

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

PEDAGOGICKÁ FAKULTA



**Sekundární sirné metabolity česnekovitých
rostlin**

bakalářská práce

Petr Curko

Školitel: doc. Ing. Roman Kubec, Ph.D.
(Katedra aplikované chemie, ZF JU)

České Budějovice 2013

Curko, P. (2013): Sekundární sírné metabolity česnekovitých rostlin. [Secondary sulfur-containing metabolites of alliaceous plants. Bc. Thesis, in Czech] 38 p., Faculty of Education, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na rostliny podrodu *Nectaroscordum*, jejich význam, rozšíření a využití. Práce se také zabývá sírnými sloučeninami vyskytujícími se v rostlinách tohoto podrodu a jejich odlišnostmi od sloučenin vyskytujících se v cibuli kuchyňské (*Allium cepa*).

Experimentální část bakalářské práce je zaměřena na izolaci a identifikaci nejvýznamnějších sírných sloučenin z rostliny *Nectaroscordum siculum* a na optimalizaci metody pro izolaci sírné aminokyseliny homoisoalliinu.

KLÍČOVÁ SLOVA: podrod *Nectaroscordum*, *Nectaroscordum siculum*, homoisoalliin

Annotation

The theoretical part of the Bachelor thesis is focused on subgenus *Nectaroscordum* plants, their significance, occurrence and usage. The thesis also deals with sulfur-containing compounds of subgenus *Nectaroscordum* plants and with their differences from those occurring in onion (*Allium cepa*).

The experimental part of the Bachelor thesis is focused on isolation and identification of the most significant sulfur-containing compounds of *Nectaroscordum siculum* and on optimization of a method for isolation of amino acid homoisoalliin.

KEY WORDS: subgenus *Nectaroscordum*, *Nectaroscordum siculum*, homoisoalliin

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci 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 práce, a to v nezkrácené podobě 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 výsledku 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.

V Českých Budějovicích 22. dubna 2013

.....

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce panu doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za odborné vedení, velmi cenné rady a především velkou ochotu a trpělivost.

Mé poděkování také patří Ing. Petře Krejčové za všestrannou pomoc, a vůbec celému pracovnímu kolektivu doc. Kubce za vytvoření příjemného a inspirativního prostředí.

Obsah

1.	Cíle práce	1
2.	Úvod.....	2
3.	Teoretická část	3
3.1.	Charakteristika rodu <i>Allium</i>	3
3.2.	Podrod <i>Nectaroscordum</i>	3
3.2.1.	Zařazení podrodu <i>Nectaroscordum</i> do botanického systému	3
3.2.2.	Vyčlenění samostatného podrodu	5
3.2.3.	Zástupci podrodu <i>Nectaroscordum</i>	6
3.3.	Samardala	9
3.4.	Sekundární sírné metabolity.....	10
3.4.1.	Specifika podrodu <i>Nectaroscordum</i>	12
3.4.2.	Nejdůležitější sírné látky v cibuli (<i>Allium cepa</i>).....	12
3.4.3.	Nejdůležitější sírné látky v podrodu <i>Nectaroscordum</i>	15
4.	Experimentální část.....	19
4.1.	Použité chemikálie	19
4.2.	Rostlinný materiál	19
4.3.	Použité přístroje a zařízení	19
4.4.	Extrakce a izolace významných látek z <i>Nectaroscordum siculum</i>	20
4.4.1.	Extrakce rozkladných produktů	20
4.4.2.	HPLC analýza extraktů	21
4.4.3.	GC analýza čerstvého extraktu.....	21
4.5.	Izolace homoisoalliinu	22
4.5.1.	Extrakce aminokyselin z cibulek <i>Nectaroscordum siculum</i>	22
4.5.2.	Přečištění extraktu pomocí sloupcové ionexové chromatografie.....	22
4.5.3.	Průběžná kontrola přečištění na HPLC	24
5.	Výsledky a diskuse.....	25
5.1.	Porovnání čerstvého a týden macerovaného extraktu	25
5.2.	Detekce těkavých sírných látek na GC/MS	27
5.3.	Izolace homoisoalliinu	30
6.	Závěr	33
7.	Reference.....	34
8.	Použité zkratky.....	38

1. Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo:

- Vypracovat literární rešerši se zaměřením na současný stav botanického a chemického poznání v souvislosti s rostlinami podrodu *Nectaroscordum* (Lindl.) z podčeledi česnekových (*Alloideae* Herbert).
- Izolovat a identifikovat nejdůležitější sirné sloučeniny z cibulek rostliny *Nectaroscordum siculum* (Ucria) Lindl.
- Optimalizovat metodu pro izolaci aminokyseliny homoisoallinu.

2. Úvod

Tato práce se zabývá sirnými sloučeninami rostlin patřících do podrodu *Nectaroscordum* (Lindl.) z podčeledi česnekových (*Alloideae* Herbert), především pak sloučeninami druhu *Nectaroscordum siculum* (Ucria) Lindl. Zmíněný druh je v České republice zatím pěstován pouze jako okrasná rostlina pro svoje líbivé květy. V jihovýchodní Evropě je *Nectaroscordum siculum* obecně známo pod několika lidovými označeními, přičemž znalcům se na prvním místě určitě vybaví samardala. Mezi další významné přídomy rostliny patří honey garlic, Mediterranean bells, Sicilian honey lily či ornamental onion. Díky své příslušnosti do podčeledi česnekových se *Nectaroscordum siculum* vyznačuje typickými sensorickými vlastnostmi, jimiž jsou štiplavá chuť, slzotvorné účinky nebo velmi výrazná vůně, což lze považovat za základní důvody toho, proč si tato rostlina našla cestu především do bulharské gastronomie¹.

Z chemického hlediska je práce zaměřena na sekundární metabolity sirného charakteru odvozené zejména od aminokyseliny cysteinu, jež jsou rostlinami využívány například jako obranné mechanismy proti spásání či mikrobiálnímu napadení, přičemž řada odvozených látek může mít velice pozitivní účinky na zdraví člověka².

3. Teoretická část

3.1. Charakteristika rodu *Allium*

Rod *Allium* L. patří k největším rodům jednoděložných krytosemenných rostlin a zahrnuje přes 700 různých druhů. Jedná se o rostliny vytrvalé (eventuelně dvouleté), jejichž základní charakteristikou je výskyt různorodých cibulek, které mohou být celistvé a jednoduché (cibule) nebo segmentované (česnek) a slouží především pro nepohlavní rozmnožování. Rostliny mívají charakteristický vzhled, kdy pochvy listů se souběžnou žilnatinou pokrývají zpravidla třetinu až polovinu délky dužnaté lodyhy. Listy bývají jednoduché nebo vzácněji řapíkaté. Podíváme-li se na květ, zjistíme, že se jedná o rostliny jednodomé s oboupohlavními květy. Ty jsou uspořádané v květenstvích a tvoří zdánlivé okolíky, ale při bližším prozkoumání je patrné vrcholičnaté květenství nazývané šroubel. Gyneceum je složeno ze tří plodolistů, je cenokarpní (vzniká srůstem více plodolistů) a synkarpní (plodolisty jsou srostlé bočně a vytvářejí vícepouzdrý semeník). Okolo něj vyrůstá šest tyčinek ve dvou přeslenech tvořících zpravidla uspořádání tři + tři. Plodem je tobolka (plod suchý a pukavý)^{3,4,5}.

Rostliny tohoto rodu rostou převážně na severní polokouli, výjimku tvoří *Allium dregeanum* z jižní Afriky. Z dalších česnekovitých rostlin pak v Jižní Africe můžeme nalézt zástupce rodů *Tulbaghia* či *Agapanthus*^{6,7} a rod *Nothoscordum* je pak typický pro oblast Jižní Ameriky⁸. Nejvyšší koncentrací druhů se může pyšnit oblast střední Asie. Druhou významnou oblastí výskytu je Severní Amerika.

3.2. Podrod *Nectaroscordum*

3.2.1. Zařazení podrodu *Nectaroscordum* do botanického systému

Podrod *Nectaroscordum* je součástí velkého rodu *Allium*, jehož další taxonomické zařazení zaznamenalo v posledních letech velké změny. Relativně dlouhou dobu byl obecně přijímán taxonomický systém APG II, který byl publikován skupinou vědců nazývanou Angiosperm Phylogeny Group usilující o co nejpřesnější systematiku krytosemenných rostlin. V roce 2009 ale došlo k vytvoření

systému APG III, jenž s sebou přinesl řadu významných úprav a v klasifikaci rostlin tak nastaly mírné nejasnosti^{9,10}. Botanický systém APG III se mimo jiné snaží omezit doposud běžně užívané pojmy jako třída nebo podtřída. Další jeho změnou oproti předchozímu způsobu řazení je kladistické pojetí, kdy rozhodujícím faktorem pro systematické zařazení rostliny už nejsou morfologické charakteristiky, nýbrž evoluční členění založené na příbuzenských aspektech. Dané změny jsou umožněny rozvojem vědomostí umožňujících analýzu genetické informace. Pro srovnání je uvedeno zařazení podrodu *Nectaroscordum* podle obou systémů.

Systém APG II:

říše: rostliny (*Plantae*)

klad: krytosemenné (*Magnoliophyta, Angiosperms*)

klad: jednoděložné (*Liliopsida, Monocots*)

řád: chřestotvaré (*Asparagales*)

čeleď: česnekovité (*Alliaceae*)

rod: *Allium*

podrod: *Nectaroscordum*

Systém APG III:

říše: rostliny (*Plantae*)

klad: krytosemenné (*Magnoliophyta, Angiosperms*)

klad: jednoděložné (*Liliopsida, Monocots*)

řád: chřestotvaré (*Asparagales*)

čeleď: amarylkovité (*Amarylidaceae*)

podčeleď: česnekové (*Alloideae*)

rod: *Allium*

podrod: *Nectaroscordum*

Lze si všimnout, že zatímco v systému APG II vytvářely česnekovité rostliny samostatnou čeleď, v modernějším systému APG III už jsou řazeny jako podčeleď spadající do čeledi amarylkovitých (*Amarylidaceae*).

3.2.2. Vyčlenění samostatného podrodu

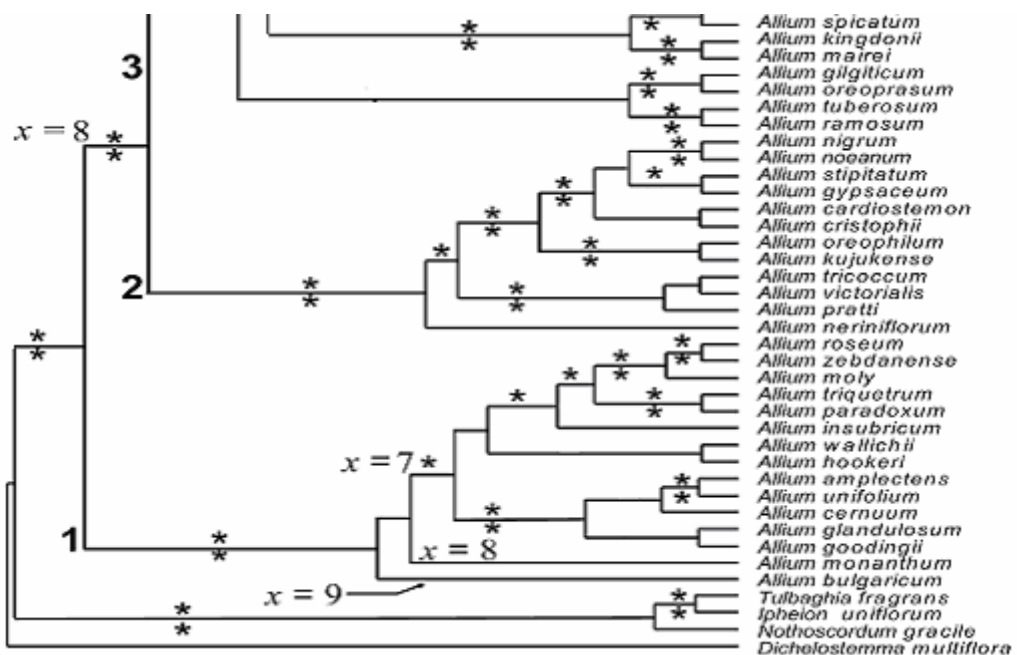
První monografie o rostlinách rodu *Allium* pochází ze 70. let 19. století³ a zahrnovala 285 druhů rozdělených do šesti sekcí. Jak už zbylo zmíněno, v současnosti je počet druhů oproti původnímu stavu více než dvojnásobný. Díky rozšiřování vědeckých možností mohla proběhnout celá řada výzkumů^{11,12} zaměřených především na genetickou informaci, a postupně tak byly vymezeny tři vývojové linie:

Linie 1 zahrnuje podrody *Amerallium sensu*, *Microscordum* a *Nectaroscordum*.

Linie 2 je zastoupena podrody *Melanocrommyum sensu*, *Caloscordum* a *Anguinum*.

Linie 3 pak obsahuje *Rhiziredium s. str.*, *Butomissa*, *Cepa*, *Allium s. str.* a *Reticulatobulbosa s. str.*

Významná práce, která měla potvrdit nebo vyvrátit dosavadní předpoklady o vyčlenění jednotlivých systematických skupin, byla publikována v roce 2006¹³. Skupina německých vědců prozkoumala na 200 vzorků rostlin použitím speciálního zařízení s označením NucleoSpin Plant kit a analyzovala ribozomální DNA. Příslušnými metodami odborníci stanovili vedle mnoha dalších údajů počet ribozomálních chromozomů (obrázek 1).



Obrázek 1: Počet chromozomů ve zkoumaných rostlinách¹

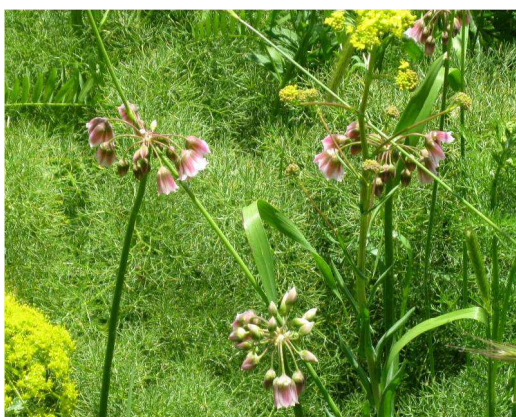
Na první pohled je patrné, že jedině podrod *Nectaroscordum* (zde zastoupen postaru pojmenovaným druhem *Allium bulgaricum*, přičemž dnes se častěji užívá označení *Nectaroscordum siculum*) má velice netypický počet devíti chromozomů, zatímco obvyklá četnost je sedm či osm.

3.2.3. Zástupci podrodu *Nectaroscordum*

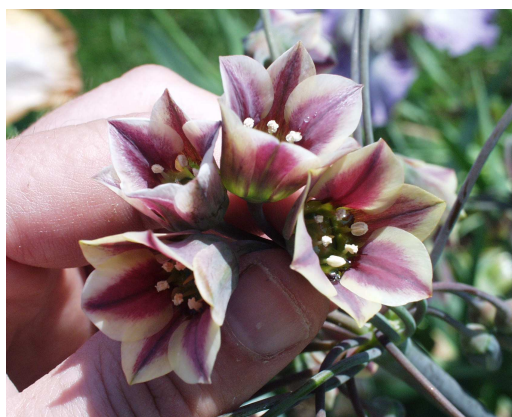
Podrod *Nectaroscordum* (Lindl.) v dnešní době zahrnuje pouze dva druhy: *Nectaroscordum tripedale* (Trautv.) Traub. a *Nectaroscordum siculum* (Ucria) Lindl.

➤ *Nectaroscordum tripedale*

Druh *Nectaroscordum tripedale* (znám také jako *Allium tripedale* či *Nectaroscordum persicum*) byl popsán v roce 1873 Ernstem Rudolfem von Trautvetterem¹⁴ a označení *tripedale* má charakterizovat typickou trojčetnost květů. Jedná se o rostlinu dorůstající výšky kolem 90–120 cm s relativně tlustým stonkem (obrázek 2a), který je téměř do poloviny kryt pochvou vrchního listu. Listy jsou tenké, žilnatina souběžná a na horní části rostliny vyrůstá velké poupětovité květenství. Květy se širokým okvětím mají zeleno-růžovou barvu zesvětlující se od středu ke kraji (obrázek 2b). Tyčinky uvnitř dorůstají poloviční velikosti než okvětní lístky a uprostřed posazené gyneceum patří mezi synkarpní. Rostlina kvete relativně časně a plné květenství se vyvíjí již v dubnu¹⁵.



a



b

Obrázek 2: *Nectaroscordum tripedale* a) celá rostlina^{II} b) detail květenství^{III}

Ideální podmínky pro její růst představují lužní lesy ve střední nadmořské výšce, ale vzácné nejsou ani nálezy ve skalních rozsedlinách. Jedná se o poměrně odolnou rostlinu snášející sušší půdy. Na méně vhodných lokalitách je ale přírůstek hmoty pomalejší než přírůstek v optimálních podmínkách. Volně ji nalezneme především v oblasti Dagestánu a Ázerbájdžánu při březích tamní řeky Samur a také v Iráku, Íránu a Turecku (obrázek 3).



Obrázek 3: Přirozený výskyt *Nectaroscordum tripedale*^{IV}

Velkou popularitu rostlina našla především v Íránu, kde se čerstvě sesbírané listy dopravují na tamní trhy a místní obyvatelé ji používají pro přípravu tradičního chleba¹⁶. Je zajímavé, že zatímco *Nectaroscordum siculum* se v Bulharsku pro využití v potravinářství přímo pěstuje, listy zástupce *Nectaroscordum tripedale* jsou sbírány z divoce rostoucích rostlin. Samotný sběr sebou nese komplikaci v podobě silného podráždění očí způsoběného přítomností sirných derivátů (příčina tohoto jevu bude popsána dále). V Arménii se pak *Nectaroscordum tripedale* velmi hojně využívá jako okrasná rostlina v parcích a na zahradách, ale zatím nedosahuje takové popularity jako *Nectaroscordum siculum*.

➤ *Nectaroscordum siculum*

Druhý zástupce tohoto podrodu, *Nectaroscordum siculum* (také znám pod označením *Allium nectaroscordum*, *Allium meliophilum*, *Allium dioscorides* či

Allium bulgaricum), byl popsán v roce 1793 italským botanikem Bernardinem Ucriou¹⁷, přičemž druhové jméno *siculum* znamená sicilský. Oproti *Nectaroscordum tripedale* působí *Nectaroscordum siculum* mohutnějším dojmem a průměrná výška rostliny dosahuje i nad 120 cm (obrázek 4a). Téměř polovina stonku se zde také ukrývá v pochvě vrchního listu se souběžnou žilnatinou. Listy mají zejména na své bázi charakteristický trojúhelníkovitý průřez. Květy jsou většinou bělavé s nachově červeným či zeleným nádechem (obrázek 4b). Nesou synkarpní gyneceum srostlé ze tří plodolistů. Součástí oboupohlavných květů jsou dva kruhy šesti tyčinek (tři a tři). Květenství představuje typický zdánlivý okolík a mezi zajímavosti patří narovnávání plodních stopek, které se při dozrávání postupně otáčejí směrem vzhůru, takže květenství na začátku generativního období se značně liší od květenství na jeho konci. Rostlina kvete pozdně zjara či na začátku léta¹⁸.



a



b

Obrázek 4: *Nectaroscordum siculum* a) celá rostlina^V b) detail květenství^{VI}

Za původní domovinu této trvalky vědci považují jižní Francii a severní Itálii, ale volně roste i ve státech jihovýchodní Evropy, např. v Rumunsku, Bulharsku a Turecku (obrázek 5). Zatímco se rostlina v posledních letech dostává pro své dekorativní vlastnosti do zahrad téměř celého světa, v Bulharsku pro ni našli využití v tamní kuchyni. Na pěstování nejsou kladeny nikterak velké nároky a růst může probíhat i na sušších půdách. Rostlina preferuje stinné prostředí vápenatého charakteru, ale problém jí nečiní ani půdy kyselější. Nevýhodou pak představuje malá schopnost konkurovat jiným rostlinám v počátečním stádiu růstu, jelikož ontogeneze v prvních dvou letech vývoje je velmi pomalá. Semena vyžadují pro vyklíčení proces jarovizace, tedy delší působení nízké teploty. Mezi zástupci rostoucími volně

v přírodě a zástupci uměle pěstovanými byla zaznamenána odlišná hmotnost v listech, jež byla třikrát až čtyřikrát vyšší u uměle pěstovaných než u volně rostoucích. Sklizení rostliny pro potravinářské účely probíhá většinou v tří až čtyřletých intervalech¹⁹.



Obrázek 5: Přirozený výskyt *Nectaroscordum siculum*^{VII}

3.3. Samardala

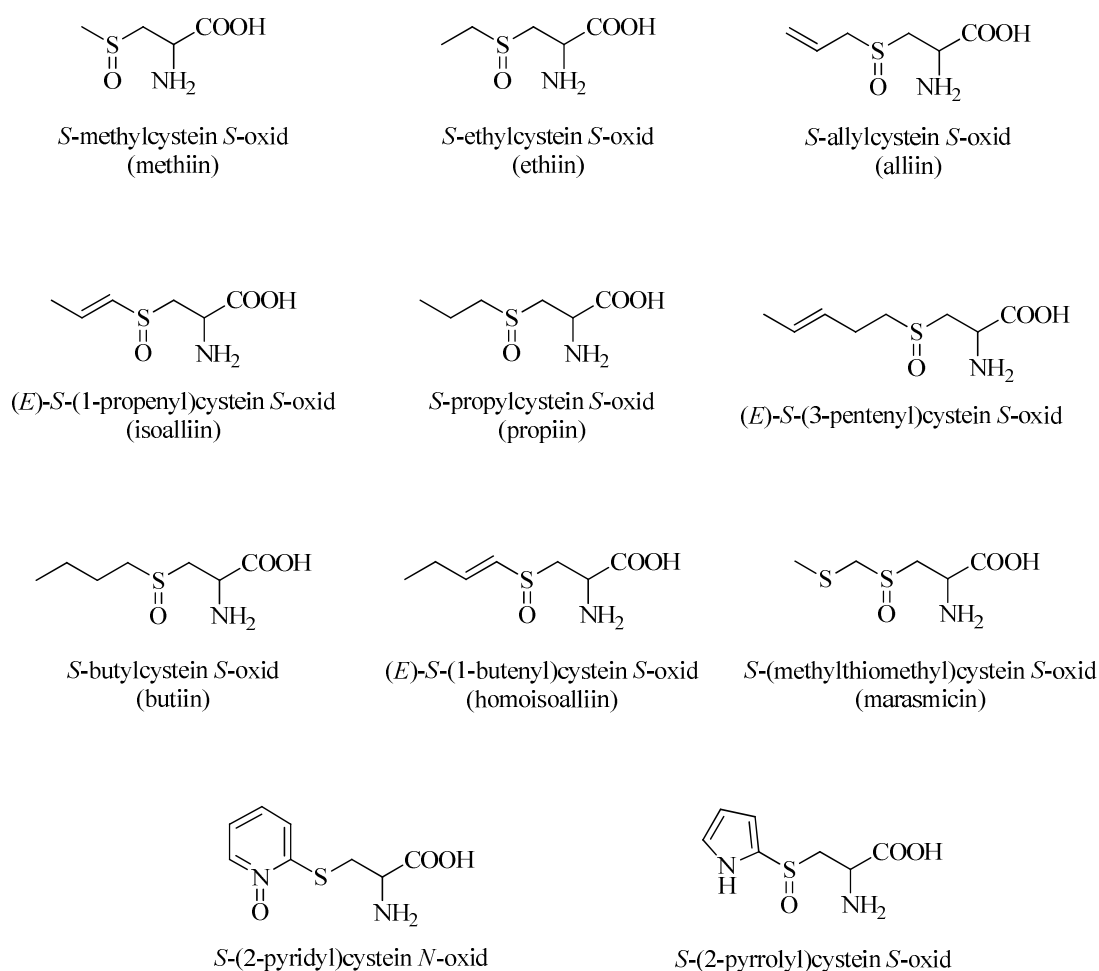
Nectaroscordum siculum má velmi intenzivní sensorické vlastnosti a právě pro svou pronikavou vůni a česnekovitou chuť se v Bulharsku využívá pro výrobu směsi známé jako samardala. Ta se vyrábí smícháním soli a rozdrčených sušených částí rostliny a k dostání je téměř na každém místním trhu¹. Bulharská kuchyně je celosvětově známá svými kořeněnými jídly a právě úpravy pokrmů založené na přidávání různých směsí stojí za objevením populárního koření. Naopak čerstvá rostlina není kulinárně téměř vůbec využívána, jelikož obsahuje značné množství látek zodpovědných za velmi intenzivní sensorické vjemy. Už samotné rozetření lístků je doprovázeno pronikavou vůní.

I přes uvedené vlastnosti je množství obsažených silic nedostačující pro přímou destilaci (hovoří se o 0,01 až 0,005 ml na 100 g čerstvé hmotnosti), a tak právě výroba samardaly představuje hlavní využití rostlinné hmoty. Dřít se mohou téměř všechny orgány, ale nejrozšířenější je využití semen, protože se tímto postupem nepoškodí rostlina. K rozemleté směsi se přidává sůl, jež absorbuje

senzorické látky a nedovolí jim ze směsi vytékat. Sušení probíhá 30–40 dnů a velmi se dbá na to, aby hmota nebyla vystavena teplotě přesahující 30 °C, což by vedlo ke zhnědnutí a degradaci produktu¹⁹.

3.4. Sekundární sírné metabolity

Česnekovité rostliny obsahují sekundární metabolity sírného charakteru, které jsou zodpovědné za jejich specifické aroma a vlastnosti. Různé zastoupení *S*-substituovaných derivátů cysteinu udává rozličnou vůni a chuť jednotlivých zástupců. Do dnešní doby bylo těchto prekurzorů v česnekovitých rostlinách popsáno jedenáct²⁰ (obrázek 6):



Obrázek 6: Seznam prekurzorů česnekovitých rostlin

Fritsch a spol. provedli v roce 2006 s využitím dosavadních znalostí rozsáhlý výzkum²¹ zaměřený na zastoupení nejběžnějších *S*-substituovaných derivátů cysteinu (methiin, alliin, isoalliin a propiin) ve všech třech fylogenetických liniích česnekovitých rostlin. V případě podrodu *Nectaroscordum* se vycházelo z údajů naměřených Keusgenem v roce 1999, které ale nebraly v potaz výskyt látek pro podrod *Nectaroscordum* specifických (butiin a homoisoalliinu) jednoduše proto, že se o jejich výskytu v těchto rostlinách dosud nevědělo²¹. Bylo zjištěno, že v první vývojové linii převažuje zastoupení methiinu. Alliin a isoalliin se vyskytovaly méně v různých hodnotách a nejmenší zastoupení připadlo propiinu. *Nectaroscordum tripedale* pak mělo stoprocentní relativní zastoupení methiinu oproti dalším zjišťovaným látkám.

V případě druhé vývojové linie byla patrná dominance methiinu, poměrně v hojné míře se vyskytoval isoalliin, ale propiin se objevil u malého podílu vzorků. Ve třetí linii byl patrný pokles relativního obsahu methiinu zejména oproti linii první a naopak bylo zaznamenáno relativní zvýšení obsahu alliinu a isoalliinu (tabulka I). V této nejmladší linii byl pozorován i nárůst zastoupení sirných derivátů na 1 gram rostlinné hmoty.

Tab. I: Relativní zastoupení derivátů cysteinu ve vybraných rostlinách dle Fritsche.

	rostlina	methiin (%)	alliin (%)	isoalliin (%)	propiin (%)
Linie 1	sg. <i>Nectaroscordum</i> Lindl.	100	0	0	0
	<i>Allium trifoliatum</i> Cyr.	90	9	1	0
	<i>Allium unifolium</i> Kellog.	79	7	9	5
Linie 2	<i>Allium jesdianum</i> Khass	98	0	2	0
	<i>Allium macleanii</i> Bak.	53	0	47	0
	<i>Allium orientale</i> Bois.	6	0	77	17
Linie 3	<i>Allium ampeloprasum</i> L.	9	60	28	3
	<i>Allium kochii</i> Lange	8	39	52	2
	<i>Allium cepa</i> L.	9	4	86	0

Uvedené hodnoty jsou zcela správné při sledování relativního zastoupení čtyř zmíněných prekurzorů. Na přelomu tisíciletí ale došlo k identifikaci látek zcela nových, díky nimž se jen zvláštnosti podrodu *Nectaroscordum* potvrdily⁴.

3.4.1. Specifika podrodu *Nectaroscordum*

Podrod *Nectaroscordum* si zaslouží zvýšenou pozornost nejen díky specifické genetické výbavě ve srovnání s jinými česnekovitými rostlinami, ale především díky výskytu látek typických pouze pro tuto skupinu rostlin. U *Nectaroscordum tripedale* a *Nectaroscordum siculum* byl zaznamenán jedinečný výskyt sirných aminokyselin triviálně označovaných jako homoisoalliin a butiin^{16,22}, jež slouží jako prekurzory pro další sloučeniny. Na základě znalostí metabolických drah ostatních prekurzorů známých již delší dobu lze vyslovit předpoklad, že analogickým způsobem reagující homoisoalliin a butiin umožní vznik látek podobných. Jelikož se o výskytu těchto specifických sloučenin ví poměrně krátkou dobu, otevírá se zde možnost dalšího vědeckého bádání.

3.4.2. Nejdůležitější sirné látky v cibuli (*Allium cepa*)

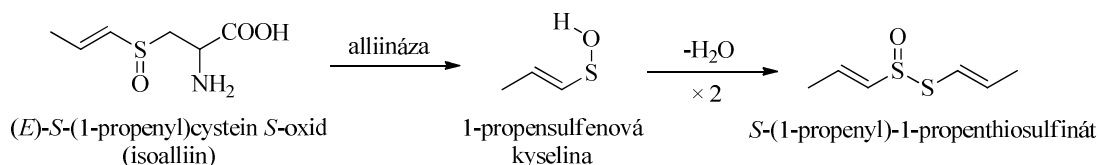
Mezi významné látky vznikající v kaskádě enzymově katalyzovaných reakcí^{4,23} z *S*-substituovaných derivátů cysteinu patří především: slzotvorný (lakrymační) faktor²⁴, cepaeny^{25,26}, zwiebelany a thiosulfináty⁴.

K tvorbě těchto sloučenin dochází až při porušení pletiva, a to z jednoho prostého důvodu. Zatímco enzym alliináza se vyskytuje ve vakuolách buněk, deriváty cysteinu se nachází v cytoplazmě, a v neporušeném rostlinném pletivu se tedy do přímého styku nedostanou⁴.

Thiosulfináty

Mezi jedny z nejvýznamnějších látek vznikajících v česnekovitých rostlinách patří thiosulfináty. Jedná se o sloučeniny s obecným vzorcem R-SO-S-R, jež vznikají ze substituovaných derivátů cysteinu kondenzací sulfenových kyselin za katalytického působení enzymu alliinázy (EC 4.4.1.4). Thiosulfináty mají nezastupitelný význam při ochraně rostlin proti nadměrnému spásání herbivory a fungují i jako ochrana před napadením mikroorganismy. Zároveň se jedná o látky, které jsou citlivé na vyšší teploty a při tepelném zpracování dochází k jejich rozkladu za vzniku celé řady produktů (např. monosulfidů, disulfidů). Vznik thiosulfinátu

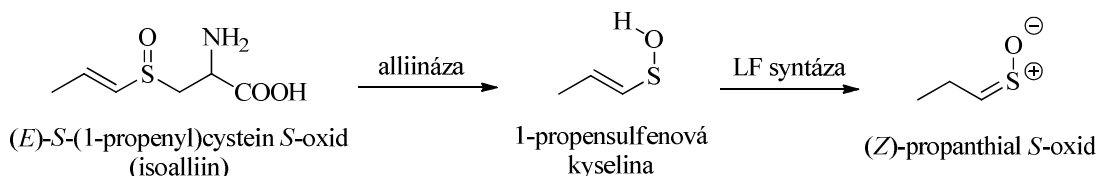
v cibuli je popsán níže (obrázek 7).



Obrázek 7: Vznik thiosulfínátu v cibuli

Slzotvorný faktor

Při porušení pletiva některých česnekovitých rostlin dochází ke vzniku látek, které pak mohou v různé míře dráždit oční sliznici. Za tímto jevem stojí alkanthial *S*-oxidy (též nazývané sulfiny). Tyto sloučeniny vznikají z některých *S*-substituovaných derivátů cysteinu, jež se za katalytického působení enzymu alliinázy rozkládají na sulfenové kyseliny a z nich posléze účinkem dalšího enzymu, LF syntázy, vznikají sulfiny. Ty se dále mohou rozkládat na desítky různých produktů. V cibuli, obsahující převážně isoalliin, vzniká jako primární látka propanthial *S*-oxid (obrázek 8).

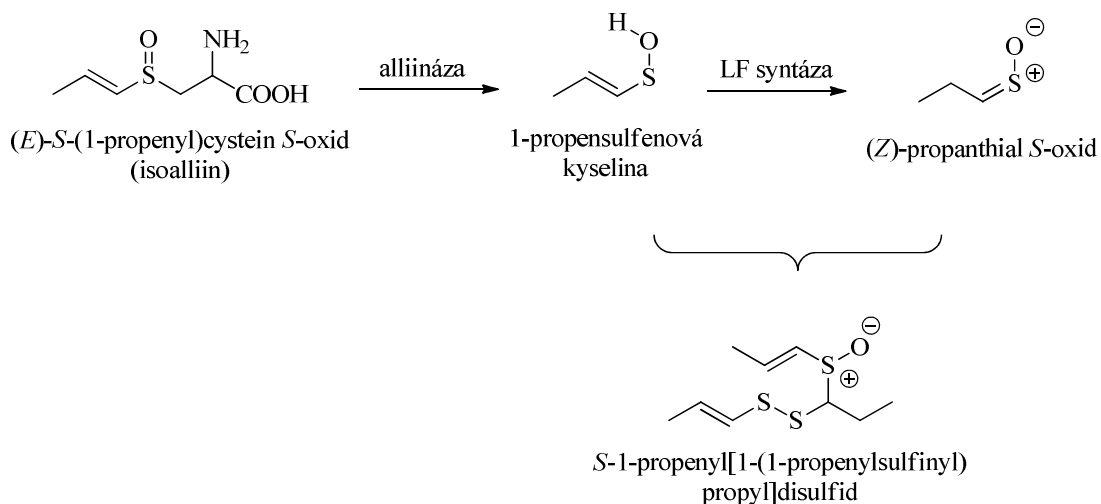


Obrázek 8: Rozklad isoalliinu v cibuli (*Allium cepa*)

Cepaeny

V roce 1988 byly při analýze látek z cibule objeveny sloučeniny obsahující devět atomů uhlíků, tři atomy síry, jeden atom kyslíku ($C_9H_{16}S_3OH$ a $C_9H_{18}S_3OH$) a také sloučeniny s pěti atomy uhlíku, třemi atomy síry a jedním atomem kyslíku ($C_5H_{12}S_3O$)⁴. Tyto látky byly označeny jako cepaeny, přičemž název vychází z botanického pojmenování cibule (*Allium cepa*). Cepaeny vznikají ze substituovaných derivátů cysteinu při působení alliinázy, kdy se dalších kroků

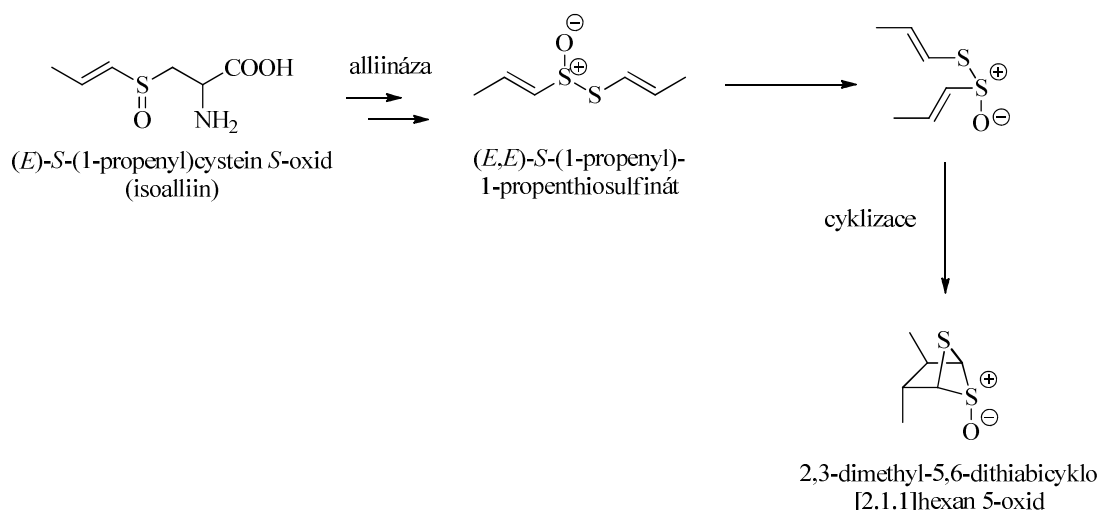
účastní příslušné sulfenové kyseliny a thialy. U cibule jsou výchozími látkami isoalliin a methiin, a tím pádem mezi produkty nalezneme například cepaen *S*-1-propenyl[1-(1-propenylsulfinyl)propyl]disulfid (obrázek 9).



Obrázek 9: Vznik cepaenu v cibuli (*Allium cepa*)

Zwiebelany

Na konci 90. let 20. století byla v cibuli objevena další velká skupina látek obsahujících ve svém řetězci síru. Sumární vzorec těchto sloučenin je $C_6H_{10}S_2O$. K jejich zdokumentování došlo nezávisle dvěma výzkumnými týmy (jeden pocházel z USA, druhý z Německa)⁴. Označení zwiebelany má původ v německém jazyce: cibule = die Zwiebel. Ve své podstatě se jedná o *cis/trans* izomery 2,3-dimethyl-5,6-dithiacyklo[2.1.1]hexan 5-oxidu. V cibuli vznikají cyklizací *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfinátu odvozeného od isoalliinu (obrázek 10). *S*-(1-Propenyl)-1-propenthiosulfinát podléhá této cyklizaci velice ochotně.

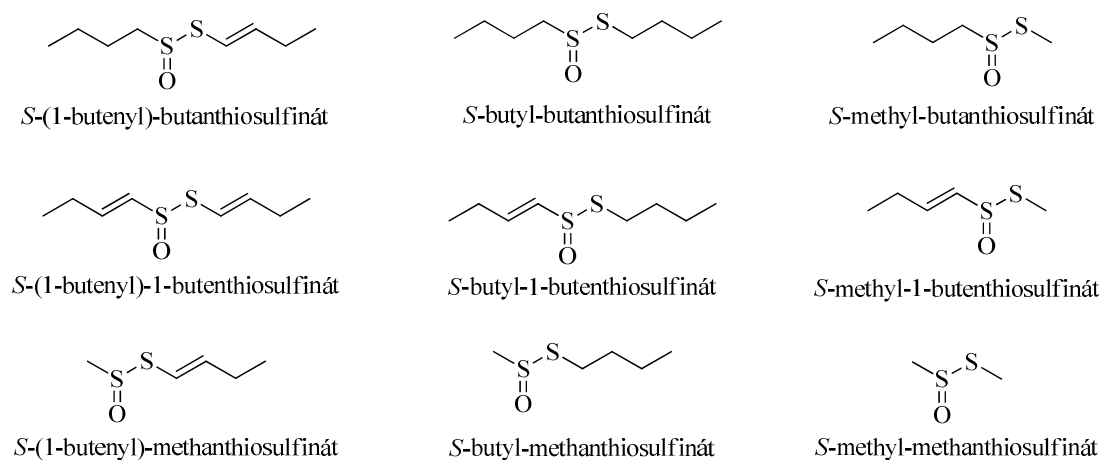


Obrázek 10: Vznik zwiebelanu v cibuli (*Allium cepa*)

3.4.3. Nejdůležitější sirné látky v podrodu *Nectaroscordum*

Thiosulfináty

Jak už bylo uvedeno, v *Nectaroscordum siculum* a *Nectaroscordum tripedale* se nacházejí celkem tři S-substituované deriváty cysteinu: methiin, butiin a homoisoalliin. Jejich enzymově katalyzovaným rozkladem mohou vzniknout tři různé sulfenové kyseliny (methan-, butan- a 1-butensulfenová kyselina). Vzájemnou kondenzací těchto sulfenových kyselin se dá předpokládat tvorba následujících thiosulfinátů (obrázek 11):



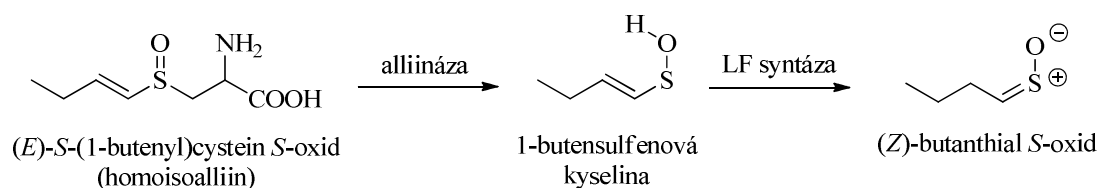
Obrázek 11: Thiosulfináty vznikající v rostlinách podrodu *Nectaroscordum*

Slzotvorný faktor

Oba zástupci podrodu *Nectaroscordum* vykazují při narušení svého pletiva velmi výrazné slzotvorné účinky. Bylo zjištěno, že touto slzotvornou látkou je butanthial *S*-oxid. Velký podíl na detekci slzotvorného butanthial *S*-oxidu mají Kubec a spol.²⁷, kteří využili techniku označovanou jako DART-MS (direct analysis in real time mass spectrometry) umožňující analýzu vzorků za pokojové teploty.

Jedná se o techniku bez nutnosti chromatografické separace, která umožňuje přímé zavedení vzorku bez předchozí náročné přípravy a tím je zabráněno degradaci termolabilních sloučenin. Výhodou metody je získávání informací v reálném čase. Umístění vzorku (pevného, plynného i kapalného) může být provedeno manuálně či za využití automatického dávkovače. Následně dojde k ionizaci působením napětí v bodové elektrodě dosahující několika tisíc voltů (tzv. PI-DART) v atmosféře hélia a za přítomnosti protonizovaných vodních klastrů se utvářejí kladně nabitě $[M+H]^+$ struktury, jež se mohou posléze analyzovat pomocí hmotnostního spektrometru.

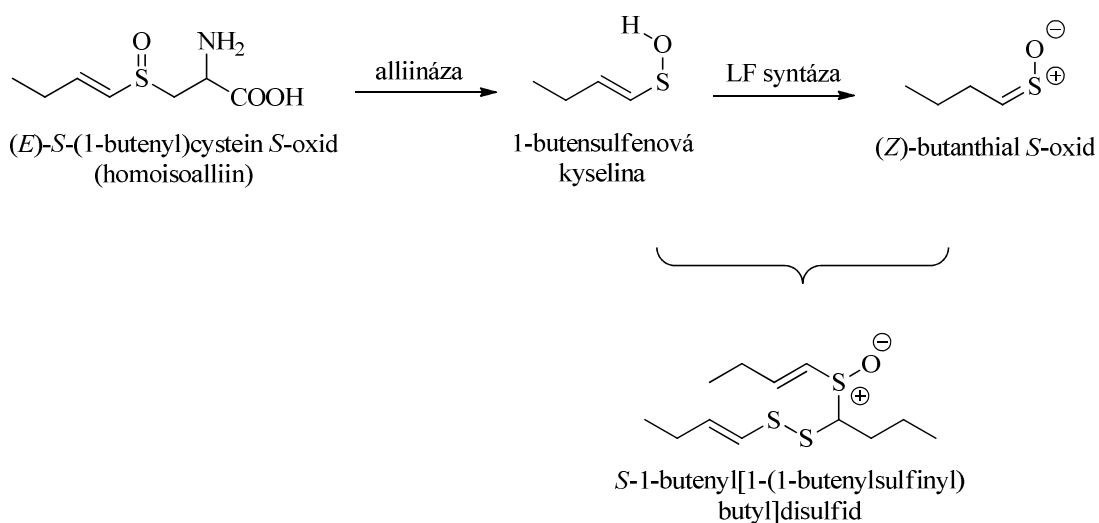
Využitím této techniky se podařilo v *Nectaroscordum siculum* prokázat přítomnost slzotvorného butanthial *S*-oxidu a několika dalších sírných sloučenin obsahujících 1-butenylovou skupinu, které zatím nebyly v přírodě zaznamenány. Lze předpokládat, že butanthial *S*-oxid vzniká naprosto stejným mechanismem jako propanthial *S*-oxid u cibule. Působením alliinázy na homoisoalliin vzniká 1-butensulfenová kyselina, která se za účinku LF syntázy transformuje do příslušného slzotvorného faktoru (obrázek 12).



Obrázek 12: Enzymově katalyzovaný rozklad homoisoalliinu

Cepaeny

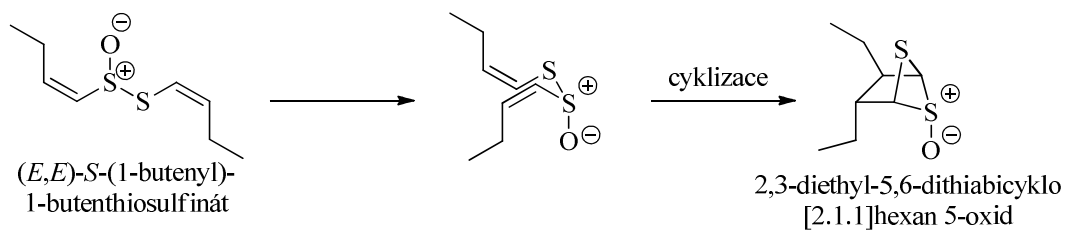
Lze také předpokládat, že v rostlinách podrodu *Nectaroscordum* se mohou tvořit vyšší homology cepaenů izolovaných z cibule. Sumární vzorec těchto látek by měl obsahovat tři uhlíky navíc (obrázek 13). Mimoto byly v *Nectaroscordum tripedale* detekovány látky cepaenům blízké, jež ve svém řetězci měly o jeden atom síry navíc¹⁶.



Obrázek 13: Předpokládaný vznik homologu cepaenu u rostlin podrodu *Nectaroscordum*

Zwiebelany

Poslední sledovaná skupina sírných látek, zwiebelany, by v rostlinách podrodu *Nectaroscordum* měla být zastoupena především homologem odvozeným od 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyklo[2.1.1]hexan 5-oxidu. V tomto případě není výchozí látkou isoalliin, nýbrž homoisoalliin lišící se přítomností jednoho uhlíku navíc. Jelikož cyklizace probíhá z thiosulfinátu složeného ze dvou 1-butenylových skupin, konečný produkt musí mít o dva atomy uhlíku více, než je tomu v případě zwiebelanu u cibule. Jedná se tedy o 2,3-diethyl-5,6-dithiabicyklo[2.1.1]hexan 5-oxid (obrázek 14).



Obrázek 14: Předpokládaný vznik zwiebelanu u rostlin podrodu *Nectaroscordum*

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie

Při izolaci látek byly použity dichlormethan (99,5 %), kyselina octová (99,8 %), bezvodý síran hořečnatý, hydroxid sodný (min. 98 %), kyselina octová (99,8 %) od firmy LACH-NER (Neratovice, ČR), vodný roztok amoniaku (26 %), octan sodný (min. 99 %), butanol (min. 99,9 %), dihydrogenfosforečnan draselný od firmy LACHEMA (Brno, ČR), methanol (min. 99,8 %), kyselina chlorovodíková (min. 35,0 %) od firmy PENTA (Chrudim ČR), ninhydrin, hydroxid draselný (min. 85 %) od firmy CHEMAPOL (Praha, ČR), acetonitril (min. 99,9 %) od firmy SIGMA-ALDRICH (Německo), destilovaná a redestilovaná voda. Jako náplň pro sloupcové ionexové kolony byl použit katex Dowex 50 WX4, 200–400 mesh a anex Dowex 2X8 od firmy SIGMA-ALDRICH (Německo).

4.2. Rostlinný materiál

Čerstvé cibulky rostliny *Nectaroscordum siculum* byly zakoupeny v roce 2011 od nizozemské firmy Eurobulb se sídlem Wanenburgerdijk 418, NL-1161 NS, Zwanenburg.

4.3. Použité přístroje a zařízení

Kromě běžného laboratorního skla a běžných laboratorních zařízení byly při identifikaci látek použity následující přístroje:

➤ **Vysokoučinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole (HPLC/DAD)**

HPLC analýzy byly provedeny na binárním systému vysokotlakých pump Varian Prostar 210 za využití DAD detektoru Varian Prostar 210 (Varian, Palo Alto, USA). Byla použita analytická kolona Varian Microsorb MV 100-5 C8 250 × 4,6 mm (5 μm).

➤ **Ultra účinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem (UHPLC-HRMS)**

UHPLC-HRMS data byla získána za využití chromatografu UltiMate 3000 RS UHPLC (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA), který byl opatřen kolonou Acquity UHPLC HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm, Waters; Milford, MA, USA) vyhřívanou na 45 °C. Objem jednoho nástřiku činil 5 μl. Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla naměřena pomocí detektoru AB (AB SCIEX, Toronto, ON, Canada) s iontovým zdrojem (teplota 600 °C) DuoSprayTM. Napětí na jehle bylo 5 kV.

➤ **Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem (GC/MS)**

GC/MS analýzy byly prováděny pomocí plynového chromatografického systému Varian 3800 (Varian, Palo Alto, USA) s hmotnostním detektorem Varian 4000 MS (Varian, Palo Alto, USA). Kapilární kolona s označením HP-5MS (30 m × 0,25 mm) měla tloušťku nanoseného filmu 0,25 μm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Využita byla ionizace způsobena nárazem elektronu (EI, 70 eV).

4.4. Extrakce a izolace významných látek z *Nectaroscordum siculum*

4.4.1. Extrakce rozkladných produktů

Oloupané cibulky *Nectaroscordum siculum* o hmotnosti 200 g byly homogenizovány v mixéru s 250 ml destilované vody. Homogenát byl nechán 30 minut macerovat a následně byl zfiltrován za sníženého tlaku na Büchnerově nálevce přes tkaninu. Získaný filtrát byl extrahován 2 × 200 ml dichlometanu. Organické fáze byly spojeny a odstředěny při 12000 rpm po dobu 10 minut. Extrakční činidlo bylo přesušeno bezvodým síranem hořečnatým a odpařeno na rotační vakuové odparce při 22 °C. Byl získán silně aromatický extrakt světle žluté barvy. Výtěžek izolovaných látek činil 0,17 %.

Stejným způsobem byly extrahovány rozkladné produkty po sedmidenní maceraci homogenátu. Výtěžek izolovaných látek činil 0,08 %.

4.4.2. HPLC analýza extraktů

Oba dva extrakty byly analyzovány pomocí HPLC/DAD. Objem nastříkovaného vzorku činil 20 μ l, přičemž průtok mobilní fáze byl 0,9 ml/min. Měření bylo prováděno při vlnové délce 220 nm. Jako mobilní fáze byly použity redestilovaná voda a acetonitril. Nastavení gradientu mobilních fází znázorňuje tabulka II.

Tab. II: Gradient mobilních fází HPLC pro porovnání obou extraktů

Mobilní fáze	Čas (min)				
	0	25	35	40	45
A (%)	80	70	20	20	80
B (%)	20	30	80	80	20

Složení mobilní fáze: A – redestilovaná voda

B – acetonitril

4.4.3. GC analýza čerstvého extraktu

Čerstvý extrakt byl analyzován na plynovém chromatografu pro zjištění obsahu těkavých sirných produktů. Nástřiková teplota činila 220 °C, teplota detektoru byla 250 °C. Nosným plynem bylo hélium s průtokem 1,3 ml/min. Ihned po nástřiku činila teplota 40 °C, která se každé tři minuty zvýšila o 4 °C, až vyšplhala na hodnotu 240 °C.

4.5. Izolace homoisoalliinu

4.5.1. Extrakce aminokyselin z cibulek *Nectaroscordum siculum*

Cibulky *Nectaroscordum siculum* o hmotnosti 1500 g byly homogenizovány s roztokem 600 ml methanolu smíchaným s 10 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Homogenát byl nalit do čtyřlitrové varné baňky a přiveden k mírnému varu. Poté byl zfiltrován přes Büchnerovu nálevku s tkaninou. Filtrační koláč byl znovu povařen s 600 ml stejného roztoku. Oba filtráty byly spojeny a zakonzentrovány na rotační vakuové odparce. Teplota lázně byla nastavena na 30 °C. Objem výsledného roztoku činil 450 ml.

4.5.2. Přechištění extraktu pomocí sloupcové ionexové chromatografie

➤ První přechištění přes katex DOWEX 50 WX4

První ionexovou kolonou byl katex Dowex 50 WX4, 200–400 mesh, který bylo zapotřebí nejdříve aktivovat. Přibližně jeden litr katexu Dowex 50 WX4, 200–400 mesh byl promyt destilovanou vodou. Poté byl katex smíchan s jedním litrem 10% HCl a ponechán jednu hodinu v laboratorních podmínkách. Po uplynutí doby byl katex zfiltrován a promýván destilovanou vodou až do neutrálního pH. Následně byla tímto aktivovaným ionexem naplněna skleněná kolona o průměru 5 cm do výšky 22 cm. Na kolonu byl nanesen extrakt aminokyselin o pH 3,5 (hodnota pH byla upravena koncentrovanou kyselinou octovou). Po promytí vodou byly aminokyseliny eluovány 0,1M CH₃COONa o pH 6,5. Celkem bylo najímáno 27 frakcí o objemu 100 ml.

U všech frakcí byla zkontrolována přítomnost aminokyselin pomocí ninhydrinu (0,2 % v acetonu). Frakce, které poskytovaly pozitivní reakci, byly nanoseny na TLC. Mobilní fází pro chromatografii na tenké vrstvě byl roztok butanolu, kyseliny octové a destilované vody v poměru 4:1:1 (v/v/v). Retardační faktory jednotlivých frakcí byly porovnány s R_f standardu homoisoalliinu. Frakce obsahující homoisoalliin (zde frakce 17–27) byly slity a nanoseny na další kolonu.

➤ Druhé přečištění přes katex DOWEX 50 WX4

Roztok aminokyselin byl zakoncentrován na rotační vakuové odparce při 23 °C na 500 ml a okyselen kyselinou octovou na pH 3,4. Poté byl nanesen na kolonu s katexem Dowex 50 WX4, 200–400 mesh (rozměry kolony 3 × 33,5 cm). Na koloně došlo k rozdělení naneseného vzorku do tří barevných pásů, každý o velikosti jednoho centimetru. První byl oranžový, druhý hnědý a třetí světle hnědý. Elučním činidlem byl 0,05M NaOH. Bylo najímáno 45 frakcí (prvních 20 po 180 ml, dalších 10 po 100 ml a zbytek po 50 ml). Frakce č. 30 až frakce č. 43 poskytovaly pozitivní reakci s ninhydrinem. Byly proto nanесeny na TLC, kde se potvrdil i výskyt homoisoalliinu. Tyto frakce byly spojeny a nanесeny na třetí kolonu (objem roztoku činil 600 ml).

➤ Třetí přečištění přes DOWEX 2X8

Třetí ionexová kolona byla naplněna anexem Dowex 2X8, který bylo zapotřebí nejprve reaktivovat. Asi 250 ml anexu bylo zalito 800 ml 1M NaOH a po promíchání se směs nechala odstát jednu hodinu v laboratorních podmínkách. Následně byl anex zfiltrován a promýván destilovanou vodou do neutrálního pH. Anex byl aktivován s 500 ml 2M CH₃COOH. Po hodině byl anex opět promyt destilovanou vodou.

Po reaktivaci anexu byl na chromatografickou kolonu (2 × 14,7 cm) nanесen aminokyselinový roztok bez úpravy pH, které činilo 8,9. Izolovaná aminokyselina se tentokrát v koloně nesorbovala. Ninhydrin pozitivní frakce byly jímány a nanесeny na TLC. Důkaz na homoisoalliin byl v tomto případě negativní, proto byly všechny roztoky s aminokyselinami spojeny a nanесeny na další ionexovou kolonu.

➤ Čtvrté přečištění přes katex DOWEX 50 WX4

Čtvrtá kolona byla naplněna katexem Dowex 50 WX4 (2,5 × 42 cm). Roztok aminokyselin byl upraven koncentrovanou kyselinou octovou na pH 3,3 a nanесen na ionexovou kolonu. Elučním činidlem byl 0,05M NH₃. Dělení na této koloně bylo vzhledem k její výšce (42 cm) časově nejnáročnější. Frakce bez pozitivní

ninhydrinové reakce byly jímány po 100 ml. Jakmile se objevily první frakce s aminokyselinami, jímáný objem byl snížen na 20 ml. Roztoky aminokyselin byly analyzovány pomocí TLC a ty, jež obsahovaly stejné aminokyseliny, byly slity dohromady. Tím byly získány tři výsledné frakce o objemu 150 ml, které byly analyzovány na HPLC.

4.5.3. Průběžná kontrola přečištění na HPLC

Aminokyselinové roztoky byly v průběhu izolace průběžně analyzovány na HPLC s cílem zjistit, zda a popřípadě jakým způsobem dochází k pročištění jednotlivých extraktů během průchodu iontoměničovými kolonami. K tomuto měření byl připraven 10mM roztok KH_2PO_4 o pH 5,4 (nastavení gradientu ukazuje tabulka III). Objem nastříkovaného vzorku byl 20 μl , průtok mobilní fáze 0,9 ml/min a vlnová délka 220 nm.

Tab. III: Mobilní fáze HPLC pro průběžnou kontrolu přečištění

Mobilní fáze	Čas (min)				
	0	10	13	15	20
A (%)	97	97	65	65	97
B (%)	3	3	35	35	3

Složení mobilní fáze: **A** – KH_2PO_4 (10 mM, pH = 5,4)

B – acetonitril

5. Výsledky a diskuse

5.1. Porovnání čerstvého a týden macerovaného extraktu

Sírné sloučeniny vznikající při mechanickém narušení cibulek rostliny *Nectaroscordum siculum* byly extrahovány dichlormethanem a následně analyzovány využitím HPLC/DAD, UHPLC-HRMS a GC/MS. Celá řada látek, mezi nimi například cepaeny nebo zwiebelany, vzniká až po delším časovém úseku, a proto byl analyzován nejen extrakt z čerstvě homogenizovaných cibulek, ale i extrakt homogenátu po týdenní maceraci. Na základě porovnání dat z UPLC-HRMS (tabulka IV) a chromatogramů z HPLC/DAD (obrázky 15 a 16) byl v extraktu z cibulí *Nectaroscordum siculum* potvrzen výskyt předpokládaných thiosulfinátů všech tří možných kombinací odvozených od methan-, butan- a 1-butensulfenové kyseliny, což odpovídá údajům uvedených v publikovaných pracích^{4,16,20,27}.

Tab. IV: UPLC-HRMS data sledovaných thiosulfinátů

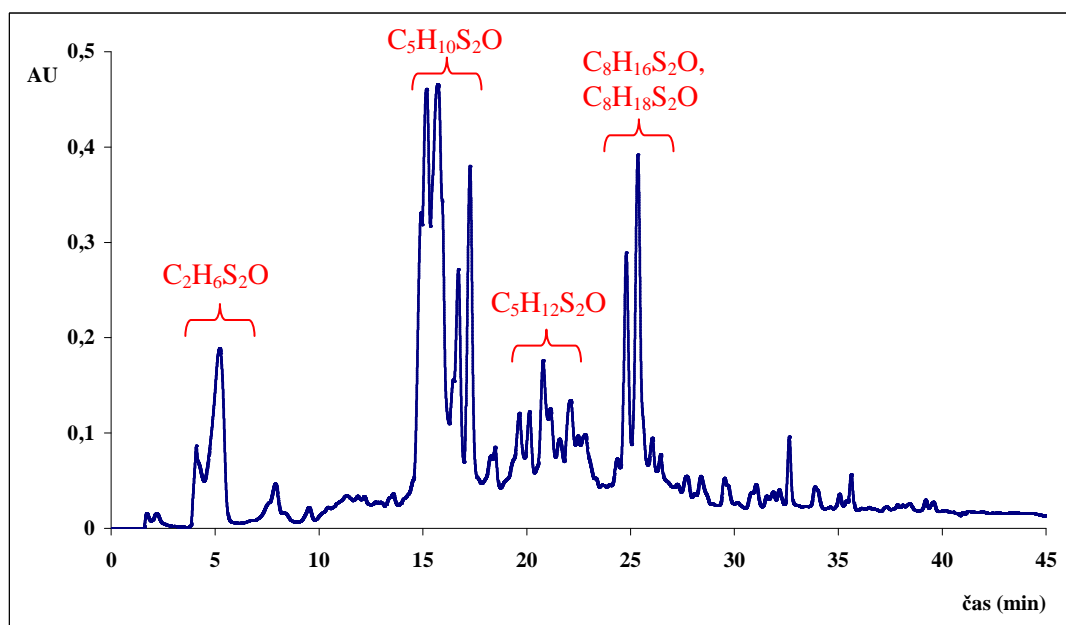
sumární vzorec	kombinace	m/z změřená (Da)	m/z spočítaná (Da)	odchylka (ppm)
$[C_2H_6S_2O + H]^+$	S-methyl-methanthiosulfinát	110,9941	110,9931	5,2
$[C_5H_{10}S_2O + H]^+$	S-methyl-1-butenthiosulfinát, S-(1-butenyl)-methanthiosulfinát	151,0253	151,0246	4,7
$[C_5H_{12}S_2O + H]^+$	S-methyl-butanthiosulfinát, S-butyl-methanthiosulfinát	153,0411	153,0402	5,7
$[C_8H_{16}S_2O + H]^+$	S-butyl-1-butenthiosulfinát, S-(1-butenyl)-butanthiosulfinát	193,0726	193,0715	5,5
$[C_8H_{18}S_2O + H]^+$	S-butyl-butanthiosulfinát	195,0882	195,0872	5,2

U porovnání chromatogramů čerstvého a týden macerovaného extraktu sice nebylo možné vzhledem k využití odlišných metod (HPLC/DAD a UPLC-HRMS) a tím i získání odlišných retenčních časů přiřadit k jednotlivým píkům přesné

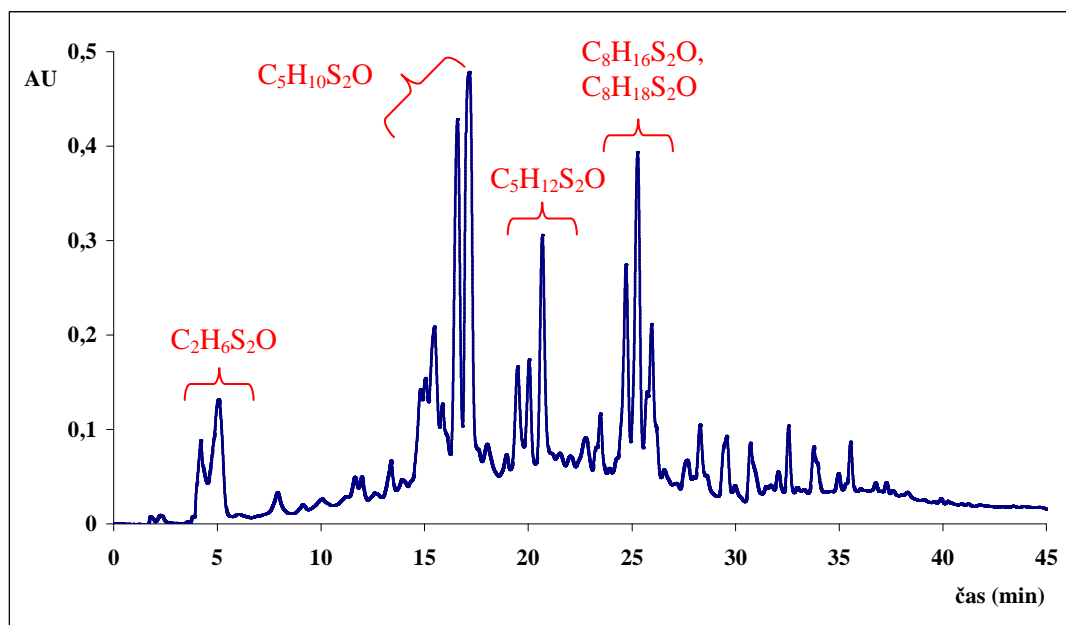
sloučeniny, ale na základě zjevných podobností bylo možné přiřadit dané látky k hlavním skupinám píků.

Kolem páté minuty retenčního času byl identifikován *S*-methylmethanthiosulfinát $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{SCH}_3$ se sumárním vzorcem $\text{C}_2\text{H}_6\text{S}_2\text{O}$. Mezi 15. a 18. minutou byly zaznamenány thiosulfináty s kombinací methyl-butenyl ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{S}_2\text{O}$), tj. thiosulfináty typu $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{SCH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$. U této skupiny je možné pozorovat největší rozdíly mezi oběma extrakty. Skupina píků s retenčním časem kolem 20. minuty představuje sloučeniny s kombinací methyl-butyl ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{S}_2\text{O}$), tj. thiosulfináty typu $\text{CH}_3\text{S}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$. Zde po týdnu došlo ke zvýšení koncentrace látek na úkor sloučenin se sumárním vzorcem $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{S}_2\text{O}$.

A konečně skupina píků kolem 25. minuty je zastoupena zbylými dvěma kombinacemi ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{S}_2\text{O}$ a $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{S}_2\text{O}$), tj. thiosulfináty typu $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{SCH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$ a $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$.



Obrázek 15: HPLC chromatogram extraktu čerstvě homogenizovaných cibulek *Nectaroscordum siculum*



Obrázek 16: HPLC chromatogram extraktu týden macerovaných cibulek *Nectaroscordum siculum*

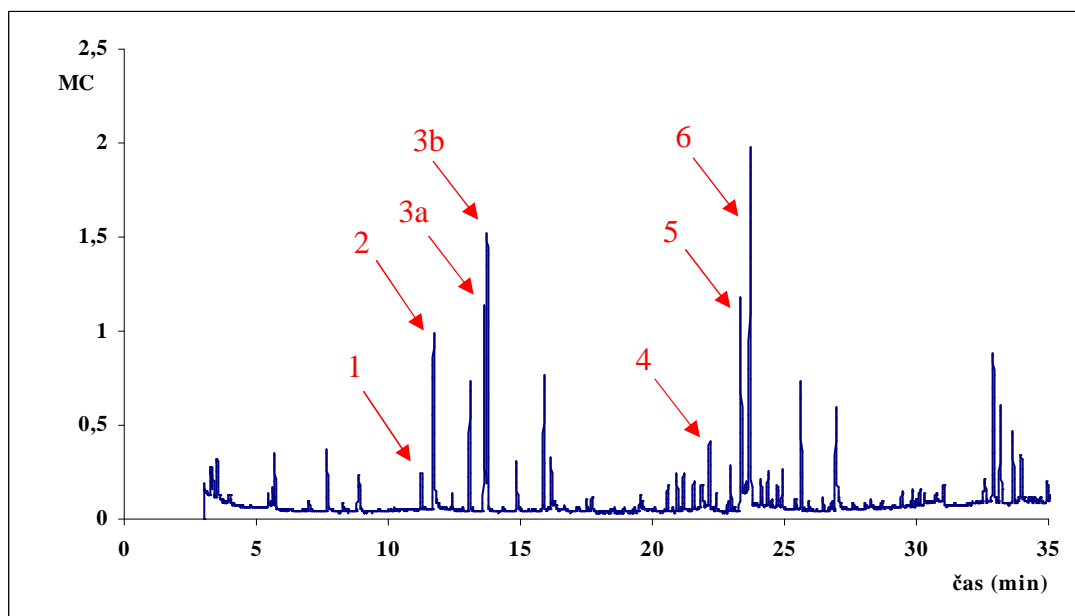
5.2. Detekce těkavých sirných látek na GC/MS

GC/MS analýza posloužila ke stanovení těkavých sirných sloučenin, přičemž hlavním záměrem bylo identifikovat látky vznikající z methiinu, butiinu a homoisoalliinu. Hmotnostní detekce byla prováděna ionizací elektronovým nárazem (EI, 70 eV). Stanovila se tak molekulová hmotnost jednotlivých těkavých sloučenin a získané hmotnostní spektrum umožnilo tyto látky identifikovat (tabulka V, obrázky 17 a 18).

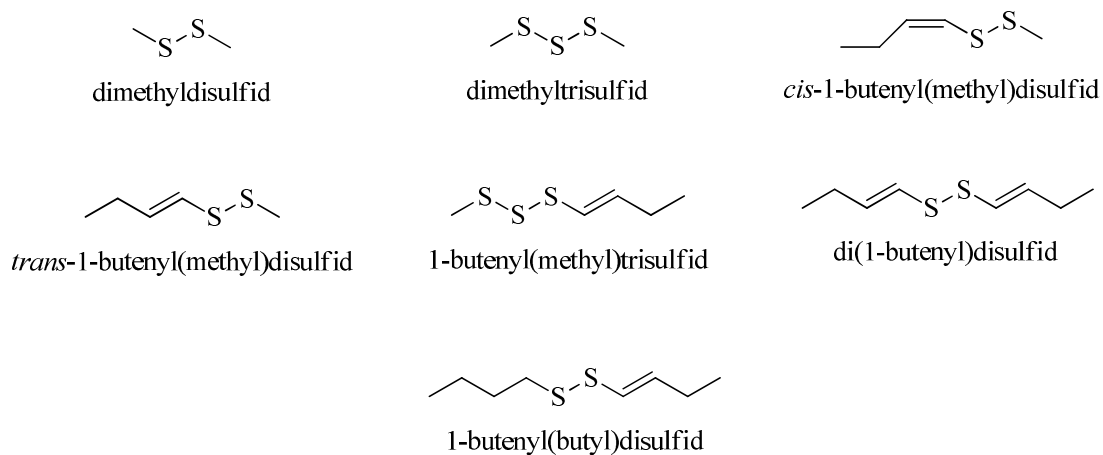
V údajích zahrnující hmotnostní spektra byly zapsány izotopické píky síry, které odpovídají procentuálnímu výskytu jejích izotopů. Údaj M^+ tedy odpovídá zastoupení izotopu síry ^{32}S , kdežto údaj M^+2 odpovídá zastoupení izotopu síry ^{34}S . Na základě poměru intenzit iontů M^+2/M^+ je možné odhadnout i pravděpodobný počet atomů síry ve sloučenině (přirozeně se izotop síry ^{34}S vyskytuje s 4,6% četností). Pravděpodobnost správnosti identifikace 1-butenyl(methyl)disulfidu a 1-butenyl(butyl)disulfidu je téměř stoprocentní, jelikož byla možnost porovnat jejich získaná hmotnostní spektra se spektry standardů těchto látek. Identifikace ostatních sloučenin byla provedena pouze srovnáním jejich hmotnostních spekter s daty uvedenými v knihovně spekter NIST.

Tab. V: Molekulová hmotnost, hmotnostní spektra a pravděpodobná struktura nejvýznamnějších těkavých sloučenin přítomných v extraktu cibulí *Nectaroscordum siculum*

Sloučenina	Molekulová hmotnost	Hmotnostní spektrum (m/z, %)	Pravděpodobná sloučenina
1	94	111 (14), 96 (9, M ⁺ +2), 95 (15), 94 (100, M ⁺), 64 (23), 63 (6), 47 (10), 45 (11)	dimethyldisulfid
2	126	128 (12, M ⁺ +2), 126 (100, M ⁺), 111 (14), 80 (20), 79 (65), 64 (26), 47 (19), 45 (42)	dimethyltrisulfid
3a	134	136 (8, M ⁺ +2), 134 (43, M ⁺), 101 (21), 87 (60), 86 (75), 85 (100), 71 (20), 55 (28)	<i>cis</i> -1- butenyl(methyl) disulfid
3b	134	136 (7, M ⁺ +2), 134 (43, M ⁺), 119 (11), 117 (13), 99 (12), 73 (20), 71 (20), 59 (21)	<i>trans</i> -1- butenyl(methyl) disulfid
4	166	168 (5, M ⁺ +2), 166 (30, M ⁺), 103 (34), 102 (77), 85 (82), 79 (34), 59 (34), 53 (33)	1-butenyl(methyl) trisulfid
5	174	176 (4, M ⁺ +2), 174 (36, M ⁺), 87 (100), 85 (56), 71 (19), 59 (31), 55 (29), 53 (24)	di(1-butenyl) disulfid
6	176	178 (0,4, M ⁺ +2), 176 (42), 141 (60), 113 (49), 87 (66), 86 (66), 85(100), 55 (51)	1-butenyl(butyl) disulfid



Obrázek 17: GC/MS chromatogram extraktu z cibulek *Nectaroscordum siculum*

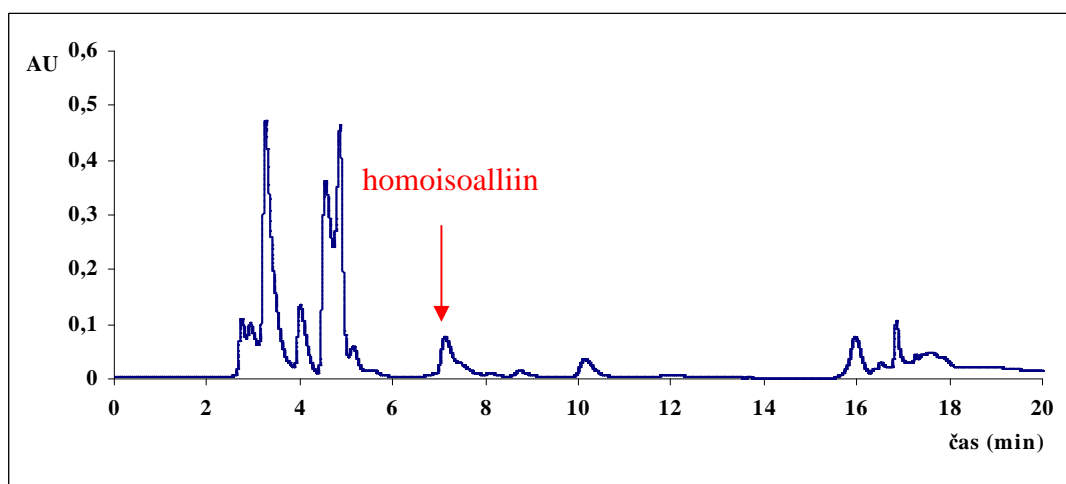


Obrázek 18: Struktury sloučenin detekovaných metodou GC/MS

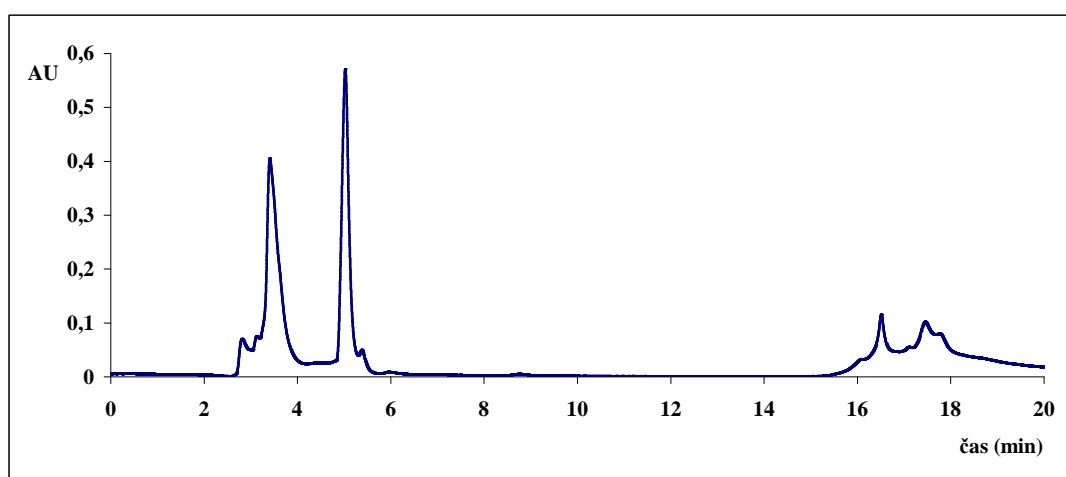
Z obrázku 18 lze vypožorovat, že struktury zjištěných sloučenin opravdu odpovídají kombinacím vznikajících ze všech tří prekurzorů (methiin, butiin a homoisoallin). Celková variabilita produktů je umocněna schopností 1-butenylové skupiny tvořit geometrické izomery.

5.3. Izolace homoisoalliinu

K izolaci aminokyseliny homoisoalliinu, (*E*)-*S*-(1-butenyl)cystein *S*-oxidu, byla využita sloupcová iontovýměnná chromatografie. Po prvních dvou separacích na katexových kolonách bylo patrné, že tato aminokyselina byla v extraktu stále přítomna. Její retenční čas při analýze na HPLC se pohyboval kolem sedmi minut (obrázek 19). Po separaci na třetí koloně (anex) již ale homoisoalliin v žádné najímané frakci pomocí HPLC detekován nebyl (obrázek 20).

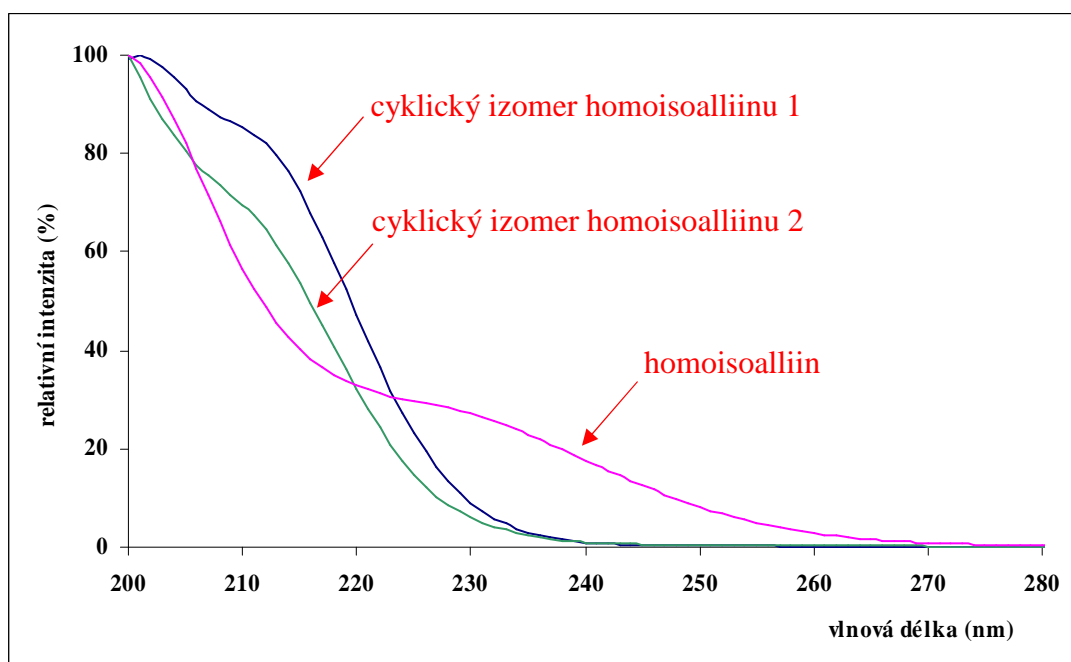


Obrázek 19: HPLC chromatogram extraktu aminokyselin z cibulek *Nectaroscordum siculum* po prvních dvou katexových kolonách



Obrázek 20: HPLC chromatogram roztoku aminokyselin z cibulek *Nectaroscordum siculum* po anexové koloně

Rozdíly mezi UV/VIS spektry alifatického homoisoalliinu a jeho dvěma cyklickými izomery ukazuje obrázek 23.



Obrázek 23: UV/VIS spektra homoisoalliinu a jeho cyklických izomerů

6. Závěr

Během této práce se podařilo potvrdit, že v česnekovitých rostlinách podrodu *Nectaroscordum* dochází k tvorbě sirných sloučenin analogických těm, které se vyskytují v cibuli.

Využitím UPLC-HRMS a HPLC/DAD analýz byl prokázán výskyt thiosulfínátů odvozených od tří prekurzorů vyskytujících se v rostlinách podrodu *Nectaroscordum* – methiinu, butiinu a homoisoalliinu. Zaznamenány byly vesměs všechny možné kombinace základních thiosulfínátů odvozených od příslušných sulfenových kyselin.

Pomocí metody GC/MS byly stanoveny nejvýznamnější těkavé sirné sloučeniny vznikající v kaskádě reakcí při poškození rostlinného pletiva, především pak 1-butenyl(methyl)disulfid a 1-butenyl(butyl)disulfid. Přirozený výskyt těchto sirných sloučenin nebyl dosud ve vědecké literatuře popsán.

Byla též aplikována metoda sloupcové ionexové chromatografie pro izolaci hlavního prekurzoru těchto sloučenin, homoisoalliinu. Bohužel, během této izolace došlo k cyklizaci homoisoalliinu na homocykloalliin.

7. Reference

1. D'Antuono, L. F., Alexieva, I. (2011) Plants and food reports: Bulgaria, August 2011, *BaSeFood* **11**, 2.
2. Harris, J. C., Cottrell, S. L., Plummer, S., Lloyd, D. (2001) Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic), *Appl. Microbiol. Biot.* **57**, 282–286.
3. Rabinowitch, H. D., Currah L. (2002) *Allium Crop Science: Recent Advances*, Wallingford, Oxon, CABI Publishing, 515 pp., ISBN: 0-85199-510-1.
4. Block, E. (2010) *Garlic and Other Alliums*. Milton Road, Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 454 pp., ISBN: 978-0-85404-190-9.
5. Sell, P., Murrell G. (1996) *Flora of Great Britain and Ireland, Volume 5, Butomaceae-Orchidaceae*, Cambridge, Cambridge University Press, 440 pp., ISBN: 978-0-521-55339-1.
6. De Sarker, D., Johnson, M. A. T., Reynolds A., Brandham, P. E. (1997) Cytology of the highly polyploid disjunct species, *Allium dregeanum* (*Alliaceae*), and of some Eurasian relatives, *Bot. J. Linn. Soc.* **124**, 361–373.
7. Lyantagye, S. L. (2011) Ethnopharmacological and phytochemical review of *Allium* species (sweet garlic) and *Tulbaghia* species (wild garlic) from Southern Africa, *Tanz. J. Sci.* **37**, 58–72.
8. Rudall, P. J., Bateman, R. M., Fay M. F., Eastman A. (2002) Floral anatomy and systematics of *Alliaceae* with particular reference to *Gilliesia*, a presumed insect mimic with strongly zygomorphic flowers, *Am. J. Bot.* **89**, 1867–1883.
9. The Angiosperm Phylogeny Group (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants:

AGP III, *Bot. J. Linn. Soc.* **161**, 105–121.

10. Angiosperm Phylogeny Website, *Mobot.org* [ONLINE]. [staženo 6. 3. 2013]. Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>.
11. Dubouzet, J. G., Shinoda, K. (1998) Phylogeny of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb et Berth.) Rouy based on DNA sequence analysis of the internal transcribed spacer region of nrDNA, *Theor. Appl. Genet.* **97**, 541–549.
12. Dubouzet, J. G., Shinoda, K. (1999) Relationships among Old and New World Alliums according to ITS DNA sequence analysis, *Theor. Appl. Genet.* **98**, 422–433.
13. Friesen, N., Fritsch R. M., Blattner F. R. (2006) Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences, *Aliso* **22**, 372–395.
14. Trudy Imperatorskago S. Peterburgskago botanicheskago sada (1873) *Acta Horti petropolitani* **2**, 485 pp.
15. Borodin, A. M. (1984) *Krasnaja kniga SSSR*, 2. sv., Moskva, Lesnaja promyšlenost', 478 pp.
16. Kusterer, J., Keusgen, M. (2010) Cysteine sulfoxides and volatile sulfur compounds from *Allium tripedale*, *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1129–1137.
17. The Plant List, *Theplantlist.org* [ONLINE]. [staženo 6. 3. 2013]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-296603>.
18. Brickel, Ch. a kol. (2000) *Velká encyklopedie květin a okrasných rostlin*, Praha, Euromedia Group – Ikar, 597 pp., ISBN: 80-7202-719-2.

19. Dzhurmanski, A. (2007) Peculiarities of growth and development *Nectaroscordum siculum* Lindl. in terms of Kazanlak field., *International Conference Stara Zagora, 7–8 June 2007*, 95–102.
20. Kubec, R., Krejčová, P., Mansur, L., García, N. (2013) Flavor precursors and sensory-active sulfur compounds in *Alliaceae* species native to South Africa and South America, *J. Agric. Food Chem.* **61**, 1335–1342.
21. Fritsch, R. M., Keusgen, M. (2006), Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (*Alliaceae*), *Phytochemistry* **67**, 1127–1135.
22. Kubec, R., Kim, S., McKeon, D. M., Musah, R. A. (2002) Isolation of *S-n*-butylcysteine sulfoxide and six *n*-butyl-containing thiosulfinates from *Allium siculum*, *J. Nat. Prod.* **65**, 960–964.
23. Ferary, S., Auger., J. (1996) What is the true odour of cut *Allium*? Complementarity of various hyphenated methods: gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with particle beam and atmospheric pressure ionization interfaces in sulphenic acids rearrangement components discrimination, *J. Chromatogr. A* **750**, 63–74.
24. He, Q., Kubec, R., Jadhav, A. P., Musah, R. A. (2011) First insights into the mode of action of a “lachrymatory factor synthase” – Implications for the mechanism of lachrymator formation in *Petiveria alliacea*, *Allium cepa* and *Nectaroscordum* species, *Phytochemistry* **72**, 1939–1946.
25. Block, E., Zhao, S., H. (1992) *Allium* chemistry: Simple syntheses of antithrombotic cepaenes from onion and deoxycepaenes from oil of shallot by reaction of 1-propenethiolate with sulfonyl halides, *J. Org. Chem.* **57**, 5815–5817.
26. Block, E., Gulati, H., Putman, D., Sha, D., You, N., Zhao, S., H. (1997) *Allium* chemistry: Synthesis of 1-[alk(en)ylsulfinyl]propyl alk(en)yl disulfides

(cepaenes), antithrombotic flavorants from homogenates of onion (*Allium cepa*), *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4414–4422.

27. Kubec, R., Cody, R. B., Dane, A. J., Musah, R. A., Schraml, J., Vattekkatte, A., Block, E. (2010) Applications of direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. 2-Propenesulfenic and 2-propenesulfinic acids, diallyl trisulfane *S*-oxide, and other reactive sulfur compounds from crushed garlic and other *Alliums*, *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1121–1128.

Zdroje obrázků:

- I. Friesen, N., Fritsch R. M., Blattner F. R. (2006) Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences, *Aliso* **22**, 372–395.
- II. <https://sites.google.com/site/wikilsnatureofarmenia/project-definition/-----nectaroscordum-tripedale-trautv-grossh> [k 10. 3. 2013]
- III. <http://www.hardybulbs.com/HTML%20Pages/misc-1.html>, [k 10. 3. 2013]
- IV. <http://e-monocot.org/taxon/urn:kew.org:wcs:taxon:282382> [k 20. 4. 2013]
- V. http://www.bethchatto.co.uk/plant_portraits_n/nectaroscordum_siculum_subsp_bulgaricum.html [k 10. 3. 2013]
- VI. <http://www.imagejuicy.com/images/plants/o/ononis/8/> k 10. 3. 2013
- VII. <http://e-monocot.org/taxon/urn:kew.org:wcs:taxon:282374> [k 20. 4. 2013]

8. Použité zkratky

DART	přímá analýza v reálném čase
EI	ionizace elektronovým nárazem
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC/DAD	vysokoučinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
MS	hmotnostní detekce
RPM	otáčky za minutu
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UHPLC-HRMS	ultra účinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem