

Izolacija i kvantizacija glukozinolata iz biljaka *Lepidium meyenii* (BRASSICACEAE) i *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)

Topolovec, Lorena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:167:127342>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET

**IZOLACIJA I KVANTIZACIJA GLUKOZINOLATA IZ
BILJAKA *Lepidium meyenii* (BRASICACEAE) I *Moringa
oleifera* (MORINGACEAE)**

DIPLOMSKI RAD

LORENA TOPOLOVEC

Matični broj 119

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

IZOLACIJA I KVANTIZACIJA GLUKOZINOLATA IZ
BILJAKA *Lepidium meyenii* (BRASSICACEAE) I *Moringa*
***oleifera* (MORINGACEAE)**

DIPLOMSKI RAD

LORENA TOPOLOVEC

Matični broj 119

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORIENTATION: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

ISOLATION AND QUANTIZATION OF GLUCOSINOLATES
FROM *Lepidium meyenii* (BRASICACEAE) AND *Moringa*
***oleifera* (MORINGACEAE) PLANTS**

DIPLOMA THESIS

LORENA TOPOLOVEC

Parent number: 119

Split, September 2020.

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

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

Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag. chem.

**IZOLACIJA I KVANTIZACIJA GLUKOZINOLATA IZ BILJAKA *Lepidium meyenii*
(BRASSICACEAE) I *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)**

Lorena Topolovec, 119

Sažetak: Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti β -tioglukozidne strukture koji hrani biljnog podrijetla daju aromu, miris i okus. Smatraju se fitokemikalijama što znači da imaju potencijal u prevenciji različitih bolesti u ljudskom organizmu, a naročito pojave karcinoma.

U ovom radu provela se identifikacija glukozinolata, te kvantizacija glukozinolata u prahu žutog i crvenog korijena Mace te Moringa praha i čaja.

Lepidium meyenii (Brassicaceae) - Maca je bogata hranjivim elementima velike vrijednosti i sekundarnim metabolitima visoke biološke aktivnosti. U ovom radu određen je glukozinoladni profil iz dvije biljne vrste *L. meyenii*, žute i crvene. Kromatogram potvrđuje činjenicu da su prisutni slični glukozinolati. Glukotropeolin (benzil-glukozinolat) je u oba uzorka glavni pri čemu njegova količina u žutoj iznosi 7,02 $\mu\text{mol/g}$, a u crvenoj 8,96 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala. Glukotropeolin je praćen s glukolimnantinom (3-metoksibenzil-glukozinolat) čija koncentracija u žutoj iznosi 1,93 $\mu\text{mol/g}$, a u crvenoj 2,55 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala.

Moringa oleifera (Moringaceae), poznata kao Moringa, podrijetlom je iz sjeverozapada Indije. U Africi se često konzumira za samo-liječenje bolesnika koji su pogođeni dijabetesom, hipertenzijom ili HIV / AIDS-om. U Moringi kao glavni spoj izdvaja se glukomoringin (4-(α -L-ramnoziloski)benzil-glukozinolat, zastupljen u čaju u količini od 29,23 $\mu\text{mol/g}$ i prahu 21,78 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala. Acetilirani izomeri glukomoringina u Moringi su zastupljeni u znatno manjim količinama.

Ključne riječi: izolacija, glukozinolati, Maca (*Lepidium meyenii*) i Moringa (*Moringa oleifera*), UHPLC-DAD-MS/MS

Rad sadrži: 35 stranica, 5 tablica, 21 sliku, 29 literaturnih referenci

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 - mentor

Datum obrane: 07.09.2020.

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

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 28.

Mentor: Ivica Blažević, PhD, Associate Professor

Technical assistance: Azra Đulović, MChem

ISOLATION AND QUANTIZATION OF GLUCOSINOLATES FROM *Lepidium meyenii* (BRASICACEAE) AND *Moringa oleifera* (MORINGACEAE) PLANTS

Lorena Topolovec, 119

Abstract: Glucosinolates are plant secondary metabolites of β -thioglucoside structure that are responsible for flavour, aroma and taste of foods of plant origin. They are considered phytochemicals which means that they have the potential to protect the human body from various diseases, especially with the onset of cancer.

In this work, the identification of glucosinolates and the quantization of glucosinolates in the powder of yellow and red roots of Maca and Moringa powder and tea were examined.

Lepidium meyenii (Brassicaceae) - Maca is rich in nutrients of high value and secondary metabolites with high biological activities. In this paper, the glucosinolate profile from two plant species *Lepidium meyenii* (Maca), yellow and red, is correct. The chromatogram exposes the fact that similar glucosinolates are present. Glucotropaeolin (benzyl glucosinolate) is the main glucosinolate in both samples having 7.02 $\mu\text{mol/g}$ of dry weight in yellow Maca powder, and 8.96 $\mu\text{mol/g}$ of dry weight in red Maca powder. Glucotropaeolin was followed by glucolimnanthine (3-methoxybenzyl-glucosinolate), having 1.93 $\mu\text{mol/g}$ of yellow Maca powder and 2.55 $\mu\text{mol/g}$ of red Maca powder.

Moringa oleifera (Moringaceae), commonly known as Moringa, is native to north-western India. In Africa, it is often consumed for the self-treatment of patients affected by diabetes, hypertension or HIV / AIDS. Glucomoringin (4- (α -L-ramnosyloxy)benzyl glucosinolate) was identified as the main compound in Moringa, with 29.23 $\mu\text{mol/g}$ of dry tea weight and 21.78 $\mu\text{mol/g}$ of Moringa powder. The acetylated isomers of glucomoringin in both Moringa samples were identified in much smaller amounts.

Keywords: isolation, quantization, glucosinolates, Plant (*Lepidium meyenii*) and Moring (*Moringa oleifera*), UHPLC-DAD-MS/MS

Thesis contains: 35 pages, 5 tables, 21 pictures, 29 literary 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 - supervisor

Defence date: 7th September 2020.

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

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića i vodstvom Azre Đulović, mag. chem., u razdoblju od listopada 2019. do rujna 2020. godine.

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

Zahvala:

Zahvalnost, ovim putem, želim uputiti izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću koji je sa zadovoljstvom prihvatio mentorstvo za moj rad, a posebno želim zahvaliti na susretljivosti i utrošenom vremenu prilikom same izrade.

Veliku zahvalnost upućujem i asistentici Azri Đulović, mag. chem., za potrebnu opremu i sastojke za izradu eksperimentalnog dijela rada. Iznimno se zahvaljujem za izdvojeno vrijeme, razumijevanje, susretljivost i savjete koji su bili od velike pomoći prilikom izrade rada. Uvijek je bila spremna pomoći.

Hvala prijateljima koji su bili tu kada je trebalo slušati i kolegama s kojima sam prolazila kroz sve uspone i padove, te koji najbolje razumiju koliko je truda uloženo za dostizanje cilja.

Najveću zahvalnost upućujem svojoj obitelji koja me podržavala i neizmjereno cijenila svaku moju odluku i želju. Uvijek su bili tu za mene, kada sam mislila da nema izlaza i kada sam htjela odustati, ali i kada se trebalo radovati. Podržavali su odluke i kada se nisu slagali s njima, ali uvijek su vjerovali da mogu doći do kraja i postići konačni cilj.

Lorena

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Izolacija glukozinolata iz biljaka Maca (*Lepidium meyenii*, Brassicaceae) i Moringa (*Moringa oleifera* Moringaceae) metodom ekstrakcije uz desulfataciju.
2. Identifikacija izoliranih desulfoglukozinolata upotrebom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti uz detekciju tandemskim masenim spektrometrom (UHPLC-MS/MS).
3. Kvantizacija glukozinolata u prahu žutog i crvenog korijena Mace te Moringa praha i čaja.

SAŽETAK

Glukozinolati su sekundarni biljni metaboliti β -tioglukozidne strukture koji hrani biljnog podrijetla daju aromu, miris i okus. Smatraju se fitokemikalijama što znači da imaju potencijal u prevenciji različitih bolesti u ljudskom organizmu, a naročito pojave karcinoma.

U ovom radu provela se identifikacija glukozinolata, te kvantizacija glukozinolata u prahu žutog i crvenog korijena Mace te Moringa praha i čaja.

Lepidium meyenii (Brassicaceae) - Maca je bogata hranjivim elementima velike vrijednosti i sekundarnim metabolitima visoke biološke aktivnosti. U ovom radu određen je glukozinoladni profil iz dvije biljne vrste *L. meyenii*, žute i crvene. Kromatogram potvrđuje činjenicu da su prisutni slični glukozinolati. Glukotropeolin (benzil-glukozinolat) je u oba uzorka glavni pri čemu njegova količina u žutoj iznosi 7,02 $\mu\text{mol/g}$, a u crvenoj 8,96 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala. Glukotropeolin je praćen s glukolimnantinom (3-metoksibenzil-glukozinolat) čija koncentracija u žutoj iznosi 1,93 $\mu\text{mol/g}$, a u crvenoj 2,55 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala.

Moringa oleifera (Moringaceae), poznata kao Moringa, podrijetlom je iz sjeverozapada Indije. U Africi se često konzumira za samo-liječenje bolesnika koji su pogođeni dijabetesom, hipertenzijom ili HIV / AIDS-om. U Moringi kao glavni spoj izdvaja se glukomoringin (4-(α -L-ramnoziloksi)benzil-glukozinolat, zastupljen u čaju u količini od 29,23 $\mu\text{mol/g}$ i prahu 21,78 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala. Acetilirani izomeri glukomoringina u Moringi su zastupljeni u znatno manjim količinama.

Ključne riječi: izolacija, kvantizacija, glukozinolati, Maca (*Lepidium meyenii*) i Moringa (*Moringa oleifera*), UHPLC-DAD-MS/MS

SUMMARY:

Glucosinolates are plant secondary metabolites of β -thioglucoside structure that are responsible for flavour, aroma and taste of foods of plant origin. They are considered phytochemicals which means that they have the potential to protect the human body from various diseases, especially with the onset of cancer.

In this work, the identification of glucosinolates and the quantization of glucosinolates in the powder of yellow and red roots of Maca and Moringa powder and tea were examined.

Lepidium meyenii (Brassicaceae) - Maca is rich in nutrients of high value and secondary metabolites with high biological activities. In this paper, the glucosinolate profile from two plant species *Lepidium meyenii* (Maca), yellow and red, is correct. The chromatogram exposes the fact that similar glucosinolates are present. Glucotropeolin (benzyl glucosinolate) is the main glucosinolate in both samples having 7.02 $\mu\text{mol/g}$ of dry weight in yellow Maca powder, and 8.96 $\mu\text{mol/g}$ of dry weight in red Maca powder. Glucotropeolin was followed by glucolimnanthine (3-methoxybenzyl-glucosinolate), having 1.93 $\mu\text{mol/g}$ of yellow Maca powder and 2.55 $\mu\text{mol/g}$ of red Maca powder.

Moringa oleifera (Moringaceae), commonly known as Moringa, is native to north-western India. In Africa, it is often consumed for the self-treatment of patients affected by diabetes, hypertension or HIV / AIDS. Glucomoringin (4- (α -L-ramnosyloxy)benzyl glucosinolate) was identified as the main compound in Moringa, with 29.23 $\mu\text{mol/g}$ of dry tea weight and 21.78 $\mu\text{mol/g}$ of Moringa powder. The acetylated isomers of glucomoringin in both Moringa samples were identified in much smaller amounts.

Keywords: isolation, quantization, glucosinolates, the Plant (*Lepidium meyenii*) and Moring (*Moringa oleifera*), UHPLC-DAD-MS/MS

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO	2
1.1. GLUKOZINOLATI	2
1.2. STRUKTURA I SVOJSTVA GLUKOZINOLATA	2
1.3. SINTEZA I RAZGRADNJA GLUKOZINOLATA	4
1.3.1. Sinteza glukozinolata	4
1.3.2. Razgradni produkti i enzimska razgradnja glukozinolata	4
1.4. EKSTRAKCIJA GLUKOZINOLATA	5
1.5. KROMATOGRAFIJA	6
1.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	7
1.6. BRASSICACEAE	8
1.6.1. <i>Lepidium meyenii</i> (Maca prah)	9
1.7. MORINGACEAE	11
1.7.1. <i>Moringa oleifera</i> (Moringa)	12
2. EKSPERIMENTALNI DIO	13
2.1. KEMIKALIJE I APARATURA	13
2.2. BILJNI MATERIJAL	13
2.3. METODE IZOLACIJE	17
2.3.1. Ekstrakcija glukozinolata	17
2.3.2. UHPLC-DAD-MS/MS analiza	19
3. REZULTATI I RASPRAVA	21
3.1. MACA	21
3.2. MORINGA	25
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	33

UVOD

Proteklih tridesetak godina kontinuirano se istražuje povoljan biološki utjecaj fitokemikalija na zdravlje ljudi. Fitokemikalije su biološki aktivni sekundarni metaboliti koji hrani biljnog podrijetla daju boju, aromu, miris i okus, prirodnu toksičnost na štetnike i izrazito povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. Glukozinolati su sekundarni metaboliti biljaka koji se smatraju fitokemikalijama jer imaju pozitivan utjecaj na zdravlje. Pronađeni su u 16 botaničkih porodica reda Capparales, a najveće količine su pronađene u porodici Brassicaceae u koju ubrajamo kupus, brokulu, cvjetaču, prokulicu, repu, rotkvice.¹ Danas su dostupne velike količine podataka o sadržaju glukozinolata koji varira i uvelike može ovisiti o sorti, uvjetima uzgoja i klimi. Sami glukozinolati su kemijski stabilni i biološki neaktivni. Međutim, oštećenjem tkiva djelovanjem štetnika, preradom hrane ili žvakanjem dolazi do kontakta s enzimom mirozinazom što u konačnici dovodi do hidrolize odnosno glukozinolati se pretvaraju u razne razgradne produkte kao što su izotiocijanati, nitrili, tiocijanati.²

1. OPĆI DIO

1.1. Glukozinolati

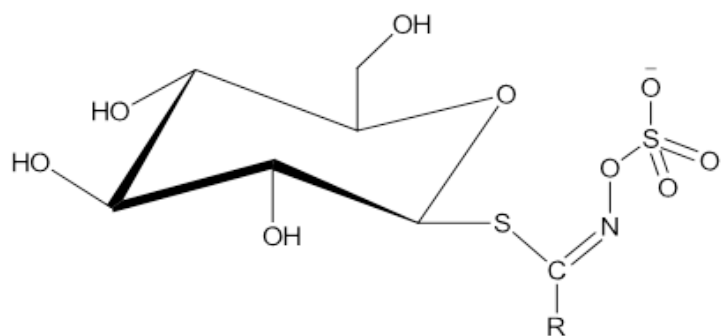
Glukozinolati su jedinstvena i važna skupina sekundarnih metabolita. Ubrajaju se u specifičnu skupinu kemijskih spojeva tzv. 'fitokemikalija' koja je zastupljena u 16 botaničkih porodica reda Capparales. Za prehranu ljudi najznačajnija je porodica Brassicaceae u koju se ubrajaju kupus, brokula, cvjetača, prokulice, rotkvica, repa, gorušica.

Glukozinolati su kemijski stabilni sve dok ne dođu u kontakt s enzimom mirozinazom (β -tioglukozid glukohidrolaza; EC 3.2.1.147). Hidroliziraju se u niz biološki aktivnih tvari, od kojih se ističu izotiocijanati. Osim što se konzumira svježe, povrće se vrlo često obrađuje, te se ovisno o uvjetima prerade, prisutni glukozinolati mogu razgraditi što može imati za posljedicu promjenu njihove biološke aktivnosti. Mnogobrojna epidemiološka istraživanja dokazala su i potvrdila pozitivan učinak konzumiranja povrća iz porodice Brassicaceae, a time i unosa glukozinolata u ljudski organizam. Osim što imaju pozitivan učinak u ljudskom organizmu, glukozinolati i njihovi razgradni produkti mogu imati i antinutritivni učinak, što je također bitno uzeti u obzir, međutim, potrebno je provesti još mnogo istraživanja u tom smjeru.³

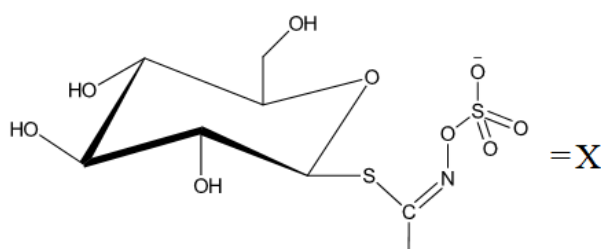
1.2. Struktura i svojstva glukozinolata

Glukozinolati su složena skupina spojeva tioglukozidne strukture. Glukozinolati imaju istu osnovnu strukturu: β -tioglukozidi u kojima je glikonski dio najčešće glukoza, a aglikonski dio tj. bočni lanac potječe od aminokiseline, prekursora u njihovoj biosintezi. Prema strukturi aminokiseline glukozinolati se dijele na: alifatske (nastali iz metionina, izoleucina, leucina i valina), indolne (nastali iz triptofana) i arilalifatski (nastali iz fenilalanina i tirozina).

Do danas je poznato više od stotinu različitih glukozinolata, ali samo se neki od njih nalaze u većim udjelima u pojedinim biljnim vrstama.⁴



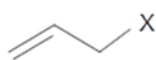
Slika 1.1. Opća struktura glukozinolata (R oznaka za bočni lanac).



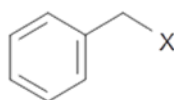
ALIFATSKI

ARILALIFATSKI

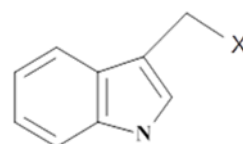
INDOLNI



sinigrin



glukonasturcin



glukobracin

Slika 1.2. Primjeri struktura glukozinolata (arilalifatski, alifatski i indolni) ovisno o bočnom lancu.

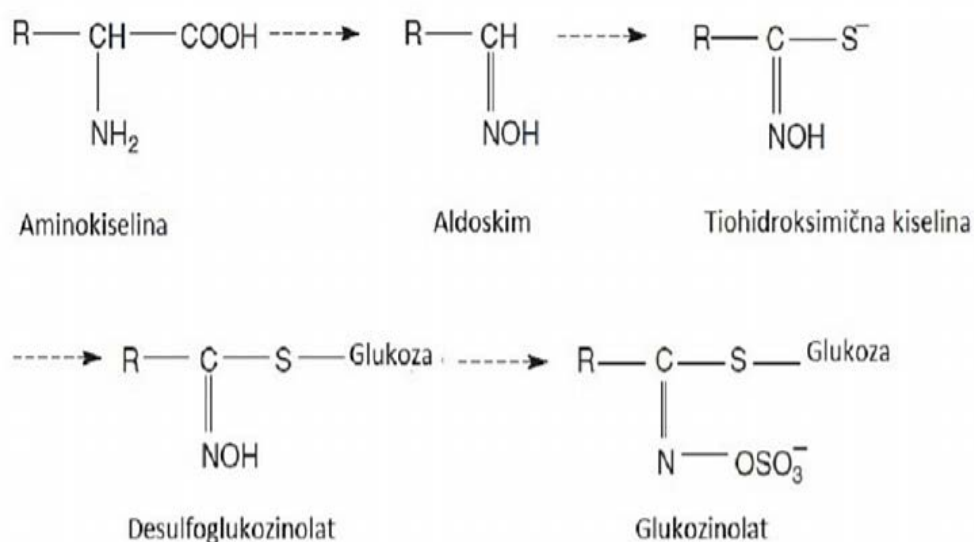
Najveći udjeli glukozinolata pronađeni su u sjemenu biljaka, a potom u drugim biljnim organima u aktivnim stupnjevima rasta. Iako su geni biosintetskog puta gotovo u cijelosti identificirani, regulacija biosinteze s ciljem manipulacije sastavom i udjelom glukozinolata u biljci nije dovoljno istražena.⁵ Kao i kod drugih sekundarnih metabolita njihov udio i sastav ovise o stupnju razvoja i okolišu u kojem se biljka nalazi.

1.3. Sinteza i razgradnja glukozinolata

Razgradnja glukozinolata je glavni uvjet za aktivaciju brojnih bioloških utjecaja koje imaju njihovi razgradni produkti. Glukozinolati su u svom osnovnom obliku stabilni i nemaju velik biološki značaj. Enzim mirozinaza se nalazi u stanicama biljaka. Prilikom oštećenja stanica, mirozinaza stupa u kontakt s glukozinolatima i katalizira njihovu razgradnju. Hidroliza glukozinolata vodi do oslobađanja određenih produkata koji mogu imati velik biološki i farmakološki značaj. Osim enzimske razgradnje, postoji i neenzimska (kemijska) razgradnja glukozinolata koja se može odvijati pod utjecajem kiselina ili lužina.⁶

1.3.1. Sinteza glukozinolata

Biosinteza glukozinolata može se podijeliti u tri stupnja: produženje lanca aminokiselina uvođenjem metilne skupine, pretvorba aminokiseline u osnovnu strukturu glukozinolata te oksidacijske modifikacije osnovne strukture. Prvi stupanj se odnosi samo na glukozinolate koji nastaju iz derivata metionina, a druga dva stupnja zajednička su za biosintezu svih glukozinolata.⁷ Kao i kod drugih sekundarnih metabolita njihov udio i sastav ovisi o stupnju razvoja i okolišu u kojem se biljka nalazi.



Slika 1.3. Pojednostavljena shema sinteze glukozinolata.³

1.3.2. Razgradni produkti i enzimska razgradnja glukozinolata

Razgradni produkti glukozinolata pokazuju niz bioloških aktivnosti, a smatra se i da su dio obrambenog mehanizma biljaka protiv napada insekata. Zbog svog toksičnog djelovanja na pojedine vrste insekata, mogu se upotrebljavati i kao pesticidi. Osim toga, produkti hidrolitičke razgradnje glukozinolata mogu značajno doprinijeti karakterističnoj aromi pojedinih vrsta povrća.⁸

Enzimsku razgradnju glukozinolata katalizira enzim mirozinaza. Istraživanja su pokazala da se enzimi nalaze u unutrašnjosti mirozinskih zrnaca, a to su glavne organele mirozinskih stanica, dok su glukozinolati smješteni u proteinskim tijelima (vakuolama) u nemirozinskim stanicama. Prilikom razgradnje glukozinolata nastaju glukoza-glukon i nestabilni međuprodukt koji se naziva aglukon. Aglukon se spontano pregrađuje i pri tome nastaju različiti razgradni produkti, a struktura bočnog lanca, uvjeti hidrolize i prisutni kofaktori određuju vrstu nastalog produkta.⁶

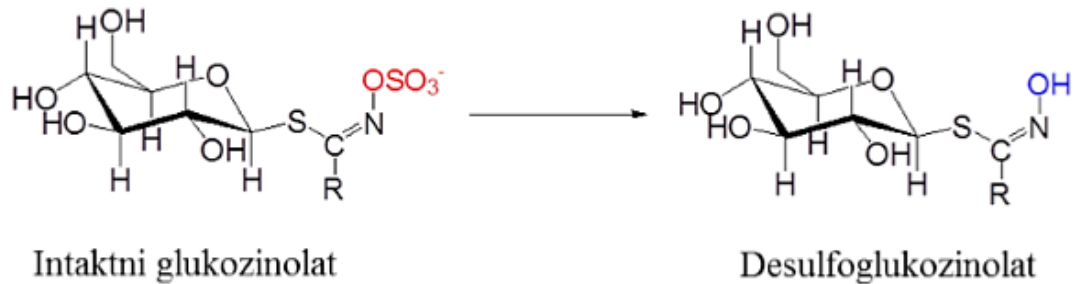
Izotiocijanati se već dugu niz godina smatraju „normalnim“ produktima razgradnje glukozinolata. Njihova opća formula je $R-N=C=S$. To su zapravo hlapljivi spojevi koji se očituju jakim mirisom i aromom. Nastanak izotiocijanata podrazumijeva da nestabilni aglukonski međuprodukt Lössenovom pregradnjom pređe u $R-N=C=S$ konfiguraciju. Izotiocijanati su prilično reaktivni, ali ipak manje u odnosu na njima srodne izocijanate. Izotiocijanati koji sadrže β -hidroksilnu skupinu u bočnom lancu imaju sposobnost da spontanom intramolekulskom reakcijom tvore cikličke tionske spojeve, odnosno oksazolidin-2-tione. Upravo ti spojevi su glavni produkti uljane repice.^{9,10}

1.4. Ekstrakcija glukozinolata

Metoda ekstrakcije glukozinolata iz biljnog materijala razvijena je zbog sve češćeg istraživanja glukozinolata u biljkama, a u svrhu njegovog pozitivnog učinka na ljudsko zdravlje. Sastoji se 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 HPLC analiza.¹³

Zbog velike zastupljenosti u biljkama, isparljivi sumporovi spojevi su često predmet istraživanja u svrhu ispitivanja njihovih bioloških svojstava. Pridodaju im se

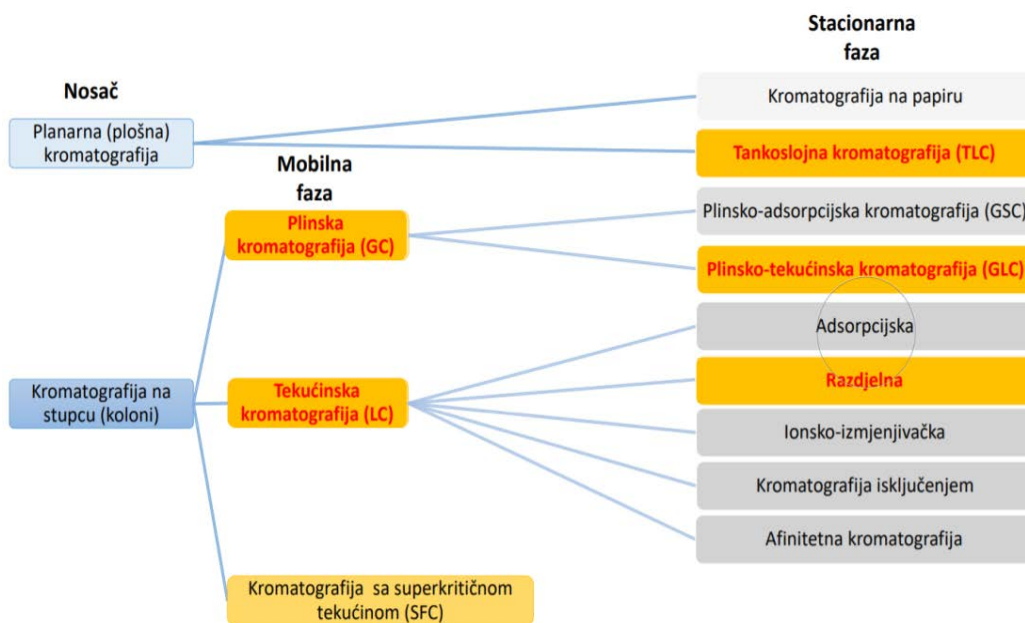
važna svojstva kao što su antioksidacijska, antitumorska i antibakterijska aktivnost. Posjeduju zajedničku strukturu koja sadrži β -D-tioglukoZnu grupu povezanu sa sulfoniranim aldoksidom i različitim dužinama lanaca koji se izvode iz aminokiselina, pa se stoga pristupa desulfataciji koja se provodi 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.^{14,15}



Slika 1.4. Reakcijska shema desulfatacije glukozinolata.¹⁴

1.5. Kromatografija

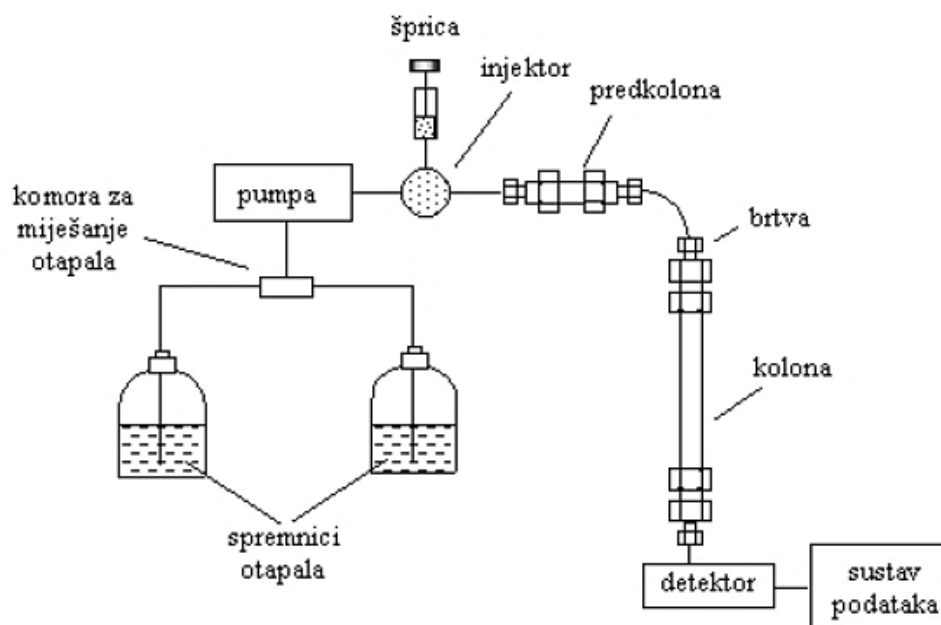
Kromatografija je metoda odjeljivanja koja se zasniva na različitoj razdiobi tvari između mobilne i stacionarne faze sustava. Dvije faze sustava između kojih dolazi do raspodjele mogu biti: kruto–tekuće (kromatografija na koloni, tankoslojna kromatografija, kromatografija na papiru), tekuće–tekuće i tekuće–plinovito (plinska kromatografija). Tankoslojna kromatografija kao i kromatografija na koloni zasniva se na razdiobi tvari između krutog adsorbensa i tekuće mobilne faze. Kod kromatografije u koloni otapalo zbog gravitacijske sile struji prema dolje, kod tankoslojne kromatografije otapalo se uspinje zbog kapilarnih sila na krutom adsorbensu.¹⁶



Slika 1.5. Podjela kromatografije¹⁷

1.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

HPLC je visokodjelotvorna razdjelna kromatografija koja se u 75% primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. Osnovni konstrukcijski dijelovi u HPLC kromatografu su rezervoar za otapala pokretne faze, pumpa, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona za odjeljivanje i detektor.



Slika 1.6. Shematski prikaz HPLC kromatografa.¹⁸

Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće i treba ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica, npr. pomoću mikroporoznih filtera pod vakuumom. Pumpa služi za unos pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnim protokom (0,1-10 ml/min) u kolonu. Kolona je najčešće cijev izrađena iz nehrđajućeg čelika. Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze ili otopljene tvari.

HPLC se koristi za odjeljivanja i određivanja polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi. Npr. važna je primjena HPLC-a u ispitivanjima hrane, zraka, industrijskih procesnih i drugih otpadnih tekućina na prisustvo i sadržaj štetnih tvari, npr. pesticida, polikloriranih bifenila kao potencijalnih karcinogena i mutagena. HPLC se isto tako koristi za odjeljivanje alkana, lipida, steroida, šećera, lipofilnih vitamina, itd.¹⁸

Vezani sustav tekućinska kromatografija visokog učinka - tandemska masena spektrometrija (HPLC-DAD-MS/MS) omogućava odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica. Moguće je izvršiti kvalitativnu analizu koja se sastoji od snimanja uzorka, određivanja molekulske mase spoja, određivanja prekursora određenog fragmenta te analize fragmentacije određenog molekuskog iona. Prednost ovog sustava je istovremeno praćenje analize korištenjem dvaju detektora: DAD (engl. *diode array detektor*) koji ima mogućnost izbora do 8 valnih duljina i spektrometra mase (do 3000 Da).¹⁹

1.6. Brassicaceae

Porodica *Brassicaceae* obuhvaća više od 300 rodova i više od 3000 vrsta u svijetu. Većina uspijeva na području umjerene klime, ali ih ima i u tropskom i u subtropskom području. Najveći dio vrsta iz ove porodice su povrćarske kulture, osim toga ima uljarica, začinskih i ukrasnih biljaka. Najvažniji je rod *Brassica* s oko 40 vrsta među kojima je brojno lisnato i korjenasto povrće. Za cijelu porodicu je karakteristična ljutina koja dolazi od glukozinolata, koji djelovanjem enzima mirozinaza daje gorko-ljuti okus. U procesu razgradnje biljnih dijelova u tlu, glukozinolati pomoću mirozinaza prelaze u međuproizvode npr. izotiocijanate koji djeluju biocidno na štetne mikroorganizme (gljive, bakterije i neke insekte). Podrijetlo većina vrsta iz roda *Brassica* potječe iz Sredozemlja, Kine i Japana. Vrste su dvogodišnje, iznimno jednogodišnje zeljaste

biljke, vjerojatno nastale mutacijama, prilagodbama ekološkim uvjetima i djelovanjem čovjeka.

U početku vegetativne faze formira se rozeta krupnog debelog lišća prekrivenog voštanom prevlakom, a u generativnoj fazi razgranata cvjetna stabljika, koja na vrhovima grana nosi grozdaste cvatove.

Cvjetovi imaju:

- 4 lapa
- 4 žute latice
- 6 prašnika
- dvogradnu plodnicu.

Plod je komuška s unutrašnjom pregradom, sjeme je sitno, okruglog oblika sivo-smeđe boje.²⁰



Slika 1.7. Maca prah.

1.6.1. *Lepidium meyenii* (Maca prah)

Lepidium meyenii Walp(Maca) je jestiva korijenska biljka koja raste u andskoj regiji Perua. Razmnožava se sjemenom, nakon sadnje počinje klijati od roku 5 dana. Mace se razlikuju u veličini i obliku korijena, pa može biti trokutasta, spljoštena kružna, sferna ili pravokutna. Može biti zlatna, crvena, žuta, ljubičasta, crna i zelena. Treba joj 8 do 10 mjeseci da postigne zrelost za branje. Koristi se u prehrani ljudi (brašno, sok, prženje, sušenje) i kao hrana za životinje. Razlika između žute, crvene i crne Mace osim u boji je i u suptilno različitim koristima koje nam ona pruža. U ovom radu koristi se crveni i žuti Maca prah.²¹

Predstavlja glavni izvor energije, jer je bogata bjelančevinama, vlaknima, ugljikohidratima, sadrži oko 10% kalcija i značajnu količinu magnezija i kalija. Sadrži i željezo, silicij, magnezij, jod, a od vitamina tiamin, riboflavin i askorbinsku kiselinu.

Maca ublažava simptome menopauze i hormonalnih poremećaja, može liječiti i sterilnost kod muškaraca jer povećava proizvodnju i pokretljivost spermija, jača spolnu moć - prirodna Viagra, sprječava pojavu rahitisa i osteoporoze, podiže energiju i jača imunološki sustav, pomaže u borbi protiv sindroma kroničnog umora.^{22,23}

Stoljećima se biljka koristi kao dodatak prehrani zbog svojih prehranbenih i terapijskih svojstava. Zbog svih blagodati koje pruža čovjeku svrstana je u kategoriju superhrana. Maca je bogata hranjivim elementima velike vrijednosti i sekundarnim metabolitima (makaridin, makamidi i glukozinolati) visoke biološke aktivnosti. Nekoliko studija pokazalo je različite biološke učinke Mace uglavnom u području plodnosti.²³

Odsjek za psihijatriju pri Općoj bolnici Massachusetts u Bostonu i Odsjek za psihijatriju i bihevioralne znanosti Sveučilišta Emory u Atlanti proveli su ispitivanje na korišćenju crvene Mace. Zaključeno je da crvena Maca može ublažiti seksualnu disfunkciju izazvanu SSRI-om (vrsta antidepresiva) kod žena u postmenopauzi.²⁷

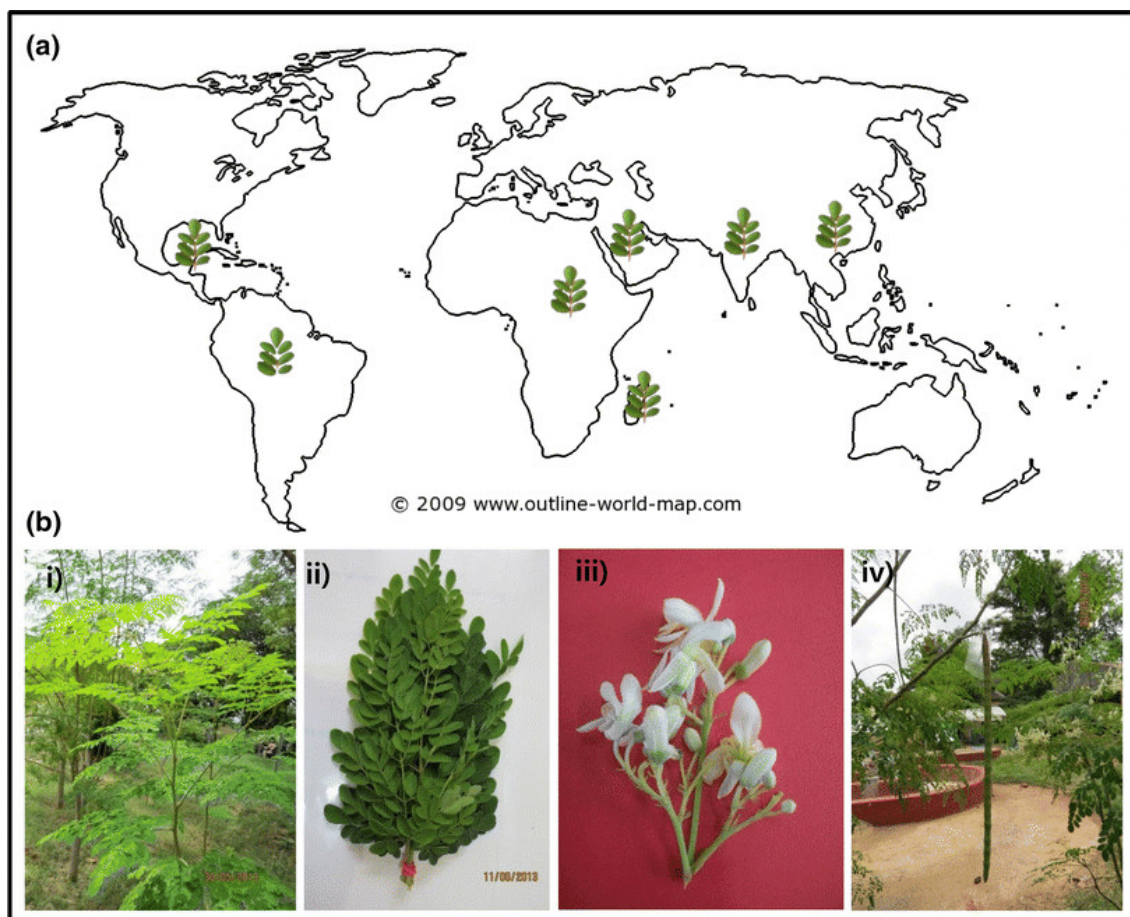
Žuta Maca prah ima osebujan okus, a prah je bež boje. Žuta sadrži gotovo sve esencijalne aminokiseline i slobodne masne kiseline, značajnu razinu vitamina A, B1, B2, B3 i C, minerale, željezo, magnezij, cink i kalcij. Sadrži visoku koncentraciju proteina i hranjive tvari jedinstvene za Macu zvane *macaenes* i *macamides*. Maca je također adaptogen i rijedak oblik biljaka za koji se misli da podiže ukupnu životnu energiju onih koji ga konzumiraju.⁴



Slika 1.8. Nutrigold crveni Maca prah i bio&bio žuti Maca prah.

1.7. Moringaceae

Moringa (lat. *Moringa*), smješten je u vlastitu porodicu Moringaceae. Pripada mu desetak vrsta drveća iz tropske Azije i Afrike, a najpoznatije među njima je korisno drvo ostrip ili željud. Biljke porodice Moringaceae su drvenaste biljke; grmovi sa krupnim stabljikama ili stabla. Obzirom da preferiraju sušna područja, neke od biljnih vrsta mogu pohraniti velike količine vode u deblima ili imaju podzemni dio koji može podnijeti duga sušna razdoblja. Porodica je prepoznatljiva po spiralno poredanim listovima sa zadebljanjima na bazama koja im omogućavaju kretanje nevezano uz rast. Cvjetovi im izgledaju kao cvjetovi graška, ali se razlikuju u tome što imaju pet prašnika smještenih na jednoj strani cvijeta. Plodovi su im izduženi i sastoje se od tri dijela, a kad sazriju, eksplozivno pucaju otpuštajući pritom sjemenke s krilcima.^{23,24}



Slika 1.8. a) Rasprostranjenost *Moringe* u svijetu; **b)** Izgled dijelova biljke: i) stablo; ii) listovi; iii) cvijet; iv) komuška.²⁸

1.7.1. *Moringa oleifera* (Moringa)

Moringa oleifera Lam(Moringaceae), obično poznata kao Moringa, porijeklom je iz sjeverozapada Indije, a široko se uzgaja u tropskim i suptropskim područjima. U Africi ga se često konzumira za samo-lijecenje bolesnika koji su pogođeni dijabetesom, hipertenzijom ili HIV / AIDS-om. U esencijalnim uljima kao glavni sastojci pronađeni su pentakozan, heksakozan, (*E*)-fitol i 1-[2,3,6-trimetilfenil]butan-2-on. U biljci je također pronađeno nekoliko fenola kao i izotiocijanata.²⁶

Različiti dijelovi ove biljke sadrže važne minerale i dobar su izvor bjelančevina, vitamina, β -karotena, aminokiselina i raznih fenolnih kiselina. Omogućuje bogatu i rijetku kombinaciju zeatina, β -sitosterola, kofeoilkininske kiseline i kaempferola. Za biljku se navodi da ima različite biološke aktivnosti. Tradicionalno se koristi za pročišćavanje vode u Aziji i Africi, zbog svojih učinkovitih svojstava koagulacije. Značajan oporavak enzima i neenzimskog oksidacijskog stresa u krvi i jetri ukazuje na dvostruki mehanizam kojim sjemenke, smanjujući arsenski teret, neizravno smanjuju oksidacijski stres izazvan arsenom, izvodeći izravne mehanizme čišćenja slobodnih radikala i pojačavanja antioksidansa. Preventivni učinci ekstrakta sjemena *Moringa oleifera* povezani su s njegovom aktivnošću u modulaciji enzima biotransformacije kako bi se olakšala detoksikacija. Ekstrakt sjemena pokazuje izraženi antimikrobni i hepatoprotektivni potencijal.²⁴



Slika 1.9. Nutrigold prah i čaj *Moringe oleifere*.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Kemikalije i aparatura

U eksperimentalnom dijelu rada korištene su sljedeće kemikalije:

- 70% metanol (MeOH), Gram-Mol d.o.o, Zagreb, Hrvatska,
- Ultra čista voda,
- Natrijev acetat (NaOAc), Merck, Darmstadt, Njemačka,
- Dekstran (DEAE-sephadex A-25), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD,
- Sulfataza, (iz *Helix pomatia*, tip H-1), Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD.

U eksperimentalnom dijelu rada korištena je sljedeću aparaturu:

- Električni mlinac za kavu, Sencor Europe, Prag, Češka Republika,
- Analitička vaga, Explorer® Semi-Micro, OHAUS, SAD,
- Vortex, Dragon lab, MX- S,
- Homogenizator, Omni International, Kennesaw, Georgia, SAD,
- Ultrazvučna kupelj, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka,
- Vodena kupelj, Julabo, Seelbach, Njemačka,
- Centrifuga, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Njemačka,
- Laboratorijske čaše,
- Centrifugalne mikroeprovete,
- Kapalice,
- UHPLC-DAD-MS/MS, Thermo Fischer Scientific, SAD.

2.2. Biljni materijal

Biljka *Lepidium meyenii* (Maca) koja je korištena u ovom radu je komercijalno pribavljeni prah crvenog korijena proizvođača Nutrigold te prah žutog korijena proizvođača bio&bio, oba podrijetlom iz Perua. Bogata nutritivna vrijednost crvenog i žutog Maca praha podvrgnuta je podacima navedenim u sljedećim tablicama (tablica 1. i 2.).

Tablica 1. Nutritivne vrijednosti crvenog Maca praha (Proizvođač: Nutrigold)

NUTRITIVNE VRIJEDNOSTI NA 100 GRAMA	
Energetska vrijednost	1448 kJ/ 342 kcal
Masti- zasićene masne kiseline	1 g 0,5 g
Ugljikohidrati- od kojih šećeri	67,2 g 24,2 g
Bjelančevine	11,9 g
Vlakna	10,1 g
Soli	0,53 g

Crveni Maca prah ima najbolju energetska vrijednost, sadrži bolji profil antioksidansa, kao i alkaloida i tanina, od maca praha koji je nastao iz korijena druge boje.



Slika 2.1. Maca prah od crvenog korijena (Proizvođač: Nutrigold).

Tablica 2. Hranjive vrijednosti žutog Maca praha (Proizvođač: bio&bio)

PROSJEČNE HRANJIVE VRIJEDNOSTI NA 100 GRAMA	
Energetska vrijednost	1233 kJ/ 290 kcal
Masne kiseline-	0,6 g
zasićene masne kiseline	0,1 g
Ugljikohidrati-	61,3 g
od kojih šećeri	36,2 g
Bjelančevine	9,7 g
Vlakna	0,5 g
Soli	0,045 g
Vitamin B3 (niacin)	42,2 mg/ 264% PU
Vitamin B2 (riboflavin)	0,65 mg/ 46% PU
Vitamin B1 (tiamin)	0,52 mg/ 47% PU
Kalij	1030 mg/ 52% PU
Fosfor	300 mg/ 43% PU
Željezo	16,6 mg/ 119% PU

PU=preporučeni dnevni unos

Žuti Maca prah naziva se prehrambenom velesilom. Sadrži gotovo sve esencijalne aminokiseline i slobodne masne kiseline, te značajnu razinu vitamina A, B1, B2, B3 i C, minerale, željezo, magnezij, cink i kalcij. Sadrži visoku koncentraciju proteina i hranjive tvari.

Druga biljka koja je korištena je 100% sirova Moringa u prahu iz ekološkog uzgoja, *Moringa oleifera* proizvođača Nutrigold, podrijetlom iz Indije te organski čaj od Moringe istog proizvođača, podrijetlom iz Kine.

Tablica 3. Nutritivne vrijednosti Moringa praha (Proizvođač: Nutrigold)

NUTRITIVNE VRIJEDNOSTI NA 100 GRAMA	
Energetska vrijednost	1349 kJ/ 320 kcal
Masti- zasićene masne kiseline	2,3 g 0,6 g
Ugljikohidrati- od kojih šećeri	38,2 g 14,7 g
Bjelančevine	27,1 g
Sol	0,3 g

Biljka Moringa je bogata željezom, te obiluje kalijem, magnezijem, cinkom i bakrom. Također je bogat izvor vitaminima A i E, te sadrži vitamine B1, B2 i B3 koji doprinosi smanjenju iscrpljenosti.



Slika 2.2. Moringa prah (Proizvođač: Nutrigold).

2.3. Metode izolacije

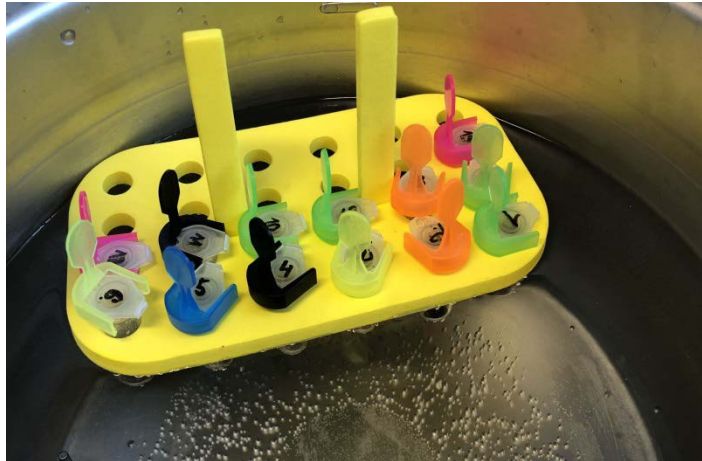
2.3.1. Ekstrakcija glukozinolata

Postupak rada za izolaciju glukozinolata uz desulfataciju koja je provedena u ovom diplomskom radu prema prethodno opisanoj proceduri.²⁶

1. Priprema otopina potrebnih za ekstrakciju glukozinolata
 - Pripremljeno je 500 mL 70% metanola (MeOH) u ultračistoj vodi u staklenoj boci.
 - Pripremljeno je 20 mM natrijevog acetata (NaOAc) (pH = 5,5).
 - Za pripremu materijala stupca pomiješa se 10 g umreženog dekstranskog gela s 125 mL ultračiste vode, te se dobivena smjesa čuva u hladnjaku (4 ° C).
2. Priprema otopine sulfataze
 - Otopljeno je 10 000 jedinica aril-sulfataze u 30 mL ultračiste vode i dodano 30 ml apsolutnog etanola (EtOH).
 - Smjesa se centrifugira 20 min na sobnoj temperaturi (RT) i dodaje se 90 ml EtOH i miješa. Centrifugira se smjesu u jednoj ili više epruveta za centrifugu.
 - Supernatanti se odbace, a preostali dio otopi u 25 mL ultračiste vode.
 - Dobivenu otopinu se vorteksira.
3. Priprema referentne otopine sinigrin
 - Odmjereno je otprilike 9 mg sinigrin monohidrata, te prebačeno u tikvicu od 10 mL.
 - Otopi se sinigrin monohidrat u 10,0 mL ultračiste vode.
 - Razrijedi se referentne uzorke sinigrina u reakcijske epruvete od 1,5 mL i zamrzne ih na 20 °C do neposredno prije upotrebe.
4. Priprema ekstrakcijskih kolona i tube za ekstrakciju
 - Pripremljen je nosač stupaca za Pasterove pipete koje su napunjene vunom otprilike 1 cm, te je sve postavljeno u posudu za prikupljanje otpada.
 - U svaku pipetu odpipetiramo 0,5 mL pripremljenog dekstrana i po 1 mL ultračiste vode u svrhu ispiranja materijala.

5. Ekstrakcija glukozinolata

- Biljni materijal izvagan je (oko 100 mg) u tube.
- Otpipetirano je po 1 mL 70% MeOH u svaku epruvetu i nakon toga vorteksirano.
- Tube se zatvore i stave sigurnosne kapice, te zagrijavaju u vrućoj vodenoj kupelji (oko 90 ° C) pet minuta, sve dok metanol ne zavre.



Slika 2.3. Zagrijavanje ekstrakta na vodenoj kupelji na 90°C.

- Nakon vodene kupelji uzorke se stave u ultrazvučnu kupelj otprilike deset minuta, nakon čega slijedi centrifugiranje uzorka deset minuta na 2700 okr/min.



Slika 2.4. Ekstrakcija na ultrazvučnoj kupelji.

- Nakon centrifugiranja supernatant se otpipetira u kolone.
- Dodaje se 1 mL 70% MeOH u preostale tubice s biljnim materijalom i ponovimo postupak te se supernatant otpipetira u kolone.
- U sljedećem koraku ispiru se kolone tako da se u svaku kolonu otpipetira dva puta po 1 mL 70% MeOH. Pričeka se da se stupac osuši prije dodavanja sljedećih 1 mL, čime se uklanja više nepolarnih spojeva iz ekstrakata.
- MeOH se ispire tako da mu se doda 1ml ultračiste vode u svaku kolonu. Nakon toga pipetira se dva puta sa po 1 mL 20 mM NaOAc pufera u svaku kolonu kako bi se stvorili optimalne uvjete za reakciju sulfataze.
- Nakon što je sva tekućina iskapala, izvadi se posuda s otpadom i osuši dno kolone i postavite stalak tako da kolona s odgovarajućim uzorkom bude uronjena u tubu s odgovarajućom oznakom.
- Dodaje se 20 μ L otopine sulfataze u kolone i pipetira 50 μ L NaOAc pufera u svaku kolonu za ispiranje sulfataze.
- Kolone se prekriju aluminijskom folijom i ostave da odstoje preko noći.
- Sljedećeg dana eluira se desulfoglukozinolate pipetiranjem dva puta po 0,75 mL ultračiste vode u svaku kolonu. Nakon što se kolone osuše, ukloni se stalak iz tuba te ih začepi kako bi liofilizacijom uklonili vodu. Nakon liofilizacije talog se otopi u 1 mL ultračiste vode.
- Prenesu se uzorci i pet referentnih uzoraka sinigrina u označene HPLC bočice.

2.3.2. UHPLC-DAD-MS/MS analiza

Uređaj UHPLC-DAD-MS/MS Ultimate 3000RS s TSQ Quantis MS/MS detektorom (Thermo Fischer Scientific, SAD) na koloni Hypersil GOLD 3.0 mm \times 100 mm, promjera čestica 3.0 μ m (Thermo Fischer Scientific, SAD) koristi za analizu desulfoglukozinolata koji su dobiveni ekstrakcijom uz desulfataciju. Vodu (otapalo A) se koristi kao mobilnu fazu i 30% acetonitril (otapalo B) uz protok od 0.5 mL/min kako slijedi: 0.14 min 96% A i 4% B; 7.84 min 14% A i 86% B; 8.96 min 14% A i 86% B; 9.52 min 5% A i 95% B; 13.16 min 5% A i 95% B; 13.44 min 96% A i 4% B; 15.68 min 96% A i 4% B. Temperatura kolone 25 $^{\circ}$ C i injektirani volumen uzorka 5 μ L održava se tijekom cijelog rada. DAD detektorom snimani su signali pri 227 nm, a maseni spektri snimani su u pozitivnom modu pri 350 $^{\circ}$ C. Za kvantizaciju

desulfoglukozinolata kao eksterni standard korišten je desulfosinigrin, odnosno baždarni pravac koji se kreće u rasponu koncentracija od 13,56 do 542,50 μM . Za izračun svakog pojedinog desulfoglukozinolata koriste se literaturne vrijednosti za faktore odziva.



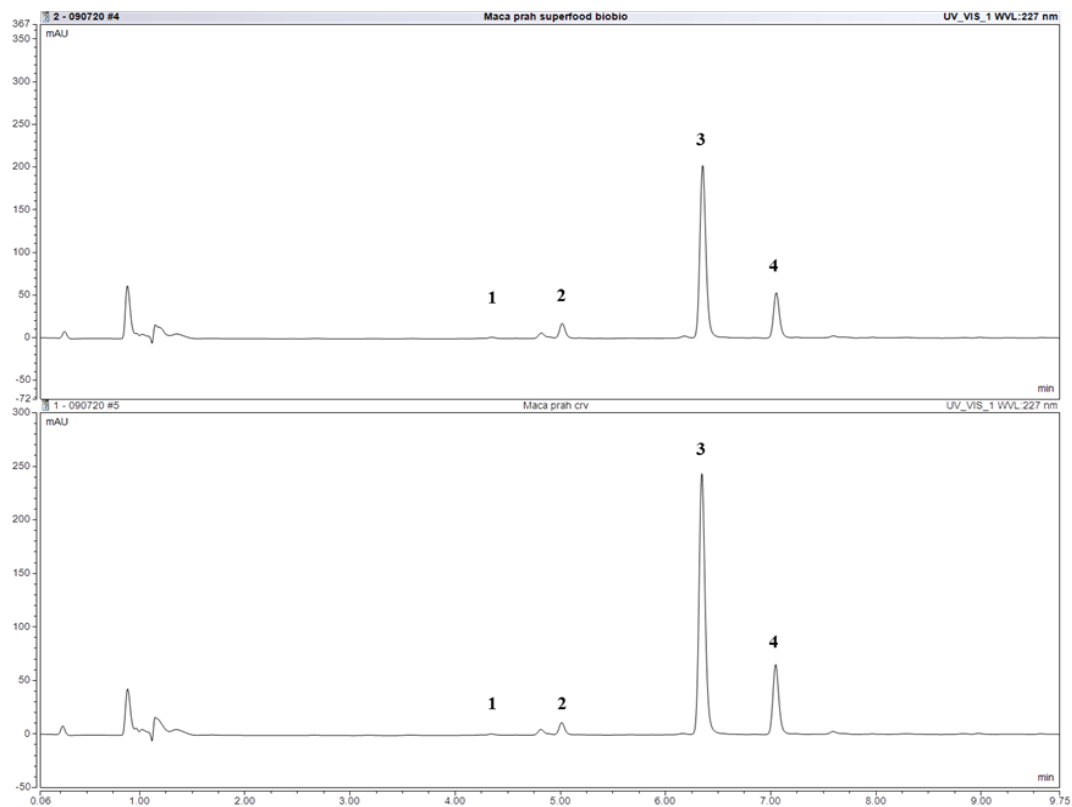
Slika 2.5. UHPLC-DAD-MS/MS uređaj.

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određen je glukozinolatni profil iz dvije biljne vrste *Lepidium meyenii* (Maca) i *Moringa oleifera* koje pripadaju dvjema različitim porodicama poznatim po glukozinolatima. Prednosti i dobrobiti ovih dodataka prehrani poznate su od davnina, ali posljednjih godina su postali popularni kao superhrana (engl. *superfood*), odnosno kao namirnice s vrlo visokim količinama različitih fitonutrijenata koje pridonose ljudskom zdravlju. Korišteni su komercijalno pribavljeni prah žutog i crvenog korijena Mace podrijetlom iz Perua te 100% sirova Moringa u prahu iz ekološkog uzgoja podrijetlom iz Indije i Moringa čaj podrijetlom iz Kine. Ekstrakcija smjesom metanola i vode je napravljena iz 100,0 mg uz grijanje pri 90 °C u svrhu inhibicije enzima mirozinaze odgovorne za razgradnju glukozinolata. Ekstrakti su pročišćeni na ionsko-izmjenjivačkoj koloni koja sadrži dekstran, ispiranjem 70% metanolom i ultračistom vodom uklonjene su nepolarne komponente, kao što je klorofil. Dodatkom sulfataze, glukozinolati su desulfatizirani i kao takvi analizirani na UHPLC-MS/MS.

3.1. Maca

Analizom su uočena četiri signala koja odgovaraju desulfoglukozinolatima izoliranim iz Maca praha za oba uzorka, prah žutog te crvenog korijena Mace (slika 3.1.). Za identifikaciju korištena su vremena zadržavanja, UV spektri snimljeni pri 227 nm za pojedini signal te maseni spektri.



Slika 3.1. UHPLC kromatogrami desulfoglukoziolata: a) Maca žuti prah; b) Maca crveni prah. 1 - desulfoglukosinalbin, 2 - desulfoglukolepigramin, 3 - desulfoglukotropeolin, 4 - desulfoglukolimnantin.

Kvantizacija je napravljena preko kalibracijske krivulje sinigrina uz primjenu faktora odziva za svaki od pojedinih spojeva

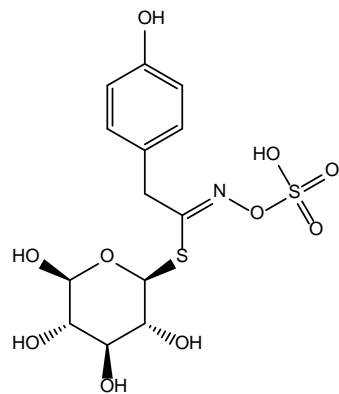
- glucosinalbin 0,5
- glucolepigramin 1,00
- glucotropaeolin 0,95
- glucolimnanthin 1,00.

Tablica 4. Glukozinolati identificirani u ekstraktu žutog i crvenog korijena Mace

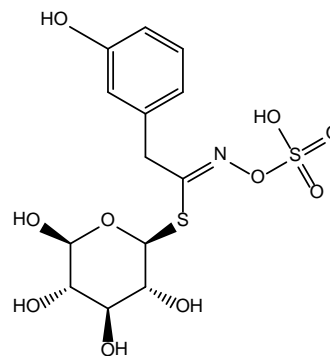
Ime spoja (trivijalni naziv)	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoGL + Natrij	Količina ($\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala Mace)	
			Žuta	Crvena
4-Hidroksibenzil- glukozinolat (Glukosinalbin)	4,37	368	Tr	Tr
3-Hidroksibenzil- glukozinolat (Glukolepigramin)	5,02	368	0,49	0,39
Benzil-glukozinolat (Glukotropeolin)	6,36	352	7,02	8,96
3-Metoksibenzil- glukozinolat (Glukolimnantin)	7,05	382	1,93	2,54

Tr – tragovi; desulfoGL – desulfoglukozinolat

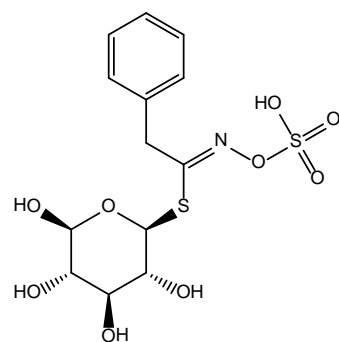
Iz tablice se može vidjeti da su u Maci prisutni vrlo slični glukozinolati, te da su u žutom i crvenom Maca prahu navedeni glukozinolati zastupljeni u sličnim koncentracijama. Glukotropeolin (benzil-glukozinolat) je u oba uzorka glavni glukozinolat pri čemu njegova količina u žutoj iznosi 7,02 $\mu\text{mol/g}$, a u crvenoj 8,96 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala. Glukolimnantin (3-metoksibenzil-glukozinolat) predstavlja sljedeći glukozinolat po sadržaju, a čija koncentracija u žutoj iznosi 1,93 $\mu\text{mol/g}$ te crvenoj 2,55 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala. Preostala dva glukozinolata su izomeri s hidroksilnom skupinom u para i meta položaju, od kojih je glukosinalbin (4-hidroksibenzil-glukozinolat) prisutan u tragovima, dok je glukolepigramin (3-hidroksibenzil-glukozinolat) prisutan u nešto većoj koncentraciji.



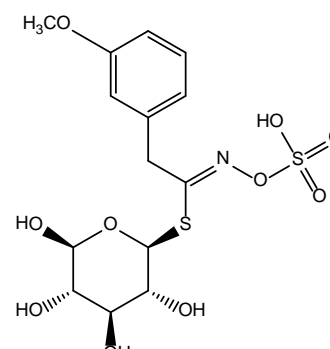
Glukosinalbin



Glukolepigramin

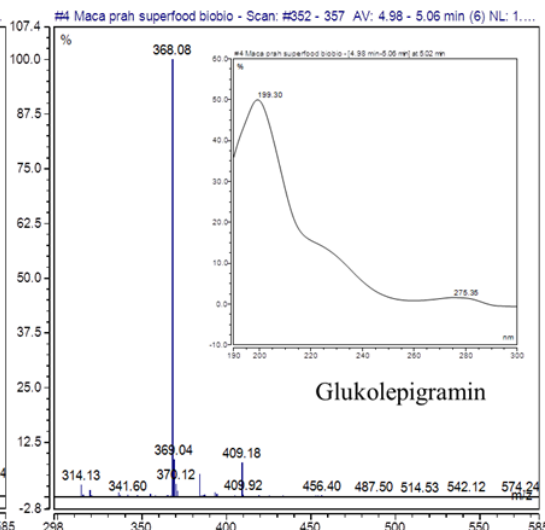
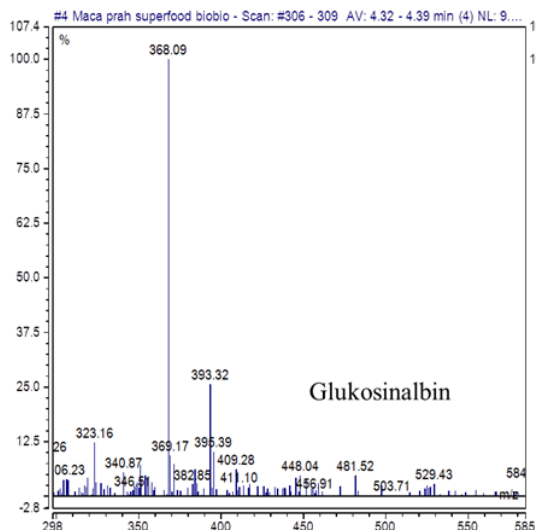


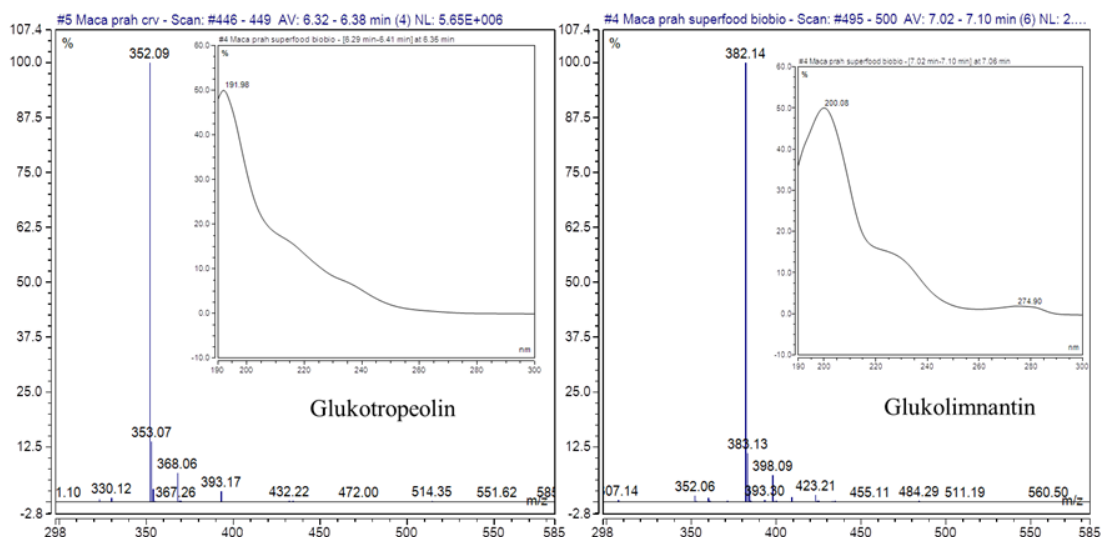
Glukotropeolin



Glukolimnantin

Pogledaju li se kemijske strukture spojeva tj. glukozinolata koji se nalaze u Maca prahu vidi se da su zastupljeni strukturno vrlo slični spojevi. Uglavnom su to arilalifatski glukozinolati, od kojih je jedan čisti aromatski spoj, dva sa hidroksilnom skupinom i jedan s metoksi skupinom na benzenovoj jezgri. Također može se vidjeti da su prisutna dva izomera od kojih je glukosinalbin s hidroksilnom skupinom u para položaju, a glukolepigramin u meta položaju.





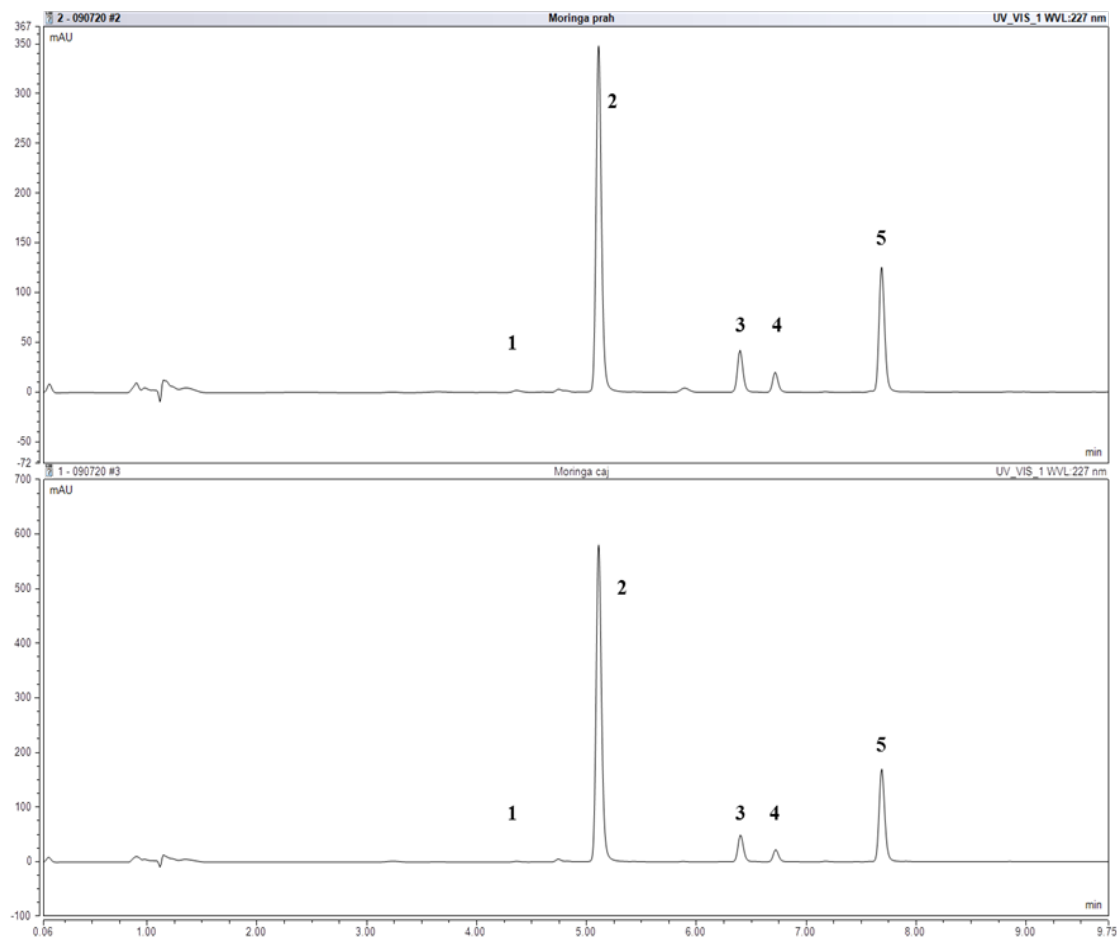
Slika 3.2. Maseni i UV spektri identificiranih desulfoglukozinolata.

Na masenom spektru namješteno je prvotno snimanje svih masa (engl. *full scan mode*) u zadanom području od 150 do 1000 Da u svrhu identifikacije molekulskih iona. U ovom slučaju molekulski ion odgovara masi desulfoglukozinolata s vezanim ionom natrija, $[M-H+Na]$, ($A_r(Na)=23$). UV spektri glukozinolata imaju karakteristične apsorpcijske vrpce ovisno o skupini kojoj pripadaju, alifatski, arilalifatski, indolni (slika 1.2.). UV spektri su uspoređeni s literaturnim te su prikazani na sljedećim slikama zajedno s masenim spektrima za svaki od navedenih desulfoglukozinolata.

Molekulski ion glukosinalbina je detektiran kao $m/z=368$ isto kao i glukolepigramin. Prethodno navedena dva glukozinolata bi trebala imati isti UV spektar jer je razlika samo u poziciji hidroksilne skupine što potvrđuje da su izomeri. Glukolimnantin ima metoksi skupinu pa ima sličan UV spektar, dok glukotropeolin koji je čisti aromatski spoj ima vrlo malu apsorpciju.

3.2. Moringa

Uzorci Moringa praha i Moringa čaja analizirani su na UHPLC-MS/MS te uspoređeni. Identificirani su desulfoglukosinalbin, desulfoglukomoringin kao glavni te tri *O*-acetilirana izomera glukomoringina (slika 3.2.). Prethodna istraživanja pokazala su da tijekom desulfatacije dolazi do hidrolize ramnozidne veze u glukomoringinu te kao artefakt nastaje glukosinalbin.²⁹ Drugim riječima, ovaj glukozinolat nije prisutan izvorno u biljnom materijalu već nastaje prilikom pripreme uzorka za analizu.



Slika 3.2. UHPLC kromatogrami desulfoglukozinolata: a) Moringa prah; b) Moringa čaj. 1 - desulfoglukosinalbin, 2 - desulfoglukomoringin, 3 - desulfo *O*-acetilirani izomer glukomoringina I, 4 - desulfo *O*-acetilirani izomer glukomoringina II, 5 - desulfo *O*-acetilirani izomer glukomoringina III.

Kvantizacija je napravljena preko kalibracijske krivulje sinigrina uz primjenu faktora odziva za svaki od pojedinih spojeva:

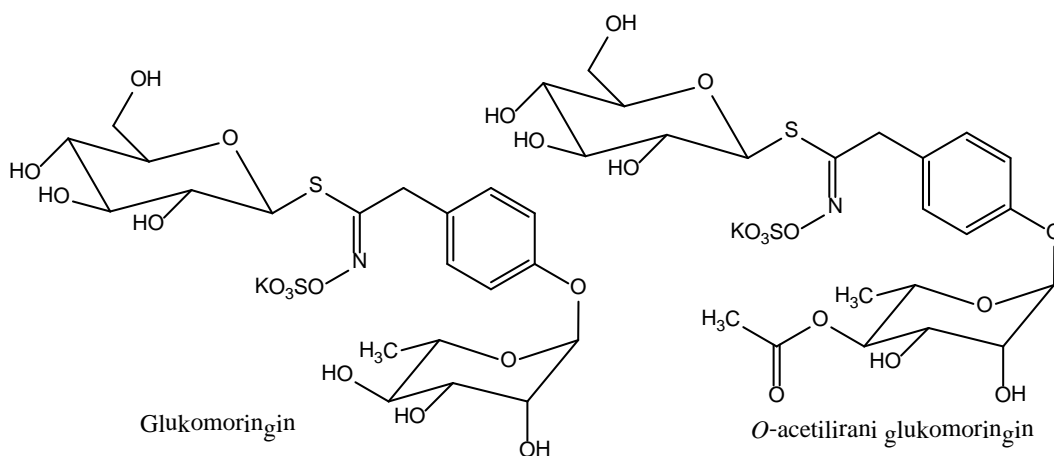
- glukosinalbin 0,5
- glukomoringin 1,00
- *O*-acetilirani izomer glukomoringina I 1,00
- *O*-acetilirani izomer glukomoringina I 1,00
- *O*-acetilirani izomer glukomoringina III 1,00.

Tablica 5. Glukozinolati identificirani u ekstraktu biljnog materijala Moringa

Ime spoja	Vrijeme zadržavanja (min)	Masa desulfoGL + Natrij	Količina ($\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala Moringa)	
			Prah	Čaj
4-Hidroksibenzil-glukozinolat (Glukosinalbin)	4,37	368	Tr	Tr
4(α-L-Ramnoziloksi)benzil-glukozinolat (Glukomoringin)	5,10	514	21,78	29,23
O-acetilirani izomer glukomoringina I	6,40	556	2,73	2,47
O-acetilirani izomer glukomoringina II	6,71	556	1,27	0,99
O-acetilirani izomer glukomoringina III	7,69	556	8,59	9,45

Tr – tragovi; desulfoGL – desulfoglukozinolat

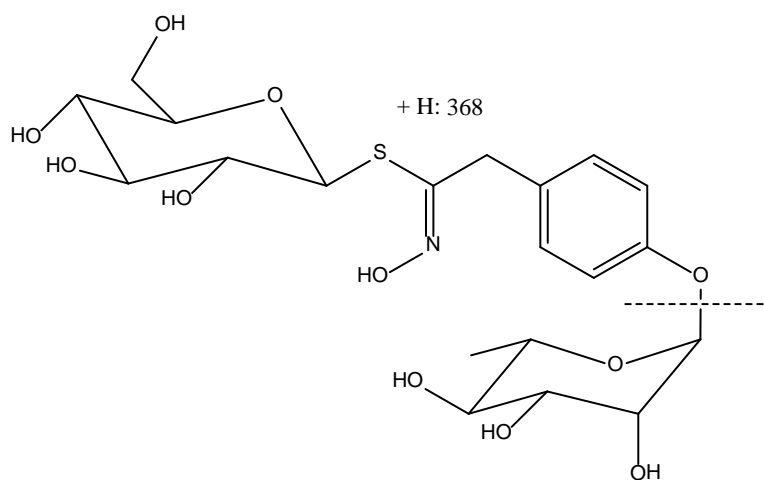
Iz tablice se vidi vidjeti da se u Moringi kao glavni spoj izdvaja glukomoringin (4-(α -L-ramnoziloksi)benzil-glukozinolat, zastupljen u čaju u količini od 29,23 $\mu\text{mol/g}$ i prahu 21,78 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala. Acetilirani izomeri glukomoringina u Moringi su zastupljeni u znatno manjim količinama. Osim glukomoringina izdvaja se i glukosinalbin koji se javlja u tragovima vjerojatno kao artefakt nastao tijekom desulfatacije.

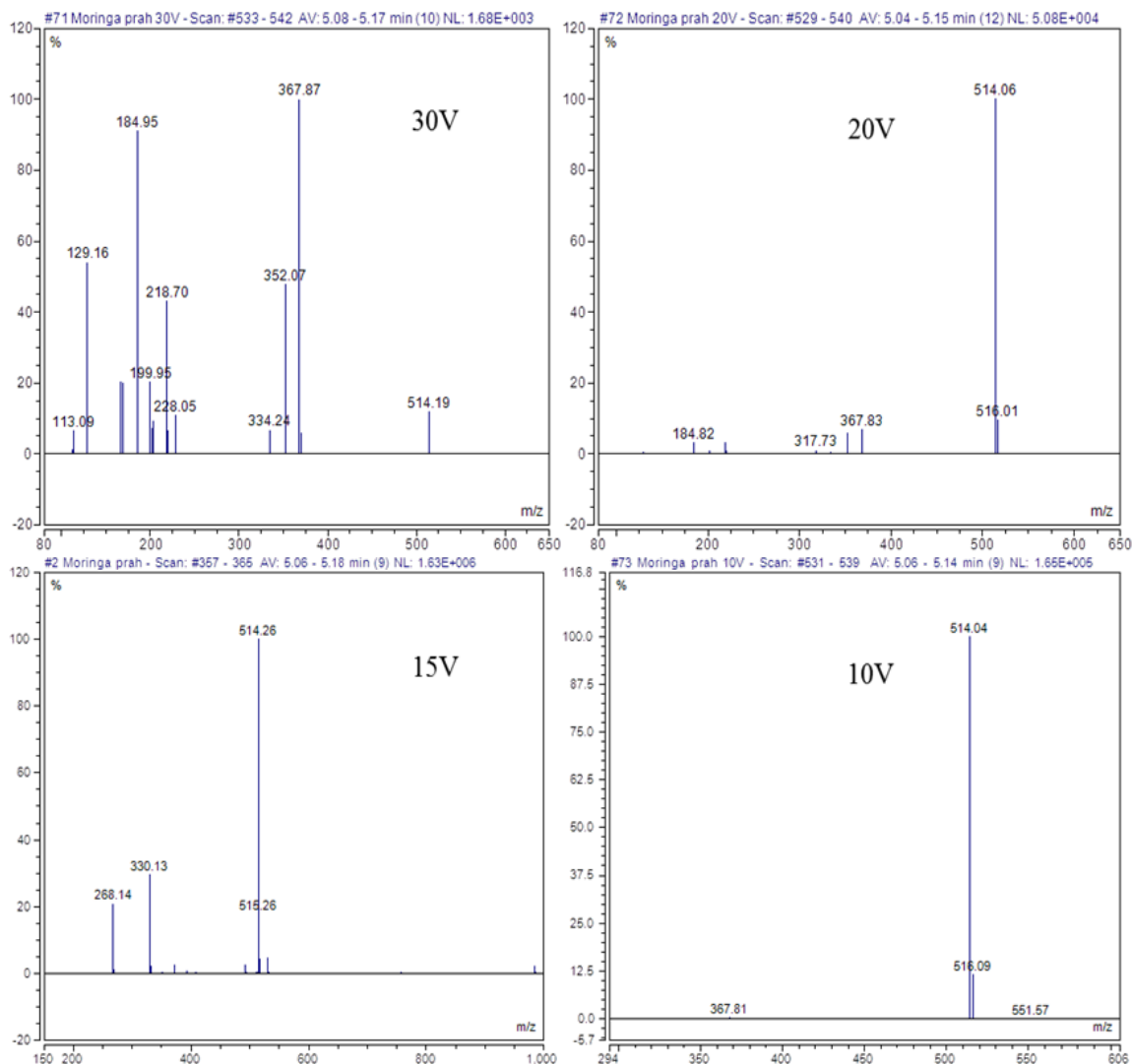


Slika 3.3. Strukture glukomoringina i *O*-acetiliranog glukomoringina.

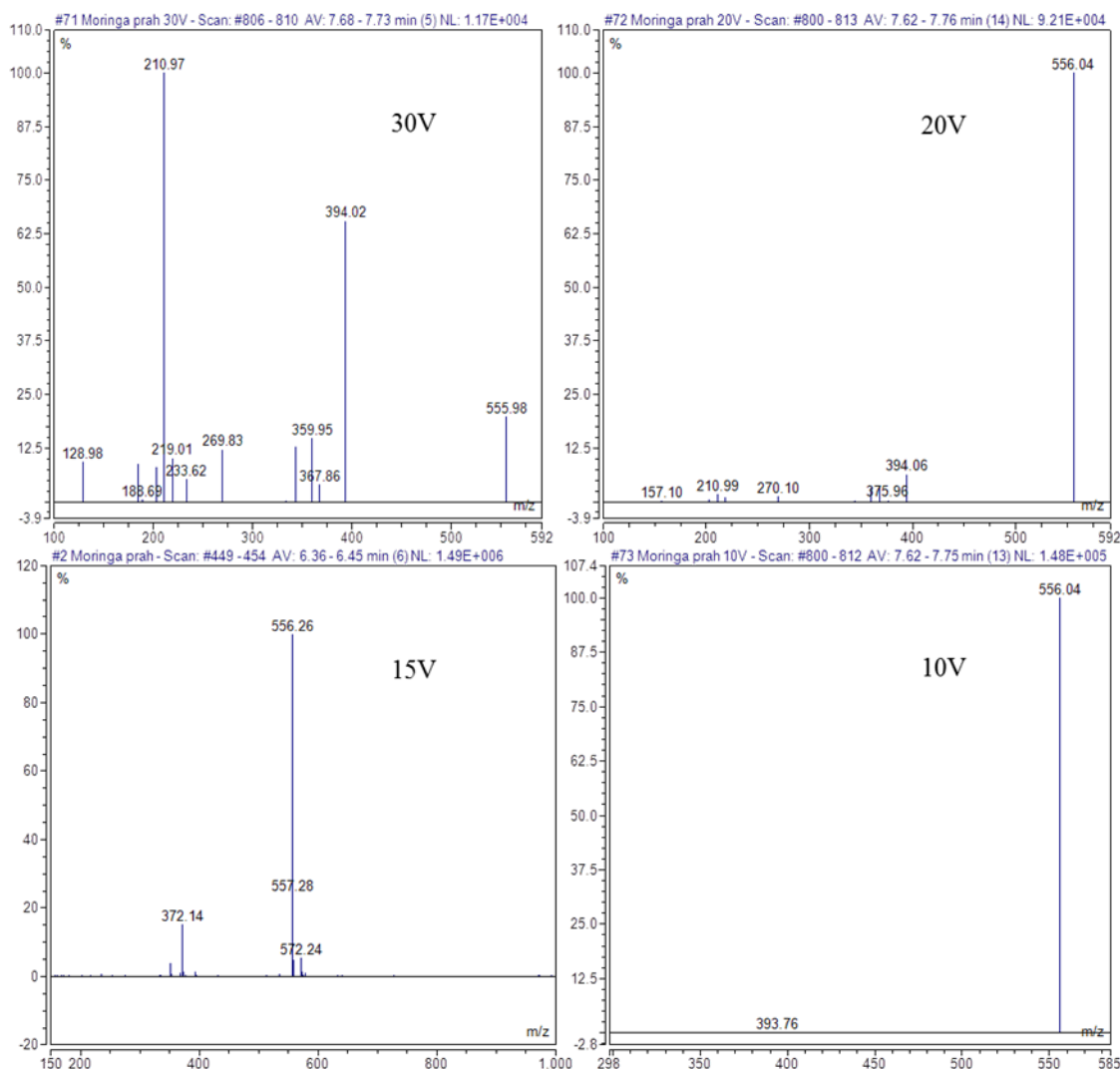
U ovom slučaju osim snimanja svih masa, identificirane molekulske mase podvrgnute su još jednom eksperimentu, skeniranju produktnih iona (engl. *product ion scan*). Naime, kod MS/MS uređaja s više analizatora moguće je kontrolirati fragmentaciju iona u drugom kvadrupolu koji se koristi kao kolizijska ćelija. U prvom analizatoru se izoliraju samo ioni određene molekulske mase (ioni prekursori) te se uvode u kolizijsku ćeliju u kojoj se fragmentacija postiže sudarom s plinom argonom pri čemu nastaju fragmenti, odnosno ioni produkti koji se analiziraju u drugom analizatoru. Fragmentacija glukomoringina je zanimljiva jer osim glukoze u strukturi sadrži još jedan šećer, ramnozu što ga čini dvostruko glikoziliranim glukozinolatom i samim tim vrlo specifičnim.

Eliminacija anhidroramnoze je karakteristična za *O*-ramnozilirane glukozinolate. Na primjeru jednog takvog spoja, desulfoglukomoringina (slika 3.4.) prikazana je karakteristična eliminacija te nastanak signala $m/z = 368$. Dodatno, ispitan je utjecaj različitih kolizijskih energija na fragmentaciju glukomoringina pri 10, 15, 20 i 30 V u svrhu njezine optimizacije. Uočeno je kako smanjenje kolizijske energije rezultira smanjenjem intenziteta signala 368 te smanjenjem broja fragmenata.





Slika 3.4. MS2 spektri desulfoglucomoringina pri različitim kolizijskim energijama.



Slika 3.5. MS2 spektri O-acetiliranog izomera desulfoglukomoringina pri različitim kolizijskim energijama.

MS2 spektri pri različitim kolizijskim energijama snimljeni su i za molekularni ion acetiliranog desulfoglukomoringina, $m/z = 556$ (slika 3.5.). Pri najvećoj kolizijskoj energiji od 30V smanjio se intenzitet molekularnog iona, a povećao se broj i intenzitet fragmenata. Može se vidjeti da pri 10V fragmenata gotovo i nema, ali je zato molekularni ion vrlo vidljiv. Zaključuje se da kolizijska energija utječe na izgled i informacije u MS2 spektru te ovisno o ispitivanoj molekuli potrebno ju je optimizirati.

4. ZAKLJUČCI

- Analizom crvenog i žutog Maca praha iz biljnog materijala UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom potvrđena je prisutnost glukotropeolina (benzil-glukozinolat), glukolimnantina (3-metoksibenzil-glukozinolat), glukosinalbina (4-hidroksibenzil-glukozinolat) i glukolepigramina (3-hidroksibenzil-glukozinolat).
- U uzorku crvenog Maca praha preko desulfatiziranih glukozinolata kvantificirani su: glukotropeolin (benzil-glukozinolat) 8,96 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala i glukolimnantin (3-metoksibenzil-glukozinolat) 2,55 $\mu\text{mol/g}$. Prisutni su izomeri s hidroksilnom skupinom u para i meta položaju, od kojih je glukosinalbin (4-hidroksibenzil-glukozinolat) prisutan u tragovima, a glukolepigramina (3-hidroksibenzil-glukozinolat) ima 0,39 $\mu\text{mol/g}$.
- U uzorku žutog Maca praha preko desulfatiziranih glukozinolata kvantificirani su: glukotropeolin (benzil-glukozinolat) 7,02 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala i glukolimnantin (3-metoksibenzil-glukozinolat) 1,93 $\mu\text{mol/g}$. Prisutni su izomeri u para i meta položaju, od kojih je glukosinalbin (4-hidroksibenzil-glukozinolat) prisutan u tragovima, a glukolepigramina (3-hidroksibenzil-glukozinolat) ima 0,49 $\mu\text{mol/g}$.
- Analizom biljnih materijala *Lepidium meyenii* UHPLC-DAD-MS/MS tehnikom potvrđena je tvrdnja da su u različitim vrstama Mace prisutni isti glukozinolati u sličnim koncentracijama.
- Uzorci Moringa praha i Moringa čaja analizirani su na UHPL-MS/MS te uspoređeni. Identificirani su desulfoglukosinalbin, desulfoglukomoringin kao glavni te tri *O*-acetilirana izomera desulfoglukomoringina.
- Analizom Moringa praha preko desulfatiziranih glukozinolata kvantificirani su: glukomoringin (4-(α -L-ramnoziloksi)benzil-glukozinolat) 21,78 $\mu\text{mol/g}$, glukosinalbin (4-hidroksibenzil-glukozinolat) prisutan u tragovima, a acetilirani izomeri glukomoringina u znatno manjim koncentracijama.
- Analizom Moringa čaja preko desulfatiziranih glukozinolata kvantificirani su: glukomoringin (4-(α -L-ramnoziloksi)benzil-glukozinolat) 29,23 $\mu\text{mol/g}$, glukosinalbin (4-hidroksibenzil-glukozinolat) prisutan u tragovima, a acetilirani izomeri glukomoringina u znatno manjim koncentracijama.

- MS2 spektri pri različitim kolizijskim energijama snimljeni su za desulfoglukomoringin, $m/z=514,04$ i za molekulski ion acetiliranog desulfoglukomoringina, $m/z =367,87$ pri 30V. Pri 10 V molekulski ion acetiliranog desulfoglukomoringina, $m/z=210,97$, a desulfoglukomoringina, $m/z=514,04$.

5. LITERATURA

1. Verkerk R, Dekker M: Glucosinolates. U: Bioactive compounds in Foods, Blackwell Publishing Ltd., 2008.
2. Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, De Schrijver R, Hansen M, Gerhäuser C, Mithen R, Dekker: Glucosinolates in *Brassica* vegetables: Molecular Nutrition and Food Research 53: S219 – S265, 2009.
3. Mirela Kopjar, Drago Šubarić, Vlasta Piližota: Glukozinolati: biodostupnost i utjecaj na zdravlje ljudi [pregledni rad]. Osijek, Hrvatska: Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek; 2012.
4. <https://soulfood.hr/razlika-izmedu-zute-crvene-i-crne-mace/>, Pristupljeno: 28.08.2020.
5. Halkier, B. A., Gershenzon, J. (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. Annu. Rev. Plant Biol. 57, 303-333
6. Sedlar A. Izolacija i identifikacija hlapljivih sumporovih spojeva odabranih biljaka porodice Brassicaceae [diplomski rad]. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017.
7. Ivana Radojčić Redovniković, marina Cvjetko Bubalo, Manuela Panić i Kristina Radošević: Uloga glukozinolata u obrani biljaka od nametnika, stručni rad
8. Zekić M. Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae [doktorski rad]. Zagreb, Hrvatska: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; 2013.
9. Brown J., Morra MJ. Glucosinolate – Containing Seed Meal as a Soil Amendment to Control Plant Pests: 2000-2002. Kolorado, SAD: National Renewable Energy Laboratory; 2005.
10. Jerković, I., Radonić, A. Praktikum iz organske kemije. Split, Hrvatska: Kemijsko-tehnološki fakultet Split; 2009.
11. Khan, Faisal I., Ghoshal, A. Removal of volatile organic compounds from polluted air, Journal of Loss Prevention in the Process Industries, 13 (2000) 527 - 545
12. Blažević, I. Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae /doktorska disertacija. Zagreb : Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2009.
13. Dohney-Adams, T., Redeker, K., Kittipol, V., Bancroft, I., Haetley, S. E. Development of an efficient glucosinolate extraction method, Plant Methods 2017.

14. Silić, A. Glukozinolatni profil u biljkama *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. i *Matthiola incana* (L.) R. BR. te njihova razgradnja potpomognuta mikrovalovima, Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet 2018.
15. Perašin, J. Priprava desulfoglukozinolata iz vodeno metanolnog ekstrakta kupusa za reverzno-faznu tekućinsku koromaografiju, Diplomski rad, Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet 1998.
16. A. Prkić, Vježbe iz analitičke kemije, Preddiplomski studij kemijske tehnologije, interna recenzirana skripta, Split, 2008.
17. Dario Mandić, Uvod u kromatografske separacije KBC Osijek, 2018.
18. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm, Pristupljeno: 30.06.2020.
19. <https://www.irb.hr/eng/Industry/Services/High-performance-liquid-chromatography-mass-spectrometry-hplc-ms-ms>, Pristupljeno: 26.08.2020.
20. <https://www.britannica.com/topic/list-of-plants-in-the-family-Brassicaceae-2004620>, Pristupljeno: 15.07.2020.
21. V. Kuete, in Medicinal Spices and Vegetables from Africa, 2017.
22. <https://www.agroklub.com/poljoprivredni-oglasnik/oglas/maca-lepidium-meyenii/3263/>, Pristupljeno: 15.07.2020.
23. Meissner H.O., Mscisz A., Kedzia B., Pisulewski P., Piatkowska E. (2015) Peruvian Maca: Two Scientific Names *Lepidium Meyenii* Walpers and *Lepidium Peruvianum* Chacon – Are They Phytochemically-Synonymous? *Int. J. Biomed. Sci.* 11, 1-15.
24. Swaran J.S. Flora, Vidhu Pachauri, in Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention, 2011.
25. https://toptropicals.com/cgi-in/garden_catalog/cat.cgi?family=Moringaceae, Pristupljeno: 16.07.2020.
26. Vlajčević, D. Termička, enzimsko i mikrovalovima potpomognuta razgradnja glukozinolata te njihova identifikacija preko razgradnih i desulfatiziranih produkata, Diplomski rad, Split: Kemijsko-tehnološki fakultet, 2018.
27. <https://www.bioandina.hr/proizvod/crvena-maca-prah-150g-30x5g-instant/>, Pristupljeno: 28.08.2020.
28. Avato, P., Argentieri, M. P. (2015) Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. *Phytochemistry Rev.* 14, 1019-1033.

29. Blažević I., Montaut S., Burčul F., Olsen C. E., Burow M., Rollin P., Agerbirk N., Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants, *Phytochemistry*, 2020., 169, 112100