

# Utjecaj mikrovalova na sadržaj glukozinolata u sjemenu bijele gorušice i daikona

---

Aljinović, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

*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:167:900380>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**UTJECAJ MIKROVALOVA NA SADRŽAJ GLUKOZINOLATA U  
SJEMENU BIJELE GORUŠICE I DAIKONA**

**ZAVRŠNI RAD**

**LAURA ALJINOVIĆ**

**Matični broj: 1443**

**Split, rujan 2023.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE**  
**SMJER KEMIJSKO INŽENJERSTVO**

**UTJECAJ MIKROVALOVA NA SADRŽAJ GLUKOZINOLATA U**  
**SJEMENU BIJELE GORUŠICE I DAIKONA**

**ZAVRŠNI RAD**

**LAURA ALJINOVIĆ**

**Matični broj: 1443**

**Split, rujan 2023.**

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

**THE INFLUENCE OF MICROWAVES ON GLUCOSINOLATE  
CONTENT IN WHITE MUSTARD AND DAIKON SEEDS**

**BACHELOR THESIS**

**LAURA ALJINOVIĆ**

**Parent number: 1443**

**Split, September 2023.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet  
Prirediplomski studij Kemijska tehnologija, smjer Kemijsko inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Tehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Kemijsko inženjerstvo  
**Mentor:** prof. dr. sc. Ivica Blažević  
**Komentor:** dr. sc. Azra Đulović, znanstv. sur.

### UTJECAJ MIKROVALOVA NA SADRŽAJ GLUKOZINOLATA U SJEMENU BIJELE GORUŠICE I DAIKONA Laura Aljinović, 1443

#### Sažetak:

Glukozinolati su specijalizirani biljni metaboliti pronađeni u 16 različitih biljnih porodica reda Brassicales. Po kemijskoj strukturi su  $\beta$ -tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s promjenjivim bočnim lancem koji se biosintetizira iz aminokiselina. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni spojevi, čijom enzimskom, termičkom ili kemijskom razgradnjom nastaju izotiocijanati, izocijanati, nitrili i drugi spojevi. Razumijevanje stabilnosti glukozinolata u uvjetima koji oponašaju obradu namirnica je važno budući da su ovi spojevi zastupljeni u hrani koja se svakodnevno konzumira (kupus, brokula, rotkva, gorušica...).

U ovom radu promatrana je stabilnost glukozinolata iz sjemena bijele gorušice i daikona u uvjetima mikrovalnog zračenja. Primijenjene su različite snage mikrovalova: 500, 800 i 1200W. Glukozinolati su kvalitativno i kvantitativno analizirani koristeći UHPLC-DAD-MS/MS. Uzorak bijele gorušice nakon izlaganja snazi mikrovalova od 1200 W, ekstrahiran je diklormetanom u svrhu izolacije razgradnih produkata glukozinolata, koji su naposljetku identificirani korištenjem GC-MS tehnike.

U bijeloj gorušici identificirani su epiprogoitrin, glukosinalbin, 4-hidroksiglukobrasicin i glukobrasicin, dok su u sjemenu daikona identificirani glukorafanin, glukorafenin, 4-hidroksiglukobrasicin i 4-metoksiglukobrasicin.

Identificirana su 3 produkta razgradnje glukozinolata koji potječu od glukosinalbina: 4-hidroksibenzenil-izotiocijanat, 2-(4-hidroksifenil)acetonitril, 5-vinil-1,3-oksazolidin-2-tion. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da je primjenom veće snage mikrovalova koncentracija identificiranih glukozinolata sve manja. Najveću koncentraciju glukozinolata ima sjeme koje nije izloženo mikrovalovima, dok najmanju koncentraciju glukozinolata ima sjeme izloženo mikrovalovima snage 1200W.

**Ključne riječi:** glukozinolati, bijela gorušica, daikon, mikrovalovi, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

**Rad sadrži:** 36 stranica, 34 slike, 7 tablica, 17 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu završnog rada:

1. prof. dr. sc. Sandra Svilović	predsjednik
2. dr. sc. Azra Đulović, znanstv. sur.	član/komentor
3. prof. dr. sc. Ivica Blažević	mentor

#### Datum obrane:

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology  
Undergraduate study of Chemical Technology, orientation Chemical engineering

**Scientific area:** Technical sciences  
**Scientific field:** Chemical engineering  
**Supervisor:** Ivica Blažević, PhD, Full Professor  
**Co-supervisor:** Azra Đulović, PhD

### THE INFLUENCE OF MICROWAVES ON GLUCOSINOLATE CONTENT IN WHITE MUSTARD AND DAIKON SEEDS

Laura Aljinović, 1433

#### Abstract:

Glucosinolates are specialized plant metabolites found in 16 different plant families of the order Brassicales. They have a chemical structure of  $\beta$ -thioglucoside-*N*-hydroxysulfates with a variable side chain synthesized from amino acids. Glucosinolates are chemically and biologically inactive compounds, which upon enzymatic, thermal, or chemical degradation, give isothiocyanates, thiocyanates, nitriles, and other compounds. Understanding the stability of glucosinolates under conditions simulating food processing is important as these compounds are present in commonly consumed foods such as cabbage, broccoli, radish, and mustard.

This thesis examined the stability of glucosinolates from white mustard and daikon seeds exposed to microwave radiation. Different microwave powers were applied: 500, 800, and 1200W. Glucosinolates were qualitatively and quantitatively analyzed using UHPLC-DAD-MS/MS. The white mustard sample, after exposure to 1200W microwave power, was extracted with dichloromethane to isolate degradation products of glucosinolates, which were ultimately identified using GC-MS technique.

Glucosinolates identified in white mustard were epiprogoitrin, glucosinalbin, 4-hydroxyglucobrassicin, and glucobrassicin, while in daikon seeds the identified glucosinolates were: glucoraphanin, glucoraphenin, 4-hydroxyglucobrassicin, and 4-methoxyglucobrassicin.

Three glucosinolate degradation products originating from glucosinalbin were identified: 4-hydroxybenzyl isothiocyanate, 2-(4-hydroxyphenyl)acetonitrile, and 5-vinyl-1,3-oxazolidin-2-thione. From the obtained results, it is evident that higher microwave power leads to decreasing concentrations of identified glucosinolates. The highest concentration of glucosinolates is found in seeds not exposed to microwaves, while the lowest concentration is in seeds exposed to 1200W microwave power.

**Keywords:** glucosinolates, white mustard, daikon, microwaves, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

**Thesis contains:** 36 pages, 34 figures, 7 tables, 17 references

**Original in:** Croatian

#### Defence committee for evaluation and defense of bachelor thesis:

- |  |                      |
|--|----------------------|
| 1. Sandra Svilović, PhD, Full Prof.    | chair person         |
| 2. Azra Đulović, PhD, Research Assist. | member/co-supervisor |
| 3. Ivica Blažević, PhD, Full Prof.     | supervisor           |

#### Defence date:

**Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivice Blaževića i komentorstvom dr. sc. Azre Đulović, u razdoblju od veljače do rujna 2023. godine.*



*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Ivici Blaževiću koji me svojim predavanjima, predanošću i angažmanom zainteresirao i usmjerio prema organskoj kemiji. Hvala na ukazanoj prilici i privilegiji izrade završnog rada na Zavodu za Organsku kemiju.*

*Veliko hvala mojoj komentorici dr. sc. Azri Đulović na svim savjetima (prijateljskim i stručnim), uloženom vremenu i trudu i neograničenoj podršci pri izradi ovoga rada.*

*Također se želim zahvaliti svojim kolegicama i prijateljima na pružanju motivacije i ohrabrivanju u svakom trenutku. Hvala na uspomenama i svim trenucima.*

*Posebno hvala mom bratu i mojoj majci koja je uvijek vjerovala u mene i podržavala me u dobrim i lošim trenucima, tijekom studija i cijelog mog života.*

**HVALA!**

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

1. Sjeme bijele gorušice i daikona izložiti mikrovalovima snage 500, 800 i 1200 W.
2. Uzorke pročistiti i desulfirati te kvalitativno i kvantitativno analizirati glukozinolate korištenjem UHPLC-DAD-MS/MS tehnike.
3. Ekstrahirati hlapljive razgradne produkte glukozinolata diklormentanom iz uzorka sjemena gorušice nakon obrade mikrovalovima snage 1200 W.
4. Hlapljivi ekstrakt analizirati korištenjem GC-MS tehnike.
5. Sjeme daikona analizirati u različitim vremenskim razdobljima u svrhu analize stabilnosti prisutnih glukozinolata u vodenoj otopini.

## SAŽETAK

Glukozinolati su specijalizirani biljni metaboliti pronađeni u 16 različitih biljnih porodica reda Brassicales. Po kemijskoj strukturi su  $\beta$ -tioglukozidni-N-hidroksisulfati s promjenjivim bočnim lancem koji se biosintetizira iz aminokiselina. Glukozinolati su kemijski i biološki neaktivni spojevi, čijom enzimskom, termičkom ili kemijskom razgradnjom nastaju izotiocijanati, izocijanati, nitrili i drugi spojevi. Razumijevanje stabilnosti glukozinolata u uvjetima koji oponašaju obradu namirnica je važno budući da su ovi spojevi zastupljeni u hrani koja se svakodnevno konzumira (kupus, brokula, rotkva, gorušica...).

U ovom radu promatrana je stabilnost glukozinolata iz sjemena bijele gorušice i daikona u uvjetima mikrovalnog zračenja. Primijenjene su različite snage mikrovalova: 500, 800 i 1200W. Glukozinolati su kvalitativno i kvantitativno analizirani koristeći UHPLC-DAD-MS/MS. Uzorak bijele gorušice nakon izlaganja snazi mikrovalova od 1200 W, ekstrahiran je diklormetanom u svrhu izolacije razgradnih produkata glukozinolata, koji su naposljetku identificirani korištenjem GC-MS tehnike.

U bijeloj gorušici identificirani su epiprogoitrin, glukosinalbin, 4-hidroksiglukobrasicin i glukobrasicin, dok su u sjemenu daikona identificirani glukorafanin, glukorafenin, 4-hidroksiglukobrasicin i 4-metoksiglukobrasicin.

Identificirana su 3 produkta razgradnje glukozinolata koji potječu od glukosinalbina: 4-hidroksibenzenil-izotiocijanat, 2-(4-hidroksifenil)acetonitril, 5-vinil-1,3-oksazolidin-2-tion. Iz dobivenih je rezultata vidljivo da je primjenom veće snage mikrovalova koncentracija identificiranih glukozinolata sve manja. Najveću koncentraciju glukozinolata ima sjeme koje nije izloženo mikrovalovima, dok najmanju koncentraciju glukozinolata ima sjeme izloženo mikrovalovima snage 1200W.

**Ključne riječi:** glukozinolati, bijela gorušica, daikon, mikrovalovi, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

## **ABSTRACT**

Glucosinolates are specialized plant metabolites found in 16 different plant families of the order Brassicales. They have a chemical structure of  $\beta$ -thioglucoside-N-hydroxysulfates with a variable side chain synthesized from amino acids. Glucosinolates are chemically and biologically inactive compounds, which upon enzymatic, thermal, or chemical degradation, give isothiocyanates, thiocyanates, nitriles, and other compounds. Understanding the stability of glucosinolates under conditions simulating food processing is important as these compounds are present in commonly consumed foods such as cabbage, broccoli, radish, and mustard.

This thesis examined the stability of glucosinolates from white mustard and daikon seeds exposed to microwave radiation. Different microwave powers were applied: 500, 800, and 1200W. Glucosinolates were qualitatively and quantitatively analyzed using UHPLC-DAD-MS/MS. The white mustard sample, after exposure to 1200W microwave power, was extracted with dichloromethane to isolate degradation products of glucosinolates, which were ultimately identified using GC-MS technique.

Glucosinolates identified in white mustard were epiprogoitrin, glucosinalbin, 4-hydroxyglucobrassicin, and glucobrassicin, while in daikon seeds the identified glucosinolates were: glucoraphanin, glucoraphenin, 4-hydroxyglucobrassicin, and 4-methoxyglucobrassicin.

Three glucosinolate degradation products originating from glucosinalbin were identified: 4-hydroxybenzyl isothiocyanate, 2-(4-hydroxyphenyl)acetonitrile, and 5-vinyl-1,3-oxazolidin-2-thione. From the obtained results, it is evident that higher microwave power leads to decreasing concentrations of identified glucosinolates. The highest concentration of glucosinolates is found in seeds not exposed to microwaves, while the lowest concentration is in seeds exposed to 1200W microwave power.

**Key words:** glucosinolates, white mustard, daikon, microwaves, UHPLC-DAD-MS/MS, GC-MS

## SADRŽAJ

<b>UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1. OPĆI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1. Glukozinolati .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Brassicaceae.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. <i>Sinapis alba</i> .....	3
1.2.2. <i>Raphanus sativus</i> .....	4
<b>1.3. Biosinteza .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4. Razgradnja glukozinolata .....</b>	<b>5</b>
1.4.1. Enzimaska razgradnja.....	5
<b>1.5. Metode izolacije.....</b>	<b>7</b>
1.5.1. Mikrovalna destilacija.....	7
<b>1.6. Metode analize.....</b>	<b>8</b>
1.6.1. Tekućinska kromatografija .....	9
1.6.2. Plinska kromatografija.....	10
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Biljni materijal .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Mikrovalna destilacija.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3. Izolacija glukozinolata i desulfatacija.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Ekstrakcija hlapljivih spojeva .....</b>	<b>19</b>
<b>2.5. UHPLC-DAD-MS/MS analiza.....</b>	<b>21</b>
<b>2.6. GC - MS analiza.....</b>	<b>22</b>
<b>3. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Izolacija glukozinolata i HPLC analiza .....</b>	<b>23</b>
3.1.1. Sjeme bijele gorušice .....	23
3.1.2. Sjeme daikona.....	27
<b>3.2. Razgradnja glukozinolata i GC-MS analiza .....</b>	<b>31</b>
<b>4. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>34</b>
<b>5. LITERATURA.....</b>	<b>35</b>

## UVOD

Glukozinolati su prirodni tioglukozidi koji se mogu opisati kao organski anioni topljivi u vodi i koji se sintetiziraju iz aminokiselina. Prisutni su u biljkama reda Brassicales, a najznačajnija je porodica Brassicaceae, tj. kupusnjače.

Glukozinolati su biološki neaktivni spojevi, osim ako ne uslijedi njihova mehanička, kemijska ili termička obrada. Do njihove hidrolize dolazi prilikom dodira s enzimom mirozinaza koja se oslobađa oštećenjem biljnog tkiva pri čemu nastaju različiti razgradni produkti glukozinolata.

Hlapljivi sumporovi spojevi čine posebnu skupinu metaboličkih produkata prisutnih u biljkama, životinjama i mikroorganizmima, a poznati su po raznolikim biološkim svojstvima. Njihova biološka aktivnost je raznolika, a ističu se svojstva kao što su antikancerogena, antibakterijska i antioksidativna.

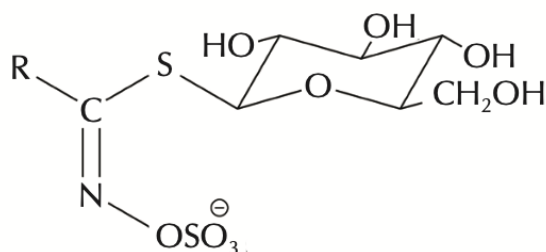
S obzirom na pojavu „trenda“ zdravog života, posljednjih godina neprestano raste interes za ove spojeve.

Izolacija glukozinolata moguća je destilacijom i ekstrakcijom, a analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Njihovi razgradni produkti analiziraju se plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa (GC-MS).

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Glukozinolati

Glukozinolati su prirodni tioglukozidi koji se mogu opisati kao organski anioni topljivi u vodi, a karakteriziraju ih zajednička osnovna strukturna obilježja koja uključuju *O*-sulfatiranu anomernu (*Z*)-tiohidroksimatnu funkcijsku skupinu,  $\beta$ -D-glukopiranoznu jedinicu i promjenjivi bočni lanac. To je jedina strukturna varijanta koja se može razlikovati ovisno o biljnoj vrsti.<sup>1</sup>

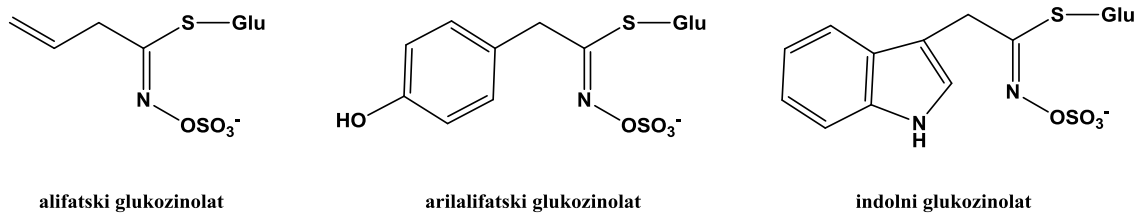


**Slika 1.** Općenita struktura glukozinolata; R – pokrajnji lanac.<sup>1</sup>

Ettlinger i Dateo su razvili polusistematski sustav za nomenklaturu glukozinolata. Anion soli se označava kao "glukozinolat", dok se ime R-skupine koristi kao prefiks. Većina glukozinolata ima trivijalna imena koja su izvedena iz latinskog naziva biljke iz koje je spoj prvi put izoliran, s prefiksom "gluko" i sufiksom "in".<sup>2</sup>

Glukozinolati se mogu pronaći u 16 različitih biljnih porodica unutar reda Brassicales, pri čemu je najvažnija porodica Brassicaceae. Ova porodica obuhvaća impresivan broj od preko 350 rodova i 3000 vrsta biljaka. Posebno je značajan rod *Brassica*, koji uključuje velik niz biljaka koje se redovito koriste u ljudskoj prehrani, poput kupusa, kelja, cvjetače, brokule, uljane repice, gorušice, prokulice, raštike i hrena.<sup>1</sup>

Najčešća podjela glukozinolata prema različitim biosintetskim aminokiselinskim prekursorima je na alifatske, arilalifatske i indolne glukozinolate.<sup>3</sup>



**Slika 2.** Podjela glukozinolata ovisno o bočnom lancu.<sup>4</sup>, Glu-glukoza

Sadržaj glukozinolata u svim dijelovima biljke nije ista, a prema dosadašnjim podacima u sjemenu je najveći sadržaj.

## 1.2.Brassicaceae

Kupusnjače (Brassicaceae) su biljna porodica koja spada u razred dvosupnica (Eudicotiledona).

Stari naziv, krstašice (Cruciferae), kupusnjače su dobile prema krstastom rasporedu latica u cvjetovima. Za cijelu porodicu je karakteristična ljutina koja potječe od glukozinolata. Djelovanjem enzima mirozinaze oni daju niz produkata koji su odgovorni za gorko-ljuti okus.

Porodici kupusnjača pripadaju poznate vrste koje se koriste svakodnevno, kako u prehrani tako i u industriji, gospodarstvu i medicini. Značajan je raznolik kompleks varijeteta kupusa (*Brassica oleracea* L.) za kojeg su Rimljani vjerovali da liječi od melankolije, te uljarica uljana repica (lat. *Brassica napus* subsp. *napus*) čije se sjemenke upotrebljavaju za proizvodnju ulja, margarina i biogoriva.<sup>2,5</sup>

### 1.2.1. *Sinapis alba*

Bijela gorušica (*Sinapis alba* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). Uzgaja se prvenstveno radi svojih sjemenki, koje su glavni sastojak za umak senf.





**Slika 3.** Sjeme bijele gorušice<sup>6</sup>

Podrijetlom sa Sredozemlja, bijela gorušica se rasprostranila diljem cijelog svijeta kao poljoprivredni korov i kao invazivna vrsta u nekim područjima izvan svog izvornog područja rasprostranjivanja.<sup>7</sup>

### 1.2.2. *Raphanus sativus*

Daikon (*Raphanus sativus*) je jednogodišnja biljka iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). Korijen je cilindričan, bijele boje, izgledom kao mrkva ali glatke teksture.



**Slika 4.** Sjeme daikona<sup>8</sup>

Jestivi su korijen i listovi. Korijen konzumiramo sirov, kao dodatak salatama ili ga kiselimo. Smatra se da odlično čisti organizam, te je česta namirnica raznih detoksikacijskih dijeta i makrobiotičke prehrane.<sup>9</sup>

### **1.3. Biosinteza**

Glukozinolati se sintetiziraju iz aminokiselina. Očekuje se da su nastali od alanina, valina, leucina, izoleucina, metionina, glutaminske kiseline, fenilalanina, tirozina i triptofana.<sup>10</sup>

Alifatski glukozinolati potječu od metionina, izoleucina, leucina ili valina, arilalifatski glukozinolati potječu od fenilalanina i/ili tirozina, dok indolni glukozinolati potječu od triptofana.<sup>3,10</sup> 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.<sup>11</sup> Prvi stupanj se odnosi isključivo na glukozinolati koji potječu od derivata metionina, dok su druga dva stupnja zajednička za biosintezu svih glukozinolata.<sup>12</sup> Sekundarne modifikacije su te koje su 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.<sup>3</sup>

### **1.4. Razgradnja glukozinolata**

Karakteristika glukozinolata jest da su kemijski stabilni i neaktivni sve dok ne uslijedi njihova mehanička, kemijska ili termička obrada.<sup>13</sup> Oni su smješteni u biljnim vakuolama, a oštećenjem stanice endogeni enzim mirozinaza dovodi se u doticaj s glukozinolatima te dolazi do njihove hidrolize. To rezultira stvaranjem niza različitih produkata razgradnje.<sup>10</sup>

Razgradnja se odvija na dva načina, hidrolizom (enzimskom ili djelovanjem kiseline/baze) ili termičkom razgradnjom.<sup>2</sup>

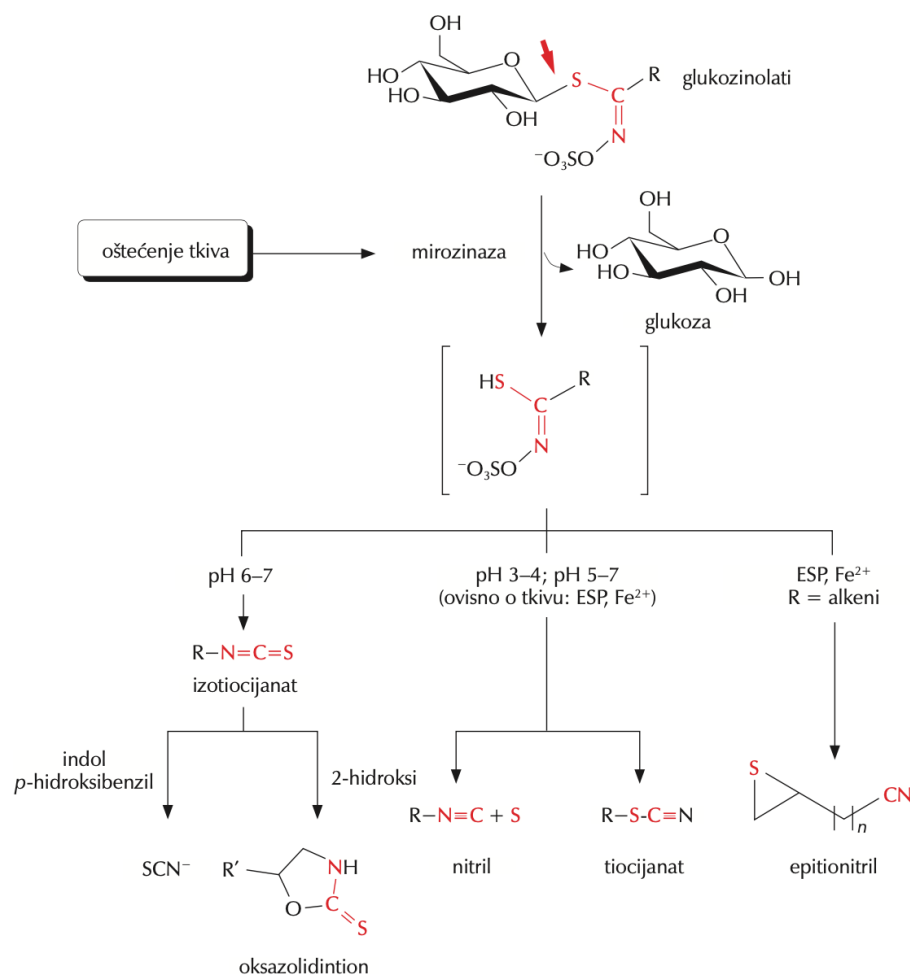
#### **1.4.1. Enzimska razgradnja**

Enzimska razgradnja glukozinolata odvija se pomoću enzima mirozinaze koja hidrolizira tioglukozidnu vezu.<sup>3</sup> Razgradni produkti glukozinolata mogu biti različiti spojevi, kao što su nitrili, izotiocijanati, tiocijanati i drugi. Sastav ovih spojeva ovisi o

pH vrijednosti, prisutnosti metalnih iona te epitijspecifičnom proteinu (ESP).<sup>1</sup> Mirozinaza ( $\beta$ -tioglukozidaza-glikohidrolaza, EC 3.2.1.147) je glikoprotein koji s glukozinolatom dolazi u kontakt kada se biljno tkivo ošteti, čime započinje njegova hidroliza.<sup>10</sup>

Tijekom reakcije hidrolize, dolazi do pucanja tioglukozidne veze (veze između sumpora i glukoze) u molekuli glukozinolata, što rezultira oslobađanjem glukoze, sulfata i aglikona. Oslobađeni je aglikon nestabilan pa se spontano pregrađuje, stvarajući različite produkte razgradnje koji su odgovorni za karakterističan okus i miris biljaka. Konačni produkt pregradnje aglikona ovisi o strukturi bočnog lanca, uvjetima hidrolize i prisutnosti kofaktora. (npr.  $\text{Fe}^{2+}$ ).<sup>2,14</sup>

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, a najvažnija primijećena su antikancerogena svojstva izotiocijanata.<sup>10</sup>



Slika 5. Opća shema razgradnje glukozinolata<sup>1</sup>

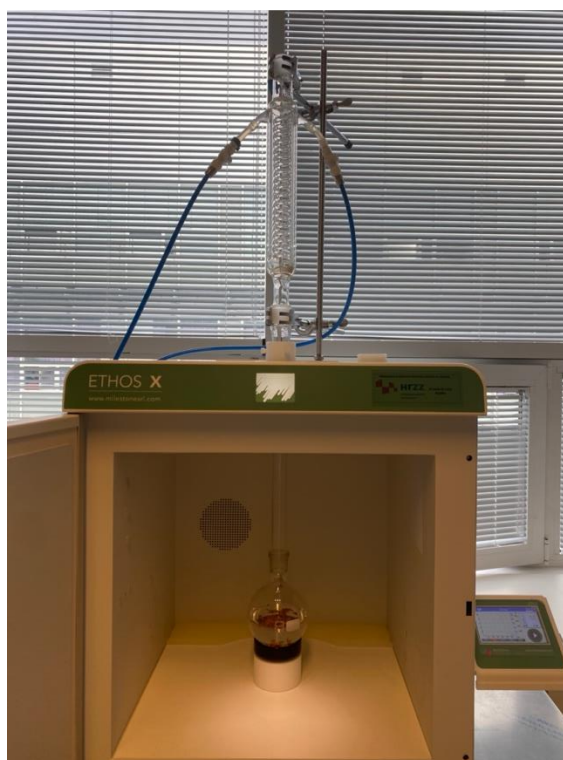
## 1.5. Metode izolacije

Kao što je opće poznato, mirisne biljke sadrže tvari koje lako isparavaju, uključujući i eterična ulja. Ovisno o biljnoj vrsti, različiti dijelovi biljke se mogu koristiti za izolaciju eteričnih ulja, kao što su cvjetovi, listovi, plodovi i sjeme. Klasične metode za izolaciju hlapljivih spojeva uključuju destilaciju i ekstrakciju s organskim otapalima, međutim, suvremene metode koje se sve više koriste nude mnoge prednosti u odnosu na klasične metode izolacije. Primjeri takvih modernih metoda uključuju mikrovalnu i ultrazvučnu ekstrakciju, kao i ekstrakciju sa superkritičnim otapalima.<sup>15</sup>

### 1.5.1. Mikrovalna destilacija

U današnje vrijeme primjenjuje se metoda izolacije potpomognute mikrovalovima. Prednost ove metode izolacije jest u kraćem vremenu trajanju izolacije s otapalom ili

bez njega, pa kažemo da se primjenjuju postulati "zelene tehnologije". Ovaj pristup zapravo kombinira mikrovalno zagrijavanje i suhu destilaciju na atmosferskom tlaku bez dodatka otapala. Glavni cilj istraživanja je odabrati optimalne parametre (temperaturu, snagu mikrovalova i vrijeme ekstrakcije) za izolaciju hlapljivih spojeva koji nastaju termičkom razgradnjom glukozinolata. Uključeni procesni parametri obuhvaćaju snagu mikrovalova od 1W po gramu biljnog materijala, dok se temperatura regulira na temperaturu vrenja unutarstanične vode. Učinkovito zagrijavanje reakcijske smjese postiže se zračenjem koje prodire kroz materijal i izravnom interakcijom s vodom. Ovo možemo uzeti kao prednost mikrovalne destilacije, s obzirom na to da se kod hidrodestilacije, gdje se smjesa zagrijava preko kalote, toplina ne može ravnomjerno raspodijeliti. Također, kod hidrodestilacije radi velike količine dodane vode može doći do hidrolize pojedinih komponenata i nastanka aretafakata. Ključna je optimizacija uvjeta mikrovalnog zagrijavanja kako bi se povećao ukupni prinos, s obzirom na to da su hidrodestilacija i enzimaska hidroliza pokazale veće iskorištenje, ali uz veću potrošnju vode, enzima i energije.<sup>1</sup>



**Slika 6.** Uređaj za mikrovalnu destilaciju

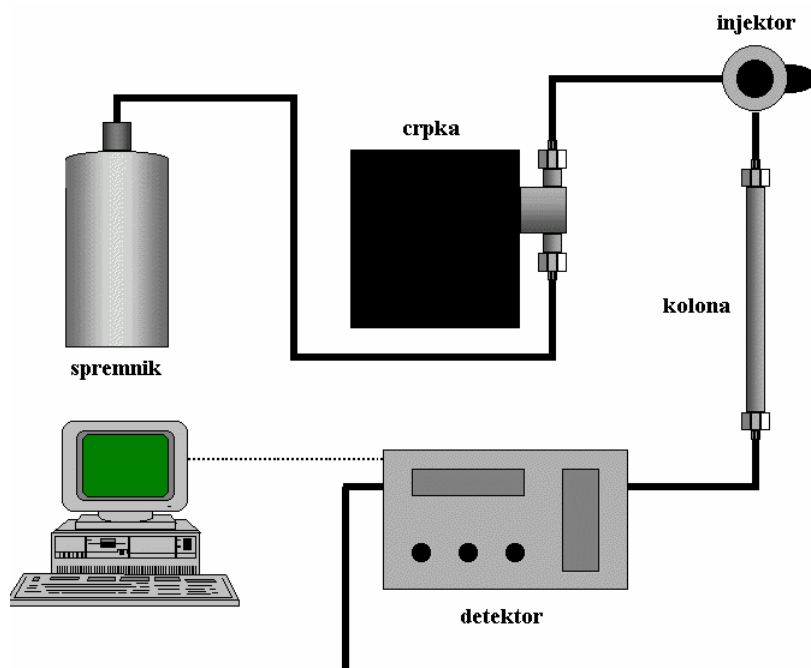
## 1.6. Metode analize

Za analizu i identifikaciju hlapljivih spojeva koriste se različite kromatografske tehnike (plinska kromatografija i tekućinska kromatografija) te spektroskopske tehnike (UV, IR

i NMR spektroskopija). Danas se najčešće primjenjuje kromatografija, samostalno ili u kombinaciji sa spektrometrijom masa.<sup>2</sup> Kromatografija je nazvana prema ruskome kemičaru Tswettu, koji je 1906. godine uveo ovu tehniku kao način odjeljivanja biljnih boja. Kasnije se taj naziv proširio na sve postupke odjeljivanja u kojima se komponente razdvajaju između stacionarne i mobilne faze. Stacionarna faza može biti u obliku tekućine ili krutine, dok mobilna faza može biti tekućina ili plin. Mobilna faza se kreće preko ili duž stacionarne faze pod utjecajem kapilarnih sila, gravitacije ili razlike u tlaku. Kromatografski proces se temelji na postizanju dinamičke ravnoteže nekog spoja između mobilne i stacionarne faze. U stacionarnoj fazi se nalazi dio tvari koji je u ravnoteži s dijelom u mobilnoj fazi. Zbog kretanja mobilne faze, ravnoteža se narušava, što uzrokuje da molekule putuju u smjeru kretanja mobilne faze. Zbog njihove specifične interakcije sa stacionarnom i mobilnom fazom, različiti se spojevi putuju različitim brzinama što rezultira njihovim odvajanjem.<sup>16</sup>

### 1.6.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) predstavlja varijantu tekućinske kromatografije koja se izvodi na kolonama s punilima granulacije od 10  $\mu\text{m}$  ili manje što omogućuje visoku učinkovitost kromatografske kolone. Za postizanje potrebnih protoka brzine potrebni su tlakovi od nekoliko milijuna Pa.



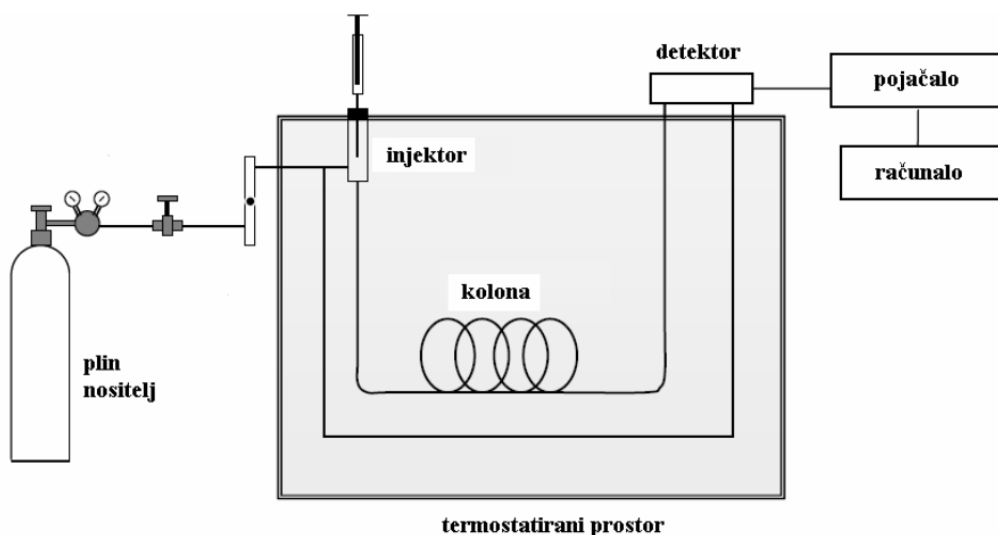
**Slika 7.** Shematski prikaz tekucinske kromatografije visoke djelotvornosti

S obzirom na to da je identifikacija intaktnih glukozinolata složena, za potrebe farmaceutske industrije razvijena je metoda analize enzimski desulfatiziranih glukozinolata koristeći tekućinsku kromatografiju (LC). Tekućinska kromatografija smatra se najpogodnijom metodom za kvantitativnu i kvalitativnu analizu.<sup>3,17</sup> Postupak analize uključuje izolaciju glukozinolata u uvjetima koji održavaju enzim mirozinazu neaktivnim. Ekstrakt koji se dobije prolazi kroz kolonu za anionsku izmjenu koja veže sve anione. Dodatak enzima sulfataze omogućava enzimsku hidrolizu sulfatnih estera u glukozinolatima, što rezultira desulfoglukozinolatima bez nabijenih sulfatnih skupina koji se eluiraju s kolone.

Ova tehnika omogućuje analizu većine glukozinolata. Jedina razlika između glukozinolata i njihovih odgovarajućih desulfo oblika jest u nedostatku sulfatne skupine, što olakšava razumijevanje i identifikaciju njihovih struktura.<sup>1</sup>

### 1.6.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (GC) je najčešće korištena tehnika za razdvajanje smjese hlapljivih spojeva. Za analizu plinskom kromatografijom, uzorci trebaju biti hlapljivi (tj. sposobni za trenutno isparavanje u injektoru) i stabilni na temperaturi koja se primjenjuje na kromatografskoj koloni. U postupku, inertni plin (mobilna faza) prolazi kroz kolonu i eluira komponente smjese, koje se zatim detektiraju.



**Slika 8.** Shematski prikaz plinskog kromatografa<sup>16</sup>

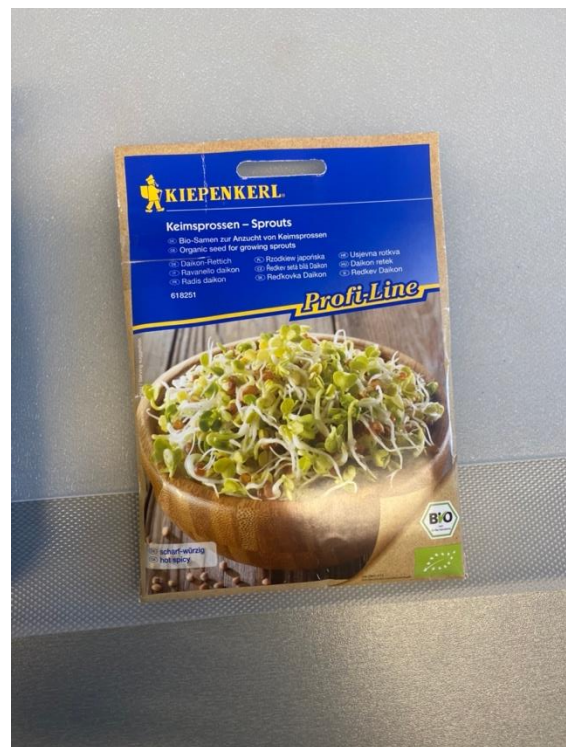
## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Biljni materijal

Za izradu ovog završnog rada kao biljni materijal korišteno je sjeme bijele gorušice i sjeme za klice daikona. Sjeme bijele gorušice komercijalno je pribavljeno od tvrtke Harissa (zemlja podrijetla Ukrajina). Sjeme za klice daikona komercijalno je pribavljeno od tvrtke Kiepenkerl (Bruno Nebelung GmbH, zemlja podrijetla Njemačka, 2020./2021.).



Slika 9. Sjeme bijele gorušice



Slika 10. Sjeme daikona



## 2.2. Mikrovalna destilacija

### Kemikalije:

- Vodovodna voda

### Aparatura:

- Uređaj za mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju, Ethos X; Milestone
- Analitička vaga, Ohaus, Nänikon, Švicarska
- Tikvica s okruglim dnom
- Hladilo

Po tri uzorka (10 g) sjemena bijele gorušice i daikona natopljena su u vodi 2 sata prije izlaganja mikrovalovima.

Materijal je izložen različitim snagama mikrovalova: 500, 800 i 1200 W.



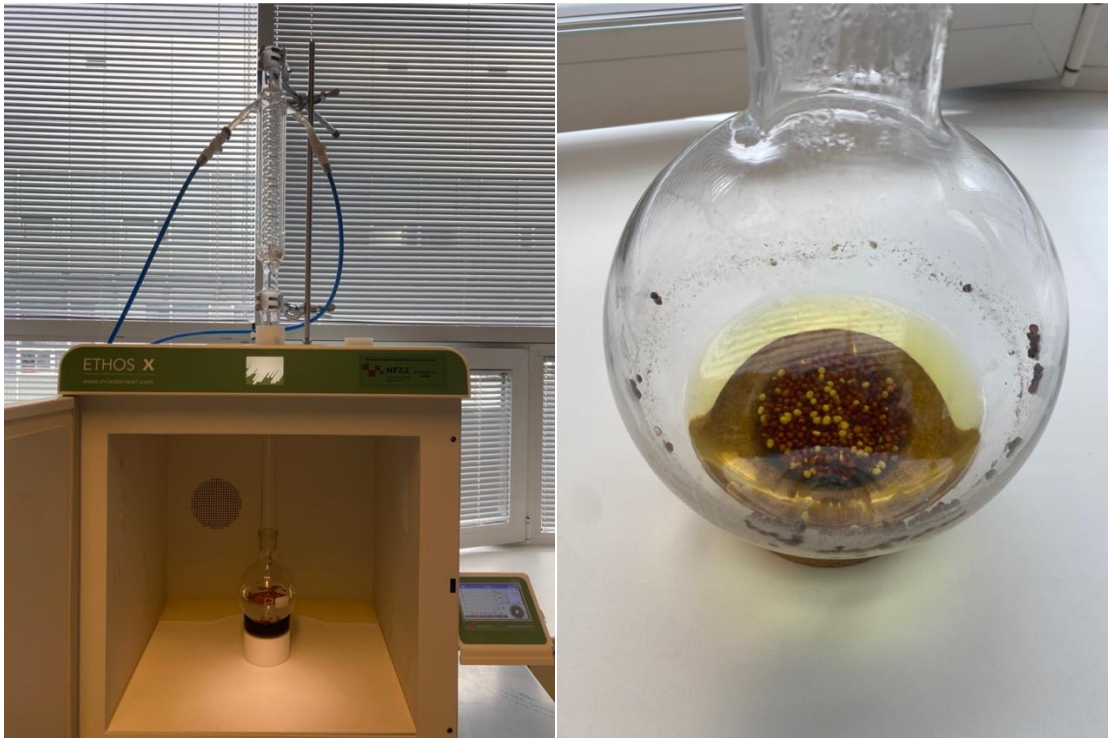
**Slika 11.** Biljni materijal natopljen u vodi

Biljni materijal stavljen je u tikvicu s okruglim dnom s 250 mL vode. Sastavljena je aparatura za mikrovalnu destilaciju. Na destilacijsku jedinicu postavljeno je hladilo.

Tri uzorka daikona i bijele gorušice izložena su različitim snagama mikrovalova (500, 800 i 1200 W) u vremenu od 30 minuta. Postignute temperature pri navedenim snagama su:

**Tablica 1.** Postignute temperature pri primijenjenim snagama mikrovalova

Snaga mikrovalne	DAIKON	BIJELA GORUŠICA
500 W	97 <sup>o</sup> C	99 <sup>o</sup> C
800 W	99 <sup>o</sup> C	100 <sup>o</sup> C
1200 W	99 <sup>o</sup> C	98 <sup>o</sup> C



**Slika 12.** Daikon tijekom i nakon mikrovalne destilacije (1200W)

Tijekom i nakon mikrovalne destilacije osjetio se intenzivan miris što je ukazalo na to da je došlo do razgradnje glukozinolata.



**Slika 13.** Bijela gorušica tijekom i nakon mikrovalne destilacije (800 W)

Prilikom mikrovalne destilacije bijele gorušice u par navrata došlo je do prekomjernog pjenjenja kada je bilo potrebno na par minuta prekinuti proces kako ne bi došlo do izbacivanja smjese iz tikvice. Uzorci su osušeni liofilizacijom te je potom izvršena ekstrakcija glukozinolata.



**Slika 14.** Liofilizacija uzoraka bijele gorušice i daikona

## 2.3. Izolacija glukozinolata i desulfatacija

### Kemikalije:

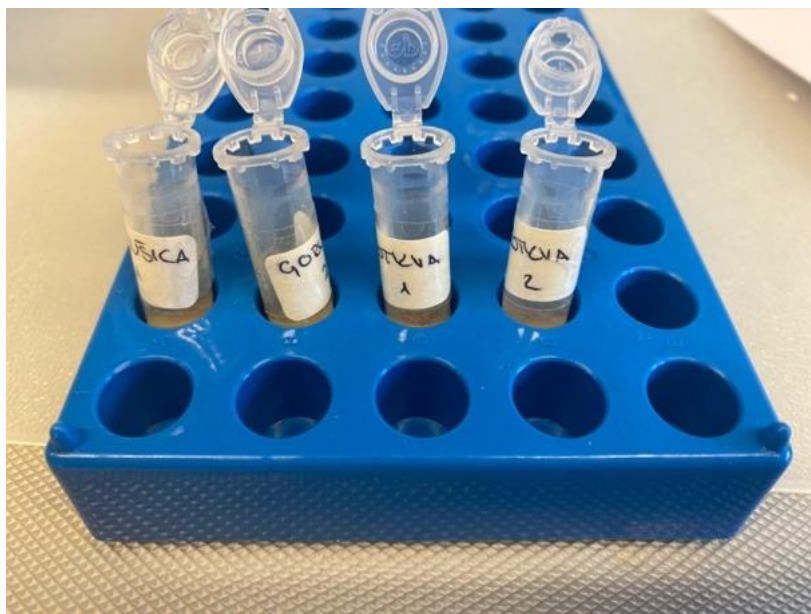
- Metanol (70%), Gram-Mol d.o.o , Zagreb, Hrvatska
- Natrijev acetat (NaOAc), Merck, Darmstadt, Njemačka
- DEXTRAN gel (G-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Sulfataza (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Ultračista voda

### Aparatura:

- Analitička vaga, Ohaus, Nänikon, Švicarska
- Mikropipete, Sartorius AG, Göttingen, Njemačka
- Električni mlinac, Sencor Europe, Prag, Češka Republika
- Vorteks, DLAB Scientific Co.,Ltd, Peking, Kina
- Vodena kupelj, Julabo, Seelbach, Njemačka
- Ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka
- Liofilizator, Labconco, Kansas City, SAD
- Centrifuga, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka
- mikroeprovete za centrifugiranje, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- Staklene pipete

Kao referentni uzorak korišten je sitno mljeveni biljni materijal sjemena bijele gorušice i daikona u svrhu usporedbe koncentracija prisutnih glukozinolata prije i nakon izlaganja uzoraka mikrovalovima. Postupak je, dakle, odrađen s uzorcima koji nisu bili izloženi mikrovalovima (referentni uzorci) i uzorcima koji su bili izloženi snagama mikrovalova od 500, 800 i 1200W.

Od sitno mljevenog biljnog materijala odvagano je 100 mg u označene mikroeprovete.



**Slika 15.** Eppendorf mikropruvete s biljnim materijalom

Pomoću mikropipete otpipetirano je 1 mL 70%-tnog metanola u svaku mikropruvetu i promiješano. Mikropruvete se zatvore i postavljaju sigurnosne kapice prije nego se postave u vruću vodenu kupelj (92 °C) na 5 minuta u svrhu inhibicije mirozinaze.



**Slika 16.** Zagrijavanje na vodenoj kupelji.

Uzorci u tubama postavljaju se u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta. Ultrazvuk poboljšava ekstrakciju, ali i homogenizaciju.



**Slika 17.** Ultrazvučna kupelj

Nakon ultrazvučne kupelji uzorci se centrifugiraju 10 minuta. Odvaja se supernatant koji se otpipetira bez dodirivanja odvojenog biljnog materijala.



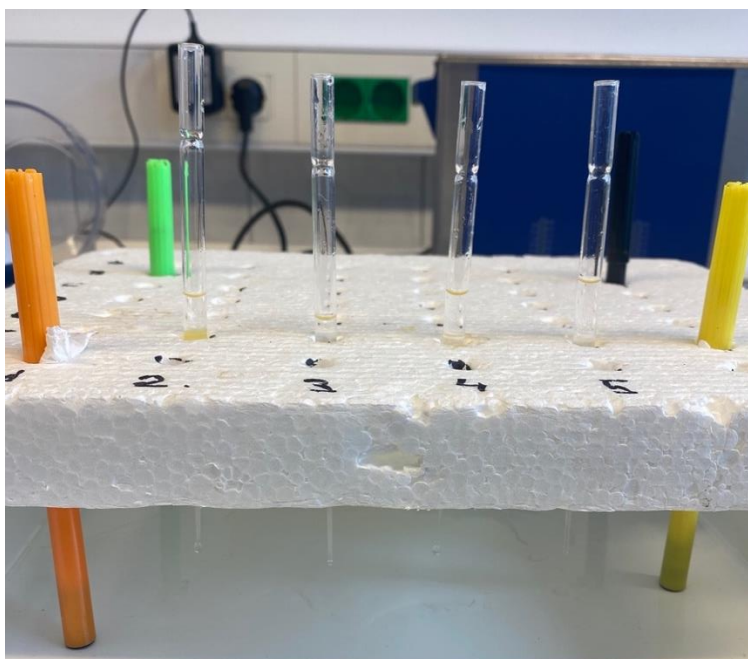
**Slika 18.** Centrifugiranje

## PROCES DESULFATACIJE

U staklene pipete koje služe kao kolone zbija se samljeveni filter papir visine 1 cm radi sprječavanja istjecanja dekstrana. U svaku od kolona, otpipetira se 0,5 mL gela dekstrana pazeći da ne dođe do istjecanja, tj ako dođe kolone zamijeniti novima. Kolone se postavljaju u stalak poviše posude u koju curi otpadni materijal.

U kolone se dodaje otpipetirani supernatant, te se preostalom talogu u mikroepiuvetama dodaje po 1 mL 70%-tnog metanola i postupak se ponavlja.

Na koloni će se zadržati glukozinolati koji su radi sulfatne skupine negativno nabijeni i ne mogu proći kroz kolonu. U svaku od kolona dodaje se po 1 mL ultračiste vode. U svrhu ispiranja kolona dodaje se 1 ml 70%-tnog metanola dva puta, kako bi se odstranile nepolarne molekule, zatim 1 mL ultračiste vode radi ispiranja metanola i na kraju se u svaku od kolona dodaje dva puta po 1 mL 20 mM NaOAc radi postizanja optimalnih uvjeta za enzim sulfatazu.



**Slika 19.** Kolone za desulfataciju glukozinolata

Naposljetku, umjesto posude stavljaju se točno poredane i označene mikroepiuvete ispod svake kolone kako bi se sakupili uzorci.

U svaku kolonu dodaje se po 20  $\mu$ L otopine sulfataze prethodno otopljene na sobnoj temperaturi i po 50  $\mu$ L NaOAc. Nakon toga kolone se prekrivaju aluminijskom folijom i ostavljaju preko noći. Djelovanjem sulfataze doći će do uklanjanja sulfatne skupine, a desulfoglukonizolati moći će se osloboditi iz kolone.

Sljedeći dan s kolone se ispiru se desulfo glukozinolati dodatkom 2 puta po 0.75  $\mu\text{L}$  ultračiste vode. Sakupljaju se u već pripremljene mikroeprovete te ih zatvaraju i probuše rupe na čepu i naposljetku i zamrznu kao priprema za liofilizaciju.

## **2.4. Ekstrakcija hlapljivih spojeva**

### **Kemikalije:**

- Diklormetan, T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- Bezvodni natrijev sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska

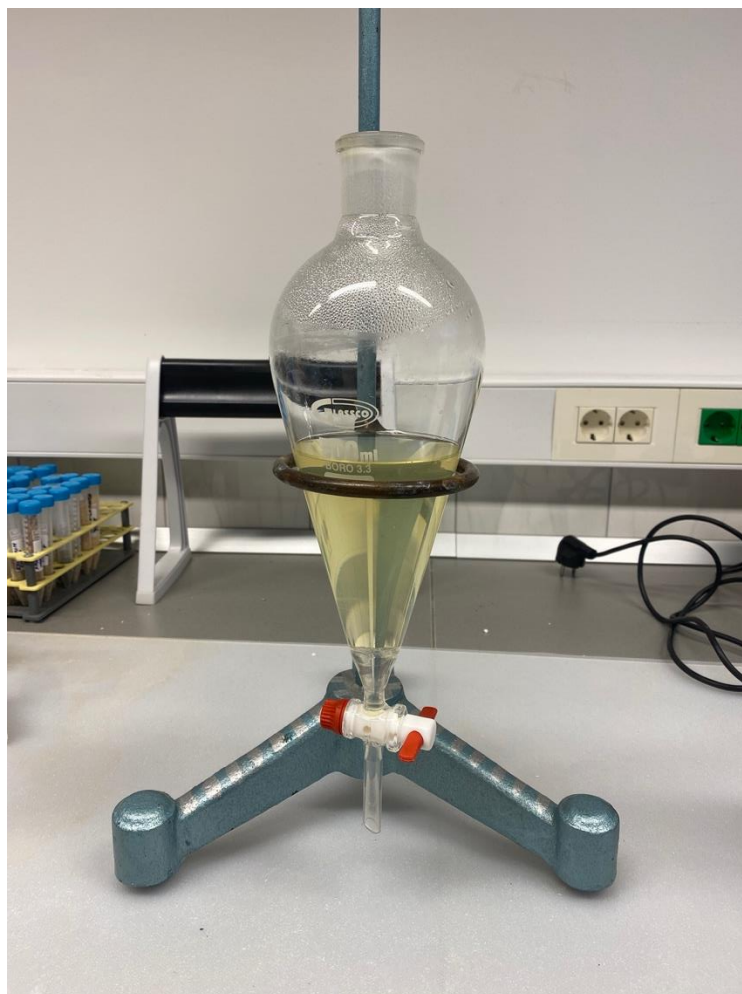
### **Aparatura:**

- Lijevak za odjeljivanje
- Stalak

Uzorak gorušice koji je izložen mikrovalovima snage 1200 W također je podvrgnut ekstrakciji s otapalom diklormetanom jer se po intenzivnom mirisu tijekom mikrovalne destilacije moglo zaključiti da je došlo do razgradnje glukozinolata. U vodeni sloj dodano je 10 mL diklormetana, te je sadržaj tikvice filtriran preko filter papira u lijevak za odjeljivanje.

Sadržaj lijevka je izmućkan i ostavljen određeno vrijeme dok se slojevi ne odijele. Organski sloj (donji) prebacuje se u suhu čašu i dodaje se bezvodni  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  kako bi vezao molekule vode.

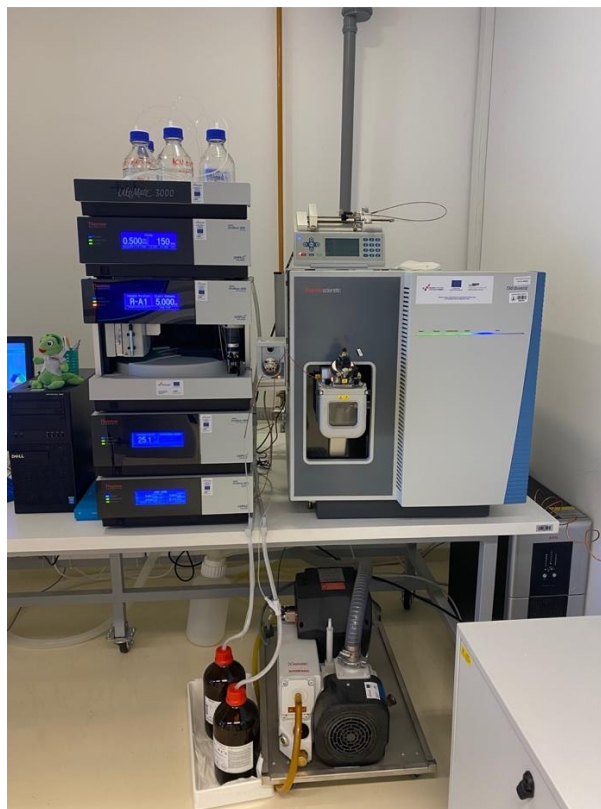




**Slika 20.** Ekstrakcija razgradnih produkata diklormetanom

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

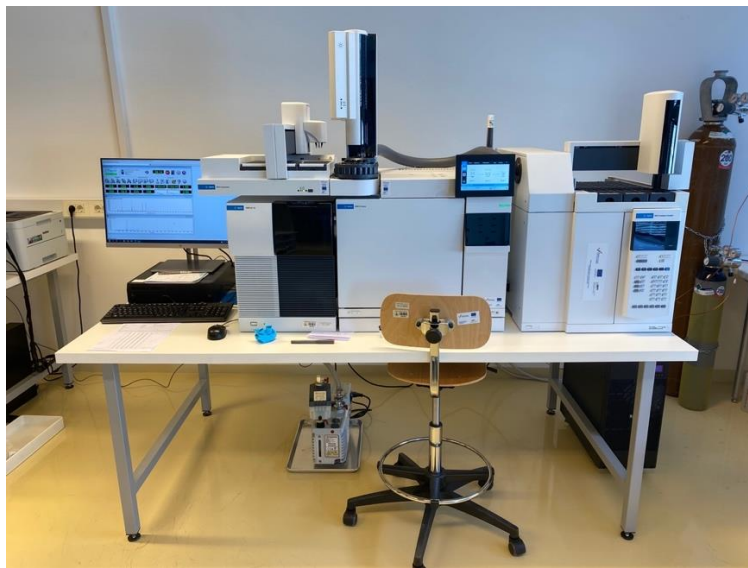
Za analizu glukozinolata i razgradnih produkata korišten je tekućinski kromatograf (Ultimate 3000RS, Thermo Fisher Scientific, SAD) u kombinaciji sa spektrometrom masa u tandemu (kvadrupol-kvadrupol, TSQ Quantis, Thermo Fisher Scientific, SAD), s kolonom Hypersil GOLD dimenzija 3,0 mm × 100 mm, promjera čestica 3,0 μm (Thermo Fisher Scientific, SAD). Kao mobilna faza korištena su otapala A (50 mM NaCl u H<sub>2</sub>O) i otapalo B (acetonitril 30:70 v/v). Kolona je bila termostatirana na temperaturi od 25 °C (ili 15 °C), dok je volumen injektiranog uzorka bio 5 μL. Signali su bilježeni pomoću DAD detektora pri valnoj duljini od 227 nm, dok su maseni spektri bilježeni u pozitivnom načinu rada pri temperaturi od 350 °C. Za kvantitativnu analizu desulfoglukozinolata korištena je krivulja umjeravanja desulfosinigrina (raspon koncentracija 13,63 μM do 545 μM), pri čemu su se za izračun koncentracije pojedinog desulfoglukozinolata koristile literaturne vrijednosti za čimbenike odziva.



Slika 21. UHPLC-DAD-MS/MS uređaj

## 2.6. GC - MS analiza

Uzorak je nakon ekstrakcije tekuće-tekuće analiziran 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  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$ . Temperatura kolone postavljena je 3 min na 60 °C, potom zagrijavanje na 246 °C brzinom od 3°C / min te se ta temperatura zadržavala 25 min. Energija ionizacije iznosila je 70 eV, temperatura izvora iona postavljena je na 200 °C, a m/z raspon je bio postavljen na 40 – 350.



**Slika 22.** GC-MS uređaj

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

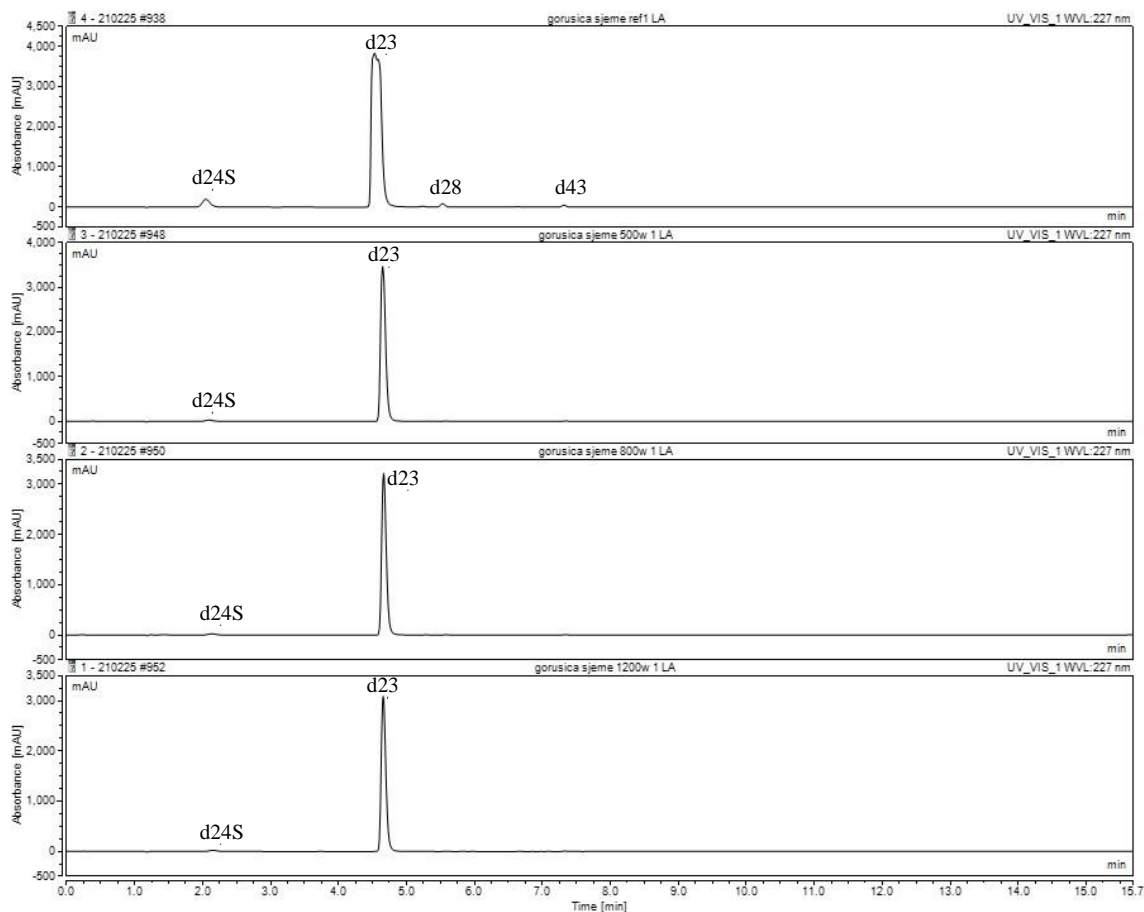
Cilj ovog rada bilo je ispitivanje utjecaja mikrovalova na stabilnost glukozinolata u sjemenu bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i daikon (*Raphanus sativus*), obje iz porodice kupusnjača (Brassicaceae). UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom određen je kvalitativni i kvantitativni sastav glukozinolata u uzorcima izloženim djelovanju triju različitih snaga mikrovalova, 500, 800 i 1200 W. Određen je i kvalitativni sastav hlapljivih sumporovih spojeva nastalih termičkom razgradnjom glukozinolata sjemena daikon nakon obrade najvećom snagom mikrovalova. U tu svrhu korištena je GC-MS tehnika.

#### **3.1. Izolacija glukozinolata i HPLC analiza**

Identifikacija i kvantifikacija glukozinolatnog profila od velike su važnosti u istraživanju, kako za određenu biljnu vrstu, tako i za pojedine biljne organe unutar vrste. Glukozinolati su karakteristični kemijski spojevi koji se nalaze u biljkama, a njihov profil može se značajno razlikovati između biljnih vrsta i unutar iste vrste, ovisno o biljnom organu. Glukozinolati su ekstrahirani iz sjemena biljaka bijele gorušice i daikona. Ekstrakcija je izvršena smjesom vode i metanola iz 100 mg usitnjenog biljnog materijala (sjeme). Nanošenjem ekstrakata na ionsko-izmjenjivačku kolonu koja je ispunjena gelom dekstranom, a zatim ispiranjem ultračistom vodom, 70% metanolom i puferom, uspješno su uklonjene nepolarne komponente poput klorofila. Nakon dodatka enzima sulfataze ekstrahirani glukozinolati su desulfatizirani.

##### **3.1.1. Sjeme bijele gorušice**

Na HPLC kromatogramu prikazani su rezultati analize ekstrakta iz sjemena bijele gorušice izloženi različitim snagama mikrovalova.



**Slika 23.** HPLC kromatogram ekstrakta iz sjemena bijele gorušice

Identifikacija desulfoglukozinolata temeljila se na vremenima zadržavanja, UV spektrima te MS2 spektrima. U tablici 2 su navedene mase natrijevih adukata pojedinih desulfoglukozinolata, a oznake za pojedine glukozinolite utvrđene literaturom<sup>3</sup> odgovaraju onima na slici 20.

**Tablica 2.** HPLC analiza glukozinolata BIJELA GORUŠICA

VRIJEME ZADRŽAVANJA/min	M+Na	OZNAKA	NAZIV
2,0	332	24S	Desulfoepiprogoitrin
4,5	368	23	Desulfoglukosinalbin
5,5	407	28	Desulfo-4- hidroksiglukobrasicin
7,3	391	43	Desulfoglukobrasicin

Iz dobivenih kromatograma zaključujemo kako je najzastupljeniji glukozinolat prisutan u sjemenu bijele gorušice glukosinalbin.

Na temelju krivulje umjeravanja desulfosinigrina izračunate su koncentracije identificiranih glukozinolata:

**Tablica 3.** Sadržaj glukozinolata u sjemenu bijele gorušice

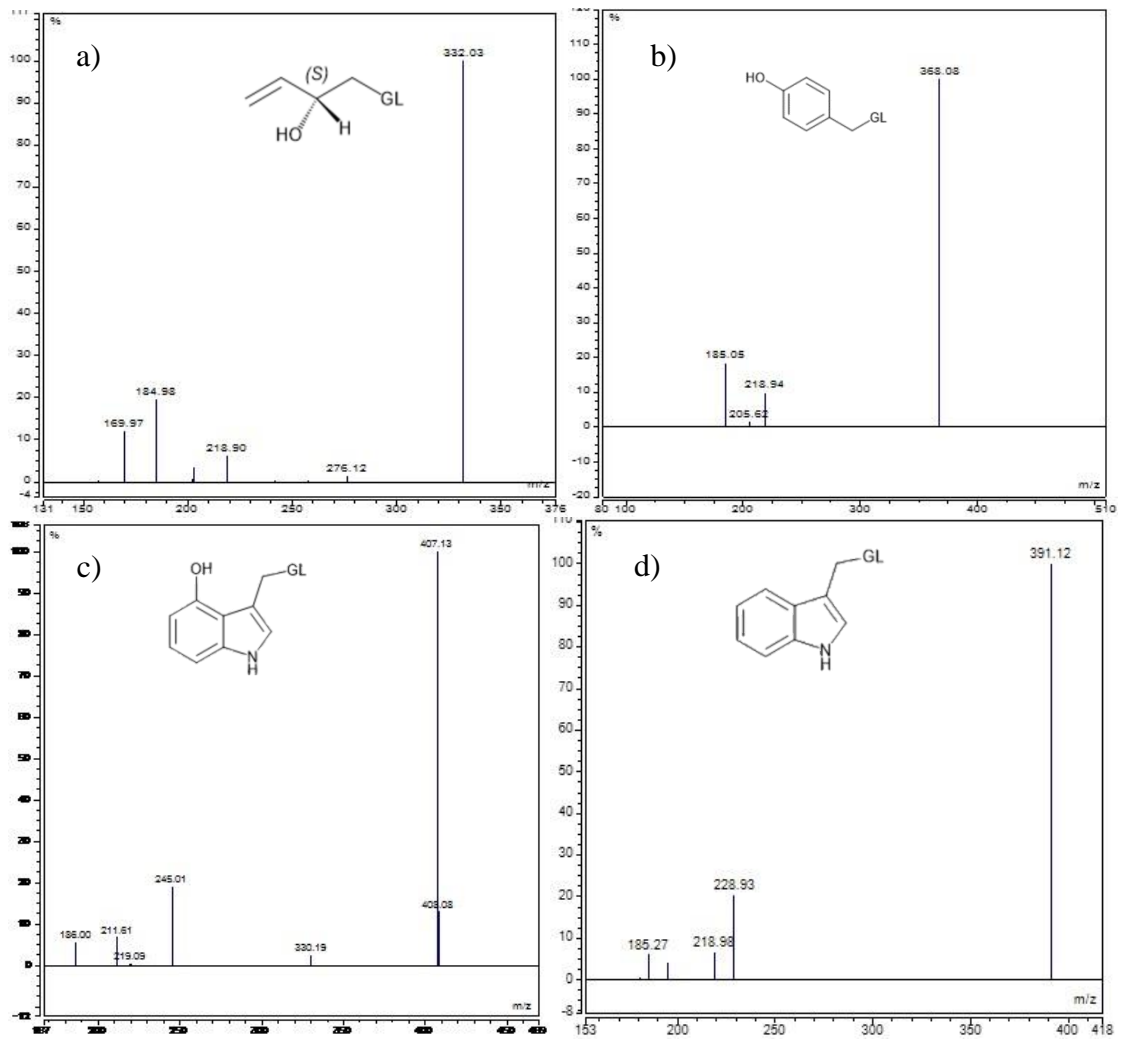
Sadržaj glukozinolata / $\mu\text{molg}^{-1}$ suhog biljnog materijala				
NAZIV	referentna	500W	800W	1200W
Epiprogoitrin	12,84	2,12	2,10	1,61
Glukosinalbin	74,76	63,26	59,03	55,07
4-hidroksiglukobrasicin	0,97	0,06	0,06	0,03
Glukobrasicin	0,50	0,07	0,10	0,07

Epiprogoitrin alifatski je glukozinolat. Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da je nestabilan s obzirom na veliku razliku u koncentraciji sjemena koje nije izloženo mikrovalnom zagrijavanju i onoga koje je izloženo različitim snagama mikrovalne destilacije.

Glukosinalbin je arilalifatski glukozinolat. Također vidimo da nije stabilan s obzirom na njegovo smanjenje.

4-hidroksiglukobrasicin i glukobrasicin su indolni glukozinolati. Kao i epiprogoitrin i glukosinalbin, njihov sadržaj se smanjuje s povećanjem snage mikrovalova.

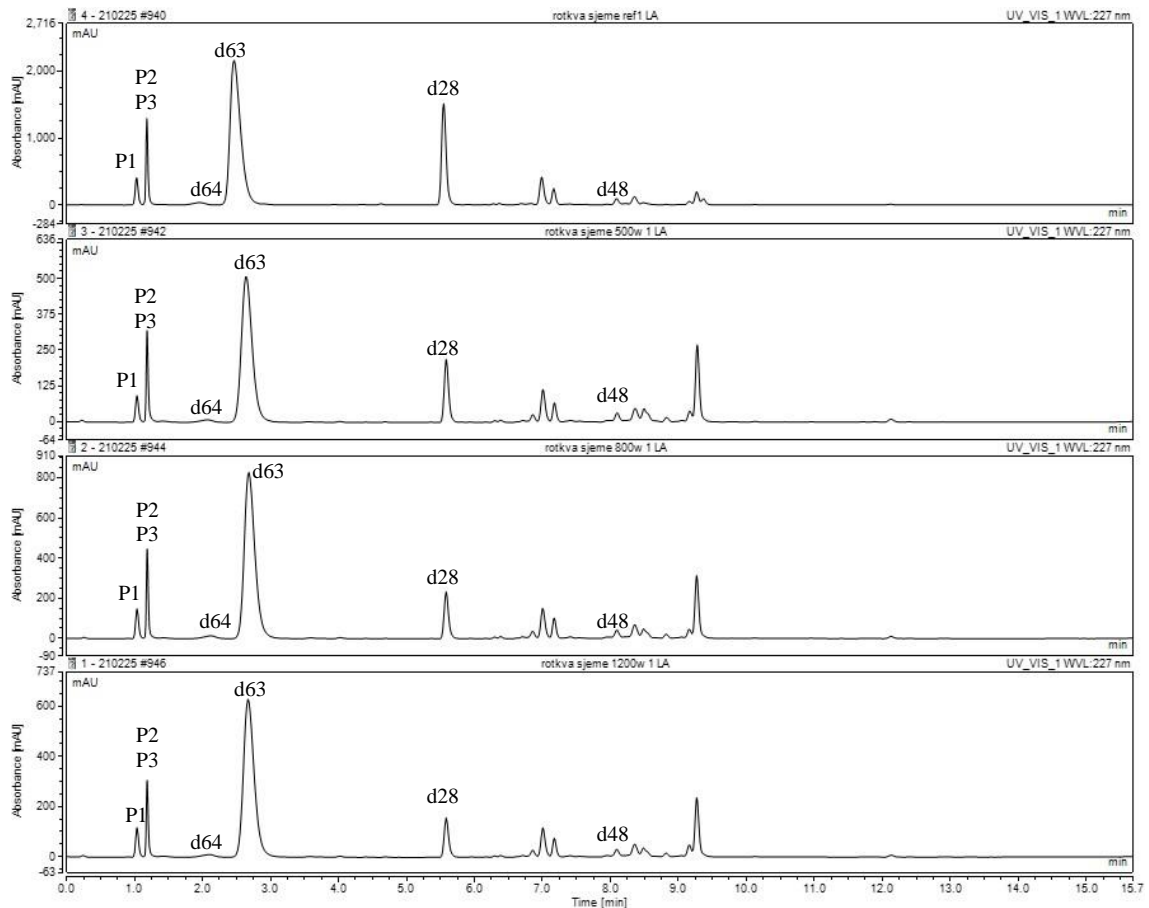
Na slici 22 su prikazani MS2 spektri svih identificiranih desulfoglukozinolata koji su služili za njihovu identifikaciju.



**Slika 24.** Spektar masa: a) desulfoepiprogoitrin b) desulfoglukosinalbin c) desulfo4-hidroksiglukobrasicin d) desulfoglukobrasicin

### 3.1.2. Sjeme daikona

Sjeme daikona analizirali smo u različitim vremenskim razdobljima kako bismo analizirali stabilnost prisutnih glukozinolata u otopini.



**Slika 25.** HPLC kromatogram ekstrakta iz sjemena daikona

Prema vremenu zadržavanja identificirani su glukozinolati dobiveni u kromatogramu uz pomoć literature:

**Tablica 4.** HPLC analiza glukozinolata DAIKON

VRIJEME ZADRŽAVANJA/min	M+Na	OZNAKA	NAZIV
<b>1,96</b>	380	64	Desulfoglukorafanin
<b>2,64</b>	378	63	Desulfoglukorafenin
<b>5,5</b>	407	28	Desulfo-4- hidroksiglukobrasicin
<b>8,05</b>	421	48	Desulfo-4- metoksiglukobrasicin



**Tablica 5.** HPLC analiza, koncentracije glukozinolata u sjemenu daikona

koncentracije/ $\mu\text{molg}^{-1}$				
NAZIV	referentna	500W	800W	1200W
Glukorafanin	4,18	1,06	1,33	1,13
Glukorafenin	179,47	54,23	54,23	51,06
4-idroksiglukobrasicin	17,17	2,51	2,35	1,64
4-metoksiglukobrasicin	tr	tr	tr	tr

„tr“ – prisutan u tragovima

Prema kromatogramu i izračunatim koncentracijama zaključeno je kako je u sjemenu daikona najzastupljeniji glukozinolat glukorafenin.

Glukorafanin i glukorafenin alifatski su glukozinolati. Primjenom različite snage mikrovalova uočava se da se njihov sadržaj smanjuje, tj. da su nestabilni.

Zbog jedinstvene strukturne specifičnosti utvrđeno je da se desulfoglukorafenin (d63), koji nastaje enzimskom desulfatacijom glukorafenina, pretvara u tioimidatne N-oksidi.<sup>8</sup>

U uzorcima su uočeni signali na  $t_R=1,0-1,5$  min koji su produkti raspada glukorafenina (m/z 330, 348, 378). Na kromatogramu su označeni kao P1, P2, P3 i predstavljaju smjese diastereomera.

4-Hidroksiglukobrasicin indolni je glukozinolat i njegova se koncentracija također smanjuje primjenom mikrovalova.

4-Metoksiglukobrasicin (indolni glukozinolat) prisutan je u tragovima.

U svrhu promatranja stabilnosti desulfoglukorafenina, uzorci su ponovno analizirani nakon 5 dana:

**Tablica 6.** HPLC analiza, koncentracije glukozinolata u uzorku, dobivenom iz sjemena daikona, nakon 5 dana

koncentracije/ $\mu\text{molg}^{-1}$				
NAZIV	referentna	500W	800W	1200W
Glukorafanin	2,05	0,92	tr	0,80
Glukorafenin	8,54	3,41	4,03	4,15
4-hidroksiglukobrasicin	12,01	2,46	2,26	1,63
4-metoksiglukobrasicin	tr	1,63	tr	tr

Nakon 1 mjeseca uzorci su po treći put stavljeni na analizu:

**Tablica 7.** HPLC analiza, koncentracije glukozinolata u uzorku, dobivenom iz sjemena daikona, nakon mjesec dana

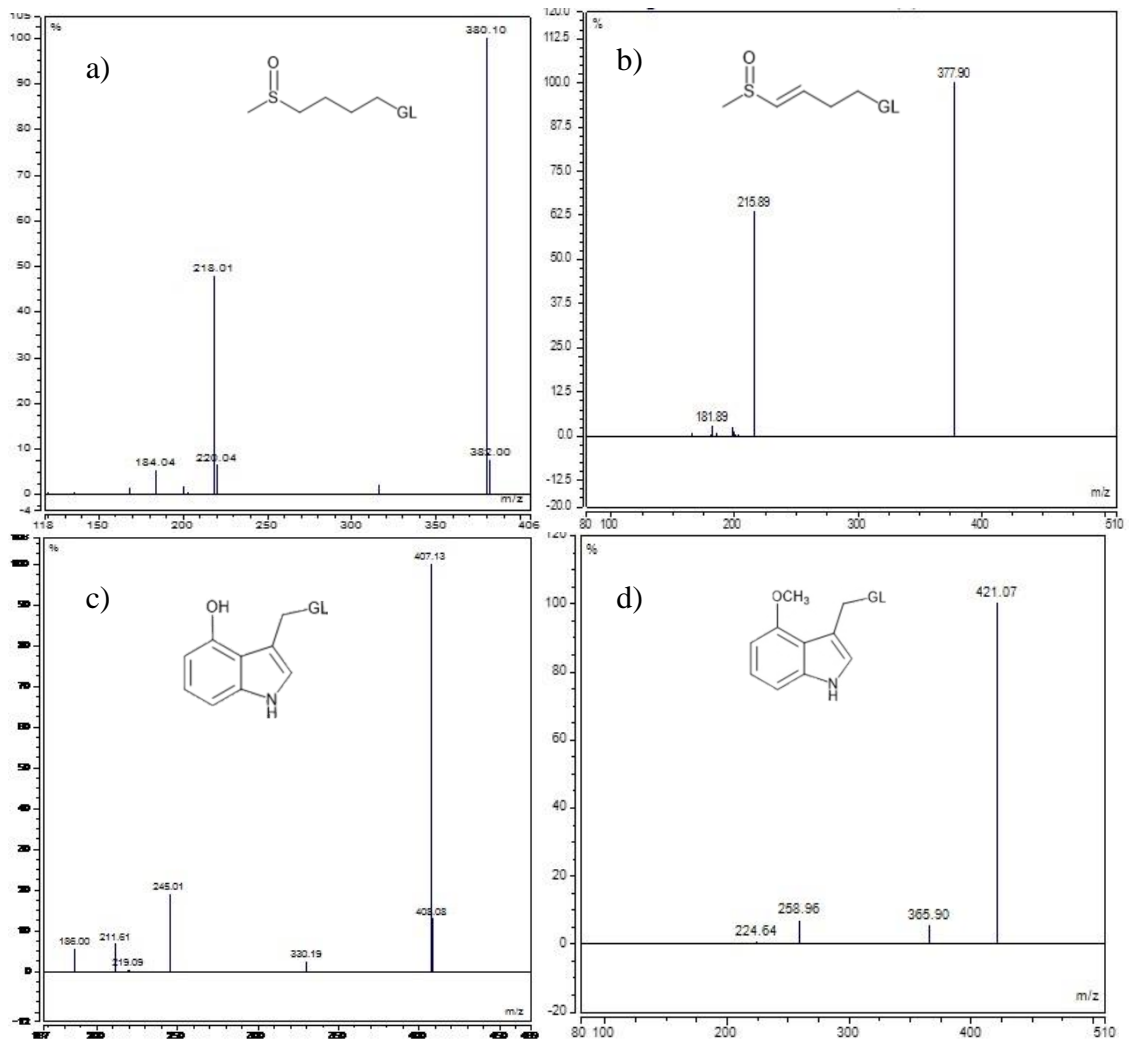
koncentracije/ $\mu\text{molg}^{-1}$				
NAZIV	referentna	500W	800W	1200W
Glukorafanin	0,99	tr	1,10	0,69
Glukorafenin	1,13	0,64	n.i.	n.i.
4-hidroksiglukobrasicin	1,18	n.i.	n.i.	tr
4-metoksiglukobrasicin	0,05	tr	tr	tr

„n.i.“ – nije identificiran

Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da su alifatski glukozinolati (glukorafanin i glukorafenin) nestabilni u vodenoj otopini, dok su indolni glukozinolati (4-hidroksiglukobrasicin i 4-metoksiglukobrasicin) stabilni u vodenoj otopini.

Eventualno odstupanje rezultata prisutno je radi eksperimentalnih pogreški.

MS2 spektri desulfoglukozinolata kojim su identificirani spojevi (navedeni u tablici 4) prikazani su na slici 24.

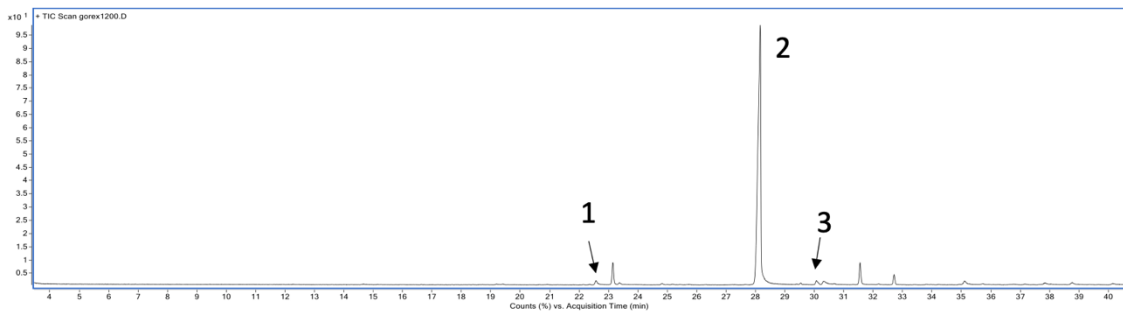


Slika 26. Spektar masa: a) desulfoglukorafanin b)desulfoglukorafenin c) desulfo4-hidroksiglukobrasicin d) desulfo4-metoksiglukobrasicin

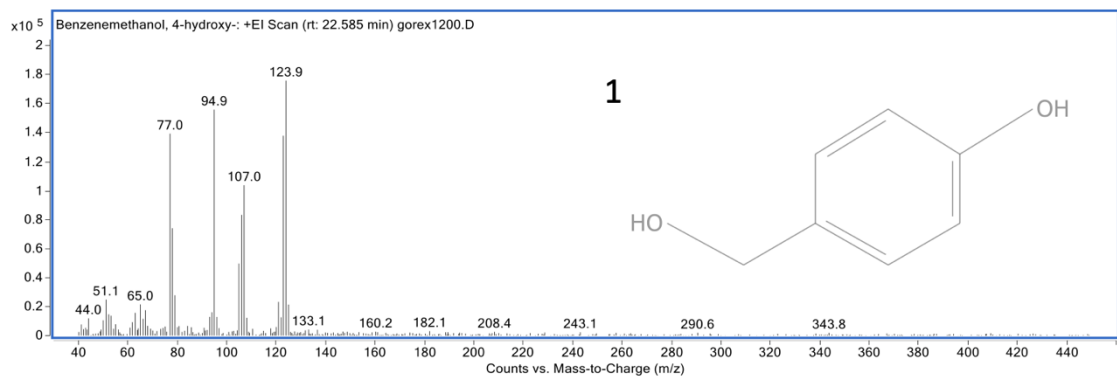
### 3.2. Razgradnja glukozinolata i GC-MS analiza

Izolacija dobivenih hlapljivih produkata provela se otapalom diklormetan za biljni materijal bijele gorušice podvrgnut mikrovalovima snage 1200W.

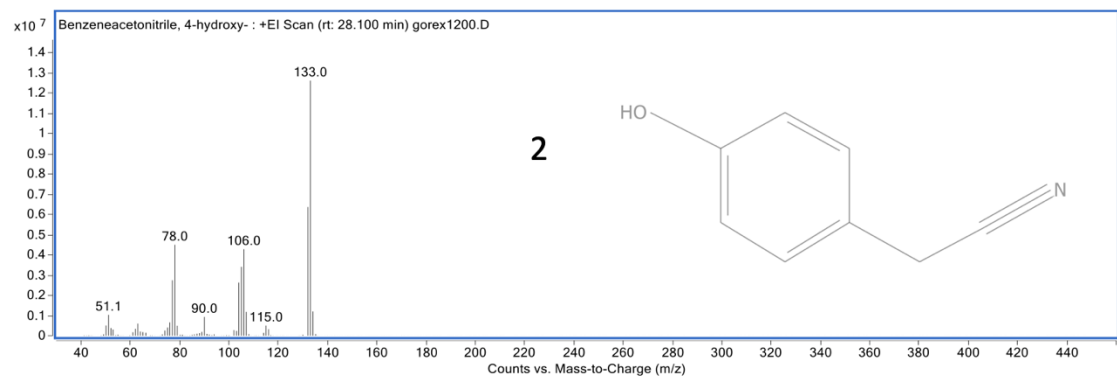
Uzorak je analiziran pomoću sustava plinska kromatografija – spektrometrija masa (GC-MS). Dobiven je kromatogram ukupne ionske struje i prema vremenu zadržavanja analizirani su dobiveni produkti razgradnje.



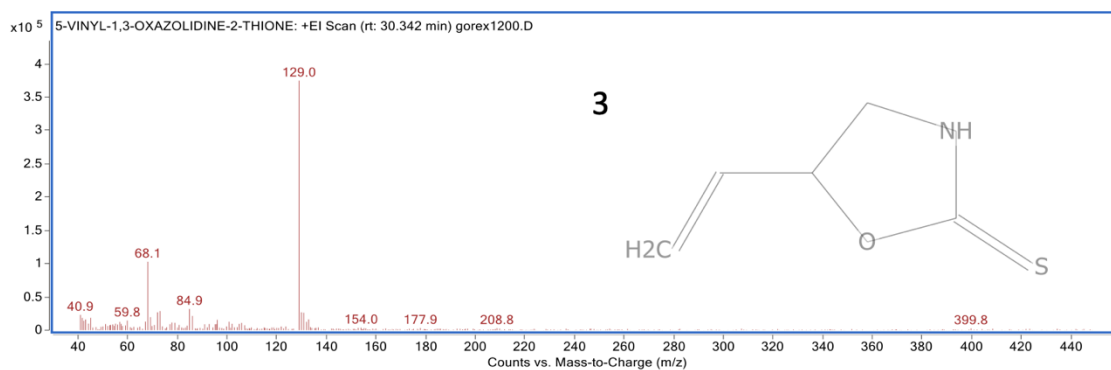
**Slika 27.** Kromatogram ukupne ionske struje diklormetanskog ekstrakta uzorka gorušice nakon zagrijavanja mikrovalovima snage 1200W



**Slika 28.** MS spektar 4-hidroksibenzilnog alkohola

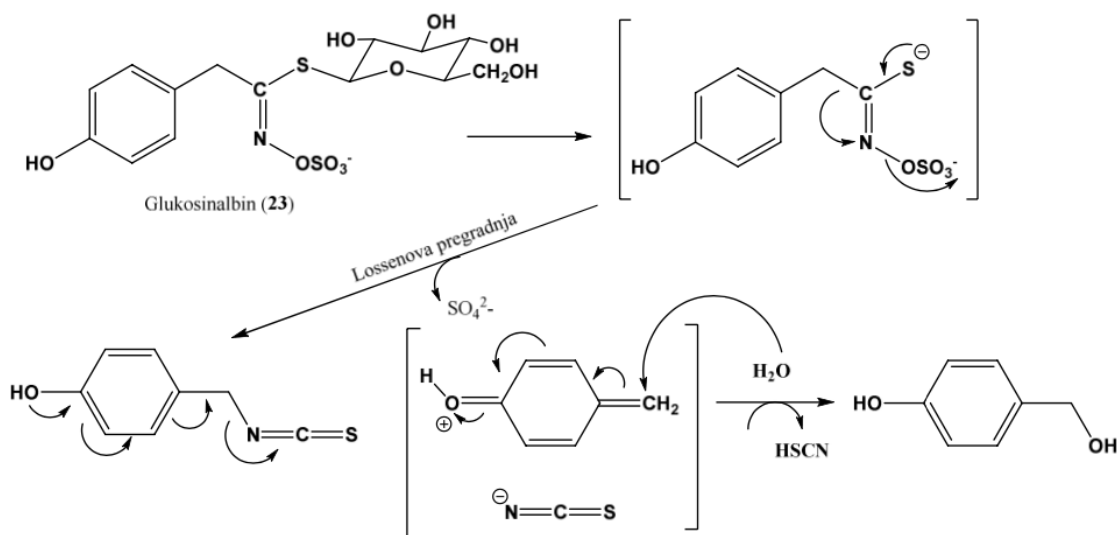


**Slika 29.** MS spektar 2-(4-hidroksifenil)acetonitrila



**Slika 30.** MS spektar 5-vinil-1,3-oksazolidin-2-tiona

Njegov produkt razgradnje je 4-hidroksibenzil-izotiocijanat koji nije stabilan jer reagira s vodom i sklon je brzom hidrolizi u 4-hidroksibenzilni alkohol.



**Slika 31.** Razgradnja glukosinalbina do 4-hidroksibenzil-izotiocijanata i njegova hidroliza.<sup>10</sup>

Stabilniji i glavni produkt razgradnje glukosinalbina jest 2-(4-hidroksifenil)acetanitril. Nitrili su poznati po svojoj relativnoj stabilnosti. Čak i pri toplinskoj obradi na temperaturama iznad 100 °C, primijećeno je da se gotovo ne razgrađuju, što ukazuje na to da gubici tijekom zagrijavanja uglavnom proizlaze iz njihove hlapljivosti. S druge strane, izotiocijanati sadrže visoko elektrofilni atom ugljika i lako reagiraju u vodenim otopinama.<sup>10</sup>

Treći identificirani produkt razgradnje epiprogoitrina je 5-vinil-1,3-oksazolidin-2-tion. U poglavlju 1.4.1. na slici 5. na kojoj je prikazana opća shema razgradnje glukozinolata možemo vidjeti da dobiveni produkt nastaje iz izotiocijanata s  $\beta$ -hidroksilnom skupinom.<sup>2,14</sup>

Oksazolidintioni su poznati goitrogeni spojevi koji utječu negativno na funkciju štitnjače. Tako 5-viniloksazolidin-2-tion (goitrin) pokazuje štetne i toksične učinke, što naglašava da je spoznaja o spojevima koji nastaju razgradnjom glukozinolata vrlo važan dio istraživanja ove skupine specijaliziranih metabolita.

## 4. ZAKLJUČAK

- UHPLC-DAD-MS/MS analizom desulfoglukozinolata iz sjemena bijele gorušice utvrđeno je da su prisutni epiprogoitrin, glukosinalbin, 4-hidroksiglukobrasicin i glukobrasicin, gdje je u najvišoj koncentraciji prisutan glukosinalbin.
- UHPLC-DAD-MS/MS analizom desulfoglukozinolata iz sjemena daikona utvrđeni su glukorafanin, glukorafenin, 4-hidroksiglukobrasicin i 4-metoksiglukobrasicin, od kojih je u najvišoj koncentraciji prisutan glukorafenin.
- Prema kvalitativnim informacijama možemo zaključiti da primjenom veće snage mikrovalova dolazi do brže razgradnje glukozinolata.
- Desulfoglukorafenin nije stabilan u vodenim otopinama te se raspada na smjesu diastereomera. Sadržaj glukorafenina u referentnom uzorku sjemena daikona prvog dana iznosio je 179,5  $\mu\text{mol/g}$  suhog biljnog materijala, dok mu se nakon mjesec dana sadržaj smanjio na 1.1  $\mu\text{mol/g}$  suhog biljnog materijala.
- GC-MS analizom uzorka izloženom mikrovalovima snage 1200W utvrđeni su sljedeći razgradni produkti: 4-hidroksibenzilni alkohol, 2-(4-hidroksifenil)acetonitril i 5-vinil-1,3-oksazolidin-2-tion.
- 4-hidroksibenzilni alkohol nastaje zbog nestabilnosti 4-hidroksibenzil-izotiocijanata u vodenoj otopini.

## 5. LITERATURA

1. *I. Blažević*, Doprinos istraživanju glukozinolata (2005. – 2020.): Strukturna raznolikost, *Kem. Ind.* **69** (2020) 541–555, doi: <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.045>
2. *I. Blažević*, Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae, Sveučilište u Zagrebu: Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2009.
3. *I. Blažević, S. Montaut, F. Burčul, C. E. Olsend, M. Burow, P. Rollin, N. Agerbirk*, Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants, *Phytochemistry* **169** (2020) 112100, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>
4. *M. Kopjar i sur.*, Glukozinolati: Biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi, *Hrana u zdravlju i bolesti* **1** (2012) 22-35, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
5. *T. Nikolić*, Sistematska botanika, Alfa d.d., 1. izdanje, Zagreb, 2013.
6. URL: <https://www.plantea.com.hr/bijela-gorusica/> (3.5.2023.)
7. URL: <https://www.britannica.com/plant/white-mustard> (3.5.2023.)
8. URL: <https://rareteacellar.com/products/daikon-radish-seeds> (9.8..2023.)
9. URL: <https://www.plantea.com.hr/daikon/> (9.8.2023.)
10. *A. Đulović*, Strukturna raznolikost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata u različitim biljnim porodicama, Doktorski rad, Split: Kemijsko-tehološki fakultet 2020.
11. *I. E. Sønderby, F. Geu-Flores, i B. A. Halkier*, Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond, *Trends Plant Sci.* **15** (2010) 283-290, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.005>
12. *Radojčić, Redovniković i sur*, 2008
13. *J. W. Fahey, A. T. Zalcmann, P. Talalay*, The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochemistry* **56** (2001), 5-51, doi: [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00316-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00316-2)
14. *M. Zekić*, Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae, Doktorska disertacija, Zagreb : Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije 2013.



15. *D. Vlačević*, Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata, Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.
16. *I. Jerković i A. Radonić*, Praktikum iz organske kemije. Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2009.
17. *K. Großer i N. M. van Dam*, A Straightforward Method for Glucosinolate Extraction and Analysis with High-pressure Liquid Chromatography (HPLC), *J. Visualized Exp.* **121** (2017) 55425, doi: <https://dx.doi.org/10.3791/55425>