoberteroin
[147]	Trp	4-Metoksiindol-3-il-GL	Glukorapasicin A
148	Phe	2-(3-Hidroksifenil)etil-GL, <i>m</i> -Hidroksifenetil-GL	
149	Ile	2-Hidroksi-3-metilpentil-GL	

150		2-Hidroksi-8-(metilsulfinil)oktil-GL	
151	Phe/Tyr	4-Hidroksi-3-metoksibenzil-GL	3-Metoksisinalbin
152	Phe/Tyr	4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-GL	3,5-Dimetoksisinalbin
153	Phe/Tyr	3-Hidroksi-4-metoksibenzil-GL	Glukobretšneiderin
[154]	Trp	1-Hidroksiindol-3-ilmetil-GL, <i>N</i> -Hidroksiindol-3-ilmetil-GL	<i>N</i> -Hidroksiglukobrasicin
[155]	Glu	3-Karboksipropil-GL	
[156]	Phe	5-Fenilpentil-GL	Glukoarmoracin
157	Phe/Tyr	4'- <i>O</i> -(β -D-apiofuranoziloksi)-3-hidroksibenzil-GL	4'- <i>O</i> - β -D-Apiofuranozilglukomatronalin
158	Phe	2''- <i>O</i> -(α -L-arabinopiranoziloksi)benzil-GL	Glukoohradenin

*GL - glukozinolat

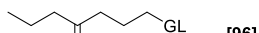
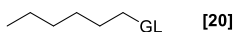
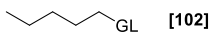
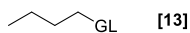
^aJedini djelomično potvrđen, postoje još 2.

*Umj - umjetno dobiveni glukozinolat zalijevan otopinom selenija u obliku selenita i selenata.

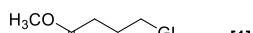
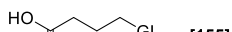
Prekursor Ala



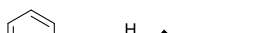
Nepoznati prekursor



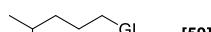
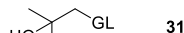
Prekursor Glu



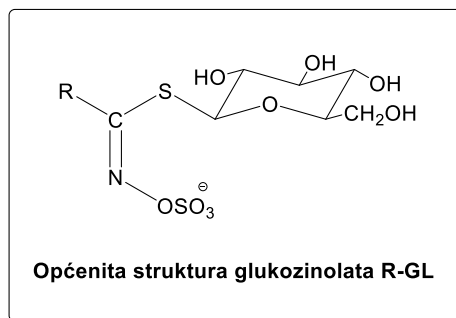
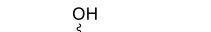
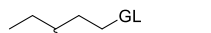
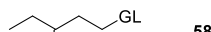
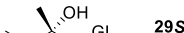
Prekursor Val



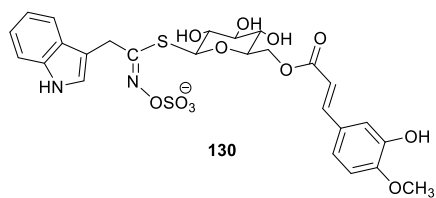
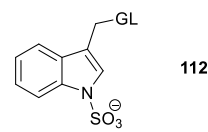
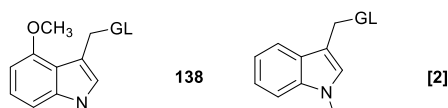
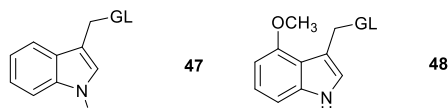
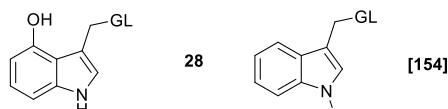
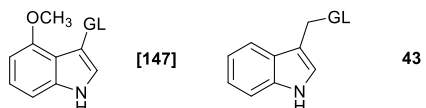
Prekursor Leu



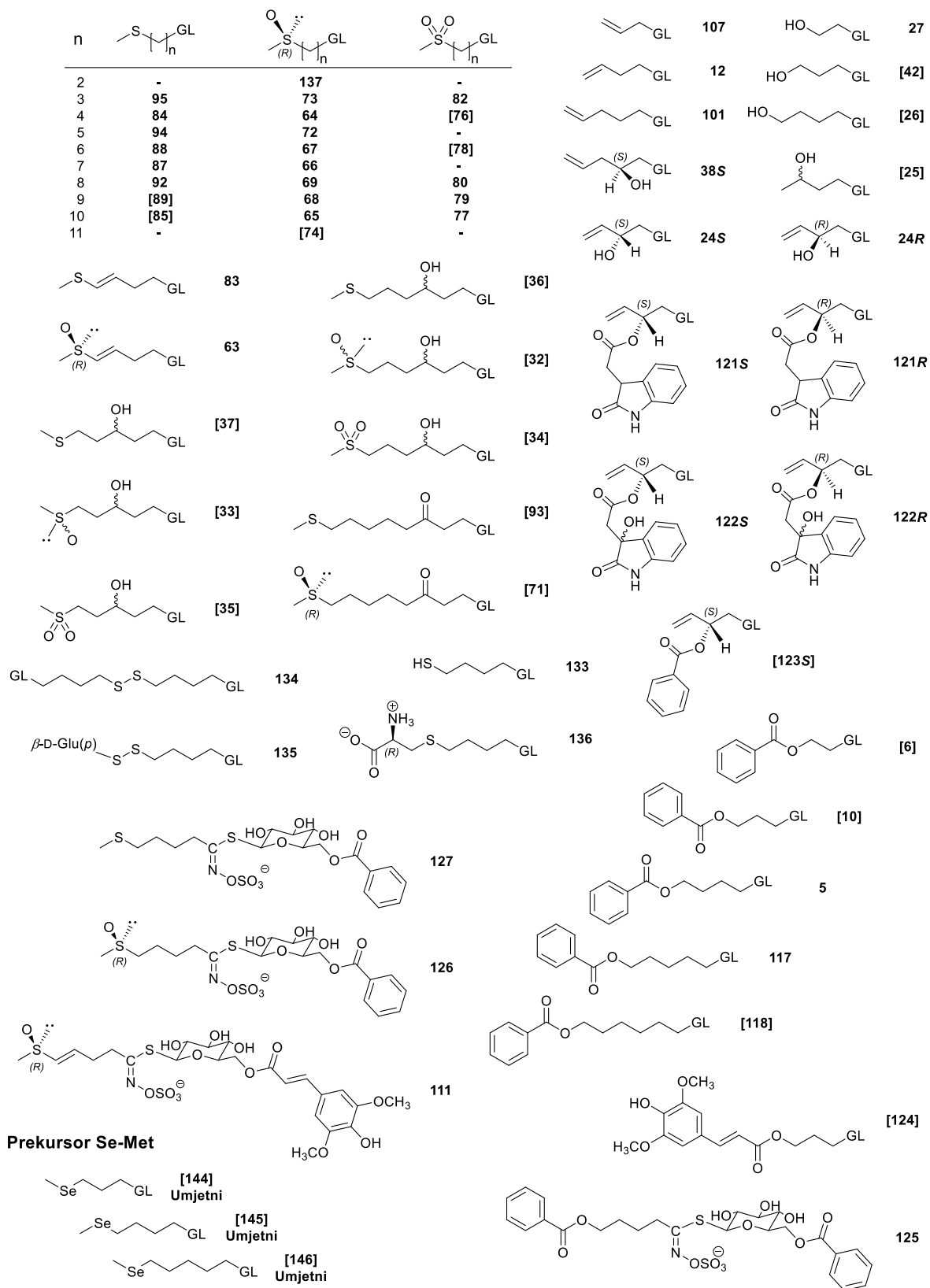
Prekursor Ile



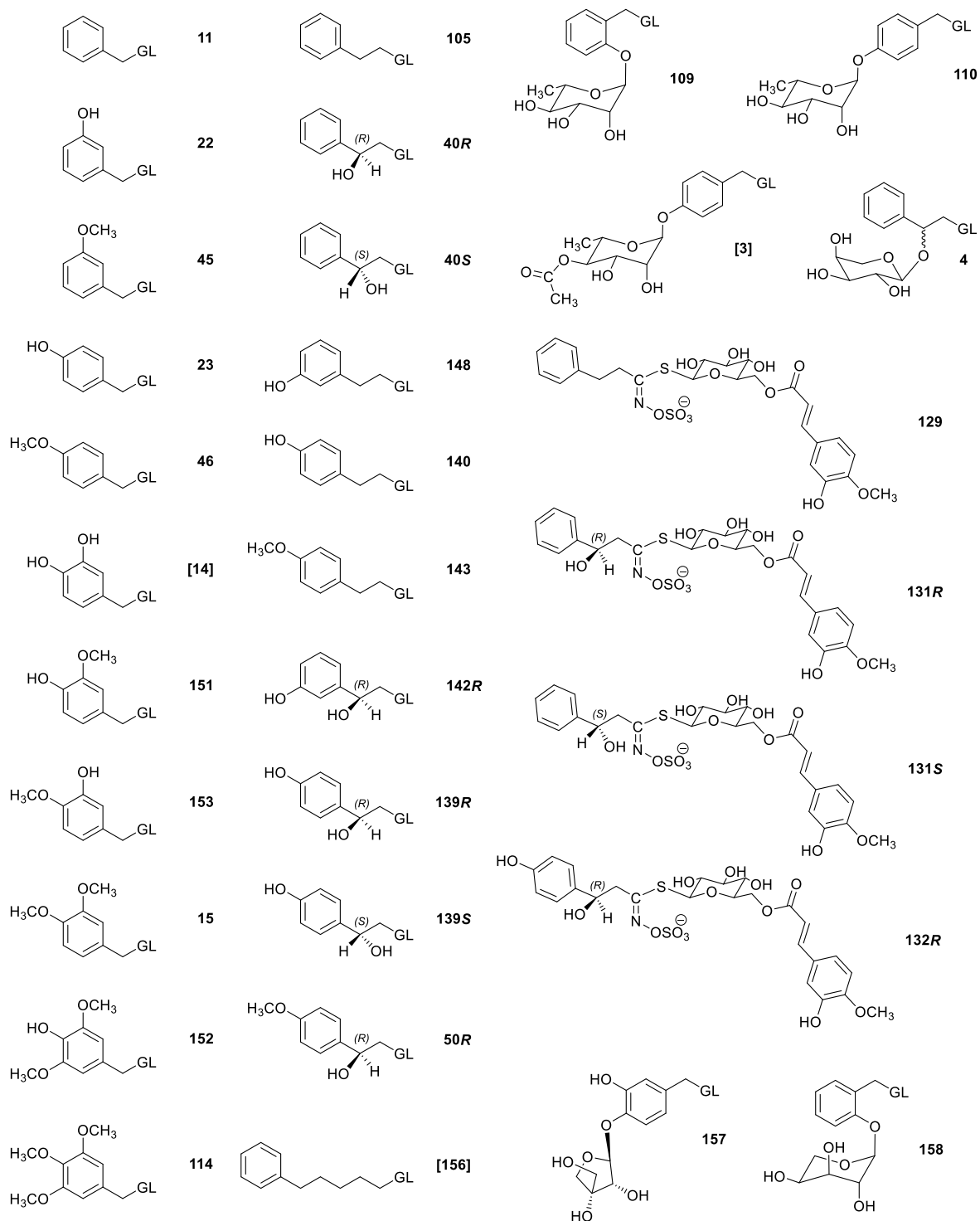
Prekursor Trp



Prekursor Met



Prekursori Phe i/ili Tyr



Slika 2.3.1. Strukture glukozinolata. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 2.3.1.^[4]

2.4. Biosinteza glukozinolata i selenoglukozinolata

Biosinteza glukozinolata

Razumijevanje evolucije glukozinolata unutar reda Brassicales je posljednjih godina iznimno unaprijeđeno, uglavnom, zahvaljujući istraživanjima na biljci *Arabidopsis thaliana*.^[30, 31] Za glukozinolate je poznato, ili se očekuje, da su nastali od sljedećih aminokiselina: alanina, valina, leucina, izoleucina, metionina, glutaminske kiseline, fenilalanina, tirozina i triptofana. Alifatski glukozinolati koji potječu od prvih šest aminokiselina, najraznovrsnija su skupina glukozinolata u rodu *Arabidopsis*, kao i mnogim drugim vrstama iz reda Brassicales. Arilalifatski glukozinolati nastaju iz fenilalanina i/ili tirozina, a indolni iz triptofana. Biosinteza se odvija kroz tri neovisne faze: (i) produljenje lanca aminokiselinskih prekursora, (ii) stvaranje jezgre glukozinolatne strukture te (iii) sekundarne modifikacije kao što su modifikacija aminokiselinskih pokrajnjih lanaca ili glukoznog dijela.^[30] Upravo su sekundarne modifikacije zajedno s produljenjem pokrajnjeg lanca odgovorne za strukturnu raznolikost glukozinolata. U većini slučajeva, produljenje lanca je odgovorno za stvaranje viših homologa u biosintezi glukozinolata, kao što je poznato za metionin, fenilalanin i glutaminsku kiselinu, odnosno predviđeno za izoleucin te vjerojatno za leucin, alanin i tirozin.^[4] Metionin je (gotovo) uvijek podložan produljenju lanca prije biosinteze glukozinolata, za razliku od triptofana koji može biti podložan skraćivanju lanca kao što je nedavno otkriveno u istraživanju biosinteze glukozinolata iz biljke *Brassica napus*.^[32, 33] Biosinteze iz metionina i fenilalanina/tirozina rezultiraju velikim brojem glukozinolata zbog produljenja lanca prije biosinteze same jezgre glukozinolatne strukture te sekundarnih modifikacija koje se događaju naknadno. Primjerice, 2-hidroksibut-3-enil-glukozinolat (**24R** i **24S**) i 4-benzoiloksibutil-glukozinolat (**5**) u *A. thaliana* biosintetiziraju se nizom složenih procesa iz metionina tako da je u konačnim strukturama njihovo aminokiselinsko podrijetlo poprilično nejasno.

Biosinteza glukozinolata uključuje nekoliko obitelji gena (BCAT, MAM, CYP), a čak više od 20 takvih gena otkriveno je u *A. thaliana*.^[30] Biosinteza je potvrđena ekspresijom gena koji aktiviraju aminokiseline iz početnog koraka biosinteze cijanogenih glukozida u ovoj biljnoj vrsti. Smatra se da je biosinteza glukozinolata, u inače cijanogenim biljnim vrstama, evoluirala, što je temeljeno na zajedničkom biosintetskom koraku kataliziranom enzimima CYP79 i kod glukozinolata i kod cijanogenih glikozida.

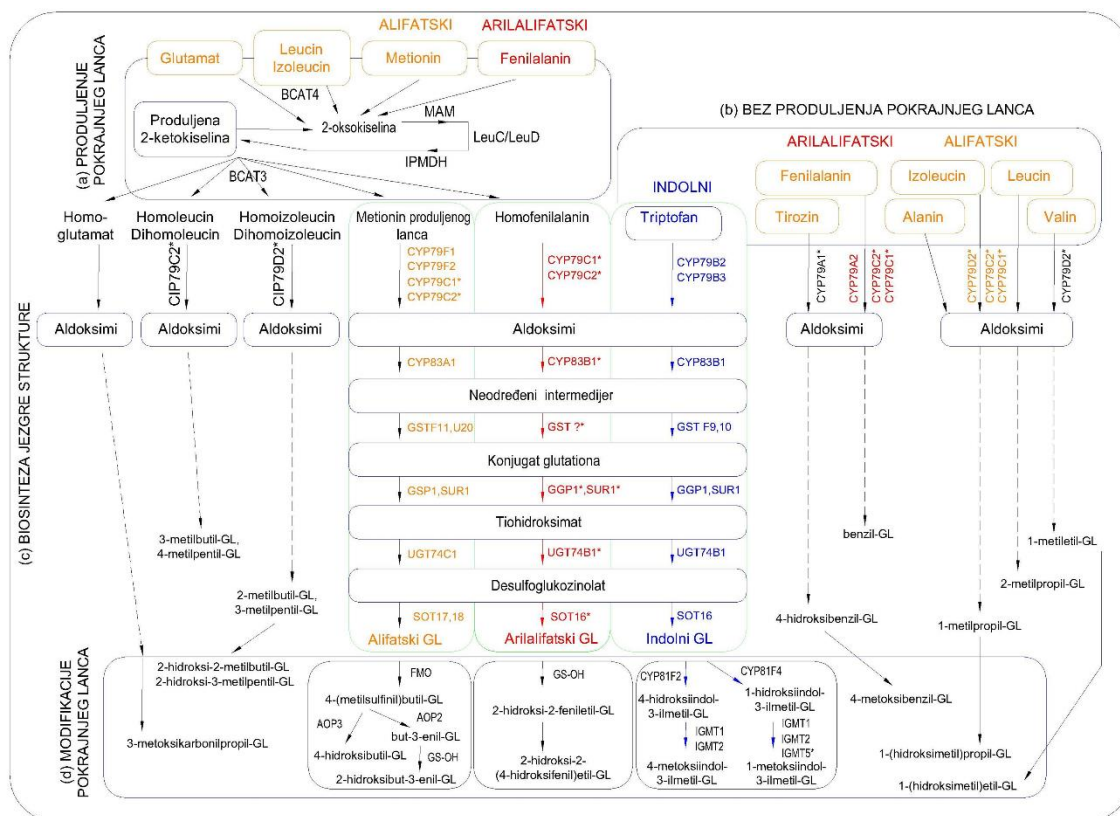
CYP79 su identificirani u većini redova kritosjemenjača^[34] i svi oni kataliziraju pretvorbu aminokiseline u odgovarajući oksim.^[35]

Biosinteza alifatskih glukozinolata izvedenih iz metionina započinje deaminacijom metionina u 2-oksokiselinu kataliziranom aminokiselinom razgranatog lanca-aminotransferazom4 (BCAT4). Unutar kloroplasta nastala 2-okso kiselina podliježe kondenzaciji s acetyl-CoA pomoću metilsulfanilalkilmalat-sintaze1 (MAM1), MAM2 i MAM3 pri čemu se produljuje lanac ugljikovih atoma^[36], nakon čega se nastali derivat izomerizira i potom dekarboksilira. Slijedi ponovna transaminacija ketokiseline katalizirana djelovanjem BCAT3 pri čemu nastaje metionin produljenog lanca koji se dalje metabolizira djelovanjem CYP79F1 i CYP79F2 do aldoksima. Nastali aldoksim djelovanjem CYP83 prevodi se u intermedijer, za sada nepotvrđene strukture za kojeg se često u literaturi navodi da je riječ o nitrilnom oksidu.^[37] Ovaj intermedijer se spaja s glutationom koji služi kao donor sumpora pomoću glutation-*S*-transferaze, a zatim se cijepa γ -glutamyl-peptidazom i C-S-liazom čime nastaje tihidroksimat. Smatra se da je biosinteza glukozinolata evoluirala na temelju općih reakcija detoksifikacije, budući da uključivanje glutaciona praćenog glikozilacijom i sulfatacijom u biosintezi glukozinolata nalikuje reakcijama detoksifikacije.^[38] Na posljetku, tihidroksimat se *S*-glukozilira pomoću UDP-glukozil-transferaze, dajući pritom desulfoglukozinolat koji se sulfatira do glukozinolata pomoću sulfo-transferaze.^[30, 39] Alifatski glukozinolati podliježu modifikacijama pokrajnjeg lanca, uključujući oksidaciju sumpora flavin-monooksigenazama te formiraju hidroksilirane alkenilne glukozinolate iz sulfinilnih glukozinolata djelovanjem enzima 2-oksoglutarat-ovisne-dioksigenaze (odgovorne za nastanak but-3-enil- i prop-2-enil-glukozinolata, hidroksialkilnih glukozinolata i nastanak 4-(metilsulfanil)but-3-enil-glukozinolata) (slika 2.4.1.).^[40, 41]

Biosinteza indolnih glukozinolata započinje pretvorbom aminokiseline triptofana u indol-3-acetaldoksim djelovanjem CYP79B2 i CYP79B3, a nastavlja se djelovanjem CYP83B1 te nastankom prethodno spomenutog intermedijera u kojeg se ugrađuje sumpor te daje tihidroksimat.^[31] Kao i kod alifatskih glukozinolata, glukozinolacija i sulfatacija su zadnje faze stvaranja intaktnih glukozinolata. Indolni glukozinolati također podliježu modifikacijama pa tako enzimi CYP81F kataliziraju njihovu hidroksilaciju. Zanimljivo je da su različiti enzimi iz ove obitelji odgovorni za hidroksilacije na različitim pozicijama indolnog prstena, točnije pozicijama 4 i 1. Hidroksiindolni glukozinolati mogu se dalje

metabolizirati u metoksiindolne derivate pomoću indol-glukozinolat-metil-transferaza 1 i 2 (IGMT1 i IGMT2) (slika 2.4.1.).^[42, 43]

Biosinteza glukozinolata iz fenilalanina/tirozina te standardnih aminokiselina razgranatog lanca smatra se evolucijski prastarom te se pojavljuje čak i u bazalnim porodicama Tropaeolaceae i Akaniaceae.^[3] Također, biosinteza glukozinolata izvedenih iz triptofana i homo-fenilalanina se smatra evolucijski prastarom, a prisutna je u nekoliko porodica, uključujući Resedaceae.^[3] Pretpostavlja se da su glukozinolati izvedeni iz triptofana evoluirali nakon odvajanja Limnanthaceae od preostalih 11 izvedenih porodica.^[44] Kada su u pitanju sekundarne modifikacije, β -hidroksilacija se smatra starom koliko i sama biosinteza glukozinolata. S druge strane, *N*-hidroksilacija i naknadna metilacija uočena je u dvije bazalne porodice, Salvadoraceae^[45] i Tovariaceae^[46], čime je stvorena osnova za pretpostavku da je *N*-metoksilacija pripada evolucijski prastarim modifikacijama.^[47] Smatra se da se početak produljenja lanca metionina odvio u zajedničkom pretku nekoliko porodica reda Brassicales te su tri porodice dijelile ovu skupinu glukozinolata, Brassicaceae, Cleomaceae i Capparaceae^[48, 49], praćenu karakterističnim modifikacijama sumpora u pokrajnjim lancima pri čemu nastaju sulfinilni, sulfonilni i alkenilni glukozinolati.

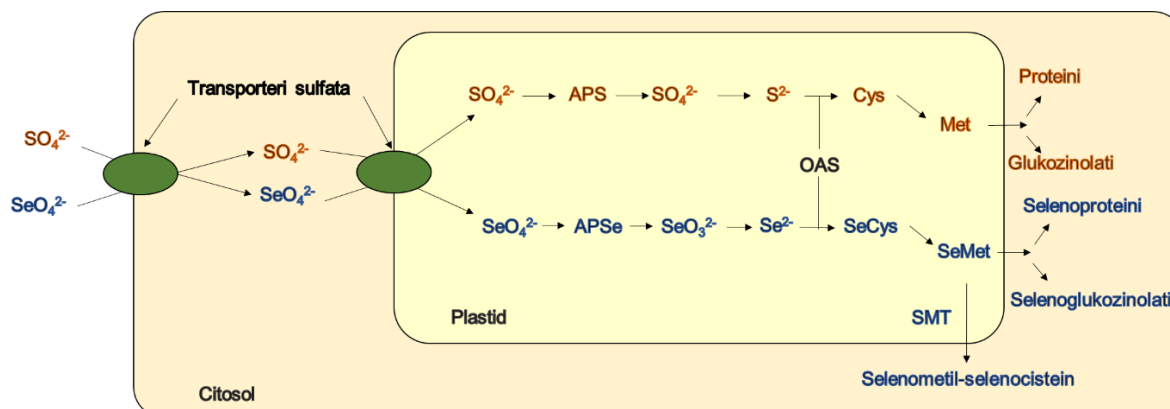


Slika 2.4.1. Biosintetski putevi alifatskih, indolnih i arilalifatskih glukozinolata.^[31]

Biosinteza selenoglukozinolata

Selenij je analog sumpora i dijeli putove unosa i asimilacije sumpora u biljkama.^[50] Unos selenata i selenita u biljci smatra se analognim onom za sulfat, odnosno sulfid. Selenat i sulfat ulaze u epidermalne stanice korijena kroz plazma membranu preko sulfatnog transportera, prijenosom protiv elektrokemijskog gradijenta koji se pokreće transportom tri protona za svaki ion (slika 2.4.2.). Smatra se da se daljnji transport selenija od korijena do izdanaka odvija preko ksilema. Hsu i sur. (2011) su pokazali da 100 μM otopina selenita ne utječe na ukupni sadržaj glukozinolata u izdancima mladih biljaka brokule.^[51] Naime, pretpostavlja se da selenit ne utječe na biosintezu glukozinolata zbog različitih metaboličkih puteva sulfata i selenita zbog različitog unosa, transporta i asimilacije. U biljkama koje se smatraju akumulatorima, selenat je koncentriran u starijim listovima, dok se organski spojevi sa selenijem, poput metilselenocisteina, nalaze u najmlađem tkivu.^[52] S druge strane, neakumulatorske biljke zadržavaju selenij uglavnom u korijenu i sjemenu, dok se samo male količine nalaze u stabljikama i lišću.^[53] Selenat se reducira istim asimilacijskim putem redukcije sulfata i ugrađuje u *O*-acetilserin (OAS) stvarajući cistein i selenocistein. Tolerancija biljaka na egzogeni selenij u visokoj

koncentraciji potječe od prisutne selenocistein-metil-transferaze (SMT) [53, 54] koja prevodi selenocistein u selenometil-selenocistein što smanjuje toksičan učinak selenija.



Slika 2.4.2. Model unosa i asimilacije sulfata i selenata u biljkama koje akumuliraju selenij; APS, 5'-adenilsulfat; APSe, 5'-adenililselenat; SMT, selenocistein-metil-transferaza; OAS, *O*-acetilserin; Cys, cistein; Met, metionin.^[54]

Primijećeno je da fortifikacija selenijem pri niskim koncentracijama povećava razinu sumpora u brojnim biljkama, dok njegova primjena u većim dozama ima antagonistički učinak na sumpor. Pored glukozinolata, poznati su i selenoglukozinolati koji su prvotno opisani kao spojevi u kojima atom selenija zamjenjuje atom sumpora na anomernoj poziciji. Međutim, ovakvi selenoglukozinolati enzimskom hidrolizom se razlažu na izoselenocijanate te se time ne uklapaju u definiciju glukozinolata.^[4] Matich i sur. (2012.) su GC-MS analizom brokule i cvjetače koje su zalijevane otopinama selenija identificirali izotiocijanate i nitrile (4-(metilseleno)butanonitril, 5-(metilseleno)pentanonitril, 3-(metilseleno)propil-izotiocijanatan, 4-(metilseleno)butilizotiocijanatan i 5-(metilseleno)pentil-izotiocijanatan), a za koje je pretpostavljeno da potječu od hidrolize odgovarajućih selenoglukozinolata. LC-MS/MS analizom utvrđen je položaj atoma selenija u identificiranim selenoglukozinolatima te njegova ugradnja u strukturu preko selenometionina u metilselenilnu skupinu, a ne u sulfatnu ili β -tioglukoznu skupinu.^[55] Ovi selenoglukozinolati sadrže selenij u bočnom lancu te su u skladu s općom strukturom glukozinolata.^[4]

2.5. Razgradnja glukozinolata

U biljkama glukozinolati ostaju neaktivni jer su pohranjeni u biljnoj stanici odvojeno od enzima mirozinaze. Mirozinaza (β -tioglukozidaza-glikohidrolaza, EC 3.2.1.147) je glikoprotein koji oštećenjem biljnog tkiva dolazi u kontakt s glukozinolatom pri čemu

započinje njegova hidroliza.^[4, 7] Reakcijom nastaje molekula glukoze i *O*-sulfonirani oksim (nestabilni aglikon) koji spontano podliježe Lossenovoj pregradnji što uzrokuje oslobađanje sulfatnog iona i stvaranje produkata razgradnje čije strukture ovise o prirodi promjenjivog pokrajnjeg lanca glukozinolata te samim uvjetima razgradnje.^[38, 56, 57] S druge strane, moguća je i neenzimska razgradnja glukozinolata što povećava broj različitih vrsta produkata među kojima su izotiocijanati, tiocijanati, nitrili, epitionitrili i 1,3-oksazolidin-2-tioni (slika 2.5.1.).^[8, 38] Alifatski glukozinolati su stabilniji u odnosu na indolne glukozinolate. Unutar skupine alifatskih glukozinolata koji sadrže sumpor u pokrajnjem lancu, metilsulfinilni glukozinolati pokazali su se stabilnijim od metilsulfanilnih glukozinolata.^[58, 59] S obzirom na odnos strukture i aktivnosti, općenito je uočeno da su glukozinolati s hidroksilnom skupinom u pokrajnjem lancu (primjerice 2-hidroksibut-3-enil-glukozinolat) manje stabilni u usporedbi sa svojim odgovarajućim nehidroksiliranim srodnicima, (but-3-enil-glukozinolat).^[58, 59] Hidroliza glukozinolata utječe na okus, miris i nutritivnu vrijednost začina i povrća iz porodice Brassicaceae, kao što su senf, hren, kupus, cvjetača i brokula, a za biljke ovaj proces je ključan za kemijsku obranu. Produkti hidrolize glukozinolata posjeduju različite biološke aktivnosti važne i za ljude.^[38] U posljednjem desetljeću mnogi od njih su identificirani kao moćni agensi za prevenciju raka na širokom rasponu životinjskih modela.^[60] Neki od produkata pokazuju i značajna antibakterijska, antinematodna i antifungalna svojstva.^[61, 62]

Međutim, u nekim biljkama specifični proteini, kao što su epitiospecifični protein ESP^[63], proteini specifični za nitrile (NSP)^[64, 65], ili tiocijanat-formirajući protein (TFP)^[66], moduliraju transformacije glukozinolata. Željezovi(II) ioni utječu na aktivnost ESP-a i NSP-a što potiče stvaranje nitrila.^[64, 67, 68] S druge strane, ESP potiče stvaranje epitionitrila od nezasićenih alifatskih glukozinolata kao što je primjerice sinigrin.^[63, 68] Samo određeni glukozinolati uz prisustvo TFP-a stvaraju tiocijanate, dok kod ostalih, ovaj protein pogoduje stvaranju nitrila.^[69] S druge strane, protein modifikator epitiospecifičnog proteina (ESM) blokira stvaranje epitionitrila i nitrila u korist izotiocijanata.^[70, 71] Blaga toplinska obrada inaktivira ESP uz održavanje aktivnosti mirozinaze, što dovodi do usmjeravanja razgradnje ka stvaranju izotiocijanata.^[72-74] Dulja toplinska obrada inaktivira mirozinazu i stoga više ili manje potpuno inhibira enzimsku razgradnju.^[75] Štoviše, pokazalo se da kuhanje kupusnjača dovodi do gubitaka glukozinolata uzrokovanog njihovim otapanjem u vodi vodu (oko 90 % sadržaja), dok

kuhanje na pari kao i kuhanje u mikrovalnoj pećnici nisu doveli do značajnih gubitaka ovih spojeva.^[7, 76-78]

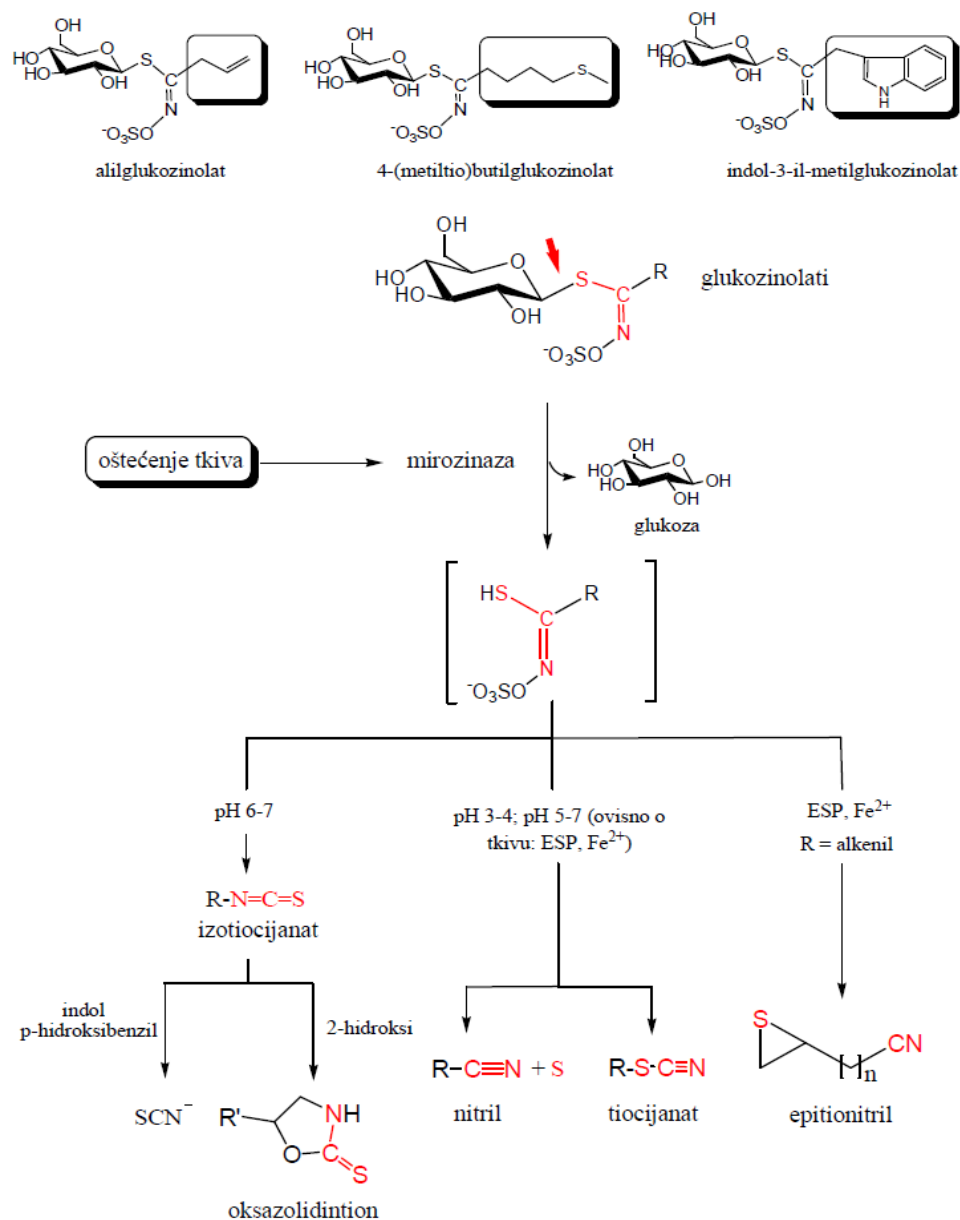
Izotiocijanati su najčešći produkti koji nastaju iz aglikona Lossenovom pregradnjom koja uključuje antistereospecifični prijenos pokrajnjeg lanca oksima na susjedni dušik. Pokrajnji lanac koji sadrži hidroksilnu skupinu na drugom ugljikovu atomu stvara nestabilne izotiocijanate koji cikliziraju u oksazolidin-2-tione.^[79] Izotiocijanate karakterizira -N=C=S skupina, s visoko elektrofilnim ugljikovim atomom, koji omogućuje reakcije s različitim staničnim nukleofilima i kovalentno modificiranim proteinima.^[80] Veličina, naboj i lipofilnost pokrajnjeg lanca izotiocijanata također utječu na njihovo unutarstanično „ponašanje“ pogodujući brzom interakciji s važnim biomolekulama kao što su proteini prisutni u citoskeletu, različitim redoks regulatorima, proteasomima te ostalim komponentama prisutnim u mitohondrijskim ili signalnim putovima.^[81] Neki od poznatih izotiocijanata s terapijskim svojstvima dobiveni iz kupusnjača su sulforafan, feniletil-izotiocijanat i benzil-izotiocijanat čija je uloga protiv tumora različitih organa, poput mozga, dojke, prostate, gušterače, jetre, pluća, debelog crijeva i kostiju, široko proučavana.^[82] Preventivno kemijsko djelovanje izotiocijanata u inhibiciji razvoja raka uglavnom se pripisuje različitim mehanizmima koji su: a) zaštita DNA, b) smanjenje oksidativnog stresa, c) inhibicija proliferacije stanica i drugih učinaka kao što su protuupalno djelovanje i modulacija stanične diferencijacije.^[83]

Transformaciju glukozinolata u nitrile katalizira enzim mirozinaza unutar biljaka. Uvjeti pri kojima nastaju nitrili uključuju $\text{pH} < 3$, prisutnost željezovih(II) iona ^[79] i drugih čimbenika, kao što su proteini uključeni u stvaranje nitrila. ESP i NSP ne mogu izravno hidrolizirati glukozinolate. Tako primjerice, nitril iz sinigrina nastaje u prisustvu NSP-a, bez formiranja epitionitrila. Kada se hidroliza odvija u odsutnosti ESP-a i NSP-a, navedeni glukozinolati stvaraju isključivo izotiocijanate.^[84] ESP potiče stvaranje epitionitrila iz alkenilnih glukozinolata, kao što je sinigrin, u prisutnosti mirozinaze. U ovoj reakciji atom sumpora koji se oslobađa prilikom stvaranja nitrila biva napadnut terminalnom dvostrukom vezom u pokrajnjem lancu što rezultira nastankom epitionitrila.^[66]

Tiocijanati se nakon hidrolize formiraju iz samo pet glukozinolata, alil-glukozinolata (sinigrina), 4-(metilsulfanil)butil-glukozinolata (glukoerucina), benzil-glukozinolata (glukotropeolina), 4-hidroksibenzil-glukozinolata (glukosinalbina) i 4-

metoksibenzil-glukozinolata (glukoaubrietina). Sposobnost njihovih pokrajnjih lanaca da tvore stabilne karbokatione zajednička je značajka ovih glukozinolata (alilni, benzilni i 4-metilsulfanilbutilni), a za nastanak tiocijanata potrebna je aktivnost TFP-a.^[69]

Za nitrile je poznato da su relativno stabilni. Čak i tijekom toplinske obrade na temperaturama višim od 100 °C utvrđeno je da se gotovo ne degradiraju^[85, 86] što dovodi do zaključka da se gubici tijekom zagrijavanja događaju uglavnom zbog njihove hlapljivosti. S druge strane, izotiocijanati sadrže vrlo elektrofilni atom ugljika i lako reagiraju s nukleofilima kao što su hidroksi, amino ili tiolne skupine, tvoreći tako *O*-tiokarbamate, derivate tiouree, odnosno ditiokarbamate. Kako izotiocijanati dobiveni iz kupusnjača obično nastaju u vodenim otopinama, reakcija s kisikom kao nukleofilom je jedna od najvažnijih, osobito u uvjetima termičke obrade. Indolni izotiocijanati su vrlo nestabilni i odmah se razgrađuju u vodi stvarajući alkohole i tiocijanatne ione^[87] kao i neki *orto*- ili *para*-hidroksilirani (ili metoksilirani) benzilni izotiocijanati.^[88] Naime, prisutnost elektron-donirajuće skupine u *orto* ili *para* položaju olakšava stvaranje karbokationa stabiliziranog rezonancijom. Nedavnim ispitivanjem ponašanja odabranih izotiocijanata, sinigrina i sulforafana, prilikom kuhanja u vodenoj otopini u prisustvu tioglukoze predložen je mehanizam nastanka dvaju novih produkata, 3-alil-4-hidroksitiazolidin-2-tiona i 4-hidroksi-3-(4-(metilsulfinil)butil)tiazolidin-2-tiona. Tioglukoza je zanimljiva za ispitivanje jer može nastati termičkom razgradnjom glukozinolata. Pretpostavlja se da retro-aldolnom reakcijom iz tioglukoze nastaje merkptoacetaldehid koji u reakciji s izotiocijanatima stvara navedene cikličke ditiokarbamate. U svrhu provjere događala li se isto i u kupusnjačama koje sadržavaju glukozinoladne prekursore ovih izotiocijanata, iste su podvrgnute kuhanju u vodi tijekom 1 h te su za kupus i brokulu identificirana oba ciklička produkta termičke razgradnje.^[89] Ovim je dodatno naglašena važnost poznavanja spojeva koji nastaju kao mogući produkti prilikom kuhanja kupusnjača koje su zastupljene u svakodnevnoj prehrani. Ujedno, dokazana je izrazita nukleofilnost tiolne skupine tioglukoze koja nastaje termičkom razgradnjom glukozinolata. Tiolna skupina je reaktivna te reagira s različitim komponentama prisutnim u matriksu čime broj mogućih razgradnih produkata glukozinolata raste.



Slika 2.5.1. Opća shema razgradnje glukozinolata.^[90]

2.5.1. Metode analize glukozinolata

Metode za identifikaciju glukozinolata počele su se razvijati od 1950-tih godina korištenjem kromatografije na papiru.^[9] Glukozinolati su na ovaj način izolirani i potom karakterizirani preko njihovih razgradnih produkata.^[8] Međutim, izolacija izotiocijanata dobivenih hidrolizom mirozinazom te njihova derivatizacija nije dovoljna potvrda postojanja glukozinolatnog prekursora, iako je ovo još uvijek jedina vrsta dokaza postojanja niza, primjerice γ -hidroksilnih glukozinolata. Uvođenje plinske kromatografije sa spektrometrom masa (GC-MS) bila je prekretnica koja je dovela do

identifikacije nekih manjih izotiocijanata iako odgovarajući glukozinolati obično nisu izolirani. MS i NMR su prihvatljive tehnike za identifikaciju prirodnih izotiocijanata, ali njihovi glukozinoladni prekursori se uvjetno prihvaćaju budući da izotiocijanati mogu potjecati od drugih prekursora osim glukozinolata ili nastati kao artefakti tijekom izolacije i/ili analize.^[4]

Kromatografsko odjeljivanje te identifikacija intaktnih glukozinolata su složeni, stoga je za potrebe farmaceutske industrije razvijena metoda analize enzimski desulfatiranih glukozinolata koristeći tekućinsku kromatografiju (LC) kao pogodniju metodu za kvantitativnu i kvalitativnu analizu (ISO 9167-1 metoda). Glukozinolati se ekstrahiraju u uvjetima inaktivnog enzima mirozinaze nakon čega se propuštaju kroz anion-izmjenjivačku kolonu u svrhu pročišćavanja od drugih spojeva prisutnih u ekstraktu. Dodatkom enzima sulfataze uklanja se sulfatna skupina te se desulfoglukozinolati eluiraju s kolone.^[4, 91] Prednost ove metode je čistoća dobivenog ekstrakta desulfoglukozinolata što omogućuje uočavanje i glukozinolata prisutnih u tragovima. Do danas je veliki broj glukozinolata otkriven na ovaj način, a identifikacija glukozinolata preko njihovih desulfo-oblika smatra se pouzdanom i prihvaćenom.^[4]

Prije dostupnosti GC-a i HPLC-a, kvantizacija je bila gotovo nemoguća i u najboljem slučaju približna. Pojavom GC-FID-a i kasnije HPLC-UV-a postala je moguća kvantitativna analiza dobro poznatih uzoraka dobivenih iz biljaka, poput uljane repice, gorušice, rotkvice i kupusa. I danas je to slučaj te se HPLC-UV pouzdano koristi za analizu vrlo dobro okarakteriziranih uzoraka. Skupine znanstvenika koristile su različite pristupe u istraživanju glukozinolata, primjenjujući izravne i neizravne metode identifikacije. Široka dostupnost MS detektora dovela je do povećanja kvalitete analize glukozinolata, primjenjujući GC-MS analize izotiocijanata ^[92, 93], GC-MS analize pertrimetil-sililiranih desulfoglukozinolata ^[94, 95], HPLC-MS analize intaktnih glukozinolata ^[96-99] te HPLC-MS analize desulfoglukozinolata.^[17, 100-102]

Danas, interpretacija glukozinolata zahtijeva opsežnu spektroskopsku karakterizaciju, uključujući najmanje ¹H NMR, MS i zadovoljavajuću analizu dobivenih spektara. Danas su nezaobilazni i drugi spektroskopski dokazi poput ¹³C NMR, 2D NMR, MS/MS, elementne analize te usporedbe sa sintetiziranim spojevima. Dodatno, vrijednosti interpretacije glukozinolata pridonose i kemijski dokazi kao što su osjetljivost na mirozinazu i identifikacija produkata hidrolize uključujući aglukon, sulfat i glukozu. NMR analiza predstavlja konačnu potvrdu strukture bilo intaktnih ili desulfoglukozinolata.^[4] Iako je izolacija intaktnih glukozinolata nešto složenija u odnosu

na onu desulfoglukozinolata, njihova NMR analiza je identična. Važna indikacija glukozinolata ili desulfoglukozinolata u NMR spektru je signal koji odgovara protonima anomernog ugljika (obično dublet) na 4,5–5,0 ppm, što ga čini odsjenjenijim od ostalih protona glukozne jedinice zbog istodobne blizine sumpora i kisika.^[103]

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

U istraživanju su korištene biljne vrste iz reda Brassicales (tablica 3.1.1.). Prema bazi podataka Flora Croatica na teritoriju Republike Hrvatske prisutne su biljne vrste iz porodica Brassicaceae, Capparidaceae, Resedaceae i Tropaeolaceae.^[104] Različite slabo istražene i neistražene biljne vrste iz ovih porodica su sabrane u R. Hrvatskoj i šire ili uzgojene, dok je predstavnik porodice Moringaceae komercijalno dostupan i pribavljen.

Tablica 3.1.1. Porijeklo i vrijeme sabiranja (pribavljanja) obrađenih uzoraka.

Red. br.	PORODICA Vrsta	Porijeklo, vrijeme branja ili pribavljanja
BRASSICACEAE		
1.	<i>Alyssoides utriculata</i> (L.) Medik.	Biokovo, lipanj 2021.
2.	<i>Anastatica hierochuntica</i> L.	komercijalno pribavljena iz Jordana (Royal Store), rujan 2021.
3.	<i>Armoracia rusticana</i> P. Gaertn. , B. Mey. et Scherb.	Konavle, ožujak 2019.
4.	<i>Arabis turrata</i> L.	Biokovo, lipanj 2021.
5.	<i>Barbarea vulgaris</i> R. Br.	Mostar, lipanj 2017.
6.	<i>Biscutella cichoriifolia</i> Loisel.	Podstrana, travanj 2018.
7.	<i>Biscutella laevigata</i> L.	Biokovo, lipanj 2021.
8.	<i>Brassica juncea</i> L.	Harissa Spice Store, Zagreb, Hrvatska, 2019.
9.	<i>Brassica nigra</i> L. Koch.	Heera Black mustard seeds, Ekirana, Indian Groceries online, 2019.
10.	<i>Brassica oleracea</i> L.	hidroponski uzgojeno iz sjemena Rapunzel, Njemačka, travanj 2021.
11.	<i>Brassica oleracea</i> L. ssp. <i>acephala</i> (DC.) O. Schwarz	Split (Kamen Šine), travanj 2021.

12.	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> Plenck.	hidroponski uzgojeno iz sjemena (Kiepenkerl, Bruno Nebelung GmbH, Njemačka), travanj 2021.
13.	<i>Bunias erucago</i> L.	Split, (Marjan), travanj 2016.
14.	<i>Cakile maritima</i> Scop.	Zadar, listopad 2021.
15.	<i>Cardamine hirsuta</i> L.	Split (Marjan), ožujak 2021.
16.	<i>Diplotaxis tenuifolia</i> (L.) DC.	Split, listopad 2017.
17.	<i>Diplotaxis eruroides</i> (L.) DC.	Split, travanj 2019.
18.	<i>Eruca vesicaria</i> (L.) Cav.	uzgojena biljka hidroponski uzgojeno iz sjemena (Kiepenkerl, Bruno Nebelung GmbH, Njemačka), travanj 2021.
19.	<i>Erysimum cheiri</i> (L.) Crantz	Hum, Istra, srpanj 2021.
20.	<i>Erysimum croaticum</i> Polatschek	Biokovo, lipanj 2021.
21.	<i>Hesperis laciniata</i> All.	Split, travanj 2017.
22.	<i>Hirschfeldia incana</i> (L.) Lagr.-Foss.	Split (Žnjan), travanj 2021.
23.	<i>Hornungia petraea</i> (L.) Rchb.	Kamešnica, travanj 2013.
24.	<i>Iberis sempervirens</i> L.	Podstrana, srpanj 2019.
25.	<i>Iberis umbellata</i> L.	komercijalno pribavljeno (Tuinplus b. v. Heerenveen, Nizozemska), svibanj 2017.
26.	<i>Lepidium didymum</i> L.	Split (Splitska riva), travanj 2021.
27.	<i>Lepidium graminifolium</i> L.	Rab; Split, svibanj 2021.
28.	<i>Lepidium meyenii</i> Walp.	ORGONA superfood maca prah, kupljen u Bio&bio trgovini listopad 2018., zemlja podrijetla: Peru Bio&bio SUPERFOODS žuta maca prah, kupljen u Bio&bio trgovini listopad 2018., zemlja podrijetla: Peru
29.	<i>Lepidium sativum</i> L.	komercijalno pribavljen, Gartenland GmbH, svibanj 2017. hidroponski uzgojeno iz sjemena (Kiepenkerl, Bruno Nebelung GmbH, Njemačka), travanj 2021.

30.	<i>Lunaria annua</i> L.	Laboulet - Apex Agri, sjever Francuske, 2011.
31.	<i>Matthiola incana</i> (L.) W. T. Aiton	Vis, srpanj 2015. Podstrana, srpanj 2018. Split (Botanički vrt Marjan), lipanj 2019.
32.	<i>Nasturtium officinale</i> L.	Split (Dujmovača), travanj 2021.
33.	<i>Raphanus sativus</i> L.	hidroponski uzgojeno iz sjemena (Kiepenkerl, Bruno Nebelung GmbH, Njemačka), travanj 2021.
34.	<i>Rorippa sylvestris</i> (L.) Besser	Malo Selo, Risnjak, srpanj 2021.
35.	<i>Sinapis alba</i> L.	komercijalno pribavljen Harissa, zemlja podrijetla Ukrajina, siječanj 2019.
36.	<i>Sisymbrium officinale</i> (L.) Scop.	Split, svibanj 2019. Krka, svibanj 2019.
37.	<i>Sisymbrium orientale</i> L.	Split (Splitska riva), travanj 2021.
38.	<i>Thlaspi alliaceum</i> L.	Novo Čiče (Velika Gorica), travanj 2021.
39.	<i>Thlaspi perfoliatum</i> L.	Split (Botanički vrt Marjan), ožujak 2021.

CAPPARIDACEAE

40.	<i>Capparis orientalis</i> Veill.	Brač, lipanj 2019. Hvar, lipanj 2019. Split, lipanj 2019. Mali Ston, lipanj 2021. Zadar, kolovoz 2021.
41.	<i>Capparis spinosa</i> L.	Cordoba, Španjolska, rujan 2021.
42.	<i>Capparis micracantha</i> DC.	Botanički vrt, Beč, Austrija, rujan 2019.
43.	<i>Maerua baillonii</i> Hadj-Moust.	Antasiranana, Madagaskar, travanj 2021.

MORINGACEAE

44.	<i>Moringa oleifera</i> L.	Encian, kupljen u Bio&bio trgovini, zemlja podrijetla Indija, listopad 2018.
-----	----------------------------	--

RESEDACEAE

45. *Reseda alba* L. Split, travanj 2021.
46. *Reseda lutea* L. Split, travanj 2021.
47. *Reseda phyteuma* L. Tisno i Murter, travanj 2021.

TROPAEOLACEAE

48. *Tropaeolum majus* L. komercijalno pribavljen, Hortus Sementi Srl, Italija, studeni 2018.
-

3.1.1. Hidroponski uzgoj klica

Sjeme biljaka *Brassica oleracea* (Rapunzel, Njemačka), *Brassica oleracea* var. *italica*, *Eruca vesicaria*, *Lepidium sativum* i *Raphanus sativus* (Kiepenkerl, Bruno Nebelung GmbH, Njemačka) je odabrano za uzgoj klica. Odvagano je po 10 g svakog sjemena i namakano u vodovodnoj vodi preko noći kako bi započeo proces klijanja. Nakon namakanja, sjeme je ispirano pod vodenim mlazom i prebačeno na rešetke za uzgoj gdje je ravnomjerno raspoređeno. Klice su ostavljene na svijetlom mjestu, ali bez izravne sunčeve svjetlosti pri sobnoj temperaturi te ispirane dva puta dnevno kako bi se spriječio razvoj mikroorganizama. Klice su sedmi dan sabrane i oprane u vodovodnoj vodi, zamrznute i u konačnici liofilizirane.



Slika 3.1.1.1. Hidroponski uzgojene klice *Lepidium sativum*.

3.2. Izolacija glukozinolata

3.2.1. Priprema otopina

Otopine za izolaciju glukozinolata pripremljene su na sljedeći način:

- 70 %-tni etanol: za pripremu 500 mL 70 %-tnog etanola pomiješano je 350 mL etanola i 150 mL ultračiste vode,
- natrijev acetat (NaOAc, 20 mM, pH = 5,5): 0,8259 g NaOAc otopljeno je u 500 mL ultračiste vode, početna pH vrijednost bila je 7,9; pH je podešen na 5,5 dodatkom klorovodične kiseline (HCl, 25 %) uz miješanje na magnetskoj miješalici; otopina je do upotrebe čuvana u hladnjaku,
- dekstran: 10,0125 g dekstrana (DEAE-Sephadex A-25 chlorideform) otopljeno je u 125 mL ultračiste vode; pripremljeni gel je čuvan u hladnjaku na 4 °C.

3.2.2. Priprema enzima sulfataze

Enzim sulfataza potreban za reakciju desulfatacije pročišćen je na sljedeći način:

- 10 000 U sulfataze (iz *Helix pomatia*, tip H-1) otopljeno je u 30 mL ultračiste vode uz dodatak 30 mL apsolutnog etanola te miješana na magnetskoj miješalici (10-15 minuta, 520 okr/min),
- dobivena otopina je podijeljena u 2 kivete i centrifugirana na 4500 okr/min i pri sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. U slučajevima kad su se nakon centrifugiranja pojavile krute čestice, otopina je dodatno centrifugirana 5 minuta pri istim uvjetima,
- nakon centrifugiranja, supernatant je prebačen u čistu čašu i pomiješan s 90 mL apsolutnog etanola,
- dobivena otopina je prebačena u 2 kivete i centrifugirana u trajanju od 15 minuta na 2500 okr/min pri sobnoj temperaturi,
- nakon drugog centrifugiranja supernatant je odbačen, a preostali dio otopljen u 25 mL ultračiste vode,
- dobivena otopina je homogenizirana miješanjem pomoću miješalice tipa „vorteks“ i podijeljena u manje Eppendorf tube te čuvana u zamrzivaču na -20 °C.

3.2.3. Priprema krivulja umjeravanja

1. Izračun koncentracije osnovne otopine (tzv. *stock* otopine) sinigrina

Stock otopina: 9,04 mg sinigrin monohidrata otopljenog u 10 mL ultračiste vode

Masena koncentracija: 0,904 mg/mL

Molarna masa sinigrin monohidrata: $M=415$ g/mol

Množinska koncentracija = 2,18 mM

2. Razrjeđenja *stock* otopine za pripremu krivulje umjeravanja

Tablica 3.2.3.1. Priprema razrjeđenja

Stock	Volumen alikvota	Volumen ultračiste vode	Konačna koncentracija
2,18 mM	250 μ L	750 μ L	545 μ M
2,18 mM	125 μ L	875 μ L	272,50 μ M
2,18 mM	75 μ L	925 μ L	163,50 μ M
2,18 mM	25 μ L	975 μ L	54,50 μ M
54,50 μ M	500 μ L	500 μ L	27,25 μ M
27,25 μ M	500 μ L	500 μ L	13,63 μ M

3.2.4. Priprema kolona i centrifugalnih mikroepreveta

Mikroeprevete potrebne za ekstrakciju glukozinolata te kolone za pročišćavanja ekstrakta pripravljene su na sljedeći način:

- Filtar papir je samljeven te su staklene pipete, koje služe kao kolone, njime napunjene u visini od 1 cm, a materijal je zbiven kako ne bi došlo do istjecanja gela. Tako pripremljene pipete postavljene su na stalak ispod kojeg se nalazi posuda za sakupljanje otpada prilikom ispiranja kolone.
- Pripremljeni dekstran je neposredno prije upotrebe izvađen na sobnu temperaturu i promiješan prije punjenja kolona. U svaku kolonu otpipetirano je 0,5 mL dekstrana i dodan po 1 mL ultračiste vode za finu raspodjelu punila.
- Čepovi mikroepreveta od 2 mL probušeni su iglicom kako bi se otopina jednostavnije liofilizirala.

3.2.5. Ekstrakcija glukozinolata

Glukozinolati su izolirani iz biljnog materijala sljedećim postupcima:

- 100 mg suhog biljnog materijala ($\pm 0,1$ mg kako bi konačne koncentracije odgovarale krivulji umjeravanja) stavljeno je u označene mikroeprovete s okruglim dnom.
- U svaku reakcijsku tubu dodan je 1 mL 70 %-tnog metanola nakon čega se smjesa promiješala te homogenizirala pomoću homogenizatora u cilju razaranja staničnih stjenki i povećanja ekstrakcijske učinkovitosti. Smjesa je zagrijavana u vrućoj vodenoj kupelji na 90 °C 5 minuta u svrhu inaktivacije enzima mirozinaze.
- Mikroeprovete su prebačene u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta i centrifugirane na 6000 okretaja/min u trajanju od 10 minuta.
- Nakon centrifugiranja supernatant je odvojen i nanosen na kolonu, a postupak ekstrakcije se ponovio s još jednim obrokom metanola.

3.2.6. Pročišćavanje ekstrakta i desulfatacija

Ekstrakcija glukozinolata i njihove desulfatacija uključuje sljedeće korake:

- Na svaku kolonu dodano je 2 puta po 1 mL 70%-tnog metanola kako bi se uklonile nepolarne molekule iz ekstrakta (primjerice klorofil), zatim 1 mL ultračiste vode na svaku kolonu u svrhu ispiranja metanola te na posljetku 2 puta po 1 mL 20 mM NaOAc za postizanje optimalnih pH uvjeta za djelovanje enzima sulfataze. Prije svakog novog dodavanja obroka potrebno je pričekati potpuno istjecanje tekućine s kolone.
- Nakon ispiranja kolona posuda za otpad zamijenjena je stalkom u kojem se nalaze označene mikroeprovete i iznad tog stalka postavljen je stalak s pripadajućim kolonama.
- U svaku kolonu s ekstraktima te kolone s referentnim uzorcima dodano je 20 μ L otopine sulfataze te 50 μ L NaOAc nakon čega kolone prekrivene aluminijskom folijom su ostavljene preko noći.
- Sljedeći dan (minimalno nakon 16 h) desulfoglukozinolati se eluirani s kolone dodatkom 2 puta po 0,75 mL ultračiste vode.

- Prikupljeni izolati su smrznuti te liofilizirani nakon čega zaostala suha tvar je otapljena u 1 mL ultračiste vode i prebačena u bočice za HPLC koje su čuvane u zamrzivaču na -20 °C do analize.

3.3. Izolacije razgradnih produkata

3.3.1. Konvencionalne metode izolacije

3.3.1.1. Hidrodestilacija

Biljni materijal (usitnjen, svježi ili suhi) je stavljen u tikvice odgovarajućeg volumena (ovisno o količini materijala) koje su nadopunjene destiliranom vodom do pola. Na tikvicu je postavljen modificirani nastavak po Clevengeru (slika 3.1.1.1.) koji je napunjen destiliranom vodom dok se voda ne počne prelijevati bočnom cijevi natrag u tikvicu, nakon čega se dodaje tzv. *trap*. *Trap* je smjesa otapala pentana i dietil-etera u omjeru 3:1 koja služi za otapanje isparljivih spojeva u slučaju njihove male koncentracije. Na nastavak je postavljeno hladilo po Allihnu. Smjesa je zagrijavana preko kalote u trajanju od 2,5 h od početka destilacije (kad padne prva kap). Po završetku destilacije, *trap* je odvajen pipetom s vrha središnje cijevi, a aparatura je dodatno ispirana pentanom kako bi se povećalo iskorištenje. *Trap* s hlapljivim spojevima se sušen s malo bezvodnog natrijevog sulfata koji veže vodu zaostalu prilikom odjeljivanja. Smjesa je dekantirana u bočicu, nakon čega je slijedilo koncentriranje ekstrakta u struji dušika te skladištenje na -20 °C do analize.



Slika .3.1.1.1. Hidrodestilacija u aparaturi po Clevengeru.

3.3.1.2. Autoliza

Biljni materijal je stavljen na autolizu prije ekstrakcije kako bi se pospješilo djelovanje enzima mirozinaze. Određena masa enzima je odvagana i otopljena u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici primjenjujući ultrazvučnu kupelj. Tikvice su začepljene, a čep je dodatno omotan parafilmom kako bi se spriječio gubitak nastalih hlapljivih spojeva. Autoliza se provodi 24 h.

3.3.1.3. Ekstrakcija hlapljivih spojeva

Nakon autolize, u uzorak je dodano oko 10 mL organskog otapala diklormetana. Sadržaj tikvice je filtriran preko cjediljke i filtera papira u lijevak za odjeljivanje. Sadržaj lijevka je izmućkan te ostavljen određeno vrijeme na stalku kako bi se slojevi odijelili. Organski sloj je prebačen u suhu čašu s bezvodnim Na_2SO_4 te je ekstrakcija ponovljena s malom količinom svježeg diklormetana. Združeni organski slojevi su koncentrirani otparavanjem otapala.

3.3.2. Moderne metode izolacije

3.3.2.1. Mikrovalna destilacija

Novije metode izolacije hlapljivih spojeva koriste dielektrično zagrijavanje vode prisutne u biljnom materijalu primjenom mikrovalova. Primjenom određene snage mikrovalova postiže se zagrijavanje, a prilikom izbora snage mikrovalova treba biti oprezan kako ne bi došlo do pregrijavanja i razgradnje termolabilnih komponenata.

Uređaj ETHOS X razvijen je u Laboratoriju za kemiju prirodnih tvari i prehrambenih znanosti na Université de la Réunion, Francuska u suradnji s tvrtkom Milestone (Italija). Mikrovalna pećnica opremljena je s dva magnetrona snage 900 W, odnosno ukupna snaga magnetrona iznosi 1800 W. Sustav je opremljen s mikrovalnim difuzorom kako bi se osigurala homogena distribucija mikrovalova unutar pećnice. Kućište mikrovalne pećnice izrađeno je od nehrđajućeg čelika presvučenog PTFE slojem. Posude za uzorke su od borosilikatnog stakla, cilindričnog oblika. Sustav uključuje stakleni destilacijski modul koji svojom izvedbom omogućava sakupljanje organske faze, dok se kondenzirana voda vraća u posudu unutar mikrovalne pećnice. Dodatno, uređaj je opremljen vanjskim, zatvorenim sustavom za hlađenje, tzv. *chiller*. Uređaj se kontrolira programskom podrškom, koji omogućava korisniku uređivanje, spremanje, kreiranje i virtualno pokretanje neograničenog broja metoda. Programska podrška kontrolira i prikazuje sve parametre u realnom vremenu tijekom izolacije: temperaturu, vrijeme i snagu.



Slika 3.3.2.1.1. Uređaj za mikrovalnu destilaciju.

Biljni materijal ne treba biti usitnjen, većinom je moguće koristiti cjelovit, a može se koristiti i suhi i svježi. U slučajevima kada je korišten suhi materijal, prije izolacije namakan je u destiliranoj vodi. Za razliku od hidrodestilacije, u posudu s biljnim materijalom se ne dodaje voda. Biljni materijal bez dodanog otapala smješten je u posudu koja je stavljena u mikrovalnu pećnicu i zagrijavana. Voda prisutna u stanicama se zagrijava te dolazi do pucanja staničnih stijenki. Uslijed pucanja staničnih stijenki, hlapljivi spojevi, nošeni vodenom parom, se oslobađaju iz stanica.

Sustav za hlađenje konstantno opskrbljuje sustav vodom za hlađenje koja prolazi hladilom, a podešena je na 13 °C. Snaga mikrovalova podešena je na 500 W jer se postiže temperatura 97 °C. Osim snage, potrebno je podesiti i vrijeme trajanja procesa. U eksperimentima je podešavano na 30 minuta destilacije uz dodatnih 5 minuta potrebnih za hlađenje. Voda u hladilu omogućava kondenzaciju nastalih para, eterično ulje se skuplja u postranoj cijevi destilacijskog modula koja je ispunjena destiliranom vodom,

dok se višak vode prelijeva dodatnim cijevima natrag u posudu unutar uređaja. Kod biljnog materijala čiji je sadržaj eteričnog ulja izrazito mali te je granicu faza (vodene i ulja) teško uočiti, dodaje se pentan radi jednostavnijeg odijeljivanja izolata. Izolat je sušen s bezvodnim Na₂SO₄ i dekantiran u bočice.

3.3.2.2. Mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija

Mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (engl. *Microwave Hydrodiffusion and Gravity*, MHG) spada u novije metode izolacije hlapljivih spojeva (eteričnih ulja, spojeva aroma i sl.). MHG je kombinacija hidrodifuzije hlapljivih spojeva iz biljnog materijala prema vani, a što je potaknuto zagrijavanjem mikrovalovima, i gravitacije pri atmosferskom tlaku koja omogućava sakupljanje hlapljivih spojeva. Osnovni uređaj je isti kao i za mikrovalnu destilaciju (Ethos X, Milestone, Italija). Aparatura za MHG se sastoji od staklene posude koji ima otvor na dnu, za razliku od prethodno opisane izvedbe gdje je otvor bio na vrhu. Na otvor se nastavlja staklena cijev te hladilo. Primijenjena snaga mikrovalova je, također, u eksperimentima postavljena na 500 W, ali tijekom kraćeg vremena (15 minuta, uz dodatnih 5 min za hlađenje). Spojevi pri tome difundiraju izvan biljnog materijala te se vodeni ekstrakt silom gravitacije ispušta, dok vanjski sustav hlađenja neprestano kondenzira ekstrakt. Vodeni ekstrakt se skuplja u čašu na dnu aparature nakon čega slijedi ekstrakcija hlapljivih spojeva diklormetanom. Dobiveni izolat je vrlo čist. Dulje vrijeme od 15 minuta u većini uzoraka je dovodilo do zagaranja biljnog materijala jer pri temperaturi iznad 100 °C sva prisutna voda biva „iscijeđena“.



Slika 3.3.2.2.1. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju.

3.3.3. Stabilnost alil-izotiocijanata u vodenoj otopini

Odvagano je 100 mg standarda alil-izotiocijanata (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) te su tri uzorka podvrgnuta konvencionalnoj hidrodestilaciji i refluksiranju te destilaciji uz primjenu mikrovalova u trajanju od 1 sata pri temperaturi od 100 °C. Primjenjena snaga mikrovalova iznosila je 500 W. Koristeći GC-MS analizirane su hlapljive frakcije dobivene destilacijom te diklormetanski ekstrakti vodenog medija kako bi se utvrdio zaostali sadržaj izotiocijanata u njemu.

3.4. Analiza glukozinolata i razgradnih produkata

3.4.1. Tekućinski kromatograf sa spektrometrom masa u tandemu (UHPLC-DAD-MS/MS)

Korišten je tekućinski kromatograf (Ultimate 3000RS, Thermo Fisher Scientific, SAD) u kombinaciji sa spektrometrom masa u tandemu (kvadrupol-kvadrupol, TSQ Quantis, Thermo Fisher Scientific, SAD) sa kolonom Hypersil GOLD dimenzija 3,0 mm × 100 mm, promjera čestica 3,0 μm (Thermo Fisher Scientific, SAD). Kao mobilna faza korištena su otapala A (50 μM NaCl u H₂O) i otapalo B (acetonitril 30:70 v/v) uz protok od 0,5 mL/min kako slijedi: 0,14 min 96 % A i 4 % B; 7,84 min 14 % A i 86 % B; 8,96

min 14 % A i 86 % B; 9,52 min 5 % A i 95 % B; 13,16 min 5 % A i 95 % B; 13,44 min 96 % A i 4 % B; 15,68 min 96 % A i 4 % B. Temperatura kolone je održavana na 25 °C (ili 15 °C), a injektirani volumen uzorka je bio 5 µL. Signali su snimani DAD detektorom pri 227 nm, a maseni spektri su snimani u pozitivnom načinu rada pri 350 °C.



Slika 3.4.1.1. UHPLC-DAD-MS/MS uređaj.

3.4.2. Tekućinski kromatograf sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (UHPLC-ESI-HRMS)

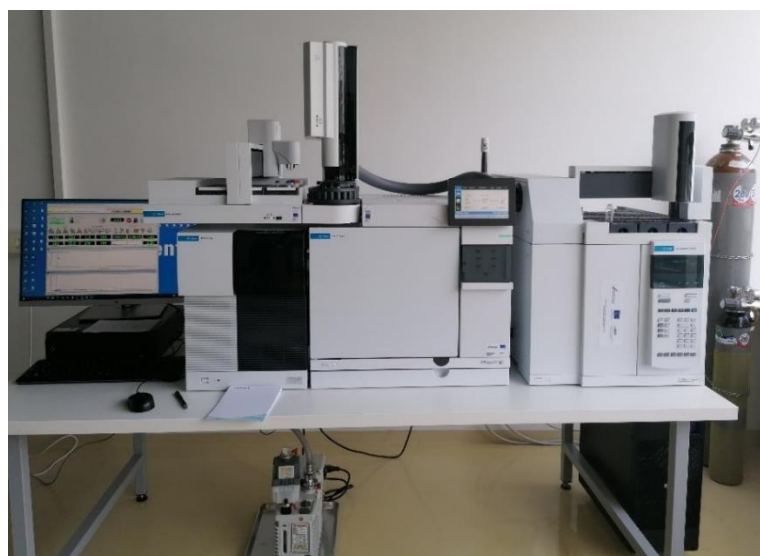
UHPLC-ESI-HRMS analiza napravljena je na tekućinskom kromatografu (ExionLC AD, AB Sciex, Kanada) u kombinaciji sa spektrometrom masa u tandemu (kvadrupol-analizator vremena leta, TripleTOF 6600+ AB Sciex, Kanada, QTOF). Korištena je kolona Acquity UPLC BEH C18 dimenzija 2,1 mm × 100 mm i promjera čestica 1,7 µm (Waters, SAD). Mobilne faze bile su voda (A) i acetonitril (B), uz dodatak 0,1 % mravlje kiseline s brzinom protoka postavljenom na 0,4 mL/min kako slijedi: 0,10 min 99 % A i 1 % B; 5 – 5,99 min 74 % A i 26 % B; 6 – 7,09 min 71 % A i 29 % B; 7,10 – 8 min 99 % A i 1 % B. Temperatura kolone postavljena je na 30 °C, a injektirani volumen 4 µL. Parametri ionskog izvora bili su: ESI kapilarni napon 5,5 kV i temperatura izvora 300 °C. Parametri masenog spektra snimanja bili su: potencijal deklasteriranja 80 V, m/z raspon 100 – 1000 (MS) i 50 – 1000 (MS/MS), energija kolizije 40 eV.



Slika 3.4.2.1. UHPLC-QTOF uređaj.

3.4.3. Plinski kromatograf sa spektrometrom masa (GC-MS)

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



Slika 3.4.3.1. GC-MS uređaj.

3.4.4. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Jednodimenzijski i dvodimenzijski homo- i heteronuklearni ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su nuklearnim magnetskim spektrometrom (Bruker AV-600, Bruker, SAD), koji radi na 600,133 MHz za jezgru ^1H i 150,917 MHz za jezgru ^{13}C . Uzorci glukozinolata mjereni su iz otopina DMSO- d_6 na 27 °C (300 K) u 5 mm NMR epruветama. Kemijski pomaci (δ) su izraženi u dijelovima na milijun (ppm) prema tetrametilsilanu (TMS, $[(\text{CH}_3)_4\text{Si}]$) kao unutrašnjem standardu ($\delta=0,00$ ppm), a konstante sprezanja (J) su izražene u hertzima (Hz). FID rezolucija u ^1H NMR i ^{13}C NMR spektrima bila je 0,29 Hz i 0,54 Hz po točki, respektivno. Korištene su sljedeće mjerne tehnike: standardna ^1H , ^{13}C , COSY i HSQC. Odvajanje protona izvedeno je modulacijom Waltz-16. COSY sa standardnim slijedom impulsa $\pi/2$ izmjeren je korištenjem 2048 točaka u dimenziji F2 i 512 koraka u dimenziji F1. Potonji je naknadno ispunjen nulom na 1024 boda. Povećanja su dobivena po 2 skeniranja svaki, 8012,82 Hz spektralne širine i relaksacijskog kašnjenja od 1,486 s. FID rezolucija je bila 3,91 Hz/točki i 15,65 Hz/točki u dimenzijama F2 i F1.



Slika 3.4.4.1. NMR spektrometar.

3.5. Biofortifikacija selenijem

Mlade biljke *Brassica oleracea* var. *italica* (brokula) starosti mjesec dana i ukupne visine 18 cm (korijen 4 cm) presađene su u posudu sa zemljom te tijekom narednih petnaest dana zalijevane vodovodnom vodom. Petnaestog dana nakon presađivanja izmjerena je visina nadzemnog dijela koja je iznosila 18 cm te visina stabljike od 10 cm. Referentna biljka je zalijevana samo vodom dok su preostale dvije biljke zalijevane pripremljenim otopinama natrijevog selenata koncentracija 2 mM i 5 mM. Biljke su tijekom uzgoja u trajanju od 35 dana zalijevane vodovodnom vodom, a biofortificirane dva puta tjedno otopinama selenata volumena 20 mL. Cijelo razdoblje bilježen je rast i razvoj nadzemnog dijela, a 35. dan od početka zalijevanja izmjereni su duljina korijena i visina nadzemnog dijela.



Slika 3.5.1. Uzgoj *Brassica oleracea* var. *italica* (brokula) tretiranih 2 mM i 5 mM otopinama natrijevog selenata.

Eruca vesicaria (rokula) uzgojena je iz sjemena talijanskog distributera Impex s.r.l. sementi, pribavljenog u trgovini Sjeme, Split. U svaku jažicu za uzgoj stavljeno je 100 mg sjemena te je klijanje započelo treći dan od sisanja. Desetog dana biljke su presađene u veće posude, a 24. dan od sisanja je započeto zalijevanje otopinama natrijevog selenata. Visina nadzemnog dijela biljki prije zalijevanja je bila 7,5 cm, a duljina korijena 3 cm.

Sve biljke su nakon sabiranja isprane vodovodnom vodom te liofilizirane. Podijeljene su na korijen i nadzemni dio u svrhu kvalitativne i kvantitativne analize glukozinolata.



Slika 3.5.2. Uzgoj *Eruca vesicaria* (rokula) tretiranih 2 mM i 5 mM otopinama natrijevog selenata.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Biljna tkiva su istraživana za svaku biljnu vrstu, kako bi se proširio uvid u strukturnu raznolikost glukozinolata. Korištene su izravne metode analize preko desulfatiranih oblika glukozinolata i neizravne metode analize glukozinolata preko njihovih razgradnih produkata. Identifikacija glukozinolata temeljila se na točnim vremenima zadržavanja, karakterističnim UV spektrima te MS i MS/MS (MS²) spektrima. Za potvrdu identifikacije korišteni su dostupni standardi, standardni referentni materijal (desulfatirani glukozinolati izolirani iz uljane repice), kao i biljni materijali točno utvrđenog glukozinolatnog sastava. Određeni glukozinolati su uvjetno identificirani zbog nedostatka autentičnog standarda na temelju „logičnog“ vremena zadržavanja (t_R) te „logičnog“ MS spektra u usporedbi s homolozima, ili na temelju slaganja t_R i omjera m/z s autentičnim standardom. U određenim slučajevima, u svrhu identifikacije, izoliran je desulfoglukozinolat i snimljeni su NMR spektri.

4.1. Brassicaceae

4.1.1. Kvalitativna analiza glukozinolata

Tablica 4.1.1. Kvalitativna analiza glukozinolata u različitim biljnim vrstama porodice Brassicaceae. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 2.3.1 i slici 2.3.1.

Rod	Val	Leu	Ile	Trp	Phe	Phe/Tyr	Met
Vrsta							
<i>Alyssoides</i>							
<i>A. utriculata</i>							12, 64, 84, 94, 101
<i>Anastatica</i>							
<i>A. hierochuntica</i>							73, 95
<i>Armoracia</i>							
<i>A. rusticana</i>			61	43	105		12, 101, 107
<i>Barbarea</i>							
<i>B. vulgaris</i>					45		[35], 67, 72, 84, 88, 94, [162]
<i>Biscutella</i>							
<i>B. cichoriifolia</i>					11		24S, 24R, 65, 66, 68, 69, 73, 79, 80, 95
<i>B. laevigata</i>				43, 48			66, 68, 69, 80, 92
<i>Brassica</i>							
<i>B. juncea</i>				28			107
<i>B. nigra</i>				28			12, 107
<i>B. oleracea</i> L. ssp. <i>acephala</i> (DC.) O. Schwarz				28, 43, 47, 48	11, 105		24R, 64, 73, 84, 95, 107
<i>Bunias</i>							
<i>B. erucago</i>					11	23	12, 63, 64, 83, 84

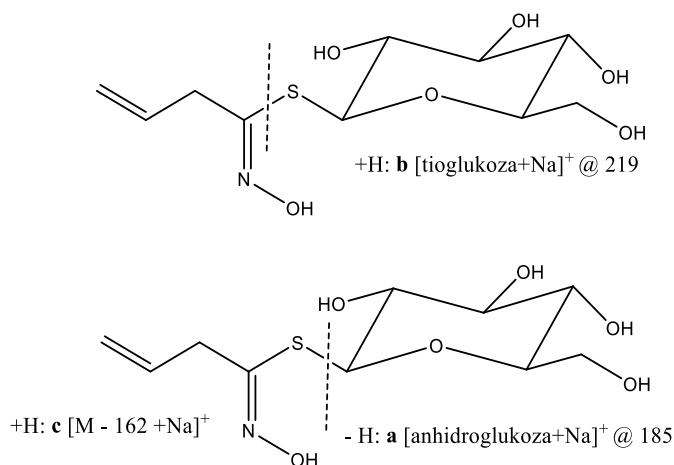
Cardamine				
<i>C. hirsuta</i>	28, 43, 47, 48	11 , 22, 105	23, 152	5, 12 , 24R, [26], 101
Diplotaxis				
<i>D. tenuifolia</i>				64, 84
<i>D. eruroides</i>	43, 47, 48	11, 105		107
Eruca				
<i>E. vesicaria</i>	48, 138			64, 65 , 84, 95, 134 , 135
Erysimum				
<i>E. cheiri</i>	48			73 , 82, 95
Hesperis				
<i>H. laciniata</i>	28, 48	109, [159]	[14], 23, 110 , 157, 160	67, 88
Hirschfeldia				
<i>H. incana</i>	28 , 43, 47, 48 , 138	105		73 , 82 , 95
Hornungia				
<i>H. petraea</i>		11 , 22 , 45	23	12
Iberis				
<i>I. sempervirens</i>	48	11		73 , 84, 95
<i>I. umbellata</i>	48	11		12, 73 , 95 , 107
Lepidium				
<i>L. didymum</i>	48	11		
<i>L. graminifolium</i>				
Rab		11, 22 , 45 , 105	15, 23, 114, 152	12, 24R, 24S
Split		11 , 22 , 45	15, 23, 114 , 152	64, 84
<i>L. meyenii</i>		11 , 22, 45	23	
<i>L. sativum</i>				84

Lunaria						
<i>L. annua</i>	56		61	11		67, 72, 88, 94
Matthiola						
<i>M. incana</i>						
Vis						63, 83
Podstrana			43			63, 83
Nasturtium						
<i>N. officinale</i>			43, 48	105		66, 67, 69, 87, 92
Rorippa						
<i>R. sylvestris</i>			48	11		66, 68, 69, 80, 92
Sinapis						
<i>S. alba</i>					23	
Sisymbrium						
<i>S. officinale</i>						
Split	56	62	61	28, 43, 47, 48	23	
Krka	56			28, 43, 47, 48	23	
<i>S. orientale</i>			47	105	23	12, 24R, 24S
Thlaspi						
<i>T. perfoliatum</i>			28, 48		[14], 23, 110, 157, [160]	
<i>T. alliaceum</i>			28, 43, 47, 48, 138, [161]			12, 107

*Novoidentificirani glukozinolati: **[159]** - *orto* ili *meta* hidroksi-4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat; **[160]** - 4'-O-(β -D-apiofuranoziloksi)benzil-glukozinolat; **[161]** - 4-hidroksi-1-metoksiglukobrasicin; **[162]** - 3-hidroksi-(4-metilsulfonyl)butil-glukozinolat. Podebljani brojevi u tablici predstavljaju glavne glukozinolate.

U 8. poglavlju Prilozi prikazani su MS2 spektri svih identificiranih desulfoglukozinolata. Prilikom analiza, u mobilnu fazu je dodan natrijev klorid, što rezultira Na⁺ aduktnim ionima koji dovode do prepoznatljivih fragmentacija u odnosu na

adukte desulfoglukozinolatnih struktura s protonima (tablica 8.1.2.). Spomenuti adukti najčešće se cijepaju na fragmente tioglukoze i ostatak molekule, pri čemu se natrij gotovo uvijek veže na tioglukoze stvarajući karakterističan fragment pri m/z 219 (označeno slovom b). Fragmentacija se odvija i s druge strane sumpora u desulfoglukozinolatima što rezultira nastankom dvaju fragmenata: anhidroglukoza s natrijem pri m/z 185 (označeno slovom a) te ostatni fragment s natrijem (označen slovom c, $[M - 162 + Na]^+$) (slika 4.1.1.).



Slika 4.1.1. Prikaz karakterističnih mjesta cijepanja u desulfoglukozinolatima na primjeru desulfosinigrina (**d107**).

Alifatski glukozinolati

Od nezasićenih glukozinolata identificirani su glukonapin (**12**), glukobrasikanapin (**101**) i sinigrin (**107**). Najdulji poznati alkenilni glukozinolati su C5 glukozinolati (**101** i glukonapoleiferin (**38S**)). Dugolančani alkenilni C6-C10 glukozinolati su prethodno identificirani preko razgradnih produkata koristeći GC-MS analizu, dok HPLC analizama nisu pronađeni odgovarajući prekursori. Naknadnim istraživanjem biljke *Arabis turrita* koja sadrži dugolančane glukozinolate sa sumporom u pokrajnjem lancu, utvrđeno je da njihovi izotiocijanati tijekom GC-MS analize zbog visoke temperature gubitkom metilsulfinilne skupine prelaze u alkenilne izotiocijanate. Stoga, postojanje ovih izotiocijanata kao i njihovih glukozinolatnih prekursora nije moguće dokazati na navedeni način te ih je za potvrdu postojanja u prirodi potrebno izolirati i provesti NMR analizu.^[105]

Dok MS2 spektri **d12** i **d107** sadržavaju samo uobičajene fragmente, spektar **d101** sadrži dva neobična fragmenta koji ukazuju na strukturno specifičnu ciklizaciju i izmjenu

kisika tijekom fragmentacije: m/z 201 (označen slovom j, [glukonolakton + Na]⁺) i m/z 152 (označen slovom k, [C₆H₁₁NS + Na]⁺) koji mogu biti korisni kao otisak prsta (poglavlje 8. Prilozi). Naime, dodatna metilenska skupina u **d101** u odnosu na **d12** dovodi dvostruku vezu bočnog lanca **d101** u blizinu tioglukoznog ostatka, što rezultira premještanjem glukoznog ostatka do kisika u N–OH skupini desulfoglukozinolata i naknadnom oksidacijom dvostrukom vezom u glukonolakton. Fragment j se zapravo dobije kao fragment a plus kisik, odnosno fragment k kao fragment c minus kisik.

Hidroksilirani nezasićeni desulfoglukozinolati, enantiomeri progoitrin (**24R**) i epiprogoitrin (**24S**), uz navedene fragmente, sadržavaju i fragment koji odgovara natrijevom aduktu glukoze, m/z 203. Od razgranatih alifatskih glukozinolata su identificirani izopropil-glukozinolat (glukoputranjivin, **56**), *sec*-butil-glukozinolat (glukokohlearin, **61**) i izobutil-glukozinolat (**62**), pri čemu su **61** i **62** konstitucijski izomeri. Fragmentacija ovih desulfoglukozinolata pratila je standardne načine fragmentacije.

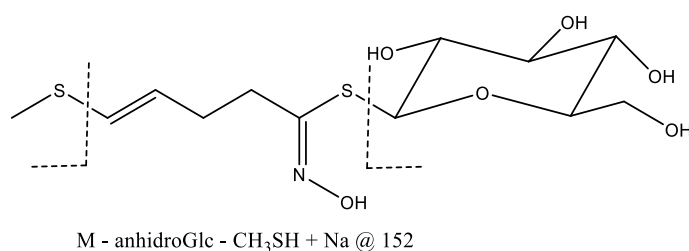
Jedini esterificirani glukozinolat identificiran je u nadzemnom dijelu biljke *Cardamine hirsuta*, i to 4-(benzoiloksi)butil-glukozinolat (**5**) koji potječe od metionina. Prema literaturi, ovaj glukozinolat do sada nije utvrđen u ovoj biljnoj vrsti. U svrhu istraživanja biosinteze ovog glukozinolata u biljci *A. thaliana* dodavani su obilježeni fenilalanin i acetyl-CoA te je zaključeno da tri od pet C atoma proizlaze iz metionina, dok je benzoatna skupina izvedena iz fenilalanina.^[106] Dodatno, iz dobro istražene biosinteze glukozinolata u *A. thaliana*, poznato je da se glukozinolat **5** biosintetizira iz 4-hidroksibutil-glukozinolata (**[26]**) koji je također identificiran u *C. hirsuta*. Identifikacija **5** je temeljena na usporedbi MS2 spektra s literaturnim.^[107] Zanimljivo je kako u MS2 spektru ovog desulfoglukozinolata nisu prisutni fragmenti a i b. S druge strane, uočen je fragment m/z 226 što je gubitak od 212. Naime, ovaj fragment (označen slovom n) predstavlja gubitak oksidiranog oblika tioglukoze te prati gubitak glukoze, odnosno gubitak m/z 196 (h) tipičan za desulfoglukozinolate s polarnim bočnim lancima.

Desulfoglukozinolati sa sumporom u pokrajnjem lancu su u poglavlju 8. Prilozi podijeljeni na metilsulfanilne, metilsulfinilne te metilsulfonilne. Identificirani su sljedeći metilsulfanilni glukozinolati: glukoerucin (**84**), 7-(metilsulfanil)heptil-glukozinolat (**87**), glukoleskverelin (**88**), glukoberteroin (**94**) i glucoibervirin (**95**). Kao jedini nezasićeni

glukozinolat iz ove skupine identificiran je (3*E*)-4-(metilsulfanil)but-3-enil-glukozinolat (**83**).

Prema studijama biosintetskih putova u biljnom modelu *A. thaliana*, biosinteza glukozinolata koji potječu od aminokiseline metionina počinje s osam enzimski kataliziranih koraka u svrhu produljenja lanca za dva C atoma, nakon čega slijedi biosinteza osnove glukozinolata koja vodi do prekursorskog dihomometionin izvedenog glukozinolata, 4-(metilsulfanil)butil-glukozinolata (glukoerucin, **84**). Daljnje uzastopne sekundarne modifikacije glukozinolata, preko 4-(metilsulfinil)butil-glukozinolata (**64**) i but-3-enil-glukozinolata (**12**) završavaju s 2-hidroksibut-3-enil-glukozinolatom (smjesa dvaju stereoizomera, **24R** i **24S**).

Zasićeni metilsulfanilni desulfoglukozinolati fragmentiraju samo s obje strane tioglukoze, a natrijevi adukti nastaju s anhidroglukožnim i tioglukožnim fragmentima, što je očekivano zbog niske polarnosti bočnog lanca. Za razliku od njih, u MS2 spektru nezasićenog **d83**, uočava se fragment *m/z* 152 koji je posljedica kombiniranog gubitka CH₃SH skupine i anhidroglukoze (slika 4.1.2.).

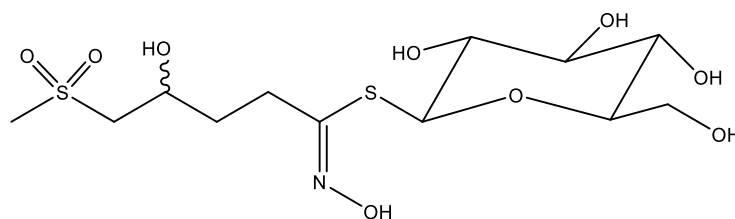


Slika 4.1.2. Nastanak karakterističnog fragmenta *m/z* 152 u (3*E*)-4-(metilsulfanil)but-3-enil-desulfoglukozinolatu (**d83**).

Identificirani metilsulfinilni glukozinolati su glukorafanin (**64**), glukokamelinin (**65**), 7-(metilsulfinil)heptil-glukozinolat (**66**), glukohirsutin (**69**), glukoalisin (**72**) i glukoiberin (**73**). ω -(Metilsulfinil)alkil-desulfoglukozinolati pokazuju neutralni gubitak od 64 Da (CH₃SOH) iz natrijeva adukta, i uglavnom u MS2 stvaraju natrijeve adukte s fragmentima koji sadrže polarnu sulfinilnu skupinu. Primjerice, MS2 spektar natrijeva adukta **d64** (poglavlje 8. Prilozi) sadržava fragment koji odgovara gubitku CH₃SOH (označen slovom g) i fragment od gubitka anhidroglukoze (označen slovom c). Međutim, analogni nezasićeni metilsulfinilni desulfoglukorafanin (**d63**) s dvostrukom vezom u blizini sulfinilne skupine nemaju fragment koji pokazuje ovaj neutralni gubitak te u MS2 spektru u potpunosti dominira fragment nastao gubitkom anhidroglukoze (c). Ovo

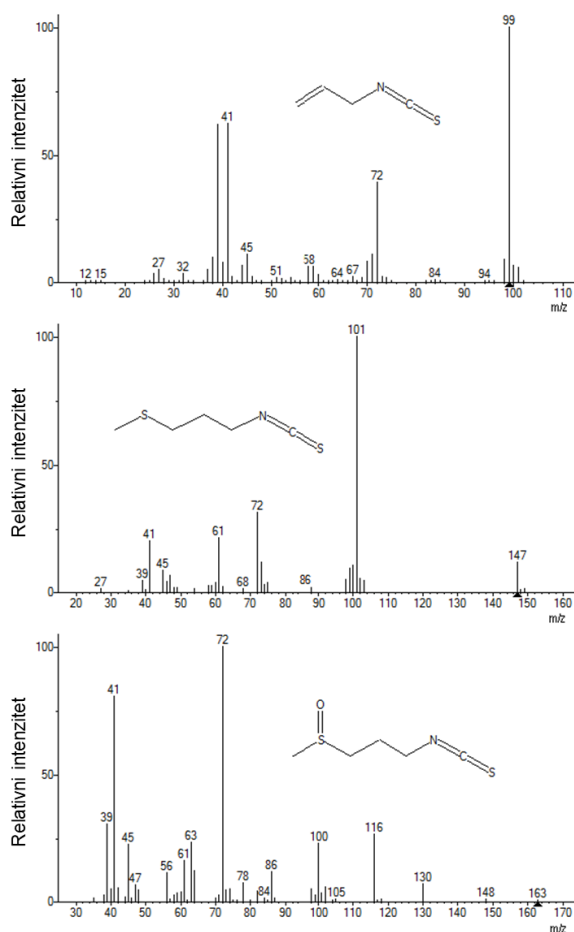
upućuje na to da dodatna dvostruka veza u **d63** sprječava cijepanje na metilsulfinilnoj skupini. Uočen je i gubitak od m/z 212 koji potječe od gubitka oksidiranog oblika tioglukoze koji nastaje oksidacijom sumpora u glukozi reakcijom sa polarnom sulfinilnom skupinom (označen slovom n). Zanimljivo je da je ovaj tip fragmenta također uočen i za neke metilsulfinilne desulfoglukozinolate (npr. 8-(metilsulfinil)oktil-glukozinolat, **d80**) za koje nisu uočene nikakve specifične fragmentacije bočnog lanca, ali ionsko sparivanje natrija sa dijelom bočnog lanca ukazuje na prisutnost jako polarne sulfinilne funkcijske skupine.

Istraživanjem biljke *Barbarea vulgaris* uočene su zanimljive mase desulfoglukozinolata koji nisu do sada identificirani tijekom ovih istraživanja. U korijenu biljke identificirani su metilsulfinilni glukozinolati, (R_S)-5-(metilsulfinil)pentil-glukozinolat (glukoalisin, **72**) i metilsulfanilni 5-(metilsulfanil)pentil-glukozinolat (glukoberteroin, **94**), zbog čega se dalo naslutiti da se biosinteza odvija slično i u ostalim dijelovima biljke u kojima su identificirani ovi neobični glukozinolati. Vremena zadržavanja oba desulfoglukozinolata su ukazivala da se radi o vrlo polarnom spoju, a UV spektri da se radi o metilsulfinilnim glukozinolatima. U tablici 2.3.1. navedeni su 3-hidroksi-6-(metilsulfinil)heksil-glukozinolat (**[34]**) prethodno pronađen u biljci *Erysimum rhaeticum* ^[108] i 3-hidroksi-5-(metilsulfinil)pentil-glukozinolat (**[35]**) pronađen u biljci *E. odoratum* ^[109] čija identifikacija, prema literaturi, je izvršena samo neizravno, preko razgradnih produkata izotiocijanata. Temeljem ove informacije pretpostavljeno je postojanje homolognog niza ove vrste glukozinolata. Stoga za $[M+Na]^+ = 426$ pri $t_R = 2,03$ min pretpostavljeno je da se radi o **d[35]** jer vrijeme zadržavanja ukazuje na vrlo polaran glukozinolat, a UV spektar odgovara metilsulfinilnom glukozinolatima. Napravljen je MS2 u svrhu provjere cijepanja desulfoglukozinolata te su uočeni fragmenti c, h te i koji potječu od eliminacije glukoze s obje strane sumpora. Za $[M+Na]^+ = 412$ pri $t_R = 1,51$ min čija masa je za 14 Da manja od **d[35]** pretpostavljeno je da odgovara njegovom homologu, 3-hidroksi-4-(metilsulfinil)butil-glukozinolat, koji je do sada jedino Clarke (2010.) pretpostavio u svom radu ^[11] te je ovom novom glukozinolatima pridružen broj **[162]** (slika 4.1.3.). MS2 spektar **d[162]** potvrdio je fragmente karakteristične za desulfoglukozinolate, i to a, c, d i h. Ovi glukozinolati nisu do sada pronađeni u biljci *B. vulgaris*. Glukozinolat **[35]** je identificiran u korijenu, cvijetu, listu i stabljici, dok **[162]** nije identificiran jedino u korijenu.



Slika 4.1.3. Struktura desulfo-3-hidroksi-4-(metilsulfonyl)butil-glukozinolata, **d[162]**.

U svrhu neizravne identifikacije glukozinolata, primjenjuje se GC-MS analiza razgradnih produkata, najčešće izotiocijanata, nitrila i/ili oksazolidin-tiona koji odražavaju varijabilni bočni lanac i time sugeriraju glukozinolatne prekursore. Nitrili koji potječu od istog glukozinolata kao i izotiocijanati eluiraju pri nižim vremenima zadržavanja na često korištenim kolonama niske polarnosti što uz njihove masene spektre, potvrđuje identifikaciju glukozinolata. Molekulski ion izotiocijanata je uvijek neparan zbog prisustva jednog atoma dušika u molekuli. Jedan od najkarakterističnijih fragmenata u masenom spektru izotiocijanata s ravnim i razgranatim alkilnim skupinama je m/z 72 koji odgovara $[\text{CH}_2\text{NCS}]^+$ i nastaje cijepanjem C-C veze do NCS skupine.^[4]

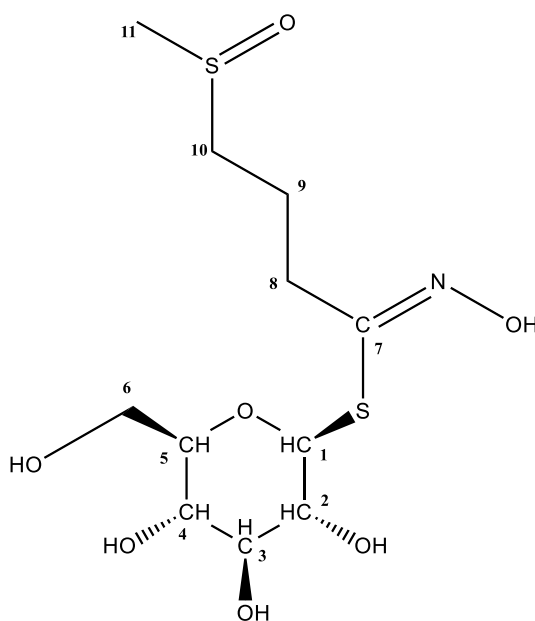


Slika 4.1.4. MS spektar alil-izotiocijanata, 3-(metilsulfinil)propil-izotiocijanata i 3-(metilsulfinil)propil-izotiocijanata.

Na slici 4.1.4. prikazan je MS spektar alil-izotiocijanata, 3-(metilsulfanil)propil-izotiocijanata i 3-(metilsulfinil)propil-izotiocijanata koji nastaju razgradnjom **107**, **95** i **73**.

Molekulski ion neparne mase dobro je vidljiv u slučaju razgradnje **107** (m/z 99), srednje vidljiv u slučaju razgradnje **95** (m/z 147), dok kod izotiocijanata koji potječe od **73** nije vidljiv. Unatoč tomu, u svim spektrima uočava se karakterističan fragment m/z 72 koji potvrđuje da je riječ o izotiocijanatu.

Alifatski glukozinolati koji sadrže sumpor u pokrajnjem lancu su poznati prekursori izotiocijanata s vrlo istaknutim biološkim djelovanjem.^[110] Stoga je iz biljke *Anastatica hierochuntica*, poznatije po nazivom jerihonska ruža, izoliran **73** te je izvršena NMR analiza (tablica 4.1.3. i slike 4.1.5., 8.3.1. - 8.3.4.).



Slika 4.1.5. Struktura desulfoglukoiberina **d73**.

Tablica 4.1.3. Asignacije u ^1H i ^{13}C NMR-u za desulfoglukoiberin.

H-atom	δ / ppm	Multipletnost	C-atom	δ / ppm
H-1	4,97	d, CH	C-1	81,40
H-2/4	3,49	ddd, CH / CH	C-2	72,16
			C-3	77,07
H-3/5	3,52	m, CH / CH	C-4	69,19
			C-5	79,99
H-6R	3,65	dd, CH	C-6	60,65
H-6S	3,84	dd, CH		
			C-7	154,55
H-8 R/S	2,88	dd, CH ₂	C-8	51,15
H-9	2,04	m, CH ₂	C-9	20,10
H-10	2,74	t, CH ₂	C-10	30,49
H-11	2,65	s, CH ₃	C-11	36,56

U ^1H NMR spektru **d73** uočava se 8 neekivalentnih protona (slika 8.3.1.). Najodsjenjeniji je dublet pri 4,97 ppm, a odgovara jednom protonu zbog čega se može pretpostaviti da pripada H-1 kako je ovaj proton u neposrednoj blizini kisika i sumpora. Signal pri 2,65 ppm je singlet te po spin-spin sprezanju, zaključuje se da pripada H-11. Za daljnju interpretaciju protona obrađen je ^1H - ^1H COSY spektar (slika 8.3.3.). Nakon utvrđivanja signala za H-1, uočava se signal korelacije ovog protona s H-2 protonom pri 3,37 ppm. U ovom istom spektru može se vidjeti signal za korelaciju H-2 s H-3 pri 3,48 ppm. Kako je za ove vrijednosti kemijskog pomaka u ^1H spektru integracijom utvrđeno da odgovaraju dva protona, može se pretpostaviti da određeni protoni ove glukopiranozne jedinice imaju isti kemijski pomak. U literaturi je opisana razlika u ^1H kemijskim pomacima protona glukopiranozne jedinice arilalifatskih i alifatskih glukozinolata. Za alifatske se navodi kako je redoslijed za sve glukozinolate s ovakvim bočnim lancem sljedeći: $\delta(\text{H-3}) > \delta(\text{H-5}) > \delta(\text{H-4}) > \delta(\text{H-2})$ gdje su vrijednosti H-3 i H-5 vrlo bliske, kao i H-2 i H-4 ^[103], što je potvrdilo prethodnu pretpostavku. Signali pri 2,74 ppm i 2,04 ppm odgovaraju dvama protonima, odnosno metilenskim vodicima unutar alifatskog lanca, H-9 i H-10, od kojih je H-10 vezan na sumpor zbog čega ima i veću vrijednost kemijskog pomaka. Uočava se sprezanje H-9 sa signalom na 2,89 ppm što je prema strukturi dodijeljeno H-8 (površina odgovara dvama protonima). Preostali proton koji nije objašnjen je H-6, kao i signali pri 3,84 i 3,65 ppm. Kako su ovo metilenski vodici, njihove vrijednosti kemijskih pomaka mogu biti različite. Literaturno, H-6R odgovara manjem ^1H

kemijskom pomaku (3,65 ppm), dok H-6S odgovara većem ^1H kemijskom pomaku (3,84 ppm).

Spektar ^{13}C NMR (slika 8.3.2.) otkriva 11 različitih kemijskih pomaka, odnosno ugljikovih atoma. Najodsjenjeniji je C-7 (154,55 ppm) zbog elektronegativnog dušika i sumpora. Sličan utjecaj ima kisik u glukopiranoznoj jedinici, pa sljedeći signal pri 81,40 ppm odgovara C-1, a pri 79,99 ppm C-5. Ugljik iz metilne skupine C-11 odgovara 36,56 ppm što je uočeno u ^1H - ^{13}C HSQC (slika 8.3.4.), kao i C-1 preko signala korelacije s H-1 pri 4,95 ppm. Zanimljivo je da signali za H-6 pri 3,90 i 3,74 ppm koreliraju s istom ugljikovom jezgrom pri 60,65 ppm čime je potvrđeno da se radi o dijastereotopnim vodovima ove metilenske skupine. Set signala za H-3/5 i H-2/4 upućuje na korelacije s njihovim ugljikovim atomima. Kako je već predloženo, C-5 odgovara 79,99 ppm, a u HSQC se može vidjeti da onda C-3 odgovara 77 ppm. Ovo potvrđuje i literatura, gdje se i za ^{13}C kemijske pomake navodi sljedeći redoslijed: $\delta(\text{C-1}) > \delta(\text{C-5}) > \delta(\text{C-3}) > \delta(\text{C-2}) > \delta(\text{C-4}) > \delta(\text{C-6})$ što je jednako i za alifatske i arilalifatske glukozinolate.^[103] Vodeći se navedenim, ^{13}C kemijski pomak pri 72,16 ppm može se pridružiti C-2, a pri 69,19 ppm C-4 jezgri. Ako se u ^1H spektru predloži da kemijski pomak H-8 odgovara 2,89 ppm, onda se kroz HSQC može pretpostaviti da je ovaj proton vezan na ugljikovu jezgru čija je vrijednost kemijskog pomaka 51,10 ppm. Time preostali H-9 pri 2,04 ppm daje signal njegove korelacije u dvodimenzijском spektru s C-9 na 20 ppm, odnosno H-10 sa C-10 na 30 ppm.

Arilalifatski glukozinolati

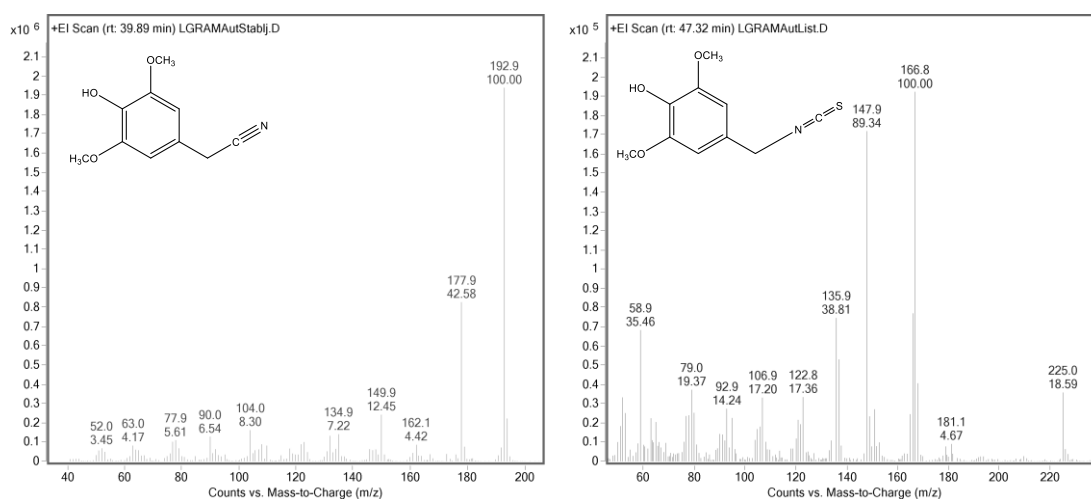
Identificirani arilalifatski glukozinolati su: glukotropeolin (**11**), glukomatronalin (**14**), 3,4-dimetoksibenzil-glukozinolat (**15**), glukolepigramin (**22**), glukosinalbin (**23**), glukolimnantin (**45**), glukonasturcin (**105**), 3,4,5-trimetoksibenzil-glukozinolat (**114**) i 3,5-dimetoksisinalbin (**152**). MS2 spektri arilalifatskih desulfoglukozinolata sadržavali su standardne fragmente koje potječu od cijepanja anhidroglukoze i tioglukoze te nisu uočena dodatna specifična cijepanja za ovu skupinu.

Disupstituirani arilalifatski glukozinolat, **14** identificiran je u biljkama *Hesperis laciniata* i *Thlaspi perfoliatum*. Prema dosadašnjoj literaturi, MS2 spektar ovog desulfoglukozinolata je snimljen i analiziran je po prvi put. Vrijeme zadržavanja je $t_R = 3,30$ min te su u njemu su vidljivi karakteristični fragmenti označeni a, b, c i d nastali cijepanjem $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 384$, čime je potvrđeno da je riječ o glukozinolatu.

Višestrukosupstituirani arilalifatski glukozinolati su pronađeni u biljkama roda *Lepidium*, od koji je 3,4,5-trimetoksibenzil-glukozinolat (**114**) do sada identificiran samo u vrstama *L. hyssopifolium*, *L. coronopus*, *L. sordidum* i *L. densiflorum*.^[3, 18, 111-114] Stoga se **114** može predložiti kao važna kemotaksonomska značajka za *Lepidium* spp.

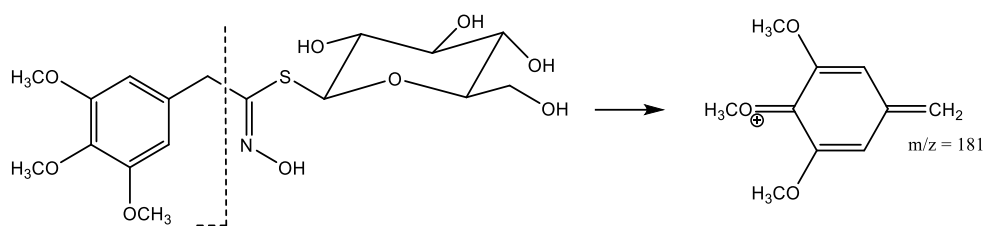
U istraživanju glukozinolatnog profila *L. graminifolium*, identificirani su između ostalih, i arilalifatski glukozinolati **11**, **15**, **22**, **23**, **45**, **105**, **114**, **152**.

Natrijev adukt $m/z=428$ identificiran je kao **152**, a GC-MS analizom ekstrakta ove biljke utvrđena su oba razgradna produkta glukozinolata, 4-hidroksi-3,5-dimetoksifenilacetonitril i 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-izotiocijanat prikazani na slici 4.1.6. Ovaj glukozinolat je ranije zabilježen samo u *L. densiflorum*.^[114] Osim u *L. graminifolium*, ovaj glukozinolat je identificiran i u nadzemnom dijelu biljke *Cardamine hirsuta*.



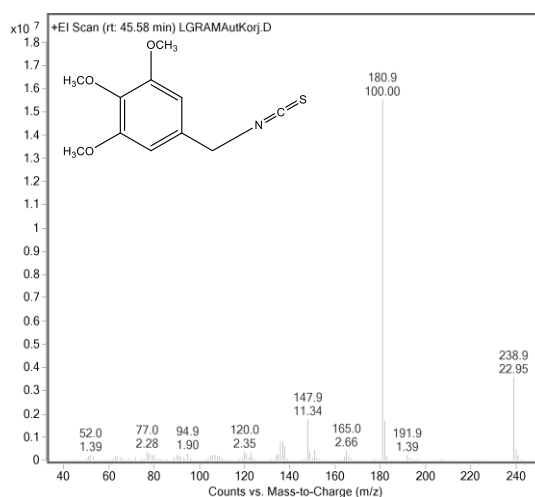
Slika 4.1.6. MS spektri razgradnih produkata 3,5-dimetoksisinibina.

U MS2 spektru trisupstituiranog arilalifatskog glukozinolata **114** (poglavlje 8. Prilozi), uz fragmente označene a, b, c, d koji su posljedica fragmentacije glukopiranozne jedinice, uočava se i m/z 181 koji predstavlja fragment stabiliziran rezonancijom (slika 4.1.7.).



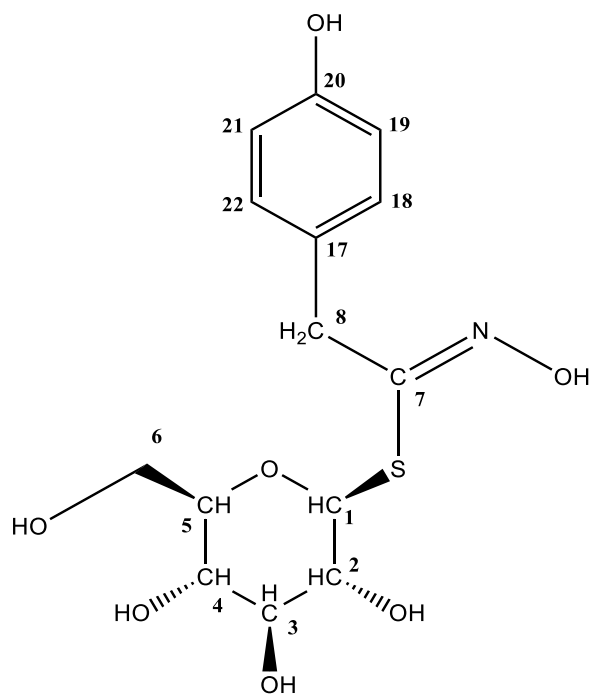
Slika 4.1.7. Nastanak fragmenta m/z 181 prisutnog u MS2 spektru 3,4,5-trimetoksibenzil-glukozinolata (**d114**).

Dodatno, **114** je potvrđen i GC-MS analizom preko odgovarajućeg izotiocijanata (slika 4.1.8.). U MS spektrima arilalifatskih razgradnih produkata uočljiv je molekulski ion neparne mase budući da je stabiliziran benzenskom jezgrom.



Slika 4.1.8. MS spektar izotiocijanata nastalog razgradnjom 3,4,5-trimetoksibenzil-glukozinolata.

Iz sjemena *Sinapis alba*, poznatije pod nazivom bijela gorušica, izoliran je **23** te je izvršena NMR analiza (tablica 4.1.4. i slike 4.1.9., 8.3.9. - 8.3.12.).



Slika 4.1.9. Struktura desulfoglukosinalbina **d23**.

Tablica 4.1.4. Asignacije u ^1H i ^{13}C NMR-u za desulfoglukosinalbin.

H-atom	δ / ppm	Multipletnost	C atom	δ / ppm
H-1	4,73	d, CH	C-1	84,27
H-2 / 3	3,35	d, CH / CH	C-2	74,61
			C-3	79,82
H-4	3,43	d, CH	C-4	71,58
H-5	3,24	d, CH	C-5	82,71
H-6 R/S	3,66 (<i>R</i>)	d, CH ₂	C-6	63,10
	3,68 (<i>S</i>)		C-7	165,47
H-8 R/S	3,95	d, CH ₂	C-8	41,02
			C-17	139,69
H-18	7,28	ddd, CH	C-18	123,71
H-19	6,93	m, CH	C-19	133,29
			C-20	162,25
H-21	6,93	m, CH	C-21	116,09
H-22	7,28	m, CH	C-22	116,32

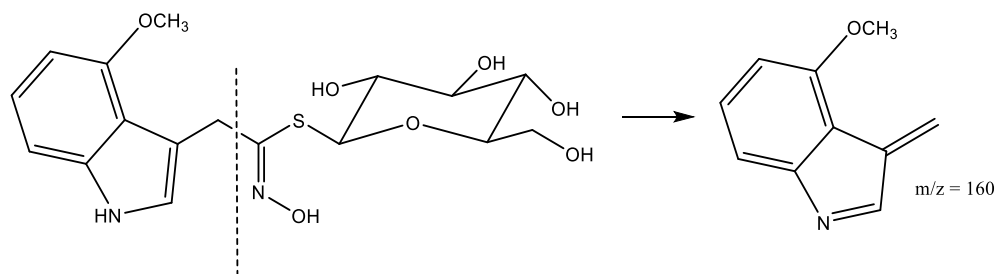
U jednodimenzijском ^1H NMR spektru **d23** integracijom je određena površina ispod pikova koja odgovara 13 vodika (slika 8.3.9.). Svakom piku dodijeljeni su odgovarajući kemijski pomaci. Dva najodsjenjenija dubleta pri 7,28 i 6,93 ppm pripadaju protonima na benzenskom prstenu (ukupno 4H). Veliko odsjenjenje benzenovih vodika se događa zbog tzv. magnetske anizotropije. To je pojava gdje je kružna struja π -elektrona aromatskog prstena inducirana djelovanjem magnetskog polja koje se na rubovima prstena zakreće u smjeru vanjskog polja – područje otkrivanja, što za posljedicu ima viši kemijski pomak aromatskih protona u odnosu na alifatske. Simetrični dubleti koji su jasno uočljivi na ^1H NMR-spektru su karakteristični za 1,4-disupstituciju na benzenskom prstenu. Ovime je potvrđen položaj hidroksilne skupine na aromatskom prstenu, tj. *para* položaj. Protoni označeni s H-22 i H-18, tj. protoni u *meta* položajima, su odsjenjeniji od protona H-21 i H-19 koji odgovaraju protonima u *orto* položajima. Ovo je posljedica rezonancije elektron-donirajuće hidroksilne skupine s aromatskom jezgrom što dovodi do zasjenjenja *orto* i *para* položaja.

Sljedeći pomak u spektru pri 4,73 ppm odgovara jednom protonu, odnosno H-1 budući da u susjedstvu ima vezane heteroatome kisik i sumpor što uzrokuje odsjenjenje, tj. pomak prema višim vrijednostima kemijskog pomaka. Potom slijede dva signala (4,07 i 3,67 ppm) čije površine odgovaraju dva protona, stoga pregledom strukture sinalbina, pretpostavlja se da je riječ o metilenskim vodicima, označenim s H-8 ili H-6. Ovi metilenski protoni su dijastereotopni. Kako je vidljivo u COSY spektru (slika 8.3.11.) H-8 nema sprežanja jer u susjedstvu nema drugih protona zbog čega je 4,07 ppm pridružen njemu, dok je H-6 pri 3,67 ppm za kojeg se vidi sprežanje sa susjednim H-5 koji je na najnižoj vrijednosti, 3,24 ppm. Signali od H-2 do H-5 odnose se na protone vezane na ugljike glukopiranoznog prstena. U literaturi se navodi kako redosljed kemijskih pomaka protona u šećernoj jedinici arilalifatskih glukozinolata je $\delta(\text{H-4}) > \delta(\text{H-3}) \approx \delta(\text{H-2}) > \delta(\text{H-5})$. Uočeno je kako su kemijski pomaci za H-3 i H-2 (integriranjem površine ispod pikova očitava se 2H) iznimno bliski što rezultira sprežanjem između H-1 i H-3, zbog čega H-1 signal nije očekivani dublet već se može zamijeniti za multiplet.^[103] Na temelju ovoga ostali signali redom se mogu pridružiti: H-4 3,43 ppm (odgovara 1H), H-3 i H-2 3,35 ppm (odgovara 2H) te H-5 3,24 ppm (za 1H). ^{13}C NMR spektar sadržava 12 signala (slika 8.3.10.), što odgovara pretpostavljenom ako se uzme u obzir da se očekuju iste vrijednosti za određene C atome u bočnom benzenskom prstenu. U ovom slučaju očekuje se da je najodsjenjeniji ugljikov atom iz tihidroksamatne skupine (C-7) te odgovara pomaku od 165,47 ppm. Izravno vezani elektronegativni atom kisika odsjenjuje jezgru

C-20 atoma i pomiče ga prema većim vrijednostima ppm-a, točnije 162,25 ppm. Sljedeći skup signala odgovara benzenskom prstenu. Pretpostavka je da signal pri 139,69 ppm odgovara kvarternom C-17. Kako jedino C-1 u strukturi odgovara korelacijama kroz više veza vrijednost 84,27 ppm se pridružuje ovom ugljiku. Ujedno, kako je izravno vezan na kisik i sumpor, logično je da ima najviši pomak u ovom dijelu molekule. Odnos C atoma u glukopiranoznoj jedinici je sljedeći: δ (C-1) > δ (C-5) > δ (C-3) > δ (C-2) > δ (C-4) > δ (C-6). Primjenom ove pretpostavke kao i vidljivih signala kroz dvodimenzijisku tehniku pridruženi su signali odgovarajućim ugljikovim atomima.

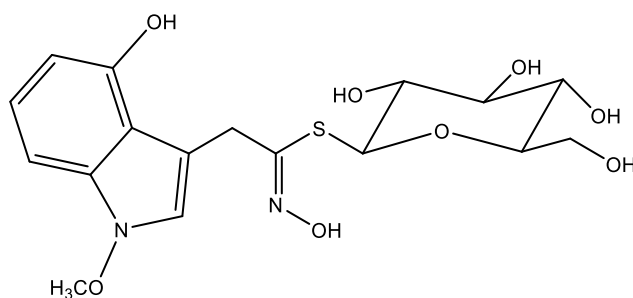
Indolni glukozinolati

Indolni glukozinolati identificirani u porodici Brassicaceae su: 4-hidroksiglukobrasicin (**28**), glukobrasicin (**43**), *N*-metoksiglukobrasicin (**47**), 4-metoksiglukobrasicin (**48**), disupstituirani 1,4-dimetoksiglukobrasicin (**138**) te novoidentificirani 4-hidroksi-1-metoksiglukobrasicin ([**161**]) (slika 4.1.11.) koji svi potječu od aminokiseline triptofana. Disupstituirani derivat **138** je obično jedino prisutan u korijenu biljke ^[107], što je bio slučaj u korijenu biljaka *Hirschfeldia incana* te *Thlaspi alliaceum*. U MS2 spektru moguće je razlikovati izomere **d47** i **d48** ($[M+Na]^+ = 421$) budući da je gubitak OCH₃ radikala prisutan kod *N*-metoksi indolnih desulfoglukozinolata, ali ne i kod C-supstituiranih. Tako MS2 spektar **d47** sadržava fragmente m/z 390 koji predstavlja gubitak OCH₃ te m/z 391 koji potječe od gubitka formaldehida (CH₂O), dok MS2 spektar **d48** nema ove fragmente. Također, cijepanje jedne metoksi skupine vezane na dušik u **d138** kao i gubitak formaldehida vidljivi su kao fragmenti m/z 420, odnosno m/z 421. MS2 spektar **d48** sadržava karakterističan fragment m/z 160 koji predstavlja rezonancijski stabiliziran fragment arilmetilenskog tipa, čija struktura je prikazana na slici 4.1.10.



Slika 4.1.10. Nastanak fragmenta m/z = 160 prisutnog u MS2 spektru 4-metoksiglukobrasicina (**d48**).

U korijenu biljke *Thlaspi alliaceum* uočen je $[M+Na]^+ = 437$ za kojeg je pretpostavljeno da se radi o do sada neidentificiranom glukozinolatu, označenom **[161]** i predložene strukture prikazane na slici 4.1.11.



Slika 4.1.11. Struktura desulfo-4-hidroksi-1-metoksiglukobrasicina **d[161]**.

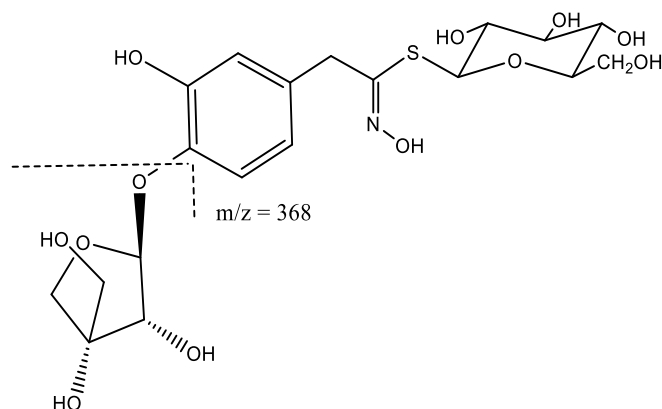
UV spektar desulfoglukozinolata ukazuje da je riječ o indolnom glukozinolatu te je snimljen MS2 spektar u svrhu prepoznavanja karakterističnih fragmenata. Uočavaju se fragmenti a i c koji potvrđuju da je riječ o glukozinolatu. Predložen je naziv 4-hidroksi-1-metoksiglukobrasicin, budući da je poznato kako se hidroksilacija te naknadna metilacija indolnog prstena odvija na položajima 1 i 4.^[17] Naime, ključni enzimi su citokrom P450-monooksigenaze potporodice CYP81F koji provode reakcije hidroksilacije na položaju 4 ili 1 indolnog prstena. IGMT enzimi koji pripadaju obitelji biljnih *O*-metiltransferaza, pretvaraju hidroksi intermedijere u metoksilirane produkte te je pronađen enzim IGMT5 specifičan za položaj 1 indolnog prstena, odnosno enzimi IGMT1-4 specifični za položaj 4.^[43] Prijedlog strukture novog glukozinolata je potkrijepljen i MS2 spektrom u kojem se uočava fragment m/z 406 što predstavlja gubitak metoksi skupine koja je vezana na dušik, dok m/z 389 predstavlja cijepanje metoksi i hidroksilne skupine.

Višestrukoglikozilirani glukozinolati

Vrlo specifični višestrukoglikozilirani glukozinolati u ovom istraživanju pronađeni su u dvije biljne vrste iz porodice Brassicaceae, *Hesperis laciniata* i *Thlaspi perfoliatum*. Glukozinoladni profil *H. laciniata* prethodno je opisan u radu Montaut i sur. (2019.) gdje su analizirani intaktni glukozinolati koristeći LC-MS te su identificirani višestrukoglikozilirani glukozinolati koji su sadržavali ramnozu ili apiozu kao dodatnu šećernu jedinicu u pokrajnjem lancu: 4'-*O*- β -D-apiofuranozilglukomatronalin (**157**), glukomoringin (**110**) te hipotetski, hidroksi-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat i D-apiozilirani analog **110** (**[160]**). Iz biljke je izoliran **157** te je njegova struktura

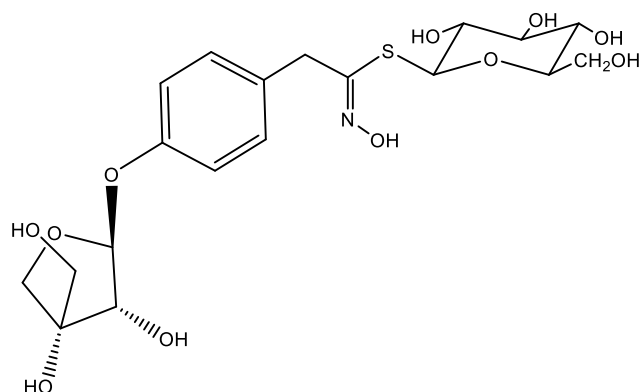
potvrđena NMR analizom.^[12] Prema literaturi, apiozilirani glukozinolati su usko rasprostranjeni u obitelji Brassicaceae, tj. prethodno su pronađeni samo u biljkama *Hesperis matronalis* i *H. laciniata*.

U ovom istraživanju analizirani su desulfoglukozinolati ove biljke te su identificirani svi navedeni glukozinolati, a u stabljici još i dodatni, 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat (**109**). Glukozinolat **110** je karakterističan za porodicu Moringaceae, dok je u porodici Brassicaceae pronađen samo u biljci *Noccaea caerulescens*.^[3] S druge strane, glukozinolat **109** prethodno je identificiran samo u biljkama porodice Resedaceae. Navedeno ukazuje na neuobičajenu raznolikost biosintetskih puteva u rodu *Hesperis* koji dovode do nastanka specifičnih dodatno glikoziliranih glukozinolata. Analizom svih biljnih organa *H. laciniata* identificiran je **d157** na $t_R = 4,88$ min i $[M+Na]^+ = 516$. U MS2 spektru (poglavlje 8. Prilozi) vidljivi su fragmenti m/z 219 što potvrđuje da je riječ o desulfoglukozinolatu, zatim m/z 368 (slika 4.1.12.) koji potječe od eliminacije apiozne jedinice, dok eliminacijom anhidroglukoze nastaje fragment m/z 354.



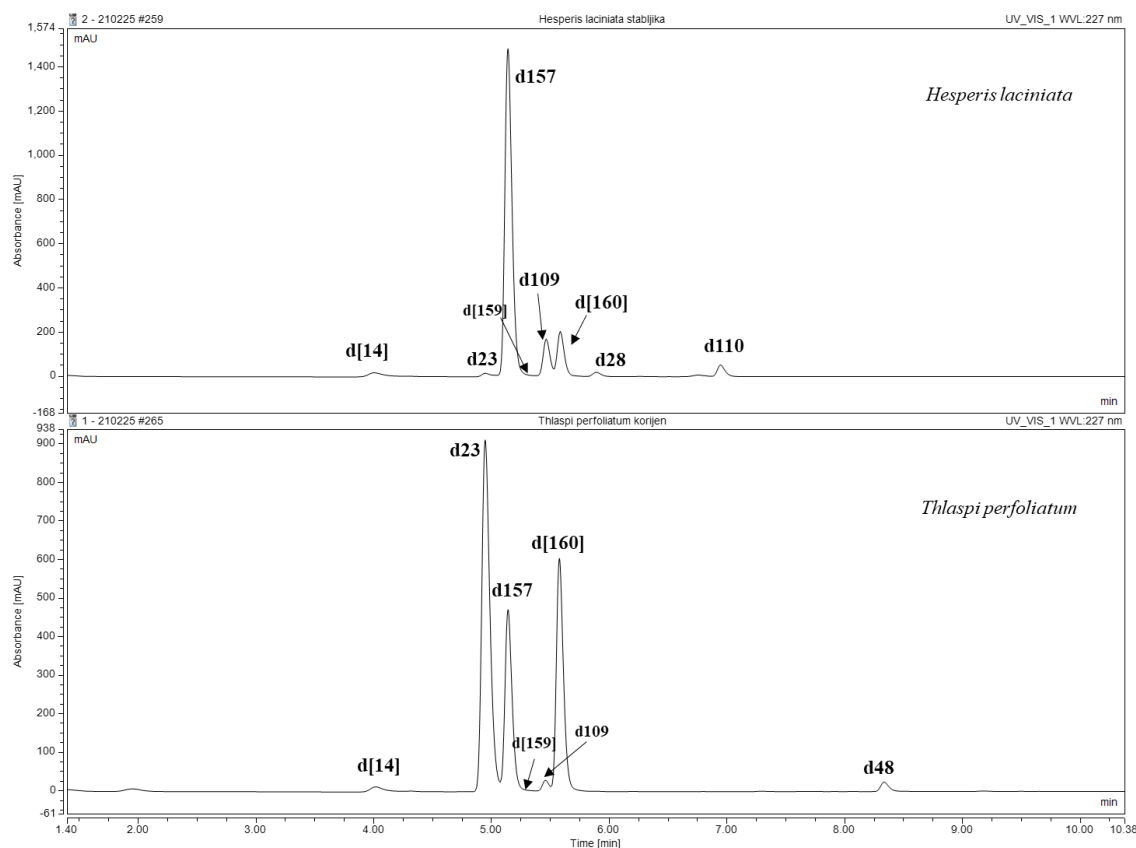
Slika 4.1.12. Nastanak fragmenta m/z 368 u desulfatiranom 4'- O - β -D-apiofuranozilglukomatronalinu (**d157**).

Hipotetski hidroksi-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat uočen je kao $[M+Na]^+ = 530$ i pretpostavljeno je da je riječ o novom glukozinolatu, te je uvršten kao **[159]**. Ovaj glukozinolat identificiran je u istraživanju biljke *Moringa oleifera* te je u poglavlju 4.3. detaljno objašnjen njegov MS2 spektar. Glukozinolat **[160]** koji predstavlja D-apiozilirani analog **110** je identificiran na $t_R = 5,50$ min te je UV spektar ukazivao da je riječ o arilalifatskom glukozinolatu čiji $[M+Na]^+ = 500$ odgovara jednom kisiku manje u odnosu na **d157** (slika 4.1.13.). U MS2 spektru **d[160]** vidljiv je fragment m/z 368 koji je uočen i za **d157**, a m/z 338 odgovara eliminaciji anhidroglukoze.



Slika 4.1.13. Struktura desulfatiranog oblika 4'-O-(β -D-apiofuranosiloksi)benzil-glukozinolata, **d[160]**.

Istraživanjem biljke *Thlaspi perfoliatum* također su identificirani višestrukoglikozilirani glukozinolati, i to **110**, **157** te **[160]**. Vremena zadržavanja, UV spektri te MS2 spektri su odgovarali prethodno analiziranim uzorcima *Hesperis laciniata* (slika 4.1.14.).



Slika 4.1.14. Kromatogrami biljaka *Hesperis laciniata* (stabljika) i *Thlaspi perfoliatum* (korijen) dobiveni pri 15 °C. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 2.3.1. te brojevima za nove: *orto* ili *meta* hidroksi-4-(α -L-ramnopiranosiloksi)benzil-glukozinolati (**[159]**) i 4'-O-(β -D-apiofuranosiloksi)benzil-glukozinolati (**[160]**).

Budući da do sada apiozilirani glukozinolati nisu identificirani nigdje osim u rodu *Hesperis*, uzorci su dodatno analizirani korištenjem UHPLC-QTOF-a (maseni spektri u poglavlju 8. Prilozi). Utvrđeno je da dobivena masa **d157** odgovara izračunatoj masi desulfoglukozinolata (pronađeno: 478,1378, izračunato za $C_{19}H_{28}O_{11}NS^+$ ($[M+H]^+ = 478,1383$), kao i masa **d[160]** (pronađeno: 494,1327, izračunato za $C_{19}H_{28}O_{12}NS^+$ ($[M+H]^+ = 494,1332$). Ovime su po prvi put identificirani apiozilirani glukozinolati u drugom rodu.

Glukozinolati neodređene strukture

U kromatogramima svih istraženih biljnih organa endemske biljke *Erysimum croaticum* s Biokova uočena su dva signala za koje se pretpostavilo da je riječ o glukozinolatima koji do sada nisu identificirani u ovim istraživanjima. Signal na $t_R = 2,42$ min odgovarao je $[M+Na] = 378$, a signal na $t_R = 4,92$ min je odgovarao $[M+Na] = 362$. Iako su ove mase desulfoglukozinolata već prethodno identificirane, vremena zadržavanja nisu odgovarala nijednim poznatim desulfoglukozinolatima. MS2 spektri (poglavlje 8. Prilozi, spektri x1 i x2) potvrđuju da je riječ o glukozinolatima zbog karakterističnih prisutnih fragmenata, ali nema dovoljno informacija za pretpostavku strukture zbog čega je potrebno provesti NMR analizu.

4.1.2. Kvantitativna analiza glukozinolata

Tablica 4.1.2. Kvantitativna analiza glukozinolata u pojedinim biljnim organima istraživanih biljaka porodice Brassicaceae.

Rod	Identificirani glukozinolat	Sadržaj ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)	Biljni organ*
Vrsta			
Aminokiselinski prekursor			
<i>Alyssoides</i>			
<i>A. utriculata</i>			
Met	Glukonapin (12)	17,16	cijela biljka
	Glukorafanin (64)	tr	cijela biljka
	Glukoerucin (84)	5,67	cijela biljka
	Glukoberteroin (94)	tr	cijela biljka
	Glukobrasikanapin (101)	tr	cijela biljka
<i>Anastatica</i>			
<i>A. hierochuntica</i>			
Met	Glukoiberin (73)	1,49; 35,46	nad dio
	Glukoibervirin (95)	tr; 0,72	k
<i>Armoracia</i>			
<i>A. rusticana</i>			
Ile	Glukokohlearin (61)	tr	l, k
Trp	Glukobrasicin (43)	tr; 0,15	l, k
Phe	Glukonasturcin (105)	tr; 7,21	l, k
	Glukonapin (12)	tr	l, k
	Glukobrasikanapin (101)	tr	l, k
	Sinigrin (107)	3,53; 11,43	k, l
<i>Barbarea</i>			
<i>B. vulgaris</i>			
Met	3-Hidroksi-5-(metilsulfonil)pentil- glukozinolat ([35])	tr; 1,71; 4,46; 5,15	k, l, st, cv
	Glukoheperin (67)	tr	k
	Glukoalisin (72)	tr	k, l, cv
	Glukoerucin (84)	0,10	k
	Glukoberteroin (94)	8,12	k
	Glukoleskverelin (88)	0,15	k
	3-Hidroksi-4-(metilsulfonil)butil- glukozinolat ([162])	0,13; 0,14; 0,30	st, l, cv
Phe	Glukolimnantin (45)	tr	st

Biscutella***B. cichoriifolia***

Met	Progoitrin (24R)	tr	cv
	Epiprogoitrin (24S)	0,36	cv
	Glukokamelinin (65)	tr; 0,03; 0,09	l, st, cv
	(<i>R</i> _S)-7-(Metilsulfinil)heptil-glukozinolat (66)	tr	cv
	Glukoarabin (68)	1,40; 3,18; 17,45	st, l, cv
	Glukohirsutin (69)	0,13; 1,04; 8,49	st, l, cv
	Glukoiberin (73)	tr; 0,49	st, l
	9-(Metilsulfonil)nonil-glukozinolat (79)	tr; tr; 0,09	st, l, cv
	8-(Metilsulfonil)oktil-glukozinolat (80)	tr	cv
	Glukoibervirin (95)	tr; 0,45	
Phe	Glukotropeolin (11)	tr	cv

B. laevigata

Met	(<i>R</i> _S)-7-(Metilsulfinil)heptil-glukozinolat (66)	0,08; tr	cv, k,
	Glukohirsutin (69)	8,47; 38,44; 45,81; 51,06; 57,87	st, k, kom, l, cv
	8-(Metilsulfanil)oktil-glukozinolat (92)	2,85	k
	8-(Metilsulfonil)oktil-glukozinolat (80)	0,47; 0,37; tr; 0,26	cv, kom, st, k
	Glukoarabin (68)	0,39; 0,27; 0,04; 0,80	cv, kom, st, k
Trp	Glucobrasicin (43)	31,11; 0,48; 6,13; 3,55; 0,73	cv, kom, l, st, k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,24	k

Brassica***B. juncea***

Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	1,00	sj
Met	Sinigrin (107)	53,56	sj

B. nigra

Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	1,60	sj
Met	Glukonapin (12)	40,25	sj
	Sinigrin (107)	12,40	sj

<i>B. oleracea</i> L.			
ssp. <i>acephala</i>			
(DC.) O. Schwarz			
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	0,69; 1,99; 2,45	st, cv, l
	Glukobrasicin (43)	0,04; 0,12; 0,42; 0,81	st, l, cv, k
	Neoglukobrasicin (47)	0,24; 4,68	st, k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,04; 1,93	st, k
Phe	Glukotropeolin (11)	tr; 0,13	k, st
	Glukonasturcin (105)	0,09; 34,02	st, k
Met	Progoitrin (24R)	0,49	st
	Glukorafanin (64)	0,50	cv
	Glukoiberin (73)	tr; 0,07; 3,36	k, l, cv
	Glukoerucin (84)	1,88	k
	Glukoibervirin (95)	12,43	k
	Sinigrin (107)	0,40; 7,65	st, k
<i>Bunias</i>			
<i>B. erucago</i>			
Phe	Glukotropeolin (11)	0,10; 0,20; 0,20	st + l, k, cv
Phe/Tyr	Glukosinalbin (23)	5,60; 6,80; 8,30	st + l, cv, k
Met	Glukonapin (12)	0,20; 0,50; 0,60	st + l, k, cv
	Glukorafenin (63)	1,00; 1,60; 5,70	st + l, k, cv
	Glukorafanin (64)	0,10; 0,10; 0,30	st + l, k, cv
	(3E)-4-(Metilsulfanil)but-3-enil-glukozinolat (83)	1,00; 2,20	cv, k
	Glukoerucin (84)	tr	k
<i>Cardamine</i>			
<i>C. hirsuta</i>			
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	0,58	nad dio
	Glukobrasicin (43)	tr; 0,67	nad dio, k
	Neoglukobrasicin (47)	0,07	k
	Glukonasturcin (105)	1,97; 3,38	nad dio, k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,20; 0,67	nad dio, k
Phe	Glukotropeolin (11)	19,18; 26,12	nad dio, k
	Glukolepigramin (22)	1,50	nad dio
Phe/Tyr	Glukosinalbin (23)	0,05; 0,13	k, nad dio
	3,5-Dimetoksisinalbin (152)	1,24	nad dio
Met	Progoitrin (24R)	tr	nad dio, k
	4-Hidroksibutil-glukozinolat ([26])	tr	nad dio, k
	4-(Benzoiloksi)butil-glukozinolat (5)	0,14	nad dio
	Glukonapin (12)	1,98; 32,38	k, nad dio
	Glukobrasikanapin (101)	0,24	nad dio

<i>Diplotaxis</i>			
<i>D. tenuifolia</i>			
Met	Glukorafanin (64)	0,63; 1,43; 2,49; 2,83	sj, l, st, cv
	Glukoerucin (84)	5,62; 14,77; 14,90; 15,85	l, st, cv, sj
<i>D. erucoides</i>			
Trp	Glukobrasicin (43)	0,13	k
	Neoglukobrasicin (47)	0,15	k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	tr; 0,19	l, k
Phe	Glukotropeolin (11)	tr	k
	Glukonasturcin (105)	0,03; 11,37	l, k
Met	Sinigrin (107)	1,72; 8,61	k, l
<i>Eruca</i>			
<i>E. vesicaria</i>			
Trp	4-Metoksiglukobrasicin (48)	tr	cijela biljka
	1,4-Dimetoksiglukobrasicin (138)	tr	cijela biljka
Met	Glukorafanin (64)	1,21	cijela biljka
	Glukokamelinin (65)	1,72	cijela biljka
	Glukoerucin (84)	0,76	cijela biljka
	Glukoibervirin (95)	0,01	cijela biljka
	Dimer 4-merkaptobutil-glukozinolata (134)	1,47	cijela biljka
	4-(β -D-Glukopiranozildisulfanil)butil-glukozinolata	0,91	cijela biljka
<i>Erysimum</i>			
<i>E. cheiri</i>			
Trp	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,16	st
Met	Glukoiberin (73)	21,69; 25,61; 55,37	k, st, l
	Glukokeirolin (82)	0,72; 0,75; 3,32	st, l, k
	Glukoibervirin (95)	0,19; 0,28; 1,95	k, l, st
<i>Hesperis</i>			
<i>H. laciniata</i>			
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	tr; 0,04; 0,28	st, l, k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,40	k
Phe	2-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolata (109)	1,93	st
Phe/Tyr	Glukomatronalin ([14])	1,56; 2,01; 2,26; 2,36	st, k, cv, l
	Glukosinalbin (23)	0,28; 0,31; 0,52; 1,25	st, l, cv, k
	Glukomoringin (110)	5,59; 7,67; 10,77; 15,71	st, cv, l, k

	4'- <i>O</i> - β -D- Apiofuranozilglukomatronalin (157)	51,34; 94,39; 108,91; 115,08	st, k, cv, l
	4'- <i>O</i> -(β -D-Apiofuranoziloksi)benzil- glukozinolat ([160])	6,93; 8,14; 14,84; 27,49	st, l, k, cv
	<i>orto</i> ili <i>meta</i> Hidroksi-4-(α -L- ramnopiranoziloksi)benzil- glukozinolat ([159])	tr	st, l, k, cv
Met	Glukoheperin (67)	16,91	k
	Glukoleskverelin (88)	2,75	k
<i>Hirschfeldia</i>			
<i>H. incana</i>			
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	0,29; 1,86	st, k
	Glukobrasicin (43)	0,11; 0,70	cv, k
	Neoglukobrasicin (47)	0,13	k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,08; 1,79	cv, k
	1,4-Dimetoksiglukobrasicin (138)	0,38	k
Phe	Glukonasturcin (105)	0,15	k
Met	Glukoiberin (73)	28,94; 37,27; 67,78; 89,87	st, k, l, cv
	Glukokeirolin (82)	2,59; 3,08; 9,30; 10,51	l, st, cv, k
	Glukoibervirin (95)	0,38; 0,13; 0,12	cv, l, st
<i>Hornungia</i>			
<i>H. petraea</i>			
Phe	Glukotropeolin (11)	2,62	cijela biljka
	Glukolepigramin (22)	7,78	cijela biljka
	Glukolimnantin (45)	8,56	cijela biljka
Phe/Tyr	Glukosinalbin (23)	tr	cijela biljka
Met	Glukonapin (12)	tr	cijela biljka
<i>Iberis</i>			
<i>I. sempervirens</i>			
Trp	4-Metoksiglukobrasicin (48)	tr	st, l
Phe	Glukotropeolin (11)	tr	st, cv
Met	Glukoiberin (73)	5,52; 6,94; 19,76; 35,37	sj, st, cv, l
	Glukoerucin (84)	tr; tr	sj, st
	Glukoibervirin (95)	1,12; 2,88; 11,20; 18,51	l, cv, st, sj
<i>I. umbellata</i>			
Trp	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,03	cijela biljka
Phe	Glukotropeolin (11)	0,04; 0,71	cijela biljka, sj
Met	Glukonapin (12)	0,11	sj

	Glukoiberin (73)	4,62; 7,45	cijela biljka, sj
	Glukoibervirin (95)	2,64; 5,23	cijela biljka, sj
	Sinigrin (107)	12,04; 58,96	cijela biljka, sj
<i>Lepidium</i>			
<i>L. didymum</i>			
Trp	4-Metoksigliukobrasicin (48)	0,25; 0,36; 0,45; 0,76	k, l, st, kom
Phe	Glukotropeolin (11)	22,11; 51,04; 58,74; 221,63	k, st, l, kom
<i>L. graminifolium</i>			
Rab			
Phe	Glukotropeolin (11)	0,12	nad dio
	Glukolepigramin (22)	3,03	nad dio
	Glukolimnantin (45)	1,24	nad dio
	Glukonasturcin (105)	tr	nad dio
Phe/Tyr	3,4-Dimetoksibenzil-glukozinolat (15)	tr	nad dio
	Glukosinalbin (23)	0,19	nad dio
	3,4,5-Trimetoksibenzil-glukozinolat (114)	tr	nad dio
	3,5-Dimetoksisinalbin (152)	tr	nad dio
Met	Glukonapin (12)	tr	nad dio
	Progoitrin (24R)	0,26	nad dio
	Epiprogoitrin (24S)	1,56	nad dio
Split			
Phe	Glukotropeolin (11)	tr; 0,47; 1,80; 5,14; 61,69	l, st, cv, kom, k
	Glukolepigramin (22)	6,43; 19,30; 20,56; 68,60 75,82	st, l, k, cv, kom
	Glukolimnantin (45)	tr; 11,95; 18,18	st, kom, k
Phe/Tyr	3,4-Dimetoksibenzil-glukozinolat (15)	tr	k
	Glukosinalbin (23)	tr; tr; 1,62; 2,15; 3,92	l, st, k, cv, kom
	3,4,5-Trimetoksibenzil-glukozinolat (114)	0,87; 3,42; 11,03; 13,17; 35,20	st, l, kom, cv, k
	3,5-Dimetoksisinalbin (152)	3,04; 11,12; 12,04; 12,49; 14,88	st, cv, kom, k, l
Met	Glukorafanin (64)	3,49; 4,00; 7,32	l, kom, cv
<i>L. meyenii</i>			
Žuti prah			
Phe	Glukotropeolin (11)	7,02	k
	Glukolepigramin (22)	0,50	k

	Glukolimnantin (45)	1,93	k
Phe/Tyr	Glukosinalbin (23)	tr	k
Crveni prah			
Phe	Glukotropeolin (11)	8,97	k
	Glukolepigramin (22)	0,40	k
	Glukolimnantin (45)	2,54	k
Phe/Tyr	Glukosinalbin (23)	tr	k
<i>L. sativum</i>			
	Glukoerucin (84)	27,97	sj
<i>Lunaria</i>			
<i>L. annua</i>			
Val	Glukoputranjivin (56)	14,60	sj
Ile	Glukokohlearin (61)	0,41	sj
Phe	Glukotropeolin (11)	1,54	sj
Met	Glukoheperin (67)	3,54	sj
	Glukoalisin (72)	1,74	sj
	Glukoleskverelin (88)	tr	sj
	Glukoberteroin (94)	tr	sj
<i>Matthiola</i>			
<i>M. incana</i>			
Vis			
Met	Glukorafenin (63)	17,02	sj
	(3 <i>E</i>)-4-(Metilsulfanil)but-3-enil-glukozinolat (83)	0,21	sj
Podstrana			
Trp	Glukobrasicin (43)	0,39	cv
Met	Glukorafenin (63)	1,53; 5,21; 15,80; 21,03	l, st, cv, kom
	(3 <i>E</i>)-4-(Metilsulfanil)but-3-enil-glukozinolat (84)	0,16; 0,43; 0,43; 0,48	st, l, cv, kom
<i>Nasturtium</i>			
<i>N. officinale</i>			
Trp	Glukobrasicin (43)	tr	cijela biljka
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,49	cijela biljka
Phe	Glukonasturcin (105)	15,13	cijela biljka
Met	(<i>R</i> _S)-7-(Metilsulfanil)heptil-glukozinolat (66)	1,93	cijela biljka
	Glukoheperin (67)	tr	cijela biljka
	Glukohirsutin (69)	0,87	cijela biljka
	7-(Metilsulfanil)heptil-glukozinolat (87)	tr	cijela biljka

	8-(Metilsulfanil)oktil-glukozinolat (92)	tr	cijela biljka
Rorippa			
<i>R. sylvestris</i>			
Trp	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,61	k
Phe	Glukotropeolin (11)	tr; 0,16	st, l, k, cv
Met	(<i>R</i> _s)-7-(Metilsulfanil)heptil- glukozinolat (66)	tr	st, l, k, cv
	Glukoarabin (68)	0,38; 0,61; 0,89; 1,25	st, k, cv, l
	Glukohirsutin (69)	26,65; 28,01; 47,53; 110,84	st, k, l, cv
	8-(Metilsulfonil)oktil-glukozinolat (80)	0,14; 0,32; 0,48; 1,87	k, st, l, cv
	8-(Metilsulfanil)oktil-glukozinolat (92)	3,72; 5,21; 7,61; 16,18	st, cv, l, k
Sinapis			
<i>S. alba</i>			
Phe/Tyr	Glukosinalbin (23)	34,86	sj
Sisymbrium			
<i>S. officinale</i>			
Split			
Val	Glukoputranjivin (56)	1,60; 10,62; 11,66; 13,54	k, l, cv, st
Leu	Izobutil-glukozinolat (62)	tr	l, cv, st
Ile	Glukokohlearin (61)	tr; tr; tr; 0,61	k, l, cv, st
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	tr; tr	l, cv
	Glukobrasicin (43)	0,36; 1,70; 3,01; 3,81	k, st, cv, l
	Neoglukobrasicin (47)	3,96	k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,07; 0,46	st, k
Phe/Tyr	Glukosinalbin (23)	0,58	k
Krka			
Val	Glukoputranjivin (56)	tr; 2,72; 2,88; 7,40	k, st, l, cv
Leu	Izobutil-glukozinolat (62)	tr	cv
Ile	Glukokohlearin (61)	tr; tr; 0,24	l, cv, st
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	1,41	l
	Glukobrasicin (43)	0,74; 0,99; 4,33; 5,72	st, k, cv, l
	Neoglukobrasicin (47)	tr; 0,04; 5,18	st, cv, k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,77	k

<i>S. orientale</i>			
Trp	Neoglukobrasicin (47)	0,15	k
Phe	Glukonasturcin (105)	tr; 0,06; 7,89	st, kom, k
Phe/Tyr	Glukosinalbin (23)	tr	k
Met	Glukonapin (12)	tr; 0,36; 0,73	st, kom, k
	Progoitrin (24R)	tr; 3,03	k, kom
	Epiprogoitrin (24S)	0,25; 0,53; 18,40	st, k, kom
<i>Thlaspi</i>			
<i>T. perfoliatum</i>			
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	1,19	kom
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,22	k
Phe/Tyr	Glukomatronalin ([14])	0,41; 0,83; 1,78; 3,13	st, k, kom, l
	Glukosinalbin (23)	0,22; 0,50; 1,02; 17,65	st, l, kom, k
	Glukomoringin (110)	0,50; 0,85; 1,85; 2,47	st, k, kom, l
	4'-O-(β -D-Apiofuranozilglukomatronalin (157))	16,38; 18,73; 87,40; 99,84	k, st, kom, l
	4'-O-(β -D-Apiofuranoziloksi)benzilglukozinolat ([160])	20,52; 25,20; 66,88; 104,16	k, st, l, kom
	<i>orto</i> ili <i>meta</i> Hidroksi-4-(α -L-rannopiranoziloksi)benzilglukozinolat ([159])	tr	k, st, l, kom
<i>T. alliaceum</i>			
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	0,17; 0,91; 2,94	st, cv, k
	Glukobrasicin (43)	0,21	k
	Neoglukobrasicin (47)	4,13	k
	4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,38	k
	1,4-Dimetoksiglukobrasicin (138)	tr	k
	4-Hidroksi-1-metoksiglukobrasicin ([161])	0,41	k
Met	Glukonapin (12)	0,15	k
	Sinigrin (107)	3,65; 20,27; 34,87; 75,90; 79,88	l, st, k, cv, kom

*k-korijen; l-list; st-stabljika; cv-cvijet; kom-komuška; pl-plod; sj-sjeme; nad dio-nadzemni dio; DW - engl. *dry weight*, suhi biljni materijal; tr – tragovi

Alifatski glukozinolati

Zajednička karakteristika većine biljnih vrsta roda *Brassica* su C3 – C5 alifatski glukozinolati. Glukozinolati pronađeni u ovim vrstama nastaju uglavnom produljenjem lanca metionina, u kombinaciji s opsežnim modifikacijama bočnog lanca nakon sinteze. Najveće količine pronađene su u sjemenu, i to: sinigrin (**107**) ($>200 \mu\text{mol g}^{-1}$ suhog biljnog materijala (DW)), glucoiberin (**73**) (do $200 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), glukonapin (**12**) (do $125 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), glukorafanin (**64**) (do $100 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), glucoerucin (**84**) i progoitrin (**24R**) (do $50 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), glucoibervirin (**95**) i glukobrasikanapin (**101**) (do $25 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[3] Kljice biljke *Armoracia rusticana* i korijen biljke *Guiraoa arvensis* su također prepoznati kao dobri izvori **107** ($>100 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[100, 115]

U ovom istraživanju značajniji sadržaj C3 – C5 glukozinolata ($> 25 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW) u samoniklim biljkama je utvrđen u biljci *Brassica juncea*, *Iberis umbellata* i *Thlaspi alliaceum*, (**107**), *Brassica nigra* i *Cardamine hirsuta* (**12**) *Anastatica hierochuntica*, *Erysimum cheiri*, *Hirschfeldia incana* i *Iberis sempervirens* (**73**), *Sisymbrium orientale* (**24S**). Najveći sadržaj **107** je pronađen u biljci *T. alliaceum* koji je ujedno i glavni spoj u svim dijelovima, i to: komuška ($79,88 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), cvijet ($75,90 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), korijen ($34,87 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), stabljika ($20,27 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW) te list ($3,65 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW).

U različitim dijelovima biljke *Barbarea vulgaris* identificirani su C5 glukozinolati. U korijenu su pronađeni poznati metilsulfanilni glukozinolat glucoalisin (**72**) u tragovima te njegov metilsulfanilni analog glukoberteroin (**94**) sa sadržajem $8,12 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Na osnovu ovoga, kako je prethodno objašnjeno, sugerirani su i hidroksimetilsulfonilni glukozinolati od kojih je 3-hidroksi-5-(metilsulfonil)pentil-glukozinolat (**[35]**) bio glavni, a sadržaj mu je varirao od $1,71 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u listu, zatim $4,46 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u stabljici do $5,15 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u cvijetu, dok je 4-hidroksi-5-(metilsulfonil)butil-glukozinolat (**[162]**) bio prisutan u tragovima.

Unutar porodice Brassicaceae, prisustvo dugolančanih C7 – C10 alifatskih glukozinolata sa sumporom u pokrajnjem lancu je ograničeno na nekoliko rodova kao što su *Arabis*, *Biscutella*, *Camelina*, *Capsella*, *Nasturtium*, *Rorippa*, kao i na određene samonikle vrste rodova *Lepidium* i *Sinapis*.^[6, 19] Sjeme *Biscutella laevigata* pokazalo se vrlo dobrim izvorom glukohirsutina (**69**) ($75,0 - 100,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[19] Glukozinolat **69** također je identificiran kao glavni spoj u biljkama *Rorippa sylvestris* (s najvećim sadržajem $43,2 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u cvijetu) te *R. amphibia* (s najvećim sadržajem $42,3 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u cvijetu).

g^{-1} DW u sjemenu).^[17] Sjeme iz različitih vrsta roda *Camelina* se navodi kao izvor 10-(metilsulfinil)decil-glukozinolata (**[74]**) (do $25,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Nadalje, sjeme *Camelina pilosa* sadrži najveću količinu 11-(metilsulfinil)undecil-glukozinolata (**[74]**), $11,1 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW, do sada najduljeg poznatog glukozinolata biosintetiziranog iz metionina.^[19, 100] U *Nasturtium officinale* identificirani su dugolančani metilsulfanilalkil (C5 – C7) i metilsulfinilalkil (C8 – C10) glukozinolati ($6 - 28 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW) s najvećom količinom 9-(metilsulfinil)nonil-glukozinolata (**68**) ($21,1 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), u kombinaciji s velikim količinama arilalifatskih glukozinolata, i to dominantno glukonasturcina (**105**) ($7,8 - 52,8 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[116]

U istraživanju biljaka porodice Brassicaceae, glukozinolat **69** identificiran je u biljkama *Biscutella cichoriifolia*, *B. laevigata*, *Nasturtium officinale* i *Rorippa sylvestris*, od kojih su *B. laevigata* i *R. sylvestris* sadržavale najveće količine **69**. Najveći sadržaj **69** pronađen je u cvijetu *R. sylvestris* i to $110,84 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW, što je znatno veća količina od prethodno utvrđenih za ovu biljnu vrstu. Ostali biljni organi ove biljke su također sadržavali značajne količine **69**, i to $47,53 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u listu, $28,01 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u korijenu te $26,65 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u stabljici. Glukozinolat **69** prati i odgovarajući metilsulfanilni analog, 8-(metilsulfanil)oktil-glukozinolat (**92**) kojeg je najviše bilo u korijenu, $16,18 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Dakle, profilom ove biljke dominiraju glukozinolati duljine lanca C8 koja odgovara šest serija produljenja lanca u ranoj biosintezi iz aminokiseline metionin. *B. laevigata* je sadržavala najveću količinu **69** u cvijetu ($57,87 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW) i listu ($51,06 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW), zatim $45,81 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u komušci, $38,44 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u korijenu i najmanju količinu u stabljici $8,47 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Zanimljivo je da je isti princip raspodjele sadržaja **69** osim u ove dvije biljke, bio i kod *B. cichoriifolia* s najvećom količinom $17,45 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW u cvijetu. Kvantizacija glukozinolata u zadnje dvije navedene biljnih vrsta do sada nije precizno izvršena te ovo predstavlja prve podatke o sadržaju glukozinolata u pojedinim tkivima ovih biljaka.

Arilalifatski glukozinolati

Arilalifatski glukozinolati potječu od aromatskih aminokiselina fenilalanina i tirozina te se obično nalaze u biljkama porodice Brassicaceae. Najveći sadržaj glukosinalbina (**23**) ($250 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW) pronađen je u sjemenu *Sinapis alba* ^[116], nešto manje količine u sjemenu *Noccaea caerulescens* ($83,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW) i listu *Kremeriella cordylocarpus* ($76,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[100, 117] *Pringlea antiscorbutica* i *Nasturtium officinale* također

predstavljaju dobar izvor glukotropeolina (**11**) odnosno glukonasturcina (**105**) sa sadržajem do 50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW.^[118] Visok sadržaj **105** prisutan je u *Barbarea* spp., do 100 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, kao i glukobarbarina (**40S**) (do 90 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) i epiglukobarbarina (**40R**) (do 55 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[19, 119] Višestrukosupstituirani glukozinolati su usko prisutni u porodici Brassicaceae. Utvrđeno je da je sjeme *Coronopus squamatus* španjolskog podrijetla dobar izvor 3,4,5-trimetoksibenzil-glukozinolata (**114**) (50-75 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[19]

U ovom istraživanju, najbolji izvor glukozinolata **11** predstavlja biljka *Lepidium didymum* sa 221,63 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u kumušci. Ostali dijelovi biljke također su sadržavali značajnije količine glukozinolata **11**: 58,74 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u listu i 51,04 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u stabljici. Glukozinolat **105** je glavni glukozinolat u raštici (*Brassica oleracea* ssp. *acephala*) s najvećim utvrđenim sadržajem 34,02 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u korijenu.

Glukozinolat **23** je izoliran iz sjemena *Sinapis alba* za kojeg je utvrđeno da jedini prisutan glukozinolat i to u količini od 34,86 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Biljka *L. graminifolium* sadržavala je najveću količinu izomera glukozinolata **23**, glukolepigramina (**22**) u kumušci, 75,82 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Disupstituirani 3,4-dihidroksibenzil-glukozinolat (**14**) bio je prisutan samo u dvije biljke *Hesperis laciniata* i *Thlaspi perfoliatum* s vrlo malom količinom, kao i 3,4-dimetoksibenzil-glukozinolat (**15**) prisutan u *L. graminifolium* u tragovima. Vrlo specifičan trisupstituirani 3,5-dimetoksisinalbin (**152**) pronađen je u biljkama *Cardamine hirsuta* (1,24 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) te u *L. graminifolium* s najvećim sadržajem u listu, 14,88 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Trisupstituirani arilalifatski glukozinolat **114** identificiran je samo u *L. graminifolium* sa 35,20 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u korijenu.

Indolni glukozinolati

Cvjetni pupoljci biljke *Isatis canescens* predstavljaju dobar izvor glukobrasicina (**43**) sa sadržajem do 60 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW.^[120] 1,4-Dimetoksiglukobrasicin (**138**) je prvi puta izoliran i strukturno potvrđen iz korijena *Barbarea vulgaris* R. Br. ssp. *arcuata* koji je sadržavao 0,5 – 3,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW ovog glukozinolata.^[121] Ovaj glukozinolat, s neuobičajenim pokrajnjim lanacem, također je nedavno otkriven u korijenu *Cardamine pratensis* (0,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[122] Utvrđeno je da ekstrakti *Isatis tinctoria* sadrže *N*-sulfoglukobrasicin (**112**) (11,3 – 13,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[97]

Indolni glukozinolati su široko zastupljeni u istraženim biljkama porodice Brassicaceae gdje u većini slučajeva nisu glavni glukozinolati, odnosno njihov sadržaj ne

prelazi 1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Raspodjela indolnih glukozinolata među biljnim tkivima prilično je specifična za vrstu, ali najčešće su prisutni u korijenu biljaka. Glukozinolat **43** je općenito glavni indolni glukozinolat, a najveći sadržaj pronađen je u listu *Sysimbrium officinale* (5,72 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Monosupstituirani derivati **43** bili su u najzastupljeniji u korijenu: 4-hidroksiglukobrasicin (**28**) u *Thlaspi alliaceum* s 2,94 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, 4-metoksiglukobrasicin (**48**) s 1,93 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u *Brassica oleracea* ssp. *acephala* te neoglukobrasicin (**47**) s 5,18 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u *S. officinale*.

Disupstituirani glukozinolat **138** prisutan je u korijenu *T. alliaceum* u tragovima, a u *Hirschfeldia incana* sa vrlo malih 0,38 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, što predstavlja prvi podatak o prisustvu ovog glukozinolata u ovim biljnim vrstama. Također, struktura tog glukozinolata određena je prvi put. Ujedno, ovim je naglašena prednost analize i kvantizacije glukozinolata preko njihovih desulfatiranih oblika s obzirom na čistoću uzoraka što omogućava uočavanje i glukozinolata prisutnih u tragovima. Unatoč vrlo maloj koncentraciji ovog desulfoglukozinolata, metoda je omogućila dobivanje MS2 spektra neophodnog za interpretaciju strukture, što je od osobitog značaja u slučajevima sumnje na nove glukozinolate. Tako je na isti način novopredloženi disupstituirani, 4-hidroksi-1-metoksiglukobrasicin (**[161]**) uočen samo u korijenu *T. alliaceum* s 0,41 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW.

Višestrukoglikozilirani glukozinolati

O-Glikozilirani glukozinolat, koji sadrži L-ramnozu kao dodatnu šećernu jedinicu, glukomoringin (**110**) identificiran je u *Noccaea caerulea* što je prvi podatak o ovom tipu glukozinolatu u porodici Brassicaceae. Identificiran je kao glavni glukozinolat u 10 od 13 populacija prikupljenih s različitih lokacija u Europi, s najvećom koncentracijom u sjemenu (do 111,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[117] Tek nedavno, analizom intaktnih glukozinolata, **110** je identificiran u još jednoj vrsti, *Hesperis laciniata*, sabranoj u Hrvatskoj.^[12] U ovoj doktorskoj disertaciji, po prvi puta je određen i njegov sadržaj u različitim dijelovima biljke, s najvišim u korijenu 15,71 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, odnosno 10,77 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u listu. Dodatno, identificiran je i njegov *orto*-izomer 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzilglukozinolat (**109**), i to samo u stabljici s 1,93 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Glukozinolat **110** je po prvi put identificiran i u *Thlaspi perfoliatum*, ali u nešto manjem sadržaju, 2,47 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u listu. Sadržaj novog višestrukoglikoziliranog glukozinolata, s apiozom vezanom na benzen u pokrajnjem lancu, 4'-O- β -D-apiofuranozilglukomatronalin (**157**) prvi put je određen u ovom istraživanju u biljkama *H. laciniata* i *T. perfoliatum*. U obje biljke, **157**

je bio glavni glukozinolat, s najvećim sadržajem u listu, 115,08 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u *H. laciniata*, odnosno 99,84 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u *T. perfoliatum*. Vrlo visok sadržaj pronađen je i u svim ostalim biljnim organima *H. laciniata*: cvijet (108,91 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), korijen (94,39 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) i stabljika (51,34 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), kao i *T. perfoliatum*: komuška (87,40 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), stabljika (18,73 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) i korijen (16,38 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Glavni glukozinolat uz **157**, u *T. perfoliatum* bio je 4'-O-(β -D-apiofuranoziloksi)benzil-glukozinolat (**[160]**), čiji sadržaj je najveći u komušci, 104,16 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, a prati ga list sa 66,88 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, stabljika s 25,20 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW i korijen s 20,52 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. U *H. laciniata* najviša utvrđena količina **[160]** iznosila je 27,49 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u cvijetu. Pretpostavlja se da spojevi koji sadrže apiozu u svojoj strukturi imaju mnoštvo različitih fizioloških funkcija u biljkama te njihova uloga predstavlja izazovno područje istraživanja. Istraživanjem biljke *H. matronalis* uočeno je da apiozilirani glukozinolati djeluju kao snažni stimulansi hranjenja eurosibirskog žiška (*Ceutorhynchus inaeffectatus* Gyllenhal) u odnosu na druge istraživane glukozinolate, kao što su sinigrin i ostali nesupstituirani glukozinolati.^[27]

4.2. Capparidaceae

Metilni glukozinolat (glukokaparin, **51**) je glavni glukozinolat u većini vrsta ove biljne porodice. Ovaj najjednostavniji poznati glukozinolat jedini biosintetski potječe od aminokiseline alanina te se iznimno rijetko i to u tragovima, pojavljuje u biljkama porodice Brassicaceae.^[3] Zastupljen je i u porodici Cleomaceae čiji su rodovi prethodno bili uključeni u obitelj Capparidaceae, ali su izdvojeni kao posebna porodica kada su DNA dokazi sugerirali da su bliži srodnici porodice Brassicaceae nego Capparidaceae.^[123] Prema bazi podataka Flora Croatica, biljke iz biljne porodice Cleomaceae nisu zastupljene na tlu R. Hrvatske. Mithen i sur. su opisali kvalitativni glukozinolatni profil biljaka Starog i Novog svijeta Capparidaceae porodice. Prema ovoj podjeli vrste iz Starog svijeta imaju visoke razine glukozinolata **51**, s tri iznimke, *Boscia longifolia* i *Capparis tomentosa* s visokim sadržajem hidroksimetilbutil-glukozinolata i hidroksietil-glukozinolata te *Maerua triphylla*, gdje je glukobrasicin (**43**) bio najzastupljeniji.^[48] Najveći sadržaj **51** pronađen je u sjemenkama *C. spinosa*, do 127 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW.^[19, 124, 125] MS analizom intaktnih glukozinolata u cvjetnim pupovima *C. spinosa* osim **51** identificirani su i izopropil/n-propil-glukozinolat, merkaptoglukokaparin, (**43**) i glukosisaustricin, (**30**)^[11, 126] te neuobičajeni glicinil-glukokaparin te disulfanil-glukokaparin i trisulfanil-glukokaparin.^[11] Dok sve Capparidaceae Starog svijeta sadrže **51**, Capparidaceae Novog svijeta, uključujući rod *Capparis*, sadrže ili jedan (glukozinolat **51**) ili nekoliko karakterističnih složenih i nerazriješenih struktura, što ukazuje na nove biosintetske putove glukozinolata. Mithen i sur. su na temelju kvalitativnih profila uočili da određene biljne vrste Capparidaceae Novog svijeta imaju visok sadržaj **51**, dok kod drugih isti nedostaje, ali su prisutni glukozinolati čije mase odgovaraju dugolančanim glukozinolatima izvedenim iz metionina ili onima izvedenim iz aminokiselina razgranatog lanca. U određenim vrstama roda *Morisonia* i *Atamisquea*, LC-MS/MS analizom na osnovi karakterističnih fragmenata, pretpostavljeno je postojanje novih glukozinolata čije strukture nisu potvrđene.^[48]

Montaut i sur. (2019.) istraživali su glukozinolatni profil grmovite kapare, *Capparis spinosa* ssp. *cordifolia* (Lam.) Fici, autohtone vrste u Francuskoj Polineziji te identificirali jedino **51** u listu i stabljici.^[127]

U ovom radu, u svrhu istraživanja ove biljne porodice, provedena je kvalitativna i kvantitativna analiza glukozinolata u tri vrste roda *Capparis* i u *Maerua baillonii*. Rezultati su prikazani u tablicama 4.2.1. i 4.2.2.

Tablica 4.2.1. Kvalitativna analiza glukozinolata u biljnim vrstama porodice Capparidaceae. Brojevi odgovaraju brojevima tablici 2.3.1.

Rod	Ala	Ile	Trp	Phe	Met
Vrsta					
Lokacija sabiranja					
<i>Capparis</i>					
<i>C. orientalis</i>					
Hrvatska					
Brač	51		43		68
Hvar	51		43	11	68, 69
Mali Ston	51		43		
Split	51		43		
Zadar	51	61	28, 43		
<i>C. spinosa</i>	51		28		
<i>C. micracantha</i>	51				
<i>Maerua</i>					
<i>M. baillonii</i>	51		28		

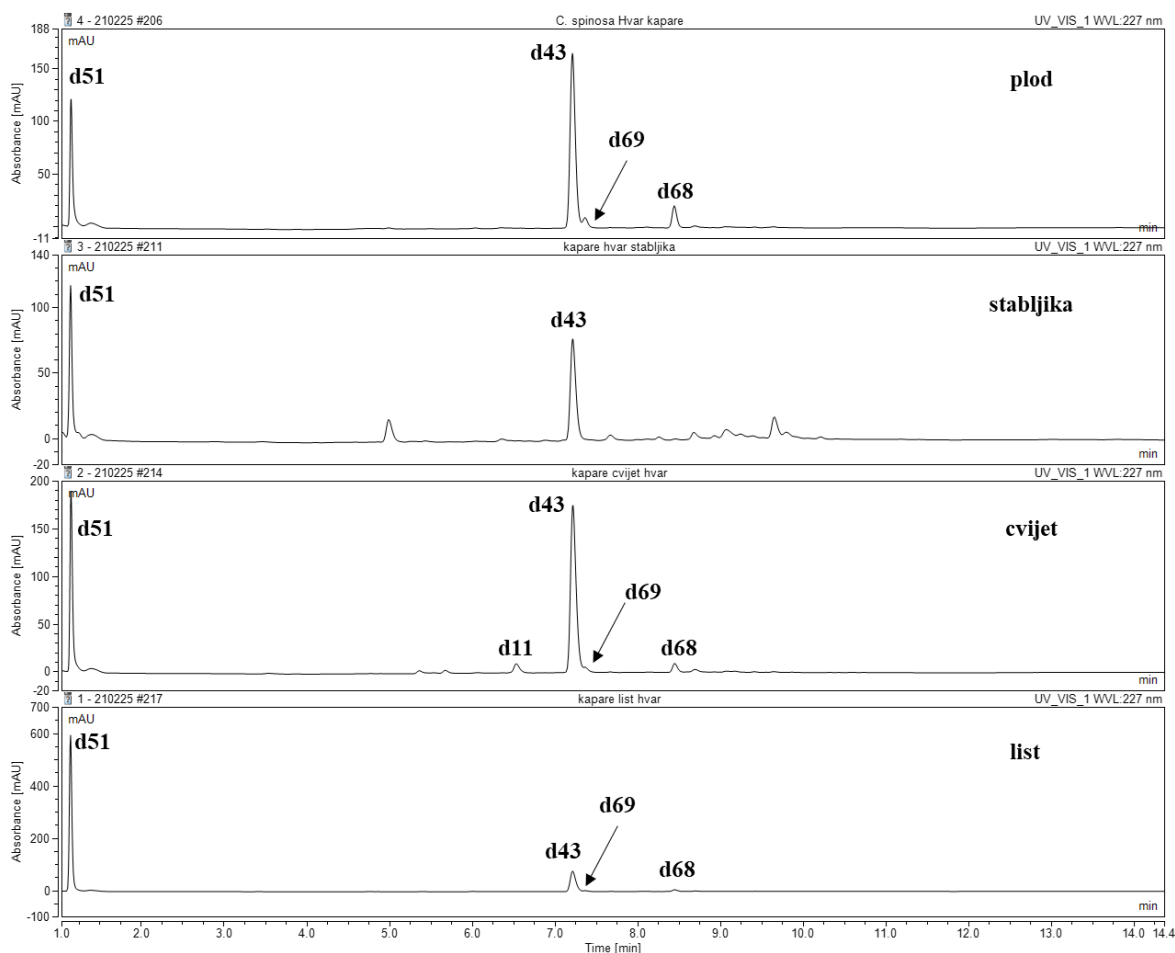
Podebljani brojevi predstavljaju glavne glukozinolate.

Tablica 4.2.2. Kvantitativna analiza glukozinolata u pojedinim biljnim organima istraživanih biljaka porodice Capparidaceae.

Rod	Identificirani	Sadržaj	Biljni
Vrsta	glukozinolat	($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)	organ
Lokacija sabiranja			
<i>Capparis</i>			
<i>C. orientalis</i>			
Hrvatska			
Brač			
Ala	Glukokaparin (51)	4,66; 5,52; 5,84; 9,34	st, pl, cv, l
Trp	Glukobrasicin (43)	0,26; 0,41; 1,22; 2,18	st, cv, l, pl
Met	Glukoarabin (68)	tr; tr	st, cv

Hvar			
Ala	Glukokaparin (51)	2,72; 2,83; 4,26; 13,39	pl, st, cv, l
Trp	Glukobrasicin (43)	0,84; 1,70; 1,92; 8,44	st, pl, cv, l
Met	Glukoarabin (68)	0,11; 0,58; 2,11	l, pl, cv
	Glukohirsutin (69)	0,18; 0,28; 0,99	l, pl, cv
Phe	Glukotropeolin (11)	0,29	cv
Mali Ston			
Ala	Glukokaparin (51)	47,40; 57,21; 132,74; 180,21	pl, l, cv, st
Trp	Glukobrasicin (43)	0,30; 0,43; 0,47; 0,62	pl, st, l, cv
Split			
Ala	Glukokaparin (51)	4,49; 5,60; 6,95; 7,03	pl, cv, l, st
Trp	Glukobrasicin (43)	1,04; 1,15; 3,18; 7,78	cv, pl, st, l
Zadar			
Ala	Glukokaparin (51)	40,43; 106,21; 132,75; 181,55	pl, st, cv, l
Ile	Glukokohlearin (61)	tr	cv
Trp	Glukobrasicin (43)	0,62; 1,41; 1,69; 2,33	cv, st, l, pl
	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	tr; tr	cv, l
<i>C. spinosa</i>			
Ala	Glukokaparin (51)	19,59; 28,29; 30,80; 49,04	l, cv, pl, st
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	0,47	st
<i>C. micracantha</i>			
Ala	Glukokaparin (51)	4,02	l
<i>Maerua</i>			
<i>M. baillonii</i>			
Ala	Glukokaparin (51)	12,90	pl
Trp	4-Hidroksiglukobrasicin (28)	1,03	pl

Na području Srednje i Južne Dalmacije, kao jedini predstavnik porodice Capparidaceae, raste *C. orientalis* te je ova vrsta sabrana na različitim lokacijama, Zadar, Split, Brač, Hvar i Mali Ston. Kromatogrami dobiveni analizom različitih biljnih organa prikazani su na slici 4.2.1. U svim biljkama **51** je identificiran kao glavni glukozinolat, i to redom: u listu (6,95 – 181,55 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), stabljici (2,83 – 180,21 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), cvijet (4,26 – 132,74 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) te plod (2,72 – 47,40 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).



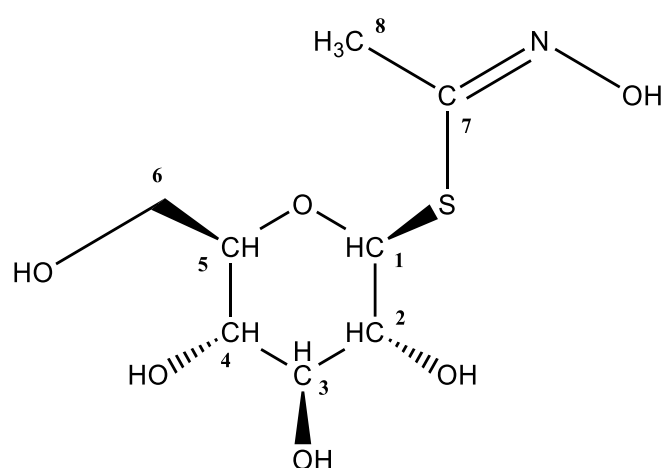
Slika 4.2.1. UHPLC kromatogram glukozinolatnog profila *C. orientalis* sabranog na Hvaru. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 2.3.1. te slici 2.3.1.

Identificirani su i indolni glukozinolati, i to **43** s najvećim sadržajem u listu (0,47 – 8,44 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) te 4-hidroksiglukobracicin (**28**) koji je identificiran samo u cvijetu i listu kapare iz Zadra i to u tragovima. Arilalifatski glukotropeolin (**11**) pronađen je samo u cvijetu kapare s Hvara. Prema do sada dostupnim informacijama o porodici Capparidaceae, jedini prethodno identificiran glukozinolat ove vrste je glukonasturcin (**105**) u dvije vrste kapara koje rastu u Turskoj.^[124]

Pronađeni su također i glukozinolati koji potječu od metionina, dugolančani glukoarabin (**68**) u uzorcima s Brača i Hvara i glukohirsutin (**69**) u uzorku s Hvara. Kako je već prethodno opisano, postojanje dugolančanih glukozinolata iz metionina su sugerirali Mithen i sur. Ovo istraživanje, u kojem su prema dostupnim informacijama, po prvi puta identificirani **68** i **69**, predstavlja prvi konkretniji dokaz biosinteze C8 i C9 metilsulfinilnih glukozinolata u ovoj biljnoj porodici. Prethodno su identificirani C3 i C5 glukozinolati, i to gluoiberin (**73**) i gluoalisin (**72**). Glukokohlearin (**61**) koji potječe iz aminokiseline izoleucina pronađen je u tragovima samo u cvijetu kapare iz Zadra.

Za razliku od *C. orientalis* koja je karakteristična vrsta kod nas, *C. spinosa* sabrana u Kordobi (Španjolska) morfološki se razlikovala jer je na stabljici imala vidljivo trnje. Pored **51** (19,59 – 49,04 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) koji je predstavljao glavni glukozinolat u svim biljnim tkivima, LC-MS/MS analizom identificiran je i **28** i to samo u stabljici (0,47 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Analiziran je i uzorak lista *C. micracantha*, stabla iz Botaničkog vrta u Beču (Austrija), koje je karakteristično za područje Južne Azije te uzorak ploda *Maerua baillonii*, autohtonog manjeg stabla s Madagaskara (Afrika). *C. micracantha* sadržava samo **51** (4,02 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), dok *M. baillonii* osim **51** (12,90 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), sadržava i **28**.

U svrhu izolacije **51** odabran je list kapare sabrane u Zadru te je struktura potvrđena koristeći ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY i HSQC (tablica 4.2.3., slike 4.2.2., 8.3.17.-8.3.20.).



Slika 4.2.2. Struktura desulfoglukokaparina, **d51**.

Tablica 4.2.3. Asignacije u ^1H i ^{13}C NMR-u za desulfoglukokaparin.

H-atom	δ / ppm	Multiplentnost	C-atom	δ / ppm
H-1	4,98	d, CH	C-1	81,38
H-2/4	3,39	ddd, CH / CH	C-2	71,99
			C-3	77,11
H-3/5	3,50	m, CH / CH	C-4	69,27
			C-5	79,88
H-6R	3,64	dd, CH	C-6	60,71
H-6S	3,84	dd, CH		
H-8	2,22	s, CH ₃	C-7	154,10
			C-8	17,74

Glukokaparin predstavlja najjednostavniju strukturu glukozinolata zbog pokrajnjeg lanca koji sadržava samo metilnu skupinu. U ^1H NMR spektru **d51** (slika 8.3.17.) signal koji odgovara ovoj skupini uočava se kao najzasjenjeniji singlet na 2,22 ppm. Ostali signali odnose se na protone glukozne jedinice te kao što je do sada slučaj najodsjenjeniji je anomerni vodik izravno vezan na sumpor i kisik. Redosljed kemijskih pomaka za protone glukopiranozne jedinice koji je prethodno opisan za desulfoglukoiberin, odgovara i u ovom slučaju budući da je riječ o alifatskom glukozinolatu.

4.3. Moringaceae

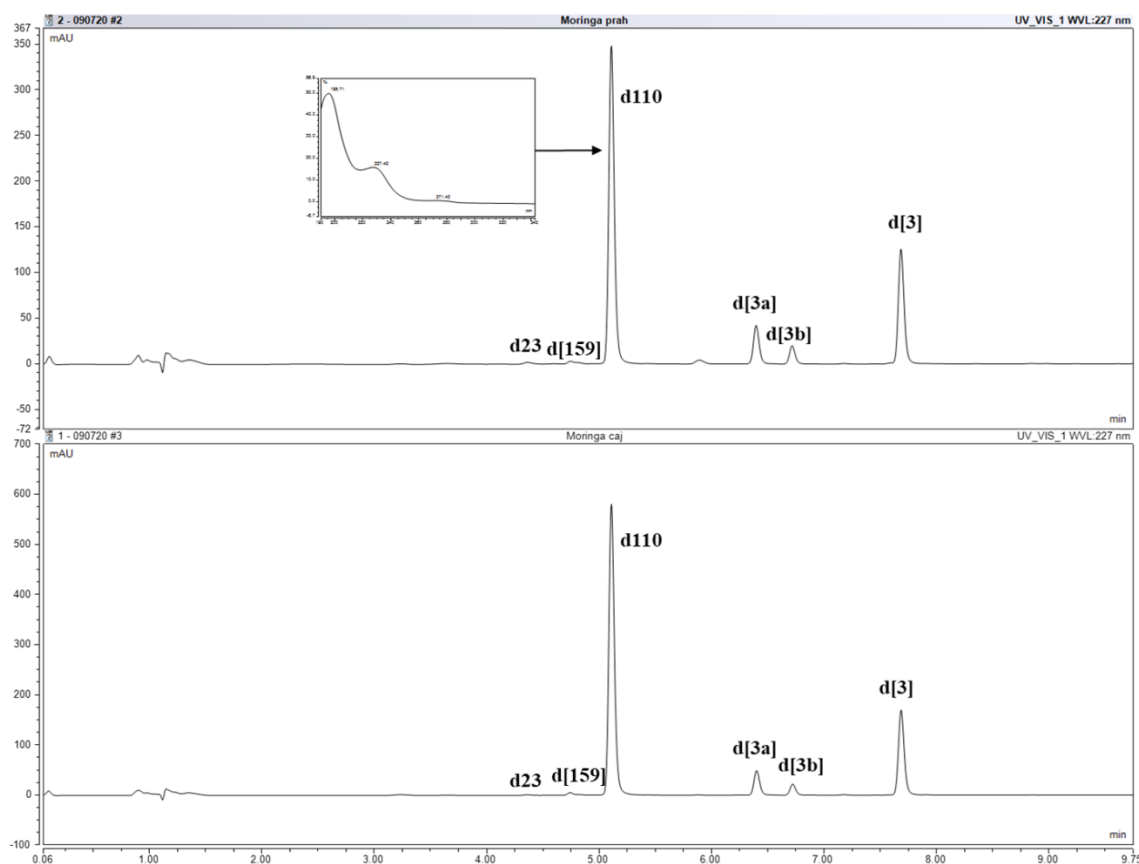
Sve biljne vrste roda *Moringa* sadrže vrlo velike količine 4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolata (glukomoringin, **110**) u svim dijelovima biljke.^[3] Najveća količina zabilježena je u sjemenkama *M. oleifera* i *M. stenopetala*, i to 450 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, što predstavlja preko 25 % osušenog biljnog materijala. Ovaj glukozinolat je također pronađen kao dominantan u listu (9,3-122,9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), korijenu (3,5-71,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), stabljici (23,8-28,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) i kori (17,9- 38,7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Osim toga, listovi biljaka iz roda *Moringa* također sadrže niže količine triju *O*-acetiliranih izomera **110**.^[128] Dok je acetilni derivat s acetilnom skupinom na 4'-položaju ramnoze već poznat i djelomično okarakteriziran (**[3]**), postoje i drugi izomeri s acetilnim skupinama na 2'- i 3'-položajima koji trebaju dodatne potvrde strukture.^[4]

Prethodnim istraživanjima korijena biljaka *M. oleifera* i *M. stenopetala* utvrđene su visoke koncentracije glukotropeolina (**11**) (do 75,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Dodatno, u *M. oleiferi* su identificirani i niži sulfinilni homolozi koji nikada do tada nisu identificirani, kao što su glucoiberin (**73**) i glukorafanin (**64**).^[129]

U ovom istraživanju, analizom uzoraka lista *M. oleifera* identificirani su desulfoglukomoringin (**d110**) kao glavni (29,23 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), tri *O*-acetilirana izomera desulfoglukomoringina te desulfoglukosinalbin (**d23**) u tragovima (tablica 4.3.1. i slika 4.3.1).

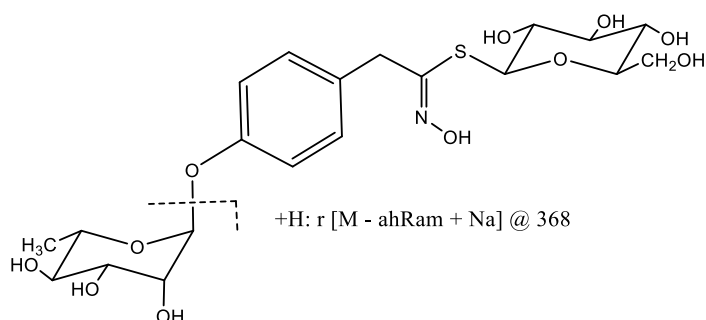
Tablica 4.3.1. Kvantitativna analiza lista *Moringa oleifera*.

Rod	Identificirani glukozinolat	Sadržaj ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)
Vrsta		
Aminokiselinski prekursor		
<i>Moringa</i>		
<i>M. oleifera</i>		
Phe/Tyr	<i>O</i> -acetilirani glukomoringin izomer 1 ([3a])	2,73
	<i>O</i> -acetilirani glukomoringin izomer 2 ([3b])	1,27
	<i>O</i> -acetilirani glukomoringin izomer 3 ([3])	9,46
	Glukosinalbin (23)	tr
	Glukomoringin (110)	29,23



Slika 4.3.1. UHPLC kromatogrami desulfoglukozinolata u *Moringa oleifera*. Brojevi odgovaraju tablici 2.3.1. i slici 2.3.1. **d[159]** – desulfo oblik *orto* ili *meta* hidroksi-4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolata.

U poglavlju 8 Prilozi prikazani su MS2 spektri **d110** pri različitim kolizijskim energijama, 20 i 30 V. Fragment m/z 368 u MS2 nastaje uslijed eliminacije anhidroramnoze koja je karakteristična za *O*-ramnozilirane glukozinolate (slika 4.3.2.).

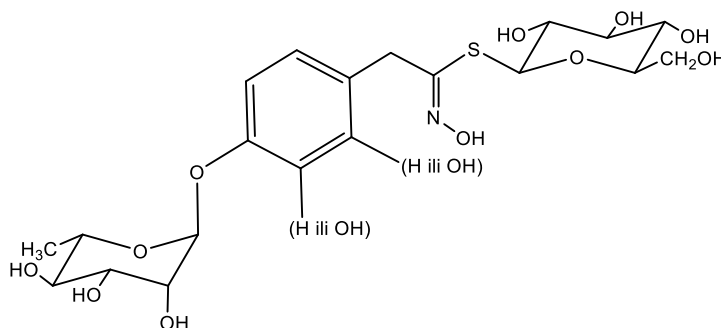


Slika 4.3.2. Nastanak fragmenta m/z 368 u desulfoglukomoringinu (**d110**).

Ramnoza sadržava tri hidroksilne skupine koje se mogu acetilirati te su sva tri desulfoglukozinolata uočena u uzorku *M. oleifera*, ali u različitim količinama. Pretpostavka je da izomer s najvećim sadržajem $9,46 \mu\text{mol g}^{-1}$ odgovara acetilaciji

hidroksilne skupine ramnoze u 4'-položaju. Snimljeni su njihovi MS2 spektri koji do sada nisu zabilježeni u literaturi. Svi spektri, osim uobičajenih fragmenata a i b, sadržavaju i m/z 368 koji predstavlja ostatak od eliminacije anhidroramnoze, čiji fragment je vidljiv na m/z 211. Pojava različitih fragmenata potvrđuje da je riječ o različitim mjestima acetiliranja, ali ne daje dovoljno informacija za utvrđivanje strukture. Prethodna istraživanja pokazala su da tijekom desulfatacije može doći do hidrolize ramnozidne veze u glukomoringinu pri čemu kao artefakt nastaje glukosinalbin.

Za signal na $t_R = 5,10$ min i $m/z = 530$ pretpostavljeno je da se radi o novom glukozinolatu, točnije hidroksiliranom **d110** koji je označen [159] čija predložena struktura je dana na slici 4.3.3.



Slika 4.3.3. Predložena struktura *orto* ili *meta* hidroksi-4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolata **d[159]**.

Fahey i sur. (2018.) istraživali su glukozinolate u moringi te po prvi puta predložili strukturu s varijacijom glikozidnog dijela u bočnom lancu **110**. Naime, identificirani glukozinolat je imao masu 16 Da višu od **110** te je pretpostavljena dodatna OH skupina na 6'-poziciji ramnozidne jedinice od **110** čime ona postaje L-glukozidnom jedinicom. Međutim, predložena struktura, „4-(α -L-glukopiranoziloksi)benzil-glukozinolata” je u suprotnosti s prikazanim NMR podacima.^[130]

Za razliku od predložene strukture s *para*-disupstituiranim benzenskim prstenom, točnije četiri benzenska protona, u ^1H NMR spektru iz integracije su vidljiva samo tri benzenska protona, očito singlet i dva dubleta što je jasno i iz COSY spektra. Dakle, spektar jasno sugerira glukozinolat s trisupstituiranim benzenskim prstenom. Struktura je zaista hidroksilni derivat **110**, ali s hidroksilnom skupinom na benzenskom prstenu. Dodatno, u ^1H NMR spektru je vidljiv i signal koji odgovara metilnoj skupini (dublet pri

1,2 ppm koji integracijom odgovara 3H) što potvrđuje da je riječ o glukozinolatu s ramnozidnom jedinicom budući da metilna skupina ne postoji u glukozidnoj jedinici.

Slijedom informacija iz literature, pretpostavljeno je da je riječ o istom glukozinolatu i u ovom uzorku te se pristupilo snimanju i analizi MS2 spektara. Ista vrsta fragmentacije uočena je i za m/z 530 gdje je eliminacijom anhidroramnoze nastao očekivani fragment m/z 384.

4.4. Resedaceae

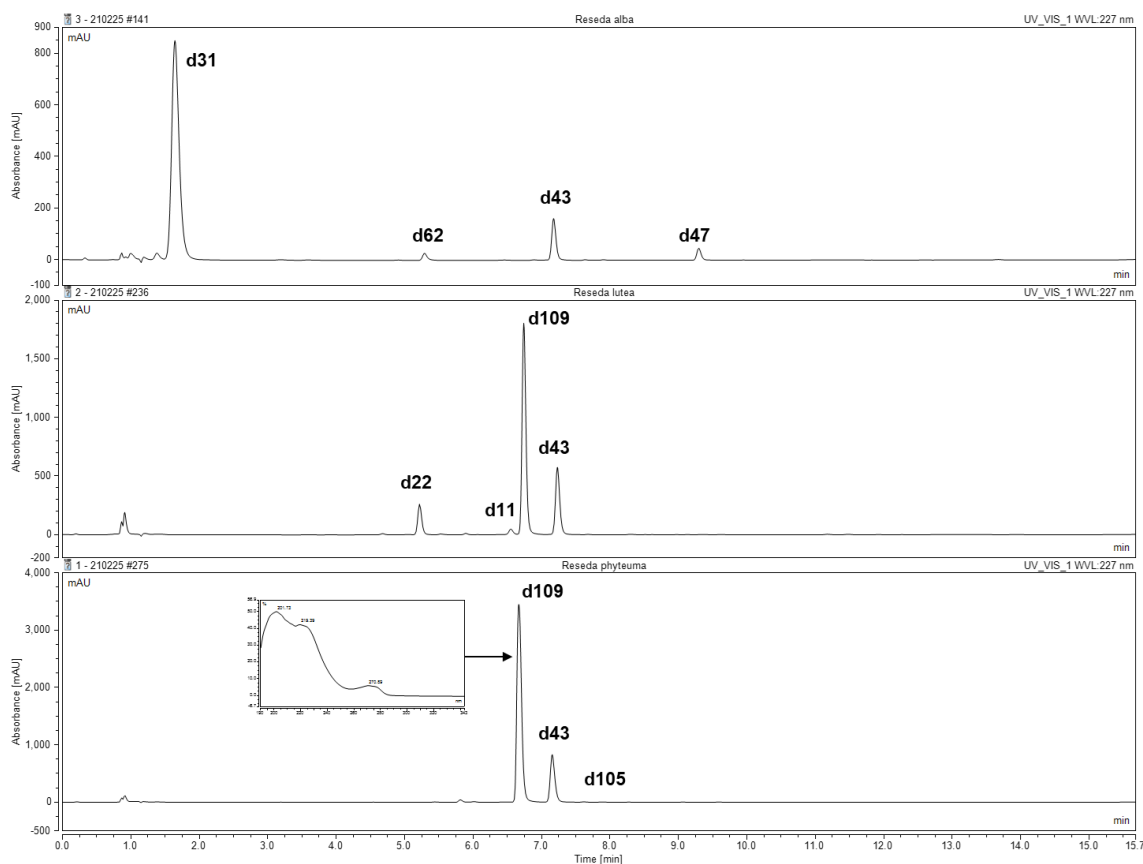
Bennett i sur. (2004.) su u sjemenu vrste *Reseda luteola* i *R. odorata* identificirali arilalifatske i indolne glukozinolate, dok je *O*-glikozilirani glukozinolat, 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat (**109**) pronađen samo u *R. lutea* (25,0 – 50,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Dva arilalifatska glukozinolata, glukobarbarin (**40S**) i epiglukobarbarin (**40R**), identificirana su u *R. luteola* sadržaja u rasponu 0,1 – 10,0 odnosno 25,0 – 50,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. U istom radu, u sjemenu *Caylusea abyssinica*, uz iste arilalifatske glukozinolate, pronađen je i glukonasturcin (**105**), te **40R** s najvišim sadržajem (10,0 – 25,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[19] Prisutnost **40S** u *R. luteola* je potvrđena unatoč velikoj evolucijskoj udaljenosti od roda *Barbarea* (Brassicaceae). Agerbirk i sur. (2021.) istraživali su ovu biljku te odredili sadržaj **40R** koji je u sjemenu odgovarao 5 % ukupnog sadržaja enantiomernih glukobarbarina, odnosno 1 % u listu. Različiti udio epimernih glukobarbarina u sjemenu i listu *R. luteola* sugerira da je svaki epimer posljedica različitog genetskog lokusa i biosintetskog enzima, kao što je slučaj u *B. vulgaris*.^[107] Glukozinolat **40S** je identificiran kao glavni glukozinolat u listu *R. luteola* i činio je preko 90 % od ukupnih glukozinolata sa površine lista (0,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ svježeg biljnog materijala).^[19]

Indolni glukozinolat glukobrasicin (**43**) pronađen je u sjemenu *R. odorata* u rasponu 10,0 – 25,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Za razliku od drugih vrsta iz roda *Reseda*, samo *R. lutea* povremeno sadrži *O*-glikozilirani 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat (**109**) s koncentracijom u rasponu 25,0 – 50,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW.^[19] Mithen i sur. (2010.) su utvrdili **109** kao prevladavajući glukozinolat u *R. lutea*, *R. odorata*, *R. phyteuma* i *R. stricta* prilikom istraživanja glukozinolatnih profila svježeg lišća i sjemena različitih vrsta roda *Reseda*. S druge strane *R. suffruticosa* pretežno je sadržavala **105** i jednostavne glukozinolate izvedene iz aminokiselina s razgranatim pokrajnjim lancem.^[48] U porodici Resedaceae, izvan roda *Reseda*, glukozinolat **109** pronađen je još u biljci *Ochradenus baccatus* s 7,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u korijenu.^[13] Fahey i sur. (2001.) navode glukozinolate u *R. alba*, identificirane na temelju razgradnih produkata, i to hidroksialifatski glukozinolat glukokonringin (**31**), zatim dva arilalifatska glukosinalbin (**23**) i **105** te indolni **43**.^[6]

Glukozinolat 2-(α -L-arabinopiranoziloksi)-2-feniletil-glukozinolat (**4**) je prvi identificirani višestrukoglikozilirani glukozinolat koji sadrži arabinozu kao dodatnu šećernu jedinicu. Izoliran je iz biljke *Sesamoides interrupta*, a pronađen je i u biljci

drugog roda, *R. phyteuma*.^[131] Nedavno je pronađen još jedan arabinozilirani glukozinolat, 2''-O-(α -L-arabinopiranoziloksi)benzil-glukozinolat (**158**) u korijenu pustinjske biljke *Ochradenus baccatus* (4,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) što predstavlja treći rod u porodici Resedaceae u kojemu su identificirani ovi specifični glukozinolati.^[13]

U ovom radu, istraživane su 3 biljne vrste roda *Reseda* iz Republike Hrvatske, *R. alba*, *R. lutea* te *R. phyteuma*. HPLC-DAD-MS/MS analizom utvrđeno je da *R. lutea* i *R. phyteuma* imaju slične glukozinolatne profile, dok je *R. alba* u potpunosti odstupala od njih (slika 4.4.1. te tablice 4.4.1. i 4.4.2.).



Slika 4.4.1. UHPLC kromatogrami biljaka *Reseda alba*, *R. lutea* i *R. phyteuma*. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 2.3.1. i slici 2.3.1.

Tablica 4.4.1. Kvalitativna analiza glukozinolata u različitim biljnim vrstama roda *Reseda*. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 2.3.1.

Rod Vrsta	Ile	Trp	Phe	Phe/Tyr
<i>Reseda</i>				
<i>R. alba</i>	31, 62	43, 47	105	
<i>R. lutea</i>		43	11, 22	109
<i>R. phyteuma</i>		43	11, 105	109

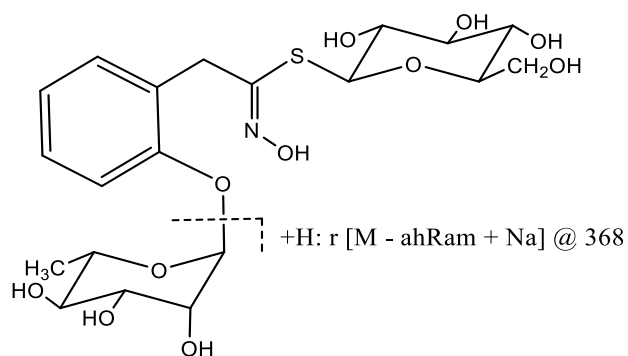
Podebljani brojevi predstavljaju glavne glukozinolate.

Tablica 4.4.2. Kvantitativna analiza glukozinolata u pojedinim biljnim organima istraživanih biljaka roda *Reseda*.

Rod Vrsta Aminokiselinski prekursor	Identificirani glukozinolat	Sadržaj ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)	Biljni organ
<i>Reseda</i>			
<i>R. alba</i> Ile	Glukokonringin (31)	6,48; 19,70; 25,29; 52,72	l, k, st, cv
	Izobutil-glukozinolat (62)	0,13; 0,13; 1,00; 1,13	l, st, cv, k
Trp	Glukobrasicin (43)	0,85; 1,64; 1,69; 3,50	st, cv, k, l
	Neoglukobrasicin (47)	0,23; 0,32; 0,55; 2,74	l, cv, st, k
Phe	Glukonasturcin (105)	0,10; 1,20; 107,77	l, st, k
<i>R. lutea</i>			
Trp	Glukobrasicin (43)	0,76; 2,45; 3,26; 5,92	l, st, k, cv
Phe	Glukotropeolin (11)	0,6; 1,64; 5,67; 106,69	l, cv, st, k
	Glukolepigramin (22)	8,66	cv
	2-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat (109)	8,10; 14,86; 20,50; 57,89	k, st, l, cv

<i>R. phyteuma</i>			
Trp	Glukobrasicin (43)	3,13; 4,79; 8,47; 11,26	kom, l, cv, st
Phe	Glukotropeolin (11)	tr	st
	Glukonasturcin (105)	1,97	st
	2-(α -L-Ramnopiranoziloksi)benzilglukozinolat (109)	50,79; 150,84; 164,37	123,93; st, kom, cv, l

U *R. lutea* identificirani su arilalifatski, indolni te *O*-glikozilirani glukozinolati. Glukotropeolin (**11**) i glukozinolati **109** i **43** su pronađeni u svim biljnim tkivima. Uočeno je da sadržaj **109** u pojedinom tkivu raste kako opada sadržaj **11**. Tako je korijen u najvećoj mjeri sadržavao **11** i to 106,69 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, dok je u cvijetu sadržaj **109** bio najviši, 57,89 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. **109** je izomer glukomoringina (**110**) koji je karakterističan za drugu porodicu, Moringaceae. Osim što je vrijeme zadržavanja **d109** ($t_R = 6,78$ min) dulje u odnosu na **d110**, razlikuju se i u MS2 spektrima. U poglavlju 8. Prilozi prikazani su MS2 spektri **d109** pri različitim kolizijskim energijama, 20 i 30 V. Uočava se karakteristična eliminacija anhidroramnoze (slika 4.4.2.), anhidroglukoze te tioglukoze kao i kod **d110**, s time da se u spektru **d109** pojavljuje i fragment m/z 334 koji nije prisutan u spektru **d110** koji nastaje gubitkom glukoze (m/z 180).



Slika 4.4.2. Nastanak fragmenta m/z 368 za desulfo-2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzilglukozinolot (**d109**).

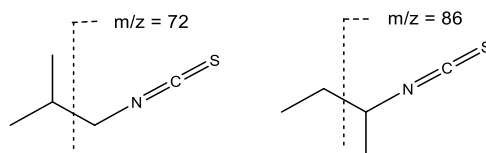
Glukolepigramin (**22**) identificiran je jedino u cvijetu i to 8,66 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, a zanimljivo je da ovaj glukozinolot do sada nije pronađen u ovoj porodici. Zbog toga se na temelju prethodnih saznanja kako glukosinalbin nastaje kao artefakt prilikom desulfatacije **110**, pretpostavilo da se možda i ovdje radi o takvom slučaju. Signal pri $t_R = 5,22$ min i m/z 368 uspoređen je sa standardom desulfoglukosinalbina koji je izoliran i potvrđen NMR-om u ovom radu, kao i sa uzorkom *Lepidium graminifolium* koji je

poslužio kao standard desulfoglukolepigramina, čiji intaktni oblik je već prethodno dokazan.^[132] Na temelju vremena zadržavanja, UV i MS2 spektra potvrđen je **22**.

U svim dijelovima biljke *R. phyteuma* su identificirani *O*-ramnozilirani **109** te indolni **43** glukozinolati. Sadržaj **109** je znatno viši nego u *R. lutei*, čak do 164,37 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW u cvijetu, zbog čega ova biljna vrsta predstavlja dobar izvor ovog glukozinolata. Arilalifatski **11** i **105** identificirani su samo u stabljici i to s vrlo niskim sadržajem.

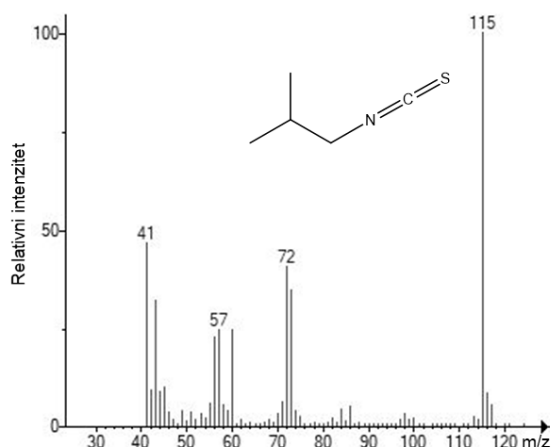
Glukozinolatni profil *R. alba* se znatno razlikuje od preostalih dviju istraživanih vrsta ove porodice. Za dominantan signal desulfoglukozinolata pri $t_R = 1,64$ min i m/z 334 pretpostavljeno je da je riječ o hidroksibutilnom glukozinolatu. Agerbirk i sur. (2021.) uočili su u *R. luteoli* također signal hidroksibutil-glukozinolata te usporedbom sa svojom bazom zaključili kako nije riječ o glukosisaustricinu (**30**), već da bi to mogao biti 4-hidroksibutil-glukozinolot (**26**) podrijetlom iz aminokiseline metionin ili 2-hidroksi-2-metilpropil-glukozinolot (**31**) podrijetlom iz aminokiseline leucin, a kojeg nisu imali dostupnog u svojoj bazi. UHPLC-QTOF MS/MS potvrdio je masu desulfohidroksibutil-glukozinolata (dobiveno je 312,1114 što odgovara izračunatoj masi za $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{NS}^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 312,1112$). Ovaj rezultat bio je u skladu s prethodnim istraživanjima o nespecificiranom hidroksibutilnom glukozinolatu u listovima *R. luteola*.^[107]

Signal m/z 318 može odgovarati dvama izomerima, desulfoglukokohlearinu (**d61**) i desulfoizobutil-glukozinolatu (**d62**). Prema vremenu zadržavanja, $t_R = 5,55$ min, pretpostavljen je **d62**, a za dodatnu potvrdu napravljena je GC-MS analiza razgradnih produkata glukozinolata *R. alba*. Kjær i sur. (1963.) prikazali su MS spektre izobutil-izotiocijanata i *sec*-butil-izotiocijanata u kojima se mogu, uz molekulski ion M^+ (m/z 115), uočiti i karakteristični fragmenti.^[93] Naime, MS spektar *sec*-butil-izotiocijanata koji potječe od glukokohlearina sadržava uočljiv karakterističan fragment m/z 86 nastao β -cijepanjem dok kod izobutil-izotiocijanata taj fragment nije prisutan (slika 4.4.3.).



Slika 4.4.3. Nastanak fragmenata izobutil-izotiocijanata i *sec*-butil-izotiocijanata β -cijepanjem.

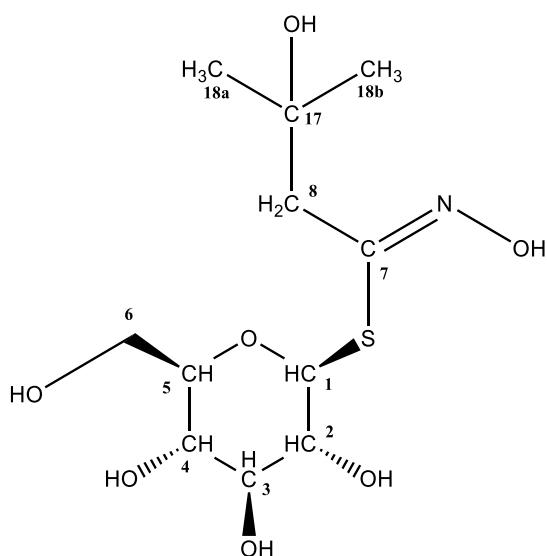
Na slici 4.4.4. je prikazan MS spektar izobutil-izotiocijanata koji nema tog fragmenta.



Slika 4.4.4. MS spektar izobutil-izotiocijanata.

Usporedbom dobivenog spektra i spektra *sec*-butil-izotiocijanata iz baze spektara Zavoda za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta, identificiran je izobutil-izotiocijanat, a samim time i odgovarajući glukozinolat **62**. Kako se **62** biosintetizira iz aminokiseline leucina, ovo je bila dodatna smjernica da je hidroksibutil-glukozinolat upravo glukokonringin (**31**). Pregledom MS2 spektra (prikazanog u poglavlju 8. Prilozi) uočeni su karakteristični fragmenti čiji nastanak je prethodno objašnjen (a, b i c fragmenti) te fragment specifičan za hidroksilirane alifatske desulfoglukozinolate koji potječe od gubitka vode (m/z 316). Sadržaj **31** je najveći u cvijetu *R. alba*, 52,72 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW stoga je izoliran u svom desulfo-obliku u svrhu potvrde strukture NMR-om.

U poglavlju 8. Prilozi se nalaze ^1H , ^{13}C , COSY i HSQC spektri izoliranog desulfoglukozinolata (tablica 4.4.3., slike 4.4.5., 8.3.13.-8.3.16.).



Slika 4.4.5. Struktura desulfoglukokonringina (**d31**).

Tablica 4.4.3. Asignacije u ^1H i ^{13}C NMR-u za desulfoglukokonringin.

H-atom	δ / ppm	Multiplentnost	C-atom	δ / ppm
H-1	5,10	d, CH	C-1	81,92
H-2/4	3,50	ddd, CH / CH	C-2	72,28
			C-3	77,09
H-3/5	3,37	m, CH / CH	C-4	69,27
			C-5	80,03
H-6R	3,64	dd, CH	C-6	62,67
H-6S	3,84	dd, CH		
H-8 R/S	2,66	dd, CH ₂	C-7	152,65
			C-8	43,64
H-18	1,26	dd, CH ₂	C-17	71,07
			C-18	28,00

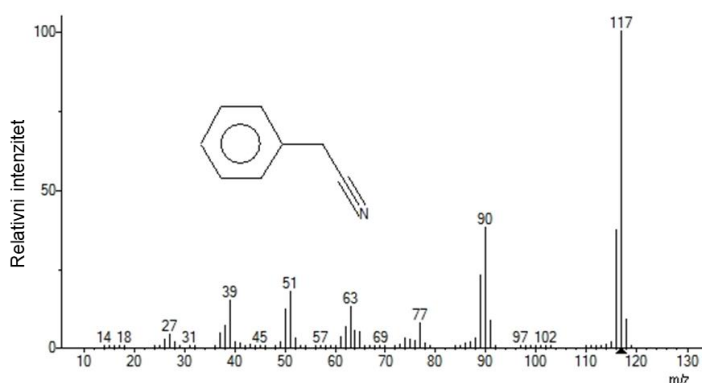
U ^1H NMR spektru **d31** (tablica 4.4.3., slika 8.3.13.) najodsjenjeniji signal odgovara H-1 protonu u glukoznoj jedinici zbog elektronegativnog kisika. Sljedeći skup signala pripada H-6 za kojeg je objašnjeno da se radi o dijastereotopnim metilenskim vodicima, a prema literaturi vrijedi da manji kemijski pomak odgovara H-6R, dok veći odgovara H-6S. Kako je već opisano, kemijski pomaci protona glukopiranozne jedinice alifatskih glukozinolata se odnose $\delta(\text{H-3}) > \delta(\text{H-5}) > \delta(\text{H-4}) > \delta(\text{H-2})$ gdje su vrijednosti H-3 i H-5 vrlo bliske, kao i H-2 i H-4. Da je riječ o izobutil-glukozinolatu potvrđuje i signal na 1,26 ppm čija površina odgovara 6 H. Riječ je o dvije metilne skupine koje su dijastereotopne i označene kao 18.

U ^{13}C NMR spektru (tablica 4.4.3., slika 8.3.14.) uočavaju se dva signala koja nemaju sprezanja s odgovarajućim protonima u HSQC spektru, iz čega proizlazi da odgovaraju kvarternim ugljicima, C7 i C17. Kao i u prethodno opisanim spektrima, C7 je najodsjenjeniji (152,65 ppm) zbog utjecaja elektronegativnog dušika i sumpora, stoga se C17 može pridružiti signalu na 71,07 ppm.

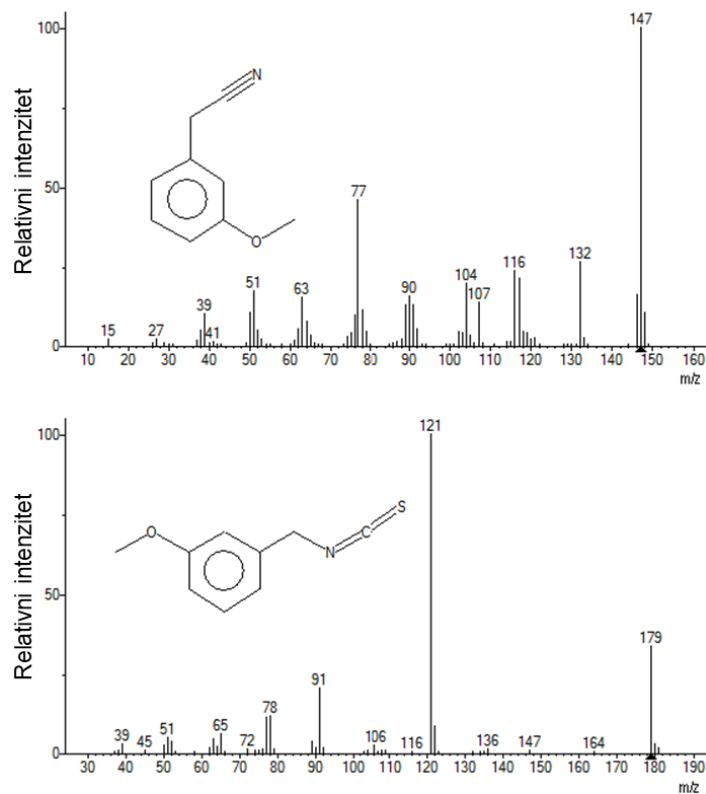
4.5. Tropaeolaceae

Prethodno istraživani glukozinolatni profili *Tropeolum majus*, *T. pereginum* i *T. tuberosum* pokazali su da isti sadrže arilalifatske glukozinolate i to: glukotropeolin (**11**) i glukoaubrietin (**46**), koji su pronađeni kao dominantni u sjemenkama *T. majus*, tj. 100,0, odnosno 50,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. S druge strane, sjemenke *T. pereginum* imale su visok sadržaj glukosinalbina (**23**) i glukozinolata **46**, 125,0 odnosno 50,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Glukozinolat **46** bio je jedini arilalifatski glukozinolat pronađen u sjemenu *T. tuberosum*, sa sadržajem do 90,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Strukturno gledano, ova porodica obuhvaća samo jednostavne arilalifatske glukozinolate.^[3]

U istraživanju sjemena na temelju *T. majus* UHPLC-DAD-MS/MS analize identificirana su dva glukozinolata: i to **11** na vremenu zadržavanja $t_R = 6,50$ min i glukolimnantin (**45**) na vremenu $t_R = 7,20$ min. Glukozinolat **45** predstavlja izomer glukozinolata **46** koji je prethodno pronađen u *T. tuberosum*.^[133] S obzirom da su dobiveni UV spektri i m/z 382 za **45** i **46** jednaki, u svrhu njihovog razlikovanja korišten je standard glukozinolata **45** i utvrđeno je njegovo prisustvo. GC-MS analizom razgradnih produkata dobiveni su spektri 2-fenilacetonitrila (slika 4.5.1., m/z 117 (100%), M^+ ; 90 (45%)) i 3-metoksifenilacetonitrila (slika 4.5.2., m/z 147 (100%), M^+ ; 90 (25%)) koji potvrđuju **11** i **45**. Biosinteza glukozinolata **11** potječe od fenilalanina, a biosinteza glukozinolata **46** može započeti od fenilalanina praćena slijednom hidroksilacijom ili od tirozna. Iako je u prethodnim istraživanjima pokazano prisustvo **23** i **46**, ovo istraživanje ukazuje i na postojanje **45** što upućuje na novi biosintetski put koji je karakterističan za porodicu Limnanthaceae, čije biljne vrste sadrže ovaj spoj kao dominantan glukozinolat.

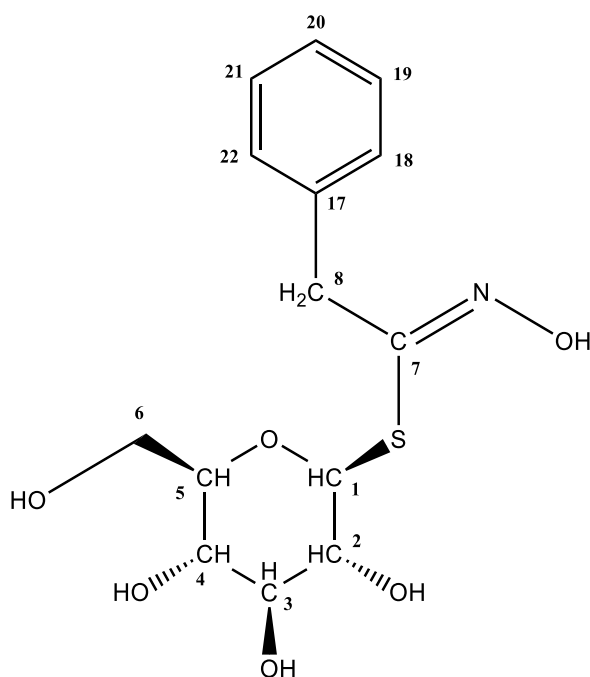


Slika 4.5.1. MS spektar 2-fenilacetonitrila.



Slika 4.5.2. MS spektar 3-metoksifenilacetonitrila i pripadajućeg izotiocijanata.

Kvantizacijom je utvrđeno $127,45 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW spoja **11** u *T. majus*, što predstavlja dobar izvor ovog glukozinolata. Isti je i izoliran te je struktura potvrđena 1D i 2D NMR analizom (tablica 4.5.1., slika 4.5.3., 8.3.5.-8.3.8.).



Slika 4.5.3. Struktura desulfoglukotropeolina (**d11**).

Tablica 4.5.1. Asignacije u ^1H i ^{13}C NMR-u za desulfoglukotropeolin.

H-atom	δ / ppm	C-atom	δ / ppm
H-1	4,72	C-1	81,17
H-2 / 3	3,34	C-2	72,12
		C-3	77,14
H-4	3,42	C-4	68,99
H-5	3,27	C-5	79,86
H-6 R/S	3,68	C-6	60,46
		C-7	154,69
H-8 R/S	4,06	C-8	38,05
		C-17	136,14
H-18	7,38	C-18	128,15
H-19	7,45	C-19	129,19
H-20	7,38	C-20	127,43
H-21	7,45	C-21	129,19
H-22	7,38	C-22	128,15

Promatranjem ^1H NMR spektra (slika 8.3.5.) može se uočiti prisutnost 12 skupina kemijski neekvivalentnih protona. Budući da je riječ o arilalifatskom glukozinolatu, odmah se prepoznaje područje signala koji odgovaraju protonima u benzenskom prstenu. Prema tome, vrijednosti kemijskih pomaka (δ), od 7,45 do 7,38 ppm odgovaraju H-18, H-19, H-20, H-21 i H-22.

Signal pri 4,72 ppm odgovara anomernom protonu (H-1) koji je odsjenjen zbog utjecaja elektronegativnih atoma kisika i sumpora. Potom slijede dva signala (4,06 i 3,68 ppm) čije površine odgovaraju dva protona, stoga se pregledom strukture glukotropeolina, pretpostavlja da je riječ o metilenskim vodicima, označenim s H-8 te H-6. Ovi metilenski protoni su dijastereotopni. Prema spin-spin cijepanju H-8 je očekivano singlet stoga se pomak pri 4,07 ppm pridružuje ovom protonu, a onda pri 3,68 ppm H-6 protonu. Ostali protoni glukozne jedinice su bliskih vrijednosti (od 3,42 do 3,27 ppm). ^{13}C NMR spektar (slika 8.3.6.) sadržava 12 signala, što odgovara pretpostavljenom ako se uzme u obzir da se očekuju iste vrijednosti za određene C atome u bočnom benzenskom prstenu. Najodsjenjeniji ugljikov atom iz tihidroksimatne skupine (C-7) odgovara pomaku od 154,69 ppm. Sljedeći skup signala odgovara benzenskom prstenu pri čemu signal pri 136,14 ppm odgovara kvarternom C-17.

Pridruživanje protona kemijskim pomacima pojednostavljuje se pregledom dvodimenzijskih spektara. ^1H - ^1H COSY spektar (slika 8.3.7.) daje informaciju o strukturi te se prethodno pretpostavljeni redoslijed protona može se potvrditi na sljedeći način: H-4 (3,42 ppm) se spreže sa susjednim H-3 (3,35 ppm) i H-5 (3,27 ppm); a da je H-2 za samo 0,02 ppm niže vrijednosti od H-3 dokazuje signal sprege H-2 na 3,33 ppm s H-1 pri 4,73 ppm. H-5 se spreže ujedno i s H-6 čija je vrijednost kemijskog pomaka već utvrđena kao 3,68 ppm, a pronalaskom signala ove sprege potvrđeni su protoni šećerne jedinice desulfoglukotropeolina.

4.6. Stabilnost i reaktivnost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata

4.6.1. *Matthiola incana* (L.) R. Br.: Stabilnost glukorafenina i glukorafasatina

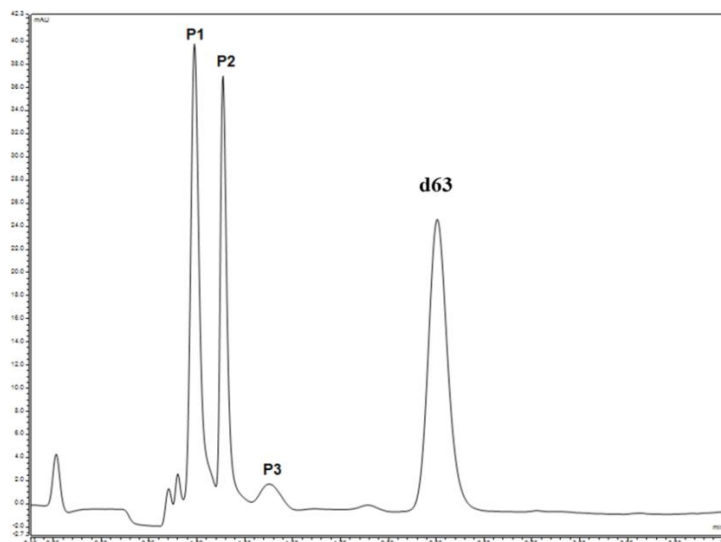
Biljka *M. incana* odabrana je kao izvor glukorafenina (**63**) budući da je samo mali broj vrsta porodice Brassicaceae (i to sjeme) do danas prepoznat kao dobar izvor **63**: *Raphanus longipinnatus* (75 – 100 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), *Raphanus sativus* (25 – 100 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), *M. bicornis* (50 – 75 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW).^[19] Zbog jedinstvene strukturne specifičnosti utvrđeno je da se desulfoglukorafenin (**d63**), koji nastaje enzimskom desulfatacijom **63**, pretvara u tioimidatne *N*-okside.^[134] Dodatno, izoliran je novi derivat koji sadrži sumpor i okarakteriziran je kao ciklički tiohidroksimat.^[135] U svrhu ispitivanja MS2 spektra ovog desulfoglukozinolata i nastalih artefakata, odabrana je biljka *M. incana* i to dva uzorka, jedan sabran u Podstrani te drugi uzorak uzgojen u Botaničkom vrtu Split iz sjemena sakupljenog na otoku Visu.^[136] Glukozinolatni profil, uzorka iz Podstrane, određen nakon višetjednog skladištenja biljnog materijala, potvrdio je **63** kao glavni glukozinolat u svim dijelovima biljke s najvećim sadržajem u komušci i cvijetu (21,03 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW i 15,80 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), a najnižim u stabljici i listu (5,21 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW i 1,53 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). 4-(Metilsulfanil)but-3-enil-glukozinolat (**83**) također je pronađen u svim dijelovima biljke u rasponu 0,16 – 0,48 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, dok su cvjetovi sadržavali i malu količinu indol-3-ilmetil-glukozinolata (**43**). Uzorak biljke iz Botaničkog vrta također je podijeljen na cvijet, list, stabljiku, komušku i sjeme, koji su sušeni na zraku dva dana i odmah nakon toga analizirani (tablica 4.6.1.1.). Utvrđena je prisutnost **63** kao glavnog glukozinolata u sjemenu, komušci i cvijetu, dok su list i stabljika kao glavni glukozinolat sadržavali njegov neoksidirani oblik **83**. Pojava većeg sadržaja **83** može se povezati s njegovom podložnosti oksidaciji tijekom duljeg vremena sušenja biljnog materijala i pretvorbom u **63**. Svi uzorci analizirani su više puta tijekom 23 dana, počevši od dana izolacije desulfoglukozinolata. U svim analizama uočeno je značajno smanjenje sadržaja **63** s konačnim gubitkom u rasponu 60 – 80 %. Nasuprot tome, **83** nije pokazao nikakvo smanjenje tijekom istog razdoblja analize.

Tablica 4.6.1.1. Sadržaj glukozinolata u različitim dijelovima biljke *Matthiola incana* analizirani tijekom perioda od 23 dana. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 2.3.1.

Biljni organ	Sadržaj glukozinolata ($\mu\text{mol g}^{-1}$ DW)														
	Dan 1.			Dan 6.			Dan 8.			Dan 13.			Dan 23.		
	63	83	43	63	83	43	63	83	43	63	83	43	63	83	43
Cvijet	9,72	0,03	tr	7,04	0,03	tr	3,89	tr	tr	4,36	tr	tr	2,18	tr	tr
List	5,87	7,66	-	4,31	7,70	-	3,42	7,79	-	3,01	7,88	-	2,31	7,87	-
Stabljika	9,19	9,90	-	6,80	9,94	-	5,39	10,09	-	4,53	10,23	-	1,89	9,51	-
Komuška	9,66	0,86	-	7,10	0,69	-	5,44	0,69	-	4,36	0,53	-	2,24	0,59	-
Sjeme	9,98	1,17	-	7,31	1,15	-	5,47	1,20	-	4,70	1,13	-	2,10	1,15	-

tr – tragovi; „-“, – nije identificiran

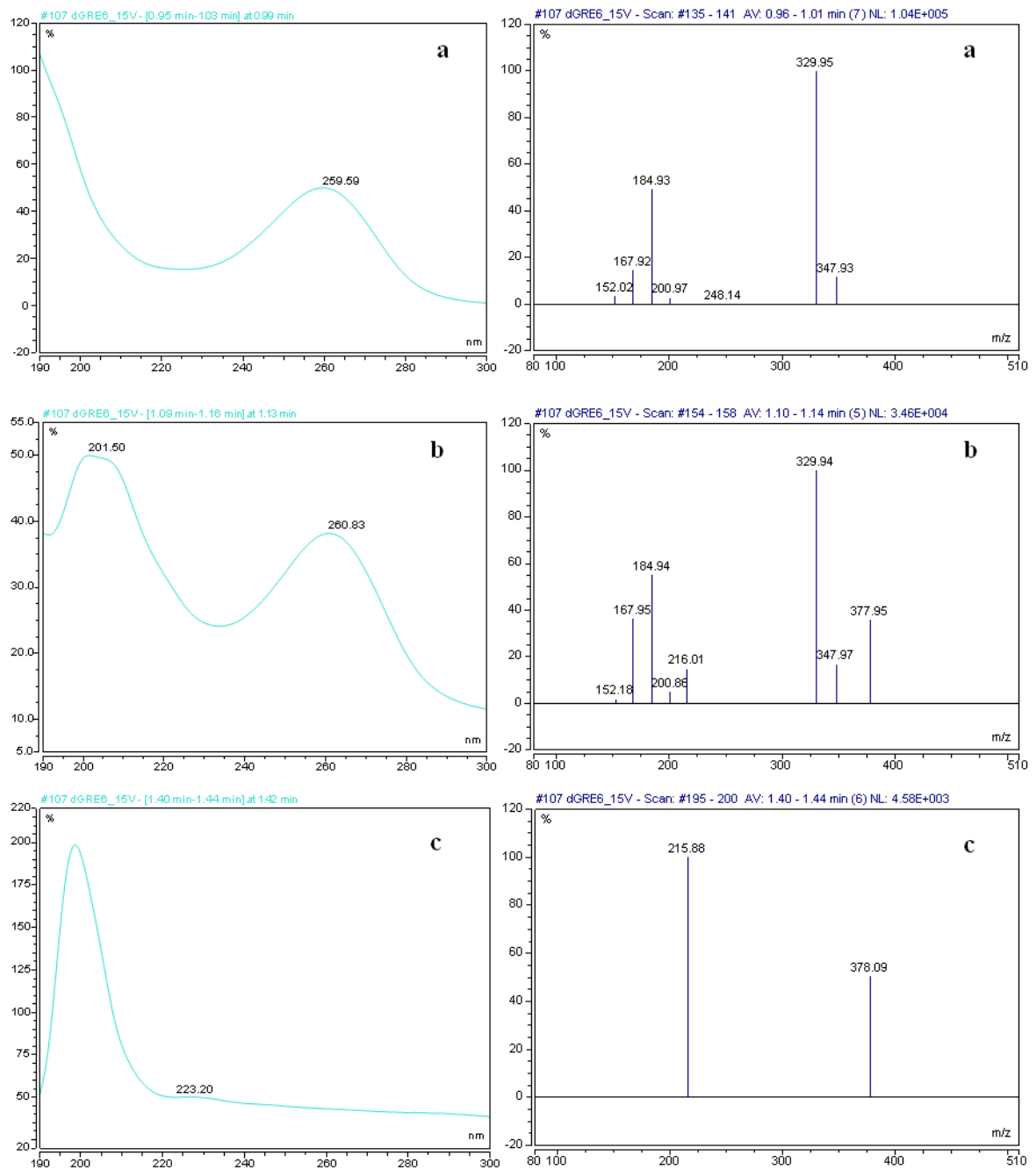
U uzorcima dobivenim iz *M. incana* uočeni su signali na $t_R = 3,6; 4,6$ i $5,0$ min s apsorpcijskim maksimumom u UV spektru, $\lambda_{\text{maks}} \sim 260$ nm koji su ukazivali na prisutne polarne spojeve koji su u skladu s onima navedenim u radu Iori i sur. (2008).^[134] UHPLC kromatogram dobiven za čisti **d63** nakon duljeg skladištenja prikazan je na slici 4.6.1.1.



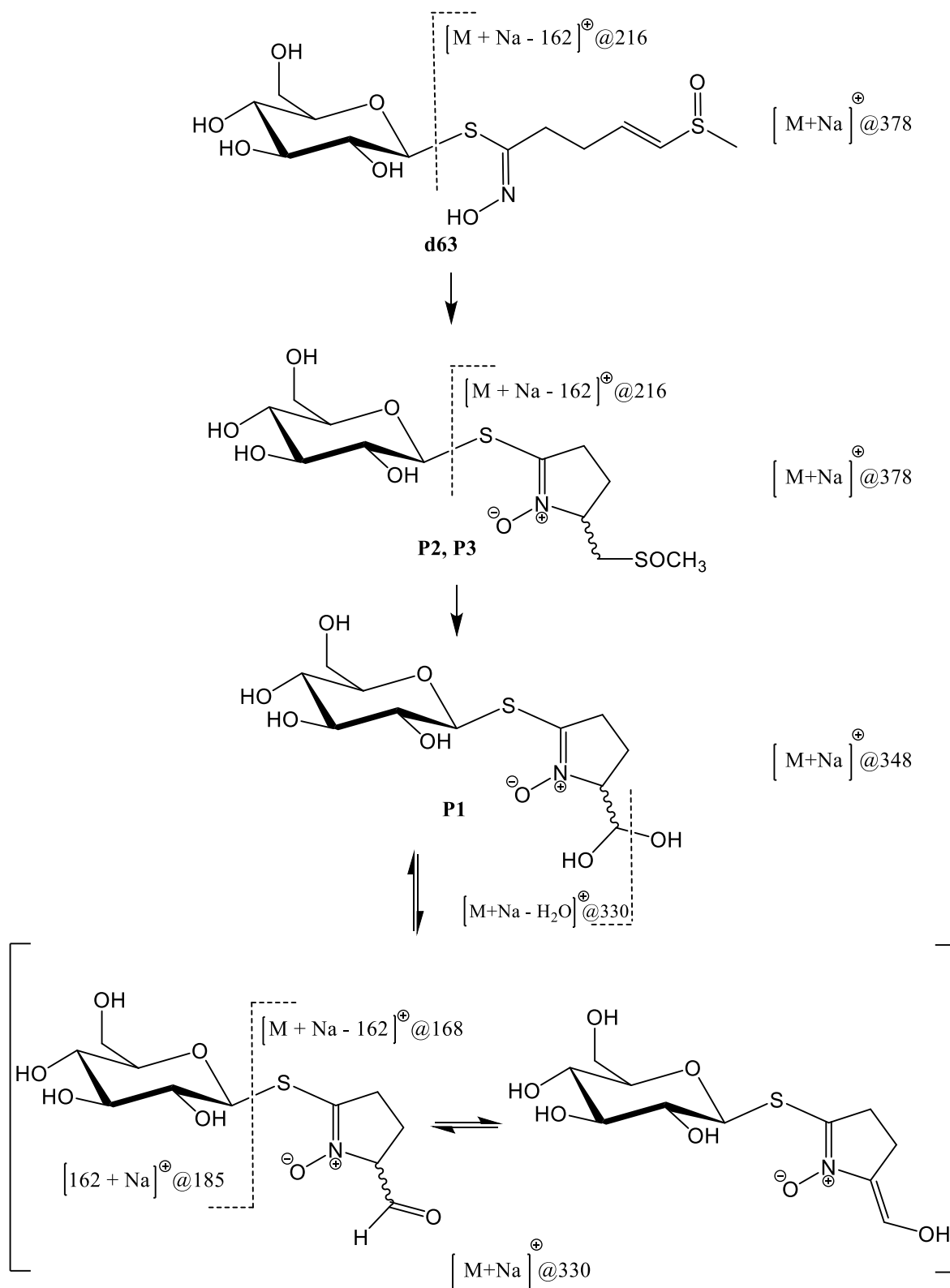
Slika 4.6.1.1. UHPLC kromatogram uzorka analiziranog mjesec dana nakon prve analize: **P1-P3** – artefakti nastali od desulfo-4-(metilsulfinil)but-3-enil-glukozinolata (**d63**).

Nastali artefakti označeni P1, P2 i P3 predstavljaju smjese diastereomera. Zbog pokrajnjeg lanca koji sadrži dvostruku vezu u konjugaciji sa sulfoksidnom skupinom dolazi do Michaelove adicije u desulfatiranom obliku **63** pri čemu nastaju ciklički nitroni. Ova transformacija uzrokuje snažan batokromni učinak (λ_{maks} 226 nm – 260 nm).^[134, 135]

U MS2 spektru **d63** (prikazan u poglavlju 8. Prilozi) prisutan je m/z 378 koja odgovara njegovom natrijevom aduktu te izražen fragment m/z 216 koji odgovara $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$. MS2 spektri nastalih P2 i P3 artefakata također su pokazali karakterističan m/z 378 i jak fragment m/z 216 slične onima za **d63** (slika 4.6.1.2.). Iori i sur. (2008.) su pretpostavili da diastereomerni sulfoksidi P2 – P3 prolaze kroz Pummererovu pregradnju pri čemu nastaje P1 struktura aldehida u njegovom hidratiziranom obliku.^[134] U MS2 analizi P1 najzastupljenije mase $[\text{M}+\text{Na}]^+$ bile su m/z 330 i 348. To sugerira P1 u obliku gem-diola (m/z = 348), dok m/z 330 vjerojatno nastaje kao posljedica dehidracije P1 u oblik koji podliježe keto-enolnoj tautomeriji (slika 4.6.1.3.) Poznato je da aldehidi niske molekulske mase postoje u ravnoteži sa svojim hidratiziranim oblicima, ali konstanta ravnoteže za hidrataciju aldehida ovisi o prisutnosti određenih strukturnih značajki.^[137] Stoga se može pretpostaviti prisutnost oba oblika P1. Za razliku od P1-aldehidnog oblika, P1-egzo-enolni oblik može se stabilizirati vodikovom vezom na polarni kisik u *N*-oksidnoj skupini, kao i uspostavljenom konjugacijom s imino dvostrukom vezom.



Slika 4.6.1.2. UV i MS2 spektri (15V) artefakata: a) **P1** (m/z 348, λ_{maks} 259 nm); b) **P1** i **P2** (m/z 348 i 378); c) **P3** (m/z 378, λ_{maks} 223 nm).



Slika 4.6.1.3. Strukture desulfoglukorafenina (**d63**), **P1**, **P2**, **P3** i nastanak karakterističnih fragmenata u njihovim MS2 spektrima.

4.6.2. Razgradni produkti glukozinolata

Produkti kontrolirane hidrolize katalizirane mirozinazom pogodni su za neizravnu identifikaciju glukozinolata, a najvažniji su izotiocijanati, nitrili i/ili oksazolidin-tioni. Osim navedenih, razgradnjom olefinskih glukozinolata mogu nastati i epitioitrili, dok je nastanak tiocijanata do danas utvrđen samo iz pet glukozinolata: sinigrina (**107**), glukoeucin (**84**), glukotropeolina (**11**), glukosinalbina (**23**) i glukoaubrietina (**46**).^[69] Zbog svoje često nepolarne i stoga hlapljive prirode, mnogi od ovih spojeva prikladni su za GC-MS analizu. Do kraja 20. stoljeća mnogi istraživači su identificirali glukozinolate isključivo na temelju GC-MS analize uzoraka dobivenih autolizom biljnog materijala neizravnom identifikacijom preko izotiocijanata.^[4] U ovom istraživanju, korištene su različite metode izolacije razgradnih produkata u svrhu ispitivanja utjecaja različitih uvjeta razgradnje.

U tablici 4.1.2. prikazani su rezultati kvantitativne analize glukozinolata prisutnih u biljakama porodice Brassicaceae. U svrhu istraživanja razgradnje glukozinolata odabrane su biljke *Bunias erucago*, *Lunaria annua*, *Lepidium graminifolium*, *Hirschfeldia incana*, *Iberis sempervirens* i *Diplotaxis eruroides*. Korištene su konvencionalne metode koje uključuju autolizu uz dodatak egzogenog enzima mirozinaze iz *Sinapis alba* (enzimska razgradnja), zatim hidrodestilaciju u aparaturi po Clevengeru (termička razgradnja) te moderne metode koje uključuju mikrovalove, i to mikrovalna destilacija te mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija (termička razgradnja potpomognuta mikrovalovima). Rezultati GC-MS analize dani su u tablici 4.6.2.1.

Tablica 4.6.2.1. Razgradni produkti glukozinolata identificirani u različitim biljkama. HD – hidrodestilacija, MD – mikrovalna destilacija, MHG – mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija.

Biljna vrsta	KI	Autoliza / CH ₂ Cl ₂ eks (%)	HD (%)	MD (%)	MHG (%)
Razradni produkti					
<i>Bunias erucago</i>		nad dio	cv k l+st		
Glukonapin					
But-3-enil-izotiocijanat	993	n.d.	0,8 10,3 2,0	/	/
Glukotropeolin					
2-Fenilacetonitril	1139	n.d.	1,0 n.d. n.d.	/	/
Benzil-izotiocijanat	1394	n.d.	n.d. n.d. tr	/	/
(3E)-4-(Metilsulfanil)but-3-enil-glukozinolat					
5-(Metilsulfanil)pent-4-enonitril izomer 1	1214	n.d.	14,5 n.d. 1,4	/	/
5-(Metilsulfanil)pent-4-enonitril izomer 2	1251	n.d.	4,7 n.d. 1,0	/	/
4-(Metilsulfanil)but-3-enil-izotiocijanat	1440	n.d.	0,1 n.d. 2,4	/	/
Glukoerucin					
4-(Metilsulfanil)pentanonitril	1233	n.d.	2,3 n.d. n.d.	/	/
4-(Metilsulfanil)butil-izotiocijanat (erucin)	1457	n.d.	n.d. n.d. 1,1	/	/

Glukorafenin						
4-(Metilsulfinil)but-3-enil-izotiocijanat	1817	88,3	n.d.	/	/	
			n.d.			
			n.d.			
<i>Lunaria annua</i>		sj	sj	sj	sj	
Glukoputranjivin						
Izopropil-izotiocijanat	858	35,6	92,1	87,0	88,0	
Glukokohlearin						
<i>sec</i> -Butil-izotiocijanat	952	0,4	4,6	4,1	3,1	
Glukoalisin						
5-(Metilsulfinil)pentil-izotiocijanat (alisin)	2005	3,3	n.d.	n.d.	n.d.	
Pent-4-enil-izotiocijanat	1093	24,3	n.d.	n.d.	4,6	
Glukohesperin						
6-(Metilsulfinil)heksil-izotiocijanat (hesperin)	2104	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	
Heks-5-enil-izotiocijanat	1226	32,0	n.d.	n.d.	2,3	
Glukoberteroin						
5-(Metilsulfanil)pentil-izotiocijanat (berteroin)	1566	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	
Glukoleskverelin						
6-(Metilsulfanil)heksil-izotiocijanat (leskverelin)	1714	n.d.	0,3	n.d.	n.d.	
Glukotropeolin						
Benzil-izotiocijanat	1395	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	
<i>Lepidium graminifolium</i>		Split	Rab	Rab		
		l	nad	nad dio		
		st	dio			
		kom				
		k				
Glukorafanin						
5-(Metilsulfinil)pentanonitril	1512	1,7	n.d.	n.d.	/	/
		2,3				
		n.d.				
		n.d.				
4-(Metilsulfinil)butil-izotiocijanat (sulforafan)	1760	71,7	n.d.	n.d.	/	/
		52,7				
		30,3				
		0,8				

Glukoerucin						
4-(Metilsulfanil)butil- izotiocijanat	1455	n.d. n.d. n.d. 2,3	n.d.	n.d.	/	/
Glukolepigramin						
3-Hidroksifenilacetonitril	1483	tr 4,7 n.d. n.d.	n.d.	n.d.	/	/
3-Hidroksibenzil- izotiocijanat	1701	3,2 5,2 20,2 8,6	n.d.	n.d.	/	/
3,5-Dimetoksisinalbin						
4-Hidroksi-3,5- dimetoksifenilacetonitril	1790	3,0 8,2 n.d. n.d.	n.d.	n.d.	/	/
4-Hidroksi-3,5- dimetoksibenzil- izotiocijanat	2017	1,0 n.d. 0,4 n.d.	n.d.	n.d.	/	/
Glukotropeolin						
2-Fenilacetonitril	1141	tr 2,5 n.d. 0,3	18,7	85,7	/	/
Benzil-izotiocijanat	1394	n.d. n.d. tr 27,9	0,5	6,0	/	/
3,4-Dimetoksibenzil- glukozinolat						
3,4-Dimetoksibenzil- izotiocijanat	1822	n.d. n.d. n.d. tr	n.d.	n.d.	/	/

3,4,5-Trimetoksibenzil-						
glukozinolat						
3,4,5-Trimetoksibenzil-	1961	1,8	n.d.	n.d.	/	/
izotiocijanat		3,1				
		5,0				
		18,7				
Glukolimnantin						
3-Metoksifenilacetonitril	1377	n.d.	29,1	1,7	/	/
		1,0				
		n.d.				
		tr				
3-Metoksibenzil-	1601	n.d.	3,8	1,1	/	/
izotiocijanat		n.d.				
		0,9				
		14,0				
Glukonasturcin						
3-Fenilpropanonitril	1242	n.d.	1,0	n.d.	/	/
		n.d.				
		n.d.				
		n.d.				
2-Feniletil-izotiocijanat	1466	n.d.	1,5	tr	/	/
		n.d.				
		n.d.				
		n.d.				
<i>Hirschfeldia incana</i>						cv
						1
						st
Neodreden prekursor						
Propil-izotiocijanat	899	/	/	/	/	1,7
						0,5
						1,8
Glukoibervirin						
4-	1083	/	/	/	/	77,1
(Metilsulfanil)butanonitril						85,4
						37,4
3-(Metilsulfanil)propil-	1309	/	/	/	/	0,5
izotiocijanat						0,3
						n.d.

Glukotropeolin									
2-Fenilacetoni-tril	1139	/	/	/				2,8	
								0,4	
								n.d.	
Benzil-izotiocijanat	1395	/	/	/				2,9	
								0,4	
								n.d.	
<i>Iberis sempervirens</i>		cijela biljka		cijela biljka		cijela biljka		cijela biljka	
Sinigrin									
Alil-izotiocijanat	890	55,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Glukoibervirin									
4-	1083	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	36,31	
(Metilsulfanil)butanonitril									
3-(Metilsulfanil)propil-izotiocijanat	1308	4,2	99,9	98,1				59,0	
Glukoiberin									
3-(Metilsulfanil)propil-izotiocijanat	1310	28,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
<i>Diplo-taxis erucoi-des</i>									
		k	cijela biljka		cijela biljka		cijela biljka		
		cv							
		kom							
		l							
		st							
Sinigrin									
Alil-izotiocijanat	890	n.d.	21,6	0,3				n.d.	
		6,7							
		0,5							
		7,8							
		2,0							
Glukonasturcin									
2-Fenilet-il-izotiocijanat	1466	n.d.	29,5	0,8				tr	
<i>Sisymbrium officinale</i>									
		cijela biljka		cijela biljka		cijela biljka		cijela biljka	
		Split	Krka	Split	Krka	Split	Krka	Split	Krka
Glukoputranjvin									
Izopropil-izotiocijanat	860	n.d.	7,0	40,9	n.d.	85,4	15,8	tr	tr
Glukokohlearin									
<i>sec</i> -Butil-izotiocijanat	955	n.d.	n.d.	4,8	n.d.	14,0	0,8	n.d.	n.d.

*KI - Kovačev indeks; / - nije odrađeno, k-korijen; l-list; st-stabljika; cv-cvijet; kom-komuška; pl-plod; sj-sjeme; nad dio-nadzemni dio;tr - tragovi; n.d. - nije pronađen

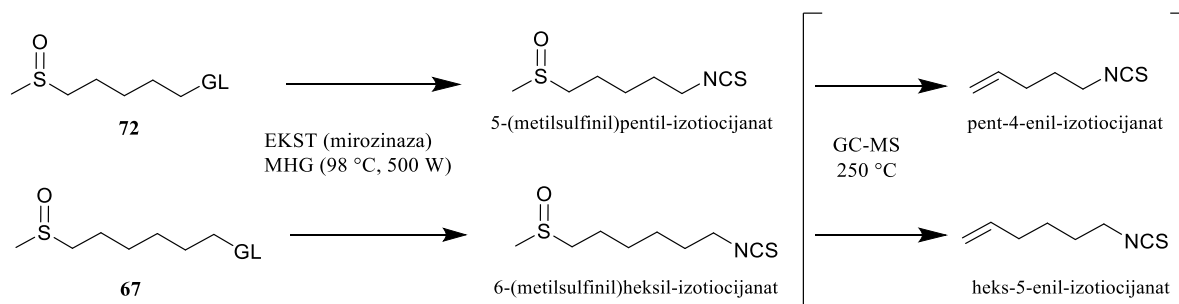
4.6.2.1. Stabilnost razgradnih produkata tiofunkcionalnih glukozinolata

Sjeme biljke *Lunaria annua* analizirano je u svrhu ispitivanja glukozinolatnog profila izolacijom desulfoglukozinolata i njihovom kvalitativnom i kvantitativnom analizom na UHPLC-DAD-MS/MS-u. Izolacija razgradnih produkata vršena je modernim metodama koje uključuju primjenu mikrovalova tijekom destilacije, odnosno tijekom hidrodifuzije i gravitacije (termička razgradnja uz djelovanje mikrovalova). Utjecaj na razgradnju ispitan je i konvencionalnim metodama, hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru (termička razgradnja) i ekstrakcijom diklormetanom nakon autolize uz dodatak enzima mirozinaze tijekom 24 h (enzimska razgradnja). Kemijska analiza izolata provedena je GC-MS-om.^[138]

UHPLC-DAD-MS/MS analizama identificirano je sedam glukozinolata: glukoputranjivin (**56**), glukokohlearin (**61**), glukotalisin (**72**), glukohesperin (**67**), glukoberteroin (**94**), glukoleskverelin (**88**) i glukotropeolin (**11**). Glavni glukozinolat čiji $[M+Na]^+ = 304$ odgovara **d56** biosintetski potječe od aminokiseline valina i njegov sadržaj iznosio je $14,60 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Drugi identificirani razgranati glukozinolat **61** potječe od izoleucina. Izopropil-izotiocijanat koji potječe od razgradnje **56** pronađen je u svim hlapljivim uzorcima dobivenim različitim metodama izolacije, u rasponu 35 – 92 %. Glukozinolat **61** i njegov izomer izobutil-glukozinolat (**62**), ne mogu se razlikovati MS2 spektrima. Kako je prethodno objašnjeno u poglavlju 4.4. RESEDACEAE, ove izomere moguće je razlikovati temeljem MS spektara njihovih razgradnih produkata, gdje je u MS spektru *sec*-butil-izotiocijanata prisutan fragment m/z 86.

Četiri glukozinolata koji sadrže sumpor u pokrajnjem lancu potječu iz metioninskog biosintetskog puta. Sadržaj dvaju ω -(metilsulfinil)alkilnih glukozinolata **72** i **67** iznosio je $1,74 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW i $3,54 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW, dok su njihovi neoksidirani oblici **94** i **88** bili prisutni u tragovima. 5-(Metilsulfinil)pentil-izotiocijanat (3,3 %) i 6-(metilsulfinil)heksil-izotiocijanat (2,3 %) koji potječu od **72** odnosno **67**, identificirani su samo u hlapljivom izolatu dobivenom ekstrakcijom diklormetanom nakon hidrolize mirozinazom. Dva olefinska izotiocijanata, pent-4-enil-izotiocijanat (24,3 % i 1,6 %) i heks-5-enil-izotiocijanat (32,0 % i 2,3 %), identificirani su u ekstraktu dobivenom nakon autolize te u izolatu dobivenom mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom, što naizgled ukazuje na moguću prisutnost još dva glukozinolata. Međutim, odgovarajući prekursori, olefinski desulfoglukozinolati, nisu identificirani UHPLC-MS/MS analizom. Zaključeno je da spomenuti izotiocijanati nastaju termičkom razgradnjom

5-(metilsulfinil)pentil-izotiocijanata, odnosno 6-(metilsulfinil)heksil-izotiocijanata, pri radnoj temperaturi tijekom GC-MS mjerenja (slika 4.6.2.1.1.).



Slika 4.6.2.1.1. Razgradnja 5-(metilsulfinil)pentil-glukozinolata (**72**) i 6-(metilsulfinil)heksil-gukozinolata (**67**) do odgovarajućih izotiocijanata i njihova termička razgradnja tijekom GC-MS mjerenja. EKST - ekstrakcija, MHG - mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija.

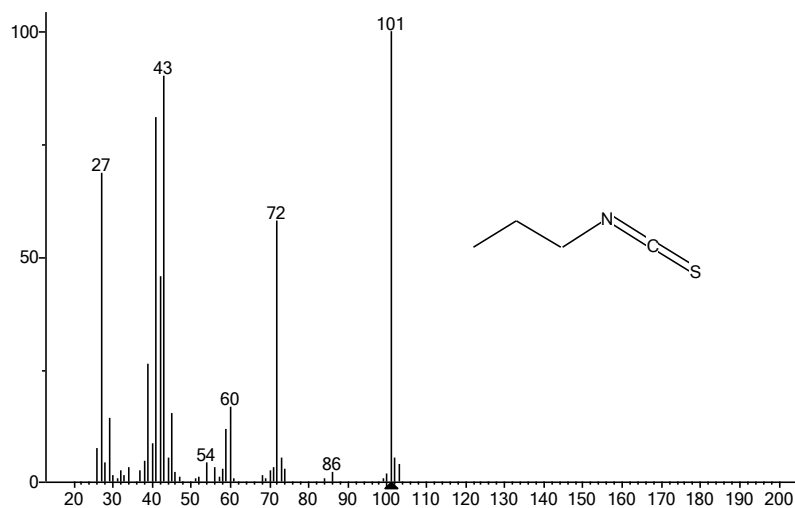
Prilikom sumnje na prisutstvo novih glukozinolata, za njihovu identifikaciju, potrebno ih je izolirati i potvrditi spektroskopskim tehnikama, MS-om i NMR-om. Prethodno navedeni zaključak je u skladu sa studijom u kojoj je standardna otopina 4-(metilsulfinil)butil-izotiocijanata (sulforafana), analizirana GC-MS-om, pokazala 80 % razgradnje do but-3-enil-izotiocijanata ^[139] kao i studijom termičke razgradnje C8-C10 metilsulfinilnih glukozinolata biljke *Arabis turrata*.^[105]

Općenito, prinosi hlapljivih spojeva dobivenih konvencionalnim tehnikama bili su mnogo veći od onih dobivenih izolacijom uz pomoć mikrovalova. U svim izolatima identificirani su samo izotiocijanati kao razgradni produkti. Hidrodestilacija (100 °C, 2,5 h) koja koristi velike količine vode i energije u odnosu na mikrovalovima potpomognute izolacije, omogućava razgradnju glukozinolata te izolaciju uglavnom niskomolekularnih i manje polarnih izotiocijanata. Dobiveno je pet izotiocijanata koji potječu od pet glukozinolata, **56**, **61**, **94**, **88** i **11**. Hlapljivi izolat dobiven mikrovalnom destilacijom (500 W, 98 °C, 30 min) može se usporediti s izolatom dobivenim hidrodestilacijom jer su principi izolacije slični. Dobiveni su samo produkti razgradnje dvaju alifatskih razgranatih glukozinolata (**56** i **61**), ali sa znatno nižim iskorištenjem (3,80 µg/g) u odnosu na hidrodestilat (578,90 µg/g). Ekstrakcijom su izolirani razgradni produkti nastali enzimskom razgradnjom glukozinolata **56**, **61** te alifatski izotiocijanati koji sadrže sulfoksid, odnosno 5-(metilsulfinil)pentil-izotiocijanat i 6-(metilsulfinil)heksil-izotiocijanat što nije postignuto nijednom drugom metodom izolacije, vjerojatno zbog njihove veće polarosti. Mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom izolirana su samo

dva razgradna produkta glukozinolata kao i u slučaju mikrovalne destilacije, uz olefinske izotiocijanate, ali u znatno nižem postotku. Dobiveni prinos u ekstrakciji potpomognutoj mikrovalovima, 47,10 $\mu\text{g/g}$ je bio značajno niži u odnosu na diklormetanski ekstrakt koji je iznosio 2331,20 $\mu\text{g/g}$. Niže iskorištenje kod modernih metoda izolacije može se pripisati znatno kraćem vremenu izolacije.

Glukoiberin (**73**), glukokeirolin (**82**) i glucoibervirin (**95**) su identificirani kao glavni alifatski glukozinolati, sa sumporom u pokrajnjem lancu, u biljci *Hirschfeldia incana*, praćeni sa arilalifatskim glukonasturcinom (**105**) i indolnim glukozinolatima. Nakon provedene izolacije mikrovalnom hidrodifuzijom i gravitacijom, glukozinolat **95** je identificiran preko 3-(metilsulfanil)propil-izotiocijanata i 4-(metilsulfanil)butanonitrila, dok očekivani razgradni produkt glavnog glukozinolata **73** kao i sporednih **82** i **105** te indolnih glukozinolata nisu identificirani.

GC-MS analizom ekstrakta pronađeni su benzil-izotiocijanat i 2-fenilacetonitril koji predstavljaju razgradne produkte glukotropeolina (**11**), kao i izotiocijanat čiji MS spektar prema Wiley i NIST bazi podataka odgovara propil-izotiocijanatu, kao i njegovo vrijeme zadržavanja, točnije $KI = 899$ (slika 4.6.2.1.2.).

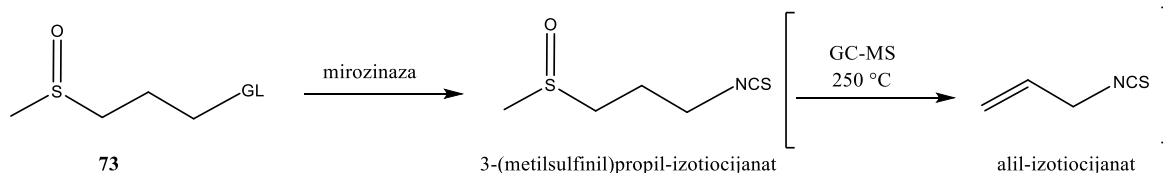


Slika 4.6.2.1.2. MS spektar propil-izotiocijanata.

Prema poznatoj shemi razgradnje, ovaj razgradni produkt potjecao bi od propil-glukozinolata čije postojanje do danas nije potvrđeno. U LC-MS kromatogramima pretražen je očekivani $[M+Na]^+ = 304$ koji bi ukazivao na prisustvo odgovarajućeg glukozinolatnog prekursora, ali nije pronađen. Prema dosadašnjim informacijama, postoji homologni niz alifatskih glukozinolata čije aminokiselinski prekursori nisu poznati kao što su etil-glukozinolat [**16**], butil-glukozinolat [**13**], pentil-glukozinolat [**102**], heksil-

glukozinolat [20] i drugi sa hidroksilnim i okso skupinama u pokrajnjem lancu. Svi navedeni su identificirani samo preko odgovarajućih razgradnih produkata, izotiocijanata ili njihovih derivata.^[4]

UHPLC-DAD-MS/MS analizom biljke *Iberis sempervirens* također su identificirani su kao glavni alifatski glukozinolati sa sumporom u pokrajnjem lancu, **73** i **95** te kao sporedni glucoerucin (**84**). U tragovima su pronađeni arilalifatski glukozinolat glukotropeolin (**11**) i indolni glukozinolat 4-metoksiglukobrasicin (**48**). Za izolaciju su korištene konvencionalne metode i mikrovalovima potpomognute metode. Hidrodestilat i destilat iz mikrovalne sadržavali su samo jedan razgradni produkt, 3-(metilsulfanil)propil-izotiocijanat koji potječe od **95**. S druge strane, u diklormetanskom ekstraktu identificirana su tri izotiocijanata, alil-izotiocijanat (s najvišim postotkom, 55,8 %), 3-(metilsulfanil)propil-izotiocijanat (4,2 %) te 3-(metilsulfinil)propil-izotiocijanat koji potječe od **73** (28,2 %). Alil-izotiocijanat je olefinski izotiocijanat i potječe od sinigrina (**107**) koji nije pronađen analizom desulfoglukozinolata, zbog čega je zaključeno da predstavlja artefakt koji nastaje iz prisutnog metilsulfinilnog izotiocijanata tijekom GC-MS mjerenja (slika 4.6.2.1.3.).

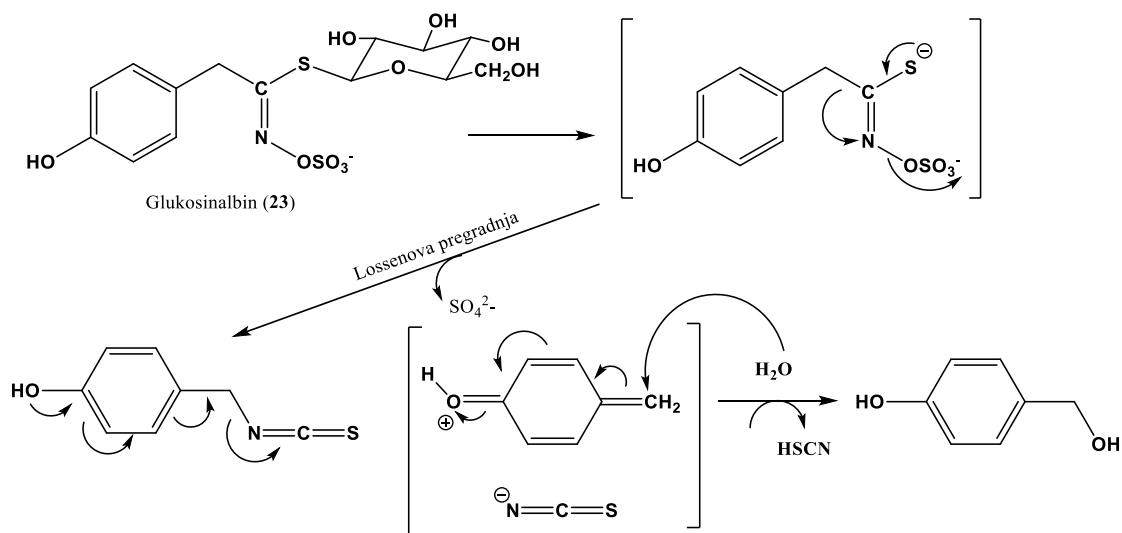


Slika 4.6.2.1.3. Razgradnja glucoiberina (**73**) do odgovarajućeg izotiocijanata i njegova termička razgradnja tijekom GC-MS mjerenja.

Mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija je rezultirala nastankom oba razgradna produkata metilsulfanilnog glukozinolata **95**, 3-(metilsulfanil)propil-izotiocijanata (59,0 %) i pripadajućeg nitrila (36,3 %). Usporedbom glukozinolatnog profila s identificiranim razgradnim produktima, zaključeno je da se metilsulfanilni glukozinolat **95** razgrađuje u uvjetima termičke razgradnje potpomognute mikrovalovima, dok je njegov oksidirani metilsulfinilni oblik **73** u istim uvjetima stabilan. Ovo je primijećeno prilikom izolacije hlapljivih spojeva obje biljke, *I. sempervirens* i *H. incana* u kojima je **73** bio glavni glukozinolat.

4.6.2.2. Stabilnost razgradnih produkata arilalifatskih glukozinolata

U biljci *Bunias erucago* UHPLC-DAD-MS/MS analizom identificirano je ukupno sedam glukozinolata ^[140], od kojih su alifatski glukozinolati: glukonapin (**12**), glukorafenin (**63**), glukorafanin (**64**), (3*E*)-4-(metilsulfanil)but-3-enil-glukozinolot (**83**) i glucoerucin (**84**) te arilalifatski: glukotropeolin (**11**) i glukosinalbin (**23**). Glavni glukozinolati su bili **23** i **63**. GC-MS analizom je utvrđena je prisutnost razgradnih produkata **11**, **12**, **63**, **83**, i **84**. Poznato je da produkt razgradnje glukozinolata **23**, 4-hidroksibenzil-izotiocijanot, nije stabilan jer reagira s vodom i sklon je brzom hidrolizi u 4-hidroksibenzilni alkohol (slika 4.6.2.2.1.).^[141] Razgradni produkti koji bi mogli potjecati od istog glukozinolata kao što su 2-(4-hidroksifenil)acetonitril, 4-hidroksibenzil-tiocijanot te 4-hidroksibenzilni alkohol, također nisu pronađeni ni u autolizatu ni u hidrodestilatu.

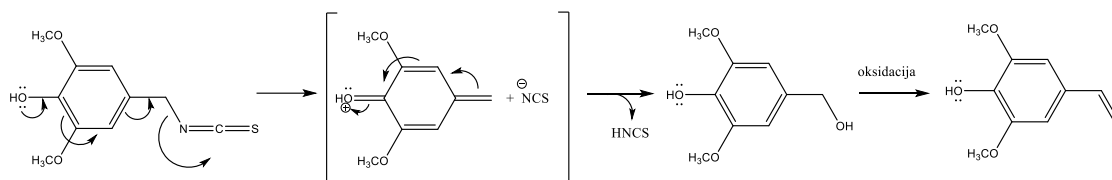


Slika 4.6.2.2.1. Razgradnja glukosinalbina do 4-hidroksibenzil-izotiocijanata i njegova hidroliza.

Sadržaj **63** bio je najveći u cvijetu (5,7 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). 4-(Metilsulfanil)but-3-enil-izotiocijanot, koji nastaje razgradnjom **63**, identificiran je samo u diklormetanskom ekstraktu nakon autolize, vjerojatno zbog njegove toplinske nestabilnosti i razgradnje tijekom hidrodestilacije (100 °C). Naime, ovaj izotiocijanot se može razgraditi u but-3-enil-izotiocijanot ^[142] koji je pronađen u svim hlapljivim izolatima (0,8 % – 10,3 %). Međutim, but-3-enil-izotiocijanot može proizaći i iz razgradnje **12**, identificiran na $t_R = 12,1$ min u svim dijelovima u rasponu od 0,2 do 0,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Desulfoglukozinolot **d83** je identificiran na $t_R = 19,5$ min u cvijetu i korijenu s 1,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ i 2,2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Njegovi produkti razgradnje, 5-(metilsulfanil)pent-4-enonitril (19,2 %) i

4-(metilsulfanil)but-3-enil-izotiocijanat (0,1 %), također su otkriveni u istim dijelovima biljke. Desulfoglukozinolati **d11** i **d84** pronađeni su u malim količinama, kao i njihovi razgradni produkti.

Glukozinolatni profili biljnih dijelova *L. graminifolium* sabranog u Splitu te na otoku Rabu kvalitativno i kvantitativno su analizirani korištenjem UHPLC-DAD-MS/MS preko desulfatiranih oblika.^[143] Kvalitativna analiza glukozinolata također je potvrđena preko njihovih razgradnih produkata dobivenim enzimskom i/ili termičkom razgradnjom te analiziranih GC-MS-om. Identificirano je ukupno trinaest glukozinolata te su glukozinolati po prvi put kvantizirani za ovu biljnu vrstu. Općenito, dominantni su bili glukozinolati biosintetski podrijetlom od fenilalanina i/ili tirozina. Osam glukozinolata od ukupnog broja, otpada na mono-, di- i trisupstituirane arilalifatske glukozinolate. Višestrukosupstituirani arilalifatski glukozinolati rijetko su prisutni u biljnim vrstama, ali se čini da su uobičajeni za vrste roda *Lepidium*. Glavni glukozinolat u svim nadzemnim dijelovima *L. graminifolium* je bio monosupstituirani glukolepigramin (**22**) s najvećim sadržajem, 75,82 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, u komušci splitske biljke te su identificirani i odgovarajući 3-metoksibenzil-izotiocijanat i pripadajući 3-metoksifenilacetonitril. U korijenu glavni glukozinolati su bili glukotropeolin (**11**) te vrlo specifični trisupstituirani 3,4,5-trimetoksibenzil-glukozinolat (**114**). U svim splitskim uzorcima, identificiran je još jedan trisupstituirani arilalifatski glukozinolat, 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-glukozinolat (**151**) sa sadržajem 3,04 – 14,88 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW koji je do sada pronađen samo u još jednoj vrsti iz roda *Lepidium*. U ekstraktu su identificirana dva razgradna produkta glukozinolata **151**, 4-hidroksi-3,5-dimetoksifenilacetonitril i 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-izotiocijanat. Ostali pronađeni hlapljivi spojevi uključuju 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehid i 3-metoksibenzaldehid, za koje je zaključeno da mogu nastati zbog nestabilnosti odgovarajućih izotiocijanata tijekom izolacije i/ili uvjeta GC mjerenja. Na slici 4.6.2.2. predložen je mehanizam nastanka 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehida iz odgovarajućeg iz 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-alkohola zbog prisutnosti elektron-donirajuće hidroksilne skupine u *para* položaju.



Slika 4.6.2.2.2. Predloženi mehanizam razgradnje 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-izotiocijanata i nastanak artefakta.

Pet sporednih glukozinolata koji biosintetski potječu od metionina su progoitrin (**24R**), epiprogoitrin (**24S**), glukorafanin (**64**), glukonapin (**12**) i glucoerucin (**84**), od kojih su glukozinolati **64** i **84** po prvi puta identificirani u ovoj vrsti. Razgradni produkti hidroksiliranih stereoizomera nisu pronađeni. Sulforafan koji potječe od razgradnje **64** bio je glavni razgradni produkt u ekstraktima nadzemnih dijelova *L. graminifolium* sabranog u Splitu (list 71,74 %, stabljika 52,70 % i komuška 30,34 %). 4-(Metilsulfanil)butil-izotiocijanat koji potječe od **84** pronađen je samo u ekstraktu korijena.

4.6.2.3. Stabilnost indolnih glukozinolata

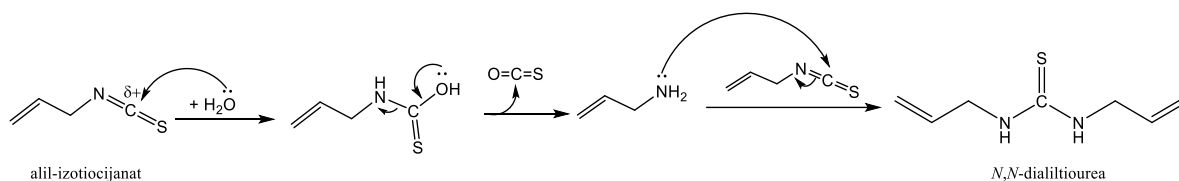
Danas je poznato da su indolni glukozinolati manje stabilni od alifatskih glukozinolata tijekom toplinske obrade povrća iz roda *Brassica*. Razlika u stabilnosti potječe od rezonancijom stabiliziranih produkata indolnih glukozinolata. 4-Hidroksiglukobrasicin (**28**) se pokazao vrlo termički nestabilnim. S druge strane, glukobrasicin (**43**) i neoglukobrasicin (**47**) bili su manje osjetljivi.^[144] Izotiocijanati indolnih prekursora su nestabilni i nije ih moguće identificirati GC-MS-om, za razliku od nitrila. Tako se primjerice odgovarajući nitril glukozinolata **43** može identificirati pomoću GC-MS-a. Proučavanjem termičke razgradnje ovih glukozinolata identificirani su odgovarajući indol-3-acetonitrili kao glavni produkti.^[4, 7]

U svrhu istraživanja prisutnosti indolnih glukozinolata preko razgradnih produkata, odabrane su biljke *Hirschfeldia incana* u kojoj su preko desulfoglukozinolata pronađeni 4-hidroksiglukobrasicin (**28**), **43**, **47**, 4-metoksiglukobrasicin (**48**) i 1,4-dimetoksiglukobrasicin (**138**), zatim *Diplotaxis eruroides* koja je sadržavala glukozinolate **43**, **47**, **48** te *Sisymbrium officinale* sa glukozinolatima **28**, **43**, **47** i **48**. Razgradnja je provedena primjenom autolize, hidrodestilacije te mikrovalovima potpomognute izolacije za biljke *D. eruroides* i *S. officinale*, dok je za *H. incana*

provedena samo mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija. GC-MS analizom navedenih izolata nisu utvrđeni razgradnih produkti indolnih glukozinolata.

4.6.2.4. Stabilnost alil-izotiocijanata u uvjetima koji oponašaju hidrodestilaciju i mikrovalovima potpomognutu destilaciju

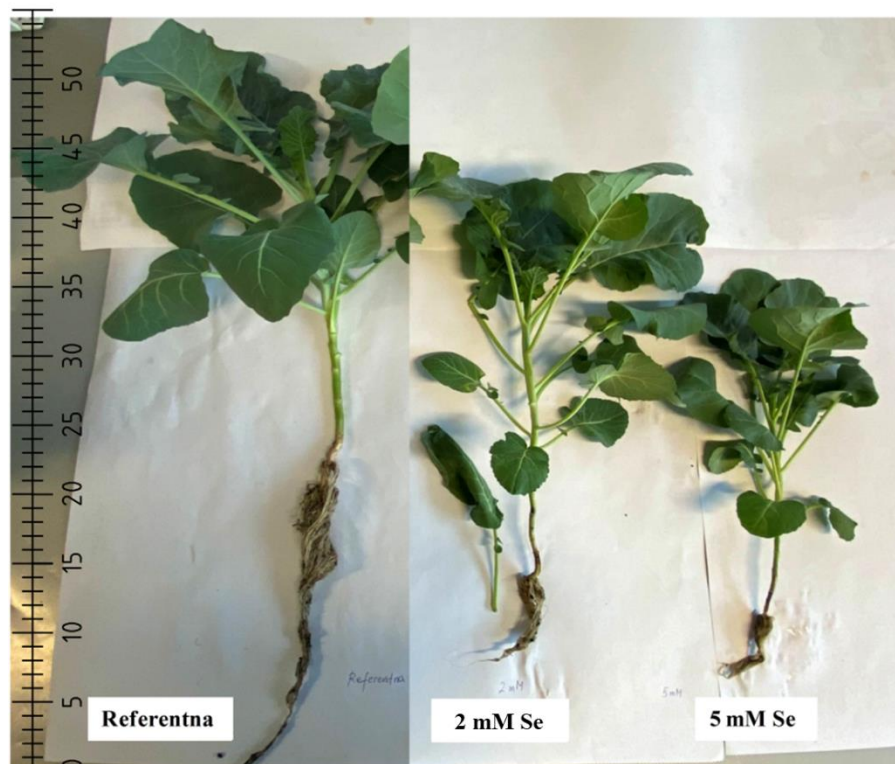
Kako je već opisano, u praktičnoj primjeni GC-MS analiza za neizravnu identifikaciju glukozinolata važni aspekti koje treba sagledati uključuju reaktivnost i stabilnost izotiocijanata. Naime, ovi spojevi sadrže prilično elektrofilan atom ugljika te mogu reagirati s biološkim nukleofilima (hidroksilna, amino ili tiolna skupina) pri čemu nastaju *O*-tiokarbamati, derivati tiouree, odnosno ditiokarbamati.^[7] U svrhu dodatnih ispitivanja stabilnosti, odnosno reaktivnosti, kao model odabran je alil-izotiocijanat s ciljem oponašanja uvjeta u konvencionalnoj hidrodestilaciji i uvjeta destilacije uz primjenu mikrovalova. Isti uzorak je refluksiran u vodenoj otopini (100 °C, 1 h). Dobivene hlapljive frakcije analizirane su GC-MS-om, kao i hlapljivi spojevi dobiveni ekstrakcijom vodenih faza diklormetanom. Eksperimentom je utvrđeno da je iscrpak (engl. *recovery*) ispitivanog izotiocijanata u uvjetima koji oponašaju destilaciju uz mikrovalove bio bolji nego u slučaju procesa hidrodestilacije. Tako je iscrpak na alil-izotiocijanatu u hidrodestilatu bio 1,6 % u odnosu na 50 % dobivenih kod mikrovalne destilacije. Analizom ekstrakta vodenog medija nakon refluksa iscrpak alil-izotiocijanata je iznosio 54,1 %, dok je za *N,N*-dialiltiourea iznosio 45,9 %. *N,N*-dialiltiourea je nastala reakcijom elektrofilnog ugljika u izotiocijanatu s vodom kako je prikazano na slici 4.6.2.4.1.



Slika 4.6.2.4.1. Mehanizam nastanka *N,N*-dialiltiouree iz alil-izotiocijanata.

4.7. Biofortifikacija selenijem

Mlada biljka *Brassica oleracea* var. *italica* (brokula) starosti mjesec dana i ukupne visine 18 cm (korijen 4 cm) presađena je u posudu te ostavljena 15 dana da se prilagodi novim uvjetima. Nakon toga, referentna biljka je zalijevana samo vodom dok su ostale zalijevane sa 20 mL otopina natrijevog selenata koncentracije 2 mM i 5 mM dva puta tjedno tijekom 35 dana. Tijekom cijelog razdoblja praćena je morfologija biljke, odnosno bilježena visina korijena i nadzemnog dijela. Biljke tijekom uzgoja nisu pokazivale znakove propadanja, ali jesu razliku u razvoju ovisno o visini koncentracije dodavane otopine selenata. Nakon sabiranja, izmjerena duljina korijena referentne biljke iznosila je 24 cm naprema 6 cm korijena biljke zalijevane najvišom koncentracijom selenija. Biofortifikacija selenijem drastično je utjecala na rast korijena što se može objasniti kompetitivnim djelovanjem sulfata i selenata pri čemu selenat u korijenu izaziva signal S-gladovanja za inicijalizaciju unosa sumpora.^[145] Tretiranje selenijem nije značajno utjecalo na rast nadzemnog dijela, visina kod referentne biljke iznosila je 33 cm, dok je za 5 mM otopinu dosegla 25 cm (slika 4.7.1.).



Slika 4.7.1. *Brassica oleracea* var. *italica* zalijevana vodom (referentna) i različitim koncentracijama otopine natrijeva selenata

Isti eksperiment je ponovljen i s biljkom *Eruca vesicaria* (rokula). Rokula je 24. dan od sijanja presađena u posudu sa zemljom te je izmjerena duljina korijena koja je iznosila 2,5 cm, a nadzemni dio je iznosio 6 cm. Slične morfološke karakteristike kao kod brokule uočene su i za rukolu gdje je korijen referentne biljke bio 15 cm, dok je korijen biljke zalijewane otopinom natrijevog selenata koncentracije 5 mM bio 7 cm. U ovom slučaju i nadzemni dio se smanjio te je za najvišu koncentraciju natrijevog selenata uočen je početak truljenja (slika 4.7.2.).



Slika 4.7.2. *Eruca vesicaria* zalijeavana vodom (referentna) i različitim koncentracijama otopine natrijevog selenata.

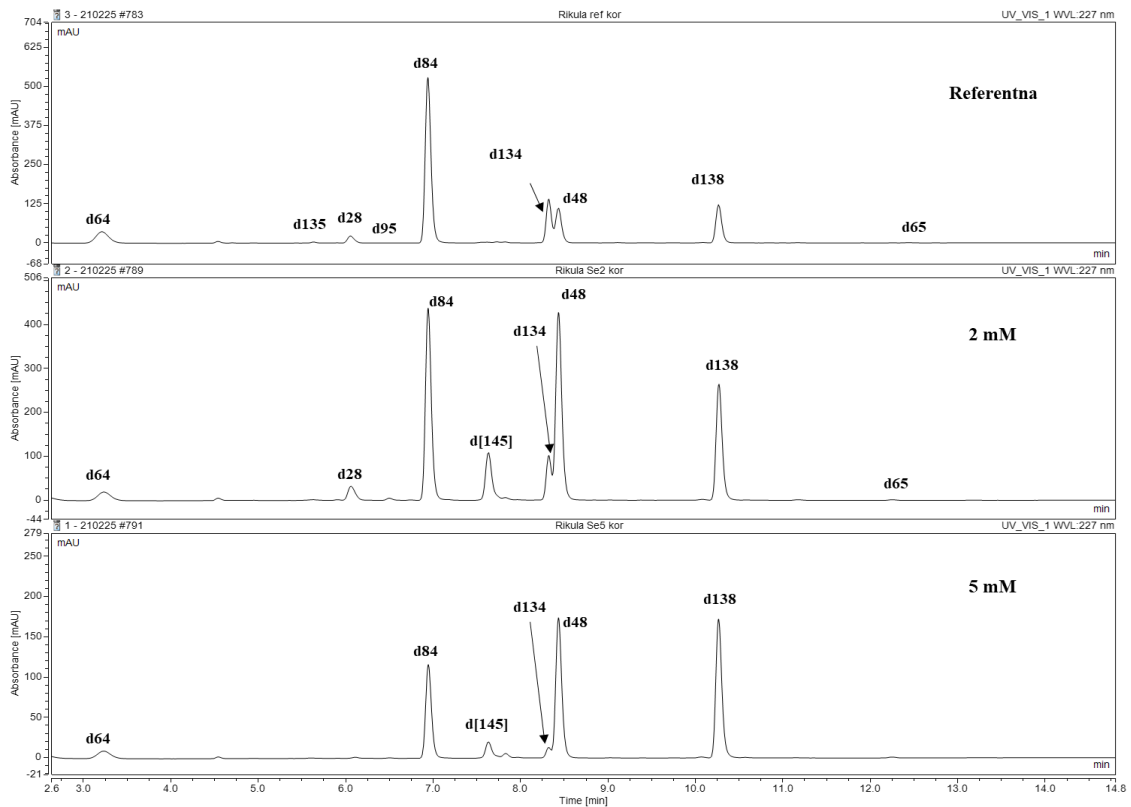
Glukozinolati brokule i rukole su kvalitativno i kvantitativno analizirani preko desulfatiranih oblika. U brokuli su identificirani alifatski glukozinolati sa sumporom u bočnom lancu koji potječu od metionina, jedan arilalifatski glukozinolat te indolni glukozinolati koji potječu od triptofana. Ukupni sadržaj glukozinolata u korijenu je porastao u oba slučaja (2 mM i 5 mM natrijevog selenata u odnosu na referentnu biljku), a glucoerucin (**84**) je bio glavni glukozinolat (tablica 4.7.1.). U brokuli su svi dobiveni $[M+Na]^+$ bili poznati te je zaključeno kako glukozinolati sa selenijem u strukturi nisu prisutni u njoj.

Tablica 4.7.1. Sadržaj glukozinolata u *Brassica oleracea* var. *italica*.

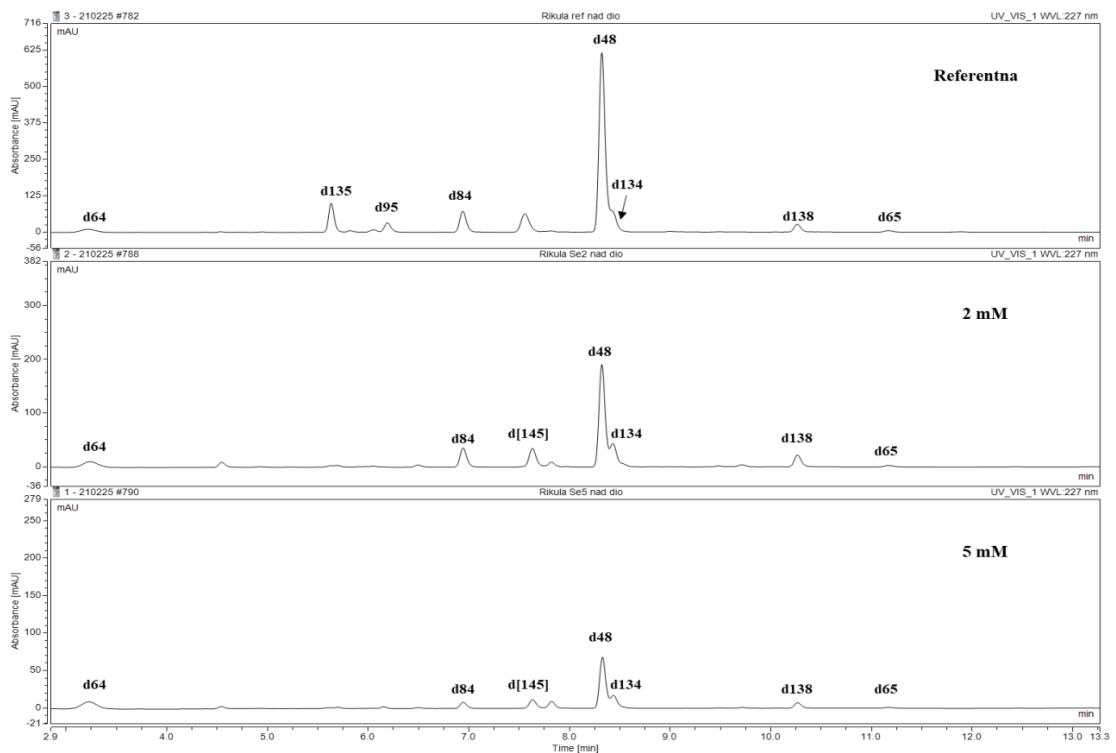
Glukozinolat	Referentna			Otopina Na ₂ SeO ₄					
				2 mM			5 mM		
	k	st	l	k	st	l	k	st	l
Prekursor Met									
Glukoiberin (73)	tr	tr	n.d.	tr	tr	n.d.	tr	tr	n.d.
Glukorafanin (64)	2,09	1,11	n.d.	1,40	0,58	tr	3,68	0,44	tr
Glukoibervirin (95)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,03	n.d.	n.d.
Glukoerucin (84)	4,88	0,13	n.d.	9,05	0,11	n.d.	9,89	tr	n.d.
Glukoberteroin (94)	tr	n.d.	tr	n.d.	n.d.	n.d.	tr	n.d.	n.d.
Ukupno Met	6,97	1,24	tr	10,45	0,69	tr	14,60	0,44	tr
Prekursor Phe/Tyr									
Glukonasturcin (105)	tr	n.d.	tr	tr	n.d.	n.d.	0,31	n.d.	n.d.
Prekursor Trp									
Glukobrasicin (43)	0,68	0,07	0,31	2,34	0,55	0,09	1,20	0,25	0,58
4-Hidroksiglukobrasicin (28)	0,62	n.d.	0,60	0,78	0,22	0,51	tr	n.d.	0,57
4-Metoksiglukobrasicin (48)	3,23	0,15	0,09	4,23	0,15	0,10	3,80	0,53	0,45
4-Hidroksi-1-metoksiglukobrasicin ([161])	n.d.	n.d.	0,24	0,04	0,04	0,02	n.d.	n.d.	0,03
Neoglukobrasicin (47)	1,97	0,20	0,04	2,73	0,56	tr	2,43	0,20	0,18
1,4-Dimetoksiglukobrasicin (138)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	tr	n.d.	n.d.
Ukupno Trp	6,50	0,42	1,28	10,12	1,52	0,72	7,43	0,98	1,81
UKUPNO	13,48	1,66	1,28	20,57	2,21	0,72	22,34	1,42	1,81

*k-korijen; st-stabljika; l-list.

S druge strane, rokula je sadržavala više glukozinolata koji potječu od metionina koji su dominirali profilom u odnosu na dodatno prisutne indolne glukozinolate (tablica 4.7.2.), a na slikama 4.7.3. i 4.7.4. su dani kromatogrami korijena i nadzemnog dijela referentne biljke te biljaka tretiranih 2 mM i 5 mM otopinom natrijevog selenata.



Slika 4.7.3. Kromatogram korijena *Eruca vesicaria*. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 3.7.2.



Slika 4.7.4. Kromatogram nadzemnog dijela *E. vesicaria*. Brojevi odgovaraju brojevima u tablici 3.7.2.

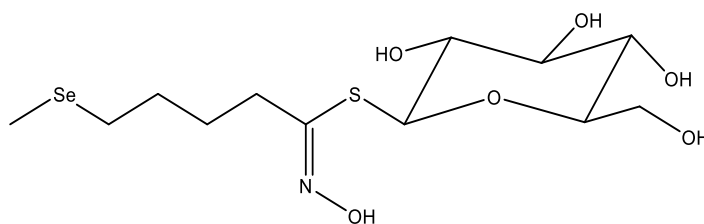
Glukozinolat **84** je i u ovom slučaju sadržajno najznačajniji, osobito u korijenu (tablica 4.7.2.).

Tablica 4.7.2. Sadržaj glukozinolata u *Eruca vesicaria*.

Glukozinolat ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{ DW}$)	Referentna		Otopina Na_2SeO_4			
			2 mM		5 mM	
	k	nad dio	k	nad dio	k	nad dio
Prekursor Met						
Glukorafanin (64)	3,23	0,87	1,69	0,95	0,75	0,74
4-(β -D-Glukopiranozildisulfanil) butil-glukozinolat (135)	tr	1,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glukoibervirin (95)	1,88	1,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glukoerucin (84)	20,59	2,78	17,27	1,30	4,50	0,21
Dimer 4-merkaptobutil-glukozinolata (134)	4,33	0,20	17,14	1,49	6,78	0,55
Glukokamelinin (65)	tr	0,21	tr	tr	n.d.	tr
Ukupno Met	30,03	7,08	36,10	3,74	12,03	1,50
Prekursor Se-Met						
Glukoselenoerucin ([145])	n.d.	n.d.	4,48	1,24	0,78	0,36
Prekursor Trp						
4-Hidroksiglukobrasicin (28)	0,23	n.d.	tr	n.d.	n.d.	n.d.
4-Metoksiglukobrasicin (48)	1,16	5,96	0,80	1,64	0,07	0,57
1,4-Dimetoksiglukobrasicin (138)	0,92	0,20	2,06	0,15	1,33	0,04
Ukupno Trp	2,31	6,16	2,86	1,79	1,40	0,61
UKUPNO	32,34	13,24	43,44	6,77	14,21	2,47

*sadržaj glukozinolata u $\mu\text{mol g}^{-1}\text{ DW}$; k-korijen; nad dio-nadzemni dio.

Usporedbom kromatograma dobivenih za korijen i nadzemni dio, uočeno je da se u uzorcima tretiranim natrijevim selenatom, pojavljuje signal koji nije prisutan u referentnoj biljci, osobito u korijenu. Njegov $[\text{M}+\text{Na}]^+$ iznosio je 412 pri $t_R = 7,41$ min koji nije odgovarao do tada poznatim glukozinolatima te mase. Pretpostavljeno je da se radi o selenoglukozinolatu i to glukoselenoerucinu ([**145**]) čija struktura desulfo oblika je dana na slici 4.7.5., budući da dobivena masa odgovara ovom glukozinolatu kada se sumpor zamijeni selenijem.



Slika 4.7.5. Struktura desulfoglucoselenoerucina, **d[145]**.

U MS2 spektru **d[145]** (poglavlje 8. Prilozi) prisutni su fragmenti označeni a, b, c i d koji upućuju na to da se selenij nije nalazio u tioglukozom dijelu već u pokrajnjem lancu izvedenom iz selenometionina (Se-Met). Tik uz 412 pojavljuje se i 410 za kojeg je pretpostavljeno da se radi o izotopu selenija 78 te je i za ovaj $[M+Na]^+$ napravljen MS2 te je i za njega dobiven fragment m/z 185 (a). Prema dosadašnjoj literaturi, ovaj selenoglukozinolat je po prvi put identificiran preko svog desulfatiranog oblika te je po prvi puta prikazan njegov MS2 spektar. Pojava ovog glukozinolata izvedenog iz Se-Met može se povezati s visokim sadržajem njegovog sumpornog analoga **84**, a najveći sadržaj dobiven je u korijenu biljke tretirane 2 mM otopinom, $4,48 \mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Za 5 mM otopinu općenito je sadržaj glukozinolata bio manji pa samim time i sadržaj **[145]** što je posljedica postupnog propadanja biljke.

4.8. Klice

Posljednjih godina, mikropovrće, odnosno klice postaju sve zastupljenije u pripremi domaće hrane i predmet sve većeg interesa tržišta i industrije dodataka prehrani. Klijanje je jednostavan i brz proces i ne ovisi o specifičnim klimatskim uvjetima. U usporedbi sa sjemenkama ili zrelim biljkama, poznato je da klice sadrže male količine antinutrijenata, a bogate su aminokiselinama, masnim kiselinama i jednostavnim šećerima, ali i vrlo važnim specijaliziranim metabolitima, zbog čega se nazivaju fitokemijskim tvornicama. Zanimljivo je da su brojne biljne vrste iz porodice Brassicaceae, kao što su brokula, hren, kupus, vrlo zastupljene kao klice.^[146, 147]

U sklopu ove doktorske disertacije hidroponski su uzgojene klice vrsta *Brassica oleracea* (kelj), *B. oleracea* var. *italica* (brokula), *Lepidium sativum* (kres salata), *Eruca vesicaria* (rokula) i *Raphanus sativus* (rotkvice). Kvalitativna i kvantitativna analiza glukozinolata provedena je koristeći UHPLC-DAD-MS/MS u cilju vrednovanja uzgojenih klica kao izvora glukozinolata te su rezultati prikazani u tablici 4.8.1.

Tablica 4.8.1. Kvalitativni i kvantitativni sastav glukozinolata u uzgojenim klicama.

Klice	Sadržaj (μmol g ⁻¹ DW)
<i>Brassica oleracea</i>	
Prekursor Met	
Glukonapin (12)	0,99
Progoitrin (24R)	5,24
Glukoiberin (73)	32,14
Glukoerucin (84)	1,43
Glukoibervirin (95)	tr
Sinigrin (107)	6,40
Prekursor Trp	
4-Hidroksiglukobrasicin (28)	5,51
Glukobrasicin (43)	1,47
Neoglukobrasicin (47)	0,19
4-Metoksiglukobrasicin (48)	0,97
UKUPNO	54,34
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	
Prekursor Ile	
Glukokohlearin (61)	tr
Prekursor Met	
Glukonapin (12)	36,88
Progoitrin (24R)	3,60
Epiprogoitrin (24S)	0,12

Glukonapoleiferin (38S)	0,62
Glukoerucin (84)	0,24
Glukoberteroin (94)	0,42
Glukobrasikanapin (101)	20,84
Prekursor Phe	
Glukonasturcin (105)	0,79
Prekursor Trp	
4-Hidroksiglukobrasicin (28)	3,97
Glukobrasicin (43)	2,69
4-Metoksiglukobrasicin (48)	7,23
Neoglukobrasicin (47)	2,92
UKUPNO	79,96
<i>Eruca vesicaria</i>	
Prekursor Met	
Glukorafanin (64)	3,48
Glukoerucin (84)	13,34
Glukoibervirin (95)	tr
Dimer 4-merkaptobutil-glukozinolata (134)	16,16
4-(β -D-Glukopiranozildisulfanil)butil-GL (135)	0,89
Prekursor Trp	
4-Hidroksiglukobrasicin (28)	0,44
Glukobrasicin (43)	tr
4-Metoksiglukobrasicin (48)	5,69
1,4-Dimetoksiglukobrasicin (138)	0,22
UKUPNO	40,22
<i>Lepidium sativum</i>	
Prekursor Phe	
Glukotropeolin (11)	218,23
Prekursor Trp	
4-Metoksiglukobrasicin (48)	1,19
UKUPNO	219,42
<i>Raphanus sativus</i>	
Prekursor Met	
Glukorafenin (63)	47,50
Glukorafanin (64)	tr
Prekursor Trp	
4-Hidroksiglukobrasicin (28)	1,53
Glukobrasicin (43)	1,27
4-Metoksiglukobrasicin (48)	10,30
UKUPNO	60,60

U klicama kelja kao glavni glukozinolat identificiran je glucoiberin (**73**) čiji sadržaj je iznosio 32,14 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW što je značajna količina ako se usporedi sa sadržajima određenim u prethodno opisanim odraslim biljkama gdje je slična količina (35,46 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) pronađena jedino u nadzemnom dijelu hrena. Ovaj glukozinolat spada u skupinu metilsulfinilnih glukozinolata koji su prekursori važnih izotiocijanata, istaknutih bioloških svojstava. Tako razgradnjom **73** nastaje 3-(metilsulfinil)propil-izotiocijanat za kojeg je utvrđeno da ima nisku toksičnost za normalne stanice, dok u tumorskim stanicama (jetra, jajnici i glioblastom) inducira apoptozu i inhibira proliferaciju.^[148] Ukupni sadržaj glukozinolata iznosio je 54,34 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW.

Klice brokule koja pripada istom rodu kao i kelj, bile su bogatije glukozinolatima (79,96 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) pri čemu najveća količina je utvrđena za alifatske nezasićene glukozinolate, glukonapin (**12**) 36,88 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW i glukobrasikanapin (**101**), 20,84 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Glukozinolat **101** pronađen je samo u 3 istraživane biljke i to u tragovima. Treba istaknuti da se u klicama brokule ovaj glukozinolat pojavljuje kao glavni, što nije utvrđeno u nijednoj biljnoj vrsti istraživanoj u sklopu ove doktorske disertacije. Zanimljiv je i podatak da u uzgojenoj biljci brokule (tablica 3.7.1.) ova dva glukozinolata nisu pronađena.

Ukupni sadržaj glukozinolata u rukoli iznosio je 40,22 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW što je slično u odnosu na sadržaj dobiven za cijelu uzgojenu biljku (tablica 3.7.2.).

Arilalifatski glukozinolat glukotropeolin (**11**) je pronađen u klicama kres salate u vrlo visokom sadržaju i to 218,23 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW, a tako visoka vrijednost je pronađena još jedino u *L. didymum* (ukupno 353,52 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Glukozinolat **11** je prekursor benzil-izotiocijanata za kojeg se pokazalo da ima antibakterijski učinak širokog spektra, s minimalnom inhibitornom koncentracijom od 1 $\mu\text{L/mL}$ za *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Aspergillus niger*, te 0,5 $\mu\text{L/mL}$ za *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* i *Penicillium citri*.^[149]

Pregledom tablice 3.1.2. utvrđeno je da se glukorafenin (**63**) nalazi u znatno višoj količini u klicama rotkvice (47,50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) nego u samoniklim biljkama koje su sadržavale ovaj glukozinolat. 4-(Metilsulfinil)but-3-enil-izotiocijanat (sulforafen), razgradni produkt glukozinolata **63**, pokazuje izražena antitumorska svojstva.

Klice su biljna hrana bogata fitonutrijentima i dobar su izvor flavonoida, drugih polifenola, glukozinolata, proteina, minerala i vitamina.^[146] Iz tog razloga, prema Reedu i sur. (2018.), klice se smatraju "funkcionalnom hranom", a to je ona hrana koja osim

svoje uobičajene nutritivne vrijednosti ima ulogu i u očuvanju zdravlja i prevenciji bolesti.^[150] Uzgoj klica je jednostavan i brz proces koji se bez posebnih zahtjeva može izvesti u kućanstvima te unutar tjedan dana imati nutritivno bogat proizvod i u razdobljima kada nije dostupno svježe povrće. U ovom istraživanju uočeno je kako su određene klice uzgojene u tjedan dana sadržavale više glukozinolata nego odrasle biljke te su u visokom postotku bili prisutni glukozinolatni prekursori izrazito biološki aktivnih izotiocijanata.

5. ZAKLJUČCI

1. Biljna porodica Brassicaceae je sadržavala najraznolikije glukozinolate koje potječu od sedam (7) aminokiselinskih prekursora i to alifatske koji potječu iz metionina, valina, leucina i izoleucina, arilalifatske iz fenilalanina i/ili tirozina te indolne iz triptofana.
2. U većini istraženih biljnih vrsta porodice Brassicaceae najzastupljeniji su alifatski glukozinolati biosintetizirani iz metionina, najčešće C3 – C5. Tako je u biljci *Barbarea vulgaris* 3-hidroksi-5-(metilsulfonyl)pentil-glukozinolat određen kao jedan od glavnih (1,70 – 5,15 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW) glukozinolata. Identificiran je na temelju MS2 spektra desulfo-oblika te pomoću poznatih homologa glukolisina i glukoberteroina pronađenih u biljnim organima *B. vulgaris*. Isti je prethodno identificiran samo u *Erysimum odoratum* i to preko razgradnog produkta. Dodatno, istim principom pretpostavljen je i novi glukozinolat, niži homolog, 3-hidroksi-4-(metilsulfonyl)butil-glukozinolat. Dugolančani glukozinolati su rijetki i pronađeni su tek u nekoliko vrsta i to: C6 u *Hesperis laciniata* i *Lunaria annua*, C8 u *Biscutella cichoriifolia*, *B. laevigata* i *Rorippa sylvestris* te C9 u *R. sylvestris*. Razgranati alifatski glukozinolati pronađeni su samo u *L. annua* i *Sisymbrium officinale*, od kojih je u obje biljke značajniji bio izopropil-glukozinolat koji potječe od valina. *sec*-Butil-glukozinolat biosintetiziran iz izoleucina, identificiran u *Armoracia rusticana*, *L. annua* i *S. officinale* te izobutil-glukozinolat biosintetiziran iz leucina, identificiran u *S. officinale*, pronađeni su u znatno manjim količinama.
3. Utvrđeni prekursori arilalifatskih glukozinolata uključuju fenilalanin i/ili tirozin. Većina glukozinolata ove strukture u porodici Brassicaceae uključuje jednostavne arilalifatske glukozinolate kao što su benzil-glukozinolat, 4-hidroksibenzil-glukozinolat te 2-feniletil-glukozinolat. Višestrukosupstituirani glukozinolati s benzenskom strukturom, pronađeni u *Lepidium graminifolium*, su iznimno rijetki, a uključuju 3,4-dimetoksibenzil-glukozinolat, 3,4,5-trimetoksibenzil-glukozinolat te 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-glukozinolat. Potonji je identificiran i u nadzemnom dijelu *Cardamine hirsuta*.
4. Pojava višestrukoglikoziliranih glukozinolata u porodici Brassicaceae je iznimno rijetka. Biljka *Hesperis laciniata* odabrana je kao izvor jedinog poznatog glukozinolata koji kao dodatnu šećernu jedinicu u pokrajnjem lancu sadrži apiozu.

Kao glavni glukozinolat identificiran je 4'-O-(β -D-apiofuranoziloksi)-3-hidroksibenzil-glukozinolat te je po prvi puta izoliran u obliku desulfoglukozinolata i kvantiziran u ovoj biljci, sa sadržajem 51,34 – 115,08 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW. Količinom se ističe i po prvi put identificirani 4'-O-(β -D-apiofuranoziloksi)benzil-glukozinolat (6,93 – 27,49 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). MS2 spektri oba desulfoglukozinolata sadrže karakterističan m/z 368 koji odgovara fragmentu apioze. Glukozinolatni profil biljke sadržavao je i ramnozilirane glukozinolate, 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat, 4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat te novoidentificirani *orto* ili *meta* hidroksi-4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat.

5. Biljka *Thlaspi perfoliatum* predstavlja novu biljku iz porodice Brassicaceae koja je izvor višestrukoglikoziliranih glukozinolata, a ima sličan glukozinolatni profil biljci *H. laciniata*. Identificirana su oba prethodno navedena apiozilirana glukozinolata s iznimno visokim sadržajem, 4'-O-(β -D-apiofuranoziloksi)-3-hidroksibenzil-glukozinolat (16,38 – 99,84 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW), dok je novoidentificirani 4'-O-(β -D-apiofuranoziloksi)benzil-glukozinolat bio glavni (20,52 – 104,16 $\mu\text{mol g}^{-1}$ DW). Koristeći *H. laciniata* kao standard, potvrđena je točna masa oba glukozinolata koristeći UHPLC-QTOF tehniku.
6. Najčešće zastupljeni indolni glukozinolati u istraženim biljkama porodice Brassicaceae bili su glukobrasicin te tri monosupstituirana glukozinolata, 4-hidroksiglukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin i *N*-metoksiglukobrasicin. Disupstituirani 1,4-dimetoksiglukobrasicin pronađen je u tragovima u *Eruca vesicaria* i *Hirschfeldia incana*. U korijenu biljke *Thlaspi alliaceum* identificiran je novi disupstituirani indolni 4-hidroksi-1-metoksiindol-3-il-glukozinolat i to temeljem karakterističnih fragmentacija u MS2 spektru, za čiju konačnu potvrdu strukture je potrebno izvršiti NMR analizu.
7. Biljna porodica Capparidaceae sadržavala je u najvećem dijelu metil-glukozinolat koji potječe iz aminokiseline alanina te predstavlja njegov jedini izvor. Arilalifatski benzil-glukozinolat pronađen je samo u cvijetu kapare s Hvara. Prema do sada dostupnim informacijama o porodici Capparidaceae, jedini prethodno identificiran glukozinolat ove vrste je 2-feniletil-glukozinolat. Pronađeni su također i glukozinolati koji potječu od metionina, dugolančani 9-(metilsulfinil)nonil-glukozinolat u uzorcima s Brača i Hvara i 8-(metilsulfinil)oktil-glukozinolat u

- uzorku s Hvara. Ovo istraživanje, u kojem su prema dostupnim informacijama, po prvi put identificirani ovi dugolančani glukozinolati, predstavlja prvi konkretniji dokaz biosinteze C8 i C9 metilsulfinilnih glukozinolata u ovoj biljnoj porodici.
8. Analizom jedinog komercijalno dostupnog predstavnika porodice Moringaceae, *Moringa oleifera*, identificirani su 4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat (glukomoringin) kao glavni ($29,23 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$) te tri *O*-acetilirana izomera desulfoglukomoringina čiji su aminokislinski prekursori fenilalanin i/ili tirozin. Desulfoglukosinalbin pronađen u tragovima, predstavlja artefakt koji nastaje tijekom desulfatacije glukomoringina što ukazuje na njegovu manju nestabilnost. Snimljeni su MS2 spektri tri desulfatirana *O*-acetilirana izomera desulfoglukomoringina što do sada nije zabilježeno u literaturi. Na temelju MS2 spektra i literature pretpostavljena je struktura *orto* ili *meta* hidroksi-4-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat koji predstavlja novi glukozinolat. Isti je prisutan i u dvjema biljkama porodice Brassicaceae, *Hesperis laciniata* i *Thlaspi perfoliatum*.
 9. U biljci *Reseda lutea* i *R. phyteuma* identificiran je 2-(α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-glukozinolat, izomer glukomoringina karakterističan za biljnu porodicu Resedaceae koji potječe od fenilalanina. Njegov MS2 spektar je karakterističan u odnosu na izomer iz porodice Moringaceae, što omogućava njihovo razlikovanje. Ista biljka sadrži i manje količine izobutil-glukozinolata čija je struktura potvrđena MS spektrom njegovog razgradnog produkta, izobutil-izotiocijanata. Oba glukozinolata potječu od izoleucina.
 10. Iz pet (5) biljaka izolirani su glukozinolati u svom desulfatiranom obliku i to: 3-(metilsulfinil)propil-glukozinolat (glukoiberin) iz nadzemnog dijela jerihonske ruže (*Anastatica hierochuntica*, $25,46 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$); 4-hidroksibenzil-glukozinolat (glukosinalbin) iz sjemena bijele gorušice (*Sinapis alba*, $34,86 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$); metil-glukozinolat (glukokaparin) iz lista kapare (*Capparis orientalis*, $181,55 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$); benzil-glukozinolat (glukotropeolin) iz sjemena dragoljuba (*Tropaeolum majus*, $127,45 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$); 2-hidroksi-2-metilpropil-glukozinolat (glukokonrinigin) iz cvijeta bijelog katanca (*Reseda alba*, $52,72 \mu\text{mol g}^{-1} \text{DW}$). Strukture izoliranih desulfoglukozinolata potvrđene su ^1H , ^{13}C , COSY i HSQC NMR analizom.

11. Istraživanjem desulfo-4-(metilsulfinil)but-3-enil-glukozinolata izoliranog iz biljke *Matthiola incana*, utvrđena je njegova nestabilnost tijekom duljeg skladištenja u vodenoj otopini prilikom čega spontano nastaju ciklički tioimidatni *N*-oksidi.
12. Na odabranim biljnim vrstama prethodno određenog glukozinolatnog profila korištenjem UHPLC-DAD-MS/MS-a ispitivana je neizravna metoda identifikacije glukozinolata preko njihovih razgradnih produkata. Pri tome je utvrđeno da biljke koje sadrže C3, C5 i C6 ω -metilsulfinilne glukozinolate daju odgovarajuće izotiocijanate koji pokazuju nestabilnost u uvjetima GC-MS mjerenja, pri čemu njihov raspad rezultira nastankom odgovarajućih olefinskih izotiocijanata. Također, glavni arilalifatski glukozinolati, 4-hidroksibenzil-glukozinolati u *Bunias erucago* te 4-hidroksi-3,5-dimetoksibenzil-glukozinolati u *Lepidium graminifolium*, nisu identificirani preko odgovarajućih očekivanih razgradnih produkata. Naime, nestabilnost njihovih razgradnih produkata posljedica je prisutne elektron-donirajuće hidroksilne skupine u *para* položaju na benzenskom prstenu. Dodatno, zbog nestabilnosti razgradnih produkata indolnih glukozinolata, isti nisu identificirani GC-MS analizom. Ovo istraživanje ukazuje na ograničenost neizravne metode identifikacije glukozinolata preko razgradnih produkata u biljnim vrstama.
13. U uvjetima refluksiranja alil-izotiocijanata uslijed reakcije elektrofilnog ugljika u izotiocijanatnoj skupini s vodom došlo je do nastanka artefakta, *N,N*-dialiltiouree (prinos 45,9 %).
14. Zasađene biljke *Brassica oleracea* var. *italica* i *Eruca vesicaria* zalijevane otopinama natrijevog selenata u svrhu biofortifikacije selenijem pokazale su značajne morfološke promjene u vidu smanjenog razvitka korijena što se može objasniti kompetitivnim djelovanjem sulfata i selenata pri čemu selenat u korijenu izaziva signal S-gladovanja za incijalizaciju unosa sumpora. Samanjeni rast i razvoj uočen je i kod nadzemnog dijela biljaka. U *E. vesicaria* u korijenu i nadzemnom dijelu identificiran je 4-(metilseleno)butil-glukozinolati koji potječe od selenometionina. Selenij je utvrđen u pokrajnjem lancu temeljem karakterističnih fragmentacija u MS2 spektru koji je za ovaj desulfoselenoglukozinolati po prvi put snimljen i analiziran.
15. Hidroponski je uzgojeno 5 vrsta klica kupusnjača, *Brassica oleracea*, *B. oleracea* var. *italica*, *Eruca vesicaria*, *Lepidium sativum* i *Raphanus sativus* za koje je utvrđeno da imaju viši ukupni sadržaj glukozinolata u odnosu na iste samonikle i

uzgojene odrasle biljne vrste. Klice koje se svrstavaju u funkcionalnu hranu mogu pridonijeti očuvanju zdravlja i prevenciji bolesti zbog visokog sadržaja glukoziolata kao prekursora biološki aktivnih izotiocijanata.

6. LITERATURA

1. D. J. Kliebenstein i A. Osbourn, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2012**, *15*, 415-423.
2. N. Agerbirk i C. E. Olsen, *Phytochemistry* **2012**, *77*, 16-45.
3. I. Blažević, S. Montaut, F. Burčul, i P. Rollin, *Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential*, u *Reference Series in Phytochemistry* (Ur: J.M. Mérillon i K. Ramawat), Springer, Cham, **2017**. 3-60.
4. I. Blažević, S. Montaut, F. Burčul, C. E. Olsen, M. Burow, P. Rollin, i N. Agerbirk, *Phytochemistry* **2020**, *169*, 112100.
5. I. Blazevic, *Kem. Ind.* **2020**, *69*, 541-555.
6. J. W. Fahey, A. T. Zalcmann, i P. Talalay, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 5-51.
7. F. S. Hanschen, E. Lamy, M. Schreiner, i S. Rohn, *Angew. Chem., Int. Edit.* **2014**, *53*, 11430-11450.
8. A. M. Bones i J. T. Rossiter, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1053-1067.
9. A. Kjør, *Naturally Derived isoThiocyanates (Mustard Oils) and Their Parent Glucosides*, u *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Ur: L. Zechmeister), Springer Vienna, Vienna, **1960**. 122-176.
10. M. G. Ettlinger i A. Kjaer, *Recent Adv. Phytochem.* **1968**, *1*, 59-144.
11. D. B. Clarke, *Anal. Methods* **2010**, *2*, 310-325.
12. S. Montaut, S. Read, I. Blažević, J. M. Nuzillard, M. Roje, D. Harakat, i P. Rollin, *Carbohydr. Res.* **2020**, *488*.
13. B. Trabelcy, N. Chinkov, M. Samuni-Blank, M. Merav, I. Izhaki, S. Carmeli, i Y. Gerchman, *Phytochemistry* **2021**, *187*, 112760.
14. G. R. Fenwick i R. K. Heaney, *Food Chem.* **1983**, *11*, 249-271.
15. A. Kjaer i H. Thomsen, *Acta Chem. Scand.* **1962**, *16*, 591-598.
16. G. P. Dateo, *Synthesis of mustard oil glucosides via hydroxamyl chlorides*, Rice University, Huston, SAD, **1961**.
17. C. E. Olsen, X. C. Huang, C. I. C. Hansen, D. Cipollini, M. Ørgaard, A. Matthes, F. Geu-Flores, M. A. Koch, i N. Agerbirk, *Phytochemistry* **2016**, *132*, 33-56.
18. M. E. Daxenbichler, G. F. Spencer, D. G. Carlson, G. B. Rose, A. M. Brinker, i R. G. Powell, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2623-2638.
19. R. N. Bennett, F. A. Mellon, i P. A. Kroon, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 428-438.

20. B. Yang i C. F. Quiros, *Genet. Resour. Crop Evol.* **2010**, *57*, 1079-1089.
21. R. A. Cole, *J. Sci. Food Agric.* **1980**, *31*, 549-557.
22. J. E. Rodman, *Syst. Bot.* **1976**, *1*, 137-148.
23. D. J. Kliebenstein, J. Kroymann, P. Brown, A. Figuth, D. Pedersen, J. Gershenzon, i T. Mitchell-Olds, *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 811-825.
24. A. A. Al-Gendy, O. D. El-gindi, A. S. Hafez, i A. M. Ateya, *Food Chem.* **2010**, *118*, 519-524.
25. G. R. Fenwick, N. M. Griffiths, i R. K. Heaney, *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34*, 73-80.
26. A. Kjær i H. Thomsen, *Phytochemistry* **1963**, *2*, 29-32.
27. L. M. Larsen, J. K. Nielsen, i H. Sørensen, *Entomol. Exp. Appl.* **1992**, *64*, 49-55.
28. N. Agerbirk i C. E. Olsen, *Phytochemistry* **2013**, *96*, 466-467.
29. N. S. Survay, B. Kumar, C. P. Upadhyaya, E. Ko, C. Lee, J. N. Choi, D.-Y. Yoon, Y.-S. Jung, i S. W. Park, *Fitoterapia* **2010**, *81*, 1062-1066.
30. I. E. Sønderby, F. Geu-Flores, i B. A. Halkier, *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 283-290.
31. S. Chhajed, I. Mostafa, Y. He, M. Abou-Hashem, M. El-Domiaty, i S. Chen, *Agronomy-Basel* **2020**, *10*.
32. M. S. C. Pedras i E. E. Yaya, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1149-1166.
33. M. S. C. Pedras, Q. H. To, i G. Schatte, *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2016**, *52*, 2505-2508.
34. D. Nelson i D. Werck-Reichhart, *Plant J.* **2011**, *66*, 194-211.
35. M. Sørensen, E. H. J. Neilson, i B. L. Møller, *Mol. Plant* **2018**, *11*, 95-117.
36. R. S. Abrahams, J. C. Pires, i M. E. Schranz, *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*.
37. C. D. Grubb i S. Abel, *Trends Plant. Sci.* **2006**, *11*, 89-100.
38. B. A. Halkier i J. Gershenzon, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 303-333.
39. D. W. Reed, L. Davin, J. C. Jain, V. Deluca, L. Nelson, i E. W. Underhill, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *305*, 526-532.
40. T. Kakizaki, H. Kitashiba, Z. Zou, F. Li, N. Fukino, T. Ohara, T. Nishio, i M. Ishida, *Plant Physiol.* **2017**, *173*, 1583-1593.
41. D. L. Zuluaga, N. S. Graham, A. Klinder, A. E. E. van Ommen Kloeke, A. R. Marcotrigiano, C. Wagstaff, R. Verkerk, G. Sonnante, i M. G. M. Aarts, *Plant Mol. Biol.* **2019**, *101*, 65-79.

42. M. Pfalz, M. D. Mikkelsen, P. Bednarek, C. E. Olsen, B. A. Halkier, i J. Kroymann, *Plant Cell* **2011**, *23*, 716-729.
43. M. Pfalz, M. Mukhaimar, F. Perreau, J. Kirk, C. I. C. Hansen, C. E. Olsen, N. Agerbirk, i J. Kroymann, *Plant Physiol.* **2016**, *172*, 2190-2203.
44. P. P. Edger, J. C. Hall, A. Harkess, M. Tang, J. Coombs, S. Mohammadin, M. E. Schranz, Z. Xiong, J. Leebens-Mack, B. C. Meyers, K. J. Sytsma, M. A. Koch, I. A. Al-Shehbaz, i J. C. Pires, *Am. J. Bot.* **2018**, *105*, 463-469.
45. R. N. Bennett, F. A. Mellon, E. A. S. Rosa, L. Perkins, i P. A. Kroon, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5856-5862.
46. H. Schraudolf i R. Bäuerle, *Z. Naturforsch. C* **1986**, *41*, 526-528.
47. N. Agerbirk, C. C. Hansen, C. Kiefer, T. P. Hauser, M. Ørgaard, C. B. Asmussen Lange, D. Cipollini, i M. A. Koch, *Phytochemistry* **2021**, *185*, 112668.
48. R. Mithen, R. Bennett, i J. Marquez, *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2074-2086.
49. P. P. Edger, H. M. Heidel-Fischer, M. Bekaert, J. Rota, G. Glöckner, A. E. Platts, D. G. Heckel, J. P. Der, E. K. Wafula, M. Tang, J. A. Hofberger, A. Smithson, J. C. Hall, M. Blanchette, T. E. Bureau, S. I. Wright, C. W. dePamphilis, M. E. Schranz, M. S. Barker, G. C. Conant, N. Wahlberg, H. Vogel, J. C. Pires, i C. W. Wheat, *PNAS* **2015**, *112*, 8362-8366.
50. M. Tian, Y. Yang, F. W. Ávila, T. Fish, H. Yuan, M. Hui, S. Pan, T. W. Thannhauser, i L. Li, *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 8036-8044.
51. F. C. Hsu, M. Wirtz, S. C. Heppel, J. Bogs, U. Krämer, M. S. Khan, A. Bub, R. Hell, i T. Rausch, *Plant, Cell Environ.* **2011**, *34*, 192-207.
52. N. Terry, A. M. Zayed, M. P. De Souza, i A. S. Tarun, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **2000**, *51*, 401-432.
53. T. G. Sors, D. R. Ellis, i D. E. Salt, *Photosynth. Res.* **2005**, *86*, 373-89.
54. J. Wang, S. Mao, H. Xu, Q. Wu, M. Liang, Y. Yuan, M. Liu, K. Huang, i Q. Wu, *Plant Mol. Biol. Rep.* **2020**, *38*, 62-74.
55. A. J. Matich, M. J. McKenzie, R. E. Lill, D. A. Brummell, T. K. McGhie, R. K. Y. Chen, i D. D. Rowan, *Phytochemistry* **2012**, *75*, 140-152.
56. J. D. Hayes, M. O. Kelleher, i I. M. Eggleston, *Eur. J. Nutr.* **2008**, *47*, 73-88.
57. F. J. Barba, N. Nikmaram, S. Roohinejad, A. Khelifa, Z. Zhu, i M. Koubaa, *Front. Nutr.* **2016**, *3*.
58. F. S. Hanschen, S. Rohn, I. Mewis, M. Schreiner, i L. W. Kroh, *Food Chem.* **2012**, *130*, 1-8.

59. F. S. Hanschen, S. Platz, I. Mewis, M. Schreiner, S. Rohn, i L. W. Kroh, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 2231-2241.
60. C. C. Conaway, Y. M. Yang, i F. L. Chung, *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3*, 233-55.
61. M. Traka i R. Mithen, *Phytochemistry Rev.* **2009**, *8*, 269-282.
62. R. Mithen, *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 91-103.
63. H. L. Foo, L. M. Gronning, L. Goodenough, A. M. Bones, B. Danielsen, D. A. Whiting, i J. T. Rossiter, *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 243-6.
64. M. Burow, A. Losansky, R. Müller, A. Plock, D. J. Kliebenstein, i U. Wittstock, *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 561-574.
65. M. Burow, J. Markert, J. Gershenzon, i U. Wittstock, *FEBS J.* **2006**, *273*, 2432-46.
66. M. Burow, M. Rice, B. Hause, J. Gershenzon, i U. Wittstock, *Plant. Mol. Biol.* **2007**, *64*, 173-185.
67. Y. Uda, T. Kurata, i N. Arakawa, *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 2735-2740.
68. D. J. Williams, C. Critchley, S. Pun, M. Chaliha, i T. J. O'Hare, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8512-8521.
69. N. R. Milica Todorovska Rašić, *Facta Univ., Ser.: Phys., Chem. Technol.* **2020**, *18*, 77-87.
70. A. M. Wentzell i D. J. Kliebenstein, *Plant Physiol.* **2008**, *147*, 415-428.
71. Z. Zhang, J. A. Ober, i D. J. Kliebenstein, *Plant Cell* **2006**, *18*, 1524-1536.
72. R. B. Jones, C. L. Frisina, S. Winkler, M. Imsic, i R. B. Tomkins, *Food Chem.* **2010**, *123*, 237-242.
73. N. V. Matusheski, J. A. Juvik, i E. H. Jeffery, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1273-81.
74. V. Rungapamestry, A. J. Duncan, Z. Fuller, i B. Ratcliffe, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7628-7634.
75. R. Verkerk i M. Dekker, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7318-23.
76. L. Song i P. J. Thornalley, *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 216-24.
77. M. Francisco, P. Velasco, D. A. Moreno, C. García-Viguera, i M. E. Cartea, *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1455-1463.
78. J. Kapusta-Duch, B. Kusznerewicz, T. Leszczyńska, i B. Borczak, *J. Funct. Foods* **2016**, *23*, 412-422.
79. F. S. Hanschen i M. Schreiner, *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*.
80. Y. Zhang, R. H. Kolm, B. Mannervik, i P. Talalay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *206*, 748-55.

81. L. Mi, B. L. Hood, N. A. Stewart, Z. Xiao, S. Govind, X. Wang, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, i F. L. Chung, *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1735-43.
82. P. Soundararajan i J. S. Kim, *Molecules* **2018**, *23*.
83. Y. Zhang, *Mutat. Res.* **2004**, *555*, 173-190.
84. V. Lambrix, M. Reichelt, T. Mitchell-Olds, D. J. Kliebenstein, i J. Gershenzon, *Plant Cell* **2001**, *13*, 2793-2807.
85. B. A. Slominski i L. D. Campbell, *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1297-1302.
86. S. Chevolleau, L. Debrauwer, G. Boyer, i J. Tulliez, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5185-5190.
87. A. Bryan Hanley i K. R. Parsley, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 769-771.
88. G. R. De Nicola, M. Bagatta, E. Pagnotta, D. Angelino, L. Gennari, P. Ninfali, P. Rollin, i R. Iori, *Food Chem.* **2013**, *141*, 297-303.
89. H. Hoffmann, L. Andernach, C. Kanzler, i F. S. Hanschen, *Food Res. Int.* **2022**, *157*, 111237.
90. I. Blažević, *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae*, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, **2009**.
91. K. Großer i N. M. van Dam, *J. Visualized Exp.* **2017**, *121*, 55425.
92. G. F. Spencer i M. E. Daxenbichler, *J. Sci. Food Agric.* **1980**, *31*, 359-367.
93. A. Kjær, M. Ohashi, J. M. Wilson, C. Djerassi, i J. J. A. C. S. Munch-Petersen, *Acta Chem. Scand.* **1963**, *17*, 2143-2154.
94. G. John Shaw, D. Andrzejewski, J. A. G. Roach, i J. A. Sphon, *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 372-378.
95. B. W. Chistensen, A. Kjær, J. Øgaard Madsen, C. E. Olsen, O. Olsen, i H. Sørensen, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 353-357.
96. N. Fabre, V. Poinot, L. Debrauwer, C. Vigor, J. Tulliez, I. Fourasté, i C. Moulis, *Phytochem. Anal.* **2007**, *18*, 306-319.
97. T. Mohn, B. Cutting, B. Ernst, i M. Hamburger, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1166*, 142-151.
98. M. Maldini, S. Baima, G. Morelli, C. Scaccini, i F. Natella, *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1198-1206.
99. S. Montaut, A. Montagut-Romans, L. Chiari, i H. J. Benson, *Biochem. Syst. Ecol.* **2018**, *78*, 31-34.

100. N. Agerbirk, S. I. Warwick, P. R. Hansen, i C. E. Olsen, *Phytochemistry* **2008**, *69*, 2937-2949.
101. A. J. Windsor, M. Reichelt, A. Figuth, A. Svatoš, J. Kroymann, D. J. Kliebenstein, J. Gershenzon, i T. Mitchell-Olds, *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1321-1333.
102. B. Kusznerewicz, R. Iori, A. Piekarska, J. Namieśnik, i A. Bartoszek, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1278*, 108-115.
103. N. Ibrahim, I. Allart-Simon, G. R. De Nicola, R. Iori, J.-H. Renault, P. Rollin, i J.-M. Nuzillard, *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 323-334.
104. T. Nikolić ur. 2005. - nadalje, *Flora Croatica Database* (URL <http://hirc.botanic.hr/fcd>). Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 4.5.2022.
105. I. Blažević, S. Montaut, G. R. De Nicola, i P. Rollin, *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 1043-1046.
106. G. Graser, N. J. Oldham, P. D. Brown, U. Temp, i J. Gershenzon, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 23-32.
107. N. Agerbirk, C. C. Hansen, C. E. Olsen, C. Kiefer, T. P. Hauser, S. Christensen, K. R. Jensen, M. Ørgaard, D. I. Pattison, C. B. A. Lange, D. Cipollini, i M. A. Koch, *Phytochemistry* **2021**, *185*.
108. A. Kjaer i A. Schuster, *Phytochemistry* **1973**, *12*, 929-933.
109. A. Kjær, Schuster, A., *Acta Chem. Scand.* **1970**, *24*, 1631-1638.
110. N. M. Fofaria, A. Ranjan, S.-H. Kim, i S. K. Srivastava, *Chapter Five - Mechanisms of the Anticancer Effects of Isothiocyanates*, u *The Enzymes* (Ur: S.Z. Bathaie i F. Tamanoi), Academic Press, **2015**. 111-137.
111. A. Đulović, F. Burčul, V. Č. Čulić, M. Ruščić, P. Brzović, S. Montaut, P. Rollin, i I. Blažević, *Molecules* **2021**, *26*.
112. A. Kjær i M. Wagnières, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2195-2198.
113. A. Kjær, A. Schuster, i R. J. Park, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 455-457.
114. E. Pagnotta, N. Agerbirk, C. E. Olsen, L. Ugolini, S. Cinti, i L. Lazzeri, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 3167-3178.
115. R. Agneta, F. Lelario, S. De Maria, C. Möllers, S. A. Bufo, i A. R. Rivelli, *Phytochemistry* **2014**, *106*, 178-187.
116. N. Agerbirk, C. E. Olsen, D. Cipollini, M. Ørgaard, I. Linde-Laursen, i F. S. Chew, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9586-9596.

117. R. M. de Graaf, S. Krosse, A. E. M. Swolfs, E. te Brinke, N. Prill, R. Leimu, P. M. van Galen, Y. Wang, M. G. M. Aarts, i N. M. van Dam, *Phytochemistry* **2015**, *110*, 166-171.
118. J. Barillari, R. Iori, P. Rollin, i F. Hennion, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 234-236.
119. N. Agerbirk i C. E. Olsen, *Phytochemistry* **2011**, *72*, 610-623.
120. S. Galletti, M. Bagatta, F. Branca, S. Argento, G. R. De Nicola, S. Cianchetta, R. Iori, i P. Ninfali, *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *95*, 158-164.
121. N. Agerbirk, B. L. Petersen, C. E. Olsen, B. A. Halkier, i J. K. Nielsen, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1502-1507.
122. N. Agerbirk, C. E. Olsen, F. S. Chew, i M. Ørgaard, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4693-4700.
123. M. J. Patchell, E. H. Roalson, i J. C. Hall, *Taxon* **2014**, *63*, 315-328.
124. B. Matthäus i M. Özcan, *J. Agric Food Chem.* **2005**, *53*, 7136-7141.
125. M. Argentieri, F. Macchia, P. Papadia, F. P. Fanizzi, i P. Avato, *Ind. Crops Prod.* **2012**, *36*, 65-69.
126. G. Bianco, F. Lelario, F. G. Battista, S. A. Bufo, i T. R. I. Cataldi, *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1160-1169.
127. S. Montaut, P. Raharivelomanana, J.-F. Butaud, T. Lehartel, i P. Rollin, *Nat. Prod. Res.* **2020**, *34*, 2847-2851.
128. R. N. Bennett, F. A. Mellon, N. Foidl, J. H. Pratt, M. S. Dupont, L. Perkins, i P. A. Kroon, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3546-3553.
129. M. Maldini, S. A. Maksoud, F. Natella, P. Montoro, G. L. Petretto, M. Foddai, G. R. De Nicola, M. Chessa, i G. Pintore, *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 900-910.
130. J. W. Fahey, M. E. Olson, K. K. Stephenson, K. L. Wade, G. M. Chodur, D. Odee, W. Nouman, M. Massiah, J. Alt, P. A. Egner, i W. C. Hubbard, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7994.
131. O. Olsen, K. W. Rasmussen, i H. Sørensen, *Phytochemistry* **1981**, *20*, 1857-1861.
132. S. Montaut, S. Read, I. Blažević, J.-M. Nuzillard, D. Harakat, i P. Rollin, *Nat. Prod. Res.* **2019**, *35*, 494-498.
133. R. Ramallo, J. P. Wathelet, E. Le Boulengé, E. Torres, M. Marlier, J. F. Ledent, A. Guidi, i Y. Larondelle, *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 701-706.
134. R. Iori, J. Barillari, E. Gallienne, C. Bilardo, A. Tatibouët, i P. Rollin, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 292-295.

135. G. R. De Nicola, A. Tatibouët, R. Iori, i P. Rollin, *J. Sulfur Chem.* **2013**, *34*, 48-54.
136. I. Blažević, A. Đulović, F. Burčul, M. Popović, S. Montaut, T. Bilušić, I. Vrca, J. Markić, I. Ljubenkov, M. Ruščić, i P. Rollin, *J. Food Compos. Anal.* **2020**, *90*, 103483.
137. M. J. Nigro, J. I. Brardinelli, E. S. Lewkowicz, A. M. Iribarren, i S. L. Laurella, *J. Mol. Struct.* **2017**, *1144*, 49-57.
138. I. Blažević, A. Đulović, V. Čikeš Čulić, M. Popović, X. Guillot, F. Burčul, i P. Rollin, *Biomolecules* **2020**, *10*, 215.
139. W. C. K. Chiang, D. J. Pusateri, i R. E. A. Leitz, *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1018-1021.
140. I. Blažević, A. Đulović, V. Čikeš Čulić, F. Burčul, I. Ljubenkov, M. Ruščić, i I. Generalić Mekinić, *Molecules* **2019**, *24*.
141. G. R. De Nicola, S. Montaut, P. Rollin, M. Nyegue, C. Menut, R. Iori, i A. Tatibouët, *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 137-142.
142. Y. Jin, M. Wang, R. T. Rosen, i C.-T. Ho, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3121-3123.
143. A. Đulović, F. Burčul, V. Č. Čulić, M. Ruščić, P. Brzović, S. Montaut, P. Rollin, i I. Blažević, *Molecules* **2021**, *26*, 5183.
144. R. McDanell, A. E. M. McLean, A. B. Hanley, R. K. Heaney, i G. R. Fenwick, *Food Chem. Toxicol.* **1988**, *26*, 59-70.
145. D. Van Hoewyk, H. Takahashi, E. Inoue, A. Hess, M. Tamaoki, i E. A. H. Pilon-Smits, *Physiol. Plant.* **2008**, *132*, 236-253.
146. R. F. Miyahira, J. O. Lopes, i A. E. C. Antunes, *Plant. Foods Hum. Nutr.* **2021**, *76*, 143-152.
147. A. Galieni, B. Falcinelli, F. Stagnari, A. Datti, i P. Benincasa, *Agronomy-Basel* **2020**, *10*, 1424.
148. T.-T. Gong, Q. Guo, X. Li, T.-N. Zhang, F.-H. Liu, X.-H. He, B. Lin, i Q.-J. Wu, *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *142*, 111533.
149. P. Li, Y.-m. Zhao, C. Wang, i H.-p. Zhu, *J. Food Sci.* **2021**, *86*, 169-176.
150. E. Reed, C. M. Ferreira, R. Bell, E. W. Brown, J. Zheng, i D. W. Schaffner, *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e02814-17.

7. POPIS OZNAKA I KRATICA

GL	glukozinolat
ITC	izotiocijanat
MAM	metiltioalkilmalat-sintaza
BCAT	aminokiselina razgranatog lanca-aminotransferazom ⁴
CYP	citokrom P450
UDP	uridin difostat
IGMT	metiltransferaza indolnog glukozinolata
SMT	selenometil-selenocistein
ESP	epitiospecifični protein
NSP	nitrilspecifični protein
TFP	tiocijanat-formirajući protein
GC-MS	plinska kromatografija-spektrometrija masa (eng. <i>gas chromatography-mass spectometry</i>)
COSY	korelacijska spektroskopija (engl. <i>COrelated SpectroscopY</i>)
HSQC	heteronuklearna korelacijska spektroskopija (engl. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
UHPLC-DAD-MS/MS	tekućinska kromatografija-detektor s poljem dioda-spektrometrija masa s trostrukim kvadrupolom
HPLC-DAD	tekućinska kromatografija-detektor s poljem dioda
Ala	alanin
Val	valin
Leu	leucin

Ile	izoleucin
Trp	triptofan
Tyr	tirozin
Met	metionin
DW	suha masa, masa suhog biljnog materijala (engl. <i>dry weight</i>)
FCD	<i>Flora Croatica Database</i>

SIMBOLI

t_R	vrijeme zadržavanja (engl. <i>retention time</i>)
μmol	mikromol
mM	milimolarna
m/z	omjer mase i naboja
Da	Dalton
sur.	suradnici

8. PRILOG

8.1. Tablice za MS2 spektre desulfoglukozinolata

8.2. MS2 spektri desulfoglukozinolata

8.3. NMR spektri

9. ŽIVOTOPIS

Azra Đulović rođena je 4. svibnja 1990. g. u Zvorniku, Bosna i Hercegovina. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje je završila u Splitu. Preddiplomski studij Kemija na Kemijsko-tehnološkom fakultetu u Splitu završila je 2012. g. i stekla titulu sveučilišna prvostupnica kemije, dok je titulu magistra kemije stekla 2014. g. na istom fakultetu završetkom diplomskog studija Kemija, smjer Organska kemija i biokemija. Za uspjehe postignute tijekom studija dodijeljena joj je Rektorova nagrada, tri (3) Dekanove nagrade te je dobitnica stipendije Grada Splita, kao i nagrade za najuspješnije studente Splitsko-dalmatinske županije. Od rujna 2016. g. zaposlena je kao asistent na Zavodu za organsku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta te sudjeluje u nastavnom procesu kao voditelj vježbi iz predmeta Organska kemija (preddiplomski studij), Organska analiza i Organska sinteza (diplomski studij). U prosincu 2017. g., na Kemijsko-tehnološkom fakultetu, upisala je poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij “Kemija mediteranskog okoliša”. Od 2017. g. do 2021. g. sudjelovala je kao suradnica na projektu Hrvatske zaklade za znanost „Biljke kao izvor bioaktivnih sumporovih spojeva te njihova sposobnost hiperakumulacije metala (BioSMe)“, voditelja izv. prof. Ivice Blaževića, a trenutno je suradnica na HAZU projektu. Autorica i koautorica je jedanaest (11) radova u časopisima citiranim u bazi *Web of Science Core Collection*, jednog (1) rada s kategorizacijom te dva (2) rada u zbornicima radova s međunarodnom recenzijom. Sudjelovala je na ukupno 25 međunarodnih i domaćih skupova. Dobitnica je stipendije za sudjelovanje na kongresu “SBio2021 Glucosinolate” u Sevilla (Španjolska). Član je HKD-Split i Alumni KTF-a.

Tablica 8.1.1. Vrijeme zadržavanja u HPLC analizama, MS informacije i čimbenici odziva za odabrane desulfoglukozinolate.

Broj	Glukozinolat	Masa (Da)			t_R / min	RF*
		Intaktni [M-H] ⁻	Desulfo M	Desulfo [M+Na] ⁺	25 °C (15 °C)	
51	Metil-GL (Glukokaparin)	332	253	276	1,15	1,25
107	Alil-GL (Sinigrin)	358	279	302	2,16	1,00
56	1-Metiletil-GL, Izopropil-GL (Glukoputranjivin)	360	281	304	3,90	1,00
12	But-3-enil-GL (Glukonapin)	372	293	316	4,81 (5,12)	1,11
62	2-Metilpropil-GL, Izobutil-GL	374	295	318	5,55	1,00 (arb.)
61	(1 <i>S</i>)-1-Metilpropil-GL, <i>sec</i> -Butil-GL (Glukokohlearin)	374	295	318	5,67	1,00 (arb.)
101	Pent-4-enil-GL (Glukobrasikanapin)	386	307	330	6,31 (6,61)	1,15
24R	(2 <i>R</i>)-2-Hidroksibut-3-enil-GL (Progoitrin)	388	309	332	1,41	1,09
24S	(2 <i>S</i>)-2- Hidroksibut-3-enil-GL (Epioprogoitrin)	388	309	332	1,92	1,09
[26]	4-Hidroksibutil-GL	390	311	334	1,58 (1,84)	1,40
31	2-Hidroksi-2-metilpropil-GL (Glukokonringin)	390	311	334	1,64 (1,96)	1,00
38S	(2 <i>S</i>)-2-Hidroksipent-4-enil-GL (Glukonapoleiferin)	402	323	346	4,02 (4,32)	1,00
95	3-(Metilsulfanil)propil-GL (Glukoibervirin)	406	327	350	5,50 (5,75)	0,80
11	Benzil-GL (Glukotropeolin)	408	329	352	6,50 (6,6)	0,95
83	(3 <i>E</i>)-4-(Metilsulfanil)but-3-enil- GL	418	339	362	4,95	0,40
84	4-(Metilsulfanil)butil-GL, 4-(Metiltio)butil-GL (Glukoerucin)	420	341	364	6,4 (6.8)	1,04
73	(<i>R</i> _s)-3-(Metilsulfinil)propil-GL (Glukoiberin)	422	343	366	1,14 (1,36)	1,07
105	2-Feniletil-GL, Fenetil-GL (Glukonasturcin)	422	343	366	8,07 (8,20)	0,95

23	4-Hidroksibenzil-GL (Sinalbin, Glukosinalbin)	424	345	368	4,51 (4,96)	0,50
22	3-Hidroksibenzil-GL (Glukolepigramin)	424	345	368	5,22 (5,60)	1,00 (arb.)
63	Glukorafenin	434	355	378	1,27 (40 °C)	0,90
94	5-(Metilsulfanil)pentil-GL, 5-(Metiltio)pentil-GL (Glukoberteroin)	434	355	378	7,95 (8,09)	1,00 (arb.)
64	(R _S)-4-(Metilsulfinil)butil-GL (Glukorafanin)	436	357	380	2,47 (2,55)	1,07
82	3-(Metilsulfonil)propil-GL (Glukokeirolin)	438	359	382	1,37 (1,80)	1,26
45	3-Metoksibenzil-GL (Glukolimnantin)	438	359	382	7,23 (7,60)	0,55
46	4-Metoksibenzil-GL (Glukoaubrietin)	438	359	382	10,97	1,00 (arb.)
[14]	3,4-Dihidroksibenzil-GL (Glukomatronalin)	440	361	384	3,30 (4,02)	1,00 (arb.)
43	Indol-3-ilmetil-GL (Glukobrasicin)	447	368	391	7,22 (7,61)	0,29
88	6-(Metilsulfanil)heksil-GL, 6-(Metiltio)heksil-GL (Glukoleskverelin)	448	369	392	9,33 (9,50)	1,00
72	(R _S)-5-(Metilsulfinil)pentil-GL (Glukoalisin)	450	371	394	4,00 (3,69, 40 °C)	1,07
87	7-(Metilsulfanil)heptil-GL, 7-(Metiltio)heptil-GL	462	383	406	10,82 (10,89)	1,00
28	4-Hidroksiindol-3-ilmetil-GL (4-Hidroksiglukobrasicin)	463	384	407	5,45 (5,89)	0,28
67	(R _S)-6-(Metilsulfinil)heksil-GL (Glukoesperin)	464	385	408	5,50 (5,72)	1,00
[162]	3-Hidroksi-4-(metilsulfonil)butil- GL	468	389	412	1,51	1,00 (arb.)
15	3,4-Dimetoksibenzil-GL	468	389	412	6,75 (6,97)	1,00 (arb.)
92	8-(Metilsulfanil)oktil-GL, 8-(Metiltio)oktil-GL	476	397	420	12,70 (12,93)	1,10

47	1-Metoksiindol-3-ilmetil-GL, <i>N</i> -Metoksiindol-3-ilmetil GL (Neoglukobrasicin)	477	398	421	9,33	0,20
48	4-Metoksiindol-3-ilmetil-GL (4-Metoksiglukobrasicin)	477	398	421	8,02 (8,40)	0,25
66	(<i>R</i> _S)-7-(Metilsulfinil)heptil-GL	478	399	422	6,47	1,00
[35]	3-Hidroksi-5- (metilsulfonil)pentil-GL	482	403	426	2,03	1,00 (arb.)
152	4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzil- GL (3,5-dimetoksisinalbin)	468	389	428	5,60 (5,89)	1,00 (arb.)
69	(<i>R</i> _S)-8-(Metilsulfinil)oktil-GL (Glukohirsutin)	492	413	436	7,25 (7,47)	1,10
[161]	4-Hidroksi-1- metoksiglukobrasicin	493	414	437	8,30	0,25 (arb.)
5	4-(Benzoiloksi)butil-GL	494	415	438	10,36	0,30 (arb.)
114	3,4,5-Trimetoksibenzil-GL	498	419	442	7,17 (7,34)	1,00 (arb.)
68	(<i>R</i> _S)-9-(Metilsulfinil)nonil-GL (Glukoarabin)	506	427	450	8,46	1,00 (arb.)
138	1,4-Dimetoksiindol-3-ilmetil-GL (1,4-Dimetoksiglukobrasicin)	507	428	451	9,94 (10,18)	0,20
80	8-(Metilsulfonil)oktil-GL	508	429	452	7,99 (8,22)	1,00 (arb.)
65	(<i>R</i> _S)-10-(Metilsulfinil)decil-GL (Glukokamelinin)	520	441	464	9,66	1,00 (arb.)
79	9-(Metilsulfonil)nonil-GL	522	443	466	9,16	1,00 (arb.)
[160]	4'- <i>O</i> -(β -D- Apiofuranoziloksi)benzil-GL	556	477	500	5,45 (5,65)	1,00 (arb.)
110	4-(α -L-Ramnopiranoziloksi)- benzil-GL (Glukomoringin)	570	491	514	5,20 (5,40)	1,00 (arb.)
109	2-(α -L-Ramnopiranoziloksi)- benzil-GL	570	491	514	6,78 (6,94)	1,00 (arb.)
157	4'- <i>O</i> - β -D- Apiofuranozilglukomatronalin	572	493	516	4,88 (5,15)	1,00 (arb.)
[159]	<i>orto</i> ili <i>meta</i> Hidroksi-4-(α -L- ramnopiranoziloksi)benzil-GL	586	507	530	5,10	1,00 (arb.)

135	4-(β -D-Glukopiranozildisulfanil)butil-GL	600	521	544	5,40 (5,55)	1,00 (arb.)
[3]	4-(4'-O-Acetil- α -L-ramnopiranoziloksi)benzil-GL (4-Acetilglukomoringin)	612	533	556	6,40	1,00 (arb.)
134	“Dimerni 4-merkaptobutil-GL”	811	652	675	8,05 (8,26)	1,00 (arb.)

*RF - engl. *response factor*, čimbenik odziva; GL - glukozinolat; arb. - arbitrarna vrijednost

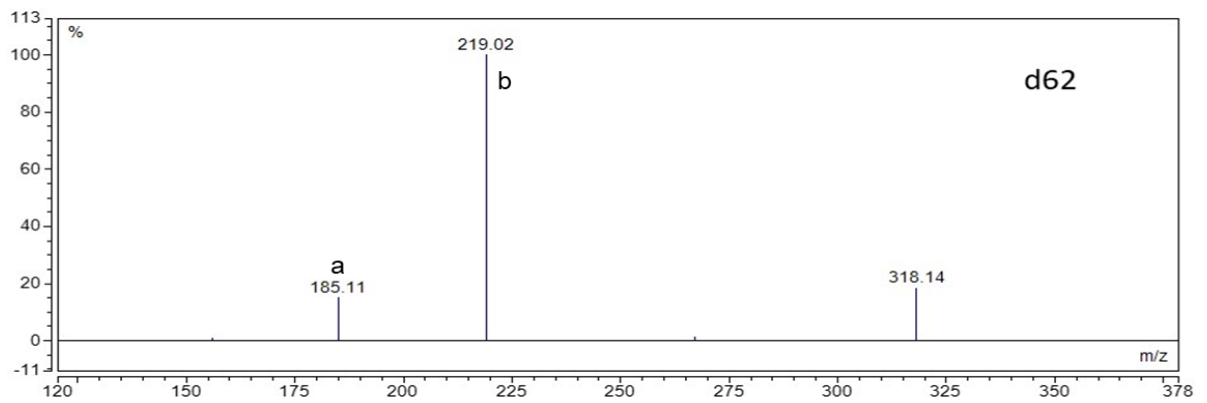
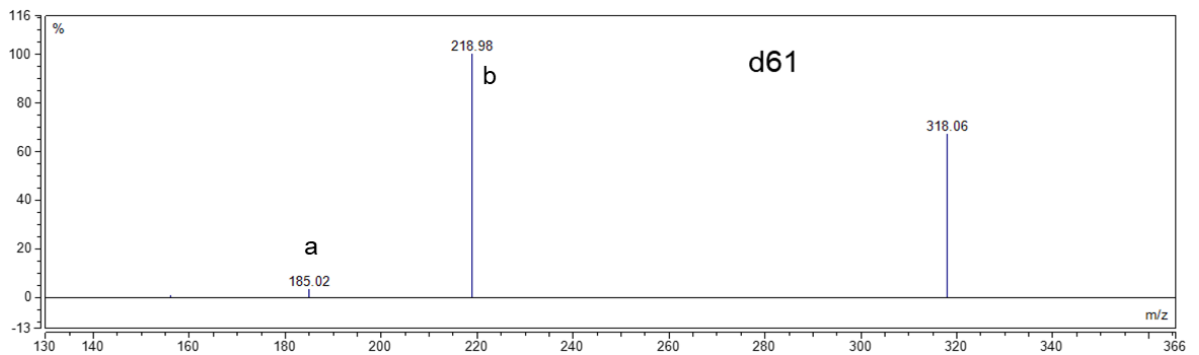
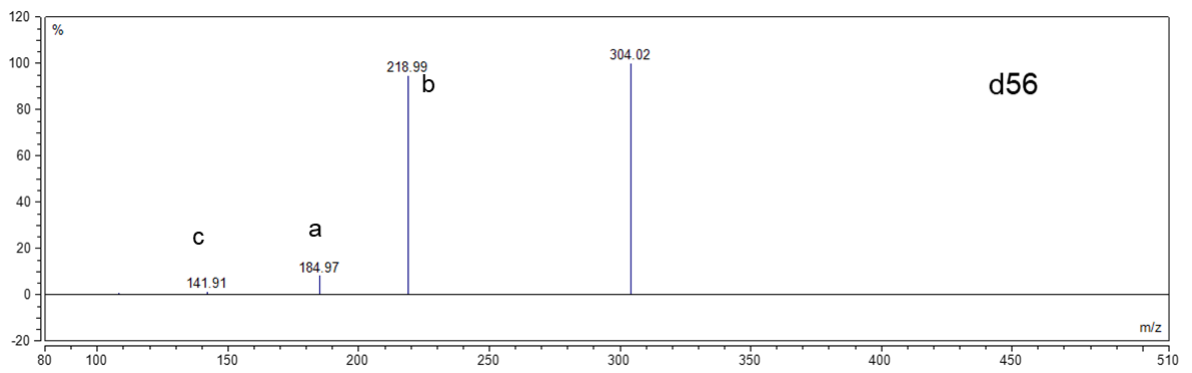
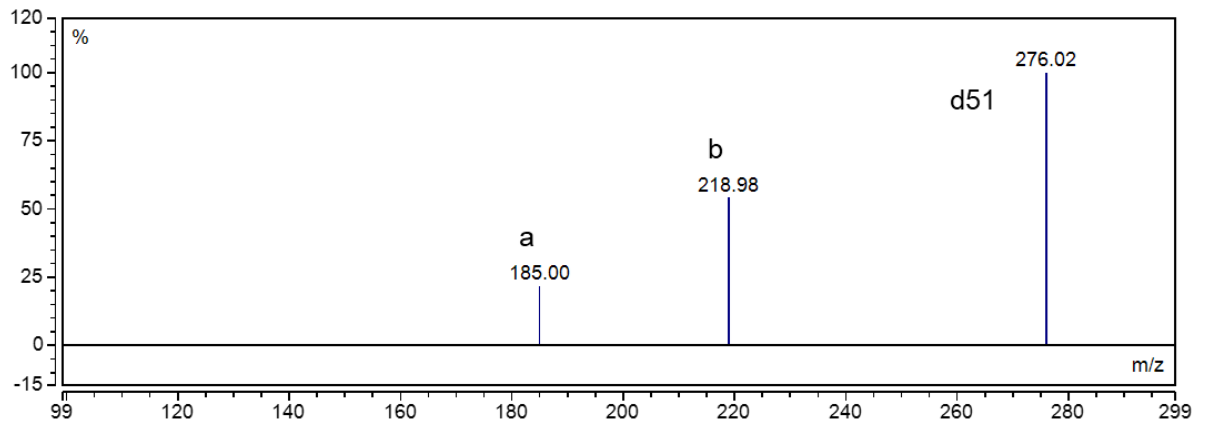
Tablica 8.1.2. Fragmenti uočeni u MS2 spektrima natrijevih adukata desulfoglukozinolata.

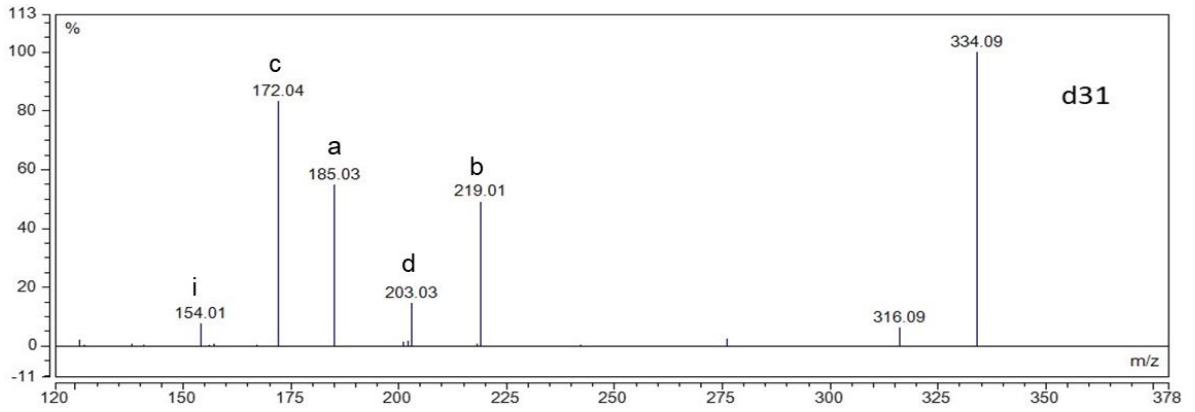
Oznaka	Fragment
a	Kationski adukt anhidroGlu, $C_6H_{10}O_5$ (Na^+ adukt na m/z 185) ili acilnog derivata
b	Kationski adukt tioGlu, $C_6H_{10}O_5SH$ (Na^+ adukt na m/z 219) ili acilnog derivata
c	Gubitak anhidroGlu (m/z 162) ili acilnog derivata
d	Kationski adukt Glu, $C_6H_{12}O_8$ (180) - Na^+ adukt na m/z 203
e	Gubitak aldehida nakon fragmentacije β -hidroksila, tvoreći desulfometilglukozinolot ili izomer (Na^+ adukt na m/z 276)
f	Gubitak H_2O (m/z 18)
g	Gubitak $CH_3(SO)H$ (m/z 64)
h	Gubitak tioGlu (m/z 196) ili acilnog derivata
i	Gubitak Glu (m/z 180)
j	Kationski adukt glukonolaktona, $C_6H_{10}O_6$ (Na^+ adukt na m/z 201)
k	Gubitak glukonolaktona
m	Gubitak CH_3SH m/z 48
n	Gubitak oksidiranog oblika tioGlu iz metilsulfinilalkilnog desulfoglukozinolata

Glu - glukoza

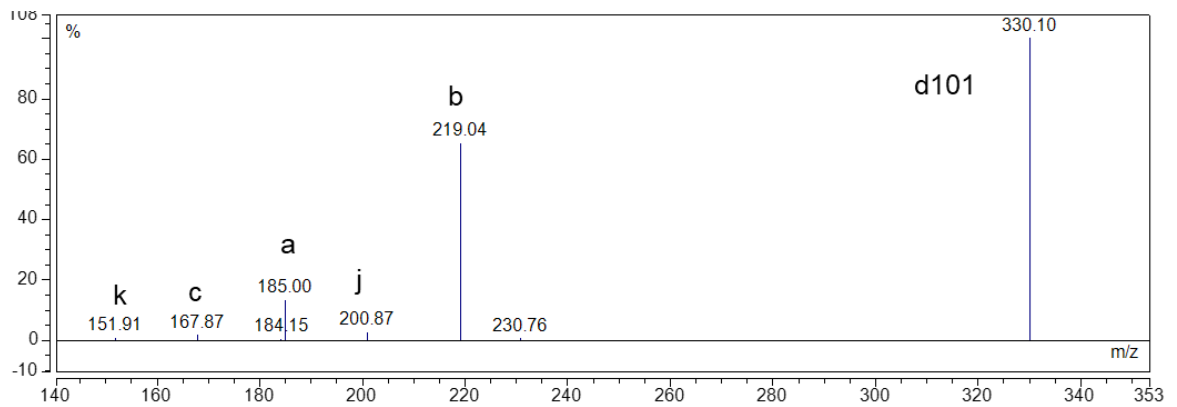
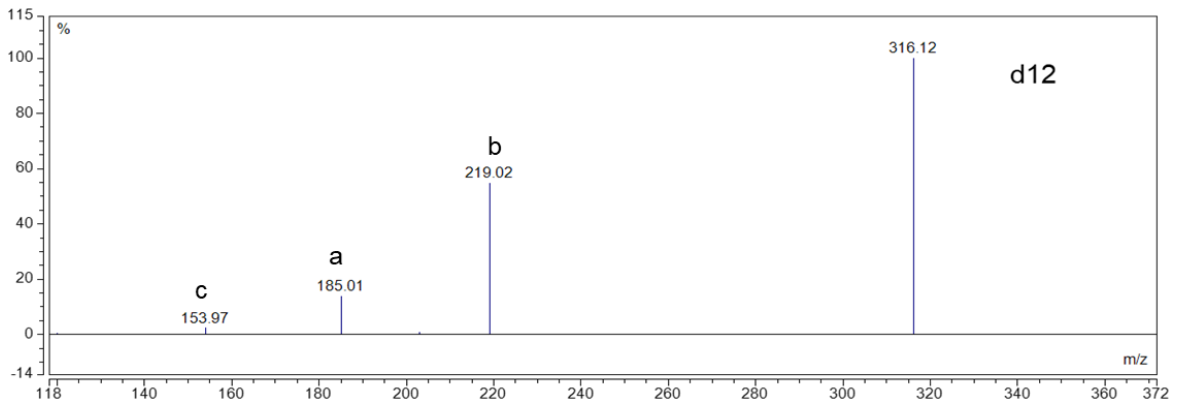
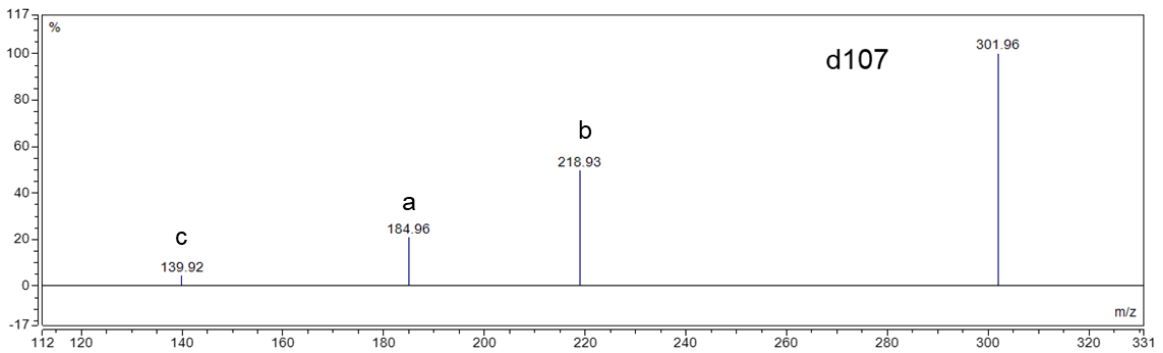
8.2. MS2 SPEKTRI

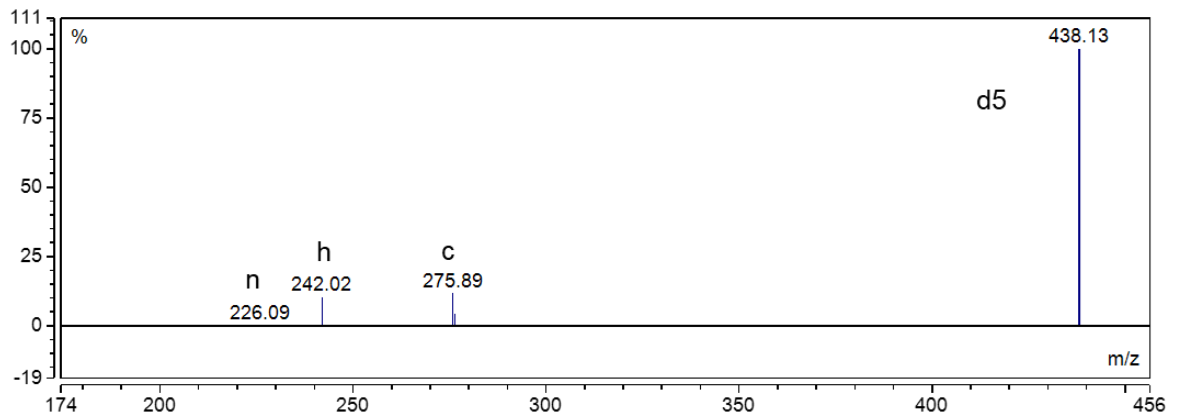
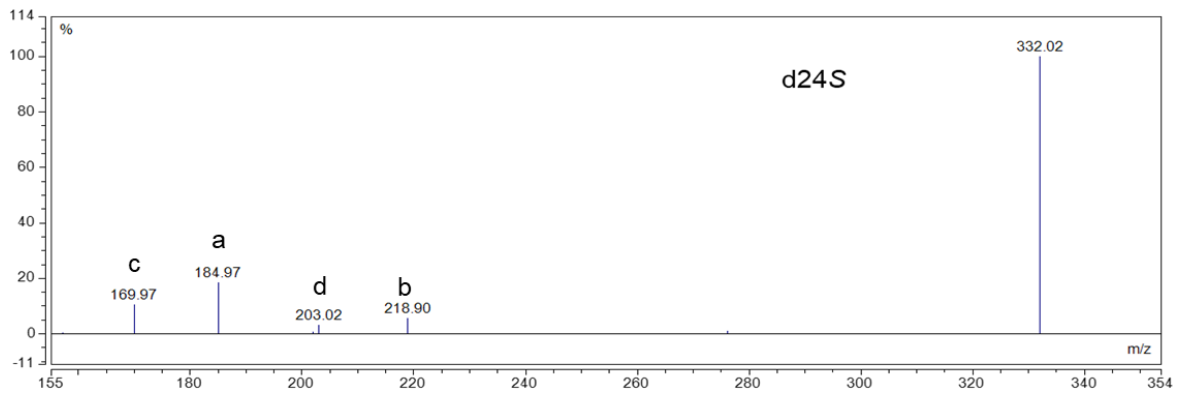
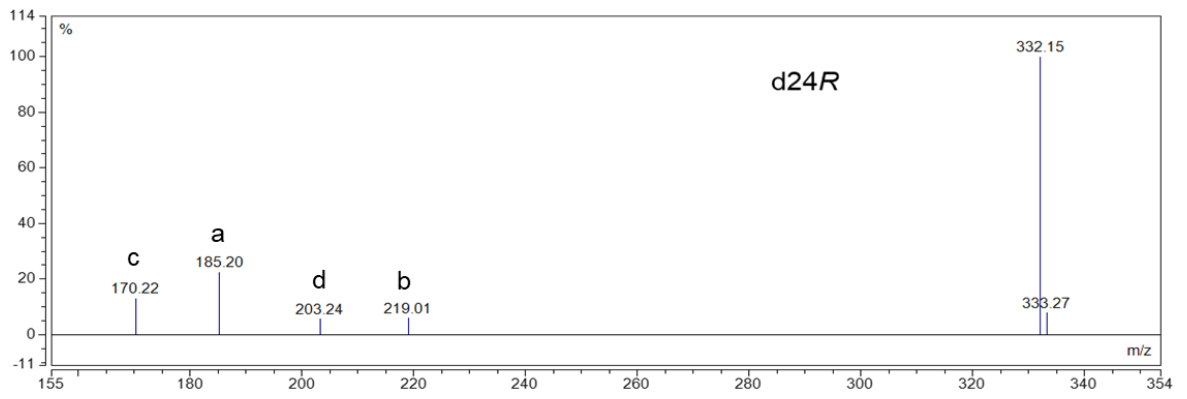
Alifatski razgranati glukozinolati



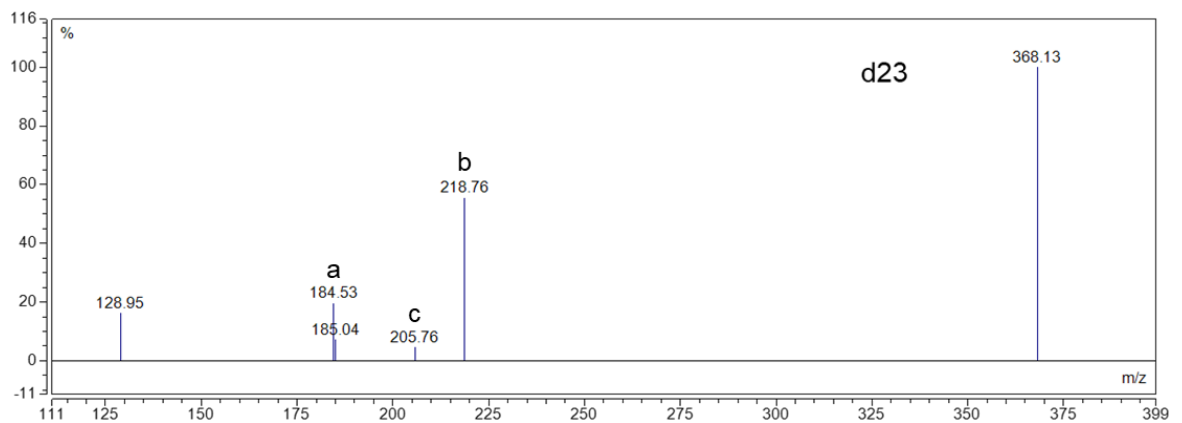
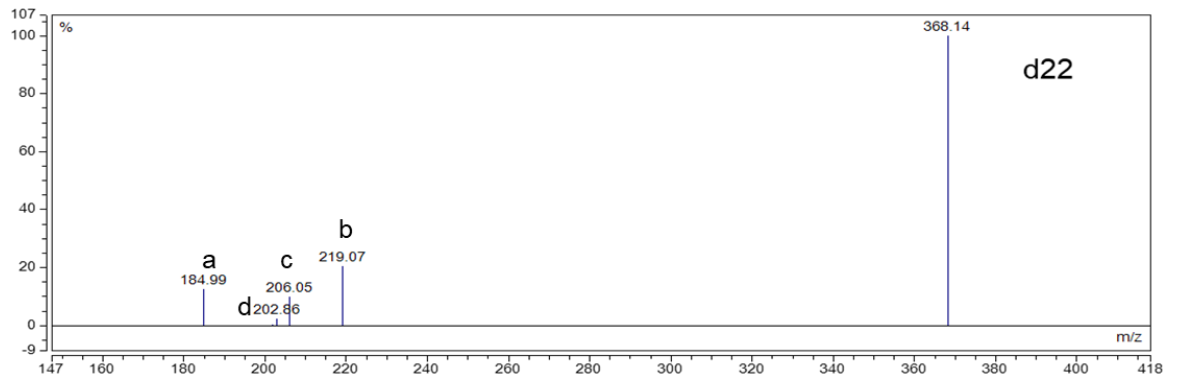
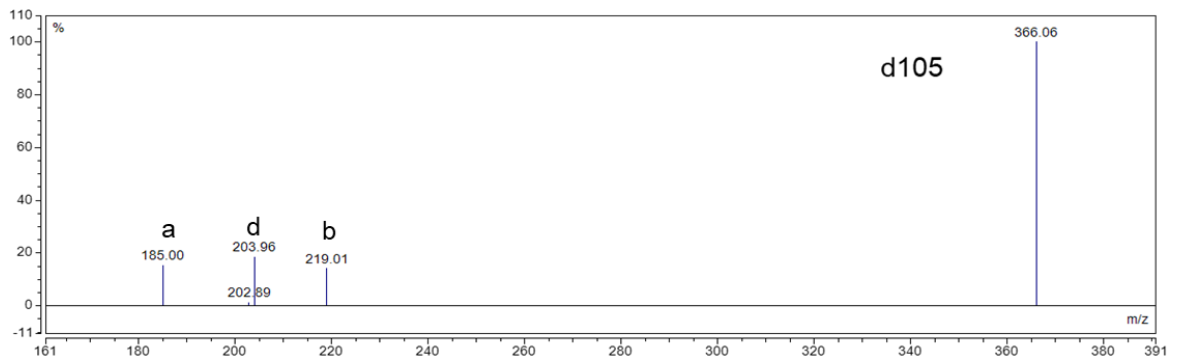
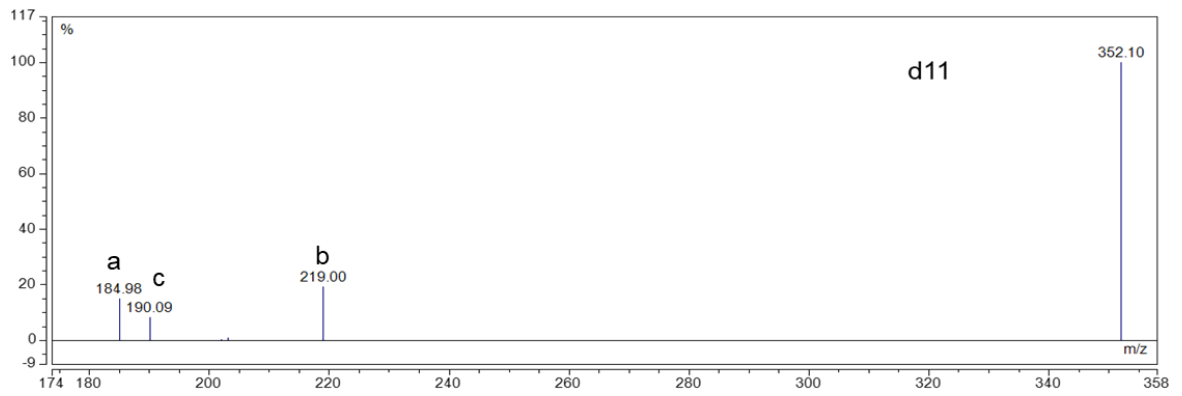


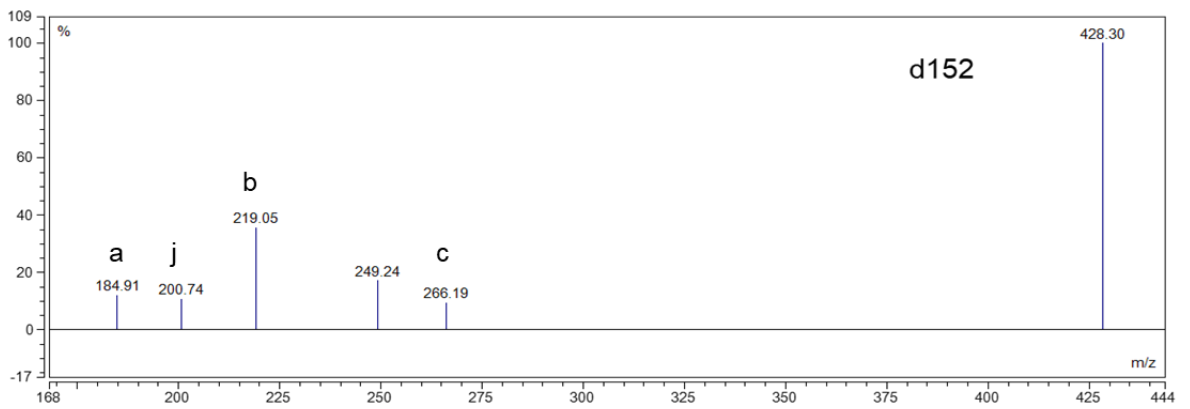
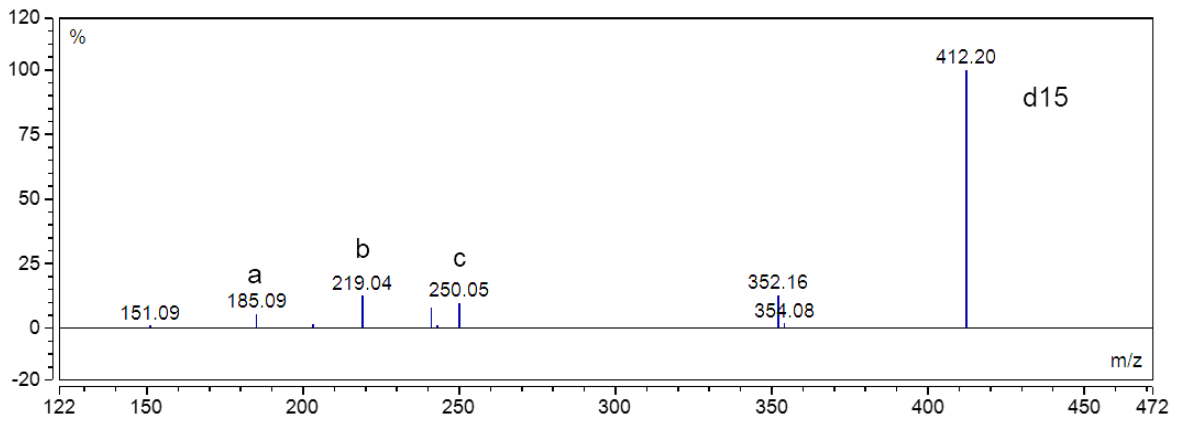
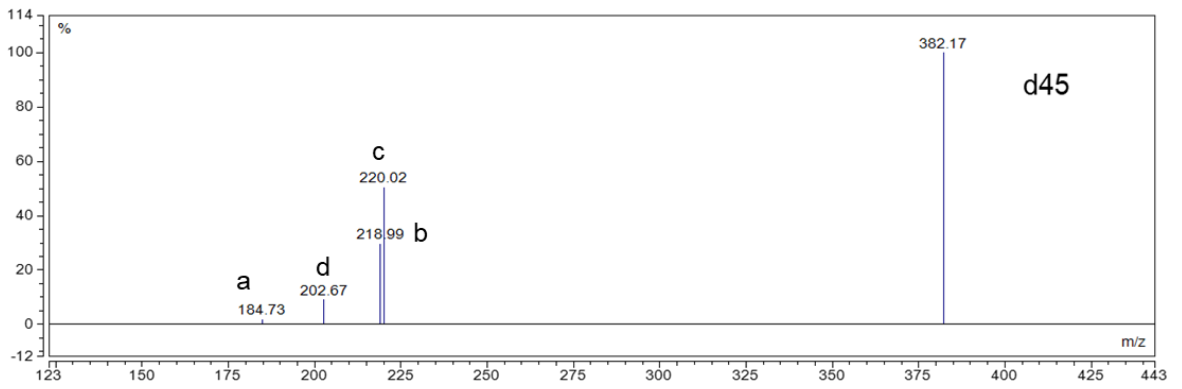
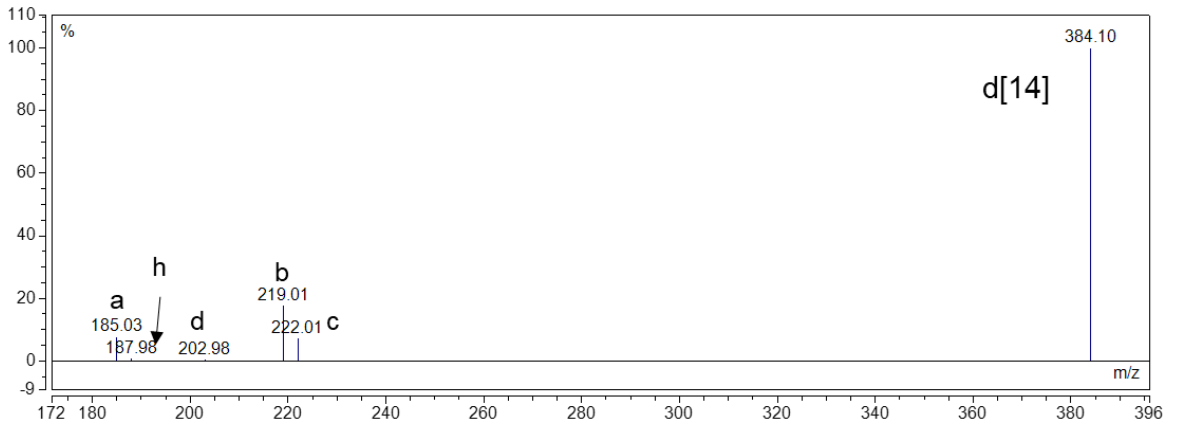
Alifatski nezasićeni glukozinolati

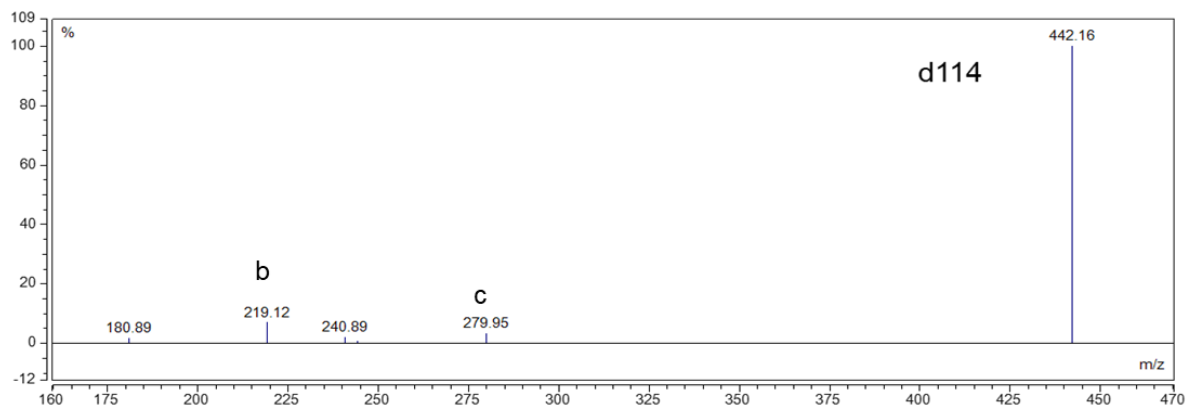




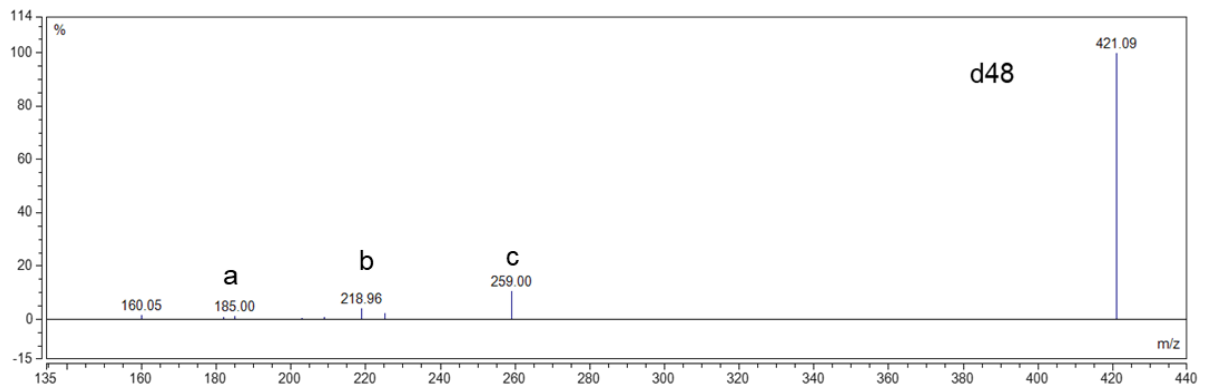
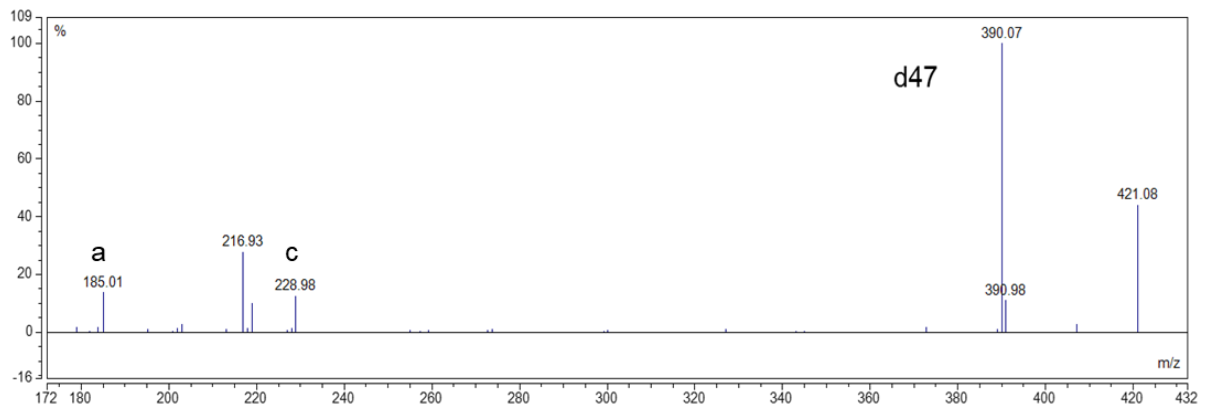
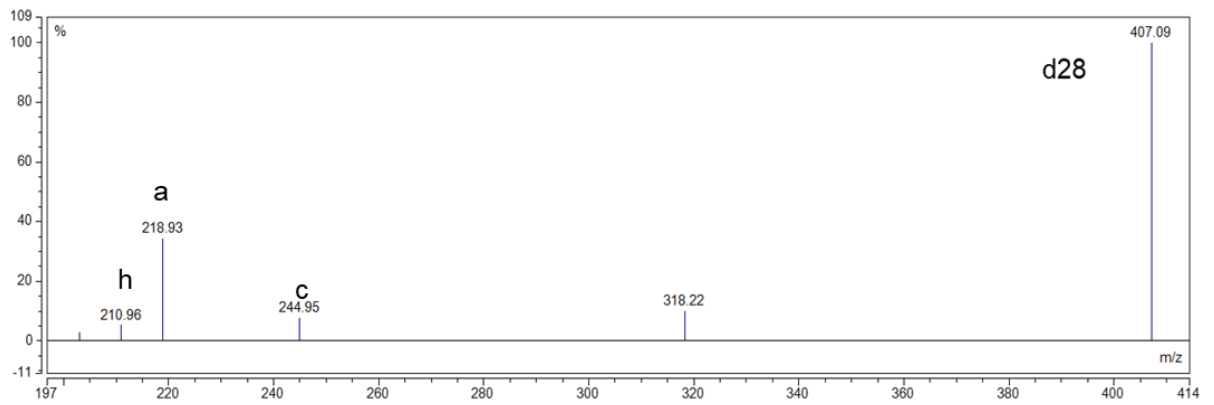
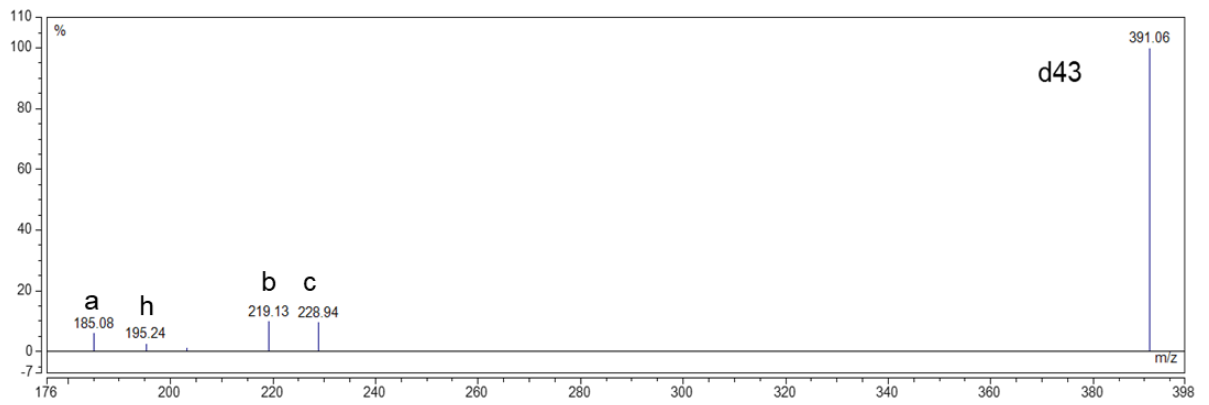
Arilifatski glukozinolati

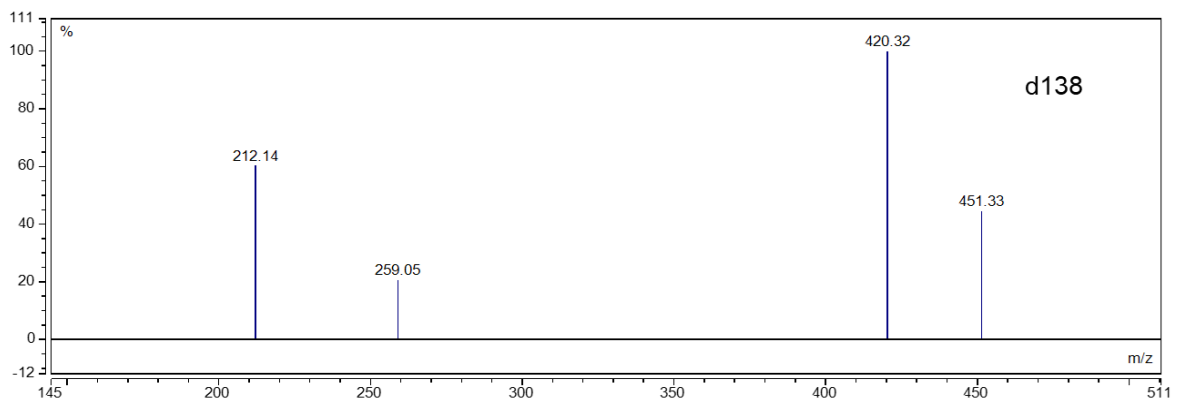
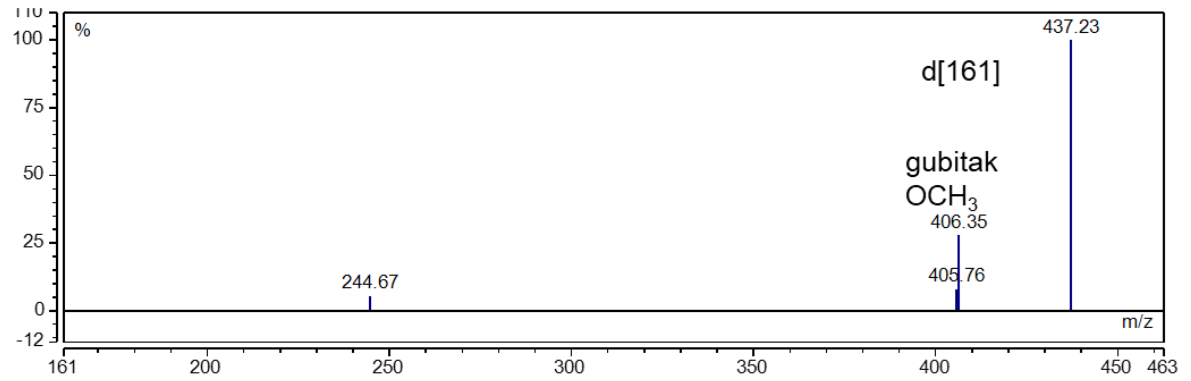
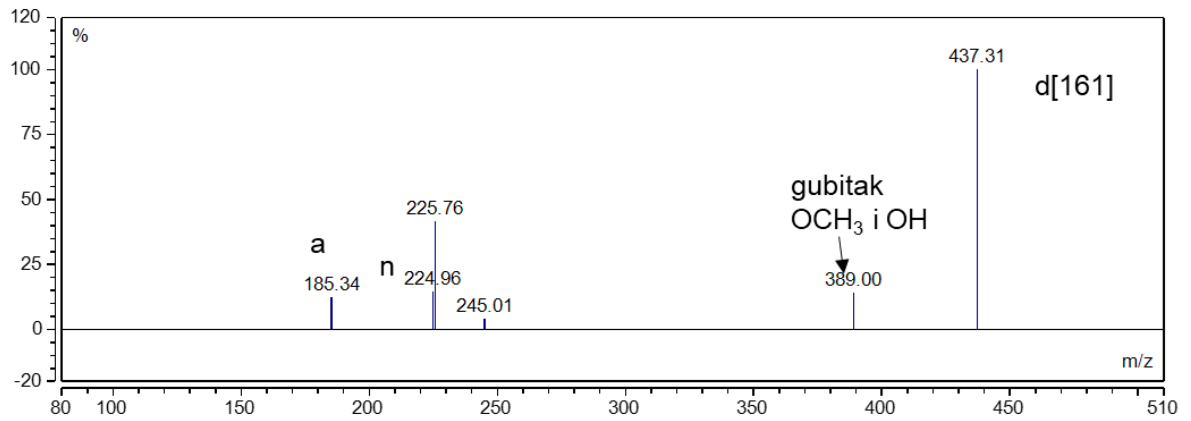
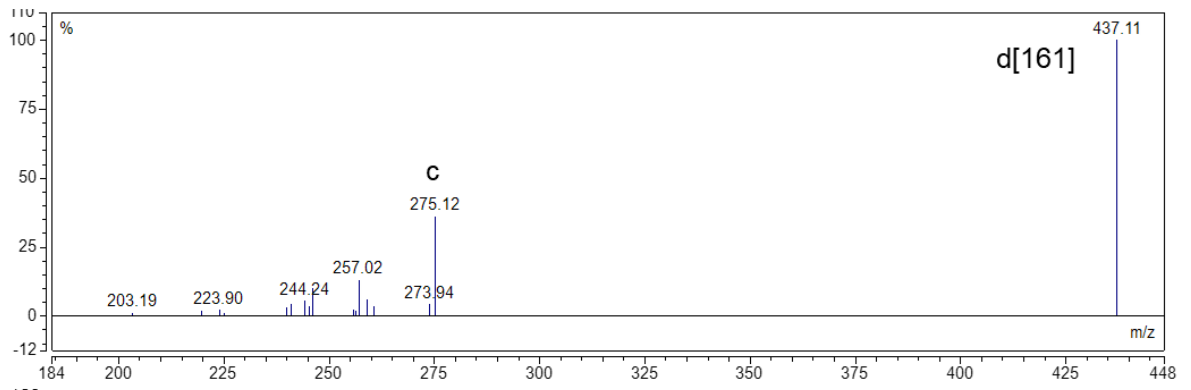






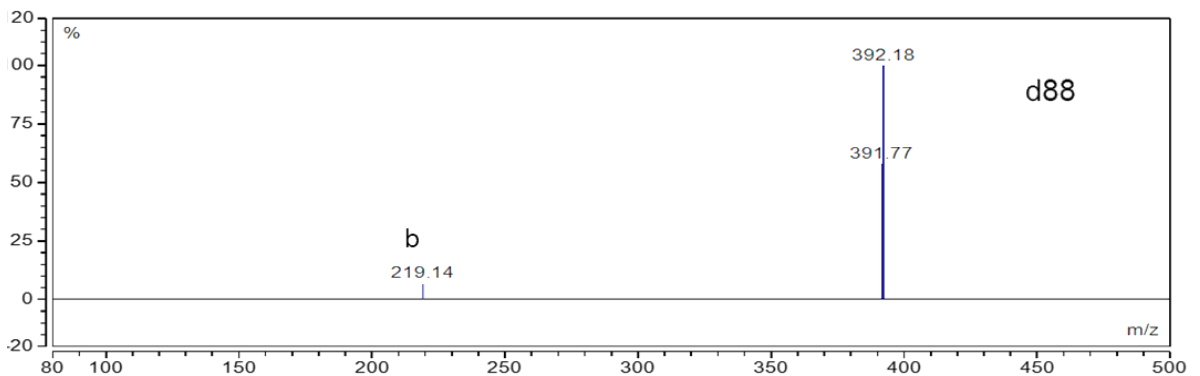
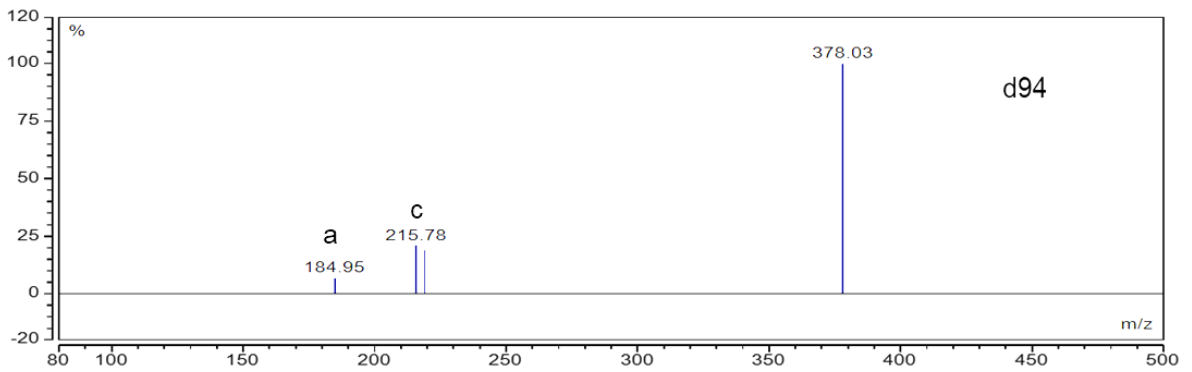
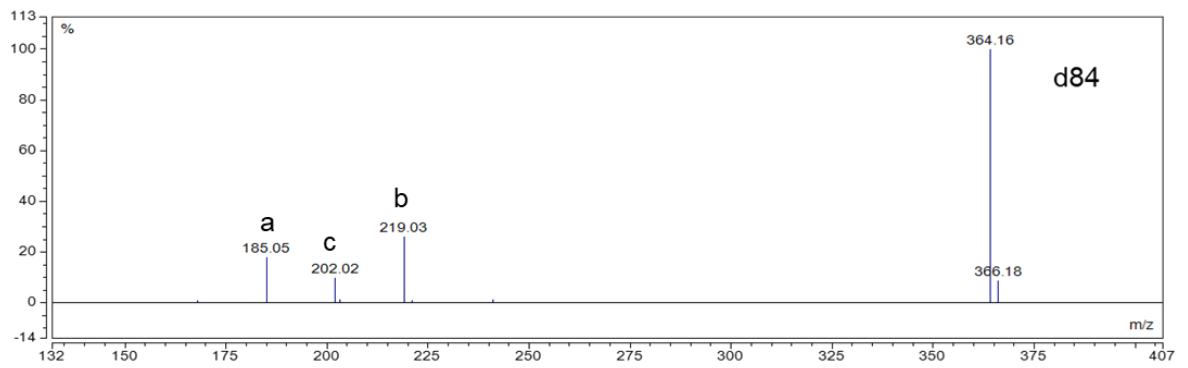
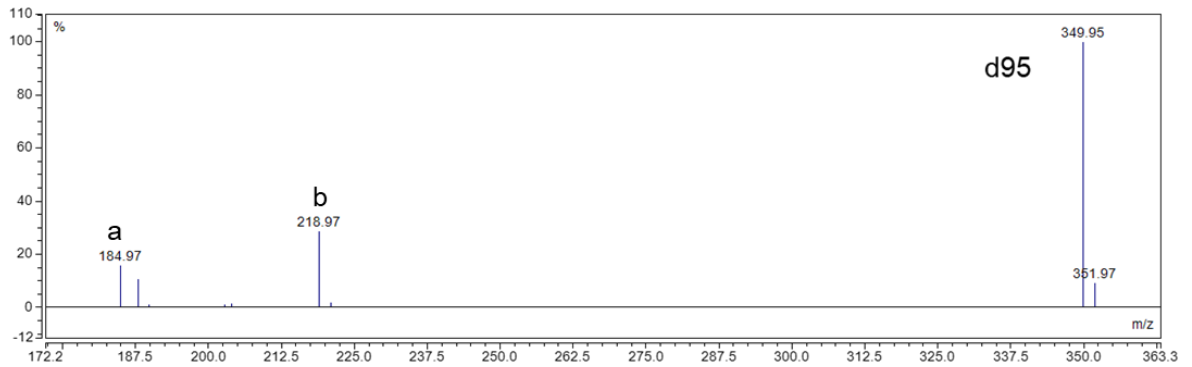
Indolni glukozinolati

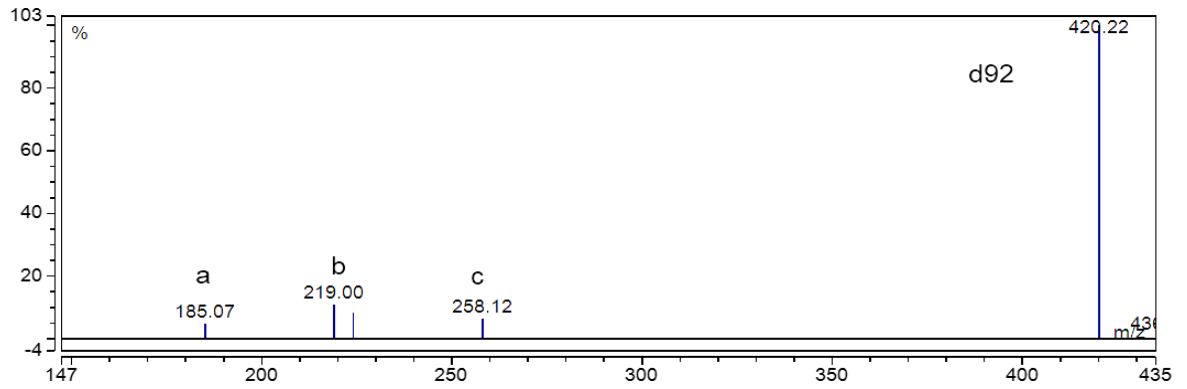
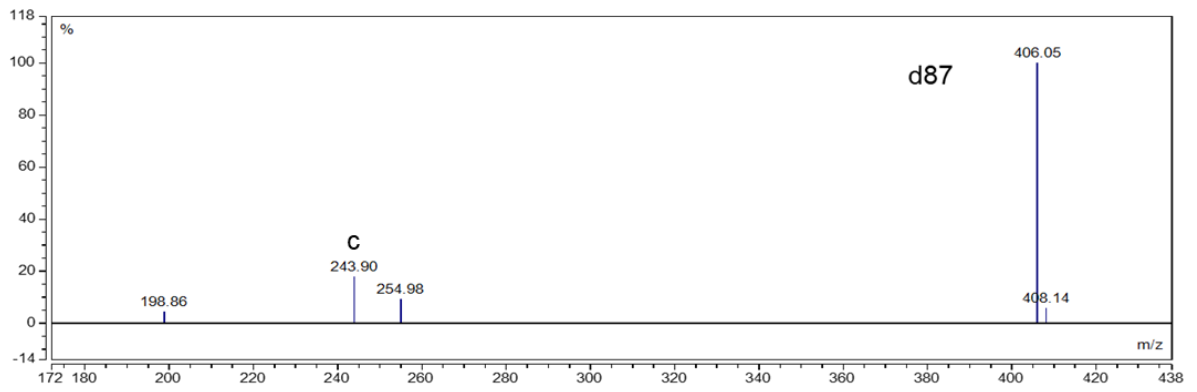




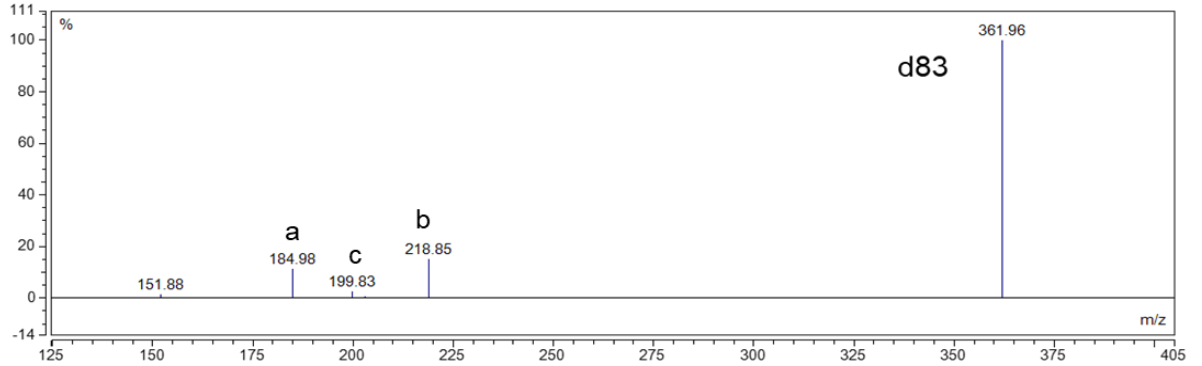
Glukozinolati sa sumporom u pokrajnjem lancu

Metilsulfanilni glukozinolati

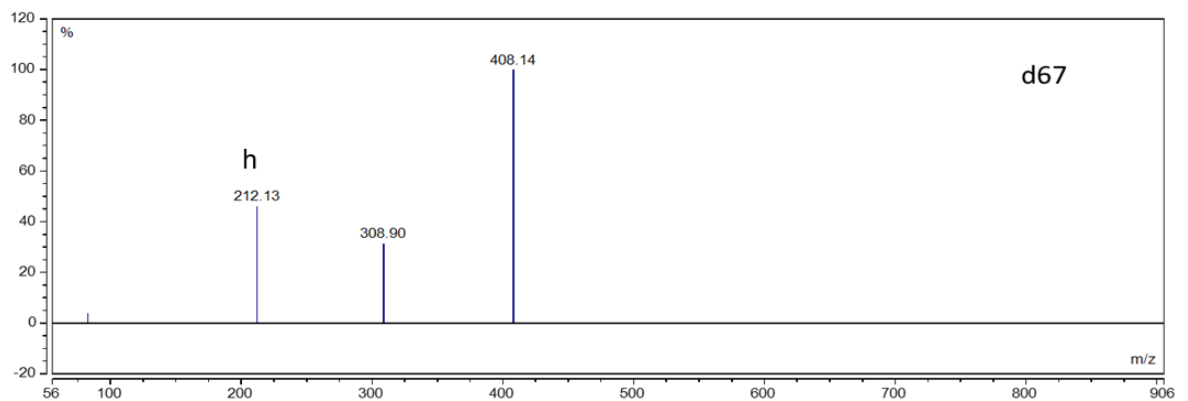
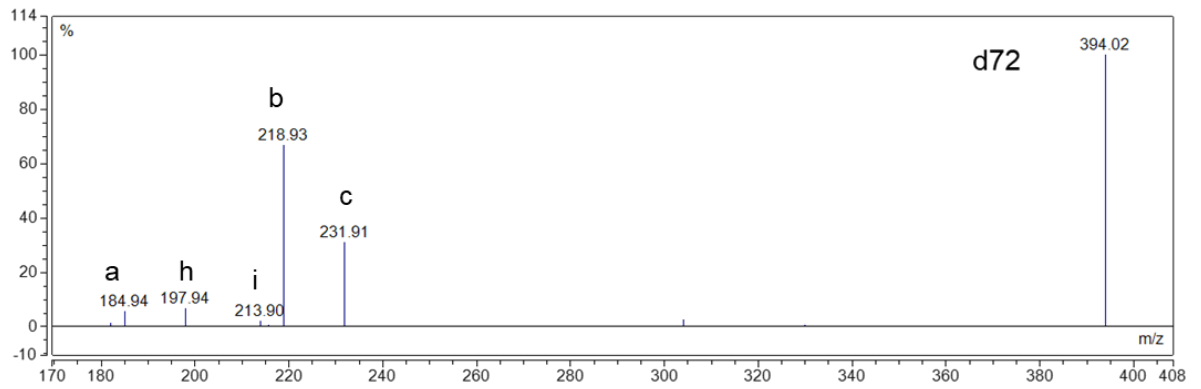
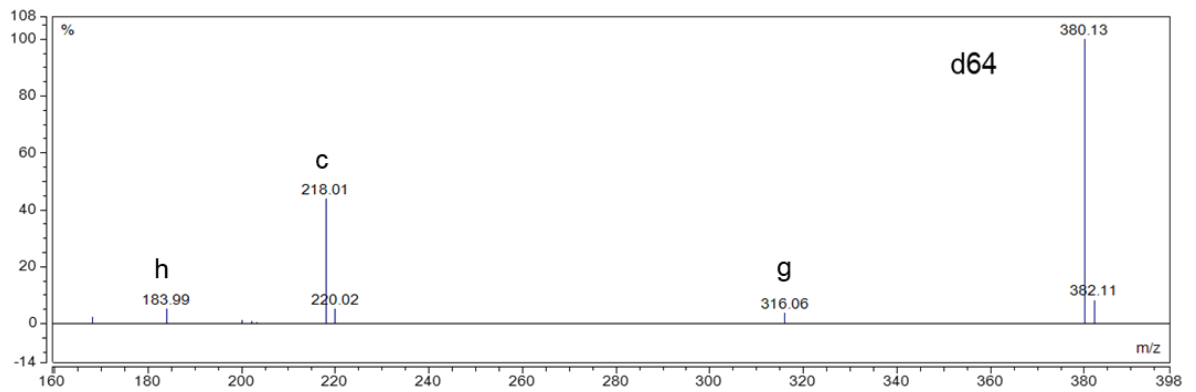
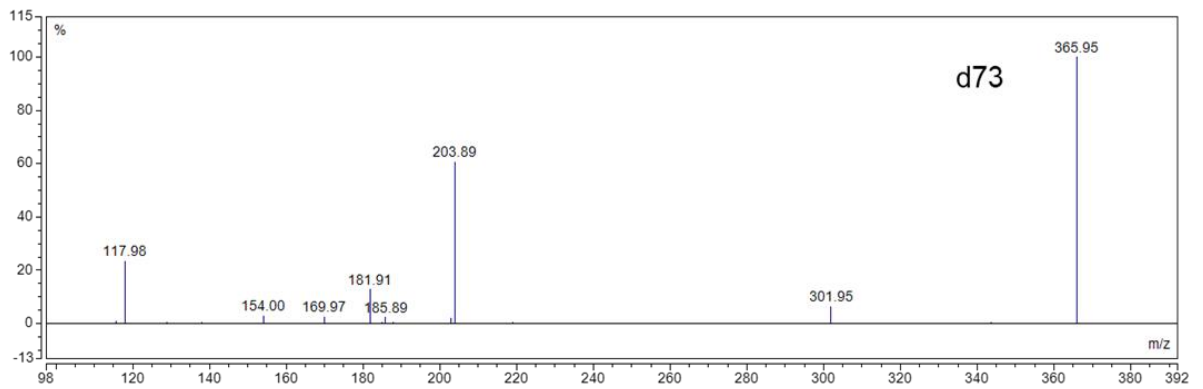


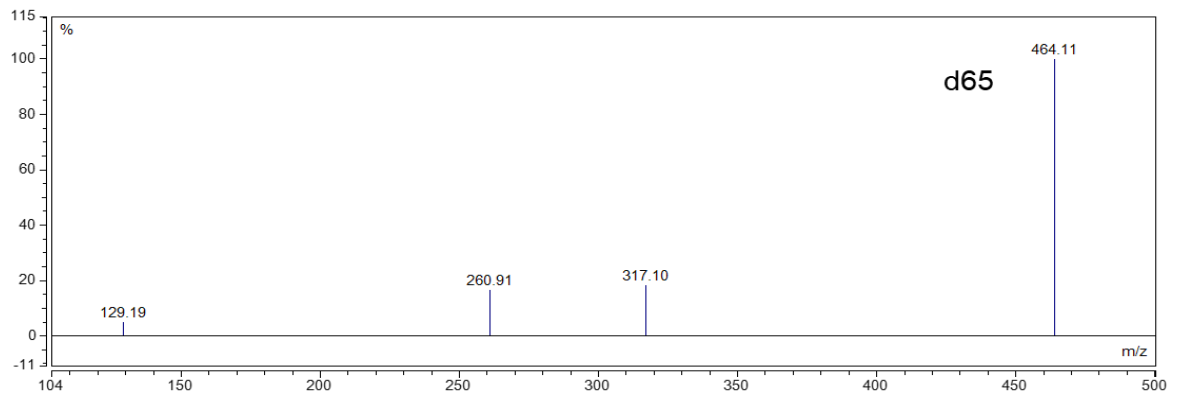
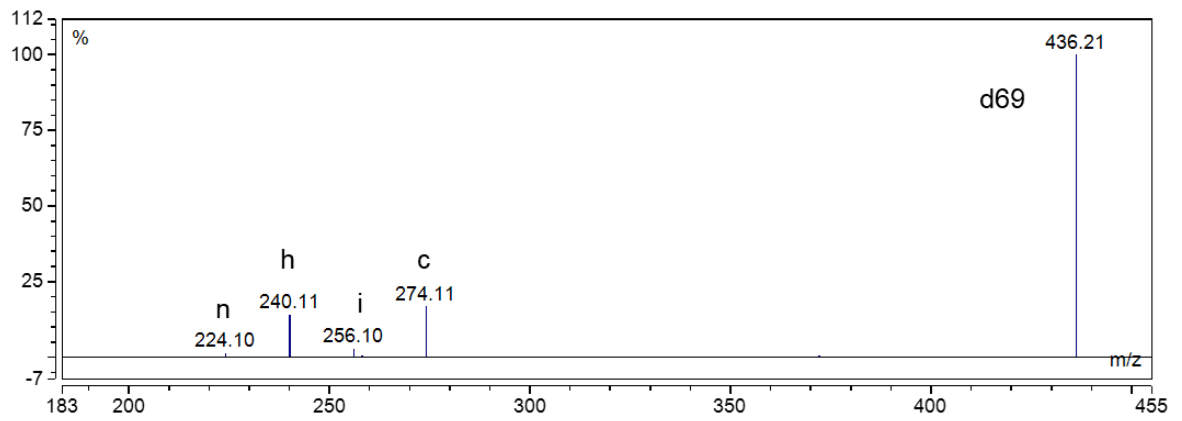
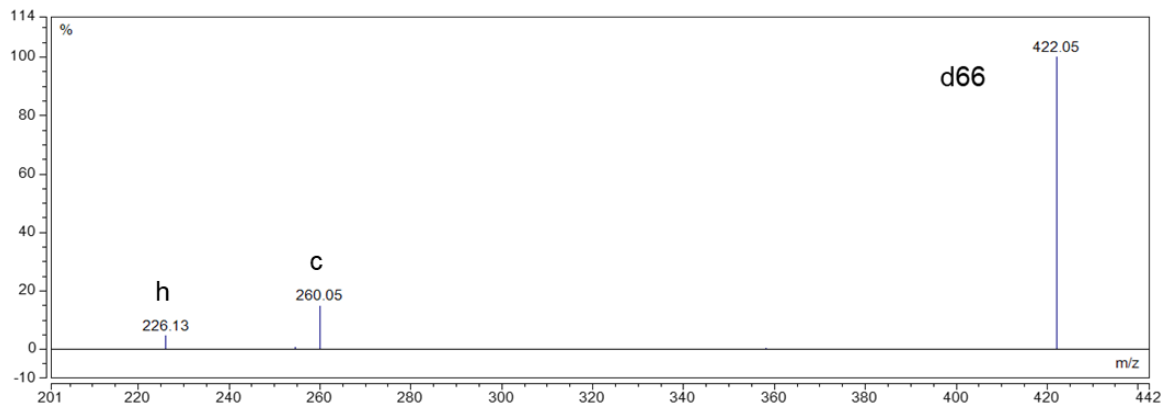


Metilsulfanilni nezasičeni glukozinolati

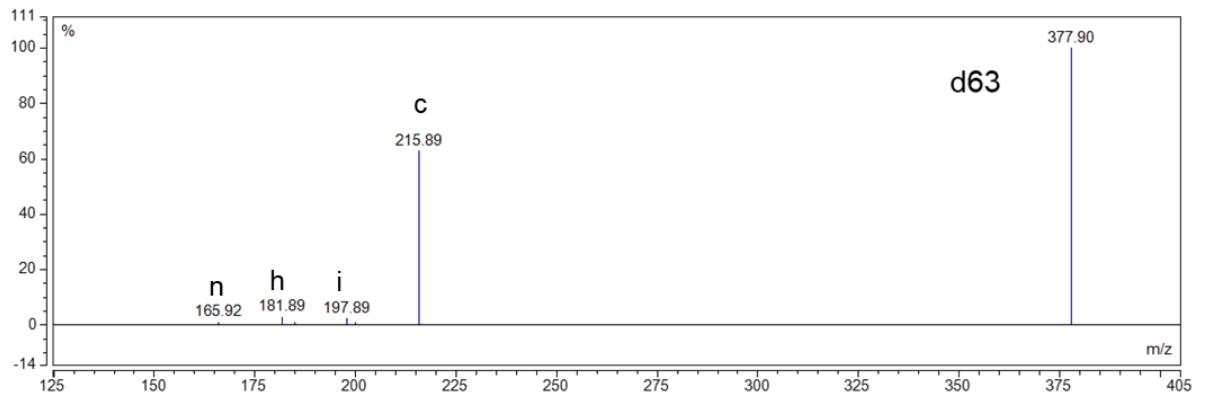


Metilsulfinilni glukozinolati

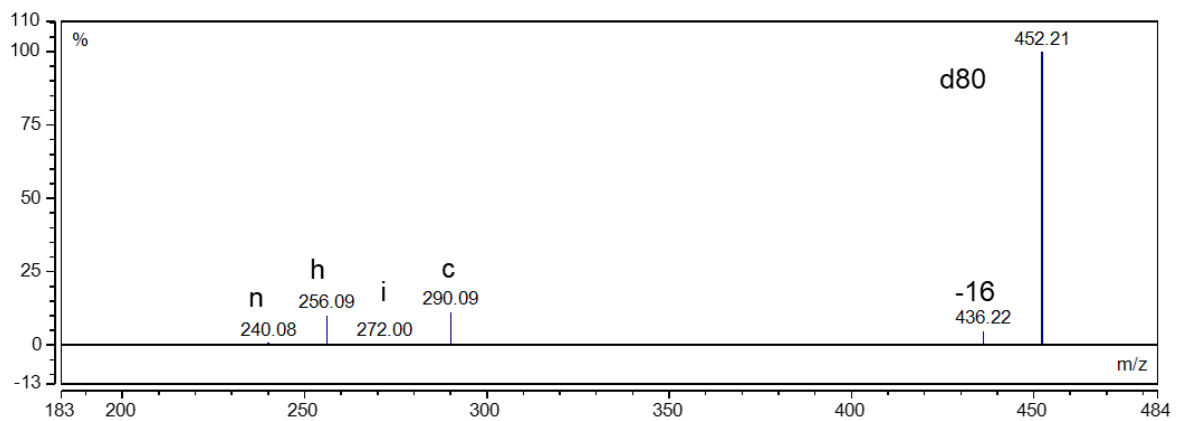
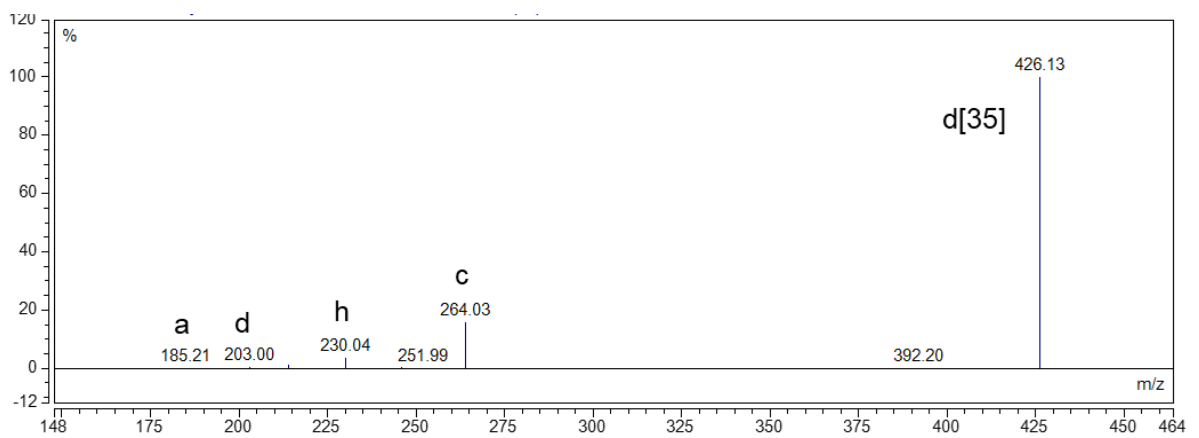
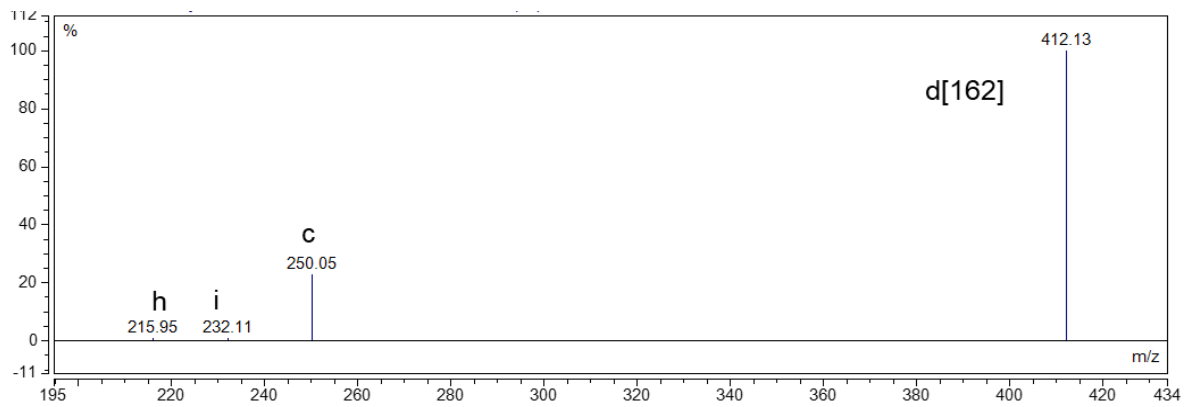
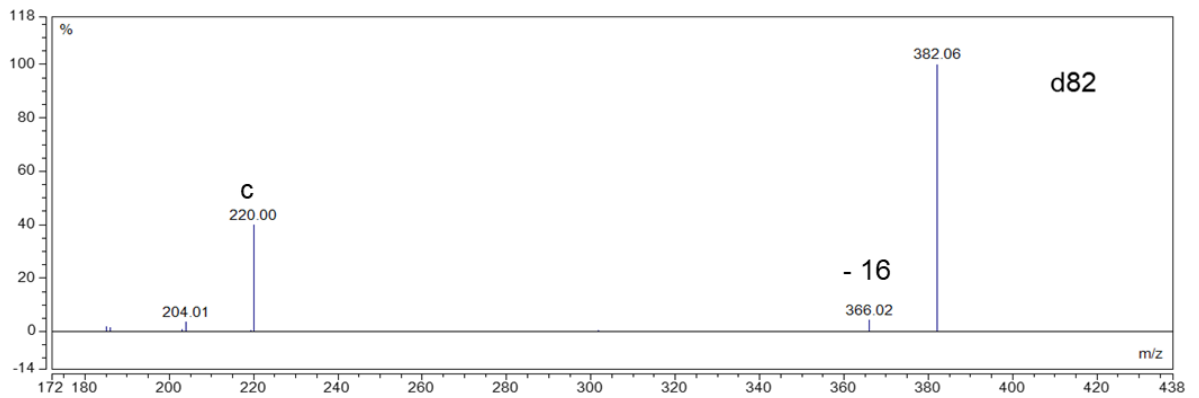


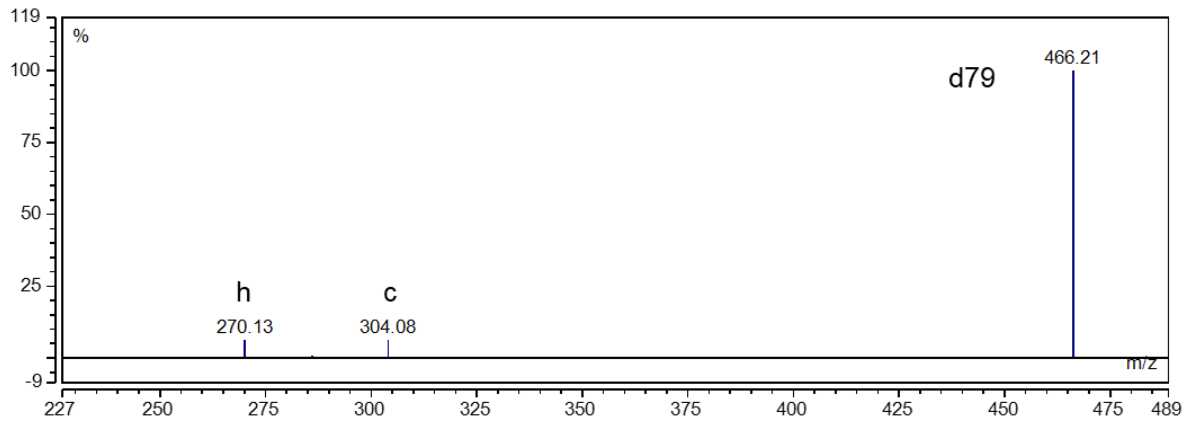


Metilsulfinilni nezasičeni glukozinolati



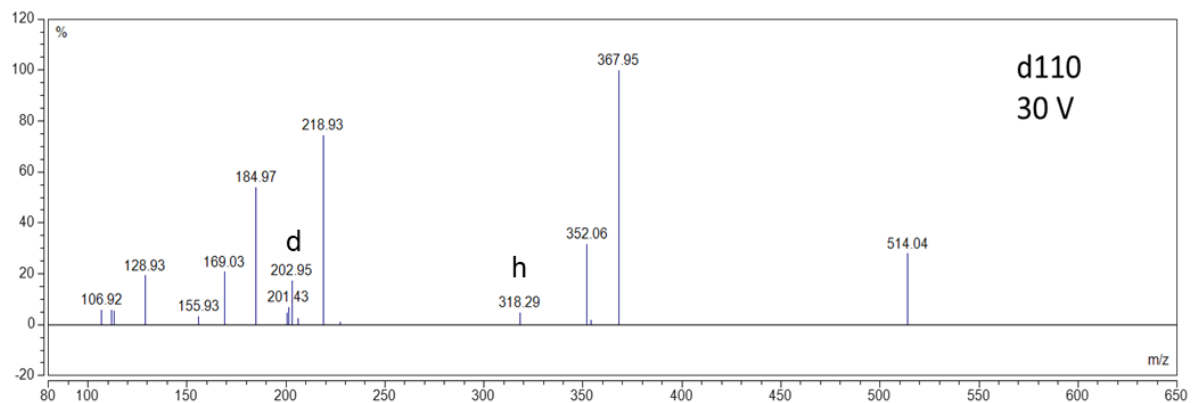
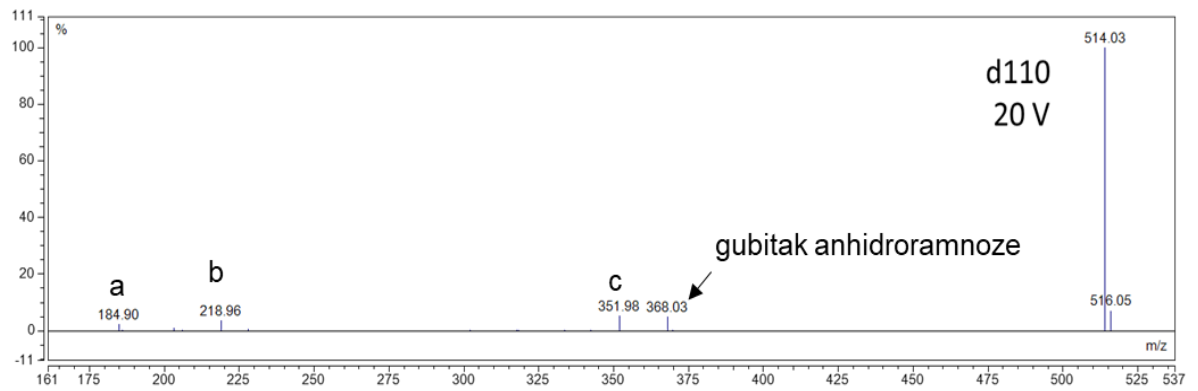
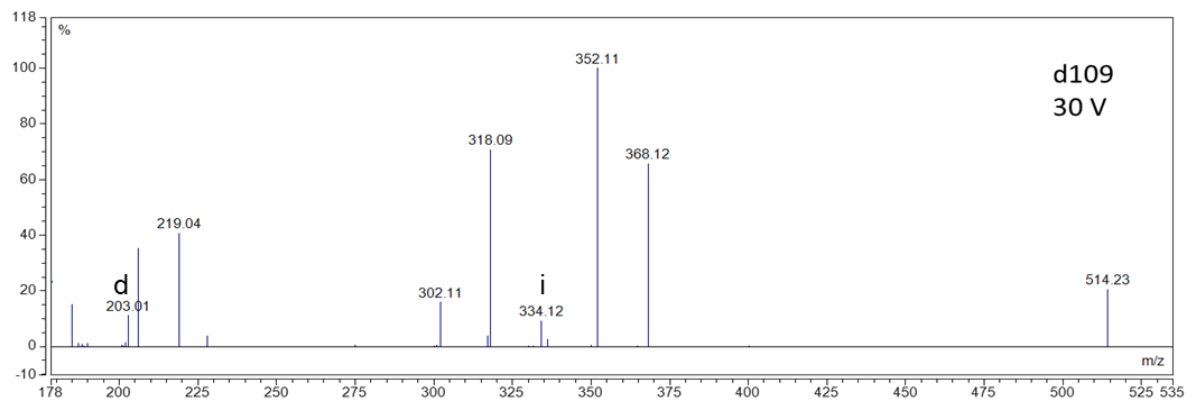
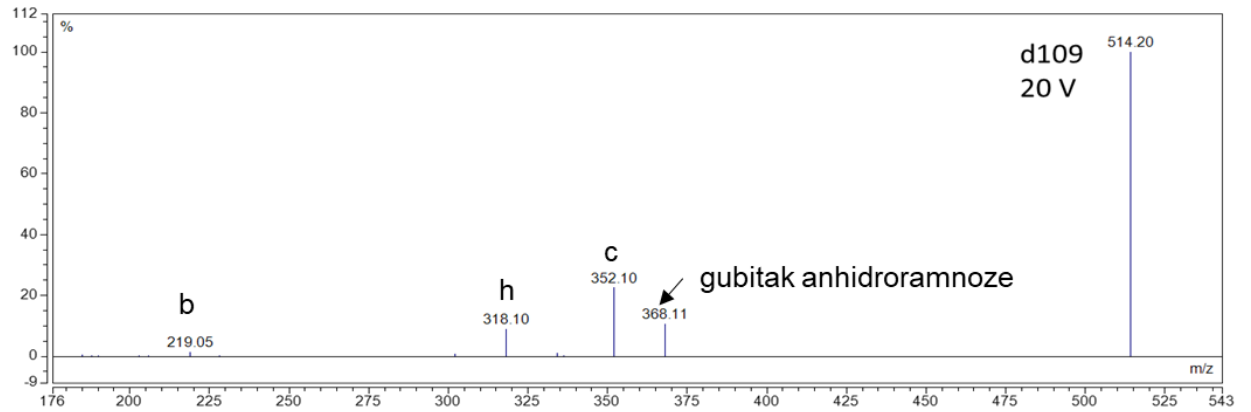
Metilsulfonilni glukozinolat

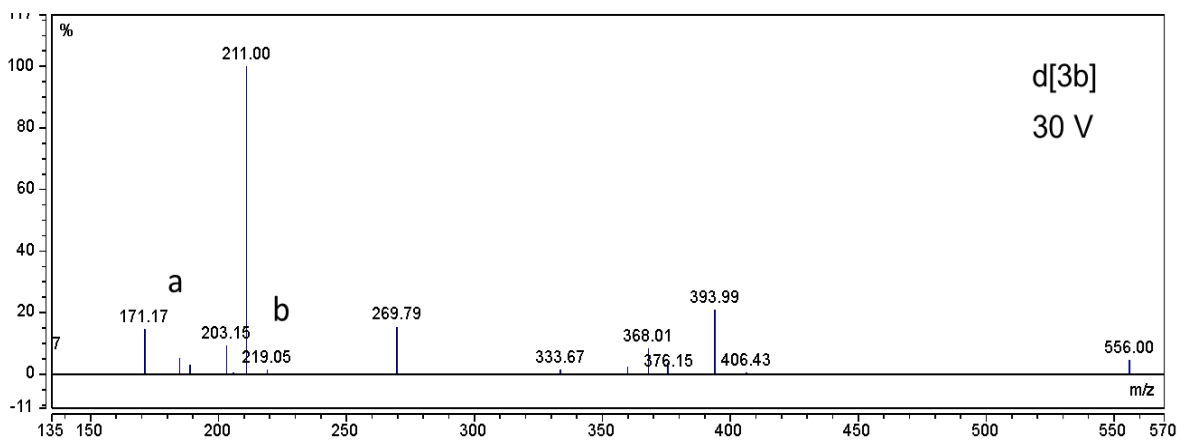
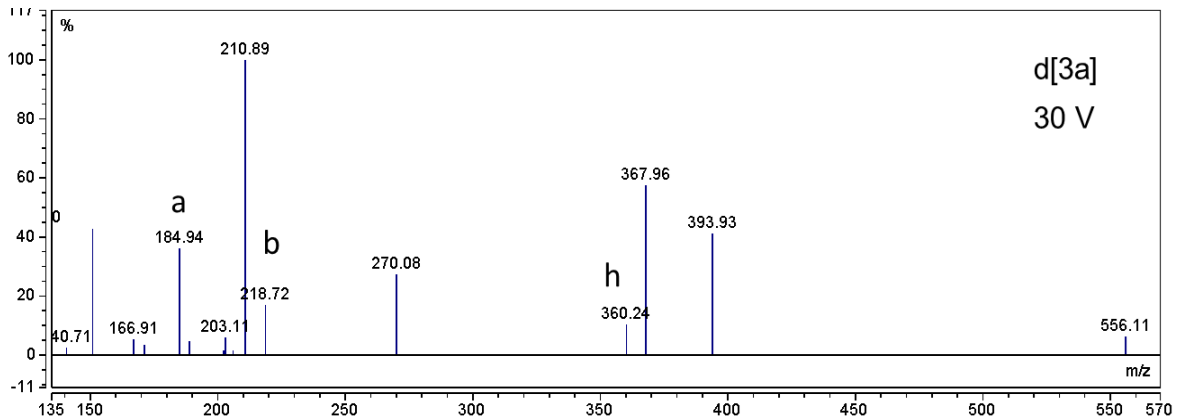
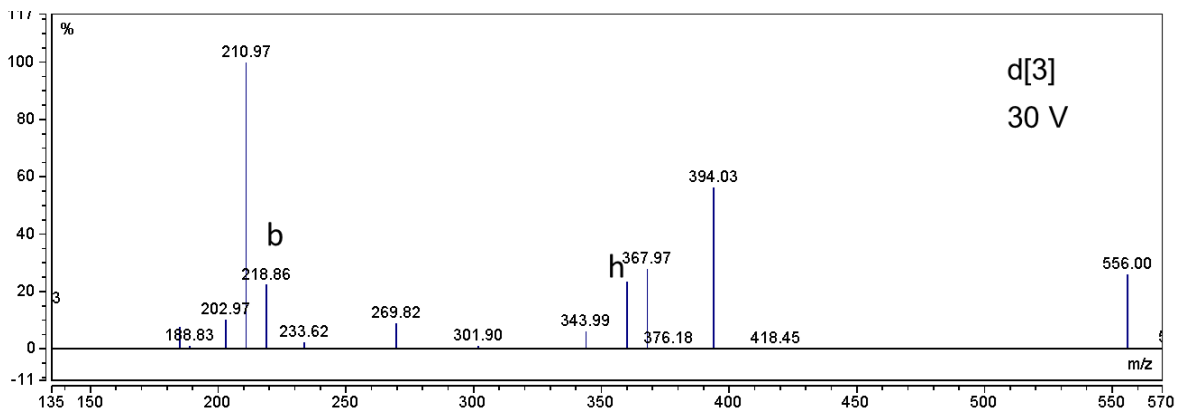
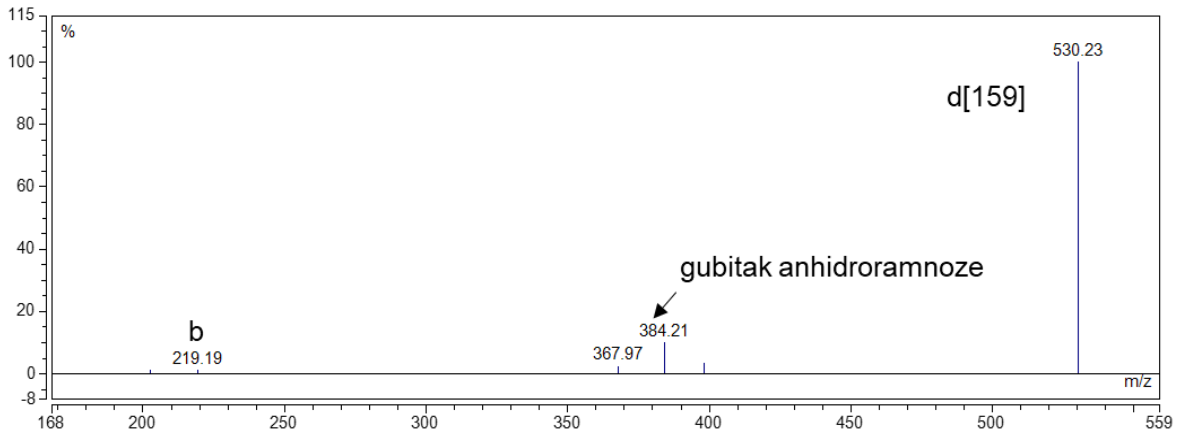




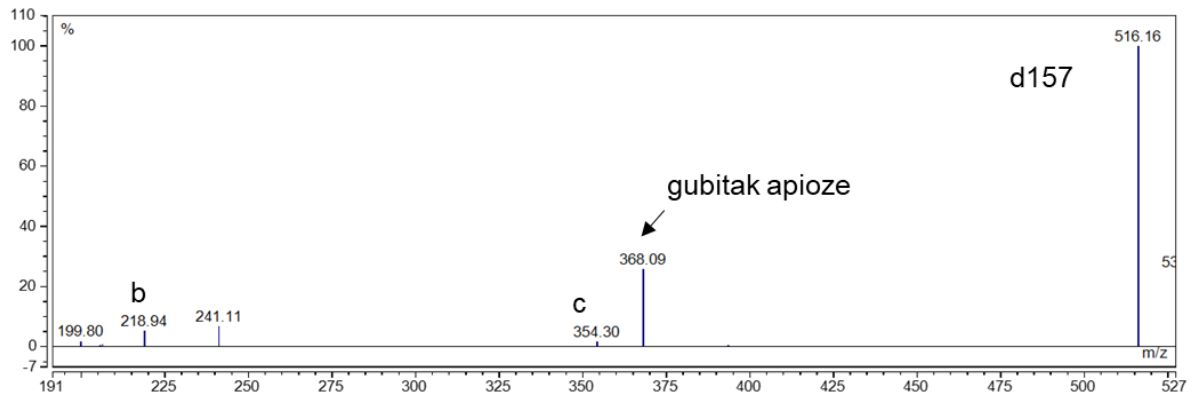
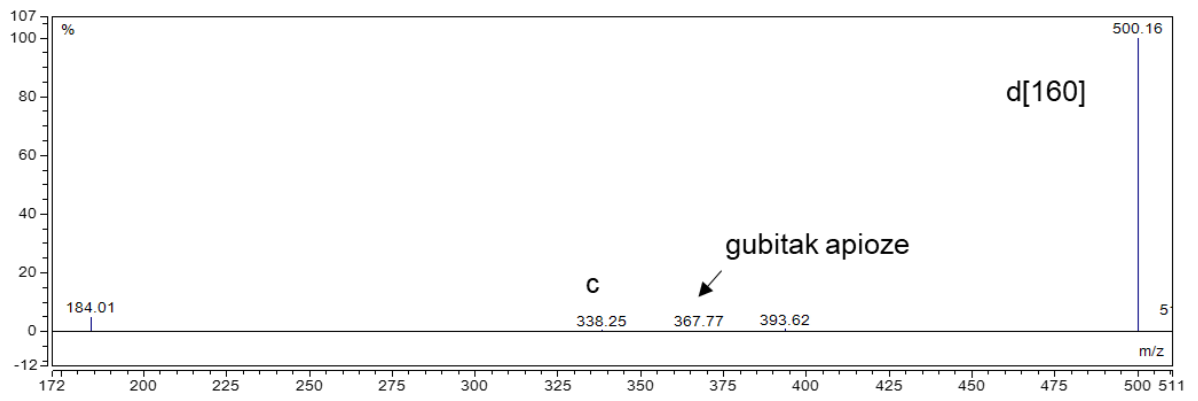
Višestruko glikozilirani glukozinolati

Ramnozilirani glukozinolati

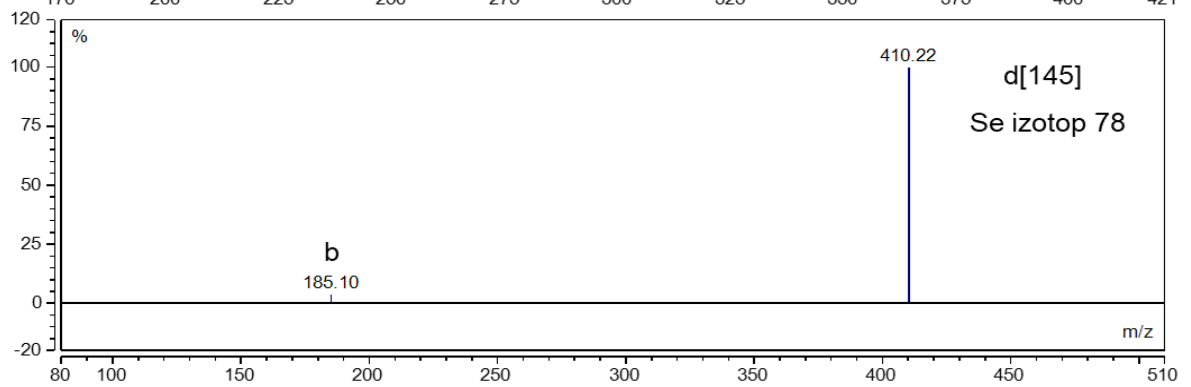
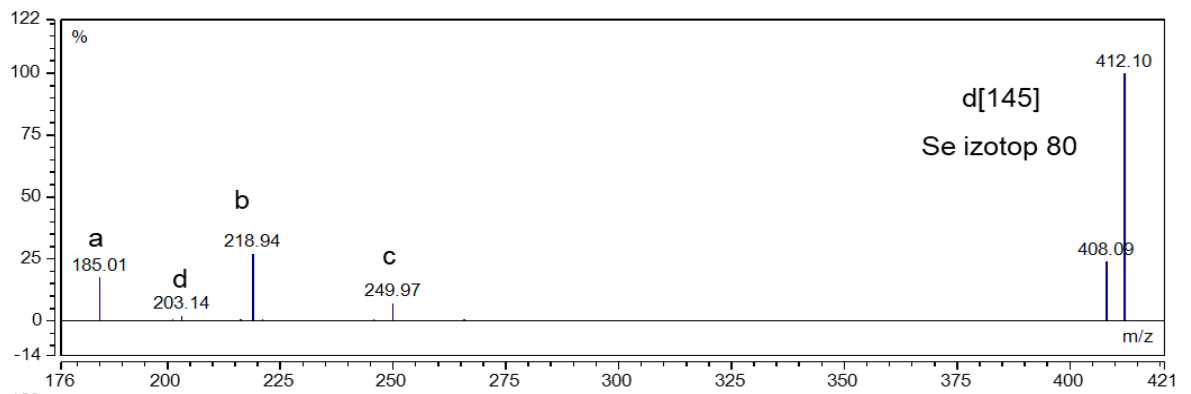




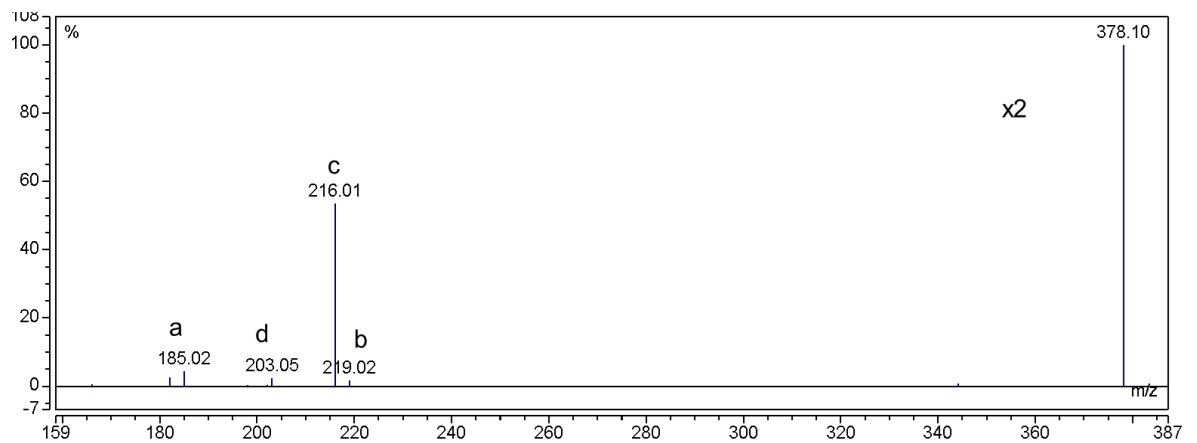
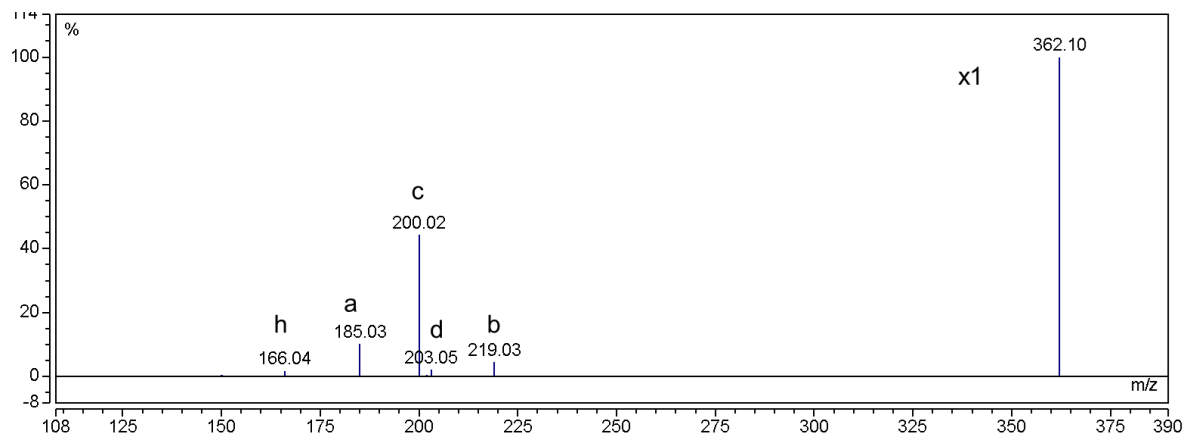
Apiozilirani glukozinolati



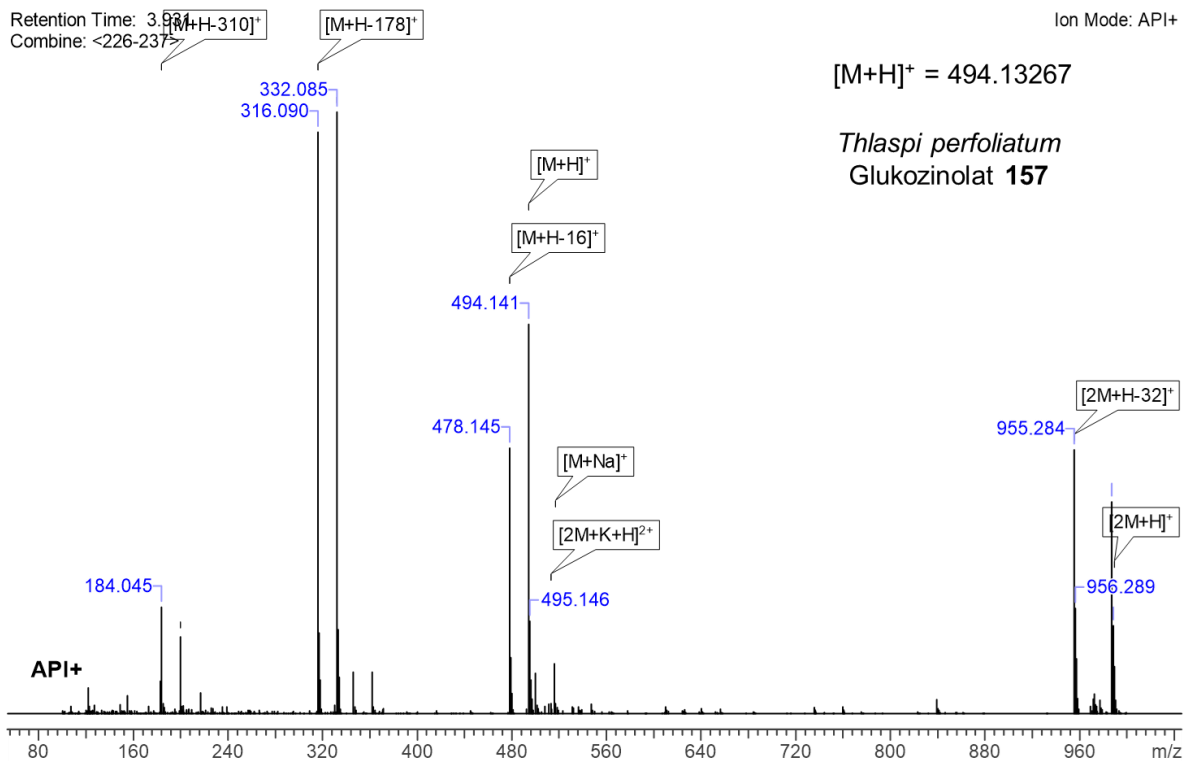
Glukozinolat izveden iz selenometionina



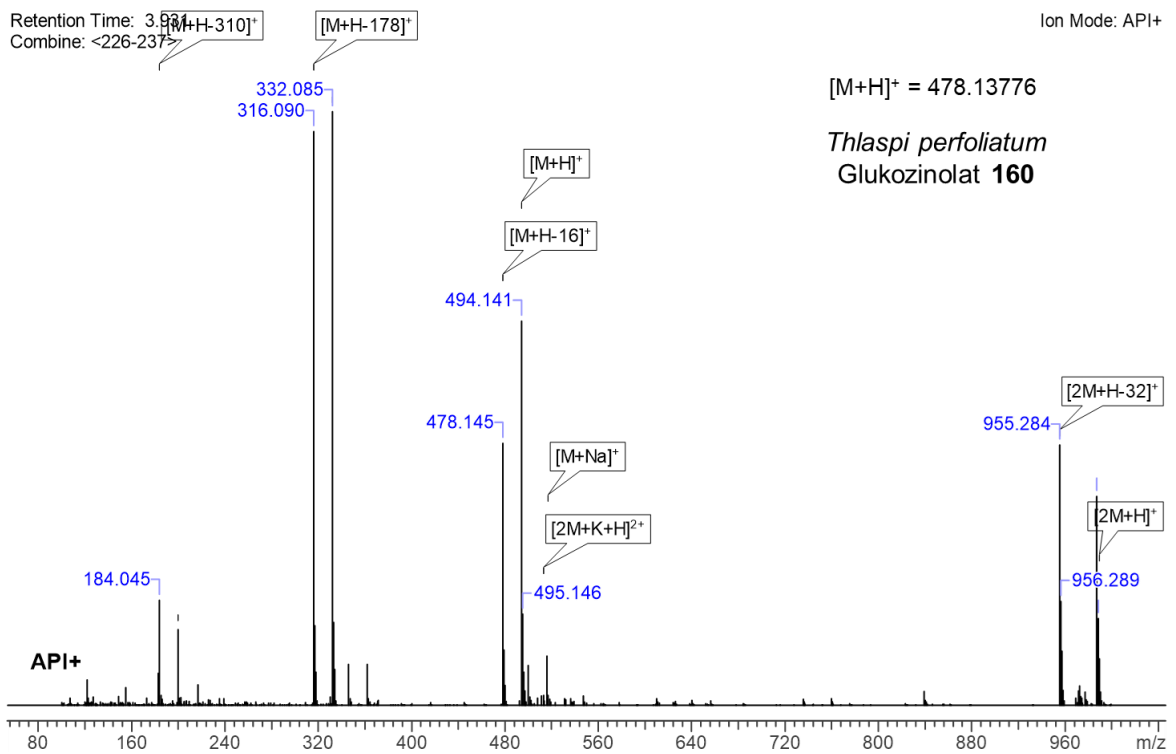
Neidentificirani glukozinolati



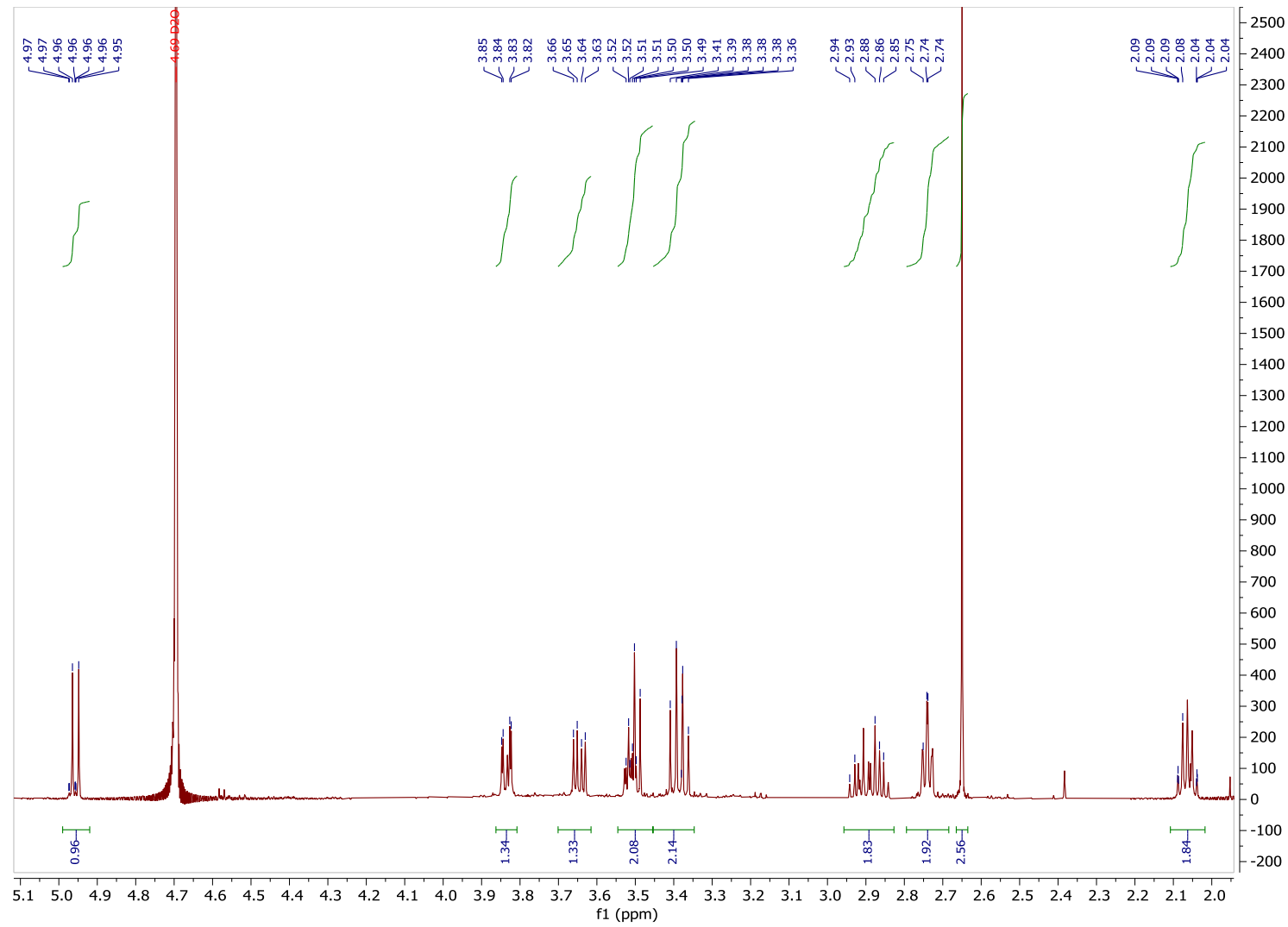
4'-O-β-D-Apiofuranosilglukomatronalin **157** iz *Thlaspi perfoliatum*



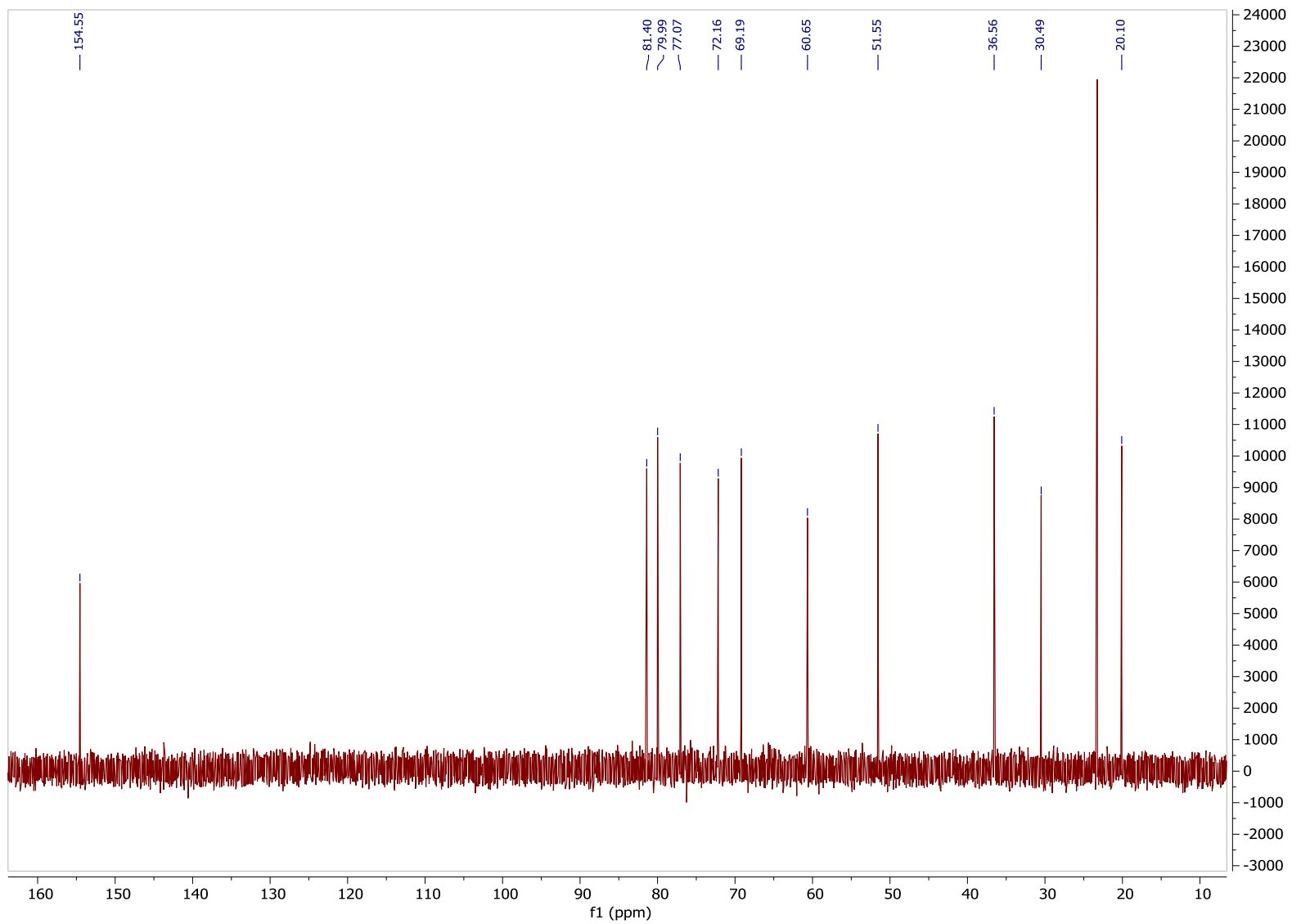
4'-O-(β-D-Apiofuranosiloksi)benzil-glukozinolat **160** iz *Hesperis laciniata*



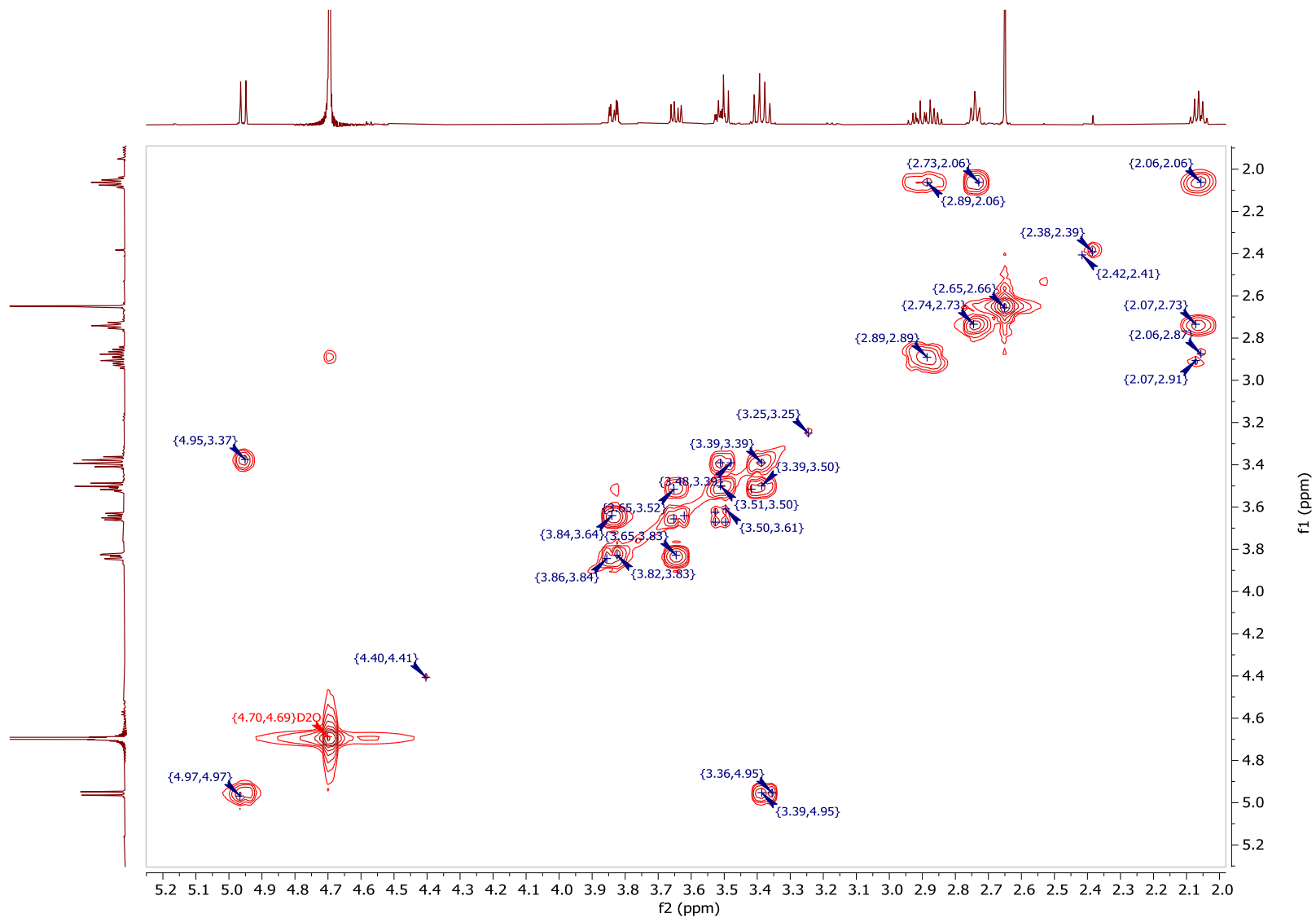
8.3. NMR SPEKTRI



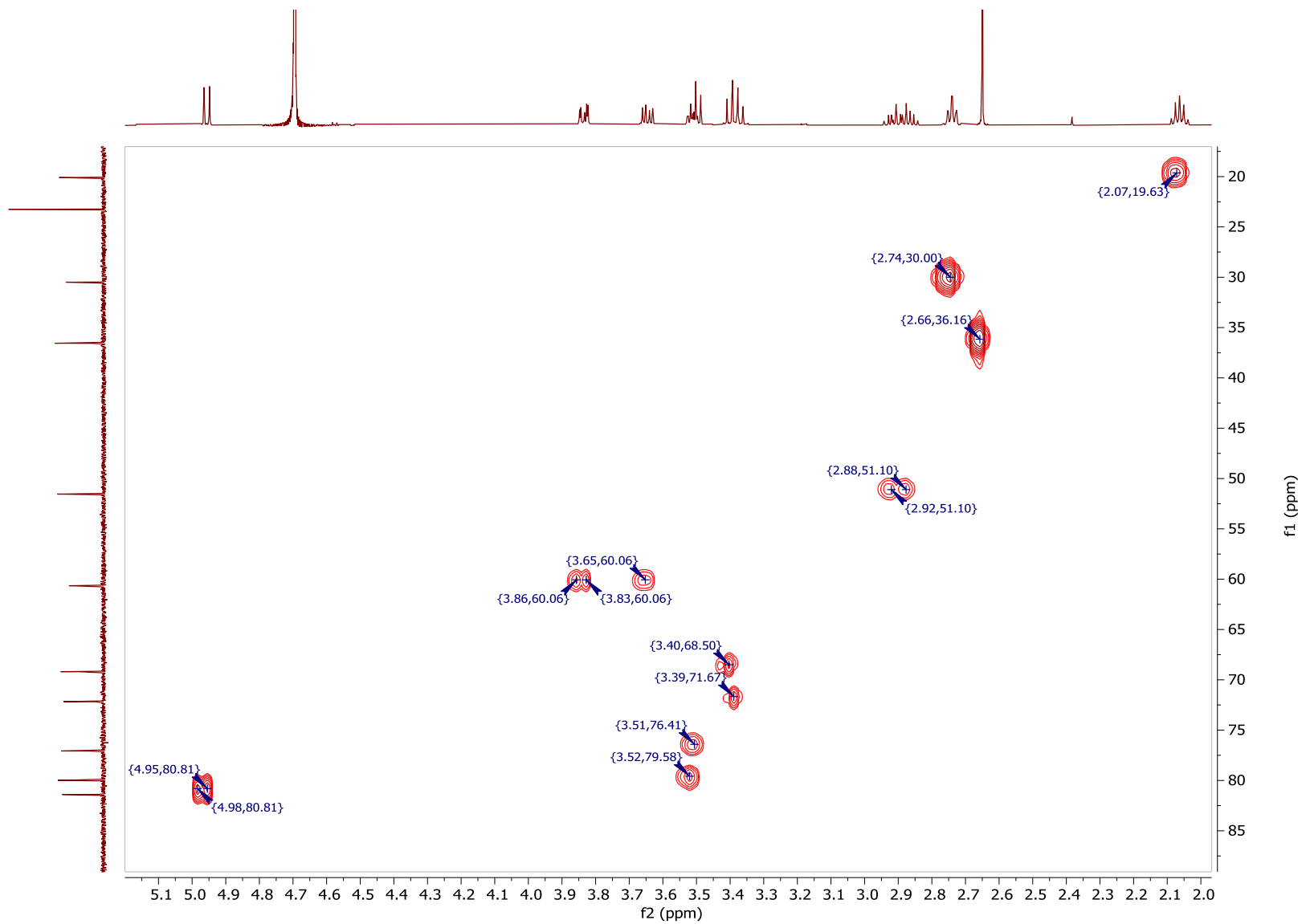
Slika 8.3.1. ^1H NMR desulfoglukoiberina.



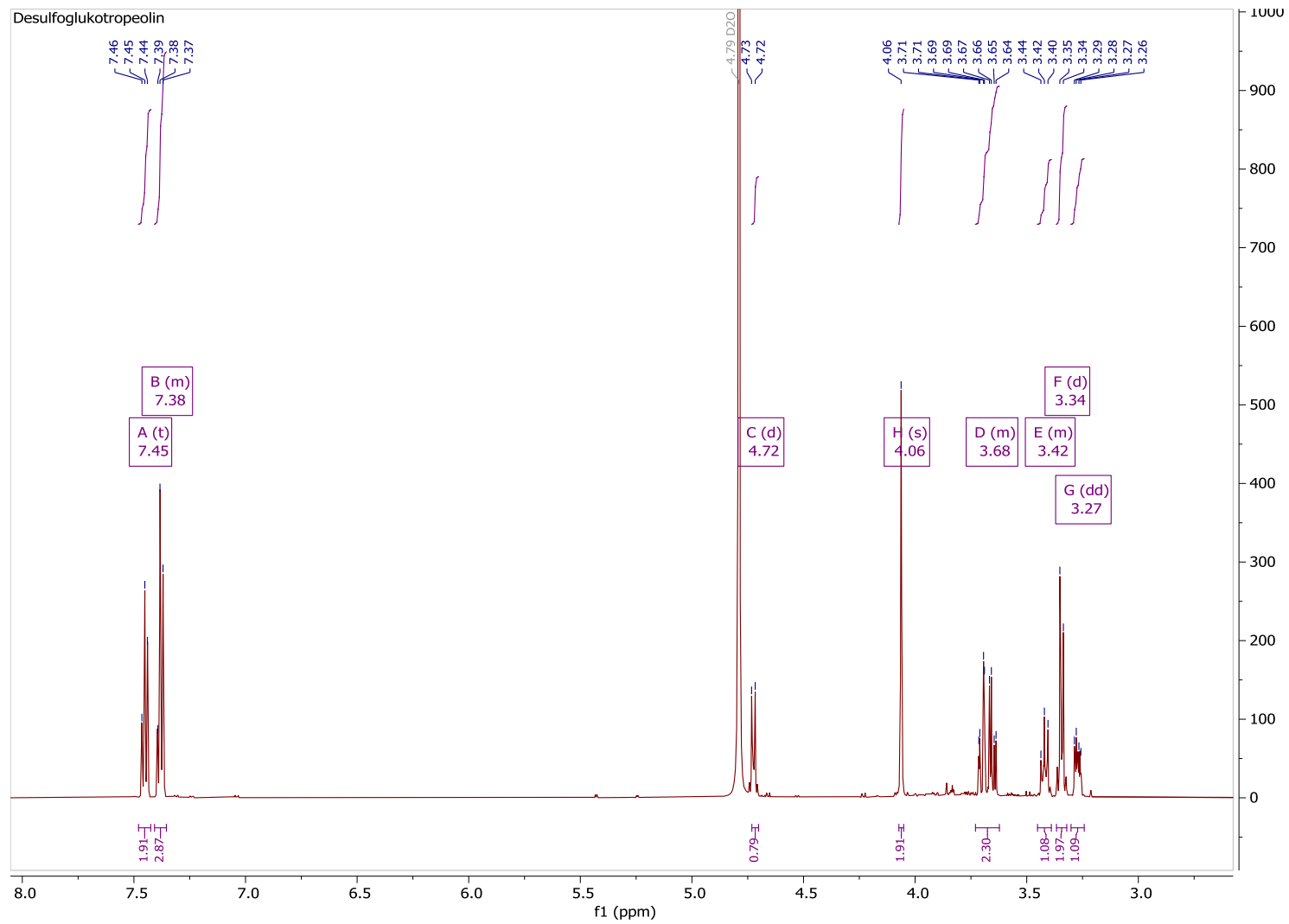
Slika 8.3.2. ^{13}C NMR desulfoglukoiberina.



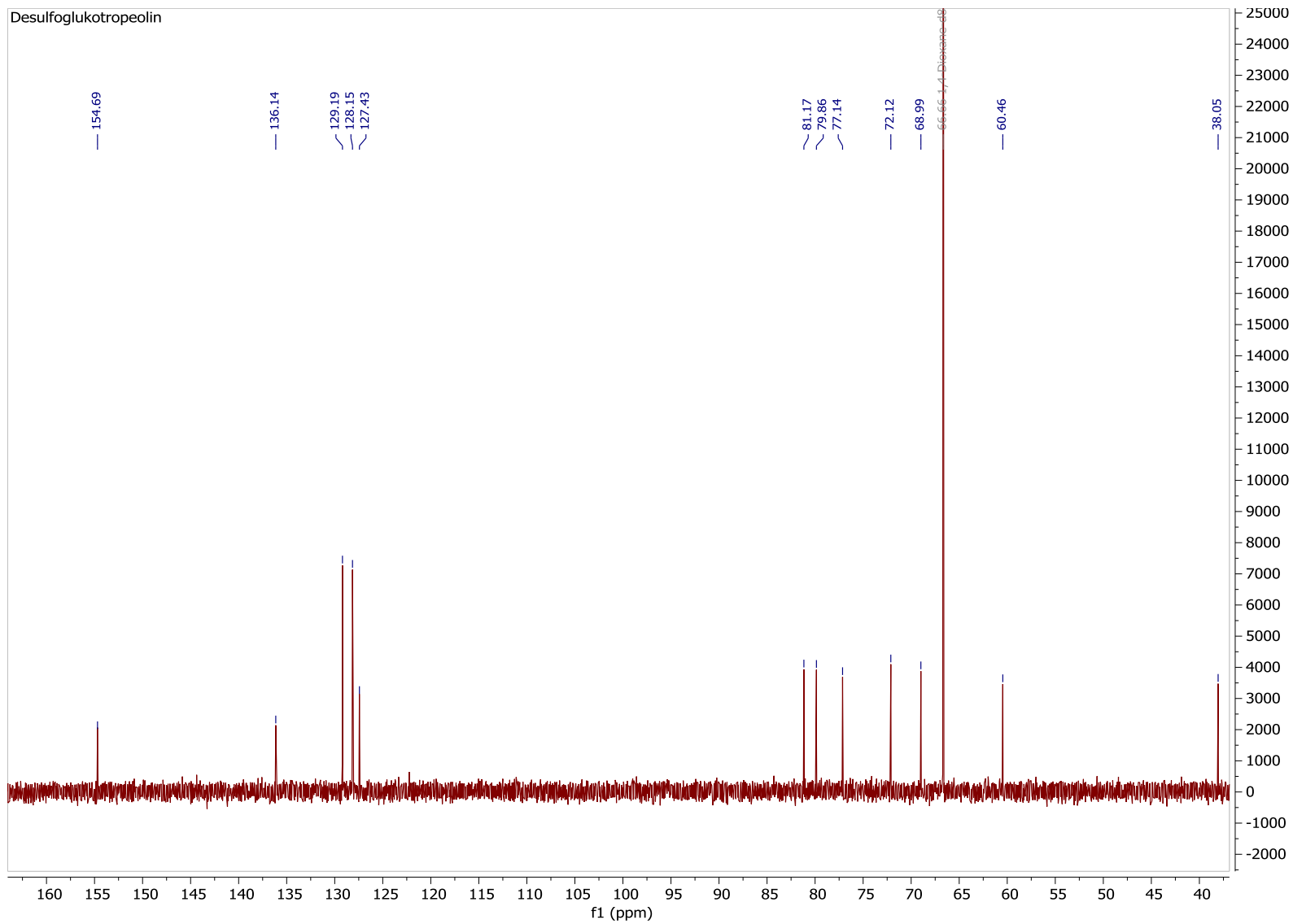
Slika 8.3.3. COSY spektar desulfoglukoiberina.



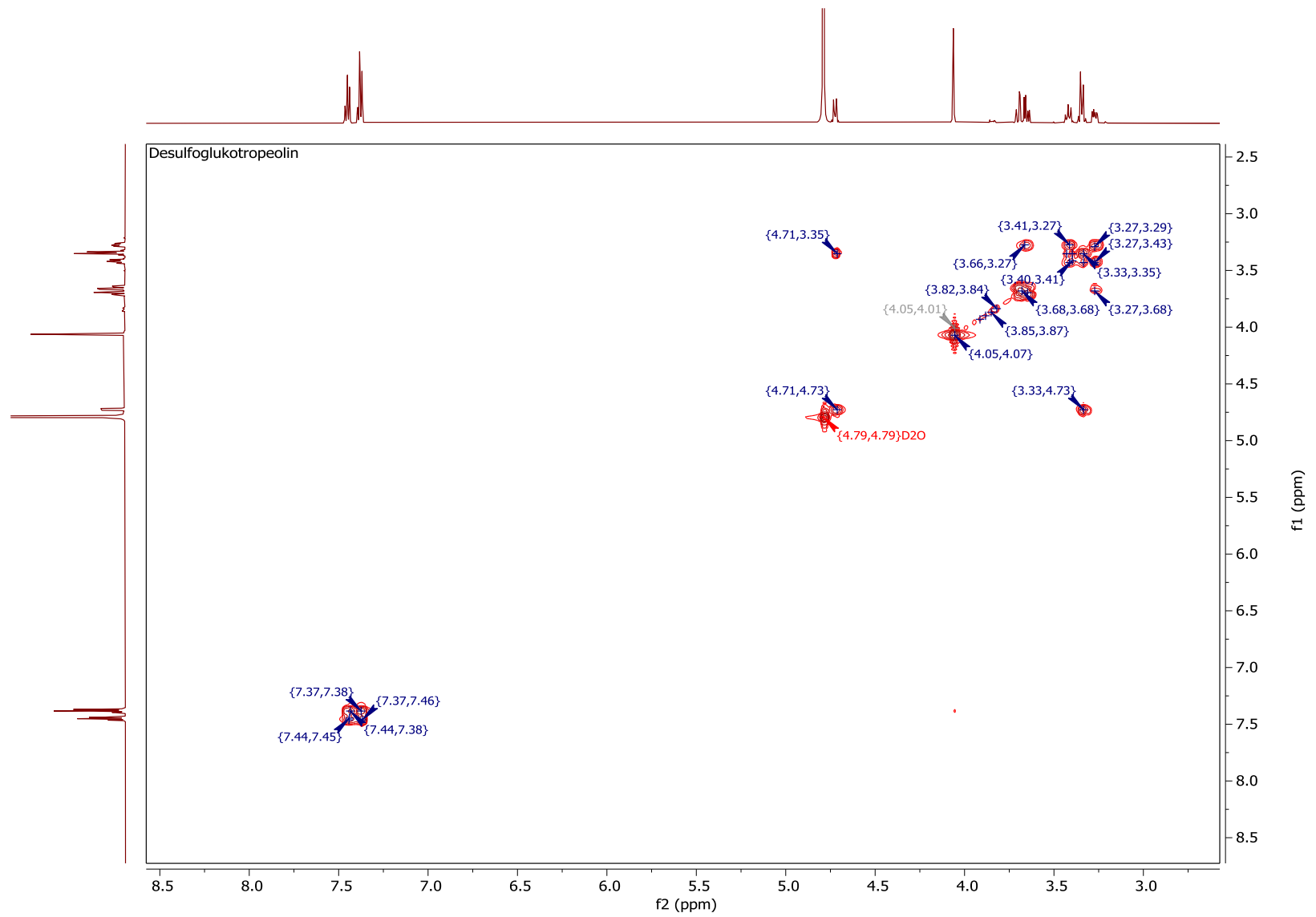
Slika 8.3.4. HSQC spektar desulfoglukoiberina.



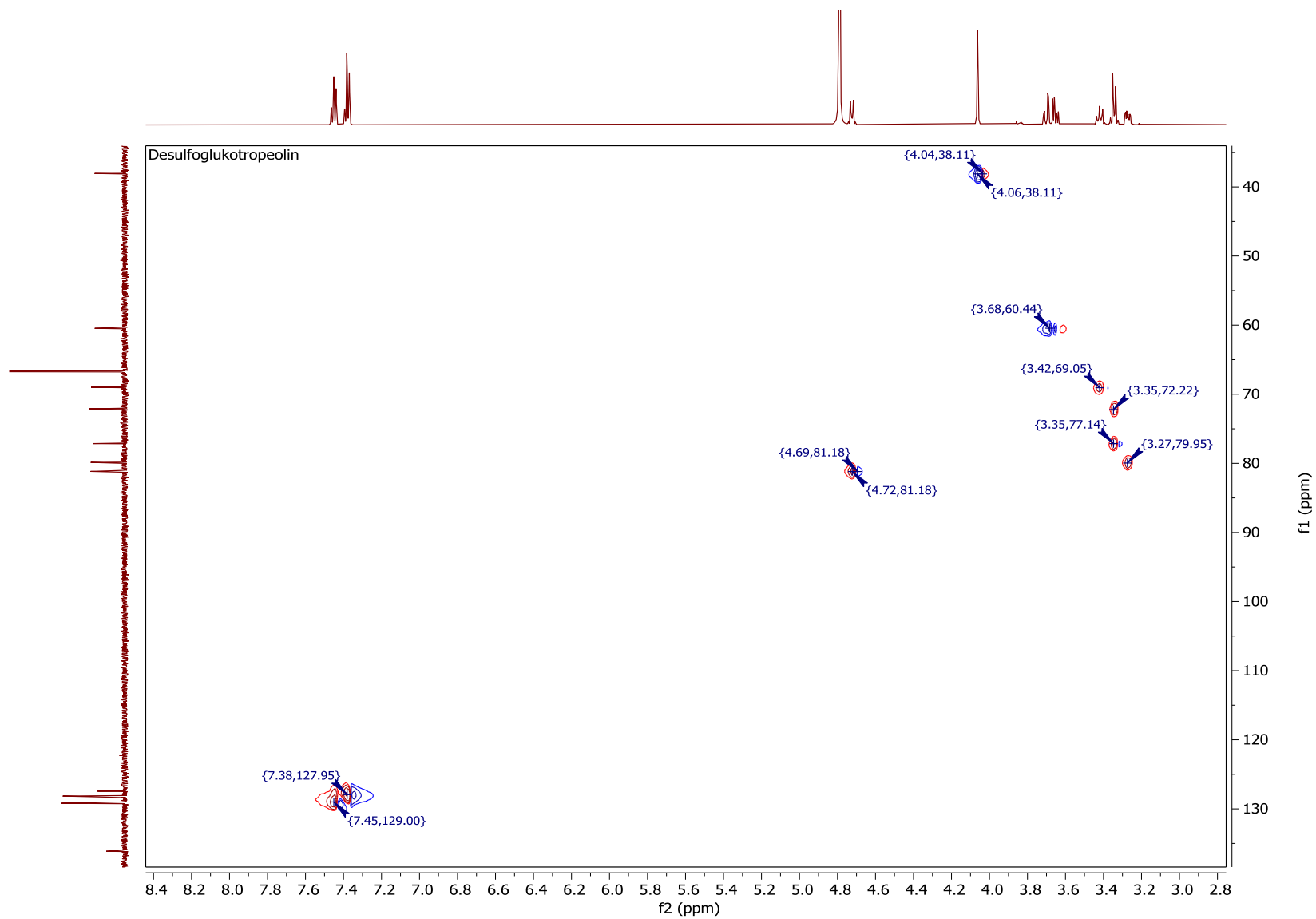
Slika 8.3.5. ^1H NMR desulfoglukotropeolina.



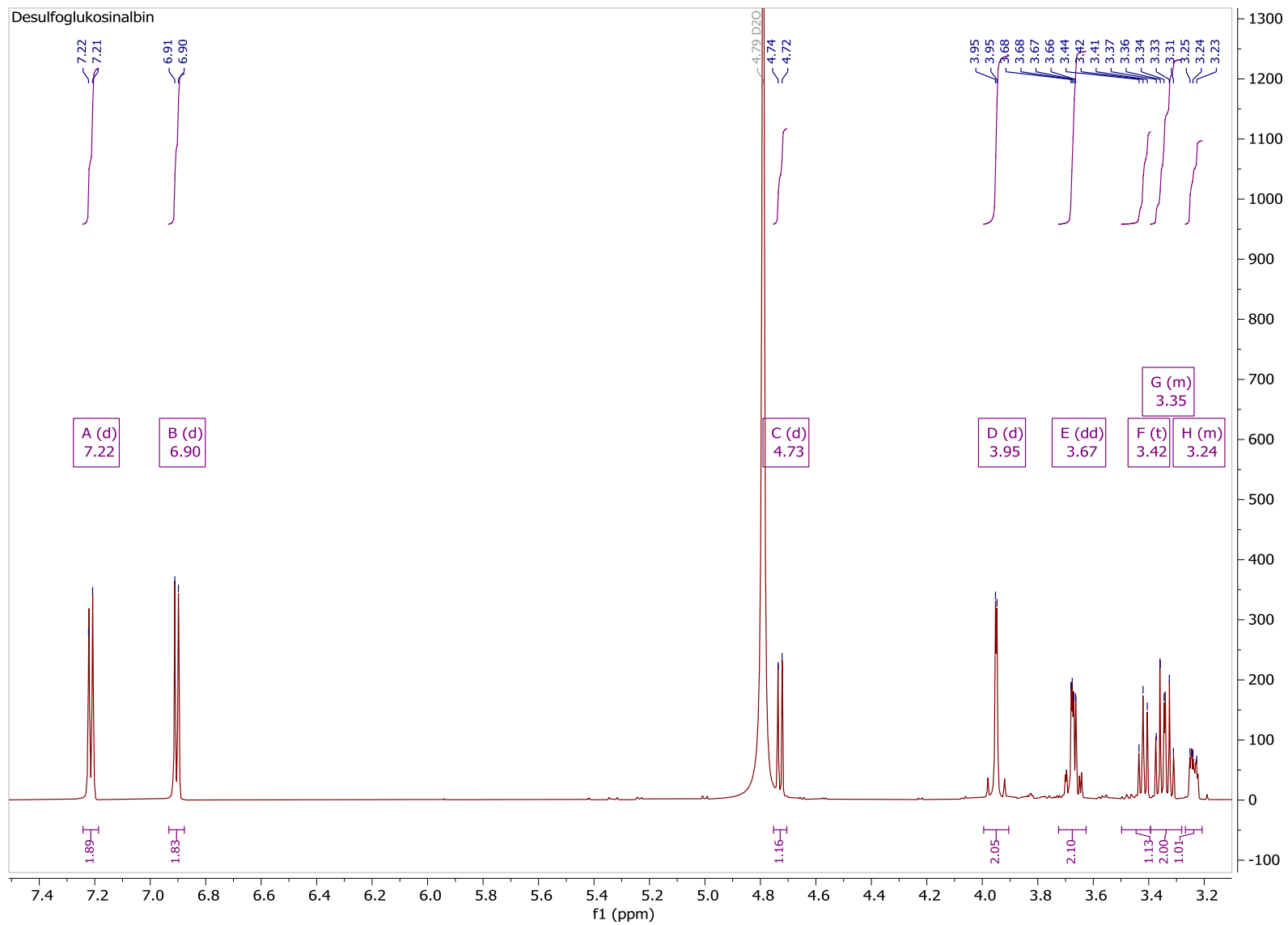
Slika 8.3.6. ^{13}C NMR spektar desulfoglukotropeolina.



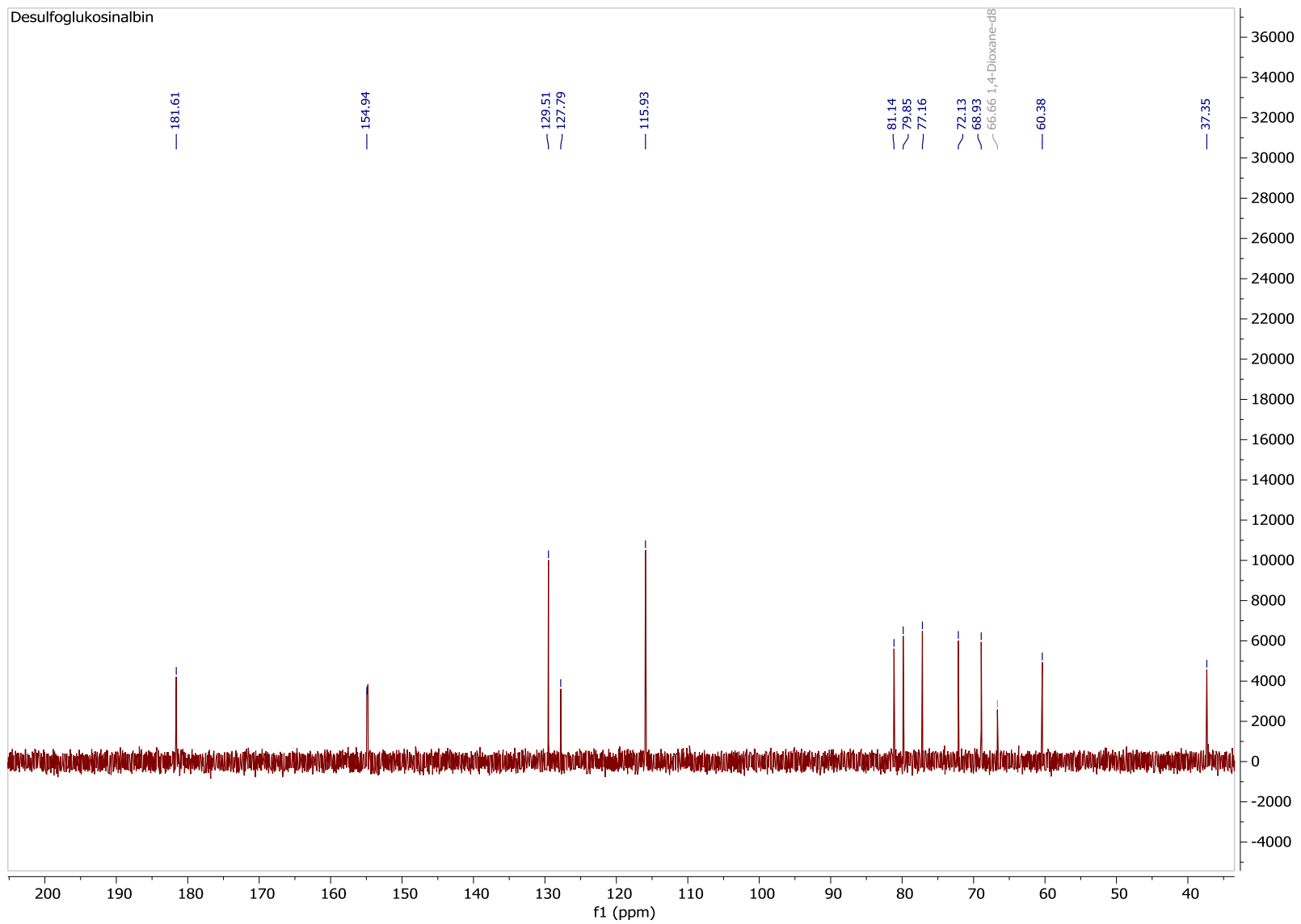
Slika 8.3.7. COSY spektar desulfoglukotropeolina.



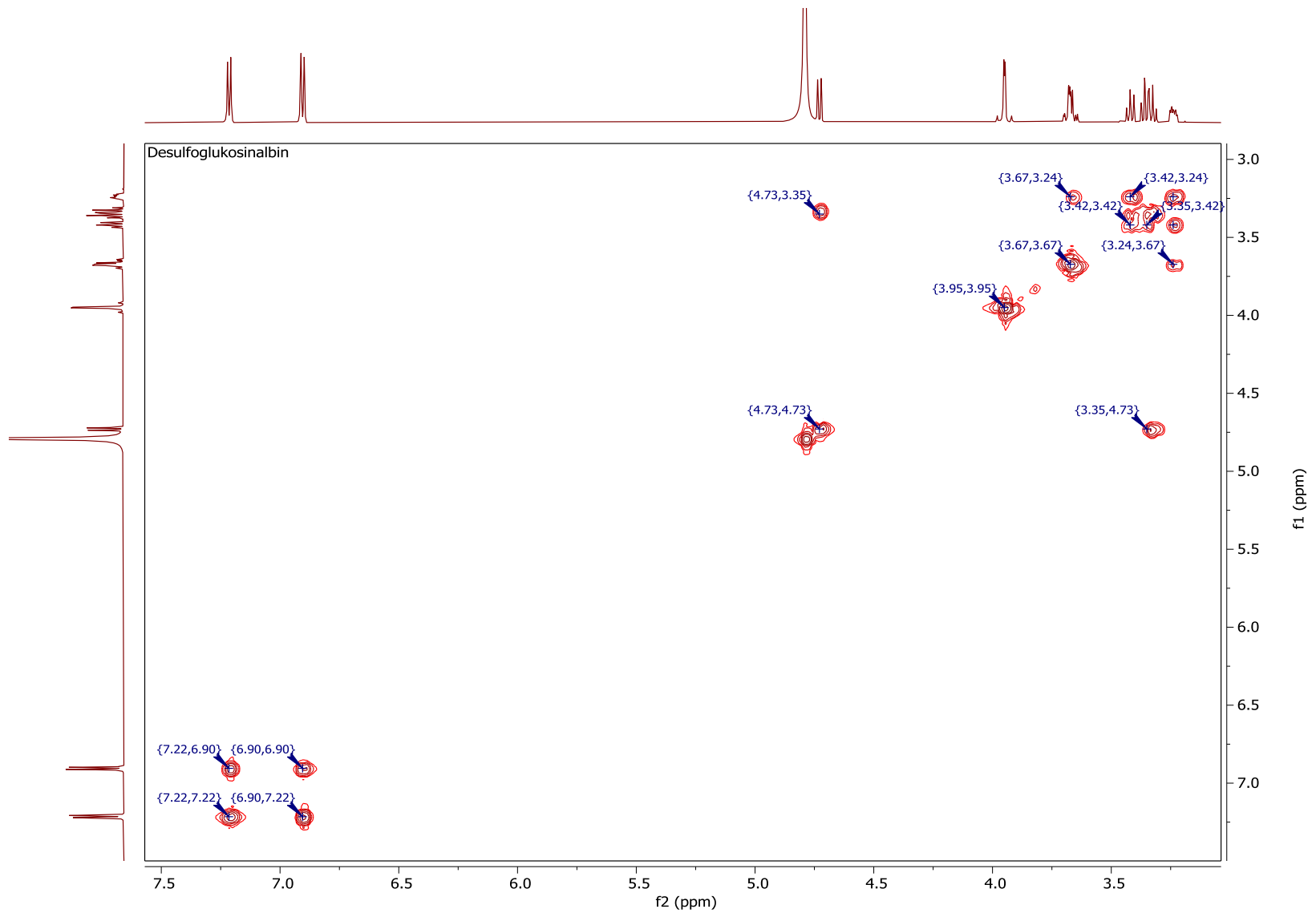
Slika 8.3.8. HSQC spektar desulfoglukotropeolina.



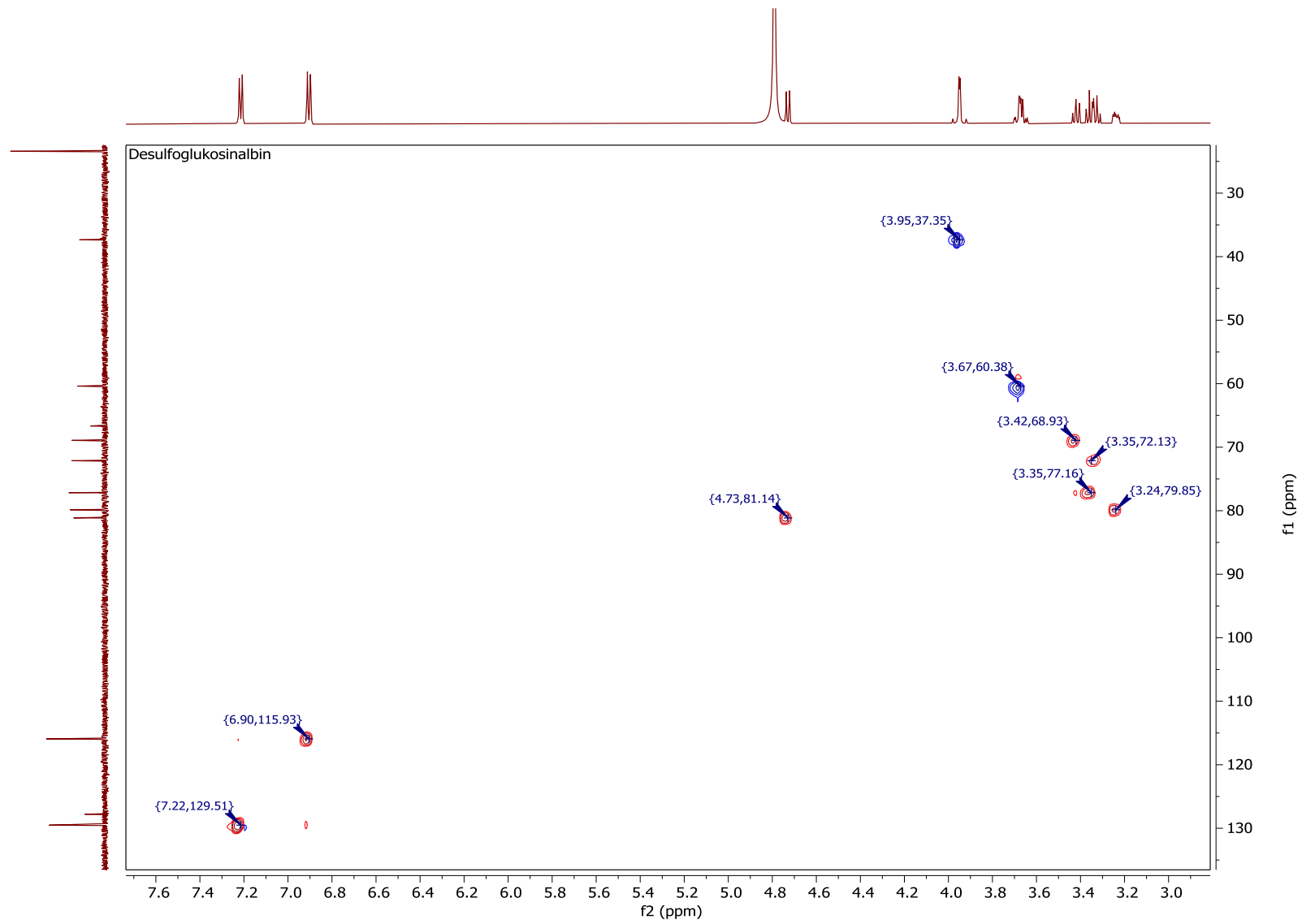
Slika 8.3.9. ^1H NMR spektar desulfoglukosinalbina.



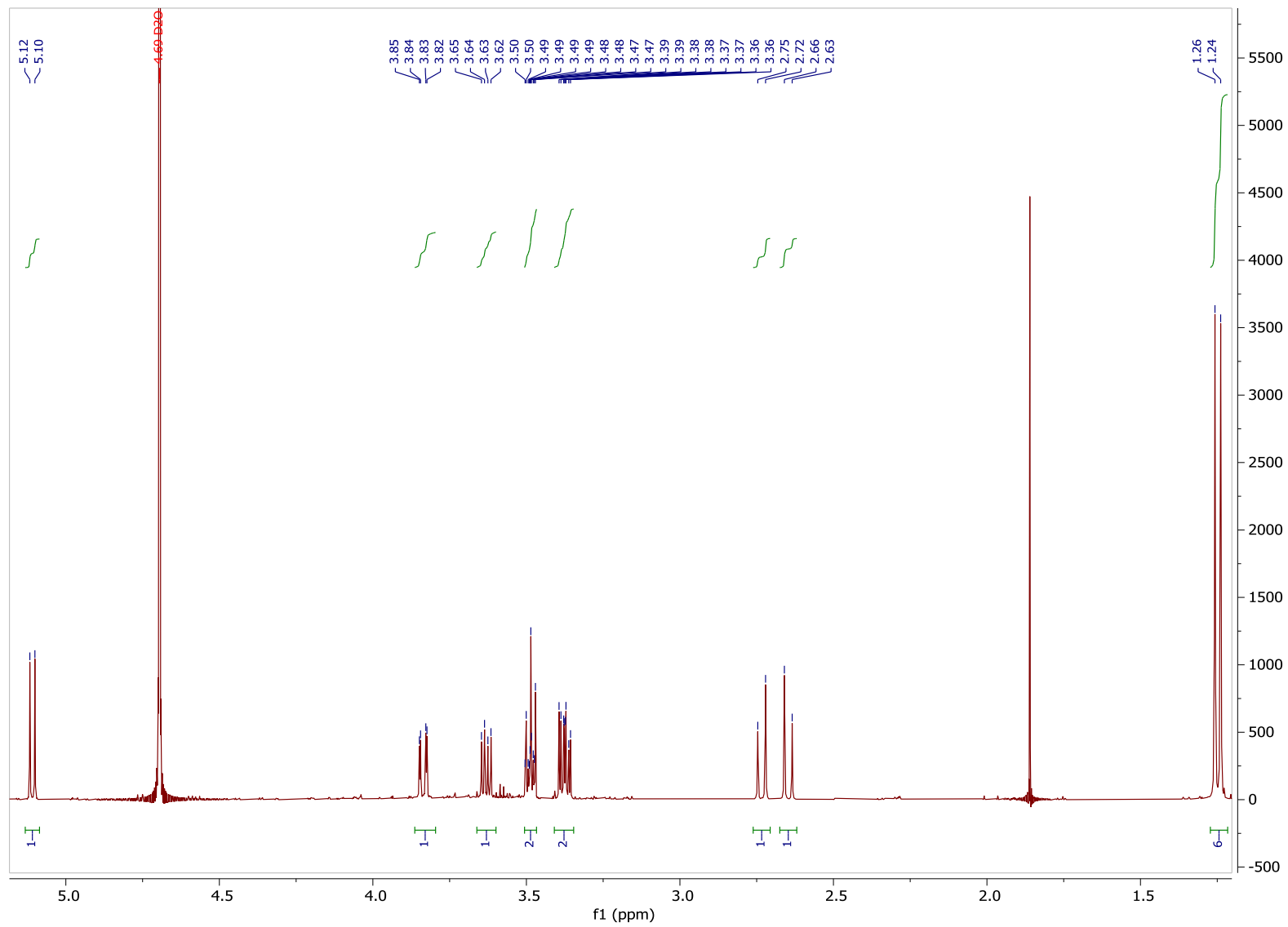
Slika 8.3.10. ¹³C NMR spektar desulfoglucosinalbina.



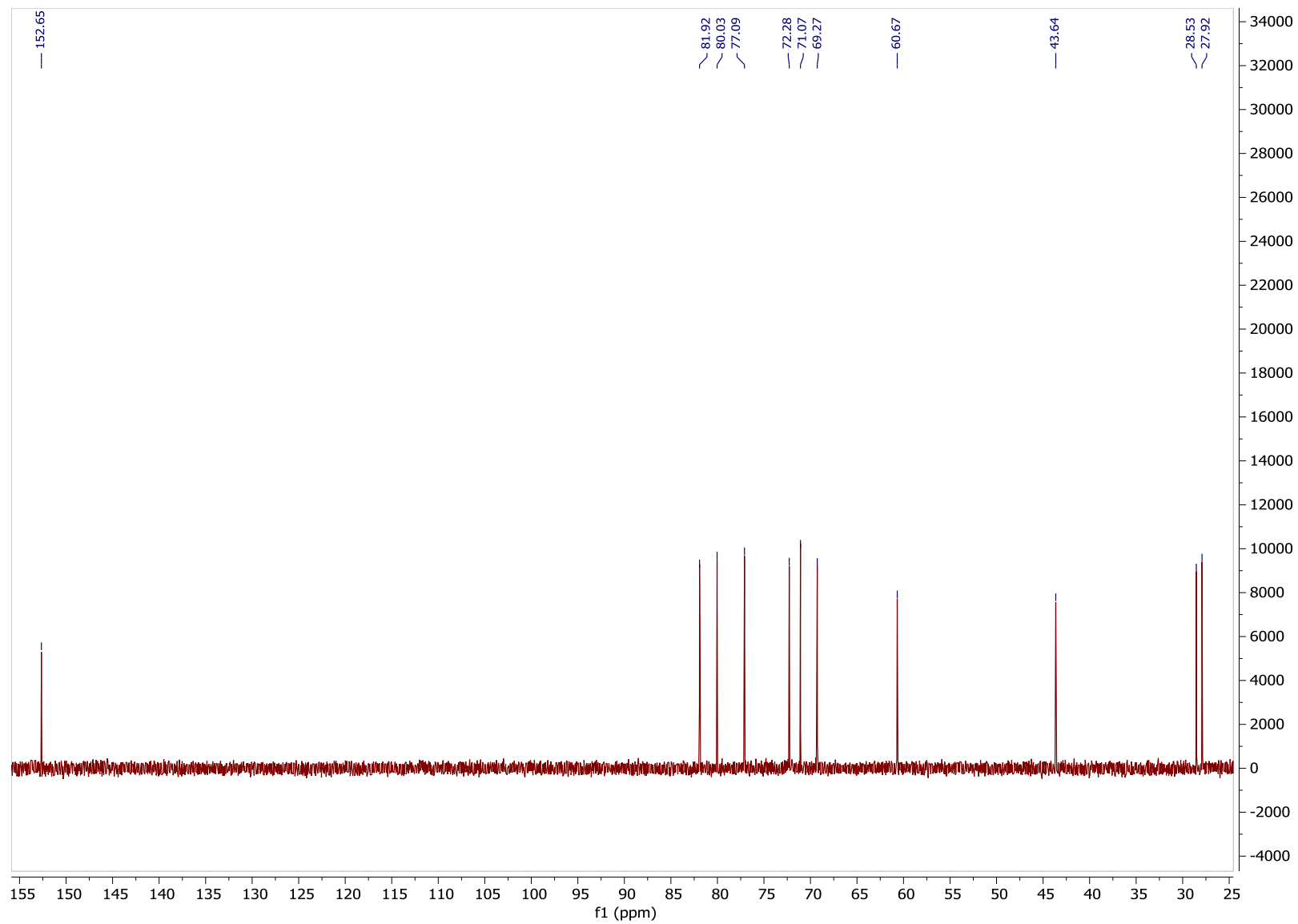
Slika 8.3.11. COSY spektar desulfoglucosinabina.



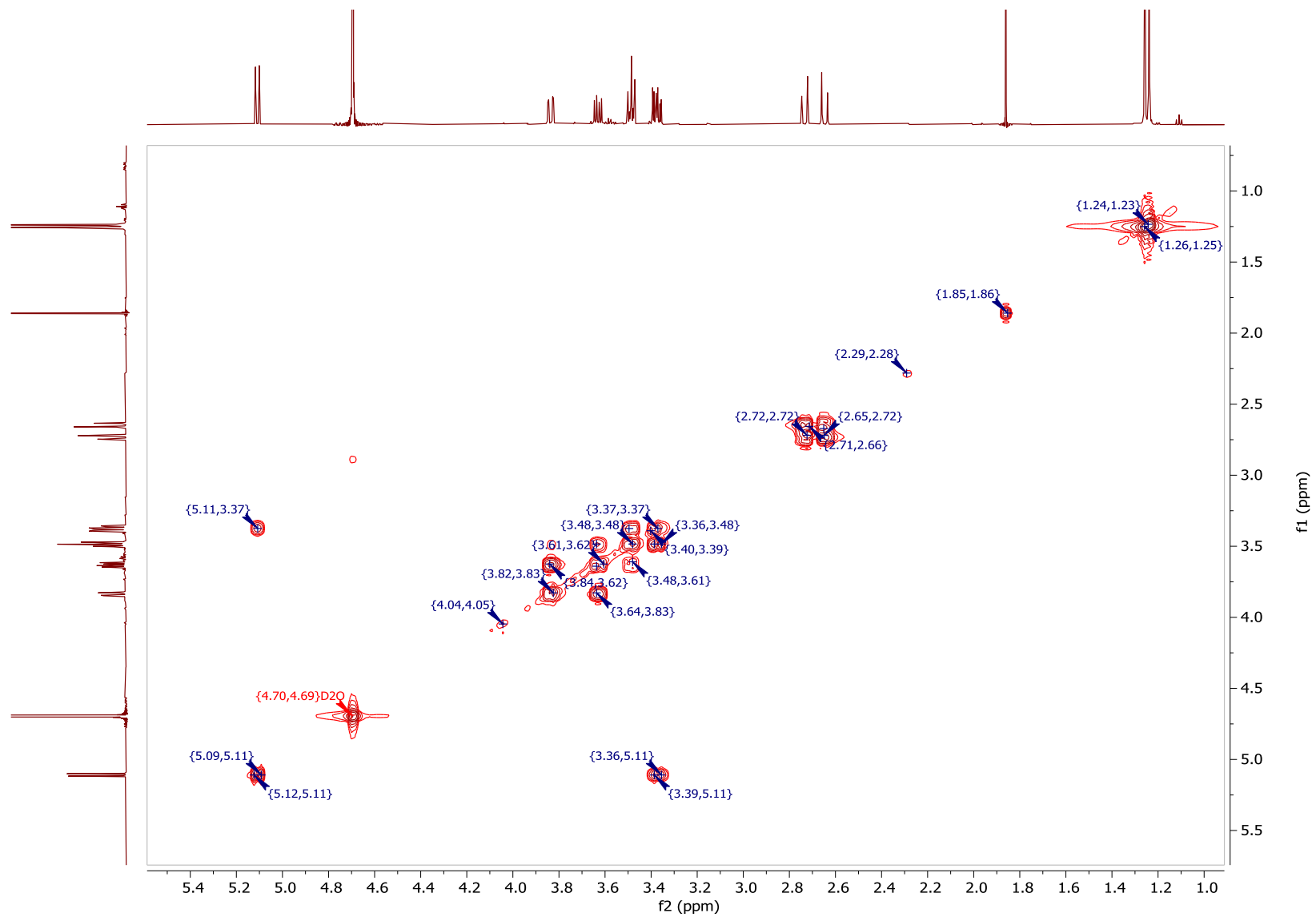
Slika 8.3.12. HSQC spektar desulfoglucosinabina.



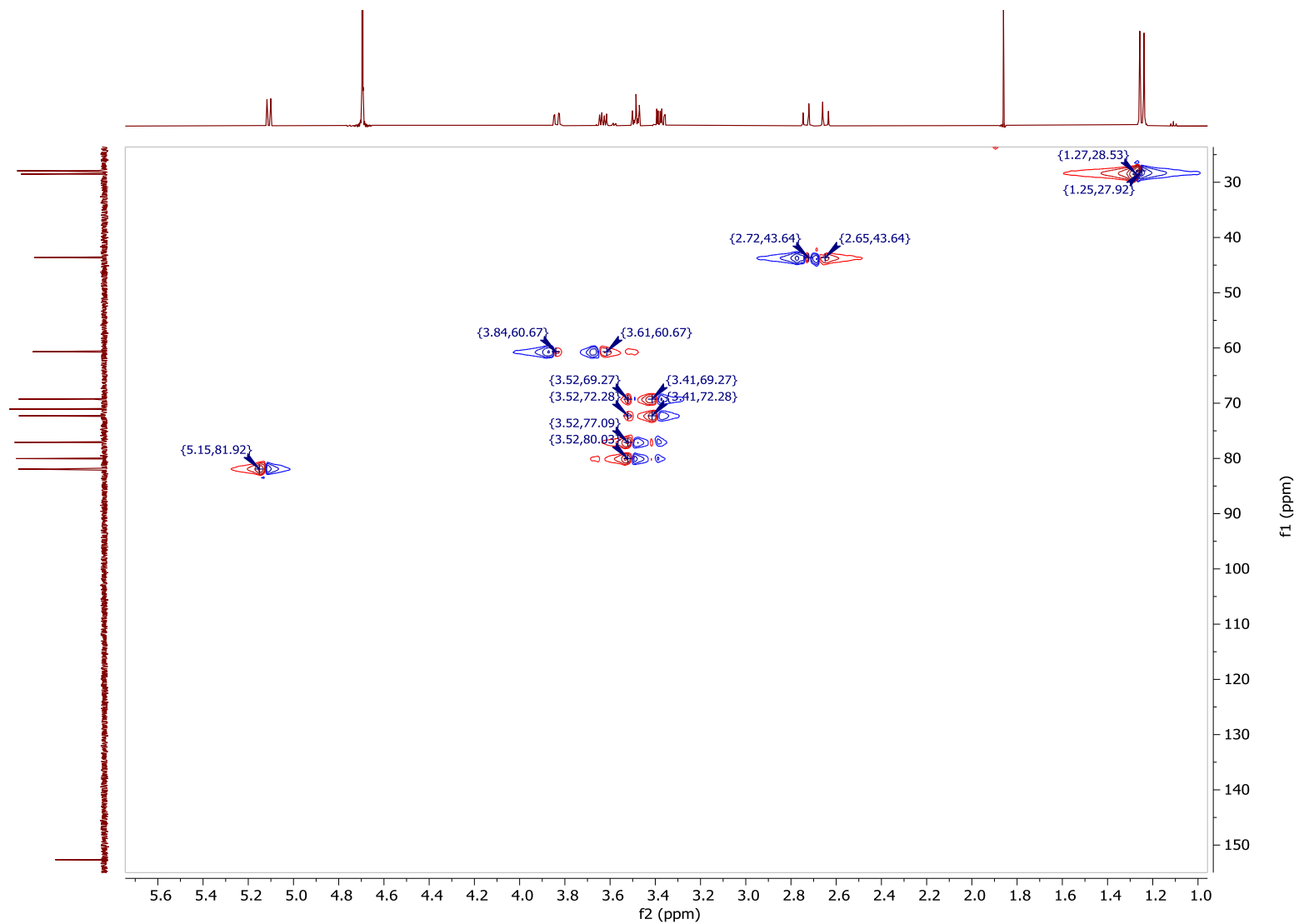
Slika 8.3.13. ^1H NMR desulfoglucokonringina.



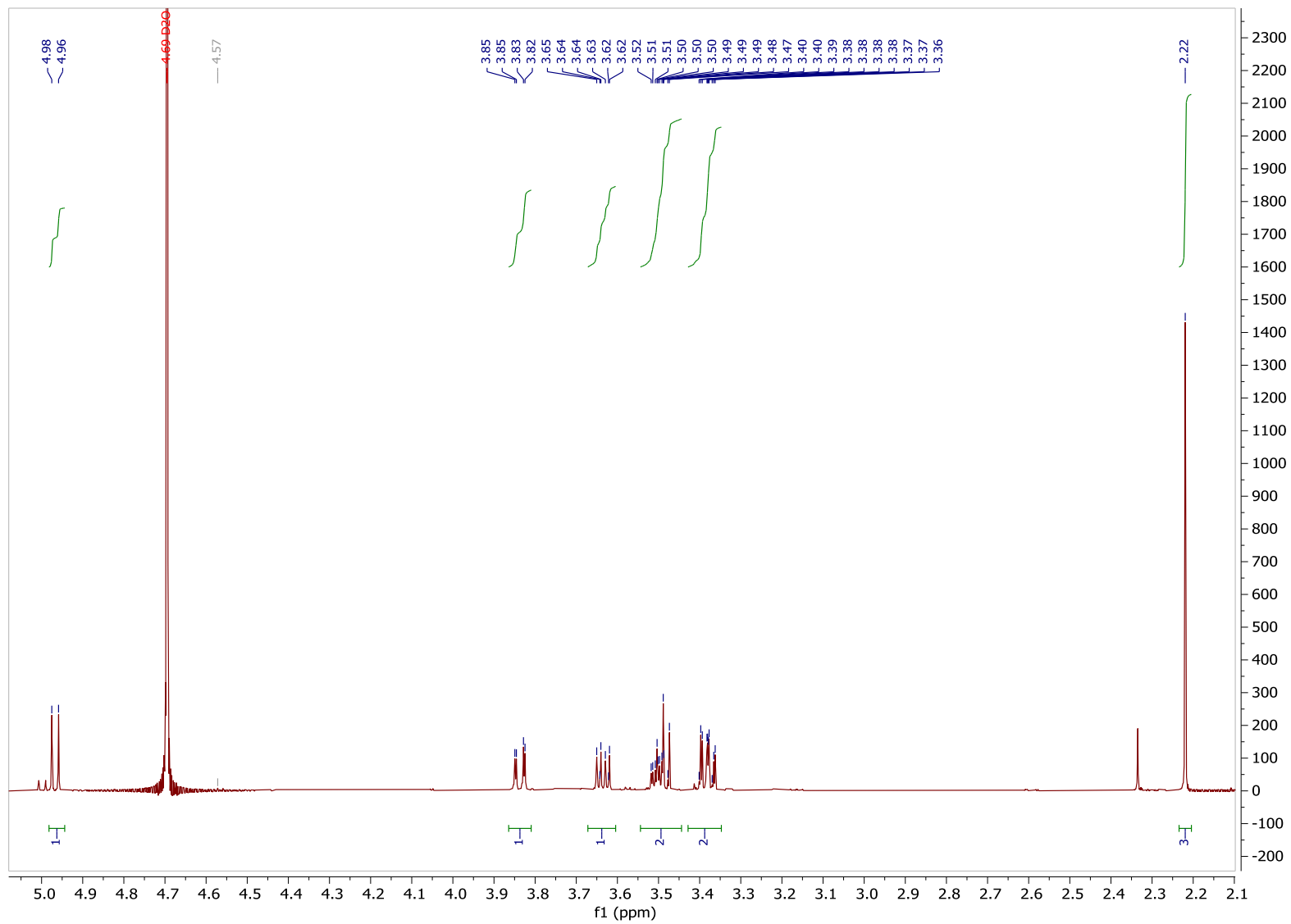
Slika 8.3.14. ^{13}C NMR desulfoglukokonringina.



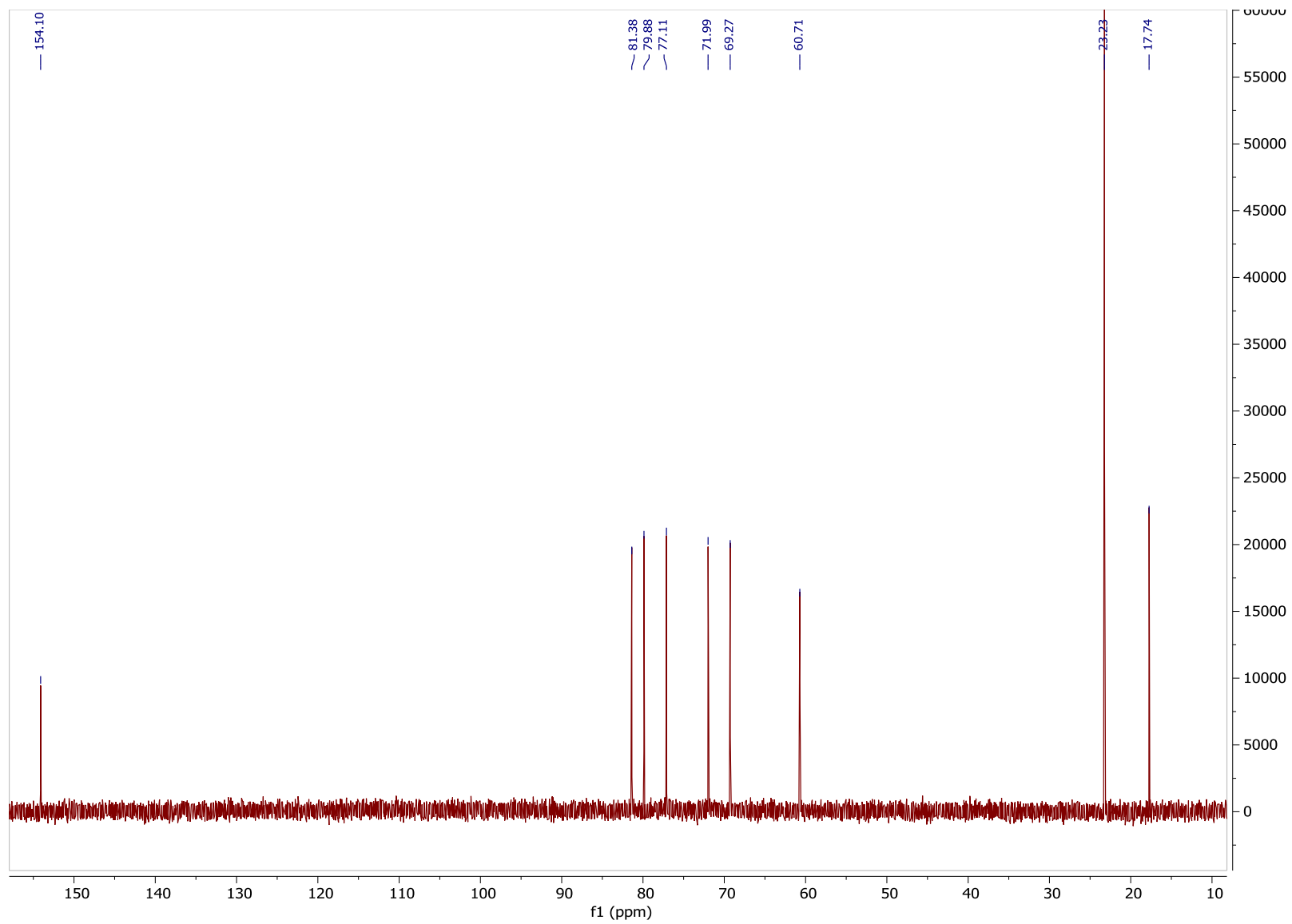
Slika 8.3.15. COSY spektar desulfoglukokonringina.



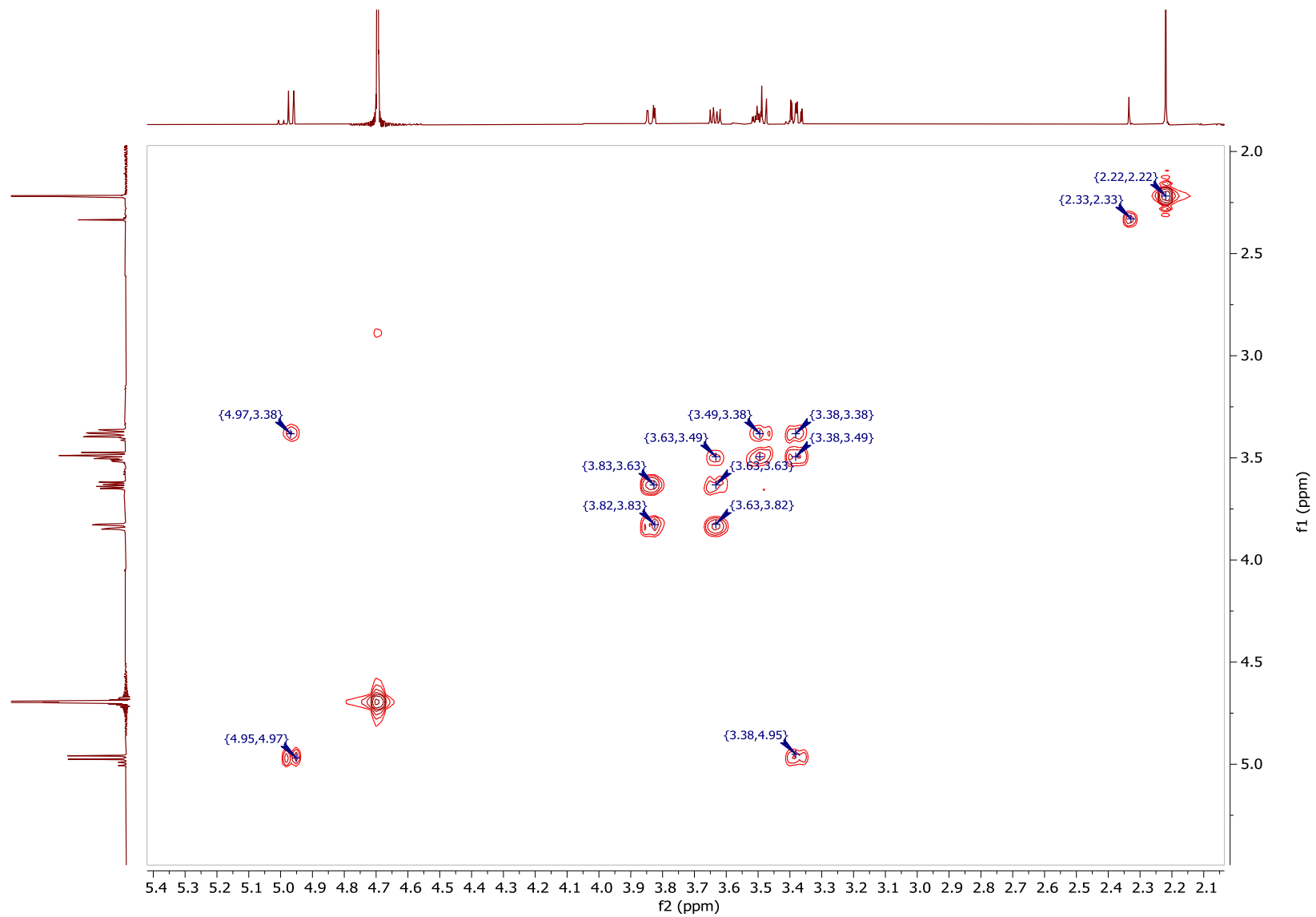
Slika 8.3.16. HSQC spektar desulfoglukokonringina.



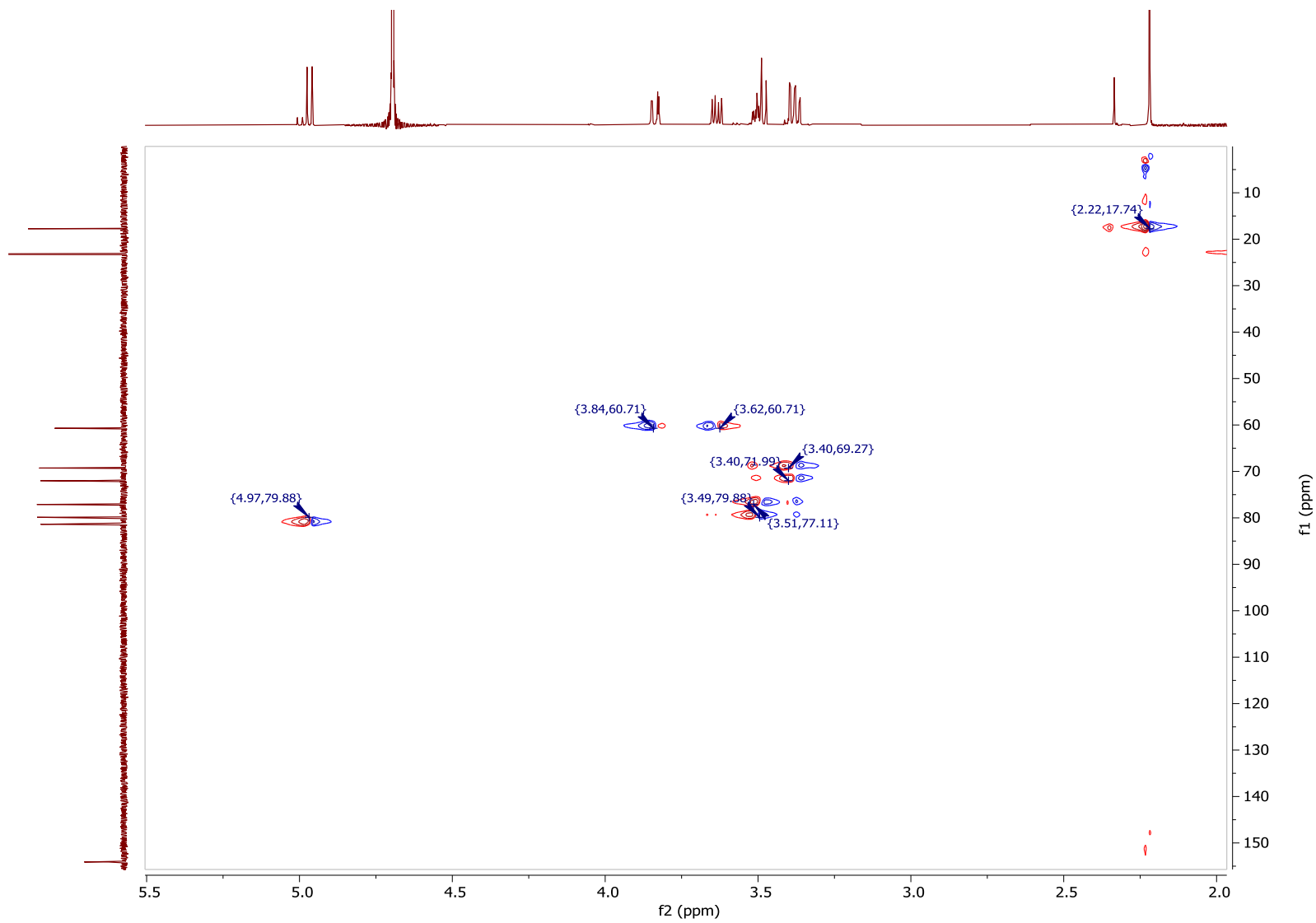
Slika 8.3.17. ^1H NMR spektar glukoparina.



Slika 8.3.18. ^{13}C NMR spektar glukokaparina.



Slika 8.3.19. COSY spektar glukoparina.



Slika 8.3.20. HSQC spektar glukoparina.