





Pedagogická  
fakulta  
Faculty  
of Education

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Pedagogická fakulta

Katedra biologie

Bakalářská práce

## Organosírné sloučeniny česneku (*Allium sativum*)

Vypracoval: Karel Šmejkal

Vedoucí práce: Mgr. Iveta Štefanová, Ph.D.

(Katedra aplikované chemie, FZT JU)

České Budějovice 2022

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci na téma Organosírné sloučeniny česneku (*Allium sativum*) jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

Datum: 14. 4. 2022

Podpis:

## **Poděkování**

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

Mé poděkování patří rovněž doc. Ing. Romanu Kubcovi, Ph.D. za odborné konzultace a vstřícný přístup.



**Šmejkal, K. (2022):** Organosírné sloučeniny česneku (*Allium sativum*). [Organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*)], 35 p., Faculty of Education, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

Tato bakalářská práce se zaměřuje na organosírné sloučeniny česneku kuchyňského (*Allium sativum*).

Teoretická část obecně popisuje rod *Allium*. Další kapitoly teoretické části jsou věnovány obecnému i morfologickému popisu česneku kuchyňského, detailně jsou popsány i organosírné sloučeniny, mechanismy jejich vzniku i prekursorů, jejichž enzymovým rozkladem organosírné sloučeniny vznikají.

Experimentální část se zaměřuje na optimalizaci HPLC/PDA metody pro izolaci vybrané skupiny organosírných sloučenin, tj. ajothiolanů. Obsahuje popis přípravy čtyř různých vzorků extraktu česneku kuchyňského, jejichž vhodnost pro izolaci zmíněných sloučenin byla analyzována pomocí HPLC/MS.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** organosírné sloučeniny, *Allium sativum*, ajothioly

### **Annotation**

This bachelor thesis is focused on organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*).

The theoretical part describes the genus *Allium*, organosulfur compounds of garlic, their precursors as well as their formation pathways.

The experimental part was focused on the optimization of an HPLC/PDA method for the isolation of the selected group of organosulfur compounds, i.e. ajothioly. This part also describes the preparation of four different samples that were used for HPLC/PDA analysis. The suitability of these samples for isolation of ajothioly was analyzed by using HPLC/MS.

**KEY WORDS:** organosulfur compounds, *Allium sativum*, ajothioly

## Obsah

1	Cíle práce .....	1
2	Úvod.....	2
3	Teoretická část .....	3
3.1	Rod <i>Allium</i> .....	3
3.2	Česnek kuchyňský .....	3
3.3	Morfologický popis česneku .....	4
3.4	Organosírné sloučeniny v česneku.....	5
3.4.1	<i>S</i> -Alk(en)ylcystein- <i>S</i> -oxidy .....	6
3.4.2	Tvorba organosírných sloučenin v česneku.....	6
3.4.3	Organosírné sloučeniny identifikované v česneku .....	9
4	Experimentální část.....	16
4.1	Chemikálie a materiály .....	16
4.2	Přístroje .....	16
4.3	Gradientsy používané v HPLC .....	17
4.4	Optimalizace metody pro izolaci ajothiolanů z česneku kuchyňského.....	17
4.4.1	Příprava vzorků.....	17
5	Výsledky a diskuse .....	21
6	Závěr .....	29
7	Reference .....	30
8	Použité zkratky .....	35

## 1 Cíle práce

- Vypracovat literární rešerši již popsaných organosírných sloučenin ve stroužcích česneku kuchyňského (*Allium sativum*),
- optimalizovat postup pro izolaci ajothiolanů z česnekového extraktu metodou HPLC/PDA,
- a identifikovat hlavní přítomné organosírné sloučeniny s využitím metody HPLC/MS.

## 2 Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá studiem organosírných sloučenin česneku kuchyňského (*Allium sativum*), které nesou zodpovědnost za typické sensorické vlastnosti této rostliny. K produkci výše zmíněných organosírných sloučenin dochází až po narušení rostlinného pletiva, např. krájením při kuchyňském zpracování česneku nebo vlivem mikrobiálního napadení. Prekurzory sensoricky výrazných látek se tak dostanou do přímého kontaktu s enzymy, které způsobí jejich enzymaticky katalyzovaný rozklad. Výrazné sensorické vlastnosti vzniklých organosírných sloučenin (palčivá chuť, dráždivá vůně) tvoří základ obranných mechanismů rostliny.

Organické sloučeniny síry byly identifikovány a zkoumány desítky let. V posledních pár letech, zejména díky modernějším analytickým metodám, začaly být objevovány nové organosírné sloučeniny česnekovitých rostlin. U česneku, kterým se tato práce zabývá, jsou známy např. ajoeny, thiosulfináty nebo vinyldithiiny. Vědecká skupina Nohary a kol. (2012, 2013, 2014, 2015, 2017b, 2017c) a Ona a kol. (2017) v posledních deseti letech popsala mnoho nových organosírných sloučenin, které získaly označení garlicininy. V odborné komunitě (popř. v odborných kruzích) však některé z těchto vědeckých prací vzbuzovaly značné pochybnosti o správnosti publikovaných struktur. Všechny výše zmíněné sloučeniny, včetně garlicininů, budou podrobněji popsány v dalších kapitolách.

Hlavním tématem této bakalářské práce byly organosírné sloučeniny nesoucí název ajothiolany (Block a kol., 2018). V současné době zatím není přesně známý mechanismus vzniku těchto sloučenin, které se navíc v česnekovém extraktu vyskytují v pouze omezeném množství. Hlavním cílem tedy bylo optimalizovat metodu pro jejich izolaci prostřednictvím preparativní HPLC/PDA. Experimentální část popisuje přípravu celkem čtyř druhů česnekových extraktů, jejichž složení bylo analyzováno metodou HPLC/MS.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Rod *Allium*

V třídě jednoděložných rostlin (*Liliopsida*) se nachází řád *Asparagales*, zahrnující čeleď *Alliaceae*, v níž má velké zastoupení právě rod *Allium*. V rámci tohoto rodu se vyskytuje až 750 druhů včetně například česneku (*Allium sativum*), cibule (*Allium cepa*), pažitky (*Allium schoenoprasum*), medvědího česneku (*Allium ursinum*), šalotky (*Allium ascalonicum*) a dalších. Zástupci rodu *Allium* mají oddenky, kořeny nebo cibule jako důležité zásobní orgány. Listy (trubicovité u cibule, ploché u česneku) vyrůstají z podzemního stonku. Na květním stvolu se nevyskytují listy, kromě jediné laty, která uzavírá mladé květenství (Block, 2010).

### 3.2 Česnek kuchyňský

Česnek kuchyňský nebo také setý (*Allium sativum*), je cibulová zelenina, u které je konzumována převážně cibule (dělená na stroužky), ale také čerstvé květní stvolky nebo celá rostlina (**Obrázek 1**). Česnek byl několik tisíciletí používán v lidovém léčitelství a mnoho staletí také ke kořenění jídel (Kozák, 2022).



**Obrázek 1:** Botanický nákres česneku kuchyňského<sup>1</sup>.

Česnek je na seznamu potravin Národního institutu pro výzkum rakoviny, jejichž pravidelná konzumace je prevencí vzniku tohoto onemocnění. Biologickou aktivitu česneku lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou je prevence kardiovaskulárních onemocnění. Jedná se především o inhibici syntézy cholesterolu, agregaci krevních destiček a inhibici proliferace hladkých svalových buněk arterií. Druhá skupina zahrnuje

pozitivní účinky česneku a jeho sloučenin na metabolismus v prevenci rakoviny a ochranu proti infekci *Helicobacteria pylori*, prevenci rakoviny žaludku a kolorektální rakoviny (Nohara a kol., 2012).

### 3.3 Morfologický popis česneku

Cibule česneku (**Obrázek 2**) je kulovitá a je složena ze stroužků. Jejich množství určuje odrůda rostliny, kdy například velkostroužkové paličáky mají 4–6 velkých stroužků, zatímco některé nepaličáky mají 20 i více malých stroužků. Vznikly metamorfózou kolaterálních pupenů, což dokazuje jejich anatomická stavba. Nejvyužívanější konzumní částí stroužku jsou dužnaté zásobní listy, uvnitř kterých je pupenový kanálek. Puppenovým kanálkem z apikálního meristému, tj. z podpučí, vyrůstají listy. Puppenová šupina, která má bílou až purpurovou barvu, která je závislá na odrůdě, je pro stroužek ochrannou vrstvou (Janča a Zentrlich, 1994; Kozák, 2022; Kubát, 2002; Štěpánková a kol., 2010).



**Obrázek 2:** Cibule česneku<sup>11</sup>.

Podpučí je zkrácený metamorfovaný stonek. Jeho funkcí je přizpůsobovat se vnějším podmínkám po celý rok. Až pro stroužek nastanou vhodné podmínky (např. vhodná teplota, dostatek vody atd.), vyrůstají z podpučí málo větvené kořeny, kterým kompletně chybí kořenové vlášení, zároveň jsou ale schopny vyrůst do hloubky až 75 cm (Janča a Zentrlich, 1994; Kozák, 2022; Kubát, 2002; Štěpánková a kol., 2010).

Při vhodných podmínkách se v pupenovém kanálku uvnitř stroužku zakládají listy a vyvíjí se. Během vegetace, po uplynutí určitého času, z pochev listů postupně vzniká nepravý stonek. Čepel listu svírá tupý úhel s vertikální osou rostliny. Listy mají souběžnou žilnatinu, jsou jednoduché, úzké, střídavé, přisedlé a žlabovité. Jejich délka bývá v rozmezí 15–60 cm a šířka přibližně 2–3cm (Kozák, 2022; Kubát, 2002; Štěpánková a kol., 2010).

Teprve až se vyvinou všechny listy, začíná vyrůstat květní stvol. Prvotně roste vzpřímeně, po dosažení určité délky se zakroučí, ale znovu se napřímí během dozrávání. Zralý květní stvol dosahuje výšky mezi 30–200 cm, výška je závislá na genotypu rostliny a také půdních i klimatických podmínkách (**Obrázek 3**) (Kozák, 2022).



**Obrázek 3:** Květní stvol česneku<sup>III</sup>.

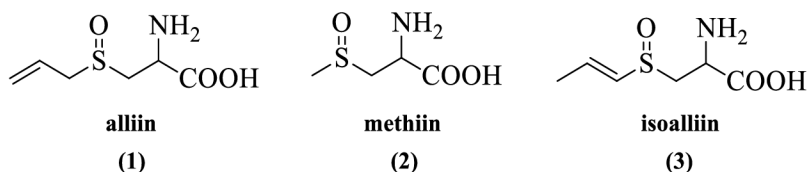
Květní stvol zakončuje květenství se sterilními květy, které nevykvétají a odumírají jako poupata. Mezi poupaty se vyvíjejí pacibulky. Na odrůdě závisí množství pacibulek v určitém květenství. Existují odrůdy, které vytvářejí 10 velkých pacibulek, zatímco jiné odrůdy mají schopnost vytvořit i více než 1000 drobných pacibulek. Tyto pacibulky mají schopnost dozrát na květním stvolu, který je oddělen od rostliny, poněvadž jsou, obdobně jako stroužky, přeměněnými pupeny (Janča a Zentrich, 1994; Kozák, 2022; Kubát, 2002; Štěpánková a kol., 2010).

### 3.4 Organosírné sloučeniny v česneku

Organosírné sloučeniny v česneku se uvolňují až při narušení stroužků. Je to obranný mechanismus, který má odpudit herbivora. Neaktivní prekurzory těkavých organosírných látek jsou v buňkách česneku fyzicky odděleny od enzymů, které katalyzují jejich rozklad. Narušením rostlinného pletiva se spustí celá kaskáda enzymově katalyzovaných reakcí za současného vzniku velmi rozmanitých skupin organosírných sloučenin (Block, 1992; Koch a Lawson 1996).

### 3.4.1 S-Alk(en)ylcystein-S-oxidy

Substráty enzymu alliinasy se nazývají *S*-alk(en)ylcystein-*S*-oxidy (dále ACSO) (Lancaster a Boland, 1990). Každá z alk(en)ylových skupin ACSO je v rostlinách rodu *Allium* přítomna v různém poměru.



**Obrázek 4:** Struktury alliinu (1), methiinu (2), isoalliinu (3) (Whitaker, 1976; Lancaster, a Boland, 1990; Block, 1992, Fritsch a Keusgen 2006).

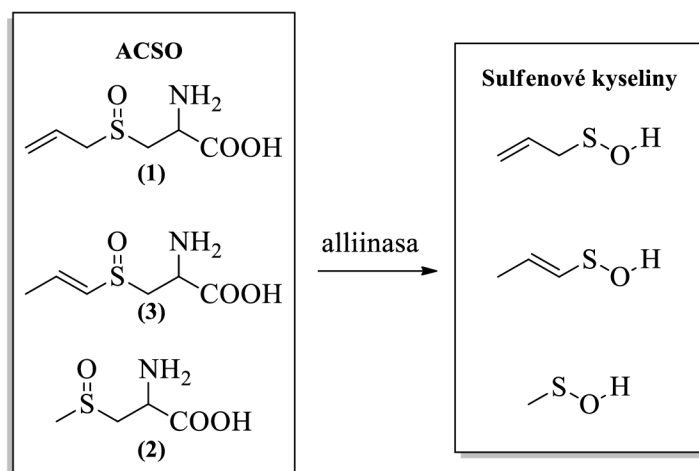
V česneku je nejvíce zastoupený *S*-allylcystein-*S*-oxid (relativní zastoupení okolo 84 %), který získal triviální označení alliin (1). Další dva zástupci ACSO vyskytující se v česneku jsou, *S*-1-propenylcystein-*S*-oxid (triviálně isoalliin, 3) a *S*-methylcystein-*S*-oxid, (triviálně methiin, 2). Relativní zastoupení těchto ACSO je téměř totožné (uvádí se okolo 5–16 %), je však výrazně ovlivněno např. podmínkami při skladování (Edwards a kol., 1994; Fritsch a Keusgen 2006; Kubec a Dadáková 2009; Thomas a Parkin, 1994; Whitaker, 1976; Yoo a Pike, 1998). Struktury hlavních ACSO v česneku uvádí **Obrázek 4**.

### 3.4.2 Tvorba organosirných sloučenin v česneku

Enzym, který katalyzuje rozklad ACSO nejen v česneku, ale i ve všech česnekovitých rostlinách, se nazývá alliinasa a je uložen ve vakuolách. V nenarušených rostlinách je tak oddělen od substrátu (tj. ACSO), který je lokalizován v cytoplazmě. Po narušení rostlinného pletiva dochází ke vzniku velmi pestré skupiny sensoricky a biologicky aktivních látek, které budou detailněji popsány v následujících kapitolách (Block, 1992; Block a kol., 2010).

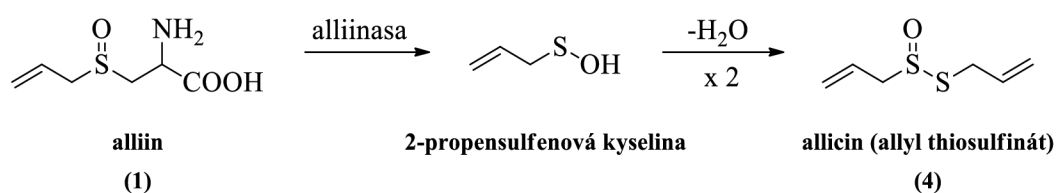
Bezprostředními produkty této enzymové reakce jsou velmi reaktivní sulfenové kyseliny, jejichž kondenzací vznikají organolepticky velmi výrazné thiosulfináty. Zjednodušený proces enzymového rozkladu ACSO znázorňuje **Obrázek 5**.





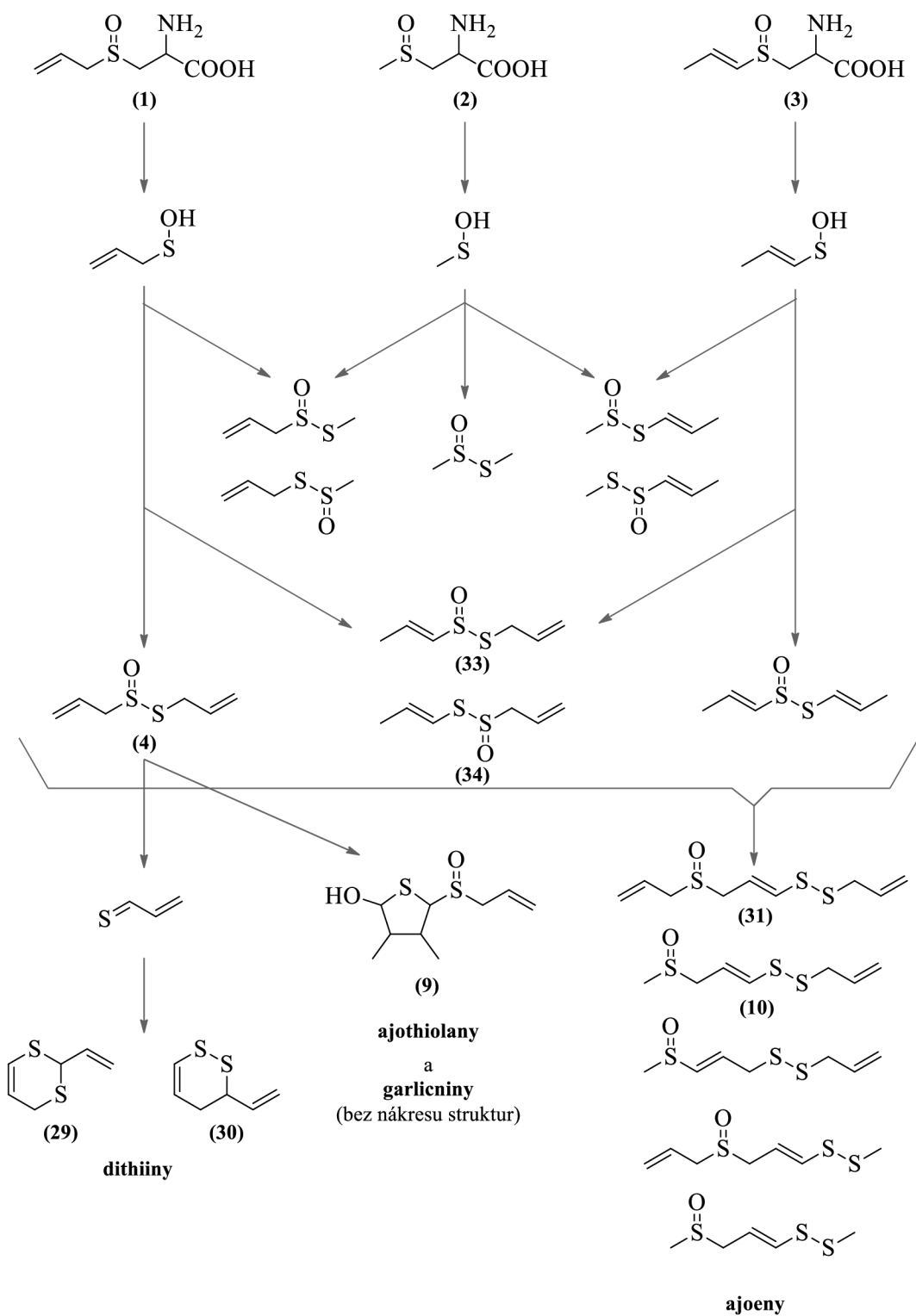
**Obrázek 5:** Enzymový rozklad ACSO česneku, tj. alliinu (1), isoalliinu (3) a methiinu (2) (Lanzotti, 2006).

Alliin (*S*-allyl-L-cystein-*S*-oxid, **1**) je nejvýznamnějším prekurzorem sensoricky aktivních sírných sloučenin v česneku. Vyskytuje se zde v množství okolo 10 mg/g čerstvého česneku (Dethier a kol., 2012; Edwards a kol., 1994; Kubec a Dadáková 2009; Thomas a Parkin, 1994; Yoo a Pike, 1998). Při narušení rostlinného pletiva, např. krájením, se alliin (**1**) dostává do přímého kontaktu s enzymem alliinase a bezprostředně tak vzniká thiosulfínát s triviálním názvem allicin (**4**), který je převládající čichovou a chuťovou složkou při zpracování česneku (Cavallito a kol., 1944). Allicin (**4**) podléhá dalším neenzymovým reakcím a je možné ho označit za prekurzor mnoha jiných, biologicky aktivních sloučenin, jako jsou např. ajoeny a vinyldithiiny, které budou detailněji probrány v následujících kapitolách. Mechanismus vzniku allicinu (**4**) uvádí **Obrázek 6**.



**Obrázek 6:** Rozklad alliinu (1) na allicin (4) (Dethier, 2016).

Mechanismus rozkladu česnekových ACSO (tj. alliinu, **1**; methiinu, **2**; isoalliinu, **3**) za přítomnosti alliinasy a následné chemické reakce, vedoucí ke vzniku dalších organosírných sloučenin uvádí **Obrázek 7**.

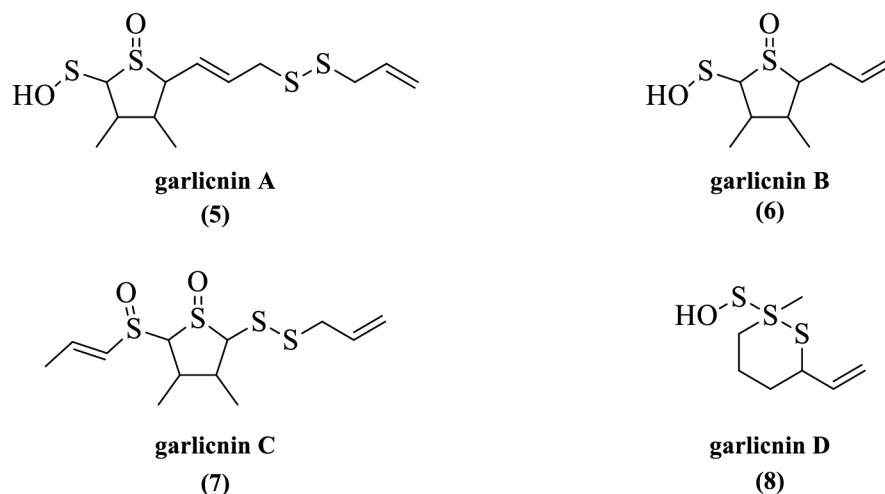


Obrázek 7: Mechanismus vzniku organosírných sloučenin v česneku.

### 3.4.3 Organosírné sloučeniny identifikované v česneku

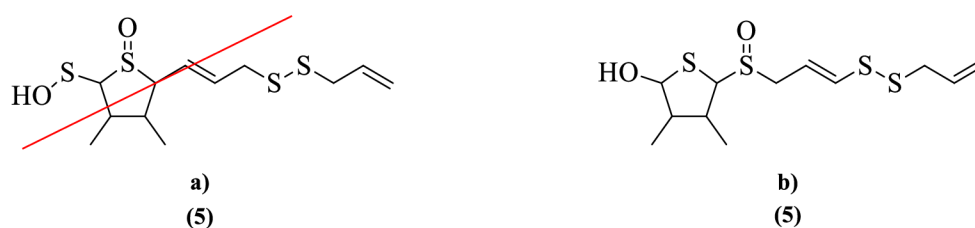
#### Garliciny

Garliciny byly izolovány z acetonových extraktů homogenizovaných stroužků česneku. Nohara a kol. (2012) identifikovali nové organosírné sloučeniny, které pojmenovali garliciny A (5), B (6), C (7) a D (8). Strukturu těchto sloučenin uvádí **Obrázek 8**.



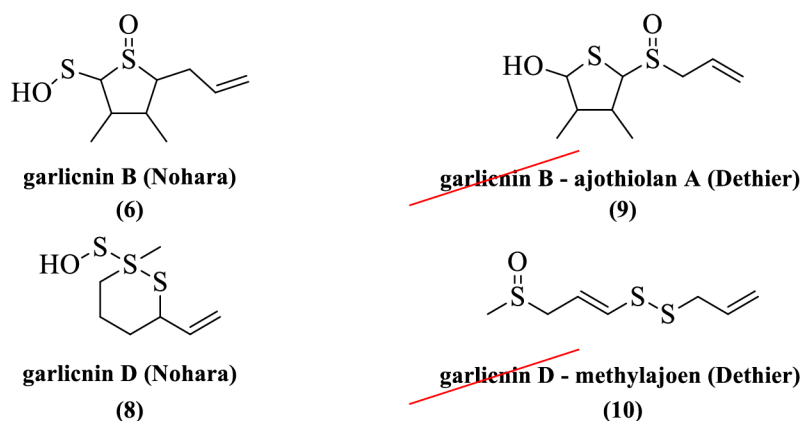
**Obrázek 8:** Navržené struktury garlicinů A (5), B (6), C (7), D (8) (Nohara a kol., 2012).

Struktury garlicinů A (5) a B (6) však v odborných kruzích vyvolávaly četné pochybnosti o jejich správnosti. Block a kol. (2018) ve své práci strukturu garlicinů A (5) následně opravili (**Obrázek 9**).



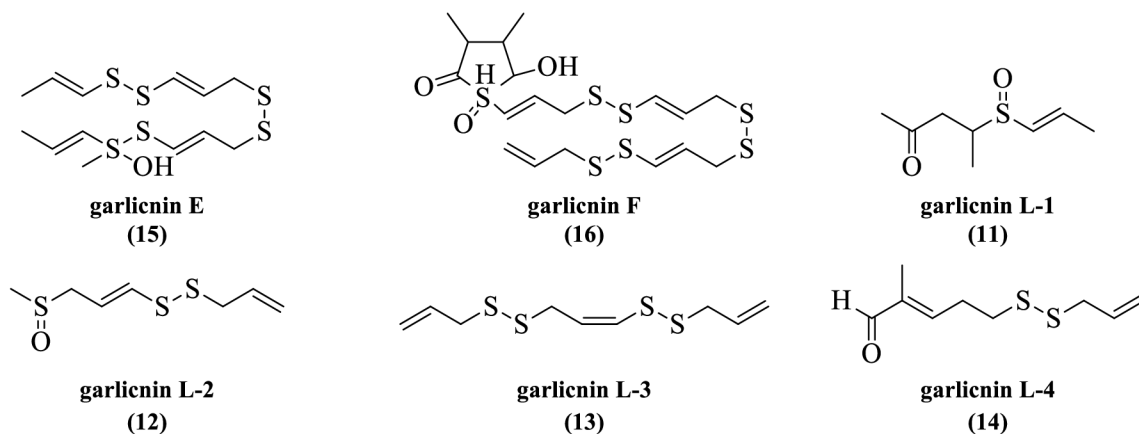
**Obrázek 9:** Návrhy struktur garlicinů A (5): a) Nohara a kol. (2012), b) Block a kol. (2018).

Dethier (2016) ve své disertační práci opravila strukturu garlicinů B (6) a následně je přejmenovala na ajothiolany. Řadu pochybností vzbuzovala také navržená struktura garlicinů D (8), zvláště přítomnost čtyřvázného atomu síry. Na základě souboru spektroskopických dat (MS, NMR) Dethier (2016) navrhla alternativní strukturu. Zmíněné návrhy struktur jsou uvedeny na **Obrázku 10**.



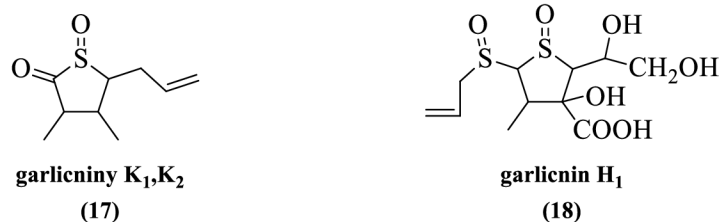
**Obrázek 10:** Návrhy struktur garlicinů B (6) a D (8) dle Nohary a kol. (2012) a opravená struktura garlicinů B (9) a alternativní struktura garlicinů D (10) podle Dethier (2016).

Nohara a kol. (2014) izolovali také šest nových acyklických organosírných sloučenin. Struktury sloučenin byly pojmenovány garlicin L-1 (11), garlicin L-2 (12), garlicin L-3 (13), garlicin L-4 (14), garlicin E (15) a garlicin F (16) (Obrázek 11). Společně se zmíněnými látkami byly také izolovány cyklické garliciny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub> (6) (stereoizomery, později opraveny struktury a přejmenovány na ajothiolany viz výše), A (5), C (7) a D (8).



**Obrázek 11:** Navržené struktury garlicinů E (15), F (16), L-1 (11), L-2 (12), L-3 (13) a L-4 (14) (Nohara a kol., 2014).

Byly izolovány cyklické garliciny K<sub>1</sub> (17), K<sub>2</sub> (17) a H<sub>1</sub> (18) (Obrázek 12), přičemž garliciny K<sub>1</sub> (17) a K<sub>2</sub> (17) jsou stereoizomery (Nohara a kol., 2015).



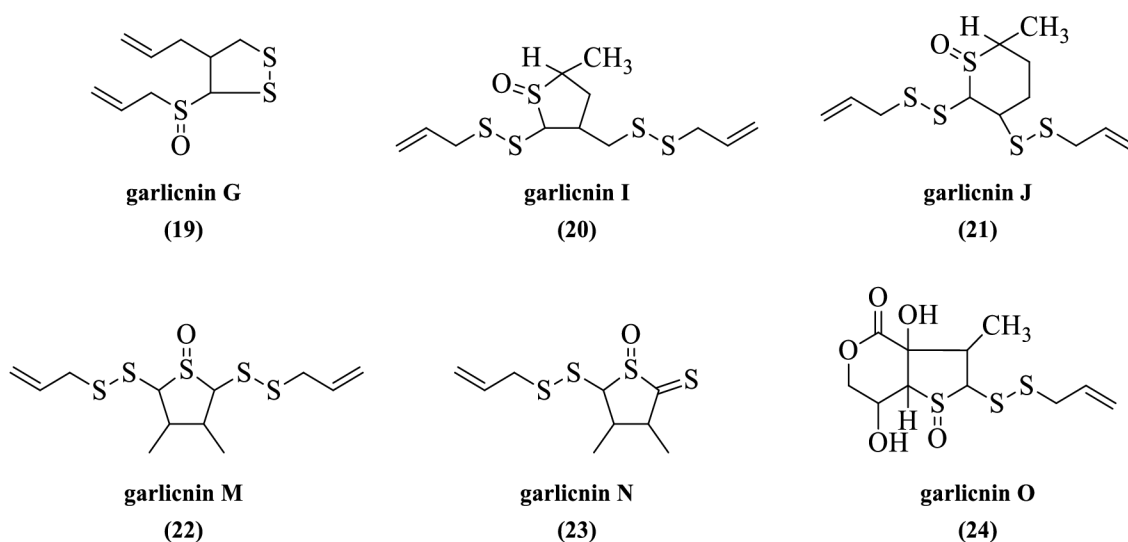
**Obrázek 12:** Návrhy struktur garlicinů K (17) a garlicinu H (18) (Nohara a kol., 2015).

Většina navržených struktur garlicinů od Nohary a kol. (2012, 2014, 2015, 2017b, 2017c) a od Ona (2017) působí nepřesvědčivým dojmem. Dalším důkazem je návrh alternativní struktury garlicinu K (17) od Dethier (2016) (**Obrázek 13**).



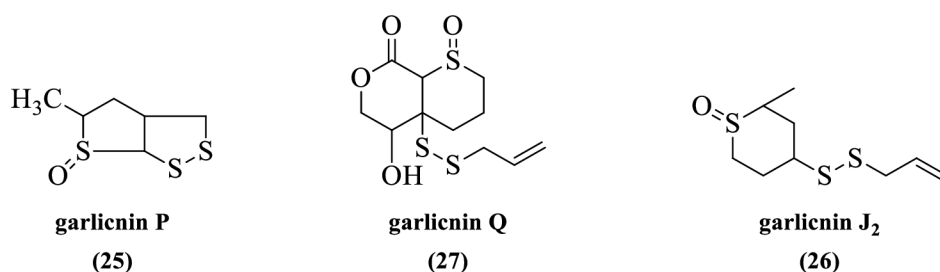
**Obrázek 13:** Návrh struktury garlicinu K (17): **a)** Nohara a kol. (2015), **b)** Dethier (2016).

Izolovány a charakterizovány byly také atypické cyklické garliciny G (19), I (20) a J (21) (Ono a kol., 2017). Dále byly identifikovány garliciny M (22) a N (23) a garlicin O (24). Návrhy struktur látek zmíněných v tomto odstavci uvádí **Obrázek 14**. Objevuje se zde také název garlicin I<sub>2</sub>, což je stereoizomer garlicinu I (20) (Nohara a kol., 2017b).



**Obrázek 14:** Navržené struktury garlicninu G (19), I (20) a J (21) (Ono a kol., 2017) a garlicninu M (22), N (23) a O (24) (Nohara a kol., 2017b).

Ze stroužků česneku z oblasti města Kumamoto (Japonsko) byly izolovány tři atypické garlicniny, a sice garlicnin P (25), garlicnin J<sub>2</sub> (26), a garlicnin Q (27) (Obrázek 15). Byly charakterizovány jejich struktury a také navrženy způsoby jejich vzniku (Nohara a kol., 2017c).

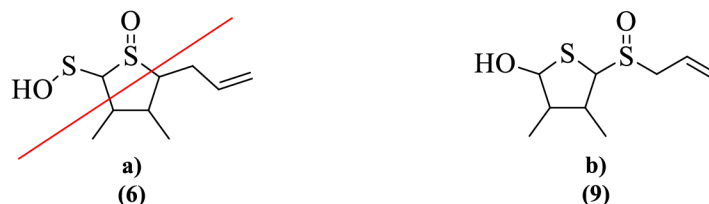


**Obrázek 15:** Navržené struktury garlicninu P (25), Q (27) a J<sub>2</sub> (26) (Nohara a kol., 2017c).

### Ajthiolany (= garlicniny B)

Ajthiolany jsou poměrně novou skupinou organosírných sloučenin česneku. Popsány byly poprvé v roce 2012 pod triviálním označením garlicnin B (Nohara a kol., 2012). Z chemického hlediska se jedná o řadu stereoizomerů 5-(2-allylsulfinyl)-3,4-dimethylthiolan-2-olu, zjednodušeně je lze zařadit do skupiny 3,4-dimethylthiolanů.

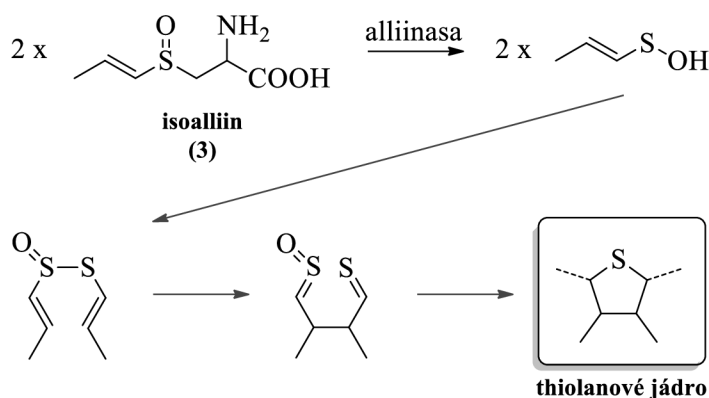
**Obrázek 16a** uvádí navrženou strukturu garlicininu B (**6**) Noharou a kol. (2012) a **Obrázek 16b** následné opravení jeho struktury a přejmenování na ajothiolan A (**9**) Dethier (2016).



**Obrázek 16:** struktura: a) garlicininů B (**6**) (Nohara a kol., 2012; Nohara a kol., 2013), b) ajothiolanu A (**9**) (Dethier, 2016; Block a kol., 2018).

Ajothiolany byly hlavním tématem této bakalářské práce. Cílem bylo optimalizovat metodu pro jejich izolaci za využití HPLC/PDA. Hlavní úskalí jejich izolace spočívá zejména v množství, ve kterém se v česneku vyskytují.

V experimentální části jsou detailně popsány přípravy extraktů česneku, ve kterých bylo snahou množství vznikajících ajothiolanů zvýšit. Např. se vycházelo ze studie Block a kol. (2018), kteří při zpracování extraktu česnek macerovali v acetonu.

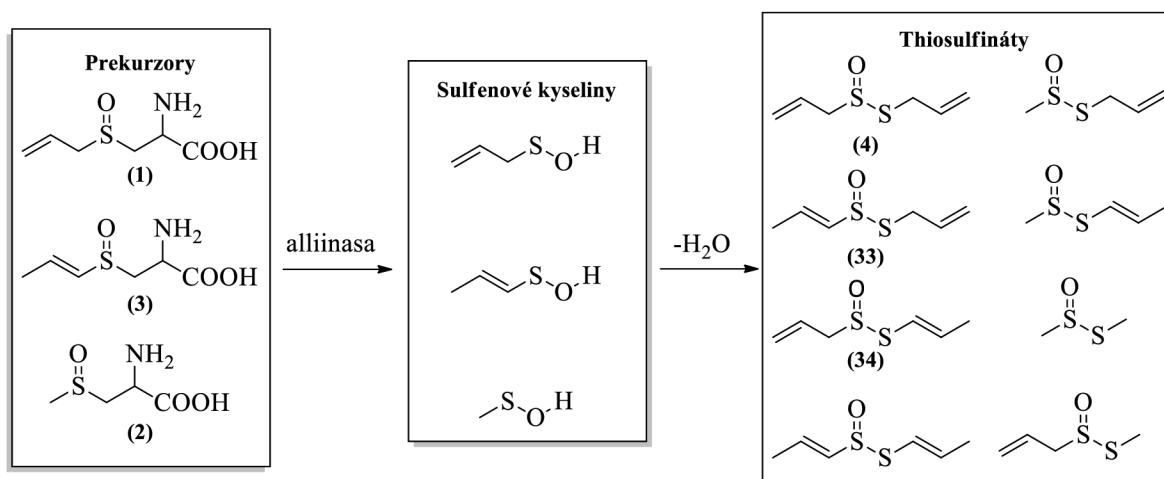


**Obrázek 17:** Předpokládaný mechanismus vzniku thiolanového jádra (Kubec a kol., 2018).

Základem dalšího postupu přípravy extraktu byl předpoklad, že thiolanové jádro ajothiolanů pravděpodobně vyžaduje pro svůj vznik 2 molekuly isoalliinu (**3**) (**Obrázek 17**), stejně jako obdobná skupina sloučenin, tzv. allithiolanů, které ve své studii popisují Kubec a kol. (2018). Isoalliinu (**3**) je však v česneku pouze minimální množství (okolo 1,3 mg isoalliinu (**3**)/g čerstvého česneku). Přidání isoalliinu (**3**) k homogenizovanému česneku ještě před samotnou extrakcí by tak mohlo vést k produkci většího množství ajothiolanů v extraktu (obecně všech sloučenin s thiolanovým jádrem

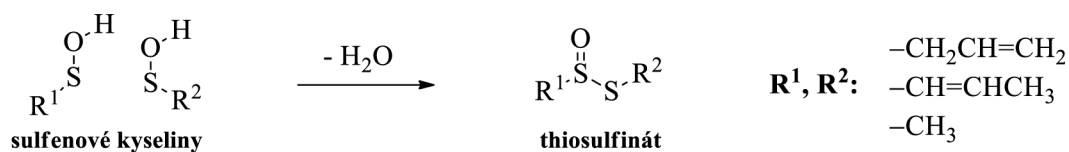
v molekule). Jako zdroj isoalliinu (**3**) byla použita lyofilizovaná cibule, ve které je obsah isoalliinu (**3**) v porovnání s česnekem výrazně vyšší (3,3 mg isoalliinu (**3**)/1 g lyofilizované cibule).

### Thiosulfináty



**Obrázek 18:** Prekurzory: alliin (**1**), isoalliin (**3**) a methiin (**2**), thiosulfináty: allicin (**4**) (Lanzotti, 2006).

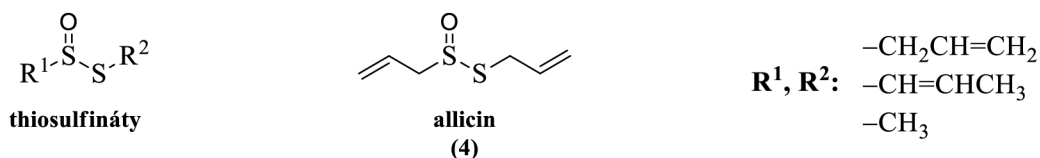
Thiosulfináty se tvoří z *S*-alk(en)yl-L-cystein-*S*-oxidů, které se nachází v cytoplasmě. Skrze enzymatické štěpení katalyzované alliinásou a C-S lyázou přítomnou ve vakuolách, dává *S*-alk(en)yl-L-cystein-*S*-oxid vzniku příslušným sulfenovým kyselinám. Jedná se o vysoce reaktivní meziprodukty, které okamžitě tvoří thiosulfináty kondenzační reakcí (**Obrázek 18 a 19**) (Lanzotti, 2006; Lawson a Hughes, 1992).



**Obrázek 19:** Kondenzační reakce dvou sulfenových kyselin a vznik thiosulfinátu (Lanzotti, 2006).

V česneku je nejvýznamnějším již výše zmíněný allicin (**4**) (**Obrázek 20**) (Lanzotti, 2006).

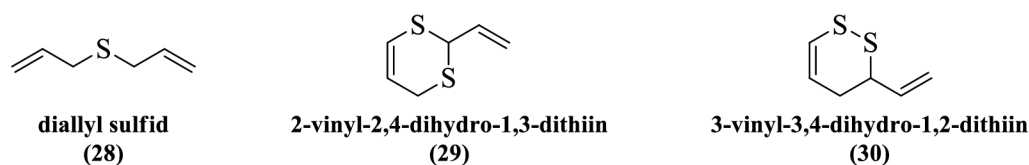




**Obrázek 20:** Obecná struktura thiosulfinátů a allicinu (4) (Ramirez a kol., 2016).

## Dithiiny

Rozklad allicinu (4) vede k tvorbě diallylsulfidu (28). Rozklad jiným způsobem dává vzniknout rozkladným produktům 2-vinyl-2,4-dihydro-1,3-dithiinu (29), 3-vinyl-3,4-dihydro-1,2-dithiinu (30) (Obrázek 21) a *E/Z*-ajoenu (31/32). Rozklad thiosulfinátů, například vařením, dává vzniku ajoenům, dithiinům, diallylsulfidu (28), diallyldisulfidu a diallyltrisulfidu (Lanzotti, 2006; Ramirez a kol., 2016).

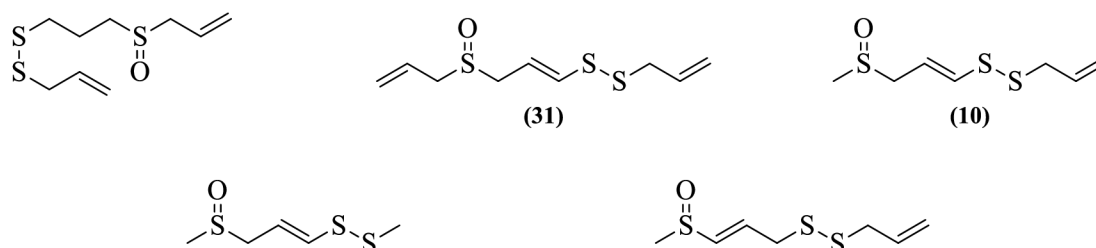


**Obrázek 21:** Struktury diallylsulfidu (28) a dithiinů (29, 30) (Lanzotti, 2006).

## Ajoeny

Skupinu organosírných sloučenin, nesoucích označení ajoeny, popisují ve své studii např. Iberl a kol. (1990) nebo Hunter a kol. (2008). Struktury těchto látek uvádí

**Obrázek 22.**



**Obrázek 22:** Struktury ajoenů (Lanzotti, 2006; Dethier, 2016).

## 4 Experimentální část

### 4.1 Chemikálie a materiály

#### Chemikálie

- aceton (99,8%, p.a.) – FISHER CHEMICAL (Loughborough, Anglie).
- bezvodý čistý síran hořečnatý – LACH NER (Neratovice, ČR).
- acetonitril (99,9%, p.a.) – SIGMA-ALDRICH (Saint Quentin-Fallavier, Francie).
- diethylether (99,5%, p.a.) – SIGMA-ALDRICH (Saint Quentin-Fallavier, Francie).

#### Rostlinný materiál

- česnek kuchyňský (*Allium sativum*) – zakoupen v roce 2021 v místním obchodním řetězci.
- lyofilizovaná cibule (*Allium cepa*) – zakoupena v místním obchodním řetězci, zlyofilizována a rozemleta na prášek.

#### Ostatní materiál

- SPE kolonky Discovery DSC-8 SPE (50 mg) – SUPELCO (Bellefonte, PE, USA).
- SPE kolonky Discovery DSC-18 SPE (100 mg) – SUPELCO (Bellefonte, PE, USA).
- centrifugační filtry (0,2  $\mu\text{m}$ ; 2 ml; PVDF) – WATREX (Praha, ČR).

### 4.2 Přístroje

HPLC analýzy byly prováděny pomocí přístroje 1260 Infinity II preparative (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s detektorem 1260 Infinity II DAD WR. Byla použita analytická kolona Kinetex C-8 (100  $\text{\AA}$ ; 250  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex). Pro nalezení optimální separační metody byly také testovány analytické kolony Biphenyl (100  $\text{\AA}$ ; 250  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex), Kinetex C-18 (100  $\text{\AA}$ ; 250  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex) a Kinetex F5 (100  $\text{\AA}$ ; 250  $\times$  4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex).

Pro separaci a identifikaci látek pomocí UHPLC-PDA-MS/MS byl použit systém sestávající z kapalinového chromatografu Ultimate3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), detektoru diodového pole PDA-3000 a hmotnostního spektrometru pracujícího na principu lineární iontové pasti LTQ XL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

### 4.3 Gradienty používané v HPLC

#### Metoda A

<i>průtok</i> [ml/min]	<i>čas</i> [min]	<i>H<sub>2</sub>O + 0,05%</i> <i>HCOOH [%]</i>	<i>CH<sub>3</sub>CN + 0,05%</i> <i>HCOOH [%]</i>
0,9	0	40	60
0,9	20	40	60
0,9	50	25	75
0,9	51	5	95
0,9	59	5	95
0,9	60	40	60
<i>kolona</i>	<i>Kinetex C8 (250 × 21,2 mm; 5 μm; 100 Å)</i>		

### 4.4 Optimalizace metody pro izolaci ajothiolanů z česneku kuchyňského

#### 4.4.1 Příprava vzorků

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat metodu pro izolaci ajothiolanů, které se v extraktu česneku kuchyňského vyskytují v omezeném množství. Podobnou problematikou se zabýval Block a kol. v roce 2018, který ve své studii maceroval homogenizovaný česnek v acetonu, což mělo mít za následek vyšší obsah ajothiolanů v česnekovém extraktu. Pro možnost posouzení vlivu acetonu na množství ajothiolanů byl připraven srovnávací vzorek, ve kterém byl aceton nahrazen destilovanou vodou (vzorek **A**) a na základě publikace Blocka a kol. (2018) byl připraven extrakt s označením vzorek **B**.

Příprava vzorků **C** a **D** byla postavena na předpokladu, že pro tvorbu thiolanového jádra v molekule ajothiolanů je potřeba dvou molekul isoalliinu (**3**), **Obrázek 17**, kterého je v česneku velmi omezené množství (okolo 1,3 mg/g čerstvého česneku). Jako zdroj isoalliinu (**3**) byla použita lyofilizovaná cibule (obsah isoalliinu (**3**) je okolo 0,5 mg/g čerstvé cibule) (Edwards a kol., 1994; Kubec a Dadáková 2009; Thomas a Parkin, 1994; Yoo a Pike, 1998). Pro možnost posouzení vlivu dodaného isoalliinu (**3**) byly připraveny vzorky s odlišným hmotnostním poměrem alliinu (**1**) (hlavního prekurzoru organosírných sloučenin v česneku) a isoalliinu (**3**), tj. 1:3, resp. 1:5 (vzorek **C**, resp. **D**).

### Vzorek A

Stroužky česneku byly oloupany a zváženy (106,9 g). Po přidavku 100 ml destilované vody byly stroužky následně homogenizovány pomocí kuchyňského mixéru (PHILIPS, HR2181 Robust). Homogenát byl ponechán 1 hodinu při laboratorní teplotě a následně filtrován přes pláténko. Vzorek byl dvakrát extrahován metodou přímé extrakce diethyletherem (dále jen DEE) v poměru 1:1 (v:v; vzorek:DEE). V dělicí nálevce nedošlo k rozdělení obou fází. Vzniklá emulze byla vložena na centrifugu (3 minuty, 4000 rpm). Organické fáze byly spojeny, přesušeny bezvodým  $MgSO_4$  a opět zfiltrovány. DEE byl na rotační vakuové odparce (dále jen RVO;  $t < 30\text{ }^\circ\text{C}$ ) odpařen. Výsledkem byl tmavě žlutý extrakt typického česnekového aroma.

Před HPLC analýzou byl získaný extrakt naředěn 2 ml acetonitrilu a přečištěn pomocí C8-SPE kolonky. Výsledný extrakt (vzorku **A**; **456,7 mg**) působil jemným olejovým charakterem, světle žlutavou barvou a měl výrazně štiplavý zápach. Vzorek byl před dalšími analýzami uchován při teplotě  $-28\text{ }^\circ\text{C}$ .

### Vzorek B

Příprava vzorku **B** byla provedena dle postupu Blocka a kol. 2018. Česnekové stroužky (146,8 g) byly zbaveny slupek, homogenizovány kuchyňským mixérem (PHILIPS, HR2181 Robust). Pro dokonalejší homogenizaci bylo k česnekovým stroužkám přidáno 15 ml destilované vody. K homogenátu byl následně přidán aceton v poměru 1:1

(v:v; vzorek:aceton). Směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 hodin, přikryta hodinovým sklem a obalena alobalem, aby se zamezilo přístupu světla.

Homogenát byl přefiltrován přes filtrační papír a filtrát zbaven acetonu pomocí RVO ( $t < 30\text{ °C}$ ). Extrakce byla provedena analogickým postupem jako u vzorku **A**. Získaný extrakt byl na RVO zbaven DEE, posléze přesušen bezvodým  $\text{MgSO}_4$ . Před následnými HPLC analýzami byl výsledný extrakt přečištěn pomocí C8-SPE kolonky.

Výsledný extrakt (vzorek **B**; **348,6 mg**) byl oranžové barvy, olejového charakteru a příjemné vůně (jemnější vůně než vzorek **A**). Před dalšími analýzami byl skladován při teplotě  $-28\text{ °C}$ .

### Vzorek C

K oloupaným stroužkům česneku (112,1 g) byla přidána lyofilizovaná cibule v množství (67 g), který odpovídá hmotnostnímu poměru alliinu (**1**): isoalliinu (**3**) 1:3. Výpočet množství přidané lyofilizované cibule byl proveden na základě následujících úvah:

- 1 g česneku průměrně obsahuje 10,5 mg alliinu (**1**) a 1,5 mg isoalliinu (**3**)
- 1 g lyofilizované cibule obsahuje okolo 3,3 mg isoalliinu (**3**)
- požadovaný hmotnostní poměr alliin (**1**):isoalliin (**3**) je 1:3 → na 1 g česneku bylo použito 0,6 g lyofilizované cibule

Dále bylo přidáno 250 ml destilované vody a čerstvé stroužky česneku byly společně s lyofilizovanou cibulí homogenizovány kuchyňským mixérem (PHILIPS, HR2181 Robust). Po přidání 300 ml acetonu, byla kádinka se vzorkem (z důvodu ochrany před světlem) obalena alobalem, přikryta hodinovým sklem a za stálého míchání ponechána 24 hodin při laboratorní teplotě.

Následující den byla směs zfiltrována přes filtrační papír, aceton byl odpařen na RVO ( $t < 30\text{ °C}$ ). Následný postup metodou přímé extrakce byl proveden dle shodného postupu uvedeného u vzorku **A**. Vlivem přídavku lyofilizované cibule obsahoval výsledný extrakt chlorofyl, který bylo nutné před HPLC analýzou odstranit. Pro tento účel byla využita C18-SPE kolonka i s vědomím následné C8-HPLC analýzy (C8-SPE kolonka nedokáže chlorofyl zcela zachytit).

Po přečištění extraktu C18-SPE kolonkou byl extrakt (vzorek **C**; **240,7 mg**) tmavě žlutý s výraznou cibulovo-česnekovou vůní. Před dalšími analýzami byl vzorek uchován při  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Vzorek D**

Stroužky česneku byly oloupany (119,5 g), společně s lyofilizovanou cibulí (21,5 g) vloženy do kuchyňského mixéru (PHILIPS, HR2181 Robust) a homogenizovány. Takto připravený vzorek odpovídá hmotnostnímu poměru alliin (**1**):isoalliin (**3**) 1:5. Stejným postupem výpočtu jako u vzorku C bylo zjištěno, že na 1 g česneku se přidalo 0,18 g lyofilizované cibule. Po dokončení homogenizace bylo do směsi vlito 300 ml acetonu. Vzorek byl při laboratorní teplotě 24 hodin míchán (opět zatemněný alobalem a přikrytý hodinovým sklem).

Následující postup extrakce a přečištění vzorku C18-SPE kolonkou byl shodný s výše uvedeným pro vzorek C.

Výsledný extrakt (vzorek **D**; **312,7 mg**) byl olejového charakteru s jemnou vůní česneku se špetkou cibule (méně výrazně než vzorek C). Před dalšími analýzami byl vzorek uchován při  $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 5 Výsledky a diskuse

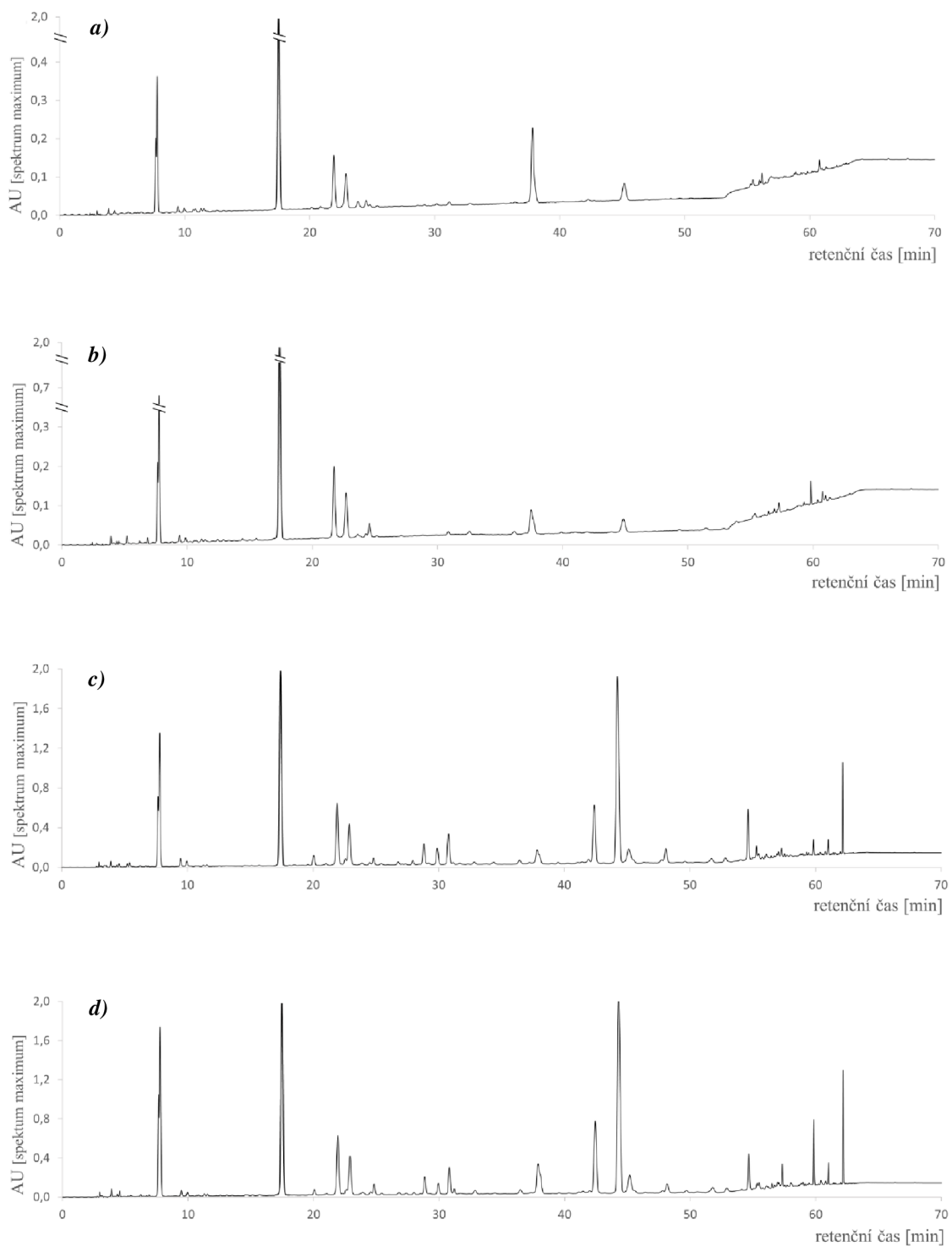
Hlavním cílem této bakalářské práce byla optimalizace HPLC/PDA metody pro izolaci ajothiolanů z extraktů česneku kuchyňského. Pro tyto účely byly připraveny 4 vzorky:

- vzorek **A**, kde byl homogenizovaný česnek macerován ve vodě,
- vzorek **B**, kde byl homogenizovaný česnek macerován v acetonu (Block a kol., 2018),
- vzorek **C**, kdy byla k česneku přidána lyofilizovaná cibule v hmotnostním poměru 1:3 (lyofilizovaná cibule je zdroj isoalliinu (**3**), viz **Kapitola Ajothiolany, Obrázek 17**) rovněž macerován v acetonu,
- vzorek **D**, kdy byla k česneku přidána lyofilizovaná cibule v hmotnostním poměru 1:5, taktéž macerován v acetonu.

Vzorek **B** byl připraven na základě publikace Blocka a kol. (2018), ve které vedl přídavek acetonu ve fázi macerace homogenizovaných česnekových stroužků ke zvýšené tvorbě ajothiolanů. Pro porovnání těchto publikovaných výsledků byl připraven vzorek **A**, u kterého byla k maceraci použita místo acetonu pouze destilovaná voda.

Vzorky **A–D** byly následně analyzovány metodou C8-HPLC/MS pro identifikaci jednotlivých píků na základě molekulových hmotností. Vzorky pro tuto analýzu byly připravovány vždy shodným postupem, aby bylo možné i bez použití vnitřního standardu orientačně stanovit kvantitativní zastoupení ajothiolanů v jednotlivých extraktech vzorků **A–D**.

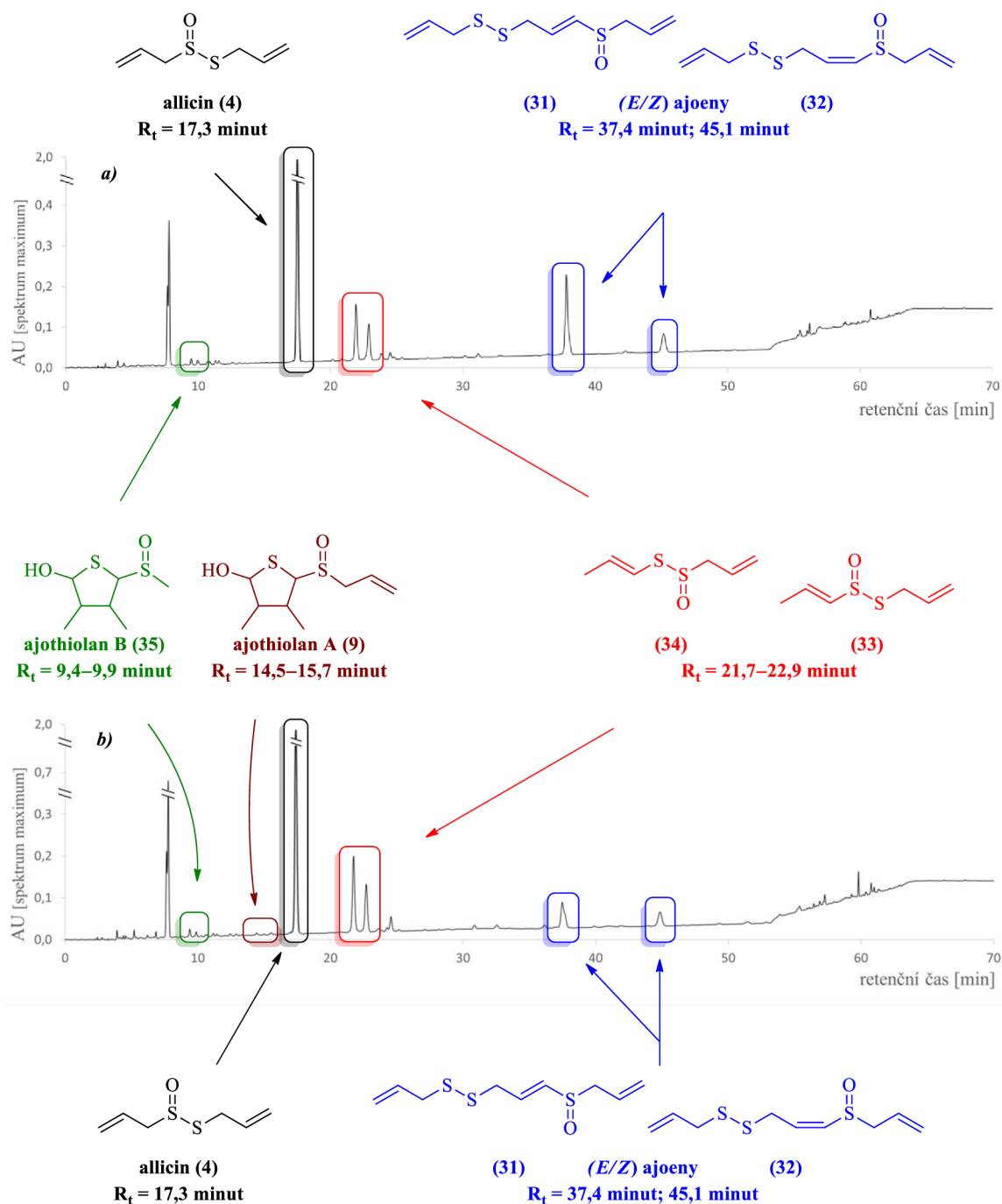
Chromatogramy z HPLC/PDA analýzy vzorků **A–D** znázorňuje **Obrázek 23a–d**.



**Obrázek 23:** C8-HPLC/PDA chromatogram (Metoda A) vzorku: **A** (a), **B** (b), **C** (c), **D** (d).



Z výsledků C8-HPLC/MS analýzy vzorků **A** a **B** (**Obrázek 24**) vyplývá, že dominantní sloučeninou česnekového extraktu byl allicin (**4**) s retenčním časem (dále jen  $R_t$ ) 17,3 minut bez ohledu na to, jestli byla při přípravě vzorku homogenizovaného česneku použita voda (**Obrázek 23a**) nebo aceton (**Obrázek 23b**). Identifikovány byly také jeho polohové izomery (thiosulfináty **33** a **34**,  $R_t$  21,7–22,9 minut). Tyto thiosulfináty byly v obou vzorcích (**A** i **B**) přibližně ve stejném množství. Posledními identifikovanými látkami byly (*E/Z*) ajoeny (**31**, resp. **32**) s  $R_t$  37,4 minut, resp.  $R_t$  45,1 minut. Požadované ajothiolany A (**9**), resp. B (**35**) ( $R_t$  9,4–9,9 minut, resp.  $R_t$  14,5–15,7 minut) byly v obou vzorcích pouze v minimálním množství. Detailnímu popisu identifikace ajothiolanů bude věnována závěrečná část této kapitoly.



**Obrázek 24:** C8-HPLC/MS chromatogram (Metoda A) se znázorněním izolovaných sloučenin u vzorků: A (a), B (b).

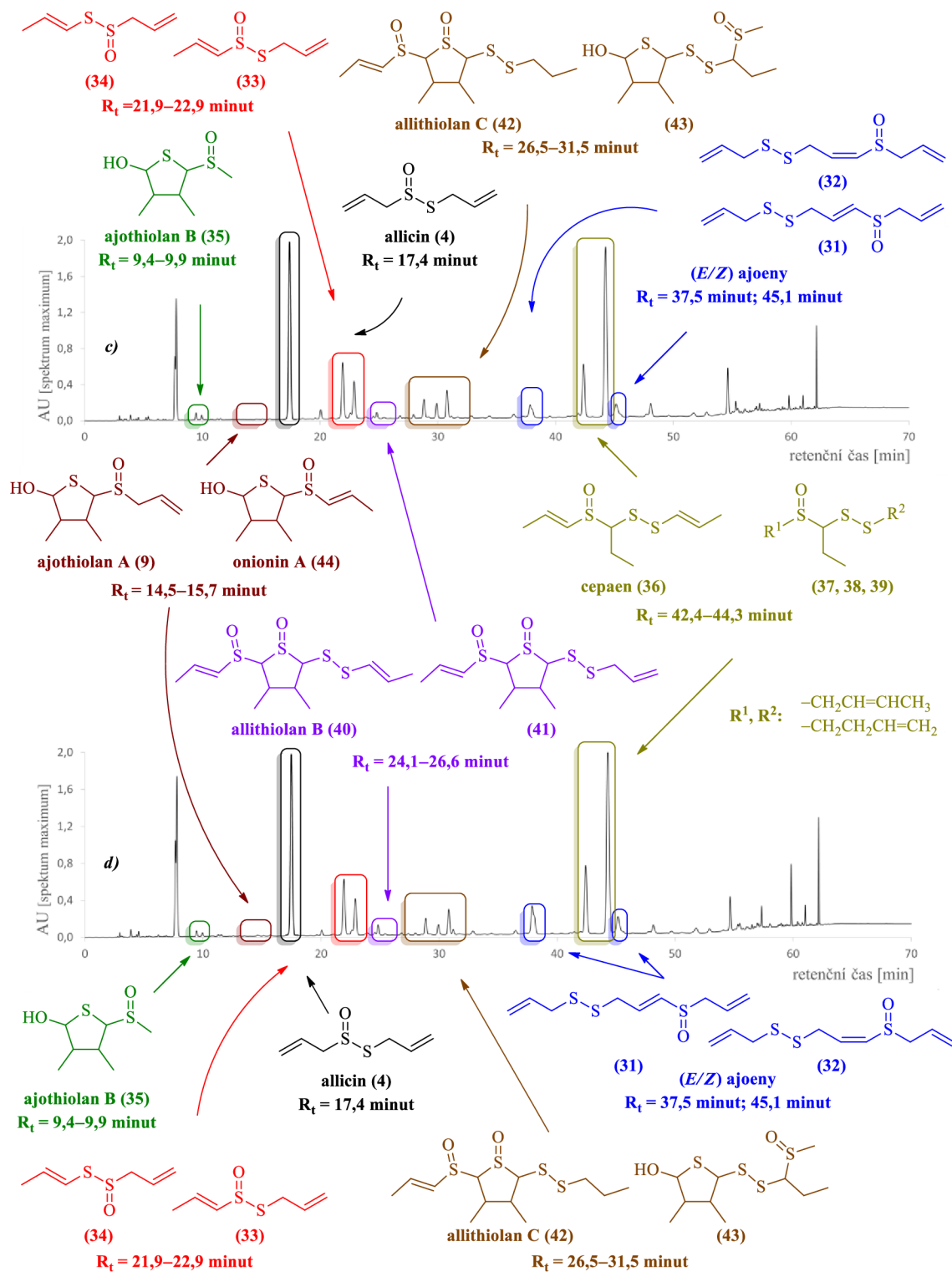
Vzorky C a D byly připraveny na základě předpokladu, že je potřeba dvou molekul isoalliinu (3) na tvorbu thiolanového jádra ajothiolanů (viz **Obrázek 17**). Poněvadž je v česneku velmi malé množství isoalliinu (3) (okolo 1,3 mg/1 g čerstvého česneku), byla k němu jako zdroj isoalliinu (3) přidána lyofilizovaná cibule (obsahující okolo 0,5 mg isoalliinu (3)/1 g čerstvé cibule) (Edwards a kol., 1994; Kubec a Dadáková 2009; Thomas a Parkin, 1994; Yoo a Pike, 1998). Vzorek C byl připraven v poměru 1:3,

alliin (**1**):isoalliin (**3**). Za účelem zjištění vlivu přídavku isoalliinu (**3**) na tvorbu thiolanového jádra ajothiolanů, byl připraven srovnávací vzorek **D**, který měl hmotnostní poměr 1:5, alliin (**1**):isoalliin (**3**).

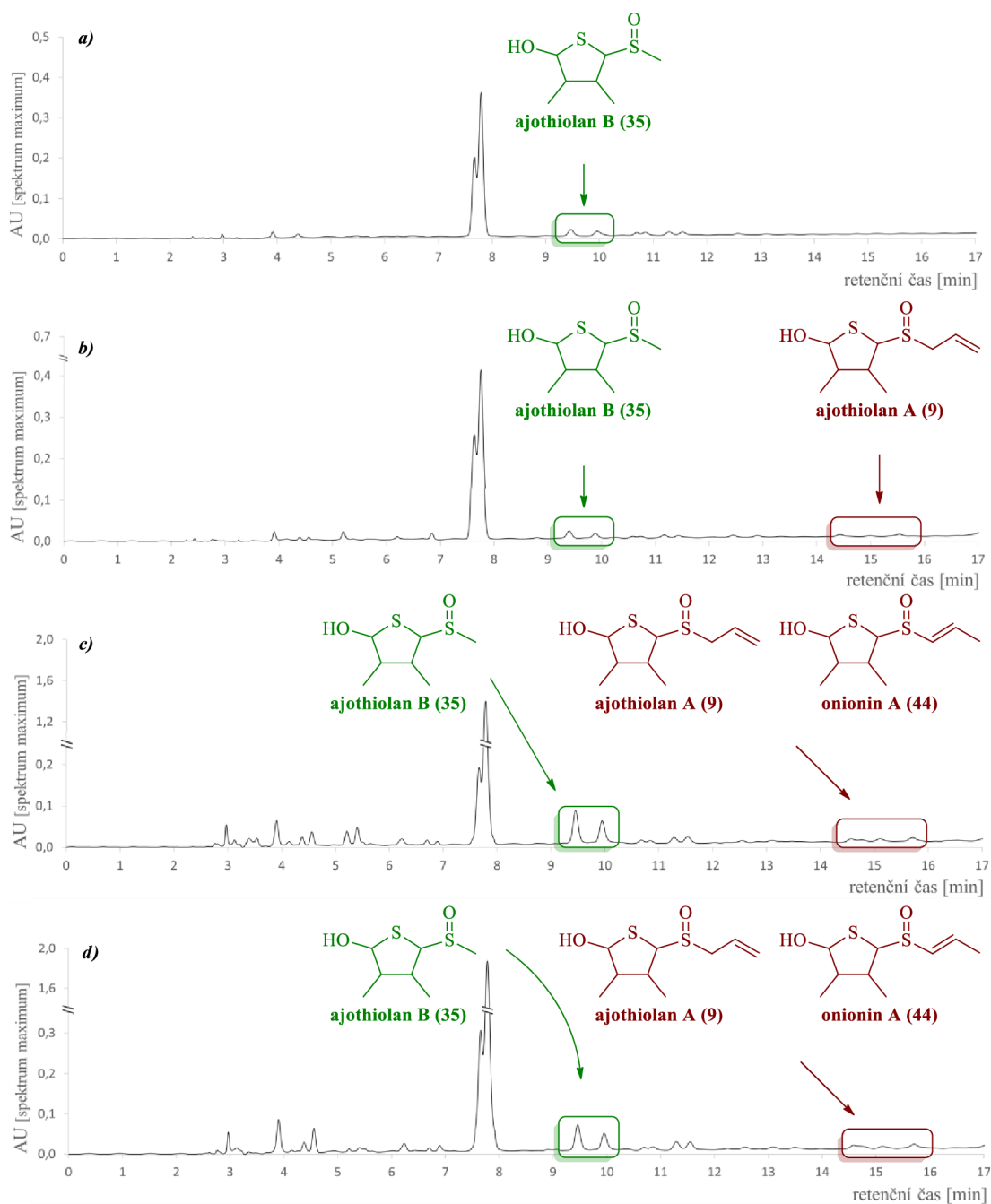
**Obrázek 25** uvádí výsledky analýzy C8-HPLC/MS vzorků **C** a **D**. Majoritní látkou byl v obou vzorcích opět allicin (**4**,  $R_t$  17,4 minut). Identifikovány byly také jeho polohové izomery (thiosulfínáty **34** a **33**;  $R_t$  21,9–22,9 minut), stejně tak (*E/Z*) ajoeny (**31**, **32**;  $R_t$  37,5 minut,  $R_t$  45,1 minut). Všechny výše zmíněné látky byly přítomny v přibližně stejném množství i u vzorků **A** i **B**. Zde přídavek isoalliinu (**3**) neměl žádný výrazný vliv na obsah výše zmíněných sloučenin. To ovšem neplatí u zbytku sloučenin, které byly na základě MS dat identifikovány jako dva stereoizomery cepaenu (**36**;  $R_t$  42,4–44,3 minut) (sloučeniny vyskytující se v cibuli), jeho polohové izomery (**37**, **38**, **39**), vzniklé kombinací prekurzorů alliinu (**1**) a isoalliinu (**3**). Další látky, které byly dříve popsány v cibuli vědeckou skupinou Kubec a kol. (2018), jako např. allithiolan B (**40**;  $R_t$  24,1–26,6 minut), jeho polohový izomer (**41**; dosud bez triviálního označení;  $R_t$  24,1–26,6 minut) a allithiolan C (**42**;  $R_t$  26,5–31,5 minut).

Zároveň s allithiolanem C (**42**) byla identifikována ve vědecké literatuře dosud nepopsaná sloučenina elementárního složení  $C_{12}H_{22}O_2S_4$  (**43**;  $R_t$  26,5–31,5 minut). Stereoizomery této sloučeniny se dříve podařilo izolovat z extraktu cibule s použitím opakovaných HPLC/PDA frakcionací. Přesná struktura této sloučeniny byla identifikována na základě NMR dat. Lze tedy konstatovat, že optimalizovaný postup pro izolaci ajothiolanů ze vzorků **C** a **D** může také sloužit pro snadnější izolaci těchto v literatuře dosud nepopsaných sloučenin  $C_{12}H_{22}O_2S_4$  (**43**;  $R_t$  26,5–31,5 minut).

Ajothiolany byly v extraktech vzorku **C** a **D** identifikovány ve vyšších koncentracích než tomu bylo u vzorků **A** a **B**. Detailnímu popisu identifikace ajothiolanů ve vzorcích **C** a **D** bude věnována závěrečná část této kapitoly



**Obrázek 25:** C8-HPLC/MS chromatogram (Metoda A) se znázorněním identifikovaných sloučenin u vzorků: **C** (c), **D** (d).



**Obrázek 26:** Výřez C8-HPLC/MS chromatogramu ( $R_t$  0–17 min; **Metoda A**) se znázorněním identifikovaných ajothiolanů i jejich polohových izomerů u vzorků: **A** (a), **B** (b), **C** (c), **D** (d).

Porovnání množství identifikovaných ajothiolanů ve vzorcích (**A**, **B**, **C**, **D**) uvádí **Obrázek 26**. Jak bylo popsáno Blockem a kol. (2018), bylo skutečně identifikováno větší množství ajothiolanů ve vzorku **B** (macerace v acetonu) než ve vzorku **A** (bez acetonu). Navíc u vzorku **B** byl identifikován i ajothiolan **A** (9), který se u vzorku s vodou neobjevil v detekovatelném množství. Vzorky **C** a **D** (přídavek lyofilizované cibule jakožto zdroje isoalliinu (3)) na základě výsledků C8-HPLC/MS analýzy také obsahovaly ajothiolany,

ale v menším množství, než bylo očekáváno. Množství ajothiolanů ve vzorku **C** a **D** bylo opět nízké, ale jednoznačně vyšší než u vzorků **A** a **B**. Z ajothiolanů byl identifikován ajothiolan **B** (**35**), ajothiolan **A** (**9**) a jeho polohový izomer, tj. onionin **A** (**44**), který byl již dříve izolován z cibule (Štefanová a kol., 2019).

Vyšší výskyt ajothiolanů (u vzorků **C** a **D**) potvrzuje hypotézu, že přídavek isoalliinu (**3**) k česnekovému homogenátu vede k vyšší tvorbě organosírných sloučenin obsahujících ve své molekule thiolanové jádro.

## 6 Závěr

- Pro možnost optimalizace HPLC/PDA metody pro izolaci ajothiolanů z česneku kuchyňského (*Allium sativum*) byly připraveny celkem čtyři vzorky, které se lišily počáteční fází přípravy extraktu,
- kvalitativní a semikvantitativní vyhodnocení připravených extraktů bylo provedeno metodou C8-HPLC/MS,
- vzorky **C** a **D** (tj. česnek obohacený o isoalliin (**3**) ve formě lyofilizované cibule) byly na základě získaných MS dat vyhodnoceny jako nejvhodnější postup pro HPLC izolaci ajothiolanů, zároveň byl potvrzen předpoklad (**Obrázek 17**), že zvýšením koncentrace isoalliinu (**3**) v homogenizovaném česneku je možné dosáhnout vyšší tvorby sloučenin, které ve své molekule obsahují thiolanové jádro, tj. i ajothiolanů.

## 7 Reference

1. Block, E. (1992). The organosulfur chemistry of the genus *Alliums* implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie International Edition England*, 31 (1), 1135–1178.
2. Block, E. (2010). Garlic and other *Alliums*. Milton Road, Cambridge, *The Royal Society of Chemistry*, ISBN: 978-1-84973-180-5.
3. Block, E., Dane, E. J., Thomas, S., Cody, R. B. (2010). Applications of direct analysis in real time mass spectrometry (DART-MS) in *Allium* chemistry. 2-Propenesulfenic and 2-propenesulfinic acids, diallyl trisulfane *S*-oxide, and other reactive sulfur compounds from crushed garlic and other *Alliums*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 4617–4625.
4. Block, E., Dethier, B., Bechand, B., Cotelesage, J. H. J., George, H. G., Goto, K., Pickering, J. I., Rengifo, M. E., Sheridan, R., Sneed, Y. E., Vogt, L. (2018). Ajothiolanes: 3,4-dimethylthiolane natural products from garlic (*Allium sativum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 10193–10204.
5. Cavallito, C. J., Buck, J. S., Suter, C. M. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Determination of the chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1952–1954.
6. Dethier, B., Laloux, M., Hanon, E., Nott, K., Heuskin, S., Wathelet, J. P. (2012). Analysis of the diastereoisomers of alliin by HPLC. *Talanta*, 101, 447–452.
7. Dethier, B. (2016). The chemistry of new garlic-derived organosulfur compounds and the molecular basis of olfaction. SUNY Albany, NY, USA.



8. Edwards, S. J., Musker, D., Collin, H. A., & Britton, G. (1994). The analysis of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides (flavour precursors) from species of *Allium* by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis*, 5, 4–9.
9. Fritsch, M. R., Keusgen, M. (2006). Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (*Alliaceae*). *Phytochemistry*, 67, 1127–1135.
10. Hunter, R., Kaschula, C. H., Parker, I. M., Cairn, M. R., Richards, P., Travis, S., Taute, F., Qwebani, T. (2008). Substituted ajoenes as novel anti-cancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(19), 5277–5279.
11. Iberl, B., Winkler, G., & Knobloch, K. (1990). Products of allicin transformation: ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. *Planta Medica*, 56(02), 202–211.
12. Janča, J., & Zentrich, J. A. (1994). *Herbář léčivých rostlin*. Praha: Eminent, 288 s.
13. Koch, H. P., Lawson, L. D., (1996). Eds. *Garlic the science and therapeutic applications of Allium sativum L. and related species*. *Williams and Wilkins*.
14. Kozák, V., získáno 15. 2. 2022 z <https://www.cesnek.cz/popis-cesneku>.
15. Kubát, K. (2002). *Klíč ke květeně České republiky*. Praha: Akademie věd České republiky, 930 s.

- 
16. Kubec, R., & Dadáková, E. (2009). Chromatographic methods for determination of *S*-substituted cysteine derivatives – a comparative study. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6957–6963.
17. Kubec, R., Štefanová, I., Moos, M., Urajová, P., Kuzma, M., & Zápál, J. (2018). Allithiolanes: nine groups of a newly discovered family of sulfur compounds responsible for the bitter off-taste of processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(33), 8783–8794.
18. Lancaster, J. E., & Boland, M. J. (1990). Flavor biochemistry. In onions and allied crops. *Biochemistry, Food Science, and Minor Crops*, 3, 33–72.
19. Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic (Review). *Journal of Chromatography A*, 1112, 3–22.
20. Lawson, L. D., & Hughes, B. G. (1992). Charakterization of formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. *Planta Medica*, 58, 345–350.
21. Nohara, T., Kiyota, J., Sakamoto, T., Manabe, H., Ono, M., Ikeda, T., Fujiwara, Y., Nakano, D., Kinjo, J. (2012). Garlicnins B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>, and D, from the fraction regulating macrophage activation of *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 60(6) 747–751.
22. Nohara, T., Fujiwara, Y., Ikeda, K., Murakami, K., Ono, M., Nakano, D., Kinjo, J. (2013). Cyclic sulfoxides garlicnins B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>, and C<sub>3</sub> from *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61, 695–699.

23. Nohara, T., Fujiwara, Y., Ikeda, T., Yamaguchi, K., Manabe, H., Murakami, K., Ono, M., Nakano, D., Kinjo, J. (2014). Acyclic sulfides, garlicnins L-1–L-4, E and F, from *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 62(5) 477–482.
24. Nohara, T., Fujiwara, Y., Komota, Y., Kondo, Y., Saku, T., Yamaguchi, K., Komohara, Y., Takeya, M. (2015). Cyclic sulfoxides-garlicnins K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>, and H1-extracted from *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 63, 117–121.
25. Nohara, T., Ono, M., Nishioka, N., Masuda, F., Fujiwara, Y., Ikeda, T., Nakano, D., Kinjo, J. (2017b). New cyclic sulfides, garlicnins I<sub>2</sub>, M, N, and O, from *Allium sativum*. *Journal of Natural Medicines*.
26. Nohara, T., Ono, M., Nishioka, N., Masuda, F., Fujiwara, Y., Ikeda, T., Nakano, D., Kinjo, J. (2017c). New cyclic sulfides extracted from *Allium sativum*: garlicnins P, J<sub>2</sub>, and Q. *Journal of Natural Medicines*.
27. Ono, M., Fujiwara, Y., Ikeda, T., Pan, Ch., El-Aasr, M., Lee, J-H., Nakano, D., Kinjo, J., Nohara, T. (2017). Atypical cyclic sulfides, garlicnins G, I, and J, extracted from *Allium sativum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 65, 102–106.
28. Raminez, A. D., Locatelli, A. D., González, E. R., Cavagnaro, F. P., Camargo, B. A. (2016). Analytical methods for bioactive sulfur compounds in *Allium*: An integrated review and future directions. *Journal of Food Composition and Analysis*.
29. Štefanová, I., Zápál, J., Moos, M., Kuzma, M., Kubec, R. (2019). Isoalliin-derived thiolanes formed in homogenized onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

30. Štěpánková, J., Chrtek, J., Kaplan, Z. (eds.) (2010). Květena České republiky. 8. Academia, Praha.
31. Thomas, D. J., & Parkin, K. L. (1994). Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in *Alliums* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1632–1638.
32. Whitaker, J. R. (1976). Development of flavour, odour and pungency in onion and garlic. *Advances in Food Research*, 22, 73–133.
33. Yoo, K. S., & Pike, L. M. (1998). Determination of flavour precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Scientia Horticulturae*, 75, 1–10.

### Zdroje obrázků

I. Získán 1. 3. 2022 z

<http://www.healinghouseherbal.com/uploads/1/2/5/8/125845184/published/garlic.jpg?1565211744>.

II. Získán 15. 2. 2022 z <https://www.ordinace.cz/img/articles/16b9/13501.jpg>.

III. Získán 15. 2. 2022 z

<https://bylinkovyraj.net/wp-content/uploads/2015/11/DSCN1282.jpg>.

## 8 Použité zkratky

ACSO	<i>S</i> -alk(en)ylcystein- <i>S</i> -oxydy ( <i>S</i> -alk(en)ylcysteine- <i>S</i> -oxides)
DAD	detektor diodového pole (diode array detector)
DEE	diethylether (diethyl ether)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
LTQ XL	hmotnostní spektrometr s lineární iontovou pastí (linear ion trap mass spectrometer)
MS	hmotnostní spektrometer (mass spectrometer)
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
p.a.	pro analýzu (per analysis)
PDA	detektor diodového pole (photodiode array)
PVDF	polyvinylidenfluorid (polyvinylidene fluoride)
rpm	rotace za minutu (rotations per minute)
R <sub>t</sub>	retenční čas (retention time)
RVO	rotační vakuová odparka (rotary vacuum evaporator)
SPE	extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)