



Pedagogická
fakulta
Faculty
of Education

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Pedagogická fakulta

Diplomová práce

Onioniny a další strukturně příbuzné sloučeniny
cibule (*Allium cepa*)

Vypracoval: Bc. Karel Šmejkal

Vedoucí práce: prof. Ing. Roman Kubec, Ph.D.

(Katedra aplikované chemie, FZT JU)

České Budějovice 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci na téma Onioniny a další strukturně příbuzné sloučeniny cibule (*Allium cepa*) jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 14. 4. 2024

Podpis:

Poděkování

Touto formou bych rád poděkoval prof. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. a Mgr. Ivetě Štefanové, Ph.D. za ochotný přístup, trpělivost, věcné i cenné rady a odborné vedení při této diplomové práci.

Mé poděkování patří rovněž všem, kteří se jakkoliv podíleli na vzniku této práce.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu GAJU 080/2022/Z.

Šmejkal, K. (2024): Onioniny a další strukturně příbuzné sloučeniny cibule (*Allium cepa*). [Onionins and related compounds in onion (*Allium cepa*). Mgr. Thesis, in Czech.] – 50 p., Faculty of Education, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá onioniny a dalšími strukturně příbuznými sloučeninami cibule kuchyňské (*Allium cepa*).

Teoretická část se věnuje specifikaci rodu *Allium* a vznikem organosírných sloučenin v rostlinách tohoto rodu. Podrobně popisuje vybrané skupiny organosírných sloučenin, u kterých se zabývá jejich objevy, izolacemi a biologickou aktivitou.

Experimentální část se zabývá optimalizací metod pro izolaci onioninů z extraktu cibule kuchyňské a jejich izolací pomocí preparativní HPLC pro budoucí podrobné zkoumání jejich biologických účinků.

KLÍČOVÁ SLOVA: organosírné sloučeniny, cibule, onioniny, biologická aktivita

Annotation

This thesis deals with onionins and other structurally related compounds of onion (*Allium cepa*).

The theoretical part deals with the specification of the genus *Allium* and the formation of organosulfur compounds in plants of this genus. It describes in detail selected groups of organosulfur compounds, which are discussed in terms of their discovery, isolation and biological activity.

The experimental part deals with the optimization of methods for the isolation of onionins from onion extracts and their isolation by preparative HPLC for future detailed investigation of their biological effects.

KEY WORDS: organosulfur compounds, onion, onionins, biological activity

Obsah

1	Cíle práce	1
2	Úvod.....	2
3	Teoretická část	4
3.1	Rod <i>Allium</i>	4
3.2	Cibule kuchyňská.....	5
3.3	Morfologický popis cibule.....	6
3.4	Organosírné sloučeniny cibule a jejich tvorba.....	7
3.4.1	Výčet vybraných organosírných sloučenin cibule	10
3.4.2	Biologická aktivita vybraných organosírných sloučenin cibule	18
4	Experimentální část.....	21
4.1	Chemikálie a materiály	21
4.2	Přístroje	22
4.3	Gradientsy používané v HPLC	22
4.4	Optimalizace metody pro izolaci onioninů z cibule kuchyňské	23
4.4.1	Příprava pufru k izolaci alliinasy	23
4.4.2	Izolace alliinasy z česneku.....	24
4.4.3	Izolace ACSO z cibule.....	24
4.4.4	Příprava extraktu.....	25
4.4.5	Frakcionace extraktu.....	25
5	Výsledky	30
5.1	Optimalizace metody pro izolaci onioninů metodou HPLC/PDA.....	30
5.1.1	Izolace alliinasy	30
5.1.2	Izolace ACSO	31
5.1.3	Další optimalizace izolace	32
5.2	Izolace a strukturní identifikace onioninu A.....	32
6	Diskuse.....	39

7	Závěr	41
8	Reference	43
9	Použité zkratky	49

1 Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši zaměřenou na onioniny a jim strukturně příbuzné organosírné sloučeniny v cibuli kuchyňské (*Allium cepa*),

- optimalizovat postup pro izolaci onioninů z cibule kuchyňské (*A. cepa*) metodou preparativní HPLC/PDA,

- izolovat a strukturně identifikovat přítomné onioniny s využitím metody HPLC/MS.

2 Úvod

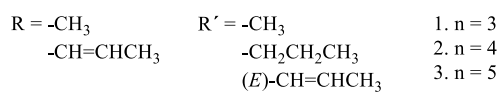
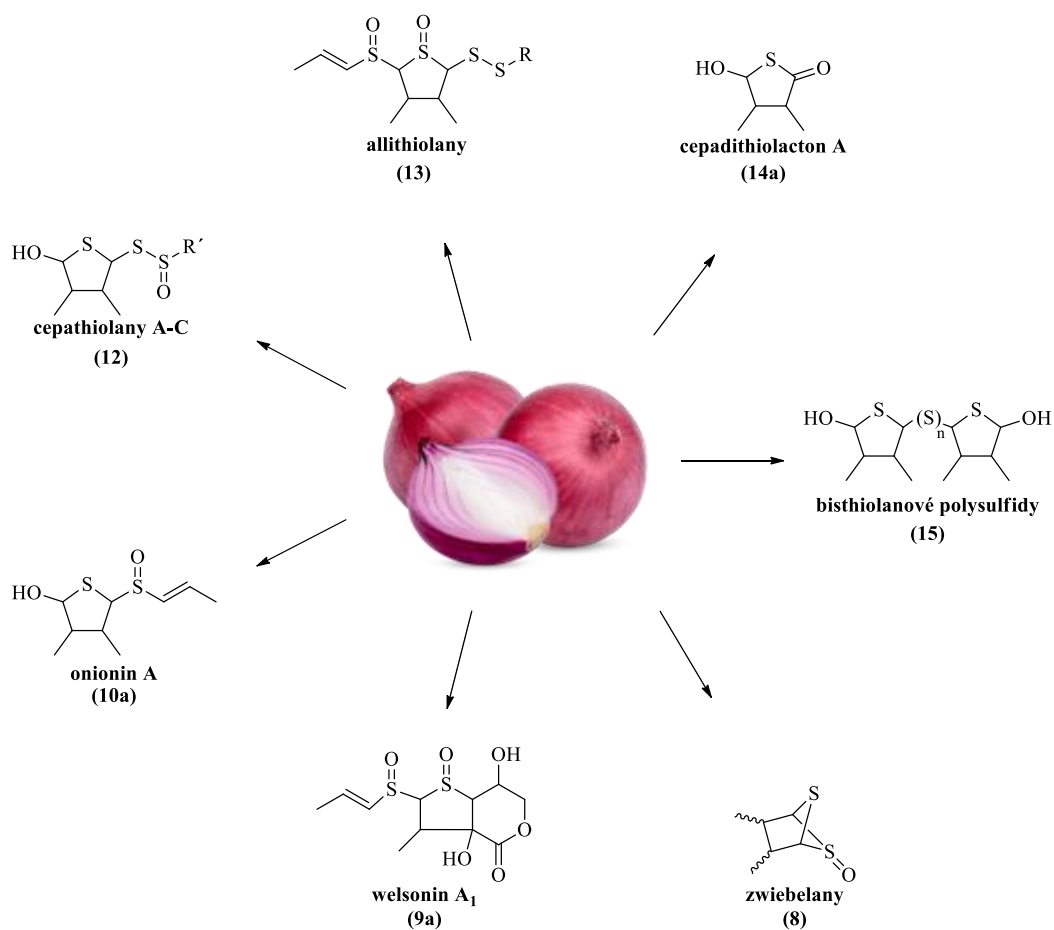
Tato diplomová práce se zabývá organosírnými sloučeninami, které vznikají v cibuli kuchyňské (*A. cepa*) po narušení rostlinného pletiva. Cibule se společně s česnekem a dalšími česnekovitými rostlinami řadí do rodu *Allium*. Tento rod je početně velmi bohatý a zeměpisně rozšířený. Rostliny v tomto rodu se využívají ke konzumaci, ale i k okrasným účelům.

Organosírnými sloučeninami cibule se zabývají vědci z různých koutů světa. U některých zástupců se prokázala protirakovinová aktivita. Byly rovněž popsány antioxidační, vasodilatační a protizánětlivé účinky. Tyto látky také přispívají k prevenci infekcí způsobených bakterií *Helicobacter pylori*, rakovině tlustého střeva a žaludku. Zároveň jsou organosírné sloučeniny zodpovědné za typické sensorické vlastnosti cibule, jako jsou zejména její štiplavé aroma a chuť. Některé látky mají sensoricky příjemné vlastnosti (např. onioniny chutí připomínají vařenou cibuli), jiné, onioninům strukturně příbuzné látky, mohou mít sensoricky nepříjemné nebo dokonce technologicky nežádoucí vlastnosti (např. hořkost).

Teoretická část práce je vypracovaná jako rešerše dosud objevených organosírných látek v cibuli. Jsou zde zahrnuty informace o jejich prvních zmínkách a biologických aktivitách, pokud byly zkoumány. Představen je i rod *Allium* a zejména pak cibule kuchyňská, včetně jejího morfologického popisu.

Cíl experimentální části spočíval v optimalizaci metody pro izolaci onioninů z cibule kuchyňské pomocí preparativní HPLC/PDA, jelikož tyto látky nejsou komerčně dostupné jako standardy. Tyto látky se ukázaly být zajímavými z hlediska jejich biologické aktivity. Z tohoto důvodu byly v rámci této diplomové práce izolovány a odeslány na spolupracující pracoviště k dalšímu zkoumání.

Obecné struktury organosírných látek, které budou popsány v následujících kapitolách, znázorňuje **Obrázek 1**.



Obrázek 1: Obecné schéma organosírných sloučenin cibule, které jsou popsány v této práci.¹

3 Teoretická část

3.1 Rod *Allium*

Početné druhové zastoupení má rod *Allium* z čeledi *Alliaceae*, která spadá pod řád *Asparagales*, který je zastřešen třídou jednoděložných rostlin (*Liliopsida*). Zastoupení v tomto rodu má asi 780 druhů, včetně například cibule kuchyňské (*A. cepa*), česneku kuchyňského (*A. sativum*), pažitky pobřežní (*A. schoenoprasum*), česneku medvědího (*A. ursinum*) a mnoha dalších. Jako zásobní orgány slouží jednotlivým zástupcům rodu *Allium* oddenky, kořeny nebo cibule. Z podzemního stonku vyrůstají bazální listy (u cibule trubicovité, u česneku ploché). Květní stvol je bezlistý (u cibule je dutý). Květy jsou ve shlucích od několika málo až po několik set v hustém květenství, které je při vývinu pokryto listeny často srostlými do laty. Barva květů je většinou bílá (**Obrázek 2**) nebo růžová až fialová. Okvětní lístky i tyčinky se vyskytují jednotlivě nebo ve dvou či třech okolicích, přičemž vnitřní okolík tyčinek je u báze většinou rozšířen. Semena jsou kulovitá až hranatá černého zbarvení díky fyto melanům v epidermis. Rezervními sacharidy jsou fruktany a mnoho druhů při narušení buněčného pletiva uvolňuje produkty z rozkladu *S*-substituovaných cystein-*S*-oxidů (CSO) s charakteristickým zápachem/vůní/chutí (Block et al., 2010; Brewster, 2008; Friesen et al., 2006).



Obrázek 2: Květenství cibule.¹¹

Rod *Allium* je rozšířen v teplém a mírném pásu severní polokoule. *A. schoenoprasum* se vyskytuje dokonce i v subarktickém pásu. Existuje několik druhů roztroušených v horách nebo na náhorních plošinách, např. v Uzbekistánu a ve Střední Asii. Rod *Allium* má velký hospodářský význam, jelikož zahrnuje několik, pro člověka důležitých plodin a také okrasných druhů (Rabinowitch, 1990).

3.2 Cibule kuchyňská

Cibule kuchyňská (*A. cepa*) se pěstuje převážně jako dvouletka, množí se semeny, cibulkami nebo sadami malých cibulek. Jedná se o rostlinu, u které je konzumována převážně její cibule, která je tvořena ztlustělými bazálními pochvami listových čepelí a vnitřními ztlustělými „pravými šupinami“ bez čepelí, obklopenými několika blanitými suchými slupkami. Konzumují se také čerstvé květní stvolý nebo celá rostlina (**Obrázek 3**) (Brewster, 2008; Rabinowitch, 1990).



Obrázek 3: Botanický nákres cibule kuchyňské.^{III}

Z epidemiologického hlediska je vhodné konzumovat cibuli v kombinaci s česnekem či jinými rostlinami rodu *Allium*. Proběhlo srovnání na přívržencích džinismu v Indii, kteří se zdržují konzumace cibule a česneku. Ukázalo se, že tito lidé vykazovali větší sklon k tvorbě krevních sraženin a vyšší hladiny cholesterolu a lipoproteinů spojených se srdečními chorobami v krevním séru, než tomu bylo u konzumentů cibule a česneku.

V čínské provincii Ťiang-su, kde je zaznamenán vyšší výskyt rakoviny jícnu a žaludku, bylo zjištěno, že konzumace cibule a česneku chrání před těmito druhy rakoviny. V Nizozemsku byl zjištěn silný inverzní vztah mezi konzumací cibule a výskytem rakoviny žaludku. Dospělým dobrovolníkům trpícím alergickým bronchiálním astmatem byl podáván zředěný ethanolový extrakt z nakrájené cibule, a to před vystavením inhalačnímu alergenu. Astmatické reakce v průduškách se výrazně snížily (Brewster, 2008).

Konzumace velkého množství cibule má příznivý účinek v boji a prevenci proti rakovině mnoha orgánů. Jsou za to částečně zodpovědné polyfenolické látky, jako jsou flavonoidy. Kromě toho jsou v chemoprevenci rakoviny významné i organosírné

sloučeniny. Tyto látky mají ochranné účinky proti rakovině jater, žaludku, tlustého střeva a prsu. Kromě toho cibule díky vysokému obsahu selenu může zabránit vzniku některých druhů rakoviny, aniž by docházelo k jeho nadměrné akumulaci ve tkáních, což je častý problém spojený s anorganickými sloučeninami selenu (Kianian et al., 2021).

3.3 Morfologický popis cibule

Cibule cibule kuchyňské (**Obrázek 4**) se skládá z velmi krátkého stonku, který nese adventivní kořeny a řadu ztlustělých listů a listových pochev, přičemž starší obklopují mladší, které mají ve svém středu ještě mladší a obvykle několik vrcholových meristémů. Listové čepele mohou být funkční, zaschlé, anebo u starších vnitřních listů mohou být listy nevyvinuté. Ve velké zralé cibuli jsou funkční čepele z tzv. vnějších šesti nebo sedmi listů zaschlé a odlomené, takže zůstávají pouze pochvy. Vnější z těchto pochev tvoří ochranu pro dužnaté zásobní listy uvnitř (Hoffman, 1933).



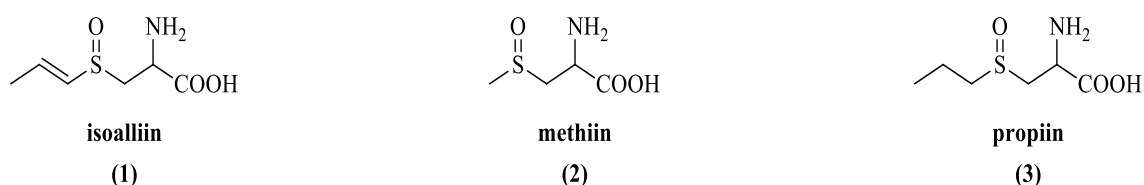
Obrázek 4: Cibule cibule kuchyňské.¹

Cibule mají na bázi značně redukovaný kotoučovitý oddenek. Mají blanitou slupku a jsou velmi variabilní co do tvaru, velikosti a barvy. Stvoly jsou až 1,8 m vysoké a postupně se zužují ze zduřelé spodní části. Listy jsou bazálně uspořádané, lišící se velikostí, na průřezu jsou téměř kruhové, ale na adaxiální straně jsou poněkud zploštělé. Květenství je subglobózní, husté, mnohokvěté (50 až 1000) a s krátkou vytrvalou lopatkou. Po vyvinutí všech listů začíná vyrůstat květní stvol. Květy jsou bílé, hvězdčité s rozprostřenými kališními lístky. Vnější okvětní lístky jsou vejčité, vnitřní jsou užší. Plodem je tobolka dlouhá přibližně 5 mm (Rabinowitch, 1990).

3.4 Organosírné sloučeniny cibule a jejich tvorba

Neporušená cibule vykazuje jen málo typické cibulové chuti nebo vůně. Organosírné sloučeniny v cibuli se uvolňují až při narušení jejího buněčného pletiva. Jedná se pravděpodobně o obranný mechanismus, který má odpudit herbivory. Neaktivní prekurzory těkavých organosírných látek jsou v buňkách lokalizovány v cytoplazmě a jsou fyzicky odděleny od enzymů (přítomny ve vakuolách), které katalyzují jejich rozklad. Narušením rostlinného pletiva se spustí kaskáda enzymově katalyzovaných reakcí za současného vzniku velmi rozmanitých skupin organosírných sloučenin (Block, 1992; Breu, 1996; Randle, 1997; Virtanen a Spåre, 1961).

V neporušeném pletivu cibule se nachází tzv. chuťové prekurzory (angl. *flavour precursors*), což jsou sírné nebílkovinné aminokyseliny *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy (dále jen ACSO). V cibuli má největší zastoupení (až 78 relativních %) *S*-1-propenylcystein-*S*-oxid (triviálně isoalliin, **1**), dále se vyskytuje *S*-methylcystein-*S*-oxid (triviálně methiin, **2**), který je obsažen v menších koncentracích a v nejmenším množství (často vůbec) je přítomen *S*-propylcystein-*S*-oxid (triviálně propiin, **3**). Methiin (**2**) a propiin (**3**) byly objeveny už v roce 1959, zatímco isoalliin (**1**) až o 4 roky později (Matikkala, 1959; Schwimmer, 1968; Spåre et al., 1963; Randle, 1997; Virtanen a Spåre, 1961). Přehled ACSO v cibuli uvádí **Obrázek 5**.

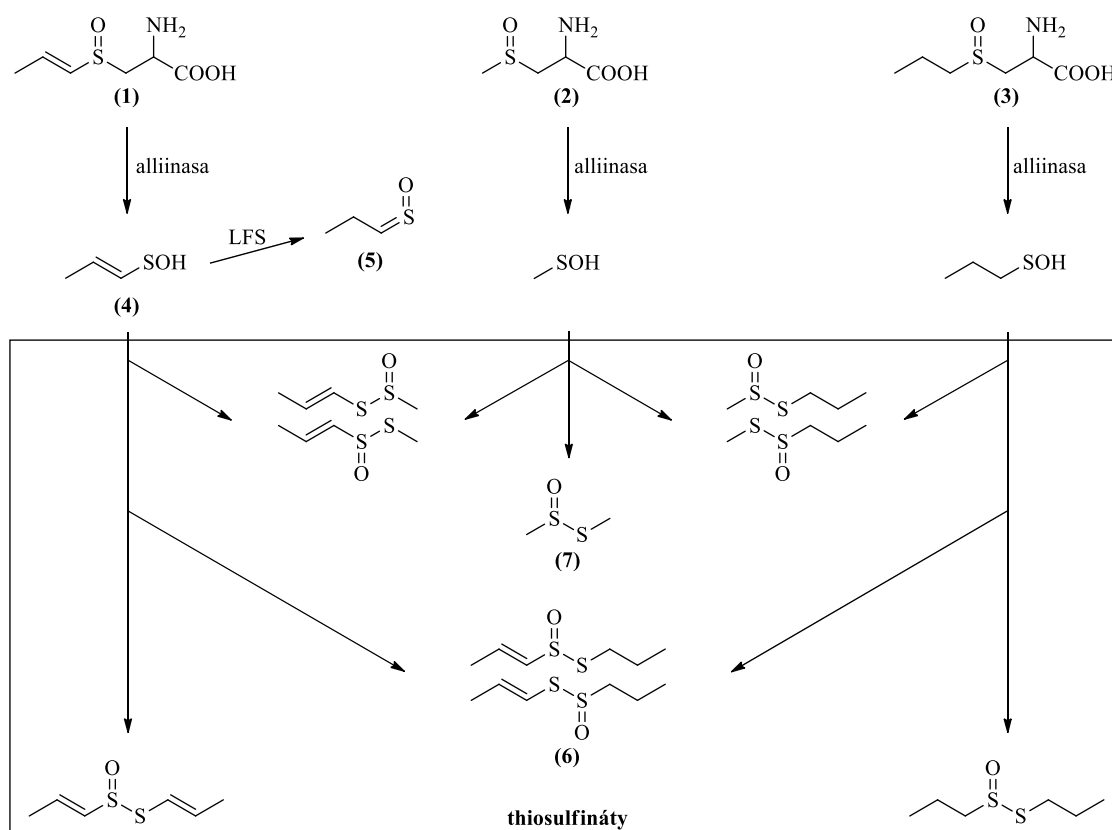


Obrázek 5: Struktury isoalliinu (**1**), methiinu (**2**) a propiinu (**3**) (Jones, 2004).

V rostlinách rodu *Allium* se nachází enzym alliinasa, který katalyzuje rozklad ACSO. Ty jsou hydrolyzovány alliinasou za vzniku kyseliny pyrohroznové, amoniaku a sulfenových kyselin, které pak spontánně kondenzují za vzniku thiosulfínátů (**Obrázek 6**). Hlavním prekurzorem aroma cibule je isoalliin (**1**), jehož degradační produkt (konkrétně 1-propensulfenová kyselina, **4**) se rychle přeměňuje za katalýzy lachrymatory faktor syntázy (LFS) na štiplavou obrannou látku propanthial-*S*-oxid, slzotvorný faktor (dále jen LF z angl. *lachrymatory factor*, **5**). LF (**5**) byl objeven a charakterizován v roce 1961 (Block, 1992; Schwimmer, 1968; Randle, 1997;

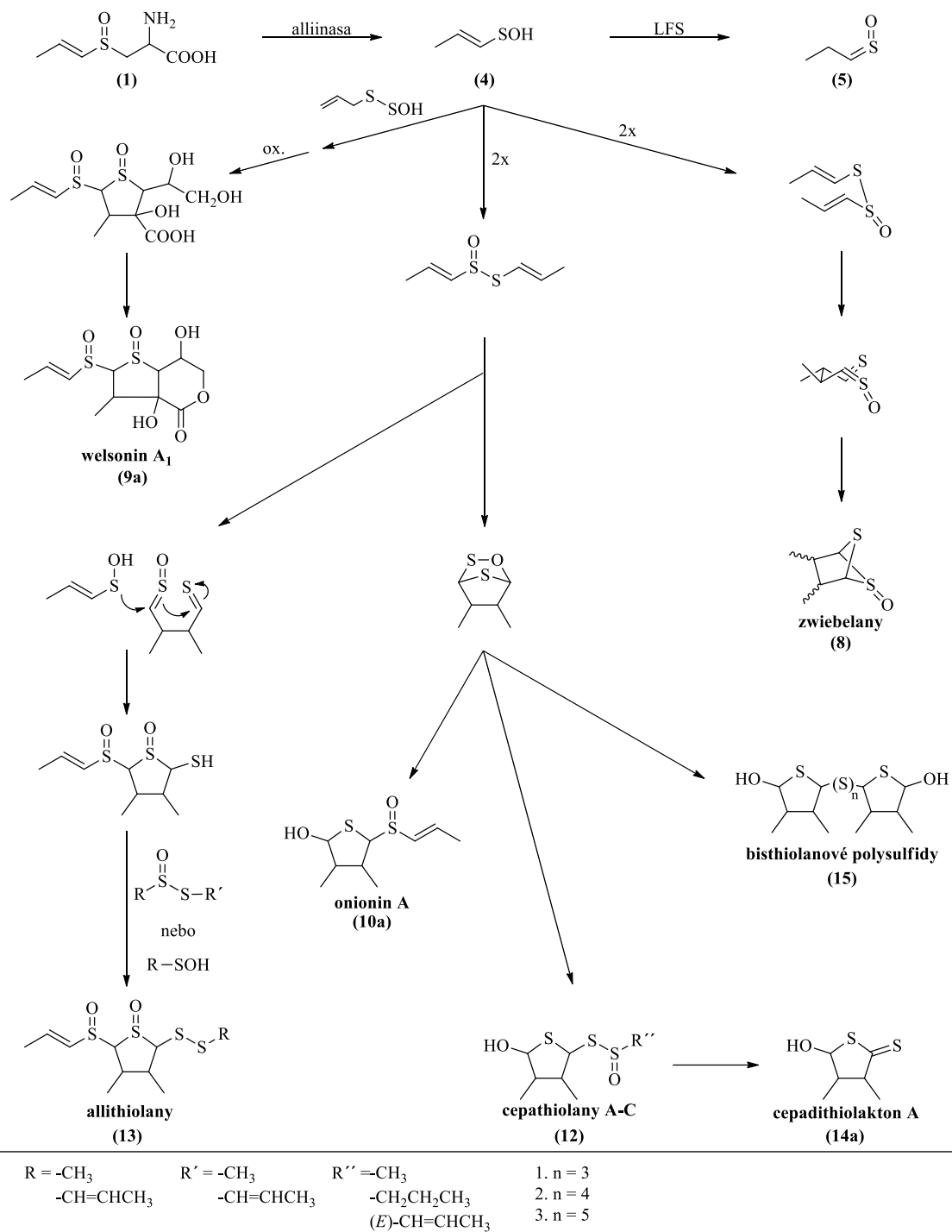
Virtanen a Spåre, 1961). LFS není přítomna v česneku, proto při jeho krájení neslžíme. Mechanismus vzniku LF (5) uvádí **Obrázek 6**.

Kondenzací sulfenových kyselin vznikají různé thiosulfináty, které společně s LF (5) poskytují cibuli její charakteristickou chuť a vůni. Různé prekurzory (1-3) dávají vzniknout různým thiosulfinátům, které propůjčují smyslovému vjemu odlišné chutě (např. *S*-propenylpropanthiosulfináty (6) vykazují chuť čerstvé zelené syrové cibule a *S*-methylmethanthiosulfinát (7) má zelný nádech) (Lancaster a Boland, 1990; Randle, 1997). Mechanismus enzymatického rozkladu ACSO přítomných v cibuli (tj. isoalliinu, 1; methiinu, 2; propiinu, 3) uvádí schéma na **Obrázku 5**.



Obrázek 6: Mechanismus rozkladu ACSO přítomných v cibuli (Block et al., 2010; Lancaster a Boland, 1990; Randle, 1997).

Mechanismus rozkladu isoalliinu (1) za přítomnosti alliinasy a následné chemické reakce, vedoucí ke vzniku dalších organosírných sloučenin, které budou popsány v dalších kapitolách, uvádí **Obrázek 7**.

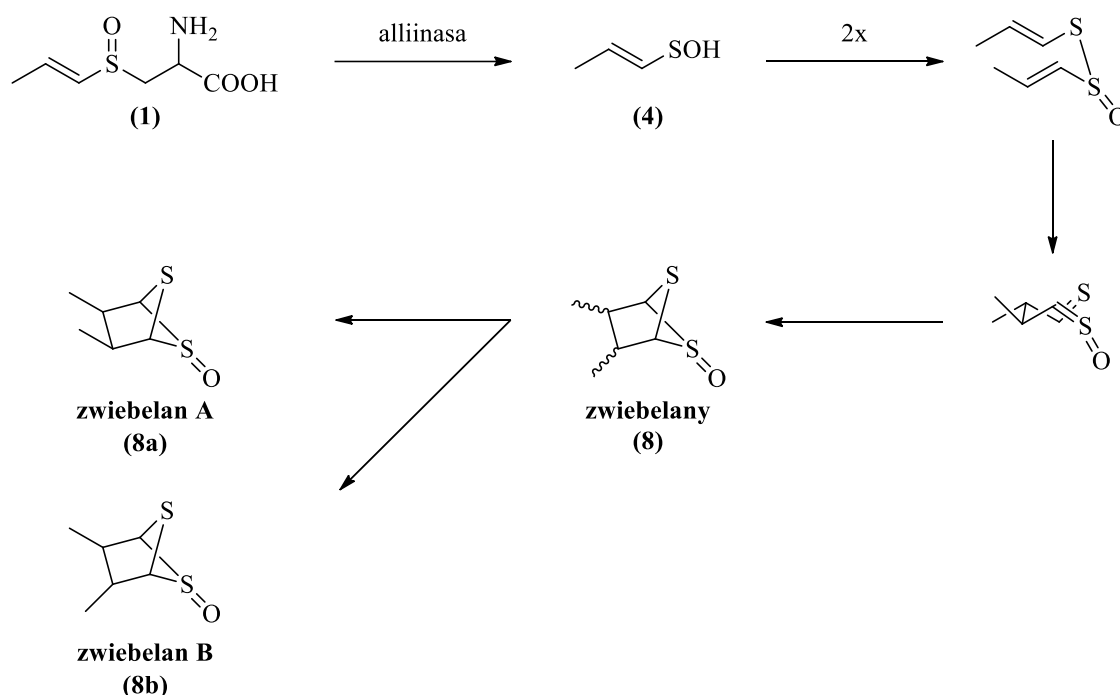


Obrázek 7: Mechanismus vzniku vybraných organosírných sloučenin v cibuli (Aoyagi et al., 2011; Aoyagi et al., 2021; Block et al., 2018; Kubec et al., 2018; Nohara et al., 2015; Štefanová et al., 2019).

3.4.1 Výčet vybraných organosírných sloučenin cibule

Zwiebelany

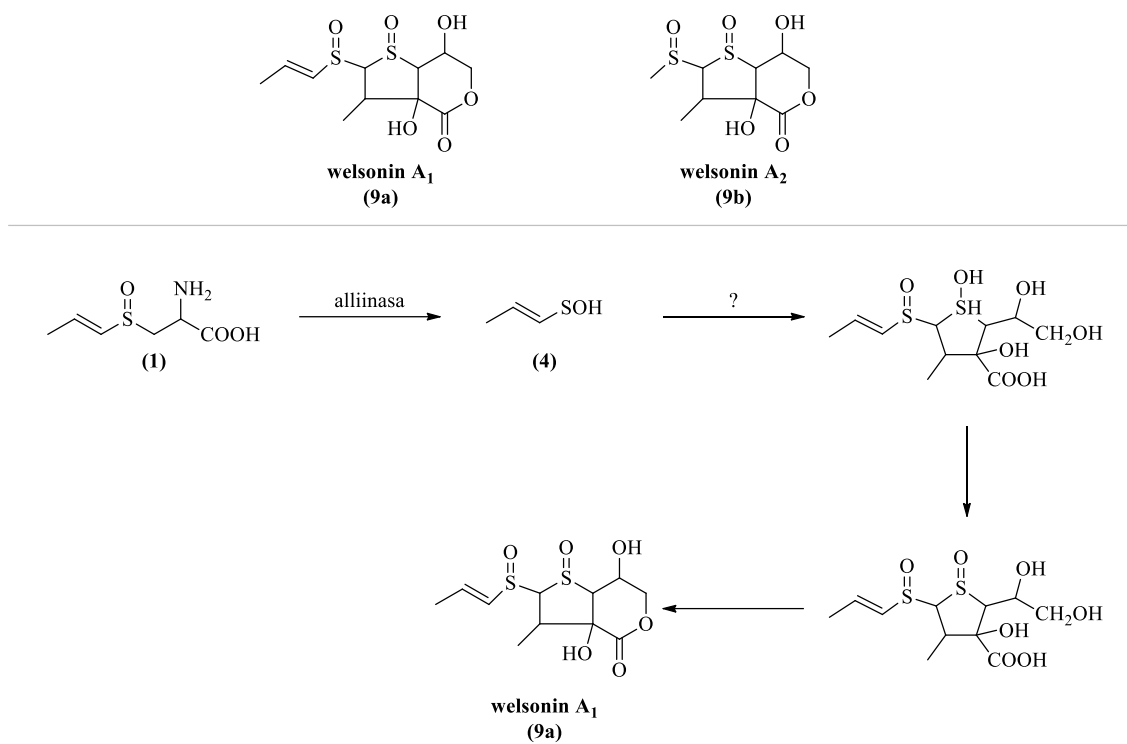
Roku 1989 byly poprvé z cibule izolovány zwiebelany (**8**), které byly pojmenovány dle německého slova *die Zwiebel* (cibule). Systematicky se jedná o dvě izomerní sloučeniny *cis*- (zwiebelan A, **8a**), resp. *trans*-2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexan-5-oxid (zwiebelan B, **8b**) (Bayer et al., 1989). Jejich struktury a mechanismus vzniku jsou uvedeny na **Obrázku 8**.



Obrázek 8: Struktury a mechanismus vzniku zwiebelanu A (**8a**) a zwiebelanu B (**8b**) (Aoyagi et al., 2011; Borjihan et al., 2010).

Welsoniny

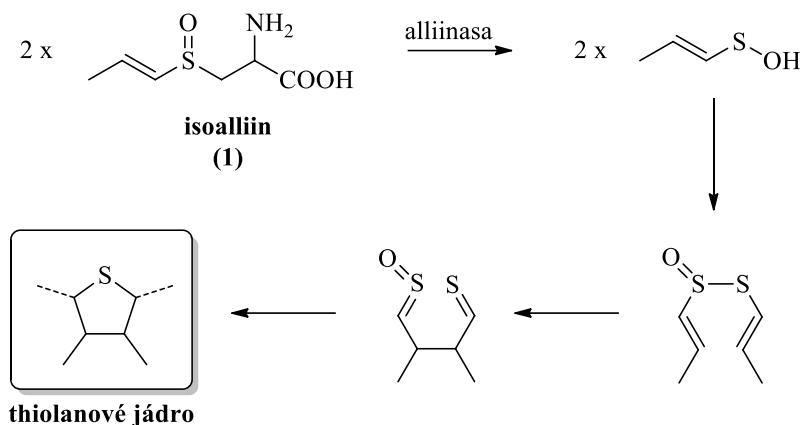
Welsoniny jsou bicycklické sloučeniny, které byly objeveny v roce 2016. Mechanismus jejich tvorby doposud není znám, existují pouze teorie. Název byl určen dle druhu cibule, ze které byly poprvé izolovány, tj. cibule velšské/zimní (*A. fistulosum*) (Nohara et al., 2016). Strukturu dvou izolovaných welsoninů, a to welsoninu A₁ (**9a**), resp. A₂ (**9b**), jakož i navržený mechanismus tvorby welsoninu A₁, uvádí **Obrázek 9**.



Obrázek 9: Struktura welsoninu A₁ (9a), resp. A₂ (9b) (Nohara et al., 2016) a navržený mechanismus tvorby welsoninu A₁.

Organosírné sloučeniny s thiolanovým jádrem

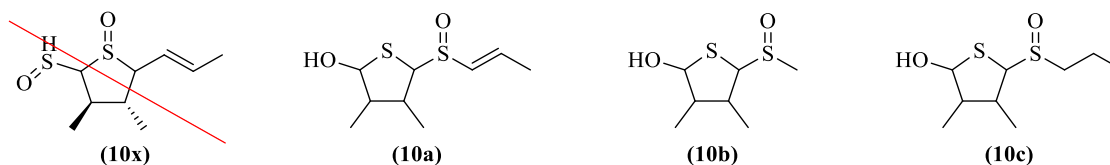
Sloučeniny, které budou popsány níže, mají jeden společný strukturální prvek, a to thiolanové jádro. Předpokládaný mechanismus vzniku thiolanového jádra uvádí **Obrázek 10**.



Obrázek 10: Předpokládaný mechanismus vzniku thiolanového jádra (Kubec et al., 2018).

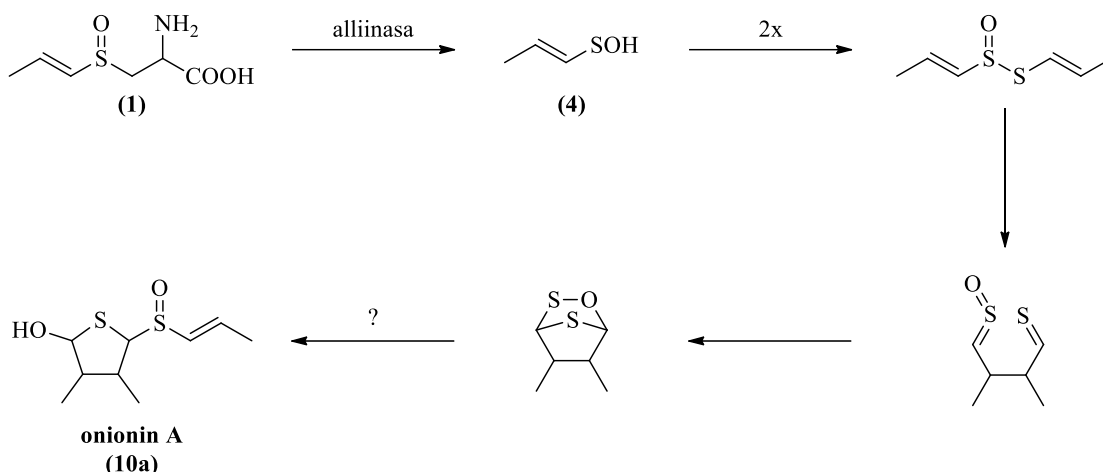
Onioniny

Izolace prvního onioninu proběhla v roce 2010, přičemž tato látka byla pojmenována jako onionin A₁ (**10x**). Název onionin je odvozen z anglického výrazu pro cibuli, tj. *onion*. O čtyři roky později se skupině japonských vědců podařilo izolovat další dva stereoizomery onioninu A₁ (**10x**), a to onionin A₂ (**10y**) a A₃ (**10z**). Pro onionin A₁ (**10x**) navrhli i strukturu, která byla ovšem chybná a povedlo se jí vyvrátit a následně i opravit (onionin A, **10a**) skupinou českých vědců v roce 2019. Rovněž se podařilo identifikovat methylové a propylové homology výše zmíněné sloučeniny, které byly pojmenovány onionin B (**10b**) a C (**10c**) (El-Aasr et al., 2010; Nohara et al., 2014; Štefanová et al., 2019). **Obrázek 11** znázorňuje původní strukturu onioninu A₁ (**10x**), opravenou strukturu onioninu A (**10a**) a struktury onioninu B (**10b**) a C (**10c**).



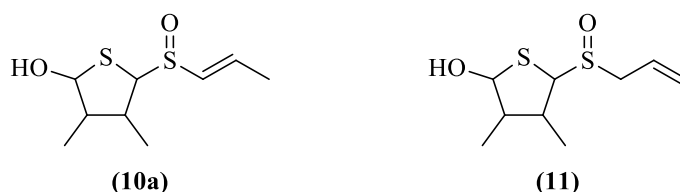
Obrázek 11: Původní struktura onioninu A (**10**), opravená struktura (**10a**), onionin B (**10b**) a onionin C (**10c**) (El-Aasr et al., 2010; Štefanová et al., 2019).

Čichový vjem onioninu A (**10a**) se charakterizuje jako příjemný, přičemž jeho vůně připomíná zelenou cibuli. Jeho chuť je označována jako příjemná, připomínající vařenou cibuli (Štefanová et al., 2019). Navržený mechanismus vzniku onioninu A (**10a**) uvádí **Obrázek 12**.



Obrázek 12: Mechanismus vzniku onioninu A (**10a**) (Štefanová et al., 2019).

Sloučenina s názvem ajothiolan A (**11**) vyskytující se v česneku je izomerní sloučeninou onioninu A (**10a**). Ajothiolan A (**11**) vzniká enzymatickou přeměnou ACSO primárně se vyskytujícího v česneku, tj. alliinu (*S*-allylcystein-*S*-oxidu). Ten se v cibuli nevyskytuje prakticky vůbec, proto ani ajothiolan A (**11**) v cibuli přítomen není (Block et al., 2018). Strukturu těchto dvou izomerních sloučenin uvádí **Obrázek 13**.

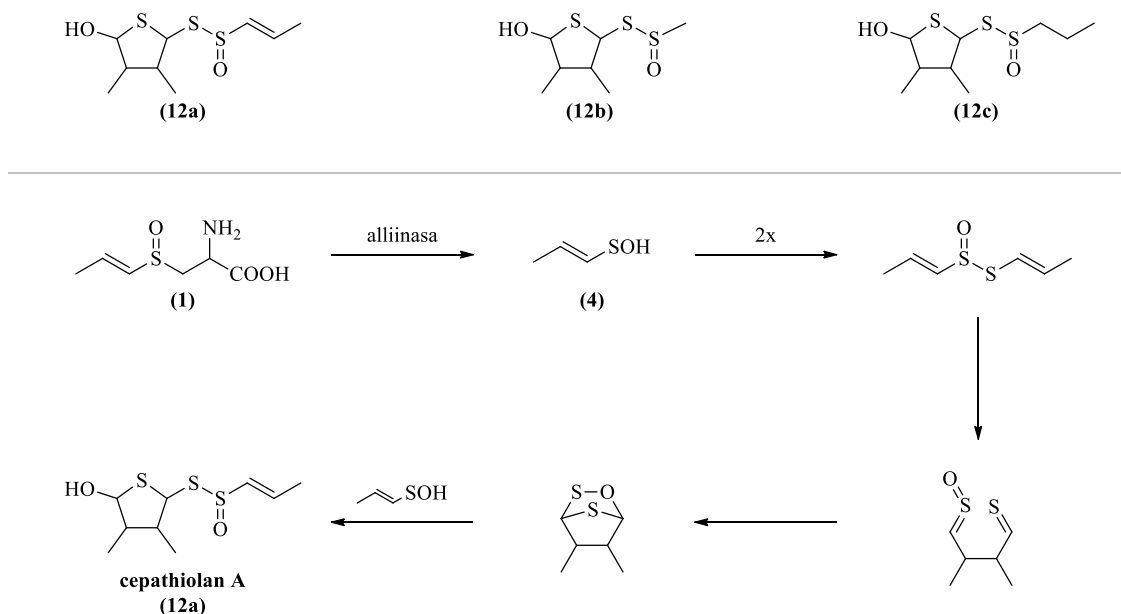


Obrázek 13: Struktura onioninu A (**10a**) a ajothiolanu A (**11**) (Block et al., 2018; Štefanová et al., 2019).

Cepathiolany

První zmínky o cepathiolanech (**12**) byly publikovány v roce 2010. Pojmenování těchto sloučenin vzniklo sloučením botanického názvu pro cibuli (tj. *A. cepa*) a triviálního názvu pro thiacyklopentan (tj. thiolan). Tyto sloučeniny (**12**) byly izolovány z extraktu homogenizované cibule s potlačenou produkcí LFS. V současné době jsou známy již tři typy cepathiolanů. Kromě cepathiolanu A (**12a**), který byl poprvé izolován roku 2010,

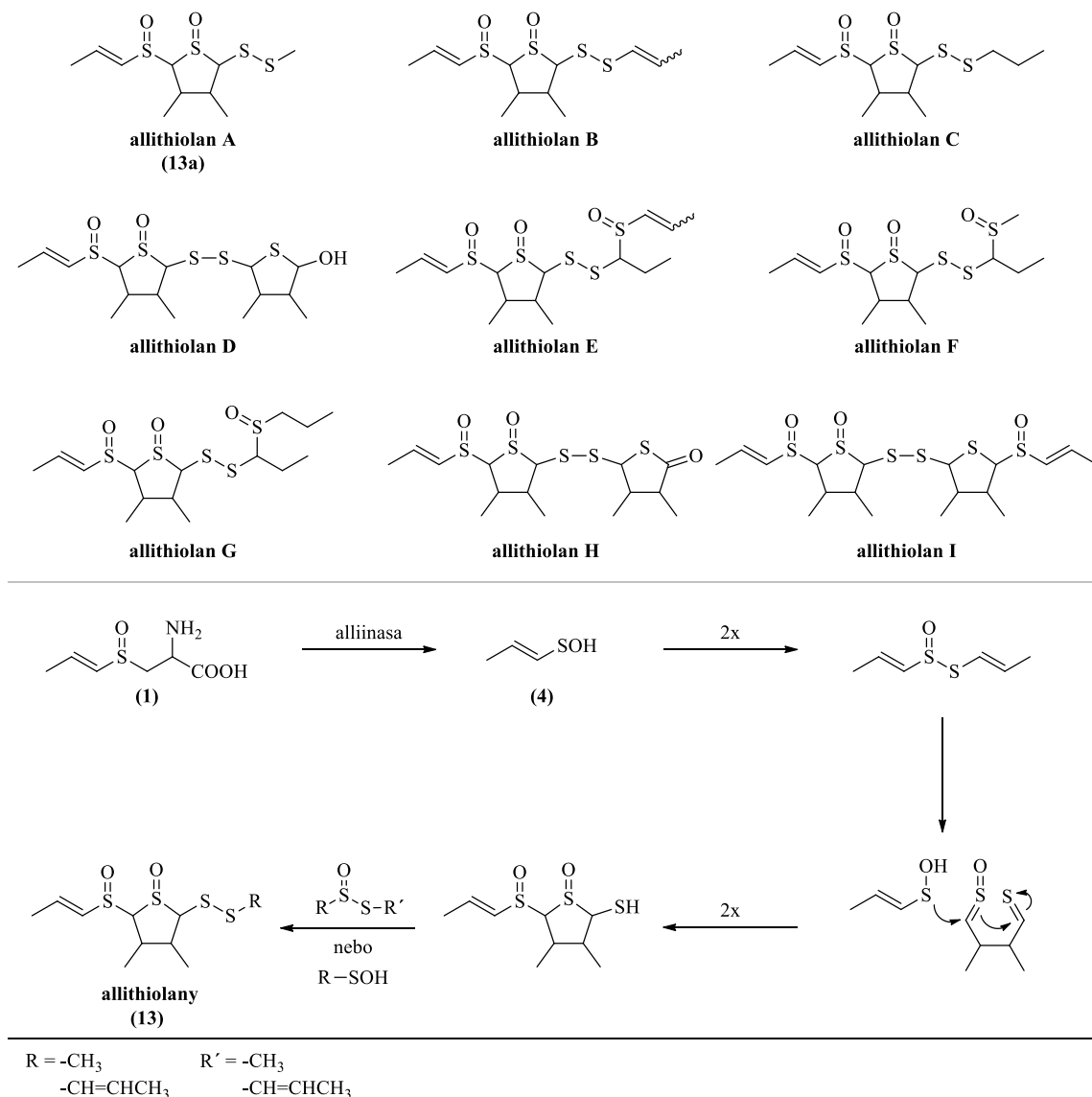
také cepathiolan B (**12b**) a cepathiolan C (**12c**), které přišly v povědomí až v roce 2019. Vůně i chuť cepathiolanu A (**12a**) je charakterizována jako příjemná, připomínající čerstvě nakrájenou zelenou cibuli (Aoyagi et al., 2011; Štefanová et al., 2019; Yoshida et al., 2010). Struktury cepathiolanů (**12**), včetně pravděpodobného mechanismu vzniku cepathiolanu A (**12a**), jsou uvedeny na **Obrázku 14**.



Obrázek 14: Struktury cepathiolanu A (včetně mechanismu vzniku, **12a**), B (**12b**) a C (**12c**) (Štefanová et al., 2019).

Allithiolany

Allithiolany (**13**) byly objeveny v roce 2018 (Kubec et al., 2018). Bohužel je tato práce stále jediným zdrojem informací o těchto sloučeninách v cibuli. Jejich název vznikl sloučením vědeckého názvu pro rod *Allium* a názvu základní jednotky jejich struktury, tj. thiolanového jádra. Jsou zodpovědné za nepříjemnou hořkou chuť cibule, která se utváří po narušení rostlinného pletiva (Kubec et al., 2018). Strukturu izolovaných allithiolanů (**13**) z cibule, včetně obecného mechanismu jejich vzniku uvádí **Obrázek 15**.



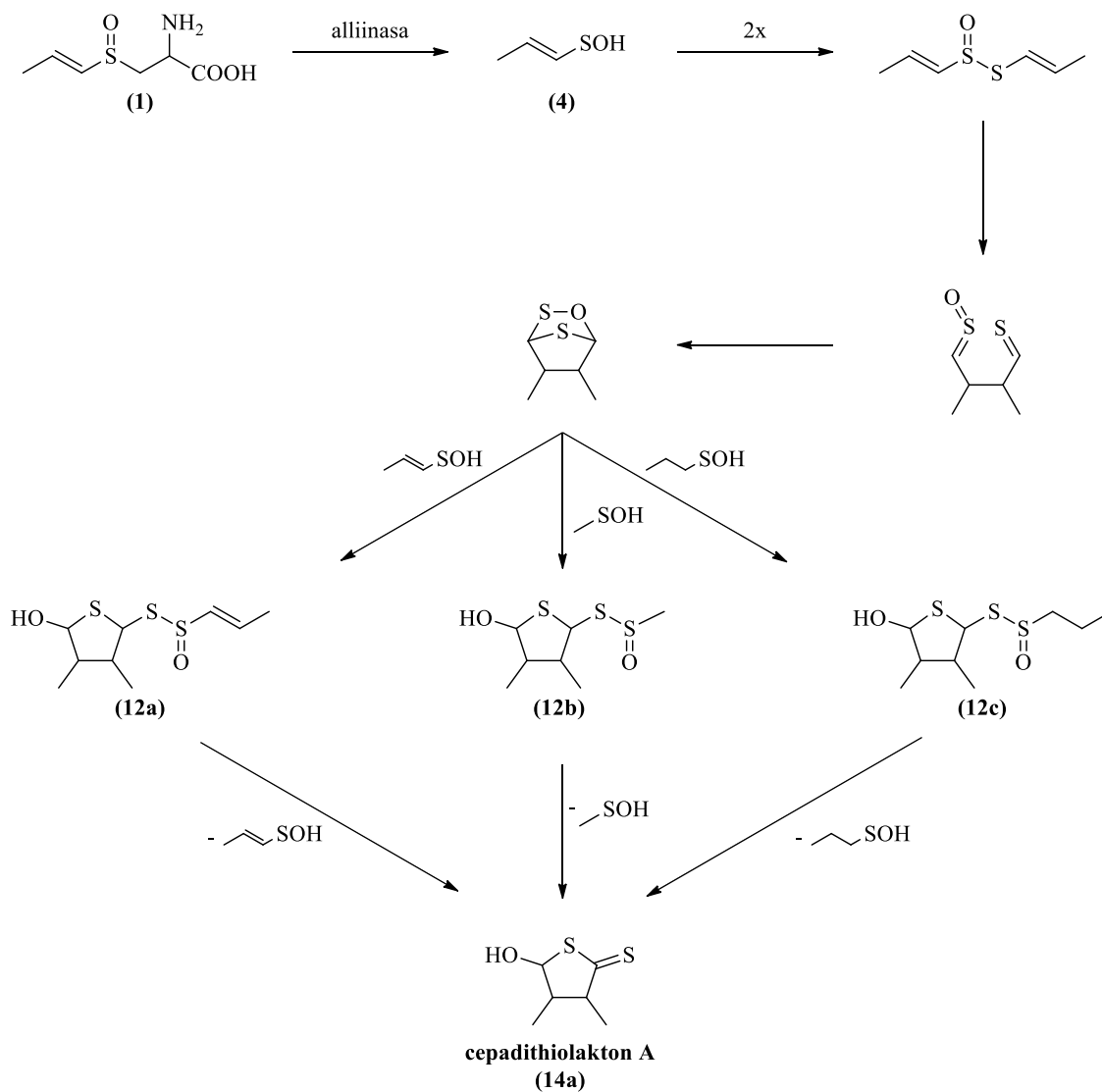
Obrázek 15: Struktury izolovaných allithiolanů včetně allithiolanu A (**13a**) (Kubec et al., 2018).

Chuť allithiolanu A (**13a**) byla popsána jako dlouhotrvající, intenzivně hořká a kovová. Čichový vjem byl popsán jako mírně cibulový (Štefanová et al., 2019).

Cepadithiolaktony

Cepadithiolaktony A (v tuto dobu jsou známe tři stereoisomery, **14a**) jsou poměrně nově objevené látky (2019). Tento objev je významný v tom, že se jedná o vůbec první (a doposud stále jediný známý) přirozeně se vyskytující γ -dithiolakton. Cepadithiolaktony A (**14a**) vznikají pravděpodobně z cepathiolanů A-C (**12a**, **12b**, **12c**) stejným mechanismem, který funguje při rozkladu jiných thiosulfínátů. Vůně

cepadithiolaktonu A (**14a**) byla charakterizována jako tepelně zpracovaná cibule s houbovými a ořechovými podtóny. Chuť **14a** byla popsána jako příjemná, připomínající vařenou cibuli (Štefanová et al., 2019). Mechanismus vzniku a strukturu této sloučeniny uvádí **Obrázek 16**.

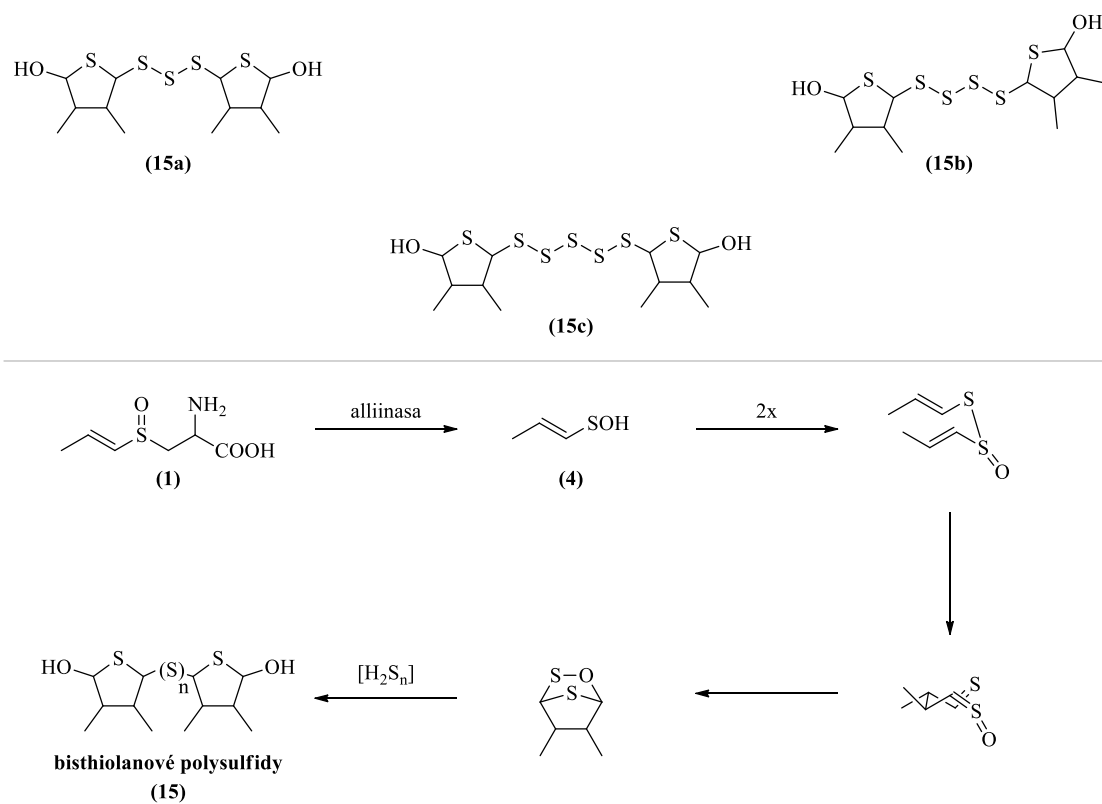


Obrázek 16: Mechanismus vzniku a struktura cepadithiolaktonu A (**14a**) (Štefanová et al., 2019).

Bisthiofanové polysulfidy

Tyto látky byly poprvé izolovány v roce 2021. Rovněž jako u cepathiolanů (**12**) byla nutná inhibice enzymu LFS, čímž byla potlačena tvorba LF (**5**). Bisthiofanové polysulfidy (**15**) jsou známy tři, a to bisthiofanový trisulfid (**15a**), resp. tetrasulfid (**15b**)

a pentasulfid (**15c**) (Aoyagi et al., 2021). Jejich strukturu s obecným mechanismem vzniku uvádí **Obrázek 17**.



1. $n = 3$
2. $n = 4$
3. $n = 5$

Obrázek 17: Struktury a obecný mechanismus vzniku bistiolanových polysulfidů (trisulfidu, **15a**, tetrasulfidu, **15b**, pentasulfidu, **15c**) (Aoyagi et al., 2021; Block et al., 2018).

3.4.2 Biologická aktivita vybraných organosírných sloučenin cibule

Makrofágy, které infiltrují nádorové tkáně, se označují jako makrofágy asociované s nádorem (angl. *tumor-associated macrophages*, dále jen TAM) a úzce se podílejí na vývoji nádorového mikroprostředí. TAM jsou díky svým protizánětlivým funkcím řazeny mezi alternativně aktivované makrofágy (M2), které se přednostně podílejí na procesech imunosuprese, angiogeneze a remodelace tkání, také urychlují proliferaci nádorových buněk. Proliferace buněk myšího osteosarkomu LM-8 se významně zvýšila při společné kultivaci s makrofágy a tato funkce pronádorových makrofágů byla potlačena léčbou onioninem A (**10a**), což dokázalo, že onionin A (**10a**) inhibuje polarizaci M2-makrofágů, čímž potlačuje proliferaci nádorových buněk. U myší dále potlačoval vývoj rakoviny vaječníků, kdy byl onionin A (**10a**) podáván perorálně a značně prodloužil přežití studovaných jedinců a potlačil růst nádoru. Tyto výsledky ukázaly, že onionin A (**10a**) je účinnou látkou pro inhibici tvorby nádorů v modelech *in vitro* i *in vivo*. Díky klinickým studiím bylo zjištěno, že konzumace červené cibule má příznivé účinky pro ženy trpící syndromem polycystických vaječníků. Navíc onionin A (**10a**) synergicky zvyšuje antiproliferační účinek protinádorových léčiv. Dále má schopnost zlepšit aktivitu lymfocytů a zabránit imunosupresivní činnosti makrofágů a myeloidních supresorových buněk v nádorovém mikroprostředí (Fujiwara et al., 2016; Nohara et al., 2017; Tsuboki et al., 2016; Zhao et al., 2021).

Signální transduktor a aktivátor transkripce 3 (dále jen STAT3) je jednou z nejdůležitějších signálních molekul v nádorových buňkách. U některých maligních nádorů souvisí aktivace STAT3 s metastazováním, invazí, proliferací a získáním tolerance k chemoterapii a radioterapii. Onionin A (**10a**) dokáže inhibovat aktivaci STAT3 vyvolanou interleukinem-6 (dále jen IL-6) podílející se na progresi malobuněčného karcinomu plic (dále jen SCLC) a proliferaci (Mito et al., 2023).

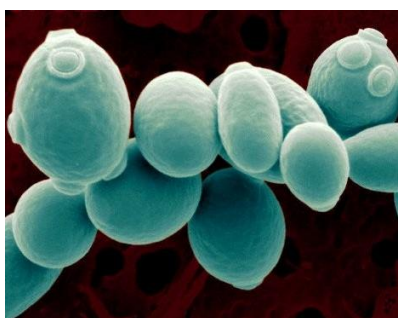
Mezi další vlastnosti patří i vliv na metabolismus karcinogenů (tj. zvýšená syntéza glutathionu v buňkách, která vyvolává zástavu buněčného cyklu a apoptózu) a prevence infekce způsobenou bakterií *Helicobacter pylori* (**Obrázek 18**), rakoviny žaludku a tlustého střeva (Nohara et al., 2014).



Obrázek 18: *Helicobacter pylori* v žaludku pod elektronovým mikroskopem (uměle obarveno).^{IV}

Onionin A (**10a**) dále vykazuje značné biologické vlastnosti důležité v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Tyto vlastnosti zahrnují inhibici syntézy cholesterolu, agregaci krevních destiček a hladkých tepen a proliferaci arteriálních svalových buněk, jakož i protizánětlivé, antioxidační a vasodilatační účinky zprostředkované sirovodíkem (Nohara et al., 2014; Nohara et al., 2017).

U zwiebelanu A (**8a**) bylo zjištěno, že se pyšní antimykotickými účinky. Stejně účinky má i allicin, který je přítomen v česneku. Obě látky způsobují zvýšení aktivity polymyxinu B, čímž dojde k narušení vakuol kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (**Obrázek 19**). Zwiebelan A (**8a**) pravděpodobně zvyšuje fungicidní aktivitu polymyxinu B účinněji než allicin, a to díky selektivitě a jeho nízké těkavosti. Oproti tomu nemá schopnost inhibice růstu kvasinkových buněk, zatímco allicin ano. Když jsou zwiebelan A (**8a**) a zwiebelan B (**8b**) ve směsi, tak se chemicky navážou na thrombin a snižují srážlivost krve (Bayer et al., 1989; Borjihan et al., 2010).



Obrázek 19: *Saccharomyces cerevisiae* pod elektronovým mikroskopem (uměle obarveno).^V

Welsoniny mají potenciální protirakovinové účinky, což bylo prokázáno u welsoninu A₁ (**9a**). Welsonin A₂ (**9b**) nebyl podrobně zkoumán (Nohara et al., 2016).

Cepathiolany (**12**) mají protizánětlivé účinky, dokonce silnější než aspirin (konkrétně cepathiolan A, **12a**). Cepathiolan A (**12a**) vykazuje také pozitivní biologické účinky, neboť dokáže snížit hladinu cukru v krvi, tj. mohl by se použít k léčbě cukrovky (Aoyagi et al., 2011).

Směs bithiolanových polysulfidů (**15**) vykazuje protizánětlivé účinky (Aoyagi et al., 2021). Biologické aktivity allithiolanů (**13**) a cepadithiolaktonu A (**14a**) se teprve zkoumají a doposud nebyly popsány ve vědeckých publikacích.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie a materiály

Chemikálie

- acetonitril (99,9%, p. a.) – SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA),
- cystein (99+%) – ACROS ORGANICS (Geel, Belgie),
- diethylether (99,5%, p. a.) – SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA),
- dihydrogenfosforečnan draselný (p. a.) – LACH NER (Neratovice, ČR),
- glycerol bezvodý (p. a.) – PENTA (Praha, ČR),
- hydroxid draselný (p. a.) – LACHEMA (Brno, ČR),
- hydroxid amonný (p. a.) – PENTA (Praha, ČR),
- chelaton III (EDTA) – PENTA (Praha, ČR),
- kyselina chlorovodíková (25%, p. a.) – LACH NER (Neratovice, ČR),
- kyselina mravenčí (98%) – LACH NER (Neratovice, ČR),
- ninhydrin (p. a.) – SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA),
- pyridoxal-5-fosfát (97%) – SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA),
- síran amonný (p. a.) – LACH NER (Neratovice, ČR),
- síran hořečnatý (bezvodý, čistý) – LACH NER (Neratovice, ČR),
- α -toluensulfonylfluorid (99%) – ACROS ORGANICS (Geel, Belgie).

Rostlinný materiál

- cibule kuchyňská (*A. cepa*), kultivar Swift, původ ČR – zakoupena v místním obchodním řetězci,
- česnek kuchyňský (*A. sativum*), původ Čína – zakoupen v místním obchodním řetězci.

Ostatní materiál

- centrifugační filtry (0,2 μ m; 2 ml; VDF) – WATREX (Praha, ČR),
- dialyzační membrána (23 mm; MWCO 12,4 kDa) – SIGMA ALDRICH (St. Louis, MO, USA),
- katex IR-120 (Amberlite, H⁺ forma) – ACROS ORGANICS (New Jersey, USA),

- membránové PTFE filtry (0,2 a 0,45 μm ; \varnothing 13 a 25 mm) – FISHER SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA),
- SPE kolony Discovery DSC-8 SPE (10 g; 60 ml) – SUPELCO (Bellefonte, PE, USA).

4.2 Přístroje

Izolace látek pomocí HPLC byla prováděna na přístroji 1260 Infinity II preparative (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s detektorem 1260 Infinity II DAD WR. Při procesu separace byla použita analytická kolona Kinetex C-8 (100 \AA ; $250 \times 4,6$ mm; 5 μm ; Phenomenex). Při hledání optimální separační metody byly testovány analytické kolony Kinetex C-18, F-5 a Biphenyl (100 \AA ; $250 \times 4,6$ mm; 5 μm ; Phenomenex). K samotné izolaci látek byla použita preparativní kolona Kinetex C-8 (100 \AA ; $250 \times 21,2$ mm; 5 μm ; Phenomenex).

Identifikace izolovaných látek byly prováděny pomocí UHPLC-PDA-MS/MS systému složeného z kapalinového chromatografu Ultimate3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), detektoru diodového pole PDA-3000 a hmotnostního spektrometru pracujícím na principu lineární iontové pasti LTQ XL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.3 Gradienty používané v HPLC

Metoda A

<i>průtok</i> <i>[ml/min]</i>	<i>čas</i> <i>[min]</i>	<i>H₂O</i> <i>[%]</i>	<i>CH₃CN</i> <i>[%]</i>
19,1	0	80	20
19,1	25	60	40
19,1	50	20	80
19,1	51	5	95
19,1	59	5	95
19,1	60	80	20
<i>kolona</i>	<i>Kinetex C8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 \AA)</i>		

Metoda B

<i>průtok</i> <i>[ml/min]</i>	<i>čas</i> <i>[min]</i>	<i>H₂O + 0,05%</i> <i>HCOOH [%]</i>	<i>CH₃CN + 0,05%</i> <i>HCOOH [%]</i>
19,1	0	85	15
19,1	20	80	20
19,1	21	5	95
19,1	29	5	95
19,1	30	85	15
<i>kolona</i>	<i>Kinetex C8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)</i>		

4.4 Optimalizace metody pro izolaci onioninů z cibule kuchyňské

Postup izolace byl modifikován z důvodu velké komplexnosti složení cibulového extraktu. Z lyofilizované cibule byla izolována směs přítomných ACSO (tedy isoalliinu, **1**, methiinu, **2** a propiinu, **3**), která byla následně smíchána s alliinasou izolovanou z česneku. Hlavní výhodou alliinasy izolované z česneku je ta, že neobsahuje enzym LFS, tudíž všechny přítomné ACSO zreagují na sloučeniny vhodné k izolaci (nevzniká žádný LF (**5**), jehož tvorba by byla v tomto případě nežádoucí).

4.4.1 Příprava pufru k izolaci alliinasy

Do odměrné baňky o objemu 2 l bylo nalito 100 ml destilované vody, vsypáno 27,22 g KH₂PO₄, 2,92 g chelatonu III (EDTA), 0,174 g α -toluensulfonylfluoroxidu, 1 g cysteinu a 0,01 g pyridoxal-5-fosfátu. K této směsi bylo přidáno 200 ml bezvodého glycerolu a destilovanou vodou byla odměrná baňka naplněna po rysku. Vzniklý roztok byl pomocí 1 M roztoku KOH upraven na hodnotu pH 7,5 a před použitím uchován v chladničce.

Složení takto připraveného pufru bylo 0,1 M KH₂PO₄, 0,5 mM α -toluensulfonylfluoroxidu, 5 mM chelatonu III (EDTA), 10 μ M pyridoxal-5-fosfátu, 0,05 % cysteinu a 10 % glycerolu.

4.4.2 Izolace alliinasy z česneku

Celý postup byl prováděn za teploty 0-4 °C (v ledu). K izolaci alliinasy bylo použito 453 g oloupaných stroužků česneku, které byly rozmixovány kuchyňským mixérem. Vzniklý homogenát byl smíchán se 400 ml vychlazeného extrakčního pufru (4.4.1), jenž byl připravený jeden den předem. Tato směs byla za sníženého tlaku zfiltrována přes Büchnerovu nálevku a plátno. Filtrát byl odstředěn při 5 000 rpm, 3 °C po dobu 15 minut. Bylo získáno cca 450 ml supernatantu. K supernatantu, umístěném v ledové lázni, byl přidáván síran amonný (185 g; 41,1 g (NH₄)₂SO₄ na 100 ml roztoku). Směs byla míchána 60 minut za stálého chlazení ledem, poté opět odstředěna (5000 rpm; 3 °C; 20 minut). Supernatant byl slit a precipitát postupně rozpouštěn v minimálním objemu extrakčního pufru a převeden do dialyzačního střívka (průměr 23 mm; MWCO 12,4 kDa).

Získaný roztok (160 ml) byl dialyzován 72 hodin proti destilované vodě (4 °C). V prvních 24 hodinách byla destilovaná voda měněna v intervalu 4 hodin, v druhé části v intervalu 8 hodin. Po dialýze byl obsah dialyzační membrány rozdělen do 100ml lahvíček (Pyrex) a lyofilizován. Celý postup byl prováděn opakovaně.

4.4.3 Izolace ACSO z cibule

K 500 g lyofilizované cibule byly přidány 4 l H₂O a 4 ml 35% HCl. Celá směs se 20 min vařila, následně byla ochlazená pomocí ledu na laboratorní teplotu. Po vychladnutí byl celý homogenát přefiltrován přes plátno a získaný filtrát odstředěn (5000 rpm). Koncentrovanou HCl byla upravena hodnota pH supernatantu z pH 4,4 na 3,5.

Vzorek upravený výše popsaným postupem byl nanesen na skleněnou kolonu naplněnou katexem (výška × šířka sloupce, 18 × 5 cm, Amberlite IR-120). Po nanesení vzorku a promytí vodou byly aminokyseliny eluovány 0,2 M NH₄OH. Frakce, které poskytovaly pozitivní reakci s ninhydrinem (přítomnost aminokyselin byla potvrzena i HPLC/PDA analýzou), byly spojeny a zbaveny nežádoucího žlutého zbarvení pomocí aktivního uhlí. Směs byla zfiltrována přes filtrační papír KA 4 a skladována při teplotě -28 °C. Po následné lyofilizaci byla získána frakce obsahující směs ACSO, tj. isoalliinu (1), methiinu (2) a propiinu (3). Získaná směs obsahovala také další aminokyseliny přítomné v cibuli, které však nebylo nutné identifikovat. Alliinasa, která byla v dalším

kroku využita, totiž katalyzuje rozklad pouze ACSO, ostatní aminokyseliny zůstanou při extrakci ve vodné fázi.

Takto získaná směs prekurzorů organosírných sloučenin cibule bude dále označována jako „nečistý isoalliin“.

4.4.4 Příprava extraktu

40 g „nečistého isoalliinu“ rozpuštěného ve 400 ml 0,5 M KH_2PO_4 (pH = 7,0; 10% glycerol; 25 $\mu\text{mol/l}$ pyridoxal-5-fosfát) bylo použito k modelové reakci. Ke vzniklému roztoku byly přidány 4 g česnekové alliinasy, rozpuštěny v 800 ml stejného extrakčního pufru (0,5 M KH_2PO_4). Směs byla míchána 4 h při laboratorní teplotě, aby v ní proběhly všechny potřebné enzymově katalyzované reakce. Následně byla směs extrahována metodou přímé extrakce 2×200 ml diethyletheru (dále jen DEE). Pomocí bezvodého MgSO_4 byl vzorek přesušen, zfiltrován přes Hirschovu nálevku a pomocí RVO ($t < 30$ °C) zbaven veškerého DEE. Tímto postupem bylo celkem zpracováno 100 g „nečistého isoalliinu“ (za využití 10 g česnekové alliinasy).

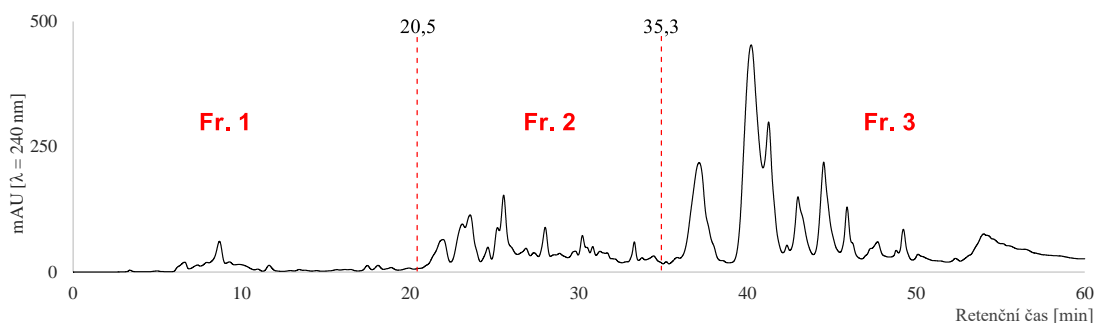
Před HPLC analýzou byl získaný extrakt ještě přečištěn pomocí SPE kolonky. V 60 ml CH_3CN byl vzorek rozpuštěn a následným protečením přes kolonku C8-SPE (Supelco; 10 g; 60 ml) zbaven látek, které by se nevratně sorbovaly na chromatografickou kolonu a znehodnocovaly analýzu. Po odpaření CH_3CN pomocí RVO ($t < 30$ °C) bylo získáno 4,16 g žlutohnědého viskózního extraktu, který byl před dalšími analýzami uchován při -28 °C.

4.4.5 Frakcionace extraktu

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo optimalizovat metodu pro izolaci vybraných skupin sloučenin (onioninů) ze získaného extraktu metodou preparativní HPLC/PDA na reverzní fázi. K tomuto účelu byla použita chromatografická kolona Kinetex C8 (250 \times 21,2 mm; 5 μm ; 100 Å, Phenomenex).

Příprava vzorku pro preparativní HPLC

Extrakt z modelové reakce (4,16 g) byl rozpuštěn ve 32 ml CH₃CN/H₂O (v/v; 2/1), čímž byl získán vzorek o koncentraci 130 mg/ml. Poté následovala filtrace přes membránový filtr (PTFE; 0,45 μm; ø 25 mm). Následně byly pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (nástríkový objem 900 μl; **Metoda A**) opakovaně jímány celkem tři frakce (označeny jako *Fr. 1–Fr. 3*), které znázorňuje **Obrázek 20**.



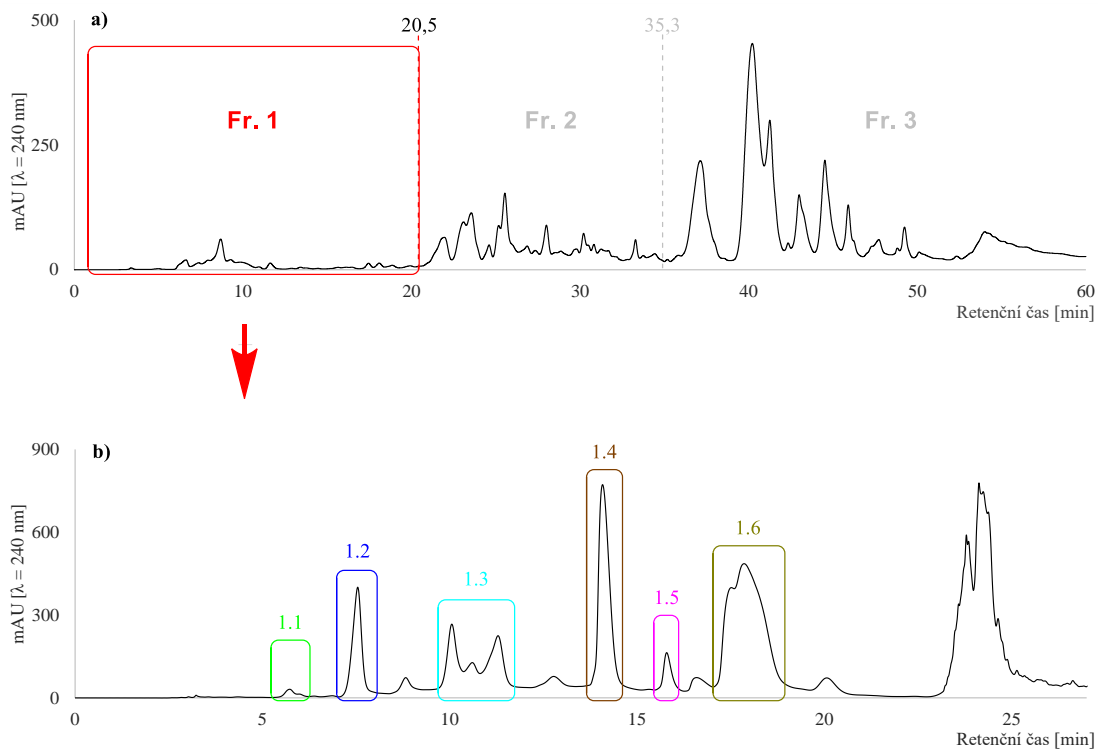
Obrázek 20: úvodní frakcionace C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce (**Metoda A**).

Pomocí RVO ($t < 30$ °C) byl odpařen CH₃CN z jednotlivých získaných frakcí. Tyto frakce byly extrahovány metodou přímé extrakce s použitím DEE (v/v; DEE/vzorek; 1/5). Vzorky byly přesušeny pomocí MgSO₄, zfiltrány přes Hirschovu nálevku a na RVO ($t < 30$ °C) byl odpařen DEE. Takto získané extrakty jednotlivých frakcí byly před dalšími analýzami uchovány při teplotě -28 °C.

Frakce 1

Najímané podíly *frakce 1* byly extrahovány DEE (v/v; 4/1), vzorek byl přesušen pomocí bezvodého MgSO₄, zfiltrován přes Hirschovu nálevku a využitím RVO ($t < 30$ °C) byl odpařen zbytek DEE. Takto bylo získáno 230 mg silně viskózního produktu.

Tento vzorek *frakce 1* (230 mg) byl rozpuštěn ve 2 ml okyseleného roztoku směsi CH₃CN/H₂O (v/v; CH₃CN + 0,05% HCOOH/H₂O + 0,05% HCOOH; 1/1), zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm) a odfoukán dusíkem. Následnou preparativní C8-HPLC/PDA byla *frakce 1* rozdělena na 6 podfrakcí s označením *Fr. 1.1–1.6* (**Obrázek 21**, **Metoda B**, nástríkový objem 300 μl).

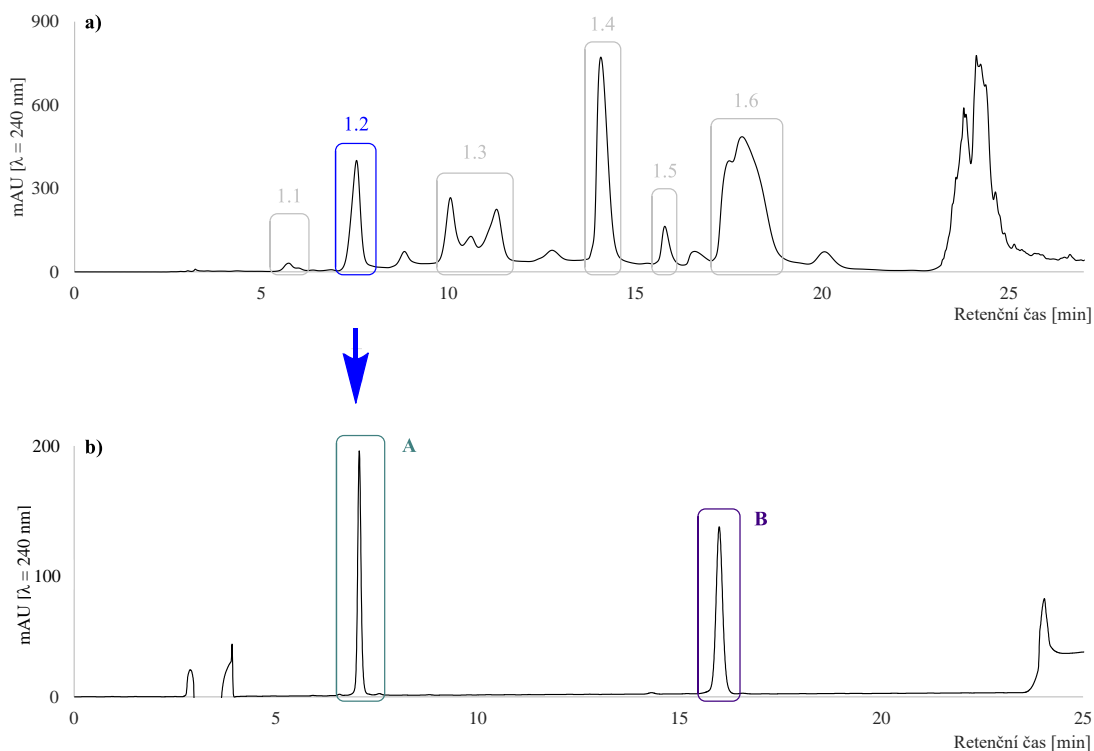


Obrázek 21: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** úvodní frakcionace modelové reakce (**Metoda A**), **b)** následná separace *frakce 1* (**Metoda B**).

Frakce 1.2

Extrakt *frakce 1* (230 mg) byl naředěn rozpuštěním v okyseleném roztoku $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; $\text{CH}_3\text{CN} + 0,05\% \text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{HCOOH}$; 1/1), zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; $0,45 \mu\text{m}$; $\varnothing 13 \text{ mm}$). Následně byla pomocí C8-HPLC/PDA (**Obrázek 22; Metoda B**, nástřikový objem $300 \mu\text{l}$) jímána *frakce 1.2*.

Najímaná *frakce 1.2* byla zbavena CH_3CN pomocí RVO ($t < 30 \text{ }^\circ\text{C}$), pH upraveno pomocí $10\% \text{NaHCO}_3$ na hodnotu 7. Pomocí C8-HPLC/MS bylo zjištěno, že v této *frakci* se vyskytují dva stereoisomery onioninu A (**10a**). V této práci jsou tyto stereoisomery označeny **A** a **B** (**Obrázek 22**). Takto bylo získáno 6 mg produktu. Před odesláním ke zkoumání biologické aktivity byla *frakce 1.2* uchována při teplotě $-28 \text{ }^\circ\text{C}$.

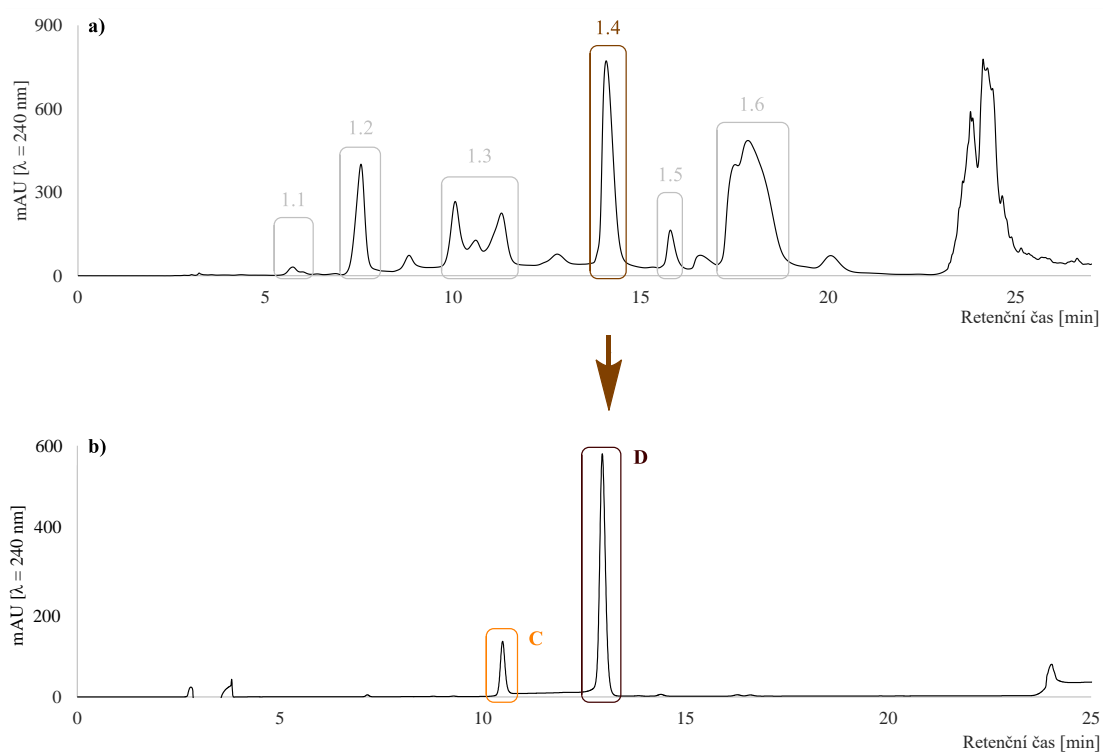


Obrázek 22: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** *frakce 1 (Metoda B)*, **b)** *frakce 1.2 (Metoda B)*.

Frakce 1.4

Extrakt *frakce 1* (230 mg) byl naředěn rozpuštěním v okyseleném roztoku $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; $\text{CH}_3\text{CN} + 0,05\% \text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{HCOOH}$; 1/1), zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; $0,45 \mu\text{m}$; $\varnothing 13 \text{ mm}$). Následně byla jímána *frakce 1.4* pomocí C8-HPLC/PDA (**Obrázek 23; Metoda B**, nástřikový objem $300 \mu\text{l}$).

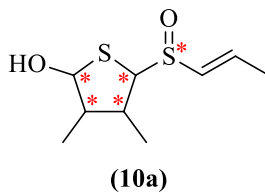
Najímaná *frakce 1.4* byla pomocí RVO ($t < 30 \text{ }^\circ\text{C}$) zbavena CH_3CN , pH upraveno na hodnotu 7 pomocí $10\% \text{NaHCO}_3$. *Frakce 1.4* po C8-HPLC/MS analýze odhalila, že obdobně jako *frakce 1.2* obsahuje dva stereoizomery onioninu A (**10a**) označené písmeny **C** a **D** (**Obrázek 23**). Takto bylo získáno $12,4 \text{ mg}$ produktu. Před odesláním ke zkoumání biologické aktivity byla *frakce 1.4* uchována při teplotě $-28 \text{ }^\circ\text{C}$.



Obrázek 23: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** *frakce 1 (Metoda B)*, **b)** *frakce 1.4 (Metoda B)*.

5 Výsledky

Onionin A (**10a**) patří mezi sloučeniny přirozeně vznikající v cibuli při narušení rostlinného pletiva (např. krájením). Tato sloučenina obsahuje ve své molekule celkem pět asymetrických center. Díky tomu může tvořit teoreticky až 32 stereoizomerů (**Obrázek 24**). Každý z těchto izomerů může vykazovat při HPLC analýze detekovatelný signál.



Obrázek 24: Asymetrická centra onioninu A (**10a**).

Optimalizace metody pro izolaci onioninu A (**10a**) pomocí metody HPLC/PDA byla hlavním cílem této práce, poněvadž standard této látky není komerčně dostupný.

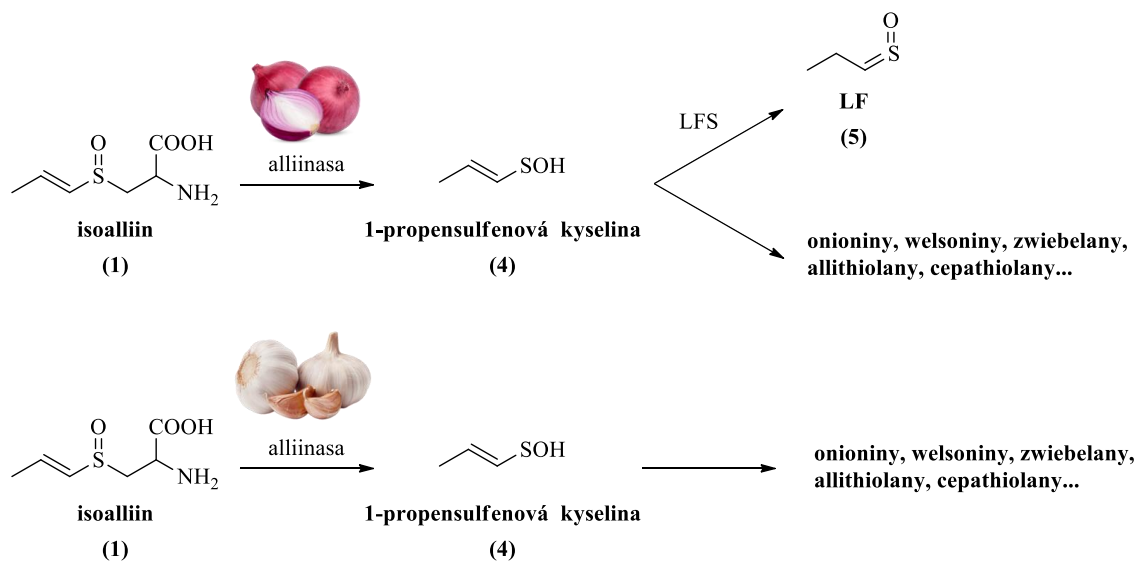
5.1 Optimalizace metody pro izolaci onioninů metodou HPLC/PDA

5.1.1 Izolace alliinasy

Enzym alliinasa byl izolován z česnekových stroužků, které byly rozmixovány a smíchány s extrakčním pufrem (přesné složení pufru uvádí kapitola **4.4.1**). Následovala filtrace za sníženého tlaku a odstředování. Poté byl přidán síran amonný, směs byla chlazená ledem, znovu byla odstředěna a převedena do dialyzačního strívka. Po dialyzaci proběhla lyofilizace (podrobný postup uvádí kapitola **4.4.2**).

Česneková alliinasa byla zvolena, jelikož pro tuto práci má oproti cibulové alliinase jednu podstatnou výhodu. Česneková alliinasa totiž neobsahuje enzym LFS (lachrymatory factor synthase), takže nedochází k nežádoucí přeměně 1-propensulfenové kyseliny (**4**) na LF (**5**) – viz **Obrázek 25**. Tvorba LF (**5**) je nežádoucí, protože touto přeměnou se snižuje množství 1-propensulfenové kyseliny (**4**), která je klíčovou stavební jednotkou pro tvorbu dalších organosírných sloučenin, kam patří i onioniny. Z toho plyne, že by se při použití cibulové alliinasy snížil výtěžek onioninů a dalších organosírných látek, které jsou přítomné ve *frakcích 2 a 3* (např. allithiolany (**13**), bithiolanové

polysulfidy (15) a další). **Obrázek 25** nastiňuje hlavní výhodu česnekové alliinasy oproti té cibulové.



Obrázek 25: Porovnání katalytického účinku česnekové a cibulové alliinasy.^{VI}

5.1.2 Izolace ACSO

Jelikož extrakt z homogenizované cibule obsahuje kromě onioninů také velká množství dalších látek, jejichž přítomnost by komplikovala následnou izolaci a přečištění onioninů, byla k produkci onioninů využita modelová směs sestávající z isoalliinu a částečně přečištěné alliinasy z česneku. Směs isoalliinu a ostatních ACSO (methiinu a propiinu) byla izolována z lyofilizované cibule pomocí iontoměničové chromatografie následujícím postupem. K lyofilizované cibuli byla přidána voda a směs se vařila, poté byla ochlazená ledem na laboratorní teplotu, proběhla filtrace, odstředování a pomocí HCl byla upravena hodnota pH. Tento vzorek byl jednou převeden přes skleněnou kolonu naplněnou katexem a následovala eluce. Směs byla zfiltrována a lyofilizována (podrobný postup je uveden v kapitole 4.4.3). Tímto postupem byla získána frakce, která obsahovala pro tuto práci nepostradatelné ACSO, tj. isoalliin (1), methiin (2) a propiin (3). Tato frakce obsahovala také další aminokyseliny vyskytující se v cibuli, které ovšem nebylo nutno identifikovat, jelikož alliinasa získaná z česneku katalyzuje rozklad pouze třech výše zmíněných ACSO. Používaná směs takto získaných aminokyselin se v této práci označuje termínem „nečistý isoalliin“.

Obvykle se k této modelové reakci s česnekovou alliinasou používal čistý isoalliin (**1**), který se získával taktéž z lyofilizovaného cibulového prášku. Pro izolaci čistého isoalliinu (**1**) však bylo nutné využít kombinaci několika iontoměníčů, což je poměrně složitý a časově náročný postup. Využití „nečistého isoalliinu“ se ukázalo býti mnohem méně časově i finančně náročné a při porovnání chování získaného isoalliinu (**1**) se zjistilo, že čistý i „nečistý isoalliin“ poskytují onioniny s podobnými výtěžky.

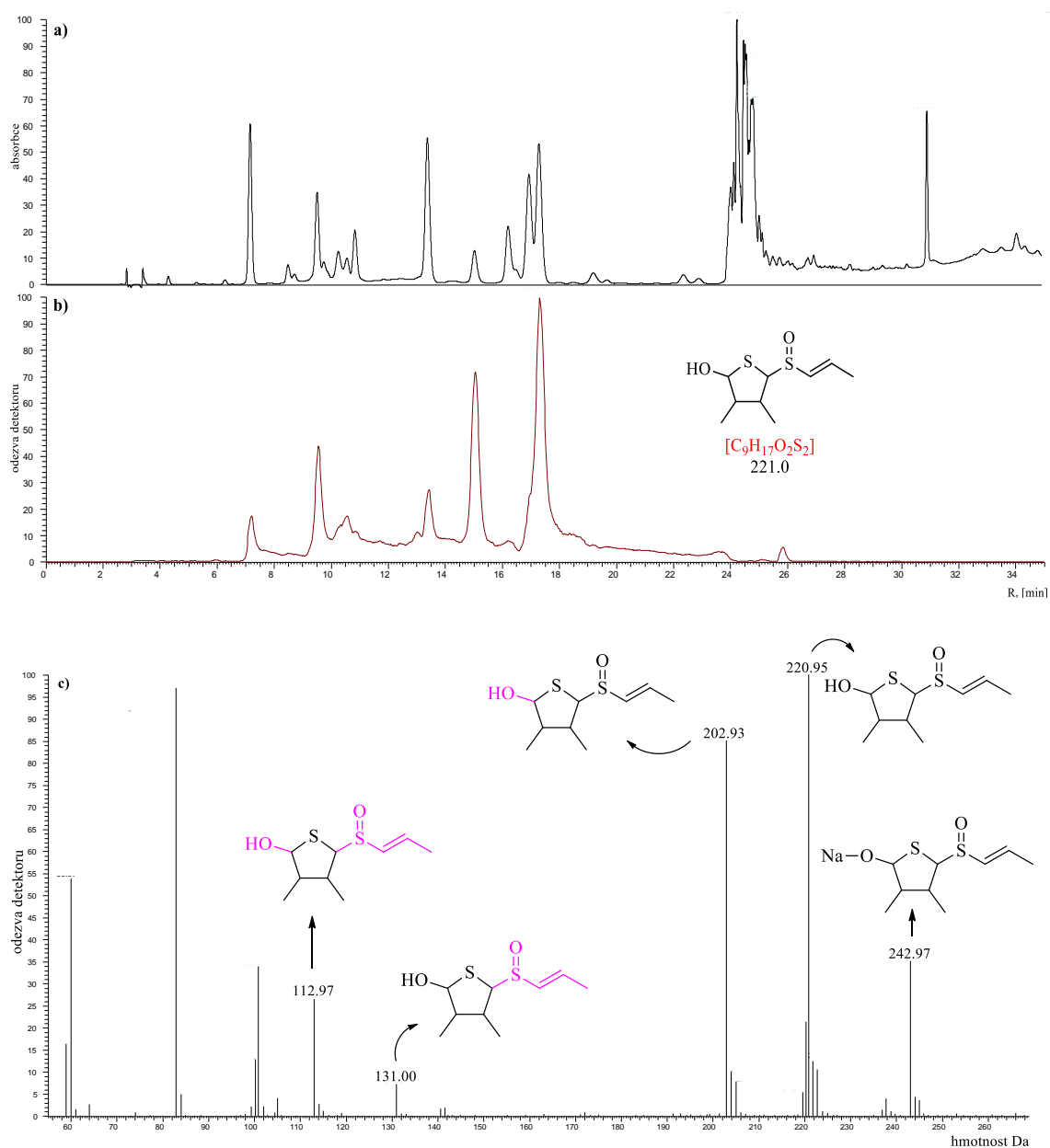
5.1.3 Další optimalizace izolace

Dalšími kroky v procesu optimalizace izolačního postupu bylo provedení několika nástřiků vzorků na dva typy HPLC stacionárních fází, a to na kolonu C8 a kolonu C18. Ukázalo se, že kolona C8 vykazovala lepší separaci vznikajících látek, proto byla zvolena k izolaci produktů modelové reakce a zároveň i k rozdělení *frakce 1* a jejích podfrakcí (*frakce 1.1–1.6*). Před samotnou preparací jsme se snažili optimalizovat gradienty. Optimální gradienty, které byly použité v této práci, uvádí kapitola **4.3**.

První HPLC analýzy byly prováděny se vzorky, u kterých nebyla upravována hodnota pH. HPLC separace těchto vzorků však nebyla ideální, neboť docházelo ke značným koelucím přítomných sloučenin. Tento problém se vyřešil při okyselení vzorku jak *frakce 1*, tak i *frakcí 1.1–1.6*. Výsledky byly lépe reprodukovatelné a jednotlivé frakce znatelně lépe rozdělené.

5.2 Izolace a strukturní identifikace onioninu A

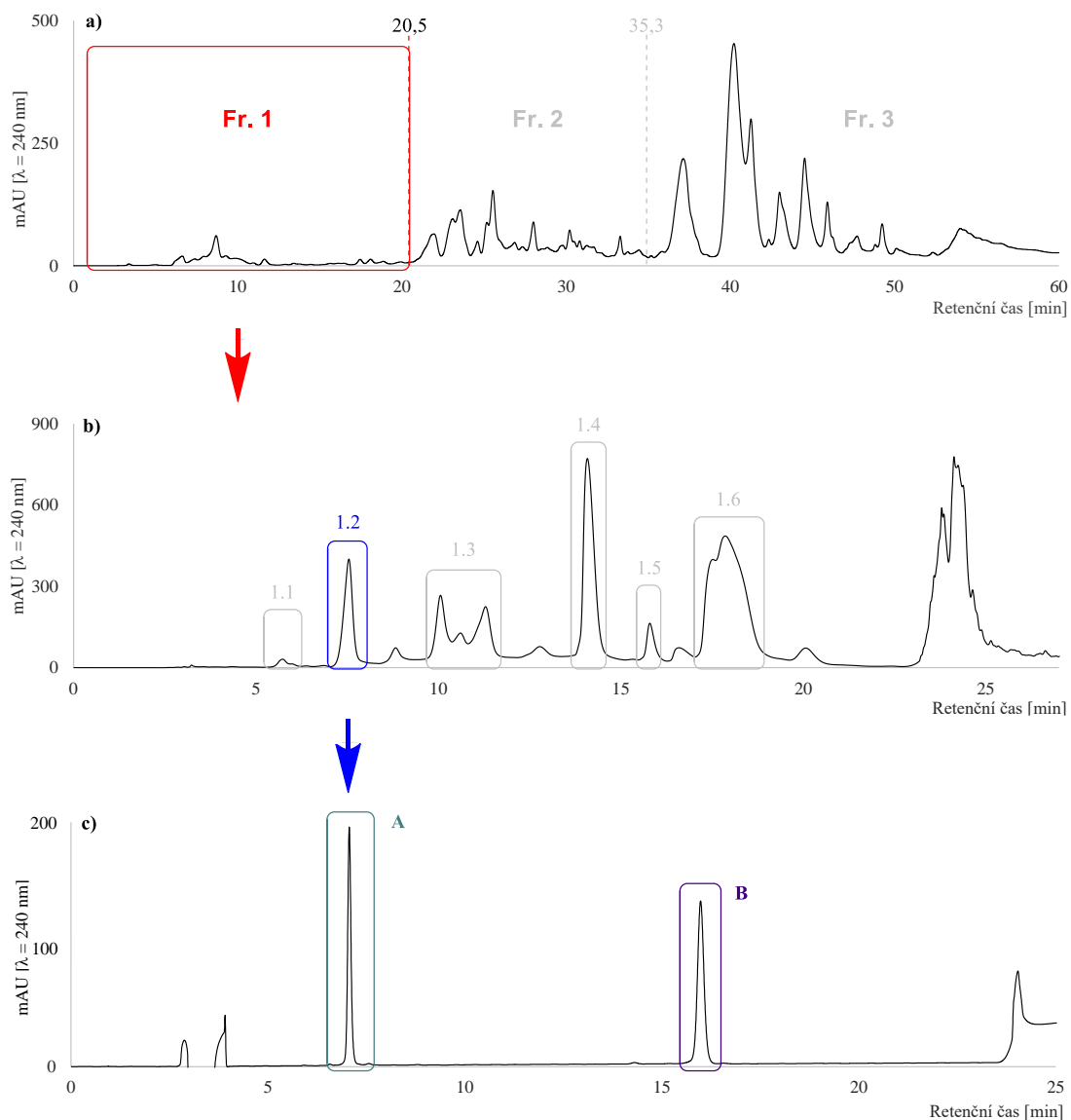
Onionin A (**10a**) je sloučenina s elementárním složením $C_9H_{17}O_2S_2$ ($[M+H]^+ = 221,0665$ Da). Na základě dat z HPLC/MS analýzy jednotlivých frakcí bylo zjištěno, že onionin A (**10a**) se vyskytuje v extraktu modelové reakce ve *frakci 1* (viz **Obrázek 26**).



Obrázek 26: Frakce 1 **a)** HPLC/PDA chromatogram, **b)** HPLC/MS chromatogram (záznam pouze hmoty $[M+H]^+ = 221.0$ Da), **c)** MS spektrum frakce 1.2.

Frakce 1 proto byla následně pomocí preparativní C8-HPLC rozdělena na celkem šest podfrakcí s označením *Fr. 1.1–1.6*. Tyto frakce byly analyzovány metodou HPLC/MS, která potvrdila přítomnost onioninů ve všech zmíněných podfrakcích. Analýza a dělení podfrakcí *Fr. 1.1, 1.3, 1.5* a *1.6* v této práci není podrobně rozepsána, jelikož neobsahovaly pouze stereoizomery onioninu A (**10a**), ale i příměsi jiných, onioninům strukturně příbuzných látek. Struktura těchto látek (včetně stereoizomerů onioninu A, **10a**) bude v nejbližší době podrobně prozkoumána v rámci jiného projektu.

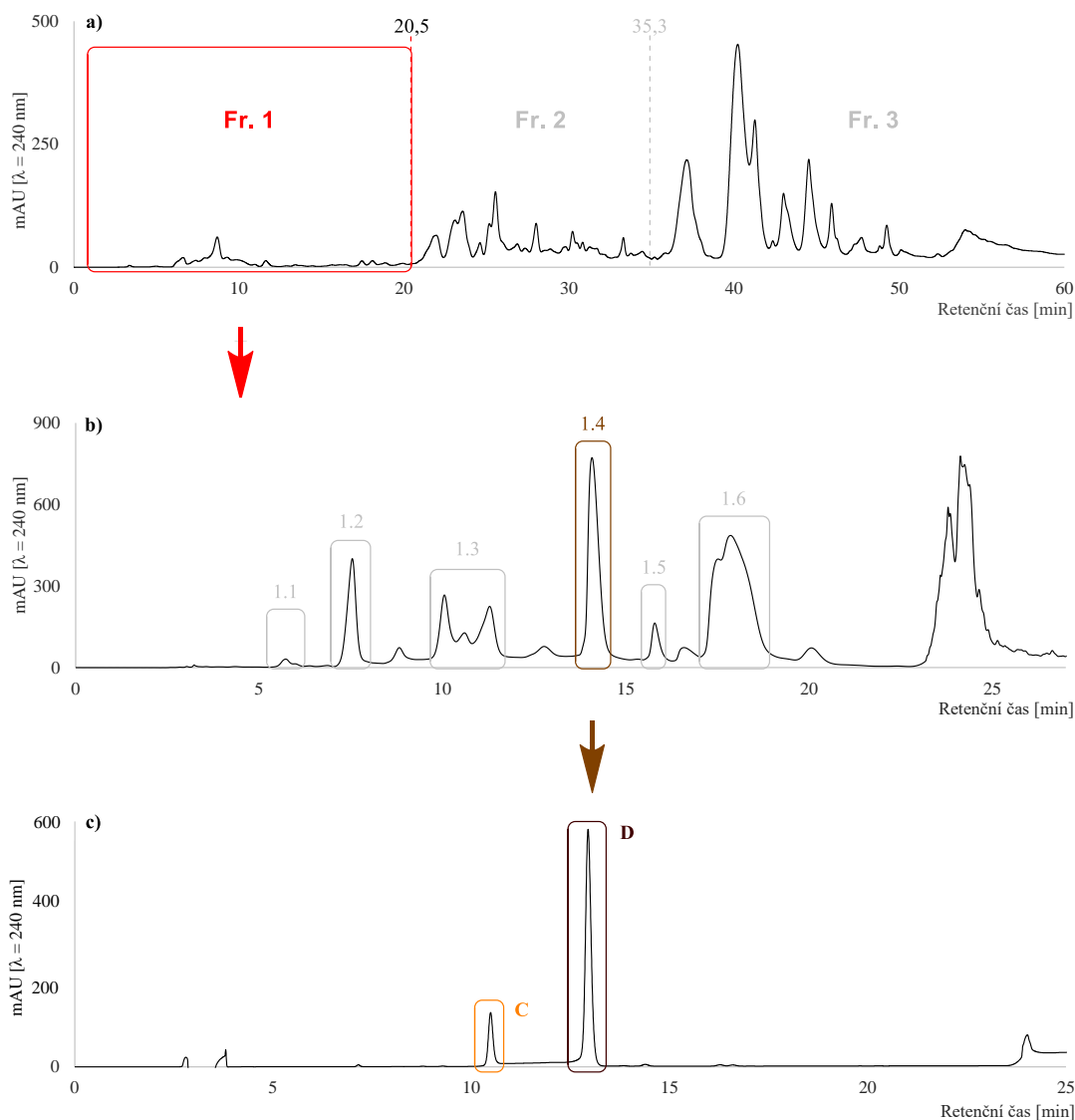
Tato práce se zabývá *frakcemi 1.2 a 1.4*, ve kterých se vyskytují celkem čtyři stereoizomery onioninu A (**10a**). Dva stereoizomery se vyskytují ve *frakci 1.2* (**Obrázek 27**) a další dva ve *frakci 1.4* (**Obrázek 28**). HPLC chromatogramy celého procesu izolace stereoizomerů onioninu A (**10a**) jsou uvedeny na **Obrázku 27** a **Obrázku 28**.



Obrázek 27: HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** modelové reakce (**Metoda A**), **b)** *frakce 1* (**Metoda B**), **c)** *frakce 1.2* (**Metoda B**).

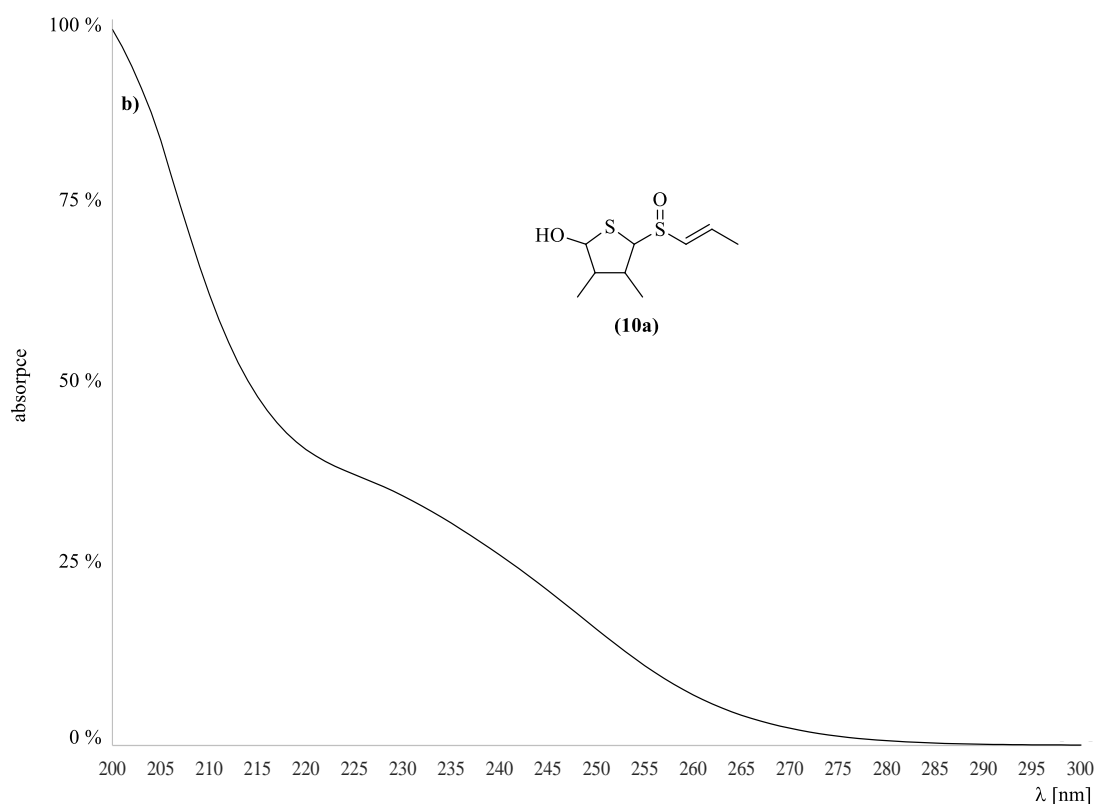
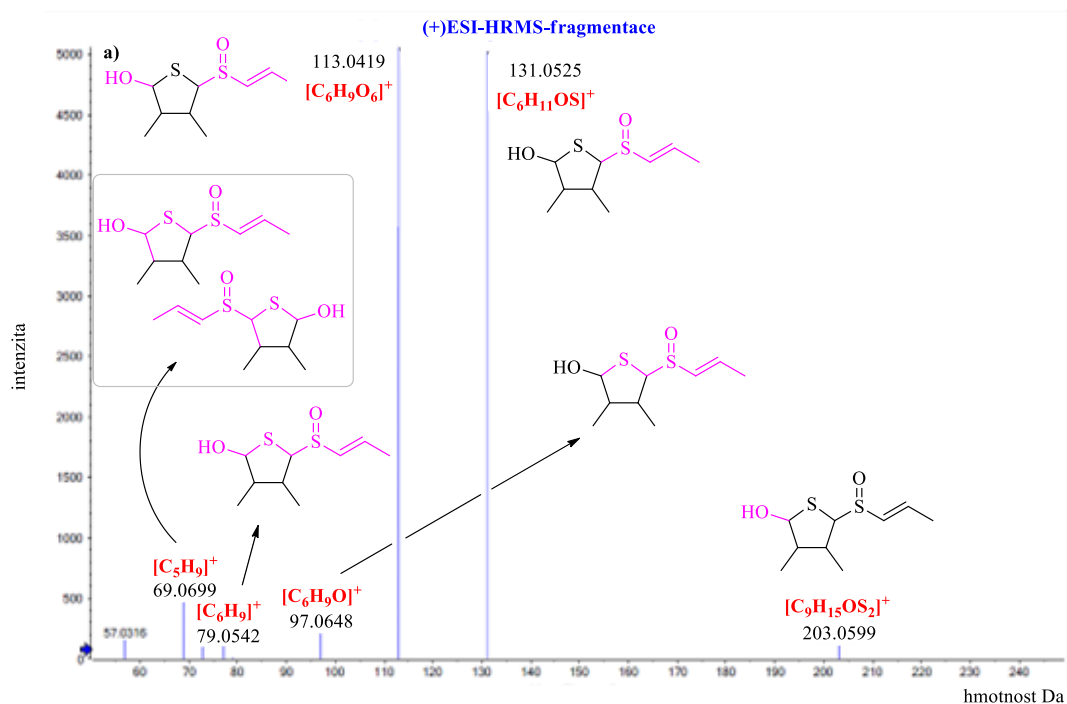
Přesnou strukturu stereoizomerů **A** a **B** odhalí až analýza pomocí nukleární magnetické rezonance (dále jen NMR). Jak je z **Obrázku 27** patrné, takto izolované stereoizomery **A** i **B** byly získány ve velmi vysoké čistotě.

U stereoizomerů **C** a **D** je to analogické jako u **A** a **B**, tj. že jsou ve velmi vysoké čistotě a jejich absolutní konfiguraci odhalí až detailní NMR analýza. HPLC chromatogramy celého procesu izolace stereoizomerů **C** a **D** uvádí **Obrázek 28**.



Obrázek 28: HPLC/PDA chromatogram extraktu: a) modelové reakce (Metoda A), b) frakce 1 (Metoda B), c) frakce 1.4 (Metoda B).

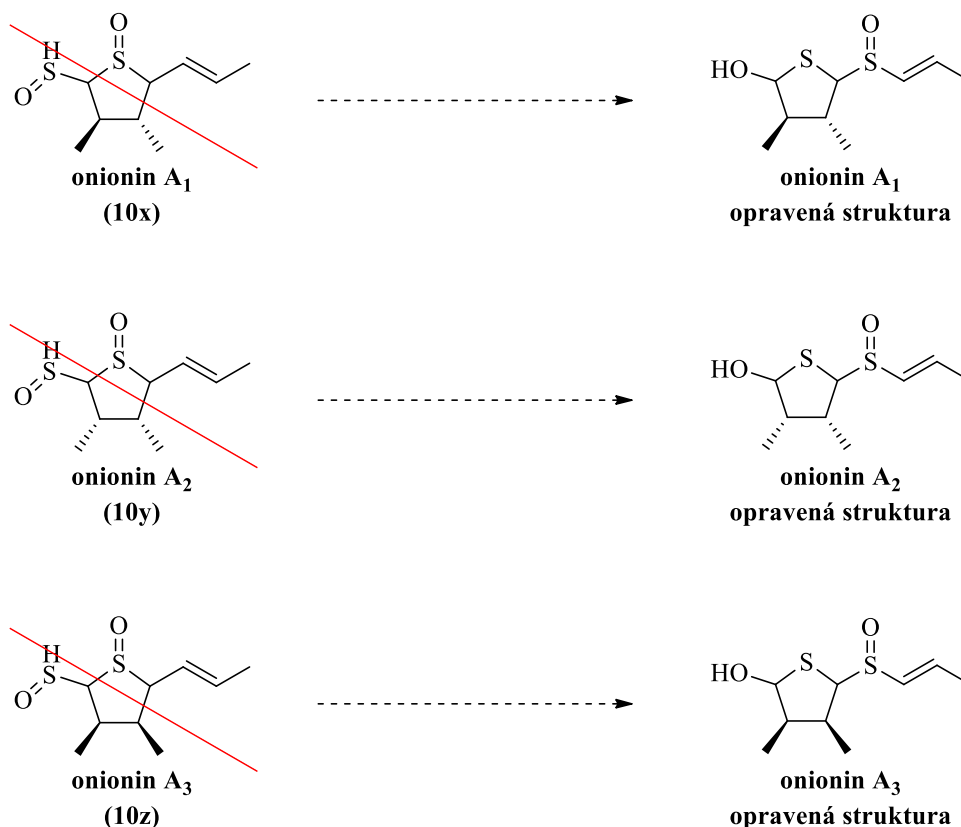
Přítomnost onioninu A (**10a**) v izolovaných frakcích 1.2 a 1.4, potvrzuje hmotnostní a UV spektrum, které znázorňuje **Obrázek 29**. Struktura odpovídá opravené struktuře, dle již publikovaných výsledků Štefanové et al. v roce 2019.



Obrázek 29: Frakce 1.4: **a)** MS spektrum, **b)** UV spektrum.

První stereoizomer onioninu A (**10a**) byl poprvé izolován roku 2010, byla mu navržena struktura (viz **Obrázek 30**) a byl pojmenován onionin A₁ (**10x**). V roce 2014 byly objeveny další dva stereoizomery, které byly pojmenovány onionin A₂ (**10y**)

a onionin A₃ (**10z**). Rovněž oběma byla navržena struktura. Tyto struktury se ukázaly být chybné a byly v roce 2019 opraveny (El-Aasr et al., 2010; Nohara et al., 2014; Štefanová et al., 2019). Původní i opravené struktury objevených stereoizomerů onioninu A (**10a**) uvádí **Obrázek 30**.



Obrázek 30: Původní i opravené struktury stereoizomerů onioninu A (**10a**), tj. onioninu A₁ (**10x**), A₂ (**10y**) a A₃ (**10z**).

V této práci se podařilo izolovat celkem čtyři velmi čisté stereoizomery (**A**, **B**, **C** a **D**) onioninu A (**10a**). Bohužel na základě získaných dat zatím nelze určit, zda všechny izolované stereoizomery jsou dosud ve vědeckých publikacích nepopsané, anebo se pod některým skrývá dříve izolovaný stereoizomer skupinou japonských vědců. Odpověď na tuto otázku přinese až NMR analýza. Všechny izolované stereoizomery v této práci, tj. **A**, **B**, **C** a **D**, byly odeslány k podrobnému zkoumání jejich biologické aktivity. Výsledky těchto experimentů nebyly před dokončením této diplomové práce dosud známy.

Zajímavé bude také podrobné prozkoumání ostatních podfrakcí *frakce 1*, tedy *frakce 1.1*, *1.3*, *1.5* a *1.6*. Výsledky budou nepochybně neméně zajímavé, jelikož s vysokou pravděpodobností se v těchto frakcích vyskytují další stereoizomery onioninu A (**10a**). Tato sloučenina je totiž schopna vytvořit teoreticky až 32 stereoizomerů díky

přítomnosti pěti asymetrických center ve své molekule. Mohou se zde také vyskytovat i různé stereoizomery onioninu B (**10b**) i onioninu C (**10c**), a to díky použití „nečistého isoalliinu“, který obsahuje hlavní prekurzory ACSO cibule, tj. isoalliin (**1**), methiin (**2**) i propiin (**3**). Právě přítomnost všech ACSO cibule umožňuje vznik methylových a propylových homologů onioninu A (**10a**), tj. onioninu B (**10b**), vzniklého z přeměny methiinu (**2**), resp. onioninu C (**10c**), vzniklého z přeměny propiinu (**3**). Lze tedy konstatovat, že optimalizace metody pro izolaci onioninů se zdařila.

6 Diskuse

Tato práce se zabývala izolací organosírných sloučenin poprvé objevených v roce 2010 skupinou japonských vědců, triviálně označovaných jako onioniny A. Onioniny lze zařadit mezi technologicky žádoucí sloučeniny, jelikož jejich chuť (připomínající vařenou cibuli) a vůně (charakterizována jako zelená cibule) jsou konzumenty vnímány pozitivně. Tyto látky v cibuli vznikají přirozeně po narušení rostlinného pletiva např. krájením (El-Aasr et al., 2010; Štefanová et al., 2019).

Tato práce se zabývala optimalizací přípravy onioninů v modelové směsi a následným postupem jejich izolace za využití preparativní HPLC/PDA a jejich identifikací pomocí HPLC/MS.

Zaměření této práce se týkalo *frakce 1* získané rozdělením modelové směsi. Modelové reakce se ovšem vybíraly tak, aby byly výhodné pro izolaci hned několika skupin organosírných sloučenin (jako např. allithiolanů (**13**), bisthioolanových polysulfidů (**15**) a dalších), které se vyskytovaly ve *frakci 2* a *frakci 3*. El-Aasr et al. (2010) a Kubec et al. (2018) k těmto modelovým reakcím použili čistý isoalliin (**1**) a methiin (**2**), jež reagovaly s enzymem alliinasou, která byla získána z česneku. Česneková alliinasa se použila kvůli nepřítomnosti enzymu LFS, čímž bylo zamezeno vzniku LF (**5**), který by snižoval výtěžek sledovaných sloučenin, tudíž by byl nežádoucí.

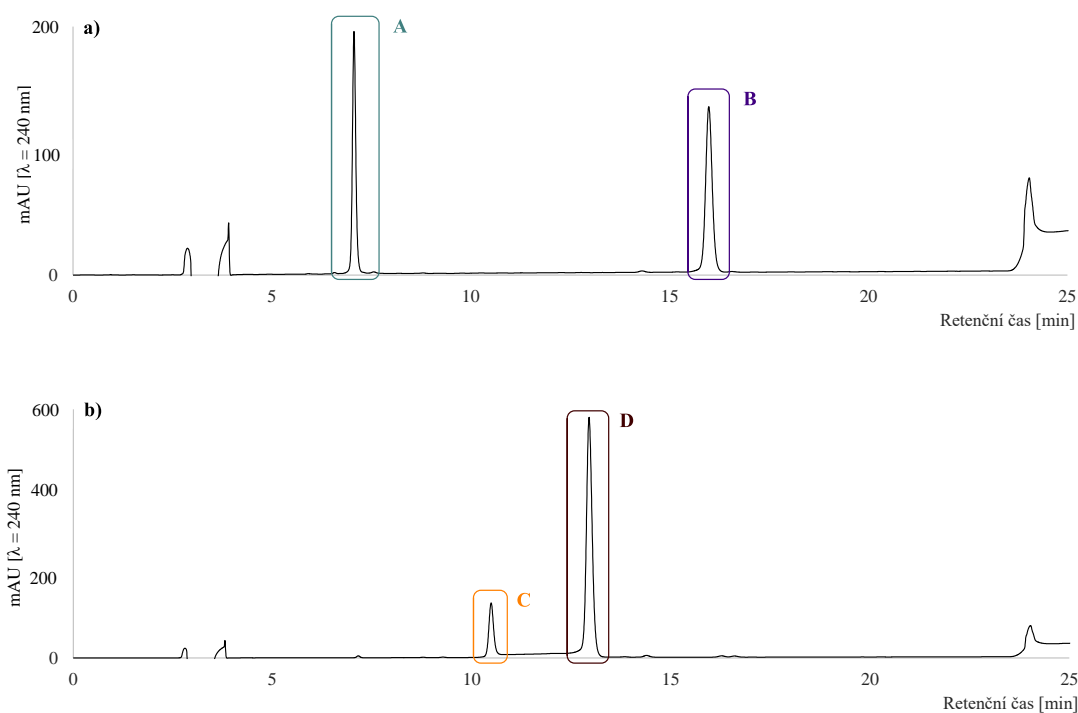
Izolace čistého isoalliinu (**1**), z cibule je značně komplikovaná a je časově náročná. K jeho izolaci přímo z cibule se používá mnohonásobně opakovaná izolace ionexovou chromatografií z lyofilizovaného cibulového prášku. Tento postup však nezajistí příliš velké množství isoalliinu (**1**). V rámci této diplomové práce byl vyvinut postup pro přípravu onioninů A s využitím modelových reakcí, kde se používal tzv. „nečistý isoalliin“. Šlo o zjednodušené a časově i ekonomicky podstatně méně náročné získání ACSO za jednorázového použití ionexové chromatografie. Tímto postupem byla získána směs isoalliinu (**1**) spolu s methiinem (**2**) i propiinem (**3**) a dalšími, v cibuli přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami. Bylo zjištěno, že enzymatická reakce s „nečistým isoalliinem“ probíhala prakticky totožně, jako by probíhala s čistým isoalliinem (**1**) a methiinem (**2**). Tím se ukázalo, že tento postup je časově výhodnější, než postup zmíněný v předchozím odstavci.

Organosírné látky vznikající v cibuli vykazují širokou škálu biologických účinků, jak již bylo podrobně popsáno v kapitole 3.4.2. Onionin A (**10a**) byl již dříve podroben zkoumání jeho biologické aktivity. Bylo zjištěno, že má protirakovinové, protizánětlivé, vasodilatační a antioxidační účinky, vykazuje příznivé účinky na kardiovaskulární systém, prevence před kardiovaskulárními onemocněními a infekcí *Helicobacter pylori* (Nohara et al., 2014; Nohara et al., 2017; Mito et al., 2023). Proto byly všechny čtyři stereoizomery onioninu A (**10a**) izolované postupem popsaným v této práci odeslány k dalším podrobným zkoumáním jejich biologické aktivity do Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně. Tyto experimenty budou provedeny v následujícím období. Pro toto zkoumání bylo potřeba získat vzorky onioninů, jelikož nejsou komerčně dostupné, a to v co nevyšší čistotě a největším množství. Jde o rozsáhlý projekt celé laboratoře, kde se neizolují pouze onioniny, ale také další organosírné látky z cibule izolované z modelových reakcí.

7 Závěr

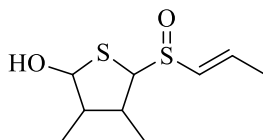
Teoretická část se zabývá vybranými organosírnými sloučeninami vznikajícími během zpracování cibule kuchyňské (*A. cepa*), jejich objevy, prvními izolacemi, mechanismem vzniku a jejich biologickými aktivitami, pokud již byly popsány. Práce se podrobněji věnuje skupině látek pojmenovaných onioniny.

Experimentální část se věnovala optimalizaci postupů a metod HPLC pro izolaci vybrané skupiny organosírných látek, tj. onioninů. Pomocí optimalizovaných metod a preparativní HPLC byly izolovány čtyři stereoizomery onioninu A (**10a**) ze dvou podfrakcí *frakce 1*, tj. *frakce 1.2* a *1.4*. Onionin A (**10a**) byl strukturně identifikován metodou HPLC/MS. HPLC chromatogramy izolovaných stereoizomerů **A**, **B**, **C** a **D** uvádí **Obrázek 31**.

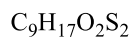


Obrázek 31: HPLC chromatogramy extraktu: **a)** *frakce 1.2* (**Metoda B**), **b)** *frakce 1.4* (**Metoda B**).

Tyto čtyři izolované stereoizomery onioninu A (**10a**, **Obrázek 32**) byly odeslány k podrobnému prozkoumání jejich biologické aktivity, výsledky by měly být zveřejněny v následujícím období.



onionin A (10a)



Obrázek 32: Obecný vzorec čtyř izolovaných stereoizomerů onioninu A (**10a**) odeslaných ke zkoumání biologické aktivity.

Přesná struktura (absolutní konfigurace) izolovaných stereoizomerů **A-D** bude určena až na základě NMR analýzy, která bude, obdobně jako zkoumání biologické aktivity těchto látek, provedena v následujícím období na spolupracujícím pracovišti (MBÚ AV ČR).

8 Reference

1. Aoyagi, M., Kamoi, T., Kato, M., Sasako, H., Tsuge, N., Imai, S. (2011). Structure and bioactivity of thiosulfinates resulting from suppression of lachrymatory factor synthase in onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (20), 10893–10900. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf202446q>.
2. Aoyagi, M., Imai, S., Kamoi, T. (2021). Novel bithiolane polysulfides from lachrymatory factor synthase-suppressed onion and their *in vitro* cyclooxygenase-1 inhibitory activity. *Food Chemistry*, 344, 128636. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128636.
3. Bayer, T., Breu, W., Seligmann, O., Wray, V., Wagner, H. (1989). Biologically active thiosulphinates and α -sulphonyldisulphides from *Allium cepa*. *Phytochemistry*, 28 (9), 2373–2377. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97987-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97987-1).
4. Block, E. (1992). The organosulfur chemistry of the genus *Alliums* implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie International Edition England*, 31 (1), 1135–1178.
5. Block, E. (2010). Garlic and other *Alliums*. Milton Road, Cambridge, *The Royal Society of Chemistry*, ISBN: 978-1-84973-180-5.
6. Block, E., Dane, E. J., Thomas, S., Cody, R. B. (2010). Applications of direct analysis in real time mass spektrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. 2-Propenesulfenic and 2-propenesulfenic acids, diallyl trisulfane S-oxide, and other reactive sulfur compounds from crushed garlic and other *Alliums*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4617–4625. DOI: 10.1021/jf1000106.

-
7. Block, E., Dethier, B., Bechand, B., Cotelesage, J. J. H., George, G. N., Goto, K., Vogt, L. (2018). Ajothiolanes: 3,4-dimethylthiolane natural products from garlic (*Allium sativum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 10193–10204. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03638.
8. Borjihhan, B., Ogita, A., Fujita, K. I., Doe, M., Tanaka, T. (2010). The cyclic organosulfur compound zwiebelane a from onion (*Allium cepa*) functions as an enhancer of polymyxin b in fungal vacuole disruption. *Planta Medica*, 76 (16), 1864–1866. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1249935>.
9. Breu, W. (1996). *Allium cepa L.* (onion) part 1: *Chemistry and analysis*. *Phytomedicine*, 3 (3), 293–306. DOI:10.1016/s0944-7113(96)80069-9.
10. Brewster, J. L. (2008). Onions and other vegetable *Alliums* (No. 15). CABI. ISBN: 978-1-84593-399-9.
11. El-Aasr, M., Fujiwara, Y., Takeya, M., Ikeda, T., Tsukamoto, S., Ono, M., Nakano, D., Okawa, M., Kinjo, J., Yoshimitsu, H., Nohara, T. (2010). Onionin A from *Allium cepa* inhibits macrophage activation. *Journal of Natural Products*, 73 (7), 1306–1308. DOI: <https://doi.org/10.1021/np100105u>.
12. Fujiwara, Y., Horlad, H., Shiraishi, D., Tsuboki, J., Kudo, R., Ikeda, T., Komohara, Y. (2016). Onionin A, a sulfur-containing compound isolated from onions, impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the protumoral and immunosuppressive functions of myeloid cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60 (11), 2467–2480. DOI: 10.1002/mnfr.201500995.

13. Friesen, N., Fritsch, R., Blattner, F. R. (2006). Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium L.* (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. In: Columbus, J.T. (ed) monocots III. Proceedings of the third international conference on the comparative biology of the monocotyledons. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, California, 372–395.
14. Hoffman, C. A. (1933). Developmental morphology of *Allium cepa*. *Botanical Gazette*, 95 (2), 279–299. DOI: <http://www.jstor.org/stable/2471184>.
15. Jones, M. G. (2004). Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany*, 55 (404), 1903–1918. DOI:10.1093/jxb/erh138.
16. Kianian, F., Marefati, N., Boskabady, M., Ghasemi, S. Z., Boskabady, M. H. (2021). Pharmacological properties of *Allium cepa*, preclinical and clinical evidences (review). *Iran Journal of Pharmaceutical Research*, 20 (2), 107–134. DOI: <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112781.13946>.
17. Kubec, R., Štefanová, I., Moos, M., Urajová, P., Kuzma, M., Zápál, J. (2018). Allithiolanes: Nine groups of a newly discovered family of sulfur compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (33), 8783–8794. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03118>.
18. Lancaster, J. E. and Boland, M. J. (1990). Flavor biochemistry. In onions and allied crops. *Biochemistry, Food Science and Minor Crops*, 3, 33–72.

19. Mito, R., Iriki, T., Fujiwara, Y., Pan, C., Ikeda, T., Nohara, T., Suzuki, M., Sakagami, T., Komohara, Y. (2023). Onionin A inhibits small-cell lung cancer proliferation through suppressing STAT3 activation induced by macrophages-derived IL-6 and cell-cell interaction with tumor-associated macrophage. *Springer Japan KK*, 36 (3), 1068–1080. DOI: 10.1007/s13577-023-00895-6.
20. Nohara, T., Fujiwara, Y., Kudo, R., Yamaguchi, K., Ikeda, T., Murakami, K., Takeya, M. (2014). Isolation and characterization of new onionins A₂ and A₃ from *Allium cepa*, and of onionins A₁, A₂, and A₃ from *Allium fistulosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 62 (11), 1141–1145. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00461>.
21. Nohara, T., Fujiwara, Y., Ikeda, T., Murakami, K., Ono, M., El-Aasr, M., Nakano, D., Kinjo, J. (2016). Two new bicyclic sulfoxides from welsh onion. *Journal of Natural Medicines*, 70 (2), 260–265. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11418-015-0947-z>.
22. Nohara, T., Fujiwara, Y., El-Aasr, M., Ikeda, T., Ono, M., Nakano, D., and Kinjo, J. (2017). Antitumor *Allium* sulfides (review). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 65 (3), 209–217. DOI: 10.1248/cpb.c16-00844.
23. Rabinowitch, H. D. (1990). Onions and *Allied* crops volume I: botany, physiology, and genetics. ISBN: 9781315896069.
24. Randle, W. M. (1997). Onion flavor chemistry and factors influencing flavor intensity. *Spices*, 660, 41–52. ISBN: 0-8412-3495-7.
25. Schwimmer, S. (1968). Enzymic conversion of trans-(+)-S-propenyl-L-cysteine-S-oxide to the bitter odor bearing component of onion. *Phytochemistry* 7, 401–404.

26. Spåre, C. G., Virtanen, A. I., Munch-Petersen, J., Kvande, P. C., Meisingseth, E. (1963). On the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*) vapours and its precursor. *Acta Chemica Scandinavica*, 17, 641–650. DOI: 10.3891/acta.chem.scand.17-0641.
27. Štefanová, I., Zápál, J., Moos, M., Kuzma, M., Kubec, R. (2019). Isoalliin-derived thiolanes formed in homogenized onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (35), 9895–9906. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01384>.
28. Tsuboki, J., Fujiwara, Y., Horlad, H., Shiraishi, D., Nohara, T., Tayama, S., Komohara, Y. (2016). Onionin A inhibits ovarian cancer progression by suppressing cancer cell proliferation and the protumour function of macrophages. *Scientific Reports*, 6 (1). DOI: 10.1038/srep29588.
29. Virtanen, A. I., Matikkala, E. J., Laland, S., Refn, S. (1959). The isolation of S-methylcysteine-sulphoxide and S-n-propylcysteine-sulfoxide from onion (*Allium cepa*) and the antibiotic activity of crushed onion. *Acta Chemica Scandinavica*, 13, 1898–1900. DOI: <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.13-1898>.
30. Virtanen, A. I. and Spåre, C. F. (1961). Isolation of the precursor of the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*). *Soumen Kemistilehti* 34, 72.
31. Yoshida, M., Kameyama, M., Hosoda, H., Shimizu, Y., Sakaue, K., Washino, T., Iwata, M., Omoto, M. (2010). New thiolane compound and use thereof. Patent JP2010143866A.
32. Zhao, XX., Lin, FJ., Li, H., Li, HB., Wu, DT., Geng, F., Ma, W., Wang, Y., Miao, BH., Gan, RY. (2021). Recent advances in bioactive compounds, health functions and safety concerns of onion (*Allium cepa* L.) (review). *Frontiers in Nutrition*, (8). DOI: 10.3389/fnut.2021.669805.

Zdroje obrázků

I. Získán 13. 2. 2024 z

<https://www.vsestary.cz/vsestarska-cibule>.

II. Získán 13. 2. 2024 z

<https://pixers.no/plakater/blomsthodet-pa-en-lok-allium-cepa-pa-hvitt-44402665>.

III. Získán 13. 2. 2024 z

<https://www.mediastorehouse.com.au/mary-evans-prints-online/new-images-august-2021/onion-allium-cepa-23174716.html>.

IV. Získán 24. 3. 2024 z

<https://www.mpg.de/11618457/original-1628000225.webp?t=eyJ3aWR0aCI6MzQxLCJmaWxlX2V4dGVuc2lvbiI6IndlYnAiLCJxdWFsaXR5Ijo4NiwiY2JqX2lkIjoxMTYxODQ1N30%3D--cbd8d7904465dd655f21113ec81e7b826ad3fbbb>.

V. Získán 24. 3. 2024 z

https://media.licdn.com/dms/image/C4D12AQHZa8YWqubeag/article-cover_image-shrink_600_2000/0/1520156546050?e=2147483647&v=beta&t=x7ZcNWB02Fqd3eH7jz_EgZrQNeeO7cjc4tBE9wbv2g4.

VI. Získán 22. 3. 2024 z

<https://hanacky-cesnek.cz/wp-content/uploads/2020/06/580b57fcd9996e24bc43c218.png>.

9 Použité zkratky

ACSO	<i>S</i> -alk(en)ylcystein- <i>S</i> -oxidy (<i>S</i> -alk(en)ylcysteine- <i>S</i> -oxides)
CSO	cystein- <i>S</i> -oxidy (cysteine- <i>S</i> -oxides)
DAD	detektor diodového pole (diode array detector)
DEE	diethylether (diethyl ether)
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
IL-6	interleukin-6 (interleukin-6)
IR	infračervené záření (infrared radiation)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
LF	propanthial- <i>S</i> -oxid/slzetovný faktor (lachrymatory factor)
LFS	lachrymatory faktor syntáza (lachrymatory factor synthase)
LM-8	buňky myšního osteosarkomu (mouse osteosarcoma cells)
LTQ XL	hmotnostní spektrometr s lineární iontovou pastí (linear ion trap mass spectrometer)
M2	alternativně aktivované makrofágy (alternatively activated macrophages)
MS	hmotnostní spektrometr (mass spectrometer)
MBÚ AV ČR	mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky (Institute of Microbiology of the CAS)
MWCO	mezní hodnota molekulové hmotnosti (molecular weight cut-off)
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
p. a.	pro analýzu (per analysis)

PDA	detektor diodového pole (photodiode array)
PTFE	polytetrafluorethylen (polytetrafluoroethylene)
rpm	rotace za minutu (rotations per minute)
RVO	rotační vakuová odparka (rotary vacuum evaporator)
SCLC	malobuněčný karcinom plic (small-cell lung cancer)
SPE	extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)
STAT3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3 (signal transducer and activator of transcription 3)
TAM	makrofágy asociované s nádorem (tumor-associated macrophages)
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)
VDF	vinylidenfluorid (vinylidene fluoride)