

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Cyklické organosírné sloučeniny cibule kuchyňské
(*Allium cepa*)

Diplomová práce

Bc. Aneta Sirná

Školitelka: Mgr. Iveta Štefanová, Ph.D.
(Katedra aplikované chemie, FZT JU)

Školitel specialista: prof. Ing. Roman Kubec, Ph.D.
(Katedra aplikované chemie, FZT JU)

České Budějovice 2023

Sirná, A., 2023: Cyklické organosírné sloučeniny cibule kuchyňské (*Allium cepa*). [Cyclic organosulfur compounds of onion (*Allium cepa*). Mgr. Thesis, in Czech.] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá cyklickými organosírnými sloučeninami cibule kuchyňské (*Allium cepa*).

Teoretická část se zabývá popisem rodu *Allium* a vznikem organosírných sloučenin v těchto rostlinách. Dále detailně popisuje vybrané skupiny cyklických organosírných sloučenin, u kterých se specializuje na jejich biologickou aktivitu.

Experimentální část je zaměřena na optimalizaci metod pro izolaci allithiolanů D a thiolanodisulfidů z extraktu cibule kuchyňské. Dalším cílem bylo tyto sloučeniny izolovat pomocí preparativní HPLC pro budoucí studium jejich biologických účinků.

KLÍČOVÁ SLOVA: organosírné sloučeniny, cibule, allithiolany, bithiolanové polysulfidy, biologická aktivita

Annotation

This master thesis deals with cyclic organosulfur compounds in onion (*Allium cepa*).

The theoretical part focuses on the description of the genus *Allium* and the formation of organosulfur compounds in these plants. This part also describes selected groups of organosulfur compounds, primarily their biological activity.

The experimental part describes the optimization of methods for isolation of allithiolanes D a thiolanodisulfide from an onion extract. Another point was purification of these compounds by preparative HPLC for evaluation of their biological effects.

KEY WORDS: organosulfur compounds, onion, allithiolanes, bithiolane polysulfides, biological activity

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2023

.....

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala mé školitelce Mgr. Ivetě Štefanové, Ph.D. za obrovskou pomoc, ochotu, trpělivost a odborné vedení této diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala prof. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za konzultace a vstřícný přístup, také Ing. Petře Bittnerové, Ph.D. za pomoc v laboratoři.

V neposlední řadě patří dík všem, kteří se jakkoliv podíleli na vzniku této práce.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Jihočeské univerzity (GAJU 080/2022/Z).

Obsah

1	CÍLE PRÁCE.....	1
2	ÚVOD	2
2.1	ROD <i>ALLIUM</i>	3
2.2	<i>ALLIUM CEPA</i>	4
2.3	ORGANOSIRNÉ SLOUČENINY	5
2.3.1	<i>S-Alk(en)ylcystein-S-oxidy</i>	6
2.3.2	<i>Tvorba organosirných sloučenin v cibuli</i>	6
2.4	CYKlickÉ ORGANOSIRNÉ SLOUČENINY A JEJICH BIOLOGICKÉ ÚČINKY	8
2.4.1	<i>Zwiebelany</i>	8
2.4.2	<i>Cepathiolany</i>	9
2.4.3	<i>Onioniny</i>	10
2.4.4	<i>Bisthiofanové polysulfidy</i>	11
2.4.5	<i>Welsoniny</i>	11
2.5	ALLITHIOLANY	12
2.5.1	<i>Změna chuti zpracované cibule</i>	13
2.5.2	<i>Mechanismus vzniku allithiolanů</i>	14
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	16
3.1	CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	16
3.2	PŘÍSTROJE.....	17
3.3	GRADIENTY POUŽÍVANÉ V HPLC	18
3.4	IZOLACE SLOUČENIN Z MODELOVÝCH REAKČNÍCH SYSTÉMŮ	20
3.4.1	<i>Izolace alliinasy</i>	20
3.4.2	<i>Izolace S-alk(en)ylcystein-S-oxidů</i>	21
3.4.3	<i>Příprava extraktu</i>	21
3.4.4	<i>Frakcionace extraktu</i>	22
4	VÝSLEDKY	28
4.1	IZOLACE ALLITHIOLANU D	29
4.2	IZOLACE THIOLANODISULFIDŮ	32
5	DISKUZE	38
6	ZÁVĚR	41

7	POUŽITÁ LITERATURA	42
8	POUŽITÉ ZKRATKY	48

1 Cíle práce

- A. vypracovat literární rešerši zaměřenou na strukturu a výskyt organosírných sloučenin obsahujících thiolanové jádro v rostlinách rodu *Allium*;
- B. optimalizovat postup pro izolaci allithiolanů D a thiolanodisulfidů z cibule kuchyňské;
- C. pokusit se vybrané sloučeniny izolovat pomocí preparativní HPLC a strukturně je charakterizovat;
- D. získané výsledky vyhodnotit, vhodně zdokumentovat a diskutovat.

2 Úvod

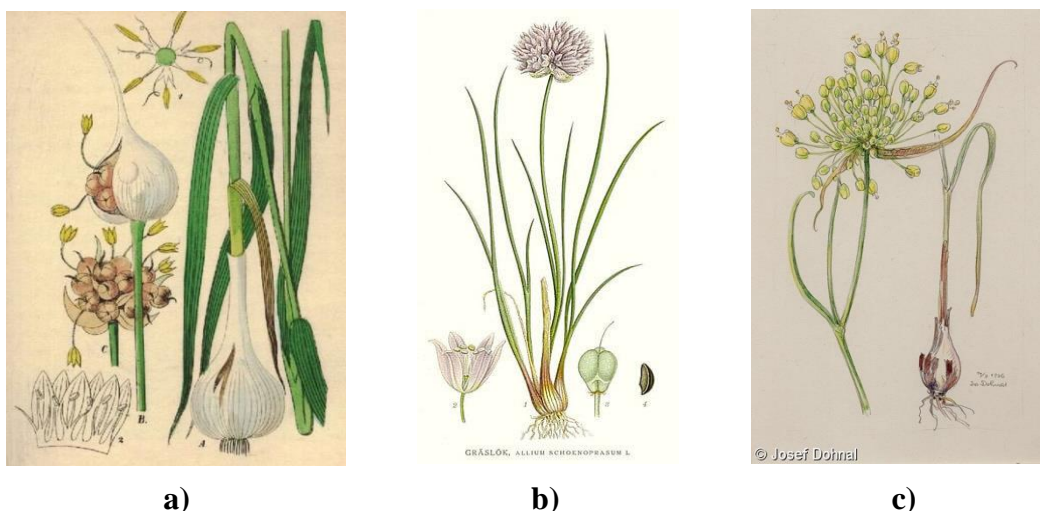
Tato diplomová práce je zaměřena na organosírné sloučeniny, které se vyskytují v cibuli kuchyňské (*Allium cepa*). Cibule patří do rodu *Allium* a jedná se o velmi početně bohatý rod jednoděložných rostlin, který zahrnuje jak ekonomicky významné druhy používané ke konzumaci, ale také zástupce vyskytující se na zahradách díky svým okrasným vlastnostem.

Právě organosírné sloučeniny jsou zodpovědné za typické sensorické znaky zástupců rodu *Allium*, jako je například štiplavé aroma, ostrá chuť nebo slzotvorný účinek. Některé popsané sloučeniny rodu *Allium* byly a stále jsou předmětem mnoha studií, zaměřených na testování jejich biologických účinků. Mezi již popsané účinky různých skupin organosírných látek patří například protirakovinná aktivita, antiagregační účinky či virucidní účinky.

Teoretická část práce je zaměřena na detailní popis vybraných cyklických organosírných sloučenin cibule kuchyňské (**Obrázek 1**), u nichž již probíhal nebo v budoucnu bude probíhat výzkum zabývající se biologickou aktivitou těchto látek.

Hlavním cílem praktické části bylo izolovat vybrané organosírné sloučeniny z cibule kuchyňské pomocí preparativní HPLC pro účely výzkumu biologické aktivity, jelikož u těchto sloučenin prozatím testována nebyla.

Skupina rostlin rodu *Allium* zahrnuje přibližně 750 druhů a patří do ní jedny z nejpoužívanějších a ekonomicky nejvýznamnějších zelenin. Mezi nejznámější zástupce, u kterých pěstování a konzumace sahá do dávné historie, patří cibule kuchyňská (*A. cepa*) a česnek kuchyňský (*A. sativum*). Dalšími významnými zástupci jsou pór zahradní (*A. porrum*), pór letní (*A. ampeloprasum*), pažitka pobřežní (*A. schoenoprasum*), česnek medvědí (*A. ursinum*) či cibule zimní (*A. fistulosum*). Za zmínku stojí také rostliny, které nejsou určené ke konzumaci, ale své využití našly především jako okrasné květiny díky rozmanitým barvám a tvarům. Do této skupiny patří např. česnek obrovský (*A. giganteum*), česnek sicilský (*A. siculum*), česnek zlatožlutý (*A. moly*), česnek žlutý (*A. flavum*) nebo česnek azurový (*A. caeruleum*).³⁻⁵ Vybraní zástupci jsou zobrazeni na **Obrázku 2**.



Obrázek 2: Zástupci rodu *Allium*: a) česnek kuchyňský;[†] b) pažitka pobřežní;[‡] c) česnek žlutý.[§]

2.2 *Allium cepa*

Cibule kuchyňská (**Obrázek 3**) je bezpochyby nejpoužívanějším zástupcem rostlin rodu *Allium*. Díky svému nenáročnému pěstování a možnosti dlouhodobého skladování si získala oblibu po celém světě. Kromě Antarktidy ji lze pěstovat na všech kontinentech při různých klimatických podmínkách. Tyto informace potvrzují i statistická data FAO⁶

[†] <https://microbz.co.uk/garlic/>; staženo dne 11. 2. 2023

[‡] <https://www.maspoma.sk/pazitka/>; staženo dne 11. 2. 2023

[§] https://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Allium%20flavum&czName=česnek%20žlutý&title=Allium%20flavum%20%7C%20česnek%20žlutý&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=lat; staženo dne 11. 2. 2023

(Food and Agriculture Organization of the United Nations), které řadí cibuli k nejpěstovanějším druhům zeleniny. Její produkce neustále roste, od roku 2019 se její produkce zvýšila o 10 milionů tun a v roce 2021 se tak celosvětově vyprodukovalo celkem 107 milionů tun cibule. K tomuto číslu přispěla Česká republika 52 tisíci tunami. Mezi celosvětově největší producenty se ovšem řadí Čína a Indie.^{4,6}

Cibule je dvouletá až trvalá rostlina, záleží na typu vyšlechtěné odrůdy. Za nejdůležitější část rostliny lze považovat zásobní orgán cibule, který se využívá ke konzumaci. Cibule má několik tvarů, které mohou dorůst v průměru až 10 cm a můžeme je znát v několika barvách (červená, žlutá a bílá). Tato část plodiny se skládá ze zdužnatělé báze listu, kde centrální jádro překrývá několik vrstev. Kromě zásobního orgánu má rostlina také vláknité kořeny, trubkovité listy a robustní stonek, který ve druhém roce života může dorůst do výšky 100–200 cm. Ve druhém roce se také na špičkách stonku objevuje 50–1000 drobných květů, které mají bílou nebo zelenobílou barvu.⁷



Obrázek 3: Botanický nákres cibule kuchyňské.^{**††}

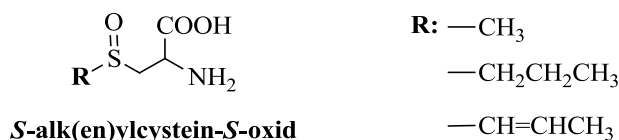
2.3 Organosírné sloučeniny

Pro rostliny rodu *Allium* je typické štiplavé aroma, pronikavá chuť a v některých případech i slzotvorné účinky. Za tyto ojedinělé organoleptické vlastnosti jsou zodpovědné sloučeniny, které obsahují síru. Důvodem, proč rostliny produkují tyto látky, může být několik,

^{**} <https://cz.pinterest.com/pin/26177241571880991/>; staženo dne 11. 2. 2023

^{††} <https://www.etsy.com/pl/listing/489855143/onion-seed-essential-oil-allium-cepa-100>; staženo dne 11. 2. 2023

ale předpokládá se, že v rostlině plní zejména ochrannou funkci. Chrání rostliny před konzumací herbivorů a také před rozvojem mikrobiálního napadení.⁸ Za vznik sirných sloučenin jsou zodpovědné prekurzory odvozené od cysteinu (**Obrázek 4**), které při narušení rostlinného pletiva podléhají enzymově katalyzovanému rozkladu.⁹

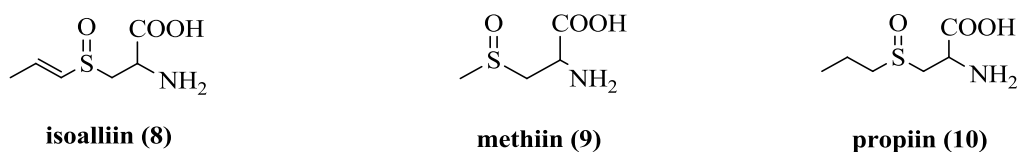


Obrázek 4: Struktura *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů přítomných v cibuli.⁹

2.3.1 *S*-Alk(en)ylcystein-*S*-oxidy

S-Alk(en)ylcystein-*S*-oxidy jsou prekurzory nejvýznamnějších organosirných sloučenin v rostlinách rodu *Allium*. Skupina těchto *S*-substituovaných derivátů cysteinu se nachází v cytoplazmě rostlin. Teprve po narušení rostlinného pletiva dochází ke kontaktu s enzymem alliinasou, který se v neporušené rostlině nachází ve vakuole.¹⁰ Tímto krokem je spuštěna kaskáda několika enzymatických reakcí.

Cibule kuchyňská obsahuje celkem tři prekurzory organosirných látek (**Obrázek 5**). S nejvyšším zastoupením (až 78 relativních %) se vyskytuje isoalliin (**8**), který byl objeven Spareem a kol.¹¹ v roce 1963. Ovšem prvním objeveným prekurzorem vědci Virtanenem a Matikkalou¹² byl v roce 1959 methiin (**9**). Těmto vědcům je připisována i izolace propiin (**10**), který se v cibuli zpravidla vyskytuje pouze ve stopovém množství.¹³

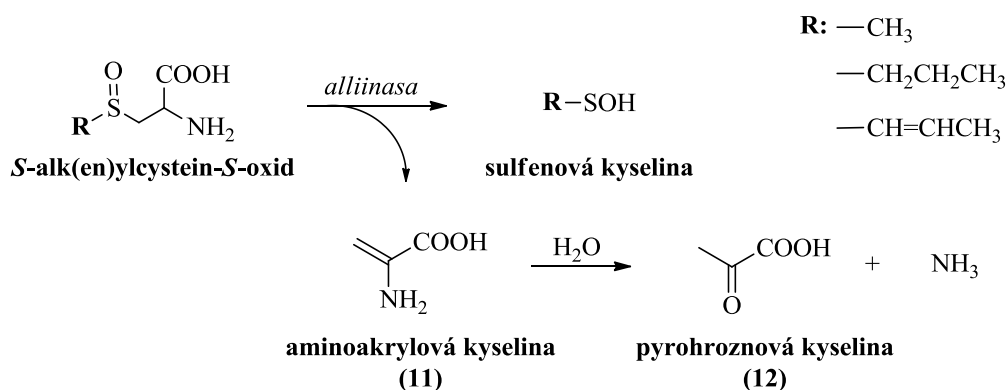


Obrázek 5: *S*-Substituované deriváty cysteinu cibule.

2.3.2 Tvorba organosirných sloučenin v cibuli

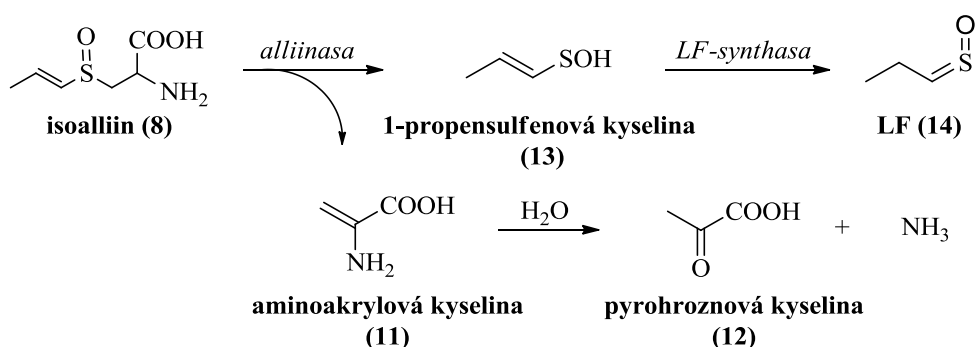
Rozklad *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, ke kterému dochází vlivem narušení rostlinného pletiva, je uveden na **Obrázku 6**. Jak již bylo zmíněno, po narušení rostlinného pletiva dochází k přímému kontaktu *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů s enzymem alliinasou a je tím tak spuštěna

kaskáda enzymově katalyzovaných reakcí. Mimořádně reaktivní sulfenové kyseliny, které jsou prvními meziprodukty těchto reakcí, jsou hlavními stavebními kameny pro vznik většiny organosírných sloučenin. Zároveň se při této enzymatické reakci odštěpuje kyselina aminoakrylová (**11**), která se spontánně přeměňuje na kyselinu pyrohroznovou (**12**).^{4,14}



Obrázek 6: Obecné schéma rozkladu *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů během zpracování cibule.

Cibule kuchyňská se odlišuje od většiny zástupců rodu *Allium* přítomností dvou enzymových systémů, tj. alliinasy a LF-synthasy (dále jen LFS). Právě LFS je zodpovědná za charakteristickou vlastnost cibule, tj. podráždění sliznic při jejím zpracování (**Obrázek 7**). Enzym alliinasa katalyzuje rozklad isoalliinu (**8**) na 1-propensulfenovou kyselinu (**13**) za současného odštěpení aminoakrylové kyseliny (**11**). Oproti tomu LFS rozkládá část vzniklé 1-propensulfenové kyseliny (**13**) na slzotvorný faktor, systematicky propanthial-*S*-oxid (**14**; dále jen LF), který způsobuje již zmíněné slzení očí.^{15,16}



Obrázek 7: Schéma enzymově katalyzovaného rozkladu isoalliinu (**8**).

2.4 Cyklické organosírné sloučeniny a jejich biologické účinky

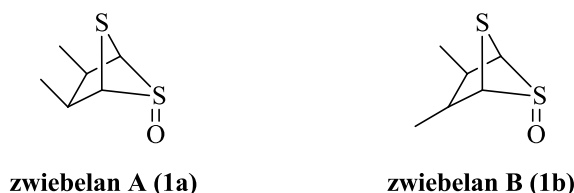
Nejen specifické senzorycké vlastnosti rostlin rodu *Allium* jsou důsledkem přítomnosti sloučenin obsahujících síru, těmto látkám je navíc připisována celá řada léčivých účinků. Blahodárné účinky cibule a česneku jsou známé od nepaměti, potvrzují to zmínky o těchto plodinách v Bibli nebo Koránu.⁴ V historii je Hippokrates předepisoval na hojení ran, správné dýchání a vylučování. Později, ve středověku, byl macerovaný česnek konzumován jako lék proti moru.¹⁷

Většina lidí dodnes používá cibuli s medem při nachlazení, ale existuje již celá řada vědeckých výzkumů, že cibule má řadu dalších přínosných biologických vlastností. Ukázalo se, že konzumace cibule je spojena se sníženým rizikem rozvoje kardiovaskulárních chorob, jelikož má příznivé účinky na rizikové faktory onemocnění. Mezi zkoumané faktory patří např. hyperglykémie, hypertenze nebo agregace krevních destiček.¹⁸ Další epidemiologické studie spojují rostliny z rodu *Allium* s mechanismy protirakovinné aktivity. Cibule prokázala silnou antiproliferační aktivitu na lidské rakovinné buněčné linie, také účinky ve všech fázích karcinogeneze. Rovněž má vliv na mnoho fyziologických procesů modifikujících riziko rakoviny.^{19,20} Další ochranný účinek se projevuje při neurodegenerativních onemocněních, kdy dochází k degeneraci či apoptóze neuronálních buněk.²¹

Zkrátka cibule má celou řadu biologických vlastností, lze ji také považovat za významný zdroj přírodních antioxidantů, které mají příznivý ochranný účinek na lidské zdraví.²⁰ Vystala tak otázka, jaké konkrétní sloučeniny jsou zodpovědné za zmíněné vlastnosti. Tuto otázku se snaží vyřešit mnoho vědců, kteří identifikují stále nové organosírné sloučeniny, u kterých je následně zkoumána jejich biologická aktivita.

2.4.1 Zwiebelany

Při hledání konkrétních sloučenin zodpovědných za antiastmatické účinky cibule objevili Bayer a kol.²² dvě izomerní sloučeniny, systematicky *cis*- (**1a**), resp. *trans*-2,3-dimethyl-5,6-dithiacyklo[2.1.1]hexan-5-oxid (**1b**), které pojmenovali zwiebelany (z německého výrazu pro cibuli, tj. die Zwiebel, **Obrázek 8**).



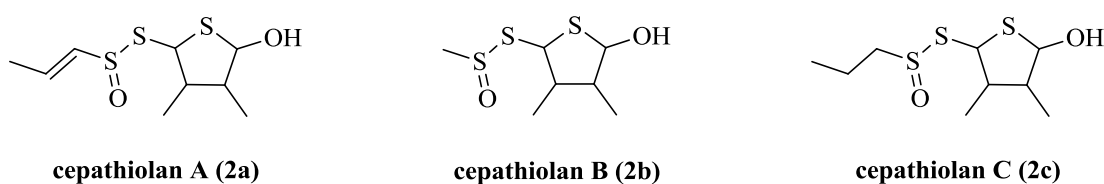
Obrázek 8: Struktura zwibelanů (1).²²

Směs zwibelanu A (1a) a B (1b) vykazuje antikoagulační účinky. Tyto sloučeniny se v krevní plazmě vážou na trombin a tím blokují jeho funkci srážení krve.²² Borjihan a kol.²³ později navíc zjistili, že zwibelan A (1a) projevuje také značné antimykotické účinky. Fungicidní účinky jsou způsobené zvýšenou aktivitou polymyxinu B, který má rušivý účinek na vakuoly kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4.2 Cepathiolany

Tyto sloučeniny byly poprvé izolovány Yoshidou a kol.²⁴ z extraktu cibule, kde byla potlačena aktivita LFS. Cepathiolany byly první objevené látky s thiolanovým jádrem, tato strukturální vlastnost společně s latinským označením cibule byla zohledněna v jejich pojmenování. Následující roky byl Aoyagim a kol.²⁵ objeven další stereoizomer, pojmenovaný jako cepathiolan A (2a), a Štefanovou a kol.²⁶ izolovány methylové a propylové homology, které získaly označení cepathiolan B (2b) a cepathiolan C (2c),

Obrázek 9.



Obrázek 9: Struktura cepathiolanů (2).^{24–26}

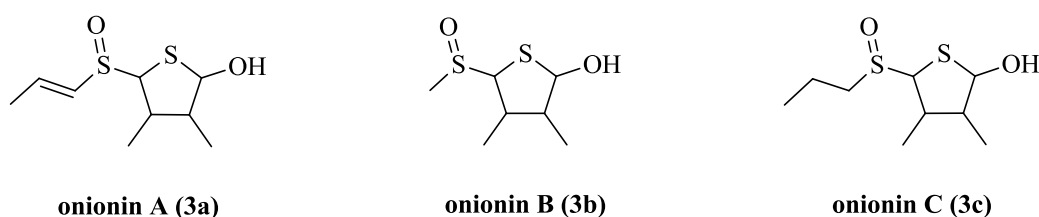
Aoyagi a kol.²⁵ také zkoumali biologickou aktivitu cepathiolanu A (2a). Zjistili, že vykazuje inhibiční aktivitu na cyklooxygenázu COX-1. COX-1 je enzym, který je zodpovědný za přeměnu kyseliny arachidonové na tromboxany a prostaglandiny, když je v těle přítomný zánět. V medicíně se jako silný inhibitor enzymu používá kyselina acetylsalicylová, známá jako aspirin, která snižuje horečku, zmírňuje bolest a rozvoj zánětu.

Právě s aspirinem byl ve výzkumu porovnáván cepathiolan A (**2a**) a ukázalo se, že vykazuje ještě větší inhibiční schopnosti na cyklooxygenázu než aspirin.

V dalším výzkumu byl cepathiolan A (**2a**) porovnáván s kyselinou kávovou, která prokazuje mírnou inhibiční aktivitu na enzymy α -glukosidázy. Inhibicí enzymů dochází ke zpomalení rozkladu oligosacharidů a disacharidů při trávení, tudíž se také zmírňuje nárůst cukru v krvi. Výsledky výzkumu ukázaly, že cepathiolan A (**2a**) má několikanásobně větší inhibiční aktivitu než kyselina kávová. Látky, které mají takové vlastnosti, se využívají při léčbě cukrovky.²⁵

2.4.3 Onioniny

Onionin A (**3a**), sloučenina se sumárním vzorcem $C_9H_{16}O_2S_2$, byla objevena vědeckou skupinou El-Aasrem a kol.²⁷ v roce 2010. Tato nově identifikovaná látka dostala název podle anglického označení cibule (onion). O čtyři roky později díky vědecké práci Nohary a kol.²⁸ přibyly další dva izomery onioninu A (**3a**). V roce 2019 byly Štefanovou a kol.²⁶ vyvráceny struktury, které původně navrhli zmínění autoři. K nově navržené struktuře onioninu A (**3a**) navíc tato vědecká skupina izolovala a identifikovala methylové a propylové homology, které pojmenovala onionin B (**3b**) a onionin C (**3c**). Všechny tři nově navržené struktury jsou znázorněny na **Obrázku 10**.



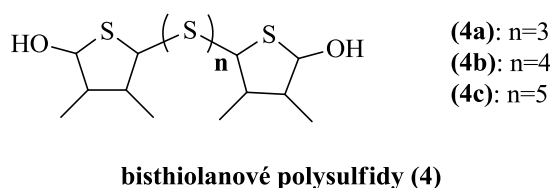
Obrázek 10: Struktura onioninů A–C (**3**).²⁶

Onioniny (**3**) byly také podrobeny výzkumu biologické aktivity a ukázalo se, že onionin A (**3a**) vykazuje značné protirakovinné účinky. Tato sloučenina má protitumorální funkci založenou na inhibici polarizace makrofágů M2. Makrofágy způsobují imunosupresi a angiogenezi, jsou v interakci s nádorovými buňkami a urychlují jejich proliferaci. Navíc onionin A (**3a**) v rakovinné tkáni zvyšuje počet infiltrujících lymfocytů a tím aktivuje protinádorovou imunitu zprostředkovanou T-lymfocyty. Na rozdíl od dosavadní léčby rakoviny nemá účinná koncentrace onioninu vliv na životaschopnost ostatních buněk v organismu.^{27,29,30}

Výzkum účinků látky byl prováděn na myších, u kterých se vyskytovala rakovina vaječníků nebo plic. U rakoviny plic byly myším izolovány buňky a lymfocyty ze sleziny, které byly následně ošetřeny onioninem A (**3a**). Ukázalo se, že onionin A (**3a**) potlačil subkutánní vývoj tumoru i metastáze v plicích.^{29,30}

2.4.4 Bisthiolanové polysulfidy

Dalšími sloučeninami objevenými v extraktu cibule, ve které byla potlačena syntéza slzotvorného faktoru, jsou bisthiolanové polysulfidy (**Obrázek 11**). V roce 2021 se podařilo Aoyagimu a kol.³¹ izolovat dvě nové látky, které byly triviálně pojmenovány thiolanotrisulfid (**4a**) a thiolanotetrasulfid (**4b**). Při této vědecké práci se také povedlo potvrdit přítomnost třetího bisthiolanového polysulfidu, tj. thiolanopentasulfidu (**4c**). Předpokládá se, že tyto sloučeniny vznikají z cepathiolanů (**Obrázek 9**), které také byly izolovány z homogenizované cibule. Existenci těchto sloučenin předpovídal už v roce 1992 Block.⁹



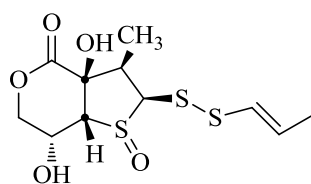
Obrázek 11: Struktura bisthiolanových polysulfidů.³¹

Možný vznik bisthiolanových sulfidů (**4**) z cepathiolanů (**2**), vyvolal další domněnku přítomnosti biologické aktivity. Stejně jako u cepathiolanu A (**2a**)³² byla zkoumána inhibiční aktivita na COX-1 a také na enzym peroxidázu. Výsledky byly opět porovnávány s aspirinem a ukázalo se, že směs bisthiolanových polysulfidů vykazuje protizánětlivé účinky.³¹

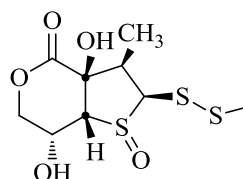
2.4.5 Welsoniny

V roce 2016 byly objeveny dvě nové bicyklické sloučeniny izolovány z acetonového extraktu cibule zimní (*A. fistulosum*). Nohara a kol.³³ pojmenovali tyto sloučeniny welsoniny (**Obrázek 12**) podle rostliny, ze které byly izolovány a která se také označuje jako cibule velšská. Ovšem většina lidí ji bude znát pod názvem cibule jarní. **Obrázek 12** představuje

strukturu welsoninu A₁ (**5a**) a welsoninu A₂ (**5b**). Mechanismus tvorby welsoninů (**5**) dosud nebyl objasněn, existují pouze jeho teoretické návrhy.



welsonin A₁ (**5a**)



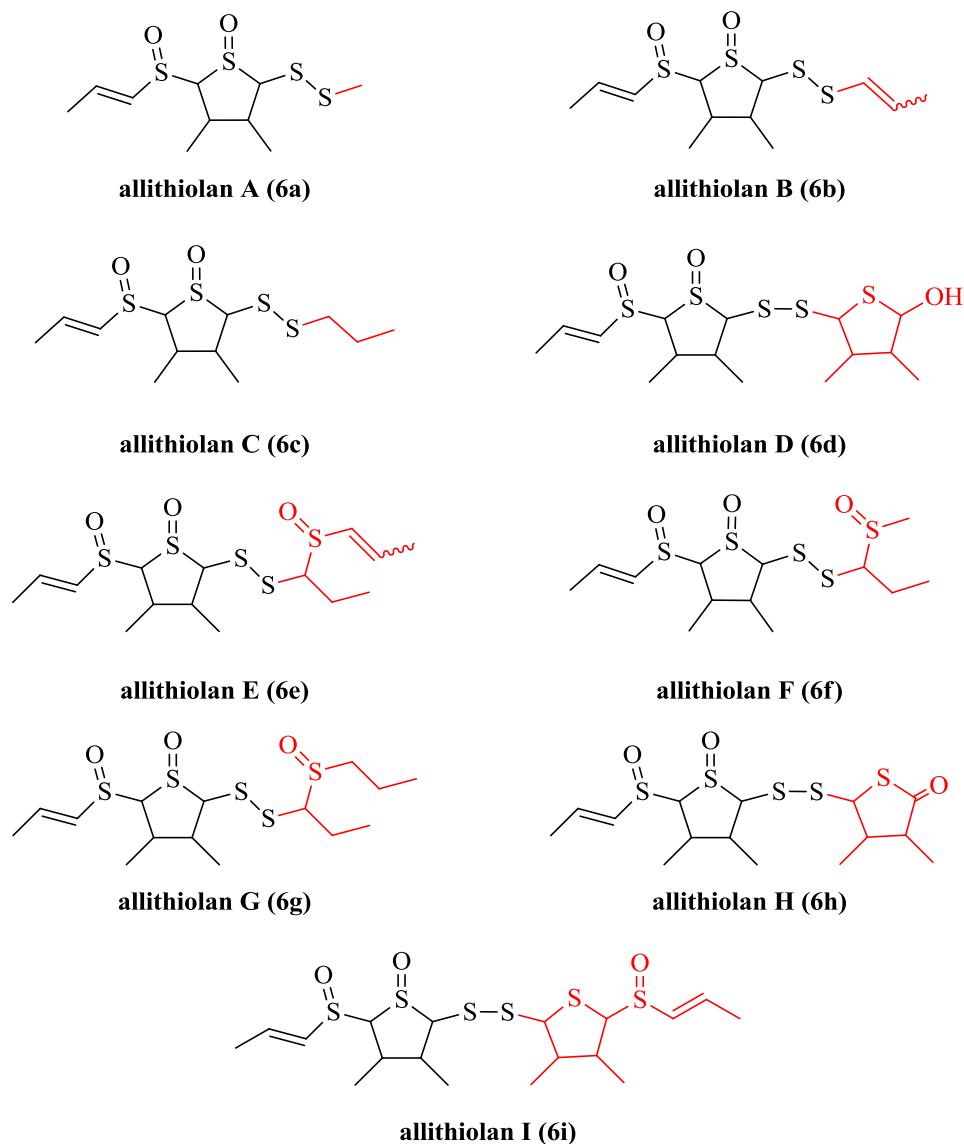
welsonin A₂ (**5b**)

Obrázek 12: Struktura welsoninů (**5**).

Podobně jako onionin A (**3a**), prokázal welsonin A₁ (**5a**) potencionální protirakovinnou aktivitu. Účinkům welsoninu (**5a**) byly podrobeny makrofágy M2 získané z lidských buněk. Výsledkem bylo potencionální potlačení proliferace nádorových buněk, jelikož welsonin A₁ dokáže inhibovat polarizaci těchto makrofágů.³³

2.5 Allithiolany

Další skupinou látek, u kterých zatím jejich biologické účinky nebyly zkoumány, jsou allithiolany. Sloučeniny byly objeveny poměrně nedávno v roce 2018 Kubcem a kol.³⁴ a v jejich názvu je zohledněn latinský název česnekovitých rostlin (rod *Allium*) a také přítomnost thiolanového jádra ve struktuře. Právě tato publikace je doposud jediným zdrojem zabývajícím se allithiolany. Dohromady bylo popsáno devět skupin s označením allithiolany A–I a patří do seskupení strukturně příbuzných derivátů 3,4-dimethylthiolan-S-oxidu. Struktury všech izolovaných allithiolanů jsou znázorněny na **Obrázku 13**.



Obrázek 13: Struktura allithiolanů A–I (6).³⁴

Z **Obrázku 13** je patrné, že všechny allithiolany mají společný strukturální základ, který je složen z 3,4-dimethylthiolanového kruhu s navázanou (*E*)-1-propenylsulfenovou skupinou. Od sebe se odlišují navázaným postranním řetězcem, který se připojuje k disulfanylové skupině. Velký počet chirálních uhlíků a s tím spojený počet stereoizomerů výrazně komplikují izolaci jednotlivých skupin allithiolanů.

2.5.1 Změna chuti zpracované cibule

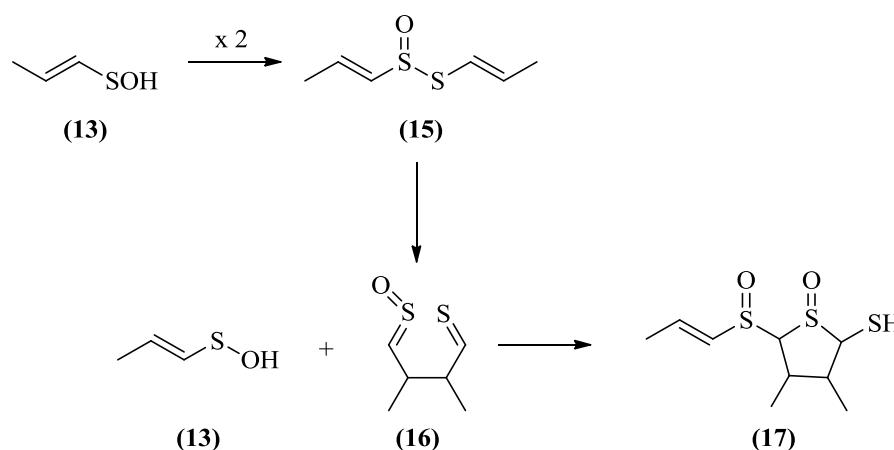
Allithiolany byly objeveny při hledání látek, které jsou zodpovědné za hořknutí cibule během jejího technologického zpracování. Výrazná hořká chuť se objevuje zcela spontánně

již po několika minutách od narušení rostlinného pletiva, např. krájením. Produkci hořkých látek v cibuli se v minulosti zabývaly pouze dvě vědecké práce.^{35,36}

Vznik allithiolanů při zpracování cibule může být velkým technologickým problémem zejména pro větší producenty cibule. Mechanismus potlačení tvorby allithiolanů (6) v cibuli, a tedy zamezení vzniku hořké chuti, není doposud znám.

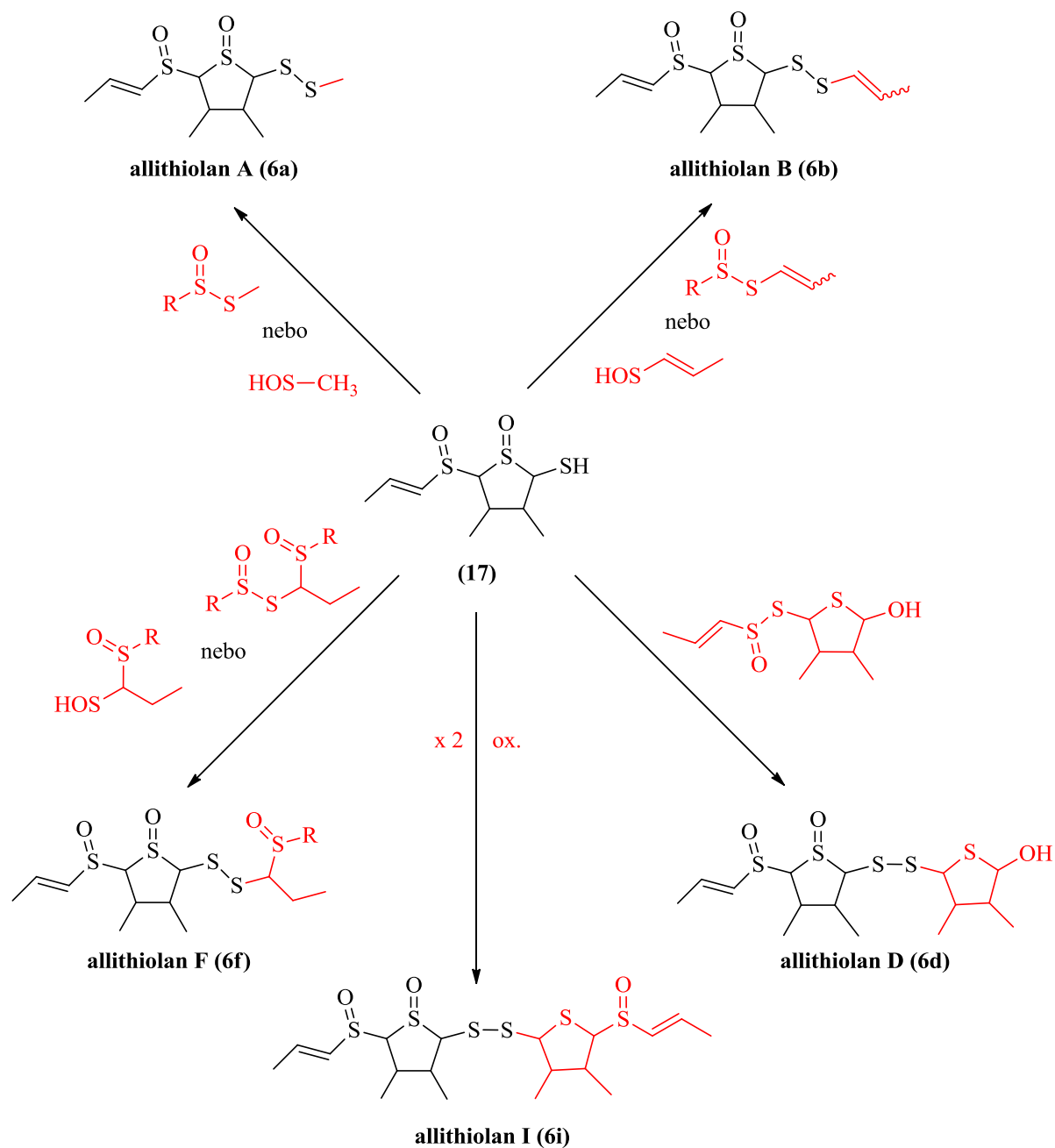
2.5.2 Mechanismus vzniku allithiolanů

Jako u většiny organosírných sloučenin je hlavním prekurzorem vzniku všech skupin allithiolanů (6) isoalliin (8). Ovšem pro tvorbu allithiolanů A (6a) a allithiolanů F (6f) je navíc nezbytná přítomnost prekurzoru methiinu (9).³⁴ Isoalliin (8) podléhá enzymově katalyzovanému rozkladu enzymem alliinasou na 1-propensulfenovou kyselinu (13). Kondenzací této kyseliny (13) se tvoří *S*-(1-propenyl)-1-propenthiosulfinát (15), který je vysoce reaktivní a samovolně se rozkládá na 2,3-dimethylbutandithial-*S*-oxid (16).^{37,38} Ten podléhá karbofilnímu ataku další molekuly 1-propensulfenové kyseliny za vzniku 3,4-dimethyl-2-(1-propenylsulfenyl)-5-sulfanylthiolan-1-oxidu (17), který lze považovat za společný meziprodukt všech skupin allithiolanů.³⁴ Celý proces je uveden na **Obrázku 14**.



Obrázek 14: První fáze vzniku allithiolanů (6).³⁴

V druhé fázi tvorby allithiolanů (6) reaguje sulfanová skupina 3,4-dimethyl-2-(1-propenylsulfenyl)-5-sulfanylthiolan-1-oxidu (17) s dalšími sloučeninami, které souběžně vznikají v cibulovém extraktu z isoalliinu (8) a methiinu (9). Vznik jednotlivých skupin allithiolanů (6) je popsán na **Obrázku 15**.



Obrázek 15: Druhá fáze tvorby allithiolanů – vznik jednotlivých skupin.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a materiály

Chemikálie

Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

acetonitril (HPLC grade), methanol (HPLC grade), diethylether (p. a.), dichlormethan (p. a.), ninhydrin (p. a.), pyridoxal-5-fosfát ($\geq 97\%$)

Acros Organics (Geel, Belgie)

cystein (99+%), α -toluensulfonylfluorid (99%)

Lachema (Brno, Česká republika)

hydroxid draselný (p. a.)

Lach-Ner (Neratovice, Česká republika)

síran amonný (p. a.), síran hořečnatý (bezvodý), dihydrogenfosforečnan draselný (p. a.), kyselina chlorovodíková (25%, p. a.), kyselina mravenčí (98%)

Penta (Praha, Česká republika)

amoniak (25–29%), glycerol bezvodý (p. a.), hydroxid sodný (p. a.), chelaton III

Rostlinný materiál

Cibule *A. cepa* (kultivar Swift, Česká republika) a česnek *A. sativum* (Čína) byly zakoupeny v místním obchodním řetězci.

Ostatní materiál

Katex IR-120 (Amberlite, H⁺ forma) – Acros Organics (New Jersey, USA), dialyzační membrána (23 mm; 12,4 kDa MWCO) – Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), centrifugační filtry (0,2 µm; 2 ml; VDF) – Watrex (Praha, ČR), membránové PTFE filtry (0,2 a 0,45 µm; ø 13 a 25 mm) – Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) a C8-SPE (10 g; 60 ml) kolonky – Supelco (Bellefonte, PE, USA).

3.2 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 byly použity analytické kolony Kinetex C-8 (100 Å; 250 × 4,6 mm; 5 µm; Phenomenex) a Kinetex phenyl-hexyl (100 Å; 250 × 4,6 mm; 5 µm; Phenomenex). Při hledání optimální separační metody byly testovány analytické kolony Kinetex C-18, F-5 a Biphenyl (100 Å; 250 × 4,6 mm; 5 µm; Phenomenex). K samotné izolaci látek byly použity preparativní kolony Kinetex C-8 (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 µm; Phenomenex) nebo Kinetex phenyl-hexyl (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 µm; Phenomenex).

Identifikace izolovaných látek byly prováděny pomocí PDA a MS (UHPLC-PDA-MS/MS) systémem složeným 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).

3.3 Gradienty používané v HPLC

V experimentální části diplomové práce byly použity následující HPLC gradienty.

METODA A

průtok	čas [min]	H ₂ O [%]	CH ₃ CN [%]
19,1 ml/min	0:00	80	20
	25:00	60	40
	50:00	20	80
	51:00	5	95
	59:00	5	95
	60:00	80	20
kolona	C-8 Kinetex (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA B

průtok	čas [min]	H ₂ O + 0,05% HCOOH [%]	CH ₃ OH + 0,05% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	45	55
	35:00	35	65
	41:00	5	95
	49:00	5	95
	50:00	45	55
kolona	Phenyl-hexyl Kinetex (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA C

průtok	čas [min]	H₂O [%]	CH₃CN [%]
19,1 ml/min	0:00	75	25
	45:00	70	30
	51:00	5	95
	59:00	5	95
	60:00	75	25
kolona	C-8 Kinetex (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA D

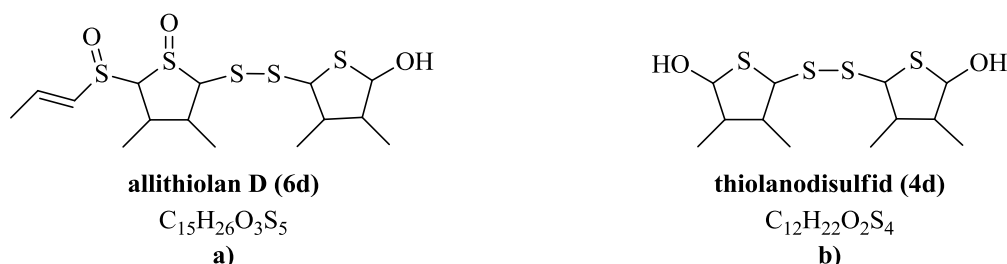
průtok	čas [min]	H₂O + 0,05% HCOOH [%]	CH₃OH + 0,05% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	75	25
	45:00	70	30
	51:00	5	95
	59:00	5	95
	60:00	75	25
kolona	C-8 Kinetex (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

METODA E

průtok	čas [min]	H₂O + 0,05% HCOOH [%]	CH₃OH + 0,05% HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	40	60
	49:00	33	67
	50:00	5	95
	59:00	5	95
	60:00	40	60
kolona	C-8 Kinetex (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)		

3.4 Izolace sloučenin z modelových reakčních systémů

Experimentální část této diplomové práce popisuje izolaci vybraných skupin organosírných sloučenin, které ve své molekule obsahují thiolanové jádro. Jedná se o skupinu allithiolanů D (**Obrázek 16a**) a v odborné literatuře dosud nepopsanou skupinu thiolanodisulfidů (**Obrázek 16b**).



Obrázek 16: Struktura: **a)** allithiolanu D (**6d**), **b)** thiolanodisulfidu (**4d**).

Obě skupiny výše zmíněných sloučenin vznikají zcela přirozeně již po několika minutách po narušení cibulového pletiva. Z důvodu komplexnosti cibulového extraktu byl postup izolace modifikován. Z cibule byla izolována pouze směs prekurzorů organosírných látek (tj. *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, kapitola 2.3), která následně reagovala s enzymem alliinase izolovaným z česneku. Zásadní rozdíl při využití česnekové alliinasy namísto alliinasy z cibule spočívá v nepřítomnosti LFS. Veškeré množství prekurzorů organosírných sloučenin tak zreaguje za vzniku sloučenin vybraných pro izolaci (využití cibulové alliinasy by vedlo k nežádoucí produkci LF, viz kapitola 2.3.2).

3.4.1 Izolace alliinasy

K izolaci alliinasy bylo použito 453 g česneku kuchyňského (*Allium sativum*). Celý proces byl z důvodu zajištění stability izolovaného enzymu prováděn při teplotě 0–4 °C. Oloupané stroužky česneku byly rozmixovány pomocí kuchyňského mixéru a smíchány se 400 ml vychlazeného roztoku 0,1M KH₂PO₄. Tento extrakční pufr se skládal z 13,6 g KH₂PO₄, 1,5 g chelatonu III, 87 g toluensulfonylfluoridu, 0,5 g cysteinu a 5 mg pyridoxal-5-fosfátu. Ke vzniklé směsi bylo přilito 100 ml glycerolu a pH celého roztoku bylo upraveno na 7,5 pomocí nasyceného roztoku KOH. Získaný česnekový homogenát byl přefiltrován za sníženého tlaku přes Büchnerovu nálevku s plátnem. Odstředěním veškerého filtrátu (5000 rpm; 15 min; 3 °C; 475 ml) bylo získáno 450 ml supernatantu. K supernatantu,

umístěného do ledové lázně, bylo postupně a za stálého míchání přidáno 185 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Celá směs byla za stálého chlazení ledem míchána dalších 60 minut. Následovalo odstředění (5000 rpm; 20 min; 3 °C) a slití supernatantu. Precipitát byl rozpuštěn v minimálním objemu extrakčního pufru a převeden do dialyzačního střívka (23 mm; 12,4 kDa MWCO).

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

3.4.2 Izolace *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů

K 500 g lyofilizované cibule byly přidány 4 l H_2O a 4 ml 35% HCl. Celá směs se nechala 20 min povařit, poté pomocí ledu byla ochlazená na laboratorní teplotu. Po vychladnutí byl celý homogenát přefiltrován přes plátno a získaný filtrát odstředěn (5000 rpm). Hodnota pH supernatantu byla upravena pomocí koncentrované HCl z pH 4,4 na 3,5.

Vzorek upravený výše popsaným postupem byl nanesen na skleněnou kolonu naplněnou katexem (výška \times šířka sloupce, 18 \times 5 cm, Amberlite IR-120). Po nanesení vzorku a promytí vodou byly aminokyseliny eluovány 0,2 M NH_4OH . Frakce, které poskytovaly pozitivní reakci s ninhydrinem (přítomnost aminokyselin byla potvrzena i HPLC/PDA analýzou) byly spojeny a pomocí aktivního uhlí zbaveny nežádoucího žlutého zbarvení. Směs byla zfiltrována přes filtrační papír KA 4 a skladována při teplotě -28 °C. Po následné lyofilizaci byly získány hrubé krystaly prekurzorů organosírných sloučenin, tj. isoalliinu (**8**), methiinu (**9**) a propinu (**10**) (**Obrázek 5**). Získaná směs obsahovala také další aminokyseliny přítomné v cibuli, které však nebylo nutné identifikovat. Alliinasa, která byla v dalším kroku využita, katalyzuje rozklad pouze *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, ostatní aminokyseliny zůstanou při extrakci ve vodné fázi.

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

3.4.3 Příprava extraktu

K modelové reakci bylo použito 40 g „nečistého isoalliinu“ rozpuštěného ve 400 ml 0,5M KH_2PO_4 (pH = 7,0; 25 $\mu\text{mol/l}$ pyridoxal-5-fosfát; 10% glycerol). Ke vzniklému roztoku byly přidány 4 g česnekové alliinasy, které byly rozpuštěny v 800 ml stejného extračního pufru

(0,5M KH_2PO_4). Směs byla ponechána 4 hodiny za mírného míchání, aby v ní proběhly všechny potřebné enzymatické reakce. Poté 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“ s 10 g česnekové alliinasy.

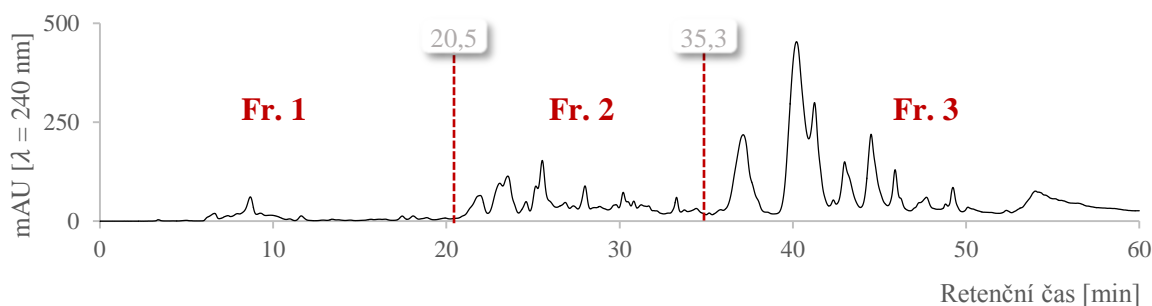
Před samotnou HPLC analýzou byl získaný extrakt ještě přečištěn pomocí SPE kolonky. Vzorek byl rozpuštěn v 60 ml CH_3CN a následným protečením přes kolonku C8-SPE (Supelco; 10 g; 60 ml) zbaven látek, které by se nevratně sorbovaly na chromatografickou kolonu. Po odpaření CH_3CN pomocí RVO ($t < 30$ °C)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

3.4.4 Frakcionace extraktu

Cílem dalšího kroku bylo optimalizovat metodu pro izolaci vybraných skupin sloučenin ze získaného extraktu metodou preparativní HPLC/PDA na reverzní fázi. K tomuto účelu bylo využito několik chromatografických kolon (C-8, C-18, F-5, phenyl-hexyl a biphenyl; Phenomenex).

Příprava HPLC vzorku ze získaného extraktu

Extrakt z modelové reakce (4,16 g) byl rozpuštěn ve 32 ml $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; 2/1) a byl tak získán vzorek o koncentraci 130 mg/ml. Následovala filtrace přes membránový filtr (PTFE; $0,45$ μm ; \varnothing 25 mm). Poté byly pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda A**, nástřikový objem 900 μl) opakovaně jímány celkem 3 frakce, které znázorňuje **Obrázek 17**.

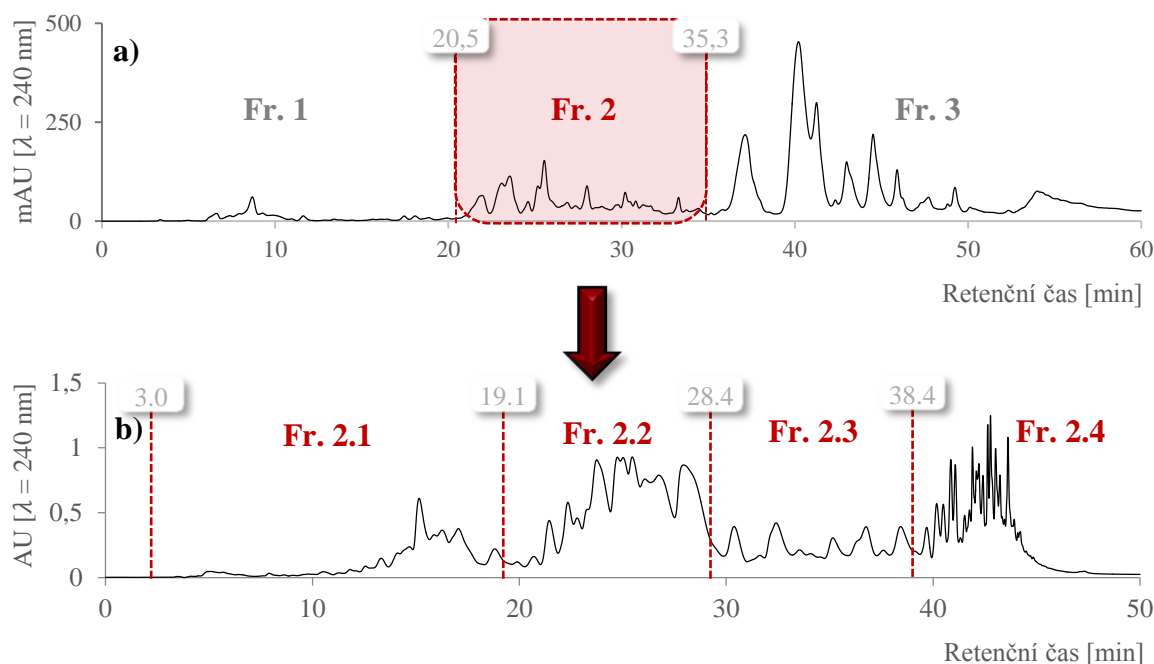


Obrázek 17: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu modelové reakce – úvodní frakcionace (**Metoda A**).

Jednotlivé získané frakce byly pomocí RVO ($t < 30$ °C) zbaveny CH_3CN a poté extrahovány metodou přímé extrakce s použitím DEE (v/v; DEE/vzorek; 1/5). Pomocí MgSO_4 byly vzorky přesušeny, zfiltrány přes Hirschovu nálevku a RVO ($t < 30$ °C) zbaveny DEE. Takto získané extrakty jednotlivých frakcí byly před dalšími analýzami uchovány při teplotě -28 °C.

Frakce 2

Extrakt *Frakce 2* (1,46 g) byl rozpuštěn ve 12 ml okyseleného roztoku směsi $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; $\text{CH}_3\text{OH} + 0,05\% \text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{HCOOH}$; 2/1). Získaný vzorek o koncentraci 120 mg/ml byl zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; 0,45 μm ; \varnothing 13 mm) a následně preparativní PH6-HPLC/PDA rozdělen na 4 frakce s označením *Fr. 2.1–2.4* (**Obrázek 18**, **Metoda B**, nástřikový objem 900 μl).



Obrázek 18: PH6-HPLC/PDA chromatogram extraktu:

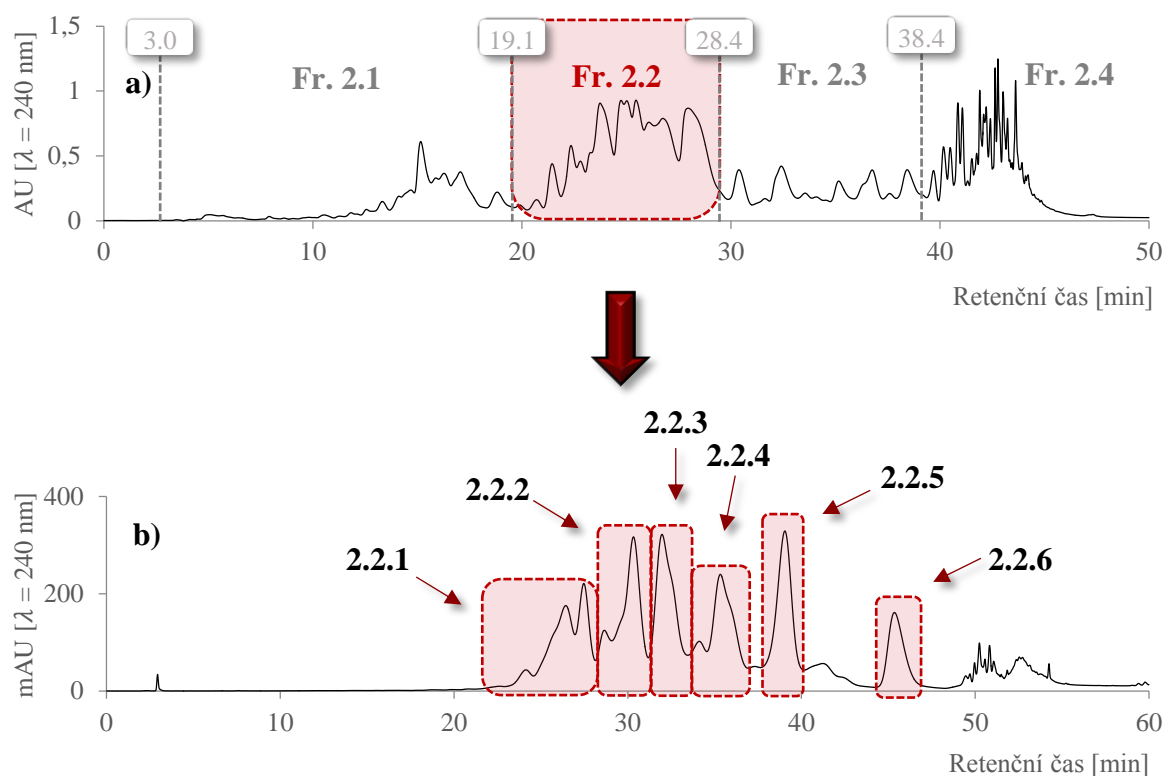
- a) modelové reakce (**Metoda A**),
 b) *frakce 2* (**Metoda B**).

Jednotlivé *frakce 2.1–2.4* byly pomocí RVO ($t < 30\text{ °C}$) zbaveny CH_3CN . Po odpaření bylo pH vzorků upraveno na 7 pomocí 10% NaHCO_3 . Následovala přímá extrakce DEE (v/v; DEE/vzorek; 1/5), přesušení vzorků MgSO_4 a přefiltrování přes Hirschovu nálevku. Po odpaření veškerého DEE na RVO ($t < 30\text{ °C}$) byly získané extrakty jednotlivých *frakcí 2.1–2.4* před dalšími analýzami uchovávány při teplotě -28 °C .

Frakce 2.2

Pro *frakci 2.2* byla optimalizována metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 19, Metoda C**). Extrakt *frakce 2.2* (227 mg) byl naředěn $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; 1/2) na koncentraci 38 mg/ml a zfiltrován pomocí membránového filtru (PTFE; $0,45\ \mu\text{m}$; $\varnothing\ 13\ \text{mm}$). Preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda C**, nástřikový objem $500\ \mu\text{l}$) bylo jímáno celkem 6 frakcí označených jako 2.2.1–2.2.6 (viz **Obrázek 19**).

Jednotlivé frakce byly pomocí RVO ($t < 30\text{ °C}$) zbaveny CH_3CN a extrahovány $2 \times$ DEE (v/v; vzorek/DEE; 5/2), přesušeny bezvodým MgSO_4 , zfiltrovány přes Hirschovu nálevku a zcela odpařeny na RVO. Před dalšími analýzami byly uchovány při -28 °C .



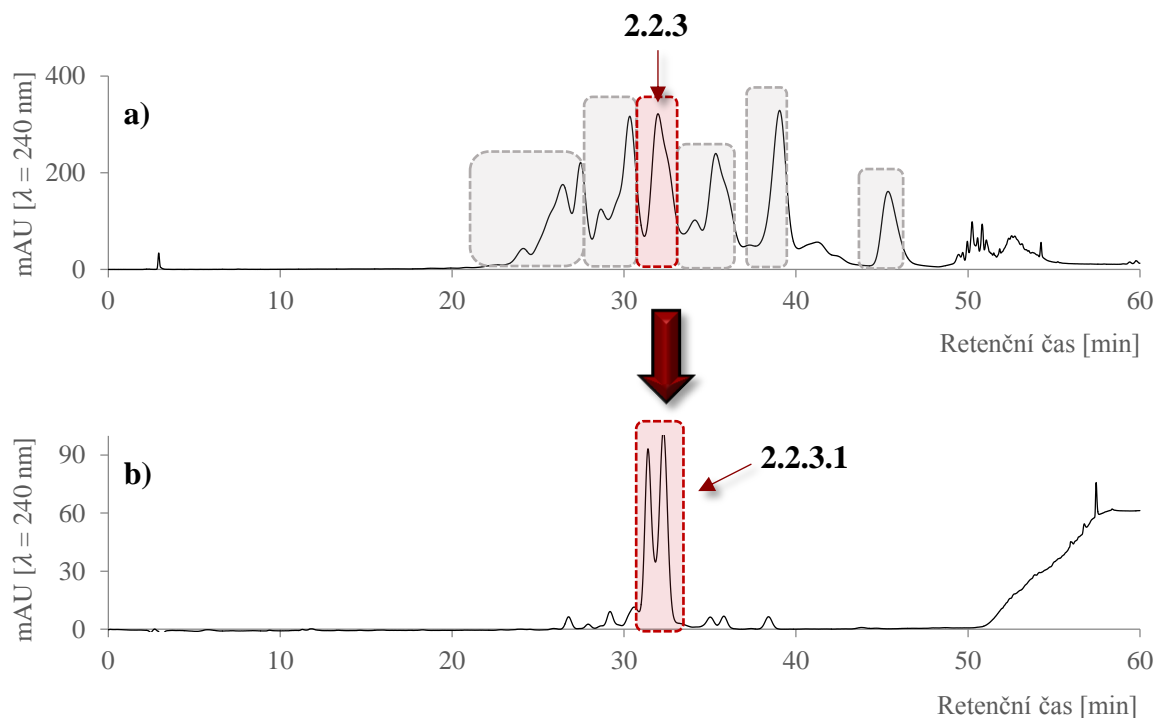
Obrázek 19: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:

- a) *frakce 2 (Metoda B)*,
- b) *frakce 2.2 (Metoda C)*.

Frakce 2.2.3

Extrakt *frakce 2.2.3* (1,46 g) byl naředěn rozpuštěním v okyseleném roztoku $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; $\text{CH}_3\text{OH} + 0,05\% \text{HCOOH}/\text{H}_2\text{O} + 0,05\% \text{HCOOH}$; 2/3) a zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; $0,45 \mu\text{m}$; $\varnothing 13 \text{mm}$). Poté byla pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda D**, nástřikový objem $700 \mu\text{l}$) opakovaně jímána *frakce 2.2.3.1* (viz **Obrázek 20**).

U najímané *frakce 2.2.3.1* bylo po odpaření CH_3CN (RVO, $t < 30 \text{ }^\circ\text{C}$) pH upraveno na hodnotu 7 pomocí $10\% \text{NaHCO}_3$. Před dalším zpracováním byla *frakce 2.2.3.1* uchovávána při teplotě $-28 \text{ }^\circ\text{C}$.



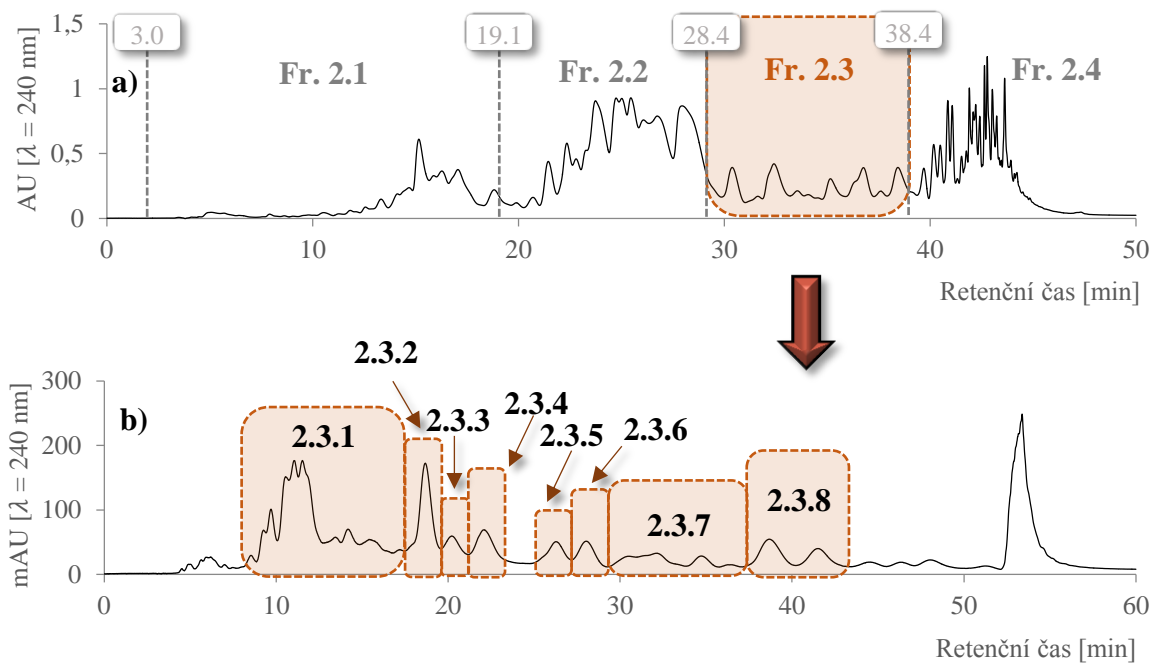
Obrázek 20: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:

- a) *frakce 2.2 (Metoda C),*
- b) *frakce 2.2.3 (Metoda D).*

Frakce 2.3

Pro *frakci 2.3* byla optimalizována metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 21, Metoda E**). *Frakce 2.3* (123 mg) byla naředěna 8 ml roztoku CH₃OH/H₂O (v/v; CH₃OH + 0,05% HCOOH/H₂O + 0,05% HCOOH; 3/1). Získaný vzorek o koncentraci 15 mg/ml byl následně zfiltrován pomocí membránového filtru (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm). S použitím preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda E**, nástřikový objem 600 μl) bylo jímáno celkem 8 frakcí, které byly označeny 2.3.1–2.3.8 (viz **Obrázek 21**).

Jednotlivé frakce byly pomocí RVO ($t < 30$ °C) zbaveny CH₃CN, pH vzorků bylo vyrovnáno na 7 pomocí 10% NaHCO₃ a dále byly před dalším zpracováním uchovávány při teplotě –28 °C.



Obrázek 21: C8-HPLC/PDA chromatogram extraktu:

- a) *frakce 2 (Metoda B),*
- b) *frakce 2.3 (Metoda D).*

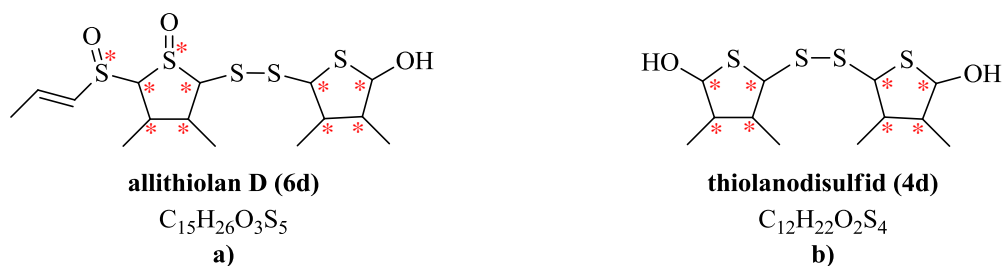
4 Výsledky

Allithiolany D a bithiolanové polysulfidy patří mezi sloučeniny, které v cibuli přirozeně vznikají narušením rostlinného pletiva. V případě allithiolanů se jejich přítomnost v cibulovém homogenátu projeví výrazně hořkou chutí, naopak bithiolanové polysulfidy přispívají spíše pozitivními sensorickými vlastnostmi k celkové chuti zpracované cibule.

HPLC izolace obou výše zmíněných skupin organosírných sloučenin, tj. allithiolanů D a bithiolanových polysulfidů, byla hlavním cílem této práce. Standardy těchto látek totiž nejsou komerčně dostupné.

Z důvodu komplexnosti cibulového extraktu byly sloučeniny izolovány s využitím modelových směsí. K těmto účelům byla použita česneková alliinasa, která katalyzuje enzymový rozklad isoalliinu přímo na organosírné sloučeniny bez současné tvorby těkavého a pro tuto práci nežádoucího LF (14). Experimentální část také popisuje izolaci tzv. „nečistého isoalliinu“, který je směsí všech *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů vyskytujících se v cibuli (tj. isoalliinu, methiinu a propiinu) a představuje značnou úsporu času v porovnání s izolací čistého isoalliinu (8). Modelová reakce byla ponechána 4 hodiny, aby mohly proběhnout všechny potřebné enzymatické reakce. Po 4 hodinách směs vykazovala intenzivní hořkou chuť, která je typická pro allithiolany. Získaná šťáva byla extrahována pomocí DEE a dále zpracována dle postupu popsáno v kapitole 3.4. Po naředění byl získaný extrakt s použitím preparativní C8-HPLC/PDA rozdělen na 3 frakce (**Obrázek 23, Metoda A**).

Izolované allithiolany D (**Obrázek 16a**) a thiolanodisulfidy (**Obrázek 16b**) jsou sloučeniny, které díky své struktuře obsahují velké množství chirálních center (**Obrázek 22**) a tudíž mohou tvořit celou řadu stereoizomerů (allithiolan D celkem 10 chirálních center, tj. 1024 stereoizomerů; thiolanodisulfid 8 chirálních center, tj. 256 stereoizomerů). Tato skutečnost značně komplikovala jejich izolaci, jelikož stereoizomery koeluovaly s dalšími sloučeninami přítomnými v extraktu.

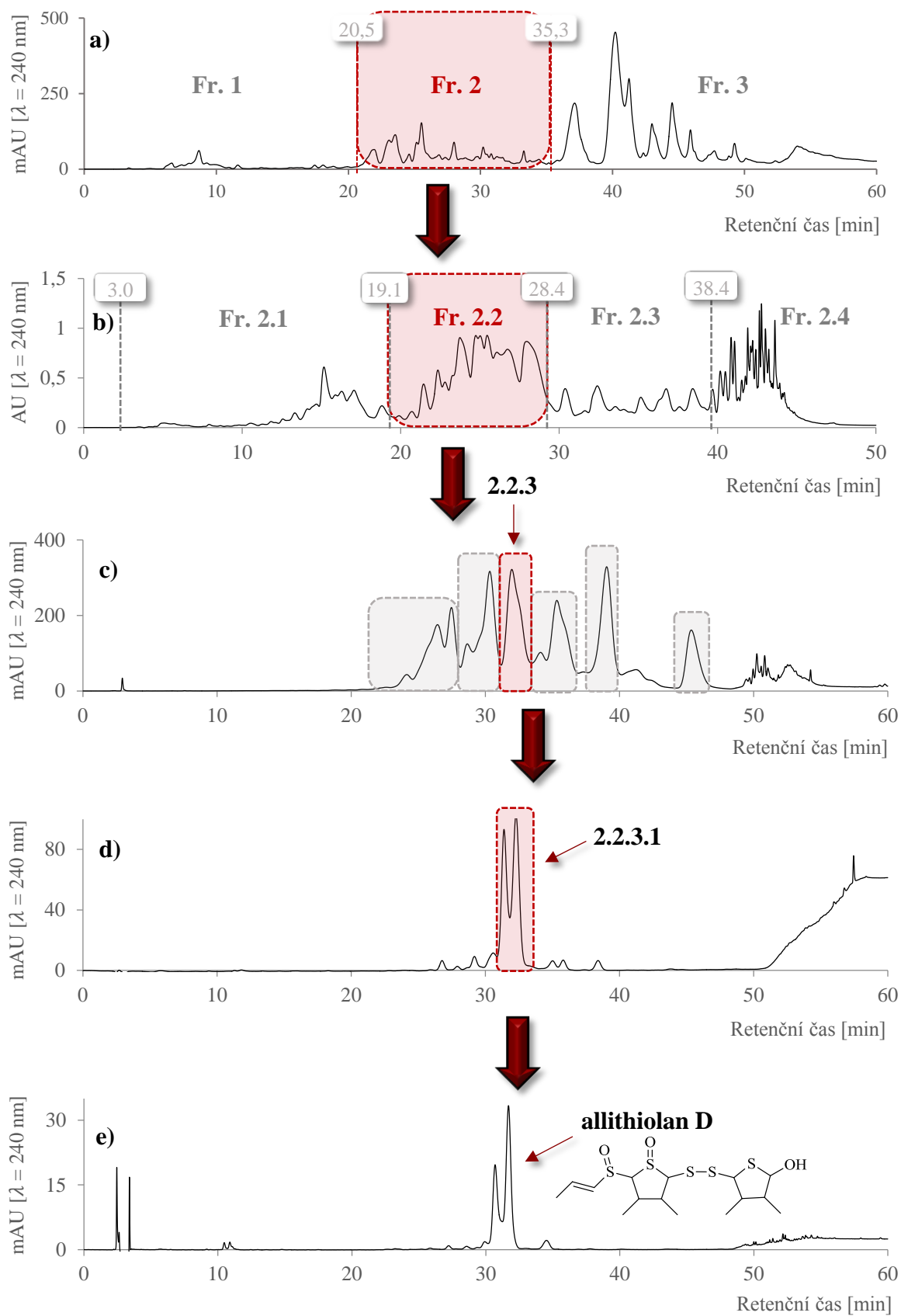


Obrázek 22: Centra chiralita: **a)** allithiolanu D, **b)** thiolanodisulfidu.

4.1 Izolace allithiolanu D

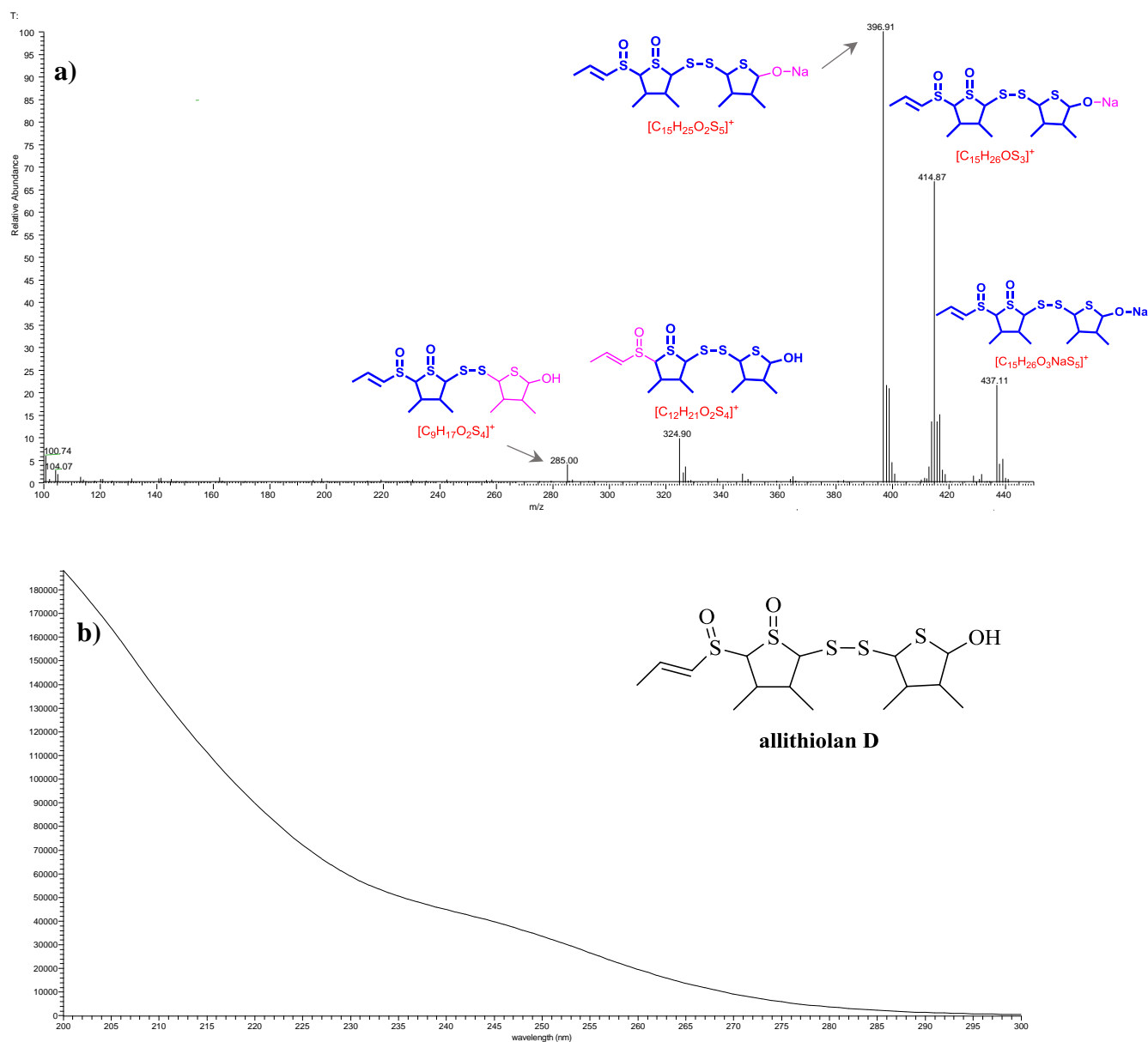
Allithiolany D jsou sloučeniny s elementárním složením C₁₅H₂₆O₃S₅ ([M+H]⁺ = 415,06 Da). Na základě dat z HPLC/MS analýzy jednotlivých frakcí bylo zjištěno, že allithiolany D se vyskytují v extraktu modelové reakce ve *frakci 2* (**Obrázek 23a**). *Frakce 2* byla proto pomocí preparativní PH6-HPLC rozdělena na 4 podfrakce, které získaly označení 2.1–2.4 (**Obrázek 23b**). Tyto frakce byly analyzovány metodou HPLC/MS, která potvrdila přítomnost allithiolanu D ve *frakci 2.2* (**Obrázek 23b**). Pro *frakci 2.2* byla dále optimalizována C8-HPLC metoda kterou bylo získáno celkem 6 podfrakcí s označením 2.2.1–2.2.6 (**Obrázek 23c**). HPLC/MS analýza potvrdila přítomnost allithiolanu D ve *frakci 2.2.3* (**Obrázek 23c**). Z *frakce 2.2.3* byla s využitím C8-HPLC metody izolována frakce s označením 2.2.3.1 (**Obrázek 23d**), u které HPLC/MS analýza potvrdila přítomnost několika stereoisomerů allithiolanu D. HPLC chromatogramy celého procesu izolace allithiolanu D jsou uvedeny na **Obrázku 23**.

Celkové množství izolované *frakce 2.2.3.1* zatím není známo. Z důvodu vyšší stability byl ze vzorku odpařen acetonitril (RVO, *t* < 30 °C) a vzorek byl takto uchován při –28 °C.



Obrázek 23: HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** modelové reakce (**Metoda A**), **b)** frakce 2 (**Metoda B**), **c)** frakce 2.2 (**Metoda C**), **d)** frakce 2.2.3 (**Metoda D**), **e)** frakce 2.2.3.1.

Hmotnostní (**Obrázek 24a**) i UV spektrum (**Obrázek 24b**) izolované frakce 2.2.3.1 jsou v plném souladu s již publikovanými výsledky Kubce a kol.³⁴ a potvrzují tak strukturu odpovídající allithiolanu D.



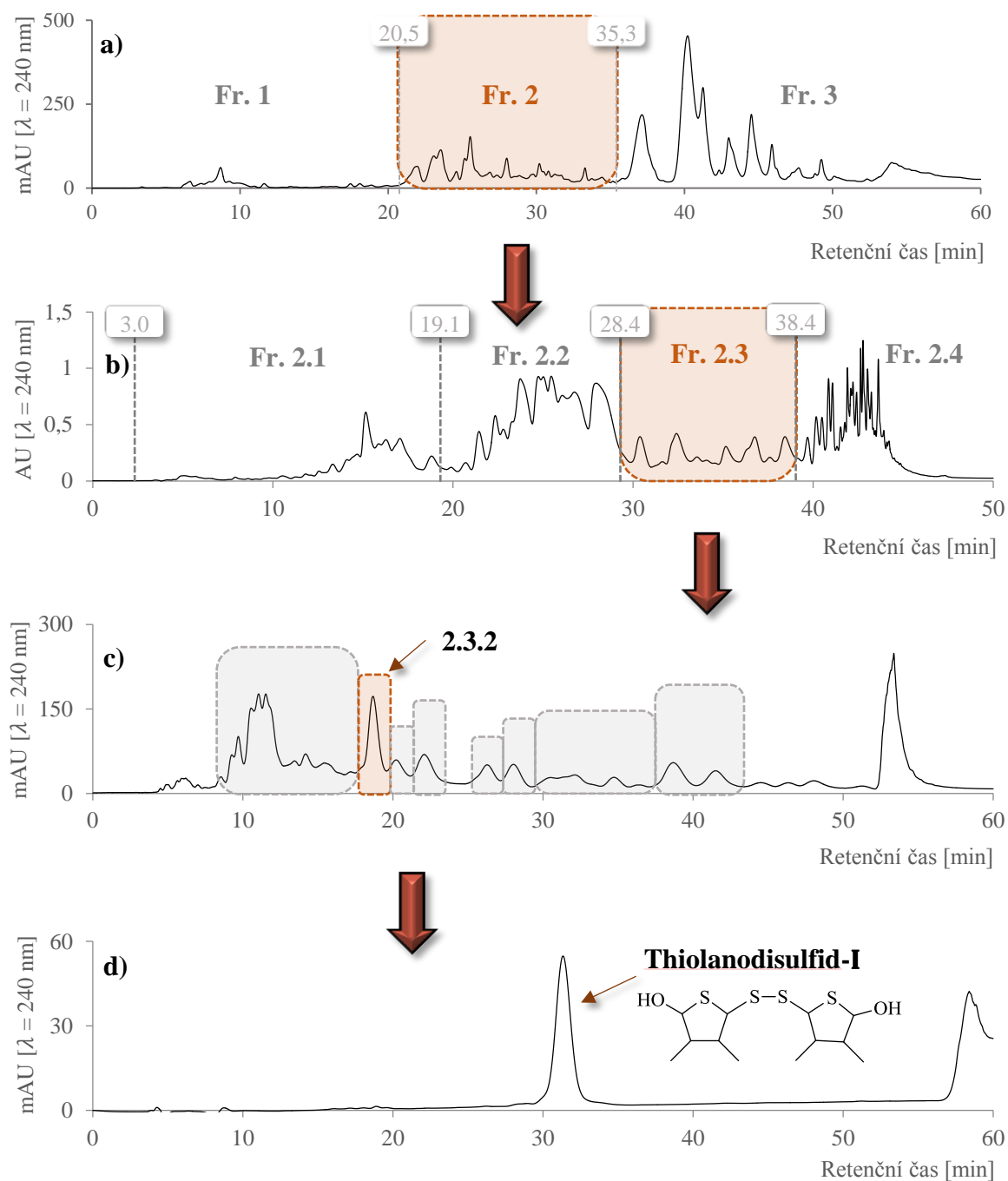
Obrázek 24: Frakce 2.2.3.1: **a)** MS spektrum,
b) UV spektrum.

4.2 Izolace thiolanodisulfidů

Thiolanodisulfidy jsou sloučeniny s elementárním složením $C_{12}H_{22}O_2S_4$ ($[M+H]^+ = 348,95$ Da). Na základě dat z HPLC/MS analýzy jednotlivých frakcí bylo zjištěno, že thiolanodisulfidy se nacházejí ve *frakci 2* (**Obrázek 25a**). *Frakce 2* byla proto pomocí preparativní PH6-HPLC/PDA rozdělena na 4 podfrakce s označením 2.1–2.4 (**Obrázek 25b**). HPLC/MS analýza získaných frakcí prokázala přítomnost thiolanodisulfidů ve *frakci 2.3* (**Obrázek 25b**). Pro závěrečnou fázi izolace thiolanodisulfidů byla pro *frakci 2.3* optimalizována C8-HPLC metoda, kterou bylo získáno celkem 8 podfrakcí (označení 2.3.1–2.3.8; **Obrázek 25c**). Pro ověření čistoty získaných frakcí byla provedena HPLC/MS analýza, která několik stereoizomerů thiolanodisulfidů identifikovala ve *frakcích 2.3.2–2.3.4*, a potvrdila tak vysokou čistotu izolovaných sloučenin. Na základě HPLC/MS analýz byly thiolanodisulfidy v celkem 3 frakcích nesoucích označení 2.3.2, 2.3.3 a 2.3.4.

Thiolanodisulfid-I

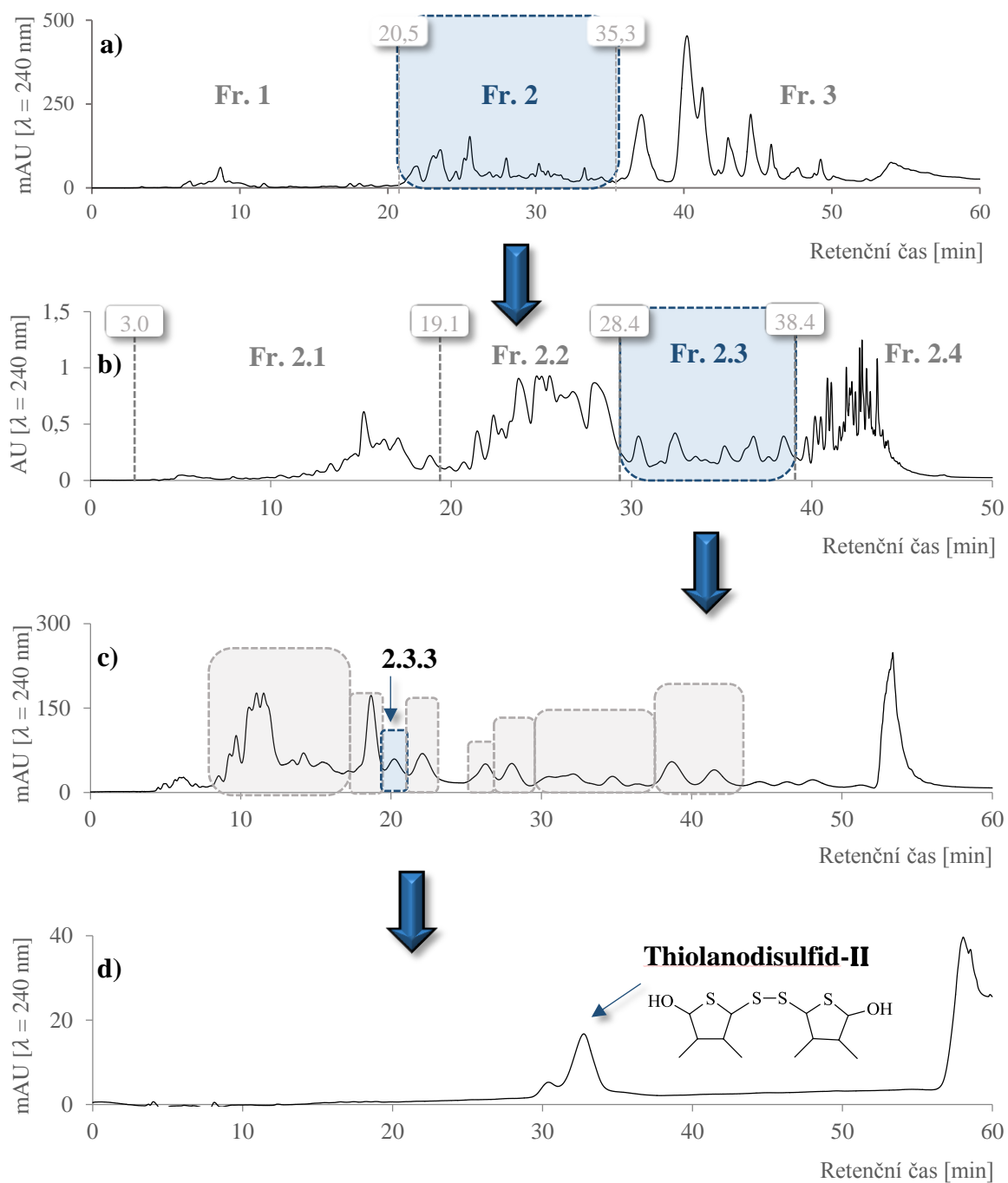
První frakcí, ve které byl detekován stereoizomer thiolanodisulfidu byla *frakce 2.3.2* (**Obrázek 25c**). Získaná frakce obsahovala stereoizomer thiolanodisulfidu, který byl označen jako thiolanodisulfid-I (**Obrázek 25d**). Celý postup izolace thiolanodisulfidu-I je detailně znázorněn na **Obrázku 25**.



Obrázek 25: HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** modelové reakce (**Metoda A**), **b)** frakce 2 (**Metoda B**), **c)** frakce 2.3 (**Metoda E**), **d)** frakce 2.3.2 (**Metoda E**).

Thiolanodisulfid-II

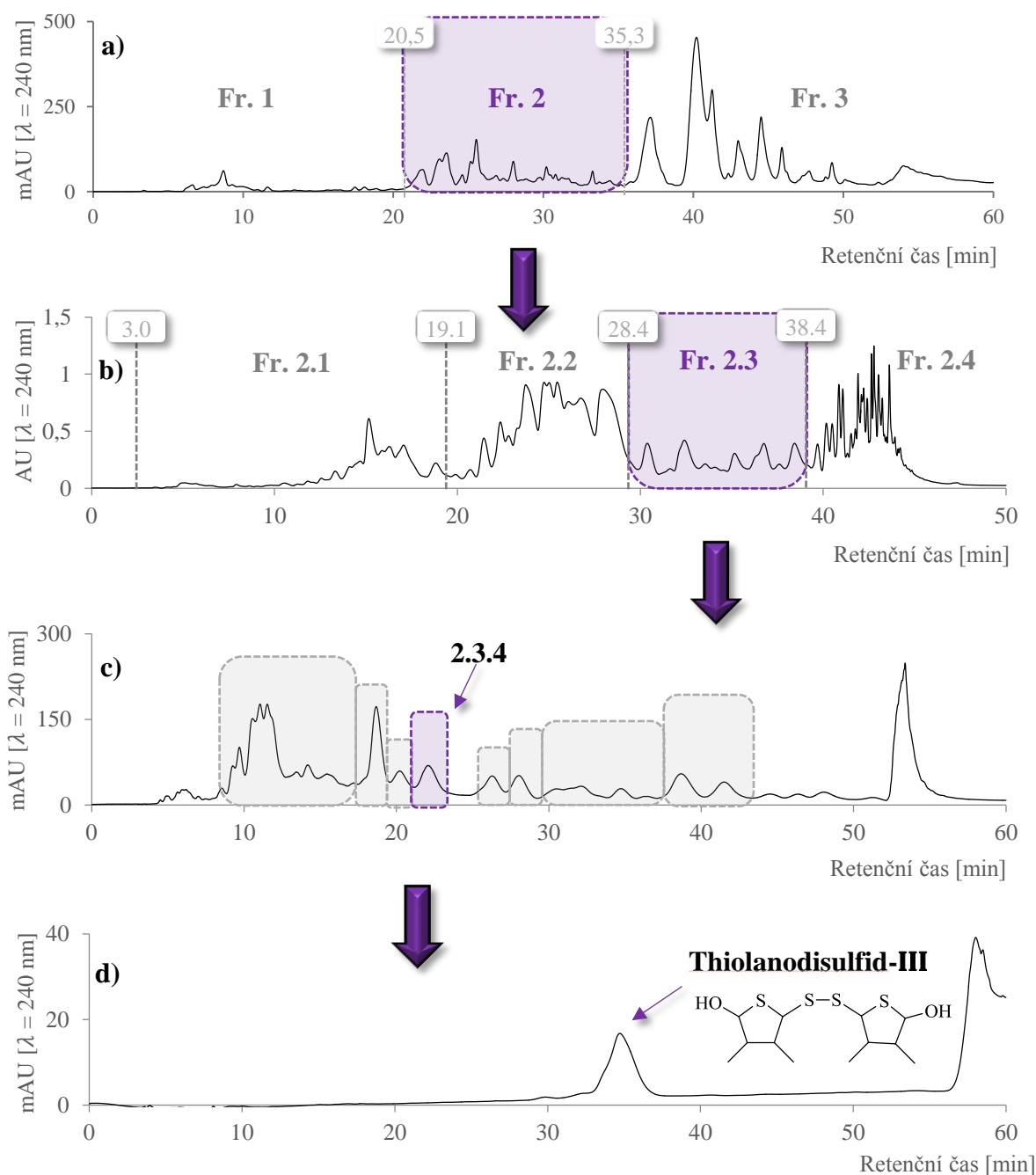
Druhou frakcí, ve které byl detekován stereoizomer thiolanodisulfidu byla *frakce 2.3.3* (**Obrázek 26c**). Frakce obsahující stereoizomer thiolanodisulfidu, byla označena jako thiolanodisulfid-II (**Obrázek 26d**). Postup izolace thiolanodisulfidu-II je detailně znázorněn na **Obrázku 26**.



Obrázek 26: HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** modelové reakce (**Metoda A**), **b)** frakce 2 (**Metoda B**), **c)** frakce 2.3 (**Metoda E**), **d)** frakce 2.3.3 (**Metoda E**).

Thiolanodisulfid-III

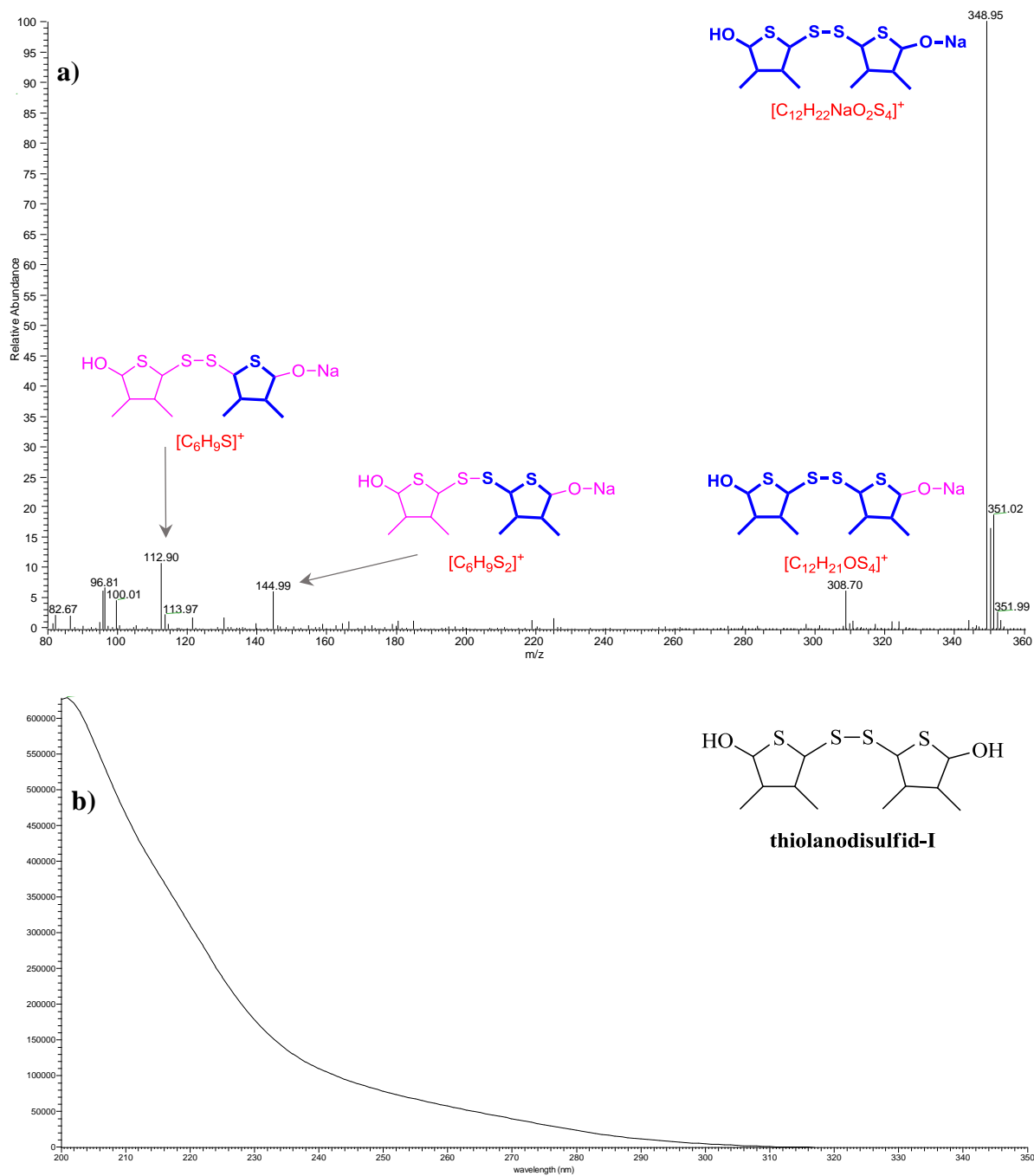
Poslední frakcí, ve které byl detekován stereoizomer thiolanodisulfidu byla *frakce 2.3.4* (**Obrázek 27c**). Získaná frakce obsahující stereoizomer thiolanodisulfidu byla označena jako thiolanodisulfid-III (**Obrázek 27d**). Celkový postup izolace thiolanodisulfidu-III je detailně znázorněn na **Obrázku 27**.



Obrázek 27: HPLC/PDA chromatogram extraktu: **a)** modelové reakce (**Metoda A**), **b)** frakce 2 (**Metoda B**), **c)** frakce 2.3 (**Metoda E**), **d)** frakce 2.3.4 (**Metoda E**).

Podobně jako u izolovaného allithiolanu D není zatím známé celkové množství izolovaných thiolanodisulfidů I–III. Z důvodu vyšší stability byl ze vzorků odpařen acetonitril (RVO, $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) a vzorky byly takto uchovány při $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

HPLC/MS analýza potvrdila ve všech frakcích, tj. thiolanodisulfidů I–III, očekávanou hmotu $[\text{M}+\text{H}]^+ = 348,95\text{ Da}$, která odpovídá elementárnímu složení thiolandisulfidu ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}_4$; **Obrázek 28**). HPLC/PDA i HPLC/MS analýza také potvrdila vysokou čistotu všech izolovaných frakcí. K přesnému určení struktury jednotlivých stereoizomerů bude nutné provést NMR analýzu. MS spektrum thiolanodisulfidu-I, resp. UV-spektrum, je uvedeno na **Obrázku 28a**, resp. **28b**. Hmotnostní spektra zbylých stereoizomerů thiolanodisulfidů byla obdobná. Izolace této sloučeniny nebyla dosud publikována a její spektrum tak není možné porovnat s žádnými publikovanými daty.



Obrázek 28: Frakce 2.3.2: **a)** MS spektrum,

b) UV spektrum.

5 Diskuze

Tato práce se zabývala izolací poměrně nedávno objevených organosírných sloučenin. Bisthiolanové polysulfidy byly objeveny teprve v roce 2021.³¹ Podobně jsou na tom allithiolany, které byly objeveny v roce 2018 vědeckou skupinou Kubce a kol.³⁴, kteří ve své publikaci popisují izolaci a strukturní charakterizaci těchto sloučenin. Allithiolany lze zařadit mezi technologicky nežádoucí sloučeniny, protože způsobují hořknutí cibule při jejím zpracování.

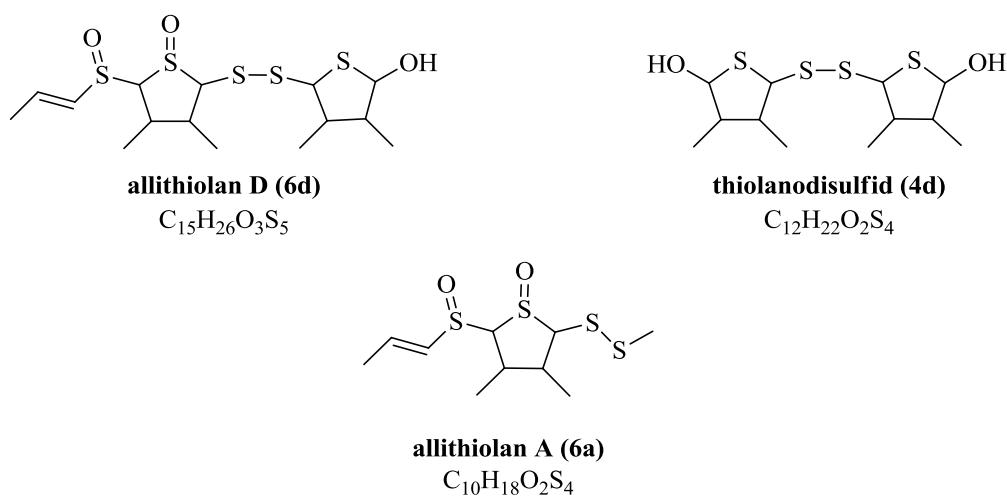
V bakalářské práci se podařilo vyvinout postup izolace allithiolanů A (**6a**) přímo z extraktu homogenizované cibule, který byl na rozdíl od modelových reakcí časově i ekonomicky výhodnější. Mínusem tohoto postupu ovšem byla přítomnost velkého množství skupin organosírných sloučenin, které výrazně komplikovaly izolaci vybraných látek. Z tohoto důvodu byly pro izolaci allithiolanu D a thiolanodisulfidu využity modelové reakční systémy. K těmto modelovým reakcím autoři^{31, 34} používali čistý isoalliin (**8**) a methiin (**9**), které nechali zreagovat s enzymem alliinase získaným z česneku kuchyňského, aby se zamezilo vzniku LF. Úskalí tohoto postupu spočívá v získání jednotlivých *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, zejména isoalliinu (**8**), který není komerčně dostupný a jeho syntéza je značně komplikovaná. K izolaci hlavního prekursoru isoalliinu (**8**) přímo z cibule se využívá lyofilizovaný cibulový prášek a mnohonásobně opakovaná izolace ionexovou chromatografií. Tento postup je velmi časově náročný a množství získaného isoalliinu (**8**) není uspokojivé. Methiin, který je nepostradatelný pro vznik celé řady methylových homologů organosírných sloučenin, se připravuje oxidací komerčně dostupného *S*-methylcysteinu a jeho příprava je naopak poměrně snadná.

V rámci této diplomové práce byl vyvinut postup pro izolaci výše zmíněných sloučenin s využitím modelových reakcí, kde se používal tzv. „nečistý isoalliin“. Jednalo se o zjednodušené získání prekursorů *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, kdy byla použita ionexová chromatografie pouze jednou a byla tak získána směs hlavního prekursoru isoalliinu (**8**) spolu s methiinem (**9**), propiinem (**10**) a některými dalšími aminokyselinami, které se v cibuli přirozeně vyskytují. Ukázalo se, že následná enzymatická reakce probíhala s „nečistým isoalliinem“ v podstatě totožně, jako by probíhala s čistým isoalliinem (**8**) a methiinem (**9**). Tento postup bylo možné označit za výhodný i z pohledu časové náročnosti. Další výhodou přineslo využití česnekové alliinasy, které nevede k produkci nežádoucího LF (**14**), jehož přítomnost nebyla pro tvorbu vybraných sloučenin nutná.

V modelové reakci tak nevznikala velká část sloučenin, které pro svou tvorbu LF (14) vyžadují, a výsledný extrakt tak byl lépe zpracovatelný metodou preparativní HPLC/PDA.

Hlavním důvodem, proč byla vypracována tato práce, je výzkum biologických účinků organosírných sloučenin. Jak již bylo detailně popsáno v teoretické části, organosírné látky vykazují celou řadou biologických účinků. Doposud byl proveden výzkum bithiolanových polysulfidů, kde se ukázalo, že vykazují značné protizánětlivé vlastnosti.³¹ Výzkum byl však proveden pouze na směsi thiolanotrisulfidu, thiolanotetrasulfidu a thiolanopentasulfidu (**Obrázek 11**). Naopak nebyly analyzovány biologické účinky čistého thiolanodisulfidu, jehož izolace byla jedním z cílů této diplomové práce. Také biologické vlastnosti allithiolanů doposud nebyly předmětem žádné vědecké publikace.

Pro výzkum biologických účinků je třeba získat standardy vybraných látek (nejsou komerčně dostupné) v co největším množství a nejvyšší kvalitě. Jedná se tedy o rozsáhlý projekt celé laboratoře, do kterého izolované sloučeniny z obou kvalifikačních prací spadají (tj. allithiolany A a D, thiolanodisulfidy; **Obrázek 29**). Výzkum biologické aktivity bude proveden v následujícím období ve spolupráci s dalšími vědeckými institucemi.



Obrázek 29: Izolované sloučeniny určené pro výzkum biologických účinků.

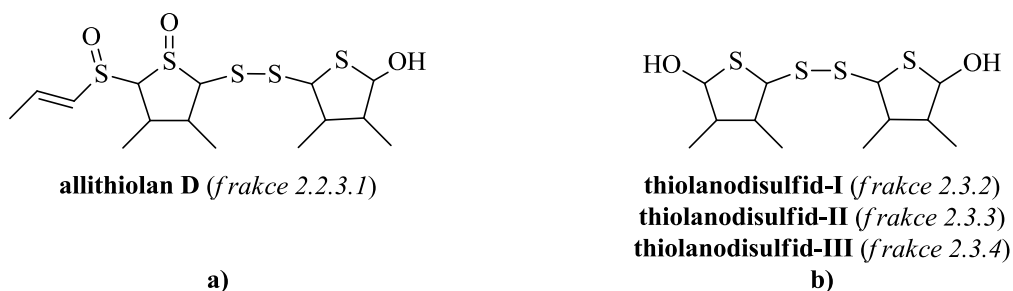
V této práci byla vůbec poprvé popsána izolace thiolanodisulfidů. V původní publikaci se autoři zabývali izolací třech skupin bithiolanových polysulfidů (thiolanotrisulfidu, thiolanotetrasulfidu a thiolanopentasulfidu, **Obrázek 11**). Tyto sloučeniny se podařilo identifikovat v extraktu modelové reakce, ale ukázalo se, že se jedná o velmi nestálé sloučeniny, které při manipulaci podléhaly rozkladu a nebylo tak možné tyto látky izolovat v čisté formě. Oproti tomu izolovaný thiolanodisulfid (**Obrázek 29**) se ukázal jako velmi

stálá látka. Jelikož se jedná o dosud nepopsanou sloučeninu, její strukturu bude nutné potvrdit NMR analýzou.

6 Závěr

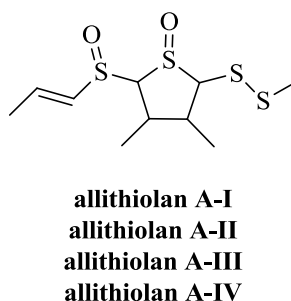
Teoretická část této diplomové práce popisuje dosavadní poznatky v testování biologických vlastností organosírných sloučenin, které se vyskytují v cibuli kuchyňské.

Experimentální část byla zaměřena na optimalizaci HPLC metod pro izolaci dvou vybraných skupin organosírných sloučenin, tj. allithiolanu D a thionodisulfidu. Pomocí preparativní HPLC a s využitím optimalizovaných metod byly získány celkem čtyři látky. První získanou látkou je allithiolan D (**Obrázek 30a**), který se podle HPLC/MS dat podařil získat jako směs minimálně dvou stereoizomerů allithiolanu D (tj. *frakce 2.2.3.1*). Dalšími látkami byly nově objeveny thiolanodisulfidy, u kterých se podařilo získat minimálně tři stereoizomery v čisté formě (tj. sloučeniny 2.3.2, 2.3.3 a 2.3.4; **Obrázek 30b**).



Obrázek 30: Izolované sloučeniny z diplomové práce.

Získané látky budou využity pro výzkum biologických účinků, do kterého budou připojeny i izolované sloučeniny z bakalářské práce (tj. allithiolany A-I – IV; **Obrázek 31**), na kterou tato diplomová práce navazovala.



Obrázek 31: Izolované sloučeniny z bakalářské práce.

7 Použitá literatura

- (1) Kubec, R.; Krejčová, P.; Mansur, L.; García, N. Flavor precursors and sensory-active sulfur compounds in *Alliaceae* species native to South Africa and South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61* (6), 1335–1342. <https://doi.org/10.1021/jf305179p>.
- (2) Fay, M.; Rudall, P.; Chase, M. Molecular studies of subfamily *Gilliesioideae* (*Alliaceae*). *Journal of Systematic and Evolutionary Botany* **2006**, *22* (1), 367–371. <https://doi.org/10.5642/aliso.20062201.30>.
- (3) Rabinowitch, H. D.; Currah, L. *Allium Crop Science: Recent Advances*; CABI: UK, 2002. ISBN 0851995101.
- (4) Block, E. *Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science*; RSC Pub.: Cambridge, UK, 2010. ISBN 978-0-85404-190-9.
- (5) Friesen, N.; Fritsch, R.; Blattner, F. Phylogeny and new intrageneric classification of *Allium* (*Alliaceae*) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Aliso* **2006**, *22* (1), 372–395. <https://doi.org/10.5642/aliso.20062201.31>.
- (6) *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> (accessed 2022-12-20).
- (7) Pareek, S.; Sagar, N. A.; Sharma, S.; Kumar, V. Onion (*Allium cepa* L.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals* **2018**, 1145–1162. <https://doi.org/DOI: 10.1002/9781119158042.ch58>.
- (8) Dini, I.; Tenore, G. C.; Dini, A. S-Alkenyl cysteine sulfoxide and its antioxidant properties from *Allium cepa* var. *tropeana* (red onion) seeds. *Journal of Natural Products* **2008**, *71* (12), 2036–2037. <https://doi.org/10.1021/np800237w>.

- (9) Block, E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie* **1992**, *31* (9), 1135–1178.
<https://doi.org/10.1002/anie.199211351>.
- (10) Lancaster, J. E.; Collin, H. A. Presence of allinase in isolated vacuoles and of alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs of onion (*Allium cepa*). *Plant Science Letters* **1981**, *22* (2), 169–76.
- (11) Spåre, C. G.; Virtanen, A. I.; Munch-Petersen, J.; Kvande, P. C.; Meisingseth, E. On the lachrymatory factor in Onion (*Allium Cepa*) vapours and its precursor. *Acta Chemica Scandinavica*, **1963**, *17*, 641–650.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.17-0641>.
- (12) Virtanen, A. I.; Matikkala, E. J.; Laland, S.; Refn, S. 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* **1959**, *13*, 1898–1900.
<https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.13-1898>.
- (13) Kubec, R.; Dadáková, E. Chromatographic methods for determination of *S*-substituted cysteine derivatives-A comparative study. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216* (41), 6957–6963.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.032>.
- (14) Block, E.; Dane, A. J.; Cody, R. B. Crushing garlic and slicing onions: detection of sulfenic acids and other reactive organosulfur intermediates from garlic and other *Alliums* using direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS). *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements* **2011**, *186* (5), 1085–1093.
<https://doi.org/10.1080/10426507.2010.507728>.

- (15) Imai, S.; Tsuge, N.; Tomotake, M.; Nagatome, Y.; Sawada, H.; Nagata, T.; Kumagai, H. An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature* **2002**, *419* (6908), 685–685. <https://doi.org/10.1038/419685a>.
- (16) Silvaroli, J. A.; Pleshinger, M. J.; Banerjee, S.; Kiser, P. D.; Golczak, M. Enzyme that makes you cry-crystal structure of lachrymatory factor synthase from *Allium cepa*. *ACS Chemical Biology* **2017**, *12* (9), 2296–2304. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00336>.
- (17) Ekşi, G.; Gençler Özkan, A. M.; Koyuncu, M. Garlic and onions: an eastern tale. *Journal of Ethnopharmacology* **2020**, *253*, 112675. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112675>.
- (18) Kendler, B. Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): A review of their relationship to cardiovascular disease. *Preventive Medicine* **1987**, *16*, 670–685.
- (19) Nicastro, H. L.; Ross, S. A.; Milner, J. A. Garlic and onions: Their cancer prevention properties. *Cancer Prevention Research* **2015**, *8* (3), 181–189. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0172>.
- (20) Fredotović, Ž.; Šprung, M.; Soldo, B.; Ljubenković, I.; Budić-Leto, I.; Bilušić, T.; Cikeš-Čulić, V.; Puizina, J. Chemical composition and biological activity of *Allium cepa* L. and *Allium × cornutum* (Clementi Ex Visiani 1842) methanolic extracts. *Molecules* **2017**, *22* (3), 448. <https://doi.org/10.3390/molecules22030448>.
- (21) Yang, E. J.; Kim, G. S.; Kim, J.; Song, K. S. Protective effects of onion-derived quercetin on glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death. *Pharmacogn Mag* **2013**, *9* (36), 302–308. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.117824>.
- (22) Bayer, T.; Breu, W.; Seligmann, O.; Wray, V.; Wagner, H. Biologically active thiosulphinates and α -sulphonyldisulphides from *Allium cepa*. *Phytochemistry* **1989**,

- 28 (9), 2373–2377.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97987-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97987-1).
- (23) Borjihan, B.; Ogita, A.; Fujita, K. I.; Doe, M.; Tanaka, T. The cyclic organosulfur compound zwiobelane a from onion (*Allium cepa*) functions as an enhancer of polymyxin b in fungal vacuole disruption. *Planta Medica* **2010**, *76* (16), 1864–1866.
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1249935>.
- (24) Yoshida, M.; Kameyama, M.; Hosoda, H.; Shimizu, Y.; Sakaue, K.; Washino, T.; Iwata, M.; Omoto, M. Japan Patent Kokai, 2010–143866, **2010**.
- (25) Aoyagi, M.; Kamoi, T.; Kato, M.; Sasako, H.; Tsuge, N.; Imai, S. Structure and bioactivity of thiosulfinates resulting from suppression of lachrymatory factor synthase in onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (20), 10893–10900.
<https://doi.org/10.1021/jf202446q>.
- (26) Štefanová, I.; Zápál, J.; Moos, M.; Kuzma, M.; Kubec, R. Isoalliin-derived thiolanes formed in homogenized onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, *67* (35), 9895–9906.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01384>.
- (27) El-Aasr, M.; Fujiwara, Y.; Takeya, M.; Ikeda, T.; Tsukamoto, S.; Ono, M.; Nakano, D.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Yoshimitsu, H.; Nohara, T. Onionin A from *allium cepa* inhibits macrophage activation. *Journal of Natural Products* **2010**, *73* (7), 1306–1308.
<https://doi.org/10.1021/np100105u>.
- (28) Nohara, T.; Fujiwara, Y.; Kudo, R.; Yamaguchi, K.; Ikeda, T.; Murakami, K.; Ono, M.; Kajimoto, T.; Takeya, M. 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* **2014**, *62* (11), 1141–1145.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00461>.

- (29) Fujiwara, Y.; Horlad, H.; Shiraishi, D.; Tsuboki, J.; Kudo, R.; Ikeda, T.; Nohara, T.; Takeya, M.; Komohara, Y. 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* **2016**, *60* (11), 2467–2480.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201500995>.
- (30) Nohara, T.; Fujiwara, Y.; El-Aasr, M.; Ikeda, T.; Ono, M.; Nakano, D.; Kinjo, J. Antitumor *Allium* sulfides. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2017**, *65* (3), 209–217.
<https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00844>.
- (31) Aoyagi, M.; Imai, S.; Kamoi, T. Novel bithiolane polysulfides from lachrymatory factor synthase-suppressed onion and their *in vitro* cyclooxygenase-1 inhibitory activity. *Food Chemistry* **2021**, *344*, 128636.
<https://doi.org/10.1016/j.food-chem.2020.128636>.
- (32) Aoyagi, M.; Kamoi, T.; Kato, M.; Sasako, H.; Tsuge, N.; Imai, S. Structure and bioactivity of thiosulfinates resulting from suppression of lachrymatory factor synthase in onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59* (20), 10893–10900.
<https://doi.org/10.1021/jf202446q>.
- (33) Nohara, T.; Fujiwara, Y.; Ikeda, T.; Murakami, K.; Ono, M.; El-Aasr, M.; Nakano, D.; Kinjo, J. Two new bicyclic sulfoxides from welsh onion. *Journal of Natural Medicines* **2016**, *70* (2), 260–265.
<https://doi.org/10.1007/s11418-015-0947-z>.
- (34) Kubec, R.; Štefanová, I.; Moos, M.; Urajová, P.; Kuzma, M.; Zápál, J. 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* **2018**, *66* (33), 8783–8794.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03118>.

-
- (35) Schwimmer S. Development of bitter substance in onion juice. *Food Technology* **1967**, *21*, 292.
- (36) Schwimmer, S. Enzymatic Conversion of *trans*-(+)-*S*-1-propenyl-L-cysteine *S*-oxide to the bitter and odor-bearing components of onion. *Phytochemistry* **1968**, *7*, 401–404.
- (37) Block, E.; Thiruvazhi, M.; Toscano, P. J.; Bayer, T.; Grisoni, S.; Zhao, S.-H. *Allium* Chemistry: Structure, synthesis, natural occurrence in onion (*Allium cepa*), and reactions of 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexane *S*-oxides. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118* (12), 2790–2798.
<https://doi.org/10.1021/ja951134t>.
- (38) Block, E.; Gulati, H.; Putman, D.; Sha, D.; You, N.; Zhao, S.-H. *Allium* chemistry: Synthesis of 1-[alk(en)ylsulfinyl]propyl alk(en)yl disulfides (cepaenes), antithrombotic flavorants from homogenates of onion (*Allium cepa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45* (11), 4414–4422.
<https://doi.org/10.1021/jf9705126>.

8 Použité zkratky

DAD	diode array detector
DCM	dichlormethan
DEE	diethylether
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
HPLC	high performance liquid chromatography
LF	lachrymatory factor
LFS	lachrymatory factor synthase
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
p.a.	per analysis
PDA	photodiode array
ppm	parts per million
PTFE	polytetrafluorethylen
rpm	rotations per minute
RVO	rotační vakuová odparka
SPE	solid phase extraction
TDA	taste dilution analysis