

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Cyklické organosírné sloučeniny v cibuli kuchyňské
(*Allium cepa*)

Diplomová práce

Bc. Ondřej Šustr

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 2024

Šustr, O., 2024: Cyklické organosírné sloučeniny v cibuli kuchyňské (*Allium cepa*). [Cyclic organosulfur compounds of onion (*Allium cepa*). Mgr. Thesis, in Czech.] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato magisterská práce se zabývá studiem cyklických organosírných sloučenin cibule kuchyňské (*Allium cepa*).

Teoretická část této práce shrnuje dosavadní poznatky o organosírných sloučeninách, jejich mechanismu vzniku a biologických vlastnostech.

Experimentální část této práce je zaměřena na optimalizaci metod pro izolaci allithiolanů D, cepathiolanů A a cepadithiolaktonů A. Cílem práce je rovněž izolace těchto látek pomocí preparativní HPLC za účelem testování jejich biologické aktivity.

KLÍČOVÁ SLOVA: cibule, organosírné sloučeniny, allithiolany, cepathiolan A, cepadithiolakton A, *Allium cepa*

Annotation

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

The theoretical part of this thesis summarizes the current knowledge about organosulfur compounds, their mechanism of formation, and biological properties.

The experimental part of this thesis focuses on the optimization of methods for isolation of allithiolanes D, cepathiolanes A, and cepadithiolactones A. The aim of the work is also isolation of these compounds using by preparative HPLC for future testing of their biological activity.

KEY WORDS: onion, organosulfur compounds, allithiolanes, cepathiolan A, cepadithiolactone A, *Allium cepa*

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2024.

.....

Poděkování

Velké poděkování patří mé školitelce Mgr. Ivetě Štefanové, Ph.D. za nekončící ochotu, pomoc, rady. A rovněž za trpělivý a přívětivý přístup při vedení této diplomové práce.

Další poděkování náleží prof. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za odborný dohled a vstřícný přístup při vzniku této práce.

Nakonec bych rád poděkoval všem, kteří se 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>	2
2.2	CIBULE KUCHYŇSKÁ (<i>ALLIUM CEPA</i>)	4
2.3	ORGANOSIRNÉ SLOUČENINY CIBULE KUCHYŇSKÉ.....	5
2.3.1	<i>S-Alk(en)ylcystein-S-oxidy</i>	6
2.3.2	<i>Mechanismus tvorby organosirných sloučenin</i>	6
2.3.3	<i>Thiosulfináty</i>	8
2.3.4	<i>Sulfiny</i>	9
2.3.5	<i>Bis-sulfin</i>	10
2.3.6	<i>Cepaeny</i>	11
2.3.7	<i>Zwiebelany</i>	12
2.3.8	<i>Cepathiolany</i>	13
2.3.9	<i>Onioniny</i>	14
2.3.10	<i>Allithiolany</i>	15
2.3.11	<i>Cepadithiolakton A</i>	17
2.3.12	<i>Bisthiofanové polysulfidy</i>	18
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	19
3.1	CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	19
3.1.1	<i>Chemikálie</i>	19
3.1.2	<i>Rostlinný materiál</i>	19
3.1.3	<i>Ostatní Materiál</i>	20
3.2	PŘÍSTROJE	20
3.3	GRADIENTY POUŽÍVANÉ V HPLC	20
3.4	IZOLACE SLOUČENIN	23
3.4.1	<i>Izolace alliinasy</i>	23
3.4.2	<i>Izolace S-alk(en)ylcystein-S-oxidů</i>	24
3.4.3	<i>Příprava extraktu 1</i>	25
3.4.4	<i>Příprava extraktu 2</i>	30
4	VÝSLEDKY	33
4.1	IZOLACE ALLITHIOLANU D	34
4.2	IZOLACE CEPATHIOLANU A.....	37
5	DISKUZE	40
6	ZÁVĚR	42

7	LITERATURA	43
8	POUŽITÉ ZKRATKY.....	47

1 Cíle práce

- ✓ Vypracovat literární rešerši zaměřenou na strukturu, mechanismy tvorby a biologické vlastnosti organosírných sloučenin cibule kuchyňské (*Allium cepa*),
- ✓ s využitím preparativní HPLC izolovat a spektrálně charakterizovat struktury vybraných cyklických organosírných sloučenin,
- ✓ získané výsledky vhodně vyhodnotit, zdokumentovat a diskutovat.

2 Úvod

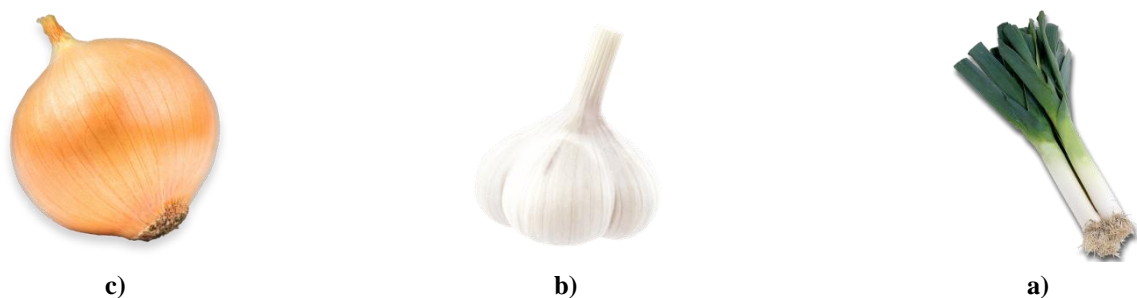
Cibule kuchyňská (*Allium cepa*) je nepostradatelnou součástí nejen naší, ale i celosvětové kulinářské kultury. O popularitě této rostliny svědčí i její druhé místo v žebříčku celosvětové produkce zeleniny¹. Její jedinečná chuť přispívá k bohatosti pokrmů na celém světě.

Cibule má rovněž nezastupitelnou historickou roli. Předpokládaný původ této rostliny je pravděpodobně v horských regionech centrální Asie, kde byly cibule i česnek poprvé domestikovány. Odtud se pravděpodobně pomocí hedvábné stezky rozšířila do zbytku světa².

Kromě svého zastoupení v potravinářském průmyslu je cibule historicky používána i v lidovém léčitelství. Vlivem toho vzniklo mnoho výzkumů s cílem objasnit jaké konkrétní látky mohou za její léčivé i sensorické vlastnosti. Tato chuť je způsobena velkou škálou různých sloučenin, které vznikají v cibuli z prekurzorů, tj. *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů. Jednotlivé nejvýznamnější sloučeniny budou podrobně rozebrány v teoretické části práce spolu s jejich mechanismem vzniku.

2.1 Rod *Allium*

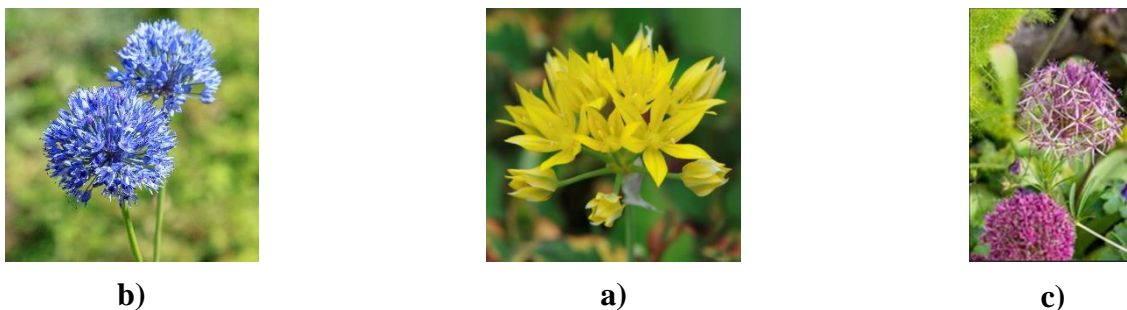
Do rodu *Allium* patří obecně velmi používané plodiny v kulinářství. Jsou jimi například *A. cepa* (cibule kuchyňská, **Obrázek 1a**), *A. sativum* (česnek kuchyňský, **Obrázek 1b**), *A. fistulosum* (cibule zimní), *A. porrum* (pór zahradní, **Obrázek 1c**), *A. ampeloprasum* (pór letní), *A. tuberosum* (pažitka čínská), *A. schoenoprasum* (pažitka pobřežní).



Obrázek 1: Vybrané rostliny rodu *Allium*: a) cibule kuchyňská*, b) česnek setý†, c) pór zahradní‡.

Do rodu *Allium* spadá i mnoho okrasných rostlin. Mezi ty nejzajímavější řadíme například *A. caeruleum* (česnek azurový; **Obrázek 2a**), *A. moly* (česnek žlutožlutý; **Obrázek 2b**), *A. rosenbachianum* (česnek obrovský), *A. roseum* (česnek růžový), *A. sphaerocephalum* (česnek kulatohlavý) nebo *A. cristophii* (česnek ozdobný, **Obrázek 2c**).

Rod *Allium* zahrnuje přibližně 750 rostlin. To z něj činí největší rod jednoděložných petaloidních rostlin s výjimkou orchidejí. Mezi hospodářsky nejvýznamnější a zároveň i nejrozšířenější řadíme cibuli, česnek a pór zahradní.



Obrázek 2: Vybrané okrasné rostliny rodu *Allium*; a) česnek azurový§, b) česnek žlutožlutý**, c) česnek ozdobný††.

* https://farmatrhlikovi.cz/wp-content/uploads/2021/01/cibule_b.png

† <https://kotanyi-cz.imgix.net/wp-content/uploads/2019/04/knoblauch-kotanyi-inhalt.png?auto=format,compress>

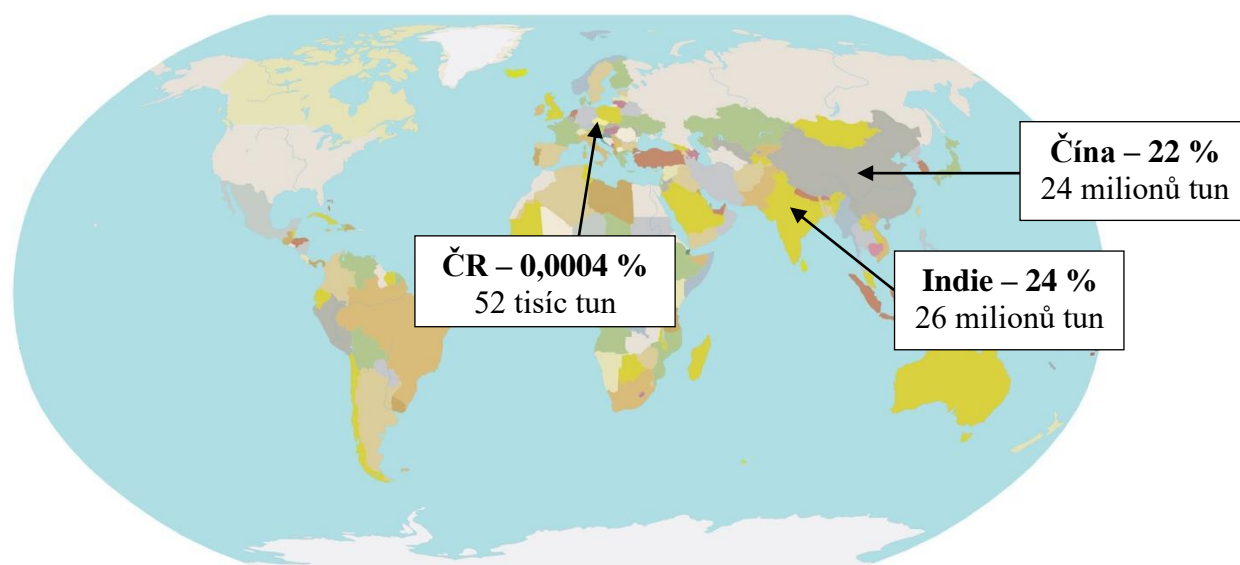
‡ <https://www.demex.fr/wp-content/uploads/2022/05/poireau.png>

§ <https://schram.ie/product/allium-caeruleum/>

** <https://www.rosen-huber.ch/artikel/allium-christophii?id=3369>

†† https://www.semena.cz/5855-medium_default/cesnek-moly-zluty-allium-moly-cibuloviny-3-ks.webp

Dle dostupných dat organizace FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)¹ činila produkce cibule za rok 2021 přibližně 106 milionů tun. Světově největším producentem se pro rok 2021 stala Indie, s produkcí přibližně 26 milionů tun. Tím sesadila z první příčky Čínu, která se dlouhodobě řadila do role největšího producenta cibule na světě. Letos její produkce činila 24 milionů tun a tím se řadí na druhé místo. Pouze pro představu produkce České republiky činila 52 tisíc tun, což je v porovnání se světovou produkcí zanedbatelné (**Obrázek 3**).



Obrázek 3: Porovnání nejvýznamnějších producentů cibule za rok 2021 a jejich procentuální zastoupení v celosvětové produkci^{††}.

2.2 Cibule kuchyňská (*Allium cepa*)

Cibule kuchyňská se řadí mezi dvouleté jednoděložné rostliny. Spadá do cibulovité zeleniny z čeledi amarylkovitých. První rok vytvoří rostlina zásobní orgán cibuli, další rok pak vzniká květenství a semeno. Rostlina má oblé a duté listy, které vyrůstají z podpučí. Zásobní orgán cibule vzniká při vyšších teplotách přeměnou listů a dolní části stonku jejich zdužnatěním. Při tom se v cibuli začínají hromadit sacharidy. Během dozrávání rostliny, se postupně přesouvají

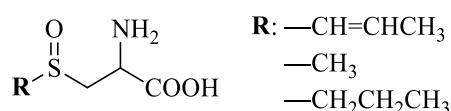
^{††} <https://gisgeography.com/free-blank-world-map/>

organické látky z listů do cibule. To má za následek postupnou ztrátu barvy listů a jejich usychání. Dále dojde k zatažení krčku cibule. Následující rok začne cibule kvést, přičemž může mít přibližně 200 až 2000 obojetných květů. Jako první kvetou prašníky a následně dozrávají blizny³.

2.3 Organosírné sloučeniny cibule kuchyňské

Využití cibule v lidovém léčitelství je známo již od starověku. Egyptský Ebersův papyrus dokládá využití cibule i česneku v léčitelství již roku 1550 př. n. l. a částečně přetrvává až dodnes. V lidovém léčitelství je cibule využívána například pro usnadnění vykašlávání, při dráždivém kašli, na potlačení zánětů a otoků sliznic. Taktéž se používá jako emenagogum, karminativum, při bodnutí hmyzem, při kožních problémech a hemoroidech. Za zmínku stojí i příznivé účinky na lidské srdce, cévy, trávicí soustavu, zlepšení metabolismu, při léčbě ran a jizev, při potížích se střevními parazity².

Takto široká škála uplatnění v lidovém léčitelství inspirovala vědce k izolaci a objasnění jednotlivých látek. V posledních desítkách let jsou stále objevovány nové a nové sloučeniny, s různou biologickou aktivitou. Tyto organosírné sloučeniny vznikají enzymatickým rozkladem prekurzorů, *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů (**Obrázek 4**).



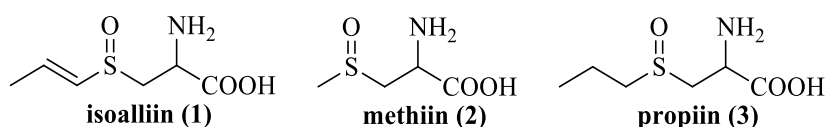
Obrázek 4: Prekurzory organosírných látek *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů.

Organosírné sloučeniny si cibule a řada dalších rostlin z rodu *Allium* vytváří jako obranu před konzumací ostatními zvířaty a taktéž pro ochranu před mikrobiálním znečištěním při poškození rostlinného pletiva. Detekční mechanismus, který je spojen s intolerancí na tyto sloučeniny se nazývá chemická nocicepce. U lidí spouští charakteristický pláč, spojený s krájením cibule. Konkrétně se jedná o receptor A1 (taktéž TRPA1), jenž je u člověka přítomný již 500 milionů let⁴.

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

Prekurzory organosírných sloučenin se nazývají S-alk-(en)ylcystein-S-oxidy. Cibule obsahuje celkem tři různé. Jsou jimi isoalliin (**1**), methiin (**2**) a propiin (**3**) (**Obrázek 5**). Nejvyšší relativní zastoupení má isoalliin (**1**; 82 relat. %), další v pořadí je methiin (**2**; 18 relat. %). Propiin (**3**) se řadí na poslední místo a v cibuli je obsažen pouze stopově⁵.

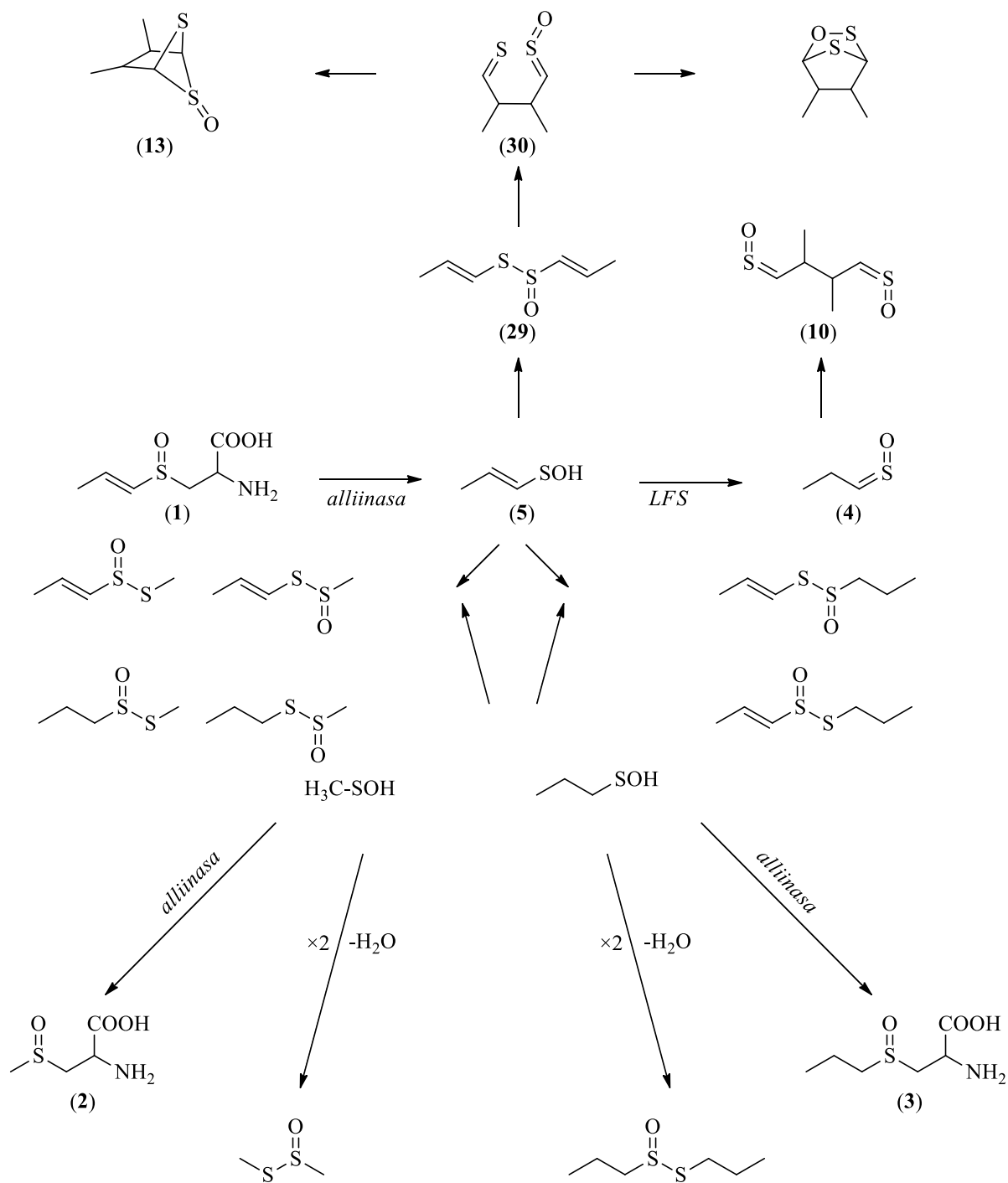
V roce 1959 Virtanen a Matikkala⁶ jako první izolovali methiin (**2**) a spolu s ním se jim podařilo získat i propiin (**3**). Poslední objevený a zároveň nejdůležitější prekurzor je isoalliin (**1**). Ten byl objeven roku 1963 dvojicí Virtanen a Spärr⁷. Jejich práce se zaměřovala na objasnění struktury slzotvorného faktoru (**4**; anglicky *lachrymatory factor*, dále jen LF). Isoalliin (**1**) je prekurzorem pro LF (**4**). Důsledkem mechanického poškození cibule dochází k rozkladu isoalliinu (**1**) na LF (**4**), což se projevuje typickým slzením očí.



Obrázek 5: Hlavní S-alk(en)ylcystein-S-oxidy cibule.

2.3.2 Mechanismus tvorby organosírných sloučenin

Unikátnost cibule oproti jiným rostlinám rodu *Allium* spočívá zejména v přítomnosti dvou enzymových systémů. Prvním je alliinasa, která se vyskytuje například i u česneku setého (*Allium sativum*) a druhým je pro cibuli unikátní LF-synthasa (dále jen LFS). Enzymy se v cibuli aktivují mechanickým narušením rostlinného pletiva. To vede k tomu, že se prekurzory dostanou do kontaktu s enzymy a spustí se nezvykle komplexní a obsáhlá kaskáda chemických reakcí. Tento jev je vyobrazen na **Obrázku 6**.

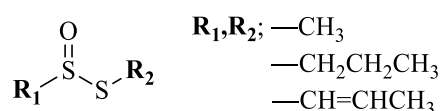


Obrázek 6: Obecné schéma vzniku organosírných sloučenin v cibuli.

Prekurzor isoalliin (1) je působením enzymu alliinasa katalyticky rozložen na 1-propensulfenovou kyselinu (5) a α -aminoakrylovou kyselinu (6). Dále LFS iniciuje přeměnu 1-propensulfenové kyseliny (5) na LF (4)⁸. Další reakce vedou ke vzniku rozmanité řady organosírných sloučenin, které budou podrobně popsány v dalších kapitolách této práce.

2.3.3 Thiosulfináty

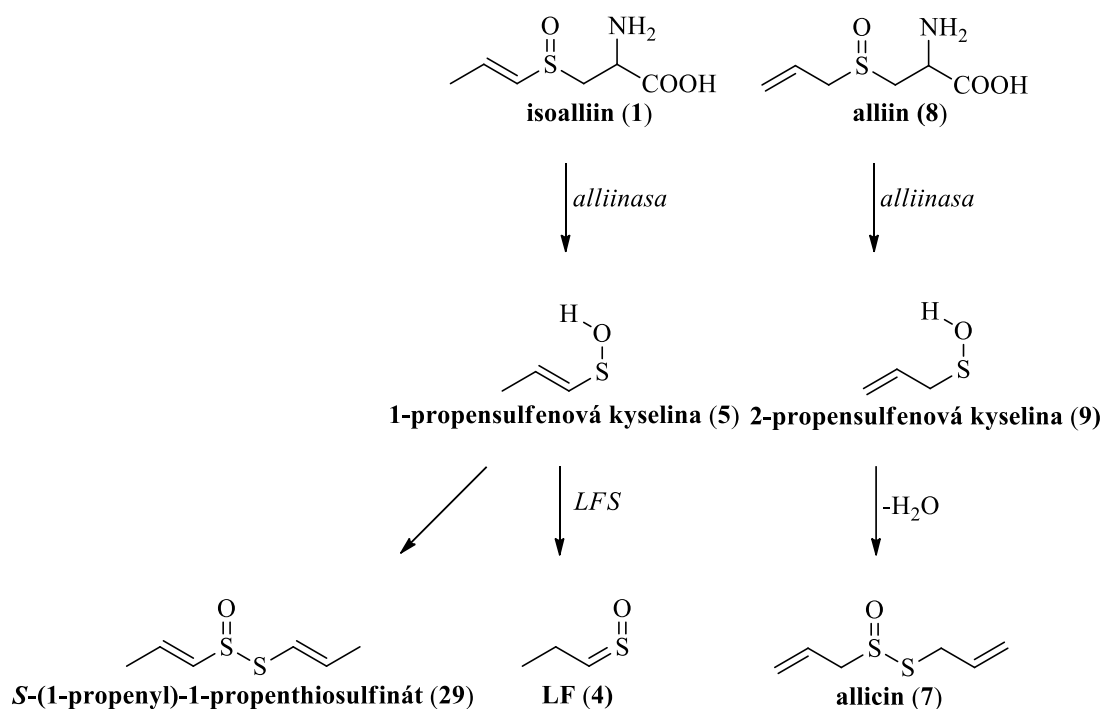
Thiosulfináty jsou jedny z nejlépe prostudovaných organosírných sloučenin. Tyto sloučeniny vznikají i v dalších rostlinách rodu *Allium*. První sloučeninou z této skupiny byla látka allicin (7), objevena dvojicí Cavallito a Bailey⁹. Allicin (7) poprvé izolovali z česneku roku 1944 a zároveň zjistili, že tato látka vykazuje antimikrobiální účinky.



Obrázek 7: Strukturální schéma thiosulfinátů.

Thiosulfináty lze dělit na symetrické a asymetrické dle výchozí struktury sulfenových kyselin. Jejich vznik je iniciován narušením pletiva, které vede k enzymatickému rozkladu stabilních prekurzorů *S*-alken(en)ylcystein-*S*-oxidů, za přítomnosti enzymu alliinasy na nestabilní sulfenové kyseliny. Ty vlivem svojí nestability samovolně kondenzují za vzniku thiosulfinátů. Obecná struktura thiosulfinátů je zobrazena na **Obrázku 7**.

Zároveň byla zjištěna silná schopnost inhibice agregace krevních destiček u vybraných thiosulfinátů¹⁰. Nejsilnější aktivitu vykazoval allicin (7), který vycházel v testech *in vitro* lépe než aspirin. U česneku je tato schopnost inhibice zároveň až třináctkrát větší než u cibule, jelikož zde vzniká mnohem více thiosulfinátů¹⁰. Pro pochopení je potřeba vysvětlit odlišné působení enzymových systémů česneku a cibule. Zatímco v česneku vzniká z prekurzoru alliinu (8) nestabilní 2-propensulfenová kyselina (9), která dále neenzymaticky kondenzuje na stabilní thiosulfinát allicin (7). V cibuli je nejvíce zastoupený prekurzor isoalliin (1) rozložen enzymem alliinasa na nestabilní 1-propensulfenovou kyselinu (5). Zde se však tyto dvě rostliny liší přítomností druhého enzymatického systému LFS, který u cibule enzymaticky rozkládá 1-propensulfenovou kyselinu (5) na LF (4). Zároveň část 1-propensulfenové kyseliny (5) se neenzymaticky rozkládá na příslušný thiosulfinát. Odlišné působení enzymatických systémů je zobrazeno na **Obrázku 8**.

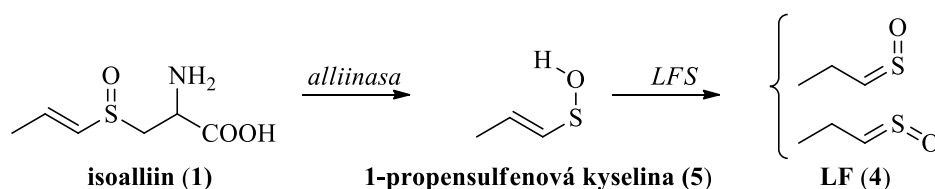


Obrázek 8: Porovnání rozkladu isoalliinu (1) a alliinu (8) na thiosulfináty.

2.3.4 Sulfiny

Obečné označení těchto látek je podmíněno přítomností funkční skupiny $-\text{CH}=\text{S}=\text{O}$. Výskyt těchto látek je v cibuli umožněn přítomností dvou enzymatických systémů (*alliinasy* a *LFS*). Jejich působením tak vzniká LF (4), systematicky propanthial-*S*-oxid. Vznik a přítomnost této látky, lze snadno prokázat, jelikož se projevuje typickým slzením očí a pláčem.

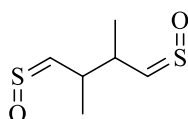
Ačkoliv struktura byla objasněna již roku 1971 Brodnitzem a Pascalem¹¹ jeho správný mechanismus vzniku zůstával skryt až do roku 2002, kdy Imai a kol.¹² dokázali, že pro vznik LF (4) je zapotřebí dvou enzymů (*alliinasy* i *LFS*). Dříve se nesprávně předpokládalo, že LF (4) vzniká samovolnou kondenzací 1-propensulfenové kyseliny (5) a to pouze za přítomnosti *alliinasy*. LF (4) tedy vzniká z isoalliinu (1) působením *alliinasy*, která přeměňuje tento prekurzor na nestabilní 1-propensulfenovou kyselinu (5). Ta je poté působením druhého enzymu *LFS* přeměna na LF (4). Celý mechanismus je popsán na **Obrázku 9**.



Obrázek 9: Mechanismus vzniku LF (4)¹⁰.

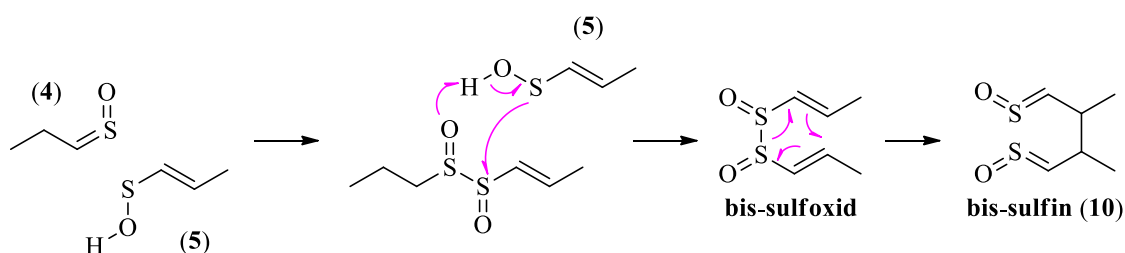
2.3.5 Bis-sulfin

Struktura této látky byla poprvé objevena roku 1990 ve studii Blocka a Bayera¹³. Systematické označení této sloučeniny je (Z,Z)-2,3-dimethyl-1,4-butandithial-S,S-dioxid. Triviální název je bis-sulfin (**10**). Struktura bis-sulfinu (**10**) je zobrazena na **Obrázku 10**.



Obrázek 10: Struktura bis-sulfinu (**10**).

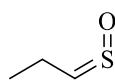
Spolu se strukturou autoři ve své práci publikovali i reakční mechanismus. Dle něho bis-sulfin (**10**) vzniká thiofilní adicí 1-propensulfenové kyseliny (**5**) na LF (**4**) a následně nukleofilním atakem druhé molekuly 1-propensulfenové kyseliny (**5**). Předpokládaný mechanismus je zobrazen na **Obrázku 11**.



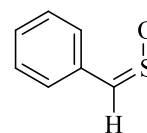
Obrázek 11: Mechanismus vzniku bis-sulfinu (**10**).

V cibuli jsou tedy přítomny dva thioaldehyd-S-oxidy (sulfiny). Prvním je LF (**4**; systematicky (Z)-propanthial-S-oxid) a bis-sulfin (**10**) Systematicky (Z,Z)-2,3-dimethyl-1,4, butandithial-S,S-dioxid). Další slzotvorné sulfiny se dále nacházejí i v jiných rostlinách rodu *Allium*

například v *Allium siculum* (**11**; systematicky butanthial-*S*-oxid;¹⁴ nebo v *Petiveria alliacea* (**12**; systematicky (*Z*)-thiobenzaldehyd-*S*-oxid) (**Obrázek 12**)¹⁵.



(11)

Petiveria alliacea

(12)

Allium siculum

Obrázek 12: Sulfiny z *Allium siculum*^{§§} a *Petiveria alliacea*^{***}.

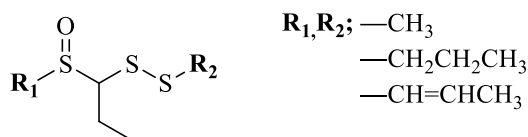
2.3.6 Cepaeny

Pojmenování této látky vychází z latinského označení rostliny cibule kuchyňské (lat. *Allium cepa*). Z té byly tyto látky poprvé izolovány a popsány v práci Bayera a kol.¹⁶ Přítomnost těchto látek je u cibule zodpovědná za protialtmatické účinky in vivo. Zároveň u nich byla prokázána schopnost inhibice cyklooxygenasy a 5-lipoxygenasy in vitro. Inhibitory cyklooxygenasy se ve farmacii používají na léčbu zánětu a bolesti. V práci Wagnera a kol.¹⁷ byly testovány různé cepaeny spolu s thiosulfináty. Bylo zjištěno, že cepaeny jsou nejúčinnějšími inhibitory cyklooxygenasy a 5-lipoxygenasy ze všech látek obsažených v cibuli. Jejich biologická aktivita je pravděpodobně umožněna přítomností dvojité vazby.

§§§§ https://www.dutchbulbs.com/product/Nectaroscordum_Siculum

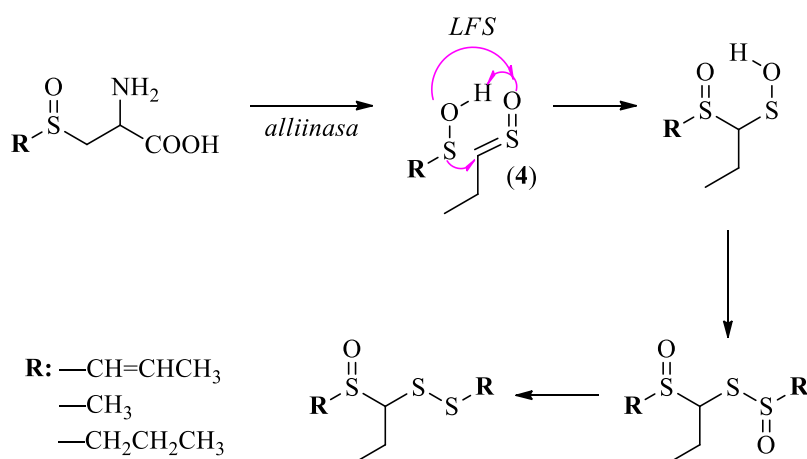
*** <https://www.inaturalist.org/taxa/166545-Petiveria-alliacea>

U cepaenů s dvěma dvojnými vazbami byla pozorována vyšší inhibiční schopnost než u ostatních. Obecná struktura cepaenů je uvedena na **Obrázku 13**.



Obrázek 13: Struktura cepaenů.

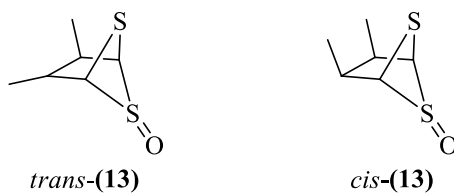
Předpokládaný mechanismus vzniku, kterého se účastní LF (4), je uveden na **Obrázku 14**.



Obrázek 14: Mechanismus vzniku cepaenů.

2.3.7 Zwiebelany

Označení zwiebelany má původ v německém názvu cibule (tj. die Zwiebel). Toto označení poprvé zavedli Bayer a kol.¹⁸. Ti ve své práci izolovali dva nové *cis*-/*trans*- izomery zwiebelanů. Tyto látky byly podobně jako jiné nalezeny při zkoumání otázky, které konkrétní látky vykazují antialergickou aktivitu u cibule. Systematické označení těchto látek je 2,3-dimethyl-5,6-dithiacyklo[2.1.1]hexan-5-oxid (**13**). Strukturu *cis*-/*trans*- izomerů zwiebelanů (**13**) uvádí **Obrázek 15**.



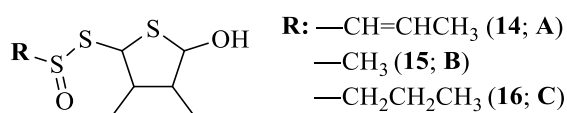
Obrázek 15: Struktura zwiebelanů (13).

2.3.8 Cepathiolany

Roku 2010 provedli Yoshida a kol.¹⁹ první izolaci těchto látek. Jejich název je také jako u mnoha jiných odvozen od latinského označení cibule (*Allium cepa*) a rovněž je v názvu zdůrazněna přítomnost thiolanového jádra. Další izomer těchto látek objevili Aoyagi a kol.²⁰ roku 2011. Tuto látku pojmenovali cepathiolan A (14). Bylo zjištěno, že při potlačení LFS aktivity vzniká v cibuli mnohem více thiosulfinátů. Nedochází totiž k enzymatickému rozkladu 1-propensulfenové kyseliny (5) na LF (4) a vznikají tudíž pouze thiosulfináty. Dvě molekuly nestabilní 1-propensulfenové kyseliny (5) procházejí samovolnou kondenzací a tvoří thiolanové jádro. Následně další molekula 1-propensulfenové kyseliny (5) nukleofilně atakuje produkt kondenzace a vzniká cepathiolan A (14; systematicky *S*-3,4,-dimethyl-5-hydroxythiolan-2-yl-1-propenthiosulfinát).

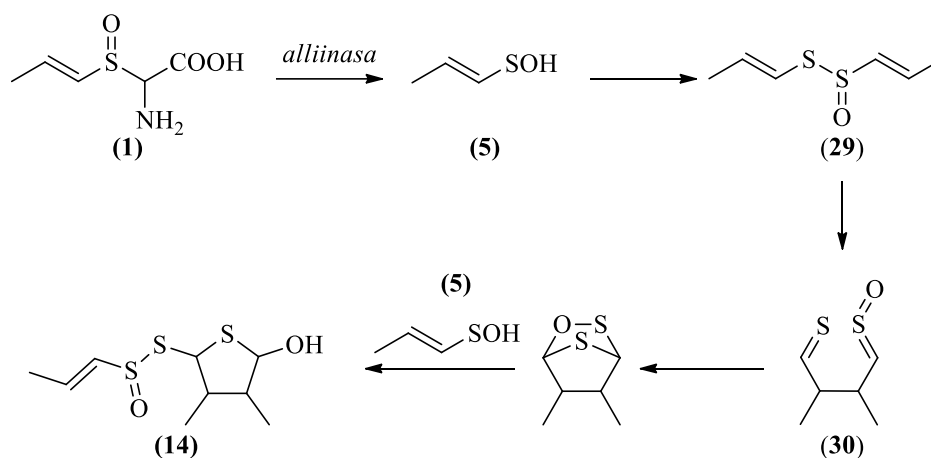
Kromě izolace nové sloučeniny se Aoyagi zaměřil i na biologickou aktivitu této látky. Jelikož cepathiolany vznikají z thiosulfinátů, předpokládala se u nich podobná biologická aktivita. Tudíž u nich byla testována schopnost inhibice COX-1 enzymu *in vitro*. Ten má cyklooxygenasovou aktivitu, která katalyzuje rozklad kyseliny arachidonové na prostaglandin. Taktéž byla předpokládána schopnost inhibice glukosidasy vlivem přítomnosti thiolanového jádra. Cepathiolan A (14) dosahoval o dva řády vyšší antikoagulační aktivitu než aspirin. Inhibice glukosidasy byla porovnávána s kyselinou kávovou. Ta měla patnáctkrát nižší účinnost inhibice než cepathiolan A (14).

Další nové methylové a propylové homology byly objeveny v roce 2019 Štefanovou a kol.²¹, jenž tyto látky pojmenovaly cepathiolan B (15) a cepathiolan C (16) (**Obrázek 16**).



Obrázek 16: Struktura cepathiolanů.

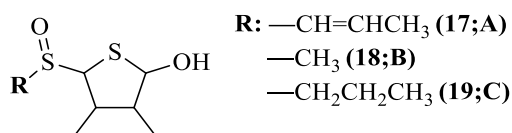
Mechanismus vzniku cepathiolanu A (**14**) uvádí **Obrázek 17**.



Obrázek 17: Mechanismus vzniku cepathiolanu A (**14**)¹⁹.

2.3.9 Onioniny

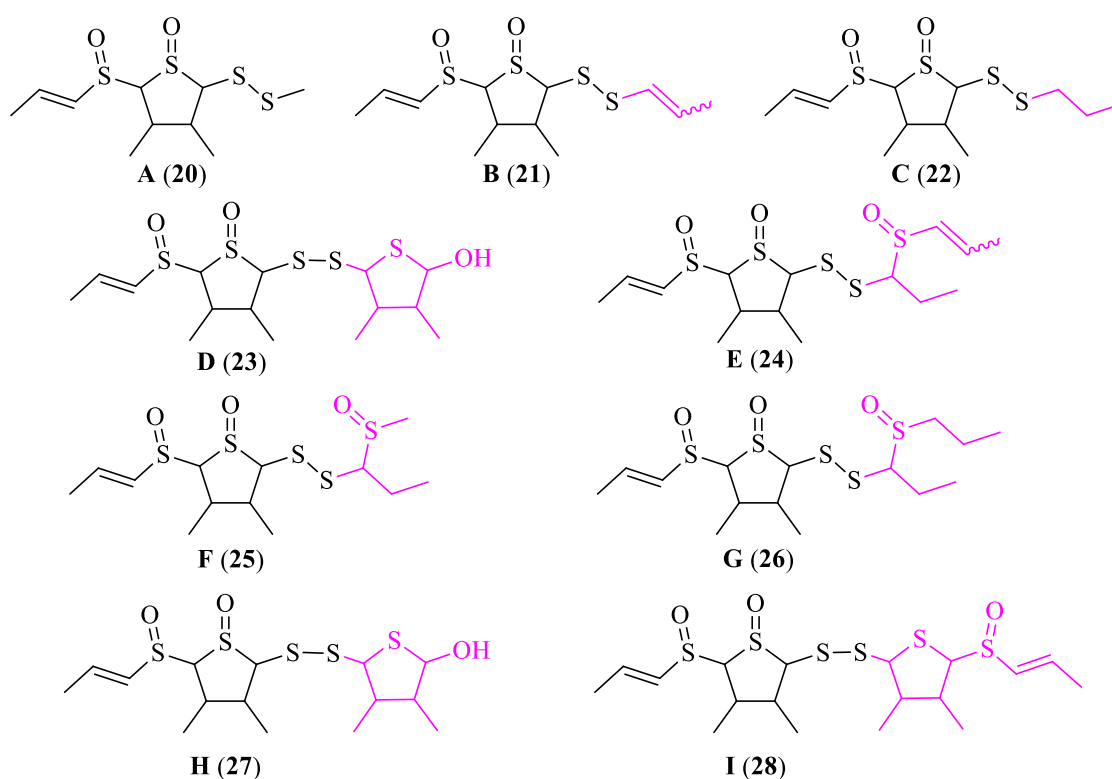
Toto označení jako první použil ve své práci El-Aasr a kol.²², kteří roku 2010 poprvé izolovali tuto sloučeninu. Název je odvozen od anglického pojmenování cibule (onion). Tato látka, u které byly zjištěny protirakovinné účinky, byla pojmenována onionin A (**17**). Další dva nové stereoizomery onioninu A (**17**) byly objeveny roku 2014 Noharou a kol.²³. Tato práce také ukázala, že onioniny se nenachází pouze v cibuli kuchyňské (*Allium cepa*) ale i v cibuli zimní (*Allium fistulosum*). Avšak roku 2019 ve své studii Štefanová a kol.²¹ publikovali nová NMR data, která vedla k opravě chybně navržených struktur Nohary i El-Aasra. Taktéž byly v této práci představeny nové methylové a propylové homology onioninu A (**17**). Pro ně bylo zavedeno označení onionin B (**18**) a onionin C (**19**) (**Obrázek 18**).



Obrázek 18: Obecná struktura onioninu A–C (**17–19**).

2.3.10 Allithiolany

V roce 2018 byly poprvé představeny tyto látky Kubcem a kol.²⁴. K jejich objevu vedla otázka, které látky vedou u zpracované cibule k postupnému hořknutí. Výsledkem byl objev 9 zcela nových strukturně odlišných sloučenin. Název allithiolany vznikl spojením latinského názvu cibule *Allium* a přítomností thiolanového kruhu. Jednotlivé strukturně podobné deriváty těchto látek jsou označeny jako allithiolan A–E (20–28) a jedná se o deriváty 3,4-dimethylthiolan-S-oxidu. Jejich struktury uvádí **Obrázek 19**.

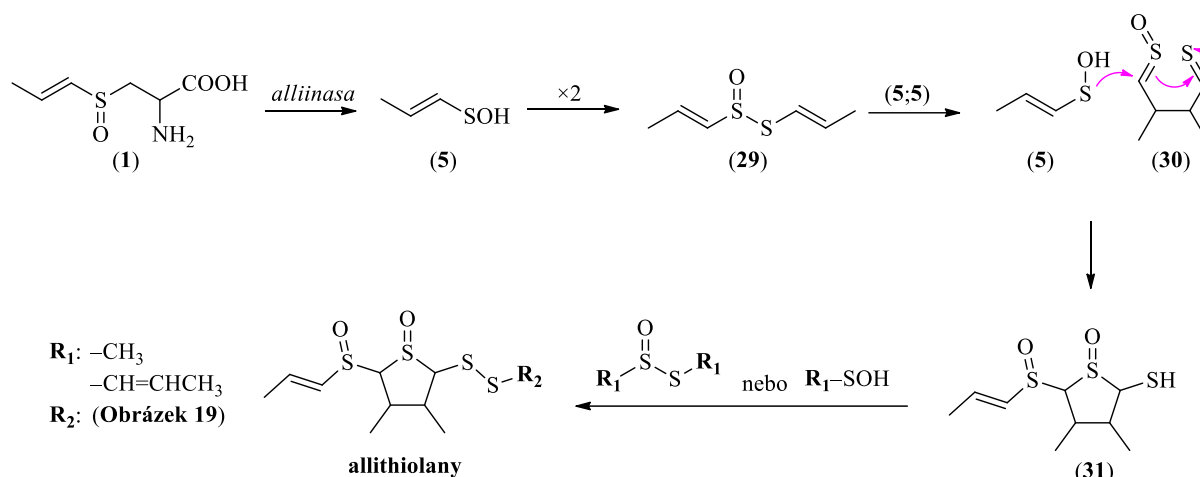


Obrázek 19: Struktury allithiolanů A–I (20–28).

Hlavní vlastností allithiolanů je zejména jejich nežádoucí výrazná hořká chuť. Tato chuť se u zpracované cibule objevuje několik minut po jejím mechanickém zpracování. Vznik allithiolanů je tudíž velmi nežádoucím jevem.

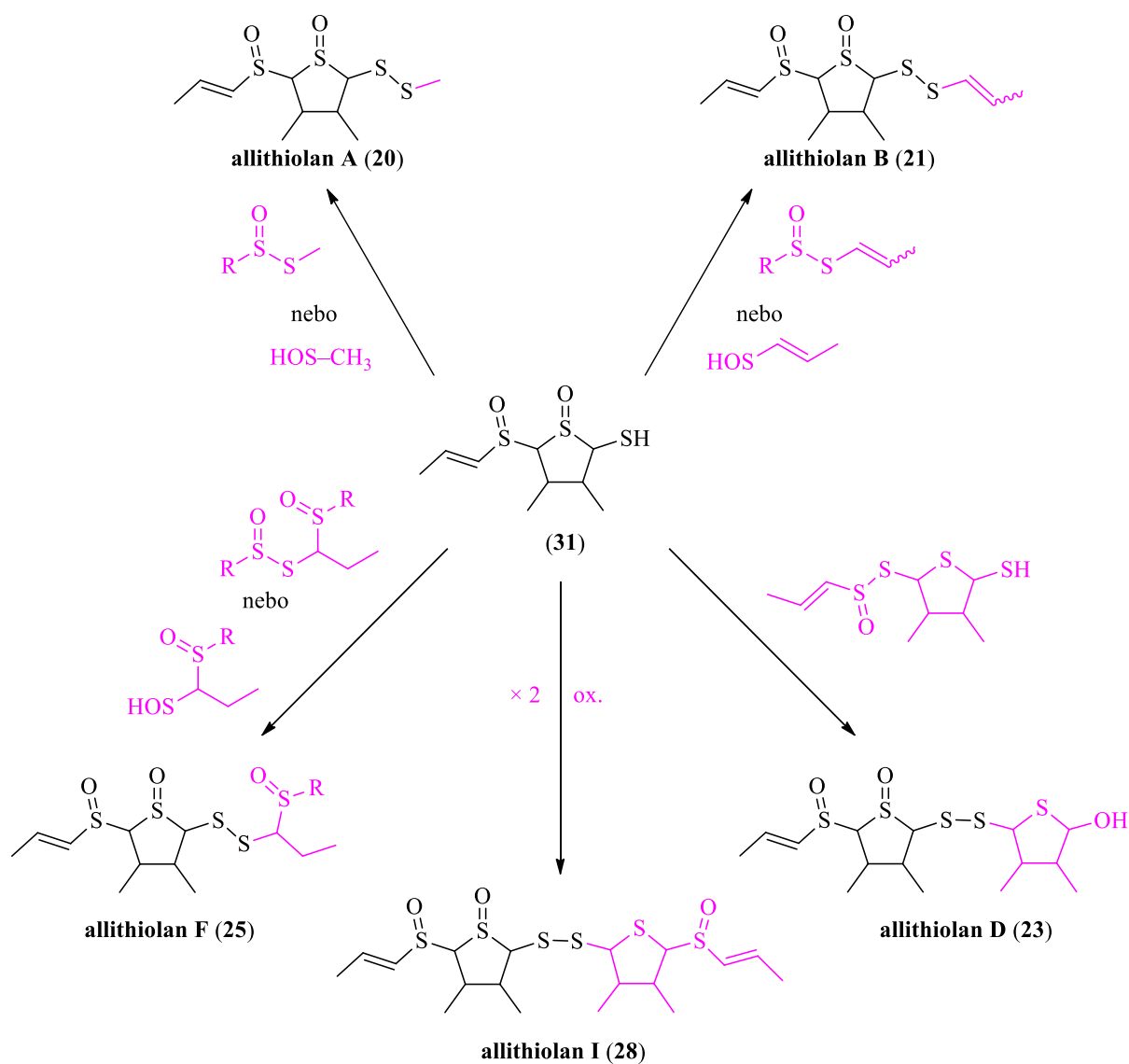
Pro vznik allithiolanů je nezbytný hlavního prekursor isoalliin (1). Tento prekursor je nutný pro všechny allithiolany, avšak pro allithiolan A (20) a allithiolan F (25) je rovněž potřeba dalšího prekursoru methiinu (2). Isoalliin (1) je katalyticky rozložen enzymem alliinasou na 1-propensulfenovou kyselinu (5). Ta podléhá kondenzaci za vzniku

S-(1-propenyl)-1-propenthiosulfinátu (**29**). Tato látka je nestabilní a samovolně se rozloží na 2,3-dimethylbutandithial-*S*-oxid (**30**). Dále je tento oxid karbofilně atakován další molekulou 1-propensulfenovou kyselinou (**5**) za vzniku 3,4-dimethyl-2-(1-propenylsulfinyl)-5-sulfanylthiolan-1-oxidu (**31**), jenž je společným meziproduktem při vzniku všech allithiolanů. Reakční mechanismus vzniku je zobrazen na **Obrázku 20**.



Obrázek 20: Primární fáze mechanismu vzniku allithiolanů.

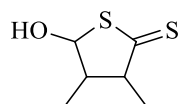
Finálním krokem vzniku allithiolanů je reakce sulfonové skupiny meziprojektu 3,4-dimethyl-2-(1-propenylsulfinyl)-5-sulfanylthiolan-1-oxidu (**31**) s ostatními sloučeninami průběžně vznikajícími v cibuli z isoalliinu (**1**) a methiinu (**2**). Vznik jednotlivých druhů allithiolanů je popsán na **Obrázku 21**.



Obrázek 21: Sekundární fáze mechanismu vzniku allithiolanů.

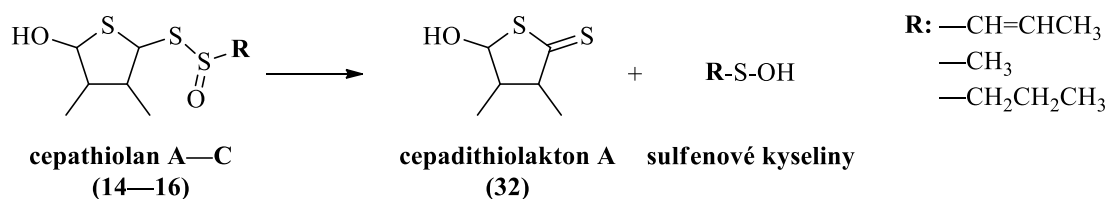
2.3.11 Cepadithiolakton A

Zcela novou látku, systematicky 5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-thion, ve své studii objevili Štefanová a kol. v roce 2019²¹. Do této doby nebyl znám žádný přírodní dithiolakton, tudíž se tato sloučenina stala prvním přirozeně se vyskytujícím dithiolaktonem. Triviální označení cepadithiolakton A (**32**; **Obrázek 22**) je tedy kombinací latinského označení pro cibuli a přítomnou strukturou dithiolaktonu.



Obrázek 22: Struktura cepadithiolaktonu A (32).

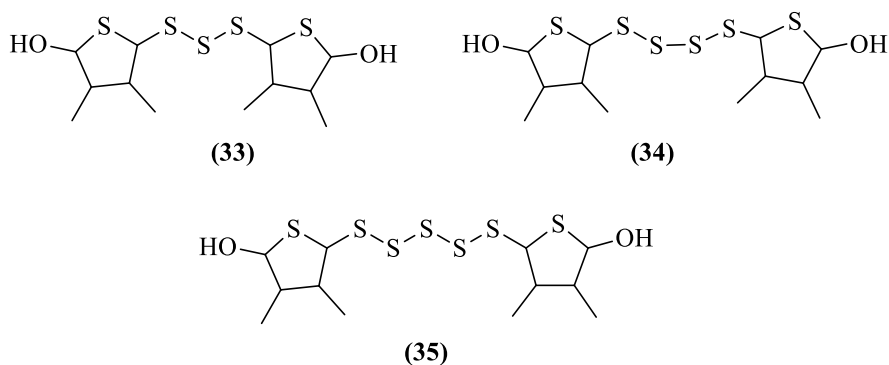
Cepadithiolakton A (32) vzniká pravděpodobně rozkladem cepathiolanů za uvolnění sulfenových kyselin, **Obrázek 23**.



Obrázek 23: Mechanismus vzniku cepadithiolaktonu A (32) rozkladem cepathiolanů.

2.3.12 Bisthiofanové polysulfidy

Zcela nové látky objevil v roce 2021 Aoyagi²⁵. Tyto tři nové látky měly strukturální vzorec C₁₂H₂₂O₂S₅₋₇ a lišily se pouze počtem atomů síry v řetězci. Jejich strukturální vzorec je bis(5-hydroxy-3,4-dimethylthiolan-2-yl)-tri/tetra/pentasulfid. Jako triviální označení těchto látek se zavedlo thiofantrisulfid (33), thiofantetrasulfid (34), a thiofanpentasulfid (35). Jejich strukturu uvádí **Obrázek 24**.



Obrázek 24: Struktura bisthiofanových polysulfidů.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a materiály

3.1.1 Chemikálie

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%, p. a.)

Penta (Praha, Česká republika)

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

Sigma Aldrich (St. Luis, MO, USA)

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

3.1.2 Rostlinný materiál

V místním obchodě byla pořízena cibule *A. cepa* (kultivar Swift, Česká republika) a česnek setý *A. sativum* (Česká republika).

3.1.3 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; 60ml) kolony – Supelco (Bellefonte, PE, USA).

3.2 Přístroje

Na izolaci látek pomocí HPLC byl použit přístroj 1260 Infinity II preparative (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s detektorem 1260 Infinity II DAD WR. Na proces separace byly použity analytické kolony Kinetex C-8 (100 Å; 250 × 4,6 mm; 5 µm; Phenomenex). Při testování nejlepší separační metody byly rovněž vyzkoušeny analytické kolony Kinetex C-18, F-5 a Biphenyl (100 Å; 250 × 4,6 mm; 5 µm; Phenomenex). K izolaci látek byly použity preparativní kolony Kinetex C-8 (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 µm; Phenomenex) popřípadě Kinetex phenyl-hexyl (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 µm; Phenomenex).

Pro identifikaci izolovaných látek byl použit systém UHPLC-PDA-MS/MS složený 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 této práci byly použity následující HPLC gradienty:

METODA A

Průtok	čas [min]	H₂O [%]	CH₃CN [%]
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	C8 Kinetex (100 Å; 250 × 21,2mm; 5 µm)		

METODA B

Průtok	čas [min]	H₂O + 0,05% HCOOH [%]	CH₃OH + 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 (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 µm)		

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	C8 Kinetex (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 µm)		

METODA D

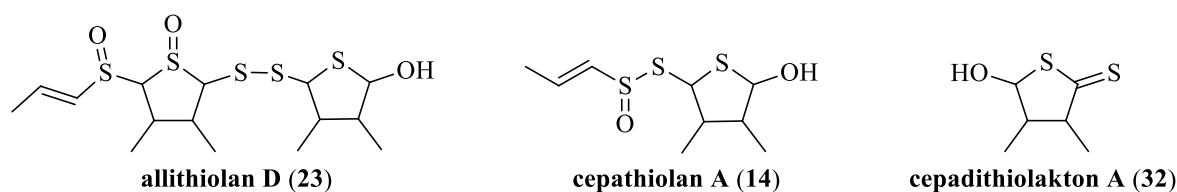
Průtok	čas [min]	H ₂ O + 0,05%	CH ₃ OH + 0,05%
		HCOOH [%]	HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	50	50
	50:00	60	40
	51:00	5	95
	59:00	5	95
	60:00	50	50
Kolona	C8 Kinetex (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 μm)		

METODA E

Průtok	čas [min]	H ₂ O + 0,05%	CH ₃ CN + 0,05%
		HCOOH [%]	HCOOH [%]
19,1 ml/min	0:00	90	10
	45:00	65	35
	46:00	5	95
	54:00	5	95
	55:00	90	10
Kolona	C8 Kinetex (100 Å; 250 × 21,2 mm; 5 μm)		

3.4 Izolace sloučenin

Experimentální část této práce bude rozdělena na izolaci třech různých typů látek, tj. allithiolanu D (**23**), cepathiolanu A (**14**) a cepadithiolaktonu A (**32**). S ohledem na odlišný postup izolace těchto sloučenin je tato práce rozdělena na **extrakt 1** (izolace allithiolanů D (**23**)) a **extrakt 2** (izolace cepathiolanu A (**14**) a cepadithiolaktonu A (**32**)). Jednotlivé struktury jsou zobrazeny na **Obrázku 25**.



Obrázek 25: Sloučeniny vybrané pro izolaci.

Z důvodu velké škály vznikajících sloučenin, které vznikají při porušení rostlinného pletiva cibule, bylo nutné postup izolace zmíněných sloučenin modifikovat. Aby se předešlo vzniku ostatních látek, které nejsou předmětem studia této práce, nebylo pracováno s klasickým cibulovým extraktem, ale pouze se směsí prekurzorů organosírných sloučenin (tj. *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, podrobněji kapitola **2.3.1**). Tato směs reagovala s enzymem alliinase, pro jejíž izolaci byl záměrně zvolen česnek. Důvod použití alliinasy z česneku namísto alliinasy cibulové je absence LFS. To má za následek, že všechny organosírné prekurzory reagují za vzniku požadovaných sloučenin vhodných k izolaci namísto nežádoucího LF (**4**) a mnoha jiných (více kapitola **2.3.3**).

3.4.1 Izolace alliinasy

Pro získání alliinasy byl použit česnek kuchyňský (*Allium sativum*) o hmotnosti 453 g. Pro zajištění stability látek byla izolace prováděna při teplotě 0–4 °C. Oloupaný česnek byl rozmixován kuchyňským mixérem a následně smíchán se 400 ml chlazeného roztoku 0,1M KH₂PO₄. Složení tohoto extrakčního pufru bylo 13,6 g KH₂PO₄, 1,5 g chelatonu III, 87 g toluensulfonylfluoridu, 0,5 g cysteinu a 5 mg pyridoxal-5-fosfátu. Vzniklý roztok byl

obohacen o 100 ml glycerolu a dále bylo za pomoci KOH upraveno pH roztoku na hodnotu 7,5. Takto získaný homogenát česneku byl přefiltrován za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky s plátnem. Roztok (475 ml) byl následně odstředěn (5000 rpm; 15 min; 3 °C) a bylo tak získáno 450 ml supernatantu. Supernatant byl umístěn do ledové lázně a za stálého míchání k němu bylo přidáno 185 g (NH₄)₂SO₄. Získaná směs byla 60 minut míchána za stálého chlazení ledem. Další krokem bylo odstředění (5000 rpm; 20 min; 3 °C) a slítí supernatantu. Rozpuštění precipitátu bylo provedeno v minimálním objemu extrakčního pufru (160 ml) a poté byl přemístěn do dialyzačního střívka (23 mm; 12,4 kDa MWCO). Takto připravený roztok byl dialyzován v destilované vodě (4 °C) po dobu 72 hodin. Během této doby byl roztok prvních 24 hodin měněn každé 4 hodiny, a nadále každých 8 hodin. Po skončení dialýzy byl obsah dialyzační membrány rozdělen do vialek a lyofilizován. Tento proces byl proveden vícekrát.

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

Pro tuto práci byla zvolena metoda modelových reakcí *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů spolu s enzymem alliinasa izolovaným z česneku. Při práci s cibulovým extraktem dochází k reakci s druhým enzymatickým systémem LFS a v extraktu vzniká nežádoucí LF (**4**; **Obrázek 8**). Tím se snižuje počet ostatních sloučenin, vhodných k izolaci. Pro tuto práci byl vyvinut postup pro izolaci směsi *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů spolu s dalšími aminokyselinami běžně se vyskytujícími v cibuli. Oproti izolaci čistých *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů nabízí tento postup časovou úsporu a reakce poskytuje identické sloučeniny jako při modelové reakci s čistými *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy (tj. s isoalliinem (**1**) a methiinem (**2**)).

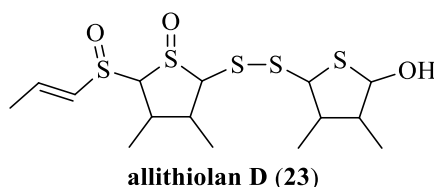
500 g lyofilizované cibule bylo smícháno s 4 l H₂O a 4 ml 35% HCl. Takto vzniklá směs se nechala 20 minut povařit, a poté byla ledem ochlazená na laboratorní teplotu. Po ochlazení došlo k filtraci homogenátu přes plátno. Následně byl filtrát odstředěn (5000 rpm). pH supernatantu bylo za pomoci koncentrované HCl upraveno z pH 4,4 na 3,5. Takto získaný vzorek byl nanesen na skleněnou kolonu naplněnou katexem (18 × 5 cm, výška × šířka sloupce, Amberlite IR-120). Nanesený vzorek aminokyselin byl promyt vodou a eluován 0,2 M NH₄OH. Jednotlivé frakce, které poskytly pozitivní reakci s ninhydrinem (potvrzení aminokyselin bylo ověřeno i pomocí HPLC/PDA analýzy), byly sloučeny a aktivním uhlím bylo odstraněno jejich nežádoucí žluté zbarvení. Filtračním papírem KA 4 byla směs

zfiltrována a uložena při teplotě $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Lyofilizací směsi byly získány hrubé krystaly prekurzorů organosírných sloučenin, tj. isoalliinu (**1**), methiinu (**2**) a propiinu (**3**) (**Obrázek 5**). Tato směs však obsahovala i jiné aminokyseliny běžně se vyskytující v cibuli. Jejich identifikace však nebyla nutná. Alliinasa, jenž byla použita v následující fázi postupu, katalyzuje rozklad pouze *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů. Další aminokyseliny zůstávají při extrakci ve vodné fázi.

Označení „nečistý isoalliin“ bude nadále používáno pro takto získanou směs prekurzorů organosírných sloučenin z cibule.

3.4.3 Příprava extraktu 1

Postup přípravy **extraktu 1** byl optimalizován pro izolaci allithiolanu D (**23**). Allithiolany přirozeně vznikají při porušení cibulového pletiva sérií enzymově katalyzovaných reakcí (viz **Obrázek 20** a **21**). Ačkoliv je tvorba allithiolanů obvykle pozorována už po 10 minutách, je výhodnější ponechat směs reagovat delší dobu. Z tohoto důvodu probíhala výchozí reakce „nečistého isoalliinu“ spolu s česnekovou alliinase celkem 4 hodiny. Strukturu izolované sloučeniny z **extraktu 1** uvádí **Obrázek 26**.



Obrázek 26: Struktura allithiolanu D (**23**) izolované z **extraktu 1**.

Pro modelovou reakci **extraktu 1** bylo užito 40 g „nečistého isoalliinu“ rozpuštěného ve 400 ml 0,5M KH_2PO_4 (10% glycerol; 25 $\mu\text{mol/l}$ pyridoxal-5-fosfát; $\text{pH} = 7$). K tomuto roztoku byly poté přidány 4 g česnekové alliinasy, rozpuštěné v 800 ml identického extračního pufru (0,5M KH_2PO_4). Po dobu 4 hodin v roztoku probíhaly za mírného míchání všechny nezbytné enzymatické reakce. Následně proběhla extrakce vzniklých sloučenin metodou přímé extrakce 2×200 ml diethyletheru (dále jen DEE). Výsledný extrakt byl přesušen bezvodým MgSO_4 , zfiltrován přes Hirschovu nálevku a pomocí rotační vakuové odparky (dále jen RVO; $t < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) došlo k odstranění veškerého DEE. Takto bylo zpracováno

celkem 100 g „nečistého isoalliinu“ spolu s 10 g česnekové alliinasy. Získaný extrakt byl před samotnou HPLC analýzou purifikován SPE kolonkou. Rozpuštěním vzorku v 60 ml CH₃CN a následným průchodem přes C8-SPE kolonu (Supelco; 10 g; 60 ml) byl vzorek přečištěn od látek, které se sorbují na chromatografickou kolonu. Po odpaření veškerého acetonitrilu pomocí RVO ($t < 30$ °C) byl získán žlutohnědý extrakt (4,16 g) typické cibulové vůně, který byl před dalšími analýzami uchováván při teplotě -28 °C.

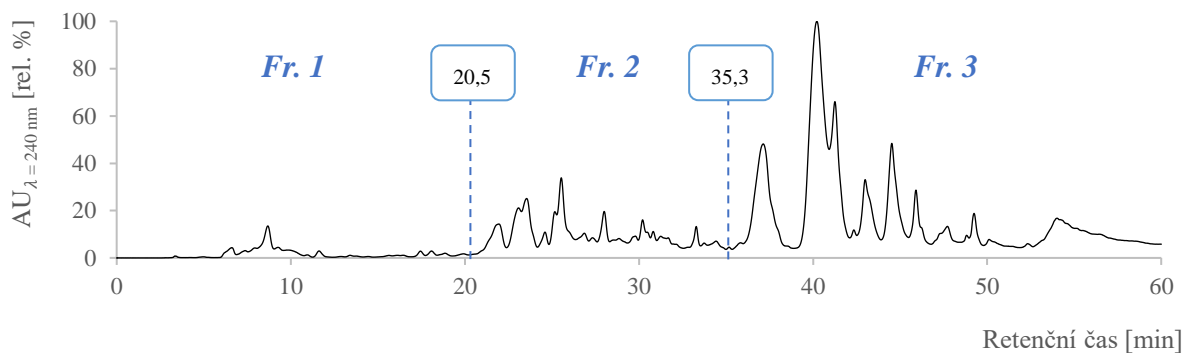
3.4.3.1 Frakcionace extraktu 1

Z důvodu velkého počtu vzniklých látek byla potřeba **extrakt 1** frakcionovat na menší podfrakce, aby mohla být provedena izolace vybraných sloučenin. Izolace byla provedena metodou preparativní HPLC/PDA na reverzní fázi. V průběhu optimalizace izolace bylo využito více různých chromatografických kolon (Kinetex biphenyl, phenyl-hexyl, C-8, C-18 a F-5; Phenomenex).

Příprava HPLC vzorku ze získaného extraktu 1

Rozpuštěním extraktu (4,16 g) ve 32 ml CH₃CN/H₂O (v/v; 2/1) byl získán vzorek o koncentraci 130 mg/ml. Následně byl vzorek přefiltrován přes membránový filtr (PTFE; \varnothing 25 mm; 0,45 μ m). Preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda A**, objem nástřiku 900 μ l) byly opakovaným jímáním získány celkem 3 frakce (označeny *Fr. 1–Fr. 3*), které jsou znázorněny na **Obrázku 27**.

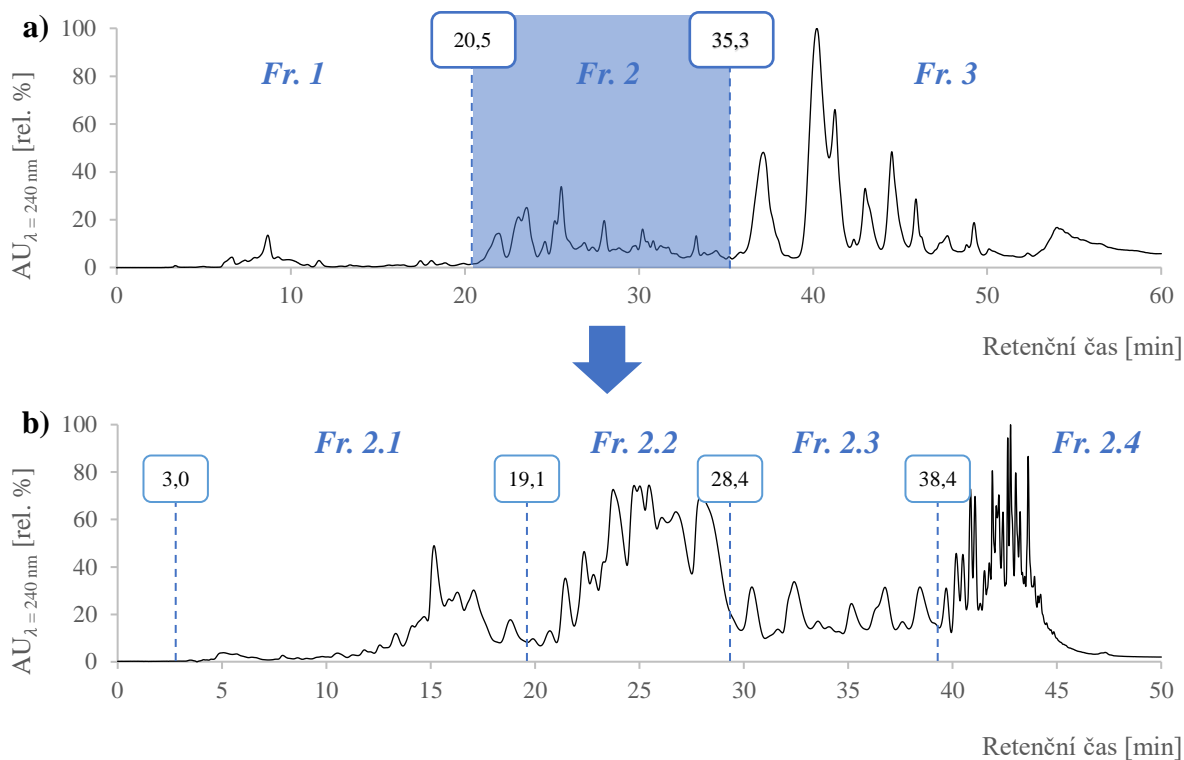
Každá z najímaných frakcí byla pomocí RVO ($t < 30$ °C) zbavena CH₃CN a metodou přímé extrakce s použitím DEE (v/v; DEE/vzorek; 1/5) extrahována, přesušena MgSO₄, zfiltrována přes Hirschovu nálevku a opět pomocí RVO ($t < 30$ °C) zbavena DEE. Extrakty jednotlivých frakcí byly před následujícími analýzami uchovány při -28 °C.



Obrázek 27: C8-HPLC/PDA chromatogram **extraktu 1** – počáteční frakcionace (**Metoda A**).

Fr. 2

Vzorek *Fr. 2* (1,46 g) byl rozpuštěn ve 12 ml okyseleného roztoku (0,05% HCOOH) směsi CH₃OH/H₂O (v/v; 2/1), poté zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; 0,45 μm; ø 13 mm). Byl tak získán vzorek pro HPLC o koncentraci 120 mg/ml. Následovala HPLC frakcionace (PH6-HPLC/PDA, **Metoda B**, objem nástřiku 900 μl), při které byla *Fr. 2* rozdělena na 4 frakce s označením *Fr. 2.1–2.4* (**Obrázek 28**).



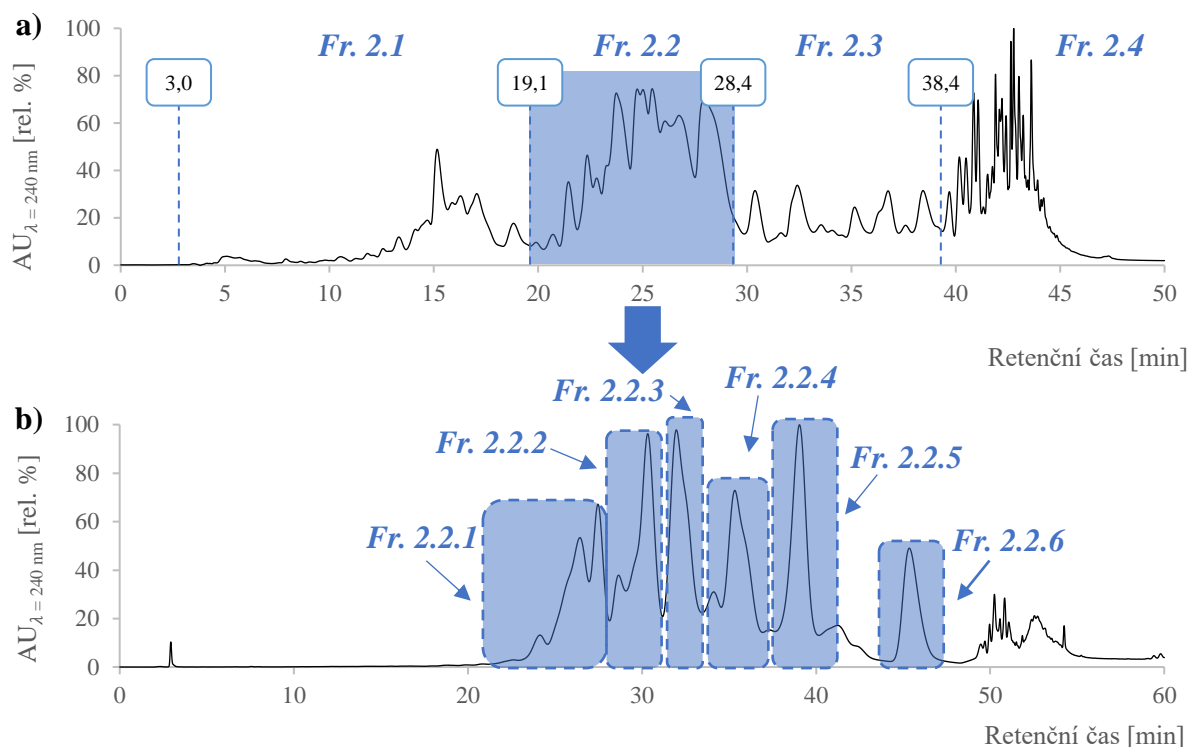
Obrázek 28: PH6-HPLC/PDA chromatogram **extraktu 1**:

- a) modelová reakce (**Metoda A**);
- b) *Fr. 2* (**Metoda B**).

U zmíněných *Fr. 2.1–2.4*. byl odpařen CH_3CN pomocí RVO ($t < 30\text{ }^\circ\text{C}$). Následně bylo pomocí 10% NaHCO_3 upraveno pH na hodnotu 7 (neutralizace HCOOH z mobilní fáze). Vzorke byly extrahovány metodou přímé extrakce DEE (v/v; DEE/vzorek; 1/5), přesušeny MgSO_4 a zfiltróvány přes Hirschovu nálevku. Následovalo odpaření zbývajícího DEE pomocí RVO ($t < 30\text{ }^\circ\text{C}$). Takto získané extrakty *Fr. 2.1–2.4* byly uchovány při $-28\text{ }^\circ\text{C}$.

Fr. 2.2

Metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 29, Metoda C**) byla optimalizována pro *Fr. 2.2*. Naředění extraktu *Fr. 2.2* (227 mg) bylo provedeno směsí $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; 1/2). Vzorek o koncentraci 38 mg/ml byl zfiltróván membránovým filtrem (PTFE; $0,45\mu\text{m}$; \varnothing 13 mm). Pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda C**, objem nástřiku $500\ \mu\text{l}$) byla *Fr. 2.2* rozdělena na 6 podfrakcí s označením *Fr. 2.2.1–2.2.6* (**Obrázek 29**).



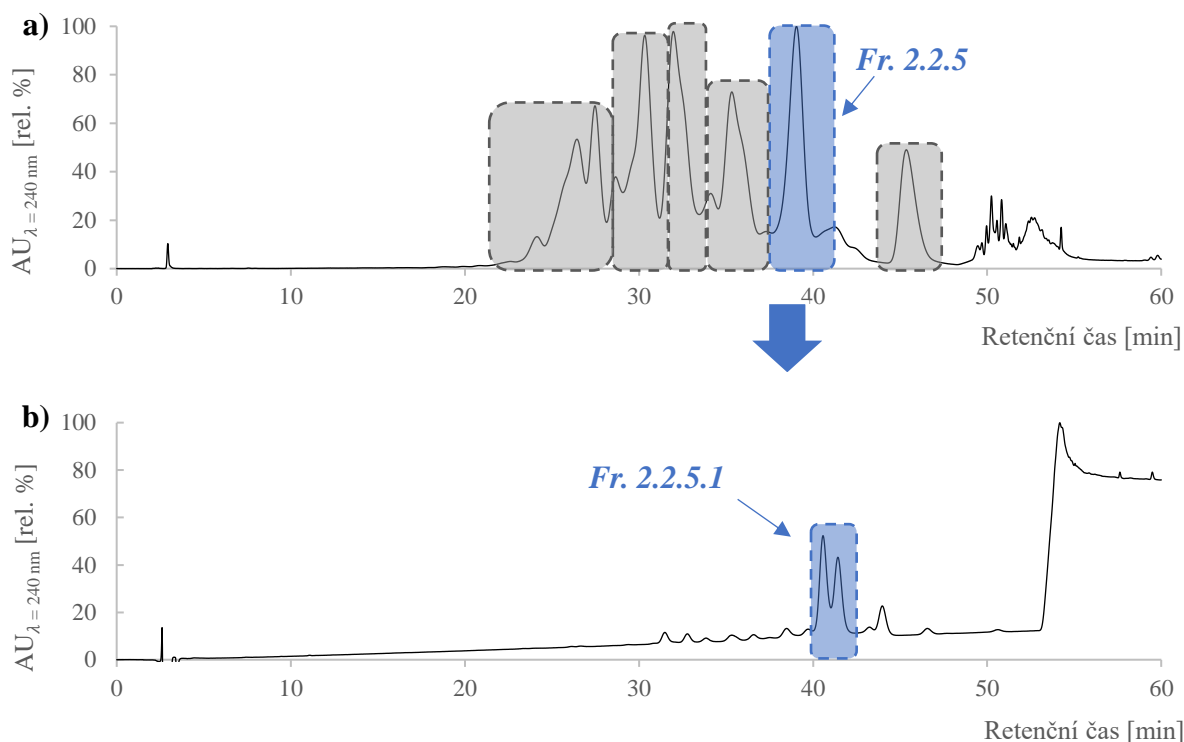
Obrázek 29: C8-HPLC/PDA chromatogram **extraktu 1**:

- a) *Fr. 2* (**Metoda B**);
- b) *Fr. 2.2* (**Metoda C**).

U zmíněných *Fr. 2.2.1–2.2.6* byl za pomoci RVO ($t < 30$ °C) odstraněn CH_3CN . Dále byly extrahovány metodou přímé extrakce $2 \times \text{DEE}$ (v/v; vzorek/DEE; 5/2) a přesušeny MgSO_4 . Následně došlo k filtraci přes Hirshovu nálevku a úplnému odpaření pomocí RVO. Získané extrakty byly uchovány při teplotě -28 °C.

Fr. 2.2.5

Pro *Fr. 2.2.5* byla optimalizována metoda preparativní C8-HPLC/PDA (**Obrázek 30, Metoda D**). Extrakt *Fr. 2.2.5* (21 mg) byl naředěn rozpuštěním v 2,5 ml okyselené (0,05% HCOOH) směsi $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v; $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$; 2/3) a zfiltrován přes membránový filtr (PTFE; $0,45\mu\text{m}$; \varnothing 13 mm). Pomocí preparativní C8-HPLC/PDA (nástríkový objem $500\ \mu\text{l}$) byla opakovaně jímána *Fr. 2.2.5.1*. Najímaná *Fr. 2.2.5.1* byla po odpaření CH_3OH (RVO, $t < 30$ °C) upravena na pH 7 pomocí NaHCO_3 (neutralizace HCOOH z mobilní fáze). *Fr. 2.2.5.1* byla uschována při -28 °C.

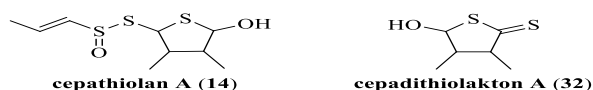


Obrázek 30: C8-HPLC/PDA chromatogram **extraktu 1**:

- a) *Fr. 2.2* (Metoda C);
- b) *Fr. 2.2.5* (Metoda D).

3.4.4 Příprava extraktu 2

Pro izolaci dalších sloučenin, tj. cepathiolanu A (**14**) a cepadithiolaktonu A (**32**) byla optimalizována příprava **extraktu 2**. Tyto látky vznikají v počáteční fázi enzymové reakce. Výchozí látky **extraktu 2**, tj. nečistý isoalliin a česneková alliinasa, byly ponechány reakci pouze 1 minutu. Látky určené k izolaci z **extraktu 2** jsou uvedeny na **Obrázku 31**.



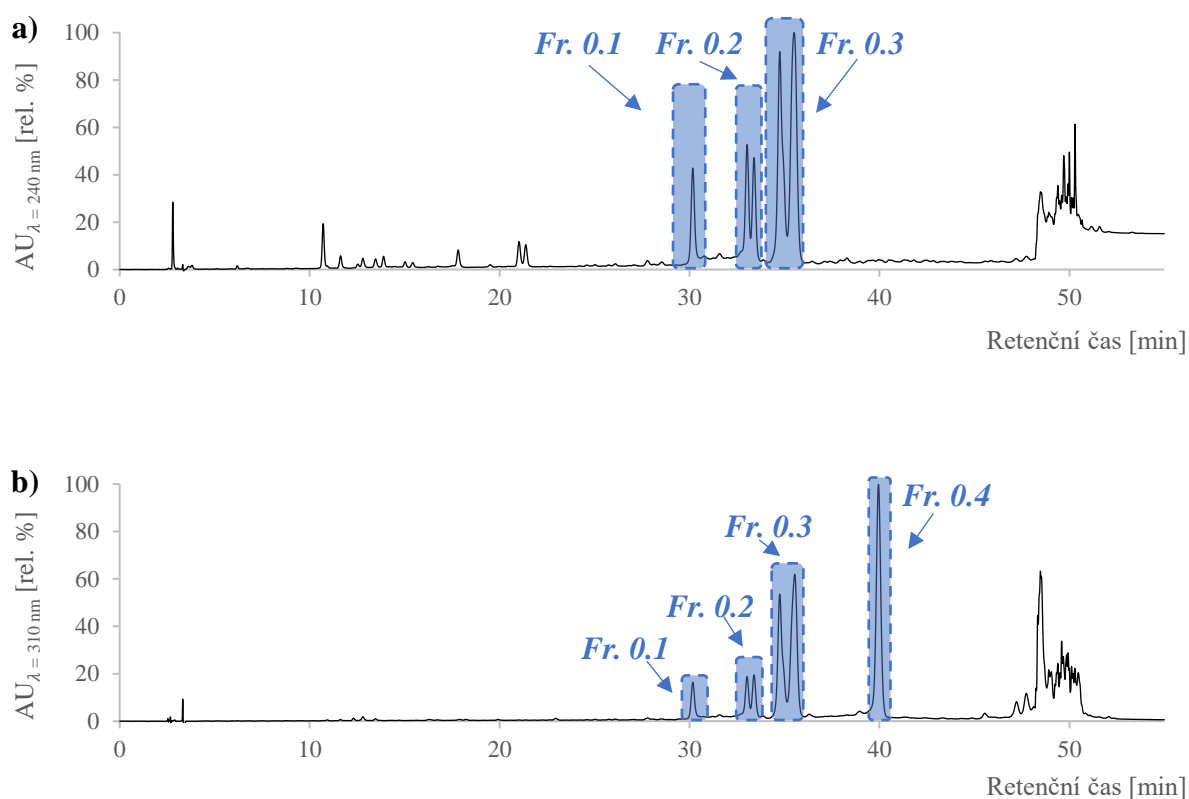
Obrázek 31: Vybrané sloučeniny cepathiolan A (**14**) a cepadithiolakton A (**32**) určené k izolaci v **extraktu 2**.

Pro modelovou reakci bylo využito 20 g „nečistého isoalliinu“ (viz kapitola *Izolace S-alk(en)ylcystein-S-oxidů*) rozpuštěného v 0,5M KH_2PO_4 (pH = 7; 25 $\mu\text{mol/l}$ pyridoxal-5-fosfát; 10% glycerol). K roztoku byly přidány 2 g česnekové alliinasy rozpuštěné ve 400 ml identického fosfátového pufru. Směs reagovala 1 minutu a poté byla extrahována metodou přímé extrakce 200 ml DEE. Následně byla směs centrifugována kvůli odstranění vzniklé emulze. Následovalo přesušení bezvodým MgSO_4 , filtrace přes Hirschovu nálevku a nakonec odpaření pomocí RVO ($t < 30\text{ }^\circ\text{C}$). Tento postup byl proveden dvakrát a celkem bylo použito 40 g „nečistého isoalliinu“ a 4 g česnekové alliinasy. Tímto postupem byl získán extrakt s cibulovým aroma (916 mg), který byl před dalšími analýzami uchován při $-28\text{ }^\circ\text{C}$

Získaný extrakt byl rozpuštěn v 5 ml CH_3CN , centrifugován a přefiltrován přes centrifugační filtr (0,45 μm). Následně byly pomocí SPE kolonky (SPE Discovery DSC-C8; 60ml; 10 g) odstraněny nežádoucí látky sorbující se nevratně na chromatografickou kolonu. SPE kolonka byla vypláchnuta 10 ml CH_3CN . Na závěr byl odstraněn CH_3CN pomocí RVO ($t < 30\text{ }^\circ\text{C}$) a bylo tak získáno celkem 777 mg **extraktu 2**.

3.4.4.1 Frakcionace extraktu 2

Získaný extrakt (777 mg) byl rozpuštěn v okyselené (0,05% HCOOH) směsi $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 1/1). Metodou preparativní C8-HPLC/PDA (**Metoda E**, objem nástřiku 400 μl) byly opakovaně jímány celkem 4 frakce (*Fr. 0.1*, *Fr. 0.2*, *Fr.0.3*, *Fr. 0.4*). Průběh frakcionace uvádí **Obrázek 32**.



Obrázek 32: C8-HPLC/PDA chromatogram **extraktu 2** [a) $\lambda = 240$ nm; b) $\lambda = 310$ nm] – frakcionace (**Metoda E**).

S ohledem na přítomnost kyseliny mravenčí z mobilní fáze bylo nutné izolované frakce neutralizovat pomocí roztoku 10% NaHCO_3 . Dále byly frakce třikrát extrahovány metodou přímé extrakce pomocí DEE (vzorek/DEE; 8/1), poté přesušeny pomocí MgSO_4 , zfiltrány přes Hirschovu nálevku a pomocí RVO zbaveny DEE. Takto zpracované frakce (*Fr. 0.1–Fr. 0.4*) byly před dalšími analýzami uschovány při teplotě -28 °C.

4 Výsledky

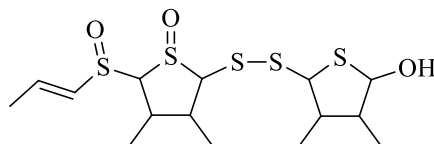
Cepathiolany A (**14**), cepadithiolaktony A (**32**) a allithiolany D (**23**) řadíme mezi organosírné sloučeniny, jejichž vznik je v cibuli iniciován poškozením rostlinného pletiva. Zatímco cepathiolany vznikají v cibuli téměř okamžitě, allithiolany D (**23**) vznikají v narušeném pletivu až po nějaké chvíli. Allithiolany se zároveň projevují hořkou chutí, což je technologicky nežádoucí jev komplikující technologické zpracování cibule.

Z důvodu rozdílného času nutného ke vzniku látek byly zvoleny dvě modelové reakce, které se lišily dobou, po kterou se nechaly společně reagovat česneková alliinasa a „nečistý isoalliin“. Sama modelová reakce byla využita pro vyšší výtěžky jednotlivých izolovaných sloučenin způsobených nižším počtem vznikajících sloučenin. V případě narušení pletiva běžné cibule jsou totiž prekurzory *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy vystaveny nejen alliinase, ale rovněž druhému enzymu LFS. Ten má za následek vznik velmi těžkého LF (**4**), který navíc reakci směřuje ke vzniku dalších organosírných sloučenin, které nebyly předmětem této práce. Proto je v reakci přítomna pouze česneková alliinasa u níž nedochází k tvorbě LF (**4**). V experimentální části je rovněž popsán proces izolace „nečistého isoalliinu“, který je složen ze všech prekurzorů *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů (tj. isoalliin (**1**), methiin (**2**) a propiin (**3**)) obsažených v cibuli.

U **extraktu 2** došlo k reakci alliinasy a „nečistého isoalliinu“ po dobu 1 minuty, zatímco u **extraktu 1** byla směs ponechána po dobu 4 hodin, aby mohly proběhnout všechny potřebné reakce. Po uplynulých 4 hodinách bylo možno sensoricky potvrdit přítomnost allithiolanů, jelikož směs vykazovala pronikavě hořkou chuť, která je u allithiolanů obvyklá. Oba extrakty byly poté extrahovány pomocí DEE.

4.1 Izolace allithiolanu D

Elementární složení allithiolanu D (**23**) je $C_{15}H_{26}O_3S_5$ ($[M+H]^+ = 415,06$ Da) (**Obrázek 33**).

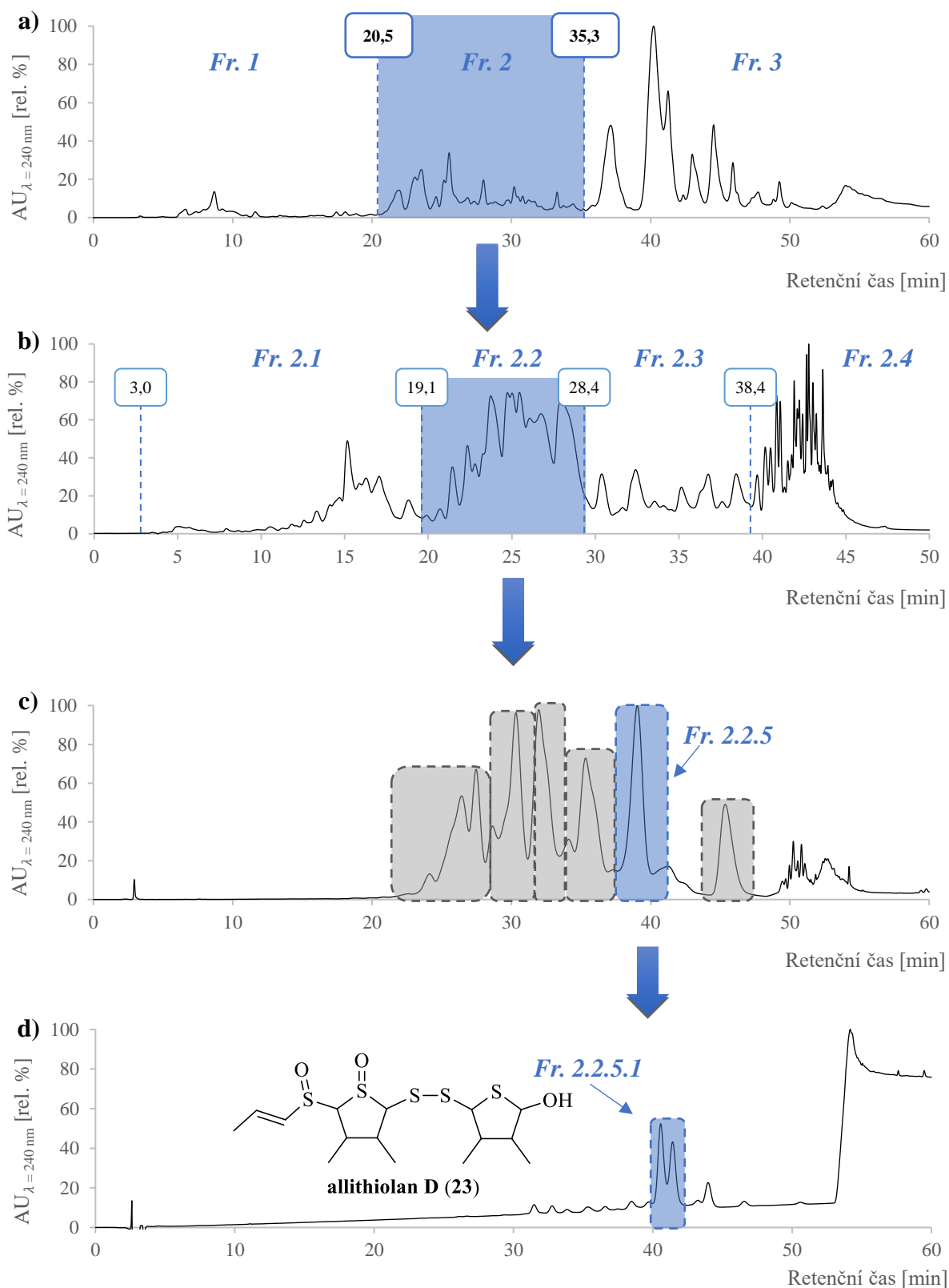


allithiolan D (23)

$C_{15}H_{26}O_3S_5$
($[M+H]^+ = 415,06$ Da)

Obrázek 33: Struktura allithiolanu D (**23**).

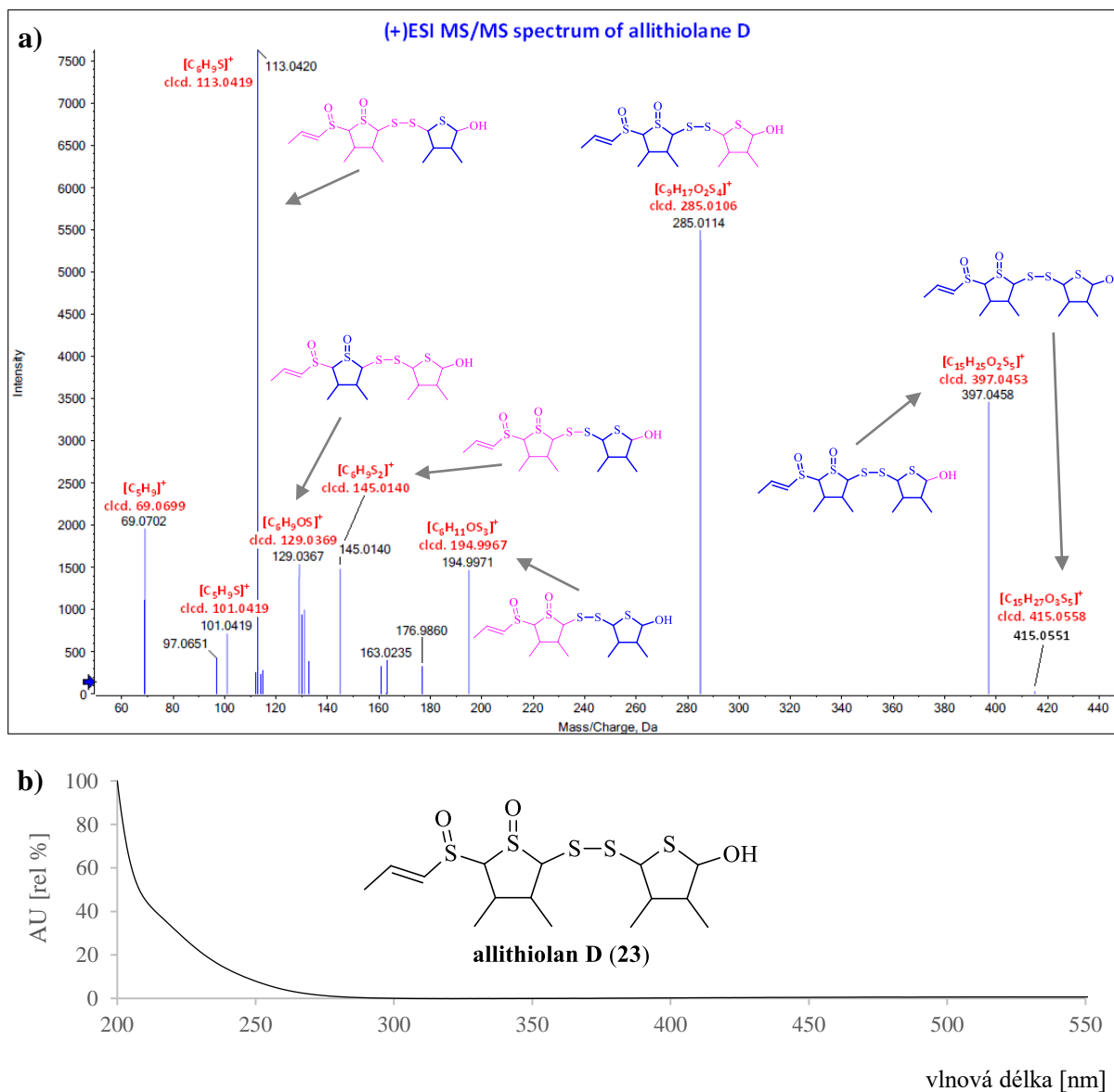
Pomocí HPLC/MS analýzy bylo zjištěno, že se látky s touto molekulovou hmotností nacházejí ve *Fr. 2* (**Obrázek 34a**). Pomocí preparativní PH6-HPLC/PDA došlo k další frakcionaci *Fr. 2* na jednotlivé podfrakce, které získaly označení *Fr. 2.1–2.4* (**Obrázek 34b**). HPLC/MS analýza izolovaných *Fr. 2.1–2.4* identifikovala allithiolany ve *Fr. 2.2*, pro kterou byla optimalizována C8-HPLC frakcionace, pomocí které bylo získáno celkem 6 podfrakcí s označením *Fr. 2.2.1–2.2.6* (**Obrázek 34c**). Pomocí HPLC/MS analýzy bylo zjištěno, že požadovaný allithiolan D (**23**) se nachází ve *Fr. 2.2.5*. *Fr. 2.2.5* byla pomocí preparativní C8-HPLC ještě přečištěna (*Fr. 2.2.5.1*) a podařilo se tak izolovat standard allithiolanu D (**23**) (**Obrázek 34d**). Celý proces izolace včetně HPLC chromatogramů je uveden na **Obrázku 34**. Celkové množství izolované *Fr. 2.2.5.1* činí 3 mg.



Obrázek 34: HPLC/PDA chromatogram extraktu 1:

- a) modelová reakce (**Metoda A**);
- b) Fr. 2 (**Metoda B**);
- c) Fr. 2.2 (**Metoda C**);
- d) Fr. 2.2.5.1. (**Metoda D**).

UV spektrum spolu s MS spektrem izolované *Fr. 2.2.5.1* (**Obrázek 35**) odpovídají struktuře allithiolanu D (**23**), publikované v práci Kubce a kol.²¹. Tato data potvrzují strukturu allithiolanu D (**23**).

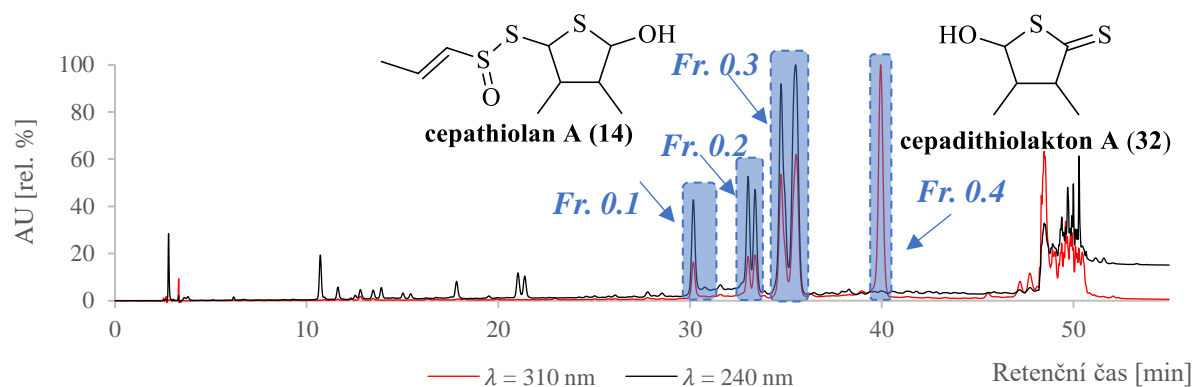


Obrázek 35: Spektrum *Fr. 2.2.5.1*:
a) MS;
b) UV-Vis.

4.2 Izolace cepathiolanu A

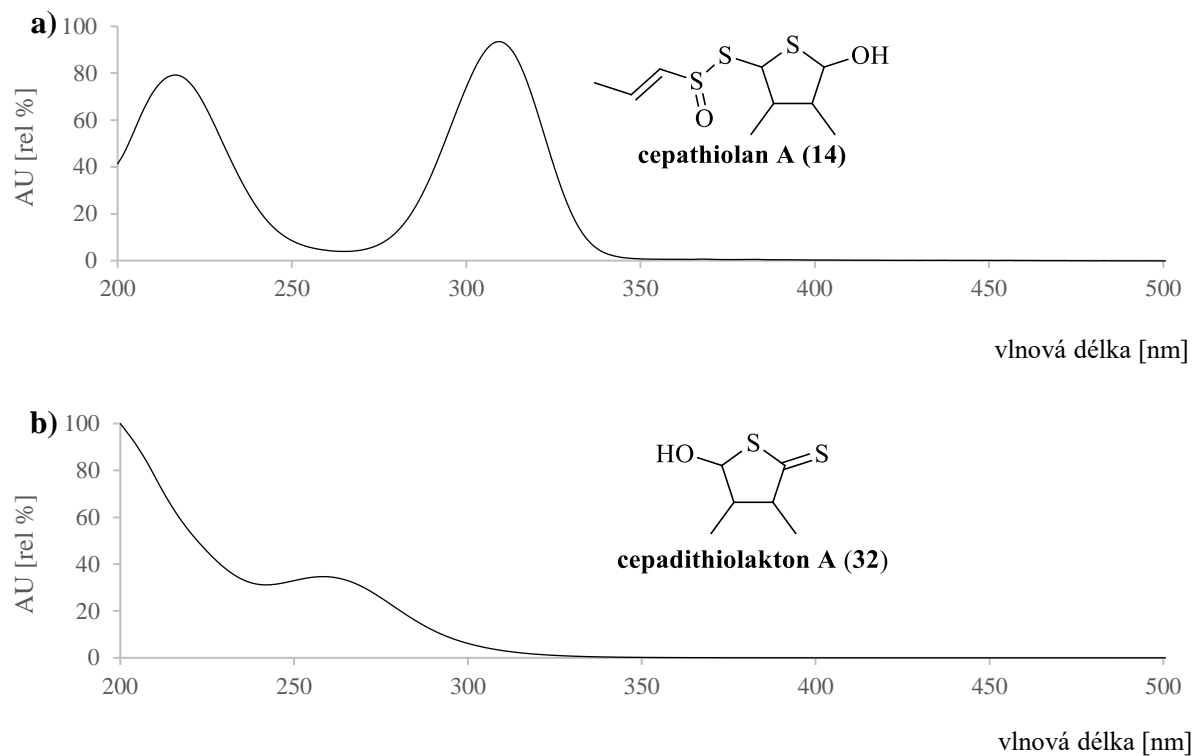
Cepathiolan A (**14**) je sloučenina s elementárním složením $C_9H_{17}O_2S_3$ ($[M+Na]^+ = 275,02$ Da). Po vyhodnocení dat HPLC/MS analýzy bylo zjištěno, že se tyto látky nachází ve *Fr. 0.1–0.3* přičemž *Fr. 0.4* je dle MS dat cepadithiolakton A (**32**; $C_6H_{11}OS_2$; $[M+H]^+ = 163,02$ Da).

Vzorek byl proto rozdělen na 4 podfrakce (označeny *Fr. 0.1–0.4*) pomocí C8-HPLC/PDA (**Obrázek 36**; **Metoda E**). Jednotlivé frakce byly zneutralizovány (10% $NaHCO_3$), extrahovány DEE a následně přesušeny $MgSO_4$, filtrovány a odpařeny. Celkové výtěžky po extrakci byly následující: *Fr. 0.1* (12 mg), *Fr. 0.2* (52 mg) a *Fr. 0.3* (186 mg). *Fr. 0.1–0.3* odpovídaly cepathiolanu A (**14**) avšak poslední *Fr. 0.4* (37 mg) byla dle MS dat cepadithiolakton A (**32**). Jednotlivé izolované frakce uvádí **Obrázek 36**.



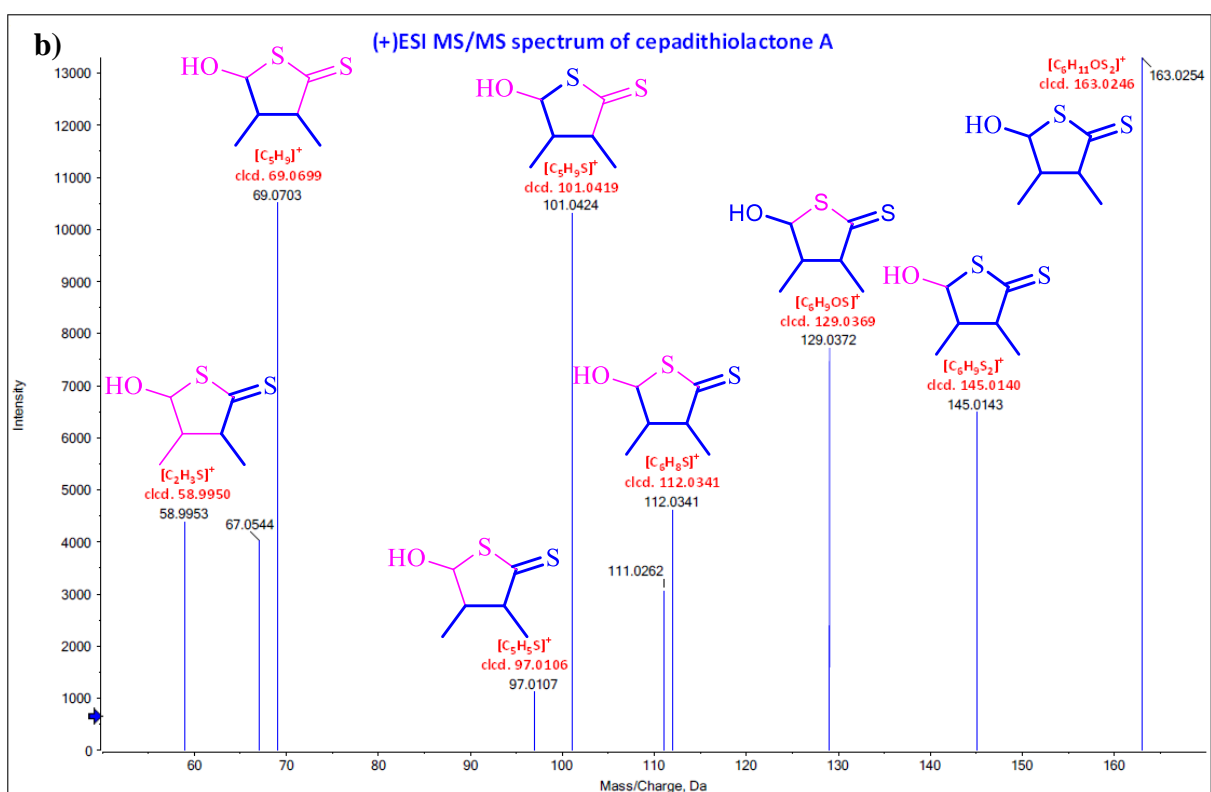
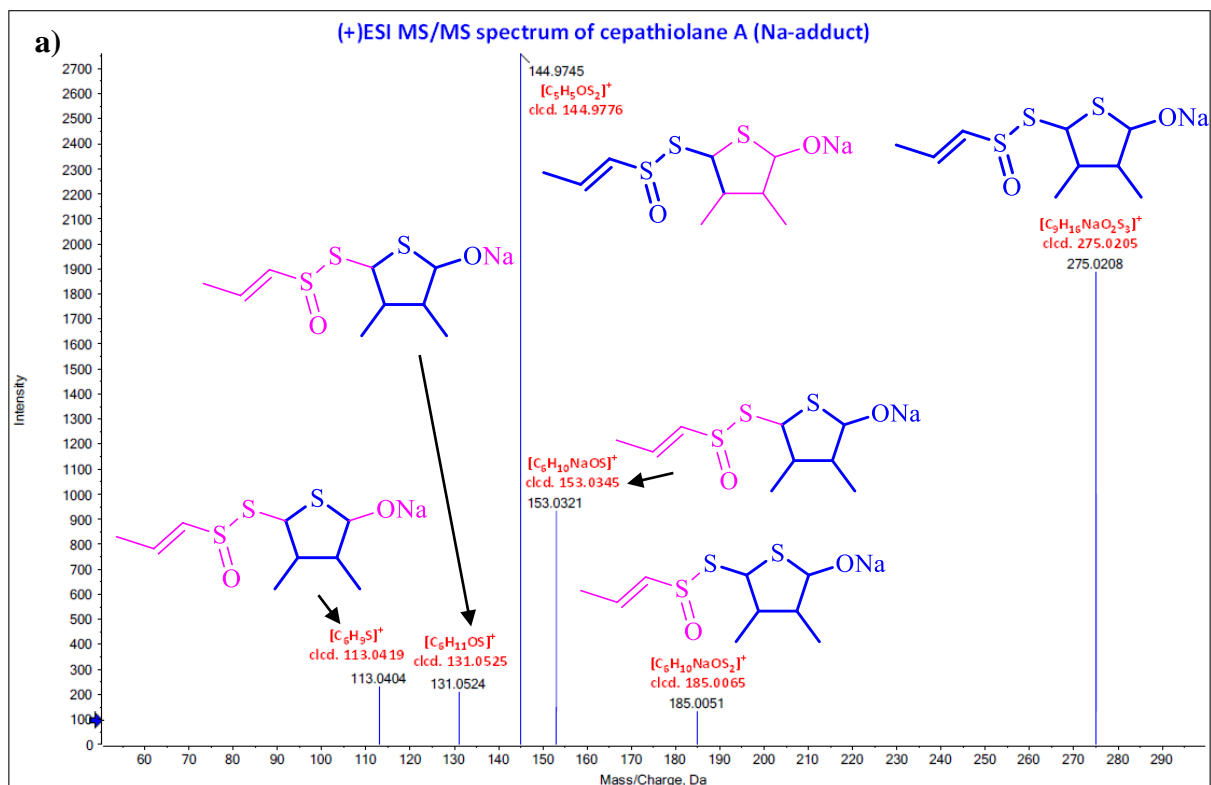
Obrázek 36: HPLC/PDA chromatogram extraktu 2: (**Metoda E**).

Na **Obrázku 37** jsou uvedena UV-VIS spektra izolovaných sloučenin, tj. cepathiolanu A (**14**) a cepadithiolaktonu A (**32**), která jsou v plné shodě s publikací Štefanovou a kol. (2019)²¹.

**Obrázek 37:** UV data:

- a) *Fr. 0.3* odpovídající cepathiolanu A (**14**);
b) *Fr. 0.4* odpovídající cepadithiolaktonu A (**32**).

Na **Obrázku 38** jsou vyobrazena MS spektra *Fr. 0.3* (**Obrázek 38a**) a *Fr. 0.4* (**Obrázek 38b**).
Jednotlivá MS spektra potvrzují sktrukturu cepathiolanu A (**14**) a cepadithiolaktonu A (**32**).



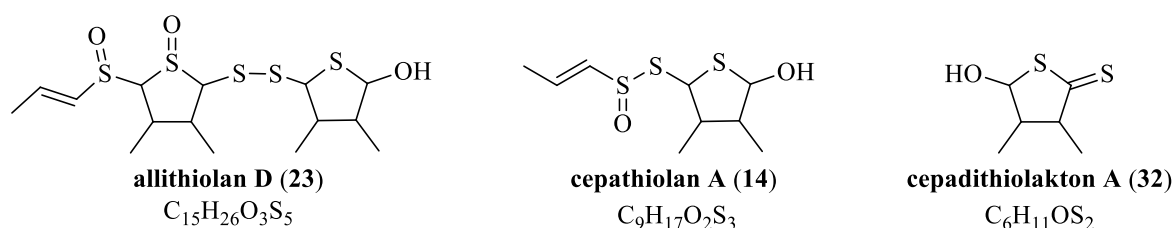
Obrázek 38: MS spektrum:

a) *Fr. 0.3* - cepathiolan A (**14**);

b) *Fr. 0.4* - cepadithiolakton A (**32**).

5 Diskuze

Cílem této práce bylo optimalizovat HPLC metodu pro izolaci vybraných cyklických organosírných sloučenin, které se přirozeně vyskytují ve zpracované cibuli. Jako hlavní látky určené pro izolaci byly vybrány allithiolany D (**23**), cepathiolany A (**14**) a cepadithiolakton A (**32**) (Obrázek 39). Izolace těchto látek je součástí rozsáhlého projektu zaměřeného na testování biologických účinků organosírných sloučenin vyskytujících se v cibuli.



Obrázek 39: Vybrané sloučeniny určené k biologickému testování.

Ačkoliv cepathiolany jsou známé již od roku 2010¹⁹, allithiolany D (**23**) a cepadithiolaktony A (**32**) lze stále považovat za sloučeniny relativně nové. Struktura allithiolanů byla objasněna Kubcem a kol.²⁴ v roce 2018 a struktura cepadithiolaktonu A (**32**) Štefanovou v roce 2019²¹. Allithiolany jsou látky, jejichž charakteristická hořká chuť negativně ovlivňuje technologicky zpracovanou cibuli a činí je tudíž nežádoucími zejména z potravinářského hlediska. Cepathiolany mají schopnost inhibovat glukosidasu a rovněž mají antikoagulační vlastnosti. U cepadithiolaktonu A (**32**) a allithiolanů nebyla doposud publikována žádná studie, která by zveřejnila jejich biologické vlastnosti.

Tato práce navazuje na mou bakalářskou práci, ve které jsem se zabýval izolací acyklických organosírných sloučenin (konkrétně cebaenů) přímo z extraktu cibule. Cebaeny totiž pro svou tvorbu vyžadují přítomnost LFS. Tento proces je ovšem velmi časově náročný, zejména z důvodu mimořádné komplexnosti extraktu. Takto vzniklý extrakt totiž obsahuje velký počet sloučenin, které komplikují práci s preparativní HPLC.

Odlišný postup pro izolaci allithiolanů zvolili Kubec a kol.²⁴. Pro izolaci využili modelové reakce čistého isoalliinu (**1**) a methiinu (**2**) s enzymem alliinasa získaného z česneku kuchyňského (*Allium sativum*). Při použití česnekové alliinasy nedochází ke vzniku LF (**4**) a enzymová reakce vede přímo ke vzniku žádaných látek určených pro izolaci.

Problematickou část však představuje izolace čistého isoalliinu (**1**). Isoalliin (**1**) není možno pořídit komerčně a jeho izolaci je nutno provádět opakovanou ionexovou chromatografií lyofilizovaného cibulového prášku. Tento proces je však časově velmi náročný a nepřináší uspokojivý výtěžek čistého isoalliinu (**1**).

Pro tuto práci byl tudíž zvolen odlišný postup. K modelovým reakcím byl využit tzv. „nečistý isoalliin“. Toto označení bylo zavedeno pro směs prekurzorů *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, u nichž byla použita ionexová chromatografie pouze jednou. Takto byla získána směs nejdůležitějšího prekurzoru isoalliinu (**1**) spolu s methiinem (**2**) a propiinem (**3**) a ostatními aminokyselinami, běžně se vyskytujícími v cibuli. Bylo zjištěno, že tato směs „nečistého isoalliinu“ reaguje stejně jako by reagovala s čistým isoalliinem (**1**) a methiinem (**2**), jelikož enzym alliinasa katalyzuje rozklad pouze *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidů, nikoli všech aminokyselin. Tento postup tudíž nabízí značnou časovou úsporu se stejnými produkty reakce jako při použití čistého isoalliinu (**1**) a methiinu (**2**). Rovněž při použití česnekové alliinasy dochází ke vzniku požadovaných látek bez nežádoucího vzniku LF (**4**).

Hlavním důvodem pro izolaci těchto látek je velká škála stále nově objevených různorodých biologických účinků organosírných sloučenin. Pro zkoumání těchto látek je ovšem zapotřebí získat standardy čistých látek, které není možno komerčně či synteticky pořídit, což bylo hlavním cílem této práce. U allithiolanu D (**23**) a cepadithiolaktonu A (**32**) dosud neexistuje žádná publikace objasňující jejich biologické vlastnosti.

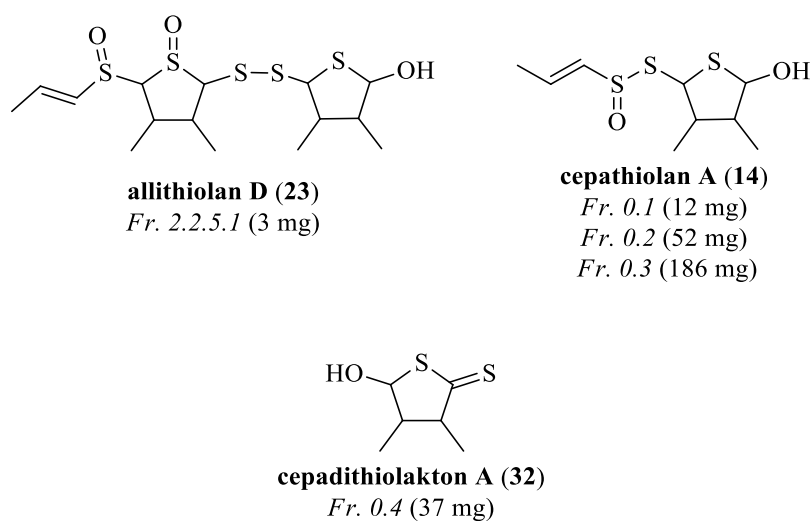
Tato práce spadá pod společný projekt celé laboratoře s cílem izolovat různé organosírné sloučeniny cibule kuchyňské. Ve spolupráci s dalšími institucemi bude následně probíhat výzkum biologických vlastností. Zjištěné biologické aktivity vybraných látek budou v budoucnu předmětem vědecké publikace.

6 Závěr

V teoretické části této práce byly shrnuty jednotlivé známé organosírné sloučeniny. U vybraných sloučenin byl popsán jejich mechanismus vzniku, biologické a senzorické vlastnosti.

Experimentální část této práce byla věnována optimalizaci HPLC metod za účelem izolace vybraných sloučenin ze dvou různých extraktů. Jednotlivé extrakty se lišily reakční dobou modelových reakcí.

V **extraktu 1** bylo cílem na základě HPLC/MS dat izolovat allithiolan D (**23**). Tuto látku se podařilo extrahovat ve *Fr. 2.2.5.1* s celkovým výtěžkem 3 mg. V **extraktu 2** bylo cílem izolovat cepathiolan A (**14**) a rovněž cepadithiolakton A (**32**). Jednotlivé izolované sloučeniny spolu s jejich výtěžkem uvádí **Obrázek 40**.



Obrázek 40: Izolované sloučeniny v diplomové práci spolu s jejich výtěžkem.

7 Literatura

- (1). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Faostat [online]. [cit. 2024-01-15]. Dostupné z: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- (2). Block, E. (2010). *Garlic and other alliums: the lore and the science*. Cambridge, Royal Soc. of Chemistry.
- (3). Malý, I., & Petříková, K. (2000). *Základy pěstování cibulové zeleniny*. Institut výchovy a vzdělání MZe ČR.
- (4). Kang, K., Pulver, S. R., Panzano, V. C., Chang, E. C., Griffith L. C., Theobald, D. L., & Garrity, P. A., (2010). Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. *Nature*, **464**(7288), 597–600. Dostupné z: doi:10.1038/nature08848.
- (5). Kubec, R., & Dadáková, E. (2009). Chromatographic methods for determination of *S*-substituted cysteine derivatives-A comparative study. *Journal of Chromatography A*, *1216*(41), 6957–6963. Dostupné z: doi: 10.1016/j.chroma.2009.08.032.
- (6). Virtanen, A. I., Matikkala, E. J., Laland, S., & S. Refn, S. (1959). The isolation of *S*-methylcysteine-sulphoxide and *S*-*n*-propylcysteine-sulfoxide from onion (*Allium cepa*) and the antibiotic activity of crushed onion. *Acta Chemica Scandinavica*, *13*, 1898–1900. Dostupné z: doi:10.3891/acta.chem.scand.13-1898.
- (7). Spåre, C. G., Virtanen, A. I., Munch-Petersen, J., Kvande, P. C., & Meisingseth, E. (1963). On the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*) vapours and its precursor. *Acta Chemica Scandinavica*, **17**, 641–650. Dostupné z: doi:10.3891/acta.chem.scand.17-0641.
- (8). Block, E., Dane A. J., & Cody, R. B. (2011). 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*, 2011-05-01, **186**(5), 1085–1093. Dostupné z: doi:10.1080/10426507.2010.507728.

- (9). Cavallito, C. J., Buck, J. S., & Suter, C. M. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II. determination of the chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 66(11), 1952–1954. Dostupné z: doi: 10.1021/ja01239a049.
- (10). Briggs, W. H., Xiao, H., Parkin, K. L., Shen, C., & Goldman, I. L. (2000). Differential inhibition of human platelet aggregation by selected *Allium* thiosulfinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000–11–01, 48(11), 5731–5735. Dostupné z: doi:10.1021/jf0004412.
- (11). Brodnitz, M. H., & Pascale, J. V. (1971). Thiopropanal *S*-oxide: a lachrymatory factor in onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(2), 269–272. Dostupné z: doi:10.1021/jf60174a009.
- (12). Imai, S., Tsuge, N., Tomotake, M., Nagatome, Y., Sawada, H., Nagata N., & Kumagai, H. (2002). An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature*, 419(6908), 685–685. Dostupné z: doi:10.1038/419685a.
- (13). Block, E., & Bayer, T. (1990). (*Z,Z*)-*d,l*-2,3-Dimethyl-1,4-butanedithial *S,S'*-dioxide: a novel biologically active organosulfur compound from onion. Formation of vic-disulfoxides in onion extracts. *Journal of the American Chemical Society*, 1990-05-01, 112(11), 4584–4585. Dostupné z: doi:10.1021/ja00167a089.
- (14). 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. (*Z*)-butanethial *S*-oxide and 1-butenyl thiosulfinates and their *S*-(*E*)-1-butenylcysteine *S*-oxide precursor from *Allium siculum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010–01–27, 58(2), 1121–1128. Dostupné z: doi:10.1021/jf903733e.
- (15). Kubec, R., Seokwon, K., & Musah, R. A. (2003). The lachrymatory principle of *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*, 63(1), 37–40. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(02)00759-8.
- (16). Bayer, T., Breu, W., Seligmann, O., Wray V., & Wagner, H. (1989). Biologically active thiosulphinates and α -sulphinyldisulphides from *Allium cepa*. *Phytochemistry*, 28(9), 2373–2377. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(00)97987-1.

- (17). Wagner, H., Dorsch, W., Bayer, T., Breu W., & Willer, F., (1990). Antiasthmatic effects of onions: Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase in vitro by thiosulfinates and "Cepaenes." *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **39**(1), 59–62. Dostupné z: doi:10.1016/0952-3278(90)90173-I.
- (18). Bayer, T., Wagner, H., Block, E., Grisoni, S., Zhao S. H., & Neszmelyi, A. (1989). Zwiebelanes: novel biologically active 2,3-dimethyl-5,6-dithiabicyclo[2.1.1]hexane 5-oxides from onion. *Journal of the American Chemical Society*, 1989–04–01, **111**(8), 3085–3086. Dostupné z: doi:10.1021/ja00190a064.
- (19). Yoshida, M., Kameyama, M., Shimizu, Y., Sakaue, K., Washino, T., Iwata, M., Omoto M., & Hosoda, H. (2010). New thiolane compound and use thereof. Patent JP2010143866A. 2010–07–01.
- (20). Aoyagi, M., Kamoi, T., Kato, M., Sasako, H., Tsuge, N., & Imai, S. (2011). Structure and bioactivity of thiosulfinates resulting from suppression of lachrymatory factor synthase in onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011–10–26, **59**(20), 10893–10900. Dostupné z: doi:10.1021/jf202446q.
- (21). Štefanová, I., Zápál, J., Moos, M., Kuzma, M., & Kubec, R. (2019). Isoalliin-derived thiolanes formed in homogenized onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019–09–04, **67**(35), 9895–9906. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.9b01384.
- (22). El-Aasr, M., Fujiwara, Y., Takeya, M., Ikeda, T., Tsukamoto, S., Ono, M., Nakano, D., Okawa, M., Kinjo, J., Yoshimitsu, H., & Nohara, T. (2010). Onionin A from *Allium cepa* inhibits macrophage activation. *Journal of Natural Products*, 2010–07–23, **73**(7), 1306–1308. Dostupné z: doi:10.1021/np100105u.
- (23). Nohara, T., Fujiwara, Y., Kudo, R., Yamaguchi, K., Ikeda, T., Murakami, K., Ono, M., Kajimoto, T., & Takeya, M. (2014). Isolation and characterization of new onionins A₂ and A₃ from *Allium cepa*, and of onionins A₁, A₂, and A₃ from *Allium fistulosum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **62**(11), 1141–1145. Dostupné z: doi:10.1248/cpb.c14-00461.
- (24). Kubec, R., Štefanová I., Moos, M., Urajová, P., Kuzma M., & Zápál, J. (2018). Allithiolanes: Nine groups of a newly discovered family of sulfur compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018–08–22, **66**(33), 8783–8794. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.8b03118.

(25). Aoyagi, M., Imai, S., & Kamoi, T. (2021). Novel bithiolane polysulfides from lachrymatory factor synthase-suppressed onion and their in vitro cyclooxygenase-1 inhibitory activity. *Food Chemistry*, **344**. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.128636.

8 Použité zkratky

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
LF	Lachrymatory factor
LFS	Lachrymatory-factor synthase
PTFE	Polytetrafluorethylen
SPE	Solid-Phase Extraction
HPLC/MS	High-performance liquid chromatography - mass spektrometry
HPLC/PDA	High-performance liquid chromatography - photodiode array detector
DEE	Diethylether
RVO	Rotační vakuová odparka
UV	Ultraviolet