Kemija Allium-a: GC-MS analiza tiosulfinata u četiri odabrane biljne vrste

Matić, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:973302

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

KEMIJA *ALLIUM-a*: GC-MS ANALIZA TIOSULFINATA U ČETIRI ODABRANE BILJNE VRSTE

DIPLOMSKI RAD

MIA MATIĆ

MATIČNI BROJ: 64

Split, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ: KEMIJA

SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

KEMIJA *ALLIUM-a*: GC-MS ANALIZA TIOSULFINATA U ČETIRI ODABRANE BILJNE VRSTE

DIPLOMSKI RAD

MIA MATIĆ

Matični broj: 64

Split, srpanj 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY ORIENTATION

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

ALLIUM CHEMISTRY: GC-MS ANALYSIS OF THIOSULFINATES IN FOUR SELECTED PLANT SPECIES

DIPLOMA THESIS

MIA MATIĆ

Parent number: 64

Split, July 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada: je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.
Mentor: doc. dr. sc. Ivica Blažević
Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag. chem.

KEMIJA *ALLIUM-a:* GC-MS ANALIZA TIOSULFINATA U ČETIRI ODABRANE BILJNE VRSTE

Mia Matić, 64

Sažetak:

Metaboliti biljaka koji sadrže sumpor uključuju različite kemijske strukture pa variraju od primarnih metabolita (aminokiseline sa sumporom) do sekundarnih metabolita (tiosulfinati, glukozinolati itd.). Poznata su važna biološka svojstva hlapljivih sumporovih spojeva, između kojih su i antioksidacijska, antibakterijska i sl. U ovom su radu istraživani hlapljivi sumporovi spojevi u *Allium* vrstama. *Allium* (Amaryllidaceae) je velika i važna skupina koja bilježi više od 500 vrsta. Tiosulfinati i tiosulfonati su sumporovi spojevi specifični za ovaj rod. U svrhu izolacije hlapljivih spojeva, u aparaturi po Clevengeru, provedena je hidrodestilacija suhog bilja *A. commutatum, A. porrum, A. sativum* i *A. sphaerocephalon* dok je samo za *A. commutatum* i *A. sativum* provedena i ekstrakcija diklormetanom. Hlapljivi izolati su analizirani GC-MS metodom. Na temelju hlapljivih razgradnih produkata je utvrđeno da su u svim ispitivanim vrstama prisutni sljedeći cistein sulfoksidi: metiin, izoaliin, propiin. Najveći maseni udio u sastavu *A. sativuma* ima dialil disulfid (39,7%) koji potječe od aliina, po čemu se vidno razlikuje od ostalih vrsta..

Ključne riječi: hlapljivi sumporovi spojevi, *Allium commutatum*- divlji ili obalni luk, *A. porrum*- poriluk, *A. sativum*- češnjak, *A. sphaerocephalon*- glavasti luk, GC-MS

Rad sadrži: 50 stranica, 49 slika, 4 tablice, 21 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. **doc. dr. sc. Maša Buljac** predsjednik
2. **dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur.** član
3. **doc. dr. sc. Ivica Blažević** mentor

Datum obrane: 14. srpnja 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom formatu (PDF formatu) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, (Ruđera Boškovića 35).

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject: was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, seasson no. 21
Mentor: Ivica Blažević, PhD, Assistant Professor
Technical assistance: Azra Đulović, MChem.

ALLIUM CHEMISTRY: GC-MS ANALYSIS OF THIOSULFINATES IN FOUR SELECTED PLANT SPECIES

Mia Matić, 64

Abstract:

Sulphur-containing plant metabolites include a variety of chemical structures, varying from primary metabolites such as sulphur-containing amino acids to secondary metabolites like, thiosulfinates, glucosinolates and others. In recent years, volatile sulphur compounds have been assigned important biological properties, including antioxidant, antibacterial, etc. The aim of the work was to uncover sulphur containing constituents of *Allium* species. *Allium* (Amaryllidaceae) is a large and very important genus which comprises of more than 500 species. Thiosulfinates and thiosulfonates are sulphuric compounds specifically found in this genus. For the purpose of isolation, The isolation of volatile compounds was carried out by hydrodistillation in Clevenger type apparatus from dry plant materials *A. commutatum, A. porrum, A. sativum* and *A. sphaerocephalon* for, , but volatile compounds from *A. commutatum* and *A. sativum* were also extracted by dichloromethane. Volatile isolates were analyzed by GC-MS method.Based on volatile degradation products, it was found that all tested species contained the following cysteine sulphoxides: Methiin, Isoaliin, Propiin. The most abundant compound in A. sativum was diallyl disulfide (39,7%) derived from Aliin, which made the plant different from other species.

Keywords: volatile sulphur compounds, *Allium commutatum*- sea garlic, *A. porrum*- leek, *A. sativum*- garlic, *A. sphaerocephalon*- drumstick allium, GC-MS

Thesis contains: 50 pages, 49 pictures, 4 tables, 21 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1.	**Maša Buljac, PhD, Assistant professor**	chair person
2.	**Mario Nikola Mužek, PhD**	member
3.	**Ivica Blažević, PhD, Assistant professor**	supervisor

Defence date: July 14, 2017

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivice Blaževića, u vremenskom razdoblju od ožujka do lipnja 2017. godine.

Rad je financiran od HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

ZAHVALA

U prvom redu veliku zahvalnost dugujem mentoru doc. dr. sc. Ivici Blaževiću na pomoći, strpljenju i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada. Nadalje, zahvaljujem se asistentici Azri Đulović mag. chem. na stručnoj pomoći pri eksperimentalnom radu te na dostupnosti za sva moja pitanja.

Najveća hvala mojim roditeljima, bratu i sestri te dečku koji su mi omogućili školovanje, davali podršku i razumijevanje tijekom mog studiranja i nisu prestali vjerovati u mene.

Velika hvala i mojoj svekrvi i svekru na nesebičnoj pomoći u ostvarenju ovog cilja.

Zahvaljujem se i svojim prijateljima koji su mi uljepšali studijske godine i učinili ih zabavnim.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- Izolirati hlapljive sumporove spojeve iz biljaka *Allium commutatum, A. porrum, A. sativum* te *A. sphaerocephalon* hidrodestilacijom i ekstrakcijom diklormetanom nakon izvršene autolize.
- Dobivene hlapljive smjese analizirati vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija.

SAŽETAK:

Metaboliti biljaka koji sadrže sumpor uključuju različite kemijske strukture pa variraju od primarnih metabolita (aminokiseline sa sumporom) do sekundarnih metabolita (tiosulfinati, glukozinolati itd.). Poznata su važna biološka svojstva hlapljivih sumporovih spojeva, između kojih su i antioksidacijska, antibakterijska i sl. U ovom su radu istraživani hlapljivi sumporovi spojevi u *Allium* vrstama.

Allium (Amaryllidaceae) je velika i važna skupina koja bilježi više od 500 vrsta. Tiosulfinati i tiosulfonati su sumporovi spojevi specifični za ovaj rod. U svrhu izolacije hlapljivih spojeva, u aparaturi po Clevengeru, provedena je hidrodestilacija suhog bilja *A. commutatum, A. porrum, A. sativum* i *A. sphaerocephalon* dok je samo za *A. commutatum* i *A. sativum* provedena i ekstrakcija diklormetanom.

Hlapljivi izolati su analizirani GC-MS metodom. Na temelju hlapljivih razgradnih produkata je utvrđeno da su u svim ispitivanim vrstama prisutni sljedeći cistein sulfoksidi: metiin, izoaliin, propiin. Najveći maseni udio u sastavu *A. sativuma* ima dialil disulfid (39,7%) koji potječe od aliina, po čemu se vidno razlikuje od ostalih vrsta..

Ključne riječi: Hlapljivi sumporovi spojevi, *Allium commutatum*- divlji ili obalni luk, *A. porrum*- poriluk, *A. sativum*- češnjak, *A. sphaerocephalon*- glavasti luk, GC-MS

SUMMARY:

Sulphur-containing plant metabolites include a variety of chemical structures, varying from primary metabolites such as sulphur-containing amino acids to secondary metabolites like, thiosulfinates, glucosinolates and others. In recent years, volatile sulphur compounds have been assigned important biological properties, including antioxidant, antibacterial, etc. The aim of the work was to uncover sulphur containing constituents of *Allium* species.

Allium (Amaryllidaceae) is a large and very important genus which comprises of more than 500 species. Thiosulfinates and thiosulfonates are sulphuric compounds specifically found in this genus. For the purpose of isolation, The isolation of volatile compounds was carried out by hydrodistillation in Clevenger type apparatus from dry plant materials *A. commutatum, A. porrum, A. sativum* and *A. sphaerocephalon* for, , but volatile compounds from *A. commutatum* and *A. sativum* were also extracted by dichloromethane.

Volatile isolates were analyzed by GC-MS method.Based on volatile degradation products, it was found that all tested species contained the following cysteine sulphoxides: Methiin, Isoaliin, Propiin. The most abundant compound in A. sativum was diallyl disulfide (39,7%) derived from Aliin, which made the plant different from other species.

Keywords: Volatile sulphur compounds, *Allium commutatum*- sea garlic, *A. porrum*- leek, *A. sativum*- garlic, *A. sphaerocephalon*- drumstick allium, GC-MS

SADRŽAJ:

UVOD ..... - 1 -

1. OPĆI DIO ..... - 2 -

1.1. Hlapljivi sumporovi spojevi ..... - 2 -

1.1.1. Klasifikacija sumporovih spojeva ..... - 3 -

1.1.2. Biosinteza i razgradnja odabranih sumporovih spojeva ..... - 5 -

1.1.3. Rasprostranjenost sumporovih spojeva u različitim porodicama ..... - 9 -

1.1.4. Biološko djelovanje ..... - 10 -

1.2. Metode izolacije isparljivih spojeva ..... - 12 -

1.2.1. Destilacija ..... - 12 -

1.2.2. Ekstrakcija ..... - 13 -

1.2.3. Kromatografske metode ..... - 14 -

1.3. Metode identifikacije razgradnih produkata sumporovih spojeva ..... - 16 -

1.3.1. Spektroskopija ..... - 16 -

1.4. Opće karakteristike biljnih vrsta roda *Allium* ..... - 18 -

1.4.1. *Allium sativum* L. (češnjak ili bijeli luk) ..... - 18 -

1.4.2. *Allium commutatum* Guss. (divlji luk ili obalni luk) ..... - 20 -

1.4.3. *Allium porrum* L. (poriluk) ..... - 20 -

1.4.4. *Allium sphaerocephalon* L. (glavasti luk) ..... - 20 -

2. EKSPERIMENTALNI DIO ..... - 21 -

2.1. Biljni materijal ..... - 21 -

2.1.1. *Allium sativum* L. (češnjak ili bijeli luk) ..... - 21 -

2.1.2. *Allium commutatum* (divlji luk ili obalni luk) ..... - 22 -

2.1.3. *Allium porrum* L. (poriluk) ..... - 22 -

2.1.4. *Allium sphaerocephalon* L. (glavasti luk) ..... - 23 -

2.2. Kemikalije i aparatura ..... - 24 -

2.2.1. Kemikalije: ..... - 24 -

2.2.2. Aparatura: ..... - 24 -

2.3. Priprema materijala i izolacija hlapljivih spojeva ..... - 24 -

2.3.1. Destilacija ..... - 25 -

2.3.2. Autoliza ..... - 26 -

2.3.3. Ekstrakcija ..... - 27 -

2.4. Priprema uzoraka za mjerenje ..... - 28 -

2.5. Analiza dobivenih spojeva ..... - 28 -

3. REZULTATI I RASPRAVA ..... - 30 -

3.1. Kemijski sastav biljnog materijala određen tehnikom GC-MS ..... - 31 -

3.1.1. ***Allium sativum*** ..... - 31 -
3.1.2. ***Allium commutatum*** ..... - 33 -
3.1.3. ***Allium porrum*** ..... - 35 -
3.1.4. ***Allium sphaerocephalon*** ..... - 36 -
4. ZAKLJUČAK ..... - 47 -
5. LITERATURA ..... - 49 -

UVOD

Hlapljivi sumporovi spojevi predstavljaju grupu spojeva nađenih u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Njihov sadržaj u biljkama ovisit će o uvjetima u kojima se biljka nalazi, o njezinoj vrsti te o načinu uzgoja.

*Allium (*Amaryllidaceae*)* je velika i važna skupina koja bilježi više od 500 vrsta od kojih 54 raste na tlu Republike Hrvatske. Biljke roda *Allium* predstavljaju prirodan i bogat izvor organosumporovih spojeva. *S*-alk(en)il-L-cistein sulfoksidi su bezmirisne sumporove aminokiseline tipične za porodicu *Alliaceae* te su preteča spojeva pronađenih u rodu *Allium.* Oštećenjem tkiva, enzim aliinaza hidrolizira *S*-alk(en)il-L-cistein sulfokside pretvarajući ih u reaktivne tiosulfinate. Ovisno o *Allium* vrsti i uvjetima rada, tiosulfinati se mogu raspasti na različite oblike kao što su dialil, metil alil i dietil mono-, di- tri-, tetra-, penta- i heksasulfide kao i vinilditiine te (*E*)- i (*Z*)-ajoene.

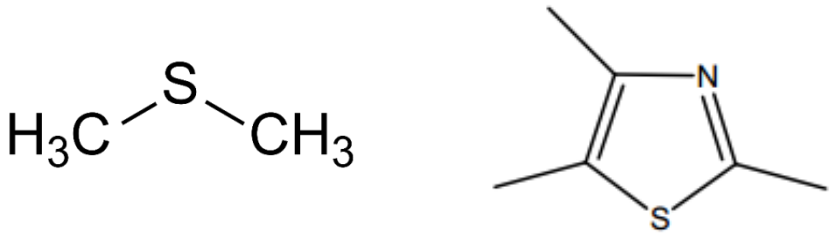
Allium vrste su agronomski važni rod zbog prisutnih sumporovih spojeva, cistein sulfoksida. Ti su spojevi dokazano učinkoviti u prevenciji kod brojnih ljudskih bolesti, uključujući karcinome te kardiovaskularne poremećaje i upalne procese.

1. OPĆI DIO

1.1. Hlapljivi sumporovi spojevi

Hlapljivi sumporovi spojevi su grupa prirodnih spojeva pronađenih u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Moguće ih je naći u različitim dijelovima biljke, kao što su korijen, stabljika, list i cvijet. Ukupni sadržaj sumporovih spojeva u biljkama ovisit će o raznim činiteljima poput vrste biljke, klime, uvjeta uzgoja, agronomske prakse i sl. Unutar iste biljne vrste sadržaj sumporovih spojeva ovisi o dijelu biljke, o uvjetima uzgoja i razvojnom statusu.

Kemijske strukture hlapljivih sumporovih spojeva kreću se od jednostavnijih prema složenim. Primjer najjednostavnije strukture je dimetil sulfid, dok složenije strukture uz atom sumpora sadrže i druge heteroatome (O, N i sl.).



Slika 1.1. Lijevo-dimetil sulfid *(jednostavna*), desno-alkiltiazol (*složena struktura*)

Nadalje, alkilni sulfidi i izotiocijanati su široko rasprostranjeni u različitim biljnim porodicama, dok sami elementarni sumpor, etil disulfidni derivati i ciklički polisulfidi se nalaze u tragovima.

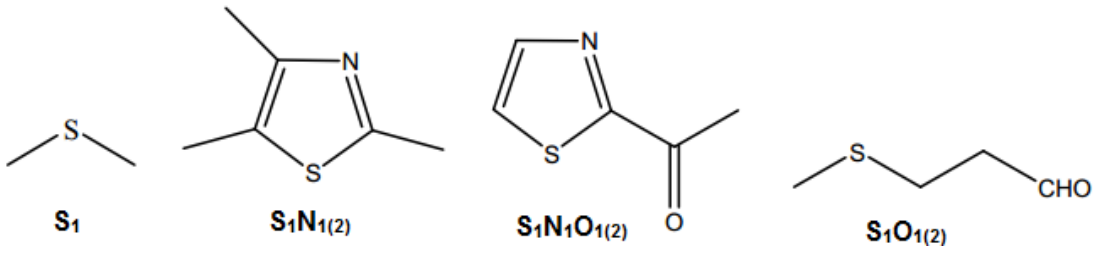
Većina organskih sumporovih spojeva imaju vrlo neugodan miris i naizgled ne trebaju biti u eteričnim uljima. Određeni sumporovi spojevi mogu biti dominantni spojevi u eteričnim uljima, npr. eterično ulje češnjaka, ali su uglavnom molekule u tragovima s funkcijom davanja specifičnog mirisa eteričnih ulja. Ovi spojevi, također, imaju važnu ulogu biološkog tipa, uključujući antibakterijsku aktivnost aliicina, antioksidacijsku aktivnost tiosulfina te inhibicijski efekt dialil disulfida na poliferaciju tumorskih stanica. Izotiocijanati su velika grupa hlapljivih sumporovih spojeva koji pokazuju antikancerogena svojstva. [1]

1.1.1. Klasifikacija sumporovih spojeva

Hlapljivi sumporovi spojevi klasificiraju se u odnosu na broj sumporovih atoma koji su sadržani u njihovoj strukturi. Klasifikacijom je definirano ukupno 16 klasa sumporovih spojeva, a dijele se na četiri glavne grupe i podgrupe te na dvije odvojene grupe:

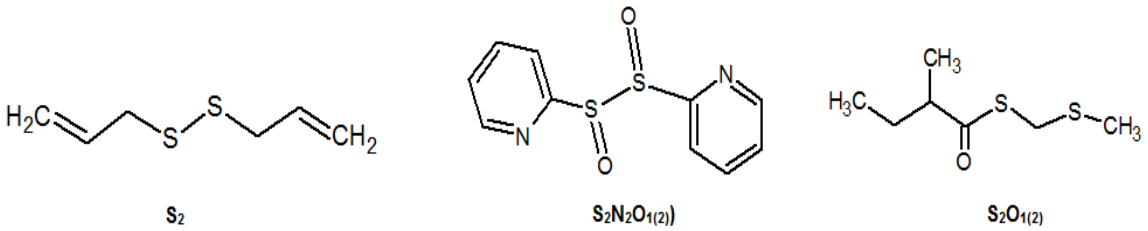
1. Sumporovi spojevi s jednim atomom sumpora u svojoj strukturi **(S_1)**
    a. Sumporovi spojevi s jednim ili dva atoma dušika **($S_1N_{1(2)}$)**
    b. Spojevi s jednim atomom dušika i jednim ili dva atoma kisika **($S_1N_1O_{1(2)}$)**
    c. Spojevi s jednim ili dva atoma kisika **($S_1O_{1(2)}$)**
2. Sumporovi spojevi s dva atoma sumpora u svojoj strukturi **(S_2)**
    a. Spojevi s jednim ili dva atoma dušika i jednim kisikom **($S_2N_{1(2)}O$)**
    b. Spojevi s dva atoma dušika i jednim ili dva atoma kisika **($S_2N_2O_{1(2)}$)**
    c. Spojevi s jednim ili dva atoma kisika **($S_2O_{1(2)}$)**
3. Sumporovi spojevi s tri atoma sumpora u strukturi **(S_3)**
    a. Skupina spojeva s različitim brojem atoma kisika **(S_3(N)O)**
    b. Skupina spojeva prema obliku molekule na linearne spojeve **(S_3L)**
    c. Spojevi sumpora cikličke strukture **(S_3C)**
4. Sumporovi spojevi s četiri sumporova atoma u strukturi **(S_4)**
    a. Grupa spojeva prema obliku molekula na linearne spojeve **(S_4L)**
    b. Sumporovi ciklički spojevi **(S_4C)**
5. Tiocijanati **(SCN)**
6. Izotiocijanati **(NCS)**

Klasifikacijom je definirano ukupno 16 klasa sumporovih spojeva.

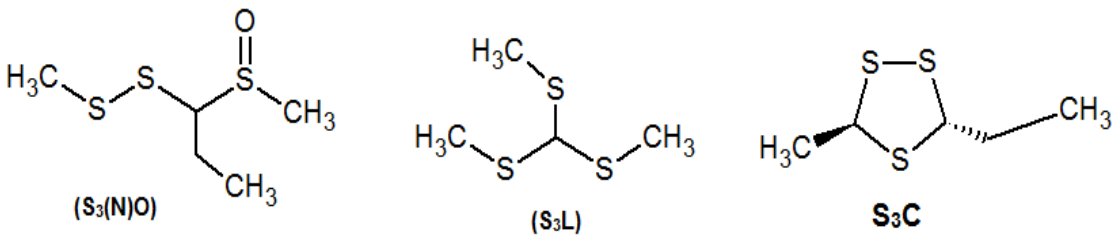


S_1 **$S_1N_{1(2)}$** **$S_1N_1O_{1(2)}$** **$S_1O_{1(2)}$**

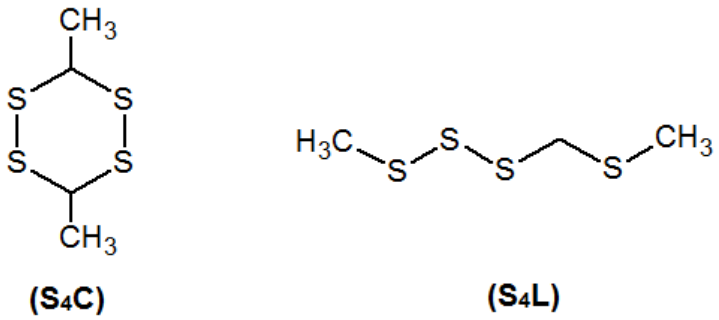
Slika 1.2. Prva grupa sumporovih spojeva



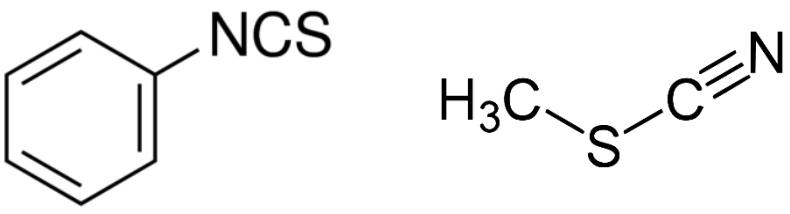
Slika 1.3. Druga grupa sumporovih spojeva



Slika 1.4. Treća grupa sumporovih spojeva [2]



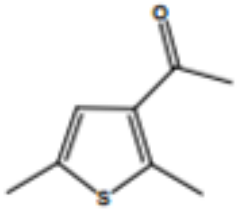
Slika 1.5. Četvrta grupa sumporovih spojeva [2]



Slika 1.6. Grupa izotiocijanata i tiocijanata

Heterociklički spojevi sa sumporom:

- aromatske molekule iz ove grupe se dijele na slijedeće podgrupe:
    - **derivati tiofena** - npr. 3-acetil-2,5-dimetiltiofen
    - **derivati tiazola** - najvažniji su alkiltiazoli (npr. 2,4,5-trimetiltiazol); acetiltiazoli (npr. 2-acetiltiazol) i hidroksimetiltiazoli (izvode se iz tiamina (vitamina B1) kao npr. 4-metil-5-tiazoletanol).



Slika 1.7. Derivat tiofena

Aromatične tvari sa sumporom su obično prisutne u tragovima u odnosu na druge komponente, međutim zbog malih granica detekcije od vitalne su važnosti za cjelokupnu aromu hrane kao što je kruh (metional), meso (2-metilfuran-3-tiol), kava (furfurilmerkaptan), pivo (prenil merkaptan), povrće (alil izotiocijanat), dimetil sulfid i alil disulfid i voće. [3]

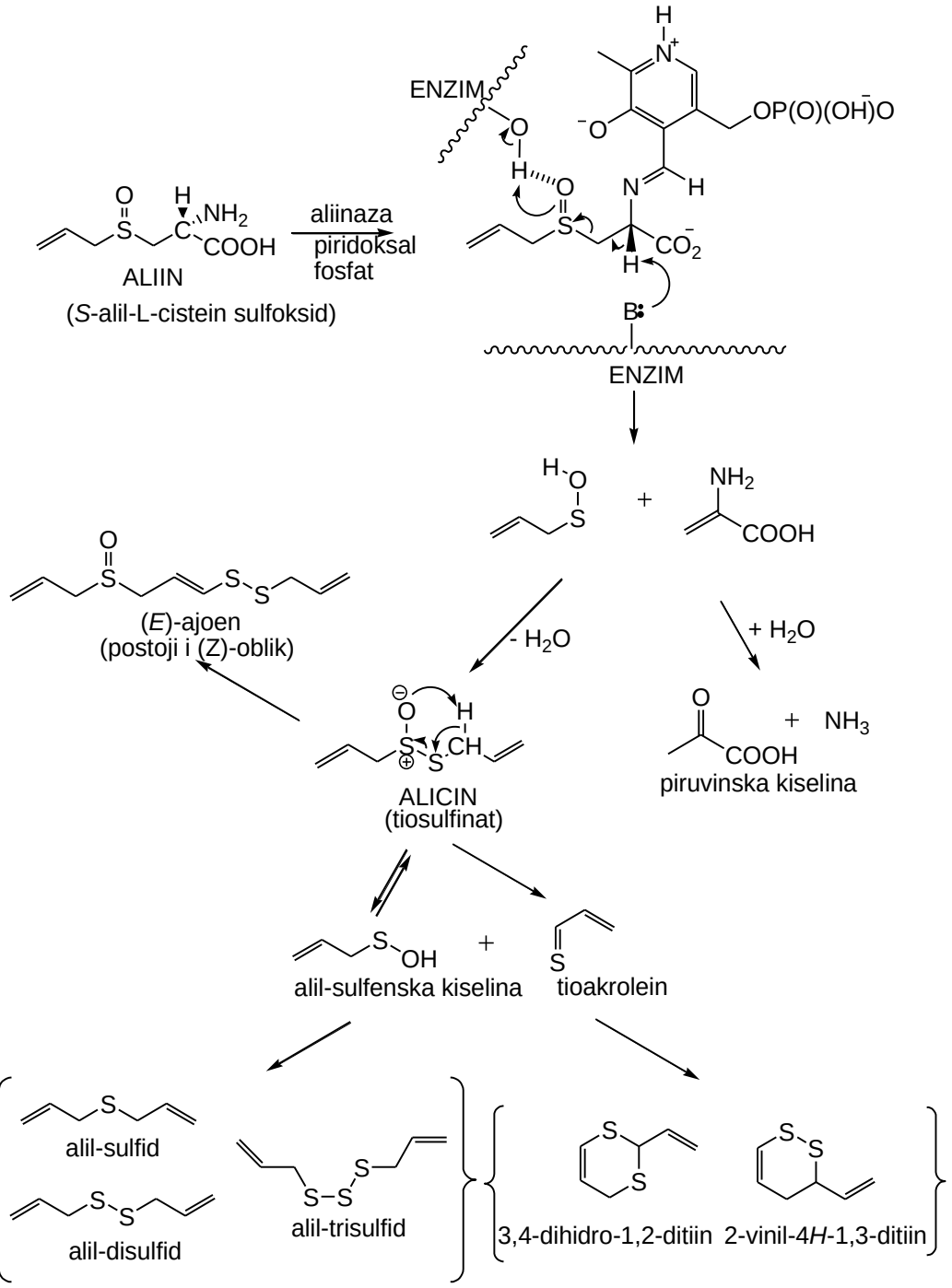
1.1.2. Biosinteza i razgradnja odabranih sumporovih spojeva

Biosinteza sumporovih isparljivih spojeva je nepoznanica, kao i enzimi koji su uključeni u proces. Istraživanja su uglavnom koncentrirana na:

- biosintetske putove nastajanja glukozinolata
- biosintezu tiosulfinata u biljkama vrste *Allium*

Isparljivi sumporovi spojevi su također odgovorni za karakterističan miris i okus *Allium* vrsta. Uslijed oštećenja tkiva prvi spojevi koji nastaju su sulfeninska kiselina i tiosulfinati. Spomenuti produkti su međuprodukti u formiranju većine hlapljivih spojeva. Isparljivi tiosulfinati nastaju transformacijom iz relativno stabilnih neisparljivih prekursora *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida uz pomoć enzima aliinaze. [3]

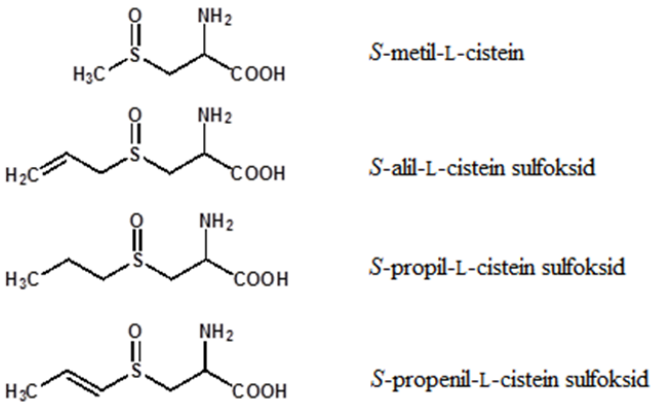
Na slici 1.8. opisana je konverzija aliina u alicin djelovanjem enzima.



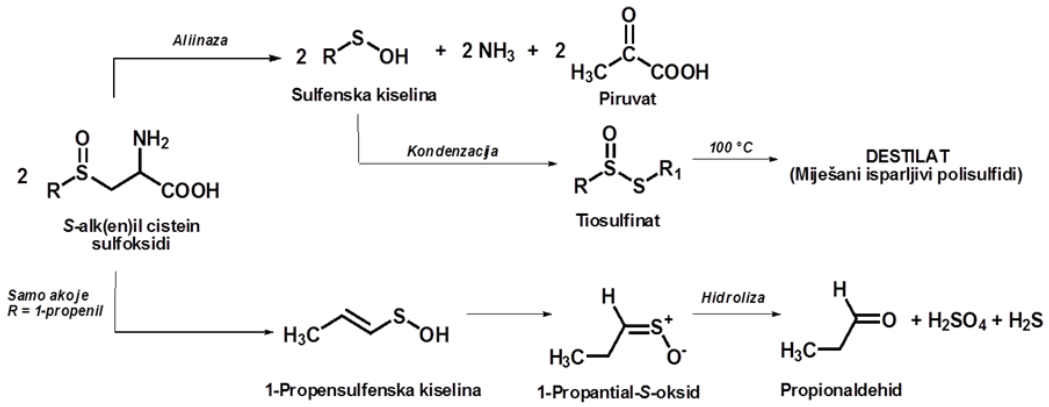
Slika 1.8. Aliinazom katalizirana konverzija aliina (S-alil-L-cistein-sulfoksid) u alicin (tiosulfinat) i ostale isparljive organosumporne spojeve [3]

Luk (engl. *onion*) i češnjak (engl. *garlic*) pripadaju *Allium* vrstama. Isparljivi sumporovi spojevi su odgovorni za karakterističan miris i okus *Allium* vrsta. Oštećenjem stanica enzim aliinaza reagira s aliinom (derivat aminokiseline cisteina). Isparljivi tiosulfinati nastaju transformacijom iz relativno stabilnih prekursora *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida uz pomoću enzima aliinaze. Karakteristični primjeri biljnih

sekundarnih metabolita *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida su *S*-metil-L-cistein sulfoksid (metiin; prisutan u većini vrsta *Allium*), *S*-alil-L-cistein sulfoksid (aliin, karakterističan za češnjak), *S*-*trans*-prop-1-en-1-il-cistein sulfoksid (izoaliin; karakterističan za luk) i *S*-propil-L-cistein sulfoksid (propiin; prisutan u luku). *S*-alk(en)il-cistein sulfoksidi su bez mirisa sve dok se tkivo biljke ne ošteti. Kada se češnjak usitni, enzim aliinaza prisutan u vakuolama unutar stanice se oslobodi. Općenito, enzimi C-S liaze, kao što su aliinaze, u biljkama cijepaju veze između sumporovih i ugljikovih atoma i dio su veće porodice aminotransferaza. [3]



Slika 1.9. Cistein sulfoksidi karakteristični za *Allium* vrste [4]



Slika 1.10. Mehanizam hidrolize *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida [4]

S obzirom na vrste kemijskih komponenti formiranih u *Allium* vrstama, priložena je shema koja opisuje razvoj spojeva pod različitim uvjetima. Spojevi se razlikuju prema obliku i uvjetima u kojima se uzorak obrađuje.

Kategorije spojeva:

1) vršne pare- spojevi proizvedeni pri sobnoj temperaturi nakon rezanja ili homogenizacije *Allium* tkiva;
2) produkti razgradnje nastali iz tiosulfinata pri sobnoj temperaturi;
3) uljne komponente - spojevi dobiveni termičkom obradom kao što je parna destilacija.[4]

Enzim transformira *S*-alk(en)il-L-cistein sulfoksid dajući u početku alk(en)il-sulfenske kiseline, vrlo reaktivni međuprodukti iz kojih kondenzacijskim reakcijama odmah nastaju tiosulfinati. Svježi češnjevi *Allium sativum* L. sadrže do 1% aliina *(S*-alil-L-cistein sulfoksida), koji pod utjecajem enzima aliin-liaze prelazi u alicin s tipičnim mirisom češnjaka. Aliin je bez mirisa i topljiv u vodi, dok je aliicin (kao i ostali tiosulfinati) vrlo nestabilan spoj koji se dalje pregrađuje pri čemu nastaju različiti sumporovi spojevi. Aliicin se destilacijom, kako je termički nestabilan, razgrađuje na polisulfide (dialil disulfid i dialil trisulfid) koji su odgovorni za karakterističan i neugodan miris eteričnog ulja. Molekule aliicina mogu reagirati međusobno pri čemu nastaju ajoeni. Također aliicin se može razgraditi pri čemu nastaje alil sulfenska kiselina i tioakrolein. Dvije molekule tioakroleina mogu reagirati Diels-Alder-ovom reakcijom pri čemu nastaju dva tiina, 3-vinil-3,4-dihidro-1,2-ditiin i 2-vinil-4[*H*]-1,3-ditiin, a koji su identificirani među isparljivim spojevima. Lukovice luka (*Allium cepa* L.) sadrže kao glavne komponente isparljive sumporove spojeve, propilensulfonske kiseline, aliin, metilaliin, propilaliin te cikloalein. Glavna sastavnica eteričnog ulja luka je alil propil disulfid. [3]

Svi identificirani kemijski spojevi u uljima se dobivaju termičkom razgradnjom tiosulfinata. Porijeklo tih komponenata sumpora najjednostavnije se može objasniti na primjeru alicina iz češnjaka. Prethodne studije su također pokazale da se na sobnoj temperaturi alicin može preurediti stvarajući sumporov dioksid i dialil mono-, di- i trisulfid. Nadalje, nastali dialil disulfid daljnjom termičkom razgradnjom daje najmanje 25 dodatnih reakcijskih produkata.

U svježim ekstraktima *Allium*-a, osim tiosulfinata, otkriveni su i drugi sumporovi spojevi. Prema istraživanjima iz ekstrakta luka izoliran je i metil-1-(metilsulfinil)propil disulfid. Daljnje studije pokazale su i prisutnost 6 novih spojeva cepaena u kloroformnim ekstraktima luka, a razvijen je i mehanizam formiranja cepaena iz međuprodukta tiosulfinata.

Nedavno je u ekstraktima *Allium*-a pronađena jedna rijetka grupa sumporovih spojeva koja pokazuje biološku aktivnost te se može dobiti iz bis-α-β-nezasićenih tiosulfinata. Radi se o 2 izomera 2,3-dimetil-5,6-ditiabicikloheksa 5-oksida koji su pronađeni u svježim ekstraktima ljutike, luka, mladog luka i vlasca. Ti spojevi se trivijalno nazivaju "*cis- i trans-zwiebelanes*". S obzirom da je njihova kemijska struktura izrazito kompleksna, fokus posljednjih znanstvenih istraživanja je na određivanju mehanizama sinteze spomenutih spojeva. [4]

1.1.3. Rasprostranjenost sumporovih spojeva u različitim porodicama

Sadržaj sumporovih spojeva u biljci ovisi o klimi, uvjetima uzgoja i razvojnom statusu, a može se nalaziti u listu, cvijetu, stabljici i korijenu. Neki hlapljivi sumporovi spojevi, uključujući metantiol, dimetil sulfid, dimetil disulfid i dimetil trisulfid, su pronađeni u velikom broju biljaka. Njihovi analozi, kao što su dimetil tetrasulfid i dimetil pentasulfid, su pronađeni u rodovima *Allium, Brassica, Ferula, Raphanus i Sinapis.* Također, propil i propilen sulfatni derivati rasprostranjeni su u mnogim biljnim rodovima, a ponajviše u rodu *Allium.*

Poznato je da u rodu *Allium* sumporove komponente sadrže različite prefikse sulfida, poput propilne, alilne, prop-1-enilne i metilne grupe pa se i kemotaksonomski *Allium*-i mogu i podijeliti prema njima u četiri skupine. Isto tako postoji veliki broj tiosulfinata, kao što su alicin, dipropil tiosulfinat i dimetil tiosulfinat te onih kao što su propil metantiosulfonat i propil propantiosulfonat, pronađeni isključivo u rodu *Allium.*

Elementarni sumporovi spojevi, uključujući ciklookta sumpor, ciklohepta sumpor, cikloheksa sumpor, rijetko se nalaze u eteričnim uljima. Iako postoji iznimka, eterično ulje biljke *Nuphar pumilum,* koje sadrži veliki postotak od čak 13,2% navedenih spojeva. Od spomenutih spojeva, samo je ciklookta sumpor pronađen u eteričnom ulju *Allium* vrsta te u *Capparis spinosa L.* [2]

1.1.4. Biološko djelovanje

Sumporovi spojevi su vrlo rasprostranjeni u prirodi, a raznoliko biološko djelovanje ih čini zanimljivim za istraživanja. Uglavnom imaju neugodan miris zbog razgradnje organskih tvari. Nalaze se i u opasnim područjima, kao što su vulkani, na mjestima gdje izlazi vulkanska para. U eteričnim uljima mogu biti dominantni spojevi iako su zbog svog neugodnog mirisa ondje nepoželjni i neočekivani. Primjerice, eterično ulje češnjaka sadrži di-prop-2-enil trisulfid, di-prop-2-enil disulfid, metil-prop-2-enil trisulfid, koji su ujedno i njegovi glavni spojevi. Zbog biološkog djelovanja navedenih spojeva, neki od dodataka prehrani koji se koriste u regulaciji metabolizma masti te kod hipertenzije (povišeni krvni tlak), sadrže eterično ulje češnjaka.

U ovom slučaju se susrećemo s pravilom kako spojevi vrlo neugodnog mirisa u malim koncentracijama naglašavaju i daju posebnu mirisnu ljepotu molekulama ugodnog mirisa, kojeg nalazimo u tradicionalnoj parfumeristici. [1]

1.1.4.1. Važnost sumporovih spojeva u liječenju

Kako bi se utvrdili potencijalni blagotvorni učinci *Allium* vrsta na ljudsko zdravlje, potrebno je usporediti niz podataka *in vivo* i *in vitro* studija. S tim znanjem može se cijeniti potencijalna uloga *Allium* vrsta u poboljšanju ljudskog zdravlja.[4]

Općenito, sumporovi spojevi pokazuju antikancerogena, antioksidacijska, antibakterijska svojstva te utječu na imunološki sustav i snižavanje lipida u krvi. Vjeruje se da konzumacija biljaka, koje sadrže sumporove spojeve, smanjuje rizik od nastanka tumora. [1]

- **Antikancerogena svojstva**: konzumacija alkohola, unos masti te pušenje povećavaju rizik od karcinoma. U istraživanjima na ljudima koja su uključivala konzumaciju *Allium* vrsta, osobito luka i češnjaka, zaključeno je da spomenute vrste smanjuju rizik od karcinoma. Pregledom epidemiološke literature zaključeno je kako je povećani unos svježeg ili kuhanog češnjaka obrnuto proporcionalan učestalosti pojave karcinoma želuca i debelog crijeva.
- **Antioksidacijska svojstva**: antioksidansi su od velike važnosti zbog njihove inhibicije razarajućeg učinka uzrokovanog slobodnim radikalima, uključujući reaktivne vrste kisika, dušika i klora (ROS, RNS, RClS). Istraživanjem je pokazano

kako ekstrakti *A. sativuma* i aliina posjeduju snažne sposobnosti inhibicije kada su ispitivani pomoću analize pufera slobodnog radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila.

- **Antibakterijska svojstva:** u narodnoj medicini *Allium* vrste se primjenjuju kod infekcija. Terapeutski učinak *Allium* vrsta, posebno njihovog antimikrobnog djelovanja, rezultat je prisutnost cistein-sulfoksida. U prošlom stoljeću češnjak se koristio za tretiranje Gram-(+) i Gram-(-) bakterija, uključujući *Pseudomonas, Proteus, Escherichiu coli, Staphylococcus aureus, Klebsiellu, Salmonellu, Micrococcus, Bacillus subtilis, Mycobacterium* te *Clostridium*.
- **Antifungalna i antiparazitska svojstva:** mnoge gljive su se pokazale osjetljive na *Allium*-e, posebno na češnjak. To uključuje *Candidu, Trichophyton, Torulopsis, Rhodotorulu, Cryptococcus, Aspergillus* i *Trichosporon*.
- **Kardiovaskularne bolesti:** ekstrakt češnjaka, kao i neki drugi organosumporovi sastojci *Allium* vrsta, pokazali su efekt snižavanja razine kolesterola u krvi prilikom ispitivanja na ljudima i životinjama. [4]

1.1.4.2. Važnost sumporovih spojeva u biljkama

U biljkama sumpor sudjeluje u građi mnogih enzima, sadrže ga vitamini biotin (vitamin H), tiamin (vitamin B1), zatim različiti antibiotici i biljna ulja te sudjeluje u građi aminokiselina (cistein, metionin). Također sudjeluje u građi aromatičnih spojeva (npr. u češnjaku). Smatra se da sumpor ima važnu ulogu u otpornosti biljaka prema niskim temperaturama i suši. Sumpor je kao biljno hranjivo izuzetno važan u formiranju endosperma žitarica koji ima značajan utjecaj na prinos i kvalitetu žitarica i sadržaj ulja u uljaricama (uljane repice, uljnih bundeva, suncokreta). U proizvodnji povrća najviše sumpora imaju kupus, cvjetača i luk. [5]



Slika 1.11. Nedostatak sumpora u biljkama (*desna biljka na svakoj slici*)

1.2. Metode izolacije isparljivih spojeva

Hlapljivi spojevi su nepolarni i slabo topljivi u vodi pa se na tome zasnivaju metode njihove najčešće izolacije. U te metode ubrajamo destilaciju, ekstrakciju, tiještenje, metodu direktnog uzimanja hlapljivih spojeva iz plinske faze koja je u ravnoteži s uzorkom, odnosno metodu analize vršnih para (HSA- *Headspace analysis*). [1]

1.2.1. Destilacija

Destilacija je postupak odvajanja smjesa tekućina na temelju različitih temperatura vrenja. Tekućina se zagrijava i prevodi u paru, a nastala para se odvodi hlađenjem (kondenzacijom) pri čemu se ukapljuje. Destilat se sakuplja u drugoj posudi. Svrha destilacije je:

- čišćenje tekućih tvari,
- razdvajanje smjesa tekućina različitog vrelišta,
- otparavanje organskih otapala,
- identifikacija tekućih tvari (određivanje vrelišta).[6]

Postoji više vrsta destilacije, a neke od njih su jednostavna, frakcijska i destilacija vodenom parom te destilacija pri sniženom tlaku, odnosno vakuum destilacija. U ovom slučaju, destilacija je postupak izolacije eteričnog ulja iz aromatičnog bilja. Prednost ove metode je to što destilat predstavlja smjesu isključivo hlapljivih spojeva. Razlikuju se tri vrste destilacija: vodena destilacija, parna destilacija i vodeno-parna destilacija. Sve metode temelje se na istom teorijskom principu, ali osnovna razlika između navedenih destilacija je kontakt biljnog materijala s vodom odnosno vodenom parom.

U aparaturi po Clevenger-u biljni materijal je uronjen u destiliranu vodu. Zagrijavanjem vode, hlapljivi spojevi iz biljke pri određenoj temperaturi destiliraju zajedno s vodenom parom. Kondenzirane kapljice ulja se spuštaju kroz središnju cijev aparature i sakupljaju u trapu, odnosno organskom otapalu, dok se one vodene pare vraćaju natrag u tikvicu s biljnim materijalom. Organski sloj (eterično ulje) se odvoji i suši u bezvodnom Na_2SO_4. Ukoliko je prisutno veliko pjenjenje u tikvici pri destilaciji, postoji opasnost otapanja pjene u eteričnom ulju koje je izolirano. Pjena sadrži visokomolekularne nepolarne površinski aktivne tvari koje bi otapanjem u ulju

promijenile izvorni kemijski sastav ulja. U slučaju otapanja ulja u trapu, lako isparljivo otapalo se oprezno ukloni isparavanjem laganom strujom dušika do stalne mase. [7]

1.2.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je metoda koju ubrajamo u metode pročišćavanja i za izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću otapala. Postoje određeni uvjeti koje organsko otapalo koje se koristi za ekstrakciju iz tekuće ili čvrste faze treba zadovoljiti:

- mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima
- tvar koja se ekstrahira mora imati što bolju topljivost u tom otapalu
- otopina iz koje se ekstrahira željena tvar i otapalo se moraju razlikovati u gustoći
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije moglo lako ukloniti
- otapalo mora biti što manje zapaljivo, otrovno i jeftino.

Najčešće korištena organska otapala za ekstrakciju su dietil eter, kloroform, petroleter, diklormetan itd.

Ekstrakcija se temelji na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa koje prate tvar u dva otapala koja se međusobno ne miješaju. Pri tom dolazi do razdijeljenja tvari između dva otapala. Ekstrakcija je bolja ako se postupak ponovi više puta s manjom količinom otapala. [7]



Slika 1.12. Lijevak za odjeljivanje [8]

Moderniji pristupi izolacije uključuju: ultrazvučnu ekstrakciju (ekstrakcija otapalom potpomognuta ultrazvukom), mikrovalnu ekstrakciju (ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima), mikrovalnu ekstrakciju bez otapala i ubrzanu ekstrakciju otapalom (ekstrakcija kod povišene temperature i tlaka) te ekstrakciju aromatičnog bilja sa subkritičnim fluidima (primjer je ekstrakcija s CO_2).

1.2.3. Kromatografske metode

Kromatografija dolazi od grčkih riječi *chroma* (boja) i *graphein* (pisati). Kromatografija je metoda odjeljivanja koja se zasniva na različitoj razdiobi tvari između mobilne i stacionarne faze sustava. Mobilna faza može biti plin (plinska kromatografija) ili tekućina (tekućinska kromatografija).
Dvije su faze sustava između kojih dolazi do raspodjele, a to su:

1. kruto-tekuće *(kromatografija na koloni; tankoslojna kromatografija; kromatografija na papiru)*
2. tekuće-tekuće
3. tekuće-plinovito *(plinska kromatografija).*

Kromatografske metode se također dijele prema prirodi stacionarne faze. Tako se plinska kromatografija dijeli na kromatografiju plin-tekuće *(GLC)* i plin-kruto *(GSC).* Razlikuju se dva tipa tekućinske kromatografije, tankoslojna *(TLC)* i papirna kromatografija, odnosno ona na stupcu i tehnike plošne kromatografije.

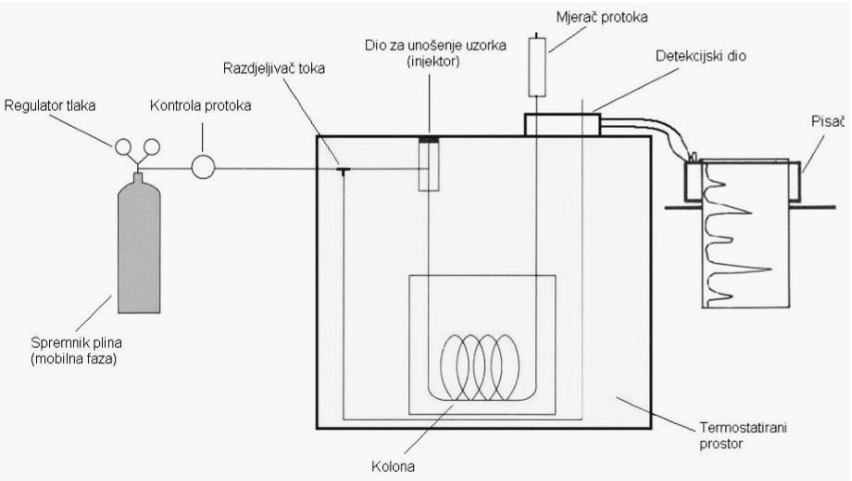
Kromatografiju je prvi primijenio ruski istraživač Mihail Cvet, početkom 20. stoljeća. Upotrijebio ju je prilikom analize smjese biljnih pigmenata na stupcu ispunjenim krutim kalcijevim karbonatom koju je ispirao eterom. Kako su se biljni pigmenti razdvojili i obojili različitim bojama kolonu, novu metodu je nazvao kromatografija. [9]

1.2.3.1. Plinska kromatografija

Ova vrsta kromatografije predstavlja vrlo brzu analitičku metodu odjeljivanja. Svrha metode je odjeljivanje komponenata iz smjese na osnovi njihovog različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi. Kao stacionarna faza upotrebljava se tekućina,

nehlapljiva pri radnoj temperaturi kromatograma, nanesena na površinu čvrstog nosača adsorpcijom ili kemijskim vezanjem. Kao mobilna faza koristi se inertni plin koji kao nositelj mora biti kemijski inertan kako nebi došlo do reakcije s uzorkom i materijalom kojim je punjena kolona. Inertni plinovi su najčešće helij, dušik, vodik ili argon.
Razlikuju se dvije vrste kromatografskih kolona, kapilarne i punjene. Izrađuju se od različitih materijala, a najčešće su u upotrebi kolone od taljenog kvarca, nehrđajućeg čelika, bakra, plastičnih masa ili aluminija.

Uređaj za plinsku kromatografiju se sastoji od injektora, kromatografske kolone, detekcijskog dijela i pisača. Pomoću mikrolitarske štrcaljke, mala količina uzorka unosi se u zagrijani dio uređaja koji je smješten na vrhu kolone, tzv. injektor. Uzorak se injektira brzo i u malim obrocima kako bi se smanjilo širenje eluiranog sastojka u kolonu. Temperatura u injektoru mora biti iznad temperature vrelišta najmanje hlapljiva sastojka i to 50°C više. Zbog toga će uzorak tijekom unošenja u kolonu trenutačno ispariti. Plin nositelj s uzorkom prolazi kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom, gdje dolazi do odjeljivanja pojedinih komponenata uzorka. Vrijeme zadržavanja komponente u koloni ovisi kako o njenoj prirodi tako i o stacionarnoj i mobilnoj fazi. Visoki tlak povećava linearnu brzinu zbog čega se komponente kraće zadržavaju, što poboljšava rezoluciju kromatograma. Prisutnost odijeljenih komponenata smjese u plinu nositelju po izlasku iz kolone utvđuje se detektorom koji registrira količinu sastojka kao funkciju vremena. Vrste detektora koji se koriste kod ovog tipa kromatografije su MS, UV-VIS detektor, elektrokemijski detektor, detektor indeksa loma.



Slika 1.13. Shematski prikaz plinske kromatografije [9]

1.3. Metode identifikacije razgradnih produkata sumporovih spojeva

1.3.1. Spektroskopija

Spektroskopija je metoda koja omogućava određivanje strukture organskih spojeva brzo i precizno. Sadrži različite tipove instrumentne analize.

Spektroskopske metode se dijele na:

1. spektrometriju masa *(MS)*
2. infracrvenu spektroskopiju *(IR)*
3. spektroskopiju nuklearne magnetske rezonancije *(NMR)*
4. ultraljubičastu i vidljivu spektroskopiju *(UV/VIS)*

1.3.1.1. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa *(MS)* je analitička metoda kojom se određuje relativna molekulska masa nekog spoja/molekule. Molekule čistog spoja se ioniziraju i fragmentiraju u ione. Ioni se potom međusobno odjeljuju i svrstavaju prema njihovoj masi i intenzitetu. Tako nastaje spektar masa. Uređaj se zove spektrometar masa.

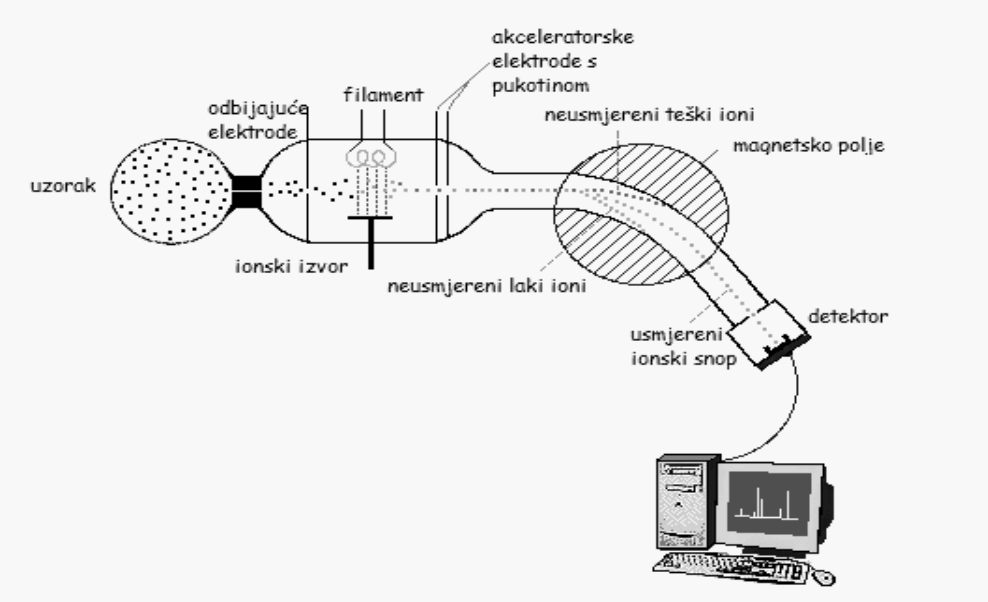
Tri su osnovne funkcije prema kojima MS radi:

- Ionizacija uzorka, uglavnom kation gubitkom jednog elektrona
- Razvrstavanje i odjeljivanje iona prema njihovoj masi i naboju
- Mjerenje odijeljenih iona i prikazivanje rezultata u obliku dijagrama.

Svaka funkcija može se odviti na različite načine, a uobičajena procedura je da se molekula bombardira snopom elektrona visoke energije. Molekula spoja gubi vanjski elektron pri čemu nastaje matični ion, radikal ($M^{\bullet +}$). Matični ion fragmentira na fragmentne ione manjih masa. Kation, molekulski ion i fragmentni ioni se ubrzavaju pomoću negativno nabijenih ploča (elektroda) pri čemu se formira u ionski snop. Ionski snop zatim ulazi u dio instrumenta s promjenjivim magnetskim poljem, ioni skreću s putanje ovisno o svojoj masi i naboju te brzini. U analizatoru se dobiveni ioni razvrstavaju prema različitom omjeru mase i naboja (m/z), često i (m/e). Analizom fragmentnih iona može se spoznati strukturu ispitivanog spoja. [10]

Dijelovi MS-a:

- Ionski izvor
- Analizator masa
- Detektor



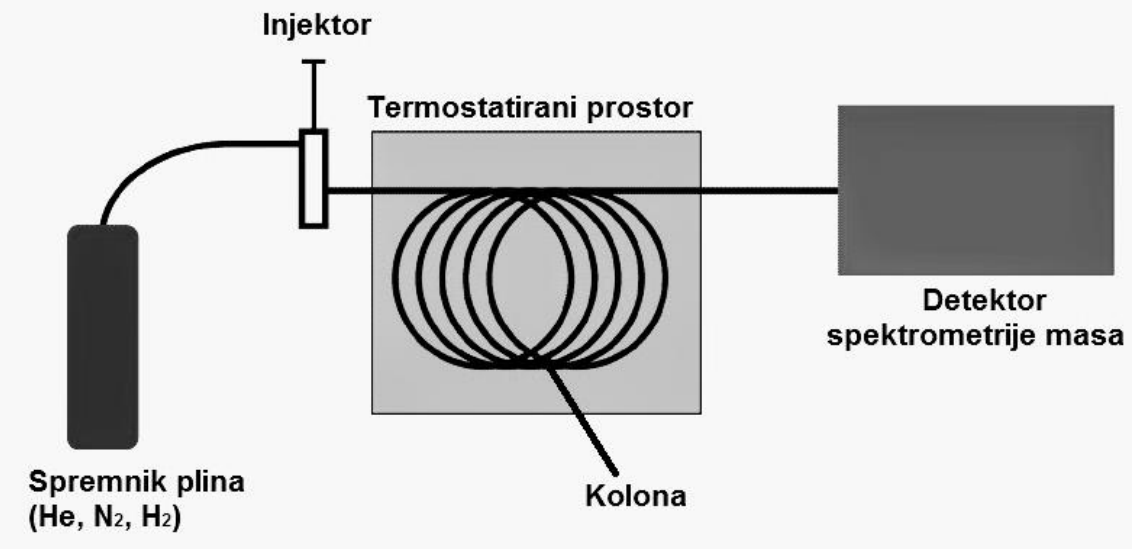
Slika 1.14. Shematski prikaz masenog spektrometra [10]

1.3.1.2. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

Od različitih kombinacija koje su nastale sprezanjem kromatografskih tehnika sa spektroskopskim, osobito mjesto pripada vezanom sustavu plinska kromatografija-spektrometrija mase. Navedene dvije metode se međusobno dopunjuju, komplementarne su i predstavljaju jedan instrument GC-MS. Dok je plinska kromatografija metoda odjeljivanja, ali nepouzdana za identifikaciju složenih organskih spojeva, masena spektrometrija je pouzdana za identifikaciju. Obje metode koriste uzorak u plinovitoj fazi te su obje osjetljive pa se njihovom kombinacijom može postići osjetljivost instrumenta u redu pikogramskih količina spoja (1 pikogram=10^{12} g).

Ova metoda pruža više specifičnih informacija po jedinici količine materijala uzorka od ostalih analitičkih metoda. Zbog toga se upotrebljava kad je količina uzorka ograničena ili kad je potrebno odrediti i identificirati izuzetno niske koncentracije pojedinih spojeva u uzorku. U kombinaciji GC-MS, spektrometrija masa ima ulogu osjetljivog i specifičnog detektora za plinski kromatograf.

Navedena se tehnika primjenjuje u petrokemijskoj, farmaceutskoj, prehrambenoj industriji i industriji plastičnih masa. Nadalje, koristi se kod farmakokinetičkih i metaboličkih studija lijekova, zaštite okoliša, određivanja sastava i strukture različitih prirodnih produkata, kontrole dopinga sportaša, toksikološke analize te kontrole i praćenja složenih procesa u industriji. [11]



Slika 1.15. Shema vezanog sustava GC-MS [12]

1.4. Opće karakteristike biljnih vrsta roda *Allium*

Biljna porodica *Allium* predstavlja mnogobrojne biljne rodove višegodišnjih zeljastih biljaka iz porodice sunovrata *(*Amaryllidaceae*)* rasprostranjenih u područjima s umjerenom klimom. Najvažniji predstavnik u prehrani je crveni luk (*A. cepa)* podrijetlom iz Azije. Ostale poznatije vrste su: češnjak ili bijeli luk *(A. sativum),* luk vlasac *(A. schoenoprasum),* zimski luk *(A. fistulosum)* te poriluk (*A. porrum).* Lukovima je podzemna lukovica zaštićena ovojnim listovima kako bi se spriječio gubitak vode. [13]

1.4.1. *Allium sativum* L. (češnjak ili bijeli luk)

Češnjak je još od davnina cijenjen i kao lijek i kao začin. Naši su preci vjerovali kako češnjak tjera zle demone i štiti od zmijskih ugriza. U srednjem vijeku stanovnici Europe njime su se barem djelomično štitili od zaraze kugom. Danas se on smatra najdjelotvornijim sredstvom protiv ovapnjena žila i mnogih drugih civilizacijskih

bolesti. Miris češnjaka kod velike većine ljudi u visokorazvijenim zemljama i dan-danas pobuđuje otpor. [14]

Češnjak je zeljasta trajnica niskog rasta. Stabljiku okružuju zeleni kopljasti listovi, a u doba cvatnje na njezinu se vrhu nalazi cvat u obliku kišobrana. Lukovica se češnjaka sastoji od 10-15 češnjeva, od kojih je svaki obavijen bjelkastom papirastom ljuskom (ovojnicom). Češnjevi tvore podzemno spremište hrane.

Sastav češnjaka dijelimo na one koji se izvorno nalaze u biljci (genuini) i one koji nastaju djelovanjem enzima i drugih reakcija razlaganja. U početku su u češnjaku prisutni glutamilpeptidi i cistein sulfoksidi (aminokiselina sa sumporom). Pri enzimskom razlaganju cistein sulfoksida aliina s enzimom *aliinazom,* preko međuprodukata, nastaje alicin (tiosulfinat).

Tiosulfinati se nalaze samo u svježim pripravcima. Zbog nestabilnosti, iz njih pri daljnjim reakcijama nastaju sekundarni sulfidi, ajoeni i vinilditiini. Sulfidi, osobito dialil sulfidi, češnjaku daju karakterističan miris. [15]

Djelovanje češnjaka:

Najstariji i ujedno lako dostupan borac protiv upala i viroza. Ljut i peckav okus češnjaka (*Allium sativum*) potječe od alil sulfida u osnovi kojih je makroelement sumpor. Upravo taj aromatični peckavi okus po čemu je češnjak prepoznatljiv zaslužan je za blagotvorni učinak na organizam, popravlja prokrvljenost, ubrzava metabolizam, detoksicira te ima povoljan učinak na imunološki sustav. Češnjak povoljno djeluje na bolesti krvožilnog sustava: sprječava ovapnjenje krvnih žila (snižava ukupni i LDL kolesterol), pomaže u snižavanju krvnog tlaka, sprječava nakupljanje krvnih pločica i stvaranje ugrušaka te poboljšava izmokrivanje (djeluje kao diuretik). Sadrži i supstancije slične prirodnom inzulinu koje pomažu regulaciju povišenog šećera u krvi. Iz češnjaka je izoliran spoj alicin koji djeluje kao prirodni antibiotik. Poznat je povoljan učinak češnjaka kod upala uzrokovanih ne samo bakterijama nego i virusima, gljivicama i parazitima. [16]

1.4.2. *Allium commutatum* Guss. (divlji luk ili obalni luk)

Obalni luk je biljka iz porodice sunovrata (Amaryllidaceae*)* koja spada u jednosupnice. Kao tipično mediteransko bilje raste na otvorenim kamenitim staništima, na otocima te obali blizu mora. Vrijeme cvatnje je od svibnja do srpanja. [17]

1.4.3. *Allium porrum* L. (poriluk)

Dvogodišnja biljka koja se uzgaja kao jednogodišnja, zbog bijelih baza listova. Naraste do 45 cm, a može biti do 15 cm širine. Dobar je izvor kalija i željeza, manje količine β-karotena i vitamina C, pogotovo u zelenim dijelovima listova.

Poriluk se nažalost po pitanju količine znanstvenih istraživanja našao drastično zapostavljen, ali postoje pojedina istraživanja koja pokazuju kako njegova konzumacija može smanjiti opasnost od pojave kardiovaskularnih oboljenja te smanjiti mogućnost pojave raka jajnika u žena i za do 40%.

1.4.4. *Allium sphaerocephalon* L. (glavasti luk)

Glavasti luk ljeti ima jajasti oblik cvijeta zelene boje, nakon čega se cvijet razvija i mijenja boju u ružičastu do crveno-ljubičaste.

Biljka izgleda vrlo atraktivno na cvjetnim gredicama, pogotovo ako je smještena da "proviruje" između drugih cvjetova poput ruža, tako da njeni neugledni listovi ostanu skriveni. Ljepota cvjetova *Allium sphaerocephalona* je dobrodošla kao dodatak svakom vrtu, a lako se i prilagođava u novom okružju. [18]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

2.1.1. *Allium sativum* L. (češnjak ili bijeli luk)

Red: Asparagales

Porodica: Amaryllidaceae (sunovratke)

Rod: *Allium* (luk)

Narodna imena: češnjak, luk, luk bili, luk češan, česan, luk česan, češanj, česnjak, češanj pasji, češenj, luk česnoviti, bijeli luk [19]



Slika 2.1. *Allium sativum (*češnjak*)*

Vrijeme berbe: veljača

Stanište: uspijeva u svim vrtovima, a zbog velike potrebe uzgaja se i na oraničnim površinama.

Češnjak korišten u eksperimentalnom dijelu pribavljen je komercijalno, a podaci s deklaracije istaknute na pakiranju su sljedeći:

- Zemlja porijekla: Italija
- Klasa: I klasa
- Dobavljač: Ecor, Via Palu 23, San Vendemiano, Italija.

2.1.2. *Allium commutatum* (divlji luk ili obalni luk)

Red: Asparagales

Porodica: Amaryllidaceae (sunovratke)

Rod: *Allium*

Narodna imena: zamjenjivani luk [19]



Slika 2.2. *Allium commutatum* (svježi [20], suhi, usitnjeni)

Stanište: priobalje

Biljni materijal je sabrao i identificirao doc. dr. sc. Mirko Ruščić s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, 20. srpnja 2016. g. na Rogačiću na otoku Visu. Biljke su sušene u sjeni, na prozračnom mjestu pri sobnoj temperaturi.

2.1.3. *Allium porrum* L. (poriluk)

Red: Asparagales Link

Porodica: Amaryllidaceae (sunovratke)

Rod: *Allium* (luk)

Narodna imena: veliki luk, luk divlji, purić, lučac, lučec, luk vinogradski, porjak vinogradski, purić divlji vinogradski [19]



Slika 2.3. *Allium porrum* (svježi, osušeni, usitnjeni-domaći uzgoj)

Poriluk je sabran na obiteljskom imanju u Gatima u blizini Splita 10. travnja 2017. godine te je sušen do svibnja.

2.1.4. *Allium sphaerocephalon* L. (glavasti luk)

Red: Asparagales Link

Porodica: Amaryllidaceae (sunovratke)

Rod: *Allium* (luk)

Narodna imena: glavasti luk [19]



Slika 2.4. *Allium Sphaerocephalon* (svježi [18], suhi, usitnjeni- domaći uzgoj)

Biljni materijal sakupljen je u travnju na području Dugopolja, u blizini Splita, a doc. dr. sc. Mirko Ruščić ga je identificirao.

2.2. Kemikalije i aparatura

2.2.1. Kemikalije:

a) Pentan, Lach-Ner, Neratovice, Češka republika
b) Dietil eter, Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španjolska
c) Diklormetan, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
d) Natrijev sulfat, bezvodni, AnalaR Normapur, Leuven, Belgija
e) Natrijev klorid, T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska.

2.2.2. Aparatura:

a) Tehnička vaga – KERN 572, Njemačka
b) Električki mlinac za kavu – Sencor SCG 3050SS, Prag, Češka
c) Modificirana aparatura po Clevengeru
d) Pipeta
e) GC-MS uređaj – model 2100T, Varian Inc.
f) Uparivač s dušikom – TECHNE, Dri-Block DB100/3
g) Vodena kupelj – Julabo SW22
h) Kalote – Thermo 2000
i) Tresilica – Vibromix 314EVT
j) Lijevak za odijeljivanja, 100 mL.

2.3. Priprema materijala i izolacija hlapljivih spojeva

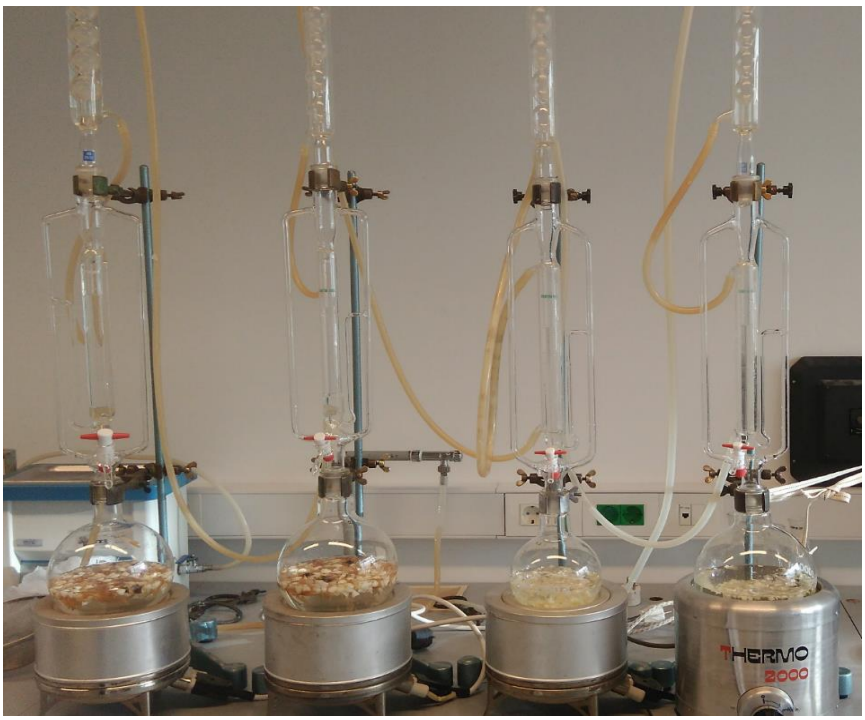
Priprema biljnog materijala za izolaciju vrši se prethodnim sušenjem biljke na suhom, sjenovitom mjestu pri sobnoj temperaturi te usitnjavanjem u mlincu za kavu.

2.3.1. Destilacija

Usitnjeni biljni materijali su odvagani i stavljeni u okrugle tikvice za destilaciju (2L). Za uzorke su upotrebljene lukovice (svih analiziranih *Allium* vrsta), stabljike (*A. commutatum, A. porrum* te *A. sphaerocephalon)* i cvijet (*A. commutatum*).

Tikvice s uzorkom se ispune destiliranom vodom do pola nakon čega se postavi aparatura za destilaciju (modificirana aparatura po Clevengeru). Aparatura se sastoji od tikvice s okruglim dnom, nastavkom za modificiranu destilaciju po Clevengeru te hladila. U središnju cijev aparature ulije se destilirana voda do razine preljevne cijevi te se doda trap, smjesa pentana i dietil etera (3:1). Tikvica se zagrijava na kaloti. Destilacija traje 2,5h, a destilacija počinje s padom prve kapi.

Destilacija se provodi na način da voda koja isparava u tikvici, odlazi bočnim cijevima do hladila, gdje se kondenzira. Vodena para sa sobom nosi i određene hlapljive spojeve. Hlapljivi se spojevi nakupljaju u središnjem dijelu aparature, točnije u trapu koji se po završetku destilacije pipetom odijeli te stavlja u čašu s bezvodnim natrijevim sulfatom. Bezvodni natrijev sulfat je sredstvo za sušenje, odnosno veže zaostale tragove vode. Uzorak se odekantira u čiste i suhe, prethodno izvagane, bočice te čuva u zamrzivaču do GC-MS analize.



Slika 2.5. Modificirana aparatura po Clevengeru za hidrodestilaciju

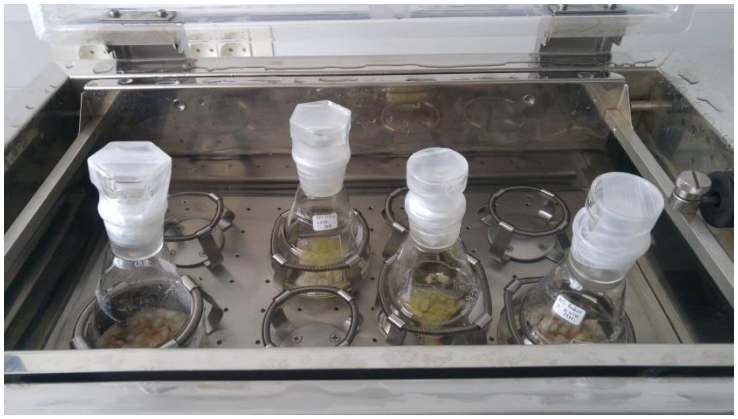
Destilacija lukovice *A. commutatum* te *A. porrum* nije bila uspješna te nije trajala zadano vrijeme. Razlog tome je pjenjenje uzorka tijekom procesa, najvjerojatnije zbog prisutnih saponina u ljuskama lukovice.



Slika 2.6. Pjenjenje tijekom destilacije

2.3.2. Autoliza

Lukovice (*A. sativum* i *A. commutatum*) te stabljika i cvijet (*A. commutatum)* se usitne u mlincu za kavu, odvažu i prenesu u staklene tikvice s čepom. Tikvica mora biti zatvorena čepom učvršćenim parafilmom kako bi se zadržali slobodno hlapljivi spojevi važni za daljnju analizu. U tikvicu s uzorkom doda se destilirana voda u količini dovoljnoj za prekrivanje biljnog materijala. Pripremljene tikvice stave se u vodenu kupelj pri 37°C, 24 sata.



Slika 2.7. Autoliza u vodenoj kupelji

2.3.3. Ekstrakcija

Nakon provedene autolize, u tikvice s biljnim materijalom dodano je 10mL diklormetana te se tikvice postave na tresilicu, 10 min.



Slika 2.8. Ekstrakcija potpomognuta miješanjem na tresilici

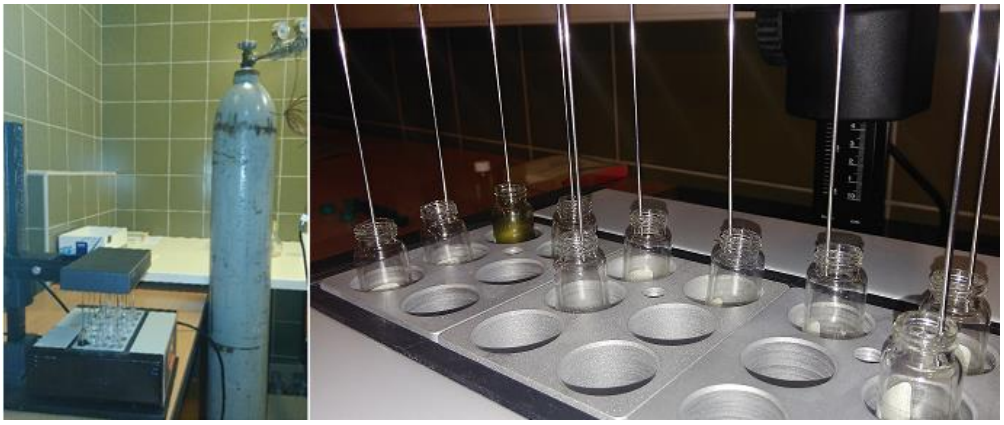
Sadržaj tikvice se filtrira preko filtar papira i lijevka za odjeljivanje. Smjesa u lijevku se dobro izmiješa potresanjem, nakon čega se kratko ostavi kako bi se slojevi odijelili. Budući da se slojevi nisu dobro odijelili, odnosno došlo je do stvaranja emulzije, smjesi je dodana zasićena otopina natrijeva klorida u destiliranoj vodi u svrhu isoljavanja. U čistu čašu ispušta se donji sloj koji sadrži diklormetan (CH_2Cl_2) jer je veće gustoće od vode. U čašu se dodaje bezvodni natrijev sulfat kako bi vezao zaostalu vodu. Ekstrakcija se ponovi još jedan put, a odijeljeni slojevi se združe i pohranjuju u bočicama u zamrzivaču.



Slika 2.9. Lijevak za odjeljivanje (lukovica, cvijet, stabljika)

2.4. Priprema uzoraka za mjerenje

Uzorci za analizu se pohranjuju u sterilne i suhe bočice. Prije GC-MS mjerenja, uzorci u bočicama stavljaju se na uparavanje u struji dušika. Razlog tome je što je dušik inertan i on ubrzava proces. Dušik uklanja organsko otapalo (lako hlapljive komponente), dietil eter i pentan, nakon čega ostaje samo hlapljiva smjesa potrebna za analizu.



Slika 2.10. Uparivač u struji dušika

2.5. Analiza dobivenih spojeva

Hlapljivi spojevi dobiveni iz biljnih materijala *Allium*-a analizirani su plinskim kromatografom (model 3900, Varian Inc., Lake Forest, CA, SAD) s plamenoionizacijskim detektorom (FID), spektrometrom masa (MS) Varian Inc., (model 2100T) s nepolarnom kolonom VF-5MS dimenzija: 30 m dužine, unutarnjeg promjera 0,25 mm te debljine stacionarne faze 0,25 μm.

Temperaturni program za kolonu programiran je da početna temperatura bude 60°C i to 3 min. Nakon toga se povećava do 246°C brzinom 3°C/min, nakon čega se postavlja izotermalno 25 min.

Plin nositelj je helij koji teče brzinom od 1mL/min. Mala količina tekućeg uzorka injektira se kroz septum u zagrijani dio uređaja, smještenog na vrhu, pomoću mikrolitarske štrcaljke. Temperatura injektora je 250°C čime se omogućava trenutačno isparavanje uzorka. Volumen unesenog uzorka je 1μL. Ionizacijski potencijal u MS-u je 70eV, a temperatura ionskog izvora 200°C. Područje skeniranja je 40-350 masenih jedinica. Pikovi su identificirani njihovim vremenima zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju n-alkana C9-C30 za VF-5MS kolonu) s onim iz literature (Adams,

2007) i/ili vremenima zadržavanja komercijalnih standarda. Maseni spektri su također uspoređivani s literaturom. [21]



Slika 2.11. Vezani sustav plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS)

3. REZULTATI I RASPRAVA

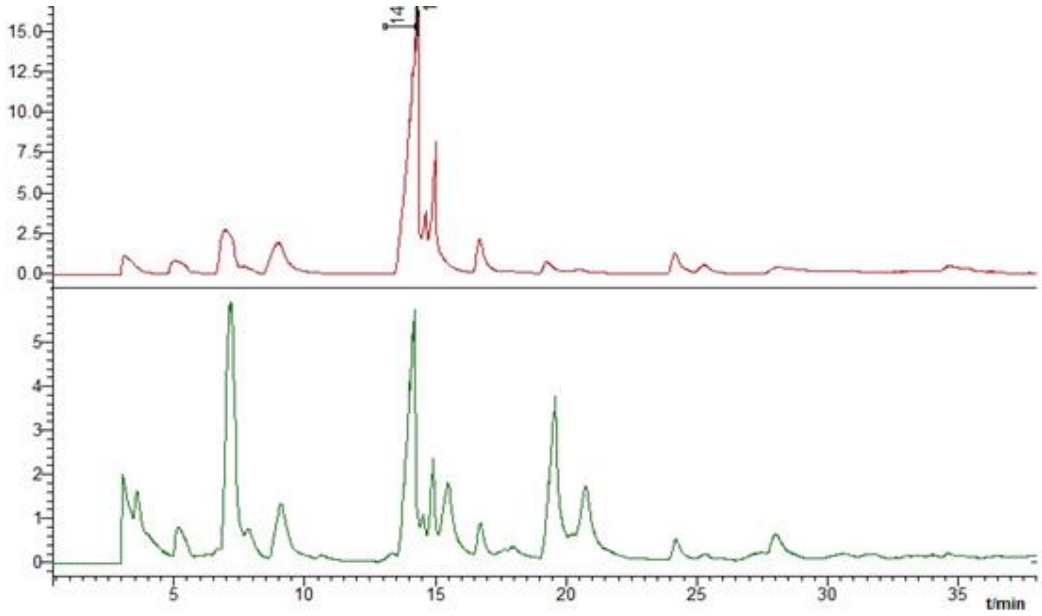
Rod *Allium* broji oko 500 vrsta, među kojima je 54 prisutno na području Republike Hrvatske. Sumporovi spojevi poznati su po antikancerogenim, antioksidacijskim, antibakterijskim svojstvima i pozitivnom utjecaju na imunološki sustav i snižavanje lipida u krvi. Vrlo intenzivan miris i okus prilikom mehaničke obrade ovih vrsta potječe od prisutnih hlapljivih spojeva nastalih hidrolizom nehlapljivih prekursora *S*-cistein sulfoksida djelovanjem enzima aliinaze.

U diplomskom radu izvršena je izolacija spomenutih hlapljivih spojeva iz nekoliko vrsta roda *Allium*, točnije komercijalno pribavljenog češnjaka (*A. sativum*), uzgojenog poriluka (*A. porrum*) te samoniklog glavatog luka (*A. sphaerocephalon*) i obalnog luka (*A. commutatum*). Eterična ulja su dobivena hidrodestilacijom biljnog materijala u modificiranoj aparaturi po Clevengeru u trajanju od 2,5 do 3h. Uzorci *A. sativuma* i *A. commutatuma* su stavljeni nasjeckani (lukovice) i samljeveni (stabljika i cvijet) te ostavljeni 24h na autolizi pri 37 °C i brzini potresanja od 120 okretaja u minuti, kako bi se omogućio što bolji kontakt između enzima i nehlapljivih *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida. U konačnici, dobivena hlapljiva smjesa je ekstrahirana diklormetanom. Hlapljivi izolati analizirani su vezanim sustavom plinska kromatografija - masena spektrometrija (GC-MS). Dobiveni rezultati predstavljeni su i interpretirani u sljedećim poglavljima.

3.1. Kemijski sastav biljnog materijala određen tehnikom GC-MS

3.1.1. *Allium sativum*

Dobiveni kromatogrami za istraživani biljni materijal prikazani su na slici 3.1. gdje crveni kromatogram predstavlja eterično ulje, a zeleni kromatogram diklormetanski ekstrakt.



Slika 3.1. Kromatogram ukupne ionske struje za *A. sativum*

U tablici 1. prikazan je sastav hlapljivih sumporovih spojeva u češnjaku. Na temelju razgradnih produkata pretpostavljeni su nehlapljivi prekursori i uvršteni u tablicu.

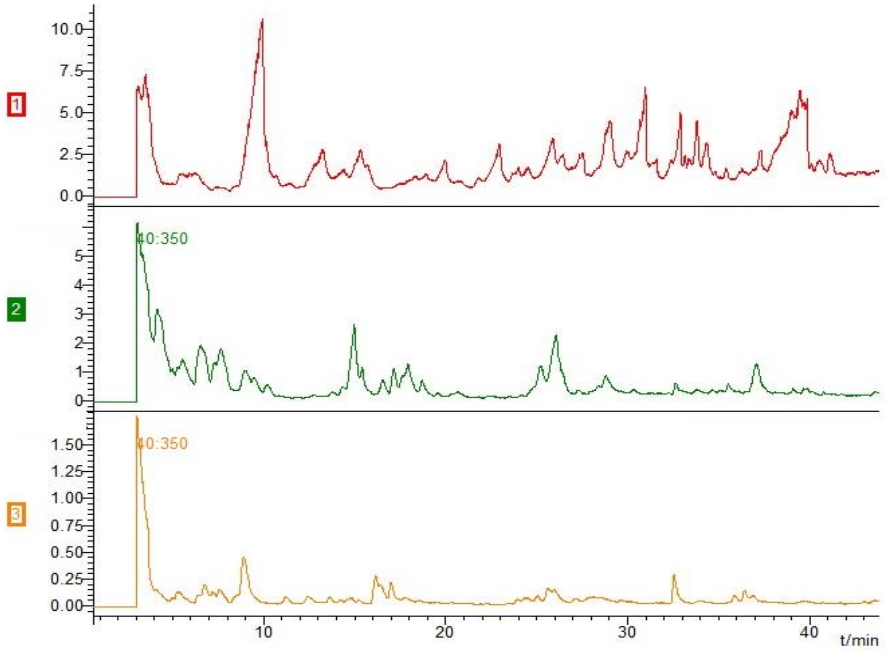
Tablica 1. Kemijski sastav zastupljenih komponenata *A. sativum*

***S*-alk(en)il-cistein sulfoksidi:**			
Aliin, Metiin, Propiin	Lukovica		
Produkti razgradnje:	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Maseni udio-destilacija (%)**	**Maseni udio-ekstrakcija (%)**
Dialil sulfid	5,0	2,7	0,1
Alil metil disulfid	7,0	8,6	15,2
1,3-Ditian	7,7	1,1	0,1
Dialil disulfid	14,3	39,7	22,9
3-Vinil-[4*H*]-1,2-ditiin	19,3	2,0	1,2
2-Vinil-[4*H*]-1,3-ditiin	20,5	1,8	1,9
Dialil trisulfid	24,2	2,8	0,2

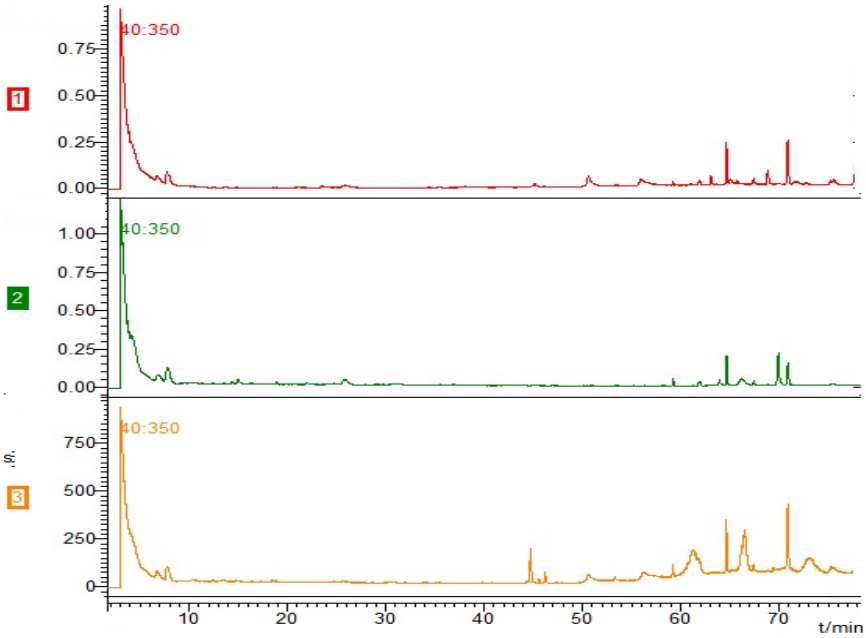
Većina hlapljivih sumporovih spojeva u *A. sativum* nastaje hidrolizom *S*-alil-L-cistein sulfoksida (slika 1.8.), preko međuprodukta alicina (tiosulfinata). Alicin samokondenzacijskom reakcijom, kao što je Diels-Alderova reakcija daje zanimljive cikličke spojeve, 3-Vinil-[4*H*]-1,2-ditiin i 2-Vinil-[4*H*]-1,3-ditiin. Pretpostavlja se da neobični zasićeni ciklički spoj, 1,3-ditian, nastaje reakcijom *S*-propil-L-cistein sulfoksida i *S*-metil-L-cistein sulfoksida, prema sličnom, prethodno opisanom principu.

3.1.2. *Allium commutatum*

Dobiveni kromatogram za eterično ulje *A. commutatum* prikazan je na slici 3.2., dok je na slici 3.3. prikazan kromatogram diklormetanskog ekstrakta.



Slika 3.2. Kromatogram ukupne ionske struje za eterično ulje *A. commutatum* dobivenog destilacijom (1. stabljika, 2. cvijet, 3. lukovica)



Slika 3.3. Kromatogram ukupne ionske struje za diklormetanski ekstrakt *A. commutatum* (1. stabljika, 2. cvijet, 3. lukovica)

U tablici 2. prikazan je sastav eteričnog ulja ove biljne vrste, budući je usporedbom prikazanih kromatograma uočeno kako diklormetanski ekstrakt ne sadržava hlapljive sumporove spojeve koji su prisutni u eteričnom ulju dobivenom hidrodestilacijom.

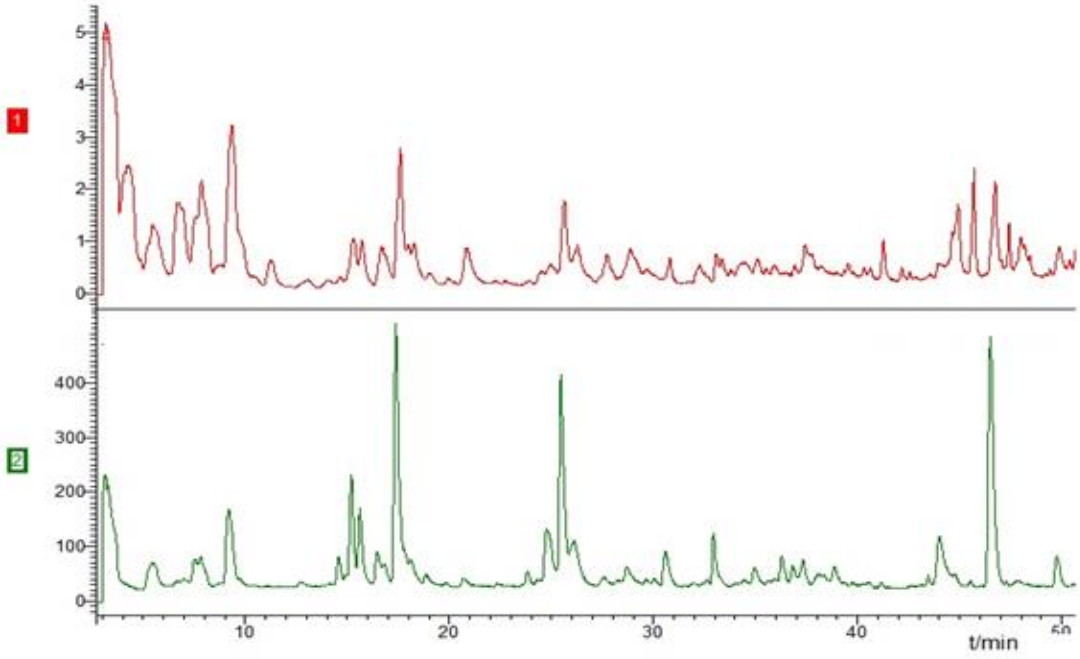
Tablica 2. Najzastupljenije komponente u uzorku *A. commutatum* (cvijet i lukovica)

		***S*-alk(en)il-cistein sulfoksid**		
		Izoaliin, Metiin, Propiin	-	Aliin, Izoaliin, Metiin, Propiin
Produkti razgradnje	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Cvijet (maseni udio/%)**	**Stabljika (maseni udio/%)**	**Lukovica (maseni udio/%)**
Alil metil disulfid	6,9	-	-	2,3
Metilpropil disulfid	7,4	-	-	0,8
1,3-Ditian	7,7	6,5	-	1,1
Dimetil trisulfid	9,0	2,5	-	7,1
trans-Propenil propil disulfid	14,1	7,0	-	0,4
Dipropil disulfid	15,0	-	-	0,6
Metil(metilsulfanil)metil disulfid	16,2	-	-	9,8
Dipropil tetrasulfid	20,3	-	-	0,2
Metil-1-(metilsulfanil)propil disulfid	22,0	-	-	0,1
Dipropil trisulfid	25,5	7,3	-	0,7

Iz tablice se uočava kako je u cvijetu najzastupljeniji dipropil trisulfid (koji potječe od *S*-propil-L-cistein sulfoksida - propiin), dok je u lukovici najzastupljeniji metil(metilsulfanil)metil disulfid (iz *S*-metil-L-cistein sulfoksida - metiin). U stabljici *A. commutatuma* nisu identificirani nikakvi sumporovi spojevi.

3.1.3. *Allium porrum*

Kromatogram eteričnog ulja *A. porrum* prikazan je na slici 3.4., gdje crveni kromatogram predstavlja nadzemni dio, a zeleni lukovice.



Slika 3.4. Kromatogram ukupne ionske struje uzorka *A. porrum*

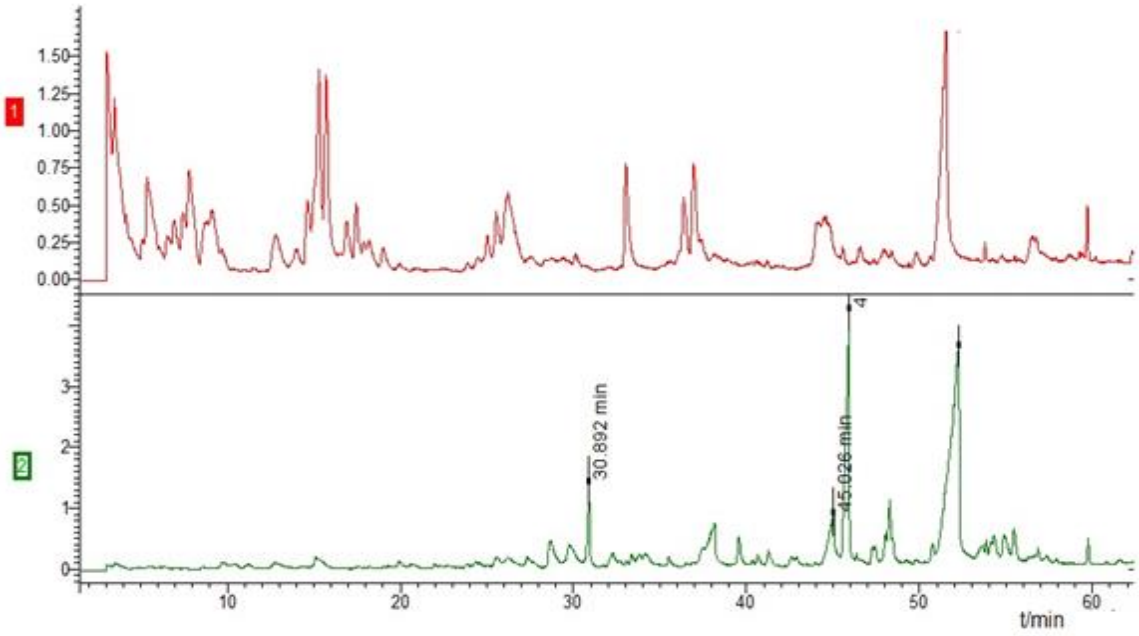
Rezultati analize dani su u tablici 3. kao i predloženi prekursori.

Tablica 3. Najzastupljeniji spojevi *A. porrum*

		***S*-alk(en)il-cistein sulfoksid**	
		Isoaliin, Metiin, Propiin	Isoaliin, Metiin, Propiin
Produkti razgradnje	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Stabljika (maseni udio/%)**	**Lukovica (maseni udio/%)**
2,4-dimetil tiofen	6,7	2,4	0,3
Metilpropil disulfid	7,5	0,8	2,3
1,3-Ditian	7,7	2,8	1,6
Dimetil trisulfid	9,0	4,6	5,0
Dipropil disulfid	15,2	1,1	2,9
trans-Propenil-propil disulfid	15,64	0,9	2,6
Metil(metilsulfanil)metil disulfid	16,65	1,2	1,1
Dimetil tetrasulfid	20,67	1,2	0,6
(Metilsulfanil)(metilsulfinil)metan	24,76	0,4	2,1
Dipropil trisulfid	25,34	1,7	6,1
trans-Propenilpropil trisulfid	26,03	1,2	3,1

3.1.4. *Allium sphaerocephalon*

Na slici 3.5. prikazan je kromatogram dobiven mjerenjem destilacijskog uzorka biljke *A. sphaelocephalon* gdje je prvi kromatogram eterično ulje lukovice prikazan crvenom bojom, a drugi, zeleni kromatogram uključuje eterično ulje nadzemnog dijela.



Slika 3.5. Kromatogram ukupne ionske struje eteričnog ulja *A. sphaerocephalon*

Tablica 4. Najzastupljeniji spojevi vrste *A. sphaerocephalon*

		S-alk(en)il cistein-sulfoksid	
		-	Izoaliin, Metiin, Propiin
Produkti razgradnje	**Vrijeme zadržavanja (min)**	**Stabljika (maseni udio/%)**	**Lukovica (maseni udio%)**
2,4-Dimetil tiofen	6,7	-	0,5
Metilpropil disulfid	7,5	-	0,9
1,3-Ditian	7,8	-	2,5
Dimetil trisulfid	8,9	-	1,2
Dipropil disulfid	15,1	-	4,9
trans-Propenil propil disulfid	15,7	-	4,0
Dimetil tetrasulfid	20,7	-	0,1
(Metilsulfanil)(metilsulfinil)metan	25,2	-	0,8
Dipropil trisulfid	25,4	-	1,3
trans-Propenilpropil trisulfid	26,1	-	1,2

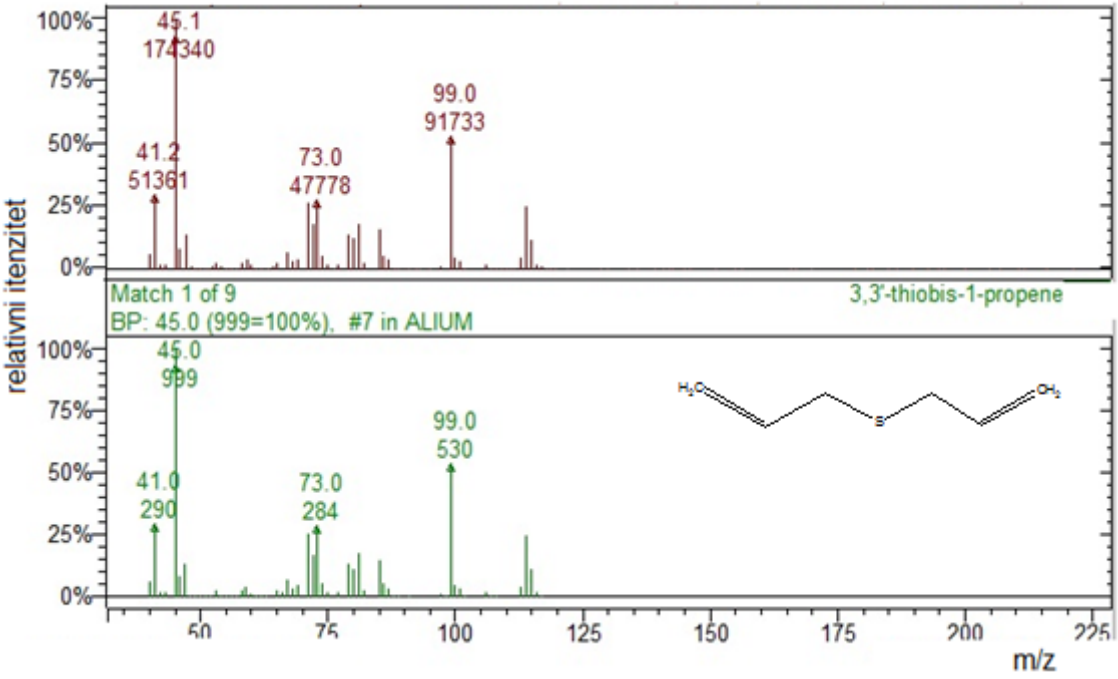
***S*-alk(en)il-cistein sulfoksidi**: ALIIN (*S*-alkil-L-cistein sulfoksid); IZOALIIN (*S*-propenil-L-cistein sulfoksid); METIIN (*S*-metil-L-cistein sulfoksid); PROPIIN (*S*-propil-L-cistein sulfoksid).

Identifikacija pojedinih razgradnih produkata često nije tako jednostavna zbog nedostupnih odgovarajućih standarda te zato što se ne nalaze u komercijalnim bazama podataka. U svrhu identifikacije se zato često koriste objavljeni maseni spektri dostupni u literaturi.

Iz tablica najzastupljenijih hlapljivih komponenata biljnih vrsta *Allium,* primjećuje se znatna razlika u kemijskom sastavu vrste *Allium sativum,* u odnosu na ostale analizirane vrste. Naime, *Allium sativum* sadrži određene hlapljive spojeve koji nisu identificirani u ostala tri biljna uzorka. Jedna od tih, koja u *A. sativum* čini najveći udio je dialil disulfid (39,7%). Upravo je ta komponenta odgovorna za ljekovita svojstva (antioksidacijsko, antimikrobno...) te za karakterističan miris češnjaka.

Slike od 3.6-3.23 prikazuju MS spektre identificiranih hlapljivih sumporovih spojeva.

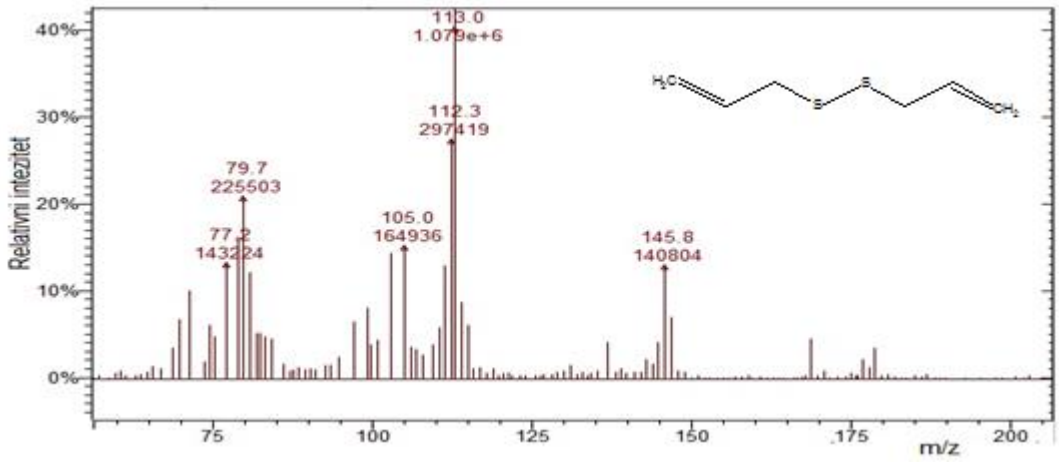
- Sljedećih 5 spektara predstavljaju spojeve nađene samo u *A. sativum:*



Slika 3.6. Maseni spektar dialil sulfida (2,7%)- crveni spektar je spektar dobiven mjerenjem; zeleni spektar je spektar iz literature za navedeni spoj.

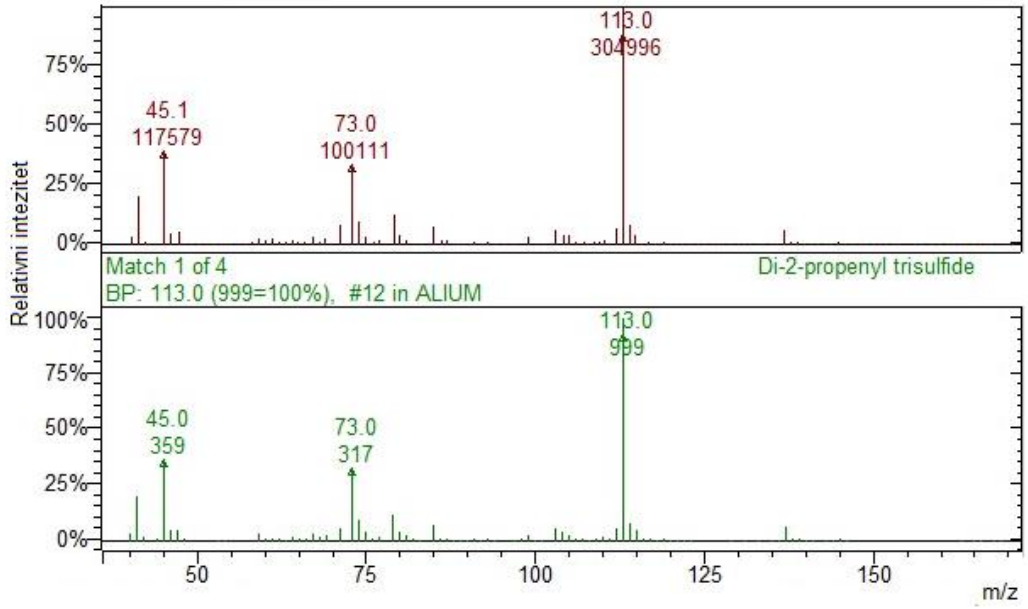
Spoj je identificiran u destilatu biljke *A. sativum.* Uočava se pik pri m/z=114 te predstavlja molekulski ion (M+), odnosno relativnu molekulsku masu. Također se uočava pik pri m/z=116 (jedva vidljiv) koji ukazuje na prisutnost sumpora (M+2). Pik

na m/z=41 predstavlja cijepanje C-S veze, $[CH_2CHCH_2]^+$. Isto cijepanje predstavlja pik pri m/z=73 ($[SCH_2CHCH_2]^+$). Osnovni pik je pri m/z=45.



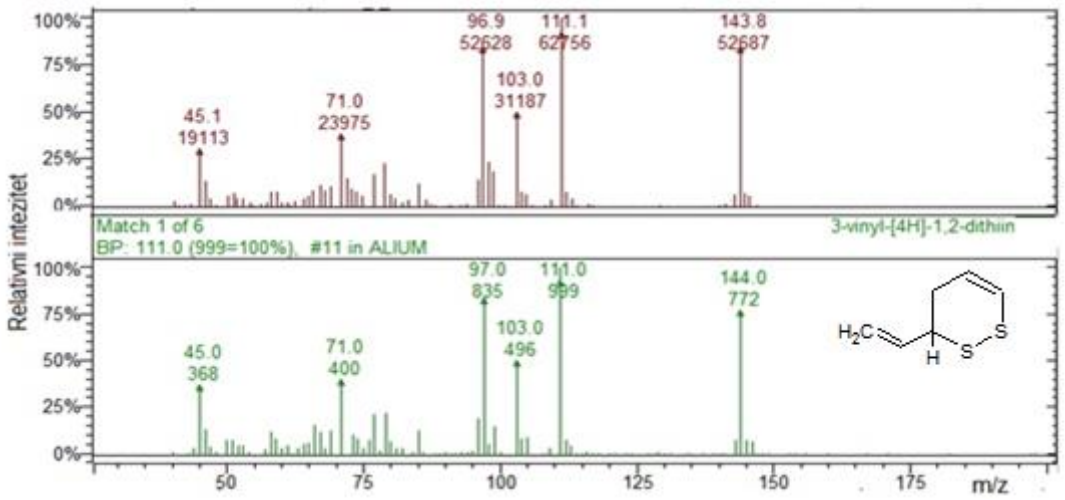
Slika 3.7. Maseni spektar dialil disulfida (39,7%)

Iz navedenog spektra se primjećuje pik pri m/z=145,8, koji bi trebao predstavljati molekulski pik (m/z=146). Osnovni pik se nalazi na m/z=113. Pik pri m/z=105 predstavlja cijepanje S-C veze, $[SSCH_2CHCH_2]^+$.



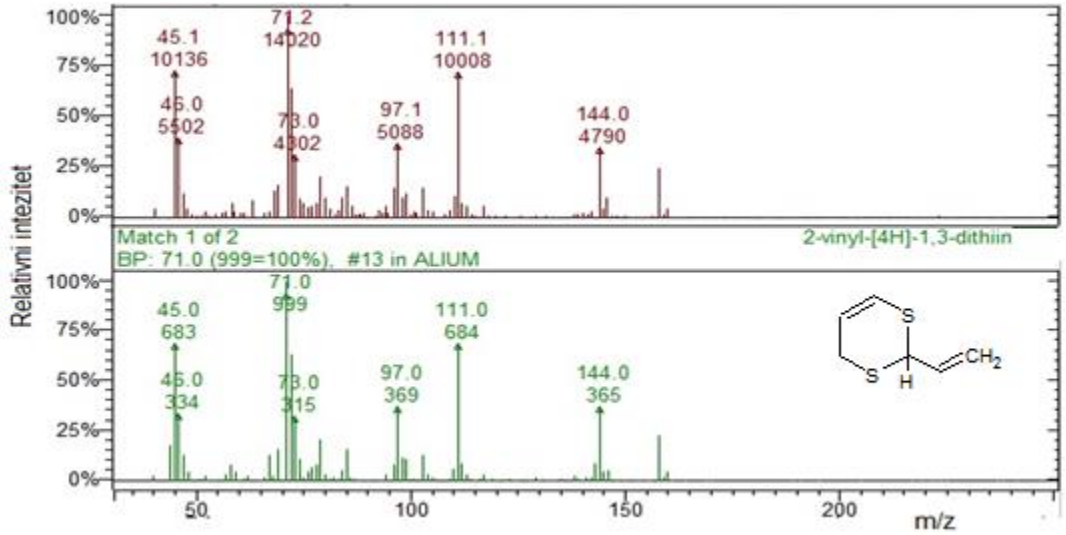
Slika 3.8. Maseni spektar dialil trisulfida (2,8%)

Na spektru se može uočiti osnovni pik, m/z=113. Molekulski pik (m/z=178) na spektru nije vidljiv. Pik na m/z=73 objašnjava cijepanje S-S veze.



Slika 3.9. Maseni spektar 3-Vinil-[4*H*]-1,2-ditiin (2,0%)

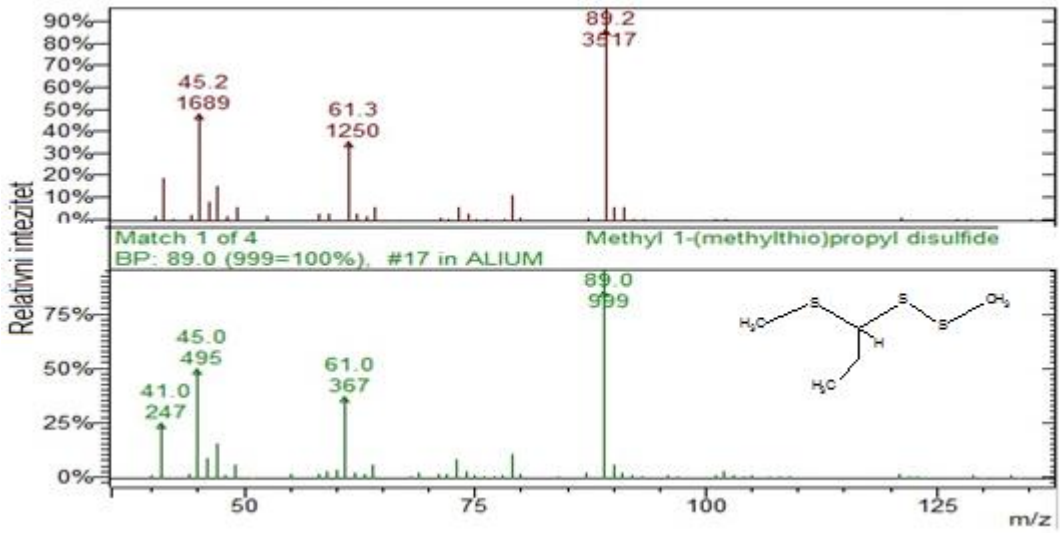
Na spektru se vidi intenzivan pik pri m/z=143,8, što predstavlja molekulski pik (m/z=144). Gubitkom SH (Δm=33) nastaje osnovni pik pri m/z=111. Primarno cijepanje C-C veze pored S vjerojatno prati gubitak C_3H_5, a koji objašnjava nastali pik m/z=103.



Slika 3.10. Spektar masa 2-Vinil-[4*H*]-1,3-ditiin (1,8%)

Molekulski pik je pri m/z=144. Osnovni pik nalazi se na m/z=71 (Δm=73, tj. gubitak C_3H_5S).

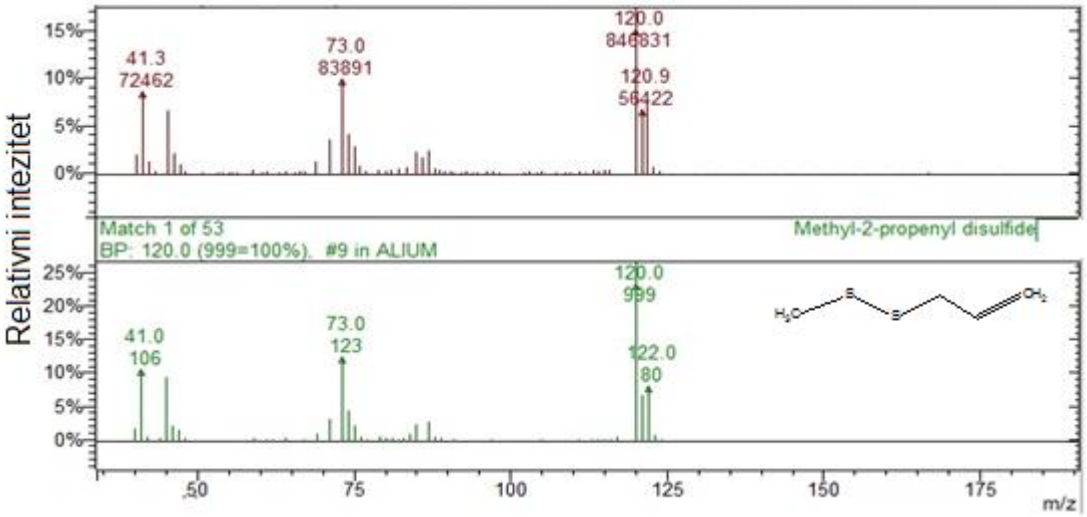
- Samo u *A. commutatum* može se pronaći metil-1-(metilsulfanil)propil disulfid i to samo u njegovoj lukovici.



Slika 3.11. Maseni spektar metil-1-(metilsulfanil)propil disulfid (0,1%)

Molekulski pik na spektru (m/z=168) nije vidljiv. Vidljiv je m/z=89 pik, odnosno osnovni pik kojeg objašnjava cijepanje C-S veze, $[CH_3SCHCH_2CH_3]^+$.

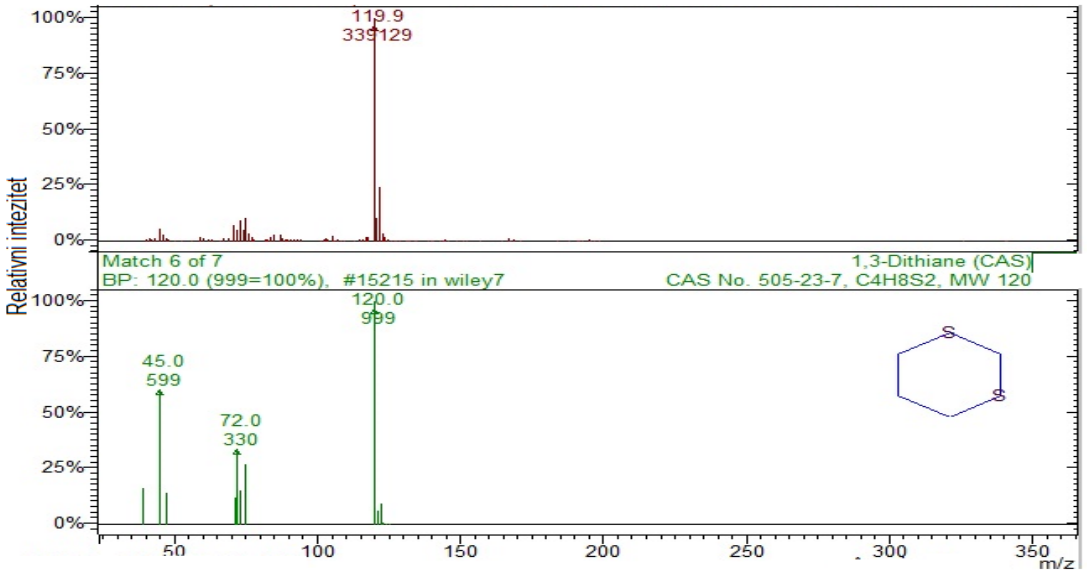
- Spoj alil metil disulfid može se pronaći samo u *A. sativum* i *A. commutatum:*



Slika 3.12. Maseni spektar alil metil disulfida (8,6%-*A. sativum;* 2,3%-*A. commutatum)*

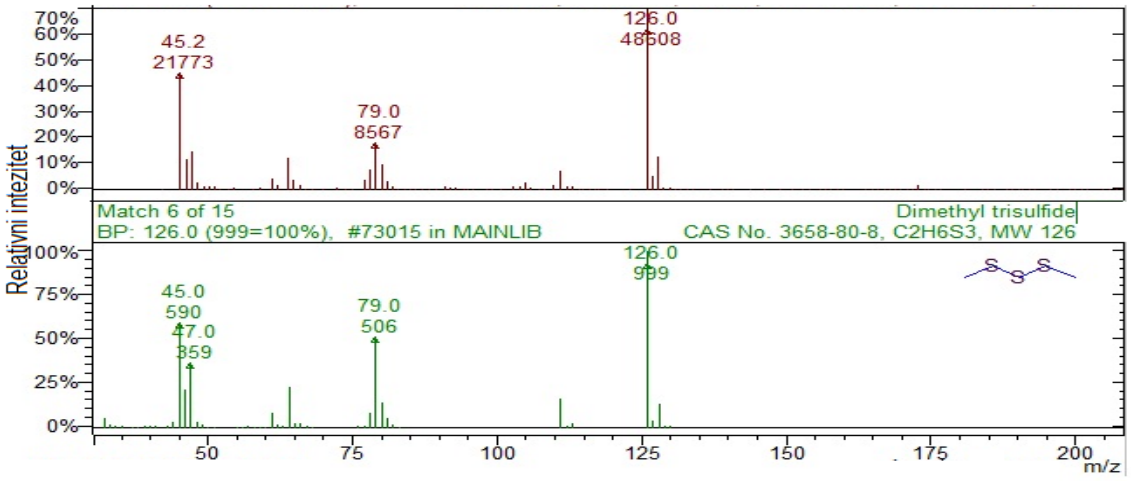
Pik na m/z=120 predstavlja molekulski pik koji je ujedno i osnovni pik. Pri m/z=73 može se vidjeti cijepanje S-S veze, $[SCH_2CHCH_2]^+$. Cijepanje S-C veze se može vidjeti u piku pri m/z=14, $[CH_2CHCH_2]^+$.

- Ostali spektri od 3.13. slike do 3.20. slike predstavljaju spojeve identificirane u svim vrstama analiziranih *Allium* vrsta, osim *A. sativum* (samo je 1,3-ditian svima zajednički).



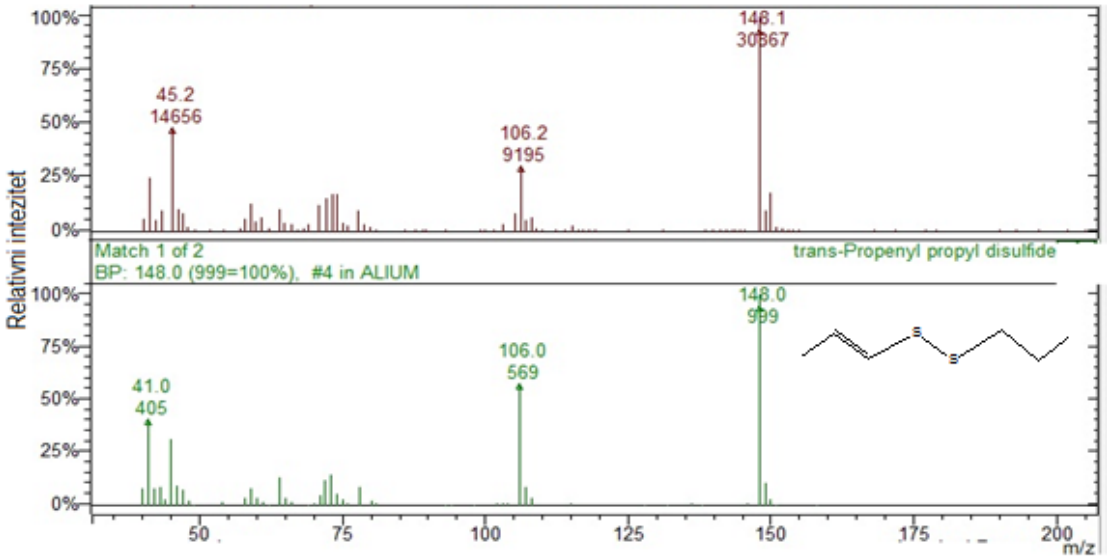
Slika 3.13. Spektar masa 1,3-ditiana

Iz spektra se vidi molekulski pik, m/z=120, koji predstavlja relativnu molekulsku masu spoja. Molekulski pik je ujedno i osnovni pik. Signal na m/z=45 predstavlja cijepanje S-C veze i C-S veze u prstenu, $[CH_2S]^+$.



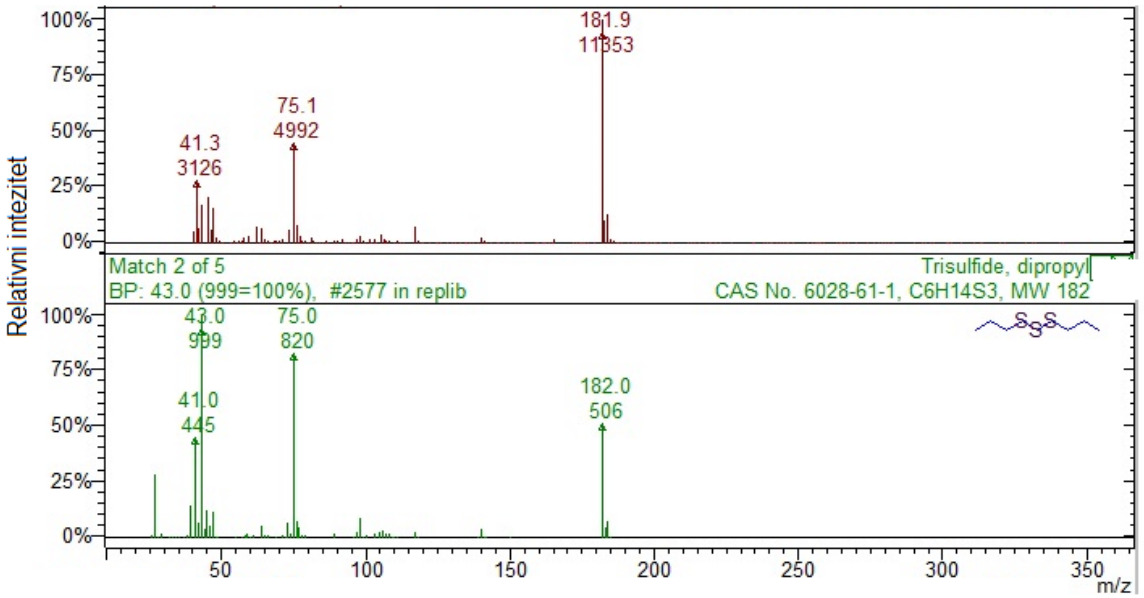
Slika 3.14. Spektar masa dimetil trisulfida

Molekulski pik nalazi se pri m/z=126 i predstavlja relativnu molekulsku masu identificiranog spoja, a ujedno je i osnovni pik. Pri m/z=79 se vidi cijepanje S-S veze, za $[CH_3SS]^+$.



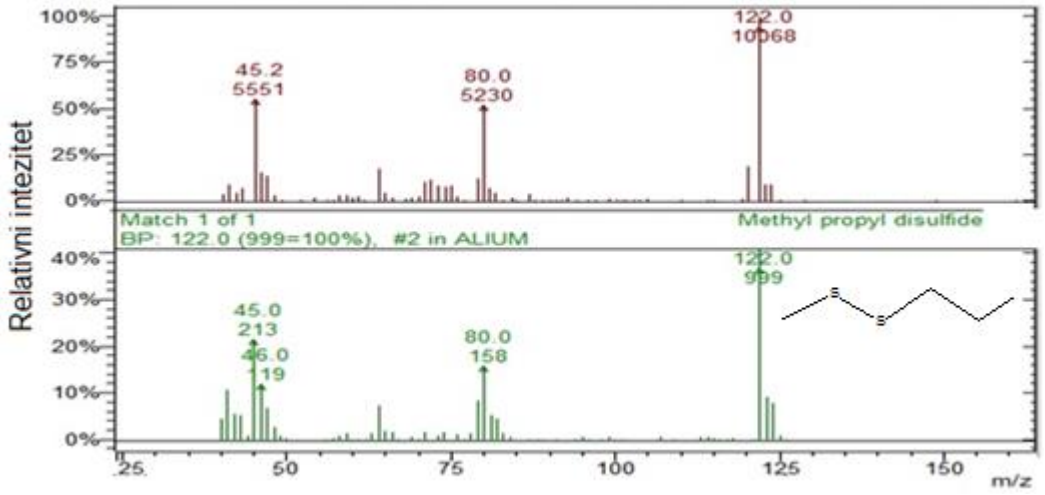
Slika 3.15. Maseni spektar *trans*-propenil-propil disulfida

Na spektru se može uočiti molekulski pik i osnovni pik na m/z=148. Pik pri m/z=41 opisuje cijepanje =C-S veze u lancu, $[CH_3CHCH]^+$.



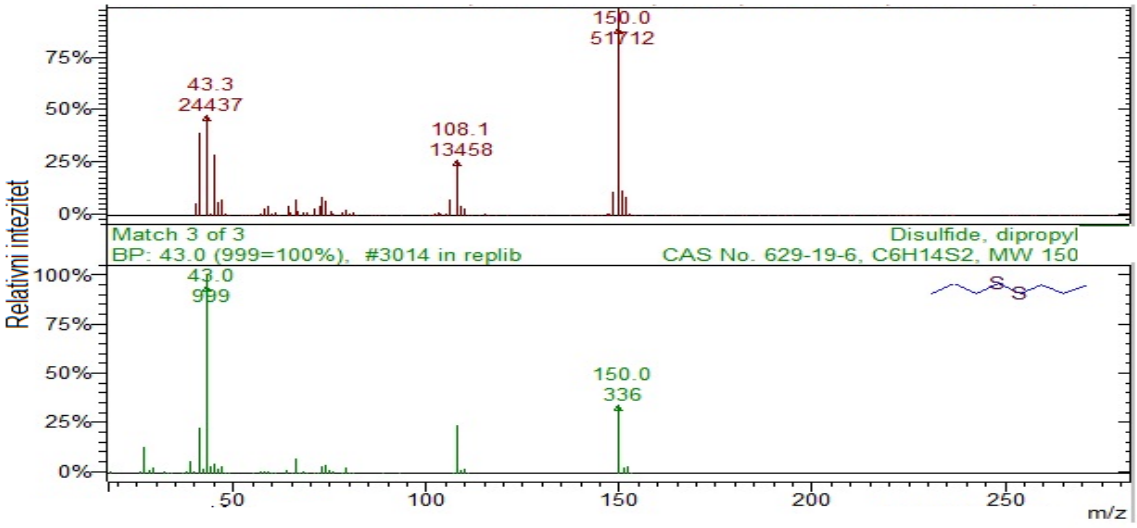
Slika 3.16. Maseni spektar dipropil trisulfida

Osnovni pik na masenom spektru nalazi se pri vrijednosti m/z=182, što je i molekulski pik, dok je na masenom spektru iz literature osnovni pik pri m/z=43, $[CH_3CH_2CH_2]^+$. Pik pri m/z=75 odnosi se na cijepanje S-S veze u lancu, $[CH_3CH_2CH_2S]^+$.



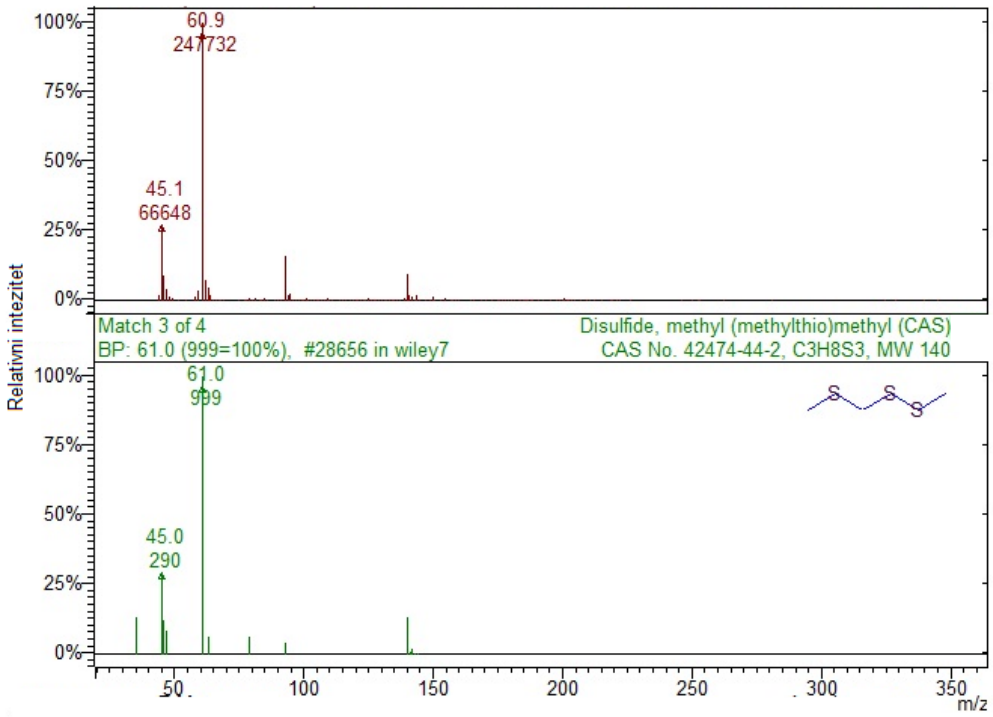
Slika 3.17. Maseni spektar metilpropil disulfida

Pri m/z=122 vidi se molekulski pik koji predstavlja i osnovni pik. Gubitak RSS' dovodi do nastanka alkil kationa koji daje $[CH_3SSH]^+$ koji odgovara m/z=80.



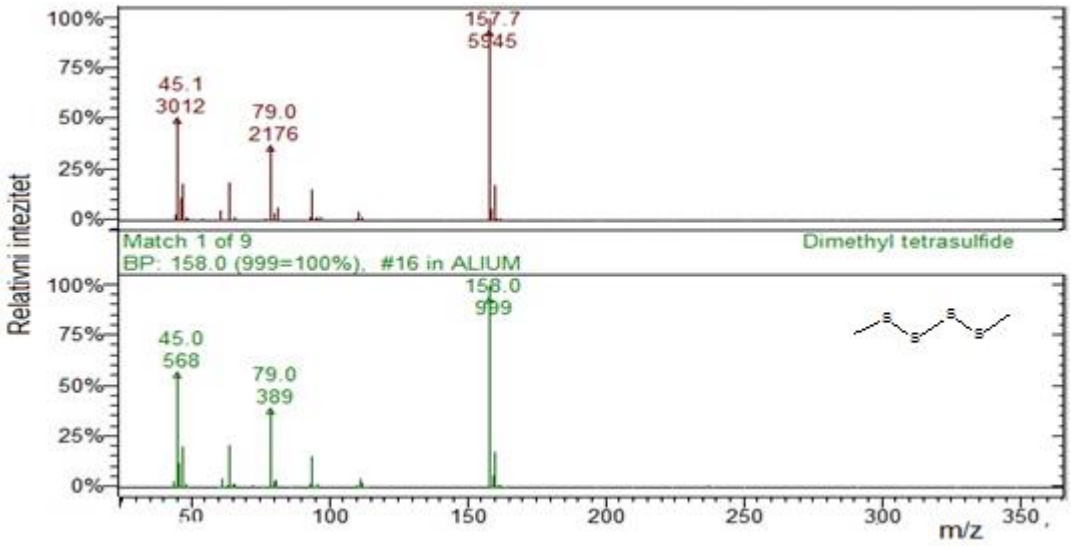
Slika 3.18. Spektar masa dipropil disulfida

M/z=150 pik predstavlja molekulski pik i osnovni pik. Cijepanje S-C veze predstavlja pik pri m/z=43, $[CH_3CH_2CH_2]^+$ te fragment $[CH_3CH_2CH_2SS]^+$ za pik pri m/z=107.



Slika 3.19. Spektar masa metil(metilsulfanil)metil disulfid

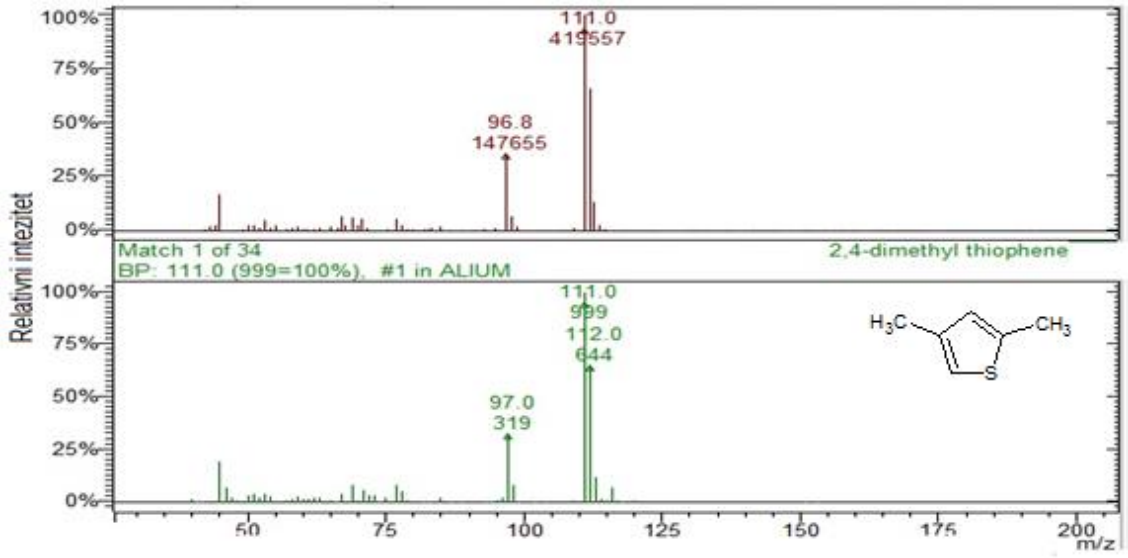
Molekulski pik se nalazi pri m/z=140. Osnovni pik opisuje cijepanje C-S veze i nastajanje fragmenta $[CH_3SCH_2]^+$, pri m/z=61.



Slika 3.20. Maseni spektar dimetil tetrasulfid

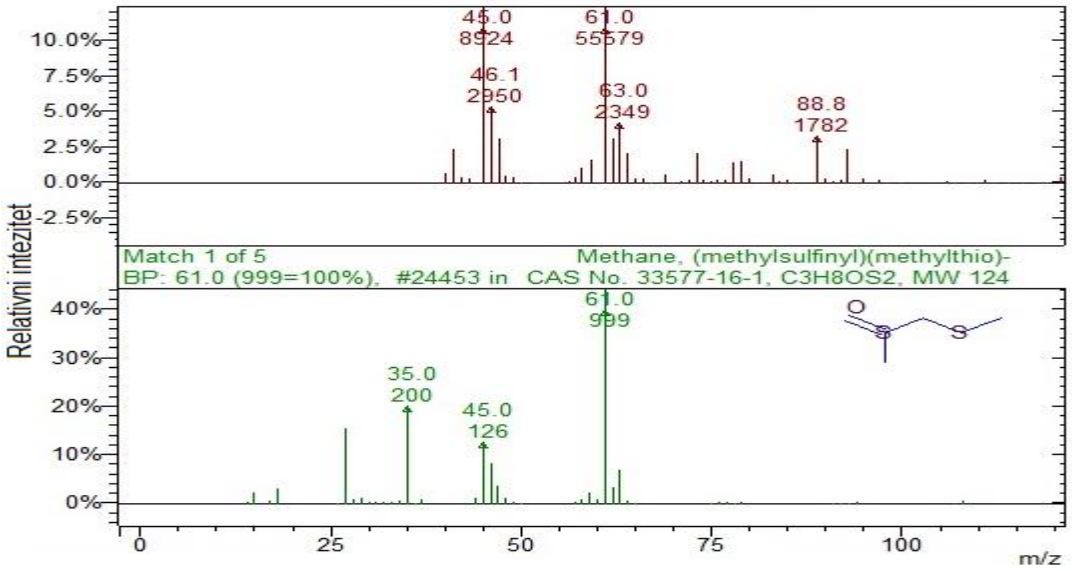
Molekulski ion nalazi se pri m/z=158, koji ujedno pokazuje i osnovni pik. Pri m/z=79 uočava se cijepanje S-S veze, $[CH_3SS]^+$.

- Sljedeći spojevi nalaze se samo u vrstama *A. porrum* i *A. sphaerocephalon.*



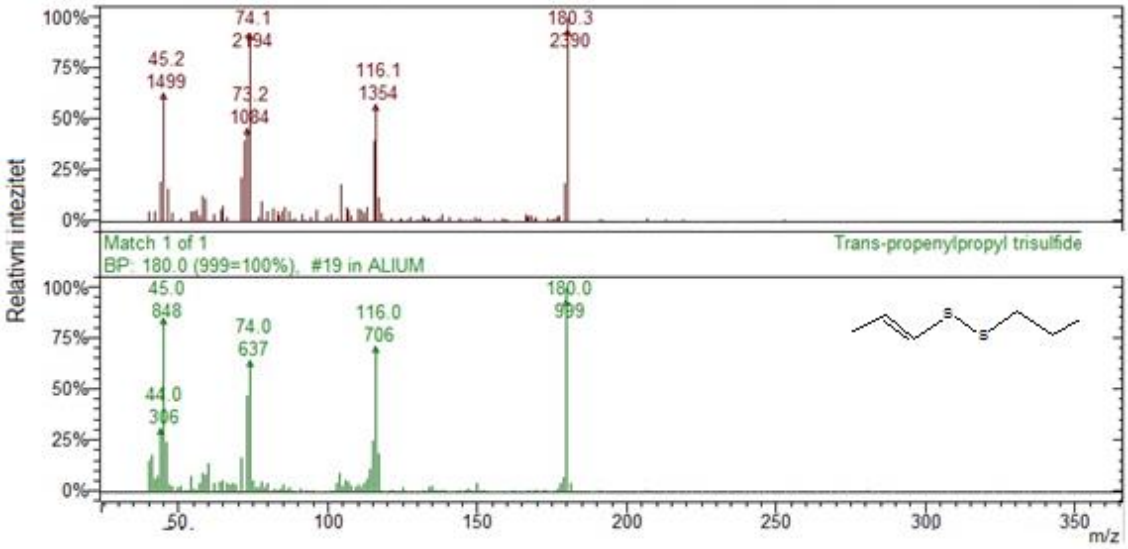
Slika 3.21. Spektar masa 2,4-dimetil tiofena

Molekulski pik nalazi se pri m/z=112. Cijepanje veze C-CH_3 opisuje pik pri m/z=97.



Slika 3.22. Spektar masa (metilsulfinil)(metilsulfanil)metana

Na spektru se ne uočava molekulski pik koji bi trebao biti pri m/z=124. Vidljiv je osnovni pik pri m/z=61 koji objašnjava cijepanje =S-C veze i nastajanje fragmenta $[CH_3SCH_2]^+$.



Slika 3.23. Maseni spektar *trans*-propenil propil trisulfida

Molekulski i osnovni pik nalaze se pri vrijednosti m/z=180. Pik na 116 odgovara gubitku S_2 što je karakteristično za cikličke, nezasićene i aromatske disulfide. Signal pri m/z=74 odgovarao bi nastanku fragmenta $[C_3H_5SH]^+$.

Od svih identificiranih spojeva može se zaključiti da je kod *A. sativum* najzastupljeniji dialil disulfid (39,7%), dok je u *A. commutatum* metil(metilsulfanil)metil disulfid najzastupljeniji (9,8%). Zanimljivo je da su destilacijom i ekstrakcijom lukovica A. sativum dobiveni isti hlapljivi sumporovi spojevi, iako su masenim udjelom bili zastupljeniji u destilatu. Poznato je da termičkom razgradnjom cistein sulfoksida nastaju sulfidi pa je to vjerojatno uzrok višeg postotka dialil disulfida u destilatu, u odnosu na ekstrakt (22,9%). Za *A. porrum* se može reći da prevladava dipropil trisulfid (6,1%), dok je to kod *A. asphaerocephalon* dipropil disulfid (4,9%). Jedini identificirani spoj koji je zajednički u svim analiziranim *Allium* vrstama je 1,3-ditian, koji je svoj najveći udio našao u cvijetu *Allium commutatum* vrste (6,5%). Razlika između *Allium commutatum* i *A. porrum* te *A. sphaerocephalon* je ta što *A. commutatum* ne sadrži komponente (metilsulfinil)(metilsulfanil)metan, 2,4-dimetiltiofen i *trans*-propenil propil trisulfid koje druge dvije vrste sadrže. Komponentu metil-1-(metilsulfanil)propil disulfid se može naći samo u *A. commutatum*-u (0,1%).

4. ZAKLJUČAK

- *Allium* vrste važne su zbog prisutnih hlapljivih sumporovih spojeva. Provedenom analizom destilata se može primjetiti razlika u kemijskom sastavu analiziranih *Allium* vrsta.
- U diplomskom radu izvršena je izolacija spomenutih hlapljivih spojeva iz nekoliko vrsta roda *Allium*, točnije komercijalno pribavljenog češnjaka (*A. sativum*), uzgojenog poriluka (*A. porrum*) te samoniklog glavatog luka (*A. sphaerocephalon*) i obalnog luka (*A. commutatum*). S obzirom na način obrade biljnog materijala, produkti se razlikuju. Eterična ulja su dobivena hidrodestilacijom biljnog materijala u modificiranoj aparaturi po Clevengeru. Kako je već spomenuto, termičkom obradom pri 100 °C kod hidrodestilacije, dobije se eterično ulje bogato polisulfidima. Iste spojeve se pokušalo izolirati i ekstrakcijom diklormetanom nakon 24h autolize. Svi hlapljivi izolati su podvrgnuti GC-MS analizi.
- Najveću razliku u sastavu čini komercijalni češnjak, *Allium sativum* koji sadrži dialil disulfid (39,7%), zaslužan za poznate biološke aktivnosti češnjaka. Drugi spoj u ovoj vrsti s najvećim udjelom je alil metil disulfid (8,6%). Navedeni spojevi pripadaju aliinima i metiinima, grupi spojeva *S*-alk(en)il-cistein sulfoksida, odnosno *S*-alkil-L-cistein sulfoksidu te *S*-metil-L-cistein sulfoksidu. U uzorku *A. sativuma* također su identificirani spojevi ditiini (2-vinil-[4*H*]-1,3-ditiin i 3-vinil-[4H]-1,3-ditiin), koji nastaju daljnim samokondenzacijskim reakcijama alicina.
- Kod *A. commutatuma* u lukovici najveći udio čini metil(metilsulfanil)metil disulfid sa svega 9,8%, dok je sljedeći dimetil trisulfid (7,1%). Spojevi pripadaju metiinu (*S*-metil-L-cistein sulfoksidu). U cvijetu samoniklog luka identificiran je dipropil trisulfid s najvećim udjelom (7,3%) te *trans*-propenil propil disulfid (7,0%), dok nešto manje ima 1,3-ditiana (6,5%). U stabljici *A. commutatuma* nisu identificirani sumporovi spojevi. Hlapljivi sumporovi spojevi u lukovici nastaju hidrolizom *S*-metil-L-cistein sulfoksid (metiin), dok oni u cvijetu nastaju cijepanjem propiina i izoaliina (*S*-propil-L-cistein sulfoksid i *S*-propenil-L-cistein sulfoksid).
- Analizom *A. porruma* uočeni su dipropil trisulfid (6,1%) i dimetil trisulfid (5,0%) u lukovici te dimetil trisulfid (4,6%) u stabljici. Navedeni spojevi čine najveći udio sastava lukovice i stabljike poriluka. Dipropil trisulfid je razgradni produkt propiina (*S*-propil-L-cistein sulfoksida), dok dimetil trisulfid potječe od metiina (*S*-metil-L-cistein sulfoksida).

- U vrsti *A. sphaerocephalon* su u lukovici identificirani dipropil disulfid (4,9%)-propiin i *trans*-propenil propil disulfid (4,0%)-izoaliin, koji također čine najveći udio sadržaja glavastog luka. U stabljici navedene vrste nisu identificirani nikakvi sumporovi spojevi.
- Iz navedenog se može zaključiti kako se dialil disulfid samo u *A. sativumu* nalazi u najvećem postotku te u nijednoj drugoj analiziranoj vrsti nije identificiran. Upravo se zbog toga češnjak razlikuje od drugih *Allium* vrsta.
- Isto tako se može zaključiti kako su *A. commutatum* i *A. porrum* po kemijskom sastavu najsličniji baš zbog zajedničkih spojeva koji čine najveći udio sastava (dimetil trisulfid, dipropil trisulfid i 1,3-ditian).
- Hlapljivi ekstrakt *A. sativuma* sadrži iste spojeve kao i eterično ulje s nešto manjim masenim udjelima, primjerice maseni udio najzastupljenijeg dialil disulfida iznosi 22,9%. S druge strane, analizom hlapljivih izolata *A. commutatuma* utvrđeno je kako nema prisutnih sumporovih spojeva, odnosno ekstrakcija uz otapalo nije pogodna metoda za izolaciju sumporovih spojeva u ovoj vrsti.

5. LITERATURA

1. D. Stojanov, *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama porodice Brassicaceae i Phytolaccaceae i sinteza fenil-izotiocijanata*, diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2015.
2. M. Iranshahi, *A review of volatile sulfur-containing compounds from terrestrial plants: biosynthesis, distribution and analytical methods.* Journal of Essential Oil Research, 2012, 24, 394-434.
3. I. Jerković, *Kemija aroma*, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2011.
4. P. Rose, M. Whiteman, P. K. Moore, Y. Z. Zhu, *Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus Allium: the chemistry of potential therapeutic agents*, 2005, 352-365.
5. https://www.agroklub.com/ratarstvo/sumpor-u-ishrani-bilja-i-ljudi/7593/ (pristupljeno 18.5.2017.)
6. http://ishranabilja.com.hr/literatura/tloznanstvo/Elementi.pdf (pristupljeno 18.5.2017.)
7. A. Radonić, I. Jerković, *Praktikum iz organske kemije*, interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, 2009.
8. http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=ekstrakcija (pristupljeno 2.6.2017.)
9. L. Kukoč Modun, Nj. Radić, *Uvod u analitičku kemiju,* Školska knjiga, Zagreb, 2016
10. I. Jerković, *Organska kemija I*, Skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
11. J. Mastelić, *Organska kemija,* Skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2012.
12. https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry (pristupljeno 2.6.2017.)
13. https://hr.wikipedia.org/wiki/Luk_(rod) (pristupljeno 2.6.2017.)
14. K. Galle Toplak, *Domaće ljekovito bilje*, Mozaik knjiga, Zagreb
15. Reader's Digest, *Prirodni lijekovi, Vodič kroz ljekovito bilje i njegovu primjenu*, Mozaik knjiga, Zagreb, 2006.
16. Reader's Digest, *Sve o ljekovitim i začinskim biljkama*, Mozaik knjiga, Zagreb, 2013.

17. B. Pevalek-Kozlina, M. Prolić, *Differentiation and morphogenetic potential of Allium commutatum Guss. callus tissue,* 2001, 169.

18. http://www.finegardening.com/drumstick-allium-allium-sphaerocephalon (pristupljeno 5.6.2017.)

19. T. Nikolić ed. (2015): Flora Croatica Database (http://hirc.botanic.hr/fcd). Faculty of Science, University of Zagreb (pristupljeno 5.6.2017.)

20. http://dryades.units.it/asinara/index.php?procedure=taxon_page&id=6919&num=6109 (pristupljeno 5.6.2017.)

21. A. Đulović, *Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze,* diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, 2014.