Sysimbrium officinale (L.) Scop.: glukozinolati i njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima

Anđelković, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:293223

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Sisymbrium officinale (L.) Scop: GLUKOZINOLATI I NJIHOVA RAZGRADNJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

DIPLOMSKI RAD

NIKOLINA ANĐELKOVIĆ
Matični broj: 92

Split, listopad 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO–TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

Sisymbrium officinale (L.) Scop: GLUKOZINOLATI I NJIHOVA RAZGRADNJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

DIPLOMSKI RAD

NIKOLINA ANĐELKOVIĆ

Matični broj: 92

Split, listopad 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORIENTATION: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

Sisymbrium officinale (L.) Scop: GLUCOSINOLATES AND THEIR MICROWAVE-ASSISTED DEGRADATION

DIPLOMA THESIS

NIKOLINA ANĐELKOVIĆ

Parent number: 92

Split, October 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija, Smjer: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević
Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag. chem.

Sisymbrium officinale (L.) Scop: GLUKOZINOLATI I NJIHOVA RAZGRADNJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

Nikolina Anđelković, 92

Sažetak: Glukozinolati, *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem, su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju iz aminokiselina. Glukozinolati su kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi, a njihovom razgradnjom nastaje niz različitih biološki aktivnih razgradnih produkata. Razgrađuju se enzimskim, termičkim i kemijskim putem. U ovom radu primijenjene su različite metode izolacije uključujući hidrodestilaciju u modificiranoj aparaturi po Clevengeru, autolizu te mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju kako bi istražili termičku, enzimsku i mikrovalovima potpomognutu razgradnju glukozinolata. Cilj rada bio je izolirati i identificirati hlapljive sumporove spojeve iz strižuše (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.). Strižuša, biljna vrsta porodice Brassicaceae, sabrana je u Splitu te na području rijeke Krke u svibnju 2019. godine. Glukozinolati su identificirani indirektno, GC-MS analizom njihovih razgradnih produkata te direktno HPLC-DAD analizom desulfatiziranih glukozinolata. U svim biljnim dijelovima strižuše (korijen, stabljika, list, cvijet), s oba područja, identificirana su tri glukozinolata glukoputranjivin (0,68-16,00 µmol/g), 4-hidroksiglukobrasicin (0,035-2,732 µmol/g) i glukobrasicin (0,244-6,397 µmol/g). U korijenu biljke još su identificirani glukosinalbin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin. Hlapljivi spojevi analizirani GC-MS analizom ukazuju da je najzastupljeniji izopropil-izotiocijanat, kao razgradni produkt glukoputranjivina.

Ključne riječi: glukozinolati, desulfoglukozinolati, *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., GC-MS, HPLC-DAD
Rad sadrži: 65 stranice, 54 slike, 13 tablica, 1 prilog, 21 literaturne reference
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek	član
3. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević	član- mentor

Datum obrane: 18.10.2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry, Orientation: Organic chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19

Mentor: Ivica Blažević, PhD, Associate professor
Technical assistance: Azra Đulović, MChem

Sisymbrium officinale (L.) Scop: GLUCOSINOLATES AND THEIR MICROWAVE-ASSISTED DEGRADATION

Nikolina Anđelković, 92

Abstract: Glucosinolates, *β*-thioglucoside-*N*-hydroxysulphates with variable side chains, are secondary metabolites synthesized from amino acids. Glucosinolates are chemically stable and biologically inactive compounds, and their degradation produces a number of different biologically active degradation products. They can be degraded enzymatically, thermally and chemically. Different isolation methods have been applied in this work, including hydrodistillation in the modified Clevenger apparatus, autolysis, and microwave distillation and extraction in order to investigate the thermal, enzymatic, and microwave-assisted glucosinolate degradation.

The aim of the study was to isolate and identify volatile sulfur compounds from the hedge mustard (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.). Hedge mustard, a plant species of the Brassicaceae family, was collected in Split and in the Krka River area during May 2019. Glucosinolates were identified indirectly by GC-MS analysis of their degradation products and directly by HPLC-DAD analysis of desulfated glucosinolates. In all plant parts of the hedge mustard (root, stem, leaf, flower), in both areas, three glucosinolates were identified: glucoputranjivin (0.68-16.00 µmol/g), 4-hydroxyglucobrassicin (0.035-2.732 µmol/g) and glucobrassicin (0.244-6.397 µmol/g). Furthermore, glucosinalbin, 4-methoxyglucobrassicin and neoglucobrassicin were also identified at the root of the plant. The volatile compounds analyzed by GC-MS analysis indicate that the most common degradation product is isopropyl isothiocyanate, as the breakdown product of glucoputranjivin.

Keywords: glucosinolates, desulfoglucosinolates, *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., GC-MS, HPLC-DAD
Thesis contains: 65 pages, 54 figures, 13 tables, 1 supplement, 21 references
Original in: Croatian.

Defence committee:

1. Franko Burčul, PhD, Assistant Professor	chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD, Assistant Professor	member
3. Ivica Blažević, PhD, Associate Professor	member - supervisor

Defence date: 18.10.2019.
Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

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

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

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću na pruženoj prilici te na stručnim savjetima i uputama prilikom izrade rada.

Iskreno se zahvaljujem asistentici Azri Đulović, mag. chem. na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada te na stručnim i prijateljskim savjetima, a najviše na utrošenom vremenu i ogromnom trudu. Zahvaljujem se i dr. sc. Marijani Popović na pomoći i na izdvojenom vremenu.

Također se želim zahvaliti svim dragim prijateljima i ljudima bez kojih ovo iskustvo ne bi bilo isto.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na neizmjernoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom cijelog mog studiranja i života.

Nikolina

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Izolirati hlapljive spojeve iz vrste *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. korištenjem ekstrakcije i destilacije potpomognute mikrovalovima te usporediti s klasičnom ekstrakcijom i hidrodestilacijom.
2. Izvršiti identifikaciju hlapljivih izolata korištenjem veznog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS).
3. Izolirati glukozinolate iz vrste *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. metodom ekstrakcije uz desulfataciju.
4. Izvršiti identifikaciju izoliranih desulfoglukozinolata korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD).
5. Usporediti rezultate dobivene za vrstu *Sisymbrium officinale* (L.) Scop. s područja Splita te s područja rijeke Krke.

SAŽETAK

Glukozinolati, *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s varijabilnim bočnim lancem, su sekundarni metaboliti koji se sintetiziraju iz aminokiselina. Glukozinolati su kemijski stabilni i biološki neaktivni spojevi, a njihovom razgradnjom nastaje niz različitih biološki aktivnih razgradnih produkata. Razgrađuju se enzimskim, termičkim i kemijskim putem. U ovom radu primijenjene su različite metode izolacije uključujući hidrodestilaciju u modificiranoj aparaturi po Clevengeru, autolizu te mikrovalnu destilaciju i ekstrakciju kako bi istražili termičku, enzimsku i mikrovalovima potpomognutu razgradnju glukozinolata.

Cilj rada bio je izolirati i identificirati hlapljive sumporove spojeve iz strižuše (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.). Strižuša, biljna vrsta porodice Brassicaceae, sabrana je u Splitu te na području rijeke Krke u svibnju 2019. godine. Glukozinolati su identificirani indirektno, GC-MS analizom njihovih razgradnih produkata te direktno HPLC-DAD analizom desulfatiziranih glukozinolata. U svim biljnim dijelovima strižuše (korijen, stabljika, list, cvijet), s oba područja, identificirana su tri glukozinolata glukoputranjivin (0,68-16,00 µmol/g), 4-hidroksiglukobrasicin (0,035-2,732 µmol/g) i glukobrasicin (0,244-6,397 µmol/g). U korijenu biljke još su identificirani glukosinalbin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin. Hlapljivi spojevi analizirani GC-MS analizom ukazuju da je najzastupljeniji izopropil-izotiocijanat, kao razgradni produkt glukoputranjivina.

Ključne riječi: glukozinolati, desulfoglukozinolati, *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., GC-MS, HPLC-DAD

SUMMARY

Glucosinolates, *β*-thioglucoside-*N*-hydroxysulphates with variable side chains, are secondary metabolites synthesized from amino acids. Glucosinolates are chemically stable and biologically inactive compounds, and their degradation produces a number of different biologically active degradation products. They can be degraded enzymatically, thermally and chemically. Different isolation methods have been applied in this work, including hydrodistillation in the modified Clevenger apparatus, autolysis, and microwave distillation and extraction in order to investigate the thermal, enzymatic, and microwave-assisted glucosinolate degradation.

The aim of the study was to isolate and identify volatile sulfur compounds from the hedge mustard (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.). Hedge mustard, a plant species of the Brassicaceae family, was collected in Split and in the Krka River area during May 2019. Glucosinolates were identified indirectly by GC-MS analysis of their degradation products and directly by HPLC-DAD analysis of desulfated glucosinolates. In all plant parts of the hedge mustard (root, stem, leaf, flower), in both areas, three glucosinolates were identified: glucoputranjivin (0.68-16.00 µmol/g), 4-hydroxyglucobrassicin (0.035-2.732 µmol/g) and glucobrassicin (0.244-6.397 µmol/g). Furthermore, glucosinalbin, 4-methoxyglucobrassicin and neoglucobrassicin were also identified at the root of the plant. The volatile compounds analyzed by GC-MS analysis indicate that the most common degradation product is isopropyl isothiocyanate, as the breakdown product of glucoputranjivin.

Keywords: glucosinolates, desulfoglucosinolates, *Sisymbrium officinale* (L.) Scop., GC-MS, HPLC-DAD

SADRŽAJ

UVOD 1
1. OPĆI DIO 2
1.1. Isparljivi sumporovi spojevi 2
1.1.1. Klasifikacija isparljivih sumporovih spojeva 2
1.2. Glukozinolati 2
1.2.1. Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata 3
1.3. Razgradnja glukozinolata 5
1.3.1. Enzimska razgradnja 5
1.3.1.1. Razgradni produkti 7
1.4. Biološka aktivnost 8
1.5. Metode izolacije isparljivih spojeva 9
1.5.1. Destilacija 9
1.5.1.1. Vodena destilacija 9
1.5.2. Ekstrakcija 10
1.5.2.1. Mikrovalna ekstrakcija 11
1.5.3. Ekstrakcija glukozinolata 12
1.6. Metode identifikacije isparljivih spojeva 13
1.6.1. Kromatografija 13
1.6.1.1. Plinska kromatografija 14
1.6.2. Spektrometrija masa 15
1.6.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa 17
1.6.4. Tekućinska kromatografija 18
1.6.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) 18
1.7. Brassicaceae 20
1.7.1. Strižuša (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.) 21
2. EKSPERIMENTALNI DIO 23
2.1. Kemikalije i aparatura 23
2.2. Biljni materijal 24
2.2.1. Strižuša 24
2.3. Metode izolacije 27
2.3.1. Mikrovalna ekstrakcija 27

2.3.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće 30
2.3.3. Hidrodestilacija 31
2.3.4. Ekstrakcija glukozinolata uz desulfataciju 32
2.4. Metode analize 34
2.4.1. GC-MS analiza 34
2.4.2. HPLC 35
3. REZULTATI I RASPRAVA 37
3.1. Razgradnja glukozinolata i GC-MS analiza 37
3.1.1. GC-MS analiza 37
3.2. Izolacija glukozinolata i HPLC analiza 45
3.2.1. Korijen 47
3.2.2. Stabljika 49
3.2.3. List 51
3.2.4. Cvijet 52
4. ZAKLJUČAK 54
5. LITERATURA 55
6. PRILOG 57
6.1. Izračun konačnih koncentracija identificiranih glukozinolata 57
6.1.1. Strižuša-Split 58
6.1.2. Strižuša-Krka 60
6.2. HPLC kromatogrami standarda desulfoglukozinolata 63

UVOD

Isparljivi sumporovi spojevi su posebna grupa metaboličkih produkata koji se mogu pronaći u biljkama, životinjama i mikroorganizmima, a poznati su po raznolikoj biološkoj aktivnosti. Neka od svojstava koja im se pripisuju su antikancerogena, antioksidacijska i antibakterijska svojstva, a pokazalo se da imaju utjecaj i na imunološki sustav. Upravo zbog toga interes za ove spojeve raste iz godine u godinu.

Od svih spojeva koji spadaju u isparljive sumporove spojeve, poseban interes usmjeren je na razgradne produkte glukozinolata. Po kemijskoj strukturi glukozinolati su *β*-tioglukozidni-*N*-hidroksisulfati s promjenjivim bočnim lancem. Ovi spojevi su pronađeni u 16 biljnih porodica reda Capparales, od kojih je najvažnija porodica Brassicacea.[1]

Poznato je da su glukozinolati biološki neaktivni i neisparljivi spojevi, ali enzimskom, kemijskom ili termičkom hidrolizom daju razgradne produkte koji su vrlo aktivni. Izolaciju spomenutih razgradnih produkata glukozinolata je moguće provesti destilacijom i ekstrakcijom, dok se identifikacija vrši primjenom tehnika kao što su plinska i tekućinska kromatografija.

1. OPĆI DIO

1.1. Isparljivi sumporovi spojevi

Isparljivi sumporovi spojevi su posebna grupa metaboličkih produkata koji se mogu pronaći u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Rasprostranjeni su u 43 biljne porodice i 173 biljna roda, od kojih su najznačanije biljne porodice Brassicaceae, Liliaceae, Capparaceae, Caricaceae, Rutaceae, Phytolaccaceae i Poaceae. U biljkama se nalaze u korijenu, stabljici, listu, cvijetu, sjemenkama, a sadržaj ovisi o vrsti i razvojnom stadiju biljke, klimi i načinu uzgoja.[1]

Zbog velike zastupljenosti u biljkama, isparljivi sumporovi spojevi su često predmet istraživanja u svrhu ispitivanja njihovih bioloških svojstava. Pridodaju im se važna svojstva kao što su antioksidacijska, antitumorska i antibakterijska aktivnost.[2]

1.1.1. Klasifikacija isparljivih sumporovih spojeva

Na temelju broja sumporovih atoma prisutnih u njihovoj strukturi, ovi spojevi su podijeljeni u pet grupa:

1. S_1 (spojevi koji u svojoj strukturi sadrže jedan atom sumpora),
2. S_2 (spojevi koji u svojoj strukturi sadrže dva atoma sumpora),
3. S_3 (spojevi koji u svojoj strukturi sadrže tri atoma sumpora),
4. S_4 (spojevi koji u svojoj strukturi sadrže četiri atoma sumpora),
5. izotiocijanati i tiocijanati (SCN tj NSC).

Prve četiri grupe se dalje mogu podijeliti s obzirom na oblik molekule i s obzirom na prisutnost heteroatoma (dušika i/ili kisika).[2]

1.2. Glukozinolati

Važna skupina sekundarnih metabolita u nekim biljnim vrstama su glukozinolati. Zastupljeni su u 16 botaničkih porodica reda Capparales što uključuje poljoprivredno važne biljne kulture porodice Brassicaceae (također poznat kao križonosni, zbog rasporeda oblika četiriju latica cvijeta), a sintetiziraju se iz aminokiselina. U porodicu

Brassicaceae ubrajaju se biljke iz svakodnevne prehrane kao što su kupus, brokula, cvjetača, prokulice, kelj, repa, gorušica i druge. Glukozinolati su pronađeni u svim dijelovima biljke, iako je sjeme najčešće najbogatije glukozinolatima. Sastav, raspodjela i sadržaj ovise o vrsti biljke, varijetetu unutar iste vrste, dijelu i razvojnom stadiju biljke te o uvjetima razvoja.[3-5]

Glukozinolati, poznati pod trivijalnim imenima, sinigrin (alilglukozinolat) i sinalbin (4-hidroksibenzil glukozinolat) izolirani su još 1830. godine iz sjemenki crne (*Brassica nigra*) i bijele (*Sinapis alba*) gorušice. Prvu strukturnu formulu predložio je Gadamer 1897. godine. Iako je bila nepravilna, prihvaćena je do 1956. godine kada su Lundeen i Ettlinger predložili novu i ispravnu strukturu.[4]

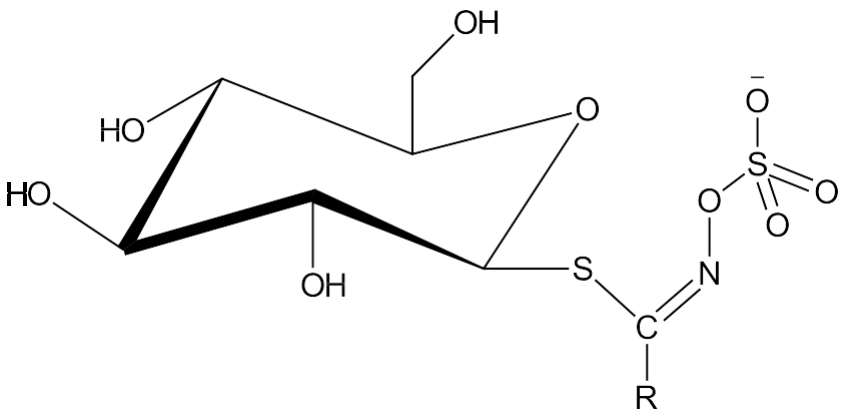
1.2.1. Kemijska struktura i nomenklatura glukozinolata

Glukozinolati su vodotopljivi ionski spojevi koji se sastoje od glukonskog dijela β-D-glukoze, i aglukonskog dijela s R-skupinom koja uključuje alkilni, arilni ili indolni bočni lanac. Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka s dušikom i sumporom[9], a posjeduju zajedničku strukturu koja sadrži β-D-tioglukoznu grupu povezanu sa sulfoniranim aldoksidom i različitim dužinama lanaca koji se izvode iz aminokiselina.

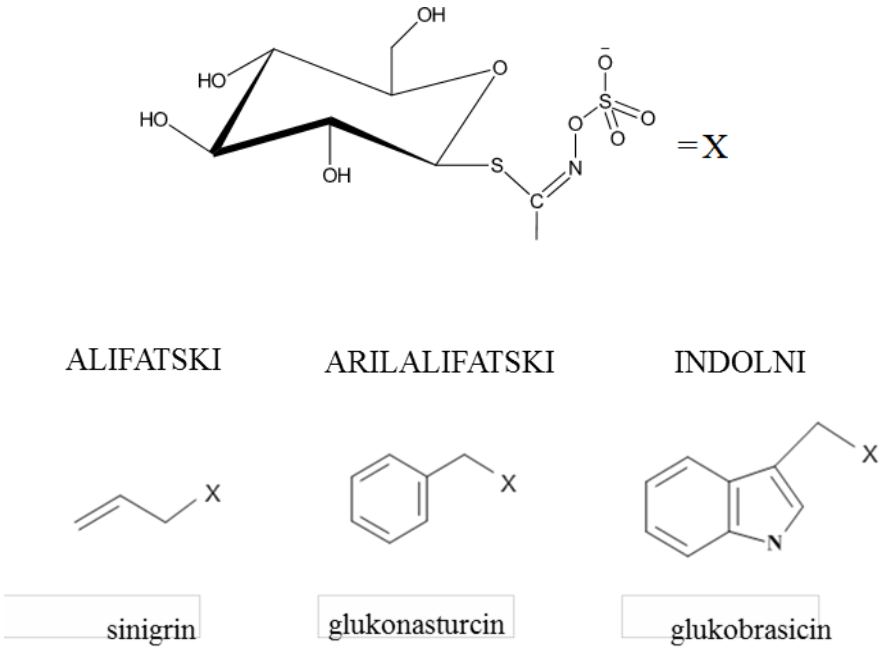
Mogu se podijeliti u tri osnovne grupe:

- alifatski glukozinolati koji se izvode iz alanina, leucina, valina ili metionina,
- aromatski glukozinolati iz fenilalanina ili tirozina,
- indol glukozinolati iz triptofana.

Opća strukturna formula prikazana je na slici 1. Struktura bočnog lanca (R), po kojem se glukozinolati međusobno razlikuju, određena je aminokiselinom (slika 2.). Lanac glukozinolata je promjenjivi dio molekule i osnova je njihove strukturne raznolikosti te biološke aktivnosti produkata koji nastaju njihovom enzimskom, termičkom ili kemijskom razgradnjom. U prirodi se pojavljuju kao kalijeve soli topljive u vodi i razrijeđenim alkoholima.[3-5]



Slika 1. Opća strukturna formula glukozinolata.



Slika 2. Primjeri struktura glukozinolata.

Ettlinger i Dateo su uveli polusistematsku nomenklaturu glukozinolata. Anion soli se označava kao „glukozinolat“, a ime R-skupine se koristi kao prefiks. Za većinu se glukozinolata koriste trivijalna imena koja su izvedena od latinskog imena biljke iz koje je spoj prvi put izoliran, s prefiksom „gluko“ i sufiksom „in“. Nekoliko primjera je prikazano u tablici 1.[4]

Tablica 1. Glukozinolati prirodnog porijekla s ustanovljenim strukturama.[4]

GLUKOZINOLAT	R-SKUPINA	BILJKA
Glukokaparin	CH_3	*Cleome spinosa*
Glukolepidin	CH_3CH_2	*Lepidium menziesii*
Glukokohlearin	$CH_3CH_2(CH_3)CH$	*Cochlearin officinalis*
Sinigrin	$CH_2{=}CHCH_2$	*Brassica nigra*
Glukonapin	$CH_2{=}CH(CH_2)_2$	*Brassica napus*
Glukoibervirin	$CH_3S(CH_2)_3$	*Iberis sempervirens*
Glukorafenin	$CH_3S(O)CH{=}CH(CH_2)_2$	*Raphanus sativus*
Sinalbin	*p*-$HOC_6H_4CH_2$	*Sinapis alba*
Glukoeripestrin	$CH_3OOC(CH_2)_3$	*Erysimum rupestre*

1.3. Razgradnja glukozinolata

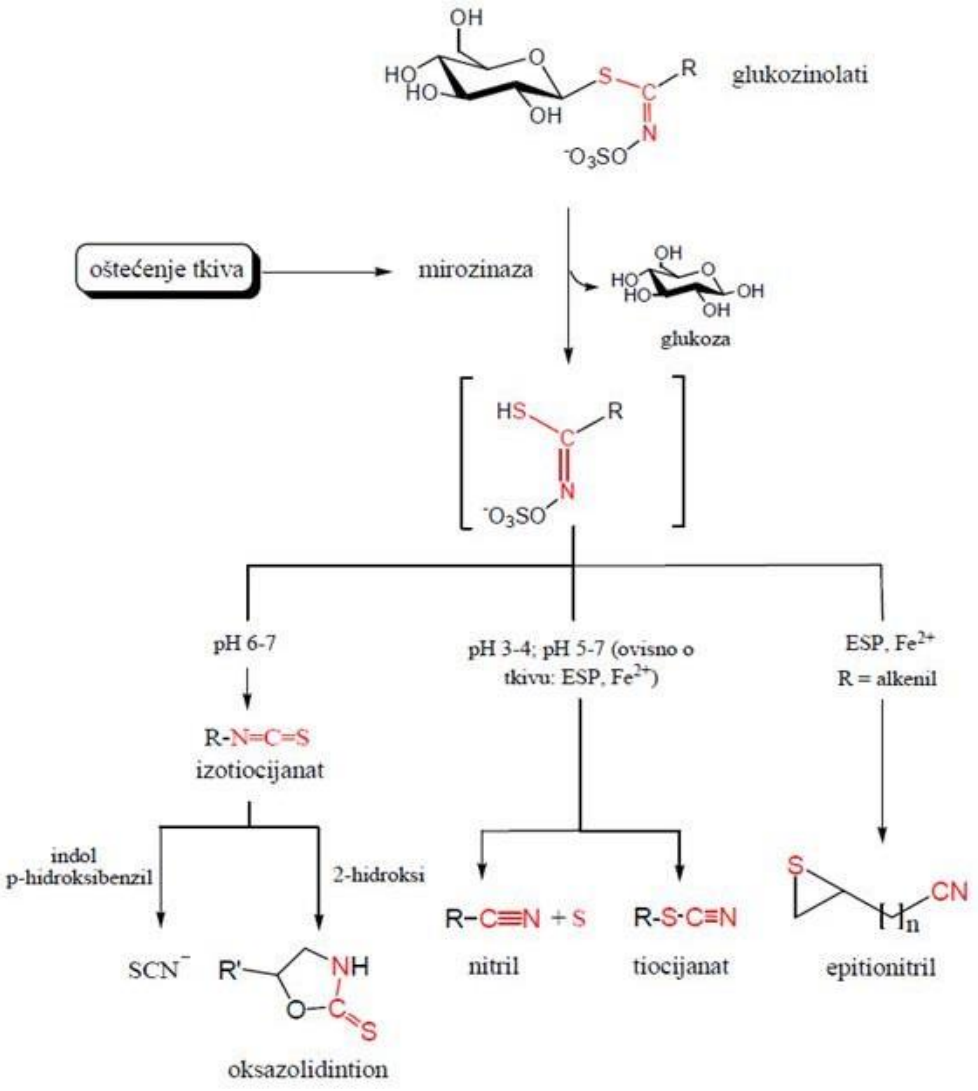
Kada se ošteti stanična struktura biljke koja sadrži glukozinolate, dolazi do razgradnje glukozinolata. Glukozinolati se mogu razgraditi enzimskom hidrolizom i termičkom razgradnjom. Razgradnja dovodi do nastajanja čitavog niza spojeva, koji uključuju nitrile, izotiocijanate, epitionitrile i vinil-oksazolidintione. Osim gore navedenih načina razgradnje, glukozinolati se mogu razgraditi i kemijski (djelovanjem kiseline ili baze).[4]

1.3.1. Enzimska razgradnja

Enzimska razgradnja glukozinolata katalizirana je enzimom mirozinazom (tioglukohidrolaza; EC 3.2.1.147.), a produkti razgradnje mogu biti različiti spojevi (npr. izotiocijanati, nitrili, tiocijanati i dr.). Sastav ovih spojeva ovisi o pH, metalnim ionima te epitiospecifičnom proteinu (ESP, slika 3.).[4]

Trivijalno ime mirozinaza označava skupinu, odnosno porodicu enzima sličnog djelovanja. Oni se ne razlikuju samo među različitim biljnim vrstama, već i u različitim dijelovima biljke. Mirozinaza i glukozinolati su odvojeni unutar biljke. Glukozinolati su vjerojatno sadržani u vakuolama, dok se mirozinaze nalaze u „mirozinskim stanicama“ koje su nađene u sjemenu, parenhinskom tkivu, epidermu i zaštitnim stanicama.[4,6]

Oštećenjem biljnog tkiva, dolazi do kontakta glukozinolata i mirozinaze, što rezultira brzim otpuštanjem produkata nastalih enzimskom hidrolizom glukozinolata. U reakciji hidrolize dolazi do cijepanja tioglukozidne veze (veza sumpor-glukoza) u molekuli glukozinolata te se oslobađaju glukoza, sulfat i aglikon. Oslobođeni aglikon je nestabilan te se spontano pregrađuje dajući različite razgradne produkte odgovorne za karakterističan okus i miris biljaka. Krajnji produkt pregradnje aglikona ovisi o strukturi bočnog lanca, uvjetima hidrolize (npr. pH-vrijednost) i prisutnosti kofaktora (npr. Fe^{2+}). Neki od produkata enzimske hidrolize glukozinolata su i biološki aktivni spojevi, a najznačajniji su izotiocijanati i indoli.[4,6]



Slika 3. Opća shema razgradnje glukozinolata te vrste razgradnih produkata.[4]

1.3.1.1. Razgradni produkti

Izotiocijanati

Izotiocijanati (R−N=C=S) su spojevi koji su se smatrali „normalnim“ produktima razgradnje glukozinolata. To su isparljivi spojevi, jakog okusa i arome koji nastaju pri neutralnom pH kada nestabilni aglikonski međuprodukt podliježe Lossenovoj pregradnji. Izotiocijanati su vrlo reaktivni, a zbog toksičnosti se smatraju pogodnima za pesticidnu aktivnost.[4,6]

Tiocijanati

Ponekad mogu nastati tiocijanati (RSCN), posebno u biljkama roda *Lepidium*. Smatra se da tiocijanati nastaju iz glukozinolata koji imaju specifične bočne lance (R) kao što su alil, benzil i 4-(metiltio)butilglukozinolati. Za nastanak tiocijanata, osim mirozinaze, potrebno je prisustvo još jednog enzima, tzv. tiocijanat formirajućeg proteina (TFP). Međutim uvjeti pod kojim nastaju tiocijanati nisu još dovoljno istraženi.[4,6]

Nitrili

Nastajanje nitrila (R−C≡N) ne zahtjeva pregradnju međuprodukta već samo gubitak sumpora iz molekule. Nastajanje nitrila ima prednost nad izotiocijanatima pri nižim pH vrijednostima (pH<4), a prisustvo Fe^{2+} ili tiolnih spojeva također povećava mogućnost nastanka nitrila.[4,6]

Indoli

Indolni spojevi nastaju hidrolizom indolnih glukozinolata, zajedno sa tiocijanatima. Mogu nastati i pod uvjetima koji pogoduju nastanku nitrila, a mogu nastati i reakcijskim putovima koji nisu vezani za razgradnju glukozinolata. Indoli su poznati po tome što sprječavaju rast tumora, posebno tumora dojke.[4,6]

1.4. Biološka aktivnost

Sami glukozinolati su biološki neaktivni spojevi. Razgradni produkti, nastali bilo enzimskom ili kemijskom razgradnjom, pokazuju biološko djelovanje i stoga su česti predmet istraživanja. Razgradnim produktima se pripisuju određena antikancerogena, antioksidacijska, antimikrobna i antifungalna djelovanja.[4,6]

Mnogi su znanstvenici u svojim istraživanjima pokazali da ljudi koji konzumiraju kupusnjače imaju smanjenu pojavu karcinoma. Istraživanja također upućuju na to da razgradni produkti modificiraju aktivnost enzima Faze I i Faze II, koji predstavljaju prvu obrambenu liniju organizma od kancerogenih tvari. Osim toga, inhibiraju rast tumora i stimuliraju apoptozu (programiranu smrt stanica).[4,6]

Glukozinolati i njihovi razgradni produkti se smatraju indirektnim antioksidansima. Njihova antioksidacijska aktivnost se temelji na modificiranju aktivnosti enzima metabolizma (Faza I i Faza II). Razgradni produkti glukozinolata pokazali su štetnu aktivnost na mikroorganizme poput bakterija, kvasaca i gljivica. Za razliku od razgradnih produkata, sami glukozinolati su fiziološki neaktivni.[4,6]

Iako imaju niz pozitivnih bioloških učinaka, određeni razgradni produkti pokazuju negativna svojstva (mutagenost, toksičnost, kancerogenost). Kod ljudi, prilikom konzumiranja hrane s visokim sadržajem glukozinolata, nije ustanovljen nijedan štetan učinak produkata njihove razgradnje na zdravlje. Iako prilikom unosa prevelikih doza može doći do štetnih učinaka.[4,6]

1.5. Metode izolacije isparljivih spojeva

Mirisne biljke sadrže isparljive spojeve, dok neke od njih sadrže eterična ulja koja su smjese isparljivih spojeva. Ovisno o vrsti biljke, različiti dijelovi biljke se mogu koristiti za izolaciju isparljivih spojeva. Klasične metode koje se primjenjuju za izolaciju isparljivih spojeva su destilacija i ekstrakcija. Međutim, danas se sve češće primjenjuju nove modernije metode poput mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije te ekstrakcije sa superkritičnim otapalima.

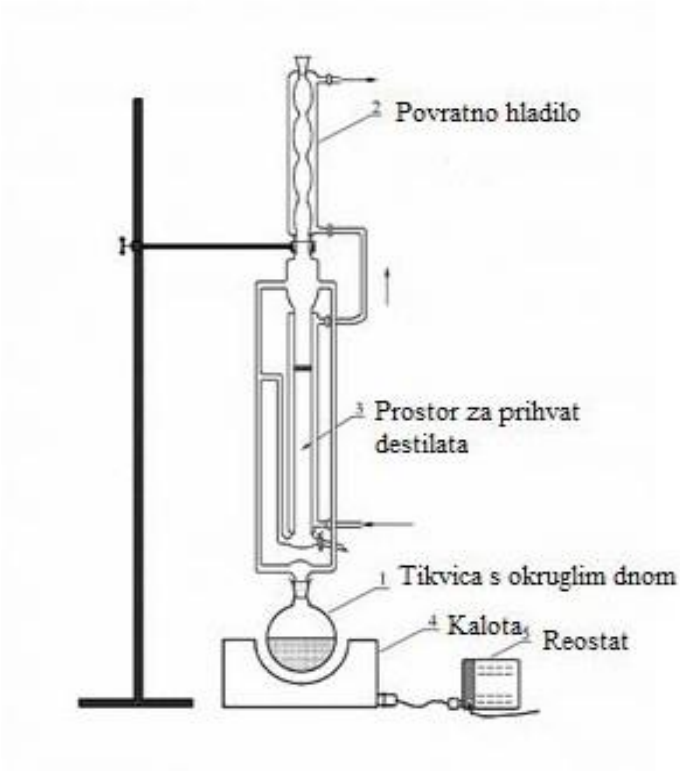
1.5.1. Destilacija

Destilacija je postupak koji služi za odjeljivanje ili pročišćavanje komponenti iz njihovih smjesa. Komponente u smjesi se odjeljuju s obzirom na razliku u temperaturi vrelišta. Razlikuje se vodena, vodeno-parna i parna destilacija. Sve tri metode se temelje na istim principima, a razlika je u kontaktu biljnog materijala i vode, odnosno vodene pare.[7]

1.5.1.1. Vodena destilacija

Vodena destilacija (hidrodestilacija) je najstarija metoda koja se koristi za izolaciju eteričnog ulja. Danas se koriste različite izvedbe aparatura, ovisno o tome koriste li se za izolaciju eteričnog ulja težeg ili lakšeg od vode. Standarne laboratorijske aparature za izolaciju eteričnih ulja hidrodestilacijom su: aparatura po Ungeru, aparatura prema Europskoj farmakopeji, aparatura prema Clevenger-u. [4]

Aparatura po Clevenger-u (slika 4.). omogućava odvajanje komponenti eteričnog ulja od vode na temelju razlika u polarnosti i topljivosti. Metoda podrazumijeva miješanje materijala, prethodno usitnjenog, s vodom uz zagrijavanje do vrenja. Pare koje izlaze kondenziraju se u hladilu i sakupljaju u središnjem dijelu aparature. Središnja cijev aparature je u donjem sloju ispunjena destiliranom vodom, a u gornjem organskim otapalom ili smjesom otapala (*trap*). Kada kondenzirana smjesa vode i komponenti eteričnog ulja prolazi kroz organsko otapalo, komponente eteričnog ulja se zadržavaju u njemu, a voda samo prolazi. Na taj način se prikuplja eterično ulje, koje se pipetom uklanja kroz gornji otvor, a voda se ispušta kroz pipac na dnu Clevengerovog nastavka.[4]



Slika 4. Modificirana aparatura po Clevengeru.[4]

1.5.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda izolacije neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute tvari pomoću otapala. Ekstrakcija bilja je proces odjeljivanja tvari iz biljnog materijala na temelju različite topljivosti u ekstrakcijskom sredstvu. Za ekstrakciju se koriste

neisparljiva i isparljiva otapala. Najčešće se kao otapalo koristi voda te organska otapala kao što su dietil-eter, diklormetan, pentan i petroleter.[7]

Osim klasičnih metoda ekstrakcije, danas su sve više prisutne moderne metode. Takve metode su: ultrazvučna i mikrovalna ekstrakcija te ekstrakcija subkritičnim i superkritičnim otapalima. Kao primjer zelene kemije posebno se ističe mikrovalna ekstrakcija.

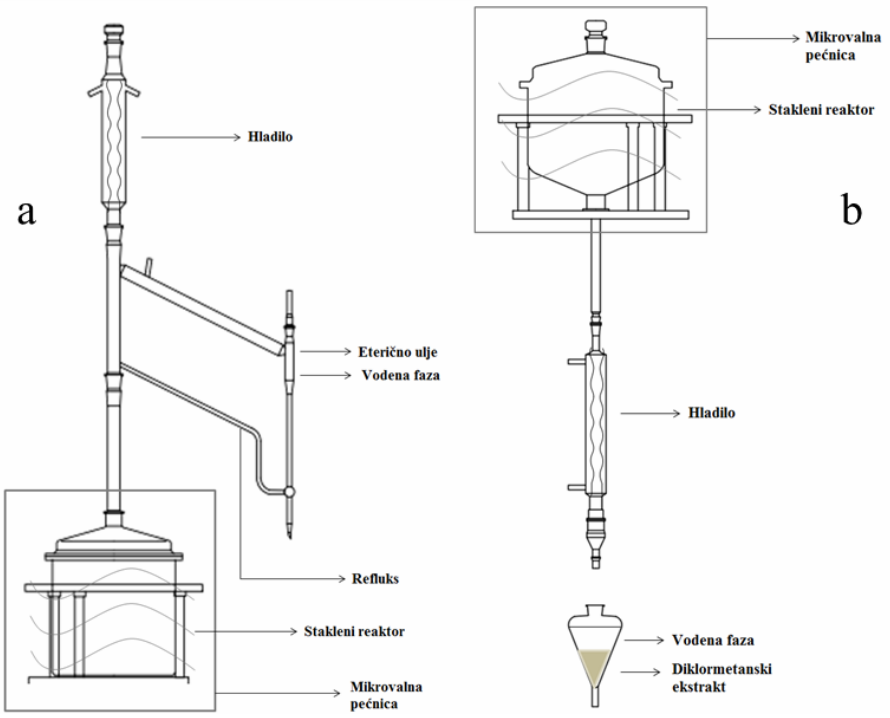
1.5.2.1. Mikrovalna ekstrakcija

Mikrovalovi su neionizirajući elektromagnetski valovi frekvencija između 300 MHz i 300 GHz, odnosno valnih duljina između 1 m i 1 mm, što ih smješta između infracrvenog i radiofrekventnog zračenja. Mikrovalovi imaju sposobnost prodiranja u biološki materijal i utječu na polarne molekule u biološkom materijalu (voda). U novije vrijeme razvijena je instrumentacija za izolaciju eteričnog ulja bez otapala (engl. *Solvent Free Microwave Extraction*, SFME). Patentirana je 2004. godine za izolaciju ulja iz biljnog materijala gdje se mikrovalno zračenje koristi za zagrijavanje. Riječ je o tehnologiji koja kombinira mikrovalno zračenje i suhu destilaciju u svrhu izolacije eteričnog ulja. Uređaj se sastoji od mikrovalne pećnice s komorom za biljni materijal te kondenzacijske jedinice koja je postavljena iznad mikrovalne komore, a povezane su priključnim kanalom (cijevi) formirajući vanjski dio zatvorenog sustava. Ova metoda ekstrakcije ima brojne prednosti u odnosu na klasične metode, a to su kraće vrijeme ekstrakcije, poboljšani ekstrakcijski prinos te mogućnost ekstrakcije bez korištenja otapala. Uz brojne pozitivne učinke, potrebno je obratiti pažnju na povišenu temperaturu koja može štetno utjecati na biološki aktivne spojeve.[7-10]

Programska podrška kontrolira i prikazuje sve parametre u realnom vremenu tijekom ekstrakcije: temperaturu, vrijeme i snagu. Biljni materijal ne treba biti smrvljen, većinu je moguće koristiti cjelovitog. Razlog tomu je što njegovim ozračivanjem mikrovalovima, voda prisutna u stanicama se zagrijava i isparava te dolazi do pucanja staničnih stjenki. Poluautomatski sustav za mikrovalnu destilaciju inspiriran je aparaturom po Clevenger-u (slika 5.a). Izrađen je od stakla i sastavljen od reaktora za biljni materijal, kondenzatora i modula za destilaciju. Modul za destilaciju omogućuje oporabu mirisa zahvaljujući odvajanju organske i vodene faze uz kontinuirano

odvođenje vode u reaktor. Ulje se jednostavno sakuplja na vodenom sloju na lijevoj strani modula za destilaciju.[8]

Godine 2008. osmišljena je nova tehnika zelene ekstrakcije koju je izradio Chemat i sur., nazvana mikrovalna hidrodifuzija i gravitacija za izolaciju aroma (engl. *Microwave Hydrodiffusion and Gravity*, MHG; slika 5.b). Konfiguracija omogućuje mikrovalnu ekstrakciju prirodnih aromatičnih tvari i nehlapljivih spojeva kao što su pigmenti, flavonoidi i karotenoidi. Ova originalna, "naopaka", mikrovalna tehnologija je kombinacija zagrijavanja mikrovalovima i gravitacije pri atmosferskom tlaku. Arome pri tome difundiraju izvan biljnog materijala te se vodeni ekstrakt silom gravitacije ispušta dok vanjski sustav hlađenja neprestano kondenzira ekstrakt.[8]



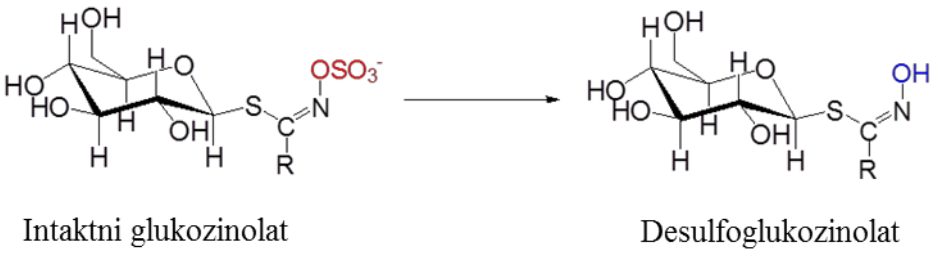
Slika 5. a) Sustav za mikrovalnu destilaciju eteričnih ulja; b) Sustav za mikrovalnu ekstrakciju aroma.[1,2]

1.5.3. Ekstrakcija glukozinolata

Glukozinolati su u zadnje vrijeme tema sve više istraživanja zbog njihovog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje. U skladu s tim razvijena je metoda ekstrakcije glukozinolata

iz biljnog materijala. Ova metoda se sastoji od ekstrakcije 70% metanolom, enzimske desulfatacije i HPLC analize dobivenih desulfoglukozinolata. Metoda uključuje nekoliko koraka, a to su priprema biljnog materijala, liofilizacija, sama ekstrakcija, pročišćavanje ekstrakata, separacija i u konačnici HPLC analiza.[11,12]

Desulfatacija se provodi uz pomoć enzima sulfataze. Sulfataza (EC 3.1.6.1.), izolirana iz puža vinogradnjaka (*Helix pomatia*, L.), odcjepljuje sulfatni ion iz molekule glukozinolata pri čemu nastaje desulfoglukozinolat (slika 6).[12]



Slika 6. Reakcijska shema desulfatacije glukozinolata.

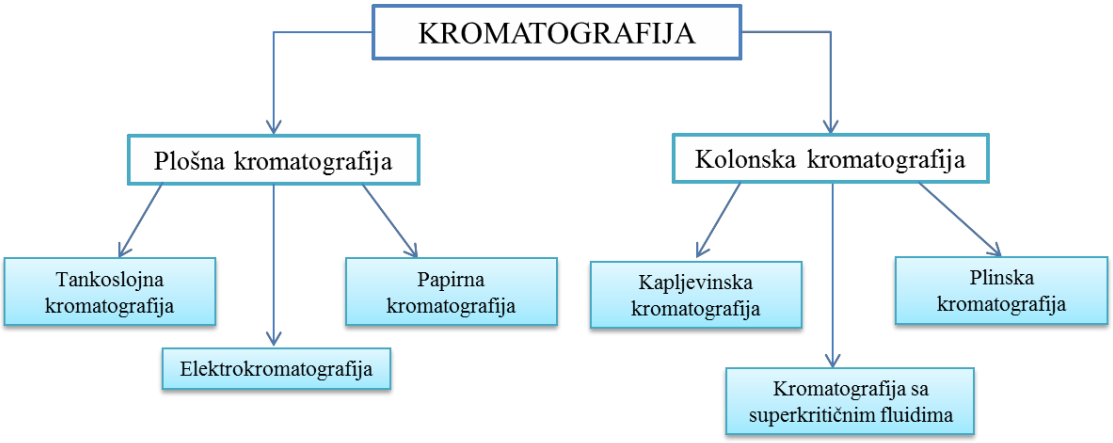
1.6. Metode identifikacije isparljivih spojeva

Prilikom analize i identifikacije isparljivih spojeva mogu se koristiti kromatografske (plinska i tekućinska kromatografija) i spektroskopske tehnike (UV, IR i NMR spektroskopija). Danas se najviše koristi kromatografija u sprezi sa spektrometrijom masa i kao takva služi za odjeljivanje komponenti te za njihovo kvantitativno i kvalitativno određivanje u smjesi.

1.6.1. Kromatografija

Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja koja se zasniva na različitoj raspodjeli komonenti uzoraka između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Ova metoda ima prednost nad ostalim metodama zato što omogućava brzu i potpuniju analizu. Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevina, a mobilna faza kapljevina ili plin. Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se odjeljuju.[7]

Kromatografske metode se mogu podijeliti u dvije osnovne grupe: plošna kromatografija i kromatografija na stupcu. Detaljna podjela kromatografskih tehnika prikazana je na slici 7.[13]

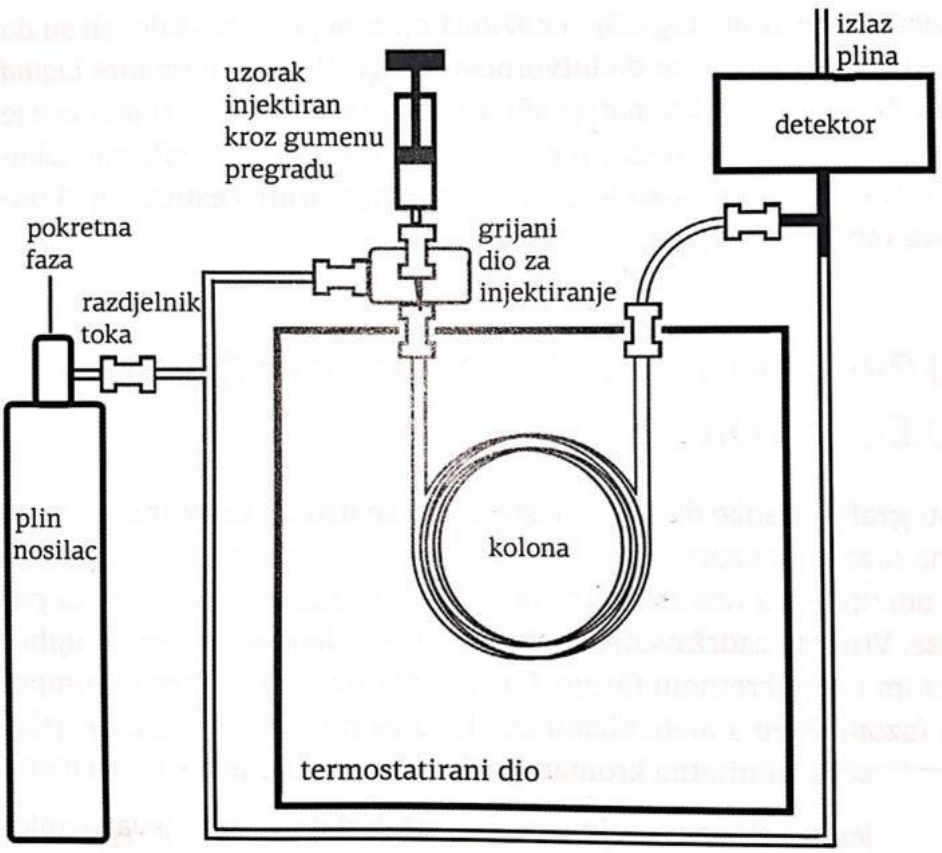


Slika 7. Podjela kromatografskih tehnika prema obliku sustavu.

1.6.1.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena tehnika odjeljivanja isparljivih spojeva. Ona predstavlja brzu metodu odjeljivanja, koja je pogodna i u situacijama kad je dostupna vrlo mala količina uzoraka.[7]

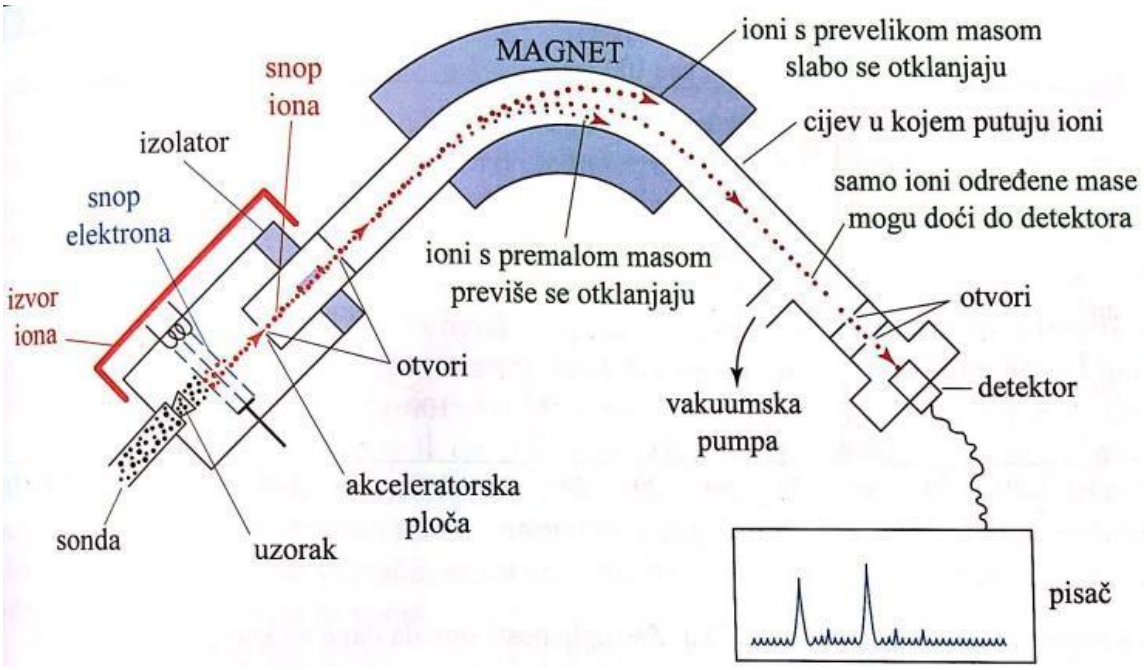
Pokretna faza je kemijski inertan plin, argon, helij, dušik ili ugljikov dioksid. Nepokretna faza je nehlapljiva tekućina nanesena na kruti nosač. Injektor, kolona i detektor su grijani na temperature koje omogućuju plinovito stanje uzorka, s time da su injektor i detektor grijani na više temperature od kromatografske kolone kako bi se postiglo brzo uplinjavanje pri injektiranju i spriječila kondenzacija dolaskom na detektor. Komponente uzorka koje se eluiraju s kolone određuju se na detektoru te je moguće njihovo kvalitativno i kvantitativno određivanje. Mjerenjem vremena zadržavanja te usporedbom s onima standarda, moguće je kvalitativno odrediti o kojem je spoju riječ. Površina ispod kromatografske krivulje predstavlja kvantitativan signal i recipročna je koncentraciji promatrane komponente. Plin kao mobilna faza kreće se vrlo brzo kroz kolonu pa je za mjerenje potrebno nekoliko minuta u odnosu na ostale kromatografske tehnike. Automatsko bilježenje signala na spregnutom detektoru, vrlo mali volumeni uzoraka te kratko vrijeme snimanja (ili mjerenja) čine plinsku kromatografiju iznimno popularnom, a vrlo često i jedinom mogućom tehnikom.[14]



Slika 8. Shematski prikaz plinskog kromatografa.[14]

1.6.2. Spektrometrija masa

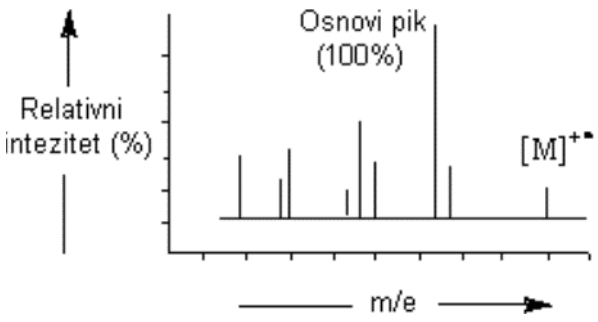
Spektrometrija masa je tehnika koja se koristi za ispitivanje kemijskih vrsta. Ovom tehnikom se analiziraju molekule na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z). Glavni dijelovi spektrometra masa su ionizator, analizator i detektor (slika 9.).[7]



Slika 9. Shema spektrometra masa.[15]

Plinoviti uzorak ulazi u ionizator gdje se u slučaju elektron-ionizacije bombardira elektronima energije 50-70 eV. Nastaje molekulski kation M^+ koji se dalje razlaže na čitav niz fragmenata. Fragmenti koji nastaju ovise o strukturi molekule i iznosu energije elektrona kojima se bombardira molekula. Na ovaj način se u ionizatoru stvara ionski snop. Dobiveni ioni se razvrstavaju u analizatoru na temelju intenziteta i veličine m/z, a razvrstavanje se vrši propuštanjem kroz promjenjivo magnetsko ili električno polje. Ionski snop se fokusira kroz leće i dolazi do četveropolnog filtra masa, sastavljenog od četiri elektrode koje su paralelne s ionskim snopom. Kroz filter masa mogu proći samo ioni koji su postigli stabilnu putanju, a ostali se uklanjaju (filtriraju). Osciliranjem iona, većina ih se izgubi udaranjem u jednu od elektroda gdje se izbijaju. Preostali ioni određenog omjera m/z usmjeravaju se do detektora spektrometra masa.[4,16]

Kao rezultat analize dobije se spektar masa koji prikazuje odnos intenziteta i omjera m/z nastalih fragmenata (slika 10.). Najviši signal (osnovni pik) predstavlja standard prema kojem se određuje udio fragmenata koji su formirali ostale signale.

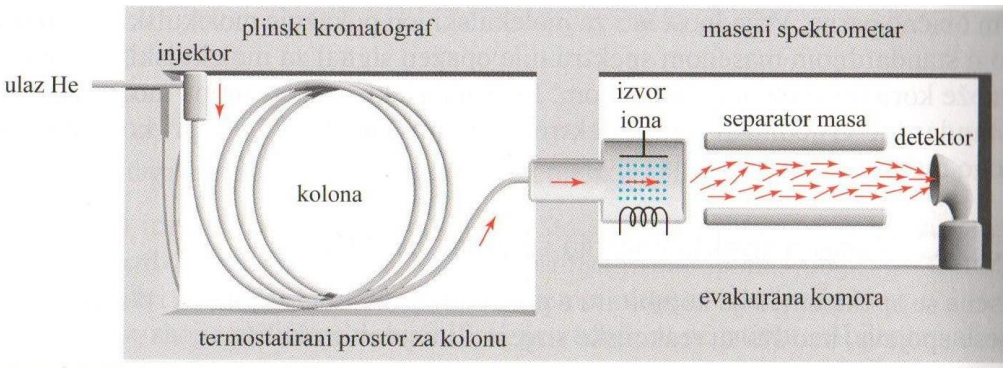


Slika 10. Spektar masa.[4]

1.6.3. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa

Vezana tehnika plinska kromatografija-spektrometar masa (GC-MS) omogućava dobivanje maksimuma podataka uz korištenje minimalne količine materijala. Plinska kromatografija je odlična tehnika za odjeljivanje i kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje. Stoga se za kvalitativno određivanje koristi masena spektrometrija. S pomoću GC-MS-a dobivaju se karakteristična retencijska vremena koja upućuju na moguće spojeve, a njihova struktura se može potvrditi usporedbom s retencijskim vremenom i masenim spektrom poznatog uzorka. Budući da GC-MS obuhvaća i odjeljivanje sastojaka na GC-u, može se primjenjivati i za analizu onečišćenih uzoraka spojeva ili smjesa.[4,15]

Na slici 11. prikazana je pojednostavljena shema GC-MS-a. U plinskom se kromatografu koriste zagrijane kapilarne kolone ispunjene stacionarnom fazom za odvajanje komponenata. Mala količina uzorka se ubacuje u zagrijani injektor, gdje ga lagani protok mobilne faze (npr. helij) unosi u kolonu. Uzorak prolazi kroz kolonu, pri čemu isparljivije komponente (koje se slabije vezuju za stacionarnu fazu) prolaze brže od onih koje su manje isparljivije. Razdvojene komponente izlaze s kolone u različitim vremenima i prenose se u ionizacijsku komoru masenog spektrometra, gdje se ioniziraju i fragmentiraju. U sustavu se najčešće koristi kvadropolni analizator masa. Kombinacijom plinske kromatografije i masene spektrometrije omogućeno je odjeljivanje komponenata smjesa u plinskom kromatografu te njihova identifikacija prema masenim spektrima koji se nalazi u Wileyevoj bazi masenih spektara.[4,15]



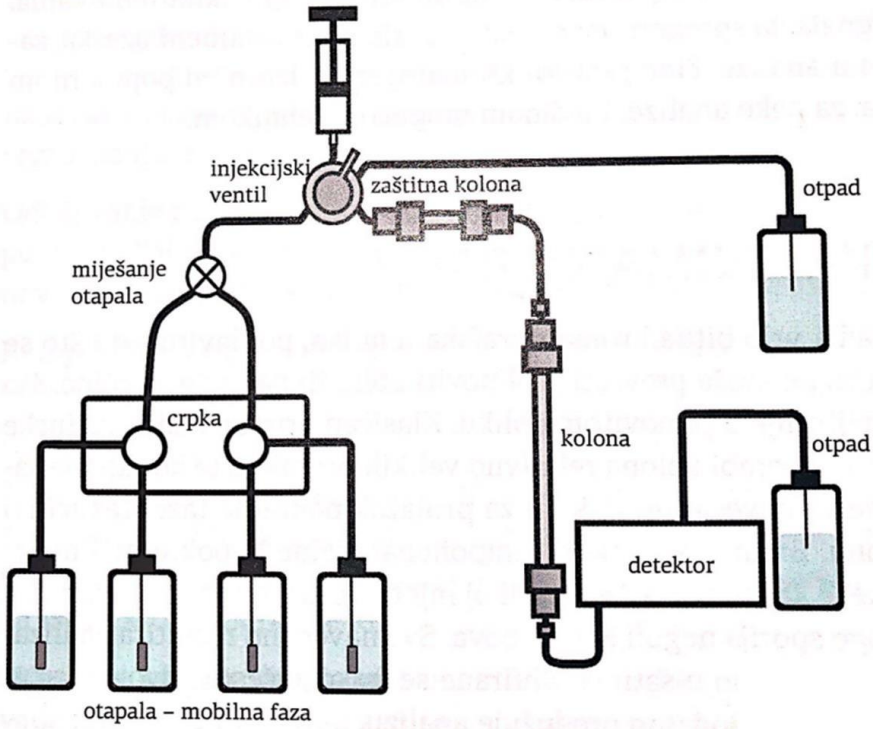
Slika 11. Shematski prikaz vezanog sustava GC-MS-a.[15]

1.6.4. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) je vrlo važna kromatografska tehnika budući da se velik broj spojeva, oko 85 %, ne može prevesti u plinovito stanje ili nisu stabilni.[14] Postoje dvije vrste tekućinske kromatografije, klasična i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Kod klasične kromatografije se koriste velike kolone ispunjene poroznom stacionarnom fazom, dok mobilna faza prolazi gravitacijski čime je protok malen, što je mana tehnike. Zbog toga se u većini slučajeva koristi suvremenija analitička tehnika HPLC kod koje se koristi pumpa za dovođenje mobilne faze te se zbog toga postiže bolje razdvajanje komponenti.[17]

1.6.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

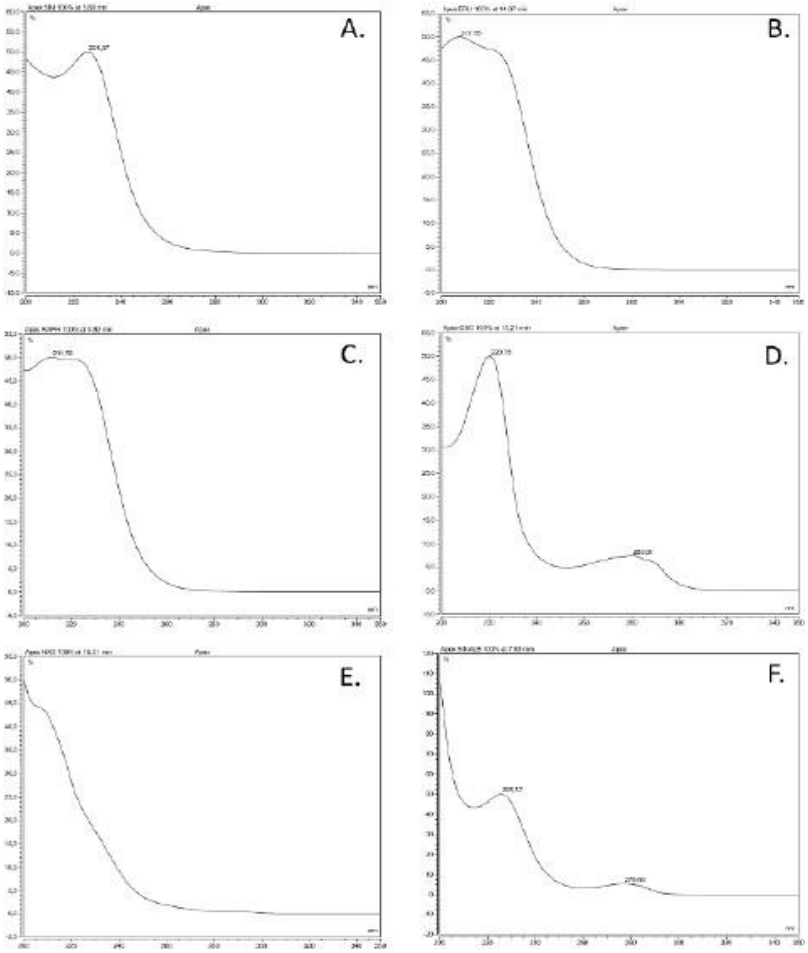
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je vrsta tekućinske kromatografije na stupcu uz upotrebu visokih tlakova za postizanje velikih brzina protoka. Potreba bržeg i djelotvornijeg odjeljivanja zahtjeva korištenje složene instrumentacije koja se sastoji od spremnika mobilne faze, injektora, kolone, pumpe koja pokreće mobilnu fazu kroz kolonu, detektora i sustava za obradu otpada (slika 12.).[14,18]



Slika 12. Shematski prikaz HPLC uređaja.[14]

Kod tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti tekući uzorak se injektira u tekuću mobilnu fazu. Sustav za opskrbu mobilnom fazom uvijek sadrži pumpu koja omogućava postizanje visokog tlaka te sustav koji omogućuje miješanje otapala. Otapala koja se koriste kao mobilna faza moraju biti visoke čistoće i mjehurići zraka moraju biti uklonjeni iz njih. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u nekom omjeru (npr. voda, metanol i druga organska otapala). Sustav za injektiranje omogućava precizno injektiranje točno određenog volumena tekućeg uzorka u kolonu. Volumeni uzoraka se kreću se od 0,5 μL do 5,0 mL. Kolona, promjera između 2,1 i 4,6 mm te dužine od 30 do 300 mm, punjena je česticama stacionarne faze različitog kemijskog karaktera. Ispred glavne kolone se postavljaju kraće predkolone istog punila kako bi se postiglo bolje razdvajanje komponenti, ali i sa ciljem zaštite glavne kolone. Detektori kao i kod plinske kromatografije mogu pružiti i kvalitativan i kvantitativan signal. Kao detektori se najčešće koriste UV-VIS, UV-VIS-DAD ili MS detektori, ali mogu se koristiti i fluorescentni, elektrokemijski detektori i dr.[14,18]

Na slici 13. prikazani su UV apsorpcijski spektri (200-350 nm) različitih desulfoglukozinolata (dGSL), koji su predstavnici najčešćih strukturnih klasa tih spojeva.[12]



Slika 13. UV spektri najčešćih grupa glukozinolata: (A) alkenilni, (B) tioalkenilni, (C) sulfinilni, (D) indolni, (E) i (F) aromatski.[12]

1.7. Brassicaceae

Kupusnjače (lat. *Brassicaceae*) su biljna porodica koja spada u razred dvospunica (Eudicotiledona). Porodica obuhvaća više od 350 rodova i preko 3200 vrsta koje su uglavnom rasprostranjene u umjerenom klimatskom području (Sredozemlje), ali ih je moguće pronaći gotovo po čitavoj Zemlji.[4,19]

Stari naziv krstašice (lat. *Cruciferae*) su dobile prema krstastom rasporedu latica u cvjetovima. Porodica je okarakterizirana jednostavnom građom pravilnih i dvospolnih cvjetova koji se sastoje od 4 lapa čaške, 4 latice, 6 prašnika (4 duža unutarnja i 2 kraća vanjska). Vjenčić je obično pravilan, bijele, žute, narančaste, purpurno crvene ili plave boje. Plodovi su uglavnom komuške različitog oblika. Za cijelu porodicu je

karakteristična ljutina koja potječe od glukozinolata. Djelovanjem enzima mirozinaze oni daju niz produkata koji su odgovorni za gorko-ljuti okus.[4,19]

Porodici pripadaju dobro poznate vrste koje se koriste u svakodnevnoj prehrani, imaju široku primjenu u industriji, medicini i gospodarstvu. Mnoge krstašice se uzgajaju od najranijih početaka ljudske civilizacije, čak i od prije 8000 godina. Najznačajnije povrće i krmne biljke porodice jesu pojedine svojte roda *Brassica*, s golemim brojem varijeteta. Osobito je raznolik kompleks varijeteta kupusa (*Brassica oleracea* L.). Kupus i njegov bliski srodnik kelj vjerojatno se uzgajaju dulje od 4000 godina na području istočnog Sredozemlja i u Maloj Aziji. Rimljani su vjerovali da kupus liječi od melankolije te da je božanskog podrijetla, tj. da je nastao od Jupiterovih kapi znoja izlučenih dok se mučio tumačenjima dvaju proročanstva. Značajna uljarica je uljana repica (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera* (DC.) Janch.) od koje se upotrebljavaju sjemenke za potrebe proizvodnje jestivog ulja, margarina te u novije vrijeme značajan je izvor sirovina za proizvodnju tzv. biogoriva. Iako se krstašice ne mogu mjeriti s mahunarkama ili travama po svojem značenju u čovjekovoj prehrani, čine vrlo značajnu komponentu poljoprivredne djelatnosti mnogih zemalja.[4,19]

1.7.1. Strižuša (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.)

Znanstveni naziv roda potječe od grčke riječi *sisymbrion* kojom su stari Grci nazivali aromatične biljke posvećene božici Veneri, koje su smatrali protuotrovima svim otrovima. Ljekoviti oranj ili još poznata kao strižuša je jednogodišnja ili dvogodišnja zeljasta biljka iz porodice kupusnjača, visine 5-100 (130) cm. Korijen je tanak, a stabljika kruto uspravna, obično pravilno razgranjena i obrasla unatrag savinutim čekinjastomaljavim dlakama. Izmjenični listovi su uglavnom perasto razdijeljeni, dugi 3 do 6 cm. Cvatovi – grozdovi sastavljeni od velikog broja sitnih cvjetova na tankim stapkama, smješteni su na vrhovima stabljike i postranih ogranaka. Cvjetovi su građeni na temelju broja četiri. Latice su blijedožute, za polovinu duže od lapova. Cvate od svibnja do srpnja. Plod je štapićasta komuška prilegla uz stabljiku, obično s 5 do 10 sjemenki. Raste na suhim i toplim ruderalnim mjestima, u naseljima, uz ceste i putove, na gradilištima, nasipima, zidovima, obalama rijeka i sličnim staništima, kako na priobalju tako na kontinentu. Najvjerojatnije potječe sa Sredozemlja, ali je udomaćena vrsta u najvećem dijelu Europe i Azije.[20]

U narodnoj medicini (lat. *officinalis*, ljekovit) širom Europe oranj je služio u liječenju skorbuta i bolesti grla pa se u nekim jezicima naziva „pjevačevom biljkom“. Ljekoviti oranj je diuretična, tonična i laksativna biljka pa se i danas rabi za liječenje bronhitisa i želučanih tegoba. Od davnina se oranj uzgaja zbog upotrebe u kulinarstvu, kao salate (listovi) i začini (sjemenke) zahvaljujući njegovom intenzivnom mirisu. Listovi imaju nagorkast okus, sličan onomu kupusa, a sjemenke su bogate masnim uljem koje se iz njih i komercijalno dobiva. U zapadnoj Europi su rabljene da bi se dobila zamjena za senf. Korijenje ornja otpušta alkalijske tvari pa se preporučuje i sadnja u svrhu ublažavanja kiselosti tla.[20]

Slika 14. *Sisymbrium officinale* (L.) Scop.[21]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Kemikalije i aparatura

Kemikalije:

- Pentan, BDH PROLABO, Ujedinjeno Kraljevstvo,
- Diklormetan, T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska,
- Dietil-eter, PanreacQuimica S.L.U., Barcelona, Španjolska,
- Bezvodni natrijev sulfat, BDH PROLABO, Ujedinjeno Kraljevstvo,
- Natrijev klorid, T.T.T., Sveta Nedelja, Hrvatska,
- Metanol (70 %), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska,
- Klorovodična kiselina (25 %), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska,
- Natrijev acetat, Merck, Darmstadt, Njemačka,
- Dekstran (DEAE – sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Ultračista voda,
- Sinigrin hidrat, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Sulfataza (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Aposlutni etanol, Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska.

Aparatura:

- Električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika,
- Tehnička vaga, Kern&Sohn, Njemačka,
- Lijevak za odjeljivanje, Deotto lab, Hrvatska,
- Modificirana aparatura po Clevengeru, Deotto lab, Hrvatska,
- Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju, Ethos X; Milestone Srl, Italija,
- Uređaj za pripravu ultračiste vode,
- Magnetska mješalica, Heidolph MR Hei-End, Njemačka,
- pH metar, Hanna instruments HI 9321, SAD,
- Centrifuga, Nuve, NF 1200R, Turska,
- Vortex, Dragon lab, Peking, Kina,
- Ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka,
- Vodena kupelj, Julabo, Seelbach, Njemačka,
- Centrifuga, IKA-Werke GmbH&Co. KG, Staufen, Njemačka,

- Uređaj za uparavanje strujom dušika, Dri-Block DB100/3, Techne, Ujedinjeno Kraljevstvo,
- GC-MS, 3900/2100T, Varian Inc., Lake Forest, Kalifornija, SAD,
- HPLC-DAD, 1090 Series II, Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornija, SAD.

2.2. Biljni materijal

2.2.1. Strižuša

Biljni materijal (slika 15.) je sakupljen 14. svibnja 2019. na području Splita, točnije kod zgrade Tri Fakulteta te na području rijeke Krke. Čuvan je na sobnoj temperaturi, a potom je obrađen, posebno materijal iz Splita i sa Krke, nakon nekoliko dana. Materijal je obrađen na način da je usitnjen te podijeljen na 3 dijela. Prvi dio je obrađen mikrovalnom destilacijom (MW - "fragrance"), drugi mikrovalnom ekstrakcijom (MW - „flavour“), a treći dio biljnog materijala iskorišten je za klasičnu hidrodestilaciju u modificiranoj aparaturi po Clevenger-u.

Slika 15. *Sisymbrium officinale* (L.) Scop.

Točne odvage biljnog materijala koje su korištene u određenim metodama izolacije prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Masa biljnog materijala.

METODA	MASA (g) -Split-	MASA (g) -Krka-
MW Destilacija	200,00	110,21
MW Ekstrakcija	152,37	113,39
Hidrodestilacija	200,81	-
Autoliza	15,00	10,43

Također, dio sabranog materijala je osušen te podijeljen na četiri dijela (slika 16.) cvijet, stabljika, list i korijen. Kao takav, obrađen je na način da je samljeven i prosijan (slika 17.) te upotrebljen za izolaciju glukozinolata metodom ekstrakcije uz desulfataciju. U tablici 3. se nalaze točne odvage pojedinih dijelova biljnog materijala.

Tablica 3. Masa suhog biljnog materijala za izolaciju glukozinolata ekstrakcijom uz desulfataciju.

Ekstrakcija glukozinolata		
BILJNI DIO	**MASA (mg) -Split-**	**MASA (mg) -Krka-**
Korijen	100,11	100,07
Stabljika	100,15	100,18
List	100,05	100,05
Cvijet	100,15	100,07

Slika 16. Uzorci biljnog materijala podijeljeni na četiri dijela.

Slika 17. Uzorci biljnog materijala nakon mljevenja i prosijavanja.

2.3. Metode izolacije

2.3.1. Mikrovalna ekstrakcija

Aparatura za mikrovalnu ekstrakciju se sastoji od dva dijela, što omogućava dvije vrste izolacije iz biljnog materijala. Biljni materijal strižuše je obrađen na oba načina, mikrovalnom destilacijom i mikrovalnom ekstrakcijom.

Gornji dio aparature (slika 18.) omogućava izolaciju hlapljivih spojeva (engl. *fragrance*). Kako se radi o procesu mikrovalne destilacije, konačni produkt je eterično ulje. Za razliku od hidrodestilacije, destilacija potpomognuta mikrovalovima ima određene prednosti, a to su kraće vrijeme destilacije i nema upotrebe organskog otapala.

Slika 18. Uređaj za mikrovalnu destilaciju (gornji dio, engl. *fragrance*).

Usitnjeni biljni materijal se stavi u staklenu tikvicu. Na tikvicu se poveže sustav za refluks pa hladilo. Po završetku destilacije hlapljivi spojevi odvoje se pomoću male količine pentana. Uvjeti pri kojima se izvodi destilacija: snaga od 500 W i temperatura

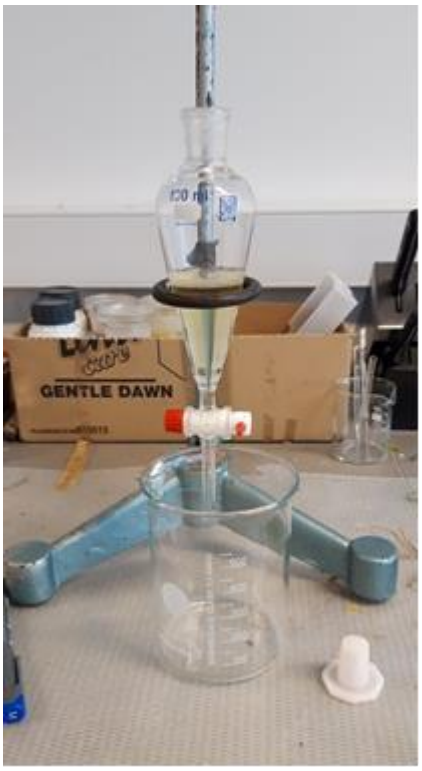
98 °C u trajanju od 35 minuta. Nakon završetka destilacije, sloj pentana i hlapljivih spojeva se odvoji u čistu čašu, a ostatak vode ispusti preko pipca. Doda se bezvodni natrijev sulfat u slučaju da ima zaostale vode. Zatim se eterično ulje prebaci u prethodno izvaganu bočicu. Dio organskog otapala zaostalog u uzorku se ukloni uparivačem u struji dušika nakon čega ide na GC-MS analizu. Uzorak se do analize čuva u zamrzivaču.

Slika 19. Biljni materijal poslije mikrovalne destilacije**.**

Donji dio aparature (slika 20.) primjenjuje se za izolaciju aroma (engl. *flavour*). Ovdje je slučaj mikrovalne ekstrakcije bez dodatka organskog otapala. Uz pomoć mikrovalova i djelovanjem gravitacijske sile, u čaši postavljenoj na dnu aparature, sakuplja se ekstrakt. Uvjeti za mikrovalnu ekstrakciju su identični onima za mikrovalnu destilaciju (500 W, 98 °C, 35 min).

Slika 20. Mikrovalna ekstrakcija uz gravitacijsku silu (donji dio, engl. *flavour*).

Po završetku ekstrakcije dobiveno je oko 250 mL ekstrakta koji se prelije u lijevak za odijeljivanje te se ekstrahira s 10 mL diklormetana 3 puta. Diklormetanski sloj se odvoji, ispusti preko pipca te suši s bezvodnim natrijevim sulfatom. Konačni ekstrakt prebaci se u prethodno izvaganu bočicu te se višak organskog otapala otkloni uparivanjem u struji dušika kao i u slučaju mikrovalne destilacije. Tako dobiveni uzorci se čuvaju u zamrzivaču (-20 °C) do GC-MS analize.



Slika 21. Obrada ekstrakta nakon mikrovalne ekstrakcije.

2.3.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Klasična ekstrakcija iz biljnog materijala strižuše napravljena je kako bi se rezultati usporedili s rezultatima mikrovalne ekstrakcije.

Usitnjeni i izvagani biljni materijal stavi se u tikvicu s ravnim dnom i prekrije s destiliranom vodom. Doda se enzim mirozinaza kako bi se poboljšala sama izolacija glukozinolata iz biljnog materijala. Tikvicu se potom začepi i obloži parafilmom te ostavi 24 sata na sobnoj temperaturi.

Najprije se doda 10 mL diklormetana direktno u tikvicu s biljnim materijalom, nakon toga se smjesa filtrira. Filtrat se prebaci u lijevak za odjeljivanje te ga se ekstrahira s još dva obroka po 10 mL diklormetana. Diklormetanski sloj se potom odvoji i suši s bezvodnim natrijevim sulfatom i odekantira u prethodno izvaganu bočicu. Višak organskog otapala se ukloni u struji dušika te je tako pripremljen uzorak za GC-MS analizu.

2.3.3. Hidrodestilacija

Zbog usporedbe s mikrovalnom destilacijom provedena je i klasična hidrodestilacija iz biljnog materijala strižuše.

Hidrodestilacija (slika 22.) biljnog materijala se odvijala u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata. Kao *trap* se koristila smjesa organskih otapala pentana i dietil-etera u omjeru 3:1. Proces hidrodestilacije je prethodno opisan u općem dijelu rada pod poglavljem 1.5.1.1. Eterično ulje koje je dobiveno nakon destilacije se odvoji od vodenog sloja pomoću propipete te osuši s bezvodnim natrijevim sulfatom kako bi se uklonio višak vode. Zatim se eterično ulje prebaci u prethodno odvaganu bočicu i spremi u zamrzivač do analize na GC-MS-u.

Slika 22. Hidrodestilacija strižuše.

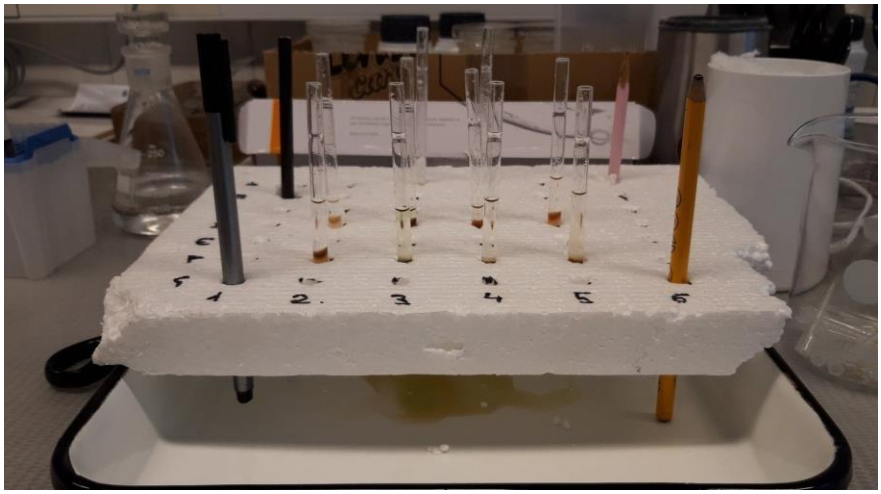
2.3.4. Ekstrakcija glukozinolata uz desulfataciju

Protokol za izolaciju glukozinolata uz desulfataciju koji je korišten u ovom radu je identičan onom u diplomskom radu kolegice Dine Vlajčević pod nazivom *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata.*[1] Odvaže se po 100 mg svakog dijela biljke i doda po 1 mL metanola kao ekstrakcijskog otapala. Smjesa se homogenizira koristeći homogenizator (15000 okretaja u trajanju 1 min) kako bi se oštetile stanične stijenke i povećala ekstrakcijska sposobnost. Tubice s homogeniziranom otopinom se potom zagriju na 90 °C (slika 23.) toliko kratko da započne vrenje metanola, a samim time se inaktivira enzim mirozinaza te spriječi razgradnja glukozinolata.

Slika 23. Zagrijavanje tubica u vodenoj kupelji.

Dodatno, ekstrakcija se poboljšava djelovanjem ultrazvuka u ultrazvučnoj kupelji. Sljedeći korak je centrifugiranje i odijeljivanje dobivenog supernatanta od istaloženog biljnog materijala. Postupak se ponavlja još jednom dodatkom novog obroka metanola u zaostali biljni materijal. Združeni ekstrakti sadržavaju intaktne glukozinolate, ali i ostale ekstrahirane spojeve prisutne u biljnom materijalu te zahtjevaju pročišćavanje i u konačnici desulfataciju čime je uzorak pripremljen za analizu tekućinskom kromatografijom.

Pročišćavanje se provodi na kolonicama od staklenih kapaljki ispunjenih prvotno samljevenim filter papirom, ali i slojem dekstran gela. Ekstrakt se nanosi na kolonu te se pročišćava dodatkom metanola, što uklanja različite polarne tvari kao što su klorofil, a metanol se uklanja ultračistom vodom (slika 24.). Nanošenjem pufera ostvaruju se uvjeti za djelovanje enzima sulfataze. Nakon dodatka enzima, kolone se ostavljaju preko noći na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi te se sutradan desulfatirani glukozinolati eluiraju u pripremljene tubice. Tako pripremljeni uzorci spremni su za analizu.



Slika 24. Kolone za ekstrakciju glukozinolata.

2.4. Metode analize

2.4.1. GC-MS analiza

Za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju hlapljivih sumporovih spojeva koristi se vezani sustav plinske kromatografije (Varian model 3900) i spektrometrije masa (Varian model 2100 T, slika 25.) proizvođača Varian Inc., Lake Forest, CA, USA. Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS (30 m x 0,25 mm) sa slojem stacionarne faze debljine 0,25 µm. Plin nositelj je helij, dok je protok postavljen na 1 mL/min. Zadana temperatura injektora je 250 °C, a volumen injektiranog uzorka iznosi 1 µL. Temperaturu kolone se postavi na sljedeći način: 3 min izotermno na 60 °C, zatim je uslijedilo zagrijavanje do 246 °C brzinom od 3 °C/min te zadržavanje na navedenoj temperaturi u trajanju 25 min. Energija ionizacije uzorka u spektrometru masa iznosi 70 eV, temperatura izvora iona je postavljena na 200 °C, dok područje skeniranja obuhvaća 40-350 masenih jedinica.[1]

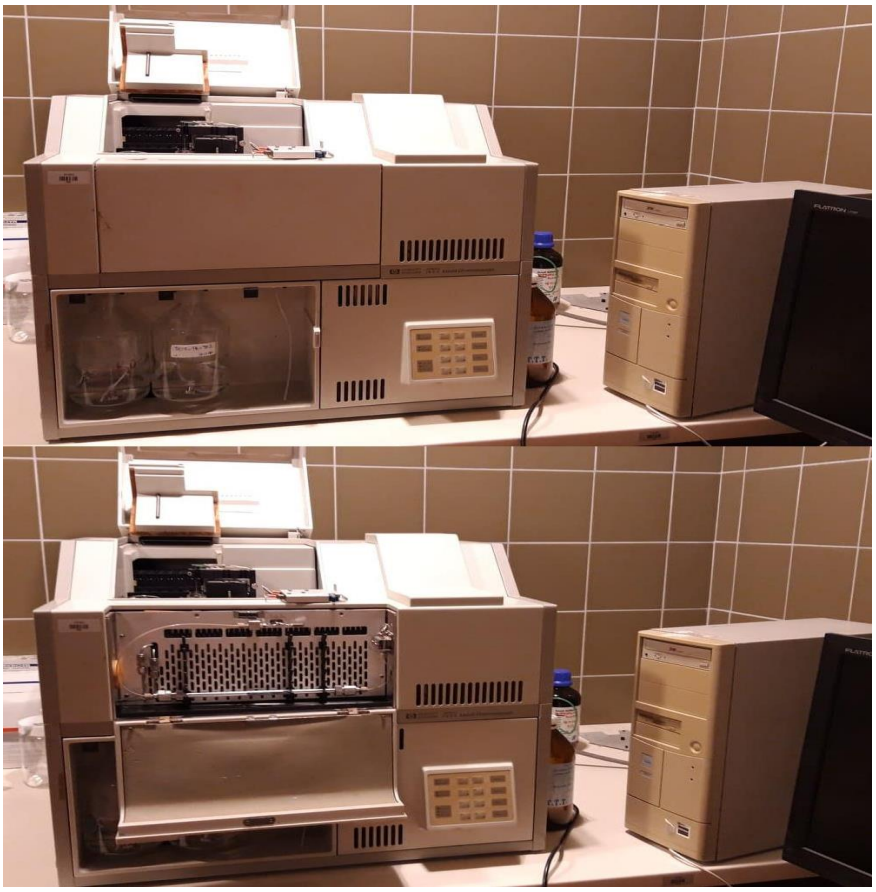
Slika 25. GC-MS uređaj (Varian, SAD).

2.4.2. HPLC

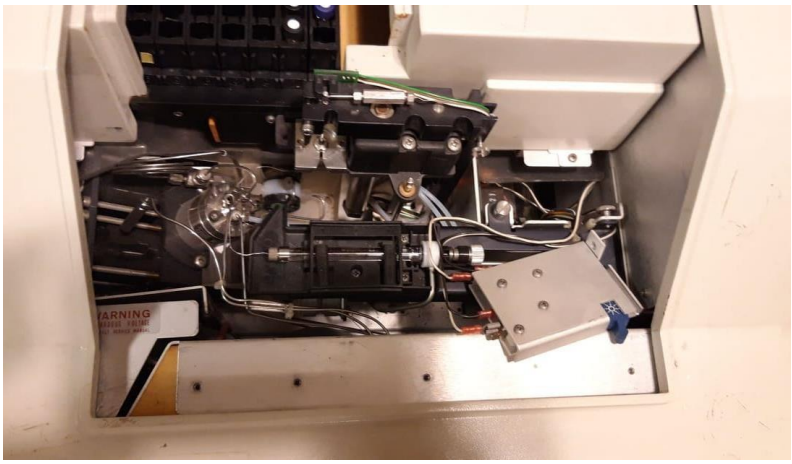
Za analizu desulfoglukozinolata dobivenih ekstrakcijom uz desulfataciju koristi se vezani sustav HPLC-DAD, Hewlett Packard 1090 Series II (slika 26.). Koristi se kolona NUCLEOSIL C-18 (250 mm x 4 mm) s promjerom čestica 5 µm (Macherey - Nagel, Düren, Njemačka). Kao pokretna faza koristi se smjesa vode i acetonitrila gdje je postavljen protok od 0,8 mL/min. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 µL. Za detekciju pojedinih spojeva koji izlaze iz kromatografske kolone korišten je UV-DAD detektor (λ=227 nm). Radna temperatura je sobna, a vrijeme trajanja analize iznosilo je 60 minuta. U tablici 4. prikazan je sastav mobilne faze koji je korišten za analizu HPLC-om.

Tablica 4. Sastav mobilne faze korištene za HPLC analizu desulfoglukozinolata.

Vrijeme (min)	Voda (%)	Acetonitril (30%)	Gradijent
Početni uvjeti	100	0	-
0,5	96	4	-
28,0	14	86	Linearno
4,0	14	86	-
2,0	5	95	Linearno
13,0	5	95	-
1,0	96	4	Linearno
8,0	96	4	-
0,0	0	100	-



Slika 26. HPLC uređaj (Hewlett Packard 1090 Series II).



Slika 27. HPLC uređaj (injekcijski blok - šprica, igla, ventil i autosampler).

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Razgradnja glukozinolata i GC-MS analiza

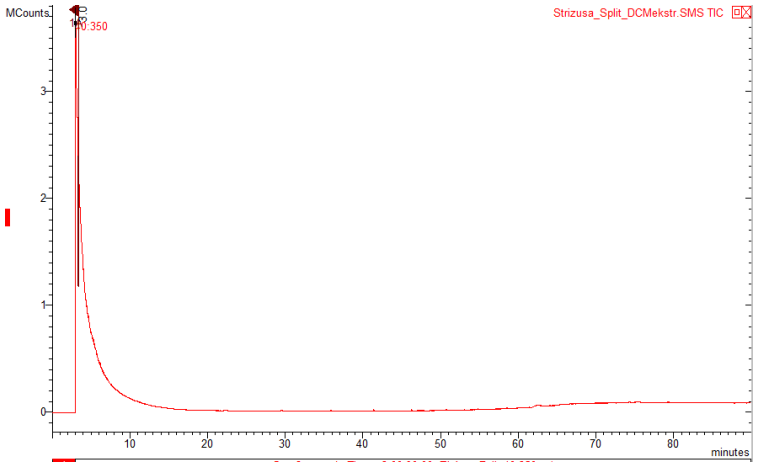
U ovom radu istraživani su glukozinolati biljne vrste strižuša (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.) sakupljene s područja Splita i rijeke Krke. Za identifikaciju spojeva korištena je indirektna metoda koja se sastoji od enzimske ili termičke razgradnje glukozinolata, izolacije hlapljivih razgradnih produkata hidrodestilacijom, destilacijom ili ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima te njihove identifikacije spregnutom tehnikom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS).

Enzimska razgradnja (autoliza) provedena je na način da se biljni materijal macerirao 24 sata u destiliranoj vodi, s dodatkom enzima mirozinaze, na sobnoj temperaturi nakon čega je provedena ekstrakcija s diklormetanom. Za biljni materijal s područja rijeke Krke provedena je autoliza svih dijelova biljke pojedinačno, dok je autoliza biljnog materijala s područja Splita provedena svih dijelova biljke zajedno.

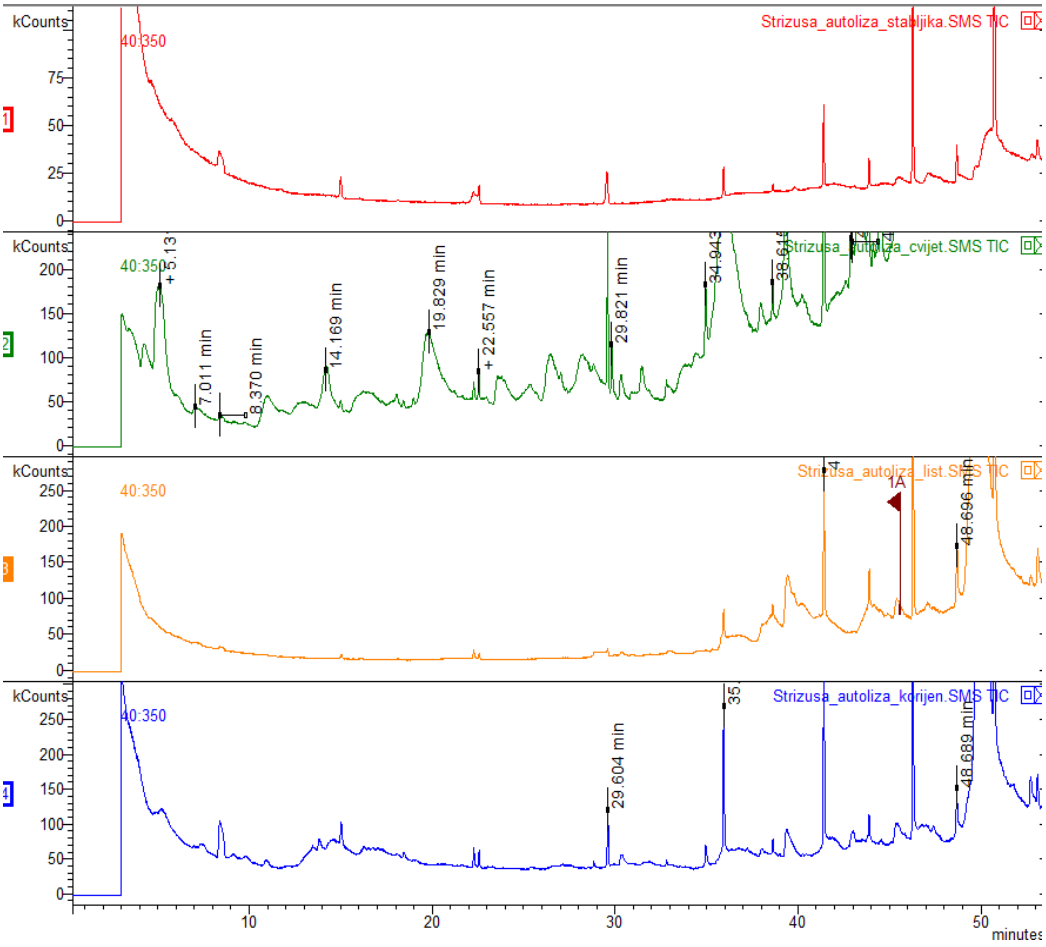
Termička razgradnja provedena je postupkom hidrodestilacije u aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 sata na temperaturi od 100 °C. Također je proveden postupak mikrovalne destilacije mikrovalovima snage 500 W (35 min; 98 °C). Izvršena je i mikrovalna ekstrakcija (snaga mikrovalova 500 W; temperatura 98 °C; 35 min).

3.1.1. GC-MS analiza

Svi uzorci dobiveni u ovom dijelu istraživanja podvrgnuti su GC-MS analizi te su na taj način dobiveni kromatogrami ukupne ionske struje za svaki uzorak. Razgradni produkti koji su uspješno identificirani usporedbom spektra masa pojedinih komponenti sa spektrima masa iz biblioteke po Wiley-u prikazani su u tablicama 5-8.



Slika 28. Kromatogram ukupne ionske struje diklormetanskog ekstrakta nakon autolize (Split).



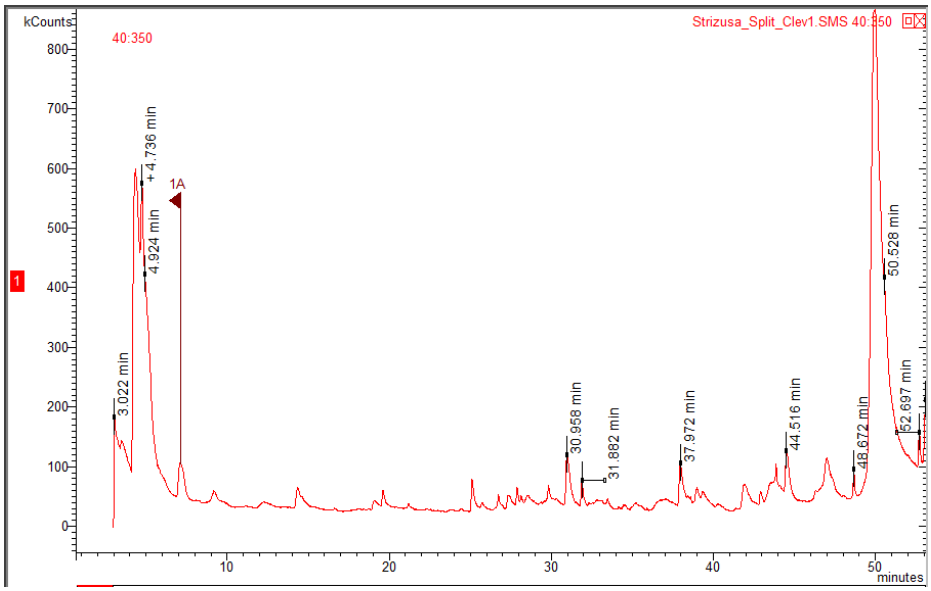
Slika 29. Kromatogram ukupne ionske struje diklormetanskog ekstrakta nakon autolize (Krka).

Tablica 5. Razgradni produkati dobiveni autolizom biljnog materijala strižuše.

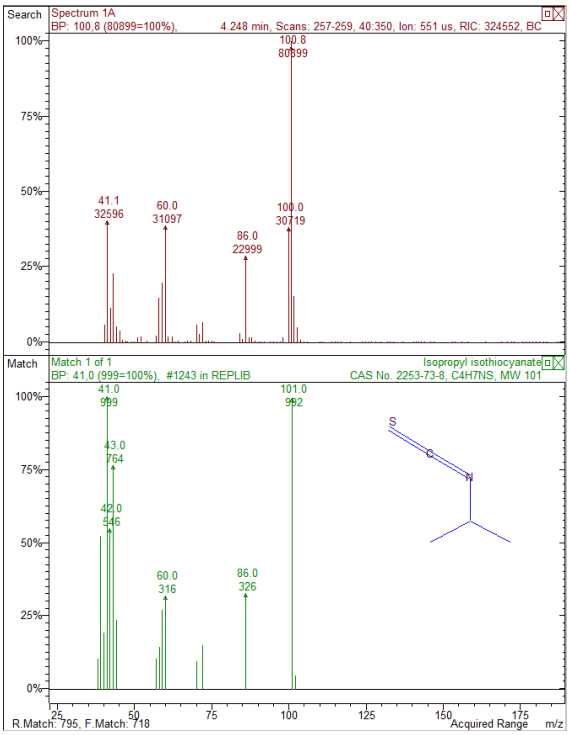
AUTOLIZA				
Glukozinolati	**Identificirani razgradni produkti**	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**w/w (%)**	
			Split	**Krka**
Glukoputranjivin	izopropil-izotiocijanat	4,3	-	7,0

„-“ -Nije identificiran.

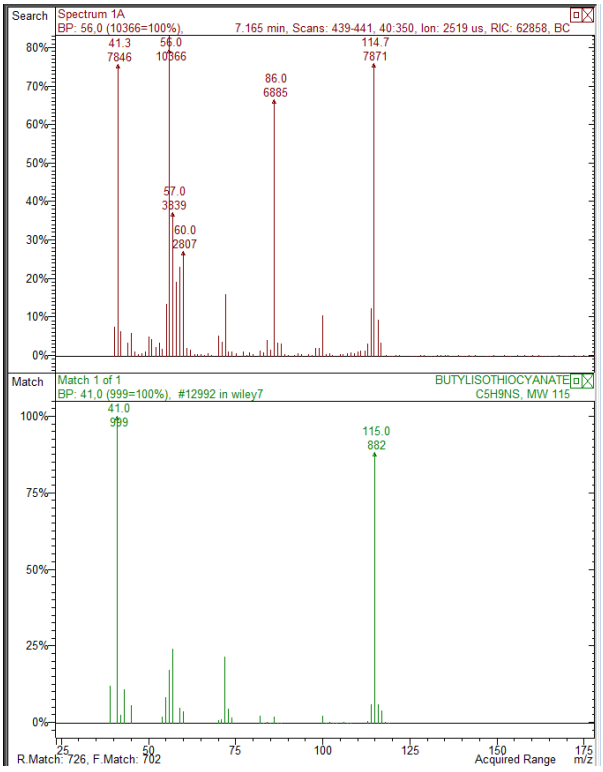
Iz kromatograma ukupne ionske struje diklormetanskih ekstrakata nakon autolize vidljivo je da je jedini identificirani spoj izopropil-izotiocijanat i to samo u cvijetu biljnog materijala s područja rijeke Krke. Zaključeno je, s obzirom na rezultate, da je potrebno dodati enzim mirozinazu tijekom autolize.



Slika 30. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja strižuše dobivenog hidrodestilacijom.



Slika 31. Spektar masa izopropil-izotiocijanata, razgradnog produkta glukoputranjivina.

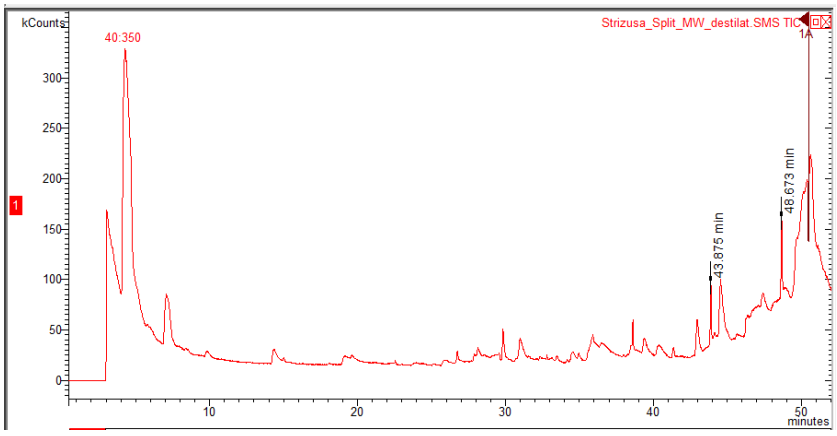


Slika 32. Spektar masa *sec*-butil-izotiocijanata, razgradnog produkta glukokohlearina.

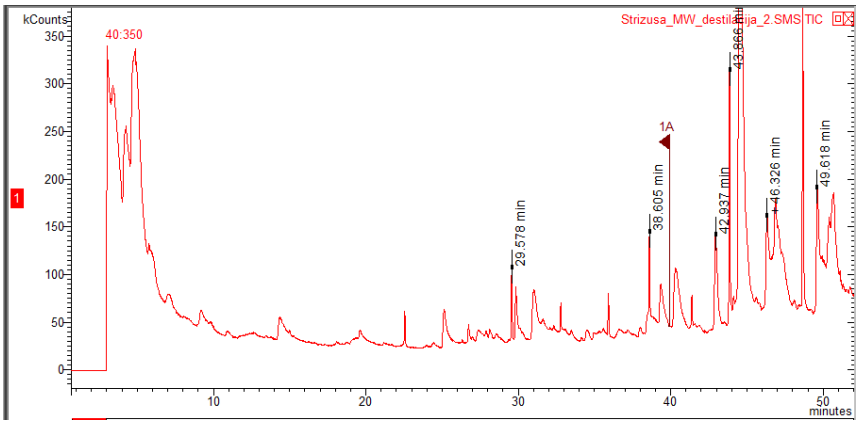
Tablica 6. Razgradni produkati dobiveni hidrodestilacijom biljnog materijala strižuše.

HIDRODESTILACIJA				
Glukozinolati	**Identificirani razgradni produkti**	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**w/w (%)**	
			Split	**Krka**
Glukoputranjivin	izopropil-izotiocijanat	4,3	40,96	/
Glukokohlearin	*sec*-butil-izotiocijanat	7,2	4,76	/

Na kromatogramu (slika 30.) vidljivi su pikovi oba karakteristična razgradna produkta. Izopropil-izotiocijanat je dominantniji i izraženiji u odnosu na *sec*-butil-izotiocijanat. Izolacija spojeva iz strižuše s područja rijeke Krke postupkom hidrodestilacije nije provedena zbog nedovoljno sabranog biljnog materijala. Na slici 31. je prikazan maseni spektar izopropil-izotiocijanata. Sukladno s „dušikovim pravilom“ za spojeve s neparnim brojem atoma dušika molekulski pik ima neparnu masu, m/z = 101. Uočava se i osnovni pik m/z = 41 te ostali karakteristični pikovi manjeg intenziteta (m/z = 86; m/z = 60). Na slici 32. je prikazan maseni spektar *sec*-butil-izotiocijanata. Uočava se molekulski pik m/z = 115, osnovni pik m/z = 41 te ostali karakteristični pikovi (m/z = 86; m/z = 56). Masa eteričnog ulja iznosila je 6,55 mg odnosno iskorištenje je bilo 0,0033 %.



Slika 33. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja strižuše (Split) dobivenog mikrovalnom destilacijom.

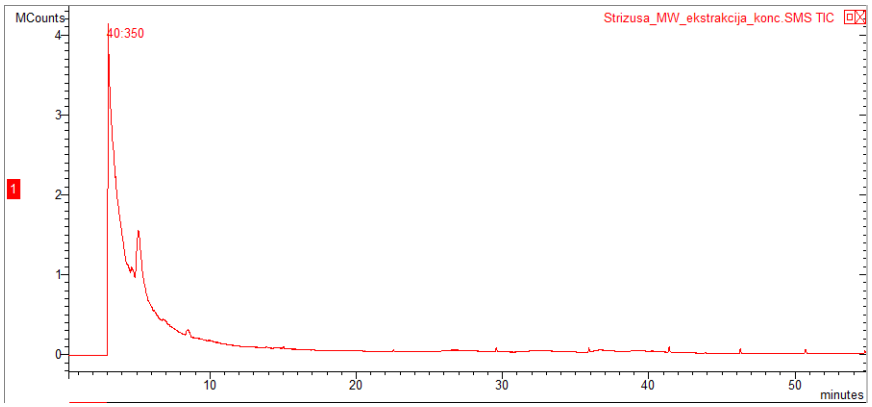


Slika 34. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja strižuše (Krka) dobivenog mikrovalnom destilacijom.

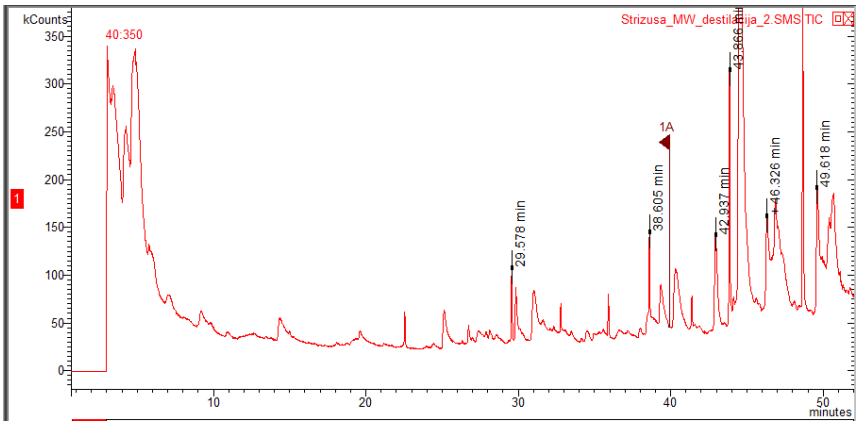
Tablica 7. Razgradni produkati dobiveni mikrovalnom destilacijom biljnog materijala strižuše.

MIKROVALNA DESTILACIJA				
Glukozinolati	**Identificirani razgradni produkti**	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**w/w (%)**	
			Split	**Krka**
Glukoputranjivin	izopropil-izotiocijanat	4,3	85,45	15,80
Glukokohlearin	*sec*-butil-izotiocijanat	7,2	14,00	0,78

Iz kromatograma za eterično ulje dobiveno destilacijom primjenom mikrovalova, može se vidjeti kako su kao i kod hidrodestilacije dobiveni razgradni produkti izopropil-izotiocijanat i *sec*-butil-izotiocijanat, ali u većem postotku. Iz toga se da zaključiti da je MW destilat bio puno čišći u odnosu na destilat hidrodestilacije. Masa eteričnog ulja bila je 3,3 mg (Split) i 1,1 mg (Krka) odnosno iskorištenje je bilo 0,00165 % (Split) i 0,00101 % (Krka).



Slika 35. Kromatogram ukupne ionske struje ekstrakta dobivenog mikrovalnom hidrodifuzijom uz gravitaciju (Split).

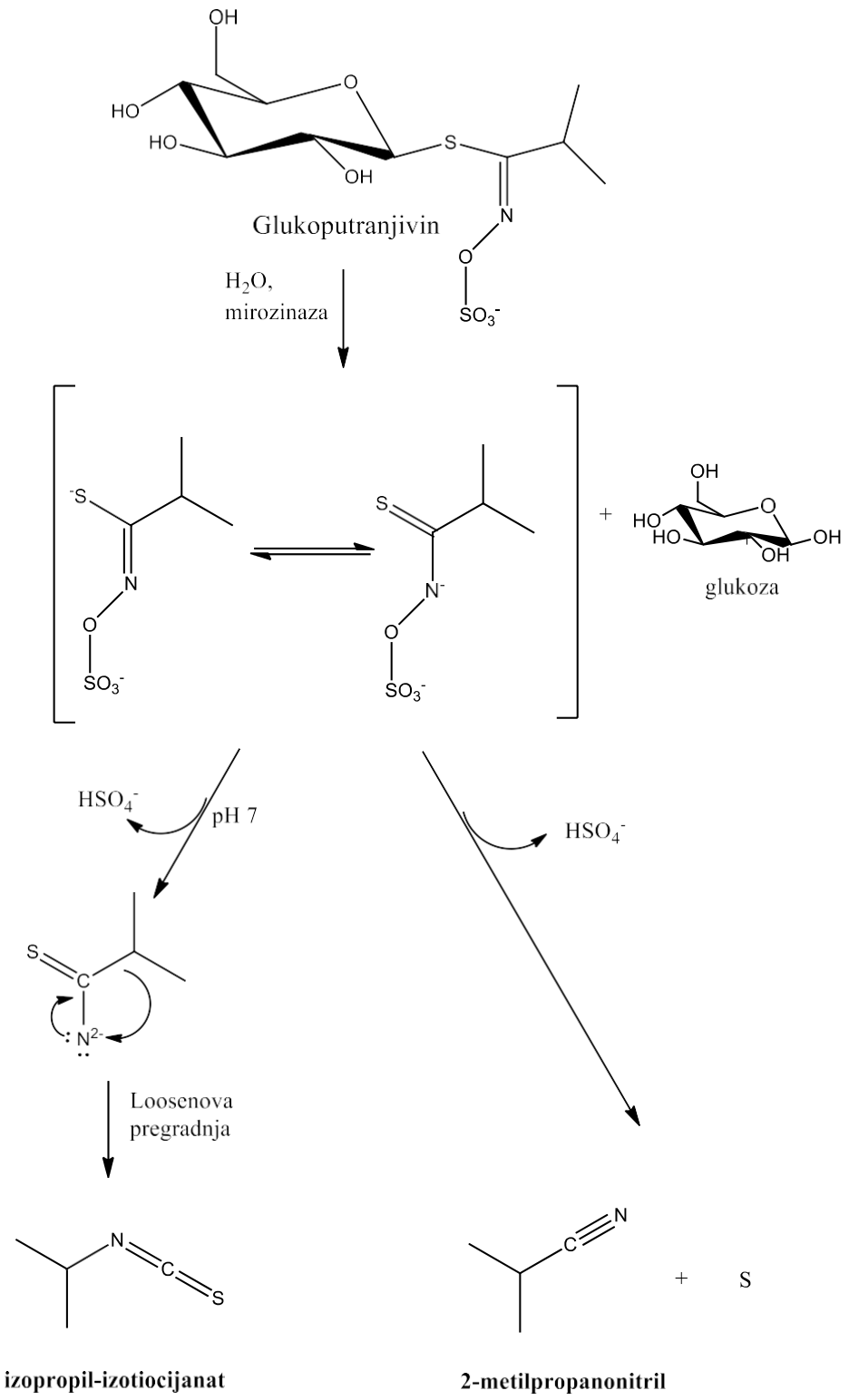


Slika 36. Kromatogram ukupne ionske struje ekstrakta dobivenog mikrovalnom hidrodifuzijom uz gravitaciju (Krka).

Tablica 8. Razgradni produkati dobiveni mikrovalnom ekstrakcijom biljnog materijala strižuše.

MIKROVALNA EKSTRAKCIJA				
Glukozinolati	**Identificirani razgradni produkti**	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**w/w (%)**	
			Split	**Krka**
Glukoputranjivin	izopropil-izotiocijanat	4,3	tr	tr

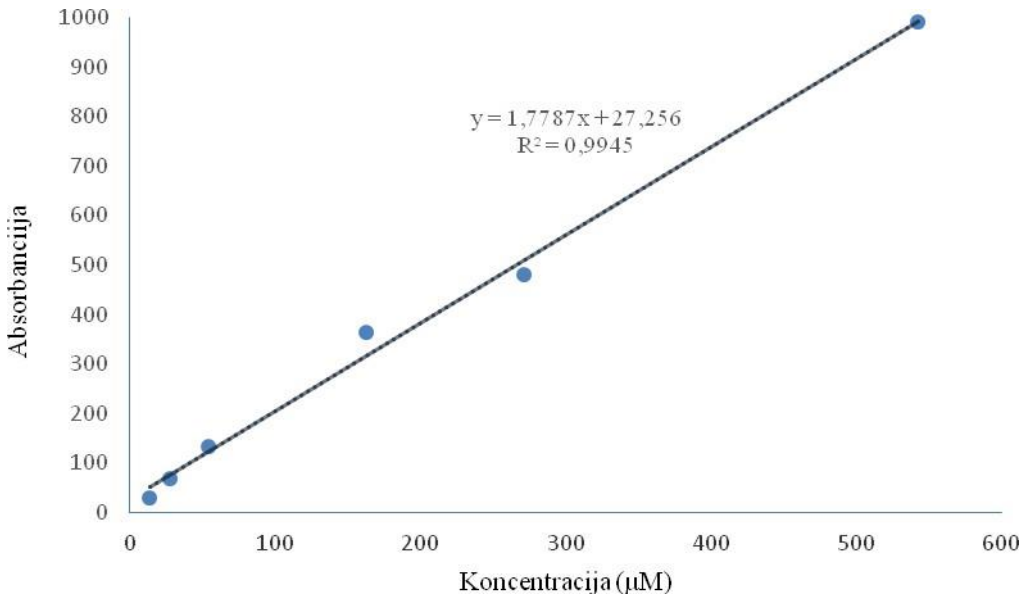
„tr“ -tragovi



Slika 37. Shematski prikaz razgradnje glukoputranjivina.

3.2. Izolacija glukozinolata i HPLC analiza

Sve biljne vrste koje sadrže glukozinolate imaju karakterističan i jedinstven profil, stoga iznimnu važnost pridonosi njihova identifikacija i u konačnici kvantizacija. U 3.1. poglavlju opisana je identifikacija glukozinolata preko razgradnih produkata, izopropil-izotiocijanata i *sec*-butil-izotiocijanata koristeći GC-MS tehniku. U svrhu kvantizacije glukozinolata, pristupilo se njihovoj izolaciji. Glukozinolati su ekstrahirani iz sušene biljke strižuše iz različitih biljnih tkiva. Ekstrakcija smjesom metanola i vode je izvršena iz 100,0 mg usitnjenog biljnog materijala pri 92 °C s ciljem inhibicije mirozinaze. Nanošenjem dobivenih ekstrakta na ionsko-izmjenjivačku kolonu koja sadrži dekstran, a potom ispiranjem ultračistom vodom, 70 % metanolom i puferom uklonjene su nepolarne komponente, kao što je klorofil. Dodatkom sulfataze, ekstrahirani glukozinolati su desulfatizirani. Usporedno, pripravljene su različite koncentracije desulfosinigrina za kalibracijsku krivulju. Svi uzorci su analizirani HPLC-UV tehnikom. Baždarna krivulja je prikazana na slici 38. odakle je vidljiva visoka korelacija i linearnost za različite koncentracije desulfatiziranog sinigrina (R^2=0,9945).



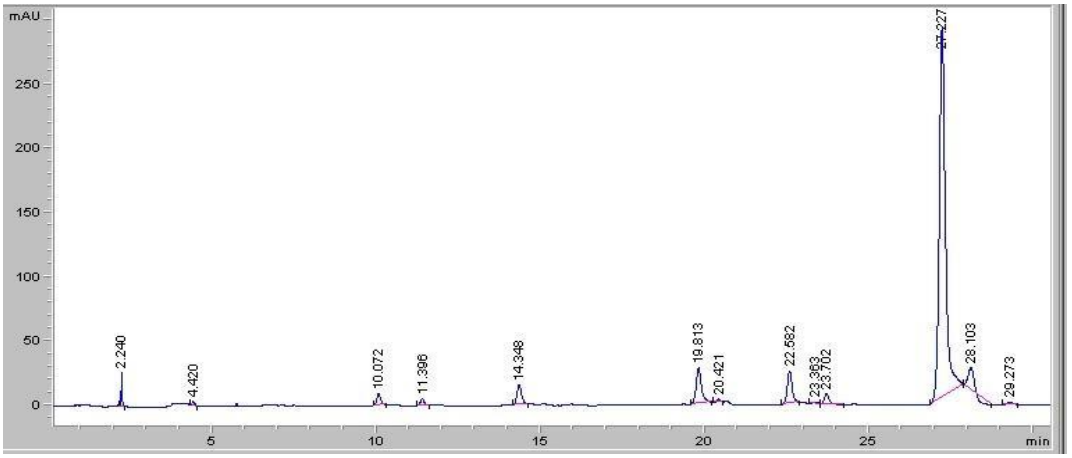
Slika 38. Baždarna krivulja sinigrina.

Tablica 9. Desulfoglukozinolati identificirani u strižuši.

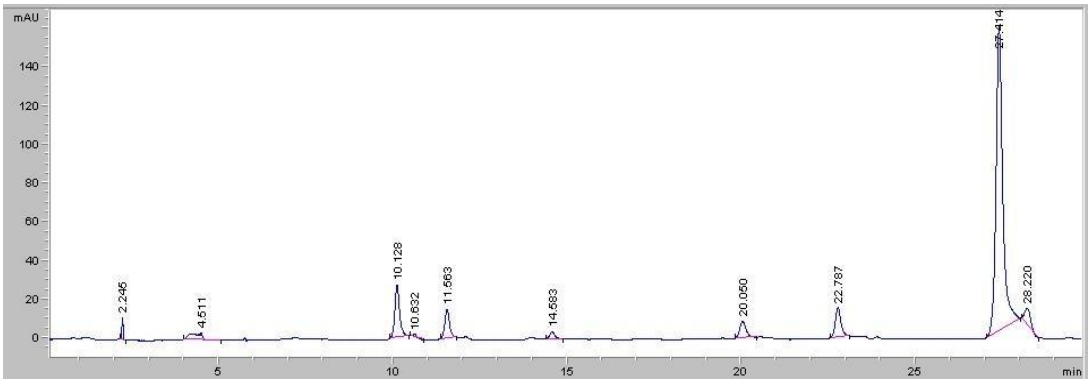
	Vrijeme zadržavanja (min)	Naziv
1	10,10	Desulfoglukoputranjivin
2	11,50	Desulfoglukosinalbin
3	14,35	Desulfo-4-hidroksiglukobrasicin
4	19,90	Desulfoglukobrasicin
5	22,80	Desulfo-4-metoksiglukobrasicin
6	27,80	Desulfoneoglukobrasicin

U tablici 9. prikazani su desulfoglukozinolati identificirani u strižuši kao i njihova vremena zadržavanja na temelju kojih se određuje prisustvo istih (desulfo)glukozinolata u drugim biljnim vrstama. Desulfoglukoputranjivin je potvrđen usporedbom s ekstraktom desulfoglukozinolata iz sjemena *Lunaria annua* gdje je ovaj glukozinolat dominantan (Slika 49). Desulfoglukosinalbin je potvrđen usporedbom s ekstraktom desulfoglukozinolata iz sjemena *Sinapis alba* gdje je ovaj glukozinolat dominantan (Slika 50). Indolni glukozinolati potvrđeni su usporedbom vremena zadržavanja komercijalno dostupnih standarda (slike 51-54).

3.2.1. Korijen



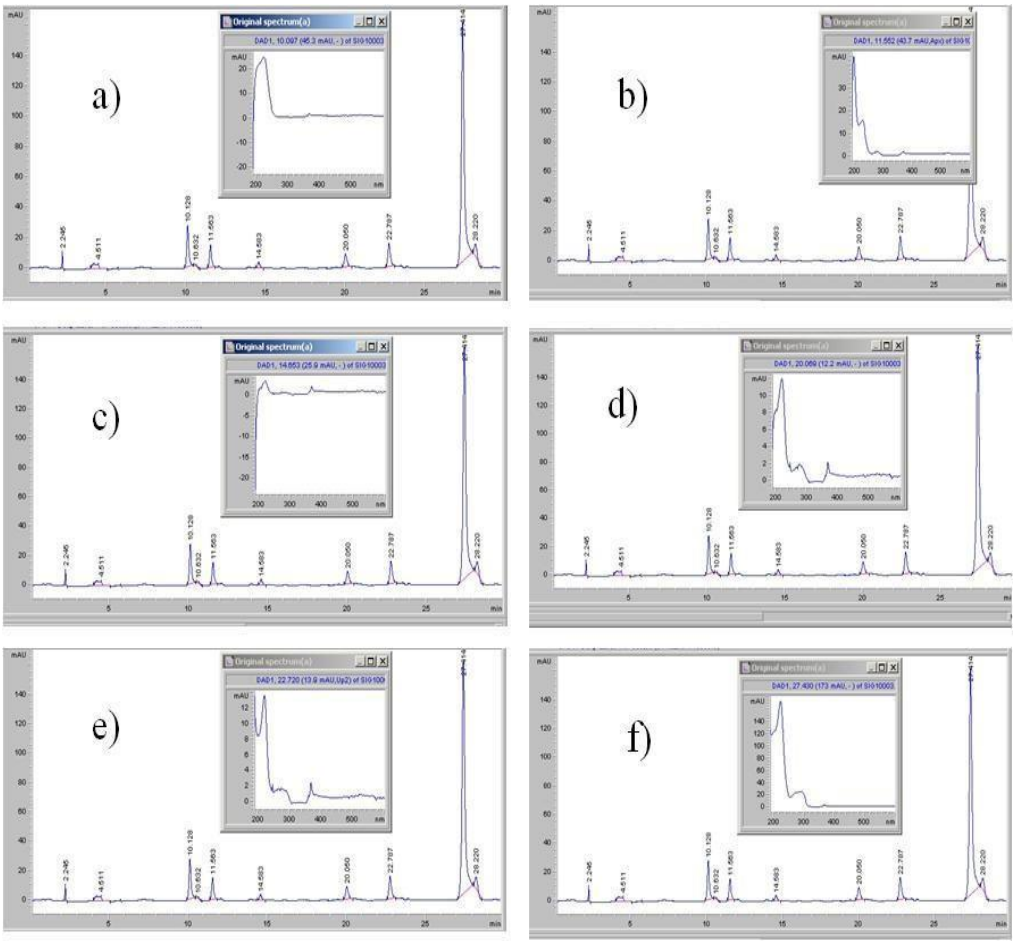
Slika 39. HPLC kromatogram ekstrakta iz korijena strižuše (Krka).



Slika 40. HPLC kromatogram ekstrakta iz korijena strižuše (Split).

Na slikama 39. i 40. prikazani su HPLC kromatogrami ekstrakta iz korijena strižuše sa područja Splita i rijeke Krke. Identificirani su pikovi pri 10,10 min koji odgovaraju desulfoglukoputranjivinu. Osim vremena zadržavanja, njegovo prisustvo potvrđeno je pregledom pripadajućeg UV spektra pri 227 nm (Slika 41.) koji odgovara alkenilnim glukozinolatima. Ostali pikovi ranijih vremena zadržavanja pripadaju nečistoćama koje nisu u potpunosti uklonjene postupkom pročišćavanja ekstrakta jer njihove apsorpcijske vrpce nemaju izgled karakterističan glukozinolatnom. Dodatna potvrda prisustva je prethodna GC-MS analiza gdje je identificiran razgradni produkt ovog glukozinolata, izopropil-izotiocijanat.

Izračunata koncentracija desulfoglukoputranjivina je iznosila 2,629 μmol/g (Split) i 0,680 μmol/g (Krka), a detaljni proračun prikazan je u prilogu. U tablici 10. su prikazani svi identificirani desulfoglukozinolati i njihove konačne koncentracije u uzorku. Ostali glukozinolati su također potvrđeni pregledom pripadajućeg UV spektra. Međutim, nisu potvrđeni GC-MS analizom zato što su spojevi koji nastaju razgradnjom indolnih glukozinolata (4-hidroksiglukobrasicin, glukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin, neoglukobrasicin) termički nestabilni te se raspadaju na temperaturi injektora GC-MS-a (250 °C).

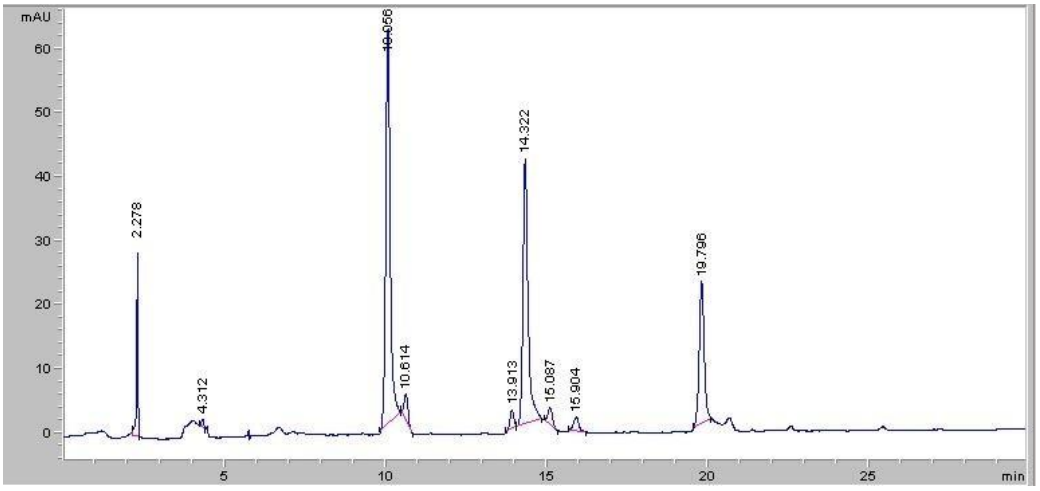


Slika 41. HPLC kromatogram ekstrakta iz korijena strižuše (Split) te UV spektri: a) desulfoglukoputranjivina; b) desulfoglukosinalbina; c) desulfo-4-hidorksiglukobrasicina; d) desulfoglukobrasicina; e) desulfo-4-metoksiglukobrasicina; f) desulfoneoglukobrasicina.

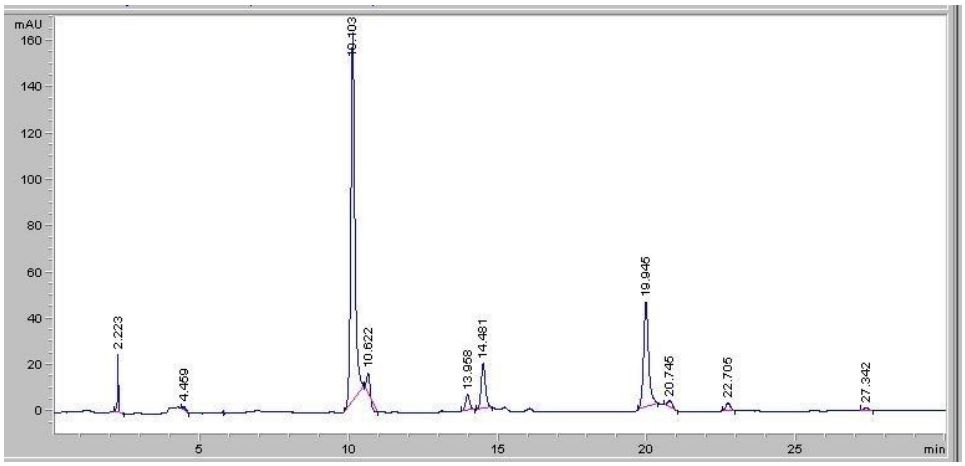
Tablica 10. Koncentracije identificiranih glukozinolata u ekstraktu korijena strižuše.

SPOJ	Konačna koncentracija u uzorku (µmol/g)	
	SPLIT	**KRKA**
Glukoputranjivin	2,629	0,680
Glukosinalbin	1,251	0,265
4-Hidroksiglukobrasicin	0,035	0,307
Glukobrasicin	0,244	0,966
4-Metoksiglukobrasicin	0,430	0,667
Neoglukobrasicin	4,488	7,865

3.2.2. Stabljika



Slika 42. HPLC kromatogram ekstrakta iz stabljike strižuše (Krka).



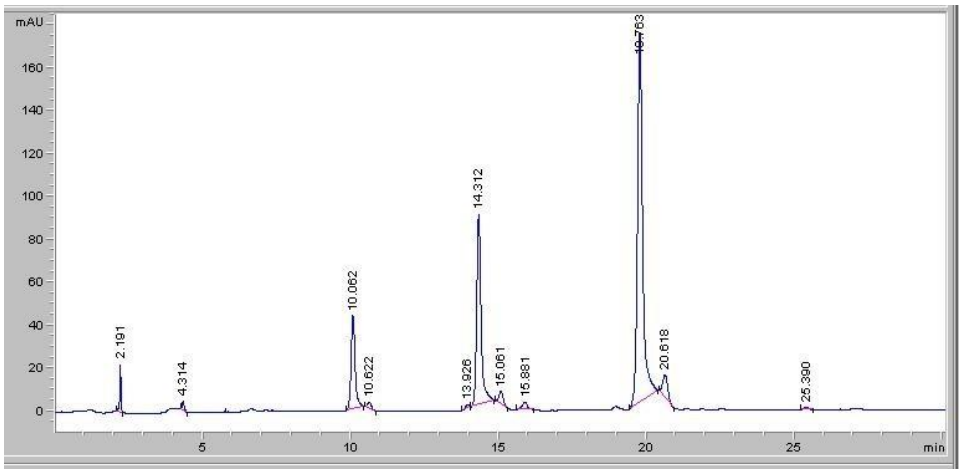
Slika 43. HPLC kromatogram ekstrakta iz stabljike strižuše (Split).

Za razliku od ekstrakta korijena, ekstrakt stabljike sadrži tri desulfoglukozinolata: desulfoglukoputranjivin, desulfo-4-hidroksiglukobrasicin i desulfoglukobrasicin. Ekstrakt stabljike strižuše sa područja Splita u maloj koncentraciji sadrži i desulfo-4-metoksiglukobrasicin. Osim vremena zadržavanja, njihova prisutnost potvrđena je pregledom odgovarajućeg UV spektra pri 227 nm. Najveća koncentracija u uzorku za Split i Krku pripada glukoputranjivinu, koji je potvrđen i prethodnom GC-MS analizom preko svog razgradnog produkta (izopropil-izotiocijanat).

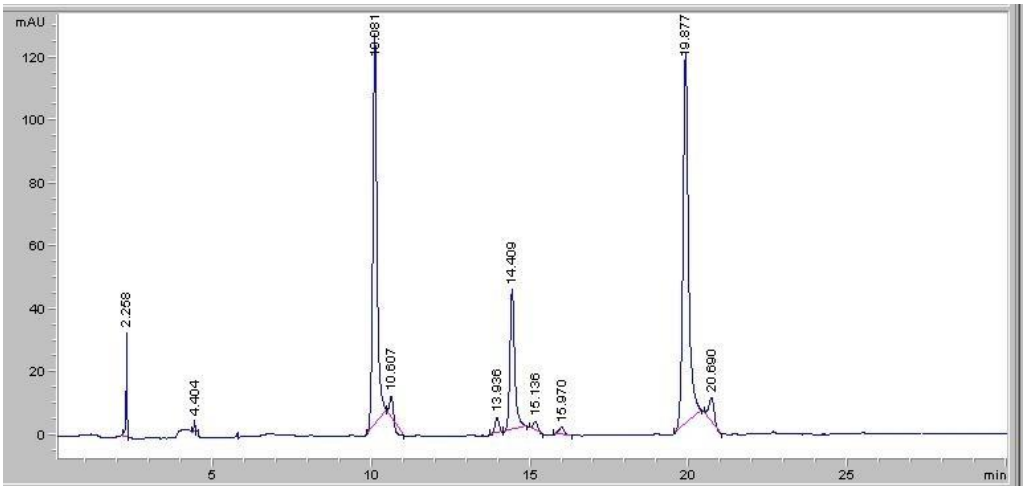
Tablica 11. Koncentracije identificiranih glukozinolata u ekstraktu stabljike strižuše.

SPOJ	**Konačna koncentracija u uzorku (μmol/g)**	
	SPLIT	**KRKA**
Glukoputranjivin	16,000	5,979
4-Hidroksiglukobrasicin	0,408	1,340
Glukobrasicin	1,706	0,758
4-Metoksiglukobrasicin	0,018	-

3.2.3. List



Slika 44. HPLC kromatogram ekstrakta iz lista strižuše (Krka).



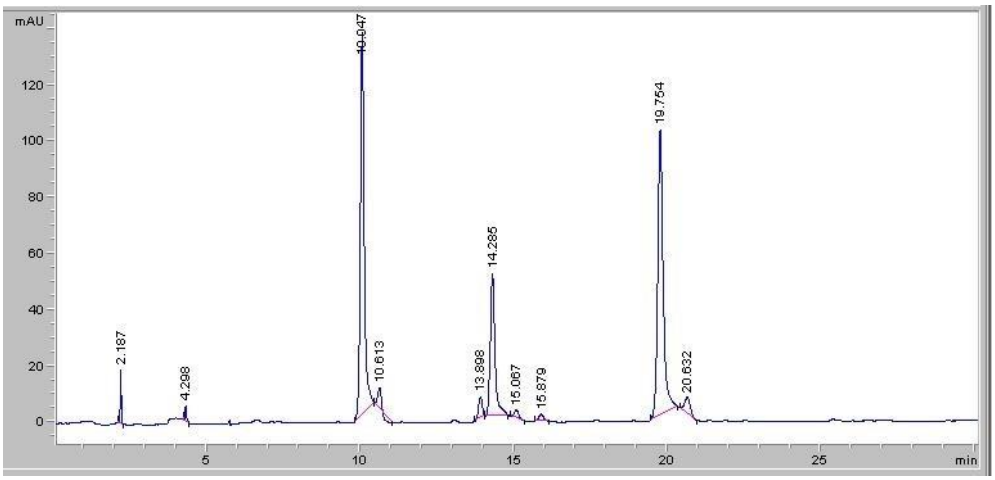
Slika 45. HPLC kromatogram ekstrakta iz lista strižuše (Split).

Na slikama 44. i 45. prikazani su HPLC kromatogrami ekstrakta iz lista strižuše. Identificirani su pikovi pri 10,10 min (desulfoglukoputranjivin), 14,35 min (desulfo-4-hidroksiglukobrasicin) i 19,90 min (desulfoglukobrasicin). U ekstraktu lista strižuše, sa područja Splita, najveća je koncentracija glukoputranjivina (12,196 µmol/g), dok sa područja Krke najveća koncentracija je glukobrasicina (6,397 µmol/g). Osim vremena zadržavanja, njihova prisutnost potvrđena je pregledom odgovarajućeg UV spektra pri 227 nm.

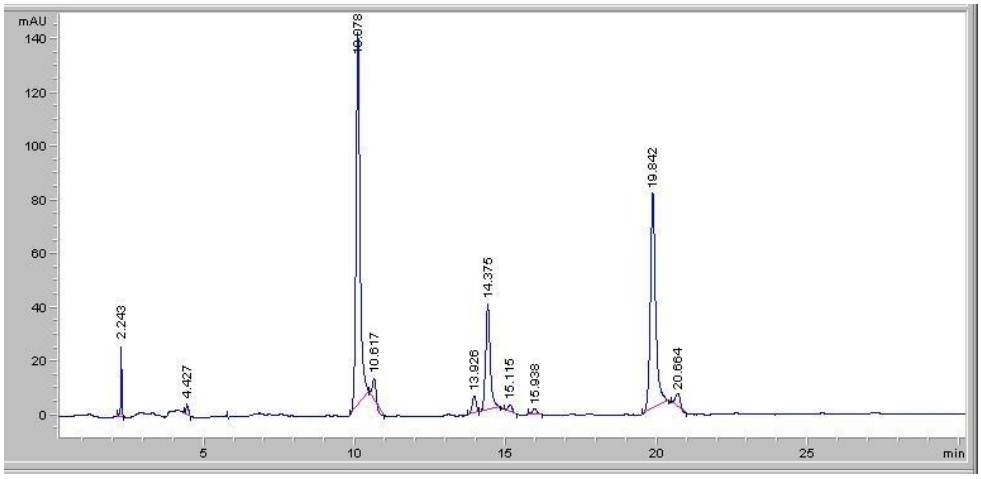
Tablica 12. Koncentracije identificiranih glukozinolata u ekstraktu lista strižuše.

SPOJ	Konačna koncentracija u uzorku (µmol/g)	
	SPLIT	KRKA
Glukoputranjivin	12,196	3,645
4-Hidroksiglukobrasicin	1,339	2,732
Glukobrasicin	4,574	6,397

3.2.4. Cvijet



Slika 46. HPLC kromatogram ekstrakta iz cvijeta strižuše (Krka).

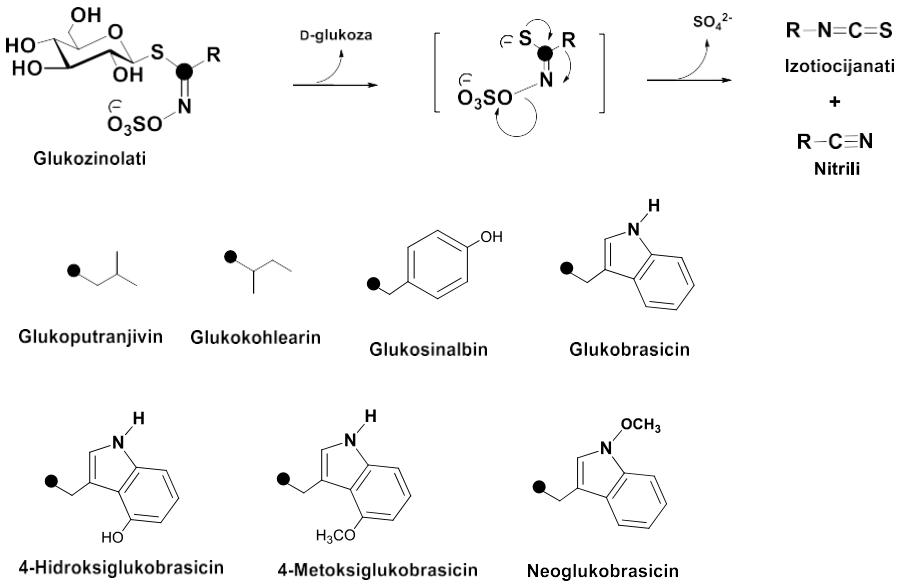


Slika 47. HPLC kromatogram ekstrakta iz cvijeta strižuše (Split).

Na slikama 46. i 47. prikazani su HPLC kromatogrami ekstrakta iz cvijeta strižuše. Identificirani su pikovi pri 10,10 min (desulfoglukoputranjivin), 14,35 min (desulfo-4-hidroksiglukobrasicin) i 19,90 min (desulfoglukobrasicin). U oba ekstrakta cvijeta strižuše najveća je koncentracija glukoputranjivina (Split-14,125 µmol/g; Krka-12,973 µmol/g). Osim vremena zadržavanja, njihova prisutnost potvrđena je pregledom odgovarajućeg UV spektra pri 227 nm.

Tablica 13. Koncentracije identificiranih glukozinolata u ekstraktu cvijeta strižuše.

SPOJ	Konačna koncentracija u uzorku (µmol/g)	
	SPLIT	**KRKA**
Glukoputranjivin	14,125	12,973
4-Hidroksiglukobrasicin	1,295	1,719
Glukobrasicin	3,112	3,904



Slika 48. Shema razgradnje glukozinolata i strukturne formule identificiranih glukozinolata u strižuši (*Sisymbrium officinale* (L.) Scop.).

4. ZAKLJUČAK

- U izolatima strižuše dobivenih hidrodestilacijom u aparaturi po Clevengeru i mikrovalnom destilacijom, GC-MS analizom preko razgradnih produkata identificirani su glukoputranjivin (izopropil-izotiocijanat) i glukokohlearin (*sec*-butil-izotiocijanat). U izolatima dobivenih ekstrakcijom pod utjecajem mikrovalova identificiran je izopropil-izotiocijanat, ali u tragovima što upućuje da je materijal bio vremenski premalo izložen snazi mikrovalova od 500 W.

- Analizom s HPLC-DAD tehnikom potvrđena je prisutnost glukoputranjivina dok su identificirani i drugi glukozinolati (glukosinalbin te indolni: 4-hidroksiglukobrasicin, glukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin), čiji razgradni produkti nisu identificirani GC-MS analizom, vjerojatno zbog njihove termičke nestabilnosti.

- Jedino u ekstraktu korijena strižuše preko desulfatiziranih glukozinolata identificirani i kvantificirani su glukoputranjivin, glukosinalbin te indolni 4-hidroksiglukobrasicin, glukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin. U korijenu strižuše s područja Splita u većoj koncentraciji su glukoputranjivin i glukosinalbin u odnosu na korijen strižuše s područja rijeke Krke, koji ima veću koncentraciju indolnih glukozinolata.

- U ekstraktima stabljike, lista i cvijeta strižuše preko desulfatiziranih glukozinolata identificirani su i kvantificirani glukoputranjivin, 4-hidoksiglukobrasicin i glukobrasicin. Kao i u ekstraktu korijena, ekstrakti strižuše s područja Splita imaju veću koncentraciju glukoputranjivina u odnosu na ekstrakte strižuše s područja rijeke Krke koji su bogatiji indolnim glukozinolatima.

5. LITERATURA

1. Vlajčević, D. *Termička, enzimska i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata,* Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2018.
2. Silić, A. *Glukozinolatni profil u biljkama Diplotaxis tenuifolia (L.)* DC. *i Matthiola inicana (L.) R. BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima,* Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2018.
3. Kopjar, M., Šubarić, D., Piližota, V. *Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi.* Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku. 1, 2012, str. 22-35
4. Blažević, I. *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae / doktorska disertacija.* Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu 2009.
5. Prieto, M. A., Jimenez Lopez, C., Simal-Gandara, J. *Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects,* Advances in food and Nutrition Research, 89, 2019.
6. Zekić, M. *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija.* Zagreb : Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu 2013.
7. Jerković, I., Radonić, A. *Praktikum iz organske kemije.* Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2009.
8. Richter R. C., Pirola C., *Microwave green extraction*, Modernizing trace organic analysis, Ikonos Srl, Italija, 2017.
9. Blekić, M., Jambrek, A. R., Chrmant, F. *Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva,* Croatian Journal of Food Science and Technology, 3, 2011., str. 32-47
10. Vujanović, T. *Mikrovalna ekstrakcija polifenola iz cvijet i lista gloga (Crataegus monogyna),* Završni rad, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet 2015.
11. Dohney-Adams, T., Redeker, K., Kittipol, V., Bancroft, I., Haetley, S. E. *Development of an efficient glucosinolate extraction method,* Plant Methods 2017.
12. URL:https://www.jove.com/video/55425/a-straightforward-method-for-glucosinolate-extraction-analysis-with (preuzeto 18.7.2019.)

13. URL:https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=kromatografija (preuzeto 15.7.2019.)
14. Radić, Nj., Kukoč Modun, L. *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga d.d., Zagreb, 2016.
15. Wade L. G., ml., *Organska kemija*, Školska knjiga d.d., 7. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko), Zagreb, 2017.
16. Pine, S. H. *Organska kemija.* Zagreb : Školska knjiga, Zagreb, 1994.
17. Galić, N., Drevenkar, V. *Interna skripta iz Kromatografije,* Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet 2006.
18. Luterotti, S. *Uvod u kemijsku analizu, IX.1.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC),* URL: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/ (preuzeto 15.7.2019.)
19. Nikolić T., *Sistematska botanika*, Alfa d.d., 1. izdanje, Zagreb, 2013.
20. Kovačić, S., Nikolić, T., Ruščić, M. i sur., *Flora jadranske obale i otoka*, Školska knjiga d.d., Zagreb, 2008.
21. URL: https://www.plantea.com.hr/ljekoviti-oranj/ (preuzeto 1.8.2019.)

6. PRILOG

6.1. Izračun konačnih koncentracija identificiranih glukozinolata

Za kvantizaciju identificiranih glukozinolata koriste se sljedeće jednadžbe:

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

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

x = količina glukozinolata u ekstraktu,

y = površina ispod pika,

c = odsječak na y-osi,

m = nagib pravca,

x_t = koncentracija glukozinolata u uzorku,

M = faktor odziva,

D = faktor razrijeđenja,

w = masa uzorka.

6.1.1. Strižuša-Split

- Korijen:

$$x(\text{GJV}) = \frac{311,085}{1,77468} = 175,29\mu\text{M} = 0,17529\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GJV}) = 0,17529\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 1 = 2,629\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GSNB}) = \frac{148,121}{1,77468} = 83,4\mu\text{M} = 0,0834\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GSNB}) = 0,0834\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 1 = 1,251\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OHGBS}) = \frac{14,7105}{1,77468} = 8,289\mu\text{M} = 0,008289\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OHGBS}) = 0,008289\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,28 = 0,035\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GBS}) = \frac{99,650}{1,77468} = 56,15\mu\text{M} = 0,05615\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GBS}) = 0,05615\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,29 = 0,244\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OMeGBS}) = \frac{203,610}{1,77468} = 114,73\mu\text{M} = 0,11473\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OMeGBS}) = 0,11473\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,25 = 0,430\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{neoGBS}) = \frac{2655,23}{1,77468} = 1496,23\mu\text{M} = 1,49623\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{neoGBS}) = 1,49623\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,20 = 4,488\ \mu\text{mol/g}$$

- Stabljike:

$$x(\text{GJV}) = \frac{1927,09}{1,77468} = 1085,88\mu\text{M} = 1,08588\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GJV}) = 1,08588\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 1 = 16\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OHGBS}) = \frac{172,51}{1,77468} = 97,21\mu\text{M} = 0,09721\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OHGBS}) = 0,09721\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,28 = 0,408\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GBS}) = \frac{696,22}{1,77468} = 392,31\mu\text{M} = 0,39231\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GBS}) = 0,39231\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,29 = 1,706\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OMeGBS}) = \frac{8,5505}{1,77468} = 4,818\mu\text{M} = 0,004818\mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OMeGBS}) = 0,004818\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,25 = 0,018\ \mu\text{mol/g}$$

- List:

$$x(\text{GJV}) = \frac{1442,99}{1,77468} = 813,09\mu\text{M} = 0,81309\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GJV}) = 0,81309\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 1 = 12,196\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OHGBS}) = \frac{565,95}{1,77468} = 318,90\mu\text{M} = 0,31890\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OHGBS}) = 0,31890\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,28 = 1,339\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GBS}) = \frac{1865,93}{1,77468} = 1051,42\mu\text{M} = 1,05142\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GBS}) = 1,05142\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,29 = 4,574\ \mu\text{mol/g}$$

- Cvijet:

$$x(\text{GJV}) = \frac{1671,11}{1,77468} = 941,64\mu\text{M} = 0,94164\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GJV}) = 0,94164\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 1 = 14,125\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OHGBS}) = \frac{547,048}{1,77468} = 308,25\mu\text{M} = 0,30825\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t\text{(4-OHGBS)} = 0,30825\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,28 = 1,295\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GBS}) = \frac{1269,77}{1,77468} = 715,49\mu\text{M}=0,71549\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GBS}) = 0,71549\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,29 = 3,112\ \mu\text{mol/g}$$

Sjeme ukupno: (2,629+1,251+0,035+0,244+0,430+4,488) µmol/g = 9,077 µmol/g

Stabljika ukupno: (16+0,408+1,706+0,018) µmol/g =18,132 µmol/g

List ukupno: (12,196+1,339+4,574) µmol/g =18,109 µmol/g

Cvijet ukupno: (14,125+1,295+3,112)µmol/g =18,532 µmol/g

6.1.2. Strižuša-Krka

- Korijen:

$$x(\text{GJV}) = \frac{80,5065}{1,77468} = 45,36\mu\text{M}=0,04536\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GJV}) = 0,04536\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 1 = 0,680\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GSNB}) = \frac{31,321}{1,77468} = 17,64\mu\text{M}=0,01764\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GSNB}) = 0,01764\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 1 = 0,265\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OHGBS}) = \frac{129,6205}{1,77468} = 1085,88\mu\text{M}=1,08588\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OHGBS}) = 1,08588\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,28 = 0,307\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GBS}) = \frac{394,21}{1,77468} = 222,13\mu\text{M}= 0,22213\mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GBS}) = 0,22213\mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,29 = 0,966\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OMeGBS}) = \frac{315,8605}{1,77468} = 177,98\mu\text{M}=0,17798\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OMeGBS}) = 0,17798\mu\text{mol/mL} \times \frac{1,5\ \text{mL}}{0,1\ \text{g}} \times 0,25 = 0,667\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{neoGBS}) = \frac{4681{,}19}{1,\ 77468} = 2621,\ 78\mu\text{M}=2{,}62178\mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{neoGBS}) = 2,\ 62178\mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 0,\ 20 = 7{,}865\ \mu\text{mol/g}$$

- Stabljika:

$$x(\text{GJV}) = \frac{707,\ 4505}{1,\ 77468} = 398,\ 63\mu\text{M}=0{,}39863\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GJV}) = 0,\ 39863\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 1 = 5,\ 979\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OHGBS}) = \frac{566,\ 39}{1,\ 77468} = 319{,}15\mu\text{M}=0{,}31915\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OHGBS}) = 0,\ 31915\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 0,\ 28 = 1,\ 340\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GBS}) = \frac{309,\ 3}{1{,}77468} = 174,\ 28\mu\text{M}=0{,}17428\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GBS}) = 0{,}17428\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 0,\ 29 = 0,\ 758\mu\text{mol/g}$$

- List:

$$x(\text{GJV}) = \frac{431{,}21}{1{,}77468} = 242,\ 98\mu\text{M}=0{,}24298\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GJV}) = 0,\ 24298\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 1 = 3,\ 645\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OHGBS}) = \frac{1154,\ 42}{1,\ 77468} = 650,\ 5\mu\text{M}=0{,}6505\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OHGBS}) = 0,\ 6505\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 0,\ 28 = 2,\ 732\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GBS}) = \frac{2609{,}83}{1,\ 77468} = 1470,\ 59\mu\text{M}=1{,}47059\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GBS}) = 1,\ 47059\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 0,\ 29 = 6,\ 397\ \mu\text{mol/g}$$

- Cvijet:

$$x(\text{GJV}) = \frac{1534,91}{1,77468} = 864{,}89\mu\text{M} = 0{,}86489\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GJV}) = 0{,}86489\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 1 = 12,973\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{4-OHGBS}) = \frac{726,42}{1,77468} = 409,32\mu\text{M} = 0{,}40932\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{4-OHGBS}) = 0,40932\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 0,28 = 1,719\ \mu\text{mol/g}$$

$$x(\text{GBS}) = \frac{1592,74}{1,77468} = 897,48\mu\text{M} = 0{,}89748\ \mu\text{mol/mL}$$

$$x_t(\text{GBS}) = 0{,}89748\ \mu\text{mol/mL} \times \frac{1{,}5\ \text{mL}}{0{,}1\ \text{g}} \times 0,29 = 3,904\ \mu\text{mol/g}$$

Sjeme ukupno: (0,68+0,265+0,307+0,966+0,667+7,865) µmol/g =10,75 µmol/g

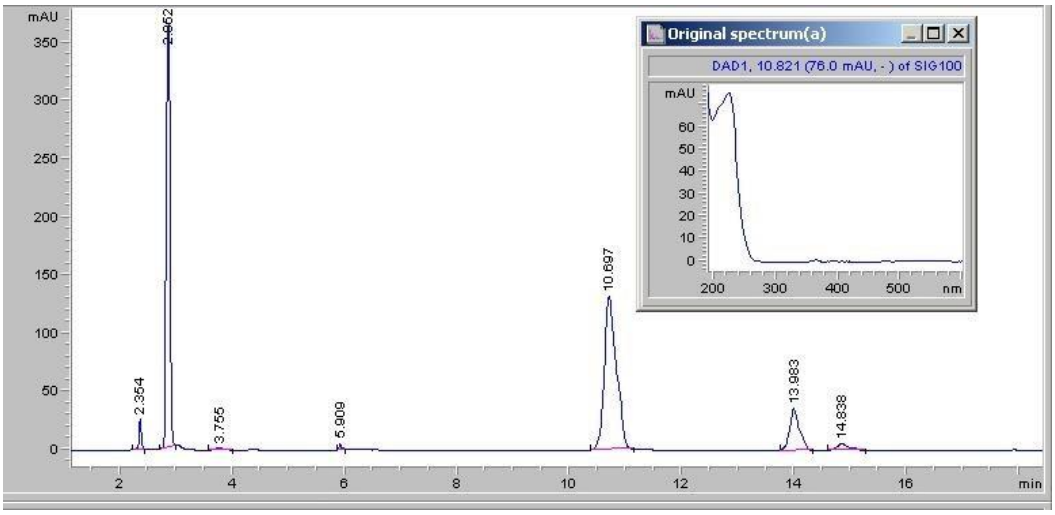
Stabljika ukupno: (5,979+1,340+0,758) µmol/g =8,077 µmol/g

List ukupno: (3,645+2,732+6,397) µmol/g =12,774 µmol/g

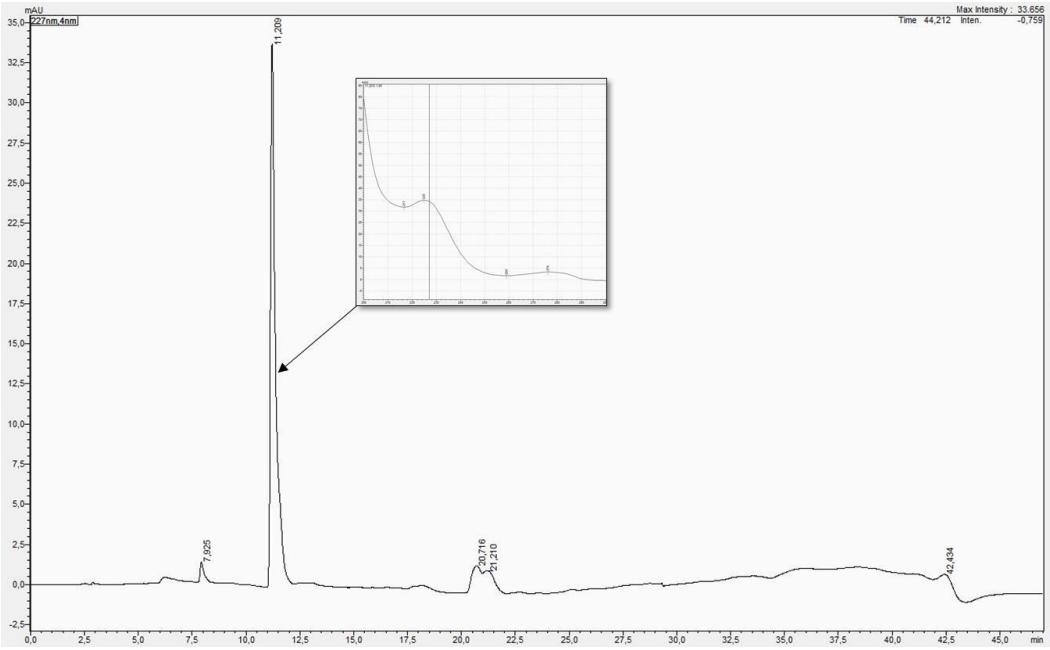
Cvijet ukupno: (12,973+1,719+3,904) µmol/g =18,569 µmol/g

6.2. HPLC kromatogrami standarda desulfoglukozinolata

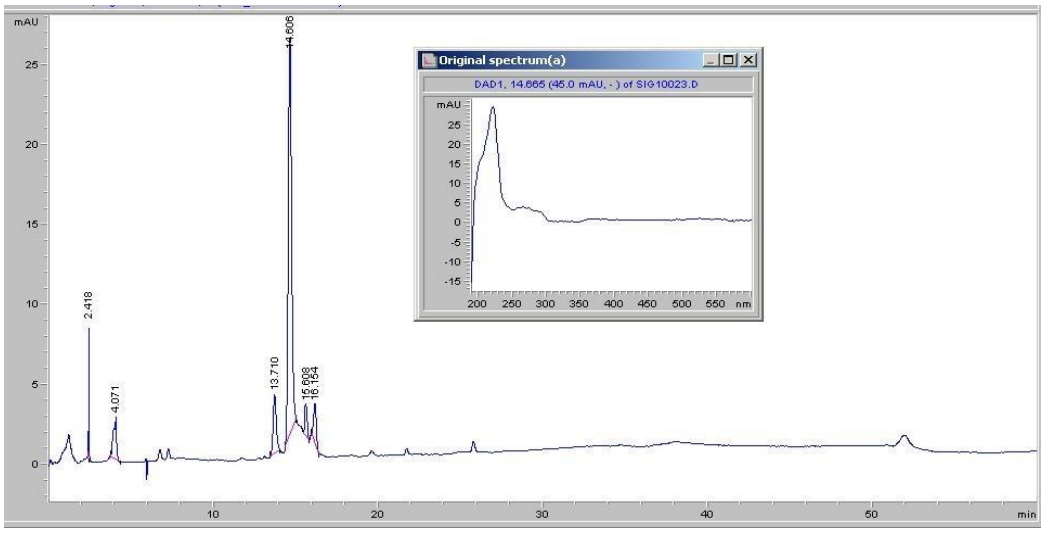
Na slikama 49.-54. su prikazani kromatogramiinternih standarda korištenih za analizu glukozinolata.



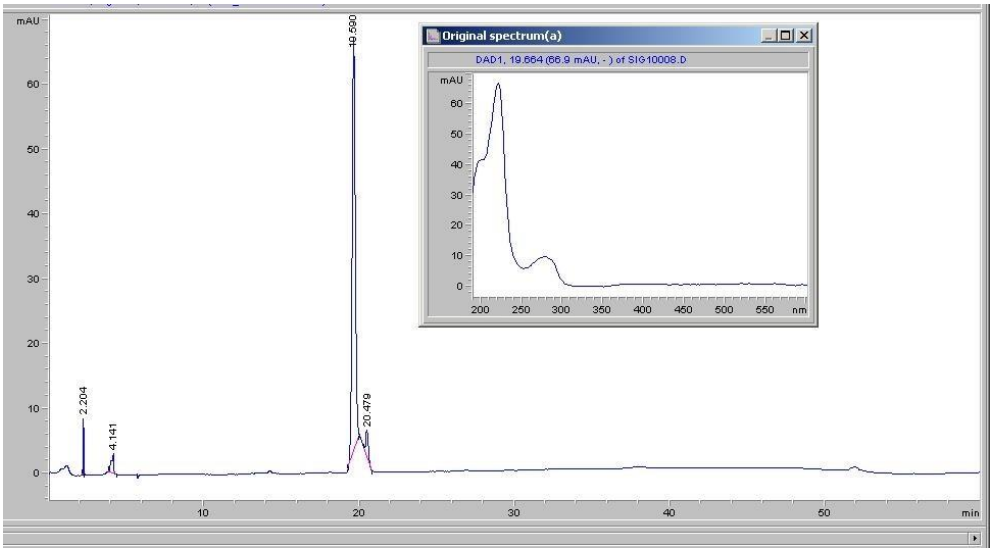
Slika 49. HPLC kromatogram iz sjemena biljke *Lunaria annua* (L.) te UV spektar desulfoglukoputranjivina.



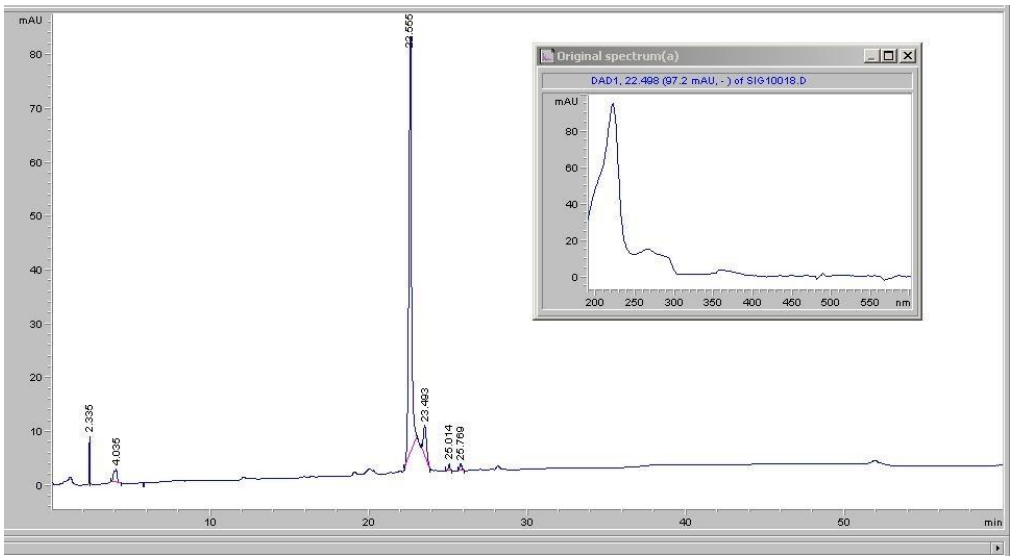
Slika 50. HPLC kromatogram iz sjemena biljke *Sinapis alba* (L.) te UV spektar desulfoglukosinalbina.



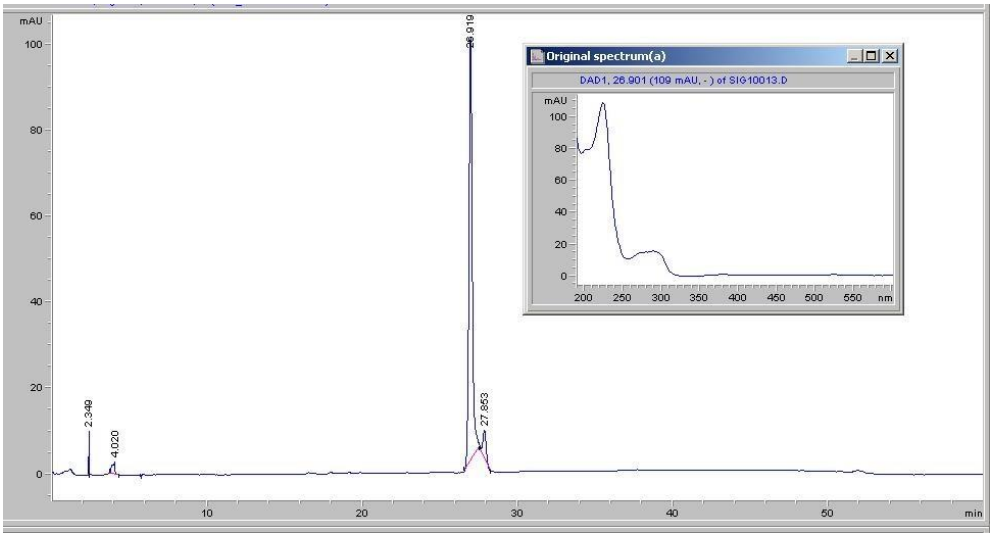
Slika 51. HPLC kromatogram desulfo-4-hidroksiglukobrasicina te njegov odgovarajući UV spektar.



Slika 52. HPLC kromatogram desulfoglukobrasicina te njegov odgovarajući UV spektar.



Slika 53. HPLC kromatogram desulfo-4-metoksiglukobrasicina te njegov odgovarajući UV spektar.



Slika 54. HPLC kromatogram desulfoneoglukobrasicina te njegov odgovarajući UV spektar.